



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110840867 B

(45) 授权公告日 2021. 12. 21

(21) 申请号 201911111966.1

(22) 申请日 2019.11.14

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110840867 A

(43) 申请公布日 2020.02.28

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

(72) 发明人 许刚 赵金华 夏凡 林丽莎

(74) 专利代理机构 北京高沃律师事务所 11569
代理人 张敏

- (51) Int. Cl.
- A61K 31/122 (2006.01)
 - A61K 31/343 (2006.01)
 - A61K 31/365 (2006.01)
 - A61K 31/05 (2006.01)
 - A61K 31/335 (2006.01)
 - A61P 7/02 (2006.01)
 - A61P 9/10 (2006.01)
 - A61P 9/00 (2006.01)

(56) 对比文件

刘艾林等.丹参药理学活性物质基础研究现状.《中国药理学杂志》.2007,第42卷(第9期),641-646.

史海龙等.基于分子对接技术探讨复方丹参方多靶点治疗冠心病的作用机制.《中国实验方剂学杂志》.2016,第22卷(第18期),176-182.

师帅等.“丹参-三七”药对作用机制的网络药理学探讨.《中国实验方剂学杂志》.2018,第24卷(第18期),192-197.

ANTONIO MICHAVJLA等.2sNOR-ABIETANE AND REARRANGED ABIETANE DITERPENOIDS FROM THE ROOT OF SALVZA ARGENTEA.《Phytochemistry》.1986,第25卷(第8期),1935-1937.

李丹丹等.基于网络药理学的西洋参、丹参组方抗血栓活性成分及作用机制研究.《中西医结合心脑血管病杂志》.2019,第17卷(第9期),1290-1296.

审查员 卢立明

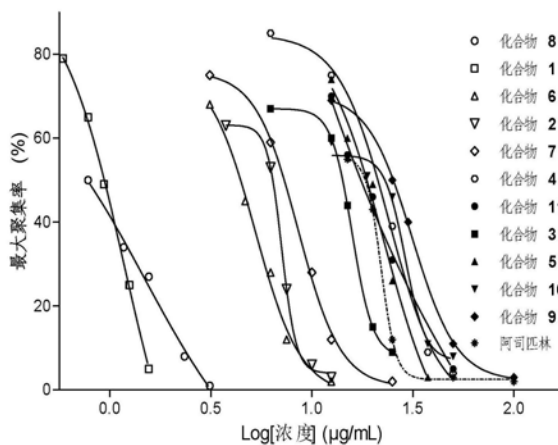
权利要求书1页 说明书10页 附图3页

(54) 发明名称

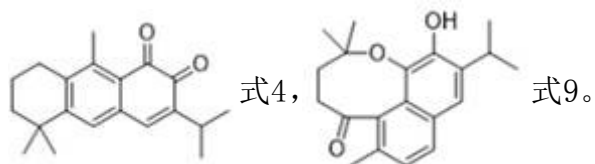
松香烷型二萜类化合物在制备预防和/或治疗血栓性疾病的药物中的应用

(57) 摘要

本发明提供了松香烷型二萜类化合物在制备预防和/或治疗血栓性疾病的药物中的应用,属于药物技术领域。本发明涉及的松香烷型二萜类化合物对花生四烯酸诱导的兔血小板聚集具有显著的抑制活性,且具有显著的体内抗血栓活性,以所述松香烷型二萜类化合物为活性成分制备预防和/或治疗血栓性疾病药物,具有潜在临床应用价值。



1. 具有抗血小板聚集活性的松香烷型二萜类化合物在制备预防和/或治疗血栓性疾病的药物中的应用,其特征在於,所述松香烷型二萜类化合物为具有式4、式9所示结构化合物中的一种或两种:



2. 根据权利要求1所述的应用,其特征在於,所述预防和/或治疗血栓性疾病的药物由松香烷型二萜类化合物和药学上可接受的辅料组成;所述预防和/或治疗血栓性疾病的药物中,松香烷型二萜类化合物的含量为0.05~99wt.%。

3. 根据权利要求2所述的应用,其特征在於,所述药学上可接受的辅料包括表面活性剂、缓冲物质、崩解剂、粘合剂、填充剂、润滑剂、增溶剂、香味剂和着色剂中的一种或几种。

4. 根据权利要求1所述的应用,其特征在於,所述预防和/或治疗血栓性疾病的药物中,松香烷型二萜类化合物的含量为0.5~90wt.%。

5. 根据权利要求1所述的应用,其特征在於,所述预防和/或治疗血栓性疾病的药物的剂型包括片剂、胶囊剂、颗粒剂、冲剂、丸剂、口服液制剂、或冻干粉针剂。

6. 根据权利要求1所述的应用,其特征在於,所述血栓性疾病包括冠心病、缺血性脑血管病和外周血管病中的一种或几种。

7. 根据权利要求6所述的应用,其特征在於,所述冠心病包括心绞痛和/或心肌梗塞;所述缺血性脑血管病包括脑卒中和/或脑梗死;所述外周血管病包括动脉粥样硬化血栓形成性疾病。

松香烷型二萜类化合物在制备预防和/或治疗血栓性疾病的药物中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及药物技术领域,尤其涉及松香烷型二萜类化合物在制备预防和/或治疗血栓性疾病的药物中的应用。

背景技术

[0002] 鼠尾草属(Salvia)植物是著名的药用植物类群之一,在我国共有82种,其中横断山区为其全球三大分布中心之一,资源极为丰富。除了在《神农本草经》被列为上品的丹参(S.miltiorhiza)之外,尚有云南鼠尾草、红根草、紫丹参等20多种该属植物在各地民间入药,多具有活血祛瘀、凉血止血等功效。鼠尾草属植物中主要含有二萜类成分和多酚类成分,其中二萜类成分结构多变、活性显著,一直是国际研究热点。然而,近年来对鼠尾草属植物中二萜类成分的药理活性研究主要集中于抗肿瘤和抗菌领域。

[0003] 花生四烯酸代谢途径是血小板活化过程重要的放大机制,且其代谢产物血栓烷素 A_2 (TXA₂)是血小板聚集的强诱导剂。TXA₂作用于血小板血栓烷素受体可促进其活化聚集,作用于内皮细胞血栓烷素受体可促进其表达粘附分子,作用于血管平滑肌细胞可增加血管张力等(Giannarelli C,Zafar MU and Badimon JJ.Prostanoid and TP-receptors in atherothrombosis:is there a role for their antagonism?Thromb haemost.,2010;10,949-954)。研究发现,在多种血栓性疾病(如心肌梗塞、非稳定性心绞痛和动脉粥样硬化)的病理过程中TXA₂的水平上调,且TXA₂介导的血小板聚集在血栓形成的病理生理过程中具有重要作用(Crescente M,Menke L,Chan MV,Armstrong PC and Warner TD.Eicosanoids in platelets and the effect of their modulation by aspirin in the cardiovascular system(and beyond).Br J Pharmacol.,2019;176,988-999)。因此,花生四烯酸代谢途径是血小板聚集过程中的重要环节,也是抗血小板类抗血栓药物研发的重要靶点(Coccheri S.Antiplatelet drugs-do we need new options?with a reappraisal of direct thromboxane inhibitors.Drugs.2010;70,887-908)。

[0004] 目前,临床上的抗血小板类抗血栓药物主要有COX-1抑制剂(如阿司匹林)、GPIIb/IIIa受体拮抗剂(如替罗非班)和P2Y₁₂受体拮抗剂(如氯吡格雷和普拉格雷)三类(Fan P,Gao Y,Zheng M,T X,Schoenhagen P and Jin Z.Recent progress and market analysis of anticoagulant drugs.J Thorac Dis.,2018;10,2011-2025)。由于药物疗效个体差异较大、高剂量时具有出血倾向,现有抗血小板类抗血栓药物存在安全窗窄的缺点,且可能产生药物抵抗(McFadyen JD,Schaff M and Peter K.Current and future antiplatelet therapies:emphasis on preserving haemostasis.Nat Rev Cardiol.2018;15,181-191)。例如,使用阿司匹林仍不能完全避免缺血性事件,其在COX-2大量表达的炎症状态下血栓抑制效果较差,且使用该药可能出现阿司匹林抵抗、过敏和胃肠道出血等副作用。噻吩并吡啶类P2Y₁₂受体拮抗剂如氯吡格雷和普拉格雷需经过体内代谢产生活性分子,其药代动力学和药效动力学个体差异较大,且可能导致治疗性血小板高反

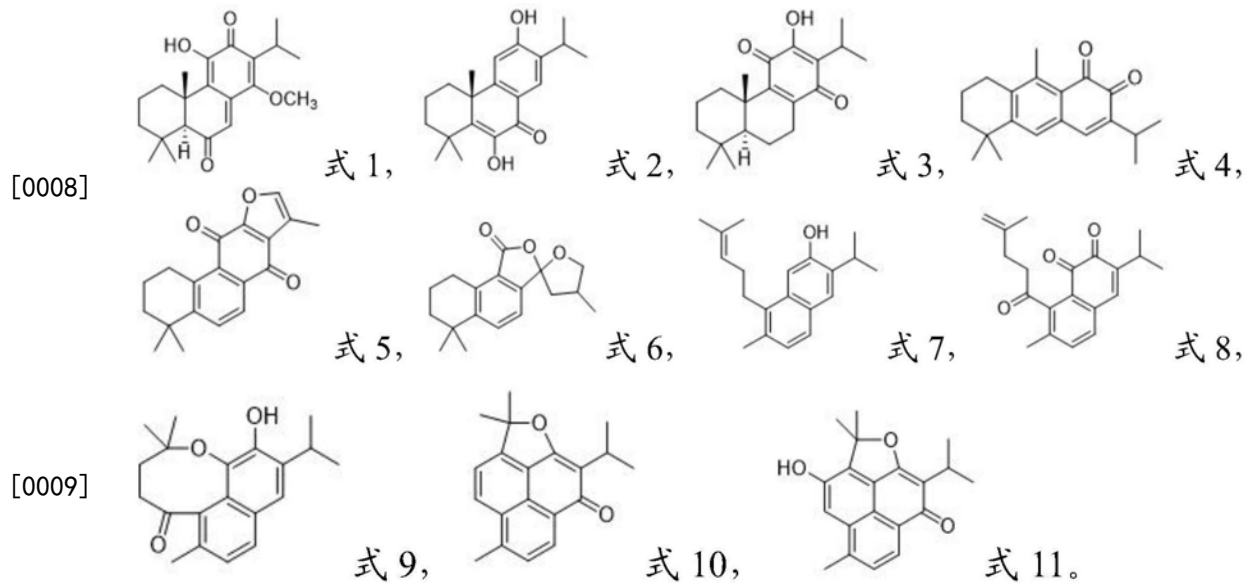
应性。因此,寻找有效防治血栓形成、低出血风险的抗血小板类抗血栓药物仍然迫在眉睫。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供松香烷型二萜类化合物在制备预防和/或治疗血栓性疾病的药物中的应用,本发明涉及的松香烷型二萜类化合物对花生四烯酸诱导的兔血小板聚集具有显著的抑制活性,且具有显著的体内抗血栓活性,可以用于制备预防和/或治疗血栓性疾病的药物。

[0006] 为了实现上述发明目的,本发明提供以下技术方案:

[0007] 本发明提供了松香烷型二萜类化合物在制备预防和/或治疗血栓性疾病的药物中的应用,所述松香烷型二萜类化合物为具有式1~式11所示结构化合物中的一种或几种:



[0010] 优选地,所述预防和/或治疗血栓性疾病的药物由松香烷型二萜类化合物和药学上可接受的辅料组成。

[0011] 优选地,所述药学上可接受的辅料包括药物载体、表面活性剂、缓冲物质、崩解剂、粘合剂、填充剂、润滑剂、赋形剂、增溶剂、香味剂和着色剂中的一种或几种。

[0012] 优选地,所述预防和/或治疗血栓性疾病的药物中,松香烷型二萜类化合物的含量为0.05~99wt.%。

[0013] 优选地,所述预防和/或治疗血栓性疾病的药物中,松香烷型二萜类化合物的含量为0.5~90wt.%。

[0014] 优选地,所述预防和/或治疗血栓性疾病的药物的剂型包括片剂、胶囊剂、颗粒剂、冲剂、丸剂、口服液制剂、注射剂或冻干粉针剂。

[0015] 优选地,所述血栓性疾病包括冠心病、缺血性脑血管病和外周血管病中的一种或几种。

[0016] 优选地,所述冠心病包括心绞痛和/或心肌梗塞;所述缺血性脑血管病包括脑卒中和/或脑梗死;所述外周血管病包括动脉粥样硬化血栓形成性疾病。

[0017] 本发明提供了松香烷型二萜类化合物在制备预防和/或治疗血栓性疾病的药物中的应用,所述松香烷型二萜类化合物为具有式1~式11所示结构化合物中的一种或几种。本

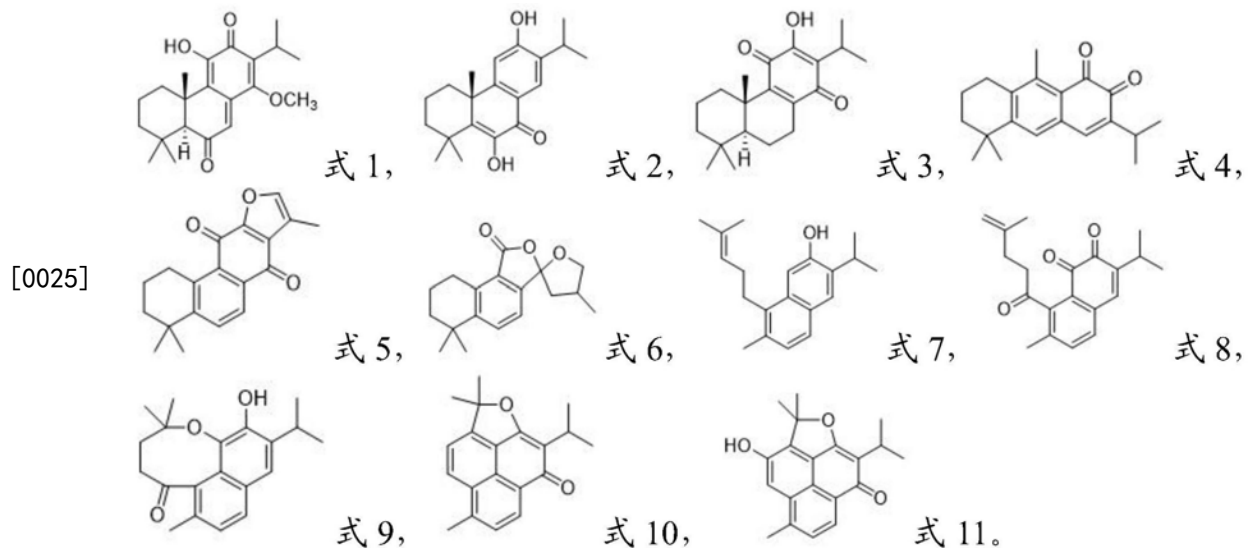
发明涉及的松香烷型二萜类化合物对花生四烯酸(arachidonic acid,AA)诱导的兔血小板聚集具有显著的抑制活性,且具有显著的体内抗血栓活性,以所述松香烷型二萜类化合物为活性成分制备预防和/或治疗血栓性疾病药物,具有潜在临床应用价值。

附图说明

- [0018] 图1为化合物2的碳谱(150MHz,acetone-d₆) ;
 [0019] 图2为化合物2的质谱图;
 [0020] 图3为化合物8在不同浓度条件下对花生四烯酸诱导兔血小板聚集的聚集率影响曲线;
 [0021] 图4为化合物2、6、4、7和阿司匹林对花生四烯酸诱导兔血小板聚集的聚集率影响曲线;
 [0022] 图5为实施例1所述化合物和阿司匹林浓度依赖性地抑制花生四烯酸诱导的兔洗涤血小板聚集曲线;
 [0023] 图6为不同化合物对FeCl₃诱导损伤后大鼠颈动脉阻塞时间的影响图。

具体实施方式

[0024] 本发明提供了松香烷型二萜类化合物在制备预防和/或治疗血栓性疾病的药物中的应用,所述松香烷型二萜类化合物为具有式1~式11所示结构化合物中的一种或几种:



[0026] 在本发明中,所述松香烷型二萜类化合物具有显著的抗血小板活性和体内抗血栓活性,以所述松香烷型二萜类化合物为活性成分制备预防和/或治疗血栓性疾病药物,具有潜在临床应用价值。本发明对所述松香烷型二萜类化合物的具体来源不作特殊限定,可以从植物(如康定鼠尾草(*S.prattii*))中分离得到,也可以通过化学合成的方法得到。在本发明中,式1~式11所示结构化合物的英文名称以及简称依次为:

- [0027] 14-methoxytaxodione(化合物1);
 [0028] montbretol(化合物2);
 [0029] royleanone(化合物3);
 [0030] 1,2-anthracenedione,5,6,7,8-tetrahydro-5,5,9-trimethyl-3-(1-

methylethyl) (化合物4)；

[0031] isotanshinone IIA (化合物5)；

[0032] cryptoacetalide (化合物6)；

[0033] 7-methyl-3-(1-methylethyl)-8-(4-methyl-3-penten-1-yl)-2-naphthalenol (化合物7)；

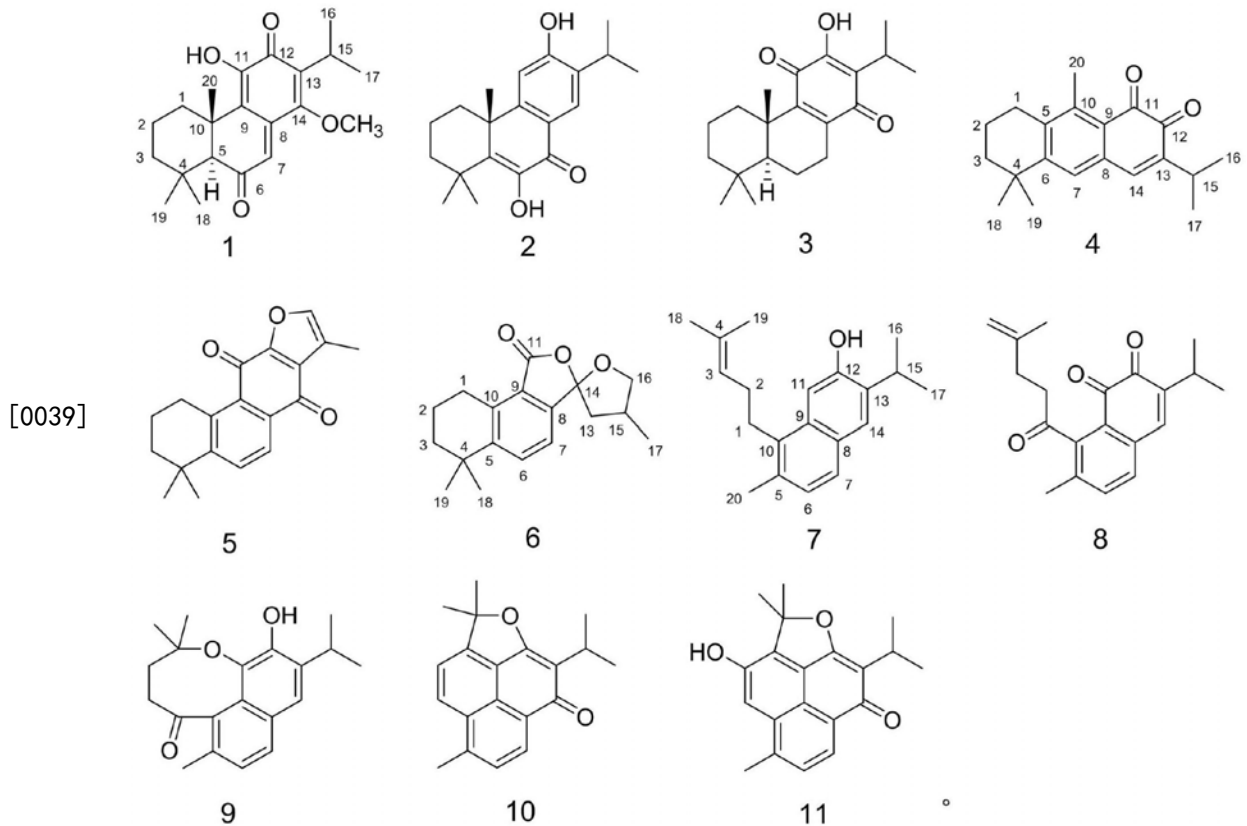
[0034] 1-oxoaethiopinone (化合物8)；

[0035] viroxocin (化合物9)；

[0036] salvilenone (化合物10)；

[0037] phenaleno[1,9-bc]furan-8(2H)-one,3-hydroxy-2,2,5-trimethyl-9-(1-methylethyl) (化合物11)。

[0038] 松香烷型二萜类化合物的结构与其简称的对应关系具体如下所示：



[0040] 在本发明中,所述预防和/或治疗血栓性疾病的药物优选由松香烷型二萜类化合物和药学上可接受的辅料组成。

[0041] 本发明对于所述药学上可接受的辅料没有特殊的限定,具体的,所述药学上可接受的辅料优选包括药物载体、表面活性剂、缓冲物质、崩解剂、粘合剂、填充剂、润滑剂、赋形剂、增溶剂、香味剂和着色剂中的一种或几种。本发明对于上述辅料中的具体种类没有特殊的限定,根据实际需要选择即可。

[0042] 在本发明中,所述预防和/或治疗血栓性疾病的药物中松香烷型二萜类化合物的含量优选为0.05~99wt.%,更优选为0.5~90wt.%。

[0043] 本发明对于所述预防和/或治疗血栓性疾病的药物的剂型没有特殊的限定,根据实际需要选择即可,具体可以为片剂、胶囊剂、颗粒剂、冲剂、丸剂、口服液制剂、注射剂或冻

干粉针剂。本发明对于不同剂型药物的制备方法没有特殊的限定,采用本领域技术人员熟知的方法即可。

[0044] 在本发明中,所述预防和/或治疗血栓性疾病的药物所给予的剂量将随着所使用的化合物、给予方式、所希望的治疗和所指示的障碍而变化。例如,口服给药,所述松香烷型二萜类化合物或其药学上可接受的盐的每日剂量可以在0.01微克/千克体重($\mu\text{g}/\text{kg}$)至100毫克/千克体重(mg/kg)的范围内。

[0045] 在本发明中,所述血栓性疾病优选包括冠心病、缺血性脑血管病和外周血管病中的一种或几种;其中,所述冠心病优选包括心绞痛和/或心肌梗塞;所述缺血性脑血管病优选包括脑卒中和/或脑梗死;所述外周血管病优选包括动脉粥样硬化血栓形成性疾病。

[0046] 下面将结合本发明中的实施例,对本发明中的技术方案进行清楚、完整地描述。显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0047] 实施例1

[0048] 本发明所述松香烷二萜类化合物1~11的理化性质、核磁共振谱碳(^{13}C)和质谱数据具体如下:

[0049] 化合物1: $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{O}_4$;无色晶体; ^{13}C NMR (150MHz, acetone- d_6): δ_{C} 37.9 (CH_2 , C-1), 19.3 (CH_2 , C-2), 43.2 (CH_2 , C-3), 33.5 (C, C-4), 62.7 (CH, C-5), 201.0 (C, C-6), 130.1 (CH, C-7), 138.0 (C, C-8), 124.4 (C, C-9), 43.3 (C, C-10), 145.2 (C, C-11), 183.9 (C, C-12), 133.4 (C, C-13), 163.0 (C, C-14), 26.7 (CH, C-15), 21.8 (CH_3 , C-16), 20.9 (CH_3 , C-17), 33.5 (CH_3 , C-18), 26.7 (CH_3 , C-19), 19.3 (CH_3 , C-20), 64.3 ($-\text{OCH}_3$); EIMS m/z 344 $[\text{M}]^+$ 。

[0050] 化合物2: $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_3$;无色晶体; ^{13}C NMR (150MHz, acetone- d_6): δ_{C} 34.1 (CH_2 , C-1), 18.1 (CH_2 , C-2), 38.5 (CH_2 , C-3), 36.3 (C, C-4), 144.7 (C, C-5), 160.3 (C, C-6), 179.9 (C, C-7), 120.8 (C, C-8), 140.1 (C, C-9), 40.8 (C, C-10), 111.9 (CH, C-11), 155.5 (C, C-12), 135.1 (C, C-13), 125.4 (CH, C-14), 27.5 (CH, C-15), 22.5 (CH_3 , C-16), 22.5 (CH_3 , C-17), 35.6 (CH_3 , C-18), 27.9 (CH_3 , C-19), 28.5 (CH_3 , C-20); EIMS m/z 314 $[\text{M}]^+$ 。化合物2的碳谱和质谱图具体如图1~2所示。

[0051] 化合物3: $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_3$;无色晶体; ^{13}C NMR (150MHz, CDCl_3): δ_{C} 36.4 (CH_2 , C-1), 17.6 (CH_2 , C-2), 41.4 (CH_2 , C-3), 33.6 (C, C-4), 51.9 (CH, C-5), 19.1 (CH_2 , C-6), 26.8 (CH_2 , C-7), 146.2 (C, C-8), 146.7 (C, C-9), 38.6 (C, C-10), 187.8 (C, C-11), 150.7 (C, C-12), 123.8 (C, C-13), 183.5 (C, C-14), 24.2 (CH, C-15), 20.2 (CH_3 , C-16), 20.1 (CH_3 , C-17), 33.6 (CH_3 , C-18), 20.0 (CH_3 , C-19), 21.9 (CH_3 , C-20); EIMS m/z 316 $[\text{M}]^+$ 。

[0052] 化合物4: $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_2$;红色粉末; ^{13}C NMR (150MHz, CDCl_3): δ_{C} 28.5 (CH_2 , C-1), 19.8 (CH_2 , C-2), 38.5 (CH_2 , C-3), 35.4 (C, C-4), 139.2 (C, C-5), 154.0 (C, C-6), 128.3 (CH, C-7), 134.8 (C, C-8), 127.5 (C, C-9), 144.5 (C, C-10), 183.2 (C, C-11), 182.5 (C, C-12), 144.9 (C, C-13), 141.2 (CH, C-14), 27.6 (CH, C-15), 21.7 (CH_3 , C-16), 21.7 (CH_3 , C-17), 31.4 (CH_3 , C-18), 31.4 (CH_3 , C-19), 16.7 (CH_3 , C-20); EIMS m/z 296 $[\text{M}]^+$ 。

[0053] 化合物5: $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{O}_3$;红色晶体; ^{13}C NMR (150MHz, acetone- d_6): δ_{C} 32.1 (CH_2 , C-1), 20.0 (CH_2 , C-2), 37.8 (CH_2 , C-3), 38.5 (C, C-4), 143.0 (C, C-5), 134.4 (CH, C-6), 121.0 (CH, C-

7), 125.7 (C,C-8), 128.3 (C,C-9), 125.6 (C,C-10), 184.2 (C,C-11), 150.7 (C,C-12), 144.4 (CH,C-13), 176.3 (CH,C-14), 127.6 (C,C-15), 143.0 (CH,C-16), 8.9 (CH₃,C-17), 30.7 (CH₃,C-18), 30.7 (CH₃,C-19); EIMS m/z 294[M]⁺。

[0054] 化合物6: C₁₈H₂₂O₃; 无色油状物; ¹³C NMR (150MHz, acetone-d₆): δ_C 26.5 (CH₂,C-1), 19.1 (CH₂,C-2), 39.0 (CH₂,C-3), 34.7 (C,C-4), 149.4 (C,C-5), 134.0 (CH,C-6), 120.6 (CH,C-7), 146.0 (C,C-8), 124.8 (C,C-9), 137.6 (C,C-10), 168.4 (C,C-11), 45.8 (CH₂,C-13), 113.7 (C,C-14), 33.4 (CH,C-15), 77.6 (CH₂,C-16), 17.0 (CH₃,C-17), 31.9 (CH₃,C-18), 31.9 (CH₃,C-19); EIMS m/z 286[M]⁺。

[0055] 化合物7: C₂₀H₂₆O; 无色油状物; ¹³C NMR (150MHz, CDCl₃): δ_C 29.7 (CH₂,C-1), 29.0 (CH₂,C-2), 125.1 (CH,C-3), 136.7 (C,C-4), 132.8 (C,C-5), 127.0 (CH,C-6), 126.5 (CH,C-7), 129.0 (C,C-8), 132.4 (C,C-9), 133.0 (C,C-10), 106.1 (CH,C-11), 154.7 (C,C-12), 132.8 (C,C-13), 126.5 (CH,C-14), 28.2 (CH,C-15), 23.0 (CH₃,C-16), 23.0 (CH₃,C-17), 26.0 (CH₃,C-18), 20.3 (CH₃,C-19), 17.8 (CH₃,C-20); EIMS m/z 282[M]⁺。

[0056] 化合物8: C₂₀H₂₂O₃; 红色晶体; ¹³C NMR (150MHz, CDCl₃): δ_C 206.2 (C,C-1), 32.1 (CH₂,C-2), 41.8 (CH₂,C-3), 136.2 (C,C-4), 134.8 (C,C-5), 138.4 (CH,C-6), 130.7 (CH,C-7), 127.8 (C,C-8), 145.6 (C,C-9), 146.0 (C,C-10), 180.2 (C,C-11), 180.4 (C,C-12), 146.3 (C,C-13), 139.0 (CH,C-14), 27.8 (CH,C-15), 21.7 (CH₃,C-16), 21.7 (CH₃,C-17), 110.4 (CH₂,C-18), 22.8 (CH₃,C-19), 18.4 (CH₃,C-20); EIMS m/z 310[M]⁺。

[0057] 化合物9: C₂₀H₂₄O₃; 无色油状物; ¹³C NMR (150MHz, CDCl₃): δ_C 210.85 (C,C-1), 41.2 (CH₂,C-2), 35.1 (CH₂,C-3), 84.3 (C,C-4), 130.4 (C,C-5), 126.3 (CH,C-6), 128.2 (CH,C-7), 126.8 (C,C-8), 127.0 (C,C-9), 132.2 (C,C-10), 132.1 (C,C-11), 147.4 (C,C-12), 136.6 (C,C-13), 121.2 (CH,C-14), 27.8 (CH,C-15), 22.3 (CH₃,C-16), 22.3 (CH₃,C-17), 26.0 (CH₃,C-18), 26.2 (CH₃,C-19), 18.9 (CH₃,C-20); EIMS m/z 312[M]⁺。

[0058] 化合物10: C₂₀H₂₀O₂; 无色晶体; ¹³C NMR (150MHz, CDCl₃): δ_C 129.5 (CH,C-1), 118.3 (CH,C-2), 146.1 (C,C-3), 96.2 (C,C-4), 140.6 (C,C-5), 127.5 (CH,C-6), 128.8 (CH,C-7), 127.5 (C,C-8), 123.0 (C,C-9), 129.9 (C,C-10), 125.5 (C,C-11), 165.7 (C,C-12), 119.5 (C,C-13), 185.8 (C,C-14), 24.1 (CH,C-15), 20.9 (CH₃,C-16), 20.9 (CH₃,C-17), 26.8 (CH₃,C-18), 26.8 (CH₃,C-19), 19.1 (CH₃,C-20); EIMS m/z 292[M]⁺。

[0059] 化合物11: C₂₀H₂₀O₃; 无色晶体; ¹³C NMR (150MHz, CDCl₃): δ_C 110.4 (CH,C-1), 152.5 (C,C-2), 138.8 (C,C-3), 98.7 (C,C-4), 140.8 (C,C-5), 129.8 (CH,C-6), 127.1 (CH,C-7), 120.1 (C,C-8), 127.8 (C,C-9), 134.0 (C,C-10), 128.2 (C,C-11), 168.3 (C,C-12), 119.5 (C,C-13), 188.1 (C,C-14), 24.1 (CH,C-15), 21.3 (CH₃,C-16), 21.3 (CH₃,C-17), 25.6 (CH₃,C-18), 25.6 (CH₃,C-19), 16.2 (CH₃,C-20); EIMS m/z 308[M]⁺。

[0060] 实施例2

[0061] 实施例1中所述化合物对花生四烯酸(AA)诱导的兔血小板聚集的影响:

[0062] 1. 溶液的配制

[0063] AA溶液: 按说明书方法加入标注体积的纯水, 充分溶解配制浓度为15mM的AA溶液, 分装后冷藏(-20℃)备用;

[0064] 受试样品(实施例1中所述化合物)溶液或对照品(阿司匹林)溶液: 用二甲基亚砜

(DMSO) 配制浓度为10mg/mL的受试样品母液或对照品母液,再用DMSO进行稀释配制所需浓度的受试样品溶液或对照品溶液;

[0065] 无Ca²⁺台氏液(Ca²⁺ free Tyrode's buffer):含NaCl 137mM、KCl 2.68mM、MgSO₄·7H₂O 0.2mM、NaH₂PO₄·2H₂O 0.42mM、NaHCO₃ 11.9 mM、葡萄糖5.05mM、EGTA0.2 mM,pH值为6.5;

[0066] 含0.25%牛血清白蛋白(BSA)的台氏液(Tyrode's buffer,0.25%BSA):台氏液含NaCl 137mM、KCl 2.68mM、MgSO₄·7H₂O 1.05mM、NaH₂PO₄·2H₂O 0.42mM、NaHCO₃ 11.9 mM、葡萄糖5.05mM、CaCl₂ 1.8 mM,pH值为7.35,实验前取适量台氏液加入牛血清白蛋白,配制得到含0.25%(W/V)牛血清白蛋白的台氏液。

[0067] 2.PRP、PPP和WP的制备

[0068] 实验兔耳中央用乙醇消毒液擦拭后,用医用一次性采血针经耳中央动脉采血至枸橼酸钠真空抗凝采血管(抗凝剂为3.2%(W/V)枸橼酸钠,全血:抗凝剂=9:1(V:V)),轻轻颠倒采血管数次使血液和抗凝剂混合均匀。

[0069] 将所得抗凝血离心(180×g,10min,20℃),收集上清液为富血小板血浆(platelet rich plasma,PRP)。将剩余血液再次离心(2400×g,20min,20℃),收集上清液为贫血小板血浆((platelet poor plasma,PPP);将PRP离心(600×g,10min,20℃),得到血小板块状沉淀,用无Ca²⁺台氏液对血小板块状沉淀进行洗涤(具体是重悬后离心),重复2次,再用含0.25%牛血清白蛋白(BSA)的台氏液重悬血小板,制备得到洗涤血小板悬液(washed platelet,WP)。

[0070] 3.受试样品对AA诱导兔PRP中血小板聚集的影响

[0071] 将带搅拌子的比色杯与不带搅拌子的比色杯分别置于血小板聚集仪预温孔,37℃预温10min。加入500μL PPP于不带搅拌子的比色杯中,并将其置于PPP测试位;向预温的带搅拌子的比色杯中加入250μL PRP,并加入2.5μL受试样品溶液/对照品溶液(终浓度为实验浓度1/100,即100μg/mL),继续预温5min后,将其放入PRP测试位;校正记录曲线的基线,加入2.5μL诱导剂(AA溶液,0.15mM)至PRP中,记录血小板聚集曲线,计算最大聚集率。以相同体积溶媒(DMSO)代替受试样品溶液/对照品溶液,检测得到溶剂对照最大聚集率,用于计算受试样品对AA诱导兔血小板聚集的抑制率,公式具体如下:

$$[0072] \quad \text{抑制率} = \frac{\text{溶剂对照最大聚集率} - \text{受试样品(或对照品)最大聚集率}}{\text{溶剂对照最大聚集率}} \times 100\%$$

[0073] 4.受试样品对AA诱导兔洗涤血小板聚集的影响

[0074] 将带搅拌子的比色杯与不带搅拌子的比色杯分别置于血小板聚集仪预温孔,37℃预温10min。加入500μL含0.25%牛血清白蛋白(BSA)的台氏液于不带搅拌子的比色杯中,并将其置于PPP测试位;向预温的带搅拌子的比色杯中加入250μL WP,并加入2.5μL受试样品溶液/对照品溶液(终浓度为实验浓度1/100,即100μg/mL),继续预温5min后,将其放入PRP测试位;校正记录曲线的基线,加入5μL诱导剂(AA溶液,0.3mM)至WP中,记录血小板聚集曲线,计算最大聚集率。以相同体积溶媒(DMSO)代替受试样品溶液/对照品溶液,检测得到溶剂对照最大聚集率,用于计算受试样品对AA诱导兔血小板聚集的抑制率。使用不同实验兔来源的WP重复检测3次或以上。

[0075] 5.实验结果

[0076] 各受试样品/对照品 (100 μ g/mL) 存在下AA (花生四烯酸, 终浓度为0.15mM) 诱导的兔血小板最大聚集率以及受试样品/对照品的抑制率如表1所示。

[0077] 表1 兔PRP中各受试样品/对照品对AA (0.15mM) 诱导血小板聚集的影响数据

[0078]	化合物	最大聚集率(%) ^a	聚集抑制率	化合物	最大聚集率(%) ^a	聚集抑制率
	DMSO	83.6 \pm 7.3				
	阿司匹林	1.0 \pm 0.8	0.99 \pm 0.01	化合物 6	8.5 \pm 15.1	0.90 \pm 0.18
	化合物 1	1.0 \pm 0.8	0.99 \pm 0.01	化合物 7	1.3 \pm 0.6	0.98 \pm 0.01
	化合物 2	2.0 \pm 1.7	0.98 \pm 0.02	化合物 8	0.0 \pm 0.0	1.00 \pm 0.00
[0079]	化合物 3	0.0 \pm 0.0	1.00 \pm 0.00	化合物 9	2.7 \pm 0.6	0.97 \pm 0.60
	化合物 4	3.0 \pm 1.6	0.96 \pm 0.02	化合物 10	1.7 \pm 0.6	0.98 \pm 0.01
	化合物 5	1.3 \pm 2.3	0.98 \pm 0.03	化合物 11	1.3 \pm 0.6	0.98 \pm 0.01

[0080] ^a实验结果表示为均值 \pm SD (n \geq 3)。

[0081] IC₅₀值:通过prism6软件对各受试样品浓度-血小板最大聚集率进行非线性拟合分析。将浓度转换为对数值后,选择log (inhibitor) vs. response--Variable slope (four parameters) 进行四参数拟合 ($Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{\wedge}((\text{LogIC}_{50} - X) * \text{HillSlope}))$), 计算IC₅₀值。各受试样品/对照品对AA (花生四烯酸, 终浓度为0.3mM) 诱导的兔洗涤血小板聚集的抑制活性如表2、图3~5 (其中, 图3和4为血小板聚集仪检测记录图) 所示。

[0082] 表2 各受试样品/对照品对AA (0.3mM) 诱导兔洗涤血小板聚集的抑制作用数据

[0083]	化合物	IC ₅₀ (μ g/mL) ^a	化合物	IC ₅₀ (μ g/mL) ^a
	阿司匹林	27.69 \pm 8.10	化合物 6	5.66 \pm 3.22
	化合物 1	1.03 \pm 0.21	化合物 7	10.05 \pm 2.73
	化合物 2	7.03 \pm 0.15	化合物 8	1.06 \pm 0.60
	化合物 3	19.52 \pm 8.00	化合物 9	44.88 \pm 29.63
	化合物 4	16.58 \pm 6.25	化合物 10	33.14 \pm 6.83
	化合物 5	25.20 \pm 18.73	化合物 11	18.87 \pm 7.07

[0084] ^a实验结果表示为均值 \pm SD (n \geq 3)。

[0085] 由表1~2和图3~5可见:在PRP或WP检测体系中,所述化合物1~11对AA诱导的兔血小板聚集均具有显著的抑制作用;其中,所述化合物1~11抑制兔洗涤血小板聚集的IC₅₀值小于或略大于阳性对照阿司匹林(aspirin)。这说明所述化合物具有显著的抗血小板活性,可作为活性成分用于制备抗血小板类抗血栓药物,具有潜在临床应用价值。

[0086] 实施例3

[0087] 实施例1中所述化合物对FeCl₃诱导的大鼠颈动脉血栓形成的抑制作用:

[0088] 1. 溶液配制

[0089] 50%FeCl₃溶液:用生理盐水溶解三氯化铁固体,配制浓度为50% (W/V) 的FeCl₃溶液;

[0090] 配药溶媒:将2.5%CMC-Na (W/V) 和0.25%Tween80 (V/V) 溶于生理盐水;

[0091] 药物溶液:用DMSO分别将实施例1中所述化合物充分溶解后,使用上述配药溶媒稀释10倍;

[0092] 2. FeCl₃诱导大鼠颈动脉血栓实验

[0093] 仪器操作:将Transonic超声血流量仪打开后,调零,定标,完成单位转换 (V----mL/min);

[0094] 动物模型:大鼠腹腔注射10%水合氯醛麻醉 (350mg/kg),固定,仰卧固定,沿颈部正中剪出切口,分离出右颈动脉约1.5cm,在动脉下方垫约1cm宽的硫酸纸条 (防止FeCl₃诱导血栓时损伤其它组织),超声血流探头涂好润滑剂后夹在分离出的颈动脉 (远心端) 上,开始连续检测颈动脉血流量。血流量检测稳定后 (至少2min),将吸有50%FeCl₃溶液的1cm×1cm的滤纸覆盖在暴露的颈动脉上 (靠近流量探头的近心端)。以FeCl₃诱导损伤为起点,以血流量记录曲线平稳位于0mL/min处为终点,计算颈动脉阻塞时间 (min)。

[0095] 给药方式:上述配制好的药物溶液在给药前用生理盐水稀释2倍后用于动物实验,给药体积为2mL/kg。大鼠腹腔注射 (i.p.) 给药约5min后麻醉,给药20min后开始FeCl₃诱导损伤;或大鼠麻醉后股静脉注射 (i.v.) 给药,给药后5min开始FeCl₃诱导损伤。

[0096] 3. 数据处理

[0097] 使用LabChart软件处理实验结果,计算阻塞时间,用Excel和prism6软件分别进行统计和作图 (结果见表3和图6)。各动物处理组阻塞时间的结果以“均值±SD”表示,FTTEST检验方差齐性,TTEST检验显著性差异 (对于每个处理组,与相应对照组相比,*p≤0.05,**p≤0.01,***p≤0.001)。

[0098] 4. 实验结果

[0099] 如表3和图6所示,FeCl₃诱导大鼠颈动脉损伤模型中,化合物8在2mg/kg剂量下,腹腔注射给药可显著延长阻塞时间。化合物9在2mg/kg剂量下,静脉注射给药可显著延长阻塞时间。10mg/kg剂量下,阳性对照阿司匹林腹腔注射对大鼠颈动脉阻塞时间无显著影响,静脉注射给药则可显著延长阻塞时间。

[0100] 表3 各受试样品/对照品对FeCl₃诱导损伤后颈动脉阻塞时间的影响数据

处理组	阻塞时间(min) ^{b,c}	F 检验	T 检验
溶媒 (i.p.) ^a	13.15 ± 0.94		
化合物 8 (i.p. 2 mg/kg)	17.37 ± 2.71*	0.036	0.016
[0101] 阿司匹林 (i.p. 10 mg/kg)	12.57 ± 2.47	0.053	0.637
vehicle (i.v.) ^a	11.58 ± 1.67		
化合物 9 (i.v. 2 mg/kg)	15.56 ± 1.14**	0.429	0.001
阿司匹林 (i.v. 10 mg/kg)	17.75 ± 3.17**	0.185	0.003

[0102] ^a对照组以相同给药方式给予等体积溶媒(10%DMSO+90%配药溶媒)；

[0103] ^b实验结果表示为均值±SD(n=6)；

[0104] ^c *P≤0.05, **P≤0.01, ***P≤0.001(双尾T检验) vs对照组。

[0105] 综上所述,本发明涉及的松香烷型二萜类化合物(化合物1~11)对花生四烯酸诱导的兔血小板聚集具有显著而强效的抑制活性。所述松香烷型二萜类化合物抑制花生四烯酸诱导的兔血小板聚集的IC₅₀约在1.03~44.88μg/mL范围内(阳性对照品阿司匹林的IC₅₀为27.69±8.10μg/mL),其中,化合物1~2及6~8的抗血小板活性强于阿司匹林(以IC₅₀值计,抑制活性强约2~25倍),其它化合物的抗血小板活性与阿司匹林相当。并且,所述松香烷型二萜类化合物具有显著的体内抗血栓活性,如,在FeCl₃诱导损伤的大鼠颈动脉血栓模型中,松香烷型二萜类化合物可以显著的延长动脉阻塞时间,其活性强于阿司匹林。

[0106] 值得注意的是,阿司匹林的抗血小板聚集机制是通过其乙酰基与环氧化酶(COX)活性位点的丝氨酸不可逆结合,使血小板的COX乙酰化,抑制COX功能,从而抑制前列腺素类化合物(PGG₂/PGH₂)和TXA₂的生成,发挥抗血小板作用。本发明所涉及的松香烷型二萜类化合物则具有明显不同于阿司匹林的抗血小板聚集作用机制。鉴于血小板聚集是形成血栓性疾病(特别是动脉血栓形成)的重要的病理机制之一,本发明所涉及的松香烷型二萜类化合物具有预防和/或治疗血栓性疾病的潜在临床应用价值。

[0107] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

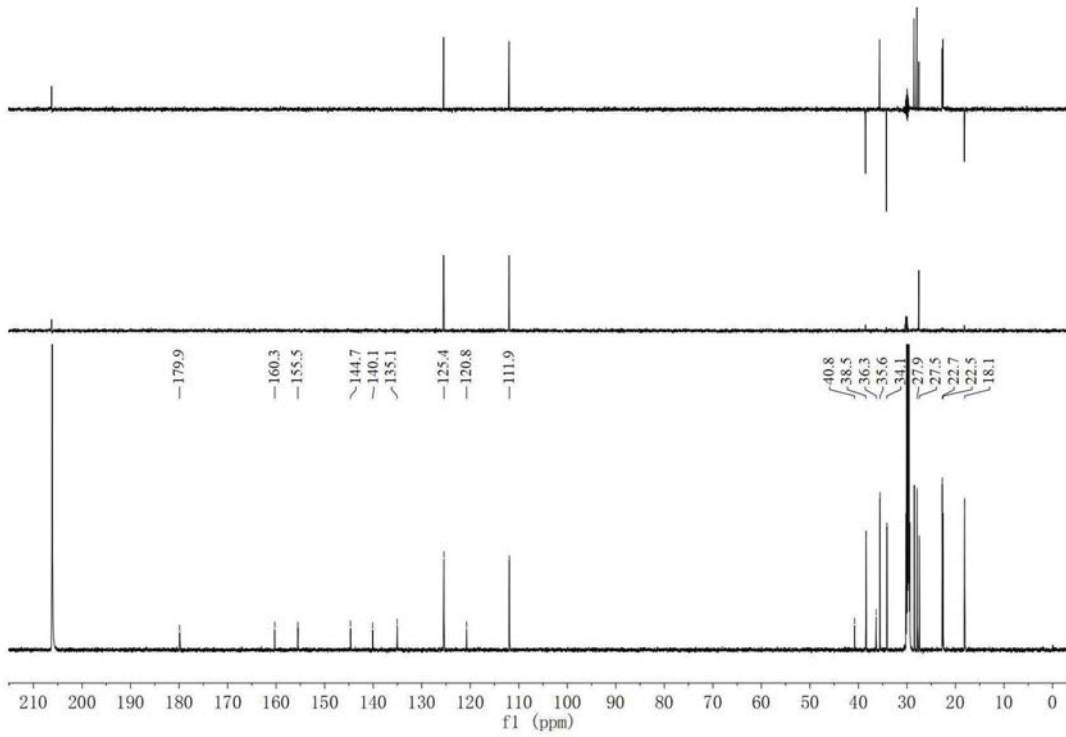


图1

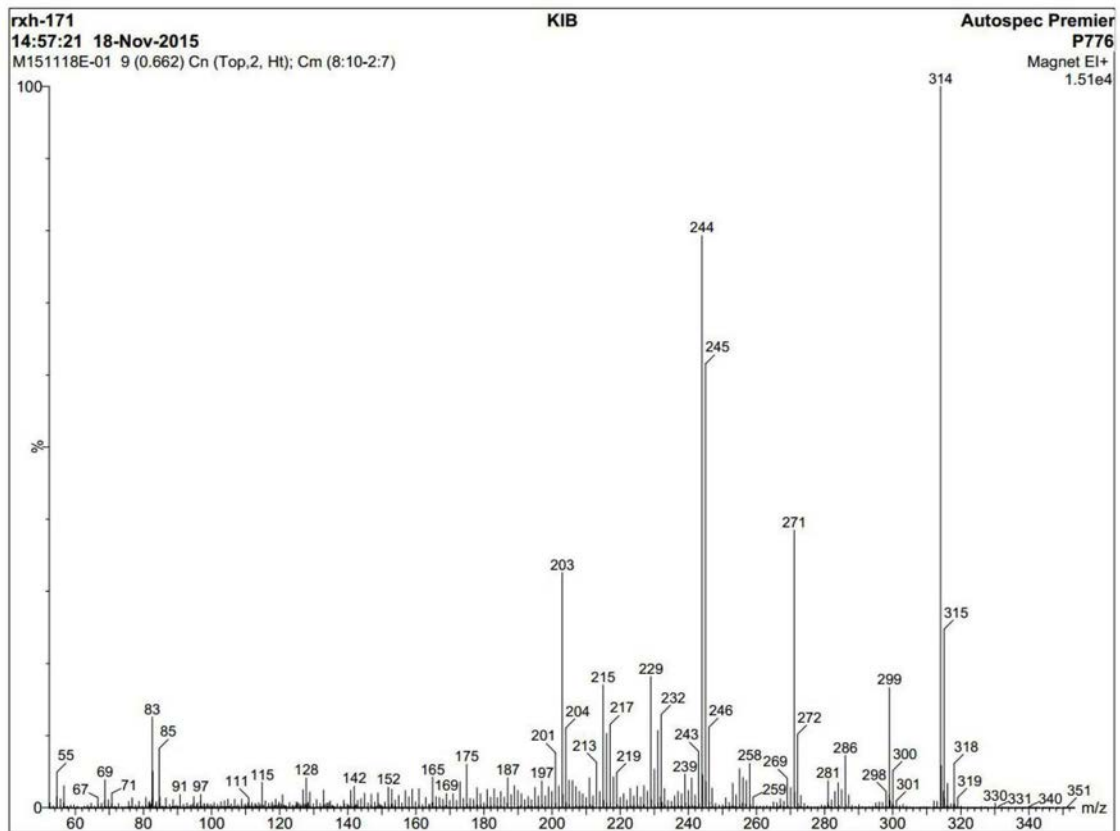


图2

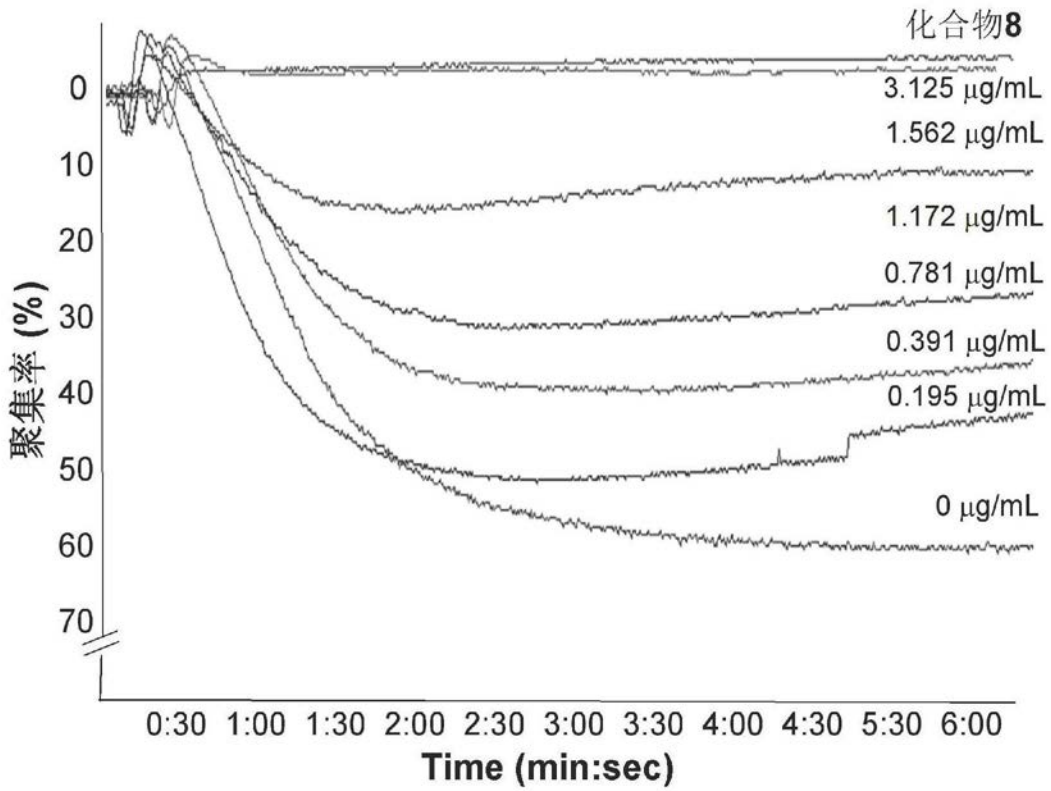


图3

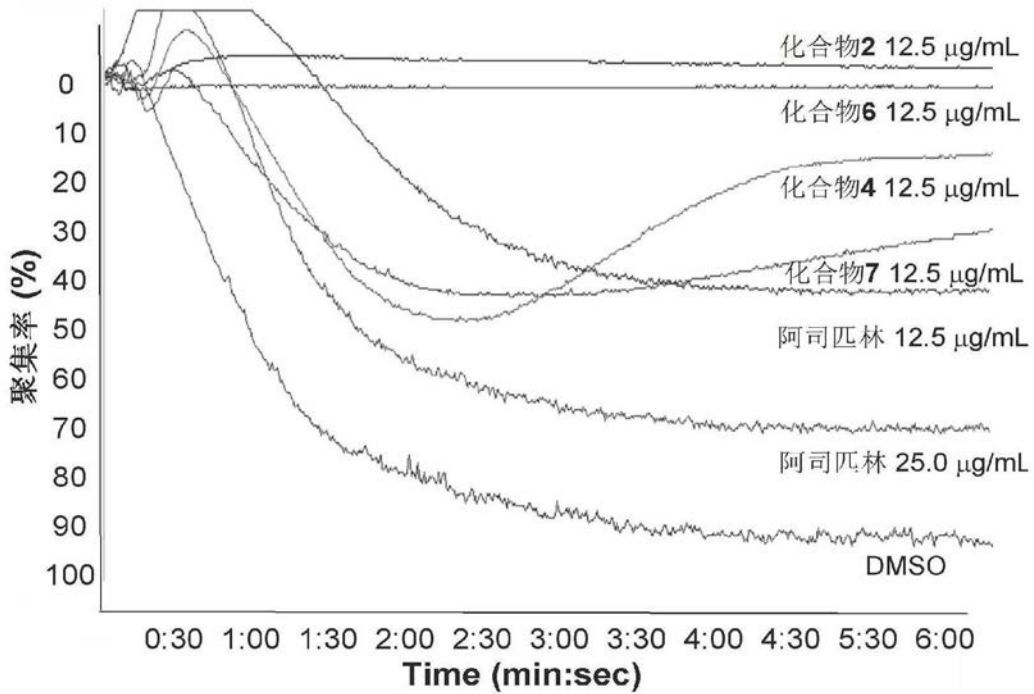


图4

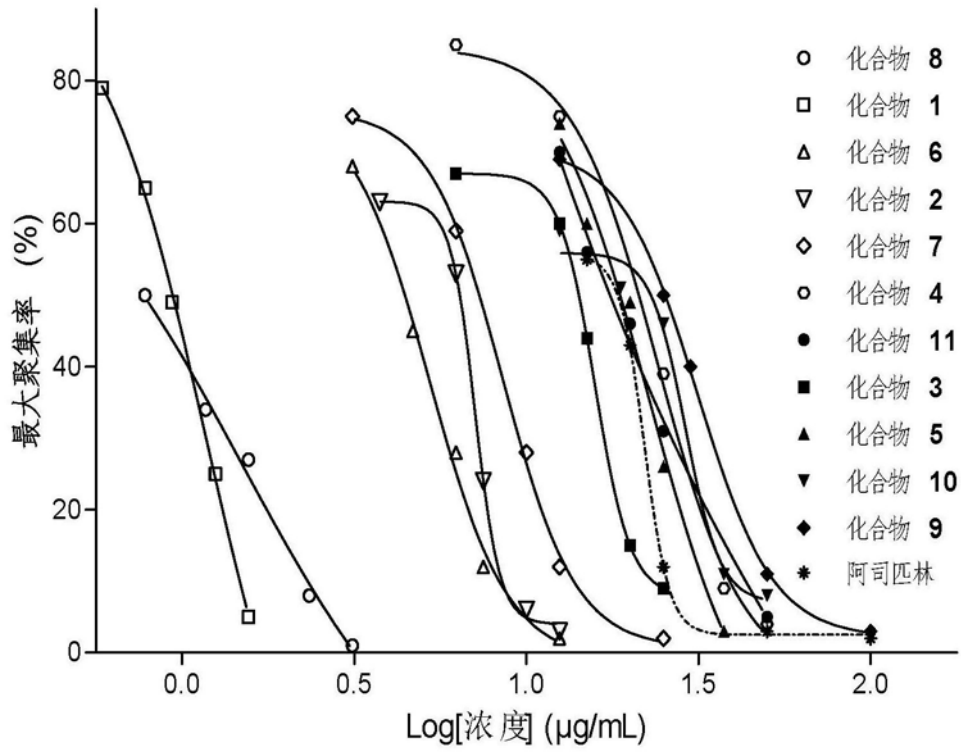


图5

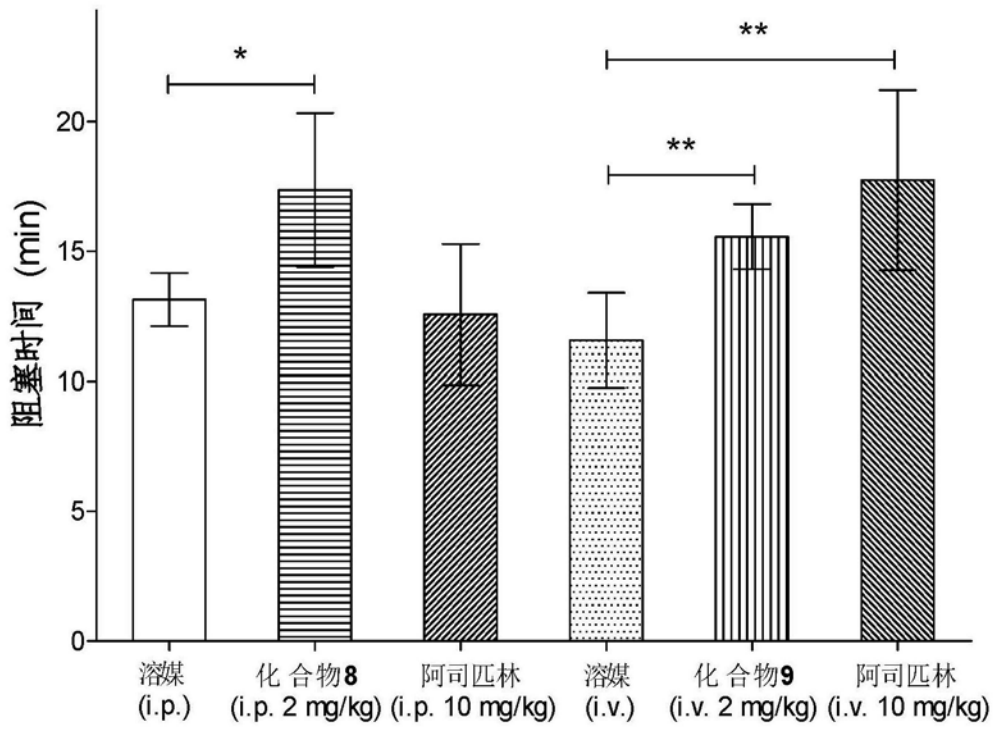


图6