

[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 200480038698.0

[51] Int. Cl.

A61K 36/77 (2006.01)
A61K 31/555 (2006.01)
A61K 31/35 (2006.01)
A61K 31/05 (2006.01)
A61K 131/00 (2006.01)
A61K 135/00 (2006.01)

[43] 公开日 2007年5月30日

[11] 公开号 CN 1972702A

[51] Int. Cl. (续)

A61K 125/00 (2006.01)

[22] 申请日 2004.12.23

[21] 申请号 200480038698.0

[30] 优先权

[32] 2003.12.23 [33] US [31] 60/532,101

[32] 2004.9.7 [33] US [31] 60/607,858

[32] 2004.9.27 [33] US [31] 60/613,811

[32] 2004.10.8 [33] US [31] 60/617,379

[32] 2004.10.8 [33] US [31] PCT/US04/33359

[86] 国际申请 PCT/US2004/043465 2004.12.23

[87] 国际公布 WO2005/063273 英 2005.7.14

[85] 进入国家阶段日期 2006.6.23

[71] 申请人 太平洋艾瑞有限公司

地址 中国香港

[72] 发明人 陈沛光 麦美送 王云

[74] 专利代理机构 北京安博达知识产权代理有限公司

代理人 徐国文

权利要求书 8 页 说明书 23 页 附图 24 页

[54] 发明名称

文冠果的提取物和从提取物分离出的化合物的组成,功能和应用,以及它们的制备方法

[57] 摘要

本发明提供了从文冠果 (*Xanthoceras sorbifolia*) 分离,提纯和鉴定具生物活性的化合物的方法和工艺。本发明同时提供了含有从文冠果提纯的化合物的组合物。从文冠果提纯的化合物中有皂甙化合物。组合物可以用于抗癌,防止脑衰老,增强记忆,改善脑功能,治疗夜尿,尿频,尿急,弱智,痴呆和老年痴呆,孤独症,脑创伤,帕金森病,和其它由于脑功能不健全或障碍所引起的病症,还可用于治疗关节炎,风湿症,循环不良,动脉硬化,雷诺氏症,心绞痛,心脏功能紊乱,冠心病,头痛,头晕,肾功能紊乱,阳痿和早泻。本发明提供的化合物,含有三萜类化合物皂甙原或其它皂甙原,在碳 21 和 22 位有含乙酰基或糖链,在糖链上联有当归酰基,这些功能集团有机地连在一起形成了该化合物。

- 1, 本专利申请的一种组合物, 其特征在于所述组合物含有从冠果的果壳和/或果柄, 叶, 枝干, 种仁, 根和树皮中提出的化合物。
- 2, 如申请专利范围第1项所述组合物, 其特征是该组合物含有皂甙化合物。
- 3, 本专利申请的一种治疗遗尿的药物或保健食品, 其特征在于所述药物或保健食品含有如申请专利范围第1-2项所述的组合物。
- 4, 本专利申请的一种松弛膀胱的药物或保健食品, 其特征在于所述药物或保健食品含有如申请专利范围第1-2项所述的组合物。
- 5, 本专利申请的一种可能改善大脑皮层和小脑反应能力的药物或保健食品, 其特征是所述的药物或保健食品是含有如申请专利范围第1-2项所述的组合物。
- 6, 本专利申请的一种能防止睡眠进入深度睡眠的药物或保健食品, 其特征是所述的药物或保健食品是含有如申请专利范围第1-2项所述的组合物。
- 7, 本专利申请的一种能改善膀胱壁中的扩约感受接收器给中枢神经系统发出信号能力的药物或保健食品, 其特征是所述的药物或保健食品是含有如申请专利范围第1-2项所述的组合物。
- 8, 本专利申请的一种能用作乙酰胆碱酯酶(AchE)的抑制剂的药物或保健食品, 其特征是所述的药物或保健食品是含有如申请专利范围第1-2项所述的组合物。
- 9, 本专利申请的一种抗炎的药物或保健食品, 其特征是所述的药物或保健食品是含有如申请专利范围第1-2项所述的组合物。
- 10, 本专利申请的一种抗病毒的药物或保健食品, 其特征是所述的药物或保健食品是含有如申请专利范围第1-2项所述的组合物。
- 11, 本专利申请的一种能治疗人体免疫缺失的药物或保健食品, 其特征是所述的药物或保健食品是含有如申请专利范围第1-7项所述的组合物。
- 12, 本专利申请的一种可用作癌细胞抑制剂的药物或保健食品, 其特征是所述的药物或保健食品是含有如申请专利范围第1-2项所述的组合物。
- 13, 本专利申请的一种可降低血液中胆固醇和甘油三酯的药物或保健食品, 其特征是所述的药物或保健食品是含有如申请专利范围第1-2项所述的组合物。
- 14, 本专利申请的一种能防止大脑衰老, 增进记忆和改善脑功能; 治疗夜尿, 尿频, 尿失禁, 痴呆, 弱智, 老年痴呆, 孤独症, 脑损伤, 帕金森病等和其它由于脑功能不健全或障碍所引起的病症; 医治关节炎, 风湿症, 循环不良, 动脉硬化, 雷诺病, 心绞痛, 心脏功能紊乱, 冠心病, 头痛, 眩晕, 肾脏功能紊乱, 阳痿和早泻的组合物, 其特征是所述的组合物是含有申请专利范围第1或2项所述的组合物。
- 15, 本专利申请的一种配伍的药物或保健食品, 其特征是所述的配伍的药物或保健食品是由如申请专利范围第1-2项所述的组合物所制成药物或保健食品和下列植物或其提取物, 或其它药物配伍: 葡萄籽提取物或其它抗氧化剂提取物; 虫草 (*Cordyceps* spp.) 或其提取物, 银杏 (*Ginkgo biloba*) 或其提取物, 人参 (*Panax ginseng*) 或其提取物, 西洋参 (*P. quinquefolium*) 或其提取物, 黄皮 (*Clausena lansium*) 或其提取物, 聚果菊 (*Echinacea*) 或其提取物, 小金丝桃 (*Hypericum perforatum*) 或其提取物, 葛根 (*Pueraria lobata*) 或其提取物, 天麻 (*Gastrodia elata*) 或其提取物, 蜜环菌 (*Armillariella mellea*) 或其提取物, 丹参 (*Salvia miltiorrhiza*) 或其提取物, 三七 (*Panax notoginseng*) 或其提取物, 红曲 (*Monascus*) 或发酵物 (Red yeast rice), 黄芪 (*Hedysarum polybotrys*) 或其提取物, 地黄 (*Rehmannia glutinosa*) 或其提取物, 当归 (*Angelica sinensis*) 或其提取物, 远志 (*Polygala tenuifolia*) 或其提取物

物, 灵芝(*Ganoderma spp.*) 或其提取物, 茯苓(*Poria cocos*)或其提取物, 甘草(*Glycyrrhiza uralensis*)或其提取物, 石杉碱 A(*Huperzine A*), *Lacithin*, *Metrifonate*, *Nocetile*, *reatine*, 叶酸, 氨基酸, 维他命 B, D, K 和纤维添加物等。

16, 本专利申请的由如申请专利范围第 1 或 2 项所述的文冠果的植物的组合物所制成药物或保健食品的剂型, 其特征是所述的剂型为胶囊, 片剂, 散剂, 水剂或其它剂型。

17, 如申请专利范围第 2 项所述的从文冠果的果壳和/或果柄, 叶, 枝干, 种仁, 根和树皮中提出粗皂甙提取物, 其特征是制备粗皂甙提取物方法依下列步骤:

- (a) 采收文冠果, 清选果壳和/或果柄, 叶, 枝干, 种壳, 根和树皮, 干燥, 粉碎, 得文冠果粉; 用有机溶剂浸提文冠果粉(2:1)4-5 次, 每次 20-35 小时, 得有机溶剂浸提液;
- (b) 收集浸提液, 再回流热提(80° C)2-3 次, 得二次浸提液;
- (c) 溶解流浸膏于水中, 得水浸提液; 集合并提取液;
- (d) 用正丁醇浸提水浸提液, 得正丁醇浸提物;
- (e) 用色谱法分离正丁醇浸提物, 得粗皂甙提取物。

18, 如申请专利范围第 17 项所述有机溶剂, 其特征在于所述有机溶剂是乙醇或甲醇。

19, 如申请专利范围第 2 项所述的从文冠果的种仁中提出粗皂甙提取物, 其特征是制备粗皂甙提取物方法依下列步骤:

- (a) 采收文冠果, 剥壳得到种仁, 压轧种仁去油得种仁饼;
- (b) 干燥, 粉碎种仁饼得种仁粉, 用正己烷提取种仁粉进一步去油;
- (c) 回收正己烷;
- (d) 干燥, 磨粉得去油种仁霜;
- (e) 用有机溶剂(乙醇, 甲醇等)浸提种仁霜, (2:1)4-5 次, 每次 20-35 时, 得有机溶剂浸提液;
- (f) 收集浸提液, 再回流热提(80° C)2-3 次, 得二次浸提液;
- (g) 溶解二次浸提液于水中, 得水浸提液;
- (h) 用正丁醇浸提水浸提液, 得正丁醇浸提物;
- (i) 用色谱法分离正丁醇浸提物, 得粗皂甙提取物。

20, 如申请专利范围第 19 项所述有机溶剂, 其特征在于所述有机溶剂是乙醇或甲醇。

21, 本专利申请的一种由如申请专利范围第 1 或 2 项所述的文冠果的组成物所制成的药物或保健食品, 其特征是所述的药物或保健食品可促进膀胱发育, 可制止深度睡眠, 可提高睡眠警觉状态, 可调节制尿荷尔蒙(ADH)和促肾上腺皮质的荷尔蒙(ACTH)的释放, 分解和摄取及其受体, 可调节 5-羟色胺(5-HT)的释放, 分解和摄取及其受体, 可调解乙酰胆碱(Ach)的释放, 分解和摄取及其受体, 可调节肾上腺素(AD)的释放, 分解和摄取及其受体, 可调节多巴胺(DA)的释放, 分解和摄取及其受体和可调解去甲肾上腺素(NE)的释放, 分解和摄取及其受体。

22, 本专利申请的一种由如申请专利范围第 1 或 2 项所述的文冠果的组成物所制成的药物或保健食品, 其特征是所述的药物或保健食品有助防止睡眠麻痹, 可调节肽的合成, 释放, 分解和活性及其受体。

23, 本专利申请的一种治疗癌症的药物或保健食品, 其特征是所述的药物或保健食品是由如申请专利范围第 1 或者说所述的文冠果的组成物所制成。

24, 如申请专利范围第 23 项所述治疗癌症, 其特征是所述的癌症包括卵巢癌, 膀胱癌,

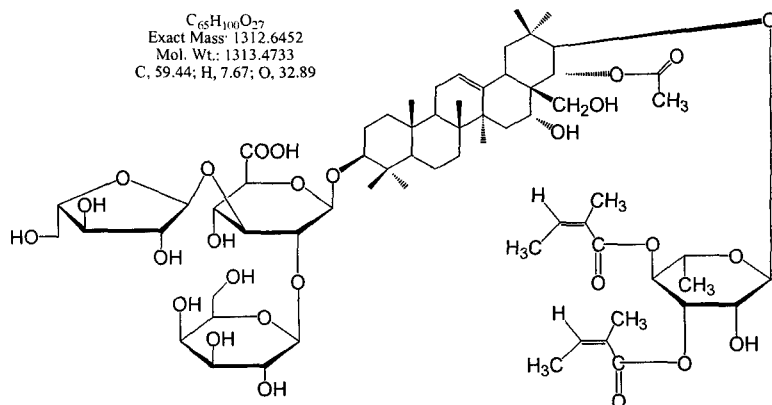
骨癌，乳腺癌，白血病，肝癌，前列腺癌，结肠癌，宫颈癌，皮肤癌和脑癌。

25, 本专利申请的一种由如申请专利范围第 1 或 2 项所述的文冠果的组成物所制成的药物或保健食品，其特征是所述的药物或保健食品可改善肺和膀胱功能；促进骨骼生长发育；减少尿量和次数和推迟排尿。

26, 本专利申请的一种配伍的药物或保健食品，其特征是所述的配伍的药物或保健食品是由如申请专利范围第 1 或 2 项所述的组合物所制成药物或保健食品和下列草药配伍：人参，巴戟天，肉苁蓉，杜仲或冬虫夏草。

27, 本专利申请一化合物，其特征是所述化合物的化学结构如下：

化合物 Y1



3-0-[β -D-半乳糖吡喃酰基(1 \rightarrow 2)]- α -L-阿拉伯糖呋喃酰基(1 \rightarrow 3)- β -D-葡萄糖醛吡喃酰基-21-0-(3,4-二羟苯基)- α -L-鼠李糖吡喃酰基-22-0-乙酰基-3 β , 16 α , 21 β , 22 α , 28-五羟基-12-烯五环三萜皂甙。

28, 本专利申请一化合物，其特征是所述化合物含有：三萜类化合物或其它皂甙元，在碳 3 位有一个糖链，在碳 21 和 22 位有一乙酰基和/或糖链，当归酰基集团联在糖链上，糖链和当归酰基集团有机的 (operatively) 和皂甙元联在一起形成了该化合物。

29, 如申请专利范围第 28 项所述的化合物，其特征是所述化合物至少含有两个糖。

30, 如申请专利范围第 28 项所述的化合物，其特征是所述化合物至少一个当归酰基集团

31, 本专利申请一化合物，其特征是所述化合物 (Y1-1) 的化学结构如图 15A 所示。

32, 本专利申请一化合物，其特征是所述化合物 (Y1-2) 的化学结构如图 15B 所示。

33, 本专利申请一化合物，其特征是所述化合物 (Y1-3) 的化学结构如图 15C 所示。

34, 本专利申请一化合物，其特征是所述化合物 (Y1-4) 的化学结构如图 15D 所示。

35, 本专利申请一化合物，其特征是所述化合物 (Y-a) 的化学结构如图 27 所示。

36, 本专利申请一化合物，其特征是所述化合物 (Y-b) 的化学结构如图 28 所示。

37, 本专利申请一化合物，其特征是所述化合物 (Y-c) 的化学结构如图 29 所示。

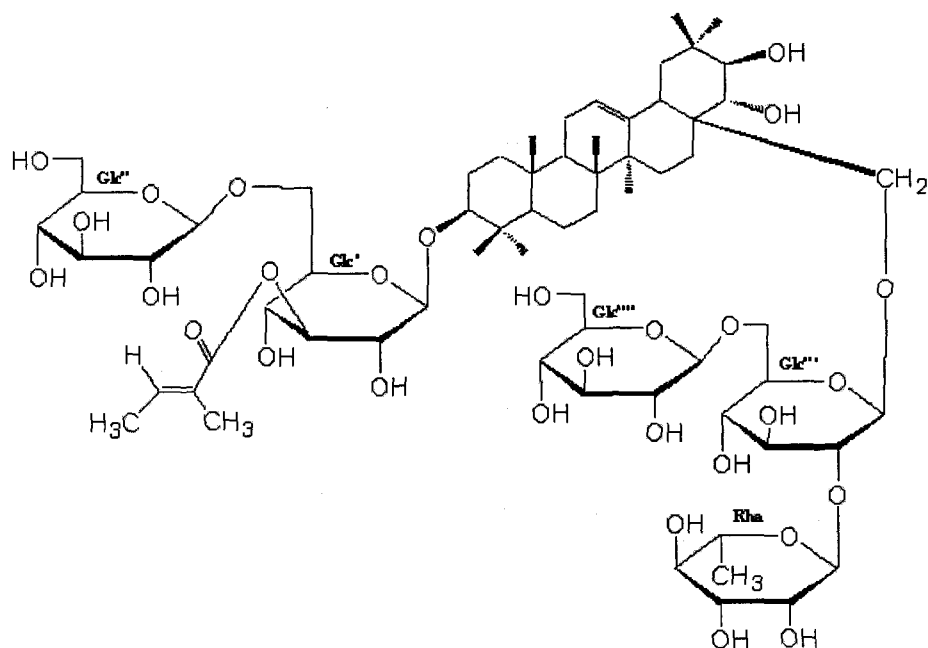
38, 本专利申请一化合物，其特征是所述化合物 (Y1-a) 的化学结构如图 30 所示。

39, 本专利申请一化合物，其特征是所述化合物 (Y1-b) 的化学结构如图 31 所示。

40, 本专利申请一化合物，其特征是所述化合物 (Y1-c) 的化学结构如图 32 所示。

41, 本专利申请一化合物，其特征是所述化合物的化学结构 (R1) 具有如下化学名称：3-0-[β -D-半乳糖吡喃酰基(1 \rightarrow 2)]- α -L-阿拉伯糖呋喃酰基(1 \rightarrow 3)- β -D-葡萄糖醛吡喃酰基-21-0-(3,4-二羟苯基)- α -L-鼠李糖吡喃酰基-22-0-乙酰基-3 β , 16 α , 21 β , 22 α , 28-五羟基-12-烯五环三萜皂甙。

42, 本专利申请一化合物，其特征是所述化合物的化学结构如下图所示：



43, 本专利申请一化合物,其特征是所述化合物的核磁共振或质子核磁共振谱如图 7 所示。

44, 本专利申请一化合物,其特征是所述化合物的核磁共振或 HMQC 图谱如图 8 所示。

45, 本专利申请一化合物,其特征是所述化合物的核磁共振或 HMBC 图谱如图 9 所示。

46, 本专利申请一化合物,其特征是所述化合物的核磁共振图谱 (COSY) 如图 10 所示。

47, 本专利申请一化合物,其特征是所述化合物的质子核磁共振谱如图 11 所示。

48, 本专利申请一化合物,其特征是所述化合物的核磁共振或 HMQC 图谱如图 12 所示。

49, 本专利申请一化合物,其特征是所述化合物的核磁共振或质子核磁共振谱如图 13 所示。

50, 本专利申请一化合物,其特征是所述化合物的核磁共振或 HMQC 图谱如图 14 所示。

51, 本专利申请一化合物,其特征是所述化合物的核磁共振或质子核磁共振谱如图 21 所示。

52, 本专利申请一化合物,其特征是所述化合物的核磁共振或 HMQC 图谱如图 22 所示。

53, 本专利申请一化合物,其特征是所述化合物的核磁共振或 HMBC 图谱如图 23 所示。

54, 本专利申请一化合物,其特征是所述化合物的核磁共振图谱 (COSY) 如图 24 所示。

55, 本专利申请一化合物,其特征是所述化合物的 C13 核磁共振谱如图 25 所示。

56, 本专利申请一化合物,其特征是所述化合物的质子核磁共振谱如图 37 所示。

57, 本专利申请一化合物,其特征是所述化合物的核磁共振或 HMQC 图谱如图 38 所示。

58, 本专利申请一化合物,其特征是所述化合物的质子核磁共振谱如图 39 所示。

59, 本专利申请一化合物,其特征是所述化合物的核磁共振或 HMQC 图谱如图 40 所示。

60, 本专利申请一化合物,其特征是所述化合物的质子核磁共振谱如图 41 所示。

61, 本专利申请一化合物,其特征是所述化合物的核磁共振或 HMQC 图谱如图 42 所示。

62, 本专利申请一化合物,其特征是所述化合物的核磁共振或 HMBC 图谱如图 43 所示。

63, 本专利申请的一种盐类化合物,其特征是所述盐类化合物为如申请专利范围第 27-62 项所述化合物的盐类化合物。

64, 本专利申请的一种可抑制癌细胞生长的组合物,其特征是所述组合物含有申请专利范围第 27-62 项所述的任一化合物。

65, 本专利申请的一种可抑制癌细胞生长的组合物,其特征是所述组合物由如申请专利范围第 27-62 项中所述化合物中任一项化合物和一种适合的载体所组成。

66, 本专利申请的一种可抑制癌细胞生长的组合物,其特征是所述组合物是由一定数量的如申请专利范围第 27-62 项所述任一项化合物和一种适合的药物载体所组成。

67, 本专利申请的一种抑制卵巢癌细胞生长的方法,其特征是所述抑制卵巢癌细胞生长的方法是用一定浓度的如申请专利范围第 27-62 项所述组合物去接触卵巢癌细胞。

68, 本专利申请的一种治疗遗尿的方法,其特征是所述方法是用一定浓度的如申请专利范围第 27-62 项所述组合物去治疗遗尿。

69, 本专利申请的一种松弛膀胱的组合物,其特征是所述组合物含有如申请专利范围第 27-62 项中所述任一项化合物。

70, 本专利申请的一种能改善大脑皮层和小脑反应能力的组合物,其特征是所述组合物含有如申请专利范围第 27-62 项中所述任一项化合物。

71, 本专利申请的一种能防止睡眠进入深度睡眠的组合物,其特征是所述组合物含有如申请专利范围第 27-62 项中所述任一项化合物。

72, 本专利申请的一种能改善膀胱壁中的扩约感受接收器给中枢神经系统发出信号能力的组合物,其特征是所述组合物含有如申请专利范围第 27-62 项中所述任一项化合物。

73, 本专利申请的一种能治疗膀胱组织紧张的组合物,其特征是所述组合物含有如申请专利范围第 27-62 项中所述任一项化合物。

74, 本专利申请的一种能用作乙酰胆碱酯酶(AchE)的抑制剂的组合物,其特征是所述组合物含有如申请专利范围第 27-62 项中所述任一项化合物。

75, 本专利申请的一种抗炎的组合物,其特征是所述组合物含有如申请专利范围第 27-62 项中所述任一项化合物。

76, 本专利申请的一种抗病毒的组合物,其特征是所述组合物含有如申请专利范围第 27-62 项中所述任一项化合物。

77, 本专利申请的一种能抑制人体免疫缺失病毒蛋白酶的组合物,其特征是所述组合物含有如申请专利范围第 27-62 项中所述任一项化合物。

78, 本专利申请的一种用作癌细胞抑制剂的组合物,其特征是所述组合物含有如申请专利范围第 27-62 项中所述任一项化合物。

79, 如申请专利范围第 78 项所述治疗癌症,其特征是所述的癌症包括卵巢癌,膀胱癌,骨癌,乳腺癌,白血病,肝癌,前列腺癌,结肠癌,宫颈癌,皮肤癌和脑癌。

80, 本专利申请的一种可降低血液中胆固醇和甘油三酯的组合物,其特征是所述组合物含有如申请专利范围第 27-62 项中所述任一项化合物。

81, 本专利申请的一种能防止大脑衰老和改善脑功能,治疗夜尿,尿频,尿失禁,痴

呆, 弱智, 老年 呆, 孤独症, 脑损伤, 帕金森病等和由于脑功能不健全或障碍所引起的病症, 医治关节炎, 风湿症, 循环不良, 动脉硬化, 雷诺病, 心绞痛, 心脏功能紊乱, 冠心病, 头痛, 眩晕, 肾脏功能紊乱, 阳痿和早泻的的组合物, 其特征是所述组合物含有如申请专利范围第 27-62 项中所述任一项化合物。

82, 本专利申请的一种能改善膀胱功能或预防膀胱癌的组合物, 其特征是所述组合物含有如申请专利范围第 27-62 项中所述任一项化合物。

83, 本专利申请的一种可提高睡眠警觉状态的组合物, 其特征是所述组合物含有如申请专利范围第 27-62 项中所述任一项化合物。

84, 本专利申请的一种可调节制尿荷尔蒙 (ADH) 的释放, 分解和摄取的组合物, 其特征是所述组合物含有如申请专利范围第 27-62 项中所述任一项化合物。

85, 本专利申请的一种可调节制促肾上腺皮质荷尔蒙 (ACTH) 的分泌, 分解和摄取及其受体的组合物, 其特征是所述组合物含有如申请专利范围第 27-62 项中所述任一项化合物。

86, 本专利申请的一种可调节多 5 - 羟色胺 (5-HT) 的释放, 分解和摄取及其受体的组合物, 其特征是所述组合物含有如申请专利范围第 27-62 项中所述任一项化合物。

87, 本专利申请的一种可调乙酰胆碱 (Ach) 的释放, 分解和摄取及其受体的组合物, 其特征是所述组合物含有如申请专利范围第 27-62 项中所述任一项化合物。

88, 本专利申请的一种可调节肾上腺素 (AD) 的释放, 分解和摄取及其受体的组合物, 其特征是所述组合物含有如申请专利范围第 27-62 项中所述任一项化合物。

89, 本专利申请的一种可调节多巴胺 (DA) 的释放, 分解和摄取及其受体的组合物, 其特征是所述组合物含有如申请专利范围第 27-62 项中所述任一项化合物。

90, 本专利申请的一种可调去甲肾上腺素 (NE) 的释放, 分解和摄取及其受体的组合物, 其特征是所述组合物含有如申请专利范围第 27-62 项中所述任一项化合物。

91, 本专利申请的一种可调节肽的合成, 释放, 分解和活性及其受体的组合物, 其特征是所述组合物含有如申请专利范围第 27-62 项中所述任一项化合物。

92, 本专利申请的一种改善肺或膀胱功能的组合物, 其特征是所述组合物含有如申请专利范围第 27-62 项中所述任一项化合物。

93, 本专利申请的一种从文冠果提取化合物的方法, 其特征是所述提取化合物的方法依下列步骤:

a. 用有机溶剂浸提文冠果样品粉, 得有机溶剂浸提液; b. 收集合并浸提液;
c. 再回流热浸提液, 得二次浸提液; d. 回收有机溶剂得流浸膏; e. 干燥, 灭菌流浸膏得文冠果粗提取物粉。f. 用高效相色谱 (HPLC) 和快速液相色谱 (FPLC) 分离文冠果粗提取物粉, 得一或多种组分; g. 检测吸收波长为 207nm 或 254nm; h. 从上述组分中鉴定出具生物活性的组分; i. 用快速液相色谱 (FPLC) 分离提纯出生物活性的成分 (一种或几种); j. 再用高效相色谱 (HPLC) 从中提纯分离出具有生物活性的化合物。

94, 如申请专利范围第 93 项所述的制备文冠果提取物的方法, 其特征是所述文冠果样品是文冠果的果壳和/或果柄, 枝干, 叶, 种仁, 种壳, 根, 和树皮。

95, 如申请专利范围第 93 项所述的制备文冠果提取物的方法, 其特征是所述有机溶剂是乙醇, 甲醇, 乙醚, 氯仿和丙醇等。

96, 如申请专利范围第 93 项所述的制备文冠果提取物的方法, 其特征是所述有机溶剂和文冠果样品的比例是 2 比 1。

97, 如申请专利范围第 93 项所述的制备文冠果提取物的方法, 其特征是所述的有机溶剂浸提文冠果样品, 浸提 4-5 次, 每次 20-35 小时。

98, 如申请专利范围第 93 项所述的制备文冠果提取物的方法, 其特征是所述的回流热提是回流热提 2-3 次。

99, 如申请专利范围第 93 项所述的制备文冠果提取物的方法, 其特征是所述的回流热提温度是 80° C。

100, 如申请专利范围第 93 项所述的制备文冠果提取物的方法, 其特征是所述鉴定生物活性成分的方法是用 MTT 鉴定法。

101, 如申请专利范围第 93 (i-j) 项所述的从文冠果提取物中分离提纯出的一种或几种生物活性成分, 其特征是所述一种或几种生物活性成分的 HPLC 图谱见于图 5-6。

102, 如申请专利范围第 93 项所述的从文冠果提取物中分离和提纯出的的化合物, 其特征是所述化合物的 HPLC 图谱见于图 19-20。

103, 如申请专利范围第 93 项所述的从文冠果提取物中分离和提纯出的的化合物, 其特征是所述化合物的 HPLC 图谱见于图 20。

104, 本专利申请的一种能治疗膀胱癌的组合物, 其特征是所述组合物含有如申请专利范围第 27-62 项中所任一种述化合物。

105, 本专利申请的一种能抑制卵巢癌细胞的方法, 其特征是所述抑制卵巢癌细胞的方法是用一定浓度的如申请专利范围第 27-62 项中所述任一种组合物去接触卵巢癌细胞。

106, 本专利申请的一种能治疗或抗卵巢癌的方法, 其特征是所述的方法是用适当的浓度的如申请专利范围第 27-62 项中所述组合物去治疗卵巢癌。

107, 本专利申请的一种能调节 Wnt 通路中的组元或它们的受体以阻止癌细胞增殖的组合物, 其特征是所述组合物是由一定浓度如申请专利范围第 27-62 项所述的任一化合物所组成。

108, 本专利申请的一种能调节 Ras-MAP 激酶链中的组元或它们的受体的组合物, 其特征是所述组合物是由一定浓度如申请专利范围第 27-62 项所述的任一化合物所组成。

109, 本专利申请的一种能调节 Ras-pendent 或 Myc 通路中的组元或它的受体的组合物, 其特征是所述组合物是由一定浓度如申请专利范围第 27-62 项所述的任一化合物所组成。

110, 本专利申请的一种能启动“检查机制”(checkpoint mechanism)以阻止癌细胞增殖的组合物, 其特征是所述组合物是由一定浓度如申请专利范围第 27-62 项所述的任一化合物所组成。

111, 本专利申请的一种能调节孢外生长的组元或其受体的组合物, 其特征是所述组合物是由一定浓度如申请专利范围第 27-62 项所述的任一化合物所组成。

112, 本专利申请的一种能调节 Ras 和 MAP 激酶链中的组元或其受体以阻止卵巢癌细胞增殖的组合物, 其特征是所述组合物是由一定浓度如申请专利范围第 27-62 项所述的任一化合物所组成。

113, 本专利申请的一种能调节 Myc 细胞增殖以阻止癌细胞裂殖的组元或其受体的组合物, 其特征是所述组合物是由一定浓度如申请专利范围第 27-62 项所述的任一化合物所组成。

114, 本专利申请的一种能调节 α -TGF 的组元或其受体以抑制卵巢和膀胱癌细胞增殖的组合物, 其特征是所述组合物是由一定浓度如申请专利范围第 27-62 项所述的任一化合物所组成。

115, 本专利申请的一种能调节 β -TGF 的组元或其受体以抑制卵巢和膀胱癌细胞增殖的组合物, 其特征是所述组合物是由一定浓度如申请专利范围第 27-62 项所述的任一化合物所组成。

116, 本专利申请的一种能调节蛋白质 E6, E7 和释放蛋白质 Rb, p53 以抑制畸形细胞裂殖的组合物, 其特征是所述组合物是由一定浓度如申请专利范围第 27-62 项所述的任一化合物所组成。

117, 本专利申请的一种能调节或能与蛋白质起反应以引起癌细胞死亡的组合物, 其

特征是所述组合物是由一定浓度如申请专利范围第 27-62 项所述的任一化合物所组成。

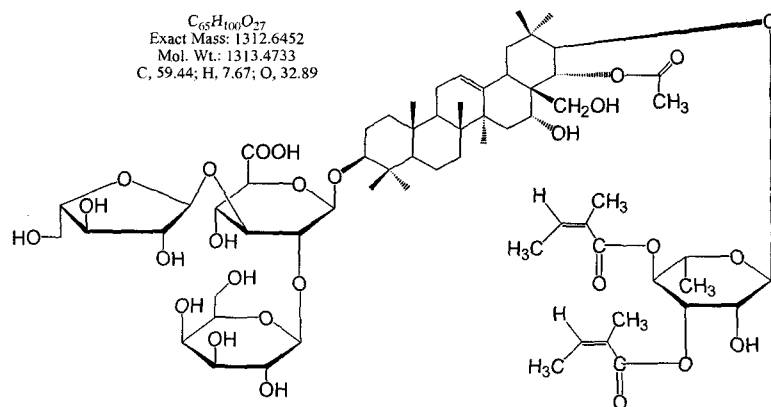
118, 本专利申请的一种能调节合成蛋白质 p53 的通路和其受体以抑制癌细胞裂殖的组合物, 其特征是所述组合物是由一定浓度如申请专利范围第 27-62 项所述的任一化合物所组成。

119, 本专利申请的一种能使细胞中被阻断的自杀信号 (suicidesignal) 重新释放的组合物, 其特征是所述组合物是由一定浓度如申请专利范围第 301-308 项所述的任一化合物所组成。

120, 本专利申请的一种能调节 BMP, GF, Jak-jnk-STAT 和 Junfos 的通路和其受体的组合物, 其特征是所述组合物是由一定浓度如申请专利范围第 27-62 项所述的任一化合物所组成。

121, 本专利申请的一种能调节糖肾上腺皮质激素, 雌激素, 酪氨酸激酶, G-蛋白, 和 EGF 的受体的组合物, 其特征是所述组合物是由一定浓度如申请专利范围第 27-62 项所述的任一化合物所组成。

122, 本专利申请的一种抑制癌细胞生长的方法, 其特征是所述方法是使一定量的具有下述化学结构的化合物去接触所述癌细胞:



3-O-[β -D-半乳糖吡喃酰基 (1 \rightarrow 2)]- α -L-阿拉伯糖呋喃酰基 (1 \rightarrow 3)- β -D-葡萄糖醛吡喃酰基-21-O-(3,4-二氧归酰基)- α -L-鼠李糖吡喃酰基-22-O-乙酰基-3 β , 16 α , 21 β , 22 α , 28-五羟基-12-烯五环三萜皂甙。

文冠果的提取物和从提取物分离出的化合物的组成，功能和应用，以及它们的制备方法

本专利要求国际专利申请书（NO. PCT/US04/33359, 2004年十月八日递交）的优先权，该申请书（NO. PCT/US04/33359）要求获得美国专利申请书（U.S. Serial N0s. 60/532, 101, 2003年12月23日递交；U.S. Serial N0s. 60/617, 379, 2004年10月8日递交；U.S. Serial N0s. 60/613, 811, 2004年9月27日递交和U.S. Serial N0s. 60/607, 858, 2004年9月7日递交）中所要求的权利。这些正在审定的专利申请书的内容因而应全面地纳入本专利申请书中。

各种文献和出版物的内容在本专利申请书中被广泛引用，以便能更好地阐明本专利申请书中所要获得的权利。

发明领域

本发明涉及一种叫文冠果（*Xanthoceras sorbifolia*）的植物的提取物，其特征在于从所述提取物中分离和提纯的生物活性化合物的组成，功能和应用，及其制备方法。

发明背景

详见专利申请书（PCT/US04/33359, 2004年10月8日递交）有关章节。

摘要

本发明专利的扼要摘要，为了使本发明的某些条款更加突出或引入新条款，另一些条款的内容可能在本摘要中被简化甚至略去，但是，这不表明本发明专利仅限于这些在摘要中提到的内容。

本发明涉及从文冠果的提取物中分离提纯的化合物的用途，其特征在于所述的提取物可治疗夜尿，遗尿，失禁，尿频。文冠果的提取物治疗夜尿，遗尿，失禁，尿频的功能不仅和它可以改善膀胱功能相关，而且它可以改善大脑中枢系统的功能和泌尿系统信息的传递过程，使传递到大脑的信号不断增强，改善了睡眠警觉系统，防止深度睡眠的发生，使大脑发出信号叫醒睡觉的人去撒尿，避免遗尿的发生。有助于松弛膀胱，提高储尿量，从而避免遗尿的发生。

本发明专利公开的文冠果的这些化合物还有助于消除由于精神紧张，压力，衰老活动过度，反射亢进和不稳定而引起的避免逼尿肌不稳定和膀胱的紧张，从而防止尿急和尿频。文冠果提取物可松弛由乙酰胆碱（ACh）引起的膀胱的紧张。

本发明专利公开的文冠果的这些化合物还能抑制乙酰胆碱酶（AChE）的合成，调解制尿荷尔蒙（ADH）的释放，从而控制膀胱产生过多的尿量，抗炎，从而避免遗尿的发生。

本发明公开了从文冠果提取皂甙化合物的方法，其特征在于所述文冠果的皂甙化合物是从文冠果的果壳和/或果柄，叶，种仁，种壳，枝干，树皮和根中提取的。本发明还公开了一种组合物，其特征在于所述组合物含有文冠果的果壳和/或果柄，叶，种仁，种壳，枝干，树皮和根的皂甙提取物。

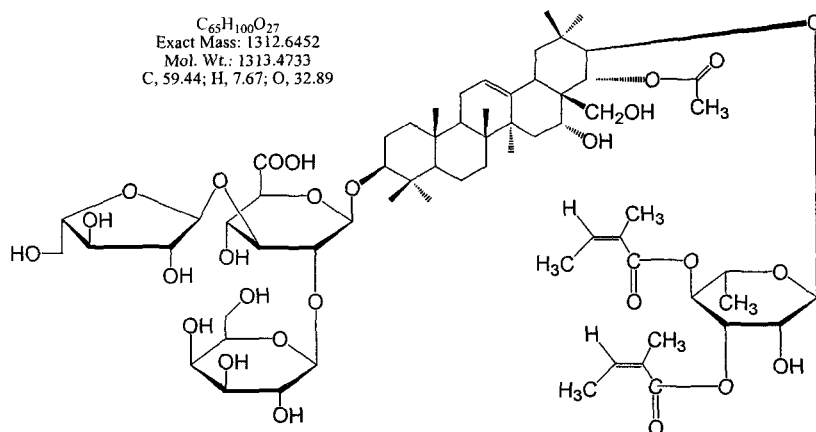
本发明公开了文冠果皂甙化合物的用途，其特征在于所述文冠果的皂甙化合物可用于促进膀胱生长，改善膀胱功能；改善睡眠警觉系统；调节制尿荷尔蒙（ADH）的释放，分解和摄取及其受体的功能；调节促肾上腺皮质的荷尔蒙（ACTH）的释放，分解和摄取及其受体的功能；调节5-羟色胺（5-HT）的释放，分解和摄取及其受体的功能；调解乙酰胆

碱(Ach)的释放,分解和摄取及其受体的功能;调节肾上腺素(AD)的释放,分解和摄取及其受体的功能;调节去甲肾上腺素(NE)的释放,分解和摄取及其受体的功能;调节神经肽的合成,释放,分解和活性及其受体的功能;防止进入睡眠麻痹的状态;治疗遗尿。治疗癌症,如卵巢癌,膀胱癌,骨癌,乳腺癌,白血病,肝癌,前列腺癌和脑癌,但又限于上癌症。以及改善肺的功能。

本发明专利还公开了一种化合物,其特征在于所述化合物含有三萜皂甙原或其它皂甙原,在碳3位上联有糖链,在碳21和22位上联有酰基和/或糖链,在糖链上联有当归酰基。这些基团有机(operatively)组成了具生物活性的化合物。

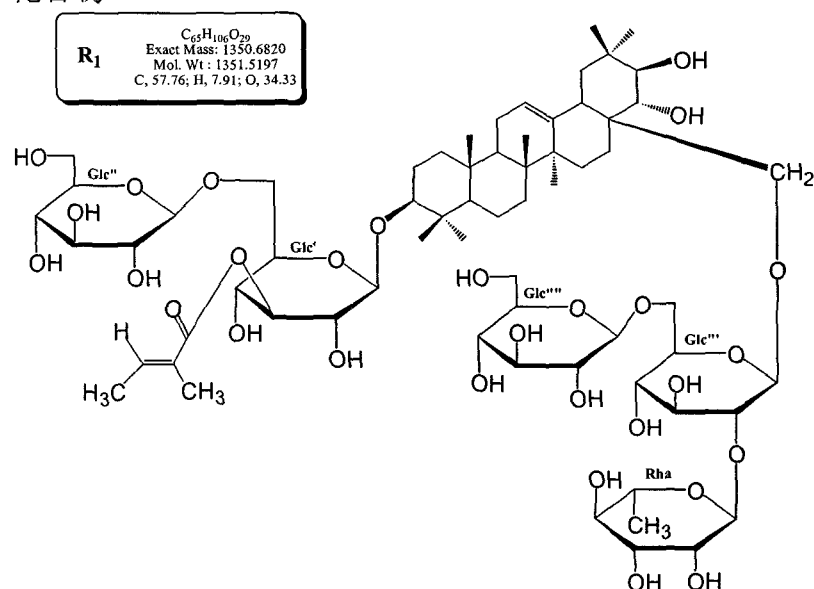
本发明专利公开了一种化合物,其特征在于所述化合物中具有如下的化学结构:

化合物 Y-1



3-0-[D-半乳糖吡喃酰基(1(2))]-(-L-阿拉伯糖呋喃酰基(1(3)))-(-D-葡萄糖醛吡喃酰基-21-0-(3,4-二羟基)-(-L-鼠李糖吡喃酰基-22-0-乙酰基-3(,16(,21(,22,28-五羟基)-12-烯五环三萜皂甙。

化合物 R-1



3-0-[二羟基)-1(3)-(-D-葡萄糖吡喃酰基-1(6))]-(-D-葡萄糖吡喃酰基-28-0-[-(-L-鼠李糖吡喃酰基-1(2))-(-D-葡萄糖吡喃酰基-1(6))-(-D-葡萄糖吡喃酰基-1(3(,21(,22(,28-四羟基)-12-烯五环三萜皂甙。

本发明专利还公开了一类盐类,其特征在于所述盐类是由上述化合物形成的。本发明专利还公开了一类组合物(composition),其特征在于所述组合物是由上述化合物或其盐类和适当载体形成的。

本发明专利还公开了一类药物组合物，其特征在于所述药物组合物是由一定数量的上述化合物或其盐类和适当药物载体所组成。

本发明专利还公开了从文冠果提取物中分离和提纯化合物的方法，其特征在于所述方法如下：采收文冠果样品，清选，干燥；粉碎文冠果样品，得文冠果样品粉；用适量的一种或几种有机溶剂浸提文冠果样品粉（适当的次数和时间），得机溶剂浸提液；收集浸提液，再回流热提（适当的次数），得第二次提取物；回收有机溶剂得流浸膏；干燥和灭菌流浸膏，得粉状文冠果提取物；把上述从文冠果提出的粉状提取物分离成一至多个成分；用速效液相色谱（FPLC）分离和提纯上述具有生物活性的成分；再用高效液相色谱（HPLC）分离出具有生物活性的化合物。

本发明专利公开了化合物 Y-1 的化学结构的验证方法，其特征在于所述验证的方法是一维和二维的核磁共振法，其图谱见图 7, 8, 9 和 10。

本发明专利公开了化合物 R-1 的化学结构的验证的方法，其特征在于所述验证的方法是一维（氢的核磁共振和 C-13 核磁共振）和二维核磁共振法（HMBC 和 HMQC），及质谱法，其图谱和数据见图 21, 22, 23, 24 和 25。

本发明专利还公开了具有抗癌作用的上述从文冠果的提取物分离出的化合物 Y-1 及其衍生物，其特征在于所述 Y-1 的化学名称为 3-O-[(β -D-半乳糖吡喃酰基 (1 \rightarrow 2))- α -L-阿拉伯糖呋喃酰基 (1 \rightarrow 3)]-(β -D-葡萄糖醛吡喃酰基 -21-O-(3,4-二氧归酰基)- α -(L-鼠李糖吡喃酰基-22-O-乙酰基-3 β , 16 α , 21 β , 22 α , 28-五羟基-12-烯五环三萜皂甙。其分子式为 C₆₅H₁₀₀O₂₇。

本发明专利还公开了具有抗癌作用的这些化合物或组合物，可癌通路(pathways)，其特征在于所述化合物或组合物可调节像 G 蛋白细胞和其受体，Fas 蛋白细胞和其受体，赖氨酸激酶和其受体，分裂素和其受体等的代谢活动。这些化合物可从文冠果中提出，或人工合成，或从其它生物资源中提出。

本发明专利公开了具有抗癌作用的从文冠果的提取物分离出的化合物 Y-1，其特征在于所述 Y-1 抗卵巢癌，膀胱癌，骨癌，乳腺癌，白血病，肝癌，前列腺癌和脑癌，但又不限于上癌症。

本发明专利的扼要摘要，为了使本发明的某些条款更加突出或引入新条款，另一些条款的内容可能在本摘要中被简化甚至略去，但是，这不表明本发明专利仅限于这些在摘要中提到的内容。

图的详细说明

图 1. 用高效液相色谱（HPLC）在 μ bondapak C18 柱上分离文冠果提取物成几个组分的图谱。

图 2. 用膀胱细胞检测被快速液相色谱（FPLC）从文冠果提取物中分离出的组分对细胞的生长的影响（MTT 法）。2 A. 被快速液相色谱（FPLC）从文冠果提取物中分离出的组分。2 B. 不同组分对膀胱细胞的生长的影响不同。仅组分 5962 (Y) 抑制细胞生长。横坐标：浓度(μ l/ml)，纵坐标：细胞生长 (%)。

图 3. 文冠果提取物组分 5962 的 64% 乙晴等梯度洗脱图谱。在 FPLC 上两个主要组分 X 和 Y 被分离出来。横坐标：光强度(254nm)；纵坐标：组分编号(1ml/组分)。

图 4. 文冠果提取物的组分 X (2021) 和 Y (2728) 对膀胱细胞生长的影响：仅 Y 抑制膀胱细胞生长。

图 5. 文冠果提取物组分 Y 的高效液相色谱（HPLC）35% 乙晴等梯度洗脱图谱，显示 Y(2728) 含有 4-5 个组分：Y0, Y1, Y2, Y3 和 Y4。

图 6. 文冠果提取物组分 Ys 的高效液相色谱（HPLC）45% 乙晴在 C18 柱(Delta Pak C18)上的等梯度洗脱图谱。Y1 和 Y2 清晰地分离开来。

图 7. 化合物 Y 的质子核磁共振 (NMR) 的图谱。

图 8. 化合物 Y1 二维核磁共振 (HMQC) 图谱。

图 9. 化合物 Y1 二维核磁共振 (HMBC) 图谱。

图 10. 化合物 Y1 质子 COSY-NMR 图谱

图 11. 化合物 Y2 质子核磁共振图谱。

图 12. 化合物 Y2 二维核磁共振 (HMQC) 图谱。

图 13. 化合物 Y5 质子核磁共振图谱。

图 14. 化合物 Y5 二维核磁共振 (HMQC) 图谱。

图 15. 化合物 Y1 的四个可能的化学结构:

A: 化学结构 Y1-1; B: 化学结构 Y1-2; C: 化学结构 Y1-3; D: 化学结构 Y1-4。

图 16. 化合物 Y1 的化学结构。

图 17. 化合物 Y1 和 Y1-2 对卵巢癌细胞生长的影响。

图 18. 用快速液相色谱 (FPLC) 纯化化合物 R。

图 19. 用高效液相色谱 (HPLC) 分析从快速液相色谱 (FPLC) 获得的组分 #9, #10 和 #11。

图 20. 用高效液相色谱 (Delta-Pak C18 柱) 纯化组分 R。A: 被快速液相色谱 (FPLC) 分出的组分 #10 进一步被高效液相色谱分离: (1) Delta-Pak C18 柱; (2) 30% 乙晴等梯度洗脱和 (3) 流速: 1ml/分, 在 207 nm 检测, 光密度: -0.128。B: 在同等条件下, R 的主要组分再次色谱分析。

图 21. 化合物 R1 的质子核磁共振 (NMR) 的图谱。

图 22. 化合物 R1 二维核磁共振 (HMQC) 图谱。

图 23. 化合物 R1 二维核磁共振 (HMBC) 图谱。

图 24. 化合物 R1 质子 COSY-NMR 图谱

图 25. 化合物 R1 的 C13 核磁共振图谱。

图 26. 化合物 R1 的化学结构。

图 27. 化合物 Y-a 的化学结构。

R5 = B or C or S1(见注释 1); R1 = A or B or C; R2 = A or B or C; R4 = B or C。注释 1: A= 当归酰基; B=乙酰基; C= H; S1= 侧链含有一至多个糖: D-葡萄糖, D-半乳糖, L-鼠李糖, L-阿拉伯糖, D-木糖和糖醛酸: D-葡萄糖醛酸, D-半乳糖醛酸, 以及它们的衍生物。

图 28. 化合物 Y-b 的化学结构。

R5 = B or C or S1(见注释 1); R1 = A or B or C; R2 = A or B or C; R4 = B or C。注释 1: A= 当归酰基; B=乙酰基; C= H; S1= 侧链含有一至多个糖: D-葡萄糖, D-半乳糖, L-鼠李糖, L-阿拉伯糖, D-木糖和糖醛酸: D-葡萄糖醛酸, D-半乳糖醛酸, 以及它们的衍生物。

图 29. 化合物 Y-c 的化学结构。

图 30. 化合物 Y1-a 的化学结构。

R5 = B or C or S1(见注释 1); R1 = A or B or C; R2 = A or B or C; R4 = B or C。注释 1: A= 当归酰基; B=乙酰基; C= H; S1= 侧链含有一至多个糖: D-葡萄糖, D-半乳糖, L-鼠李糖, L-阿拉伯糖, D-木糖和糖醛酸: D-葡萄糖醛酸, D-半乳糖醛酸, 以及它们的衍生物。

图 31. 化合物 Y1-b 的化学结构。

R5 = B or C or S1(见注释 1); R1 = A or B or C; R2 = A or B or C; R4 = B or C。注释 1: A= 当归酰基; B=乙酰基; C= H; S1= 侧链含有一至多个糖: D-葡萄糖, D-半乳糖, L-鼠李糖, L-阿拉伯糖, D-木糖和糖醛酸: D-葡萄糖醛酸, D-半乳糖醛酸, 以

及它们的衍生物。

图 32. 化合物 Y1-c 的化学结构。

R5 = B or C or S1(见注释 1); R1 = A or B or C; R2 = A or B or C; R4 = B or C. 注释 1: A= 当归酰基; B=乙酰基; C= H; S1= 侧链含有一至多个糖: D-葡萄糖, D-半乳糖, L-鼠李糖, L-阿拉伯糖, D-木糖和糖醛酸: D-葡萄糖醛酸, D-半乳糖醛酸, 以及它们的衍生物。

图 33. 用高效液相色谱 (HPLC 20% 乙晴等梯度洗脱) 分离从快速液相色谱 (FPLC) 获得的组分 0。

图 34. 组分#28 再次色谱分析。

图 35. 组分#34 再次色谱分析。

图 36. 组分#54 再次色谱分析。

专利申请的详细说明

本发明提供文冠果粗皂甙提取物, 其特征在于所述文冠果粗皂甙提取物从文冠果的果壳和/或果柄, 种仁, 种壳, 枝干, 树皮和根中取得的。其从文冠果制备粗皂甙的工艺过程如下: 采收文冠果, 清选果壳, 干燥; 粉碎文冠果果壳, 得文冠果果壳粉; 用有机溶剂 (乙醇, 甲醇等) 浸提文冠果果壳粉, 有机溶剂: 果壳粉 2:1 的比例, 在室温下, 浸提 4-5 次, 每次 20-35 小时, 得有机溶剂提取物; 收集浸提液, 再回流热提 (80 C) 2-3 次, 得二次提取物; 把二次提取物溶于水, 得水提取液; 用正丁醇萃取水提取液, 得正丁醇提取物; 正丁醇萃取物经色谱分离得粗皂甙。该粗皂甙提取物主要含有皂甙。

根据传统中医理论, 遗尿, 尿频和尿急是由肾亏引起的。因此, 治疗遗尿, 尿频和尿急要用草药, 如人参, 巴戟天, 肉苁蓉, 杜仲和虫草固肾。这些固肾的草药可增强肾功能, 通过“肾经”调节人体的水分代谢作用, 从而达到治疗遗尿, 尿频和尿急的目的。

本发明提供的文冠果提取物也可用于治疗遗尿, 尿频和尿急, 但是, 是通过“膀胱经”调节人体的水分代谢作用从而达到治疗遗尿, 尿频和尿急的目的。本发明提供的文冠果提取物可刺激膀胱的生长 (见图 9 和 23B), 增强膀胱控制排尿的能力和尿容量, 详见国际 PCT 专利申请 No. PCT/US04/33359 的实验 5 (101-106 页)。因而, 把入“肾经”的草药和本发明提供的入“膀胱经”的文冠果提取物结合起来用于治疗遗尿, 尿频和尿急, 会受到更佳的效果。

本发明还提供了由文冠果提取物制成的药物或保健品, 其特征在于所述这些文冠果提取物制成的药物或保健品分别可和和维生素 B, D, K, 葡萄籽提取物或其它抗氧化剂, 冬虫夏草及其提取物, 银杏及其提取物, 人参和西洋参及其提取物, 聚果菊及其提取物, 小金丝桃及其提取物, 葛根及其提取物, 天麻及其提取物, 蜜环菌及其提取物, 丹参及其提取物, 三七及其提取物, 红曲, 黄芪及其提取物, 地黄及其提取物, 当归及其提取物, 远志及其提取物, 灵芝及其提取物, 茯苓及其提取物, 甘草及其提取物, 石松碱 A, 敌百虫, 拉西汀 (Lacithin), 脑洗泰来 (Nocetile), 叶酸, 氨基酸, 肌酸激酶和纤维添加剂等配伍一起制成各种造新药物和保健食品。

本发明提供的文冠果提取物, 其特征在于所述提取物可抑制 5-羟色胺 (5-HT) 的吸收, 5-羟色胺的存在可维持和加强人的深度睡眠。文冠果提取物抑制 5 羟色胺的吸收, 从而打破深度睡眠, 使人在膀胱尿满时可以惊醒, 避免尿床。(详见国际 PCT 专利申请 No. PCT/US04/33359 的 38 页)。

本发明提供的文冠果提取物, 其特征在于所述提取物可增强多巴胺的活力, 从而提高中枢神经系统的警觉能力。

本发明提供的文冠果提取物，其特征在于所述提取物可调节制尿荷尔蒙（ADH）的合成，以减少肾脏产尿量，防止遗尿发生。

本发明提供的文冠果提取物，其特征在于所述提取物可抑制乙酰胆碱酶（AchE）的合成，调解乙酰胆碱（Ach）的释放，吸收和分解，从而改善大脑中枢系统和泌尿系统信息的传递过程，避免由5-羟色氨（5HT）造成的深度睡眠发生，而增加轻度睡眠。

本发明提供的文冠果提取物，其特征在于所述提取物可防止睡眠麻痹（sleep paralysis）的发生。

本发明提供的文冠果提取物，其特征在于所述提取物可为睡眠提供警觉系统。

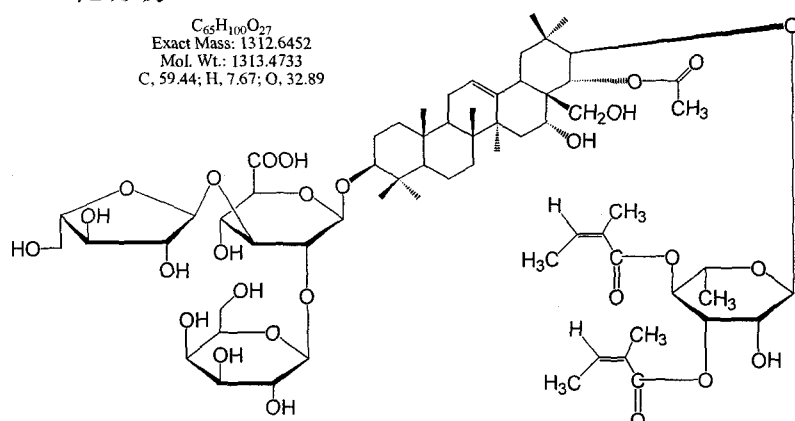
本发明提供的文冠果提取物，其特征在于所述提取物有助于膀胱和括约肌的生长发育，防止遗尿发生。发育不良的膀胱和括约肌不能控制排尿过程。

本发明提供从文冠果提取物提出的化合物，其特征在于所述化合物可治疗癌症，如卵巢癌，膀胱癌，骨癌，乳腺癌，白血病，肝癌，前列腺癌和脑癌，但又限于上癌症。

本发明专利还公开了一种化合物，其特征在于所述化合物含有三萜皂甙原或其它皂甙原，在碳3位上联有糖链，在碳21和22位上联有酰基和/或糖链，在糖链上联有当归酰基。这些基团有机（operatively）组成了具生物活性的化合物。

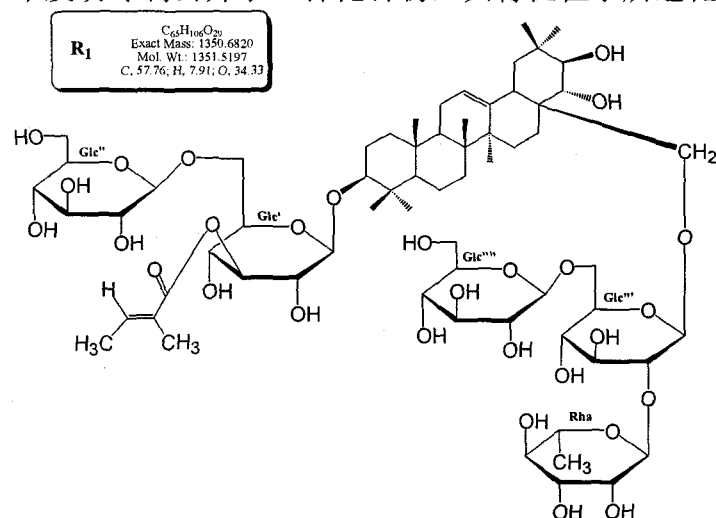
本发明专利公开了一种化合物，其特征在于所述化合物中具有如下的化学结构：

化合物 Y1



3-O-[β -D-半乳糖吡喃酰基(1 \rightarrow 2)]- α -L-阿拉伯糖吡喃酰基(1 \rightarrow 3)- β -D-葡萄糖醛吡喃酰基-21-O-(3,4-二羟基酰基)- α -L-鼠李糖吡喃酰基-22-O-乙酰基-3 β , 16 α , 21 β , 22 α , 28-五羟基-12-烯五环三萜皂甙。

本发明专利公开了一种化合物，其特征在于所述化合物中具有如下的化学结构：



化合物 R1: 3-O-[二糖归酰基-(1 \rightarrow 3)- β -D-葡萄糖吡喃酰基-(1 \rightarrow 6)]-(β -D-葡萄

糖吡喃酰基-28-O-[(-L-鼠李糖吡喃酰基-(1(2))-(-D-葡萄糖吡喃酰基-(1(6))-(-D-葡萄糖吡喃酰基-1-3(, 21(, 22(, 28-四羟基-12-烯五环三萜皂甙。

本发明专利还公开了一种化合物, 其特征在于所述化合物的化学结构见于图 15A, 15B, 15C, 15D, 27, 28, 29, 30, 31 和 32。

本发明专利还公开了一类盐类, 其特征在于所述盐类是由上述化合物形成的。

本发明专利还公开了一类组合物 (composition), 其特征在于所述组合物是由上述化合物或其盐类和适当载体形成的。

本发明专利还公开了一类药物组合物, 其特征在于所述组合物是由一定数量的上述化合物或其盐类和适当药物载体所组成。

本发明专利公开了一种抗卵巢癌的组合物, 其特征在于所述组合物是由上述组合物所组成。

本发明还提供了检测文冠果提取物的细胞特异性毒性反应的方法, 其特征在于所述方法是 MTT 检测法。

材料和方法

细胞: 下列人体癌细胞是从美国模式菌种保藏中心 (American Type Culture Collection) 获得: HTB-9(膀胱), HeLa-S3(宫颈), DU145(前列腺), H460(肺), MCF-7(乳腺), k562(白细胞), HCT116(结肠), HepG2(肝), U2OS(骨), T98G(脑), 和 OVCAR-3(卵巢)。

培养: HeLa-S3(宫颈), DU145(前列腺), MCF-7(乳腺), HepG2(肝) 和 T98G(脑) 细胞培养在 MEN(Earle 盐) 培养基上。HTB-9(膀胱), H460(肺), k562(白细胞) 和 OVCAR-3(卵巢) 培养在 RPMI-1640 培养基上, 其它细胞在 McCoy-5A 培养基上。

这些培养基都要添加 10% 的牛胎儿血清, 谷氨酰胺和抗菌素。在 CO₂ 浓度为 5% 的培养箱内培养。

MTT 检测

检测方法基本按照 Carmicheal et al. 1987 的方法, 仅个别地方小有改动。这些细胞培养在有 96 个小穴的培养皿的小穴中 24 小时; 每穴 1 万 HTB-9(膀胱), HeLa-S3(宫颈), H460(肺), HCT116(结肠), T98G(脑), 和 OVCAR-3(卵巢) 的细胞; 每穴 1.5 万 DU145(前列腺), MCF-7(乳腺), HepG2(肝) 和 U2OS(骨) 的细胞; 每穴 4 万 k562(白细胞)。然后, 将文冠果提取物的试样放入穴中, 再培养 48 小时 (肝和骨癌细胞 72 小时, 乳腺癌细胞 96 小时)。然后, MTT (0.5mg/ml) 加入每个穴中, 培养 1 小时。产生的 formazan 溶于 DMSO, 然后用 ELISA 读数器 (Dynatech, Model R700) 测它的 O.D. 值 (TD)。加入试样前的 MTT O.D. 值 (TO) 也要测出。每种细胞生长的百分数 (%G) 可按下面公式求出:

$$\%G = (TD - TO / TC - TO) \times 100 \quad (1)$$

(TC 是对照细胞组的 O.D. 值)

当 TO < TD 时, 则细胞特异性毒性反应 (LC) 值为:

$$\%LC = (TD - TO / TO) \times 100 \quad (2)$$

本发明提供的抗癌化合物, 其特征在于所述化合物的分子式是 C₆₅H₁₀₀O₂₇, 化学名称: 3-O-[β-D-半乳糖吡喃酰基(1→2)]-α-L-阿拉伯糖吡喃酰基(1→3)-β-D-葡萄糖醛吡喃酰基-21-O-(3,4-二羟萘酰基)-α-L-鼠李糖吡喃酰基-22-O-乙酰基-3β, 16α, 21β, 22α, 28-五羟基-12-烯五环三萜皂甙, 即化合物 Y1。它的衍生物也具抗癌作用。另外, 本发明还提供了化合物的化学结构 Y, 化学结构 R1, 化学结构 1-4, 化学结构 Y-a, 化学结构 Y-b, 化学结构 Y-c, 化学结构 Y1-a, 化学结构 Y1-b, 化学结构 Y1-c, 化学结构

Y1-3, 化学结构 Y1-4 和它们的衍生物, 详见图案 5, 27, 28, 29, 30, 31 和 32。这些化合物可从文冠果中提出或人工合成。

本发明提供的文冠果提取物的皂甙化合物及其衍生物可调节 Wnt 信号途径中的生化环节或其受体, Wnt 信号系统 (Wnt signaling pathway) 调控胚胎发育和细胞的增殖, 死亡和形态发育, 同时在癌细胞的发生方面也起着重要作用。发现一些癌症发生是和 Wnt 信号系统被不适当地活化有关。本发明提供的文冠果提取物和新皂甙化合物或其组合物, 可调控 Wnt 信号途径中的生化环节或其受体, 避免 Wnt 信号系统的不适当地活化, 从而防止制癌细胞的生成和增殖。

细胞有丝分裂和 Ras-MAP 激酶链信号途径有关, 如果 Ras-MAP 激酶链的活动过分活跃, 会导致基因调控蛋白 Myc 的生成, Myc 会加快一些基因的复制, 如果这一活动过分活跃, 会导致癌细胞的生成和增殖。本发明提供的文冠果提取物和新皂甙化合物或其组合物, 可调控 Ras-MAP 激酶链的活动, 使 Ras-MAP 激酶途径的活动不能过分活跃, 从而不会引起癌细胞的生成和增殖。

有时 Ras 信号途径中的氨基酸发生突变, 引起含有这一氨基酸的蛋白永久性的过分活跃, 导致从属的 Ras 信号途径在没有有丝分裂的刺激的情况下也过分活跃。同样, 氨基酸发生突变也会引起 Myc 信号途径活动过分活跃。这都会导致细胞异常生长, 而引起癌细胞的生成。本发明提供的文冠果提取物和新皂甙化合物或其组合物, 可调控氨基酸发生突变从属的 Ras 信号途径和 Myc 信号途径, 使它们不能过分活跃, 从而不会引起细胞异常生长而导致癌变。

本发明提供的文冠果提取物的皂甙化合物及其衍生物可启动不正常细胞内的监控点 (checkpoint) 机制, 细胞内有一种监控点 (checkpoint) 机制, 监控畸形有丝分裂和引起不正常过分活跃的细胞的死亡。癌细胞的监控点机制由于编译监控点机制的基因突变而不能活动, 造成癌细胞无限制的生长和增殖。本发明提供的文冠果提取物和新皂甙化合物或其组合物, 可启动细胞内的监控点机制, 及时制止不正常的有分裂活动发生和制止癌细胞的生长和增殖。

本发明提供的文冠果提取物的皂甙化合物及其衍生物可调控胞外生长信号途径。刺激细胞生长的胞外生长因子可通过细胞表面的受体启动胞内信号途径, 激活 PI3 激酶促进蛋白质的合成, 至少通过激活激酶 eif4e 和 s6 增加 mRNA 的扩增, 从而刺激细胞的生长。本发明提供的文冠果提取物和新皂甙化合物或其组合物, 可调控胞外生长信号途径的环节或其受体, 从而影响胞内生长信号途径, 抑制细胞过分增殖, 防止癌细胞的产生。

细胞分裂也要受到细胞核内的 Myc 蛋白的控制。Myc 蛋白过多会引起细胞的过分增殖, 癌细胞形成。本发明提供的文冠果提取物和新皂甙化合物或其组合物, 控制细胞内 Myc 蛋白的过量产生, 从而防止细胞过分增殖, 导致肿瘤形成。

转化生长因子 α (TGF- α) 可诱导鼠和鸡的不成熟的先期造血细胞 (例如 BFU-E) 的长期增值, 还可诱导 BFU-EDE 细胞转化成红血球。转化生长因子 α 还可刺激培养的内皮细胞的增殖。它在肿瘤组织的血管化方面起重要作用。转化生长因子 α 是由 keratinocyte, 巨噬细胞, 肝细胞和血小板等产生的, 病毒感染可刺激转化生长因子 α 的合成。本发明提供的文冠果提取物和新皂甙化合物或其组合物, 可调控转化生长因子 α 信号途径的环节或其受体, 从而抑制卵巢和膀胱癌细胞的生长。

转化生长因子 β (TGF- β) 可调控细胞的生长, 阻止许多细胞的生长。它有两种受体: 受体 1 受体 2。它们是丝氨酸-苏氨酸激酶, 通过 SMAD 编译调节基因家族传递信号。转化生长因子 β 信号途径和 SMAD 编译调节基因的突变和癌变有关。本发明提供的文冠果提取物和新皂甙化合物或其组合物, 可调控转化生长因子 β 信号途径的环节或其受体, 从而抑制卵巢和膀胱癌细胞的生长。

DNA 肿瘤病毒可通过干扰细胞循环控制蛋白 E6 和蛋白 p53 引起癌变。蛋白 p53 基因的突变使癌细胞在 DAN 损伤的情况下继续生存和增长。乳头瘤病毒利用蛋白 E6 和 E7 去分别使蛋白 p53 和 Rb 排序，这一过程会启动突变的细胞，使他们生存，分裂和增长。损伤细胞的生长会导致癌变。本发明提供的文冠果提取物和新皂甙化合物或其组合物，可调控蛋白 E6 和 E7 和释放蛋白 p53 和 Rb，而抑制畸形细胞的分裂生长。同时，还可以控制或者与这些蛋白质发生反应，引起癌细胞死亡。

蛋白 p53 可以帮助多细胞有机体在 DAN 损伤和其它不利的情况下安全的自我复制，并在危险的情况下停止细胞分裂和增长。癌细胞往往含有大量突变的蛋白 p53，表明在不利的情况下遗传上的突变或者生长受到压抑会启动蛋白 p53。因而，失去蛋白 p53 的活性是很危险的，因为它会使突变的细胞继续完成它的生长周期，避免死亡。所以，如果 DAN 受到损伤，一些细胞会死亡，那些没有修复损伤而生存下来并能继续增长的细胞，可能携带一组败坏的基因组，在基因扩增的过程中，导致失去抑制癌变的基因，而启动致癌基因。同时，基因扩增也可能使细胞发展抗药性。本发明提供的文冠果提取物和新皂甙化合物或其组合物，可调控蛋白质 53 信号途径的环节或其受体，从而抑制癌细胞增殖。

所有细胞的细胞核内都有各种休眠的 procaspase，等待命令去杀死细胞。procaspase 是一种休眠的酶原，由自杀蛋白酶形成。它可通过蛋白酶的裂解被另外 caspase 酶组启动。两个裂解的碎片结合在一起组成了 caspase 的有活性的部分。一个有活性的酶都被认为是这两个部分之一的四分体。每一启动了的 caspase 分子可裂解成多个 procaspase 分子，它们反过来又启动更多的 caspase 分子。通过这一链式反应，导致大量 procaspase 分子的爆炸式的活动。一些启动了的 procaspase 裂解成多个关键的蛋白质，包括细胞液蛋白和 nuclear-lamins，控制细胞的死亡。启动细胞外的死亡受体也能启动 procaspase。但是，由于基因突变癌细胞的杀死细胞的信号被阻断了。因而，癌细胞就不断的分裂，导致了癌变。本发明提供的文冠果提取物和新皂甙化合物或其组合物，可疏通阻滞癌细胞“自杀”信号传递的通路，使癌细胞“自杀”。

本发明专利还公开了一种化合物，其特征在于所述化合物含有三萜皂甙原或其它皂甙原，在碳 3 位上联有糖链，在碳 21 和 22 位上联有酰基和/或糖链，在糖链上联有当归酰基。这些基团有机（operatively）组成了具生物活性的化合物。

本专利还公开了一种抑制癌细胞生长的方法，其特征是所述方法是使一定量的上述化合物和适当的药物载体所组成的药物去接触所述癌细胞。

本专利还公开了一种抑制癌细胞生长的方法，其特征是调整上述药物的用量。

下面通过实施例进一步说明本专利公开的文冠果提取物，它的组成，功能和应用，以及他们的制备方法。

实施例之一 文冠果提取物的制备

制备工艺过程如下：（a）采收文冠果果壳，枝干，叶，种仁，根和树皮，清选，干燥，粉碎，得文冠果原料粉；（b）用有机溶剂浸提文冠果原料粉，有机溶剂：原料粉 2：1 的比例，浸提 4-5 次，每次 20-35 小时，得有机溶剂提取物；（c）收集浸提液，再回流热提（80℃）2-3 次，得二次提取物；（d）回收有机溶剂，得文冠果提取物浸膏；（e）干燥和灭菌，得粉状文冠果提取物。

实施例之二 用高压液相色谱（HPLC）分离提纯文冠果提取物

方法和材料：

色谱柱：采用 C18 逆相 μ bondapak 柱 (Water P/N 27324)，乙睛（10%），

三氟乙酸 (TFA, 0.005%) 为平衡液。

进样: 样品溶于 10% 的乙腈-TFA(0.005%) 中, 浓度为 1mg/ml;

进样: 20 μg。

洗脱: 用乙腈逐梯度洗脱, 在 70 分钟内, 浓度由 10% 升到 80%;

流速: 0.5ml/分。然后, 在浓度 80% 时再保持 10 分钟 (70-80 分)。然后, 乙腈浓度降到 10% (80-85 分), 并保持 25 分钟 (85-110 分)。

检测吸收波长: 207nm。

记录纸速度: 0.25cm/分。

光密度 (OD): 满程, 0.128。

所用仪器: Waters Model 510 溶剂传送系统; Waters 484 吸收率可调探测器; Waters 745/745B 数据模型。

结果:

HPLC 图谱显示, 有 60-70 个峰。其中有 4 个为主要的峰, 10 个中等的峰, 余者为小峰 (见图 5)。其中 27 个主要的峰按乙腈洗脱液的浓度递增的顺序编号为 a-z (见图 1)。

实施例之三 MTT 检测文冠果提取物的细胞特异性毒性反应的方法

方法和材料

细胞: 下列人体癌细胞是从美国模式菌种保藏中心 (American Type Culture Collection) 获得: HTB-9(膀胱), HeLa-S3(宫颈), DU145(前列腺), H460(肺), MCF-7(乳腺), k562(白细胞), HCT116(结肠), HepG2(肝), U20S(骨), T98G(脑), 和 OVCAR-3(卵巢)。

培养: HeLa-S3(宫颈), DU145(前列腺), MCF-7(乳腺), HepG2(肝) 和 T98G(脑) 细胞培养在 MEN(Earle 盐) 培养基上。HTB-9(膀胱), H460(肺), k562(白细胞) 和 OVCAR-3(卵巢) 培养在 RPMI-1640 培养基上, 其它细胞在 McCoy-5A 培养基上。

这些培养基都要添加 10% 的牛胎儿血清, 谷氨酰胺和抗菌素。在 CO₂ 浓度为 5% 的培养箱内培养。

MTT 检测

检测方法基本按照 Carmicheal et al.1987 的方法, 仅个别地方小有改动。这些细胞培养在有 96 个小穴的培养皿的小穴中 24 小时; 每穴 1 万 HTB-9(膀胱), HeLa-S3(宫颈), H460(肺), HCT116(结肠), T98G(脑), 和 OVCAR-3(卵巢) 的细胞; 每穴 1.5 万 DU145(前列腺), MCF-7(乳腺), HepG2(肝) 和 U20S(骨) 的细胞; 每穴 4 万 k562(白细胞)。然后, 将文冠果提取物的试样放入穴中, 再培养 48 小时 (肝和骨癌细胞 72 小时, 乳腺癌细胞 96 小时)。然后, MTT (0.5mg/ml) 加入每个穴中, 培养 1 小时。产生的 formazan 溶于 DMSO, 然后用 ELISA 读数器 (Dynatech, Model R700) 测它的 O.D. 值 (TD)。加入试样前的 MTT O.D. 值 (T0) 也要测出。每种细胞生长的百分数 (%G) 可按下面公式求出:

$$\%G = (TD - T0 / TC - T0) \times 100 \quad (1)$$

(TC 是对照细胞组的 O.D. 值)

当 T0 < TD 时, 则细胞特异性毒性反应 (LC) 值为:

$$\%LC = (TD - T0 / T0) \times 100 \quad (2)$$

结果:

在这 10 种癌细胞中, 可根据对文冠果提取物的敏感程度分为 4 组: 最敏感的是

卵巢癌细胞；第二敏感的是膀胱，骨，前列腺和白血病癌细胞；有点敏感的是肝，乳房和脑癌细胞；不太敏感的是结肠，宫颈和肺癌细胞（图 23 和国际专利申请 No. PCT/US04/33359 的表 8.1）。

表 A 文冠果提取物的 MTT 检测结果

癌细胞类别	IC50 (ug/ml)
卵巢 (最敏感)	15-15
膀胱 (敏感)	45-50
骨 (敏感)	40-55
前列腺 (敏感)	40-50
白血病 (敏感)	45-50
肝 (稍敏感)	45-65
乳房 (稍敏感)	65
脑 (稍敏感)	70-85
结肠 (欠敏感)	90
宫颈 (欠敏感)	115
肺 (欠敏感)	110

同时发现，低浓度的文冠果提取物可刺激膀胱，骨，和肺细胞的生长（详见国际专利申请 No. PCT/US04/33359 的 109-110 页）。

实施例之四 文冠果的化合物 Y1 的提纯分离和化学结构确定的方法

(A) 用快速液相色谱 (FPLC) 分离文冠果的提取物的组分的方法

方法:

色谱柱：采用 octadecyl 活化的硅胶柱，2cm X 28cm，用乙腈（10%）-TFA(0.005%)为平衡液。

进样：样品溶于 10% 的乙腈-TFA(0.005%)，浓度为 100mg/ml；

进样体积：1-2ml。

梯度洗脱：用 10-80% 的乙腈（总共 500ml）梯度洗脱。

检测吸收波长：254nm。

收集分离组分：从 10%-72% 的乙腈洗脱液中共得到 90 个组分，每组分 5ml。

所用仪器：AKTA-FPLC；泵：P920；检测器：UPC-900；Frac-900。

结果:

FPLC 洗脱图谱显示，有 4-5 大的组分（见图 4）。这些组分进一步用高效液相色谱 (HPLC) 分析，其中一些在图 21L 按 a-z 编号的特别的小峰（成分）再在 FPLC 的组分图谱上定位。

经 FPLC 分离的组分被分为 7 组，并用于膀胱细胞生长的 MTT 检测。结果表明，至少有一组（5962）对膀胱细胞生长有抑制作用（图 2B）。

纯的文冠果提取物 Y（5962）组分失去了刺激膀胱，骨，和肺细胞的生长的能力，但是，仍然保持抑制癌细胞的能力。

(B) 用快速液相色谱 (FPLC) 进一步分离文冠果生物活性物质组分 #5962。

方法:

色谱柱：采用 octadecyl 活化的硅胶，50ml，2cm X 28cm，用乙腈（64%）-TFA(0.005%)为平衡液。

进样：样品溶于 65% 的乙腈-TFA，浓度为 1-2mg/ml；

进样体积：1-2ml。

洗脱：用 64% 乙腈等梯度洗脱。

检测吸收波长：254nm。

收集分离组分：从洗脱液中收集前 90 个组分，每组分 1 ml。

所用仪器：AKTA-FPLC；泵：P920；检测器：UPC-900；Frac-900。

结果：

组分 #5692 用开式 ODS-C18 分流柱和 64% 的 isocratic 乙腈洗脱进一步分离和纯化，得到两个主要组分 X 和 Y（图 3）。但是，MTT 检测结果显示，仅组分 Y 癌细胞有抑制反应（图 4）。

(C) 高压液相色谱（HPLC）分离文冠果生物活性物质组分 Y

方法：

色谱柱：采用 Waters μ bondapak C18 (3.9mm x 300cm)。

洗脱：35% 或 45% 的等梯度洗脱。

流动速率：0.5ml/分，检测吸收波长：207nm。

检测：光密度 (O.D.) 标度 0.128；记录纸速度：0.25cm/分。

结果：

用 35% 等梯度洗脱，组分 Y 分离出 4-5 成份 (Y0, Y1, Y2, Y3, Y4 和 Y5)（图 5）。

(D) 用 HPLC 把组分 Y 中的生物活性成分分离提纯出来

方法：

色谱柱：采用 Waters Delta Pak C18-300A。

洗脱：45% 的等梯度洗脱。

流动速率：1.0ml/分。

检测吸收波长：207nm。

结果：

Y1 和 Y2 被很好地分离出来，并分别予以收集。但是，Y3/Y4 和 Y5 没有很好地分离开（图 6）。Y1 峰的部分收集起来，并真空冷冻干燥（化合物 Y1）。

最终提纯的 Y1 组分外观呈不定型的白色粉末状。可溶于水醇中（甲醇和乙醇），50% 的乙腈和 100% 的吡啶中。

Y1 和 Y2 MTT 检测结果显示，它们都有很强的抗癌活性（图 17）。

(E) 文冠果生物活性物质 Y 组分的化学结构的测定

方法：

核磁共振（NMR）分析

纯的文冠果提取物 Y 组分样品溶在含有 0.05% TMS 的吡啶-d5 (pydine-D5) 中，用带有 QXI 探头 ($^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}/^{31}\text{P}$) 的 Bruker Avance 600 MHz 核磁共振仪，获得所有样品的 298k 核磁共振谱。一维 ^1H 的核磁共振谱的扫描次数 (16-128) 取决于样品的浓度。二维 HMQC 核磁共振谱，谱宽 6000 x 24000Hz，t1 和 t2 维的资料点分别为 2024 x 256，扫描次数为 4-128。二维 HMBC 核磁共振谱，谱宽 6000 x 30000 Hz，t1 和 t2 维的资料点分别为 2024 x 256，扫描次数为 64。这些二维数据通过数学演算和运用 XWIN-NMR 软件进行 Fourier 变换，最后得到的二维 HMQC 和 HMBC 核磁共振谱的矩阵的规模分别是 2048 x 256 和 2048 x 512 (data points, F2 x F1)。

质谱分析

文冠果提取物样品的质量通过 MALDI-TOF 质谱测定法来测定。

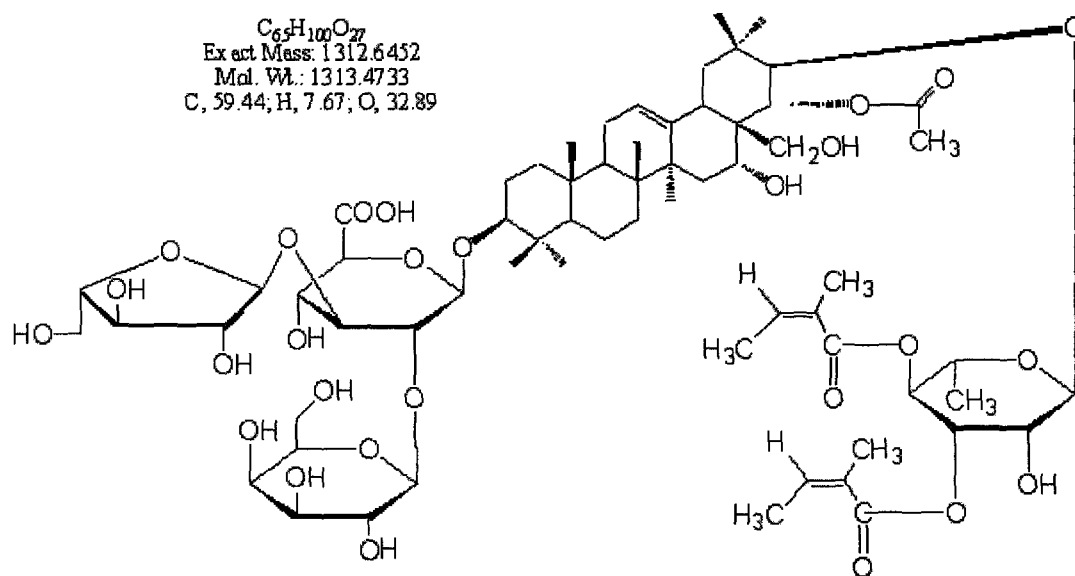
首先将样品溶于乙腈中，然后和 CHCA 母液混合 (α -氰-4-羟基肉硅酸 10mg/ml，

溶于 50:50 水/乙腈和 0.1% TFA 中)。样品完全溶于乙腈中, 和母液混合后仍保持溶解状态。分子量通过高分辨率的质谱仪测定。

结果

组分 Y1

组分 Y1 的质子核磁共振谱见图 7。组分 Y1 的二维 HMQC 核磁共振谱的数据见图 8, 二维 HMBC 核磁共振谱的数据见图 9, 二维 COSY 核磁共振谱的数据见图 10。根据这些资料和分析 (见表 1), 从文冠果提取物分离出具生物活性的化合物 Y1 是一种三萜皂甙, 含有 2 个糖链 4 个糖, 联在其中含有 1 个糖的糖链上的 2 个当归酰基, 化合物 Y1 的分子式: $C_{65}H_{100}O_{27}$, 化学结构如下图所示:



化学名称: 3-*O*-[β -D-半乳糖吡喃酰基 (1 \rightarrow 2)]- α -L-阿拉伯糖呋喃酰基 (1 \rightarrow 3)- β -D-葡萄糖吡喃酰基-21-*O*-(3, 4-二当归酰基)- α -L-鼠李糖吡喃酰基-22-*O*-乙酰基-3 β , 16 α , 21 β , 22 α , 28-五羟基齐墩果-12-烯三萜皂甙。

表 1. 化合物 Y1 的 ^{13}C 和 1H NMR 数据 (溶在吡啶- d_6 中)^a

位置	C	H
1	38.6	0.85, 1.33
2	26.3	1.86, 2.10
3	89.7	3.25, 1H, dd
4	39.5	-
5	55.5	0.75
6	18.3	1.40, 1.43
7	33.1	1.20, 1.50
8	40.0	-
9	46.7	1.69
10	36.5	-

11	22.5	2.30
12	123.6	5.36, 1H, br s
13	143.5	-
14	41.8	-
15	34.7	1.53, 1.73
16	68.5	4.45
17	48.2	-
18	39.9	3.04
19	47.6	1.30, 3.05
20	36.7	-
21	85.3	5.05, 1H, d
22	73.8	6.17, 1H, d
23	27.7	1.29, 3H, s
24	16.5	1.16, 3H, s
25	15.5	0.81, 3H, s
26	17.1	0.82, 3H, s
27	20.6	1.83, 3H, s
28	63.7	3.42, 1H, d, 3.60, 1H, d
29	29.9	1.42, 3H, s
30	19.9	1.37, 3H, s
GlcA		
1	105.0	4.88, 1H, d
2	79.0	4.37
3	86.0	4.20
4	71.6	4.43
5	78.0	4.50
6	171.8	-
Gal		
1	104.5	5.31, 1H, d
2	73.5	4.43
3	74.9	4.10
4	69.5	4.57

5	76.3	3.95
6	61.1	4.44, 4.53
Ara-f		
1	110.9	6.04, 1H, br s
2	83.3	4.95
3	78.3	4.78
4	85.2	4.82
5	62.0	4.13, 4.31
21-O-Rha		
1	105.1	4.92, 1H, d
2	70.5	4.25
3	74.0	5.59
4	71.5	5.70
5	68.5	3.89
6	17.6	1.18, 3H, d
Rh-3-Ang		
1	167.2	-
2	127.9	-
3	138.7	5.92, 1H, q
4	15.7	2.02, 3H, d
5	20.6	1.92, 3H, s
Rh-4-Ang		
1	167.2	-
2	128.0	-
3	137.9	5.87, 1H, q
4	15.5	1.96, 3H, d
5	19.8	1.85, 3H, s
22-O-Ac		
1	171.4	-
2	21.8	2.31, 3H, s

^a 数据是根据 HMQC 和 HMBC 的相关资料确定 (The data were assigned based on HMQC and HMBC correlations.)

Y1 的质量根据 MALDI-TOF 测定是 is 1358.71, 和 Y1 理论值加上两个钠

(Na) 和一个氢 (H) 是一致的 (1312.64)。

组分 Y2

组分 Y2 的质子核磁共振谱见图 11。组分 Y2 的二维 HMQC 核磁共振谱的数据见图 12。

组分 Y5

组分 Y5 的质子核磁共振谱见图 13。组分 Y2 的二维 HMQC 核磁共振谱的数据见图 14。

实施例之五 文冠果的化合物 Y1 的酸解

化合物 Y 是从文冠果纯化分离出来的 (详见国际 PCT 专利申请 No. PCT/US04/33359 的 107-108, 110 和 136 页)

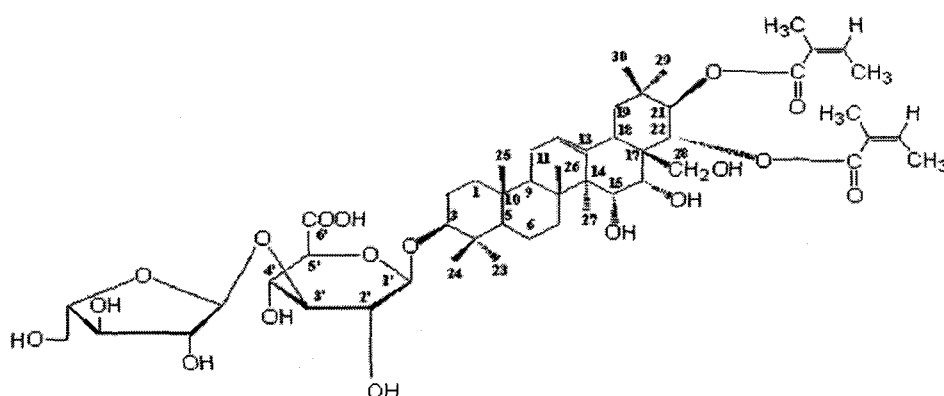
通过酸解, 化合物 Y1-c 的化学结构被确定下来。

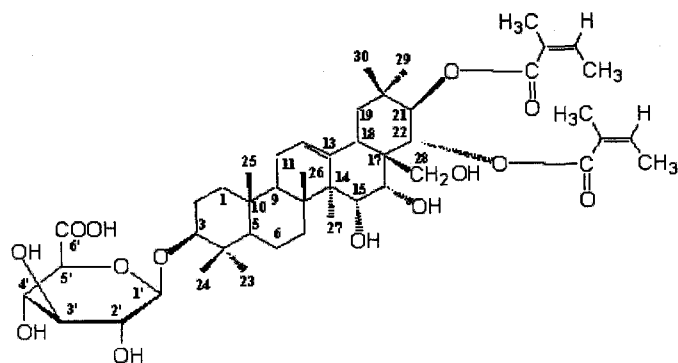
方法

5mg 的文冠果提取物 Y 溶于 3ml 的甲醇中, 然后用 3ml 的 3N HCl 酸处理, 回流 4 小时, 进行水解。水解后用 5% Na₂CO₃ 中和, 然后用 EtOAc 萃取三次, 得到水溶性部分, 含糖类, 和脂溶性部分, 含皂甙元 (aglycon)。皂甙元 (aglycon) 用硅胶柱色谱法 (CHCl₃:MeOH, 1:9) 或 C18 ODS 柱高压液相色谱法 (HPLC) 进一步提纯。得到约 2mg 新化合物 Y-c (方法参阅: Essentials of Carbohydrate Chemistry. By John F. Robyt, Springer, 1998)。

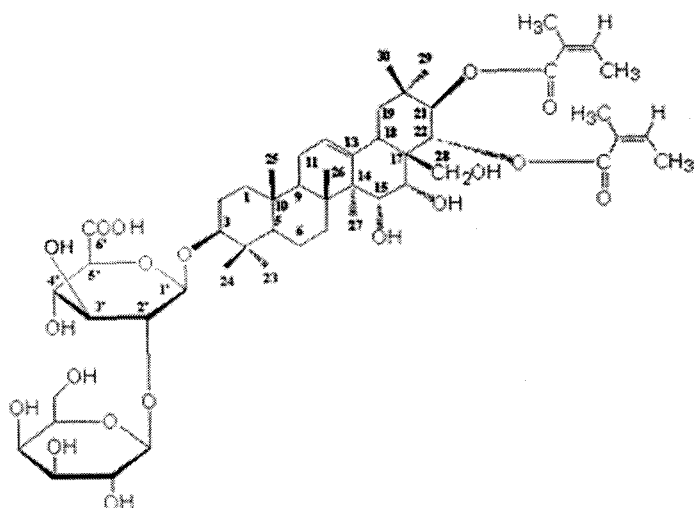
低聚糖通过不完全酸水解和特殊酶水解来裂解。如, 阿拉伯呋喃糖醛酸 1 → 4 键可被 α-淀粉酶裂解。其它酶如 β-淀粉酶, 异粉酶, 葡萄糖氧化酶, 甘露聚糖酶 (mannanase) 和麦芽糖酶也可来裂解皂甙中的低聚糖。

皂甙中的当归酰胺基可用碱水解来裂解。如, 把化合物 Y 溶于 1M NaOH, 室温下搅拌 2-3 小时, 用 2M HCl 酸化或中和, 水解了的皂甙再用乙酸乙酯萃取。然后, 再在 C18 柱上用 HPLC 进一步提纯。通过酶水解, 化合物 Y 可转化为下列化合物:

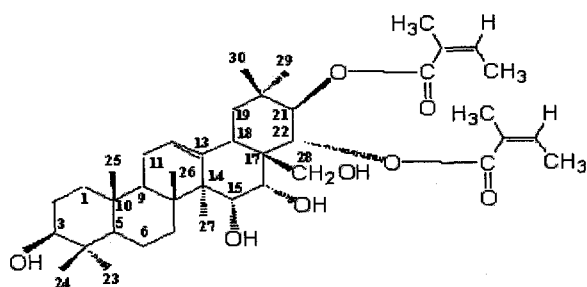




和化合物



通过酸解，化合物 Y1-c 的化学结构被确定下来，如下：



实施例之六 文冠果的化合物 R1 的提纯分离和化学结构确定的方法

(A) 用快速液相色谱 (FPLC) 分离文冠果的提取物的组分的方法
方法：

色谱柱：采用 octadecyl 活化的硅胶柱，2cm X 28cm，用乙腈 (10%) - TFA(0.005%) 为平衡液。

进样：样品溶于 10% 的乙腈-TFA(0.005%)，浓度为 100mg/ml；

进样体积: 1-2ml。

梯度洗脱: 用 10-80% 的乙腈 (总共 500ml) 梯度洗脱。

检测吸收波长: 254nm。

收集分离组分: 从 10%-72% 的乙腈洗脱液中共得到 90 个组分, 每组分 5ml。

所用仪器: AKTA-FPLC; 泵: P920; 检测器: UPC-900; Frac-900。

结果:

FPLC 洗脱图谱显示, 有 4-5 大的组分 (见图 2A)。这些组分进一步用高效液相色谱 (HPLC) 分析, 其中一些特别的小峰 (成分), 如 a-z 再在 FPLC 的组分图谱上定位编号 (见图 1)。

(B) 用快速液相色谱 (FPLC) 进一步分离文冠果组分 R

方法:

色谱柱: 采用 octadecyl 活化的硅胶, 50ml, 2cm X 28cm, 用乙腈 (30%) - TFA (0.005%) 为平衡液。

进样: 样品溶于 30% 的乙腈-TFA, 浓度为 1-2mg/ml;

进样体积: 0.2ml。

洗脱: 用 30% 乙腈等梯度洗脱。

检测吸收波长: 254nm。

收集分离组分: 从洗脱液中收集前 90 个组分, 每组分 1 ml。

所用仪器: AKTA-FPLC; 泵: P920; 检测器: UPC-900; Frac-900。

结果:

从快速液相色谱 (FPLC) 等梯度洗脱所得组分 39-41 (图 2A)。用开式 ODS-C18 分流柱 30% 的 isocratic 乙腈洗脱进一步分离和纯化, 得到两个主要组分中的两个成分得以确定 (图 18)。组分 6-13 的特性也得到进一步分析。

(C) 高压液相色谱 (HPLC) 分离组分 R

方法:

色谱柱: 采用 Waters μ bondapak C18 (3.9mm x 300cm)。

洗脱: 30% 的乙腈梯度洗脱 (10-80%)。

流动速率: 0.5ml/分, 检测吸收波长: 207nm。

检测: 光密度 (O.D.) 标度 0.128; 记录纸速度: 0.25cm/分。

结果:

用 30% 梯度洗脱, 组分 9-11 含有一个主成分和几个次要成份 (图 19)。这些成分进一步用 Delta Pak 柱 30% 的乙腈等梯度洗脱, 分离出 4-5 成分, 其中主成分被确认为 R1 (图 20A)。R1 随后从柱上收集起来 (图 20 B)。最终提纯的 R1 外观呈不定型的白色粉末状。可溶于水醇中 (甲醇和乙醇), 50% 的乙腈和 100% 的吡啶中。

(D) 文冠果化合物 R1 的化学结构的测定

方法:

核磁共振 (NMR) 分析

请见实施例之四的核磁共振 (NMR) 分析。

质谱分析

请见实施例之四的 MALDI-TOF 质谱测定法。

结果

组分 R1 的质子核磁共振谱见图 21, 二维 HMQC 核磁共振谱的数据见图 22, 二维 HMBC 核磁共振谱的数据见图 23, 二维 COSY 核磁共振谱的数据见图 24。组分 R1 的碳 13 核磁共振谱见图 25,

根据上述这些资料, R1 的功能集团和化学结构见表 2。

表 2. 化合物 R1 的 ^{13}C 和 ^1H NMR 数据 (溶在吡啶- d_6 中)^a

位置	碳	氢	Key HMBC correlations
1	38.6	1.01, 1.63	C-3, C-25
2	26.4	1.89, 2.33	C-3
3	89.1	3.26, 1H, dd, 12.0/4.2 Hz	C-23, C-24, Glc' C-1
4	39.2	((
5	55.5	0.69, 1H, d, 11.4 Hz	C-4, C-6, C-7, C-9, C-10, C-23, C-24, C-25
6	18.3	1.30, 1.39	C-5, C-8, C-10
7	32.5	1.41	C-6, C-26
8	40.1	((
9	47.7	1.61	C-1, C-5, C-8, C-10, C-11, C-14, C-25, C-26
10	36.7	((
11	23.7	1.90, 2.00	C-8, C-12, C-14
12	123.5	5.35, 1H, br s	C-9, C-14, C-18
13	142.9	((
14	41.9	((
15	25.7	1.88, 1.90	(
16	18.0	1.95, 2.29	C-14, C-17, C-18
17	43.1	((
18	41.6	2.60, dd, 12.0/2.4 Hz	C-19
19	46.3	1.28, 2.11	C-18, C-20, C-29, C-30
20	36.1	((
21	76.5	3.73, 1H, d, 9.6 Hz	C-20, C-22, C-29, C-30

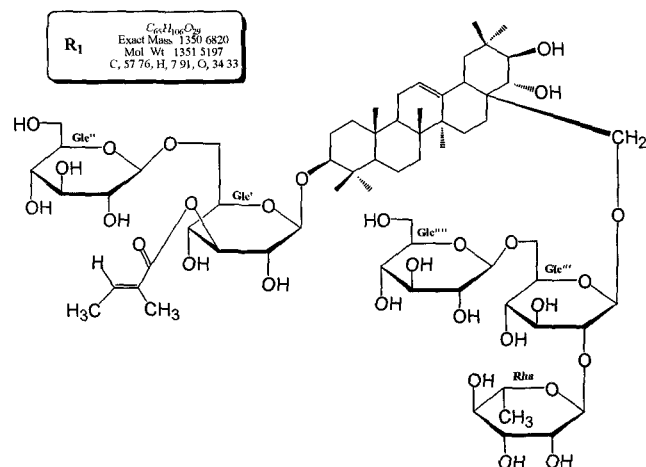
22	75.1	4.31, 1H, d, 9.6 Hz	C-16, C-17, C-21
23	27.9	1.20, 3H, s	C-3, C-4, C-5, C-24
24	16.6	0.95, 3H, s	C-3, C-4, C-5, C-23
25	15.7	0.95, 3H, s	C-1, C-5, C-9, C-10
26	16.7	1.07, 3H, s	C-7, C-8, C-9, C-14
27	26.1	1.25, 3H, s	C-8, C-13, C-14
28	75.8	4.10, 2H, br s	C-16, C-17, C-18, C-22, Glc''' C-1
29	30.2	1.22, 3H, s	C-19, C-20, C-21, C-30
30	19.5	1.26, 3H, s	C-19, C-20, C-21, C-29
3-Glc'			
1	106.5	4.84, 1H, d, 7.2 Hz	C-3, Glc' C-5
2	73.2	3.99	(
3	79.1	5.90, 1H, t, 9.6 Hz	Ang C-1, Glc' C-2, C-4
4	69.4	4.26	Glc' C-6
5	76.4	3.95	Glc' C-1, C-3
6	69.8	4.40, 4.83	Glc' C-4, Glc'' C-1
Ang			
1	167.9	((
2	128.7	((
3	136.7	5.80, 1H, ddd, 6.6/0.6 Hz	Ang C-1, C-4, C-5
4	15.7	1.93, 3H, dd, 6.6/0.6 Hz	Ang C-2, C-3
5	20.6	1.81, 3H, s	Ang C-1, C-2, C-3
Glc''			
1	105.4	5.09, 1H, d, 7.8 Hz	Glc' C-6, Glc'' C-5
2	74.9	4.05	Glc'' C-1

3	78.2b	4.22	Glc''' C-5
4	71.4c	4.24	Glc''' C-6
5	78.3d	3.90	(
6	62.4e	4.40, 4.51	Glc''' C-4
28-			
Glc''''			
1	103.5	4.72, 1H, d, 7.2 Hz	C-28
2	75.3	4.22	Glc'''' C-1, C-3, Rha C-1
3	79.8	4.25	(
4	71.6	4.20	(
5	76.6	4.13	Glc'''' C-3
6	70.0	4.67, 2H, d, 10 Hz	Glc'''' C-1, Glc'''' C-4, C-5
Rha			
1	100.7	6.52, 1H, br s	Glc'''' C-2, Rha C- 3, C-5
2	72.3f	4.70, d, 3.0 Hz	Rha C-4
3	72.3f	4.63, dd,	Rha C-2
4	74.1	4.35	Rha C-2, C-5
5	69.1	4.79	(
6	18.7	1.82, 3H, d, 6.6 Hz	Rha C-4, C-5
Glc'''''			
1	105.5	5.01, 1H, d, 7.8 Hz	Glc'''' C-6, Glc'''' C-5
2	74.9	4.05	Glc'''' C-1
3	78.2b	4.22	Glc'''' C-5
4	71.4c	4.24	Glc'''' C-6
5	78.3d	3.90	(
6	62.5e	4.40, 4.51	Glc'''' C-4

a 功能集团的结构根据 COSY, HMQC 和 HMBC 的相关资料确定 (The data were assigned based on COSY, HMQC and HMBC correlations.) ^{b,c,d,f} 每纵行中数据具有相同字母的, 是相互重迭的。* 每纵行中数

据具有相同字母的，是可能相互交换的。

根据对以上数据的分析，从文冠果提取物分离出具生物活性的化合物 R1 是一种三萜皂甙，含有 2 个糖链 5 糖，和联在其中含有 2 个糖的糖链上的一个当归酰基，化合物 R1 的分子式： $C_{65}H_{105}O_{29}$ ，化学结构如下图所示：



化合物 R1 化学名称为：3-O-[党归酰基-(1 (3)-(-D-葡萄糖吡喃酰基 (1 (6)))-(-D-葡萄糖吡喃酰基-28-O-[(-L-鼠李吡喃酰基-(1 (2))-(-D-葡萄糖吡喃酰基-(1 (6))-(-D-葡萄糖吡喃酰基-3 (, 21 (, 22 (, 28-四羟基齐墩果-12-烯五环三萜皂甙。

实施例之七 文冠果的化合物 O 的提纯分离和化学结构确定的方法

(A) 用快速液相色谱 (FPLC) 分离文冠果的提取物的组分 O 的方法
方法：

色谱柱：采用 octadecyl 活化的硅胶柱，2cm X 28cm，用乙腈 (10%) - TFA(0.005%) 为平衡液。

进样：样品溶于 10% 的乙腈-TFA(0.005%)，浓度为 100mg/ml；

进样体积：1-2ml。

梯度洗脱：用 10-80% 的乙腈 (总共 500ml) 梯度洗脱。

检测吸收波长：254nm。

收集分离组分：从 10%-72% 的乙腈洗脱液中共得到 90 个组分，每组分 5ml。

所用仪器：AKTA-FPLC；泵：P920；检测器：UPC-900；Frac- 900。

结果：

FPLC 洗脱图谱显示，有 4-5 大的组分 (见图 2A)。这些组分进一步用高效液相色谱 (HPLC) 分析，其中一些的小峰 (成分)，如 a-z 再在 FPLC 的组分图谱上定位编号 (见图 1)。

(B) 用快速液相色谱 (HPLC) 进一步分离文冠果组分 O
方法：

色谱柱：采用 Waters Delta Pak C18-300A 柱。

进样：收集从 FPLC 分离出的样品#280，进 HPLC 分析。

进样体积：0.2ml。

洗脱：用 20% 乙腈等梯度洗脱。进样速度 1ml/min, 检测吸收波长：254nm。收集组分 28, 34 和 54，并冻干燥。在同等条件下，再次把组分 28, 34 和 54 进行液相色谱分析。

结果：

从快速液相色谱（FPLC）等梯度洗脱观察到 16 个组分（图 33）。用 HPLC 进一步分离和纯化组分 34, 35 和 36, 得到单一峰的组分 28, 34 和 54, 说明它们是单一的成分。

最终提纯的成分 0-28 和 0-34 外观呈不定型淡黄色粉末状。可溶于水醇中（甲醇和乙醇），50% 的乙腈和 100% 的吡啶中。最终提纯的成分 0-54 外观呈不定型白色粉末状。可溶于水醇中（甲醇和乙醇），50% 的乙腈和 100% 的吡啶中。

(C) 从文冠果化合物 0 中纯化组分化学结构的测定
方法:

核磁共振（NMR）分析

请见实施例之四的核磁共振（NMR）分析。

质谱分析

请见实施例之四的 MALDI-TOF 质谱测定法。

尽管本专利发明仅对一些特别关注的方面做了详尽的说明，但这并不意味着对其它不同的方面不能加以说明，和不能对已详尽说明的部分加以改变。很明显，详尽说明这些变化和改变是受到了本专利发明规模的影响。同时，上面提供的发明，说明和图表仅用于表述目的，并不能限制本专利发明对专利权利要求的要求。

参考文献

1. 陈奇主编《中药药理研究方法学》人民卫生出版社 1995 第一版, P892
2. 黄兆胜, 刘明平, 陈长州等, 养寿丹改善学习记忆功能的实验研究, 中国中西医结合杂志 1997, 9 (17) 9, P553
3. 张艳, 张鹤云, 李卫平等, 安吉复的促智作用研究, 中国药理学报, 1995, 7, 11 (3) P233
4. 扬军, 王静, 冯平安等脑康泰胶囊对小鼠学习记忆的改善作用, 中药新药与临床药理 2000, 1 (11) 1, P29
5. 扬军, 王静, 张继训等, 赤芍总甙对小鼠学习记忆的改善作用。中国药理学通报 2000, 2 (16) 1, P46
6. 夏卫军, 金妙文, 张莉等, 抵当汤治疗老年期血管性痴呆的实验研究, 中药药理与临床 2000, 16 (4)
7. 卞慧敏, 俞晶早, 龚婕宁等通脉益智胶囊对小鼠记忆功能的影响, 中药药理与临床 2000, 16 (5) P40
8. 魏小龙, 张永祥, 老年性痴呆动物模型研究进展, 中国药理学通报 2000, 8, (16) 4, P372
9. 卫生部药政局, 新药研究指南, 神经系统药物药效学指导原则 (促智药) P45
10. 张丹参, 张均田, 人参总皂甙对 B-淀粉样肽致小鼠记忆障碍的影响, 中国药理学通报 2000, 8, (16) 4, P422

图 1



图 2A

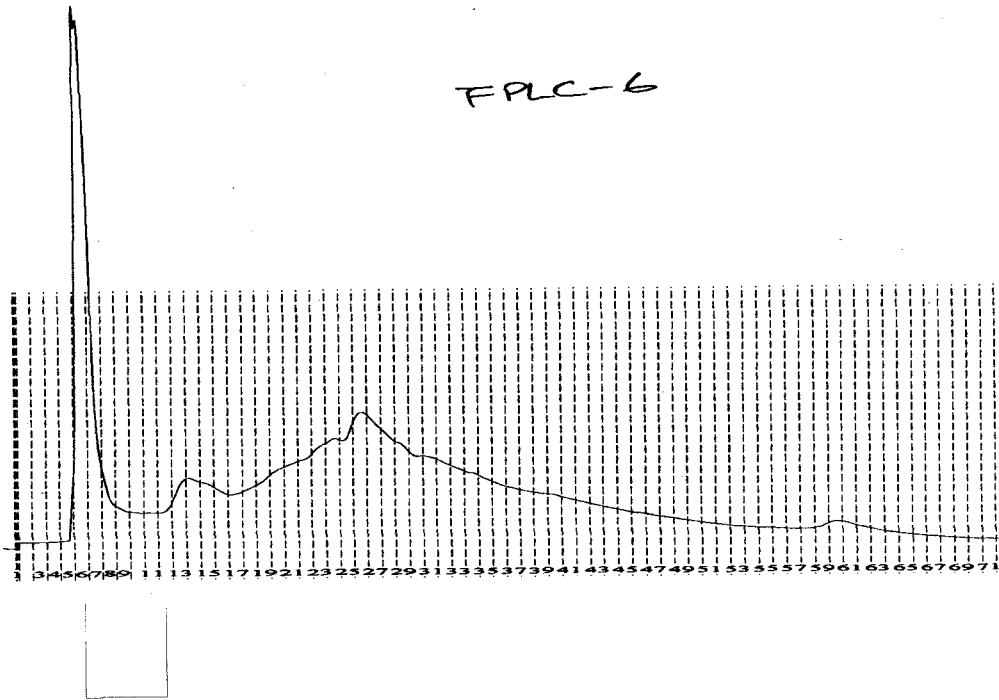


图 2B

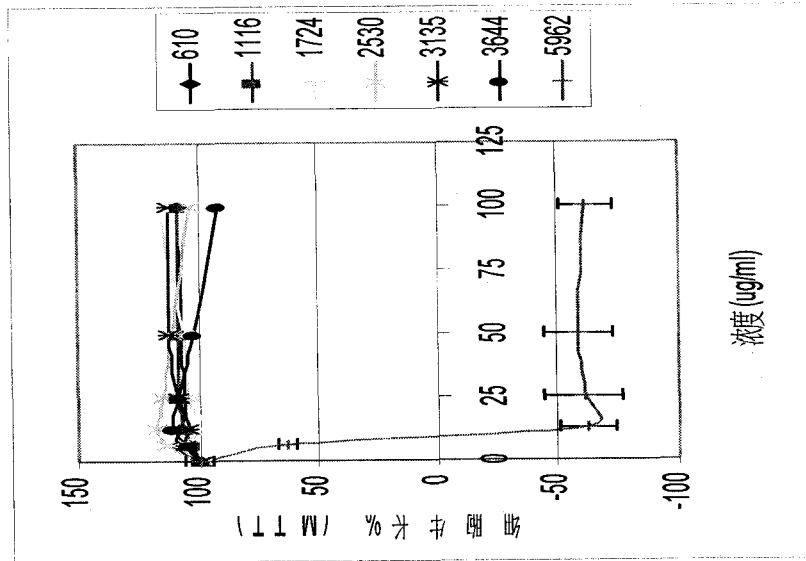


图 3

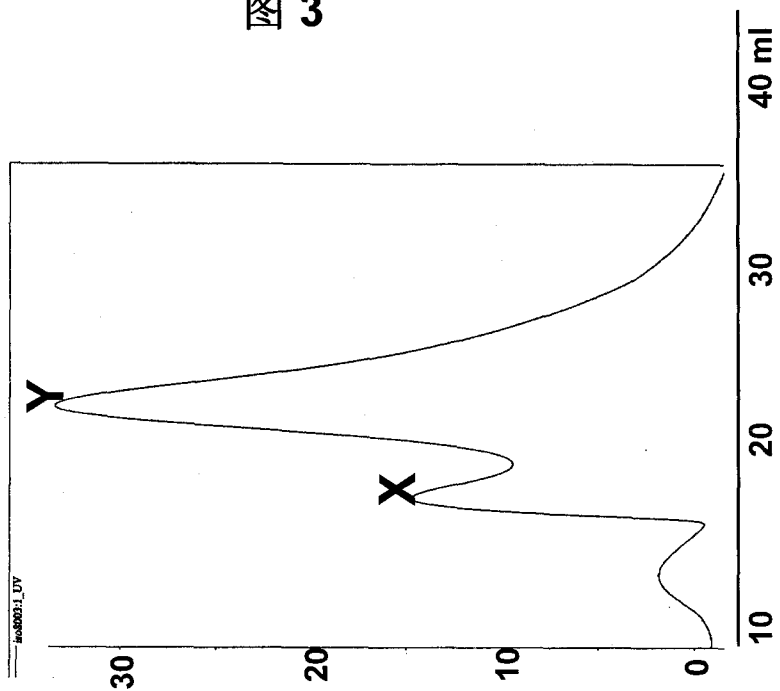


图 4

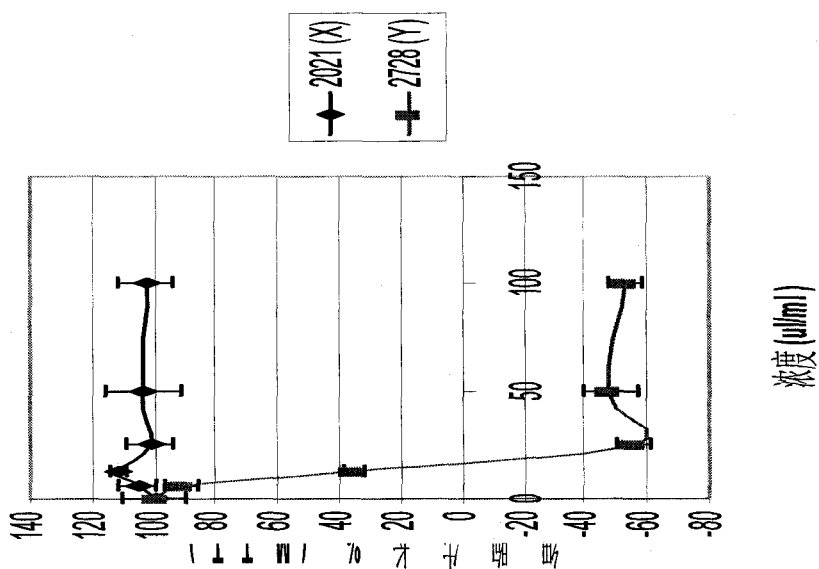


图 5

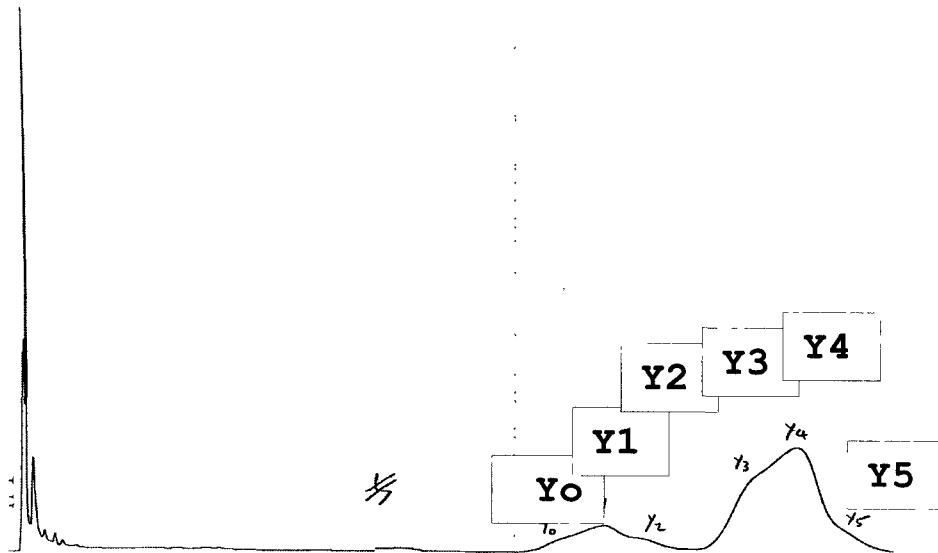


图 6

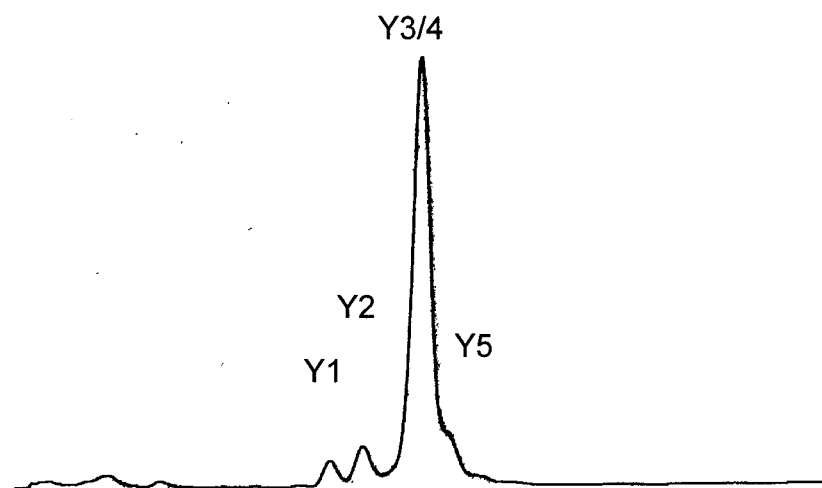


图 7

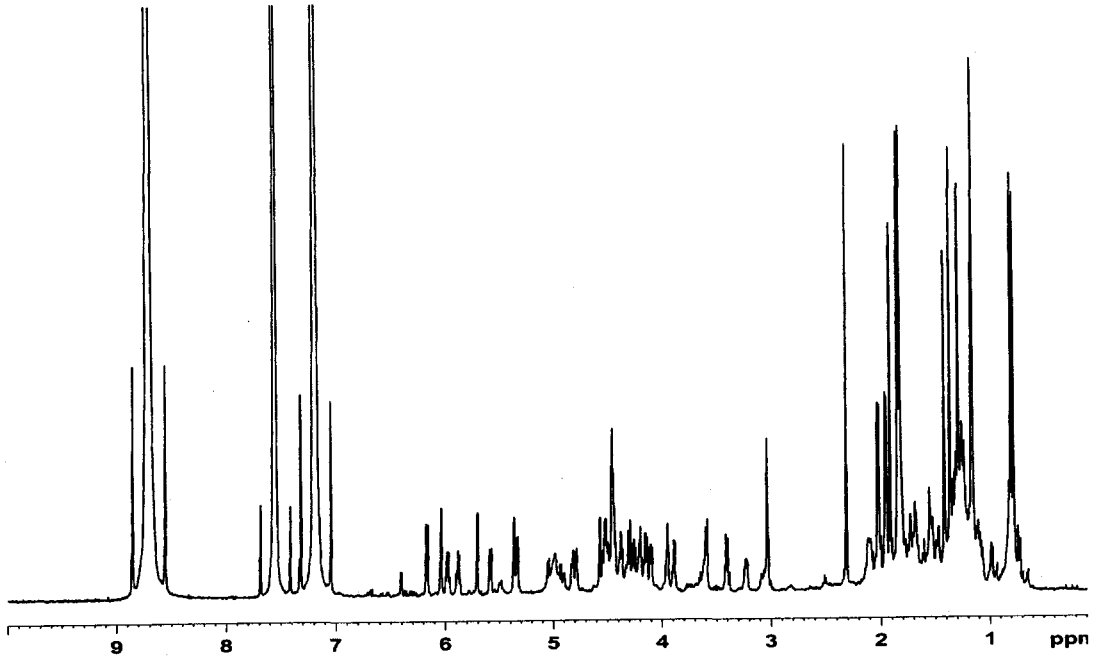


图 8

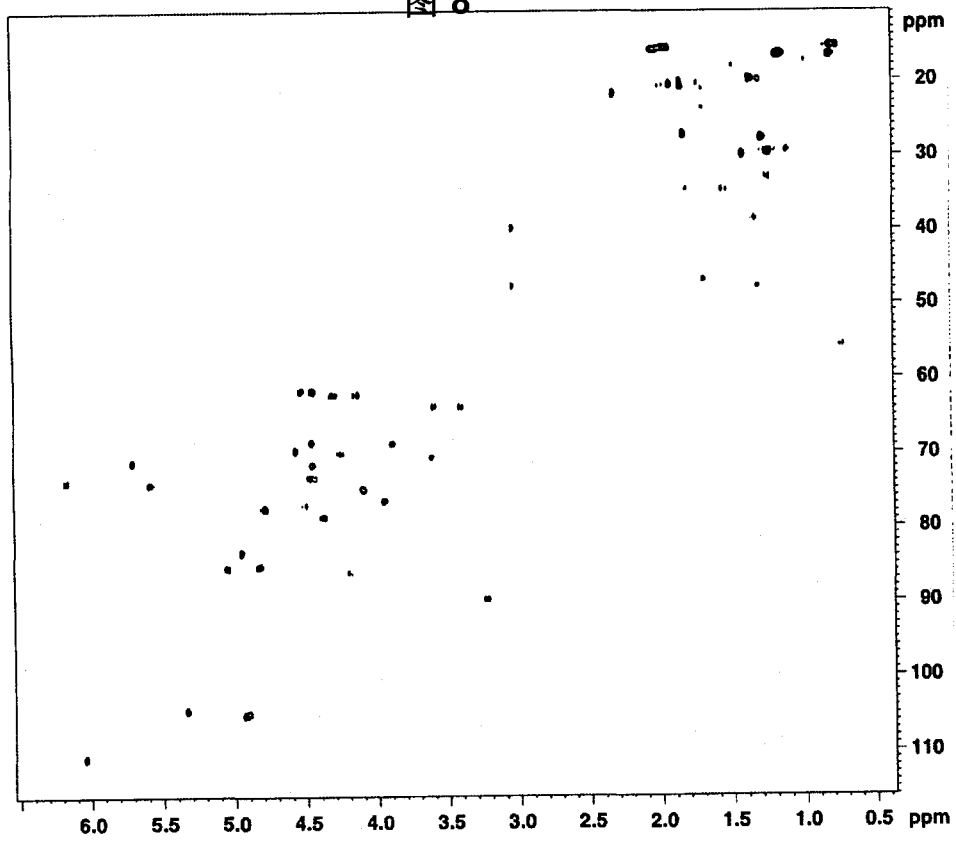


图 10

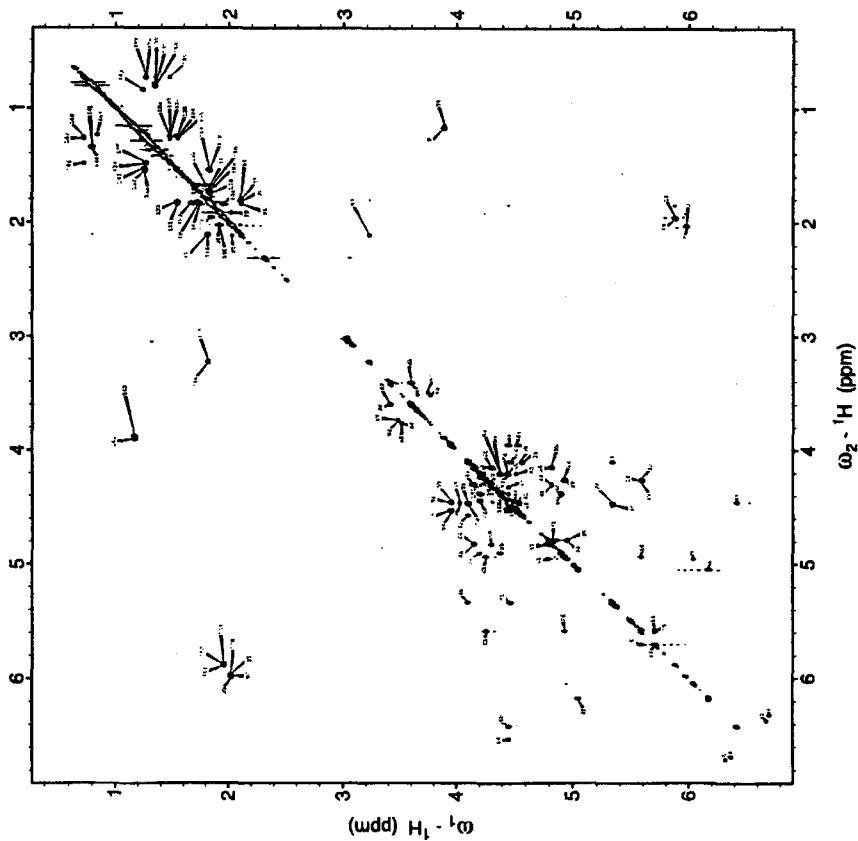


图 9

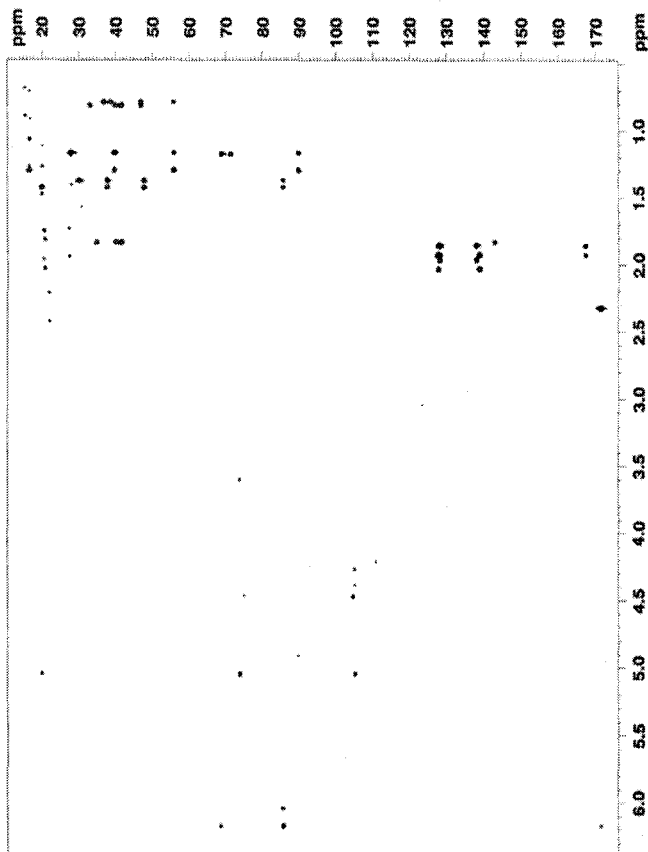


图 11

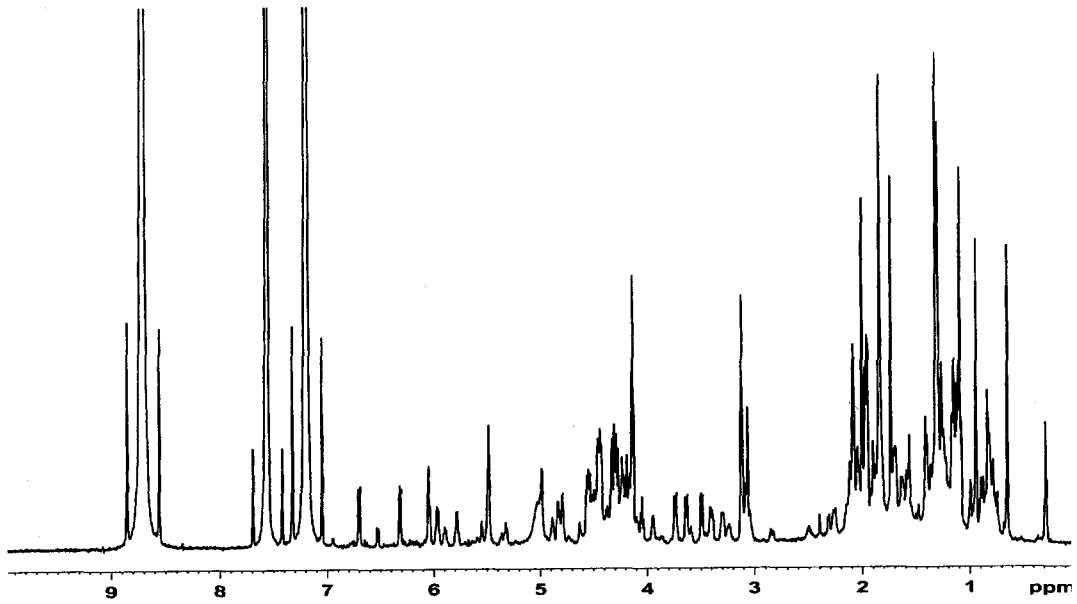


图 12

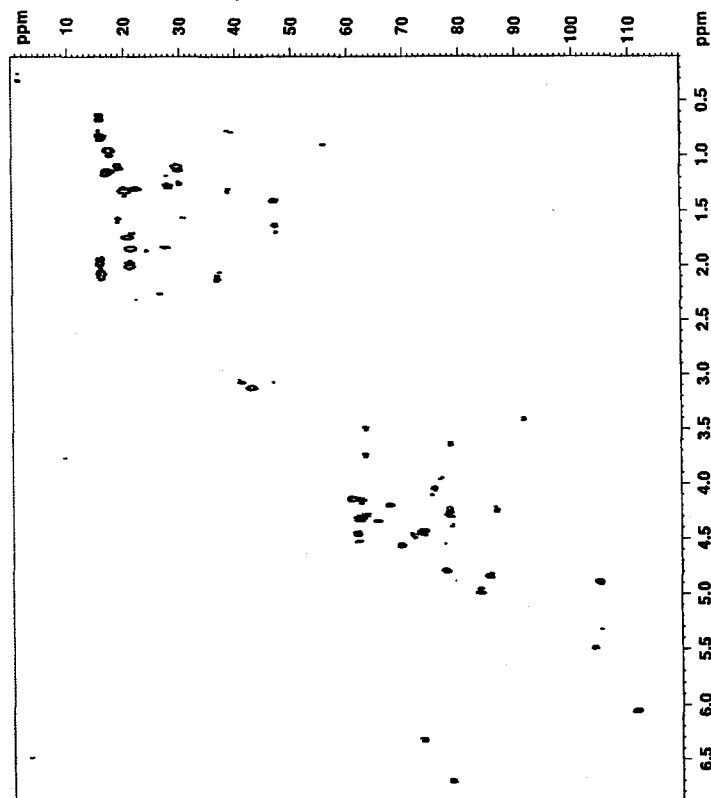


图 13

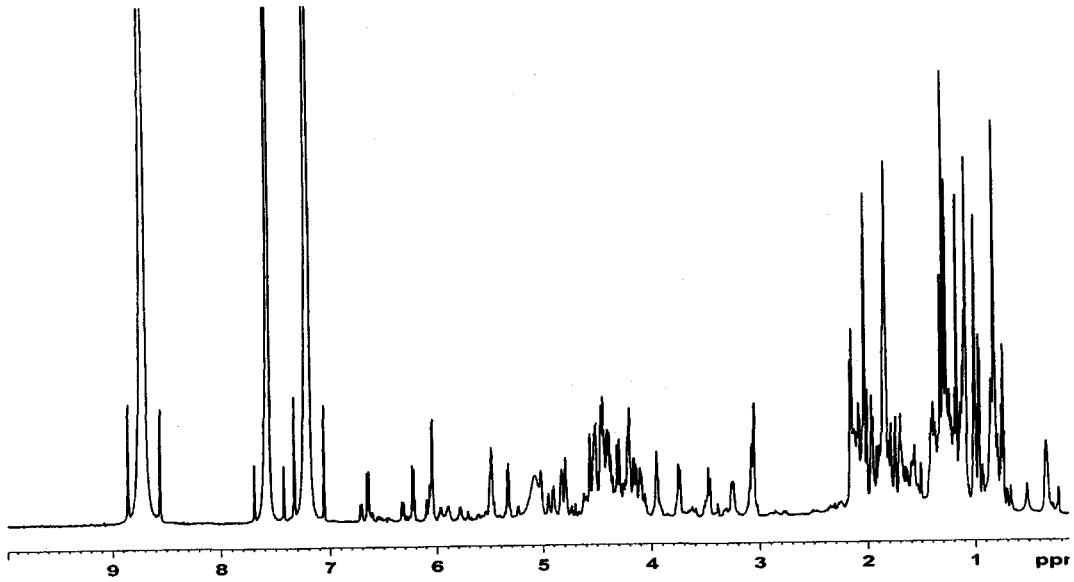


图 14

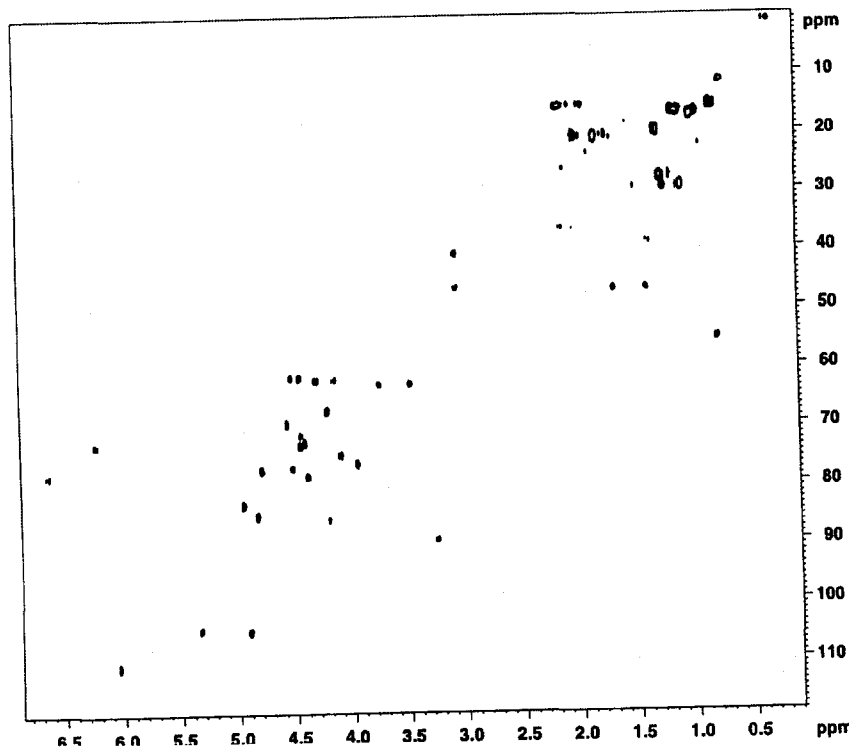


图15

图 15A 化学结构1

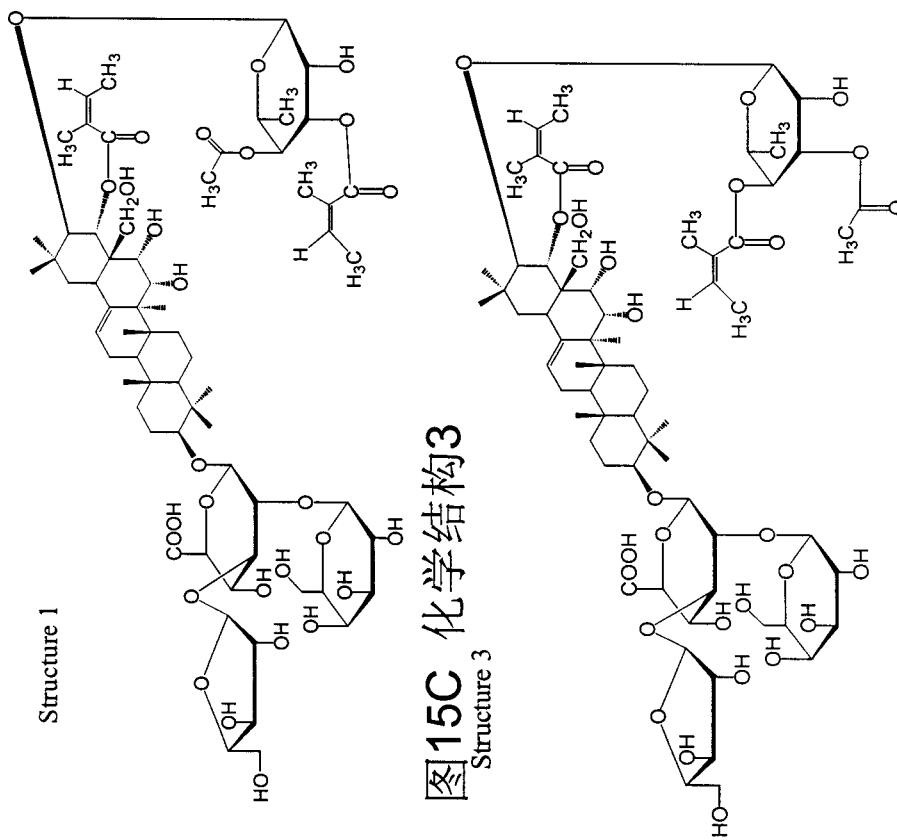


图15B 化学结构2

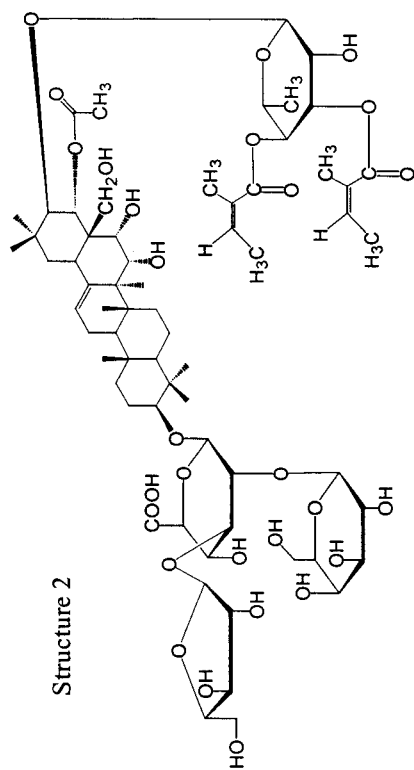
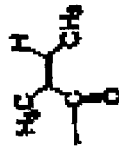
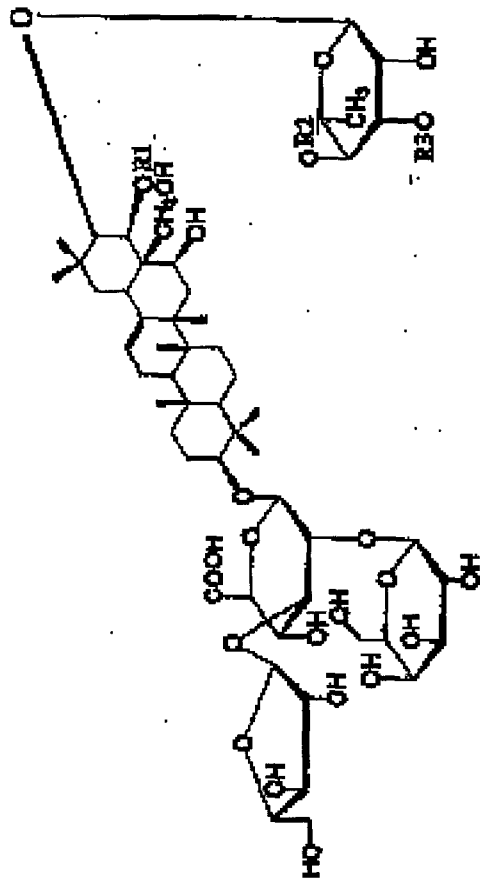


图15C 化学结构3

Structure 3

图 15D



C = H.

Where R1 = A or B or C
 R2 = A or B or C
 R3 = A or B or C

	R1	R2	R3
1	A	A	A
2	A	A	B
3	A	A	C
4	A	B	A
5	A	B	B
6	A	B	C
7	A	C	A
8	A	C	B
9	A	C	C

10	B	A	A
11	B	A	B
12	B	A	C
13	B	B	A
14	B	B	B
15	B	B	C
16	B	C	A
17	B	C	B
18	B	C	C

19	C	A	A
20	C	A	B
21	C	A	C
22	C	B	A
23	C	B	B
24	C	B	C
25	C	C	A
26	C	C	B
27	C	C	C

图 16

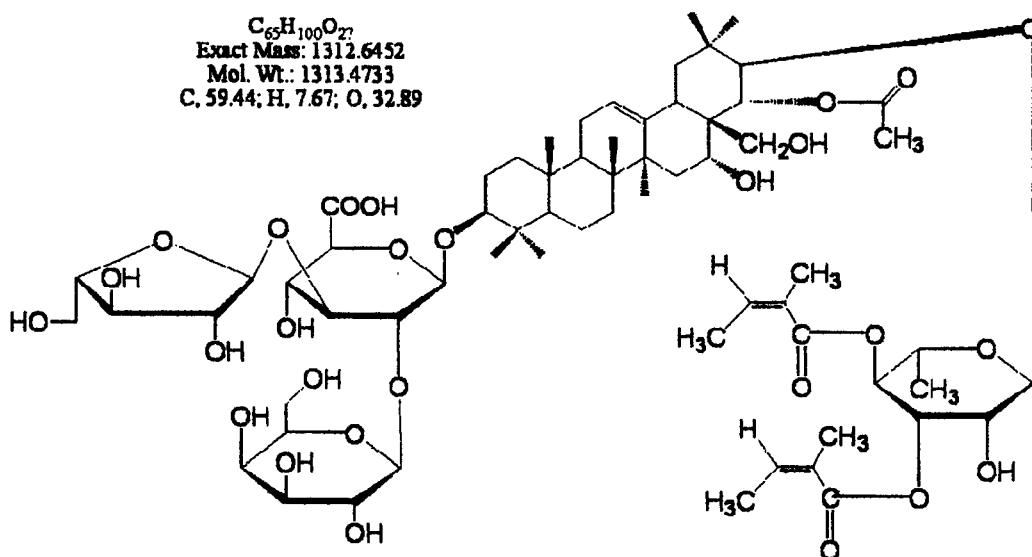


图 17

化合物Y1和Y1-2对卵巢癌细胞生长的影响

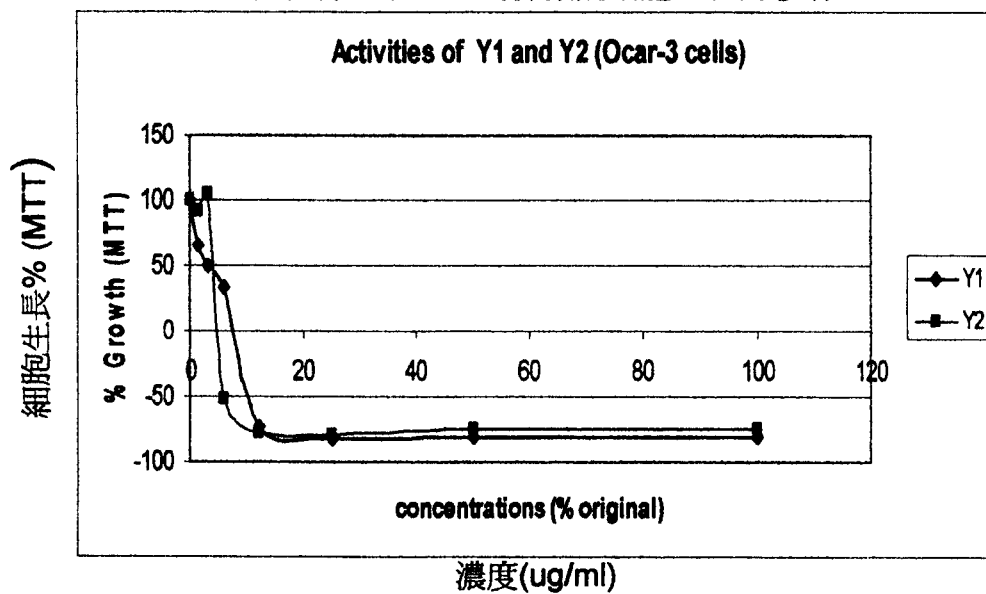


图 19 用高效液相色谱发分析组分9,10和11

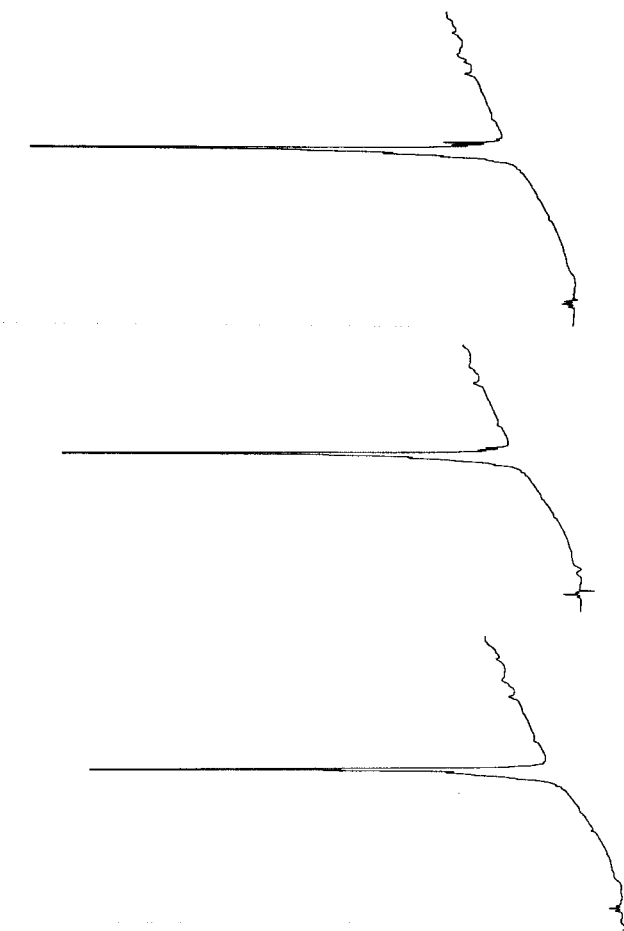


图 18

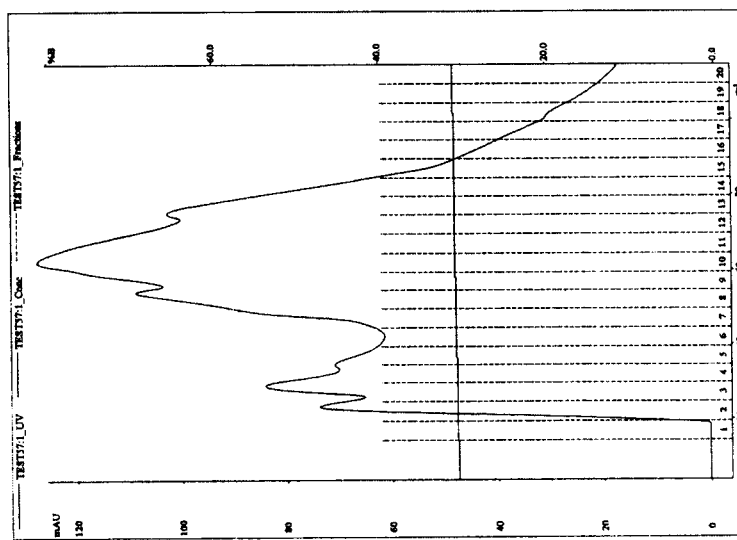


图 21

RI OF CCL₄, 2004

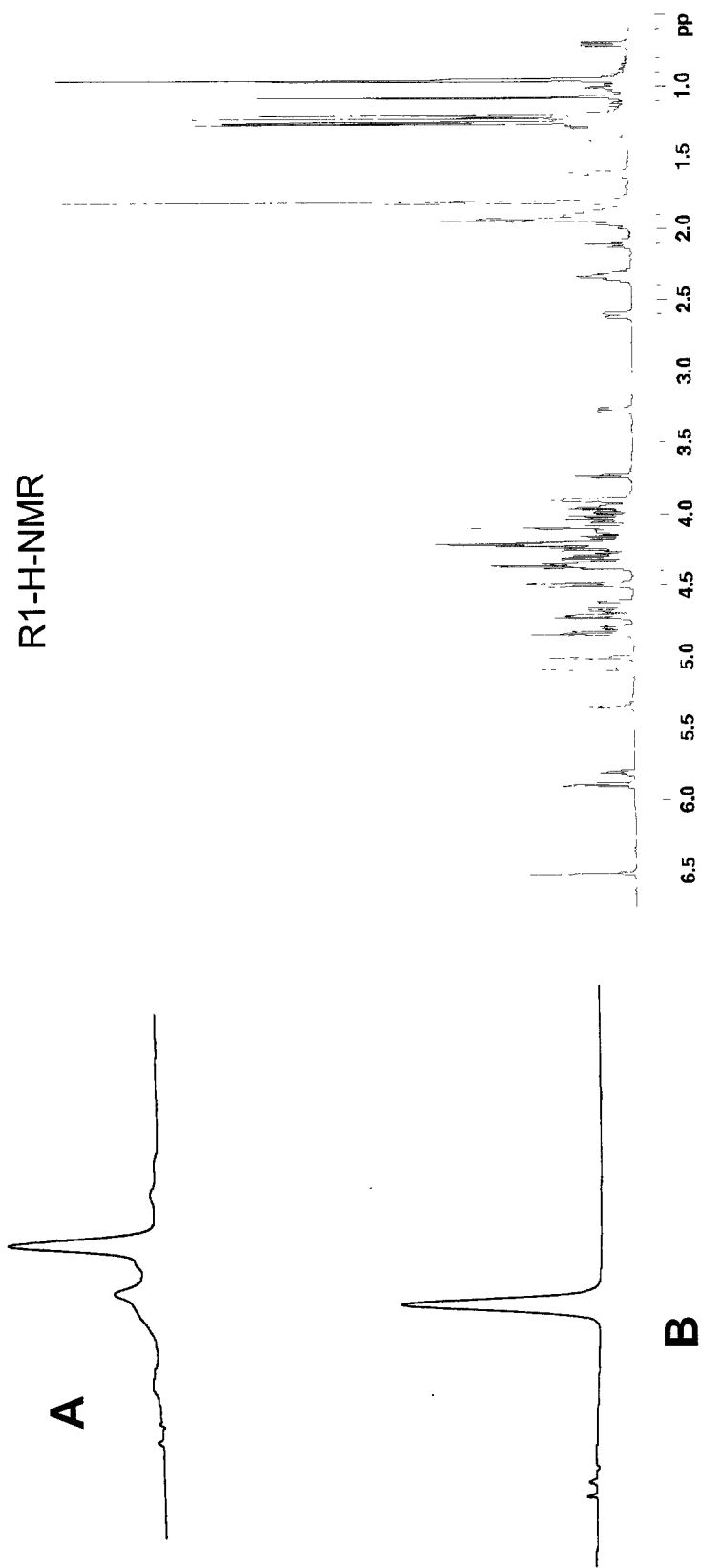


图 23

R1-HMBC-level 1

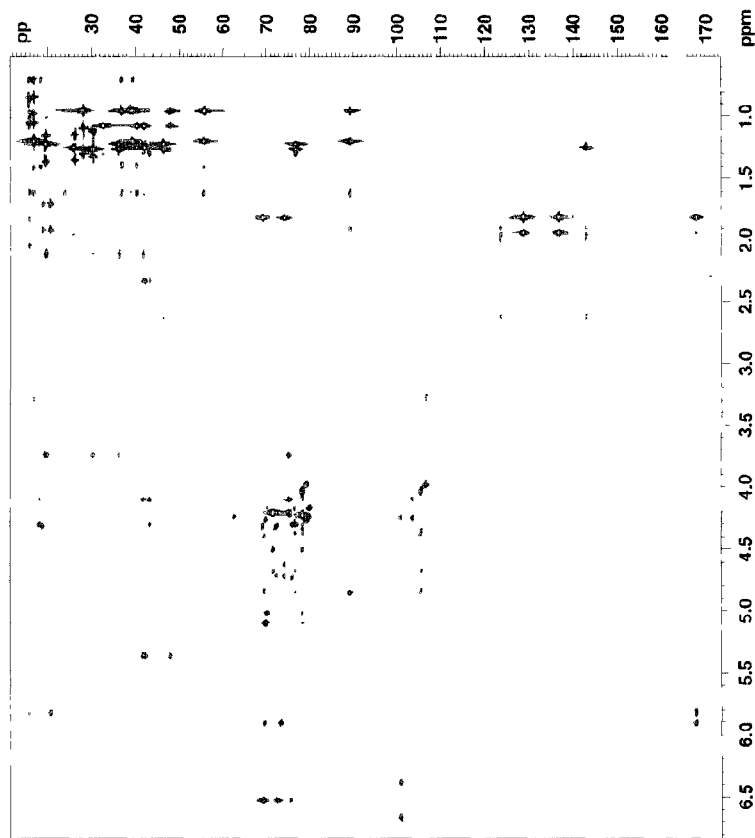


图 22

R1-HMQC

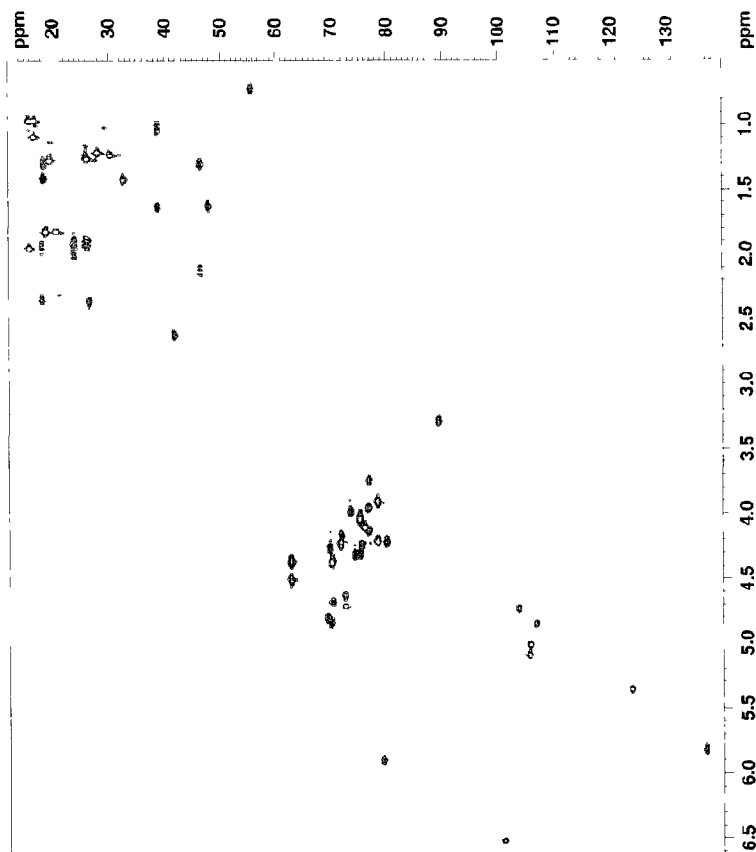
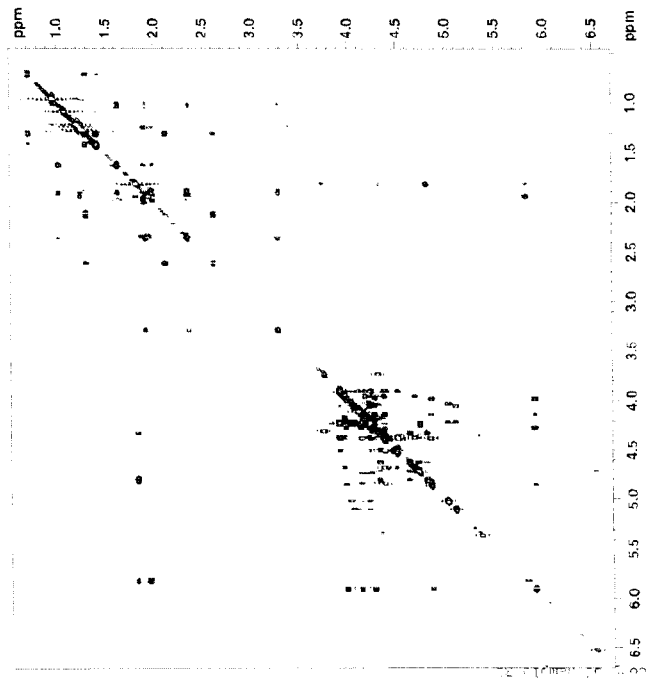


图 24
R1-COSY



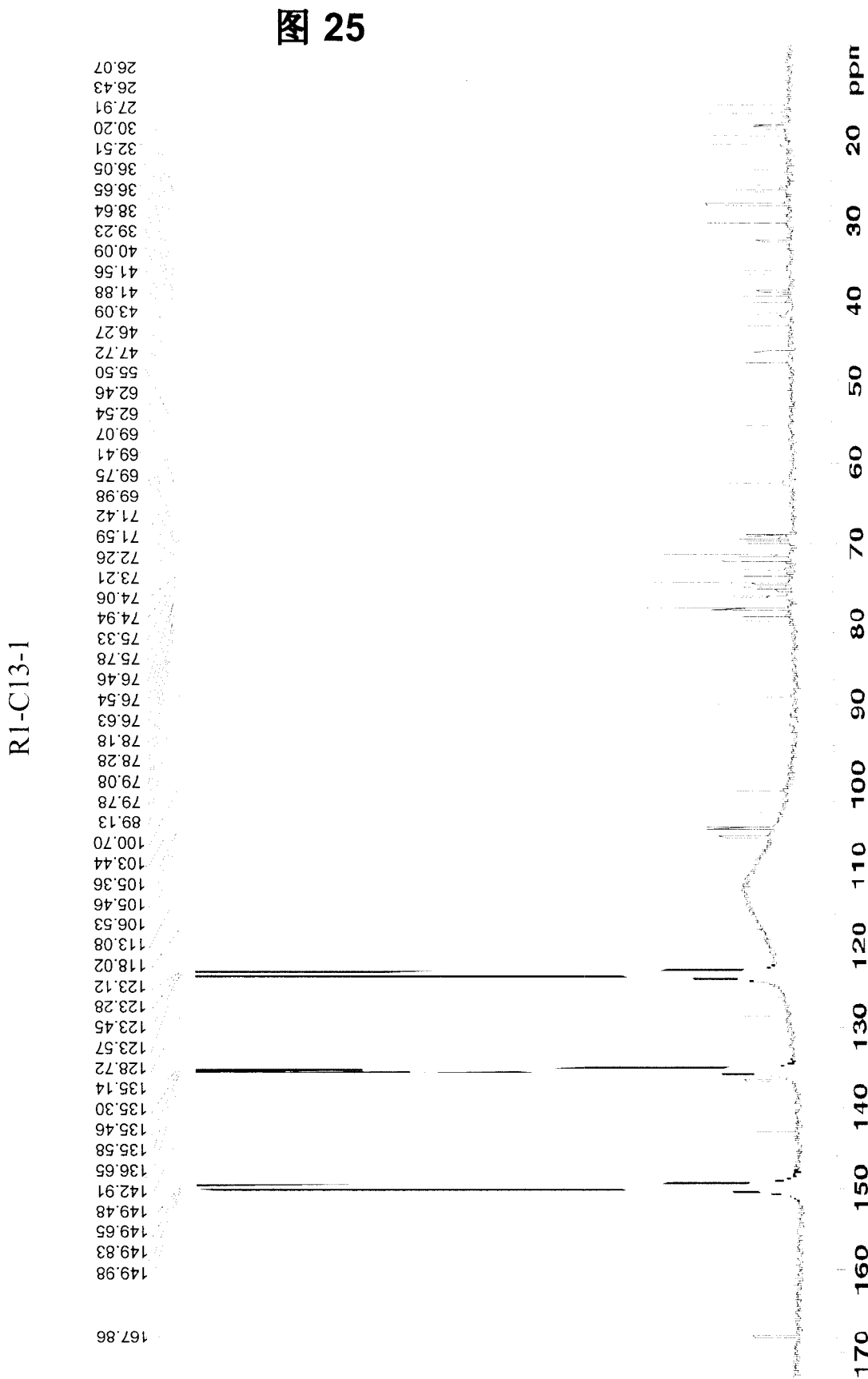
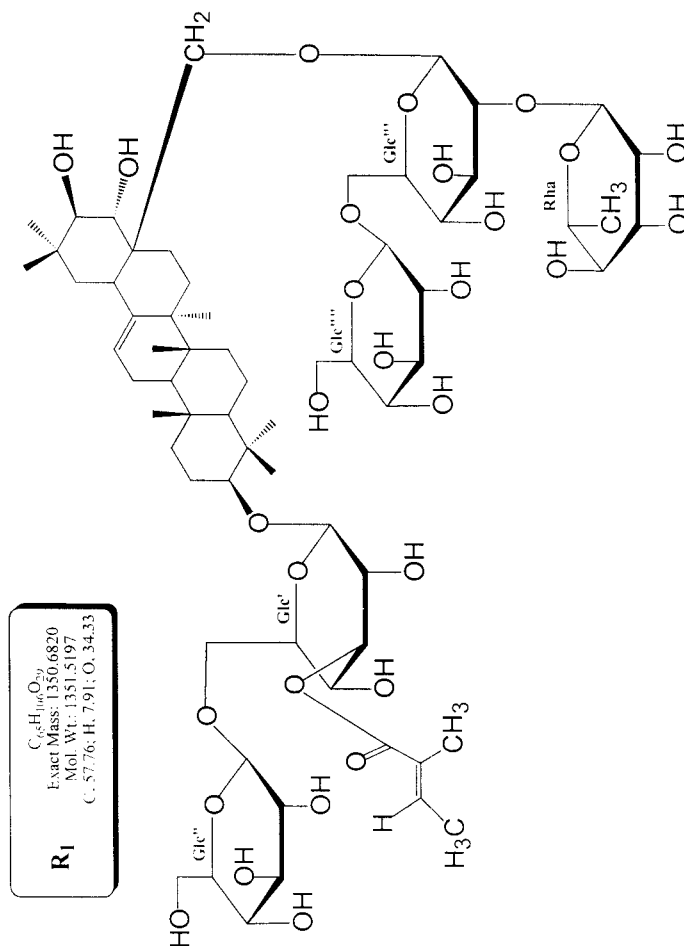


图 26

化合物R1的化学结构



R₁: 3-O-[二党归酰基-(1→3)-β-D-葡萄糖吡喃酰基-(1→6)]-β-D-葡萄糖吡喃酰基-28-O-[α-L-鼠李糖吡喃酰基-(1→2)-β-D-葡萄糖吡喃酰基-(1→6)-β-D-葡萄糖吡喃酰基-12-烯基-28-O-四羟基-2,2,8-四羟基-5,6-三羟基呋喃糖基]

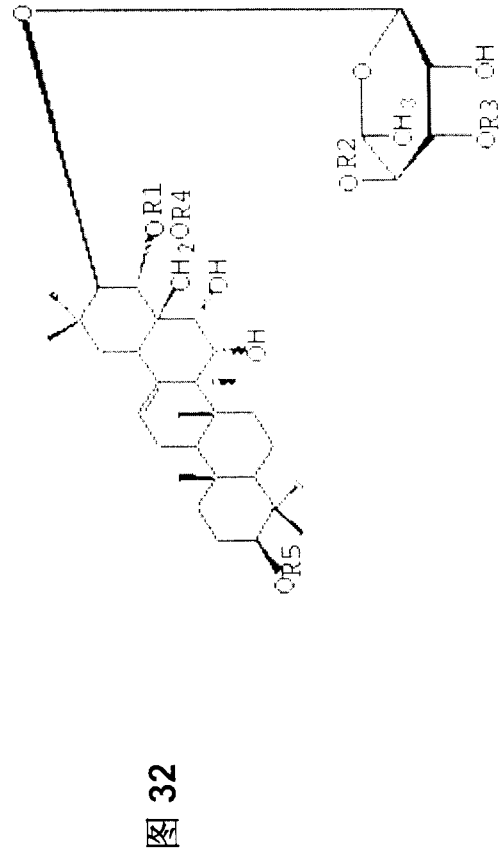
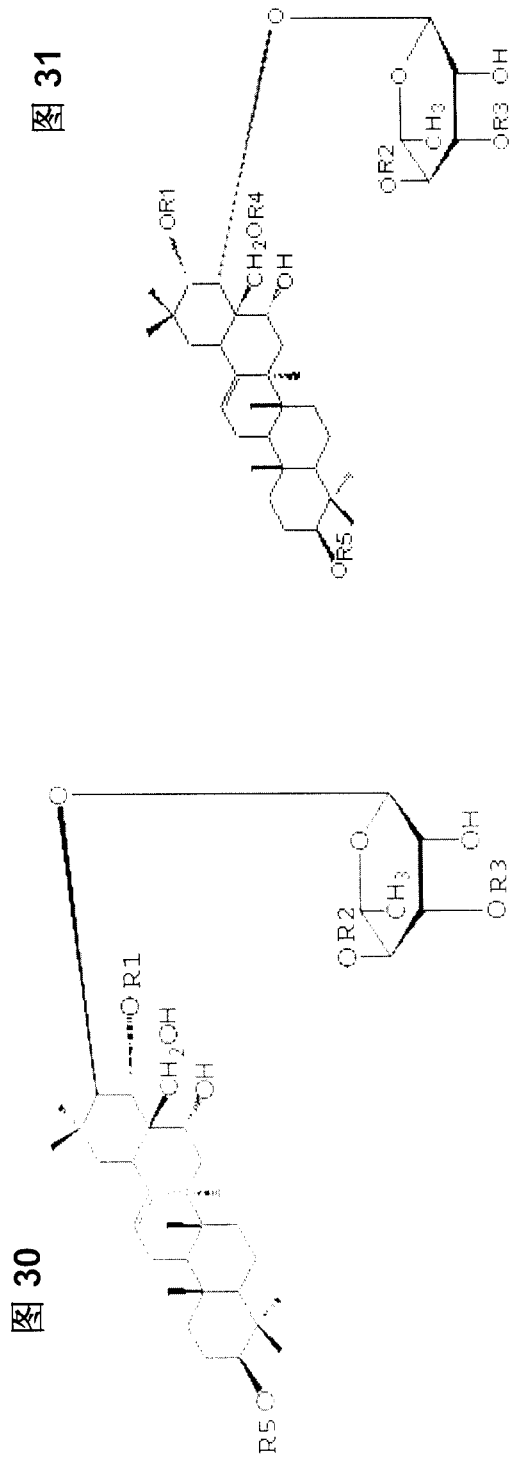


图 34 组分28(从iso-20)二次色谱图

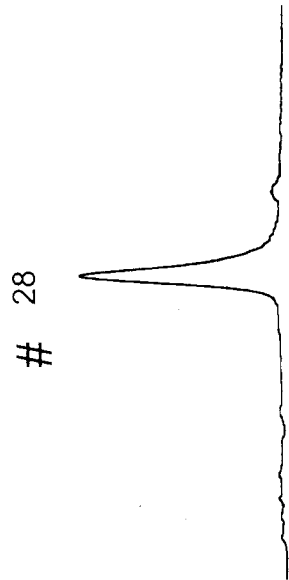


图 33 (iso-20)

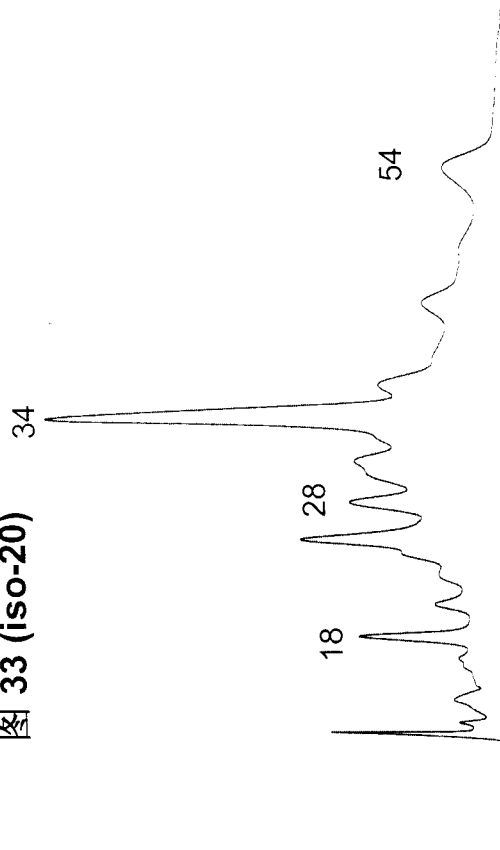


图 36 组分54(从iso-20)二次色谱图

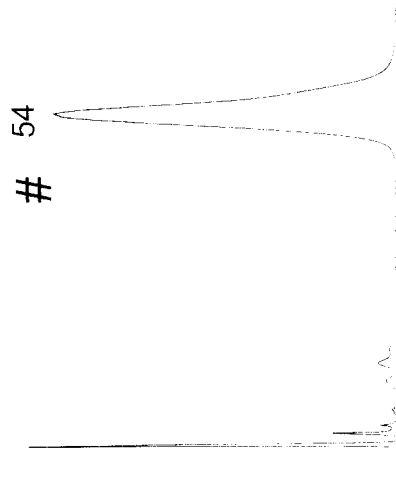


图 35 组分34(从iso-20)二次色谱图

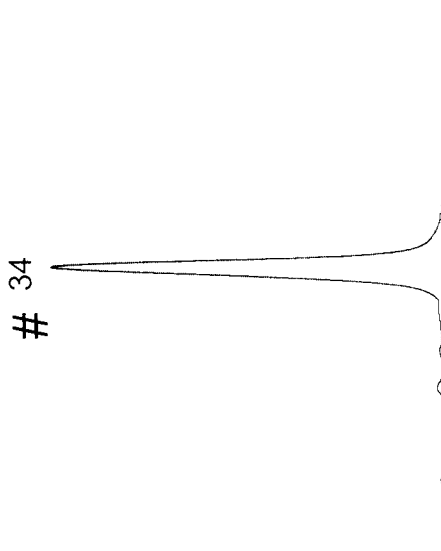


图 38

O28-H-HMQC核磁共振图谱

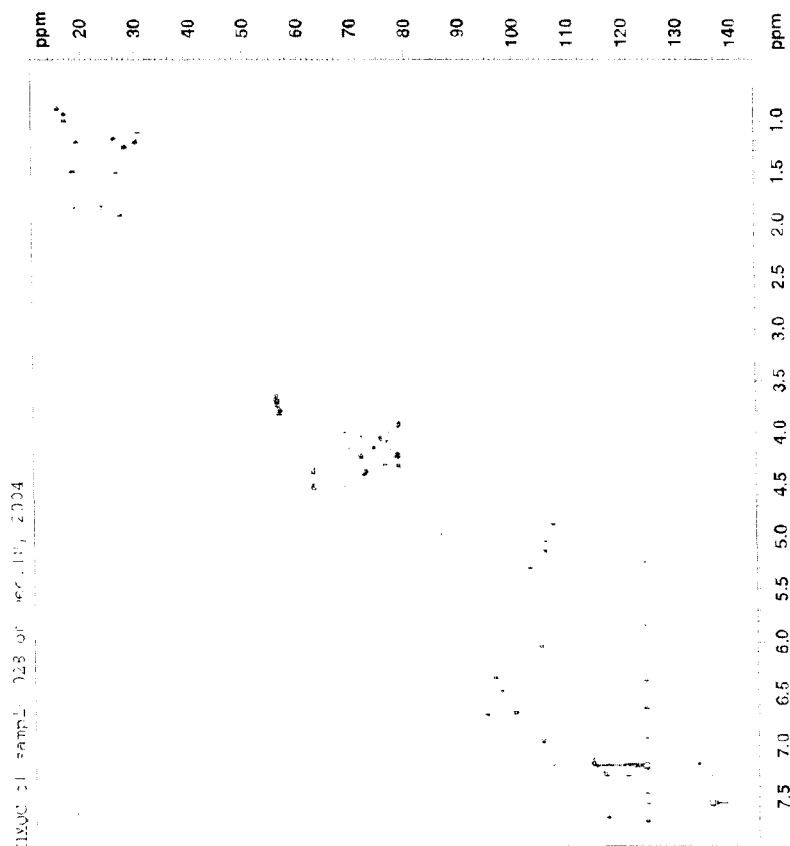


图 37

O28-H-核磁共振图谱

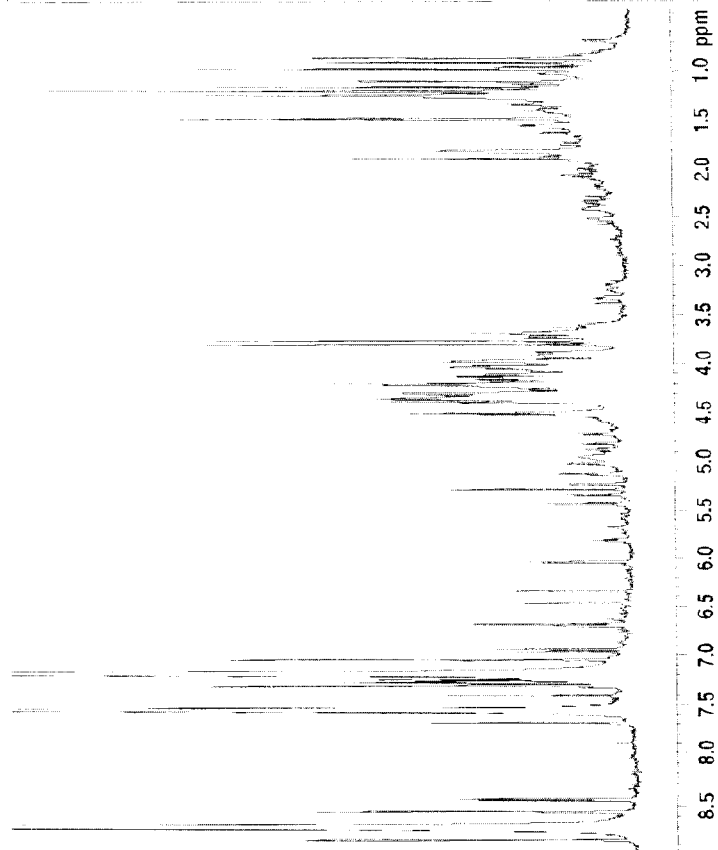


图 40
O34-HMQC核磁共振图谱

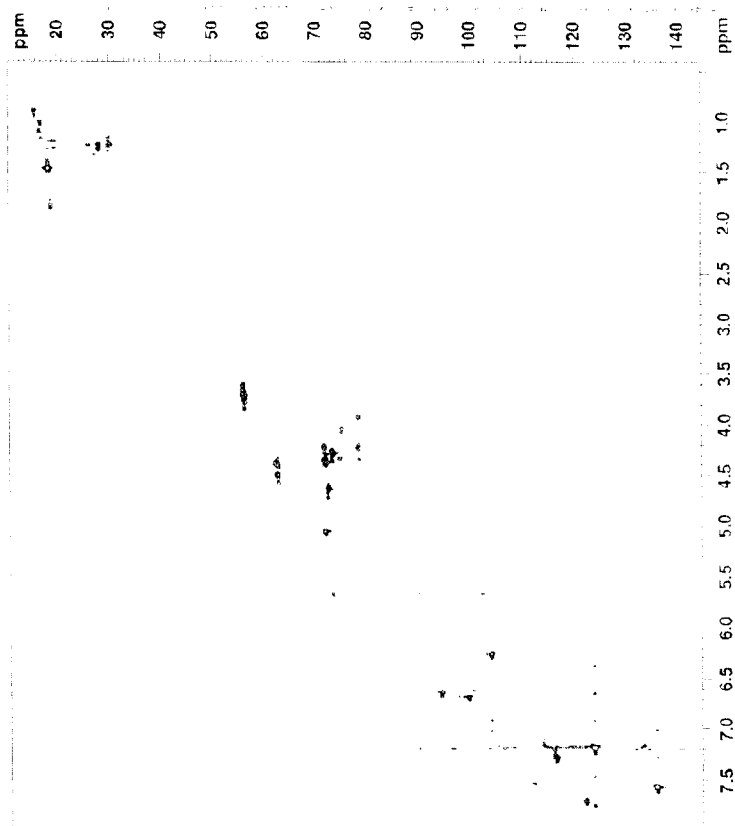


图 39
O34-H-核磁共振图谱

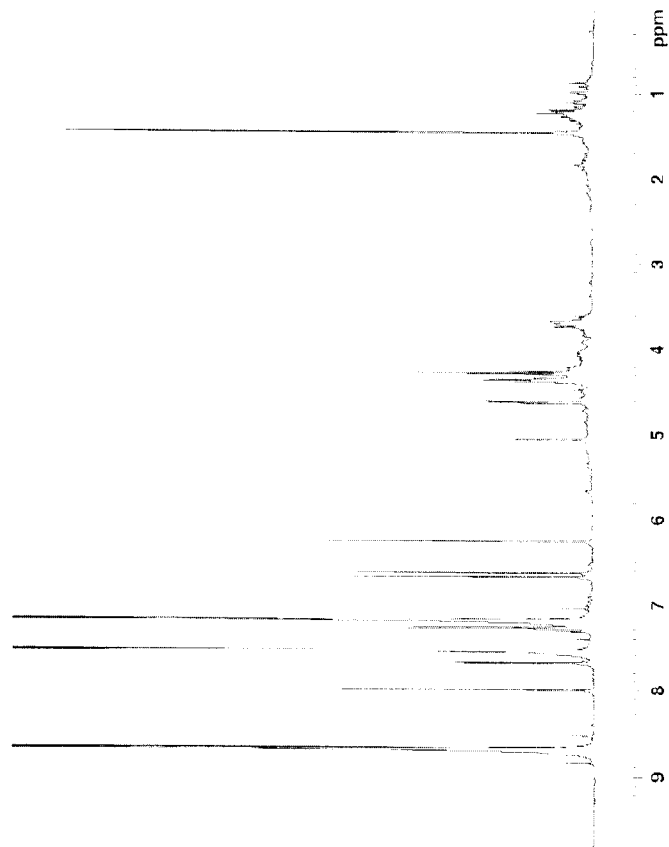


图 42

O54-HMQC核磁共振图谱

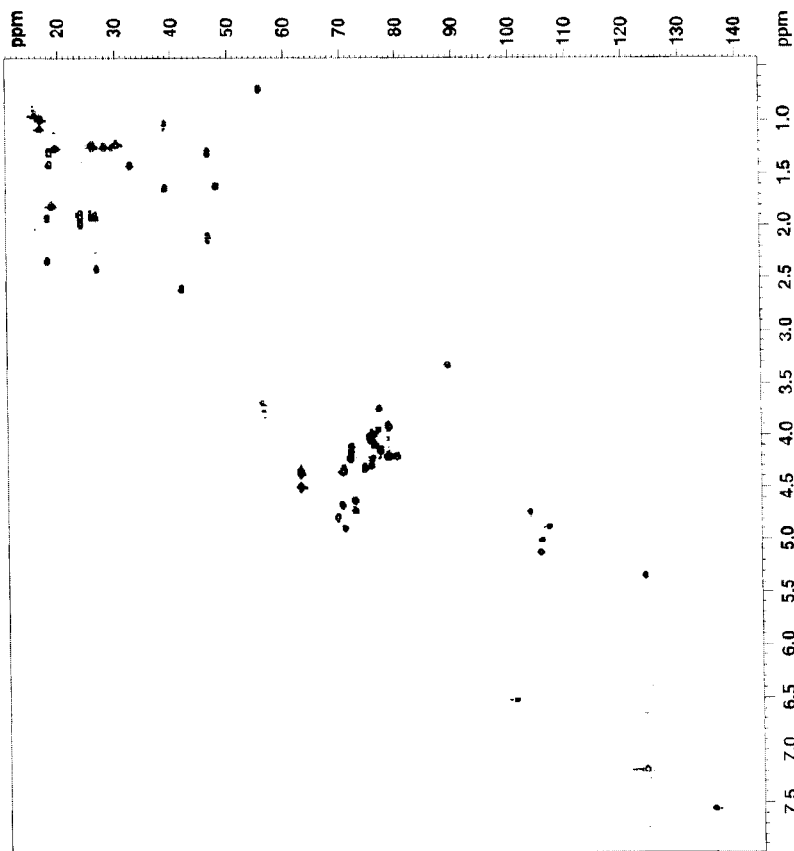


图 41

O54-H-核磁共振图谱

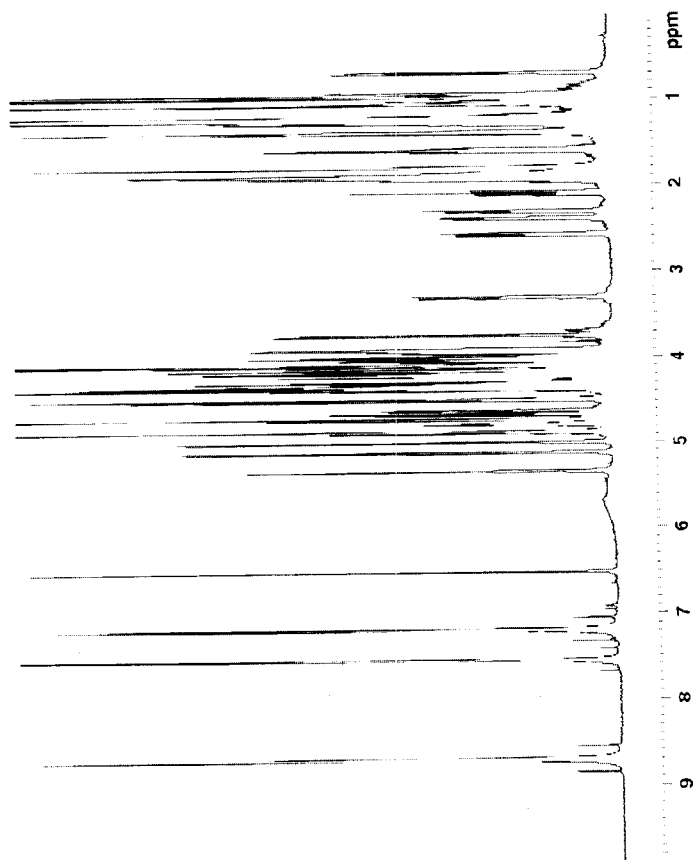


图 43

O54-HMBC核磁共振谱

