

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6977059号  
(P6977059)

(45) 発行日 令和3年12月8日 (2021. 12. 8)

(24) 登録日 令和3年11月12日 (2021. 11. 12)

(51) Int. Cl.

F I

C O 8 B 37/00 (2006. 01)

C O 8 B 37/00 J

A 6 1 K 31/7028 (2006. 01)

A 6 1 K 31/7028

A 6 1 K 31/7032 (2006. 01)

A 6 1 K 31/7032

A 6 1 K 31/715 (2006. 01)

A 6 1 K 31/715

A 6 1 P 25/00 (2006. 01)

A 6 1 P 25/00

請求項の数 17 (全 23 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2019-556407 (P2019-556407)  
 (86) (22) 出願日 平成29年12月27日 (2017. 12. 27)  
 (65) 公表番号 特表2020-507619 (P2020-507619A)  
 (43) 公表日 令和2年3月12日 (2020. 3. 12)  
 (86) 国際出願番号 PCT/CN2017/118843  
 (87) 国際公開番号 W02018/121559  
 (87) 国際公開日 平成30年7月5日 (2018. 7. 5)  
 審査請求日 令和2年9月28日 (2020. 9. 28)  
 (31) 優先権主張番号 PCT/CN2016/113879  
 (32) 優先日 平成28年12月30日 (2016. 12. 30)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関  
 中国 (CN)

(73) 特許権者 519237834  
 シャンハイ、グリーン、バレー、ファーマ  
 スーティカル、カンパニー、リミテッド  
 SHANGHAI GREEN VALL  
 EY PHARMACEUTICAL C  
 O., LTD.  
 中華人民共和国シャンハイ、ブードン、ニ  
 ユー、エリア、チャン、ジャン、ハイーテ  
 ク、パーク、ニウドゥン、ロード、421

最終頁に続く

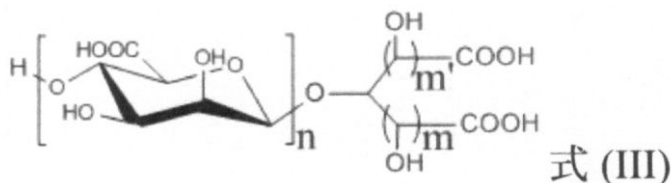
(54) 【発明の名称】 マンヌロン二酸の組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式 ( I I I ) のマンヌロン二酸またはその薬学的に許容可能な塩：

【化 1】



[ 式中、n は、1 ～ 9 の整数であり、m は、0、1 または 2 であり、m' は、0 または 1 である ]

を含んでなる、マンヌロン二酸オリゴ糖組成物であって、

ここで、

n = 1 ～ 5 であるマンヌロン二酸の総重量は、前記組成物の総重量の 80 ～ 95 % であり、かつ

n = 4 ～ 7 であるマンヌロン二酸の総重量に対する、n = 1 ～ 3 であるマンヌロン二酸の総重量の比が、1.0 ～ 3.5 の間である、マンヌロン二酸オリゴ糖組成物。

【請求項 2】

m + m' = 1 または 2 であるマンヌロン二酸の総重量が、前記組成物の総重量の 50 %

10

20

以上、好ましくは60～90%、より好ましくは70～90%である、請求項1に記載のマンヌロン二酸オリゴ糖組成物。

【請求項3】

$m + m' = 1$ であるマンヌロン二酸の総重量が、前記組成物の総重量の10%以上、好ましくは30～40%である、請求項2に記載のマンヌロン二酸オリゴ糖組成物。

【請求項4】

$m + m' = 2$ であるマンヌロン二酸の総重量が、前記組成物の総重量の10%以上、好ましくは30～50%である、請求項1に記載のマンヌロン二酸オリゴ糖組成物。

【請求項5】

$n = 1 \sim 5$ であるマンヌロン二酸の総重量が、前記組成物の総重量の80～95%である、請求項1に記載のマンヌロン二酸オリゴ糖組成物。 10

【請求項6】

$n = 1 \sim 3$ であるマンヌロン二酸の総重量が、前記組成物の総重量の20～70%である、請求項1に記載のマンヌロン二酸オリゴ糖組成物。

【請求項7】

$n = 4 \sim 7$ であるマンヌロン二酸の総重量に対する、 $n = 1 \sim 3$ であるマンヌロン二酸の総重量の比が、1.0～3.5の間である、請求項1に記載のマンヌロン二酸オリゴ糖組成物。

【請求項8】

$n = 4 \sim 7$ であるマンヌロン二酸の総重量に対する、 $n = 1 \sim 3$ であるマンヌロン二酸の総重量の比が、1.0～3.0の間である、請求項7に記載のマンヌロン二酸オリゴ糖組成物。 20

【請求項9】

前記組成物における異なる重合度を有するマンヌロン二酸の重量パーセントが、二糖類5～25%、三糖類15～30%、四糖類15～25%、五糖類10～25%、六糖類5～15%、七糖類3～10%、八糖類2～5%、九糖類1～5%、および十糖類1～5%である、請求項1～8のいずれか一項に記載のマンヌロン二酸オリゴ糖組成物。

【請求項10】

前記組成物における異なる重合度を有するマンヌロン二酸の重量パーセントが、二糖類10～20%、三糖類18～30%、四糖類15～25%、五糖類15～20%、六糖類5～10%、七糖類3～5%、八糖類2～3%、九糖類1～3%、および十糖類1～3%である、請求項9に記載のマンヌロン二酸オリゴ糖組成物。 30

【請求項11】

薬学的に許容可能な塩が、ナトリウム塩またはカリウム塩である、請求項1～10のいずれか一項に記載のマンヌロン二酸オリゴ糖組成物。

【請求項12】

有効量の請求項1～11のいずれか一項に記載のマンヌロン二酸オリゴ糖組成物と、必要に応じて、好適な担体とを含んでなる、医薬組成物または医療製品。

【請求項13】

抗老年性認知症薬または医療製品の製造における、請求項1～11のいずれか一項に記載のマンヌロン二酸オリゴ糖組成物の使用。 40

【請求項14】

抗老年性認知症薬または医療製品として使用するための請求項1～11のいずれか一項に記載のマンヌロン二酸オリゴ糖組成物。

【請求項15】

請求項1～11のいずれか一項に記載のマンヌロン二酸オリゴ糖組成物を含む、老年性認知症の治療のための医薬組成物。

【請求項16】

オゾン酸化分解により、マンヌロン二酸オリゴ糖およびその組成物を調製する方法であって、ホモポリマンヌロン酸とオゾンとを接触させて、請求項1～11のいずれか一項に 50

定義されるマンヌロン二酸オリゴ糖組成物の成分の１種以上を調製する工程を含む、方法。

【請求項１７】

酸化反応が、好ましくは０～７０、より好ましくは１０～４５の温度で行われ、酸化分解工程が、ｐＨ３～１３、好ましくは４～１０、より好ましくは６～８で行われる、請求項１６に記載のオゾン酸化分解によりオリゴ糖およびその組成物を調製する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、マンヌロン二酸の異なる重合度および割合のその生物活性に対する効果を評価するための老年性認知症の動物モデルを用いる生物活性スクリーニング法により得られるマンヌロン二酸の最適な組成物に関する。最良の生物活性を有する組成物を最終的に選別し、限外濾過膜分離により所望の標的物質を調製した。

10

【０００２】

発明の背景

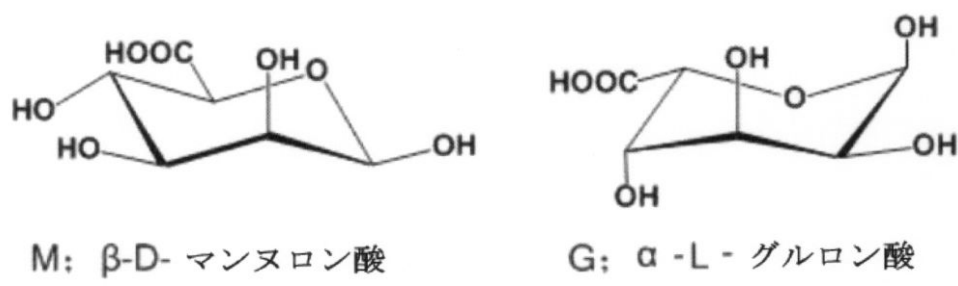
マンヌロン二酸は、その潜在的な医学的価値のために、広く注目を集めている。マンヌロン二酸は通常、アルギン酸を原料として用いる多段階方法により調製される。

【０００３】

原料であるアルギン酸の多糖分子は、 $\alpha$ -１，４-グリコシド結合により連結されたD-マンヌロン酸から形成されるMセグメント、 $\alpha$ -１，４-グリコシド結合により連結されたL-グルロン酸から形成されるGセグメント、およびこの２つの糖から形成されるハイブリッドMGセグメントを含んでなる。マンヌロン酸およびグルロン酸の構造式を以下の式（Ⅰ）に示す。

20

【化１】



30

【０００４】

MおよびGセグメントは、原料であるアルギン酸から分離することができる。一般的な方法を、以下に簡単に記載することができる。アルギン酸を予め分解し、ポリマンヌロン酸およびポリグルロン酸の多糖混合物を得る。この多糖混合物を酸性沈殿に供し、その中のポリグルロン酸を除去する。さらに精製を行い、純度９０％以上を有するホモポリマンヌロン酸（以後「Mセグメント中間体」ともいう）を得る（例えば、中国特許出願番号９８８０６６３７．８およびＣＮ０２８２３７０７．２に開示の方法を参照）。

40

【０００５】

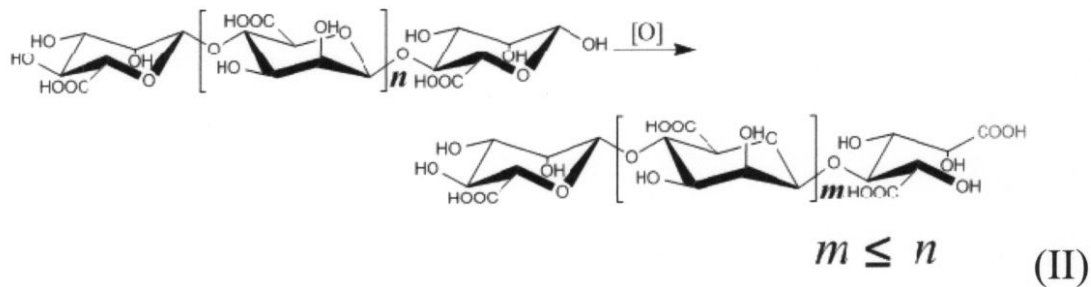
オリゴマンヌロン酸は、以下のように調製することができる。上記で得たMセグメント中間体を、酸性条件下で加熱することにより、さらに酸加水分解に供し、所望の範囲の分子量を有する小断片マンヌロン酸ポリマーを得る。さらに、分解効率、酸化分解方法により向上させることができ、一方、還元末端は、開環サッカリン酸に酸化することができる（Meiyu Gen gらにより出願された中国特許出願番号２００５８０００９３９６．５（特許文献１）および米国特許番号８，８３５，４０３Ｂ２（特許文献２）を参照）。便宜上、特許文献１および２を以後まとめて先行特許といい、引用することによりその全体が本明細書の開示の一部とされる。

50

## 【 0 0 0 6 】

先行特許において開示されているマンヌロン二酸の反応過程は、以下の反応式（ⅠⅠ）で表すことができる。すなわち、オリゴマンヌロン酸多糖の還元末端にあるマンヌロン酸のC 1 位のアルデヒド基が、カルボキシル基に酸化される。

## 【 化 2 】



10

## 【 0 0 0 7 】

上記の酸化変換過程において、慣用の酸化剤は、アルカリ性硫酸銅溶液、すなわちフェーリング試薬である。先行特許は、まさにこの酸化方法を採用している。具体的には、アルカリ性条件下で、反応基質のポリマンヌロン酸、すなわち、上記のMセグメント中間体を硫酸銅溶液に加え、沸騰水浴中で15分～2時間反応させる。この方法は、アルデヒド基を酸化するために $\text{Cu}^{2+}$ イオンを酸化剤として用いており、赤れんが色の酸化第一銅の沈殿が、反応において生成される。この反応は、還元糖の同定にしばしば使用される。

20

## 【 0 0 0 8 】

先行特許は、オリゴマンナル酸(oligomannaric acid)が、アルツハイマー病(AD)および糖尿病に対する効果を有することを開示している。アルツハイマー病および2型糖尿病の病因は、アミロイド( - アミロイドおよびアミリン)と密接に関連している。アミロイドは、凝集してタンパク質オリゴマーを形成し得、さらに凝集して線維を形成し得る。これらのタンパク質凝集物は、細胞傷害性であり、細胞における酸化反応を誘導してミトコンドリアを損傷させ得、炎症性応答などのカスケード反応を惹起して、多数のニューロンおよび細胞に損傷を引き起こし得、最終的に、アルツハイマー病および2型糖尿病の発症に至る。オリゴマンナル酸は、アミロイドを標的とし、アミロイドにより誘導されるカスケード反応と拮抗するため、アルツハイマー病および2型糖尿病を予防および処置する効果を有する。

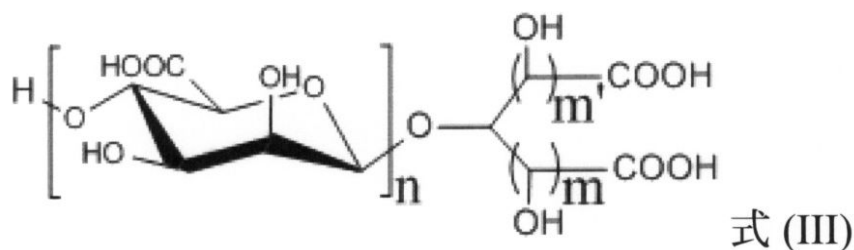
30

## 【 発明の概要 】

## 【 0 0 0 9 】

本発明の第1の側面は、式(ⅠⅠⅠ)のマンヌロン二酸またはその薬学的に許容可能な塩：

## 【 化 3 】



40

[ 式中、n は、1 ～ 9 の整数であり、m は、0、1 または 2 であり、m' は、0 または 1 である ]

を含んでなるマンヌロン二酸オリゴ糖組成物であって、

50

ここで、

$n = 1 \sim 5$  であるマンヌロン二酸の総重量は、前記組成物の総重量の  $80 \sim 95\%$  であり、かつ

$n = 4 \sim 7$  であるマンヌロン二酸の総重量に対する  $n = 1 \sim 3$  であるマンヌロン二酸の総重量の比が、 $1.0 \sim 3.5$  の間である、マンヌロン二酸オリゴ糖組成物に関する。

【0010】

本発明の別の側面は、本発明のマンヌロン二酸オリゴ糖組成物と、必要に応じて、好適な担体とを含んでなる、医薬組成物または医療製品を提供する。

【0011】

本発明のさらなる側面は、有効量の本発明のマンヌロン二酸オリゴ糖組成物を、それを必要とする患者に投与することを含んでなる、老年性認知症を有する患者を処置する方法を提供する。

【0012】

本発明のマンヌロン二酸オリゴ糖組成物は、従来技術の方法と異なる方法で調製される。この調製方法は、反応が単純であること、有効成分の含量が大きいこと、および反応試薬が残存しないこと、との利点を有する。本発明のマンヌロン二酸オリゴ糖組成物は、細胞損傷を阻害し、神経細胞を保護し、細胞生存率を増加させ得ることが、実験的に実証されている。動物モデルにおいて、本発明のマンヌロン二酸オリゴ糖組成物は、認知症ラットの学習機能および認知機能を有意に改善し得る。本発明のマンヌロン二酸オリゴ糖組成物は、アルツハイマー病を予防および処置する潜在的な効果を有する。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】図1は、生成物Aにおける二糖類、三糖類および四糖類の質量スペクトルを示す。

【図2】図2は、生成物Aにおける五糖類、六糖類および七糖類の質量スペクトルを示す。

【図3】図3は、生成物Aにおける八糖類、九糖類および十糖類の質量スペクトルを示す。

【図4】図4は、A誘導性神経細胞損傷に対する異なる濃度の生成物Aの保護効果を示す。

【図5】図5は、A誘導性神経細胞損傷に対する単一の重合度を有するオリゴマンナル酸の保護効果を示す。

【図6】図6は、ADの動物モデルに対する二糖類～十糖類の効果の評価を示す。

【図7】図7は、AD動物のプラットフォーム通過回数に対するオリゴ糖組成物および六糖類の効果を示す。

【図8】図8は、AD動物の水泳距離に対するオリゴ糖組成物および六糖類の効果を示す。

【図9】図9は、細胞共培養モデルに対する二糖類～十糖類および組成物Aの活性を示す。

【0014】

発明の詳細な説明

本発明の種々の側面を以下に詳細に説明する。しかしながら、本発明は、これらの特定の実施形態に限定されない。当業者ならば、以下の実質的な開示を踏まえ、本発明に多少の改変および調整を行うことができ、このような改変も、本発明の範囲に包含される。

【0015】

マンヌロン二酸オリゴ糖組成物

本発明の第1の側面は、式(III)のマンヌロン二酸またはその薬学的に許容可能な塩：

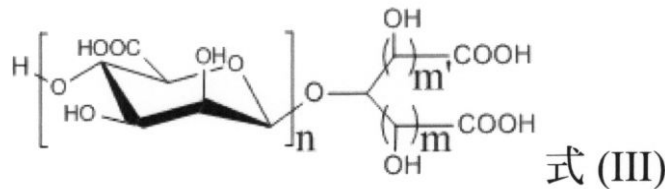
10

20

30

40

## 【化 4】



【式中、 $n$ は、1～9の整数であり、 $m$ は、0、1または2であり、 $m'$ は、0または1である】

を含んでなるマンヌロン二酸オリゴ糖組成物であって、  
ここで、

$n = 1 \sim 5$ であるマンヌロン二酸の総重量は、前記組成物の総重量の80～95%であり、かつ $n = 4 \sim 7$ であるマンヌロン二酸の総重量に対する $n = 1 \sim 3$ であるマンヌロン二酸の総重量の比が、1.0～3.5の間である、  
マンヌロン二酸オリゴ糖組成物に関する。

## 【0016】

本発明のマンヌロン二酸オリゴ糖組成物は、異なる重合度を有するマンヌロン二酸の混合物であり、その主成分は、2～10の重合度を有するマンヌロン二酸オリゴ糖である。先願によれば、マンヌロン二酸において最も活性が高い糖類は、五糖類～八糖類、特に六糖類である。しかしながら、公知の従来技術とは異なり、本発明者らは、高活性糖類の濃度を希釈する条件下で、活性が低い二糖類～四糖類を最も活性が高い五糖類～八糖類に加えることにより、五糖類～八糖類よりも高い生物活性が得られることを見出した。

## 【0017】

好ましい実施形態によれば、本発明のマンヌロン二酸オリゴ糖組成物において、 $m + m' = 1$ または2であるマンヌロン二酸の総重量は、前記組成物の総重量の50%以上、好ましくは60～90%、より好ましくは70～90%である。特に、本発明のマンヌロン二酸オリゴ糖組成物において、 $m + m' = 1$ であるマンヌロン二酸の総重量は、前記組成物の総重量の10%以上、好ましくは30～40%である。別の好ましい実施形態では、本発明のマンヌロン二酸オリゴ糖組成物において、 $m + m' = 2$ であるマンヌロン二酸の総重量は、前記組成物の総重量の10%以上、好ましくは30～50%である。

## 【0018】

好ましい実施形態によれば、本発明のマンヌロン二酸オリゴ糖組成物において、 $n = 1 \sim 5$ であるマンヌロン二酸の総重量は、前記組成物の総重量の80～95%である。

## 【0019】

好ましい実施形態によれば、本発明のマンヌロン二酸オリゴ糖組成物において、 $n = 1 \sim 3$ であるマンヌロン二酸の総重量は、前記組成物の総重量の20～70%である。

## 【0020】

好ましい実施形態によれば、本発明のマンヌロン二酸オリゴ糖組成物において、 $n = 4 \sim 7$ であるマンヌロン二酸の総重量に対する $n = 1 \sim 3$ であるマンヌロン二酸の総重量の比は、1.0～3.0の間である。

## 【0021】

好ましい実施形態によれば、本発明のマンヌロン二酸オリゴ糖組成物において、前記組成物における異なる重合度を有するマンノソニック二酸(mannosonic diacid)オリゴ糖の重量パーセントは、二糖類5～25%、三糖類15～30%、四糖類15～25%、五糖類10～25%、六糖類5～15%、七糖類3～10%、八糖類2～5%、九糖類1～5%、および十糖類1～5%である。特に、前記組成物におけるオリゴ糖の重量パーセントは、二糖類10～20%、三糖類18～30%、四糖類15～25%、五糖類15～20%、六糖類5～10%、七糖類3～5%、八糖類2～3%、九糖類1～3%、および十糖類1～3%である。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 2 2 】

本発明のマンヌロン二酸オリゴ糖組成物において、薬学的に許容可能な塩は、ナトリウム塩またはカリウム塩である。

## 【 0 0 2 3 】

マンヌロン二酸オリゴ糖組成物の調製方法

本発明によるマンヌロン二酸の調製方法を、以下に要約する。

## 【 0 0 2 4 】

上記のMセグメント中間体を、酸化剤の存在下で、糖鎖上で酸化分解し、異なる重合度を有する酸化オリゴ糖を得る。この酸化オリゴ糖は、オリゴ糖の還元末端でのマンヌロン酸が、3～6個の炭素原子を有するサッカリン酸に酸化されていることを特徴とする。

10

## 【 0 0 2 5 】

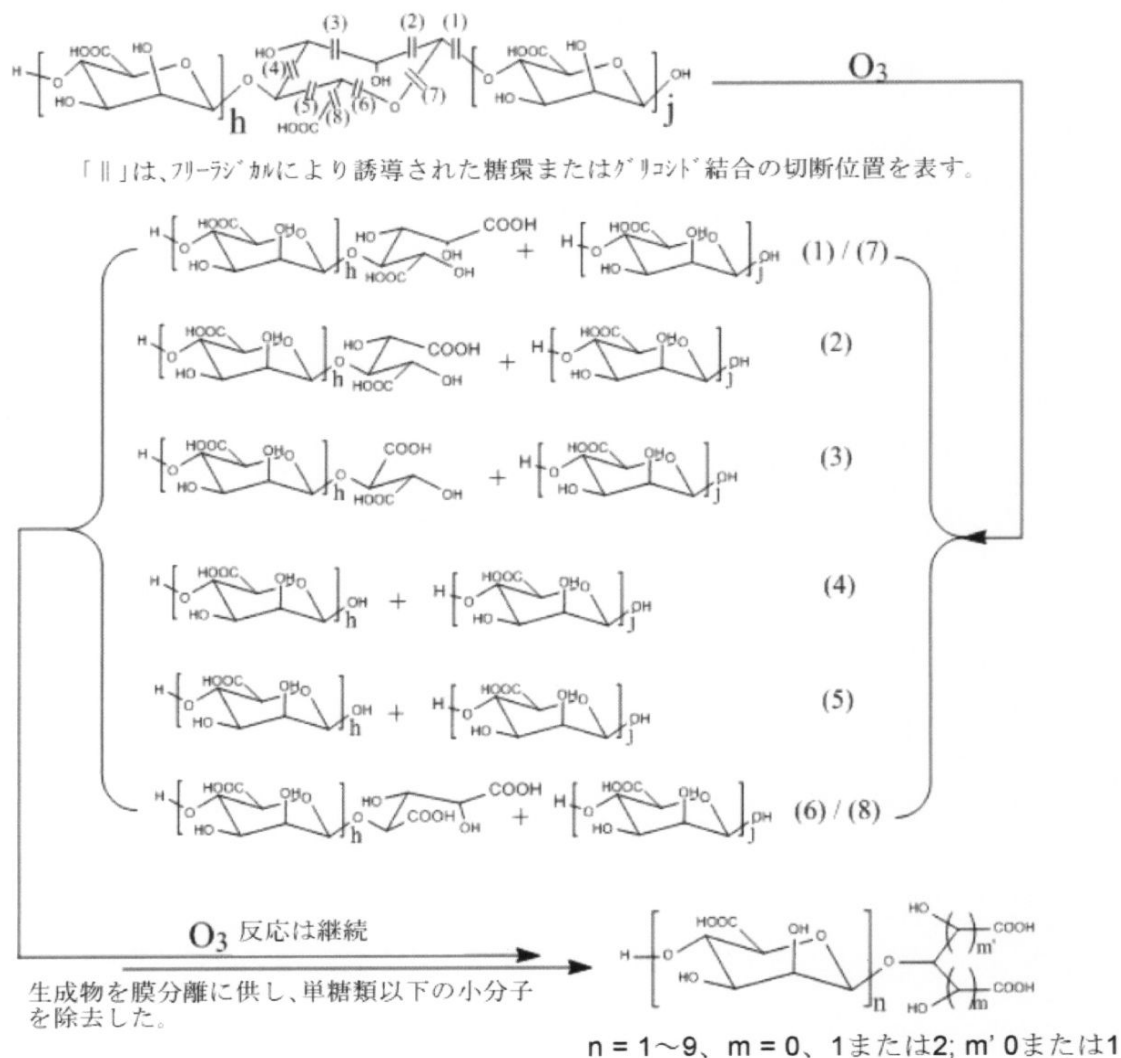
本発明の反応に特に有利である酸化剤は、オゾンである。反応中、Mセグメント中間体を含む溶液にオゾンを導入すると、糖鎖の酸化分解反応が生じる。酸化分解工程を行う温度は、好ましくは0～70℃、より好ましくは10～45℃である。上記の酸化分解工程を行うpHは、3～13、好ましくは4～10、より好ましくは6～8である。

## 【 0 0 2 6 】

本発明におけるオゾンを用いた酸化分解反応、ならびに従来技術におけるアルカリ性硫酸銅を用いた酸化分解（先行特許）または過酸化水素および次亜塩素酸ナトリウムの存在下での酸加水分解（中国特許出願番号01107952.5）は総て、糖鎖の分解を引き起こすが、分解生成物の糖鎖の還元末端の構造は異なる。本発明で得られる酸化分解生成物であるマンヌロン二酸は、還元末端に3～6個の炭素原子を有する二酸構造を有する。さらに、本発明の酸化分解工程で用いる方法は、以下のその他の利点ももたらす：1）反応条件は穏やかであり、特別な反応条件を必要としない；2）使用するオゾンはその場で調製することができるため、工業生産において輸送圧力が減少する；および3）反応後、オゾンは自動的に酸素に分解されるため、残存する反応試薬または環境汚染による害は生じない。反応過程は、以下の式（IV）で示される。

20

## 【化5】



## 【0027】

上記の反応式(ⅠⅤ)および式(ⅠⅠⅠ)の化合物の概略図において、

$m = 2$  および  $m' = 1$  であるオリゴ糖は、6個の炭素原子を含んでなるサッカリン酸であり；

$m = 1$  および  $m' = 1$  または ( $m = 2$  および  $m' = 0$ ) であるオリゴ糖は、5個の炭素原子を含んでなるサッカリン酸であり；

$m = 1$  および  $m' = 0$  または ( $m = 0$  および  $m' = 1$ ) であるオリゴ糖は、4個の炭素原子を含んでなるサッカリン酸であり；かつ

$m = 0$  および  $m' = 0$  であるオリゴ糖は、3個の炭素原子を含んでなるサッカリン酸である。

## 【0028】

上記の反応生成物を膜分離により脱塩し、LC-MS構造確認およびオリゴ糖割合測定で決定された生成物Aを得る。オリゴ糖の割合は、多角度光散乱測定と組み合わせた分子ふるい排除クロマトグラフィー(molecular sieve exclusion chromatography)により決定する。次に、生成物Aをカラムクロマトグラフィーにより分離し、単一の重合度を有するオリゴ糖、すなわち、二糖類～十糖類を調製する。これらの単一の重合度を有するオリゴ糖を、*in vitro* および *in vivo* における生物活性に関して比較する。9種類のオリゴ糖のうち、六糖類が最も活性が高いことが認められており、これは、先行特許の結果、例えば、先行特許出願文献1に開示されているオリゴ糖活性の結果と類似している。



## 【0029】

本特許出願の発明者らは、上記の新規構造を有する9種類のオリゴ糖を特定の比で配合すると、最も活性が高い六糖類よりも高い活性を有する高活性オリゴ糖組成物が得られることを見出した。高活性オリゴ糖組成物中の種々のオリゴ糖の割合は、以下の割合関係に従って組み合わせる必要がある。

## 【0030】

組成物中の  $n = 1 \sim 5$  であるマンヌロン二酸オリゴ糖の総重量は、前記組成物の総重量の  $80 \sim 95\%$  であり、かつ、 $n = 1 \sim 3$  であるマンヌロン二酸オリゴ糖の総重量は、前記組成物の総重量の  $20 \sim 70\%$  である。 $n = 4 \sim 7$  であるマンヌロン二酸オリゴ糖の総重量に対する  $n = 1 \sim 3$  であるマンヌロン二酸オリゴ糖の総重量の比は、 $1.0 \sim 3.5$  の間、好ましくは、 $1.0 \sim 3.0$  の間である。

10

## 【0031】

本発明は、高活性オリゴマンナール酸オリゴ糖組成物を調製するための処方を提供する。

## 【0032】

本発明のマンヌロン二酸オリゴ糖組成物は、細胞損傷を阻害し、神経細胞を保護し得る。動物モデルにおいて、本発明により提供されるマンヌロン二酸オリゴ糖組成物は、認知症モデル動物の学習機能および認知機能を有意に改善し得る。従って、本発明により提供されるマンヌロン二酸オリゴ糖組成物は、アルツハイマー病を予防および処置する潜在的な効果を有する。

## 【0033】

例示的实施形態では、本発明の方法は、以下の工程を含む。

20

## 【0034】

(1) マンヌロン二酸生成物の調製：

Mセグメント中間体の調製。上記のように、本発明において用いる出発材料であるMセグメント中間体は、従来技術において公知の方法、例えば、中国特許出願番号98806637.8およびCN02823707.2に開示の方法により、製造することができる。一般的な方法を、以下に簡単に記載することができる。アルギン酸を予め分解し、ポリマンヌロン酸およびポリグルロン酸の多糖混合物を得る。この多糖混合物を酸性沈殿に供し、その中のポリグルロン酸を除去する。さらに精製を行い、純度90%以上を有するホモポリマンヌロン酸、すなわち、Mセグメント中間体を得る。

30

## 【0035】

オゾン酸化分解。Mセグメント中間体を、適当な量の水に溶かし、室温でまたは加熱下で攪拌する。オゾンを連続的に投入し、反応を開始する。反応のpHは、希塩酸または希NaOH溶液を滴下することにより、 $3 \sim 13$ 、好ましくは $4 \sim 10$ 、より好ましくは $6 \sim 8$ に調整することができる。温度は、好ましくは $0 \sim 70$ 、より好ましくは $10 \sim 45$  である。反応完了後、オゾンの投入を停止し、pHを中性に調整する。

## 【0036】

膜分離および精製。上記で得た反応生成物を、約10%の濃度の溶液に調合し、分子カットオフ膜により分離して、単糖類以下の分解生成物を除去し、保持液を回収する。使用する分子カットオフ膜は、 $1,000 \sim 3,000 \text{ Da}$ 、好ましくは $2,000 \text{ Da}$ のMWCOを有する。回収した液体を、ロータリーエバポレーターで濃縮し、真空下で乾燥させ、オリゴマンヌロン二酸混合物を得る。これらの生成物は、含量が特定範囲内にあるオリゴ糖、すなわち、二糖類～十糖類を含んでなる組成物であることが分かる。3つの組成物、A、BおよびCを、前述の方法に従って調製した。これらの組成物におけるオリゴ糖の割合および構造は、例1～3において確認した。

40

## 【0037】

(2) 単一の重合度を有するオリゴ糖の調製

工程(1)において得たオリゴ糖混合物を、約10%の濃度まで溶解し、P6ゲルクロマトグラフィーカラムで分離し、紫外検出に供し、各溶出液成分を回収する。同じ重合度を有する成分を合わせる。二糖類～十糖類の9種類の成分を回収し、G10ゲルカラムク

50

ロマトグラフィーにより脱塩し、ロータリーエバポレーターで濃縮し、真空下で乾燥させる。特定の精製法および調製法を例 4 に示す。カラムクロマトグラフィー、脱塩および乾燥のこれらの操作は、当業者に公知である。

#### 【 0 0 3 8 】

単一の重合度を有する 9 種類のオリゴ糖を、老年性認知症の動物モデルにおける薬理活性に関して評価した。六糖類が最も高い活性を有していたことが分かった（詳細については、例 4 を参照）。

#### 【 0 0 3 9 】

##### ( 3 ) オリゴ糖組成物の活性の比較

上記の工程 ( 2 ) において調製した単一の重合度を有するオリゴ糖を、以下の表に示される質量パーセントで配合し、4 番目の組成物、すなわち組成物 D を得る。上記の工程 ( 1 ) から得た 3 つのオリゴ糖組成物 A、B および C ならびに組成物 D におけるオリゴ糖の割合を、以下の表に示す。

#### 【 0 0 4 0 】

【表 1】

	二糖 類	三糖 類	四糖 類	五糖 類	六糖 類	七糖 類	八糖類	九糖 類	十糖 類
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%

#### 【 0 0 4 1 】

上記の 4 つの組成物および工程 ( 2 ) において精製した六糖類を、薬理活性に関して比較する。結果は、4 つのオリゴ糖組成物 A、B、C および D は、単一の重合度を有するオリゴ糖において最も高い活性を有する六糖類よりも有意に活性が高いことを示す。単一のオリゴ糖が、配合後に相乗作用を示し得ることが分かる。配合後、二糖類および三糖類などの活性が低いオリゴ糖は、六糖類よりも活性が高くなる。

#### 【 0 0 4 2 】

要約すると、本発明は、オゾンの存在下で M セグメント中間体を原料として用いた酸化分解反応と、限外濾過膜を介した反応生成物の分離および精製とを含んでなる、高活性マンヌロン二酸オリゴ糖組成物の調製方法を提供する。調製方法は、単純な製造方法および高収率が関与し、反応生成物を容易に精製して、優れた活性を有する生成物を得ることができる。本発明者らは、高活性組成物における種々のオリゴ糖の質量パーセントおよび割合の範囲も明らかにしている。本発明により提供される調製方法の重要性は、新規構造、すなわち、糖鎖の還元末端に 6 個の潜在的構造を有する二酸残基を有するマンヌロン二酸が得られること、ならびに、調製されたオリゴ糖組成物が、あまり大きくない割合の種々のオリゴ糖を含んでなり、強力な生物活性を有することにある。

#### 【 0 0 4 3 】

本発明は、上記のマンヌロン二酸オリゴ糖組成物と、場合により、薬学的に許容可能な担体または賦形剤とを含んでなる薬剤または医療製品をさらに提供する。

#### 【 0 0 4 4 】

有効成分を種々の割合で含有するオリゴ糖配合薬の調製方法は、例えば、Remington ' s Pharmaceutical Sciences, Martin, E.W. 編, Mack Publishing Company, 第 19 版 (1995) に記載のとおり、本発明の開示から当業者に公知または明らかである。医薬組成物の調製方法は、好適な医薬賦形剤、担体、希釈剤などを組み入れることを含んでなる。

#### 【 0 0 4 5 】

本発明の医薬調製物は、従来の混合、溶解または凍結乾燥を含む既知の方法により調製される。

## 【0046】

本発明の医薬組成物は、経口または非経口（静脈内、筋肉内、局所もしくは皮下経路を介して）などの選択された投与方法に好適な種々の経路を介して、患者に投与することができる。

## 【0047】

よって、本発明の併用薬は、不活性希釈剤または食用担体などの薬学的に許容可能な担体と組み合わせて、全身投与、例えば、経口投与することができる。本発明の併用薬は、硬または軟シェルゼラチンカプセル剤に封入してもよく、または、錠剤に圧縮してもよい。経口治療的投与のために、本発明の活性化合物は、1以上の賦形剤とともに組み入れてよく、内服用錠剤、口内錠剤、トローチ剤、カプセル剤、エリキシル剤、懸濁剤、シロップ剤、ウエハー剤などの形態で使用してよい。このような組成物および調製物は、少なくとも0.1%の活性化合物を含有する必要がある。組成物および調製物の割合は、当然のことながら変わり得、所与の単位投与形の約1%～約99重量%の範囲内であり得る。このような治療上有用な組成物における活性化合物の量は、有効量レベルが得られるような量である。

## 【0048】

錠剤、トローチ剤、丸剤、カプセル剤などは、トラガカントガム、アラビアガム、コーンスターチもしくはゼラチンなどの結合剤；リン酸二カルシウムなどの賦形剤；コーンスターチ、ジャガイモデンプン、アルギン酸などの崩壊剤；ステアリン酸マグネシウムなどの滑沢剤；およびスクロース、フルクトース、ラクトースもしくはアスパルテムなどの甘味剤；またはペパーミント、冬緑油、もしくはサクランボ香味剤などの香味剤を含有してもよい。単位投与形がカプセル剤である場合、これは、上記の種類の材料に加えて、植物油またはポリエチレングリコールなどの液体担体を含有してもよい。種々の他の材料を、コーティングとして、またはそうでなければ、固体単位投与形の物理形態を修飾するために提示してもよい。例えば、錠剤、丸剤、またはカプセル剤は、ゼラチン、ろう、セラック、または糖でコーティングしてもよい。シロップ剤またはエリキシル剤は、活性化合物、甘味剤としてのスクロースまたはフルクトース、保存剤としてのメチルパラベンまたはプロピルパラベン、色素、サクランボまたはオレンジ香味剤などの香味剤を含有してもよい。当然のことながら、いずれかの単位投与形の調製に用いるいずれの材料も、用いる量において薬学上許容され、無毒である必要がある。さらに、活性化合物は、徐放性製剤および徐放性デバイスに組み入れてもよい。

## 【0049】

活性化合物は、注入または注射により静脈内にまたは腹腔内に投与してもよい。活性化合物またはその塩の溶液は、場合により、無毒の界面活性剤と混合した水中で調製することができる。分散液は、グリセロール、液体ポリエチレングリコール、トリアセチン、およびその混合物中、ならびに油中で調製することもできる。貯蔵および使用の通常条件下では、これらの調製物は、微生物の成長を防止するための保存剤を含有する。

## 【0050】

注射または注入に好適な医薬投与形は、注射または注入に好適な無菌溶液または分散液の即時調製物に含まれる有効成分（場合により、リボソームに包まれた）の無菌水溶液または分散液または無菌粉末を含み得る。総ての場合において、最終投与形は、無菌であり、液体であり、製造および貯蔵条件下で安定でなければならない。液体担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコールなど）、植物油、無毒のグリセリド、およびその好適な混合物を含んでなる溶媒または液体分散媒であり得る。適切な流動性は、例えば、リボソームを形成すること、分散液の場合は必要な粒子径を維持すること、または界面活性剤を使用することにより、維持することができる。抗微生物作用は、種々の抗菌薬および抗真菌薬、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサルなどによって、もたらされ得る。多くの場合、等張剤、例えば、糖、バッファーまたは塩化ナトリウムを含むことが好ましい。注射可能組成物の持続的吸収は、吸収を遅延させる薬剤、例えば、

モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを使用することにより、もたらされ得る。

【0051】

無菌注射可能溶液は、必要量の活性化合物を、上記の種々の他の成分を有する適当な溶媒に組み入れ、次いで、濾過滅菌を行うことにより、調製する。無菌注射可能溶液の調製の無菌粉末の場合は、好ましい調製方法は、真空乾燥および凍結乾燥法であり、これにより、有効成分の粉末に加え、先に無菌濾過したその溶液からのいずれかのさらなる所望の成分が得られる。

【0052】

有用な固体担体は、粉碎固体（例えば、タルク、粘土、微晶質セルロース、シリカ、アルミナなど）を含む。有用な液体担体は、水、エタノール、エチレングリコールまたは水-エタノール/エチレングリコール混合物を含む。本発明の併用薬は、場合により、無毒の界面活性剤を用いて、有効量で担体に溶解または分散させてもよい。アジュバント（芳香剤など）および追加の抗菌薬を加え、所与の使用のための特性を最適化することができる。

【0053】

増粘剤（合成ポリマー、脂肪酸、脂肪酸塩および脂肪酸エステル、脂肪アルコール、改質セルロースまたは改質無機材料など）は、液体担体とともに使用して、使用者の皮膚に直接塗布できる塗布可能なペースト、ゲル、軟膏、石けんなどを形成することもできる。

【0054】

化合物またはその混合物の治療上必要な量は、化合物それ自体だけではなく、投与方法、処置する疾患の性質、ならびに患者の年齢および状態にも依存し、最終的に、担当医または臨床医の決定に依存する。

【0055】

上記の調製物は、単位投与形で存在してもよく、この単位投与形は、単位用量を含有する物理的に分離した単位であり、ヒトおよびその他の哺乳類の身体への投与に好適である。単位投与形は、カプセル剤もしくは錠剤、または複数のカプセル剤もしくは錠剤であり得る。有効成分の単位用量の量は、関与する特定の処置によって、変えてもよく、または、約0.1～約1000mg以上の間に調整してもよい。

【0056】

動物モデルならびに有効性および活性の評価工程

1. ADに対する有効性を評価するための動物モデル：ADモデルを、Aの片側脳室内注射により誘導し、ADモデルラットの学習および記憶挙動をモリス水迷路試験により評価する。

【0057】

体重がそれぞれ180～220gの間である雄ウィスターラットを用いる。無作為化：シャム手術対照群、モデル群、および投与群、1群あたり14匹。ラットを、ペントバルビタールナトリウム（40mg/kg）の腹腔内注射により麻酔し、脳定位固定装置に固定する。皮膚を慣例的に準備し、滅菌し、切開し、大泉門を露出させる。Stereotaxic Map of Rat Brain, Xinming Bao and Siyun Shu, Beijing, People's Medical Publishing House, 1991, 28に記載のとおり、海馬CA1領域は、「大泉門の後ろ3.0mm、縫線核の隣2.2mm、および硬膜の下2.8mm」の位置に位置する。モデル群および投与群に対して、凝集したA<sub>β</sub> 5μl（A<sub>β</sub> 1-40をPBS溶液中で1.4mg/mLに調合し、インキュベーターにて37℃で5日間インキュベートし、凝集状態を作り出す）を、流速1μL/分で、頭蓋骨に垂直に、微量注入器ニードルで右海馬CA1領域にゆっくり注射する。注射完了後、A<sub>β</sub>が十分に分散できるように、針を5分間静置する。次に、針をゆっくり引き抜く。外科的切開部位を縫合し、回復させるために保温する。対照群に対しては、等量の無菌PBSを注射することを除き、同じ手順を行う。手術の7日前に対応する薬剤を投与し、実験の最後まで投与を継続する。

【0058】

モリス水迷路試験は、手術の11日後に行う。

## 【0059】

空間定位試験：各群のラットに対し、1日1回5日連続で訓練を行う、すなわち、空間定位試験を行う。動物がプラットフォームを見つける時間（すなわち、逃避潜時）を記録する。約90秒以内にプラットフォームを見つけられないラットを、直線方向のプラットフォームまで泳ぎ、プラットフォームで30秒間立つように導き、ラットの学習および記憶を誘導する。

## 【0060】

空間探索試験：空間定位試験終了後2日目に、プラットフォームを除去し、ラットを入口の場所から水中に置く。動物がプラットフォームを通過した回数、および総距離に対するプラットフォームが位置していた四分円における水泳距離のパーセンテージを記録する。動物の学習機能および記憶機能を評価する。

10

## 【0061】

2. 細胞生存率評価用モデル：SH-SY5Y細胞（神経芽腫細胞）を96ウェルプレートに播種する（3,000個/ウェル）。24時間後、培地を除去し、薬剤を加え、0.5時間前処理する（無血清培養培地に処方；1用量あたり3回）。次に、凝集したA1-42（A1-42は、PBS溶液中で1mg/mlに調合し、インキュベーターにて4℃で24時間インキュベートし、終濃度2μMの凝集状態を作り出す）を加え、48時間インキュベートする。細胞生存率は、CCK8により検出する。

## 【0062】

本発明の利点を、以下の限定されない例においてさらに示す。しかしながら、例で使用する特定の材料およびその量、ならびに他の試験条件は、本発明を限定するものと解釈してはならない。特に断りのない限り、本発明における部、割合、パーセンテージなどは総て、質量で表す。

20

## 【実施例】

## 【0063】

## 例1：

## 工程1)：マンヌロン二酸オリゴ糖混合物の調製

Mセグメント中間体を、先行特許に開示の方法により調製した。特定の操作を以下に簡単に記載する。アルギン酸ナトリウム5Kgを約10%の溶液に調合し、希塩酸を加えることにより、pHを約3.0に調整した。この溶液を80℃まで加熱し、攪拌した。これを10時間反応させた後、加熱を停止した。室温まで冷却した後、NaOHを加えることによりpHを9.0に調整し、希塩酸を加えることにより、さらに2.85に調整した。この溶液を5000rpmで10分間遠心分離した。上清を回収し、HClを加えることにより、pH1.0に調整した。遠心分離後、沈殿を回収し、ロータリーエバポレーターで濃縮し、真空乾燥して、Mセグメント中間体1,500gを得た。Mセグメント中間体500gを秤量し、蒸留水に溶かして、5Lの容量の溶液を調製した。溶液をNaOHでpH6.5に調整し、水浴中で加熱して、反応温度を75℃に制御した。オゾンを経過速度8g/hrで反応溶液に導入するように、酸素ポンプの出口のガス流速およびオゾン発生器の出力を調整した。反応の4時間後、オゾンの導入を停止し、好適な量の水を加えて、溶液の濃度を約10%に調整した。2,000Daの分子量カットオフを有する限外濾過膜で溶液を濾過し、保持液を回収した。回収した液体を、ロータリーエバポレーターで濃縮し、真空下で乾燥させ、マンヌロン二酸生成物A 350gを得た。

30

40

## 【0064】

工程2)：マンヌロン二酸生成物Aにおける種々の重合度を有するオリゴ糖の割合および構造の分析

上記の乾燥マンヌロン二酸生成物A 100mgを正確に量り、濃度10mg/mLまで水に溶かし、0.22μm濾過膜に通して試験サンプル溶液を得た。組成物における異なる重合度を有するオリゴ糖の割合を、多角度光散乱(MALS, Wyatt Co.)と組み合わせたSuperdexペプチド分子排除クロマトグラフィー(GE Co.)により決定した。試験条件は、以下のとおりであった。

50

クロマトグラフィーカラム：Superdex ペプチド 10 / 300 G1

移動相：0.1 mol/L NaCl

注入量：10  $\mu$ L

流速：0.3 mL / 分

【0065】

試験結果：二糖類～十糖類は、それぞれ dp 2～dp 10 で表した。dp 2 は 19 %、dp 3 は 25 %、dp 4 は 22 %、dp 5 は 13 %、dp 6 は 9 %、dp 7 は 6 %、dp 8 は 3 %、dp 9 は 2 %、および dp 10 は 1 % であった。

【0066】

工程 3)：マンヌロン二酸生成物 A における種々の重合度を有するオリゴ糖の構造の LC-MS 分析 10

試験条件：

クロマトグラフィーカラム：Superdex ペプチド 10 / 300 G1

移動相：20 % メタノール + 80 % 80 mmol/L NH<sub>4</sub>Ac

流速：0.1 mL / 分

カラム温度：25  $\pm$  0.8  $^{\circ}$ C。

質量分析条件：Agilent 6540 QTOF；イオン源：ESI 衝突電圧 120 V；陰イオンモード。取得したシグナルの幅 (m/z) は、100～1,000 であった。

【0067】

20

種々の重合度を有するオリゴ糖の質量スペクトルを、図 1～3 に示す。質量スペクトルにおける種々のシグナルピークを割り当て、生成物 A における全オリゴ糖の分子構造、すなわち、式 (III) に示される構造を確認した。シグナルの割り当ておよびシグナルに対応する構造を、以下の表 1 に示す。

【0068】

【表 2】

表1. 生成物Aにおける異なる重合度を有するオリゴ糖の6個の二酸構造および質量スペクトルにおけるそれらの質量電荷比

No.	分子構造	分子式	質量電荷比 (m/z)								
			n=1 [M-1] <sup>-</sup>	n=2 [M-1] <sup>-</sup>	n=3 [M-1] <sup>-</sup>	n=4 [M-1] <sup>-</sup>	n=5 [M-1] <sup>-</sup>	n=6 [M-1] <sup>-</sup>	n=7 [M-2] <sup>2-</sup>	n=8 [M-2] <sup>2-</sup>	n=9 [M-2] <sup>2-</sup>
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		$(C_6H_8O_6)_n C_4H_8O_6$ n=1-9	325	501	677	853	1029	1205	690	778	866
5		$(C_6H_8O_6)_n C_4H_8O_6$ 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

【 0 0 6 9 】

上記の質量分析構造分析から、生成物Aにおける糖鎖の還元末端のマヌロン酸は、サッカリン酸構造（式ⅠⅠⅠを参照）に酸化され、この構造は、含量が約10～30%であ

10

20

30

40

50

る6個の炭素原子を含んでなるマンナル酸構造 ( $m + m' = 3$ ) であり得るか、または、マンナル酸の脱炭酸生成物、すなわち、5個の炭素原子を含んでなるサッカリン酸 ( $m + m' = 2$ ) (30 ~ 50%) および4個の炭素原子を含んでなるサッカリン酸 ( $m + m' = 1$ ) (30 ~ 40%) であり得ることが分かった。

#### 【0070】

##### 工程4) 薬理活性の評価

##### 1. A 誘導性神経細胞傷害に対する生成物Aの保護効果

試験は、「細胞生存率評価用モデル」に従って行い、試験手順は以下のとおりであった。SH-SY5Y細胞(神経芽腫細胞)を96ウェルプレートに播種した(3,000個/ウェル)。24時間後、培地を除去し、投与群に対して、薬剤(10mg/mL)10 10  
 $\mu$ L/ウェルを加え、0.5時間前処理した(無血清培養培地に処方; 1用量あたり3回)。次に、凝集したA 1-42 (A 1-42は、PBS溶液中で1mg/mLに調合し、インキュベーターにて4 で24時間インキュベートし、終濃度2  $\mu$ Mの凝集状態を作り出した)を加え、48時間インキュベートした。細胞生存率は、CCCK8により検出した。

#### 【0071】

結果は、2  $\mu$ M A 1-42によるSH-SY5Y細胞の処理は、48時間後に有意な細胞損傷を誘発し得、細胞生存率を減少させたが、25、50および100  $\mu$ g/mL生成物Aは、A により誘導された細胞生存率の減少を有意に阻害し得たことを示した(図4参照)。上記の結果は、生成物Aは、低濃度(25  $\mu$ g/mL)、中濃度(50  $\mu$ g 20  
 /mL)、および高濃度(100  $\mu$ g/mL)でA の毒性作用から神経細胞を保護し得ることを示す。

#### 【0072】

##### 例2:

例1のMセグメント中間体100gを秤量し、蒸留水に溶かして、0.8Lの容量の溶液を調製した。溶液をNaOHでpH4.0に調整し、反応を室温(25 )で行った。オゾンを質量濃度流速1g/hrで反応溶液に導入するように、酸素ポンベの出口のガス流速およびオゾン発生器の出力を調整した。反応の10時間後、オゾンの導入を停止し、好適な量の水を加えて、溶液の濃度を約15%に調整した。1,000Daの分子量カットオフを有する限外濾過膜で溶液を濾過し、保持液を回収した。回収した液体を、ロータリーエバポレーターで濃縮し、真空下で乾燥させ、マンヌロン二酸生成物B 80gを得た。 30

#### 【0073】

Bにおける種々の重合度を有するオリゴ糖の割合を、多角度光散乱(MALS, Wyatt Co.)と組み合わせたSuperdexペプチド分子排除クロマトグラフィー(GE Co.)により決定した。測定方法は、例1と同じであった。試験結果: 二糖類~十糖類は、それぞれdp2~dp10で表した。dp2は24%、dp3は25%、dp4は19%、dp5は12%、dp6は9%、dp7は5%、dp8は3%、dp9は2%、およびdp10は1%であった。

#### 【0074】

##### 例3:

例1のMセグメント中間体100gを秤量し、蒸留水に溶かして、1.5Lの容量の溶液を調製した。溶液をNaOHでpH9.0に調整し、反応を45 の水浴中で行った。オゾンを質量濃度流速3g/hrで反応溶液に導入するように、酸素ポンベの出口のガス流速およびオゾン発生器の出力を調整した。反応の2時間後、オゾンの導入を停止し、好適な量の水を加えて、溶液の濃度を約5%に調整した。3,000Daの分子量カットオフを有する限外濾過膜で溶液を濾過し、保持液を回収した。回収した液体を、ロータリーエバポレーターで濃縮し、真空下で乾燥させ、マンヌロン二酸生成物C 60gを得た。

#### 【0075】

Cにおける種々の重合度を有するオリゴ糖の割合を、多角度光散乱(MALS, Wyatt 40

10

20

30

40

50



t t Co.)と組み合わせたSuperdexペプチド分子排除クロマトグラフィー(GE Co.)により決定した。測定方法は、例1と同じであった。試験結果：二糖類～十糖類は、それぞれdp2～dp10で表した。dp2は8%、dp3は20%、dp4は28%、dp5は19%、dp6は13%、dp7は6%、dp8は3%、dp9は2%、およびdp10は1%であった。

【0076】

例4：

工程1)単一の重合度を有するマンヌロン二酸オリゴ糖の調製は、以下のとおりであった。

【0077】

1. サンプル調製：例1において調製したマンヌロン二酸生成物A 300gを水に溶かし、濃縮液1,000mLを調製し、これを、使用するために4の冷蔵庫に入れた。各使用のために、この溶液50mLを、水で1：2に希釈した後、0.22μm限外濾過膜で吸引濾過した。

【0078】

2. クロマトグラフィー分離条件：クロマトグラフは、UV検出器および自動コレクターを備えたAKTA pure 150(GE Co.から購入)であった。分離イオンクロマトグラフィーカラム：BioGel P6(Bio-Rad Co.から購入)1.2kgを、脱イオン水と混合し、真空脱気し、手でガラスカラム(内径：10cm)に充填し、10カラム容量の純粋ですすいだ。クロマトグラフィーカラムベッドは安定であり、高さは1.0mであった。次に、移動相を0.02M NaCl溶液に変え、10カラム容量で平衡化した後、サンプルローディングを開始した。

【0079】

3. ローディングおよび分離：ポンプの流速を1mL/分に設定した。サンプル溶液100mLを、クロマトグラフ自体のポンプを介してカラムの上部に注入した後、これを移動相に切り替え、流速5mL/分で溶出させた。死水容量を流出させた後、自動回収を開始し、チューブ1本あたり50mLを回収した。

【0080】

4. サンプルローディングを繰り返し、調製を20回繰り返した後、同じ画分を合わせ、ロータリーエバポレーターで濃縮し、凍結乾燥して、二糖類～十糖類の単一の重合度を有する計9種類のオリゴ糖を得た。

【0081】

工程2)薬理活性の評価

単一の重合度を有するオリゴマンナル酸(oligomannaric acid)オリゴ糖の薬理活性を、以下のように評価した。

【0082】

1. A誘導性神経細胞傷害に対するオリゴ糖の保護効果

実験は、例1に記載の方法と同じ方法で行い、オリゴ糖溶液を10mg/mLの濃度で調製した。

【0083】

結果は、2μM A1-42によるSH-SY5Y細胞の処理は、48時間後に有意な細胞損傷を誘発し得、細胞生存率を減少させたが、単一の重合度を有する総てのマンヌロン二酸オリゴ糖は、A誘導性細胞損傷を阻害する傾向を有していたことを示した。4～10の重合度を有するマンヌロン二酸オリゴ糖(薬剤の終濃度は25μg/mLであった)は、Aの毒性作用から神経細胞を有意に保護することができ、そのうち、5～8の4つの重合度を有するオリゴ糖が優れた効果を示し、六糖類が最も高い活性を示した(図5参照)。

【0084】

2. ラットにおけるA1～40の右脳室内注射により誘導された学習および記憶障害モデルに対するオリゴ糖の効果

10

20

30

40

50

## 【 0 0 8 5 】

「 A D に対する有効性を評価するための動物モデル」の方法に従って、二糖類～十糖類各 10 g に対して試験手順を行った。

## 【 0 0 8 6 】

単一の重合度を有するオリゴサッカリン酸の数が大きかったため、実験は複数のバッチにおいて完了した。シャム手術対照動物がプラットフォームを通過した回数に対する、各群の動物がプラットフォームを通過した回数のパーセンテージを算出することにより、種々のオリゴ糖の有効性の比較および評価を行った。結果は、プラットフォーム通過回数は、シャム手術対照群と比較して、モデル群において有意に減少したことを示した。単一の重合度を有する各オリゴ糖は、プラットフォーム通過回数が増加する傾向を示した。4～10の単一の重合度を有するマンヌロン二酸オリゴ糖は、プラットフォーム通過回数を有意に増加させることができ、そのうち、5～8の4つの重合度を有するオリゴ糖が優れた効果を示し、六糖類が最も高い活性を示した（図6参照）。

10

## 【 0 0 8 7 】

## 例 5

組成物における異なる重合度を有するオリゴ糖の相乗作用およびオリゴ糖の割合の範囲を調べるために、組成物と六糖類との間で薬理活性評価を行った。

## 【 0 0 8 8 】

サンプル調製：例4において調製した単一の重合度を有するマンヌロン二酸オリゴ糖を、重合度別の二糖類～十糖類に正確に量った。用いた各糖類の重量は、以下のとおりであった。二糖類 0.5 g、三糖類 3.0 g、四糖類 2.0 g、五糖類 2.0 g、六糖類 0.5 g、七糖類 0.5 g、八糖類 0.5 g、九糖類 0.5 g、および十糖類 0.5 g。これらを混合し、組成物生成物 D 10 g を得た。

20

## 【 0 0 8 9 】

例 1、2、および 3 においてそれぞれ調製した生成物 A、B、および C、ならびに本例において調製した生成物 D におけるオリゴ糖の割合を、以下の表 2 に示す。

## 【 0 0 9 0 】

## 【表 3】

表 2. マンヌロン二酸オリゴ糖組成物の生成物におけるオリゴ糖の割合

30

割合 組合せ	二糖類	三糖類	四糖類	五糖類	六糖類	七糖類	八糖類	九糖類	十糖類
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%

40

## 【 0 0 9 1 】

上記のサンプル A、B、C、および D の各 10 g を用いて、「 A D に対する有効性を評価するための動物モデル」に記載の方法に従って、これらの組成物および六糖類（6 T）の薬理活性を比較した。

## 【 0 0 9 2 】

実験において、シャム手術対照群と比較して、モデル群の動物は、プラットフォーム探索潜時が有意に延長し、この評価モデル化が成功したことが示された。モデル群と比較し

50

て、各投与群は、プラットフォーム探索潜時が有意に短かった。

【0093】

空間定位訓練終了後、1日の休息日があった。次に、プラットフォームを除去し、空間探索試験を行い、動物がプラットフォームを通過した回数、および総距離に対するプラットフォームが最初に位置していた四分円における水泳距離のパーセンテージを観察し、動物の記憶機能を評価した。結果は、図7に示されるように、プラットフォーム通過回数は、シャム手術対照群と比較して、モデル群において有意に減少し、投与群において有意に増加したことを示した。総距離に対するプラットフォームが最初に位置していた四分円における水泳距離のパーセンテージは、プラットフォーム通過回数と類似した傾向を示した。図8に示されるように、シャム手術対照群と比較して、総距離に対するプラットフォームが最初に位置していた四分円における水泳距離のパーセンテージは、モデル群において有意に減少し、投与群において有意に増加した。

10

【0094】

実験結果は、オリゴ糖組成物A、B、CおよびDのそれぞれの薬理活性は、4日目においても依然として非常に強く、単一の重合度を有する六糖類の活性より強かったことを示し、組成物におけるオリゴ糖間の相乗作用が示唆された。

【0095】

例6

細胞共培養技術を用いて、単一の重合度を有する種々のオリゴ糖および組成物の活性をさらに評価した。

20

【0096】

例4において調製した単一の重合度を有する好適な量のオリゴ糖および例1において調製した好適な量のオリゴ糖組成物生成物Aを、正確に量り、PBSに溶かし、濃度10mg/mLの被験薬溶液を調製した。

【0097】

細胞共培養実験は、前述の例1および例4における細胞培養方法と実質的に同じであった。主な違いは、細胞共培養技術は、in vivoにおける異なる細胞の相互作用を模倣したものである、という点である。in vivoにおける細胞は、シグナル伝達経路を介して互いに相互作用する可能性を考慮し、in vivoの環境に近づけるため、かつADの発生中の異なる細胞間の相互作用をシミュレートするために、培養中に小グリア細胞を導入した。特定の実験手順は、以下のとおりであった。SH-SY5Y細胞（神経芽腫細胞）を24ウェルプレートに播種し（12,000個/ウェル）、BV-2細胞（小グリア細胞）を、15,000個/ウェルの濃度で上部チャンバーに播種した。24時間後、培地を除去し、被験薬溶液を下部チャンバーに加え、最終薬剤濃度25μg/mLを得た。0.5時間の処理（無血清培養培地に処方；1薬液あたり3回）後、凝集したA1-42（A1-42は、PBS溶液中で1mg/mLに調合し、インキュベーターにて4で24時間インキュベートし、終濃度2μMの凝集状態を作り出す）を加え、48時間インキュベートした。下部チャンバーにおけるSH-SY5Y細胞の生存率は、CK8により検出した。

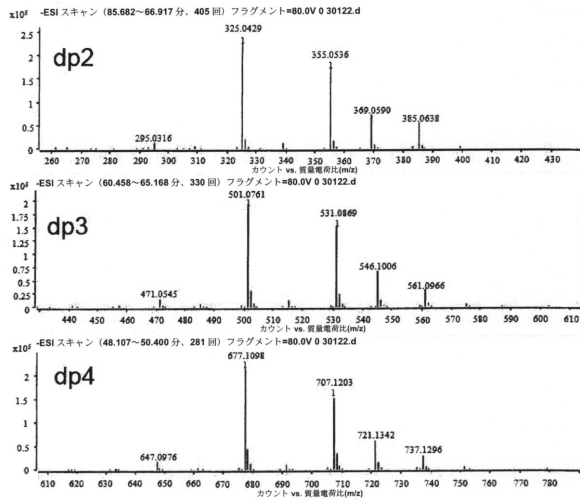
30

【0098】

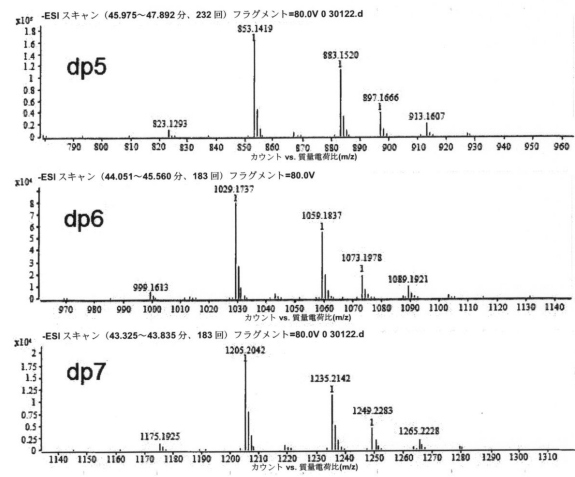
48時間後、モデル群を正常対照群と比較した。前者は、有意な損傷および細胞生存率の減少を示した。投与群は、A誘導性細胞損傷を阻害する効果を示した。特に、図9に示されるように、生成物Aの活性は、単一の重合度を有する他の9種類のオリゴ糖の活性よりも有意に高かった。共培養細胞モデルは、組成物と単一の重合度を有するオリゴ糖との間の活性の差を同定することができるが、その理由としては、小グリア細胞から放出されたサイトカインと、組成物における異なる重合度を有するオリゴ糖との間に相乗作用が生じ、それにより、オリゴ糖組成物の活性が増加し得る可能性が考えられる。

40

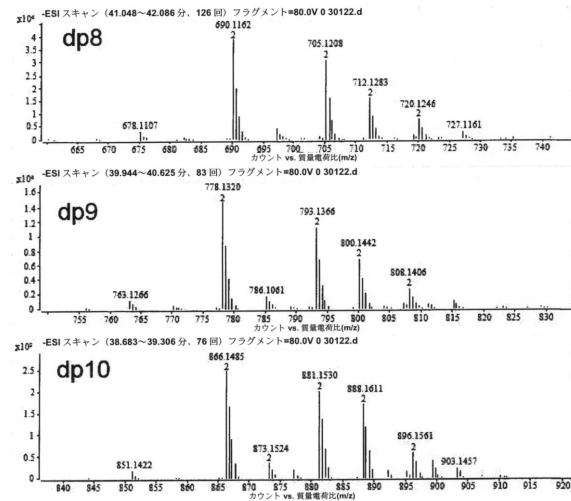
【図 1】



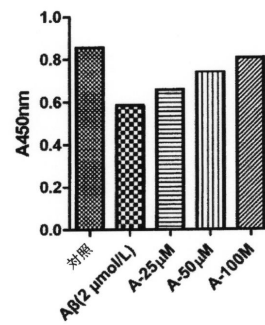
【図 2】



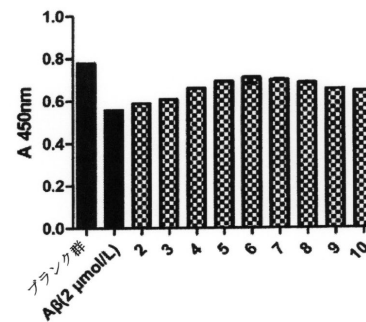
【図 3】



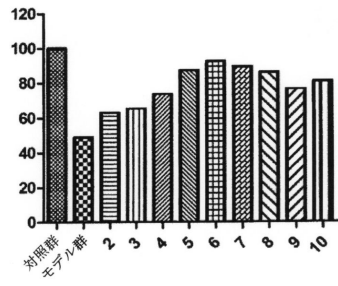
【図 4】



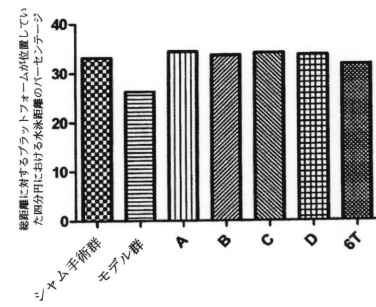
【図 5】



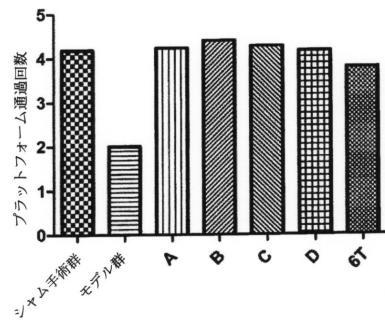
【図 6】



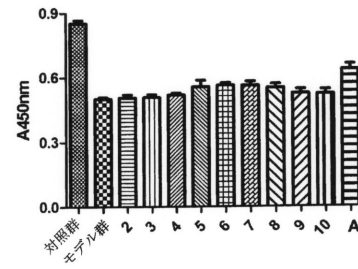
【図 8】



【図 7】



【図 9】



## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 P 25/28 (2006.01)		A 6 1 P 25/28
C 0 7 H 1/00 (2006.01)		C 0 7 H 1/00
C 0 7 H 7/033 (2006.01)		C 0 7 H 7/033
C 0 8 B 37/04 (2006.01)		C 0 8 B 37/04

(73)特許権者 509011765

シャanghai インスティテュート オブ マテリア メディカ、チャイニーズ アカデミー オブ  
サイエンス

SHANGHAI INSTITUTE OF MATERIA MEDICA, CHINESE  
ACADEMY OF SCIENCES

中国 201203 シャanghai プドン チャンジャンハイ-テックパーク ズーチョンツーロ  
ード 555

555 Zu Chong Zhi Road Zhang Jiang Hi-Tech Pa  
rk Pudong Shanghai 201203 (CN)

(74)代理人 100091982

弁理士 永井 浩之

(74)代理人 100091487

弁理士 中村 行孝

(74)代理人 100105153

弁理士 朝倉 悟

(74)代理人 100120617

弁理士 浅野 真理

(74)代理人 100126099

弁理士 反町 洋

(74)代理人 100143971

弁理士 藤井 宏行

(72)発明者 ゲン、メイユ

中華人民共和国シャanghai、チェンファイ、ロード、レーン、828、ビルディング、15、110  
1

(72)発明者 ディン、ジャン

中華人民共和国シャanghai、プードン、ニュー、エリア、チントン、ロード、レーン、358、ナ  
ンバー7

(72)発明者 チャン、チェンチン

中華人民共和国チャンスー、スーチョウ、スーチョウ、インダストリアル、パーク、ガオヘ、ロー  
ド、ナンバー58、ビルディング、87、701

(72)発明者 シャオ、チョンピン

中華人民共和国シャanghai、プードン、ニュー、エリア、ファーシャ、イースト、ロード、レーン  
、2139、ナンバー28、501

(72)発明者 ドウ、シャオグアン

中華人民共和国シャanghai、プードン、ニュー、エリア、シャナン、ロード、レーン、65、ビ  
ルディング、5、602

(72)発明者 シン、シャンリヤン

中華人民共和国シャanghai、プードン、ニュー、エリア、チェンファイ、ロード、レーン、828、  
ビルディング、38、701

審査官 新留 素子

(56)参考文献 特表2007-530718(JP,A)

特開2016-108474(JP,A)

Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2008年, Vo.26, No.4, pp.394-399

J Pharmacol Sci, 2004年, Vol.95, pp.248-255

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 31/00-33/44

A61P 1/00-43/00

C08B 37/00

C08B 37/04

C07H 1/00

C07H 7/033

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )