



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103145741 B

(45) 授权公告日 2015. 11. 25

(21) 申请号 201310097163. 1

(22) 申请日 2013. 03. 25

(73) 专利权人 中国科学院昆明植物研究所
地址 650201 云南省昆明市蓝黑路 132 号

(72) 发明人 蔡祥海 罗晓东 保梅芬

(74) 专利代理机构 昆明协立知识产权代理事务
所(普通合伙) 53108
代理人 马晓青

(51) Int. Cl.

C07D 519/04(2006. 01)

A61K 31/475(2006. 01)

(续)

(56) 对比文件

CN 101928293 A, 2010. 12. 29, 全文.

CN 102225937 A, 2011. 10. 26, 全文.

Bruno Danieli et al..

Tabernaegantines C and D, Two New Bisindole Alkaloids containing a Cyano Group from Tabernaemontana elegans Stapf. Part 2. 《J. C. S. Perkin I》. 1980, 第 601-606 页.

Ezio Bombardelli et al.. Structures of Tabernaegantines A-D and Tabernaegantines A and B, New Indole Alkaloids from Tabernaemontana elegans. 《J. C. S. Perkin I》. 1973, 第 1432-1438 页.

Hiroimitsu TAKAYAMA et al.. Two New Dimeric Indole Alkaloids from Tabernaemontana subglobosa MERR. from Taiwan. 《Chem. Pharm. Bull.》. 1994, 第 42 卷(第 2 期), 第 280-284 页.

Kornakanok Ingkaninan et al..

Vobasinyl-iboga bisindole alkaloids, potent acetylcholinesterase inhibitors from Tabernaemontana divaricata root. 《Journal of pharmacy and pharmacology》. 2006, 第 58 卷第 847-852 页.

M. S. Morales-rios et al.. 13C NMR Spectroscopy of Indole Derivatives. 《magnetic resonance in chemistry》. 1987, 第 25 卷第 377-395 页.

Marion Girardot et al.. Indole alkaloids from Muntafara sessilifolia with antiplasmodial and cytotoxic activities. 《Phytochemistry》. 2011, 第 73 卷第 65-73 页.

Nantaka Khorana et al.. Prospective acetylcholinesterase inhibitory activity of indole and its analogs. 《Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters》. 2012, 第 22 卷第 2885-2888 页.

TOH-SEOK KAM et al.. plumeran alkaloids from kopsia profunda. 《Phytochemistry》. 1990, 第 29 卷(第 7 期), 第 2311-2322 页, 第 2322 页左栏倒数第一段.

Toh-Seok Kam et al.. Conodirines A and B, Novel Vobasine-Iboga Bisindoles Incorporating an Additional Tetrahydro-1, 3-oxazine Unit on the Vobasinyl Moiety. 《Helvetica Chimica Acta》. 2003, 第 86 卷第 122-126 页, 第 122 页摘要, 第 124 页化学式 3 和 4, 第 122 页 introduction, 第 125 页第 1 段. (续)

审查员 吴永英

权利要求书 2 页 说明书 13 页 附图 2 页

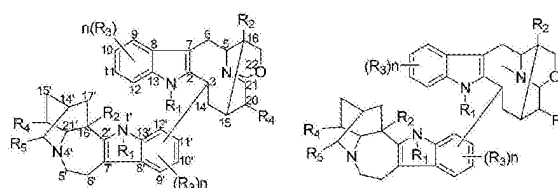
(54) 发明名称

双吲哚化合物及其药物组合物与其制备方法和用途

(57) 摘要

本发明涉及式(I)所示的具有抗肿瘤活性的吲哚生物碱类化合物, 狗牙花植物提取物, 其制备方法, 含有他们的药物组合物以及在制药中的应

用。



(I)

[转续页]

[接上页]

(51) Int. Cl.

A61P 35/00(2006.01)

A61P 35/02(2006.01)

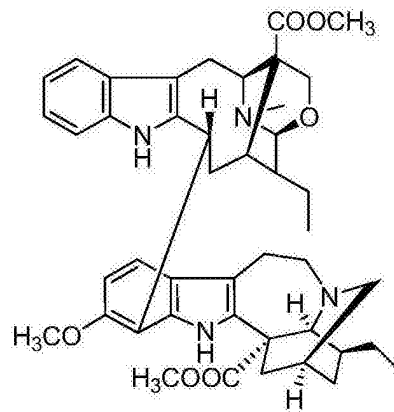
(56) 对比文件

黄丽瑛 等. 二杈狗牙花中生物碱的研

究. 《中草药》. 1997, 第 28 卷 (第 8 期), 第 451-454 页.

黄丽瑛 等. 海南药用狗牙花中生物碱的分离和鉴定. 《中草药》. 1997, 第 28 卷 (第 6 期), 第 323-326 页.

1. 下述结构式所示的双吲哚化合物 Divaricatine B,



III_a

2. 权利要求 1 所述的双吲哚化合物 Divaricatine B 的制备方法,其特征在于:取狗牙花干燥茎、叶 5kg,粉碎,甲醇浸回流提取 3 次,减压浓缩,调节 pH = 2,乙酸乙酯萃取 3 次,减压浓缩得非碱,酸水调节 pH = 9-10,乙酸乙酯萃取 3 次,75g 硅胶拌样,氯仿-丙酮洗脱,分为 4 份 I-IV;第 III 部分上 320g 反相柱,10% -100% 甲醇得到五个部分 IIIa-IIIe;III-b 6g 硅胶柱分离,6:1 ~ 1:1 的石油醚-丙酮洗脱,进而用 RP18 反相柱 MeOH-H₂O 8:2 为洗脱剂得到 divaricatine C,III-d 用 RP18 反相柱 MeOH-H₂O,7:3 分得 divaricatine D;III-e 用 RP-18MeOH-H₂O,6:4 得到 divaricatine A 和一混合物,该混合物用 Sephadex LH-20 分离,MeOH 洗脱得到 divaricatine B。

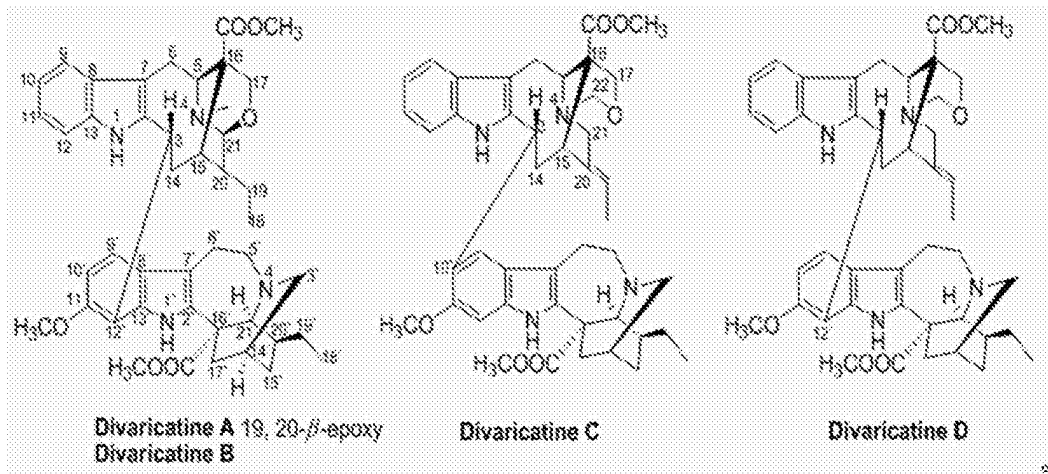
3. 一种狗牙花提取物,其从狗牙花属植物中用水或有机溶剂提取分离而得,取狗牙花 *Tabernaemontana divaricata*、尖蕾狗牙花 *T. bufalina*、平脉狗牙花 *T. pandacaqui*、或药用狗牙花 *T. bovina*,植物茎叶粉碎,甲醇提取,调节 pH = 1.0-4.5,乙酸乙酯萃取,水层调节至 pH = 8.0-11.0,乙酸乙酯萃取,萃取物浓缩,经硅胶柱层析,氯仿-丙酮洗脱,得粗产物,甲醇重结晶。

4. 药物组合物,其含有权利要求 1 所述的双吲哚化合物 Divaricatine B 作为有效成分,至少还包含一种药学上可接受的载体。

5. 药物组合物,其含有权利要求 3 的狗牙花提取物作为有效成分,至少还包括一种药学上可接受的载体。

6. 权利要求 1 所述的双吲哚化合物或权利要求 3 所述的狗牙花提取物或权利要求 4 或 5 所述的药物组合物在制备预防或治疗人或动物增生性疾病或病症的药物中的应用,所述增生性疾病或病症是癌症,所述癌症是白血病、肝癌、肺癌、乳腺癌、结肠癌。

7. 如下结构式所示的双吲哚化合物 divaricatine A、divaricatine B、divaricatine C、divaricatine D 在制备预防或治疗人或动物增生性疾病或病症的药物中的应用,所述增生性疾病或病症是癌症,所述癌症是白血病、肝癌、肺癌、乳腺癌、结肠癌,



双吡啶化合物及其药物组合物与其制备方法和用途

技术领域

[0001] 本发明属于药物技术领域,具体地,涉及式(I)所示的具有抗肿瘤活性的双吡啶生物碱类化合物、其衍生物、有机和无机酸盐,含有他们的药物组合物,狗牙花植物提取物,以及它们在制备治疗或预防癌症药物中的应用。

背景技术

[0002] 随着肿瘤生物学及相关学科的发展,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细胞无限增殖,药物研发的焦点正在从传统细胞毒药物转向针对肿瘤细胞异常信号系统的新一代抗肿瘤药物。不同于传统细胞毒药物选择性差、易产生耐药性的特点,靶向抗肿瘤药针对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。当前抗肿瘤药物的主要研究方向:寻找新的作用靶点(酶、受体)、新的抗肿瘤活性分子和新的实验方法,而天然产物在抗肿瘤活性分子方面发挥着重要的作用。据美国 NCI 的分析,在过去 25 年 63% 的新药来源于天然产物;以抗肿瘤药物为例自上世纪 40 年代以来,155 个小分子抗肿瘤药物中 73% 非合成药,其中有 47% 实际上是天然产物及其衍生物。³以植物亲缘关系和化合物结构相似性为线索,在植物中寻找结构多样性的小分子;并以这些小分子为先导化合物发现的物质基础,通过活性筛选寻找抗肿瘤先导化合物,是发现抗肿瘤分子的重要手段。迄今为止,现有技术中未见有式(I)所示的双吡啶生物碱类化合物及其药用活性的报道。

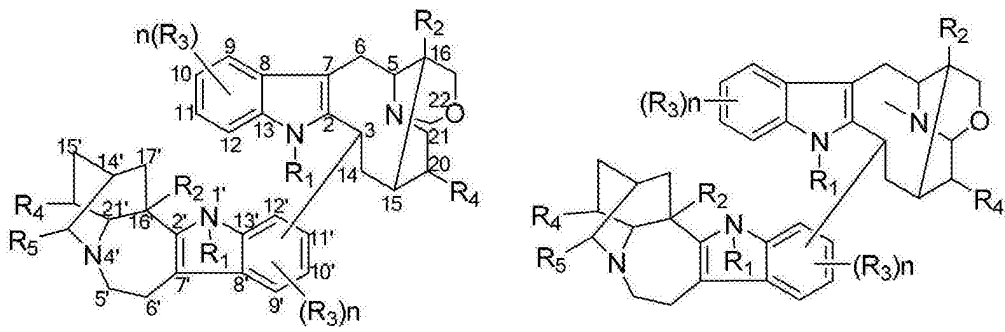
发明内容

[0003] 本发明的目的在于:提供式(I)的双吡啶生物碱类化合物,以及利用有机酸(酒石酸,柠檬酸,甲酸,乙酸,乙二酸等)或无机酸(盐酸,氢溴酸,硝酸,硫酸,磷酸等)制成的盐,制备该类化合物的原料狗牙花植物的提取物;其制备方法;其作为有效成分与可药用载体或赋形剂组成的药物组合物;以及式(I)的双吡啶生物碱类化合物或其药用盐或其药物组合物在制备预防或治疗肝癌、白血病、结肠癌、乳腺癌及肺癌的药物中的用途。

[0004] 为了实现上述目的,本发明提供了如下的技术方案:

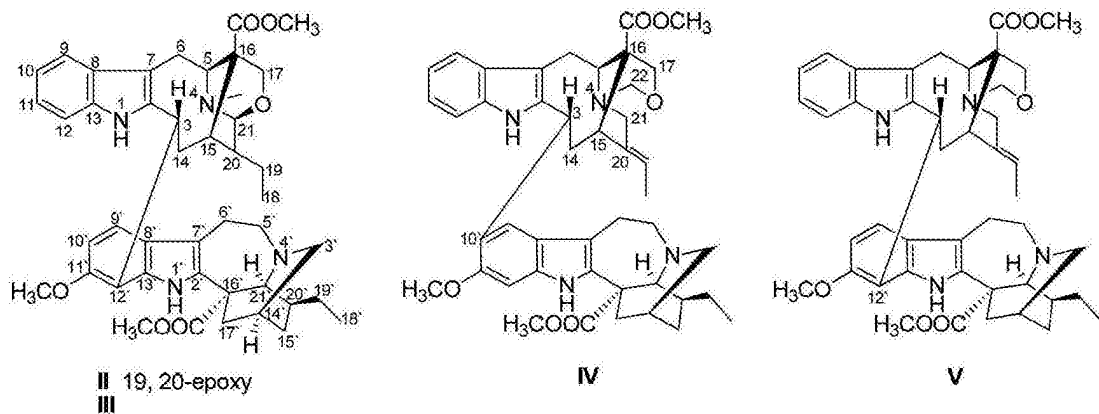
[0005] 式(I)所示的双吡啶化合物或其药学上可接受的盐,

[0006]



(I)

- [0007] 其中,各 R¹彼此独立的是氢、C₁₋₁₀烷基、C₁₋₁₀醛基或 C₁₋₁₀烷酰基;
- [0008] 各 R²彼此独立的是 C₁₋₁₀烷氧基羰基;
- [0009] 各 R³彼此独立的是氢、羟基、C₁₋₁₀烷氧基;
- [0010] n 是 0-4 的整数;
- [0011] R⁴是氢、未取代的 C₁₋₁₀烷基或 C₂₋₁₀烯基;
- [0012] R⁵是氢或氧代 C₁₋₁₀烷基;
- [0013] 条件是:当 R⁵是氢时,R⁴是未取代的 C₁₋₁₀烷基且 R³不是羟基。
- [0014] 上述的生物碱或其药学上可接受的盐,其中 R⁵是氧代 C₁₋₁₀烷基。
- [0015] 上述的双吲哚化合物或其药学上可接受的盐,其中 R⁵是氧代 C₁₋₆烷基。
- [0016] 上述的双吲哚化合物或其药学上可接受的盐,其中 R⁵是 2- 氧代丙基。
- [0017] 上述的双吲哚化合物或其药学上可接受的盐,其中通过吲哚环的 3-12'、3-10' 位连接。
- [0018] 如上述的任一项的双吲哚化合物或其药学上可接受的盐,其中 R²是的 C₁₋₁₀酯基。
- [0019] 如上述的任一项的双吲哚化合物或其药学上可接受的盐,其中 R²是 C₁₋₆甲酯基。
- [0020] 如上述的任一项的双吲哚化合物或其药学上可接受的盐,其中 R²是甲酸甲酯基。
- [0021] 如上述的任一项的双吲哚化合物或其药学上可接受的盐,其中 R⁴是未取代的 C₁₋₁₀烷基。
- [0022] 如上述的任一项的双吲哚化合物或其药学上可接受的盐,R⁴是乙基或并烯基。
- [0023] 如上述的双吲哚化合物或其药学上可接受的盐,其选自:
- [0024]



- [0025] 如上任一项所述的双吲哚化合物或其药学上可接受的盐,其中所述的药学上可接

受的盐为盐酸盐、氢溴酸盐、硝酸盐、硫酸盐、磷酸盐、酒石酸盐、柠檬酸盐、甲酸盐、乙酸盐、乙二酸盐。

[0026] 如上任一项的双咪唑化合物或其药学上可接受的盐的制备方法,是从狗牙花属植物中用水或有机溶剂提取分离而得,需要时进一步与适当的酸成盐,适当的酸为盐酸、氢溴酸、硝酸、硫酸、磷酸、酒石酸、柠檬酸、甲酸、乙酸、乙二酸或其他适合的有机酸或无机酸。

[0027] 上述的制备方法中所述的狗牙花属植物为狗牙花 *Tabernaemontana divaricata*、尖蕾狗牙花 *T. bufalina*、平脉狗牙花 *T. pandacaqui*、伞房狗牙花 *T. corymbosa* 或药用狗牙花 *T. bovina*。

[0028] 上述的制备方法中所述的狗牙花属植物为伞房狗牙花 *Tabernaemontana divaricata*。

[0029] 如上所述的任一项的制备方法,其中提取用的有机溶剂选自醇类溶剂、酮类溶剂、酯类溶剂、醚类溶剂或卤代烷类溶剂。

[0030] 更具体地,提取用的有机溶剂选自甲醇、乙醇、丙酮、乙酸乙酯、氯仿或石油醚。

[0031] 更具体的制备方法是取狗牙花的茎叶粉碎,甲醇提取,调节 $\text{pH}=1.0-4.5$,乙酸乙酯萃取,水层调节至 $\text{pH}=8.0-11.0$,乙酸乙酯萃取,萃取物浓缩,经硅胶柱层析,氯仿-丙酮洗脱,得粗产物,甲醇重结晶得纯品。

[0032] 本发明还提供了狗牙花提取物,其是由上述任一项的方法制备而得的。

[0033] 本发明同时提供了药物组合物,其含有上述任一项的双咪唑化合物或其药学上可接受的盐作为有效成分,至少还包含一种药学上可接受的载体。

[0034] 另一类药物组合物,其含有狗牙花提取物作为有效成分,至少还包括一种药学上可接受的载体。

[0035] 本发明还进一步提供了上述任一项所述的双咪唑化合物或药用盐,狗牙花提取物,药物组合物在制备预防或治疗人或动物增生性疾病或病症的药物中的应用。

[0036] 所述的应用中,所述增生性疾病或病症是癌症。

[0037] 所述癌症是白血病、肝癌、肺癌、乳腺癌、结肠癌。

[0038] 本发明涉及的狗牙花属植物提取物,是从狗牙花属植物,例如狗牙花 *Tabernaemontana divaricata*、尖蕾狗牙花 *T. bufalina*、平脉狗牙花 *T. pandacaqui*、伞房狗牙花 *T. corymbosa* 或药用狗牙花 *T. bovina* 等植物原料中用水或有机溶剂提取,优选回流提取或浸提,经分离纯化而得。如果有必要,与适当的酸成盐,所述的适当的酸选自盐酸、氢溴酸、硝酸、硫酸、磷酸、酒石酸、柠檬酸、甲酸、乙酸、乙二酸或其他适合的有机酸或无机酸。

[0039] 所述的有机溶剂选自醇类溶剂、酮类溶剂、酯类溶剂、醚类溶剂或卤代烷类溶剂,例如 C_{1-6} 醇、 C_{3-6} 酮、 C_{3-6} 酯、 C_{2-6} 醚或 C_{1-6} 卤代烷。其中所述的 C_{1-6} 醇包括例如甲醇、乙醇、正丙醇、异丙醇、正丁醇、异丁醇、叔丁醇、正戊醇、异戊醇、环戊醇、正己醇、环己醇等。所述的 C_{3-6} 酮包括例如丙酮、甲乙酮、甲基异丁酮等。所述的 C_{2-6} 醚包括例如甲醚、乙醚等。所述的 C_{3-6} 酯包括例如甲酸乙酯、乙酸乙酯丙酸乙酯等。所述的 C_{1-6} 卤代烃包括例如二氯甲烷、氯仿、二氯乙烷等。

[0040] 如果有必要的话,可对式(I)化合物进一步分离纯化,其中包括将提取物经酸化,优选 $\text{pH}=1.0-4.5$,用有机溶剂分配,水层碱化,优选 $\text{pH}=8.0-11.0$,再用有机溶剂萃取,分离有机溶剂层而得。

[0041] 如果有必要的话,还可包括用柱层析进一步提高纯度。所述的柱层析可以是硅胶柱层析、C18 柱层析、离子交换树脂柱层析、葡聚糖凝胶层析等。例如经硅胶柱层析,用氯仿/甲醇梯度洗脱,分配比例为氯仿/甲醇 10 : 0,20 : 1,10 : 1,8 : 1,5 : 1,3 : 1,1 : 1。

[0042] 具体地,取伞房狗牙花的茎叶粉碎,甲醇提取,调节 PH=1.0-4.5,乙酸乙酯萃取,水层调节至 PH=8.0-11.0,乙酸乙酯萃取,萃取物浓缩,经硅胶柱层析,氯仿-丙酮洗脱,得粗产物,甲醇重结晶得纯品。

[0043] 更具体的方法为:狗牙花干燥茎、叶(5kg),粉碎,甲醇浸回流提取 3 次,减压浓缩,调节 PH=2,乙酸乙酯萃取 3 次,减压浓缩得非碱,酸水调节 PH=9-10,乙酸乙酯萃取 3 次,硅胶拌样,氯仿-丙酮洗脱。分为 4 份(I-IV)。III(18g)反相柱(320g),10%-100% 甲醇分得 divaricatines A-D。

[0044] 本发明所述的药学上可接受的盐是指其与有机酸或无机酸形成的盐,其中有机酸包括但不限于酒石酸、柠檬酸、甲酸、乙酸、乙二酸,无机酸包括但不限于盐酸、硫酸、磷酸、氢溴酸盐、硝酸盐。

[0045] 本说明书中,术语“烷基”是指饱和的直链或支链烃基,优选具有 1-10 个碳原子,更优选具有 1-6 个碳原子,更优选具有 1-4 个碳。代表性的例子包括甲基、乙基、丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基、正戊基等。

[0046] “烯基”是指具有至少一个碳碳双键,直链或支链的脂族烃基,优选具有 2-10 个碳原子,更优选具有 2-6 个碳原子,更优选具有 2-4 个碳。代表性的例子包括乙烯基、丙烯基、烯丙基、丁烯基、戊二烯基等。

[0047] “炔基”是指具有至少一个碳碳三键,直链或支链的脂族烃基,优选具有 2-10 个碳原子,更优选具有 2-6 个碳原子,更优选具有 2-4 个碳。代表性的例子包括乙炔基、丙炔基、丁炔基等。

[0048] “酰基”是指饱和的或不饱和的,直链或支链的,环状或无环的脂族或芳香族羧酸去掉羧基上的羟基形成的基团,优选具有 1-10 个碳原子,更优选具有 1-6 个碳原子,更优选具有 1-4 个碳,代表性的例子包括甲酰基、乙酰基、丙酰基、丁酰基、苯甲酰基、萘甲酰基。

[0049] “芳基”是指具有单环或双环的芳香性基团,它具有 6-14 个碳原子,优选具有 6-10 个碳原子,可以含有 0-3 个选自 O、S、N、S(O)、S(O₂) 的杂原子,并且可与其他环稠合。代表性的例子包括苯基、萘基、呋喃基、噻啉基等。

[0050] 本发明的式(I)化合物或其盐可经口或不经过口给药,给药量因药物不同而各有不同,对成人来说,每天 1-1000mg 比较合适。

[0051] 经口服给药时,首先使化合物与常规的药用辅剂如赋形剂、崩解剂、黏合剂、润滑剂、抗氧化剂、包衣剂、着色剂、芳香剂、表面活性剂等混合,将其制成颗粒剂、胶囊、片剂等形式给药;非经口给药时可以注射液、输液剂或栓剂等形式给药。制备上述制剂时,可使用常规的制剂技术。

附图说明:

[0052] 图1为本发明双咪唑化合物的结构示意图;其中,各 R¹彼此独立的是氢、C₁₋₁₀烷基、C₁₋₁₀醛基或 C₁₋₁₀烷酰基;各 R²彼此独立的是 C₁₋₁₀烷氧基羰基;各 R³彼此独立的是氢、羟基、

C₁₋₁₀烷氧基;n是0-4的整数;R⁴是氢、未取代的C₁₋₁₀烷基或C₂₋₁₀烯基;R⁵是氢或氧代C₁₋₁₀烷基;条件是:当R⁵是氢时,R⁴是未取代的C₁₋₁₀烷基且R³不是羟基;

[0053] 图2、图3为本发明化合物分离提取流程图;

[0054] 图4为本发明化合物化学合成流程图。

具体实施方式:

[0055] 下面结合附图,用本发明的试验实施例、实施例和制剂实施例来更详细地说明本发明,但不以任何形式限制本发明。

[0056] 试验实施例1:

[0057] 试验证明,本发明的通式(I)双咪唑化合物、狗牙花属植物提取物对人乳腺癌细胞株(MCF-7),人肝癌细胞株(SMMC7721),人白血病细胞株(HL-60),人结肠癌细胞株(SW-480),人肺癌细胞株(A549)生长的半数抑制浓度(IC₅₀)在0.1-1000 μM之间,具有预防或治疗增生性疾病例如癌症的作用。实验方法和结果如下:

[0058] 一、材料与方法:

[0059] 1. 样品及制备:

[0060] 样品呈无色,二甲基亚砜(DMSO)溶解配制为10mg/ml浓度的贮存液避光保存备用。

[0061] 2. 细胞株:

[0062] HL-60,人白血病细胞株

[0063] SMMC7721,人肝癌细胞株

[0064] A549,人肺癌细胞株

[0065] MCF-7,人乳腺癌细胞株

[0066] SW-480,人结肠癌细胞株

[0067] 3. 实验方法:

[0068] (1) 接种细胞:用含10%胎牛血清的培养液(DMEM或者RPMI1640)配成单个细胞悬液,以每孔10000-20000个细胞接种到96孔板,每孔体积100μl,贴壁细胞提前12小时接种培养。

[0069] (2) 加入待测化合物溶液(化合物单体固定浓度40μM初筛,在该浓度对肿瘤细胞生长抑制在50%附近的化合物设5个浓度进入梯度复筛),每孔终体积200μl,每种处理均设3个复孔。

[0070] (3) 显色:37摄氏度培养48小时后,每孔加MTT溶液20μl。继续孵育4小时,终止培养,小心吸弃孔内培养上清液100μl以避免细胞丢失,每孔加20%的SDS100μl,过夜孵育(温度37℃),使结晶物充分融解。

[0071] (4) 比色:选择595nm波长,酶联免疫检测仪(Bio-Rad680)读取各孔光吸收值,记录结果,以浓度为横坐标,细胞存活率为纵坐标绘制细胞生长曲线,应用两点法(Reed and Muench法)计算化合物的IC₅₀值。

[0072] (5) 阳性对照:顺铂

[0073] 二、结果:

[0074] 本发明化合物和提取物的抗肿瘤活性(IC₅₀, μM)

[0075]

化合物	白血病	肝癌	肺癌	乳腺癌	结肠癌
divaricatine A	0.79	3.41	3.52	3.10	2.59
divaricatine B	1.35	3.68	6.52	3.32	3.44
divaricatine C	0.41	2.64	0.40	1.24	2.65
divaricatine D	0.35	2.04	0.43	1.23	1.94
DDP(MW300)	1.05	16.24	9.40	21.90	19.62
狗牙花属植物提取物	1.38	3.97	6.05	3.13	3.65

[0076] 三、结论：

[0077] 在本实验条件下,对以上包括人乳腺癌细胞株(MCF-7),人肝癌细胞株(SMMC7721),人白血病细胞株(HL-60),人结肠癌细胞株(SW-480),人肺癌细胞株(A549)生长的半数抑制浓度(IC50)在0.4-10 μ M之间。

[0078] 实施例1：

[0079] 本发明式(I)所示的双咪唑生物碱化合物以及狗牙花属植物提取物的一般制备方法：

[0080] 1、来源于植物及衍生化：

[0081] 从狗牙花属植物,例如狗牙花 *Tabernaemontana divaricata*、尖蕾狗牙花 *T. bufalina*、平脉狗牙花 *T. pandacaqui*、伞房狗牙花 *T. corymbosa* 或药用狗牙花 *T. bovina* 等植物原料中用水或有机溶剂提取,优选回流提取或浸提,得狗牙花属植物提取物;再经分离纯化而得式(I)化合物。如果有必要,与适当的酸成盐,所述的适当的酸选自盐酸、氢溴酸、硝酸、硫酸、磷酸、酒石酸、柠檬酸、甲酸、乙酸、乙二酸或其他适合的有机酸或无机酸。

[0082] 所述的有机溶剂选自醇类溶剂、酮类溶剂、酯类溶剂、醚类溶剂或卤代烷类溶剂,例如 C_{1-6} 醇、 C_{3-6} 酮、 C_{3-6} 酯、 C_{2-6} 醚或 C_{1-6} 卤代烷。其中所述的 C_{1-6} 醇包括例如甲醇、乙醇、正丙醇、异丙醇、正丁醇、异丁醇、叔丁醇、正戊醇、异戊醇、环戊醇、正己醇、环己醇等。所述的 C_{3-6} 酮包括例如丙酮、甲乙酮、甲基异丁酮等。所述的 C_{2-6} 醚包括例如甲醚、乙醚等。所述的 C_{3-6} 酯包括例如甲酸乙酯、乙酸乙酯丙酸乙酯等。所述的 C_{1-6} 卤代烃包括例如二氯甲烷、氯仿、二氯乙烷等。

[0083] 如果有必要的话,可对式(I)化合物进一步分离纯化,其中包括将提取物经酸化,优选 pH=1.0 ~ 4.5,用有机溶剂分配,水层碱化,优选 pH=8.0 ~ 11.0,再用有机溶剂萃取,分离有机溶剂层而得。

[0084] 如果有必要的话,还可包括用柱层析进一步提高纯度。所述的柱层析可以是硅胶柱层析、C18柱层析、离子交换树脂柱层析、葡聚糖凝胶层析等。例如经硅胶柱层析,用氯仿/甲醇梯度洗脱,分配比例为氯仿/甲醇 10 : 0, 20 : 1, 10 : 1, 8 : 1, 5 : 1, 3 : 1, 1 : 1。

[0085] 具体地,取狗牙花的茎叶粉碎,甲醇提取,调节 PH=1.0-4.5,乙酸乙酯萃取,水层调节至 PH=8.0-11.0,乙酸乙酯萃取,萃取物浓缩,经硅胶柱层析,氯仿-丙酮洗脱,得粗产物,甲醇重结晶得纯品。

[0086] 更具体的方法为：狗牙花干燥茎、叶 (5kg)，粉碎，甲醇浸回流提取 3 次，减压浓缩，调节 PH=2，乙酸乙酯萃取 3 次，减压浓缩得非碱，酸水调节 PH=9 - 10，乙酸乙酯萃取 3 次，45g 硅胶拌样，氯仿-丙酮洗脱。分为 7 份。III (18g) 反相柱，10%-100% 甲醇得到 divaricatines A-B。

[0087] 可选择地对式 (I) 的双吲哚化合物进行结构修饰和衍生化，例如在吲哚环上引入各种取代基团，或对其它环上的取代基进行变换和修饰。

[0088] 吲哚环上的取代基可通过例如中国专利 CN101108859A 的方法而引入。其中以式 (I-1a) 为原料，在适当的温度 (-20°C ~ 30°C) 下，在无水二氯甲烷及三氟乙酸的混合溶剂中与卤代试剂反应，得到卤素取代的通式 (I-1b、c、d) 化合物，其中 (I-1b) 和 (I-1d) 可进一步转化为 (I-1c)，然后在过渡金属催化下加热 40 ~ 150°C 进行反应最终得到式 (I) 化合物 (图 2、图 3)。

[0089] 2、化学合成方法

[0090] 将构成式 (I) 双吲哚化合物的两个吲哚单体分别通过前述方法在吲哚环或其他环上引入相应的取代基进行必要的修饰，然后在醇 (例如甲醇、乙醇) 溶液中经酸催化，在适当的温度下 (例如常温到回流的温度，具体地 20 ~ 80°C) 进行偶联，从而得到式 I 化合物 (图 4)。

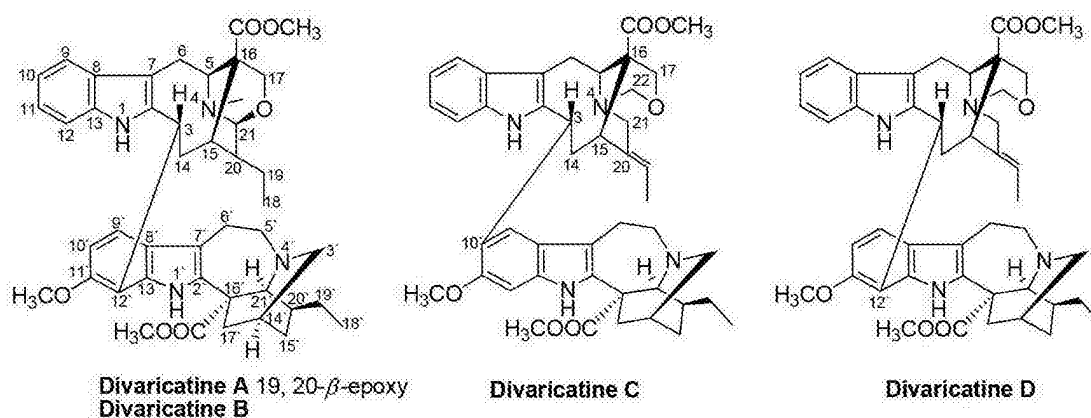
[0091] 具体地，本发明的狗牙花属植物提取物的制备：

[0092] 从狗牙花属植物，例如狗牙花 *Tabernaemontana divaricata*、尖蕾狗牙花 *T. bufalina*、平脉狗牙花 *T. pandacaqui*、伞房狗牙花 *T. corymbosa* 或药用狗牙花 *T. bovina* 等植物原料中用水或有机溶剂提取，优选回流提取或浸提。

[0093] 本发明双吲哚化合物的提取分离：

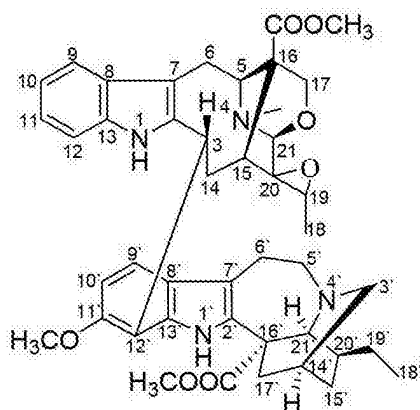
[0094] 干燥茎、叶 (5kg)，粉碎，甲醇浸回流提取 3 次，减压浓缩，调节 PH=2，乙酸乙酯萃取 3 次，减压浓缩得非碱，酸水调节 PH=9 - 10，乙酸乙酯萃取 3 次，75g 硅胶拌样，氯仿-丙酮洗脱。分为 4 份 (I-IV)。第 III 部分 (18g) 反相柱 (320g)，10%-100% 甲醇得到五个部分 (IIIa-IIIe)。III-b (6 g) 硅胶柱分离，石油醚-丙酮 (6:1 ~ 1:1) 洗脱，进而用 RP18 反相柱 MeOH-H₂O (8:2) 为洗脱剂得到 divaricatine C，III-d (4g) 用 RP18 反相柱 (MeOH-H₂O, 7:3) 分得 divaricatine D。III-e (2.5g) 用 RP-18 (MeOH-H₂O, 6:4) 得到 divaricatine A 和一混合物，该混合物 (19mg) 用 Sephadex LH-20 分离，MeOH 洗脱得到 divaricatine B。

[0095]



[0096] Divaricatine A 的化学结构式为：

[0097]



II

[0098] 分子量 748, 分子式 $C_{44}H_{52}N_4O_7$ 。旋光: $[\alpha]_D^{25} = -6.9^\circ$ 。白色粉末。易溶于氯仿, 丙酮, 甲醇, 微溶于水。

[0099] 紫外光谱数据: UV λ (max) (MeOH): 222, 285, 292。

[0100] 红外光谱数据: IR ν (max) (KBr): 3388, 2947, 1728, 1619, 1461 cm^{-1}

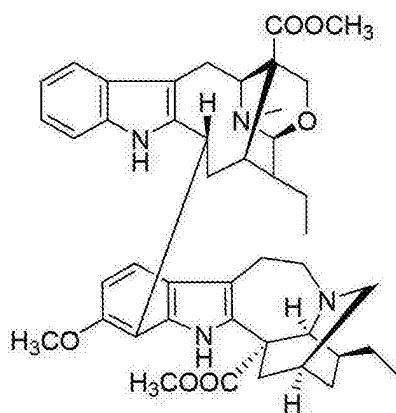
[0101] 质谱数据: HR-ESI-MS (m/z): 748. 3836 ($[M]^+$)

[0102] 1H NMR 和 ^{13}C NMR 数据见表 1-2。

[0103] 以上数据结合 2D NMR 分析证实了 divaricatine A 的化学结构为式 (II)。

[0104] Divaricatine B 的化学结构式为:

[0105]



III

[0106] 分子量 734, 分子式 $C_{47}H_{58}N_4O_7$ 。旋光: $[\alpha]_D^{25} = -26.4^\circ$ 。白色粉末。易溶于氯仿, 丙酮, 甲醇, 微溶于水。

[0107] 紫外光谱数据: UV λ (max) (MeOH): 222, 285。

[0108] 红外光谱数据: IR ν (max) (KBr): 3405, 2956, 1727, 1619, 1461。

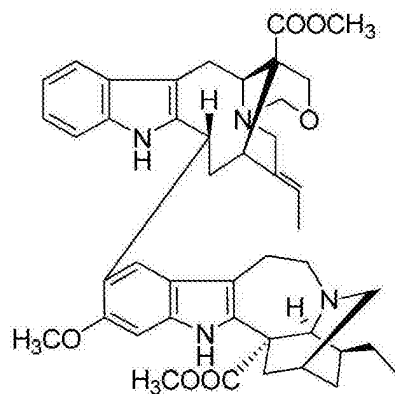
[0109] 质谱数据: HR-ESI-MS (m/z): 734. 3969 ($[M]^+$)

[0110] 1H NMR 和 ^{13}C NMR 数据见表 1-2。

[0111] 以上数据结合 2D NMR 分析证实了 divaricatine B 的化学结构为式 (III)。

[0112] Divaricatine C 的化学结构式为:

[0113]



IV

[0114] Divaricatine C 的结构是基于它的紫外光谱、红外光谱、质谱和核磁共振谱特别是二维核磁共振谱而确定。

[0115] 紫外光谱数据 :UV λ (max) (MeOH) :225, 295。

[0116] 红外光谱数据 :IR ν (max) (KBr) :3424, 2951, 1723, 1629, 1462

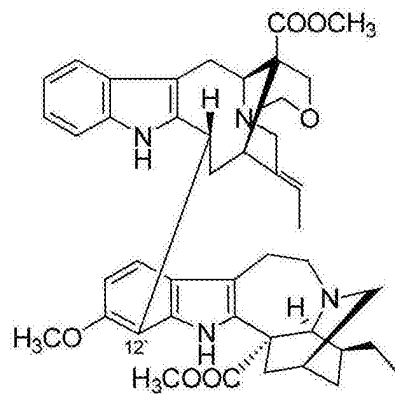
[0117] 质谱数据 :HR-ESI-MS (m/z) :732. 3676 ($[M]^+$)。

[0118] ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 数据见表 1-2。

[0119] 以上数据结合 2D NMR 分析证实了 divaricatine C 的化学结构为式(IV)。

[0120] Divaricatine D 的化学结构式为 :

[0121]



V

[0122] Divaricatine D 的结构是基于它的紫外光谱、红外光谱、质谱和核磁共振谱特别是二维核磁共振谱而确定。

[0123] 紫外光谱数据 :UV λ (max) (MeOH) :222, 285。

[0124] 红外光谱数据 :IR ν (max) (KBr) :3433, 2952, 1725, 1628, 1461。

[0125] 质谱数据 :HR-ESI-MS (m/z) :732. 3881 ($[M]^+$)。

[0126] ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 数据见表 1-2。

[0127] 以上数据结合 2D NMR 分析证实了 divaricatine B 的化学结构为式(IV)。

[0128] 表 1. Divaricatines A-D 的 ^1H NMR 数据 (J in Hz. δ in ppm)

postion	$\delta_{\text{H}}(1)$	$\delta_{\text{H}}(2)$	$\delta_{\text{H}}(3)$	$\delta_{\text{H}}(4)$
NH	9.75 br. s	9.66 br. s	7.57 br. s	9.71 br. s
3	4.93 br. d (12.2)	5.15 br. d(12.6)	5.14 br. d (13.8)	5.30 br. d (13.6)
5	3.48 m	3.49 m	4.13 t (9.2)	4.12 t (9.4)
6	3.22 m 4.13 dd (4.0,8.0)	3.27 m 4.01 m	3.41 m 3.75 m	3.57 m 3.73 m
9	7.72 d (7.2)	7.71 d (7.5)	7.09 d (7.5)	7.74 d (7.4)
10	7.04 t (7.2)	7.03 t (7.5)	7.62 t (7.5)	7.07 t (7.4)
11	7.06 t (7.2)	7.01 t (7.5)	7.09 t (7.5)	7.04 t (7.4)
12	7.12 d (7.2)	7.08 d (7.5)	7.04 d (7.5)	7.11 d (7.4)
14	2.24 m 3.08 m	2.02 m 2.73 m	2.07 m 2.50 m	1.95 m 2.60 m
15	2.79 m	2.38 m	3.79 m	3.80 m
17	3.69 overlap	3.61 overlap 3.49 overlap	3.63 d (11.0) 3.69 d (11.0)	3.57 overlap
[0129] 18	1.36 d (5.6)	0.95 t (7.3)	1.63 d (6.6)	1.60 d (6.7)
19	3.03 q(5.6)	1.45 m 1.49 m	5.18 q (6.6)	5.08 q (6.7)
20		1.39 m		
21	3.62 s	4.05 d (1.8)	3.25 d (16.0) 4.30 d (16.0)	3.19 d (15.8) 4.24 d (15.8)
22			4.62 d (9.6) 4.74 d (9.6)	4.55 d (9.7) 4.64 d (9.7)
NCH ₃	2.66 s	2.71 s		
COOCH ₃	2.28 s	2.31 s	2.43 s	2.45 s
NH'	7.37 br. s	7.52 br. s	7.65 br. s	7.70 br. s
3'	2.38 m 2.66 m	2.40 m 2.65 m	2.72 m 2.83 m	2.38m 2.65 m
5'	2.92 m 3.24 m	2.95 m 3.23 m	3.08 m 3.19 m	2.93 m 3.23 m
6'	2.84 m 2.93 m	2.83 m 2.95 m	2.71 m 2.94 m	2.82 m 2.93 m

	9'	7.22 d (8.6)	7.22 d (8.6)	6.83 s	7.20 d (8.6)
	10'	6.85 d (8.6)	6.86 d (8.6)		6.84 d (8.6)
	12'			6.80 s	
	14'	1.34 m	1.37 m	1.83 m	1.34 m
	15'	0.87 m	0.88 m	1.07 m	0.88 m
		1.45 m	1.48 m	1.69 m	1.46 m
	17'	0.54 br. d (13.2)	0.62 br. d (13.5)	1.80 m	0.59 br. d (13.9)
[0130]		1.66 br. d (13.2)	1.77 br. d (13.5)	2.50 m	1.72 br. d (13.9)
	18'	0.81 t (7.4)	0.81 t (7.4)	0.84 t (7.0)	0.81 t (7.4)
	19'	1.30 m	1.30 m	1.38 m	1.31 m
		1.43m	1.44 m	1.50 m	1.44 m
	20'	1.13 m	1.15 m	1.25 m	1.15 m
	21'	3.36 s	3.35 s	3.42 br. s	3.35 br. s
	11-OCH ₃ '	3.94 s	3.95 s	3.97 s	3.95 s
	COOCH ₃ '	3.71s	3.72 s	3.66 s	3.68 s

[0131] 表 2. Divaricatines A-D 的 ¹³C NMR 数据 (δ in ppm)

	position	$\delta_c(1)$	$\delta_c(2)$	$\delta_c(3)$	$\delta_c(4)$
	2	138.7 C	138.7 C	137.4 C	137.9 C
	3	36.2 CH	35.9 CH	37.0 CH	35.9 CH
	5	62.9 CH	64.2 CH	61.0 CH	61.7 CH
	6	31.2 CH ₂	32.1 CH ₂	25.5 CH ₂	26.3 CH ₂
	7	109.2 C	109.4 C	110.2 C	109.5 C
	8	130.0 C	130.1 C	129.9 C	130.2 C
	9	119.1 CH	119.0 CH	119.1 CH	118.8 CH
	10	119.7 CH	119.5 CH	117.7 CH	119.5 CH
	11	122.5 CH	122.4 CH	121.9 CH	122.5 CH
	12	110.8 CH	110.7 CH	110.0 CH	110.7 CH
[0132]	13	137.4 C	137.5 C	136.3 C	137.7 C
	14	33.5 CH ₂	41.2 CH ₂	38.3 CH ₂	36.4 CH ₂
	15	43.5 CH	41.2 CH	39.6 CH	40.2 CH
	16	50.7C	48.6 C	47.0 C	47.5 C
	17	73.1 CH ₂	72.9 CH ₂	76.7 CH ₂	76.9 CH ₂
	18	17.6 CH ₃	12.3 CH ₃	11.8 CH ₃	11.6 CH ₃
	19	59.1 CH	27.6 CH ₂	114.0 CH	113.5 CH
	20	65.2 C	51.4 CH	141.2 C	142.6 C
	21	90.1 CH	87.0 CH	50.0 CH ₂	50.3 CH ₂
	22			88.4 CH ₂	88.7 CH ₂
	NCH ₃	40.8 CH ₃	42.4 CH ₃		
	COOCH ₃	50.5 CH ₃	50.4 CH ₃	50.5 CH ₃	50.5 CH ₃
	COOCH ₃	172.1 C	172.9 C	173.6 C	173.9 C

	2'	136.6 C	136.7 C	135.4 C	136.5 C
	3'	52.8 CH ₂	52.5 CH ₂	51.5 CH ₂	52.5 CH ₂
	5'	53.8 CH ₂	53.8 CH ₂	53.1 CH ₂	53.7 CH ₂
	6'	22.5 CH ₂	22.5 CH ₂	22.2 CH ₂	22.4 CH ₂
	7'	109.5 C	109.7 C	110.1 C	109.6 C
	8'	125.4 C	125.4 C	122.5 C	125.4 C
	9'	117.5 CH	117.5 CH	118.0 CH	117.4 CH
	10'	105.6 CH	106.2 CH	127.3 C	106.2 CH
	11'	152.9 C	152.8 C	153.4 C	152.8 C
	12'	115.8 C	116.3 C	92.7 CH	116.2 C
[0133]	13'	135.9 C	135.9 C	134.8 C	135.9 C
	14'	28.1 CH	28.1 CH	27.4 CH	28.0 CH
	15'	32.8 CH ₂	32.8 CH ₂	32.1 CH ₂	32.7 CH ₂
	16'	55.1 C	55.2 C	55.1 C	55.0 C
	17'	35.3 CH ₂	35.5 CH ₂	36.6 CH ₂	35.5 CH ₂
	18'	11.8 CH ₃	11.9 CH ₃	11.8 CH ₃	11.7 CH ₃
	19'	27.4 CH ₂	27.4 CH ₂	26.8 CH ₂	27.4 CH ₂
	20'	39.4 CH	39.4 CH	39.3 CH	39.4 CH
	21'	57.3 CH	57.6 CH	57.7 CH	57.2 CH
	11-OCH ₃	57.0 CH ₃	57.4 CH ₃	56.0 CH ₃	57.4 CH ₃
	COOCH ₃	174.7 C	174.7 C	176.0 C	174.7 C
	COOCH ₃	52.7 CH ₃	52.6 CH ₃	52.7 CH ₃	52.5 CH ₃

[0134] 实施例 2 :

[0135] 按实施例 1 的方法先制得狗牙花属植物提取物, 化合物 divaricatines A-D, 加入 4% 的硫酸乙醇溶液, PH=4, 过滤, 干燥, 制成硫酸 divaricatines A-D。

[0136] 实施例 3 :

[0137] 按实施例 1 的方法先制得狗牙花属植物提取物, 化合物 divaricatines A-D, 加入 4% 的盐酸酸溶液, PH=4, 过滤, 干燥, 制成盐酸 divaricatines A-D。

[0138] 实施例 4 :

[0139] 按实施例 1 的方法先制得狗牙花属植物提取物, 化合物 divaricatines A-D, 加入 4% 的磷酸酸溶液, PH=4, 过滤, 干燥, 制成磷酸 divaricatines A-D。

[0140] 实施例 5 :

[0141] 按实施例 1 的方法先制得狗牙花属植物提取物, 化合物 divaricatines A-D, 加入 4% 的酒石酸溶液, PH=4, 过滤, 干燥, 制成酒石酸 divaricatines A-D。

[0142] 实施例 6 :

[0143] 按实施例 1 的方法先制得狗牙花属植物提取物, 化合物 divaricatines A-D, 加入 4% 的柠檬酸溶液, PH=4, 过滤, 干燥, 制成柠檬酸 divaricatines A-D。

[0144] 实施例 7 :

[0145] 按实施例 1 的方法先制得狗牙花属植物提取物, 化合物 divaricatines A-D, 加入 4% 的甲酸溶液, PH=4, 过滤, 干燥, 制成甲酸 divaricatines A-D。

[0146] 实施例 8 :

[0147] 按实施例 1 的方法先制得狗牙花属植物提取物, 化合物 divaricatines A-D, 加入 4% 的乙二酸溶液, PH=4, 过滤, 干燥, 制成乙二酸 divaricatines A-D。

[0148] 实施例 9 :

[0149] 将 divaricatines A-D 在适当的温度 (-20 ~ 30°C) 下溶于无水二氯甲烷及三氟乙酸的混合溶剂中, 与 NBS 反应得到 10- 溴代 divaricatines A-D, 然后将其溶于水, 在过渡金属催化下加热至 75°C 进行反应得到 10- 羟基 divaricatines A-D。

[0150] 类似地, 可以制备本发明结构通式(I) 所表述的其它化合物。

[0151] 制剂实施例 1 :

[0152] 按实施例 1 的方法先制得狗牙花属植物提取物, 化合物 divaricatines A-D, 以及利用有机酸(酒石酸, 柠檬酸, 甲酸, 乙二酸等) 或无机酸(盐酸, 硫酸, 磷酸等) 制成的盐, 按常规加注射用水, 精滤, 灌封灭菌制成注射液。

[0153] 制剂实施例 2 :

[0154] 按实施例 1 的方法先制得狗牙花属植物提取物, 化合物 divaricatines A-D, 以及利用有机酸(酒石酸, 柠檬酸, 甲酸, 乙二酸等) 或无机酸(盐酸, 硫酸, 磷酸等) 制成的盐, 将其溶于无菌注射用水中, 搅拌使溶, 用无菌抽滤漏斗过滤, 再无菌精滤, 分装于 2 安瓿中, 低温冷冻干燥后无菌熔封得粉针剂。

[0155] 制剂实施例 3 :

[0156] 将所分离得到 divaricatines A-D, 以及利用有机酸(酒石酸, 柠檬酸, 甲酸, 乙二酸等) 或无机酸(盐酸, 硫酸, 磷酸等) 制成的盐, 与赋形剂重量比为 9:1 的比例加入赋形剂, 制成粉剂。

[0157] 制剂实施例 4 :

[0158] 按实施例 1 的方法先制得狗牙花属植物提取物, 化合物 divaricatines A-D, 以及利用有机酸(酒石酸, 柠檬酸, 甲酸, 乙二酸等) 或无机酸(盐酸, 硫酸, 磷酸等) 制成的盐, 按其 与赋形剂重量比为 1:5-1:10 的比例加入赋形剂, 制粒压片。

[0159] 制剂实施例 5 :

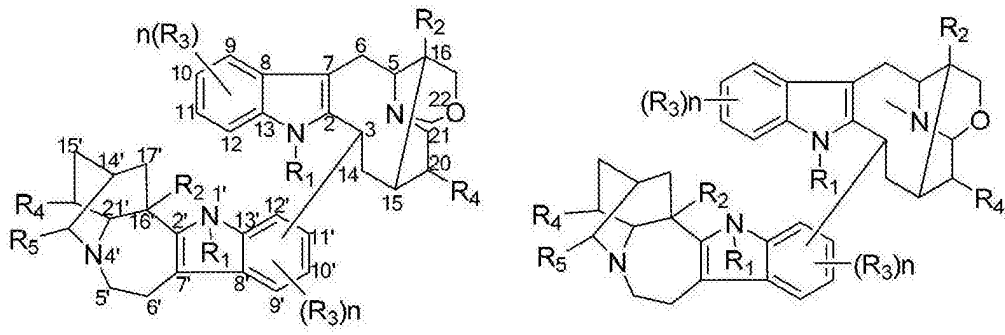
[0160] 按实施例 1 的方法先制得狗牙花属植物提取物, 化合物 divaricatines A-D, 以及利用有机酸(酒石酸, 柠檬酸, 甲酸, 乙二酸等) 或无机酸(盐酸, 硫酸, 磷酸等) 制成的盐, 按常规口服液制法制成口服液。

[0161] 制剂实施例 6 :

[0162] 按实施例 1 的方法先制得狗牙花属植物提取物, 化合物 divaricatines A-D, 以及利用有机酸(酒石酸, 柠檬酸, 甲酸, 乙二酸等) 或无机酸(盐酸, 硫酸, 磷酸等) 制成的盐, 按其 与赋形剂重量比为 5:1 的比例加入赋形剂, 制成胶囊或颗粒剂或冲剂。

[0163] 制剂实施例 7 :

[0164] 按实施例 1 的方法先制得狗牙花属植物提取物, 化合物 divaricatines A-D, 以及利用有机酸(酒石酸, 柠檬酸, 甲酸, 乙二酸等) 或无机酸(盐酸, 硫酸, 磷酸等) 制成的盐, 按其 与赋形剂重量比为 3:1 的比例加入赋形剂, 制成胶囊或颗粒剂或冲剂。



(I)

图 1

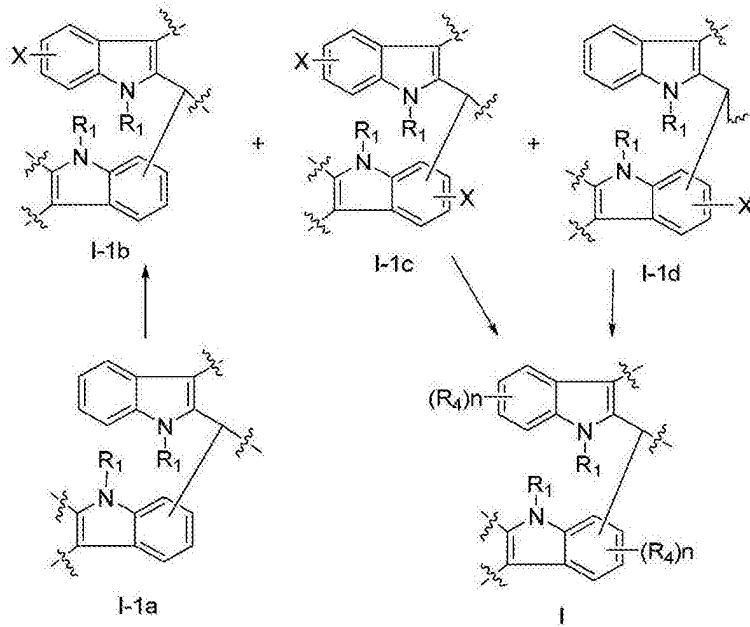


图 2

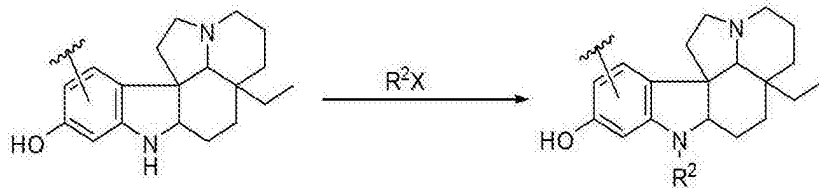


图 3

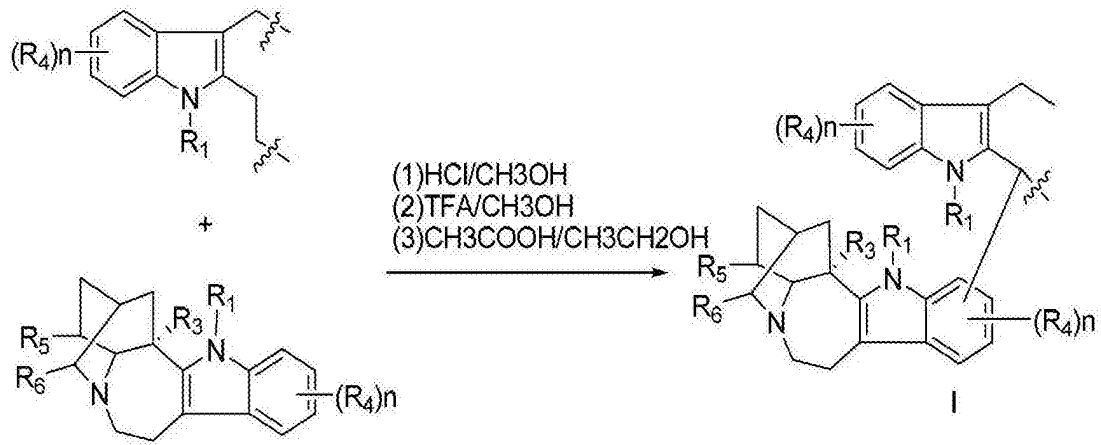


图 4