



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1973902 B

(45) 授权公告日 2010. 11. 10

(21) 申请号 200610163225. 4
 (22) 申请日 2006. 12. 12
 (73) 专利权人 东北师范大学
 地址 130024 吉林省长春市人民大街 5268 号
 (72) 发明人 周义发 台桂花 赵雪淞 刘杨 毕宏涛
 (74) 专利代理机构 长春市东师专利事务所 22202
 代理人 刘延军 李荣武

(51) Int. Cl.
 A61K 47/48 (2006. 01)
 A61K 47/36 (2006. 01)
 A61K 31/704 (2006. 01)
 A61P 35/00 (2006. 01)

(56) 对比文件
 CN 1310631 A, 2001. 08. 29, 权利要求 1 — 3, 9, 10, 16, 17、摘要。
 CN 1515265 A, 2004. 07. 28, 说明书第 1 页第

13 — 16 行、摘要。
 CN 1596129 A, 2005. 03. 16, 权利要求 1 — 40、摘要。
 CN 1503679 A, 2004. 06. 09, 说明书第 2 页第 23 行至第 4 页第 14 行、摘要。
 CN 1332640 A, 2002. 01. 23, 权利要求 1 — 3, 33, 34、摘要。
 CN 1227500 A, 1999. 09. 01, 权利要求 1 — 10、摘要。
 CN 1150761 A, 1997. 05. 28, 权利要求 31, 35、摘要。
 CN 1613452 A, 2005. 05. 11, 权利要求 1 — 9、摘要。
 US 5688931 A, 1997. 11. 18, 摘要。
 US 5037883 A, 1991. 08. 06, 说明书第 1 栏第 51 行至第 4 栏第 3 行、摘要。

审查员 何瑜

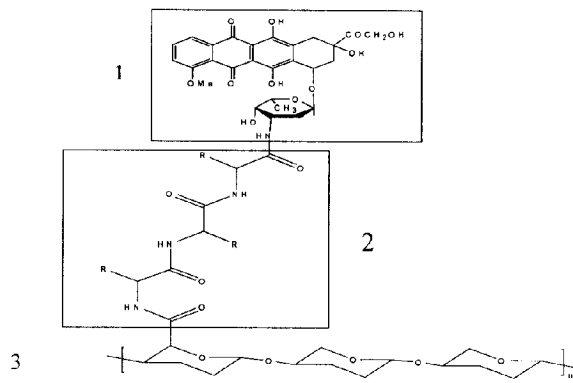
权利要求书 2 页 说明书 6 页 附图 2 页

(54) 发明名称

以人参多糖为载体的抗肿瘤药物阿霉素复合物及制备方法

(57) 摘要

以人参多糖为载体的抗肿瘤药物阿霉素复合物及制备方法, 本发明属于制药技术领域, 具体涉及制备抗肿瘤药物阿霉素复合物及制备方法。本发明采用人参多糖作为化疗药物阿霉素的定向和缓释载体, 利用由三到四个氨基酸组成的肽链作为抗癌药物阿霉素和人参多糖分子之间的连接体, 人参多糖分子中糖醛酸的羧基和肽链的末端氨基形成肽键, 肽链另一端羧基与阿霉素中的氨基形成酰胺键, 药物复合物到达病变部位后, 体内的蛋白酶将肽链水解, 释放出抗癌药物阿霉素和人参多糖, 肽链被降解成无毒的氨基酸, 从而使阿霉素更为集中地作用于病灶组织, 杀死癌细胞, 同时改善机体免疫功能。增强抗肿瘤活性, 无毒、副作用。



1. 以人参多糖为载体的抗肿瘤药物阿霉素复合物,其特征是以人参多糖作为阿霉素的载体,以小肽为中间连接体与阿霉素复合而成,由二到四个氨基酸组成的肽链作为抗癌药物阿霉素和人参多糖分子之间的连接体,人参多糖分子中糖醛酸的羧基和肽链的末端氨基形成肽键,肽链另一端羧基与阿霉素中的氨基形成酰胺键。

2. 以人参多糖为载体的抗肿瘤药物阿霉素复合物的制备方法,其特征是具体步骤如下:

(1) 小肽与阿霉素连接形成组合物

把小肽溶于羟基琥珀酰亚胺的二甲基甲酰胺溶液,冷却,加入二环己基碳二亚胺缩合剂后低温搅拌 1-4 小时,然后加入阿霉素混合搅拌 8-12 小时,反应完成后硅胶柱分离纯化,将纯化后产物投入乙酸中室温搅拌 1 小时,加水静置沉淀,将沉淀过滤去除,溶液进行冻干,冻干产物过阴离子交换树脂柱得产物;

(2) 人参多糖与上述组合物连接形成复合物

把人参多糖加入二甲基甲酰胺水溶液中,然后加入上述组合物,再加入 2-乙氧基-1-乙氧羰基-1,2-二氢喹啉混合搅拌 1-4 小时,得到终产物。

3. 按权利要求 2 所述的以人参多糖为载体的抗肿瘤药物阿霉素复合物的制备方法,其特征是所述的小肽为 3'-N-Gly-Gly-Phe-Gly,具体步骤如下:

(1) 3'-N-Gly-Gly-Phe-Gly-DXR · HCl 的制备

N^α-Trt-Gly-Gly-Phe-Gly 475mg,溶于含有羟基琥珀酰亚胺 115mg 的二甲基甲酰胺溶液 4ml,冷却至 4℃,加入二环己基碳二亚胺 206mg 后,混合液在 4℃ 条件下搅拌 2 小时,然后加入含有 DXR 446mg 的二甲基甲酰胺溶液 3ml,4℃ 搅拌 10 小时,加入 30mlH₂O,用 Cl₃CH 抽提,有机层用硫酸钠干燥,上硅胶柱进行浓缩纯化,得到 766mg 产物,将 750mg 产物投入 3ml75%乙酸中室温搅拌 1 小时,加 50ml 水,静置沉淀,将沉淀过滤去除,溶液进行冻干,将冻干产物溶于水,过阴离子交换树脂柱,柱后溶液冻干,得产物 462mg;

(2) Ginseng polysaccharide-3'-N-Gly-Gly-Phe-Gly-DXR 的制备

人参多糖 1000mg,加入二甲基甲酰胺与水 1:1 混合形成的溶液 30ml 中溶解,将 3'-N-Gly-Gly-Phe-Gly-DXR · HCl 220mg 溶于二甲基甲酰胺与水 1:1 混合形成的溶液,向人参多糖溶液中加入 3'-N-Gly-Gly-Phe-Gly-DXR · HCl 溶液 6ml,再加入 2-乙氧基-1-乙氧羰基-1,2-二氢喹啉 1000mg,室温搅拌 2 小时,然后用纯水透析膜透析,外水温度保持在 4℃,透析 2 天,透析内液冻干,得产物 1085mg;

其中 DXR 是指阿霉素,Ginseng polysaccharide 是指人参多糖。

4. 按权利要求 2 所述的以人参多糖为载体的抗肿瘤药物阿霉素复合物的制备方法,其特征是所述的小肽为 3'-N-Gly-Phe-Gly-Gly,具体步骤如下:

(1) 3'-N-Gly-Phe-Gly-Gly-DXR · HCl 的制备

将 N^α-Trt-Gly-Phe-Gly-Gly 579mg 溶于含有羟基琥珀酰亚胺 127mg 的二甲基甲酰胺溶液 4ml,冷却至 4℃,加入二环己基碳二亚胺 226mg 后,混合液在 4℃ 条件下搅拌 2 小时,然后加入含有 DXR 544mg 的二甲基甲酰胺溶液 3ml,4℃ 搅拌 10 小时,加入 30mlH₂O,用 Cl₃CH 抽提,有机层用硫酸钠干燥,上硅胶柱进行浓缩纯化,得到 670mg 产物,将 595mg 产物投入 3ml75%乙酸中室温搅拌 1 小时,加 50ml 水,静置沉淀,将沉淀过滤去除,溶液进行冻干,将冻干产物溶于水,过阴离子交换树脂柱,柱后溶液冻干,得产物 316mg;

(2) Ginseng polysaccharide-3' -N-Gly-Phe-Gly-Gly-DXR 的制备

人参多糖 1000mg, 加入二甲基甲酰胺与水 1 : 1 混合形成的溶液 30ml 中溶解, 将 3' -N-Gly-Phe-Gly-Gly-DXR · HCl 220mg 溶于二甲基甲酰胺与水 1 : 1 混合形成的溶液, 向人参多糖溶液中加入 3' -N-Gly-Phe-Gly-Gly-DXR · HCl 溶液 10ml, 再加入 2-乙氧基-1-乙氧羰基-1,2-二氢喹啉 1000mg, 室温搅拌 2 小时, 然后用纯水透析膜透析, 外水温度保持在 4℃, 透析 2 天, 透析内液冻干, 得产物 1070mg ;

其中 DXR 是指阿霉素, Ginseng polysaccharide 是指人参多糖。

5. 按权利要求 2 所述的以人参多糖为载体的抗肿瘤药物阿霉素复合物的制备方法, 其特征是所述的小肽为 3' -N-Gly-Phe, 具体步骤如下 :

(1) 3' -N-Gly-Phe-DXR · HCl 的制备

将 N^α-Trt-Gly-Phe 140mg 溶于含有羟基琥珀酰亚胺 38mg 的二甲基甲酰胺溶液 4ml, 冷却至 4℃, 加入二环己基碳二亚胺 68mg 后, 混合液在 4℃ 条件下搅拌 2 小时, 然后加入含有 DXR159mg 的二甲基甲酰胺溶液 3ml, 4℃ 搅拌 10 小时, 加入 30ml H₂O, 用 Cl₃CH 抽提, 有机层用硫酸钠干燥, 上硅胶柱进行浓缩纯化, 得到 174mg 产物, 将 150mg 产物投入 3ml 75% 乙酸中室温搅拌 1 小时, 加 50ml 水, 静置沉淀, 将沉淀过滤去除, 溶液进行冻干, 将冻干产物溶于水, 过阴离子交换树脂柱, 柱后溶液冻干, 得产物 55mg ;

(2) Ginseng polysaccharide-3' -N-Gly-Phe-DXR 的制备

人参多糖 250mg, 加入二甲基甲酰胺与水 1 : 1 混合形成的溶液 7.5ml 中溶解, 将 3' -N-Gly-Phe-DXR · HCl 45mg 溶于二甲基甲酰胺与水 1 : 1 混合形成的溶液, 向人参多糖溶液中加入 3' -N-Gly-Phe-DXR · HCl 溶液 2.5ml, 再加入 2-乙氧基-1-乙氧羰基-1,2-二氢喹啉 250mg, 室温搅拌 2 小时, 然后用纯水透析膜透析, 外水温度保持在 4℃, 透析 2 天, 透析内液冻干, 得产物 223mg ;

其中 DXR 是指阿霉素, Ginseng polysaccharide 是指人参多糖。

以人参多糖为载体的抗肿瘤药物阿霉素复合物及制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于制药技术领域,涉及以人参多糖作为抗肿瘤药物阿霉素的载体,制备抗肿瘤药物阿霉素复合物。具体涉及以人参多糖通过小肽连接阿霉素,以小肽作为连接体形成药物复合物,达到提高阿霉素抗肿瘤疗效的目的。

[0002] 背景技术

[0003] 目前药物治疗是癌症患者的主要治疗方法之一。临床上所用的抗肿瘤药物一般为小分子药物,其特点是选择性不高,除了杀死癌细胞外,对正常的细胞也有较大的杀伤作用。临床病人通过化学疗法治疗后,虽然局部病灶得到明显缓解,但机体的免疫功能亦遭到严重破坏,严重低下的免疫功能无以遏止残余的瘤灶,使残余的瘤灶迅速发展。据国外 500 例病人尸检资料显示,有 22% 的死因直接归于恶病质,而不是癌症本身,是癌症的复发、低下的免疫功能和严重的衰竭的机体功能使得病人很快走向衰竭和死亡。在癌症的治疗中放、化疗是目前的主要手段,但在没有更好的取代化疗的手段之前,提高放化疗药物的定向性和缓释性是目前国内外医药界关注的重点。

[0004] 用具有生物相容性和生物可降解性的高分子材料作为载体的抗肿瘤药物可在病灶部位选择性地释放药物,能极大地提高药物的生物利用率,有效地降低药物的毒副作用和用药剂量,是目前药物研发领域的热点之一。利用生物医用高分子作为载体,化学结合或物理包裹抗肿瘤药物,并通过药物扩散、药物结合链断裂或聚合物降解,药物以一定速率缓慢释放,因此可以减少给药次数,提高药物的生物利用度,从而降低药物对全身的毒副作用,用于抗肿瘤药物载体的聚合物有天然高分子材料和合成高分子材料。

[0005] 当前运用抗癌药物载体所遇到的问题是载体本身的定向性、稳定性和毒性,其次是药物与载体的连接方式是否能使药物再到达病变部位才能有效的释放出来。

[0006] 某些植物多糖在治疗癌症中对特定癌细胞的定向性,以及免疫促进性已得到大量的药理和临床研究验证。目前在临床实际治疗上已有小分子抗癌药物和一些植物多糖免疫促进剂复合使用,以便恢复和提高由于化疗作用而降低的肌体免疫机能。

[0007] 目前,国外已有相关的专利和论文发表,如日本东京药物载体系统研究院 1997 年专利(专利号 5688931),采用葡聚糖和甘露聚糖作为定向和缓释载体,2003 年美国德克萨斯技术大学健康科学中心用普鲁士兰多糖、葡聚糖、甘露聚糖等作为定向与缓释载体,国内也有用壳聚糖作为定向和缓释载体,这些多糖本身并不是免疫促进剂,定向性也不太令人满意,只有缓释作用。而且国内外研究多糖作为药物载体,多数利用多糖中的羟基作为连接基团,在连接上一个带有羧基的连接体(如乙酸基),通过引入的连接体将多糖与抗癌药物连接起来,这些引入的连接体可能有毒性,在体内被酶水解的速度较难控制。

发明内容

[0008] 本发明的目的是把抗肿瘤药物阿霉素负载在人参多糖上,利用人参多糖对某些癌细胞(肉瘤、淋巴癌等)的亲合性达到定向的作用;利用连接体肽链的长短控制释放速度,达到缓释的作用;利用人参多糖免疫促调节作用,增强免疫力提高治疗的效果。本发明提供

了一种新颖的抗肿瘤药物载体,即使用人参多糖制备抗肿瘤药物阿霉素复合物。

[0009] 我们采用人参多糖作为化疗药物阿霉素的定向和缓释载体。利用我们自主设计和合成的由三到四个氨基酸组成的肽链作为抗癌药物阿霉素和人参多糖分子之间的连接体,人参多糖分子中糖醛酸的羧基和肽链的末端氨基形成肽键,肽链另一端羧基与阿霉素中的氨基形成酰胺键,药物复合体到达病变部位后,体内的蛋白酶将肽链水解,释放出抗癌药物阿霉素和人参多糖,肽链被降解成无毒的氨基酸,从而使阿霉素更为集中地作用于病灶组织,杀死癌细胞,同时人参多糖作为免疫促进剂抑制肿瘤生长、激活免疫细胞、改善机体免疫功能。以人参多糖为载体负载抗肿瘤药物阿霉素形成的复合物结构见附图 1。

[0010] 一、以人参多糖为载体负载抗肿瘤药物阿霉素的制备方法

[0011] 1. 小肽与阿霉素连接形成组合物

[0012] 把小肽溶于羟基琥珀酰亚胺的二甲基甲酰胺等溶液,冷却,加入 DCC(二环己基碳二亚胺)等缩合剂后低温搅拌 1-4 小时,然后加入 DXR(阿霉素)混合搅拌 8-12 小时。反应完成后硅胶柱分离纯化。将纯化后产物投入乙酸中室温搅拌 1 小时左右,加水静置沉淀,将沉淀过滤去除,溶液进行冻干。冻干产物过阴离子交换树脂柱得产物。

[0013] 2. 人参多糖与上述组合物连接形成复合物

[0014] 把人参多糖加入二甲基甲酰胺水溶液中,然后加入上述组合物,再加入 EEDQ(2-乙氧基-1-乙氧碳酰基-1,2-二氢喹啉)混合搅拌 1-4 小时,得到终产物。

附图说明

[0015] 图 1 为阿霉素连接在人参多糖分子上形成的复合物

[0016] 其中:1 = 阿霉素、2 = 小肽链、3 = 人参多糖部分片断;

[0017] 图 2:人参多糖作为载体与阿霉素形成的复合物 1 与阿霉素的抑瘤效果比较

[0018] 其中:纵坐标表示:瘤重占长瘤大鼠体重的百分率(%)

[0019] 横坐标表示:药物剂量(ug/kg)

[0020] 空白柱表示:阿霉素

[0021] 斜线柱表示:阿霉素-人参多糖复合物 1。

[0022] 图 3 为人参多糖作为载体与阿霉素形成的复合物 2 与阿霉素的抑瘤效果比较

[0023] 其中:纵坐标表示:瘤重占长瘤大鼠体重的百分率(%)

[0024] 横坐标表示:药物剂量(ug/kg)

[0025] 空白柱表示:阿霉素

[0026] 斜线柱表示:阿霉素-人参多糖复合物 2。

[0027] 图 4 为人参多糖作为载体与阿霉素形成的复合物 3 与阿霉素的抑瘤效果比较

[0028] 其中:纵坐标表示:瘤重占长瘤大鼠体重的百分率(%)

[0029] 横坐标表示:药物剂量(ug/kg)

[0030] 空白柱表示:阿霉素

[0031] 斜线柱表示:阿霉素-人参多糖复合物 3。

[0032] 图 5 为人参多糖作为载体与阿霉素形成的复合物与阿霉素的毒副作用比较

[0033] 其中:纵坐标表示:大鼠的体重占最初体重的百分比(%)

[0034] 横坐标表示:给药后的天数

- [0035] 实心菱形线表示:正常对照
[0036] 空心圆形线表示:阿霉素-人参多糖复合物 2
[0037] 实心三角形线表示:阿霉素-人参多糖复合物 1
[0038] 空心三角形线表示:阿霉素-人参多糖复合物 3
[0039] 实心圆形线表示:阿霉素

具体实施方式

[0040] 下面通过实施例对本发明做进一步说明,以下叙述中 DXR 是指阿霉素。

[0041] 实施例 1

[0042] 步骤 1:3'-N-(Gly-Gly-Phe-Gly)-DXR·HCl 的制备

[0043] N^α-Trt-Gly-Gly-Phe-Gly(475mg,0.82mmol)溶于羟基琥珀酰亚胺(115mg,1.0mmol)的二甲基甲酰胺溶液(4ml),冷却至 4℃,加入 DCC(二环己基碳二亚胺)(206mg,1.0mmol)后,混合液在 4℃条件下搅拌 2 小时,然后加入 DXR(446mg,0.82mmol)的二甲基甲酰胺溶液(3ml),4℃搅拌 10 小时。加入 30mlH₂O,用 Cl₃CH 抽提,有机层用硫酸钠干燥,上硅胶柱进行浓缩纯化,得到 766mg 产物。将 750mg 产物投入 3ml75%乙酸中室温搅拌 1 小时,加 50ml 水,静置沉淀,将沉淀过滤去除,溶液进行冻干。将冻干产物溶于水,过阴离子交换树脂柱,柱后溶液冻干,得产物 462mg。

[0044] 步骤 2:Ginseng polysaccharide-3'-N-(Gly-Gly-Phe-Gly)-DXR 的制备

[0045] 人参多糖(1000mg),加入二甲基甲酰胺与水 1:1 混合形成的溶液(30ml)中溶解。将 3'-N-(Gly-Gly-Phe-Gly)-DXR·HCl(220mg)溶于二甲基甲酰胺与水 1:1 混合形成的溶液。向人参多糖溶液中加入 3'-N-(Gly-Gly-Phe-Gly)-DXR·HCl 溶液(6ml),再加入 EEDQ(2-乙氧基-1-乙氧碳酰基-1,2-二氢喹啉)(1000mg),室温搅拌 2 小时,然后用纯水透析膜透析,外水温度保持在 4℃,透析 2 天。透析内液冻干,得产物(1085mg)。

[0046] 实施例 2

[0047] 步骤 1:3'-N-(Gly-Phe-Gly-Gly)-DXR·HCl 的制备

[0048] 与实施例 1 相同的方法,将 N^α-Trt-Gly-Phe-Gly-Gly(579mg,1.0mmol)溶于羟基琥珀酰亚胺(127mg,1.1mmol)的二甲基甲酰胺溶液(4ml),冷却至 4℃,加入 DCC(二环己基碳二亚胺)(226mg,1.1mmol)后,混合液在 4℃条件下搅拌 2 小时,然后加入 DXR(544mg,1.0mmol)的二甲基甲酰胺溶液(3ml),4℃搅拌 10 小时。加入 30mlH₂O,用 Cl₃CH 抽提,有机层用硫酸钠干燥,上硅胶柱进行浓缩纯化,得到 670mg 产物。将 595mg 产物投入 3ml75%乙酸中室温搅拌 1 小时,加 50ml 水,静置沉淀,将沉淀过滤去除,溶液进行冻干。将冻干产物溶于水,过阴离子交换树脂柱,柱后溶液冻干,得产物 316mg。

[0049] 步骤 2:Ginseng polysaccharide-3'-N-(Gly-Phe-Gly-Gly)-DXR 的制备

[0050] 与实施例 1 相同的方法,人参多糖(1000mg),加入二甲基甲酰胺与水 1:1 混合形成的溶液(30ml)中溶解。将 3'-N-(Gly-Phe-Gly-Gly)-DXR·HCl(220mg)溶于二甲基甲酰胺与水 1:1 混合形成的溶液。向人参多糖溶液中加入 3'-N-(Gly-Phe-Gly-Gly)-DXR·HCl 溶液(10ml),再加入 EEDQ(2-乙氧基-1-乙氧碳酰基-1,2-二氢喹啉)(1000mg),室温搅拌 2 小时,然后用纯水透析膜透析,外水温度保持在 4℃,透析 2 天。透析内液冻干,得产物(1070mg)。

[0051] 实施例 3

[0052] 步骤 1 :3' -N-(Gly-Phe)-DXR • HCl 的制备

[0053] 与实施例 1 相同的方法,将 N^α-Trt-Gly-Phe(140mg,0.3mmol)溶于羟基琥珀酰亚胺(38mg,0.33mmol)的二甲基甲酰胺溶液(4ml),冷却至 4℃,加入 DCC(二环己基碳二亚胺)(68mg,0.33mmol)后,混合液在 4℃条件下搅拌 2 小时,然后加入 DXR(159mg,0.30mmol)的二甲基甲酰胺溶液(3ml),4℃搅拌 10 小时。加入 30mlH₂O,用 Cl₃CH 抽提,有机层用硫酸钠干燥,上硅胶柱进行浓缩纯化,得到 174mg 产物。将 150mg 产物投入 3ml75%乙酸中室温搅拌 1 小时,加 50ml 水,静置沉淀,将沉淀过滤去除,溶液进行冻干。将冻干产物溶于水,过阴离子交换树脂柱,柱后溶液冻干,得产物 55mg。

[0054] 步骤 2 :Ginseng polysaccharide-3' -N-(Gly-Phe)-DXR 的制备

[0055] 与实施例 1 相同的方法,人参多糖(250mg),加入二甲基甲酰胺与水 1 : 1 混合形成的溶液(7.5ml)中溶解。将 3' -N-(Gly-Phe)-DXR • HCl(45mg)溶于二甲基甲酰胺与水 1 : 1 混合形成的溶液。向人参多糖溶液中加入 3' -N-(Gly-Phe)-DXR • HCl 溶液(2.5ml),再加入 EEDQ(2-乙氧基-1-乙氧碳酰基-1,2-二氢喹啉)(250mg),室温搅拌 2 小时,然后用纯水透析膜透析,外水温度保持在 4℃,透析 2 天。透析内液冻干,得产物(223mg)。

[0056] 实验例 1

[0057] 体内抗肿瘤实验

[0058] 小鼠肉瘤 S-180(1×10⁷)细胞液 0.2ml/只腹腔注射进雌性大白鼠(6周,110±10g)体内。3 天后,随机分组,10 只大鼠一组。将实施例 1、2、3 得到的复合物和盐酸阿霉素分别溶于生理盐水中,尾静脉注射给药。复合物的剂量分别为 50、120、320 和 800ug/kg,这个剂量与阿霉素的剂量相等。

[0059] 7 天后,大鼠脱颈处死。解剖小鼠,取实体瘤称重。给药组与对照组比较,得到抑瘤率,从而判断抗肿瘤活性。剂量与抑瘤率的关系见附图 2、3、4。本发明得到的复合物与阿霉素相比,增强了抗肿瘤活性。

[0060] 实验例 2

[0061] 体外抗肿瘤实验

[0062] 1. 实验材料

[0063] 主要试剂和仪器

[0064] 酶标仪(Bio-Rad microplate reader Model 550, USA),二氧化碳气体培养箱(SANYOCO₂ incubator MCO-15AC, Japan),含 10%胎牛血清 RPMI 1640(GIBCO, USA),四甲基偶氮唑盐(MTT, Sigma, USA)。

[0065] 测试用肿瘤细胞株

[0066] 人宫颈癌细胞株 HeLa,来自东北师范大学遗传与细胞研究所,培养于含 10%胎牛血清 RPMI 1640(GIBCO, USA)培养液(含 0.1%青霉素、链霉素)中,培养条件为 37℃、5% CO₂,每 3~5d 传代 1 次。

[0067] 测试样品

[0068] 实施例 1 所得到的复合物 1、2、3,纯度 90%以上。同时,选取盐酸阿霉素为阳性对照药物,各化合物均以 DMSO 溶解后稀释。

[0069] 2. 实验方法

[0070] 采用 MTT 法测定各受试化合物对肿瘤细胞株的半数抑制率 IC_{50} 值。取对数生长期人宫颈癌 HeLa 细胞株,用含 10%胎牛血清 RPMI 1640 (GIBCO, USA) 培养基调整细胞浓度为 5×10^4 个 /ml, 加到 96 孔培养板中, 每孔 $100 \mu l$, 置 $37^\circ C$ 、5% CO_2 培养箱中培养。实验组分别正常对照组、阳性对照组、未加酶和加酶组。24h 后, 未加酶组各加入 100、150、200、400 $\mu g/ml$ 的化合物 1、2 和 3 各 $100 \mu l$ (10%胎牛血清 RPMI1640 培养基溶解, DMSO 助溶, 并用 $0.22 \mu m$ 的微孔滤膜过滤除菌), 使其终浓度分别为 50、100、150、200 $\mu g/ml$; 加酶组除加入上述浓度的药物外同时还加入了内切蛋白酶 (酶终浓度为 $0.25u/ml$), 正常对照组加入 $100 \mu l$ 培养基 (含有相同浓度的 DMSO), 阳性对照加入 200 $\mu g/ml$ 阿霉素 $100 \mu l$ (阿霉素终浓度 $100 \mu g/ml$), 每个剂量设 3 个平行孔, 置 $37^\circ C$ 、5% CO_2 培养箱中继续培养 48h。培养结束前 4h, 每孔加入 $5mg/ml$ MTT 试液 $20 \mu l$, 培养 4h 后吸弃上清, 每孔加 DMSO $100 \mu l$, 用微量振荡器振荡 10min, 用酶标仪测定各孔吸光度, 检测波长 570nm, 参比波长 490nm。

[0071] 3. 试验结果

[0072] 根据 MTT 法测试结果, 计算人参多糖 - 阿霉素复合物 1、2、3 对 HeLa 细胞的 IC_{50} 值。结果表明, 不加蛋白酶组抑瘤作用很低 (抑制率太低, 无法计算 IC_{50} 值), 而加酶组对 HeLa 细胞的 IC_{50} 值与阿霉素相当 (见表 1), 说明本发明的化合物有很好的抗肿瘤活性, 可以作为抗癌药物活性成分。

[0073] 表 1. 人参多糖 - 阿霉素复合物体外抗肿瘤活性测试结果

[0074]

化合物	化合物对 HeLa 细胞的 IC_{50} 值 ($\mu g/ml$)
阿霉素 人参多糖 - 阿霉素复合物 1 (加酶组)	10.03 9.23
人参多糖 - 阿霉素复合物 2 (加酶组) 人参多糖 - 阿霉素复合物 3 (加酶组)	9.54 9.32

[0075] 实验例 3

[0076] 毒性及副作用实验

[0077] 雌性大白鼠每组 5 只 (6 周, $110 \pm 10g$)。盐酸阿霉素和人参多糖 - 阿霉素复合物 1、2、3 分别用生理盐水溶解, 尾静脉注射给药, 给药剂量为 $10mg/kg$ 。给药后每天观察大鼠体重的变化, 同时记录大鼠的存活时间, 连续观察 7 周。大鼠体重的变化以占最初体重的百分比表示 (结果见图 5)。实验结果表明, 在给药后前 10 天, 盐酸阿霉素和人参多糖 - 阿霉素复合物 1、2、3 均引起了大鼠体重下降, 但是人参多糖 - 阿霉素复合物组比阿霉素组体重下降小; 10 天后, 人参多糖 - 阿霉素复合物组大鼠的体重开始迅速增加并且超过了最初体重, 但是阿霉素组大鼠的体重一直没有超过最初体重, 并且有二只大鼠死亡。这些结果表明: 人参多糖 - 阿霉素复合物的毒性和副作用明显低于阿霉素。

[0078] 人参多糖 - 阿霉素复合物急性毒性测试结果

[0079]

化合物	化合物对小鼠的 LD_{50} 值 (mg/kg)
阿霉素 人参多糖 - 阿霉素复合物 1 人参多糖 - 阿霉素复合物 2 人参多糖 - 阿霉素复合物 3	89.56 156.32 178.21 165.54

[0080] 由以上实验可知,以人参多糖作为载体,小肽链作为人参多糖与抗癌药物阿霉素的连接体制备的人参多糖-阿霉素复合物克服了目前研究中所遇到的问题,增强了抗肿瘤活性,降低了阿霉素的毒副作用。载体本身就是抗癌的免疫促进剂,具有生物相溶和生物可降解性,无毒无副作用。作为连接体的小肽链能被体内蛋白水解酶水解,通过不同的氨基酸种类和不同的肽链长度能调节药物释放的速度以满足需要,水解后的产物为氨基酸,被体内吸收,无任何副作用。

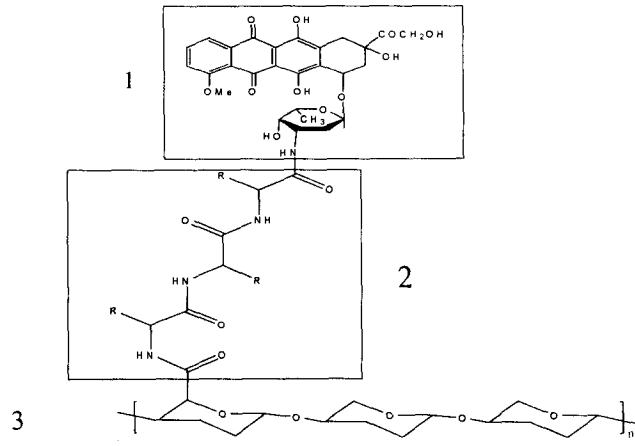


图 1.

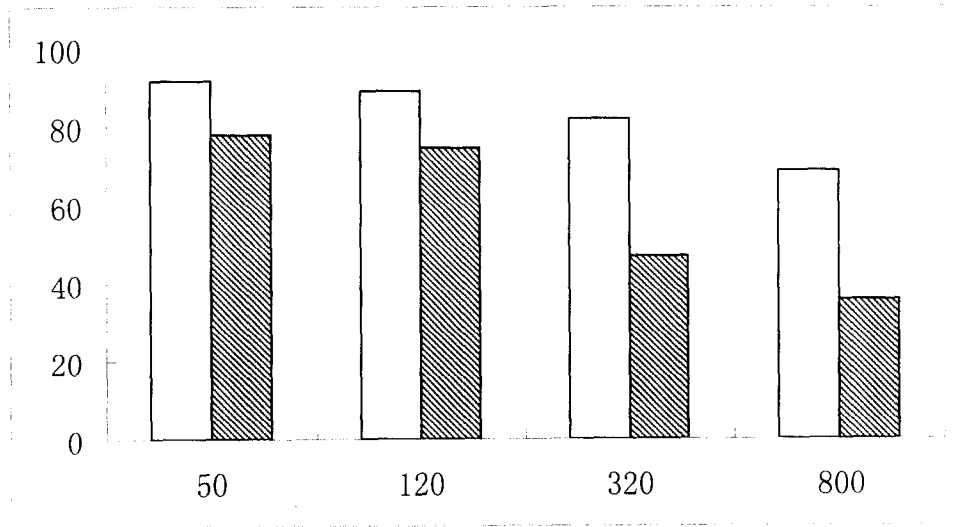


图 2.

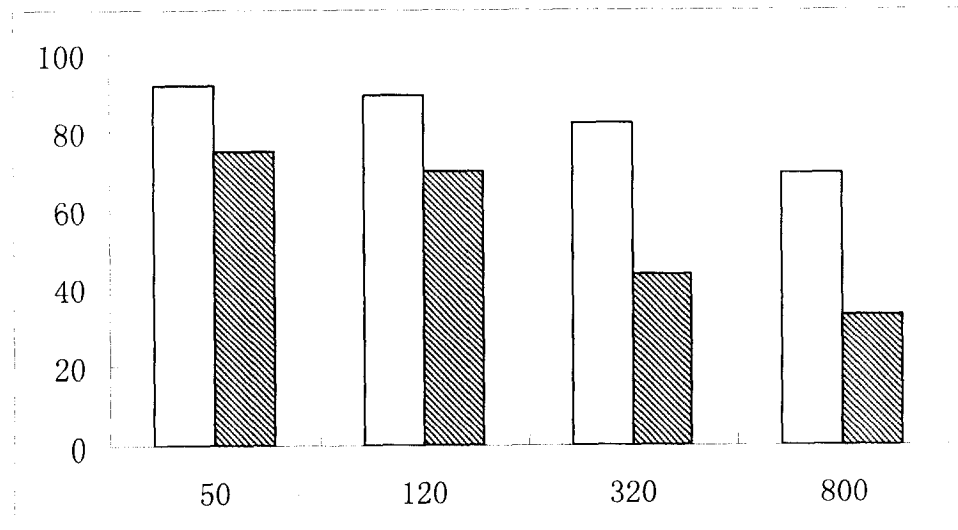


图 3.

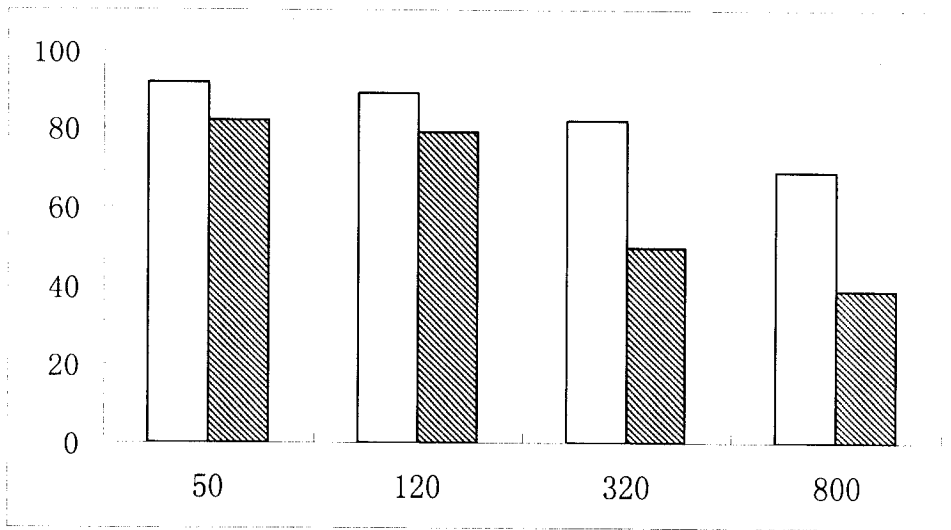


图 4.

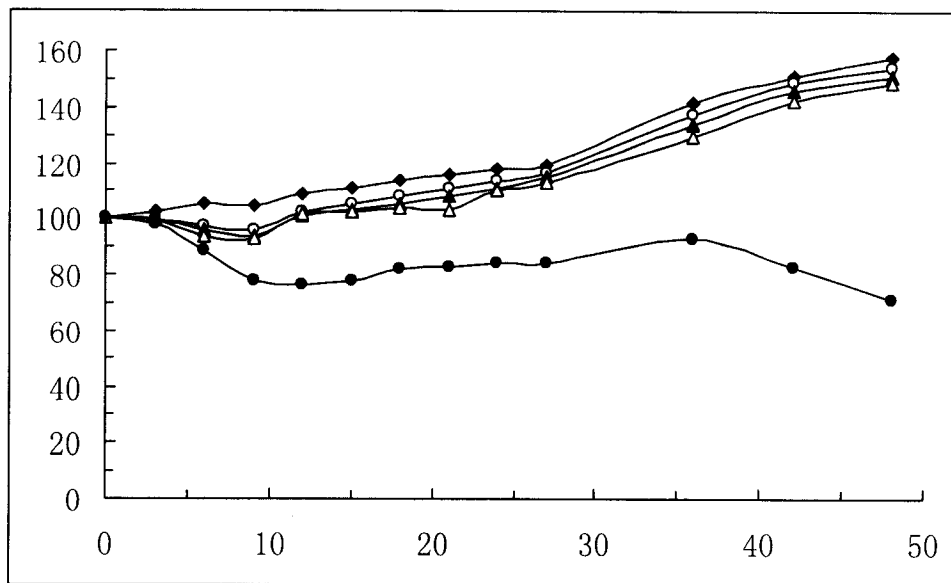


图 5.