



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201006484 A1

(43)公開日：中華民國 99 (2010) 年 02 月 16 日

(21)申請案號：098122061

(22)申請日：中華民國 98 (2009) 年 06 月 30 日

(51)Int. Cl. : A61K36/896 (2006.01)

A61K31/4355(2006.01)

C07D491/048(2006.01)

(30)優先權：2008/07/02 美國 61/077,703

(71)申請人：英菲尼提發現公司 (美國) INFINITY DISCOVERY, INC. (US)

美國

(72)發明人：杰阿提克 吉米尼 沙瑞斯 JAYATILAKE, GAMINI SENERATH (US) ; 瑞奇米爾
史堤夫 L RICHHEIMER, STEVE L. (US) ; 曼恩 大衛 A MANN, DAVID A. (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：33 項 圖式數：11 共 54 頁

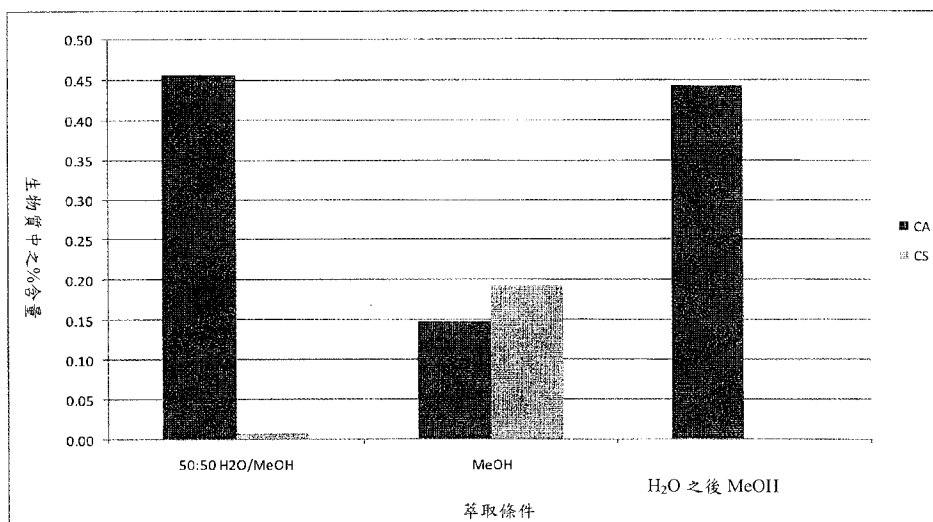
(54)名稱

環杷明 (CYCLOPAMINE) 之單離

ISOLATION OF CYCLOPAMINE

(57)摘要

本發明提供經設計以最優化來自藜蘆屬植物(Veratrum plant)材料及/或藜蘆屬植物材料之萃取物的藜蘆生物鹼產率之去糖基化方法。





(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201006484 A1

(43)公開日：中華民國 99 (2010) 年 02 月 16 日

(21)申請案號：098122061

(22)申請日：中華民國 98 (2009) 年 06 月 30 日

(51)Int. Cl. : A61K36/896 (2006.01)

A61K31/4355(2006.01)

C07D491/048(2006.01)

(30)優先權：2008/07/02 美國 61/077,703

(71)申請人：英菲尼提發現公司 (美國) INFINITY DISCOVERY, INC. (US)

美國

(72)發明人：杰阿提克 吉米尼 沙瑞斯 JAYATILAKE, GAMINI SENERATH (US) ; 瑞奇米爾
史堤夫 L RICHHEIMER, STEVE L. (US) ; 曼恩 大衛 A MANN, DAVID A. (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：33 項 圖式數：11 共 54 頁

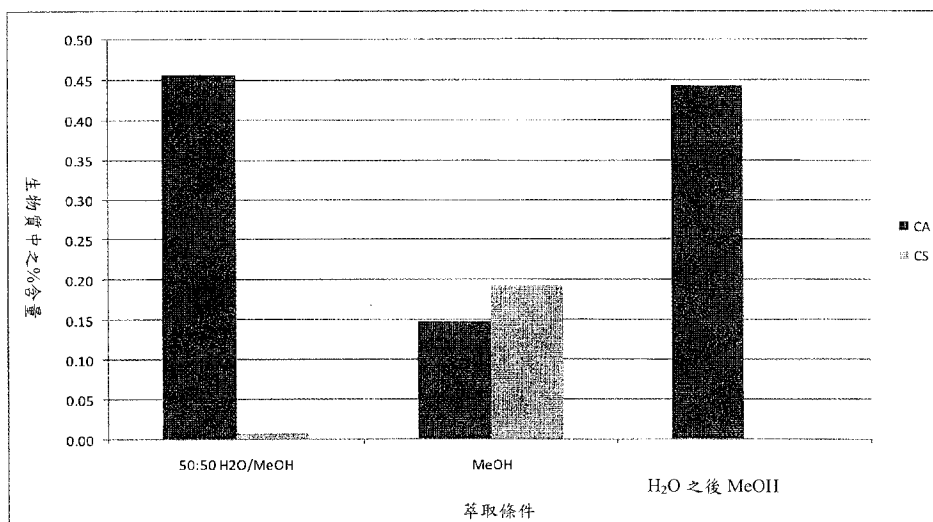
(54)名稱

環杷明 (CYCLOPAMINE) 之單離

ISOLATION OF CYCLOPAMINE

(57)摘要

本發明提供經設計以最優化來自藜蘆屬植物(Veratrum plant)材料及/或藜蘆屬植物材料之萃取物的藜蘆生物鹼產率之去糖基化方法。



六、發明說明：

本申請案主張優先於2008年7月2日提出申請之美國臨時專利申請案第61/077,703號之權利，該案之全文以引用方式併入本文中。

【先前技術】

在二十世紀五十年代中期，據報導在愛達荷州(Idaho)中部出生了嚴重畸形的單眼羔羊。美國農業部(US Department of Agriculture)及FDA經過11年研究確定，懷孕母羊在妊娠第14天母體攝取野生鳶尾植物加州藜蘆(*Veratrum californicum*)誘導羔羊中之此獨眼型畸形。加州藜蘆生長在美國西部海拔介於5,000-11,000英尺之開放亞高山草甸及山坡上。之後分離出了加州藜蘆中誘導獨眼型畸形之主要致畸形化合物且經鑑別為11-去氧介芬胺，稱為「環杷明(Cyclopamine)」。環杷明用作hedgehog (Hh)途徑抑制劑，阻斷對胚胎發育至關重要之Sonic hedgehog基因的功能(Cooper等人，*Science* (1998) 280:1603-1607；Chen等人，*Genes and Development* (2002) 16:2743-2748；Incardona等人，*Dev. Biol.* (2000) 224:440；及Chen等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2002) 99:14071)。加州藜蘆中可存在之其他藜蘆生物鹼包括(但不限於)3-葡萄糖基-11-去氧芥芬胺(cycloposine)、藜蘆胺、藜蘆胺葡萄糖苷、介藜蘆胺及穆達明(muldamine)。

儘管環杷明具有致畸形性質，但其仍係有效抗癌劑。在使用環杷明之研究中，研究人員已使大部分惡性人類腫瘤

(此種類佔癌症死亡之25%)之生長終止。目前正研究環杷明及環杷明類似物作為若干不同癌症(例如基底細胞癌、髓母細胞瘤、橫紋肌肉瘤、肺癌、胰腺癌、乳癌、膠質母細胞瘤)之治療劑及作為用於多發性骨髓瘤之治療劑。

若干年前Keeler與其合作者闡述了自加州藜蘆單離環杷明之方法(Keeler, *Phytochemistry* (1968) 7:303-306)，但此方法自千克量之乾燥植物材料中僅獲得毫克量之環杷明。因此，仍然需要新穎及改良之環杷明分離方法。

【發明內容】

加州藜蘆中儲存有大量呈糖基化衍生物形式之藜蘆生物鹼。本發明提供經設計以最優化來自藜蘆屬植物材料及/或藜蘆屬植物材料之萃取物的去糖基化藜蘆生物鹼產率之新穎去糖基化方法。

舉例而言，本發明提供一種自藜蘆屬植物材料單離去糖基化藜蘆生物鹼之方法，其包含以下步驟：

- (i) 提供包含糖基化藜蘆生物鹼之藜蘆屬植物材料；
- (ii) 使該藜蘆屬植物材料與水溶液接觸；及
- (iii) 用溶劑萃取該藜蘆屬植物材料以提供包含該去糖基化藜蘆生物鹼之萃取物。

本發明亦提供包含使糖基化藜蘆生物鹼與酶在緩衝溶液中接觸以提供去糖基化藜蘆生物鹼之去糖基化方法。

【實施方式】

本發明提供經設計以最優化來自藜蘆屬植物材料及/或藜蘆屬植物材料之萃取物的去糖基化藜蘆生物鹼產率之本

發明去糖基化方法。

水性預處理方法

加州藜蘆中存在的大量藜蘆生物鹼(例如環杷明及藜蘆胺)呈其相應糖基化衍生物(例如, 3-葡萄糖基-11-去氧芥芬胺及藜蘆胺葡萄糖苷)形式。通常相信, 藜蘆屬植物中存在之一或多種內源酶將根據植物需求促使該等藜蘆生物鹼轉與其糖基化衍生物間相互轉化。

已發現, 在萃取前用水溶液處理所收穫並乾燥之藜蘆屬植物材料時, 糖基化藜蘆生物鹼之量降低, 且在萃取時去糖基化藜蘆生物鹼之分離產率升高。不欲受限於任何理論, 提出在水性處理期間, 藜蘆屬植物材料中存在之一或多種內源酶促使糖基化藜蘆生物鹼去糖基化, 藉此使所觀測到之去糖基化藜蘆生物鹼的分離產率增加。

因此, 本發明提供一種自藜蘆屬植物材料單離去糖基化藜蘆生物鹼之方法, 其包含以下步驟:

- (i) 提供包含糖基化藜蘆生物鹼之藜蘆屬植物材料;
- (ii) 使該藜蘆屬植物材料與水溶液接觸; 及
- (iii) 用溶劑萃取該藜蘆屬植物材料以提供包含去糖基化藜蘆生物鹼之萃取物。

在某些實施例中, 糖基化藜蘆生物鹼係3-葡萄糖基-11-去氧芥芬胺, 且去糖基化藜蘆生物鹼係環杷明。

在某些實施例中, 藜蘆屬植物材料包含3-葡萄糖基-11-去氧芥芬胺與環杷明之混合物。

在某些實施例中, 糖基化藜蘆生物鹼係藜蘆胺葡萄糖

苷，且去糖基化藜蘆生物鹼係藜蘆胺。

在某些實施例中，藜蘆屬植物材料包含藜蘆胺葡萄糖苷與藜蘆胺之混合物。

在某些實施例中，藜蘆屬植物材料包含3-葡萄糖基-11-去氧芥芬胺與藜蘆胺葡萄糖苷之混合物。

在某些實施例中，藜蘆屬植物材料包含3-葡萄糖基-11-去氧芥芬胺、環杷明、藜蘆胺葡萄糖苷及藜蘆胺之混合物。

本文所用「藜蘆屬植物材料」係指所收穫之加州藜蘆植物，例如加州藜蘆加州變種(*Veratrum californicum* var. *californicum*)，其可視情況乾燥並視情況研磨成微細粉末。藜蘆屬植物材料亦可包含經基因改造以產生或含有一或多種藜蘆生物鹼之收穫植物(例如，經基因改造以產生高含量之一或多種藜蘆生物鹼(例如環杷明及/或3-葡萄糖基-11-去氧芥芬胺)的植物)。

在某些實施例中，水溶液之pH係約pH 9或低於約pH 9。在某些實施例中，水溶液之pH係約pH 8或低於約pH 8。在某些實施例中，水溶液之pH係約pH 7.5或低於約pH 7.5。在某些實施例中，水溶液之pH係約pH 7或低於約pH 7。

在某些實施例中，水溶液之pH介於約4至約9之間且包括二者。在某些實施例中，水溶液之pH介於約4至約8之間且包括二者。在某些實施例中，水溶液之pH介於約5至約8之間且包括二者。在某些實施例中，水溶液之pH介於約5至約7.5之間且包括二者。在某些實施例中，水溶液之pH介

於約5至約7之間且包括二者。在某些實施例中，水溶液之pH介於約5至約6之間且包括二者。在某些實施例中，水溶液之pH介於約6至約7.5之間且包括二者。

在某些實施例中，水溶液係中性(亦即，於約pH 7下)。

在某些實施例中，水溶液係酸性(亦即，低於約pH 7)。

在某些實施例中，水溶液不包含鹼。

在某些實施例中，水溶液不包含無機鹼。在某些實施例中，水溶液不包含有機鹼。

在某些實施例中，水溶液不包含氫氧化銨或碳酸鈉。在某些實施例中，水溶液不包含氫氧化銨。

在某些實施例中，水溶液經緩衝。實例性緩衝液包括(但不限於)3-{[叁(羥甲基)甲基]胺基}丙磺酸(TAPS)、N,N-雙(2-羥乙基)甘胺酸(Bicine)、叁(羥甲基)甲基胺(Tris)、N-叁(羥甲基)甲基甘胺酸(Tricine)、4-2-羥乙基-1-六氫吡嗪乙磺酸(HEPES)、2-{[叁(羥甲基)甲基]胺基}乙磺酸(TES)、3-(N-嗎啉基)丙磺酸(MOPS)、六氫吡嗪-N,N'-雙(2-乙磺酸)(PIPES)、二甲基次膦酸(Cacodylate)、2-(N-嗎啉基)乙磺酸(MES)、碳酸緩衝液、磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)、乙酸鹽緩衝液、及其鹽。在某些實施例中，緩衝液係乙酸鹽緩衝液。在某些實施例中，緩衝液係Tris緩衝液。

在某些實施例中，水溶液包含大於約1%、大於約5%、大於約10%、大於約15%、大於約20%、大於約25%、大於約30%、大於約35%、大於約40%、大於約45%、大於約

50%、大於約 60%、大於約 65%、大於約 70%、大於約 75%、大於約 80%、大於約 85%、大於約 90%、大於約 95%、大於約 98%、或大於約 99%之水。

在某些實施例中，水溶液包含介於約 5%至約 100%間且包括二者之水。在某些實施例中，水溶液包含介於約 10%至約 100%間且包括二者之水。在某些實施例中，水溶液包含介於約 20%至約 100%間且包括二者之水。在某些實施例中，水溶液包含介於約 30%至約 100%間且包括二者之水。在某些實施例中，水溶液包含介於約 40%至約 100%間且包括二者之水。在某些實施例中，水溶液包含介於約 50%至約 100%間且包括二者之水。在某些實施例中，水溶液包含介於約 60%至約 100%間且包括二者之水。在某些實施例中，水溶液包含介於約 70%至約 100%間且包括二者之水。在某些實施例中，水溶液包含介於約 80%至約 100%間且包括二者之水。在某些實施例中，水溶液包含介於約 90%至約 100%間且包括二者之水。

在某些實施例中，水溶液包含水與共溶劑之混合物。實例性共溶劑包括有機醇，例如甲醇、乙醇及異丙醇。在某些實施例中，水溶液係水與甲醇之混合物。

在某些實施例中，水溶液包含約 1:1(v/v)、約 1:2(v/v)、約 1:3(v/v)、約 1:4(v/v)、約 1:5(v/v)、約 1:6(v/v)、約 1:7(v/v)、約 1:8(v/v)、約 1:9(v/v)、或約 1:10(v/v)之水與共溶劑的混合物。

在某些實施例中，水溶液包含約 1:1(v/v)、約 1:2(v/v)、

約 1:3(v/v)、約 1:4(v/v)、約 1:5(v/v)、約 1:6(v/v)、約 1:7(v/v)、約 1:8(v/v)、約 1:9(v/v)、或約 1:10(v/v)之共溶劑與水的混合物。

在某些實施例中，水溶液係100%水。

在某些實施例中，水溶液之總重量係藜蘆屬植物材料重量之至少約 1.5 倍 (w/w)、至少約 2 倍 (w/w)、至少約 3 倍 (w/w)、至少約 4 倍 (w/w)或至少約 5 倍 (w/w)。

在某些實施例中，水溶液係處於低於約 100°C、低於約 90°C、低於約 80°C、低於約 70°C、低於約 60°C、低於約 50°C、低於約 40°C、低於約 30°C、低於約 28°C、低於約 25°C、低於約 20°C、低於約 15°C、低於約 10°C、或低於約 5°C 之溫度下。

在某些實施例中，水溶液係處於約 0°C 至約 100°C 之間且包括二者之溫度下。在某些實施例中，水溶液係處於約 0°C 至約 90°C 之間且包括二者之溫度下。在某些實施例中，水溶液係處於約 0°C 至約 80°C 之間且包括二者之溫度下。在某些實施例中，水溶液係處於約 0°C 至約 70°C 之間且包括二者之溫度下。在某些實施例中，水溶液係處於約 0°C 至約 60°C 之間且包括二者之溫度下。在某些實施例中，水溶液係處於約 0°C 至約 50°C 之間且包括二者之溫度下。在某些實施例中，水溶液係處於約 0°C 至約 40°C 之間且包括二者之溫度下。在某些實施例中，水溶液係處於約 0°C 至約 30°C 之間且包括二者之溫度下。在某些實施例中，水溶液係處於約 0°C 至約 25°C 之間且包括二者之溫度

下。在某些實施例中，水溶液係處於約25°C至約75°C之間且包括二者之溫度下。在某些實施例中，水溶液係處於約30°C至約60°C之間且包括二者之溫度下。

在某些實施例中，在該接觸步驟期間，糖基化藜蘆生物鹼之量降低。在某些實施例中，在該接觸步驟期間，去糖基化藜蘆生物鹼之量升高。在某些實施例中，在該接觸步驟期間，糖基化藜蘆生物鹼之量降低且去糖基化藜蘆生物鹼之量升高。

在某些實施例中，在該接觸步驟期間，藉由植物材料中存在之一或多種內源酶使糖基化藜蘆生物鹼轉化為去糖基化藜蘆生物鹼。

在某些實施例中，接觸步驟包含使藜蘆屬植物材料與水溶液接觸一段足以使植物材料中存在之約10%糖基化藜蘆生物鹼轉化為去糖基化藜蘆生物鹼的時間。在某些實施例中，接觸步驟包含使藜蘆屬植物材料與水溶液接觸一段足以使植物材料中存在之至少約25%糖基化藜蘆生物鹼轉化為去糖基化藜蘆生物鹼的時間。在某些實施例中，接觸步驟包含使藜蘆屬植物材料與水溶液接觸一段足以使植物材料中存在之至少約50%糖基化藜蘆生物鹼轉化為去糖基化藜蘆生物鹼的時間。在某些實施例中，接觸步驟包含使藜蘆屬植物材料與水溶液接觸一段足以使植物材料中存在之至少約75%糖基化藜蘆生物鹼轉化為去糖基化藜蘆生物鹼的時間。在某些實施例中，接觸步驟包含使藜蘆屬植物材料與水溶液接觸一段足以使植物材料中存在之至少約95%

糖基化藜蘆生物鹼轉化為去糖基化藜蘆生物鹼的時間。

在某些實施例中，將植物材料中存在之所有糖基化藜蘆生物鹼轉化為去糖基化藜蘆生物鹼。

在某些實施例中，接觸步驟包含使藜蘆屬植物材料與水溶液接觸至少5分鐘。在某些實施例中，接觸步驟包含使藜蘆屬植物材料與水溶液接觸至少10分鐘。在某些實施例中，使藜蘆屬植物材料與水溶液接觸至少30分鐘。在某些實施例中，使藜蘆屬植物材料與水溶液接觸至少45分鐘。在某些實施例中，使藜蘆屬植物材料與水溶液接觸至少1小時。在某些實施例中，使藜蘆屬植物材料與水溶液接觸至少1.5小時。在某些實施例中，使藜蘆屬植物材料與水溶液接觸至少2小時。

在某些實施例中，接觸步驟包含使藜蘆屬植物材料與水溶液接觸達介於約5分鐘至約5小時之間並包括二者。在某些實施例中，接觸步驟包含使藜蘆屬植物材料與水溶液接觸達介於約5分鐘至約2小時之間並包括二者。在某些實施例中，接觸步驟包含使藜蘆屬植物材料與水溶液接觸達介於約5分鐘至約1小時之間並包括二者。

在某些實施例中，接觸步驟包含在水溶液中攪拌藜蘆屬植物材料。在某些實施例中，攪拌步驟包含在水溶液中振盪或攪拌植物材料。在其他實施例中，接觸步驟不包含攪拌。

在某些實施例中，此方法另外包含在萃取藜蘆屬植物材料之前自水溶液去除藜蘆屬植物材料之步驟。在某些實施

例中，去除步驟包含過濾或離心。

在某些實施例中，在第一接觸步驟後但在萃取步驟之前，該方法另外包含使植物材料與鹼性水溶液接觸。

在某些實施例中，萃取步驟包含用溶劑萃取藜蘆屬植物材料以提供包含去糖基化藜蘆生物鹼之萃取物，其中該溶劑包含一或多種可視情況與水及/或鹼混合之有機溶劑。

在某些實施例中，有機溶劑係有機醇、酯、酮、醚、鹵代烴、烴、芳香族化合物、或雜芳香族化合物、或其兩者或更多者之混合物。

實例性有機醇包括(但不限於)甲醇、乙醇、丙醇、異丙醇、2-丁醇及正丁醇。實例性酯包括(但不限於)乙酸乙酯及乙酸異丙基酯。實例性酮包括(但不限於)丙酮及甲基乙基酮(MEK)。實例性醚包括(但不限於)四氫呋喃(THF)、二噁烷及二乙基醚。實例性鹵代烴包括(但不限於)二氯甲烷、二氯乙烷及氯仿。實例性烴包括(但不限於)己烷、庚烷及戊烷。實例性芳香族溶劑包括(但不限於)苯、苯甲醚、甲苯及二甲苯。

在某些實施例中，有機溶劑係有機醇。在某些實施例中，有機溶劑係甲醇。

在某些實施例中，萃取步驟中所用之溶劑包含有機溶劑與水之混合物。在一些實施例中，萃取步驟中所用之溶劑包含甲醇與水之混合物。

在某些實施例中，萃取步驟中所用之溶劑包含約 1:1(v/v)、約 1:2(v/v)、約 1:3(v/v)、約 1:4(v/v)、約

1:5(v/v)、約 1:6(v/v)、約 1:7(v/v)、約 1:8(v/v)、約 1:9(v/v)、或約 1:10(v/v)之水與有機溶劑的混合物。

在某些實施例中，萃取步驟中所用之溶劑包含約 1:1(v/v)、約 1:2(v/v)、約 1:3(v/v)、約 1:4(v/v)、約 1:5(v/v)、約 1:6(v/v)、約 1:7(v/v)、約 1:8(v/v)、約 1:9(v/v)、或約 1:10(v/v)之有機溶劑與水的混合物。

在某些實施例中，萃取步驟中所用之溶劑包含有機溶劑與鹼之混合物。在一些實施例中，鹼係鹼性水溶液。在其他實施例中，鹼係非水性。

在某些實施例中，鹼係以小於約 20%(v/v)、小於約 15%(v/v)、小於約 10%(v/v)、小於約 5%(v/v)、或小於約 1%(v/v)之量存在於有機溶劑中。在某些實施例中，鹼係以介於約 1%至約 20%(v/v)間且包括二者、介於約 1%至約 10%(v/v)間且包括二者、或介於約 1%至約 5%(v/v)間且包括二者之量存在於有機溶劑中。

實例性鹼包括有機鹼及無機鹼。實例性無機鹼包括(但不限於)氫氧化銨、氫氧化鈉、碳酸鈉、碳酸氫鈉、乙酸鈉、檸檬酸鈉、氫氧化鉀、碳酸鉀、碳酸氫鉀、酒石酸鉀鈉(aka Rochelle's鹽)、及氫氧化鋰之水溶液。實例性有機鹼包括(但不限於)三乙胺、二乙基異丙胺及吡啶。在某些實施例中，鹼係碳酸鈉水溶液。在某些實施例中，鹼係三乙胺。在某些實施例中，鹼係氫氧化鈉水溶液。

在一些實施例中，萃取步驟中所用之溶劑包含甲醇與碳酸鈉水溶液之混合物。在其他實施例中，萃取步驟中所用

之溶劑包含甲醇與三乙胺之混合物。在其他實施例中，萃取步驟中所用之溶劑包含甲醇與氫氧化鈉水溶液之混合物。在某些實施例中，該方法另外包含在提供包含去糖基化藜蘆生物鹼之萃取物的萃取步驟後濃縮溶劑之步驟。

在某些實施例中，該方法另外包含純化自萃取物分離之去糖基化藜蘆生物鹼。在某些實施例中，純化步驟包含提供具有大於約85%純度之去糖基化藜蘆生物鹼。在某些實施例中，純化步驟包含提供具有大於約90%純度之去糖基化藜蘆生物鹼。在某些實施例中，純化步驟包含提供具有大於約92%純度之去糖基化藜蘆生物鹼。在某些實施例中，純化步驟包含提供具有大於約95%純度之去糖基化藜蘆生物鹼。

可使用此項技術習知之各種分析技術(例如，液相層析質譜法(LC-MS)及高壓液相層析(HPLC))測定有機化合物之總純度。可用於表徵有機化合物純度之其他方法包括熔點、旋光度及核磁共振光譜(NMR)。

在某些實施例中，純化步驟包含層析純化。在某些實施例中，層析純化包含矽膠層析純化。

在某些實施例中，純化步驟包含研磨。

在某些實施例中，純化步驟包含結晶。

在某些實施例中，本發明提供一種自藜蘆屬植物材料單離環杷明之方法，其包含以下步驟：

- (i) 提供包含3-葡萄糖基-11-去氧芥芬胺之藜蘆屬植物材料；

(ii) 使該藜蘆屬植物材料與水溶液接觸；及

(iii) 用溶劑萃取該藜蘆屬植物材料以提供包含3-葡萄糖基-11-去氧芥芬胺之萃取物。

在某些實施例中，在該接觸步驟期間，3-葡萄糖基-11-去氧芥芬胺之量降低。在某些實施例中，在該接觸步驟期間，環杷明之量升高。在某些實施例中，在該接觸步驟期間，3-葡萄糖基-11-去氧芥芬胺之量降低且環杷明之量升高。

在某些實施例中，在該接觸步驟期間，藉由植物材料中存在之一或多種內源酶將3-葡萄糖基-11-去氧芥芬胺轉化為環杷明。

在某些實施例中，水溶液之pH係約pH 8或低於約pH 8。在某些實施例中，水溶液之pH介於約4至約8之間且包括二者。

在某些實施例中，水溶液不包含鹼。在某些實施例中，水溶液不包含氫氧化銨或碳酸鈉。

在某些實施例中，水溶液包含大於約25%之水。在某些實施例中，水溶液包含介於約30%至約100%間且包括二者之水。在一些實施例中，水溶液包含100%之水。

在某些實施例中，水溶液包含水與共溶劑之混合物。在某些實施例中，共溶劑係甲醇。

在某些實施例中，此方法另外包含在萃取藜蘆屬植物材料之前自水溶液去除藜蘆屬植物材料之步驟。

在某些實施例中，萃取步驟中所用之溶劑包含一或多種

可視情況與水及/或鹼混合之有機溶劑。在某些實施例中，有機溶劑係甲醇。在某些實施例中，萃取步驟中所用之溶劑包含混合有水之甲醇混合物。在某些實施例中，萃取步驟中所用之溶劑包含混合有鹼性水溶液(例如碳酸鈉水溶液或氫氧化鈉水溶液)之甲醇混合物。在其他實施例中，萃取步驟中所用之溶劑包含混合有有機鹼(例如，三乙胺)之甲醇混合物。

外源酶促方法

本發明亦提供包含使糖基化藜蘆生物鹼與酶在緩衝溶液中接觸以提供去糖基化藜蘆生物鹼之去糖基化方法。

在某些實施例中，糖基化藜蘆生物鹼係3-葡萄糖基-11-去氧芥芬胺，且去糖基化藜蘆生物鹼係環杷明。

在某些實施例中，糖基化藜蘆生物鹼係藜蘆胺葡萄糖苷，且去糖基化藜蘆生物鹼係藜蘆胺。

在某些實施例中，酶係源自或分離自真核細胞之酶(亦即，真核源酶)。在其他實施例中，酶係源自或分離自原核細胞之酶(亦即，原核源酶)。

在某些實施例中，酶係 β -葡萄糖苷酸酶。在某些實施例中， β -葡萄糖苷酸酶係選自蓋罩大蝸牛(*Helix pomatia*) β -葡萄糖苷酸酶、散佈大蝸牛(*Helix aspersa*) β -葡萄糖苷酸酶、歐洲帽貝(*Patella vulgate*) β -葡萄糖苷酸酶、牛10型肝 β -葡萄糖苷酸酶、或源自杏仁之 β -葡萄糖苷酸酶。在某些實施例中， β -葡萄糖苷酸酶係蓋罩大蝸牛 β -葡萄糖苷酸酶。

在某些實施例中，緩衝溶液之pH係約pH 9或低於約pH 9。在某些實施例中，緩衝溶液之pH係約pH 8或低於約pH 8。在某些實施例中，緩衝溶液之pH係約pH 7.5或低於約pH 7.5。在某些實施例中，緩衝溶液之pH係約pH 7或低於約pH 7。在某些實施例中，緩衝溶液之pH係約pH 6或低於約pH 6。在某些實施例中，緩衝溶液之pH係約pH 5.5或低於約pH 5.5。

在某些實施例中，緩衝溶液之pH係介於約4至約9之間且包括二者。在某些實施例中，緩衝溶液之pH介於約5至約8之間且包括二者。在某些實施例中，緩衝溶液之pH介於約5至約7.5之間且包括二者。在某些實施例中，緩衝溶液之pH係約5至約5.5且包括二者。在某些實施例中，緩衝溶液之pH介於約7至約7.5之間且包括二者。

實例性緩衝液包括(但不限於)3-{[叁(羥甲基)甲基]胺基}丙磺酸(TAPS)、N,N-雙(2-羥乙基)甘胺酸(Bicine)、叁(羥甲基)甲基胺(Tris)、N-叁(羥甲基)甲基甘胺酸(Tricine)、4-2-羥乙基-1-六氫吡嗪乙磺酸(HEPES)、2-{[叁(羥甲基)甲基]胺基}乙磺酸(TES)、3-(N-嗎啉基)丙磺酸(MOPS)、六氫吡嗪-N,N'-雙(2-乙磺酸)(PIPES)、二甲基次膦酸(Cacodylate)、2-(N-嗎啉基)乙磺酸(MES)、碳酸緩衝液、磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)、乙酸鹽緩衝液及其鹽。在某些實施例中，緩衝液係乙酸鹽緩衝液。在某些實施例中，緩衝液係Tris緩衝液。

在某些實施例中，緩衝溶液之溫度低於約100°C、低於

約 90°C、低於約 80°C、低於約 70°C、低於約 60°C、低於約 50°C、或低於約 40°C。

在某些實施例中，緩衝溶液之溫度介於約 25°C 至約 75°C 之間且包括二者。在某些實施例中，緩衝溶液之溫度介於約 25°C 至約 50°C 之間且包括二者。在某些實施例中，緩衝溶液之溫度介於約 25°C 至約 40°C 之間且包括二者。在某些實施例中，緩衝溶液之溫度係約 37°C 或低於約 37°C。

在某些實施例中，接觸步驟包含使糖基化藜蘆生物鹼與酶接觸一段足以使約 10% 糖基化藜蘆生物鹼轉化為去糖基化藜蘆生物鹼之時間。在某些實施例中，接觸步驟包含使糖基化藜蘆生物鹼與酶接觸一段足以使至少約 25% 糖基化藜蘆生物鹼轉化為去糖基化藜蘆生物鹼之時間。在某些實施例中，接觸步驟包含使糖基化藜蘆生物鹼與酶接觸一段足以使至少約 50% 糖基化藜蘆生物鹼轉化為去糖基化藜蘆生物鹼之時間。在某些實施例中，接觸步驟包含使糖基化藜蘆生物鹼與酶接觸一段足以使至少約 75% 糖基化藜蘆生物鹼轉化為去糖基化藜蘆生物鹼之時間。在某些實施例中，接觸步驟包含使糖基化藜蘆生物鹼與酶接觸一段足以使至少約 95% 糖基化藜蘆生物鹼轉化為去糖基化藜蘆生物鹼之時間。

在某些實施例中，接觸步驟包含使糖基化藜蘆生物鹼與酶接觸一段足以將所有糖基化藜蘆生物鹼轉化為去糖基化藜蘆生物鹼之時間。

在某些實施例中，接觸步驟包含使糖基化藜蘆生物鹼與

酶接觸至少30分鐘。在某些實施例中，接觸步驟包含使糖基化藜蘆生物鹼與酶接觸至少1小時。在某些實施例中，接觸步驟包含使糖基化藜蘆生物鹼與酶接觸至少2小時。在某些實施例中，接觸步驟包含使糖基化藜蘆生物鹼與酶接觸至少5小時。在某些實施例中，接觸步驟包含使糖基化藜蘆生物鹼與酶接觸至少10小時。在某些實施例中，接觸步驟包含使糖基化藜蘆生物鹼與酶接觸至少15小時。

在某些實施例中，本發明提供一種去糖基化方法，其包含使3-葡萄糖基-11-去氧芥芬胺與 β -葡萄糖苷酸酶真核源酶在緩衝溶液中接觸以提供環杷明。

在某些實施例中，酶係蓋罩大蝸牛 β -葡萄糖苷酸酶真核源酶。

範例

設計一系列研究以測定3-葡萄糖基-11-去氧芥芬胺是否可經由酶促去糖基化轉化為環杷明。該等研究展示，不僅粗萃取混合物中之3-葡萄糖基-11-去氧芥芬胺可經酶促轉化為環杷明，而且可將藜蘆胺葡萄糖苷轉化為藜蘆胺。使用各種來源之不同酶證實酶促轉化。

亦發現，可在萃取前藉由用水溶液處理收穫之藜蘆屬植物材料實施3-葡萄糖基-11-去氧芥芬胺至環杷明、以及藜蘆胺葡萄糖苷至藜蘆胺之轉化。先前外源酶研究支持以下假說：在萃取前用水處理時，藜蘆屬植物材料中存在之一或多種內源酶可將3-葡萄糖基-11-去氧芥芬胺轉化為環杷明且將藜蘆胺葡萄糖苷轉化為藜蘆胺。如本文所述，溫度

及pH研究另外支持此假說。

引入以下實例僅用於闡釋本發明某些態樣及實施例之目的，而非意欲限制本文所揭示內容。

A. 收穫生物質

加州藜蘆通常在每年的八月至十月收穫。在可獲得之時間及地點手動及/或使用農業設備自地面挖取植物材料。通常，自植物分離根球莖、實穗及根莖且手動將其切成小片，且另外乾燥2-4周之時間。隨後將乾燥材料碾碎成微細顆粒(亦即，生物質)。微細顆粒之水份含量介於7%至10%間。許多粗生物質含有不同量之環杷明及3-葡萄糖基-11-去氧芥芬胺(參見圖2及3)。在萃取之前，於約2°C -8°C下將生物質儲存在襯貼聚丙烯之密封不透明袋中。

B. 分析方法

一般HPLC方法：Waters Symmetry C18管柱，4.6x150 mm，5微米，(P/N WAT045905)；流動相：在0時刻時20/80 MeCN/0.1% TFA至在12分鐘時35/65 MeCN/0.1% TFA、之後再平衡5分鐘；流速：1.5 mL/min；注射：10微升；檢測器：215 nm；溫度：40°C。

C. 外源酶促研究

所有酶均係呈純化分離物或粗萃取物形式供應且呈溶液或稀釋於緩衝溶液中之固體形式供應。基於供應商在包裝資訊上提供之資訊計算酶活性濃度。製得適當稀釋度以達成期望酶濃度。

反應通常在溫控加熱區塊中培育之Eppendorf管中在緩

衝溶液中於約37°C下實施約22小時。實例性緩衝液提供於表1中。

表 1.

通用名	緩衝範圍	化合物全名
TAPS	7.7-9.1	3 - {[叁(羥甲基)甲基]胺基}丙磺酸
Bicine	7.6-9.0	N,N-雙(2-羥乙基)甘胺酸
Tris	7.5-9.0	叁(羥甲基)甲胺
Tricine	7.4-8.8	N-叁(羥甲基)甲基甘胺酸
HEPES	6.8-8.2	4-2-羥乙基-1-六氫吡嗪乙磺酸
TES	6.8-8.2	2 - {[叁(羥甲基)甲基]胺基}乙磺酸
MOPS	6.5-7.9	3-(N-嗎啉基)丙磺酸
PIPES	6.1-7.5	六氫吡嗪-N,N'-雙(2-乙磺酸)
Cacodylate	5.0-7.4	二甲基次膦酸
MES	5.5-6.7	2-(N-嗎啉基)乙磺酸
碳酸	7.35-7.45	碳酸-碳酸氫鹽溶液
PBS	7.4	磷酸鹽緩衝鹽水
乙酸鹽	3.7-5.6	乙酸-乙酸鈉溶液

將純淨3-葡萄糖基-11-去氧芥芬胺(約7 mg)或含有3-葡萄糖基-11-去氧芥芬胺之粗藜蘆萃取物(約16 mg)溶於500 uL於乙醇中之10% DMSO中。向450 uL緩衝溶液(0.1M Tris緩衝液，pH 7.2；或0.1 M乙酸鹽緩衝液，pH 5.1)中添加50 uL含有3-葡萄糖基-11-去氧芥芬胺之溶液(1當量)及50 uL酶之溶液(約2個活性單位當量)。將混合物於37°C下加熱22

小時。此時，將 50 uL 渾濁反應懸浮液與 50 uL MeOH 組合。藉由 HPLC 確定酶促轉化。各種實例性酶之結果匯總於表 2 中。

表 2

酶	宿主有機體	來源	CS至CA之轉化
β -葡萄糖苷酸酶	蓋罩大蝸牛	Calbiochem 347420	是
β -葡萄糖苷酸酶	H-1型蓋罩大蝸牛	Sigma G0715	是
β -葡萄糖苷酸酶	HP-2型蓋罩大蝸牛	Sigma G7017	是
β -葡萄糖苷酸酶	H3型蓋罩大蝸牛	Sigma G8885	是
β -葡萄糖苷酸酶	H-5型蓋罩大蝸牛	Sigma G1512	是
β -葡萄糖苷酸酶	散佈大蝸牛	Sigma G4259	是
β -葡萄糖苷酸酶	L-II型歐洲帽貝(鑰孔蟲戚(keyhole limpet))	Sigma G8132	是
β -葡萄糖苷酸酶	來自肝之牛10型	Sigma G0501	是
β -葡萄糖苷酶	杏仁	Sigma G4511	是
α -葡萄糖苷酶	釀酒酵母菌 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	Sigma G0660	未觀測到
β -葡萄糖苷酸酶	大腸埃希桿菌(<i>E. coli</i>)	Sigma G8162	未觀測到
β -葡萄糖苷酸酶	以大腸埃希桿菌表現之大腸埃希桿菌	Sigma G8295	未觀測到
α -葡萄糖苷酶	嗜熱脂肪芽孢桿菌	Sigma G3651	未觀測到

如圖 4 及 5 中所示，使用蓋罩大蝸牛 β -葡萄糖苷酸酶在乙酸鹽或 Tris 緩衝液中將純化 3-葡萄糖基-11-去氧芥芬胺轉化為環杷明。圖 6 及 7 展示粗藜蘆萃取物之類似結果。

一般而言，已發現於約 37°C 下在約 pH 7.2 及約 pH 5.1

下，此研究中所用之外源酶可有效將3-葡萄糖基-11-去氧芥芬胺轉化為環杷明，其中約5.1之pH獲得更完全轉化(參見圖5)。亦觀察到此研究中所用之真核源酶比原核源酶更有效。在使用粗生物鹼萃取物之反應中，亦觀察到藜蘆胺葡萄糖苷轉化為藜蘆胺(參見圖6)。

D. 第一方案

(i) 生物質之萃取

使用有機溶劑並添加5%氫氧化銨水溶液之萃取比單獨使用有機溶劑或使用10%或20%氫氧化銨水溶液及有機溶劑提供較佳環杷明產率。比率為3:1之有機溶劑與5%氫氧化銨水溶液提供具有最均勻並易於混合之生物質的混合物。兩次萃取通常可自生物質萃取出大部分環杷明，後續萃取通常提供具有較少環杷明之更粗萃取物。3-葡萄糖基-11-去氧芥芬胺通常亦存在於萃取物中。各種萃取溶劑之結果匯總於表3中。

表 3.

萃取溶劑	環杷明(mg/kg)					3-葡萄糖基-11-去氧芥芬胺 (mg/kg) 根據CA標準曲線估計					CA + CS (mg/kg)
	第一次	第二次	第三次	總量		第一次	第二次	第三次	總量		
5% AcOH	625	209	22	855		226.3	65.6	0.0	292	1147	
EtOH	495	15	0	510		195.5	0.0	0.0	196	706	
IPA	292	25	0	317		71.8	0.0	0.0	72	389	
乙腈	48	0	0	48		0.0	0.0	0.0	0	48	
吡啶	469	85	0	554		199.4	10.9	0.0	210	765	
THF	425	7	0	431		112.6	0.0	0.0	113	544	
二噁烷	226	0	0	226		81.0	0.0	0.0	81	307	
MEK	188	0	0	188		0.0	0.0	0.0	0	188	
DME	138	263	0	401		2.9	0.0	0.0	3	404	
DCM/5%NH ₄ OH	651	235	44	930		270	288	60	618	1548	
MTBE/5%NH ₄ OH	681	292	51	1024		235	235	85	555	1579	
苯/5%NH ₄ OH	790	282	4	1076		0	0	0	0	1076	
甲苯/5%NH ₄ OH	770	213	0	983		0	0	0	0	983	
環己烷/5%NH ₄ OH	770	354	47	1171		0	0	0	0	1171	
MIBK/5% NH ₄ OH	608	347	26	981		283	283	83	649	1630	
EtOAc/5%NH ₄ OH	345	191	17	553		204	211	9	424	977	

	環杷明(mg/kg)				3-葡萄糖基-11-去氧芥芬胺 (mg/kg) 根據CA標準曲線估計					
	365	223	15	603	147	236	122	505	1108	
iPrOAc/5%NH ₄ OH	365	223	15	603	147	236	122	505	1108	
2-MeTHF/5%NH ₄ OH	373	303	31	707	343	303	58	704	1411	
MTBE	104	6	nd	110	0	0	nd	0	110	
MTBE/5%NH ₄ OH	681	292	51	1024	235	235	85	555	1579	
MTBE/5%Na ₂ CO ₃	395	286	58	739	116	172	93	381	1120	
MTBE/5%AcOH	191	52	52	295	0	0	0	0	295	
環己烷	6	0	nd	6	0	0	nd	0	6	
環己烷/5%NH ₄ OH	770	354	47	1171	0	0	0	0	1171	
環己烷/5%Na ₂ CO ₃	443	325	82	850	0	nd	nd	0	850	
環己烷/5%AcOH	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

大規模萃取：在室溫下將約6 kg生物質懸浮於含有二氯甲烷(CH_2Cl_2)之5%氫氧化銨水溶液之混合物中達16小時。將溶劑輕輕倒出並濃縮成膏糊，將其吸收於THF/己烷(1:3)混合物中。在放置2至3天後，將溶劑輕輕倒出並濃縮成黏性油。將粗製油裝載至矽膠管柱上並用EtOAc/ CH_2Cl_2 /MeOH/ Et_3N (8:1:1:0.1)洗脫。將富含環杷明之部分濃縮至 $1/4$ 體積並過濾出沉澱之環杷明。藉由進一步用丙酮沉澱獲得更多環杷明。在熱MeOH中重結晶組合之環杷明。此方案通常獲得1 g環杷明/千克乾燥生物質。藉由此方法獲得之環杷明的純度超過95%，如藉由HPLC所測定。

(ii) 萃取物之純化

使11 g粗萃取物(如上所述獲得)在50 mL甲醇中攪拌過夜、之後過濾以獲得粗製濾液。向濾液中添加矽藻土(25 g)並藉由旋轉蒸發將混合物濃縮至乾燥。用乙酸乙酯洗脫所得乾燥粉末以獲得含有藜蘆胺與環杷明混合物之第一粗製部分、之後用甲醇洗脫以獲得含有3-葡萄糖基-11-去氧芥芬胺之第二粗製部分。將第二部分濃縮至4克粗物質。

將自第二部分獲得之粗物質裝載至矽膠管柱並用1:2:4 MeOH:EtOAc:己烷(0.5%三乙胺作為添加劑)洗脫以獲得3-葡萄糖基-11-去氧芥芬胺(85%純，如藉由HPLC所測定)。將粗3-葡萄糖基-11-去氧芥芬胺用丙酮研磨並輕輕倒出，並另外藉由矽膠層析(1:2:4 MeOH:EtOAc:己烷洗出液，含有0.5%三乙胺作為添加劑)純化以獲得純化之3-葡萄糖基-11-去氧芥芬胺，將其自甲醇重結晶以獲得200 mg 3-葡萄

糖基-11-去氧芥芬胺，其如藉由HPLC所測定為97%純。

B. 第二方案-水性預處理

發現在萃取之前用水溶液處理藜蘆屬植物材料會降低植物材料中所存在之3-葡萄糖基-11-去氧芥芬胺及藜蘆胺葡萄糖苷之量並增大單離環杷明及藜蘆胺之產率。此方案代表，與上述方案相比環杷明之產率增大2至5倍。

(i) 用100% 甲醇萃取

將13.2 g乾燥之生物質用甲醇充分萃取(將每單位重量經研磨/乾燥加州藜蘆與8-10體積MeOH混合，且在室溫下振盪混合物24小時)並過濾。對所過濾生物質再重複兩次萃取過程，總共3次萃取。HPLC分析展示22 mg環杷明(CA)(生物質總重量之0.17%)及65 mg (0.49%) 3-葡萄糖基-11-去氧芥芬胺(CS)(圖8)。若所有3-葡萄糖基-11-去氧芥芬胺均轉化為環杷明，則理論總量係0.66%(理論總量係藉由取CA含量與針對分子量差異校正之CS含量之和確定(例如， $CA + CS \cdot (mw_{CA}/mw_{CS}) = \text{理論CA}$)。可萃取固體之百分比係25.7%。

(ii) 用水處理、之後100% 甲醇萃取

將10.0 g乾燥生物質在室溫下與50 mL水攪拌一起約1.5小時。觀察到水性濾液中之3-葡萄糖基-11-去氧芥芬胺(CS)在小於1小時內消失，如藉由HPLC所監測。隨後添加50 mL MeOH且過濾漿液，得到含有313 mg環杷明(理論最大量666 mg之47%)之78 mL濾液。隨後用65 mL MeOH重新萃取生物質，得到另外18.2 mg環杷明(CA)，總共331.2

mg。

圖 8 展示自 (a) 100% MeOH 及 (b) 用水處理、之後用 100% MeOH 萃取獲得之萃取物的 HPLC 曲線。層析圖顯示，在用水處理之試樣中，3-葡萄糖基-11-去氧芥芬胺 (CS) 及 藜蘆胺葡萄糖苷 (VS) 降低且 環杷明 (CA) 及 藜蘆胺 (VA) 二者升高。

圖 9 繪示各種生物質試樣之 3-葡萄糖基-11-去氧芥芬胺至環杷明的轉化。在各情形下，在用水處理之後進行 MeOH 萃取時，生物質試樣存在中之環杷明的總濃度升高。

(iii) 用存於水中之 50% 甲醇萃取

將兩批 100 g 生物質在室溫下攪拌過夜，一批與 500 mL MeOH 且另一批與 500 mL 1:1 MeOH/水一起攪拌。過濾漿液並用 300 mL 相同溶劑重新萃取各批生物質。MeOH 萃取獲得 152 mg 環杷明，而 MeOH/水萃取物含有 349 mg 環杷明。

圖 10 展示自 (a) 100% MeOH 及 (b) 用存於水中之 50% MeOH 處理、之後用存於水中之 50% MeOH 萃取獲得之萃取物的 HPLC 曲線。層析圖顯示，在用存於水中之 50% 甲醇處理之試樣中，3-葡萄糖基-11-去氧芥芬胺 (CS) 及 藜蘆胺葡萄糖苷 (VS) 降低且 環杷明 (CA) 及 藜蘆胺 (VA) 二者升高。

(iv) 在用水溶液處理期間之溫度影響

將生物質之兩個試樣 (2.0 g 含有 0.17% CA 及 0.49% CS 之生物質，CS/CA 比 = 2.88，如藉由 MeOH 萃取之 HPLC 分析所測定) 以及 10 mL 於水中之 50% MeOH 各放置於 50 mL 離心

管中。振盪該等管且將一個管放置於40℃浴液中且另一管置於室溫下。移出1 mL試樣並在不同時間過濾至HPLC小瓶中。藉由HPLC測定各試樣中之環杷明(CA)及3-葡萄糖基-11-去氧芥芬胺(CS)的濃度(參見表4)。

表 4.

時間(Min)	溫度℃	mg/mL CA	mg/mL CS	CS/CA比
0	---	---	---	2.88
45	22	0.47	0.17	0.36
45	40	0.06	0.03	0.47
165	22	0.69	0.08	0.11
165	40	0.26	0.05	0.20
270	22	0.67	0.0	0.0
270	40	0.55	0.07	0.14

在單獨實驗中，將乾燥生物質加熱至100℃，隨後冷卻至室溫並用水處理。MeOH萃取之HPLC分析展示無可檢測到之3-葡萄糖基-11-去氧芥芬胺至環杷明的轉換(亦即，CS/CA比未變化)。結果指示，若在用水處理前首先將生物質加熱至100℃，則可停止或減小生物質中3-葡萄糖基-11-去氧芥芬胺至環杷明的轉化。

(v) 在用水溶液處理期間之pH影響

將生物質之兩個試樣(2.0 g含有0.17% CA及0.49% CS之生物質，CS/CA比=2.88，如藉由MeOH萃取之HPLC分析所測定)以及5 mL MeOH及5 mL 0.5 M碳酸鈉溶液各放置於50 mL離心管中。振盪該等管且將一個管放置於40℃浴液中且另一管置於室溫下。移出1 mL試樣並在不同時間過濾至

HPLC小瓶中。45分鐘後，兩個試樣之HPLC分析展示無可檢測到之3-葡萄糖基-11-去氧芥芬胺至環杷明的轉化(亦即，CS/CA比未變化)。結果指示，若用鹼處理或若與生物鹼接觸之水溶液係鹼溶液，則可停止或減小生物質中3-葡萄糖基-11-去氧芥芬胺至環杷明的轉化。

(vi)用水處理、之後用鹼性或中性甲醇萃取：使用碳酸鈉之實驗

將兩份100 g生物質試樣稱量至兩個各自為750 mL之兩個瓶子中。向各瓶子中添加500 mL水且經1.5小時之時間段偶爾振盪試樣。隨後單獨過濾兩個試樣，得到300 mL具有14.5 g固體及僅痕量環杷明(CA)之水性濾液。濾液中未觀察到3-葡萄糖基-11-去氧芥芬胺(CS)(如藉由HPLC所測定)，此表明其均已轉化為環杷明。

在40℃下用甲醇(3×150 mL)萃取第一試樣(標記「中性」)三次。組合之中性萃取物含有0.50 g環杷明(理論最大量0.66 g之75%)。用300 mL沸騰MeOH之第四次萃取生物質使總量為0.54 g(理論量之82%)。

用25 mL 1 M碳酸鈉溶液鹼化第二試樣(標記「鹼性」)。隨後在40℃下用甲醇(3×150 mL)萃取此試樣三次。在第二次鹼性萃取前而非第三次萃取前向試樣中添加額外25 mL 1 M碳酸鈉溶液。組合之鹼性萃取物含有0.62 g環杷明(理論最大量0.66 g之94%)。用300 mL沸騰MeOH之第四次萃取生物質使總量為0.67 g(理論量之100%)。

大規模研究：向10 L圓底燒瓶中添加1000 g生物質及5.0

L去離子水且在室溫下將混合物緩慢混合1.5 hr。將此漿液在417號硬化紙上並經由矽藻土545床過濾。水性濾液之分析顯示存在0.069 g環杷明(總量之1%)。

將濕潤生物質返回至圓底燒瓶中並用125 mL 2 M碳酸鈉及4 L MeOH處理。將混合物在40°C浴液中緩慢混合1.5小時且隨後使用具有417號紙之24 cm布氏(Buchner)漏斗過濾。在此情形下過濾極快。用MeOH再重複兩次萃取程序。在第二次萃取前而非第三次萃取前向試樣中添加250 mEq碳酸鈉。結果匯總於下表5中。

表 5.

萃取編號	體積 (L)	[環杷明] ^a :g/L	計算之環杷明(g) ^b	實際環杷明(g) ^c
1	4.0	0.99	3.96	3.96
2	5.1	0.45	2.29	2.29
3	3.8	0.11	0.41	0.41
總量	12.9	1.55	6.66	6.66

^a如藉由HPLC所觀測；^b 理論/計算量；^c 萃取時獲得之量

發現組合萃取物含有151 g固體及生物質試樣中可獲得之100%理論最大量之環杷明。萃取物中之環杷明具有4.4%之純度(如藉由HPLC所測定)。

(vii)用水處理、之後用鹼性或中性甲醇萃取：使用三乙胺之實驗

將兩個15 g試樣放置於兩個各自為250 mL之離心瓶中並用150 mL水處理，1小時中對其偶爾振盪。此後，離心兩

個試樣並輕輕倒出水。回收100 mL水且在水性萃取物中發現2.6 mg環杷明。3-葡萄糖基-11-去氧芥芬胺似乎完全轉化為環杷明，此乃因水性萃取物中僅有痕量3-葡萄糖基-11-去氧芥芬胺。

一個試樣(標記「中性」)用50 mL MeOH萃取四次。每次萃取需要將試樣與溶劑一起振盪、離心、及經由1號濾紙真空過濾上清液。將留於紙上之任何生物質返回至瓶子中且重複此過程。組合之中性MeOH萃取物含有61 mg環杷明(理論量之61%)。

如上處理第二試樣(標記「鹼性」)，只是萃取溶劑係MeOH與三乙胺之95:5混合物。鹼性試樣之過濾比中性試樣慢。然而，鹼性萃取物中之環杷明的濃度較高。組合之鹼性MeOH萃取物含有73 mg環杷明(理論量之73%)。

(viii) 最優化萃取步驟

(a) 用EtOAc/己烷/NaOH液-液萃取

在低壓下蒸發50% MeOH中之含有約248 mg環杷明的萃取物以去除大部分甲醇。藉助添加NaOH將溶液之pH調節至9.2且用存於己烷中之50%乙酸乙酯(200 mL)萃取混合物。有機相中形成乳液，且使組合之有機層及乳液層穿過過濾器中之無水硫酸鈉進入乾淨圓底燒瓶中。蒸發萃取物，留下含有154 mg環杷明(29%純度，62%回收率)之淡黃色固體(0.5 g)。水層之HPLC分析顯示不存在環杷明。

(b) 用EtOAc/己烷/碳酸鈉之液-液萃取

在低壓下濃縮含有約169 mg環杷明之555 mL甲醇/水萃

取物以獲得 275 mL 漿液。藉助添加 10 mL 1M 碳酸鈉溶液將漿液之 pH 調節至 9.5。隨後用存於己烷中之 50% 乙酸乙酯 (2×150 mL) 萃取漿液且藉助各萃取分離乳液層及有機層。離心來自兩個萃取之組合乳液層，得到界限分明的有機層，將其與圓底燒瓶中之剩餘有機層組合。不實施乾燥劑乾燥。蒸發提供含有 166 mg 環杷明 (18.8% 純度，98% 回收率) 之 0.88 g 黃色固體。水層之 HPLC 分析顯示不存在環杷明。

(c) 1 kg 萃取物之液-液萃取

於低壓下使用 55-60°C 浴液在 10 L 旋轉式蒸發燒瓶中濃縮 12.9 L MeOH 萃取物。自殘餘黑色焦油輕輕倒出 1.55 L 黑色懸浮液至分離漏斗中且用 1×1000 mL 及 3×500 mL 1:1 EtOAc/己烷萃取 (在室溫下焦油僅微溶於 EtOAc 中)。藉由第四次萃取，水相中僅存在 32 mg 環杷明 (對應於總量之 0.5%)。獲得總共 1.8 L 萃取物且 HPLC 分析顯示，萃取物中存在具有 14.3% 純度之 3.9 g 環杷明 (理論量之 59%)。此結果表明，剩餘環杷明 (2.7 g) 一定存在於黑色焦油中。因此，在自水層輕輕倒出液體後將燒瓶中所剩餘黑色焦油及剩下之額外焦油溶於 725 mL MeOH 中並藉由 HPLC 分析。環杷明係存在於焦油中，其中 20 g 固體中含 2.78 g，對應於 14% 純度。

用 EtOAc/己烷重新萃取黑色焦油：用水將 50 mL 甲醇焦油溶液稀釋至 250 mL 並用 1:1 EtOAc/己烷重新萃取。添加硫酸鈉以改良水/有機層之分離。用 100 mL 溶劑之單一萃

取在有機相中產生70%環杷明。在第二實驗中，將100 mL 甲醇焦油溶液蒸發至50 mL並用400 mL水稀釋。對此用2×100 mL 1:1 EtOAc/己烷萃取，在水相中僅留下2%環杷明且在有機相中72%。剩餘26%留在焦油中。

在矽膠上乾燥焦油：在2 g矽膠上乾燥含有7.6 mg環杷明之2 g 甲醇焦油溶液。將0.5 g混合物放置於空的3 mL固相萃取管柱中並用5 mL EtOAc萃取。大部分環杷明留在管柱上。使用EtOAc/三乙胺(TEA)作為洗出液實施第二實驗，其中自氧化矽洗脫約80%環杷明。使用35%丙酮及0.5% TEA實施第三實驗，其中自氧化矽洗脫約84%環杷明。

在矽藻土上乾燥焦油：在2 g矽藻土上乾燥含有7.6 mg環杷明之2 g 甲醇焦油溶液。用35% EtOAc及TEA洗脫產生具有約49%純度之產物，其中13%之環杷明留在矽藻土上。用100% EtOAc、存於己烷中之50%丙酮及100%丙酮洗脫各自從矽藻土獲得幾乎定量回收率之環杷明，其分別提供具有28%、22%及20%純度之環杷明。

將剩餘甲醇焦油溶液(525 mL，其中14.2 g固體中含有2.0 g環杷明)蒸發至約300 mL並與180 g矽藻土503在1 L凍乾瓶中混合。在低壓下去除額外100 mL MeOH且隨後將混合物放置於乾燥桌上並在100℃烘箱中乾燥至恆定重量。分析展示散粉末(194 g)中之環杷明含量係1.01%。

在60 mL玻璃燒結漏斗中用130 mL EtOAc萃取17 g散粉末。所得琥珀色萃取物在620 mg固體中含有158 mg(93%回收率)環杷明(25%純度)。矽藻土粉末之MeOH洗滌提供於

586 mg 固體中之13 mg 環杷明。

(ix) 含環杷明萃取物之純化

(a) 步驟1：矽膠層析

薄層層析(TLC)實驗指示，使用存於己烷中之50%丙酮及5%三乙胺(TEA)作為洗出液可良好地單離環杷明與藜蘆胺(環杷明之 $R_f = 0.4$)。

使用存於己烷中之40%丙酮及5%三乙胺在 1.2×15 cm 氧化矽 Biotage 12 M 管柱上實施藉由矽膠層析之分離。用丙酮洗滌管柱且用己烷均衡。將第一液-液萃取產物溶於10 mL 乙酸乙酯中並裝載於管柱上。收集20 mL 部分。在部分2中洗脫大部分藜蘆胺，而在部分3及4中洗脫環杷明。組合部分3及4之試樣中的環杷明具有如藉由HPLC測定之73.1%分析純度(標準化回收率=99%；以理論上起始材料中存在之145 mg 環杷明計回收率=60%)。

使用存於己烷中之35%丙酮及5%三乙胺流動相在 1.2×15 cm 氧化矽 Biotage 12 M 管柱上實施第二小規模矽膠層析實驗。用己烷平衡管柱且將含有150 mg 環杷明之0.80 g 液-液萃取產物溶於5 mL EtOAc 中並裝載於管柱上。流動相係以5 mL/min 流動且收集20 mL 部分。在實驗中充分分離藜蘆胺及環杷明且於含有藜蘆胺之初期部分中之環杷明僅損失5 mg。環杷明收集液含有純度為76%之141 mg 環杷明(94%回收率)而僅0.5 面積百分比藜蘆胺。標準化回收率係97%。

(b) 步驟2：研磨

環杷明收集液(自使用存於己烷中之35%丙酮及0.5%三乙胺流動相實施之層析實驗而提供)之部分蒸發可沉澱出環杷明。

將收集液蒸發至乾燥且隨後用10 mL存於己烷中之35%丙酮超音波處理1分鐘。在玻璃燒結過濾器上回收不溶產物並乾燥，提供具有95%分析純度及93.8%層析純度之白色固體(110 mg)。濾液中存在22.6 mg環杷明(84%回收率)。

(c) 步驟3：結晶

對研磨產物之小規模實驗指示，環杷明自熱乙醇、異丙醇及甲苯結晶且可在室溫下藉由添加己烷迫使自THF重結晶。亦可使用乙醇及甲苯二者藉由共沸去除水而去除水合之水以提供無水環杷明。

將100 mg研磨產物溶於5 mL熱甲苯中。沸騰使體積降低至約3 mL且隨後在4°C下將溶液冷凍過夜。在小玻璃燒結過濾器上收集晶體並用最小量之冷甲苯及5 mL室溫之己烷洗滌。晶體具有97.7%之分析純度及96.4%之層析純度。

E. 製造方案

向1000 L反應容器/萃取罐中添加約200 kg生物質且添加約45 L水/18 kg生物質袋。在無攪拌下將混合物保持於室溫下2.5小時(在完成裝載時開始)。此時，藉由過濾自容器去除水。

向含有生物質之容器中添加8升MeOH/千克生物質且在攪拌下將混合物維持於40-50°C下達最少4小時，且收集

MeOH萃取物。將此萃取過程重複2次以達成完全產率。

濃縮甲醇萃取物直至固體開始沉澱。將固體再溶解於最小體積之MeOH中並經小型矽藻土過濾以去除任何不溶材料。將所得MeOH溶液與矽藻土混合並乾燥至粉末。藉由加熱至40-50°C之EtOAc徹底洗脫粉末獲得富含環杷明之萃取物，且將EtOAc洗脫液濃縮至粗物質。

藉由使用存於庚烷中之35%丙酮(含有0.5%三乙胺作為添加劑)作為洗脫液的矽膠層析純化粗物質。自此純化步驟收集之部分提供如HPLC測定之70-80%純度的環杷明。藉由用EtOAc研磨使環杷明材料之純度增大至超過95%。

等效物

彼等熟習此項技術者將認識到或僅使用常規實驗即可確定本文所述本發明具體實施例之許多等效物。這些等效物均意欲涵蓋在下述申請專利範圍內。

【圖式簡單說明】

圖1繪示3-葡萄糖基-11-去氧芥芬胺(CS)、環杷明(CA)、藜蘆胺葡萄糖苷(VS)及藜蘆胺(VA)之化學結構。

圖2繪示加州藜蘆之不同生物質試樣中存在之環杷明的量(以g/kg表示)。

圖3繪示加州藜蘆之不同生物質試樣中存在之環杷明(CA)及3-葡萄糖基-11-去氧芥芬胺(CS)的量(以g/kg表示)。

圖4繪示經由使用 β -葡萄糖苷酸酶(蓋罩大蝸牛)在乙酸鹽緩衝液(pH 5.1)中去糖基化之純化3-葡萄糖基-11-去氧芥芬胺至環杷明的酶促轉化，如藉由液相層析-質譜(LCMS)所

監測。

圖 5 繪示比較使用 β -葡萄糖苷酸酶(蓋罩大蝸牛)在乙酸鹽緩衝液(pH 5.1)及 Tris 緩衝液(pH 7.2)中之純化 3-葡萄糖基-11-去氧芥芬胺至環杷明的酶促轉化效率之 HPLC 曲線。

圖 6 繪示 LCMS 曲線，其展示對應於用 β -葡萄糖苷酸酶(蓋罩大蝸牛)處理之粗藜蘆萃取物中的 3-葡萄糖基-11-去氧芥芬胺、藜蘆胺葡萄糖苷、環杷明及藜蘆胺之峰。

圖 7 繪示酶濃度對 3-葡萄糖基-11-去氧芥芬胺至環杷明轉化之影響。

圖 8 繪示在用水處理、之後 MeOH 萃取時粗藜蘆萃取物中之糖基化生物鹼的轉化。

圖 9 繪示各種生物質試樣之 3-葡萄糖基-11-去氧芥芬胺至環杷明的轉化。

圖 10 繪示在用 MeOH 或存於水中之 50% MeOH 處理並萃取時粗藜蘆萃取物中之糖基化生物鹼的轉化。

圖 11 比較在以下各種條件下處理生物質之結果：(i)用存於水中之 50% MeOH 處理，之後萃取，如圖 10 所述；(ii)用 100% MeOH 處理，之後萃取，如圖 10 所述；及(iii)用水處理，之後用 MeOH 萃取，如圖 8 所述。

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：98 1220 61

※ 申請日：98. 6. 3 0

※IPC 分類：~~B01D~~ C07D 491/048

A61K 36/896 (2006.01)

A61K 31/4355 (2006.01)

(2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

環杷明(CYCLOPAMINE)之單離

ISOLATION OF CYCLOPAMINE

二、中文發明摘要：

本發明提供經設計以最優化來自藜蘆屬植物(*Veratrum* plant)材料及/或藜蘆屬植物材料之萃取物的藜蘆生物鹼產率之去糖基化方法。

三、英文發明摘要：

Provided are deglycosylation methods designed to optimize the yield of *Veratrum* alkaloid from *Veratrum* plant material and/or from an extract of *Veratrum* plant material.

七、申請專利範圍：

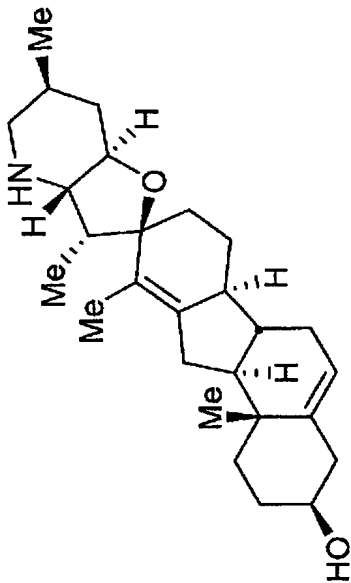
1. 一種自藜蘆屬植物(*Veratrum plant*)材料單離去糖基化藜蘆生物鹼之方法，其包含以下步驟：
 - (i) 提供包含糖基化藜蘆生物鹼之藜蘆屬植物材料；
 - (ii) 使該藜蘆屬植物材料與水溶液接觸；及
 - (iii) 用溶劑萃取該藜蘆屬植物材料以提供包含該去糖基化藜蘆生物鹼之萃取物。
2. 如請求項1之方法，其中該水溶液之pH係約8或低於約8。
3. 如請求項1之方法，其中該水溶液之pH係介於約4與約8之間。
4. 如請求項1之方法，其中該水溶液經緩衝。
5. 如請求項1之方法，其中該水溶液係中性。
6. 如請求項1之方法，其中該水溶液係酸性。
7. 如請求項1之方法，其中該水溶液包含大於約25%之水。
8. 如請求項1之方法，其中該水溶液係100%水。
9. 如請求項1之方法，其中該水溶液係在低於約100°C之溫度下。
10. 如請求項1之方法，其中該糖基化藜蘆生物鹼係3-葡萄糖基-11-去氧芥芬胺(*cycloposine*)且該去糖基化藜蘆生物鹼係環杷明(*cyclopamine*)。
11. 如請求項1之方法，其中該糖基化藜蘆生物鹼係藜蘆胺葡萄糖苷且該去糖基化藜蘆生物鹼係藜蘆胺。
12. 如請求項1之方法，其中該接觸步驟包含使該植物材料

與水溶液接觸一段足以使至少約50%的該糖基化藜蘆生物鹼轉化為去糖基化藜蘆生物鹼之時間。

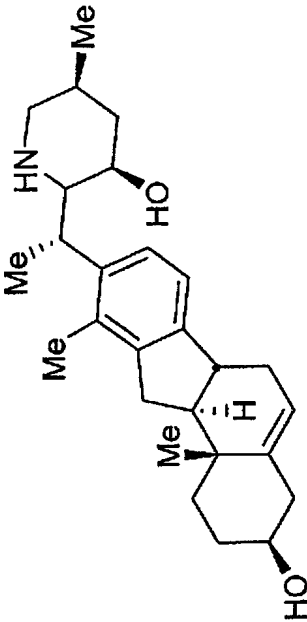
13. 如請求項1之方法，其中在該接觸步驟期間，藉由一或多種該植物材料中存在之內源酶將該糖基化藜蘆生物鹼轉化為去糖基化藜蘆生物鹼。
14. 如請求項1之方法，其中該接觸步驟包含使該藜蘆屬植物材料與水溶液接觸至少約10分鐘。
15. 如請求項1之方法，其中該溶劑包含一或多種有機溶劑。
16. 如請求項15之方法，其中該有機溶劑係選自由以下組成之群：有機醇、酯、醚、鹵代烴、烴、芳香族化合物及雜芳香族化合物、及其兩者或更多者之混合物。
17. 如請求項15之方法，其中該有機溶劑係選自由以下組成之群：甲醇、乙醇、異丙醇、2-丁醇、正丁醇、丙酮、甲基乙基酮、乙酸乙酯、乙酸異丙基酯、二氯甲烷、氯仿、苯甲醚、苯、甲苯、二甲苯、己烷、庚烷、四氫呋喃、二噁烷及二乙基醚、及其兩者或更多者之混合物。
18. 如請求項17之方法，其中該有機溶劑係甲醇。
19. 如請求項1之方法，其中該溶劑包含一或多種有機溶劑與水之混合物。
20. 如請求項19之方法，其中該溶劑包含甲醇與水之混合物。
21. 如請求項1之方法，其中該溶劑包含一或多種有機溶劑與鹼之混合物。

22. 如請求項21之方法，其中該鹼係鹼性水溶液。
23. 如請求項22之方法，其中該鹼性水溶液包含氫氧化銨、氫氧化鈉、碳酸鈉、碳酸氫鈉、乙酸鈉、檸檬酸鈉、氫氧化鉀、碳酸鉀、碳酸氫鉀、酒石酸鉀鈉、或氫氧化鋰之水溶液。
24. 如請求項22之方法，其中該鹼性水溶液包含氫氧化鈉或碳酸鈉之水溶液。
25. 如請求項24之方法，其中該有機溶劑係甲醇。
26. 如請求項21之方法，其中該鹼係有機鹼。
27. 如請求項25之方法，其中該有機鹼係選自三乙胺、二乙基異丙胺及吡啶。
28. 如請求項27之方法，其中該有機溶劑係甲醇。
29. 一種去糖基化方法，其包含使糖基化藜蘆生物鹼與酶在緩衝溶液中接觸以提供去糖基化藜蘆生物鹼。
30. 如請求項29之方法，其中該糖基化藜蘆生物鹼係3-葡萄糖基-11-去氧芥芬胺且該去糖基化藜蘆生物鹼係環杷明。
31. 如請求項29之方法，其中酶係真核源酶。
32. 如請求項29之方法，其中該酶係 β -葡萄糖苷酸酶。
33. 如請求項32之方法，其中該 β -葡萄糖苷酸酶係蓋罩大蝸牛(*Helix pomatia*)。

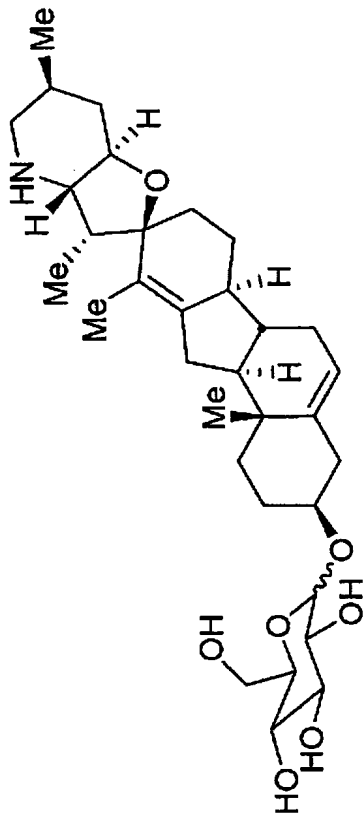
八、圖式：



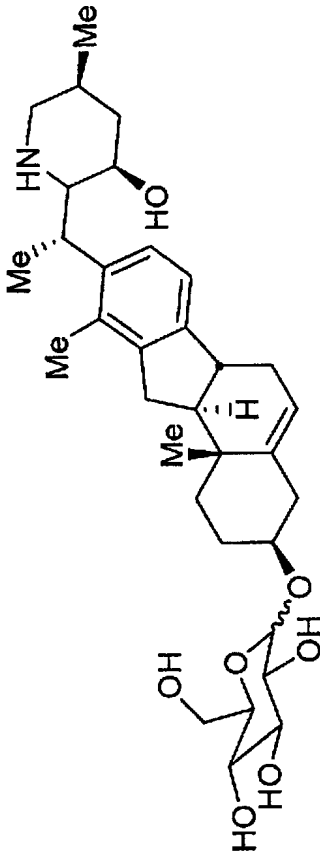
環杷明(CA)



藜蘆胺(VA)



3-葡萄糖基-11-去氧芥芬胺(CS)



藜蘆胺葡萄糖苷(VS)

圖 1

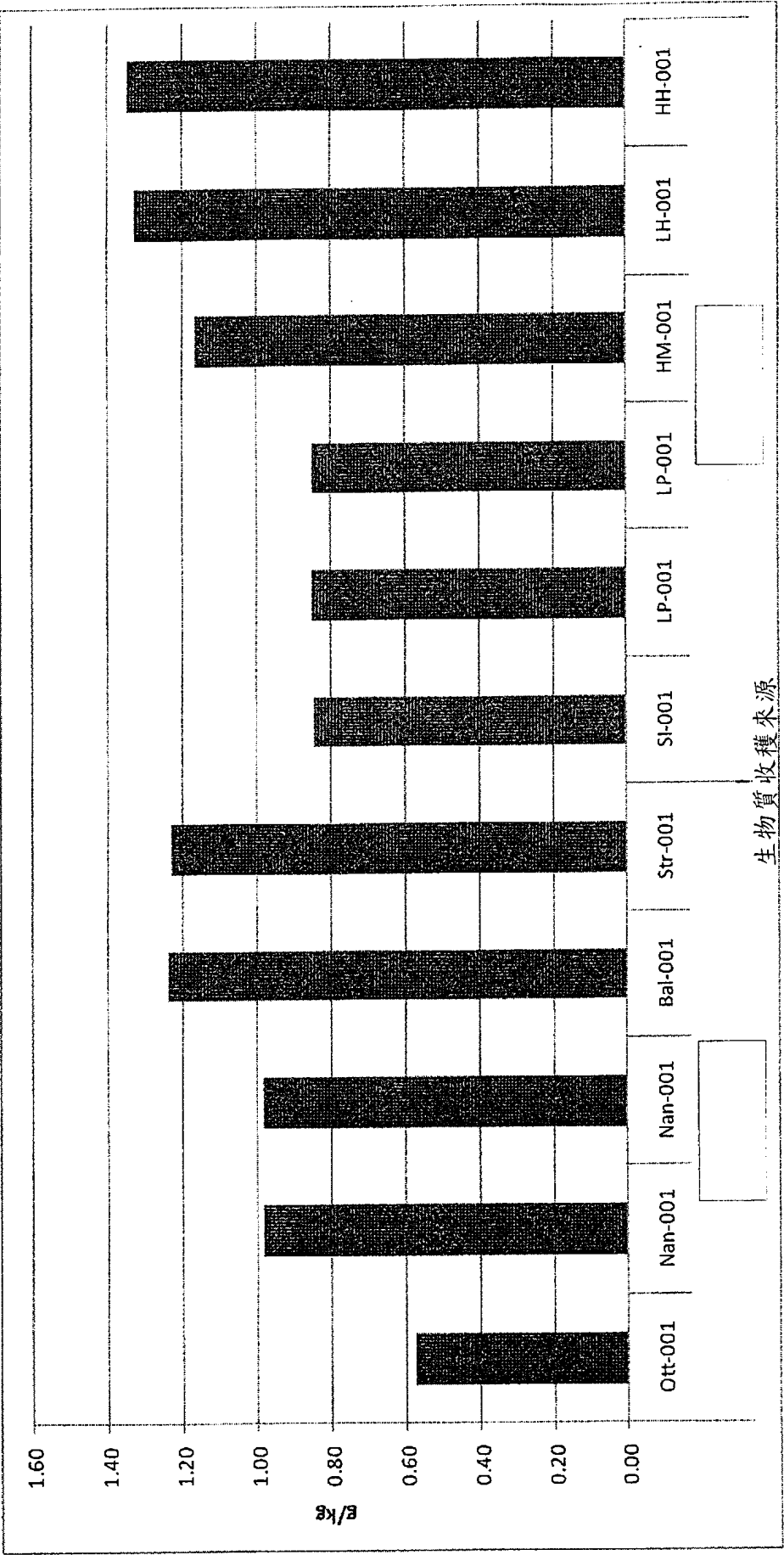
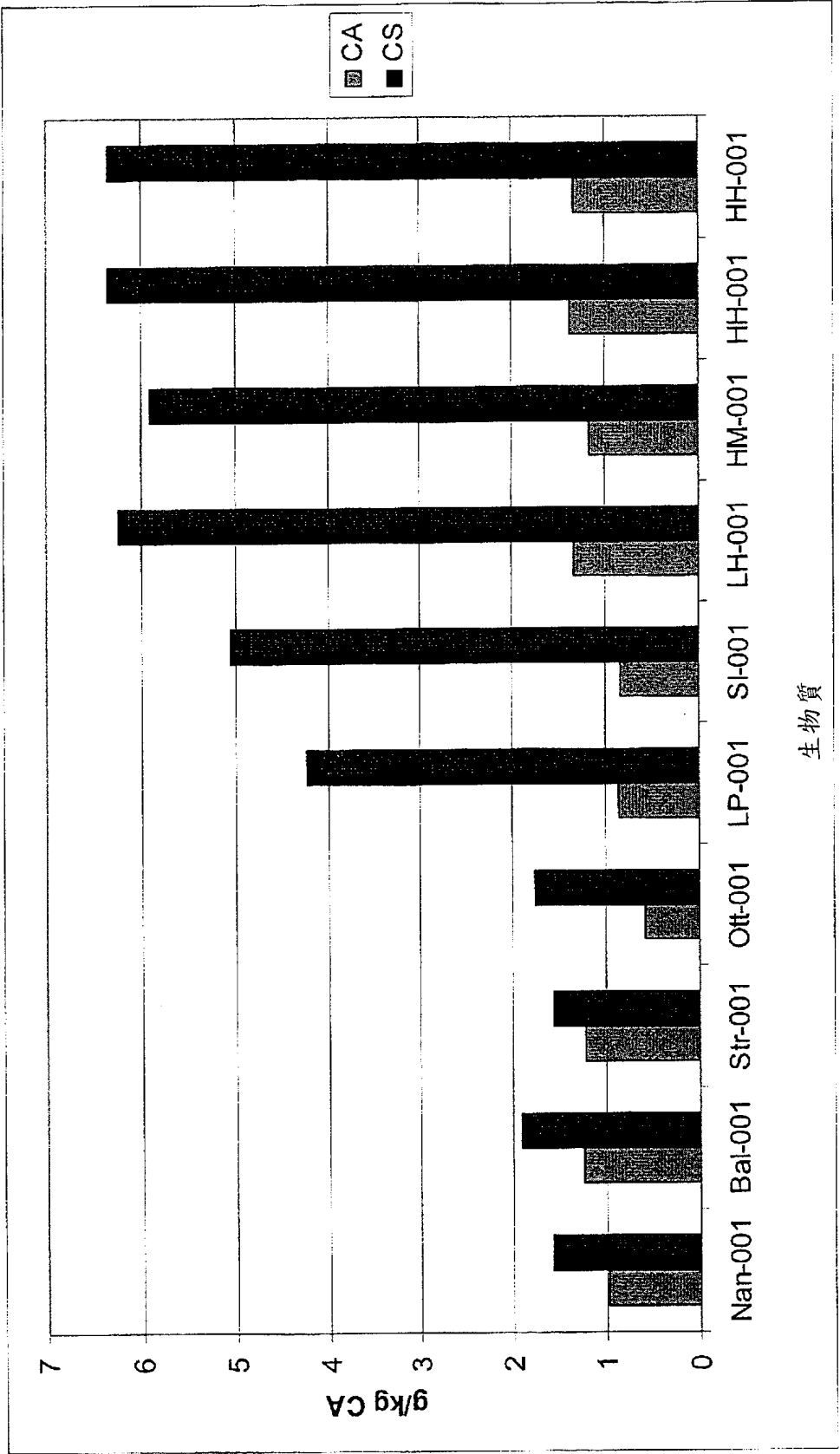


圖 2



生物質

圖 3

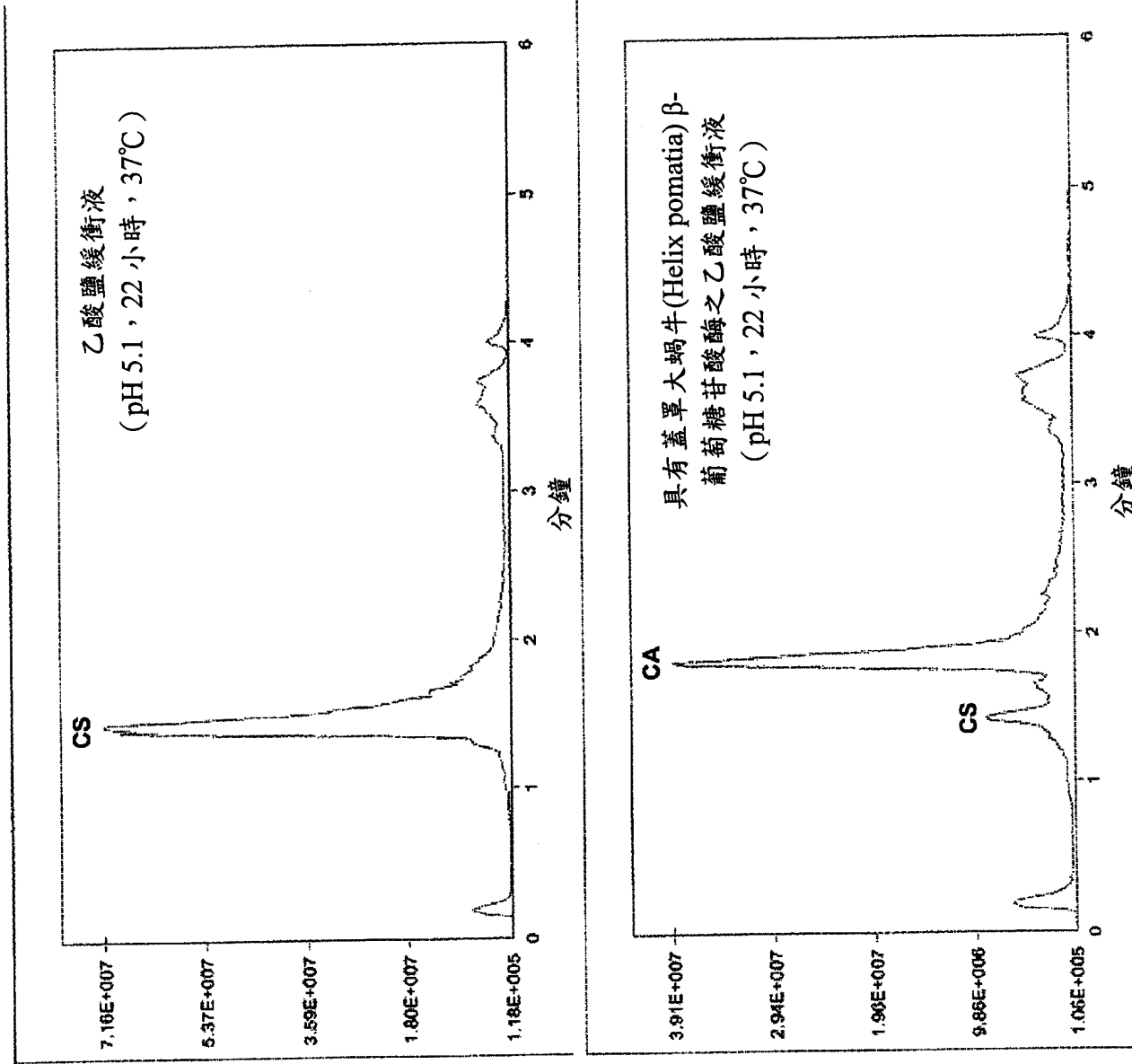


圖 4

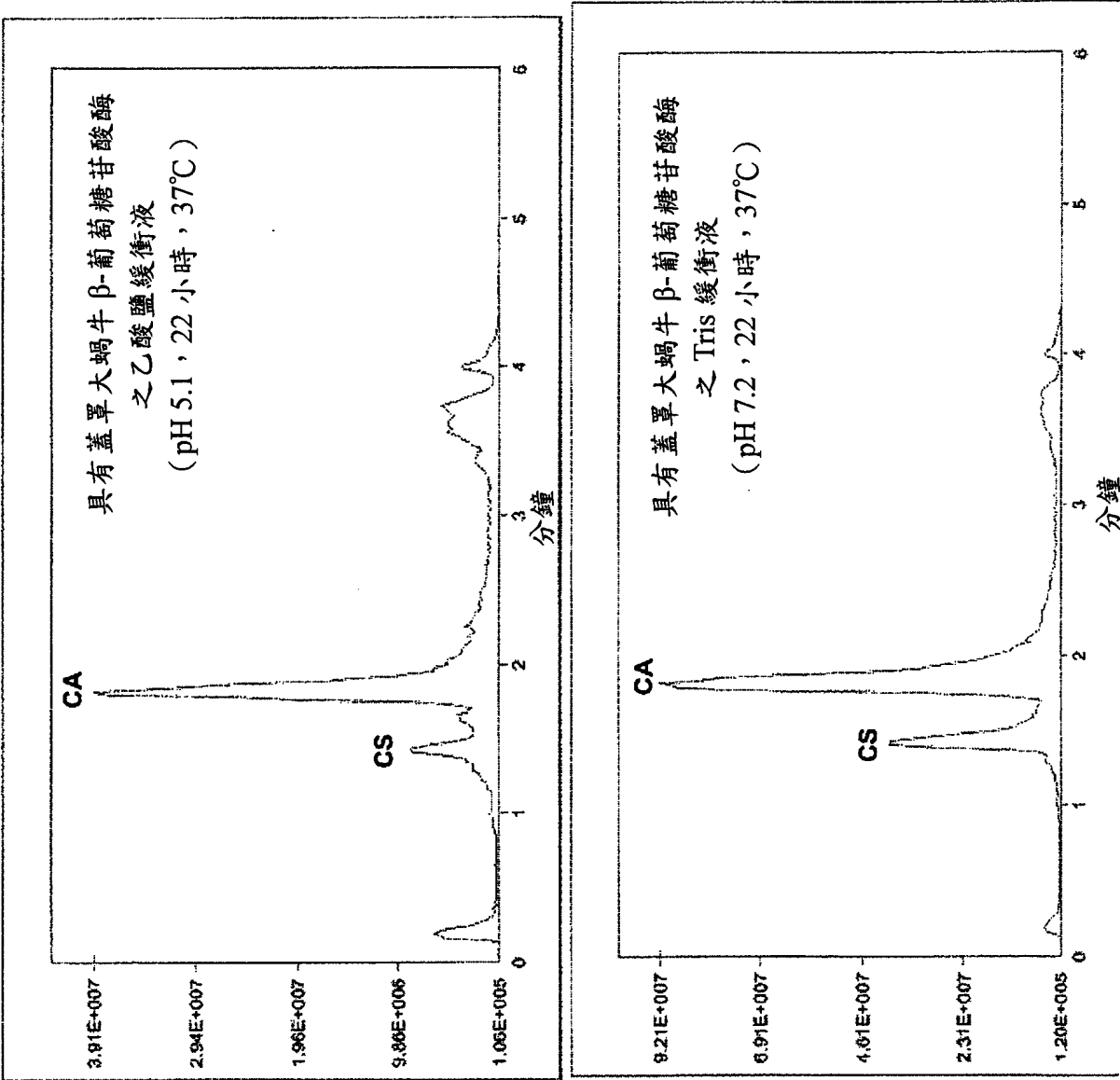


圖 5

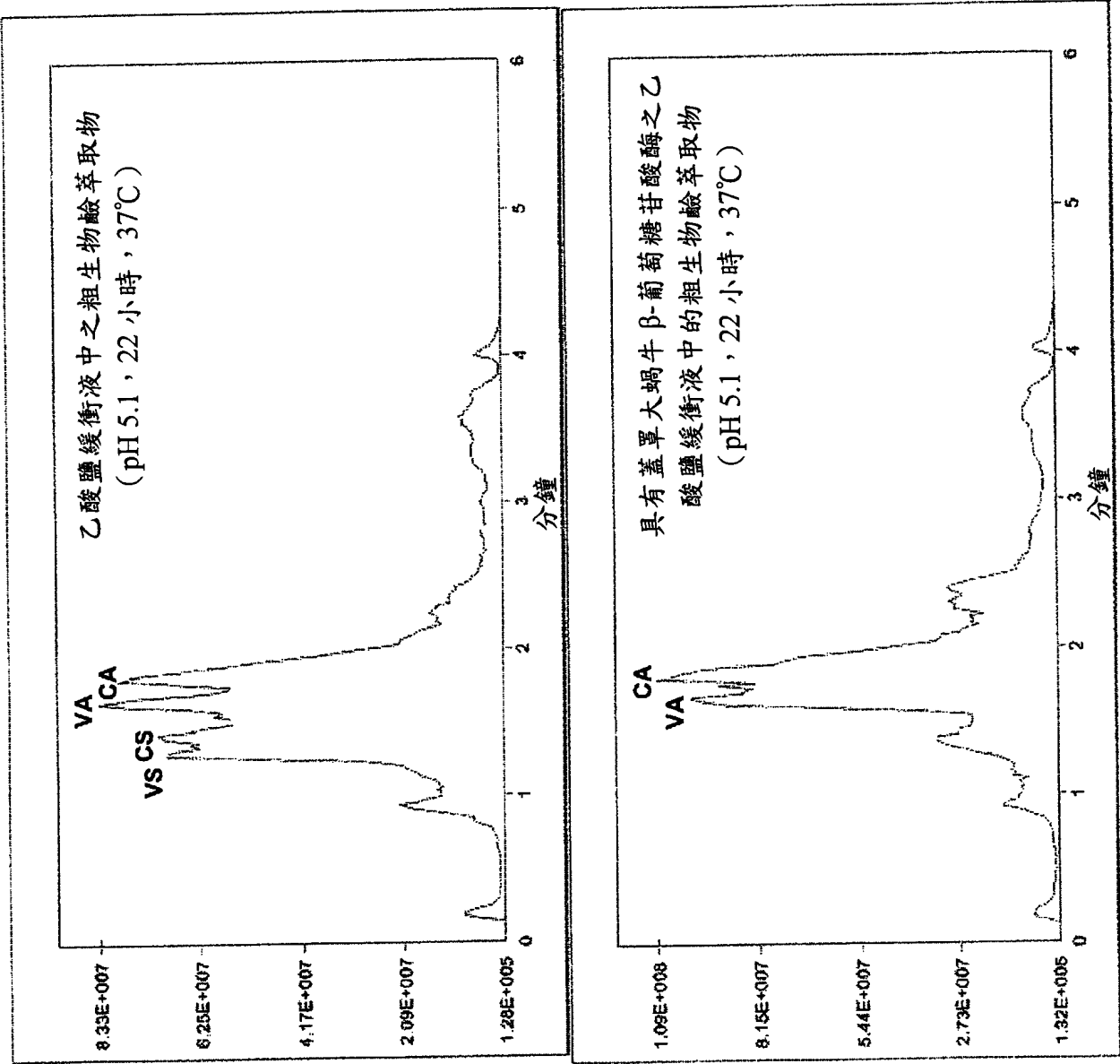


圖 6

具有蓋罩大蝸牛 β -葡萄糖苷酸酶之乙酸鹽
緩衝液中的粗生物鹼萃取物
(pH 5.1, 72 小時, 37°C)

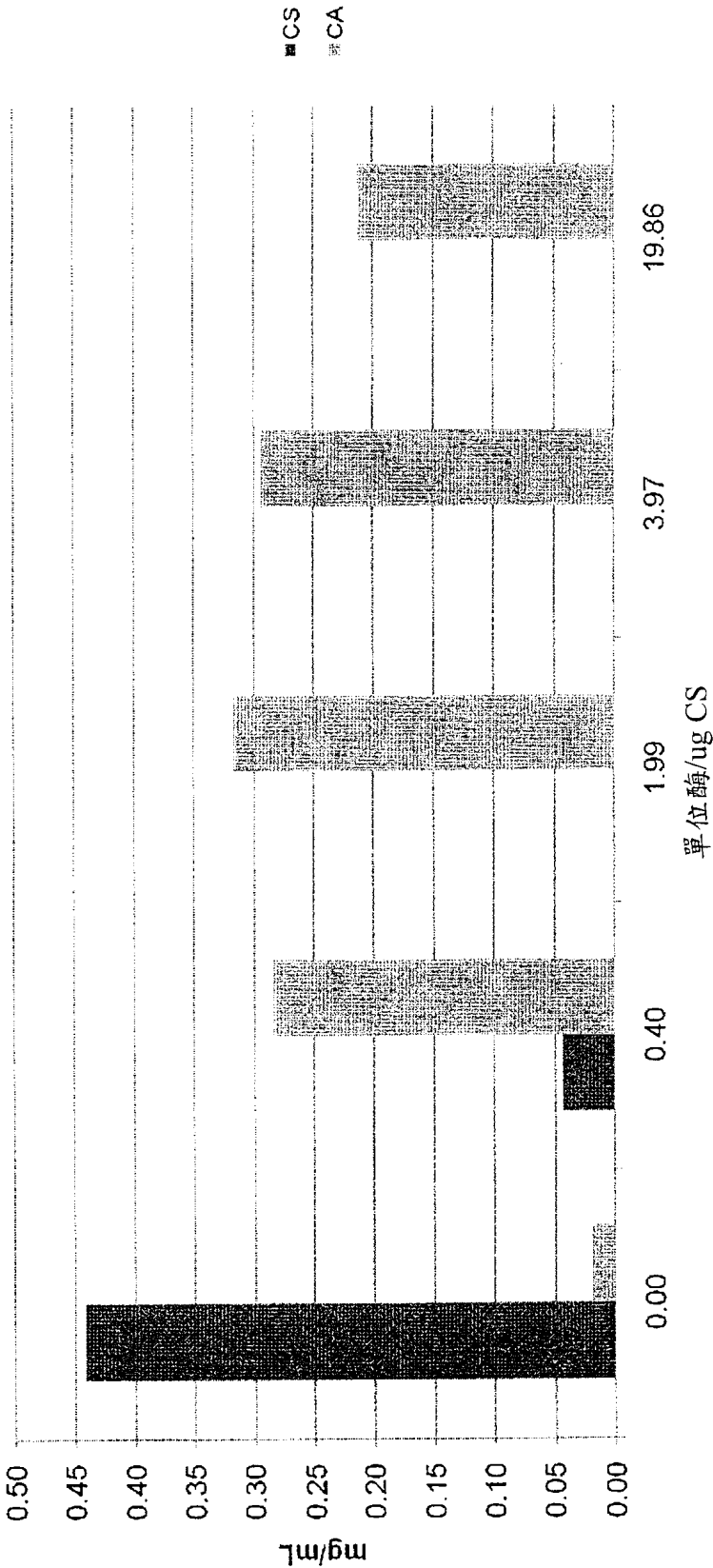


圖 7

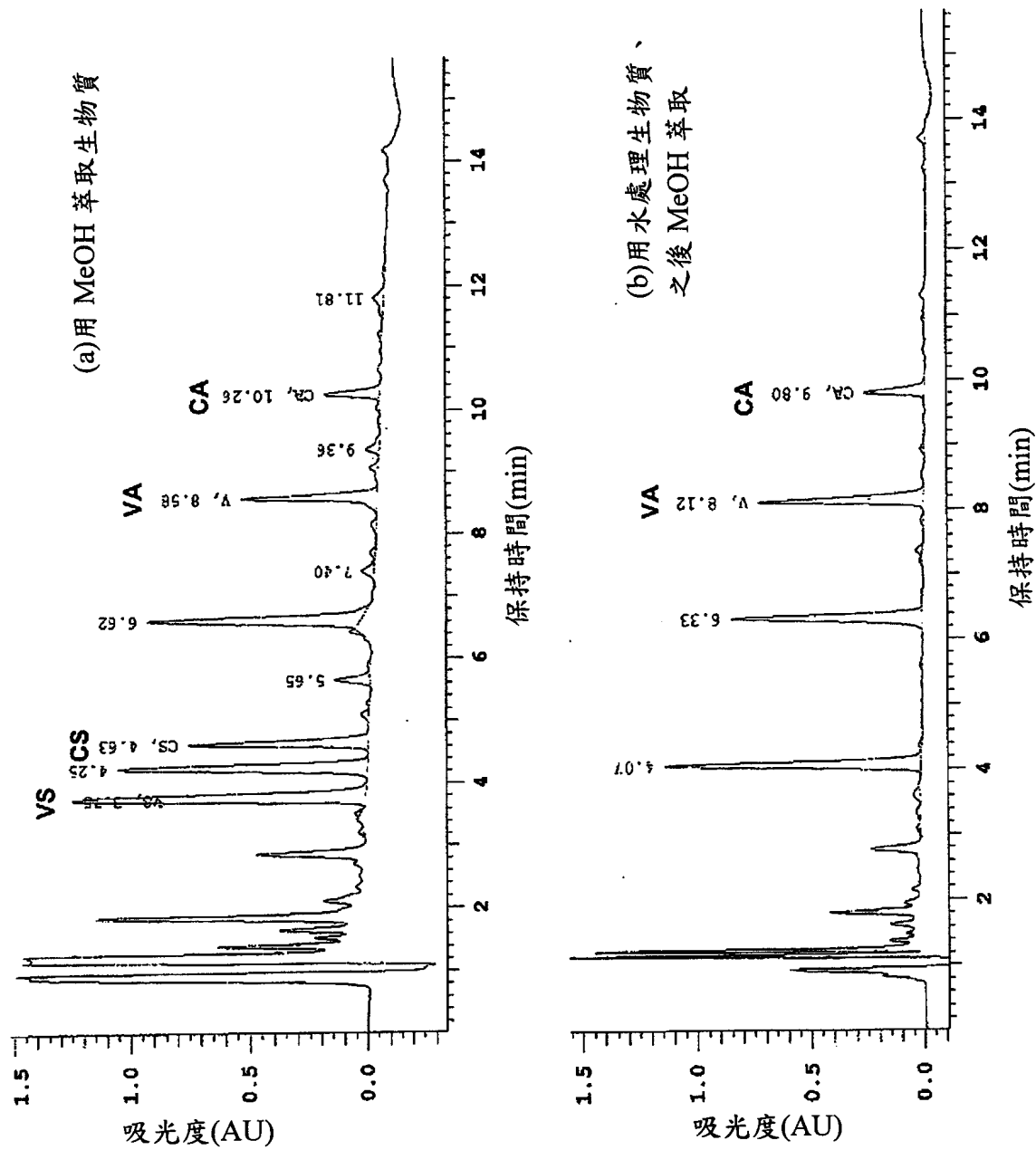


圖 8

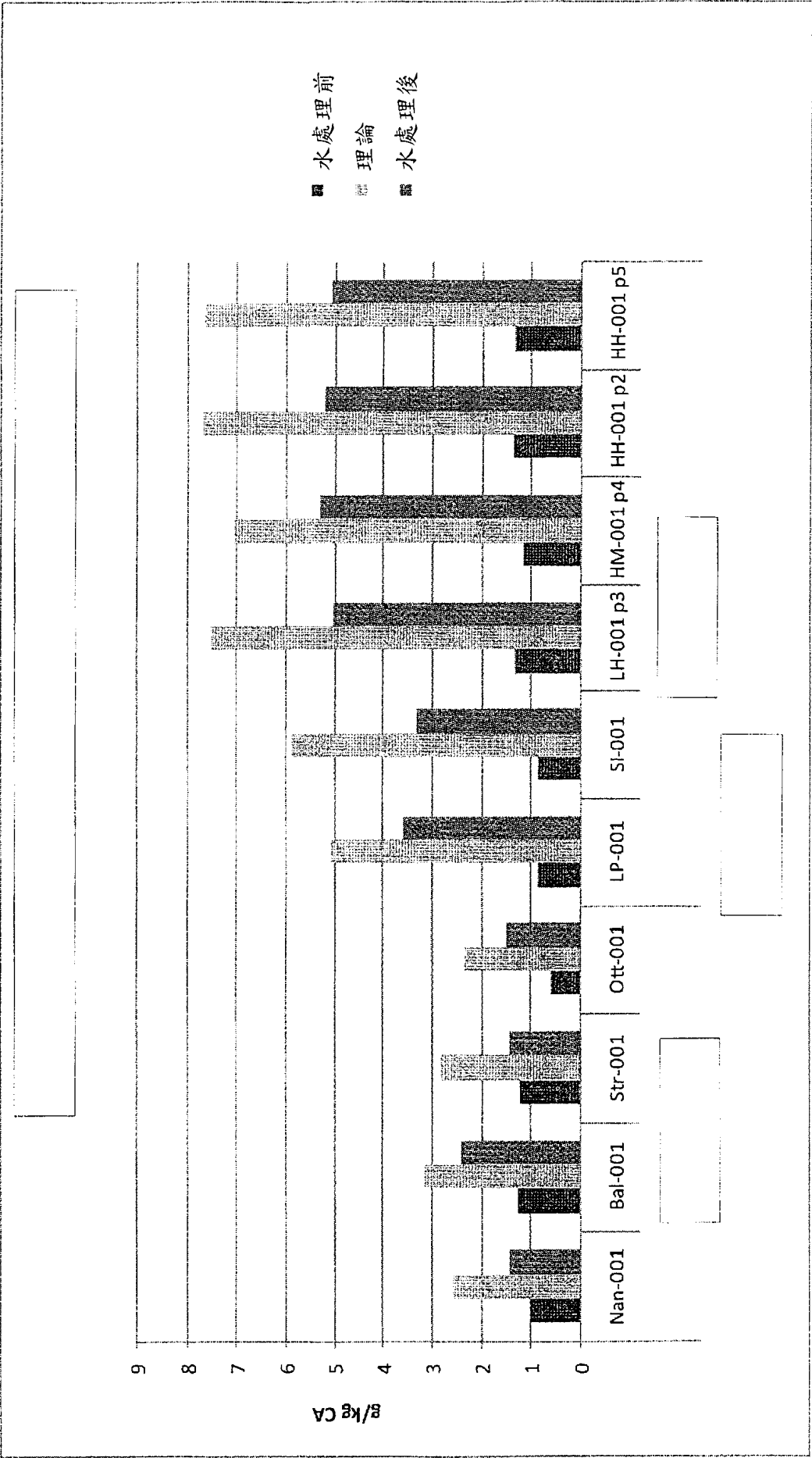


圖 9

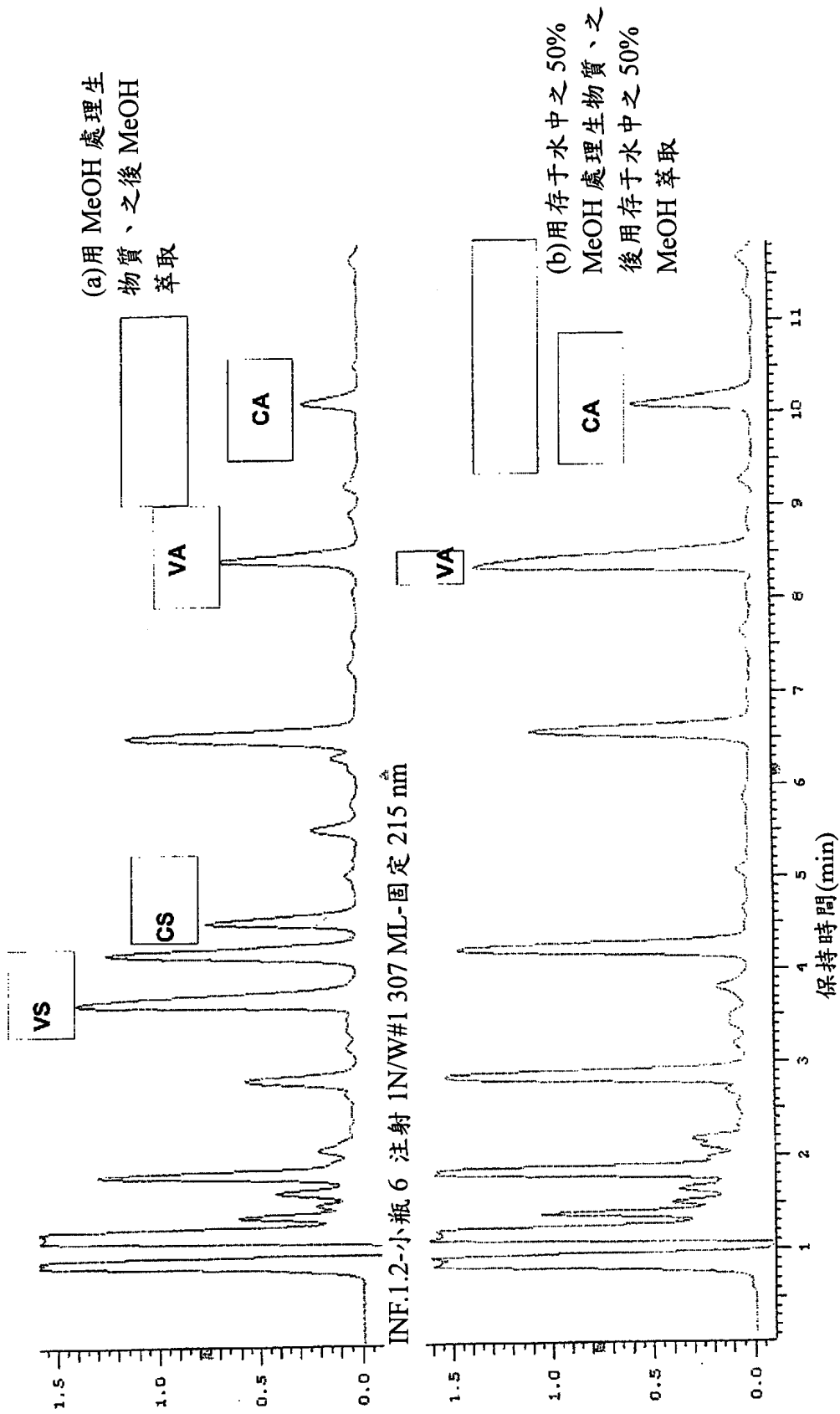


圖 10

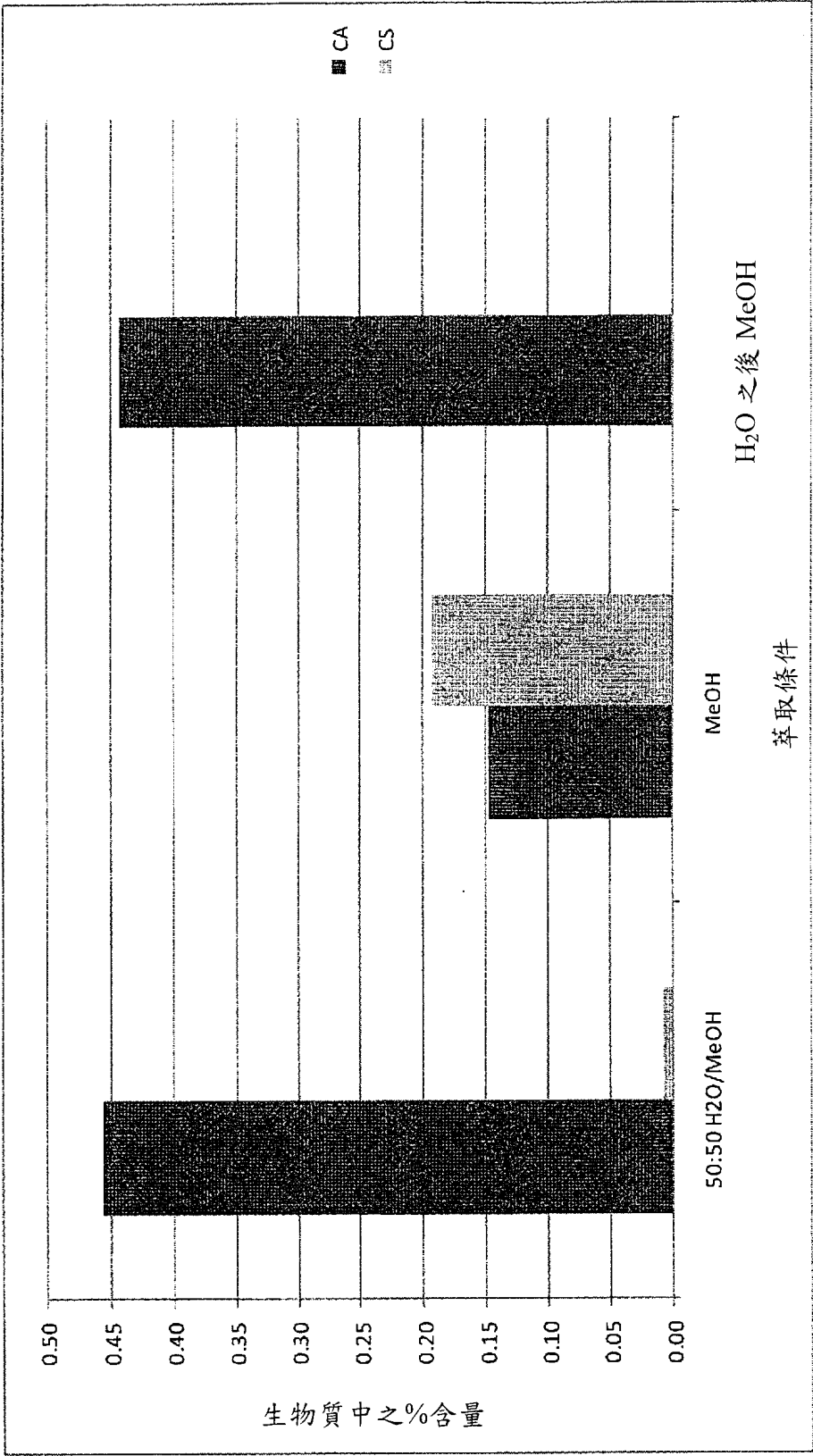


圖 11

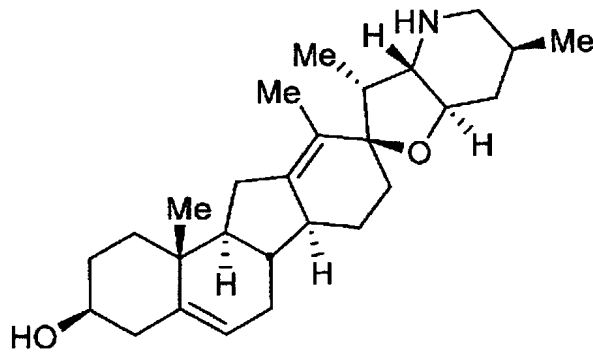
四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (11) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：



cyclopamine (CA)