

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510017123.7

[51] Int. Cl.
A61K 31/715 (2006.01)
A61K 9/20 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

[43] 公开日 2006年3月1日

[11] 公开号 CN 1739548A

[22] 申请日 2005.9.9

[21] 申请号 200510017123.7

[71] 申请人 中国科学院长春应用化学研究所

地址 130022 吉林省长春市人民大街 5625 号

[72] 发明人 刘志强 宋凤瑞 王淑敏 刘淑莹
石磊 白进发

[74] 专利代理机构 长春科宇专利代理有限责任公司
代理人 马守忠

权利要求书 1 页 说明书 8 页

[54] 发明名称

治疗肝癌的虎眼万年青多糖药物

[57] 摘要

本发明涉及从虎眼万年青中提取的治疗肝癌的虎眼万年青多糖药物，其含有阿拉伯糖 (arabinose) 和半乳糖 (galactose) 成分，其主要组分是阿拉伯半乳糖蛋白。所述的虎眼万年青多糖提取物是通过如下的方法提取的：以虎眼万年青为原料，采用水提醇沉方法使虎眼万年青多糖含量以葡萄糖计达 50%~60% (W/W)；以虎眼万年青多糖为活性成分，不加任何辅料可以制成治疗肝癌药物，疗效确切。吉林省长白山区野生和人工种植虎眼万年青资源十分丰富。本发明的虎眼万年青多糖，有丰富的原料来源。由于虎眼万年青多糖所具有的明显的抗辐射、提高机体免疫力和抗肿瘤的功效，可以用于制备有效治疗肝癌的药物，具有广阔的应用前景。

1、一种治疗肝癌的虎眼万年青多糖药物，其特征在于：虎眼万年青多糖含有阿拉伯糖(arabinose)和半乳糖(galactose)成分，其主要组分是阿拉伯半乳糖蛋白。

所述的虎眼万年青多糖是用如下的方法提取的：将虎眼万年青药材粉碎成粗颗粒，加水量分别为 13mL / g 生药、10mL / g 生药及 10 mL / g 生药，加热至沸腾，提取三次，每次 2 小时，滤液浓缩至相对密度 1.03~1.05(80℃)，加乙醇至含醇量为 20%，静置 24 小时，抽滤，弃去沉淀，滤液继续加乙醇至含醇量为 70%，静置 24 小时，抽滤，收取沉淀，沉淀以无水乙醇适量洗涤，干燥(50℃)，得虎眼万年青多糖干粉提取物，其中虎眼万年青多糖含量以葡萄糖计达 50%~60% (W/W)。

2、根据权利要求 1 所述的治疗肝癌的虎眼万年青多糖药物，其特征在于，所述的虎眼万年青多糖的提取方法是：在沉淀以无水乙醇适量洗涤，干燥(50℃)后，粉碎成 80 目细粉，得虎眼万年青多糖干粉提取物，其中虎眼万年青多糖含量以葡萄糖计达 50%~60% (W/W)。

3、根据权利要求 1 所述的治疗肝癌的虎眼万年青多糖药物，其特征在于，以虎眼万年青多糖提取物为单一组分，以虎眼万年青多糖为有效活性成分，可以制成胶囊剂型。

4、根据权利要求 1 所述的治疗肝癌的虎眼万年青多糖药物，其特征在于，以虎眼万年青多糖提取物为单一组分，以虎眼万年青多糖为有效活性成分，可以制成片剂剂型。

治疗肝癌的虎眼万年青多糖药物

技术领域：

本发明涉及从虎眼万年青中提取的虎眼万年青多糖提取物为单一组分，以虎眼万年青多糖为有效活性成分治疗肝癌的虎眼万年青多糖药物

背景技术：

虎眼万年青 (*Ornithogalum caudatum* Ait.) 是长白山地区特有的民间药材，虽然未见历代本草收载，但民间多用其全草或球茎入药，外用其鲜汁液涂抹于患处以治疗疔疮、消炎；内服可治疗无名肿毒、肝炎、腮腺炎、肝硬化、肝癌等，而且疗效确切，毒副作用小。

近几年来，国内外对其基础研究的报道较多，1992年，国外科学家从同属植物虎眼万年青 (*Ornithogalum Saundersiae*) 中分离出具有强抗癌作用的酰化二糖皂苷类化合物 OSW-1。生理活性筛选实验表明，其体外对肺癌、乳房癌有明显抗癌活性，对 P388 小鼠白血病细胞有细胞毒作用，对 P388 细胞蛋白合成前体的结合及核酸的合成有抑制作用，比常见抗癌药喜树碱、阿霉素、紫杉醇的抗癌活性高 10 倍以上，而且对正常细胞没有毒性作用。

目前，科学家正在对虎眼万年青皂苷的分子结构进行改造，以期进一步提高其活性，使其更有可能成为抗癌药物，而美国同行则正在利用我国科学家提供的样品进行抗癌机理的研究。

发明内容：

本发明的目的在于：提供一种用新的方法从虎眼万年青提取的虎眼万年

青多糖提取物，以虎眼万年青多糖提取物为单一组分，将虎眼万年青多糖作为活性成分用于制备治疗肝癌的药物。

本发明提供的从虎眼万年青提取的虎眼万年青多糖提取物，它是通过如下的方法提取的：以虎眼万年青为原料，粉碎成粗颗粒，分别按 13mL / g 生药、10mL / g 生药及 10 mL / g 生药加水，加热至沸腾，提取三次，每次 2 小时，滤过，合并滤液，浓缩至相对密度 1.03~1.05(80℃)，放冷，加乙醇至含醇量为 20%，静置 24 小时，抽滤，弃去沉淀物，滤液再加乙醇至含醇量为 70%，静置 24 小时，抽滤，收取沉淀，沉淀以无水乙醇适量洗涤，干燥(50℃)，粉碎成 80 目细粉，得虎眼万年青多糖干粉提取物，其中虎眼万年青多糖含量以葡萄糖计达 50%~60% (W/W)。

本发明所述的虎眼万年青多糖含有阿拉伯糖 (arabinose) 和半乳糖 (galactose) 成分，其主要组分是阿拉伯半乳糖蛋白。

发明人发现本发明提供的从虎眼万年青提取的虎眼万年青多糖对于肝癌有良好的治疗作用。本发明提供的虎眼万年青多糖即使大剂量使用时，实验动物的行为也无任何显著变化。对动物神经系统、心血管系统、呼吸系统无明显影响。大鼠长期毒性试验结果表明：给药组及对照组大鼠在给药期间及恢复期内均活动正常，毛发光泽，未见尿、粪便异常，无一死亡；动物体重增长给药组与对照组比较无显著性差异；动物血液血象和血液生化学检查总体未见异常，病理组织学检查未见异常，其它送检的脏器均未见有规律的形态学改变，在大鼠长期毒性恢复期后也未见有各脏器有规律的形态学改变。故可认为虎眼万年青多糖对大鼠长期毒性极低。

虎眼万年青多糖鉴定：

将本发明提供的从虎眼万年青提取的虎眼万年青多糖提取物粗品溶解配成 20%水溶液，经唾液淀粉酶 37℃酶解除淀粉，Sevage 法除蛋白，蒸馏水透析 48h 除盐浓缩后的样品在热水（60℃）中溶解，然后加入不同体积的乙醇使含醇量分别达到 40%、60%进行分级沉淀。这样多糖被分成 3 个部分：40%乙醇沉淀（OC-1）、60%乙醇沉淀（OC-2）和 60%乙醇溶解部分（即 60%乙醇沉淀的上清液）（OC-3）。

将 60%乙醇沉淀部分（OC-2）溶于热水（60℃）后与 Sephadex DEAE 树脂在一个烧杯中混合。平衡后，将树脂置于漏斗中并用 0.5M NH_4HCO_3 溶液洗涤，由此分成 2 个组分：0.5M NH_4HCO_3 洗脱液（OC-2-1）和结合在树脂上的残余组分（OC-2-2）。0.5M NH_4HCO_3 洗脱液蒸干后溶解在水中装在 DEAE 柱上，将此多糖用 0.2M NH_4HCO_3 溶液等度洗脱，测定各洗脱液的 215nm 和 280nm 的吸收值（OD 值），用收集管数对 OD 值绘制洗脱曲线。将同一洗脱峰的组分合并，产生 4 个主要组分：OC-2-1-a(未结合部分)，OC-2-1-b，OC-2-1-c，OC-2-1-d，OC-2-1-e。用旋转蒸发仪在 60℃以下将各组分蒸干，然后用 PD 10 柱除去盐和小分子。

我们采用改良硫酸-咔唑法，首先对其中 OC-2-1-b，OC-2-1-c，OC-2-1-d，OC-2-1-e 四个组分糖醛酸含量法进行了测定，结果表明，OC-2-1-b，OC-2-1-c，OC-2-1-d，OC-2-1-e 各组分含有较高的糖醛酸含量，其含量分别为 22%，25%，52%，53%。

其次，OC-2-1-b，OC-2-1-c，OC-2-1-d，OC-2-1-e 四个组分在 SDS 凝胶（SDS PAGE 4-15%）电泳后用考马斯亮蓝（Coomassie Blue）试剂和 β -葡

葡萄糖基-Yariv (1, 3, 5-三-(4-β-D-葡萄糖吡喃糖基-氧化苯基-偶氮基)-2, 4, 6-三羟基苯) 试剂分别染色, 所用 Marker 是 Benchmarker 预先染色的蛋白梯度 (分子量从 6.0 到 181.8kDa) OC-2-1-b, OC-2-1-c, OC-2-1-d, OC-2-1-e 四个组分用考马斯亮蓝试剂染色后未发现明显的蛋白质点; 用 β-葡萄糖基-Yariv 试剂染色后现出 4 个明显的红色条带。由于 β-葡萄糖基-Yariv 试剂是阿拉伯半乳糖蛋白 (arabino-galactan proteins, AGPs) 的特异性染色剂, 因此可以初步说明 OC-2-1-b, OC-2-1-c, OC-2-1-d, OC-2-1-e 四个组分是阿拉伯半乳糖蛋白。

将糖醛酸还原, 然后甲基化, 用气相色谱法进行连接和组成分析, 结果表明, OC-2-1-b, OC-2-1-c, OC-2-1-d, OC-2-1-e 四个组分含有较高的阿拉伯糖 (arabinose) 和半乳糖 (galactose) 成分, 这进一步说明四个组分主要是阿拉伯半乳糖蛋白。

实验结果表明: 本发明的虎眼万年青多糖对昆明小鼠肝癌 H₂₂ 的平均抑瘤率分别为 16.72%、23.86%、40.75%; 对小鼠肉瘤 S₁₈₀ 的平均抑瘤率分别为 27.49%、33.53%、49.61%; 对腹腔接种肝癌腹水(HepA)小鼠的平均生命延长率分别为 35.4%、51.4%、49.2%。提示虎眼万年青多糖 200mg/kg 剂量组对小鼠肝癌 H₂₂ 及肉瘤 S₁₈₀ 生长有明显的抑制作用, 可使腹腔接种肝癌腹水(HepA)小鼠的生命延长率明显延长。

吉林省长白山区野生和人工种植虎眼万年青资源十分丰富。本发明提供的从虎眼万年青提取的虎眼万年青多糖, 有丰富的原料来源。本发明对其有效成分和药理活性作了进一步的研究, 由于虎眼万年青多糖所具有的明显的抗辐射、提高机体免疫功能和抗肿瘤的功效, 其可以用于制备治疗肝癌的药

物

本发明的虎眼万年青多糖可以按照医药学领域的常规技术及生产方法，以虎眼万年青多糖提取物为单一组分，以虎眼万年青多糖为有效活性成分制备药物的各种剂型，包括片剂和胶囊剂。本发明的虎眼万年青多糖药物对于人的用量可以是 0.9g /次。一日 3 次服用。

具体实施方式：

下列实施例旨在进一步举例描述本发明，而不是限制本发明。

实施例一：虎眼万年青多糖提取物的制备

取虎眼万年青药材 6000g，粉碎成粗颗粒，分别加水 13mL / g 生药、10mL / g 生药及 10 mL / g 生药，加热至沸腾，提取三次，每次 2 小时，滤过，合并滤液，浓缩至相对密度 1.03~1.05(80℃)放冷，加乙醇至含醇量为 20%，静置 24 小时，抽滤，弃去沉淀物，滤液继续加乙醇至含醇量为 70%，静置 24 小时，抽滤，收取沉淀，沉淀以无水乙醇适量洗涤，干燥(50℃)，粉碎成细粉，得虎眼万年青多糖提取物干粉 300 g，经分光光度法测定虎眼万年青多糖含量以葡萄糖计达 50%~60% (W/W)。

实施例二

取虎眼万年青多糖提取物细粉，装入 1# 胶囊，制成 1000 粒，每粒 0.3g，即得药物成品。

其它项目应符合中华人民共和国药典 2005 版胶囊项下有关规定。

实施例三

取虎眼万年青多糖提取物细粉，用 85%乙醇湿法制粒，整粒，干燥，压片。每片 0.3g，即得药物成品。

其它项目应符合中华人民共和国药典 2005 版片剂项下有关规定。

实施例四

虎眼万年青多糖对肝癌的治疗作用的实验：

实验是用本发明的实施例一所得的虎眼万年青多糖提取物 50、100、200mg/kg 剂量组对昆明种小鼠进行试验。昆明种小鼠，6~8 周龄，体重 18~22g，雌雄兼用。每批实验采用同一性别，实验前在实验室常规饲养一周。

将小鼠按体重随机分为 5 组：

对照组： 给予蒸馏水

阳性药对照组：给予环磷酰胺 20mg/kg

药物多糖小剂量组：给予虎眼万年青多糖提取物 50mg/kg

药物多糖中剂量组：给予虎眼万年青多糖提取物 100mg/kg

药物多糖大剂量组：给予虎眼万年青多糖提取物 200mg/kg

药物组每日灌胃给药 1 次，给药容量均为 0.2ml/10g，共 10~15 天。

按抗肿瘤药物实验方法制备体内移植性肿瘤模型，取接种于昆明种小鼠第 7 天的肝癌 H₂₂ 腹水，在无菌条件下配制成瘤细胞悬液，调整活细胞数为 1×10⁷/ml，接种于昆明种小鼠左腹股沟皮下，每只小鼠接种 0.2ml，接种次日起分组给药。于停药后 24 小时颈椎脱臼处死荷瘤小鼠，剥离肿瘤组织，称重。结果以肿瘤生长抑瘤率表示：

$$\text{抑瘤率} = (1 - \text{实验组平均瘤重} / \text{对照平均瘤重}) \times 100\%$$

取符合实验标准要求（对照组平均瘤重>1g，且瘤重<400mg 的动物数不超过总数的 20%）的三批试验结果进行统计学分析。

三批试验结果表明, 虎眼万年青多糖多糖提取物 50、100、200mg/kg 剂量组对小鼠肝癌 H₂₂ 的平均抑瘤率分别为 16.72%、23.86%、40.75%; 虎眼万年青纯化前多糖 50、100、200mg/kg 剂量组对小鼠肝癌 H₂₂ 的平均抑瘤率分别为 15.02%、21.86%、30.06%, 表明虎眼万年青多糖大剂量组对小鼠肝癌 H₂₂ 生长有明显抑制作用, 虎眼万年青多糖小、中剂量组及虎眼万年青纯化前多糖对小鼠肝癌 H₂₂ 生长有一定的抑制作用, 见表 1-1、1-2、1-3。

表 1-1 虎眼万年青多糖对小鼠肝癌 H₂₂ 的生长抑制作用($\bar{x} \pm s$)

组别	例数 (药前/药后)	药前体重 (g)	药后体重 (g)	瘤重 (g)	抑瘤率 (%)
对照组					
20 ml/kg	21/20	21.40±1.96	23.55±3.82	2.44±1.13	—
环磷酰胺					
20mg/kg	21/17	20.67±1.35	19.93±1.98	1.09±0.31	55.43***
虎眼万年青多糖					
50mg/kg	12/12	20.11±1.44	22.20±2.90	2.10±0.83	14.00
100mg/kg	12/12	20.58±1.44	21.50±2.81	2.03±0.58	16.88
200mg/kg	12/9	20.11±1.27	23.78±2.44	1.49±0.68	38.93*
虎眼万年青纯化前多糖					
50mg/kg	12/11	21.80±1.40	24.20±2.90	2.06±0.74	15.90
100mg/kg	12/12	22.08±1.56	24.50±2.84	1.96±0.72	19.92
200mg/kg	12/9	20.56±2.01	23.56±4.19	2.00±1.31	18.22

注: 与对照组比较 ***P<0.001

表 1-2 虎眼万年青多糖对小鼠肝癌 H₂₂ 的生长抑制作用($\bar{x} \pm s$)

组 别	例数 (药前/药后)	药前体重 (g)	药后体重 (g)	瘤 重 (g)	抑瘤率 (%)
对 照 组					
20 ml/kg	22/16	19.75±1.48	26.56±3.93	2.07±1.06	—
环磷酸胺					
20mg/kg	22/14	19.50±1.51	20.71±4.78	0.80±0.71	61.16**
虎眼万年青多糖					
50mg/kg	12/12	20.80±1.40	25.20±2.90	1.77±0.62	14.42
100mg/kg	12/11	20.55±1.21	27.27±4.78	1.71±0.72	17.42
200mg/kg	12/11	20.11±0.78	24.89±3.86	1.23±0.62	40.58**
虎眼万年青纯化前多糖					
50mg/kg	12/11	20.80±1.40	26.20±2.90	1.84±0.46	11.08
100mg/kg	12/12	20.58±1.16	27.00±5.13	1.64±0.96	20.78
200mg/kg	12/12	20.58±1.16	27.08±3.92	1.60±0.86	22.54

注：与对照组比较 **P<0.01

表 1-3 虎眼万年青多糖对小鼠肝癌 H₂₂ 的生长抑制作用($\bar{x} \pm s$)

组 别	例数 (药前/药后)	药前体重 (g)	药后体重 (g)	瘤 重 (g)	抑瘤率 (%)
对 照 组					
20 ml/kg	18/14	18.12±0.86	26.21±3.04	2.20±1.58	—
环磷酸胺					
20mg/kg	18/15	18.13±1.13	22.67±3.64	0.46±0.25	79.12***
虎眼万年青多糖					
50mg/kg	13/11	19.80±1.40	24.20±2.90	1.72±0.46	21.97
100mg/kg	13/11	19.27±0.65	25.27±5.20	1.38±0.84	37.28
200mg/kg	13/13	18.92±0.95	26.85±3.02	1.26±0.77	42.73*
虎眼万年青纯化前多糖					
50mg/kg	13/11	18.80±1.40	26.20±2.90	1.80±0.66	18.09
100mg/kg	13/12	18.53±0.79	26.83±2.66	1.66±0.86	24.88
200mg/kg	13/12	18.58±0.79	26.67±1.92	1.11±0.56	49.42**

注：与对照组比较 *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001