

## (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  
2016 年 3 月 24 日 (24.03.2016)



(10) 国际公布号  
**WO 2016/041258 A1**

- (51) 国际专利分类号:  
*C08B 37/00* (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)  
*A61K 31/715* (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2014/092986
- (22) 国际申请日: 2014 年 12 月 4 日 (04.12.2014)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:  
201410468143.5 2014 年 9 月 15 日 (15.09.2014) CN
- (71) 申请人: 华南理工大学 (SOUTH CHINA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY) [CN/CN]; 中国广东省广州市天河区五山路 381 号, Guangdong 510640 (CN)。
- (72) 发明人: 杨继国 (YANG, Jiguo); 中国广东省广州市天河区五山路 381 号, Guangdong 510640 (CN)。 张榕 (ZHANG, Rong); 中国广东省广州市天河区五山路 381 号, Guangdong 510640 (CN)。 廖文镇 (LIAO, Wenzhen); 中国广东省广州市天河区五山路 381 号, Guangdong 510640 (CN)。 任娇艳 (REN, Jiaoyan); 中国广东省广州市天河区五山路 381 号, Guangdong 510640 (CN)。 林泽华 (LIN, Zehua); 中国广东省广州市天河区五山路 381 号, Guangdong 510640 (CN)。

宁正祥 (NING, Zhengxiang); 中国广东省广州市天河区五山路 381 号, Guangdong 510640 (CN)。

(74) 代理人: 广州粤高专利商标代理有限公司 (YOGO PATENT & TRADEMARK AGENCY LIMITED COMPANY); 中国广东省广州市天河区体育西路中石化大厦 B 塔 3912 室, Guangdong 510620 (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, 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,

[见续页]

(54) Title: METHOD FOR PREPARING BAMBOO FUNGUS POLYSACCHARIDE-ZINC CHELATE AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 一种竹荪多糖-锌螯合物的制备方法及其应用

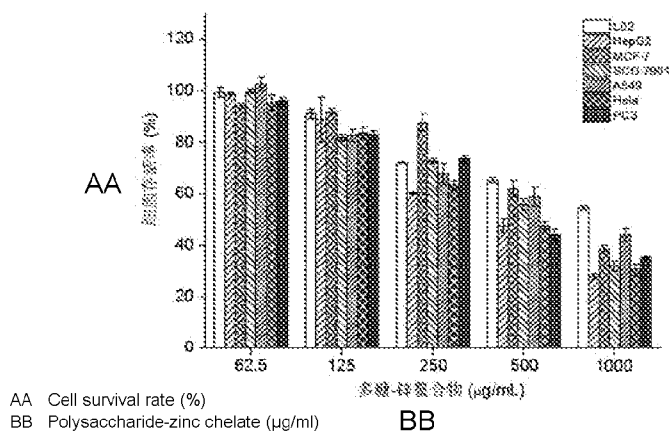


图1b / Fig.1b

(57) Abstract: Disclosed is a method for preparing a bamboo fungus polysaccharide-zinc chelate. The method comprises the following steps: (1) extracting the bamboo fungus polysaccharide; (2) separating the bamboo fungus polysaccharide; (3) purifying the bamboo fungus polysaccharide; (4) adding an inorganic zinc source into the bamboo fungus polysaccharide for a chelation reaction; (5) ethanol precipitation; and (6) lyophilization, thereby obtaining the bamboo fungus polysaccharide-zinc chelate. The bamboo fungus polysaccharide-zinc chelate is used for preparing zinc-replenishing health products and drugs, and the chelate also has anti-tumour biological activity.

(57) 摘要: 一种竹荪多糖-锌螯合物的制备方法, 该方法包括以下步骤: (1) 竹荪多糖的提取; (2) 竹荪多糖的分离; (3) 竹荪多糖的纯化; (4) 在竹荪多糖中加入无机锌源进行螯合反应; (5) 醇沉; (6) 冷冻干燥, 得竹荪多糖-锌螯合物。所述竹荪多糖-锌螯合物用于补锌保健品及药品的制备, 且该螯合物具有抗肿瘤生物活性。



RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, **本国际公布:**

CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, — 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。  
TG)。

**根据细则 4.17 的声明:**

— 发明人资格(细则 4.17(iv))

## 说明书

### 发明名称：一种具有抗肿瘤活性的竹荪多糖-锌螯合物的制备方法及其应用

- [1] 技术领域
- [2] 本发明涉及一种 抗肿瘤物质的制备方法及其应用，具体涉及一种具有抗肿瘤活性的竹荪多糖 - 锌螯合物的制备方法及其应用。
- [3] 背景技术
- [4] 锌是人体必须的微量元素，是人体 200 种金属酶的组成成分或辅酶，对全身代谢都有广泛作用，如参与能量代谢、核酸和蛋白质的合成、细胞与体液免疫过程等。机体缺锌会导致基础代谢下降、蛋白质利用率降低、食欲与消化功能低下、影响生长发育等。而以往和现在临床上补锌多用硫酸锌和单纯葡萄糖酸锌等制剂，它们绝大部分在体内以离子形式吸收。锌离子一方面容易与膳食中的植酸、草酸、脂肪酸等物质结合，容易生成不溶物而导致大量流失；另一方面受结合蛋白不足等因素影响，吸收率低。
- [5] 糖类是自然界中分布最为广泛的生物分子之一，是组成有机体结构的主要成分，也是细胞能量的最主要来源。糖类尤其是多糖，具有大量的活性基团、多样化的分子量和多变的化学组成，具有其他材料无可比拟的优势：生物相容性、生物可降解性、无细胞毒性等等。此外，多糖还可以通过与其他生物分子如蛋白质、核酸等分子相互作用传递识别过程，部分多糖分子还具有调节免疫力、抗肿瘤、促进肿瘤细胞凋亡等生物活性。多糖配合物作为补锌剂不仅具有合适的配合稳定性，对胃肠道无或甚少刺激作用，而且当其释放锌后，配体多糖就可以发挥其多方面的生理活性。
- [6] 竹荪也叫竹参、竹鸡蛋或面纱菌，也被称为'真菌之花'、'山珍之王'，是世界上名贵的大型食用菌之一。竹荪多糖广泛存在于子实体的细胞壁中，是具有高活性的大分子物质，在抗肿瘤、抗凝血、抗炎症、刺激免疫以及降血糖方面都有一定的保健作用，对病毒感染性疾病也有一定的抑制作用。竹荪多糖主要的生理功能有：（1）调节免疫功能；（2）抑制肿瘤和癌细胞作用；（3）延缓衰老

的作用；（4）抑菌作用；（5）降血糖、降血脂的作用；（6）对肝脏的保护作用；（7）抗诱变作用。

[7] 为了大力开发利用竹荪资源及提供一种高效的补锌剂，我们提取竹荪多糖并分离纯化后和锌离子螯合。竹荪多糖 - 锌螯合物不仅是一种高效的补锌剂，其还具有很高的抗肿瘤活性，在用于补锌剂保健品及药品制备的同时，还有望成为治疗癌症的高效低毒药剂。

[8] 有关多糖 - 锌螯合物的研究目前甚少。目前公开的中国专利中与多糖 - 锌螯合物相关的专利只有一个：中国专利申请公布号 CN 102351959 A 中公开了'首乌藤多糖螯合锌的制备方法及应用'，该专利中涉及的是首乌藤多糖 - 锌螯合物增强机体免疫力的作用。

[9] 综上所述，有关多糖 - 锌螯合物抗肿瘤活性的报道目前尚无。本发明人以竹荪为原料，提取竹荪多糖并分离纯化后与无机锌源进行螯合，经醇沉，洗涤，制备具有抗肿瘤活性的竹荪多糖 - 锌螯合物。本发明原料丰富，方法简单，制得的产品安全性高，可大量生产，在作为补锌剂的同时还具有极高的抗肿瘤活性，可发展成为治疗癌症尤其是肝癌的高效低毒药剂。

[10] 发明内容

[11] 本发明的目的在于通过竹荪多糖与无机锌盐的螯合制备出具有抗肿瘤活性的补锌剂，为相关抗癌药物的开发提供一种具有抗肿瘤活性的竹荪多糖 - 锌螯合物的制备方法。

[12] 一种具有抗肿瘤活性的竹荪多糖 - 锌螯合物的制备方法，包括如下步骤：

[13] （1）竹荪多糖的提取：将干燥的竹荪子实体粉碎后，沸水浴提取多糖，浓缩，真空冷冻干燥；

[14] （2）竹荪多糖的分离：用 *Sevage* 法对竹荪多糖除蛋白后，加入乙醇，3000 ~ 6000 r/min 离心 10 ~ 20 min，弃去上清液，将沉淀溶解于蒸馏水，重复3 ~ 5次，将得到的溶液冷冻干燥，得到竹荪多糖；

[15] （3）竹荪多糖的纯化：把步骤（2）得到的竹荪多糖溶于水，用 DEAE-52 纤维素离子交换层析柱纯化，以 0.05 ~ 2 mol/L NaCl 溶液为洗脱剂，收集洗脱液，再用 Sephadex G-200 葡聚糖凝胶色谱柱纯化，以 0.05 ~ 2 mol/L NaCl 溶液为洗

脱剂，收集洗脱液，浓缩，冷冻干燥，得到螯合用的竹荪多糖；

[16] (4) 在竹荪多糖溶液中加入无机锌源进行螯合反应：将无机锌盐溶于蒸馏水配成 1 ~ 3 mg/mL 的溶液，调节 pH=2.0~3.0，使无机锌盐充分溶解，再按多糖与无机锌盐质量比为 1 : 1 ~ 1 : 3 加入 3 ~ 5 mg/mL 的竹荪多糖溶液，漩涡混匀，调节 pH 8.0 ~ 10.0, 温度保持在 45 ~ 65 °C 下震荡反应 36 ~ 50 h；

[17] (5) 将反应液浓缩后加入 3 ~ 5 倍体积的无水乙醇将产物沉淀出来，抽滤，用 60% ~ 80% 的乙醇洗涤，沉淀，最后用无水乙醇洗涤，沉淀。

[18] (6) 冷冻干燥，得竹荪多糖 - 锌螯合物。

[19] 上述方法中，步骤 (2) 所述 Sevage 试剂的配制方法为氯仿、正丁醇按体积比 3 : 1 ~ 5 : 1 混合，Sevage 法脱蛋白的方法为多糖与 Sevage 试剂按体积比 1 : 1 ~ 1 : 3 混合，振摇 10 ~ 30 min，2000 ~ 4000 r/min 离心 10 ~ 20 min，取出上层多糖溶液，再按上述步骤重复 3 ~ 5 次。

[20] 上述方法中，步骤 (5) 所述醇沉，洗涤次数为 3 ~ 5 次。

[21] 上述方法中，所述无机锌盐包括  $\text{ZnCl}_2$  或  $\text{ZnSO}_4$  中的一种以上。

[22] 所述竹荪多糖 - 锌螯合物应用于肝癌药物的制备。

[23] 与现有技术相比，本发明具有如下优点：

[24] 1、本发明公布的具有抗肿瘤活性的竹荪多糖 - 锌螯合物经过醇沉，洗涤后已经除去了没有螯合上的锌离子，且通过 MTT 法和配体竹荪多糖对肿瘤细胞增殖的抑制能力进行了对比，结果表明，竹荪多糖 - 锌螯合物的抗肿瘤活性并不是来自多糖，相反多糖还能促进部分肿瘤细胞的增殖，只有当竹荪多糖和锌离子形成螯合物后才具有抗肿瘤活性。

[25] 2、本发明公布的抗肿瘤活性竹荪多糖 - 锌螯合物能明显抑制肝癌细胞 HepG2、乳腺癌肿瘤细胞 MCF-7、胃癌细胞 SCG-7901、肺癌细胞 A549、子宫颈癌细胞 Hela 以及前列腺癌细胞 PC3 的增殖，其中对 HepG2 细胞的抑制作用最为明显。

[26] 3、本发明公布的抗肿瘤活性竹荪多糖 - 锌螯合物制备工艺简单，产品安全，可规模化生产。

[27] 附图说明

- [28] 图1a和图1b为竹荪多糖和竹荪多糖-锌螯合物分别对正常细胞和不同肿瘤细胞增殖的抑制作用图，其中图1a为竹荪多糖对各组细胞的影响图，其中图1b为竹荪多糖-锌螯合物对各组细胞的影响图；
- [29] 图2a-图2d为Hoechst 33258染色法观察不同浓度的竹荪多糖-锌螯合物对HepG2细胞DNA的损伤情况图；其中图3a为空白浓度，图3b的浓度为250 $\mu$ g/mL，图3c的浓度为500 $\mu$ g/mL，图3d的浓度为1000 $\mu$ g/mL；
- [30] 图3为DNA Ladder检测不同浓度的竹荪多糖-锌螯合物对HepG2细胞DNA的损伤情况图；
- [31] 图4a-图4d为JC-1染色法观察不同浓度的竹荪多糖-锌螯合物对HepG2细胞线粒体膜电位的影响图，其中图4a为空白浓度，图4b的浓度为250 $\mu$ g/mL，图4c的浓度为500 $\mu$ g/mL，图4d的浓度为1000 $\mu$ g/mL。
- [32] 具体实施方式
- [33] 以下结合具体实施例对本发明的实施作进一步说明，但本发明的实施不限于此。
- [34] 实施例1和实施例2中所述Sevage试剂的配制方法为氯仿、正丁醇按体积比4：1混合，Sevage法脱蛋白的方法为多糖与Sevage试剂按体积比1：1混合，振摇20 min，3000 r/min离心10 min，取出上层多糖溶液，再按上述步骤重复5次。
- [35] 实施例1：
- [36] (1) 竹荪多糖的提取：将干燥的竹荪子实体粉碎后，于沸水浴中振荡2 h提取多糖，过滤，浓缩，真空冷冻干燥；
- [37] (2) 竹荪多糖的分离：用Sevage法对竹荪多糖除蛋白后，加入乙醇，3000 r/min离心20 min，弃去上清液，将沉淀溶解于蒸馏水，重复5次，将得到的溶液冷冻干燥；
- [38] (3) 竹荪多糖的纯化：把步骤(2)得到的竹荪多糖溶于水，用DEAE-52纤维素离子交换层析柱纯化，以0.05 mol/L NaCl溶液为洗脱剂，收集洗脱液，再用Sephadex G-200葡聚糖凝胶色谱柱纯化，以0.05 mol/L NaCl溶液为洗脱剂，收集洗脱液，浓缩，冷冻干燥，得到竹荪多糖；

[39] (4) 竹荪多糖抗肿瘤功效：通过其对肿瘤细胞存活率及肿瘤细胞形态等指标评价其抗肿瘤功效。

[40] 实施例2：

[41] (1) 竹荪多糖的提取：将干燥的竹荪子实体粉碎后，于沸水浴中振荡2 h提取多糖，过滤，浓缩，真空冷冻干燥；

[42] (2) 竹荪多糖的分离：用 Sevage 法对竹荪多糖除蛋白后，加入乙醇，3000 r/min 离心 20 min，弃去上清液，将沉淀溶解于蒸馏水，重复 5 次，将得到的溶液冷冻干燥；

[43] (3) 竹荪多糖的纯化：把步骤 (2) 得到的竹荪多糖溶于水，用 DEAE-52 纤维素离子交换层析柱纯化，以 0.05 mol/L NaCl 溶液为洗脱剂，收集洗脱液，再用 Sephadex G-200 葡聚糖凝胶色谱柱纯化，以 0.05 mol/L NaCl 溶液为洗脱剂，收集洗脱液，浓缩，冷冻干燥，得到竹荪多糖；

[44] (4) 在竹荪多糖溶液中加入无机锌源进行螯合反应：将  $\text{ZnSO}_4$  溶于蒸馏水配成 1 mg/mL 的溶液，调节 pH 2.0，使  $\text{ZnSO}_4$  充分溶解，再按多糖与  $\text{ZnSO}_4$  质量比为 1：1 加入 5 mg/mL 的竹荪多糖溶液，漩涡混匀，调节 pH 10.0，温度保持在 45 °C 下震荡反应 50 h；

[45] (5) 将反应液浓缩后加入3倍体积的无水乙醇将产物沉淀出来，抽滤，用80%的乙醇洗涤，沉淀，最后用无水乙醇洗涤，沉淀。

[46] (6) 冷冻干燥，得竹荪多糖 - 锌螯合物，通过其对肿瘤细胞存活率及肿瘤细胞形态等指标评价其抗肿瘤功效。

[47] 实施例3：

[48] (1) 竹荪多糖的提取：将干燥的竹荪子实体粉碎后，于沸水浴中振荡6 h提取多糖，过滤，浓缩，真空冷冻干燥；

[49] (2) 竹荪多糖的分离：用 Sevage 法对竹荪多糖除蛋白后，加入乙醇，6000 r/min 离心 10 min，弃去上清液，将沉淀溶解于蒸馏水，重复 3 次，将得到的溶液冷冻干燥；

[50] (3) 竹荪多糖的纯化：把步骤 (2) 得到的竹荪多糖溶于水，用 DEAE-52 纤维素离子交换层析柱纯化，以 2 mol/L NaCl 溶液为洗脱剂，收集洗脱液，再用

Sephadex G-200 葡聚糖凝胶色谱柱纯化，以 2 mol/L NaCl 溶液为洗脱剂，收集洗脱液，浓缩，冷冻干燥，得到螯合用的竹荪多糖；

- [51] (4) 在竹荪多糖溶液中加入无机锌源进行螯合反应：将  $\text{ZnCl}_2$  溶于蒸馏水配成 3 mg/mL 的溶液，调节 pH 2.0，使  $\text{ZnCl}_2$  充分溶解，再按多糖与  $\text{ZnCl}_2$  质量比为 1 : 3 加入 3 mg/mL 的竹荪多糖溶液，漩涡混匀，调节 pH 8.0，温度保持在 65 °C 下震荡反应 36 h；
- [52] (5) 将反应液浓缩后加入 5 倍体积的无水乙醇将产物沉淀出来，抽滤，用 60 % 的乙醇洗涤，沉淀，最后用无水乙醇洗涤，沉淀。
- [53] (6) 冷冻干燥，得竹荪多糖 - 锌螯合物，通过其对肿瘤细胞存活率及肿瘤细胞形态等指标评价其抗肿瘤功效。
- [54] 本实施方式通过不同的试验证明竹荪多糖 - 锌螯合物的抗肿瘤活性：（1）通过 MTT 法分别检测竹荪多糖和竹荪多糖 - 锌螯合物对不同细胞增殖的抑制作用；（2）流式细胞术检测不同浓度的竹荪多糖 - 锌螯合物对 HepG2 细胞周期的影响；（3）Hoechst 33258 染色法观察不同浓度的竹荪多糖 - 锌螯合物对 HepG2 细胞 DNA 的损伤情况；（4）DNA Ladder 检测不同浓度的竹荪多糖 - 锌螯合物对 HepG2 细胞 DNA 的损伤情况；（5）JC-1 染色法观察不同浓度的竹荪多糖 - 锌螯合物对 HepG2 细胞线粒体膜电位的影响。
- [55] （1）通过 MTT 法分别检测竹荪多糖和竹荪多糖 - 锌螯合物对不同细胞增殖的抑制作用（图 1a 和图 1b）；
- [56] 事先培养正常肝细胞 LO2、肝癌细胞 HepG2、乳腺癌肿瘤细胞 MCF-7、胃癌细胞 SCG-7901、肺癌细胞 A549、子宫颈癌细胞 Hela 以及前列腺癌细胞 PC3，用 0.25 % 胰蛋白酶消化贴壁细胞 3 min 制成单细胞悬液，以  $5 \times 10^3$  个细胞 / 孔接种 96 孔培养板，置于培养箱中（37 °C，5%  $\text{CO}_2$ ）预培养 24 h 后，加入含有不同浓度的竹荪多糖或竹荪多糖 - 锌螯合物的培养基 100 mL / 孔，继续培养 48 h。往培养板加入 MTT（5 mg/mL）20 mL / 孔，37 °C 孵育 4 h 后弃上清，加入 DMSO 100 mL / 孔，振荡 10 min，紫色结晶物充分溶解后，测定各孔  $\text{OD}_{570}$  值。以对照组  $\text{OD}_{570}$  为 100%，计算药物处理后各组细胞存活率。
- [57] 细胞存活率 (%) =  $(\text{OD}_{570 \text{ 实验组}} / \text{OD}_{570 \text{ 对照组}}) \times 100\%$



- [58] 由图中可观察得到竹荪多糖 - 锌螯合物的抗肿瘤活性并不是来自单独的多糖，而是通过多糖和锌生成的螯合物才具有的。竹荪多糖 - 锌螯合物对正常肝细胞 LO2、肝癌细胞 HepG2、乳腺癌肿瘤细胞 MCF-7、胃癌细胞 SCG-7901、肺癌细胞 A549、子宫颈癌细胞 Hela 以及前列腺癌细胞 PC3 增殖都有抑制作用，其中对 HepG2 细胞的抑制作用最为明显，而对正常肝细胞影响不大。这表明，该螯合物不仅对肝癌细胞和正常细胞间有选择性，而且对不同的肿瘤细胞也有一定的选择性，具有应用于肿瘤治疗的潜力。
- [59] (2) 流式细胞术检测不同浓度的竹荪多糖 - 锌螯合物对 HepG2 细胞周期的影响；
- [60] 用 0.25% 胰蛋白酶消化贴壁 HepG2 细胞 3 min 制成单细胞悬液，以  $5 \times 10^3$  个细胞/孔接种 6 孔培养板，置于培养箱中（37 °C，5% CO<sub>2</sub>）预培养 24 h 后，分别加入 250 m g/mL、500 m g/mL、1000 m g/mL 竹荪多糖 - 锌螯合物的培养基 100 m L / 孔，并以空白为对照，继续培养 48 h。流式细胞法计数细胞周期各期的细胞数目。
- [61] 检测结果，S 期细胞明显增多，细胞被阻滞在 S 期，从而抑制癌细胞 DNA 合成和细胞增殖。
- [62] (3) Hoechst 33258 染色法观察不同浓度的竹荪多糖 - 锌螯合物对 HepG2 细胞 DNA 的损伤情况（图2a-图2d）；
- [63] 按上述方法，用不同浓度的竹荪多糖 - 锌螯合物培养 HepG2 细胞，涂片，Hoechst 33258 染色，在荧光显微镜下观察不同浓度的竹荪多糖 - 锌螯合物对 HepG2 细胞的影响。
- [64] 从图中可观察得到，随着浓度的增加，荧光亮度增加，HepG2 细胞核固缩，在 1000 m g/mL 浓度下能明显观察到凋亡小体。
- [65] (4) 通过 DNA Ladder 检测不同浓度的竹荪多糖 - 锌螯合物对 HepG2 细胞 DNA 的损伤情况（图3）；
- [66] 按上述方法，用不同浓度的竹荪多糖 - 锌螯合物培养 HepG2 细胞，DNA Ladder 检测试剂盒提取 DNA，琼脂糖凝胶电泳分析 DNA 条带。A、B、C、D、E 条带分别为 Marker、对照、250 m g/mL、500 m g/mL、1000 m g/mL

- 。
- [67] 从图中可观察得到，随着浓度的增加，癌细胞出现明显凋亡特征。
- [68] (5) JC-1 染色法观察不同浓度的竹荪多糖 - 锌螯合物对 HepG2 细胞线粒体膜电位的影响（图4a-图4d）；
- [69] 按上述方法，用不同浓度的竹荪多糖 - 锌螯合物培养 HepG2 细胞，涂片，JC-1 染色，在荧光显微镜下观察不同浓度的竹荪多糖 - 锌螯合物对 HepG2 细胞的影响。
- [70] 从图中可观察得到，随着竹荪多糖 - 锌螯合物浓度的增加，细胞出现绿色荧光的数量增多，说明线粒体膜电位下降，线粒体膜外翻，癌细胞凋亡。

## 权利要求书

### [权利要求 1]

一种具有抗肿瘤活性的竹荪多糖-锌螯合物的制备方法，其特征在于，包括如下步骤：

(1) 竹荪多糖的提取：将干燥的竹荪子实体粉碎后，沸水浴提取多糖，浓缩，真空冷冻干燥；

(2) 竹荪多糖的分离：用Sevage法对竹荪多糖除蛋白后，加入乙醇，3000 ~ 6000 r/min离心10 ~ 20 min，弃去上清液，将沉淀溶解于蒸馏水，重复3 ~ 5次，将得到的溶液冷冻干燥，得到竹荪多糖；

(3) 竹荪多糖的纯化：把步骤(2)得到的竹荪多糖溶于水，用DEAE-52纤维素离子交换层析柱纯化，以0.05 ~ 2 mol/L NaCl溶液为洗脱剂，收集洗脱液，再用Sephadex G-200葡聚糖凝胶色谱柱纯化，以0.05 ~ 2 mol/L NaCl溶液为洗脱剂，收集洗脱液，浓缩，冷冻干燥，得到螯合用的竹荪多糖；

(4) 在竹荪多糖溶液中加入无机锌源进行螯合反应：将无机锌盐溶于蒸馏水配成1 ~ 3 mg/mL的溶液，调节pH=2.0~3.0，使无机锌盐充分溶解，再按多糖与无机锌盐质量比为1 : 1 ~ 1 : 3加入3 ~ 5 mg/mL的竹荪多糖溶液，漩涡混匀，调节pH 8.0 ~ 10.0,温度保持在45 ~ 65 °C下震荡反应36 ~ 50 h；

(5) 将反应液浓缩后加入3 ~ 5倍体积的无水乙醇将产物沉淀出来，抽滤，用60% ~ 80%的乙醇洗涤，沉淀，最后用无水乙醇洗涤，沉淀。

(6) 冷冻干燥，得竹荪多糖-锌螯合物。

### [权利要求 2]

根据权利要求1所述的方法，其特征在于步骤(2)所述Sevage试剂的配制方法为氯仿、正丁醇按体积比3 : 1 ~ 5 : 1混合，Sevage法脱蛋白的方法为多糖与Sevage试剂按体积比1 : 1 ~ 1 : 3混合，振摇10 ~ 30 min，2000 ~ 4000 r/min离心10 ~ 20 min，取出上层多糖溶液，再按上述步骤重复3 ~ 5次。

- [权利要求 3] 根据权利要求1所述的方法，其特征在于步骤（5）所述醇沉，洗涤次数为3 ~ 5次。
- [权利要求 4] 根据权利要求1所述的方法，其特征在于，所述无机锌盐包括ZnCl<sub>2</sub>或ZnSO<sub>4</sub>中的一种以上。
- [权利要求 5] 权利要求1所述的方法制备得到的竹荪多糖-锌螯合物应用于肝癌药物的制备。

说明书附图

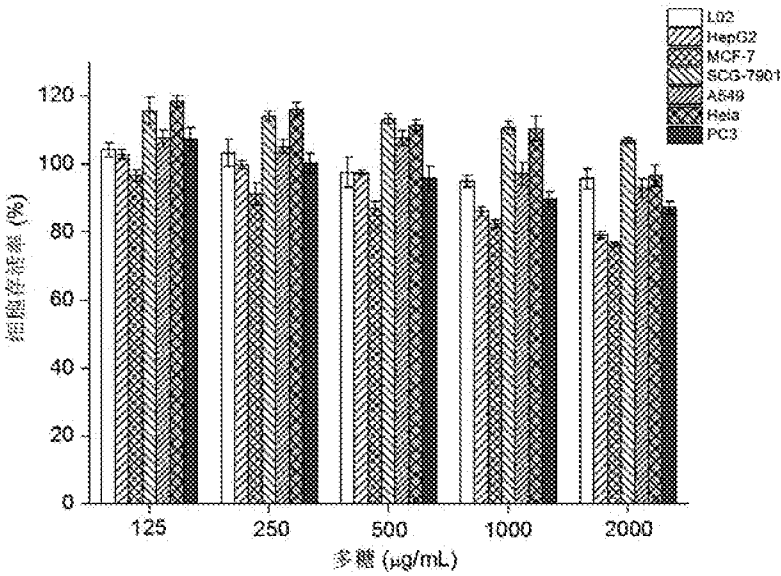


图1a

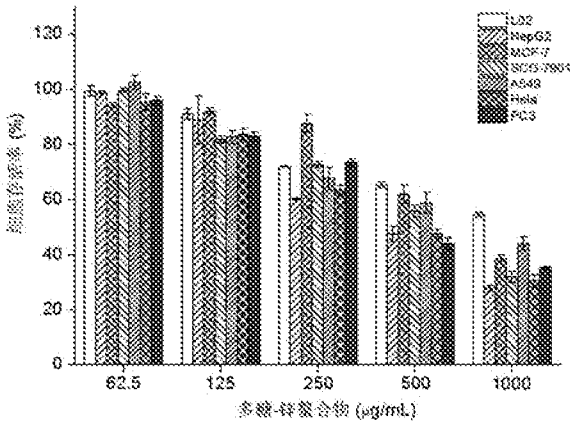


图1b

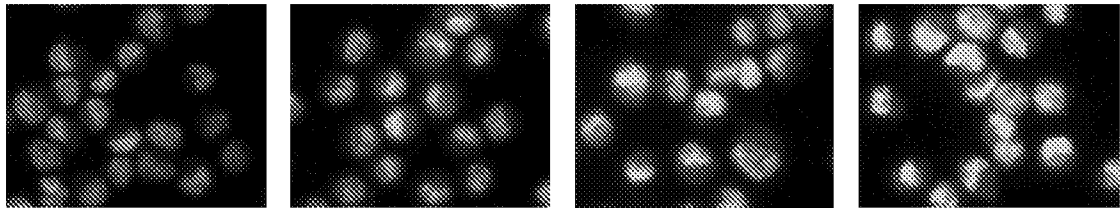


图2a

图2b

图2c

图2d

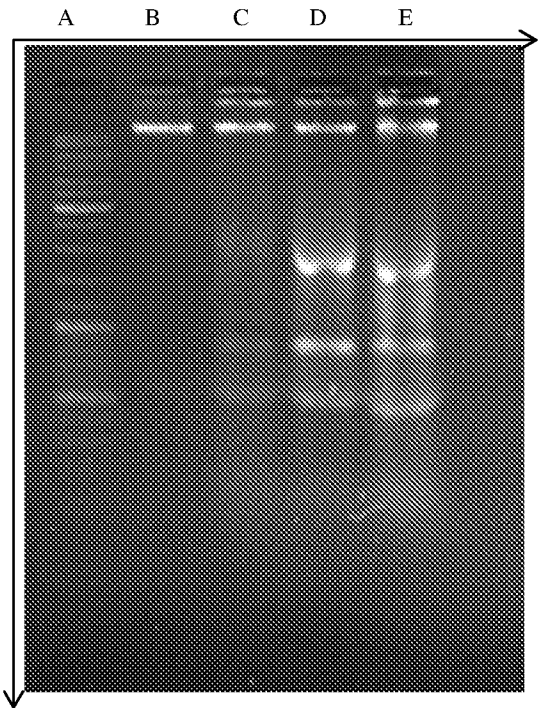


图3

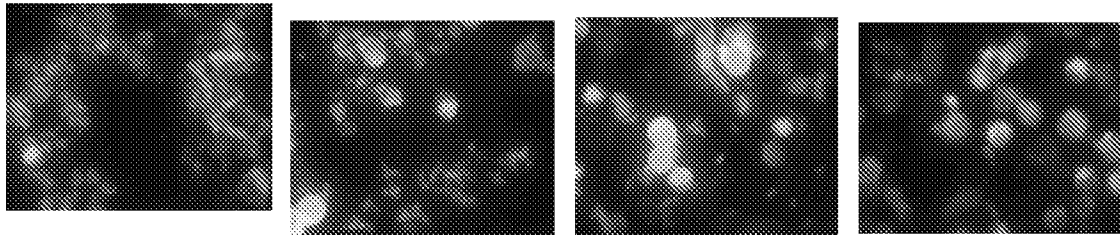


图 4a

图 4b

图 4c

图 4d

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/CN2014/092986**

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C08B 37/00 (2006.01) i; A61K 31/715 (2006.01) i; A61P 35/00 (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; A61K; A61P

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)

CPRS, CNKI: dictyophora indusiata, basidiomycete, polysaccharide, alcohol, chromatography, zinc, chelate, combine, purify

WPI, EPODOC: dictyophora indusiata, polysaccharide, alcohol, ethonal, chromatography, DEAE, Sephadex, zinc, chelate, purify

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                           | Relevant to claim No. |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Y         | CN 101029087 A (ZHEJIANG UNIVERSITY), 05 September 2007 (05.09.2007), description, page 3, lines 4-7, and page 3, line 19 to page 4, line 9                                                                                                                                                  | 1-5                   |
| Y         | CN 104031156 A (SOUTH CHINA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY), 10 September 2014 (10.09.2014), claims 1 and 10                                                                                                                                                                                       | 1-5                   |
| Y         | CN 102351959 A (HENAN UNIVERSITY OF TRADITIONAL CHINESE MEDICINE), 15 February 2012 (15.02.2012), claim 1                                                                                                                                                                                    | 1-5                   |
| Y         | HUA, Yanglin, "Extraction and Structural Analysis of Polysaccharides in the Fruiting Body of Dictyophora Indusiata and Their Bioactivities", DOCTORAL DISSERTATION OF SOUTH CHINA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, 09 April 2012 (09.04.2012), page 59, section 4.2.3.1 to page 60, section 4.2.3.3 | 1-5                   |
| Y         | ZHAO, Kai et al., "Extraction and Primary Investigation of Antitumor Activity of Polysaccharides from the Volva of Dictyophora Rubrovolvata", MYCOSYSTEMA, vol. 27, no. 2, 15 March 2008 (15.03.2008), page 290, section 1.2 to page 291, section 1.6                                        | 1-5                   |
| A         | CN 101503477 A (WUHAN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY), 12 August 2009 (12.08.2009), the whole document                                                                                                                                                                                             | 1-5                   |

☐ 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<br>09 June 2015 (09.06.2015)                                                                                                                             | Date of mailing of the international search report<br><b>23 June 2015 (23.06.2015)</b> |
| Name and mailing address of the ISA/CN:<br>State Intellectual Property Office of the P. R. China<br>No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao<br>Haidian District, Beijing 100088, China<br>Facsimile No.: (86-10) 62019451 | Authorized officer<br><b>ZHANG, Na</b><br>Telephone No.: (86-10) <b>62084469</b>       |

International application No.  
**PCT/CN2014/092986**

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



## 国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2014/092986

## A. 主题的分类

C08B 37/00(2006.01)i; A61K 31/715(2006.01)i; A61P 35/00(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)

C08B; A61K; A61P

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))

CPRS, CNKI: 竹荪, 担子菌, 多糖, 醇, 层析, 色谱, 锌, 螯合, 配合, 纯化 WPI, EPODOC: dictyophora indusiata, polysaccharide, alcohol, ethonal, chromatography, DEAE, Sephadex, zinc, chelate, purify

## 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 |
|------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| Y    | CN 101029087 A (浙江大学) 2007年 9月 5日 (2007 - 09 - 05)<br>说明书第3页第4-7行, 第3页第19行-第4页第9行                           | 1-5     |
| Y    | CN 104031156 A (华南理工大学) 2014年 9月 10日 (2014 - 09 - 10)<br>权利要求1、10                                           | 1-5     |
| Y    | CN 102351959 A (河南中医学院) 2012年 2月 15日 (2012 - 02 - 15)<br>权利要求1                                              | 1-5     |
| Y    | 华洋林. "竹荪多糖的提取分离、结构分析和生物活性研究"<br>华南理工大学博士学位论文, 2012年 4月 9日 (2012 - 04 - 09),<br>第59页第4.2.3.1节-第60页第4.2.3.3节  | 1-5     |
| Y    | 赵凯等. "红托竹荪菌托多糖的提取及抗肿瘤活性的初步研究"<br>菌物学报, 第27卷卷, 第2期期, 2008年 3月 15日 (2008 - 03 - 15),<br>第290页第1.2节-第291页第1.6节 | 1-5     |
| A    | CN 101503477 A (武汉理工大学) 2009年 8月 12日 (2009 - 08 - 12)<br>全文                                                 | 1-5     |

☐ 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

“&amp;” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2015年 6月 9日

国际检索报告邮寄日期

2015年 6月 23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)  
北京市海淀区蓟门桥西土城路6号  
100088 中国

传真号 (86-10)62019451

授权官员

张娜

电话号码 (86-10)62084469

|       |                   |
|-------|-------------------|
| 国际申请号 | PCT/CN2014/092986 |
|-------|-------------------|

| 检索报告引用的专利文件 |           |   | 公布日<br>(年/月/日) | 同族专利 |             | 公布日<br>(年/月/日) |
|-------------|-----------|---|----------------|------|-------------|----------------|
| CN          | 101029087 | A | 2007年 9月 5日    | CN   | 100528901 C | 2009年 8月 19日   |
| CN          | 104031156 | A | 2014年 9月 10日   | 无    |             |                |
| CN          | 102351959 | A | 2012年 2月 15日   | CN   | 102351959 B | 2013年 3月 6日    |
| CN          | 101503477 | A | 2009年 8月 12日   | CN   | 101503477 B | 2011年 10月 19日  |

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)