

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102176915 A

(43) 申请公布日 2011. 09. 07

(21) 申请号 200980133863. 3

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2009. 06. 30

A61K 31/727(2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 31/726(2006. 01)

P200802002 2008. 07. 01 ES

A61K 9/08(2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 02. 28

(86) PCT申请的申请数据

PCT/ES2009/070264 2009. 06. 30

(87) PCT申请的公布数据

W02010/000904 ES 2010. 01. 07

(71) 申请人 罗维实验室制药股份公司

地址 西班牙马德里

(72) 发明人 伊万·洛佩斯-贝尔蒙特·恩西纳

玛丽亚德洛斯·安赫莱斯·卡纳莱斯·马约多莫

埃莱娜·塞瓦德拉·米兰达

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任

公司 11021

代理人 吴小明

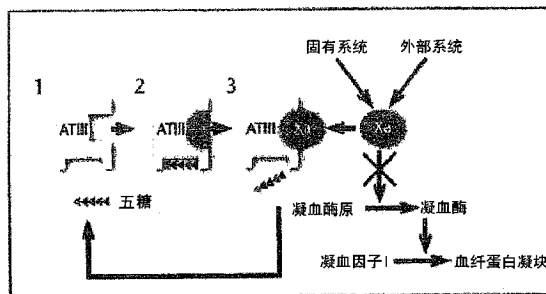
权利要求书 2 页 说明书 37 页 附图 12 页

(54) 发明名称

具有糖胺聚糖的药物组合物及其在治疗慢性溃疡中的应用

(57) 摘要

本发明涉及用于治疗糖尿病足部溃疡的糖胺聚糖组合物。更具体地,本发明涉及低分子量肝素(LMWHs)和极低分子量肝素(VLMWHs)用于治疗慢性溃疡、特别是糖尿病足部溃疡,并且更特别用于制备治疗慢性溃疡、特别是糖尿病足部溃疡和压力性溃疡的药物。



1. 用于治疗慢性溃疡的糖胺聚糖药物组合物,所述药物组合物在药用介质中包括至少下列单糖,其中百分数为占所述组合物总单糖百分数的百分数:

a)N- 磺基 -D- 葡糖胺 :25-50%

b)D- 葡糖醛酸 :3-25%

其特征在于,与 N- 磺基 -3- 磺基 -D- 葡糖胺结合的二糖单元 D- 葡糖醛酸的比例不大于 20%。

2. 根据权利要求 1 所述的组合物,其特征在于,与 N- 磺基 -3- 磺基 -D- 葡糖胺结合的二糖单元 D- 葡糖醛酸的比例不大于所述组合物总单糖百分数的 10%。

3. 根据权利要求 1 所述的组合物,其特征在于,与 N- 磺基 -3- 磺基 -D- 葡糖胺结合的二糖单元 D- 葡糖醛酸的比例不大于所述组合物总单糖百分数的 5%。

4. 根据前述权利要求 1-3 中任一项所述的组合物,其特征在于,其还包括多至占所述组合物总单糖百分数的 10%的 N- 乙酰 -D- 葡糖胺比例。

5. 根据前述权利要求 1-4 中任一项所述的组合物,其特征在于,其还包括多至占所述组合物总单糖百分数的 35%的 L- 艾杜糖醛酸比例。

6. 根据前述权利要求 5 所述的组合物,其特征在于,L- 艾杜糖醛酸的比例占所述组合物总单糖百分数的多至 10%。

7. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其特征在于,其还包括占所述组合物总单糖百分数的多至 50%比例的 2- 硫酸化 L- 艾杜糖醛酸。

8. 根据权利要求 7 所述的组合物,其特征在于,2- 硫酸化 L- 艾杜糖醛酸的比例处于占所述组合物总单糖百分数的 15-50%范围内。

9. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其特征在于,其包括低分子量肝素。

10. 根据前述权利要求 9 所述的组合物,其中所述低分子量肝素是平均分子量小于 8,000 道尔顿的肝素。

11. 根据前述权利要求 1-8 中任一项所述的组合物,其特征在于,其包括极低分子量的肝素。

12. 根据前述权利要求 1-8 中任一项所述的组合物,其特征在于,其包括未分级分离的肝素。

13. 根据前述权利要求 1-12 中任一项的组合物在制备用于治疗慢性溃疡的医药产品中的应用。

14. 根据权利要求 13 所述的应用,其中所述慢性溃疡是糖尿病足部溃疡。

15. 根据权利要求 13 所述的应用,其中所述慢性溃疡是压力性溃疡。

16. 根据权利要求 13-15 中任一项所述的应用,其特征在于,所述组合物包括低分子量肝素,并且特征在于,所提及的肝素的血浆半衰期和以 IU 为单位的剂量之间的比例为 1 : 800-1 : 5000。

17. 根据权利要求 13-15 中任一项所述的应用,其特征在于,所述组合物包括具有 5.2-5.4 小时的血浆半衰期的低分子量肝素,并且特征在于,所提及的肝素的血浆半衰期和以 IU 为单位的剂量之间的比例为 1 : 900-1 : 1200。

18. 根据权利要求 13-15 中任一项所述的应用,其特征在于,所述组合物包括具有 4.0-4.4 小时的血浆半衰期的低分子量肝素,并且特征在于,所提及的低分子量肝素的血浆

半衰期和以 IU 为单位的剂量之间的比例为 1 : 1000-1 : 2500。

19. 根据权利要求 18 所述的应用,其特征在于,所提及的低分子量肝素的血浆半衰期和以 IU 为单位的剂量之间的比例约为 1 : 2000。

20. 根据前述权利要求 13-19 中任一项所述的应用,其中所述低分子量肝素通过静脉内途径施用。

21. 根据前述权利要求 13-19 中任一项所述的应用,其中所述低分子量肝素通过皮下途径施用。

22. 根据前述权利要求 13-19 中任一项所述的应用,其中所述低分子量肝素通过口服途径施用。

23. 根据前述权利要求 13-19 中任一项所述的应用,其中所述低分子量肝素通过局部途径施用。

具有糖胺聚糖的药物组合物及其在治疗慢性溃疡中的应用

发明领域

[0001] 本发明涉及一种用于治疗慢性溃疡、特别是糖尿病足部溃疡 (diabetic foot ulcers) 和压力性溃疡 (pressure ulcers) 的糖胺聚糖组合物。更具体地,涉及治疗慢性溃疡、更特别地制备用于治疗慢性溃疡的医药产品的低分子量肝素 (LMWHs) 和极低分子量肝素 (VLMWHs) 的组合物。

[0002] 技术状况

[0003] 糖尿病 (Diabetes Mellitus) (DM) 是一种代谢疾病,其特征在于血浆葡萄糖水平持续不变的增加,其有助于外周神经病和大血管以及微血管并发症的发作。根据世界卫生组织 (WHO) 公布的数据,DM 的发病率以令人担忧的方式递增,在 2000 年在世界人口中发病率为 2.8%,并且估计在 2030 年该数字将增加至 4.4%。因此,在 2000 年,患有 DM 的患者数目约为一亿七千一百万,并且估计在 2030 年这一数目将增加至三亿六千六百万。在其它因素中,DM 发病率的增加已经与人口的普遍老龄化相关,因为在年龄和该疾病的发病率之间存在直接的关系。在这种意义上,已经预计,DM 在西班牙的发病率可能为 2% -6%;10% 将对应是 1 型 DM,患有 2 型 DM 的患者中有 50% 未被确诊。考虑到已公布的关于在西班牙不同地区 DM 发病率的研究是在 2002 年之前的以及发病率增加的趋势,预计目前在西班牙有超过两百五十万糖尿病病人。

[0004] 神经损害,外周系统和自主系统的神经损害,可能代表最常见的 DM 并发症。其可能在两种类型的 DM 中发生,并且其发病率和严重性与糖尿病发展的年数相关,和肝抗胰岛素物质控制的程度相关。估计这种并发症影响 60% 的 DM 受试者,这是糖尿病受试者足部溃疡发作的主要原因。在这一点上,美国糖尿病协会 (American Diabetes Association) 在其第十六次科学会议上确定 15% 的 DM 患者在其整个一生中发展足部溃疡,并且足部溃疡是在糖尿病受试者中发生的 6% 的住院治疗的原因。在糖尿病患者中发生的所有溃疡中的 15% 最终导致截肢,与 DM 相关的并发症是非外伤性截肢的主要原因 (40-70%),糖尿病患者中发生的 85% 的截肢又与足部溃疡相关。在美国,每年进行 100,000 例截肢,这极大地影响卫生保健成本,据计算,在 2001 年,在美国溃疡和截肢大约花费 10 亿美元,而在英国这笔费用为四亿五千六百万美元。这些源于糖尿病足部溃疡的花费取决于是否进行截肢而在很大程度上不同,并且因此,在 1990 年在瑞士进行的研究中,观察到在治愈且没有局部缺血成分的那些溃疡的情形中,相关的费用为 16,500 美元。相反,在必须进行较轻微的截肢的情形中,花费达到 27,000 美元,在发生严重截肢的事件中费用总计 63,000 美元。

[0005] 由西班牙血管学和血管手术学会的 Grupo de Consenso sobre Pie Diabético (关于糖尿病足合意的组 (Group of Consensus on Diabetic Foot)) 提议的糖尿病足的定义为:“由持续的高血糖症诱发的具有神经病疾病发生学基础的临床改变,其中,伴有或不伴有缺血的共存,并且在外伤引发后,发生足部损害和 / 或溃疡”。

[0006] 足部溃疡是疾病如糖尿病的显著并发症,每年的发病率略微高于 2% (Abbott C. A., 等 (2002) The North-West Diabetes Foot Care Study: incidence of, and risk factors for, new diabetic foot ulceration in a community-based patient cohort (西

北糖尿病性足护理研究:基于社团的患者群体中新的糖尿病足部溃疡的发病率、和危险因素). *Diabet. Med.* (糖尿病医学) 19(5):377-84)。据估计 15% 的患有糖尿病的患者将在他们生命中的某个时间发展溃疡 (Reiber G. E. (1996) *The epidemiology of diabetic foot problems* (糖尿病足问题的流行病学). *Diabet. Med.* (糖尿病医学) 13 增刊 1:S6-11), 并且约 10% -30% 的具有溃疡的那些患者将发展为肢体的截肢 (Lipsky B. A. (2004) *Medical treatment of diabetic foot infections* (糖尿病足感染的医学治疗). *Clin. Infect Dis.* (临床传染病) 39 增刊 2:S104-14)。此外, 这在该事件中是复杂的, 在出现溃疡的下肢中存在局部缺血, 在大部分病例中是由于因高的血栓形成发生率导致的血液供应不足而发生的。

[0007] 关于已经进行了下肢截肢的患者的 5 年的死亡率, 为 50-60 % (Reiber G. E. (1996) *The epidemiology of diabetic foot problems* (糖尿病足问题的流行病学). *Diabet. Med.* (糖尿病医学) 13 增刊 1:S6-11)。已经使用了多种用于治疗患有糖尿病足的患者方法, 包括严格的代谢控制, 预防可缓和的危险因素, 清创术, 使用敷料, 感染的抗微生物治疗, 消除损害区域的压力, 使用皮肤移植, 施用生长因子和在存在适应证的情形中使用血管再造法 (revascularization)。

[0008] 在大部分病例中, 对这种类型的慢性溃疡的治疗通过局部途径进行的, 例如, 在溃疡处如在糖尿病足部溃疡处使用敷料剂是常用的。在受控的临床试验中研究的新敷料剂包括基于半透性聚合物膜、Promogran (胶原基质)、藻酸盐、羧甲基纤维素、透明质烷 (hyaluronan) 和低于大气压的敷料 (Eldor R. 等 (2004) *New and experimental approaches to treatment of diabetic foot ulcers: a comprehensive review of emerging treatment strategies* (糖尿病足部溃疡的新的和实验治疗方法: 新现治疗策略的综合评论). *Diabet. Med.* (糖尿病医药) 21(11):1161-73)。还开发了置于溃疡损害处产生皮肤替代品的的方法。Dermagraft[®] 是通过将人皮肤成纤维细胞接种在合成的生物可吸收材料的构架上而生成的, 已证明其在低等溃疡中是有效的, 在较短时间中具有较大的治愈比例 (M(Marston W. A., 等 (2003) *Dermagraft Diabetic Foot Ulcer Study Group* (Dermagraft 糖尿病足部溃疡研究组). *The efficacy and safety of Dermagraf[®] in improving the healing of chronic diabetic foot ulcers: results of a prospective randomized trial* (Dermagraft[®] 在提高慢性糖尿病足部溃疡的治愈中的功效和安全性: 预期的随机化试验的结果). *Diabetes Care* (糖尿病护理) 26:1701-5)。Apligrat[®] 由下列各项组成: 由人成纤维细胞在牛 I 型胶原基质上形成的皮肤层和之后由人角质形成细胞形成的表皮。类似地, 已经证明, 当这一皮肤替代物应用在低级和非感染性神经病性溃疡时, 其显著地与损害的更大更快的愈合相关 (Veves A., 等 (2001) *Graftskin, a human skin equivalent, is effective in the management of noninfected neuropathic diabetic foot ulcers: a prospective randomized multicenter clinical trial* (Graftskin, 一种人皮肤等价物, 有效护理非感染性神经病性糖尿病足部溃疡: 预期的随机化多中心临床试验). *Diabetes Care* (糖尿病护理) 24:290-5)。在 III 期随机化双盲安慰剂对照的临床试验中, 证明凝胶形式的血小板来源的生长因子 (PDGF) 对于治疗具有良好的血液灌注的患有神经病性溃疡的糖尿病患者的治疗是有效和安全的 (Wieman T.J., 等 (1998) *Clinical efficacy of beclapernin (rh PDGF-BB) gel* (贝卡普勒明 (rh

PDGF-BB) 凝胶的临床功效)。Diabetes Care(糖尿病护理)21(5):822-7)。依据测面积学评估,该研究中所包括的大部分患者(95%)具有面积 $< 10\text{cm}^2$ 的溃疡。与安慰剂相比较,100 $\mu\text{g/g}$ 的贝卡普勒明凝胶,显著增加完全的损害闭合比例 43% (50 相对 35%, $p = 0.007$), 并且缩短获得所述作用的时间 32% (86 相对 127 天, $p = 0.013$)。使用 PDGF 或贝卡普勒明 (Regranex[®]) 的令人满意的结果致使它们被核准用于治疗糖尿病患者下肢的神经病性溃疡,所述溃疡延伸到皮下组织或更深层,并且具有适当的血液流动 (Brem H., Sheehan P., Boulton A.J. (2004) Protocol for treatment of diabetic foot ulcers(糖尿病足部溃疡的治疗方法). Am. J. Surg. (美国手术杂志) 187(5A):1S-10S)。然而,几个月后, FDA 在接收到表明在将强生 (Johnson&Johnson) 的局部生长因子 Regranex[®] 直接应用到糖尿病足部和腿部溃疡上的糖尿病患者中存在较高的癌症危险的研究数据后进行了安全性评估,因此,这种治疗性备选物目前处于评估中,并且限制性用于不具有易患任何类型的肿瘤的倾向的患者。

[0009] 关于通过局部的肠胃外途径的治疗,几年前公开了施用修补剂 (healing agent) 如表皮生长因子 (EGF) 的方法,其由通过几次注射的方式将生物分子溶液渗透至损害中组成 (WO 03053458)。已经证明这种治疗有效用于防止糖尿病足的截肢,但是由于将注射施用到损害中非常痛,并且每次治疗必须施用几次注射持续几周,其具有对于患者是创伤性的缺点。此外,文献 EP 1499317 公布了使用 1 型钠-氢交换剂 (NHE-1) 抑制剂治疗糖尿病并发症如糖尿病足的方法,国际公布 WO 02077155 描述了角质形成细胞生长因子 (KGF-2) 促进或者加速损害的愈合。

[0010] 最后,国际公布 WO2007087759 涉及一种用于肠胃外施用给具有慢性皮肤病症如糖尿病足部溃疡的患者的药物组合物,其包含具有表皮生长因子的微球体。许多其它专利已经集中在加速愈合范围的其它方法上。然而,这些方法无一证明是广泛有效的。

[0011] 另外,非专利文献中已经公开了一些研究,其公开了基于肝素是已知的抗血栓形成剂和消炎剂,可以改善血管微循环,使用低分子量肝素 (LMWHs) 治疗的糖尿病足患者的某些有希望的结果。在“Effect of Dalteparin of healing of chronic foot ulcers in diabetic patients with peripheral arterial occlusive disease(达肝素治愈具有外周动脉闭塞疾病的糖尿病患者的慢性足部溃疡中的作用)”, Diabetes Care(糖尿病护理), 卷 26(9), 2003 年 9 月中,以及在 M. Kalani, A. 等同组的公布中,题目为“Beneficial effects of dalteparin on haemostatic function and local tissue oxygenation in patients with diabetes, severe vascular disease and foot ulcers(达肝素对具有糖尿病、严重血管疾病和足部溃疡的患者中的止血功能和局部组织氧化的有益作用)”, Thrombosis Research. (血栓形成研究) 120, 653-661, 2007 中,描述了证明低分子量肝素 (LMWH) 如达肝素 (dalteparin) 改善具有外周动脉闭塞疾病的患者的糖尿病足部溃疡的进展的临床试验。然而,令人吃惊的是,在这些文献中,患者用乙酰水杨酸联合治疗,即,暗示联合具有抗凝集作用的两种活性成分如何协同性地有助于具有外周动脉闭塞疾病的患者的糖尿病足部溃疡的进展。“Low molecular weight heparin seem to improve local capillary circulation and healing of chronic foot ulcers in diabetic patients(低分子量肝素似乎改善局部毛细循环和糖尿病患者中慢性足部溃疡的治愈)”, VASA, Brand 22, 1993, FET 2 也公开了评估达肝素在具有糖尿病足部溃疡的患者中的功效

的双盲安慰剂对照的临床试验。该研究的初步结果表明,达肝素可能对预防这种类型的伤口具有有益的作用,尽管总是以预防剂量,即,由于在以较高剂量的治疗过程中预见到出血,决不使用大于 2500IU/ 天的达肝素剂量,而在具有糖尿病足部溃疡的患者的情形中,这一增加,并不包括更大的功效。这是由于在现有技术领域中通常相信糖尿病患者比不具有该疾病的患者具有更高的出血危险 (Adverse impact of bleeding on prognosis in patients with acute coronary syndromes(出血对具有急性冠状动脉综合征的患者预后的不利影响),Eikelboom JW 等. *Circulation*(循环). 2006年8月22日 ;114(8) :774-82)。

[0012] 发明简述

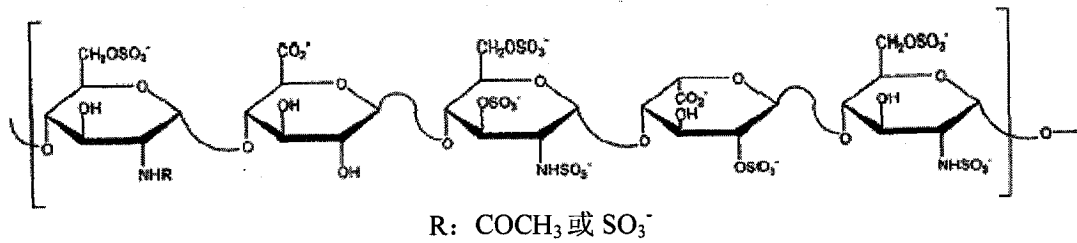
[0013] 在慢性溃疡、特别是糖尿病足部溃疡的治疗中使用糖胺聚糖,并且特别是使用一些低分子量肝素用于这一目的,目前已经概略地描述用于具有严重循环病症的患者,因为这些低分子量肝素具有抗血栓形成和抗凝集活性,表示为抗激活的因子 X(Xa) 作用和抗因子 IIa 作用。然而,因为在以较高剂量的治疗中包含的出血危险,它们通常不用于患有糖尿病足部溃疡但无外周动脉闭塞疾病的糖尿病患者。这是由于这种类型的化合物的抗因子 Xa 作用,其转化为抗血栓形成作用,并且其与在形成低分子量和极低分子量肝素的糖结构中存在的特异性五糖的类肝素结构内的含量具有直接关系,并且由于抗因子 Xa/ 抗因子 IIa 作用比例。因为在总结构中的五糖的量越大,抗因子 Xa 活性越大,合成的五糖(磺达肝素(fondaparinux)) 成为最有选择性的因子 Xa 抑制剂,并且因此成为以选择性方式具有最大抗血栓形成能力的分子,确定这一比例。

[0014] 因此,磺达肝素的抗血栓形成活性是对因子 Xa 的选择性抑制的结果,该选择性抑制由抗凝血酶 III(ATIII) 介导。由于其与 ATIII 的选择性结合,磺达肝素将 ATIII 对因子 Xa 固有的中和提高 300 倍。因子 Xa 的中和中断血液凝集级联,并且抑制凝血酶形成和血栓发展(参见图 1)。

[0015] 考虑到技术现状,开始可能认为结构中的大量五糖对于获得治愈(非减轻)作用是必需的。然而,如上文所示,由于在以较大剂量的治疗中包含的出血危险,没有进行这一方法。本发明的发明人已经克服了现有技术的偏见,因为他们设法证实了,尽管五糖处于较小的比例或以选择性方式被化学或酶学改变,但治愈和再生作用不受影响,因为在糖胺聚糖结构中真正重要的是不包含五糖的多糖链的比例。此外,本发明的研究者已经能够实验确定,在认为是慢性的任何类型的溃疡中——不仅是在糖尿病足部溃疡中——施用具有较少量的五糖的糖胺聚糖的有益治愈作用,并且所述施用通过三种主要施用途径是有效的:肠胃外,口服和局部途径。

[0016] 由于 Lindahl 和 Choay 小组在 20 世纪八十年代初期进行的工作(Choay J, Lormeau JC, Petitou M, Sinag P 和 Fareed J. *Ann NY Acad Sci*(纽约科学学会年度杂志)1981 ;370 : 644-649 ;Thunberg L, **Bäckström** G 和 Lindahl U. *Carbohydr Res*(碳水化合物研究)1982 ; 100 :393-410),提出了这样的假说:在肝素链内存在与五糖对应的特异性序列,其与抗凝血酶 III 选择性相互作用。这种五糖的结构如下(式 1):

[0017]



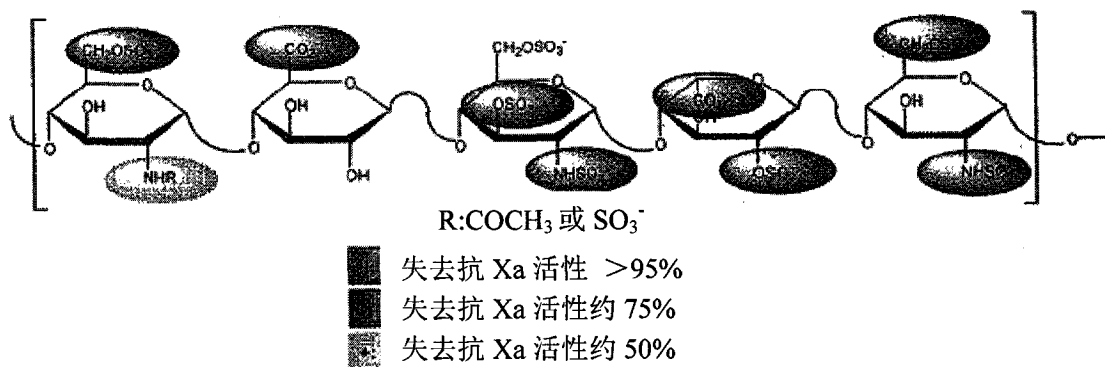
式 1

[0018] 在未分级分离的肝素 (non-fractionated heparin) 以及在通过已知的解聚方法 (酶、硝酸、 β -消除等) 获得的各种 LMWHs 或 VLMWHs 中, 存在允许通过与 N-磺基-3-磺基-D-葡萄糖胺 ($A_{Ns,3s}$) 结合的叫作 D-葡萄糖醛酸的五糖特异性和唯一的二糖单元的含量的量化而确定五糖在通用结构中的量的测量。这一测量允许获得在该二糖存在的百分数和五糖在肝素结构中的含量之间的良好的相关性, 并由此获得该二糖存在的百分数与分析的肝素的抗 FXa 活性之间的良好的相关性 (Guerrini M 等 Seminars in Thrombosis and Hemostasis (血栓形成和止血研讨会) 2007 ;33 :478-787)。

[0019] 可能影响五糖的完整性的不同化学和 / 或酶学修饰也将使其与化合物抗-FXa 活性的减少相关。这些反应可以是去-N-乙酰化, N 和 O-硫酸化, O-酰化, 开环反应等。

[0020] 例如, 如果五糖关于硫酸化的程度进行化学或酶学改变, 则抗因子 Xa 作用也被改变。然而, 在许多研究 (Lindhahl U, **Bäckström** G 和 Thunberg L. J. Biol. Chem. (生物化学杂志) 1983 ;258 :9826-9830 ;Riesenfeld J, Thunberg L, **Höök** M 和 Lindahl U. J. Biol. Chem. (生物化学杂志) 1981 ;256 :2389-2393) 中, 已经证明, 当硫酸化程度改变时, 在五糖中存在的具有关于抗凝血酶 III 亲和性的所有硫酸根基团不是同等重要的, 因此可能确定任何这些基团的消除怎样影响五糖的抗因子 Xa 活性:

[0021]



[0022] 因为这一原因, 在本发明中, 不同的 LMWHs 或 VLMWHs (见实施例) 已被物理和化学修饰从而以定性和定量方式改变负责抗 FXa 活性的五糖, 从而证明, 在溃疡的情形中, 特别是糖尿病足部溃疡的情形中, 感兴趣的是, 在这种类型的糖胺聚糖中存在较大比例的寡糖序列, 所述寡糖序列富含选自下列各项组成的组的单糖: N-磺基-D-葡萄糖胺和 D-葡萄糖醛酸, 并且在本发明的优选实施方案中, 还富含 N-乙酰-D-葡萄糖胺, L-艾杜糖醛酸 (L-iduronic acid) 和 2-硫酸化 L-艾杜糖醛酸 (2-sulfated L-iduronic acid), 并且不如负责抗 FXa 活性的五糖那样多 (不必需存在对于五糖的抗血栓形成 (antithrombotic) 活性是重要的高浓度的 N-磺基-3-磺基-D-葡萄糖胺单元)。因为这一原因, 为了本发明

的目的,五糖的比例最大限制为糖胺聚糖结构中 20%五糖特有的二糖(与 N-磺基-3-磺基-D-葡萄糖胺结合的 D-葡萄糖醛酸),按照现有技术状况,其负责抗 FXa 活性,并且因此,按照后者,其将适合具有较高的比例。

[0023] 现有技术清楚地表明,糖尿病患者的由疾病本身引起的溃疡的治愈过程是变化的,但是本发明的发明人还证明,本发明的目的药物组合物令人惊讶地对所有类型的溃疡(慢性溃疡和压力性溃疡两者)起作用。

[0024] 为了本发明的目的,慢性溃疡理解为皮肤中的物质持续失去的方案,取决于溃疡的起因,其可以分为:压力性溃疡,糖尿病溃疡,缺血性(动脉或静脉)溃疡,烧伤后溃疡,放射治疗后溃疡等。

[0025] 这种分类按照产生溃疡的原因进行,然而,伤口/溃疡转化为慢性的病理生理学机制是缺血过程的改变,这导致皮肤坏死和通过天然方式导致其再生困难(Kirman CN. Pressure ulcers, non surgical treatment and principles(压力性溃疡,非手术治疗和原理), Emedicine 2008年7月(www.emedicine.com/plastic)An G, Faeder J, Vodovotz Y. Transactional systems biology: introduction of an engineering approach to the pathophysiology of the burn patient(交换系统生物学:向烧伤患者的病理生理引入工程方法). J Burn Care Res. (烧伤护理研究杂志)2008;29(2):277-85. Nikolovska S, 等 The role of nitric oxide in the pathogenesis of venous ulcers(氧化氮在静脉溃疡发病机理中的作用). Acta Dermatovenerol Croat 2005;13(4):242-6)。

[0026] 在这种意义上,例如,局部缺血可能由于对毛细血管的外部压力而发生(褥疮或压力性溃疡),由于热损伤(烧伤)而发生,或由于血管闭塞(糖尿病、动脉硬化等)而发生。在皮肤和周围器官的缺血过程后,存在损伤组织的再灌注,其加重初始损害,导致损害的恶化和加重。在初始坏死之后发生的局部缺血-再灌注过程加重初始损害并且导致损害的长期性的准确机制是未知的,但是怀疑炎症介质(细胞因子、白介素等)的持续产生加重初始缺血过程,恶化损害,并且导致溃疡的长期性。

[0027] 为了该目的,研究了用于建模炎症介质的产生的不同的治疗武器,其促进组织再生,但是不恶化细胞损伤。应该强调的事实是,在暴露于任何破坏性过程后,伤口的治愈过程在几乎所有组织中是相同的(Gurtner GC 等 Wound repair and regeneration(伤口修复和再生). Nature(自然)2008;453:314-21);因此,近来已经在烧伤伤口的预防中使用低分子量肝素进行研究(Ravikumar T 等, Low molecular weight heparin-induced pharmacological modulation of burn wound healing(低分子量肝素诱导的烧伤伤口治愈的药物调节). Ann Burn fire Disast 2006;19(3):1-10 Oremus M, 等 The uses of heparin to treat burn injury(肝素治疗烧伤损伤的应用). Evid Rep Technol Assess(Full Rep). 2006;(148):1-58),但是迄今为止没有促进慢性溃疡再生的系统治疗(Fonder MA 等 Treating the chronic wound:A practical approach to the care of nonhealing wounds and wound care dressings(治疗慢性伤口:不愈合伤口护理的实用方法和伤口护理敷料剂). J Am Acad dermatol 2008;58:185-206),并且在糖胺聚糖的情形中关于单糖的组成和/或百分比所知甚至更少,所述单糖负责这种愈合和有利于生理系统出现的再生活性,诸如阻断炎症介质的产生,毛细血管再生,或溃疡再灌注以及愈合机制。

[0028] 换言之,本发明的目的组合物对于慢性溃疡起作用,甚至对于不具有糖尿病并且

其中存在某种类型的不容易愈合的慢性溃疡（如压力性溃疡）发作的患者起作用，压力性溃疡理解为在皮肤中和在由在硬面上持久压力引起的组织下具有损伤区域的那些，不必是强烈的，而且独立于位置。目前不再使用术语褥疮性溃疡，是因为其确实涉及压力是其发作的决定因素，并且因为其排除了不在卧姿位置出现的那些。

[0029] 其是在护理患有慢性疾病的患者中的常见问题，特别是在护理活动性有限、具有相当大的病理死亡率和高经济和社会反响的老年患者中的常见问题，因此对于本发明的目的，重要的是确定尽管已经在动物中进行了引起糖尿病的大部分实例，但是在实施例 5 中，清楚地看到施用本发明的目的药物组合物怎样令人吃惊地良好起作用，尽管动物没有糖尿病。

[0030] 此外，不希望受到理论限制，然而，本发明人相信，这一假说得到他们的实施例结果的支持，因为如果将合成五糖（磺达肝素）用于治疗溃疡，并且特别是治疗糖尿病足部溃疡，则愈合和 / 或再生活性高度减小（此时其应该是相反的），其以如同选自自由 N- 磺基 -D- 葡萄糖胺和 D- 葡萄糖醛酸组成的组的单糖，以及在本发明的优选实施方案中，还选自自由 N- 乙酰 -D- 葡萄糖胺，L- 艾杜糖醛酸和 2- 硫酸化 L- 艾杜糖醛酸组成的组的单糖被化学和 / 或酶学修饰一样的方式减小，本发明人的糖胺聚糖的活性急剧减小。因此，推论尽管在结构中存在五糖部分，但是其不负责组织愈合和 / 或再生活性，并且如果上文提及的单糖定性或定量改变，则不会获得良好的组织愈合和 / 或再生活性。

[0031] 因为这一原因，本发明的主要方面目的在于含有一定比例的些单糖和含有不超过 20% 的五糖特有的二糖的比例的糖胺聚糖组合物用于治疗慢性溃疡特别是治疗糖尿病足部溃疡。

[0032] 本发明的发明人还确定了前文提及的单糖的必需量和含有药物有效量的糖胺聚糖的医药产品的剂量之间的关系，使单糖的比例 (IU) 与该产品的血浆半衰期相关，以获得疾病“治疗性”剂量而不是预防性剂量。

[0033] 在目前公布的研究中，用于慢性溃疡特别是糖尿病足部溃疡的一些肝素的目的总是预防性的，即，相信增加剂量将在患者中引起出血，或者使用以不同水平在凝集级联中起作用的另一种类型的化合物如 ASA 进行疾病的共同辅助治疗。因此，在这些情形中所用的条件已经是常见的用于预防的那些，其包括使用非常低浓度的肝素，例如，对于贝米肝素的情形，贝米肝素血浆半衰期（以小时为单位）和以 IU 为单位的剂量之间的比例是 1 : 472。

[0034] 这是这样的，是因为使用肝素所寻求的作用是在预防中起作用，考虑到现有技术状况，负责抗血栓形成活性的五糖的量比足以有助于患有糖尿病足部溃疡的患者的下肢血管形成更高，并且以高于通常认为由于所述抗血栓形成作用过量而出血危险增加所示的剂量更高的剂量，考虑到糖尿病患者具有更高的出血倾向，没有意识到真正重要的是施用更大量的其它单糖，所述单糖在制剂中不形成部分五糖。因此，非常低的剂量常规上总是用于这一目的，其中在血浆半衰期和以 IU 为单位的 LMWH 剂量之间的比例小于 1 : 500，因为认为对于已经患有复杂疾病如糖尿病的患者这样获得相同的抗凝集和抗血栓形成作用，但是具有较低的出血危险。

[0035] 就发明人的了解来看，对于在非预防性剂量的情况下使用糖胺聚糖如低分子量肝素的组合物治疗糖尿病足部溃疡没有充分的专利文献，因为所述预防性剂量不是治愈性的而是预防性的，并且实际上不通过肉芽组织再生的愈合而治愈溃疡，而相反相信它们防止

其形成而使用它们,并且在大部分情形中,它们与其它药物如乙酰水杨酸用在协同治疗中 (“Effect of Dalteparin of healing of chronic foot ulcers in diabetic patients with peripheral arterial occlusive disease(达肝素在治愈具有外周动脉闭塞疾病的糖尿病患者的慢性足部溃疡中的作用)”, Diabetes Care(糖尿病护理),卷 26(9),2003 年 9 月;M.Kalani, A. 等,题目为 Beneficial effects of dalteparin on haemostatic function and local tissue oxygenation in patients with diabetes,severe vascular disease and foot ulcers(达肝素对患有糖尿病、严重血管疾病和足部溃疡的患者中止血功能和局部组织氧化的有益作用). Thrombosis Research(血栓形成研究). 120, 653-661, 2007)。

[0036] 此外,本发明的发明人已经实现消除现有技术的偏见,因为他们已经确定在某些糖胺聚糖的情形中,如 LMWHs 和 VLMWHs,用于治疗糖尿病足部溃疡(在糖尿病患者中)的五糖的量并不重要,相反,真正重要的是存在一定比例的富含某些特异性单糖的寡糖序列。该比例的某些特异性单糖,在本发明的详细描述中提及,负责糖尿病患者中这种类型的溃疡的治愈,因为当通过皮下途径或通过肠胃外途径施用这种类型的糖胺聚糖时,愈合作用是由于存在某些寡糖成分,其不包含五糖,在现有技术中五糖通常与低分子量和极低分子量肝素的抗因子 Xa 作用相联系。此外,本发明的发明人已经确定,假定在类肝素结构中五糖略微(定量和定性)改变,抗 FXa 活性极大地减少。然而,在治愈能力中没有观察到类似的减少。

[0037] 因此,在治疗糖尿病足部溃疡中的一个重要问题是获得医药产品的有效和灵验的剂量,其实现缺血组织再生并且防止糖尿病足的截肢,此外,其不但在预防中有效而且还作为有效的治疗。选择治疗必须具有的另一种其它益处是,其对于患者不是非常具有创伤性的,因为糖尿病足部溃疡特征在于非常疼痛,因此施用途径必须在伤口附近不是非常具有创伤性的。因此,为了本发明的目的,优选的施用途径是肠胃外途径、口服途径和局部途径,其是非侵入性的,或者直接施用在待治疗的黏膜上。

[0038] 附图描述

[0039] 图 1 描述合成五糖(磺达肝素)的作用机制。

[0040] 图 2A 描述在重水(D₂O)中在 298K 记录的磺达肝素(负责与抗凝血酶 III 相互作用的五糖)的 ¹³C-¹H HSQC 光谱的端基异构信号(H1-C1 相关性)的区域。在该光谱中,可以观察到 5 个相关的峰,其对应于形成五糖的 5 个单糖。ANSred,还原端的 N-磺基-D-葡糖胺;I2S,2-硫酸化的 L-艾杜糖醛酸;ANS,3S, N-磺基-3O-磺基-D-葡糖胺;G-(ANS,3S),在 ANS,3S 单元之前的 D-葡糖醛酸,和 ANS-(G),在 D-葡糖醛酸环前的 N-磺基-D-葡糖胺。G-(ANS,3S) 单元的 H1-C1 相关峰已用圆圈突出表示,因为其是五糖的最特征性信号,并且将被视为其在各种样品中存在的量的参照。这种单糖在磺达肝素中的比例为 20%。

[0041] 图 2B 描述在重水(D₂O)中在 298K 记录的低分子量肝素贝米肝素的 ¹³C-¹H HSQC 光谱的端基异构信号(H1-C1 相关性)的区域。该光谱比关于磺达肝素获得的光谱(参见图 2A)复杂得多,原因在于存在磺达肝素中不存在的新的单糖单元(I,非硫酸化的 L-艾杜糖醛酸;ANAc,N-乙酰-D-葡糖胺)和已有单元的比例的改变,如在 2-硫酸化的 L-艾杜糖醛酸环 I2S 的情形中,其以较大的比例存在。五糖的特征性 G-(ANS,3S) 单元的 H1-C1 相关峰已用圆圈突出表示。如在附图中可以观察到的,与磺达肝素样品相比较,由于与 N-磺

基-D-葡糖胺 G-(ANS) (其是主要的葡糖醛环) 结合的 D-葡糖醛酸的比例增加, 该信号强度减小。G-(ANS, 3S) 在贝米肝素样品中的比例的减小, 即占总单糖含量的 1.5%, 表明大部分的寡糖链没有负责与抗凝血酶 III 相互作用的结构基序。

[0042] 还已经标记了下述信号:

[0043] ANSred, 还原端的 N-磺基-D-葡糖胺; ANS, 3S, N-磺基-3O-磺基-D-葡糖胺。

[0044] 图 2C 描述在重水 (D₂O) 中在 298K 记录的极低分子量肝素 R014ckw2_13_11L 的 ¹³C-¹H HSQC 光谱的端基异构信号 (H1-C1 相关性) 的区域。该光谱比关于磺达肝素获得的光谱 (参见图 2A) 复杂得多, 原因在于存在磺达肝素中不存在的新的单糖单元 (I, 非硫酸化的 L-艾杜糖醛酸; ANAc, N-乙酰-D-葡糖胺) 和已有单元的比例的改变, 如在 2-硫酸化的 L-艾杜糖醛酸环 I2S 的情形中, 其以较大的比例存在。五糖的特征性 G-(ANS, 3S) 单元的 H1-C1 相关峰已用圆圈突出表示。如在附图中可以观察到的, 与磺达肝素样品相比较, 由于与 N-磺基-D-葡糖胺 G-(ANS) (其是主要的葡糖醛环) 结合的 D-葡糖醛酸的比例增加, 该信号强度减小。G-(ANS, 3S) 单元在 R014ckw2_13_11L 样品中的比例的减小, 即占总单糖含量的 2.6%, 表明大部分的寡糖链没有负责与抗凝血酶 III 相互作用的结构基序。

[0045] 已经标记了下述信号:

[0046] ANSred, 还原端的 N-磺基-D-葡糖胺; ANS, 3S, N-磺基-3O-磺基-D-葡糖胺。

[0047] 图 2D 描述在重水 (D₂O) 中在 298K 记录的低分子量肝素依诺肝素 (enoxaparin) 的 ¹³C-¹H HSQC 光谱的端基异构信号 (H1-C1 相关性) 的区域。该光谱比关于磺达肝素获得的光谱 (参见图 2A) 复杂得多, 原因在于存在磺达肝素中不存在的新的单糖单元 (I, 非硫酸化的 L-艾杜糖醛酸; ANAc, N-乙酰-D-葡糖胺) 和已有单元的比例的改变, 如在 2-硫酸化的 L-艾杜糖醛酸环 I2S 的情形中, 其以较大的比例存在。五糖的特征性 G-(ANS, 3S) 单元的 H1-C1 相关峰已用圆圈突出表示。如在附图中可以观察到的, 与磺达肝素样品相比较, 由于与 N-磺基-D-葡糖胺 G-(ANS) (其是主要的葡糖醛环) 结合的 D-葡糖醛酸的比例增加, 该信号强度减小。G-(ANS, 3S) 单元在依诺肝素样品中的比例的减小, 即占总单糖含量的 1.7%, 表明大部分的寡糖链没有负责与抗凝血酶 III 相互作用的结构基序。

[0048] 还已经标记了下述信号:

[0049] ANSred, 还原端的 N-磺基-D-葡糖胺; ANS, 3S, N-磺基-3O-磺基-D-葡糖胺。

[0050] 图 2E 描述在重水 (D₂O) 中在 298K 记录的低分子量肝素亭扎肝素 (tinzaparin) 的 ¹³C-¹H HSQC 光谱的端基异构信号 (H1-C1 相关性) 的区域。该光谱比关于磺达肝素获得的光谱 (参见图 2A) 复杂得多, 原因在于存在磺达肝素中不存在的新的单糖单元 (I, 非硫酸化的 L-艾杜糖醛酸; ANAc, N-乙酰-D-葡糖胺) 和已有单元的比例的改变, 如在 2-硫酸化的 L-艾杜糖醛酸环 I2S 的情形中, 其以较大的比例存在。五糖的特征性 G-(ANS, 3S) 单元的 H1-C1 相关峰已用圆圈突出表示。如在附图中可以观察到的, 与磺达肝素样品相比较, 由于与 N-磺基-D-葡糖胺 G-(ANS) (其是主要的葡糖醛环) 结合的 D-葡糖醛酸的比例增加, 该信号强度减小。G-(ANS, 3S) 单元在亭扎肝素样品中的比例的减小, 即占总单糖含量的 1.05%, 表明大部分的寡糖链没有负责与抗凝血酶 III 相互作用的结构基序。

[0051] 还已经标记了下述信号:

[0052] ANSred, 还原端的 N-磺基-D-葡糖胺; ANS, 3S, N-磺基-3O-磺基-D-葡糖胺。

[0053] 图 2F 描述在重水 (D₂O) 中在 298K 记录的极低分子量肝素 R014-H13-96-5 的 ¹³C-¹H

HSQC 光谱的端基异构信号 (H1-C1 相关性) 的区域。该光谱比关于磺达肝素获得的光谱 (参见图 2A) 复杂得多, 原因在于存在磺达肝素中不存在的新的单糖单元 (I, 非硫酸化的 L- 艾杜糖醛酸 ;ANAc, N- 乙酰 -D- 葡萄糖胺) 和已有单元的比例的改变, 如在 2- 硫酸化的 L- 艾杜糖醛酸环 I2S 的情形中, 其以较大的比例存在。五糖的特征性 G-(ANS, 3S) 单元的 H1-C1 相关峰已用圆圈突出表示。如在附图中可以观察到的, 与磺达肝素样品相比较, 由于与 N- 磺基 -D- 葡萄糖胺 G-(ANS) (其是主要的葡萄糖醛环) 结合的 D- 葡萄糖醛酸的比例增加, 该信号强度减小。G-(ANS, 3S) 单元在 R014_H13_96_5 样品中的比例的减小, 即占总单糖含量的 1.9%, 表明大部分的寡糖链没有负责与抗凝血酶 III 相互作用的结构基序。

[0054] 还已经标记了下述信号:

[0055] ANSred, 还原端的 N- 磺基 -D- 葡萄糖胺 ;ANS, 3S, N- 磺基 -3O- 磺基 -D- 葡萄糖胺。

[0056] 图 2G 描述在重水 (D₂O) 中在 298K 记录的低分子量肝素 BEMI_99_4 的 ¹³C-¹H HSQC 光谱的端基异构信号 (H1-C1 相关性) 的区域。该光谱与关于磺达肝素获得的光谱 (参见图 2A) 非常不同, 原因在于存在磺达肝素中不存在的新的单糖单元 (I, 非硫酸化的 L- 艾杜糖醛酸 ;ANAc, N- 乙酰 -D- 葡萄糖胺) 和一些特征性信号如 ANS, 3S 和 G-(ANS, 3S) 的消失。五糖, G-(ANS, 3S) 信号的消失表明这种类型的低分子量肝素不具有可检测的量的负责与抗凝血酶 III 相互作用的结构基序。同样地, I2S 信号的消失表明该 LMWH 还在常规肝素区的特征性单元中具有显著的改变。

[0057] 图 2H 描述在重水 (D₂O) 中在 298K 记录的肝素钠的 ¹³C-¹H HSQC 光谱的端基异构信号 (H1-C1 相关性) 的区域。该光谱比关于磺达肝素获得的光谱 (参见图 1) 复杂得多, 原因在于存在磺达肝素中不存在的新的单糖单元 (I, 非硫酸化的 L- 艾杜糖醛酸 ;ANAc, N- 乙酰 -D- 葡萄糖胺) 和已有单元的比例的改变, 如在 2- 硫酸化的 L- 艾杜糖醛酸环 I2S 的情形中, 其以较大的比例存在。五糖的特征性 G-(ANS, 3S) 单元的 H1-C1 相关峰已用圆圈突出表示。如在附图中可以观察到的, 与磺达肝素样品相比较, 由于与 N- 磺基 -D- 葡萄糖胺 G-(ANS) (其是主要的葡萄糖醛环) 结合的 D- 葡萄糖醛酸的比例增加, 该信号强度减小。G-(ANS, 3S) 单元在肝素钠样品中的比例的减小, 即占总单糖含量的 1.0%, 表明大部分的寡糖链没有负责与抗凝血酶 III 相互作用的结构基序。

[0058] 还已经标记了下述信号:

[0059] ANSred, 还原端的 N- 磺基 -D- 葡萄糖胺 ;ANS, 3S, N- 磺基 -3O- 磺基 -D- 葡萄糖胺。

[0060] 图 2I 描述在重水 (D₂O) 中在 298K 记录的低分子量肝素 BEMI_99_2 的 ¹³C-¹H HSQC 光谱的端基异构信号 (H1-C1 相关性) 的区域。该光谱与关于磺达肝素获得的光谱 (参见图 1) 非常不同, 原因在于存在磺达肝素中不存在的新的单糖单元 (I, 非硫酸化的 L- 艾杜糖醛酸 ;ANAc, N- 乙酰 -D- 葡萄糖胺 ;ANH2, D- 葡萄糖胺 ;ANH2, 3S, D-3-O- 磺基 - 葡萄糖胺) 和一些特征性信号如 ANS, 3S 和 G-(ANS, 3S) 的消失。

[0061] 图 2J 描述在重水 (D₂O) 中在 298K 记录的肝素钙的 ¹³C-¹H HSQC 光谱的端基异构信号 (H1-C1 相关性) 的区域。该光谱比关于磺达肝素获得的光谱 (参见图 1) 复杂得多, 原因在于存在磺达肝素中不存在的新的单糖单元 (I, 非硫酸化的 L- 艾杜糖醛酸 ;ANAc, N- 乙酰 -D- 葡萄糖胺) 和已有单元的比例的改变, 如在 2- 硫酸化的 L- 艾杜糖醛酸环 I2S 的情形中, 其以较大的比例存在。五糖的特征性 G-(ANS, 3S) 单元的 H1-C1 相关峰已用圆圈突出表示。如在附图中可以观察到的, 与磺达肝素样品相比较, 由于与 N- 磺基 -D- 葡萄糖胺 G-(ANS)

(其是主要的葡糖醛环)结合的D-葡糖醛酸的比例增加,该信号强度减小。G-(ANS,3S)单元在肝素钠样品中的比例的减小,即占总单糖含量的1.0%,表明大部分的寡糖链没有负责与抗凝血酶III相互作用的结构基序。

[0062] 还已经标记了下述信号:

[0063] ANSred,还原端的N-磺基-D-葡糖胺;ANS,3S,N-磺基-3O-磺基-D-葡糖胺。

[0064] 图2K描述在重水(D₂O)中在298K记录的低分子量肝素BP06408-66/27-A的¹³C-¹H HSQC光谱的端基异构信号(H1-C1相关性)的区域。该光谱与关于磺达肝素获得的光谱(参见图2A)非常不同,原因在于存在磺达肝素中不存在的新的单糖单元(I,非硫酸化的L-艾杜糖醛酸;ANAc,N-乙酰-D-葡糖胺)和与ANS,3S和G-(ANS,3S)相对应的信号的减小。五糖G-(ANS,3S)信号的减小表明这种类型的低分子量肝素具有低浓度的负责与抗凝血酶III相互作用的结构基序。

[0065] 图2L描述在重水(D₂O)中在298K记录的低分子量肝素BP06408-66/28-A的¹³C-¹H HSQC光谱的端基异构信号(H1-C1相关性)的区域。该光谱与关于磺达肝素获得的光谱(参见图2A)非常不同,原因在于存在磺达肝素中不存在的新的单糖单元(I,非硫酸化的L-艾杜糖醛酸;ANAc,N-乙酰-D-葡糖胺)和与ANS,3S和G-(ANS,3S)相对应的信号的消失。五糖G-(ANS,3S)信号的消失表明这种类型的低分子量肝素不具有可检测量的负责与抗凝血酶III相互作用的结构基序。

[0066] 图3显示当以半衰期与剂量之间的比率为1:950施用贝米肝素时,当以半衰期与剂量之间的比率为1:472施用贝米肝素时,和当以相等的治疗剂量即5mg/ml施用磺达肝素时(因为其在健康个体中具有17小时的半衰期,因此在wistar大鼠中其为每只大鼠0.22mg),在实施例2的小鼠中溃疡化面积减少的百分比。

[0067] 图4显示关于用贝米肝素钠治疗的小鼠,实施例4的糖尿病对照小鼠的进展。伤口面积表示在每只动物的右侧。

[0068] 图5显示在实施例4的小鼠中伤口随时间愈合的百分比的进展。

[0069] 图6显示在用苏木精-曙红染色后,实施例4的小鼠的伤口切片的显微照片。A糖尿病对照,B用磺达肝素钠治疗的糖尿病动物,C用贝米肝素钠治疗的糖尿病动物。

[0070] 图7描述当对实施例5的小鼠通过局部途径施用对组合物,贝米肝素钠局部组合物和磺达肝素钠局部组合物,未分级分离的肝素的局部组合物时,它们的溃疡面积减少的百分数。

[0071] 图8显示关于用肝素钙治疗的小鼠,实施例5的非糖尿病对照小鼠的进展。伤口面积表示在每只动物的右侧。

[0072] 图9显示在实施例5的小鼠中伤口随时间愈合的百分数的进展。

[0073] 图10显示在用苏木精-曙红染色后,实施例5的小鼠的伤口切片的显微照片。A非糖尿病对照,B用贝米肝素钠治疗的非糖尿病动物,C用贝米肝素钙治疗的非糖尿病动物。

[0074] 图11描述当对糖尿病wistar大鼠通过口服途径施用对照溶液、口服100mg/kg贝米肝素钠混悬液和10mg/kg磺达肝素钠混悬液时,它的溃疡面积减少的百分数。

[0075] 发明详述

[0076] 因此,本发明要解决的问题是提供解决现有技术的问题的药物组合物。

[0077] 解决方案是基于这样的事实:本发明人已经确定糖胺聚糖的药物组合物特别是

LMWHs 和 VLMWHs 实现了解决所示的问题,因为其实现组织再生,防止肢体的截肢,并且作为治疗性治疗是有效的,并且不仅在预防中有效,所述糖胺聚糖药物组合物通过皮下或肠胃外途径、口服途径和 / 或局部途径使用,用于治疗慢性溃疡如糖尿病足部溃疡,其包含下述比例的下述单糖(其中所有的百分数对比所述组合物中单糖的总百分数):

[0078] a) N- 磺基 -D- 葡糖胺 :25-50%

[0079] b) D- 葡糖醛酸 :3-25%

[0080] 并且特征在于,与 N- 磺基 -3- 磺基 -D- 葡糖胺结合的二糖单元 D- 葡糖醛酸的比例不大于 25%,并且优选地不大于 20%。

[0081] 本发明的另一个方面还涉及糖胺聚糖的组合物特别是 LMWHs 和 VLMWHs 用于制备用于治疗慢性溃疡如压力性溃疡和糖尿病足部溃疡的备用医药产品的应用,所述糖胺聚糖组合物通过皮下或肠胃外途径、口服途径和 / 或局部途径使用,至少包含特有比例的选自由下列各项组成的组的单糖:N- 磺基 -D- 葡糖胺,N- 乙酰 -D- 葡糖胺,L- 艾杜糖醛酸,2- 硫酸化的 L- 艾杜糖醛酸和 D- 葡糖醛酸。

[0082] 解决方案是基于这样的事实:本发明人已经确定,与一般的观点相反,可以向患有糖尿病足部溃疡的患者实施由一定剂量的低分子量肝素(LMWH)组成的治疗,所述剂量分类为静脉血栓栓塞病治疗剂量,而不存在较大的出血危险,并且令人吃惊地获得了更好的结果,所述结果高于其以较低的浓度施用,如以通常用于预防的浓度施用的结果,原因在于在糖胺聚糖中存在特定比例的特定单糖。因此,本发明提供了使用通常用于静脉血栓栓塞病的治疗剂量来治疗糖尿病足部溃疡的药物组合物,将治疗剂量理解为其中血浆半衰期和以 IU 为单位的 LMWH 的剂量之间的比例为 1 : 800-1 : 5,000 的那些,即,包含较多量的特异性单糖的那些剂量。

[0083] 在本发明的特定实施方案中,提供了通过皮下或肠胃外途径、口服途径和 / 或局部途径施用的糖胺聚糖药物组合物,特别是 LMWHs 和 VLMWHs,其用于治疗糖尿病足部溃疡,其包含下述比例的下述单糖:

[0084] -N- 磺基 -D- 葡糖胺 :25-50%

[0085] -N- 乙酰 -D- 葡糖胺 :0-10%

[0086] -L- 艾杜糖醛酸 :0-35%

[0087] -2- 硫酸化的 L- 艾杜糖醛酸 :0-50%

[0088] -D- 葡糖醛酸 :3-25%

[0089] 在本发明的另一个特定实施方案中,提供了通过皮下或肠胃外途径、口服途径和 / 或局部途径施用的糖胺聚糖药物组合物,特别是 LMWHs 和 VLMWHs,其用于治疗糖尿病足部溃疡,其包含下述比例的下述单糖:

[0090] -N 磺基 -D- 葡糖胺 :25-50%

[0091] -N- 乙酰 -D- 葡糖胺 :0-10%

[0092] -L- 艾杜糖醛酸 :0-10%

[0093] -2- 硫酸化 L- 艾杜糖醛酸 :15-50%

[0094] -D- 葡糖醛酸 :3-25%

[0095] 在本发明的另一个特定实施方案中,提供了通过皮下或肠胃外途径、口服途径和 / 或局部途径施用的糖胺聚糖药物组合物,特别是 LMWHs 和 VLMWHs,其用于治疗糖尿病足部

溃疡,其包含下述比例的下述单糖:

- [0096] -N- 磺基 -D- 葡糖胺 :25-50%
 [0097] -N- 乙酰 -D- 葡糖胺 :0.1-8%
 [0098] -L- 艾杜糖醛酸 :1-10%
 [0099] -2- 硫酸化的 L- 艾杜糖醛酸 :15-40%
 [0100] -D- 葡糖醛酸 :3-15%

[0101] 更具体地,本发明目的在于通过皮下或肠胃外途径、口服途径和 / 或局部途径施用的糖胺聚糖药物组合物,特别是 LMWHs 和 VLMWHs,用于治疗慢性溃疡如糖尿病足部溃疡,其包含小于总糖组合物的 20%、甚至更优选地小于 10% 和最优选地小于 5% 的二糖单元 D- 葡糖醛酸比例,所述 D- 葡糖醛酸与 N- 磺基 -3- 磺基 -D- 葡糖胺 ($A_{NS,3S}$) 结合。

[0102] 本发明的一个优点是不仅消除了现有技术的偏见,而且确定了前文提及的单糖比例与包含前文提及的药物组合物的医药产品的剂量之间的有效相关性,依据这些糖胺聚糖的血浆半衰期,所述药物组合物是治疗患者中的糖尿病足部溃疡以及有助于组织愈合和再生所必需的。多种已知的 LMWHs 的血浆半衰期显示在表 1 中,其中的数据节取自出版物 Planes, A. Review on bemiparin sodium—a second generation low molecular weight heparin—and its applications in venous thromboembolism(贝米肝素钠——第二代低分子量肝素——及其在静脉血栓栓塞中的应用的综述). Expert opinion Pharmacother. (药物疗法专家观点) 2003 ;4 :1551-61。

表 1		
LMWH	血浆半衰期范围 (小时)	血浆半衰期 (小时)
RO-14	6.5 – 6.9	6.7
[0103] 贝米肝素	5.2 - 5.4	5.3
依诺肝素	4.0 – 4.4	4.2
那屈肝素 (Nadroparin)	3.7	3.7
达肝素	2.3 – 2.8	2.5
亭扎肝素	3.0	3.0

[0104] 关于不同类型的 LMWHs,观察到所用的剂量以反比例方式取决于血浆半衰期,如在表 2 中所示(资料:参见前文提及的文献“Expert opinion Pharmacother(药物疗法专家观点)”,除了 R014 的情形之外,所述数据来自本申请人的实验):

表 2		
LMWH	平均剂量(IU/天)	近似的半衰期/剂量比率
RO-14	5,400	1:800
贝米肝素	5,000	1:950
依诺肝素	8,000	1:1,900
那屈肝素	7,600	1:2,000
达肝素	10,000	1:4,000
亭扎肝素	10,000	1:3,300

[0105]

[0106] 结果,本发明的另一个方面目的是糖胺聚糖特别是低分子量肝素在制备用于治疗糖尿病足部溃疡的医药产品中的应用,其特征在于,LMWH 的血浆半衰期和以 IU 为单位的剂量之间的比率为 1 : 800-1 : 5,000,即,特征在于,施用这样的组合物,以用于治疗糖尿病足部溃疡,所述组合物包含较大量的选自由下列各项组成的组的单糖:N-磺基-D-葡萄糖胺,N-乙酰-D-葡萄糖胺和 D-葡萄糖醛酸,并且在本发明的优选的实施方案中,还选自由 L-艾杜糖醛酸和 2-硫酸化的 L-艾杜糖醛酸组成的组,并且与 N-磺基-3-磺基-D-葡萄糖胺结合的二糖单元 D-葡萄糖醛酸的比例小于总糖组合物的 20%,更优选地小于 10%,且最优选地小于 5%。

[0107] 在另一方面中,本发明目的是低分子量肝素在制备用于治疗糖尿病足部溃疡的医药产品中的应用,其中 LMWH 是具有小于 6,000 道尔顿的平均分子量的肝素。

[0108] 在另一方面中,本发明目的是低分子量肝素在制备用于治疗糖尿病足部溃疡的医药产品中的应用,其特征在于,血浆半衰期为 5.2-5.4,每日平均剂量是 5,000IU,其确保具有特定的单糖比例,所述单糖选自由 N-磺基-D-葡萄糖胺和 D-葡萄糖醛酸组成的组,并且在本发明的优选实施方案中,还选自由 N-乙酰-D-葡萄糖胺,L-艾杜糖醛酸和 2-硫酸化的 L-艾杜糖醛酸组成的组,并且与 N-磺基-3-磺基-D-葡萄糖胺结合的二糖单元 G-葡萄糖醛酸的比例小于总糖组合物的 20%,更优选地小于 10%,且最优选地小于 5%。

[0109] 在另一方面中,本发明目的是低分子量肝素在制备用于治疗糖尿病足部溃疡的医药产品中的应用,其特征在于,血浆半衰期为 4.0-4.4,每日平均剂量是 7,600IU,其确保具有特定的单糖比例,所述单糖选自由 N-磺基-D-葡萄糖胺,N-乙酰-D-葡萄糖胺,L-艾杜糖醛酸,2-硫酸化的 L-艾杜糖醛酸和 D-葡萄糖醛酸组成的组。

[0110] 在另一方面中,本发明目的是低分子量肝素在制备用于治疗糖尿病足部溃疡的医药产品中的应用,其特征在于,血浆半衰期为 2.3-2.8,每日平均剂量是 10,000IU,其确保具有特定的单糖比例,所述单糖选自由 N-磺基-D-葡萄糖胺和 D-葡萄糖醛酸组成的组,并且在本发明的优选实施方案中,还选自由 N-乙酰-D-葡萄糖胺,L-艾杜糖醛酸和 2-硫酸化的 L-艾杜糖醛酸组成的组。

[0111] 如已经表示的,作为提供治疗剂量的 LMWH 的结果,其中每种 LMWH 的血浆半衰期和每种 LMWH 的以 IU 为单位的剂量之间的比率是 1 : 800-1 : 5,000,获得提供用于治疗慢

性溃疡如糖尿病足部溃疡的备选医药产品的益处,其给出比传统治疗更大的功效,而没有显著增加典型地与该治疗相关的缺点,如更大的出血危险,其原因在于这样的事实:其包含较大量的特定的单糖和有限量的与 N- 磺基 -3- 磺基 -D- 葡糖胺结合的二糖单元 D- 葡糖醛酸,所述量小于总糖组合物的 20%。

[0112] 作为这样的事实的结果:本发明人已经克服了在肝素技术领域中存在的偏见,将 LMWHs 的浓度增加到静脉血栓栓塞疾病治疗剂量量级的水平,而不是保持在通常(较低的)预防剂量,因为相信这样的增加将显著增加出血危险,而关于上皮组织再生和愈合的提高方面不会带来本发明中观察到的有益的效果,本发明已经成为可能。

[0113] 此外,不希望受到理论限制,然而,本发明的发明人认为,实施例的结果支持他们的假说,由于如果使用合成的五糖(磺达肝素)来治疗糖尿病足部溃疡,愈合和/或再生活性高度减小(此时其应该是相反的),其以如同如果选自由 N- 磺基 -D- 葡糖胺, N- 乙酰 -D- 葡糖胺, L- 艾杜糖醛酸, 2- 硫酸化的 L- 艾杜糖醛酸和 D- 葡糖醛酸组成的组的单糖被化学和/或酶学修饰,糖胺聚糖组合物的活性急剧减小一样的方式减小。因此,推论尽管在结构中存在五糖部分,但是其不负责组织愈合和/或再生活性,并且如果上文提及的单糖定性或定量改变,则不会获得良好的组织愈合和/或再生活性。

实施例

[0114] 下文提供的下述具体实施例作用为举例说明本发明的性质。包含这些实施例仅是出于举例说明的目的,并且必须不被解释为限制本文所要求的本发明。

[0115] 已经进行了一系列的实验来证明糖胺聚糖如低分子量肝素在制备用于以 LMWHs 的治疗剂量来治疗糖尿病足部溃疡的医药产品中的应用,其中每种 LMWH 的血浆半衰期和 LMWH 的以 IU 为单位的剂量之间的比率为 1 : 800-1 : 5,000,这提供了本发明所示的优点。

[0116] 在这些实验中已经使用了一些化合物,特别是下述:

[0117] 商购产品:

[0118] - 磺达肝素:通过化学合成获得的五糖类类似物,具有针对抗凝血酶 III 的高亲和性。其特别具有下述特征:分子量 1728 道尔顿,抗 - 因子 Xa 活性 :700IU/mg。

[0119] - 贝米肝素:其为第二代肝素,具有低分子量(平均分子量为 3,600 道尔顿)且抗 -Xa/ 抗 -IIa 比例大于 8。贝米肝素通过新解聚作用和分级分离——在非水性介质中的 β - 消除——方法获得,目的是获得甚至比先前的肝素更低的分子量,以及其片段的最优分布,以使得到的大于 6,000 道尔顿的片段的百分数比其余 LMWHs 低得多,具有高比例的低于临界长度 ($MW < 5,400D$) 的链。不希望受到理论限制,本发明人相信,正是所述存在的单糖(其不形成负责抗血栓形成活性的五糖特征性部分的一部分,其被认为是次要的,并且迄今为止其不被认为是重要的),给本发明的 LMWHs 提供了所示优点,因为这一原因,这些单糖的剂量越大,糖尿病足部溃疡的康复和治愈越好。

[0120] - 依诺肝素:通过在预先形成的肝素的苯甲酯的水性介质中进行 β - 消除方法的解聚反应获得的低分子量肝素。其特别具有下述特征(Ph. Eur. 第 6 版):平均分子量为 3500-5500 道尔顿,抗 - 因子 Xa 活性 :90-125IU/mg。

[0121] - 达肝素:通过使用硝酸进行的解聚反应获得的低分子量肝素。其特别具有下述特征(Ph. Eur. 第 6 版):平均分子量为 5600-6400 道尔顿,抗 - 因子 Xa 活性 :110-210IU/

mg。

[0122] -亭扎肝素:通过使用肝素酶 I 的酶促解聚反应获得的低分子量肝素。其特别具有下述特征 (Ph. Eur. 第 6 版):平均分子量为 5500-7500 道尔顿,抗-因子 Xa 活性:70-120IU/mg。

[0123] -肝素钠:未分级分离的肝素。其特别具有下述特征 (Ph. Eur. 第 6 版):抗-凝集活性: ≥ 150 IU/mg。

[0124] -肝素钙:未分级分离的肝素。其特别具有下述特征 (Ph. Eur. 第 6 版):抗-凝集活性: ≥ 150 IU/mg。

[0125] 研究阶段的产品:

[0126] -RO-14:通过在非水性介质中经由 β -消除法的解聚反应获得极低分子量肝素。其特别具有下述特征:平均分子量为 1800-3000 道尔顿,其具有抗-因子 Xa 活性:80-140IU/mg。

[0127] -BEMI-99/4:其为一种硫酸化程度改变的低分子量肝素,以使其仅在葡萄糖胺的位置 N 处具有硫酸根基团。因为这一原因,其抗-因子 Xa 活性极大降低,原因在于五糖部分受到定性和定量的影响。

[0128] 对于获得这种肝素的修饰是基于去-N, O-硫酸化反应和 N-硫酸化反应的反应,去-N, O-硫酸化反应按照 Nagasawa 和 Inoue (Nagasawa K, Inoue Y. De-N-sulfation (去-N-硫酸化). Methods Carbohydr. Chem. (碳水化合物化学方法) 1980 ;8 :287-289) 所述的条件进行, N-硫酸化反应按照 Lloyd 等 (Lloyd AG, Embrey G, Fowler LJ. Studies on heparin degradation-I:Preparation of [35S]sulphamate derivatives for studies on heparin degrading enzymes of mammalian origin (关于肝素降解-I 的研究:制备 [35S] 氨基磺酸盐衍生物用于关于哺乳动物来源的肝素降解酶的研究). Biochem. Pharmacol. (生物化学药理学) 1971 ;20 :637-648) 的条件进行,因此将 10g 贝米肝素溶解在 150ml 水中,并且将溶液流过 Dowex 50WX8, H⁺ 柱。将洗脱物用吡啶中和并且冻干,获得 11.2g 贝米肝素吡啶盐。

[0129] 将贝米肝素吡啶盐 (3g) 溶解在 75ml 含有 10% 甲醇的二甲亚砷中,并且将溶液在 105°C 保持 24 小时。在这一时间后,加入 75ml 水,将 pH 用氢氧化钠调整至 9.0-9.5,并且搅拌 15 分钟。将溶液用盐酸中和,溶解 0.5g 氯化钠,并且通过加入 3 体积的甲醇使其沉淀,获得去-N, O-硫酸化的衍生物。

[0130] 按照 Lloyd 等的条件将所述去-N, O-硫酸化的衍生物 (1g) N-硫酸化。将产物溶解在 75ml 饱和碳酸氢钠溶液中,并且调整 pH 为 9。将溶液加热至 55°C,并且加入 3g 三氧化硫-三甲胺复合物。反应在 55°C 维持 3 小时。在这一时间后,再加入 3g 三氧化硫-三甲胺复合物,再将反应置于 55°C 3 小时。将溶液冷却,并且用盐酸将 pH 调整至 7,加入 1g 氯化钠,并且用三体积的甲醇使其沉淀。获得 0.88g 的 BEMI-99/4。所获得的产品具有下述特征:平均分子量为 3468 道尔顿,抗-因子 Xa 活性:4IU/mg。

[0131] -BEMI-99/2:其为通过去-N-硫酸化反应改变硫酸化程度的低分子量肝素。因为五糖受到影响,这包括其抗-因子 Xa 活性的减少。

[0132] 对于获得这种肝素的修饰是基于由 Nagasawa 和 Inoue (Nagasawa K, Inoue Y. De-N-sulfation. (去-N-硫酸化) Methods Carbohydr. Chem. (碳水化合物化学方

法) 1980 ;6 :287-289) 所述的条件进行。

[0133] 将 3g 贝米肝素吡啶盐 (如前述实施例所示制备) 溶解在 450ml 含有 10% 甲醇的二甲亚砷中, 并且将溶液在 55°C 维持 2 小时。在这一时间后, 将 pH 用氢氧化钠调整至 9.0-9.5, 并且搅拌 15 分钟。用盐酸中和溶液, 溶解 0.5g 氯化钠, 并且加入 3 体积甲醇使其沉淀, 获得去 -N, O- 硫酸化衍生物。获得 0.91g 的 BEMI-99/2。所获得的产物具有下述特征: 平均分子量为 3619 道尔顿, 抗 - 因子 Xa 活性: 19IU/mg。

[0134] H13-96/5: 其为具有较低乙酰化程度的低分子量肝素。因为这一原因, 由于五糖部分受到定性和定量影响, 其抗 - 因子 Xa 活性极大减小。在这一情形中, 为了能够获得这种糖胺聚糖, 按照 Shaklee 和 Conrad (Shaklee PN, Conrad HE. *Hydrazinolysis of heparin and other glycosaminoglycans* (肝素和其他糖胺聚糖的胍解). *Biochem J* (生物化学杂志) 1984 ;217 :187-197) 所述的条件进行去 -N- 乙酰化。因此, 将 5g R0-14 溶解在 125ml 含有 1% 硫酸胍的无水胍中, 并且在 95°C 维持 6 小时。将溶液浓缩至干燥, 重新溶解在最少量的水中, 并且用盐酸中和。加入 2.5g 氯化钠, 并且用 3 体积甲醇沉淀, 获得产物 H13-96/5 (3.4g)。所获得的产物具有下述特征: 平均分子量为 2008 道尔顿, 抗 - 因子 Xa 活性: 46UI/mg。

[0135] -BP06408-66/27-A: 其为具有减小的抗因子 Xa 活性的低分子量肝素, 其通过经由针对 ATIII 的亲层析的贝米肝素的分级分离获得。为了获得这一衍生物, 将 10mg 贝米肝素通过 CNBr- 激活的琼脂糖 4B 柱, 该柱预先用 (人) ATIII 活化, 其按照 **Höök M, Björk I**, Hopwood J, Lindahl U. *FEBS Lett.* 1976 ;66, :90-93) 所述的条件进行制备。该柱用 1mM Tris-HCl+0.4M NaCl 的 pH 7.40 的缓冲液在 4°C 洗脱, 这样洗脱具有低亲和性的级分。

[0136] 该级分通过 Biogel P2 柱用水洗脱进行纯化。将含有该产物的溶液冻干, 最终获得 7.6mg 产物。

[0137] 所获得的产物具有下述特征: 平均分子量为 3567 道尔顿, 抗 - 因子 Xa 活性为: 32IU/mg。

[0138] -BP06408-66/28-A: 其是具有最小化抗 -Xa 活性的低分子量肝素, 其通过关于 ATIII 的亲层析分级分离贝米肝素获得。

[0139] 为了获得该衍生物, 将 10mg 贝米肝素通过在前述产物的制备中所述的亲和柱。该柱在 4°C 用 1mM Tris-HCl+0.25M NaCl 的 pH 7.40 的缓冲液洗脱, 洗脱具有低亲和性的级分。

[0140] 该级分通过 Biogel P2 柱用水洗脱进行纯化。冻干包含该产物的溶液, 最终获得 3.6mg 产物。

[0141] 所获得的产物具有下述特征: 平均分子量为 3611 道尔顿, 抗 - 因子 Xa 活性为: 5.4IU/mg。

[0142] 所进行的实验通常为下述: 通过 NMR 方式制备、量化和鉴定糖胺聚糖级分的级分物, 并且施用在预先糖尿病化 (diabetized) 的 wistar 大鼠和遗传修饰的小鼠中, 以评估所述溃疡的治愈。

[0143] 通过 NMR 对级分的量化和鉴定的研究

[0144] 确定产物的单糖比例

[0145] 本发明的发明人已经分析了商购样品以及他们自己的研究样品,以确定那些负责治愈糖尿病足部溃疡的单糖的单糖比例以及在五糖中存在的不同糖级分的单糖比例。

[0146] 已经通过核磁共振 (NMR) 技术,使用定量 ^{13}C - ^1H HSQC(异核单量子内聚(heteronuclear single quantum coherence)) 二维实验,按照 Marco Guerrini 等所述的方法确定了糖胺聚糖 (GAG) 样品中的单糖的平均含量。使用第二维获得的分辨率的增加允许量化在一维光谱中重合的信号,这一技术对于研究复合碳水化合物如 GAGs 是特别有兴趣的。这些分子在一维 ^1H 光谱中具有严重的重合问题,这使得难以确定在 1D 中分离的峰的面积来进行其量化。

[0147] 与在获自天然肝素的 GAGs 中存在的 N-磺基-3-磺基-D-葡糖胺 G(ANS, 3S) 结合的 D-葡糖醛酸的量可以直接与其抗-Xa 活性相关,如 M. Guerrini 等所述。这种二糖属于负责与抗凝血酶 III 相互作用的五糖,并且仅以活性序列检测到。这种类型的具有直接结合的氢的葡糖醛酸的异头碳的相关信号出现在 HSQC 光谱中的特征性和不重合区域,并且因此可以用来量化 GAG 中五糖的比例。

[0148] 磺达肝素的 ^{13}C - ^1H HSQC 光谱和不同 GAGs 的 ^{13}C - ^1H HSQC 光谱显示在后附的附图 2A-2L 中,其中与五糖的葡糖醛酸单元相对应的异头质子的 ^1H - ^{13}C 相关信号已经用圆圈突出表示。

[0149] 对光谱中这一信号强度的测量允许确定五糖的比例。这一结果表明,在所分析的 GAGs 中,单糖 G-(ANS, 3S) 的百分数无一超过 3%,这与磺达肝素不同,在磺达肝素中该比例为 20%。

[0150] 然而,所研究的 GAGs 具有新的单糖单元,如非硫酸化的艾杜糖醛酸环 (I) 或 N-乙酰化葡糖胺 (ANAc)。同样地,2-硫酸化的艾杜糖醛酸单元的比例比在五糖中高得多。因此,所分析的样品主要包含与磺达肝素不同的寡糖链。

[0151]

级分	磺达肝素	贝米肝素	ROI 4	H13_96 _5	BEMI_99 _2	BEMI_99_4	BP064 08 66/27 A	BP064 0866/2 8A	依诺 肝素	达肝 素	亭扎 肝素	未分级分离的 肝素	%
ANS	40	44.4	35.3	39.6	-	44.4	43.4	49.3	40.65	37.3	42.45	42.6	25-5 0
ANAc	0	2.9	2.2	0.1	2.5	6.03	1.8	4.1	5.6	5.15	7.5	5.1	0-10
I2S	20	30.7	28.3	23.1	26.9	0	34.6	22.6	26	37.7	30.2	38.4	0-50
I	0	2.8	3.3	1.4	1.8	34.2	1.8	1.3	3.35	5.0	4.30	5.7	0-35
G	20	5.7	5.7	6.8	5.7	9.26	6.2	8.6	8.4	7.25	7.9	7.0	3-25
ANS _{3S}	20	2.4	3.1	3.0	0	0	<0.1	0	2.2	2.3	1.0	2.2	<20
G-ANS _{3S}	20	1.5	2.6	1.9	0	0	<0.1	0	1.7	2.05	1.05	1.0	<20

该表中的所有数据以%表示。

ANS: N-磺基-D-葡萄糖胺
 ANAc: N-乙酰-D-葡萄糖胺
 I2S: 2-硫酸化 L-艾杜糖醛酸
 I: L-艾杜糖醛酸 G: D-葡萄糖醛酸
 ANS_{3S}: N-磺基-3-磺基-D-葡萄糖胺
 G-ANS_{3S}: 与 N-磺基-3-磺基-D-葡萄糖胺结合的 D-葡萄糖醛酸

[0152] 在 W1STAR 大鼠中通过肠胃外途径的研究

[0153] 实施例 1:

[0154] wistar 大鼠的糖尿病化 (diabetization)。

[0155] 为了进行本实施例,通过肌肉途径施用 45mg/kg 链佐星 (streptozocin) (STZ) 的剂量,以产生一批次 8 只糖尿病大鼠 (Andrades Ja 等 Engineering, expression, and renaturation of a collagen-targeted human bFGF fusion protein(胶原蛋白靶向的人 bFGF 融合蛋白的加工、表达和复性). Growth Factors(生长因子). 2001;18(4):261-75)。

[0156] 使用雄性 wistar 大鼠,每只大鼠平均体重 250g,通过在每只大鼠的左足肌内施用 100 μ L 而对每只大鼠施用 11.25mg STZ 的剂量。

[0157] 对所有大鼠施用加糖水 (350mg/dL) 三天,并且每天用尿糖测定仪 (glucometer) 进行葡萄糖测量,以验证大鼠确实糖尿病化 (diabetized)。因为该原因,在施用链佐星前和在施用链佐星后 4 天时,从大鼠尾静脉采集一滴血,用于随后量化糖血,和观察在开始溃疡测定之前它们是否是糖尿病性的。

[0158] 表 1:wistar 大鼠的重量 - 糖血测量

[0159]

大鼠	重量(g)	第 0 天的糖血 (mg/dL)	第 4 天的糖 血(mg/dL)	第 9 天的糖 血(mg/dL)
1	250	120	>350	>350
2	245	129	>350	----
3	255	119	>350	----
4	250	135	>350	----
5	240	136	>350	----
6	260	171	>350	>350
7	270	124	>350	----
8	245	133	>350	----

[0160] wistar 大鼠的溃疡和治愈程度的测量

[0161] 对于该实施例,总共选择 3 组 8 只雄性 Wistar 大鼠:

[0162]

对照组:	2 只大鼠
组 1:高剂量肝素 (217IU)	3 只大鼠
组 2:低剂量肝素 (108IU)	3 只大鼠

[0163] 对每组中所包含的大鼠的选择是随机进行的。

[0164] 一旦大鼠被糖尿病化,使用解剖刀在其上产生每个直径为 1cm 的 4 个溃疡。按照书:“Handbook of laboratory animal management and welfare(实验室动物管理和救济手册)”的建议使用氯胺酮 (ketamine)/赛拉嗪 (xylazine) 的麻醉/止痛流程:

[0165] - 麻醉 :10mg/kg 赛拉嗪 +90mg/kg 氯胺酮 IP

[0166] - 止痛 :300mg/kg 对乙酰氨基酚 (paracetamol), 通过口服途径 (溶解在水中)

[0167] 在本实施例中, 在溃疡后的那天, 除了组 1 的一只和组 2 的另一只之外, 研究中所包含的所有大鼠死亡。死亡的引起不是由于感染现象, 而可能是由于麻醉作用。因此, 使用每只 4 个溃疡的两只大鼠继续进行实验, 一只使用高剂量的贝米肝素, 另一只使用低剂量的贝米肝素, 因此继续实验以观察在不同剂量之间治愈和溃疡化面积方面的差异。

[0168] 在溃疡之后, 用水处理溃疡, 并且清理 9 天。

[0169] 通过皮下途径施用贝米肝素溶液 (100 μ L) 进行贝米肝素的施用, 用以治疗溃疡。

[0170] 通过将溃疡描绘在透明物 (transparency) 上来量化溃疡的直径, 以观察愈合的进展。

[0171] 表 2 显示计算的相对于第 1 天的第 9 天的面积减少百分数:

[0172] 表 2

[0173]

108IU 大鼠	217IU 大鼠
E 43.23% *	A 26.2%
F 17.36%	B 20.14%
G 32.24%	C 25.64%
H 23.59%	D 37.43%
平均值 :24.39 \pm 7.47	平均值 :27.35 \pm 7.25

[0174]

[0175] (* 由于错误的量化, 由平均值中排除)

[0176] 愈合进展

[0177] 在量化上, 关于两只大鼠之间的溃疡面积没有观察到许多差异。然而, 与 D = 108IU 大鼠相比, D = 217IU 大鼠的愈合进展在肉眼上观察要好得多, 因为溃疡的闭合在肉芽组织或真皮组织再生方面具有更高的质量, 具有更少的纤维含量, 因此, 关于 D = 217 的施用, 关于溃疡化组织的愈合和再生观察到定性的改善。

[0178] 实施例 2:

[0179] wistar 大鼠的糖尿病化

[0180] 为了进行本实施方案, 通过肌肉途径施用 45mg/kg 链佐星 (STZ) 的剂量, 以产生一批次 8 只糖尿病大鼠 (Andrades Ja 等 Engineering, expression, and renaturation of a collagen-targeted human bFGF fusion protein (胶原蛋白靶向的人 bFGF 融合蛋白的加工、表达和复性). Growth Factors (生长因子). 2001 ;18(4) :261-75)。

[0181] 使用雄性 wistar 大鼠, 每只大鼠平均体重 250g, 通过在每种大鼠的左足肌肉内施用 100 μ L 而对每只大鼠施用 11.25mg STZ 的剂量。

[0182] 对所有大鼠施用加糖水 (350mg/dL) 三天, 并且每天用尿糖测定仪进行葡萄糖测

量,以验证大鼠确实糖尿病化。因为该原因,在施用链佐星前和在施用链佐星后 4 天时,从大鼠尾静脉采集一滴血,用于随后量化糖血,和观察在开始溃疡测定之前它们是否糖尿病化。

[0183] 表 3:wistar 大鼠的重量 - 糖血测量

[0184]

大鼠	重量 (g)	第 0 天的糖血 (mg/dL)	第 4 天的糖 血(mg/dL)	第 9 天的糖 血(mg/dL)
1	240	128	>350	1
2	240	132	>350	2
3	250	121	>350	3
4	260	138	>350	4
5	250	142	>350	5
6	245	136	>350	6
7	265	129	>350	7
8	245	141	>350	8

[0185]

[0186] wistar 大鼠的溃疡和愈合程度的测量

[0187] 对于该实施例,总共选择 3 组 8 只雄性 Wistar 大鼠:

[0188]

对照组磺达肝素	2 只大鼠
组 1:高剂量肝素 (217IU)	2 只大鼠
组 2:低剂量肝素 (108IU)	2 只大鼠

[0189] 对每组中所包含的大鼠的选择是随机进行的。

[0190] 一旦大鼠被糖尿病化,使用解剖刀在其上产生每个直径为 1cm 的 2 个溃疡。按照书:“Handbook of laboratory animal management and welfare(实验室动物管理和救济手册)”的建议使用氯胺酮 / 赛拉嗪的麻醉 / 止痛流程:

[0191] - 麻醉 :10mg/kg 赛拉嗪 +90mg/kg 氯胺酮 IP

[0192] - 止痛 :300mg/kg 对乙酰氨基酚,通过口服途径 (溶解在水中)

[0193] 在溃疡之后,用水处理溃疡,并且清理 9 天。

[0194] 通过皮下途径施用贝米肝素溶液 (100 μ L) 进行贝米肝素和磺达肝素的施用,用以治疗溃疡。

[0195] 通过将溃疡描绘在透明物上来量化溃疡的直径,以观察愈合的进展。

[0196] 表 4 显示计算的相对于第 1 天的第 9 天的面积减少百分数：

[0197] 表 4

[0198]

217 IU 大鼠 批次 1		108 IU 大鼠 批次 2		磺达肝素大鼠 批次 3	
A	29.31%	E	16.96%	H	17.00%*
B	31.85%	F	13.26%	I	20.69%
C	28.40%	G	19.14%	J	21.32%
D	24.89%	H	19.71%	K	23.81%
平均值: 27.35±7.25		平均值: 24.39±7.47		平均值: 20.70±7.20	

[0199] 这一测定的三个批次的平均值显示在图 3 中。

[0200] 愈合进展

[0201] 在该测定中,在第 0 天和第 9 天之间已经出现溃疡化面积的减少(参见图 3);此外,在实施例 1 中,确实观察到关于溃疡化组织愈合类型的肉眼可见的数量差异:D = 217IU 大鼠的愈合进展比在磺达肝素的情形中肉眼可见的要好得多,在磺达肝素的情形中,与第 0 天相比,第 9 天伤口几乎没有变化。与 D = 108IU 大鼠相比,在使用 D = 217 的大鼠情形中,溃疡的闭合在肉芽组织或真皮组织再生方面具有更高的质量,具有更少的纤维含量,因此,使用 D = 217 施用和使用磺达肝素的大鼠,关于溃疡化组织的愈合和再生观察到定性的改善。

[0202] 实施例 3:

[0203] wistar 大鼠的糖尿病化

[0204] 为了进行本实施方案,通过肌肉途径施用 45mg/kg 链佐星 (STZ) 的剂量,以产生一批次 10 只糖尿病大鼠 (Andrades Ja 等 Engineering, expression, and renaturation of a collagen-targeted human bFGF fusion protein(胶原蛋白靶向的人 bFGF 融合蛋白的加工、表达和复性). Growth Factors(生长因子). 2001 ;18(4) :261-75)。

[0205] 使用雄性 wistar 大鼠,每只大鼠平均体重 250g,通过在每只大鼠的左足肌肉内施用 100 μ L 而对每只大鼠施用 11.25mg STZ 的剂量。

[0206] 在所有大鼠中的 6 只中诱导糖尿病,并且将所有大鼠中的 4 只作为非糖尿病对照,以检测不是由糖尿病引起的慢性溃疡的愈合结果。

[0207] 对大鼠施用加糖水 (350mg/dL) 三天,并且每天用尿糖测定仪进行葡萄糖测量,以验证大鼠确实糖尿病化。因为该原因,在施用链佐星前和在施用链佐星后 4 天时,从大鼠尾静脉采集一滴血,用于随后量化糖血,和观察在开始溃疡测定之前它们是否是糖尿病性的。

[0208] 表 5:wistar 大鼠的重量-糖血测量

[0209]

大鼠	体重(g)	第 0 天的糖血(mg/dL)	第 4 天的糖血(mg/dL)
1	250	138	>350
2	255	145	>350
3	250	129	>350
4	260	122	>350
5	255	146	>350
6	260	140	>350
非糖尿病大鼠			
大鼠	体重(g)	第 0 天的糖血(mg/dL)	第 4 天的糖血(mg/dL)
7	245	135	141
8	260	149	137
9	245	152	129
10	250	148	138

[0210] wistar 大鼠的溃疡和愈合程度的测量

[0211] 对于该实施例,总共选择 5 组 10 只雄性 Wistar 大鼠:

[0212]

非糖尿病对照组	2 只大鼠
糖尿病对照组	2 只大鼠
组 1 :非糖尿病贝米肝素 (217IU/ 大鼠)	2 只大鼠
组 2 :糖尿病 Bem i 99_2(2. 2mg/ 大鼠)	2 只大鼠
组 3 :糖尿病磺达肝素 (0. 22mg/ 大鼠)	2 只大鼠

[0213]

[0214] 对每组中所包含的大鼠的选择是随机进行的。

[0215] 一旦大鼠已经准备好,使用解剖刀在其上产生每个直径为 1cm 的 2 个溃疡。按照书:“Handbook of laboratory animal management and welfare(实验室动物管理和救济手册)”的建议使用氯胺酮 / 赛拉嗪的麻醉 / 止痛流程:

[0216] - 麻醉 :10mg/kg 赛拉嗪 +90mg/kg 氯胺酮 IP

[0217] - 止痛 :200mg/kg 布洛芬,通过口服途径 (溶解在 1L 水中)

[0218] 在本实施例中,在溃疡后那天,组 3 中的一只糖尿病大鼠死亡。死亡的原因不是由于感染现象,而是可能是由于麻醉作用。因此,使用糖尿病对照组、非糖尿病对照组、组 1 和

组 2 的每只具有两个溃疡的 8 只大鼠和组 3 的一只具有两个溃疡的大鼠继续实验,因此继续该实验,以观察在不同剂量之间愈合和溃疡表面方面的差异。

[0219] 在溃疡之后,用水处理溃疡,并且清理 9 天。通过 SC 途径 (100 μ L) 对每组施用相对应的溶液,用于治疗溃疡。通过将溃疡描绘在透明物上来量化溃疡的直径,以观察愈合的进展。

[0220] 表 6 显示计算的相对于第 1 天的第 9 天的愈合百分数:

[0221] 表 6

[0222]

非糖尿病对照	组 1	糖尿病对照	Bemi 99_2	磺达肝素
A 39.85%	A 75.05%	A 56.70%	A 51.98%	A 50.99%
B 46.12%	B 69.83%	B 57.24%	B 37.08%	B 49.55%
C 51.02%	C 72.56%	C 47.41%	C 68.21%	--
D 43.74%	D 69.83%	D 51.82%	D 62.12%	--%
平均值 : 45.18%	平均值 : 71.82%	平均值: 53.29%	平均值 : 54.85%	平均值: 50.22%

[0223] 在这一测定中已经进行了愈合百分数的研究:如可以观察到的,在 9 天的研究过程中,大鼠具有约 50% 的愈合百分数,即,9 天里,伤口减小一半。然而,如在前述实施例中观察到的,当给它们施用具有下列较高单糖百分数的寡糖组合物时:

[0224] a) N-磺基-D-葡糖胺:25-50%

[0225] b) D-葡糖醛酸:3-25%

[0226] 其中与 N-磺基-3-磺基-D-葡糖胺结合的二糖单元 D-葡糖醛酸的比例不大于 20%,观察到愈合增加到约 70%,并且如果剂量更大(相对于单糖总量更大的量),甚至更好。

[0227] 在非糖尿病大鼠中,愈合与糖尿病化大鼠相似。换言之,在糖尿病对照和非糖尿病对照的愈合之间没有观察到差异。

[0228] 当给它们施用磺达肝素时,愈合的百分数保持为相等的,即,与其糖尿病对照相比,没有改善,因此,推论该产品不是真正有助于溃疡的愈合。

[0229] 当施用改变的低分子量肝素 Bemi_99_2 时,反应实际上与其糖尿病对照是相同的,因此,推论该产品不是真正有助于溃疡的愈合,原因在于这样的事实:其改变了负责溃疡愈合的单糖。

[0230] 在施用非糖尿病贝米肝素 (217IU/大鼠) 的情形中,即,组 1 的大鼠,观察到,与其非糖尿病对照相比,愈合实质上减少 71.82%,因此推论,在非糖尿病患者的慢性溃疡(如压力性溃疡)的情形中,施用具有下述较高单糖百分数的寡糖组合物:。

[0231] a) N-磺基-D-葡糖胺:25-50%

[0232] b) D-葡糖醛酸:3-25%

[0233] 其中与 N-磺基-3-磺基-D-葡糖胺结合的二糖单元 D-葡糖醛酸的比例不大于

20%，观察到愈合约为 70%。

[0234] 作为该研究的定性的概括结论，强调的是组 1 的大鼠的愈合过程在肉眼观察上好得多，因为与其余的组相比，溃疡的闭合在肉芽组织或真皮组织再生方面具有更高的质量，具有更少的纤维含量。

[0235] 在 WISTAR 大鼠中通过口服途径的研究

[0236] 本研究的目的是评估测定产品：磺达肝素钠和贝米肝素在其通过口服途径施用到糖尿病大鼠伤口模型中的愈合活性。

[0237] 两种治疗均通过口服途径以 10mL/kg 的施用体积进行施用。在磺达肝素的情形中，施用 10mg/kg 的剂量，并且在贝米肝素的情形中，施用 100mg/kg。

[0238] 对照组仅接受用于制备测定产品的载体。用于制备测定产品的载体是注射用的在水中的 1.5% (w/v) 的碳酸氢盐溶液。经验证所制备的制剂的 pH 高于 8.00。

[0239] wistar 大鼠的糖尿病化

[0240] 在测定的初始，在所有动物中诱导糖尿病。为了这一目的，它们接受单次链佐星的腹膜内注射 (60mg/kg, 10mL/kg)。72 小时后，糖尿病的建立通过分析血糖水平来证实。为了这一目的，将动物用异氟烷麻醉，并且从轮匝肌后丛 (retroorbicular plexus) 采集 0.8mL 血液。动物必须具有大于 15mmol/L 的葡萄糖值。在诱导糖尿病后一周，产生伤口。

[0241] 将动物麻醉 (氯胺酮 + 赛拉嗪, 90+10mg/kg, i. m.)。将它们的背部剃毛，并且用消毒剂 (聚乙烯吡咯烷酮 - 碘) 清洁，利用模板标记将要产生伤口的区域，以使在所有动物中伤口位置是统一的。

[0242] 通过圆形切口产生直径约为 1.5cm 的伤口，将背部中央区域的皮肤去除。在干预后，通过腹膜内途径施用 1mL/ 动物的生理血清。持续至干预后 7 天。在干预后持续 7 天在饮用水中提供止痛剂 (对乙酰氨基酚, 1mg/mL)。

[0243] 在产生伤口后的那天并且总共持续 14 天，对动物实施指定的治疗。进行动物的随访，并且伤口的进展每周肉眼观察评估两次，通过伤口的数字照片进行评估。动物的体重也是每周记录两次。

[0244] 在最后一次施用后那天，将动物用过量的麻醉剂 (戊巴比妥钠) 处死。摘取产生伤口的区域。前半部分在液氮中冷却，并且保存在冷冻机 (-80±5℃) 中，后半部分保存在甲醛溶液中，用于其随后的组织学处理。

[0245] 愈合程度的测量

[0246] 通过下述标准式计算伤口的面积，表示为其减少的百分数，以评估其治愈的程度：

[0247]

$$\% \text{治愈} = \frac{(A_{\text{基线}} - A_{\text{时间}})}{(A_{\text{基线}})} \times 100$$

[0248] 将在干预或切口后立即进行的测量用作基线面积。

[0249] 非糖尿病化大鼠

[0250] 在随后的那天并且总共持续 14 天，通过口服途径对动物施用 10mg/kg。

[0251] 为了这一目的，将动物依据体重预先均匀分布到下述治疗组中，每组至少 5 只动

物：

[0252] _____

[0253] 治疗 剂量

[0254] _____

[0255] 非糖尿病对照 -

[0256] 用磺达肝素钠治疗的大鼠 10mg/kg

[0257] 用贝米肝素钠治疗的大鼠 100mg/kg

[0258] 在产生伤口的那天并且总共持续 14 天,对动物实施指定的治疗。

[0259] 对动物进行随访,伤口的进展通过肉眼观察每周评估两次,通过伤口的数字照片进行评估。动物的体重也是每周记录两次。

[0260] 伤口面积的测量。

[0261] 与伤口面积相对应的值并不显著。在这一情形中,用贝米肝素钠治疗的大鼠或多或少与对照动物相同的程度减小溃疡面积。

[0262] 组织病理学评估。

[0263] 在研究的第 15 天将动物处死,并且将引起伤口的皮肤区域保存在甲醛溶液中,以进行组织病理学评估(苏木精-曙红染色)。

[0264] 每个切片提供一个组织学计分,并且以 I 级到 V 级范围表示,其中 I 意指未愈合的伤口, V 意指完全上皮化的伤口。计分是基于细胞侵入、肉芽组织的形成、血管化和上皮化的程度。

[0265] 对于不同组获得的组织病理学计分显示在下表中：

[0266]

治疗	计分	等级
非糖尿病对照	10.0	III
用磺达肝素钠治疗的糖尿病动物	9.5	III
用贝米肝素钠治疗的糖尿病动物	9.0	III

[0267] 所有属于在治疗开始后 15 天处死的动物的样品均已经发展了愈合活性,明显地存在肉芽组织、新血管形成和或多或少的诱导的皮肤溃疡的完全上皮再形成。

[0268] 在这一情形中,所有的动物表现出或多或少相同程度的平均愈合;然而,在对照组中和在用磺达肝素治疗的组中,观察到在用来计算平均值的数据中存在高可变性。在任何情形中,用贝米肝素钠治疗的组的 5 只动物获得 9.0 的组织学值,由此观察到愈合程度是令人吃惊地均一的。

[0269] 此外,与用磺达肝素治疗的动物相比,在用贝米肝素治疗的组的情形中,观察到明显得多的结痂进程。在这种意义上,应该强调痂的形成在伤口愈合过程中是重要的,原因在于,其实现了限制经皮水分流失的目的和作为抗细菌和外部病原体的屏障、防止伤口感染的目的。

[0270] 在本实施例中,已经在前些日子形成痂的大鼠,在痂痕的组织病理学分析中,与没有形成痂或痂较小的动物的伤口相比较,显现更接近正常的真皮模式。尽管存在这样的事

实,即,在其落下后,与没有形成痂的动物相比较,愈合面积更大,并且因此测量是不确定的。因此,痂的形成是天然愈合过程的良好指征,在该具体案例中,其仅在用贝米肝素治疗的组中肉眼观察到。

[0271] 在糖尿病大鼠中研究通过口服途径的糖胺聚糖的因 Xa 抑制活性与其治愈能力的关系

[0272] 在次日并且总共持续 14 天,通过口服途径给动物施用 10mL/kg。

[0273] 为了这一目的,将动物按照体重预先均匀分布到下述治疗组中:

[0274]

[0275]	治疗	剂量
[0276]		

[0277]	糖尿病对照	-
--------	-------	---

[0278]	用磺达肝素钠治疗的大鼠	10mg/kg
--------	-------------	---------

[0279]	用贝米肝素钠治疗的大鼠	100mg/kg
--------	-------------	----------

[0280] 在产生伤口的那天并且总共持续 14 天,对动物实施指定的治疗。

[0281] 进行动物随访,伤口的进展通过肉眼观察每周评估两次,通过伤口的数字照片进行评估。动物的体重也每周记录两次。

[0282] 伤口面积的测量。

[0283] 图 11 显示与用贝米肝素钠和磺达肝素治疗的糖尿病大鼠相比,糖尿病对照大鼠的进展。该图显示用贝米肝素治疗的大鼠治愈效果比用磺达肝素治疗的那些好得多。关于溃疡面积,当比较所有产品时,观察到具有较高常规区域 (regular region) 单糖比例的糖胺聚糖是怎样对伤口的愈合具有有利的作用的。

[0284] 组织病理学评估。在研究的第 15 天将动物处死,并且将引起伤口的皮肤区域保存在甲醛溶液中,以进行组织病理学评估 (苏木精 - 曙红染色)。

[0285] 每个切片提供一个组织学计分,并且以 I 级到 V 级范围表示,其中 I 意指未愈合的伤口, V 意指完全上皮化的伤口。计分是基于细胞侵入、肉芽组织的形成、血管化和上皮化的程度。

[0286]

等级	计分	描述
I	1-3	零至最小的细胞累积,不存在肉芽组织或上皮发育。
II	4-6	由炎性细胞占主导的良好和不成熟的肉芽组织,但是具有很少成纤维细胞、毛细管或胶原蛋白沉积;最小的上皮迁移。
III	7-9	适度厚的肉芽组织。其可以由炎性细胞占主导变化到存在更多的成纤维细胞和胶原蛋白沉积、广泛的新血管形成、最少至适度的上皮迁移。

[0287]

- IV 10-12 由成纤维细胞和广泛的胶原蛋白沉积占主导的厚且血管化的肉芽组织，上皮细胞部分或完全覆盖伤口。
- V 13-15 与完全上皮形成的伤口对应的区域，不具有或多或少的伤口痕迹。

[0288] 对于不同组获得的组织病理学计分显示在下表中：

[0289]

治疗	计分	等级
----	----	----

[0291]

糖尿病对照	10.0	III
-------	------	-----

用磺达肝素钠治疗的糖尿病动物	9.5	III
----------------	-----	-----

用贝米肝素钠治疗的糖尿病动物	11.3	IV
----------------	------	----

[0295] 所有属于在治疗开始后 15 天处死的动物的样品均已经发展了愈合活性，清楚地存在肉芽组织、新血管形成和或多或少的诱导的皮肤溃疡的完全上皮再形成。

[0296] 除了在所有动物中获得的更大的结果一致性之外，在用贝米肝素钠治疗的组中，观察到更有进展的肉芽组织、强烈的新血管形成，具有更高的愈合水平。用贝米肝素钠治疗的高血糖动物显示出比正常血糖对照组的那些甚至更高的愈合水平。

[0297] 这些结果由组织学发现的支持：在用贝米肝素钠治疗的糖尿病动物中获得更高的愈合水平。

[0298] 通过皮下途径在具有遗传诱导的糖尿病的糖尿病小鼠中的糖尿病足部溃疡的研究

[0299] 实施例 4：

[0300] C57BL/KS BKS. Cg-m+Lepr^{db}/+Lepr^{db}/J 糖尿病小鼠的溃疡，愈合程度测量和组织学评估。

[0301] 将 C57BL/KsJ-db/db 糖尿病小鼠用作具有改变的愈合的 II 型糖尿病模型，与前述实施例中所用的具有通过链佐星诱导的糖尿病的小鼠不同，所述具有通过链佐星诱导的糖尿病的小鼠是 I 型糖尿病模型 (Michaels, J., 等, db/db mice exhibit severe wound-healing impairments compared with other murine diabetic strains in a silicone-splinted excisional wound model (在硅氧烷-夹持的切口伤口模型中，与其它鼠糖尿病品系相比，db/db 小鼠表现出严重的伤口-愈合损伤). Wound Repair Regen (伤口修复再生), 2007. 15 (5) :p. 665-70)。遗传的糖尿病小鼠发展对胰岛素的抗性和与在成年糖尿病中观察到的那些相似的高血糖症。在这些小鼠背部产生的总厚度的伤口比在非糖尿病动物中引起的相同伤口花费更久的时间形成肉芽组织和闭合。

[0302] 在测定的第一天，将动物麻醉（氯胺酮 + 赛拉嗪，100+10mg/kg, i. m.）。将动物的背部剃毛，用消毒剂清洁该区域，并且利用模板标记伤口区域，以使在所有动物中伤口位置是相同的。

[0303] 通过圆形切口产生直径约为 1.5cm 的伤口，将背部中央区域的皮肤去除。随后将半透性敷料置于伤口上。在干预后，通过腹膜内途径施用 1mL/ 动物的生理血清。

[0304] 在干预后持续 7 天在饮用水中提供止痛剂（对乙酰氨基酚，1mg/mL）。

[0305] 通过下述标准式计算伤口的面积（表示为其减少的百分数），以评估其治愈的程度：

[0306]

$$\%治愈 = \frac{(A_{基线} - A_{时间})}{(A_{基线})} \times 100$$

[0307] 将在干预或切口后立即进行的测量用作基线面积。在随后的那天并且总共持续 14 天，对动物实施指定的治疗。

[0308] 研究通过皮下途径的糖胺聚糖的因子 Xa 抑制活性与其治愈能力的关系。

[0309] 在次日并且总共持续 14 天，给动物通过皮下途径在动物背部施用 10mL/kg，避开伤口区域。

[0310] 为了这一目的，将动物按照体重预先均匀分布到下述治疗组中：

[0311]

治疗	剂量
糖尿病对照	-
[0312]	
用磺达肝素钠治疗的糖尿病动物	1 mg/kg
用贝米肝素钠治疗的糖尿病动物	1000 IU Xa/kg
用肝素钙治疗的糖尿病动物	600 IU Xa/kg
用 BP06408-66/28-A 治疗的糖尿病动物	10 mg/kg
用 RO-14 治疗的糖尿病动物	1000 IU Xa/kg

[0313] 进行动物随访直至 21 天的时间（在这种动物模型中对于伤口的愈合所需要的平均时间）。评估通过伤口的数字照片以及随后的图像分析进行。

[0314] 测量伤口面积

[0315] 图 4 显示与用贝米肝素钠治疗的小鼠相比，糖尿病对照小鼠的进展。伤口面积表示在每只动物右侧。

[0316] 图 5 显示伤口随时间愈合的百分数的进展。

[0317] 未治疗的糖尿病动物是表现出较低治愈率的那些，因为它们在第 21 天时没有达到 90% 的愈合，其次是用磺达肝素治疗的动物，其没有达到完全的治愈，其在第 21 天时达到 96%。用贝米肝素治疗的动物在第 21 天时达到完全的治愈，并且从第 18 天起具有 98% 的愈合值。

[0318] 这些结果表明，不存在在所用的糖胺聚糖的抗-Xa 活性（通过存在负责结合抗凝

血酶 III 的五糖而确定) 与其对愈合的有益效果之间的关系, 原因在于, 贝米肝素钠是在其结构中具有最低的五糖含量的产品 (仅 1.5% 的单糖总含量对应于五糖特有的与 N- 磺基 -3- 磺基 -D- 葡萄糖胺结合的 D- 葡萄糖醛酸), 然而, 其具有比磺达肝素 (纯五糖, 与 N- 磺基 -3- 磺基 -D- 葡萄糖胺结合的 D- 葡萄糖醛酸占总单糖含量的 20%) 更短的愈合时间。关于溃疡的面积, 当比较所有产品时, 观察到具有较大比例的常规区域单糖的糖胺聚糖怎样在伤口的愈合中具有有益作用。在图 5 中观察到这一事实, 其中观察到未分级分离的肝素以及贝米肝素钠有助于愈合, 在施用第 11 天后获得高于 80% 的百分数。

[0319] 肉眼可见的评估

[0320] 在提取的数据中, 在未分级分离的肝素钙、R0-14 和贝米肝素组之间观察到大量肉眼可见的差异, 从观察的第 5 天起观察到不同的行为。以这种方式, 可以看出, 用贝米肝素治疗的组怎样在治疗第 5 天后表现出清楚的疤痕质量差别, 在伤口中观察到覆盖有肉芽组织的一层, 该事实在对照组中没有发生, 在用磺达肝素治疗的组中部分发生。

[0321] 这一差异性的事实标记了愈合进程的速度和愈合的质量 (如在图 5 中所示), 原因在于, 除了保护动物免受可能的感染之外, 肉芽组织还负责细胞组织再生和愈合。

[0322] 此外, 在对照组中, 观察到没有产生肉芽组织 (伤口的基底是清楚且有光泽的), 并且在用磺达肝素治疗的组中, 这仅在伤口的边缘观察到。因此, 对照糖尿病小鼠的伤口的闭合和用磺达肝素治疗的那些的伤口的闭合通过伤口边缘的收缩而发生, 这一过程比通过形成肉芽组织发生的过程更缓慢。另外, 用贝米肝素治疗的组的伤口在第 18 天闭合, 而在对照组中, 伤口保持为开放性的, 具有后续的和并发症的危险。

[0323] 组织病理学评估

[0324] 将动物在研究的第 21 天处死, 并且将引起伤口的皮肤区域保存在甲醛溶液中, 以进行组织病理学评估 (苏木精 - 曙红染色)。

[0325] 每个切片提供一个在 I 级到 V 级范围内的组织学计分, 其中 I 意指未愈合的伤口, V 意指完全形成上皮的伤口。计分是基于细胞侵入、肉芽组织的形成、血管化和上皮化的程度。

[0326]

等级	计分	描述
I	1-3	零至最小的细胞累积, 不存在肉芽组织或上皮发育。
II	4-6	由炎性细胞占主导的良好和不成熟的肉芽组织, 但是具有很少成纤维细胞、毛细管或胶原蛋白沉积; 最小的上皮迁移。
III	7-9	适度厚的肉芽组织。其可以由炎性细胞占主导变化到存在更多的成纤维细胞和胶原蛋白沉积、广泛的新血

[0327]

管形成、最少至适度的上皮迁移。

IV	10-12	由成纤维细胞和广泛的胶原蛋白沉积占主导的厚且血管化肉芽组织，上皮细胞部分或完全覆盖伤口。
V	13-15	与完全形成上皮的伤口对应的区域，不具有或多或少的伤口痕迹。

[0328] 对于不同组获得的组织病理学计分显示在表 7 中：

[0329] 表 7

[0330]

治疗	计分	等级
糖尿病对照	6.7	III
用磺达肝素钠治疗的糖尿病动物	7.2	III
用贝米肝素钠治疗的糖尿病动物	11.5	IV
用肝素钙治疗的糖尿病动物	8.0	III
用 BP06408-66/28-A 治疗的糖尿病动物	9.0	III

[0331] 与皮肤样品对应的切片形态研究表明在所有组中正常的瘢痕修复过程进展。在治疗组中，完全形成肉芽组织，贝米肝素钠获得最好的计分，因为，在该情形中，观察到通过恢复到初始条件的全新细胞结构（见图 6 的 C 图），其中观察到下述结果：

[0332] A 完全的上皮再形成。真皮 (dermis) 中很少炎性渗液。在真皮中适度存在成纤维细胞。在真皮中适度新血管形成。

[0333] B 完全的上皮再形成。适度的炎症渗透。真皮中适度的炎性渗液、多形核嗜中性粒细胞。真皮中适度存在成纤维细胞。真皮中适度新血管形成。

[0334] C 完全再生的细胞结构。

[0335] 从通过确定伤口面积和组织病理学评估获得的结果，可以推论，所测定的最好的产品是贝米肝素，原因在于，其是具有最短愈合时间和最高组织质量的一种产品。表现非常好起作用的另一种产品是实验产物 BP06408-66/28-A。因此，这同样表明，更大的因子 Xa 抑制活性不与更好的愈合效果相关。

[0336] 通过局部途径的糖胺聚糖的因子 Xa 抑制活性与其治愈能力的关系的研究。

[0337] 在这一情形中，制备用于直接施用在溃疡上的局部制剂，所述制剂的载体由卡波普 (Carbopol)，Phenonip[®]，司盘 80 (Span 80)，甘油和水形成。

[0338] 如在皮下施用测定中详述那样进行溃疡和面积测量。在切口后那天和总共持续 14 天，对动物实施指定的治疗，通过局部途径在动物背部在伤口上施用 0.15ml/ 动物，。

[0339] 为了这一目的，将动物按照体重预先均匀分布到下述治疗组中：

[0340]

治疗	剂量
糖尿病对照	-
用贝米肝素治疗的糖尿病动物	1000 IU/kg
用磺达肝素治疗的糖尿病动物	1000 IU/kg
用肝素钙治疗的糖尿病动物	1000 IU/kg

[0341] 进行动物的随访直到 14 天的时间（在这种动物模型中伤口愈合所需要的平均时间）。通过伤口的数字照片和随后的图像分析进行评估。图 7 显示与对照组相比，治疗组伤口减小的百分数的进展的总值。如在该图中所观察到的，使用贝米肝素观察到最好的伤口，在治疗结束时，获得大于 60% 的面积减少值。

[0342] 肉眼可见的评估

[0343] 如果通过肉眼观察的，在所有组（对照、贝米肝素、磺达肝素和未分级分离的肝素钙（NFH））中看到大量差异，在观察的第 7 天后，不同的行为是显著的。

[0344] 尽管在对照组中在第 7 天观察到没有产生肉芽组织（伤口的基底是清楚有光泽的），相反可以看出在治疗的同一天治疗组怎样表现出清楚的瘢痕质量差异，在伤口中观察到覆盖有肉芽组织的一层。这一差异性事实标记了愈合进程的速率和愈合的质量，原因在于，除了保护动物免受可能的感染之外，肉芽组织还负责细胞组织再生和愈合，因为其非常富含成纤维细胞、毛细血管和胶原蛋白。

[0345] 组织病理学评估

[0346] 将动物在最后一次施用后那天（第 15 天）处死，并且摘取产生伤口的区域。将含有伤口的区域的后部分保存在甲醛溶液中用于其组织学处理（苏木精 - 曙红染色）。

[0347] 结果是基于通过 Greenhalgh 等（1990）的方法给出的计分。每个组给出 1-15 的组织学计分，其中 1 意指未愈合的伤口，15 意指完全形成上皮的伤口。计分是基于细胞侵入、肉芽组织形成、血管化和上皮化的程度：

[0348] 对于不同组获得的组织病理学计分显示在下表中。

[0349]

治疗	计分	等级
糖尿病对照	6.7	III
用贝米肝素治疗的糖尿病动物	8.7	III
用磺达肝素治疗的糖尿病动物	8.6	III
用 NFH 治疗的糖尿病动物	9.4	IV

[0350] 三个治疗组通常获得比对照组更好的组织学计分，高于后者至少两点。尽管存在这样的事实：所有组（对照和治疗组）中的愈合特征在于存在适度厚的肉芽组织，它们之间的差别在于，与在治疗组的情形中更多存在成纤维细胞和胶原蛋白纤维沉积物相比，在对照组的情形中发生更多炎性细胞的存在。这表明，在对照组的情形中，愈合过程是在较早的阶段中，因此解释在伤口面积减小研究中所显示的较缓慢的愈合速率。在治疗中，属于用贝米

肝素和 NFH 治疗的组的皮肤样品具有稍微更有进展的瘢痕修复速率,具有更有进展的肉芽组织,更多成纤维细胞的存在和真皮新血管形成。

[0351] 用 NFH 治疗的组在组织学计分中是不同的,其包括在等级 IV 中,这表明与其它组相比,更高的愈合质量。所形成的肉芽组织更厚,并且由成纤维细胞占主导,具有广泛的胶原蛋白纤维沉积。上皮细胞部分或完全覆盖伤口。

[0352] 从通过确定伤口面积和通过组织病理学评估获得的结果,可以得出结论,即所测定的最好产品是贝米肝素和 NFH。贝米肝素具有较高的愈合速率,而在 NFH 的情形中,愈合较缓慢,但是在所形成的组织中具有较高的质量。

[0353] 实施例 5:

[0354] C57BL/KS. Cg-m Lepr^{db}+/+m 小鼠的溃疡,测量愈合程度和组织学评估。在非糖尿病动物中研究 NFH 和 LMWH 的愈合效果。确定肝素在通过口服、皮下和局部途径治疗非-糖尿病患者中的慢性溃疡上的潜在应用。

[0355] C57BL/KS. Cg-m Lepr^{db}+/+m 小鼠是在前述实施例中所用的小鼠的非糖尿病相似体。

[0356] 在测定的第一天,将动物麻醉(氯胺酮+赛拉嗪,100+10mg/kg, i. m.)。将动物的背部剃毛,用消毒剂清洁该区域,并且利用模板标记伤口区域,以使在所有动物中伤口位置是相同的。

[0357] 通过圆形切口产生直径约为 1.5cm 的伤口,将背部中央区域的皮肤去除。随后将半透性敷料置于伤口上。在干预后,通过腹膜内途径施用 1mL/ 动物的生理血清。

[0358] 在干预后持续 7 天在饮用水中提供止痛剂(对乙酰氨基酚,1mg/mL)。

[0359] 通过下述标准式计算伤口的面积(表示为其减少的百分数),以评估其治愈的程度:

[0360]

$$\%治愈 = \frac{(A_{基线} - A_{时间})}{(A_{基线})} \times 100$$

[0361] 将在干预或切口后立即进行的测量用作基线面积。在随后的那天并且总共持续 14 天,对动物实施指定的治疗。

[0362] 研究通过皮下途径的糖胺聚糖的因子 Xa 抑制活性与其治愈能力的关系。

[0363] 在次日并且总共持续 14 天,给动物通过皮下途径在动物背部施用 10mL/kg,避开伤口区域。

[0364] 为了这一目的,将动物按照体重预先均匀分布到下述治疗组中:

[0365]

治疗	剂量
非糖尿病对照	-
用贝米肝素钠治疗的非糖尿病动物	1000 IU Xa/kg
用肝素钙治疗的非糖尿病动物	600 IU Xa/kg
用 BP06408-66/28-A 治疗的非糖尿病动物	10 mg/kg

[0366] 进行动物随访直至 21 天的时间。评估通过伤口的数字照片以及随后的图像分析进行。

[0367] 图 8 显示与用肝素钙治疗的小鼠相比,非糖尿病对照小鼠的进展。伤口的面积已经显示在每只动物的右侧。

[0368] 图 9 显示随着时间伤口愈合的百分数进展。

[0369] 未治疗的非糖尿病动物在第 14 天后达到大于 90% 的伤口减少值。用贝米肝素钠治疗没有提高愈合速率。然而,与对照相比,用肝素钙治疗的动物确实有提高,在第 11 天达到 90% 愈合。

[0370] 肉眼可见的评估

[0371] 三组动物具有正常的愈合进程,伤口在第 21 天治愈。然而,看起来用肝素钙治疗的小鼠组中,该进程加速,因为在第 11 天,伤口是干燥且闭合的,并且在第 21 天其覆盖有毛发。

[0372] 组织病理学评估

[0373] 将动物在研究的第 21 天处死,并且将引起伤口的皮肤区域保存在甲醛溶液中,以进行组织病理学评估(苏木精-曙红染色)。

[0374] 每个切片提供一个在 I 级到 V 级范围内的组织学计分,其中 I 意指未愈合的伤口, V 意指完全形成上皮的伤口。计分是基于细胞侵入、肉芽组织的形成、血管化和上皮化的程度。

[0375]

等级	计分	描述
I	1-3	零至最小的细胞累积,不存在肉芽组织或上皮发育。

[0376]

II	4-6	由炎性细胞占主导的良好和不成熟的肉芽组织,但是具有很少成纤维细胞、毛细管或胶原蛋白沉积;最小的上皮迁移。
III	7-9	适度厚的肉芽组织。其可以由炎性细胞占主导变化到存在更多的成纤维细胞和胶原蛋白沉积、广泛的新血管形成、最少至适度的上皮迁移。
IV	10-12	由成纤维细胞和广泛的胶原蛋白沉积占主导的厚且血管化的肉芽组织,上皮细胞部分或完全覆盖伤口。
V	13-15	与完全形成上皮的伤口对应的区域,不具有或多或少的伤口痕迹。

[0377] 对于不同组获得的组织病理学计分显示在表 8 中:

[0378] 表 8

[0379]

治疗	计分	等级
非糖尿病对照	11.7	IV
用贝米肝素钠治疗的非糖尿病动物	8	III
用肝素钙治疗的非糖尿病动物	15	V
用 BP06408-66/28-A 治疗的非糖尿病动物	12.8	V

[0380] 与皮肤样品对应的切片的形态研究表明在所有组中正常的瘢痕修复过程进展。在所有治疗的组中,完全形成肉芽组织,在用肝素钙治疗中获得最好的计分,因为,在该情形中,观察到通过恢复到初始条件的全新细胞结构。另外,对于非糖尿病动物的情形,使用研究产品 BP06408-66/28A 的样品(其在结构中几乎不具有五糖的存在)获得的计分特别好,具有完整的细胞结构和非常高程度的上皮化,这又表明较高的因子 Xa 抑制活性不是治疗慢性溃疡所必需的,因为其不与更好的愈合效果相关。

[0381] 图 10 显示在用苏木精-曙红染色后伤口切片的显微照片:

[0382] A 非糖尿病对照;B 用贝米肝素钠治疗的非糖尿病动物;C 用肝素钙治疗的非糖尿病动物。获得的结果如下:

[0383] A 完全的上皮再形成。没有观察到改变。

[0384] B 完全的上皮再形成。在真皮中轻度炎性渗液、多形核嗜中性粒细胞。在真皮中存在多核巨细胞。在真皮中适度存在成纤维细胞。在真皮中适度新血管形成。

[0385] C 完全再生的细胞结构。

[0386] 从通过确定伤口面积和组织病理学评估获得的结果,可以得出结论,即使用肝素钙的治疗对非糖尿病动物的治愈具有有益效果,更短的愈合时间和完全再生的细胞结构,

其次是用处于研究阶段的 BP06408-66/28-A 产品获得的结果。因此,本发明的糖胺聚糖可以用于治疗与糖尿病足部溃疡不同的其它慢性溃疡。

[0387] 不希望受到上述实施例的限制,由于所获得的结果以及在动物中观察到行为,相信非常可能的是,本发明将对于其它支链或非支链多糖有效,所述多糖特别是诸如多硫酸戊聚糖 (pentosan polysulfates)、 β -葡聚糖、硫酸软骨素 (chondroitin sulfates)、硫酸皮肤素 (dermatan sulfates)、角叉藻聚糖 (carrageenans)、藻酸盐、阿拉伯木聚糖 (arabinoxylans)、半乳甘露聚糖 (galactomannans) 和葡甘露聚糖 (glucomannans)。

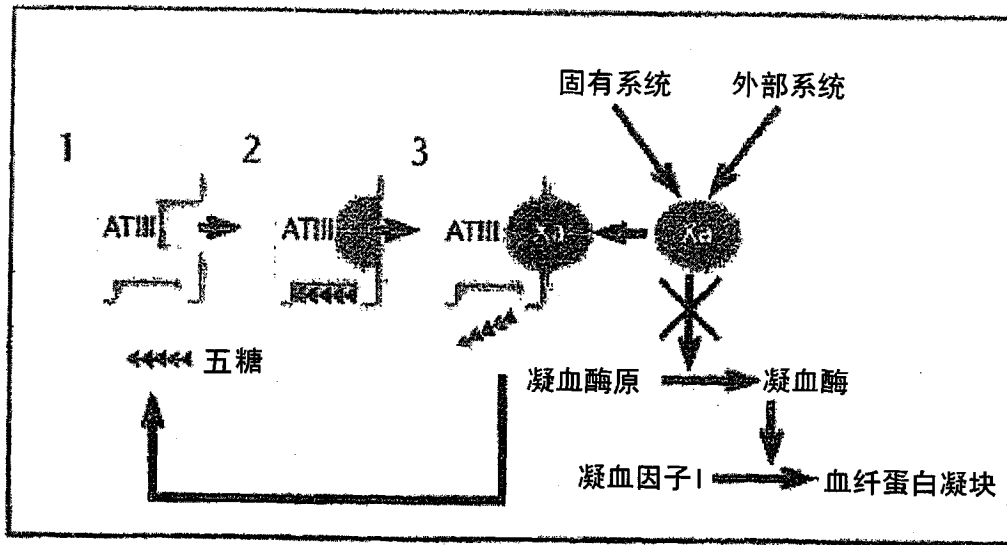


图 1

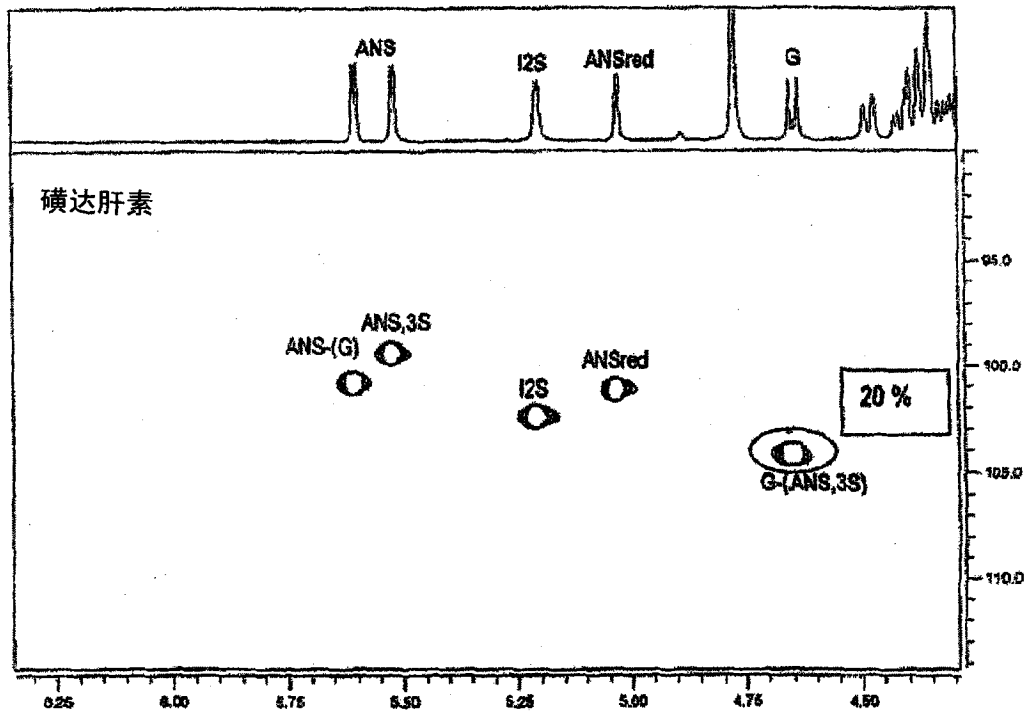


图 2A

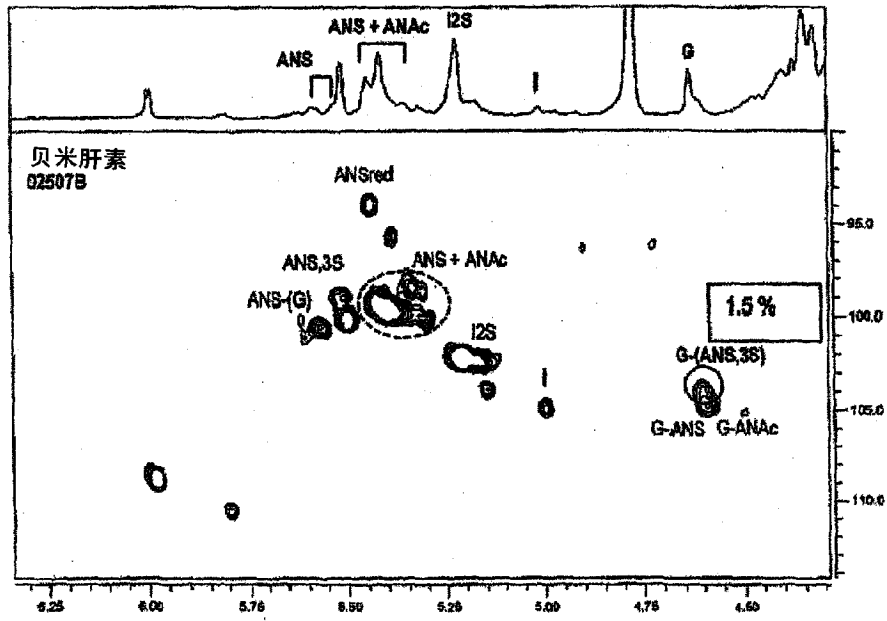


图 2B

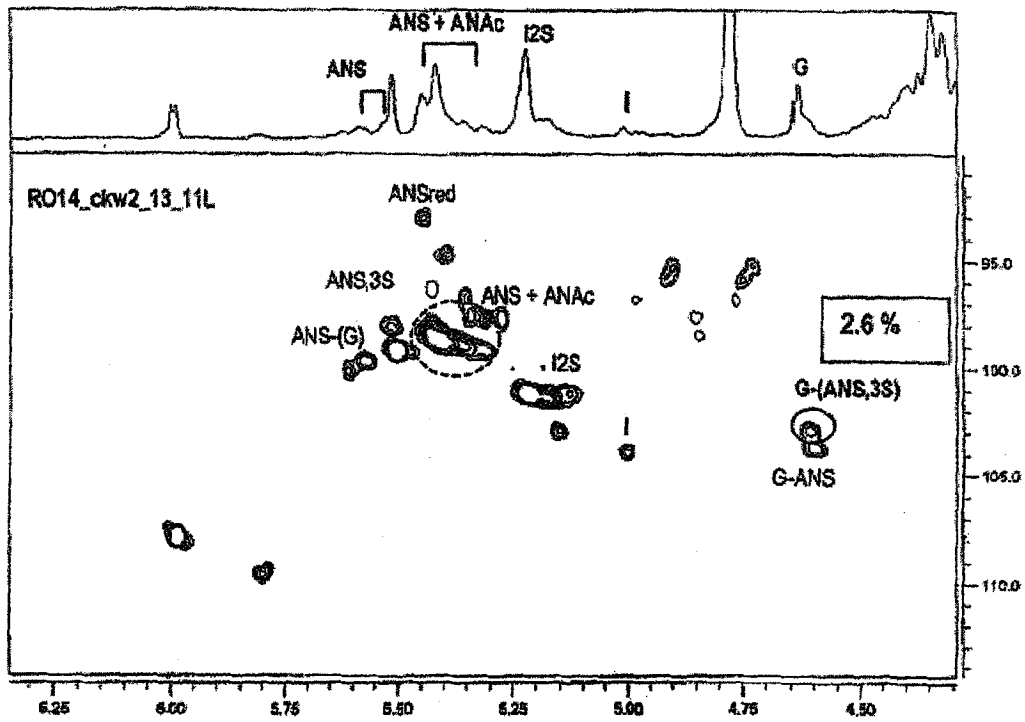


图 2C

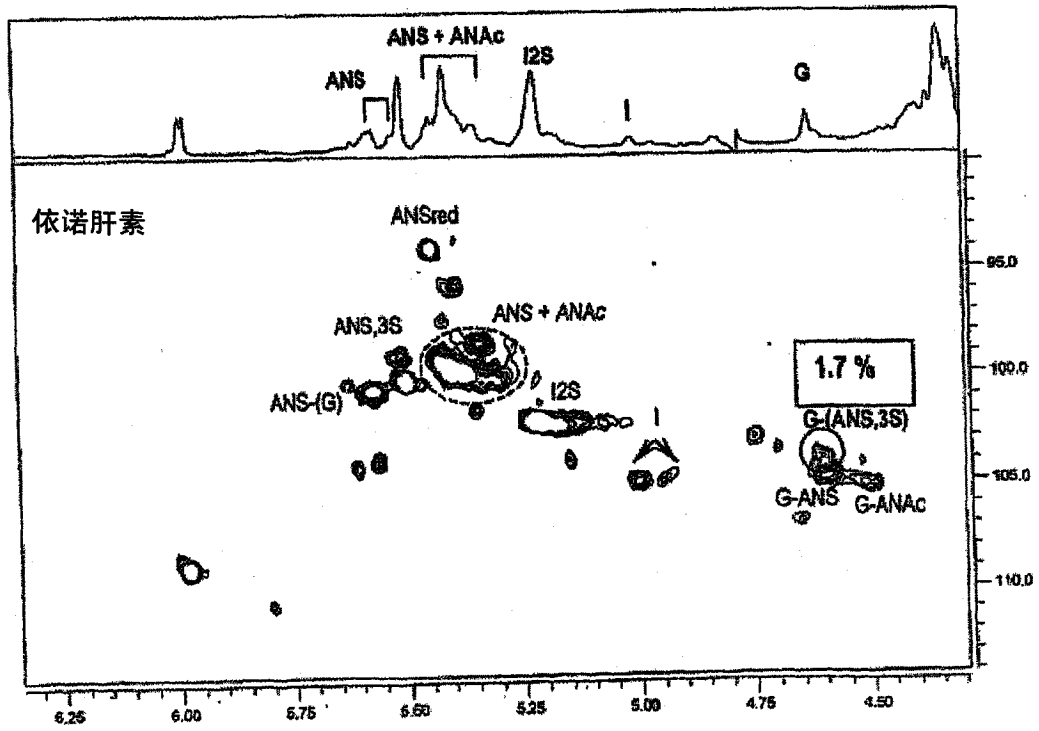


图 2D

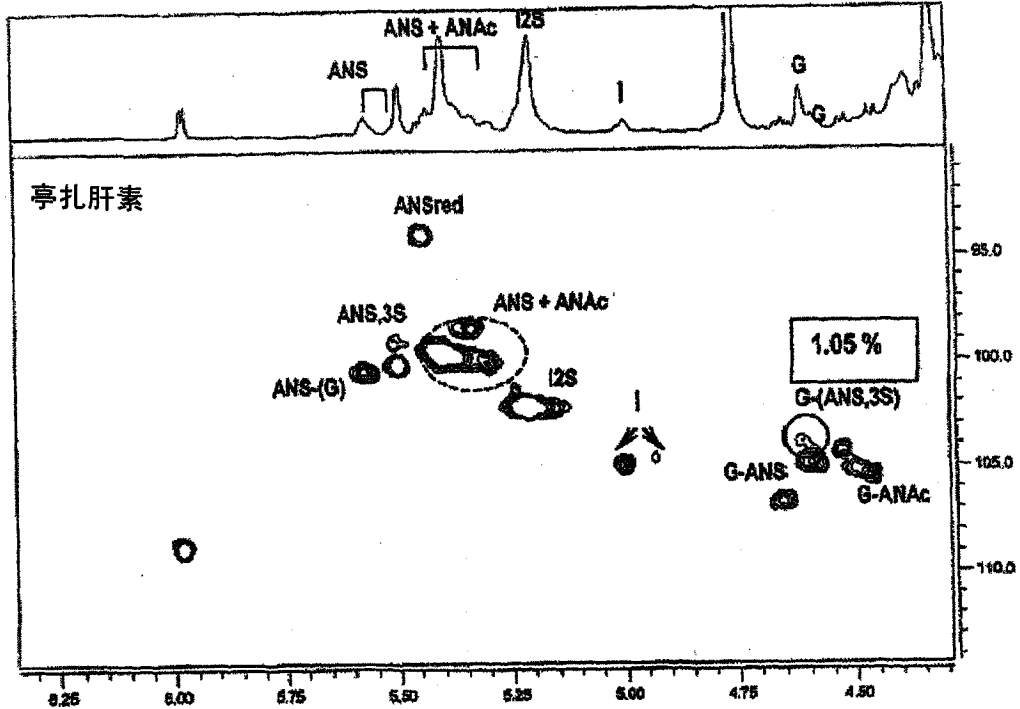


图 2E

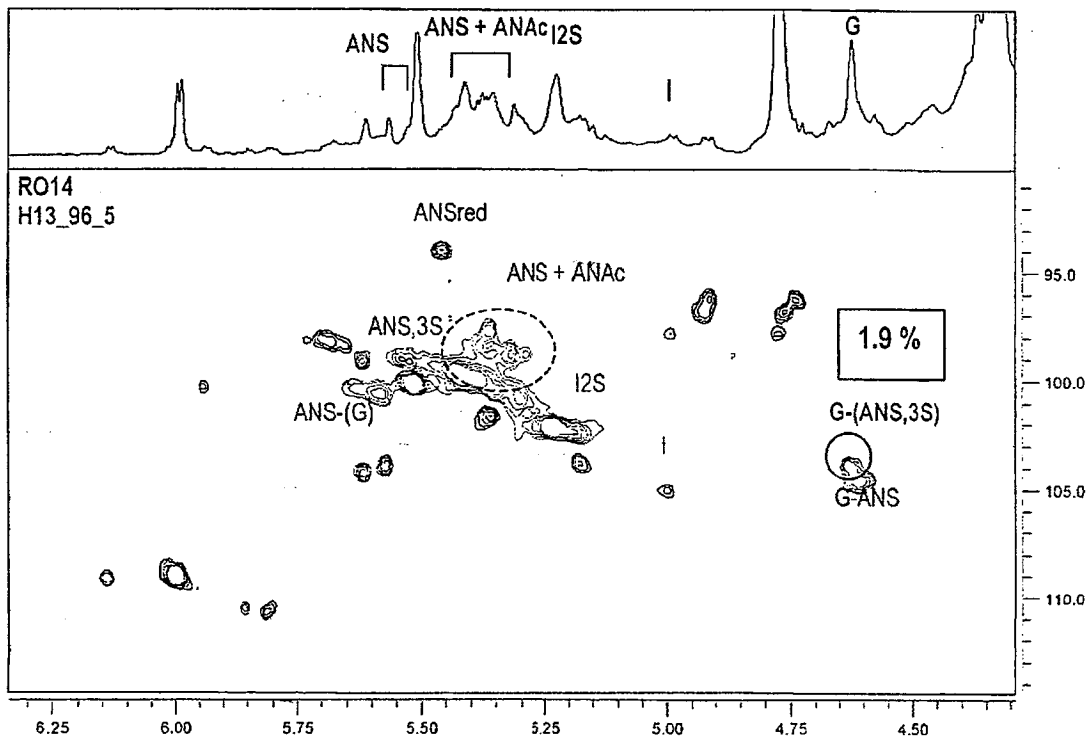


图 2F

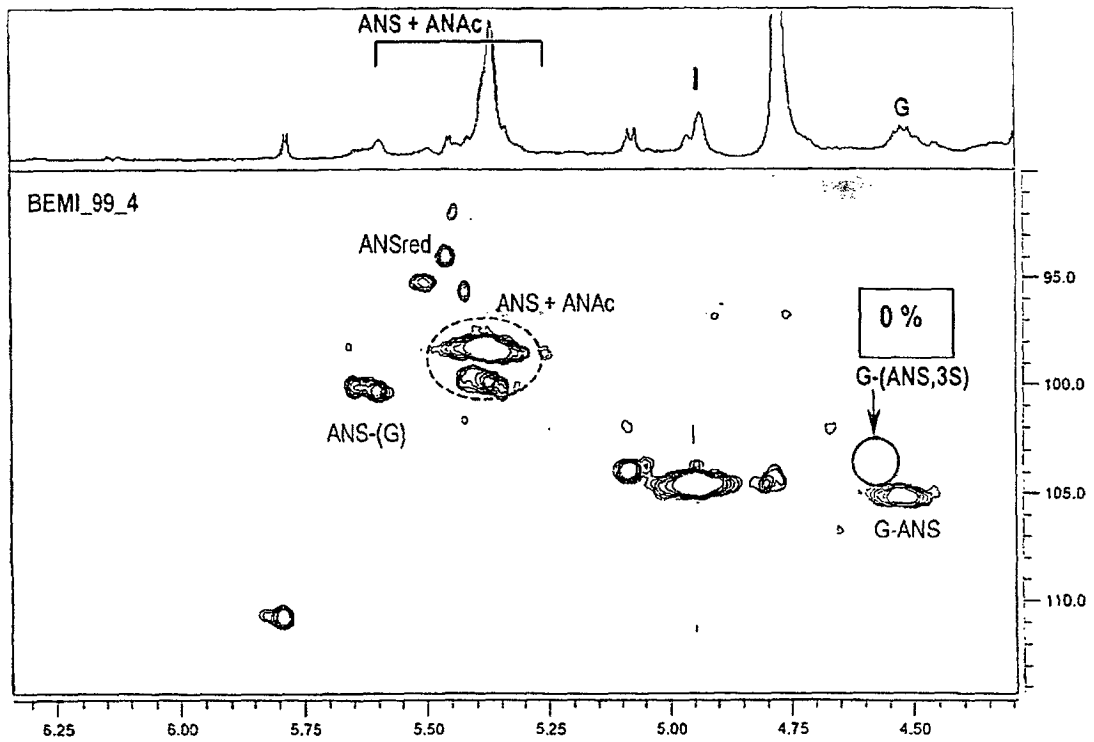


图 2G

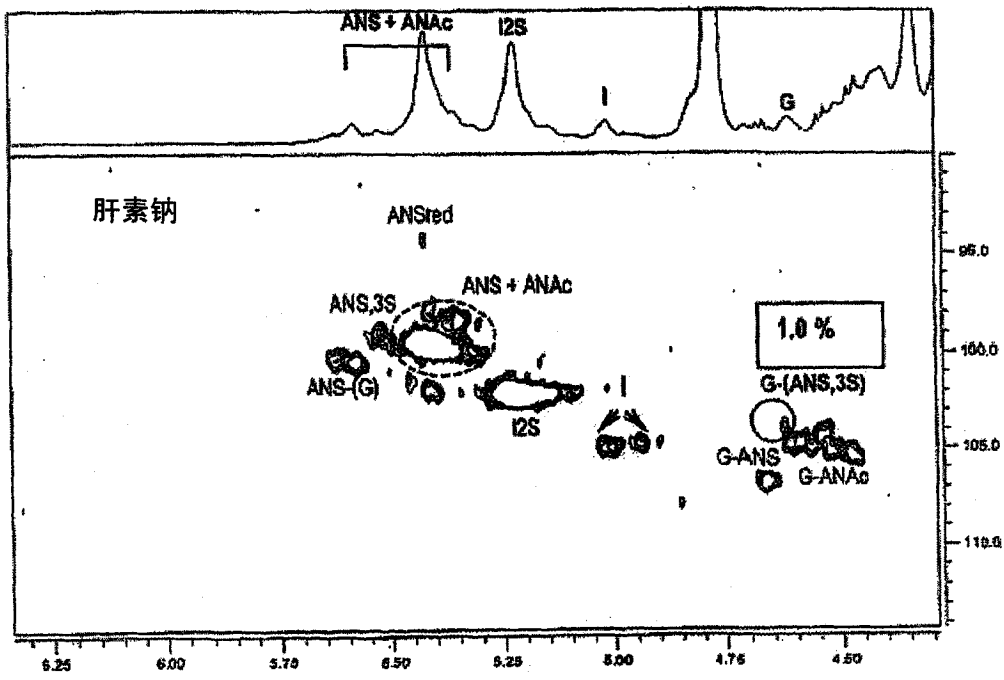


图 2H

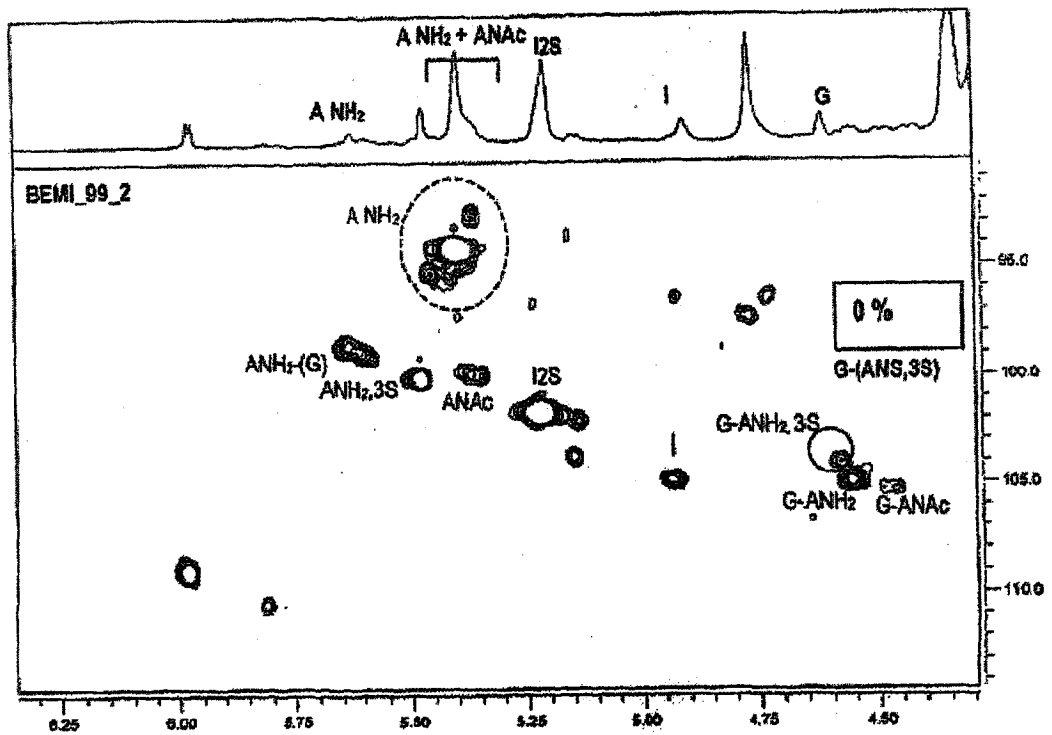


图 2I

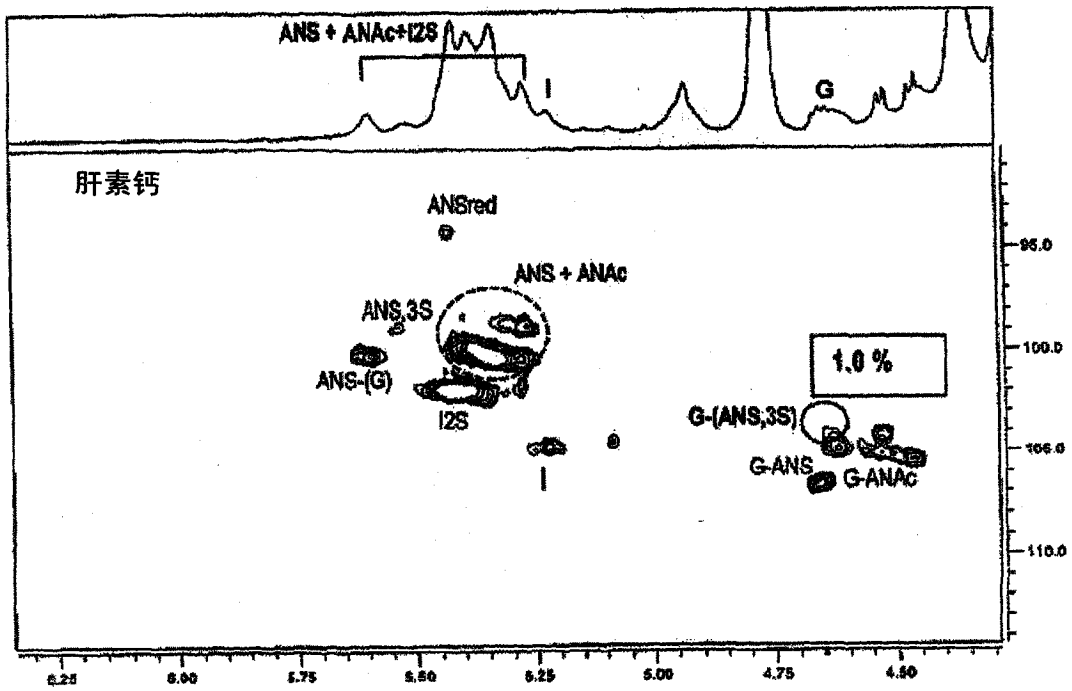


图 2J

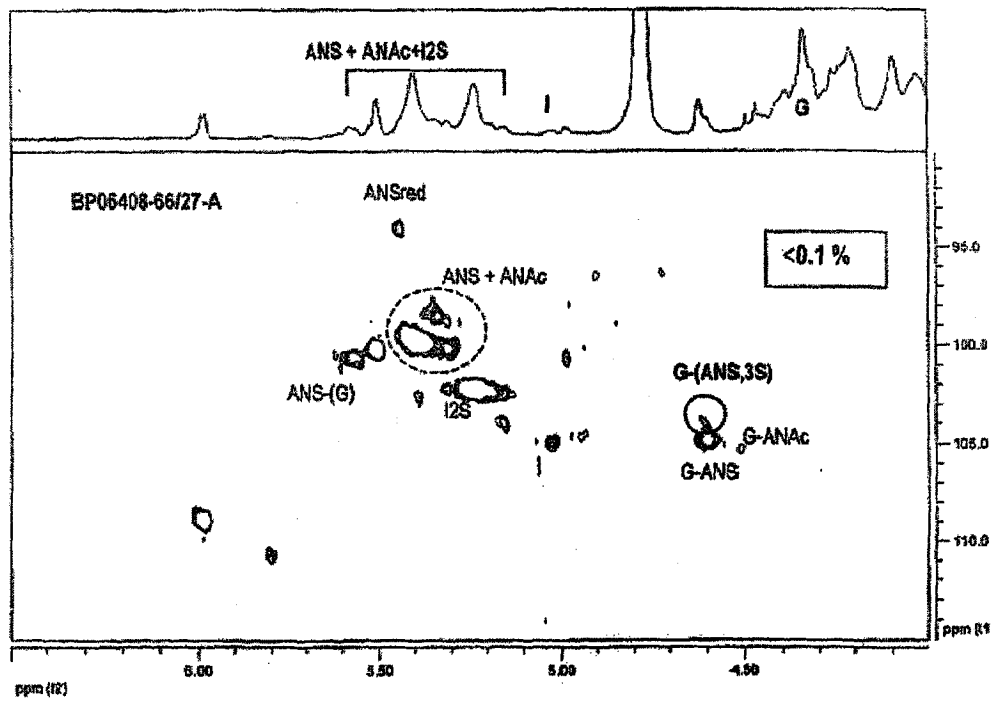


图 2K

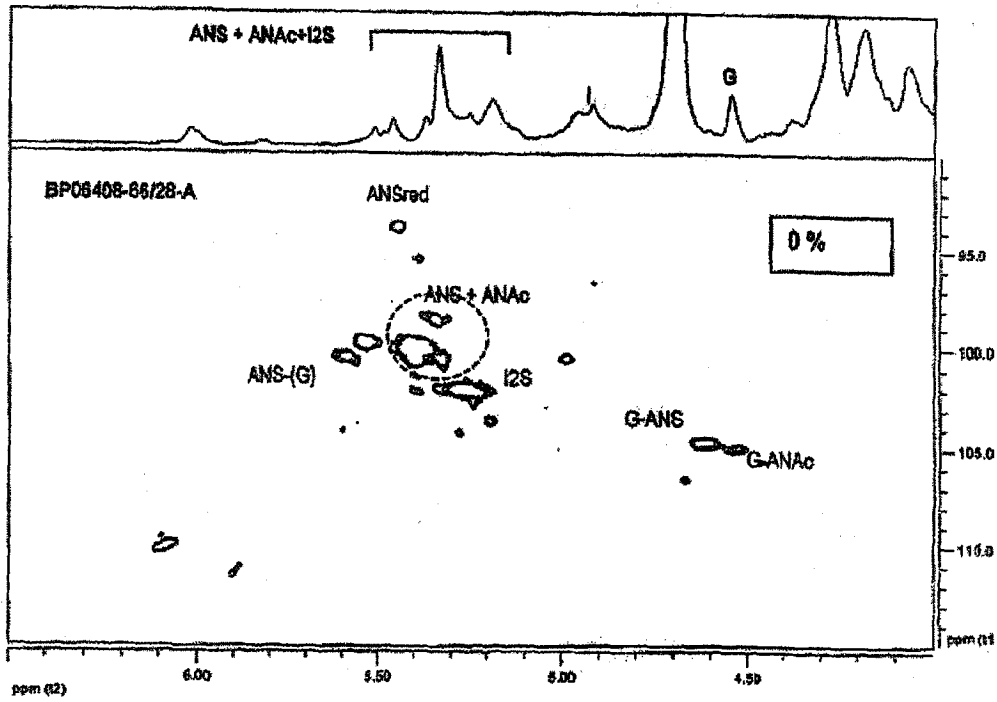


图 2L

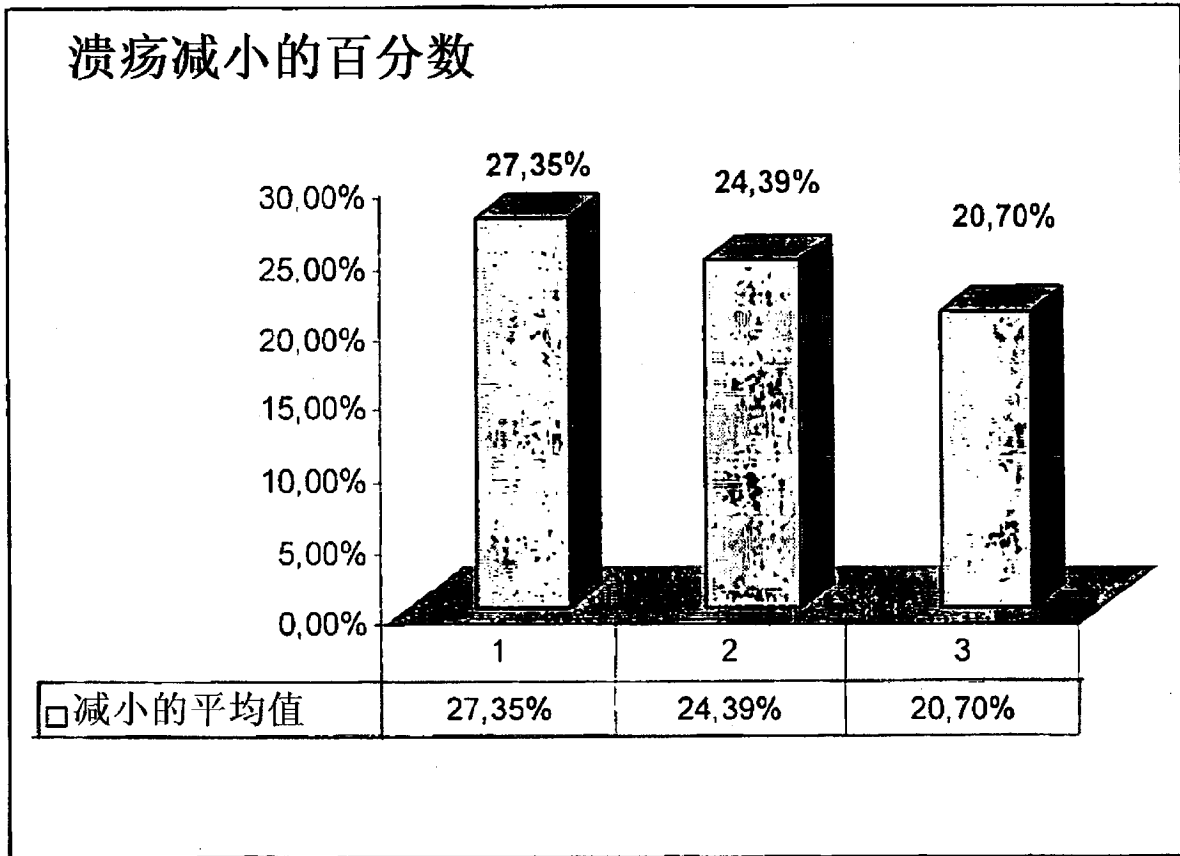


图 3

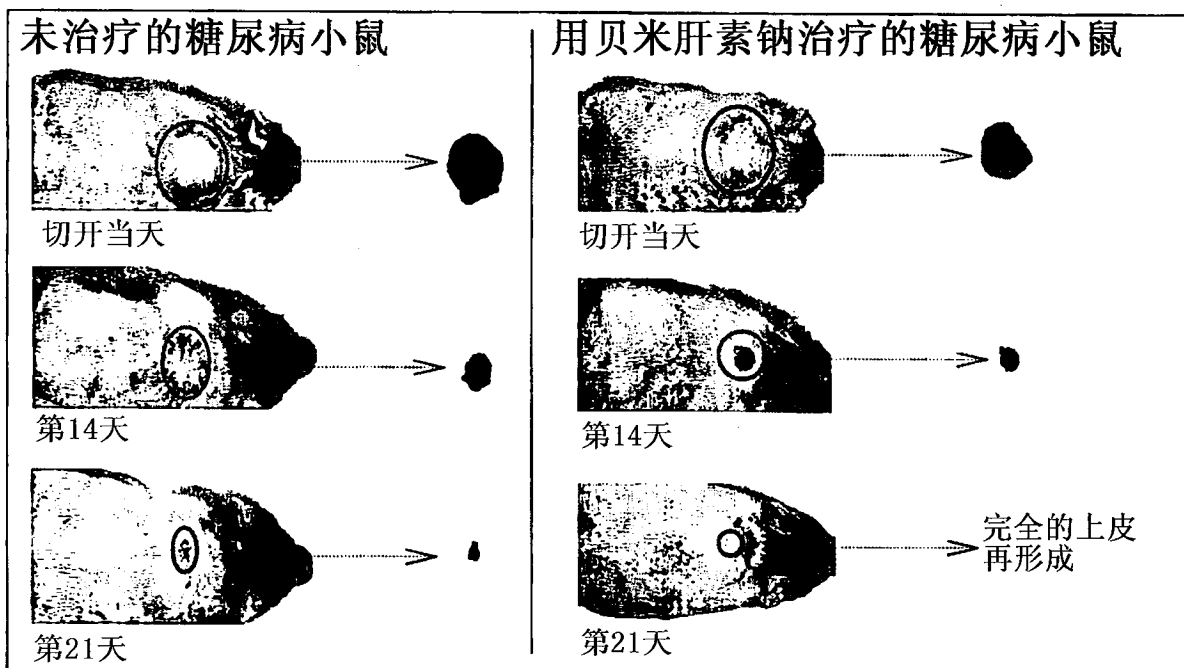


图 4

糖尿病C57BL/KsJ-db/db小鼠

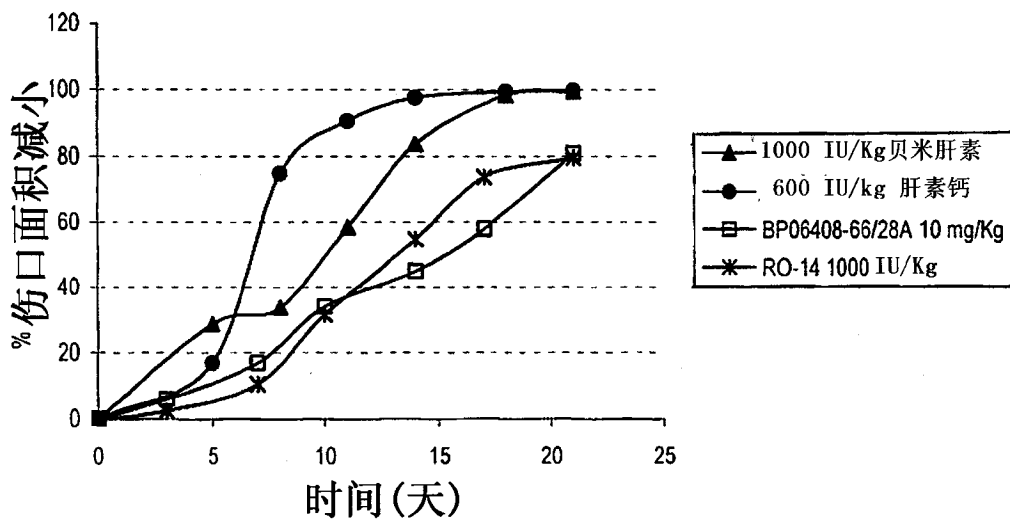


图 5

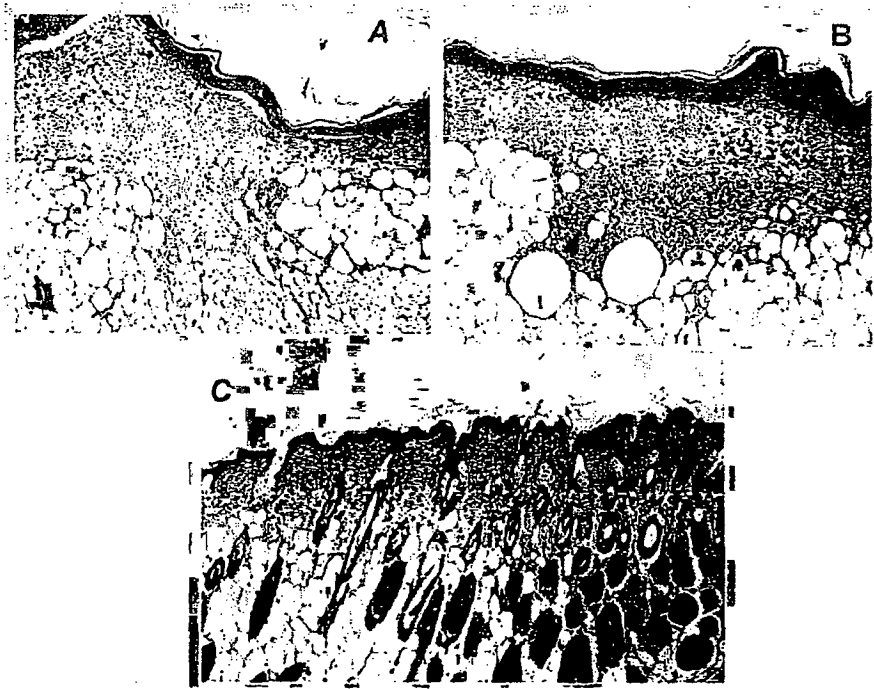


图 6

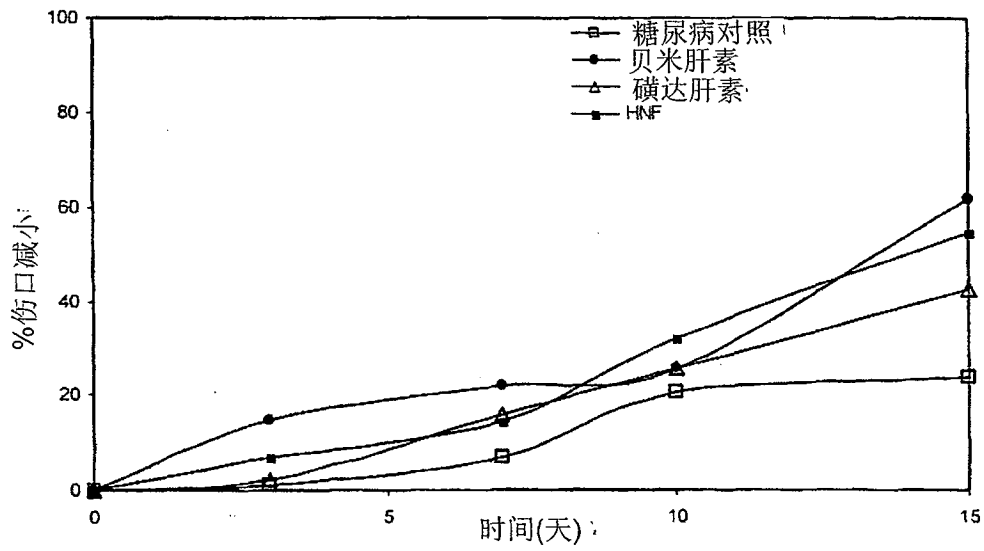


图 7

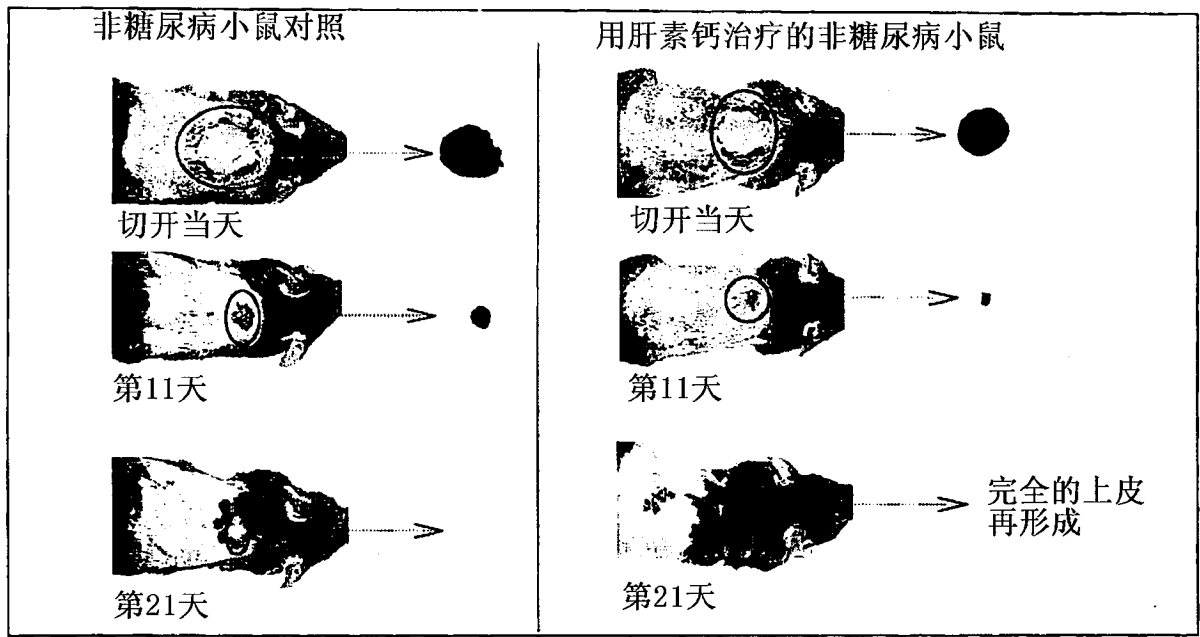


图 8

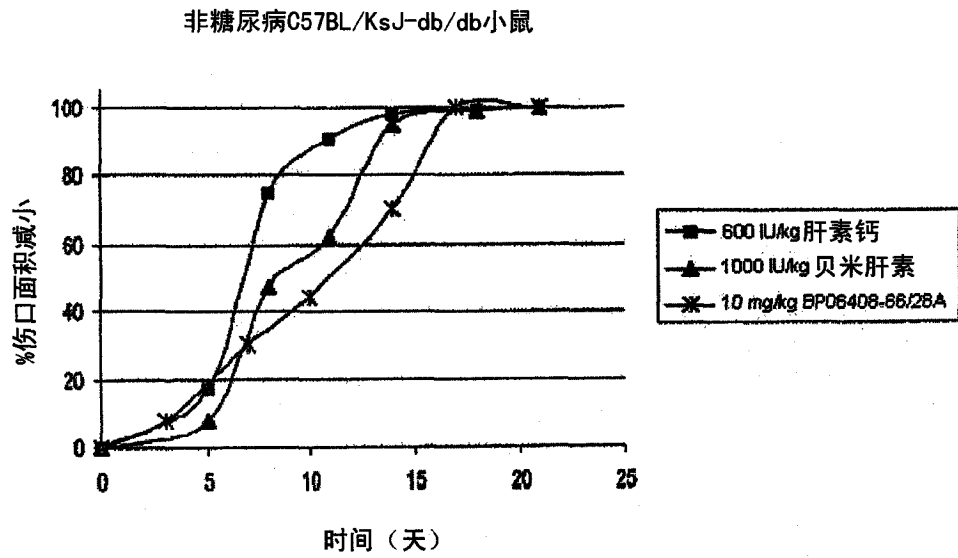


图 9

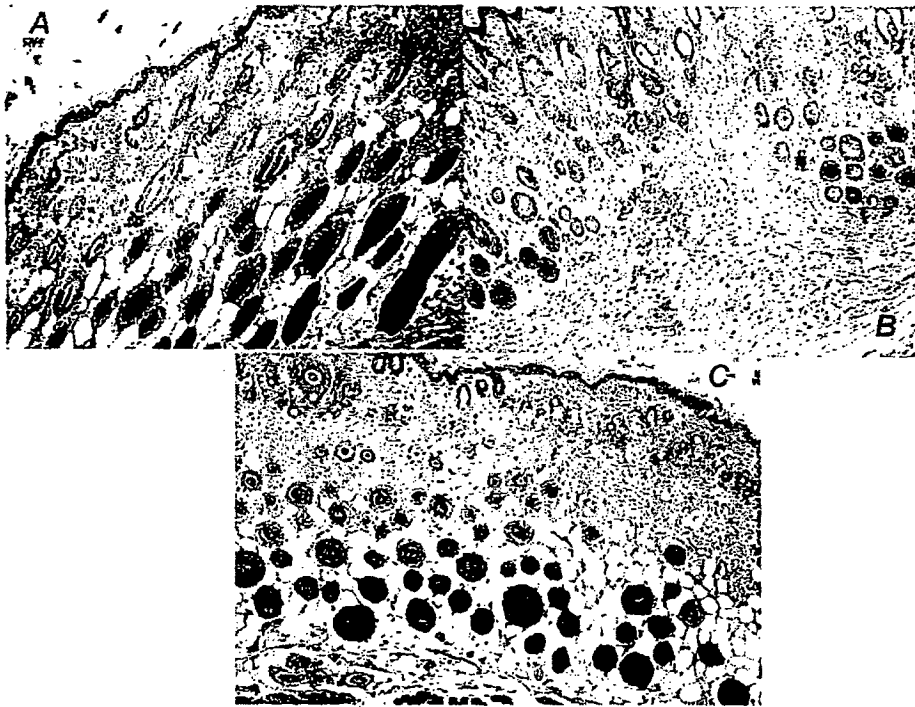


图 10

糖尿病Wistar大鼠

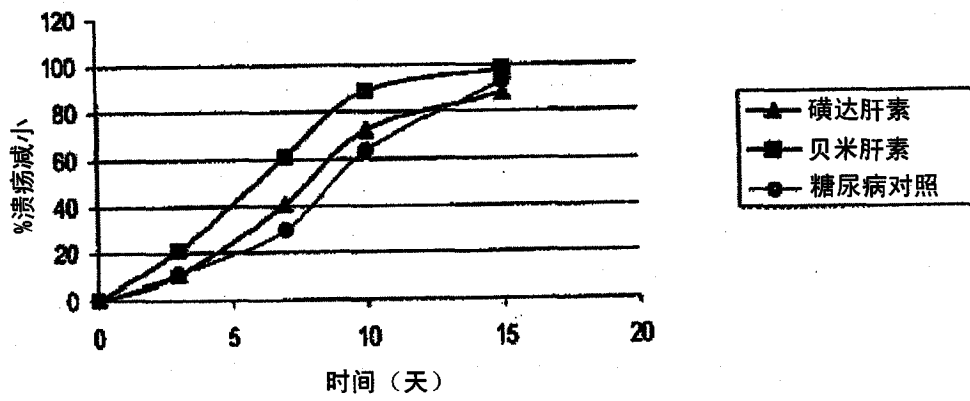


图 11