

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局



(43) 国际公布日
2011 年 6 月 3 日 (03.06.2011)

PCT

(10) 国际公布号
WO 2011/063595 A1

- (51) 国际专利分类号:
C08B 37/08 (2006.01) A61P 7/02 (2006.01)
A61K 31/737 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2010/001678
- (22) 国际申请日: 2010 年 10 月 25 日 (25.10.2010)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
200910109861.2 2009 年 11 月 25 日 (25.11.2009) CN
- (71) 申请人 (对除美国外的所有指定国): 深圳海王药业有限公司 (SHENZHEN NEPTUNUS PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [CN/CN]; 中国广东省深圳市南山区高新技术北区朗山二路海王工业城, Guangdong 518057 (CN)。
- (72) 发明人: 及
- (75) 发明人/申请人 (仅对美国): 赵金华 (ZHAO, Jinhua) [CN/CN]; 中国广东省深圳市南山区高新技术北区朗山二路海王工业城, Guangdong 518057 (CN)。康晖 (KANG, Hui) [CN/CN]; 中国广东省深圳市南山区高新技术北区朗山二路海王工业城, Guangdong 518057 (CN)。吴明一 (WU, Mingyi) [CN/CN]; 中国广东省深圳市南山区高新技术北区朗山二路海王工业城, Guangdong 518057 (CN)。曾伟珍 (ZENG, Weizhen) [CN/CN]; 中国广东省深圳市南山区高新技术北区朗山二路海王工业城, Guangdong 518057 (CN)。李姿 (LI, Zi) [CN/CN]; 中国广东省深圳市南山区高新技术北区朗山二路海王工业城, Guangdong 518057 (CN)。高媛 (GAO, Yuan) [CN/CN]; 中国广东省深圳市南山区高新技术北区朗山二路海王工业城, Guangdong 518057 (CN)。崔婧 (CUI, Jing) [CN/CN]; 中国广东省深圳市南山区高新技术北区朗山二路海王工

业城, Guangdong 518057 (CN)。王志国 (WANG, Zhiguo) [CN/CN]; 中国广东省深圳市南山区高新技术北区朗山二路海王工业城, Guangdong 518057 (CN)。冯汉林 (FENG, Hanlin) [CN/CN]; 中国广东省深圳市南山区高新技术北区朗山二路海王工业城, Guangdong 518057 (CN)。于琳 (YU, Lin) [CN/CN]; 中国广东省深圳市南山区高新技术北区朗山二路海王工业城, Guangdong 518057 (CN)。

- (74) 代理人: 北京律诚同业知识产权代理有限公司 (LECOME INTELLECTUAL PROPERTY AGENT LTD.); 中国北京市海淀区知春路甲 48 号盈都大厦 B16 层, Beijing 100098 (CN)。
- (81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。
- (84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

根据细则 4.17 的声明:

- 一 关于申请人有权申请并被授予专利(细则 4.17(ii))

[见续页]

(54) Title: DEPOLYMERIZED GLYCOSAMINOGLYCAN FROM THELENOTA ANANAS AND PREPARATION METHOD THEREOF

(54) 发明名称: 低聚凤梨参糖胺聚糖及其制备方法

(57) Abstract: Disclosed is a depolymerized glycosaminoglycan from Thelenota ananas(dTHG), weight average molecular weight of which is about 8000 ~ 20000Da, and monosaccharide components of which are acetylgalactosamine(GalNAc), glucuronic acid(GlcUA), fucose(Fuc) or their sulfates(expressed as -OSO₃), in which molar ratio of GalNAc: GlcUA: Fuc: -OSO₃ is about 1: (1±0.3): (1±0.3): (3.5±0.5). Said dTHG is a potent endogenous factor X enzyme inhibitor, which has good anticoagulating and antithrombotic activity, and can be used to prevent and/or treat thrombotic diseases. Also provided is a method for preparing said dTHG, which comprises steps of 1) extracting and obtaining fucosylated glycosaminoglycan(THG) from Thelenota ananas body wall; 2) depolymerizing THG to obtain dTHG by method of peroxide depolymerization or method of peroxide depolymerization catalyzed by catalyst of the fourth period transition metal ions; 3) removing oligomer and/or polymer impurities in dTHG.

(57) 摘要: 本发明公开了一种低聚凤梨参糖胺聚糖(dTHG), 其重均分子量为约 8000~20000Da, 单糖组成为乙酰氨基半乳糖(GalNAc)、葡萄糖醛酸(GlcUA)、岩藻糖(Fuc)、或其硫酸酯(-OSO₃-表示), GalNAc: GlcUA: Fuc: -OSO₃-的摩尔比例约为 1: (1±0.3): (1±0.3): (3.5±0.5)。所述 dTHG 为强效内源性因子 X 酶抑制剂, 具有良好的抗凝抗血栓活性, 可用于预防和/或治疗血栓性疾病。本发明还提供制备所述 dTHG 的方法, 包括步骤 1) 从凤梨参体壁提取获得岩藻糖化糖胺聚糖(THG); 2) 采用过氧化物法或第四周期过渡金属离子催化剂催化下的过氧化物法解聚 THG 以获得 dTHG; 3) 除去 dTHG 中的低分子和/或高分子杂质成分。

WO 2011/063595 A1

— 发明人资格(细则 4.17(iv))

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

低聚凤梨参糖胺聚糖及其制备方法

技术领域

5 本发明属于医药技术领域，具体涉及一种低聚凤梨参糖胺聚糖及其制备方法、含有该低聚凤梨参糖胺聚糖的药用组合物及其在血栓性疾病的预防和/或治疗中的用途。本发明是基于本申请人2009年11月6日提交的名称为“低聚岩藻糖化糖胺聚糖及其制备方法”、申请号为200910110114.0的发明专利申请的进一步发明，所述专利申请的全文以参考文献的形式结合于本发明说明书。

10 技术背景

岩藻糖化糖胺聚糖（Fucose-branched Glycosaminoglycan, fucose-containing glycos-aminoglycan 或 Fucosylated Glycosaminoglycan, FGAG）或称岩藻糖化硫酸软骨素（Fucose-branched Chondroitin Sulfate, FCS）是指一类从棘皮动物体壁或内脏中提取获得的带有硫酸岩藻糖取代基团的特殊的糖胺聚糖（樊绘曾等，
15 药学报, 1980, 18(3): 203; Ricardo P. et al., J. Biol. Chem., 1988, 263 (34) : 18176; Yutaka K. et al., J. Biol. Chem., 1990, 265:5081）。

现有资料显示，棘皮动物来源的 FGAG 在化学组成方面既存在共性也存在差异。首先，不同来源以及不同方法制备的 FGAG 存在一些共同特点，即，FGAG 组成单糖包括 N-乙酰氨基半乳糖基（GalNAc, A, 所述 N-乙酰氨基半乳
20 糖化学名为 N-乙酰基-2 去氧-2-氨基半乳糖，下文同）、葡萄糖醛酸基（GlcUA, U）、岩藻糖基（Fuc, F）以及它们的硫酸酯（上文樊绘曾, 1980; Ricardo P, 1988; 和 Ken-ichiro Y. et al., Tetrahedron Letters, 1992, 33(34): 4959）；其中，GlcUA 和 GalNAc（或其硫酸酯）通过 $\beta(1-3)$ 及 $\beta(1-4)$ 糖苷键交互连接形成类似于硫酸软骨素具有 [GlcUA $\beta(1-3)$ - GalNAc $\beta(1-4)$ -] 二糖重复结构单元的主链，而岩
25 藻糖或其硫酸酯以侧链形式连接于主链。

不同来源以及不同方法制备的 FGAG 存在着不同程度的化学结构差异，例如：

（1）单糖组成比例方面的差异。不同种属海参、不同组织来源乃至不同制备方法所得 FGAG 的单糖组成都可能存在显著差异，几种来源的 FGAG 单
30 糖组成参见表 1。

表 1. 几种海参来源的 FGAG 单糖组成及硫酸酯基

来源		化学组成 (摩尔比)		文献来源
海参种属	组织	A : U : F : -OSO ₃ ⁻		
<i>Stichopus Japonicus</i> (刺参)	体壁	1 : 1.14 : 0.97 : 4.20		樊绘曾, 药学报, 1980,15: 267

		1 : 0.88 : 0.93 : 4.01	Ken-ichiro Y, <i>Tetrahedron Letters</i> , 1992, 33: 4959
		1 : 1.18 : 2.78 : 5.46	Yutaka K, <i>J. Biol. Chem.</i> , 1990, 265: 5081
		1 : 0.84 : 2.38 : 3.69 ^[b]	Yutaka K, <i>Biochem. J.</i> , 2002, 132: 335
	内脏	1 : 1.00 : 1.00 : 4.70	樊绘曾, <i>海洋药物</i> , 1983, (3): 134
<i>Stichopus variegatus</i> (花刺参)	体壁	1 : 1.21 : 1.29 : 4.62	陈菊娣, <i>中国海洋药物</i> , 1994, (1): 24
<i>Holothuria leucospilota</i> (玉足海参)	体壁	1 : 0.94 : 0.84 : 3.60	樊绘曾, <i>药学报</i> , 1983, 18 (3): 203
		1 : 0.96 : 0.78 : 1.98	李海棠, <i>中药材</i> , 1999, 22(7):328
<i>Holothuria atra</i> (黑海参)	体壁	1 : 1.15 : 0.79 : 2.7 ^[e]	唐孝礼, <i>中药材</i> , 1999, 22(5):223
<i>Holothuria scabr</i> (糙海参)	体壁	1 : 1.28 : 0.68 : 1.72	陈健, <i>食品与发酵工业</i> , 2006, 32: 123
<i>Ludwigothurea grisea</i>		1 : 1.17 : 2.17 : 2.39 ^[c]	Paulo AS, <i>Eur. J. Biochem.</i> , 1987, 166:639
	体壁	1 : 0.90 : 0.97 : 2.67 ^[d]	Ricardo PV, <i>J. Biol. Chem.</i> , 1988, 263: 18176
		1 : 0.92 : 1.23 : 2.21	Paulo AS, <i>J. Biol. Chem.</i> , 1996, 271:23973

^[a] 文献以 mmol/g 报告 (0.81:0.69:1.93:2.99); ^[b] 文献以质量百分比(%)报告(16.2:20.3:11.66:23.52);

^[c] 文献报告比例为 0.46 : 0.54 : 1.00 : 1.10; ^[d] 文献报告比例为 0.33 : 0.30 : 0.32 : 0.88。

不同种属、组织来源及不同提取方法所得 FGAG 组成差异主要表现在 Fuc 及硫酸酯基的组成比例变化较大。根据资料可以判断, 不仅不同物种来源的 FGAG 存在不同, 提取方法的不同也可能导致产物组成的较大差异。例如, Yutaka K 等 (1990, 2002) 与樊绘曾等 (1980)、Ken-ichiro Y 等 (1992) 同样从刺参体壁中提取 FGAG, 前者所得 FGAG 中岩藻糖摩尔组成比例较后者高 2~3 倍; 而相同研究小组从同种海参 (*L. grisea*) 中提取获得的 FGAG 在岩藻糖组成比例方面也存在较大变化 (Paulo AS 等, 1987, 1988)。组织来源相同而提取方法/时间不同所致 FGAG 的岩藻糖组成比例差异, 其原因可能是岩藻糖组成比例较高的 FGAG 产物中存在非 GAG 类的岩藻聚糖污染, 也可能是岩藻糖组成比例较低的 FGAG 产物制备过程中, 其侧链基团存在破坏和损失, 此外还可能与含量检测方法的准确性有关。

(2) 主链结构方面的差异。如同硫酸软骨素 A、C、D 等存在的硫酸酯基位置和数量方面的差异一样, 不同种属来源的 FGAG 的主链结构中同样存在硫酸酯基位置和数量方面的差异, 例如, 资料显示, 刺参 FGAG 主链中 GalNAc 的 4-位和 6-位均存在硫酸酯化 (Ken-ichiro Y et al., *Tetrahedron Letters*, 1992, 33: 4959); 玉足海参 FGAG 主链 GalNAc 仅存在 6-位硫酸酯化而无 4-位硫酸酯化 (樊绘曾等, *药学报*, 1983, 18 (3): 203); 而 *L. grisea* 来源的 FGAG

主链中, 约 53% 的 GalNAc 为 6-硫酸酯, 少量为 4,6-二硫酸酯 (约 12%)、4-硫酸酯 (约 4%), 并且存在约 31% 未被硫酸酯化的 GalNAc (Lubor Borsig et al. *J. Biol. Chem.* 2007, 282: 14984)。

(3) 侧链岩藻糖基及硫酸化程度差异。根据资料, *S. Japonicus* (刺参) 及 *L. grisea* 来源的 FGAG 都存在三种类型的侧链岩藻糖基, 即 2,4-二硫酸酯、3,4-二硫酸酯以及 4-硫酸酯化的岩藻糖基; 后者另含约 25% 未被硫酸酯化的岩藻糖, 这些岩藻糖成束存在于 FGAG 的还原端 (Ken-ichiro Y. et al., *Tetrahedron Letters*, 1992, 33: 4959, Paulo AS. et al., *J. Biol. Chem.*, 1996, 271: 23973)。

如表 1 所示, 刺参、花刺参所得 FGAG 的硫酸化程度一般较高, 而 *L. grisea*、黑海参、糙海参来源的 FGAG 的硫酸化程度相对较低。

现有资料显示, 棘皮动物来源的 FGAG 具有多方面的生物学活性。

各种来源的 FGAG 多具有一定的抗凝血活性 (樊绘曾等, *药学学报*, 1980, 15(5): 263; 张佩文, *中国药理学与毒理学杂志*, 1988, 2(2): 98; Paulo AS. et al., *J. Biol. Chem.* 1996, 271: 23973); 然而, 这些天然 FGAG 也同时具有诱导血小板聚集活性 (Jia-zeng L. et al, *Thromb Haemos*, 1988, 54(3): 435; 单春文, *中药药理与临床*, 1989, 5(3): 33)。

见于报道的 FGAG 生物学活性还涉及调血脂 (His-Hisen L. et al., *J. Agric. Food Chem.*, 2002, 50: 3602)、抗动脉粥样硬化及抑制血管内皮增生 (Tapon-Brethaudiere et al., *Thromb. Haemost*, 2000, 84: 332; Masahiko I. et al., *Atherosclerosis*, 1997, 129: 27; 欧洲专利申请, EP 0811635)、免疫调节 (孙玲等, *生物化学与生物物理学进展*, 1991, 18(5): 394; 陈祖琼等, *天津医药*, 1987, (5): 278)、抗肿瘤 (胡人杰等, *中国肿瘤临床*, 1992, 19(1): 72; 李惟敏等, *肿瘤临床*, 1985, 12(2): 118), 以及抗病毒 (JA. Beutler et al., *Antivir. Chem. Chemother.*, 1993, 4(3), 167; PCT 专利申请 PCT/JP90/00159) 等。

海参来源的 FGAG 及其衍生物的抗血栓、抗凝血活性及其作用机制、药理学作用靶点研究资料显示, FGAG 具有不同于肝素、硫酸皮肤素的抗凝机制, 其抗凝血/抗血栓作用靶点可涉及:

(1) AT-III: 即存在依赖 AT-III 的抗凝血酶活性 (Paulo AS et al., *J. Biol. Chem.*, 1996, 271, 23973; 马西, *中华血液学杂志*, 1990, 11(5): 241); (2) HC-II: 即存在依赖 HC-II 的抗凝血酶活性 (Hideki Nagase et al., *Blood*, 1995, 85, (6): 1527; 张广森, *中华血液学杂志*, 1997, 18(3): 127); (3) IIa: 即抑制凝血酶 (IIa) 反馈激活因子 XIII (Nagase H et al., *Biochem. J.*, 1996, 119(1): 63-69);

(4) f.Xase: 抑制内源性因子 X 酶 (因子 VIII-IX 复合物) 对因子 X 的激活 (Hideki Nagase et al., *Blood*, 1995, 85(6): 1527; JP Sheehan et al., *Blood*, 2006, 107(10): 3876); (5) TFPI: 包括提高 TFPI 对 Xa 的抑制速率, 降低 TFPI-Xa

对 TF-VIIa 的抑制活性, 并且刺激 TFPI 释放 (Hideki Nagase et al., *Thromb Haemost*, 1997, 78: 864; T. Bretauiere et al., *Thromb Haemost*, 2000, 84: 332);

(6) 纤溶酶: 促进纤溶酶原的激活并由此促进血栓溶解 (杨晓光等, *中国医学科学院学报*, 1990, 12(3), 187; Yutaka Kariya et al., *Biochem. J.*, 2002, 132: 335)。

尽管海参 FGAG 独特的抗凝血机制及其良好的抗凝活性强度使之具有重要的潜在应用价值, 但迄今 FGAG 难以应用于临床, 究其原因主要在于:

(1) 海参 FGAG 兼具抗凝血以及诱导血小板聚集的活性。临床上, 抗凝血的目的在于抗血栓形成, 而抗血小板则是临床常规使用的另一种重要的抗血栓形成的方法。显然, 对于血栓形成而言, FGAG 的抗血栓的抗凝活性与其促血栓的血小板激活效应相互对立, 使其难以应用于临床血液学疾病的预防和治疗。例如, 研究表明, 在兔急性弥漫性血管内模型中, 刺参 FGAG 的血小板激活效应完全抵消了其抗凝血疗效作用 (李安国, *湖南中医学院学报*, 1991, 11(3): 37)。

(2) 药效剂量的刺参 FGAG 的活体动物血管内给药可致血小板计数减少 (李家增等, *中国药理学报*, 1985, 6(2): 107)。血小板减少, 例如肝素所致免疫性血小板减少症, 既可能引发出血倾向, 也可能引发严重乃至致命的弥漫型血管内凝血。现有资料显示, 海参 FGAG 所致血小板减少可能与其诱导血小板聚集, 并由此导致血小板在微血管内的“扣押”有关 (李家增等, *中药通报*, 1983, 8(5): 35)。

(3) 一般认为, 广泛的药理学作用靶点与抗凝药物的出血倾向副作用密切相关, 选择性作用靶点已成为新型抗凝血药物研发的重要评价指标 (KA Bauer, *Hematology*, 2006, (1): 450)。海参 FGAG 具有与已知的其它类型抗凝血药物不同的药物靶点, 但如前文所述, 其作用靶点仍然相对广泛, 现有资料已经显示, 抗凝剂量下的 FGAG 可以产生显著的出血倾向 (Paulo AS et al., *British Journal of Haematology*, 1998, 101: 647)。

天然来源的海参 FGAG 具有独特抗凝机制和效价, 另一方面则存在限制其应用的缺陷, 因此, 通过结构修饰以获得具有相对理想的目标产物已经成为其应用研究的重要内容之一。

目前, FGAG 的化学结构修饰方法包括过氧化解聚 (欧洲专利公开 EP 040 8770; Ken- ichiro Y et al., *Tetrahedron Letters*, 1992, 33: 4959)、脱硫酸化或羧基还原 (Paulo AS et al., *Thrombosis Research*, 2001, 102: 167)、部分酸水解 (Yutaka Kariya, *Biochem. J.*, 2002, 132: 335; Paulo AS et al., *Thrombosis Research*, 2001, 102: 167) 等。这些工作已经取得了一些进展。例如, 研究发现, 刺参 FGAG 的诱导血小板聚集的活性可随分子量降低而减弱 (樊绘曾等,

生物化学杂志, 1993, 9(2): 146); 刺参 FGAG 的过氧化解聚产物依赖 ATIII 的抗凝血酶活性也可能有所降低(马西, 中华血液学杂志, 1990, 11(5): 241; Paulo AS et al., *J. Biol. Chem.* 1996, 271, 23973; Hideki Nagase et al., *Blood*, 1995, 85 (6):1527); 对于 *L. grisea* 来源的 FGAG, 分子量的降低对于其 HC-II 依赖的抗凝血酶活性影响更显著(RG Pacheco et al., *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, 2000, 11:563)。

综合刺参 FGAG 解聚产物(多被称为 DHG)的研究资料来看, 仅仅通过解聚方法以获得相对理想效价与靶点特征的抗凝活性产物仍然存在困难。例如, 资料显示, 刺参 FGAG 重均分子量低至约 9000Da 时方可消除其血小板诱导聚集活性(樊绘曾等, 生物化学杂志, 1993, 9(2): 146); 另一方面, 由于抗凝活性随分子量降低而减弱(RG Pacheco et al., *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, 2000, 11:563; 樊绘曾等, 生物化学杂志, 1993, 9(2): 146)。DHG 相关的药理药效学研究资料中, 早期曾使用约 10000 Da 以下分子量的 DHG, 但其后十余年的研究中, DHG 重均分子量多为 12000 ~ 15000 Da (Hideki Nagase et al., *Thromb Haemost*, 1997, 77(2): 399; Kazuhisa M et al., *Kidney International*, 2003, 63: 1548; JP Sheehan et al., *Blood*, 2006, 107(10): 3876)。显然, 后者应当为保持必要的抗凝效价所必须, 但对于刺参 FGAG 而言, 该分子量范围对于消除血小板诱导活性以及避免血管内给药所致血小板减少而言, 其安全性显然存在疑虑, 而这种安全性并未能在相关研究资料中得到体现和验证。

研究已经显示, 水解侧链岩藻糖以及部分去硫酸化都可以致 FGAG 抗凝血活性显著降低乃至消失, 羧基还原对抗凝活性影响相对较小, 但出血倾向仍然显著且对血小板活性的影响未知(Paulo AS, *J. Biol. Chem.*, 1996, 271, 23973; Paulo AS et al., *British J. Haematology*, 1998, 101: 647; Paulo AS et al., *Thrombosis Research*, 2001, 102: 167)。

关于海参 FGAG 化学与生物活性的研究资料主要来自 *L. grisea* 以及刺参 FGAG, 虽有资料介绍凤梨参糖胺聚糖的提取方法(刘学湘等, 南京中医药大学学报, 2003, 19(3): 161), 但未见其化学结构分析以及生物学活性方面的研究报道。

综合现有资料, *L. grisea* 以及刺参 FGAG 的化学结构方面的差异可表现在: 硫酸化程度不同, 主链 GalNAc 硫酸化类型和程度不同, 侧链岩藻糖类型基本一致, 而不同类型侧链岩藻糖的组成比例不同并致侧链硫酸化程度不同(Ken-ichiro Y et al., *Tetrahedron Letters*, 1992, 33: 4959; Lubor Borsig et al. *J. Biol. Chem.* 2007, 282: 14984)。根据两种 FGAG 相对于肝素和/或低分子肝素的抗凝效价判断, 刺参 FGAG 的抗凝及抗血栓效价更强(Norihiko S et al. *Thromb Haemost*, 1991, 65(4): 369; Paulo AS et al., *British J. Haematology*, 1998, 101:

647)。

然而,上述工作均未能阐明其所得产物的血小板激活效应及其静脉内给药对血小板计数的影响,此为限制海参 FGAG 产物应用价值的最重要的因素;其次,尽管相关资料报告了这些结构修饰产物对某些血液因子(药理学靶点)的作用效价,但结构修饰与所得产物药理学作用机制特点的关系并不清晰,因此难以判断取得良好药理机制特点的结构修饰程度或范围。迄今为止,硫酸化位置对于 FGAG 的活性及作用特征的影响未见报道,尽管改变主链和/或侧链糖基的硫酸化结构类型有可能发现实现更具选择性药效学作用特征并由此根据应用价值的新型 FGAG,然而,在现有技术条件下,虽然可以对糖胺聚糖的进行非选择性的硫酸化或去硫酸化处理,但难以进行位置选择性的硫酸化或脱硫酸化改造。

本发明通过凤梨参 FGAG 的化学结构及生物学活性比较研究惊奇发现,FGAG 侧链岩藻糖硫酸化位置或类型对其生物学活性,特别是对血小板诱导聚集活性具有重要影响。由此,不同种属来源的 FGAG 可存在显著的应用价值的差异。此外,本发明人现已发现,不同解聚程度和方法对 FGAG 通过不同靶点产生的生物学效应强度的影响不同,基于这种差异可以获得具有特殊靶点选择性特征进而获得针对特定疾病治疗和/或预防的 FGAG 衍生物。

本发明首先发现凤梨参来源的岩藻糖化糖胺聚糖 (Fucosylated glycosaminoglycan from *Thelenota ananas*, THG) 具有特殊的化学结构特征,其侧链岩藻糖类型不同于已经或部分阐明化学结构的 FGAG,例如 *L. grisea* 以及刺参 FGAG; THG 在生物学活性方面同样具有特殊性,其血小板激活活性远低于玉足海参及刺参来源的 FGAG 等。

本发明确证了 THG 具有抑制内源性因子 X 酶 (f.Xase)以及依赖 HC-II 的抗凝血酶 (f.IIa) 活性,首次阐明了 THG 的解聚程度与所述药理学作用的活性强度的相关性,在此基础上,本发明获得了具有较高的抑制 f.Xase/抗 IIa 活性强度比例(效价比)的 THG 解聚产物 (Depolymerized THG, dTHG)。也就是说,本发明以具有特殊化学及生物活性的 THG 为起始物,基于解聚与生物学活性之间的相关性规律,制备出一种具有良好抗凝效价并且具有特殊的靶点选择性特征的 dTHG 产物,所述 dTHG 不存在诱导血小板聚集的活性,高剂量及重复给药情况下不发生血小板数量减少。

发明内容

本发明的一个目的在于提供一种具有特定化学结构和良好抗凝效价的低聚凤梨参糖胺聚糖,该产品不存在诱导血小板聚集的活性,不会导致血小板数量减少。

本发明的另一个目的是提供制备上述低聚凤梨参糖胺聚糖的方法。

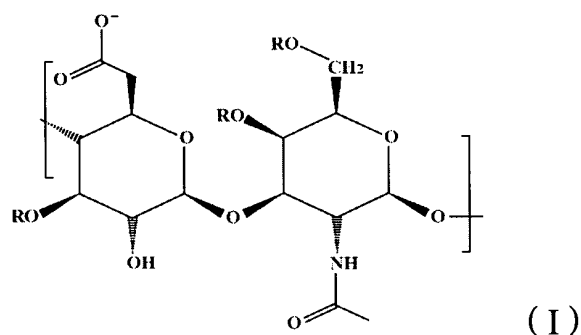
本发明的再一个目的是提供含有上述低聚凤梨参糖胺聚糖的药物组合物及其在制备预防和/或治疗血栓性疾病的药物中的应用。

本发明研究发现，凤梨参来源的岩藻糖化糖胺聚糖（Glycosaminoglycan from *Thelenota ananas*, THG）除具有一些已知 FGAG 的共性特点外，如组成单糖包括 GalNAc、GlcUA 和 Fuc 等，还具有特殊的化学结构特征，它的侧链岩藻糖类型、硫酸化程度不同于已经阐明或部分阐明的海参 FGAG。例如 *L. grisea* 和刺参 FGAG 均主要包括三种结构类型的侧链岩藻糖，即岩藻糖-2,4-二硫酸酯基、-3,4-二硫酸酯和 -4-硫酸酯基，而 THG 则主要包括岩藻糖-2,4-二硫酸酯基、-3-硫酸酯和 -4-硫酸酯基。与此相一致，本发明确证了 THG 具有抑制内源性因子 X 酶（f.Xase）以及依赖 HC-II 的抗凝血酶（f.IIa）活性，并且发现 THG 在生物学活性方面也表现出特殊性，例如其血小板激活活性远低于玉足海参和刺参来源的 FGAG。

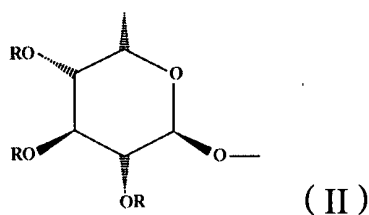
此外，本发明人通过对 THG 的化学结构和生物学活性比较研究惊奇发现，FGAG 侧链岩藻糖硫酸酯化位置和类型对其生物学活性尤其是对血小板诱导聚集活性具有重要影响。

基于以上研究，本发明以这种具有特殊化学结构和生物活性的 THG 为起始物，基于解聚与生物学活性之间的相关性规律，制备出具有良好抗凝效价并且具有特殊的靶点选择性特征的低聚凤梨参糖胺聚糖（Depolymerized THG, dTHG）。

根据本发明的一个方面，所述低聚凤梨参糖胺聚糖（dTHG）是凤梨参（*Thelenota ananas*）来源的岩藻糖化糖胺聚糖（THG）的解聚产物，其具有如下式所示的结构：



式 (I) 中：-OR 为羟基（-OH）、硫酸酯基（-OSO₃⁻）、或为如式 (II) 所示的硫酸酯化岩藻糖基：



式 (II) 中: -OR 定义同式 (I)。

其中: 单糖组成包括 N-乙酰氨基半乳糖 (GalNAc)、葡萄糖醛酸 (GlcUA)、岩藻糖 (Fuc)、或其硫酸酯 (以 $-\text{OSO}_3^-$ 表示), 以摩尔比计, GalNAc: GlcUA: Fuc: $-\text{OSO}_3^-$ 的比例约为 $1: (1 \pm 0.3): (1 \pm 0.3): (3.5 \pm 0.5)$, dTHG 的重均分子量 (Mw) 为约 8000 ~ 20000 Da。优选的分子量范围为 10000 ~ 18000 Da, 更优选为 12000 ~ 16000 Da。

研究证明, 本发明的 dTHG 具有较高的抗 f.Xase/抗 f.IIa 活性强度比例 (效价比), 较高的抗 Xase/延长 APTT 效价比, 不存在诱导血小板聚集的活性, 并且高剂量及重复给药情况下不发生血小板数量减少, 可以用于预防和/或治疗血栓性疾病。

根据本发明的另一方面, 提供制备上述低聚凤梨参糖胺聚糖的方法, 主要包括以下步骤:

- 1) 提取: 从凤梨参体壁提取获得岩藻糖化糖胺聚糖 (THG);
- 2) 解聚: 解聚步骤 1) 所得的 THG 以获得低聚岩藻糖化糖胺聚糖 (dTHG);
- 3) 精制: 收集和纯化所需分子量的 dTHG, 以除去其中的低分子和/或高分子杂质成分。

具体地, 步骤 1) 通常可包括切制/粉碎、酶解、碱解、脱色、分离等步骤。凤梨参可以是去内脏的鲜品或干品。为达到提高提取得率的目的, 所述凤梨参干品一般需切制成片状或小块状, 然后加水浸泡, 对于鲜品则可以切制也直接加水粉碎成混悬液, 然后对其进行酶解和/或碱处理。

酶解步骤中, 一般选择广谱蛋白酶, 包括动物来源的胃蛋白酶、胰蛋白酶、复合酶或粗酶制剂, 植物和/或微生物来源的蛋白酶如木瓜蛋白酶、actinase 等。酶解条件如温度、时间、pH 值及酶用量等均根据所用蛋白酶的自身属性进行选择确定。

碱解步骤中, 可选择使用氢氧化钾、氢氧化钠等强碱, 用量一般选择为使提取液中碱浓度达到约 0.5 ~ 2 N (当量浓度), 反应温度一般选择为室温至 70 °C, 碱处理时间可以为约 0.5 ~ 3 h。

酶解和/或碱处理后的提取液经灭酶和/或中和处理后, 通过离心和/或过滤去不溶物, 所得上清液可采用或联合采用低级醇/酮如乙醇、丙酮, 或者钾盐如醋酸钾, 或者酸性粘多糖沉淀剂如十六烷基吡啶沉淀提取液中的糖胺聚糖,

所得沉淀可干燥成粗提物、或不经干燥直接进入下一步处理。所得糖胺聚糖粗提物可选择进行脱色、分级沉淀、凝胶色谱和/或离子交换色谱纯化。本发明优选采用过氧化氢脱色结合乙醇-醋酸钾分级沉淀法(参见樊绘曾等, 药学报, 1983, 18 (3): 203) 获得相对纯净的凤梨参岩藻糖化糖胺聚糖, 即 THG。

5 本发明中, 凤梨参 (*Thelenota ananas*) 来源的岩藻糖化糖胺聚糖 (THG) 具有一些已知岩藻糖化糖胺聚糖的共性特点, 例如, 其组成单糖包括乙酰氨基半乳糖 (GalNAc)、葡萄糖醛酸 (GlcUA)、岩藻糖 (Fuc) 等, 但其硫酸酯化 (以 $-\text{OSO}_3^-$ 表示) 程度与已知的岩藻糖化糖胺聚糖有所不同。以整数 (或半数) 摩尔比计, THG 的组成单糖及硫酸酯基的组成比例 GalNAc: GlcUA: Fuc: $-\text{OSO}_3^-$ 接近 1: 1: 1: 3.5, 进一步地, 约为 $1: (1 \pm 0.3): (1 \pm 0.3): (3.5 \pm 0.5)$ 。

10 步骤 2) 中, THG 的解聚方法可选择过氧化氢解聚法, 或者由第 IV 周期过渡金属离子催化的过氧化物解聚法。本发明优选使用后者, 该方法在本申请入于 2009 年 11 月 6 日提交的名称为“低聚岩藻糖化糖胺聚糖及其制备方法”、申请号为 200910110114.0 的发明专利申请中有详细描述, 它是在水相介质中采用含有第四周期过渡金属离子的催化剂, 催化过氧化物解聚反应, 获得低聚凤梨参岩藻糖化糖胺聚糖。具体地, 该方法包括以下步骤:

2.1) 在第四周期过渡金属离子的催化剂存在下, 在水相介质中, 加入过氧化物以解聚海参来源的岩藻糖化糖胺聚糖 (THG);

2.2) 中止反应, 收集所需分子量范围的低聚岩藻糖化糖胺聚糖 (dTHG)。

20 其中, 解聚反应在水相介质中进行, 过氧化物可以在反应体系中产生自由基, 通过自由基链式反应裂解 THG, 形成 dTHG 产物。所述过氧化物包括但不限于过氧乙酸、过氧化氢、3-氯-过苯甲酸、氢过氧化枯烯、过硫酸钠、过氧化苯甲酰以及它们的盐或酯, 优选为过氧化氢。

25 所述 THG 在反应体系中的质量分数约为 0.05%-15%, 过氧化物在反应体系中的质量分数约为 0.5%至约 30%。FGAG 的解聚反应过程中, 过氧化物反应物可以在反应前一次性全部加入到反应体系中, 也可以采用持续或断续性方式将过氧化物反应物逐步加入到反应体系中。本发明优选将过氧化物反应物按照可控速率的方式持续加入到反应体系中。

30 所述作为催化剂的金属离子为第四周期过渡金属离子, 包括 Cu^+ 、 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Cr^{3+} 、 $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ni^{2+} 等, 这些金属离子可以单独使用, 也可以相互组合作为复合催化剂使用。其中, 优选的催化剂为 Cu^+ 、 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Zn^{2+} , 最优选为 Cu^{2+} 。由于金属离子并非独立存在的化学试剂, 实际使用的是这些金属离子的无机或有机盐。在反应体系中, 所述金属离子的浓度范围可以为约 $1 \text{ nmol/L} \sim 0.1 \text{ mol/L}$, 优选的浓度范围为 $10 \text{ } \mu\text{mol/L} \sim 10 \text{ mmol/L}$ 。

35 所述解聚反应过程的常规工艺参数为: 温度范围为 $10^\circ\text{C} \sim 75^\circ\text{C}$; 反应时

间为 20 分钟~8 小时;反应可以在常压或加压条件下进行;可以选择氮气、惰性气体保护下进行,也可以在常压条件下与大气环境相通进行。

反应结束时,可选择地向反应体系中加入螯合剂使之与金属离子催化剂螯合而抑制催化反应速度,继而通过冷却、有机溶剂沉淀等技术手段终止反应。

5 螯合剂是指能与金属离子形成螯合物的物质,其包括但不限于乙二胺四乙酸(EDTA)、二乙烯三胺五乙酸(DTPA)、3-丙二胺四乙酸(PDTA)、三乙酸基氨(NTA)或它们的盐。本发明方法优选乙二胺四乙酸二钠或其水合物。反应产物沉淀法是直接或在进一步加入无机盐(如乙酸钾)的条件下加入有机溶剂使聚糖类物质从反应体系中析出的方法,所述有机溶剂包括甲醇、乙醇、丙酮
10 等低碳醇/酮,其中优选为乙醇和丙酮。

上述方法可以显著改善过氧化物解聚岩藻糖化糖胺聚糖的反应条件,即采用相同过氧化物反应物和原型 FGAG 起始物制备相同或近似相等分子量的 dFG 时,在温度等反应条件近似的情况下,相对于直接过氧化物解聚法(即没有金属离子催化剂存在下的过氧化物解聚方法),该方法可以提高反应速度,
15 缩短反应时程;类似地,在控制反应时间的条件下,该方法可以显著降低反应所需温度,以至可以在室温条件下完成所需反应。

在 dTHG 的重复制备过程中,在保持反应条件相同或近似的条件下,与直接氧化物解聚法相比,该方法所得产物的批次间差异显著降低,所得低聚产物的分子量与目标分子量的差异小于 5%,可以显著改善 dTHG 制备的重复性和
20 可控性,并且低聚产物具有更好的质量均一性。这可能与催化剂所致活化能降低进而形成相对稳定的反应速率有关,也可能与反应温度降低或反应时程缩短等温和反应条件及其反应条件的可控性和稳定性改善有关。

此外,为了进一步提高和改善解聚反应的可控性,还可选择地向金属离子催化的过氧化物解聚反应体系中加入一定浓度的无机和/或有机盐。所述无机
25 和/或有机盐包括金属元素(如碱金属、碱土金属元素等)与卤素、有机酸等形成的盐,有机酸或无机酸与有机碱形成的盐,以及它们相互组合的复合盐,其中优选氯化钠、氯化钾、乙酸钠、三水合乙酸钠、乙酸钾。本发明中,用于改善解聚反应速度和反应可控性的无机和/或有机盐的优选的盐浓度为约 0.1 mmol/L 至约 1.0 mol/L。

30 本发明中,收集的所述 dTHG 的重均分子量(Mw)约为 8000~20000 Da,优选的分子量范围为 10000~18000 Da,更优选为 12000~16000 Da。

步骤 3)中,收集的 dTHG 可采用本领域已知的方法纯化,以除去低和/或高分子杂质成分。纯化方法包括但不限于通过透析法除去低和/或高分子杂质成分、通过离子交换法制备 THG 盐,和/或凝胶色谱/阴离子交换色谱层析
35 法纯化等步骤。

进一步地, 本发明的制备低聚凤梨参糖胺聚糖的方法可包括步骤:

4) 干燥步骤 3) 中获得的 dTHG。干燥方法可选择减压真空干燥或冷冻干燥, 本发明优选冷冻干燥法干燥。

通过本发明上述方法制备得到的 dTHG, 其单糖组成及硫酸酯基组成比例可采用本领域内已知的化学显色法、红外光谱 (IR) 法以及核磁共振波谱 (NMR) 法检测 (张惟杰, 糖复合物生化研究技术 (第二版), 浙江: 浙江大学出版社, 1999; 本申请人的前述发明专利申请 CN200910110114.0)。

由于本发明的 dTHG 存在硫酸酯基及羧基, 因此可以与无机离子或有机碱性基团形成药学上可接受的盐或酯, 其中所述 dTHG 的药学上可接受的无机盐可以是碱金属和/或碱土金属盐, 优选为钠盐、钾盐或钙盐。显然, 这些盐或酯也应包括在本发明范围之内。

根据本发明的再一方面, 提供一种药用组合物, 其包括本发明所述的 dTHG 或其药学上可接受的盐或酯, 以及药学上可接受的赋形剂。所述药物组合物可制备成口服制剂 (包括固体和液体制剂)、注射剂 (包括注射液和冻干粉针剂) 等各种剂型, 然而本发明人已经发现, dTHG 口服吸收微弱, 而皮下注射等注射途径给药则具有良好的生物利用度。因此, 本发明的药物组合物优选制成注射剂, 由于 dTHG 具有良好的水溶性, 可以通过本领域内常用的技术方法容易地制备其溶液型制剂和冻干制品。

本发明所述 dTHG 为强效内源性因子 X 酶抑制剂, 具有良好的抗凝抗血栓活性, 因此含有 dTHG 的上述药物组合物可以用于预防和/或治疗血栓性疾病, 例如各种术后抗凝治疗、各种动静脉血栓的预防和治疗、血栓相关性的心脑血管疾病的预防和治疗等。不同疾病的预防/和或治疗的使用方法及剂量应由临床医师决定。

附图说明

图 1: 图示 THG 和 dTHG 样品的 ^1H NMR 谱图, 其中 dTHG-6、dTHG-9 谱图中的水峰被压制;

图 2: 图示 dTHG (A) 与低聚刺参 FGAG (即 dSJG, B) 的 ^1H - ^1H COSY 谱图; 其中箭头指示的信号显示两种低聚 FGAG 产物侧链岩藻糖结构类型的差异: A 图为 dTHG 含有的岩藻糖-3-硫酸酯相关信号, B 图为 dSJG 含有的岩藻糖-3,4-二硫酸酯相关信号; 方框内信号分别为岩藻糖-3-硫酸酯和岩藻糖-3,4-二硫酸酯的相关氢信号; 双圈内信号为岩藻糖-3,4-二硫酸酯的 4 位氢信号。

图 3: 图示 THG 与刺参 FGAG (即 SJG) 的 ^{13}C NMR 以及 DEPT 谱图;

图 4: 图示 dTHG-6 的 NMR 同核/异核相关谱图;

图 5: 图示不同分子量的 dTHG 抑制 f.Xase 活性、依赖 HC-II 抗 IIa 活性

以及延长 APTT 时间的效价关系,其中方框限定部分为本发明所述 dTHG 的分子量范围;

图 6: 图示给药 dTHG 与低分子肝素钠 (LMWH) 对实验动物出血时间的影响。

5

具体实施方式

通过以下实施例的详细描述,结合附图可以进一步理解本发明,所述实施例并不构成对本发明范围的限制。

实施例 1 THG 提取、解聚与精制

10 1.1 材料

凤梨参, 又称梅花参 (*Thelenota ananas*), 市售品, 去内脏干燥体壁。

刺参 (*Stichopus japonicus*), 市售品, 去内脏干燥体壁。

玉足海参 (*H. leucospilota*), 市售品, 去内脏干燥体壁。

木瓜蛋白酶: 8×10^5 U/g, 广西南宁庞博生物工程有限公司。

15 阳离子交换树脂: 001×7 强酸性苯乙烯系阳离子交换树脂, 天津南开大学树脂厂。

KOH、KCOCH₃、H₂O₂、乙醇等试剂均为市售分析纯试剂。

1.2 提取

取干燥凤梨参 20 kg, 切片机切制成厚度约 1.5 mm 的薄片, 装入夹层反应罐(300L)中, 加入 200 L 水搅拌浸泡。搅拌加入固体氢氧化钠至浓度为 0.5 M, 20 60℃碱解反应 2 h。冷却, 6 N 盐酸调 pH 值为 6~7, 加入 100 g 木瓜蛋白酶, 50℃搅拌反应 6 小时, 升温至 100℃保持 10 min。冷却, 以 6 N 盐酸调 pH 值为 2 (沉淀蛋白), 2~8℃静置约 4 h, 离心去沉淀。所得上清液调 pH 值约为 7, 加乙醇使其终浓度达 70%, 静置、离心, 离心沉淀加约 30 倍量 (v/v) 水溶解, 离心去不溶物, 以 2 M NaOH 调 pH 值约 10, 加 H₂O₂ 至终浓度约 3 % 25 (v/v), 50℃搅拌反应 2 h (脱色)。反应液加醋酸钾使其最终浓度为 0.5 mol/L, 并加入乙醇使其终浓度达 30%, 静置、离心, 离心沉淀加 20 倍量 (v/w) 水溶解, 离心去不溶物, 加醋酸钾使其终浓度为 2.5 mol/L, 静置、离心, 离心沉淀乙醇洗涤 2 遍, 减压去残留乙醇, 水溶冷冻干燥, 即得凤梨参糖胺聚糖 (THG) 30 约 162 g。

作为参比, 同上述条件对 2 kg 刺参和玉足海参进行提取, 分别得到刺参 FGAG (SJG) 20.2g 和玉足海参 FGAG (HLG) 15.6 g。

1.3 解聚与精制

取上述方法制备的 THG 50 g, 加入 1825 ml 含有 122g 三水合乙酸钠和 60g 氯化钠的水中, 加入 120ml 浓度为 0.0668 mol/L 的乙酸铜溶液, 搅拌混匀。35

℃水浴搅拌条件下, 在约 2 小时的时程内以 126ml/h 速率滴加 10% (v/v) 的 H_2O_2 。整个过程中控制反应 pH 值为 7.2 ~ 7.8。上述条件下连续搅拌反应约 5 小时, 其反应过程中, 分别于反应起始后的 0.2、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5 及 5.0 小时的时间点分取反应液约 180 ml。

- 5 被分取的每份反应液均在其取出后立即加入 0.5 g Na_2EDTA , 用 15 % 乙酸调节 pH 值为 6.5 ~ 7.0, 然后加入反应液 2.5 倍体积 (约 450ml) 的乙醇, 静置, 离心得沉淀。沉淀以 100 ml 水溶, 再次醇沉 (250 ml 95% 乙醇), 离心所得沉淀以 50 ml 乙醇洗涤两遍, 减压挥干乙醇, 以约 30 倍量 (v/w) 水溶解、0.45 μm 膜抽滤, 滤液过 Na^+ 型阳离子交换树脂柱 ($\varnothing 40 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$), 收集流出液, 10 以截留分子量 3500Da 的透析膜透析 6 小时, 透析截留溶液冷冻干燥得到对应于各解聚时间点的解聚产物 dTHG-1 ~ dTHG-10, 各时间点对应的产量在约 3.0 ~ 3.5 g 范围内, 产物总量为 33.2 g。

- 作为参比, 分别取 10g SJG 和 10g HLG, 同上述解聚条件进行操作, 分取解聚反应液的时间点设定为 2 个, 即反应起始后的 3h 和 5 h。所得解聚产物记 15 为 dSJG-1, dSJG-2 和 dHLG-1, dHLG-2, 得到 dSJG 总量为 7.5 g, dHLG 总量为 8.0 g。

1.3 dTHG、dSJG 和 dHLG 的理化性质检测与比较

样品: THG, dTHG-1 ~ dTHG-10

参比样品: SJG, dSJG-1 ~ dSJG-3; HLG, dHLG-1 ~ dHLG-4

- 20 分子量检测: HPGPC-LALLS 法

旋光度检测: 中国药典 (2005 版) 二部附录 VIE 方法。WZZ-1S 型自动旋光仪, 钠光源 ($\lambda_{589.3\text{nm}}$), 样品管 1dm。

特性黏度检测: 中国药典 (2005 版) 二部附录 VI G 第三法。

- 25 单糖组成检测: 乙酰氨基半乳糖 (GalNAc): Elson-Morgon 法 (张惟杰, 糖复合物生化研究技术 (第二版), 浙江: 浙江大学出版社, 1999, 19-20);

葡萄糖醛酸 (GlcUA): 咋唑法;

岩藻糖 (Fuc): 根据实施例 2 所述 ^1H NMR 甲基峰积分面积计算 GalNAc/Fuc 摩尔比;

- 30 硫酸根 ($-\text{OSO}_3^-$): 电导率法检测羧酸/硫酸摩尔比 (张惟杰, 糖复合物生化研究技术 (第二版), 浙江: 浙江大学出版社, 1999, 409-410), 以此作为 GlcUA / $-\text{OSO}_3^-$ 组成比。

结果: 见表 2。

表 2. 各种样品的化学组成和理化性质

样品	分子量 (Mw)	旋光度 ($[\alpha]_{\text{D}}^{20}$, C=1%)	特性黏度 (0.1M NaCl, ml/g)	单糖组成 (摩尔比) GalNAc : GlcUA : Fuc : $-\text{OSO}_3^-$
----	-------------	---	---------------------------	--

THG	65820	-59.1°	46.7	1.00 : 1.16 : 1.01 : 3.60
dTHG-1	46070	-58.3°	29.3	1.00 : 1.09 : 1.00 : 3.52
dTHG-2	33260	-58.2°	19.2	1.00 : 1.12 : 1.02 : 3.61
dTHG-3	25380	-59.5°	13.5	1.00 : 1.03 : 0.98 : 3.45
dTHG-4	19650	-57.3°	9.64	1.00 : 1.06 : 1.01 : 3.50
dTHG-5	17150	-55.7°	8.07	1.00 : 1.15 : 0.97 : 3.42
dTHG-6	13950	-53.7°	6.17	1.00 : 1.03 : 0.96 : 3.53
dTHG-7	11580	-58.4°	4.84	1.00 : 1.08 : 1.00 : 3.48
dTHG-8	10260	-55.9°	4.12	1.00 : 1.04 : 0.99 : 3.56
dTHG-9	8549	-59.0°	3.25	1.00 : 1.06 : 0.97 : 3.55
dTHG-10	6725	-56.9°	2.37	1.00 : 1.01 : 0.95 : 3.43
SJG	68740	-64.2°	54.6	1.00 : 1.05 : 1.02 : 4.12
dSJG-1	14930	-63.5°	16.9	1.00 : 0.98 : 0.95 : 4.09
dSJG-2	9300	-60.3°	8.5	1.00 : 0.95 : 0.93 : 3.93
HLG	51500	-48.9°	36.5	1.00 : 0.97 : 0.89 : 2.01
dHLG-1	13320	-47.3°	5.70	1.00 : 0.97 : 0.85 : 1.98
dHLG-2	9790	-47.6°	4.24	1.00 : 0.95 : 0.84 : 1.96

从表 2 的结果可见, dTHG、dSJG、dHLG 及其原型多糖 THG、SJG、HLG 中 GalNAc: GlcUA: Fuc 的摩尔比均接近 1 : 1 : 1, 而硫酸酯基含量则有所不同, 其中 SJG/dSJG 含量较高, HLG/dHLG 含量较低; 此外, 三种来源的 FGAG 的旋光度范围和特性黏度也有较大差异。

- 5 对于 THG/dTHG 而言, 其单糖组成比例在同批次海参原料制备的产物中变化较小, 而不同批次原料制备的 THG 和/或 dTHG 产物中, 上述单糖比例的变化范围有所增宽, 总体上, 其 GalNAc: GlcUA: Fuc: $-\text{OSO}_3^-$ 摩尔比通常仍处于 1: (1 ± 0.3): (1 ± 0.3): (3.5 ± 0.5) 范围内。

- 10 上述结果还可见, 在过渡金属离子催化的过氧化物解聚法所得产物中, 岩藻糖与硫酸根含量比例变化较小, 并且经 ^1H - ^1H COSY 检测分析可知其产物的还原性末端主要为 GalNAc, 这与本申请人的前述发明专利申请 CN200910110114.0 中的结果基本一致。

实施例 2 THG/dTHG 波谱分析

检测样品: THG, dTHG-6, dTHG-9, 来源同实施例 1。

- 15 参比样品: SJG, SJG-1, 来源同实施例 1。

检测谱图: ^1H NMR; ^1H - ^1H COSY; ^1H - ^1H TOCSY; ^1H - ^1H NOESY; ^{13}C -NMR; DEPT-135°; ^1H - ^{13}C HSQC; ^1H - ^{13}C HMBC。

检测条件: 溶剂, D_2O , 99.9Atom%D (Norell 公司); 内标, trimethylsilyl-propionic acid (TSP-d4); 温度, 45°C。

- 20 仪器, AVANCE AV 400 超导核磁共振谱仪 (瑞士 Bruker 公司 400 MHz)。
谱图: 见图 1 ~ 图 4。

结果分析:

(1) THG 与 dTHG 的谱图比较:

图 1 显示 THG、dTHG-6、dTHG-9 的 ^1H NMR 谱图, 其中 dTHG-6、dTHG-9 谱图中的水峰被压制。从图 1 可见, THG、dTHG-6 和 dTHG-9 三者信号特征基本一致, 仅分子量较低时, 信号更为清晰, 可见 THG 解聚前后的 NMR 信号特征保持稳定, 表明除聚合度降低外, THG 解聚前后的基本化学结构未发生显著变化。

(2) THG、SJG 谱图比较:

参见图 2~图 4, 图 2 显示 dTHG (A) 与 dSJG (B) 的 ^1H - ^1H COSY 谱图; 其中箭头指示的信号显示两种低聚 FGAG 产物侧链岩藻糖结构类型的差异: A 图为 dTHG 含有的岩藻糖-3-硫酸酯相关信号, B 图为 dSJG 含有的岩藻糖-3,4-二硫酸酯相关信号; 方框内信号分别为岩藻糖-3-硫酸酯和岩藻糖-3,4-二硫酸酯的相关氢信号; 双圈内信号为岩藻糖-3,4-二硫酸酯的 4 位氢信号。图 3 显示 THG 与 SJG 的 ^{13}C NMR 和 DEPT 谱图。图 4 显示 dTHG-6 的 NMR 同核/异核相关谱图。

综合图谱数据可见, THG 和 SJG 的主链结构基本近似, 两者的显著差别在于: 如图 2 所示, dSJG 的 3,4-二硫酸岩藻糖的强信号在 THG 谱图中很微弱或者不存在; 而后者归属为 3-硫酸岩藻糖的信号在 SJG 谱图中未出现, 说明两者在侧链取代基类型方面存在显著差异。

参见图 3, 其中 6-位有和无硫酸酯基取代的 GalNAc 的碳信号分别出现在约 70ppm 和约 64ppm 位置, 因 GalNAc 的 6-位碳属于仲碳, 其在 DEPT135° 谱图中的信号峰为倒峰。从图 3 可知, THG 主链中仍有少量 (低于约 10%) 6 位羟基未被硫酸酯基取代的 GalNAc, 而 SJG 主链中基本不存在 6 位无硫酸酯基取代的 GalNAc。这进一步证明了 THG 和 SJG 的侧链取代基类型存在差异。

此外, 从现有文献资料可知, 本发明的 THG 与其他已知的海参 FGAG 的侧链取代基也存在差异, 例如资料 (Paulo AS et al., *J. Biol. Chem.* 1996, 271: 23973; Lubor Borsig et al., *J. Biol. Chem.* 2007, 282, 14984) 及其所附 ^{13}C NMR 图谱显示, *L. grisea* 来源的 FGAG 中约 35% 的 GalNAc 没有 6-位硫酸酯基取代; 资料 (樊绘曾等, *药学学报*, 1983, 18 (3): 203) 显示, 玉足海参 FGAG 主链 GalNAc 仅存在 6-位硫酸酯化而无 4-位硫酸酯化。

综上所述, 本发明的 THG 存在有异于已知结构的其他种属来源的 FGAG 的化学结构, 其首先表现在侧链岩藻糖取代基结构类型的不同, 即主要含有岩藻糖-2,4-二硫酸酯基、-3-硫酸酯和 -4-硫酸酯基, 而不含或少含岩藻糖-3,4-二硫酸酯; 其主链结构与其他种属来源的 FGAG 也有不同程度的差别。

(3) dTHG-6 NMR 谱图数据归属: 谱图归属见表 3, 几种相关谱图见图 4。

表 3. THG-6 $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -NMR 谱图数据及归属

位置归属		¹ H NMR	谱图显示的相关氢			¹³ C NMR	DEPT	谱图显示的相关氢	
		δ [ppm]	COSY	TOCSY	NOESY	δ [ppm]	90/135°	HMQC	HMBC
GalNAc 4S6S (A)	1	4.45	2 [#]	2 [#] , 3 [#]	3 [#] , 4 [#] , 5 [#] , U3 [#]	102.5	CH	1 [#]	2 [#] , 3 [#] , U-4 [#]
	2	4.04	1 [#] , 3 [#]	1 [#] , 3 [#] , 4 [#]	--	54.1	CH	2 [#]	1 [#] , 3 [#]
	3	3.93	2 [#] , 4 [#]	2 [#] , 4 [#]	1 [#] , 4 [#] , 5 [#]	78.2	CH	3 [#]	1 [#] , 2 [#] , 4 [#] , 5 [#]
	4	4.82	3 [#] , 5 [#]	3 [#] , 5 [#]	1 [#] , 3 [#] , 5 [#] , 6 [#] , 6 [#]	79.4	CH	4 [#]	3 [#] , 4 [#] , 6 [#]
	5	3.97	4 [#] , 6 [#] , 6 [#]	4 [#] , 6 [#] , 6 [#]	4 [#] , 5 [#] , 6 [#] , 6 [#]	74.6	CH	5 [#]	
	6	4.23	5 [#] , 6 [#]	5 [#] , 6 [#]	3 [#] , 4 [#] , 5 [#] , 6 [#]	69.3	CH ₂	6 [#] 6 [#]	5 [#] , 6 [#]
	6'	4.11	5 [#] , 6 [#]	5 [#] , 6 [#]	3 [#] , 4 [#] , 5 [#] , 6 [#]				
	7	/	/	/	/	177.7	C	/	2 [#] , 8 [#]
	8	2.01	/	/	1 [#] , 3 [#] , 4 [#] , 5 [#]	25.4	CH ₃	8 [#]	8 [#]
GalNAc 4S (A')	1	4.51	2 [#]	2 [#] , 3 [#]	[3 [#] , 4 [#]], 5 [#]	102.5	CH	1 [#]	
	2	3.91	1 [#] , 3 [#]	1 [#] , 3 [#] , [4 [#]]	/	55.3	CH	2 [#] , 3 [#]	
	3	3.80	2 [#] , 4 [#]	[2 [#] , 4 [#]]	[---]	78.2	CH	3 [#]	
	4	4.76	3 [#] , 5 [#]	[3 [#] , 5 [#]]	[---]	80.4	CH	4 [#]	
	5	3.73	4 [#] , 6 [#] , 6 [#]	4 [#] , [6 [#] , 6 [#]]	[4 [#] , 5 [#] , 6 [#] , 6 [#]]	74.6	CH	5 [#]	4 [#] , 6 [#]
	6	3.62	5 [#] , 6 [#]	[5 [#] , 6 [#]]	[3 [#] , 4 [#] , 5 [#] , 6 [#]]	64.1	CH ₂	6 [#] 6 [#]	
	6'	3.69	5 [#] , 6 [#]	[5 [#] , 6 [#]]	[3 [#] , 4 [#] , 5 [#] , 6 [#]]				
	7	/	/	/	/	177.7	C	/	2 [#] , 8 [#]
	8	1.98	/	/	[1 [#] , 3 [#] , 4 [#] , 5 [#]]	25.4	CH ₃	8 [#]	8 [#]
GlcUA (U)	1	4.42	2 [#]	2 [#] , 3 [#] , 4 [#] , 5 [#]	3 [#] , 5 [#]	106.6	CH	1 [#]	2 [#] , 3 [#] , A-3 [#]
	2	3.57	1 [#] , 3 [#]	1 [#] , 3 [#] , 4 [#] , 5 [#]	4 [#]	74.7	CH	2 [#]	3 [#]
	3	3.71	2 [#] , 4 [#]	1 [#] , 2 [#] , 4 [#] , 5 [#]	1 [#] , 5 [#]	79.9	CH	3 [#]	2 [#] , 4 [#]
	4	3.90	3 [#] , 5 [#]	1 [#] , 2 [#] , 3 [#] , 5 [#]	2 [#]	79.1	CH ₃	4 [#]	5 [#]
	5	3.66	4 [#]	1 [#] , 2 [#] , 3 [#] , 4 [#]	3 [#] , 1 [#]	79.6	CH	5 [#]	4 [#]
	6	/	/	/	/	177.7	C	/	4 [#] , 5 [#]
Fuc-2S4 S (I)	1	5.64	2 [#]	2 [#] , 3 [#]	2 [#] , U3 [#]	99.2	CH	1 [#]	U-3 [#]
	2	4.45	1 [#] , 3 [#]	1 [#] , 3 [#] , 4 [#]	1 [#]	76.5	CH	2 [#]	1 [#] , 3 [#] , 4 [#]
	3	4.09	2 [#] , 4 [#]	1 [#] , 2 [#] , 4 [#]	4 [#] , 5 [#] , 6 [#]	69.3	CH	3 [#]	1 [#] ,
	4	4.84	3 [#] , 5 [#]	3 [#] , 5 [#]	3 [#] , 5 [#] , 6 [#]	83.8	CH	4 [#]	5 [#] , 6 [#]
	5	4.90	4 [#] , 6 [#]	4 [#] , 6 [#]	3 [#] , 4 [#] , 6 [#]	69.0	CH	5 [#]	4 [#]

	6	1.31	5 [#]	4 [#] ,5 [#]	3 [#] ,4 [#] ,5 [#]	18.6	CH ₃	6 [#]	5 [#] ,6 [#]
Fuc-3S (II)	1	5.36	2 [#]	2 [#] ,3 [#]	2 [#] ,U3 [#]	101.3	CH	1 [#]	2 [#]
	2	4.13	1 [#] ,3 [#]	1 [#] ,3 [#] ,4 [#]	1 [#]	73.3	CH	2 [#]	
	3	4.60	2 [#] ,4 [#]	1 [#] ,2 [#] ,4 [#]	4 [#] ,5 [#] ,6 [#]	83.8	CH	3 [#]	4 [#]
	4	4.18	3 [#] ,5 [#]	3 [#] ,5 [#]	3 [#] ,5 [#] ,6 [#]	71.9	CH	4 [#]	3 [#]
	5	4.47	4 [#] ,6 [#]	4 [#] ,6 [#]	3 [#] ,4 [#] ,6 [#]	69.7	CH	5 [#]	3 [#] ,4 [#]
	6	1.31	5 [#]	4 [#] ,5 [#]	3 [#] ,4 [#] ,5 [#]	18.6	CH ₃	6 [#]	6 [#]
Fuc-4S (III)	1	5.28	2 [#]	2 [#] ,3 [#]	2 [#] ,U3 [#]	101.2	CH	1 [#]	
	2	3.80	1 [#] ,3 [#]	1 [#] ,3 [#]	1 [#]	71.1	CH	2 [#]	1 [#] ,2 [#]
	3	3.99	2 [#] ,4 [#]	1 [#] ,2 [#] ,4 [#]	4 [#] ,5 [#] ,6 [#]	71.2	CH	3 [#]	4 [#] ,5 [#]
	4	4.78	3 [#] ,5 [#]	3 [#] ,5 [#]	3 [#] ,5 [#] ,6 [#]	83.8	CH	4 [#]	5 [#] ,6 [#]
	5	4.80	4 [#] ,6 [#]	4 [#] ,6 [#]	3 [#] ,4 [#] ,6 [#]	69.0	CH	5 [#]	4 [#]
	6	1.31	5 [#]	5 [#]	3 [#] ,4 [#] ,5 [#]	18.0	CH ₃	6 [#]	5 [#] ,6 [#]

上表中: GalNAc4S6S 表示 4,6-二硫酸-N-乙酰氨基半乳糖基; GalNAc4S 表示 4-硫酸-N-乙酰氨基半乳糖基; Fuc-2S4S 表示 2,4-二硫酸岩藻糖基; Fuc-3S 表示 3-硫酸岩藻糖基; Fuc-4S 表示 4-硫酸岩藻糖基; Fuc-0S 表示无硫酸酯基的岩藻糖基。括号[]表示其中的数据因信号过度重叠而难以确认。

5 实施例3 THG/dTHG 生物学活性检测

3.1 血小板诱导活性检测

样品: dTHG-1 ~ dTHG-10, 来源同实施例 1

参比样品: dSJG-1 ~ dSJG-4, 来源同实施例 1

方法: 新西兰白兔, 腹主动脉取血, 3.8%枸橼酸钠抗凝 (1:9), 200×g 离心 8min 得富血小板血浆 (PRP), 1500×g 离心 10min 得贫血小板血浆。PRP 血小板计数约 $4.0 \times 10^5/\text{mm}^3$ 。Bron 法 (Born GVR. *Nature*, 1962, 194:927) 血小板聚集仪检测样品对血小板聚集的影响。试验以生理盐水作空白对照, 样品终浓度为 200 μg/ml, 重复试验三次, 计算血小板最大聚集率均值。

结果: 见表 4。

15 表 4. 不同 FGAG 诱导血小板聚集活性比较

样品	NS	THG	dTHG-1	dTHG-2	dTHG-3	dTHG-4
血小板聚集率	2.7 ± 4.1	28.1 ± 7.8	16.3 ± 5.6	12.8 ± 4.9	9.3 ± 4.8	3.9 ± 2.8
样品	dTHG-5	dTHG-6	dTHG-7	dTHG-8	dTHG-9	dTHG-10
血小板聚集率	1.9 ± 2.9	1.1 ± 1.3	2.9 ± 3.3	2.4 ± 3.3	1.2 ± 2.5	3.4 ± 4.3
样品	SJG	dSJG-1	dSJG-2	SJG	dHLG-1	dHLG-2
血小板聚集率	58.4 ± 13.6	22.7 ± 8.5	5.3 ± 5.5	53.6 ± 17.4	18.3 ± 8.6	4.6 ± 5.4

通过比较上述凤梨参、刺参、玉足海参来源的 FGAG 及其不同程度的解聚产物的血小板诱导活性, 可以发现, 对于原型 FGAG 而言, THG 诱导血小板聚集的活性远低于 SJG 和 HLG, 说明不同种属来源的 FGAG 结构差异对其

血小板活性具有显著影响。鉴于 THG 与 SJG、HLG 的结构差异主要表现在侧链硫酸化岩藻糖基的类型不同,由此推测其血小板活性差异应归因于岩藻糖侧链的不同,THG 的侧链岩藻糖基类型/特征有效削弱了其血小板凝聚的活性。从分子量方面看,THG 重均分子量低至约 20000 Da 时,dTHG 的血小板诱导活性业已消失,而 SJG、HLG 分子量需要在其分子量低至约 9,000~12,000 Da 时,方可避免高浓度下的血小板激活效应,此与文献(樊绘曾等,生物化学杂志,1993,9(2):146)结果基本一致,这表明 dTHG 比原型 THG 具有更好的应用价值。

3.2 抗凝血活性体外检测

样品: dTHG-1~dTHG-10, 来源同实施例 1

参比样品: dSJG-1~dSJG-4, 来源同实施例 1

低分子肝素钠(LMWH): 3500~5500 Da, 0.4 ml×4000AxaIU, Anofi-Aventis(法国)。

试剂: 凝血酶(IIa): 123 NIH U/mg, sigma 公司(美国)。

凝血酶检测生色底物(S): 25 mg/vial, HYPHEN BioMed(法国)。

肝素辅因子 II(HC-II): 100 µg/vial, HYPHEN BioMed(法国)。

因子 VIII(f.VIII): 200 IU/支, 绿十字(中国)生物制品有限公司。

f.VIII 检测试剂盒: 试剂包括 *Reagents*: R1: Human Factor X; R2: Activation Reagent, human Factor IXa, containing human thrombin, calcium and synthetic phospholipids; R3: Sxa-11, Chromogenic substrate, specific for Factor Xa; R4: Tris-BSA Buffer; HYPHEN BioMed(法国)。

兔贫血小板血浆, 广州蕊特生物科技有限公司。

APTT 测定试剂盒(鞣花酸), 上海太阳生物技术有限公司。

仪器: 酶标仪, Bio-Rad 680(美国); BICO-双信道血凝仪, Minivolt 公司(意大利)。

方法:

(1) 抑制内源性因子 X 酶(f.Xase, Tenase)活性检测: 采用 f.VIII 检测试剂盒结合 f.VIII 试剂建立的检测方法。系列浓度的 THG、dTHG、SJG、LMWH 溶液或空白对照溶液(Tris-BSA 缓冲液 R₄) 30µl 与 1.0 IU/ml 因子 VIII(30µl) 混合后, 顺次加入试剂盒试剂 R₁(30µl)、R₂(30µl), 37℃ 孵育 1 min 后, 加 R₃(30µl), 37℃ 孵育 1min, 以 20% 乙酸(60µl) 中止反应并检测 OD_{405nm}。根据空白对照(R₄) 计算 ΔOD, 按文献(Shiehan J. P. & Walke E. K., *Blood*, 2006,107:3876-3882) 中提供的公式计算各样品抑制 f.Xase 的 IC₅₀ 值。

(2) HC-II 依赖的抗凝血酶活性检测: 系列浓度的 THG、dTHG、SJG、LMWH 溶液或空白对照溶液(Tris 缓冲液) 50µl 加入 96 孔酶标板后, 加入 50µl

1μmol/L 的 HC-II, 混合, 37℃ 孵育 2min, 然后加入 50μl 5U/ml 的 IIa, 37℃ 孵育 2 min, 加入 50μl 2mmol/L 的 CS-0138, 混合, 37℃ 孵育 1min, 以 50% 乙酸 (100μl) 中止反应并检测 OD_{405nm}。根据空白对照 (R₄) 计算 ΔOD, 按文献 (Sheehan J. P. & Walke E. K., *Blood*, 2006,107:3876-3882) 中提供的公式计算各样品抑制 IIa 的 IC₅₀ 值。

(3) 延长 APTT 时间的活性检测: 系列浓度的 THG、dTHG、SJG、LMWH 溶液或空白对照溶液 (Tris 缓冲液) 10μl 混入 180μl 兔血浆, 然后按试剂盒说明书的方法测各个样品的 APTT 时间, 根据各样品检测结果计算倍增 APTT 时间 (使 APTT 时间延长一倍) 的药物浓度。

结果: 见表 5 和图 5。

表 5. THG/dTHG 以及参比样品的抗凝血活性

样品	分子量 Mw (Da)	IC ₅₀ (μg/ml)		抗 f.Xase-抗 IIa 效价比 ^[1]	倍增 APTT 的药物浓度 (μg/ml)	抗 f.Xase-延长 APTT 效价比 ^[2]
		抗 f.Xase	抗 IIa			
THG	65820	0.275	1.25	4.54	1.77	8.66
dTHG-1	46070	0.270	1.56	5.78	2.05	7.59
dTHG-2	33260	0.268	1.64	6.11	2.50	9.32
dTHG-3	25380	0.266	1.75	6.58	3.28	12.3
dTHG-4	19650	0.253	1.90	7.51	3.59	14.2
dTHG-5	17150	0.245	2.27	9.26	4.08	16.6
dTHG-6	13950	0.216	2.84	13.1	4.56	21.1
dTHG-7	11580	0.282	3.55	12.6	6.29	22.3
dTHG-8	10260	0.463	4.02	8.68	8.82	19.1
dTHG-9	8549	0.714	5.96	8.34	10.6	14.8
dTHG-10	6725	0.864	6.23	2.17	21.9	7.6
SJG-2	9300	0.683	5.35	7.83	9.7	14.2
LMWH	3500~5500	9.22	6.08	0.66	4.48	0.48

^[1] 抗 f.Xase-抗 IIa 效价比: 抗 IIa IC₅₀ (μg/ml) / 抗 f.Xase IC₅₀ (μg/ml)

^[2] 抗 f.Xase-延长 APTT 效价比: 倍增 APTT 的药物浓度 (μg/ml) / 抗 f.Xase IC₅₀ (μg/ml)

文献资料 (GZ. Feuerstein, et al., *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 1999, 19:2554; CJ. Refino, et al., *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 2002, 22:517) 显示, f.IXa 抑制剂可以在基本上不影响血液 APTT 以及出血时间的剂量下显著抑制血栓形成, 并且抗凝药物的出血倾向与其抗凝血酶活性存在相关性。此外, 低分子肝素的临床实践已经证实, 随着抗 Xa/抗 IIa 效价比提高, 其出血倾向得到显著降低 (G. Andriuoli et al. *Heamostasis*, 1985, 15: 324)。基于以上认识以及 dTHG 分子量与其作用于不同凝血因子靶点的效价强度的相关性, 适当解聚的

THG 有可能在消除 FGAG 诱导血小板聚集活性的同时, 可以产生尽可能高的抗 f.Xase 与 HC-II 依赖的抗 IIa 活性的效价比, 和/或尽可能高的抗 f.Xase 与延长 APTT 活性的效价比。

表 5 的结果显示, THG 和/或 dTHG 具有延长 APTT 时间、抑制内源性 f.Xase 以及依赖 HC-II 的抗凝血酶活性, 解聚 THG 可以消除其血小板诱导活性, 但解聚程度对其抗 f.Xase、抗 IIa (依赖 HC-II) 及其延长 APTT 活性的影响不同。

首先, dTHG 的分子量 (M_w) 低至约 20000 Da 时其血小板诱导活性完全消失, 而 M_w 低至约 6000 Da 时仍存在抗凝活性 (延长 APTT 时间)。显然, 该分子量范围内的 dTHG 较可能较原型 THG 具有更好的应用价值。

其次, THG 与 dTHG 均具有强效抑制内源性 f.Xase 的活性。在本发明实施例 3.2 所述系统条件下, 对于重均分子量约 8000 ~ 70000 Da 的 dTHG (或 THG), 其抑制 f.Xase 的 IC_{50} 值一般低于约 0.1 $\mu\text{mol/L}$ (低于约 1 $\mu\text{g/ml}$), 且总体上呈现活性随分子量升高而增强的趋势, 但在不同分子量范围内, 这种趋势具有较大差异。当分子量低于约 12000 Da 时, dTHG 抑制 f.Xase 的活性可随分子量降低而显著减弱; 而当分子量不低于约 12000 Da 时, 其 IC_{50} 值均处于约 0.2 $\mu\text{g/ml}$ ~ 0.3 $\mu\text{g/ml}$ 的范围内, 以摩尔浓度计, 其 IC_{50} 值可随分子量升高而略呈降低趋势; 但以质量浓度计, 其 IC_{50} 值基本不随分子量变化而变化, 或者更准确地说, 是随分子量升高反而略有升高。总体上, 对于 dTHG (或 THG) f.Xase 而言, 当分子量不低于约 10000 Da 时, 其抑制内源性因子 X 酶的活性可在一定程度上保持相对恒定。

表 5 的结果还显示, THG/dTHG 具有 HC-II 抗凝血酶活性以及其延长 APTT 时间的活性。对于重均分子量为约 8000 ~ 70000 Da 的 dTHG (或 THG), 其依赖 HC-II 抗凝血酶活性以及其延长 APTT 的活性均随分子量升高而增强, 这表现在其依赖 HC-II 抗凝血酶活性的 IC_{50} 值以及其倍增 APTT 时间的药物浓度均随分子量的对数值升高而呈线性降低。

综合本发明上述发现可以判断, 当 dTHG 的重均分子量达到约 10000 Da, 特别是约 12000 Da 以上时, 分子量大小对 dTHG 延长 APTT 和以及依赖 HCII 的抗凝血酶活性的影响远大于对抑制内源性 f.Xase 活性的影响。为方便叙述, 表 5 定义了“抗 f.Xase-抗 IIa 效价比”和“抗 f.Xase-延长 APTT 效价比”以体现不同分子量 THG/dTHG 抗凝血活性特点。总体上, 对于重均分子量不低于 10000 Da 的 dTHG 而言, 分子量越低, 其抑制 f.Xase 活性与其依赖 HC-II 抗凝血酶活性或延长 APTT 时间活性的效价比越高。当分子量更低时 (低于约 10000 Da), 该效价比则可呈现降低趋势。

表 5 的结果还表明, LMWH 具有相对较弱的抗 f.Xase 活性, 而对于 dSJG 而言, 血小板诱导活性限制了活性较强和/或“效价比”较高的产物的应用。

本发明以 (1) 消除血小板诱导活性、(2) 获得尽可能高的抗 Xase/抗 IIa 效价比、和/或 (3) 获得尽可能高的抗 Xase/延长 APTT 效价比为依据, 综合衡量 dTHG 分子量与其抑制 f.Xase 活性、依赖 HC-II 的抗凝血酶活性、延长 APTT 时间活性以及血小板影响活性的关系, 本发明选择的 dTHG 重均分子量 (Mw) 范围可以为约 8000 ~ 20000 Da, 优选的分子量范围为约 10000 ~ 18000 Da, 更优选的分子量范围为约 12000 ~ 16000 Da。

3.3 dTHG 抗在体静脉血栓形成

样品: dTHG-6, 来源见实施例 1; 低分子肝素钠 (LMWH): 3500 ~ 5500 Da, 0.4 ml × 4000AxaIU, Anofi -Aventis

方法:

(1) 兔静脉血栓形成: 雄性新西兰白兔, 戊巴比妥 (30 mg/kg iv) 麻醉, 分离左右双侧颈静脉, 分别于 2 cm 区段放置两个结扎缝线, 静脉注射重组人组织因子 1ng/kg, 5min 后结扎静脉近心端和远心端, 15min 后纵向切开血管取出血栓, 滤纸洗干残血, 称量血栓湿重。受试药物 (dTHG-6、LMWH) 及对照溶剂 (生理盐水, NS) 均于静脉结扎前 2 小时皮下注射给药。

(2) 出血时间检测: SD 大鼠, 戊巴比妥 (30 mg/kg ip) 麻醉, 静脉注射 dTHG-6 或 LMWH 15 sec 后断尾 (距尾端 5mm), 每隔 15 sec 以滤纸小心吸取断尾处出血印迹。连续 1min 不出现出血印迹时即判断为已经止血。

结果:

(1) 兔静脉血栓形成: 在结扎和高粘血状态下的静脉血栓模型中, 皮下注射 dTHG-6 4.5、9、18mg/kg 可以显著抑制血栓形成, 抑制率范围为约 35% 至约 70%, 其抑制活性呈现明显的量效关系 (表 6)。本试验中, LMWH 720 IU/kg 对静脉血栓形成的抑制率约 56%。

表 6. THG 对颈静脉血栓形成的影响

组别	n	血栓重量 (mg)	抑制率 (%)
模型组	10	152.8 ± 13.6	--
THG 4.5 mg/kg	10	98.3 ± 25.6 *	35.7
9 mg/kg	10	56.4 ± 20.6 *	63.1
18 mg/kg	10	45.7 ± 26.8 *	70.1
LMWH 720 IU/kg	10	67.3 ± 21.2 *	56.0

与模型组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

(2) 出血时间检测: 皮下注射 dTHG-6 或 LMWH 对大鼠出血时间的影响检测结果见图 6。试验结果表明, 相对于 LMWH, 在近似的抗凝抗血栓药效剂量下, dTHG-6 对出血时间的影响更低。

权利要求书

- 1、一种低聚凤梨参糖胺聚糖及其药学上可接受的盐，其特征在于，所述低聚凤梨参糖胺聚糖是来源于凤梨参 (*Thelenota ananas*) 的岩藻糖化糖胺聚糖的解聚产物，其重均分子量为 8000 ~ 20000 Da，其单糖组成包括 N-乙酰氨基半乳糖、葡萄糖醛酸、岩藻糖以及它们的硫酸酯，以摩尔比计，N-乙酰氨基半乳糖：葡萄糖醛酸：岩藻糖：以 $-OSO_3^-$ 表示的硫酸酯基的比例为 $1:(1\pm0.3):(1\pm0.3):(3.5\pm0.5)$ 。
- 2、如权利要求 1 所述的低聚凤梨参糖胺聚糖及其药学上可接受的盐，其特征在于，所述单糖组成中，其岩藻糖硫酸酯基包括 3-硫酸-岩藻糖基。
- 3、如权利要求 1 所述的低聚凤梨参糖胺聚糖及其药学上可接受的盐，其特征在于，所述低聚凤梨参糖胺聚糖的重均分子量为 10000 ~ 18000 Da。
- 4、一种制备权利要求 1 所述低聚凤梨参糖胺聚糖及其药学上可接受的盐的方法，其中所述低聚凤梨参糖胺聚糖的制备包括步骤：
- 1) 从凤梨参体壁提取获得岩藻糖化糖胺聚糖；
 - 2) 利用过氧化物解聚步骤 1) 所得的岩藻糖化糖胺聚糖，以获得低聚岩藻糖化糖胺聚糖；
 - 3) 收集和纯化所需分子量范围的低聚岩藻糖化糖胺聚糖。
- 5、如权利要求 4 所述的方法，其特征在于，在催化剂存在下，于水相介质中催化过氧化物解聚凤梨参岩藻糖化糖胺聚糖获得低聚岩藻糖化糖胺聚糖，所述催化剂为含有选自元素周期表第四周期过渡金属离子的催化剂。
- 6、如权利要求 5 所述的方法，其中所述含选自元素周期表第四周期过渡金属离子的催化剂为 Cu^+ 、 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Cr^{3+} 、 $Cr_2O_7^{2-}$ 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ni^{2+} 形成的无机盐或有机盐，或其组合。
- 7、一种药物组合物，含有权利要求 1 至 3 任一项所述的低聚凤梨参糖胺聚糖或其药学上可接受的盐，以及药学上可接受的赋形剂。
- 8、如权利要求 7 所述的药物组合物，其特征在于，所述药学上可接受的盐为钠盐、钾盐或钙盐。
- 9、如权利要求 7 或 8 所述的药物组合物，其特征在于，所述药物组合物制备成注射用冻干粉针剂。
- 10、如权利要求 7 或 8 所述的药物组合物在用于制备预防和/或治疗抗血栓药物中的应用。

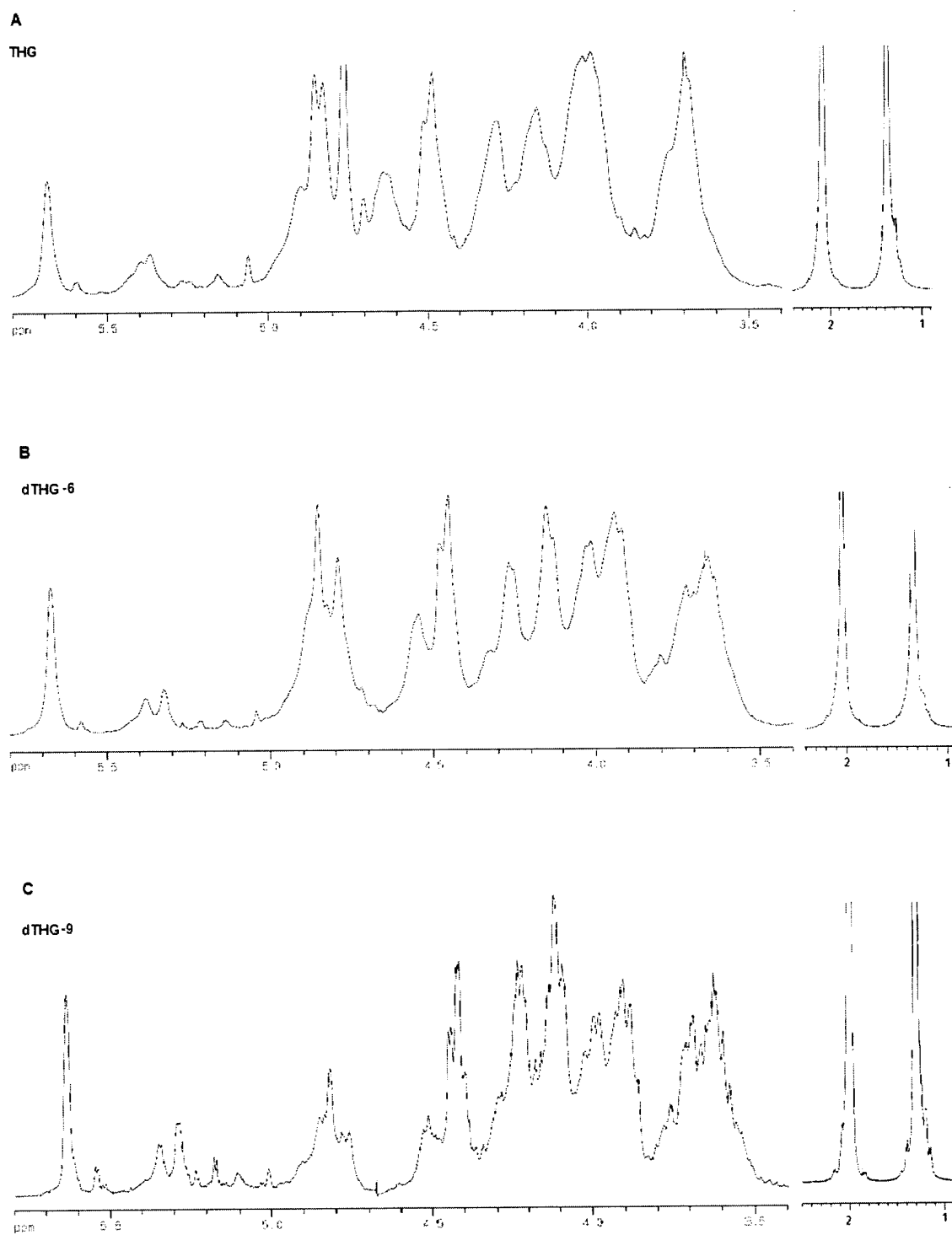


图 1

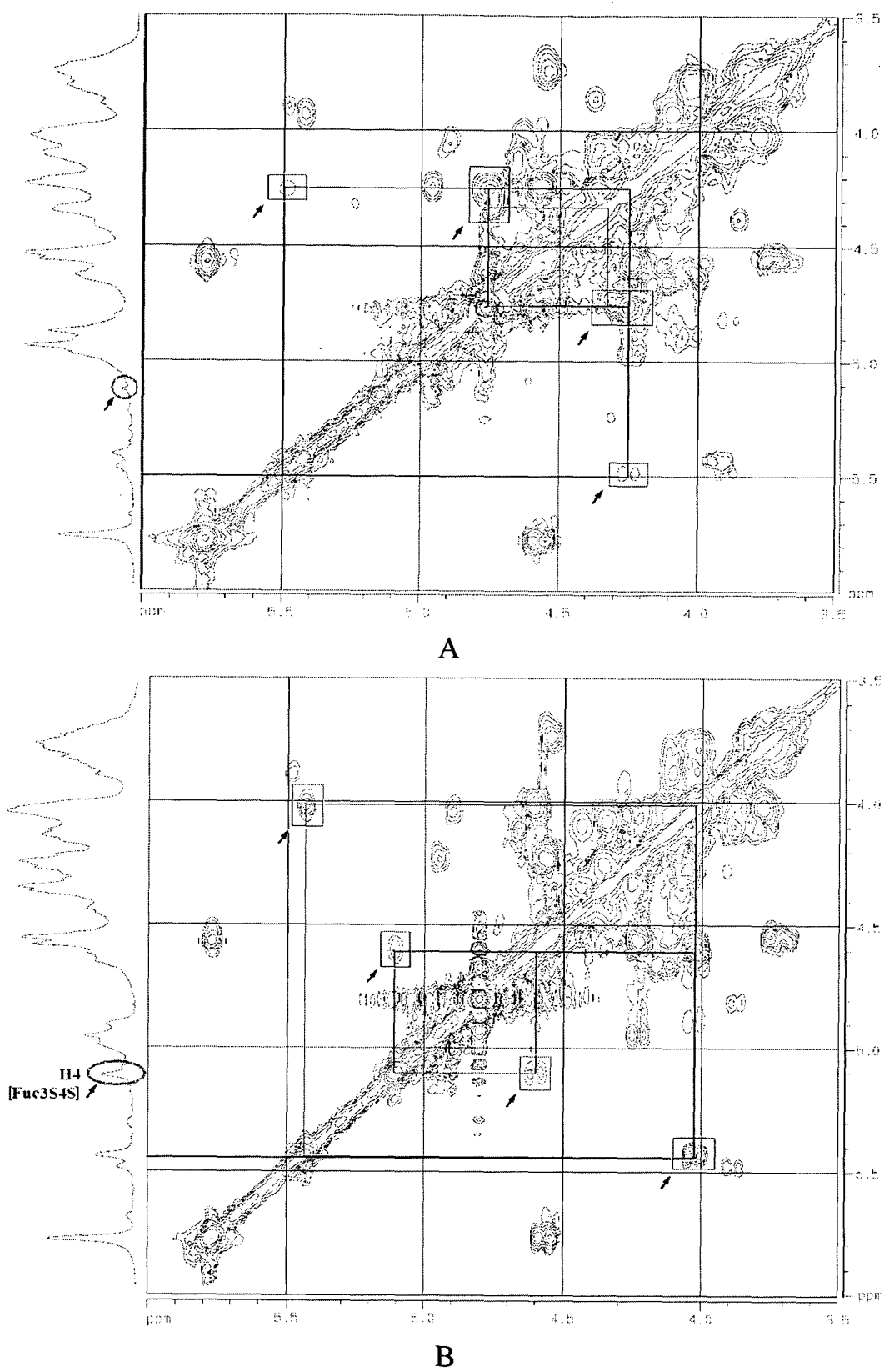


图 2

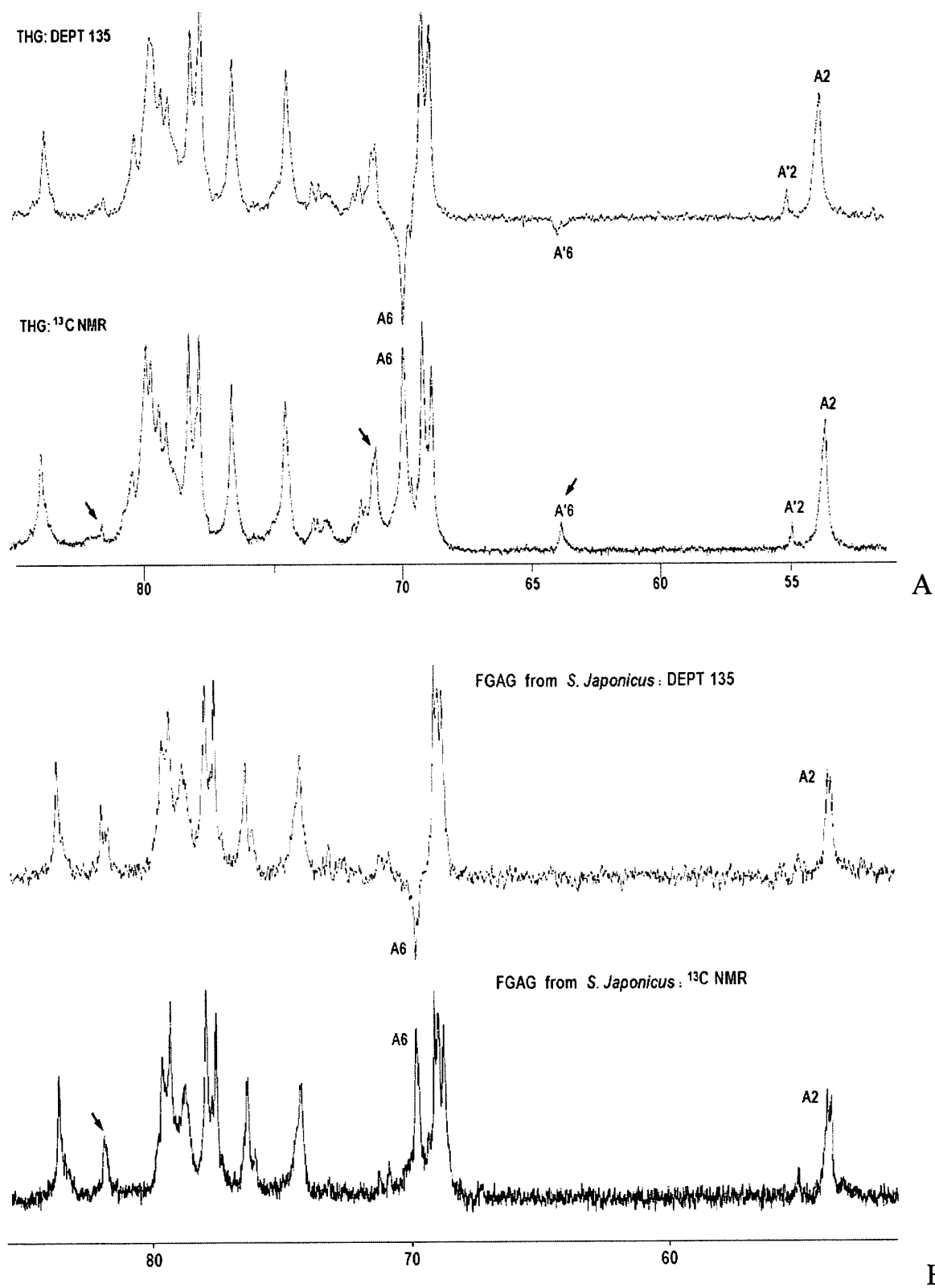


图 3

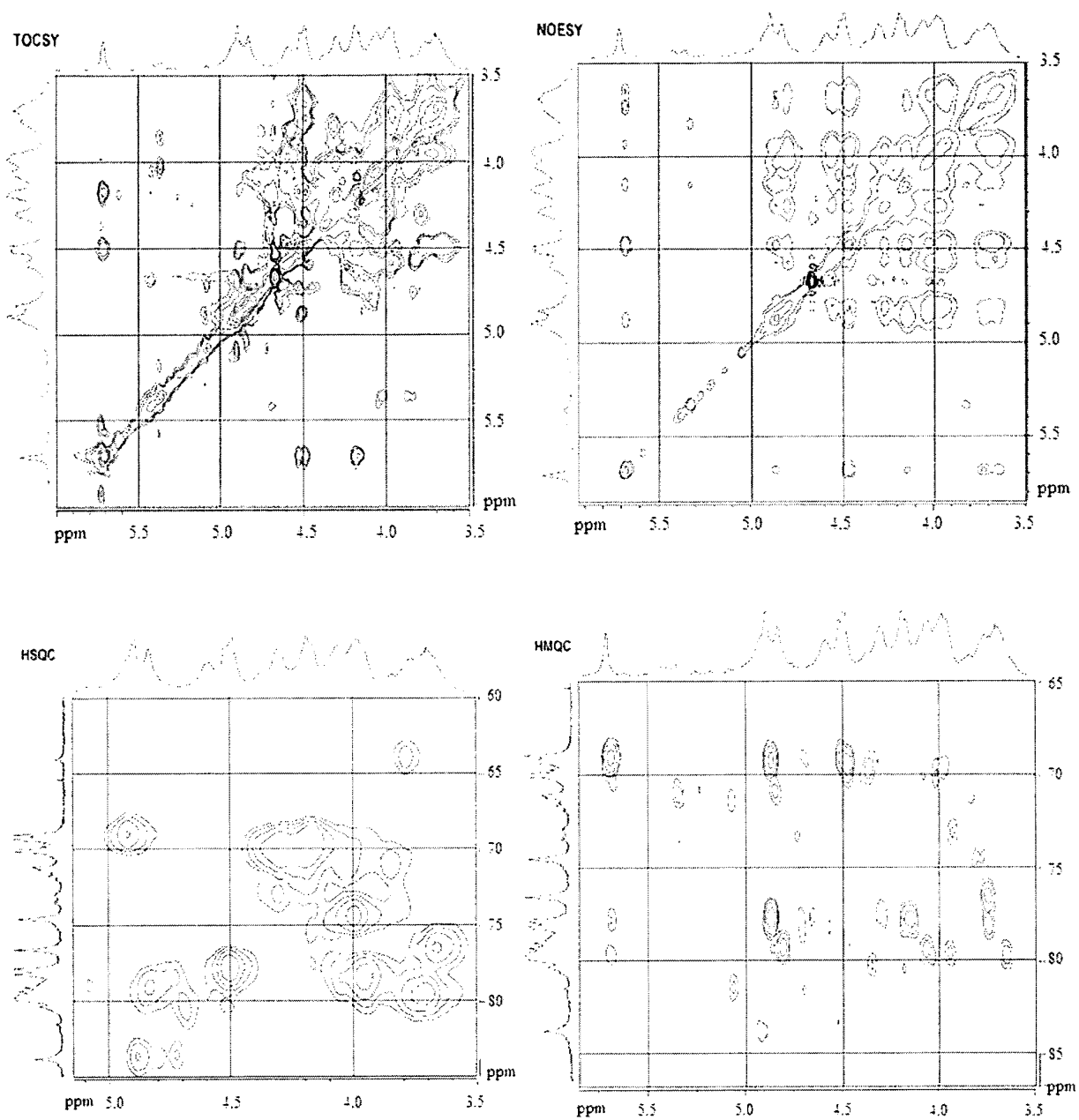


图 4

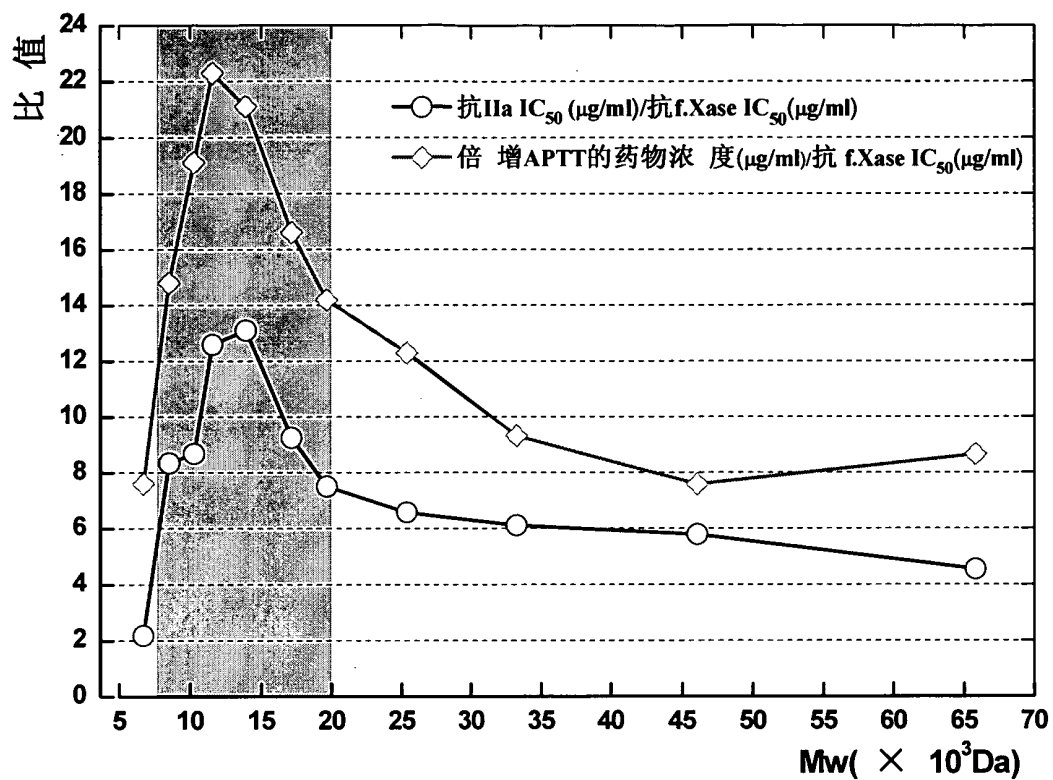


图 5

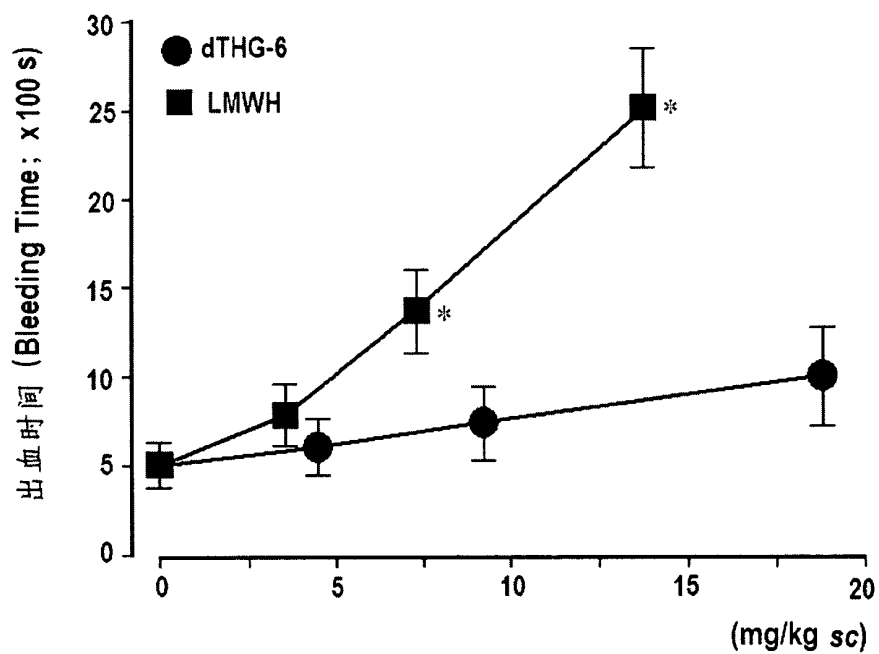


图 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2010/001678

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: C08B37/08; A61K31/737; A61P7/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, EPODOC, CNPAT, CNKI: GLYCOSAMINOGLYCAN, (GLYCOSAMINO W GLYCAN), MUCOPOLYSACCHARIDE?, CHONDROITIN FUCOSYLATED, (FUCOSE W BRANCH), (FUCOSE W CONTAINING), OLIGOMER+, DEPOLYMERIZ+, (SEA W PUMPKIN), (SEA W CUCUMBER), HOLOTHURIAN, TREPANG, THELENOTA W ANANAS, ACETYLGALACTOSAMINE, GALNAC, FUCOSE, FUC, (GLUCURONIC W ACID), GLCUA, SULFATE, POLYSACCHARIDE?, POLYOSE?, POLYSACCHAROSE?

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN101724086A(SHENZHEN NEPTUNUS PHARM CO LTD),09 Jun.2010(09.06.2010), claims 1-10	1-10
A	CN101057859A(ZHANG D),24 Oct.2007(24.10.2007),claims 1-14	1-10
A	CN101451157A(DALIAN HAIYANTANG BIOLOGICAL CO LTD),10 Jun.2009(10.06.2009) Claim 1	1-10
A	US2004087543A1(MOMENTA PHARM INC ET AL.),06 May 2004(06.05.2004),examples 1-10	1-10
A	CN1651470A(SYNTEX SA),10 Aug.2005(10.08.2005),claims 1-15	1-10
A	JP2007008899A(TAKARA BIO KK ET AL.),18 Jan.2007(18.01.2007),claims 1-9,example 1	1-10

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date	“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
“L” document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	“&” document member of the same patent family
“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
21 Jan.2011(21.01.2011)

Date of mailing of the international search report
10 Feb. 2011 (10.02.2011)

Name and mailing address of the ISA/CN
The State Intellectual Property Office, the P.R.China
6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing, China
100088
Facsimile No. 86-10-62019451

Authorized officer
BAI Yu
Telephone No. (86-10)62084467

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2010/001678

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SHENG, Wenjing et al. Chemical Component Analysis of Polysaccharides from Different Sea Cucumbers. Chin J Mar Drugs. February 2007, Vol. 26, No. 1, pages 44-49	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2010/001678

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN101724086A	09.06.2010	NONE	
CN101057859A	24.10.2007	CN100525777C	12.08.2009
CN101451157A	10.06.2009	NONE	
US2004087543A1	06.05.2004	WO03090696A2	06.11.2003
		AU2003225182A1	10.11.2003
		EP1551852A2	13.07.2005
		JP2006501815T	19.01.2006
		AU2003225182B2	26.02.2009
CN1651470A	10.08.2005	EP1561760A2	10.08.2005
		CA2491398A1	04.08.2005
		US2005234015A1	20.10.2005
		EP1561760B1	26.11.2008
		DE602005011189E	08.01.2009
		CN100564397C	02.12.2009
JP2007008899A	18.01.2007	NONE	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2010/001678

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C08B37/08 (2006.01) i

A61K31/737 (2006.01) i

A61P7/02 (2006.01) i

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2010/001678

A. 主题的分类

参见附加页

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC: C08B37/08; A61K31/737; A61P7/02

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNPAT,CNKI:海参,凤梨参,梅花参,聚糖,多糖,催化,铜,铁,锌,金属,离子,过氧化,低聚,低分子量,解聚

WPI,EPODOC: GLYCOSAMINOGLYCAN, (GLYCOSAMINO W GLYCAN), MUCOPOLYSACCHARIDE?, CHONDROITIN FUCOSYLATED, (FUCOSE W BRANCH), (FUCOSE W CONTAINING), OLIGOMER+, DEPOLYMERIZ+, (SEA W PUMPKIN), (SEA W CUCUMBER), HOLOTHURIAN, TREPANG, THELENOTA W ANANAS, ACETYLGALACTOSAMINE, GALNAC,FUCOSE, FUC, (GLUCURONIC W ACID), GLCUA, SULFATE, POLYSACCHARIDE?, POLYOSE?, POLYSACCHAROSE?

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
PX	CN101724086A(深圳海王药业有限公司),09.6 月 2010(09.06.2010),权利要求 1-10	1-10
A	CN101057859A(张登科),24.10 月 2007(24.10.2007),权利要求 1-14	1-10
A	CN101451157A(大连海晏堂生物有限公司),10.6 月 2009(10.06.2009),权利要求 1	1-10
A	US2004087543A1(MOMENTA PHARM INC 等),06.5 月 2004(06.05.2004),实施例 1-10	1-10
A	CN1651470A(SYNTEX SA),10.8 月 2005(10.08.2005),权利要求 1-15	1-10
A	JP2007008899A(TAKARA BIO KK 等),18.1 月 2007(18.01.2007),权利要求 1-9, 实施例 1	1-10

☒ 其余文件在 C 栏的续页中列出。

☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

21.1 月 2011(21.01.2011)

国际检索报告邮寄日期

10.2 月 2011 (10.02.2011)

ISA/CN 的名称和邮寄地址:

中华人民共和国国家知识产权局

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088

传真号: (86-10)62019451

受权官员

白玉

电话号码: (86-10) **62084467**

C(续). 相关文件

类 型	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	盛文静 等, 不同海参多糖的化学组成分析比较, 中国海洋药物杂志, 2 月 2007, 第 26 卷第 1 期, 第 44-49 页	1-10

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2010/001678

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN101724086A	09.06.2010	无	
CN101057859A	24.10.2007	CN100525777C	12.08.2009
CN101451157A	10.06.2009	无	
US2004087543A1	06.05.2004	WO03090696A2	06.11.2003
		AU2003225182A1	10.11.2003
		EP1551852A2	13.07.2005
		JP2006501815T	19.01.2006
		AU2003225182B2	26.02.2009
CN1651470A	10.08.2005	EP1561760A2	10.08.2005
		CA2491398A1	04.08.2005
		US2005234015A1	20.10.2005
		EP1561760B1	26.11.2008
		DE602005011189E	08.01.2009
		CN100564397C	02.12.2009
JP2007008899A	18.01.2007	无	

续:主题的分类

C08B37/08 (2006.01) i

A61K31/737 (2006.01) i

A61P7/02 (2006.01) i