



(12) 发明专利申请

(10) 授权公告号 CN 103059160 A

(43) 申请公布日 2013.04.24

(21) 申请号 201110321162.1

A61P 35/04 (2006.01)

(22) 申请日 2011.10.20

(71) 申请人 中国科学院上海药物研究所

地址 201203 上海市浦东新区张江祖冲之路
555 号

(72) 发明人 丁侃 王滢 方建平 董群

(74) 专利代理机构 北京金信立方知识产权代理
有限公司 11225

代理人 朱梅 徐琳

(51) Int. Cl.

C08B 37/02 (2006.01)

A61K 31/716 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

权利要求书2页 说明书9页

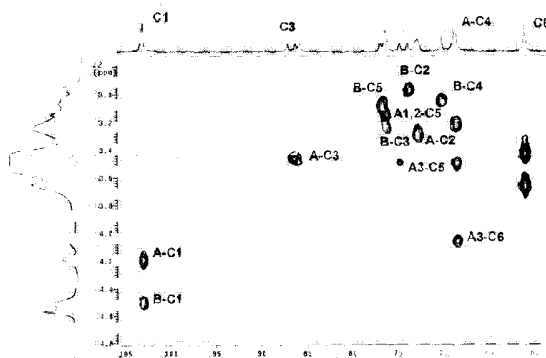
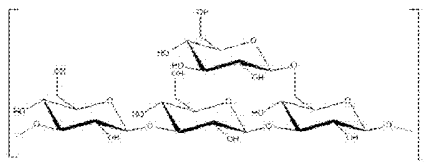
序列表1页 附图5页

(54) 发明名称

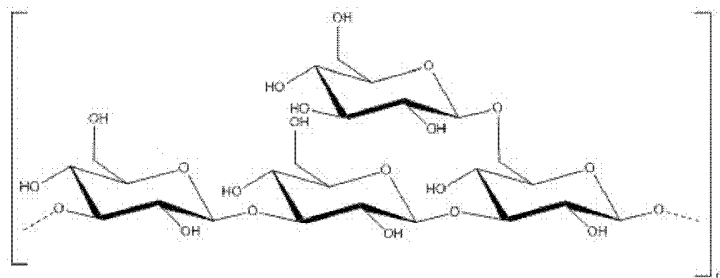
β -葡聚糖 GFPBW1 及其制备方法和用途

(57) 摘要

本发明涉及一种具有如下所示的结构式的 β -葡聚糖 GFPBW1、其制备方法以及该 β -葡聚糖在制备用于治疗肿瘤的药物中的用途。本发明所述的 β -葡聚糖 GFPBW1 可以利用一种简单有效的多糖提取工艺和方法,从蕈菌灰树花中分离提取以及纯化而得到。药理实验表明 GFPBW1 能通过 Dectin-1 受体激活原代巨噬细胞释放细胞因子,而体内抗肿瘤实验也进一步表明 GFPBW1 具有免疫调节功能及相应的抗肿瘤活性。



1. 一种具有如下所示的结构式的 β -葡聚糖 GFPBW1:



其中, n 表示 150 ~ 750 的整数。

2. 根据权利要求 1 所述的 GFPBW1, 其特征在于, 所述 β -葡聚糖 GFPBW1 的平均分子量为 3×10^5 Da, 分子量范围为 $1 \sim 5 \times 10^5$ Da。

3. 一种制备如权利要求 1 所述的 β -葡聚糖 GFPBW1 的方法, 包括如下步骤:

(a) 用醇溶液浸泡干燥的灰树花子实体, 离心, 固体物晾干, 然后用沸水提取, 所得固体残渣用碱溶液浸泡, 离心将残渣丢弃, 收集上清; 调 pH 至 7, 再进行透析、浓缩, 随后用醇溶液进行沉淀, 离心收集沉淀, 再经无水乙醇和丙酮依次洗涤, 干燥后得棕黄色固体 GFPB 粗产物;

(b) 用适量蒸馏水溶解步骤 (a) 所得 GFPB 粗产物, 离心除去不溶物, 收集上清液并进行 DEAE-纤维素柱层析, 然后将得到的洗脱组分进行浓缩、透析和干燥以得到 β -葡聚糖 GFPBW1。

4. 根据权利要求 3 所述的方法, 其特征在于, 步骤 (a) 中所述的醇溶液为 95% 乙醇, 优选地用醇溶液浸泡为用 95% 乙醇浸泡灰树花子实体两周, 每周更换乙醇一次。

5. 根据权利要求 3 所述的方法, 其特征在于, 步骤 (a) 中所述的沸水提取的条件为: 每次加约 2 倍体积蒸馏水, 提取时间为 4 ~ 6 小时, 并用苯酚-硫酸法检测提取液中糖含量, 提取 3 ~ 5 次, 优选提取 4 次。

6. 根据权利要求 3 所述的方法, 其特征在于, 步骤 (a) 中所述的碱溶液浸泡的条件为: 于 4°C 下用 5% NaOH 溶液浸泡两次, 每次 4 小时。

7. 根据权利要求 3 所述的方法, 其特征在于, 步骤 (a) 中所述的透析条件为: 采用对流动水透析 2 天。

8. 根据权利要求 3 所述的方法, 其特征在于, 步骤 (b) 中所述 DEAE-纤维素柱层析的条件为: 先以蒸馏水做洗脱液, 然后分别用 0.1、0.2、0.3 mol/L 的氯化钠溶液进行洗脱, 再将蒸馏水洗脱部分的组分进行浓缩、透析和冷冻干燥以得到 GFPBW1。

9. 根据权利要求 3 所述的方法, 其特征在于, 包括如下步骤:

(a) 取干燥的灰树花子实体, 用 3 倍体积的 95% 的乙醇浸泡脱脂, 每 7 天为一周期, 更换两次, 浸泡完毕, 离心, 将所得固体物置于室温通风处晾干; 然后进行提取, 3kg 原材料每次加 30L 自来水加热煮沸, 提取时间为 4 ~ 6 小时, 并用苯酚-硫酸法检测提取液中糖含量, 至糖反应不明显, 共计提取 4 次; 沸水提取后的固体残渣于 4°C 下用 5% NaOH 浸泡两次, 每次 4 小时, 合并离心, 将残渣丢弃, 收集上清; 用约 2 mol/L HCl 中和至 pH 约 7, 出现浑浊, 对流动水透析 2 天, 浓缩, 加入 3 倍体积的 95% 的乙醇进行沉淀, 8000 rpm 离心收集沉淀, 经无水乙醇和丙酮依次洗涤后, 于 40°C 真空干燥, 得棕黄色固体 GFPB 粗产物;

(b) 取上述 GFPB, 加入适量蒸馏水溶解, 离心除去不溶物, 收集上清液并进行 DEAE- 纤维素柱层析, 其中先以蒸馏水作为洗脱液, 然后分别用 0.1、0.2 和 0.3mol/L 的氯化钠溶液洗脱, 分别收取合并各流分, 蒸馏水洗脱部分的组分进行浓缩、透析和冷冻干燥后得到 GFPBW1。

10. 一种药物组合物, 其包含有效剂量范围的权利要求 1 所述的 β - 葡聚糖 GFPBW1 作为有效成分, 并且优选地进一步含有药学上可接受的载体及辅料。

11. 权利要求 1 所述的 β - 葡聚糖 GFPBW1 在制备用于治疗肿瘤的药物中的用途。

12. 根据权利要求 11 所述的用途, 其中所述肿瘤包括组织系统的实体瘤、血液系统癌症、各种原发或继发性恶性肿瘤以及恶性肿瘤的转移。

β -葡聚糖 GFPBW1 及其制备方法和用途

技术领域

[0001] 本发明涉及真菌提取多糖,更具体地说,涉及一种从灰树花中提取得到的 β -葡聚糖 GFPBW1、其制备方法以及该 β -葡聚糖在制备用于治疗肿瘤的药物中的用途。

背景技术

[0002] 灰树花 (*Grifola frondosa* (Fr.) S. F. Gray) (又名舞茸) 是药、食兼用蕈菌,属担子菌亚门层菌纲目多孔菌科树花菌属。野生的灰树花主要产于日本,野生的灰树花在封建社会时期的日本民间主要是由于其极佳的美味而用于烹调食材,直到上世纪八十年代,它的药用价值才逐渐被日本学者所研究和发现。灰树花提取物具有治疗 AIDS、糖尿病、高血压等功能,而其中最主要的是其多糖具有通过增强免疫系统来达到抗肿瘤的作用。

[0003] 由于多糖是极性大分子化合物,酸性条件下能引起多糖苷链的断裂。它的提取分离十分复杂,大多采用沸水、碱溶液提取。提取液中的游离蛋白质主要用 Sevage 法、三氟乙酸法和三氟三氯乙烷法等三种方法去除。小分子杂质可用透析法除去。

[0004] 多糖的纯化方法很多,有分布沉淀法、盐析法、金属络合法、季铵盐沉淀法。DEAE-纤维素法和其他各种不同类型的凝胶柱层析法等,并采用硫酸-苯酚法等比色方法来测定多糖。

[0005] 多糖最主要的功能是免疫调节功能。其中作为真菌细胞壁组分的 β -葡聚糖作为一种典型的生物反应调节剂 (BRM),同时又作为一种病原相关分子模式 (PAMP),进入人体后,能够被免疫细胞表面的模式识别受体 (PRRs) 所识别而激活信号传导,并最终促进巨噬细胞、NK 细胞、中性粒细胞以及 CTL 细胞的活化和增殖,从而实现对肿瘤细胞的细胞免疫清除。同时多糖还能通过诱导释放细胞因子 (如 $\text{TNF-}\alpha$) 以及激活补体系统而对肿瘤细胞进行体液免疫清除。目前发现的识别 β -葡聚糖的 PRRs 包括 Dectin-1、补体受体 3 (CR3)、清道夫受体 (Sc)、乳糖基神经酰胺受体 (LacCer) 以及 Toll 样受体 (TLRs) 等,其中 Dectin-1 受体在 β -葡聚糖的免疫调节过程中是最重要的受体。Dectin-1 作为巨噬细胞的主要 β -葡聚糖受体,在小鼠体内腹腔注射 Dectin-1 中和抗体后再给 β -葡聚糖,结果表明 β -葡聚糖的抗肿瘤效果大大降低甚至完全消失。而 Dectin-1 基因敲除小鼠也完全阻断巨噬细胞对真菌的免疫反应以及 β -葡聚糖诱导的 $\text{TNF-}\alpha$ 等细胞因子的释放。Dectin-1 作为一个 II 型跨膜 C 型凝集素受体家族成员, β -葡聚糖结合 Dectin-1 受体后通过几条信号通路激活内吞,活性氧 (ROS) 产生,诱导细胞因子表达。其中主要一条信号通路是 Dectin-1 在结合配体后,细胞质内结构域中的酪氨酸被 Src 激酶磷酸化后,招募 Syk 激酶结合和活化,然后激活 CARD9-BCL10-MALT1 复合物,并进一步诱导激活 NF- κ B 转录表达 IL-2, $\text{TNF-}\alpha$ 等细胞因子。同时, Dectin-1 还能不依赖 Syk 的参与而行使巨噬细胞的吞噬功能以及依赖 Syk 的 ROS 释放。

[0006] 恶性肿瘤,也称癌症,是一种严重威胁人类健康的疾病,根据世界卫生组织 WHO 的统计,全球每年癌症患者的死亡人数高达六千万,继心血管疾病、传染性和寄生虫病之后位居第三位,并且在 2015 年将屈居第二。对于癌症的治疗主要采用手术、放疗以及化疗。对

癌症患者的化疗由于目前临床上使用的烷化剂、抗代谢、抗生素等药物的作用靶点在正常的细胞中也表达,靶向性不强,因而造成了很大的毒副作用,如骨髓抑制、免疫抑制、白细胞减少等血液系统毒性、呕吐等胃肠道不良反应以及脱发等皮肤及附属器官反应。因而人类一直在寻找新的药物和治疗方法意图延长癌症患者的存活期,提高他们的生活质量以致最终达到根除肿瘤的目的。利用多糖的免疫调节功能的免疫治疗则由于靶向性强并且不容易产生副作用,近年来已经成为肿瘤治疗的热点,并且在未来的 5-10 年将有可能同传统的手术、放疗以及化疗一道在肿瘤的治疗中成为常用方法,同时鉴于肿瘤放疗、化疗经常导致的一些免疫抑制副作用,因而利用多糖的免疫增强功能并联合放、化疗来治疗肿瘤将更有其临床应用价值。

发明内容

[0007] 本发明利用一种简单有效的多糖提取工艺和方法,以灰树花为原料获得了一种新的均一的 β -葡聚糖(GFPBW1),药理实验表明 GFPBW1 能通过 Dectin-1 受体激活原代巨噬细胞释放细胞因子,而体内抗肿瘤实验也进一步表明 GFPBW1 具有免疫调节功能及相应的抗肿瘤活性。因此 GFPBW1 有望开发成为一种免疫调节剂作为抗肿瘤药物或者辅佐药物而用于临床。

[0008] 因此,本发明的一个目的在于提供一种化学结构特征明确的均一的 β -葡聚糖 GFPBW1。

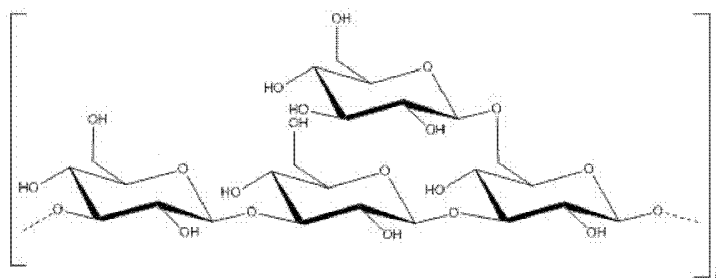
[0009] 本发明的另一个目的是提供一种制备 GFPBW1 方法。

[0010] 本发明的再一个目的是提供一种用于治疗肿瘤的药物组合物,其包含有效剂量范围的 GFPBW1 作为有效成分,并且优选地,其可进一步含有药学上可接受的载体及辅料。

[0011] 本发明的又一个目的是提供 β -葡聚糖 GFPBW1 在制备用于治疗肿瘤的药物中的用途。

[0012] 为实现上述目的,本发明提供了一种具有如下所示的结构式的 β -葡聚糖 GFPBW1 :

[0013]



[0014] 其中, n 表示 150 ~ 750 的整数,优选为 450。

[0015] 本发明中,所述 β -葡聚糖 GFPBW1 的平均分子量为 3×10^5 Da,分子量范围为 $1 \sim 5 \times 10^5$ Da。

[0016] 根据本发明的另一个目的,本发明提供了制备 β -葡聚糖 GFPBW1 的方法,主要是从蕈菌灰树花中进行分离提取以及纯化,包括如下步骤:

[0017] (a) 用醇溶液(例如,优选 95%乙醇)浸泡干燥的灰树花子实体,离心,固体物晾干,然后用沸水提取,所得固体残渣用碱溶液(例如,优选 NaOH 溶液)浸泡,离心将残渣去

弃,收集上清;调 pH 至 7,再进行透析、浓缩,随后用醇溶液(例如,优选 95%的乙醇)进行沉淀,离心收集沉淀,再经无水乙醇和丙酮依次洗涤,干燥后得棕黄色固体 GFPB 粗产物。

[0018] (b) 用适量蒸馏水溶解步骤(a)所得 GFPB 粗产物,离心除去不溶物,收集上清液并进行 DEAE-纤维素柱层析,然后将得到的洗脱组分进行浓缩、透析和干燥以得到 GFPBW1。

[0019] 其中,步骤(a)中所述的用醇溶液浸泡优选为用 95%乙醇浸泡灰树花子实体两周,每周更换乙醇一次。

[0020] 步骤(a)中所述的沸水提取的条件为:每次加约 2 倍体积蒸馏水,提取时间为 4~6 小时,并用苯酚-硫酸法检测提取液中糖含量,提取 3~5 次,优选提取 4 次。

[0021] 步骤(a)中所述的碱溶液浸泡的条件为:于 4℃下用 5% NaOH 溶液浸泡两次,每次 4 小时。

[0022] 步骤(a)中所述的透析条件为:采用对流动水透析 2 天。

[0023] 步骤(b)中所述 DEAE-纤维素柱层析的条件为:先以蒸馏水做洗脱液,然后分别用 0.1、0.2、0.3mol/L 的氯化钠溶液进行洗脱,再将蒸馏水洗脱部分的组分进行浓缩、透析和冷冻干燥以得到 β -葡聚糖 GFPBW1。

[0024] 在本发明的一个优选实施方式中,制备 β -葡聚糖 GFPBW1 的方法包括如下步骤:

[0025] (a) 取干燥的灰树花子实体,用 3 倍体积的 95%的乙醇浸泡脱脂,每 7 天为一周期,更换两次,浸泡完毕,离心,将所得固体物置于室温通风处晾干;然后进行提取,3kg 原材料每次加 30L 自来水加热煮沸,提取时间为 4~6 小时,并用苯酚-硫酸法检测提取液中糖含量,至糖反应不明显,共计提取 4 次;沸水提取后的固体残渣于 4℃下用 5% NaOH 溶液浸泡两次,每次 4 小时,合并离心,将残渣丢弃,收集上清;用约 2mol/L HCl 中和至 PH 约 7,出现浑浊,对流动水透析 2 天,浓缩,加入 3 倍体积的 95%的乙醇进行沉淀,8000rpm 离心收集沉淀,经无水乙醇和丙酮依次洗涤后,于 40℃真空干燥,得棕黄色固体 GFPB 粗产物。

[0026] (b) 取上述 GFPB,加入适量蒸馏水溶解,离心除去不溶物,收集上清液并进行 DEAE-纤维素柱层析,其中先以蒸馏水作为洗脱液,然后分别用 0.1、0.2 和 0.3mol/L 的氯化钠溶液洗脱,分别收取合并各流分,蒸馏水洗脱部分的组分进行浓缩、透析和冷冻干燥后得到 GFPBW1。

[0027] 根据本发明的再一个目的,本发明提供了一种用于治疗肿瘤的药物组合物,其包含有效剂量范围的 GFPBW1 作为有效成分,并且优选地,其可进一步含有药学上可接受的载体及辅料。

[0028] 本发明的 GFPBW1 可经口服或不经口给药。经口服给药时,首先使该类化合物与常规的药用辅剂(如赋形剂、崩解剂、黏合剂、润滑剂、抗氧化剂、包衣剂、着色剂、芳香剂、表面活性剂等)混合,将其制成颗粒剂、胶囊、片剂等形式;非经口给药时,可以注射液、输液剂或栓剂等形式给药。制备上述制剂时,可使用常规的制剂技术。

[0029] 根据本发明的又一个目的,本发明提供了 GFPBW1 在制备用于治疗肿瘤的药物中的用途。所述肿瘤涉及多种组织系统的实体瘤,包括胃癌、肝癌、胰腺癌、卵巢癌、宫颈癌、膀胱癌、前列腺癌、结肠癌、乳腺癌、肺癌、鼻咽癌、神经母细胞瘤等,还包括可能的急性淋巴细胞白血病,慢粒性白血病等血液系统癌症以及其它未特别指出的各种原发、继发性恶性肿瘤以及恶性肿瘤的转移。

[0030] 本发明利用一种简单有效的多糖提取工艺和方法,以灰树花为原料获得了一种均

一的 β -葡聚糖 GFPBW1, 药理实验表明 GFPBW1 能通过 Dectin-1 受体激活原代巨噬细胞释放细胞因子, 而体内抗肿瘤实验也进一步表明 GFPBW1 具有免疫调节功能及相应的抗肿瘤活性。因此 GFPBW1 有望开发成为一种免疫调节剂作为抗肿瘤药物或者辅佐药物用于临床。

附图说明

[0031] 图 1 是根据本发明的一个实施方式的 β -葡聚糖 GFPBW1 的提取分离纯化流程图。

[0032] 图 2 是根据本发明的一个实施方式的 β -葡聚糖 GFPBW1 的红外光谱 (IR) 图。

[0033] 图 3 是根据本发明的一个实施方式的 β -葡聚糖 GFPBW1 的 ^{13}C NMR 谱图, 其中, A 和 B 分别代表 GFPBW1 重复单元中的葡萄糖残基, 且 A 包括 A1、A2、A3。

[0034] 图 4 是根据本发明的一个实施方式的 β -葡聚糖 GFPBW1 的 HSQC 谱图, 其中, A 和 B 分别代表 GFPBW1 重复单元中的葡萄糖残基, 且 A 包括 A1、A2、A3。

[0035] 图 5 是根据本发明的一个实施方式的 β -葡聚糖 GFPBW1 竞争性结合 Dectin-1 受体的图。

[0036] 图 6 是根据本发明的一个实施方式的 β -葡聚糖 GFPBW1 的激活巨噬细胞功能的图。

[0037] 图 7 是根据本发明的一个实施方式的 β -葡聚糖 GFPBW1 的体内免疫调节和抗 S-180 同种移植瘤活性的图。

具体实施方式

[0038] 下面结合实施例对本发明作进一步阐述, 以下实施方式只以举例的方式描述本发明。很明显, 本领域普通技术人员可在本发明的范围和实质内, 对本发明进行各种变通和修改。需要了解的是, 本发明意欲涵盖在所附权利要求书中包括的变通和修改。

[0039] 仪器:

[0040] 高效凝胶过滤色谱 (HPGPC): Agilent 1200Series 系统, 配置为 G1311AQudra pump, G1329AALS 自动进样器, G1362A 示差检测器, G1316A 柱温箱, DAD G1315D 紫外检测器, Agilent Chemstation 控制系统及 GPC 数据处理软件。两根多糖专用凝胶色谱柱串联: Shodex sugar KS-804 和 KS-805 (8mm \times 300mm, 磺酸化苯乙烯-二乙烯基苯共聚物凝胶, 排阻极限分别为 4×10^5 和 5×10^6 Da), 色谱条件: 以 10mM NaOH 为流动相, 柱温为 40 $^{\circ}\text{C}$, 流速为每分钟 0.8ml, 进样量为 40 μl 。

[0041] LKB 恒温系统 (瑞典 LKB 公司), BSZ-100 自动部分收集器和 HL-2 恒流泵 (上海青浦沪西仪器厂), Modulyo 型冷冻干燥器 (英国 Edwards 公司), Labconco 18 型冷冻干燥器 (英国 Labconco 公司), 日立 20PR-52D 型高速离心机 (日本 Hitachi 公司), 电热恒温真空干燥箱 (上海医疗器械七厂), Buchi461 型旋转蒸发仪, EYELA-N1001 型旋转蒸发仪, 725N 紫外可见分光光度计 (上海精科仪器有限公司)。

[0042] 药品和试剂:

[0043] 灰树花子实体购自于上海大山公司。

[0044] DEAE-cellulose 购于 Whatman 公司; 透析袋 (分子截留为 3500Da) 和二甲亚砜 (DMSO) 为 Merck 公司产品。其他试剂来源与上海国药集团。

[0045] 制备实施例

[0046] 实施例 1 β -葡聚糖 GFPBW1 的制备：

[0047] 取灰树花子实体（购自上海大山公司）3 公斤，经 2 倍体积 95% 的乙醇浸泡 2 周后，过滤，晾干。脱脂后的干品（3 公斤）用沸水提取，每次加水 20 升，提取时间为 5-6 小时，以苯酚硫酸法检测提取液的糖含量，直至糖反应不明显，共计提取 4 次。提取结束后的固体残渣于 4℃ 下用 5% NaOH 浸泡过夜，离心，用约 2mol/L HCl 中和至 pH 约 7，出现浑浊，对流动水透析 2 天，浓缩，加入 3 倍体积的 95% 的乙醇醇沉，8000rpm 离心收集沉淀，经无水乙醇和丙酮依次洗涤后，于 40℃ 真空干燥，得 50g 棕黄色固体（GFPB，产率为 1.6%）。

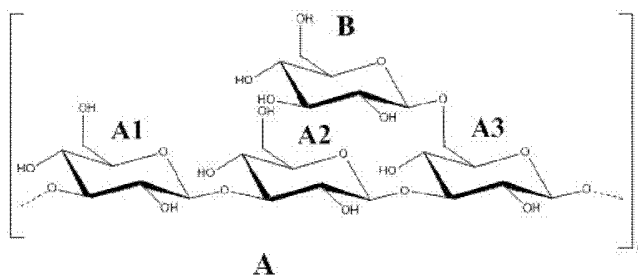
[0048] 取 10g 上述碱提多糖 GFPB，加入适量（50ml）蒸馏水溶解，离心，上清液用 DEAE-纤维素（氯型）柱层析（DEAE-32, Whatman）进行初步分离，分离条件为：首先以蒸馏水作为洗脱液，然后用 0.1、0.2 和 0.3mol/L 的 NaCl 溶液洗脱，分别收取各流份，其中从蒸馏水洗脱组分中获得多糖组分 GFPBW1（300mg）（图 1）。

[0049] 经高效凝胶柱层析（HPGPC）（Shodex sugar KS 804 与 KS 805 串联）分析表明 GFPBW1 的平均分子量为 3×10^5 Da。比旋度 $[\alpha]_D = +23^\circ$ 。糖组成分析表明 GFPBW1 为一葡聚糖。红外图谱显示， 1720cm^{-1} 附近没有吸收峰，表明该多糖不含有糖醛酸， 920cm^{-1} 峰显示多糖为 β -连接的葡聚糖（图 2）。 ^{13}C NMR 谱中，位于 δ 103.69ppm 的碳信号，提示该多糖的葡萄糖残基为吡喃环型，且糖苷键连接方式为 β 型。在 ^{13}C -NMR 谱的非异头碳区域，位于 87.72ppm 的 C-3 取代信号、86.862ppm 的碳取代信号显示该多糖具有两种不同的 C-3 取代方式，60.988ppm 有未取代的 C-6 信号（图 3）。

[0050] 多糖 GFPBW1 中糖残基连接方式的种类及比例可用甲基化分析得到阐明。结果表明，GFPBW1 的葡萄糖残基有三种连接方式，分别为 1,3-、1,3,6- 以及末端连接葡萄糖基，其比例为 1.5 : 1 : 1。从上述比例可以发现，C-3 位取代的糖残基约占所有糖残基总数的 55.5%，如此高的比例说明 GFPBW1 的主链结构主要包含 1,3-连接的葡聚糖结构，并且在主链的部分葡萄糖残基的 C-6 位形成分支。

[0051] 以上结果表明 GFPBW1 的结构为：1,3 连接的葡萄糖残基为主链，在 6 位上有分支，与一个末端葡萄糖基相连，每 3 个单元有一个分支。本发明的 GFPBW1 具有如下所示的结构式：

[0052]



[0053] 上述结构式中，A 和 B 分别代表 GFPBW1 重复单元中的葡萄糖残基，且 A 包括 A1、A2、A3。

[0054] 实验实施例

[0055] 实验例 1 药理实验：

[0056] 1、全长小鼠 Dectin-1 表达质粒的构建和细胞转染

[0057] a) Trizol 试剂（美国 Invitrogen 公司）提取 RAW264.7 细胞（购自中国科学院细

胞库)总 RNA, M-MLV 反转录酶(日本 Takara 公司)反转录成 cDNA。

[0058] b) 正义链引物 5' -GGGGAATTCTGCCACCATGAAATATCACTCTCATATAG-3' (EcoR I) 和反义链引物 5' -AATTCTAGACTCAGTTCCTTCTCACAGATACTGTAT-3' (Xba I) (上海生工合成) 利用 Primstar 高保真聚合酶(日本 Takara 公司)PCR 反应扩增目的片段(PTC200, 德国 Eppendorf 公司)。琼脂糖凝胶电泳, 割胶回收。

[0059] c) 限制性核酸内切酶 EcoR I 和 Xba I (日本 Takara 公司) 双酶切上述 PCR 产物 DAN 片段以及质粒 pCDNA3.1/myc-HisB (美国 Clontech 公司), 37°C 反应 3h。

[0060] d) 琼脂糖凝胶电泳, 割胶回收酶切 DNA 片段(北京鼎国生物)。

[0061] e) 将酶切回收后的目的 DNA 片段和空载体片段用 T4DNA 连接酶(日本 Takara 公司)在 16°C 连接过夜。

[0062] f) 连接产物转化大肠杆菌感受态细胞 DH5 α (北京全式金), 涂布 LB 固体抗性(Ampicillin(氨苄西林)100 μ g/ml 或者 Kanamycin(卡那霉素)50 μ g/ml, 购自美国 Sigma 公司)培养板, 37°C 倒置培养过夜至长出单菌落。

[0063] g) 挑选 5 ~ 10 个单菌落经过菌落 PCR 鉴定, 进行测序验证(美国 Invitrogen 公司)。

[0064] 2、荧光分光光度法检测 FITC-zymosan 结合

[0065] a) FITC-zymosan 存贮液的准备: 以 5mg/ml 的浓度配置 FITC-zymosan 悬浊液(PBS), 漩涡振荡器剧烈震荡三次, 每次 15 秒。同时超声三次, 20 秒/次(45 ~ 50kHz, 55 ~ 90W) 以消除颗粒聚集形成的团。临用时用 DMEM 高糖培养基(美国 Gibco 公司)稀释至 100 μ g/ml (一般为 1 ~ 2 $\times 10^7$ 颗粒/ml) 的工作液使用。

[0066] b) 用 Lipfectamine 2000 (美国 Invitrogen 公司) 转染 48h 后或未转上述方法制备的 Dectin-1 的胚肾 HEK293 细胞(购自中国科学院细胞库)以 2 $\times 10^5$ 个细胞/ml 浓度接种至 12 孔板, 500 μ l 每孔, 培养过夜。

[0067] c) 16h 后, 用预冷的 PBS 洗细胞三次。

[0068] d) 加入用 RPMI1640 培养基(美国 Gibco 公司)配制的不同浓度的实施例 1 制备的 GFPBW1 的溶液(20 μ g/ml、100 μ g/ml、500 μ g/ml), 每孔 500 μ l, 放入 CO₂ 培养箱 (Serial II, 美国 Thermo 公司) 内, 37°C, 5% CO₂ 继续培养 30min。

[0069] e) 吸去培养基, 以 20 颗粒: 1 细胞的比例加入 FITC-zymosan (FITC-酵母聚糖, 购自美国 Invitrogen 公司) 同时混合相应浓度 GFPBW1 的悬浊液, 并继续培养 30min。

[0070] f) 用预冷的 PBS 洗涤四次, 以洗去多余的未结合的 FITC-zymosan 颗粒。

[0071] g) 用含 3% Triton X-100 的 PBS 溶液裂解细胞, 每孔 500 μ l。

[0072] h) 将细胞裂解液转入黑色荧光检测 96 孔板(德国 Greiner 公司), 每孔加入 100 μ l, 三复孔, 用酶标仪 (Novostar, 德国 BMG Labtech 公司) 检测荧光强度 518/494nm (EM/EX)。

[0073] 3、流式细胞术检测 FITC-zymosan 内吞

[0074] a) FITC-zymosan 存贮液的准备: 以 5mg/ml 的浓度配置 FITC-zymosan 悬浊液(PBS), 漩涡振荡器剧烈震荡 15s/次, 三次。同时超声三次, 20s/次(45 ~ 50kHz, 55 ~ 90W) 以消除颗粒聚集形成的团。临用时用 DMEM 高糖培养基(美国 Gibco 公司)稀释至 100 μ g/ml (一般为 1 ~ 2 $\times 10^7$ 颗粒/ml) 的工作液使用。

[0075] b) 用 Lipfectamine 2000 转染 48h 后或未转 Dectin-1 的 HEK293 细胞以 1×10^6 个细胞 /ml 浓度接种至 12 孔板 (德国 Greiner 公司), 1ml 每孔, 培养过夜。

[0076] c) 16h 后, 用预冷的 PBS 洗细胞三次。

[0077] d) 加入用 RPMI1640 培养基配制的浓度为 $500 \mu\text{g/ml}$ 的实施例 1 制备的 GFPBW1 的溶液, 每孔 $500 \mu\text{l}$, 放入 CO_2 培养箱内 37°C , $5\% \text{CO}_2$ 继续培养 30min。

[0078] e) 吸去培养基, 以 20 颗粒 : 1 细胞的比例加入 FITC-zymosan 同时混合相应浓度 GFPBW1 的悬浊液, 并继续培养 60min。

[0079] f) 用预冷的 PBS 洗涤四次, 以洗去多余的未结合的 FITC-zymosan 颗粒。

[0080] g) 胰酶 (购自美国 Invitrogen 公司) 消化收集细胞, 500g 离心 10min。

[0081] h) 弃去上清, 加入 1% 多聚甲醛室温固定 10min。

[0082] i) 500g 离心 10min 后, 用 PBS 重悬细胞。

[0083] j) 上流式细胞仪 (FACS Calibur, 美国 BD Bioscience 公司) 检测。

[0084] 4、小鼠腹腔巨噬细胞的制备

[0085] a) ICR 小鼠 (6 ~ 8 周, 雌性, 购自上海斯莱克实验动物中心) 颈椎脱臼处死, 75% 酒精浸泡 5min, 取出小鼠, 置于无菌纸上, 腹面朝上。

[0086] b) 用镊子提起小鼠下腹部皮肤, 剪开一个小口, 撕开皮肤, 完全暴露腹膜。

[0087] c) 10ml 注射器装上大号针头, 用镊子提起腹膜, 向腹腔中注入 6ml 冷的 PBS, 针尖朝上, 避开肠和脂肪。液体打进小鼠腹腔后, 用镊子夹一个酒精棉球在小鼠腹部按摩几次 (用这个方法代替来回用针头抽吸液体)。

[0088] d) 用剪刀在腹膜上剪开一个小口, 然后迅速用无针头注射器通过开口插入腹腔内吸出细胞悬液。

[0089] e) 细胞悬液 200g 离心 10min (德国 Eppendorf 公司), 用 PBS 洗一次, 用 RPMI1640+ 10% FBS 培养液 (美国 Gibco 公司) 重悬细胞, 调整浓度至 1×10^6 个细胞 /ml。

[0090] f) 细胞悬液置入培养箱 (Serial II, 美国 Thermo 公司), 37°C 培养 2h 后, 吸弃上清, 用预热 RPMI1640 培养基洗二次, 留下贴壁细胞, 即为腹腔巨噬细胞, 纯度一般大于 90% 。

[0091] 5、细胞因子 ELISA 检测

[0092] 细胞因子检测采用 ELISA 试剂盒 (购自美国 R&D 公司), 具体方法如下:

[0093] a) 捕获抗体 1 : 180 用 PBS 稀释, 加入 ELISA 板 (Costar, 美国 Corning 公司) 中, $100 \mu\text{l}$ 每孔, 封板膜封板后, 4°C 包被过夜。

[0094] b) 第二天, 用洗涤液 (含 0.5% Tween-20 的 PBS) 洗涤 3 次后, 用含 1% BSA 的 PBS, $100 \mu\text{l}$ 每孔, 封板膜封板后, 室温封闭 1h。

[0095] c) 洗涤液洗涤 3 次, 加入用稀释液 (含 0.1% BSA 的 PBS) 稀释的标准准品或者待测样品, $100 \mu\text{l}$ 每孔, 封板膜封板后, 室温孵育 2h。

[0096] d) 洗涤液洗涤 3 次, 加入生物素标记的检测抗体 (稀释液 1 : 180 稀释), $100 \mu\text{l}$ 每孔, 封板膜封板后, 室温孵育 2h。

[0097] e) 洗涤液洗涤 3 次, 加入 HRP-链亲和素 (Streptavidin) (1 : 200 稀释), $100 \mu\text{l}$ 每孔, 封板膜封板后, 室温孵育 0.5h。

[0098] f) 洗涤 3 次, 加入 3,3',5,5' - 四甲基联苯胺显色底物, $100 \mu\text{l}$ 每孔, 显色 10 ~

20min, 加入终止液 (1M H_2SO_4), 100 μ l 每孔。

[0099] g) 酶标仪 (Novostar, 德国 BMG Labtech 公司) 检测 450nm 吸光度 (OD_{450})。

[0100] 6、体内对小鼠 S180 移植瘤模型的抗肿瘤作用评价

[0101] a) 复苏 S180 细胞 (购自中国科学院细胞库), RPMI 1640+10% FBS 培养传 2 代后, 收集细胞, 用 PBS 重悬至 $1-2 \times 10^6$ 个细胞 /0.2ml/ 鼠, i. p. 接种。

[0102] b) 观察到第一代的种鼠肚子较大后 (一般约 8-9 天左右), 可以传代。传代时取 1ml 注射器, 种鼠腹部消毒后直接将针头插入抽取腹水即可, 注意不要把针头插得很深, 尽量浅一点, 还可以把老鼠拎起来, 利用重力, 让腹水集中在某处便于抽取, 一般抽 0.5ml 就可以了, 然后放置于冰上, 不用离心, 直接用 PBS 稀释 3-6 倍后, 接种到新的老鼠腹腔, 腹水颜色为白色或者略有发黄都是正常的, 但是血性腹水说明不好, 需要注意调整。第二代以后, 在 6-7 天的时候传代, 不要等的时间太久, 否则腹水容易血性, 三代后可用于实验。

[0103] c) 第 0 天开始实验, 抽取的腹水需要量比较多, 一牺牲种鼠后, 小心地用消毒眼科剪刀镊子剖开腹部皮肤, 注意不要弄破肌肉, 然后, 用镊子拎起腹部的肌肉, 用剪刀剪开一个小口, 然后用玻璃滴管或者去掉针头的注射器吸取腹水。经过一定的稀释后 (一般为 1 : 1 ~ 1 : 4, 细胞浓度为 $1 \times 10^7 \sim 5 \times 10^7$ 个细胞 /ml 之间), 接种到小鼠的腋下。

[0104] d) 腋下接种 24h 后, 随机分组, 每组 12 只, 腹腔注射 (i. p.) 不同剂量的用生理盐水配制的 GFPBW1 溶液 (0.25mg/kg、15mg/kg、5mg/kg 体重), 同时设溶媒组以及阳性药 30mg/kg 环磷酰胺 (CTX, 购自美国 Sigma 公司) 组, 每天 1 次, 连续腹腔注射给药 10 天。

[0105] e) 第 11 天结束实验, 断颈牺牲小鼠, 剥去肿瘤, 称瘤重。

[0106] 实验例 2 β -葡聚糖 GFPBW1 靶向结合 Dectin-1 受体:

[0107] 采用实施例 1 制备的 β -葡聚糖 GFPBW1 预先孵育瞬时转染表达 Dectin-1 受体的 HEK293 细胞半小时或 1 小时后, 再加入 FITC-zymosan, 按照实验例 1 的荧光分光光度法和流式细胞术检测的细胞结合和内含 FITC-zymosan 的相对比例表明, 不同浓度的 GFPBW1 (20 μ g/ml、100 μ g/ml、500 μ g/ml) 能够剂量依赖地抑制 FITC-Zymosan 同 Dectin-1 受体的特异性结合, 并同对照昆布多糖 (Laminarin (Lam) 500 μ g/ml, 购自美国 Sigma 公司) 效果相当 (图 5A)。而流式检测内含的 FITC-zymosan 则表明, 500 μ g/ml GFPBW1 能够显著抑制 Dectin-1 介导的对 FITC-Zymosan 的特异性内含 (34.21% 对 17.51%), 且效果也同对照昆布多糖相当 (图 5B)。

[0108] 实验例 3 β -葡聚糖 GFPBW1 体外通过 Dectin-1 受体介导激活原代巨噬细胞的功能:

[0109] 将实施例 1 制备的 β -葡聚糖 GFPBW1 配置成不同浓度 (5 μ g/ml、50 μ g/ml、500 μ g/ml) 来处理上述实验例 1 中从 ICR 小鼠分离的腹腔巨噬细胞 4 小时后, 按照实验例 1 的 ELISA 检测的细胞因子的水平表明, GFPBW1 能够剂量依赖地诱导细胞因子 TNF α (图 6A) 和 IL-6 (图 6B) 的分泌, 并且用 Dectin-1 竞争性抑制剂昆布多糖 Lam 预处理 1 小时后, 这种作用显著受到抑制, 而进一步通过免疫印迹实验检测信号通路说明 GFPBW1 能够激活 Dectin-1/Syk/NF- κ B 信号通过, 并且该通路受 Dectin-1 抑制剂昆布多糖的阻断, 表明 GFPBW1 能够部分通过 Dectin-1 受体通过 Dectin-1/Syk/NF- κ B 介导激活原代巨噬细胞分泌细胞因子 (图 6C)。

[0110] 实验例 4 β -葡聚糖 GFPBW1 的体内免疫调节功能和抗肿瘤作用:

[0111] 采用实施例 1 制备的 β -葡聚糖 GFPBW1 每天 1 次腹腔注射给药 ICR 小鼠不同剂量 (0.2mg/kg、1mg/kg、5mg/kg) 连续 10 天后,取脾淋巴细胞,用 ConA (5 μ g/ml,购自美国 Sigma 公司) 诱导 36 小时后再使用 BrdU 细胞增殖检测试剂盒 (购自瑞士 Roche 公司) 利用检测增殖细胞掺入合成的 DNA 中 BrdU 的方法,最后加显色底物反应检测 450nm 吸光度表明,给 GFPBW1 组小鼠能够剂量依赖的促进 ConA 诱导的脾淋巴细胞的增殖 (图 7A),说明 GFPBW1 在体内具有免疫激活作用。而进一步通过抑制 S-180 移植瘤生长的实验则表明,GFPBW1 按照上述不同剂量连续给药 10 天后,GFPBW1 能够剂量依赖地抑制 S-180 肉瘤在 ICR 小鼠皮下的生长 (图 7B),但对免疫缺陷的 BALB/c nu/nu 裸鼠 (购自上海斯莱克实验动物中心) 移植 S-180 的生长没有影响 (图 7C),这进一步说明 GFPBW1 是通过激活免疫系统来实现抗肿瘤作用的。

[0001]

序列表

<110> 中科院上海药物研究所

<120> β -葡聚糖GFPBW1及其制备方法和用途

<130> DI11-1984E-XC68

<160> 2

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 37

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 正义链引物

<400> 1

ggggaattcg ccaccatgaa atatcactct catatag

37

<210> 2

<211> 36

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反义链引物

<400> 2

aattctagac tcagttcctt ctcacagata ctgtat

36

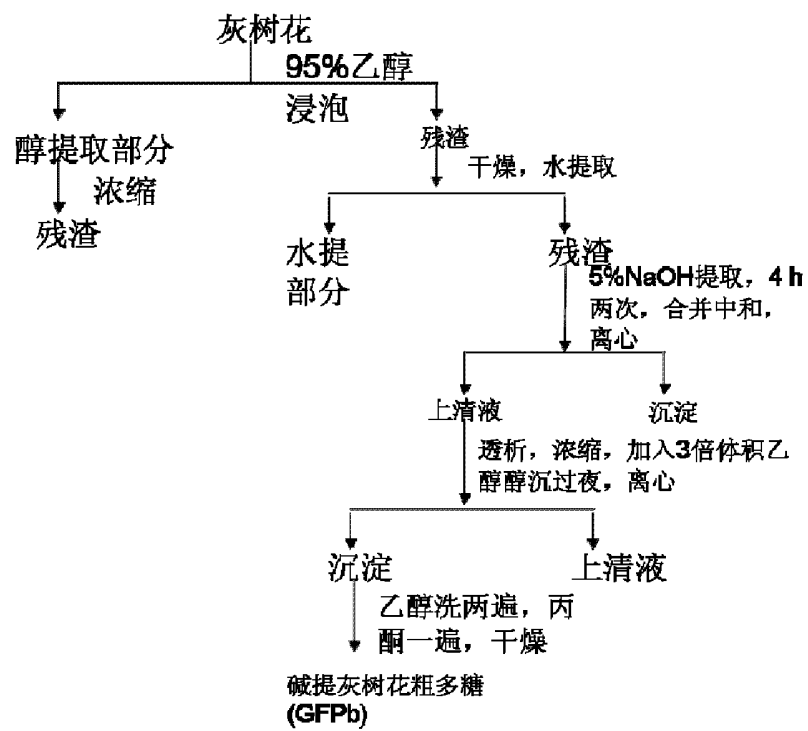


图 1

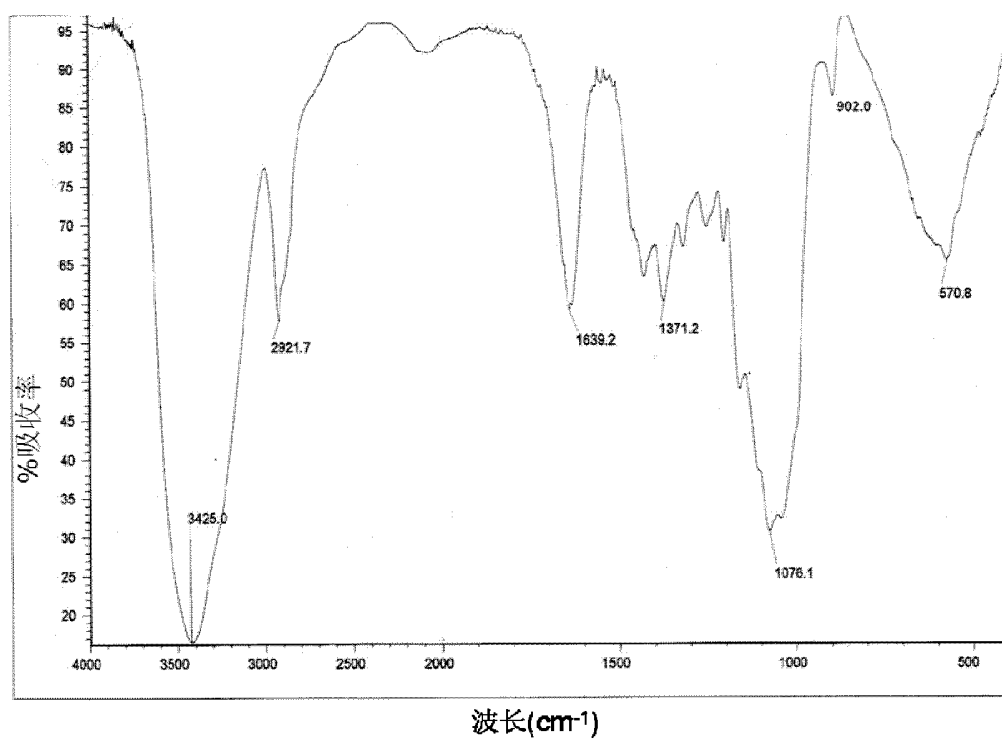


图 2

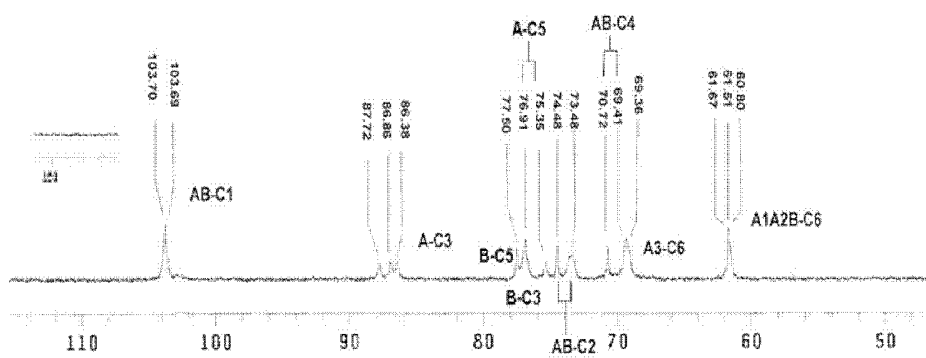


图 3

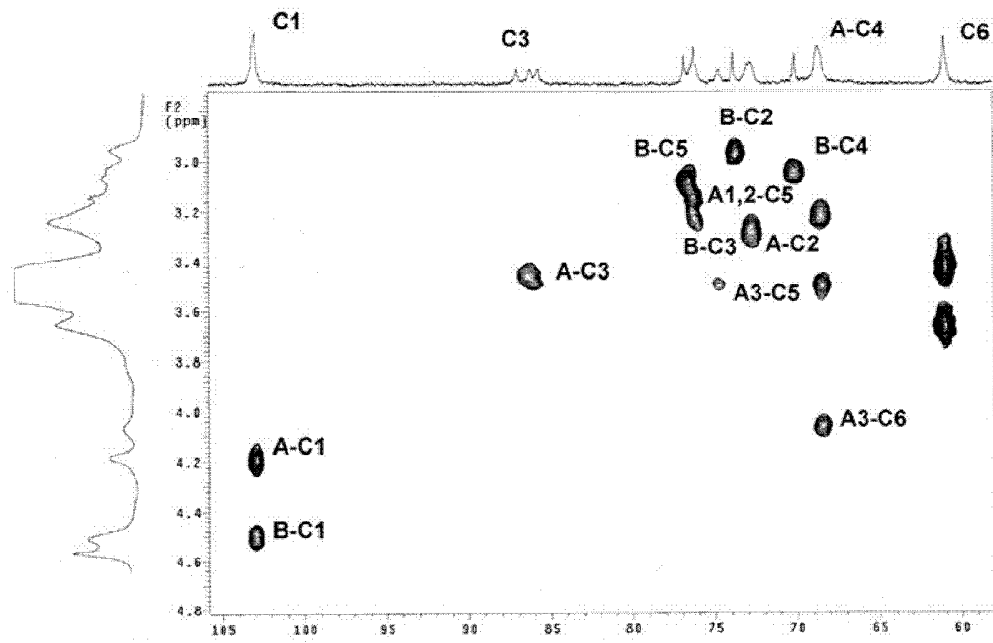


图 4

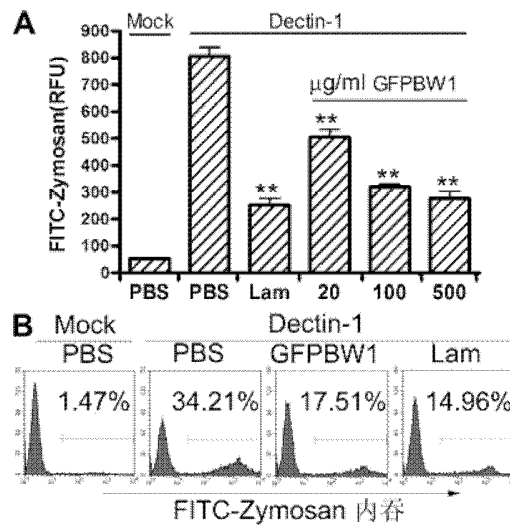


图 5

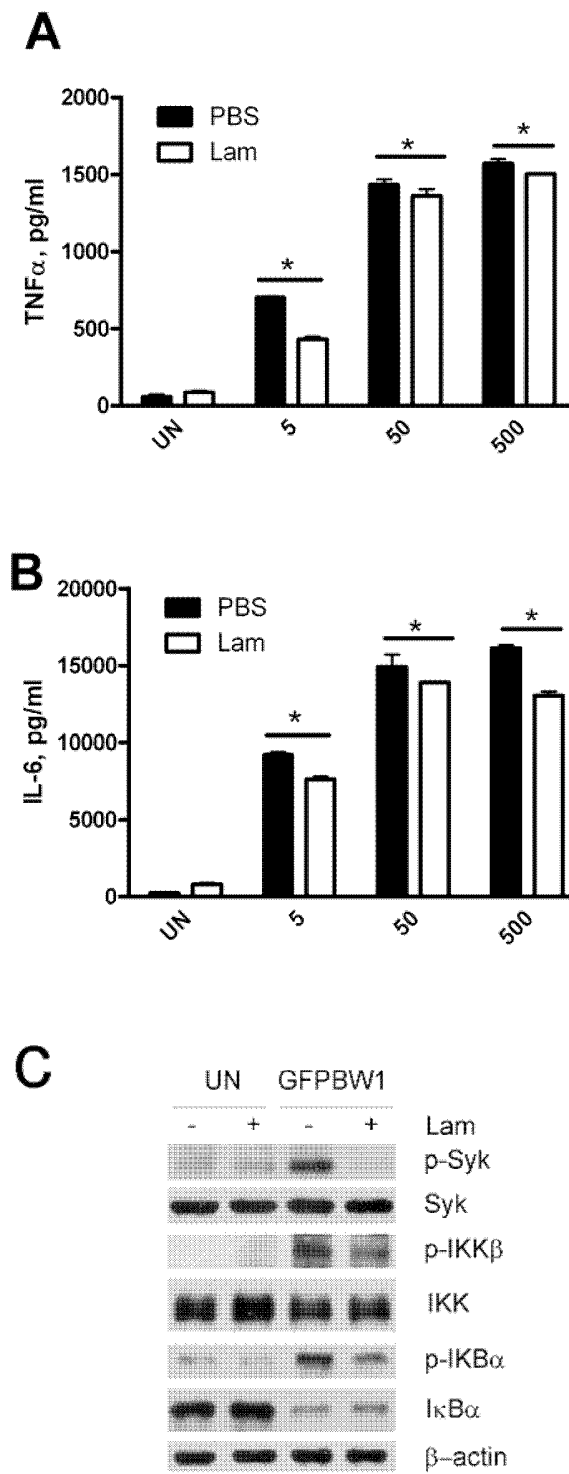


图 6

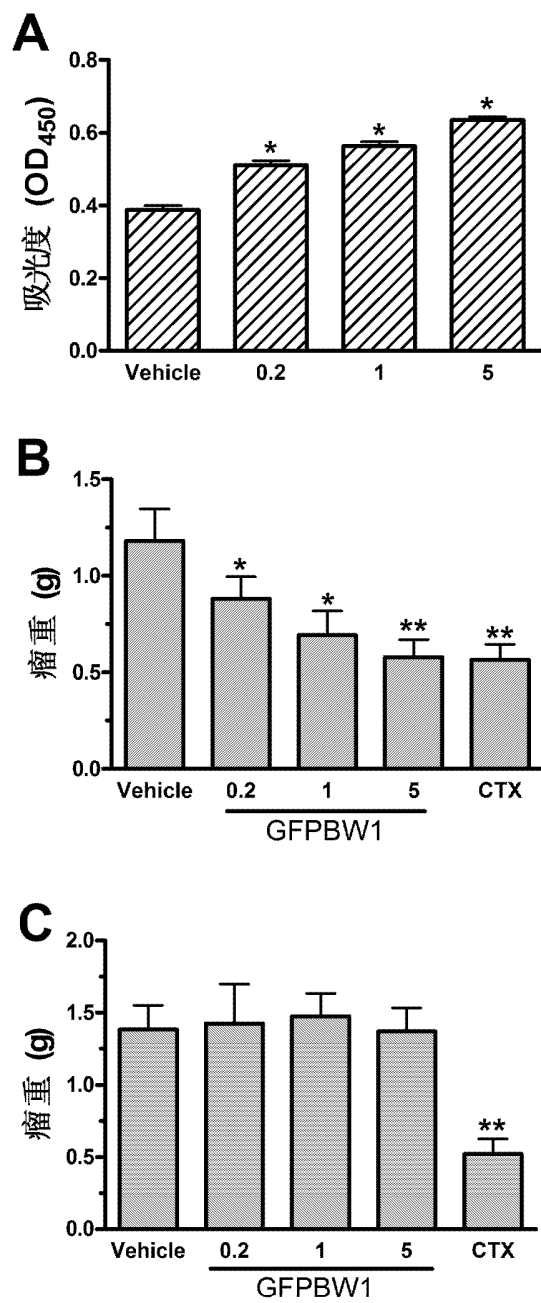


图 7