

[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 200410078967.8

[51] Int. Cl.

C12P 19/40 (2006.01)

C12R 1/91 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

[45] 授权公告日 2006 年 12 月 27 日

[11] 授权公告号 CN 1292073C

[22] 申请日 1998.6.2

[21] 申请号 200410078967.8

分案原申请号 98806532.0

[30] 优先权

[32] 1997.6.3 [33] JP [31] 159321/1997

[73] 专利权人 森庸厚

地址 日本东京都

共同专利权人 森崇英

伊藤忠高科技化工株式会社

[72] 发明人 森庸厚 郭卯戌 森悦子

审查员 朱洪杰

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 陈 昕

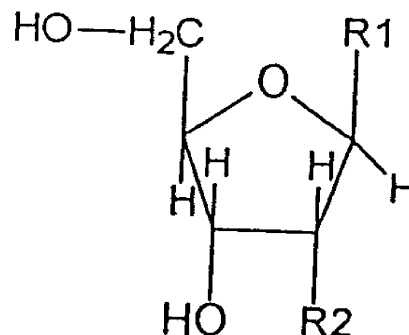
权利要求书 1 页 说明书 34 页 附图 24 页

[54] 发明名称

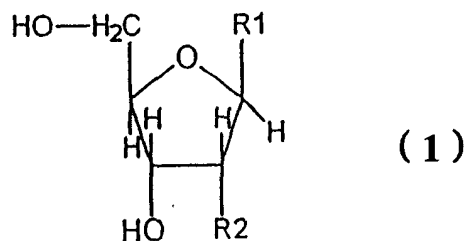
天然抗肿瘤性或抗病毒性物质及其用途

[57] 摘要

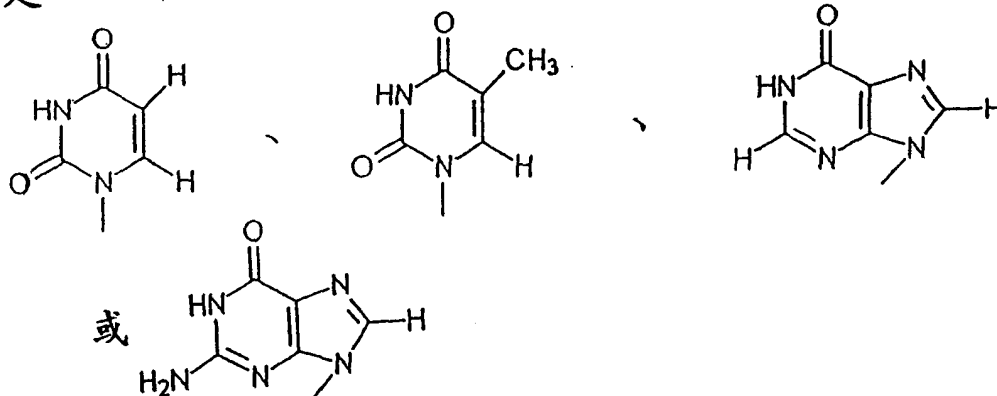
本发明提供对现有的抗肿瘤制剂和抗病毒制剂不能充分发挥效果的癌和病毒具有效果，对各种耐药性癌具有制癌和抗病毒作用的，对人正常细胞没有伤害的副作用小的物质。本发明涉及到用式(1)，(式中的 R1 是用特定的式表示的核酸碱基，R2 代表氢原子、羟基或甲氧基)表示的抗肿瘤性或抗病毒性物质或其医药上允许的盐。本发明也涉及到式(1)的物质或医药上允许的盐的制备方法，该方法是培养具有产生式(1)的化合物能力的 NS 细胞，从其培养液中提取式(1)的化合物，根据需要作成医药上允许的盐。另外本发明也公开了以上述化合物为有效成分的医药，以及 CD57 阳性、HLA-DR 强阳性的人型自然抑制细胞。



1. 下式(1)表示的抗肿瘤性或抗病毒性物质或其医药上允许的盐的制造方法,其特征是:培养具有产生式(1)的化合物能力的取自人胎盘蜕膜细胞,从其培养液中提取式(1)的化合物,根据需要作成医药上允许的盐,



式中的 R1 是



R2 代表氢原子、羟基或甲氧基。

2. 保藏号为 FERM BP 6350 的 CD57 阳性、HLA.DR 强阳性的人型自然抑制细胞系。

天然抗肿瘤性或抗病毒性物质及其用途

本申请是申请号 98806532.0、申请日 1998 年 6 月 2 日、发明名称为“天然抗肿瘤性或抗病毒性物质及其用途”的分案申请。

本发明涉及到在医药领域有用的、抑制肿瘤细胞和病毒增殖的、发挥抗肿瘤效果以及抗病毒效果的来自天然的新的化合物，以及该化合物的制造方法、用途和产生它的细胞。

更详细地说本发明涉及到从取自人胎盘蜕膜的细胞株，代表性的是从 TTK-1 细胞进一步克隆的 CD57 阳性、HLA-DR 强阳性的人型自然抑制 (NS) 细胞 (CD57 + HLA-DRbrightNS 细胞株 (TTK-1)) (以下略记为[NS 细胞]) 的培养产物、其制造方法、其用途以及该 NS 细胞。

在癌化疗领域中，人们尝试着将博莱霉素 (Bleomycin) 以及阿霉素 (Adriamycin) 等许多微生物的代谢产物应用于临床，而实际上临床上正在使用这些代谢物。

然而，这些代谢物对各种肿瘤的疗效未必充分，随着肿瘤细胞对临床上这些药剂的耐药性现象被弄清楚，它们临床上的应用性正变得复杂化[参照第 47 次日本癌学会总会记事，12 页～15 页 (1988 年)]。

另外，人们已经弄清楚母系对胎儿的免疫反应最初是在蜕膜组织被调节的，属于带有 NK 标记的大颗粒淋巴细胞 (LGL) 的大群细胞集积于包括初期妊娠的人在内的哺乳动物的蜕膜层中 (森等，哺乳纲植入法中的免疫分子机制.内分泌，J.41 (增刊)：S17 [Mori,T et.al, Immunmolecular mechanisms in mammalian implantation. Endocrine.J.41 (Suppl)：S17.])。

由于小鼠中的 NS 细胞含有 WGA 凝集素的受体，人体中的 NS 细胞含有 CD57 的糖链标记，所以属于 LGL 的 NS 细胞是与免疫 T 细胞、B 细胞、巨噬细胞不同的细胞群。

有报道说由于 NS 具有能强烈抑制因 MHC-非限制性分裂素引起的淋巴细胞的分裂反应和混合淋巴细胞反应等淋巴细胞分裂反应的功能，所以 NS 细胞还有抑制癌细胞分裂的功能 (Tilden 等，免疫学杂志 130

卷, 1171 页)。

然而有关担任 NS 细胞的免疫抑制作用、癌细胞的增殖抑制作用的物质, 虽然有人指出是 TGF- β 族的蛋白质和分子量 1 万以下的核糖醇那样的物质 (Clark 等人, 免疫学杂志, 144 卷, 3008 页 (Clark et.al., J. Immunol) 以及 (Mortari 等人, 免疫学杂志, 144 卷, 3037 页 (Mortari et.al., J. Immunol)), 但现在正确的结构和功能完全不清楚, 人们一直期待着给予阐明。

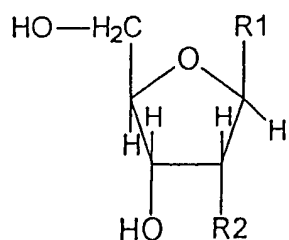
作为与本发明化合物化学构造近似的已知的具有抗肿瘤和抗病毒效果的化合物有氟尿嘧啶 (Fluorouracil) (美国专利第 2802005 号和 2885396 号)、脱氧氟尿苷 (Doxifluridine) (美国专利第 4071680 号)、喃氟啉 (Tegafur) (英国专利第 1168391 号)、叠氮胸苷 (zidovudine; AZT) (德国专利第 3608606 号)、双脱氧腺苷 (Didanosine; ddI) (欧州专利公开第 206497 号公报) 等。

虽然这些核酸系抗癌制剂、抗病毒制剂不只限于用于预料有效果的肿瘤细胞和病毒类, 对人的正常细胞也有作用, 但存在的细胞毒性高的副作用正成为社会化问题。

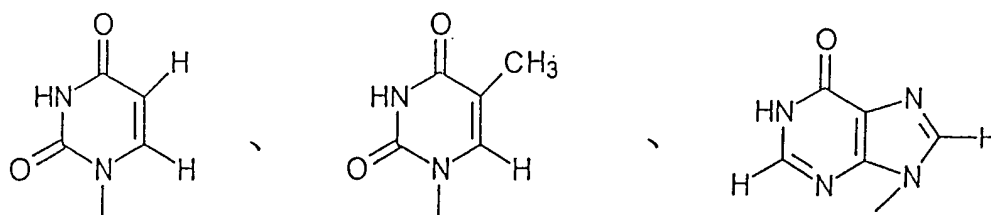
本发明是借鉴含有上述以前技术的课题后完成的发明, 其目的在于从人细胞代谢产物中探索对已有抗肿瘤制剂和抗病毒制剂不能充分发挥效果的癌类以及病毒具有效果的物质, 提供对各种耐药性癌具有抗癌作用和抗病毒作用, 对人正常细胞没有伤害, 副作用低的物质。

本发明人为达到上述目的, 进行了锐意研究, 结果发现了 NS 细胞株诱导 K562、Molt4、U937、BeWo、GCIY 人癌细胞程序死亡, 抑制癌细胞的分裂反应, 进一步发现该细胞株分泌的诱导癌细胞程序化死亡的核酸系物质 (命名为 AIF), 并进行了分离、纯化和确定其结构。我们认为这些物质作为按照全新的设想作成副作用小的天然型抗癌制剂、抗病毒制剂以及其它药品开发应用是有可能。

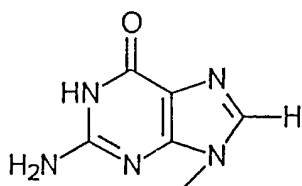
本发明人通过培养取自具有产生式 (1) 化合物能力的人胎盘蜕膜的 NS 细胞, 从其培养液 (上清和细胞, 特别是上清) 提取式 (1) 化合物, 根据需要作成医药上允许的盐, 得到式 (1)



(式中 R1 是用



或



表示的基团, R2 代表氢原子、羟基或甲氧基)表示的化合物或其医药上允许的盐,发现式(1)表示的化合物或其医药上允许的盐具有诱导人癌细胞程序死亡,抑制癌细胞增殖反应,具有抗肿瘤效果以及抗病毒效果,直至本发明完成。

即本发明涉及到上述式(1)(式中的 R1 和 R2 与上述定义相同)表示的抗肿瘤性或抗病毒性物质或医药上允许的盐、其制造方法、以上述式(1)表示的抗肿瘤性或抗病毒性物质或医药上允许的盐作为有效成分的医药,上述化合物的医药制造和治疗上的使用,以及取自 CD57 阳性、HLA-DR 强阳性的来自人胎盘蜕膜的 NS 细胞。

附图的简单说明

图 1 是化合物 P1 的 NMR 图。

图 2 是化合物 P2 的 NMR 图。

图 3 是化合物 P3 的 NMR 图。

图 4 是化合物 P4 的 NMR 图。

图 5 是化合物 P5 的 NMR 图。

图 6 是化合物 P6 的 NMR 图。

图 7 给出了 AIF (P1) 的 UV 光谱、质谱和结构式。

图 8 给出了 AIF (P2) 的 UV 光谱、质谱和结构式。

图 9 给出了 AIF (P3) 的 UV 光谱、质谱和结构式。

图 10 给出了 AIF (P4) 的 UV 光谱、质谱和结构式。

图 11 给出了 AIF (P5) 的 UV 光谱、质谱和结构式。

图 12 给出了 AIF (P6) 的 UV 光谱、质谱和结构式。

图 13 是本发明的 NS 细胞株的相差显微镜照片。

图 14 (A~G) 是表示 DNA 片段化试验结果的照片。

图 15 是表示 NS 细胞与靶细胞的间接共培养结果的曲线。

图 16 (A, B) 是表示 AIF 引起的靶细胞 ^3H -胸腺嘧啶摄入抑制结果的曲线。

图 17 (A, B) 是表示由 AIF 引起的靶细胞 DNA 片段化试验结果的照片。

图 18 (A~C) 是 AIF 的 HPLC 图。

图 19 是表示 ^3H -胸腺嘧啶摄入抑制结果的曲线。

图 20 是表示由 AIF 引起的靶细胞 DNA 片段化试验结果的照片。

图 21 (A~D) 是表示由 AIF 引起的靶细胞 DNA 片段化试验结果的照片。

图 22 是表示由 AIF 对人胃癌细胞的抑制效果的曲线。

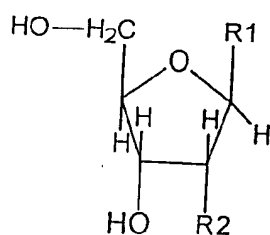
图 23 是表示由 AIF 引起的人胃组织萎缩的效果 (A~B) 以及 DNA 片段化试验结果 (C) 的照片。

图 24 是表示 AIF 对人 T 细胞白血病细胞的抑制效果的曲线。

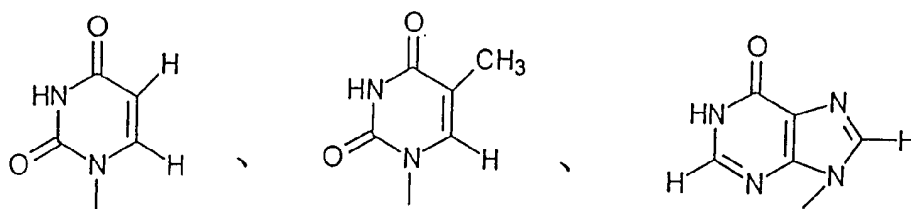
以下就本发明进行详细说明。

首先就本说明书中涉及到的各种用语以及定义进行说明。

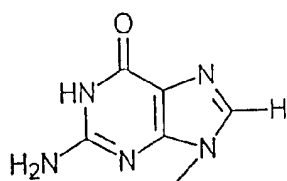
式(1)化合物是通过物理和化学的方法从 NS 细胞株的培养上清中分离、纯化得到的程序化死亡诱导因子(AIF)，是用下式(1)



(式中 R1 是用



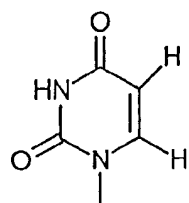
或



表示的基团，R2 代表氢原子、羟基或甲氧基)表示的化合物，这些化合物由于是通过反相高速液相色谱进行活性分级，所以被分别命名为 P1、P2、P3、P4、P5 和 P6。

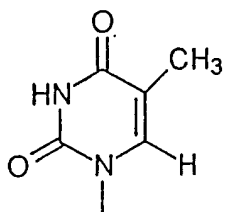
这里，所谓[P1、P2、P3、P4、P5 和 P6]，具体来说分别是分别指 2'-O-脱氧尿苷、核糖胸腺嘧啶核苷、2'-O-甲基尿苷、脱氧胸腺嘧啶核苷、2'-O-次黄苷和 2'-O-甲基鸟苷。

即在式(1)中，R1 和 R2 分别为



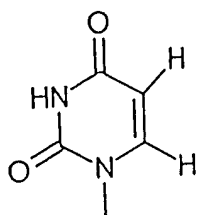
和氢原子的化合物 P1,

分别为



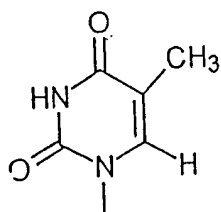
和羟基的化合物 P2,

分别为



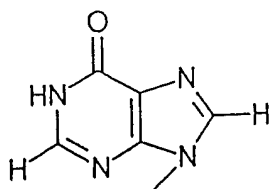
和甲氧基的化合物 P3,

分别为



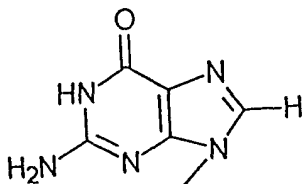
和氢原子的化合物 P4,

分别为



和甲氧基的化合物 P5,

分别为



和甲氧基的化合物 P6。

以下给出了本发明代表性化合物的理化性状。

a) P1 的理化性状

性状：无色结晶

分子式：C₉H₁₂N₂O₅

mp: 165℃

质谱：高分辨能 FAB-MS; m/z 229 [M+1]

UV 光谱：λ [H₂O (pH7.2), max, 258.5nm]

¹H-NMR 谱 (300MHz, d-三氯甲烷, δ ppm)：图 1 中给出了 P1 的 NMR 谱。

溶解性：可溶于甲醇、二甲亚砜等有机溶剂，溶于水。

酸性、中性、碱性物质的区别：碱性物质

薄层层析 (Merck 公司制造、Kieselgel60F254)

Rf 值：0.64 [展开溶剂：三氯甲烷/甲醇/水 (60: 40: 8)]

高速液相色谱

柱子：TSKgel ODS-80™ 4.6 × 150mm (东洋曹达公司制造)

流动相：于含有 0.1%三氟乙酸的水中以浓度梯度 5% /360 分钟速度增加含有 0.1%三氟乙酸的乙腈的体系。

流速：0.5ml/分

检测：UV214nm

保留时间：20 分钟

b) P2 的理化性状

性状：无色结晶

分子式：C₁₀H₁₄N₂O₆

mp: 183 ~ 185℃

质谱：高分辨能 FAB-MS; m/z 259 [M + 1]

UV 光谱：λ [H₂O (pH7) , max, 267nm]

¹H-NMR 谱 (300MHz, d-三氯甲烷, δ ppm)：图 2 中给出了 P2 的 NMR 谱。

溶解性：可溶于甲醇、二甲亚砜等有机溶剂，溶于水。

酸性、中性、碱性物质的区别：碱性物质

薄层层析 (Merck 公司制造、Kieselgel60F254)

R_f 值：0.66 [展开溶剂：三氯甲烷/甲醇/水 (60: 40: 8)]

高速液相色谱

柱子：TSKgel ODS-80™ 4.6 × 150mm (东洋曹达公司制造)

流动相：于含有 0.1%三氟乙酸的水中以浓度梯度 5% /360 分钟速度增加含有 0.1%三氟乙酸的乙腈的体系。

流速：0.5ml/分

检测：UV214nm

保留时间：29 分钟

c) P3 的理化性状

性状：无色结晶

分子式：C₁₀H₁₄N₂O₆

mp: 159℃

质谱：高分辨能 FAB-MS; m/z 259 [M + 1]

UV 光谱：λ [H₂O (pH7) , max, 263nm]

¹H-NMR 谱 (300MHz, d-三氯甲烷, δ ppm)：图 3 中给出了 P3 的 NMR 谱。

溶解性：可溶于甲醇、二甲亚砜等有机溶剂，溶于水。

酸性、中性、碱性物质的区别：碱性物质

薄层层析 (Merck 公司制造、Kieselgel60F254)

Rf 值: 0.72[展开溶剂: 三氯甲烷/甲醇/水 (60: 40: 8)]

高速液相色谱

柱子: TSKgel ODS-80™ 4.6 × 150mm (东洋曹达公司制造)

流动相: 于含有 0.1%三氟乙酸的水中以浓度梯度 5% /360 分钟速度增加含有 0.1%三氟乙酸的乙腈的体系。

流速: 0.5ml/分

检测: UV214nm

保留时间: 40 分钟

d) P4 的理化性状

性状: 无色结晶

分子式: $C_{10}H_{14}N_2O_5$

mp: 185℃

质谱: 高分辨能 FAB-MS; m/z 243 [M+ 1]

UV 光谱: λ [H_2O (pH7) , max, 267nm]

^1H -NMR 谱 (300MHz, d-三氯甲烷, δ ppm): 图 4 中给出了 P4 的 NMR 谱。

溶解性: 可溶于甲醇、二甲亚砜等有机溶剂, 溶于水。

酸性、中性、碱性物质的区别: 碱性物质

薄层层析 (Merck 公司制, Kieselgel60F254)

Rf 值: 0.69[展开溶剂: 三氯甲烷/甲醇/水 (60: 40: 8)]

高速液相色谱

柱子: TSKgel ODS-80™ 4.6 × 150mm (东洋曹达公司制造)

流动相: 于含有 0.1%三氟乙酸的水中以浓度梯度 5% /360 分钟速度增加含有 0.1%三氟乙酸的乙腈的体系。

流速: 0.5ml/分

检测: UV214nm

保留时间: 50 分钟

e) P5 的理化性状

性状: 无色结晶

分子式: $C_{11}H_{14}N_4O_5$

mp: 210 ~ 212℃

质谱: 高分辨能 FAB-MS; m/z 283 $[M+1]$

UV 光谱: λ $[H_2O (pH7), \max, 283nm]$

^1H -NMR 谱 (300MHz, d-三氯甲烷, δ ppm): 图 5 中给出了 P5 的 NMR 谱。

溶解性: 可溶于甲醇、二甲亚砜等有机溶剂, 溶于水。

酸性、中性、碱性物质的区别: 碱性物质

薄层层析 (Merck 公司制造、Kieselgel60F254)

Rf 值: 0.67 [展开溶剂: 三氯甲烷/甲醇/水 (60: 40: 8)]

高速液相色谱

柱子: TSKgel ODS-80™ 4.6 × 150mm (东洋曹达公司制造)

流动相: 于含有 0.1%三氟乙酸的水中以浓度梯度 5% /360 分钟速度增加含有 0.1%三氟乙酸的乙腈的体系。

流速: 0.5ml/分

检测: UV214nm

保留时间: 64 分钟

f) P6 的理化性状

性状: 无色结晶

分子式: $C_{11}H_{15}N_5O_5$

mp: 218 ~ 220℃

质谱: 高分辨能 FAB-MS; m/z 298 $[M+1]$

UV 光谱: λ $[H_2O (pH7), \max, pH11 \text{ 时 } 258nm, pH1 \text{ 时 } 256nm]$

^1H -NMR 谱 (300MHz, d-三氯甲烷, δ ppm): 图 6 中给出了 P6 的 NMR 谱。

溶解性: 可溶于甲醇、二甲亚砜等有机溶剂, 溶于水。

酸性、中性、碱性物质的区别: 碱性物质

薄层层析 (Merck 公司制造、Kieselgel60F254)

Rf 值: 0.59 [展开溶剂: 三氯甲烷/甲醇/水 (60: 40: 8)]

高速液相色谱

柱子: TSKgel ODS-80™ 4.6 × 150mm (东洋曹达公司制造)

流动相: 于含有 0.1%三氟乙酸的水中以浓度梯度 5% /360 分钟速度增加含有 0.1%三氟乙酸的乙腈的体系。

流速: 0.5ml/分

检测: UV214nm

保留时间: 83 分钟

以下给出了本发明细胞株的细胞学的性质。

- (1)细胞的形态: 大颗粒性淋巴细胞 (LGL)
- (2)细胞的来源: 从妊娠 7 周令的人胎盘分离的蜕膜组织细胞
- (3)继代培养: 能永久增殖
- (4)生长因子需求性: 在不含有人正常子宫内皮细胞生长因子和肝素的培养基中是能够增殖的。
- (5)细胞维持、增殖条件、增殖依赖性: 本细胞株一般是在 36 ~ 38℃、最好是在 37℃ 的温度条件下以及 pH6.5 ~ 7.5, 最好是 7.0 的条件下能良好地维持增殖。
- (6)细胞增殖能力: 如果将本细胞的 2×10^5 个细胞/ml 在上述培养条件下培养, 3 日后至少达到 5×10^5 个细胞/ml 的密度。
- (7)功能: 从没有雌激素和孕酮受体以及不分泌催乳激素可知不是蜕膜间质细胞。产生核酸系功能物质, 抑制由 MLR 和分裂素刺激引起的淋巴细胞分裂反应。
- (8)菌落形式: 在平皿上形成菌落, 但在琼脂中不能形成菌落。
- (9)冷冻保存: 于 -70℃ ~ -196℃ 下可以保存非常长的时间。
- (10)染色体的性状: 着丝点位于染色体中央部位
- (11)通过染色体分析确认: 来自人组织的细胞
- (12)染色体数: 99 ~ 100、107 ~ 108
- (13)细胞表面标记: 由 CD57 阳性、HLA - DR 强阳性看是免疫系统细胞。
- (14)维持和增殖用培养基: 于 10% FCS + RPMI - 1640 培养液或除去

脱氧胸腺嘧啶核苷的无血清培养基能良好地维持增殖。

为了得到本发明的细胞株，例如可以采用如下方法，即为了取得人胎盘蜕膜细胞，可以按照临床研究杂志（J.Clin.Invest.）第52卷、2745页-2756页（1973年）记载的方法进行。方法的概要如下：首先尽可能地无菌条件下采取人子宫内膜或胎盘蜕膜（只要是人子宫内组织哪种组织都可以，例如能很容易得到胎盘蜕膜部位是最好。），洗净后，用胰蛋白酶处理将细胞从结合组织上分离下来，收集获得人胎盘蜕膜细胞。

本发明使用的细胞是来自CD57阳性、HLA-DR强阳性的人胎盘蜕膜细胞，只要是有产生式（1）化合物能力的细胞无论哪种细胞都可以，但最好是NS细胞或其克隆株、亚克隆株。本细胞株（NS）可以通过常规方法经有选择性地克隆得到。

例如在利用常规方法对NS细胞进行克隆时，通过检测式（1）化合物的产生量，就可以获得式（1）化合物产生能力高的克隆株。具体来说，首先按照有限稀释方法将 1×10^5 个TTK-1细胞稀释到0~1个细胞/孔，于37℃、5%二氧化碳气存在下进行培养，选择式（1）化合物产生能力高的克隆株。

另外本发明的细胞株保藏于通商产业省工业技术院生命工程工业技术研究所（日本茨城县筑波市东1丁目1番3号），其生命研保藏号是FERM BP6350（原保藏日：平成9年5月19日）（由国内保藏FERM P-16233号移管（移管日：平成10年5月13日））。

图13给出了本发明的NS细胞株（TTK-1）的相差显微镜照片（400倍）。NS细胞株自身分泌昆布氨酸，附着于培养基，表现出LGL细胞株形态。

以下说明本发明化合物的制造方法。

将取自人胎盘蜕膜的细胞，有代表性的NS细胞接种于含有营养源的培养基上，在CO₂培养箱内进行有氧培养，从其培养液（上清和细胞，最好是上清）提取本发明的式（1）化合物，如果需要，可以作成医药上允许的盐。

象上述那样得到的取自人胎盘蜕膜的 NS 细胞可以在一般动物细胞培养用的培养基中按需要添加血清的培养基中培养，具体来说是在含有 20% 的胎牛血清的通常的细胞培养用培养基中培养。

作为该细胞培养用培养基有 BME 培养基、MEM 培养基 (Earle, Dulbecco, High-GEM)、Ham 培养基 (F-10、F-12)、ISKOF 培养基、119 培养基、L-15 培养基、Mccoy5A 培养基、NCTC135 培养基、WilliamsE 培养基、Waymouth 培养基等，只要是可培养该细胞的培养基无论哪一种都可以，最好是 RPMI-1640。

培养方法可以与一般的细胞株代谢产物的生产方法一样进行，无论是固体还是液体培养都可以。在液体培养时，使用静置培养、搅拌培养、振荡培养、通气培养等哪一种培养方法都可以，但振荡培养或通气搅拌培养等更好。在培养该细胞时，最好是使上述的培养基中的 CO₂ 的百分含量为 5% 左右。

有关培养基的 pH 是 6~8，尤其是在中性附近更合适。培养可在 30~40℃ 下进行，最好是在 37℃ 附近。培养时间因使用的培养基、pH、温度条件等不同不能一概而论，通常是培养 4~5 日就可进行该细胞的继代。

为了从培养液中提取目的物质式 (1) 化合物，可以适当地利用从培养物中提取微生物生产的代谢物中常用的分离手段。

通过单独或联合使用众所周知的分离纯化方法，例如溶剂萃取法、离子交换树脂法、吸附或分配层析法、凝胶过滤法等可以纯化生成的式 (1) 化合物。

从培养滤液进行萃取纯化时也可以适当利用反相高速液相色谱和薄层色谱等。例如通过将硅胶柱层析、离子交换层析、亲和层析、反相高速液相层析适当地组合能进行高度地纯化。

就象后面叙述的那样 (“本发明的可用性的确认”一项)，人们期待着本发明化合物能作为包括人在内的哺乳动物的肿瘤以及病毒性疾病的治疗剂等医药。

另外本发明化合物虽然在生物体内有被磷酸化后表现出药理作用的

可能性，不用说有关的磷酸化合物也包括在本发明的范围内。

适合本发明化合物，预期有治疗效果的肿瘤不只是人的血癌、还有一般的胃癌、大肠癌等消化系统癌、肺癌等呼吸系统癌、卵巢癌、绒毛癌等生殖系癌等上皮性癌。

适合本发明化合物，预期有治疗效果的病毒有人逆转病毒系的HTLV、HIV等。

本发明的式(1)化合物在作为抗肿瘤制剂或抗病毒制剂可以使用时，其医药上允许的盐也可以使用。

作为用式(1)表示的本发明化合物的无毒性盐，有与盐酸、硝酸、硫酸或磷酸等无机酸形成的盐，与醋酸、柠檬酸或酒石酸等有机酸形成的盐，与甲磺酸或p-甲苯磺酸等有机磺酸形成的盐或与天冬氨酸、谷氨酸或赖氨酸等形成的盐。

本发明化合物的医药上允许的盐的制造方法可以使用将在有机合成化学领域中通常使用的方法进行适当组合后形成的方法。具体讲，如可以用酸性溶液对含有游离的本发明化合物的溶液进行中和滴定等。

将本发明化合物作为抗肿瘤制剂或抗病毒制剂使用时的药剂形态可以选择各种形态，例如片剂、胶囊、散剂、颗粒制剂、液体制剂等口服制剂，以及将溶液、悬浊液等灭菌的液体状非口服制剂等。本发明的制剂其有效成分含有本发明化合物(一种或数种)，根据需要可以含有载体、稀释剂或成型剂等通常的各种添加物(医药组合物)。

固体制剂虽然可以直接作成片剂、胶囊、颗粒剂或粉末形态，但也可以使用适当的添加物制造。

作为添加物有乳糖、葡萄糖等糖类，例如玉米、小麦、大米等淀粉类，例如硬脂酸等脂肪酸，例如硅酸钠、铝酸镁、无水磷酸钙等无机盐，例如聚乙烯吡咯烷酮、聚(亚烷基)二醇等合成的高分子，例如硬脂酸钙、硬脂酸镁等脂肪酸盐、例如十八烷醇、苯甲醇等醇类，例如甲基纤维素、羧甲基纤维素、乙基纤维素、羟丙甲基纤维素等合成的纤维素衍生物，此外水、明胶、滑石、植物油、阿拉伯树胶等通常用的添加物等。

这些片剂、胶囊、颗粒制剂、粉末等固体形制剂一般含有 0.1~100 重量%、最好含有 5~100 重量%的有效成分。

液体制剂在水、醇类或来自大豆油、花生油、芝麻油等植物油的油等液体状制剂中使用通常用的适当的添加物，可以制造成悬浊液、糖浆制剂、注射制剂等形态。

以非口服方式经肌肉内注射、静脉内注射、皮下注射、肿瘤内注射给药时所用的溶剂有注射用的蒸馏水、盐酸利多卡因水溶液（肌肉内注射用）、生理盐水、葡萄糖水溶液、乙醇、静脉内注射用液体（例如柠檬酸、柠檬酸钠等水溶液）、电解质溶液（例如点滴静脉输入、静脉内注射用）等或它们的混合溶液。

这些注射制剂除了预先溶解的制剂以外，也可以采用用时溶解粉末或添加了适当添加物的制剂形态。这些注射液通常含有 0.1~10 重量%、最好含有 1~5 重量%的有效成分。

口服的悬浊液制剂或糖浆制剂可以含有 0.5~10 重量%的有效成分。

本发明的制剂可以含有作为有效成分的本发明化合物的 1 种或数种，理想的有效成分的例子可以是本发明代表性的化合物 P1~P6 中的 1 种，最好是 2~6 种的组合。

本发明化合物的实际理想的给药量可以根据使用的化合物的种类、配合的组合物的种类、适用的频度以及可以治疗的疾病的部位和患者的病状适当地增减。

例如，每天每一个成年人的给药量口服是 10 至 500mg，非口服给药最好是静脉注射，每天是 10 至 100mg。而给药次数可因给药方法和病状不同而不同，可以一次或分成 2 至 5 次给药。

确认本发明的有用性

取自人胎盘蜕膜组织的 CD57 阳性、HLA-DR 强阳性自然抑制（NS）细胞株诱导 K562、Molt4、U937、GCIY、BeWo 等人癌细胞程序死亡，抑制这些细胞的增殖。使用物理、化学方法对 NS 细胞产生的 AIF 进行了分离和纯化。AIF 的活性测定是通过细胞摄入 ^3H 脱氧胸腺嘧啶核苷

的能力和 DNA 片段化方法进行的。首先 NS 细胞株培养上清中的 AIF 的分离是通过使上清吸附于 C18 柱, 然后再进行洗脱。该粗提取物在薄层层析 (TLC) 展开, 活性级分用反相高速液相色谱 (HPLC) 纯化。

从 HPLC 得到的六个峰的成分 (P1 - P6) 可以诱导 K562、Molt4、U937、GcIY、BeWo 癌细胞的死亡和抑制增殖, 但来自人胎儿肺的正常 WI - 38 细胞对这些癌细胞完全没有伤害。这六个 AIF 的物理、化学的性质表明是核酸或其衍生物, 实际上通过 FAB - MS、NMR 进行结构解析确认 P1 是 2' -O-脱氧尿苷、P2 是核糖胸腺嘧啶核苷、P3 是 2' -O-甲基尿苷、P4 是脱氧胸腺嘧啶核苷、P5 是 2' -O-次黄苷, P6 是 2' -O-甲基鸟苷。在将这六种 AIF 给移植了人癌组织的鼠服用的动物实验中也可确认显著的肿瘤萎缩效果。

将经 HPLC 最后分离纯化的 AIF 添加到靶癌细胞中, 在研究试管内的程序化死亡诱导能力的同时, 研究 AIF 在接种了癌细胞的 SCID 小鼠的治疗效果 (动物实验)。

[1]试管内的实验

下面为了显示本发明的有用性, 首先将与本发明有关的代表例 NS 细胞株和来自有代表性的各种人的癌细胞作为靶细胞使用, 测定由于直接或间接的共培养引起的相互作用。使用的细胞如下所示。

NS 细胞株 (TTK - 1) (取自人胎盘蜕膜的细胞株)

是从妊娠 7 周令的人胎盘蜕膜组织细胞的培养的细胞, 是 CD57 阳性、HLA-DR 强阳性的来自骨髓淋巴系组织的自然免疫抑制细胞。

Molt4 (人 T 细胞性白血病细胞株)

K562 (人成红细胞性白血病细胞株)

U937 (人组织性白血病细胞株)

GcIY (人胃癌细胞株)

BeWo (人绒毛癌细胞株)

WI - 38 (来自人胎儿肺组织的正常细胞株)

以上细胞是在 10% FCS + RPMI - 1640 培养液或除去脱氧胸腺嘧啶核苷的无血清培养基上于 5% CO₂、37℃ 培养箱内进行继代培养的细胞。

试验例 1: NS 细胞株与 Mol t4/K562/U937/GcIY/BeWo/ WI-38 靶细胞直接共培养试验 (直接反应)

直接共培养试验:

使用 NS、Mol t4 (人 T 细胞性白血病细胞株)、K562 (人成红细胞性白血病细胞株)、U937 (人组织性白血病细胞株)、GcIY (人胃癌细胞株)、BeWo (人绒毛癌细胞株) 和 WI-38, 于 24 孔板中各加入 2ml 培养液对 NS (10^4 、 10^5 、 10^6) 与 Mol t4/K562/U937/GcIY/BeWo/ WI-38 细胞 (10^6) 直接共培养 24 小时到 48 小时。

NS 细胞株与靶细胞间的直接相互作用 (共培养) 的结果经 24 小时培养后, 提取细胞的 DNA, 在 2% 的琼脂糖凝胶上进行电泳检测。

其结果就象图 14A 所示的那样, 带 1、2、3 分别是 NS 细胞数为 10^4 、 10^5 、 10^6 /孔与 Mol t4 10^6 /孔间的共培养, 靶细胞中 DNA 片段化程度随着接种的 NS 细胞数的增加而上升。

而带 4 中只有 NS 10^6 /孔, 带 5 中只有 Mol t4 10^6 /孔时看不到 DNA 片段化。M 带是表示 DNA 大小的标记物。

象图 14B 所示的那样, 带 1、2、3 分别是 NS 细胞数为 10^4 、 10^5 、 10^6 /孔与 K562 10^6 /孔间的共培养, 靶细胞中 DNA 片段化程度随着接种的 NS 细胞数的增加而上升。

而带 4 中只有 K562 10^6 /孔, 带 5 中只有 NS 10^6 /孔时看不到 DNA 片段化。

象图 14C 所示的那样, 带 1、2、3 分别是 K562 细胞和细胞数为 10^6 、 10^5 、 10^4 /孔的 Mol t4 共培养, 带 4 中只有 Mol t4 10^6 /孔、带 5 中只有 K562 10^6 /孔时, 无论那种情况都没引起 DNA 片段化。

象图 14D 所示的那样, 带 1、2、3 分别是 NS 细胞数为 10^4 、 10^5 、 10^6 /孔与 BeWo 10^6 /孔间的共培养, 靶细胞中 DNA 片段化程度随着接种的 NS 细胞数的增加而上升。而在带 4 只有 NS 10^6 /孔, 带 5 只有 BeWo 10^6 /孔, 带 6 是 BeWo 10^6 /孔与 GcIY 10^6 /孔间共培养, 带 7 只有 GcIY 10^6 /孔时, 无论那种情况都看不到 DNA 片段化。

象图 14E 所示的那样, 带 1、2、3、4 分别是 NS 细胞数为 10^3 、 10^4 、

10^5 、 10^6 /孔与 U937 10^6 /孔间的共培养, 靶细胞中 DNA 片段化程度随着接种的 NS 细胞数的增加而上升。而在带 7 是 Mol t4 10^6 /孔与 U937 10^6 /孔间的共培养, 带 8 是只有 Mol t4 10^6 /孔, 带 6 是只有 U937 10^6 /孔, 带 5 是只有 NS 10^6 /孔时, 都不会引起 DNA 片段化。

象图 14F 所示的那样, 带 1、2、3 分别是 NS 细胞数为 10^4 、 10^5 、 10^6 /孔与 GcIY 10^6 /孔间的共培养, 靶细胞中 DNA 片段化程度随着接种的 NS 细胞数的增加而上升。

而在带 4 只有 GcIY 10^6 /孔, 带 5 只有 NS 10^6 /孔时看不到 DNA 片段化。

象图 14G 所示的那样, 带 1、2、3 分别是 NS 细胞数为 10^4 、 10^5 、 10^6 /孔与 WI-38 10^6 /孔间的共培养, 尽管接种的 NS 细胞数的增加, 在靶细胞中也看不到 DNA 片段化。带 4 只有 WI-38 10^6 /孔, 带 5 只有 NS 10^6 /孔时都不会引起 DNA 片段化。

即 NS 细胞株与 Mol t4、K562、BeWo、U937、GcIY 细胞间的相互作用(共培养)的结果是在培养 24 小时后能看到靶细胞的 DNA 片段化。另外靶细胞中 DNA 片段化程度随着接种的 NS 细胞数的增加而上升。

另外 DNA 片段化在 K562 与 Mol t4 细胞间共培养, 或是在 Mol t4 与 U937 细胞间, 以及 BeWo 与 GcIY 细胞间共培养, 无论那种情况都不会发生。而即使 NS 细胞与 WI-38 正常细胞间的共培养也看不到 DNA 片段化。这表明 NS 细胞不会伤害人正常细胞。就是说 NS 细胞株能引起由于人癌细胞的特异的细胞程序死亡(DNA 片段化)。

试验例 2: 将 NS 细胞与靶细胞 K562/Mol t 细胞加入到容器内进行的间接相互作用(间接共培养)

间接共培养:

安装一个孔中底部成滤膜状(直径 $0.45\mu\text{m}$)的细胞反应用培养室, 然后分别注入 Mol t4/K562(10^4)细胞。

于 5% CO_2 、 37°C 条件下培养三天后, 收集靶细胞, 进行 ^3H 脱氧胸腺嘧啶核苷摄入放射能法、台盼蓝摄入染色法、DNA 片段化法, 测定细胞间相互作用的结果。

在这个系统中，随着接种的 NS 细胞数的增加，72 小时后可以看到容器内的靶癌细胞数的减少（图 15）。

该实验结果表示能通过容器室的微孔膜，低分子量的可溶性的引起靶癌细胞死亡的物质是由 NS 细胞株产生的。

试验例 3: 通过薄层层析（TLC）确认由粗提取的 AIF 引起的 ^3H 脱氧胸腺嘧啶核苷的摄入抑制以及 DNA 片段化试验

将由 NS 细胞株培养上清 50ml 冷冻干燥的样品加到 C18 柱上（BONDELUTE），用乙腈和甲醇分离、洗脱保留在柱子上的物质，利用氮气使溶剂挥发，进行浓缩干燥。柱子中保留的级分抑制 K562/Molt4 细胞的增殖、诱导 DNA 片段化。

利用 TLC 将该级分展开，即将用 C18 柱分离的物质溶解在三氯甲烷：甲醇（1: 1）溶液中之后，点到薄层板上，通过三氯甲烷：甲醇：蒸馏水（60: 40: 8）展开。展开后，在培养基中含有的级分被酚红试剂的带（ $R_f = 0.5$ ）分为下级分部（ $R_f < 0.5$ ，TLC-A）和上级分部（ $R_f > 0.5$ ，TLC-B），挑取相应凝胶，利用三氯甲烷/甲醇分别萃取回收，用氮气干燥。确认在 TLC 上酚红（ $R_f = 0.5$ ）位置上部存在的级分中存在抑制 K562/Molt4 细胞增殖（图 16A~B），诱导 DNA 片段化的物质（图 17A~B）。

作为对照，在所用的新鲜培养基、或靶细胞 K562 / Molt4 细胞的培养上清中看不到抑制靶细胞的增殖，或诱导 DNA 片段化的物质的产生。然而在 NS 细胞株的培养上清中能产生可以诱导人癌细胞程序化死亡（细胞死亡）的物质（AIF），通过 TLC 可以确认在比酚红移动更快的级分中（酚红 $R_f = 0.5$ ）中存在 AIF。

试验 4: 用 HPLC 最终分离纯化的 AIF 对靶细胞 Molt4 摄入 ^3H -脱氧胸腺嘧啶核苷的抑制试验

利用 ODS-80TM 柱（TOSOH），通过在 360 分钟内使含有 0.1% 三氟乙酸的乙腈从 0 达到 5% 的浓度，以流速 0.5ml/分进行分离纯化，同时通过 OD214nm 吸光度进行测定。

来自得到的主要六个峰（1-6）（图 18A、HPLC 图）的样品（ $7\mu\text{g/ml}$ ）

无论哪一种都抑制 MolT4 摄入 ^3H -脱氧胸腺嘧啶核苷。特别是取自峰 1 和峰 4 的样品表现出很强的活性, 各个峰稀释到 1/10 浓度的混合样品 ($0.7\mu\text{g/ml}$) 也表现出很强的活性 (图 19)。

就象图 19 的柱 M 表示的那样, 它表现出了各个峰 (AIF) 的协同效果。

试验例 5: 能够诱导 MolT4 细胞的 DNA 片段化的 AIF 的界限量

就象图 20A、20B 表示的那样, 使取自通过 HPLC 分离的各个活性峰 (1-6) 的样品 (A: $7\mu\text{g/ml}$ 、B: $7\times 3^{-2}\mu\text{g/ml}$) 作用于 5×10^5 个 MolT4 细胞 48 个小时, 然后提取靶细胞的 DNA, 在 2% 琼脂糖凝胶上进行电泳。虽然在 $7\mu\text{g/ml}$ 和 $7\times 3^{-2}\mu\text{g/ml}$ 的浓度下能看到 MolT4 细胞的 DNA 片段化, 但就象图 20C 表示的那样, 在 $7\times 3^{-5}\mu\text{g/ml}$ 的低浓度下其作用已经消失了。

试验例 6: 用 HPLC 最终分离纯化的 AIF 对靶细胞 BeWo 细胞的 DNA 片段化试验

就象图 21A 表示的那样, 使取自通过 HPLC 分离的各个活性峰 (1-6) 的样品 ($21\mu\text{g/ml}$) 作用于 BeWo 细胞 48 个小时, 然后提取 BeWo 细胞的 DNA, 在 2% 琼脂糖凝胶上进行电泳。无论那一个峰都能诱导 BeWo 细胞的 DNA 片段化 (图 21A)。

试验例 7: 用 HPLC 最终分离纯化的 AIF 对靶细胞 U937 细胞的 DNA 片段化试验

就象图 21B 表示的那样, 使取自通过 HPLC 分离的各个活性峰 (1-6) 的样品 ($21\mu\text{g/ml}$) 作用于 U937 细胞 48 个小时后, 然后提取 U937 细胞的 DNA, 在 2% 琼脂糖凝胶上进行电泳。无论那一个峰都能诱导 U937 细胞的 DNA 片段化 (图 21B)。

试验例 8: 用 HPLC 最终分离纯化的 AIF 对靶细胞 GCIY 细胞的 DNA 片段化试验

就象图 21C 表示的那样, 使取自通过 HPLC 分离的各个活性峰 (1-6) 的样品 ($21\mu\text{g/ml}$) 作用于 GCIY 细胞 48 个小时后, 然后提取 GCIY 细胞的 DNA, 在 2% 琼脂糖凝胶上进行电泳。无论那一个峰都能诱导 GCIY

细胞的 DNA 片段化（图 21C）。

试验例 9: 用 HPLC 最终分离纯化的 AIF 对人正常细胞 WI-38 的 DNA 片段化试验

以人正常细胞 WI-38 作为靶细胞时，即使用 3 倍来自各个活性峰（1-6）的样品量（63 μ g/ml）作用于该细胞，也看不到细胞增殖的抑制和 DNA 片段化（图 21D）。就象图 14G 表示的那样，这种现象与即使使 NS 细胞与 WI-38 细胞直接作用也不会伤害正常细胞的结果对应。

这一系列的实验结果具有重大的意义。即本发明人分离纯化的 AIF 会引起癌细胞特异地程序化死亡（DNA 片段化），但对正常细胞几乎没有伤害，就是说患者服用后没表现出副作用，表明可以作为理想的抗癌制剂进行开发。

而以前的免疫抑制制剂是用阻碍淋巴细胞分裂的药理作用表现其效果的，本发明化合物也是有可能作为免疫抑制制剂进行开发的。

作为用 HPLC 的最终分离对照，对 Mol4 细胞的培养上清或新鲜的培养基进行与 NS 细胞株培养基完全相同的处理，最终加到 HPLC 上比较时，发现从 TTK-1 培养基得到的那样的活性峰（1-6）在对照的 HPLC 图上不存在（图 18B、C）。

另外破坏 NS 细胞株本身提取的样品的 HPLC 图与 NS 细胞株培养上清的图相同。这表明 NS 细胞本身也含有与上清相同的活性峰（1-6）。

以上试管内实验结果归纳如下。

（1）[NS 细胞株诱导靶癌细胞的细胞程序死亡]

NS 细胞株与 Mol4、K562、BeWo、U937、GCIY 细胞间的直接相互作用（共培养）的结果，在培养 24 小时后能看到靶细胞的 DNA 片段化（图 14A. B. C. D. E. F）。

靶细胞中 DNA 片段化程度随着接种的 NS 细胞数的增加而上升。另外 DNA 片段化在 K562 与 Mol4 细胞间共培养（图 14C），或是在 Mol4 与 U937 细胞间，以及 BeWo 与 GcIY 细胞间共培养，无论那种情况都不会发生。而即使 NS 细胞与 WI-38 正常细胞间的共培养也看不到 DNA

片段化(图 14G)。这表明 NS 细胞不会伤害人正常细胞。就是说只有 NS 细胞株具有诱导人癌细胞特异程序死亡的能力。

(2) [NS 细胞株将 AIF 释放到培养上清中]

在将 NS 细胞与 K562/Molt 细胞加入到培养室内进行间接相互作用(间接共培养)的系统中,随着接种的 NS 细胞数的增加,72 小时后可以看到容器内的靶癌细胞数的减少(图 15)。另外也可以看到容器内的靶癌细胞的 DNA 片段化。该实验结果表明能通过容器室的微孔膜的,低分子量的可溶性的能引起靶癌细胞死亡的物质是由 NS 细胞株产生的。

(3) [通过薄层层析(TLC)确认由粗提取的 AIF 引起的 ^3H 脱氧胸腺嘧啶核苷摄入抑制、诱导 DNA 片段化]

将由 NS(TTK-1)细胞株培养上清约 50ml 冷冻干燥的样品加到 C18 柱上,用乙腈和甲醇对保留在柱子上的物质进行洗脱、浓缩干燥,得到的级分抑制 K562/Molt4 细胞的分裂、诱导 DNA 片段化。

再将该级分加到 TLC 上,在培养基中含有的处于酚红试剂的带($R_f = 0.5$)以上的级分($R_f > 0.5$, TLC-B)中存在抑制 K562/Molt4 细胞增殖(图 16A, B),诱导 DNA 片段化的物质(图 17A, B)。

作为对照,在所用的新鲜培养基(SFM)、既看不到靶细胞 K562/Molt4 细胞的培养上清中抑制靶细胞的增殖,也没有诱导 DNA 片段化的物质的产生。

进而在 NS 细胞株的培养上清中能产生可以诱导人癌细胞程序死亡(细胞死亡)的物质(AIF),通过 TLC 可以确认在比酚红移动更快的级分中(酚红 $R_f > 0.5$)中存在 AIF。

(4) [用 HPLC 最终分离纯化的 AIF 对靶细胞 DNA 片段化的诱导]

由 NS 细胞培养上清 500ml 经 TLC 粗纯化的总的活性级分(TLC-B)再经 TSKgelODS-80TM 柱(东曹)、反相 HPLC 分离提取。

得到主要的六个峰(1-6)(图 18A、HPLC 图)。当测定 ^3H -脱氧胸腺嘧啶核苷的摄入能力时,来自(1-6)六个峰的样品($7\mu\text{g/ml}$)无论那一种都抑制 Molt4 细胞摄入 ^3H -脱氧胸腺嘧啶核苷(图 19)。

就是说抑制 Mol t4 细胞的分裂。特别是取自峰 1 和峰 4 的样品表现出很强的活性，各个峰稀释到 1/10 浓度的混合样品 ($0.7\mu\text{g/ml}$) 也表现出很强的活性。就象图 19 的柱 M 表示的那样，它表现出了各个峰 (AIF) 的协同效果。

(5) [能够诱导靶细胞的 DNA 片段化能的 AIF 界限量]

与各个活性峰 (1-6) 的抑制 Mol t4 细胞分裂效果相对应，取自各个峰 (1-6) 的样品 ($7\mu\text{g/ml}$) 无论那一个都可诱导 Mol t4 细胞的 DNA 片段化 (图 20A)。

用经 HPLC 分离的各个活性峰 (1-6) 的样品 $7\times 3^{-2}\mu\text{g/ml}$ 作用于 Mol t4 细胞 48 个小时，确认靶细胞的 DNA 片段化 (图 20B)，但在 $7\times 3^{-5}\mu\text{g/ml}$ 的低浓度下其作用已经消失了 (图 20C)。

(6) 如果使用 BeWo、U937、和 GCIY 作为靶细胞，无论来自那个峰 (1-6) 的样品 ($21\mu\text{g/ml}$) 以及稀释到 1/10 的混合样品 (各 $2.1\mu\text{g/ml}$) 都可诱导靶细胞的 DNA 的片段化 (图 21A、B、C)

以人正常细胞 WI-38 作为靶细胞时，即使用 3 倍来自各个活性峰 (1-6) 的样品量 ($63\mu\text{g/ml}$) 作用于该细胞，也看不到细胞增殖的抑制和 DNA 片段化 (图 21D)。就象图 14G 表示的那样，这种现象与即使使 NS 细胞与 WI-38 细胞直接作用也不会伤害正常细胞的结果对应。

这一系列的实验结果具有重大的意义。即本发明人分离纯化的 AIF 会引起癌细胞特异地程序化死亡 (DNA 片段化)，但对正常细胞几乎没有伤害，就是说患者服用后没表现出副作用，表明可以作为理想的抗癌制剂进行开发。对 Mol t4 细胞的培养上清或新鲜的培养基进行与 TTK-1 培养基完全相同的处理，最终加到 HPLC 上比较时，发现从 TTK-1 培养基得到的那样的活性峰 (1-6) 在其 HPLC 图上不存在 (图 18B、C)。

另外破坏 NS 细胞株本身提取的样品的 HPLC 图与 NS 细胞株培养上清的图相同。这表明 NS 细胞本身也含有与上清相同的活性峰 (1-6)。

如果归纳以上结果，可以得出 AIF 是由 NS 细胞株产生的、释放到

培养基中的物质的结论。

(7) AIF 的物理化学特性的研究和构造确定

用 HPLC 最终分离纯化的 AIF 中的氨基酸或六碳糖的有无可以通过地衣酚硫酸反应和茚三酮反应定性地研究。由于进一步从 UV 光谱解析可以看到最大吸收值出现在 260nm 前后, 所以判断是核酸系物质。分子量通过质谱 (FAB-MASS) 推定。利用质子核磁共振 (NMR) 法可以确定最终的构造。

通过 HPLC 分离的 AIF 的各个活性峰 (1-6) 耐热, 茚三酮、地衣酚反应呈阴性, 表明是非蛋白质类、非六碳糖类的物质。

由于进一步从 UV 光谱解析可以看到最大吸收值出现在 260nm 前后, 所以判断是核酸系物质 (图 7~12 左上图)。

因为确定了构造解析的方向, 所以进行 NS 细胞的大量培养 (约 300L), 从最终的 HPLC 分离纯化的各个峰 (1-6) 制备样品。通过质量分析 (FAB-MASS) 和核磁共振 (NMR) 法确定最终的构造。AIF 的活性峰 1-6 中, P1 是 2'-O-脱氧尿苷、P2 是核糖胸腺嘧啶核苷、P3 是 2'-O-甲基尿苷、P4 是脱氧胸腺嘧啶核苷、P5 是 2'-O-次黄苷, P6 是 2'-O-甲基鸟苷 (图右上画面)。

AIF 的各个活性峰 (1-6) 的分子量 (+H) 表示在质量分析图 (图 7~12 下的画面) 的箭头的下方。

[II] 动物实验

作为试管内实验已确认 AIF 效果的血液癌细胞的代表, 使用 Mol4, 而作为上皮性癌细胞的代表使用 GCIY。

(1) 向 SCID 鼠各 20 只接种大约 10^8 个人胃癌细胞 (GCIY), 在肿瘤的直径达到 0.5cm (0.25cm^2) 时 (约 2 周后), 分成 4 组, 使用 AIF 在荷瘤鼠中进行治疗实验, 每组各有荷瘤鼠 5 只。

试验例 1.

将含有上述经 TLC 分级的 6 种核苷 (AIF) 样品 (TLC-B 级分) 溶解于磷酸缓冲液 (PBS) 后, 每次将总量 1mg (相当于 2'-O-脱氧尿苷 90 μg 、胸腺嘧啶核苷 110 μg 、2'-O-甲基尿苷 135 μg 、脱氧胸腺嘧

啶核苷 322 μg 、2'-O-次黄苷 226 μg 、2'-O-甲基鸟苷 116 μg) 溶解于 0.5ml 的 PBS 后, 对荷瘤鼠各 5 只由静脉(尾部静脉)共 18 次(总量 18mg) 给药。

作为对照, 使用用 TLC 分级时得到的 TLC 上酚红以下的级分, 即不含 6 种核苷的样品(TLC-A 级分), 仍然是经静脉(尾部静脉)共 18 次给药。肿瘤的大小用长径 $\times$ 短径的面积(面积)计量。图 22 给出了第 1 周、第 2 周、第 3 周各 5 只鼠的肿瘤的平均大小。就象曲线表明的那样, 可以看出注入 AIF 组与对照组两组的差异, 注入 AIF 组与对照组相比, 表现出有意义的很强的抑制肿瘤效果(在 t 检测中 $P < 0.01$)。

试验例 2.

与试验例 1 一样, 将 TLC-A、B 各 1mg 溶解在 0.3ml 的 PBS 后, 分 3 次(0.1ml/次)3 天内直接注入各 5 只荷瘤鼠的肿瘤内, 若是用含有 TLC-B 级分的 6 种核苷的样品(组成量与实验 1 一样), 结果使得肿瘤完全萎缩。若是用作为对照不含有 AIF 的 TLC-A 级分, 完全不能诱导肿瘤的萎缩。(作为代表性的例子, 图 23A、B 给出了对照荷瘤鼠与治疗鼠各一只以及切除肿瘤的 AIF 给药组 3 例和对照组 3 例)。AIF 引起肿瘤萎缩的机制就象图 23C 表示的那样 AIF 诱导 DNA 片段化, 即经细胞程序死亡使肿瘤死亡。

(2) 向 SCID 鼠各 30 只接种大约 10^8 个人 T 细胞白血病(Molt4), 在肿瘤的直径达到 0.3cm (0.09cm²) 时(约 2 周后), 分成 2 组, 使用 AIF 在荷瘤鼠中进行治疗实验。

将 3 种 AIF 核苷(2'-O-脱氧尿苷、胸腺嘧啶核苷、脱氧胸腺嘧啶核苷各 400 μg , 三者合计 1.2mg) 溶解于 0.5ml 的 PBS 后, 反复交替经静脉和直接向 5 只荷瘤鼠肿瘤内给药, 共 18 次(总量 21.6mg)。肿瘤的大小用长径 $\times$ 短径的面积(面积)计量, 追踪 3 周。5 只鼠中有 3 只鼠的肿瘤完全萎缩, 其余的 2 只的肿瘤也被抑制到非常小。图 24 的曲线给出了第 1 周、第 2 周、第 3 周各 5 只鼠的肿瘤的平均大小。而就象对照组曲线表示的那样在注入 PBS 的对照组中会引起肿瘤的增

大,可以看出两者之间完全有意义的差别(在t检测中 $P < 0.001$)。

[III]考察

母系对胎儿的免疫反应最初是在蜕膜组织被调节的。

认为含有NK细胞标记的LGL细胞的大群细胞团集积在包括初期妊娠的人在内的哺乳类的蜕膜层的现象通过本发明人的研究已经被搞清楚了。大概这些NK细胞团在胚盘胞的着床的局面起着重要的作用。就是说NK细胞在妊娠时不断增殖,控制处于发育过程中的胎儿胎盘的形成。换句话说天然的癌免疫反应在妊娠时就进行着。

本发明人拥有的NS细胞株是本发明人从人妊娠3个月的蜕膜层克隆、建立的CD57阳性、HLA-DR强阳性的人型自然抑制细胞。该细胞株不具有作为蜕膜间质细胞特征的雌性激素和黄体酮受体,由于也不分泌催乳激素,可以认为是从骨髓或淋巴系组织游离出来的细胞系谱。

作为NS细胞的具体功能不只是抑制由MLR或分裂素刺激引起的淋巴细胞分裂反应,最近抑制肿瘤细胞增殖的作用也有报道(Sugiura, K., M. Inaba., H. Ogata., R. Yasumizu., E. E. Sardin., K. Inaba., S. Kuma., R. A. Good., and S. Ikehara. 1990. Inhibition of tumor cell proliferation by natural suppressor cells present in murine bone marrow. *Cancer Res.* 50:2582)。该NS细胞基本上作为参与细胞分裂调控的效应物质虽然一直被认为是TGF- β 家族的蛋白质(Clark, D. A., K. C. Flanders., D. Banwatt., W. Millar-Book., J. Manuel., J. Stedronska-Clark., and B. Rowley, 1990. Murine pregnancy decidua produces a unique immunosuppressive molecule related to transforming growth factor beta-2. *J. Immunol.* 144:3008)或分子量1万以下的核糖醇那样的物质(Mortari, F., and S. K. Singhal. 1988. Production of human bone marrow-derived suppressor factor Effect on antibody synthesis and lectin-activated cell proliferation. *J. Immunol.* 141:3037),但其实体还不清楚。作为由NS细胞引起的免疫抑制作用机制,就象本发明人的以前的研究(Tatsumi, K, T. Mori., E. Mori., H. Kanzaki., and

T. Mori. 1987. Immunoregulatory factor released from a cell line derived from human decidual tissue. Am. J. Reprod. Immunol. Microbiol. 13:87) 就以指出的那样, NS 细胞株的上清中的蛋白类物质抑制通过 IL-2 进行的 T 细胞分裂反应。

在本发明中可能使人惊奇的是我们已经搞清楚该 NS 细胞株通过细胞程序死亡 (DNA 片段化) 作用不只是诱导人血液癌细胞 K562/Molt4/U937, 也诱导恶性度极高的人胃癌细胞 GCIY 和人绒毛癌细胞 BeWo 死亡和抑制其增殖。

另外从该细胞株的培养上清进行了诱导癌细胞程序死亡的物质 (AIF) 的分离、纯化、构造确定。其过程首先是将 NS 细胞株培养上清的冷冻干燥样品上 C18-柱, 然后用乙腈将与柱子疏水性结合的物质洗脱出来。洗脱出来的活性因子再经 TLC 粗纯化。活性级分表现出来的 Rf 值比酚红大, 能抑制 K562/Molt4 细胞分裂、引起 DNA 片段化。最终通过 C18 反相柱经 HPLC 将活性分子作为 6 个主要的峰分离纯化。由这 6 个峰获得的样品无论那一个都抑制靶癌细胞的增殖, 诱导 DNA 片段化, 可以确认就是当初的目的物即 AIF。而这 6 种 AIF 混合后作为混合物使用时 (现在癌化疗法进行的多制剂并用, 这里是天然的多制剂并用) 发现最有效。由于这 6 种 AIF 的物理化学的性质是地衣酚反应和茚三酮反应阴性, 所以它们是非蛋白性的不含六碳糖的物质。其分子量推定为 100~500。

象图 7~12 左上表示的那样经 HPLC 分级的各活性峰在 UV 光谱中显示出的最大吸收值处于 245nm 到 265nm 范围。就是说强烈地暗示出 AIF 是核酸或与其衍生物有关的物质。

从大量的 NS 细胞培养上清最终分离纯化 AIF, 制备可以进行构造解析的样品, 通过 FAB-MS 确定分子量, 用 NMR 最终确定它们的构造 (图 1~12)。6 种 AIF 属于含有碱基或核糖的一部分被脱氧, 或是被甲基化的唯一构造的核苷系列。

象本发明人那样发现 NS 细胞分泌一系列的核酸系物质, 诱导人的所有癌细胞的程序死亡一事仅限于本发明人了解, 即使在世界也是首

次。

现在临床上使用的核酸系抗癌制剂、抗病毒制剂（例如 5-FU）、Futrafu (FT)、Furtulon、AZT、DDI、Ara-c）细胞毒性高，其效果也就差些，用于人时副作用大，正成为社会化问题。

本发明人发现的 AIF 虽说是是试管和动物实验所见（这些实验体系是以人用的抗癌制剂、抗病毒制剂的评价作为目的，在该领域中确立的一直用的试管内和动物实验体系（例如参照图 22、23、24）），但对人正常细胞完全没有伤害，就是说将来用于人时副作用减轻，由于诱导癌细胞特异的细胞程序死亡（DNA 片段化）这一自然的药理作用机制开拓了可能开发引起癌细胞死亡的天然型理想的制癌剂。

[IV]图的补充说明

图 14: 表示 NS 细胞株诱导靶癌细胞的程序死亡，但不诱导正常细胞的程序死亡。

NS 细胞株与靶细胞间的直接相互作用（共培养）的结果，经 24 小时培养后，提取细胞的 DNA，在 2% 的琼脂糖凝胶上进行电泳。

其结果就象图 14A 所示的那样，带 1、2、3 分别是 NS 细胞数为 10^4 、 10^5 、 10^6 /孔与 Molt4 10^6 /孔间的共培养，靶细胞中 DNA 片段化程度随着接种的 NS 细胞数的增加而上升。

而带 5 中只有 Molt4 10^6 /孔，带 4 中只有 NS 10^6 /孔时看不到 DNA 片段化。M 是标记物。

象图 14B 所示的那样，带 1、2、3 分别是 NS 细胞数为 10^4 、 10^5 、 10^6 /孔与 K562 10^6 /孔间的共培养，靶细胞中 DNA 片段化程度随着接种的 NS 细胞数的增加而上升。

而带 4 中只有 K562 的 10^6 /孔，带 5 中只有 NS 10^6 /孔时看不到 DNA 片段化。M 是标记物。

象图 14C 所示的那样，带 1、2、3 分别是 K562 细胞和 Molt 细胞数分别为 10^6 、 10^5 、 10^4 /孔间共培养，带 4 中只有 Molt4 10^6 /孔、带 5 中只有 K562 10^6 /孔时，无论那种情况都没引起 DNA 片段化。M 是标记物。

象图 14D 所示的那样, 带 1、2、3 分别是 NS 细胞数为 10^4 、 10^5 、 10^6 /孔与 BeWo 10^6 /孔间的共培养, 靶细胞中 DNA 片段化程度随着接种的 NS 细胞数的增加而上升。而在带 4 只有 NS 10^6 /孔, 带 5 只有 BeWo 10^6 /孔, 带 6 是 BeWo 10^6 /孔与 GcIY 10^6 /孔间共培养, 带 7 只有 GcIY 10^6 /孔时, 无论那种情况都看不到 DNA 片段化。

象图 14E 所示的那样, 带 1、2、3、4 分别是 NS 细胞数为 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 /孔与 U937 10^6 /孔间的共培养, 靶细胞中 DNA 片段化程度随着接种的 NS 细胞数的增加而上升。而在带 7 是 Mol t4 10^6 /孔与 U937 10^6 /孔间的共培养, 带 8 是只有 Mol t4 10^6 /孔, 带 6 是只有 U937 10^6 /孔, 带 5 是只有 NS 10^6 /孔时, 都不会引起 DNA 片段化。M 是标记物。

象图 14F 所示的那样, 带 1、2、3 分别是 NS 细胞数为 10^4 、 10^5 、 10^6 /孔与 GcIY 10^6 /孔间的共培养, 靶细胞中 DNA 片段化程度随着接种的 NS 细胞数的增加而上升。而在带 4 只有 GcIY 10^6 /孔, 带 5 只有 NS 10^6 /孔时看不到 DNA 片段化。M 是标记物。

象图 14G 所示的那样, 带 1、2、3 分别是 NS 细胞数为 10^4 、 10^5 、 10^6 /孔与 WI-38 10^6 /孔间的共培养, 即使接种的 NS 细胞数增加, 在靶细胞中也看不到 DNA 片段化。带 4 只有 WI-38 10^6 /孔, 带 5 只有 NS 10^6 /孔时都不会引起 DNA 片段化。M 是标记物。

图 15: 表示 NS 细胞与 K562/ Mol t4 细胞间接共培养中抑制靶细胞增殖。

象图 15 表示的那样在将 NS (TTK-1) 细胞与 K562/Mol t 细胞加入到培养室内进行间接相互作用 (间接共培养) 的系统中, 随着接种的 NS 细胞数的增加, 72 小时后可以观察到容器内的靶癌细胞数的减少。

图 16~17: 表示通过薄层层析 (TLC) 的粗提取的 AIF 抑制靶细胞摄入 ^3H 脱氧胸腺嘧啶核苷、诱导 DNA 片段化。

将由 NS (TTK-1) 细胞株培养上清 (TTK-1 Sup) 50ml 冷冻干燥的样品加到 C18 柱上, 用乙腈和甲醇对保留在柱子上的物质进行洗脱、浓缩干燥, 得到的级分抑制 K562/Mol t4 细胞的分裂。

象图 16A 表示的那样, 将该级分加到 TLC 上, 在培养基中含有的处

于酚红试剂的带 ($R_f = 0.5$) 上部的级分 (U) 与无血清的培养基 (SFM)、对照组 (C) 以及存在于 TLC 上的下部的级分 (L) 相比, 可以看出抑制 K562 的分裂。

另外象图 16B 表示的那样, 进一步将该级分加到 TLC 上展开, 培养基中存在的处于酚红 ($R_f = 0.5$) 位置的上部 (U) 的级分与存在于酚红位置下部的级分相比, 能看出有意义的抑制 Mol t4 细胞分裂。

对照组 (C) 和使用新鲜无血清培养基 (SFM) 都看不到抑制靶细胞增殖的现象。

象图 17A, B 所表示的那样, 将由 NS (TTK-1) 细胞培养上清约 50ml 冷冻干燥的样品加到 C18 柱上, 用乙腈洗脱保留在柱子上的物质, 然后浓缩, 浓缩的级分利加到 TLC 上展开, 然后将处于酚红位置 (R_f 值 0.5) 上部 (U, 带 1, 3) 和下部 (L, 带 2, 4) 的级分分别提取出来, 研究是否存在诱导 K562 细胞 (A) / Mol t4 细胞 (B) 的 DNA 片段化。

用这些提取物与 K562/Mol t4 细胞反应 24 小时 (带 1, 2)、48 小时 (带 3, 4) 后提取细胞 DNA, 进行 2% 琼脂糖凝胶电泳。就象该图所表示的那样, NS 细胞培养上清中产生了诱导人癌细胞程序死亡的物质 (AIF), 确认在 TLC 上比酚红移动快的级分 ($R_f > 0.5$) 中存在 AIF。

图 18: 用 HPLC 最终分离的 AIF 的 HPLC 曲线

象图 18A 所表示的那样, 由 NS (TTK-1) 培养上清 500ml 经 TLC 粗纯化的总的活性级分经 TSKgel ODS-80TM 柱 (东曹)、反相 HPLC 分离提取。得到了主要的六个峰 (1-6)。

象图 18B, C 所表示的那样, 对 Mol t4 细胞的培养上清 (B) 或新鲜的培养基 (C) 进行与 NS (TTK-1) 细胞培养基完全相同的处理, 最终加到 HPLC 上比较时, 发现从 NS 细胞株培养基得到的那样的活性峰 (1-6) 在其 HPLC 图上不存在。

图 19, 20: 表示了用 HPLC 最终分离纯化的 AIF 能够抑制 Mol t4 摄入 ^3H -脱氧胸腺嘧啶核苷, 诱导 DNA 片段化, 以及能够诱导 DNA 片段化的 AIF 的有效量。

象图 19 所表示的那样, 来自用 HPLC 分离的主要的 (1-6) 六个峰

的样品 ($7\mu\text{g/ml}$) 无论那一种都抑制 Mol t4 摄入 ^3H -脱氧胸腺嘧啶核苷, 就是说抑制 Mol t4 细胞的分裂。特别是取自峰 1 和峰 4 的样品表现出很强的活性, 各个峰稀释到 1/10 浓度的混合样品 (各 $0.7\mu\text{g/ml}$) 也表现出很强的活性。就象图 19 的柱 M 表示的那样, 它表现出了各个峰 (AIF) 的协同效果。

象图 20A 所表示的那样, 用从各个活性峰 (1-6) 制备的样品作用于 Mol t4 细胞 48 小时后, 提取 Mol t4 细胞的 DNA, 进行 2% 琼脂糖凝胶电泳。与各个活性峰 (1-6) 的抑制 Mol t4 细胞分裂效果相对应, 取自各个峰 (1-6) 的样品 ($7\mu\text{g/ml}$) 和取自各个峰 (1-6) 的稀释到 1/10 浓度的样品 ($0.7\mu\text{g/ml}$) 的混合物无论那一个都可诱导 Mol t4 细胞的 DNA 片段化 (图 20A, 带 1-7)。

象图 20B, C 所表示的那样, 用经 HPLC 分离的各个活性峰 (1-6) 的样品 (B; $7\times 3^{-2}\mu\text{g/ml}$, C; $7\times 3^{-5}\mu\text{g/ml}$) 作用于 Mol t4 细胞 48 个小时, 提取细胞 DNA, 进行 2% 琼脂糖凝胶电泳。就象图 20B 表示的那样, 取自各个活性峰 (1-6) 的样品 ($7\times 3^{-2}\mu\text{g/ml}$) 和取自各个峰 (1-6) 的稀释到 1/10 浓度的样品 ($0.7\times 3^{-2}\mu\text{g/ml}$) 的混合物无论那一个都可诱导 Mol t4 细胞的 DNA 片段化 (带 1-7)。象图 20C 表示的那样, 单独 $7\times 3^{-5}\mu\text{g/ml}$, 还是 1/10 稀释的混合物, 在 $0.7\times 3^{-5}\mu\text{g/ml}$ 的低浓度下其作用已经消失了 (带 1-7)。

图 21: 经 HPLC 最终分离的 AIF 虽然可以诱导人癌细胞 BeWo/U937/GCIY 的 DNA 片段化, 但不能诱导人正常细胞 WI-38 的 DNA 片段化。

象图 21A、B、C 所表示的那样, 用来自各个峰 (1-6) 的样品 ($21\mu\text{g/ml}$) 以及取自各个峰 (1-6) 的稀释到 1/10 的混合样品 (各 $2.1\mu\text{g/ml}$) 与 BeWo (A) /U937 (B) /GCIY (C) 细胞反应 48 小时后, 然后提取各个靶细胞的 DNA, 进行 2% 琼脂糖凝胶电泳。与各个活性峰 (1-6) 的抑制靶细胞分裂效果相对应, 取自各个峰 (1-6) 的样品以及取自各个峰 (1-6) 的稀释到 1/10 的混合样品无论那个样品都可诱导靶细胞的 DNA 片段化 (带 1-7)。

象图 21D 所表示的那样, 用取自各个峰 (1-6) 样品 (用量是与靶

癌细胞反应的 3 倍 ($63\mu\text{g/ml}$)) 与人正常细胞 WI-38 反应 48 小时后, 提取 WI-38 细胞的 DNA, 进行 2% 琼脂糖凝胶电泳。无论那一种 AIF 都不能抑制正常细胞的分裂和诱导 DNA 片段化。

图 7~12: 经 HPLC 分离的各活性峰 1-6 (AIF) 的物理化学特性和构造确定

进行 NS 细胞的大量培养 (约 300L), 从最终的 HPLC 分离纯化的各个峰 (1-6) 制备样品。

象图 7~12 各 P1-P6 的左上图表示的那样, 由于从 UV 光谱解析可以看到最大吸收值出现在 260nm 前后, 所以判断是核酸系物质。

因为通过 UV 光谱解析确定了构造解析的方向, 所以通过质量分析 (FAB-MASS) 确定分子量 (下图箭头)。又象图 7~12 (右上) 表示的那样, 利用核磁共振 (NMR) 法确定了 AIF 的最终构造。

以下通过实施例进一步详细说明本发明, 但本发明并不限于这些实施例。

(实施例 1)

(说明培养基、培养液)

于 5% CO_2 、37℃ 条件下培养 3 天, 将 NS 细胞培养上清 (500ml) 冷冻干燥, 通过 C18 柱进行分离。由于活性物质结合在柱子上, 所以利用乙腈、甲醇从柱子上分离、洗脱, 再利用氮气使溶剂挥发, 最后使溶质浓缩干燥。

将用 C18 柱分离的物质溶解在三氯甲烷: 甲醇 (1: 1) 溶液中之后, 点到薄层 (kieselgel) 板上, 通过三氯甲烷: 甲醇: 蒸馏水 (60: 40: 8) 展开。展开后, 被酚红试剂的带分为下级分部 (L) 和上级分部 (U), 挑取相应凝胶, 利用三氯甲烷/甲醇 (1: 1) 分别萃取回收, 用氮气干燥。

利用 ODS-80TM 柱 (TOSOH), 通过乙腈、0.1% 三氟乙酸从 0 到 5% 的直线浓度梯度洗脱, 时间为 360 分钟, 流速 0.5ml/分, 用 OD214nm 吸光度检测, 对具有活性的 TLC 中的 u 级分进行分离纯化, 得到的主

要的六个峰（1-6）（图 18A、HPLC 图）。

得到的目的物 P1、P2、P3、P4、P5 和 P6 分别有 0.014mg、0.017mg、0.021mg、0.050mg、0.035mg、0.018mg。

以下虽然给出了本发明的化合物的制剂化例子，但本发明的化合物制剂化并不限于本制剂化例子。

制剂化例 1

本物质（P1）10（份）（以下相同，表示重量比例）

碳酸氢镁 15

乳糖 75

将上述化合物均匀混合，作成 350 μm 以下的粉末状的或细粒状的散剂。将该散剂放入胶囊容器内作成胶囊制剂。

制剂化例 2

本物质（P2）45（份）

淀粉 15

乳糖 16

结晶纤维素 21

聚乙烯醇 3

蒸馏水 30

将上述成分均一混合，破碎造粒，干燥，然后筛选，作成 177 ~ 1410 μm 大小的颗粒制剂。

制剂化例 3

使用与制剂化例 2 同样的方法作成颗粒制剂后，相对于该颗粒制剂 96 份加硬脂酸钙 4 份，压缩成形，作成直径 10mm 的片剂。

制剂化例 4

相对于用制剂化例 2 的方法作成的颗粒制剂 90 份，加入结晶纤维素 10 份和硬脂酸钙 3 份，压缩成形，作成直径 8mm 的片剂后，然后再加入糖水明胶、沉淀性的碳酸钙混合悬浊液，作成糖衣状。

制剂化例 5

本物质（P3）0.6（份）

非离子系表面活性剂 2.4

生理盐水 97

将上述成分加温混合后，加入到安瓶中，灭菌后作成注射剂。

本发明的式（1）化合物或医药上允许的盐对人正常细胞完全没有伤害，用于人体时预计副作用会很轻，所以因其通过特异的细胞程序死亡引起癌细胞的死亡这一自然的作用机制，人们期待着用它治疗人癌症以及病毒疾病，在医药领域中作为抗肿瘤制剂和抗病毒制剂是有用的。

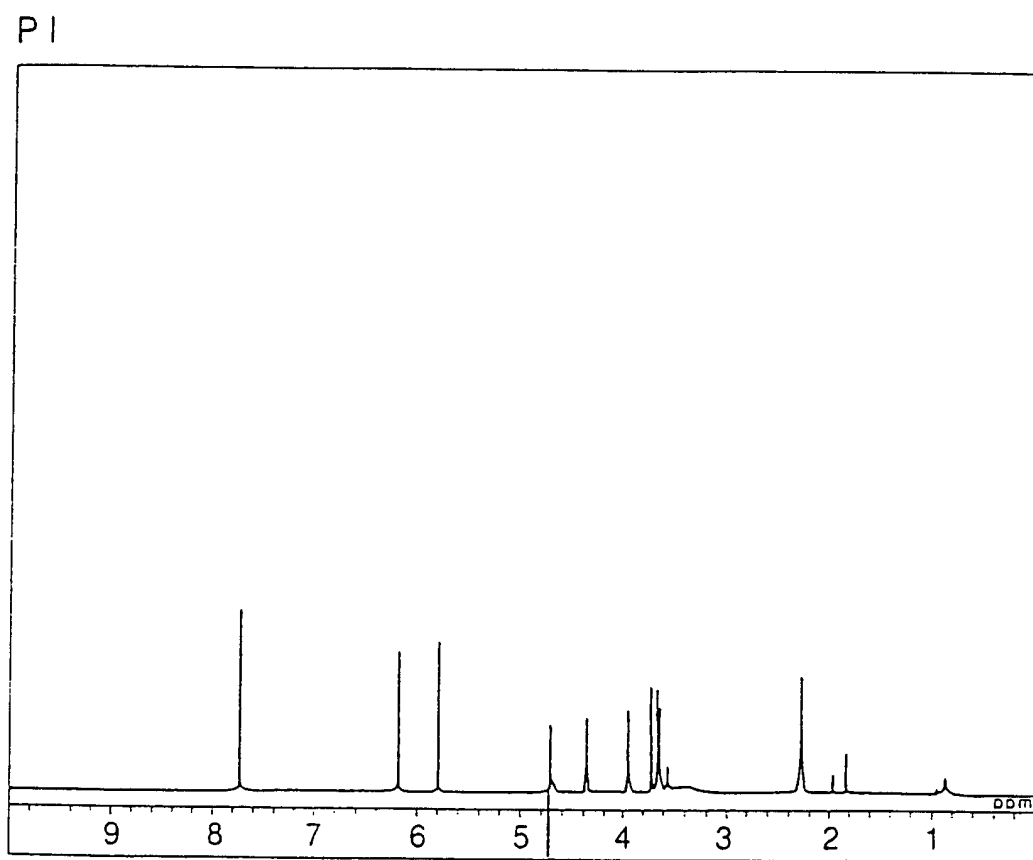
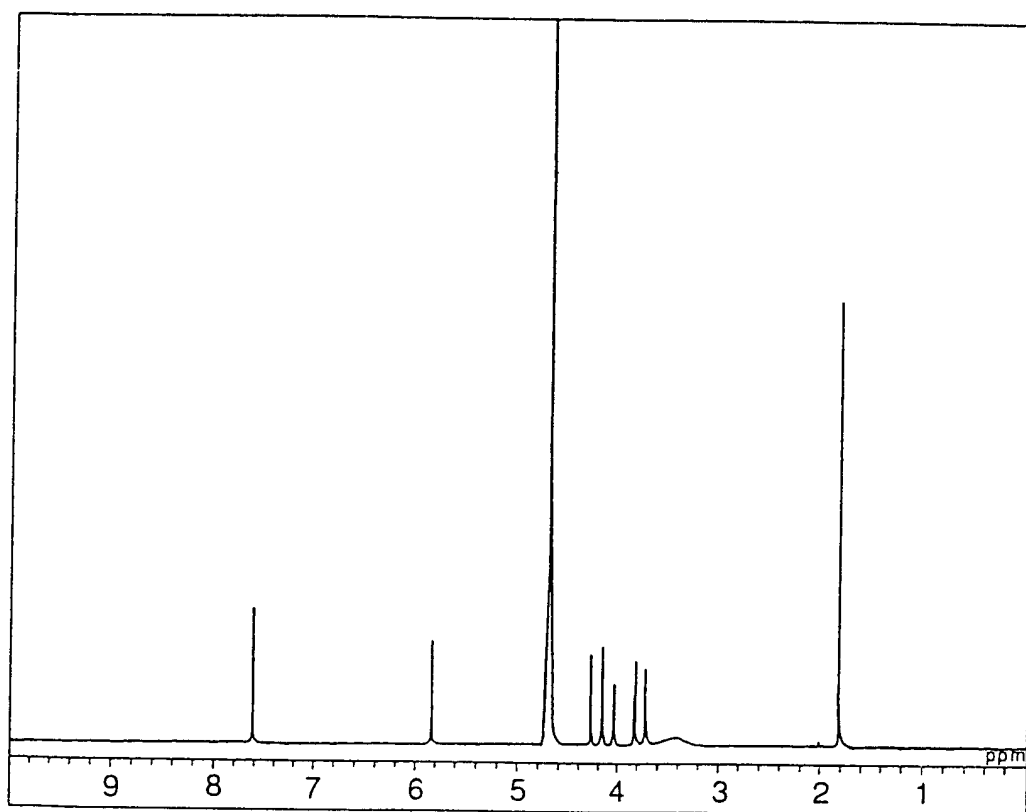


图 1

**图 2**

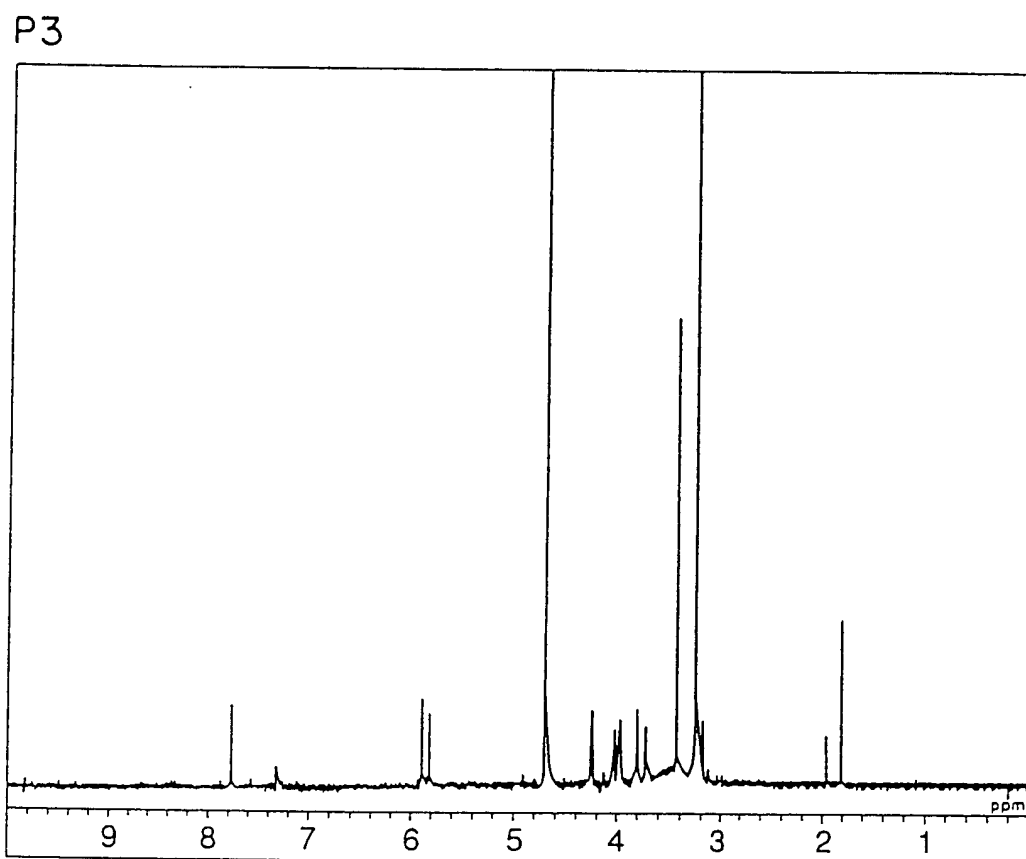


图 3

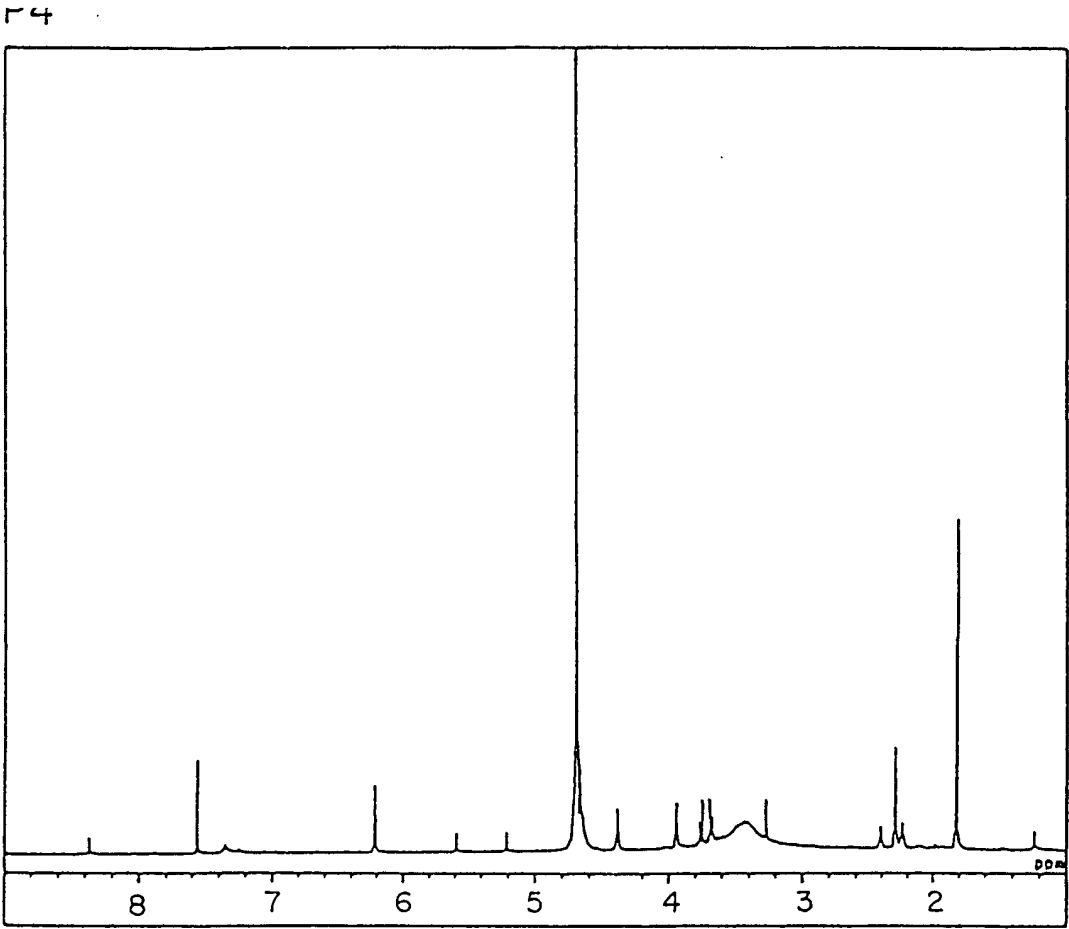


图 4

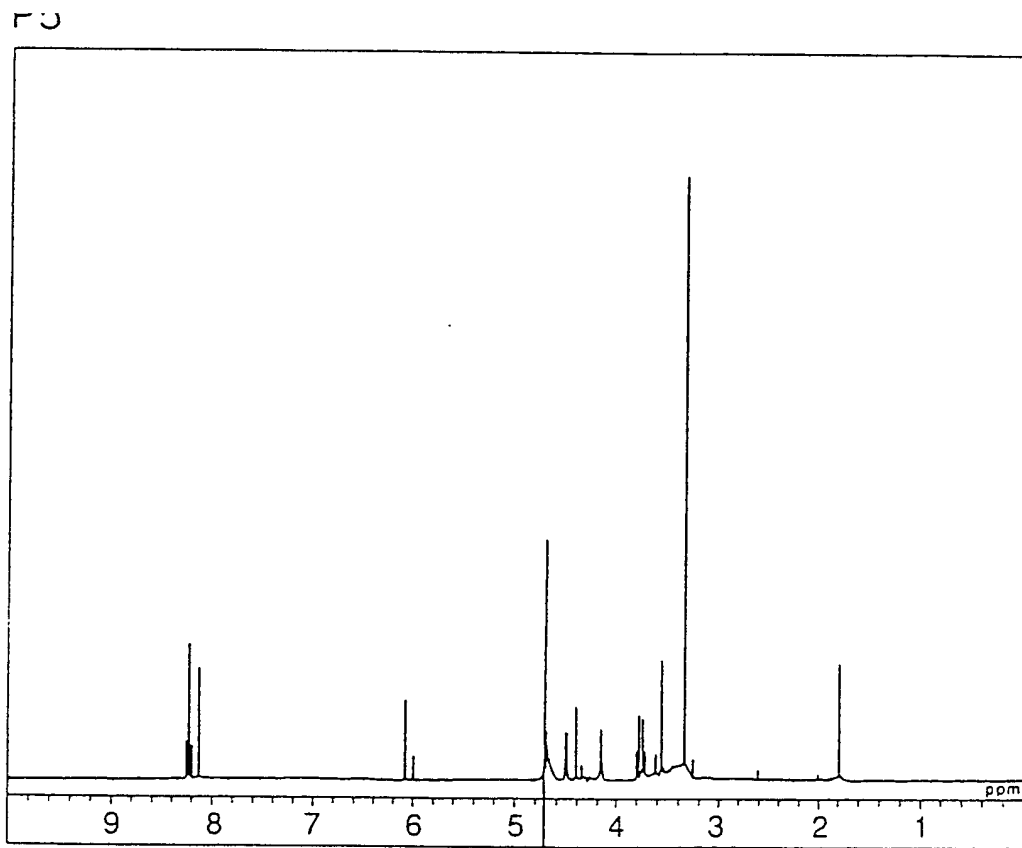


图 5

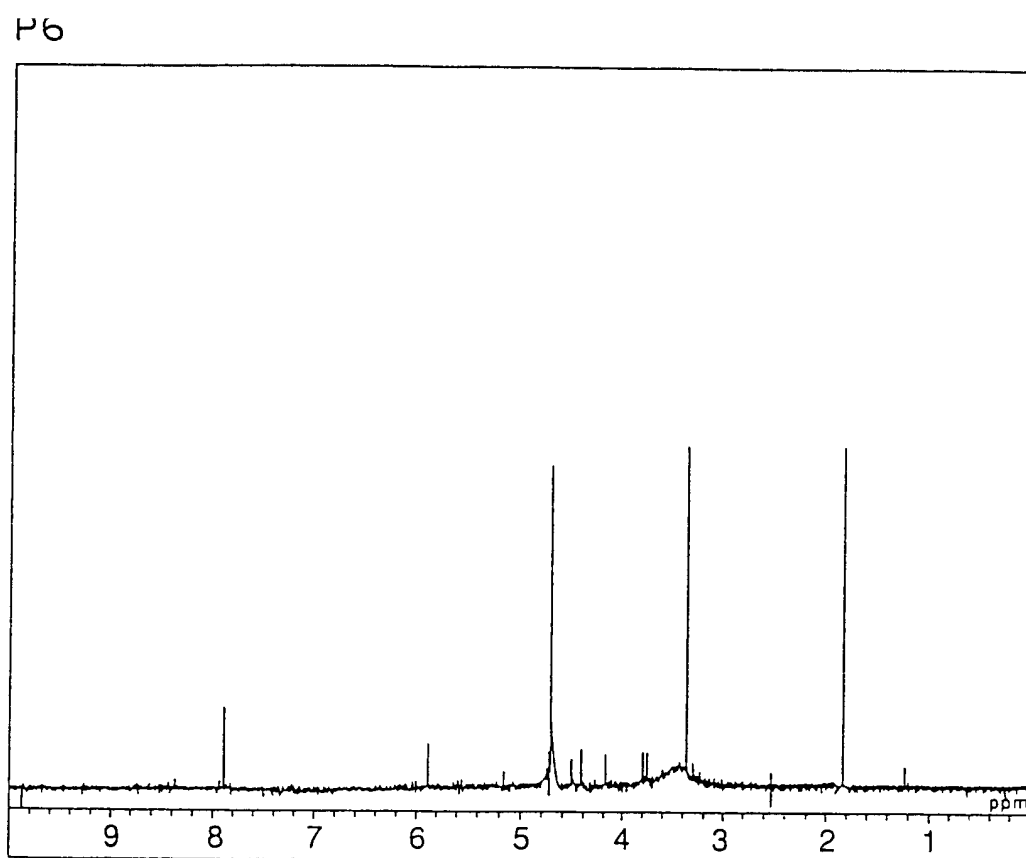


图 6

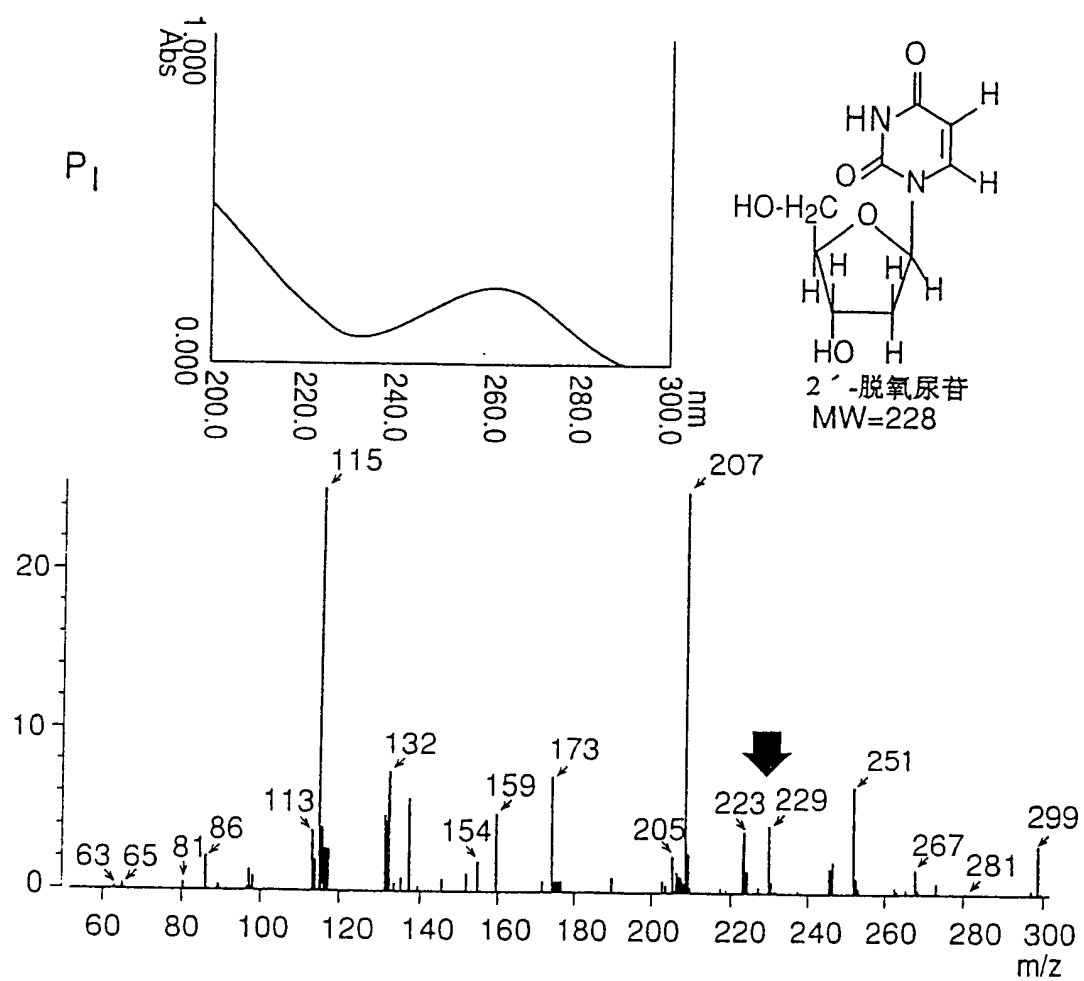


图 7

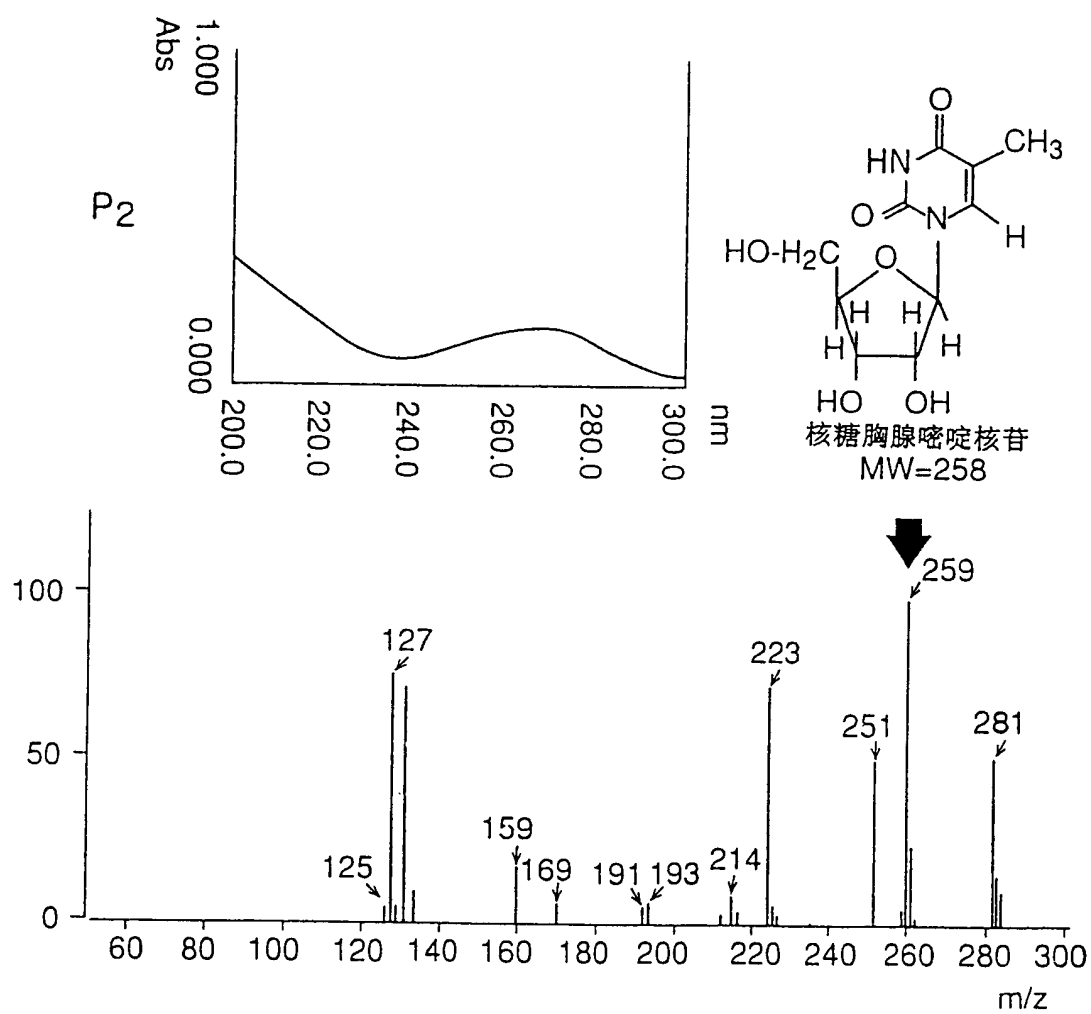


图 8

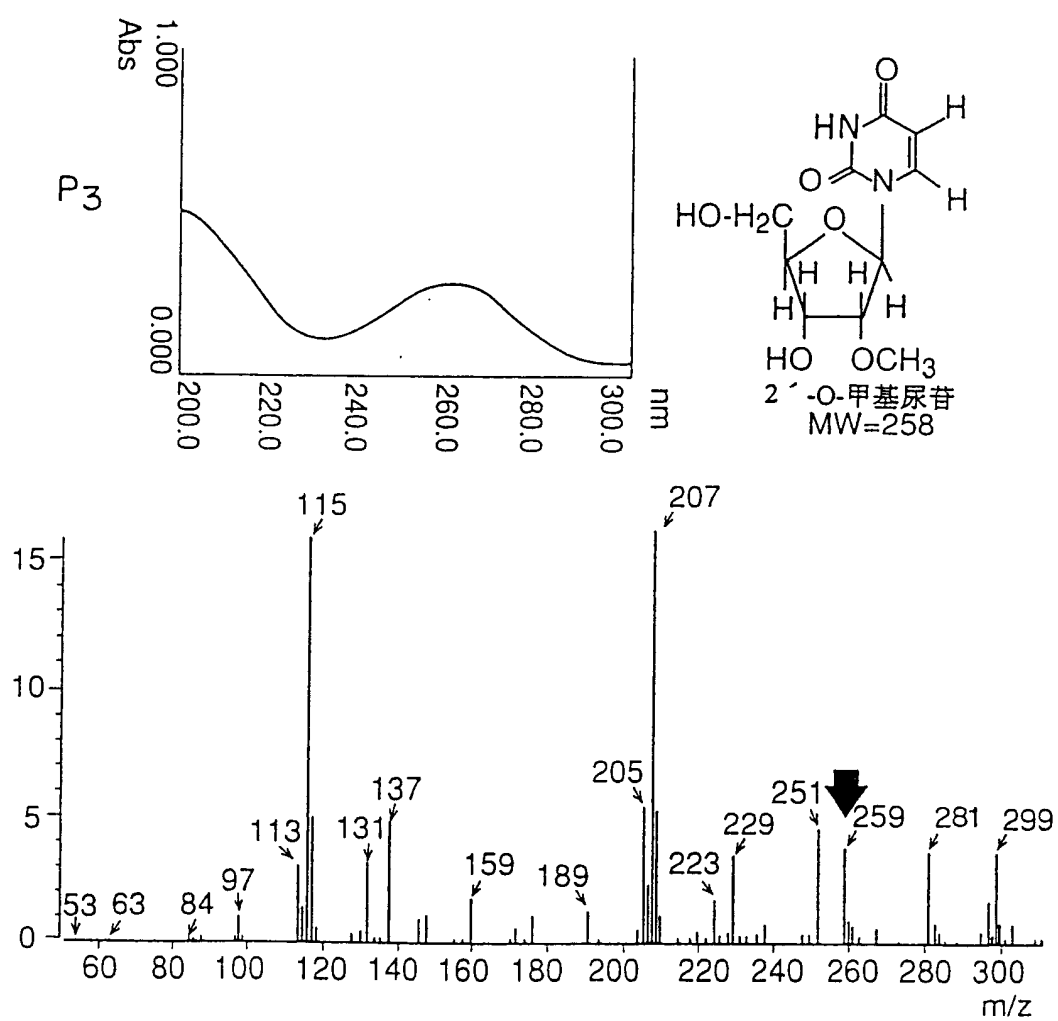


图 9

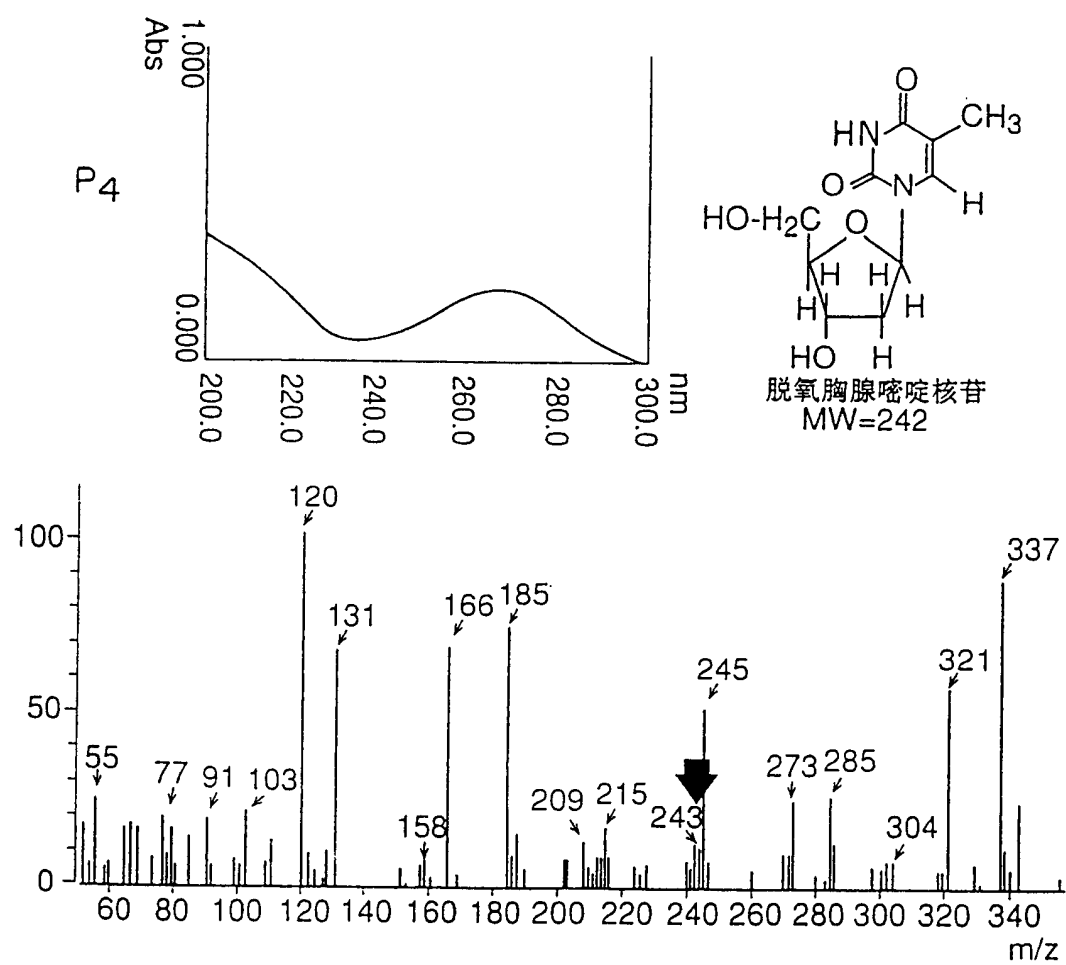


图 10

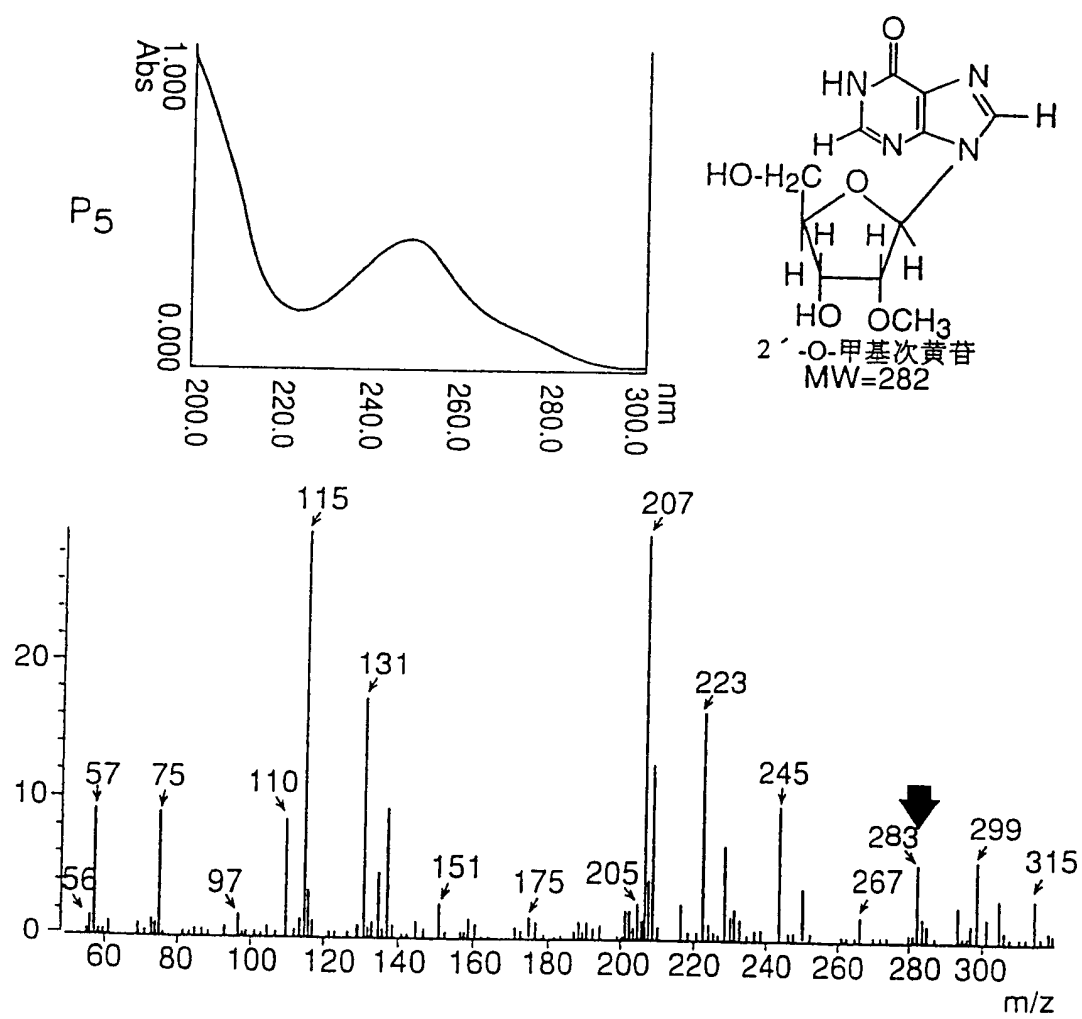


图 11

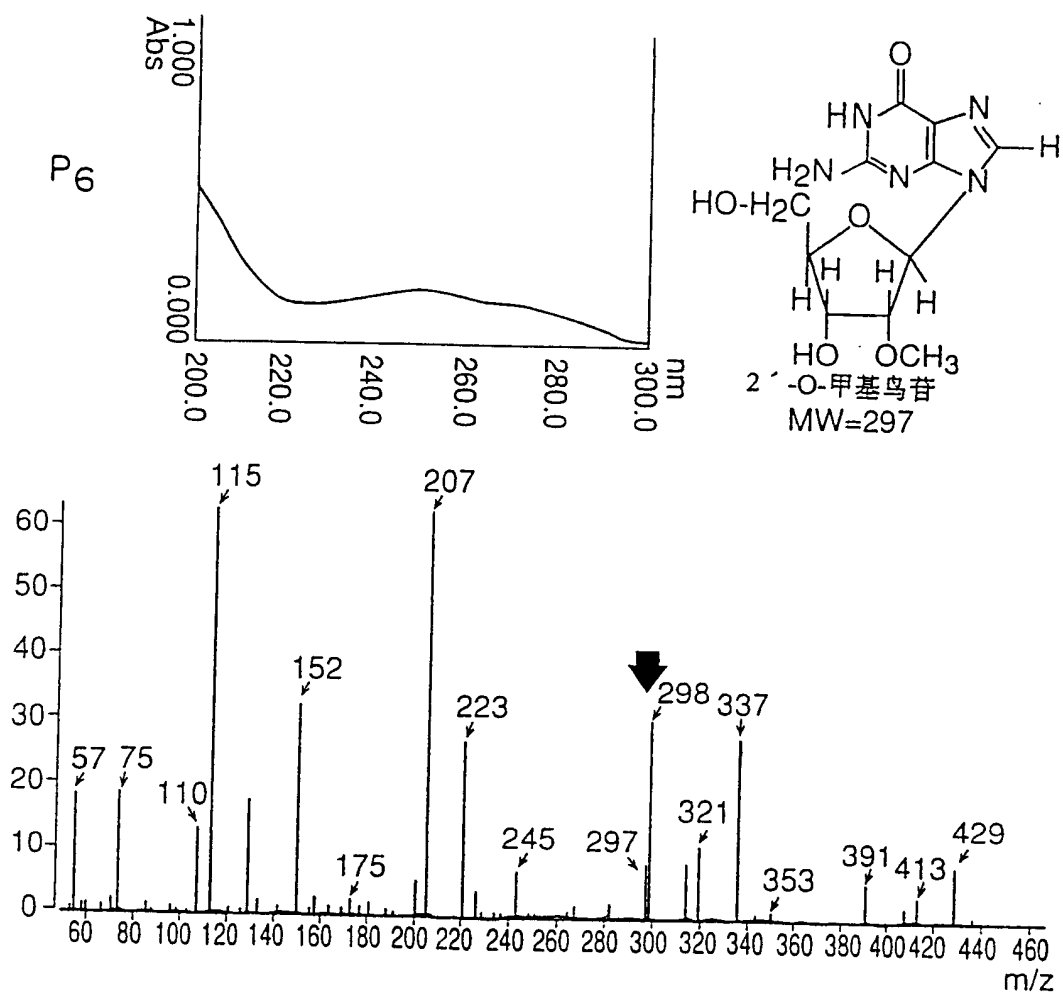


图 12

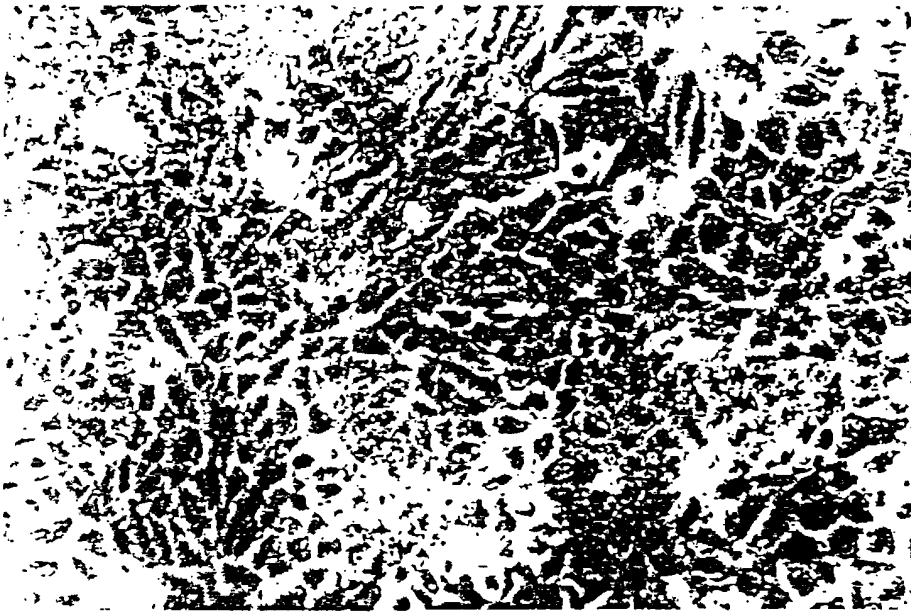


图 13

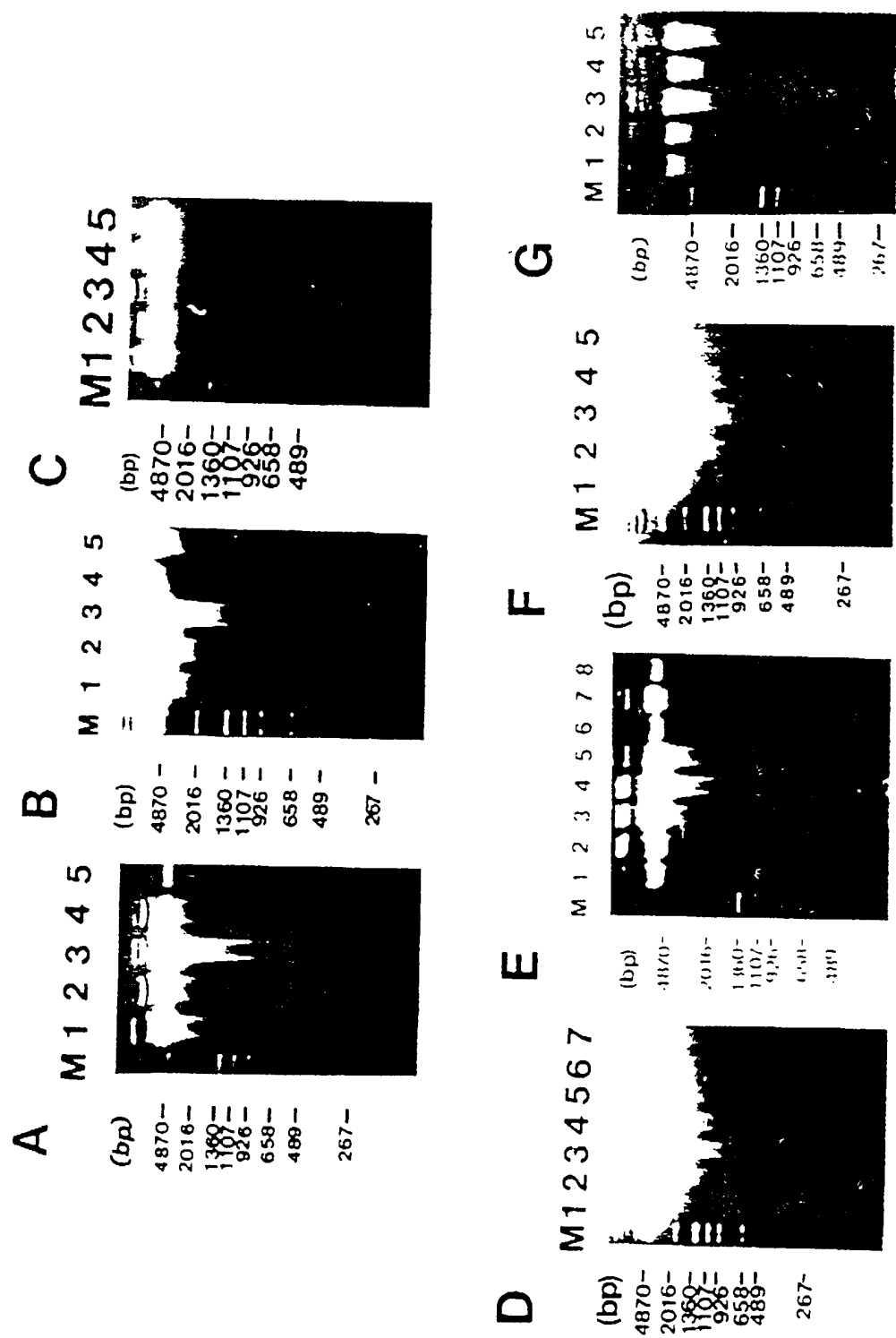


图 14

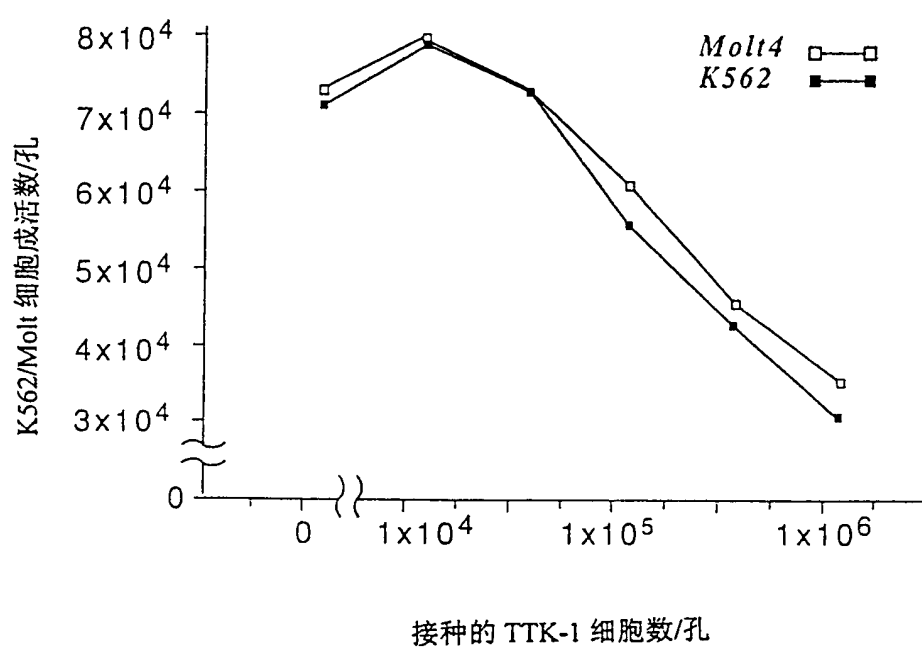


图 15

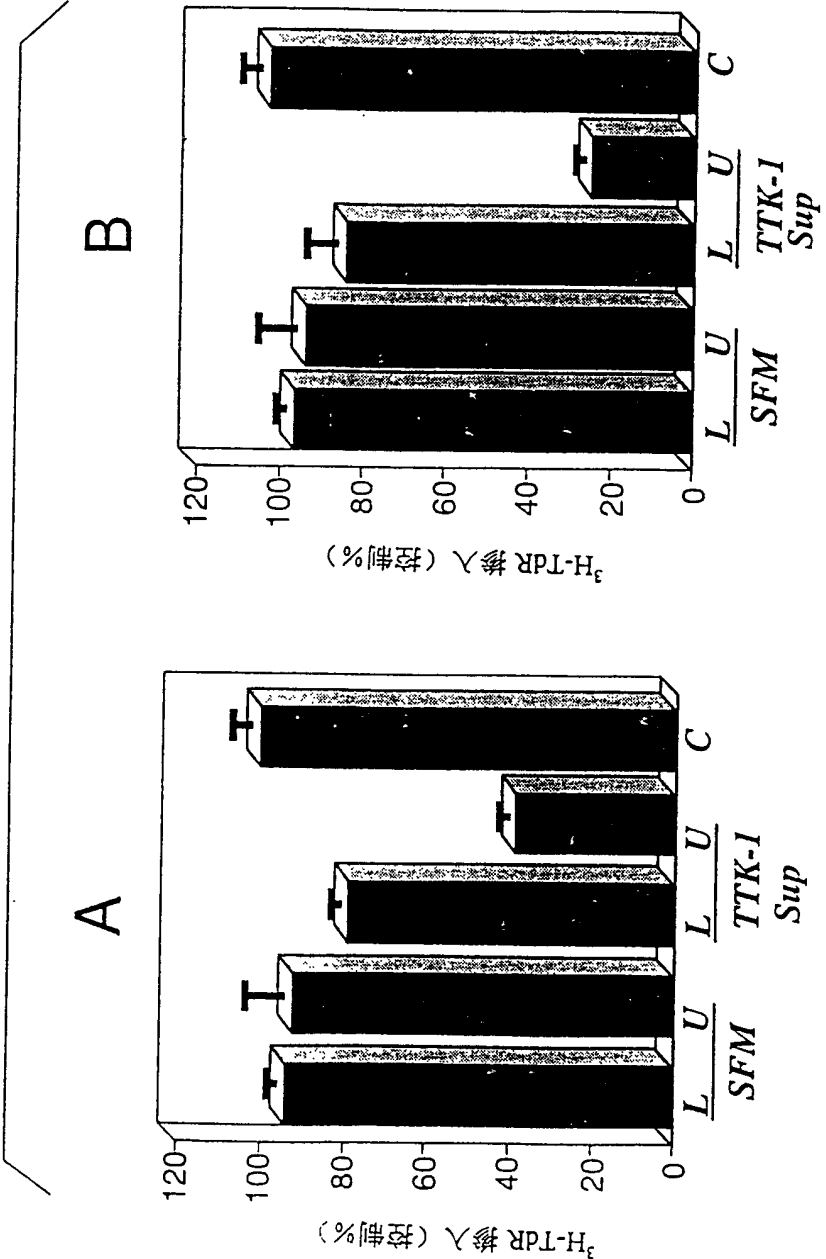


图 16

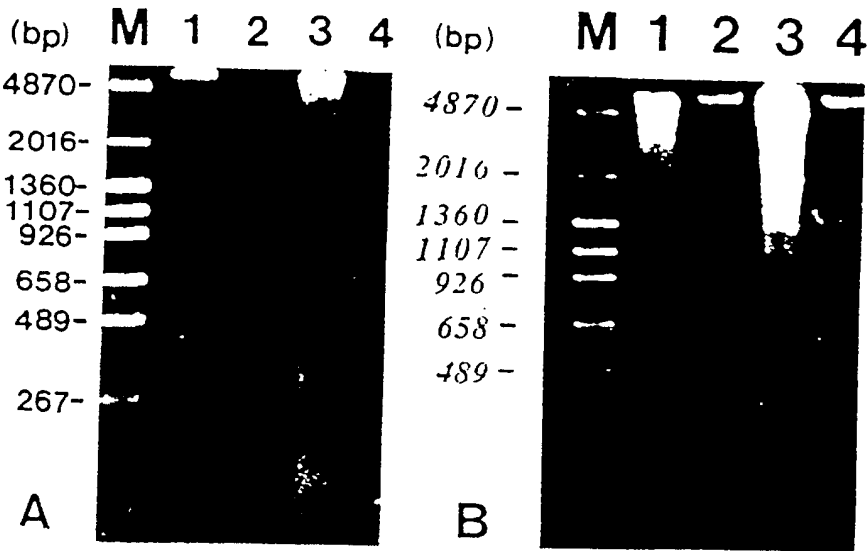
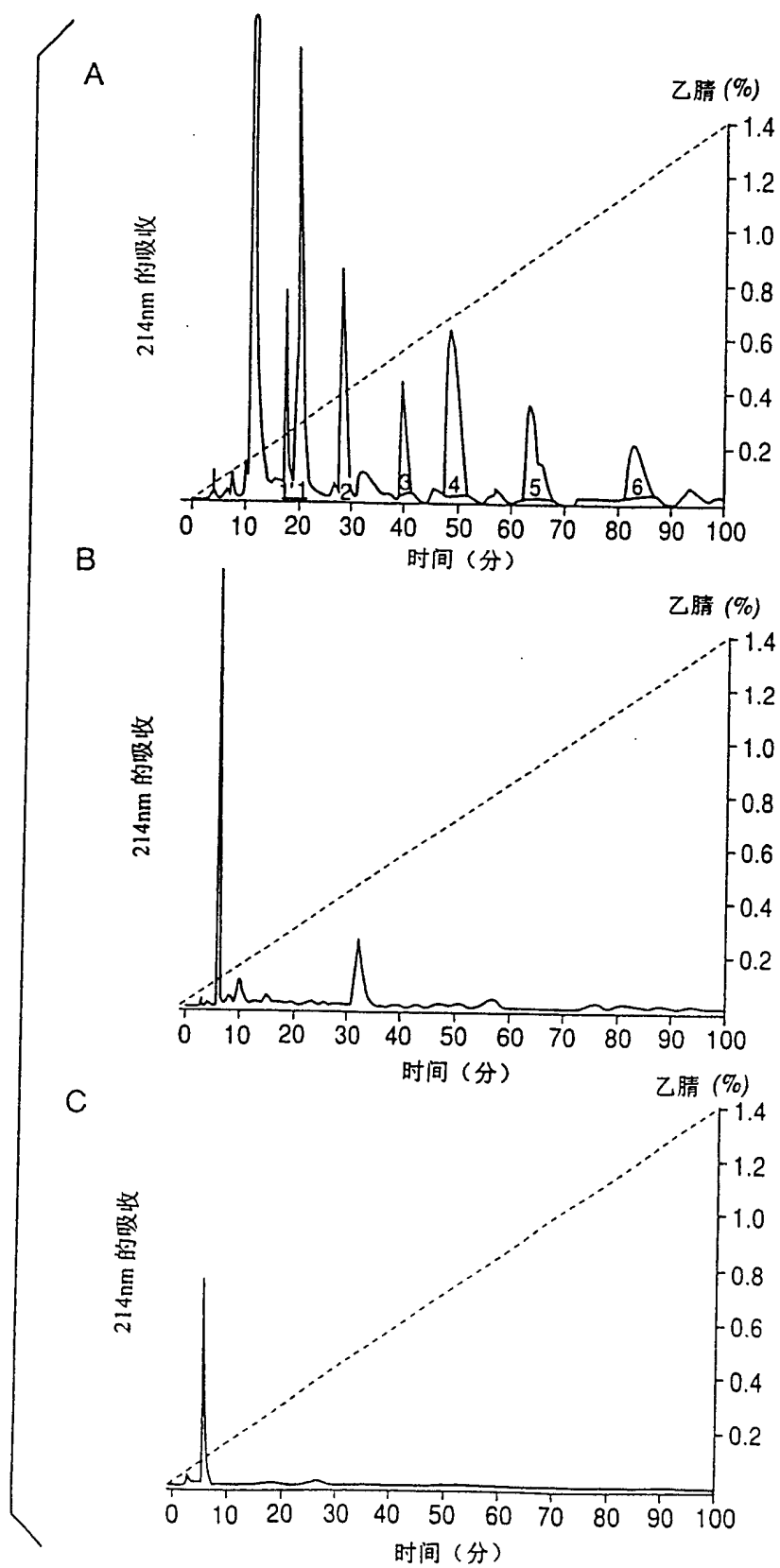


图 17

**图 18**

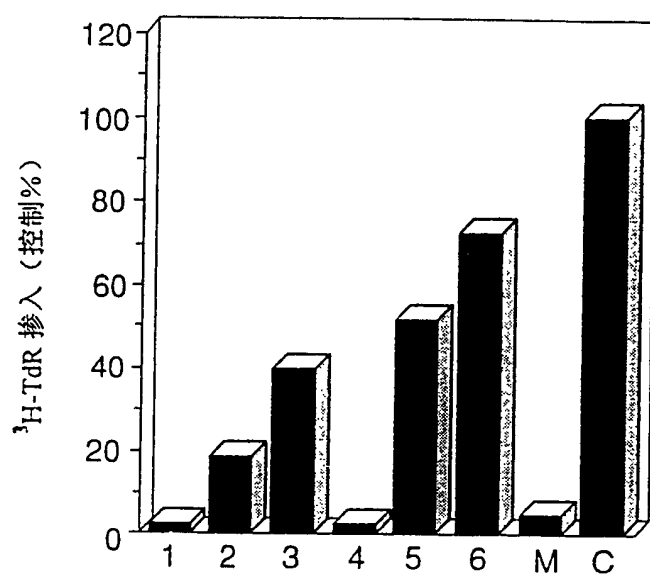


图 19

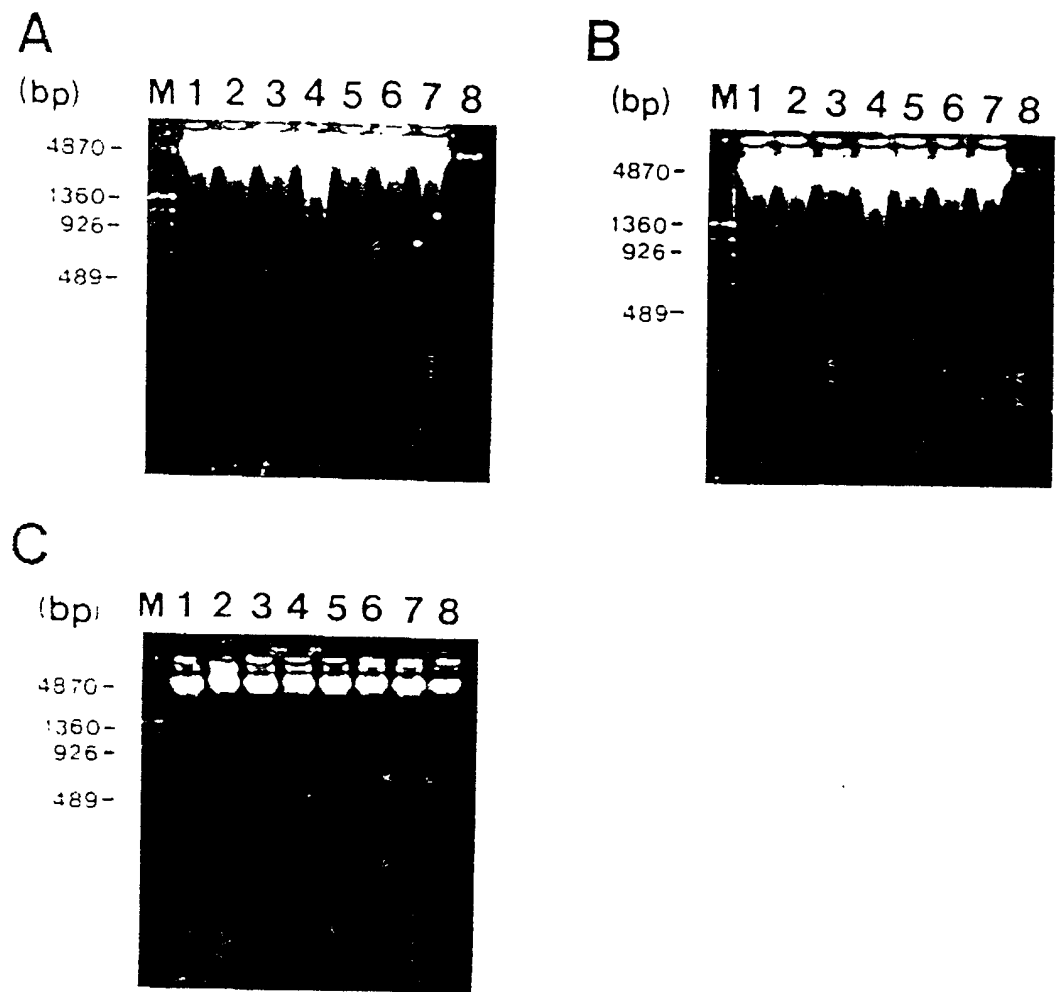


图 20

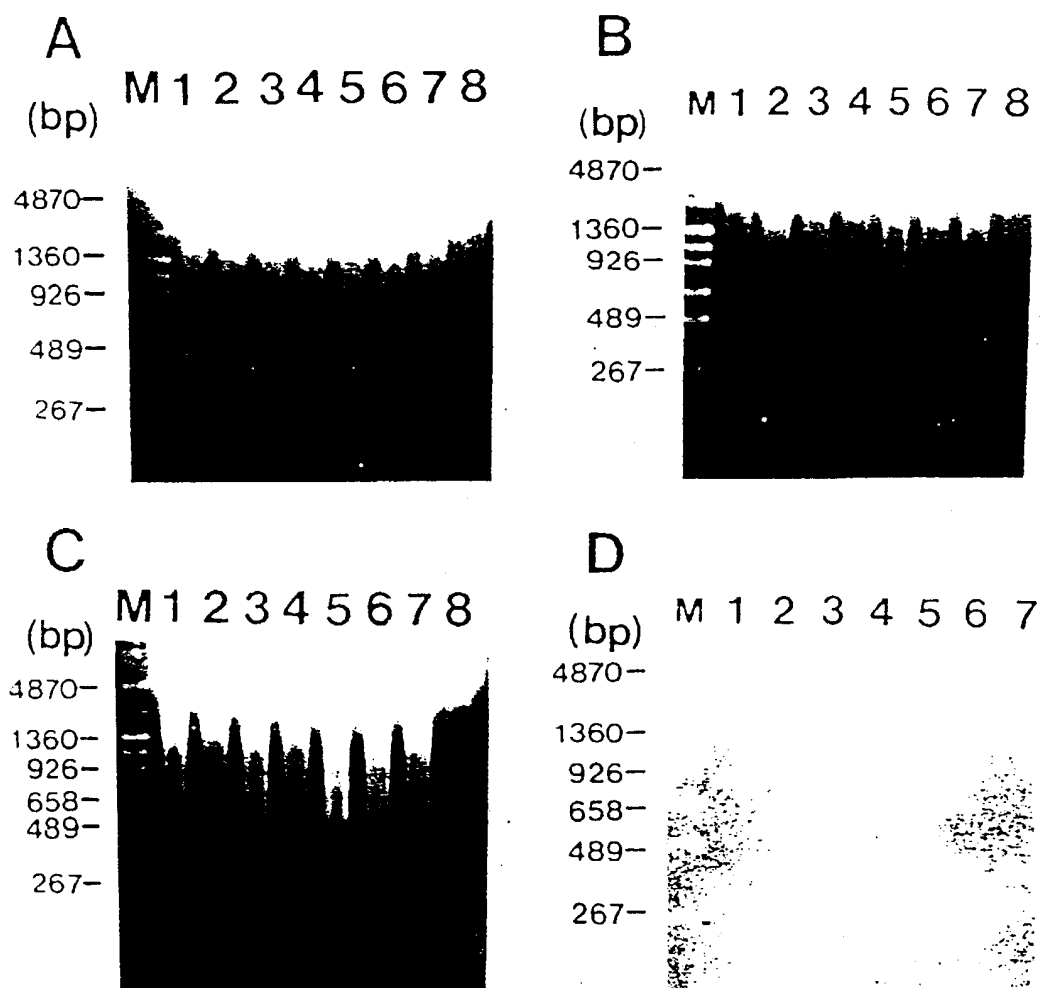


图 21

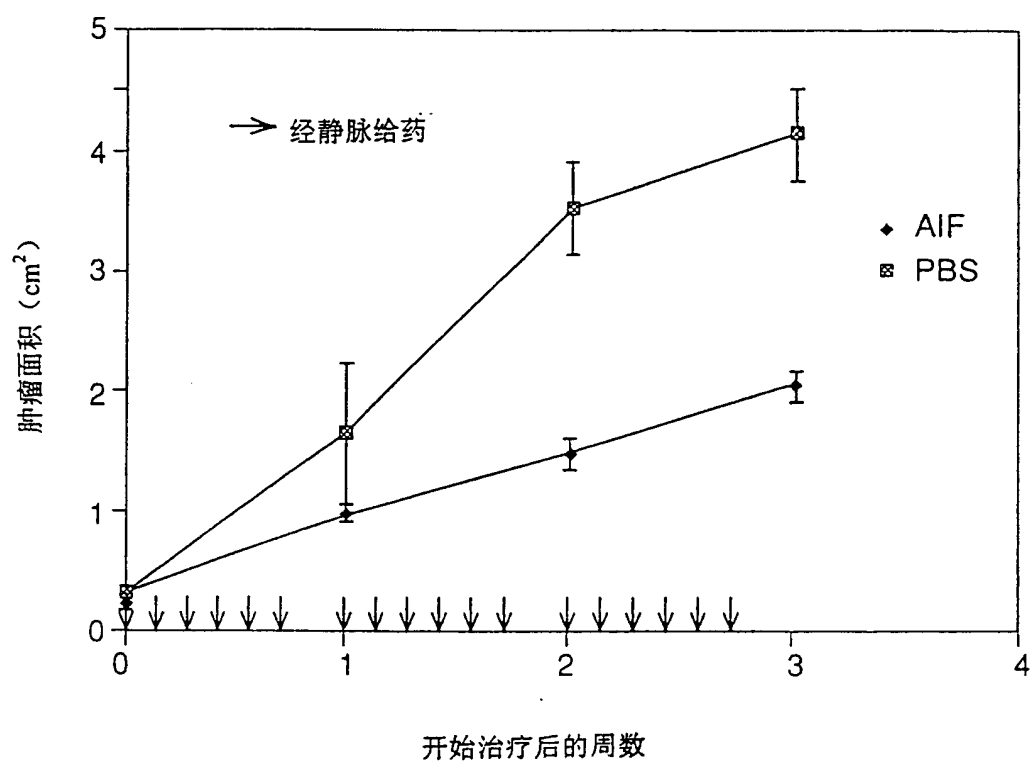


图 22

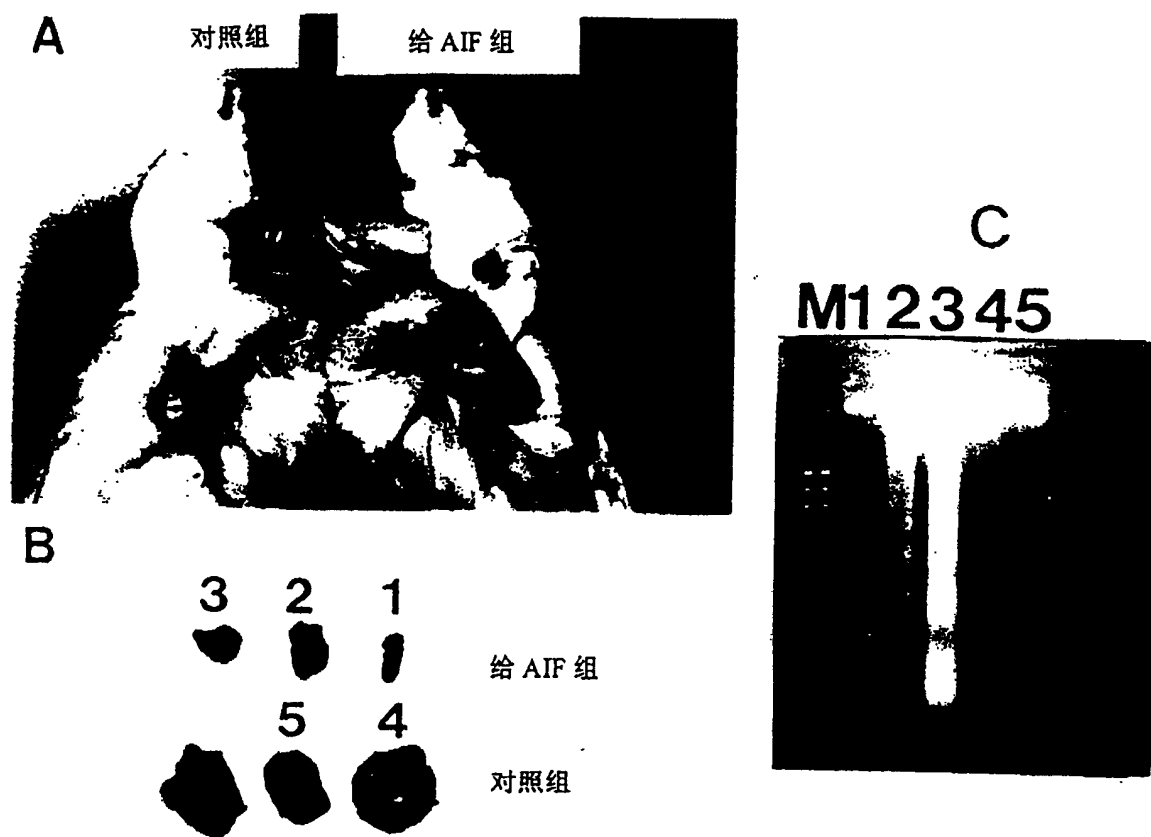


图 23

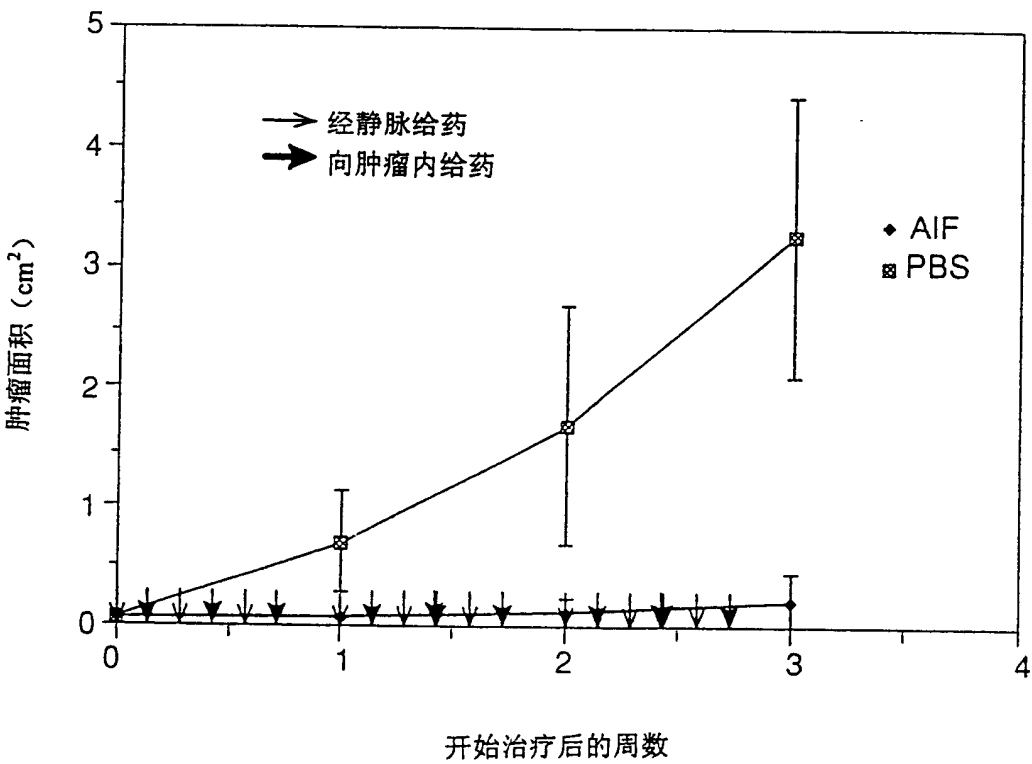


图 24