

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发 明 专 利 说 明 书

专利号 ZL 99802306. X

[51] Int. Cl.

A61K 35/60 (2006.01)

A23K 1/18 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 25/06 (2006.01)

[45] 授权公告日 2006 年 3 月 29 日

[11] 授权公告号 CN 1247205C

[51] Int. Cl. (续)

A61P 19/02 (2006.01)

A61P 17/06 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01)

A61P 9/14 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

A61P 1/04 (2006.01)

[22] 申请日 1999.1.20 [21] 申请号 99802306. X

[30] 优先权

[32] 1998.1.21 [33] US [31] 09/010,123

[86] 国际申请 PCT/US1999/001179 1999.1.20

[87] 国际公布 WO1999/037314 英 1999.7.29

[85] 进入国家阶段日期 2000.7.21

[71] 专利权人 彼得·唐纳德·科林

地址 美国缅因州

[72] 发明人 彼得·唐纳德·科林

审查员 王晓许

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 于 辉

权利要求书 5 页 说明书 49 页 附图 9 页

[54] 发明名称

海参类胡萝卜素脂类分馏产物及其用法

[57] 摘要

描述了治疗炎性自身免疫疾病和其它疾病的方法和组合物，其中方法是使用海参组织的脂类馏份。还公开了用于掺入到水生动物和人饮食中的组合物。

1. 含带有类胡萝卜素脂类的产物，其中所述产物是从干燥的海参肠或体壁组织中用有机溶剂经下列步骤分离的：

- a) 从海参中分离肠或体壁组织；
- b) 将所述肠或体壁组织的 pH 调节为 4 至 5.5；
- c) 在 pH 调节至 4 至 5.5 后将所述肠或体壁组织干燥；
- d) 用有机溶剂提取所述肠或体壁组织；
- e) 从所述肠或体壁组织中分离所述溶剂；及
- f) 蒸发所述溶剂。

2. 权利要求 1 的产物，其还经过如下的处理步骤：

- g) 脱胶；
- h) 用硅胶处理；
- i) 加热；及
- j) 过滤。

3. 权利要求 1 的产物，其中还含有抗氧化剂。

4. 权利要求 1 的产物，其还经过如下步骤的处理：

- a) 用有机溶剂提取干燥的海参肠或体壁组织制得提取物后，将能结合色素的吸附剂与所述提取物混和；及
- b) 除去所述吸附剂；

其中所述产物由除去所述吸附剂的剩余物质组成。

5. 权利要求 4 的产物，其中所述吸附剂是存在于用氯仿平衡的柱中的硅酸，且通过氯仿流经所述柱从所述吸附剂中得到所述产物。

6. 权利要求 4 的产物，其中所述吸附剂选自活化的粘土、非活化的粘土、活性炭和二氧化硅。

7. 权利要求 4 的产物，其中还含有抗氧化剂。

8. 权利要求 1 的产物，其还经过如下步骤的处理：

a) 用有机溶剂提取所述海参组织制得提取物后, 加入能结合所述提取物中的色素的吸附剂;

b) 移出所述吸附剂;

c) 用溶剂提取所述吸附剂;

d) 将所述溶剂和所述吸附剂分离; 及

e) 除去所述溶剂以得到所述产物。

9. 权利要求 8 的产物, 其中所述吸附剂选自活化的粘土、非活化的粘土、活性炭、硅酸和二氧化硅。

10. 权利要求 1 所述的产物, 其还经过如下步骤的处理:

a) 用有机溶剂提取所述的干燥的海参组织制得提取物后, 将所述提取物蒸馏; 并

b) 在冷凝器中, 在 25—35℃下, 收集蒸馏馏份。

11. 权利要求 10 的产物, 其中还含有抗氧化剂。

12. 权利要求 1 的产物, 其是通过包括如下步骤的方法分离:

a) 用有机溶剂提取所述的干燥的海参组织制得提取物后, 将能结合色素的吸附剂与所述提取物混和;

b) 移出所述吸附剂以制备金黄色油;

c) 蒸馏所述金黄色油; 并

d) 在冷凝器中, 在 25—35℃下, 收集蒸馏馏份。

13. 权利要求 12 的产物, 其中还含有抗氧化剂。

14. 从新鲜海参的肠或体壁组织中纯化的产物, 其中所述产物通过包括下列步骤的方法分离:

a) 从海参中分离肠或体壁组织;

b) 将所述肠或体壁组织的 pH 调节为 4 至 5.5;

c) 用有机溶剂提取所述肠或体壁组织;

d) 从所述肠或体壁组织中分离所述溶剂; 及

e) 收集除去所述溶剂的肠或体壁组织;

其中所述产物是除去所述溶剂后剩余的含类胡萝卜素的脂类物质。

15. 含脂类的产物，其中所述产物制备如下：

- a) 将权利要求 14 步骤(e)的所述肠或体壁组织干燥以制备干燥的组织；
- b) 用有机溶剂提取所述干燥组织，将脂类提取进入溶剂相；
- c) 从组织中分离所述溶剂相；并
- d) 除去所述溶剂；

其中所述产物是从所述溶剂相中除去溶剂后剩余的脂类物质。

16. 权利要求 15 所述的产物，其中所述有机溶剂选自己烷、丁烷、液化丙烷、乙醇、丙酮、氯仿和超临界二氧化碳。

17. 权利要求 15 的产物，其中还含有抗氧化剂。

18. 含蛋白物质、本质上不含脂类的产物，其中所述产物制备如下：

- a) 将权利要求 14 步骤(e)或权利要求 1 步骤(e)的所述肠或体壁组织干燥以制备干燥组织；
- b) 用溶剂提取所述干燥组织，将脂类提取进入溶剂相；并
- c) 从组织分离所述溶剂相；

其中所述产物是步骤(c)的所述组织。

19. 权利要求 1 的产物、权利要求 4 的产物、权利要求 10 的产物、权利要求 12 的产物、权利要求 15 的产物在制备以有效量向哺乳动物给药以抑制哺乳动物的由脂肪氧合酶活性引起的炎症的药品中的用途。

20. 权利要求 1 的产物、权利要求 4 的产物、权利要求 10 的产物、权利要求 12 的产物、权利要求 15 的产物在制备以 5—500mg/kg 体重每天的量向哺乳动物给药用于抑制哺乳动物的免疫反应的药品中的用途。

21. 权利要求 19 的用途，其中所述哺乳动物是患有牛皮癣、关节炎或特应性皮炎的人。

22. 权利要求 20 的用途，其中所述哺乳动物有移植排斥反应发生的危险。

23. 权利要求 19 的用途, 其中所述动物患有选自如下的一种或多种病症: 变态反应、哮喘、关节炎、皮肤病、痤疮、牛皮癣、炎性肠道疾病、心血管疾病、心绞痛、中风、特应性皮炎、前列腺癌、肺癌、皮肤癌和消化道癌。

24. 权利要求 20 的用途, 其中所述动物患有糖尿病、类风湿性关节炎、骨关节炎、强直性脊椎炎、偏头痛、痤疮、胃灼热、红斑狼疮或癌症, 而本发明的有效制剂以剂量为 5mg/kg 每天至 500mg/kg 每天给药。

25. 权利要求 20 的用途, 其中所述免疫反应显示为普通痤疮, 而所述哺乳动物是人。

26. 一种水生动物饲料, 其中含有权利要求 10 所述的产物。

27. 一种水生动物饲料, 其中含有权利要求 16 的产物。

28. 从海参肠或体壁组织中大规模提取脂类馏份的方法, 其中包括如下步骤:

a) 通过人工或机械方法, 提取海参的肠或体壁组织;

b) 将所述组织酸化为 pH 为 4 至 5.5 的海参组织物质;

c) 将步骤(b)的所述组织干燥; 并

d) 用有机溶剂从步骤(c)所述组织中提取脂类馏份, 其中溶剂选自己烷、液化丙烷、超临界二氧化活性炭、丙酮、乙醇或所述溶剂的混和物。

29. 权利要求 1 的产物、权利要求 6 的产物、权利要求 12 的产物、权利要求 14 的产物、权利要求 15 的产物在制备以 20—500mg/kg 体重每天的施用量向哺乳动物给药用于抑制哺乳动物血管生成的药物中的用途, 其中新血管生成有助于病理症状。

30. 权利要求 29 的用途, 其中所述给药通过局部接触新血管生成的区域进行。

31. 权利要求 1 或 6 所述产物的高压液相色谱分离馏份, 其特征在于该馏份在抑制由白三烯 B₄、6—反式—白三烯 B₄ 和 6—反式

— 12 — 表 — 白三烯 B₄ 和 5-HETE (5(S) — 羟基 — (E, Z, Z, Z) — 6, 8, 11, 14 — 二十碳四烯酸) 引起的炎症方面有活性。

32. 权利要求 31 的馏份在制备用于抑制哺乳动物的炎症的药物中的用途。

33. 权利要求 32 的用途, 其中所述的炎症起源于 5-脂肪氧合酶的活性。

海参类胡萝卜素脂类分馏产物及其用法

发明领域

本专利涉及治疗用产品及抑制某些疾病的方法的总领域，这些疾病与人和兽药学的总医药领域有关，其中脂肪氧合酶路径的激活是病理状态的原因。已知抑制或调节 5-脂肪氧合酶或 12-脂肪氧合酶路径的试剂可用于此医药领域。无毒性或毒性很小的、抑制系统或皮肤炎症的试剂可用于伤后愈合领域。此专利还涉及用于水产养殖业的着色试剂领域，其中着色组分必须掺入水生动物饲料中，以便在动物肉或其皮肤或壳上产生色素沉着。

更具体地讲，本发明涉及某些新的脂类，其得自海参科，或海参，并特别是瓜参属 *frondosa* 变体，其发现于缅甸州和北大西洋。海参的任何种都可以作为提取本发明化合物的原料。通过掺入饲料，由这些海参的任何种得到油可以用于水生物种的着色，它们还可以用于治疗或减轻疾病，脂肪氧合酶活性或白三烯反应是这些疾病的病因。即，得自海参的任何纲或种的新的脂类抑制脂肪氧合酶和/或结合白三烯受体。在花生四烯酸级联中脂肪氧合酶是熟知的。这些油(将其命名为 RED OIL 和 GOLD OIL)可以照原样用于免疫抑制目的，并还提供了制备免疫抑制药物组分的原料，这些药物组分适于改善器官移植或如红斑狼疮或类风湿性关节炎等疾病中的自身免疫反应。这些油或其分子蒸馏的衍生物适于原样使用，或可以进一步通过本领域已知方法分馏，并用于减轻、压制、抑制或预防不需要的免疫反应，例如，在需要免疫抑制的人或动物中。这些情况的实例，包括但不限于，治疗或预防自身免疫疾病如糖尿病、狼疮和类风湿性关节炎。器官移植也常要结合免疫抑制。当人

或动物已经或可能接触超级抗原或已知引起免疫系统过度刺激的其它因子时,也可以使用免疫抑制剂。本发明的化合物也可用作评价其它假定免疫抑制剂活性的标准物。本发明还涉及含这些化合物的药物组合物。如小鸡绒毛尿囊膜检测(Knighton 等, 1977)所示,通过本发明说明这些油还抑制血管生成。已表明为本发明目的命名为 RED OIL 的着色油中类胡萝卜素、鸡油菌黄质、虾青素的含量是令人意想不到的,并适于加入到出售的鱼饲料中以便让所需特定种类的肉或皮肤产生色素沉着。

发明背景

本发明涉及新的化合物、药物组合物及其用于治疗病因是 2-和 12-脂肪氧合酶活性的疾病的方法。本发明还涉及得自海参组织的脂类馏份的产物,其改善免疫反应并还可以掺入水生物种的饲料中以便给鱼或虾的肉或皮肤带来颜色。虽然,文献中已报道了得自某些鱼类的海洋生物脂类用于治疗多种与关节炎有关的疾病,海参脂类从来没有包括任何研究中,也没有任何证据表明在哺乳动物系统中脊椎动物鱼类已知的炎症抑制机制与本发明有关(DeLuca 等, 1995)。还已知某些海绵类和海鞘类具有免疫调节或免疫抑制活性,但是在海洋生物药学领域尚无报告说明海参脂类具有任何用于药学领域的这种抑制活性(Konig and Wright, 1995)。

更具体地讲,限定如下的化合物抑制哺乳动物的 5-脂肪氧合酶路径和 12-脂肪氧合酶路径。脂肪氧合酶路径的产物如白三烯 B₄、C₄、D₄ 和 E₄、5-羟基二十碳四烯酸、5-羟基过氧二十碳四烯酸和 12-羟基二十碳四烯酸与上述病症有关。使用本发明新的脂肪氧合酶抑制化合物、其药物组合物和本发明所用新方法的特定病症包括变态反应;哮喘;关节炎;皮肤病,包括牛皮癣、特应性皮

炎和痤疮；包括炎性肠道疾病或疼痛的炎症；包括前列腺、肺、结肠直肠和皮肤等部位的多种癌症；以及心血管疾病，包括心肌缺血和梗塞、心绞痛、心率不齐、中风、偏头痛和动脉硬化。

本发明的化合物得自任何种或亚门的海参的脂类馏份；得自这些脂类馏份的脱色馏份；得自本领域技术人员已知的分子蒸馏相；或得自本领域技术人员已知的色谱柱分离；得自任何海参的表皮、真皮、腹部、臀部、肠内物质，其包括呼吸树、性腺、输卵管(cuverian tubules)或灰囊泡(polian vesicle)。

多种海参提供了用于伤后愈合领域的治疗活性馏份。专利 5519010 教导解聚多糖用作抗凝剂。Collin 的专利 5770205 教导通过多种方法提取的海参组织具有抗炎活性，用于人和兽药领域。已表明得自海参器官的糖苷含抗癌剂(Miyamoto 等, 1990)。上述文献都没有描述得自海参的脂类抑制任何脂肪氧合酶路径，没有描述炎症，没有描述这种海参衍生试剂用于抑制病因是脂肪氧合酶产物、异构体或代谢物的病症。上述专利也都没有给出任何证据表明这样的脂类为哺乳动物提供了免疫调节活性。

本发明给出了富含色素的脂类物质和脱色脂类物质，及从任何含色素或脱色海参脂类物质的分子蒸馏回收的轻相，能抑制人中性白细胞中的 5-脂肪氧合酶活性和人血小板中的 12-脂肪氧合酶。

目前有很多专利描述旨在抑制哺乳动物的白三烯和 5-脂肪氧合酶及 12-脂肪氧合酶路径的试剂。这些化合物中的一些是有效的，而一些具有毒副作用，或者因成本太高不能生产。本发明的一个目的是制备海参油及其衍生物，其可以掺混入软膏、栓剂，及加入到口服或注射给药的药物中，或加入到通过其它方式给药的药物中，提供成本低且容易采用的方式来调节哺乳动物的白三烯路径，并因此有助于如癌症、牛皮癣、特应性皮炎等疾病的治疗，在

这些疾病中白三烯、LTB₄、5-HETE 和 12-HETE 是病因之一。

发明目的

新化合物及其组合物的治疗应用可以认为能通过任何适宜的治疗方法和目前或将来本领域技术人员已知的技术完成。此外，本发明的化合物可用作制备其它有用的、表现出更强活性的化合物和组合物的起始物或中间体。

本发明的目的是给本领域提供药物组合物，其中含有有效量的一种或多种本文所述的新化合物作为活性组分。本发明的另一个目的是给本领域提供新的化合物，其通过其对哺乳动物脂肪氧合酶路径的抑制活性及通过其对哺乳动物免疫系统淋巴细胞增殖路径的抑制活性，来用作免疫调节剂，以及用于给海洋生物着色的水生动物饲料中的组分。含轻相的分子蒸馏或其它分离技术的馏份，即所谓的天然海参组织的海参提取油，已表现出对脂肪氧合酶路径的抑制。另外，由对这些同样的油进行分子蒸馏得到的重相显示了类似的活性。对重相路径更具活性部分的分离可以通过例如柱色谱分离完成，或通过脂类生物化学领域技术人员已知的其它方法来完成。因此，如果需要更强或特定的馏份，则为这种分离提供原料或活性中间体，这是本发明的目的之一。

本发明的化合物抑制哺乳动物 5-脂肪氧合酶和 12-脂肪氧合酶活性，其抑制活性与抗变态反应、抗炎和抗过度增殖有关。本发明的化合物因此可用于脂类如上所述的变态反应性疾病、上皮的炎性疾病、胃灼热、癌症和过度增殖性皮肤病。还表明它们能抑制人血液中淋巴细胞增殖。

其可以治疗的炎性疾病包括关节炎、滑囊炎、腱炎、痛风和炎性肠疾病。

“过度增殖性皮肤病”指具有加速的皮肤细胞生成、剥落、鳞

屑或丘疹损伤症状的任何病症。增殖性皮肤病的实例包括，例如，牛皮癣、苔藓性湿疹、皮屑等。

本发明的化合物可以一任何常规的剂型给药，例如，局部、口服、非肠道、直肠、透皮、吸入等方式。口服或直肠给药剂型包括胶囊、片剂、丸剂、散剂、扁囊剂和栓剂。液体口服剂型包括溶液剂和悬液剂。非肠道给药制剂包括灭菌溶液剂和悬液剂。吸入给药可以是鼻内或口腔内喷雾，或通过吹入。局部给药剂型可以是霜剂、软膏、洗剂、透皮装置(例如，常规的贴剂或骨架型)等，并优选用于治疗过度增殖性皮肤病。

上述剂型所指的制剂和药物组合物可以用常规药用赋形剂和添加剂以常规技术制备。这些药用赋形剂和添加剂可包括载体、粘合剂、矫味剂、缓冲剂、增稠剂、着色剂、稳定剂、乳化剂、分散剂、助悬剂、香料、防腐剂、润滑剂等。

适宜的药用固体载体为碳酸镁、硬脂酸镁、滑石、糖、乳糖、果胶、糊精、淀粉、明胶、黄芪胶、甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、低熔点蜡、可可脂等。可以通过将活性化合物装入作为载体的药用胶囊中制备胶囊剂。本发明的化合物可以与药用赋形剂混和或可以以不含赋形剂的细粉末的形式包封在胶囊中。同样，作为脂质体形式的扁囊剂是本领域技术人员已知的。

液体形式的制剂包括溶液剂、悬液剂和乳剂。例如，可以提及的是非肠道注射用水或水-丙二醇溶液。液体制剂也可以在聚乙二醇和/或丙二醇的溶液中配制，其中可以含有水。可以通过将活性组分加入到水中并加入所需适当的着色剂、矫味剂、稳定剂、甜味剂、稳定剂和增稠剂来制备适于口服的含水溶液剂。可以通过将活性组分分散在油中来制备适于口服的含水悬液剂，其中含有乳化剂如吐温 80，正如工业领域已知的油/水乳液。

局部施用的制剂，例如，用于治疗过度增殖性皮肤病的，可以

包括上述液体剂型，以及霜剂、气雾剂、喷雾剂、粉剂，其中此油与适宜的载体混和，通过将本发明的活性组分与局部制剂中常使用的常规药用稀释剂和载体混和来制备洗剂和软膏。例如，软膏和霜剂可以用含水或油性基质，同时加入适宜的增稠剂和/或胶凝剂来配制。按照该基质的性质可以使用的增稠剂包括软蜡、硬脂酸铝、十六醇十八醇混和物、丙二醇、聚乙二醇、羊毛脂、氢化羊毛脂等。

可以用含水或油性基质配制洗剂，且一般来说其中还含有一种或多种药用稳定剂、乳化剂、分散剂、助悬剂、增稠剂、着色剂、香料等。

局部用药物组合物还可以含有一种或多种防腐剂或抑菌剂，例如，羟基苯甲酸甲酯、羟基苯甲酸丙酯、氯甲酚、苯扎氯铵等。

局部药物组合物还可以含有与其它活性组分混和的本发明的活性化合物，其它活性组分如抗菌剂，特别是抗生素，麻醉剂，止痛剂和止痒剂吡硫磺锌。

本发明的化合物还可以通过透皮方式进行系统给药。此透皮给药组合物的形式可以是霜剂、洗剂和/或乳剂，且可以含于为此目的常用的骨架或贮库型的透皮贴剂中。

本发明的化合物可以以任何常规方式给药，其中使用了以此给药方式进行抗变态反应、抗炎或抗过度增殖有效量的本发明化合物。根据主治医师诊断的患者需求、所治疗症状的严重性及所用特定化合物，剂量是可以变化的。特定情况的适当剂量的确定是本领域技术人员的一般知识。治疗可以较小的剂量开始，该较小剂量小于该化合物的最佳剂量。此后，小量增加此剂量直到在该情况下达到最佳效果。方便起见，总的日剂量可以细分，且如果需要在当天分次给药。

因此，根据该方式，每天可以使用剂量约 0.1 至约 500mg/kg 体重。例如，当口服给药时，其发挥抗变态反应活性的剂量为约 0.5

至约 200mg/kg 体重并优选约 50 至约 100mg/kg 体重；当通过吸入给药时，这些化合物表现出抗变态反应活性的剂量为 0.1 至 5mg 每次吸入，每隔 4 小时可以进行 1 至 4 次吸入。

本发明的化合物可以一任何常规的给药方式给药，通过使用抗炎有效量的本发明化合物获得抗炎活性。作为抗炎剂，本发明化合物给药剂量为约 0.1 至约 500mg/kg 体重每天，优选约 5 至约 200mg/kg 每天。优选每天总给药剂量以 2 至 4 个均分剂量给药。例如，约 5mg/kg 体重每天至约 50mg/kg 体重每天的口服剂量范围，可以采用约 4 小时间隔以均分剂量形式给药。

当用于治疗过度增殖性皮肤病时，本发明化合物可以局部、口服、直肠或非肠道给药，优选局部给药。当局部给药时，所用化合物的量依所治疗皮肤的面积大小及给感染区施用的活性组分浓度变化很大。优选，局部给药组合物含约 0.10 至约 10% (重量) 的活性组分，并根据主治医师诊断按照需要施用。当口服给药时，RED OIL 和 GOLD OIL 的化合物以日剂量约 0.1mg/kg 至约 500mg/kg 体重给药对治疗过度增殖性皮肤病是有效的，优选约 5mg/kg 至约 100mg/kg，其可以以均分剂量给药。当直肠给药时，本发明化合物日剂量可以是约 0.1mg/kg 至约 100mg/kg。

作为本发明化合物给药的结果，可以预计大多数病例中牛皮癣患者的症状得以缓解。因此，可以预期牛皮癣患者的脱皮、红疹、斑的大小、瘙痒的减轻或减小。药物的剂量和成功治疗各个牛皮癣患者所需的时间可以变化，但是本领域技术人员能认知这些变化并按此调整疗程。

脂肪氧合酶系统

花生四烯酸作为生理活性二十碳酸类的生物前体。这些包括由环加氧酶的作用而衍生的产物，如前列腺素-E 和-F 化合物类、血

栓烷和前列腺环素，以及由脂肪氧合酶作用而衍生的产物，如羟基一和羟基过氧化二十碳四烯酸和白三烯。

已表明这些脂肪氧合酶产物是多形核白细胞迁移或趋化性、溶酶体酶释放及脱粒的高强度立体特异性诱发剂。此外，这些产物引起平滑肌如血管和肺组织收缩，并引起产生其它炎性原如血栓烷和前列腺环素。脂肪氧合酶产物还与血管舒张剂前列腺素类及其它介体作用，导致炎性反应的提高或扩大。

在很多病症的病理中，白三烯和羟基及羟基过氧化二十碳四烯酸起重要作用。已在类风湿性关节的滑液、牛皮癣患者皮肤、发炎的结肠组织及局部缺血心肌中发现这些化合物，其在局部缺血心肌中浓度升高。它们还是变态反应和哮喘症状的介体。

最近一些出版物中说明了在刺激一些不同类型的肿瘤生长中 5-HETE 的作用。例如，加入花生四烯酸来培养人前列腺癌细胞，造成细胞生长的显著增加和 5-羟基二十碳四烯酸 (5-HETE) 生物合成的增加 (Ghosh and Myers, 1997)。通过加入 5-脂肪氧合酶 (5-LO) 抑制剂 AA681 和 MK886 阻断了此加速生长，但是 12-LO 抑制剂、黄芩黄素和 N-苄基-N-羟基-5-苯基戊酰胺 (BHPP) 不能阻断，环加氧酶 (COX) 抑制剂也不能阻断。此外，向细胞中加入 5-HETE，而不是 5-LO 路径的其它产物如白三烯 B₄，不仅刺激细胞生长，还逆转 MK886 的作用。不论在体外还是体内，在其它类型的癌细胞中也有类似的发现。例如，在人乳腺癌 (HS578T) 细胞系中，这些 LO 抑制剂去甲二氢愈创木酸 (NDGA) 和七叶树原抑制细胞生长，但是 COX 抑制剂吡罗昔康无作用 (Hofmanova 等, 1996)。在鼠腺瘤细胞系 (MAX) 和 MAC 细胞移植鼠中，5-LO 抑制剂 BWA4C (一种乙酰基异羟肟酸，通式为 R-CONHOH) 和 BWB70C (一种乙酰基异羟肟酸衍生物) 抑制了肿瘤细胞的生长和 5-HETE 的产生 (Hussey and Tisdale, 1996)。此外，在以尿烷引起腺瘤的 A/J 小鼠的体内研究

中, NDGA 的使用显著降低了肺腺瘤细胞数(Moody 等, 1998), 而在鼠腺瘤中, 通过对 5-和 12-HETE 产生的作用, 也表明 BWA4C 和 BWB70C 降低 MAC26 和 MAC16 细胞生长(Hussey and Tisdale, 1996)。

12-HETE

越来越多的证据表明由血小板和肿瘤细胞产生的 12-HETE 是刺激肿瘤转移的决定性分子。它通过增加表明整联蛋白表达、诱导内皮细胞退缩并增加肿瘤细胞的能动性(这些堵塞肿瘤转移的重要步骤), 促进肿瘤细胞诱导的血小板凝集和肿瘤细胞粘附内皮下基层(Honn 等, 1994)。体外研究表明 12-LO 抑制剂 BHPP 除去了上述作用, 不论内源性的和外源性加入 12-HETE(Honn 等, 1992; Chen 等, 1994)。还表明 12-HETE 产生是肿瘤细胞转移可能性的良好的指示。例如, 与正常细胞相比, 12-HETE mRNA 水平在前列腺癌细胞中增加, 而 mRNA 水平的增加与癌细胞的在前阶段及较差的分化有关(Gao 等, 1995)。进一步的研究中, 已表明大鼠 Walker 瘤(W256)和小鼠黑素瘤(B16a)细胞使花生四烯酸(AA)代谢为 12-HETE 和 5-HETE, 而在此试验性转移中, BHPP 的使用降低了肺中集落的形成(Chen 等, 1994; Liu 等, 1994)。

本发明的化合物、药物和营养组合物抑制脂肪氧合酶或白三烯的生物合成或生化作用, 因此, 可用于治疗或改善病理包括白三烯及其它脂肪氧合酶衍生产物如 5-HETE 和 12-HETE 及白三烯 B_4 (LTB₄)产生的一些疾病。这些脂肪氧合酶抑制剂有助于预防组织损伤和炎症, 这些病症是由白细胞浸润、组织消化溶酶体酶释放和平滑肌组织的渗透性和收缩状态的变化造成的。

本发明的这种脂肪氧合酶抑制或白三烯拮抗化合物和药物组合物针对的特定病症包括变态反应; 哮喘; 关节炎; 皮肤病, 包括

牛皮癣和痤疮；炎症；炎性肠疾病；疼痛；及心血管疾病，包括心肌局部缺血和梗塞、心绞痛、心率不齐、中风、特应性皮炎、动脉硬化和多种病因的癌症，包括前列腺、肺、皮肤和消化道癌症。

用本发明的 RED OIL 和 GOLD OIL 抑制血管生成

寻找血管生成的新抑制剂有非常多的科学利益，这基于对新血管的这种抑制会限制新生肿瘤的生长，因这些肿瘤的生长依赖于新血管的生长。正常细胞变为实体瘤时，其进行了一系列的变化。就生理水平而言，生长加速，免疫性减退，而新血管生成产生。新血管生成或血管生成看来是肿瘤生长的先决条件。没有血液的供应，试验性实体瘤连几厘米的厚度都不能生长。多数天然实体瘤加工血管生成因子，其诱发它们赖以生存的新血管。因此，针对可以防止强烈的毛细血管增殖和保持正常组织的内皮细胞静止状态的问题研究一直持续不断。

本发明的另一个目的是提供药物组合物以及抑制有此治疗需要的温血动物的血管生成的方法，其中包括给所述温血动物使用治疗有效量的组合物，该组合物中含有分离的 RED OIL 或 GOLD OIL，或从下文所述的分子蒸馏方法中得到的轻相和重相。

得自海参组织的类胡萝卜素

得自海参的类胡萝卜素在多种科学期刊中已有所提及，Matsuno 等(1995)报告了虾青素是海参 *Holothuria leucospilota* 和 *Stichopus japonicus* 性腺的主要类胡萝卜素，而由 *H. leucospilota* 和 *S. japonicus* 的性腺中鉴定了胡萝卜素，海胆烯酮，鸡油菌黄质和玉米黄质。另一方面，虾青素及其酯、鸡油菌黄质、*phoenicoxanthin* 和海胆烯酮，也由 Bullock 和 Dawson(1970) 从 *Psolus fabrichii* 的红体壁中分离。Tsushima 等(1996)对由海

参 *Cucumaria japonica* 得到新的海洋生物二—Z类胡萝卜素, 海参素 (cucumariaxanthin) A、B 和 C 作了报告。Findlay 等(1983a)报告了得自 *Cucumaria frondosa* 种的鸡油菌黄质。这些包括都没有提供将这些类胡萝卜素用于水产养殖或医疗或保健食品工业的任何手段, 且没有提供浓缩这些有色脂类馏份的方法。

Spinelli, Stout 和 Nilsson 的美国专利 4692280 描述了用超临界的二氧化碳获得纯化鱼油的方法(从鱼组织初提后), 并将其所述方法引入本文作为参考。此专利没有公开用该专利给出的超临界纯化方法纯化获得海参馏份的手段。

因此, 现有技术中没有充分和大量地除去脂类馏份, 且没有直接获得可利用的海参组织类胡萝卜素或非类胡萝卜素脂类馏份。

本发明的目的之一是提供从海参肠道物质和/或体壁中回收可利用的有色脂类馏份和无色脂类馏份的方法, 特别是从 *Cucumaria frondosa* 种中提取。本发明的另一个目的是公开一种物质组合物, 其是得自这些回收方法的有色脂类馏份和脱色脂类馏份。用商购的提取设备, 如 Crown 2 Extractor (Crown Iron Works, Chicago, IL)(其用于豆油提取领域)用丙酮或醇溶剂提取获得的有色脂类馏份, 提供了富含于鸡油菌黄质和虾青素中的着色物质, 浓度约每百万 4500 份, 并作为饲料组分用于水产养殖业中。脂类提取后, 干燥的、脱脂组织可以以高蛋白膳食或必需氨基酸含量惊人的水解物。

发明内容

本发明给出了对得自湿或干原料海参肠或体壁组织的新的有色或无色脂类化合物进行工业提取的方法及其组合物。本发明化合物可用作水生动物饲料的着色添加剂或作为哺乳动物的治疗剂, 并通过本文中描述的分子蒸馏技术、工业规模的溶剂提取技术、柱色谱技术及通过制备高压液相色谱技术制备。

本发明的化合物显示了抗炎活性,通过鼠炎症模型的耳重增加的低百分比,并当局部施用时对佐剂引起的大鼠后爪炎症的抑制结果,以及从人个体受益的轶闻中,该活性显而易见。

本发明的化合物, RED OIL 和 GOLD OIL 和其分子蒸馏的馏份用于治疗哺乳动物(例如,人和狗)的变态反应,且优选的用途是治疗这些哺乳动物皮肤的变应性慢性炎症,其与适宜的透皮载体化合物作为关节炎病症的抑制剂,其中本发明的油透皮到达脂肪氧合酶活化的局部部位。另一个优选的用途是治疗变应性慢性阻塞性肺病。本文中慢性阻塞性肺病指空气进出肺部的通道被阻塞或消除的疾病,如哮喘、变应性和季节性鼻炎和/或支气管炎等。对牛皮癣、痤疮、关节炎或癌症的治疗,可以通过用本发明的化合物作为局部给药化合物和通过口服给药来完成。

因此,本发明的另一个目的涉及从海参组织中分离的 RED OIL 和 GOLD OIL, 及这些化合物的多种衍生物和类似物的免疫抑制用途。这些化合物可以用来降低、制止、抑制或预防不需要的免疫反应。有利的是,获得此免疫抑制可没有细胞毒性。因此,这些化合物可用于治疗需要免疫抑制的人或动物。这些情况的实例包括但不限于,治疗或预防自身免疫性疾病如糖尿病、狼疮和类风湿性关节炎。免疫抑制在器官移植中也常常需要。当人或动物已经,或可能接触超级抗原或已知引起免疫系统过度刺激的其它因子时,也可使用免疫抑制剂。本发明的化合物也可用作评价其它假定免疫抑制剂活性的标准物。本发明还涉及含这些化合物的药物组合物。

作为色素添加剂,根据该油的类胡萝卜素的含量食用着色饲料的特定色素生物的种类需要颜色的特定强度,可以以不同的浓度将多种有色油加入到鱼或虾饲料中。

本发明的目的通过下述技术方案得以实现:

1. 含带有类胡萝卜素脂类的产物,其中所述产物是从干燥的海参肠或体壁组织中用有机溶剂经下列步骤分离的:

- a) 从海参中分离肠或体壁组织;
 - b) 将所述肠或体壁组织的 pH 调节为 4 至 5.5;
 - c) 在 pH 调节至 4 至 5.5 后将所述肠或体壁组织干燥;
 - d) 用有机溶剂提取所述肠或体壁组织;
 - e) 从所述肠或体壁组织中分离所述溶剂; 及
 - f) 蒸发所述溶剂。
2. 如方案 1 中的产物, 其还经过如下的处理步骤:
- g) 脱胶;
 - h) 用硅胶处理;
 - i) 加热; 及
 - j) 过滤。
3. 如方案 1 的产物, 其中还含有抗氧化剂。
4. 如方案 1 的产物, 其还经过如下步骤的处理:
- a) 用有机溶剂提取干燥的海参肠或体壁组织制得提取物后, 将能结合色素的吸附剂与所述提取物混和; 及
 - b) 除去所述吸附剂;
- 其中所述产物由除去所述吸附剂的剩余物质组成。
5. 如方案 4 的产物, 其中所述吸附剂是存在于用氯仿平衡的柱中的硅酸, 且通过氯仿流经所述柱从所述吸附剂中得到所述产物。
6. 如方案 4 的产物, 其中所述吸附剂选自活化的粘土、非活化的粘土、活性炭和二氧化硅。
7. 如方案 4 的产物, 其中还含有抗氧化剂。
8. 如方案 1 的产物, 其还经过如下步骤的处理:
- a) 用有机溶剂提取所述海参组织制得提取物后, 加入能结合所述提取物中的色素的吸附剂;
 - b) 移出所述吸附剂;
 - c) 用溶剂提取所述吸附剂;
 - d) 将所述溶剂和所述吸附剂分离; 及
 - e) 除去所述溶剂以得到所述产物。

9. 如方案 8 的产物, 其中所述吸附剂选自活化的粘土、非活化的粘土、活性炭、硅酸和二氧化硅。

10. 如方案 1 的产物, 其还经过如下步骤的处理:

a) 用有机溶剂提取所述的干燥的海参组织制得提取物后, 将所述提取物蒸馏; 并

b) 在冷凝器中, 在 25—35℃下, 收集蒸馏馏份。

11. 如方案 10 的产物, 其中还含有抗氧化剂。

12. 如方案 1 的产物, 其是通过包括如下步骤的方法分离:

a) 用有机溶剂提取所述的干燥的海参组织制得提取物后, 将能结合色素的吸附剂与所述提取物混和;

b) 移出所述吸附剂以制备金黄色油;

c) 蒸馏所述金黄色油; 并

d) 在冷凝器中, 在 25—35℃下, 收集蒸馏馏份。

13. 如方案 12 的产物, 其中还含有抗氧化剂。

14. 从新鲜海参的肠或体壁组织中纯化的产物, 其中所述产物通过包括下列步骤的方法分离:

a) 从海参中分离肠或体壁组织;

b) 将所述肠或体壁组织的 pH 调节为 4 至 5.5;

c) 用有机溶剂提取所述肠或体壁组织;

d) 从所述肠或体壁组织中分离所述溶剂; 及

e) 收集除去所述溶剂的肠或体壁组织;

其中所述产物是除去所述溶剂后剩余的含类胡萝卜素的脂类物质。

15. 含脂类的产物, 其中所述产物制备如下:

a) 将方案 14 步骤(e)的所述肠或体壁组织干燥以制备干燥的组织;

b) 用有机溶剂提取所述干燥组织, 将脂类提取进入溶剂相;

c) 从组织中分离所述溶剂相; 并

d) 除去所述溶剂;

其中所述产物是从所述溶剂相中除去溶剂后剩余的脂类物质。

16. 如方案 15 所述的产物, 其中所述有机溶剂选自己烷、丁烷、液化丙烷、乙醇、丙酮、氯仿和超临界二氧化碳。

17. 如 5 的产物, 其中还含有抗氧化剂。

18. 含蛋白质、本质上不含脂类的产物, 其中所述产物制备如下:

a) 将方案 14 步骤(e)或方案 1 步骤(e)的所述肠或体壁组织干燥以制备干燥组织;

b) 用溶剂提取所述干燥组织, 将脂类提取进入溶剂相; 并

c) 从组织分离所述溶剂相;

其中所述产物是步骤(c)的所述组织。

19. 如方案 1、4、10、12 和 15 的产物在制备以有效量向哺乳动物给药以抑制哺乳动物的由脂肪氧合酶活性引起的炎症的药品中的用途。

20. 如方案 1、4、10、12 和 15 的产物在制备以 5—500mg/kg 体重每天的量向哺乳动物给药用于抑制哺乳动物的免疫反应的药品中的用途。

21. 如方案 19 的用途, 其中所述哺乳动物是患有牛皮癣、关节炎或特应性皮炎的人。

22. 如方案 20 的用途, 其中所述哺乳动物有移植排斥反应发生的危险。

23. 如方案 19 的用途, 其中所述动物患有选自如下的一种或多种病症: 变态反应、哮喘、关节炎、皮肤病、痤疮、牛皮癣、炎症肠道疾病、心血管疾病、心绞痛、中风、特应性皮炎、前列腺癌、肺癌、皮肤癌和消化道癌。

24. 如方案 20 的用途, 其中所述动物患有糖尿病、类风湿性关节炎、骨关节炎、强直性脊椎炎、偏头痛、痤疮、胃灼热、红斑狼疮或癌症, 而本发明的有效制剂以剂量为 5mg/kg 每天至 500mg/kg 每天给药。

25. 如方案 20 的用途, 其中所述免疫反应显示为普通痤疮, 而所述哺乳动物是人。

26. 一种水生动物饲料, 其中含有方案 10 所述的产物。

27. 一种水生动物饲料, 其中含有方案 16 的产物。

28. 从海参肠或体壁组织中大规模提取脂类馏份的方法, 其中包括如下步骤:

a) 通过人工或机械方法, 提取海参的肠或体壁组织;

b) 将所述组织酸化为 pH 为 4 至 5.5 的海参组织物质;

c) 将步骤(b)的所述组织干燥; 并

d) 用有机溶剂从步骤(c)所述组织中提取脂类馏份, 其中溶剂选自己烷、液化丙烷、超临界二氧化活性炭、丙酮、乙醇或所述溶剂的混和物。

29. 如方案 1、6、12、14 和 15 的产物在制备以 20—500mg/kg 体重每天的施用量向哺乳动物给药用于抑制哺乳动物血管生成的药物中的用途, 其中新血管生成有助于病理症状。

附图简述

图 1 表明了与对照物相比 GOLD OIL 轻相在合成 LTB₄中的作用。

图 2 表明了 GOLD OIL 稀释物对嗜中性白细胞 5-脂肪氧合酶代谢物合成的抑制。

图 3 说明了稀释度为 1:10000 的 RED OIL 对嗜中性白细胞 5-脂肪氧合酶代谢物合成的抑制。

图 4 说明了与甲醇对照 RED OIL 和 GOLD OIL 对 12-HETE 合成的作用。

图 5 说明了 GOLD OIL 的气相色谱。

图 6 显示了 RED OIL 的吸收谱。

图 7 显示了与丙酮对照相比 5%GOLD OIL 对用巴豆油刺激的小鼠耳的作用。

图 8 显示了与丙酮对照相比 RED OIL 对用巴豆油刺激的小鼠耳的作用。

图 9 显示了与甲醇对照相比 GOLD OIL 轻相对 12-HETE 合成的作用。

发明详述

制备可利用的海参馏份的方法

将海参的不同馏份分离并用于治疗或作为水生生物的饲料。简言之,制备这些馏份的方法包括用溶剂提取干燥的海参肠和体壁以制备有色油,将其称为 RED OIL。从 RED OIL 中可以除去色素得到或多或少的脱色油,将其称为 GOLD OIL 和第二馏份,其是红色脂类浓缩物。此 RED OIL 和此 GOLD OIL 可以分别蒸馏得到不同的馏份,包括称为轻相和重相的。另一种方法是使用湿的海参组织而不是干燥的组织。当用丙酮或乙醇进行此步骤时,第一溶剂提取得到称为 RRED GREASE 的产物。也给出了第二种制备 GOLD OIL 的方法。

此方法包括在第一次提取除去了全部或大部分红色后通过任何手段的手段对干燥的海参组织进行第二溶剂提取。最后，通过获得脱脂的海参组织并对其进行处理以制备富含蛋白的水解物，获得海参的其它馏份。此水解物用作食物添加剂或可以掺入到多种食品中。制备和使用每种本发明不同产物的方法见下文，该方法制备了本质上相同的产物，而该产物的名称旨在包括此产物，而不考虑在此说明书中给出的方法，或可以使用得到具有类似活性或用途的本质上相同的产物的方法制备此产物。

制备可利用的海参馏份的一种方法

从海参加工业处理的废物中收集得自 460 千克海参，*Cucumaria frondosa* 的肠物质。在常规低温海产品干燥机 (Southwind, Nova Scotia, Canada) 中的网架上将此肠物质干燥 3 天，得到 105 磅干燥的物质。随后，如在豆油领域已知的用常规方法将此干燥的肠物质用己烷提取 (Crown Model 2 Extractor, Crown Iron Works, Chicago, IL)，以制备约 42 磅的红色脂类物质，称为 RED OIL。然后，通过向此油中加入 1% 水将此脂类物质除胶，水合 30 分钟，然后以 800 0rpm 在 150°F 下离心。再用 0.5% 硅胶预处理此红色脱胶脂类物质，加热至 180°F，然后用 6 微米过滤纸过滤。通过加入 5% 漂白粘土预处理此油以除去色素。在 28 英寸 Hg 真空下将此油加热至 220°F，保持 20 分钟。所得油 (34 磅) 为淡黄色，大多数色素被漂白粘土吸附。将没有色素的肠脂类称为 “GOLD OIL”，且其是脂类馏份之一，进一步测定其对脂肪氧合酶活性的抑制和抗炎活性。

然后，用丙酮将所得粘土提取，粘土与溶剂的比例为 1:2 (w:w)，并洗涤两次。再将所得溶液在 Luwa 蒸发器中在 90°C 和 29 英寸 Hg 真空下除去溶剂，并回收了 8 磅的红色脂类馏份浓缩物。

制备 GOLD OIL 的另一种方法是让 RED OIL 通过用氯仿平衡的硅酸柱,并用氯仿洗涤此柱。用氯仿洗脱液洗脱 GOLD OIL。然后,让氯仿:甲醇(优选 60%:40%)的化合物通过此柱从该柱上可以洗脱出浓缩的 RED OIL。结果回收了占该柱上装载原料的约 70%的 GOLD OIL 和 30%的浓缩 RED OIL。

无色素的 GOLD OIL 和有色 RED OIL 都进行分子蒸馏以便分离蒸发的馏份。在 200℃和 0.005 托下三次通过分子蒸馏器。每次通过回收到三种馏份。在冷凝器温度约 30℃下收集轻相(轻相 I)并保留。在乙醇/干冰收集器中收集挥发的馏份并弃去。重相(重相 I)是在蒸馏器底部的部分,其在此方法中没有蒸发。随后,将重相 I 再加入到分子蒸馏器中制备轻相 II 和重相 II。重相 II 留在该蒸馏器的底部,然后将其在加入到此蒸馏器中并制备轻相 III 和重相 III。总之,这些技术提供了轻相 I、II 和 III;重相 I、II 和 III;以及弃去的其它挥发物。随后,测定轻相在抑制脂肪氧合酶路径中的活性。图 1 描述了轻相对 5-脂肪氧合酶活性的抑制。图 2 描述了未蒸馏的 GOLD OIL 对 5-脂肪氧合酶活性的抑制。图 3 描述了 RED OIL 脱色前对 5-脂肪氧合酶抑制活性。图 4 描述了 GOLD OIL 和 RED OIL 对 12-脂肪氧合酶路径的活性和 12-HETE 产生的作用。图 9 描述了与甲醇对照相比稀释度为 1:1000 的 GOLD OIL 轻相对 12-HETE 合成的作用。

制备可利用的馏份的第二种方法

本发明的目的包括使用本发明的得自海参肠或体壁组织的油馏份的用途,该油馏份作为提供色素的化合物用于给鱼或虾着色,此目的通过使用以下方法完成,其步骤包括以下步骤的组合:

a. 通过手工或机械从处理过的海参中分离肠物质。手工分离包括用刀切割此动物并自然移出肠。机械切割包括任何机械方案,

其中自动切割工具可切开动物，其中肠待移出。

b. 从该动物分离后，用足够的酸预处理含蛋白质的脂类肠物质，以将该物质的 pH 降低至约 4 至约 5.5，优选约 4.3 至约 4.7，以便抑制微生物降解，将此物质脱矿质并改善在随后用溶剂或溶剂混和物提取期间整个红色类胡萝卜素的回收。

c. 在一种加工方法中，将含蛋白质的脂类肠物质与丙酮、乙醇或类似的溶剂以溶剂比物质为 3:1(v:v)的比例混和，然后搅拌 24 小时或直到足够的色素从此肠物质中释放到此溶剂中。

d. 将丙酮或其它溶剂从剩余的肠物质中倾析掉，随后用清洁溶剂将此肠物质洗涤 4 次或 4 次以上，以除去剩余的带类胡萝卜素的脂类。

e. 将剩余的肠物质离心除去残留的溶剂，或在密闭的容器中加热，如本领域技术人员已知的方法，用除溶剂器将此溶剂回收。

f. 如油化学领域技术人员已知的，将含色素的丙酮或溶剂泵入转膜蒸发器中并保留并分离此色素，回收溶剂。

g. 将所得脂类色素馏份与含类胡萝卜素的脂类物质(其中含有鸡油菌黄质和虾青素)混和，并在本文中将其称为“RED GREASE”。在 *Cucumaria frondosa* 的实例中主要类胡萝卜素是鸡油菌黄质。

h. 用本领域已知的抗氧化剂稳定所得有色脂类馏份。

i. 然后，将剩余的肠物质干燥并用己烷、丁烷、超临界二氧化碳或类似的溶剂提取，以移出本质上不含色素的金黄色油。其中本质上不含大多数类胡萝卜素，将此金黄色油称为 GOLD OIL。所得剩余的干燥含蛋白质物质中没有脂类，其蛋白质和多糖的含量高，并适于加入到动物或人食物的辅食中，该辅食需要必需氨基酸。该含蛋白质的脱色食品在海洋鱼类食品工业中是独特的，是因为其是脱色的、脱脂的、可以通过本文中给出的方法变为水溶性的、可利

用蛋白质和必需氨基酸含量高、且本质上没有污染物的恶臭味。其可容易地制备为粉末或通过水解物领域技术人员已知的方法制备为水解物，在本文中会对此进行描述。

在本发明的另一个实施方式中，在如上方法所述的酸化处理后将分离的海参肠干燥。在酸化处理前，此肠物质也可在水中在150°F至沸点之间加热，加热时间为10分钟至30分钟，而不对本发明的总方法造成不利影响。此干燥步骤可以是低热(60—80°F)或高热(150—200°F)，而不影响靶脂类馏份或类胡萝卜素。包括干燥肠或组织物质的此实施方式，通过以下联合的步骤进一步完成：

a. 对含水量小于约10%的干燥的肠物质，用己烷或本领域已知的其它适宜的溶剂实行标准“油—回收方法”，其中干燥的肠或组织物质以1:1的比例在130°F混和5分钟并再排出溶剂。然后，用新鲜的溶剂将提取的产物洗涤3次。将含类胡萝卜素的此溶液在转膜蒸发器(Luwa and Pope)中在95°C和28英寸Hg真空下除去溶剂。

b. 将溶剂/脂类相分离到为此设计的容器中，并通过标准“蒸汽蒸馏”或通过“转膜”油技术从类胡萝卜素—油/溶剂相中除去所述溶剂。

c. 用本领域已知的抗氧化剂如6—乙氧基—1,2—二氢—2,2,4—三甲基喹啉(Ethoxyquin, Monsanto)以300至600份每百万份或约1%的维生素E处理此油相。

d. 将所得红色油通过向此油中加入1%水，然后水合30分钟进行脱胶，并在8000rpm在150°F下离心。将此油称为RED OIL。

e. 按照下列方式回收浓缩的色素：

先用0.5%硅胶(Trysil 600, Grace Co.)预处理脱胶的油，加热至180°F，然后用6微米过滤纸过滤。通过加入5%漂白(活化)粘土(Englehard 105)预处理此油，并再将此油在28英寸Hg真空

下加热至 220°F, 保持 20 分钟, 进行色素的回收。所得油是淡黄色油, 大多数色素吸附在漂白粘土中。将此油称为 GOLD OIL。然后, 将所得粘土用丙酮提取, 粘土与溶剂的比例为 1:2(w:w), 并洗涤两次。再在蒸发器(Rotovap)中在 90°C 和 29 英寸 Hg 真空下除去溶剂。

f. 通过本领域技术人员已知的标准 HPLC 方法测定提取的浓缩物中的类胡萝卜素的含量。通过本发明提取的浓缩色素适于加入到水生动物的饲料中, 并依原料的类胡萝卜素的含量, 每百万份含类胡萝卜素鸡油菌黄质 2000 至 5000 份。

g. 通过以 1 至 5% (重量) 的浓度加入维生素 E 或本领域技术人员已知的其它适宜的抗氧化剂来稳定得自类胡萝卜素提取方法的脱色脂类(GOLD OIL)。

h. 将得自海参肠物质的含类胡萝卜素油提取方法的脱色脂类馏份(GOLD OIL)或有色油(RED OIL)包封在“软胶囊”中, 含量为 500 至 1000 毫克, 或将其包装在适宜的容器中以备给哺乳动物口服或局部给药。通过混和软化剂与无色脂类馏份, 根据个别或总病症所需的作用, 可以得到局部给药产品。

i. 根据每百万份中类胡萝卜素的份数, 将所述有色脂类馏份以足以给肉或皮肤产生类胡萝卜素沉着的百分比浓度掺入到水生动物的饲料中。

制备可利用馏份的其它方法

本发明的另一个目的是公开含本质上不含类胡萝卜素的海参肠脂类馏份的组合物。其相对来说是无味的; 含显著量的 $\Omega-3$ 脂肪酸, EPA(二十碳五烯酸); 并含维生素 E。

对脱色脂类馏份进行气相色谱/质谱。图 5 给出了气相色谱数据。图 5 是通过活化的粘土转移手段在类胡萝卜素提取后脱色脂类馏份的色谱图, 其用 Hewlett-Packard Model 5890 气相色谱和 5971

Mass Selective Detector(质谱仪)进行的。用于分析的柱是 25mm 长的 HP Ultra-1 Capillary GC 柱。用甲醇钠先将脱色脂类馏份皂化以游离脂肪酸, 因为它是脂类分析领域的标准, 然后酸化, 再转变为甲酯。随后将如此制备的合成甲酯与已知参考库的脂肪酸的标准特性比较。表 1 比较了得自海参的脱色脂类馏份与已知脂肪酸特性相配合的百分率。

表 1

峰	库中化合物	%匹配
A	花生四烯酸, 甲酯	97
B	2-萘酚, 8-氨基	64
C	戊酰胺	49
D	十五烷酸, 甲酯	91
E	十五烷酸, 甲酯	98
F	十六烷酸, 甲酯	43
G	十五烷酸, 4-甲基-, 甲酯	64
H	十六烷酸, 甲酯	41
I	十六烷酸, 甲酯	87
J	7-十六烷酸, 甲酯	99
K	9-十六烷酸, 甲酯	98
L	十五烷酸, 14-甲基-, 甲酯	93
M	十六烷酸, 14-甲基-, 甲酯	93
N	十六烷酸, 15-甲基-, 甲酯	78
O	1, 2, 8-十二碳三烯, (E, E, E)-	94
P	10, 13-十八碳二烯酸, 甲酯	98
Q	9-十八碳烯酸(Z)-, 甲酯	99
R	7-十八碳烯酸, 甲酯	99
S	十八碳烯酸, 甲酯	98
T	二十碳-5, 8, 11, 14, 17-五烯酸甲酯	80
U	7-十六烷酸, 甲酯(Z)	91

本发明的另一个目的是包括其中含有通过本文所述方法脱脂的海参肠物质的组合物。此物质是独特的, 因为其本质上无味, 蛋白质含量高, 并且容易制备为可利用的粉末。随后的两个实例说明

了选自用不同技术和溶剂制备的一些流出物中的典型流出物。体壁组织较肠物质含脂类少，并通过海参肠物质所述的相同方法提取。但是，体壁组织的此脂类馏份含量比肠物质低，即占体壁组织总干重的约 1 至 2%。

海参的有色脂类馏份，称为 RED GREASE，以足以使肉或皮肤产生类胡萝卜素沉着的、占此食物的百分率(根据每百万份中类胡萝卜素的份数)，掺入水生生物的食物中。本发明的目的之一是公开含得自海参肠或体组织的类胡萝卜素脂类馏份的组合物，根据环境因素该馏份中含有不同百分比和每百万份数的虾青素和鸡油菌黄质。所公开的称为 RED GREASE 的类胡萝卜素脂类馏份通过比色分析鉴定每百万份含 4706.52 份的鸡油菌黄质。此吸收谱附于图 6。图 6 显示了其中类胡萝卜素含量为 4706.52ppm 的新鲜海参肠物质的用丙酮提取的类胡萝卜素脂类馏份得自 beckman DU-800 色谱的吸收谱。将 23 毫克的丙酮提取的类胡萝卜素脂类馏份用 10ml 石油醚稀释，其中类胡萝卜素物质的消光系数为 $E=2400$ ，并在 467nm 读取鸡油菌黄质的读数。

新鲜海参肠物质和体组织可以是脂类化合物的原料，并可以用热的食用油提取，如 Meyers 和 Chen(1982)的方法所述。专利号 4505963(将其引入作为参考)也是 Meyers 和 Chen 的，公开了从加工的废物中用热油提取蛄类胡萝卜素色素的工业方法。虽然此工业方法与可能用于以新鲜海参肠物质为主要原料的热油方法不同，但是过程本质上是相同的，因为两种方法都依赖于含类胡萝卜素的脂类转移至热的食用油中。将 *Cucumaria frondosa*(1 kg)的新鲜肠物质置于装有加热至 170°F 的 5 千克豆油的容器中，并放置 20 分钟。通过 200 目不锈钢滤器和普通咖啡过滤纸过滤除去该组织，并将剩余的油轻轻倒回到该熬炼容器中。随后向该容器中加入 1 千克肠物质，并用新的肠物质重复该方法。经过以上述方法处理新的 5

批肠物质后，由于肠脂类转移到此油混和物中，熬炼容器中的油变为暗红色。在此方法的一个实例中，制备 5 千克湿的肠物质的 5 千克豆油保持开始体积并在约 20 分钟后除去。在此剩余油中以此加工的样本中总类胡萝卜素百分比通过标准方法检测为每百万份 540 份。

脱脂富含蛋白质的水解物的制备

将如上所述获得的 300 克红色肠组织干燥并通过豆油领域技术人员已知的方法用己烷提取脱脂。通过加热和气流将所得海参食品去溶剂并收集所得食品。将此食品再倒入 1 升蒸馏水的溶液中。用浓氢氧化钠，将 pH 升高至 12，并将此溶液搅拌 30 分钟。在此 30 分钟结束时，用 HCl 将 pH 调节至 8.5。达到此 pH 后，立即将此溶液加热至 80℃，保持 1 分钟。让此溶液冷却至 25℃，再以 10000rpm 离心 20 分钟，将固体当作废物处理，并将上清液调节至 pH 为 3.0。从此溶液中沉淀出蛋白质并通过离心和倾析从此溶液中移出。然后，将此蛋白质溶解于最少量的水中，并将 pH 调节至 7.2，在用冻干机干燥。发现此液体水解物适于本领域已知的常规喷雾干燥。初步实验的提取率说明从原料中得到了 73% 的提取率。发现上述方案适于在较大容器中大量机械制备，这对食品科学和蛋白质水解工业是普通的。经测定所得干燥的水解物是水溶性的，而此物质的氨基酸特性如下：

色氨酸	0.82%
天门冬氨酸	8.14
苏氨酸	3.01
丝氨酸	2.62
谷氨酸	8.67

脯氨酸	2.67
甘氨酸	4.21
丙氨酸	4.39
半胱氨酸	0.21
缬氨酸	4.31
甲硫氨酸	1.00
异亮氨酸	4.03
亮氨酸	3.38
苯丙氨酸	4.39
赖氨酸	5.31
组氨酸	1.88
精氨酸	5.93

上述海参水解物为作为蛋白质或预消化的氨基酸化合物加入到液体饮料中，掺入食品添加剂、沙拉酱、肉汁、婴儿配方奶粉的替代物、蛋白条、化妆品、软饮料、意大利面食、面包和人的改善肠功能的配方中，这些人的蛋白质营养不良是由于其营养条件造成的。此处没有必要包括这些干燥的或液体的富含氨基酸粉末可以掺入的变化形式，以及与食品是何种比例，因为这些配制品的类型是食品科学领域技术人员完全熟知的。

海参馏份的使用方法

掺入水生食物饲料中的有色脂类的实例

A) 在 300 加仑密闭容器中，将 100 磅的新鲜海参肠物质与约 55 加仑丙酮混和并室温下搅拌 3 小时。将丙酮从此混和物中排出到一个容器中，并用新鲜的丙酮洗涤肠物质直到几乎不含色素。丙酮泵入通过转膜蒸发器(Pope Still)，并在丙酮混和物中含有水，从

此有色脂类类似中分离出丙酮并回收。回收丙酮并弃去水相。

所得脂类馏份(63 磅)含有粘稠重油脂和 4700ppm 的类胡萝卜素鸡油菌黄质。向此脂类相中加入抗氧化剂 6-乙氧基-1,2-二羟基-2,2,4-三甲基喹啉(Ethoxyquin, Monsanto)并以 1%(重量)混和。

经 HPLC 分析测定此含类胡萝卜素物质的重脂类馏份(RED GREASE)含 4700ppm 的鸡油菌黄质,并将其掺入标准的观赏鱼饲料中,在其制造过程中不包括商购的类胡萝卜素物质。由制造商配制鱼饲料以便最终含 80ppm 的得自海参的鸡油菌黄质。给石斑鱼(clownfish)喂此试验性饲料两个月并由 5 个一组的鉴定人评判,得出平均份数 8.5(平分为 1 至 10,“10”是非常可接受的色素沉着),其皮肤得到了可接受的沉着颜色。

(B) 通过手工将 *Cucumaria frondosa* 种的海参(1000)的内脏取出,并通过低热方法在 70°F 将肠物质(352 磅)在海产品干燥器(Southwind, Nova Scotia)中干燥 4 天。干燥前,向此新鲜的、湿海参肠物质中以 7.2%(重量)的浓度加入丙酸。所得干燥的物质(105 磅)含 10%的水分和 41%的脂类。然后,按照工业标准在 200 加仑密闭容器中将干燥的肠物质进行脂类馏份的己烷提取,与豆油工业采用本质上相同的方法,并制备了红色脂类类似(42 磅)(此后称为 RED OIL),其中以鸡油菌黄质判断含 924.5ppm 的类胡萝卜素,其中含 8.8%的二十碳五烯酸。此脂类馏份每 100 克还含有 35 IU 的 d- α -生育酚。然后通过向此油中加入 1%水并让其水合 30 分钟,并再以 8000rpm 在 150°F 下离心,将此红色脂类馏份(RED OIL)脱胶。此脱胶的物质也包括在术语“RED OIL”范围内。

先用 0.5%硅胶预处理此脱胶的油(红色肠脂类馏份),再用 6 微米滤纸过滤。通过向预处理的油中加入 5%漂白粘土回收此色素。在 28 英寸 Hg 真空下将此加热至 220°F,并保持 20 分钟。所得

油(34 磅)为淡黄色, 并且大部分色素吸附在漂白粘土中。将此馏份称为 GOLD OIL。然后用丙酮(粘土与溶剂比例为 1:2(w/w))提取所得粘土并洗涤两次。再在 Luwa 蒸发器中在 90℃和 29 英寸 Hg 真空下将所得溶液去溶剂, 回收到 8 磅的红色脂类馏份浓缩物。

此方法得到三种物质: 黄色/金黄色油(GOLD OIL); 浓缩的含类胡萝卜素的脂类馏份; 以及不含脂类的蛋白质干粉。将此黄色脂类馏份(GOLD OIL)掺入到局部用化妆品和口服“营养”海洋“Ω 3 脂类”被测产品中, 以备实验中使用。将此红色浓缩脂类馏份掺入到观赏鱼饲料中, 用一个月的时间测定含类胡萝卜素的脂类在给这种鱼带来适当颜色方面的效果。

用 RED OIL 抑制鸡胚胎中的血管生成

用微量移液器在直径 1/4 英寸的 6 个甲基纤维素园盘上每个加入 1μg RED OIL, 并放置干燥。将这些圆盘置于 6 个 10 天的鸡胚绒毛尿囊膜上, 并将含氢化可的松/肝素的圆盘也置于另外 6 个胚胎的对照膜上, 如 Knighton 等(1977)所述。RED OIL 处理的膜对血管生长显示了几乎彻底的抑制, 并比用肝素和氢化可的松的“阳性对照”具有更有效的新血管生成抑制作用。此检测是体内检测, 并被认为是通过抑制肿瘤血液供应来抑制肿瘤生长所设计化合物的临床应用的指标(Knighton 等, 1977)。

以 RED OIL 作为佐剂引起的大鼠关节炎检测

将如上所述用己烷从干燥物质中提取的由 *Cucumaria frondosa* 海参肠和体壁组织制备的 RED OIL、氢化可的松和保泰松用在大鼠佐剂关节炎模型中, 以研究它们的抗炎作用(Winter and Nuss, 1966; Glenn, 1966; Langford 等, 1972)。

已表明用大鼠建立的佐剂关节炎模型可用于在筛选可用来治

疗人类风湿性关节炎的化合物中。佐剂引起的关节炎对甾族化合物和非甾族化合物都有反应。通过检测爪重量和/或爪体积的增加来评价炎症的程度。

方法

重 160—180g 的大鼠购自 B&K Universal, Inc., Kent, WA 98032。它们是雄性 Sprague-Dawley。将这些动物单独关在不锈钢笼中,可自由进食和饮水。光照周期保持在 12 小时光照和 12 小时黑暗。温度维持在 $22\pm3^{\circ}\text{C}$, 相对湿度保持在 40 至 70%。饲料为 Harlan Teklan Rodent Diet。

被测物

以如下所示的剂量将被测物悬浮于去离子水中。所有的管饲量为 2ml。

<u>被测物</u>	<u>批号</u>	<u>剂量, mg/kg 体重</u>
去离子水	12/4/98	2ml
氢化可的松	Spectrum, Lot# HH325	10
保泰松	Sigma Lot# 15H0063	10
RED OIL	Coastside Research	10

实验设计

通过注射弗氏完全佐剂(灭结核分支杆菌的 0.5%悬液(H37RA, Difco, 在矿物油中))将雄性 Sprague-Dawley 大鼠(160—180g)致敏。在每只大鼠的右后腿足底皮下注射 0.05ml。

口服存在于 0.5%甲基纤维素中的被测物(通过管饲), 每天一次, 共 7 天。在致敏后当天开始给药。

取每个实验周期中每组爪重量的平均值。活性计算如下：(对照组的平均爪重量－实验组的平均爪重量)/(实验组的平均爪重量) $\times 100\%$ ＝%抗炎反应。

结果和讨论

表 2 给出了抗炎反应结果。用弗氏佐剂处理的平均爪重量与未处理爪重量相比抗炎反应是不同的。在此研究中，氢化可的松对照组给出了 59.0%的抗炎反应，保泰松给出了 155.3%的抗炎反应。这两种化合物是阳性对照。在此检测中 RED OIL 给出了 158.6%的抗炎反应。

表 2

基于平均爪体积降低的抗炎给药(%)

组别	大鼠数量	处理	平均爪重量 gm	% 抗炎反应
I	6	对照, 水	0.97	0
II	6	氢化可的松 10mg/kg	0.61	59.0
II	6	保泰松 10mg/kg	0.38	155.3
IV	6	RED OIL, 10mg/kg	0.375	158.6

随后检测 GOLD OIL 在小鼠耳水肿中的炎症抑制活性。

小鼠一耳水肿模型

当局部施用，含有多种佛波酯和花生四烯酸(AA)的巴豆油是小鼠耳炎症的标准诱发剂。给小鼠耳多次局部施用花生四烯酸诱发炎性和增殖变化(Doherty 等, 1988)。佛波酯，特别是豆蔻酰佛波醇乙酯(PMA)激活普遍存在的膜受体的一种或多种异构酶，蛋白激

酶 C(PKC), 其依次引起几种代谢级联, 导致炎症(Castagna 等, 1982)。AA 是这些级联之一的底物, 导致前列腺素和白三烯的产生, 它们都是炎性的。假定的生物活性试剂对这种炎症的抑制被认为是潜在的药理活性的总的指标。刚断奶的雄性 Balb/C 小鼠购自 B&K Universal, Kent, WA, 并在实验前一天放置在实验室中。在 $t=0$ 时, 每只小鼠的两个耳朵的前侧用 $10\mu\text{L}$ 的存在于丙酮中的 10% 巴豆油局部刺激($n=12$ 个耳朵)或局部施用溶解于丙酮中的 5% GOLD OIL($n=8$ 个耳朵)。在 $t=24$ 小时时, 通过颈脱位处死这些动物, 切下耳朵, 并用 8mm 钻孔器从每个耳朵上取样进行活组织检查。将活组织立即在 4-脚天平上称重。结果见图 7。与只用丙酮处理的比较, 在肿胀方面 GOLD OIL 产生了 52% 的降低($p<0.05$, Wilcoxin 秩和检验), 而与未处理耳朵相比为 50%。

如上述实施例所述, 检测 RED OIL 以确定此油在巴豆油引起的小鼠耳水肿中的炎症抑制活性。以相同的剂量局部给药, 较只用丙酮处理的耳朵, RED OIL 对肿胀产生了 85% 的抑制。结果见图 8。

5-脂肪氧合酶检测

5-脂肪氧合酶(5-L0)是很多种细胞(包括多形核(PMN)白细胞)中花生四烯酸(AA)代谢为白三烯 B_4 (LTB_4)和羟基二十碳四烯酸(5-HETE)的关键酶(Henderson, 1994), 并在最近证实与前列腺和其它癌症有关(Ghosh and Myers, 1977)。 LTB_4 是参与 PMNs 从血流向组织损伤部位迁移的趋化性信号试剂, 其是炎性反应的证明标记。通过标准方法从正常自愿者中分离的人 PMNs, 预温至 37°C , 并在时间=0 时, 向 1mL PMN 悬浮液中加入通过超声处理悬浮于甲醇中的 $10\mu\text{L}$ 被测化合物, 或甲醇。在 $t=10$ 分钟时, 向每个悬浮液中加入 5mL 的 2mM AA 作为 5-L0 底物。在 $t=14$ 分钟时, 加入钙离子载体 A23187(5mL , 1mM)以激活此酶。用 $100\mu\text{L}$ 的 100mM 枸橼酸, 维

持 pH 为 3.0, 在 $t=19$ 分钟时终止该反应。加入前列腺素 B_2 和 15-HETE 作为内标物, 进行高压液相色谱 (HPLC) 分别鉴定 LTB_4 和 5-HETE。用氯仿/甲醇 (7:3) 从该悬浮液中萃取代谢物和内标物。将氯仿相蒸发并在 HPLC 洗脱的流动相中重新溶解。通过紫外光检测代谢物并用标准曲线定量分析。

在图 2 中给出的数据中统计学显著性和在 PMN 产生 LTB_4 , 其两个异构体, 以及 5-HETE 中的 GOLD OIL 剂量-依赖性降低是显而易见的。这些结果是由于不同于细胞毒性的因素, 这表明通过观察细胞接触 1:100 和 1:1000 稀释度的 GOLD OIL 10 分钟分别产生了 85% 和 94% 的细胞生存力。通过本领域技术人员已知的台盼蓝排除方法测定生存力。

RED OIL 的 HPLC 馏份

在 E. Merck Si 60 柱, $5\mu m$, $250 \times 4.6 mm$ 中, 用线性梯度在 30 分钟内由 100% 己烷至 30% 异丙醇洗脱, 通过分析高压液相色谱将 RED OIL 分馏为 18 个独立的馏份。流速为 2.0 ml/分钟。在头两分钟内不收集任何馏份。此后以两分钟为周期收集馏份。将分离的所有馏份用于检测在人嗜中性白细胞的 5-脂肪氧合酶路径中的抑制活性的实验中, 如上一节所述。发现馏份 7 和 8, 其包括在 14 至 18 分钟之间的峰, 在抑制白三烯 B_4 、6-反式-白三烯 B_4 和 6-反式-12-表-白三烯 B_4 和 5-HETE (5(S)-羟基-(E, Z, Z, Z)-6, 8, 11, 14-二十碳四烯酸) 方面有活性。

12-HETE 检测

通过类似于检测 5-脂肪氧合酶的方法用人血小板检测 RED OIL 和 GOLD OIL。将多形核白细胞混和, 用 A23187 刺激, 并通过高压液相色谱 (HPLC) 检测 12-HETE 的产生。向此反应中加入

1:10000 稀释度的 RED OIL, 结果 12-HETE 浓度为甲醇对照组的 65%, 而稀释度为 1:1000 的 GOLD OIL 所得浓度为对照组的 46%。

肥大细胞脱粒

在刺激前 24 小时、12 小时和 5 分钟以及在刺激后 5 分钟和 20 分钟, 用溶解于己烷中的 GOLD OIL 处理刚断奶的雄性 Balb/c 小鼠。将 20 μ L 的存在于丙酮中的 10% 巴豆油施用于耳廓的两侧对耳进行刺激。刺激后 6 小时从每个耳朵上取 8 毫米的活组织, 称重并保存在福尔马林中以供组织学分析。从石蜡包埋的活组织中以 1/3 的间距取出 3 个 5 微米的薄片并用甲苯胺蓝染色, 其对含组胺颗粒是特异性的。给中间的切片和表现出脱粒的切片计数。结果见表 3。

表 3

用巴豆油局部刺激造成的小鼠耳肥大细胞的脱粒

<u>处理</u>	<u>%脱粒</u>
载体(己烷)	72.4(2.2)
10% GOLD OIL	20.4(3.5)
10% 石蜡油	66.4(3.0)

如上所述, 将耳朵预防性处理 24 小时, 再加上刺激后处理。给出的数据为脱粒肥大细胞的平均(+/-平均值的标准误差; n=4 个耳朵)百分数。

淋巴细胞增殖检测

通过检测含氚(³H) - 胸苷吸收评价 GOLD OIL 和 RED OIL 对淋巴细胞增殖的作用。通过给人自愿者或羊静脉穿刺获得外周血, 并通

过 Ficoll 密度梯度离心从红细胞和粒细胞中分离外周血单核细胞 (PBMNC)。离心后, 抽吸 PBMNC, 用 PBS 洗涤并再悬浮于培养基 (RPMI, 其中含 10% 胎牛血清 (FCS) 和 2 mM 谷酰胺)。将 PBMNC 的密度调节为 $2 \times 10^6/\text{ml}$ 并将 100 μL 的等份 (2×10^5 细胞) 加到 96 孔圆底板的孔中。每个实验组包括同样的 5 个孔。在一定范围稀释度的 GOLD OIL 或 RED OIL 存在下, 将这些细胞培养 24 小时。油的稀释液如下制备: 在纯乙醇中制备浓度为 5% (v/v) 的油的微胶粒悬浮液。在含 10% FCS 的 RPMI 中将此 5% 的悬浮液进一步稀释, 得到一定范围的稀释液 (0.0062, 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1% v/v)。每个稀释步骤剧烈混和以维持该油的悬浮液。

在对照孔中, 细胞在没有任何油的条件下培养。孵育 24 小时后, 向含淋巴细胞的每个孔中加入 1 微居里的 ^3H -胸苷, 并再孵育 18 小时, 让 ^3H -胸苷掺入到淋巴细胞的复制 DNA 中。将 96 孔板中的细胞收获到玻璃纤维过滤器上, 其能捕获放射活性标记的 DNA。然后, 按照本领域技术人员已知的标准方法, 用闪烁计数器对含收获细胞的过滤器进行 ^3H 计数。

此外, 向淋巴细胞中以浓度 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 加入促细胞分裂剂伴刀豆球蛋白 A (Con A)。通过这些油与 Con A 共同培养来评价这些油对促细胞分裂刺激的作用。伴刀豆球蛋白 A 是有洋刀豆 (Jack Bean) 获得的植物凝集素, 其对 α -D-甘露醇基和 α -D-葡萄糖基具有亲和力。Con A 表现出促细胞分裂活性, 该活性依赖于分子凝集的能力, 并需要钙和/或锰离子。

结果和讨论

未处理 PBMNC 制剂显示出了低基线值的 ^3H 胸苷掺入, 但是, 当用 Con A 刺激 PBMNC 时, 较其基线值而言, 通过 ^3H 胸苷吸收增加的指示证明这些细胞的增殖增加。此外, 当 GOLD OIL 或 RED OIL

与 Con A 共同孵育时，观察到增殖的剂量效应抑制，这正如 PBMNC 掺入的 ^3H 胸苷的降低所指示的。在稀释度为 0.1% 至 0.025% 之间的 GOLD OIL 对 Con-A 刺激的人 PBMNC 增殖抑制 71% 至 12%，而相同的稀释范围对羊 PBMNC 的抑制为 100% 至 75%。RED OIL 的抑制作用与 GOLD OIL 观察到的趋势类似。0.1% 的 RED OIL 稀释液对人 PBMNC 产生了 85% 的抑制，0.1% 的稀释液对羊 PBMNC 表现出了 95% 的抑制，0.05% 的稀释液表现出了 56% 的抑制。

用 RED OIL 进行混和淋巴细胞反应

混和淋巴细胞反应 (MLR) 是由两个不相关个体的淋巴细胞的同种异体反应性介导的淋巴细胞增殖的体外检测。此增殖反应通过含氘胸苷的吸收检测。本质上，在 MLR 中，一个个体的抗原呈递细胞 (APC) 通过 MHC 分子结合 T 细胞受体将异源肽置于第二个个体 T 细胞上。此反应命名为信号 1。紧接着信号 1，通过 T 细胞和 APC (例如，CD28-B7) 之间的细胞粘着分子的相互作用介导共同刺激 (信号 2)，其导致 T 细胞活化和增殖。因此，MLR 是同种异体反应性的体外表示，其在宿主抗移植物病 (骨髓移植排斥) 和移植物抗宿主病 (器官移植排斥) 中继发。此检测现已广泛用于临床，以预测同种异体反应性，并用于实验筛选潜在的免疫抑制剂。RED OIL 与环孢菌素 A 进行了比较，环孢菌素 A 是世界上常用的免疫抑制剂。

用 RED OIL 进行 MLR 的方法

使用来自两个不相关供者细胞进行的 MLR 可以从根本上研究两个细胞群同时发生的彼此反应 (即双向 MLR)。

通过给两个不相关的人自愿者静脉穿刺获得外周血，并通过 Ficoll 密度梯度离心从红细胞和粒细胞中分离外周血单核细胞 (PBMNC)。离心后，抽吸 PBMNC，用 PBS 洗涤并再悬浮于 RPMI，其

中含 10% 人 AB 型血清和 2 mM 谷酰胺。用得自 3 对不相关个体的 PBMNCs 进行 MLRs。

在典型实验中, 将得自两个不相关个体的 PBMNCs 的密度调节为 $2 \times 10^6/\text{ml}$ 并将 50 μL 的等份 (1×10^5 细胞) 加到 96 孔圆底板的孔中。每个实验组包括同样的 5 个孔。在环孢菌素 A 和一定范围稀释度的 RED OIL 存在下孵育细胞。稀释液制备如下: 在纯乙醇中制备浓度为 5% (v/v) 的油的微胶粒悬浮液。在含 10% 人 AB 型血清的 RPMI 培养基中将此 5% 的悬浮液进一步稀释, 得到一定范围的稀释液 (0.0062, 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1% v/v)。每个稀释步骤剧烈混和以维持该油的悬浮液。将环孢菌素 A 在组织培养基中稀释得到最终浓度为 100ng/ml 和 500ng/ml。

在对照孔 (未处理) 中, 细胞在没有加任何试剂的条件下培养。孵育 96 小时后, 向含混和淋巴细胞的每个孔中加入 1 微居里的 ^3H —胸苷, 并再孵育 18 小时, 让 ^3H —胸苷掺入到淋巴细胞的复制 DNA 中。将 96 孔板中的细胞收获到玻璃纤维过滤器上, 其能捕获放射性标记的 DNA。用闪烁计数器对含收获细胞的过滤器进行 ^3H 计数。

用 RED OIL 进行 MLR 的结果

未处理 MLR 制剂显示出了高基线值的 ^3H 胸苷掺入, 其是两个不相关淋巴细胞群之间同种异体反应的指示。

在环孢菌素 A 的存在下, 不论浓度是 100ng/ml 还是 500ng/ml, 观察到了由降低的 ^3H 胸苷吸收指示的增殖的降低。此抑制以未处理 MLR 的百分数表示。环孢菌素 A 对 MLR 的抑制在 100ng/ml 为 37—75%, 而在 500ng/ml 为 81—90%。这与环孢菌素 A 已知的免疫抑制性质一致。环孢菌素 A 与亲免蛋白作用并防止转录因子 NF-AT 的核转运, 该因子对于白细胞介素-2 (IL-2, 一种 T 细胞生长因

子)来说是重要的。

如³H 胸苷掺入的降低所示, RED OIL 也显示了对 MLR 的剂量依赖性抑制。在稀释度为 0.025%时, 在三项实验中对 MLR 的抑制为 40—52%, 而在稀释度为 0.05%时, 抑制为 82—98%。如本领域已知的, 通过台盼蓝排除确定的细胞生存力表明在稀释度为 0.025%至 0.05%时细胞生存力为 70—99%, 这说明了在这些稀释度下 RED OIL 可能缺乏毒性。RED OIL 的稀释度为 0.1%时显示了细胞生存力的降低。

在这些实验中证明的具有免疫抑制的化合物已显示出了可利用的治疗性质。因此, 本发明的目的之一是将 RED OIL 和 GOLD OIL 掺入到具有免疫调节活性的药用化合物中。免疫调节化合物可以是建立对某些疾病的免疫性或引起由这些疾病痊愈的免疫刺激剂。反之, 免疫调节剂可以是用来防止身体对外源性物质不需要的免疫反应或用来防止或改善免疫反应或疾病的免疫抑制剂。

已发现免疫调节剂可用于治疗系统性自身免疫性疾病, 如红斑狼疮和糖尿病, 以及免疫缺陷性疾病。此外, 免疫调节剂可以用于癌症的治疗或在移植中预防外源性器官或其它组织(如肾、肺、心脏或骨髓)的排斥反应(Grover 等, 1997)。

已发现了多种免疫调节化合物, 包括 FK506, 胞壁酰二肽衍生物, 左旋咪唑, 尼立达唑, oxysuran, 甲硝哒唑及干扰素、白细胞介素、白三烯、皮质类固醇和环孢菌素。但是, 已发现这些化合物中的很多种具有不需要的副作用和/或高毒性。因此, 需要新的免疫调节剂化合物, 以对特定的区域提供范围更大的免疫调节功能, 而不需要的副作用最小(Ishida 等, 1997)。

因此, 免疫调节对人来说是首要的, 且对免疫调节手段已进行大量的研究。需要其它方法和组合物。

本发明的目的之一是, 如果它们是可获得的, 则利用海参油为

原料并通过人工方法补充。本发明给免疫调节化合物系统中增加了两个新的、可利用的免疫调节剂，包括能从任何种海参的通气物中分离的化合物。

因此，本发明的另一个目的涉及从海参组织中分离的 RED OIL 和 GOLD OIL 及这些化合物的多种衍生物和类似物的免疫抑制用途。可以用这些化合物降低、压制、抑制或预防不需要的免疫反应。有利的是，此免疫抑制可以在没有细胞毒性的前提下达到。因此，这些化合物用于治疗需要免疫抑制的人或动物。这些情况的实例，包括但不限于，治疗或预防自身免疫性疾病如糖尿病、红斑狼疮和类风湿性关节炎。在器官移植中也常常需要结合免疫抑制。当人或动物已经接触或可能接触超级抗原或已知引起免疫系统过度刺激的其它因子时，也可以使用免疫抑制剂。本发明的化合物还可以用作评价其它假定的免疫抑制剂活性的标准物。本发明还涉及含这些化合物的药物组合物。

预见的用途是需要通过 T 细胞活性调节的免疫反应(体内/体外)。本发明的一方面涉及在人体内抑制 T 细胞反应，例如，在移植和自身免疫性疾病中。因为在医疗领域环孢菌素常用来抑制牛皮癣，本发明的目的之一是将 RED OIL 或 GOLD OIL 掺入软膏中并如本文所述局部施用，来调节牛皮癣患者的皮肤中的免疫反应。如本发明的其它部分所述，本发明给牛皮癣患者带来的有利反应可很好地导致患者局部皮肤中的 T 细胞和/或 B 细胞的免疫抑制。

给药剂量依赖于所需的免疫调节反应；被治疗对象的类型；其年龄、健康状况、体重和所用治疗方法的类型；治疗的频率；治疗比等因素。有利的是，活性组分给药的日剂量水平可以为，例如，皮肤施用 1 至约 500mg/kg；口服 0.01 至 200mg/kg；鼻内吸入 0.01 至约 100mg/kg；和气雾剂使用 0.01 至约 50mg/kg 动物体重。

对于皮肤局部施用、鼻内、支气管内、肌肉、阴道、静脉或口

服给药组合物来说, 本发明的活性组分在新组合物中的含量, 以浓度表示占此组合物的约 0.01 至约 50% w/w, 并特别是约 0.01 至约 30% w/w。

用于本发明的化合物可以通过本文中描述的不同方法分离。对本领域技术人员来说, 所用材料和试剂的实例是显而易见的, 其可以从已知来源(例如化工产品供应机构)商购。对于将本发明的油掺入到不同胶囊、软膏、洗剂、肥皂和香波中, 除了本文中给出的细节外, 没有给出有关它们的其它细节。

变体的讨论

本发明的范围不通过特定实施例和推荐的相关方法和用途限定, 因为在此范围内由此说明书提供的总信息可以进行变化。

下列制剂举例说明了本发明组合物的一些剂型。其中术语“活性化合物”指从任何种的海参组织得到的脂类化合物, 不论是纯化的还是非纯化的; 也不论是分馏的还是未分馏的。

口服给药

按照营养药工业熟知的方法, 将本文所述的 RED OIL 和 GOLD OIL 包封为原形“软胶囊”。如此工业已知的, 用混和的生育酚稳定本发明的油。RED OIL 通过用己烷从 *Cucumaria frondosa* 的干燥的、稳定的海参肠物质中提取, 将其通过本领域技术人员已知的方法脱胶, 并通过加入 1% 的混和生育酚(COVI-0X-T70, 得自 Henkel Corporation, PA)防止氧化。以 1000 片装入 500 毫克本发明的 RED OIL 制备原形软胶囊。按照本文所述得自 RED OIL 的 GOLD OIL 也加入到原形软胶囊中以备实验中使用。

还以 1:5(v:v)将 GOLD OIL 和 RED OIL 掺入橙汁中, 其中加入卵磷脂以提高脂类在橙汁的水相的稳定性。

局部给药

用本发明的 RED OIL 和 GOL 的 OIL 配制下列剂型，其举例说明了一些其中可以使用抗牛皮癣剂的剂型。

实施例 A

软膏

<u>组分</u>	<u>毫克</u>
活性化合物	1-20
苜醇，NF	20.0
杏仁油或其它油	30.0
白凡士林，USP	至总量 1.0g

制备方法：搅拌的同时，在 140°F 下将油组分缓慢加入到醇组分中。

实施例 B

霜剂

<u>组分</u>	<u>毫克</u>
活性化合物	1.0-20.0
硬脂酸，USP	60.0
甘油单硬脂酸酯	100.0
丙二醇，USP	50.0
聚乙烯脱水山梨醇单棕榈酸酯	50.0
山梨醇溶液，USP	30.0
苜醇，NF	10.0
纯化水	加至总重量 1.0g

制备方法：将硬脂酸、甘油单硬脂酸酯和聚乙烯脱水山梨醇单棕榈酸酯加热至 70℃。在另一个容器中，溶解山梨醇溶液、苜醇、水和半量丙二醇，并加热至 70℃。在高速搅拌下，将水相加入到油相中。在余量的丙二醇中溶解活性化合物并在乳液的温度为 37—40℃时将其加入到上述乳液中。搅拌混和均匀并冷却至室温。

实施例 C

鼻吸入剂

对于口腔或鼻内吸入剂给药，可以将已知的惰性液体如丙二醇作为载体。还可以在已知的抛射剂如三氯氟甲烷和二氯二氟甲烷中用加压吸入器给药，其中选择性地存在分散剂，其都是本领域熟知的。

实施例 D

凝胶

组分	毫克
活性化合物	1.0-20.0
丙二醇, USP	300.0
丁基化羟基甲苯	5.0
卡波姆 940	5.0
氢氧化钠(以 1% w/w 的丙二醇 溶液加入)	0.7
聚乙二醇 400, USP	加至总重量 1.0g

制备方法：在丙二醇中制备 1% 的氢氧化钠溶液。将剩余丙二醇的约一半和聚乙二醇 400 加入到适宜的容器中并混和。在此混和物中溶解丁基化羟基甲苯。剧烈搅拌下在上述混和物中分散卡波姆

940。高速搅拌下加入氢氧化钠溶液将 pH 值调节为 7，并混和至得到粘稠的凝胶。在余量丙二醇中溶解活性化合物，并在不断搅拌该凝胶的同时将其缓慢加入到该凝胶中。

实施例 E

洗剂

<u>组分</u>	<u>毫克</u>
活性化合物	1.0-20.0
卡波姆 940	3.0
氢氧化钠(以 4% w/w 水溶液的形式加入)	0.05
异丙醇	40.0
纯化水	加至总重量 1.0g

制备方法：在水中制备氢氧化钠的 4% 溶液。将纯化水加热至 60℃。加入卡波姆 940 并高速搅拌至分散。将上述混和物冷却至室温并缓慢加入氢氧化钠溶液至均匀。搅拌下，将 80% 异丙醇加入到上述混和物中。将活性化合物溶解于剩余的异丙醇中。搅拌下将其加入到此混和物中。如果需要，用氢氧化钠将 pH 调节至 5.0 至 5.5。

实施例 F

混和草药的抗牛皮癣霜剂

<u>组分</u>	<u>百分比</u>
活性化合物	1-20
绿茶浓缩物	1-5
齿叶乳香提取物	1-10

水飞蓟素	1—10
岩藻糖基硫酸软骨素	1—20
蜂蜡	1—40
姜黄油	1—10
圣罗勒油	1—10
姜的醇提取物	1—10
水	1—30
DMSO	1—5
Emu 油	1—30
茶树油	1—5

制备方法：本发明的目的之一是提供基础配方，其中有利的试剂协同作用来改善牛皮癣病症。已知牛皮癣病是通过一些炎性介体介导的。血管生成是此疾病的一部分，因为其是 12, 15-和 5-脂肪氧合酶路径。补体的激活也是此疾病的介体。本发明人已揭示了在蜡载体骨架中将 RED OIL 或 GOLD OIL 作为脂肪氧合酶抑制剂混和的软膏；岩藻糖基硫酸软骨素作为血管生成和补体的抑制剂，齿叶乳香提取物作为补体的抑制剂而绿茶提取物作为皮肤抗氧化剂和鸟氨酸脱羧酶抑制剂，而其它草药制剂为牛皮癣提供了有效的局部治疗。姜提取物已显示了可作为鸟氨酸脱羧酶的抑制剂，鸟氨酸脱羧酶是牛皮癣炎症的辅助介体。不同百分含量的这些试剂可以与乳化剂和其它试剂混和，使它们适于局部施用。活性试剂的百分含量可随患者的病症和由不同介体导致的多种症状的水平变化。换言之，较牛皮癣斑显示了脂肪氧合酶路径激活增加的患者而言，大量新血管生成的患者可能需要更多的岩藻糖基硫酸软骨素。能熟练确定牛皮癣斑中所参与的不同路径的临床医生，能够配制出实施例 E 所列试剂的适宜混和形式。例如，用牛皮癣患者血清可以检测在局

部脓包集中处的脂肪氧合酶路径的激活，本领域技术人员可以容易地评价脓包损伤中的 C5a 和 C3a 的补体级联激活。因此，本领域临床医生和制剂工作者可以检查出牛皮癣症状的基于机理的靶向性。

实施例 G

年龄为 34 至 67 的六个牛皮癣患者，患有不同形式的疾病，在治疗时患有多种“潮红”症状，给他们使用实施例 F 的局部用软膏，并让他们自己用药一个月，并向医生报告对此软膏治疗作用的主观评价。六个患者中有五个报告了其牛皮癣症状“极大的改善”或“完全缓解”。

种属未知的三只狗，患有特应性皮炎并在躯干和尾背部区域存在“发热点”，让它们的主人以“无对照”的方式任意局部施用实施例 F，时间为 6 周。所有三只狗的主人报告了它们所拥有动物症状的彻底消失，及对治疗区域的搔咬的停止。

十位年龄在 46 至 81 岁之间的男性和女性自己向医生报告患有类风湿性关节炎，给他们以约 2000 毫克每天每人口服补充 RED OIL，补充 3 个月。其中八个人报告了其疾病症状的“急剧减轻”以及他们手臂和腿活动范围的增加。一位 81 岁的妇女报告了其肩部和腰部疼痛的彻底停止。

年龄在 50 至 56 岁的三个男性自己使用含 9.5%(重量)的 RED OIL、薄荷脑、二甲基亚砜(DMSO)、emu 油、冬青油、乙醇和橄榄油的局部用组合物，以检测作为局部“擦”痛控制制剂的 RED OIL 的缓解疼痛的能力。给疼痛的肩部、手指或膝盖使用 4 天后，两位参与者声称获得了令人惊奇的主观效果，即极强的效果，而一位男性声称主观效果为中等的。

给自己报告患有骨关节炎的四位女性每天两次使用 1500 毫克

的 GOLD OIL, 其存在于橙汁和乳化剂中, 使用时间为两个月。所有四位报告了此化合物产生了“增加的益处”, 在对所有疼痛的评价中有三位声称疼痛急剧降低, 且活动范围加大。

一匹种属不明的 19 岁的马, 患有关节炎, 并相应地其右前腿跛行, 用含 20% RED OIL 并类似于本文所述实施例 D 的凝胶治疗其膝盖。用此凝胶给其包扎并每天换药, 治疗 2 周。在两周末, 此马的主人称其活动范围加大且跛行减轻。

一只狗由兽医诊断患有犬狼疮, 每天通过食物给其施用 1000 毫克的 RED OIL, 施用时间为 6 个月。在治疗过程中, 疾病的症状减轻, 而该主人能大大降低给此动物使用的泼尼松的剂量, 降低至原来水平的 1/10。

患有普通胃灼热(食道炎症)的两个人, 每天使用用卵磷脂、果汁和糖乳化的 GOLD OIL, 在果汁中 RED OIL 的用量为每天 2000 毫克。他们城在两分钟内症状减轻。

一位 22 岁患有哮喘的人, 在两个半月内在食物中每天添加与其它食物赋形剂混和的 RED OIL 1000 毫克。在此期间, 她报告了其常规吸入药物降低, 并获得了其它主观利益。

三个青春期男孩在其面部患有不同程度的痤疮疤痕, 在 1 个月内每天给其使用与橙汁和卵磷脂混和的 1000 毫克的 RED OIL。他们都报告了从 RED OIL 中获得的主观益处, 证据是其症状的溢出物惊人地降低。

抗癌检测

在体外, 针对人癌细胞系, 检测 RED OIL 和 GOLD OIL 以及多种薄层色谱馏份。将这些物质开始溶解于二甲基亚砜中, 然后在组织培养基中稀释。然后给 PC3(人前列腺癌)、MCF7(人乳腺癌)、HT29(人结肠癌)或 BRO(人黑素瘤)细胞系施用 23 μ g/ml 的等份。在

72 小时后, 通过本领域技术人员常用的 MTT 生存染色方法评价这些馏份介导的、相对于对照细胞的细胞生长抑制。在所有细胞系中, RED OIL 和多种馏份能以浓度依赖的方式抑制细胞生长。认为从海参脂类相中通过 Findlay 等(1983b)的方法分离出的一种馏份, 胞质苯并二氢吡喃醇(plastochromanol)-8, IC_{50} 值(抑制 50% 细胞生长的浓度)测定为 20–50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。还在上述 5-脂肪氧合酶实验中检测胞质苯并二氢吡喃醇-8, 并证明是 5-脂肪氧合酶、 LTB_4 和此酶的若干异构体的强抑制剂。胞质苯并二氢吡喃醇-8 还对人血小板中的 12-脂肪氧合酶路径显示了抑制活性。

胞质苯并二氢吡喃醇-8 的数据

在白三烯激活实验中, 以占甲醇对照的百分数通过 Betts(1997)的方法, 显示在人嗜中性白细胞中胞质苯并二氢吡喃醇-8 对白三烯合成的作用, 胞质苯并二氢吡喃醇-8 抑制 5-HETE 活化, 抑制率约 60%, 对 LTB_4 的抑制率为 40%, 对 LTB_4 的两个 6-反式异构体(6-反式-白三烯 B_4 和 6-反式-12-表白三烯 B_4) 的抑制率为 75%。在胞质苯并二氢吡喃醇-8 对白三烯合成的作用的相关实验中, 以每 10^6 PMN 的白三烯合成表示, 胞质苯并二氢吡喃醇-8 抑制 5-HETE 的产生, 抑制率约 75%, 对 LTB_4 的抑制率为 50%, 而对 LTB_4 的两个反式-6 异构体的抑制率约 80%。对人血小板的类似检测中, 胞质苯并二氢吡喃醇-8 抑制 12-HETE 的合成, 抑制率约 80%。

虽然本发明已参照本发明的优选实施方案的详述在本申请中作了公开, 应理解此公开只是举例说明, 而不是限制范围, 因为应考虑到对本领域技术人员来说, 在本发明的实质和所附权利要求书的范围内, 进行改进是容易的。

参考文献

- Betts H (1997). *Inflammopharmacology* 5:237-246.
- Bullock E and Dawson CJ (1970). *Comp. Biochem. Physiol.* 34:799.
- Castagna M, et al. (1982). *J. Biol. Chem.* 257:7847-7851.
- Chen YQ, et al. (1994). *Cancer Res.* 54:1574-1579.
- DeLuca P, et al. (1995). *Rheum. Dis. Clin. North. Am.* 21:759-777.
- Doherty NS, et al. (1988). *J. Invest. Dermatol.* 91:298-302.
- Findlay JA, et al. (1983a). *Marine Chemistry* 12:228.
- Findlay J, et al. (1983b). *J. Nat. Prod.* 47:334-340.
- Gao X, et al. (1995). *Urology* 46:227-237.
- Ghosh J and Myers CE (1997). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 235:418-423.
- Glenn EM (1966). *Am. J. Vet. Res.* 27:339-352.
- Grover FL, et al. (1997). *Am. J. Surg.* 173:523-533.
- Henderson WR (1994). *Ann. Intern. Med.* 121:648-697.
- Hofmanova J, et al. (1996). *Gen. Physiol. Biophys.* 15:317-331.
- Honn KV, et al. (1994). *Cancer Metastasis Rev.* 13:365-96.
- Honn KV, et al. (1992). *Prostaglandins* 44:413-429.
- Hussey HJ and Tisdale MJ (1996). *Br. J. Cancer* 74:683-687.
- Ishida H, et al. (1997). *Toxicology* 123:167-175.
- Knighton D, et al. (1977). *J. Cancer* 35:347-355.
- Konig GM and Wright AD (1995). *Planta Medica* 62:193-211.
- Langford FD, et al. (1972). *J. Pharm. Sci.* 61:75-78.
- Liu B, et al. (1994). *Lab. Invest.* 70:314-323.
- Matsuno T, et al. (1995). *Comp. Biochem. Physiol. B* 11B:597-605.
- Meyers S and Chen N (1982). *Journal of Food Science* 47:345-348.
- Miyamoto T, et al. (1990). *Liebigs Ann. Chem.* 33:453-460.
- Moody TW, et al. (1998). *Exp. Lung Res.* 24:617-28.
- Tsushima M, et al. (1996). *J. Nat. Prod.* 59:30-34.
- Winter CA and Nuss GW (1966). *Arthritis & Rheumatism* 9:394-404.

美国专利4495207

美国专利4505963

美国专利4692280

美国专利5519010

美国专利5770205

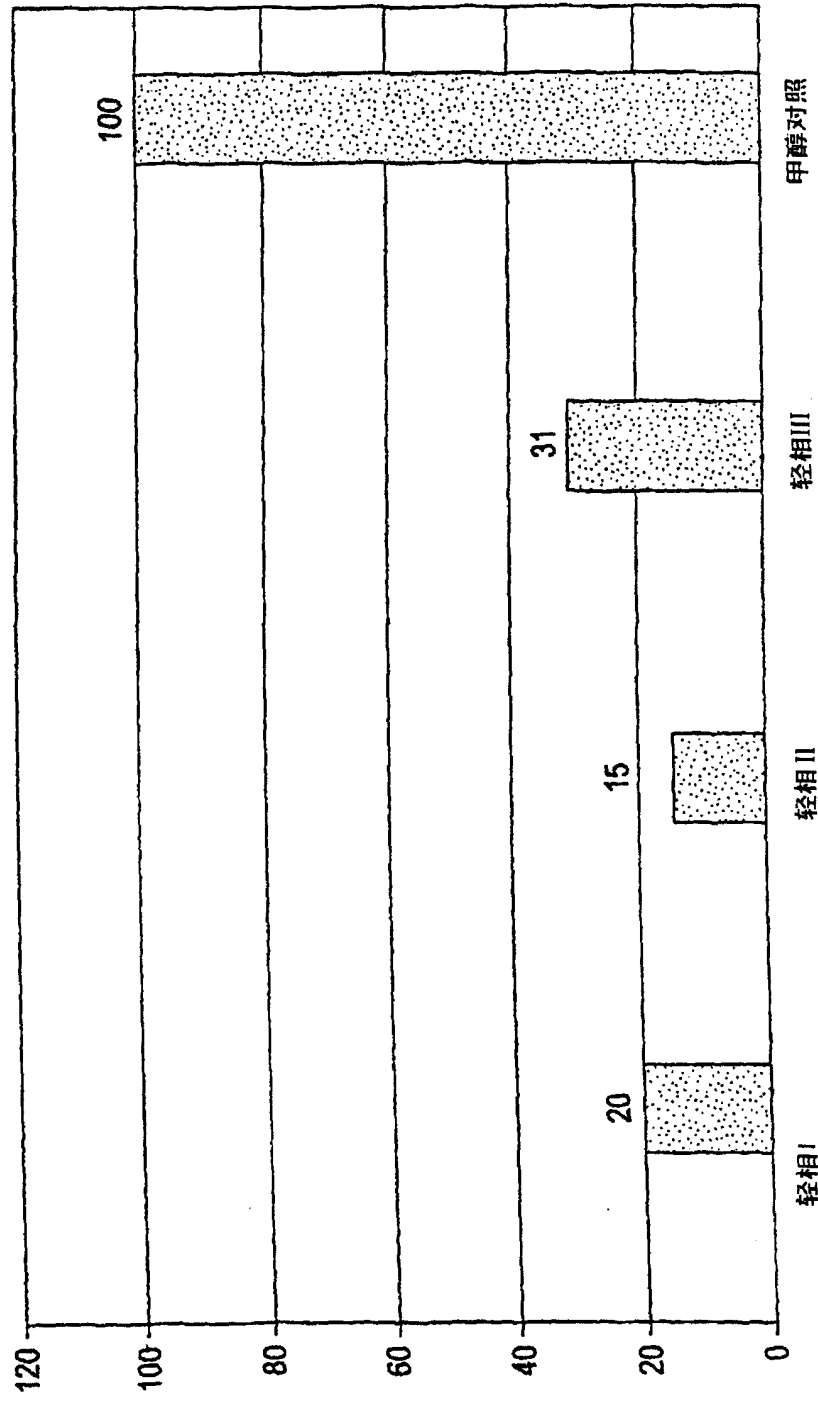


图1

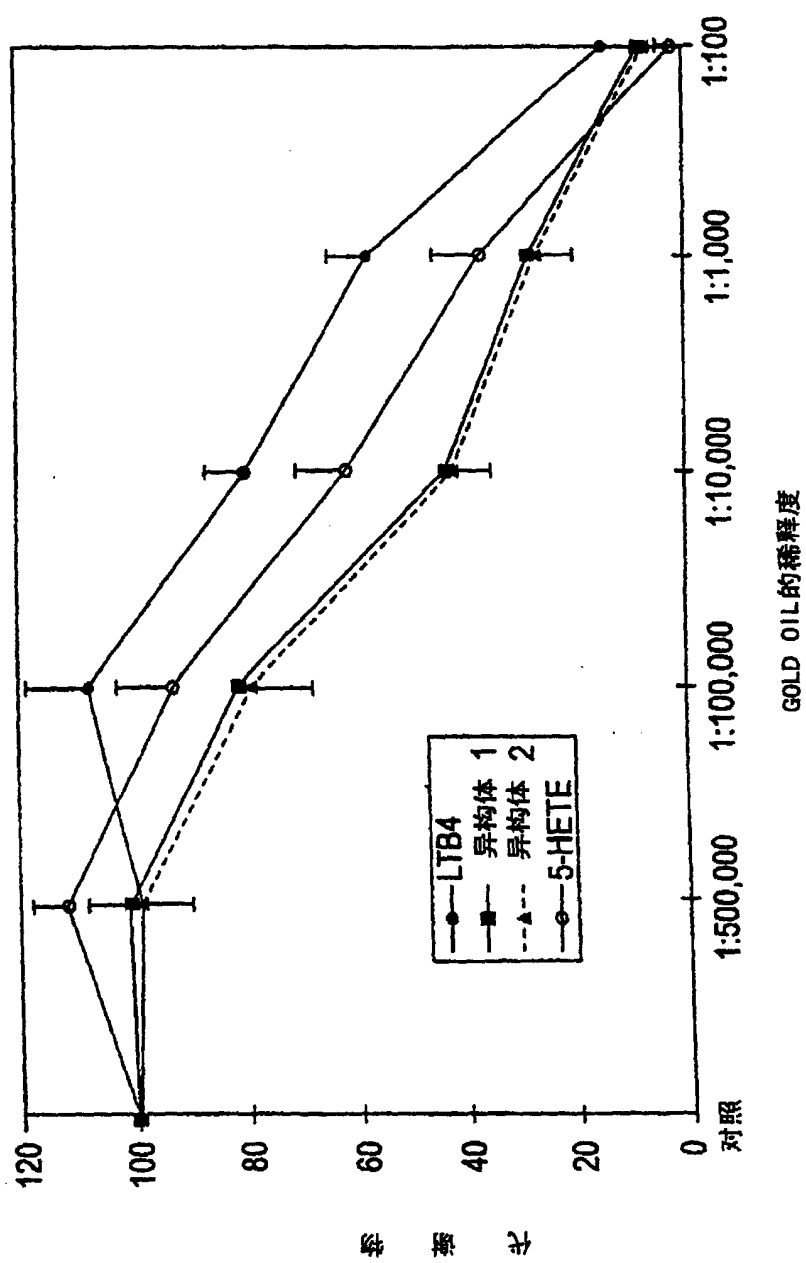


图2

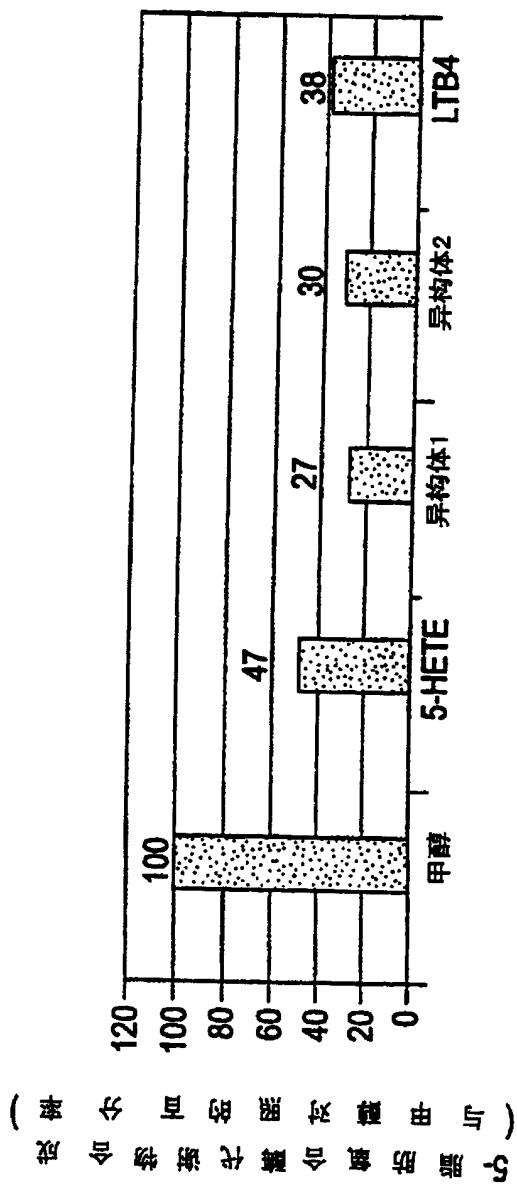


图3

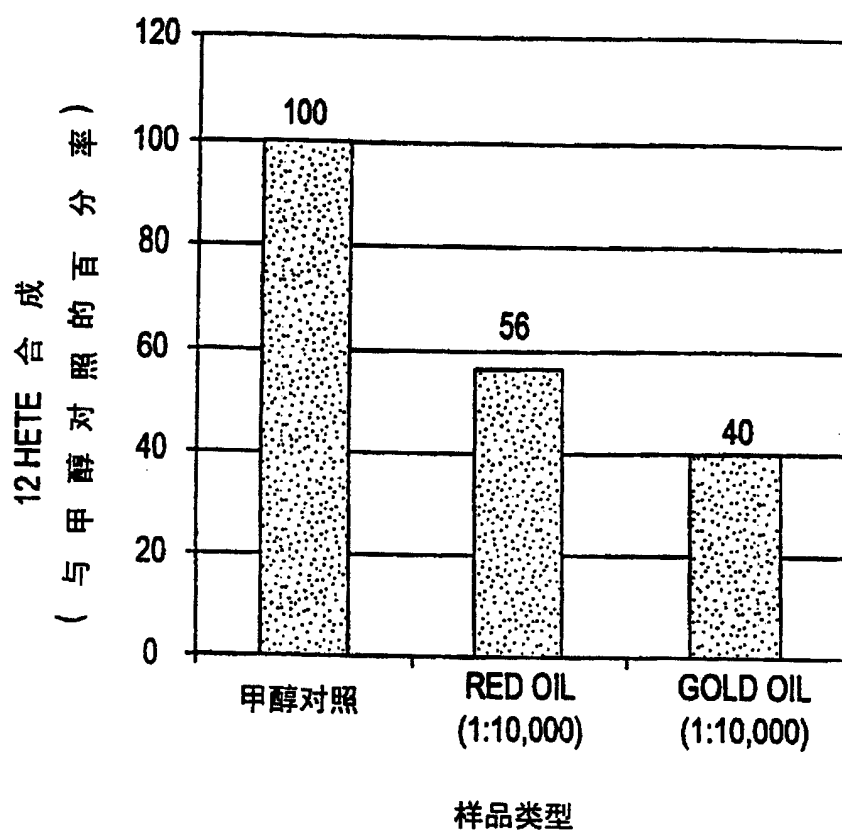


图4

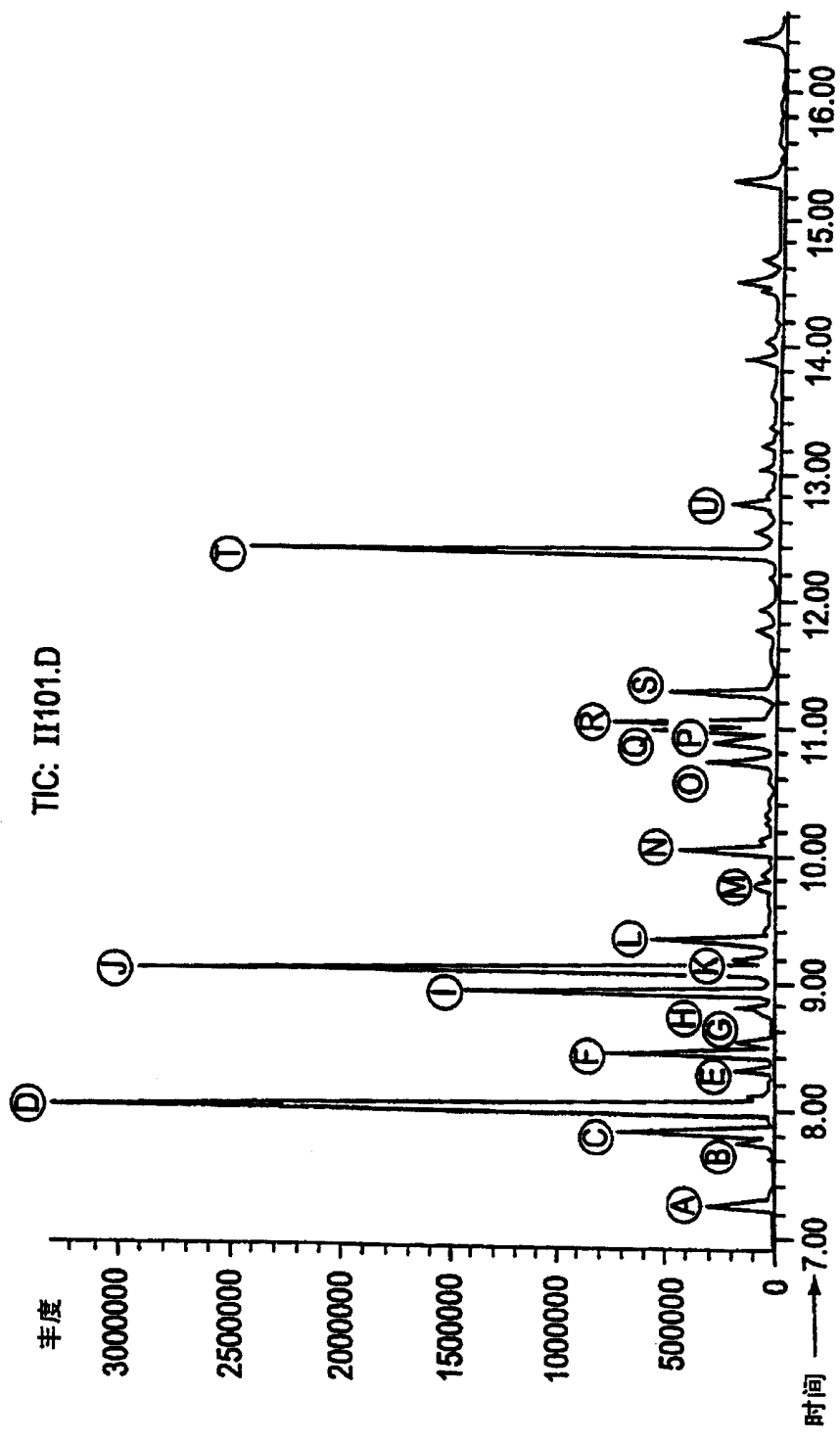


图5

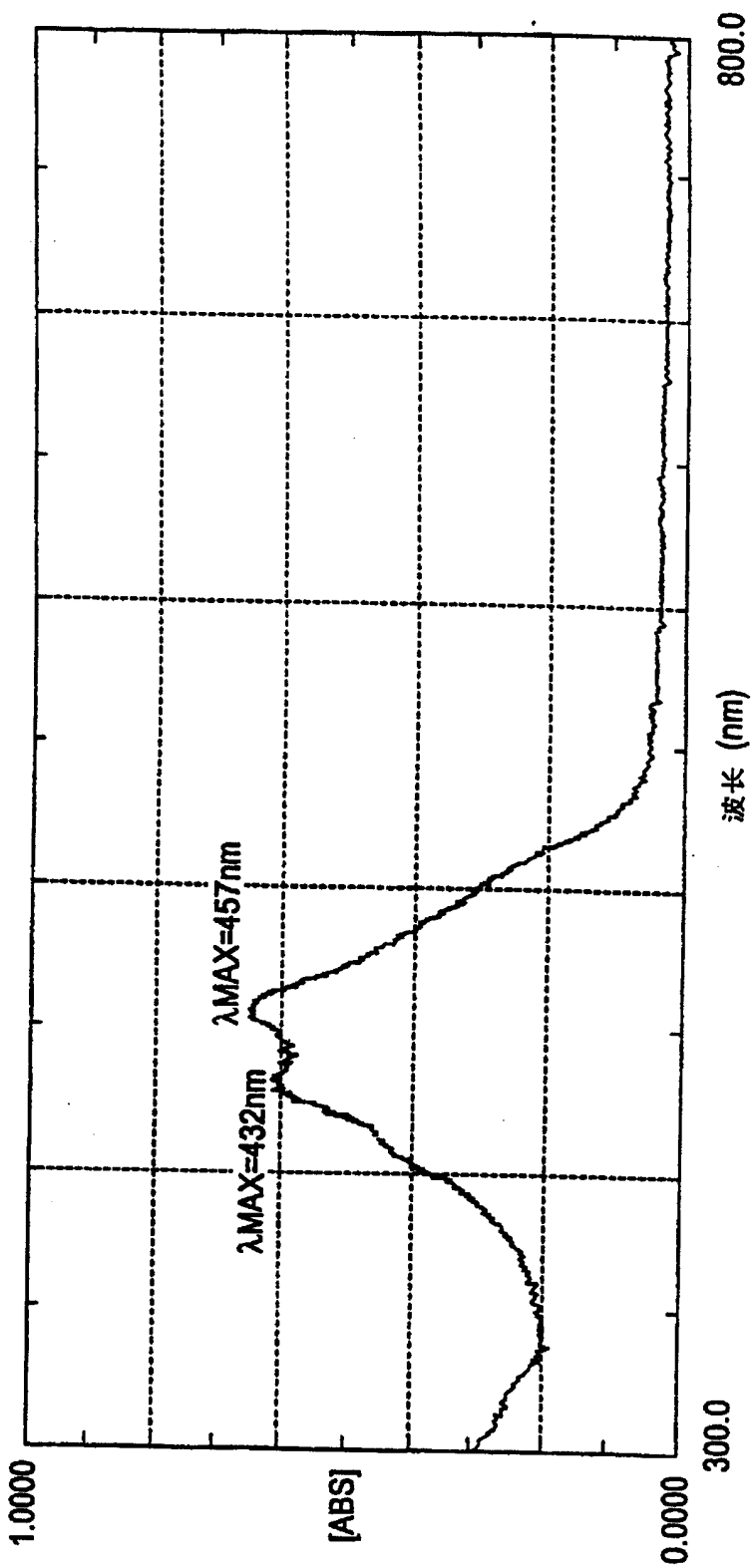


图6

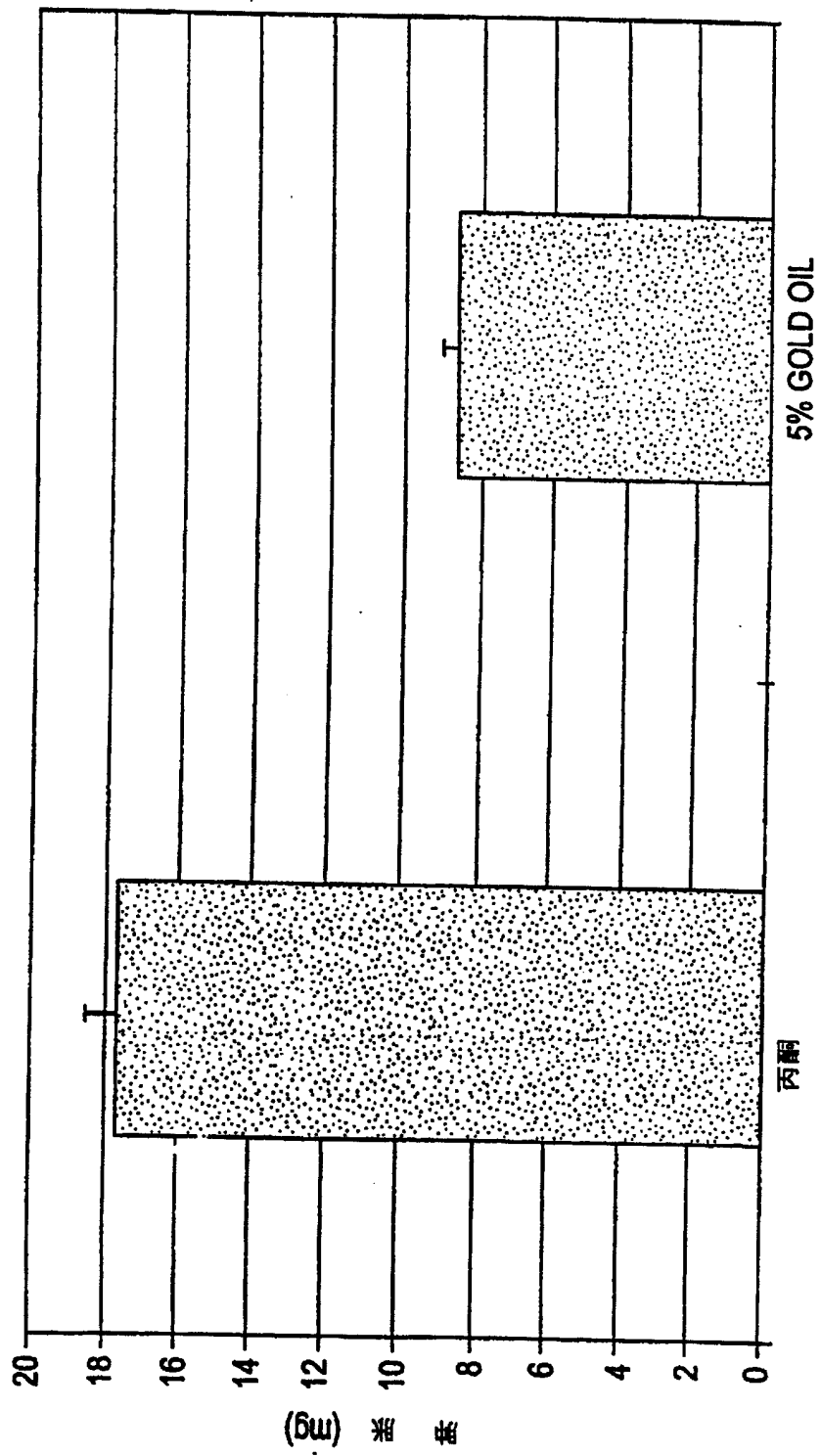


图7

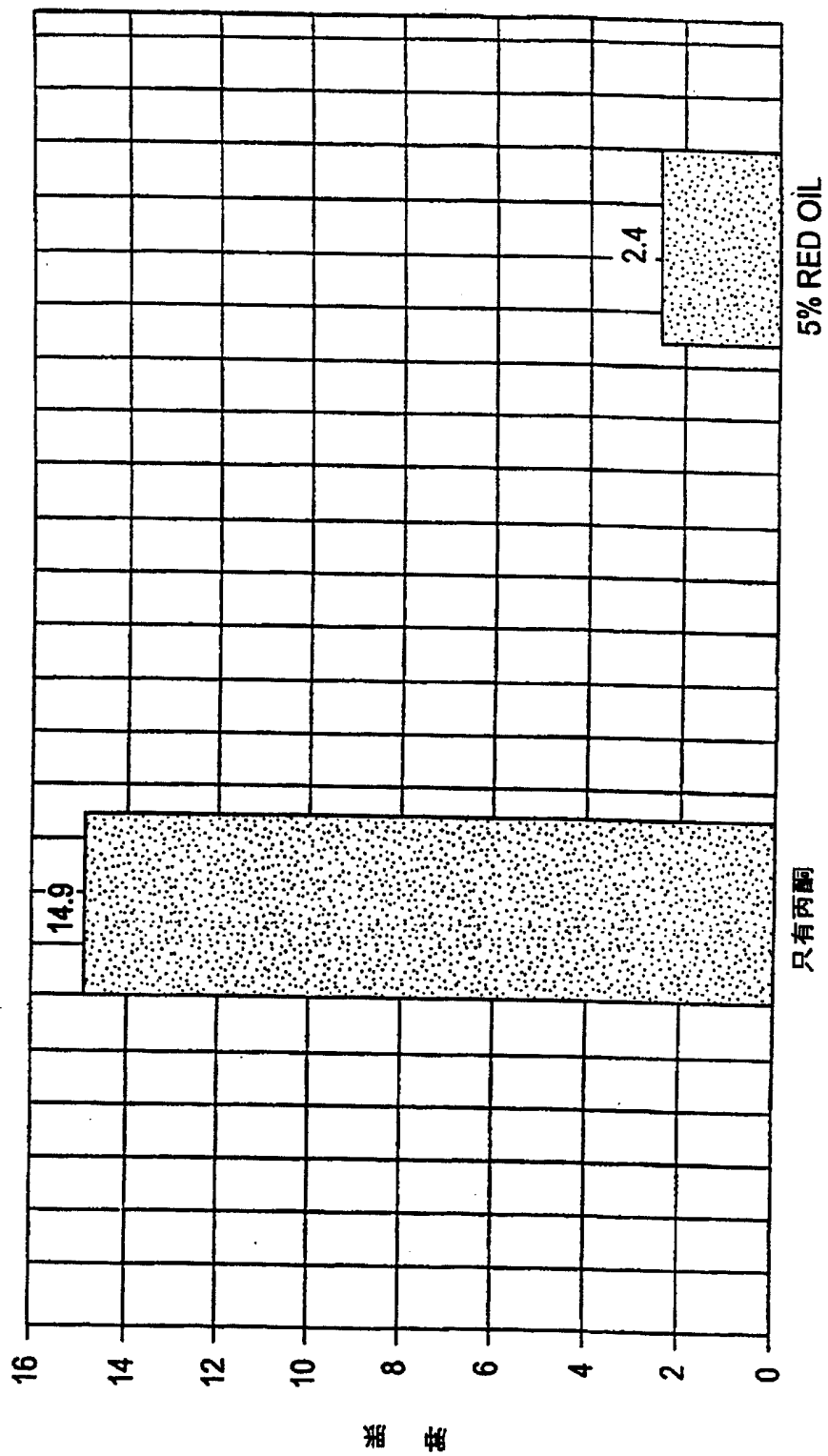


图8

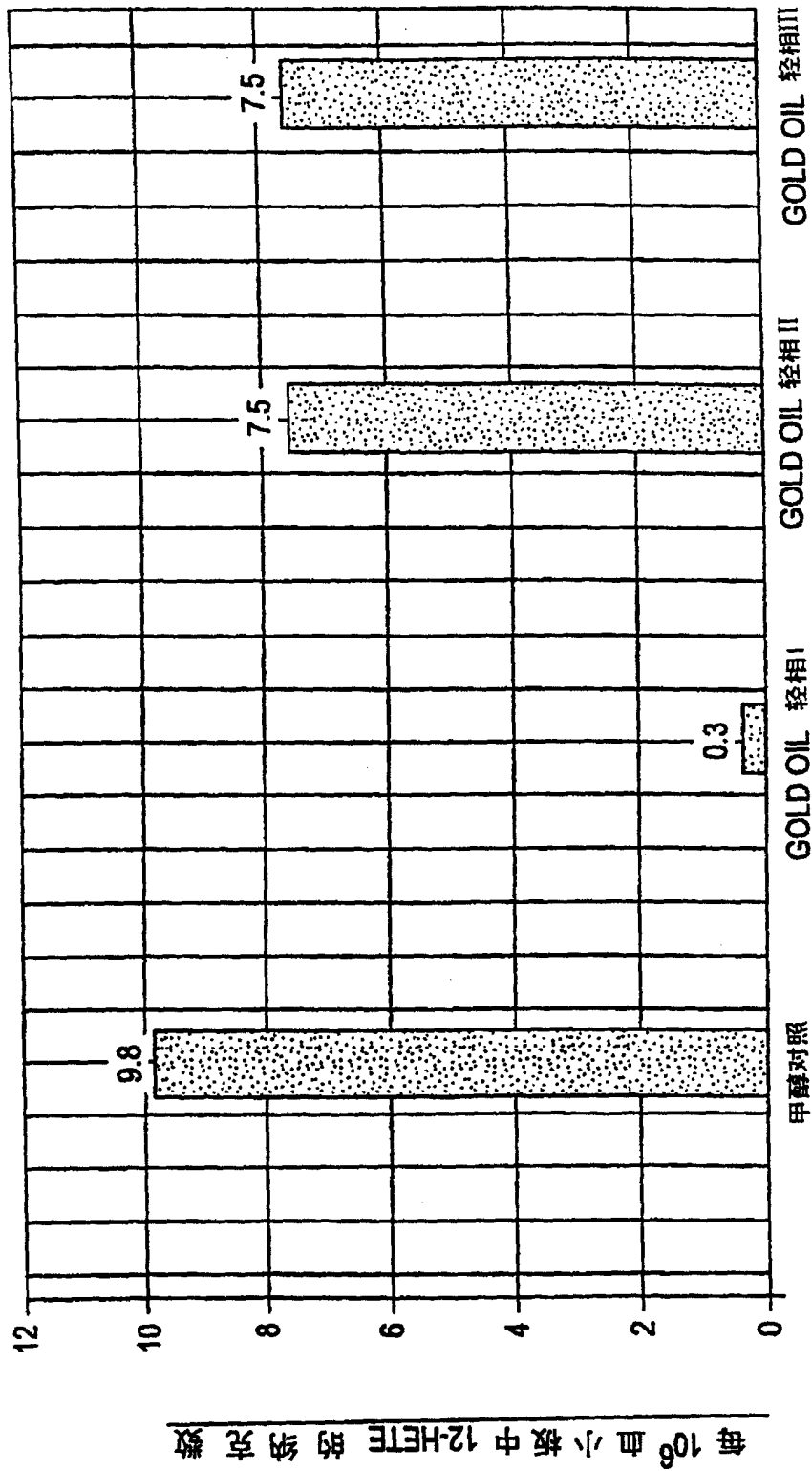


图9