

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
A61K 31/35 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200480036220.4

[43] 公开日 2007年1月3日

[11] 公开号 CN 1889944A

[22] 申请日 2004.10.8

[21] 申请号 200480036220.4

[30] 优先权

[32] 2003.10.10 [33] US [31] 60/510,604

[86] 国际申请 PCT/US2004/033355 2004.10.8

[87] 国际公布 WO2005/034879 英 2005.4.21

[85] 进入国家阶段日期 2006.6.5

[71] 申请人 马尔斯公司

地址 美国弗吉尼亚州

[72] 发明人 H·H·施米茨

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 李炳爰

权利要求书2页 说明书27页 附图8页

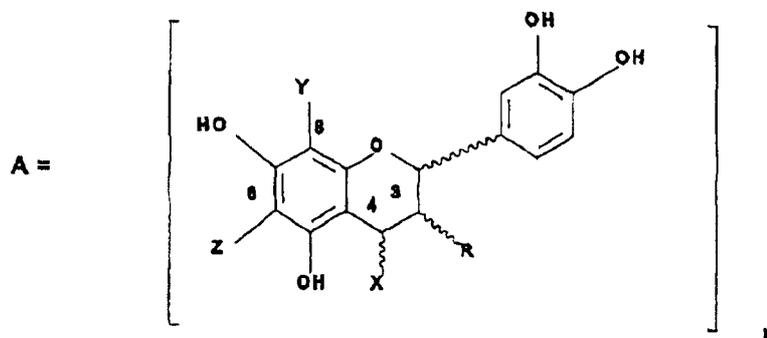
[54] 发明名称

ErbB2 激酶过量表达相关疾病的治疗

[57] 摘要

本发明涉及包含多酚例如黄烷醇及其相关低聚体的组合物, 以及与 ErbB2 激酶过量表达相关的疾病的治疗方法, 例如与 ErbB2 激酶过量表达相关的癌症的治疗方法。图 2 表示实时 PCR 实验的结果, 证实在原矢车菊素存在下, HAEC 中 ErbB2 激酶的表达降低。

1. 一种治疗与 ErbB2 激酶过量表达有关的疾病的方法，所述方法包括给予过量表达 ErbB2 激酶的人或牲畜有效量的选自以下的化合物：表儿茶素、儿茶素、具有下式的聚合物及其药物可接受的盐、衍生物或氧化产物：



其中

n 为 2-18 的整数；

10 R 和 X 各自具有 α 或 β 立体化学结构；

R 为 OH；

C-4、C-6 和 C-8 取代基分别为 X、Z 和 Y，且单体单元的键合发生在 C-4、C-6 和 C-8 上；和

15 如果任一 C-4、C-6 或 C-8 不与另一个单体单元键合，则 X、Y 和 Z 为氢。

2. 权利要求 1 的方法，其中与 ErbB2 过量表达有关的疾病是以 ErbB2 激酶过量表达为特征的癌症。

3. 权利要求 2 的方法，其中 n 为 5。

4. 权利要求 2 的方法，其中 n 为 8。

20 5. 权利要求 2 的方法，其中所述癌症是乳腺癌。

6. 权利要求 2 的方法，其中所述癌症是转移性乳腺癌。

7. 权利要求 2 的方法，其中所述癌症是卵巢癌。

8. 权利要求 2 的方法，其中所述癌症是喉癌。

9. 权利要求 2 的方法，其中所述癌症是前列腺癌。

10. 权利要求 2 的方法，其中所述癌症选自膀胱癌、唾液腺癌、子宫内膜癌、胰腺癌和非小细胞肺癌。

11. 权利要求 2 的方法，其中所述化合物与另外的化疗药物联合用药，或者给予所述化合物以提高化疗效果。

5 12. 权利要求 3 的方法，其中所述癌症是乳腺癌。

13. 权利要求 3 的方法，其中所述癌症是转移性乳腺癌。

14. 权利要求 3 的方法，其中所述癌症是卵巢癌。

15. 权利要求 3 的方法，其中所述癌症是喉癌。

16. 权利要求 3 的方法，其中所述癌症是前列腺癌。

10 17. 权利要求 3 的方法，其中所述癌症选自膀胱癌、唾液腺癌、子宫内膜癌、胰腺癌和非小细胞肺癌。

18. 权利要求 3 的方法，其中所述化合物与另外的化疗药物联合用药，或者给予所述化合物以提高化疗效果。

19. 权利要求 4 的方法，其中所述癌症是乳腺癌。

15 20. 权利要求 4 的方法，其中所述癌症是转移乳腺癌。

21. 权利要求 4 的方法，其中所述癌症是卵巢癌。

22. 权利要求 4 的方法，其中所述癌症是喉癌。

23. 权利要求 4 的方法，其中所述癌症是前列腺癌。

20 24. 权利要求 4 的方法，其中所述癌症选自膀胱癌、唾液腺癌、子宫内膜癌、胰腺癌和非小细胞肺癌。

25. 权利要求 4 的方法，其中所述化合物与另外的化疗药物联合用药，或者给予所述化合物以提高化疗效果。

ErbB2 激酶过量表达相关疾病的治疗

5

发明领域

本发明涉及组合物及其使用方法，该组合物包含多酚例如黄烷醇及其相关低聚体(原矢车菊素(procyanidin))，例如可可多酚(例如可可黄烷醇和可可原矢车菊素)，它们用于治疗 ErbB2 激酶过量表达相关疾病(例如与 ErbB2 激酶过量表达相关的癌症)。

10

发明背景

被称为 ErbB2 的激酶属于受体酪氨酸激酶的 Erb-B 家族，其中包括四个已知的成员：EGFR (表皮生长因子受体，也称为 ErbB1)、ErbB2、ErbB3 和 ErbB4。所有成员对正常发育及正常细胞机能都是必不可少的，然而，它们在某些癌症患者中失调，尤其是 EGFR 和 ErbB2 (Anderson 和 Ahmad, Front Biosci., 2002, 7:d1926-40)。ErbB2 也称为 HER2 (人表皮生长因子受体 2)和 NEU (参见例如 OMIM 数据库，www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez可查)。

ErbB2 在血管生成的调节中发挥重要作用。由 ErbB 受体调节的血管生成是由包含与其它 ErbB 家族成员结合在一起的 ErbB2 异二聚体的形成介导的。因此，抑制 ErbB2 基因可能降低更有效的 ErbB2 异二聚体形成的可能性，并且可能降低引起更多血管生成刺激物的下游信号活动。ErbB 受体与几种激酶信号传导途径偶联，其中包括 ERK1/2 (p44/p42) MAPK、磷脂酶 C、磷脂酰肌醇 3-激酶和 c-Jun 氨基端激酶。ErbB2 信号转导还与 PI-3/Akt 激酶途径及多胺合成途径有关。

在某些以下癌症患者亚群中观察到 ErbB2 激酶的过量表达：乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、肺癌、胃癌、膀胱癌、唾液腺癌、子宫

内膜癌、胰腺癌和上皮癌、非小细胞肺癌和喉癌(Dowsett 等, Eur. J. Cancer, 36:170-6, 2000; Wang 和 Hung, Semin. Oncol., 28:115-24, 2001; Eccles, Recent Res. Cancer Res., 157:41-54, 2000; Kazkayasi 等, Eur. Arch. Otorhinolaryngol., 258:329-35, 2001; Scholl 等, Ann. Oncol., 增刊 12, 1:S81-7, 2001)。例如, 在 20-30%的乳腺癌中, ErbB2 过量表达(通常为原癌基因扩增的结果)(Dowsett 等, Eur. J. Cancer, 36:170-6, 2000)。过量表达 ErbB2 的乳腺癌患者预后差, 复发时间短, 复发率较高, 存活时间较短, 存活率低(Wang 和 Hung, Semin. Oncol., 28:115-24, 2001)。过量表达与转移可能性增加和化疗药物有关。在乳腺癌中, ErbB2 过量表达与淋巴结转移癌有关。因此, 在本领域中, 有需要设计治疗肿瘤恶性程度增加的患者亚群的特异性靶向治疗方法。

目前, ErbB2 激酶是抗 ErbB2 单克隆抗体疗法的靶标(Slamon 等, N. Engl. J. Med., 344:783-92, 2001)。鉴于 ErbB2 过量表达相关疾病的严重性, 因此需要其它的治疗方法和治疗药物。现在, 申请人意想不到地发现了某些多酚(例如黄烷醇)及其相关低聚体, 包括从可可中得到的多酚及其相关低聚体, 有效地降低 ErbB2 过量表达, 因而可用于治疗过量表达 ErbB2 的癌症等疾病。

20

发明概述

本发明涉及用于治疗或预防以 ErbB2 过量表达为特征的疾病的组合物、产品和方法, 例如治疗和化学预防过量表达 ErbB2 激酶的癌症。

25

一方面, 本发明涉及包含多酚例如黄烷醇和/或其相关低聚体的组合物, 例如食品、食品添加剂、膳食补充剂或药物。所述组合物可任选包含其它癌症治疗药物。

包括上述组合物、标签和/或说明书并用于治疗过量表达 ErbB2 激酶的癌症的包装产品也落入本发明的范围内。

另一方面, 本发明涉及治疗哺乳动物(例如人或牲畜(veterinary animal))的过量表达 ErbB2 激酶的癌症的方法, 所述方法包括给予有需要的哺乳动物包含多酚例如黄烷醇和/或其相关低聚体的组合物。

5 又一方面, 本发明涉及化学预防哺乳动物(例如人或牲畜)的过量表达 ErbB2 激酶的癌症的方法, 所述方法包括给予有需要的哺乳动物包含多酚例如黄烷醇和/或其相关低聚体的组合物。

附图简述

10 图 1 表示酪氨酸激酶 PCR 片段的放射自显影图, 该酪氨酸激酶 PCR 片段由 HAEC (人主动脉内皮细胞)经原矢车菊素处理以及 RsaI 限制酶消化而制备。标出了显示 ErbB2 激酶差异表达的凝胶条带。泳道: M = 单体, D = 二聚体, P = 五聚体, O = 八聚体, E = 表儿茶素, C = 对照盐水。

15 图 2 表示实时 PCR 实验的结果, 证实在原矢车菊素存在下, ErbB2 激酶在 HAEC 中的表达降低。

图 3 表示在原矢车菊素单体或五聚体存在下, 添加或不添加血管内皮生长因子(VEGF)时所进行的细胞增殖实验。

20 图 4A 表示酪氨酸激酶 PCR 片段的放射自显影图, 该酪氨酸激酶 PCR 片段由经原矢车菊素处理以及 RsaI 限制酶消化的微切皮肤(micro dermal)内皮细胞而制备。显示了表示酪氨酸激酶 MET 和 ErbB2 的消化条带以及消化产物的大小。泳道: M = 单体, P = 五聚体, C = 对照盐水。

25 图 4B 表示酪氨酸激酶 PCR 片段的放射自显影图, 该酪氨酸激酶 PCR 片段由经原矢车菊素处理及 Bsp1286I 消化的微切皮肤内皮细胞而制备。显示了表示酪氨酸激酶 ErbB2 和 VEGFR-3 的消化条带以及消化产物的大小。泳道: M = 单体, P = 五聚体, C = 对照盐水。

图 5 表示定量实时 PCR 实验, 证实 ErbB2、KDR/VEGFR-2 和 MAPK11 基因表达降低(20 μ g/ml 五聚体预处理 HMDEC 和对照

HMDEC)。

图 6 表示用 RC20 H 抗体探测的五聚体预处理 HMDEC 裂解物及对照 HMDEC 裂解物的蛋白质印迹。

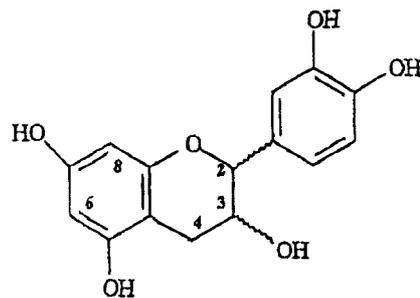
图 7 表示五聚体预处理 HMDEC 和对照 HMDEC 的蛋白质印迹，
5 该 HMDEC 暴露在 1mM H_2O_2 中 30 分钟，用重组 HRP-抗磷酸酪氨酸(PY20)抗体进行探测。

图 8 表示五聚体处理 HMDEC 和八聚体处理 HMDEC 的增殖，
10 该 HMDEC 用 1mM H_2O_2 刺激 30 分钟。Agst 表示血管生成刺激(1mM H_2O_2)。

发明详述

本申请所引用的所有专利、专利申请和参考文献都通过引用结合到本文中。如有任何不一致的情况，则以本申请公开内容为准。

15 本发明涉及包含黄烷醇和/或其相关低聚体(例如至少一种黄烷醇和/或其相关原矢车菊素低聚体)的组合物，以及给予有需要的哺乳动物所述组合物。例如，所述组合物可包含有效量的具有下式的黄烷醇、或其药物可接受的盐、衍生物或氧化产物：



20

或者，组合物或以联用的形式，可包含有效量的式 A_n 聚合物或其药物可接受的盐、衍生物或氧化产物：

约 92%、或至少约 95%、或至少约 98%、或至少约 99%。

黄烷醇和/或其相关低聚体可为可可黄烷醇和/或可可原矢车菊素低聚体。另外，组合物可包含代替可可多酚但不是可可来源的多酚，其结构和/或性质与可可多酚相同或相似。所述组合物可任选包含另外的癌症治疗药。

5

本文所用术语“可可多酚”(cocoa polyphenol, CP)是指多酚类物质，例如黄烷醇及其具有可可豆特征的相关低聚体。换言之，可可多酚、可可黄烷醇或可可原矢车菊素低聚体，是不论其来源的任何多酚、黄烷醇或原矢车菊素低聚体，具有可可中天然存在的多酚、黄烷醇或原矢车菊素的结构式。在一个实施方案中，这类化合物可从可可豆或可可成分中提取。术语“黄烷醇”包括单体儿茶素和单体表儿茶素。儿茶素低聚体和表儿茶素低聚体均称为原矢车菊素(procyanidin)。本文中，只要涉及多酚都应当理解成也适用于黄烷醇和原矢车菊素(联用和单用)，反之亦然。

10

15

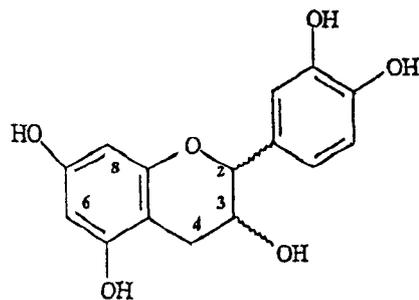
术语“可可成分”是指从无壳可可豆瓣得到的含可可固体的材料，例如巧克力浆料和部分脱脂或完全脱脂的可可固体(例如饼或粉)。

20

本发明所用多酚可为天然来源的多酚(例如来源于可可豆或其它天然来源的多酚)，或为合成制备的多酚。本领域技术人员可根据供应量或成本，选择天然多酚或合成多酚。组合物中可以包含多酚，其形式为含有可可多酚的可可成分，例如巧克力中包含的巧克力浆料；或者可以独立地加入可可成分，例如提取物、提取馏分、分离纯化的单一化合物、混合提取馏分或合成制备的化合物。

25

黄烷醇包括(+)-儿茶素、(-)-表儿茶素及其相应的差向异构体(例如(-)-儿茶素和(+)-表儿茶素)，并具有下列结构：



原矢车菊素低聚体可具有 2 至约 18、优选 2 至约 12、最优选 2 至约 10 个单体单元。或者，所述低聚体可具有 3-18、优选 3-12、更
 5 优选 3-10 个单体单元；或者 5-18、优选 5-12、更优选 5-10 个单体单元。例如，低聚体可以是二聚体、三聚体、四聚体、五聚体、六聚体、七聚体、八聚体、九聚体和十聚体。在低聚体中，单体通过黄烷间(4→6)键和/或(4→8)键连接。只有(4→8)键的低聚体为直链；而存在至少一个(4→6)键时产生支链低聚体。本发明范围内还包括至少
 10 一个非天然键(6→6)、(6→8)和(8→8)的低聚体。在 2000 年 10 月 19 日以 WO 00/61547 公布的国际申请号 PCT/US00/08234 中，描述了此类非天然产生的低聚体的合成，有关内容通过引用结合到本文中。

可可多酚可从可可豆、可可豆瓣或可可成分(例如巧克力浆料、部分脱脂可可固体和/或完全脱脂可可固体)中提取制备。优选提取物
 15 从完全或部分脱脂可可粉制备。可采用可可树属(*Theobroma*)、梧桐属(*Herrania*)中任何种、或其种间杂交和种内杂交的豆类。提取物可从发酵、发酵不足或未发酵豆制备，发酵豆中的可可多酚含量最低，未发酵豆中最高。可根据豆的发酵系数进行豆的选择，例如，可从发酵系数约 275 以下的豆中得到提取物。按以 WO98/09533 公布的国
 20 际申请号 PCT/US97/15893 中所描述的方法，控制发酵程度，从而使可可成分及其提取物中多酚浓度最大化，所述文献的相关部分通过引用结合到本文中。

采用可可加工的传统方法(例如 *Industrial Chocolate Manufacture and Use*, Beckett, S.T. 编著, Blackie Acad. & Professional, New York,

1997, 第 1、5 和 6 章所述方法), 或者采用 Kealey 等的美国专利号 6,015,913 中描述的, 与传统方法相比保持可可成分中多酚(防止其破坏)的改进加工方法, 加工可可成分, 从中提取可可多酚。改进的可可加工方法省去了传统的烘焙步骤。因此, 可使用从下述步骤得到的可可成分: (a)将可可豆加热一段时间, 温度足以使可可壳松脱, 而所得可可豆瓣无需烘焙; (b)用风选法使可可壳与无壳可可豆分开; (c)螺旋压榨无壳可可豆; 和(d)回收可可脂和含有保持水平可可多酚的部分脱脂可可固体。所述方法比传统加工方法得到的高级原矢车菊素低聚体水平高得多。通过该方法生产的可可固体可含有大于 20,000 μg 总黄烷醇和/或原矢车菊素/g 非脂固体、优选大于 25,000 $\mu\text{g}/\text{g}$ 、更优选大于 28,000 $\mu\text{g}/\text{g}$ 、最优选大于 30,000 $\mu\text{g}/\text{g}$ 。对于本发明的目的, 用实施例 1 的方法测定黄烷醇和/或原矢车菊素的总量。

可用溶解多酚的溶剂, 从上述来源, 或从含多酚或黄烷醇或原矢车菊素的任何其它来源提取多酚。合适的溶剂包括水或有机溶剂, 例如甲醇、乙醇、丙酮、异丙醇和乙酸乙酯。也可使用混合溶剂。当用水作为溶剂时, 可使之略微酸化, 例如用乙酸。某些溶剂的实例为水与有机溶剂的混合物, 例如甲醇、乙醇或丙酮的水溶液。有机溶剂水溶液可含有例如约 50%至约 95%的有机溶剂。因此, 可使用约 50%、约 60%、约 70%、约 80%和约 90%有机溶剂的水溶液。所述溶剂还可含有少量的酸, 例如含量约 0.5%至约 1.0%的乙酸。提取物的组成, 即原矢车菊素低聚体的表现度(即低聚特征)和原矢车菊素低聚体的含量取决于对溶剂的选择。例如, 水提取物主要包含单体, 乙酸乙酯提取物包含单体和低级低聚体, 主要为二聚体和三聚体, 甲醇、乙醇或丙酮水溶液提取物包含单体和各种高级低聚体。用于提取单体以及提取高级原矢车菊素低聚体的溶剂之一为约 70%丙酮。然而, 任何包含多酚的提取物都可用于本发明。可可多酚的提取方法为本领域所知, 在例如 Romanczyk 等的美国专利号

5,554,645、以 WO97/36497 公布的国际申请号 PCT/US97/05693 中对其进行了描述。因此，在一个实施方案中，通过下述方法制备可可提取物：将可可豆磨成可可粉，使可可粉脱脂，提取可可多酚，纯化提取物。可以通过下述方法制备可可粉：将可可豆和果浆冷冻干燥，冻干可可豆进行脱浆(depulping)和脱壳(dehulling)，把脱壳可可豆磨成粉。

可对可可多酚提取物进行纯化，例如通过除去咖啡碱和/或可可碱，再通过凝胶渗透色谱法和/或高压液相色谱法(HPLC)进行纯化。可用凝胶渗透色谱法(例如交联葡聚糖凝胶 LH-20 (Sephadex LH-20))浓缩高级原矢车菊素低聚体提取物。例如，当所选的低聚体开始从柱上洗脱时，才收集含有单体和低级低聚体的洗脱液。此类提取物的一个实例为本领域所知，并记载于以 WO97/36497 公布的国际申请号 PCT/US97/05693 的实施例 5 中，所述文献的相关部分通过引用结合到本文中。可使用制备型 HPLC (例如正相 HPLC)，将提取物分成例如单体馏分和低聚体馏分，该馏分含有至少 50% (重量)的单体或特定低聚体。当特殊馏分含有单体或任何低级低聚体(例如二聚体、三聚体或四聚体馏分)时，所述馏分含有约 90-95% (重量)特殊低聚体馏分。所需馏分经分离后，可合并得到所选低聚体的合并物，例如低聚体 3-10 或 5-10 的合并物。本领域技术人员可按本说明书的指导、本领域的常识、以及例如 Romanczyk 等的美国专利号 5,554,645 和以 WO97/36497 公布的国际申请号 PCT/US97/05693 中的方法，通过控制色谱条件，得到所需的原矢车菊素。

单体馏分通常含有单体表儿茶素和单体儿茶素的混合物；低聚体馏分通常含有二聚体(在二聚体馏分中)、三聚体(在三聚体馏分中)、四聚体(在四聚体馏分中)等的混合物。所分离的馏分中存在单体和低聚体的混合物，因为可可含有不止一种类型的各种单体、二聚体等。两种单体，即表儿茶素和儿茶素，既是原矢车菊素的结构单元，也是低聚体中的化学键连接单体，由于这两种单体的原因，产生了低

聚多样性。因此，可可二聚体主要为 B2 和 B5，各自含有表儿茶素的两种单体。可用反相 HPLC，例如用 C18 柱得到各单体和低聚体。

5 本发明的组合物中使用可可多酚，其形式为可可提取物，例如得自溶剂的提取物、可可馏分、分离的化合物或以包含有效量的可可黄烷醇和/或原矢车菊素的可可成分或巧克力。可用传统的可可加工方法制备可可成分，但优选用 Kealey 等的美国专利号 6,015,913 中描述的方法制备。或者，为了提高可可多酚的水平，可使用发酵系数约 275 或更低的可可豆制备巧克力浆料和可可固体。这些成分含可可多酚的量高于用传统可可加工方法(例如烘焙)和完全发酵豆所得到的量。可用常规技术从上述成分制备巧克力，或者用以 WO99/45788 10 公布的国际申请号 PCT/US99/05414 中所述的巧克力生产过程中保持可可多酚的改进方法，所述专利的相关内容通过引用结合到本文中。通过至少一种下述非传统方法所制备的巧克力在本文中称为“具有保存量(conserved amount)的可可多酚的巧克力”：(i)从发酵不足或未发酵的可可豆制备可可成分；(ii)在可可成分生产过程中保持可可多酚；和(iii)在巧克力生产过程保持可可多酚。

在某些实施方案中，组合物包含至少一种低聚体，例如二聚体。此类组合物另外还可包含至少一种单体或混合单体(例如儿茶素和表儿茶素)。在另一个实施方案中，还制备和使用包含混合单体(儿茶素 20 和表儿茶素，例如从可可中分离的单体馏分形式)的组合物。

也可使用合成的原矢车菊素，合成的原矢车菊素用本领域已知方法和例如以 WO99/19319 公布的国际申请号 PCT/US98/21392 中描述的方法制备，其中相关内容通过引用结合到本文中。

也可使用黄烷醇和/或原矢车菊素衍生物。所述衍生物包括单体 25 和低聚体的酯类，例如没食子酸酯(例如表儿茶素没食子酸酯和儿茶素没食子酸酯)；与单糖部分或二糖部分(例如 β -D-葡萄糖)等糖部分在上式中的 X、Y 和/或 Z 位上衍生的化合物；糖基化单体和糖基化低聚体及其混合物；原矢车菊素单体和低聚体的代谢物，例如硫酸化、

glucoronidated 和甲基化形式，由结肠微生物菌群代谢产生的原矢车菊素的酶切产物除外。所述衍生物可来自天然来源或者合成制备。

5 本发明组合物用作药物、食品、食品添加剂、膳食补充剂或药物。该组合物可包含载体、稀释剂或赋形剂。可根据预期用途，选择适用于人或兽医用途、食品、添加剂、补充剂或药物用途的载体、稀释剂或赋形剂。

10 本文所用“食品”是指主要含有蛋白质、糖和/或脂肪的物质，用于有机体维持生长、修复和生命过程并提供能量。食品也含有补充物质例如矿物质、维生素和调味品。参见 Merriam-Webster's Collegiate Dictionary, 第 10 版, 1993 年。术语食品包括适合人或动物消费的饮料。本文所用“食品添加剂”的定义同美国食品与药品管理局(FDA)在 21 C.F.R. 170.3(e)(1)中的定义，包括直接添加剂和间接添加剂。本文所用“药物(Pharmaceutical)”是指医用药物。参见 Merriam-Webster's Collegiate Dictionary, 第 10 版, 1993 年。药物
15 (Pharmaceutical)也可称为药剂(medicament)。本文所用“膳食补充剂”是旨在补充饮食的产品(烟草除外)，该产品具有或包含一种或多种下述膳食成分：维生素、矿物质、草药类或其它植物、氨基酸、膳食物质，这类产品供人用，通过增加每日总吸收量或浓度、代谢物、组分、提取物或这些成分的联用以补充膳食。

20 因存在多酚或其衍生物(例如甲基化化合物或代谢分解产物)而得到改良的任何常规食品(包括任何饮料)，任选与其它癌症治疗药物联用。也可存在其它化合物，例如 L-精氨酸、钙、钾、镁、抗氧化剂(例如维生素 E 和维生素 C)、任一种复合维生素 B、类胡萝卜素、瓜尔胶和/或单不饱和脂肪酸或多不饱和脂肪酸(例如 ω -3)。

25 可通过下述方法得以改进：(i)向不含可可多酚的食物中添加多酚或其衍生物，或(ii)如果食品传统上含有可可多酚(例如巧克力)，则提高按传统方法制作食品中的多酚浓度。可通过以下方式提高多酚水平：以提取物、馏分、或从中所分离纯化的化合物的形式，加入

额外的多酚例如可可多酚；加入与另一种含多酚成分(例如坚果皮(nut skin))联用的可可多酚；按上述方法，通过控制可可成分的加工和可可豆的选择，保持用于食品生产的可可成分中的可可多酚；或按上述方法控制巧克力生产过程。因此，与有关常规食品(包括饮料)相比，
5 这些食品(包括饮料)含有“水平升高的多酚”(包括可可原矢车菊素)。具有水平升高的多酚的巧克力的一个实例是，巧克力制造商在其以前市售的产品中添加含有可可多酚的可可提取物。该食品也可称为“高可可多酚食品”，即与其传统食品相比，含有较高水平的多酚。

含有可可多酚的食品，和任选其它癌症治疗药一起可适用于人或兽医用途，包括宠物食品。该食品可不同于糖果，然而，优选的低胆固醇食品是认证标准(standard of identity (SOI))和非认证标准巧克力等糖果，该巧克力例如牛奶巧克力、甜巧克力和半甜巧克力，其中包括黑巧克力、低脂巧克力和涂有巧克力的糖果等。其它实例包括烘焙产品(例如巧克力小饼、烘焙零食、小甜饼、饼干)、调味品、
10 杂拌糕条、太妃糖、膳食代用方条状食品、抹酱、糖浆、饮料混合粉、可可味或巧克力味饮料、布丁、米糕、米粉混合料、风味沙司等。如果需要，该类食品可用巧克力或可可调味。食物产品可以是巧克力和糖块，例如杂拌糕条，其中含有花生、核桃、杏仁和榛子等坚果。应该注意，向本文所述食品中加入连皮的坚果，还可增加
15 多酚总含量，因为，例如，花生皮含约 17%黄烷醇和原矢车菊素，杏仁皮含约 30%黄烷醇和原矢车菊素。在一个实施方案中，在巧克力牛轧糖中加入坚果皮。
20

在某些实施方案中，非巧克力食物产品含有约至少 5 μ g/g 至约 10mg/g 可可黄烷醇和/或原矢车菊素低聚体，例如至少 5 μ g/g、优选
25 至少 10 μ g/g、更优选至少 100 μ g/g 可可黄烷醇和/或原矢车菊素低聚体。如果需要，非巧克力食物产品与下述巧克力食物产品相比，可含有水平高得多的可可原矢车菊素。

在一个实施方案中，巧克力糖果含有有效量的可可黄烷醇和/或原

矢车菊素，以治疗、预防心律失常或一般与间隙连接性通讯异常相关的任何疾病(例如神经变性疾病)、降低疾病的风险、减少疾病的发生。所述巧克力糖果可为牛奶巧克力或黑巧克力。在某些实施方案中，根据产品中的非脂可可固体总量，巧克力含至少 3,600 μ g、优选至少 4,000 μ g、优选至少 4,500 μ g、更优选至少 5,000 μ g、最优选至少 5,500 μ g 可可黄烷醇和/或原矢车菊素/g 巧克力。在其它实施方案中，根据产品中的非脂可可固体，巧克力含至少 6,000 μ g、优选至少 6,500 μ g、更优选至少 7,000 μ g、最优选至少 8,000 μ g 可可原矢车菊素/g，甚至更优选 10,000 μ g/g。

根据牛奶巧克力产品中的非脂可可固体的总量，牛奶巧克力糖果中每克牛奶巧克力可含有至少 1,000 μ g、优选至少 1,250 μ g、更优选至少 1,500 μ g、最优选至少 2,000 μ g 可可黄烷醇和/或原矢车菊素。在一个优选的实施方案中，根据牛奶巧克力产品中的非脂可可固体的总量，牛奶巧克力中每克牛奶巧克力含至少 2,500 μ g、优选至少 3,000 μ g、更优选至少 4,000 μ g、最优选至少 5,000 μ g 可可黄烷醇和/或原矢车菊素。

食物产品中 L-精氨酸的量可以不同。通常，可可含 1-1.1g L-精氨酸/100 克部分脱脂可可固体。可介于 0.8-1.5g/100 克可可的范围内。在一些实施方案中，本发明的巧克力食物产品含 L-精氨酸的量大于天然可可成分中的含量。已知食物产品中所用可可成分和 L-精氨酸的量时，本领域普通技术人员可轻易求出最终产品中 L-精氨酸的总量。所述食物产品一般将含至少 5 μ g/g、优选至少 30 μ g/g 或至少 60 μ g/g、甚至更优选至少 200 μ g/g 食物产品。

可按单次份量提供每日有效量的多酚(例如黄烷醇和/或原矢车菊素)。因此糖果(例如巧克力)可含至少约 100mg/份(例如 150-200mg/份、200-400mg/份)可可原矢车菊素。

含有黄烷醇和/或原矢车菊素的药物，任选与其它癌症治疗药物联用，可以不同的方式给予，例如口服、舌下、含服、鼻内、直肠

内、静脉内、肠胃外和局部。本领域技术人员能够确定合适的给药方式，任选与其它癌症治疗药物一起，使式 A_n 化合物在肿瘤部位的释药最多。因此，适用于各给药类型的剂型在本发明的范围内，包括固体剂型、液体剂型和半固体剂型，例如片剂、胶囊剂、明胶胶囊剂(软胶囊剂)、散装或单位剂量粉剂或者散装或单位剂量颗粒剂、乳剂、混悬剂、糊剂、乳膏剂、凝胶剂、泡沫剂或胶冻剂(jellies)。缓释剂型也在本发明的范围内，可按美国专利号 5,024,843、5,091,190、5,082,668、4,612,008 和 4,327,725 所述方法制备，其中相关内容通过引用结合到本文中。合适的药物可接受的载体、稀释剂或赋形剂通常为本领域所知，本领域技术人员可轻易地确定。例如，片剂可含有效量的含多酚组合物和任选的载体，例如山梨醇、乳糖、纤维素或磷酸二钙。

含可可黄烷醇和/或原矢车菊素的膳食补充剂和任选的其它癌症治疗药物可用本领域已知方法制备，所述膳食补充剂可含有例如磷酸二钙、硬脂酸镁、硝酸钙、维生素和矿物质等营养素。

包括本发明的组合物(例如食物、膳食补充剂、药物)和标签的包装也落入本发明范围内，该标签标明存在黄烷醇和/或原矢车菊素和/或其衍生物，或黄烷醇和/或原矢车菊素和/或其衍生物含量提高，或表示应用所述组合物治疗过量表达 ErbB2 的癌症。包装可包括组合物和治疗以 ErbB2 过量表达为特征的癌症或其它症状的使用说明书。

本文所用“治疗”是指通过例如减缓疾病进程，延长生存时间，降低死亡风险等改善现有的医学病症(例如过量表达 ErbB2 的癌症)。术语“预防”是指降低疾病发展的相关风险，包括减少疾病的发作。预防可用于已知处于发生过量表达 ErbB2 的癌症的高危个体。该方法可用于人或牲畜，例如狗、猫和马。

所述方法包括有效时期内(例如经治疗，ErbB2 过量表达相应降低)，给予哺乳动物(优选人或牲畜)，有效量的含黄烷醇和/或其相关低聚体(例如可可黄烷醇和/或其相关低聚体)的组合物，任选与其它癌

症治疗药物联用，黄烷醇和/或其相关低聚体为治疗过量表达 ErbB2 的癌症的有效量。

5 在一个实施方案中，本发明涉及治疗和/或预防以 ErbB2 过量表达为特征的癌症的方法，该方法包括给予人或牲畜有效量的包含五聚体或八聚体的组合物一段有效时期。

10 因此，下述用途在本发明的范围内。黄烷醇和/或其低聚体在生产用于以 ErbB2 过量表达为特征的病症的药物、食品、营养药或膳食补充剂中的用途。在一个实施方案中，提供黄烷醇和/或其低聚体在生产药物、食品、营养药或膳食补充剂中的用途，所述药物、食品、营养药或膳食补充剂用于治疗人或牲畜的过量表达 ErbB2 的癌症，或降低过量表达 ErbB2 的癌症的风险。所述黄烷醇和/或其低聚体可为可可黄烷醇和/或可可黄烷醇低聚体。

15 下述用途为某些实施方案中的代表。黄烷醇和/或其低聚体在生产药物、食品、营养药或膳食补充剂中的用途，所述药物、食品、营养药或膳食补充剂用于治疗过量表达 ErbB2 的乳腺癌，或降低过量表达 ErbB2 乳腺癌的风险。黄烷醇和/或其低聚体在生产药物、食品、营养药或膳食补充剂中的用途，所述药物、食品、营养药或膳食补充剂用于治疗人过量表达 ErbB2 的卵巢癌、前列腺癌、膀胱癌、内皮癌、唾液腺癌、子宫内膜癌、胰腺癌、喉癌和非小细胞肺癌。
20 也可治疗牲畜中相应的癌症。

本领域技术人员可用本文所提供的方法确定有效量。例如，有效量可以是为了达到哺乳动物体内生理上相应浓度的量。此类生理上相应的浓度可为至少 20 纳摩尔(nM)、优选至少约 100nM、更优选至少约 500nM。在一个实施方案中，哺乳动物血液中达到至少约 1
25 微摩尔。

所述方法还包括，通过例如检测 ErbB2 表达水平或细胞增殖水平，确定治疗功效。

为了预防目的，可给予健康哺乳动物所述组合物，或者可将所

述组合物给予需要治疗或具有至少一种与过量表达 ErbB2 的癌症有关的风险因子的哺乳动物。例如，给予有此类癌症家族史的个体所述组合物。其它易发生过量表达 ErbB2 的癌症的哺乳动物群体对本领域技术人员而言是显而易见的。

5 本领域的技术人员可用本文所提供的方法及本领域的常识，确定治疗过量表达 ErbB2 的癌症或降低过量表达 ErbB2 的癌症风险的有效量。可给予黄烷醇和/或相关低聚体的量为约 50mg/天至约 1000mg/天、优选约 100-150mg/天至约 900mg/天、最优选约 300mg/天至约 500mg/天。然而，也可用高于上述量的用量。

10 治疗性/预防性给药可作为治疗方案持续给予，即给予一段有效时期，例如，每日一次、每月一次、每月两次、每年两次、每年一次、或其它方案，正如熟练医师所确定的必需时间一样。给药可持续至少所需要的一段时间，以降低 ErbB2 过量表达而达到 ErbB2 表达的治疗相应水平。优选组合物按每日一次、最优选每日两次或三次给予，例如早、晚各一次以维持哺乳动物体内有效化合物的水平。为了达到最有益的效果，可给予所述组合物至少约 30 天至约 60 天。可定期重复这些方案。

在下述非限制性实施例中，对本发明作进一步的描述。

20 **实施例**

实施例 1: 黄烷醇/原矢车菊素的检测

25 原矢车菊素定量测定方法如下：用市售(-)-表儿茶素，以及用 Hammerstone, J.F.等, *J. Ag. Food Chem.*; 1999; 47 (10) 490-496; Lazarus, S.A.等, *J. Ag. Food Chem.*; 1999; 47 (9); 3693-3701 和 Adamson, G.E.等, *J. Ag. Food Chem.*; 1999; 47 (10) 4184-4188 中所述方法得到的纯化二聚体至十聚体，制备复合标准物。用前面引用的 Adamson 参考文献中所述的正相 HPLC 方法，对用这些化合物的标准贮液进行分析，在激发波长和发射波长分别为 276nm 和 316nm 下进行荧光检测。

将峰值分组，面积之和包括任一类低聚体中所有异构体的基值，运用二次曲线拟合绘制标准曲线。单体和低级低聚体几乎呈线性图，与以前使用线性回归制成的基于单体的标准曲线和基于二聚体的标准曲线相符。

- 5 然后，可用这些校准曲线计算按下述方法制备的样品中的原矢车菊素水平：首先，用三次己烷提取液(各 45ml)使可可或巧克力样品(约 8 克)脱脂。其次，用 5ml 丙酮/水/乙酸混合物(70:29.5:0.5 (体积/体积))抽提 1 克脱脂材料。然后，通过将样品的 HPLC 数据与上述所得校准曲线(使用纯化低聚体)进行比较，求出脱脂材料中原矢车菊素的量。用公职分析化学工作者协会(Association of Official Analytical Chemists (AOAC 法定分析法(Official Method)) 920.177)标准化的方法，求出样品(巧克力用 1 克样品量，或巧克力浆料用 1.5 克样品量)中脂肪的百分比。然后，计算原样(含脂肪)中原矢车菊素水平的总量。在各个样品过柱前进行校正，防止柱-柱间的差异。
- 10

15

实施例 2. 激酶概况分析表达试验(Kinase Profiling Expression Assay)

- 实施例表明，原矢车菊素负调节 ErbB2 受体激酶的表达。详述如下，用激酶概况分析表达试验得到表现，结果经定量实时聚合酶链式反应(PCR)得到证实。另外，原矢车菊素抑制人主动脉内皮细胞(HAEC)和人微切皮肤内皮细胞(HMDEC)的生长，其生长抑制部分是由 ErbB2 负调节和其后的下游活动所引起的。促分裂原活化蛋白激酶 11 (MAPK11)和 KDR 也被下调。
- 20

材料与方法

- 25 **通过制备型正相 HPLC 纯化原矢车菊素低聚体**

 将约 0.7g 半纯化的可可丙酮提取物溶于 7ml 丙酮/水/乙酸(体积比分别为 70:29.5:0.5)。在环境温度下用 5m Supelcosil LC-Si 100 Å 进行分离。将原矢车菊素进行线性梯度洗脱。通过 UV 在 280nm 下监

测低聚体的分离，收集对应于低聚体波峰间波谷的馏分。合并几个制备型分离中有相同保留时间的馏分，部分真空下旋转蒸发并冻干。单体馏分包括表儿茶素和儿茶素。表儿茶素从 Sigma 公司购买。

5 细胞处理

对于激酶概况分析实验，将不同浓度的原矢车菊素和对照(2.5-40 μ g/ml)与 75%汇合人主动脉内皮细胞(HAEC)一起，在 Medium 200 培养基(Cascade Biologics, Inc)中进行孵育，该培养基含有 10%胎牛血清，并补充了 2% (体积/体积)氢化可的松、1mg/ml 人表皮生长因子(EGF)、10ng/ml 碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、3ng/ml 和 10mg/ml 肝素。孵育持续三个不同时期，即 2 小时、8 小时和 24 小时。同时进行阳性对照和阴性对照的孵育。记录观察结果，例如细胞形态、生长和活力。

15 RNA 分离

在每个时间点，收获细胞，立即加入 1ml Trisol 试剂(Invitrogen, Carlsbad, CA)使细胞裂解，按照制造商说明书，分离 RNA，并在-80 $^{\circ}$ C 下冷冻。按照说明书，用 Superscript II RT (Invitrogen, Carlsbad, CA)将 5 μ g RNA 进行反转录，得到 cDNA。根据下述方法，用 1 μ l cDNA 进行 PCR。

如果实验所用细胞受试剂毒性危害，基于酪氨酸激酶 PCR 表达的实验结果可能有所偏离，引起不同数量级的 mRNA 产率。因此，细胞用于实验之前，使用显微镜观察活力和孔中的任何脱落。所有剂量处理及所有时间点上，细胞的存活率>90%，并粘附在孔上。

25

激酶概况分析

激酶概况分析试验由 Robinson 及同事(Robinson 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:5958, 1996 和 Kung 等, J. Biomed Sci 5:74, 1998)

创建, 稍加修改后用于本文。因此, 用得自位于激酶催化域中保守基序 DFG 和 DVW 的简并引物混合物, 扩增各种酪氨酸激酶 cDNA 转录物(表 1)。

5

表 1

RAGE 引物—有义		
引物	序列	序列标识号
5' TYKI-14	CCAGGTCACCAARRTWGGNGAYTTYGG	SEQ ID NO. 1
5' TYKI-15	CCAGGTCACCAARRTIDCNGAYTTYGG	SEQ ID NO. 2
5' TYKI-16	CCAGGTCACCAARRTTDCNGAYTTYGG	SEQ ID NO. 3
5' TYKI-17	CCAGGTCACCAARRTIWGYGAYTTYGG	SEQ ID NO. 4
5' TYKI-18	CCAGGTCACCAARRTTGYGGAYTTYGG	SEQ ID NO. 5
RAGE 引物—反义		
TYKI-A3	CACAGGTTACCRHANGMCCAAACRTC	SEQ ID NO. 6
TYKI-C3	CACAGGTTACCRHANGMCCACACRTC	SEQ ID NO. 7
TYKI-G3	CACAGGTTACCRHANGMCCAGACRTC	SEQ ID NO. 8
TYKI-T3	CACAGGTTACCRHANGMCCATACRTC	SEQ ID NO. 9
TYKI-YAG3	CACAGGTTACCRHARCTCCAYACRTC	SEQ ID NO. 10
TYKI-RAG3	CACAGGTTACCRHARCTCCARACRTC	SEQ ID NO. 11
TYKI-AT3	CACAGGTTACCRAACATCCAACACRTC	SEQ ID NO. 12

因此, 编码氨基酸序列 K [V/I][S/C/G] DFG [SEQ ID NO. 13]的 5' (有义)引物用 5'-AAR RTT DCN GAY TTY GG [SEQ ID NO. 14]表示。编码氨基酸序列 DVW [S/A][F/Y] [SEQ ID NO. 15]的 3' (反义)引物用 5'-RHA IGM CCA IAC RTC [SEQ ID NO. 16]表示。上述序列所示的混合碱基表示如下: (1) N=A+C+T+G; (2) D=A+T+G; (3) H=A+T+C; (4) R=A+G; (5) Y=C+T; (6) M=A+C; 和(7) I=脱氧肌苷。T4 多核苷酸激酶(Invitrogen, Carlsbad, CA)催化下, 5'引物用 $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]$ -ATP (NEN Life Science Products, Boston, MA)标记。用 T4 多核苷酸激酶(Invitrogen, Carlsbad, CA), 5'引物用 P^{33} 进行末端标记。50 μl PCR 反应物中含有 5 μl 10x PCR 缓冲液(Perkin Elmer, Boston, MA)、2 μl

MgCl₂ 溶液、1μl 10mM dNTP、5μl P³³ 标记的 5'引物、1μl 3'引物、1μl 样品 cDNA 和 1μl TaqGold 聚合酶(Perkin Elmer, Boston, MA)。按下述方法，用低严格性要素促使简并引物结合到激酶靶上，进行 PCR。按下述过程进行：94℃10 分钟一轮循环，随后 94℃1 分钟、45℃1.5 分钟和 72℃15 秒钟五轮循环。随后用高严格性 PCR 要素，按下述过程完成激酶靶的扩增：94℃1 分钟，56℃1.5 分钟和 72℃20 秒钟，加上 2 秒钟/循环，进行另外的 23 轮循环。

PCR 扩增产物用 2.4%琼脂糖凝胶(Nusieve GTG 和琼脂糖 LE 之比为 3:1; BMA, Rockland, ME)进行电泳。从凝胶中切下 153-177 bp 条带，DNA 用 QIAEX II®凝胶提取试剂盒(QIAGEN, Valencia, CA)抽提。通过液体闪烁计数测出洗脱 DNA 的活性，用无核酸酶的 H₂O 稀释，使每个样品标准化，达到 20,000-cpm/μl。

用限制酶(New England Biolabs, Beverly, MA)消化各样品中等量的放射性 DNA，之后，将消化产物在 7%丙烯酰胺凝胶(10:1 丙烯酰胺/双丙烯酰胺; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)上进行分离。将凝胶干燥，并进行放射自显影。

对于每种市售酶，可得到超过 100 种酪氨酸激酶经计算机处理的详细的限制性酶切消化图谱。因此，通过检查放射自显影图像，对于每次消化，都可绘出差异表达的激酶条带图谱。根据各凝胶上电泳的标准大小标记物，评价各差异表达条带的大小。当在放射自显影图中观察到差异表达消化条带时，为了获得重现性，重复进行消化。数个激酶具有一个以上的酶限制位点，一旦存在，则用于证明激酶鉴定的正确性。

25 定量实时 PCR

确定某些激酶受原矢车菊素影响后，用 GenAmp 5700 序列检测系统(GenAmp 570 Sequence Detection System (PE Biosystems, Foster City, CA))进行定量实时 PCR，以证实激酶鉴定的正确性。

简而言之，用引物表达软件(Prime Express software (PE Biosystems, Foster City, CA))设计各激酶的最佳 PCR 引物。对于 ErbB2, 引物为: 正向引物 5'-AGGGAAAACACATCCCCCAA [SEQ ID NO. 17]和反向引物 5'-TTGGCAATCTGCATACACCAG [SEQ ID NO. 18]。对于 KDR, 引物为: 正向引物 5'-CTTCCAAGTGGCTAAGGGCA [SEQ ID NO. 19]和反向引物 5'-GGCGAGCATCTCCTTTTCTG [SEQ ID NO. 20]。对于 MAPK11, 引物为: 正向引物 5'-ACGCCCGGACATATATCC [SEQ ID NO. 21]和反向引物 5'-GTCCAGCACCAGCATCCT [SEQ ID NO. 22]。对于用作标准物的持家基因、肌动蛋白或 GAPDH 的引物, 可向 PE 公司(Perkin Elmer, Boston, MA)购买。

用 SYBR Green technology (S.A. Bustin, Quantification of mRNA Using Real-time Reverse Transcription PCR (RT-PCR): Trends and Problems (用实时反转录 PCR (RT-PCR)对 mRNA 进行定量测定: 趋势和问题) J. Mol. Endocrinol. 29 (2002), 第 23-39 页), 进行 PCR。PCR 反应重复进行了三次。每 50 μ l PCR 反应物中含有 5 μ l 最佳稀释的 cDNA 样品、最佳正向引物和最佳反向引物各 3 μ l、5 μ l 10X SYBR PCR 缓冲液、4 μ l dNTP 混合物(2.5mM)、6 μ l 25 mM MgCl₂、0.25 μ l AmpliTaq Gold 和 23.75 μ l H₂O。根据预制的对照样品, 绘出靶基因和持家基因的标准曲线。根据标准曲线, 测出靶基因的相对浓度, 并经标准化, 调整到持家基因的量。

细胞增殖

按照文献方法(Battista PJ, Bowen HJ, & Gorfien SF (1994), A serum-free medium for the culture of human umbilical vein endothelial cells (用于人脐静脉内皮细胞培养的无血清培养基), Focus 17:10-13), 将 HAEC (2.5x10⁴ 细胞/15mm 孔)与补充了 EGF 和 FGF (10ng/ml)、含或不含 VEGF (10ng/ml)的人内皮-无血清培养基 200 (Human Endothelial-Serum Free Medium 200 (Cascade Biologics Inc., Portland,

OR))一起进行培养, 评价细胞增殖。内皮细胞用可可低聚体和对照处理 24 小时和 48 小时。这时, 细胞用 $0.6\mu\text{Ci}$ [^3H]胸苷/15mm 孔进行脉冲 12 小时, 测量掺入 DNA 的 [^3H]胸苷作为细胞增殖的指示剂 (Ferrara 等, 1991, Endocrinology 129, 896-900)。

5

免疫沉淀法和免疫印迹法

实验的目的是说明在蛋白质水平上, 可可原矢车菊素对某些受体使用的影响。可用该方法测定 ErbB2 受体。

免疫沉淀后, 为了进行 ErbB2 免疫印迹分析, 细胞用冰预冷的含有 1mM Na_3VO_4 的裂解缓冲液 [150mM NaCl 、 10mM Tris-HCl (pH 7.4)、 1mM EDTA 、 0.5% NP40 和 1% Triton X-100] 裂解。对于每次处理, 通过与 A 蛋白/G 蛋白-琼脂糖凝胶珠 (Sepharose beads) 混合物在 4°C 孵育 1 小时, 预纯化 (preclear) 等量蛋白质 ($100\mu\text{g}$)。低速离心除去琼脂糖凝胶珠后, 将上清液移到干净试管中。在 $2\mu\text{g/ml}$ 特异性抗体存在下, 裂解物上清液在裂解缓冲液中于 4°C 孵育过夜。将裂解物与 $25\mu\text{l}$ A 蛋白-琼脂糖凝胶珠 (50% 悬浮液) 一起于 4°C 再孵育 2 小时, 收集免疫复合物。然后免疫沉淀物用裂解缓冲液洗涤三次, 用含 1mM Na_3VO_4 的 PBS (pH 7.4) 洗涤一次。蛋白质用两倍浓缩的 Laemmli 样品缓冲液 [125mM Tris-HCl (pH 6.8)、 20% 甘油、 4% SDS、 10% β -巯基乙醇和 0.00125% 溴酚蓝] 抽提, 煮沸 4 分钟, 经 7.5% SDS-PAGE 分离, 用蛋白质印迹法进行分析。

10

15

20

体外激酶试验

实验的目的是测定刺激细胞前后, 所分离激酶的磷酸化水平。

使汇合 HAEC 血清饥饿 24 小时, 然后细胞用 VEGF 或 1.0mM H_2O_2 刺激并裂解。经预纯化的细胞裂解物 ($450\mu\text{g}$ 蛋白质) 与抗 VEGFR-1 抗体和抗 VEGFR-2 抗体孵育过夜, 所得免疫复合物用 A 蛋白-琼脂糖凝胶珠收集并洗涤。将洗涤珠在 $15\mu\text{l}$ 含有特定儿茶素的

25

激酶缓冲液[100mM Tris-HCl (pH 7.0)、0.2% β -巯基乙醇、20mM $MgCl_2$ 和 0.2mM Na_3VO_4]中在冰上孵育 1 小时。加入 $5\mu Ci$ [^{32}P] ATP (ICN Biochemicals, Irvine, CA)使终体积为 $20\mu l$, 开始激酶反应, 在 $30^\circ C$ 下孵育 15 分钟。加入 Laemmli 样品缓冲液终止反应, 蛋白质在 7.5% SDS 凝胶上进行电泳分离。所得凝胶用 0.1% (重量/体积)考马斯蓝 R-250 (Coomassie Blue R-250)/30%甲醇和 10%乙酸溶液染色 30 分钟, 在不
5 含考马斯蓝染料的相同溶液中脱色。然后, 将凝胶在该溶液中彻底清洗, 并对富士 X-光(Fuji X-ray)胶片曝光。

10 原矢车菊素对人微切皮肤内皮细胞的功效

ErbB2 是毛细血管细胞生长成为新组织的重要受体。与主动脉内皮细胞相比, 这些微血管细胞表达许多不同的蛋白质, 这些微血管细胞是更为典型地参与肿瘤血管生成、炎症和伤口愈合的细胞。因此, 用经历 $1mM H_2O_2$ 所诱导的血管生成(即生长)刺激物的人微切
15 皮肤内皮细胞(HMDEC), 进行激酶表达概况分析、实时 PCR 和细胞增殖实验。这些细胞经受刺激 30 分钟, 4 小时后收获。采用上述用于 HAEC 的方法进行实验(但将 HAEC 培养 2 小时、8 小时和 24 小时, 不使用 H_2O_2)。使用 β 肌动蛋白表达使 PCR 表达结果归一化。

这些细胞还用于测试磷酸化的变化。因此, 用 $50\mu l/ml$ 五聚体预处理 HMDEC(48 小时)和对照 HMDEC 的蛋白质裂解物, 制备蛋白质
20 印迹。按照上述“免疫沉淀法和免疫印迹法”中的方法制备裂解物。该印迹用重组 HRP-抗磷酸酪氨酸(RC20H)抗体进行探测。通过对抗微管蛋白等量染色, 使蛋白质样品标准化。另外, 用 $50\mu g/ml$ 五聚体预处理 HMDEC 和对照 HMDEC 的蛋白裂解物, 制备蛋白质印迹。
25 细胞暴露在 $1mM H_2O_2$ 中 30 分钟, 20 分钟后收获。该印迹用重组 HRP-抗磷酸酪氨酸(PY20)抗体进行探测。

结果

为了鉴定最大量差异表达的激酶，本项研究中使用了 30 种不同限制酶为一组的实验，提供鉴定 150 种以上不同激酶的方法。用从可可中分离纯化的原矢车菊素单体、二聚体、五聚体和八聚体处理后，大多数酪氨酸激酶的表达保持不变。例如，用 RsaI 进行消化时，
5 激酶 Trk、Gsk-3b 和 Slk 似乎不受原矢车菊素处理的影响。这些未受影响的条带作为内部对照验证了消化效率及不同激酶间的相对表达水平。

表达中最多、最一致和最显著的差异发生在 8 小时时间点上。例如，在 2 小时时间点，用 10 μ g/ml 原矢车菊素剂量处理，观察到共
10 8 条差异表达条带中重现率为 6/8 (75%)。在 8 小时时间点，观察到 20 条差异表达条带的重现率为 18/20 (90%)。将对照处理与五聚体处理和八聚体相比较，观察到 90% 的差异表达条带。选择在不同剂量和时间点上再现差异表达的激酶用于进一步的研究。对 ErbB2、MAPK11 和 KDR 激酶进行了更为详细的研究。

15 原矢车菊素，尤其是五聚体和八聚体，负调节 ErbB2 激酶的表达，如限制酶 RsaI 消化凝胶所示(图 1)。当激酶 PCR 产物用限制酶 Bsp1286I 消化时，观察到同样模式的负调节；ErbB2 包括该限制位点。当从不同个体中分离主动脉内皮细胞时，观察到相同的负调节。

用定量实时 PCR 和 ErbB2-特异性引物证实了上述结果。观察到
20 表达显著降低，尤其在使用 20 μ g/ml 五聚体和八聚体的剂量时(8 小时)(图 2)。

由于 ErbB2 可能参与 VEGF (血管内皮生长因子)和 MAPK (促分裂原活化蛋白激酶)系统的表达，故进行了进一步的实时 PCR 实验，该实验表明 VEGFR-2/KDR (血管内皮生长因子受体 2/激酶插入域受体)，即 VEGF 和 MAPK11/p38 β 2 激酶的主要促有丝分裂激酶受体的
25 表达降低(图 5)。

增殖实验(用于确定原矢车菊素是否改变 HAEC 的生长特性)表明，细胞增殖受到抑制(图 3)。对于图 3，特别是五聚体处理降低细

胞增殖, 而且在加入 VEGF (10ng/ml)后, 细胞无法拯救。

在使用微切皮肤上皮细胞的实验中, 在限制酶 RsaI (图 4A)和限制酶 Bsp 1286I (图 4B)消化时, 用单体和五聚体处理负调节 ErbB2 表达。Met 和 VEGFR-3 表示不受原矢车菊素影响的酪氨酸激酶。经严密检查, VEGFR-3 和 Met 经可可处理的样品条带的强度似乎与对照大致相同。相反, 五聚体样品中的 ErbB2 条带被负调节。定量实时 PCR 实验证实了这些观察结果(图 5, 表示 20 μ g/ml 五聚体预处理 HMDEC 和对照 HMDEC)。对于图 5, 除了 ErbB2 表达降低外, KDR/VEGFR-2 和 MAPK11 激酶表达也降低。

10 为了确定原矢车菊素是否影响酪氨酸激酶磷酸化, HMDEC 裂解物的蛋白质印迹用 RC20 H 抗体进行探测。观察到对照(C)和五聚体处理细胞(T)间酪氨酸磷酸化有轻微差异(图 6)。

另外, 用 50 μ g/ml 五聚体预处理 HMDEC 和对照 HMDEC 的蛋白质裂解物得到蛋白质印迹。对于图 6 中的蛋白质印迹, 细胞暴露在 1mM H₂O₂ 中 30 分钟, 20 分钟中后收获。用重组 HRP-抗磷酸酪氨酸(PY20)抗体探测印迹。对于图 7, 箭头指示对照(C)和原矢车菊素处理细胞(T)间酪氨酸磷酸化有变化。原矢车菊素处理的细胞在分子量 129 kDa 附近酪氨酸磷酸化减少。

15 图 8 表示不同浓度五聚体和八聚体处理的 HMDEC 增殖。细胞暴露在 1mM H₂O₂ (促生长刺激物)中 30 分钟, 48 小时后收获。对于图 8, 五聚体和八聚体均显示剂量依赖性生长抑制。

25 大多数类型的肿瘤生长依赖于血管生成, 血管生成过程的中断通常引起抑制。可通过活化血管内皮生长因子(VEGF)受体信号以及表皮生长因子(Erb)受体信号而产生血管生成过程。ErbB 酪氨酸激酶受体及其配体之间的相互作用, 通过对自分泌环和旁分泌环的调节, 在血管生成中发挥重要作用。据报道, ErbB2 受体的过量表达会导致 VEGF 基础水平被诱导并暴露给调蛋白即 ErbB3 的配体和 ErbB4 的

配体，进一步促进 VEGF 分泌。因此，降低 ErbB2 水平可通过某种机制减缓生长，还可通过除去与活化 ErbB3 和 ErbB4 形成二聚体的可用的 ErbB2，抑制 VEGF 产生的功效。由于 ErbB2 和 VEGF 都可能激活 MAPK 激酶系统，上述原矢车菊素负调节 MAPK11 和 KDR (VEGF 受体)的观察结果，与 ErbB2 负调节以及进而对生长抑制的影响是一致的。因此，原矢车菊素对内皮血管生成和肿瘤血管生成都可以产生影响。

图 1

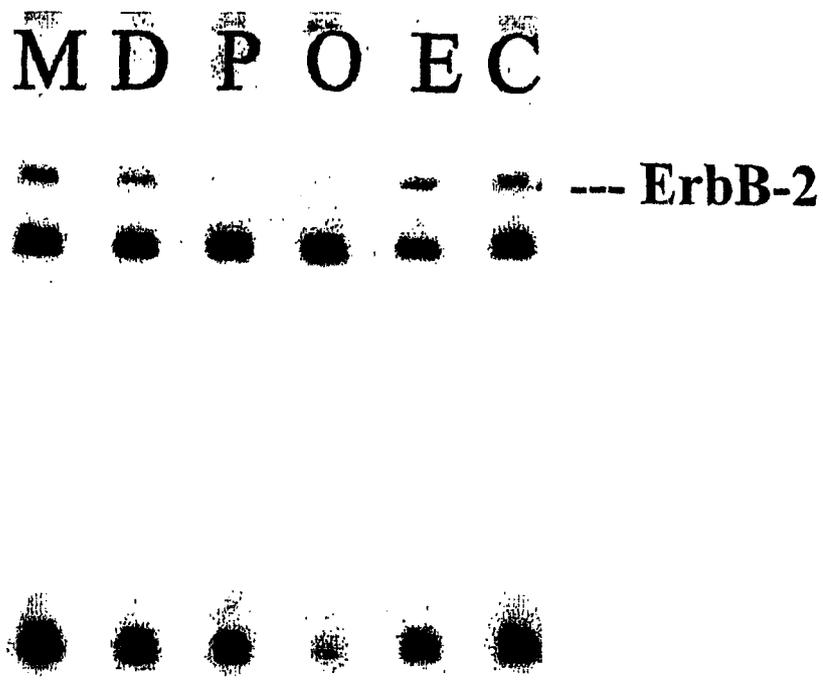


图 2
ErbB-2 表达(表示为%表达)

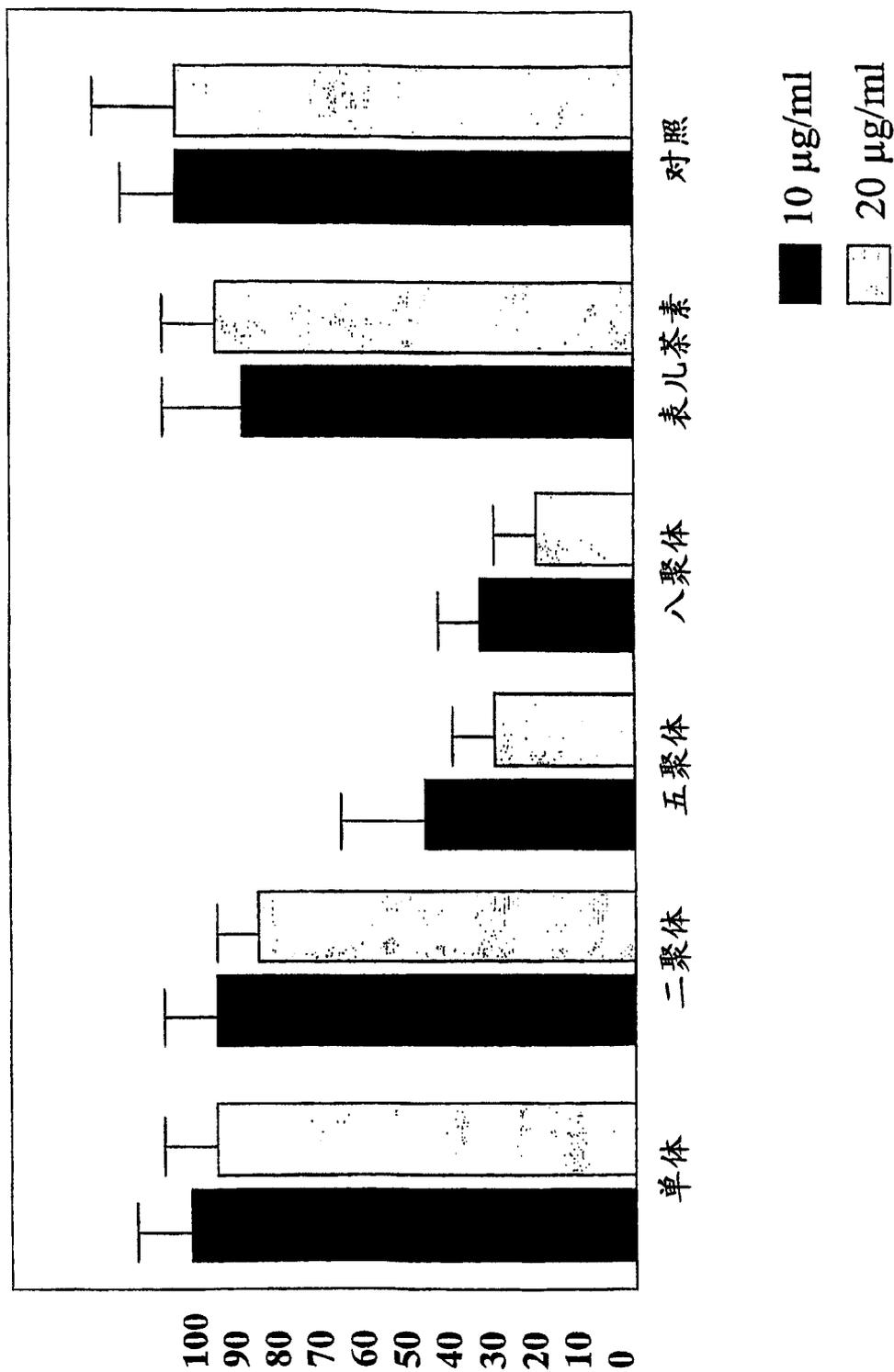
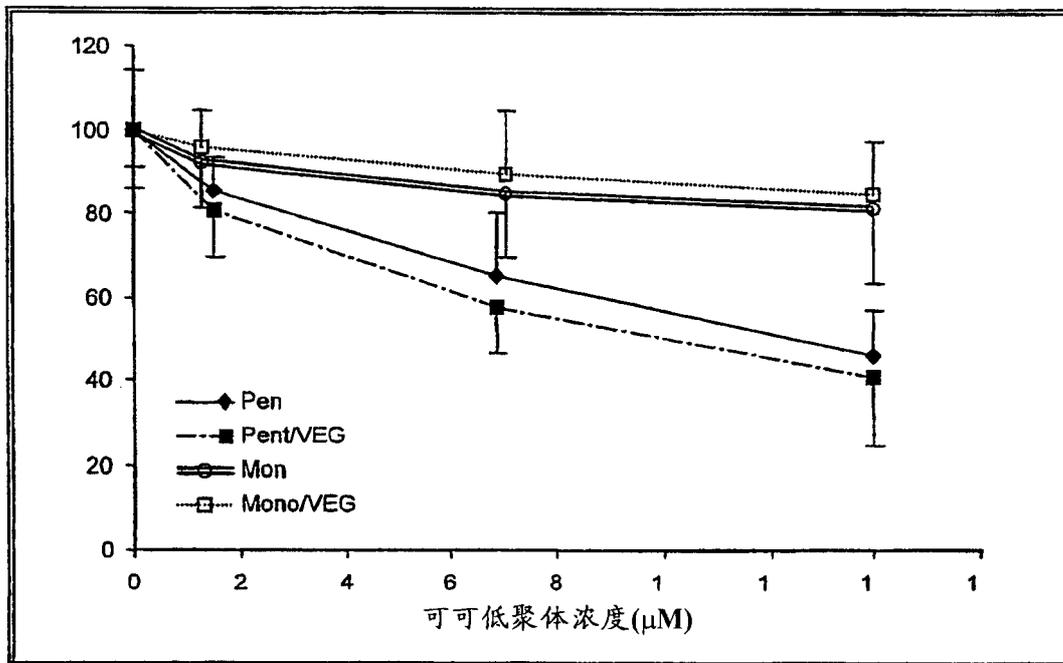
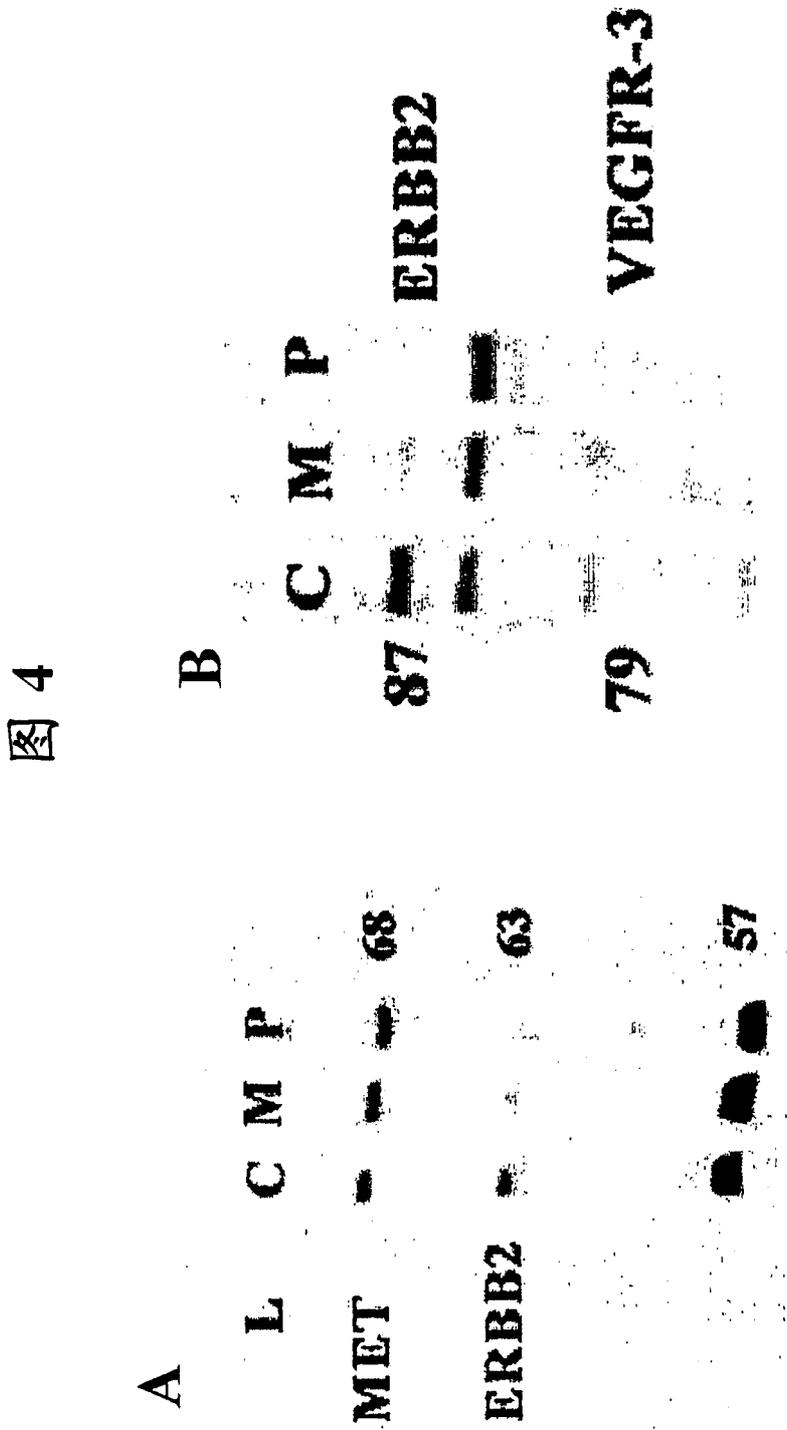


图 3





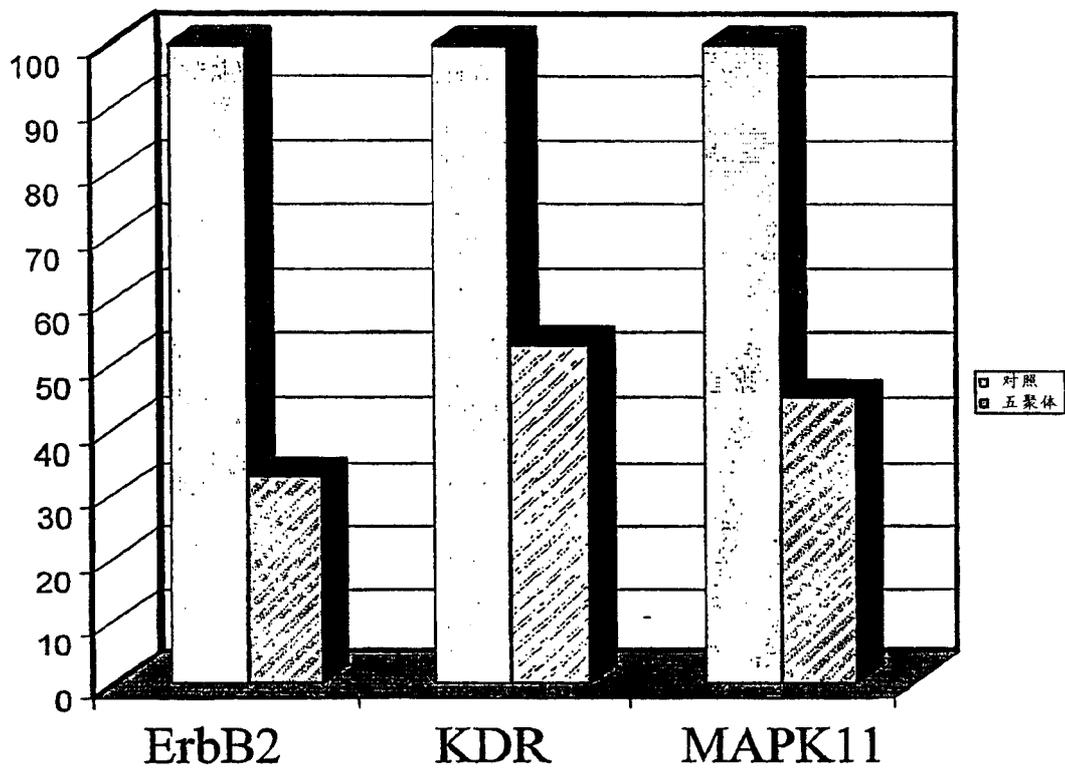


图 5

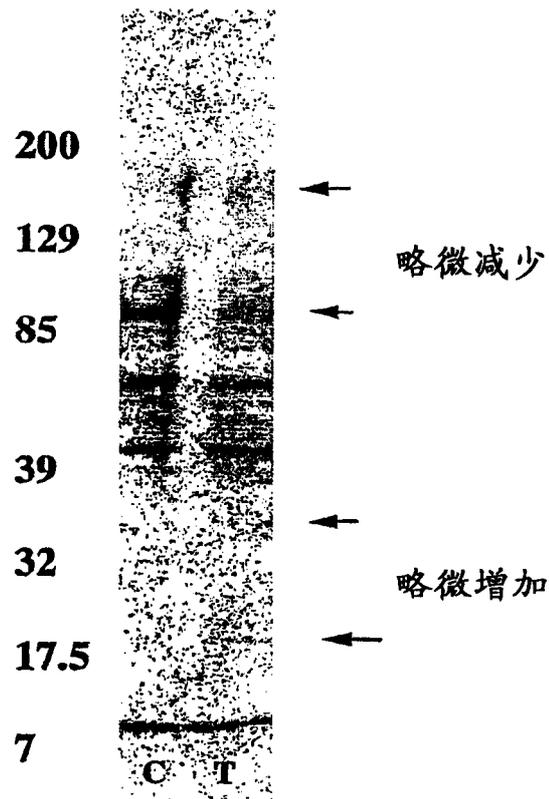


图 6

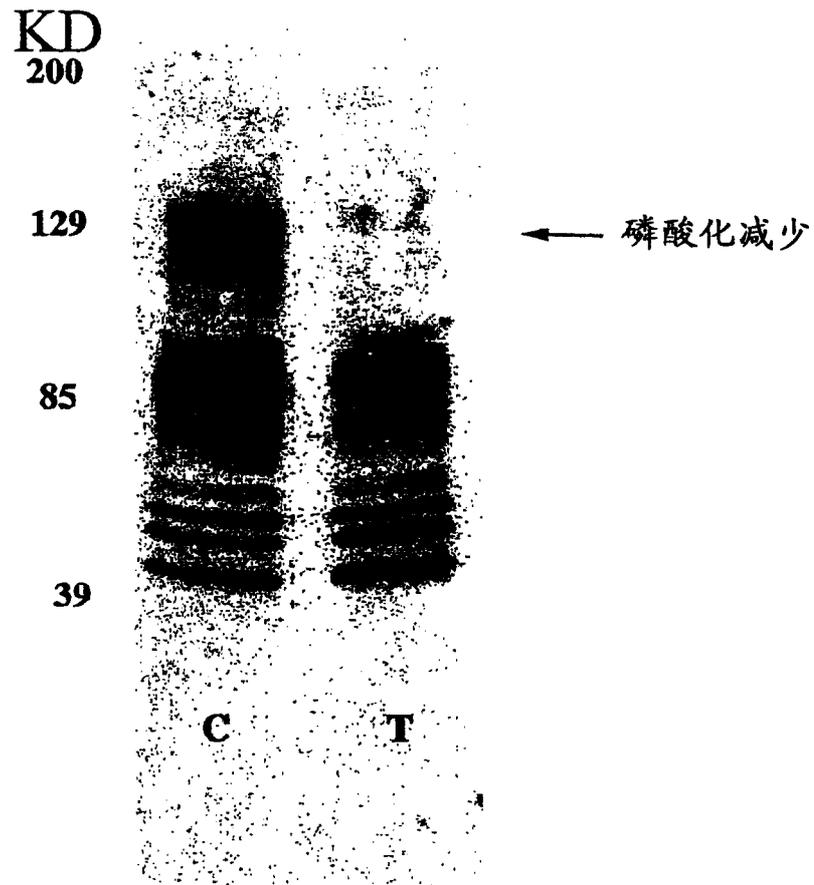


图 7

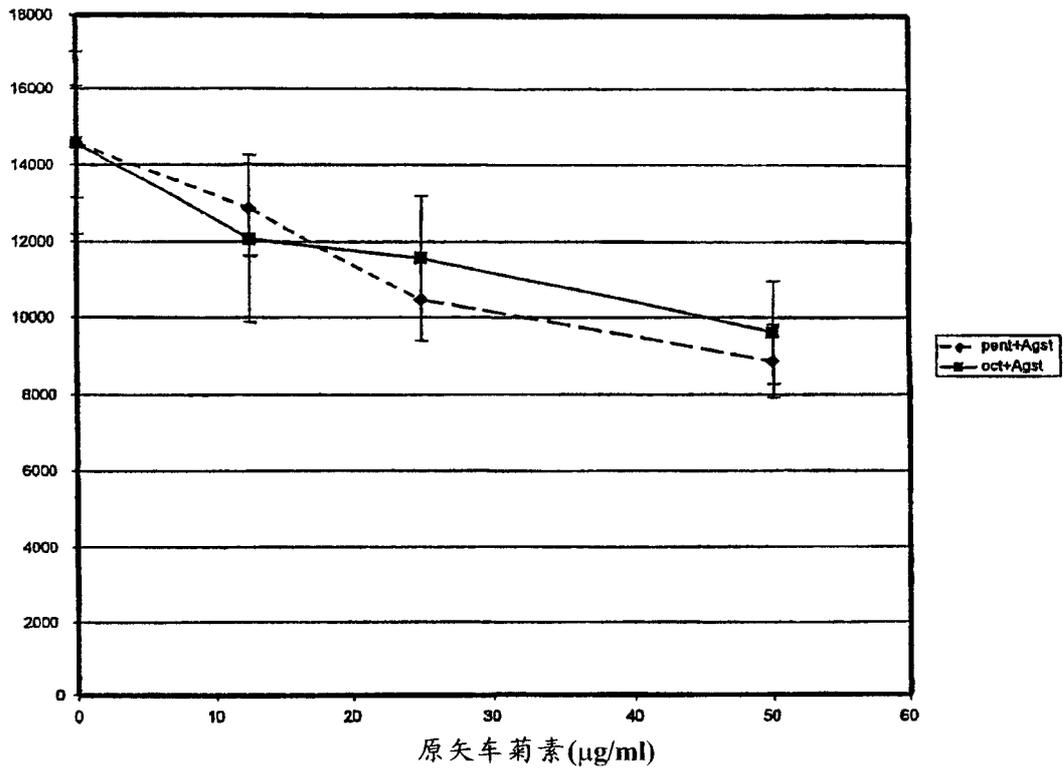


图 8