



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104610211 B
(45)授权公告日 2016. 10. 19

(21)申请号 201510056911.0
(22)申请日 2015.02.03
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104610211 A
(43)申请公布日 2015.05.13
(73)专利权人 上海中医药大学
地址 201203 上海市浦东新区蔡伦路1200号
(72)发明人 徐宏喜 付文卫 吴曼 劳远至
祝伦伦 谭红胜
(74)专利代理机构 上海精晟知识产权代理有限公司 31253
代理人 冯子玲
(51)Int.Cl.
C07D 311/00(2006.01)
A61K 31/352(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)

Mass Spectrometry Guided Isolation of Apoptosis-Inducing Benzophenones and Xanthone from the Pericarp of *Garcinia yunnanensis* Hu.《Journal of Agricultural and Food Chemistry》.2008,第56卷(第23期), 11144-11150.

Zheng-Xiang Xia et al..Bioassay-Guided Isolation of Prenylated Xanthenes and Polycyclic Acylphloroglucinols from the Leaves of *Garcinia nujiangensis*.《Journal of Natural Products》.2012,第75卷(第8期),1459-1464.

Le-Thu T. Nguyen et al..Polyisoprenylated acylphloroglucinols and a polyisoprenylated tetracyclic xanthone from the bark of *Calophyllum thorelii*.《Tetrahedron Letters》.2012,第53卷(第34期),4487-4493.

Chao Feng et al..Characterization of Proapoptotic Compounds from the Bark of *Garcinia oblongifolia*.《Journal of Natural Products》.2014,第77卷(第5期),1111-1116.

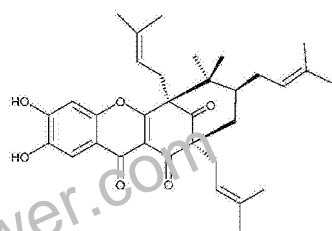
审查员 张书恩

权利要求书1页 说明书7页 附图4页

(56)对比文件
CN 103420971 A,2013.12.04,全文.
CN 103536588 A,2014.01.29,全文.
Xu Gang et al..Bioassay and
Ultrapformance Liquid Chromatography/

(54)发明名称
苯甲酮类化合物及其药物组合物和用途

(57)摘要
本发明涉及药学领域,特别是涉及一种如结构式(I)的化合物,或其药学上可接受的盐、水合物或前药,所述结构式(I)为:



本发明的上述结

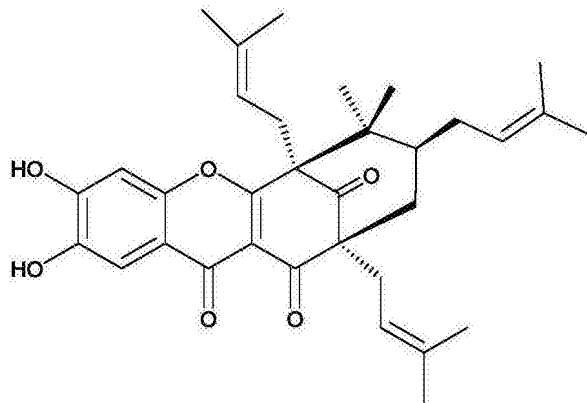
(I)

构式(I)的化合物可用于治疗肿瘤。本发明还涉及含有上述结构式(I)的化合物的药物组合物。

CN 104610211 B

patviewer.com

1. 一种具有下列结构式(I)的化合物,或其药学上可接受的盐:



2. 一种药物组合物,含有治疗有效量的如权利要求1所述的化合物或其药学上可接受的盐及药学上可接受的载体。

3. 如权利要求1所述的化合物或其药学上可接受的盐在制备抗肿瘤药物中的应用。

4. 如权利要求3所述的应用,所述肿瘤选自人宫颈癌、人胰腺癌、人胃癌、人结肠癌或人食管癌。

www.patviewer.com

苯甲酮类化合物及其药物组合物和用途

技术领域

[0001] 本发明属于药学领域,提供了一种苯甲酮类化合物及其药物组合物和用途。

背景技术

[0002] 据世界卫生组织统计,癌症已经成为全人类最主要的死因之一,全世界每年癌症新发病人数超过1000万人,年死亡人数超过700万,造成经济损失超过1万亿美元,相当于全球生产总值的1.5%。肿瘤也是严重危害我国人民健康的重大疾病,是国家科技重大专项“重大新药创制”所针对的10类(种)重大疾病之一。因此抗肿瘤研究领域成为当今生命科学研究中极富挑战性且意义重大的领域。目前,虽然抗肿瘤药物研究已经取得了很大的进步,肿瘤患者生存时间明显延长,特别是白血病、恶性淋巴瘤的治疗有了突破,但对严重危害人类生命健康的,占恶性肿瘤90%以上的实体瘤仍未能达到令人满意的疗效。

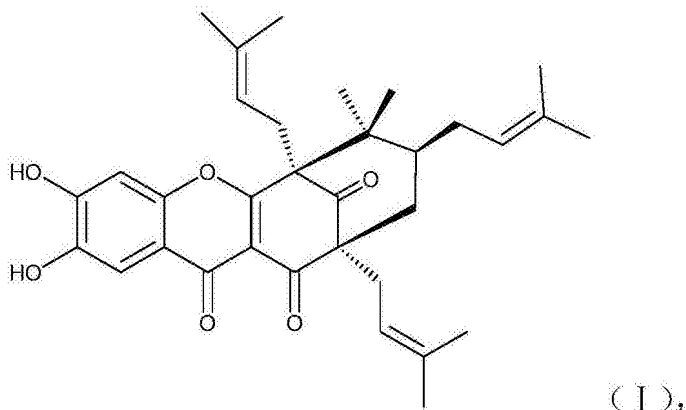
[0003] 随着肿瘤生物学及相关学科的飞速发展,人们逐渐认识到细胞癌变的本质是细胞信号转导通路的失调导致的细胞无限增殖,随之而来的是抗肿瘤药物研发理念的重大转变。研发的焦点正在从传统细胞毒药物转移到针对肿瘤细胞内异常信号系统靶点的特异性新一代抗肿瘤药物。不同于传统细胞毒药物选择性差、毒副作用强、易产生耐药性等特点,靶点特异性抗肿瘤药针对于正常细胞和肿瘤细胞之间的差异,达到了高选择性、低毒性的治疗效果,因此有着巨大的应用前景,成为21世纪肿瘤生物治疗的最新发展方向。

[0004] 当前抗肿瘤药物作用机理大致分为以下几类:1、削弱细胞分裂能力:促使细胞停止分裂并坏死;2、诱导细胞死亡:其中又包括细胞凋亡(Apoptosis)或称程序化细胞死亡,即细胞在一定的生理或病理条件下,遵循自身的程序,自己结束其生命的过程,最后细胞脱落离体或裂解为若干凋亡小体,被其他细胞吞噬;自噬性细胞死亡(Autophagy),即细胞将不需要的物质或细胞器运输至溶酶体并降解,从而实现细胞死亡的过程;细胞坏死(Necrosis或Necroptosis),即通过激活TNF- α , FasL或TRAIL等表皮受体,并且激活RIP蛋白家族的一类细胞死亡的过程。3、抑制肿瘤细胞浸润(Invasion)和转移(Metastasis):包括抑制单个肿瘤细胞转移到别的器官,以及抑制肿瘤细胞对器官的侵入性破坏等。随着近几十年来对细胞死亡信号通路的深入了解,揭示了许多可以作为药物靶点的基因和蛋白,使得抗肿瘤药物的研究有了更大的空间。例如,在细胞凋亡过程中,许多癌基因、原癌基因和抑癌基因都参与了调控过程,包括Caspases、Apaf-1、Bcl-2、Fas、c-myc、p53等。

发明内容

[0005] 本发明首先提供了一种具有结构式(I)的能够抗肿瘤的苯甲酮类化合物 Garcimultiflorone I,或其药学上可接受的盐、水合物或前药,所述结构式(I)为:

[0006]

[0007] 分子式： $C_{33}H_{40}O_6$ 分子量：532.3

[0008] 本发明还提供了上述化合物的相应的所有药学上可以接受的盐、水合物或前药。这些盐可以由化合物中带正电荷的部分(例如,胺基)与具有相反电性的带负电荷(例如,三氟醋酸)形成;或者由化合物中带负电荷的部分(例如,羧基)与正电荷(例如,钠、钾、钙、镁)形成。化合物可以含有一个非芳香性的双键,具有一个或多个不对称中心。所以,这些化合物可以作为外消旋的混合物、单独的对映异构体、单独的非对映异构体、非对映异构体混合物、顺式或反式异构体存在。所有这些异构体都是可预期的。所述的“结构式(I)的化合物的前药”通常指一种物质,当用适当的方法施用后,可在受试者体内进行代谢或化学反应而转变成结构式(I)的至少一种化合物或其盐。

[0009] 本发明的结构式(I)的化合物可通过本领域的常规方法如醇提、层析等从多花山竹子等植物中提取获得,亦可通过商业途径购买或者利用市售原料,通过现有技术中传统的化合物合成方法合成获得。本领域的普通技术人员根据现有公知技术可以合成本发明的化合物。合成的化合物可以进一步通过柱色谱法、高效液相色谱法或结晶等方式进一步纯化。

[0010] 合成化学改造、保护官能团方法学(保护或去保护)对合成应用化合物是很有帮助的,并且是现有技术中公知的技术,如R.Larock,Comprehensive Organic Transformations,VCH Publishers(1989);T.W.Greene and P.G.M.Wuts,Protective Groups in Organic Synthesis,3rd Ed.,John Wiley and Sons(1999);L.Fieser and M.Fieser,Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis,John Wiley and Sons(1994);and L.Paquette,ed.,Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis, John Wiley and Sons(1995)中都有公开。

[0011] 本发明的结构式(I)的化合物或其药学上可接受的盐、水合物或前药可以有效地抑制多种人肿瘤细胞的增殖并诱导其凋亡,故而本发明的化合物或其药学上可接受的盐、水合物或前药可用于制备抗肿瘤的药物。

[0012] 本发明还提供了一种组合物,该组合物包括本发明的化合物或其药学上可接受的盐、水合物或前药,与药学上可接受的载体,该组合物可用于治疗肿瘤;

[0013] 本发明还提供了一种药物制剂,该药物制剂包括一种或几种本发明的化合物或其药学上可接受的盐、水合物或前药,该药物制剂可用于治疗肿瘤。

[0014] 本发明的结构式(I)的化合物或其药学上可接受的盐、水合物或前药在组合物或药物制剂中的含量例如0.0001-50wt%;较佳的0.001-30wt%;更佳的0.01-20wt%。

[0015] 治疗有效量(即:可对人和/或动物产生功能或活性的且可被人和/或动物所接受的量)的本发明的化合物与药学上可以接受的载体(用于治疗给药的载体,它们本身并不是必要的活性成分,且施用后没有过分的毒性)可以组成药物制剂,这些药物制剂可以制备成口服制剂、注射剂、片剂、粉制剂、胶囊剂、分散片、缓释制剂等。

[0016] 治疗有效量的本发明的组合物的用量介于0.001~500mg/kg体重/天之间,任何介于上述范围内的用量皆为本发明的有效量。优选的,本发明的组合物的用量介于0.005~300mg/kg体重/天之间;更优选的,本发明的组合物的用量介于0.01~100mg/kg体重/天之间。所述的“治疗有效量”可用于相关疾病的单一用药或联合用药治疗。本领域的专业人员能够理解,在实际给药时的用量可高于或低于上述剂量范围。针对某一对象(如哺乳动物一人)的“治疗有效量”和具体治疗方案可受诸多因素的影响,包括所用化合物或其前药的药效活性、给药对象的年龄、体重、一般情况、性别、饮食、给药时间、疾病易感性、疾病进程以及收治医师的判断等。所述的“治疗”指得是给予机体(含有肿瘤、具有肿瘤的症状、或者具有肿瘤的前兆)本发明的结构式(I)的化合物,以治疗、减轻、减缓、改变、治愈、影响、改善其肿瘤、肿瘤的症状或肿瘤的前兆。

[0017] 本发明的结构式(I)的化合物或其药学上可接受的盐、水合物或前药或其组合物或其药物制剂可以通过口服、静脉内、肌肉内、皮下、鼻腔内、直肠内等途径给药。固体载体如:淀粉、乳糖、磷酸二酯、微晶纤维素、黑糖和白陶土,而液态载体如:无菌水、聚乙二醇、非离子型表面活性剂和食用油(如玉米油、花生油和芝麻油),只要适合活性成分的特性和所需要的特定给药方式。在制备药物组合物中通常使用的佐剂也可有利地被包括,如,调味剂、色素、防腐剂和抗氧化剂如维生素E、维生素C、BHT和BHA。

[0018] 本发明的结构式(I)的化合物也可肠胃外或腹腔内给药。也可在适当混合有表面活性剂(如羟丙基纤维素)的水中制备这些活性化合物(作为游离碱或药学上可接受的盐)的溶液或悬浮液。还可在甘油、聚乙二醇及其在油中的混合物中制备分散液。在常规储存和使用条件下,这些制剂中含有防腐剂以防止微生物的生长。

[0019] 适用于注射的药物形式包括:无菌水溶液或分散液和无菌粉(用于临时制备无菌注射液或分散液)。在所有情况中,这些形式必须是无菌的且必须是流体以易于注射器排出流体。在制造和储存条件下必须是稳定的,且必须能防止微生物如细菌和真菌的污染和影响。载体可以是溶剂或分散介质,其中含有如水、醇、它们的适当混合物和植物油。

[0020] 本发明各个方面的细节将在随后的章节中得以详尽描述。通过下文以及权利要求的描述,本发明的特点、目的和优势将更为明显。

附图说明:

[0021] 图1 Garcimultiflorone I抑制肿瘤细胞生长。

[0022] 图2 Garcimultiflorone I可诱导HeLa细胞死亡。

[0023] 图3 Garcimultiflorone I可诱导SGC-7901细胞死亡。

[0024] 图4 Garcimultiflorone I通过凋亡途径诱导肿瘤细胞死亡。

具体实施方式

[0025] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明

而不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明,否则所有的百分数、比率、比例、或份数按重量计。

[0026] 除非另行定义,文中所使用的所有专业与科学用语与本领域熟练人员所熟悉的意义相同。此外,任何与所记载内容相似或均等的方法及材料皆可应用于本发明方法中。文中所述的较佳实施方法与材料仅作示范之用。

[0027] 本发明提到的上述特征,或实施例提到的特征可以任意组合。本专利说明书所揭示的所有特征可与任何组合物形式并用,说明书中所揭示的各个特征,可以任何可提供相同、均等或相似目的的替代性特征取代。因此除有特别说明,所揭示的特征仅为均等或相似特征的一般性例子。

[0028] 实施例1从多花山竹子中提取并鉴定Garcimultiflorone I

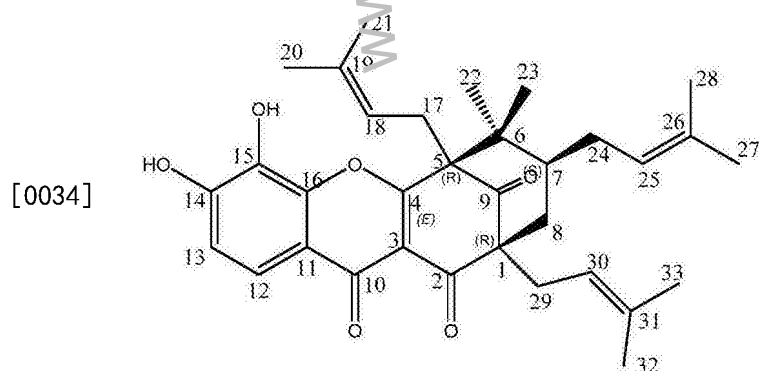
[0029] 1.1实验材料

[0030] 多花山竹子于2006年采自海南万宁县吊罗山。植物经乔春峰博士鉴定。植物样本保存于上海中医药大学创新中药实验室。

[0031] 1.2实验方法

[0032] 在室温下,用丙酮(20升)将干燥的多花山竹子叶粉末(3.1公斤)来回萃取三次。在减压下蒸发萃取液,得到暗绿色的提取物(194.2克)。将提取物用氯仿-甲醇混合溶液溶解并与适量硅胶拌匀,除去溶剂后加在20倍量的硅胶柱上,用氯仿,氯仿-甲醇(10:1)和氯仿-甲醇(1:1)依次洗脱,进行成分分离。氯仿部分在真空中蒸发,得到残余物(35.1克),其中33.0克通过MCI柱,依次用水,30%乙醇水溶液,60%乙醇水溶液以及95%的乙醇水溶液洗脱得到6个组分。其中90%的乙醇水洗脱物的第二个组分3.2克通过ODS的中压制备色谱,以甲醇/水梯度系统(40:60至100:0,体积/体积)依次洗脱,得到5个组分。第二个组分用HPLC Alltima C-18柱,用含0.1%甲酸的水溶液/CH₃CN(35/65,体积比)洗脱获得Garcimultiflorone I(7.6mg)。

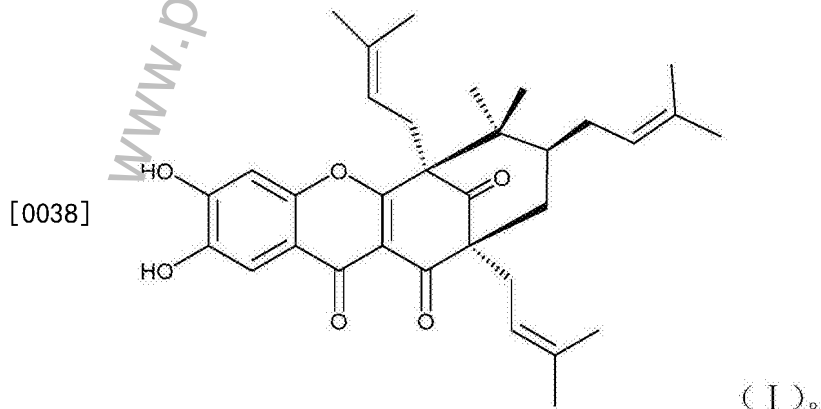
[0033] Garcimultiflorone I是一个浅黄色、无定形粉末,通过高分辨质谱确定分子式为C₃₃H₄₀O₆,为一未见报道的新化合物。其NMR数据如下:



position	δ_C	δ_H (J in Hz)
1	65.7	
2	190.9	
3	116.5	
4	175.7	
5	62.1	
6	47.6	
7	45.8	1.28 (1H, m)
8	37.4	2.20 (1H, dd, J = 13.5, 10.6) 1.82 (1H, dd, J = 14.2, 4.2)
9	206.0	
10	171.2	
11	115.3	
12	107.5	7.23 (1 H, s)
13	146.0	
14	154.4	
15	102.6	6.87 (1 H, s)
16	149.3	
[0035] 17	26.4	2.82 (1 H, dd, J=13.7, 9.7) 2.66 (1 H, d-like, J=12.5) 4.48 (1 H, t-like)
18	118.4	
19	134.2	
20	18.1	1.63 (3H, s)
21	25.6	1.34 (3 H, s)
22	25.6	1.02 (3 H, s)
23	20.6	1.14 (3 H, s)
24	28.5	1.93 (1 H, br d, J=13.1Hz) 1.69 (overlap)
25	123.1	4.81 (1 H, t-like)
26	132.3	
27	17.5	1.40 (3 H, s)
28	25.8	1.60 (3 H, s)
29	28.0	2.39 (1 H, dd, J=14.3, 2.33 (1 H, dd, J=14.4, 5.15 (1 H, t, J=6.8Hz)
30	119.6	
31	133.6	
32	25.8	1.68 (3H, s)
33	17.6	1.60 (3 H, s)

[0036] 1.3实验结果

[0037] 从多花山竹子中分离得到的化合物Garcimultiflorone I,经核磁及质谱检测,化学结构如式(I)所示:



[0039] 实施例2Garcimultiflorone I抑制人肿瘤细胞增殖

[0040] 2.1实验材料

[0041] 人宫颈癌细胞HeLa,人胰腺癌细胞Capan 2,人胃癌细胞SGC-9701,人结肠癌细胞HCT116和人食管鳞状癌细胞TE1购自上海生物化学与细胞生物学研究所。

[0042] RPMI1640,DMEM,胎牛血清,青霉素和链霉素购自美国Gibco公司。

[0043] 2.2实验方法

[0044] 人宫颈癌细胞HeLa,人胰腺癌细胞Capan 2,用含10%胎牛血清,100U/ml青霉素和100 μ g/ml链霉素的DMEM培养液基,人胃癌细胞SGC-9701,人结肠癌细胞HCT116和人食管鳞状癌细胞TE1用含10%胎牛血清,100U/ml青霉素和100 μ g/ml链霉素的RPMI1640培养液基,于37 $^{\circ}$ C,5%CO₂及饱和湿度的培养箱中培养,用0.25%胰蛋白酶消化传代,取对数生长期细胞用于实验。

[0045] 人宫颈癌细胞HeLa,人胰腺癌细胞Capan 2,人胃癌细胞SGC-9701,人结肠癌细胞HCT116和人食管鳞状癌细胞TE1(5000个细胞/孔)接种于96孔板中。分别加入浓度梯度为2.5 μ M、5 μ M、10 μ M、20 μ M的Garcimultiflorone I于96孔板中,72h后,每孔加入10 μ l MTT,避光孵育4h进行染色。然后吸出培养基,加入100 μ l DMSO使用酶标仪在490nm下检测吸光度值,用excel计算不同浓度的生长抑制率,生长抑制率=(治疗组的平均值-blank)/(control的平均值-blank) \times 100。当细胞的生长抑制率达到50%时Garcimultiflorone I的浓度即为IC₅₀值。实验数据均用平均值 \pm 标准误差表示。

[0046] 2.3实验结果

[0047] 结果如表1和图1所示,Garcimultiflorone I分别作用于HeLa,SGC-7901,TE1,HCT116及Capan 2细胞72小时后,可明显抑制细胞增殖的活性,其中5 μ M作用72h就能够显著性地抑制SGC7901和HCT116细胞的增殖。以上结果可以证明Garcimultiflorone I能够浓度依赖性抑制肿瘤细胞的增殖能力。

[0048] Garcimultiflorone I作用于多种人肿瘤72h的IC₅₀如下表所示。

[0049] 表1Garcimultiflorone I抑制肿瘤细胞生长的IC₅₀值

[0050]

compund	IC 50 (μ M)				
	HeLa	SGC7901	TE1	HCT116	Capan 2
Garcimultiflorone I	7.65 \pm 0.18	4.20 \pm 0.33	8.14 \pm 1.74	5.96 \pm 0.13	12.86 \pm 2.62

[0051] 实施例3Garcimultiflorone I诱导肿瘤细胞死亡。

[0052] 3.1实验材料

[0053] RPMI1640,DMEM,胎牛血清,青霉素和链霉素购自美国Gibco公司。

[0054] 3.2实验方法

[0055] 人宫颈癌细胞HeLa用含10%胎牛血清,100U/ml青霉素和100 μ g/ml链霉素的DMEM培养液基,人胃癌细胞SGC-7901用含10%胎牛血清,100U/ml青霉素和100 μ g/ml链霉素的1640培养液基,于37 $^{\circ}$ C,5%CO₂及饱和湿度的培养箱中培养,用0.25%胰蛋白酶消化传代,取对数生长期细胞用于实验。

[0056] 将人宫颈癌细胞HeLa和人胃癌细胞SGC-7901(250000个细胞/孔)接种于6孔板中。分别加入浓度梯度为2.5 μ M、5 μ M、10 μ M、20 μ M的Garcimultiflorone I,48h后,将细胞收集,用

70%乙醇固定细胞过夜。将固定的细胞离心,加入20 μ g/ml的碘化丙啶(PI)PBS溶液染色,孵育30min,用流式细胞仪检测Sub-G1峰。

[0057] 3.3实验结果

[0058] 结果如图2所示,20 μ M Garcimultiflorone I处理HeLa细胞48h后,出现了24.2% Sub-G1峰,即出现细胞死亡。同样如图3所示,10 μ M Garcimultiflorone I处理SGC-7901细胞48h后,出现了15.1%的Sub-G1峰。以上结果证明Garcimultiflorone I可诱导肿瘤细胞死亡。

[0059] 实施例4Garcimultiflorone I通过凋亡诱导肿瘤细胞死亡。

[0060] 4.1实验材料

[0061] DMEM,胎牛血清,青霉素和链霉素购自美国Gibco公司。

[0062] 4.2实验方法

[0063] 人宫颈癌细胞HeLa用含10%胎牛血清,100U/ml青霉素和100 μ g/ml链霉素的DMEM培液基,于37 $^{\circ}$ C,5%CO₂及饱和湿度的培养箱中培养,用0.25%胰蛋白酶消化传代,取对数生长期细胞用于实验。

[0064] 将人宫颈癌细胞HeLa(250000个细胞/孔)接种于6孔板中。分别加入浓度梯度为2.5 μ M、5 μ M、10 μ M、20 μ M的Garcimultiflorone I,48h后,将细胞收集,裂解,用Western Blot方法检测相关蛋白变化。

[0065] 4.3实验结果

[0066] 结果如图4所示,Garcimultiflorone I于10 μ M时可诱导caspase 9的剪切和激活,并且出现cleaved caspase 9,说明Garcimultiflorone I诱导了凋亡。同时也观察到了caspase 3和PARP的剪切和激活。以上结果证明Garcimultiflorone I可通过凋亡诱导肿瘤细胞死亡。

[0067] 本实验证明:Garcimultiflorone I具有抑制肿瘤细胞增殖的作用,表明Garcimultiflorone I具有潜在的抗肿瘤作用,可以作为治疗肿瘤的药物或保健品。

[0068] 本发明所涉及的多个方面已做如上阐述。然而,应理解的是,在不偏离本发明精神之前提下,本领域专业人员可对其进行等同改变和修饰,所述改变和修饰同样落入本申请所附权利要求的覆盖范围。

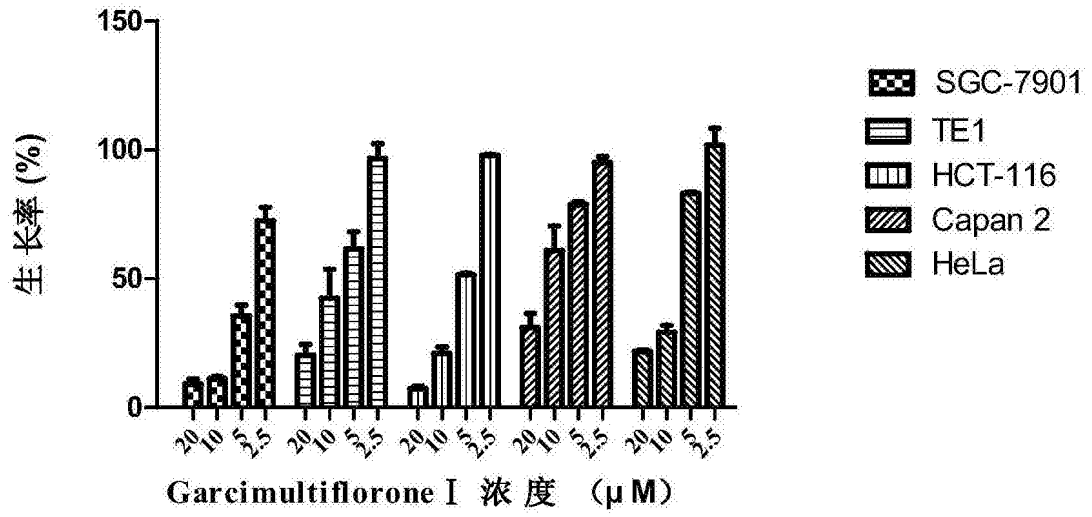


图1

www.patview.com

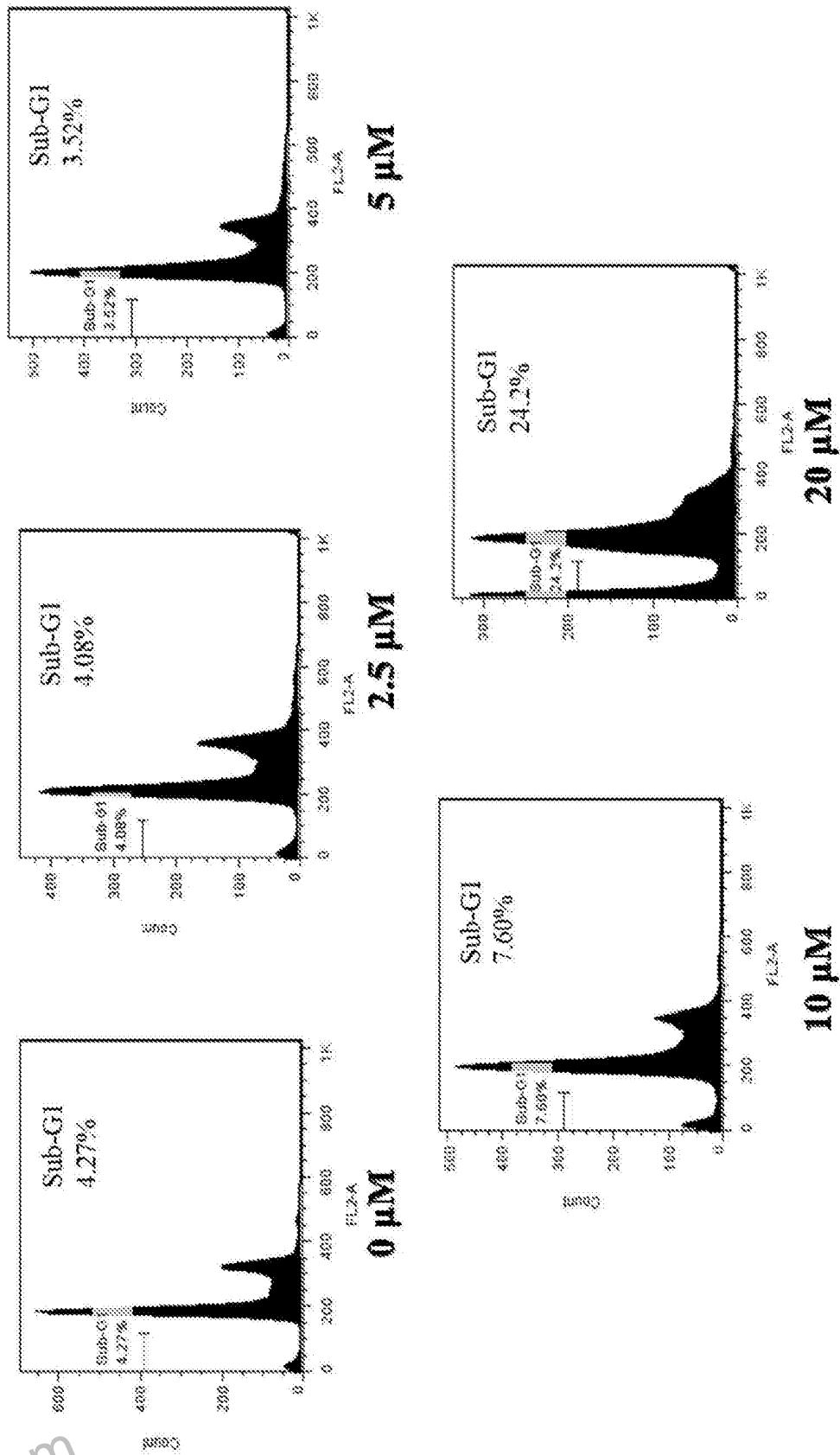


图2

patviewer.com

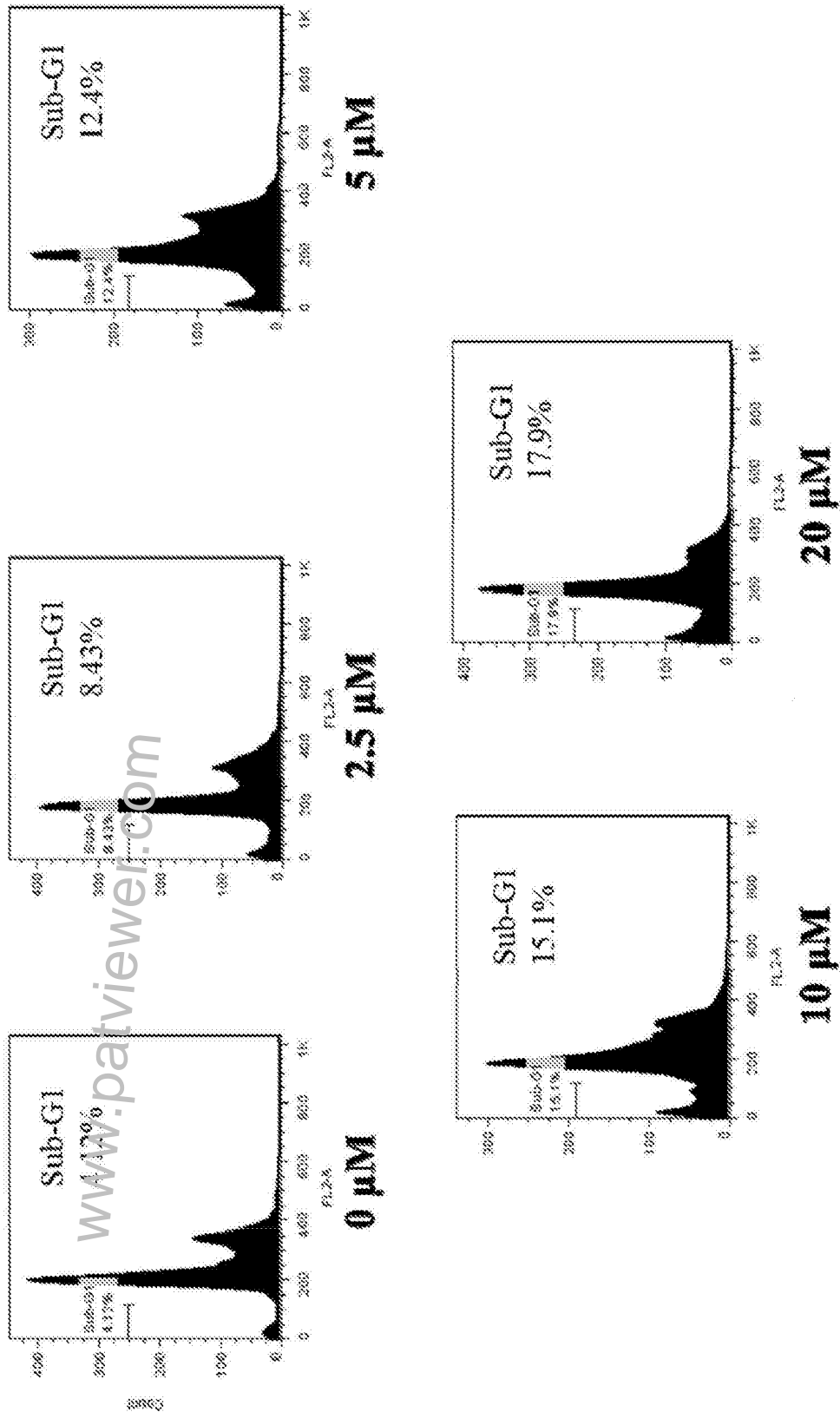


图3

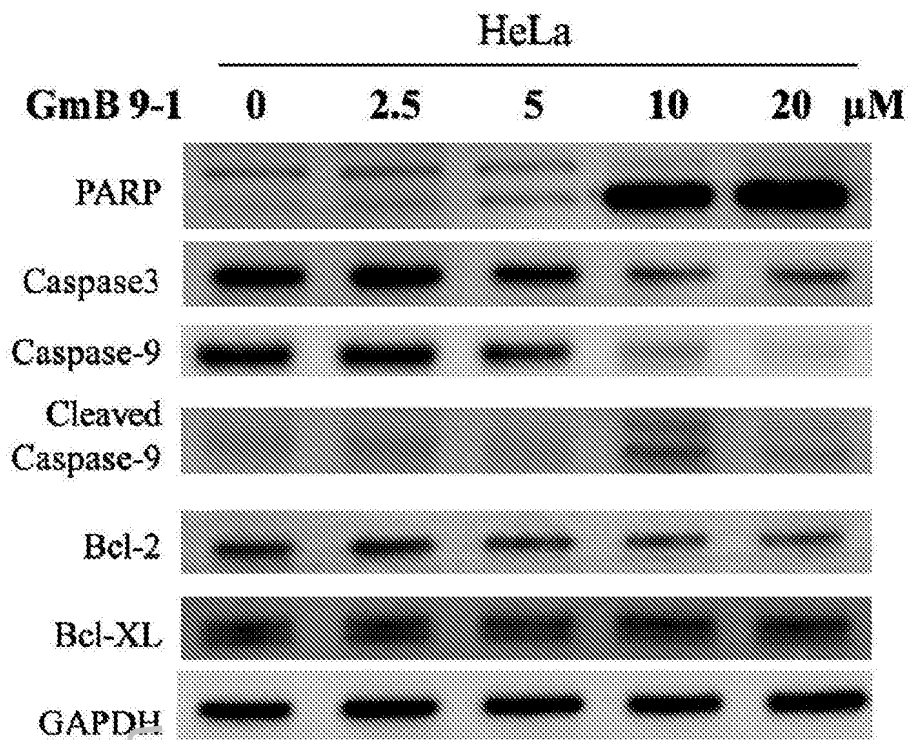


图4