



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101080236 B

(45) 授权公告日 2012. 04. 25

(21) 申请号 200580043591. X

(22) 申请日 2005. 11. 02

(30) 优先权数据

2004/8945 2004. 11. 04 ZA

(85) PCT申请进入国家阶段日

2007. 06. 18

(86) PCT申请的申请数据

PCT/IB2005/003268 2005. 11. 02

(87) PCT申请的公布数据

W02006/048734 EN 2006. 05. 11

(73) 专利权人 南非医学研究院

地址 南非帕劳

专利权人 开普敦大学

(72) 发明人 M·G·马茨比萨 W·E·坎贝尔

P·I·福尔伯 P·J·史密斯

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

代理人 余颖

(51) Int. Cl.

A61K 36/28 (2006. 01)

A61P 33/06 (2006. 01)

(56) 对比文件

dorothy c. ramathal et al. medicinal
plants used by rwandese traditional healers
in refugee camps in tanzania. pharmaceutical
biology 39 2. 2001, 39(2), 132-7.

f chinemana et al. indigenous
plant remedies in zimbabwe. journal of
ethnopharmacology 14. 1985, (14), 159-172.

审查员 张婷

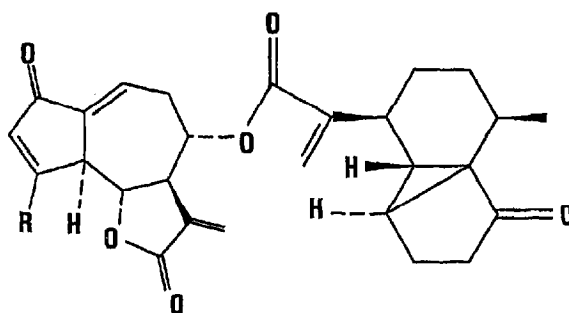
权利要求书 7 页 说明书 12 页 附图 4 页

(54) 发明名称

人和动物寄生虫感染的药物制备方法

(57) 摘要

本发明提供了通过治疗或预防处理人体或动
物体的寄生虫感染、尤其是疟疾感染如恶性疟原
虫感染的物质或组合物的制造方法。该方法包括
用有机溶剂提取以获得含有所述物质或组合物的
液体提取物, 并从所述液体提取物中除去溶剂以
便留下含有所述物质或组合物的干燥的提取物,
从 *Dicoma anomala* 种类植物的根中提取所述物
质或组合物。本发明还涉及所述物质或组合物
在制造用于处理这样的感染的药物或制品中的应
用; 涉及所述物质或组合物在所述感染的这样的
处理中的应用; 涉及所述化合物在所述感染的这
样的处理中的应用; 并涉及用这样的化合物处理
所述感染的方法。



1. 一种通过治疗或预防来处理人体或动物体被疟疾感染的物质或组合物的制造方法，该方法包括以下步骤：

使用极性指数小于 3.90 的有机溶剂从含有植物 *Dicoma anomala* 的根的植物根原料提取所述物质或组合物，得到含有所述物质或组合物的液体提取物；和

从所述液体提取物中除去溶剂，留下含有所述物质或组合物的干燥提取物。

2. 如权利要求 1 所述的方法，所述的疟疾感染是恶性疟原虫感染。

3. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述提取是在不超过 40℃ 的温度下进行的冷提取。

4. 如权利要求 1 或 2 所述的方法，其特征在于，所述植物根原料是粒度不超过 10 μm 的精粉碎形式的固体植物材料。

5. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述溶剂是二氯甲烷 (CH₂Cl₂)。

6. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述初步提取在 15-30℃ 的温度下用非极性溶剂进行，所述干燥在不超过 40℃ 的温度下进行，且两次提取都进行至完全。

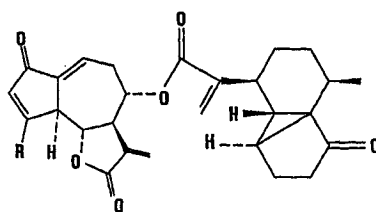
7. 如上述权利要求中任一项所述的方法，其特征在于，所述方法包括用有机酰胺的聚合物除去含有所述物质或组合物的干燥提取物中的鞣质。

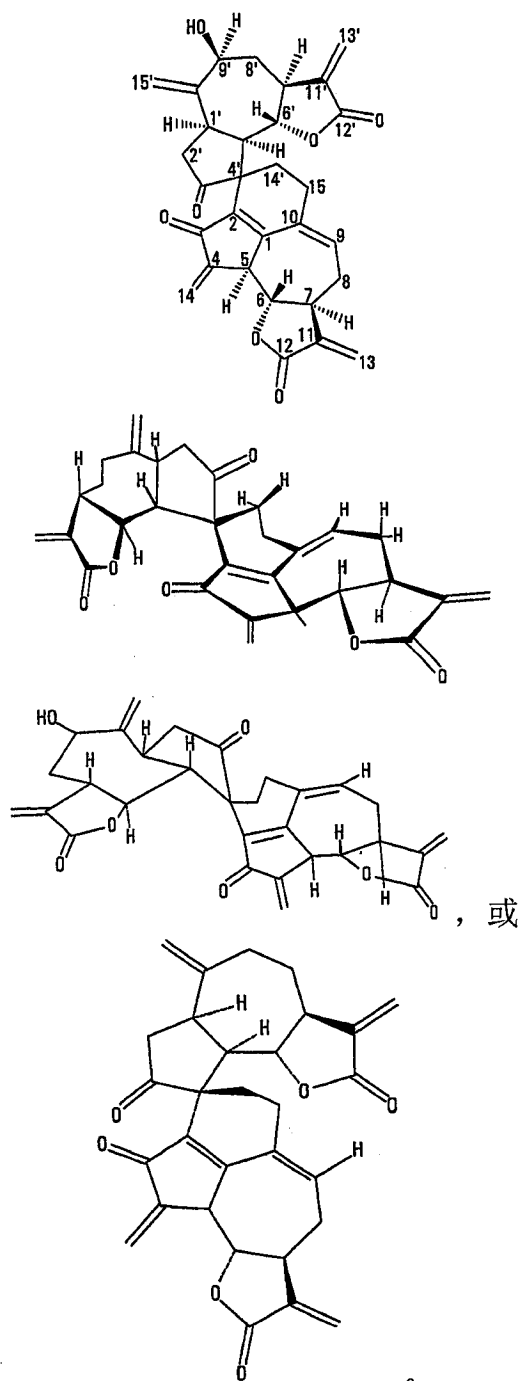
8. 一种物质或组合物在制造用于治疗性或预防性处理人体或动物体被疟疾感染的药物或制品中的应用，其特征在于，所述物质或组合物含有植物 *D. anomala* 的有机溶剂根提取物，所述有机溶剂的极性指数小于 3.90。

9. 如权利要求 8 所述的应用，所述的疟疾感染是恶性疟原虫感染如恶性疟原虫感染

10. 如权利要求 8 所述的应用，其特征在于，所述物质或组合物包含至少一种分子量为 230-539 个原子质量单位的不对称倍半萜二聚体。

11. 如权利要求 8-9 中任一项所述的应用，其特征在于，所述物质或组合物含有至少一种具有以下所示结构式的不对称倍半萜二聚体：





12. 如权利要求 11 所述的应用, 其特征在于, 所述物质或组合物含有至少一种所述不对称倍半萜二聚体的衍生物, 所述衍生物选自:

所述二聚体中一个或多个形成 γ -内酯一部分的 α -亚甲基和环外亚甲基被还原成甲基的衍生物;

一个或多个任意 γ -内酯被水解打开以形成羟基-羧酸的衍生物;

所述二聚体中的一个或多个羧基被还原成亚甲基的衍生物;

所述二聚体中的一个或多个伯醇基团被氧化成醛基的衍生物; 和

所述二聚体中的一个或多个仲醇基团被转化成酮基和乙酸基团的衍生物。

13. 一种物质或组合物, 所述物质或组合物被用于通过给予人体或动物体有效量的所述物质或组合物来治疗或预防人体或动物体被疟疾感染, 所述物质或组合物的特征在

于,它是植物 *D. anomala* 的有机溶剂根提取物的组成部分,所述有机溶剂的极性指数小于 3.90。

14. 如权利要求 13 所述的物质或组合物,所述的疟疾感染是恶性疟原虫感染如恶性疟原虫感染

15. 如权利要求 13 所述的物质或组合物,其特征在于,所述物质或组合物含有至少一种分子量为 230-539 个原子质量单位的不对称倍半萜二聚体。

16. 如权利要求 13 至 15 中任一项所述的物质或组合物,其特征在于,所述物质或组合物含有至少一种具有选自下组的经验式的不对称倍半萜二聚体: $C_{30}H_{36}O_7$ (分子量为 508.239-508.240 个原子质量单位) 和 $C_{30}H_{34}O_7$ (分子量为 506.238-506.239 个原子质量单位)。

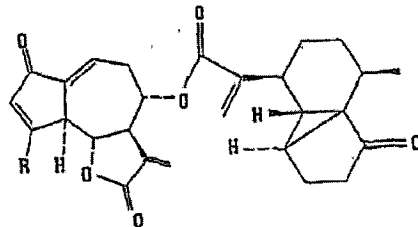
17. 如权利要求 13-16 中任一项所述的物质或组合物,其特征在于,在所述物质或组合物中,所述不对称倍半萜二聚体的浓度至少为 0.2 质量%。

18. 如权利要求 17 所述的物质或组合物,其特征在于,在所述物质或组合物中,所述浓度至少为 99 质量%。

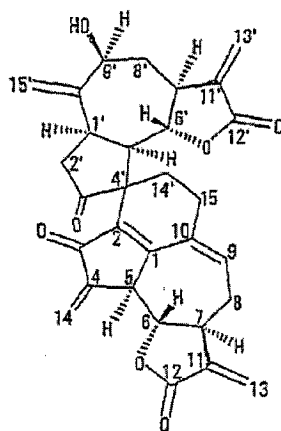
19. 如权利要求 13-18 中任一项所述的物质或组合物,其特征在于,所述物质或组合物的形式选自胶囊、片剂、糖浆剂、可注射制品、草药酊剂或栓剂。

20. 如权利要求 13-19 中任一项所述的物质或组合物,其特征在于,所述物质或组合物为单位剂型。

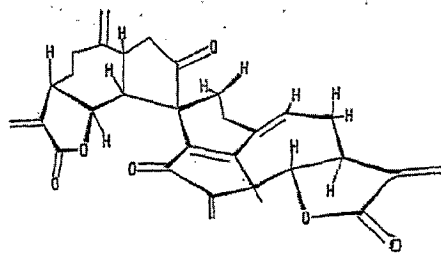
21. 如权利要求 13-20 中任一项所述的物质或组合物,其特征在于,它含有至少一种具有以下结构式的不对称倍半萜二聚体:



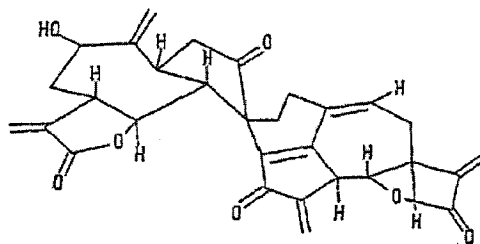
22. 如权利要求 13-21 中任一项所述的物质或组合物,其特征在于,它含有至少一种具有以下结构式的不对称倍半萜二聚体:



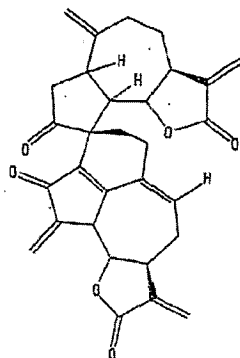
23. 如权利要求 13-22 中任一项所述的物质或组合物,其特征在于,它含有至少一种具有以下结构式的不对称倍半萜二聚体:



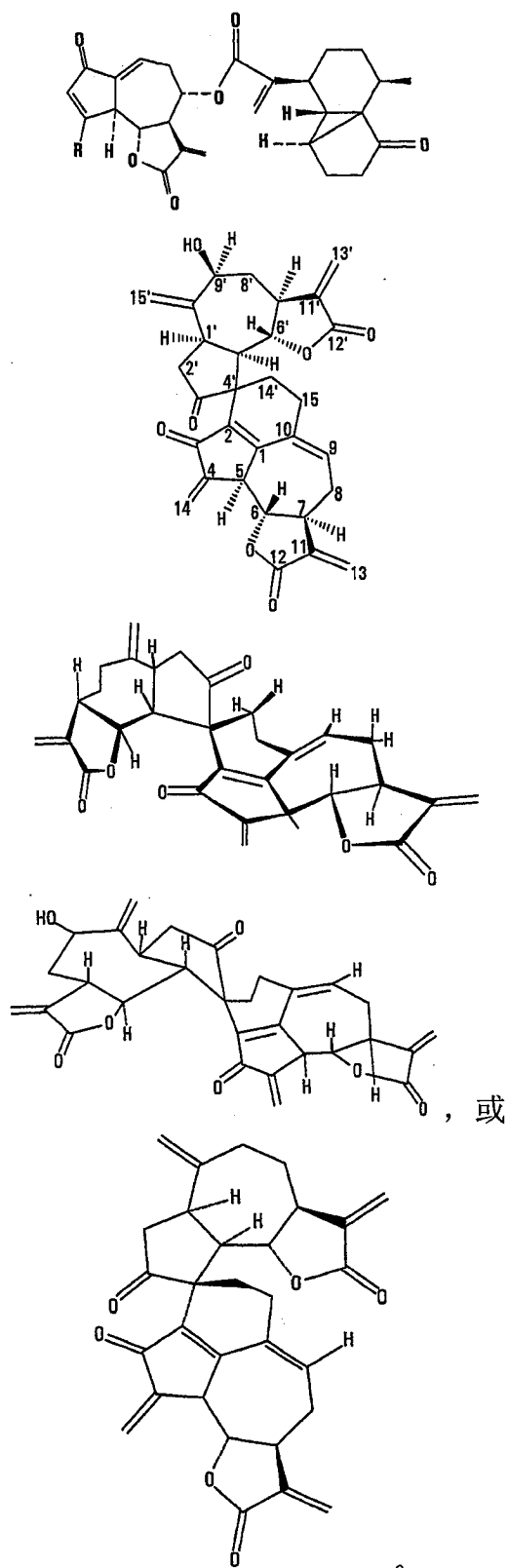
24. 如权利要求 13-23 中任一项所述的物质或组合物,其特征在于,它含有至少一种具有以下结构式的不对称倍半萜二聚体:



25. 如权利要求 13-24 中任一项所述的物质或组合物,其特征在于,它含有至少一种具有以下结构式的不对称倍半萜二聚体:



26. 一种不对称倍半萜二聚体,其特征在于,它具有以下所示的结构式:

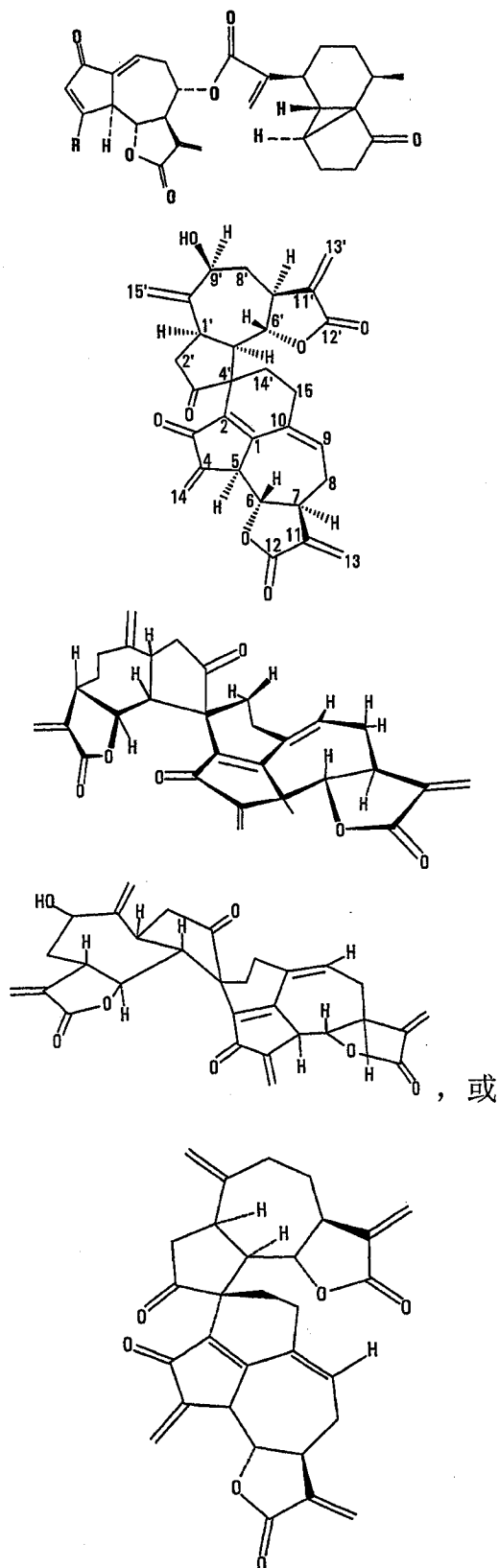


27. 一种不对称倍半萜二聚体,其特征在于,所述二聚体可从 *D. anomola* 种类植物的有机溶剂根提取物中获得,所述有机溶剂的极性指数小于 3.90。

28. 如权利要求 27 所述的不对称倍半萜二聚体,其特征在于,所述二聚体的分子量为 230-539 个原子质量单位。

29. 一种权利要求 27 或 28 所述不对称倍半萜二聚体的衍生物,其特征在于,所述二聚

体具有以下所示的结构式，



所述衍生物选自：

所述二聚体中一个或多个形成 γ -内酯一部分的形成 α -亚甲基和环外亚甲基被还原成甲基的衍生物；

所示二聚体中的任意 γ -内酯被水解打开以形成羟基-羧酸的衍生物；

所述二聚体中的一个或多个羧基被还原成亚甲基的衍生物；
所述二聚体中的一个或多个伯醇基团被氧化成醛基的衍生物；和
所述二聚体中的一个或多个仲醇基团被转化成酮基和乙酸基团的衍生物。

人和动物寄生虫感染的药物制备方法

[0001] 本发明涉及人和动物寄生虫感染的治疗。更具体地,本发明涉及用于这种治疗性或预防性处理的一种物质或组合物和一种或多种化合物、涉及这种治疗的方法、并涉及制造这种治疗寄生虫感染的物质或组合物以及化合物的方法,所述物质或组合物及化合物、治疗方法以及它们的制造方法都可用于但不限于由疟原虫 (Plasmodium)、尤其是恶性疟原虫 (P. falciparum) 造成的疟原虫感染的预防或治疗。

[0002] 根据本发明,提供了一种通过治疗或预防处理人体或动物体的寄生虫感染、尤其是疟疾感染如恶性疟原虫 (Plasmodium falciparum) 感染的物质或组合物的制造方法,该方法包括以下步骤:

[0003] 从含有 *Dicoma anomala* 种类植物的植物根的原料提取所述物质或组合物,方法是使用有机溶剂提取所述植物根原料以获得含有所述物质或组合物的液体提取物;和

[0004] 从所述液体提取物中除去溶剂以便留下含有所述物质或组合物的干燥的提取物。

[0005] 尽管所述提取可以是冷(室温)提取,但它也可以是热(S Soxhlet)提取。因此,所述提取可以是在 35-140°C 的升高的温度(例如 35-50°C)下进行的热提取。然而通常,所述提取是在最高 40°C 的温度下进行的冷提取。

[0006] 所述植物根原料可以是细致分散形式的固体植物材料,其粒度不超过 100 μm ,优选不超过 10 μm 。因此,换句话说,所述植物根原料可以是粒度最大为 100 μm ,优选最大为 10 μm 的粉末形式。

[0007] 一种或多种有机液体可用作提取溶剂,它们可以依次单独使用或者作为混合物或掺合物。所述溶剂可以是极性指数为 0.00-5.00 的极性溶剂。因此,用作溶剂的各液体或液体掺合物的极性指数优选至少为 0.00,且最大为 5.00。具体地说,溶剂的极性指数可以为 1.0-4.8,并可含有至少一种选自下表 1 的溶剂,该表还列出了溶剂的极性指数:

[0008] 表 1

[0009] <u>溶剂</u>	<u>极性指数</u>
[0010] 苯	2.7
[0011] n-丁醇	3.9
[0012] 乙酸丁酯	4.0
[0013] 四氯化碳	1.6
[0014] 氯仿	4.1
[0015] 1,2 二氯乙烷	3.5
[0016] 二氯甲烷	3.1
[0017] 二恶烷	4.8
[0018] 乙酸乙酯	4.4
[0019] 二乙醚	2.8
[0020] 甲基-叔-丁醚	2.5
[0021] 甲乙酮	4.7
[0022] n-丙醇	4.0

[0023]	异丙醇	3.9
[0024]	二 - 异丙醇	2.2
[0025]	四氢呋喃	4.0
[0026]	甲苯	2.4
[0027]	三氯乙烯	1.0
[0028]	二甲苯	2.5

[0029] 发现特别优选的溶剂是二氯甲烷 (CH_2Cl_2)。

[0030] 该方法可包括用极性指数小于 3.90、优选极性指数为 3.10–3.50 的非极性有机溶剂对所述植物根原料进行初步提取,随后进行干燥以蒸发所述固体植物材料中残余的非极性溶剂,然后对所述已经除去非极性溶剂的干燥的植物根材料进行提取以获得含有所述物质或组合物的液体提取物。所述初步提取可以在 15–30°C 的温度下用非极性溶剂进行,所述干燥在不超过 40°C 的温度下进行,且两次提取都进行到完全。具体地说,该方法可包括用有机酰胺的聚合物除去含有所述物质或组合物的干燥提取物中的鞣质。

[0031] 因此,在本发明方法的一个优选实施方案中,在室温或环境温度 (15–30°C) 下用非极性溶剂如己烷对粉末状的植物根原料进行初步提取 (可将其基本提取完全),弃去己烷提取物并在不超过 40°C 的温度下干燥固体植物材料以便通过蒸发除去固体植物材料中残余的己烷。在所述方法的这个实施方案中,随后会对已经除去己烷的干燥的植物材料进行进一步的提取以获得该植物材料的药物活性组分,进一步的提取也优选经过选择的极性溶剂如二氯甲烷提取完全。进一步的提取之后,随后可在不超过 40°C 的温度下除去植物材料中的二氯甲烷以提供所述植物材料的二氯甲烷提取物并弃去剩下的干燥的固体植物残余物。然后可用 Polyamide S (即购自 Riedel de Haen 的有机酰胺的聚合物) 除去所述二氯甲烷提取物中的鞣质。

[0032] *D. anomala* 是一种小且生长缓慢的草本植物,具有小的蓝灰色硬叶。它具有在盛夏开放的山龙眼样头状花序。这种草本植物沿着朝北的岩石山坡地面匍匐生长。它喜欢阳光充足和排水良好的土壤,仅通过种子繁殖。从南非的 Eastern Cape 省,经南非的 KwaZulu-Natal 省、Free State 省、Gauteng 省、Mpumalanga 省和 Northern 省,直到津巴布韦和莱索托都有 *D. anomala* 分布。还在博茨瓦纳、纳米比亚以及北部的赞比亚和乌干达发现了这种植物。

[0033] 出于本发明的目的,本申请人采用收集自莱索托 Morifi 和 Mohale 隐谷地区、FreeState 省 Reitz 地区以及 Northern 省 Sikhukhuni 地区的 *D. anomala* 根。还研究了购自 KwaZulu-Natal 省 Durban 草药市场的根。所用 *D. anomala* 已保藏于位于南非 WesternCape 省的 Cape Town 大学的 Bolus 植物标本室,凭证标本号为 98142。

[0034] 我们发现,如上所述从 *D. anomala* 获得的二氯甲烷提取物在除去鞣质之后具有一些抗疟原虫活性,该活性大大超过其细胞毒性,这表明它含有某种适合对人体或动物体的疟疾进行治疗性或预防性处理的物质或组合物。

[0035] 因此发现, *D. anomala* 的二氯甲烷提取物对恶性疟原虫的氯喹敏感型 D10 菌株和氯喹抗性 FAC8 菌株都具有抗疟 (plasmocidal) 效果,其对 D10 和 FAC8 菌株的 IC_{50} 值分别 2000ng/ml 和 6000ng/ml。本申请人发现,就多数人癌细胞系而言,所述二氯甲烷提取物的抗疟原虫活性超过其细胞毒活性 10 倍 (即一个数量级)。就这点而言,对于多数癌细胞系,

发现该二氯甲烷提取物（以及下文所讨论的显示出抗疟原虫活性的倍半萜）的抗疟原虫选择指数约为 10。所述抗疟原虫选择指数（SI 抗疟原虫）可表示为：

[0036] $SI \text{ 抗疟原虫} = IC_{50} \text{ 抗疟原虫} / IC_{50} \text{ 细胞毒性}$

[0037] 将二氯甲烷提取物分成多个组份并测试这些组份的抗疟原虫活性后，发现抗疟原虫活性局限于那些含有一系列不对称倍半萜二聚体中某些成员的组份，所述成员两两间的分子量差异为 18 个原子质量单位（以损失若干个水（ H_2O ）为特征），最小分子量为 230，最大分子量为 539。

[0038] 具体地说，发现含有分子量分别为 506.23879 个原子质量单位和 508.23980 个原子质量单位的两种不对称倍半萜二聚体的 *D. anomala* 二氯甲烷提取物组份具有抗疟原虫活性，两者之间的这种质量差异基本为 2 个原子质量单位。通过 ^1H 谱、液相层析-质谱（LC-MS）和大气压化学电离高分辨质谱（APCI HRMS）测定，较重化合物与较轻化合物（即 508.23980 个原子质量单位的化合物与 506.23879 个原子质量单位的化合物）的摩尔比为 1 : 3。APCI HRMS 显示，这两种化合物中次要（较重的）化合物的最高分子量为 $M^+ + 1 = 509.2545$ 个原子质量单位，与经验分子式 $C_{30}H_{36}O_7$ 一致；而通过 APCI ARMS 测得主要（较轻的）化合物的最高分子量为 $M^+ + 1 = 507.2388$ 个原子质量单位，与经验分子式 $C_{30}H_{34}O_7$ 一致。

[0039] 发现具有分子式 $C_{30}H_{36}O_7$ 或 $C_{30}H_{34}O_7$ 的化合物对恶性疟原虫的氯喹敏感型（D10）菌株具有抗疟原虫活性，其 IC_{50} 值为 200ng/ml。该值基本上比粗制二氯甲烷提取物活性提高了 10 倍。

[0040] 也在体外测试了 *D. anomala* 的二氯甲烷提取物对革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌抗性，发现最小有效浓度（MEC）250 μ g/ml 时具有杀菌活性，这说明它对细菌感染具有杀菌活性并可用于抵抗细菌感染。

[0041] 当在实验动物中测试 *D. anomala* 的二氯甲烷提取物的毒性时，给予水平高达每千克体重 100 毫克提取物时未发现毒性，并且未发现实验动物的脾脏、肝脏或肾脏发生形态改变。以死亡、毛发直立（身体状况不良的信号）和体重下降（身体状况不良的信号）来测定毒性。就这些参数而言，发现实验动物与对照动物没有区别。

[0042] 使用 10 克 C-18 封端的（EC）70ml Isolute 柱（cartridge）通过固相提取（SPE）浓缩所述活性倍半萜化合物。小柱用甲醇调节三次，然后用水调节三次，之后以 4mg/ml（即 200mg/50ml）加入样品，接着进行渗滤得到组份 1，用 100% 水洗涤得到组份 2，并用 50ml MeCN 与水的混合物连续洗脱该柱以得到组份 3-12，MeCN 与水的比例如下表 2 所示：

[0043] 表 2

[0044]	洗脱液	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
[0045]	组份	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
[0046]	混合物中的	10%	20%	30%	40%	50%	60%	70%	80%	90%	100%
[0047]	% MeCN										

[0048] （以体积计）

[0049] 将 MeCN（含 0.05% 体积四氟乙酸（TFA））和水（含 0.05% 体积 TFA）的混合物作为流动相并采用 40 分钟 30-100% MeCN 梯度对活性倍半萜化合物进行分析型高压液相色谱（HPLC）分离和制备级纯化。分析时采用的流速为 1 毫升 / 分钟，制备级纯化时采用的

流速为 50 毫升 / 分钟。使用的柱是采用 ODS 2 型二氧化硅、C-18、粒度为 5 μ m (粒度) 的 Phenomenex Prodigy 柱 (4.6x150mm) ;用于数据收集的紫外 (UV) 范围为 200-600nm。纯的化合物在波长为 225nm 时有最大吸收 (λ max)。样品浓度为 10mg/1, 分析型分离的加样体积为 50 μ l, 制备型分离的加样体积为 500ml。

[0050] 为阐明活性倍半萜化合物的结构, 在 HPLC 进行的同时使用与高压液相色谱在线连接的 Thermo Quest LCQ (Finnegan) 高分辨质谱仪获得质谱。液相色谱 / 质谱仪装置同时配备有电喷雾电离 (ESI) 和大气压化学电离 (APCI) 探针和离子阱。

[0051] 用 Bruker-DR X-400 光谱仪 (^1H :400.13MHz, ^{13}C :100.62MHz) 和带有反相检测和 z- 梯度设备的 Bruker-DRX-500 光谱仪 (^1H :500.13MHz, ^{13}C :125.77MHz) 于 23°C 在 CDCl_3 中记录核磁共振 (NMR) 谱 (^1H 、 ^{13}C 、关联能谱法 (COSY)、无畸变极化转移增益法 (DEPT)-135)、异核多量子相干 (HMQC) 和异核多键相关 (HMBC)。化学位移 (δ) 与残余溶剂的信号有关。

[0052] 发现所述转化得到的 *D. anomala* 提取物的不对称倍半萜抗疟原虫活性二聚体化合物溶解性差且该化合物的生物利用度将取决于可能的给药途径 (口服、直肠和静脉内)。原则上可以将这种活性化合物制成胶囊、片剂、糖浆剂、可注射液及草药酊剂 (任选经稳定的) 中的一种或多种, 所述制剂或选择的制剂取决于该化合物的生物利用度和药代动力学。

[0053] 此外, 本发明还涉及一种物质或组合物在制造用于治疗性或预防性处理人体或动物体的寄生虫感染、尤其是疟疾感染如恶性疟原虫感染的药物或制品中的应用, 所述物质或组合物含有 *D. anomala* 种类植物的有机溶剂根提取物。

[0054] 此外, 本发明还涉及一种物质或组合物在制造用于治疗性或预防性处理人体或动物体的寄生虫感染、尤其是疟疾感染如恶性疟原虫感染的药物或制品中的应用, 所述物质或组合物包含至少一种分子量为 230-539 个原子质量单位的不对称倍半萜二聚体。

[0055] 所述物质或组合物可含有多种分子量在 230-539 个原子质量单位之间的不对称倍半萜二聚体。

[0056] 所述物质或组合物可含有至少一种具有如下所述图 2 和 6-9 中任一幅图所示结构式的不对称倍半萜二聚体; 或者它可含有至少一种具有图 2 和 6-9 中任一幅图所示结构式的不对称倍半萜二聚体的衍生物, 所述衍生物选自:

[0057] 一个或多个任意 α -亚甲基形成 γ -内酯的一部分且所述二聚体中的任何环外亚甲基被还原成甲基的衍生物;

[0058] 一个或多个任意 γ -内酯被水解打开以形成羟基-羧酸的衍生物;

[0059] 所述二聚体中的一个或多个任意羧基被还原成亚甲基的衍生物;

[0060] 所述二聚体中的一个或多个任意伯醇基团被氧化成醛基的衍生物; 和

[0061] 所述二聚体中的一个或多个任意仲醇基团被转化成酮基和乙酸基团的衍生物。

[0062] 本发明还涉及植物提取物 (并涉及其中所含的抗疟原虫活性倍半萜化合物), 它们被作为通过治疗或预防而处理动物体尤其是人体的细菌感染、尤其是疟原虫 (疟疾) 感染的物质或组合物。

[0063] 因此, 更具体地说, 本发明还涉及一种物质或组合物, 所述物质或组合物通过给予人体或动物体有效量的所述物质或组合物而在人体或动物体的寄生虫感染、尤其是疟疾感染如恶性疟原虫感染的治疗或预防方法中使用, 所述物质或组合物形成提取自 *D. anomala*

种类植物根的有机溶剂根提取物的一部分。

[0064] 所述物质或组合物可含有至少一种分子量为 230-539 个原子质量单位的不对称倍半萜二聚体。具体地说,所述物质或组合物可含有至少一种具有选自下组的经验式的不对称倍半萜二聚体: $C_{30}H_{36}O_7$ (分子量为 508. 239-508. 240 个原子质量单位) 和 $C_{30}H_{34}O_7$ (分子量为 506. 238-506. 239 个原子质量单位)。所述物质或组合物可含有多种分子量在 230-539 个原子质量单位之间的不对称倍半萜二聚体。

[0065] 本发明还涉及一种物质或组合物,所述物质或组合物通过给予人体或动物体有效量的所述物质或组合物而在治疗或预防人体或动物体的寄生虫感染、尤其是疟疾感染如恶性疟原虫感染的方法中使用,所述物质或组合物含有至少一种分子量为 230-539 个原子质量单位的不对称倍半萜二聚体。

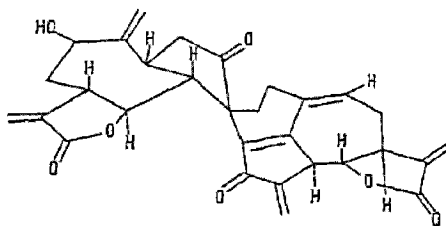
[0066] 所述物质或组合物可含有多种分子量在 230-539 个原子质量单位之间的不对称倍半萜二聚体。

[0067] 具体地说,如上所述,所述物质或组合物可含有至少一种具有选自下组的经验式的不对称倍半萜二聚体: $C_{30}H_{36}O_7$ (分子量为 508. 239-508. 240 个原子质量单位) 和 $C_{30}H_{34}O_7$ (分子量为 506. 238-506. 239 个原子质量单位)。

[0068] 所述不对称倍半萜二聚体可以至少 0. 08 质量%,例如至少 0. 2 质量%的浓度存在于上述物质或组合物中。优选地,所述不对称倍半萜二聚体的浓度至少为 50 质量%,更优选至少为 70 质量%,且最优选至少为 99 质量%。

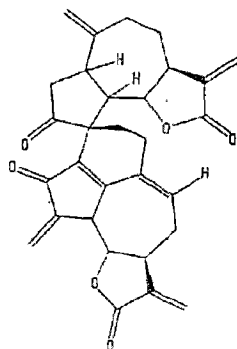
[0069] 具体地说,所述物质或组合物可采取胶囊、片剂、糖浆剂、可注射制品、草药酊剂或栓剂的形式。因此,所述物质或组合物可用于以单位剂型给予所述物质或组合物的治疗或预防方法。优选地,以二聚体的质量计,给予的物质或组合物可在人体或动物体内达到有效血清浓度。更具体地说,可以有效日剂量率给予所述物质或组合物,所述剂量率取决于对象的体重。

[0070]



[0071] 作为替代或者除此之外,所述物质或组合物可含有至少一种具有以下结构式的不对称倍半萜二聚体:

[0072]



[0073] 本发明涉及一种具有如图 2 和 6-9 中任一幅图所示结构式的不对称倍半萜二聚体。

[0074] 本发明还涉及一种可获自 *D. anomala* 种类植物的有机溶剂根提取物的衍生物, 该衍生物为不对称倍半萜二聚体的衍生物, 所述二聚体可获自 *D. anomala* 种类植物的有机溶剂根提取物。

[0075] 所述衍生物可以是所述分子量为 230-539 个原子质量单位的二聚体的衍生物。

[0076] 所述衍生物可选自:

[0077] 一个或多个任意 α -亚甲基形成 γ -内酯的一部分且所述二聚体中的任何环外亚甲基被还原成甲基的衍生物;

[0078] 所述二聚体中的任意 γ -内酯被水解打开以形成羟基-羧酸的衍生物;

[0079] 所述二聚体中的一个或多个任意羧基被还原成亚甲基的衍生物;

[0080] 所述二聚体中的一个或多个任意伯醇基团被氧化成醛基的衍生物; 和

[0081] 所述二聚体中的一个或多个任意仲醇基团被转化成酮基和乙酸基团的衍生物。

[0082] 所述衍生物可以是所述具有如图 2 和 6-9 中任一幅图所示结构式的二聚体的衍生物。

[0083] 本发明还涉及一种治疗或预防人体或动物体的寄生虫感染、尤其是疟疾感染如恶性疟原虫感染的方法, 所述方法包括给予人类或动物对象有效量的含有提取自 *D. anomala* 种类植物根的有机溶剂根提取物的物质或组合物。

[0084] 本发明还涉及一种治疗或预防人体或动物体的寄生虫感染、尤其是疟疾感染如恶性疟原虫感染的方法, 所述方法包括给予人类或动物对象有效量的含有至少一种分子量为 230-539 个原子质量单位的不对称倍半萜二聚体的物质或组合物。

[0085] 所述物质或组合物可含有多种分子量在 230-539 个原子质量单位之间的不对称倍半萜二聚体。

[0086] 所述物质或组合物可以单位剂型给予。具体地说, 以二聚体的质量计, 给予的物质或组合物可在人体或动物体内达到有效血清浓度。更具体地说, 可以有效日剂量率给予所述物质或组合物, 所述剂量率取决于对象的体重。

[0087] 下面将参考以下示意图讨论形成本发明活性成分的不对称倍半萜二聚体的结构, 其中:

[0088] 图 1 显示了毫吸收单位 (mAU) 与用纳米 (nm) 表示的波长 (nm) 的图;

[0089] 图 2 显示了本发明二聚体的示意性通用结构;

[0090] 图 3 和 4 分别显示了图 2 的二聚体可拆分成的单体的示意性结构;

[0091] 图 5 显示了形成图 2-4 中二聚体和单体的取代基的 α -亚甲基- γ -内酯的示意性结构; 和

[0092] 图 6-9 分别显示了本发明的某些不对称倍半萜二聚体的结构式。

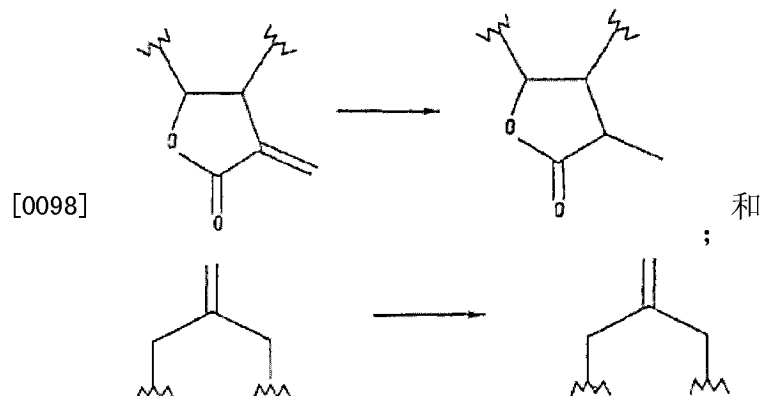
[0093] 图 1 显示了本发明的两种活性不对称倍半萜二聚体, 即按照其在 *D. anomala* 提取物中以及 *D. anomala* 本身中的比例以 0.2% 的总浓度存在于二氯甲烷溶液中的不对称倍半萜二聚体的 UV 光谱, 上述二聚体的分子量分别最佳表示为 506.23879 个原子质量单位和 508.23980 个原子质量单位。

[0094] 图 2 显示了申请人目前能够用来表示上述两种二聚体的最具代表性的结构式。

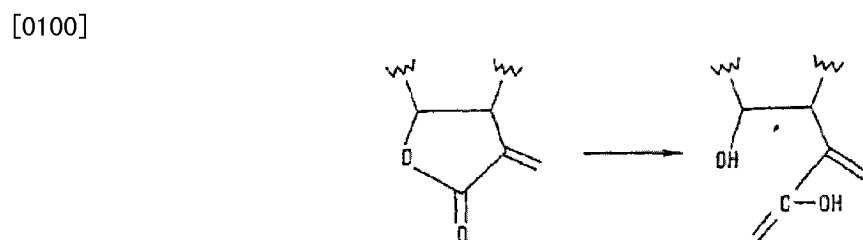
[0095] 图 3 和 4 分别显示了图 2 的二聚体可拆分成的代表性单体,需要注意的是,所述二聚体和单体各自含有图 5 的 α -亚甲基- γ -内酯。

[0096] 图 6-9 分别显示了四种其它不对称倍半萜二聚体的结构式,这四种二聚体不同于图 2 所显示的两种二聚体,但也形成本发明的活性成分。

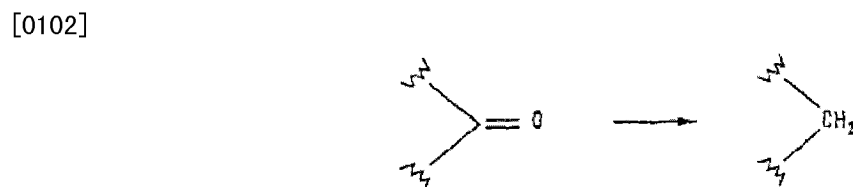
[0097] 不局限于理论,申请人认为,从获自 *D. anomala* 的不对称倍半萜二聚体可获得许多半合成衍生物。因此, γ -内酯的 α -亚甲基以及二聚体中的任何其它环外亚甲基可被还原成甲基,如下所述:



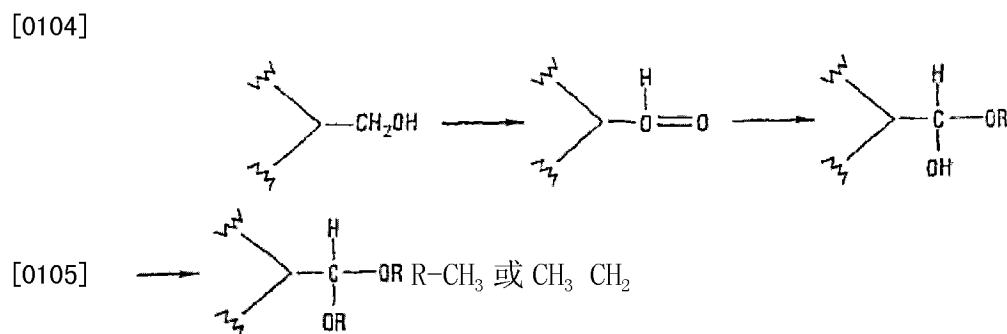
[0099] 所述 γ -内酯可通过水解打开以产生羟基-羧酸,如下所述:



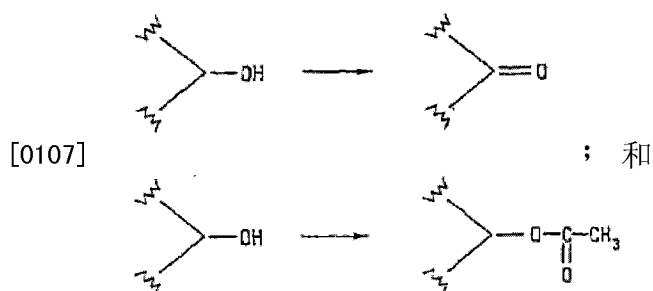
[0101] 羰基可被还原成亚甲基,如下所述:



[0103] 伯醇可被氧化成醛,醛可被进一步衍生化,如下所述:



[0106] 最后,仲醇可被转化成酮和乙酸,如下所述:



[0108] 据信,可用上述方法获得的不对称倍半萜二聚体衍生物中至少有一些可具有抗疟活性,且与源自 *D. anomala* 的二聚体相比其抗疟活性可能增强。

[0109] 现在将参考以下修饰过的实施例以非限制性列举的方式阐述本发明。

[0110] 实施例 1

[0111] 来自 *D. anomala* 的植物材料已经确认并将该植物材料的凭证标本 [No. 98142] 保藏于 Cape Town 大学的 Bolus 植物标本室。洗去植物材料上生长的真菌、细菌和 / 或土壤,并避开阳光直射在室温下干燥。然后用植物研磨机研磨植物材料,使其粒度最大为 10 μ m。经过研磨的植物材料在提取之前储存在通风良好的干燥的纸板盒中。

[0112] 为对植物材料进行冷提取,称重 500 克批次的经过研磨的干燥植物材料并用 5 升冷(室温)二氯甲烷提取。提取时间为 24 小时,期间以 130rpm 搅动 / 振荡,过滤提取的混合物之后再加入 5 升冷二氯甲烷进行再一次提取周期。重复提取周期直到将材料提取完全,之后收集获自各周期的滤液,并在最高 40℃ 通过旋转蒸发除去二氯甲烷而留下植物提取物。然后在避免阳光直射的通风橱中干燥提取物,之后测定产量并筛选具有抗疟活性的干燥的提取物。

[0113] 弃去无抗疟活性的提取物,将 200mg 干燥的二氯甲烷提取物溶于 100ml 甲醇并在其中加入 5g Polyamide S(一种有机酰胺聚合物)粉末,然后充分混合并用布氏漏斗真空过滤,以便从具有抗疟活性的提取物中除去鞣质和多酚类化合物。残余物再用 100ml 甲醇洗涤,然后再进行所述过滤,之后收集含有溶解的无鞣质提取物的甲醇滤液。在真空下蒸发甲醇并在通风橱中干燥无鞣质提取物。

[0114] 甲醇提取后剩下的残余物用 20ml 批次的 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)洗涤两次以提取该残余物中的鞣质材料。然后在真空下除去 DMF 并在通风橱中干燥剩余的提取物。

[0115] 检测二氯甲烷提取物、甲醇提取物和 DMF 提取物的抗疟活性,除二氯甲烷提取物外其余弃去。

[0116] 通过固相提取(SPE),用容量为 10g 和 70ml 的 C-18 封端的 SPE 反相柱纯化二氯甲烷提取物。为 SPE 提取制备 200mg 已经除去鞣质和多酚化合物的干燥的二氯甲烷提取物,方法是将提取物完全溶于 15ml MeCN,将溶液 13000rpm 离心 15 分钟,之后离心析出上清液。然后在上清液中加入 35ml 蒸馏的去离子水,13000rpm 离心 15 分钟,之后离心并过滤上清液以用于 SPE。

[0117] 用 50ml MeCN 洗涤三次、之后用 50ml 蒸馏的去离子水洗涤三次以调节 SPE 柱。以 4mg/ml 加样,在各柱上加入 50ml 获自 200mg 提取物的溶液。间隔 1 分钟后在各柱上温和施加真空以获得渗滤液,收集该渗滤液作为第一组份。将收集的渗滤液冻干。然后用每份 50ml 去离子水将各柱洗涤 5 次(共 250ml),然后冻干除去水,留下第二组份或洗涤过的组份。

[0118] 用每份 50ml MeCN 与水的混合物对各柱进行 5 次洗脱（共 250ml），洗脱液中 MeCN 与水的浓度如上表 2 所示发生阶梯式变化，该表还显示了组份 3-12，组份 1 和 2 是上面提到的第一组份和第二组份，分别来自加样和柱洗涤。

[0119] 为检测植物提取物使用恶性疟原虫，将疟原虫养在 37℃、含 3% 氧气、4% 二氧化碳和 93% 氮气（按体积计）的大气下的培养瓶中，然后检测植物提取物。疟原虫在培养基中培养，培养基每天更换并每 2-3 天用新鲜的血红细胞稀释以使任何时刻都有至少 5% 的血红细胞被感染。用 Giemsa R66 染色的薄涂片观察寄生虫血症。涂片用甲醇固定并在室温下暴露于 10 质量% 的 Giemsa-R66 的磷酸缓冲盐溶液 10 分钟。在载玻片上观察薄涂片，载玻片用自来水流冲洗并用不含棉绒的纸擦干后再涂片。采用 100 倍物镜用光学显微镜对载玻片进行油镜观察，油的粘度为 1.250 厘沱，并对受寄生虫感染的红细胞计数。

[0120] 植物提取物被制备成通过复原才能使用，先将二氯甲烷提取物溶于 100 μ l 甲醇，然后用蒸馏的去离子水调至 2ng/ml。用 0.22 μ m 的无菌滤器对用这种方法形成的原液加以灭菌，然后储存在 -18℃ 的冰箱中直到筛选。

[0121] 使用微滴定板或微稀释板，各板都包含排成 8 排（A-H）、12 列（1-12）的 96 个平底孔。用移液管在各孔中加入 100 μ l 培养基，但在第 3 列的各孔中加入 200 μ l 复原的植物提取物。在平板内用多道 Eppendorff 分配器对各提取物进行对倍连续稀释。保留第 1 列作为血红细胞空白，保留第 2 列作为寄生虫对照。用移液管在第 1 列的各孔中加入 100 μ l 2% 的血细胞比容（占血红细胞质量的 2%），并在平板其余的孔中加入 100 μ l 2% 的血细胞比容及 100 μ l 带有 2% 寄生虫血症的 2% 的血细胞比容（即有 2% 的细胞被寄生虫感染）作为对照。将平板置于用混合气吹扫过的气密性干燥器中并于 37℃ 孵育 48 小时以检测甲醇或其它溶剂对寄生虫的影响，以体积计，混合气中含有 3% 氧气、4% 二氧化碳和 90% 氮气。

[0122] 微滴定板 / 微稀释板之一示于下表 3 中。从平板的第 3 列开始直到第 12 列，培养基的量连续减半（即第 3 列为 100%，第 4 列为 50%，第 5 列为 25%，如此类推直到第 12 列降至 0.1953%）。第 3 列的提取物浓度最高，为 100 000ng/ml，第 12 列的浓度最低，为 195ng/ml。氯喹的检测浓度为 200ng/ml-0.39ng/ml。如上所示，第 1 列用作血红细胞空白，第 2 列用作寄生虫对照，在 A 和 B 排检测第一样品，在 C 和 D 排检测第二样品，在 E 和 F 排检测第三样品，在 G 和 H 排检测第五样品。

[0123] 表 3

[0124]

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B	C	10 0	50	25	12.5	6.25	3.125	1.5625	0.78125	0.3906	0.1953
B	B	C										
C	B	C	10 0	50	25	12.5	6.25	3.125	1.5625	0.78125	0.3906	0.1953
D	B	C										
E	B	C	10 0	50	25	12.5	6.25	3.125	1.5625	0.78125	0.3906	0.1953
F	B	C										
G	B	C	10 0	50	25	12.5	6.25	3.125	1.5625	0.78125	0.3906	0.1953
H	B	C										

[0125] 为进行抗疟原虫筛选采用寄生虫乳酸脱氢酶试验。从培养箱中取出测试平板并重悬其内容物。在另一清洁 96 孔 (8 排 × 12 列) 微滴定板的孔中加入 100 μl Malstat™ 试剂以与寄生物乳酸脱氢酶反应。从取自培养箱的各平板的各孔中取出 15 μl 液体转移到含有 Malstat™ 试剂的微滴定板的相应孔中,并在含有 Malstat™ 试剂的各个这些孔中加入 25 μl 0.24mM (毫摩) 苯基乙基硫酸酯 (PES) 和 1.96mM 硝基四唑蓝 (nitro bluetetrazoleum) (NBT) 溶液。产生紫色表明有寄生虫存活。使 Malstat™ 反应在黑暗中进行 10 分钟,并在 Cambridge Technology, Inc. 制造的 7520 型酶标仪中读取 620nm 的吸光度。各板第 1 列的孔仅含空白血细胞。用以下公式从吸光度读数计算寄生虫存活百分数:

[0126]

$$\text{寄生虫存活}\% = 100 \times \frac{\text{测试孔的平均读数} - \text{空白孔的平均读数}}{\text{对照孔的平均读数} - \text{空白孔的平均读数}}$$

[0127] 将吸光度读数与提取物浓度绘图来准备剂量应答曲线,并通过外推从这些应答曲线确定各种情况下的 IC₅₀,即抑制 50% 寄生虫群体的浓度。需要的话可从吸光度读数计算标准差。

[0128] 对显示出抗疟原虫活性的提取物进行细胞毒性研究。生存力大于 95% 的完全贴壁的融合细胞被用于细胞毒性试验。

[0129] 用提取物的液体培养基将提取物储用培养物稀释至密度为 50 000 细胞 / 毫升以制备微稀释板,将其用于下面描述的 MTT 细胞毒性试验。在 8 排 12 列的 96 孔微稀释板的每个孔中加入 200 μl 含有 10 000 个细胞的稀释的储用培养物,但分别作为空白和寄生虫对照的第 1 和 2 列除外。各板在用二氧化碳气体连续吹扫过的培养箱中于 37℃ 孵育。孵育平板直到细胞融合。

[0130] 按上文对抗疟原虫筛选中的描述制备提取物。测试各种情况下用来溶解植物提取物的溶剂对细胞的影响。

[0131] 为确定细胞生存力,用 5 质量%的胰蛋白酶乙二胺四乙酸的磷酸缓冲盐水 (PBS) 溶液使细胞胰蛋白酶化,从而使细胞从含有它们的烧瓶上分离。然后用离心机 1500rpm 离心细胞 5 分钟,之后吸出其中的上清液,用用作其培养基的液体将细胞洗涤两次。然后将细胞重悬于培养基以获得细胞悬液,将 1 份细胞悬液与等体积台盼蓝混合。充分混合后取出 1 滴混合物置于血细胞计数器并盖上盖玻片。使细胞静置 2 分钟,计算无活力细胞 (即被染成蓝色的细胞) 的百分比,即每百个细胞中被染成蓝色的细胞的数目。

[0132] 然后测试细胞毒性。当细胞达到融合时从其中吸去培养基,并用 5ml 所述 5% 的胰蛋白酶乙二胺四乙酸来分离细胞。细胞悬液于 2050rpm 离心 2 分钟,之后吸去胰蛋白酶乙二胺四乙酸并用培养基洗涤细胞。将载玻片染色之后如上所述在血细胞计数器上计算有活力细胞的数量,以 10 000 细胞 / 孔将细胞接种到 96 孔平底微滴定板的孔中。使细胞静置并附着 24 小时,之后吸去培养基并加入新鲜的培养基和测试提取物。使细胞连续接触 11 种提取物的对倍稀释液 48 小时。

[0133] 孵育 48 小时后在所有孔中加入 50 μ l 用 PBS 制备的 1mg/ml 的 [3-(4,5- 二甲基噻唑)-2-基]-2,5- 二苯基 (dithenyl)- 溴化四唑 (MTT) 溶液。平板再在 37℃ 的培养箱中孵育 4 小时,然后将平板 2050rpm 离心 10 分钟。在通风橱中吸去培养基。该试验基于通过仅存在于具有代谢活性的活生物体中的还原酶将 MTT 还原成紫色不溶性甲 (formazan) 产物。得到甲晶体,在各孔中加入 100 μ l 二甲亚砜,之后在上述酶标仪上读取 620nm 的吸光度,从而可计算细胞存活率。

[0134] 用选择指数来确定某植物提取物是否具有细胞毒性或者能抗疟原虫。为计算选择指数对细胞毒性和抗疟原虫浓度采取相同单位,并按照以下公式计算:

[0135]

$$\text{选择指数(抗疟原虫)} = \frac{\text{抗疟原虫 IC}_{50}}{\text{细胞毒性 IC}_{50}}$$

[0136] 实施例 2

[0137] 对二氯甲烷提取物重复实施例 1,但调节 SPE 柱时用 50ml 甲醇洗涤 1 次然后用 50ml 蒸馏的去离子水洗涤 1 次 (而实施例 1 是用 MeCN 洗涤 3 次然后用水洗涤 3 次)。如实施例 1 所述,在各柱上加入 4mg/ml 粗制的提取物。如上表 2 的详细描述以 17 毫升 / 分钟的速度洗脱结合的化合物,即所用流动相含有 MeCN 和水,MeCN 和水的比例如表 2 所示。

[0138] 分别含有 30% MeCN、40% MeCN 和 50% MeCN (均以体积计) 的洗脱组份 5、6 和 7 分别含 $0.56 \pm 0.065 \mu\text{g/ml}$ 提取物、 $0.55 \pm 0.12 \mu\text{g/ml}$ 提取物和 $0.54 \pm 0.11 \mu\text{g/ml}$ 提取物。洗脱组份 5、6 和 7 各自的抗疟活性高于粗制的二氯甲烷提取物。

[0139] 收集 40% MeCN 组份 (洗脱组份 6) 的各个峰以获得纯的化合物,该组份具有许多显著的峰。采用规格为 $250 \times 10\text{mm}$ 、粒度为 $5 \mu\text{m}$ 的 C18 HPLC Haisil 100 半制备柱。采用的检测波长为 215nm,流速为 2.5 毫升 / 分钟,加样体积为 216 μ l,流动相为含有 60 体积% MeCN 的 MeCN/ 水混合物。该过程可以分离分别具有图 6 和 7 所示结构式的化合物。发现图 6 所示化合物的 IC_{50} 为 $0.19 \mu\text{g/ml}$; 图 7 所示化合物的 IC_{50} 为 $0.28 \mu\text{g/ml}$ 。

[0140] 实施例 3

[0141] 对二氯甲烷提取物重复实施例 1,并除了图 2 的化合物还分离出图 8 和 9 所示的化合物。

[0142] 图 6 和 7 所示化合物的 IC_{50} 值分别为 $0.19 \mu g/ml$ 和 $0.28 \mu g/ml$, 比所述粗制提取物抗疟活性提高约 10 倍, 比分离出它们的各组份分别提高 2 倍和 5 倍。图 6 和 7 所示化合物的抗疟原虫选择指数为 1/2, 说明细胞毒性是抗疟活性的 2 倍, 但图 6 和 7 所示化合物的抗疟活性略高于图 2、8 和 9 所示的化合物。

[0143] 可以预期, 为治疗患有疟疾的人, 将能够以胶囊、片剂、糖浆剂、可注射液体、草药酊剂 (可被标准化)、栓剂等中的一种或多种途径将所述植物提取物或其活性成分给予患有疟疾的人。

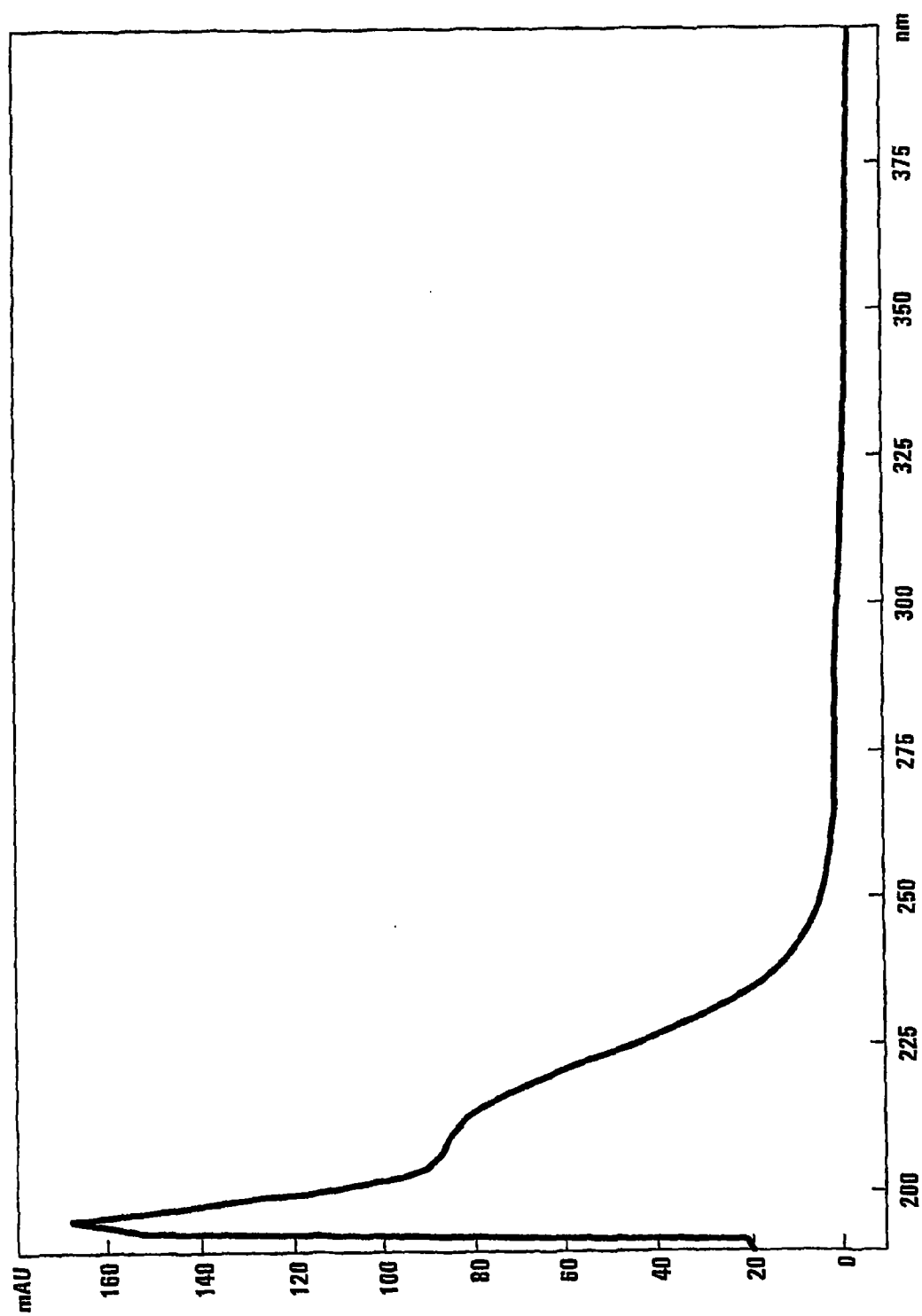


图 1

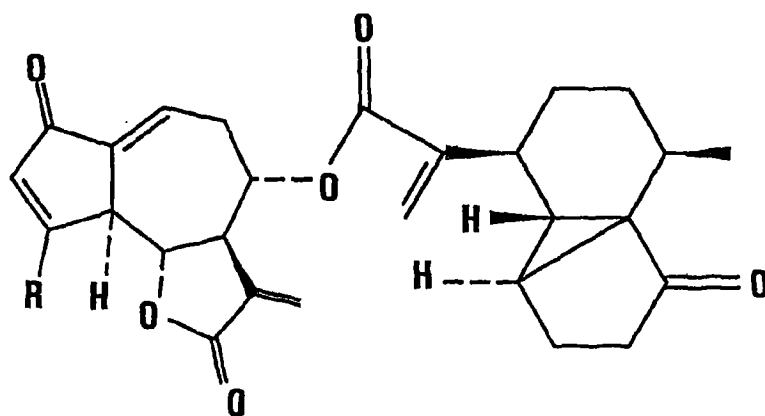


图 2

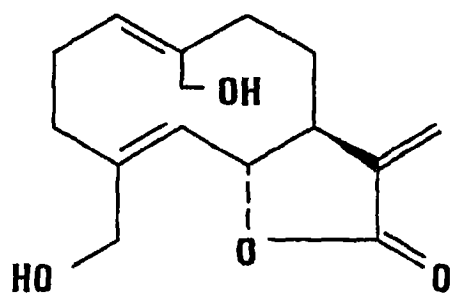


图 3

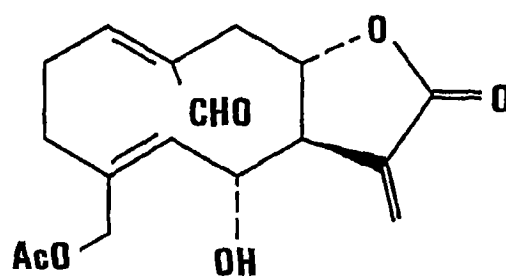


图 4

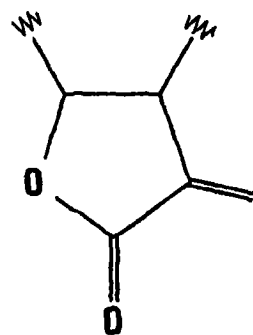


图 5

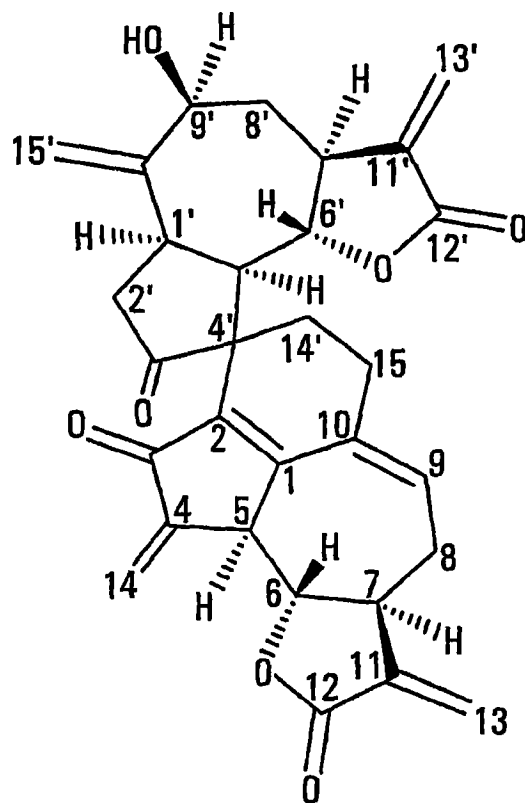


图 6

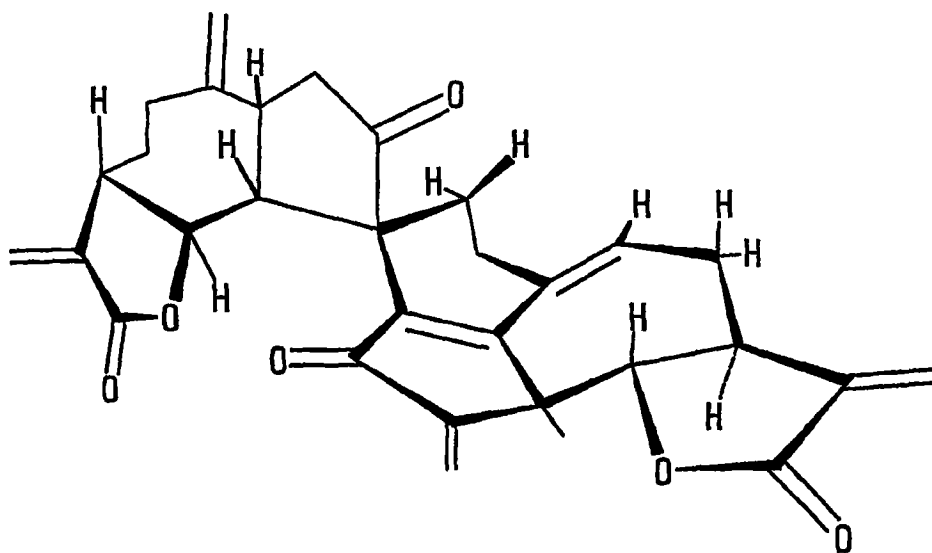


图 7

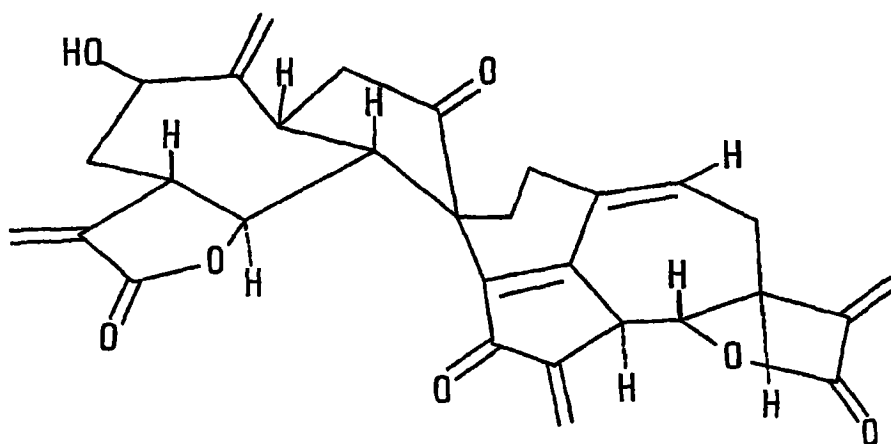


图 8

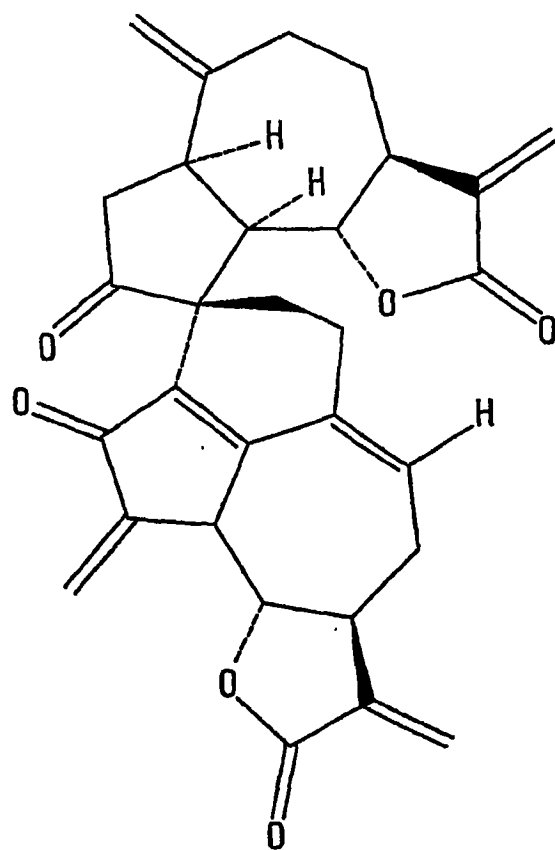


图 9