



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101234117 B

(45) 授权公告日 2012. 11. 07

(21) 申请号 200810010441. 4

研究.《中国现代中药》. 2006, 第 8 卷 (第 6 期),

(22) 申请日 2008. 02. 20

审查员 白雪

(73) 专利权人 江苏正大天晴药业股份有限公司

地址 222006 江苏省连云港市新浦区巨龙北路 8 号

专利权人 沈阳药科大学

(72) 发明人 赵余庆 吴春福 李巍 杨静玉

曹家庆 张弘 孙宝山

(51) Int. Cl.

A61K 31/575 (2006. 01)

A61P 35/00 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1939311 A, 2007. 04. 04,

史公良等. 人参稀有抗肿瘤皂苷制备方法的

权利要求书 1 页 说明书 6 页

(54) 发明名称

一对人参皂苷元和它们的混合体的医药用途

(57) 摘要

本发明属于医药技术领域, 涉及一对新的人参皂苷元和它们的混合体的医药用途。这对化合物为 20(R)-25- 甲氧基 - 达玛烷 -3 β , 12 β , 20- 三醇和 20(S)-25- 甲氧基 - 达玛烷 -3 β , 12 β , 20- 三醇 [20(R)-25-methoxyl-dammarane-3 β , 12 β , 20-triol (简称 25Rmdt) 和 20(S)-25-methoxyl-dammarane-3 β , 12 β , 20-triol (简称 25Smdt)]。25Rmdt 和 25Smdt 及它们的混合物具有抑制多种瘤细胞生长与增殖, 诱导肿瘤细胞分化、凋亡, 抑制肿瘤新生血管生成、抑制肿瘤的浸润和转移、增强机体免疫力和降低化疗药物毒副作用等抗肿瘤活性, 主要应用于恶性肿瘤的防治, 其总有效剂量为 1-100mg/kg/d。

1. 25Rmdt 或 25Smdt 或它们的混合物在制备治疗人乳腺癌、人结肠癌、人肝癌、人早幼粒白血病的药物中的应用,其中 25Rmdt 为 20(R)-25- 甲氧基 - 达玛烷 -3 β ,12 β ,20- 三醇,25Smdt 为 20(S)-25- 甲氧基 - 达玛烷 -3 β ,12 β ,20- 三醇,所述的混合物为 25Rmdt 和 25Smdt 的外消旋体。

2. 根据权利要求 1 所述的用途,其特征在于:以 25Rmd t 或 25Smdt 或它们混合物为有效成分,其总有效剂量为 1-100mg/kg/d。

一对人参皂苷元和它们的混合体的医药用途

技术领域：

[0001] 本发明属于医药技术领域，涉及一对新的人参皂苷元和它们的混合体的医药用途。具体涉及化合物 20(R)-25- 甲氧基 - 达玛烷 -3 β , 12 β , 20- 三醇和 20(S)-25- 甲氧基 - 达玛烷 -3 β , 12 β , 20- 三醇 [即 20(R)-25-methoxyl-dammarane-3 β , 12 β , 20-triol (简称 25Rmdt) 和 20(S)-25-me-thoxyl-dammarane-3 β , 12 β , 20-triol (简称 25Smdt)]

[0002] 及它们的混合体在抑制人肿瘤细胞 (人乳腺癌、人小细胞肺癌、人胃癌、人结肠癌、人神经胶质癌、人黑色素瘤、人宫颈癌、人肝癌、早幼粒白血病、肉瘤 S-180、肝癌腹水型、小鼠宫颈癌 -14 及艾氏腹水癌等) 生长与增殖, 诱导肿瘤细胞分化、凋亡, 抑制肿瘤新生血管生成、抑制肿瘤的浸润和转移、增强机体免疫力和降低化疗药物毒副作用中的应用。主要应用于恶性肿瘤的防治。

背景技术：

[0003] 癌症是残害人类生命的世界第二大疾病, 死亡率仅次于心脑血管疾病, 是人类死亡的最主要因素之一。在全世界 60 亿人口中, 目前约有各类癌症患者 3500 万。癌症造成的死亡人数每年全世界约有 630 万人, 据国际权威调查机构统计, 到 2020 年癌症死亡人数将翻一番, 达到 1000 万人以上。近年来, 工业大生产导致人类生存环境不断恶化。化学、病毒、物理辐射等各种致癌因素逐渐增多, 我国的癌症发病率也逐年上升。据国家卫生部卫生统计信息中心报道, 1999 年全国城市恶性肿瘤患病率男性为 169.58 人 / 万人、女性为 110.05 人 / 万人、大城市中患病率为 148.90 人 / 万人、中小城市为 110.70 人 / 万人。若按我国 13 亿人口计算, 每年恶性肿瘤的新发病例达 200 万人。

[0004] 目前, 治疗癌症的常用方法有手术、放疗和药物治疗等。专业人士指出, 从 50、60 年代主要依靠外科治疗及放射治疗的进步提高癌症病人相对存活率至今的 40 年里, 外科手术及放射治疗的进步已近顶峰, 很难再期待有更大的突破。而药物治疗能成功地治愈或明显延长病人的生命, 在癌症的治疗中占有越来越主要的地位。肿瘤的化疗基本上着眼于直接杀伤肿瘤细胞, 这一治疗模式往往存在以下问题: 对增长缓慢的实体瘤效果差或几乎无影响; 药物选择性很小, 毒副反应多且严重, 其中骨髓抑制是最主要的剂量限制因素。肿瘤细胞动力学研究已经取得很大进展但不完善; 缺乏简便实用的方法测知肿瘤处于何期, 一些常用用药方案几乎多来自临床经验。肿瘤的生物治疗是继手术、放疗和化疗之后的肿瘤的第四模式, 主要通过肿瘤宿主防御机制或生物制剂的作用以调节机体自身的生物学反应, 从而抑制或消除肿瘤。虽然没有太大毒副作用, 但由于技术要求严、工艺复杂, 因此价格高, 众多癌症患者及家属难以承受, 影响其在癌症治疗领域的普及。

[0005] 鉴于上述种种原因, 人们把目光转向天然抗肿瘤药物的研发上。无论是抑制或杀伤肿瘤细胞、调整机体免疫功能、改善症状与特征、减轻放化疗毒副作用, 还是肿瘤的病后调理, 天然抗癌药物具有重要作用。由此, 天然植物新疗法将成为继手术、放疗、化疗、生物疗法的第五大治疗方法。

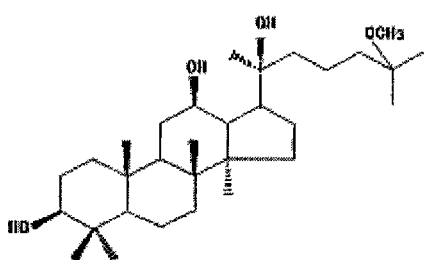
[0006] 许多学者的研究表明人参皂苷具有明显的抗肿瘤和免疫调节作用、改善微循环作用、提高生命质量等多种生物活性。但是由于天然人参皂苷较难吸收,而由天然皂苷转化而来的低极性皂苷、苷元或二者的衍生物是天然人参皂苷发挥其药效的原型。因此,有关低极性皂苷、苷元或二者的衍生物的制备与抗肿瘤活性的研究非常活跃,已发现它们在具有多种抗肿瘤活性的同时,基本无毒副作用。至今发现具有抗肿瘤活性的低极性皂苷、苷元或二者的衍生物有:人参皂苷-Rg₃、Rh₂、C-K、Mc、PPD 以及 3 β ,12 β -二羟-20(22),24(25)-二烯达玛烷和 3 β ,6 α ,12 β -三羟-20(22),24(25)-二烯达玛烷等。已经上市的抗肿瘤药物参一胶囊(人参皂苷-Rg₃)、正在用于临床实验研究的抗肿瘤药物有人参皂苷-Rh₂ 和人参皂苷-C-K。

[0007] 在对体外多种人肿瘤细胞的抗癌实验研究中,我们发现和发明了具有抗肿瘤活性的一对新人参皂苷元和它们的混合体(外消旋体)的抗肿瘤用途。研究证明,25Rmdt 和 25Smdt 及它们的混合体(外消旋体)对体内外肿瘤细胞的抑制作用均优于 PPD 和人参皂苷-Rg₃。

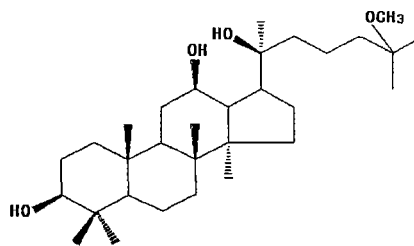
发明内容:

[0008] 本发明提供了一对新人参皂苷元和它们的混合体的抗肿瘤用途。这对化合物的名称为 20(R)-25-甲氧基-达玛烷-3 β ,12 β ,20-三醇和 20(S)-25-甲氧基-达玛烷-3 β ,12 β ,20-三醇 [20(R)-25-methoxyl-dammarane-3 β ,12 β ,20-triol(简称 25Rmdt) 和 20(S)-25-methoxyl-dammarane-3 β ,12 β ,20-triol(简称 25Smdt)]。25Rmdt 和 25Smdt 的结构式如下所示:

[0009]



25Rmdt



25Smdt

[0010] 25Rmdt 和 25Smdt 及它们的混合体(外消旋体)的制备方法如下:A:酸水解 I 法:人参总皂苷溶解于酸性有机溶液中进行超声酸解,然后经过碱中和,有机溶剂萃取及硅胶柱层析分离后得到 25Rmdt 和 25Smdt 及它们的混合体(外消旋体);B、酸水解 II 法:即人参总皂苷溶解于酸性有机溶液中进行超声酸水解,然后加水沉淀,水洗至中性的沉淀经硅胶柱层析分离后得到 25Rmdt 和 25Smdt 及它们的混合体(外消旋体);C、采用化学合成的方法,25Rmdt 和 25Smdt 及它们的混合体(外消旋体)是采用 20(R) 和 20(S)-25-羟基-达玛烷-3 β ,12 β ,20-三醇(20(R) 和 20(S)-25-OH-PPD) 或它们的混合体(混合体(外消旋体))在碱催化下与碘甲烷/无水四氢呋喃溶剂中进行甲基化反应而得。D、合成法 2,25Rmdt 和 25Smdt 及它们的混合体(外消旋体)是采用 20(R) 和 20(S)-25-OH-PPD 或它们的混合体(混合体(外消旋体))在碱催化下与硫酸二甲酯/无水丙酮溶剂中反应而得。E、采用核磁共振光谱法对所得 25Rmdt 和 25Smdt 及它们的混合体(外消旋体)进行结构鉴定。

[0011] 所述的人参总皂苷,是指来自五加科人参属具有达玛烷四环三萜结构骨架的所有植物的根、茎、叶、花(蕾)、果实(浆)、种子中及绞股蓝中含有的皂苷类化合物。所述的20(R)和20(S)-25-OH-PPD或它们的混合体可由人参总皂苷通过酸、碱、酶和微生物水解或转化制得,也可由20(R)和20(S)-原人参二醇经过结构改造制得。人参总皂苷是采用硅胶层析法:用10-99%乙醇提取、大孔吸附树脂纯化后得到的

[0012] 本发明采用碱解法:即以人参总皂苷溶解于低级醇溶液中,用碱金属氢氧化物作为水解试剂进行碱水解,然后经过酸中和、有机溶剂萃取、硅胶柱层析分离后得到25Rmdt和25Smdt及它们的混合体或采用酸解法即人参总皂苷溶解于低级醇中在超声条件下进行酸水解,然后经过碱金属氢氧化物中和,有机溶剂萃取及硅胶柱层析分离得到25Rmdt和25Smdt及它们的混合体。所说的低级醇为甲醇;有机溶剂为石油醚、正己烷、苯、甲苯、二甲苯、氯仿、二氯甲烷、乙醚、乙酸乙酯、正丁醇之一种或其中2-3种任意比例的混合物;所说的碱金属氢氧化物包括钠、钾和钙的氢氧化物,碱金属氢氧化物的浓度为0.02-9% W/V。

[0013] 酸水解为人参总皂苷的水解在酸性水溶液和有机溶剂中在超声条件下进行;其条件如下:人参总皂苷的用量10-800g/L;

[0014] 低级醇为甲醇,浓度为1-95% V/V;

[0015] 酸为盐酸、硫酸、高氯酸、磷酸、草酸、冰乙酸、甲酸,浓度为0.2-9mol/L和它们的饱和酸;

[0016] 超声条件:频率:20-70kHz;功率:2.4-6KW;时间:1-120分钟;水温:15-100℃;

[0017] 水解后的反应液用氢氧化钠或氢氧化钾中和,使用浓度为0.2-9mol/L;

[0018] 萃取用的有机溶剂为石油醚、正己烷、苯、甲苯、二甲苯、氯仿、二氯甲烷、乙醚、乙酸乙酯、正丁醇;

[0019] 柱层析用硅胶粒度为100-400目;

[0020] 水解温度为:4-100℃,时间1min-5d。

[0021] 本发明所提供的新型抗肿瘤制剂中,以25Rmdt和25Smdt及它们的混合体(外消旋体)为有效成分,其总有效剂量为1-100mg/kg/d。

[0022] 本发明所提供的新型抗肿瘤制剂中,25Rmdt和25Smdt及它们的混合体(外消旋体)可与任何法定药用配合剂和赋形剂制成各种药用剂型的制剂。

[0023] 本发明所提供的新型抗肿瘤制剂中,25Rmdt和25Smdt及它们的混合体(外消旋体)可与目前市场上的任何化疗药、生物制剂,包括激素类、烷化剂类、铂类、抗代谢类、拓扑异构酶抑制剂类、抗微丝微管类、诱导分化类、抗肿瘤生长类、提高机体免疫类及其他药物,制备成复方制剂。

[0024] 本发明所提供的新型抗肿瘤制剂中,制剂剂型为口服、注射或局部用药剂型。

[0025] 本发明所提供的新型抗肿瘤制剂中,口服剂型包括片剂、粉剂、悬浊液、乳浊液、胶囊、颗粒剂、糖衣片、药丸、液体、糖浆和柠檬水剂等。

[0026] 本发明所提供的新型抗肿瘤制剂中,注射剂型包括水剂、冻干粉针、静脉乳剂、多相质脂体制剂、静脉微乳剂、悬浊液等。

[0027] 本发明所提供的新型抗肿瘤制剂中,局部用药剂型包括软膏、固体、悬浊液、水剂、粉剂、糊剂、栓剂、气溶胶、泥敷剂、涂抹剂、灌肠剂和乳剂等。

[0028] 本发明所提供的新的人参皂苷元25Rmdt和25Smdt及它们的混合体具有抑制人肿

瘤细胞（人乳腺癌、人小细胞肺癌、人胃癌、人结肠癌、人神经胶质瘤、人黑色素瘤、人宫颈癌、人肝癌、早幼粒白血病、肉瘤S-180、肝癌腹水型、小鼠宫颈癌-14及艾氏腹水癌等）生长与增殖，诱导肿瘤细胞分化、凋亡，抑制肿瘤新生血管生成、抑制肿瘤的浸润和转移、增强机体免疫力和降低化疗药物毒副作用等抗肿瘤活性。其总有效剂量为1-100mg/kg/d。

具体实施方式：

[0029] 实施例1：氢氧化钠水解法制备25Rmdt和25Smdt及它们的混合体（外消旋体）

[0030] 称取人参果总皂苷10g，溶于1000ml 氢氧化钠浓度为2.5mol/L、浓度为80%的甲醇水溶液中加热回流水解24h，用2.5mol/L 盐酸中和反应液，减压回收甲醇，用氯仿萃取反应液，氯仿相经水洗、无水硫酸钠干燥、蒸干收集残余物，经硅胶柱层析分离、石油醚：乙酸乙酯（10：1-1：1）梯度洗脱得86个流分，流分52-55经乙酸乙酯重结晶后得25Rmdt；流分56-58经TLC检查后合并，除去溶剂后乙酸乙酯重结晶后得25Rmdt和25Smdt的混合体（外消旋体）；流分59-62经TLC检查后合并，乙酸乙酯重结晶后得25Smdt。

[0031] 实施例2：盐酸水解法制备得到25Rmdt和25Smdt及它们的混合体（外消旋体）

[0032] 称取西洋参叶总皂苷10g，溶于1000ml 盐酸浓度为2.5mol/L、浓度为80%的甲醇水溶液中超声。超声条件：频率：50kHz；功率：3KW；时间：30分钟；在温度40℃水解12h，用2.5mol/L 氢氧化钠中和反应液，减压回收甲醇，用氯仿萃取反应液，氯仿相经水洗、无水硫酸钠干燥、蒸干收集残余物，经硅胶柱层析分离、氯仿：乙酸乙酯（15：1-1：1）梯度洗脱得58个流分，流分30-35经乙酸乙酯重结晶后得25Rmdt；流分36-38经TLC检查后合并，除去溶剂后乙酸乙酯重结晶后得25Rmdt和25Smdt的混合体（外消旋体）；流分38-41经TLC检查后合并，乙酸乙酯重结晶后得25Smdt。

[0033] 实施例3：25Rmdt和25Smdt及它们的混合体在体外抑制人癌细胞生长

[0034] 使用6种人恶性肿瘤（人白血病细胞HL-60，人前列腺癌细胞Du145，人乳腺癌细胞MCF-7，人结肠癌细胞Colon205，人肺癌细胞A549和人肝癌细胞Hep3B/HepG2）细胞系，采用MTT法测定了25Rmdt和25Smdt及它们的混合体体外抗癌活性，测定浓度为0-500 μM，处理时间为72小时。不同的细胞系之间观察到对这些化合物敏感性的明显不同。对于25Rmdt和25Smdt及它们的混合体，大多数细胞系的IC₅₀值在较低的 μM 水平。（最好提供试验数据）

[0035] 表1 25Rmdt和25Smdt及它们的混合体对6种人肿瘤细胞IC₅₀(μmol/L)(%) (M±SE)

[0036]

	MCF-7	HepG2	A549	Du145	Colon205	HL-60
25Rmdt	13.52	12.43	33.57	11.43	10.81	7.13
25Smdt	8.34	8.32	35.62	11.83	14.2	8.48
25Rmdt：25Smdt(1：	10.17	9.03	33.80	10.61	11.39	7.47

[0037] 实施例4：25Rmdt和25Smdt及它们的混合体抑制S-180肿瘤细胞生长实验

[0038] 实验动物，健康昆明种小白鼠50只，体重19-24克，雄性，由中国医科大学动物中心提供。所有动物均在同样环境下饮水、摄食、保持自然光照。温度25℃，湿度60-70%。动物全价颗粒饲料由沈阳市实验动物饲料厂提供。

[0039] 实验共分7组：荷瘤对照组（ig 蒸馏水10mL/kg）；B：25Rmdt组（ig 10mg/kg/d）；

25Smd t 组 ;25Rmdt : 25Smdt(1 : 1) 组 (ig 10mg/kg/d) ;人参皂苷 -Rg₃ 组 (ig 10mg/kg/d) ;原人参二醇组 (ig 10mg/kg/d) ;E :紫杉醇组 (ip 10mg/kg/d)。

[0040] 选取移植肿瘤 7 天,肿瘤生长良好,腹部膨隆明显的小鼠,接种癌细胞混悬液 0.2mL/ 只。接种后小鼠按体重随机共分成 5 组,每组 10 只,分别为于接种后次日开始给药,每日 1 次,连续给药 12 天。给药结束次日,将动物称体重后脱臼处死,剥离出皮下肿块称重,进行统计处理,计算抑瘤率。25Rmdt 和 25Smdt 及它们的混合体对 S-180 荷瘤小鼠抑瘤作用的结果见表 2。

[0041] 统计学处理方法采用组间“t”检验。

[0042] 抑瘤率(%) = [(荷瘤对照组瘤重 - 实验组瘤重) / 荷瘤对照组瘤重] × 100%

[0043] 表 2 25Rmdt 和 25Smdt 及它们的混合体对 S-180 荷瘤小鼠抑瘤作用的结果

[0044]

组别	剂量	动物数	动物体重 (g)	瘤重	抑瘤率	
	mg/kg/d	(n)	给药前	给药后	(g)	(%)
荷瘤对照组 A	-	10	20.2±2.25	22.10±2.28	0.99±0.36	-
25Smdt	10	10	20.7±1.89	21.89±2.12	0.46±0.22*	53.5
25Rmdt	10	10	20.1±2.09	21.42±1.08	0.44±0.12*	55.4
25Rmdt :	10	10	20.9±1.62	21.68±2.30	0.45±0.46*	54.4
25Smdt(1 : 1)						
人参皂苷 -Rg ₃	10	10	20.0±2.18	21.36±2.25	0.60±0.28*	39.4
原人参二醇	10	10	20.8±1.82	21.89±1.69	0.55±0.20*	44.4
紫杉醇	10	10	20.6±1.98	21.90±2.07	0.47±0.36*	52.5

[0045] 备注 :1,给药量为 0.1mg/10g ;2,与荷瘤对照组比较 *P < 0.01。

[0046] 实施例 5 :25Rmdt 和 25Smdt 及它们的混合体对艾氏腹水癌小鼠生存影响实验

[0047] 将实验小鼠饲养 3 天,选取生长状态良好,腹部膨隆明显的接种 2 周艾氏腹水癌的小鼠,腹部皮肤消毒,在无菌条件下给每只实验小鼠腹腔注射癌细胞混悬液 0.2mL/ 只。接种后小鼠按体重随机分租,共分成 7 组,每组 10 只,分别为于接种后次日开始灌胃给药,每日 1 次,连续给药 12 天。观察小鼠死亡情况并记录,25Rmdt 和 25Smdt 及它们的混合体对艾氏腹水癌小鼠的生存期影响见表 3。

[0048] 实验结果表明:与艾氏腹水癌对照组相比,25Rmdt 和 25Smdt 及 25Rmdt : 25Smdt(1 : 1) 对艾氏腹水癌小鼠生存期有明显延长作用。

[0049] 表 3 25Rmdt 和 25Smdt 及它们的混合体对艾氏腹水癌小鼠生存期的影响

[0050]

组别	剂量 mg/ kg/d	给药量 mL/g	动物数 (n)	平均存活期 (d)	延长存活期 (d)
荷瘤对照组 A	-	0.01	10	15.0	-
25Smdt	10	0.01	10	22.4	7.4
25Rmdt	10	0.01	10	22.6	7.6
25Rmdt : 25Smdt (1 : 1)	10	0.01	10	22.0	7.0
人参皂苷 -Rg ₃	10	0.01	10	20.2	5.2
原人参二醇	10	0.01	10	20.8	5.8
紫杉醇	10	0.01	10	21.9	6.9

[0051] 实施例 6 :25Rmdt 和 25Smdt 及它们的混合体抑制小鼠 Lewis 肺癌生长实验

[0052] 实验共分 7 组 :荷瘤对照组 (ig 蒸馏水 10mL/kg) ;B :25Rmdt 组 (ig 10mg/kg/d) ; 25Smdt 组 ;25Rmdt : 25Smdt (1 : 1) 组 (ig 10mg/kg/d) ; 人参皂苷 -Rg₃ 组 (ig 10mg/kg/d) ;原人参二醇组 (ig 10mg/kg/d) ;E :紫杉醇组 (ip 10mg/kg/d) 。

[0053] 取接种后第 15 天生长良好的 Lewis 荷瘤小鼠腹水,以无菌盐水 1 : 3 稀释后,昆明种小鼠前肢右腋下 sc 接种 0.2mL/ 只,接种后小鼠按体重随机共分成 5 组,每组 10 只,分别为于接种后次日开始给药,每日 1 次,连续给药 12 天。给药结束次日,将动物称体重后脱臼处死,剥离出皮下肿块称重,进行统计处理,计算抑瘤率。

[0054] 25Rmdt 组 (ig 10mg/Kg/d) ;25Smdt 组 ;25Rmdt : 25Smdt (1 : 1) 组对小鼠 Lewis 肺癌的影响见表 4。统计学处理方法采用组间“t”检验。

[0055] 表 4 25Rmdt 和 25Smdt 及它们的混合体对小鼠 Lewis 肺癌抑瘤作用的结果

[0056]

组别	剂量 mg/kg/d	动物数 (n)	动物体重 (g)	瘤重 (g)	抑瘤率 (%)	
给药前	给药 后					
荷瘤对照组 A	-	10	20.6±1.20	22.90±2.06	1.16±0.42	-
25Smdt	10	10	19.9±2.26	21.06±2.48	0.52±0.22*	55.5
25Rmdt	10	10	20.6±1.76	21.22±2.08	0.53±0.32*	54.4
25Rmdt : 25Smdt (1 : 1)	10	10	20.2±2.78	21.48±1.67	0.61±0.46*	55.4
人参皂苷 -Rg ₃	10	10	20.7±2.59	22.02±1.88	0.69±0.28*	40.4
原人参二醇	10	10	19.8±2.62	21.58±2.02	0.62±0.20*	46.4
紫杉醇	10	10	20.6±2.68	21.90±2.96	0.54±0.36*	53.5