



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104892714 A

(43) 申请公布日 2015. 09. 09

(21) 申请号 201510191378. 9

A61P 35/02(2006. 01)

(22) 申请日 2015. 04. 22

(71) 申请人 福建医科大学

地址 350108 福建省福州市闽侯县上街镇学园路 1 号

(72) 发明人 李鹏 许建华 张志强 沈翠娥 熊小文

(74) 专利代理机构 福州智理专利代理有限公司 35208

代理人 王义星

(51) Int. Cl.

C07J 9/00(2006. 01)

A61K 31/575(2006. 01)

A61P 35/00(2006. 01)

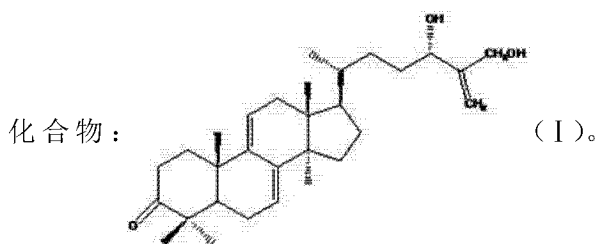
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

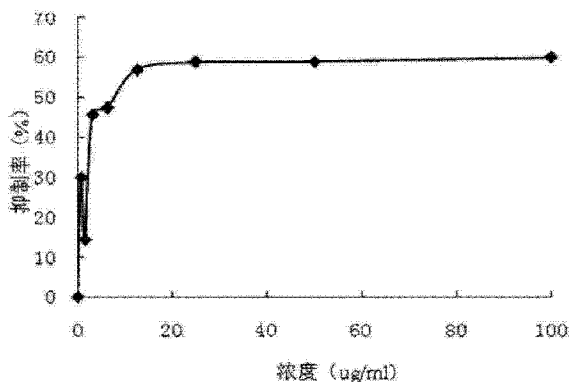
一种新的灵芝三萜及其制备方法和医药用途

(57) 摘要

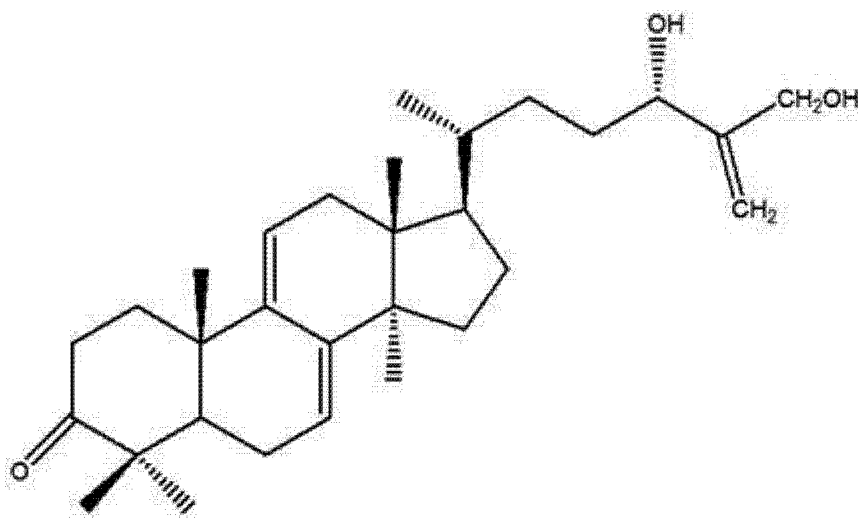
本发明公开一种新的灵芝三萜及其制备方法和医药用途,新的灵芝三萜为下列结构式(I)的



该化合物由下述方法制备:将灵芝用醇或醇溶液提取一次或2次以上,过滤,收集滤液,再减压浓缩干燥,获得醇提取物;将醇提取物加水,以石油醚萃取脱脂后,再以乙酸乙酯萃取,获得的乙酸乙酯萃取液再以 pH 8-12 碱性水溶液萃取,取乙酸乙酯相蒸干,获得粗品;将获得的粗品进行色谱分离纯化,得到纯的式(I)化合物。其能在制备治疗肿瘤药物中的应用。



1. 一种结构式(I)的化合物,其化学结构式如下:



(I)。

2. 权利要求 1 的所述的化合物的制备方法,包括以下步骤:

A) 将灵芝用醇或醇溶液提取一次或 2 次以上,过滤,收集滤液,再减压浓缩干燥,获得醇提取物;

B) 将醇提取物加水,以石油醚萃取脱脂后,再以乙酸乙酯萃取,获得的乙酸乙酯萃取液再以 pH 8-12 碱性水溶液萃取,取乙酸乙酯相蒸干,获得粗品;

C) 将获得的粗品进行色谱分离纯化,得到纯的式(I)化合物。

3. 根据权利要求 2 所述的化合物的制备方法,其特征在于步骤 C) 的粗品进行色谱分离纯化的步骤包括如下:1) 将粗品在硅胶上进行柱层析,用石油醚-乙酸乙酯梯度洗脱,获得石油醚-乙酸乙酯的体积比为 1:1 的洗脱物;2) 取石油醚-乙酸乙酯的体积比为 1:1 的洗脱物经制备型高效液相色谱分离,甲醇-水梯度洗脱,从甲醇-水的体积比为 85:15 的洗脱部位得到纯的化合物(1)。

4. 根据权利要求 1 或 2 所述的化合物的制备方法,其特征在于 pH 8-12 碱性水溶液采用饱和 NaHCO<sub>3</sub>水溶液。

5. 权利要求 1 所述的结构式(I)的化合物或其衍生物在制备治疗肿瘤药物中的应用。

6. 根据权利要求 5 所述的应用,其特征在于所述的肿瘤为人慢性粒细胞白血病细胞株 K562、骨髓系白血病细胞株 HL60、人口腔表皮样癌细胞株 KB、人食管癌细胞株 OE-19 或人结肠癌细胞株 SW620。

7. 含有治疗有效量的权利要求 1 所述的结构式(I)的化合物或其衍生物的药物组合物。

8. 根据权利要求 7 所述的药物组合物,其特征在于其中结构式(I)的化合物和/或其衍生物的含量大于 50% 以上,尤其 90% 以上。

9. 含有治疗有效量的权利要求 1 所述的结构式(I)的化合物或其衍生物的药物组合物在制备治疗肿瘤药物中的应用。

## 一种新的灵芝三萜及其制备方法和医药用途

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种从灵芝中分离出的具有抗肿瘤作用并可抑制肿瘤细胞的多重耐药性(MDR)的新化合物。

[0002] 本发明还涉及该化合物的制备方法。

[0003] 本发明还涉及以该化合物在制备抗肿瘤药物中的应用。

### 背景技术

[0004] 恶性肿瘤常称癌症,是严重威胁人类健康的常见病、多发病。目前治疗恶性肿瘤的三大主要方法包括化学治疗、外科手术和放射治疗。其中化疗在肿瘤的综合治疗中仍占有极为重要的地位,然而对占恶性肿瘤 90% 以上的实体瘤的治疗目前仍未能达到满意的疗效,其存在两大主要障碍:药物的耐药的产生和毒性反应。细胞毒类抗肿瘤药在杀伤肿瘤细胞的同时,对正常组织细胞也产生不同程度的损伤作用,那是由于其对肿瘤细胞缺乏足够的选择性,因此毒性反应成为肿瘤化疗时药物用量受限的关键因素。化疗过程中肿瘤细胞对药物产生不敏感现象即耐药性是肿瘤化疗失败的重要原因,亦是肿瘤化疗急需解决的难题。因此如何提高化疗治疗指数,如何突破化疗两大障碍已成为目前研究的热点。从中草药中寻找毒性低、疗效高的抗肿瘤活性成分成为当今抗肿瘤药物发展战略中的要点之一。由于植物所含的天然化合物具有来源广泛、价格低廉、毒性低等优点,因此从中草药中寻找高效低毒,作用专一的抗肿瘤药物有广阔的发展前景。

[0005] 中药灵芝是多孔菌科灵芝属真菌植物赤芝 [*Ganoderma lucidum*(Leyss. ex Fr.) Karst] 或紫芝 [*Ganoderma japonicum*(Fr.) Lloyd] 的干燥子实体。性温、味甘,具有补中益气、滋补强壮、扶正固本的功效,临床上常用于肿瘤的治疗或辅助治疗。对于灵芝抗肿瘤有效成分的研究,主要针对灵芝多糖和灵芝三萜类成分。抗肿瘤研究结果表明,灵芝三萜对多种肿瘤细胞的生长和转移都有抑制作用。对灵芝三萜类成分的研究在 20 世纪八十年代达到了高潮,目前已经有 150 多种灵芝三萜类成分被分离鉴定,我们在针对灵芝抗肿瘤作用的有效成分研究中,分离鉴定了一个新的三萜类化合物,命名为  $5\alpha$ -lanosta-7, 9, 25-triene-24 $\alpha$ , 26-dihydroxy-3-one。药理学实验表明,该化合物具有抗肿瘤活性。针对该化合物经过试验,确定了合理的制备方法。

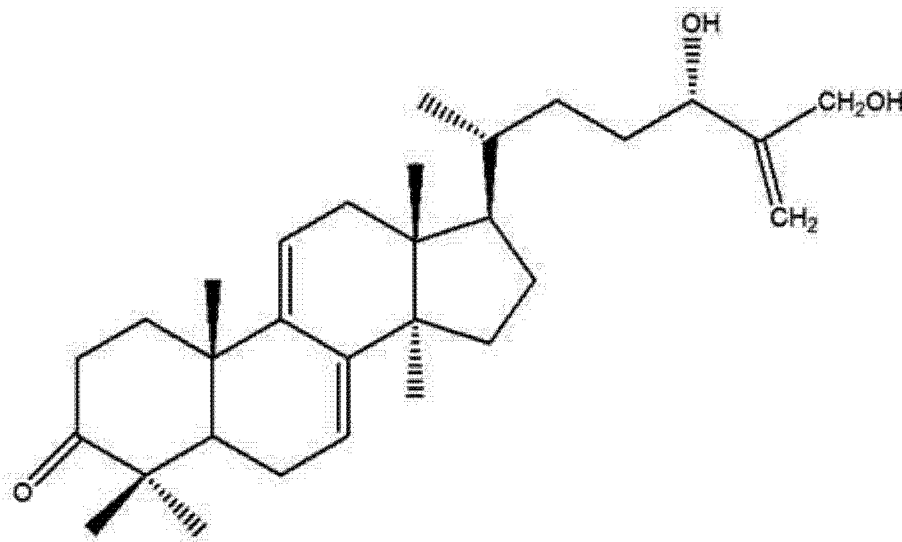
### 发明内容

[0006] 本发明的目的是提供一种从灵芝中分离出的具有抗肿瘤作用的新化合物——灵芝三萜( $5\alpha$ -lanosta-7, 9, 25-triene-24 $\alpha$ , 26-dihydroxy-3-one)。

[0007] 本发明的另一个目的在于提供制备该化合物方法。

[0008] 本发明的再一目的在于提供该化合物在制备治疗肿瘤药物中的应用。

[0009] 本发明的目的是这样实现的,本发明所述的一种结构式(I)的化合物,其化学结构式如下:



(I)。

[0010] 本发明上述的化合物的制备方法,包括以下步骤:

A) 将灵芝用醇或醇溶液提取一次或2次以上,过滤,收集滤液,再减压浓缩干燥,获得醇提取物;

B) 将醇提取物加水,以石油醚萃取脱脂后,再以乙酸乙酯萃取,获得的乙酸乙酯萃取液再以 pH 8-12 碱性水溶液萃取,取乙酸乙酯相蒸干,获得粗品;

C) 将获得的粗品进行色谱分离纯化,得到纯的式(I)化合物。

[0011] 上述步骤C)的粗品进行色谱分离纯化的步骤包括如下:1)将粗品在硅胶上进行柱层析,用石油醚-乙酸乙酯梯度洗脱,获得石油醚-乙酸乙酯的体积比为1:1的洗脱物;2)取石油醚-乙酸乙酯的体积比为1:1的洗脱物经制备型高效液相色谱分离,甲醇-水梯度洗脱,从甲醇-水的体积比为85:15的洗脱部位得到纯的化合物(1)。

[0012] 上述 pH 8-12 碱性水溶液采用饱和  $\text{NaHCO}_3$  水溶液。

[0013] 本发明上述结构式(I)的化合物或其衍生物在制备治疗肿瘤药物中的应用。

[0014] 所述的肿瘤为人慢性粒细胞白血病细胞株 K562、人髓系白血病细胞株 HL60、人口腔表皮样癌细胞株 KB、人食管癌细胞株 OE-19 或人结肠癌细胞株 SW620。

[0015] 本发明含有治疗有效量的结构式(I)的化合物或其衍生物的药物组合物。

[0016] 其中结构式(I)的化合物和/或其衍生物的含量大于50%以上,尤其90%以上。

[0017] 本发明含有治疗有效量的结构式(I)的化合物或其衍生物的药物组合物在制备治疗肿瘤药物中的应用。

[0018] 具体地说,本发明提供化合物的制备方法,本发明的化合物可以人工合成,但优选的是从天然植物中分离提取,以获得天然存在的、低毒性的天然化合物。在本发明的一个优选实施方案中,从中国传统中药灵芝中分离纯化了本发明的化合物,其制备步骤包括:

A) 将灵芝用醇或醇溶液提取一次或多次,过滤,收集滤液,再减压浓缩干燥,获得醇提取物;

B) 将醇提取物加水,以石油醚萃取脱脂后,再以乙酸乙酯萃取,获得的乙酸乙酯萃取液再以饱和  $\text{NaHCO}_3$  水溶液萃取,取乙酸乙酯相蒸干,获得粗品。

[0019] C) 将获得的粗品进行色谱分离纯化, 得到纯的式(I) 化合物。

[0020] 上述步骤 C) 的粗品进行色谱分离纯化的步骤包括如下: 1) 将粗品在硅胶上进行柱层析, 用石油醚-乙酸乙酯梯度洗脱, 获得石油醚-乙酸乙酯(体积比 1:1) 洗脱物; 2) 取石油醚-乙酸乙酯(体积比 1:1) 洗脱物经制备型高效液相色谱分离, 甲醇-水梯度洗脱, 从甲醇-水(体积比 85:15) 洗脱部位得到纯的化合物(1)。

[0021] 根据本发明的再一方面, 提供含有本发明化合物的药物组合物, 可以通过将本发明化合物添加药学上可接受的载体或赋形剂或可选的其他成分而制成适于临床使用的药物组合物。

[0022] 根据本发明的再一方面, 提供本发明化合物在制备治疗肿瘤药物中的应用, 具有杀伤肿瘤细胞的作用。

[0023] 所述的肿瘤优选为人慢性粒细胞白血病细胞株 K562、人髓系白血病细胞株 HL60、人口腔表皮样癌细胞株 KB、人食管癌细胞株 OE-19、人结肠癌细胞株 SW620。

[0024] 实验表明在含有结构式(I) 的化合物和 / 或其衍生物的药物组合物中, 其中结构式(I) 的化合物和 / 或其衍生物的含量大于 50% 以上, 尤其 90% 以上, 治疗效果较佳。

[0025] 本发明的有益效果是: 肿瘤细胞增殖的抑制作用, 本发明的  $5\alpha$ -lanosta-7, 9, 25-triene-24 $\alpha$ , 26-dihydroxy-3-one 对 SW620 及 OE-19 细胞增殖有显著的抑制作用, 均表现出明显的量效关系(见图 1, 图 2)。药物作用于 SW620 和 OE-19 细胞 48 h 的  $IC_{50}$  值分别是 3.71  $\mu$ g/ml 和 6.25  $\mu$ g/ml。作用于 K562、HL60 及 KB 细胞 48 h 的  $IC_{50}$  值分别是 34.38  $\mu$ g/ml、21.46  $\mu$ g/ml 和 14.04  $\mu$ g/ml。实验结果表明, 本发明的化合物具有抗肿瘤活性。由上可知, 本发明的化合物(1)—— $5\alpha$ -lanosta-7, 9, 25-triene-24 $\alpha$ , 26-dihydroxy-3-one 制备方法简便, 工艺条件温和, 化合物(1) 为白色晶体, 实验证明采用本发明工艺步骤, 获得的产品纯度可达 98%, 明显高于现有技术的步骤。本发明的化合物能作为治疗肿瘤的药物, 其具有杀伤肿瘤细胞的作用, 尤其对人结肠癌具有较好的疗效。

## 附图说明

[0026] 图 1 为本发明化合物(1) (作用 48h) 对 SW620 细胞增殖抑制作用的量效关系曲线图。

[0027] 图 2 为本发明化合物(1) (作用 48h) 对 OE-19 细胞增殖抑制作用的量效关系曲线图。

## 具体实施方式

[0028] 下面通过对本发明实施例的描述, 详细说明但不限制本发明。

[0029] 实施例 1 化合物(1) 的制备

材料来源 灵芝(*Ganoderma lucidum*(Leys. ex Fr.) Karst) 购自中国福建仙芝楼生物科技有限公司, 该灵芝的标本样本保藏在福建医科大学药学院。

[0030] 提取和分离 将干的和粉碎的灵芝用无水乙醇回流提取 3 次, 每次 2h, 提取液用 2 号滤纸过滤, 用旋转蒸发器去除乙醇获得醇提浸膏。醇提浸膏加适量水后, 依次用石油醚、乙酸乙酯萃取, 获得的乙酸乙酯萃取液再用饱和碳酸氢钠水溶液萃取, 取出乙酸乙酯相减压浓缩蒸干得粗品, 将粗品在硅胶上进行柱层析, 用体积比 1:1 的石油醚-乙酸乙酯洗脱,

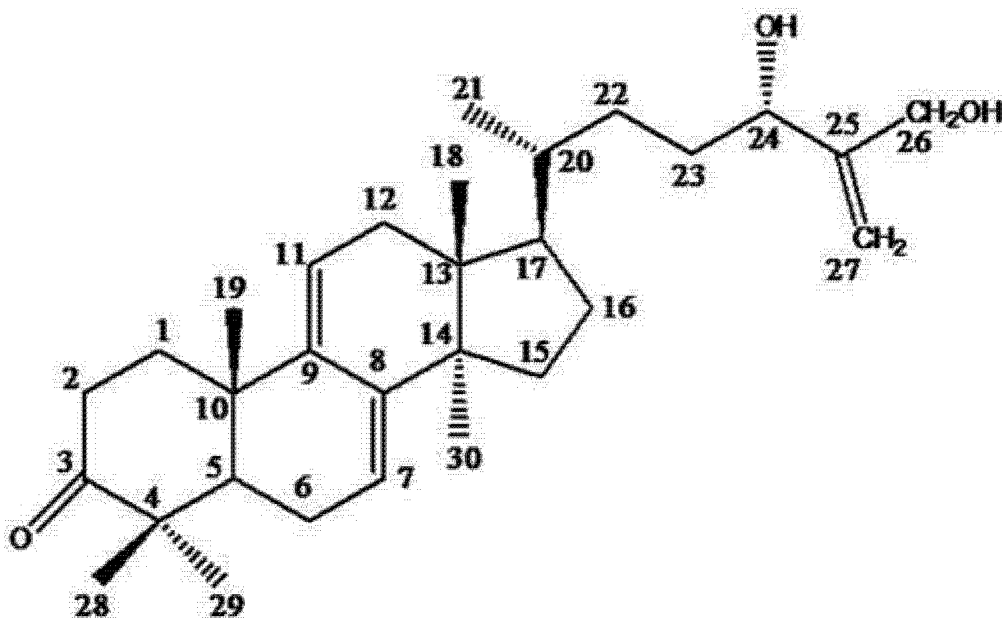
取石油醚-乙酸乙酯(体积比 1:1)洗脱物经制备型高效液相色谱(沃特世 Pre-150B 制备型高效液相色谱仪)分离,采用体积比 85:15 的甲醇-水洗脱,从甲醇-水(体积比 85:15)洗脱部位得到纯的化合物(1)。化合物(1)为白色晶体,经测试纯度达 98%。

#### [0031] 实施例 2 化合物(1)的化学结构测定

结构测定 用 Shimadzu-3100 分光光度计测定紫外光谱,在  $\text{CDCl}_3$  溶液中用 BRUKER 核磁共振波谱仪记录 NMR 光谱,用 Agilent 6210 飞行时间质谱仪测定质谱。

[0032] 化合物(1)的理化性质 本发明化合物(1)为白色晶体,熔点  $183-185^\circ\text{C}$ , UV (EtOH)  $\lambda_{\text{max}} 254\text{nm}$ ; Liebermann-Burchard 反应 阳性;  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500MHz):  $\delta$  1.78(1H, m, H-1),  $\delta$  2.29(1H, m, H-1'),  $\delta$  2.38(1H, m, H-2),  $\delta$  2.80(1H, m, H-2'),  $\delta$  1.54(1H, m, H-5),  $\delta$  2.05(1H, m, H-6),  $\delta$  2.14(1H, m, H-6'),  $\delta$  5.53(1H, d,  $J=6.5\text{Hz}$ , H-7),  $\delta$  5.41(1H, d,  $J=5.5\text{Hz}$ , H-11),  $\delta$  2.10 (1H, m, H-12),  $\delta$  2.29(1H, m, H-12'),  $\delta$  1.42(1H, m, H-15),  $\delta$  1.72(1H, m, H-15'),  $\delta$  1.35(1H, m, H-16),  $\delta$  2.02(1H, m, H-16'),  $\delta$  1.59(1H, m, H-17),  $\delta$  0.61(3H, s, H-18),  $\delta$  1.11(3H, s, H-19),  $\delta$  1.46(1H, m, H-20),  $\delta$  0.95(3H, d,  $J=5.0\text{Hz}$ , H-21),  $\delta$  1.01(1H, m, H-22),  $\delta$  1.54(1H, m, H-22'),  $\delta$  1.57(1H, m, H-23),  $\delta$  1.75(1H, m, H-23'),  $\delta$  4.23(1H, m, H-24),  $\delta$  4.20 (1H, d,  $J=13.0\text{Hz}$ , H-26),  $\delta$  4.35 (1H, d,  $J=13.0\text{Hz}$ , H-26'),  $\delta$  5.13(1H, s, H-27),  $\delta$  5.17(1H, s, H-27'),  $\delta$  0.90(3H, s, H-28),  $\delta$  1.15(3H, s, H-29),  $\delta$  1.22(3H, s, H-30);  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125MHz):  $\delta$  36.63(C-1), 34.86(C-2), 216.94(C-3), 47.49(C-4), 50.31(C-5), 23.68(C-6), 119.94(C-7), 142.85(C-8), 144.52(C-9), 37.21(C-10), 117.27(C-11), 37.82(C-12), 43.76(C-13), 50.73(C-14), 31.46(C-15), 27.86(C-16), 50.85(C-17), 15.72(C-18), 22.47(C-19), 36.13(C-20), 18.55(C-21), 32.08(C-22), 32.41(C-23), 75.58(C-24), 149.62(C-25), 64.00(C-26), 112.89(C-27), 25.37(C-28), 25.44(C-29), 22.06(C-30); ESI-MS :  $m/z$  453.4  $[\text{M-H}]^{-1}$ 。

[0033] 从 HMBC 谱图及 HSQC 谱图数据,并结合上述理化数据,确证本化合物(1)的结构式如下:



#### 实施例 3 化合物(1)抗癌作用的生物学实验及分析

## 1、材料和方法

**细胞系和试剂** 人慢性粒细胞白血病细胞株 K562、人髓系白血病细胞株 HL60、人口腔表皮样癌细胞株 KB、人食管癌细胞株 OE-19 和人结肠癌细胞株 SW620。将这些细胞在含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液中培养,置 37℃,5% 饱和湿度的 CO<sub>2</sub>培养箱中培养。上述的化合物(1)——灵芝三萜化学名为 5 $\alpha$ -lanosta-7,9,25-triene-24 $\alpha$ ,26-dihydroxy-3-one,来自于实施例 1 的制备而获得的。

**[0034] 细胞增殖分析** 取对数生长期的 K562、HL60、KB、OE-19 及 SW620 细胞,根据细胞株不同按一定的密度接种于 96 孔培养板中,每孔 190  $\mu$ l。接种细胞后立即加药。实验组加入不同浓度药物 10  $\mu$ l/孔,细胞对照组加含等量浓度 DMSO 的无血清培养液,空白对照组为 190  $\mu$ l RPMI 1640 加 10  $\mu$ l 无药溶剂,每组 3 个复孔。K562、HL60、KB、OE-19 及 SW620 孵育 48 h 后,加入 5 mg/ml 的 MTT 20  $\mu$ l/孔,37℃孵育 4 h 后离心(2000 rpm,10 分钟),小心吸去上清,加 150  $\mu$ l/孔 DMSO 混匀,各组均于 570 nm 波长处测定各孔的 OD 值,计算细胞生长抑制率,抑制率=(1-药物处理孔平均 OD 值/细胞对照孔平均 OD 值) $\times$ 100%。以药物浓度为横轴,抑制率值为纵轴绘制细胞增殖抑制量效关系曲线。用 Logit 法计算 48 h 时药物浓度的 IC<sub>50</sub>值,实验重复 3 次,取平均值。

## **[0035] 结果**

**肿瘤细胞增殖的抑制作用结果** 上述的化合物(1)灵芝三萜(5 $\alpha$ -lanosta-7,9,25-triene-24 $\alpha$ ,26-dihydroxy-3-one)对 SW620 及 OE-19 细胞增殖有显著的抑制作用,均表现出明显的量效关系(见图 1,图 2)。药物作用于 SW620 和 OE-19 细胞 48 h 的 IC<sub>50</sub>值分别是 3.71  $\mu$ g/ml 和 6.25  $\mu$ g/ml。作用于 K562、HL60 及 KB 细胞 48 h 的 IC<sub>50</sub>值分别是 34.38  $\mu$ g/ml、21.46  $\mu$ g/ml 和 14.04  $\mu$ g/ml。实验结果表明,本发明的化合物具有抗肿瘤活性。

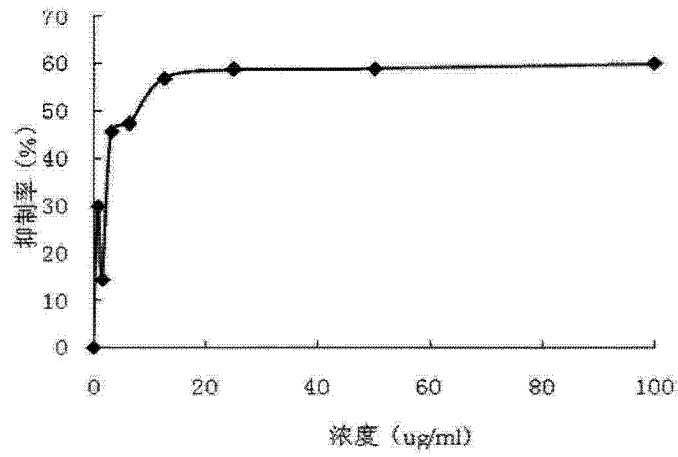


图 1

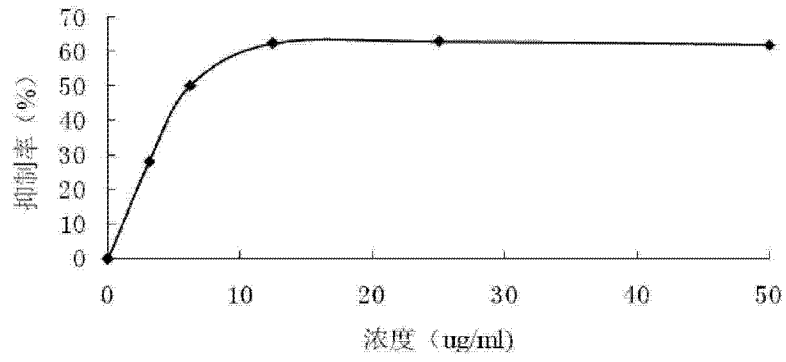


图 2