

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02825816.9

[51] Int. Cl.

C07H 15/04 (2006.01)

C07H 15/06 (2006.01)

A61K 31/70 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009 年 3 月 18 日

[11] 授权公告号 CN 100469784C

[22] 申请日 2002.11.21 [21] 申请号 02825816.9

[30] 优先权

[32] 2001.11.21 [33] US [31] 60/332,084

[32] 2001.12.18 [33] US [31] 60/341,609

[32] 2002.2.22 [33] US [31] 60/358,391

[86] 国际申请 PCT/DK2002/000783 2002.11.21

[87] 国际公布 WO2003/043613 英 2003.5.30

[85] 进入国家阶段日期 2004.6.21

[73] 专利权人 奥尔胡斯大学

地址 丹麦奥尔胡斯

共同专利权人 丹麦国家医院 哥本哈根大学

[72] 发明人 E·拉尔森 A·哈拉茨米

S·B·克里斯滕森

L·P·克里斯滕森 K·勃兰特

[56] 参考文献

JP7149786A 1995.6.13

JP6336437A 1994.12.6

US5620962A 1997.4.15

审查员 李跃然

[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

代理人 黄革生 安佩东

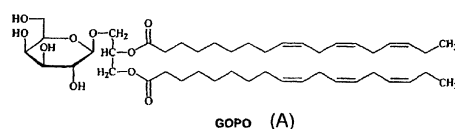
权利要求书 4 页 说明书 22 页 附图 2 页

[54] 发明名称

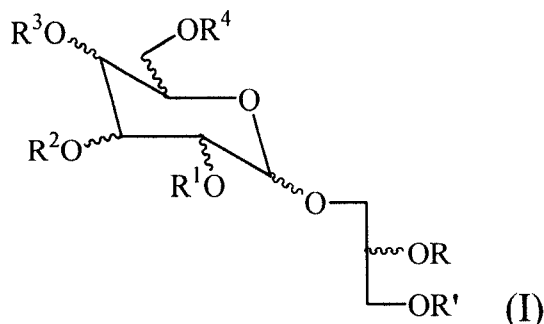
甘油一酯和甘油二酯糖苷作为抗炎药物的用途

[57] 摘要

甘油二酯的糖苷，例如经活性导引分离法由玫瑰果提取物中分离得到的 3-β-D-吡喃半乳糖基氧基-2-(十八碳-9Z, 12Z, 15Z-三烯酰氧基)丙基十八碳-9Z, 12Z, 15Z-三烯酸酯 (GOPO) (A)，可作为治疗炎症疾病例如关节炎和骨关节炎的口服抗炎药物。



1. 式 I 化合物在制备用于治疗、缓解或预防选自类风湿性关节炎、炎性肠疾病、反应性关节炎或骨关节炎的哺乳动物炎症疾病的药物中的用途，



其中 R 和 R' 独立地选自氢、C₁₀₋₂₄ 烷基和 C₁₀₋₂₄-酰基，所述的烷基和酰基具有 0 到 5 个不饱和键，R¹、R²、R³ 和 R⁴ 独立地选自氢和单糖或二糖；其中第一个附加条件是 R 和 R' 不同时为氢，第二个附加条件是 R 和 R' 均不是二十碳五烯酰基。

2. 如权利要求 1 所述的用途，其中 R 和 R' 独立地选自 C₁₀₋₂₄ 烷基和 C₁₀₋₂₄-酰基，所述的烷基和酰基具有 0 到 5 个不饱和键。

3. 如权利要求 2 所述的用途，其中 R 和 R' 独立地选自 C₁₀₋₂₄-酰基，所述的酰基具有 0 到 5 个不饱和键。

4. 如权利要求 1 所述的用途，其中任何烷基和酰基均具有 0 到 4 个不饱和键。

5. 如权利要求 4 所述的用途，其中任何烷基和酰基均具有 1-3 个不饱和键。

6. 如权利要求 5 所述的用途, 其中任何烷基和酰基均具有 2 或 3 个不饱和键。

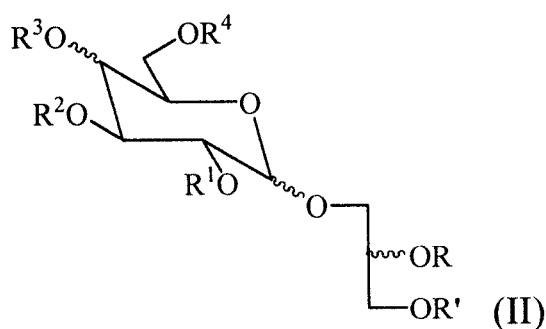
7. 如权利要求 6 所述的用途, 其中任何烷基和酰基均具有 3 个不饱和键。

8. 如权利要求 1-7 任意一项所述的用途, 其中不饱和键为双键。

9. 如权利要求 1 所述的用途, 其中 R 和 R' 均为具有 1 到 3 个双键的 C₁₆₋₂₀-酰基。

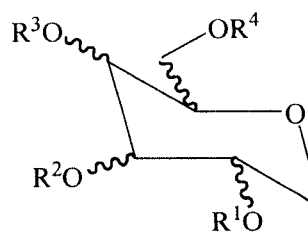
10. 如权利要求 9 所述的用途, 其中 R 和 R' 均为具有 3 个双键的 C₁₈ 酰基。

11. 如权利要求 1 所述的用途, 其中的化合物具有如式 II 所示的结构:



其中 R、R'、R¹、R²、R³ 和 R⁴ 如权利要求 1-10 任一项所定义。

12. 如权利要求 1 所述的用途, 其中式 I 中的



O部分选自 β -D-吡喃半乳糖基、 α -D-吡喃半乳糖基、 β -D-吡喃葡萄糖基以及 α -D-吡喃葡萄糖基。

13. 如权利要求 1 所述的用途，其中的化合物选自 3- β -D-吡喃半乳糖基氧基-2-(十八碳-9Z,12Z,15Z-三烯酰氧基)丙基十八碳-9Z,12Z,15Z-三烯酸酯、3- β -D-吡喃葡萄糖基氧基-2-(十八碳-9Z,12Z,15Z-三烯酰氧基)丙基十八碳-9Z,12Z,15Z-三烯酸酯、3- α -D-吡喃半乳糖基氧基-2-(十八碳-9Z,12Z,15Z-三烯酰氧基)丙基十八碳-9Z,12Z,15Z-三烯酸酯和 3- α -D-吡喃葡萄糖基氧基-2-(十八碳-9Z,12Z,15Z-三烯酰氧基)丙基十八碳-9Z,12Z,15Z-三烯酸酯。

14. 如权利要求 1 所述的用途，其中的药物适于口服、口腔、非胃肠道、局部、直肠、经皮或鼻内给药。

15. 如权利要求 1 所述的用途，其中的药物适于以 0.005-50mg/kg 体重/天的量以单剂量或多剂量给药。

16. 如权利要求 1 所述的用途，其中的炎症疾病是关节炎。

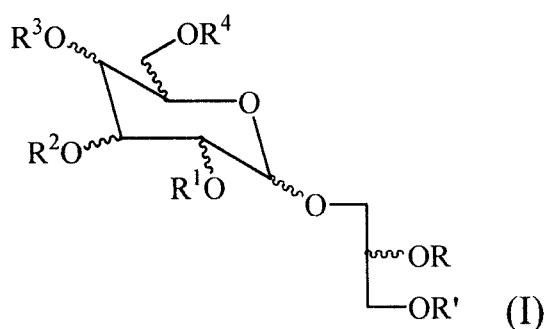
17. 如权利要求 1 所述的用途，其中的炎症疾病是骨关节炎。

18. 如权利要求 1 所述的用途，其中的药物包含一种或多种权利要求 1-13 任意一项所定义的化合物，所述化合物的重量含量为 0.1-50%。

19. 包含作为活性成分的一种或多种如权利要求 1-13 任意一项所述的化合物、抗氧化剂以及可药用载体的药物组合物。

20. 如权利要求 19 所述的组合物，其中一种或多种如权利要求 1-13 任意一项所述的化合物的重量含量为 0.1-50%。

21. 一种基于玫瑰果原料的标准化产品，所述玫瑰果原料在单位剂量形式中包含 0.01 - 500mg 式 I 所示的活性成分：



其中 R 和 R' 独立地选自氢、C₁₀₋₂₄ 烷基和 C₁₀₋₂₄-酰基，所述的烷基和酰基基团具有 0 到 5 个不饱和键，R¹、R²、R³ 和 R⁴ 独立地选自氢和单糖或二糖部分，附加条件为 R 和 R' 不同时为氢。

22. 如权利要求 21 所述的产品，其中的活性成分为 3-β-D-吡喃半乳糖基氧基-2-(十八碳-9Z,12Z,15Z-三烯酰氧基)丙基十八碳-9Z,12Z,15Z-三烯酸酯。

23. 如权利要求 21 或 22 所述的产品，其中所述的产品为天然药物产品。

甘油一酯和甘油二酯糖苷作为抗炎药物的用途

发明领域:

本发明涉及甘油一酯或甘油二酯的糖苷,例如 3- β -D-吡喃半乳糖基氧基-2-(十八碳-9Z,12Z,15Z-三烯酰氧基)丙基十八碳-9Z,12Z,15Z-三烯酸酯(玫瑰果(*Rosa canina* L.的果实)的一种成分),用于治疗炎症疾病,例如通过减轻白细胞的趋化性和氧化爆发应答(oxidative burst response)治疗炎症疾病的用途。

背景技术:

已有文献记载,玫瑰果的水提取物具有抗炎特性(Winther, Rein, 和 Kharazmi, *Inflammopharmacology*, 第 7 卷, pp 63-68(1999)). 还有文献记载,玫瑰果提取物能够在体外抑制人外周血嗜中性粒细胞的趋化性和化学发光,并可在体内降低某些炎症参数(Kharazmi 和 Winther, *Inflammopharmacology*, 第 7 卷, pp 377-386 (1999)).

美国专利 6,024,960 记载,维生素 C 含量较高的玫瑰果浓缩物能够减轻炎症症状。具体地讲,该浓缩物是通过能够保留相对高含量维生素 C 和其他维生素的方法制备的。据申请人的相关美国专利(申请号 09/694,764, 申请日 2000 年 10 月 23 日)记载,口服给予玫瑰果浓缩物和鱼油组合物,能够减轻关节疼痛和僵硬,特别是与关节炎有关的疼痛和僵硬。然而,这些专利申请中所记载的用于产生有益疗效的玫瑰果浓缩物的用量均相对较高,有些不适于每日服用。

据美国专利 5,620,962 和 5,767,095 记载,从海藻中获得的单半乳糖双二十碳五烯酸甘油(MGDG-EPA)用于局部制剂中时具有抗炎活性。这些专利申请记载了只有经至少一个二十碳五烯酸酯化的半乳糖甘油才具有局部抗炎活性。

据称 β -D-吡喃半乳糖甘油经 1: 10: 10 的肉豆蔻酸、棕榈酸和棕榈油酸混合物酯化后, 能够适度地抑制过氧化物自由基的生成(Kikuchi, H., Tsukitani, Y., Shimizu, I., Kobayashi, M., Kitagawa, I: Chem. Pharm. Bull. 第 31 卷, 552-556 页(1983)), 但是没有对这些化合物的混合物的抗炎活性和潜在的医药用途作深入研究。

发明概述:

申请人在对玫瑰果浓缩物的继续研究中惊奇地发现, 玫瑰果中一种特有的成分是一种具有高度抗炎活性的药物。既然口服玫瑰果可以有效缓解炎症疼痛, 例如由关节炎引起的疼痛, 我们相信, 所述抗炎剂的制剂可用于治疗与炎症疾病相关的一些症状。该被提取分离的物质已确定为是半乳糖脂 3- β -D-吡喃半乳糖基氧基-2-(十八碳-9Z,12Z,15Z-三烯酰氧基)丙基十八碳-9Z,12Z,15Z-三烯酸酯(1,2-双-O- α -亚麻酰基-3-O- β -D-吡喃半乳糖基-甘油), 对其将在下文作进一步描述。令人惊奇的是, 我们发现该化合物能够有效抑制多形核白细胞的趋化性和化学发光。

因此, 本发明的一个目的就是提供一种治疗、缓解或预防炎症疾病的方法, 该方法使用包含甘油一酯或甘油二酯(不包括二十碳五烯酸酯)的糖苷, 特别是 3- β -D-吡喃半乳糖基氧基-2-(十八碳-9Z,12Z,15Z-三烯酰氧基)丙基十八碳-9Z,12Z,15Z-三烯酸酯(简称“GOPO”)或相关化合物的药物。在本发明的一个特定的方面, 所述药物适合口服给药, 并能减轻炎症疾病, 例如关节炎和骨关节炎(即, 引起关节疼痛或关节僵硬的疾病)的症状, 包括缓解疼痛、减轻炎症以及提高活动能力。

通过使用甘油一酯或甘油二酯(或醚, 不包括二十碳五烯酸酯)的糖苷, 特别是权利要求 1 所定义的物质, 能够成功地实现本发明的上述目的以及其它目的。

附图简述:

图 1 以图解的方式说明了为从 *Rosa canina* L. 玫瑰果中分离抗炎药物

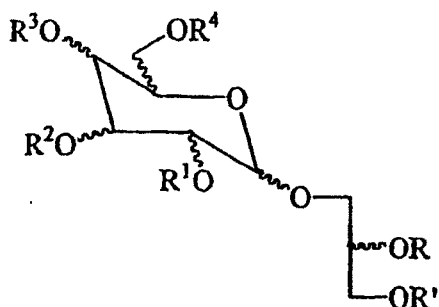
所进行的初始分离过程的第一步。

图 2 显示了干燥、粉碎的犬蔷薇果实(*Rosa canina* L)的皮的 THF 提取物的典型分析 HPLC 色谱图, 其中犬蔷薇果实得自 Hyben Vital International ApS。此外还显示了活性化合物(GOPO)的保留时间。

发明详述:

术语“单或二酯化甘油的糖苷”、“甘油单酯或甘油二酯的糖苷”以及类似的表述是指一类甘油单酯或甘油二酯(以及醚)的糖苷, 例如通过本文记载的各种方法从植物中提取分离的那些物质, 但不包括二十碳五烯酸的酯。有代表性的“糖苷”部分有戊糖、己糖或庚糖, 特别是己糖如半乳糖和葡萄糖, 例如半乳糖, 但也可以是包含两个或多个组合的糖部分的二糖和寡糖, 特别是二糖苷例如二半乳糖苷和二葡萄糖苷, 例如 6-O-(α -D-吡喃半乳糖基)- β -D-吡喃半乳糖。

因此, 本发明提供了式 I 化合物在制备用于治疗、缓解或预防哺乳动物炎症疾病的药物中的用途:



其中 R 和 R' 独立地选自氢、C₁₀₋₂₄ 烷基和 C₁₀₋₂₄-酰基, 所述的烷基和酰基具有 0 到 5 个不饱和键, R¹、R²、R³ 和 R⁴ 独立地选自氢和糖苷; 其中第一个附加条件是 R 和 R' 不同时为氢, 第二个附加条件是 R 和 R' 均不是二十碳五烯酰基。

分子式中的“波浪键”是指被所述取代基取代的碳原子可以呈(R)构型或(S)构型。就“糖”部分(糖苷)而言, 其两种不同的构型有时被称为 α 和 β 构型。特别令人关注的组合是其中的葡萄糖或半乳糖为 β -吡喃糖构型。

尽管本文的结构式中的“糖”部分是以吡喃糖构型画出的，但应当理解，抗炎药物也可以为呋喃糖构型(或是吡喃糖和呋喃糖的混合形式)，以固体或溶液的形式存在。

本申请中的术语“C₁₀₋₂₄烷基”是指具有 10 到 24 个碳原子的直链或支链烃基，例如癸基、十一烷基、十二烷基、十四烷基、十六烷基、十八烷基、十九烷基、二十烷基(eicodacyl)等。

本申请中的术语“C₁₀₋₂₄酰基”是指具有 10 到 24 个碳原子，其中第一个碳原子为羰基碳的直链或支链烃基(C₉₋₂₃ 烷基-C(=O)-)，例如具有 10 到 24 个碳原子的脂肪酸残基。例如月桂酸(C₁₂)残基、肉豆蔻酸(C₁₄)残基、棕榈酸(C₁₆)残基、硬脂酸(C₁₈)残基等。

烷基和酰基基团可以具有 0 到 5 个不饱和键，例如双键或三键，特别是双键。具有一个或多个不饱和双键的酰基实例有棕榈油酸(C₁₆:1)残基、油酸(C₁₈:1)残基、亚油酸(C₁₈:2)残基、亚麻酸(C₁₈:3)残基、花生四烯酸(C₂₀:3)残基、视黄酸(C₂₀:5)残基等。

更具体地讲，甘油单酯或二酯(或醚)的糖苷是二酯、二醚或单醚-单酯糖苷，即 R 和 R'独立地选自 C₁₀₋₂₄烷基和 C₁₀₋₂₄酰基。目前最优选的是二酯糖苷，即 R 和 R'独立地选自 C₁₀₋₂₄酰基。在所有情况下，烷基和酰基均具有 0 到 5 个不饱和键。

就烷基和酰基的不饱和度而言，目前我们认为任何一种具有 0 到 4 个不饱和键，例如 1-3 个不饱和键，例如 2 或 3 个不饱和键，特别是 3 个不饱和键的烷基和酰基是最适合的 R 和 R'基团。

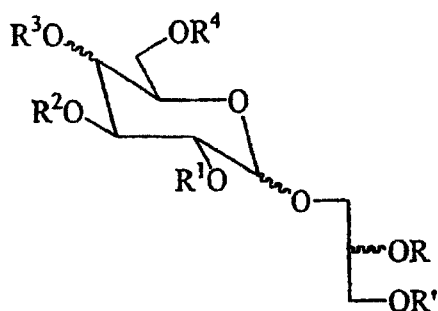
同样，目前我们认为任意不饱和键中最适宜的是双键。

也就是说，我们设想特别令人感兴趣的抗炎药物是那些 R 和 R'均为具有 1 到 3 个双键的 C₁₆₋₂₄酰基基团(例如具有 3 个双键的 C₁₈酰基)的化合物，特别是糖部分为葡萄糖或半乳糖，尤其是半乳糖的化合物。

如上所述，R¹、R²、R³ 和 R⁴独立地选自氢和糖苷部分，优选 R¹、R²、R³ 和 R⁴中至多一个为糖苷。后面的实施方案中涉及的是那些通常存在于植物中的化合物以及 R¹、R²、R³ 和 R⁴均为氢的化合物。在一些令人关注的实施方案中，R¹、R²、R³ 和 R⁴均为氢。

术语“糖苷部分”是指单糖或二糖部分，例如来自 O-吡喃半乳糖、O-吡喃葡萄糖、O-吡喃半乳糖基吡喃半乳糖、O-吡喃葡萄糖基吡喃半乳糖、O-吡喃半乳糖基吡喃葡萄糖和 O-吡喃葡萄糖基吡喃葡萄糖的部分。

此外，我们设想化合物(抗炎药物)优选具有式 II 所示的结构：



其中 R、R'、R¹、R²、R³ 和 R⁴ 如上所定义。

特别令人感兴趣的更具体的抗炎药物实例有，例如选自 β-D-吡喃半乳糖基衍生物、α-D-吡喃半乳糖基衍生物、β-D-吡喃葡萄糖基衍生物、α-D-吡喃葡萄糖基衍生物的物质，例如 β-D-吡喃半乳糖基和 6-O-(α-D-吡喃半乳糖基)-β-D-吡喃半乳糖基衍生物。

值得关注的更加具体的抗炎药物实施例有，3-β-D-吡喃半乳糖基氧基-2-(十八碳-9Z,12Z,15Z-三烯酰氧基)丙基十八碳-9Z,12Z,15Z-三烯酸酯、3-β-D-吡喃葡萄糖基氧基-2-(十八碳-9Z,12Z,15Z-三烯酰氧基)丙基十八碳-9Z,12Z,15Z-三烯酸酯、3-α-D-吡喃半乳糖基氧基-2-(十八碳-9Z,12Z,15Z-三烯酰氧基)丙基十八碳-9Z,12Z,15Z-三烯酸酯、3-α-D-吡喃葡萄糖基氧基-2-(十八碳-9Z,12Z,15Z-三烯酰氧基)丙基十八碳-9Z,12Z,15Z-三烯酸酯、6-O-(α-D-吡喃半乳糖基)-3-β-D-吡喃半乳糖基氧基-2-(十八碳-9Z,12Z,15Z-三烯酰氧基)丙基十八碳-9Z,12Z,15Z-三烯酸酯，以及 6-O-(α-D-吡喃半乳糖基)-3-α-D-吡喃半乳糖基氧基-2-(十八碳-9Z,12Z,15Z-三烯酰氧基)丙基十八碳-9Z,12Z,15Z-三烯酸酯，例如 3-β-D-吡喃半乳糖基氧基-2-(十八碳-9Z,12Z,15Z-三烯酰氧基)丙基十八碳-9Z,12Z,15Z-三烯酸酯或 3-β-D-吡喃葡萄糖基氧基-2-(十八碳-9Z,12Z,15Z-三烯酰氧基)丙基十八碳-9Z,12Z,15Z-三烯酸酯，例如从玫瑰果中提取分离的 3-β-D-吡喃半乳糖基

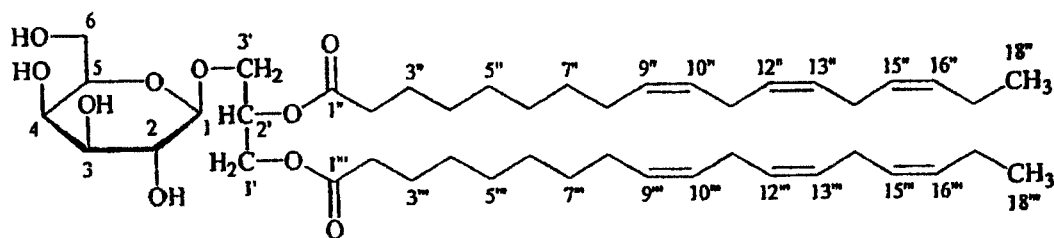
氧基-2-(十八碳-9Z,12Z,15Z-三烯酰氧基)丙基十八碳-9Z,12Z,15Z-三烯酸酯。

如上所述,抗炎药物可以按照本领域已知的方法经全部或部分合成制备(例如参见 Nagatsu 等, *Bioorg. and Medicinal Chem.* 第 4 卷, 1619-1622, 1994 ; Ohta 等, *Chem. Pharm.*, 第 39 卷, 1337-1339, 1991; Shibuya 等, *Chem. Pharm.*, 第 40 卷, 1166-1169, 1992), 或是分离自玫瑰果或其它植物中。或者, 抗炎药物可以存在于植物提取物或植物原料中, 优选富含抗炎药物或用抗炎药物标准化的(*standardised*)的植物提取物或植物原料。

当从玫瑰果分离时, 通过已知的常规方法采摘完全成熟的玫瑰果。玫瑰果取自野生蔷薇灌木, 例如, 优选取自 *Rosa canina* ("犬蔷薇果"), 法国蔷薇(*Rosa gallica*)、*Rosa condita*、玫瑰(*Rosa rugosa*)、黄蔷薇(*Rosa hugonis*)、*Rosa nitida*、*Rosa pendulina*、*Rosa pimpinellifolia* 和绢毛蔷薇(*Rosa sericea*)。优选通过溶剂提取, 用无机或有机溶剂例如己烷、二氯甲烷、乙醇或水从干燥、粉碎的玫瑰果中提取抗炎药物, 但也可以使用其它溶剂。提取后, 将得到的提取物蒸发至干获得包含抗炎药物的提取物, 或者, 取决于提取的步骤, 分离得到抗炎药物本身, 对此将在下文作进一步讨论。

例如, 3-β-D-吡喃半乳糖基氧基-2-(十八碳-9Z,12Z,15Z-三烯酰氧基)丙基十八碳-9Z,12Z,15Z-三烯酸酯(式 III)可从犬蔷薇果的干燥粉末中提取。该分离得到的化合物不仅能够有效地抑制白细胞的氧化爆发应答, 而且还能够抑制人白细胞的趋化性。

式 III



GOPO

尽管可以使用经提取分离得到的化合物, 但在完全分离过程中得到的富集的或标准化的植物提取物或标准化的植物原料也可用于本发明, 特别

是，获得提取或标准化的产物的费用要比分离化合物低廉。此外，提取物或植物原料中的其它成分，例如在部分提取后保留下来的维生素(其中一些具有抗氧化作用)，能够维持或增强抗炎药物的作用。选择以富集或标准化的提取物或标准化的植物原料来治疗炎症，还是选择分离或合成得到的产物进行治疗，这在很大程度上取决于炎症疾病的程度。例如，就关节炎而言，若只感到轻微不适则最好使用富集或标准化的提取物或标准化的植物原料，而对那些严重的不堪忍受的情况而言，可以使用分离或合成的化合物。

本申请的发明人注意到，本文所述的式 III 化合物能够抑制氧化爆发应答和趋化性，这使得人们有理由相信它是干燥的玫瑰果粉末中发挥抗炎作用的活性物质。因此，本发明人认为，该发现表明本文所述的抗炎药物，不论是分离得到的化合物，还是富集或标准化的提取物或是富集的植物原料，都能够用于治疗炎症疾病，例如与关节炎有关的炎症疾病。

包含抗炎药的药物(药物组合物)可以用于预防、治疗或缓解炎症，不论是由疾病还是医学情况引起的炎症，例如病毒或细菌性疾病(通常称为“炎症疾病”)。Stedman 医学词典第 26 版对“炎症”作了如下定义：“一种基础病理学过程，出现在遭受疾病侵袭的血管和临近组织中，是物理、化学或生物试剂、包括局部反应所致的损伤或异常刺激产生的细胞和化学反应的动态集合体，并引起形态学改变、有害物质去除的破坏，以及导致修复和愈合的反应”。相应的炎症疾病的实例有肝炎、脑膜炎、类风湿性关节炎、炎性肠疾病例如节段性回肠炎、过敏综合症、糖尿病、充血性心脏病、银屑病、反应性关节炎或骨关节炎或其它关节炎例如骨关节病、多发性硬化、动脉粥样硬化、败血症/脓毒性休克、皮炎、移植排斥以及由肿瘤疾病的化学治疗或放射治疗导致的继发炎症。

据信本发明尤其适合于治疗关节炎和骨关节炎。

制剂

如上所述，可直接使用抗炎药物的纯化合物，或使用包含抗炎药物的

富集或标准化的植物提取物或标准化的干燥植物原料。

因此，药物可以是植物提取物的形式，特别是其中的抗炎药物的浓度是已知的从而可以控制哺乳动物给药剂量的提取物。

尽管不考虑药物制剂的形式，但特别指出的是，当使用纯化合物时，为了便于哺乳动物给药以及确保适宜的生物利用度，通常有必要将其制成药物制剂。

最好将抗炎药物用可药用的载体(或赋形剂)制成药物制剂，并任选地与抗氧化剂联用。也可将抗炎药物与其它活性成分联用以增强抗炎效果，或带给使用者其它的有益效果。

因此，可将抗炎药物或包含抗炎药物的富集或标准化的提取物或标准化的植物原料，单独或其它成分，以及本领域已知的用于制备所述制剂的成分联合制成粉剂、颗粒剂、片剂、混悬液、溶液剂或乳剂，并包装成每日单剂量或多剂量的形式。

具体地讲，药物组合物(药物)通常包含在可药用载体中的约 0.1 到约 50%重量的抗炎药物，优选与抗氧化剂联用。

给药方式可以为口服给药、口腔给药、非胃肠道给药、局部给药、直肠给药、经皮给药或鼻内给药，优选口服给药。

本文所述的“可药用载体”是指那些就对哺乳动物、包括人的给药而言通常可以接受的媒介物。

术语“哺乳动物”包括大型哺乳动物例如人，以及家畜或畜养动物例如马、狗、绵羊、猪、牛等。在这些哺乳动物中，人类是特别值得关注的可以从本发明受益的对象。

药物组合物通常是按照本领域普通技术人员所知的一些需要考虑的因素来制备的，其包括但不限于：特定的抗炎药物、药物浓度、稳定性以及预期的生物利用度；应用药物所治疗的具体炎症疾病、障碍或病症(统称为“疾病”)；受治对象、其年龄、体重以及一般状况；以及组合物的给药方式，例如口服给药、口腔给药、非胃肠道给药、局部给药、直肠给药、经皮给药或鼻内给药。用于非胃肠道给药的典型的可药用载体包括，例如

D5W, 一种含 5% (重量/体积)葡萄糖的水溶液, 以及生理盐水。可药用的载体还可以包含其它成分, 例如能增加活性成分稳定性的物质, 例如防腐剂 and 抗氧化剂。

在一个实施方案中, 药物含有与本文定义的化合物联用的抗氧化剂, 以及可药用的载体。抗氧化剂例如选自维生素 C 及其衍生物、维生素 E、类黄酮、酚酸例如对羟基苯甲酸甲酯、乙酯或正丙酯、胡萝卜素、丁基化的羟基苯甲醚、丁基化的羟基甲苯、去甲二氢愈创木酸等。该实施方案特别涉及包含一个或多个不饱和键例如双键的抗炎药物, 这些不饱和键使得化合物易被氧化降解。

药物组合物中可包含常规、无毒的可药用载体和赋形剂, 以剂量形式、制剂或例如适宜的给药装置或植入物的形式, 经注射、输注或植入等非胃肠道方式给药。

所述组合物的配方和制备均是药物制剂领域技术人员所熟知的内容。具体的配方可在 Remington: 药学领域的科学与实践, Alfonso R Gennaro(主编), 第 20 版(2000), Lippincott, Williams & Wilkins ; ISBN: 0683306472 中找到。

抗炎药物通常在可药用的水性介质中配制。

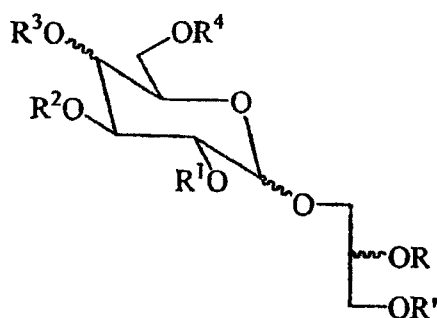
因此, 药物组合物可以是包含抗炎药物的灭菌注射剂。为了制备这样的组合物, 将适宜的抗炎药物分散在合适的注射用液体载体中, 所述载体还可包含助悬剂、助溶剂、稳定剂、pH-调节剂和/或分散剂。在这些适宜的载体中, 可以使用的是水、通过加入适量的盐酸、氢氧化钠或合适的缓冲剂而调至适宜 pH 值的水、1,3-丁二醇、Ringer 溶液以及等渗的氯化钠溶液。

抗炎药物能够被制成通过不同方式给药的制剂。优选方便易行的口服给药。一单位剂量中包含适于每日单次给药(例如, 经口服或饲管进入肠道)的治疗有效量的抗炎药物, 或将其制成每日多剂量的形式。一单位剂量取决于多种因素, 其中包括患者年龄、身体状态以及疾病状况, 但无论如何, 整个日剂量都应是个体生理上所能接受的, 并能在长时间内持续每日给药。

尽管仍在研究中,但我们确信,抗炎药物的剂量为每天 0.001-50mg/kg 体重,例如每天 0.005-20mg/kg 体重(mg/kg/天),能够有效地治疗炎症疾病,特别是关节炎和骨关节炎,并减轻炎症的相关症状。可以每日给予类似的至较少剂量的药物来预防疾病。一个优选的单位剂量是约 0.001 到约 50,例如 0.001-20mg/kg/天。每日总剂量可以是约 0.1 到约 5000mg/天,例如 0.5-500mg/天。例如,可将单位剂量的药物制成片剂或胶囊剂给予患者服用,每种剂型中均含有 0.01-500mg 的 3-β-D-吡喃半乳糖基氧基-2-(十八碳-9Z,12Z,15Z-三烯酰氧基)丙基十八碳-9Z,12Z,15Z-三烯酸酯,患者每日服用一到四粒胶囊。

虽然本申请主要讨论的是抗炎药物对人类的治疗,但我们同样可以预见,其也能够治疗或预防除人类之外的哺乳动物(包括家畜或畜养动物)的炎症疾病,例如由关节炎引起的炎症疾病。本领域技术人员能够轻而易举地获知对动物进行治疗的方式和方法。例如,可将组合物放入动物的饮水或饮食中,或像其它药物一样,以片剂、胶囊剂、溶液、乳液或类似的形式给予动物。

由于管理上的原因,通常需要对作用于人类的天然药物的植物提取物或原料进行标准化,因此,本申请的另一个方面涉及针对作为活性成分的式 I 化合物之一标准化天然药物产物的方法:



其中 R 和 R'独立地选自氢、C₁₀₋₂₄烷基和 C₁₀₋₂₄-酰基,所述的烷基和酰基基团具有 0 到 5 个不饱和键,R¹、R²、R³和 R⁴独立地选自氢和糖苷部分,附加条件为 R 和 R'不同时为氢,所述的天然药物产物预期能够用于治疗、缓解或预防哺乳动物的炎症疾病,所述方法包括:

- (a) 提供一批含有式 I 化合物的植物提取物或原料;
- (b) 确定该批中式 I 化合物的浓度;
- (c) 将天然药物产物制成单位剂量形式, 每一剂量中均包含预定量的活性成分, 其中活性成分的预定量由一定量的所述批提供, 所述批的量通过将活性成分的预定量除以所述批的活性成分的浓度来确定。
优选的式 I 化合物为 3- β -D-吡喃半乳糖基氧基-2-(十八碳-9Z,12Z,15Z-三烯酰氧基)丙基十八碳-9Z,12Z,15Z-三烯酸酯。这方面的内容将在实施例 4 中作进一步说明。

尽管我们已经给出并描述了本申请的一些优选实施方案, 但本领域技术人员应该理解的是, 可以进行各种改变或修饰而不超出本申请的主旨和范围, 同时本申请并不限于给定的实施例。

实施例 1:

本实施例说明了如何通过活性导引分离法 (activity guided fractionation) 从玫瑰果提取物中分离其活性成分, 以及用于鉴定活性化合物 (GOPO) 的方法。本实施例还说明了通过分析 HPLC 定量活性化合物例如玫瑰果提取物中的活性化合物的方法。

活性导引分离法以及活性化合物的鉴定

犬蔷薇果实中的活性化合物由活性导引分离法测定。因此, 我们取 1000 克干燥、粉碎的果实, 然后依次用己烷、二氯甲烷、甲醇和水提取, 蒸干提取物。残余物用于在体外检测其对人外周血嗜中性粒细胞趋化性的抑制作用。从这些结果中我们可以确定, 活性化合物存在于二氯甲烷提取物中 (图 1)。该提取物通过硅胶色谱分离, 用二氯甲烷和甲醇进行梯度洗脱 (开始仅用二氯甲烷洗脱, 最后仅用甲醇洗脱), 分离成几组物质, 然后在体外检测各种级分对人外周血嗜中性粒细胞趋化性的抑制作用。从这些结果中我们推断出, 在这些实验中产生活性的即使不完全是, 但也主要是局

表 1: GOPO 的 ^{13}C -NMR 谱数据(75MHz, CDCl_3 或 CD_3OD , δ -值单位为 ppm)

归属	峰型*	$\delta_{\text{C}}(\text{CDCl}_3)$	δ_{C} (CD_3OD)	$\delta_{\text{C}}(\text{CD}_3\text{OD})$ 参考文献 1 的数据
C-1	d	104.3	106.3	105.4
C-2	d	71.6	73.3	72.4
C-3	d	73.7	75.7	74.9
C-4	d	69.5	71.1	70.2
C-5	d	74.8	77.7	76.8
C-6	t	62.4	63.3	62.5
C-1'	t	63.1	64.9	64.0
C-2'	d	70.4	72.7	71.8
C-3'	t	68.4	69.6	68.7
C-1'', C-1'''	s	174.1, 173.7	176.1, 175.8	175.0, 174.7
C-2'', C-2'''	t	34.5, 34.3	36.0, 35.8	35.1, 35.0
C-3'', C-3'''	t	25.1 ^a	26.8 ^a	26.6 ^a
C-4'', C-4'''	t	29.8 ^b	31.6 ^b	30.8 ^b
C-5'', C-5'''	t	29.5 ^b	31.2 ^b	30.4 ^b
C-6'', C-6'''	t	29.4 ^b	31.1 ^b	30.3 ^b
C-7'', C-7'''	t	29.3 ^b	31.0 ^b	30.2 ^b
C-8'', C-8'''	t	27.4	29.0	28.2
C-9'', C-9'''	d	132.2 ^c	133.8 ^c	132.7 ^c
C-10'', C-10'''	d	130.4 ^c	132.1 ^c	131.1 ^c
C-11'', C-11'''	t	25.9 ^a	27.4 ^a	26.4 ^a
C-12'', C-12'''	d	128.6 ^c	130.2 ^c	129.2 ^c
C-13'', C-13'''	d	128.5 ^c	130.2 ^c	129.2 ^c
C-14'', C-14'''	t	25.8 ^a	27.3 ^a	26.0
C-15'', C-15'''	d	128.0 ^c	129.9 ^c	128.9 ^c
C-16'', C-16'''	d	127.3 ^c	129.2 ^c	128.3 ^c
C-17'', C-17'''	t	20.8	22.3	21.5
C-18'', C-18'''	q	14.5	15.5	14.7

*峰型由 DEPT 和 HETCOR-NMR 实验确定。峰型缩写说明: s = 单峰, d = 双峰, t = 三重峰, q = 四重峰。在同一栏中的 ^{a,b,c}: 这些归属可以互换。

表 2: GOPO 的 ^1H -NMR 谱数据(300MHZ, CD_3OD , δ -值单位为 ppm)

H	δ_{H} (峰型, J 为 Hz) CD_3OD	δ_{H} (峰型, J 为 Hz), CD_3OD (参考文献 1)
1	4.23 (d, 6.6)	4.23 (d, 7.3)
2	3.51 (dd, 6.6, 9.7)	3.52 (dd, 7.4, 9.8)
3	3.45 (dd, 2.1, 9.7)	3.45 (dd, 3.3, 10.3)
4	3.84 (dd, 0.5, 2.1)	3.83 (dd, 1.0, 2.5)
5	3.48 (m)	3.48 (m)
6a	3.73 (dd, 6.6, 12.0)	3.71 (m)
6b	3.75 (dd, 4.4, 12.0)	3.76 (m)
1'a	4.22 (dd, 6.9, 12.0)	4.23 (dd, 7.3, 13.6)
1'b	4.43 (br d, 12.0)	4.44 (dd, 3.0, 12.1)
2'	5.27 (m)	5.26 (m)
3'a	3.71 (dd, 5.4, 11.0)	3.70 (dd, 5.4, 11.2)
3'b	3.98 (dd, 5.4, 10.8)	3.97 (dd, 5.4, 10.9)
2'', 2'''	2.32 (br t, 7.0)	2.32 (m)
3'', 3'''	1.60 (m)	1.59 (m)
4''-7'', 4'''-7'''	1.35 (m)	1.32 (m)
8'', 17'', 8''', 17'''	2.08 (m)	2.08 (m)
9'', 10'', 12'', 13'', 15'', 16''	5.35 (m)	5.33 (m)
9''', 10''', 12''', 13''', 15''', 16''', 11'', 14'', 11''', 14'''	2.82 (br t, 6.8)	2.80 (m)
18'', 18'''	0.98 (t, 7.5)	0.97 (t, 7.5)

峰型缩写说明: d = 双峰, dd = 两个双峰, m = 多重峰, t = 三重峰, br = 宽峰

原料和方法:

干燥、粉碎的犬蔷薇果实 (*Rosa canina* L.) 得自 Hyben Vital International ApS (Tulløblle, 丹麦)。HPLC 级己烷、甲醇(CH_3OH)、乙腈(CH_3CN)、二氯甲烷(CH_2Cl_2)和四氢呋喃(THF)得自 Merck (达姆斯塔特, 德国)。硅胶 60 (0.063-0.200mm) 和分析用(0.1mm)硅胶 60 F₂₅₄ 板(TLC 板)也同样得自 Merck。用 10 % 的 H_2SO_4 CH_3OH 溶液展开分析 TLC 板, 然后加热。

提取步骤:

将犬蔷薇粉末(1000g)在己烷(2 L)中浸泡 24 小时, 过滤, 用己烷(2 x 500mL)洗涤粉末。合并己烷溶液, 减压蒸发至干燥。然后将粉末在 CH_2Cl_2 (2L)中浸泡 24 小时, 过滤, 残余粉末用 CH_2Cl_2 (2 x 500mL)洗涤。合并 CH_2Cl_2 溶液, 减压蒸发至干燥。然后将粉末在 CH_3OH (2 L)中浸泡 24 小时, 过滤, 用 CH_3OH (2 x 500mL)洗涤粉末。合并 CH_3OH 溶液, 减压蒸发至干燥。最后将粉末在水(2 L)中浸泡 24 小时, 过滤, 用水(2 x 500mL)洗涤粉末。合并水溶液, 减压蒸发至干燥(图 1)。

色谱条件:

将从 CH_2Cl_2 溶液蒸发得到的残余物溶于 100mL CH_2Cl_2 中, 然后置于用己烷润湿的硅胶柱(500 x 40mm 内径)上。用 CH_3OH 和 CH_2Cl_2 (CH_3OH 在 CH_2Cl_2 中的含量依次为 0、1、2、5、10、20 和 100%)进行梯度洗脱(1L)。用分析 TLC 对洗脱得到的每一级分进行分析, 如果检测到相关物质, 则进行减压蒸发至干燥。

制备型 HPLC 条件:

为配合制备型 HPLC, 我们使用 Merck L-6200 智能泵和 Merck L-4200 UV-VIS 检测器。分离在 35℃ 下、在带有保护滤柱(50 x 20mm 内径)的 Develosil ODS-HG-5 色谱柱(RP-18, 粒径 5 μm ; 250x 20mm 内径, Nomura

Chemical Co.日本)上进行, 保护滤柱的填料与色谱柱相同, 洗脱梯度为: 150mL 25% CH₃CN (水溶液); 150mL 50%CH₃CN (水溶液); 150mL 60% CH₃CN (水溶液); 150mL 70%CH₃CN (水溶液); 150mL 80% CH₃CN (水溶液); 150mL 90% CH₃CN (水溶液)和 300mL 100% CH₃CN. 在 203nm 处检测化合物。流速: 5mL / 分钟, 注射体积: 5mL。

分析 HPLC 条件:

分析 HPLC 在带有光电二极管阵列检测器(波长范围 195-700nm)的 SUMMIT/Dionex HPLC 系统中进行。在 35°C 下使用带有 LiChrospher 100 RP-18 色谱柱(粒径 5μm; 244 x 4mm 内径, Merck)的反相分析 HPLC 检测分离化合物的纯度, 洗脱梯度如下: 0-10 分钟 (100%溶剂 B); 10-25 分钟 (100-50%溶剂 B, 0-50%溶剂 A); 25-55 分钟(50-0%溶剂 B, 50-100%溶剂 A); 55-64 分钟(100%溶剂 A); 64-74 分钟 (100-80%溶剂 A, 0-20%溶剂 C); 74-85 分钟(80%溶剂 A, 20%溶剂 C); 85-95 分钟(80-100%溶剂 A, 20-0%溶剂 C); 95-105 分钟(100-0%溶剂 A, 0-100%溶剂 B); 以及 105-110 分钟 (100%溶剂 B)。所有的梯度变化均呈线性。溶剂 A : 100% CH₃CN。溶剂 B: 20% CH₃CN (水溶液)。溶剂 C: 100% THF。在 203nm 处检测化合物。数据采集时间: 0-75 分钟。流速: 1mL / 分钟。注射体积: 20μL。GOPO 的保留时间: 约 54 分钟(图 2)。

在这些检测中, 我们确定了获取半乳糖脂组份的提取过程, 包括: 取植物原料例如玫瑰果, 将干燥、粉碎的植物原料(玫瑰果)磨成粉末, 将粉末用半乳糖脂不溶于其中的第一有机溶剂处理, 除去有机溶剂得到第一种残余物, 该残余部分中含有半乳糖脂。最初使用有机溶剂提取可以除去非活性成分, 以利于得到高浓度的活性提取物。半乳糖脂的分离过程包括以下几个步骤: 用有机 / 含氯溶剂从第一残余物中提取半乳糖脂, 除去有机 / 含氯溶剂, 得到富含半乳糖脂的沉淀物。

也可以使用有机/含氯溶剂直接从玫瑰果粉末中提取半乳糖脂抗炎提取物级分,然后除去有机/含氯溶剂,得到富含半乳糖脂的沉淀物。

实施例 2:

本实施例说明了实施例 1 的活性化合物在不同的细胞功能实验中呈现的生物活性。

GOPO 的生物学数据:

按照上文记载的步骤制备浓度为 20mg/ml 的 GOPO 二甲亚砜(DMSO)溶液,于最低基础培养基(MEM)中稀释,得到浓度为 100 μ g/ml、50 μ g/ml、10 μ g/ml、1 μ g/ml 和 0.1 μ g/ml 的溶液,用于细胞功能实验。

多形核白细胞

多形核白细胞(PMN)是在柠檬酸化的玻璃容器中从健康个体的外周血中分离得到的。用不同密度梯度的右旋糖酐和 Lymphoprep 分离细胞。PMN 的纯度大于 98%,由台盼蓝染料测定的细胞活力大于 98%。

趋化性

用改进的博伊登室技术进行趋化性实验,如 Jensen, P.和 Kharazmi, A., 体外人嗜中性粒细胞的计算机辅助图像分析实验, J. Immunol. Methods, 144, 43-48. 1991 所述。在 37°C 下用不同稀释度的提取半乳糖脂对纯化的 PMN 预培养 30 分钟。随后就可以检测细胞对含有生物活性化学诱导物 C5a 的趋化因子酵母聚糖活性血清(ZAS)的趋化性。用计算机辅助图像分析系统计算迁移细胞的数量。

化学发光:

化学发光实验用于检测由活性 PMN 产生的氧基团。用 Kharazmi, A., Høiby, N., Doring, G.,和 Valerius, N.H., 铜氯假单胞菌外蛋白酶抑制人嗜

中性粒细胞的化学发光, *Infect. Immun.* 44, 587, 1984 中记载的方法进行测定。以不同浓度的提取半乳糖脂对 PMN 进行预培养, 然后用调理酵母聚糖进行刺激。活性细胞的氧化爆发应答由发光计(1250-LKB Wallace)测定。

结果:

趋化性:

表 3 显示了 GOPO (100 μ g/ml 和 50 μ g/ml 的稀释液)对人外周血多形核白细胞趋化性的活性的测定结果。结果用细胞迁移数和抑制率表示。

表 3

制剂	细胞迁移数	抑制率
GOPO (100 μ g/ml)	8	86
GOPO (50 μ g/ml)	5	92
DMSO 对照	59	0

表 3 显示的是用一批新的活性化合物(GOPO)进行同样的试验所得的结果。表 4 显示了 GOPO (100 μ g/ml、10 μ g/ml、1 μ g/ml 和 0.1 μ g/ml 稀释液)对人外周血多形核白细胞趋化性的活性的测定结果。结果用细胞迁移数和抑制率表示。

表 4

制剂	细胞迁移数	抑制率
GOPO (100 μ g/ml)	12	71
GOPO (10 μ g/ml)	16	62
GOPO (1 μ g/ml)	15	64
GOPO (0.1 μ g/ml)	39	7
DMSO 对照	42	0

表 5 显示了人外周血多形核白细胞的化学发光结果。结果用毫伏表示。

表 5

制剂	毫伏
GOPO (100 μ g/ml)	339
GOPO (50 μ g/ml)	520
DMSO 对照	664

表 6 显示了细胞活力的实验结果。细胞活力由台盼蓝染料排斥法测定。用台盼蓝对细胞进行孵育。死亡的细胞将会被染色，在显微镜下呈现蓝色。结果用存活细胞百分比表示。

表 6

制剂	存活百分比
GOPO (100 μ g/ml)	99
GOPO (50 μ g/ml)	100
DMSO 对照	100

结论:

如表 3 和表 4 所示，分离得到的化合物(GOPO)在相当低的浓度下就可以抑制人外周血白细胞向含有 C5a 的生物活性化学诱导物酵母聚糖活性血清的迁移。

如表 5 所示，分离得到的化合物(GOPO)在相当低的浓度下就可以抑制人外周血白细胞的化学发光。化学发光是氧化爆发应答的衡量。这表明分离得到的化合物具有抗氧化活性。由于实际的组织损伤是由炎症细胞例如 PMN 和单核细胞 / 巨噬细胞通过释放蛋白水解酶和水解酶以及激活组织和关节中的毒性活泼氧基团而引起的，因此分离得到的化合物应该是人外周血多形核白细胞(最重要和数量最多的炎症细胞)氧化爆发应答的有效抑制剂。

如表 6 所示，细胞在各浓度的能够抑制细胞趋化性和化学发光的化合物的溶液中均能存活，这说明对细胞迁移以及氧化爆发的抑制与毒性无关。换句话说，活性化合物在被测浓度下均是无毒的。

实施例 3:

本实施例说明了实施例 1 和 2 的活性成分在市售玫瑰果产物中的浓度 (mg/kg)。

通过分析 HPLC 分析市售犬蔷薇产品中的 GOPO。

在“分析 HPLC 条件”部分所述的分析 HPLC 方法就特异性、可重复性、中等精密度、准确度、线性范围以及稳定性方面符合欧洲委员会 ICH-指南(指南 3A 卷；用于人类的医药产品；质量和生物技术，1998 年版)的规定，并使用该方法来定量测定市售犬蔷薇产品中 GOPO 的含量。表 7 显示了 10 种犬蔷薇产品中 GOPO 的分析结果。

表 7

市售产品	GOPO (mg/kg 犬蔷薇产品)
Hyben Vital	303.0
CP1	75.8
CP2	72.7
CP3	62.1
CP4	51.5
CP5	40.9
CP6	18.2
CP7	15.2
CP8	6.1
CP9	6.1

CP = 匿名的市售产品。

实施例 4:

使用本发明的方法制备标准化制剂。

依据丹麦医学公司出版的指南(Lagemiddelstyrelsen),天然药物必须要标准化以包含特定量的化合物,其对于制得所述化合物的植物或动物材料来说是一定的。如果一个化合物被认为是药物产生临床效应的原因,那么其就被定义为活性化合物,也就必须标准化。如果没有已知的活性化合物,则生产人员可以选择其它特征性的化合物作为标准化的标记化合物。由于本发明阐明了 GOPO 是玫瑰果制剂中能够减轻关节炎疼痛的活性化合物,它就必需用于被注册为天然药物的玫瑰果制剂的标准化。其它国家的中药产品等也有类似的制剂标准化注册规定。

如果根据一种化合物例如 GOPO 对产品进行标准化,那么就意味着每一个单元,例如片剂或胶囊剂均要含有足够量的植物原料以便提供确定量的 GOPO。例如,如果单位剂量被认定为 0.1mg,并且产品中的浓度为 303mg/kg (如实施例 3 表 7 所述),则由该批原料制备的每一单位均必须包含 0.330g 的粗产物。

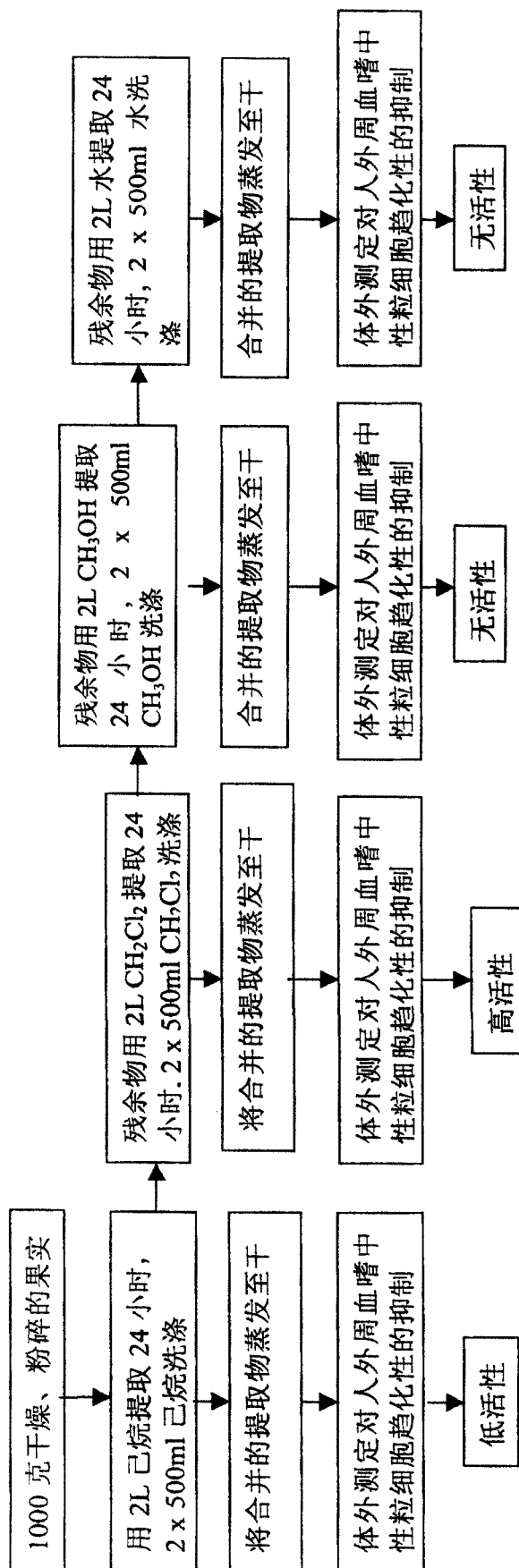
鉴于实际原因,我们没有调整各个片剂或胶囊剂中所用原料的含量,而是根据需要尽可能的稀释粗产品,以便获得所需浓度的产品,然后在各个片剂或胶囊剂中使用具有固定含量的稀释产品。例如,预从含量为 303mg/kg 的一批植物原料制备包含 500mg 物质和 0.1mg 单位剂量的 GOPO 的胶囊剂,就必须将浓度稀释到 200mg/kg。这可以通过在粗产品中加入相当于粗产物重量的 51.1% 的碳酸钙或其它惰性物质来完成。这样,包含 500mg 稀释物质的每一个胶囊剂中均含有 0.1mg 的 GOPO,因此也就符合了标准化产品的要求。

或者,一批高品质的原料(例如包含 303mg/kg 的原料(如上所述))可以与一批低品质的原料(例如包含 75.8mg/kg 的原料)混合。

在这个例子中,混合物中含有 54.6% 的高品质原料(其提供 165.6mg/kg 的 GOPO)和 45.4% 低品质的原料(其提供 34.4mg/kg 的 GOPO),以获得所需的 200mg/kg 的标准化浓度。

在任何情况下，当活性化合物用于标准化时，则必须选择标准浓度以保证终产物与原材料的最佳部分相比含有较低浓度的活性化合物。此处概括的一般规则适用于正文中记载的任何类型的化合物以及任何原材料。

图 1



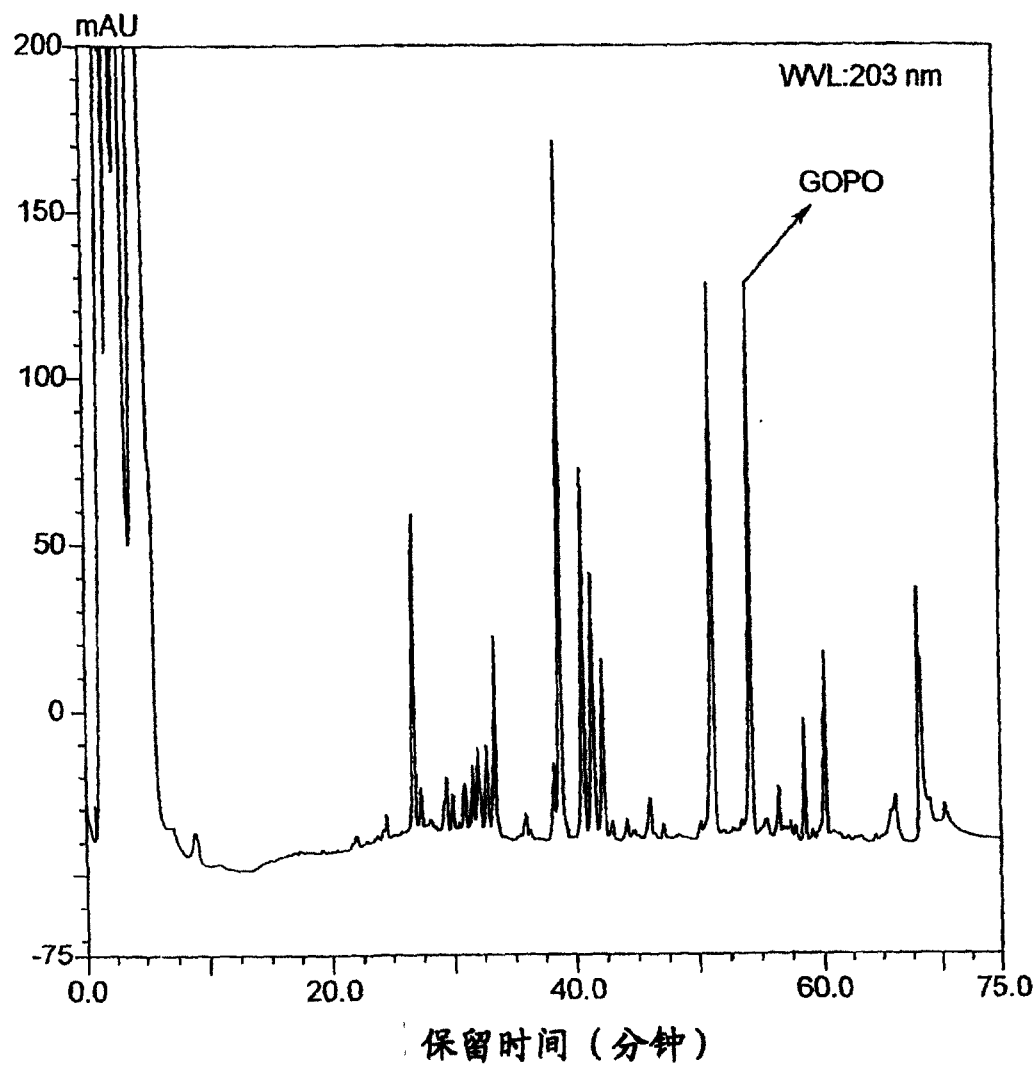


图 2