[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int.Cl[7]
A61K 31/70
A61K 31/715

[12]发明专利申请公开说明书

[21]申请号 98809672.2

[43]公开日 2000年11月1日

[11]公开号 CN 1272060A

[22]申请日 1998.9.1 [21]申请号 98809672.2
[30]优先权
[32]1997.9.1 [33]AU [31]PO8884
[86]国际申请 PCT/AU98/00707 1998.9.1
[87]国际公布 WO99/11273 英 1999.3.11
[85]进入国家阶段日期 2000.3.30
[71]申请人 澳大利亚国立大学
地址 澳大利亚澳大利亚首都直辖区
[72]发明人 W·B·科登 D·J·弗朗西斯
C·R·帕里施
[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所
代理人 樊卫民

权利要求书2页 说明书9页 附图页数3页

[54]发明名称 使用硫酸化寡糖作为心血管疾病的抑制剂

[57]摘要

一种抑制需要此种治疗的人类或其它温血动物患者的血管平滑肌细胞增生的方法，包括给患者施用有效剂量的至少一种硫酸化寡糖，其中寡糖具有通式(Ⅰ)：$R_1-(R_x)_n-R_2$，其中R_1、R_2和每个R_x代表一个单糖单位，它们可能相同或不同，相邻的单糖单位之间用1→2、1→3、1→4和/或1→6糖苷键连接，n是从1到6的整数。

ISSN1008-4274

权 利 要 求 书

1. 一种抑制需要此种治疗的人类或其它温血动物患者的血管平滑肌细胞增生的方法，它包括给患者施用有效剂量的至少一种硫酸化寡糖，其中所述的寡糖具有通式 I:

$$R_1\text{-}(R_x)_n\text{-}R_2$$

（I）

其中 R_1、R_2和每个 R_x代表一个单糖单位，它们可能相同或不同，相邻的单糖单位之间用 1→2、1→3、1→4 和/或 1→6 糖苷键连接，n 是从 1 到 6 的整数。

2. 根据权利要求 1 所述的方法，其中在所述寡糖通式I中，n 是 3 或 4。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法，其中在所述寡糖通式I中，单糖单位是从甘露糖、阿卓糖、阿洛糖、塔罗糖、半乳糖、艾杜糖和古洛糖中选出的己糖。

4. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述的寡糖具有通式 II：

$$R_x\text{-}(R_x)_n\text{-}R_x$$

(II)

其中每个 R_x 基团是相同的且每个代表一个单糖单位，相邻的单糖单位之间用 1→2、1→3、1→4 和/或 1→6 糖苷键连接，n 是从 1 到 5 的整数。

5. 根据权利要求 4 所述的方法，其中在所述的寡糖通式II中，n 是 3 或 4。

6. 根据权利要求 4 或 5 所述的方法，其中在所述的寡糖通式II中，R_x代表从甘露糖、阿卓糖、阿洛糖、塔罗糖、半乳糖、艾杜糖和古洛糖中选出的单糖单位。

7. 根据权利要求 6 所述的方法，其中在所述的寡糖通式II中，R_x代表甘露糖或半乳糖。

8. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述的寡糖通过天然存在的多糖的酶解或化学降解制备。

9. 根据权利要求 8 所述的方法，其中所述的寡糖是甘露寡糖。

10. 根据权利要求 9 所述的方法，其中所述的寡糖是甘露五糖。

11. 根据权利要求 8 所述的方法，其中所述的寡糖是来自酵母 *Pichia holstii* 的甘露五糖磷酸。

12. 根据权利要求 1 至 11 中任一项所述的方法，其中所述的治疗包括动脉粥样硬化或血管成形术相关的再狭窄的治疗。

13. 在权利要求 1 中所述的至少一种硫酸化寡糖的用途，其用于抑制需要此种治疗的人类或其它温血动物患者的血管平滑肌细胞增生。

14. 一种抑制血管平滑肌细胞增生的药学或兽医用组合物，它包括权利要求 1 中所述的至少一种硫酸化寡糖，以及一种药学或兽医学可接受的载体或稀释液。

15. 在权利要求 1 中所述的至少一种硫酸化寡糖的用途，其用于制造用来抑制人类或其它温血动物患者的血管平滑肌细胞增生的药物。

说　明　书

使用硫酸化寡糖作为心血管疾病的抑制剂

发明领域

本发明涉及硫酸化寡糖，尤其涉及到在动脉粥样硬化和冠状血管成形术后再狭窄治疗时使用某些硫酸化寡糖作为血管平滑肌细胞增生的抑制剂。

发明背景

正常的动脉壁由两部分组成，一部分是由内皮细胞的单细胞层覆盖的腔内表面，另一部分是包埋在复合胞外基质（ECM）中的平滑肌细胞的腔下多细胞层。ECM 的主要成分是葡糖胺聚糖和硫酸乙酰肝素，后者通常被认为可以抑制平滑肌细胞的增殖 [1-3]。相反，动脉粥样硬化形成的机理与 ECM 硫酸乙酰肝素的损失有关，并伴随平滑肌细胞的移行和增殖 [1-3]。尽管有人提出由白血球浸入发展中的动脉粥样硬化斑块产生的乙酰肝素酶可能引起 ECM 硫酸乙酰肝素的损失，但对引起 ECM 降解的因素了解的还很少 [4]。

在对动脉粥样硬化中冠状动脉的狭窄和堵塞的治疗常常通过气囊血管成形术来扩张。不幸的是，大约 30%到 40%的患者会由于血管的增生发生再狭窄，这个过程被认为是由于血管内皮的剥露和随后的内皮下平滑肌细胞的移行和增殖造成的 [5]。随着动脉粥样硬化的产生，认为由乙酰肝素酶调节的 ECM 硫酸乙酰肝素的损失是血管成形术后再狭窄的一个关键因素。

在先国际专利申请 PCT/AU96/00238 公开了一类硫酸化寡糖的制备，制备用的是单糖单位之间用 1→2、1→3、1→4 和/或 1→6 糖苷键连接的聚合物，它包括 3 到 8 个单糖单位，是哺乳动物乙酰肝素酶的有效抑制剂，可以用来抑制人类的血管形成、肿瘤转移和炎症。

在进行本发明的工作中，发现这些硫酸化寡糖也可以用来抑制与血管

成形术相关的再狭窄和动脉粥样硬化相关的血管平滑肌细胞的增生。

发明概述

一方面，本发明提供了一种抑制血管平滑肌细胞增生的方法，尤其是用于治疗人类或其它需要此种治疗的温血动物患者动脉粥样硬化或血管成形术相关的再狭窄，此方法包括向患者施用至少一种有效剂量的硫酸化寡糖，其中寡糖具有通式 I 为：

$$R_1\text{-}(R_x)_n\text{-}R_2$$

（I）

其中 R_1、R_2 和每个 R_x 代表一个单糖单位，它们可能相同或不同，相邻的单糖单位之间用 1→2、1→3、1→4 和/或 1→6 糖苷键连接；n 是从 1 到 6 的整数，优选为 3 或 4。

优选地，硫酸化寡糖具有通式 II:

$$R_x\text{-}(R_x)_n\text{-}R_x$$

(II)

其中 R_x 代表相同的单糖单位，相邻的单糖单位之间用 1→2、1→3、1→4 和/或 1→6 糖苷键连接，n 是从 1 到 5 的整数，优选为 3 或 4。

如此处所用的，术语“抑制血管平滑肌细胞增生”和“动脉粥样硬化或血管成形术相关的再狭窄的治疗”的意思包含对需要此种治疗的患者的预防和治疗。

作为有效的乙酰肝素酶抑制剂，上述的硫酸化寡糖的另一个的特点是其可以产生两个额外的效果。第一，它们是血管形成的有效抑制剂，可能通过干扰硫酸乙酰肝素结合生长因子的活性来起作用（公开于在先国际专利申请 PCT/AU96/00238 中），第二，它们具有单一的抗凝血/抗血栓活性（公开于在先国际专利申请 PCT/AU98/00151 中）。既然血管形成是冠状动脉粥样硬化斑块形成的一个重要特征[6]，并且血管内血栓的形成是与血管成形术和动脉粥样硬化相关的一个主要危险因素[7]，因此硫酸化寡糖的这两个额外的活性进一步提高了它们的治疗效果。

发明详述

本发明使用的硫酸化寡糖基于单糖单位的聚合物，其可能用 1→2、1→3、1→4 和/或 1→6 糖苷键连接，并可由 3 到 8 个单糖单位组成。优选地，寡糖由 3 到 6 个单糖单位组成（即：n 从 1 到 4），更优选地由 5 到 6 个单糖单位组成（n 从 3 到 4）。尽管均聚物是优选的，但聚合物可能是仅含有一种单糖单位的均聚物，也可能是含有 2 种或更多不同种单糖单位的杂聚物。

连接在一起形成寡糖的单糖单位优选为己糖，如甘露糖、阿卓糖、阿洛糖、塔罗糖、半乳糖、艾杜糖或古洛糖。特别优选的己糖为甘露糖和半乳糖。己糖可以是 D-构型或 L-构型。

通式I和II中的寡糖也包括化合物，其中的单糖单位是衍生的，尤其是此单位为单糖的磷酸、乙酰或其它酯类的衍生物。

通常情况下，本发明中的硫酸化寡糖可以通过本领域公知的方法使寡糖硫酸化来制备，以得到其相应的 O-硫酸化衍生物。适宜的硫酸化方法在国际专利申请 PCT/AU96/00238 中有描述，其内容此处引用作为参考。待硫酸化的寡糖可以是天然产品，包括天然存在的寡糖和由天然存在的多糖（如甘露聚糖和来自酵母 *Pichia holstii* 的磷酸甘露聚糖外源多糖）酶解或化学降解制备的寡糖。另外，寡糖还可以通过在国际专利申请 PCT/AU96/00238 中公开的方法来合成制备。

本发明延及至少一种上述的硫酸化寡糖来抑制需要此种治疗的人类或其它温血动物患者的血管平滑肌细胞的增生的用途，尤其是治疗动脉粥样硬化或血管成形术相关的再狭窄。

本发明还延及至少一种上述的硫酸化寡糖的用途，用来制造对需要此种治疗的人类或其它温血动物患者的血管平滑肌细胞增生有抑制作用的药物，尤其是制造用于治疗动脉粥样硬化或血管成形术相关的再狭窄的药物。

此外，本发明也提供了一种药学或兽医组合物，用于抑制血管平滑肌细胞增生，尤其是治疗动脉粥样硬化或血管成形术相关的再狭窄，此组合物包括至少一种上述的硫酸化寡糖，同时还包括药学和兽医上可接受

的载体或稀释液。

按照治疗有效剂量施用活性组分。治疗有效剂量是指此量必须至少部分达到预期效果，或延迟受治疗的特定病情的发作、抑制它的恶化或同时阻止它的发作或恶化。当然，此剂量将由治疗的特定病情、病情严重程度和患者的个体参数包括年龄、身体状况、大小、重量和当前的治疗方法来决定。这些参数为本领域的普通技术人员所共知，可以通过常规的实验来提供。通常优选使用最大剂量，即根据正确的医疗规定确定的最高安全剂量。然而本领域的普通技术人员了解可能因为医学原因、生理原因或实际的其它原因而服用较低剂量或忍受剂量。

治疗组合物的配制为本领域的技术人员所共知。适宜的药学或兽医可接受的载体和/或稀释液包括任一和所有的传统溶剂、分散剂、填充物、固体载体、水溶液、包衣、抗细菌和抗真菌剂、等渗和吸收延迟剂等等。本领域技术人员众所周知，此类介质和药剂可用于药学和兽医的活性物质，并且以举例的形式在美国宾西法尼亚洲 Mack 出版公司 Remington 制药科学（*Remington's Pharmaceutical Sciences*）第 18 版中得到描述。有些传统的介质或药剂不能与本发明药学和兽医组合物中的活性成分同用，除此之外，均构思了其在本发明中的使用。此组合物还可掺入一些补充的活性成分。

用剂量单位形式来配制组合物有明显的优点，这可以方便施用和剂量一致性。此处使用的剂量单位形式指物理上分离的单位，它作为单位剂量适合于受治疗的人或动物；每个单位包含预先计算好的一定量的活性成分及所结合的所需的药学或兽医的载体和/或稀释液，以便产生预期的治疗效果。本发明中新的剂量单位形式的规格受以下两方面限制，并直接依赖于以下两方面:（a）活性成分的独特特性和要达到的特定的治疗效果，和（b）本领域对用于特殊治疗的活性成分化合的固有限制。

为了方便患者优选口服方式，但也可选用其它的施用方式。当然，选用的特定方式依赖于受治疗的特定病情和达到治疗效果所需剂量。通常来讲，本发明的方法可使用药学上可接受的任何服药方式，即可达到本发明活性成分的治疗效果而不造成任何临床上不可接受的负作用的方

式。此施用方式包括口、直肠、局部（表皮）、鼻子、经皮肤或非肠胃施用方法（例如，皮下、肌肉或静脉注射）。口服方式包括胶囊、片剂、锭剂等分离单位。其它途径包括椎管内施用，直接注入脊髓液；直接引入如通过多种导管和气囊式血管成形术设备，这些均为本领域普通技术人员众所周知；以及穿薄壁组织注射到目标区域。

本发明适于口服的组合物可为胶囊、扁囊剂、片剂或锭剂等独立单位，每一种内都含有预定量的活性成分，它们包裹在脂质体内或作为溶液或悬浮液处于水溶液或非水溶液如糖浆、酏剂或乳剂中。

适于非肠胃施用的组合物包括活性成分的无菌水制剂，它优选地与受体血液等渗。根据已知的方法，选用适宜的分散或保湿剂和悬浮剂来制备水制剂。无菌注射制剂也可以是存在于无毒的、肠胃外可接受的稀释液或溶剂中的无菌注射溶液或悬浮液，例如为存在于聚乙二醇和乳酸中的溶液。使用的载体和溶剂可以是水、林格氏溶液和等渗的氯化钠溶液。另外，传统上也使用无菌不挥发性油来作为溶剂或悬浮剂。因此可使用包括合成甘油一酯或甘油二酯在内的任意温和的不挥发性油。此外，在制备注射剂时可使用脂肪酸类物质如油酸。

其它递送系统包括可持续释放的递送系统。优选的可持续释放的递送系统是那些在可持续释放的药丸或胶囊中能使本发明活性成分释放的系统。有多种可持续释放递送系统可以选用，包括但并不局限于以下两个系统；（a）侵蚀系统，其中活性成分包含在基质里，和（b）扩散系统，其中活性成分以可控的速率透过聚合物。另外，也可使用泵基硬件递送系统，其中一些适于植入体内。

如前所述，根据本发明特别优选的方面，硫酸化寡糖可用来治疗动脉粥样硬化和冠状血管成形术相关的再狭窄。

在此说明书中，除非内容有其它方面的要求，词语“包括”或它的变化形式如“包含”或“组成”，都将理解为包含所述的整体或整体群，但不排除其他的整体或整体群

本发明另一个特点在下列的实施例中有更为详细的描述。此详细描述的目的仅仅是为了用来例证本发明，而不应该理解为是对上述发明描述

广度的一种限制。

在以下附图中:

图 1　用皂苷处理剥露动脉内皮细胞 14 天后，大鼠颈动脉横切面的苏木精和伊红染色之光学显微镜图。注意到血管腔几乎完全被大量的平滑肌细胞增生所堵塞。

图 2　正常大鼠颈动脉横切面的苏木精和伊红染色光学显微镜图。示血管内皮下与血管壁平行的平滑肌细胞的薄边层。

图 3　用皂苷处理剥露动脉内皮细胞 14 天后的大鼠的颈动脉横切面的苏木精和伊红染色光学显微镜图。在此种情况下，大鼠用 35mg/kg/天剂量的硫酸化甘露五糖磷酸处理 1 到 14 天，化合物用微渗泵供给。示与图 1 中描述的未处理的对照组比较，平滑肌细胞的增生大大减少。血管腔内着色的物质是血凝块。

实施例 1

硫酸化寡糖的制备

两种来源的寡糖可用于以下硫酸化。第一种来源是来自天然存在的多糖的寡糖。常见的制备方法包括用酶或化学法对多糖的部分解聚和对生成的寡糖按大小进行分级。制备寡糖的多糖的例子有甘露聚糖和来自酵母 *Pichia holstii* 的磷酸甘露聚糖外源多糖。第二种来源是通过己糖单体的化学聚合作用制备的含有己糖的全合成寡糖。先前的国际专利申请 PCT/AU96/00238 中公开了一种制造这些全合成寡糖的方法。此国际专利申请也描述了来自酵母 *Pichia holstii* 的外源多糖、结构为 P-6-Man-α-(1→3)-Man-α-(1→3)-Man-α-(1→3)-Man-α-(1→2)Man 的甘露五糖磷酸的分离方法。其它天然存在寡糖可以购买，例如可从日本东京的 Seikagaku 购买。最后，所有的寡糖可以按照在国际专利申请 PCT/AU96/00238 中公开的方法硫酸化，其内容此处引用作为参考。

实施例 2

硫酸化寡糖抑制血管平滑肌增生的用途

材料与方法

硫酸化寡糖

从酵母 *Pichia holstii* 的外源多糖中分离甘露五糖磷酸，并按照在国际专利申请 PCT/AU96/00238 中公开的方法硫酸化。

血管增生模型

可以使用两种方法来诱导血管增生。第一种方法中，雄性 Fisher 344 大鼠（18-30 周龄）麻醉后，解剖取出一段大约 1 厘米长的颈动脉。用带衬垫的动脉钳夹住 1 厘米长的动脉段的两端。用标号为 30 的针头往动脉段内注入少量的皂苷溶液（0.5mg/ml 的 PBS 溶液），保持 2 分钟后将溶液吸去。在针孔的每端结扎（5/0 丝线）1 厘米长的动脉段，去掉动脉钳，动脉放回，缝合伤口。第二天将大鼠分成对照组和治疗组。随后的 14 天里治疗组用皮下植入的微渗泵（Alzet 2ML2）供给剂量为 35mg/kg/天的硫酸化寡糖、硫酸化甘露五糖磷酸（PI-88）。对照动物则植入含盐水的微渗泵。2 周后麻醉动物（戊巴比妥），在 10%的缓冲福尔马林液中浸泡 20 分钟，无痛杀死后（戊巴比妥），取下剥露的动脉段用以组织学观察。用数字图象分析法检测内膜增生的程度。

第二种方法中，基本上根据 Clowes 等[8]描述的方法，使用传统的气囊膨胀模型。麻醉（三溴乙醇）13 只雄性 Wistar 大鼠（16-20 周龄），沿腹部正中切开，取出左侧的颈总动脉。用带衬垫的血管钳夹住取出动脉的最远端。动脉切开后将 2F 的 Fogarty 气囊式导管插入到颈动脉内，移去血管钳，将导管向动脉末端方向推进 1-1.5cm。随后将气囊充入 0.12cc 的空气，导管退回到动脉插入点。接着气囊放气，此步骤再重复两次。导管第三次退回时，气囊放气，从动脉中移走导管，同时马上用带衬垫的血管钳夹住动脉切开段的尾部，但需为以后结扎（5/0 丝线）留下空间。随后马上用相似的方法结扎动脉切口的颅侧以防止出血。六个这样的大鼠通过皮下植入微渗泵（Alzet 2ML2）用 PI-88 处理（35mg/kg/天），另外七个则植入含有普通无菌盐水的微渗泵（Alzet 2ML2）（对照组）。两周后动物用戊巴比妥麻醉，在 10%的缓冲福尔马林液中浸泡 20 分钟，无

痛杀死（戊巴比妥）后，取下剥露的动脉段（从动脉切开点到升主动脉）用以组织学观察。每 100μM 的福尔马林固定的组织制成连续的横切片（4μM），盐水（对照）组的内膜最厚区域与 PI-88 组（治疗）的此区域比较。用数字图象系统分析这些区域。

结果

本研究中使用的皂苷诱导的血管增生模型是一种新的方法，它有几个需要特别注意的重要特点。第一，通过短时间暴露于皂苷去污剂中使动脉壁的内皮细胞剥露。此方法与气囊式血管成形术导致的内皮剥露相似。第二，与未处理的对照组动物的颈动脉相比（图 2），皂苷接触 14 天后在皂苷处理的颈动脉内观察到大量的血管平滑肌增生（图 1）。事实上，皂苷处理的血管几乎完全堵塞（图 1）。第三，根据对照实验，皂苷诱导的血管增生模型是筛选抑制血管增生药物的最佳系统，血管增生发生在动脉粥样硬化斑块和血管成形术相关的再狭窄过程中。

通过微渗泵（35mg/kg/天）施用硫酸化寡糖、硫酸化甘露五糖磷酸（PI-88）会使皂苷诱导的血管增生减少（图 3）。与未处理的对照组动物相比，从硫酸化寡糖处理的动物的颈动脉组织学检查中可以看出，对血管增生的抑制达 34%，效果接近显著（P=0.08）（表 1）。

表 1　硫酸化甘露五糖磷酸抑制内皮剥露诱导的平滑肌增生的能力

内皮剥露方法	处理	动脉壁厚度	
		μm	%对照
皂苷	盐水	401.8±45.7[a]	100±11.3
皂苷	PI-88（35mg/kg/day）	266.7±27.7[b]	66.4±6.9[b]

a　数据代表平均值±SEM

b　与对照组比，P 值=0.08

在第二种方法中用气囊膨胀模型，血管内壁增生的程度用占血管横切面总面积的百分比来表示。具体来讲，增生百分比通过用内膜面积除以动脉横切面积测定。在此实验中，发现通过微渗泵施用 35mg/kg/天剂量

的硫酸化甘露五糖磷酸（PI-88）可引起血管内膜增生的显著降低（P=0.0008）（表2）。

表2 硫酸化甘露五糖磷酸抑制内皮剥露诱导的平滑肌增生的能力

内皮剥露方法	处理	新内膜产生的百分比	SEM
气囊导管膨胀法	盐水	57.66	3.17
气囊导管膨胀法	PI-88	36.02[a]	3.48

a 与对照相比 P=0.008（不成对 t 测验）。

参考文献:

1. Marcum, J.A., Reilly, C.F.和 Rosenberg, R.D. (1986). 凝血与血栓进展（*Prog. Hemost. Thromb.*） 8:185-215.
2. Castellot, J.J., Wright, T.C.和 Karnovsky, M.J. (1987).凝血与血栓论坛（*Semin. Thromb. Hemost.*） 13:489-503.
3. Karnovsky, M.J., Wright, T.C., Castellot, J.J., Choay, J., Lormeau, J.C.和 Petitou, M. (1989).纽约科学院年鉴（*Ann. N.Y. Acad. Sci.*） 556: 268-281.
4. Campbell, J.H., Rennick, R.E., Kalevitch, S.G.和 Campbell, G.R. (1992).实验细胞研究（*Exp. Cell Res.*） 200:156-167.
5. Vietstra, R.E.和 Holmes, D.R. (1988). 心脏外科杂志（*J. Card. Surg.*） 3:53-66.
6. O'Brien, E.R., Garvin, M.R., Dev, R., Stewart, D.K., Hinohara, T., Simpson, J.B.和 Schwartz, S.M. (1994). 美国病理学杂志（*Am. J. Pathol.*）. 145:883-894.
7. Schwartz, L.和 Seidelin, P.H. (1995).心血管疾病进展（*Prog. Cardiovasc. Dis.*） 38:67-86.
8. Clowes, A.W., Reidy, M.A.和 Clowes, M.M. (1983).实验室研究（*Lab. Invest.*） 48:208-215.

说 明 书 附 图

图 1

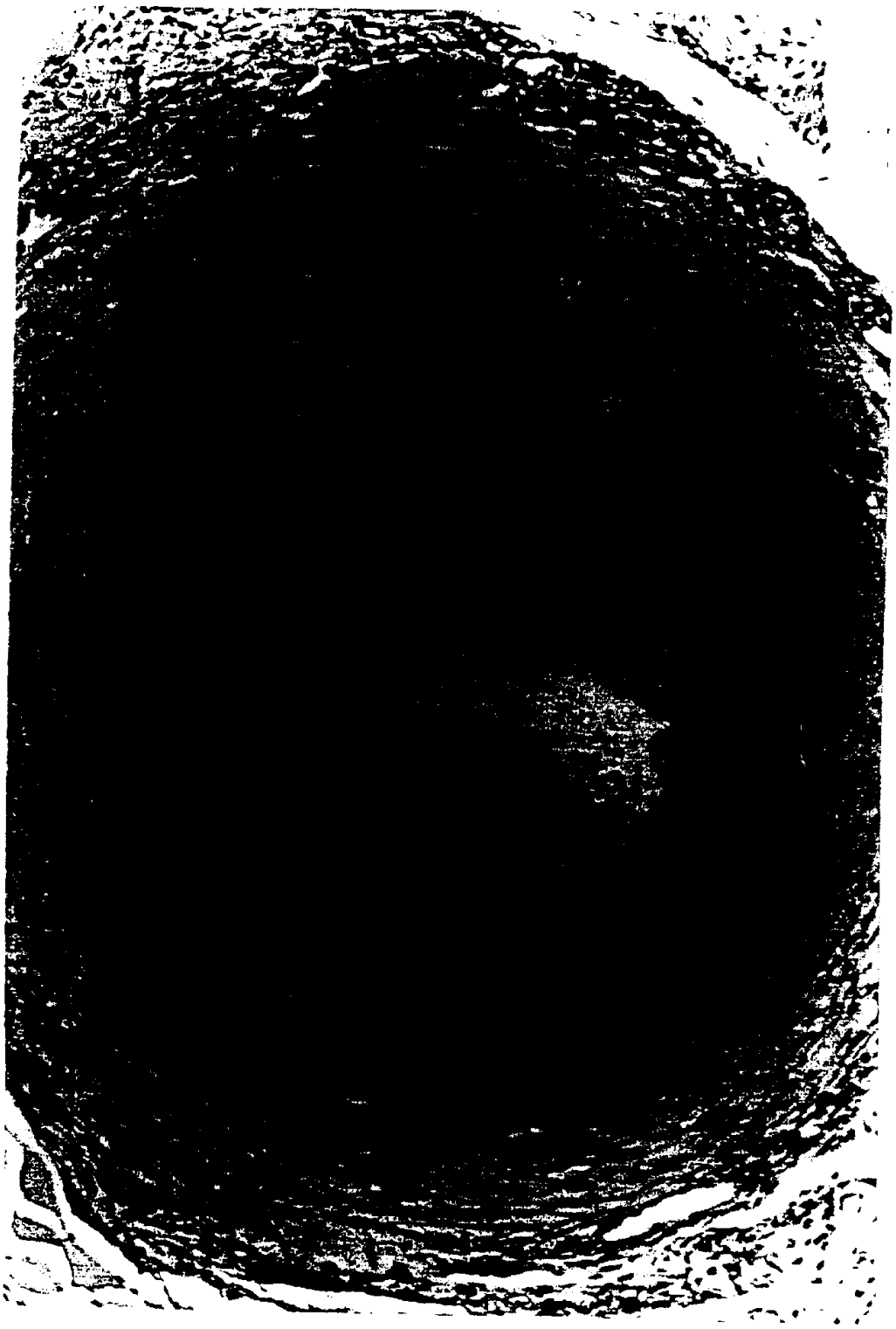


图 2

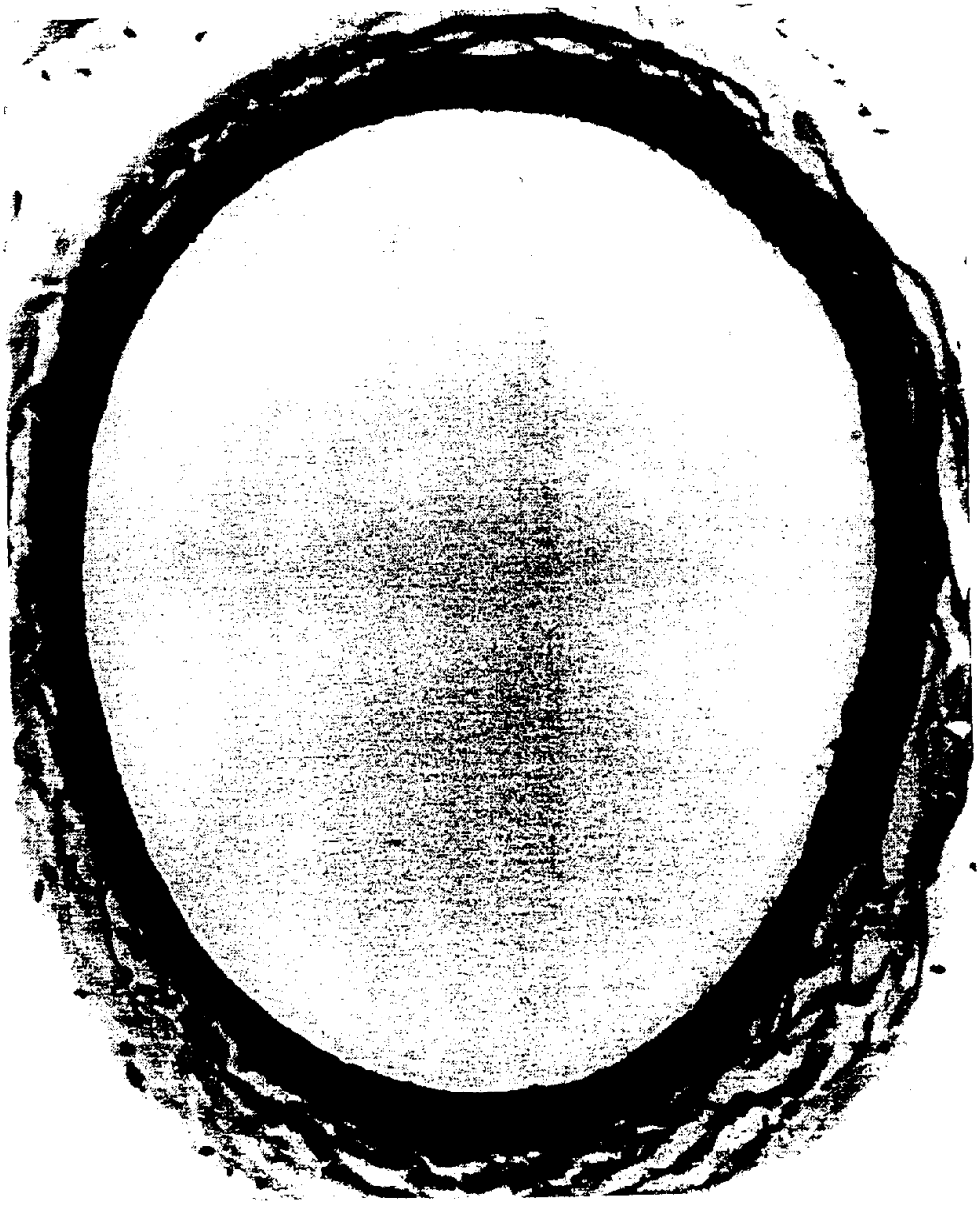


图 3

