



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106946903 B

(45)授权公告日 2019.11.22

(21)申请号 201710220869.0

(22)申请日 2017.04.06

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 106946903 A

(43)申请公布日 2017.07.14

(73)专利权人 澳门大学
地址 中国澳门氹仔大学大马路

(72)发明人 林理根 陆金健 冯喆玲 张乐乐
刘倩瑜

(74)专利代理机构 北京金信知识产权代理有限公司 11225

代理人 张皓 李海明

(51)Int.Cl.

C07D 493/06(2006.01)

A61K 31/366(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

(56)对比文件

US 6221899 B1,2001.04.24,

CN 102579428 A,2012.07.18,

WO 2016131426 A1,2016.08.25,

KEITH S. BROWN, JR.等.Distribution and functions of norditerpene dilactones in Podocarpus species.《Biochemical Systematics and Ecology》.1974,第2卷(第1期),第11-14页.

George R. Pettit,等.Antineoplastic Agents. 488. Isolation and Structure of Yukonin from a Yukon Territory Fungus.《J. Nat. Prod.》.2002,第66卷第276-278页.

Hayashi Yuji,等.Antitumor activity of nagilactones.《Gann》.1975,第66卷(第5期),第587-588页.

JOHNNY A. HEMBREE,等.THE CYTOTOXIC NORDITERPENE DILACTONES OF PODOCARPUS MILANJIANUS AND PODOCARPUS SELLOWII.《Phytochemistry》.1979,第18卷第1691-1694页.

XIPING WANG,等.THREE NEW CYTOTOXIC NORDITERPENOID DILACTONES FROM PODOCARPUS PURDIEANUS HOOK..《Natural Product Letters》.1997,第10卷第59-67页.

审查员 张倩

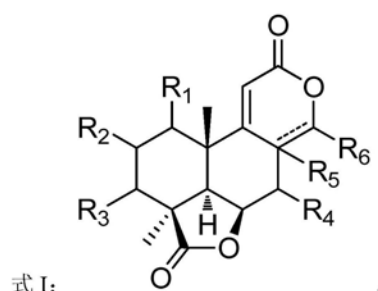
权利要求书1页 说明书11页 附图1页

(54)发明名称

一类降二萜化合物、其提取分离方法及其在制备抗肿瘤药物中的应用

(57)摘要

本发明公开了一种具有式I所示的结构降二萜化合物,或其药学上可接受的盐或酯,其提取分离方法,及其用途。所述的降二萜化合物或其药学上可接受的盐或酯可以用于制备治疗肿瘤的药物,其中,所述肿瘤为肺癌、卵巢癌、肝癌、乳腺癌、胃癌或黑色素瘤。



1. 一种降二萜化合物的提取分离方法,其包括如下步骤:

1) 取竹柏种子为原料,粉碎后用80-95%乙醇回流提取,浓缩提取液至无醇味,加蒸馏水混悬提取物;

2) 依次用石油醚萃取数次、乙酸乙酯萃取数次、正丁醇萃取数次,收集使用乙酸乙酯得到提取物和使用正丁醇得到提取物;

3) 将步骤2) 所得的提取物分别用MCI树脂分离,以0-100%甲醇水梯度洗脱,所得馏分再利用硅胶、ODS和制备液相色谱分离,分别得到竹柏内酯A、竹柏内酯B、竹柏内酯D、竹柏内酯E、竹柏内酯G、1-脱氧-2 β -羟基竹柏内酯A、2-羰基竹柏内酯A、7 β -羟基竹柏内酯D、3-异竹柏内酯D、竹柏内酯K、竹柏内酯L、3 β -羟基竹柏内酯L、2 β -羟基竹柏内酯L、15-羟基-3-异竹柏内酯D、2 α , 3 β , 15-三羟基竹柏内酯L或15-羟基竹柏内酯L。

2. 降二萜化合物或其药学上可接受的盐在制备抗卵巢癌的药物中的用途,

其中,所述降二萜化合物为竹柏内酯A、竹柏内酯B、竹柏内酯D、竹柏内酯E、竹柏内酯G、1-脱氧-2 β -羟基竹柏内酯A、2-羰基竹柏内酯A、7 β -羟基竹柏内酯D、3-异竹柏内酯D、竹柏内酯K、竹柏内酯L、3 β -羟基竹柏内酯L、2 β -羟基竹柏内酯L、15-羟基-3-异竹柏内酯D、2 α , 3 β , 15-三羟基竹柏内酯L或15-羟基竹柏内酯L。

3. 竹柏内酯E或其药学上可接受的盐在制备抗肿瘤的藥物中的用途,所述肿瘤为肺癌、肝癌、乳腺癌、胃癌或黑色素瘤。

一类降二萜化合物、其提取分离方法及其在制备抗肿瘤药物中的应用

技术领域

[0001] 本发明属于制药领域，具体涉及一类具有抗肿瘤活性的降二萜化合物或其药学上可接受的盐或酯，它的提取分离方法，及其在制备抗肿瘤药物中的应用。

背景技术

[0002] 多年来抗肿瘤药物一直是世界药学研究的热点和重点。抗肿瘤化学药物因毒副作用大，临床应用受到很大限制，因此近年来从天然来源原料中寻找新的具有抗肿瘤活性的药物受到人们越来越多的关注。降二萜类化合物广泛存在于罗汉松科植物中，前人的研究发现这类化合物具有一定的抗肿瘤活性，尤其对乳腺癌细胞和卵巢癌细胞具有较好活性。

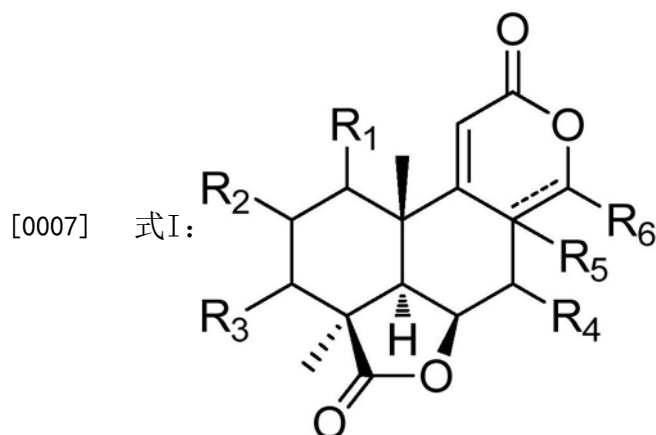
[0003] 竹柏是罗汉松科 (Podocarpaceae) 罗汉松属 (Podocarpus) 植物。罗汉松属包括乔木和灌木共13种3变种，为常绿树种，主要分布在亚洲，中国的广东、广西、云南、台湾省、缅甸、越南、印度等地。罗汉松属植物的根、茎、叶及种子是我国民间药物，可以舒筋活血，治疗腰肌劳损、止血接骨，外伤骨折、刀伤、枪伤，也用于治疗精神疾病，狐臭、眼疾，感冒等，鲜树皮或根适量，水煎熏洗患处，治风湿性关节炎。本属植物所含化学成分主要是黄酮、二萜和倍半萜。

[0004] 竹柏 (Podocarpus nagi) 别称椰树、罗汉柴、楞树、山杉、糖鸡子、船家树、宝芳、铁甲树、猪肝树、大果竹柏，高达20米，叶对生，革质，有多数并列的细脉，无中脉，种子圆球形，花期3-4月，种子10月成熟，在中国浙江、福建、江西、湖南、广东、广西、四川等地区均有分布。本发明从竹柏种子中分离得到了一类降二萜化合物，并首次发现该类化合物具有很好的抗肿瘤活性。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一类抗肿瘤活性化合物，以及提供所述化合物的提取分离方法，及其在制备抗肿瘤药物中的用途。

[0006] 根据本发明的一个方面，提供了一类具有式I所示的结构降二萜化合物，或其药学上可接受的盐或酯：



[0008] 其中, R_1 至 R_5 各自独立地为氢原子, 羟基或者被保护基保护的羟基, 或者 R_1 至 R_5 中的任意相邻的两个基团与连接它们的碳原子还可以一起形成环氧乙烷环, R_6 为异丙基、乙基、1-羟基乙基、2-羟基异丙基或者被保护基保护的羟基, --- 表示单键或双键, 当 --- 表示双键时, R_5 不存在。

[0009] 优选地, 所述保护基为烷基硅基、烷基(芳基)硅基、芳基硅基、芳基、四氢吡喃基、烷基、酰基或芳基酰基, 其包括但不限于, 三甲基硅基、三乙基硅基、三异丙基硅基、异丙基二甲基硅基、叔丁基二甲基硅基、叔丁基二苯基硅基、三苯基硅基、苄基、甲基、乙基、甲酰基、乙酰基、丙酰基或苯甲酰基等。

[0010] 所述降二萜化合物包括竹柏内酯A (nagilactone A)、竹柏内酯B (nagilactone B)、竹柏内酯D (nagilactone D)、竹柏内酯E (nagilactone E)、竹柏内酯G (nagilactone G)、1-脱氧-2 β -羟基竹柏内酯A (1-deoxy-2 β -hydroxy-nagilactone A)、2-羰基竹柏内酯A (2-oxo-nagilactone A)、7 β -羟基竹柏内酯D (7 β -hydroxy-nagilactone D)、3-异竹柏内酯D (3-epi-nagilactone D)、竹柏内酯K (nagilactone K)、竹柏内酯L (nagilactone L)、3 β -羟基竹柏内酯L (3 β -hydroxy-nagilactone L)、2 β -羟基竹柏内酯L (2 β -hydroxy-nagilactone L)、15-羟基-3-异竹柏内酯D (15-hydroxy-3-epi-nagilactone D)、2 α , 3 β , 15-三羟基竹柏内酯L (2 α , 3 β , 15-trihydroxy-nagilactone L) 和15-羟基竹柏内酯L (15-hydroxy-nagilactone L), 优选竹柏内酯E。

[0011] 当 R_1 和 R_4 为 β 羟基, R_2 和 R_3 为氢, --- 为双键, R_6 为异丙基时, 式I表示的化合物为 (1R, 3aS, 3a¹R, 5aS, 6R, 10bS) -1, 6-二羟基-7-异丙基-3a, 10b-二甲基-1, 3, 3a, 5a, 6, 10b-六氢异苯并呋喃并[7, 1-fg]异色烯-4, 9 (2H, 3a¹H) -二酮 (竹柏内酯A, nagilactone A, (1R, 3aS, 3a¹R, 5aS, 6R, 10bS) -1, 6-dihydroxy-7-isopropyl-3a, 10b-dimethyl-1, 3, 3a, 5a, 6, 10b-hexahydroisobenzofuro[7, 1-fg]isochromene-4, 9 (2H, 3a¹H) -dione)。

[0012] 当 R_1 、 R_2 和 R_4 为 β 羟基, R_3 为氢, --- 为双键, R_6 为异丙基, 式I表示的化合物为 (1S, 2R, 3aS, 3a¹R, 5aS, 6R, 10bS) -1, 2, 6-三羟基-7-异丙基-3a, 10b-二甲基-1, 3, 3a, 5a, 6, 10b-六氢异苯并呋喃并[7, 1-fg]异色烯-4, 9 (2H, 3a¹H) -二酮 (竹柏内酯B, nagilactone B, (1S, 2R, 3aS, 3a¹R, 5aS, 6R, 10bS) -1, 2, 6-trihydroxy-7-isopropyl-3a, 10b-dimethyl-1, 3, 3a, 5a, 6, 10b-hexahydroisobenzofuro[7, 1-fg]isochromene-4, 9 (2H, 3a¹H) -dione)。

[0013] 当 R_1 和 R_2 形成 β 环氧, R_3 为 β 羟基, R_4 为氢, --- 为双键, R_6 为乙基, 式I表示的化合物为 (1aR, 2R, 2aR, 2a¹R, 4aR, 9bS, 9cS) -6-乙基-2-羟基-2a, 9b-二甲基-2, 2a, 4a, 5, 9b, 9c-六氢环氧乙烷[2', 3':5, 6]异苯并呋喃并[7, 1-fg]异色烯-3, 8 (1aH, 2a¹H) -二酮 (竹柏内酯D, nagilactone D, (1aR, 2R, 2aR, 2a¹R, 4aR, 9bS, 9cS) -6-ethyl-2-hydroxy-2a, 9b-dimethyl-2, 2a, 4a, 5, 9b, 9c-hexahydrooxireno[2', 3':5, 6]isobenzofuro[7, 1-fg]isochromene-3, 8 (1aH, 2a¹H) -dione)。

[0014] 当 R_1 和 R_2 为氢, R_3 为 β 羟基, R_4 和 R_5 形成 α 环氧, --- 为单键, R_6 为 α 异丙基, 式I表示的化合物为 (1aR, 2R, 5bS, 5b¹R, 8S, 8aR, 10aS, 10bR) -8-羟基-2-异丙基-5b, 8a-二甲基-6, 7, 8, 8a, 10a, 10b-六氢-2H-异苯并呋喃并[7, 1-fg]环氧乙烷并[2, 3-i]异色烯-4, 9 (5bH, 5b¹H) -二酮 (竹柏内酯E, nagilactone E, (1aR, 2R, 5bS, 5b¹R, 8S, 8aR, 10aS, 10bR) -8-hydroxy-2-isopropyl-5b, 8a-dimethyl-6, 7, 8, 8a, 10a, 10b-hexahydro-2H-isobenzofuro[7, 1-fg]oxireno[2, 3-i]isochromene-4, 9 (5bH, 5b¹H) -dione)。

[0015] 当 R_1 、 R_2 和 R_3 为氢, R_4 和 R_5 形成 α 环氧,----为单键, R_6 为 α 异丙基,式I表示的化合物为(1aR,2R,5bS,5b¹R,8aS,10aS,10bR)-2-异丙基-5b,8a-二甲基-6,7,8,8a,10a,10b-六氢-2H-异苯并呋喃并[7,1-fg]环氧乙烷并[2,3-i]异色烯-4,9(5bH,5b¹H)-二酮(竹柏内酯G, nagilactone G, (1aR,2R,5bS,5b¹R,8aS,10aS,10bR)-2-isopropyl-5b,8a-dimethyl-6,7,8,8a,10a,10b-h exahydro-2H-isobenzofuro[7,1-fg]oxireno[2,3-i]isochromene-4,9(5bH,5b¹H)-dione)。

[0016] 当 R_2 和 R_4 为 β 羟基, R_1 和 R_3 为氢,----为双键, R_6 为异丙基时,式I表示的化合物为(2S,3aS,3aR,5aS,6R,10bS)-2,6-二羟基-7-异丙基-3a,10b-二甲基-1,3,3a,5a,6,10b-六氢异苯并呋喃并[7,1-fg]异色烯-4,9(2H,3a¹H)-二酮(1-脱氧-2 β 羟基竹柏内酯A,1-deoxy-2 β -hydroxy-nagilactone A, (2S,3aS,3aR,5aS,6R,10bS)-2,6-dihydroxy-7-isopropyl-3a,10b-dimethyl-1,3,3a,5a,6,10b-hexahydroisobenzofuro[7,1-fg]isochromene-4,9(2H,3a¹H)-dione)。

[0017] 当 R_1 和 R_4 为 β 羟基, R_2 为羰基, R_3 为氢,----为双键, R_6 为异丙基时,式I表示的化合物为(1S,3aS,5aS,6R,10bS)-1,6-二羟基-7-异丙基-3a,10b-二甲基-1,3,3a,5a,6,10b-六氢异苯并呋喃并[7,1-fg]异色烯-2,4,9(3a¹H)-三酮(2-羰基竹柏内酯A,2-oxo-nagilactone A, (1S,3aS,5aS,6R,10bS)-1,6-dihydroxy-7-isopropyl-3a,10b-dimethyl-1,3,3a,5a,6,10b-hexahydroisobenzofuro[7,1-fg]isochromene-2,4,9(3a¹H)-trione)。

[0018] 当 R_1 和 R_2 形成 β 环氧, R_3 和 R_4 为 β 羟基,----为双键, R_6 为乙基,式I表示的化合物为(1aR,2R,2aR,4aS,5R,9bS,9cS)-6-乙基-2,5-二羟基-2a,9b-二甲基-2,2a,4a,5,9b,9c-六氢环氧乙烷[2',3':5,6]异苯并呋喃并[7,1-fg]异色烯-3,8(1aH,2a¹H)-二酮(7 β -羟基竹柏内酯D,7 β -hydroxy-nagilactone D, (1aR,2R,2aR,4aS,5R,9bS,9cS)-6-ethyl-2,5-dihydroxy-2a,9b-dimethyl-2,2a,4a,5,9b,9c-hexahydrooxireno[2',3':5,6]isobenzofuro[7,1-fg]isochromene-3,8(1aH,2a¹H)-dione)。

[0019] 当 R_1 和 R_2 形成 β 环氧, R_3 为 α 羟基, R_4 为氢,----为双键, R_6 为乙基,式I表示的化合物为(1aR,2S,2aR,4aR,9bS,9cS)-6-乙基-2-羟基-2a,9b-二甲基-2,2a,4a,5,9b,9c-六氢环氧乙烷[2',3':5,6]异苯并呋喃并[7,1-fg]异色烯-3,8(1aH,2a¹H)-二酮(3-异竹柏内酯D,3-epi-nagilactone D, (1aR,2S,2aR,4aR,9bS,9cS)-6-ethyl-2-hydroxy-2a,9b-dimethyl-2,2a,4a,5,9b,9c-hexahydrooxireno[2',3':5,6]isobenzofuro[7,1-fg]isochromene-3,8(1aH,2a¹H)-dione)。

[0020] 当 R_1 为 α 羟基, R_2 和 R_3 为 β 羟基, R_4 为氢,----为双键, R_6 为乙基,式I表示的化合物为(1R,2S,3R,3aR,5aR,10bS)-7-乙基-1,2,3-三羟基-3a,10b-二甲基-1,3,3a,5a,6,10b-六氢异苯并呋喃并[7,1-fg]异色烯-4,9(2H,3a¹H)-二酮(竹柏内酯K,nagilactone K, (1R,2S,3R,3aR,5aR,10bS)-7-ethyl-1,2,3-trihydroxy-3a,10b-dimethyl-1,3,3a,5a,6,10b-hexahydroisobenzofuro[7,1-fg]isochromene-4,9(2H,3a¹H)-dione)。

[0021] 当 R_1 为 β 羟基, R_2 、 R_3 和 R_4 为氢,----为双键, R_6 为乙基,式I表示的化合物为(1R,3aS,5aR,10bS)-7-乙基-1-羟基-3a,10b-二甲基-1,3,3a,5a,6,10b-六氢异苯并呋喃并[7,1-fg]异色烯-4,9(2H,3a¹H)-二酮(竹柏内酯L,nagilactone L, (1R,3aS,5aR,10bS)-7-ethyl-1-hydroxy-3a,10b-dimethyl-1,3,3a,5a,6,10b-hexahydroisobenzofuro[7,1-fg]isochromene-4,9(2H,3a¹H)-dione)。

[0022] 当R₁和R₃为β羟基,R₂和R₄为氢,====为双键,R₆为乙基,式I表示的化合物为(1R,3S,3aR,5aR,10bS)-7-乙基-1,3-二羟基-3a,10b-二甲基-1,3,3a,5a,6,10b-六氢异苯并呋喃并[7,1-fg]异色烯-4,9(2H,3a¹H)-二酮(3β-羟基竹柏内酯L,3β-hydroxy-nagilactone L,(1R,3S,3aR,5aR,10bS)-7-ethyl-1,3-dihydroxy-3a,10b-dimethyl-1,3,3a,5a,6,10b-hexahydroisobenzofuro[7,1-fg]isochromene-4,9(2H,3a¹H)-dione)。

[0023] 当R₁和R₂为β羟基,R₃和R₄为氢,====为双键,R₆为乙基,式I表示的化合物为(1S,2R,3aS,5aR,10bS)-7-乙基-1,2-二羟基-3a,10b-二甲基-1,3,3a,5a,6,10b-六氢异苯并呋喃并[7,1-fg]异色烯-4,9(2H,3a¹H)-二酮(2β-羟基竹柏内酯L,2β-hydroxy-nagilactone L,(1S,2R,3aS,5aR,10bS)-7-ethyl-1,2-dihydroxy-3a,10b-dimethyl-1,3,3a,5a,6,10b-hexahydroisobenzofuro[7,1-fg]isochromene-4,9(2H,3a¹H)-dione)。

[0024] 当R₁和R₂形成β环氧,R₃为α羟基,R₄为氢,====为双键,R₆为1-羟基乙基,式I表示的化合物为(1aR,2S,2aR,4aR,9bS,9cS)-2-羟基-6-(1-羟基乙基)-2a,9b-二甲基-2,2a,4a,5,9b,9c-六氢环氧乙烷[2',3':5,6]异苯并呋喃并[7,1-fg]异色烯-3,8(1aH,2a¹H)-二酮(15-羟基-3-异竹柏内酯D,15-hydroxy-3-epi-nagilactone D,(1aR,2S,2aR,4aR,9bS,9cS)-2-hydroxy-6-(1-hydroxyethyl)-2a,9b-dimethyl-2,2a,4a,5,9b,9c-hexahydrooxireno[2',3':5,6]isobenzofuro[7,1-fg]isochromene-3,8(1aH,2a¹H)-dione)。

[0025] 当R₁和R₃为β羟基,R₂为α羟基,R₄为氢,====为双键,R₆为1-羟基乙基,式I表示的化合物为(1S,2R,3R,3aR,5aR,10bS)-1,2,3-三羟基-7-(1-羟基乙基)-3a,10b-二甲基-1,3,3a,5a,6,10b-六氢异苯并呋喃并[7,1-fg]异色烯-4,9(2H,3a¹H)-二酮(2α,3β,15-三羟基竹柏内酯L,2α,3β,15-trihydroxy-nagilactone L,(1S,2R,3R,3aR,5aR,10bS)-1,2,3-trihydroxy-7-(1-hydroxyethyl)-3a,10b-dimethyl-1,3,3a,5a,6,10b-hexahydroisobenzofuro[7,1-fg]isochromene-4,9(2H,3a¹H)-dione)。

[0026] 当R₁为β羟基,R₂、R₃和R₄为氢,====为双键,R₆为1-羟基乙基,式I表示的化合物为(1R,3aS,5aR,10bS)-1-羟基-7-(1-羟基乙基)-3a,10b-二甲基-1,3,3a,5a,6,10b-六氢异苯并呋喃并[7,1-fg]异色烯-4,9(2H,3a¹H)-二酮(15-羟基竹柏内酯L,15-hydroxy-nagilactone L,(1R,3aS,5aR,10bS)-1-hydroxy-7-(1-hydroxyethyl)-3a,10b-dimethyl-1,3,3a,5a,6,10b-hexahydroisobenzofuro[7,1-fg]isochromene-4,9(2H,3a¹H)-dione)。

[0027] 根据本发明的另一方面,还提供了所述降二萜化合物的提取分离方法,其包括如下步骤:

[0028] 1) 取竹柏(*Podocarpus nagi*)种子为原料,粉碎后用80-95%乙醇回流提取,浓缩提取液至无醇味,加蒸馏水混悬提取物;

[0029] 2) 依次用石油醚萃取数次(优选3至5次)、乙酸乙酯萃取数次(优选3至5次)、正丁醇萃取数次(优选3至5次),收集使用乙酸乙酯得到提取物和使用正丁醇得到提取物;

[0030] 3) 将步骤2)所得的提取物分别用MCI树脂分离,以0-100%甲醇水梯度洗脱,所得馏分再利用硅胶、ODS和制备液相色谱分离,分别得到竹柏内酯A、竹柏内酯B、竹柏内酯D、竹柏内酯E、竹柏内酯G、1-脱氧-2β-羟基竹柏内酯A、2-羰基竹柏内酯A、7β-羟基竹柏内酯D、3-异竹柏内酯D、竹柏内酯K、竹柏内酯L、3β-羟基竹柏内酯L、2β-羟基竹柏内酯L、15-羟基-3-异竹柏内酯D、2α,3β,15-三羟基竹柏内酯L和15-羟基竹柏内酯L;

[0031] 优选地,步骤3)按如下进行:将使用乙酸乙酯萃取得到的提取物和使用正丁醇萃取得到的提取物分别用MCI树脂分离,以0-100%甲醇水梯度洗脱,在20%甲醇部位,以及40%甲醇部位分别析出晶体,鉴定为竹柏内酯B以及竹柏内酯D,将10%到40%甲醇洗脱段合并经过硅胶柱层析,流动相为石油醚丙酮洗脱,重结晶得到化合物竹柏内酯A,将硅胶柱层析石油醚丙酮5:1洗脱段合并并经过ODS柱层析,将60%甲醇洗脱段合并并经过制备高效液相65%乙腈洗脱得到化合物1-脱氧-2 β -羟基竹柏内酯A、2-羰基竹柏内酯A和15-羟基竹柏内酯L。将硅胶柱层析石油醚丙酮2:1洗脱段合并并经过凝胶柱层析氯仿甲醇1:1洗脱,再经过制备高效液相20%乙腈洗脱得到化合物3-异竹柏内酯D和15-羟基-3-异竹柏内酯D,将70%甲醇洗脱段经过硅胶柱层析,流动相氯仿甲醇19:1洗脱后析出晶体得到化合物竹柏内酯E和竹柏内酯G。

[0032] 将正丁醇段提取物经过MCI柱层析,甲醇水比例19:1到1:19进行洗脱,将15:1洗脱段合并并经过ODS柱层析,甲醇水比例19:1到1:19进行洗脱,将15:1洗脱段合并并经过制备高效液相65%乙腈洗脱得到化合物2-羰基竹柏内酯A,将MCI柱层析10:1洗脱段合并并经过硅胶柱层析甲醇水60:1到5:1进行洗脱,将15:1洗脱段合并并经过高效制备液相45%乙腈进行洗脱得到化合物3 β -羟基竹柏内酯L、2 α , 3 β , 15-三羟基竹柏内酯L和15-羟基竹柏内酯L。将MCI甲醇水10:1洗脱段合并并经过ODS柱层析,甲醇水19:1到1:19进行洗脱,将19:1洗脱段合并并经过硅胶柱层析,氯仿甲醇40:1到5:1进行洗脱,收集20:1洗脱段合并并经过高效制备液相5%乙腈洗脱得到化合物7 β -羟基竹柏内酯D、竹柏内酯K、竹柏内酯L和2 β -羟基竹柏内酯L。

[0033] 根据本发明的再一方面,还提供了所述的降二萜化合物,特别涉及竹柏内酯A、竹柏内酯B、竹柏内酯D、竹柏内酯E、竹柏内酯G、1-脱氧-2 β -羟基竹柏内酯A、2-羰基竹柏内酯A、7 β -羟基竹柏内酯D、3-异竹柏内酯D、竹柏内酯K、竹柏内酯L、3 β -羟基竹柏内酯L、2 β -羟基竹柏内酯L、15-羟基-3-异竹柏内酯D、2 α , 3 β , 15-三羟基竹柏内酯L和15-羟基竹柏内酯L,在制备抗肿瘤的藥物中的用途。

[0034] 所述肿瘤可以为肺癌、卵巢癌、肝癌、乳腺癌、胃癌或黑色素瘤等,但不限于此。

[0035] 本发明应用现代药理筛选方法,对药用植物中的抗肿瘤活性物质进行研究,从罗汉松科罗汉松属植物竹柏种子的乙酸乙酯和正丁醇部位分离降二萜化合物,并通过体外细胞模型筛选,证实所述化合物具有很强的抗肿瘤活性。

[0036] 本发明进一步涉及式I所述的化合物经过体外抗肿瘤活性筛选实验,结果证实这类化合物对人肺癌(A549)、卵巢癌(A2780)、肝癌(HepG2)、乳腺癌(MCF-7)、胃癌(SGC7901)和黑色素瘤(A375)细胞具有显著的生长抑制作用。其中,竹柏内酯E活性最显著,对A549, A2780, HepG2, MCF-7, SGC7901和A375细胞的IC₅₀值分别为1.89, 1.07, 1.12, 6.58, 3.65和1.71 μ M。

[0037] 本发明所述的降二萜化合物,或其药学上可接受的盐或酯,可以作为活性成分,进一步制成治疗肿瘤疾病的药物。

[0038] 根据本发明的另一方面,提供了一种药物组合物,其包含治疗有效量的一种或多种选自所述的降二萜化合物或其药学上可接受的盐或酯和药学上可接受的辅料。

[0039] 药用辅料的选择因施用途和作用特点而异,通常是填充剂、稀释剂、粘合剂、润湿剂、崩解剂、润滑剂、乳化剂或助悬剂等。本发明降二萜化合物或其药学上可接受的盐或

酯在上述组合物中的所占的比例为总重量的0.1%~99.9%，优选1%~99%。

附图说明

[0040] 图1为显示不同浓度的竹柏内酯E对人肺癌A549, 卵巢癌A2780, 肝癌HepG2, 乳腺癌MCF-7, 胃癌SGC7901和黑色素瘤A375细胞的抑制率的图;

[0041] 图2为显示竹柏内酯E化合物体外能够引起人肺癌A549细胞周期阻滞于G2期, 且长时间的处理引起细胞凋亡的图, 其中, A: A549细胞以不同浓度竹柏内酯E处理24小时后, 流式细胞术检测细胞周期分布; B: A549细胞以诺考达唑预处理12小时, PBS洗后以竹柏内酯E继续处理12小时, 流式细胞术检测细胞周期分布; C: A549细胞以不同浓度竹柏内酯E处理48小时后, Annexin V/PI双染检测细胞凋亡并统计。

具体实施方式

[0042] 下面所列实施例有助于本领域技术人员更好的理解本发明, 但不以任何方式限制本发明。

[0043] 实施例1

[0044] 竹柏内酯A、竹柏内酯B、竹柏内酯D、竹柏内酯E、竹柏内酯G、1-脱氧-2β-羟基竹柏内酯A、2-羰基竹柏内酯A、7β-羟基竹柏内酯D、3-异竹柏内酯D、竹柏内酯K、竹柏内酯L、3β-羟基竹柏内酯L、2β-羟基竹柏内酯L、15-羟基-3-异竹柏内酯D、2α, 3β, 15-三羟基竹柏内酯L和15-羟基竹柏内酯L的分离提取

[0045] 以药用植物竹柏(*Podocarpus nagi*)的种子15kg为原料, 粉碎后用40L80-95%乙醇回流提取三次, 浓缩提取液, 用蒸馏水混悬提取物, 依次用石油醚萃取三次、乙酸乙酯萃取三次、正丁醇萃取三次, 收集使用乙酸乙酯得到的提取物138.7g, 和使用正丁醇得到的提取物265.1g, 将使用乙酸乙酯萃取得到的提取物和使用正丁醇萃取得到的提取物分别用MCI树脂分离, 以0-100%甲醇水梯度洗脱, 在20%甲醇部位, 以及40%甲醇部位分别析出晶体, 鉴定为竹柏内酯B以及竹柏内酯D, 将10%到40%甲醇洗脱段合并经过硅胶柱层析, 流动相为石油醚丙酮洗脱, 重结晶得到化合物竹柏内酯A, 将硅胶柱层析石油醚丙酮5:1洗脱段合并并经过ODS柱层析, 将60%甲醇洗脱段合并经过制备高效液相65%乙腈洗脱得到化合物1-脱氧-2β-羟基竹柏内酯A、2-羰基竹柏内酯A和15-羟基竹柏内酯L。将硅胶柱层析石油醚丙酮2:1洗脱段合并并经过凝胶柱层析氯仿甲醇1:1洗脱, 再经过制备高效液相20%乙腈洗脱得到化合物3-异竹柏内酯D和15-羟基-3-异竹柏内酯D, 将70%甲醇洗脱段经过硅胶柱层析, 流动相氯仿甲醇19:1洗脱后析出晶体得到化合物竹柏内酯E和竹柏内酯G。

[0046] 将正丁醇段提取物经过MCI柱层析, 甲醇水比例19:1到1:19进行洗脱, 将15:1洗脱段合并并经过ODS柱层析, 甲醇水比例19:1到1:19进行洗脱, 将15:1洗脱段合并并经过制备高效液相65%乙腈洗脱得到化合物2-羰基竹柏内酯A, 将MCI柱层析10:1洗脱段合并并经过硅胶柱层析甲醇水60:1到5:1进行洗脱, 将15:1洗脱段合并并经过高效制备液相45%乙腈进行洗脱得到化合物3β-羟基竹柏内酯L、2α, 3β, 15-三羟基竹柏内酯L和15-羟基竹柏内酯L。将MCI甲醇水10:1洗脱段合并并经过ODS柱层析, 甲醇水19:1到1:19进行洗脱, 将19:1洗脱段合并并经过硅胶柱层析, 氯仿甲醇40:1到5:1进行洗脱, 收集20:1洗脱段合并并经过高效制备液相5%乙腈洗脱得到化合物7β-羟基竹柏内酯D、竹柏内酯K、竹柏内酯L和2β-羟基

竹柏内酯L。

[0047] 竹柏内酯A:丙酮中结晶,无色针状晶体,mp 305℃。MF:C₁₉H₂₄O₆,ESI-MS:m/z 348[M+H]⁺,¹H NMR (600MHz,DMSO) δ3.82 (dd,J=11.7,6.1Hz,1H,H-1),1.54 (m,1H,H-2α),2.10 (m,1H,H-2β),1.42 (m,1H,H-3α),1.79 (dt,J=13.6,6.9Hz,1H,H-3β),1.83 (dd,J=14.2,6.0Hz,1H,H-5),5.01 (dt,J=17.7,8.8Hz,1H,H-6),5.18 (dd,J=8.8,4.4Hz,1H,H-7),6.52 (s,1H,H-11),3.24 (m,1H,H-15),1.18 (m,6H,Me-20,Me-16),1.15 (d,3H,J=6.8Hz,Me-17),1.27 (m,3H,Me-18);¹³C NMR (125MHz,DMSO):59.3 (C-1),39.1 (C-2),40.0 (C-3),42.8 (C-4),29.2 (C-5),74.1 (C-6),28.8 (C-7),106.6 (C-8),166.2 (C-9),27.4 (C-10),111.9 (C-11),162.1 (C-12),169.1 (C-14),24.2 (C-15),15.5 (C-16),27.4 (C-17),25.6 (C-18),181.1 (C-19),20.5 (C-20)。

[0048] 竹柏内酯B:丙酮中结晶,白色针状晶体,mp 320℃。MF:C₁₉H₂₄O₇.EI-MS:m/z 364 (M⁺),347 (M⁺-OH),346 (M⁺-H₂O)。¹H NMR (600MHz,C₅D₅N) δ4.32 (d,J=6.1Hz,1H,H-1),4.28 (ddd,J=4.6,6.1,13.1Hz,1H,H-2),2.10 (dd,J=13.1,4.5Hz,1H,H-3α),2.74 (dd,J=13.1,13.1Hz,1H,H-3β),1.89 (d,J=6.6Hz,1H,H-5),5.16 (dd,J=6.6,8.4Hz,1H,H-6),5.64 (d,J=8.4Hz,1H,H-7),7.01 (s,1H,H-11),3.47 (m,J=6.7Hz,1H,H-15),1.27,1.24 (d,J=6.8Hz,6H,Me-16,Me-17),2.01 (s,3H,Me-18),1.45 (s,3H,Me-20)。

[0049] 竹柏内酯D:丙酮中结晶,无色针状晶体,mp 265-266℃。MF:C₁₈H₂₀O₆.ESI-MS:m/z 333[M+H]⁺,355[M+Na]⁺,687[2M+Na]⁺。¹H NMR (400MHz,CDCl₃) δ3.63 (d,J=4.3Hz,1H,H-1),3.48 (dd,J=4.3,6.7Hz,1H,H-2),4.48 (d,J=6.7Hz,1H,H-3),1.91 (d,J=6.5Hz,1H,H-5),5.0 (m,H-6),3.46 (dd,J=10.4,16.4Hz,1H,H-7α),2.80 (dd,J=7.1,16.4Hz,1H,H-7β),6.35 (s,1H,H-11),2.64 (q,J=7.5Hz,1H,H-15),1.18 (t,J=7.5Hz,3H,Me-16),1.43 (s,3H,Me-18),1.26 (s,3H,Me-20)。¹³C NMR (100MHz,CDCl₃):57.1 (C-1),50.5 (C-2),67.5 (C-3),48.6 (C-4),50.5 (C-5),73.2 (C-6),25.5 (C-7),106.7 (C-8),163.6 (C-9),37.6 (C-10),106.2 (C-11),161.9 (C-12),162.9 (C-14),24.6 (C-15),11.7 (C-16),25.8 (C-18),178.2 (C-19),17.5 (C-20)。

[0050] 竹柏内酯E:丙酮中结晶,无色针状晶体,mp 295℃。MF:C₁₉H₂₄O₆.EI-MS:m/z 348 (M⁺)。¹H NMR (600MHz,DMSO) δ3.50 (m,1H,H-3),1.82 (d,J=4.6Hz,1H,H-5),15.00 (dd,J=4.1,1.3Hz,1H,H-6),4.20 (d,J=1.3Hz,1H,H-7),5.96 (s,H-11),4.63 (d,J=2.9Hz,1H,H-14),1.97 (m,H-15),0.97 (d,J=6.8Hz,3H,Me-16),0.94 (d,J=6.7Hz,3H,Me-17),1.32 (s,3H,Me-18),1.07 (s,3H,Me-20)。¹³C NMR (125MHz,DMSO) 36.1 (C-1),44.8 (C-2),71.3 (C-3),44.2 (C-4),28.8 (C-5),71.7 (C-6),53.5 (C-7),58.3 (C-8),159.0 (C-9),27.8 (C-10),116.2 (C-11),163.8 (C-12),82.1 (C-14),25.9 (C-15),16.3 (C-16),23.7 (C-17),21.3 (C-18),178.5 (C-19),21.1 (C-20)。

[0051] 竹柏内酯G:丙酮中结晶,无色针状晶体,mp 296-298℃。MF:C₁₉H₂₄O₅ESI-MS:m/z 333[M+H]⁺,355[M+Na]⁺,687[2M+Na]⁺。¹H NMR (400MHz,CDCl₃) 1.85 (d,J=5Hz,1H,H-5),4.91 (dd,J=2.6,5.9Hz,1H,H-6),3.95 (d,J=2.6Hz,1H,H-7),4.40 (d,J=5.1Hz,1H,H-14),δ 5.95 (s,1H,H-11),1.10 (d,J=7Hz,6H,Me-16,Me-17),1.28 (s,3H,Me-18),1.15 (s,3H,Me-20);¹³C NMR (100Hz,CDCl₃) 29.7 (C-1),17.5 (C-2),26.8 (C-3),41.9 (C-4),43.8 (C-5),72.4 (C-6),53.7 (C-7),58.1 (C-8),159.0 (C-9),36.0 (C-10),117.0 (C-11),163.5 (C-12),82.9

(C-14), 28.4 (C-15), 16.4 (C-16), 21.3 (C-17), 25.1 (C-18), 180.0 (C-19), 24.1 (C-20).

[0052] 1-脱氧-2β-羟基竹柏内酯A:白色无定型粉末。MF: C₁₉H₂₄O₆, ESI-MS: m/z 719 [2M+Na]⁺, ¹H NMR (600MHz, DMSO) δ 2.22 (dd, J=13.4, 9.2Hz, 1H, H-1α), 1.53 (dd, J=13.4, 6.6Hz, 1H, H-1β), 3.89 (m, 1H, H-2α), 1.66 (dd, J=13.4, 5.1Hz, 1H, H-3α), 1.95 (t, J=13.0Hz, 1H, H-3β), 1.89 (d, J=6.4Hz, 1H, H-5), 5.00 (dd, J=8.7, 6.4Hz, 1H, H-6), 5.20 (dd, J=8.7, 6.4Hz, 1H, H-7α), 5.89 (s, 1H, H-11), 3.26 (m, 1H, H-15), 1.16 (d, J=6.8Hz, 3H, Me-16), 1.19 (d, J=6.8Hz, 3H, Me-17), 1.28 (s, 3H, Me-18), 1.35 (s, 3H, Me-20). ¹³C NMR (125MHz, DMSO) 37.0 (C-1), 63.3 (C-2), 42.6 (C-3), 42.9 (C-4), 47.5 (C-5), 74.4 (C-6), 59.1 (C-7), 111.8 (C-8), 167.2 (C-9), 37.0 (C-10), 105.7 (C-11), 161.8 (C-12), 169.4 (C-14), 28.8 (C-15), 20.7 (C-16), 20.6 (C-17), 24.0 (C-18), 181.9 (C-19), 27.2 (C-20).

[0053] 2-羰基竹柏内酯A:白色无定型粉末。MF: C₁₉H₂₂O₇. ESI-MS: m/z 385 [M+Na]⁺. ¹H NMR (600MHz, DMSO), 4.45 (d, J=4.4Hz, 1H, H-1α), 2.61 (d, J=18.6Hz, 1H, H-3α), 2.95 (d, J=18.6Hz, 1H, H-3β), 2.55 (d, J=5.8Hz, 1H, H-5), 5.16 (dd, J=8.7, 5.8Hz, 1H, H-6), 5.24 (dd, J=4.4, 8.7Hz, 1H, H-7α), 6.80 (s, 1H, H-11), 3.26 (q, J=6.8Hz, 1H, H-15), 1.20 (d, J=7.1Hz, 3H, Me-16), 1.18 (d, J=7.1Hz, 3H, Me-17), 1.36 (s, 3H, Me-18), 1.14 (s, 3H, Me-20). ¹³C NMR (125MHz, DMSO), 78.7 (C-1), 207.7 (C-2), 42.6 (C-3), 243.3 (C-4), 49.5 (C-5), 74.0 (C-6), 59.2 (C-7), 111.6 (C-8), 162.9 (C-9), 42.5 (C-10), 108.0 (C-11), 161.7 (C-12), 169.3 (C-14), 28.9 (C-15), 20.7 (C-16), 20.5 (C-17), 25.2 (C-18), 180.0 (C-19), 15.4 (C-20).

[0054] 7β-羟基竹柏内酯D:白色无定型粉末。MF: C₁₈H₂₀O₇. ESI-MS: m/z 347 [M-H]⁻. ¹H NMR (600MHz, DMSO) 3.57 (d, J=4.3Hz, 1H, H-1α), 3.38 (m, 1H, H-2α), 4.23 (dd, J=6.0, 4.9Hz, 1H, H-3α), 2.04 (d, J=5.2Hz, 1H, H-5), 4.88 (dd, J=8.5, 5.2Hz, 1H, H-6), 5.16 (dd, J=8.5, 4.1Hz, 1H, H-6), 6.29 (s, 1H, H-11), 2.65 (q, J=7.5Hz, 1H, H-15), 1.19 (t, J=7.5Hz, 3H, Me-16), 1.19 (s, 3H, Me-18), 1.34 (s, 3H, Me-20). ¹³C NMR (125MHz, DMSO), 57.3 (C-1), 51.1 (C-2), 66.8 (C-3), 49.4 (C-4), 50.4 (C-5), 72.6 (C-6), 59.5 (C-7), 112.7 (C-8), 165.3 (C-9), 37.3 (C-10), 106.3 (C-11), 161.7 (C-12), 167.4 (C-14), 24.0 (C-15), 12.4 (C-16), 26.0 (C-18), 177.2 (C-19), 18.7 (C-20).

[0055] 3-异竹柏内酯D:白色无定型粉末。MF: C₁₈H₂₀O₆. ESI-MS: m/z 333 [M+H]⁺. ¹H NMR (600MHz, DMSO) 3.64 (d, J=4.7Hz, 1H, H-1α), 3.08 (dd, J=4.7, 3.2Hz, 1H, H-2α), 3.87 (dd, J=5.5, 3.2Hz, 1H, H-3α), 2.16 (d, J=6.5Hz, 1H, H-5), 5.05 (dt, J=9.9, 6.5Hz, 1H, H-6), 3.47 (dd, J=16.6, 9.9Hz, 1H, H-7α), 2.56 (dd, J=16.6, 6.6Hz, 1H, H-7β), 6.34 (s, 1H, H-11), 2.59 (q, J=7.5Hz, 1H, H-15), 1.13 (t, J=7.5Hz, 3H, Me-16), 1.24 (s, 3H, Me-18), 1.13 (s, 3H, Me-20). ¹³C NMR (125MHz, DMSO) 56.1 (C-1), 57.5 (C-2), 67.4 (C-3), 48.4 (C-4), 51.2 (C-5), 73.6 (C-6), 25.3 (C-7), 107.6 (C-8), 163.7 (C-9), 37.8 (C-10), 106.7 (C-11), 162.0 (C-12), 163.1 (C-14), 24.2 (C-15), 12.1 (C-16), 18.4 (C-18), 181.0 (C-19), 18.4 (C-20).

[0056] 竹柏内酯K:白色无定型粉末。MF: C₁₈H₂₀O₇. ESI-MS: m/z 349 [M-H]⁻. ¹H NMR (600MHz, DMSO), 3.88 (d, J=10.8, 4.8Hz, 1H, H-1β), 3.51 (m, 1H, H-2α), 4.00 (dd, J=7.9, 3.4Hz, 1H, H-3α), 1.98 (d, J=6.5Hz, 1H, H-5), 5.05 (dt, J=9.8, 6.4Hz, 1H, H-6), 3.41 (m, 1H, H-7α), 2.64 (dd, J=16.6, 6.6Hz, 1H, H-7β), 6.26 (s, 1H, H-11), 2.56 (q, J=7.5Hz, 1H, H-

15), 1.12 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 3H, Me-16), 1.19 (s, 3H, Me-18), 1.03 (s, 3H, Me-20). ^{13}C NMR (125MHz, DMSO), 69.0 (C-1), 67.9 (C-2), 66.8 (C-3), 45.4 (C-4), 45.0 (C-5), 73.2 (C-6), 24.6 (C-7), 107.0 (C-8), 165.2 (C-9), 40.7 (C-10), 105.7 (C-11), 161.8 (C-12), 161.8 (C-14), 23.4 (C-15), 11.4 (C-16), 16.6 (C-18), 180.4 (C-19), 16.6 (C-20).

[0057] 竹柏内酯L: 白色无定型粉末。MF: $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{O}_5$. ESI-MS: m/z 319 $[\text{M}+\text{H}]^+$. ^1H NMR (600MHz, DMSO) 3.84 (m, 1H, H-1 α), 1.75 (m, 1H, H-2 α), 1.48 (m, 1H, H-2 β), 2.05 (m, 1H, H-3 α), 1.47 (m, 1H, H-3 β), 1.78 (d, $J=5.5\text{Hz}$, 1H, H-5), 5.07 (m, 1H, H-6), 3.38 (m, 1H, H-7 α), 2.74 (dd, $J=17.0, 4.8\text{Hz}$, 1H, H-7 β), 6.54 (s, 1H, H-11), 2.55 (q, $J=7.5\text{Hz}$, 1H, H-15), 1.13 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 3H, Me-16), 1.34 (s, 3H, Me-18), 1.03 (s, 3H, Me-20). ^{13}C NMR (125MHz, DMSO) 69.9 (C-1), 28.7 (C-2), 27.9 (C-3), 41.7 (C-4), 48.6 (C-5), 73.9 (C-6), 25.3 (C-7), 108.0 (C-8), 165.2 (C-9), 41.4 (C-10), 106.6 (C-11), 162.3 (C-12), 162.3 (C-14), 24.1 (C-15), 12.1 (C-16), 24.5 (C-18), 180.9 (C-19), 14.0 (C-20).

[0058] 3 β -羟基竹柏内酯L: 白色无定型粉末。MF: $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{O}_6$. ESI-MS: m/z 333 $[\text{M}-\text{H}]^-$. ^1H NMR (600MHz, DMSO) 3.78 (dt, $J=11.2, 4.4\text{Hz}$, 1H, H-1 α), 1.93 (ddd, $J=11.2, 5.9, 4.1\text{Hz}$, 1H, H-2 α), 1.68 (m, 1H, H-2 β), 3.56 (m, 1H, H-3 α), 1.71 (d, $J=5.5\text{Hz}$, 1H, H-5), 5.06 (dt, $J=9.9, 5.5\text{Hz}$, 1H, H-6), 3.38 (m, 1H, H-7 α), 2.79 (dd, $J=17.0, 4.8\text{Hz}$, 1H, H-7 β), 6.54 (s, 1H, H-11), 2.54 (q, $J=7.6\text{Hz}$, 1H, H-15), 1.12 (t, $J=7.6\text{Hz}$, 3H, Me-16), 1.32 (s, 3H, Me-18), 1.06 (s, 3H, Me-20). ^{13}C NMR (125MHz, DMSO) 73.3 (C-1), 25.2 (C-2), 71.1 (C-3), 45.4 (C-4), 49.5 (C-5), 69.0 (C-6), 38.5 (C-7), 108.6 (C-8), 164.8 (C-9), 42.1 (C-10), 106.6 (C-11), 162.4 (C-12), 162.4 (C-14), 24.2 (C-15), 12.1 (C-16), 22.1 (C-18), 177.8 (C-19), 13.5 (C-20).

[0059] 2 β -羟基竹柏内酯L: 白色无定型粉末。MF: $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{O}_6$. ESI-MS: m/z 333 $[\text{M}-\text{H}]^-$. ^1H NMR (600MHz, DMSO) 3.95 (dd, $J=7.0, 4.2\text{Hz}$, 1H, H-1 α), 3.80 (m, 1H, H-2 α), 1.52 (dd, $J=13.2, 4.6\text{Hz}$, 1H, H-3 α), 1.95 (dd, $J=13.2, 7.1\text{Hz}$, 1H, H-3 β), 1.88 (d, $J=6.4\text{Hz}$, 1H, H-5), 5.09 (m, 1H, H-6), 3.43 (dd, $J=16.7, 10.0\text{Hz}$, 1H, H-7 α), 2.66 (dd, $J=16.7, 4.9\text{Hz}$, 1H, H-7 β), 6.27 (s, 1H, H-11), 2.56 (q, $J=7.6\text{Hz}$, 1H, H-15), 1.12 (t, $J=7.6\text{Hz}$, 3H, Me-16), 1.26 (s, 3H, Me-18), 1.07 (s, 3H, Me-20). ^{13}C NMR (125MHz, DMSO) 69.7 (C-1), 64.4 (C-2), 34.6 (C-3), 41.5 (C-4), 44.6 (C-5), 73.6 (C-6), 25.3 (C-7), 107.5 (C-8), 165.9 (C-9), 42.2 (C-10), 106.1 (C-11), 162.3 (C-12), 162.4 (C-14), 24.0 (C-15), 12.0 (C-16), 23.8 (C-18), 181.5 (C-19), 16.5 (C-20).

[0060] 15-羟基-3-异竹柏内酯D: 白色无定型粉末。MF: $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{O}_6$. ESI-MS: m/z 347 $[\text{M}-\text{H}]^-$. ^1H NMR (600MHz, DMSO) 3.84 (dd, $J=7.7, 4.9\text{Hz}$, 1H, H-1 α), 1.77 (m, 1H, H-2 α), 1.51 (m, 1H, H-3 α), 2.05 (m, 1H, H-3 β), 1.77 (m, 1H, H-5), 5.04 (m, 1H, H-6), 3.63 (m, 1H, H-7 α), 2.70 (dd, $J=16.8, 5.8\text{Hz}$, 1H, H-7 β), 6.60 (s, 1H, H-11), 4.79 (m, 1H, H-15), 1.31 (d, $J=6.5\text{Hz}$, 3H, Me-16), 1.17 (s, 3H, Me-18), 1.05 (s, 3H, Me-20). ^{13}C NMR (125MHz, DMSO) 57.9 (C-1), 68.8 (C-2), 64.5 (C-3), 49.4 (C-4), 52.4 (C-5), 74.1 (C-6), 25.6 (C-7), 107.6 (C-8), 163.8 (C-9), 38.6 (C-10), 108.4 (C-11), 162.7 (C-12), 163.0 (C-14), 56.6 (C-15), 18.6 (C-16), 21.1 (C-18), 181.2 (C-19), 18.7 (C-20).

[0061] 2 α , 3 β , 15-三羟基竹柏内酯L: 白色无定型粉末。MF: $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{O}_6$. ESI-MS: m/z 365 $[\text{M}-\text{H}]^-$. ^1H NMR (600MHz, DMSO), 4.64 (dd, $J=5.0, 3.0\text{Hz}$, 1H, H-1 α), 4.08 (dd, $J=5.3, 3.3\text{Hz}$, 1H,

H-2 α), 3.18 (dd, J=4.7, 3.3Hz, 1H, H-3 β), 2.27 (dd, J=6.5Hz, 1H, H-5), 4.99 (m, 1H, H-6), 3.77 (dd, J=16.7, 9.8Hz, 1H, H-7 α), 2.70 (dd, J=16.7, 6.6Hz, 1H, H-7 β), 6.33 (s, 1H, H-11), 1.43 (d, J=6.5Hz, 1H, H-15), 1.43 (t, J=6.5Hz, 3H, Me-16), 1.39 (s, 3H, Me-18), 0.94 (s, 3H, Me-20). ¹³C NMR (125MHz, DMSO) 64.2 (C-1), 72.2 (C-2), 70.4 (C-3), 44.1 (C-4), 44.9 (C-5), 72.9 (C-6), 24.1 (C-7), 108.0 (C-8), 161.5 (C-9), 41.6 (C-10), 108.0 (C-11), 161.6 (C-12), 162.2 (C-14), 63.3 (C-15), 20.6 (C-16), 22.8 (C-18), 178.4 (C-19), 23.3 (C-20).

[0062] 15-羟基竹柏内酯L: 白色无定型粉末。MF: C₁₈H₂₂O₈. ESI-MS: m/z 335 [M+H]⁺. ¹H NMR (600MHz, DMSO) 4.12 (dd, J=5.0, 3.0Hz, 1H, H-1 α), 3.89 (dd, J=10.8, 5.0Hz, 1H, H-2 β), 4.08 (d, J=10.8Hz, 1H, H-3 α), 2.27 (d, J=4.6Hz, 1H, H-5), 5.17 (td, J=10.3, 4.6Hz, 1H, H-6), 3.63 (dd, J=17.7, 10.4Hz, 1H, H-7 α), 2.76 (dd, J=17.7, 4.1Hz, 1H, H-7 β), 6.17 (s, 1H, H-11), 4.77 (m, 1H, H-15), 1.31 (d, J=6.5Hz, 3H, Me-16), 1.45 (s, 3H, Me-18), 1.40 (s, 3H, Me-20). ¹³C NMR (125MHz, DMSO) 69.4 (C-1), 28.1 (C-2), 27.2 (C-3), 41.2 (C-4), 47.8 (C-5), 73.1 (C-6), 24.2 (C-7), 107.6 (C-8), 164.6 (C-9), 40.9 (C-10), 107.2 (C-11), 160.9 (C-12), 161.3 (C-14), 62.6 (C-15), 20.1 (C-16), 23.9 (C-18), 180.4 (C-19), 13.5 (C-20).

[0063] 实施例2体外抗肿瘤实验 (MTT法)

[0064] 1, 材料: 细胞购自美国ATCC, 培养基DMEM, 胎牛血清FBS购自Gibico公司, MTT购自Sigma公司。

[0065] 2, 肿瘤细胞的培养: 细胞培养在含10%FBS的DMEM培养基中, 收集生长良好并取出于对数生长期的细胞用培养基配成密度1乘10的5次方。

[0066] 3, 式I化合物对肿瘤细胞的抑制率计算, 根据测得的吸光度值进行细胞的存活率计算, 各测试孔的OD值减去空白组的OD值, (完全培养基加MTT, 无细胞), 各重复孔的OD值取均数, 细胞的存活率以T/C%表示, T为加药细胞的OD值, C为对照组细胞的OD值, 化合物对肿瘤细胞的抑制率以(1-T/C%)表示。每个实验至少重复三次。半数抑制浓度IC₅₀由三次实验结果统计得到。

[0067] 4, 实验结果

[0068] 参见表1, 化合物竹柏内酯A、竹柏内酯B、竹柏内酯D、竹柏内酯E、竹柏内酯G、1-脱氧-2 β -羟基竹柏内酯A、3-异竹柏内酯D、竹柏内酯K、竹柏内酯L和2 β -羟基竹柏内酯L在体外对卵巢癌HEY和A2780细胞具有明显的生长抑制作用, 半数抑制浓度在0.5-20 μ M之间。

[0069] 表1为式I所述化合物对卵巢癌HEY和A2780细胞增殖的半数抑制浓度

化合物	半数抑制浓度 (平均 \pm SD, μ M)	
	HEY	A2780
竹柏内酯 A	7.87 \pm 1.70	6.42 \pm 1.13
竹柏内酯 B	10.0 \pm 1.65	6.41 \pm 1.47
竹柏内酯 D	0.91 \pm 0.33	0.52 \pm 0.31
竹柏内酯 E	0.75 \pm 0.31	0.53 \pm 0.37
竹柏内酯 G	5.52 \pm 0.45	4.94 \pm 2.53
1-脱氧-2 β -羟基竹柏内酯 A	4.62 \pm 0.33	2.26 \pm 0.16
[0070] 2-羰基竹柏内酯 A	>20	>20
7 β -羟基竹柏内酯 D	>20	>20
3-异竹柏内酯 D	3.75 \pm 0.55	<2.5
竹柏内酯 K	17.37 \pm 1.94	12.00 \pm 1.64
竹柏内酯 L	6.37 \pm 1.35	3.77 \pm 0.94
3 β -羟基竹柏内酯 L	>20	>20
2 β -羟基竹柏内酯 L	<2.5	<2.5
15-羟基-3-异竹柏内酯 D	>20	>20
2 α ,3 β ,15-三羟基竹柏内酯 L	>20	>20
15-羟基竹柏内酯 L	>20	>20

[0071] 实施例3体外抗肿瘤实验

[0072] 1,材料:细胞购自美国ATCC,培养基DMEM,胎牛血清FBS购自Gibico公司,MTT购自Sigma公司。

[0073] 2,肿瘤细胞的培养:细胞培养在含10%FBS的DMEM培养基中,收集生长良好并取出于对数生长期的细胞用培养基配成密度1乘10的5次方。

[0074] 3,不同浓度的化合物竹柏内酯E对肿瘤细胞的抑制率计算,根据测的的吸光度值进行细胞的存活率计算,各测试孔的OD值减去空白组的OD值,(完全培养基加MTT,无细胞),各重复孔的OD值取均数,细胞的存活率以T/C%表示,T为加药细胞的OD值,C为对照组细胞的OD值,化合物对肿瘤细胞的抑制率以(1-T/C%)表示。每个实验至少重复三次。

[0075] 4,实验结果

[0076] 参见图1,其显示不同浓度的竹柏内酯E化合物体外对人肺癌(A549)、卵巢癌(A2780)、肝癌(HepG2)、乳腺癌(MCF-7)、胃癌(SGC7901)和黑色素瘤(A375)细胞具有明显的生长抑制作用。

[0077] 参见图2,其显示竹柏内酯E化合物体外能够引起人肺癌A549细胞周期阻滞于G2期,且长时间的处理引起细胞凋亡。

[0078] 本发明所述的化合物,对细胞生长的抑制作用,主要是阻滞细胞周期于G2期,同时可以诱导细胞凋亡。

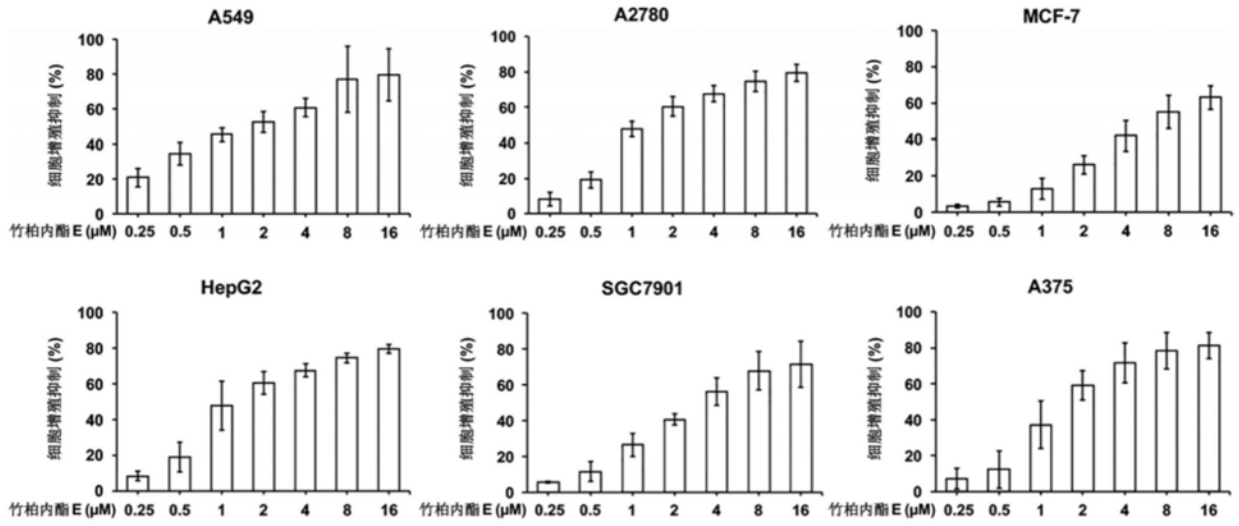


图1

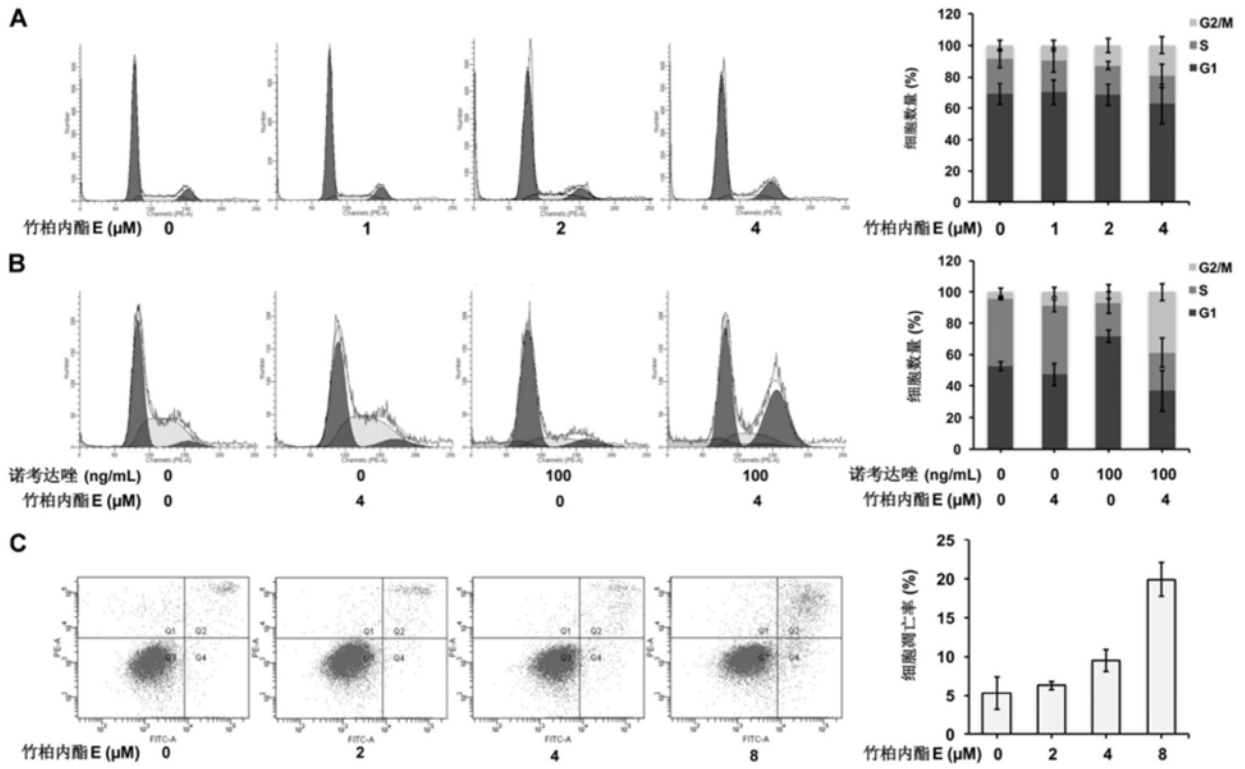


图2