

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2017 年 1 月 19 日 (19.01.2017)



(10) 国际公布号
WO 2017/008768 A1

- (51) 国际专利分类号:
C08B 37/02 (2006.01) A23L 1/29 (2006.01)
A61K 31/716 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2016/095989
- (22) 国际申请日: 2016 年 8 月 19 日 (19.08.2016)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201510409825.3 2015 年 7 月 14 日 (14.07.2015) CN
- (71) 申请人: 青岛海大海洋生物医药销售有限公司 (QINGDAO HAIDA MARINE BIOMEDICINE SALES CO., LTD.) [CN/CN]; 中国山东省青岛市崂山区香港东路 23 号海大浮山校区图书馆楼 B 区 101 房间刘丽丽, Shandong 266000 (CN)。
- (72) 发明人: 于广利 (YU, Guangli); 中国山东省青岛市崂山区香港东路 23 号刘丽丽, Shandong 266000 (CN)。郝杰杰 (HAO, Jiejie); 中国山东省青岛市崂

山区香港东路 23 号刘丽丽, Shandong 266000 (CN)。
丛大鹏 (CONG, Dapeng); 中国山东省青岛市崂山区香港东路 23 号刘丽丽, Shandong 266000 (CN)。
管华诗 (GUAN, Huashi); 中国山东省青岛市崂山区香港东路 23 号刘丽丽, Shandong 266000 (CN)。
赵峡 (ZHAO, Xia); 中国山东省青岛市崂山区香港东路 23 号刘丽丽, Shandong 266000 (CN)。
吕友晶 (LV, Youjing); 中国山东省青岛市崂山区香港东路 23 号刘丽丽, Shandong 266000 (CN)。
胡婷 (HU, Ting); 中国山东省青岛市崂山区香港东路 23 号刘丽丽, Shandong 266000 (CN)。

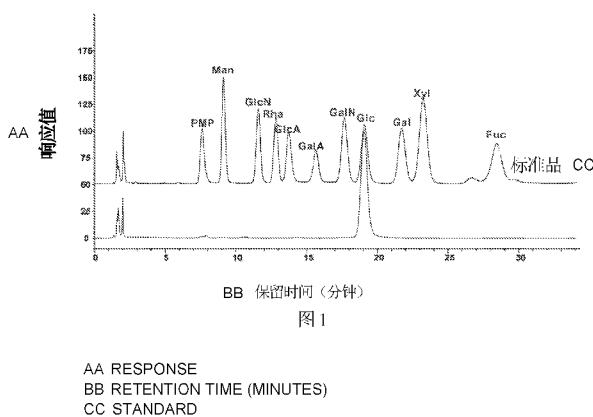
- (74) 代理人: 青岛致嘉知识产权代理事务所 (普通合伙) (QINGDAO ZHIJIA INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY FIRM (GENERAL PARTNERSHIP)); 中国山东省青岛市李沧区万年泉路 237 号中海国际社区 1511 室王晓晓, Shandong 266199 (CN)。

- (81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,

[见续页]

(54) Title: GLUCAN AND PREPARATION METHOD THEREOF, AND APPLICATION IN PREPARATION OF IMMUNE-ENHANCING AND ANTITUMOR MEDICINE AND FUNCTIONAL FOOD

(54) 发明名称: 一种葡聚糖及其制备方法和在制备用于免疫增强和抗肿瘤的药物和功能性食品中的应用



(57) Abstract: Provided are a glucan and preparation method thereof, and an application in the preparation of immune-enhancing and antitumor medicine and functional food. The method comprises: drying and crushing Antarctic brown algae; and after degreasing, water extraction, precipitation by calcium chloride, and purification by an anion exchange resin, obtaining a glucan having β -1,3-glucose as a main chain, β -1,6-glucose as a branched chain, and a molecular weight of 1.1 kDa-50 kDa. The β -glucan prepared in the present invention has immune-enhancing activities indicated by in vitro neutral red uptake of macrophages, and T and B lymphocyte proliferation tests, and also has functions of tumor growth suppression, tumor metastasis inhibition, and an increase in a spleen index of tumor-bearing mice immune system organs indicated by experiments.

(57) 摘要: 提供了一种葡聚糖及其制备方法和在制备用于免疫增强和抗肿瘤的药物和功能性食品中的应用, 将南极褐藻烘干、粉碎, 经脱脂、水提、氯化钙沉淀及阴离子交换树脂纯化, 获得以 β -1,3-葡萄糖为主链, β -1,6-葡萄糖为支链的葡聚糖, 分子量为 1.1kDa-50kDa。通过体外巨噬细胞吞噬中性红和 T、B 淋巴细胞增殖试验表明上述葡聚糖具有免疫增强活性, 通过实验表明具有抗肿瘤生长并抑制肿瘤转移、增强荷瘤小鼠免疫器官脾脏指数的作用。



WO 2017/008768 A1



BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

- (84) **指定国** (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO,

PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

根据细则 4.17 的声明:

- 发明人资格(细则 4.17(iv))

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。
- 在修改权利要求的期限届满之前进行, 在收到该修改后将重新公布(细则 48.2(h))。
- 包括关于请求恢复一项或多项优先权要求的信息(细则 26 之二.3 和 48.2(b)(vii))。

一种葡聚糖及其制备方法和在制备用于免疫增强和抗肿瘤的药物和功能性食品中的应用

技术领域

本发明属于海洋药物领域，涉及利用海藻制备高纯度低分子量葡聚糖的方法及其应用，尤其涉及一种葡聚糖及其制备方法和在制备用于免疫增强和抗肿瘤的药物和功能性食品中的应用。

背景技术

葡聚糖（Glucan）是一种以葡萄糖为唯一组成单元的多糖物质，广泛存在于动植物和微生物以及褐藻中。自然界中的葡聚糖种类很多，有直链或分支的 α/β -葡聚糖，葡萄糖之间其连接方式有 1,2-连接、1,3-连接、1,4-连接和 1,6-连接等形式，其中 β -1,3 及 β -1,6-葡聚糖有较好的生物活性，如抗肿瘤、增强免疫、促伤口愈合、抗辐射及预防高脂血症等。据世界卫生组织统计，在未来的 20 年，癌症病例将由 2012 年的 1400 万上升到 2200 万。中国每天有 8550 人成为癌症患者，每七到八人中就有一人死于癌症。癌症治疗除了手术疗法和放化疗法外，免疫疗法是一种安全可靠的疗法之一，其中通过免疫增强执行抗肿瘤作用的 β -1,3-葡聚糖的市场需求量很大。 β -1,3-葡聚糖除了用做免疫增强和抗肿瘤作用外，在代用血浆、预防口腔黏膜溃疡以及化妆品等行业中也具有广泛的用途，市场应用前景广阔。

目前，市场上 β -1,3-葡聚糖多来自于大麦、燕麦、食用真菌（香菇，灰树花，裂褶菌）、酵母等陆生生物，由于原料来源不同，所得 β -1,3-葡聚糖的分子量、连接方式及分支度等差别很大，质量很难控制，如注射药用的 β -葡聚糖主要来源于香菇，是一种具有 β -1,6-分支的 β -1,3-葡聚糖，由于其分子量高达 400-800kDa，水溶性较差。随着 β -葡聚糖应用领域的不断扩大，市场需求量的不断增长，现有的香菇 β -葡聚糖已不能满足市场的需要。

在海藻来源葡聚糖制备方面，经过专利检索发现有 1 项中国发明专利（专利号 201010169739.7）涉及了海藻低分子葡聚糖的制备方法，其原料是海带，裙带菜和羊栖菜，所用方法是采用 80%乙醇分级沉淀以及双氧水氧化的方法，所得到的产品分子量只有 800-1000 道尔顿（Da），结构不明确，也未见其有抑制肿瘤生长与转移的活性报导。

发明内容

本发明的目的在于提供了一种葡聚糖及其制备方法和在制备用于免疫增强和抗肿瘤的药物和功能性食品中的应用，所述 β -1,3/1,6-葡聚糖从南极褐藻中制备而得，细胞和动物实验均表明其安全性无毒，且具有显著的免疫增强和抗肿瘤活性，具有开发为免疫增强和抗肿瘤作用的潜力，能弥补市场药用 β -1,3/1,6-葡聚糖缺乏的需求。

为实现上述发明目的，本发明的技术方案是：

本发明提供了一种葡聚糖，所述葡聚糖为 β -1,3/1,6-葡聚糖，它以 β -1,3-葡萄糖为主链，以 β -1,6-葡萄糖为支链，重均分子量为 1.1 kDa ~50kDa；所述 β -1,3/1,6-葡聚糖中葡萄糖的含量为 90wt% ~ 98wt%，粗蛋白含量 0.5%wt -2.5%wt，其余为水分。

所述 β -1,3/1,6-葡聚糖从南极褐藻中提取获得，所述南极褐藻为海茸、海笋或雷松藻。

本发明提供了所述的葡聚糖的制备方法，它包括以下步骤：

- (1) 脱脂：将南极褐藻烘干、粉碎得到藻粉，用有机溶剂浸泡、搅拌，得脱脂藻粉；
- (2) 水提：所述脱脂藻粉室温下用水搅拌提取得水提液；
- (3) 分级：将步骤(2)所得水提液离心，在离心获得的上清液中加入氯化钙水溶液；搅拌后离心，取上清液进行透析或超滤脱盐，减压浓缩干燥获得粗多糖；
- (4) 纯化：将步骤(3)所述粗多糖用蒸馏水溶解，以蒸馏水和氯化钠水溶液为

流动相，经过阴离子交换树脂分离纯化，硫酸苯酚法检测，收集水洗脱组分，减压浓缩、冻干，获得所述 β -1,3/1,6-葡聚糖。

进一步的：所述步骤(1)中加入的有机溶剂的体积与藻粉的质量比例为 10~20: 1，采用浸泡或间歇搅拌脱脂 2~8 h，所用有机溶剂为乙醇、丙酮或甲醇中的一种或几种。

进一步的：所述步骤(3)中加入氯化钙水溶液的体积为上清液体积的 1~3 倍，所述氯化钙水溶液浓度为 1-3mol/L，透析或超滤所用膜的截留分子量为 1000~3000 Da。

进一步的：所述步骤(4)中阴离子交换树脂纯化所用氯化钠水溶液浓度为 0.01~2.0 mol/L，洗脱 2~8 个柱体积。

本发明还提供了所述的 β -1,3/1,6-葡聚糖在制备用于免疫增强和抗肿瘤的药物和功能性食品中的应用。

进一步的：所述 β -1,3/1,6-葡聚糖浓度为 1~100 $\mu\text{g/mL}$ 时，具有促进巨噬细胞吞噬中性红的作用。

进一步的：所述 β -1,3/1,6-葡聚糖浓度为 1~200 $\mu\text{g/mL}$ 时，具有促进 T、B 淋巴细胞增殖的作用。

进一步的：所述 β -1,3/1,6-葡聚糖剂量大于 0.5mg/kg/day 时，能够有效抑制荷瘤小鼠的肿瘤生长和肿瘤转移。

进一步的：所述 β -1,3/1,6-葡聚糖剂量大于 0.5mg/kg/day 时，能够有效提高荷瘤小鼠免疫器官的指数。

进一步的：所述 β -1,3/1,6-葡聚糖与紫杉醇、顺铂或氟尿嘧啶、多西他塞复配用于制备抗肿瘤的药物。

本发明的优点和有益效果为：

(1) 本发明将南极海藻烘干、粉碎，经脱脂、氯化钙沉淀及阴离子交换树脂纯化，获得高纯度的以 β -1,3-葡萄糖为主链及 β -1,6-葡萄糖为支链的低分子量

β -1,3/1,6-葡聚糖，其葡萄糖含量为 90wt% ~98wt%，蛋白含量 0.5%wt ~2.5%wt，重均分子量为 1.1 kDa ~50kDa。原料来源于南极可食用的褐藻，安全性高。

(2) 本发明采用的原料资源丰富、制备工艺简单、成本低廉、易于产业化生产，可弥补市场供应量不足的缺陷。

(3) 采用本发明方法制备的 β -1,3/1,6-葡聚糖，产品纯度 90wt% ~ 98wt%，分子量为 1.1 kDa ~50kDa。

(4) 采用本发明方法制备的低分子量 β -1,3/1,6-葡聚糖在细胞和动物水平具有免疫增强和抑制肿瘤生长与转移作用。

附图说明

图 1 为本发明所述 β -1,3/1,6-葡聚糖的单糖组成分析 HPLC 图。

图 2 为本发明所述 β -1,3/1,6-葡聚糖的傅里叶变换红外光谱 (FTIR) 图。

图 3 为本发明所述 β -1,3/1,6-葡聚糖的核磁共振碳谱 (^{13}C -NMR) 图。

图 4 为本发明所述 β -1,3/1,6-葡聚糖促进巨噬细胞吞噬中性红效果图。

图 5 为本发明所述 β -1,3/1,6-葡聚糖促进 B 淋巴细胞 (5A)、T 淋巴细胞 (5B) 增殖效果图。

图 6 为本发明所述 β -1,3/1,6-葡聚糖抑制鼠源 4T1 乳腺癌 (6A) 和人源乳腺癌 MDA-MB-231 的乳腺癌 (6B) 生长，并有效增加临床常用化疗药物紫杉醇的治疗效果的效果图。

具体实施方式

下面结合附图和具体实施例对本发明的技术方案进一步的详细说明，结合附图阅读本发明的具体实施例后，本发明的其他优点和特点将变得更加清晰，但本发明要求保护的范围并不局限于实施例表述的范围。

实施例 1

1、将南极褐藻（如海茸，海笋，雷松藻）烘干，粉碎得到藻粉，取藻粉 400 g，向藻粉中加入 4000 mL 95%乙醇浸泡、间歇搅拌 4 h，离心弃去乙醇，利用乙

醇重复提取 1 次，干燥得 300 g 脱脂藻粉。

2、取 30g 所述脱脂藻粉，加入 600 mL 双蒸水，室温搅拌提取 2-4h 得到水提液。

3、离心取上清液；在搅拌下向上清液中加入 3mol/L 氯化钙水溶液 600 mL，离心后收集上清液，然后用 3000 Da 的透析袋或者 1000Da 纳滤膜脱盐，减压浓缩后冷冻干燥，得到粗多糖 1.6 g。

4、将 0.5 g 所述粗多糖用 2 mL 水溶解，以蒸馏水和氯化钠水溶液为流动相，氯化钠水溶液浓度为 0.0~2.0 mol/L，采用阴离子交换色谱柱(填料为 Q Sepharose Fast Flow)进行分离，用超纯水洗脱，洗脱 2~8 个柱体积。合并收集洗脱液，再经浓缩后冷冻干燥，得到 0.32g 高纯度 β -1,3/1,6-葡聚糖。

本实施例中制备的 β -1,3/1,6-葡萄糖纯度为 97.5wt%，蛋白含量 2%wt，采用高效凝胶渗透色谱 (HPGPC) 与十八角激光散射仪 (MALLS) 和示差检测器 (RI) 联用分析，其分子量分布在 1.1 kDa ~50kDa 之间。

如图 1 所示，本发明产品的单糖组成分析结果表明，所得多糖的单糖组成中只有葡萄糖，表明其为葡聚糖。

如图 2 所示，本发明产品的红外光谱显示， 3347 cm^{-1} 为多糖羟基的 O-H 伸缩振动峰， 2917 cm^{-1} 为糖环中 C-H 的伸缩振动峰， 1646 cm^{-1} 为少量蛋白中 N-H 伸缩振动吸收峰， 1371 cm^{-1} 为 C-H 的变角振动峰； 1152 cm^{-1} ， 1072 cm^{-1} 和 1030 cm^{-1} 分别为 D-吡喃葡萄糖环非对称伸缩振动峰； 896 cm^{-1} 为 β -端基 C-H 的特征伸缩振动峰，由此可以判断本发明产品是一种 β -D-吡喃葡聚糖。

表 1 为本发明产品甲基化分析结果。从表中数据可知，本发明葡聚糖产品中各葡萄糖 (Glc) 之间存在 Glc(1 $\rightarrow$ 、 $\rightarrow$ 3)Glc(1 $\rightarrow$ 、 $\rightarrow$ 6)Glc(1 $\rightarrow$ 和 $\rightarrow$ 3,6)Glc(1 $\rightarrow$ 四种连接方式，表明该葡聚糖是以 1 $\rightarrow$ 3 连接为主链和以 1 $\rightarrow$ 6 连接为支链的葡聚糖。

表 1 褐藻 β -葡聚糖甲基化分析结果

连接方式	离子碎片
Glc($\rightarrow$	101、117、129、145、162、205

→3)Glc(1→	71、101、118、129、161、174、202、234、277
→6)Glc(1→	71、87、99、102、118、129、162、189、233
→3,6)Glc(1→	87、118、129、139、174、189、234、245、305

图3为本发明产品的 ^{13}C -NMR谱图。从图3中可以看出， $\delta 170\sim 176 \times 10^6$ 范围内无信号，表明样品中糖醛酸和乙酰基， $\delta 16\sim 18 \times 10^6$ 之间无信号，表明样品中无甲基糖。本发明产品信号归属见表2。从表2数据证明，所得产品是 β -1,3/1,6-葡萄糖。

表2 所述 β -1,3/1,6 葡聚糖的 ^{13}C -NMR 信号归属

连接方式	化学位移 $\times 10^6$					
	C1	C2	C3	C4	C5	C6
→3,6)Glc(β 1→	102.71	73.23	84.24	71.00	75.80	68.68
→3)Glc(β 1→	102.49	73.11	84.07	69.53	75.55	60.66
→6)Glc(β 1→	95.62	73.23	75.80	68.12	73.78	68.04
Glc(1 →	91.96	71.17	74.46	68.04	73.40	62.44

实施例2

用含10%胎牛血清的高糖DMEM培养基培养巨噬细胞(Raw264.7)，调整细胞浓度，将其接种于96孔细胞培养板中，使得细胞浓度为 2×10^4 个/孔，然后加入不同浓度样品，使 β -1,3/1,6-葡萄糖终浓度分别为 $5 \mu\text{g/mL}$ ， $25 \mu\text{g/mL}$ ， $50 \mu\text{g/mL}$ ， $100 \mu\text{g/mL}$ ，以空白培养基为对照。培养24小时之后吸去培养基，用PBS洗涤多余的培养基，加入0.075%中性红， 37°C 下，5% CO_2 孵育半小时，PBS洗净多余中性红，加细胞裂解液（无水乙醇：冰醋酸=1:1，体积比），混匀后在酶标仪上540 nm处测吸光度值，通过吸光值评价样品促进巨噬细胞吞噬中性红能力。以上实验做3次重复，取平均值进行结果统计分析。从图4结果可知，本发明产品在1~100 $\mu\text{g/mL}$ 时，随浓度的增加对巨噬细胞吞噬中性红均有明显的促进作用。

实施例3

昆明种小鼠脱颈椎处死后，75%酒精消毒3-5min，超净台解剖小鼠，摘取小鼠脾脏，PBS洗净，研磨成单个细胞，显微镜下计数，以 4×10^7 cells/mL的密度接

种于 96 孔板中, 4h 后加入不同浓度 β -1,3/1,6-葡聚糖 (1, 5, 25、50、100 μ g/ml), 设置给药组分别为 LPS+葡聚糖组, ConA+葡聚糖组, LPS+香菇多糖, ConA+香菇多糖, LPS 终浓度为 20 μ g/ml, ConA 终浓度为 4 μ g/ml。每个浓度设置 4 个平行孔, 在 5%CO₂, 37°C, 饱和湿度的恒温培养箱中培 72h, 实验结束前 4h, 每孔加入 20 μ L 5% 的 MTT, 继续常规孵育 4h, 用酶标仪 570nm/630nm 处比色, 测其各自的 OD 值, 计算细胞存活率 (Relative growth rate, RGR), 实验结果重复 3 次。

实验结果如图 5 所示, 葡聚糖在 1-200 μ g/ml 浓度时可有效增加脾脏淋巴细胞对 LPS 和 ConA 的反应能力, 表明葡聚糖具有促进脾脏淋巴细胞增殖的显著作用。

实施例 4

将小鼠 Lewis 肺癌细胞(LLC)在适宜的条件下培养, 待细胞生长至对数期时, 重悬细胞, 计数, 接种, 在体传代。于小鼠右前肢腋窝皮下接种 1mm³ 瘤块, 待瘤子长到 10mm³ 左右, 按体重将小鼠随机分组, 即葡聚糖高中低剂量组, 环磷酰胺(CTX, 30mg/mL)阳性对照组, 每组 10 只。空白组给予 20mL/kg/day 生理盐水, 给药组葡聚糖剂量为 1、4、10 mg/kg/day, 环磷酰胺(30mg/kg/day)为阳性对照组, 腹腔注射给药, 连续 21 天。每周测定 2 次瘤重, 计算瘤体积。颈椎脱臼处死小鼠后, 取出瘤块称重, 取出肺组织, 观察肿瘤转移结节数量。肿瘤抑制率按如下公式计算: 肿瘤抑制率 (%) = (空白对照组的瘤重 - 治疗组的瘤重) / 空白对照组瘤重 $\times$ 100%; 转移抑制率 = (空白对照组结节数 - 治疗组结节数) / 空白对照组结节数 $\times$ 100%, 结果如表 3 和表 4 所示。

表 3 海藻 β -1,3/1,6-葡聚糖抑制荷肺癌小鼠肿瘤生长结果 (n=10)

组别	体重(g)	瘤重(g)	抑瘤率(%)
模型组	29.7 $\pm$ 1.1	10.1 $\pm$ 0.11	-
CTX, 30mg	21.8 $\pm$ 1.4	2.83 $\pm$ 0.21**	71.9
葡聚糖, 1mg	27.4 $\pm$ 1.6	6.78 $\pm$ 0.61*	32.9
葡聚糖, 4mg	29.7 $\pm$ 1.9	7.13 $\pm$ 0.79	29.6

葡聚糖, 10mg	29.1±1.5	8.26±0.34	19.6
-----------	----------	-----------	------

注: $\bar{x} \pm SE$, 与模型组相比, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

由表 3 可以看出, 葡聚糖可以有效地抑制肿瘤的生长, 抑瘤率达 32.9%, 而且环磷酰胺在用药过程中出现体重下降的趋势, 但是葡聚糖组的体重没有出现明显下降, 表明葡聚糖药物安全无毒, 对动物也具有保护损伤的作用。

表 4 海藻 β -1,3/1,6-葡聚糖抑制肺癌转移结果 (n=10)

组别	数量 (只)	肺部结节数 (个)	转移抑制率(%)
模型组	10	6.9±2.8	—
CTX, 30mg	10	3.1±1.2**	55.1
葡聚糖, 1mg	10	4.1±1.7*	40.6
葡聚糖, 4mg	10	4.8±2.2	30.4
葡聚糖, 10mg	10	5.3±2.6	23.2

注: $\bar{x} \pm SE$, 与模型组相比, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

由表 4 可以看出, 葡聚糖能显著抑制 Lewis 肺癌的自发性肺转移, 抑制效率达 40.6%, 表明葡聚糖对肿瘤的转移侵袭具有有效的抑制作用。

实施例 5

液氮复苏小鼠乳腺癌细胞株 4T-1, 用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基培养; 培养瓶中扩大培养细胞, 达到所需细胞量后, 消化收集细胞; 用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基稀释成 500 万/ml 细胞悬液, 常规消毒后按每只 0.2ml 接种于小鼠右前肢腋窝部皮下。用游标卡尺测量移植瘤直径, 待肿瘤生长至 100mm³后将小鼠随机分组, 每组 12-15 只; 分别为生理盐水阴性对照组; 阳性对照紫杉醇组: 紫杉醇 25mg/kg, 紫杉醇 12.5mg/kg; 葡聚糖组: 1mg/kg, 4mg/kg; 联合给药组为紫杉醇和葡聚糖组合: 紫杉醇 12.5mg/kg+ 1mg/kg, 紫杉醇 12.5mg/kg+ 4mg/kg。给药方式, 紫杉醇为腹腔注射, 隔天给药。葡聚糖为腹腔注射, 每天给药。阴性对照组为腹腔注射同等体积的生理盐水, 结果如表 5 和表 6 所示。

表 5 海藻 β -1,3/1,6-葡聚糖抑制荷乳腺癌小鼠肿瘤生长结果 ($\bar{X} \pm S$ 单位: g)

	瘤重	抑制率%
阴性对照(生理盐水)	1.08±0.35	/
紫杉醇 25mg/kg	0.55±0.16	49**
紫杉醇 12.5mg/kg	0.80±0.25	26*
葡聚糖 1mg/kg	0.81±0.24	25*
葡聚糖 4mg/kg	0.87±0.29	19
紫杉醇 12.5mg/kg+ 1mg/kg	0.65±0.22	39**
紫杉醇 12.5mg/kg+ 4mg/kg	0.60±0.16	44**

注: $\bar{x} \pm SE$, 与模型组相比, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

表 5 数据表明, 海藻 β -1,3/1,6-葡聚糖在 1mg/kg 单独用药时显示出明显的抑瘤作用, 抑瘤率为 25%。联合 12.5mg/kg 紫杉醇用药后, 1 和 4mg/kg 的 β -1,3/1,6-葡聚糖明显的提高了紫杉醇的抑瘤效果, 使 12.5mg/kg 紫杉醇的抑瘤率从 26%升到 39%和 44%, 显示海藻 β -1,3/1,6-葡聚糖有增加紫杉醇抗肿瘤药效的作用。

表 6 海藻 β -1,3/1,6-葡聚糖增加荷乳腺癌小鼠免疫器官脾脏指数

脾指数 (脾指数=100*脾脏质量/体重质量)

	脾指数
阴性对照(生理盐水)	1.70±0.26
紫杉醇 25mg/kg	0.52±0.09**
紫杉醇 12.5mg/kg	1.56±0.3
葡聚糖 1mg/kg	2.08±0.27**
葡聚糖 4mg/kg	2.01±0.36*
紫杉醇 12.5mg/kg+1mg/kg	1.53±0.41
紫杉醇 12.5mg/kg+4mg/kg	1.32±0.25

注: $\bar{x} \pm SE$, 与模型组相比, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$

脾脏的淋巴细胞主要分为 T 和 B 淋巴细胞和少量的 NK 细胞, 完成细胞和体液免疫功能以及肿瘤细胞的杀伤作用。表 6 的结果表明, 海藻 β -1,3/1,6-葡聚糖单独给药组有明显的提高脾指数的作用, $P < 0.01$; 脾指数的提高说明脾脏的淋巴细胞增殖。

图 6A 实验过程中分离获得的肿瘤大小直观图。可明显观察到葡聚糖对乳腺癌的抑制作用，以及葡聚糖增加紫杉醇的抗乳腺癌效果。

实施例 6

液氮复苏人乳腺癌细胞株 MDA-MB-231，用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基培养；细胞融合达到 80%以上，0.25%胰酶消化，按 1: 3 比例传代一次，第 4 代左右，收集细胞计数，每只小鼠皮下接种 10^7 个细胞。待肿瘤长到直径大致 1-1.5cm 时，分离肿瘤组织，用剪刀剪成 1mm^3 大小接种裸鼠腋下。用游标卡尺测量移植瘤直径，待肿瘤生长至 10mm^3 后将小鼠随机分组，每组 10-12 只；分别为生理盐水阴性对照组；阳性对照 5-Fu（5-氟尿嘧啶）组：5mg/kg；葡聚糖组：0.5mg/kg, 1mg/kg, 5mg/kg；给药 21 天。5-Fu 为腹腔注射，隔天给药；给药 21 天。葡聚糖高中低三个剂量为腹腔注射，每天给药；给药 21 天。阴性对照组为腹腔注射同等体积的生理盐水。

实验结果如图 6B 所示，海藻 β -1,3/1,6-葡聚糖在不同给药剂量下对免疫缺陷裸鼠的乳腺癌肿瘤的重量具有明显的抑制作用，在低剂量 0.5mg/kg/day 时肿瘤抑制率达 25%，在 0.5mg/mg, 1.0mg/kg 以及 5.0mg/kg 剂量时，其乳腺癌肿瘤抑制率在 20-25%。

综上，本发明制备的所述 β -1,3/1,6-葡聚糖浓度为 1~200 $\mu\text{g/mL}$ 时，具有促进巨噬细胞吞噬中性红和 T、B 淋巴细胞增殖的作用，表明其具有显著的免疫增强活性。体内小鼠实验表明，在 0.5mg/kg/day 时，具有明显抑制肺癌和乳腺癌小鼠肿瘤生长和肺部肿瘤转移效果，并增加荷瘤小鼠免疫器官脾脏指数的作用，具有开发为免疫增强和抗肿瘤药物的潜力。

以上实施例仅用于说明本发明的技术方案，而非对其进行限制；尽管参照前述实施例对本发明进行了详细的说明，对于本领域的普通技术人员来说，依然可以对前述实施例中所记载的技术方案进行修改，或者对其中部分技术特征进行等同替换；而这些修改或替换，并不使相应技术方案的本质脱离本发明所要求保护

的技术方案的精神和范围。

权 利 要 求 书

1. 一种葡聚糖, 其特征在于, 所述葡聚糖为 β -1,3/1,6-葡聚糖, 它以 β -1,3-葡萄糖为主链, 以 β -1,6-葡萄糖为支链, 重均分子量为 1.1 kDa ~ 50kDa; 所述 β -1,3/1,6-葡聚糖中葡萄糖的含量为 90wt% ~ 98wt%, 粗蛋白含量 0.5%wt -2.5%wt, 其余为水分。

2. 根据权利要求 1 所述的葡聚糖, 其特征在于, 所述 β -1,3/1,6-葡聚糖从南极褐藻中提取获得, 所述南极褐藻为海茸、海笋或雷松藻。

3. 权利要求 2 所述的葡聚糖的制备方法, 其特征在于它包括以下步骤:

(1) 脱脂: 将南极褐藻烘干、粉碎得到藻粉, 用有机溶剂浸泡、搅拌, 得脱脂藻粉;

(2) 水提: 所述脱脂藻粉室温下用水搅拌提取得水提液;

(3) 分级: 将步骤(2)所得水提液离心, 在离心获得的上清液中加入氯化钙水溶液; 搅拌后离心, 取上清液进行透析或超滤脱盐, 减压浓缩干燥获得粗多糖;

(4) 纯化: 将步骤(3)所述粗多糖用蒸馏水溶解, 以蒸馏水和氯化钠水溶液为流动相, 经过阴离子交换树脂分离纯化, 硫酸苯酚法检测, 收集水洗脱组分, 减压浓缩、冻干, 获得所述 β -1,3/1,6-葡聚糖。

4. 根据权利要求 3 所述的葡聚糖的制备方法, 其特征在于, 所述步骤(1)中加入的有机溶剂的体积与藻粉的质量比例为 10~20: 1, 采用浸泡或间歇搅拌脱脂 2~8 h, 所用有机溶剂为乙醇、丙酮或甲醇中的一种或几种。

5. 根据权利要求 3 所述的葡聚糖的制备方法, 其特征在于, 所述步骤(3)中加入氯化钙水溶液的体积为上清液体积的 1~3 倍, 所述氯化钙水溶液浓度为 1-3mol/L, 透析或超滤所用膜的截留分子量为 1000~3000 Da。

6. 根据权利要求 3 所述的葡聚糖的制备方法, 其特征在于, 所述步骤(4)中阴离子交换树脂纯化所用氯化钠水溶液浓度为 0.01~2.0 mol/L, 洗脱 2~8 个柱体积。

7. 权利要求 1 或 2 所述的 β -1,3/1,6-葡聚糖在制备用于免疫增强和抗肿瘤的
药物和功能性食品中的应用。

8. 根据权利要求 7 所述的 β -1,3/1,6-葡聚糖在制备用于免疫增强和抗肿瘤的
药物和功能性食品中的应用，其特征在于，所述 β -1,3/1,6-葡聚糖浓度为 1~100
 $\mu\text{g/mL}$ 时，具有促进巨噬细胞吞噬中性红的作用。

9. 根据权利要求 7 所述的 β -1,3/1,6-葡聚糖在制备用于免疫增强和抗肿瘤的
药物和功能性食品中的应用，其特征在于，所述 β -1,3/1,6-葡聚糖浓度为 1~200
 $\mu\text{g/mL}$ 时，具有促进 T、B 淋巴细胞增殖的作用。

10. 根据权利要求 7 所述的 β -1,3/1,6-葡聚糖在制备用于免疫增强和抗肿瘤的
药物和功能性食品中的应用，其特征在于，所述 β -1,3/1,6-葡聚糖剂量大于
0.5mg/kg/day 时，能够有效抑制荷瘤小鼠的肿瘤生长和肿瘤转移。

11. 根据权利要求 7 所述的 β -1,3/1,6-葡聚糖在制备用于免疫增强和抗肿瘤的
药物和功能性食品中的应用，其特征在于，所述 β -1,3/1,6-葡聚糖剂量大于
0.5mg/kg/day 时，能够有效提高荷瘤小鼠免疫器官的指数。

12. 根据权利要求 7 所述的 β -1,3/1,6-葡聚糖在制备用于免疫增强和抗肿瘤的
药物和功能性食品中的应用，其特征在于，所述 β -1,3/1,6-葡聚糖与紫杉醇、顺铂
或氟尿嘧啶、多西他塞复配用于制备抗肿瘤的藥物。

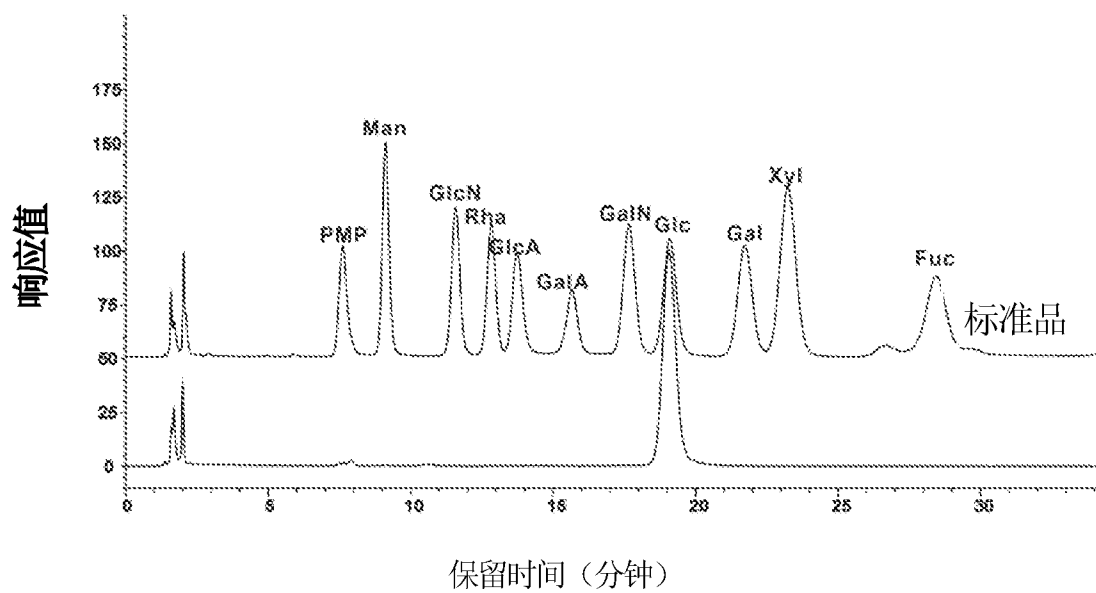


图 1

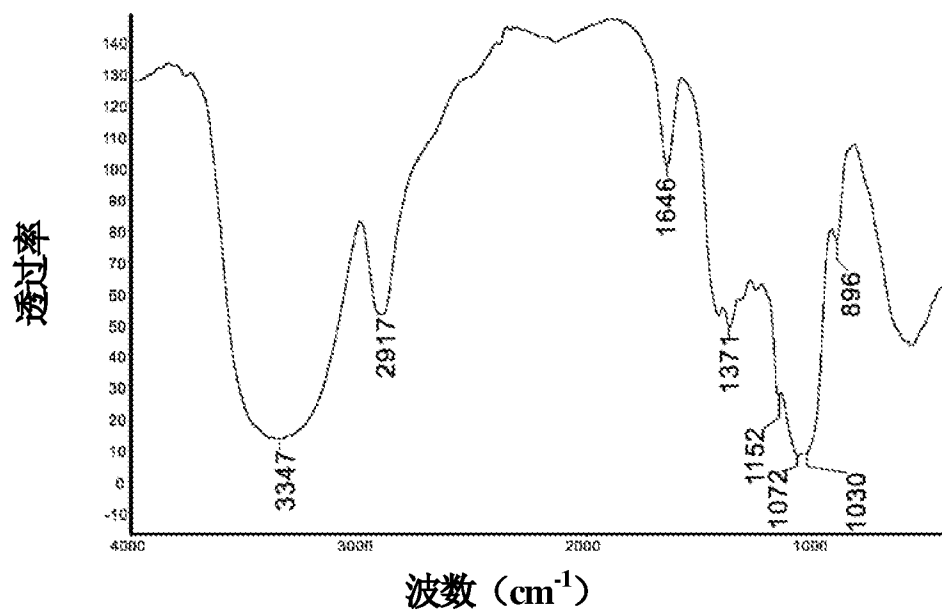


图 2

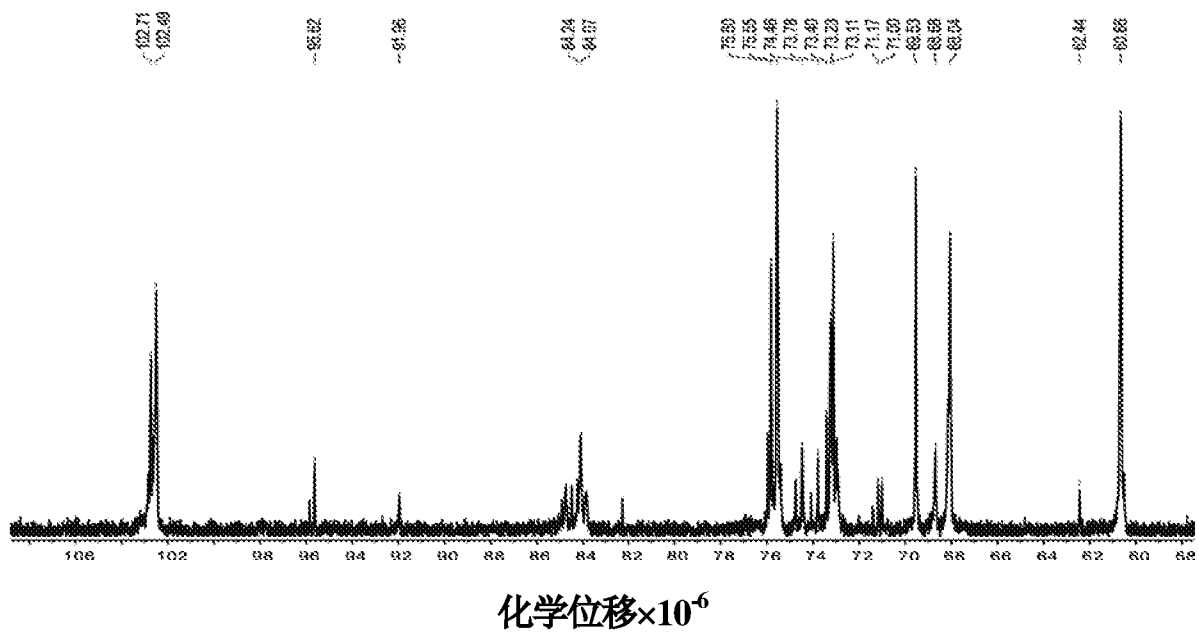


图 3

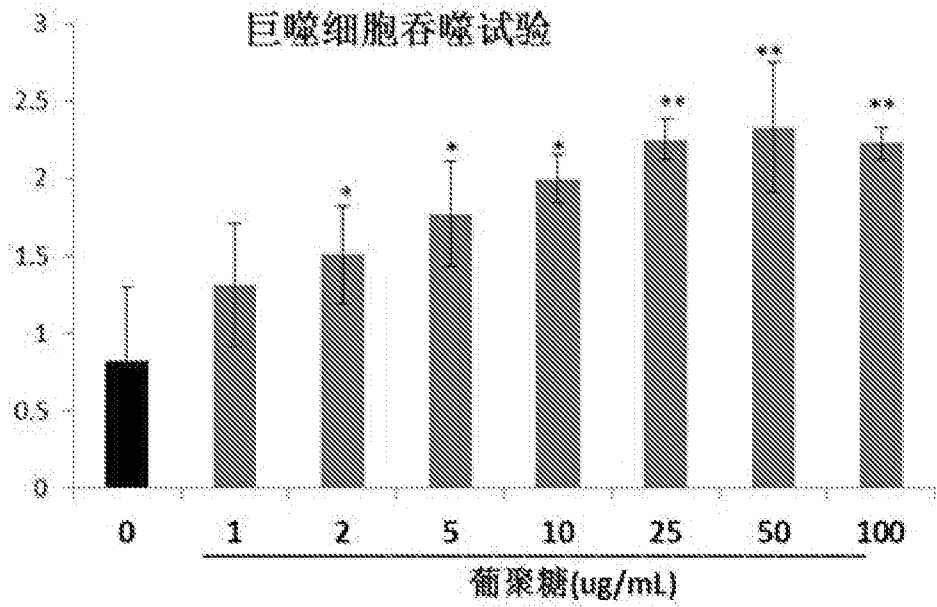


图 4

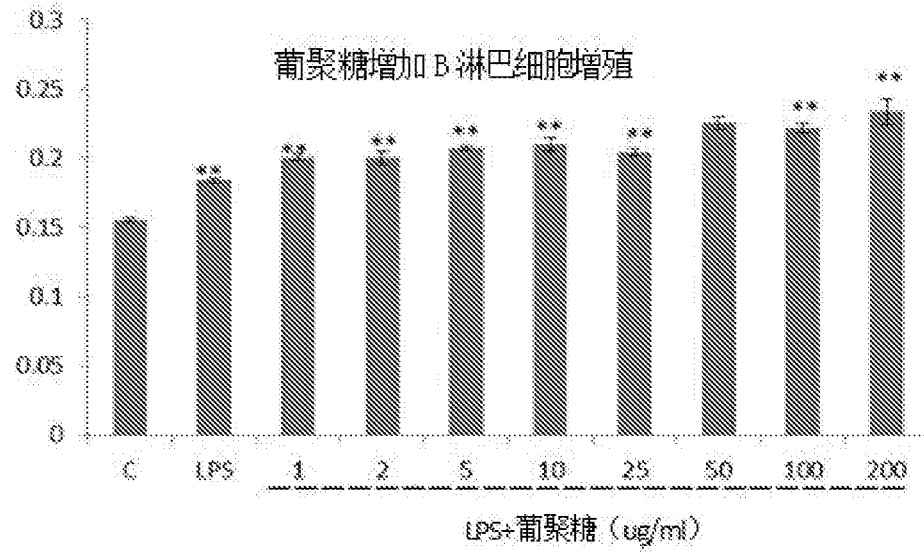


图 5A

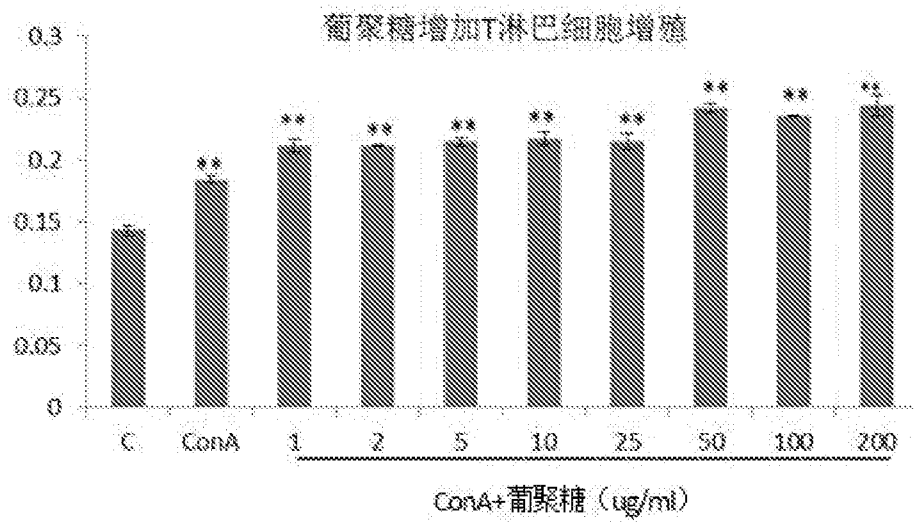


图 5B

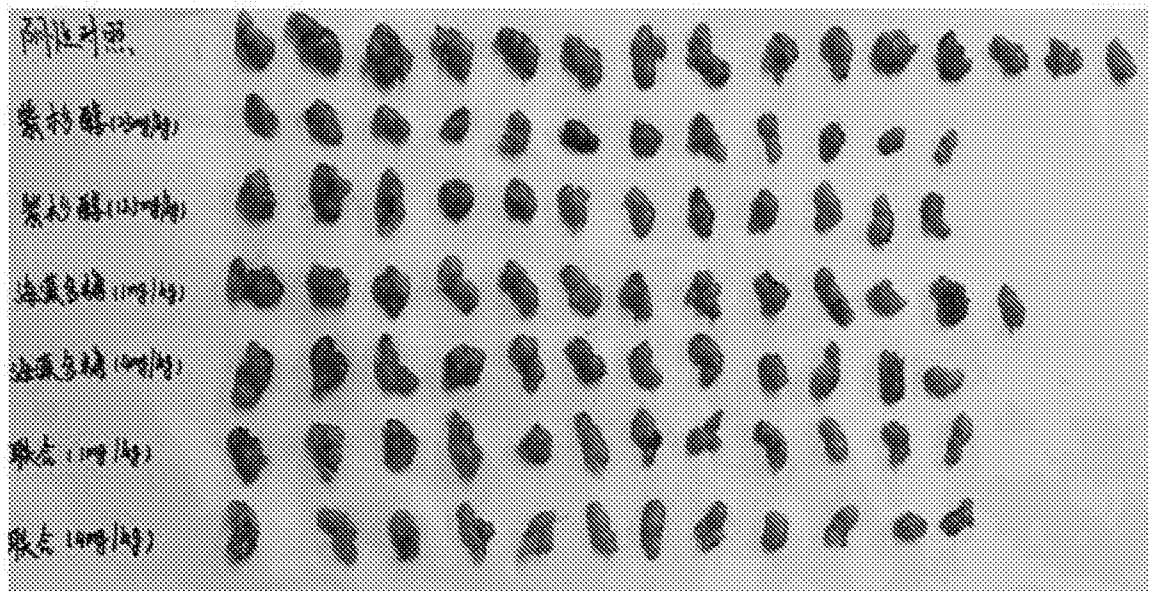


图 6A

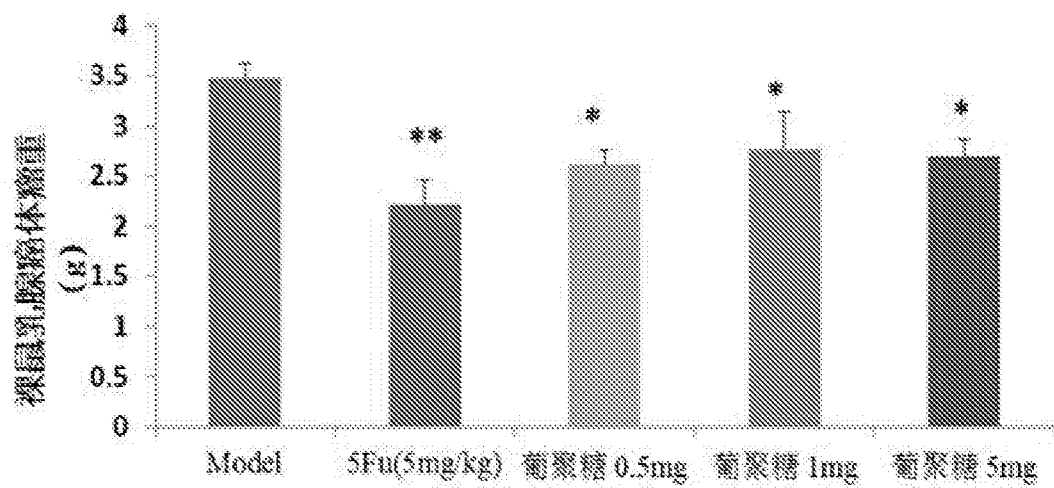


图 6B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2016/095989

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C08B 37/02 (2006.01) i; A61K 31/716 (2006.01) i; A23L 1/29 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C08B 37/-; A61K 31/-; A23L 1/-

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNPAT; CNKI; EPDOC; WPI; STN; PATENTICS; OUC KEY LABORATORY OF MARINE DRUGS, MINISTRY OF EDUCATION; QINGDAO MARINE BIOMEDICAL; weight average molecular weight, algae; SHANDONG JINGBO; antarctic brown alga, durvillaea antarctica, paddock, lei gong algae, comb-like, OCEAN UNIVERSITY OF CHINA; YU, Guangli; HAO, Jiejie; CONG, Dapeng; GUAN, Huashi; ZHAO, Xia; LV, Youjing; HU, Ting; QINGDAO ZHIJIA; SHANDONG QINGTAI; anion exchange resin, calcium chloride, degrease, classification, purification, main chain, branch chain, glucan?, polysaccharide?, southern hemisphere, glucose?, exchange chromatography, Sepharose Fast Flow, weight+, water extraction, branch+, backbone

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 105001352 A (QINGDAO MARINE BIOMEDICAL RESEARCH INSTITUTE CO., LTD.), 28 October 2015 (28.10.2015), description, paragraphs [0007]-[0020]	1-12
PX	CONG, Dapeng et al., "Structural Characterization and Immune Activity of a β -glucan from Durvillaea Antarctic", CHINESE JOURNAL OF MARINE DRUGS, volume 34, number 5, 15 October 2015 (15.10.2015), ISSN: 1002-346, pages 1-6	1-12
X	FRANCISCA, B. et al. "Soluble β -1, 3/1, 6-glucan in Seaweed from the Southern Hemisphere and its Immunomodulatory Effect", CARBOHYDRATE POLYMERS, volume 92, 01 October 2012 (01.10.2012), ISSN: 0144-861, pages 241-248	1-12

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 29 September 2016 (29.09.2016)	Date of mailing of the international search report 14 November 2016 (14.11.2016)
Name and mailing address of the ISA/CN: State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No.: (86-10) 62019451	Authorized officer LIU, Hui Telephone No.: (86-10) 61648382

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2016/095989

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CAI, Rufan, "Study on Nutrient Composition of Durvillaea Antarctica and Extraction, Separation, Purification, Oxidation Resistance and Structural Characteristics of Polysaccharides", SCIENCE-ENGINEERING (A), CHINA MASTER'S THESES FULL-TEXT DATABASE, number 8, 15 August 2016 (15.08.2016), ISSN: 1674--024, B024-428, abstract	1-12
A	CN 101353383 A (SHANDONG JINGBO HOLDING DEVELOPMENT CO., LTD.), 28 January 2009 (28.01.2009), description, page 2, paragraph 4, page 4, paragraph 4 and page 5, paragraph 2	1-2, 7-12
A	HE, Jinzhe et al., "Analysis of the Structure of Polysaccharides of Durvillaea Antarctica and Its Monosaccharide Composition", FOOD AND FERMENTATION INDUSTRIES, volume 40, number 3, 31 March 2014 (31.03.2014), pages 196-200	1-12

International application No.
PCT/CN2016/095989

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 2009)

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2016/095989

A. 主题的分类

C08B 37/02 (2006.01) i; A61K 31/716 (2006.01) i; A23L 1/29 (2006.01) i

按照国际专利分类 (IPC) 或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献 (标明分类系统和分类号)

C08B37/-; A61K31/-; A23L1/-

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库 (数据库的名称, 和使用的检索词 (如使用))

CNPAT; CNKI; EPDOC; WPI; STN; PATENTICS: 青岛海大海洋, 青岛海洋生物医药, 葡聚糖, 重均分子量, 藻, 山东京博, 南极褐藻, 海茸, 海笋, 雷公藻, 梳状, 中国海洋大学, 于广利, 郝杰杰, 丛大鹏, 管华诗, 赵峡, 吕友晶, 胡婷, 青岛致嘉, 山东清泰, 多糖, 阴离子交换树脂, 氯化钙, 脱脂, 水提, 分级, 纯化, 主链, 支链, 葡萄糖, glucan?, polysaccharide?, southern hemisphere, glucose?, exchange chromatography, Sepharose Fast Flow, weight+, water extraction, branch+, backbone

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
PX	CN 105001352 A (青岛海洋生物医药研究院股份有限公司) 2015年 10月 28日 (2015 - 10 - 28) 说明书第[0007]-[0020]段	1-12
PX	丛大鹏 等. "1种 β -葡聚糖的结构表征及其体外免疫活性研究" 中国海洋药物, 第34卷, 第5期, 2015年 10月 15日 (2015 - 10 - 15), ISSN: 1002-346, 第1-6页	1-12
X	Francisca Bobadilla et al. "Soluble β -1, 3/1, 6-glucan in seaweed from the southern hemisphere and its immunomodulatory effect" Carbohydrate Polymers, 第92卷, 2012年 10月 1日 (2012 - 10 - 01), ISSN: 0144-861, pages 241-248	1-12

☒ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2016年 9月 29日

国际检索报告邮寄日期

2016年 11月 14日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中华人民共和国国家知识产权局 (ISA/CN)
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10) 62019451

授权官员

刘辉

电话号码 (86-10) 61648382

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
PX	蔡如繁. “南极海茸营养成分及多糖提取、分离纯化、抗氧化性和结构特征研究” 中国优秀硕士学位论文全文数据库 工程科技 I 辑, 第8期, 2016年 8月 15日 (2016 - 08 - 15), ISSN: 1674--024, B024-428, 摘要	1-12
A	CN 101353383 A (山东京博控股发展有限公司) 2009年 1月 28日 (2009 - 01 - 28) 说明书第2页第4段, 第4页第4段, 第5页第2段	1-2, 7-12
A	何晋浙 等. “南极海茸多糖结构及其单糖组分的分析” 食品与发酵工业, 第40卷, 第3期, 2014年 3月 31日 (2014 - 03 - 31), 第196-200页	1-12

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2016/095989

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN	105001352	A	2015年 10月 28日	无	
CN	101353383	A	2009年 1月 28日	无	