

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

A61K 35/12

A61K 35/36 A61P 43/00

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00106593.9

[43]公开日 2000 年 11 月 8 日

[11]公开号 CN 1272365A

[22]申请日 2000.4.14 [21]申请号 00106593.9

[30]优先权

[32]1999.4.15 [33]JP [31]108221/1999

[71]申请人 日本脏器制药株式会社

地址 日本大阪府

[72]发明人 小西甚右卫门

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事
务所

代理人 魏永良

权利要求书 1 页 说明书 8 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 新型生理活性物质

[57]摘要

本发明提供一种具有非常高活性的新型生理活性物质。本发明的生理活性物质 是对动物或动物组织给予内外应激物,在由活化组织提取出的物质中加入硅酸盐,或提取使之达到高硅酸含量得到的。本发明的生理活性物质与从活化组织 提取的现有生理活性物质相比活性非常高,作为药物等非常有用。

ISSN 1 0 0 8 - 4 2 7 4

权 利 要 求 书

1、新型生理活性物质，是由活化组织提取、制备的物质，对氨基酸(茚三酮反应)、糖(苔黑酚-氯化铁 III-盐酸法)、磷(钼蓝法)和硅酸(钼蓝法)的显色反应为阳性，对蛋白质(三氯醋酸法)和苯酚(氯化铁试验法)的定性反应为阴性，1mg 干燥固体中按硅换算含有硅类超过20 μ g。

说明书

新型生理活性物质

本发明涉及对动物或动物组织给予内·外应激物，在由活化组织提取出的物质中加入硅酸盐，或提取使之达到高硅酸含量，得到的高活性新型生理活性物质。

生物体应对内外环境的变化，将生物体的物理、化学状态调节或维持在某一稳定的生理条件内，以维持个体的生命。为了维持调节生物体的上述内稳态，时常在生物体内产生各种物质，同时在病毒、细菌等侵入时或出现肿瘤细胞时，对这些内、外侵袭的抵抗物质也一同在体内产生。

但是，任何原因都可造成生体机能失去平衡，如果变成慢性，就将出现所谓病态的各种疾病。疾病的理想治疗方法是使保持生物体内稳态的机能活化或对其进行调节，使紊乱的生体机能的病态失调恢复到正常状态。众所周知生体机能的维持或正常化特别是通过细胞表面的各种受体或钠、钾、钙等离子通道进行的。已知随着年龄的增加，哺乳动物细胞中 DNA 的损伤修复能力降低，体内产生自由基促进老化、胶原病或癌变，另外胶原是广泛存在于皮肤、血管、软骨、眼球、肾脏等处的非细胞物质，随着年龄的增加胶原出现交联，失去弹性，变硬。

在抗原抗体反应中，由身体构成细胞中的肥大细胞放出的组胺是造成过敏反应的原因，通过抑制该肥大细胞的破裂，有望使异常病态缓和，趋于正常化。

本发明人着眼于调节、修复病态时产生的伴有生物体细胞机能缺陷的神经系统、内分泌系统失常的生物体内稳态维持机制，对于生物体内特别是在对生物体内、外应激反应的抵抗期生物体内产生的物质，即生物体组织活化时产生的、提高生物体自然治愈能力、使身体机能正常化的物质进行了悉心的研究，发现了具有更高活性的新型生

理活性物质，从而完成了本发明。

本发明涉及给各种动物或动物组织接种作为应激物的病毒或肿瘤细胞，使组织活化后，从这些活化组织中提取生理活性物质，向其中添加可溶性硅酸盐，或提取该生理活性物质使之达到高硅酸含量，得到的高活性新型生理活性物质，具有组胺游离抑制作用以及透明质酸酶活性抑制作用等生理活性，修复病态时产生的机能异常，正常化的生物体功能的调节、维持物质。

本发明的目的在于提供一种具有非常高的生理活性的新型生理活性物质。

本发明的物质是通过将动物的活化组织磨碎，加入提取溶剂除去组织碎片后，进行除蛋白处理，将其用吸附剂吸附，然后在洗脱吸附成分得到的生理活性物质中加入一定量的可溶性硅酸盐，或用吸附剂进行洗脱操作使之达到高硅酸含量，得到的具有高生理活性的新型生理活性物质。

以下详细说明本发明。本发明中，动物组织是指人和各种动物的病毒感染培养组织、培养细胞和病毒感染炎症组织或孵化鸡蛋的绒毛膜尿囊等，作为用于动物组织活化的应激物的病毒中有痘苗病毒、牛痘病毒、痘疮病毒、小鼠畸肢病毒、猴痘病毒等原痘病毒，蛇病毒(オアフウイルス)、副痘苗病毒、牛乳头状口内炎病毒等副痘病毒，绵羊痘病毒、山羊痘病毒、银屑病(块皮病)病毒等山羊痘病毒，鸡痘病毒、野兔纤维肿病毒等鸟痘病毒，兔粘液肿病毒、兔纤维肿病毒等兔痘病毒，其它猪痘病毒、Yava 猴肿瘤病毒、Tara 痘病毒等属于痘病毒科的病毒。另外，作为应激物的肿瘤细胞中可以使用来源于人和各种动物细胞的肿瘤培养细胞株，只要是可接种在上述动物、动物组织中的物质即可。

为了得到活化组织，作为动物可以兔、牛、马、绵羊、山羊、猪、鸡等家畜、家禽类，或猴、大鼠、小鼠、豚鼠、仓鼠等哺乳动物，可以根据使用的应激物的种类或目的适当选择。另外，作为培养细胞，只要是所使用的应激物可以增殖的培养细胞即可，例如人血细胞或胎

盘等各种组织以及上述动物及其胚胎的肾脏、皮肤、肺脏、睾丸、肝脏、肌肉、肾上腺、甲状腺、脑、神经细胞、血细胞等各组织的培养细胞。

将这些活化组织无菌取出并磨碎，加入其 1 倍至 5 倍量的提取溶剂，形成乳化悬浊液。作为提取溶剂可以使用蒸馏水、生理盐水、弱酸性至弱碱性的缓冲液，也可以适当添加甘油等稳定剂、苯酚等杀菌·防腐剂、氯化钠、氯化钾、氯化镁等无机盐类等。这时，通过冻结融解、超声波、细胞膜溶解酶或表面活性剂等的处理，可以破坏细胞组织而易提取。

将得到的乳状提取液过滤或离心分离除去组织碎片后，进行除蛋白处理。除蛋白可以采用公知的方法进行，可以采用通过加热、超声波、蛋白质变性剂，例如酸、碱、尿素、胍、有机溶剂、表面活性剂等进行处理、等电点沉淀、盐析等方法。然后，通过使用滤纸(纤维素、硝基纤维素等)、玻璃滤器、硅藻土、塞氏过滤板(Seitz filter)等进行过滤、超滤、凝胶过滤、离子交换树脂、离心分离等，除去析出的不溶蛋白质。

将这样得到的提取部分用盐酸、硫酸、氢溴酸等酸调节为酸性，优选 pH3.5 至 5.5，用吸附剂进行吸附操作。可以使用的吸附剂例如活性炭、高岭土、离子交换树脂等，在提取液中加入吸附剂进行搅拌或使之通过填充有吸附剂的柱，可以吸附有效成分。

自吸附剂洗脱生理活性物质，可以在上述吸附剂中加入提取溶剂，例如碱性水溶液或醇等的水混合性溶剂或其混合溶液，优选调节为 pH9 至 12，在室温下或适当加热或搅拌进行洗脱，通过过滤等常规方法除去吸附剂。然后，必要时通过采用层析法、超滤法、反渗透过滤法的透析法等惯用方法或进行脱盐处理，可以得到进一步精制的生理活性物质。当这样由活化组织提取的生理活性物质是干燥固体时，1mg 中按硅换算含有硅类 1~20 μ g。

上述生理活性物质中添加的硅类为水溶性硅酸或硅酸聚合形成的硅酸聚合物及其盐类，这些物质能够以原硅酸、偏硅酸、中二硅酸、

中三硅酸、中四硅酸等硅酸或其钠、钾等碱金属盐、或水玻璃等单体或聚合物的形式加入。另外，能够以碱性溶液溶解轻质和重质硅酸酐的形式加入，也可以加入将水晶、石英、长石、花岗岩、橄榄岩等含有大量硅的矿物质用碱溶解得到的物质或将硅藻土、膨润土玻璃、活性炭用碱性物质处理得到的物质，或者加入由硅含量高的木贼、紫芝、杜仲、稻、麦、竹、芒、问荆、海绵、硅藻类等植物或动物或硅藻土中提取的可溶性硅酸盐。另外，通过活化组织制备生理活性物质的时候，由活性炭、高岭土、膨润土等吸附剂洗脱时，由于 pH 的上升或洗脱时间的延长、洗脱温度的上升，由吸附剂混入硅类，也可以得到硅酸含量高的本发明生理活性物质。

本发明物质中的硅化合物可以根据其使用目的，并在不妨碍其作用的范围内适当添加到上述生理活性物质中，或使上述生理活性物质中含有本发明物质中的硅化合物。本发明物质中含有的硅类是水溶性的硅酸或硅酸盐聚合得到的硅酸聚合物，这些物质能够以原硅酸、偏硅酸、中二硅酸、中三硅酸、中四硅酸等硅酸或其钠、钾等碱金属盐等单体或聚合物的形式存在，本发明的物质中 1mg 干燥固体按硅换算含有硅类 20 μ g 以上。

以下列出本发明的优选方式。

(1)是由活化组织提取、制备的物质，对氨基酸(茚三酮反应)、糖(苔黑酚-氯化铁 III-盐酸法)、磷(钼蓝法)和硅酸(钼蓝法)的显色反应为阳性，对蛋白质(三氯醋酸法)和苯酚(氯化铁试验法)的定性反应为阴性，1mg 干燥固体中按硅换算含有硅类超过 20 μ g 的新型生理活性物质。

(2)如上述(1)所述的生理活性物质，在由活化组织提取的物质中加入硅酸盐。

(3)如上述(1)所述的生理活性物质，在由活化组织提取的物质中加入硅酸聚合物。

(4)如上述(1)所述的生理活性物质，在由活化组织提取的物质中加入二氧化硅用氢氧化钠或氢氧化钾溶解得到的硅酸盐。

(5)如上述(1)所述的生理活性物质,在由活化组织提取的物质中加入由硅含量高的木贼、紫芝、杜仲、稻、麦、竹、芒、问荆、海绵、硅藻类等植物或动物或硅藻土中提取的可溶性硅酸盐。

(6)如上述(1)所述的生理活性物质,在由活化组织提取的物质中加入将水晶、石英、长石、花岗岩、橄榄岩、玻璃等含有大量硅的岩石类用碱提取得到的硅酸。

(7)如上述(1)所述的生理活性物质,是在由活化组织提取时,从吸附剂洗脱的操作中增加硅的混入而得到的。

以下是本发明物质的制备方法的实施例。但是,这些实施例并不能限定本发明的范围。

实施例 1

在健康成熟的家兔皮肤上接种痘苗病毒,使之活化后,将活化的皮肤无菌剥离,将其切细,加入水,用匀浆机磨碎形成乳状物。然后将其加压过滤,用盐酸将得到的滤液调节为 pH5.0 后,加热到 100℃。过滤除去蛋白后,用氢氧化钠调节为 pH9.1,再在 100℃下加热处理后过滤。用盐酸将滤液调节为 pH4.1,加入活性炭 2%,搅拌 2 小时后过滤。再在滤液中加入活性炭 5.5%,搅拌 2 小时后过滤。在最初过滤得到的活性炭中加入水,用氢氧化钠调节为 pH9.9,在 60℃下搅拌 1.5 小时后过滤。在最初的活性炭和之后的活性炭中加入水,用氢氧化钠调节为 pH10.9,在 60℃下搅拌 1.5 小时后过滤。合并滤液,用盐酸中和后,在减压条件下干燥固化。1kg 活化皮肤的收量为 4g。以其作为出痘皮肤提取物。该提取物具有以下性质。

(1)性状:淡黄褐色无定形的吸湿粉末。

(2)溶解性:可溶于水,不溶于苯、醚。

(3)pH: 7.5

(4)紫外吸收: $\lambda_{\max}=270\text{nm}$

(5)显色反应:氨基酸(茚三酮反应:阳性)、糖(苔黑酚-氯化铁 III-盐酸法:阳性)、磷(钼蓝法:阳性)、蛋白质(三氯醋酸法:阴性)、苯酚(氯化铁试验法:阴性)

在水 100mL 中加入上述出痘皮肤提取物 1g、偏硅酸钠 500mg(按硅为 50mg)。用盐酸将其调节为 pH7.5 后,在减压条件下干燥固化得到粉末状的本发明生理活性物质。

实施例 2

在铂或镍的坩埚中加入轻质硅酸酐 3g 和氢氧化钠 2g,加入水 13mL 搅拌。再将该坩埚加热 5 分钟使之沸腾后,在该液体中加入水达到 100mL。该液体 100mL 中含有硅 1.4g,以其为硅酸溶液。在水 100mL 中加入实施例 1 的出痘提取物 0.5mg 和硅酸溶液 2.1mL,调节为 pH7.5,在减压条件下干燥固化。

本发明的生理活性物质与以往的出痘皮肤提取物相比硅化合物含量高,其生理活性效果例如抑制组胺由肥大细胞游离的作用、抑制透明质酸酶活性的作用、抑制由于组胺回流引起鼻腔内血管通透性的作用、抑制 II 型变态反应等效果,以下,详细叙述抑制组胺由肥大细胞游离的作用以及抑制透明质酸酶活性的作用。

(1)抑制组胺由肥大细胞游离的作用

将 Wistar 系大鼠断头,按照常规方法从腹腔内取出肥大细胞。在该细胞液中加入试样溶液和化合物 48/80,在 37℃ 下放置 10 分钟后,用冰冷却停止反应,用原甲醛使之发生荧光测定游离组胺。由于添加试样带来的组胺游离抑制率用 % 表示。将试样溶液中出痘皮肤提取物的浓度调节为 15mg/ml,对以各种浓度含有硅类的出痘皮肤提取物考察其抑制组胺游离的作用,确认本发明的生理活性物质具有高活性。一例结果如表 1 所示。

表 1

试样溶液中的硅浓度	组胺游离抑制率(%)
100μg/mL	16.9
300μg/mL	43.4
400μg/mL	53.0
500μg/mL	65.1

(2)抑制透明质酸酶活性的作用

可以说在变态反应 PCA 炎症反应部位, 血管的通透性亢进, 同时透明质酸酶活性上升, 另外已有抑制透明质酸酶活性可以抑制毛细血管通透性的报道。因此, 对于本发明的物质进行抑制透明质酸内活性的试验。

将透明质酸酶标准溶液(最终浓度: 5 单位/mL)0.5mL 和试样溶液 0.5mL 在 37℃ 下培养 10 分钟后, 将该 0.1mL 加入到透明质酸溶液 (150 μ g/mL)0.9mL 中, 在 37℃ 下温育 15 分钟。加入含有 2.5mg 牛血清白蛋白的醋酸缓冲液 (pH4.0)5mL, 停止反应, 5 分钟后精确测定 540nm 处的吸光度。用生理盐水代替试样溶液得到的吸光度作为对照, 求出酶活性抑制率。将试样溶液中出痘皮肤提取物的浓度调节为 15mg/mL, 对本发明生理活性物质抑制透明质酸酶活性的作用进行考察。一例结果如表 2 所示。

表 2

被测物质	试样溶液中的硅浓度	抑制率(%)
出痘皮肤提取物	50 μ g/mL	10.9
本发明生理活性物质	500 μ g/mL	89.1

从上述药理试验结果可以看出, 本发明生理活性物质与从活化组织提取出的现有生理活性物质相比活性非常高, 作为抗变态反应剂等药物是非常有用的。

本发明的生理活性物质与药用的各种载体或稀释剂适当组合, 按照常规方法可以制成各种制剂, 可以制成口服或非口服的固体、半固体、液体或气雾剂等剂型。在配方中, 可以单独使用本发明的物质, 也可以与其它药物活性成分适当组合。

作为注射剂可以制成水性溶剂或非水性溶剂(例如注射用蒸馏水、生理盐水、林格氏溶液、植物油、合成脂肪酸甘油酯、高级脂肪

酸酯、丙二醇等)的溶液或悬浊液, 调节 pH 达到等渗。另外, 可以与食盐、乳糖、白糖、甘露醇等一同冷冻干燥, 制成用时溶解的注射剂。

作为口服给药制剂, 可以直接或与合适的添加剂适当组合制成片剂、散剂、颗粒剂或胶囊剂, 其中添加剂例如乳糖、甘露醇、玉米淀粉、结晶纤维素等常用的赋形剂, 以及纤维素衍生物、阿拉伯胶、玉米淀粉、明胶等粘合剂, 玉米淀粉、马铃薯淀粉、羧甲醚纤维素(carmellose)、羧甲醚纤维素钙等崩解剂, 滑石粉、硬脂酸镁等润滑剂, 其它增量剂、润湿剂、缓冲剂、防腐剂、香料等。另外, 根据患者的状态或疾病的种类, 也可以制成最适于其治疗的上述以外的剂型, 例如与高级脂肪酸、高级醇、丙二醇、硅油、液体石蜡、凡士林、各种表面活性剂一起制成霜剂、软膏, 或与ウイテツプ溶胶一起制成栓剂, 或制成其它吸入剂、气雾剂、巴布剂、滴眼剂等适当的制剂。