



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103288614 A

(43) 申请公布日 2013.09.11

(21) 申请号 201310262991.6

(22) 申请日 2013.06.27

(71) 申请人 中国科学院昆明植物研究所

地址 650201 云南省昆明市蓝黑路 132 号

申请人 广州中医药大学

(72) 发明人 许刚 沈小玲 张晶晶 杨兴伟

胡英杰

(74) 专利代理机构 昆明协立知识产权代理事务

所(普通合伙) 53108

代理人 马晓青

(51) Int. Cl.

C07C 49/743(2006.01)

C07C 45/78(2006.01)

A61K 31/122(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

A61P 35/02(2006.01)

权利要求书1页 说明书6页

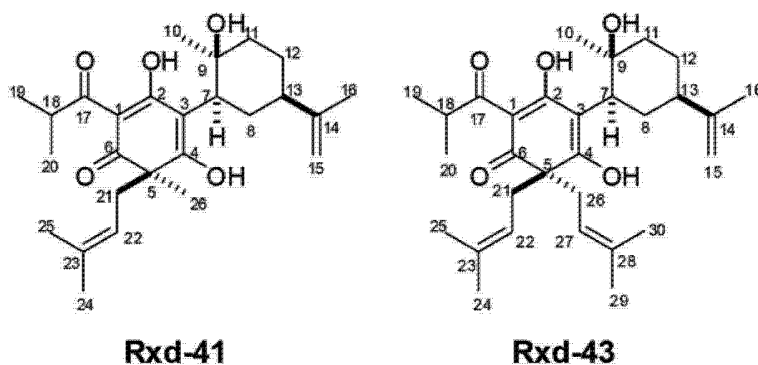
(54) 发明名称

具有抗肿瘤活性的单环间苯三酚类化合物及其药物组合物

(57) 摘要

提供单环间苯三酚类化合物 Rxd-41、Rxd-43 或其药用盐,以其为有效成分和至少一种药学上可接受的载体组成的药物组合物,其制备方法,以及其在制备抗肿瘤药物中的应用。Rxd-41 和 Rxd-43 为具有五元环侧链的间苯三酚类化合物,具有显著的体外细胞毒活性,化学结构新颖,活性强,作为抗肿瘤药物有较多优势。

1. 下述结构式所示的单环间苯三酚类化合物 Rxd-41 和 Rxd-43 或其药用盐，



2. 如权利要求 1 所述的药用盐，是指药学上可接受的盐，与有机酸如酒石酸或柠檬酸或甲酸或乙二酸，或是与无机酸如盐酸或硫酸或磷酸形成的盐。

3. 一种用于预防或治疗肿瘤疾病的药物组合物，其包含权利要求 1 所述的化合物或其药用盐和至少一种药学上可接受的载体。

4. 权利要求 1 所示的化合物的制备方法，包括用 100% 丙酮或乙醇或甲醇溶剂，冷浸或热回流浸提芒种花地上部分粗粉得到总浸膏，总浸膏经各种正反相柱层析及制备和半制备 HPLC 分离后得所述化合物。

5. 权利要求 1 所述的化合物或其药用盐在制备预防或治疗肿瘤药物中的应用。

6. 权利要求 1 所述的化合物或其药用盐在制备预防或治疗白血病、肺癌、结肠癌药物中的应用。

具有抗肿瘤活性的单环间苯三酚类化合物及其药物组合物

技术领域：

[0001] 本发明属于药物技术领域，具体地说，涉及具有抗肿瘤活性的活性化合物 Rxd41 和 Rxd43 其制备方法，以该化合物为活性成分的药物组合物，以及其治疗肿瘤疾病中的应用。

背景技术：

[0002] 金丝桃属(Hypericum)是藤黄科(Guttiferae)的一个大属，全世界约 400 种，除南北两极地或荒漠地及大部分热带低地外世界广布。我国约有 55 种 8 亚种，几产于全国各地，但主要集中在西南。本属植物是一类重要的药用和观赏植物类群。金丝桃属植物的许多种类具有药用价值，其中民间药用植物约有 18 种。主要用于抗菌消炎，收敛止血，解毒消肿，利湿止痛。国外民间或临床医学上也较常使用本属植物治疗神经系统疾病，治外伤，抗菌等方面。正是由于该属植物中有许多种均具有长期的民间药用基础，各国先后对该属植物展开了大量的研究工作，尤其是在药学研究方面。先后从不同的金丝桃属植物中发现了如金丝桃素类、槲皮苷、金丝桃苷、芦丁、黄烷酮醇类、黄酮类、酮类、香豆素类和间苯三酚衍生物（贯叶金丝桃素）等活性成分。其中间苯三酚类化合物结构类型十分丰富且多变，且多有全新骨架类型的化合物报道。其中单环间苯三酚类化学成分结构类型十分多样，且生物活性较好，一直是国际上相关领域的研究热点。然而迄今为止，现有技术中未见有单环间苯三酚类化合物 Rxd41 和 Rxd43 及其活性的报道。

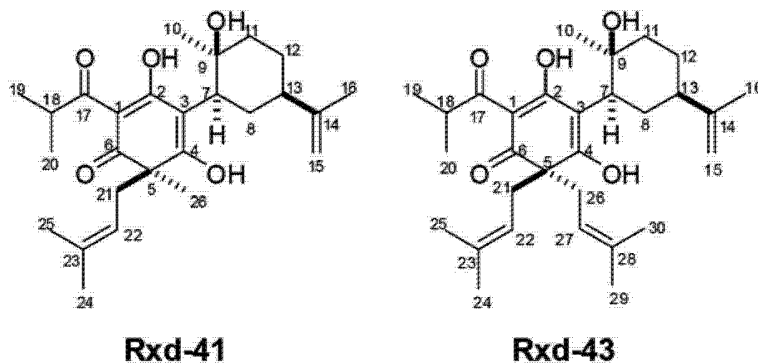
发明内容：

[0003] 本发明目的在于提供从芒种花(Hypericum henryi levl.)中分离得到的一类具有六元环侧链的单环间苯三酚类化合物，其制备方法，在药物中特别是在抗肿瘤药物中的应用。

[0004] 为了实现本明的上述目的，本发明提供了如下的技术方案：

[0005] 下述结构式所示的单环间苯三酚类化合物 Rxd-41 和 Rxd-43 或其药用盐，

[0006]



[0007] 所述的药用盐，是指药学上可接受的盐，与有机酸如酒石酸或柠檬酸或甲酸或乙二酸，或是与无机酸如盐酸或硫酸或磷酸形成的盐。

[0008] 用于预防或治疗肿瘤疾病的药物组合物,其包含所述的化合物 Rxd-41、Rxd-43 或其药用盐和至少一种药学上可接受的载体。

[0009] 所示的化合物 Rxd-41、Rxd-43 的制备方法,包括用 100%丙酮或乙醇或甲醇溶剂,冷浸或热回流浸提芒种花地上部分粗粉得到总浸膏,总浸膏经各种正反相柱层析及制备和半制备 HPLC 分离后得所述化合物。

[0010] 所述的化合物 Rxd-41、Rxd-43 或其药用盐在制备预防或治疗肿瘤药物中的应用。

[0011] 所述的化合物 Rxd-41、Rxd-43 或其药用盐在制备预防或治疗白血病、肺癌、结肠癌药物中的应用。

[0012] 本发明的化合物 Rxd-41、Rxd-43 可直接作为药物使用,其余辅料为药物学上可接受的,对人和动物无毒和惰性的药用载体或赋形剂。

[0013] 所述的药用载体或赋形剂是一种或多种选自固体、半固体和液体稀释剂、超填料以及药物制品辅料。将所述的有效提取物或有效部位以单位体重服用量的形式使用。本发明的药物可经口服和口腔喷雾两种形式给药。

[0014] 口服可用其固体或液体制剂,如粉剂、片剂、糖衣片剂、胶囊、酏剂、糖浆、滴丸剂等。

[0015] 口腔喷雾可用其固体或液体制剂。

[0016] 本发明药物可用于治疗肿瘤疾病。

具体实施方式：

[0017] 下面用本发明的实施例来进一步说明本发明的实质性内容,但并不以此来限定本发明。

[0018] 实施例 1：

[0019] 化合物 Rxd-41、Rxd-43 的制备：

[0020] 分离流程:干燥芒种花地上部分 18kg,粉碎后用 100% 甲醇(每次 50 升)在室温下冷浸三次,每次 2 天,提取液浓缩后用硅胶拌样上硅胶柱,分别以氯仿及乙酸乙酯冲柱。氯仿部分 125g,以丙酮溶解,聚酰胺拌样上 MCI 柱,以甲醇/水为流动相梯度洗脱,用 TLC 进行检测,合并相同馏份,得到七个部分。其中第三部分硅胶拌样过硅胶柱分成三部分,组分 2 经 Sephadex LH-20 柱后,再经过 MPLC 分离得到 Rxd-41 (18mg), Rxd-43 (10mg)。

[0021] 化合物结构解析：

[0022] 化合物 Rxd-43, 无色油状物, $[\alpha]_D^{25} -48.8$ (c 0.16, MeOH)。ESI-MS 谱给出准分子离子峰为 $m/z 507 [M+Na]^+$, 结合高分辨正离子 HR-ESIMS ($m/z [M+Na]^+ 507.3093$, calcd for 507.3086) 和 NMR 谱提供的信息, 确定其分子式为 $C_{30}H_{44}O_5$ 。UV 光谱在 206(3.3), 224(3.3), 356 (3.2) nm 处有吸收, 说明分子中存在多个共轭基团。IR 光谱显示存在羟基 (3419cm^{-1} , br) 和羰基 (1727 and 1637cm^{-1}) 等基团。分析 ^1H 和 ^{13}C NMR 谱, 再结合 HSQC 谱表明化合物 43 中含有 30 个碳信号, 其中包括 8 个甲基, 6 个亚甲基, 5 个次甲基; 11 个季碳 (包括 9 个不饱和季碳)。

[0023] 表 -1. Rxd-43 的 NMR 波谱数据 (Me_2CO)

[0024]

	¹³ C	¹ H	COSY	HMBC	NOESY
C-1	107.4, s				
C-2	191.1, s				
C-3	112.6, s				
C-4	177.9, s				
C-5	58.5, s				
C-6	196.4, s				
C-7	42.2, d	3.28 dd (13.2, 3.8)	8	2,3,4,8,9,13	8 α ,10,11 α ,13
C-8	31.8, t	H β 1.96 m	7,13	3,7,9,12,13,14	
		H α 1.29 m	7,13	7,9,12,13	7,13
C-9	73.7, s				
C-10	27.9, q	1.23 s		7,9,11	7,11 α
C-11	40.4, t	H β 1.90 m	12	7,9,12,13	
		H α 1.69 m	12	12,13	7,10
C-12	27.3, t	H β 1.79 m	11,13	9,11,13	
		H α 1.61 m	11,13	9,11,13	13
C-13	46.4, d	2.11 m	8,12	8,12,14,15,16	7,8 α ,12 α
C-14	150.6, s				
C-15	108.9, t	4.71 s		13,14,16	
		4.69 s		13,14,16	16
C-16	21.1, q	1.73 s		13,14,15	15
C-17	206.4, s				
C-18	35.6, d	4.10 sept. (6.8)	19,20	17,19,20	
C-19	19.2, q	1.08 d (6.8)	18	17,18,20	
C-20	19.3, q	1.09 d (6.8)	18	17,18,19	
C-21	39.0, t	2.58 m	22	4,5,6,22,23	25
C-22	119.7, d	4.80 t (7.9)	21	5,21,24,25	24
C-23	134.3, s				
C-24	26.0, q	1.50 s		22,23,25	22,25
C-25	18.0, q	1.55 s		22,23,24	21,24
C-26	39.3, t	2.59 overlapped	27	4,5,6,27,28	30
C-27	120.0, d	4.86 t (7.5)	26	5,26,29,30	29
C-28	134.4, s				
C-29	26.1, q	1.52 s		27,28,30	27,30
C-30	18.0, q	1.56 s		27,28,29	26,29

[0025]

[0026] 化合物 Rxd-41, 无色油状物, $[\alpha]_D^{25} + 36.1(c\ 0.1, \text{MeOH})$ 。ESI-MS 谱给出准分子离子峰为 $m/z\ 429[M-H]^-$, 结合高分辨正离子 HR-EI ($m/z\ [M]^+ 430.2726$, calcd for 430.2719) 和 NMR 谱提供的信息, 确定其分子式为 $C_{26}H_{38}O_5$ 。UV 光谱在 202(3.0), 223(2.9), 290(2.7), 356(2.8) nm 处有吸收, 说明分子中存在多个共轭基团。IR 光谱显示存在羟基 (3426cm^{-1} , br) 和羰基 (1712 and 1632cm^{-1}) 等基团。分析 ^1H 和 ^{13}C NMR 谱, 再结合 HSQC 谱表明化合物 41

中含有 26 个碳信号,其中包括 7 个甲基,5 个亚甲基,4 个次甲基;10 个季碳(包括 8 个不饱和季碳)。

[0027] 表 -2. Rxd-41 的 NMR 波谱数据 (MeOD)

[0028]

	¹³ C	¹ H	COSY	HMBC	NOESY
C-1	106.1, s				
C-2	189.7, s				
C-3	110.4, s				
C-4	182.7, s				
C-5	55.3, s				
C-6	199.2, s				
C-7	42.8, d	3.20 d (12.4)	8	2,4,7,8,13,15	10,12b,13
C-8	32.2, t	Ha 1.98 m	7,13	3,7,9,12,13,14	12b,13,15,16
		Hb 1.29m overlapped	7,13	7,9,12,13,	7,13,15,16
C-9	73.2, s				
C-10	29.5, q	1.30 s		7,9,11,	7
C-11	41.0, t	Ha 1.80 m	12	3,7,9,12,13,14,16	10,12b,13
		Hb 1.56 m	12	9,12,13	
C-12	27.8, t	Ha 1.78 m	11,13	3,7,9,10,11,13,14,	10,13,15
		Hb 1.56 m	11,13	9,13	7,8b,11a
C-13	47.3, d	2.08 m	8,12	7,8,11,14,15	7,11a,12a,15,16
C-14	151.1, s				
C-15	109.1, t	Ha 4.70 s		13,14,16	12a,13
		Hb 4.66 s		13,14,16	16
C-16	21.1, q	1.71 s		13,14,15	8b,13,15b
C-17	208.0, s				
C-18	32.1, d	3.98 m	19,20	17,19,20	19,20
C-19	19.6, q	1.10 d (6.7)	18	17,18,20	18,20
C-20	19.4, q	1.09 d (6.7)	18	17,18,19	18,19
C-21	40.1, t	2.55 m	22	4,5,22,23,26	24,26
C-22	120.7, d	4.84 t (7.5)	21,24,	24,25	21,22,25
C-23	135.0, s				
C-24	26.2, q	1.54 s		22,23,25	21
C-25	18.2, q	1.57 s		22,23,24	22
C-26	24.9, q	1.30 s		4,5,6,21,	21

[0029]

[0030] 实施例 2:

[0031] Rxd41 和 Rxd43 体外抗肿瘤活性评价:

[0032] 药物与试剂:细胞试验用的 RPMI1640 培养基、DMEM 培养基、胎牛血清 (FBS)、胰酶为 GibcoBRL 产品 (Invitrogen Coporation, USA);细胞计数试剂盒 CCK-8 为日本同仁株式会社产品。其它化学试剂购自 Sigma/Aldrich 公司。

[0033] 细胞系与细胞培养：人非小细胞肺癌细胞株 NCI-H460 和人前列腺癌细胞株 PC3 的培养液为采用添加了 10%FBS 的 RPMI1640 培养基，人乳腺癌细胞株 MCF-7 的培养液为添加了 10%FBS 的高糖 DMEM 培养基，人结直肠腺癌细胞株 HCT-15 培养液为添加了 10%FBS、2mM L- 谷氨酰胺、1.5g/L 碳酸氢钠、4.5g/L 葡萄糖、10mMHEPES 和 1.0mM 丙酮酸钠的 RPMI1640 培养基培养。细胞培养条件：37℃、饱和湿度、5% 二氧化碳培养箱。

[0034] 药物作用：收集对数生长期的肿瘤细胞，用培养液配成每毫升含 5×10^4 个细胞的单细胞悬液，按 100 μ L/ 孔接种于 96 孔板后置于 37℃ 培养箱中培育 24 小时使细胞贴壁。再将各孔的培养液更换成含不同浓度待测药物的新鲜培养液，每 3 孔为一个检测浓度。实验另设培养液空白对照组及未加药处理的细胞对照组。药物与细胞作用 72h 后，取出培养板，按 10 μ L/ 孔加入 CCK-8 后继续置于细胞培养箱 1-2h。取出，与酶标仪上测定 450nm 处每孔的光密度值 OD。该光密度值和活细胞数目正相关。根据 OD 值可得出不同浓度药物作用下的细胞相对于对照孔细胞的活力(%)，及细胞活力为 50% 时的药物浓度即药物对细胞增殖的半数抑制浓度 IC_{50} 。 IC_{50} 值越小则药物抑制肿瘤细胞增殖的能力越强。

[0035] 结果：Rxd41 和 Rxd43 对人非小细胞肺癌细胞株 NCI-H460、人结直肠腺癌细胞株 HCT-15、人乳腺癌细胞株 MCF7 和人前列腺癌细胞株 PC3 的增殖都显示了抑制活性。其中，Rxd43 活性最强，在所有四种细胞株上都表现出了显著的增殖抑制能力(IC_{50} 1.3 ~ 7.9 μ M)，对 HCT-15 细胞的抑制能力最强。Rxd41 对 NCI-H460、HCT-15 及 MCF-7 细胞的增殖也显示了显著的抑制活性(IC_{50} 2.4 ~ 7.0 μ M)，且对 HCT-15 细胞也表现出了更强的抑制活性，但其对 PC3 细胞增殖的抑制能力稍弱。具体数据见表 3。

[0036] 表 3. Rxd41、Rxd43 对肿瘤细胞增殖的抑制作用(IC_{50} ， μ M)

[0037]

	NCI-H460	HCT-15	MCF-7	PC3
Rxd41	7.03 \pm 4.96	2.41 \pm 0.14	6.63 \pm 2.70	23.76 \pm 2.36
Rxd43	1.76 \pm 1.24	1.29 \pm 0.17	3.27 \pm 0.85	7.90 \pm 4.19

[0038] 注：表中所示为三次独立试验结果的平均值 \pm 标准差

[0039] 结论：Rxd41 和 Rxd43 具有显著的抗肿瘤作用，具有一定的抗肿瘤作用。

[0040] 实施例 3：

[0041] 按实施例 1 制得 Rxd41 和 Rxd43，按其 与赋形剂重量比 1:1 的比例加入赋形剂，制粒压片。

[0042] 实施例 4：

[0043] 按实施例 1 制得 Rxd41、Rxd43，按其 与赋形剂重量比 1:2 的比例加入赋形剂，制粒压片。

[0044] 实施例 5：

[0045] 按实施例 1 制得 Rxd41、Rxd43，按常规胶囊制剂方法制成胶囊。

[0046] 实施例 6：

[0047] 按实施例 1 制得 Rxd41、Rxd43，再按下述方法制成片剂：

- | | | |
|--------|--|-------|
| | Rxd41、Rxd43 | 100mg |
| | 淀粉 | 适量 |
| [0048] | 片剂： | |
| | 玉米浆 | 适量 |
| | 硬脂酸镁 | 适量 |
| [0049] | 实施例 7： | |
| [0050] | 胶囊剂：Rxd41、Rxd43 | 100mg |
| [0051] | 淀粉 | 适量 |
| [0052] | 硬脂酸镁 | 适量 |
| [0053] | 制备方法：将 Rxd41、Rxd43，与助剂混合，过筛，在合适的容器中均匀混合，把得到的混合物装入硬明胶胶囊。 | |
| [0054] | 实施例 8： | |
| | Rxd41、Rxd43 | 80 mg |
| | 氯化钠 | 8 mg |
| | EDTA | 1 mg |
| [0055] | 鼻喷雾剂： | |
| | 磷酸钠缓冲液 (pH6.5) | 10 mg |
| | 多乙氧基醚 | 10 mg |
| | 重蒸馏水 | 2ml |
| [0056] | 制备方法：搅拌下于适当体积的重蒸馏水中每次加入一种成分，直至完全深解，然后再加入另一种成分。加水至 2ml 后，将该溶液在无菌过滤器上过滤，装入瓶中并按照适当的剂量分隔。 | |
| [0057] | 实施例 9： | |
| [0058] | 滴丸：Rxd41、Rxd43 | 1g |
| [0059] | 聚乙二醇 6000 | 9g |
| [0060] | 制法：Rxd41、Rxd43 与聚乙二醇 6000 熔融液的制备：按上述处方量称取 Rxd41、Rxd43，加入适量无水乙醇，微热溶解后，加入处方量的聚乙二醇熔融液中 (60℃水浴保温)，搅拌混合均匀，直至乙醇挥尽为止，静置于 60℃水浴中保温 30 分钟，待气泡除尽，然后将除尽气泡的上述混匀熔融液转入贮液筒内，在保温 80-85℃的条件下，控制滴速，一滴滴地滴入冷凝液中，等冷凝完全，倾去冷凝液，收集滴丸，沥净和用滤纸除去丸上的冷凝液，放置硅胶干燥器中或自然干燥即可。 | |