



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101812040 A

(43) 申请公布日 2010.08.25

(21) 申请号 200910046628.4

A61K 38/10(2006.01)

(22) 申请日 2009.02.25

A61P 35/00(2006.01)

(71) 申请人 上海金昊药业开发有限公司

地址 201203 上海市张江高科技园区哈雷路
1043 号 303 室

(72) 发明人 李云森 陈子珺 檀爱民 程萍
雷启福

(74) 专利代理机构 上海新天专利代理有限公司
31213

代理人 王敏杰

(51) Int. Cl.

C07D 307/58(2006.01)

C07K 7/06(2006.01)

C07K 7/02(2006.01)

C07K 1/02(2006.01)

A61K 31/365(2006.01)

A61K 38/08(2006.01)

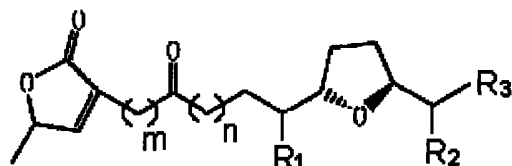
权利要求书 2 页 说明书 14 页 附图 1 页

(54) 发明名称

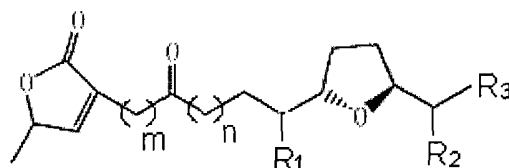
番荔枝内酯衍生物、制备方法及其用途

(57) 摘要

本发明公开了番荔枝内酯衍生物、制备方法及其用途。所述番荔枝内酯衍生物以番荔枝内酯为主体,进一步包含 1 个反式四氢呋喃环、1 个羰基、1 个丁-内酯环、IL-11 α 配体 CGRRAGGSC 和 / 或羟基。本发明采用番荔枝科植物粗粉作为原料,进行提纯、萃取等得到番荔枝内酯 (Corossolone),再和多肽 IL-11 α Binding Peptide II(CGRRAGGSC)进行进一步的酯化反应,得到所述番荔枝内酯衍生物。本发明所公开的番荔枝内酯衍生物具有较高的抗癌活性,针对性地治疗前列腺癌以及恢复癌症患者的免疫功能。



1. 一种番荔枝内酯衍生物,其特征在于,是一种具有手性的长碳链活性化合物,包含 1 个反式四氢呋喃环、1 个羰基、1 个丁 - 内酯环、IL-11 α 配体 CGRRAGGSC 和 / 或羟基,其分子结构的通式如下:

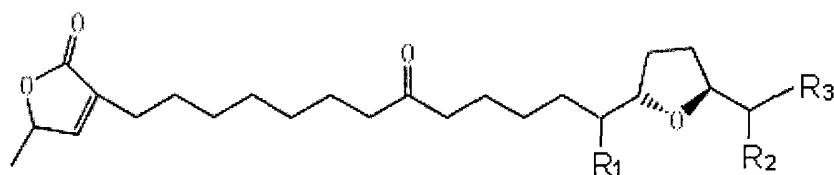


其中, R_1 为 -CGRRAGGSC 或 -OH, R_2 为 -CGRRAGGSC 或 -OH, R_3 为 $C_{6\sim 20}$ 的烷基;

其中, m、n 处为直链烷基, $m = 4 \sim 10$, $n = 0 \sim 5$;

所述的 R_1 、 R_2 为 R 或 S 构型。

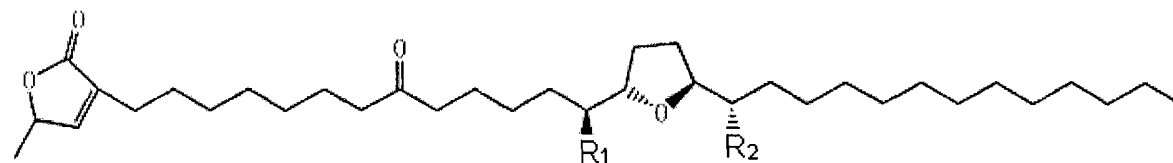
2. 如权利要求 1 所述的番荔枝内酯衍生物,其特征在于,分子结构的通式进一步如下:



其中, R_1 为 -CGRRAGGSC 或 -OH, R_2 为 -CGRRAGGSC 或 -OH, R_3 为 $C_{6\sim 20}$ 的烷基;

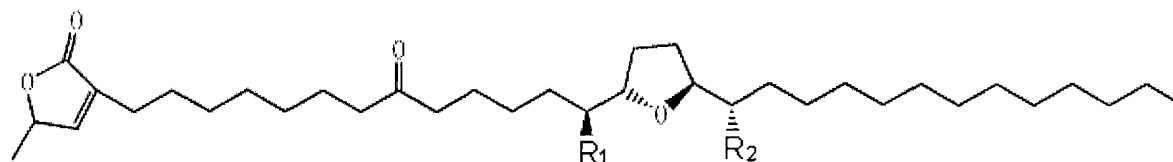
所述的 R_1 、 R_2 为 R 或 S 构型。

3. 如权利要求 1 所述的番荔枝内酯衍生物,其特征在于,分子结构如下:



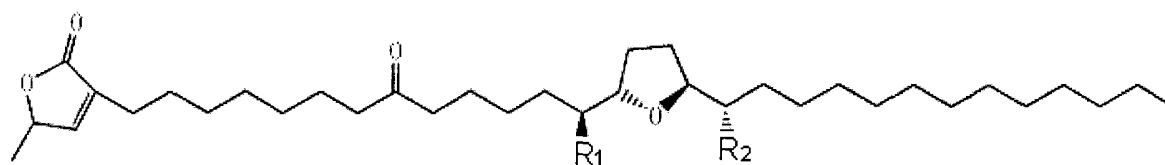
其中, R_1 为 -CGRRAGGSC, R_2 为 -OH。

4. 如权利要求 1 所述的番荔枝内酯衍生物,其特征在于,分子结构如下:



其中, R_1 为 -OH, R_2 为 -CGRRAGGSC。

5. 如权利要求 1 所述的番荔枝内酯衍生物,其特征在于,分子结构如下:



其中, R_1 为 -CGRRAGGSC, R_2 为 -CGRRAGGSC。

6. 一种如权利要求 2~5 所述的番荔枝内酯衍生物的制备方法,其特征在于,包含以下步骤:

步骤 1:在索氏提取器中加入番荔枝科植物粗粉、醇类物质,回流,得到醇类物质提取液,然后减压回收溶剂至浸膏状,得到提取物;

步骤 2:将步骤 1 所得提取物加水加热溶解得到溶液,随后进行步骤 2.1、步骤 2.2 的萃

取以及步骤 2.3；

步骤 2.1：采用一种或一种以上的极性溶剂萃取所得溶液数次，分液得到水层，合并该极性溶剂萃取过的水层，并蒸去其中的残留极性溶剂；

步骤 2.2：采用一种或一种以上的极性溶剂萃取所得水层数次，分液得到有机层，合并有机层；

步骤 2.3：以无水硫酸钠将所得有机层脱水，减压回收溶剂至干，得到残留物；

步骤 3：将步骤 2.3 所得残留物溶于温热醇类物质，随后浓缩，放置析晶，滤出析出的结晶，得到黄色针状结晶；

步骤 4：对步骤 3 所得的结晶，采用醇类物质、水反复重结晶，得到番荔枝内酯 (Corossolone)；

步骤 5：将步骤 4 所得番荔枝内酯 (Corossolone)、多肽 IL-11 α Binding Peptide II (CGRRAGGSC) 在无水极性溶剂中混合，在加热条件下，搅拌冷凝回流，随后趁热抽滤，分离出固体超强酸；

步骤 6：蒸馏步骤 5 所得固体超强酸，冷却得到粉末状晶体。

7. 如权利要求 6 所述的番荔枝内酯衍生物的制备方法，其特征在于，所述步骤 1 中的醇类物质为无水乙醇或无水甲醇，优选为无水乙醇；

所述步骤 3 中的醇类物质为无水乙醇或无水甲醇，优选为无水甲醇；

所述步骤 4 中的醇类物质为无水乙醇或无水甲醇，优选为无水甲醇；

所述步骤 1 中，以每 150g 番荔枝科植物粗粉对应 300 ~ 500ml 乙醇的比例在索氏提取器进行回流，回流时间为 10 ~ 12 小时；

所述步骤 3 中，采用 30 ~ 40℃ 的甲醇溶解所述残留物；

所述步骤 4 中，采用甲醇和水对所得晶体重复结晶 2 ~ 4 次。

8. 如权利要求 6 所述的番荔枝内酯衍生物的制备方法，其特征在于，所述步骤 2.1 中的极性溶剂为氯仿和 / 或丙酮，优选为体积比为 1 : 1.5 的氯仿丙酮混合溶液；

所述步骤 2.2 中的极性溶剂为石油醚或乙酸乙酯，优选为 60-90℃ 的乙酸乙酯；

所述步骤 2 中，以 30 ~ 50ml 水在 60 ~ 80℃ 加热条件下溶解步骤 1 所得提取物；

所述步骤 2.1 中，以体积比为 1 : 0.8 ~ 1 : 1.5 来混合所得溶液和氯仿并进行 1 ~ 4 次萃取；

所述步骤 2.2 中，以体积比为 1 : 0.8 ~ 1 : 1.5 来混合所得水层和乙酸乙酯并进行 1 ~ 4 次萃取。

9. 如权利要求 6 所述的番荔枝内酯衍生物的制备方法，其特征在于，所述步骤 5 中的无水极性溶剂为无水乙醇或无水甲醇，优选为无水乙醇；

所述步骤 5 中，以每 8 ~ 17g 步骤 4 所得番荔枝内酯 (Corossolone) 对应 0.7 ~ 2.3g 多肽 IL-11 α Binding Peptide II (CGRRAGGSC) 和 80 ~ 150ml 无水乙醇的比例混合，并在 60 ~ 80℃ 加热条件下，搅拌冷凝回流 8 小时。

10. 如权利要求 2 ~ 5 所述的番荔枝内酯衍生物在治疗前列腺癌以及恢复癌症患者的免疫功能中的应用。

番荔枝内酯衍生物、制备方法及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及番荔枝内酯衍生物,特别涉及含有多肽的番荔枝内酯衍生物。

[0002] 本发明还涉及所述含有多肽的番荔枝内酯衍生物的制备方法及其在治疗癌症中的应用。

背景技术

[0003] 国内外多篇文献中都已公开番荔枝内酯具有很强的抗肿瘤活性,并且由于其结构独特,作用机理不同于现有的抗肿瘤药物,并且其作用于线粒体干扰能量代谢、无致突变型,对其的研究非常广泛。

[0004] 中国专利 ZL02115003.6 公开了一种新型番荔枝内酯衍生物及其制备方法和用途。该专利采用直接提纯番荔枝种子的方法得到番荔枝双酯素,并用于癌症的治疗。然而直接的番荔枝内酯类物质在治疗癌症方面具有一定的局限,对于特定种类癌症的治疗效果不佳。

[0005] 中国专利 ZL99125750.2 公开了手性番荔枝内酯类化合物、合成方法及其用途。该专利采用有机合成的方法以手性卤代烷和手性二羟基烷基羧酸酯为原料进行合成,得到多种番荔枝内酯类衍生物,并用于癌症的治疗。然而上述有机合成过程较为复杂,并采用了多种化学物质、催化剂等,从而使得合成所得产物中的杂质较多、毒副作用较大,并且导致后期的提纯等过程复杂。

[0006] 同时,中国专利 97106368.0、01107594.5、03141633.0、200310108779.0、03111501.2,中国专利申请 200610085443.0、200610085998.5、200610085741.X、200710170479.3、200710043520.0 也公开了多种番荔枝内酯类衍生物及其在治疗癌症中的应用。然而上述专利及专利申请多是采用过程复杂、使用大量催化剂和化学物质的有机合成来制备番荔枝内酯类衍生物的,其毒副作用会极大的干扰其作为药物的使用。

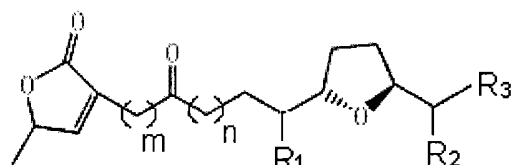
发明内容

[0007] 本发明的目的之一在于提供能针对性治疗前列腺癌以及恢复癌症患者免疫功能的番荔枝内酯衍生物,从而解决目前番荔枝内酯衍生物类药物无法进行针对性治疗前列腺癌的缺点。

[0008] 本发明的目的之二在于提供一种制备番荔枝内酯衍生物的制备方法,从而避免单纯的采用有机合成所带来的毒副作用较大的缺陷,并且避免单纯的采用原料提纯多带来的药效较低、无法针对性治疗某一特定癌症的缺陷。

[0009] 本发明技术方案所提供的番荔枝内酯衍生物,其分子结构具有如下的通式:

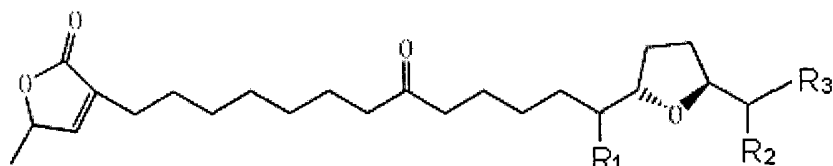
[0010]



[0011] 其中, R_1 为 -CGRRAGGSC 或 -OH, R_2 为 -CGRRAGGSC 或 -OH, R_3 为 $C_{6\sim 20}$ 的烷基。其中, m, n 处为直链烷基, $m = 4 \sim 10$, $n = 0 \sim 5$ 。所述的 R_1, R_2 为 R 或 S 构型。

[0012] 其中 m, n 处的直链烷基中, 优选 $m = 7, n = 3$, 即优选的番荔枝内酯衍生物的分子结构具有如下的通式:

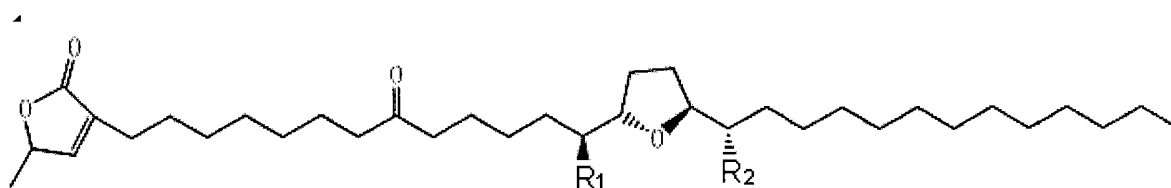
[0013]



[0014] 其中, R_1 为 -CGRRAGGSC 或 -OH, R_2 为 -CGRRAGGSC 或 -OH, R_3 为 $C_{6\sim 20}$ 的烷基。所述的 R_1, R_2 为 R 或 S 构型。

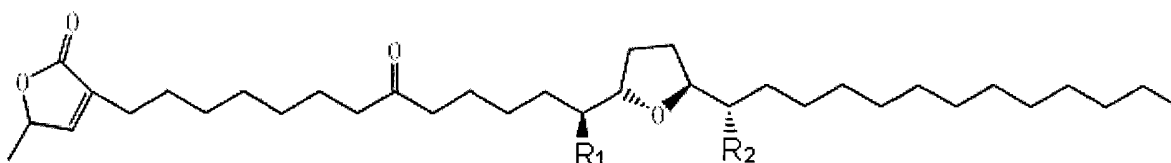
[0015] 进一步, R_3 优选为 C_{12} 的直链烷基, 即优选的番荔枝内酯衍生物的分子结构如下:

[0016]



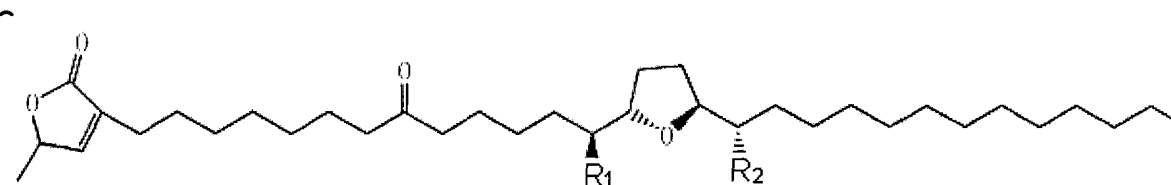
[0017] 其中, R_1 为 -CGRRAGGSC, R_2 为 -OH。

[0018]



[0019] 其中, R_1 为 -OH, R_2 为 -CGRRAGGSC。

[0020]



[0021] 其中, R_1 为 -CGRRAGGSC, R_2 为 -CGRRAGGSC。

[0022] 本发明采用番荔枝科植物粗粉作为原料, 进行提纯、萃取等得到番荔枝内酯 (Corosolone), 再和多肽 IL-11 α Binding Peptide II (CGRRAGGSC) 进行进一步的酯化反应, 得到产品。其具体制备方法如下:

[0023] 步骤 1: 在索氏提取器中加入 150g 番荔枝科植物粗粉、300 ~ 500ml 醇类物质, 回流 10 ~ 12 小时, 得到提取液, 然后减压回收溶剂至浸膏状, 得到提取物。

[0024] 所述醇类物质为无水乙醇或无水甲醇, 优选为无水乙醇 (分析纯)。

[0025] 步骤2:将步骤1所得提取物加30~50ml水,在60~80℃加热条件下溶解得到溶液,随后进行步骤2.1、步骤2.2的萃取以及步骤2.3。

[0026] 步骤2.1:采用一种或一种以上的极性溶剂,以体积比为1:0.8~1:1.5混合所得溶液和极性溶剂,并进行1~4次萃取,分液得到水层,合并该水层,并蒸去其中的残留极性溶剂。

[0027] 所述极性溶剂为氯仿和/或丙酮,优选为体积比为1:1.5的氯仿丙酮混合溶液(分析纯)。

[0028] 步骤2.2:采用一种或一种以上的极性溶剂,以体积比为1:0.8~1:1.5混合所得水层和极性溶剂,并进行1~4次萃取,分液得到有机层,合并该有机层。

[0029] 所述极性溶剂为石油醚或乙酸乙酯,优选为60-90℃的乙酸乙酯(分析纯)。

[0030] 步骤2.3:以无水硫酸钠将所得有机层脱水,减压回收溶剂至干,得到残留物。

[0031] 步骤3:将步骤2.3所得残留物溶于温度为30~40℃的温热醇类物质,随后浓缩,放置析晶,滤出析出的结晶,得到黄色针状结晶。

[0032] 所述醇类物质为无水乙醇或无水甲醇,优选为无水甲醇(分析纯)。

[0033] 步骤4:对步骤3所得的结晶,采用醇类物质、水反复重结晶2~4次,得到番荔枝内酯(Corossolone)。

[0034] 所述醇类物质为无水乙醇或无水甲醇,优选为无水甲醇(分析纯)。

[0035] 步骤5:将步骤4所得番荔枝内酯(Corossolone)和多肽IL-11 α Binding Peptide II(CGRRAGGSC),以每8~17g番荔枝内酯(Corossolone)对应0.7~2.3g多肽IL-11 α Binding Peptide II(CGRRAGGSC)和80~150ml无水极性溶剂的比例混合,并在60~80℃加热条件下,搅拌冷凝回流8小时,随后趁热抽滤,分离出固体超强酸。

[0036] 所述极性溶剂为无水乙醇或无水甲醇,优选为无水乙醇(分析纯)。

[0037] 步骤6:蒸馏步骤5所得固体超强酸,冷却得到粉末状晶体。

[0038] 经高效液相色谱、LC-MS、NMR分析确认所得粉末状晶体为含有多肽IL-11 α Binding Peptide II(CGRRAGGSC)的番荔枝内酯(Corossolone)衍生物。

[0039] 本发明同时公开了前述本发明所公开的任一结构的番荔枝内酯衍生物在治疗前列腺癌中的应用,以及在恢复癌症患者的免疫功能中的应用。

[0040] 本发明所公开的前述任一结构的番荔枝内酯衍生物可以采用药剂学上的常规药物载体制成任何一种剂型,包括但不限于片剂、胶囊剂、软胶剂、喷雾剂、凝胶剂、凝胶吸入剂、口服剂、混悬剂、冲剂、贴剂、软膏、丸剂、散剂、注射剂、输液剂、冻干注射剂、脂质体注射剂、靶向给药注射剂、栓剂、缓释制剂或控释制剂。优选为冻干粉针、水针等注射剂、直肠给药的栓剂。

附图说明

[0041] 图1是本发明实施例七中所述的番荔枝内酯衍生物的分子结构通式一。

[0042] 图2是本发明实施例七中所述的番荔枝内酯衍生物的分子结构通式二。

[0043] 图3是本发明实施例八、实施例九和实施例十中所述的番荔枝内酯衍生物的分子结构通式。

具体实施方式

[0044] 根据本发明的权利要求和发明内容所公开的内容,本发明的技术方案具体如下所述。

[0045] 实施例一番荔枝内酯衍生物的制备:

[0046] 以下所制备过程中所采用的各化学试剂如无特别标注,则为分析纯。

[0047] 采用番荔枝科植物粗粉作为原料,制备含有多肽 IL-11 α Binding Peptide II (CGRRAGGSC) 的番荔枝内酯 (Corossolone) 衍生物,具体制备方法如下:

[0048] 步骤 1:在索氏提取器中加入 150g 番荔枝科植物粗粉、300 ~ 500ml 醇类物质,回流 10 ~ 12 小时,得到提取液,然后减压回收溶剂至浸膏状,得到提取物。

[0049] 所述醇类物质为无水乙醇或无水甲醇。

[0050] 步骤 2:将步骤 1 所得提取物加 30 ~ 50ml 水,在 60 ~ 80℃ 加热条件下溶解得到溶液,随后进行步骤 2.1、步骤 2.2 的萃取以及步骤 2.3。

[0051] 步骤 2.1:以体积比为 1 : 0.8 ~ 1 : 1.5 混合所得溶液和极性溶剂,并进行 1 ~ 4 次萃取,分液得到水层,合并该水层,并蒸去其中的残留极性溶剂。

[0052] 所述极性溶剂为氯仿和 / 或丙酮。

[0053] 步骤 2.2:以体积比为 1 : 0.8 ~ 1 : 1.5 混合所得水层和极性溶剂,并进行 1 ~ 4 次萃取,分液得到有机层,合并该有机层。

[0054] 所述极性溶剂为石油醚或 60-90℃ 的乙酸乙酯。

[0055] 步骤 2.3:以无水硫酸钠将所得有机层脱水,减压回收溶剂至干,得到残留物。

[0056] 步骤 3:将步骤 2.3 所得残留物溶于温度为 30 ~ 40℃ 的温热醇类物质,随后浓缩,放置析晶,滤出析出的结晶,得到黄色针状结晶。

[0057] 所述醇类物质为无水乙醇或无水甲醇。

[0058] 步骤 4:对步骤 3 所得的结晶,采用醇类物质、水反复重结晶 2 ~ 4 次,得到番荔枝内酯 (Corossolone)。

[0059] 所述醇类物质为无水乙醇或无水甲醇。

[0060] 步骤 5:将步骤 4 所得番荔枝内酯 (Corossolone) 和多肽 IL-11 α Binding Peptide II (CGRRAGGSC),以每 8 ~ 17g 番荔枝内酯 (Corossolone) 对应 0.7 ~ 2.3g 多肽 IL-11 α Binding Peptide II (CGRRAGGSC) 和 80 ~ 150ml 无水极性溶剂的比例混合,并在 60 ~ 80℃ 加热条件下,搅拌冷凝回流 8 小时,随后趁热抽滤,分离出固体超强酸。

[0061] 所述极性溶剂为无水乙醇或无水甲醇。

[0062] 步骤 6:蒸馏步骤 5 所得固体超强酸,冷却得到粉末状晶体。

[0063] 经高效液相色谱、LC-MS、NMR 分析确认所得粉末状晶体为含有多肽 IL-11 α Binding Peptide II (CGRRAGGSC) 的番荔枝内酯 (Corossolone) 衍生物。

[0064] 实施例二番荔枝内酯衍生物的制备:

[0065] 采用以下技术参数改进实施例一的制备方法:

[0066] 步骤 1:在索氏提取器中加入 150g 番荔枝科植物粗粉、300ml 无水乙醇,回流 12 小时,得到提取液,然后减压回收溶剂至浸膏状,得到提取物。

[0067] 步骤 2:将步骤 1 所得提取物加 30ml 水,在 80℃ 加热条件下溶解得到溶液,随后进行步骤 2.1、步骤 2.2 的萃取以及步骤 2.3。

[0068] 步骤 2.1:以体积比为 1 : 0.8 混合所得溶液和极性溶剂,并进行 1 ~ 4 次萃取,分液得到水层,合并该水层,并蒸去其中的极性溶剂。

[0069] 所述极性溶剂为体积比为 1 : 1.5 的氯仿丙酮混合溶液。

[0070] 步骤 2.2:以体积比为 1 : 0.8 混合所得水层和 60℃的乙酸乙酯,并进行 1 ~ 4 次萃取,分液得到有机层,合并该有机层。

[0071] 步骤 2.3:以无水硫酸钠将所得有机层脱水,减压回收溶剂至干,得到残留物。

[0072] 步骤 3:将步骤 2.3 所得残留物溶于温度为 30℃的温热无水甲醇,随后浓缩,放置析晶,滤出析出的结晶,得到黄色针状结晶。

[0073] 步骤 4:对步骤 3 所得的结晶,采用无水甲醇、水反复重结晶 2 次,得到番荔枝内酯 (Corossolone)。

[0074] 步骤 5:将步骤 4 所得番荔枝内酯 (Corossolone) 和多肽 IL-11 α Binding Peptide II (CGRRAGGSC),以每 8g 番荔枝内酯 (Corossolone) 对应 0.7g 多肽 IL-11 α Binding Peptide II (CGRRAGGSC) 和 80ml 无水乙醇的比例混合,并在 60℃加热条件下,搅拌冷凝回流 8 小时,随后趁热抽滤,分离出固体超强酸。

[0075] 步骤 6:蒸馏步骤 5 所得固体超强酸,冷却得到粉末状晶体。

[0076] 经高效液相色谱、LC-MS、NMR 分析确认所得粉末状晶体为含有多肽 IL-11 α Binding Peptide II (CGRRAGGSC) 的番荔枝内酯 (Corossolone) 衍生物。

[0077] 实施例三番荔枝内酯衍生物的制备:

[0078] 采用以下技术参数改进实施例一的制备方法:

[0079] 步骤 1:在索氏提取器中加入 150g 番荔枝科植物粗粉、350ml 无水乙醇,回流 11.5 小时,得到提取液,然后减压回收溶剂至浸膏状,得到提取物。

[0080] 步骤 2:将步骤 1 所得提取物加 35ml 水,在 75℃加热条件下溶解得到溶液,随后进行步骤 2.1、步骤 2.2 的萃取以及步骤 2.3。

[0081] 步骤 2.1:以体积比为 1 : 0.9 混合所得溶液和极性溶剂,并进行 1 ~ 4 次萃取,分液得到水层,合并该水层,并蒸去其中的极性溶剂。

[0082] 所述极性溶剂为体积比为 1 : 1.5 的氯仿丙酮混合溶液。

[0083] 步骤 2.2:以体积比为 1 : 0.9 混合所得水层和 70℃的乙酸乙酯,并进行 1 ~ 4 次萃取,分液得到有机层,合并该有机层。

[0084] 步骤 2.3:以无水硫酸钠将所得有机层脱水,减压回收溶剂至干,得到残留物。

[0085] 步骤 3:将步骤 2.3 所得残留物溶于温度为 30℃的温热无水甲醇,随后浓缩,放置析晶,滤出析出的结晶,得到黄色针状结晶。

[0086] 步骤 4:对步骤 3 所得的结晶,采用无水甲醇、水反复重结晶 2 次,得到番荔枝内酯 (Corossolone)。

[0087] 步骤 5:将步骤 4 所得番荔枝内酯 (Corossolone) 和多肽 IL-11 α Binding Peptide II (CGRRAGGSC),以每 10g 番荔枝内酯 (Corossolone) 对应 0.7 ~ 1.0g 多肽 IL-11 α Binding Peptide II (CGRRAGGSC) 和 100ml 无水乙醇的比例混合,并在 65℃加热条件下,搅拌冷凝回流 8 小时,随后趁热抽滤,分离出固体超强酸。

[0088] 步骤 6:蒸馏步骤 5 所得固体超强酸,冷却得到粉末状晶体。

[0089] 经高效液相色谱、LC-MS、NMR 分析确认所得粉末状晶体为含有多肽

IL-11 α Binding Peptide II (CGRRAGGSC) 的番荔枝内酯 (Corossolone) 衍生物。

[0090] 实施例四番荔枝内酯衍生物的制备：(优选实施例)

[0091] 采用以下技术参数改进实施例一的制备方法：

[0092] 步骤 1：在索氏提取器中加入 150g 番荔枝科植物粗粉、400ml 无水乙醇，回流 11 小时，得到提取液，然后减压回收溶剂至浸膏状，得到提取物。

[0093] 步骤 2：将步骤 1 所得提取物加 40ml 水，在 70℃ 加热条件下溶解得到溶液，随后进行步骤 2.1、步骤 2.2 的萃取以及步骤 2.3。

[0094] 步骤 2.1：以体积比为 1：1 混合所得溶液和极性溶剂，并进行 1～4 次萃取，分液得到水层，合并该水层，并蒸去其中的极性溶剂。

[0095] 所述极性溶剂为体积比为 1：1.5 的氯仿丙酮混合溶液。

[0096] 步骤 2.2：以体积比为 1：1 混合所得水层和 75℃ 的乙酸乙酯，并进行 1～4 次萃取，分液得到有机层，合并该有机层。

[0097] 步骤 2.3：以无水硫酸钠将所得有机层脱水，减压回收溶剂至干，得到残留物。

[0098] 步骤 3：将步骤 2.3 所得残留物溶于温度为 35℃ 的温热无水甲醇，随后浓缩，放置析晶，滤出析出的结晶，得到黄色针状结晶。

[0099] 步骤 4：对步骤 3 所得的结晶，采用无水甲醇、水反复重结晶 3 次，得到番荔枝内酯 (Corossolone)。

[0100] 步骤 5：将步骤 4 所得番荔枝内酯 (Corossolone) 和多肽 IL-11 α Binding Peptide II (CGRRAGGSC)，以每 12.5g 番荔枝内酯 (Corossolone) 对应 1.5g 多肽 IL-11 α Binding Peptide II (CGRRAGGSC) 和 115ml 无水乙醇的比例混合，并在 70℃ 加热条件下，搅拌冷凝回流 8 小时，随后趁热抽滤，分离出固体超强酸。

[0101] 步骤 6：蒸馏步骤 5 所得固体超强酸，冷却得到粉末状晶体。

[0102] 经高效液相色谱、LC-MS、NMR 分析确认所得粉末状晶体为含有多肽 IL-11 α Binding Peptide II (CGRRAGGSC) 的番荔枝内酯 (Corossolone) 衍生物。

[0103] 实施例五番荔枝内酯衍生物的制备：

[0104] 采用以下技术参数改进实施例一的制备方法：

[0105] 步骤 1：在索氏提取器中加入 150g 番荔枝科植物粗粉、450ml 无水乙醇，回流 10.5 小时，得到提取液，然后减压回收溶剂至浸膏状，得到提取物。

[0106] 步骤 2：将步骤 1 所得提取物加 45ml 水，在 65℃ 加热条件下溶解得到溶液，随后进行步骤 2.1、步骤 2.2 的萃取以及步骤 2.3。

[0107] 步骤 2.1：以体积比为 1：1.2 混合所得溶液和极性溶剂，并进行 1～4 次萃取，分液得到水层，合并该水层，并蒸去其中的极性溶剂。

[0108] 所述极性溶剂为体积比为 1：1.5 的氯仿丙酮混合溶液。

[0109] 步骤 2.2：以体积比为 1：1.2 混合所得水层和 80℃ 的乙酸乙酯，并进行 1～4 次萃取，分液得到有机层，合并该有机层。

[0110] 步骤 2.3：以无水硫酸钠将所得有机层脱水，减压回收溶剂至干，得到残留物。

[0111] 步骤 3：将步骤 2.3 所得残留物溶于温度为 40℃ 的温热无水甲醇，随后浓缩，放置析晶，滤出析出的结晶，得到黄色针状结晶。

[0112] 步骤 4：对步骤 3 所得的结晶，采用无水甲醇、水反复重结晶 4 次，得到番荔枝内酯

(Corossolone)。

[0113] 步骤5:将步骤4所得番荔枝内酯 (Corossolone) 和多肽 IL-11 α Binding Peptide II (CGRRAGGSC), 以每 15g 番荔枝内酯 (Corossolone) 对应 2.0g 多肽 IL-11 α Binding Peptide II (CGRRAGGSC) 和 130ml 无水乙醇的比例混合, 并在 75℃ 加热条件下, 搅拌冷凝回流 8 小时, 随后趁热抽滤, 分离出固体超强酸。

[0114] 步骤6:蒸馏步骤5所得固体超强酸, 冷却得到粉末状晶体。

[0115] 经高效液相色谱、LC-MS、NMR 分析确认所得粉末状晶体为含有多肽 IL-11 α Binding Peptide II (CGRRAGGSC) 的番荔枝内酯 (Corossolone) 衍生物。

[0116] 实施例六番荔枝内酯衍生物的制备:

[0117] 采用以下技术参数改进实施例一的制备方法:

[0118] 步骤1:在索氏提取器中加入 150g 番荔枝科植物粗粉、500ml 无水乙醇, 回流 10 小时, 得到提取液, 然后减压回收溶剂至浸膏状, 得到提取物。

[0119] 步骤2:将步骤1所得提取物加 50ml 水, 在 60℃ 加热条件下溶解得到溶液, 随后进行步骤 2.1、步骤 2.2 的萃取以及步骤 2.3。

[0120] 步骤 2.1:以体积比为 1 : 1.5 混合所得溶液和极性溶剂, 并进行 1 ~ 4 次萃取, 分液得到水层, 合并该水层, 并蒸去其中的极性溶剂。

[0121] 所述极性溶剂为体积比为 1 : 1.5 的氯仿丙酮混合溶液。

[0122] 步骤 2.2:以体积比为 1 : 1.5 混合所得水层和 90℃ 的乙酸乙酯, 并进行 1 ~ 4 次萃取, 分液得到有机层, 合并该有机层。

[0123] 步骤 2.3:以无水硫酸钠将所得有机层脱水, 减压回收溶剂至干, 得到残留物。

[0124] 步骤3:将步骤 2.3 所得残留物溶于温度为 40℃ 的温热无水甲醇, 随后浓缩, 放置析晶, 滤出析出的结晶, 得到黄色针状结晶。

[0125] 步骤4:对步骤3所得的结晶, 采用无水甲醇、水反复重结晶 4 次, 得到番荔枝内酯 (Corossolone)。

[0126] 步骤5:将步骤4所得番荔枝内酯 (Corossolone) 和多肽 IL-11 α Binding Peptide II (CGRRAGGSC), 以每 17g 番荔枝内酯 (Corossolone) 对应 2.3g 多肽 IL-11 α Binding Peptide II (CGRRAGGSC) 和 150ml 无水乙醇的比例混合, 并在 80℃ 加热条件下, 搅拌冷凝回流 8 小时, 随后趁热抽滤, 分离出固体超强酸。

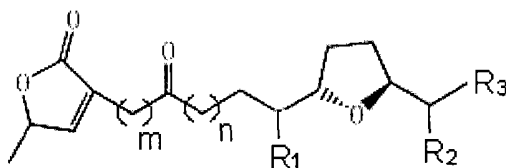
[0127] 步骤6:蒸馏步骤5所得固体超强酸, 冷却得到粉末状晶体。

[0128] 经高效液相色谱、LC-MS、NMR 分析确认所得粉末状晶体为含有多肽 IL-11 α Binding Peptide II (CGRRAGGSC) 的番荔枝内酯 (Corossolone) 衍生物。

[0129] 实施例七:

[0130] 采用优选实施例四的制备方法制备的含有多肽 IL-11 α Binding Peptide II (CGRRAGGSC) 的番荔枝内酯 (Corossolone) 衍生物, 其分子结构的通式如下:

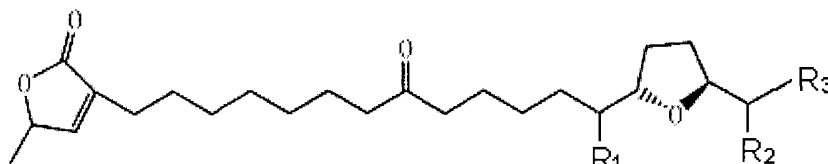
[0131]



[0132] 其中, R_1 为 -CGRRAGGSC 或 -OH, R_2 为 -CGRRAGGSC 或 -OH, R_3 为 $C_{6\sim 20}$ 的烷基。其中, m, n 处为直链烷基, $m = 4 \sim 10$, $n = 0 \sim 5$ 。所述的 R_1, R_2 为 R 或 S 构型。

[0133] 上述含有多肽 IL-11 α Binding Peptide II (CGRRAGGSC) 的番荔枝内酯 (Corossolone) 衍生物的主产物为具有如下分子结构通式的物质:

[0134]

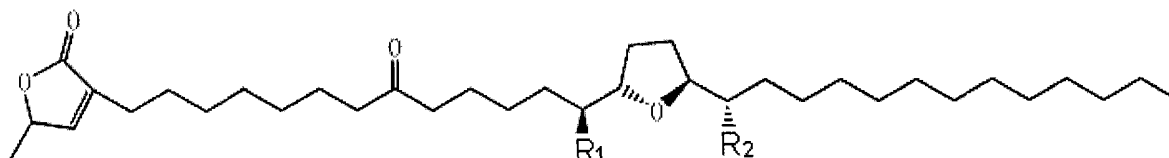


[0135] 其中, R_1 为 -CGRRAGGSC 或 -OH, R_2 为 -CGRRAGGSC 或 -OH, R_3 为 $C_{6\sim 20}$ 的烷基。所述的 R_1, R_2 为 R 或 S 构型。

[0136] 实施例八:

[0137] 实施例七所述之含有多肽 IL-11 α Binding Peptide II (CGRRAGGSC) 的番荔枝内酯 (Corossolone) 衍生物的主产物的优选药物成分为具有如下分子结构的物质:

[0138]

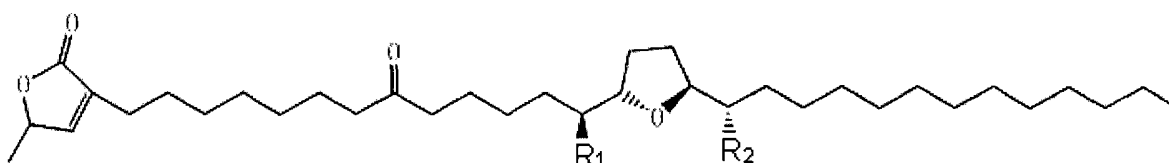


[0139] 其中, R_1 为 -CGRRAGGSC, R_2 为 -OH。

[0140] 实施例九:

[0141] 实施例七所述之含有多肽 IL-11 α Binding Peptide II (CGRRAGGSC) 的番荔枝内酯 (Corossolone) 衍生物的主产物的优选药物成分为具有如下分子结构的物质:

[0142]

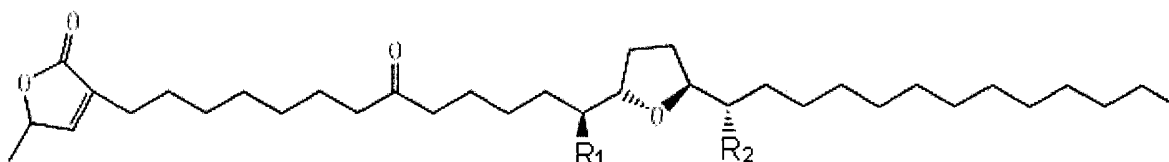


[0143] 其中, R_1 为 -OH, R_2 为 -CGRRAGGSC。

[0144] 实施例十:

[0145] 实施例七所述之含有多肽 IL-11 α Binding Peptide II (CGRRAGGSC) 的番荔枝内酯 (Corossolone) 衍生物的主产物的优选药物成分为具有如下分子结构的物质:

[0146]



[0147] 其中, R_1 为 -CGRRAGGSC, R_2 为 -CGRRAGGSC。

[0148] 实施例十一番荔枝内酯衍生物制剂的制备:

[0149] 采用药剂学上的常规药物载体, 并采用药剂学上的常规制备方法, 将采用优选实施例四的制备方法制备的、具有实施例八、实施例九、实施例十的分子结构的番荔枝内酯衍

生物中的一种或多种,制备成药剂学上的常规剂型,包括但不限于片剂、胶囊剂、软胶剂、喷雾剂、凝胶剂、凝胶吸入剂、口服剂、混悬剂、冲剂、贴剂、软膏、丸剂、散剂、注射剂、输液剂、冻干注射剂、脂质体注射剂、靶向给药注射剂、栓剂、缓释制剂或控释制剂。

[0150] 其中优选制备剂型为冻干粉针、水针等注射剂、直肠给药的栓剂。实施例十二番荔枝内酯衍生物的应用:

[0151] 根据实施例一至六中任意制备方法制备所得的番荔枝内酯衍生物,用于癌症的治疗,特别具有在用于治疗前列腺癌以及恢复癌症患者的免疫功能中的应用。

[0152] 实施例十三番荔枝内酯衍生物治疗前列腺癌的动物模型试验:

[0153] 采用根据优选实施例四的制备方法制备的、具有实施例八、实施例九、实施例十的分子结构的番荔枝内酯衍生物的混合物(以下简称 GH-1)进行动物模型试验,考察 GH-1 对激素非依赖型人前列腺癌细胞株 PC-3 裸鼠移植模型的抑瘤作用,包括对裸鼠移植瘤生长、瘤重、瘤细胞增殖周期及凋亡、血清 PSA 浓度以及前列腺指数的影响。

[0154] 1、对荷瘤鼠肿瘤的抑制作用

[0155] 激素非依赖型人前列腺癌细胞株 PC-3 传代,消化生长良好的细胞配成 $5 \times 10^6/\text{ml}$,以 0.2ml 给 BALB/c(nu/nu) 裸鼠右腋窝皮下接种。待肿瘤直径大于 1cm 时,无菌条件下剥离瘤块,选生长良好的瘤组织切成直径 2mm 的小块,接种于 BALB/c(nu/nu) 裸鼠右腋窝皮下,共接种 30 只裸鼠。接种次日按每组 6 只随机分成 5 组并开始给药,分组即荷瘤对照组、环磷酰胺 (30mg/kg)、GH-1 高剂量组 (60mg/kg)、GH-1 中剂量组 (24mg/kg)、GH-1 低剂量组 (10mg/kg)。另设正常对照组,6 只裸鼠。环磷酰胺腹腔注射,每周 2 次,连续 6 周 [6]。GH-1 灌胃给药,正常和荷瘤对照组均灌胃给予等体积蒸馏水,每天 1 次,连续 45 天。待接种瘤块 2 周后,开始用游标卡尺测量瘤体的长径和短径,按公式 $a \times b \times 3.14/6$ 计算瘤体积 (a 为长径, b 为短径),绘制生长曲线图。末次给药后 0.5h,裸鼠眼眶采血,分离血清,放射免疫标记法检测裸鼠血清前列腺特异性抗原 (PSA) 的浓度。脱颈处死裸鼠,完整剥离肿瘤,电子天平称重,根据下列公式计算抑瘤率。摘取脾脏和前列腺,电子天平称重,计算脏器指数 (mg/10g)。

[0156] 结果见表 1、表 2、表 3、表 4。

[0157]

$$\text{抑瘤率(\%)} = \frac{\text{对照组平均瘤重} - \text{治疗组平均瘤重}}{\text{对照组平均瘤重}} \times 100\%$$

[0158] 2、对荷瘤鼠肿瘤细胞增殖周期及凋亡的影响

[0159] 将取出的瘤块各取 1-2mm³ 左右研磨制成细胞悬液,用 PBS 洗 3 次,70%,4%冷乙醇固定,PI 染色,用流式细胞仪 (FCM) 分析细胞周期及各期分布情况及凋亡细胞所占的比例。结果见表 5。

[0160] 3、统计方法:数据用均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用 SPSS10.0 统计软件,方差分析进行统计分析。

[0161] 4、实验结果

[0162] 表 1 对 PC-3 细胞裸鼠移植瘤生长的影响 ($\bar{x} \pm s$, n = 6)

[0163]

组别	剂量 (mg/kg)	瘤体积(cm ³)				
		接种 2 周	接种 3 周	接种 4 周	接种 5 周	接种 6 周
荷瘤对照组	-	0.2037±0.1013	0.4449±0.0809	0.7501±0.1664	1.1280±0.3337	1.7178±0.4678
环磷酰胺	30	0.0554±0.0642	0.1362±0.0352	0.0402±0.0626	0.0000±0.0000	0.0000±0.0000
		△△	△△	△△	△△	△△
GH-1 高剂量组	60	0.1664±0.0326	0.3161±0.1231	0.5103±0.1796	0.7550±0.3746	1.0678±0.4443
		▲▲	▲	△▲▲	▲▲	△▲▲
GH-1 中剂量组	24	0.1504±0.0359	0.3588±0.0668	0.6188±0.2356	0.9580±0.4030	1.4235±0.5900
		▲		▲▲	▲▲	▲▲
GH-1 低剂量组	10	0.1684±0.0390	0.3524±0.0852	0.5658±0.2085	0.8856±0.3868	1.2179±0.5110
		▲▲		▲▲	▲▲	▲▲

[0164] 注 : * 表示与正常对照组比较, $P < 0.05$ 。 ** 表示与正常对照组比较, $P < 0.01$ 。
△表示与荷瘤对照组比较, $P < 0.05$ 。 △△表示与荷瘤对照组比较, $P < 0.01$ 。 ▲表示与环
磷酰胺组比较, $P < 0.05$ 。 ▲▲表示与环磷酰胺组比较, $P < 0.01$ 。

[0165] 结果表明 : 与荷瘤对照组比较, 从接种 2 周至接种 4 周, 环磷酰胺组瘤体积明显减小, 至接种 5 周时肿瘤已逐渐消失。 GH-1 高剂量组在接种 4 周和 6 周, 瘤体积明显减小。

[0166] 表 2 对 PC-3 裸鼠移植瘤瘤重及抑瘤率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

	组别	剂量(mg/kg)	瘤重(g)	抑瘤率(%)
	荷瘤对照组	-	2.0893±0.5924	
[0167]	环磷酰胺	30	0.0000±0.0000 △△	100
	GH-1 高剂量组	60	1.4053±0.5543 △△▲▲	32.74
	GH-1 中剂量组	24	1.2331±0.4596	40.98
			△△▲▲	
[0168]	GH-1 低剂量组	10	1.3052±0.363 2△△▲▲	37.53

[0169] 注 : * 表示与正常对照组比较, $P < 0.05$ 。 ** 表示与正常对照组比较, $P < 0.01$ 。
△表示与荷瘤对照组比较, $P < 0.05$ 。 △△表示与荷瘤对照组比较, $P < 0.01$ 。 ▲表示与环
磷酰胺组比较, $P < 0.05$ 。 ▲▲表示与环磷酰胺组比较, $P < 0.01$ 。

[0170] 结果表明 : 与荷瘤对照组比较, , GH-1 各剂量组能明显减小瘤重, 说明其能显著抑制
激素非依赖型人前列腺癌细胞株 PC-3 裸鼠移植肿瘤的生长, 但抑瘤率不如环磷酰胺强。
环磷酰胺在接种次日开始用药, 有效地抑制了肿瘤的生长, 抑瘤率达 100%。

[0171] 表 3 对裸鼠血清 PSA 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

	组别	剂量(mg/kg)	PSA ($\mu\text{g/L}$)
[0172]	正常对照组	-	1.757 \pm 0.281
	荷瘤对照组	-	2.229 \pm 0.294**
	环磷酰胺组	30	1.966 \pm 0.290
	GH-1 高剂量组	60	1.962 \pm 0.179
	GH-1 中剂量组	24	1.924 \pm 0.229 Δ
	GH-1 低剂量组	10	1.853 \pm 0.239 Δ

[0173] 注 : * 表示与正常对照组比较, $P < 0.05$ 。 ** 表示与正常对照组比较, $P < 0.01$ 。 Δ 表示与荷瘤对照组比较, $P < 0.05$ 。 $\Delta\Delta$ 表示与荷瘤对照组比较, $P < 0.01$ 。 \blacktriangle 表示与环磷酰胺组比较, $P < 0.05$ 。 $\blacktriangle\blacktriangle$ 表示与环磷酰胺组比较, $P < 0.01$ 。

[0174] 结果表明 : 与正常对照组比较, 荷瘤对照组 PSA 明显升高。与荷瘤对照组比较 GH-1 中、低剂量组能使 PSA 明显降低。PSA 是前列腺特异性抗原, 是前列腺癌的特异性标记物, 其升高可较敏感的提示肿瘤的进展转移等。说明 GH-1 通过降低 PSA 的浓度起到了对前列腺癌的生长抑制作用。

[0175] 表 4 对裸鼠前列腺指数的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

	组别	剂量(mg/kg)	前列腺指数(mg/10g)
[0176]	正常对照组	-	11.40 \pm 1.78
	荷瘤对照组	-	7.16 \pm 3.78**
	环磷酰胺	30	7.38 \pm 1.89**
[0177]	GH-1 高剂量组	600	5.62 \pm 1.24** $\Delta\Delta$
	GH-1 中剂量组	240	7.89 \pm 9.19**
	GH-1 低剂量组	96	7.41 \pm 2.49**

[0178] 注 : * 表示与正常对照组比较, $P < 0.05$ 。 ** 表示与正常对照组比较, $P < 0.01$ 。 Δ 表示与荷瘤对照组比较, $P < 0.05$ 。 $\Delta\Delta$ 表示与荷瘤对照组比较, $P < 0.01$ 。 \blacktriangle 表示与环磷酰胺组比较, $P < 0.05$ 。 $\blacktriangle\blacktriangle$ 表示与环磷酰胺组比较, $P < 0.01$ 。

[0179] 结果表明 : 与正常对照组比较, 荷瘤对照组、环磷酰胺、GH-1 各剂量组前列腺指数明显减小。与环磷酰胺组比较, GH-1 高剂量组前列腺指数明显减小。

[0180] 表 5 对 PC-3 裸鼠移植瘤细胞周期及凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

[0181]

组别	剂量 (mg/kg)	细胞周期			Apoptosis (%)
		G ₀ -G ₁ (%)	G ₂ -M(%)	S(%)	
荷瘤对照组	-	45.68 \pm 9.63	26.33 \pm 13.53	28.00 \pm 13.22	16.13 \pm 6.14
GH-1 高剂量组	60	34.00 \pm 9.00*	50.90 \pm 11.19**	15.10 \pm 4.73*	15.27 \pm 4.04
GH-1 中剂量组	24	30.90 \pm 5.43*	54.35 \pm 10.06**	14.76 \pm 7.20*	16.92 \pm 5.19
GH-1 低剂量组	10	35.32 \pm 12.19	48.78 \pm 15.50**	15.90 \pm 6.63*	18.36 \pm 5.95

[0182] 注 : * 表示与正常对照组比较, $P < 0.05$ 。 ** 表示与正常对照组比较, $P < 0.01$ 。 Δ 表示与荷瘤对照组比较, $P < 0.05$ 。 $\Delta\Delta$ 表示与荷瘤对照组比较, $P < 0.01$ 。 \blacktriangle 表示与环

磷酸胺组比较, $P < 0.05$ 。▲▲表示与环磷酸胺组比较, $P < 0.01$ 。

[0183] 结果表明:与荷瘤对照组比较,GH-1 各剂量组能使 G2-M 期增加而使 G0-G1 期及 S 期细胞明显减少。对细胞凋亡无明显影响。说明 GH-1 对细胞周期的影响是其抑制前列腺癌生长的作用机制之一。

[0184] 5、结论

[0185] GH-1 高剂量组在肿瘤接种 4 周后能使瘤体积明显减小,GH-1 各剂量组能明显减小瘤重,说明其能显著抑制激素非依赖型人前列腺癌细胞株 PC-3 裸鼠移植肿瘤的生长,其抑瘤作用在给药 4 周后逐渐起效。GH-1 的抑瘤率低于环磷酸胺。环磷酸胺在接种次日开始用药,有效地抑制了肿瘤的生长,抑瘤率达 100%。

[0186] GH-1 能抑制前列腺癌的生长,其机制是通过降低 PSA 的浓度以及对细胞周期的影响而起到抑瘤作用。

[0187] 实施例十四番荔枝内酯衍生物对免疫功能影响的动物模型试验:

[0188] 采用根据优选实施例四的制备方法制备的、具有实施例八、实施例九、实施例十的分子结构的番荔枝内酯衍生物的混合物(以下简称 GH-1)进行动物模型试验,考察 GH-1 对 S180 荷瘤小鼠细胞免疫功能的影响。

[0189] 1、实验材料

[0190] 1.1 药品与试剂:GH-1 (GH-1) 制剂。贞芪扶正胶囊,甘肃扶正药业科技股份有限公司,批号:060303。

[0191] 1.2 仪器:AR-1140/c 电子分析天平,奥豪斯国际贸易(上海)有限公司。

[0192] 1.3 动物:昆明种小鼠,雄性,18 ~ 22g,由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供。清洁级,实验动物生产许可证:SCXK(沪)2003-0003,实验动物使用许可证:SYXK(沪)2004-0005。饲养于上海中医药大学实验动物中心清洁级实验室,环境温度:20-25℃。

[0193] 1.4 瘤株:肉瘤 180 实体型(S180),移自上海斯莱克实验动物有限责任公司,本室传代。

[0194] 2、实验方法

[0195] 取腹腔接种 S180 瘤株 8d 的荷瘤小鼠,无菌操作下抽取腹腔瘤液,以灭菌生理盐水稀释成瘤细胞悬液(镜检含瘤细胞数 1×10^7 个/ml),用此瘤细胞悬液于昆明种小鼠右前肢腋窝皮下注射 0.2ml 进行肿瘤接种,共接种 50 只小鼠。接种次日随机分成 5 组并开始给药,即荷瘤对照组、贞芪扶正胶囊组(60g 制剂/kg)、GH-1 高剂量组(60mg/kg)、GH-1 中剂量组(24mg/kg)、GH-1 低剂量组(10mg/kg)。另设正常对照组,10 只小鼠。各组灌胃给予受试药物或蒸馏水,连续 10d。给药第 5d,以 8% Na₂S 溶液在小鼠腹部进行脱毛处理,次日用 1% 2,4-二硝基氟苯(DNFB)(用 1:1 丙酮麻油配制)25 μ l 涂于脱毛处的皮肤致敏,24h 后同法加强 1 次。致敏第 4d 后用相同浓度的 DNFB20 μ l 均匀涂抹于左耳进行攻击,第 2d 处死小鼠,剪下左右耳,用打孔器在双耳相应部位打耳片,称重,根据公式肿胀度(g) = 左耳重 - 右耳重,肿胀率(%) = [(治疗组肿胀度 / 荷瘤对照组肿胀度) - 1] \times 100%,计算肿胀度和肿胀率。摘取脾脏和胸腺,称取其重量,计算脏器指数。结果见表 6、表 7。

[0196] 统计方法:数据用均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS10.0 统计软件,方差分析进行统计分析。

[0197] 3、实验结果

[0198] 表 6 对 S180 荷瘤小鼠迟发型超敏反应小鼠耳肿胀的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

	组别	剂量(mg/kg)	肿胀度 (g)	肿胀率 (%)
	正常对照组		0.0296±0.0052	
	荷瘤对照组	-	0.0222±0.0039**	
[0199]	贞芪扶正胶囊	600	0.0263±0.0022*△	18.17
	GH-1 高剂量组	60	0.0264±0.0029△	18.66
	GH-1 中剂量组	24	0.0293±0.0030△△▲	31.83
	GH-1 低剂量组	10	0.0272±0.0034△△	22.12

[0200] 注 : * 表示与正常对照组比较, $P < 0.05$ 。 ** 表示与正常对照组比较, $P < 0.01$ 。
 △表示与荷瘤对照组比较, $P < 0.05$ 。 △△表示与荷瘤对照组比较, $P < 0.01$ 。 ▲表示与贞芪扶正胶囊组比较, $P < 0.05$ 。 ▲▲表示贞芪扶正胶囊组与比较, $P < 0.01$ 。

[0201] 结果表明 : 与正常对照组比较, 荷瘤小鼠的耳肿胀度明显减小, 说明迟发型超敏反应下降。与荷瘤对照组比较, GH-1 高、中、低各剂量组均能使耳肿胀度明显增加, 增强下降的迟发型超敏反应, 说明 GH-1 可恢复荷瘤小鼠低下的细胞免疫功能。

[0202] 表 20 对 S180 荷瘤小鼠胸腺指数和脾脏指数的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

	组别	剂量(mg/kg)	胸腺指数(mg/10g)	脾脏指数(mg/10g)
	正常对照组		23.33±4.41	42.00±6.82
	荷瘤对照组	-	19.38±7.85	120.53±24.86**
[0203]	贞芪扶正胶囊	600	19.79±3.15	114.45±14.91**
	GH-1 高剂量组	60	19.29±3.44	107.45±12.66**
	GH-1 中剂量组	24	20.28±3.40	116.90±11.65**
	GH-1 低剂量组	10	19.30±4.72	121.76±18.48**

[0204] 注 : * 表示与正常对照组比较, $P < 0.05$ 。 ** 表示与正常对照组比较, $P < 0.01$ 。
 △表示与荷瘤对照组比较, $P < 0.05$ 。 △△表示与荷瘤对照组比较, $P < 0.01$ 。 ▲表示与贞芪扶正胶囊组比较, $P < 0.05$ 。 ▲▲表示贞芪扶正胶囊组与比较, $P < 0.01$ 。

[0205] 结果表明 : 与正常对照组比较, 荷瘤对照组及各给药组的脾脏指数明显增加, 胸腺指数无明显差异。

[0206] 4、结论

[0207] 与正常对照组比较, 荷瘤小鼠的耳肿胀度明显减小, 说明迟发型超敏反应下降。与荷瘤对照组比较, GH-1 高、中、低各剂量组均能使耳肿胀度明显增加, 增强下降的迟发型超敏反应, 说明 GH-1 可恢复荷瘤小鼠低下的细胞免疫功能。

[0208] 实施例十三及十四中所采用的检测方法及含量数据如下 :

[0209] 1、仪器 :

[0210] 仪器为安捷伦 1200 系列液相色谱仪, 包括 4 元泵, DAD 检测器、自动进样器、在线脱气机, 安捷伦化学工作站。甲醇为 MERCK (HPLC GRADE), 水为双重石英蒸馏水, 其它试剂为分析纯, 标准对照品 GH-1 自制, 经中科院上海有机所鉴定

[0211] 2、最佳色谱条件

[0212] 色潜柱为 XDB C-18-ODS (4.6mm×150mm), 带前置保护柱, 流动相为甲醇 h 水为

90 : 10 ;流速 1.0ml/min ;检测波长 210nm ;室温。在上述色谱条件下,标准对照品及样品各峰均能达到基线分离。峰形良好。

[0213] 3、线性关系 :

[0214] GH-1 标准品溶液配制 :20 μ g/mL, 40 μ g/mL 60 μ g/mL, 80 μ g/mL, 100 μ g/mL, 分别进样 5 次测定,以不同浓度为纵坐标 x,峰面积为横坐标 y,绘制标准曲线。

[0215] 其回归方程为 : $y = 5065.0465x - 6902.702$, $r = 0.9998$ 。

[0216] 结果表明,对照品浓度在试验范围内与峰面积具有良好的线性关系。

[0217] 4、样品测定 :

[0218] 共测定了 5 批样品。每个样品测定 2 次,取均值,样品中各峰均达到基线分离。峰形良好, GH-1 的平均含量分别为 99.92%。

[0219] 上述内容为本发明的具体实施例的例举,对于其中未详尽描述的试剂、设备、操作方法等,应当理解为采取本领域已有的普通及常规试剂、设备、操作方法等来予以实施。

[0220] 同时本发明上述实施例仅为说明本发明技术方案之用,仅为本发明技术方案的列举,并不用于限制本发明的技术方案及其保护范围。采用等同技术手段、等同试剂等对本发明权利要求书及说明书所公开的技术方案的改进应当认为是没有超出本发明权利要求书及说明书所公开的范围。

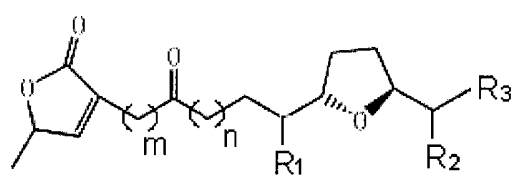


图 1

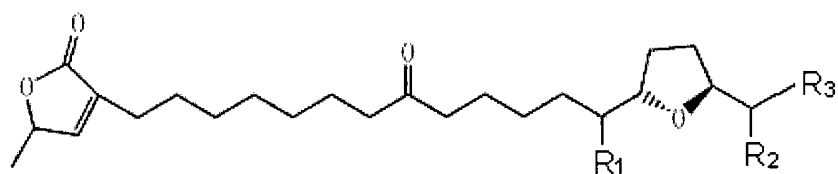


图 2

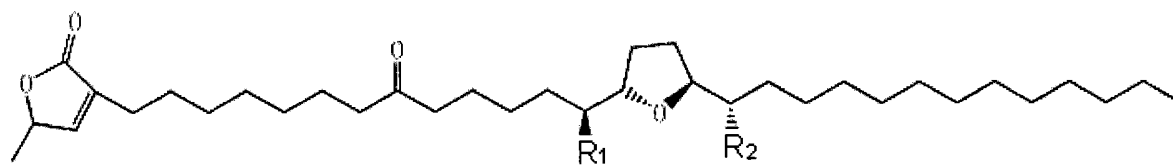


图 3