

(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
2020 年 1 月 2 日 (02.01.2020)



(10) 国际公布号
WO 2020/001611 A1

(51) 国际专利分类号:
A61K 31/702 (2006.01) *A61P 29/00* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2019/093656

(22) 国际申请日: 2019 年 6 月 28 日 (28.06.2019)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201810721276.7 2018 年 6 月 29 日 (29.06.2018) CN

(71) 申请人: 上海绿谷制药有限公司 (SHANGHAI GREEN VALLEY PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [CN/CN]; 中国上海市浦东张江高科技园区牛顿路 421 号, Shanghai 201203 (CN)。中国科学院上海药物研究所 (SHANGHAI INSTITUTE OF MATERIAL MEDICA, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) [CN/CN]; 中国上海市浦东新区张江高科技园区祖冲之路 555 号, Shanghai 201203 (CN)。

(72) 发明人: 耿美玉 (GENG, Meiyu); 中国上海市浦东张江高科技园区牛顿路 421 号, Shanghai 201203 (CN)。辛现良 (XIN, Xianliang); 中国上海市浦东张江高科技园区牛顿路 421 号, Shanghai 201203 (CN)。张真庆 (ZHANG, Zhenqing); 中国上海市浦东张江高科技园区牛顿路 421

号, Shanghai 201203 (CN)。丁健 (DING, Jian); 中国上海市浦东张江高科技园区牛顿路 421 号, Shanghai 201203 (CN)。

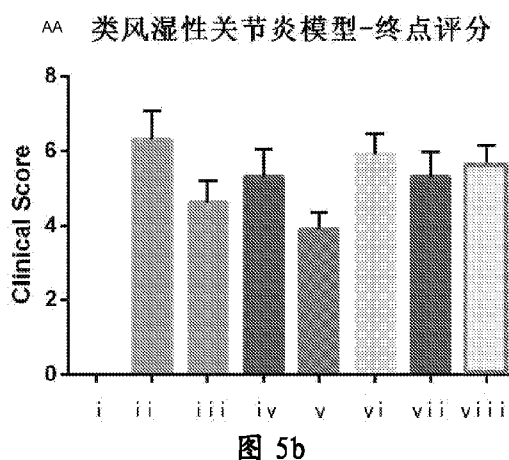
(74) 代理人: 北京市金杜律师事务所 (KING & WOOD MALLESONS); 中国北京市朝阳区东三环中路 1 号环球金融中心办公楼东楼 20 层, Beijing 100020 (CN)。

(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, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, 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, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, 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,

(54) Title: USE OF MANNURONIC DICARBOXYLIC ACID COMPOSITION IN TREATMENT OF INFLAMMATION

(54) 发明名称: 甘露糖醛二酸的组合物在治疗炎症中的应用



AA RHEUMATOID ARTHRITIS MODEL-ENDPOINT SCORE

(57) Abstract: Disclosed is the use of a mannuronic dicarboxylic acid oligosaccharide composition in the treatment of inflammation.

(57) 摘要: 本发明涉及一种甘露糖醛二酸寡糖组合物在治疗炎症方面的应用。

[见续页]

RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

根据细则4.17的声明:

- 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))。

甘露糖醛二酸的组合物在治疗炎症中的应用

技术领域

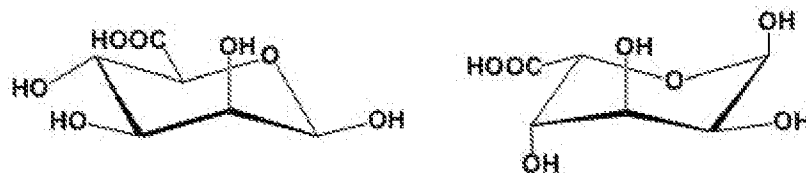
本发明涉及通过生物活性筛选的方法得到甘露糖醛二酸的最佳组
5 合物在治疗炎症方面的应用。

背景技术

炎症 (Inflammation) 是指生物组织受到外伤、出血或病原感染、
异物等刺激, 激发的生理反应。炎症反应涉及一些特定自体活性物质,
10 如前列腺素类和白三烯类物质, 及特定炎性细胞因子, 如白介素类等
物质的变化。炎症的发生除清除异物、消除感染外。过度的炎症反应
还能够损伤机体自身物质。目前, 常用抗炎药物除对因使用抗生素外,
主要是甾体和非甾体抗炎药物。

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
15 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

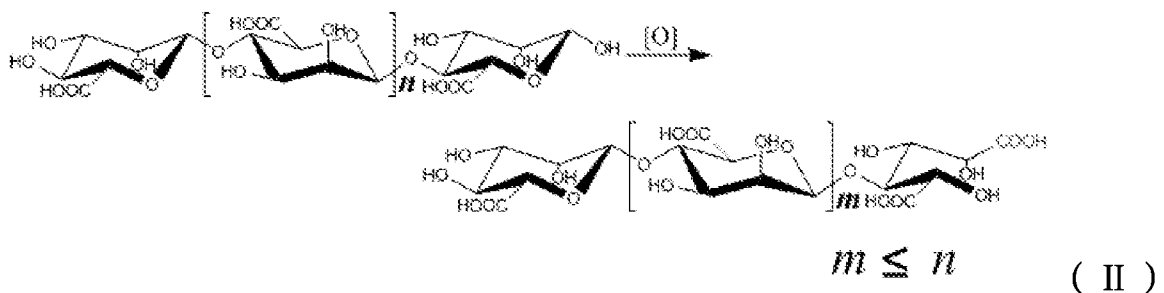
G: α -L-古罗糖醛酸 (I)

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。

为制备寡聚甘露糖醛酸,可将上述得到的 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 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。



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

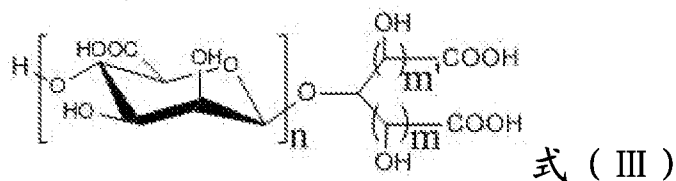
性，在细胞内诱导氧化反应损伤线粒体以及引发炎症反应等级联反应，造成大量的神经元和 β 细胞损伤，最终导致阿尔茨海默病与 II 型糖尿病的发生。甘露寡糖二酸靶向淀粉样蛋白并拮抗其诱导的级联反应，由此具有预防和治疗阿尔茨海默病与 II 型糖尿病的作用。

5 在先专利 CN106344594A 公开了还原端 1 位为羧基的甘露糖醛酸寡糖及其衍生物在治疗炎症方面的应用，并公开了四糖-十糖混合物在治疗炎症方面的药效活性情况。

发明内容

10 本发明涉及一种甘露糖醛二酸寡糖组合物在治疗炎症中的用途。本发明还涉及一种治疗炎症的方法，包括给予需要治疗的患者治疗有效量的本发明所述的甘露糖醛二酸寡糖组合物。

本发明涉及的甘露糖醛二酸寡糖组合物，包含具有式 (III) 的甘露糖醛二酸或其药学上可接受的盐：



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物总重量的 60% 以上；

20 $n=1-2$ 的甘露糖醛二酸的重量总和占所述组合物总重量的低于 60%。

申请人发现，特定组合的甘露糖醛二酸组合物对于治疗炎症反应表现出有利的效果，同时，由于其源于天然产物的高安全性，有利于缓解患者的慢性或急性疼痛。

附图说明

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。

5 图 4 表示单一聚合度的甘露寡糖二酸对 $A\beta$ 诱导的神经炎症的抑制作用。

图 5a 和 5b 表示本发明的寡糖组合物及六糖对小鼠类风湿性关节炎的治疗作用；图 5b 中横坐标的编号分别对应的样品为：i: 对照组；ii: 模型组；iii: 产品 A；iv: 产品 B；v: 产品 C；vi: 产品 D；vii: 对比实验
10 样品；viii: 六糖。

图 6a 和 6b 表示本发明的寡糖组合物及六糖对小鼠多发性硬化症的治疗作用；图 6b 中横坐标附图标记同图 5b。

图 7a 和 7b 表示本发明的寡糖组合物及六糖对小鼠系统性红斑狼疮的治疗作用；图 7b 中横坐标附图标记同图 5b。

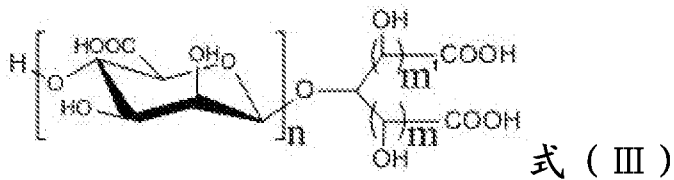
15 图 8a 和 8b 表示本发明的寡糖组合物及六糖对小鼠炎症性肠炎的治疗作用；图 8b 中横坐标附图标记同图 5b。

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。
20

本发明涉及一种甘露糖醛二酸寡糖组合物在治疗炎症中的用途。本发明还涉及一种治疗炎症的方法，包括给予需要治疗的患者治疗有效量的本发明所述的甘露糖醛二酸寡糖组合物。

25 本发明涉及的甘露糖醛二酸寡糖组合物，包含具有式 (III) 的甘露糖醛二酸或其药学上可接受的盐：



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 60% 以上;

5 $n=1-2$ 的甘露糖醛二酸的重量总和占所述组合总重量的低于 60%。

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 $n=1-5$ 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%。

15 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 $n=1-2$ 的甘露糖醛二酸寡糖的重量总和占所述组合总重量的 10-50%, 更优选 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 $n=1-3$ 的甘露糖醛二酸寡糖的重量总和占所述组合总重量的 20-70%。

20 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%,
25 三糖 15-30%, 四糖 15-28%, 五糖 5-25%, 六糖 2-20%, 七糖 2-20%,

八糖 2-20%，九糖 2-20%，十糖 2-20%。特别地，组合中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 15-28%，五糖 10-20%，六糖 5-15%，七糖 3-10%，八糖 2-5%，九糖 1-5%，十糖 1-5%。更优地，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 15-28%，五糖 15-20%，六糖 5-10%，七糖 3-5%，八糖 2-5%，九糖 1-3%，十糖 1-3%。

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。

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，其活性比活性最好的六糖还要高；尤其是添加了一定比例二糖和三糖的组合物，其活性高于不含二糖和三糖的组合物。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：

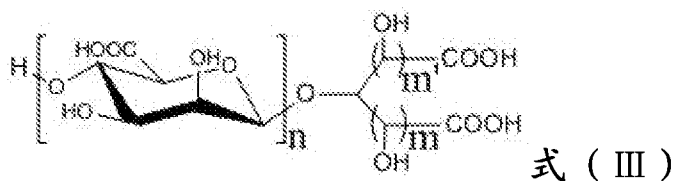
组合物中 $n=1-5$ 的甘露糖醛二酸的重量总和占所述组合总重量的 60% 以上，优选 80-95%。 $n=1-2$ 的甘露糖醛二酸的重量总和占所述组合总重量的低于 60%，优选 10-50%，更优选 30-50%。 $n=1-3$ 的甘露糖醛二酸寡糖的重量总和占所述组合总重量的 20-70%。其中 $n=1-3$ 的甘露糖醛二酸寡糖的重量总和与 $n=4-7$ 的甘露糖醛二酸寡糖重量总和的比例在 1.0-3.5 之间，优选在 1.0-3.0 之间。

本发明所述用于治疗炎症的药物包含甘露糖醛二酸寡糖组合物，其包含具有式 (III) 的甘露糖醛二酸或其药学上可接受的盐，以及一种或多种药学上可接受载体。本发明所述药物可以是片剂、硬胶囊、软胶囊、肠溶胶囊、微囊剂、颗粒剂、糖浆剂、注射剂、颗粒剂、乳剂、悬浮液、溶液和用于口服或非口服给药的缓释制剂的形式。

本发明所述药学上可接受载体是指本领域技术人员熟知的药学上可接受的载体，本发明的药学上可接受载体包括但不限于：填充剂、

润湿剂、黏合剂、崩解剂、润滑剂、粘合剂、助流剂、掩味剂、表面活性剂、防腐剂等。填充剂包括但不限于乳糖、微晶纤维素、淀粉、糖粉、糊精、甘露醇、硫酸钙等。润湿剂与黏合剂包括但不限于羧甲基纤维素钠、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、明胶、蔗糖、聚乙烯吡咯烷酮等。崩解剂包括但不限于羧甲基淀粉钠、交联聚乙烯吡咯烷酮、交联羧甲基纤维素钠、低取代羟丙基纤维素等。润滑剂包括但不限于硬脂酸镁、微粉硅胶、滑石粉、氢化植物油、聚乙二醇、月桂醇硫酸镁等。粘合剂包括但不限于阿拉伯胶、藻酸、羧甲基纤维素钙、羧甲基纤维素钠、葡萄糖结合剂、糊精、右旋糖、乙基纤维素、明胶、液体葡萄糖、瓜尔胶、羟乙基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、硅酸铝镁、麦芽糖糊精、甲基纤维素、聚甲基丙烯酸酯、聚乙烯吡咯烷酮、预明胶化淀粉、藻酸钠、山梨醇、淀粉、糖浆和黄蓍胶。助流剂包括但不限于胶体二氧化硅、粉状纤维素、三硅酸镁、二氧化硅和滑石粉。掩味剂包括但不限于阿斯巴坦、甜菊苷、果糖、葡萄糖、糖浆、蜂蜜、木糖醇、甘露醇、乳糖、山梨醇、麦芽糖醇、甘草甜素。表面活性剂包括但不限于吐温-80、泊洛沙姆。防腐剂包括但不限于尼泊金酯、苯甲酸钠、山梨酸钾等。

在一些实施方式中，本发明还涉及用于治疗炎症的甘露糖醛二酸寡糖组合物，包含具有式(III)的甘露糖醛二酸或其药学上可接受的盐：



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 60% 以上；

n=1-2 的甘露糖醛二酸的重量总和占所述组合总重量的低于 60%。

根据一个优选的实施方案，本发明所述用于治疗炎症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，
5 本发明所述用于治疗炎症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%。在另一个优选实施方案中，本发明所述用于治疗炎症的甘露糖醛二酸寡糖组合物中 $m+m'=2$ 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%。

10 根据一个优选实施方案，本发明所述用于治疗炎症的甘露糖醛二酸寡糖组合物中 $n=1-5$ 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%。

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 $n=1-2$ 的甘露糖醛二酸寡糖的重量总和所述组合总重量的 10-50%，更优选
15 30-50%。

根据一个优选实施方案，本发明所述用于治疗炎症的甘露糖醛二酸寡糖组合物中 $n=1-3$ 的甘露糖醛二酸寡糖的重量总和所述组合总重量的 20-70%。

根据一个优选实施方案，本发明所述用于治疗炎症的甘露糖醛二酸寡糖组合物中 $n=1-3$ 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。
20

根据一个优选实施方案，本发明所述用于治疗炎症的甘露糖醛二酸寡糖组合物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 15-28%，五糖 5-25%，六糖
25 2-20%，七糖 2-20%，八糖 2-20%，九糖 2-20%，十糖 2-20%。特别地，组合中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 15-28%，五糖 10-20%，六糖 5-15%，七糖 3-10%，八糖

2-5%，九糖 1-5%，十糖 1-5%。更优地，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 15-28%，五糖 15-20%，六糖 5-10%，七糖 3-5%，八糖 2-5%，九糖 1-3%，十糖 1-3%。

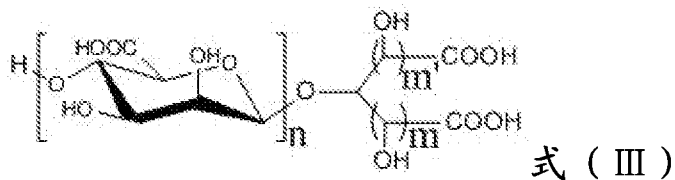
5 本发明所述炎症包括各种炎症，包括但不限于急性炎症、慢性炎症、血管炎症、神经炎症、中枢神经炎症（例如多发性硬化症，包括脑脊髓炎等）、外周神经炎症、关节炎（例如骨关节炎、骶髂关节炎等、牛皮癣关节炎、类风湿性关节炎、风湿性关节炎等）、强直性脊柱炎、炎症性肠病（例如克罗恩病和溃疡性结肠炎）、炎症性糖尿病性溃疡、
10 系统性红斑狼疮、炎症性皮肤病（例如银屑病、特应性皮炎、湿疹）等。

本文使用的术语“治疗”一般是指获得需要的药理和/或生理效应。该效应根据完全或部分地预防疾病或其症状，可以是预防性的；和/或
15 根据部分或完全稳定或治愈疾病和/或由于疾病产生的副作用，可以是治疗性的。本文使用的“治疗”涵盖了对患者疾病的任何治疗，包括：(a) 预防易感染疾病或症状但还没诊断出患病的患者所发生的疾病或症状；(b) 抑制疾病的症状，即阻止其发展；或(c) 缓解疾病的症状，即，导致疾病或症状退化。

20

甘露糖醛二酸寡糖组合

本发明所述用于治疗炎症的甘露糖醛二酸寡糖组合物，其包含具有式（III）的甘露糖醛二酸或其药学上可接受的盐：



25 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 60%以上；

$n=1-2$ 的甘露糖醛二酸的重量总和占所述组合总重量的低于 60%。

本发明涉及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。已知在甘露糖醛二酸中，活性最高的糖为 4-10 糖，特别是 6 糖。但是，发明人研究发现，在活性最高的 4-10 糖基础上添加一定比例活性较低的 2-3 糖，同等质量的给药剂量下，生物活性不降低甚至还有提高，这可能是由于分子量较小的 2-3 糖虽然不能单独起效，但跟其他寡糖混合后能起到协同增效的作用。但当 2-3 糖的比例过高时，组合物的整体活性降低。因此，组合物中 2-3 糖的比例必须控制在一定的范围之内。

在实际制备过程中，氧化降解反应中会产生一定量的 2-3 糖，通常会因其活性低，为避免影响到产品的药效，而将从产物中分离后去除。而基于发明人的上述发现，可以不需要氧化降解产物中的 2-3 糖分离除去，而只需控制氧化降解反应的条件，将 2-3 糖的比例控制在一定的范围之内，获得的组合物活性能达到甚至优于在先申请所公开的组合物，且因不用将 2-3 糖作为杂质去除，产品得率理论上也显著高于在先申请所公开的产品得率，大大降低生产成本，减少废弃物的排放，在实际生产中更容易实现，更易于实现工业化大生产。

在一个示例性的实施方案中，本发明所述用于治疗炎症的甘露糖醛二酸寡糖组合物的制备方法包括如下几个步骤：

(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。

5 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 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。

10 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。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。一些组合物中寡糖比例和结构确证见实施例 1-3。

15 (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。一个具体的纯化制备过程见实施例 4。这
20 些柱层析、脱盐和干燥等操作是本领域技术人员所已知的。

将这 9 个单一聚合度的寡糖分别用抗炎症细胞模型评价药理活性，发现六糖的活性最好。

(3) 寡糖组合物的治疗活性比较

25 将本发明的组合物与组合物与纯化获得的六糖同时比较药理活性，结果表明本发明的寡糖组合物比单一聚合度寡糖中活性最好的六糖还要好，而包含较高比例的二糖和三糖的组合物的活性略低于六糖。不囿于任何理论，推测寡糖组合物中二、三糖的百分比含量在特定的范

围内使得寡糖组合能发挥协同增效的作用，当组合物中二-六糖的比例高于 60%以上，且二、三糖的比例低于 60%时，组合物的整体活性较高；但二、三糖的比例超过 60%时，组合物的整体活性也会降低。

5 动物模型及药效活性评价步骤

1、神经炎症模型—A β 刺激小胶质细胞炎症因子分泌模型

将原代小胶质细胞接种在 48 孔板中，培养 24 小时，加入药物预处理 30 分钟后，加入 1nM 老化的 A β 1-42 寡聚体刺激 6 小时。取处理后的小胶质细胞抽提 RNA 做 RT-PCR 来检测炎症因子 IL-1 β 的表达，
10 来反映 A β 刺激所引起的神经炎症反应。

2、类风湿性关节炎模型—胶原诱导的小鼠关节炎模型

取雄性 DBA/1 小鼠，体重 19-22 g，随机分组：空白对照组、模型组、给药组，每组 8 只。除空白对照组外，其余动物于第 0 天尾根部
15 皮下注射牛二型胶原-完全弗氏佐剂(CII-CFA) 乳剂 10mg/kg 免疫致敏，第 23 天，腹腔注射脂多糖 (LPS) 1.5mg/kg。第 28 天开始给药，空白对照组和模型组口服生理盐水，其余各组均给予相应药物，每天
20 给药 1 次，连续给药 14 天。LPS 注射后，每天观察小鼠发病情况。当小鼠开始发病之后（出现关节炎的临床症状），根据病变的不同程度（红肿，关节变形）按照 0-4 分
25 的标准进行临床评分来反应疾病进展程度。0 分为无红斑和红肿；1 分为近跗骨附近或踝关节或跖骨出现红斑或轻度红肿，1 个脚趾红肿；2 分为踝关节和跖骨轻微红斑和肿胀，或超过两个脚趾红肿；3 分为踝、腕关节和跖骨中度红斑和肿胀；4 分为踝、腕关节，跖骨和脚趾全部严重红肿；每个肢体的最高评分为 4 分，每只动物最高评分为 16 分。

3、多发性硬化症模型—MOG 诱导的小鼠多发性硬化症模型

取雌性 C57BL/6 小鼠, 体重 17-20g, 随机选出 5 只作为空白对照组。其余动物于第 0 天背部皮下注射髓鞘少突胶质细胞糖蛋白-完全弗氏佐剂 (MOG-CFA) 乳剂免疫致敏, MOG 10mg/kg, CFA 20mg/kg, 并于第 0 天和第 2 天腹腔注射百日咳毒素, 10ug/kg。并于第 1 天开始给药, 空白对照组和模型组口服生理盐水, 其余各组均给予相应药物, 每天给药 1 次, 连续给药 24 天。免疫后第 12 天左右, 免疫的老鼠会出现病症, 开始每天密切观察记录体重和临床评分。以 0-4 分表示不同程度, 0 分为正常表现, 没有明显的疾病征兆; 1 分为尾巴下垂无力, 后肢单侧无力; 2 分为尾巴下垂无力, 双后肢均无力步态蹒跚; 3 分为单侧后肢无力麻痹瘫痪; 4 分为双后肢均无力麻痹瘫痪, 来反应疾病进展程度。

4、系统性红斑狼疮模型—MRL/lpr 红斑狼疮小鼠模型

MRL/lpr 转基因小鼠, 具有 Fas^{lpr} 基因的纯合子突变, 可以自发形成淋巴组织增生, 小鼠在第 10-14 周龄左右开始发病, 出现系统性红斑狼疮症状。雌性 MRL/lpr 转基因小鼠, 9 周龄, 随机分组: 空白对照组、给药组, 每组 8 只。空白对照组口服生理盐水, 其余各组均给予相应药物, 每天给药 1 次, 连续给药 4 周。每周进行一次淋巴结评分。以 0-6 分表示不同程度, 0 分为正常; 1 分为在一个两侧点位置直径小于 1cm; 2 分为在两个两侧点位置直径小于 1cm; 3 分为在三个两侧点位置直径小于 1cm; 4 分为在一个两侧点位置直径大于 1cm, 另外两个两侧点位置直径小于 1cm; 5 分为在两个两侧点位置直径大于 1cm, 另外一个两侧点位置直径小于 1cm; 6 分为在三个两侧点位置直径大于 1cm。

5、炎症性肠病 (IBD) 模型-葡聚糖硫酸钠 (dextran sulfate sodium, DSS) 诱导小鼠结肠炎模型

取雌性 C57 小鼠, 7-8 周龄, 体重 18-20g, 随机分组: 空白对照组、模型组、给药组, 每组 8 只。模型组、给药组小鼠于第 1-7 天以饮水方

式给予 2.5 % 的高分子量聚合物葡聚糖硫酸钠(dextran sulfate sodium, DSS)造模, 并于第 1 天开始给药, 空白对照组和模型组口服生理盐水, 其余各组均给予相应药物, 每天给药 1 次, 连续给药 30 天。第 31 天, 小鼠颈椎脱臼处死, 打开腹腔, 分离肠系膜。取每只小鼠回盲部起始
5 端到肛门末端, 每组顺次取样, 计量结肠长度。

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。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
10 质量计。

实施例

实施例 1:

15 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 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
20 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
25 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 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 μm 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 μL

流速：0.3 mL/min

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
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 $^{\circ}\text{C} \pm 0.8^{\circ}\text{C}$ 。

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 ₆ H ₈ O ₆) _n C ₆ H ₁₀ O 8 n=1-9	385	561	737	913	1089	1265	720	808	896
2		(C ₆ H ₈ O ₆) _n C ₅ H ₈ O ₇ n=1-9	355	531	707	883	1059	1235	705	793	881
3		(C ₆ H ₈ O ₆) _n C ₅ H ₈ O ₇ n=1-9	355	531	707	883	1059	1235	705	793	881
4		(C ₆ H ₈ O ₆) _n C ₄ H ₆ O ₆ n=1-9	325	501	677	853	1029	1205	690	778	866
5		(C ₆ H ₈ O ₆) _n C ₄ H ₆ O ₆ n=1-9	325	501	677	853	1029	1205	690	778	866
6		(C ₆ H ₈ O ₆) _n C ₃ H ₄ O 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%）。

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 °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 20%，dp3 为 25%，dp4 为 19%，dp5 为 12%，dp6 为 9%，dp7 为 5%，dp8 为 5%，dp9 为 3%，dp10 为 2%。

实施例 3:

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 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 μ m 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, 手动填装到玻璃柱 (10 cm 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、单一聚合度寡糖对 A β 引起的神经炎症的影响

取二糖-十糖各 1mg, 实验过程按照 “A β 引起的神经炎症” 的方法进行。

通过测定 A β 刺激后小胶质细胞中主要功能炎症因子 IL-1 β 的表达量，来反映药物对神经炎症的抑制作用，进行各个寡糖之间药效的对比评价。结果发现 A β 模型组与空白对照组相比，神经炎症明显增强。各单一聚合度寡糖均有减少神经炎症的趋势，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降低 IL-1 β 的表达量，5-8 四种聚合度寡糖作用尤佳。六糖的活性最佳，2-3 糖的效果较弱。见附图 4。

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：

组合物产品 D：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：二糖 3.0 g，三糖 3.0 g，四糖 1.5 g，五糖 1.5 g，六糖 0.4 g，七糖 0.2 g，八糖 0.2 g，九糖 0.1 g，十糖 0.1 g，混匀得 10 g 组合物产品 D。

对比实验样品制备

参照在先专利 CN106344592A 实施例 1 和 2 披露的方法制备含四糖-十糖的混合物

称取 1g 多聚甘露糖醛酸钠盐（重均分子量 8235Da，上海绿谷制药有限公司提供），加入适量蒸馏水配成 1%（重量百分比）的多聚甘露糖醛酸钠水溶液。用盐酸将所述 1% 的多聚甘露糖醛酸钠水溶液的 pH 值调节为 4，然后将该水溶液置于高压釜中。在 110℃ 温度下加热反应 4 小时。从高压釜中取出该反应后的溶液并使其冷却。冷却后，用 NaOH 溶液调节该反应后溶液的 pH 值得到中性液体。在搅拌条件下，将所述中性液体缓慢加入到该液体体积 4 倍体积量的乙醇中，进行醇沉并静置过夜。过滤分离醇沉所得固体物质，并在过滤分离时用无水乙醇洗涤过滤分离所得固体物质，最终得到白色滤饼。将该滤饼置于 60℃ 烘箱中干燥，得褐藻胶寡糖粗品。

取 5g 褐藻胶寡糖粗品配成 5 % (重量百分比) 的水溶液。通过向 50ml 的 10% (重量百分比) 氢氧化钠溶液中加入 25ml 的 5 % (重量百分比) 的硫酸铜溶液并立即混匀制备得到新鲜氧化剂氢氧化铜。将该新鲜氧化剂氢氧化铜立即加入到 40ml 上述 5% (重量百分比) 的褐藻胶寡糖溶液中, 同时通过沸水浴进行加热, 直至不再有砖红色沉淀产生。将该反应体系进行离心处理以去除沉淀从而得到上清液。取少许上清液再次加入所述氧化剂, 检查是否还有砖红色沉淀产生。若还有砖红色沉淀产生, 则将上述离心所得全部上清液与另外部分的所述氧化剂继续进行反应, 直至检验不再有砖红色沉淀产生为止。将最后得到的反应体系离心分离获得上清液。向上清液中加入 4 倍体积量的 95% 乙醇进行醇沉, 并静置过夜。过滤分离醇沉所得固体物质, 并用无水乙醇洗涤该固体物质。将所得固体物质置于 60℃ 烘箱中烘干, 得到式 (II) 所示褐藻胶寡糖粗品。

取上述褐藻胶寡糖粗品 1g, 配成 10 % (重量百分比) 的水溶液, 用 95% 乙醇溶液再次进行醇沉, 过滤分离再次醇沉所得沉淀物并任选地用无水乙醇洗涤。分离该沉淀物并干燥, 得到固体物质。将该固体物质配成 5 % (重量百分比) 的水溶液, 用 3 μ m 孔径膜过滤该水溶液并收集滤液。将该滤液在分子排阻色谱 Bio-Gel-P6 凝胶柱 (1.6 $\times$ 180cm, 购自 Bio-Rad 公司) 上进行洗脱分离, 作为流动相的洗脱液为 0.2mol $\cdot$ L⁻¹ NH₄HCO₃。依次使用多个 5 毫升试管从该柱色谱收集洗脱液, 然后用硫酸-咔唑法检测所述各集液管中洗脱液的糖含量。根据该检测结果分别收集含有不同分子量褐藻胶寡糖组分的洗脱液。将含有不同分子量褐藻胶寡糖组分的洗脱液各自分别减压浓缩并冷冻干燥, 弃去组分 1, 得到分别具有不同分子量的式 (II) 所示褐藻胶寡糖组分 2-12 (n 分别具有 0-10 的值) 收集并合并 n=2-8 的式 (II) 所示褐藻胶寡糖洗脱液并干燥, 然后得到 n=2-8 的式 (II) 所示褐藻胶寡糖混合物 (四-十糖混合物), 作为对比实验样品。

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) 测定对比实验样品中各聚合度寡糖组分

的比例。测定方法同实施例 1 中相关部分。测试结果：四糖-十糖分别以 dp4-dp10 表示，分别为 dp4 为 10%，dp5 为 12%，dp6 为 13%，dp7 为 14%，dp8 为 15%，dp9 为 19%，dp10 为 17%。

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

表 2 甘露糖醛二酸寡糖组合物产品及对比试验样品中的寡糖百分比

组合 \ 比例	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	20%	25%	19%	12%	9%	5%	5%	3%	2%
C	8%	20%	28%	19%	13%	6%	3%	2%	1%
D	30%	30%	15%	15%	4%	2%	2%	1%	1%
对比实验样品	0	0	10%	12%	13%	14%	15%	19%	17%

以上 A、B、C、D 四个样品各取 10 g，按照“抗炎症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）及对比实验样品的药理活性。

10

1、胶原诱导的小鼠关节炎模型

实验中，模型组与正常对照组相比，出现明显的关节炎症状，踝、腕关节和跖骨中度红斑和肿胀。临床评分达到 6 分，说明该关节炎模型造模成功。与模型组相比，各个给药组发病程度均有不同程度的减轻。从附图 5a 和 5b 可以看出产品 A、B、C 使得小鼠发病时间较对比实验样品和单一聚合度的六糖明显延迟，临床评分也低于对比实验样品和单一聚合度的六糖，说明产品 A、B、C 的药效活性均好于对比实验样品，且好于活性最高的单一聚合度的六糖；但产品 D 发病时间较早，临床评分较高，反映出产品 D 的活性弱于六糖。说明组合物中各寡糖之间的比例很重要，添加一定比例的二糖、三糖有协同增效作用，但当二糖、三糖的比例过高时则会降低组合物的活性。

15

20

2、MOG 诱导的小鼠多发性硬化症模型

实验中，模型组与正常对照组相比，大部分小鼠出现双后肢均无力麻痹瘫痪症状，模型组平均临床评分达到 3 分，说明该多发性硬化症模型造模成功。与模型组相比，各给药组的炎症进展均有不同程度的减轻。从附图 6a 和 6b 可以看出产品 A、B、C 在整个实验过程中以及终点时的临床评分均低于对比实验样品和单一聚合度的六糖；而产品 D 在整个实验过程中以及终点时的临床评分略高，其抗炎活性最弱。

3、MRL/lpr 红斑狼疮小鼠模型

从第 10 周开始，转基因小鼠开始发病，出现淋巴结肿大情况，且淋巴结评分随着时间进展不断增大，说明模型组已经成功发病，且疾病进展迅速。与模型组相比，各给药组的发病进展均有不同程度的减轻。从附图 7a 和 7b 可以看出产品 A、B、C 使得小鼠发病时间较对比实验样品和单一聚合度的六糖明显延迟，淋巴结评分也低于对比实验样品和单一聚合度的六糖；但产品 D 发病时间较早，淋巴结评分较高，因此产品 D 的活性弱于六糖。不囿于任何理论，结合上文中其他实验的结果，推测组合物中二糖和三糖的适量存在有利于发挥各组之间的协同效果。

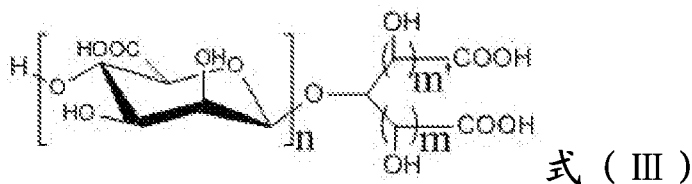
4、葡聚糖硫酸钠（dextran sulfate sodium, DSS）诱导小鼠结肠炎模型

实验结束后，模型组与正常对照组相比，结肠出现由于炎症造成的明显缩短，大部分小鼠体重明显下降，近半数模型组动物后期出现死亡，说明肠部炎症非常严重。与模型组相比，各给药组的肠部炎症均有不同程度的减轻，反映在结肠长度恢复，存活率提高上。从附图 8a 和 8b 可以看出产品 A、B、C 使得小鼠结肠长度和动物存活率大于对比实验样品和单一聚合度的六糖；但产品 D 结肠长度较小，存活率也略低于六糖，反映出产品 D 的活性弱于六糖。同样，实验结果与前述实验一致，表明组合物中二、三糖的含量以及各组

分的重量百分比对于药效的发挥有协同增效的作用，添加一定比例的二糖、三糖有协同增效作用，但当二糖、三糖的比例过高时则会降低组合物的活性。

权利要求书

1. 一种甘露糖醛二酸寡糖组合物用于制备治疗炎症及由炎症产生的疼痛的药物的用途；其中所述甘露糖醛二酸寡糖组合物包含具有式 (III) 的甘露糖醛二酸或其药学上可接受的盐：



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 60% 以上；

$n=1-2$ 的甘露糖醛二酸的重量总和占所述组合总重量的低于 60%。

2. 如权利要求 1 所述的用途, 其中所述炎症为血管炎症、神经炎症、关节炎、强直性脊柱炎、炎症性肠病、炎症性糖尿病性溃疡、炎症性皮肤病或系统性红斑狼疮。

3. 根据权利要求 1 所述的用途, 其中所述的甘露糖醛二酸寡糖组合物中, $n=1-2$ 的甘露糖醛二酸的重量总和占所述组合物总重量的 10-50%, 更优选 30-50%。

4. 根据权利要求 1 所述的用途, 其中所述的甘露糖醛二酸寡糖组合物中, $n=1-3$ 的甘露糖醛二酸的重量总和与 $n=4-7$ 的甘露糖醛二酸重量总和的比例在 1.0-3.5 之间。

5. 根据权利要求 1 所述的用途, 其中所述的甘露糖醛二酸寡糖组合物中, $m+m'=1$ 或 2 的甘露糖醛二酸的重量总和不低于所述组

合物总重量的 50%以上, 优选 60%-90%, 更优选 70%-90%。

6. 根据权利要求 5 所述的用途, 其中 $m+m'=1$ 的甘露糖醛二酸的重量总和不低于所述组合物总重量的 10%, 优选 30-40%。

5

7. 根据权利要求 5 所述的用途, 其中 $m+m'=2$ 的甘露糖醛二酸的重量总和不低于所述组合物总重量的 10%, 优选 30-50%。

8. 根据权利要求 1 所述的用途, 其中 $n=1-5$ 的甘露糖醛二酸的重量总和占所述组合物总重量的 80-95%。

10

9. 根据权利要求 1 所述的用途, 其中 $n=1-3$ 的甘露糖醛二酸的重量总和占所述组合物总重量的 20-70%。

15

10. 根据权利要求 4 所述的用途, 其中 $n=1-3$ 的甘露糖醛二酸的重量总和与 $n=4-7$ 的甘露糖醛二酸重量总和的比例在 1.0-3.0 之间。

11. 根据权利要求 1-9 任一项所述的用途, 其中各聚合度甘露糖醛二酸在所述组合物中的重量百分含量为: 二糖 5-25%, 三糖 15-30%, 四糖 15-28%, 五糖 5-25%, 六糖 2-20%, 七糖 2-20%, 八糖 2-20%, 九糖 2-20%, 十糖 2-20%。

20

12. 据权利要求 11 所述的用途, 其中各聚合度甘露糖醛二酸在所述组合物中的重量百分含量为: 二糖 5-25%, 三糖 15-30%, 四糖 15-28%, 五糖 10-20%, 六糖 5-15%, 七糖 3-10%, 八糖 2-5%, 九糖 1-5%, 十糖 1-5%。

25

13. 根据权利要求 12 所述的用途, 其中各聚合度甘露糖醛二酸在所述组合物中的重量百分含量为: 二糖 10-20%, 三糖 18-30%, 四

糖 15-28%，五糖 15-20%，六糖 5-10%，七糖 3-5%，八糖 2-5%，九糖 1-3%，十糖 1-3%。

14. 根据权利要求 1-13 所述的用途，其中所述药学上可接受的
5 盐是钠盐或钾盐。

15. 一种治疗患有炎症的患者的方法，其包括给予需要的患者有效量的根据权利要求 1-14 任一项所述的甘露糖醛二酸寡糖组合物。

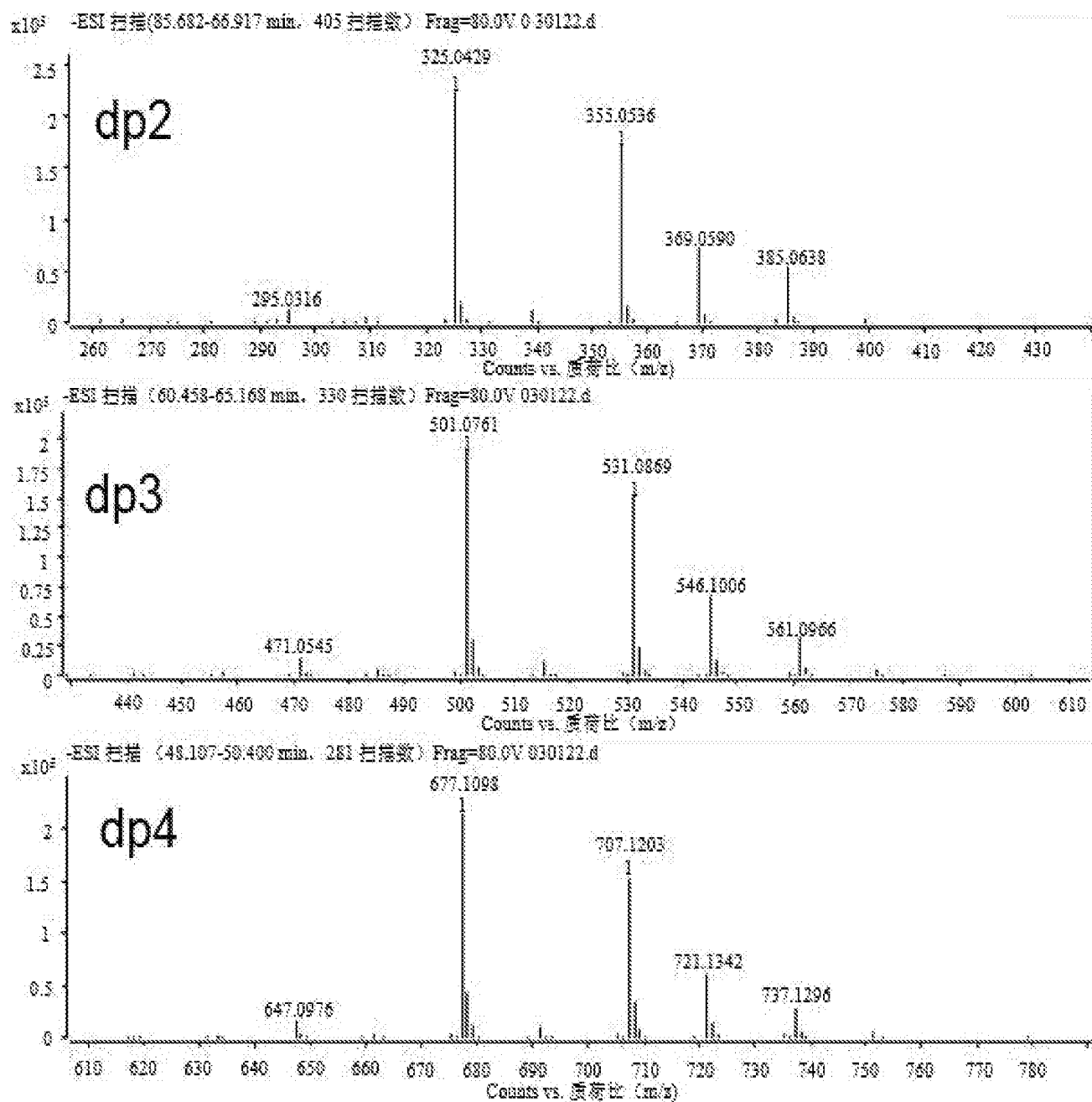


图 1

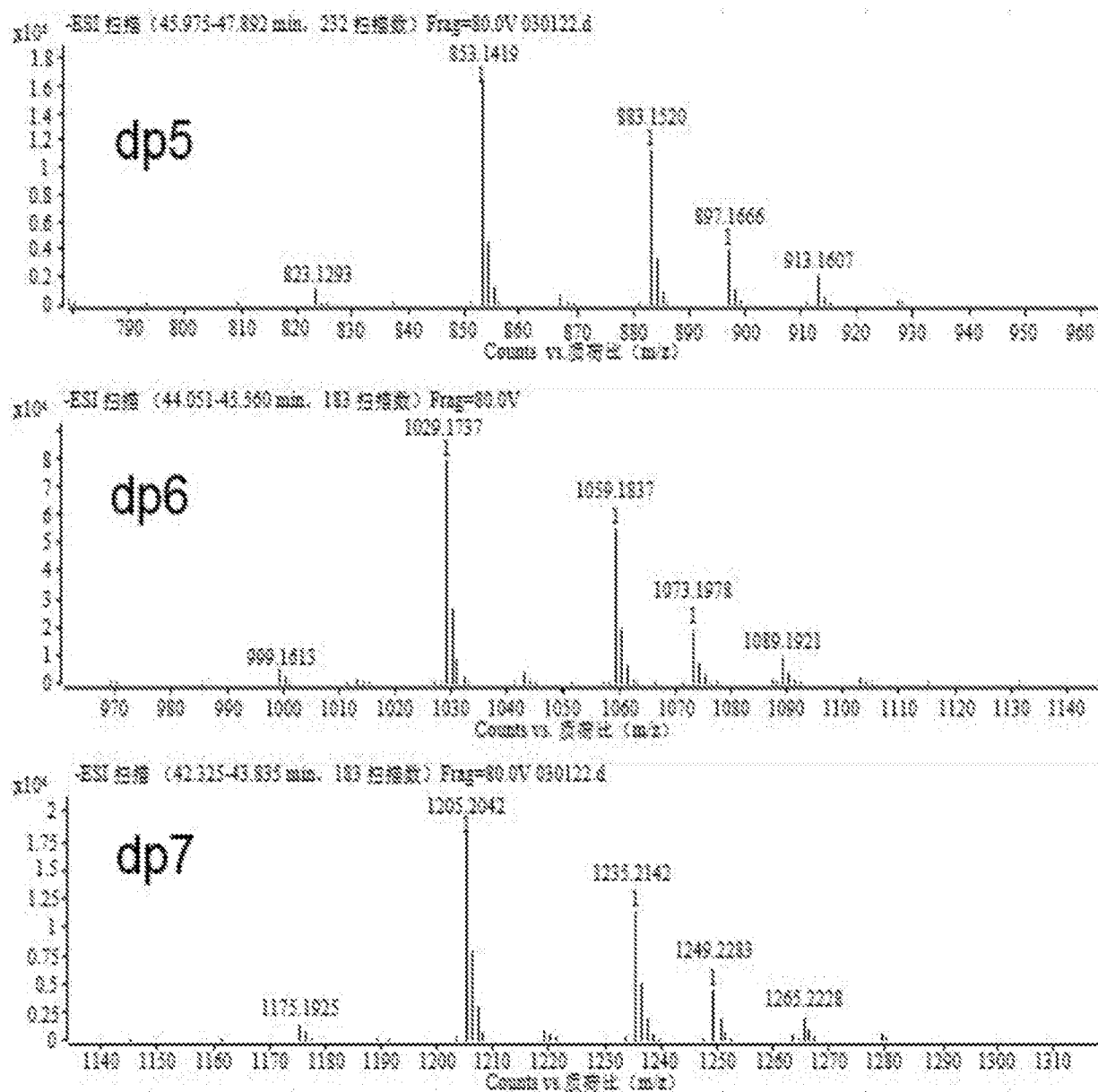


图 2

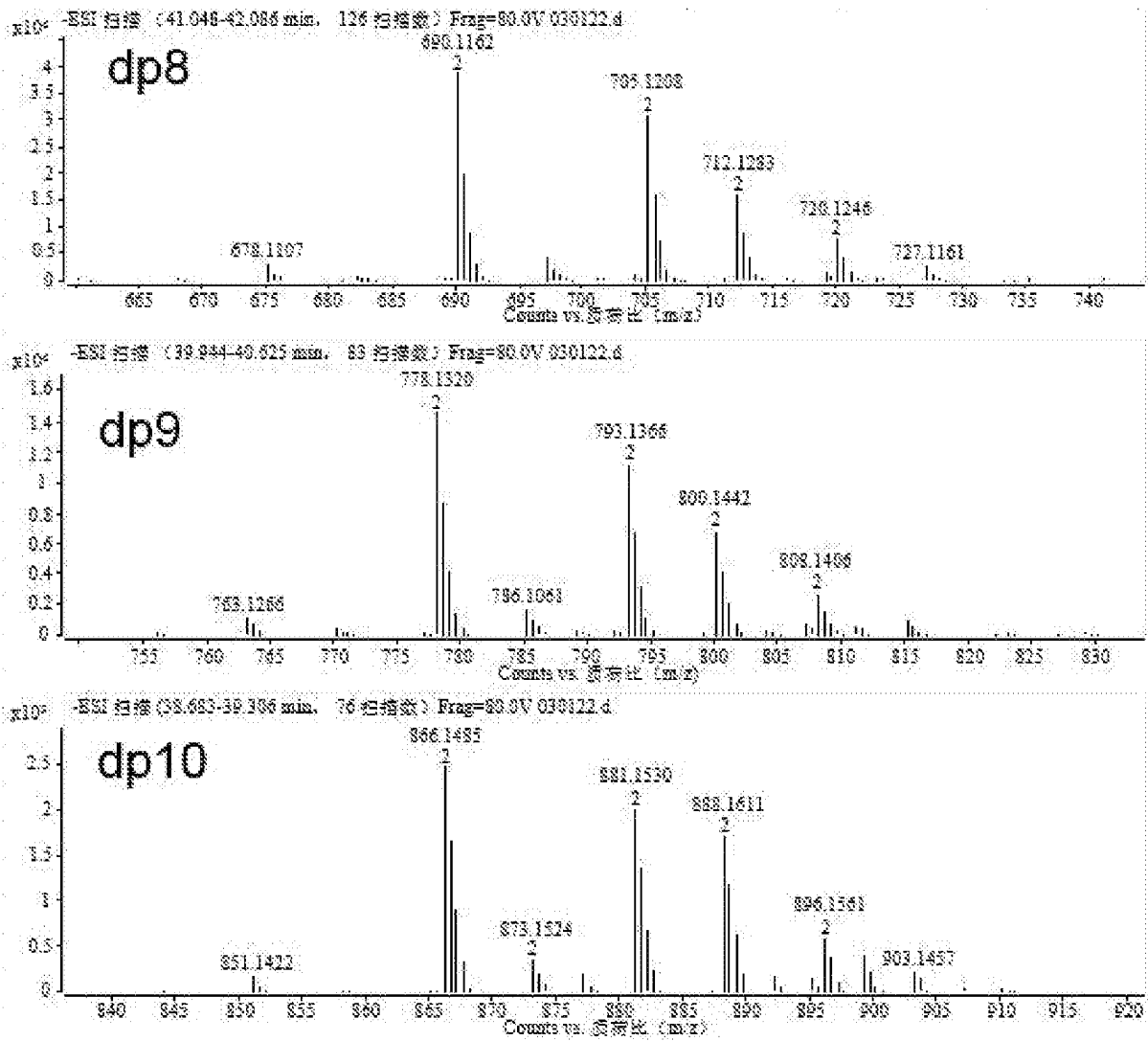


图 3

IL-1 β

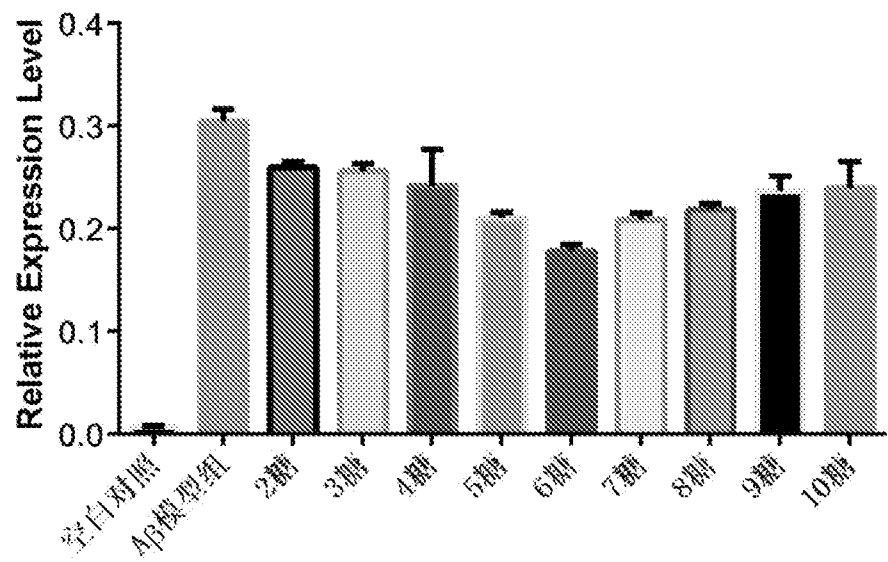


图 4

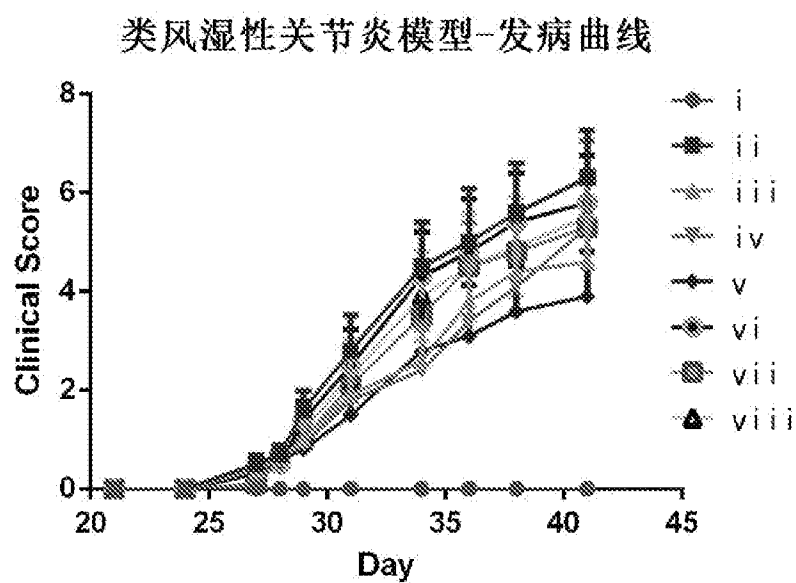


图 5a

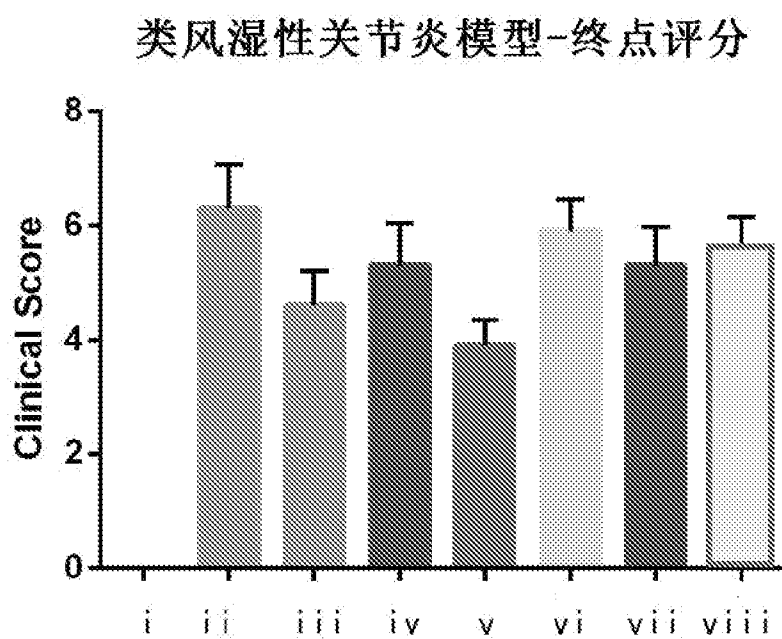


图 5b

多发性硬化症模型-发病曲线

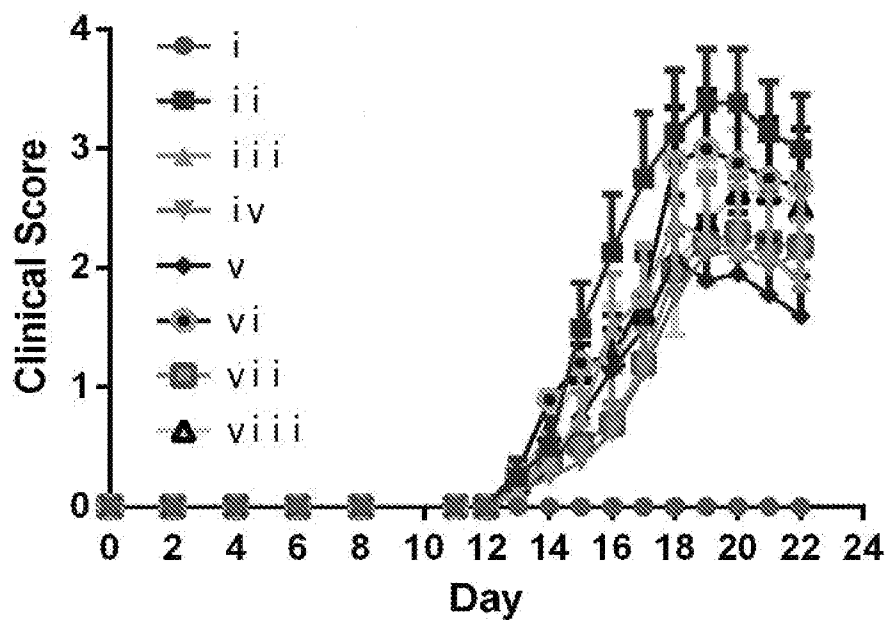


图 6a

多发性硬化症模型-终点评分

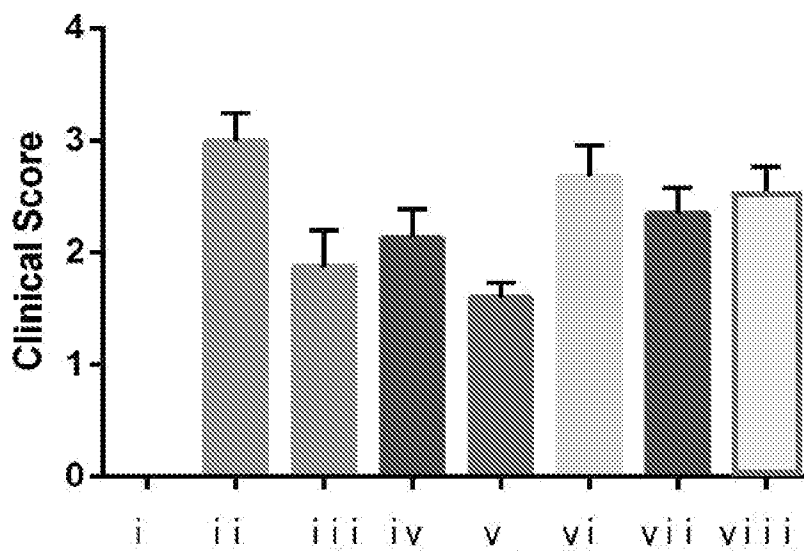


图 6b

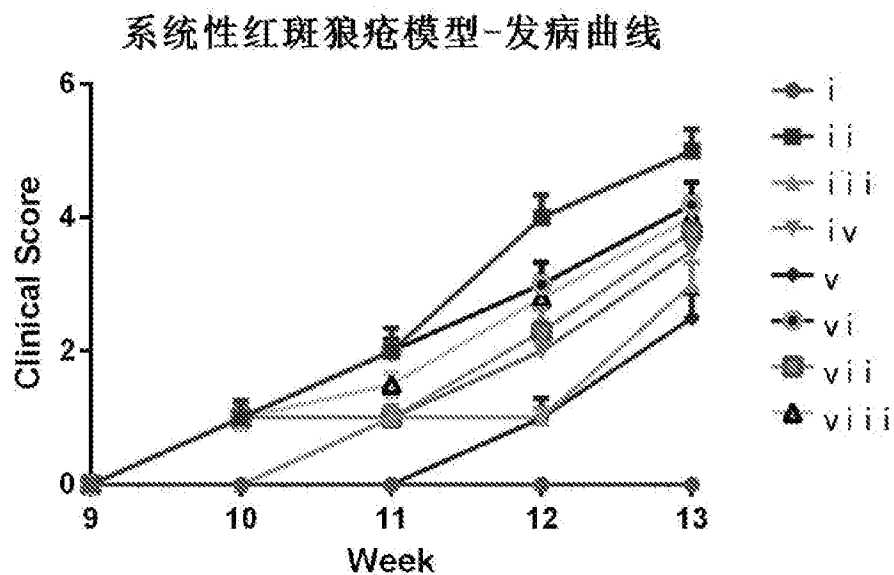


图 7a

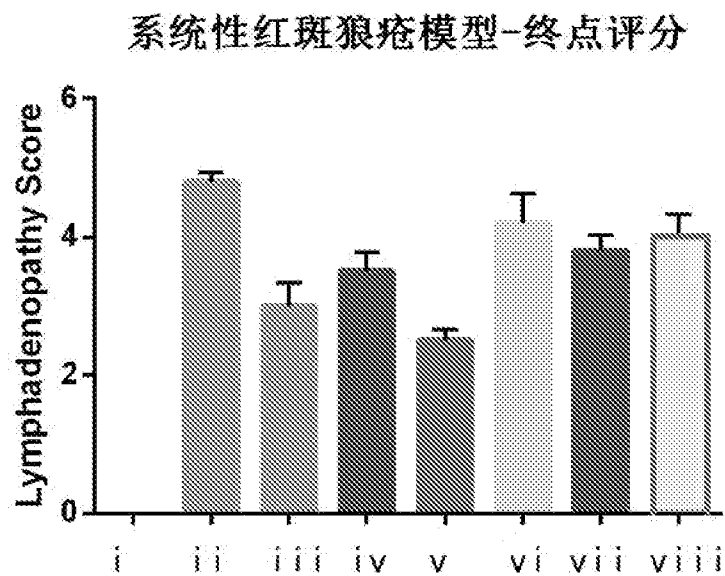


图 7b

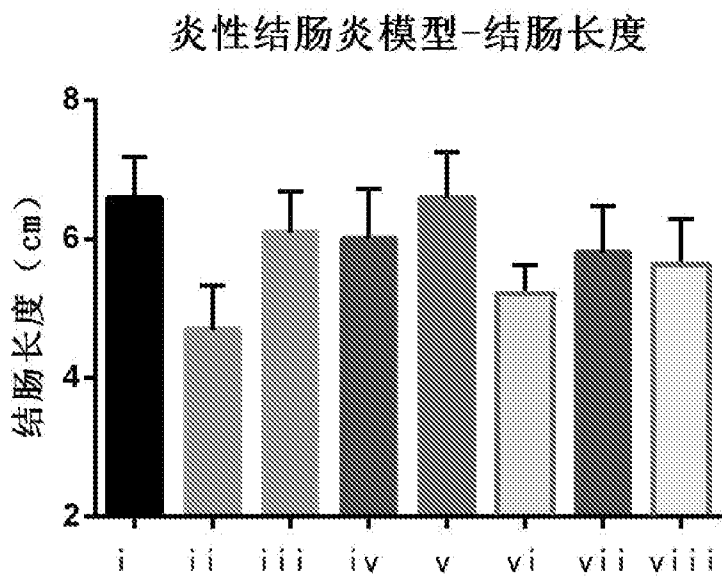


图 8a

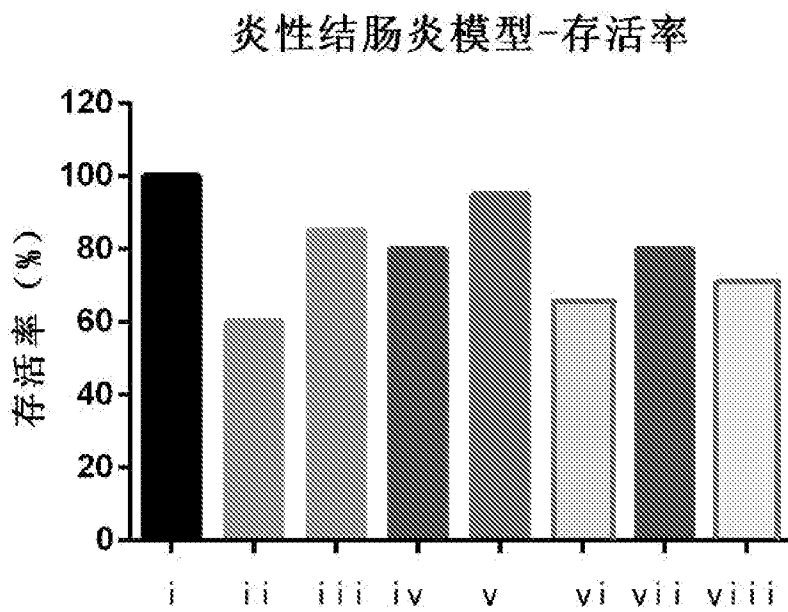


图 8b

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/093656

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 31/702(2006.01)i; A61P 29/00(2006.01)i

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)

A61K; A61P

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)

CNABS, VEN(DWPI+SIPOABS), CNTXT, EPTXT, USTXT, WOTXT, 中国药物专利数据库, CTCMPD, CNKI, 百度学术搜索, BAIDU XUESHU SEARCH, ISI-WEB OF SCIENCE: 甘露糖醛, mannuron+, 炎症, 炎, +inflam+, neuroinflam+, Arthritis, 神经炎症, 关节炎, 强直性脊柱炎, 红斑狼疮, ankylosing spondylitis, erythematous lupus, lupus erythematosus

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 106344594 A (SHANGHAI GREEN VALLEY PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 25 January 2017 (2017-01-25) see the abstract, and claims 1-7	1-15

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“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)

“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

“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

“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

“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

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 September 2019

Date of mailing of the international search report

09 October 2019

Name and mailing address of the ISA/CN

**China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)**
**No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing
100088**
China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/093656

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **15**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
 - [1] The claim relates to a method for treating inflammation, which is the subject matter that does not warrant a search (PCT Rule 39.1(iv)). However, the search is still made on the use of the composition in the preparation of a medicament for treating inflammation.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2019/093656

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN 106344594 A	25 January 2017	None	

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2019/093656

A. 主题的分类

A61K 31/702(2006.01)i; A61P 29/00(2006.01)i

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)

A61K; A61P

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))

CNABS, VEN(DWPI+SIPOABS), CNTXT, EPTXT, USTXT, WOTXT, 中国药物专利数据库, CNKI, 百度学术搜索, ISI-WEB OF SCIENCE:甘露糖醛, mannuron+, 炎症, 炎, +inflam+, neuroinflamm+, Arthritis, 神经炎症, 关节炎, 强直性脊柱炎, 红斑狼疮, ankylosing spondylitis, erythematous lupus, lupus erythematosus

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
X	CN 106344594 A (上海绿谷制药有限公司) 2017年 1月 25日 (2017 - 01 - 25) 参见说明书摘要, 权利要求1-7	1-15

☐ 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

2019年 9月 16日

国际检索报告邮寄日期

2019年 10月 9日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局(ISA/CN)
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

受权官员

修文

传真号 (86-10)62019451

电话号码 (86-10)62411076

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☒ 权利要求： 15
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
[1] 该权利要求涉及治疗炎症的方法，这属于不要求检索的主题(PCT细则39.1(iv))，但还是针对所述组合物在制备治疗炎症的药物中的应用进行了检索。
2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，具体地说：
3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际申请号
PCT/CN2019/093656

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN	106344594	A	2017年 1月 25日	无	