

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810124587.1

[51] Int. Cl.

A61K 36/185 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 31/365 (2006.01)

[43] 公开日 2009 年 1 月 14 日

[11] 公开号 CN 101342202A

[22] 申请日 2008.8.26

[21] 申请号 200810124587.1

[71] 申请人 南京中医药大学

地址 210029 江苏省南京市汉中路 282 号

[72] 发明人 章永红

[74] 专利代理机构 南京经纬专利商标代理有限公司

代理人 楼高潮

权利要求书 1 页 说明书 6 页

[54] 发明名称

番荔枝内酯化合物 V 在制备治疗抗癌药物中的应用

[57] 摘要

本发明涉及一种番荔枝内酯化合物 V 的新用途，具体地说是涉及化合物 V 在制备治疗抗癌药物中的应用。先用乙醇、石油醚、乙酸乙酯、氯仿等有机溶剂从番荔枝种子粗粉中提取番荔枝内酯；再将番荔枝内酯经硅胶柱层析，氯仿-甲醇，石油醚-乙酸乙酯，乙酸乙酯-甲醇洗脱，得到一种番荔枝内酯化合物 V，其含量为质量分数的 50% ~ 90%。经动物体内抗癌药理实验，其内酯化合物 V 对肺癌、乳腺癌、肝癌细胞的生长有明显的抑制作用，其抗癌活性百倍高于化疗药 5-氟脲嘧啶，可用于抗癌药物的制备。

-
- 1、一种番荔枝内酯化合物 V 在制备治疗抗癌药物中的应用。
 - 2、根据权利要求 1 所述的应用，其特征在于番荔枝内酯化合物 V 在制备治疗肺癌药物中的应用。
 - 3、根据权利要求 1 所述的应用，其特征在于番荔枝内酯化合物 V 在制备治疗乳腺癌药物中的应用。
 - 4、根据权利要求 1 所述的应用，其特征在于番荔枝内酯化合物 V 在制备治疗肝癌药物中的应用。
 - 5、根据权利要求 2、3 或 4 所述的应用，其特征在于番荔枝内酯化合物 V 在体内对肺癌，乳腺癌或肝癌细胞有明显的抑制作用，其抗癌活性高于化疗药物 5-氟脲嘧啶。

番荔枝内酯化合物 V 在制备治疗抗癌药物中的应用

一、技术领域

本发明涉及一种抗癌药物的新用途，具体地说是以番荔枝种子为原料提取的一种番荔枝内酯化合物 V 的新用途，该化合物 V 在制备治疗肺癌、乳腺癌及肝癌药物中的应用。

二、背景技术

癌症是危害人类健康的大敌。我国每年新发癌症病例约有 160 万人，每年死于癌症的约有 130 万人，全国因癌症而死亡的人数逐年上升，我国为肺癌、乳腺癌、肝癌等癌症的高发区域，癌症死亡率居高不下。

目前尚无有效的药物治愈大多数癌症患者。化疗药物对癌症虽有一定疗效，但毒副作用大，中成药对癌症的疗效普遍较低，疗效均不理想。

本发明人经过十几年艰苦研究了番荔枝 (*Annona squamosa* Linn) 种子的抗癌有效物质，从中提取出多种抗癌活性化合物，经抗癌实验研究表明，对人肝癌细胞、人胃癌细胞、人食管癌细胞和动物移植性肿瘤（如 S₁₈₀、H₂₂ 和 Heps）均有显著的体内外抗癌治疗效果，并已申请获得 3 项抗癌产品发明专利证书（专利号分别为：ZL02148474.0、ZL02148475.9、ZL03112707.X）。在上述研究的基础上，本发明人继续提取分离、筛选番荔枝种子的抗癌有效化学成分，即番荔枝内酯化合物 V，具有特别显著抗癌活性。

三、发明内容

1、发明目的：本发明的目的是涉及一种番荔枝内酯化合物 V 的新用途，具体是涉及其番荔枝内酯化合物 V 在制备治疗抗癌药物中的应用。

2、技术方案：本发明从番荔枝 (*Annona squamosa* Linn) 种子提取分离到一种抗癌物质番荔枝内酯化合物 V。先用乙醇、石油醚、氯仿等有机溶剂从番荔枝种子中提取番荔枝内酯；再将番荔枝内酯经硅胶柱层析，氯仿-甲醇，石油醚-乙酸乙酯，乙酸乙酯-甲醇梯度洗脱，得到一种番荔枝内酯化合物 V，其含量为质量分数的 50%~90%。

番荔枝种子粗粉用浓度为 95%~97% 的乙醇回流提取；乙醇提取液常压浓缩后，依次用石油醚（20~60℃）、水饱和乙酸乙酯、氯仿萃取；萃取液浓缩干燥后经多次硅胶

柱层析,硅胶粒度为 100~300 目,与萃取物的质量比为 10:1~20:1;以体积比为 100:0~90:10 的氯仿-甲醇梯度洗脱,将收集到的番荔枝内酯物质浓缩干燥。再经多次硅胶柱层析,硅胶粒度为 100~300 目,与番荔枝内酯物质的质量比为 10:1~50:1;以体积比为 100:0~90:10 的石油醚-乙酸乙酯,乙酸乙酯-甲醇梯度洗脱,用薄层层析检查,以碘化铋钾试剂显色;将收集到的番荔枝内酯化合物 V 浓缩干燥,其含量为质量分数的 50%~90%。

番荔枝内酯化合物 V 对肺癌、乳腺癌、肝癌细胞的生长有明显的抑制作用,其抗癌活性百倍高于化疗药 5-氟脲嘧啶 (5-FU)。

番荔枝内酯化合物 V 对小鼠移植性肺癌的生长抑制作用:不同剂量 15 μ g/kg、30 μ g/kg 和 60 μ g/kg 的番荔枝内酯化合物 V 均能显著抑制小鼠移植性肺癌的生长 ($P<0.01$),其抑瘤率分别为 63.01%、70.04%、77.81%。番荔枝内酯化合物 V 抗肺癌活性是化疗药 5-氟脲嘧啶的百倍以上。

番荔枝内酯化合物 V 对小鼠移植性乳腺癌的生长抑制作用:不同剂量 15 μ g/kg、30 μ g/kg 和 60 μ g/kg 的番荔枝内酯化合物 V 均能显著抑制小鼠移植性乳腺癌的生长 ($P<0.01$),其抑瘤率分别为 41.18%、65.44%、78.68%。番荔枝内酯化合物 V 抗乳腺癌活性是化疗药 5-氟脲嘧啶的百倍以上。

番荔枝内酯化合物 V 对小鼠移植性肝癌的生长抑制作用:不同剂量 15 μ g/kg、30 μ g/kg 和 60 μ g/kg 的番荔枝内酯化合物 V 均能显著抑制小鼠移植性肝癌的生长 ($P<0.01$),其抑瘤率分别为 49.70%、64.24%、78.18%。番荔枝内酯化合物 V 抗肝癌活性是化疗药 5-氟脲嘧啶的百倍以上。

3、有益效果:本发明一种番荔枝内酯化合物 V 是从番荔枝种子中提取得到的抗癌活性物质。动物体内抗癌实验结果显示,番荔枝内酯化合物 V 对肺癌、乳腺癌、肝癌细胞的生长均有非常高的抗癌活性,其体内抗癌活性百倍高于化疗药 5-氟脲嘧啶 (5-Fu)。这为提高抗癌临床疗效提供了非常有前景的高效预选药物。

四、具体实施方式

实施例 1: 番荔枝内酯化合物 V 的提取制备方法

番荔枝种子 20kg,粉碎成粗粉,用浓度为 95%的乙醇回流提取 3 次,乙醇提取液常压浓缩后得 1.2kg。依次用 10 倍量石油醚 (20~60 $^{\circ}$ C)、水饱和乙酸乙酯、氯仿萃取 3 次,合并萃取液浓缩干燥后得 610g。

经多次硅胶柱层析,硅胶粒度为 100~300 目,与萃取物的质量比为 10:1~20:1;

以体积比为 100:0~90:10 的氯仿-甲醇梯度洗脱,收集到的番荔枝内酯物质浓缩干燥得 230g。再经多次硅胶柱层析,硅胶粒度为 100~300 目,与番荔枝内酯物质的质量比为 10:1~50:1;以体积比为 100:0~90:10 的石油醚-乙酸乙酯,乙酸乙酯-甲醇梯度洗脱,收集到的流分浓缩干燥得到蜡状固体 38g,即为番荔枝内酯 V。

实施例 2: 番荔枝内酯化合物 V 对移植性肺癌的抑制作用

1、实验动物和瘤株

雄性健康 C57BL/6 小鼠,体重 18—22g,鼠龄 6—8 周,购自本校动物实验中心;小鼠 Lewis 肺癌瘤株购自江苏省肿瘤研究所动物实验中心。

2、造模与实验方法

C57BL/6 小鼠 60 只,按比例随机留 10 只为阴性对照组,其余 50 只进行造模。制备 Lewis 肺癌荷瘤小鼠,剥离生长旺盛期的瘤组织,选取生长良好的肿块 1.5mm^3 左右,按肿瘤(g):生理盐水(ml)为 1:3 比例匀浆,调细胞数为 $2 \times 10^6/\text{ml}$ 。选取健康小鼠,在无菌条件下每只小鼠右侧腋窝皮下接种 0.2ml。整个接种过程须在无菌罩内以无菌操作进行,1h 内完成接种。

接种后随机分为 5 组,每组 10 只,分别为肿瘤模型对照组、 $15\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $30\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 $60\mu\text{g}/\text{kg}$ 试验组、5-fu 阳性对照组,另加阴性对照组,共 6 组。接种瘤细胞 24h 后,试验组腹腔注射番荔枝内酯 V,剂量分别为 $15\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $30\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 $60\mu\text{g}/\text{kg}$,阴性对照组和肿瘤模型对照组等体积注射药物溶媒,5-FU 对照组以生理盐水为溶剂,剂量为 $20\text{mg}/\text{kg}$,各组动物均按 0.2ml 在腹腔注射,连续给药 10d。末次给药后次日,进行如下观察:

完整剥离瘤块,并称重计算肿瘤抑制率,肿瘤抑制率 = (对照组肿瘤重量 - 治疗组肿瘤重量) / 对照组肿瘤重量 $\times 100\%$ 。

3、实验结果:

番荔枝内酯化合物 V 对小鼠移植性肺癌的生长抑制作用:不同剂量的番荔枝内酯化合物 V 均能显著抑制小鼠移植性肺癌的生长($P < 0.01$)。番荔枝内酯化合物 V 的剂量极小,其抗肺癌活性是化疗药 5-氟脲嘧啶(5-FU)的百倍以上,见表 1。

表 1 番荔枝内酯 V 对小鼠移植性肺癌 Lewis 作用结果

剂量		动物数 (开始/结束)	瘤重 (x±s)	抑瘤率 (%)	P 值
NS		10/10	3.92±0.19		
5-FU	20mg/kg	10/10	1.36±0.20	65.31%	<0.01
番荔枝内酯 V	15µg/kg	10/10	1.45±0.17	63.01%	<0.01
	30µg/kg	10/10	1.16±0.21	70.04%	<0.01
	60µg/kg	10/10	0.87±0.15	77.81%	<0.01

实施例 3：番荔枝内酯化合物 V 对移植性乳腺癌的抑制作用

2、实验动物和瘤株

雌性健康 TA2 小鼠，体重 18—22g，鼠龄 6—8 周，购自本校动物实验中心；小鼠乳腺癌细胞株 MA-891 购自江苏省肿瘤研究所动物实验中心。

2、造模与实验方法

TA2 小鼠 60 只，按比例随机留 10 只为阴性对照组，其余 50 只进行造模。取体外培养的对数生长期 MA-891 小鼠乳腺癌细胞，细胞浓度调整为 1×10⁷/ml。无菌条件下，将 MA-891 小鼠乳腺癌细胞接种于 TA2 小鼠右腋部皮下，接种量为 0.2ml/只（细胞数为 2×10⁶/只）。整个接种过程须在无菌罩内以无菌操作进行，1h 内完成接种。

接种后随机分为 5 组，每组 10 只，分别为肿瘤模型对照组、15µg/kg、30µg/kg 和 60µg/kg 试验组、5-fu 阳性对照组，另加阴性对照组，共 6 组。接种瘤细胞 24h 后，试验组腹腔注射番荔枝内酯 V，剂量分别为 15µg/kg、30µg/kg 和 60µg/kg，阴性对照组和肿瘤模型对照组等体积注射药物溶媒，5-FU 对照组以生理盐水为溶剂，剂量为 20mg/kg，各组动物均按 0.2ml 在腹腔注射，连续给药 10d。末次给药后次日，进行如下观察：

完整剥离瘤块,并称重计算肿瘤抑制率，肿瘤抑制率＝（对照组肿瘤重量－治疗组肿瘤重量）/对照组肿瘤重量×100%。

3、实验结果：

番荔枝内酯化合物 V 对小鼠移植性乳腺癌的生长抑制作用：不同剂量的番荔枝内酯化合物 V 均能显著抑制小鼠移植性乳腺癌的生长(P<0.01)。番荔枝内酯化合物 V 的剂量极小，其抗乳腺癌活性是化疗药 5-氟脲嘧啶（5-FU）的百倍以上，见表 2。

表2 番荔枝内酯 V 对小鼠移植性乳腺癌作用结果

剂量		动物数 (开始/结束)	瘤重 (x±s)	抑瘤率 (%)	P 值
NS		10/10	1.36±0.23		
5-FU	20mg/kg	10/9	0.61±0.27	55.15%	<0.01
番荔枝内酯 V	15μg/kg	10/10	0.80±0.24	41.18%	<0.01
	30μg/kg	10/10	0.47±0.18	65.44%	<0.01
	60μg/kg	10/10	0.29±0.15	78.68%	<0.01

实施例 4：番荔枝内酯化合物 V 对移植性肝癌的抑制作用

3、实验动物和瘤株

雄性健康昆明种小鼠，体重 18—22g，鼠龄 6—8 周，来自本校动物实验中心；昆明鼠传代腹水型鼠肝癌 HepS 瘤株均购自江苏省肿瘤研究所动物实验中心。小鼠在南京中医药大学动物实验中心的动物实验房饲养，温度 21~25℃，湿度为 45%~55%。

2、造模与实验方法

昆明种雄性小鼠 60 只，按比例随机留 10 只为阴性对照组，其余 50 只进行造模。无菌抽取接种 HepS 瘤种 8 天的小鼠的腹水，以生理盐水稀释 10 倍，0.02%伊红染色，滴加到细胞计数板上计数后，调细胞浓度至 $1 \times 10^7 / \text{ml}$ ，迅速地分别将 50 只小鼠右腋皮肤消毒，每鼠接种 0.2mlHepS 肿瘤细胞悬液于皮下。整个接种过程须在无菌罩内以无菌操作进行，1h 内完成接种。

接种后随机分为 5 组，每组 10 只，分别为肿瘤模型对照组、15 μ g/kg、30 μ g/kg 和 60 μ g/kg 试验组、5-fu 阳性对照组，另加阴性对照组，共 6 组。接种瘤细胞 24h 后，试验组腹腔注射番荔枝内酯化合物 V，剂量分别为 15 μ g/kg、30 μ g/kg 和 60 μ g/kg，阴性对照组和肿瘤模型对照组等体积注射药物溶媒，5-FU 对照组以生理盐水为溶剂，剂量为 20mg/kg，各组动物均按 0.2ml 在腹腔注射，连续给药 8d。末次给药后次日，进行如下观察：

完整剥离瘤块，并称重计算肿瘤抑制率，肿瘤抑制率 = (对照组肿瘤重量 - 治疗组肿瘤重量) / 对照组肿瘤重量 $\times 100\%$ 。

3、实验结果：

番荔枝内酯化合物 V 对小鼠移植性肝癌 HepS 的生长抑制作用：不同剂量的番荔枝内酯 V 均能显著抑制小鼠移植性肝癌 HepS 的生长 ($P < 0.01$)。番荔枝内酯 V 的剂量极小，

其抗肝癌活性是化疗药 5-氟脲嘧啶（5-FU）的百倍以上，见表 3。

表 3 番荔枝内酯 V 对小鼠移植性肝癌 HepS 作用结果

剂量		动物数 (开始/结束)	瘤重 (x±s)	抑瘤率 (%)	P 值
NS		10/10	1.65±0.31		
5-FU	20mg/kg	10/10	0.79±0.30	52.12%	<0.01
番荔枝内酯 V	15µg/kg	10/10	0.83±0.26	49.70%	<0.01
	30µg/kg	10/10	0.59±0.17	64.24%	<0.01
	60µg/kg	10/10	0.36±0.15	78.18%	<0.01