

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
C12N 1/18
A61P 37/04 A61P 35/04



[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 98810125.4

[45] 授权公告日 2005 年 3 月 9 日 [11] 授权公告号 CN 1192099C

[22] 申请日 1998.8.11 [21] 申请号 98810125.4
[30] 优先权
[32] 1997. 8. 13 [33] HU [31] P9701392
[32] 1998. 8. 5 [33] HU [31] P9801797
[86] 国际申请 PCT/HU1998/000077 1998. 8. 11
[87] 国际公布 WO1999/008694 英 1999. 2. 25
[85] 进入国家阶段日期 2000. 4. 13
[71] 专利权人 马特·希德弗吉
地址 匈牙利布达佩斯
共同专利权人 法卡斯·里塔·托莫斯科辛尼
卡洛利·拉皮斯
厄谢贝特·拉索 贝拉·申德
[72] 发明人 马特·希德弗吉
法卡斯·里塔·托莫斯科辛尼

卡洛利·拉皮斯 厄谢贝特·拉索
贝拉·申德
审查员 田洪旻
[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 罗 宏 谭明胜

权利要求书 1 页 说明书 14 页 附图 4 页

[54] 发明名称 植物性发酵物质及其制备方法及其
应用以及含该物质的药用组合物和
饮食添加剂

[57] 摘要
本发明涉及具有免疫刺激和转移抑制功能的发
酵干燥植物性物质、含后者的药用组合物、生产方
法以及上述干燥物质在生产饮食添加剂与具有免疫
刺激转移抑制功能的药用组合物中的应用。 根据
本发明的物质可通过 *Saccharomyces cerevisiae* 存在下
在液体介质中发酵麦芽和干燥发酵液得到。

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

1. 生产具有免疫刺激与转移抑制功能的发酵干燥物质的方法，其特征
5 在于研磨的麦芽在酿酒酵母的存在下，在含水介质中于 25-35℃ 发酵 10-24 小时，并且发酵液被分离、过滤至清澈、蒸发、沸腾并如此干燥或在辅助干燥物质的存在下干燥。
2. 根据权利要求 1 的方法，其特征在于，发酵进行 15-20 小时。
3. 根据权利要求 2 的方法，其特征在于发酵在 30℃、连续通气与搅拌的条件下进行 18 小时。
4. 根据权利要求 3 的方法，其特征在于干燥是在麦芽糖糊精的存在下进行的。
10
5. 一种具有免疫刺激与转移抑制功能的发酵干燥物质，上述物质通过权利要求 1-4 之任一的方法获得。
6. 根据权利要求 5 的物质，以 HPLC 检测其 2, 6 - 二甲氧基 - 对 - 苯醌含量为 0.12-0.52mg/g 干物质，2 - 甲氧基 - 对 - 苯醌含量为
15 0.05-0.28mg/g 干物质。
7. 根据权利要求 6 的物质，其 2, 6 - 二甲氧基 - 对 - 苯醌含量为 0.4mg/g 干物质。
8. 一种免疫刺激与转移抑制药用产品，其活性成分为权利要求 1 的发酵干燥物质。
- 20 9. 哺乳动物的饮食添加剂，其含有权利要求 1 的发酵干燥物质。
10. 根据权利要求 9 的饮食添加剂，含有通过权利要求 4 中的方法得到的干燥物质，该干燥物质含有占重量 60% 的发酵物质与占重量 40% 的麦芽糖糊精。
11. 权利要求 5 的发酵干燥物质在生产免疫刺激与转移抑制药用
25 组合物中的应用。
12. 权利要求 5 的发酵干燥物质在生产哺乳动物饮食添加剂中的应用。

植物性发酵物质及其制备方法及其应用以及含该
物质的药用组合物和饮食添加剂

本发明涉及具有免疫刺激和转移抑制功能的、经发酵和干燥的植物性物质，以及含有该物质的药用组合物，还涉及制备该物质的方法以及生产免疫刺激和，尤其是，转移抑制药用组合物时上述干燥植物性物质作为饮食添加剂的应用。

治疗肿瘤的一个主要目标是抑制转移，因为由于细胞的恶性生长而导致的原发性肿瘤可能通过转移扩散到邻近细胞和器官并导致后来的继发性肿瘤，继发性肿瘤不能通过外科手段除去并且可能对化学疗法具有抗性。

研究人员越来越将注意集中于发展免疫调节物质，对天然来源的物质 - 主要是植物来源的物质 - 进行了深入的研究。众所周知，具有醌结构的化合物扮演着重要的生物学角色。在植物中发现了几种醌衍生物，如泛醌、质体醌、甲基萘醌，它们在光合作用中起作用，还在脊椎动物，也因此包括人，的细胞呼吸系统中以及血液凝集中起作用。几种苯醌衍生物还被用作药物用途。阿霉素、道诺霉素和丝裂霉素 C 是具有细胞生长抑制功能的醌衍生物，而其它苯醌和氢醌具有抗微生物效应，是适于治疗细菌感染的抗生素如 Tetran-B、Metacyclin 和 Doxycyclin 的活性成分。

文献报道 2, 6-二甲氧基-对-苯醌 (2, 6-DMBQ) 和 2-甲氧基-对-苯醌 (2-MBQ) 具有杀真菌和抑制细菌生长的效应，它们还对恶性肿瘤细胞具有细胞毒性。[Int. J. Quant. Chem.: Quant. Biol. Symp. 7,. 217-222(1980), 9,. 27-30(1982) 和 12,. 257-261(1985); Phytochemistry 27,. 225 (1971) 和 J. Agric. Food Chem. 39,. 266(1991)]。有文献表明 2, 6-二甲氧基-对-苯醌和抗坏血酸的混合物抑制小鼠中 Ehrlich ascites 肿瘤细胞的生长。[Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81., 2088-2091(1984) 和 82. 1439-1442 (1985)]。2, 6-二甲氧基-对-苯醌和 2-甲氧基-对-苯醌以在几种植物中发现并分离 [Magy. Kem. Folyorat 102/7,. 320-325 (1996)]。在小麦 (Triticum vulgaris) 中，更准确地说在麦芽中，发现这两种化合物大量地以糖苷的形式存在。这些化合物被从用酵母发酵的麦芽中分离

出并进行鉴定以确定加入麦芽的面包质量腐坏的程度。[Helv. Him Acta 33., 433 (1950); J. Chem Soc. London 1952, 4821-4823].

根据文献在麦芽中 2-MBQ 的量大约为重量的 0.05%，2, 6-DMBQ 为重量的 0.01%（为糖苷）。醌，尤其是甲氧基取代-对-苯醌是活泼的而它们的氢醌-糖苷则更为稳定和惰性，这解释了醌作为糖苷的存在。

在我们关于麦芽发酵的研究中我们得出了这样的结论：从用酿酒酵母（*Saccharomices cerevisiae*）发酵麦芽时产生的发酵液体得到的干燥抽提物具有惊人的免疫刺激和转移抑制效应，并且它可成功地被用作免疫刺激和转移抑制药用组合物中的活性物质。

这个发现是惊人的，因为尽管有文献报道[Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80., 129(1983)] 2, 6-DMBQ 和抗坏血酸的混合物抑制 Ehrlich ascites 肿瘤细胞 - 它们以适用于定量分析肿瘤生长和研究它们的生化功能而著名 - 本发明中描述的除了未鉴定成分外还含有 2, 6-DMBQ 和 2-MBQ 的上述抽提物被证明对这些原发性肿瘤细胞没有作用，纵然与抗坏血酸联用时也是如此。该抽提物作用于所有的原发性肿瘤细胞，并且被证明只在治疗转移时才非常有效。对原发性肿瘤以及从原发性肿瘤发展而来的转移的治疗方面之间在本质上各不相同，所以对研究人员而言，含有已知在原发性肿瘤治疗中有效，但其化学成分还未完全清楚的组分的植物抽提物具有免疫刺激和转移抑制效应这一点并非不证自明 [Cancer Principles and Practice of Oncology, Vol 1.4th edition. J. B. Lippicott Company. Philadelphia, 1993].

因此本发明关系到一种具有免疫刺激和转移抑制功能的、经发酵和干燥的植物物质，该物质可通过在含水介质中用酿酒酵母发酵麦芽，过滤发酵液除去细胞并干燥上述液体而得到。

本发明还关系到活性物质包括本发明中描述的发酶干燥植物性物质的免疫刺激和转移抑制药用组合物。

本发明还关系到上述发酶干燥植物性物质在免疫刺激和转移抑制药用组合物生产中的应用。

本发明还关系到用本发明描述的药用组合物刺激免疫系统和抑制转移而治疗哺乳动物的方法。

本发明进而关系到一种含有本发明中描述的发酶干燥植物性物质

麦芽糖糊精的食品添加剂。

根据本发明发酵干燥植物性物质已在其 2, 6 - DMBQ 含量的基础上得以鉴定和检测。我们愿意在此强调通过可利用的方法完全鉴定抽提物的化学成分是不可能的, 所以全部数据都是以 2, 6 - DMBQ 为基础的。

- 5 麦芽为面粉加工的副产品并可大量得到, 磨成粉的脱脂麦芽或原始麦芽被证明适用于生产本发明中的发酵干燥植物性物质。使用脱脂的麦芽并没有特别的优势。发酵用啤酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 进行。这种酵母可由商业途径获得。发酵周期约为 10 - 24 小时, 优选为 15 - 20 小时或约 18 小时。发酵温度约为 25 - 35°C, 优选约为 30°C。
- 10 麦芽和酵母的重量比为 4:1 到 2:1, 优选约为 3:1, 干物质与水的比例为 1:6 - 1:12, 优选约为 1:9。

发酵 - 实验室规模 - 可通过在玻璃发酵罐中加入新鲜研磨的麦芽和酵母的水悬液, 然后搅拌和摇晃混合物而实现。发酵过的液体容易起泡沫。

- 15 发酵后混合物 2000 - 4500 转/分钟, 优选约 3000 转/分钟离心 5 - 15 分钟。上清煮沸冷却后以适当的方式干燥, 例如通过冻干或喷雾干燥。

- 这种产物, 一种红褐色的粉末, 是根据本发明的物质。由于其吸湿特性, 有必要在密闭容器中低温保存直至进一步使用。得到的干燥物质的 2, 6 - DMBQ 含量为 0.4mg/g。在大规模发酵 (例如, 4 立方米) 时应
- 20 进行连续通气, 例如 0.5L 空气 / L 发酵液 / 分钟, 以及缓慢搅拌。发酵时间约为 18 小时。为了防止泡沫形成可使用通常的添加剂 - 使用向日葵油是优选的。在发酵过程结束时通气和搅拌被中断, 发酵液从麦芽 - 酵母悬浮液中以常规手段, 如先用螺杆倾注器 (screw decanter), 然后用分离装置 (separator) 和压力过滤装置 (filter press), 分离出。
- 25 如果有必要可加入过滤辅助物质。每立方米发酵液使用 5 - 10kg 过滤珍珠岩是合适的。发酵液被过滤清澈, 过滤效果用显微镜检查。经过滤的发酵液基本上不含有细胞, 这意味着每 10 个视野的酵母细胞少于 1 个。得到干物质占重量比约 1.5% 的发酵液在真空浓缩器中蒸发, 优选在 40 - 50°C 进行, 结束真空浓缩后在大气压下沸腾约 15 分钟。这降低了有害酶的活性。然后混合物利用喷雾干燥法, 例如在旋转喷雾装置中,
- 30 进行干燥。如果利用了上述的发酵方法那么得到的发酵干燥植物性物质的 2, 6 - DMBQ 的含量为 0.12-0.52mg/g 干物质, 2 - MBQ 的含量为

0.05-0.28mg/g 干物质，它们的含量依赖于所使用麦芽的苯醌含量。

由于终产物是吸湿性的所以为了增强喷雾干燥以及终产物利用的效力可在喷雾时加入一种常用添加剂，例如麦芽糖糊精、阿拉伯树胶、瓜尔豆树胶、黄原胶、蝗虫豆粉（locust bean flour）等等。优选地使用麦芽糖糊精。适当的方法是测定真空浓缩器中蒸发的混合物的干物质含量，沸腾，加入大量麦芽糖糊精使混合物中的干物质含量大约达到重量的 30%。恰当的方法是用热水溶解麦芽糖糊精冷却后加入浓缩混合物。干燥后终产物 - 一种粉末 - 按重量计算含 60% 的发酵干燥植物性物质和 40% 的麦芽糖糊精。

得到的物质的稳定性可通过检测 2, 6 - DMBQ 浓度的变化验证。定量分析可用 HPLC 进行。通过以上描述的方法得到的粉末在室温下 3 年内稳定。根据本发明的发酵干燥植物性物质可用作免疫刺激和转移抑制药用组合物的活性物质。除了上述活性物质外上述药用组合物还可含有抗坏血酸或其它细胞生长抑制物质。

发酵干燥植物性物质可被加工成用于口服施用或非肠道施用的常见固态或液态药用组合物。在生产药用组合物时应考虑发酵干燥植物性物质的吸湿特性。恰当的形式为将活性物质隔离空气中的湿气的胶囊。

生产药用组合物时可使用制药实践中常用的辅助性物质。由于这些物质和它们可能的用途在制药文献中有详尽描述，选择和制备适当的形式是一种常规作业。有效物质的一次剂量可在很大的范围内浮动，这依赖于病人的状态。合适剂量的选择永远是医生的职责。通常如果剂量在 0.001-100g，优选地 0.01-50g，更优选地 0.1-40g 每千克体重，例如在 0.1-10g、1-25 或 10-30 克时可达到合适的效果。

根据本发明的发酵干燥植物性物质也可与抗坏血酸（维生素 C）混合。根据我们的实验抗坏血酸可增强本发明的物质的转移抑制效应。发酵干燥植物性物质与抗坏血酸的重量比可以是，例如，10:1 - 1:1，优选为 6:1 - 2:1，更优选为 3:1，4:1 或 5:1。

本发明还关系到用根据本发明的发酵干燥植物性物质进行免疫刺激和/或转移抑制治疗。治疗的要点是给病人有效剂量的发酵干燥植物性物质。

发酵干燥植物性物质也可用作哺乳动物的饮食添加剂。在这种情况下优选使用含麦芽糖糊精以及食品工业中常用的辅助物质，如，芳香剂、

甜味剂、色素等等，的混合物，饮食补充的生产可以为，例如，在液压床（fluid bed）上将含 60% 重量干物质和 40% 重量麦芽糖糊精加芳香物质和甜味剂的混合物制成粒状，然后将这种颗粒装到，如，袋子里。

附图描述如下：

5 图 1 HPLC 测量 2, 6 DMBQ 的标准图

图 2 上述物质氯仿抽提物的 HPLC 层析图

图 3 上述物质乙醇抽提物的 HPLC 层析图

图 4 不同浓度冻干物存在下在置入后第 60 和第 90 分钟 B16 肿瘤细胞的结合（每个数值代表通过分光光度法测量的 8 次平行实验的平均值 ± 标准差）

图 5 开始处理 24 小时和 48 小时后不同剂量冻干物对 B16 细胞增殖的影响（每个数值代表通过分光光度法测量的 8 次平行实验的平均值 ± 标准差）。

图 6 在不同剂量冻干物的存在下开始处理 24 小时后人 A2058 黑色素瘤的发展。培养物的评测是在蛋白（SRB）和脱氢酶活性（MTT）的基础上通过分光光度法平行测量进行的（每个数值代表 8 次平行实验的平均值 ± 标准差）。

图 7 用不同剂量冻干物处理 A2058 人黑色素瘤体外培养物后凋亡细胞的定量。

20 以下的例子是用于示明根据本发明的发酵干燥植物性物质的生产和药用效果。

实施例 1.

实验室规模的麦芽发酵

25 往 100g 磨成粉的新鲜麦芽（根据 Hungarian standard MSZ-081361-80）中加入 1000ml 饮用水和 33.3g 酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）的悬液。该混合物在振荡器上 30°C 振荡 18 小时。在此期间发酵液产生许多泡沫并达到其初始体积的三倍。发酵后混合物在 3000/min 离心 15min。经过沸腾和冷却后上清通过冻干而干燥。得到的冻干物质保存在冰箱里（-10°C）直至进一步使用。得到的冻干物的 2, 6 DMBQ 的含量为 0.4mg/g 干物质（0.04% 重量）。

实施例 2

大规模的麦芽发酵

将 300kg 磨成粉的麦芽 (根据 Hungarian standard) 和 100kg 的酵母置入 5 立方米的发酵罐内, 加入饮用水直至体积达到 4000l. 发酵时间为 18 小时, 在此期间进行连续通气 (0.5 l 空气/ 1 发酵液/ 分钟) 和缓慢搅拌 (30 转/分钟). 为了抑制泡沫生成往混合物中加入 11 向日葵油/立方米. 终止发酵通气和搅拌后, 首先在一个螺杆倾注器中分离发酵液, 然后在分离器中, 最后在带编织滤膜的壓力过滤器中分离. 加入 10kg 辅助物过滤用珍珠岩/立方米. 发酵液被过滤清澈, 清澈度用显微镜检查. 经过滤的发酵液基本上不含有细胞, 这意味着每 10 个视野的酵母细胞少于 1 个. 得到的干燥物质约占重量 1.5% 的发酵液在真空浓缩装置中在 40-50°C 进行蒸发. 结束真空浓缩后在大气压下沸腾约 15 分钟. 然后确定溶液中的干物质含量, 加入麦芽糖糊精 - 先用热水溶解然后冷却 - 使干物质含量占溶液重量的 30%. 此后该溶液在剪切喷嘴旋转喷雾干燥装置 (shear nozzle rotating spray drier) 中进行喷雾干燥, 其中流出空气的温度为 90°C. 得到的终产物 - 一种粉末 - 中根据本发明的发酵植物性物质含量为重量的 60%, 麦芽糖糊精含量为重量的 40%. 2, 6-DMBQ 的含量 - 根据下面实施例中描述的方法用 HPLC 测定 - 为 0.4mg/g 干物质.

实施例 3

根据本发明物质的特征描述

可用两种方法描述根据本发明物质的特征, 即通过确定 2, 6 DMBQ 含量或通过所谓的指纹色谱 (fingerprint chromatogram). 在两种情况下都使用了 HPLC.

对实施例 1 中描述的方法和实施例 2 中描述的方法得到的物质都进行了分析, 两种情况下的结果相同.

A. 苯醌衍生物的定量和定性分析

样品制备

分析之前有必要提高冻干物中的苯醌浓度. 为了达到此目的将冻干物用蒸馏水稀释至初始浓度 (干物质含量为重量的 1%) - (0.5g 冻干物. 50ml 蒸馏水). 溶液用 3×25ml 氯仿抽提 3 次. 用无水硫酸钠除去氯仿相中残留的水分. 经过滤后氯仿相被蒸发, 往剩余物中加入氯仿使总体积达到 5ml. 该样品在 HPLC 分析时被注射上样.

用 HPLC 方法进行苯醌衍生物的定性和定量分析.

HPLC 方法的描述

使用的 HPLC 设备由 Beckman model 114 M 泵、LaborMim 紫外灯连同 Merk-Hitachi-DAD mod. 4500 diode array 探测器和 Water 740 型积分器单元组成。测量用的是 Chromsil C18(250×4mm)10 μ 层析柱。

5 UV 探测在 290nm 进行, 流速为 2ml/min。使用的洗脱液的成分为: Na₂HPO₄ 25mmol, NaH₂PO₄ 25mmol, Na₂EDTA 25mmol, NH₂OH HCl 20mmol, 10 体积 % 甲醇, pH=6.05。利用上述的方法分析出了三种不同的苯醌和氢醌。这些化合物的滞留时间之间只有很小的差别。经过降低洗脱洗的强度(有机相降到 10%)可极大地增强选择性。对滞留数据的分析表明对-苯醌

10 显示出比相应氢醌更长的滞留, 并且滞留时间随着甲氧基的增加而增加。所有三种标准的浓度都为 0.1mg/ml。表 2 示明标准的滞留时间(t_R)和容量因子(K')的数据。测量的目的是检测和定量定义 2, 6-二甲氧基-对-苯醌, 所以在下文还将详细讨论此部分。检验了以上详细描述的方法是否适于定量分析 2, 6-二甲氧基-对-苯醌。所使用的标准图

15 见图 1。结果为一直线, 相关性常数为 0.99。还检验了该方法是否可重复, 每个样品进行了三次平行测量并计算了结果的离散度。表 1 示明了在六个月内对样品测量的平行结果和它们之间的离散度。我们的结果表明该测量方法适于精确可重复地测量 2, 6-二甲氧基-对-苯醌。

日期	2, 6-DMBQ 含量 (mg/50g 样品)			(σ %)
04.27	3.45	3.54	3.66	0.08-2
04.28	3.27	3.68	3.31	0.18-5
05.10	1.56	1.49	1.48	0.03-1.9
05.10	3.65	3.42		0.12-3
06.08	3.00	2.98	2.86	0.06-2
06.09	2.92	3.06	2.87	0.08-2.3
06.10	3.34	3.23	3.36	0.05-1.5

20

表 1

2, 6-DMBQ 定性分析的平行数值和离散度结果

标准	t_R	k'
2,6-DMBQ	13.4	5.0
2,6-DMBQ	5.1	1.2
2,-MBQ	8.5	2.7

表 2

接受检测物质的滞留时间 (t_R) 和容量因子 (k')

图 2 示明如上文描述的方法制备的氯仿样品的 HPLC 层析图谱。该层析图谱示明具有 2,6-DMBQ 特征的单一峰。2,6-DMBQ 含量的测定是建立在后者的基础上的。

B. 指纹色谱

样品制备

将 50ml 96% 体积比的乙醇加入到 5g 喷雾干燥物质中 (按实施例 2 中的描述制备)。混合物 50°C 200/min 摇晃 30 分钟。此后将混合物过滤, 蒸干然后将剩余的物质溶于 10ml 甲醇中。过滤后的溶液注射上样到层析柱。

HPLC 方法

使用的 HPLC 设备、层析柱、和条件如上文描述。但洗脱液的组分如下: Na_2HPO_4 1.25mmol, NaH_2PO_4 1.25mmol, Na_2EDTA 1.25mmol, NH_2OH HCl 2.50mmol, 5 体积% 甲醇。

图 3 示明了 HPLC 层析图谱的结果。结果表明在这样的条件下分离出两个特征峰, 一个在 4.7 分钟 (5) 另一个在 5.8 分钟 (6)。在滞留时间 7.3 和 7.7 分钟两个峰 (7, 8) 彼此紧挨着出现, 这两个峰不能完全分开。一个强度较小的峰在 9.8 分钟出现 (9), 随后是一个特征的强峰 (11) 在 13.1 分钟出现。在 15 分钟出现一个较小的峰 (12), 另一个强峰 (14) 在 18 分钟出现。在 21.8 分钟图谱显示一个较小的峰 (15), 在 31 分钟出现一个较平缓的峰, 含几种物质。

C. 稳定性实验

根据本发明物质的分解是通过检测 2,6-二甲氧基-对-苯醌浓度的变化进行的。我们在 3 个不同的温度 (室温 20°C、40°C 和 60°C) 下进行储存实验。冻干物 - 约 1g - 储存在气密的试管中。实验的持续时间为 8 个星期。每星期对三个不同储存温度系列的样品进行三次平行实验。

苯醌衍生物的定量分析通过 HPLC 进行。

实验表明根据本发明的干燥物质甚至在室温储存 3 年后仍然保持稳定，即 2,6 DMBQ 保持不变。同时该物质在 40°C 不稳定 - 2,6 DMBQ 在几个星期内分解，并且在 60°C 2,6 DMBQ 含量在几天内迅速降低。

- 5 在两个系列的实验中也研究了 2-甲氧基-对-苯醌的分解。这种化合物比 2,6-二甲氧基-对-苯醌更不稳定，样品在 40°C 或 60°C 储存一个星期后即不能探测到它的存在。而在室温这种化合物的浓度也保持不变。

实施例 4

10 效力实验

- 测试了按实施例 1 所描述的方法制备的冻干物和按实施例 2 所描述的方法制备的喷雾干燥物质的效力。使用了 2,6 DMBQ 含量为 0.4mg/g 干燥物质、HPLC 曲线如图 2 示明的干燥物质作为标准。两种物质给出相同的结果 - 所以根据本发明的物质将进而被简单地称为冻干物。下文
- 15 将讨论这种冻干物的生物学和毒理学实验结果，重点强调免疫重建 (immune reconstitution) 和肿瘤生长以及转移抑制效应。

I. 肿瘤生长和转移抑制效应 (体内实验)

- 以下生长于小鼠或大鼠中的可注射肿瘤类型用于测试: Lewis 肺肿瘤 (小鼠肺癌) 的高转移形成变株 (3LL-HH)、B16 小鼠黑素瘤和 HCR
- 20 - 25 人结肠肿瘤异种移植。

- 3LL-HH (LLT-HH) 和 B16 肿瘤在 C57B1/6 近亲交配系小鼠中维持。HCR-25 异种移植注射入预先通过胸腺切除术和全身辐射进行免疫抑制的 CBA/CA 小鼠中。3LL-HH 和 HCR-25 肿瘤的肿瘤细胞被移植到脾脏而 B16 黑素瘤的肿瘤细胞被移植到左下肢的肌肉中。注射 HCR-25 肿瘤
- 25 的治疗组和对照组在肿瘤移植后 21 天进行脾脏切除术。

用根据本发明的冻干物进行的治疗在注射肿瘤后 24 小时开始。日剂量为 3g/kg 体重，以 0.6g/ml 水悬浮液的形式通过胃饲管 (stomach probe) 从口腔施用。

- 在 3LL-HH 肿瘤的实验测试在移植后 14 天结束。B16 肿瘤在移植后 21 天，HCR-25 肿瘤在移植后 51 天，通过将麻醉的动物放血致死而结束。
- 30

表 3, 4 和 5 总结了测试的结果。

处理	注射的细胞数	肝脏转移数
对照	3×10^4	104.0 ± 28.2
冻干物	3×10^4	$19.8 \pm 16.4^*$

$P < 0.01$

每组含 10 只动物

表 3.

脾脏注射 3LL-HH 小鼠肺癌时

根据本发明的冻干物对肝脏转移数的治疗效果

治疗	生长肿瘤的脾脏重量 (g)	肝脏转移数
对照, 未进行脾脏切除	1.02 ± 0.59	42.0 ± 25.8
冻干物, 未进行脾脏切除	0.62 ± 0.47	19.5 ± 19.0
对照, 进行脾脏切除	0.10 ± 0.02	19.1 ± 13.5
*冻干物, 进行脾脏切除	0.08 ± 0.02	10.6 ± 11.6

*脾脏切除术在脾脏注射肿瘤后 21 天进行

每组含 12 只动物

表 4

HCR-25 人结肠癌注射入免疫抑制的 CBA/CA 小鼠脾脏后 51 天根据

本发明的冻干物对肝脏转移数的治疗效果

治疗	生长肿瘤的肢体的重量 (平均)	肺转移数 (平均)
对照	7.6 ± 0.43	42.4 ± 10.2
冻干物	7.2 ± 0.38	$6.2 \pm 3.7^*$

* $P < 0.01$

每组含 10 只动物

表 5.

B16 黑素瘤肢端肌肉注射后 21 天根据本发明的冻干物对注射肿瘤的
肢体重量以及肺转移数的治疗效果

上述结果表明当 3LL-HH 肿瘤注射进脾脏时用根据本发明的冻干物
处理显著 - 71% - 降低了肺转移数。(表 3)

在 HCR-25 人结肠癌实验中 50 天的治疗同时降低了生长肿瘤的脾脏的重量以及肝脏转移数。在脾脏切除组和非脾脏切除组与对照相比转移数都降低了 50%。(表 4)

5 在肌肉注射黑素瘤实验中, 肌肉中生长的肿瘤的重量并未由于处理而改变, 但肺转移数的降低非常显著, 与对照组相比降低了 85% (表 5)

II 体外测试

上述测试明确表明根据本发明的冻干物能显著地降低恶性肿瘤的转移, 还检测了该产品对转移形成不同时期的疗效。转移的形成由几个时期组成, 其中除了原发性肿瘤细胞的增殖和调亡活性外, 肿瘤细胞的粘附能力和组织抗肿瘤细胞的保护机制也起作用。在体外测试中研究了冻干物对细胞增殖、调亡与粘附的效应。

由于相当一部分的体内测试是在 B16 小鼠黑素瘤细胞上进行的, 所以首先用此种细胞测试冻干物。

1. 粘附测试

15 肿瘤细胞的粘附是在 96 孔板上进行的。冻干物的剂量为 300, 3000, 和 30000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。使用的是不含血清和含 10% FCS 的 RPMI 培养基。在常规环境下温育 10、30、60、90 和 120 分钟后测试了粘附性。测试是在 SRB 检测的基础上通过比色法进行的 (Mossmann, T.; J. Immunol. Neth. 65, 55-63/1983)。该检测是基于硫氰酸盐 B 对培养物中总蛋白的显色进行的, 在分光光度计上 570nm 读吸收值。图 4 只显示了两个时间点, 20 但足以充分代表冻干物的效力。如果冻干物的剂量是 3000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 或高 10 倍, 肿瘤细胞的粘附显著降低, 在血清存在或不存在时都是如此。如果剂量是 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 则没有观察到这样的效果。

2. 增殖测试

25 在此测试中肿瘤细胞在处理前 24 小时被置于 96 孔板中。在用适当剂量的冻干物处理后 24, 48 和 72 小时通过 SRB 检测测试了细胞的增殖活性。重复测试的结果表明 900-15000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 范围内的处理导致肿瘤细胞到达单层的表面并且 - 锥虫蓝排出实验表明 - 死亡。(Kaltenbach, J. P. et al.: Exp Cell Res. 15, 112-117/1985/)(图 5)。

30 我们对人黑色素黑素瘤 (A2058 肿瘤细胞 - Todaro, G. J. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci USA 77 5258-5262/1980/) 的测试表现出和小鼠黑色素黑素瘤类似的结果 (图 6)。在这种肿瘤的实验中与 SRB 检测

同时还进行了反应细胞的黑色素活性的 MTT 检测。(Cole, S. P. C.: Cancer Chemother. Pharmacol. 17, 259-263/1986/). 该测试是基于以下现象: 具有代谢活性的细胞主要通过其脱氢酶活性将 tetrasolium 盐转化成具有颜色的甲胨 (formazan) 产物。与上述活性相对应的颜色反应可通过分光光度计在 570nm 读数, MTT 检测清楚地显示纵然剂量为 300 μ g/ml 时肿瘤细胞的功能活性也降低 (图 4)。由于细胞到达表面时调亡的原因不清, 通过流式细胞 (FACS) 分析测试了全部细胞群的调亡活性 (图 7)。图 7 显示肿瘤细胞的调亡 - 依赖于剂量 - 达到了不同寻常的程度。

10 III. 测试对免疫反应的效果

用两种不同的模型检测了根据本发明的冻干物的效果。在一系列的测试中研究了从用冻干物处理的动物脾脏中得到的单核细胞转化爆发 (blast transformation) 的可能性; 在另一系列测试中研究了同种异体皮肤移植模型中小鼠背部区域移植皮肤的总结合。

15 1. 测试 T-淋巴细胞的转化爆发

用根据本发明的冻干物处理显著地增加了在免疫反应中起重要作用的 T-淋巴细胞的转化爆发。这通过以下实验示明。

$C_{57}Bl_{16}$ 小鼠用本发明描述的冻干物处理六星期, 每星期 5 次通过胃饲管经口腔施用, 剂量为 3g/kg (0.6g/ml 水悬浮液)。完成处理后将通过灌注从脾脏得到的淋巴细胞进行细胞培养, 用 1 μ g/ml ConA 处理。48 小时后进行 DNS 合成的细胞为 0.4 μ Ci 的 3H timidin 所标记。标记的程度用液闪计数器 (Beckman) 测量。如表 6 显示, 用 ConA 处理显著提高了 - 与对照相比 - 3H -TdR 的掺入, 即转化爆发。

处理	1 μ g/ml Con A	
	平均 (cpm)	SEM
对照	3760.6	583.3
冻干物	8041.8	957.1

表 6.

25 冻干物处理与对照小鼠脾脏淋巴细胞对 3H -timidin 的掺入

2. 在同种异体皮肤移植模型中检测免疫刺激效应

说明缺陷免疫反应恢复的最好模型是通过胸腺切除 (手术除去胸腺) 造成部分免疫缺陷的小鼠的同种异体皮肤移植实验。 $C_{57}Bl_{10}$ 与 $B_{10}LP$

血统的小鼠只在 H-3 基因座有区别，所以从一种血统小鼠的皮肤移植到另一血统的小鼠在 7 天内不会发生排斥反应，而只会在 3 星期后发生。如果接受者已进行胸腺切除，排斥反应平均在 50 天后发生。任何促进淋巴细胞和骨髓成熟与分化的物质，如胸腺激素，都会减少排斥移植皮肤所需的时间。(J. Immunopharmacology 7, 67-78/1985/). 在我们的实验中用根据本发明的冻干物进行处理时也能观察到同样的效应。

C₅₇Bl₁₀ 小鼠作为受体而 B₁₀LP 小鼠作为供体。受体小鼠进行胸腺切除术并在 7 星期后移植皮肤。胸腺切除 1 星期后用 30mg/kg 体重剂量的冻干物处理，每星期 5 次，通过口腔施用。处理在皮肤移植后 70 天终止。每天观察可能发生的排斥。表 7 显在未切除胸腺的小鼠中排斥时间分别为 21 天（雄性）和 28.7 天（雌性）。在胸腺切除小鼠中排斥时间分别延长到 52.4 天和 41.6 天。用根据本发明的冻干物的处理大大缩短了胸腺切除并处理小鼠中皮肤移植物的存活时间。这表明处理的结果是显著减小了由于胸腺切除导致的免疫缺陷，这意味着上述冻干物具有免疫刺激效应。

处理	排斥时间			
		雄性		雌性
	平均（时间）	SEM	平均（时间）	SEM
对照（未切除胸腺）	21.0	3.1	28.7	4.5
对照（胸腺切除）	52.4	5.0	41.6	5.5
冻干物（30mg/kg）	28.8*	8.6	32.6**	4.5

*0.001<p<0.01 相对胸腺切除小鼠

**0.01<p<0.05 相对胸腺切除小鼠

表 7

根据本发明冻干物的处理对排斥皮肤移植物的影响（受体小鼠

C₅₇Bl₁₀，供体小鼠 B₁₀LP）

在几种动物实验模型中利用根据本发明的冻干物进行的体内和体外测试表明这种产物具有显著的抗转移效应。这种效应可能是与在体内与体外实验中观察到的免疫刺激效应相关的，但是转移数的减少也可能受抗增殖效应、调亡诱导效应、该物质对粘附的影响以及导致产生自由基效应的影响。

IV. 自由基结合活性

由于众所周知苯醌对自由基的形成有影响，我们还测试了本发明中描述的冻干物对自由基的结合活性。用电子自旋共振方法同时测量了过氧化物（SSA）和羟基自由基（OH-SA）的结合。上述冻干物具有显著的 SSA，1mg 的净自由基结合活性相当于 5.64 μ g 超氧化物歧化酶（SOD）的活性。冻干物不具有 OH-SA 活性，但它能破坏过氧化氢/Fe 羟基自由基形成系统，所以可以猜想它具有所谓的非螯合剂活性。

V. 毒理测试（亚急性）

根据 Registry of Industrial Toxicology Animal-data (RITA) (Exp. Toxic. Pathol. 47, 247-266/1995/) 的建议在 F344 大鼠和 C₅₇Bl₁₀ 小鼠上进行了 77 天的毒理测试。上述动物每天用 3g/kg 的剂量(0.6mg/ml 悬浮液) 进行处理。在处理过程中观察了动物体重的变化，最终的病理身体变化和自发死亡。结束实验时测量了心、肺、胸腺、脾脏、肝脏、肾脏、和睾丸的重量并对由 RITA 列出的 34 个器官进行了病理检测。未观察到自发死亡。动物体重的变化与对照组相似。与对照组相比在实验结束时不同器官的重量没有变化。在对受处理动物进行病理学处理过程中未观察到可能由于冻干物导致的变化。

上述结果表明根据本发明的发酵植物性物质没有毒性，并且由于其免疫刺激效应，在所有免疫系统受损害的情况下可用其进行治疗。由于其以上描述的生物学特性，它可在恶性肿瘤的药物治疗中作为补充手段，主要用于抑制转移。

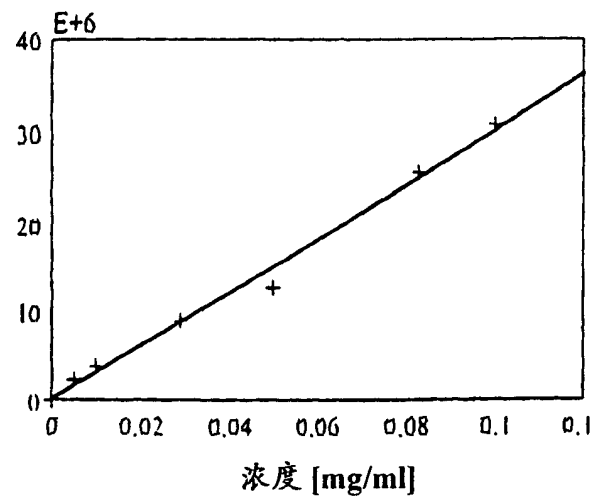


图 1

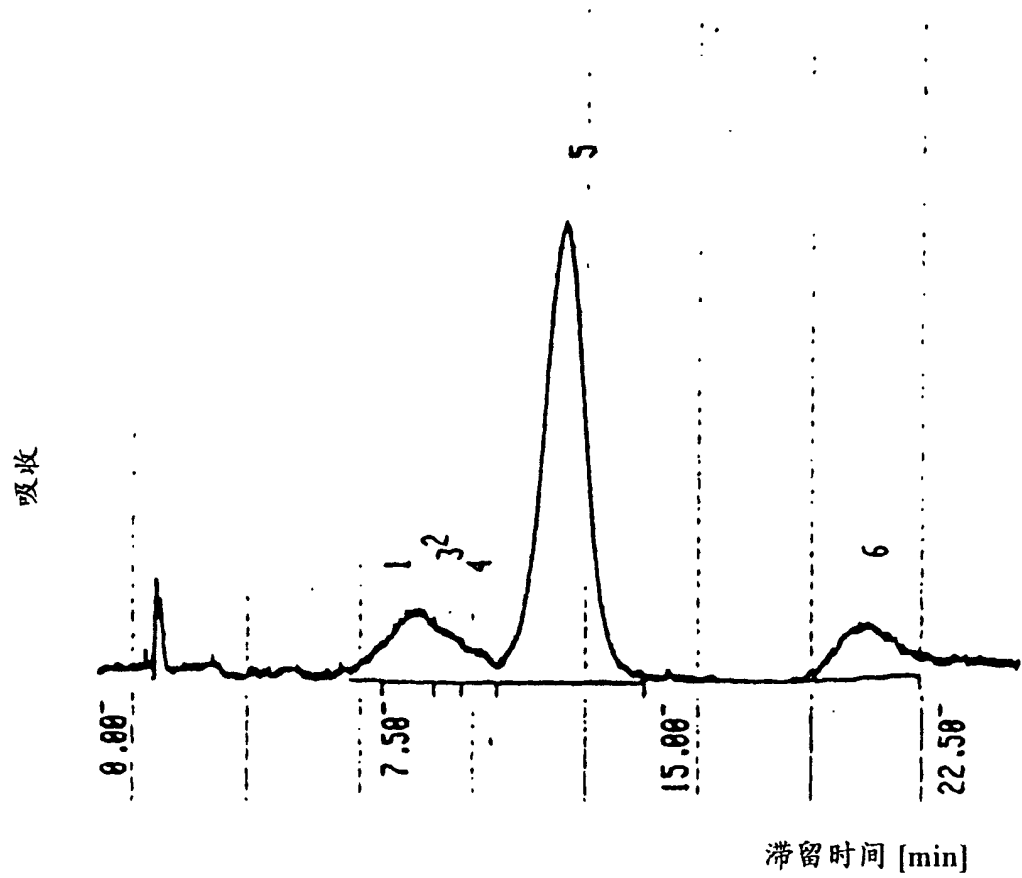


图 2

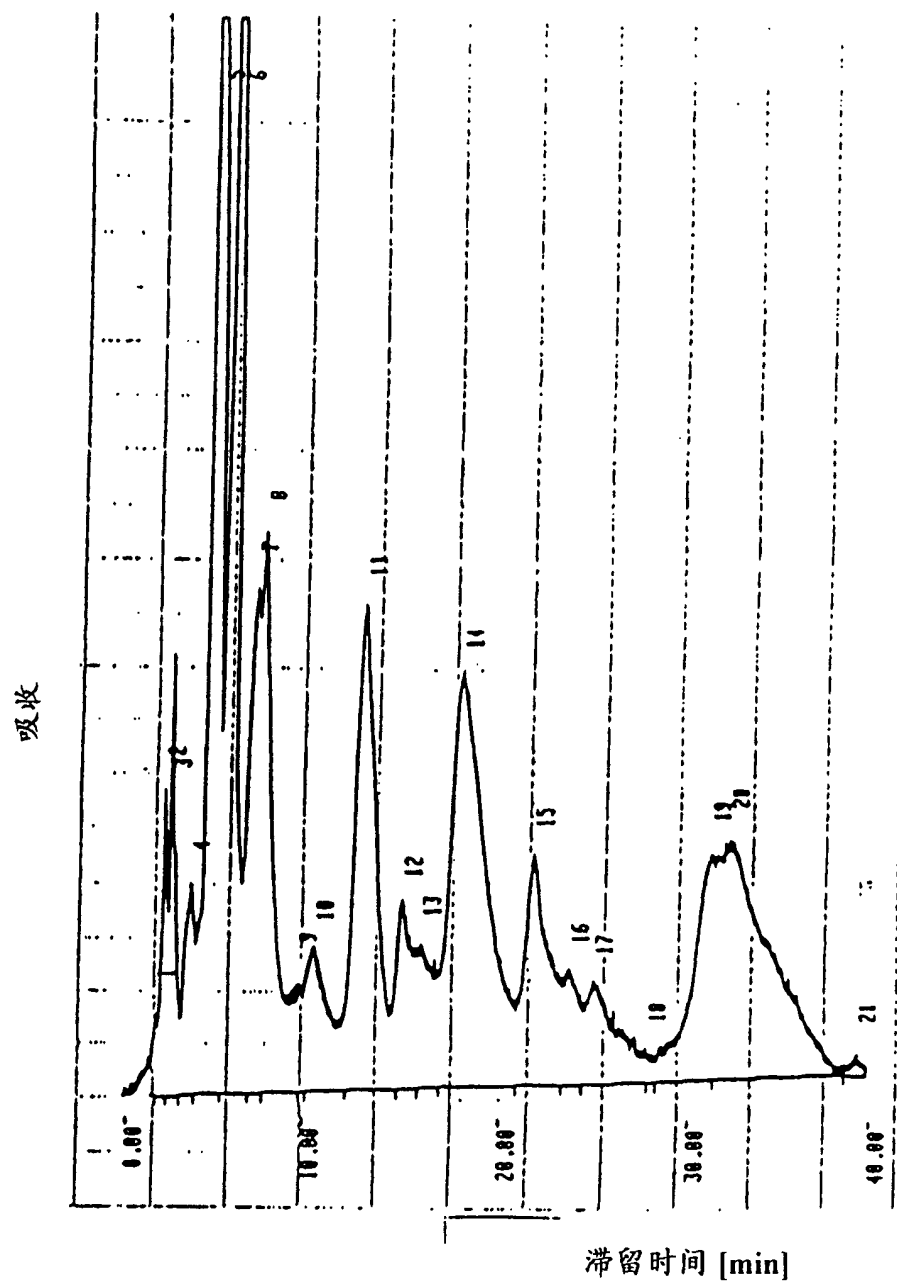


图 3

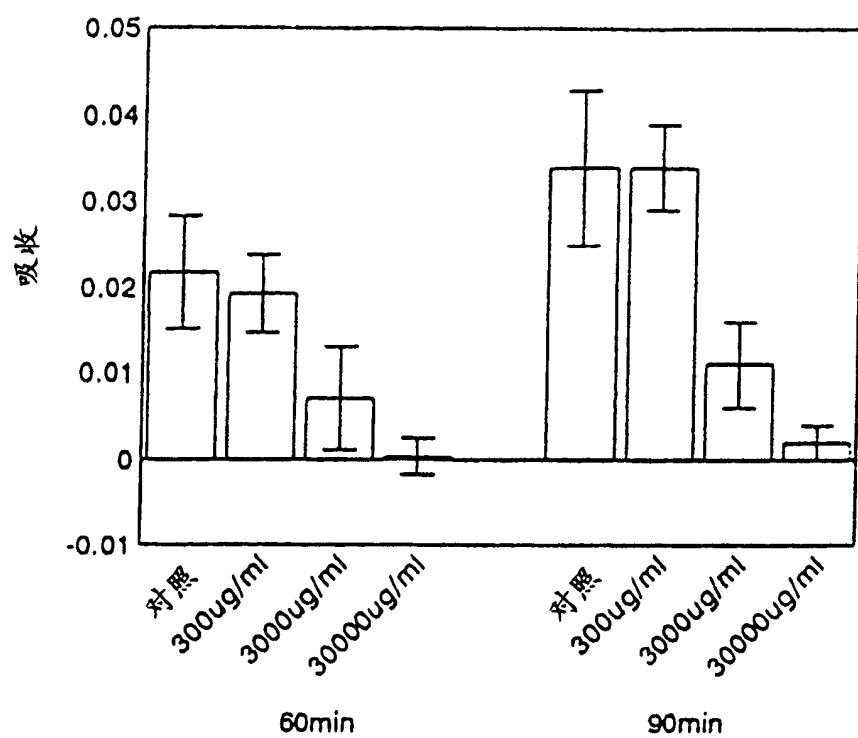


图 4

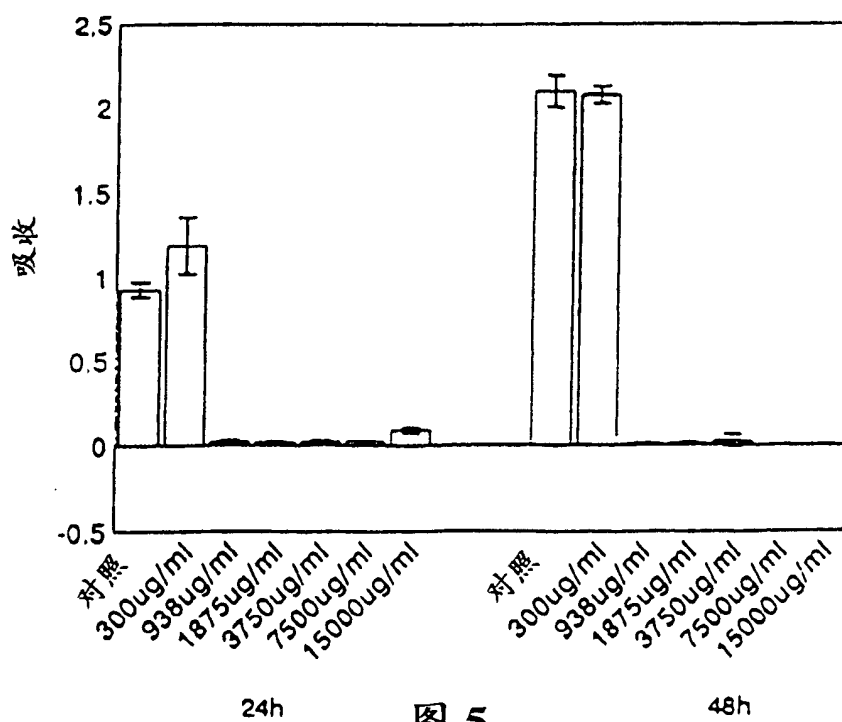


图 5

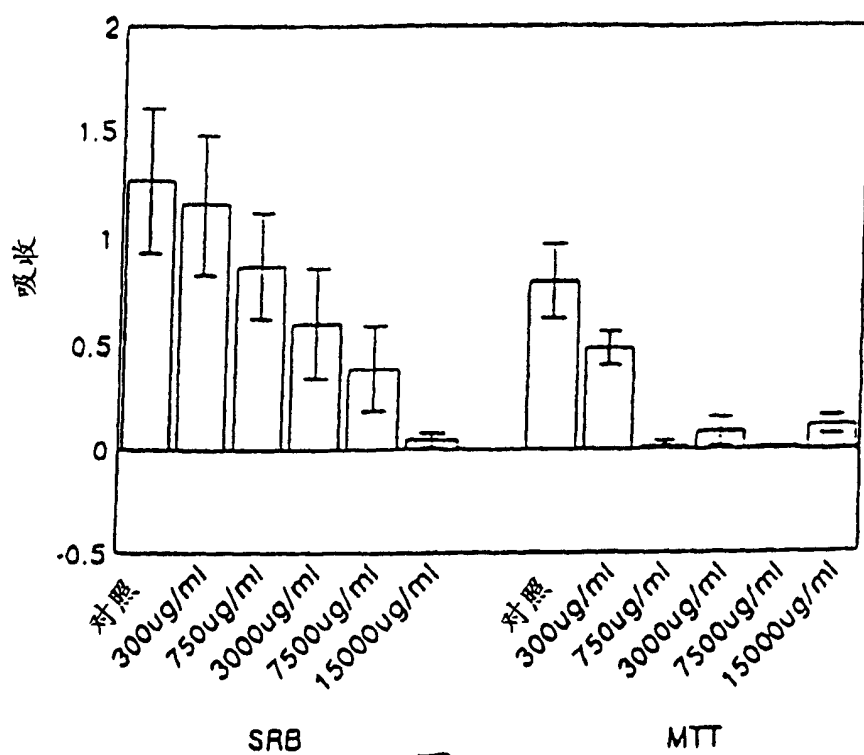


图 6

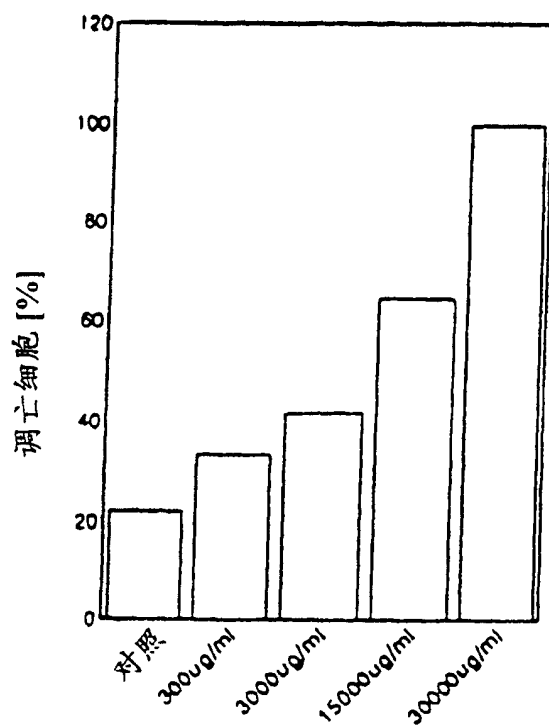


图 7