

甘露糖醛二酸的组合物

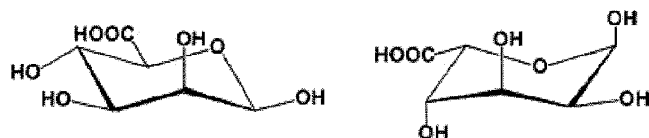
技术领域

本发明涉及通过生物活性筛选的方法得到甘露糖醛二酸的最佳组合物，该方法采用老年痴呆动物模型评价甘露糖醛二酸的不同聚合度及其配比对生物活性的影响。最终筛选到具有最佳生物活性的组合物并通过超滤膜分离的办法制备得到所需的目标物质。

背景技术

甘露糖醛二酸由于其潜在的药用价值已经受到广泛的重视。甘露糖醛二酸通常以海藻酸为原料经过多步骤制得。

在原料海藻酸的多糖分子中，有由甘露糖醛酸（D-mannuronic acid）通过 β -1,4-糖苷键连接形成的 M 段、古罗糖醛酸（L-guluronic acid）通过 α -1,4-糖苷键连接形成的 G 段，以及由这两种糖杂合形成的 MG 段。甘露糖醛酸和古罗糖醛酸的结构式如下（I）式所示：



M: β -D-甘露糖醛酸

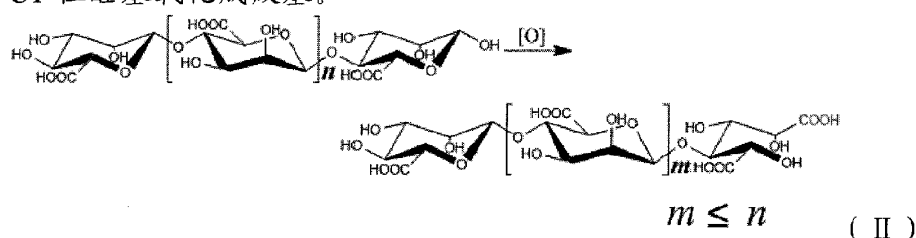
G: α -L-古罗糖醛酸 (I)

M 段和 G 段可以从原料海藻酸中分离。通常的方法可以简单描述为：将海藻酸初步降解后可得到聚甘露糖醛酸和聚古罗糖

醛酸的混合多糖，混合多糖再经酸法沉淀后，可以除去其中的聚古罗糖醛酸，进一步精制可以得到纯度在 90% 以上的均聚甘露糖醛酸（下文中也称“M 段中间体”）。例如，可参见中国专利申请 No.98806637.8 以及 CN02823707.2 所披露的方法。

- 5 制备寡聚甘露糖醛酸的做法如下：将上述得到的 M 段中间体在酸性条件下加热进一步酸解得到所需分子量范围的小片段甘露糖醛酸聚合物。另外，也有通过氧化降解的办法提升降解效率，同时可以将还原末端氧化为开环的糖二酸，详见耿美玉等人的中国专利申请 200580009396.5（专利文献 1）及美国专利 US
10 8835403B2（专利文献 2）。为了方便叙述，专利文献 1 和 2 在下文中统称为在先专利，它们以引证的方式全部并入本文。

在先专利披露的甘露糖醛二酸的反应过程可通过如下反应方程式（II）表示，即寡聚甘露糖醛酸多糖还原端的甘露糖醛酸 C1-位醛基氧化成羧基。



- 15 在上述氧化转化过程中，常用的氧化剂有碱性硫酸铜溶液，即菲林试剂，在先专利即采用了该氧化方法，具体为：在碱性条件下，将反应底物聚甘露糖醛酸即上文的 M 段中间体加入硫酸铜溶液中，在沸水浴中反应 15 分钟至 2 小时。该法是以 Cu^{2+} 离子为氧化剂氧化醛基，反应中产生砖红色的氧化亚铜沉淀，这个
20 反应常用于鉴定还原性糖。

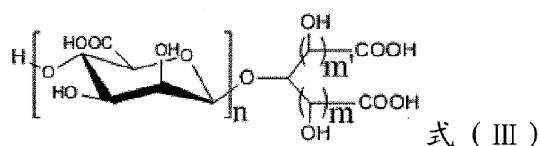
在先专利公开了甘露寡糖二酸具有抗阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 和抗糖尿病的作用。阿尔茨海默病与 II

型糖尿病的发病过程与淀粉样蛋白 (β -amyloid 及 amylin) 密切相关。淀粉样蛋白聚集以后产生蛋白寡聚体, 进一步聚集形成纤维。这些蛋白聚集物有细胞毒性, 在细胞内诱导氧化反应损伤线粒体以及引发炎症反应等联级反应, 造成大量的神经元和 β 细胞损伤, 最终导致阿尔茨海默病与 II 型糖尿病的发生。甘露寡糖二酸靶向淀粉样蛋白并拮抗其诱导的级联反应, 由此具有预防和治疗阿尔茨海默病与 II 型糖尿病的作用。

发明内容

10

本发明的第一个方面涉及一种甘露糖醛二酸寡糖组合, 其包含具有式 (III) 的甘露糖醛二酸或其药学上可接受的盐:



15

其中 n 为选自 1-9 的整数, m 选自 0, 1 或 2, m' 选自 0 或 1, 并且其中,

$n=1-5$ 的甘露糖醛二酸的重量总和占所述组合总重量的 80-95%;

$n=1-3$ 的甘露糖醛二酸的重量总和与 $n=4-7$ 的甘露糖醛二酸重量总和的比例在 1.0-3.5 之间。

20

本发明的另一个方面提供一种药物组合物或保健品, 其包含本发明的甘露糖醛二酸寡糖组合物和必要时适当的载体。

本发明的再一个方面提供一种治疗患有老年性痴呆的患者的方法, 其包括给予有需要的患者有效量的本发明的甘露糖醛二酸寡糖组合物。

本发明的甘露糖醛二酸寡糖组合物使用不同于现有技术的方法制备，制备方法反应简单，有效成分含量高，无反应试剂残留。经实验证明，本发明的甘露糖醛二酸寡糖组合能够抑制细胞损伤，保护神经细胞，并且增加细胞存活率。在动物模型上，本发明的甘露糖醛二酸寡糖组合物可明显改善痴呆模型大鼠的学习和认知功能。本发明的甘露糖醛二酸寡糖组合物具有潜在的预防和治疗阿尔茨海默病的作用。

附图说明

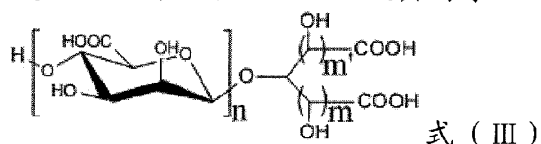
- 10 图 1 是产品 A 中二糖、三糖和四糖的质谱图。
图 2 是产品 A 中五糖、六糖和七糖的质谱图。
图 3 是产品 A 中八糖、九糖和十糖的质谱图。
图 4 表示产品 A 在不同浓度下对 A β 诱导的神经细胞损伤的保护作用。
- 15 图 5 表示单一聚合度的甘露寡糖二酸对 A β 诱导的神经细胞损伤的保护作用。
图 6 表示在 AD 动物模型上评价二糖-十糖的效果。
图 7 表示寡糖组合物及六糖对 AD 动物穿越平台次数的影响。
图 8 表示寡糖组合物及六糖对 AD 动物游泳路程的影响。
- 20 图 9 表示二糖-十糖及组合物 A 在细胞共培养模型上的活性。

具体实施方式

下文将对本发明的各个方面进行具体说明，但本发明并不限于这些具体的实施方式。本领域技术人员可以根据下文公开内容的实质对本发明进行一些修改和调整，这些调整也属于本发明的范围。

甘露糖醛二酸寡糖组合

本发明的第一方面涉及一种甘露糖醛二酸寡糖组合，其包含具有式 (III) 的甘露糖醛二酸或其药学上可接受的盐：



- 5 其中 n 为选自 1-9 的整数, m 选自 0, 1 或 2, m' 选自 0 或 1, 并且其中,

$n=1-5$ 的甘露糖醛二酸的重量总和占所述组合总重量的 80-95%; $n=1-3$ 的低聚甘露糖醛二酸的重量总和与 $n=4-7$ 的低聚甘露糖醛二酸重量总和的比例在 1.0-3.5 之间。

- 10 本发明的甘露糖醛二酸寡糖组合是不同聚合度的甘露糖醛二酸的混合物, 其主要成分是聚合度为 2 至 10 的甘露糖醛二酸寡糖。根据在先申请已知, 在甘露糖醛二酸中, 活性最高的糖为 5-8 糖, 特别是 6 糖。但是, 与已知的现有技术不同, 发明人发现, 在活性最高的 5-8 糖基础上添加活性较低的 2-4 糖, 在稀
- 15 释高活性糖浓度的情况下反而获得了优于 5-8 糖的生物活性。

- 根据一个优选的实施方案, 本发明的甘露糖醛二酸寡糖组合中 $m+m'=1$ 或 2 的甘露糖醛二酸的重量总和不低于所述组合总重量的 50% 以上, 优选 60%-90%, 更优选 70%-90%。特别地, 本发明的甘露糖醛二酸寡糖组合中 $m+m'=1$ 的甘露糖醛二酸的重量总和不低于所述组合总重量的 10%, 优选 30-40%。在另一个
- 20 优选实施方案中, 本发明的甘露糖醛二酸寡糖组合中 $m+m'=2$ 的甘露糖醛二酸的重量总和不低于所述组合总重量的 10%, 优选 30-50%。

- 根据一个优选实施方案, 本发明的甘露糖醛二酸寡糖组合中
- 25 $n=1-5$ 的甘露糖醛二酸寡糖的重量总和占所述组合总重量的

80-95%。

根据一个优选实施方案，本发明的甘露糖醛二酸寡糖组合中 $n=1-3$ 的甘露糖醛二酸寡糖的重量总和与所述组合总重量的 20-70%。

- 5 根据一个优选实施方案，本发明的甘露糖醛二酸寡糖组合中 $n=1-3$ 的甘露糖醛二酸的重量总和与 $n=4-7$ 的甘露糖醛二酸寡糖重量总和的比例在 1.0-3.5 之间，优选在 1.0-3.0 之间。

根据一个优选实施方案，本发明的甘露糖醛二酸寡糖组合中各聚合度甘露糖醛二酸寡糖在所述组合中的重量百分含量为：二糖 5~25%，三糖 15~30%，四糖 15~25%，五糖 10~25%，六糖 5~15%，
10 七糖 3~10%，八糖 2~5%，九糖 1~5%，十糖 1~5%。特别地，组合中寡糖在所述组合中的重量百分含量为：二糖 10~20%，三糖 18~30%，四糖 15~25%，五糖 15~20%，六糖 5~10%，七糖 3~5%，八糖 2~3%，九糖 1~3%，十糖 1~3%。

- 15 本发明的甘露糖醛二酸寡糖组合中，其中所述药学上可接受的盐是钠盐或钾盐。

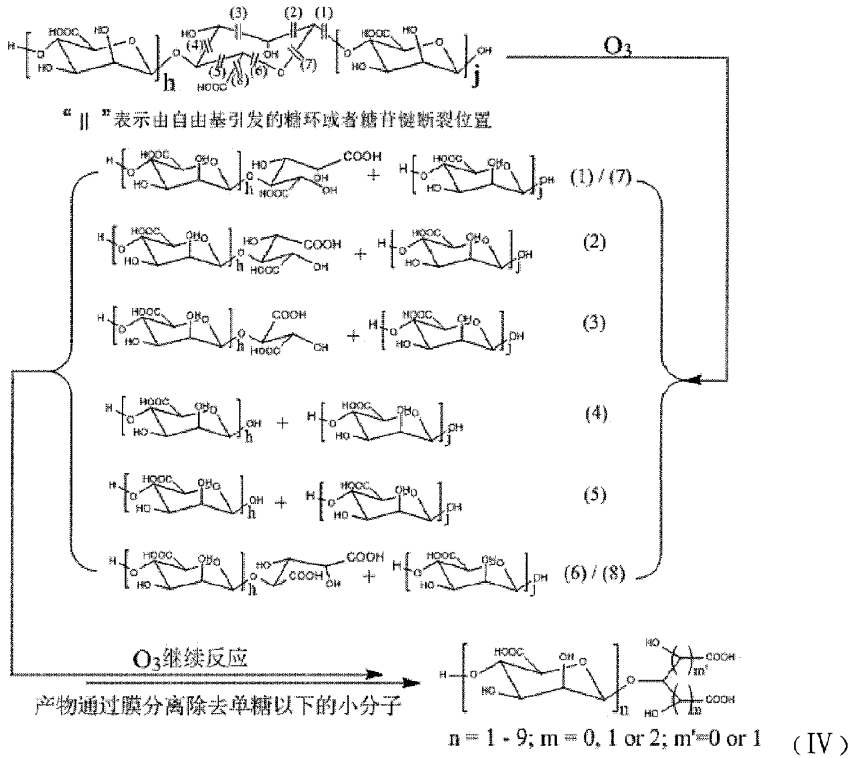
甘露糖醛二酸寡糖组合物的制备方法

- 20 本发明的甘露糖醛二酸的制备过程概括如下：

上文所述的 M 段中间体在氧化剂存在下，糖链发生氧化降解得到不同聚合度的氧化型寡糖，该氧化型寡糖的特征为寡糖还原端的甘露糖醛酸被氧化为 3-6 个碳的糖二酸。

- 25 特别有利于本发明反应的氧化剂为臭氧。反应过程中，将臭氧通入含 M 段中间体的溶液中即可发生糖链的氧化降解反应。氧化降解步骤进行的温度优选为 0-70 °C，更优选 10-45 °C。上述氧化降解步骤进行的 pH 值为 3-13，优选 4-10，更优选 6-8。

本发明中使用臭氧的氧化降解反应与现有技术中使用的碱性硫酸铜(在先专利)或者双氧水和次氯酸钠存在下的酸水解(中国专利申请 01107952.5)氧化降解的相同之处为三种方法均可使得糖链降解, 不同之处在于降解产物的糖链还原末端结构不同, 5 本发明中得到的氧化降解产物甘露糖醛二酸的还原末端包含 3-6 个碳的二酸结构。另外, 本发明的氧化降解步骤所采用的工艺还具有其他方面的优势: 1、反应条件温和, 无需特殊反应条件; 2、所用臭氧可以在反应现场制备, 在工业生产中减少了运输的压力; 3、反应后臭氧自动分解成氧气, 无反应试剂残留的危害, 也不会给环境造成污染。反应过程如下方程式 (IV) 所示:



上述反应方程式 (IV) 和化合物通式 (III) 的示意图中,

$m=2$ 且 $m'=1$ 的寡糖为 6 个碳的糖二酸;

$m=1$ 且 $m'=1$ 或者 ($m=2$ 且 $m'=0$) 的寡糖为 5 个碳的糖二酸;

$m=1$ 且 $m'=0$ 或者 ($m=0$ 且 $m'=1$) 的寡糖为 4 个碳的糖二酸;

5 $m=0$ 且 $m'=0$ 的寡糖为 3 个碳的糖二酸。

上述反应产物经膜分离脱盐, LC-MS 结构验证和寡糖比例测定, 得到产品 A。其中, 寡糖比例是通过分子筛排阻色谱-多角度激光散射仪联用进行测定的。再由 A 通过柱层析分离制备单一聚合度寡糖二糖-十糖。这些单一聚合度的寡糖通过体外和
10 体内的生物学活性比较, 发现这 9 个寡糖中, 以六糖的活性最佳, 这个结果与在先专利的结果类似, 例如在先申请专利文件 1 中所披露的寡糖活性结果。

本专利申请的发明人发现, 当上述 9 个具有新结构的寡糖按照一定的比例进行复配, 可以得到高活性的寡糖组合物, 其活性
15 比活性最好的六糖还要高。高活性寡糖组合物中的各寡糖比例需要按照如下的比例关系进行组合:

组合物中 $n=1-5$ 的甘露糖醛二酸寡糖的重量总和占所述组合总重量的 80-95%, $n=1-3$ 的甘露糖醛二酸寡糖的重量总和所述组合总重量的 20-70%。其中 $n=1-3$ 的甘露糖醛二酸寡糖的重量总和与 $n=4-7$ 的甘露糖醛二酸寡糖重量总和的比例在 1.0-3.5 之间,
20 优选在 1.0-3.0 之间。

本发明提供了一种制备高活性甘露寡糖二酸寡糖组合物的配方。

本发明的甘露糖醛二酸寡糖组合物能够抑制细胞损伤, 保护
25 神经细胞。在动物模型上, 本发明提供的甘露糖醛二酸寡糖组合物可以明显改善痴呆模型动物的学习和认知功能。因此, 本发明提供的甘露糖醛二酸寡糖组合物具有潜在的预防和治疗阿尔茨

海默病的作用。

在一个示例性的实施方案中，本发明的方法包括如下几个步骤：

5 (1) 甘露糖醛二酸产品的制备：

M 段中间体的制备。如前文所述，本发明中采用的原料 M 段中间体可以通过现有技术中已知的方法制备。例如中国专利申请 No.98806637.8 以及 CN02823707.2 所披露的方法。通常的方法可以简单描述为：将海藻酸初步降解后可得到聚甘露糖醛酸和
10 聚古罗糖醛酸的混合多糖，混合多糖再经酸法沉淀后，可以除去其中的聚古罗糖醛酸，进一步精制可以得到纯度在 90%以上的均聚甘露糖醛酸，即 M 段中间体。

臭氧氧化降解。在室温或者加热条件下使 M 段中间体溶解于适量的水中，搅拌，持续通入臭氧，反应开始进行。反应 pH
15 值可以通过滴加稀盐酸或者稀 NaOH 溶液调节至 3-13 之间，优选 4-10，更优选 6-8。温度优选为 0-70℃，更优选 10-45℃。反应完成以后，停止通入臭氧，调节 pH 至中性。

膜分离纯化。将上述所得的反应产物配成约 10%浓度的溶液，通过分子截留膜分离，去除单糖以下的降解产物，收集未透过液。
20 所采用的分子截留膜 MWCO 规格为 1000 Da-3000 Da，优选 2000 Da。收集液经旋转蒸发仪浓缩、真空干燥即得寡聚甘露糖醛二酸混合物。经分析发现这些产品均是以二糖-十糖的寡糖且其含量是在一定比例范围的组合物。按照前述方法，分别制备了 A、B、C 三个组合物，这些组合物中寡糖比例和结构确证见实施例 1-3。

25 (2) 单一聚合度寡糖的制备

将步骤 (1) 所得的寡糖混合物溶解，配成约 10%左右的浓度，经 P6 凝胶色谱柱分离，紫外检测，收集各流出组分，合并

相同聚合度的组分。收集到 2-10 糖的 9 个组分，分别经 G10 凝胶柱层析脱盐，旋转蒸发仪浓缩，真空干燥即得。具体的纯化制备过程见实施例 4。这些柱层析、脱盐和干燥等操作是本领域技术人员所已知的。

5 将这 9 个单一聚合度的寡糖分别用抗老年痴呆动物模型评价药理活性，发现六糖的活性最好。具体见实施例 4。

(3) 寡糖组合物的活性比较

将上述步骤 (2) 中制备的单一聚合度寡糖按照如下表中的质量百分比进行复配，得到第四个组合物，即组合物 D。上述步
10 骤 (1) 中的 A、B、C 三个寡糖组合物以及组合物 D 中寡糖比例如下表所示：

	二糖	三糖	四糖	五糖	六糖	七糖	八糖	九糖	十糖
A	19%	25%	22%	13%	9%	6%	3%	2%	1%
B	24%	25%	19%	12%	9%	5%	3%	2%	1%
C	8%	20%	28%	19%	13%	6%	3%	2%	1%
D	5%	30%	20%	20%	5%	5%	5%	5%	5%

将上述 4 个组合物与步骤 (2) 中纯化的六糖同时比较药理活性，结果表明 A、B、C、D 这四个寡糖组合物均要明显比单一聚合度寡糖中活性最好的六糖还要好。由此看出，单个寡糖经
15 复配后能发挥协同增效的作用，二糖、三糖这些单个活性不强的寡糖通过复配后反而比六糖的活性更强。

20 综上，本发明提供了一种制备高活性的甘露糖醛二酸寡糖组合物的方法，该方法是以 M 段中间体为原料，在臭氧存在的条件下发生氧化降解反应，反应产物经超滤膜分离纯化即得。该制备过程的生产工艺简单，产率高，且反应产物易于纯化，得到的

产品活性好。发明人还揭示了高活性的组合物中各寡糖的质量百分比及比例范围。本发明提供的制备工艺，关键在于制备得到了结构新颖的甘露糖醛二酸，即糖链还原端具有 6 种可能结构的二酸残基，且制备得到的寡糖组合物中各寡糖的比例适中，生物活
5 性强。

本发明还提供了包含如上所述的甘露寡糖二酸寡糖组合以及任选的药学上可以接受的载体或赋形剂的药物或保健品。

制备各种含有各种比例活性成分的寡糖组合药物的方法是已
10 知的，或根据本发明的公开内容对于本领域技术人员是显而易见的。如 Remington's Pharmaceutical Sciences, Martin, E.W., ed., Mack Publishing Company, 19th ed. (1995)所述。制备所述药物组合物的方法包括掺入适当的药学赋形剂、载体、稀释剂等。

以已知的方法制造本发明的药物制剂，包括常规的混合、溶解
15 或冻干方法。

本发明的药物组合物，并向患者以适于选定的施用方式的各种途径施用，例如口服或肠胃外（通过静脉内、肌内、局部或皮下途径）。

因此，本发明的组合药物结合药学上可以接受的载体（如惰性
20 稀释剂或可食用的载体）可以全身施用，例如，口服。它们可以封闭在硬或软壳的明胶胶囊中，可以压为片剂。对于口服治疗施用，本发明的活性化合物可以结合一种或多种赋形剂，并以可吞咽的片剂、颊含片剂、含片、胶囊剂、酏剂、悬浮剂、糖浆、圆片等的形式使用。这种组合物和制剂应该包含至少 0.1% 的活性化合物。这
25 种组合物和制剂的比例当然可以变化，可以占给定的单位剂型重量的大约 1% 至大约 99%。在这种治疗有用的组合物中，活性化合物的量使得能够获得有效剂量水平。

片剂、含片、丸剂、胶囊剂等也可以包含：粘合剂，如黄蓍胶、阿拉伯胶、玉米淀粉或明胶；赋形剂，如磷酸氢二钙；崩解剂，如玉米淀粉、马铃薯淀粉、藻酸等；润滑剂，如硬脂酸镁；和甜味剂，如蔗糖、果糖、乳糖或阿司帕坦；或调味剂，如薄荷、冬青油或櫻桃香味。当单位剂型是胶囊时，除了上面类型的材料，它还可以包含液体载体，如植物油或聚乙二醇。各种其他材料可以存在，作为包衣，或以其他方式改变固体单位剂型的物理形式。例如，片剂、丸剂或胶囊剂可以用明胶、蜡、虫胶或糖等包衣。糖浆或酏剂可以包含活性化合物，蔗糖或果糖作为甜味剂，对羟苯甲酸甲酯或对羟苯甲酸丙酯作为防腐剂，染料和调味剂（如櫻桃香料或桔子香料）。当然，用于制备任何单位剂型的任何材料应该是药学上可以接受的且以应用的量为无毒。此外，活性化合物可以掺入缓释制剂和缓释装置中。

活性化合物也可以通过输注或注射到静脉内或腹膜内施用。可以制备活性化合物或其盐的水溶液，任选的可混和的无毒的表面活性剂。也可以制备在甘油、液体聚乙二醇、甘油三乙酸酯及其混合物以及油中的分散剂。在普通的储存和使用条件下，这些制剂包含防腐剂以防止微生物生长。

适于注射或输注的药物剂型可以包括包含适于无菌的可注射或可输注的溶液或分散剂的即时制剂的活性成分（任选封装在脂质体中）的无菌水溶液或分散剂或无菌粉末。在所有情况下，最终的剂型在生产和储存条件下必须是无菌的、液体的和稳定的。液体载体可以是溶剂或液体分散介质，包括，例如水、乙醇、多元醇（例如，甘油、丙二醇、液体聚乙二醇等）、植物油、无毒的甘油酯及其合适的混合物。可以维持合适的流动性，例如，通过脂质体的形成，通过在分散剂的情况下维持所需的粒子大小，或通过表面活性剂的使用。可以通过各种抗细菌剂和抗真菌剂（如对羟苯甲酸酯、

氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等)产生预防微生物的作用。在许多情况下,优选包括等渗剂,如糖、缓冲剂或氯化钠。通过使用延缓吸收剂的组合物(例如,单硬脂酸铝和明胶)可以产生可注射的组合物的延长吸收。

5 通过将合适的溶剂中的需要量的活性化合物与需要的上面列举的各种其他成分结合,然后进行过滤灭菌,制备无菌可注射溶液。在用于制备无菌注射溶液的无菌粉末的情况下,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥技术,这会产生活性成分加上任何另外需要的以前无菌过滤溶液中存在的成分的粉末。

10 有用的固体载体包括粉碎的固体(如滑石、粘土、微晶纤维素、二氧化硅、氧化铝等)。有用的液体载体包括水、乙醇或乙二醇或水-乙醇/乙二醇混合物,本发明的组合药物可以任选在无毒的表面活性剂的帮助下以有效含量溶解或分散在其中。可以加入佐剂(如香味)和另外的抗微生物剂来优化对于给定用途的性质。

15 增稠剂(如合成的聚合物、脂肪酸、脂肪酸盐和酯、脂肪醇、改性纤维素或改性无机材料)也可和液体载体用于形成可涂覆的糊剂、凝胶、软膏、肥皂等,直接用于使用者的皮肤上。

20 化合物或其混合物的治疗需要量,不仅取决于化合物本身,而且取决于施药方式、待治疗的疾病的本质和患者的年龄和状态,最终取决于在场医师或临床医生的决定。

25 上述制剂可以以单位剂型存在,该单位剂型是含有单位剂量的物理分散单元,适于向人体和其它哺乳动物体给药。单位剂型可以是胶囊或片剂,或是很多胶囊或片剂。根据所涉及的具体治疗,活性成分的单位剂量的量可以在大约0.1到大约1000毫克或更多之间进行变化或调整。

动物模型及药效活性评价步骤

1、抗 AD 的药效评价动物模型：采用 A β 单侧脑室注射诱导 AD 模型，采用 Morris 水迷宫对 AD 模型大鼠的学习记忆行为进行评价。

取雄性 Wistar 大鼠，每只体重在 180-220 g 之间。随机分组：

- 5 假手术对照组、模型组、给药组，每组 14 只动物。大鼠经戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔注射麻醉后固定于脑立体定位仪上，常规备皮消毒，切开皮肤，暴露前囟，海马 CA1 区参照《大鼠脑立体定向图谱》（包新明，舒斯云，北京，人民卫生出版社，1991，28）“前囟后 3.0 mm，中缝旁开 2.2 mm，硬膜下 2.8 mm”进行定位。模型组及给药组分别于右侧海马 CA1 区用微量进样器垂直颅骨进针，缓慢注入凝聚态 A β （A β 1-40 以 PBS 溶液配制成 1.4 mg/mL，于 37℃ 培养箱中孵育 5 天使其形成聚集态）5 μ l，流速 1 μ L/min，注射完成后留针 5 min，以使 A β 充分弥散，然后缓慢撤针。缝合手术切口，保温苏醒。对照组注入等量灭菌 PBS，
- 10 余步骤同前。术前 7 天开始给予相应药物，连续给药至实验结束。

术后第 11 天进行 Morris 水迷宫实验。

- 定位航行实验：各组大鼠每天训练 1 次，连续训练 5 天，即定位航行实验，记录动物找到平台所用时间（即逃避潜伏期）。约 90 s 未找到站台者，引导其按直线方向游向平台并在平台上站立 30 s，诱导其学习记忆。
- 20 空间探索实验：定位航行实验结束后，间隔 1 天，撤去平台，将大鼠从入水点放入水中，记录其穿越平台次数、在平台所在象限的游泳距离占总路程的百分比。评价动物的学习记忆功能。

- 25 2、细胞活性评价模型：SH-SY5Y 细胞（神经母细胞瘤细胞）接种于 96 孔板（3000/孔），24 hr 后去除培养基，加入药物预处理 0.5 hr（无血清培养配制，每个剂量 3 复孔），然后加入聚集

的 A β 1-42 (A β 1-42 以 PBS 溶液配制成 1 mg/mL, 于 4 °C 培养箱中孵育 24 hr, 使其形成聚集态, 终浓度 2 μ M) 孵育 48 hr, CCK8 检测细胞活力。

本发明的优点在以下非限制性的实施例中进一步进行说明。

- 5 但实施例中采用的具体材料及其用量, 以及其他实验条件并不应理解为对本发明的限制。除非特别指明, 本发明中份数、比例、百分比等均以质量计。

实施例

10

实施例 1:

步骤 1): 甘露糖醛二酸寡糖混合物的制备

- 如在先专利所披露的方法制备 M 段中间体, 具体操作简述如下: 将 5 Kg 海藻酸钠配成约 10% 的溶液, 加稀盐酸调 pH 至
15 3.0 左右, 升温至 80 °C, 搅拌, 反应 10 hr, 停止加热, 冷却至室温后, 加 NaOH 调 pH 值至 9.0, 再加稀盐酸回调 pH 至 2.85, 离心机 5000 rpm 离心 10 min, 收集上清, 加 HCl 调 pH 至 1.0, 离心, 收集沉淀, 旋转蒸发仪浓缩, 真空干燥得 M 段中间体 1500 g。称取 500g M-段中间体, 加蒸馏水溶解后, 配成 5 L 体积的溶
20 液, NaOH 调 pH 至 6.5, 水浴加热, 控制反应温度到 75 °C。调节氧气钢瓶出口的气流量和臭氧发生器的功率, 使得臭氧质量浓度流量达到 8 g/hr, 通入反应液中。反应 4 hr 后停止通入臭氧, 加适量水调整溶液浓度至 10% 左右, 以截留分子量为 2000 Da 的超滤膜过滤, 收集未透过液, 旋转蒸发仪浓缩, 真空干燥, 得
25 350 g 甘露糖醛二酸产品 A。

步骤 2): 甘露糖醛二酸产品 A 中各聚合度寡糖的比例和结构分析

精密称取 100 mg 上述干燥的甘露糖醛二酸产品 A，加水溶解配制成 10 mg/mL 的浓度，过 0.22 μ m 滤膜，做为供试样品溶液。采用 Superdex peptide（GE 公司）分子排阻色谱联用多角度激光散射（MALS，怀雅特公司）测定组合物中不同聚合度寡糖

5 的比例。实验方法如下：

色谱柱：Superdex peptide 10/300G1

流动相：0.1 mol/L NaCl

进样量：10 μ L

流速：0.3 mL/min

10 测试结果：二糖-十糖分别以 dp2-dp10 表示，分别为 dp2 为 19%，dp3 为 25%，dp4 为 22%，dp5 为 13%，dp6 为 9%，dp7 为 6%，dp8 为 3%，dp9 为 2%，dp10 为 1%。

步骤 3）：LC-MS 分析甘露糖醛二酸产品 A 中各聚合度寡糖的结构

15 实验条件：

色谱柱：Superdex peptide 10/300G1

流动相：20% 甲醇+80% 80mmol/L NH_4Ac

流速：0.1 mL/min

柱温：25 $^{\circ}\text{C} \pm 0.8$ $^{\circ}\text{C}$ 。

20 质谱条件：Agilent 6540 QTOF；离子源：ESI 碰撞电压 120 V；负离子模式。采集信号（m/z）宽度为 100-1000。

各聚合度寡糖的质谱图见附图 1-3 所示。对质谱图中各信号峰进行归属，验证了产品 A 中所有寡糖的分子结构，即通式（III）所示的结构。信号归属及该信号所对应的结构见下表 1。

表 1 产品 A 中不同聚合度寡糖中的 6 种二酸结构及其在质谱中的质荷比

序号	分子结构	分子式	质荷比 (m/z)								
			n=1 [M-1] ⁺	n=2 [M-1] ⁺	n=3 [M-1] ⁺	n=4 [M-1] ⁺	n=5 [M-1] ⁺	n=6 [M-1] ⁺	n=7 [M-2] ²⁺	n=8 [M-2] ²⁺	n=9 [M-2] ²⁺
1		$(C_6H_8O_6)_n C_6H_{10}O_8$ n=1-9	385	561	737	913	1089	1265	720	808	896
2		$(C_6H_8O_6)_n C_3H_8O_7$ n=1-9	355	531	707	883	1059	1235	705	793	881
3		$(C_6H_8O_6)_n C_3H_8O_7$ n=1-9	355	531	707	883	1059	1235	705	793	881
4		$(C_6H_8O_6)_n C_4H_6O_6$ n=1-9	325	501	677	853	1029	1205	690	778	866
5		$(C_6H_8O_6)_n C_4H_6O_6$ n=1-9	325	501	677	853	1029	1205	690	778	866
6		$(C_6H_8O_6)_n C_3H_4O_5$ n=1-9	295	471	647	823	999	1175	675	763	851

由上述质谱结构解析发现,产品 A 中糖链还原末端的甘露糖醛酸氧化为糖二酸结构(结构见通式 III),该糖二酸可以是含 6 个碳($m+m'=3$)的甘露糖二酸结构,含量约为 10%~30%,也可以是甘露糖二酸的脱羧产物,即 5 个碳($m+m'=2$)的糖二酸(30~50%)和 4 个碳($m+m'=1$)的糖二酸(30%~40%)。

步骤 4) 药理活性评价

1、产品 A 对 A β 诱导的神经细胞损伤的保护作用

按照“细胞活性评价模型”进行,实验过程如下:SH-SY5Y 细胞(神经母细胞瘤细胞)接种于 96 孔板(3000/孔),24 hr 后去处培养基,用药组每孔加入 10 μ L 药物(10mg/mL)预处理 0.5 hr(无血清培养配制,每个剂量 3 复孔),然后加入聚集的 A β 1-42(A β 1-42 以 PBS 溶液配制成 1 mg/mL,于 4 $^{\circ}$ C 培养箱中孵育 24hr,使其形成聚集态,终浓度 2 μ M)孵育 48 hr,CCK8 检测细胞活力。

结果发现 2 μ M 的 A β 1-42 处理 SH-SY5Y 细胞 48 小时后可诱导明显的细胞损伤,细胞存活率降低,而 25、50、100 μ g/mL 的产品 A 均可明显抑制 A β 诱导的细胞存活率下降,见附图 4。上述结果表明产品 A 在低浓度(25 μ g/mL)、中浓度(50 μ g/mL)和高浓度(100 μ g/mL)下均可保护神经细胞免受 A β 的毒性作用。

20 实施例 2:

称取 100 g 实施例 1 中的 M-段中间体,加蒸馏水溶解后,配成 0.8 L 体积的溶液,NaOH 调 pH 至 4.0,室温 25 $^{\circ}$ C 反应。调节氧气钢瓶出口的气流量和臭氧发生器的功率,使得臭氧质量浓度流量达到 1 g/hr,通入反应液中。反应 10 hr 后停止通入臭氧,加适量水调整溶液浓度至 15%左右,以截留分子量为 1000 Da 的超滤膜过滤,收集未透 25 过液,旋转蒸发仪浓缩,真空干燥,得 80 g 甘露糖醛二酸产品 B。

采用 Superdex peptide (GE 公司)分子排阻色谱联用多角度激光散射(MALS,怀雅特公司)测定 B 中各聚合度寡糖组分比例。测定方法同实施例 1 中相关部分。测试结果:二糖-十糖分别以 dp2-dp10

表示, 分别为 dp2 为 24%, dp3 为 25%, dp4 为 19%, dp5 为 12%, dp6 为 9%, dp7 为 5%, dp8 为 3%, dp9 为 2%, dp10 为 1%。

实施例 3:

5 称取 100 g 实施例 1 中的 M-段中间体, 加蒸馏水溶解后, 配成 1.5 L 体积的溶液, NaOH 调 pH 至 9.0, 水浴 45 °C 反应。调节氧气钢瓶出口的气流量和臭氧发生器的功率, 使得臭氧质量浓度流量达到 3 g/hr, 通入反应液中。反应 2 hr 后停止通入臭氧, 加适量水调整溶液浓度至 5% 左右, 以截留分子量为 3000 Da 的超滤膜过滤, 收集未透
10 过液, 旋转蒸发仪浓缩, 真空干燥, 得 60 g 甘露糖醛二酸产品 C。

采用 Superdex peptide (GE 公司) 分子排阻色谱联用多角度激光散射 (MALS, 怀雅特公司) 测定 C 中各聚合度寡糖组分比例。测定方法同实施例 1 中相关部分。测试结果: 二糖-十糖分别以 dp2-dp10 表示, 分别为 dp2 为 8%, dp3 为 20%, dp4 为 28%, dp5 为 19%, dp6
15 为 13%, dp7 为 6%, dp8 为 3%, dp9 为 2%, dp10 为 1%。

实施例 4:

步骤 1) 单一聚合度的甘露糖醛二酸寡糖的制备, 方法如下:

1、样品准备: 由实施例 1 中制备得到的甘露糖醛二酸产品 A 中
20 取出 300 g, 加水溶解, 配置成 1000 mL 的浓溶液, 放置在 4 °C 冰箱备用。每次使用时取出 50 mL 加水稀释 1 倍后, 用 0.22 μm 超滤膜抽滤。

2、色谱分离条件: 色谱仪为 AKTA pure 150 (购置于 GE 公司), 配 UV 检测器和自动收集器。分离色谱柱: 1.2 kg BioGel P6 (购于伯乐公司) 用去离子水混合, 真空脱气以后, 手动填充到玻璃柱 (10 cm
25 内径) 中, 纯水冲洗 10 倍柱体积以后, 色谱柱床稳定, 高度为 1.0 m。然后改用 0.02 M 的 NaCl 溶液为流动相, 平衡 10 倍柱体积以后, 开始上样。

3、上样和分离: 泵的流速设置为 1 mL/min, 将 100 mL 的样品

溶液通过色谱仪自带的泵抽到色谱柱顶端后，切换到流动相，以 5 mL/min 的流速洗脱，待死水体积部分流出以后，开始自动收集，每管收集 50 mL。

- 4、重复上样，20 次重复制备以后，合并相同组分，旋转蒸发仪
5 浓缩，冷冻干燥，得到二糖至十糖共 9 个单一聚合度的寡糖。

步骤 2) 药理活性评价

单一聚合度的甘露寡糖二酸寡糖的药理活性评价步骤如下：

1、寡糖对 A β 诱导的神经细胞损伤的保护作用

- 采用与实施例 1 中描述的相同方法进行实验，寡糖溶液配制浓度
10 为 10mg/mL。

结果发现 2 μ M 的 A β 1-42 处理 SH-SY5Y 细胞 48 小时后可诱导明显的细胞损伤，细胞存活率降低，而单一聚合度的甘露糖醛二酸寡糖均具有抑制 A β 诱导细胞损伤的趋势。其中聚合度为 4-10 的甘露糖醛二酸寡糖（药物终浓度均为 25 μ g/mL）均可明显保护神经细胞免受
15 A β 的毒性作用，5-8 四种聚合度的寡糖作用尤佳，六糖的活性最佳，见附图 5。

2、寡糖对 A β 1-40 右侧脑室注射诱导的大鼠学习记忆障碍模型的影响

- 取二糖-十糖各 10g，实验过程按照“抗 AD 的药效评价动物模型”
20 的方法进行。

由于单一聚合度寡糖二酸数目较多，实验分多批次完成。以假手术对照组动物穿越平台次数为基数，通过计算各组动物穿越平台次数相对于假手术对照组的百分比，进行各个寡糖之间药效的对比评价。结果发现模型组与假手术对照组相比，穿越平台次数明显减少。各个
25 单一聚合度寡糖均有增加穿越平台次数的趋势，其中聚合度 4-10 的单一聚合度甘露糖醛二酸寡糖均可明显增加穿越平台次数，5-8 四种聚合度寡糖作用尤佳。六糖的活性最佳，见附图 6。

实施例 5

组合物与六糖之间的药理活性评价，考察组合物中不同聚合度寡糖之间的协同增效作用及寡糖比例范围。

样品准备：实施例 4 中制备得到的单一聚合度的甘露糖醛二酸寡糖，按照聚合度的大小从二糖到十糖准确称量，各糖取出的重量如下：
5 二糖 0.5 g，三糖 3.0 g，四糖 2.0 g，五糖 2.0 g，六糖 0.5 g，七糖 0.5 g，八糖 0.5 g，九糖 0.5 g，十糖 0.5 g，混匀得 10 g 组合物产品 D。

实施例 1、2、3 中分别制备得到的产品 A、B、C 以及本实施例中的产品 D 的寡糖比例如下表 2 所示。

表 2 甘露糖醛二酸寡糖组合物产品中的寡糖百分比

比例 组合	二糖	三糖	四糖	五糖	六糖	七糖	八糖	九糖	十糖
A	19%	25%	22%	13%	9%	6%	3%	2%	1%
B	24%	25%	19%	12%	9%	5%	3%	2%	1%
C	8%	20%	28%	19%	13%	6%	3%	2%	1%
D	5%	30%	20%	20%	5%	5%	5%	5%	5%

10 以上 A、B、C、D 四个样品各取 10 g，按照“抗 AD 的药效评价动物模型”所描述的方法，比较这些组合物与六糖(6T)的药理活性。

实验中，模型组与假手术对照组相比，前者寻找平台潜伏期明显延长，说明该评价模型造模成功。与模型组相比，各个给药组寻找平台潜伏期明显缩短。

15 在结束定位航行训练后，休息一天。然后撤去平台，开展空间探索试验，观测动物穿越平台次数、在原平台所在象限的游泳距离占总路程的百分比，评价动物的记忆功能。结果发现模型组与假手术对照组相比，穿越平台次数明显减少，且给药组穿越平台次数明显增加，见附图 7。在原平台所在象限的游泳距离占总路程的百分比这一指标
20 与穿越平台次数具有相似的趋势。模型组与假手术对照组相比，在原平台所在象限的游泳距离占总路程的百分比明显减少，且给药组在原平台所在象限的游泳距离占总路程的百分比明显增加，见附图 8。

实验结果表明，A、B、C、D寡糖组合物各自的药理活性在第4天时仍非常强，且比单一聚合度的六糖活性更强，说明组合物中各寡糖之间有协同增效作用。

5 实施例6

细胞共培养技术进一步评价各单一聚合度寡糖和组合物的活性。

实施例4中制备的单一聚合度寡糖和实施例1中制备的寡糖组合物产品A，各取适量，准确称定，用PBS溶解，配置成10 mg/mL的浓度，作为供试药液。

10 细胞共培养实验与前述实施例1和实施例4中的细胞培养方法基本相同。主要区别在于细胞共培养技术模拟了体内不同细胞的相互作用。考虑到体内细胞可能通过信号通路相互影响，为了更加贴近体内环境，模拟AD疾病发生发展过程中不同细胞之间的相互影响，在培养过程中引入了小胶质细胞，具体实验过程如下：SH-SY5Y细胞（神经母细胞瘤细胞）接种于24孔板（12000/孔），上室接种BV-2细胞（小胶质细胞），浓度15000/孔。24 hr后去除培养基，下室分别加入各供试药液，使得药物的终浓度为25 ug/mL，处理0.5 hr（无血清培养配制，每个药液3复孔），然后加入聚集的A β 1-42（A β 1-42以PBS溶液配制成1 mg/mL，于4℃培养箱中孵育24 hr，使其形成聚

15 集态，终浓度2 μ M）孵育48 hr，CCK8检测下室SH-SY5Y细胞活力。

48小时后将模型组与正常对照组比较，前者明显损伤，细胞存活率降低。用药组均具有抑制A β 诱导细胞损伤的作用。特别的，产品A的活性明显要好于其他9个单一聚合度寡糖的活性，具体见附图9。共培养细胞模型能筛选出组合物和单一聚合度寡糖之间的活性差异，

25 这可能是由于小胶质细胞释放的细胞因子能与组合物中不同聚合度的寡糖发生协同作用，增强了寡糖组合物的活性。