

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 31/715

A61P 35/00



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 98805127.3

[45] 授权公告日 2004 年 12 月 1 日

[11] 授权公告号 CN 1177593C

[22] 申请日 1998.5.14 [21] 申请号 98805127.3
[30] 优先权
[32] 1997.5.20 [33] BE [31] 97870069.8
[86] 国际申请 PCT/EP1998/002864 1998.5.14
[87] 国际公布 WO1998/052578 英 1998.11.26
[85] 进入国家阶段日期 1999.11.15
[71] 专利权人 蒂西苏克拉非纳德里有限公司
地址 比利时布鲁塞尔
[72] 发明人 简·范鲁 安妮·弗里皮亚特
审查员 刘瑞华

[74] 专利代理机构 上海智信专利代理有限公司
代理人 费开逵

权利要求书 1 页 说明书 14 页

[54] 发明名称 用于结肠癌预防和治疗的果聚糖复合物

[57] 摘要

本发明提供平均聚合度至少为 15 的果聚糖用来制造用于非牛哺乳动物，特别是人结肠癌预防和/或治疗的复合物的应用。本发明也提供可用于非牛哺乳动物，特别是人结肠癌预防和/或治疗的方法，该方法包括给予所述哺乳动物含有效剂量的平均聚合度至少为 15 的果聚糖的复合物。所述复合物可以是药物，也可以是功能性食物。在一个较佳实施例中该果聚糖是菊粉，更佳是平均聚合度至少为 20 的菊粉。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

权 利 要 求 书

- 1、平均聚合度为20-40的果聚糖用于制造用于预防和/或治疗非牛哺乳动物结肠癌的复合物的应用。
2. 按权利要求1的应用，其特征在于哺乳动物选自于由人、狗和猫组成的哺乳动物群。
3. 按权利要求1或2的应用，其特征在于果聚糖为菊粉。
4. 按权利要求3的应用，其特征在于菊粉是菊苣菊粉。
5. 按权利要求4的应用，其特征在于菊粉是平均聚合度为25的菊苣菊粉。
6. 按权利要求1或2的应用，其特征在于复合物是药物。
7. 按权利要求6的应用，其特征在于药物是以口服、直肠给药、或管饲给药的盖仑制剂形式存在。
8. 按权利要求1或2的应用，其特征在于复合物为功能性食物。

说明书

用于结肠癌预防和治疗的果聚糖复合物

发明领域

本发明涉及以某些菊粉类为优先的果聚糖用来制造用于预防和/或治疗非牛哺乳动物结肠癌的复合物的应用。

本发明也涉及该复合物在预防和/或治疗非牛哺乳动物结肠癌的应用及其方法。

发明背景

哺乳动物的癌症是一种自古以来就已经知道的疾病。当今在工业化社会，癌症特别是肺癌，乳腺癌及结肠癌已经成为非牛哺乳动物，特别是人类死亡的主要原因之一。

癌症的发展有多个步骤，其中包括基因组及功能改变的细胞的发生，导致恶变细胞的生成，恶变细胞失去控制的增生，对周围正常组织的侵蚀以及转移。在转移过程中，癌变细胞在体腔中扩散和/或通过血液和/或淋巴扩散到全身，侵蚀各正常组织。对正常组织结构的侵蚀可导致它们功能的失调和/或破坏，最终导致哺乳动物的死亡。

已知有多种因素可促进癌症的生成，其中包括病毒感染，遭受电离辐射，接触矿物性纤维，接触化学致癌物及不恰当的饮食。

在此基础上，人们提出了多种预防措施，并已成功地用于某些癌症的预防和减少发生率。

此外，已经发展了多种手术治疗及化疗用于癌症的治疗。根据癌症的类型，疾病的阶段，以及患病不同个体，这些治疗方法通常显示出不同程度的效果。

目前已有多种可靠的动物模型可用于研究不同癌症的生成和发展，使我们可以用来评价各种化学物质和食品的预防及治疗作用。

流行病学研究结合动物模型上的研究发现食用纤维是哺乳动物预防某些癌症的重要因素

食用纤维通常定义为植物细胞中对人体内消化酶水解作用耐受的组分。食用纤维包括纤维素，半纤维素，多糖，果胶，树胶，蜡以及木质素。根据上述定义，果聚糖类(fructans)这种可溶的，可食用的多糖是食用纤维。果聚糖类是由主要由果糖单位组成的碳水化合物链组成，其中果糖—果糖键合占键合的大多数。果聚糖类通常作为多分散性碳水化合物存在。它们存在于植物中，但也可来源于细菌活动及在酶的催化下合成。所有这些果聚糖具有典型的食用纤维性质，它们均包括在本发明中，并通称为果聚糖类。

果聚糖类是一类已知化合物，它包括左聚糖，菊粉等碳水化合物。左聚糖类是一类 D-果聚糖，一般由基本上相互通过 $\beta(2-6)$ 键连接的果糖链单位组成。菊粉类也是一类一般含有果糖链单位的D-果聚糖，但它是由基本上相互通过 $\beta(2-1)$ 键连接的果糖链单位组成。多数菊粉类糖链的末端是葡萄糖。

左聚糖可以以直链碳水化合物存在，但大多数左聚糖由支链果糖组成。而菊粉类一般是由直链碳水化合物组成，但也有一些是由多条果糖链组成的支链碳水化合物。本发明所指的左聚糖类和菊粉类物质包括直链碳水化合物和支链碳水化合物以及它们的混合物。

菊粉类存在于许多植物和农作物中，在菊苣(chicory)，大丽花(dahlia)的块茎及北美菊芋(jerusalem artichoke)中，菊粉的含量可达新鲜组织重量的约10%—20%。利用已经很成熟的技术，它们可以工业规模从这些植物中分离，通过纯化和精制去除杂质和不需要的碳水化合物组分。

菊粉类可用 GF_n 和 F_m 通式表示，其中G表示一个葡萄糖单位，F表示一个果糖单位，n表示与末端葡萄糖单位连接的果糖单位数目，m表示该碳水化合物中相互连接的果糖单位数。

一个果聚糖分子中糖单位(果糖和葡萄糖单位)的数目，即上述公式中 $n+1$ 值和m通常是指聚合的程度，用(DP)表示。平均聚合度($\overline{DP}$)这个参数也常常应用，该值相当于某一多糖中糖单位数的总数除以糖分子的总数。

植物来源的菊粉是由多分散的果糖链组成，其聚合度(DP)为2—100左右，而细菌来源的菊粉通常有较高的聚合度。

包括通式为 GF_n 和 F_m 的菊粉的果聚糖类，具有较低聚合度的(通常定义为(DP)<10)一般称为寡聚果糖。

菊粉已有商品供应。例如，ORAFTI, (Tienen, 比利时)可提供不同规格的名称为RAFTILINE®的菊粉(从菊苣中得到)。例如，典型的RAFTILINE®有ST, ST-Ge1, 和GR (平均聚合度($\overline{DP}$)为10, 按重量计算含约8%葡萄糖, 果糖和蔗糖), LS(平均聚合度也为10, 但按重量计算含不到1%的葡萄糖, 果糖和蔗糖)和HP(高效菊粉)及HP-Ge1 (平均聚合度 ≥ 23 , 通常约为25, 基本上无葡萄糖, 果糖和蔗糖)。

寡聚果糖通常通过菊粉部分酸解或酶解，但也可按照已知的技术利用蔗糖酶法合成。

寡聚果糖有商品供应。例如，ORAFTI, (Tienen, 比利时)就可提供多种规格的名称为RAFTILOSE®的寡聚果糖，例如，RAFTILOSE® P95, 含约95%

重量的寡聚多糖，聚合度为2—7，含大约5%重量的葡萄糖，果糖和蔗糖。

研究现状

食用纤维，特别是果聚糖类，已知对哺乳动物的生理功能及机理有多种作用。

在非牛哺乳动物中，这些纤维在嘴，胃及小肠中几乎不代谢，它们几乎全部进入大肠，并在结肠菌群作用下发酵。该现象在非牛哺乳动物中导致各种对健康有益的作用，例如使小肠通过时间减少，小肠pH下降，结肠中双歧菌被激活以及粪便量和排便次数增加。

果聚糖类，特别是菊粉，也已知对脂代谢产生有益的作用，包括血胆固醇和甘油三脂下降作用和提高HDL/LDL比例作用。

P. D. Copper等(Molecul. Immunol., 23(8) 895, (1986))报道 γ -菊粉(一种大丽花菊粉的特殊多晶型物)可激活补体的备用通路，目前认为一个补体备用通路的激活剂有可能具有潜在的非特异性的抗肿瘤作用。

此外，果聚糖，特别是菊粉，还报道具有预防和抑制癌肿的作用。

P. D. Copper等(Molecul. Immunol., 23(8) 903, (1986))证明腹腔注射 γ -菊粉可延长荷黑素瘤小鼠的存活时间。

研究表明，双歧菌培养在大鼠实验中可抑制2-氨基-3-甲基-咪唑[4, 5-f]喹啉对结肠，肝，和乳腺的致癌作用(B.S. Reddy et al., Cancer Res., 53, 3914-3918, (1993))，也可抑制氧化偶氮甲烷(azoxymethane)对结肠的致癌作用(N. Kulkarni et al., Proc Soc. Exptl. Biol. Med. 207, 278-283, (1994))。

欧洲专利申请 EP0692252 A1 披露寡聚果糖 RAFTILOSE® P95 (ORAFIT, 比利时; 由95%寡聚果糖链组成, 聚合度 (DP) 为2-7) 和菊粉类 RAFTILINE® ST, GR和LS (平均聚合度约为10) 对大鼠注射N-甲基亚硝基尿 (N-methylnitrosourea, MNU) 引起的乳房致癌作用及小鼠移植Taper 肝癌的生长均有抑制作用。已研究过的寡聚果糖和菊粉显示具有类似的抗致癌物质作用和癌抑制作用。

此外, 有许多文章也介绍了服用食用纤维与减少结肠癌发生的关系, 例如 J. Potter et al. Principles of Chemoprevention. IARC Scientific Publication No 139, 61-90, (1996); G.R. Howe et al., J. Natl. Cancer Inst. 84, 1887-1896, (1992) 及 B.S. Reddy et al., Gastroenterol., 102, 1475-1482, (1992)。

尽管人们已做了巨大努力与癌症, 特别是结肠癌作斗争, 但要预防, 抑制及治疗结肠癌还不十分有可能。因此, 医学正在继续寻找可改进预防, 抑制和治疗结肠癌的方法。考虑到多种因素, 如病人的舒适程度等, 化疗是最先被考虑的治疗方法。因此, 人们正在不断寻找比现有药物或治疗方法具有更好的, 可抑制和/或治疗结肠癌作用和/或较少副作用的新药物及新方法。

发明描述

申请人提出的本发明将为上述一个或几个问题提供解决办法, 并有可能提供新的优点。

本发明中所用结肠癌一词是指结肠癌病变过程中的任何一步, 包括结肠癌发生, 结肠中癌变细胞的形成, 癌变细胞的增生, 结肠中癌肿的形成和/或所述癌变细胞对正常结肠组织的侵入。

本发明是建立在发明人对果聚糖类大量研究的基础上，发明人发现对非牛哺乳动物结肠癌的预防和抑制作用而言，具有较高聚合度的果聚糖类，特别是平均聚合度为15或更高的果聚糖类比较低聚合度果聚糖类的作用更强。

根据以往的研究结果，可以预测到较高聚合度的果聚糖类及某些较低聚合度果聚糖类均对结肠癌有预防和/或抑制作用。但是，仅根据这些结果是不可能预测到本发明人的惊人发现，即果聚糖类特别是具有较高平均聚合度的菊粉对非牛哺乳动物结肠癌的预防和抑制作用比具有较低平均聚合度果聚糖类强得多。

因此，从一方面来讲，本发明涉及到具有平均聚合度至少为15的果聚糖的应用，用于制造一种复合物用来预防和/或治疗非牛哺乳动物的结肠癌，特别是人类结肠癌。

从另一方面来讲，本发明涉及到一种包含具有平均聚合度至少为15的果聚糖的复合物的应用，用于预防和/或治疗非牛哺乳动物的结肠癌，特别是人类结肠癌。

更进一步来讲，本发明涉及到一种预防和/或治疗非牛哺乳动物的结肠癌，特别是人类结肠癌的方法，通过对所述结肠癌易感哺乳动物需要这种预防或治疗时的给予一种含有效剂量的平均聚合度至少为15的果聚糖的复合物。

在一较佳实施例中，果聚糖是左聚糖，平均聚合度较佳至少为20，更好是20到50之间。

在另一较佳实施例中，果聚糖是平均聚合度至少为20，更好是20到70之间的菊粉。在还有一个较佳实施例中，菊粉的平均聚合度在20至40之间。典型的较佳菊粉具有平均聚合度25左右。

主要由直链多糖组成的菊粉或含有约2%重量的支链多糖的菊粉适合本发明。但是含有高百分比支链多糖或主要由支链多糖组成的菊粉甚至由上述直链和支链菊粉组成的混合物仍适合本发明。适合本发明的典型菊粉是菊苣菊粉，例如RAFTILINE® HP和RAFTILINE® HP-Gel（都是高效菊粉（简称HP菊粉）ORAFIT，比利时），平均聚合度约25。

对于本发明而言该复合物在这里是一种药物（就是说对于被给药的哺乳动物该复合物具有预防和/或治疗的效果），但也可以说该复合物是一种功能性食物（就是说该食物含有除其天然特性外的额外功效成分，对于人类或非人类哺乳动物能产生有利的生理效应）。对于本发明而言的功能性食物，额外的功效成份是指上述所定义的包含左聚糖和菊粉的果聚糖。举例而言，典型的有利生理效应有对于消化道的有益作用，对于脂质代谢的效果以及对癌症特别是结肠癌的预防作用。

与本发明一致，该复合物是一种药物，它可由所述的果聚糖组成，或包含与任何药学上可接受的载体相结合，也可和任选一种或多种具有生理活性的化合物，药物或药物前体相结合的所述果聚糖。所说的药物可以有多种剂型，也有已知的相应给药方法。药物最好制成粉剂，片剂，软胶囊，糖浆，溶液或悬液，通过口服给药。另外，若将其制成适当的盖仑制剂(galenic form)，也可胃肠外给药，经管道给药或直肠给药。

本发明中的复合物作为功能性食物时，常口服，可以任何已知的食物形式存在，举例而言，可以是涂抹物，乳制品如牛奶，甜点，酸乳酪或干酪，酒精类或非酒精类饮料，面包制品，巧克力，冰淇淋，肉制品，水果制品，糖果制品，谷类食物，沙司，汤，快餐，干混合物，代餐食品，宠物食品以及其他类似物。

根据应用的对象和果聚糖的种类，预防结肠癌的每日有效剂量较好范围是0.01到2g/kg体重，更好是0.05到0.5g/kg体重。

根据应用的对象，果聚糖的种类及结肠癌的进程，对结肠癌提供抑制和/或治疗作用的每日有效剂量较好范围是0.2到3g/kg体重，更好是0.5到1.5g/kg体重。

在预防和/或治疗，包括抑制和/或治疗非牛哺乳动物，特别是人结肠癌的方法中，对结肠癌易感病人需要这种治疗时可给予本发明所讲的复合物的日常剂量，根据已知的方法，可在一定期间内每一天给予一次或几次随由复合物提供的有效浓度而变。当该复合物作为一功能性食物，目的主要是起预防作用时，该功能食物最好以一种或几种形式，并服用较长时间，最好终生服用。

与聚合度较低的果聚糖类相比，较高聚合度的果聚糖类除了具有更好的生理性，预防和/或治疗作用外，按本发明的复合物及其治疗方法还有其他许多优点。例如，该复合物服用或给药方便，治疗方法容易，用药哺乳动物没有不适。此外，复合物中存在的较高聚合度的果聚糖链可减少服用不消化碳水化合物出现的不适如软便，腹泻，气胀，及小肠痉挛。

本发明果聚糖类又一值得考虑的优点是，特别是菊苣菊粉是天然产物，它们可生物降解，无毒性，新生儿和成人包括孕妇和老年人均可服用。与已知的化疗药物相比，用本发明的复合物通常很容易受到用药者的欢迎，不会引起明显的不良副作用，不会有明显的不适。此外，本发明所提到的果聚糖类已有大量供应，而且价格也可以接受。

实验部分

为了支持本发明，以下是检测寡聚果糖和HP菊粉对致癌剂引起大鼠结肠内异常肠腺灶(aberrant crypt foci, ACF)形成的影响研究结果。

在实验动物中，实验性引起结肠发生癌变过程中，常常观察到异常肠腺灶。ACF是一种结肠内肿瘤发生前的损伤(McLellan, E.A. et al., Cancer Res., 51, 5270-5274, (1991); Wargovich, M.H., et al., Cancer Epidemiol Biomarkers & Prev., 5, 355-360, (1996))。Pretlow, T.P. et al., (J. Cell. Biochem., 16G (Suppl.), 55-62, (1992))发现这些损伤同样也存在于结肠癌患者的结肠粘膜上。他认为ACF很可能是早期损伤，该损伤可最终发展为腺癌和癌。ACF在apc基因和ras癌基因有突变，可能作为结肠癌发展的标志 (Vivona, A. A., et al., Carcinogenesis (Lond.) 14, 1777-1781, (1993))。

有证据表明，一些ACF形成的抑制剂可减少实验动物结肠癌的发生率(Wargovich, M.H. et al., Cancer Epidemiol Biomarkers & Prev., 5, 355-360, (1996))，该结果提示ACF的生成可用于评价具有结肠癌化学预防作用的新化合物。

材料与方法

动物，饲料，致癌剂及化学预防剂

氧化偶氮甲烷(Azoxymethane AOM)从Ash Stevens (Detroit, MI, 美国)获得。RAFTILOSE® P95 (干品中含95%寡聚果糖)和 RAFTILINE® HP (干品中含99.5%菊粉)从ORAFITI (Tienen, 比利时)获得。由菊苣菊粉部分酶解生成的RAFTILOSE®是一个多分散性 β [2-1]果聚糖，其DP在2-7之间， $\overline{DP}$ 为4.5。RAFTILINE® HP(即高效菊粉，简写为HP菊粉)是一种菊苣菊粉，其

18
中较低DP部分已经去除。它的DP在10至60, $\overline{DP}$ 为25。选用这些试验品的目的是观察聚合度对其作用的影响。

Weanling 雄性 F344大鼠得自Charles River Breeding 实验室 (Kingston, NY, 美国)。所有AIN-76A部分纯化饲料的配料组成均来自Dyets Inc (Bethlehem PA, 美国), 4℃保管直至配制实验饲料时。这种部分纯化饲料中百分组成的配比为: 酪蛋白, 20; D, L-蛋氨酸, 0.3; 玉米淀粉, 52; 葡萄糖, 13; 玉米油, 5; alphacel, 5; 矿物混合物 (AIN-76A), 3.5; 维生素复合物 (AIN-76A), 1; 及胆碱二酒石酸, 0.2 (Reddy B. S. et al., Cancer Res., 48, 6642-6647, (1988))。大鼠在隔离室内饲养1周, 饲料为改进的AIN-76A部分纯化饲料。动物按重量随机分为不同的实验组, 将动物转移到动物室, 在12小时光照/12小时黑暗循环运转, 相对湿度50%及室温21℃控制条件下, 动物饲养在有机玻璃笼中, 每笼三只大鼠。将10%的RAFTILOSE®或RAFTILINE®分别加到对照饲料中 (淀粉作相应减少)。

实验步骤

从5周龄开始, 动物组给予对照或试验饲料。除了空白组大鼠外, 所有动物在7及8周龄时均皮下给予AOM, 每周一次, 剂量为15mg/kg体重。空白组给予同体积生理盐水。大鼠继续给予对照或试验饲料一直到实验结束, 当动物达16周龄, 所有动物用CO₂无痛苦处死。取出动物的结肠, 用Krebs-Ringer溶液冲洗, 从盲肠到肛门打开结肠, 放入10%缓冲福尔马林液中, 在两张滤纸片之间放平。结肠至少在缓冲福尔马林液中放24小时, 然后切割成2cm长片段, 放入含有0.2%亚甲基兰的 Krebs-Ringer溶液的皮氏培养皿 (Petri dish) 中5-10 分钟。然后, 将组织粘膜面向上放在显微镜载玻片上, 在光学显微镜下观察。按照常规步骤记录ACF (McLellan E. A., et

al., Cancer Res., 51, 5270-5274, (1991)). 异常肠腺与周围正常肠腺的差异表现为体积变大, 从组织层到细胞的基底表面的距离明显增加, 并可见明显的肠腺周围区。肠腺多重性 (Crypt multiplicity) 以每一病灶中肠腺的数目形式测定, 分为每一病灶中有3, 4或更多异常肠腺。全部结肠由一观察者作记录他并不知道来自何种处理的动物, 该记录再由另一研究人员随机核对。

统计分析 所有结果均以平均数 $\pm$ SD表示, 并用student的单侧t-检验法(one-tailed student's t-test)分析, $P<0.05$ 时, 为差异显著。

结果

一般观察 在喂食对照饲料或实验饲料(含10%菊粉或寡聚果糖)的AOM组或空白组中, 各组动物的体重无明显差异(表1)。喂食菊粉或寡聚果糖动物的肝, 肾, 胃, 小肠及肺等组织无明显病变可见。

异常肠腺灶 表2是大鼠喂食了对照饲料或实验饲料后AOM引起结肠中异常肠腺灶的结果。在给予生理盐水, 同时喂食对照饲料或含菊粉或寡聚果糖的试验饲料的动物中, 结肠中未见异常肠腺生成。在喂食对照饲料, 同时给予AOM的动物中, 结肠中的异常肠腺平均约为120 ACF/结肠。异常结肠主要发生在结肠远端。本研究中疗效观察依据是对结肠中ACF总数的抑制及每个病灶中异常肠腺中多肠腺丛(2个或更多个)数目的减少。给予含寡聚果糖或HP菊粉的饲料, 比给予对照饲料的明显抑制结肠中ACF数。给予含HP菊粉饲料的动物组的ACF抑制($P<0.006$)比给予寡聚果糖组的ACF抑制($P<0.02$)

2~

更为明显。在动物给予HP菊粉 ($P < 0.02 - 0.0001$) 或寡聚果糖 ($P < 0.04 - 0.01$) 后, 以每个病灶中有2或3个异常肠腺为依据的肠腺多重性也明显下降。由于异常肠腺的多重性可作为结肠癌预测的指标 (Pretlow, T.P., et al., Carcinogenesis (Lond.), 13. 1509-1512, (1992)), 因此本研究用该指标来评价寡聚果糖和HP菊粉的抑制作用。

本研究表明大鼠口服寡聚果糖及HP菊粉可抑制AOM引起的结肠中ACF的形成, 提示菊苣果聚糖类对结肠癌具抑制作用。实验结果证明, 较高聚合度果聚糖 (即HP菊粉) 的预防作用及对ACF的抑制作用明显比较低聚合度果聚糖 (即寡聚果糖) 强。

表1, 动物给予对照饲料或含有寡聚果糖或HP菊粉的试验饲料后各周的体重

实验组	给予对照饲料或试验饲料后各周的体重(克)			
	0	3	6	10
AOM处理组				
1. 对照饲料	119±5.9 ^a	173±9.1	257±11	320±14
2. 寡聚果糖 10%	119±6.6	167±9.8	258±15	327±16
3. HP 菊粉 10%	120±7.1	73±7.8	259±12	328±15
生理盐水组				
4. 对照饲料	117±8.5	179±9.7	256±9.8	329±12
5. 寡聚果糖 10%	120±5.9	175±7.3	264±9.3	338±12
6. HP 菊粉 10%	119±5.7	171±6.0	256±8.1	329±13

a 平均数±SD

表2. 食用寡聚果糖或HP菊粉对雄性F344大鼠结肠内ACF形成的影响

实验组	总ACF/结肠	含不同异常肠腺数的病灶			
		1个/病灶	2个/病灶	3个/病灶	4或4个以上/病灶
对照饲料	120±28	19.5±7.3	43.7±7.8	28.2±7.5	28.3±8.2
寡聚果糖 10%	92±28 ^b (P<0.024)	15.4±7.5	31.2±13 ^b (P<0.01)	21.3±7.8 ^b (P<0.04)	23.9±8.2
HP 菊粉 10%	78±37 ^b (P<0.006)	15.7±8.2	24±12 ^b (P<0.0001)	16.6±7.2 ^b (P<0.02)	21.8±14.2

a 平均数± SD

b 与对照组比差异显著，显著性水平见括号内所示