(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 104321064 A
(43)申请公布日 2015.01.28

(21)申请号 201380026403.7

(22)申请日 2013.05.22

(30)优先权数据
MI2012A000896 2012.05.23 IT

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2014.11.20

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2013/060501 2013.05.22

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2013/174863 EN 2013.11.28

(71)申请人 阿尔特刚股份有限公司
地址 瑞士卢加诺

(72)发明人 M·德罗萨 C·斯基拉尔迪

(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所 11247
代理人 凌立 黄革生

(51)Int.Cl.
A61K 31/726(2006.01)
A61P 19/02(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61P 27/02(2006.01)

权利要求书1页 说明书28页

(54)发明名称

软骨素用于医学

(57)摘要

软骨素是哺乳动物和其他活生物中硫酸软骨素合成的代谢中间物，具有不同于硫酸软骨素的生物学特性，可以有利地用于药物、营养制品、药用化妆品和医疗器械领域中的应用。软骨素具有生物刺激、抗炎和抗微生物活性，可以用于骨关节炎、眼障碍、间质性膀胱炎、肺障碍、一般炎性障碍、肿瘤学障碍的治疗，腹膜透析、组织生物复活和创伤修复，作为皮肤填充剂，及作为生物可吸收的支架。

CN 104321064 A

1. 药物组合物、营养制品组合物、药用化妆品组合物或医疗器械，其包含非硫酸化软骨素作为活性成分。

2. 权利要求 1 的组合物，其是胶囊剂、片剂、滴眼液、凝胶剂、乳膏剂、溶液剂或混悬剂、口腔可溶性粉剂、喷雾剂、糖浆剂的形式。

3. 权利要求 1 或 2 的组合物，其进一步包含其他活性成分。

4. 权利要求 3 的组合物，其中非硫酸化软骨素与透明质酸组合。

5. 非硫酸化软骨素，其用作药物组合物、营养制品组合物、药用化妆品组合物或医疗器械中的活性成分。

6. 权利要求 5 的非硫酸化软骨素，其用作用于创伤修复；用于治疗关节病理、眼病理、肿瘤学病理、呼吸器官病理、骨关节炎、间质性膀胱炎、皮肤衰老的活性成分；用作用于腹膜内透析的溶液中的渗压剂和保护剂；及用作用于 3D 细胞培养物的生长的支架。

7. 权利要求 6 的非硫酸化软骨素，其用于关节粘弹性补充疗法和软骨组织的修复、利用皮内微量注射的皮肤生物复活，用于治疗干眼病及用于隐形眼镜的应用。

软骨素用于医学

[0001] 本发明涉及包含非硫酸化软骨素作为活性成分的药物组合物、营养制品组合物和药用化妆品组合物或医疗器械。

背景技术

[0002] 软骨素（硫酸软骨素的代谢前体）是由 N- 乙酰 -D- 半乳糖胺 β 1:4 和 D- 葡糖醛酸盐 (D-glucuronate) β 1:3 的交替残基形成的天然线性多糖。在脊椎动物中，软骨素在 N- 乙酰 -D- 半乳糖胺的 4 或 6 个羟基及在一些情况下在葡糖醛酸 (glucuronic acid) 的 2 或 3 个羟基处区域选择性硫酸化 (Sugahara 等，J. Biol. Chem.，1996，271:26745-54)。软骨素的分子量及硫酸化的程度和位点取决于物种、年龄和组织类型 (Kuettner 等，编辑，在 Articular cartilage and osteoarthritis, NY, Raven Press, 1992 中；Volpi 编辑，在 Chondroitin sulfate:structure, role and pharmacological activity, S. Diego, California Academic Press-Elsevier Inc, 2006 中）。

[0003] 硫酸软骨素（其代表多种家族的蛋白聚糖 (GAG) 的多糖部分）通过四糖 GlcA-Gal-Gal-Xyl 与核心蛋白质的丝氨酸残基成键。对于大多数膜蛋白，GAG 的核心蛋白质的生物合成始于胞质溶胶中，然后多肽易位至内质网。四糖合成始于内质网的网眼中，并在高尔基体中完成，其中硫酸软骨素的聚合 / 硫酸化开始。聚合由于与膜结合的多酶系统的协调、高度有组织的作用而发生，其中 GalNAc 转移酶和 GlcA 转移酶在新生蛋白聚糖的非还原端交替加入两种糖，导致形成约 70kDa 的软骨素链。聚合物的硫酸化发生在高尔基体中；具体而言，6- 位中的硫酸化发生在高尔基体的内侧 / 反面区域，而 4- 位中的硫酸化发生在反面区域。使用微粒体制剂的研究 (Sugumaran 和 Silbert, J. Biol. Chem. 1990 年 10 月 25 日，265(30):18284-8) 已证明，硫酸化过程在软骨素聚合过程开始后仅 30 秒就已开始；在硫酸化过程中，硫酸酯基 (sulphate) 的供体底物是 PAPS(3'- 磷酸腺苷 -5'- 磷酸硫酸)，其形成由 ATP 硫酸化酶 (sulphurylase) 和 APS 激酶催化。

[0004] 糖和硫酸盐 (sulphate) 的活化反应发生在胞质溶胶中；然后活化形式转运至内质网和高尔基体，它们在其中用于硫酸软骨素的合成。

[0005] 胞外基质中的 GAG 呈现非常伸展的构象，形成吸引阳离子和水的多孔凝胶。这样，GAG 使组织水化和膨胀，使得基质适于经受更强的压力。

[0006] 硫酸软骨素不仅存在于脊椎动物中，还存在于斑马鱼、线虫和昆虫中。一些细菌也产生与软骨素相关的聚合物作为其荚膜的成分。与脊椎动物不同，这些多糖不作为蛋白聚糖存在且不硫酸化，而是与细菌表面的脂质成分结合或释放入培养基 (Whitfield, Ann. Rev. Biochem. 2006, 75:39-68；De Angelis, Glycobiol, 12:9R-16R)。

[0007] 通过从多种动物来源（如猪软骨、鲨鱼鳍和硬骨鱼软骨）提取而获得的硫酸软骨素用作营养制品，及作为软骨保护 (chondroprotective) 和抗风湿药物用于治疗膝盖的胫腓骨关节炎和关节软骨的骨关节炎 ((Kuettner KE 等，编辑，在 Articular cartilage and osteoarthritis, NY, Raven Press, 1992 中；Simànek V 等，2005, 149:51-56；Goerres GW 等，J. Clinical Densitometry2005, 8:484-487；Altman

RD 等 ,OsteoArthritis and Cartilage 2005,13:13-19 ;Chan PS 等 ,OsteoArthritis and Cartilage 2005,13:387-394 ;Chou MM 等 ,Exp.Biol.Med.2005,230:255-262 ; Clegg DO 等 ,New England J.of Medicine,2006,23:795-808 ;Roman-Blas 等 ,OsteoArthritis and Cartilage,2006,14:839-848 ;Maheu E 等 ,OsteoArthritis and Cartilage,2006,14:303-322 ;Fotinì N 等 ,Biomed.Chromatogr.2006,20:539-550 ; Lagnaoui R 等 ,Thérapie 2006,61:341-346 ;Volpi N 编 辑 , 在 Chondroitin sulfate:structure,role and pharmacological activity,S.Diego,California Academic Press-Elsevier Inc,2006 中 ;Zhang W 等 ,Ann.Rheum.Dis.2007,66:377-38)。使用硫酸软骨素的其他治疗领域是间质性膀胱炎 (Nickel 等 ,BJU Int.2009,103:56-60 ; Cervigni 等 ,Int Urogynecol.J.Pelvic Floor Dysfunction.2008,19:943-947) 和 滑膜炎 (Hochberg 和 Clegg,Osteoarthritis and Cartilage 2008, 增刊 16,3:S22-S24 ; Moller,Osteoarthritis and Cartilage 2009, 增刊 17,1:S32-S33)。

[0008] 但是,代谢中间物软骨素不能以显著的量从动物来源分离。最近才设想从微生物或通过酶促合成产生软骨素的方法。

[0009] 通过 WO 2010136435 中所述的改造的大肠杆菌 (E.coli)K4 菌株产生软骨素尤其令人关注 ;该菌株产生软骨素多糖 K4,其在葡糖醛酸的 C3 中存在 β-呋喃果糖残基。由于连接果糖和软骨素链的糖苷键的低稳定性,可以通过受控的酸水解容易地去除这些残基。通过插入几个拷贝的自体基因 Rah(其作为负责合成荚膜物质的基因簇的转录的正调节物发挥作用)来设计菌株的改造,以改善负责合成多糖 K4 的整个酶复合物的持续合成能力。使用此微生物和基于三阶段发酵方法(分批-补料分批-微量过滤)的优化的整体策略,获得了 >8g/L 的软骨素产率。高产率、下游纯化方法的简化、低总体方法成本和低环境影响使得 WO 2010136435 中所述的方法优于之前描述的所有发酵策略 (Rodriguez 等 ,Eur.J.Biochem.,1988,177:117-124 ;Manzoni 等 ,Biotechnology Letters,1996,18:383-386 ; WO 01/02597A1 ;US6,288,044 ;US 6,777,398 ;US 2005266460 ;WO 0180810 ;EP 1282684 ; EP1832662 ;US 20030104601 ;US 20050164984 ;US 20070015249 ;US20030109693 ; EP 1950308 ;WO 2007145197 ;WO 2007069693 ;WO2007058252 ;WO 2007058252 ;WO 2007023867 ;US 7,273,729 ;JP2004024208 ;US 20060052335 ;US 20060057697 ;US 7,232,676 ;US20070059805)。最近,US 2011244520A1 描述了一系列以与 WO 2010136435 的浓度相当的浓度产生软骨素的改造微生物。

[0010] 关于软骨素的酶促合成,US 2005266460、WO 0180810、EP 1282684、EP 1832662、US 20030104601 和 US 20050164984 公开了来自多杀巴斯德氏菌 (Pasteurella multocida) 的软骨素合成酶的用途,该酶是催化从对应的 UDP 糖合成软骨素的酶。尤其是,这些文件描述了编码该酶的核苷酸区段的序列、表达它们的重组体(在原核和真核表达系统中)的构建和使用及用该重组体产生多种大小的修饰软骨素。所有这些文件都缺乏所要求的产生方法的实验证据 ;尤其是完全未报道关于用来产生该酶的发酵方法和软骨素产率的详细数据。US 20070015249 和 US 20030109693 描述了从大肠杆菌 K4 产生软骨素合成酶,及该软骨素合成酶在体外产生软骨素中的用途。该由负责荚膜抗原生物合成的大肠杆菌 K4 基因簇 II 区的基因 kfoC 编码的酶的产生表征为以下阶段 :扩增 kfoC,基因克隆入 pTrcHis 载体,在大肠杆菌 TOP 的市售菌株中表达。这两个文件还要求具有突变的天然或人

工蛋白质，该突变可在软骨素合成酶中诱导轻微的结构改变而不改变其催化功能。这些文件也缺乏关于产生方法的产率、关于软骨素合成酶的产生及在体外从对应的 UDP- 糖酶促产生软骨素的数据。

[0011] EP 1950308、WO 2007145197、WO 2007069693、WO 2007058252、WO 2007058252 和 WO 2007023867 描述了合成软骨素和衍生物的体外方法，该方法使用来自大肠杆菌 K4 的软骨素合成酶及其突变体，该突变体只具有两种转移酶活性之一。

[0012] US 7,273,729、JP 2004024208、US 20060052335、US 20060057697 和 US 7,232,676 公开了人软骨素合成酶的用途，该酶催化从对应的 UDP 糖合成软骨素。这些文件要求人软骨素合成酶的结构、包含该酶的序列的表达载体、该载体在真核细胞中的表达及用于合成软骨素的多糖链的方法。

[0013] US 20070059805 要求人软骨素合成酶的结构、包含该酶的序列的表达载体、该载体在真核细胞中的表达及用于合成软骨素的多糖链的方法。

[0014] 上文引用的所有文件都认为软骨素是硫酸软骨素合成的中间物，未指出其固有的生物学特性。它们中的一些确实提到在未指明的组合物中使用软骨素的可能性，但只是一般性地提到，如 US 20110244520（权利要求 63）和 WO 0180810（权利要求 73）的情况；最后一个文件在第 4-5 页中陈述："粗略地说，软骨素聚合物比类似的 HA 分子更不活泼"。Kujawa M J 等，(Developmental Biology 1985,114,504-518 和 519-528) 描述，透明质酸和软骨素（尽管效率较低）刺激培养的 24 阶段鸡肢间充质细胞（受精后 4,5 天）的体外软骨发生。仅在该多糖共价结合于培养细胞的表面时观察到此作用，而在这类分子处于溶液中时未观察到此作用。没有治疗性应用可以与这类观察相联系，这类观察涉及不能广泛适用的实验模型中严格条件下的 ambyogenesis 过程。

[0015] WO 2012/032151 还描述了透明质酸和软骨素之间的杂种协作复合体。后者仅作为降低黏度的流变学赋形剂提出，未描述药理学作用。

[0016] 定义

[0017] 术语软骨素常不正确地用来表示硫酸软骨素；因此，为了清楚，两个术语"软骨素"和"硫酸软骨素"在后文中将分开使用。术语"软骨素"意指非硫酸化的多糖，用字母 C 表示，而术语"硫酸软骨素"意指差异硫酸化的多糖，用字母 CS 表示。

[0018] 发明概述

[0019] 虽然广泛记录了硫酸软骨素在医学领域中的用途，但对于软骨素的应用尚无可获得的数据。现已发现，软骨素具有一系列重要的生物学活性，这些生物学活性使得它不仅在治疗领域中，还在美容医学、营养制品和药用化妆品中用于多种应用。

[0020] 实验模型和临床试验已证明，软骨素以多因子的方式与生物学系统相互作用，在细胞、组织和整个身体中引起新的或比硫酸软骨素的生物应答大的生物应答。

[0021] 虽然软骨素是用于硫酸软骨素的生物合成的代谢中间物，但该分子并非这样存在于组织中，因为它已在生物合成阶段通过四糖 GlcA-Gal-Gal-Xyl 锚定至核心蛋白质的丝氨酸残基，由 N- 乙酰 -D- 半乳糖胺 β1:4 和 D- 葡糖醛酸 β1:3 的二糖单位的重复形成的链在该四糖单位上生长。链的延长及其随后的硫酸化的过程几乎同时发生。

[0022] 因此，外源施用后游离软骨素在身体中的存在是造成一系列多因子生物应答的新的代谢条件。

[0023] 已发现，软骨素刺激细胞生长，尤其是软骨细胞的生长，促进细胞类型的维持，具有抗炎和抗菌活性，并刺激创伤修复。软骨素还可以在硫酸软骨素或其他糖胺聚糖的典型应用中取代硫酸软骨素或其他糖胺聚糖，例如在粘弹性补充疗法(viscosupplementation)、软骨修复中、在眼科领域中、在关节病的治疗中及在使用皮内微量注射的皮肤生物复活(biorevitalisation)处理中。还已发现，软骨素加强抗肿瘤活性组分的活性，并用于治疗多种障碍，如骨关节炎、间质性膀胱炎和呼吸系统障碍。软骨素还用于腹膜透析液，并用作组织生长支架的结构成分。

[0024] 因此，本发明涉及含有非硫酸化软骨素作为活性成分的药物组合物、营养制品和药用化妆品组合物或医疗器械。

[0025] 软骨素可以可选地与其他活性成分组合，如透明质酸、抗炎药、抗肿瘤药、粘液溶解剂和抗菌剂。

[0026] 给药途径和剂量将取决于待治疗的病症的类型，且可以由专家用已知的方法根据临床前和临床研究来确定。粗略地说，在用于相同的应用时，该剂量将与目前用于硫酸软骨素的那些基本上不同。该剂量可以是例如0.1至200mg/Kg之间口服及0.01至20mg/Kg之间注射，而局部制剂可以包含0.01wt％至80wt％之间的软骨素浓度。软骨素可以配制在适合用于口服、注射或局部施用的组合物中。这些施用形式的实例包括胶囊剂、片剂、滴眼液、凝胶剂、乳膏剂、溶液剂或混悬剂、口腔可溶性粉剂、喷雾剂和糖浆剂。

[0027] 软骨素的注射、口服或局部施用即使在非常高的剂量下也未引起可以不利于其用途的不良反应。表1中报道的软骨素的毒理学特征证明了其安全性。

[0028]

试验	实验模型	值
毒性		
急性	小鼠/大鼠	LD_{50} >2000 mg/Kg p.o.和 160 mg/Kg i.v.
亚急性 30 天	大鼠	>200 mg/kg/天 p.o.和 i.m.无毒性
慢性 26 周	大鼠	>200 mg/kg/天 p.o.无毒性
诱变性/基因毒性		
体外试验，Ames 试验	鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)的 5 个菌株	至多 2.0 mg/平板，无点逆向突变
体外试验，染色体畸变试验	人淋巴细胞	至多 5 μg/mL，观察到具有染色体畸变的细胞数目未显著增加
体外试验，DNA 修复试验	对诱变物质的作用敏感的大肠杆菌菌株	即使在更高剂量下，它也不与 DNA 相互作用，不改变 DNA
体内试验，微核试验	小鼠	即使在 80 mg/Kg 的剂量下，也可以认为软骨素在早期微核试验中无诱变性
致癌性研究	大鼠	在大鼠上进行的亚急性和慢性试验的组织病理学检查证明所有重要器官中完全没有致癌性变质
生殖系统毒性研究		
生育和生殖能力研究	大鼠	即使在 200 mg/Kg 的剂量下，每天口服施用软骨素 60 天对雄性大鼠的生育能力也没有影响。类似地，在交配前 15 天直至泌乳的第 21 天每天施用至多 200 mg/Kg 对雌性的生殖能力没有影响。
胚胎-胎儿发育研究	大鼠	即使在所测试的 100 mg/Kg 的最大剂量下，软骨素也未显示致畸活性
出生后发育研究	大鼠	从妊娠第 15 天至泌乳期结束施用 200 mg/Kg/天的口服剂量后，软骨素在大鼠中无致畸作用。
致敏		
全身致敏和过敏反应	豚鼠	软骨素未在所处理的任何动物中诱发过敏反应或超敏反应
皮肤致敏	豚鼠	未在所处理的动物中观察到皮肤致敏的迹象。

[0029] 表 1- 软骨素的毒理学概况 ;实验详情在实施例 5-9 中报道。

[0030] 发明详述

[0031] 下文总结形成本发明所涉及的用途的基础的实验证据。进一步的详情在实施例中报道。

[0032] 刺激细胞生长

[0033] 软骨素的存在强烈刺激许多细胞类型（如角质形成细胞、成纤维细胞，尤其是软骨细胞）的生长。涉及通过刺激创伤愈合过程的体外实验清楚地证明了复杂的现象学。通过缩时光学显微术进行创伤愈合实验，缩时光学显微术是允许在重现细胞生长的最适条件（具有含 5％ v/v CO_2 的湿空气和 37±0.1℃的温度的环境）的环境中就黏附、增殖和移动的长时间（2-4 天）监测细胞行为的技术。使培养物生长至汇合并在其中产生切口（创伤）；然后通过计算创伤面积的变化来随着时间的推移评估修复速率。定性和定量分析显示，软

骨素存在下的创伤修复耗时不到 20 小时，而在硫酸软骨素的存在下，创伤即使在 70 小时后也未完全愈合；在相同条件下，对照（未加入多糖的培养基）在 40 小时后封闭。在每个实验条件中，C 显示缩短愈合时间的能力，愈合时间大约减半。此结果代表开放性创伤愈合并因此减少涉及感染、浓度的典型并发症的重要指示。

[0034] 刺激软骨细胞生长和维持细胞类型

[0035] 分离自鼻成形术期间获得的健康人软骨样品的人软骨细胞原代培养物上的实验证明，软骨素在培养基中的存在不仅刺激细胞生长，还在维持软骨细胞细胞类型中具有特异性作用。在软骨细胞的情况下，观察到细胞分化的过程，该过程随着生长期的行进具有在形态学上越来越类似于成纤维细胞的外观。软骨素在培养基中的存在抵消了这类行为。用缩时视像显微术进行的软骨素对细胞生长的影响的研究显示，用软骨素处理的细胞的生长比未处理的细胞和用硫酸软骨素处理的细胞的生长好。

[0036] 涉及在软骨素或硫酸软骨素存在下培养的人软骨细胞上的免疫组织化学测试的表型分析显示，4 天的处理后，不同培养物（未处理的细胞、用软骨素处理的细胞和用硫酸软骨素处理的细胞）全都显示 II 型胶原（软骨细胞细胞类型的特异性标记）强阳性，但此条件仅在用软骨素处理的细胞中维持更长的时间（7 和 10 天）。

[0037] 软骨素或硫酸软骨素存在下培养的人软骨细胞中主要的特异性分化标记（β-肌动蛋白、聚集蛋白聚糖、II 型胶原、I 型胶原和 sox9）的基因表达的实时 PCR 分析显示：a）软骨素处理导致所分析的分化和基质基因（聚集蛋白聚糖、I 型胶原、II 型胶原和 sox9）在所考虑的不同分析时间（4、7 和 10 天）的表达的变化；b）如果用软骨素处理第二生长期的软骨细胞，则它们显示高水平的 II 型胶原表达，而如果用硫酸软骨素处理它们，则它们显示高水平的 I 型胶原表达，伴随明显的成纤维细胞类型的形态学变化；c）第三生长期的细胞显示对软骨素或硫酸软骨素处理的响应较低，但清楚地观察到软骨素存在下 II 型胶原的持续表达，证明即使在晚生长期也维持软骨细胞表型。

[0038] 这些结果在组织工程中具有相当大的应用兴趣，证明可在软骨素存在下通过移植获得的软骨细胞生长允许随时间推移扩增细胞，维持软骨细胞表型，从而维持所形成的组织的特征。在药理学方面，此结果对软骨素在其中软骨细胞表型及其最佳代谢在治愈障碍中发挥战略性作用的所有障碍中的用途也很重要。

[0039] 抗炎活性

[0040] 硫酸软骨素在治疗骨关节炎（OA）中的用途几十年来基于以下假说：它的含量在 OA 患者中随年龄下降，施用的产物因此具有补充该蛋白聚糖和滑液降低的生物合成能力的功能。最近关于硫酸软骨素在治疗 OA 中的作用机制的研究已改变了此作用机制假说，证明硫酸软骨素主动涉及减少 OA 和类风湿性关节炎进程潜在的炎症状态。具体而言，已证明由于反复的关节损伤（软骨组织、滑液、软骨下骨），在该障碍的病理发生中发挥重要作用的促炎介质释放入胞外基质。它们包括白细胞介素 1b（IL-1β）和肿瘤坏死因子 a（TNF-α）。具体而言，在软骨细胞中，IL-1β 结合至膜受体，并激活经由诸如 ERK-1/2 和 p38MAPK 的激酶的信号传导途径，该信号传导途径转而激活细胞中的炎症途径。具体而言，体外研究已证明，硫酸软骨素抑制 ERK-1/2 和 p38MAPK 的磷酸化和激活，因此减少 NF-kB 的易位，这支持硫酸软骨素的抗炎作用（Du Souich, P. 等，J. Cellular and Molecular Medicine, 2009, 13:1451-1463）。在提取自膝盖软骨

并在实验室中扩增的人软骨细胞上进行的一项更近的研究中，Calamia 等 (Calamia V 等，Arthritis Res. Ther.，2010，12(4)：R138) 研究了加入促炎细胞因子 IL-1b(Fernandes JC 等，Biorheology，2002，39：237-246) 的作用，并评价了涉及炎症状态的表现的两种标记 (陪伴蛋白 GRP78 和超氧化物歧化酶 (SOD-2)) 的调节。

[0041] 软骨素和硫酸软骨素之间的比较研究已证明，虽然软骨素不是天然存在于身体中的分子，但它能够体外激活细胞系统 (如软骨细胞)，这是与针对硫酸软骨素提出的那些类型相同但显著更强有力的信号发放作用。实验结果证明 ：a) 软骨素处理以显著好于硫酸软骨素的程度正调节 GRP78 的表达 ；b) 软骨素预处理有效减少 IL-1β 诱导的 SOD-2 上调过程 (强氧化应激的症状)，而硫酸软骨素预处理无效。

[0042] 软骨素因此是用于治疗其中炎症成分是障碍的结果或病因的障碍的药物，如 OA 和类风湿性关节炎的情况。

[0043] 抗菌活性

[0044] 最近证明，在 OA 患者中，施用抗生素曲莫沙唑 (trimoxazole) 来治疗伴随的尿道感染还具有显著减轻 OA 症状的作用。此发现导致硫酸软骨素在治疗 OA 中的作用也可以至少以某种程度与可能的抗微生物活性相关的假说。此假说为两项研究 (Rozin AP，Clin. Rheumatol.，2009 年 10 月 28 日 (10)：1221-3 ；Sprecher H. 等 ，Clin. Exp. Rheumatol.，2008，26(3)：509-510) 所证实，这两项研究证明包含硫酸软骨素的产品对大肠杆菌的抗菌活性。

[0045] 软骨素和硫酸软骨素之间的比较研究证明，虽然软骨素以多种修饰形式 (例如 fructosylated) 存在于一些微生物的荚膜中，但它能够抑制致病肠细菌的生长。尤其是，已证明了对大肠杆菌和粪肠球菌 (Enterococcus faecalis) 的显著作用。

[0046] 此活性有助于软骨素在多种适应症中的功效，如 ：a) 创伤愈合，因为除促进创伤愈合外，软骨素的存在阻止了所暴露的组织感染的风险 ；b)OA，因为改变的肠 / 粪便区系对该障碍的进程具有不利作用，如文献中所证明 ；抗菌活性因此作为辅助因素发挥作用来防止障碍恶化 ；c) 间质性膀胱炎，因为其中流体停滞的区域可以构成细菌浸润和感染的优先区域。

[0047] 刺激创伤修复

[0048] 由于其与细胞系统的多种相互作用，软骨素具有加速组织修复过程的显著能力。在广泛认可的实验模型微型猪上评价了局部应用的软骨素或硫酸软骨素加速愈合过程的能力。在动物背部手术产生创伤，并通过每天两次将化合物的水溶液缓慢滴入创伤，用纱布敷料擦拭，然后用该纱布敷料覆盖创伤来进行处理。研究持续 6 周。

[0049] 创伤愈合的皮肤学评价证明，愈合过程的质量在软骨素的存在下比硫酸软骨素好，因为前者更快，且表征为创伤边缘和周围组织的质量上更好的外观。

[0050] 在软骨素处理的情况下，组织病理学评价显示比硫酸软骨素处理中更低的肉芽组织含量，及比硫酸软骨素处理中轻微得多的炎症症状。

[0051] 组织学评价证明，在软骨素处理的情况下，胶原纤维的组织类似于正常组织的组织，表明晚期创伤愈合过程。

[0052] 治疗关节障碍

[0053] 软骨素在细胞水平的再生能力、该多糖的流变学特性及其对软骨细胞类型的特异

性作用形成此化合物在治疗关节病中的用途的基础。在犬实验模型（其中与变性关节病(DJD)相关的变性或炎性矫形问题在幼龄和老龄时都尤其多发）上进行的软骨素在治疗关节病中的治疗潜能的评价证明，按15mg/Kg/天的剂量口服施用软骨素6个月比硫酸软骨素更有效，且显著改善临床表现，具有良好的疾病消退。

[0054] 皮肤生物复活

[0055] 利用皮内微量注射透明质酸溶液的皮肤生物复活是最常见的美容处理之一。原理是，此多糖引入真皮引出由多种细胞信号发放活动介导的复杂生物学反应，这些生物学反应导致代谢组织再活化。已发现，皮内微量注射软骨素具有优于透明质酸的那些的生物复活作用。按两周的间隔微量注射2mL浓度为20或60mg/mL的软骨素6个月。另一组个体用2mL 20mg/mL的透明质酸类似地处理。在研究开始和结束时进行经皮水分流失(TEWL)、组织一致性和皮肤糙度的仪器测量。医生和患者也独立地随时间推移评价总体外观。此研究证明，在与透明质酸相同的浓度(20mg/mL)下，软骨素具有更早和持续时间更长的生物复活作用，而在更高浓度(60mg/mL)下，软骨素的生物复活作用大得多，达到如来自第二种处理的优良结果。

[0056] 加强抗肿瘤药物的活性

[0057] 软骨素强烈加强两种用于膀胱内治疗非肌肉膀胱肿瘤的抗肿瘤药吉西他滨(GEM)和丝裂霉素-C(MMC)的凋亡作用。在人膀胱癌细胞系HT-1376上进行的体外研究中，评价了GEM或MCC与软骨素或硫酸软骨素的不同组合抑制生长的能力和凋亡/坏死作用。此研究证明：a)抗肿瘤药和软骨素或硫酸软骨素的组合对抑制肿瘤细胞生长具有强烈的作用；b)协同条件取决于所使用的抗肿瘤药而不同；c)多糖-GEM协同作用主要导致细胞经历凋亡，而MMC多糖协同作用导致细胞经历坏死；d)软骨素的协同作用显著高于硫酸软骨素的协同作用；e)软骨素与GEM或MMC的协同结合可代表表面膀胱肿瘤领域有前景的治疗途径。

[0058] 粘弹性补充疗法和软骨修复

[0059] 由于其在刺激软骨细胞并随时间推移维持其细胞类型中的作用的特异性，软骨素是粘弹性补充疗法和修复损伤的软骨组织的有效物质。通过将透明质酸和软骨素的组合在治疗与关节软骨成分的损伤关联的关节病中的功效与仅基于透明质酸的常规治疗的功效相比较，验证了软骨素的此治疗用途的有效性。在患有伴随软骨成分损伤、明显的持续炎症症状、肿胀和疼痛的膝关节严重受损的志愿者上进行的研究证明，软骨素的存在导致优良的关节恢复水平，伴随软骨成分的修复和疼痛症状的病理学表现随时间推移的全面改善。但是，在仅使用透明质酸的常规粘弹性补充疗法治疗中未观察到这类良好的结果。

[0060] 治疗间质性膀胱炎

[0061] 已知透明质酸和硫酸软骨素在治疗间质性膀胱炎中的用途(D.Porru等，Urol.Int.1997,59:26-29；Curtis等，BUJI,2008,103:56-60；M.Cervigni,Int.Urogynecol.,2008,19:943-947；D.Porru等，Reviews on Recent Clinical Trials,2008,3:00-00；DE 102006060953)。鉴于软骨素与这些多糖的结构相似性及细胞和组织刺激作用，进行了透明质酸和软骨素或硫酸软骨素的组合在治疗间质性膀胱炎中的功效的比较研究。

[0062] 将透明质酸和软骨素或透明质酸和硫酸软骨素的溶液滴入插入导管的膀胱来治疗确诊间质性膀胱炎的志愿者。治疗每周重复一次，持续6周，然后每月一次，再持续5个

月。在治疗开始时及研究结束时，进行伴随膀胱扩张的膀胱镜检查来检查上皮组织的状态，并取膀胱壁活检组织来确定验证状态。在研究期间评价尿动力学（尿急感、频率和夜尿症）及刺痛和膀胱疼痛的存在。就尿动力学和残痛而言，治疗前和治疗后进行的膀胱镜检查的比较证明了透明质酸 / 软骨素组合治疗的患者的病理状态的全面、更好的消除，这是通过膀胱壁活检组织的组织学评价（其证明炎症过程的更好的消除）及通过临床数据（其证明病理状态的更彻底、更快的消除）确认的发现。

[0063] 用于眼科制剂

[0064] 由于其生物相容性、创伤愈合作用、水化能力、轻微的抗微生物作用、包含它的水溶液的最适黏度和热灭菌而无流变学改变的可能性，软骨素可以与其他活性成分组合用于制备眼科制剂，如滴眼液和眼膏。以软骨素作为流变学治疗成分制备的滴眼液的改善的特征是 :a) 制剂中无黏着性的最适黏度 ;b) 滴眼液在角膜的所有部分中均一、更均匀的分布 ;c) 泪液膜更好的稳定性 ;d) 更好地粘附于角膜 - 结膜细胞 ;e) 对角膜表面的上皮再形成、抗炎和消毒作用 ;f) 表面张力的正常化 ;g) 在角膜中更长的保留时间 ;h) 一天中进行反复应用来恢复足够泪液条件的可能性。

[0065] 干眼病患者的研究（其比较了基于透明质酸的常规眼科制剂和基于软骨素的眼科制剂这两种眼科制剂，二者都按 3％ w/v 的浓度处于盐溶液中，治疗周期涉及每天 4 次应用持续 30 天）证明，基于软骨素的滴眼液在临床评价和所治疗的患者的主观评价中都显示最好的评价指数。

[0066] 用于腹膜透析

[0067] 其物理化学特性和组织再生能力形成软骨素在腹膜透析领域的新用途的基础。透析液主要由加入其他盐的糖（葡萄糖溶液）组成。存在三种不同浓度 (1.36％、2.27％和 3.86％）:浓度越高，去除的流体的量越大。在较高流体保留的情况下，因此将指示使用高浓度的溶液，而在脱水的情况下，较低浓度的溶液将更适宜。

[0068] 如果处理不能优化，则必须仔细评价向血液透析的转换。

[0069] 腹膜透析相对于血液透析具有许多优势，因为它涉及对饮食和活动的较少限制，对血流动力学具有较少的不利影响，更好地保持残余肾功能，且更易于恢复。但是，近年来在长期腹膜透析的情况下出现了与腹膜功能恶化、透析处理期间水分和代谢废物去除不充分相关的一系列缺点。认为这种腹膜功能恶化与作为腹膜透析液中的渗压剂存在的高浓度葡萄糖相关，高浓度葡萄糖导致蛋白质糖基化和活性氧类别 (ROS) 形成的过程。虽然提出了问题的局部性和许多制剂创新，但尚未发展出令人满意地最小化与长期腹膜透析相关的腹膜功能损伤的策略 (US 2010286085、WO9801141、US 5955450、US 55978051、WO 9314796、JP 1151462)。

[0070] 已发现，由于此多糖促进腹膜间皮再生、防止纤维化过程的能力，软骨素在腹膜透析制剂中作为具有保护作用的渗压剂的用途代表了最小化上述问题的良好解决方案。

[0071] 治疗呼吸系统障碍

[0072] 由于其流变学和生物学特性，如保持水分、促进组织水化的能力、其成膜作用和粘附于黏膜的能力、其生物刺激细胞和组织的能力及其抗炎和抗菌作用，软骨素可以用来治疗具有不同病因学的口咽和肺部器官的障碍，如口炎、扁桃体炎、喉炎、咳嗽和支气管炎。对于这些用途，软骨素可以以不同的药物形式（如糖浆剂、片剂、口腔可溶性粉剂和喷雾剂）

与光滑剂和粘液溶解剂组合配制。

[0073] 软骨素作为营养制品和药用化妆品

[0074] 鉴于上文报道的生物学活性（特别是抗炎和抗菌活性）及其完全无毒性，软骨素可能与其他化合物一起用于营养制品和药用化妆品的制剂，该药用化妆品尤其用于细胞和组织的生物复活。

[0075] 组织生长支架

[0076] 软骨素可以在再生医学领域中用作用于构建用于细胞系统的 3D 生长的支架的结构元件。

[0077] 以下实施例更详细地描述本发明。

[0078] 实施例 1- 角质形成细胞生长的激活

[0079] 用 HaCat 细胞（人角质形成细胞的永生化细胞系）作为模型系统。在细胞培养箱 (37℃，含 5％ CO_2 的湿空气）中在含有 10％胎牛血清 (FBS)+1％青霉素 - 链霉素溶液（含 10,000 单位青霉素 -G/mL 和 10mg 链霉素 /mL 的盐溶液）的 Dulbecco’s Modified Eagle Medium(DMEM) 中培养和扩增 HaCat 细胞。通过缩时光学显微术进行创伤愈合实验，缩时光学显微术是允许就黏附、增殖和移动的长时间 (2-4 天）监测细胞行为的技术。系统由倒置光学显微镜 (Zeiss Axiovert 200)、恒温槽 (LAUDA Ecoline)、具有这样的几何形状以容纳不同尺寸的平板（从 6 孔至 96 孔）的 CO_2 微型孵箱和输出气体（空气和 CO_2）的控制单元组成。仪器还配有数字视频摄录机和控制马达，该马达允许孵箱沿着 x、y 和 z 方向移动，以便按预设间隔记录和获取操作人员选择的图像。

[0080] 这样组装的系统允许将细胞维持在重现细胞生长的最适条件（具有含 5％ v/v CO_2 的湿空气和 37±0.1℃的温度的环境）的环境中，并在整个实验中监测。系统还配有允许精确分析图像的软件。具体而言，仪器配有自动化软件，该软件允许在创伤愈合测试中计算创伤修复，并提供关于修复速率和细胞迁移速率的数据，修复速率和细胞迁移速率是用于在体外评价可以加速或抑制创伤修复的物质的生物复活作用的重要参数。

[0081] 用于创伤愈合测试的标准方法如下 ：a) 向 12 孔多孔板的每个孔中加入 100μL 胶原在 CH_3COOH 中的 0.1mg/mL 的溶液，以增加细胞 - 基底黏附和改善细胞迁移的方向性，在层流操作台下保持平板打开，直至酸完全蒸发 ；b) 用 DMEM 2％ FBS 作为培养基，向孔中加入终浓度在 0.1 和 1％ w/v 之间的软骨素或硫酸软骨素或透明质酸，后者用作比较系统 ；12 个孔中作为对照的两个孔的培养基不加入任何东西 ；c) 将部分 HaCat 细胞悬液 ($1.8*10^5$) 接种至各孔，以在 2 天的孵育 (37℃、含 5％ CO_2 的湿空气）后获得完全汇合 ；d) 用无菌吸头在存在于各孔中的汇合层中产生约 1mm 长的切口（创伤）；e) 将 12 孔多孔板放置在缩时视像显微术工作站的孵育台中 ；f) 实验仅在环境条件适于体外维持细胞且适于良好地展示图像时 (37℃ ±0.1，5％ CO_2，无冷凝液）开始 ；g) 每个孔选择切口的 4-5 个视野，然后开始平均持续 72-96 小时的实验 ；h) 在此期间，仪器以 1 小时的时间间隔监测由所选择的所有视野代表的多种切口的封闭 ；i) 创伤愈合测试后，通过软件对创伤修复进行定性和定量分析，该软件针对所选择的每个视野自动测量切口面积随时间的变化 ；1) 以图像形式（其允定性观察创伤修复）和作为修复百分比 [（时间 0 的面积 - 时间 t 的面积 ÷ 时间 0 的面积)*100] 以数值形式报道随时间变化的结果。

[0082] 结果证明，软骨素在 0.1w/v 的浓度下已经加速了修复过程，而硫酸软骨素减慢修

复过程。在1％ w/v 下更清楚地确认了此发现。创伤修复的定性和定量分析显示，在软骨素的存在下，创伤在不到20小时内修复，而对照在40小时后才封闭，在硫酸软骨素的情况下，创伤即使在70小时后也未完全愈合。

[0083] 实施例2- 软骨细胞增殖测试

[0084] 用分离自鼻成形术期间获得的健康人软骨样品的人软骨细胞原代培养物作为模型系统。将刚在手术室中取出的组织片段浸没在0.9％ w/w NaCl 盐溶液中，并快速转移至实验室进行软骨细胞的提取。在层流操作台下在无菌条件下操作，将组织样品转移至培养皿，用无菌镊子和解剖刀在培养皿中将它切为小片。然后将软骨片浸没在含有1型胶原酶(3mg/mL)、分散酶(4mg/mL)和庆大霉素(5μL/mL 的80mg/mL 溶液)的0.01M 磷酸盐缓冲液pH 7.4(PBS)中，以确保酶促消化期间无菌。将小片在Falcon 管中37℃搅拌孵育过夜。16-18小时后，将溶液滤过70μm滤膜，将黏附于Falcon管的部分转移至滤膜上，并用7-8mL DMEM 10％FBS洗涤。1,500转/分钟离心滤液7分钟，取出上清，将沉淀悬浮在10mL 含有两性霉素(5μL/mL 的80mg/mL 溶液)和庆大霉素(5μL/mL 的80mg/mL 溶液)的DMEM 10％FBS 中。将这样获得的细胞悬液接种在25cm^2瓶中，并在37℃、5％ CO_2环境下孵育，每2或3天更换培养基，直至细胞培养物完全汇合。将具有软骨细胞特征性外观(具有略微延长的形状的小的膨胀细胞)的细胞从瓶底脱附，计数，并再次在新鲜培养基中孵育。以0.4g 软骨起始，通常在第二生长期获得约$2*10^6$细胞。培养物之前已经历的生长周期数的了解对原代细胞至关重要；尤其是在软骨细胞的情况下，观察到细胞分化过程，其中随着生长期行进，细胞越来越呈现形态上类似于成纤维细胞的外观。为此，用处于第2至第4生长期的原代软骨细胞培养物进行整个研究。

[0085] 用实施例1中所述的缩时视像显微术评价软骨素对软骨细胞增殖的影响。用未刺激的软骨细胞作为对照系统，与用硫酸软骨素刺激的软骨细胞进行了比较研究。24孔多孔板的每个孔接种$20*10^3$细胞。按DMEM 10％FBS 中1％ w/v 的浓度用内毒素含量≤0.1EU/mg 的软骨素或硫酸软骨素处理细胞；在对照中，将细胞接种在DMEM 10％FBS 中。实验一式三份地进行，并分析96和120小时之间的总时间。用Image Pro-plus 5.1分析软件进行的图像分析允许在操作人员预设的时间以手动计数获得细胞的精确数目，以随时间推移构建生长曲线。数据分析显示(表2)，用软骨素处理的细胞的生长好于未处理的细胞和用硫酸软骨素处理的细胞的生长。

[0086]

时间	细胞数 x 10^4		
(小时)	对照	硫酸软骨素	软骨素
0	7.0±0.8	7.0±0.5	7.0±0.7
20	10.0±1.1	10.0±1.2	10.2±0.9
40	15.1±1.6	14.0±1.8	15.3±1.3
60	18.8±1.4	18.0±1.6	22.0±1.8
80	22.5±1.9	21.8±1.7	27.0±2.0
100	27.0±2.3	25.0±2.5	32.0±2.1

[0087] 表 2- 软骨细胞的数目作为时间的函数，在 1％ w/v 软骨素或硫酸软骨素的存在下孵育。

[0088] 实施例 3- 用在软骨素或硫酸软骨素的存在下培养的人软骨细胞上的免疫组织化学测试进行的表型分析

[0089] 使用 Envision+(DaKo) 试剂盒（该试剂盒使用 II 型胶原的抗体，认为 II 型胶原是软骨细胞分化的特异性标记 (Stokes 等，Biochem. J.，2001，360:461-470))，用免疫组织化学测试进行了提取自人软骨组织样品的新鲜细胞及在含有软骨素或硫酸软骨素的培养基中生长 4、7 和 10 天后的细胞的软骨细胞表型的评价。处理 4 天后，多种细胞（未处理的细胞、用软骨素处理的细胞和用硫酸软骨素处理的细胞）全都显示 II 型胶原强阳性，但此状态仅在用软骨素处理的细胞中维持更长时间 (7 和 10 天)。

[0090] 实施例 4- 通过实时 PCR 分析在软骨素或硫酸软骨素的存在下培养的人软骨细胞中主要的分化特异性标记的基因表达

[0091] 为了评价软骨素对人软骨细胞培养物的生物学作用，测定了认为对确定表型关键的一组基因和适合用于评价所产生的组织的质量的标记的表达。在实施例 2 中报道的从人软骨制备的软骨细胞上进行研究，在软骨素或硫酸软骨素的存在下培养细胞。使用标准方法，在 24 孔多孔板中每孔接种 $5*10^4$ 细胞。在含有 1％ w/v 软骨素或硫酸软骨素（内毒素含量≤ 0.1EU/mg) 的 DMEM 中培养软骨细胞。刺激细胞 4、7 和 10 天 (Ishak 等，International J.of Pediatric Otorhinolaryngology，2011，75:835-840)，然后按试剂盒手册 (Life Technologies Ltd，Milan，Italy) 中所述用 Trizol 试剂提取 RNA。通过在光学显微镜下观察第 4、7 和 10 天的相应样品，还在与 RNA 提取平行的多种时间进行了细胞培养物的定性形态学分析。在显微镜下观察了在三个不同时间接种的细胞，并用缩时视像显微术工作站获取了最能代表细胞生长状态的图像。RNA 提取后，用总计 1μg RNA 进行反转录，然后通过实时 PCR 扩增软骨细胞的特异性标记基因（表 3)

[0092]

基因	寡序列	退火温度(℃)
β-肌动蛋白	正向:5'gCgAgAAgATgA CCC AgA TC 3' 反向:5'ggATAgCACAgCCTggATAg 3'	55
聚集蛋白聚糖	正向:5' TCgAggACAgCgAggCC 3' 反向:5' TCgAgggTgTAgCgTgTAgAg 3'	56
I 型胶原	正向:5'CAgCCgCTTCACCTACAgC 3' 反向:5'TTTgTATTCAATCACTgTCTTgCC 3'	56
II 型胶原	正向:5'CAACACTgCCAACgTCCAgAT 3' 反向:5'CTgCTTCgTCCAgATAggCAA 3'	57
Sox9	正向:5'AgACCTTTgggATgCCTTAT 3' 反向:5' TAgCCTCCCTCACTCCAAgA 3'	55

[0093] 表 3- 用于硫酸化和非硫酸化软骨素刺激的人软骨细胞中主要的分化特异性标记的表达的实时 PCR 研究的寡序列。

[0094] 作为软骨细胞分化和表征的特异性标记分析了与基质产生关联的基因,如聚集蛋白聚糖、I 型胶原、II 型胶原和 Sox9 基因,Sox9 基因的表达与 II 型胶原的表达密切相关。(Akiyama H.,Mod Rheumatol.,2008,18(3):213-9 ;Yang 等,J.of Orthopaedic Res.2011)

[0095] 在处于第二和第三生长期的细胞培养物上,分析了该标记在培养于基础培养基(对照)中及具有软骨素处理 (C) 或硫酸软骨素处理 (CS) 的人软骨细胞上的基因表达。

[0096] 表 4 显示 4、7 和 10 天后与对照和持家基因相比的基因表达水平的值,持家基因允许标准化表达(Δ Δct 法)(Pfaffl MW.,Nucleic Acids Res.,2001,May 1 ;29(9):e45)。基因表达分析的结果报道为在 C 或 CS 的存在下在 2 和 3 生长期的细胞上进行的至少 3 次独立测试实验的平均值。

[0097] 在生长期 2 中,对于用 C 处理的细胞,聚集蛋白聚糖表达在接种 4 天后低于对照,而同时,对于用 CS 处理的细胞,该基因的表达平均略高。所观察到的差异在用 CS 处理的样品和对照之间不显著,但在用 CS 处理的样品和用 C 处理的样品之间显著。短期表达数据与 C 存在下软骨细胞增殖增加的发现一致,这可以解释聚集蛋白聚糖的表达的延迟,因此可以解释聚集蛋白聚糖的合成的延迟。7 天后,与对照相比,在用 C 处理的样品中观察到聚集蛋白聚糖表达的显著增加 (1.66±0.22),而用 CS 处理的样品略微下调。后者持续进行,在孵育 10 天后变得显著,而同时,用 C 处理的细胞的聚集蛋白聚糖表达值类似于对照的表达值。

[0098] 处理和未处理的样品的缩时实验中的观察显示表型随着培养的行进(及在后续阶段中)向成纤维细胞类型改变,通过特异性标记 I 型胶原确认了明显的形态学改变。如表 4 中所示,孵育 4 天后,两种处理 (C 和 CS) 都导致 I 型胶原的表达的不显著增加 ;但是,7 天后,与用 C 处理的细胞不同,对于用 CS 处理的细胞,增加变得显著,用 C 处理的细胞实际上在长孵育时间后显示统计上显著的 30%的减少。形态学分析和 I 型胶原的表达的评价都确认,软骨细胞表型在 C 的存在下比在 CS 的存在下保持得好 (Chiu L.H. 等,J.Cell.Physiol.,2011,226:1981-1988)。

[0099] 还分析了 Sox9 和 II 型胶原 ;认为后者尤其是在免疫组织化学分型中是软骨细胞类型最显著的特异性标记之一。分析了 Sox-9 基因的表达,因为最近将 Sox-9 分类为正调 II 型胶原的合成的转录因子,且对软骨发生至关重要 (Yang 等,Journal of Orthopaedic Research,2011 年 8 月)。

[0100] 孵育 4 天后，与对照相比，针对两种处理 (C 和 CS) 观察到了与 Sox9 的上调相关的相似的行为。随着时间推移 (7 和 10 天)，与对照相比，软骨素帮助维持高水平的表达，但显著性比短时间时低，而 CS 在 10 天后显示下调。

[0101] 最后，对于用 C 处理，主要软骨细胞标记 II 型胶原在所分析的所有培养时间都强烈上调，且对于用 CS 处理的细胞，在短时间后显示显著增加，随着孵育时间的增加而下降，基本回到对照值。

[0102] 比较分析的一系列基因证明，用 C 处理允许更长时间维持表型，可能以与胞外基质合成阶段之前的增值阶段关联的方式调节聚集蛋白聚糖的产生 (Ishak M.F. 等，Journal of Pediatric Otorhinolaryngology, 2011, 75:835-840)。接种后几天 (4 天) 的第三生长期的软骨细胞在光学显微镜下的分析证明发生了增殖和基质产生。在这些时间，C 存在下的聚集蛋白聚糖基因表达仍然低，但随后在 7 天后与对照相比增加，继而细胞密度增加 (Roughley 等，European Cells and Materials, 2006, 11:1-7)。CS 存在下的行为直至孵育 7 天都类似，但 10 天后有明显的下调，该下调与用 C 处理的样品的表达值相比显著。在软骨细胞处于 C 的存在下时，I 型胶原的表达在所有孵育时间都低于对照。含有 CS 的培养基的结果不同；它在 7 天后显示 I 型胶原的表达增加。同时，对于用 CS 处理的样品，在生长的前 4 天内观察到 II 型胶原的下调，然后其在 7 天后转换为与对照相比过量表达 (约两倍)，随后在 10 天后以震荡的趋势进一步下调。接种 4 天后，用 C 处理的样品与对照相比已经显示 II 型胶原的高表达，此调节在 7 和 10 天时持续维持，确认了此分子在更长时间 (包括在连续接种中) 维持软骨细胞表型中的作用。

[0103] 总之，本研究作为整体证明：

[0104] a)C 处理测定所分析的分化和基质基因 (聚集蛋白聚糖、I 型胶原、II 型胶原和 Sox9) 在所考虑的多种分析时间 (4、7 和 10 天) 的表达的变异；

[0105] b) 如果用 C 处理，则第二生长期的软骨细胞显示 II 型胶原的高水平表达，而如果用 CS 处理，则它们显示 I 型胶原的高水平表达，伴随成纤维细胞表型的明显形态学变化；

[0106]

基因	功能	样品	生长期	倍数表达*		
				4g	7g	10g
聚集蛋白聚糖	此基因是聚集蛋白聚糖/多功能蛋白聚糖家族的成员。所编码的蛋白质是软骨组织中胞外基质的不可缺少的部分。	C	II	0.08±0.02	1.66±0.22	1.07±0.15
			III	0.16±0.08	0.79±0.2	2.3±1.0
		CS	II	1.28±0.75	0.72±0.27	0.45±0.19
			III	0.17±0.10	0.87±0.20	0.59±0.13
I 型胶原	编码 I 型胶原的原-α1 链的基因，I 型胶原作为存在于结缔组织中且主要存在于骨、角膜、真皮和肌腱中的胶原原纤维的形式存在。	C	II	1.23±0.29	1.03±0.52	0.67±0.20
			III	0.24±0.01	0.85±0.49	0.59±0.13
		CS	II	1.20±0.56	1.44±0.08	1.36±0.05
			III	0.34±0.01	2.42±0.88	1.09±0.45
II 型胶原	此基因编码 II 型胶原的 α1 链，II 型胶原是存在于软骨中的纤维蛋白质。此基因的突变与软骨发生的缺乏、软骨发育不全和早发性骨关节炎相关。对软骨细胞表型特异。	C	II	2.70±0.32	2.4±0.43	2.56±0.75
			III	1.69±0.20	2.62±0.47	2.3±0.16
		CS	II	2.8±0.75	1.25±0.45	0.58±0.29
			III	0.50±0.01	2.26±0.17	0.8±0.45
Sox9	SOX9 基因编码在发育的第一阶段期间发挥重要作用的蛋白质。尤其在骨骼和软骨的发育中发挥关键作用。在软骨细胞中，SOX9 与 COL2A1 的内含子 6 上的特异性位点相互作用，调节其活性。	C	II	1.87±0.85	1.16±0.15	1.78±0.75
			III	3.68±0.44	1.09±0.01	0.53±0.02
		CS	II	2.2±1.20	0.86±0.31	0.53±0.02
			III	2.6±1.21	1.41±0.04	0.81±0.05

[0107] * 与对照（未处理的软骨细胞）相比的标准化的基因表达水平

[0108] 表 4- 第二和第三生长期的人软骨细胞中的标记基因聚集蛋白聚糖、I 型胶原、Sox 9 和 II 型胶原的表达的评价。数据报道为这些基因在用 1% w/v 软骨素 (C) 或硫酸软骨素 (CS) 处理 4、7 和 10 天后的软骨细胞培养物中的表达水平与相同的基因在由未处理的细胞组成的对照中的表达水平相比的比值。

[0109] c) 第三生长期的细胞显示对 C 或 CS 处理的反应较低，但在 C 的存在下 II 型胶原明显持续表达，证明即使在晚生长期也维持软骨细胞表型。

[0110] 实施例 5- 软骨素的抗炎作用的分子原理

[0111] 本研究的目的是评价软骨素或硫酸软骨素对用促炎细胞因子 IL-1β 处理后的人软骨细胞中 GRP78 和 SOD-2 的基因表达的影响。

[0112] 本研究中使用 IL-1β（在 OA 起始的潜在生物学机制的激活中作为介质发挥作用的促炎细胞因子）处理的提取自鼻软骨的人软骨细胞。具体而言，评价了涉及炎症状态的表现的两种标记（陪伴蛋白 GRP78 和超氧化物歧化酶 (SOD-2)）的调节。

[0113] 在标准实验中，在 24 孔多孔板的每个孔中接种 10^4 细胞，5 天后，在达到汇合时，使细胞饥饿 24 小时（在含 0.5% FBS 的 DMEM 中孵育）。然后用不含 FBS 的 DMEM 中的 1% w/v 软骨素 (C) 或硫酸软骨素 (CS)（内毒素含量≤ 0.1EU/mg）处理细胞 2 小时；对照维持在相同的条件下，但不加入 C 或 CS。然后向培养物中加入浓度为 10ng/mL 的 IL-1β。孵育 24 小时后，回收细胞，并按试剂盒手册 (Life Technologies Ltd, Milan Italy) 中所述用 Trizol 试剂从它们提取 RNA。

[0114] 然后用总计 1μg RNA 进行反转录，通过 Calamia V 等，(Calamia V 等，Arthritis Res. Ther. 2010, 12(4):R138) 中报道的实时 PCR 扩增参考基因 (GRP78 和 SOD-2)。

[0115] 表 5 显示与所选择的两个标记基因的表达相关的 RT-PCR 分析的结果，与由未用 C、

CS 或 IL-1β 处理的软骨细胞组成的阴性对照和由仅用 IL-1β 处理的软骨细胞组成的阳性对照比较。在仅用 IL-1β 处理（阳性对照）中，GRP78 的表达提高两倍，在用 CS+IL-1β 处理中与阴性对照相比提高约 3 倍，在用 C+IL-1β 处理中提高约十倍。虽然此基因是活性炎症机制的症状，但已证明，它所编码的蛋白质定位于内质网中，是类风湿性关节炎（具有自身免疫内涵的障碍）的自身抗原，负责细胞因子合成的单核细胞刺激，从而调节身体的抗炎反应。

[0116] 关于 SOD-2 的表达（表 5），结果证明，在 IL-1β+CS 和 IL-1 的情况下，基因表达基本等同，但在 IL-1β+C 的情况下显著减少。

[0117] 与组成性微管蛋白基因相比较，通过 GRP78 蛋白质条带和 SOD2 的光密度测定分析，通过在 Western 印迹中获得的蛋白质表达数据确认了基因表达值（表 6）。

[0118]

基因	对照	IL-1β	IL-1β+CS	IL-1β+C
GRP78	1	2.0±0.5	2.8±0.2*	10±2,1§
SOD-2	1	22±4	24±3	8±1.1§

[0119] 表 5. 与取值为 1 的未处理细胞（阴性对照）相比，用 IL-1β、IL-1β 硫酸软骨素 (IL-1β CS) 和 IL-1β + 软骨素 (IL-1β+C) 处理后人软骨细胞中 GRP78 和 SOD 2 的基因表达的变异。通过实时 PCR 分析测定基因表达 (n = 3，*p<0.05IL-1β+CS 对阳性对照，§p<0.01IL-1β+C 对 IL-1β+CS 和阳性对照）。

[0120]

蛋白质	对照	IL-1β	IL-1β+CS	IL-1β+C
GRP78	1	1.15±0.15	1.18±0.10	1.71±0.31*
SOD-2	1	1.96±0.20	1.94±0.30	1.42±0.22*

[0121] 表 6. 用 IL-1β、IL-1β + 硫酸软骨素 (IL-1β+CS) 和 IL-1β + 软骨素 (IL-1β+C) 处理后人软骨细胞中 GRP78 和 SOD 2 的蛋白质表达值，获自 Western 印迹的光密度测定分析，在 n = 3 次独立实验上进行的分析，*p（印迹与组成性表达的微管蛋白比较）(*p<0.05IL-1β+C 对 IL-1β+CS 和阳性对照）。

[0122] 简言之，实验结果证明：a) C 预处理以显著好于 CS 预处理的程度正调节 IL-1β 诱导的 GRP78 的表达；b) 软骨素预处理有效减少 IL-1β 诱导的 SOD-2 上调过程（强氧化应激的症状），而硫酸软骨素预处理无效。

[0123] 实施例 6- 软骨素作为抗菌药

[0124] 检查了软骨素 (C) 和硫酸软骨素 (CS) 对在固体培养基上体外生长的大肠杆菌 ATCC 25922 和粪肠球菌 ATCC 19433 的抗菌活性。所探究的浓度是在培养基中的终浓度在 40μg/mL 至 40mg/mL C 或 CS 的范围内。用脑心浸出液 (Oxoid) 作为大肠杆菌 ATCC 25922 的培养基，M17(Oxoid) 作为粪肠球菌 ATCC 19433 的培养基；两种培养基都调节至相同的 pH 和相同的重量摩尔渗透压浓度，然后通过加入琼脂并冷却来固化。作为接种物接种 100μL

含有 10^2、10^3 或 10^4 细菌 /mL 的细菌悬液。在摇床中在 37℃空气中孵育所接种的平板 16 小时。然后计数缺乏所研究的物质的对照平板上及多种浓度的 C 和 CS 的平板上的菌落数。来自两种微生物的实验（每种条件一式三份地进行）的数据显示在表 7 和 8 中。

[0125] 结果证明，C 的作用在所有浓度下都高于 CS 的作用，但尤其出现了前者的强功效，在加入 40mg/mL C 时达到大肠杆菌生长的完全抑制，及在高 10 倍的浓度下已经很高的抑制内，高于敏感性阈值。

[0126]

浓度	接种的细菌数			16 小时后的 CFU			抑制因子	抑制的定性评价
对照	10	100	1000	8±2	90±8	870±100	-	
40 μg/mL CS	10	100	1000	7±2	85±7	860±70	1	不显著
400 μg/mL CS	10	100	1000	5±1	50±5	400±70	2	轻微
4 mg/mL CS	10	100	1000	0	9±2	100±10	10	显著
40 mg/mL CS	10	100	1000	0	0	3±1	330	高
40 μg/mL C	10	100	1000	7±2	80±5	800±70	1.3	轻微
400 μg/mL C	10	100	1000	2±1	10±2	120±30	9	显著
4 mg/mL C	10	100	1000	0	1±1	20±4	66	高
40 mg/mL C	10	100	1000	0	0	0	1000	完全

[0127] 表 7-CS 和 C 存在下平板上的大肠杆菌菌株 ATCC 25922 的细胞生长的抑制。

[0128]

浓度	接种的细菌数			36 小时后的 CFU			抑制因子	抑制的定性评价
对照	10	100	1000	9±2	95±8	950±100	-	
40 μg/mL CS	10	100	1000	8±2	90±7	960±70	-	不显著
400 μg/mL CS	10	100	1000	7±1	80±5	780±70	1.3	轻微
4 mg/mL CS	10	100	1000	5±1	48±4	520±30	2	显著
40 mg/mL CS	10	100	1000	0	15±2	120±10	7.4	高
40 μg/mL C	10	100	1000	8±2	82±5	870±70	1.2	轻微
400 μg/mL C	10	100	1000	5±1	55±6	480±30	2	显著
4 mg/mL C	10	100	1000	0	18±4	150±4	6.1	显著
40 mg/mL C	10	100	1000	0	0	20±2	50	高

[0129] 表 8-CS 和 C 存在下平板上的粪肠球菌菌株 ATCC 19433 的细胞生长的抑制。

[0130] 证明肠球菌属 (Enterococcus) 菌株通常敏感性低；但是，在最大浓度的测试物质存在下，它显示 CS 的抑制因子为 7.4，C 的抑制因子为 50。这些结果证明 C 作为抗菌药的功效。

[0131] 实施例 7- 软骨素的毒性研究

[0132] 急性毒性研究 - 在对其口服 (p.o.) 或静脉内 (i.v.) 施用软骨素的两种动物模型（小鼠和大鼠）上进行本研究。对于每个实验，将动物（小鼠或 Sprague Dawley 大鼠）分入 20 只动物 (10 只雄性和 10 只雌性) 的 5 个组，动物按 250 至 2,000mg/Kg（对于口服施用）和 20 至 160mg/Kg（对于静脉内施用）的剂量接受 p.o. 或 i.v. 软骨素；施用体积为 10mL/Kg（对于 p.o. 施用）和 5mL/Kg（对于 i.v. 施用）。表 9 显示研究设计。

[0133]

动物数	剂量 (mg/Kg)	剂量 (mg/动物)		用于 20 只动物的总软骨素 (mg)	
		小鼠	大鼠	小鼠	大鼠
20	0	0,0	0	0	0
20	20	0,6	4	12	80
20	40	1,2	8	24	160
20	80	2,4	16	48	320
20	160	4,8	32	96	640
总计				180	1.200

[0134] 表 9- 用于评价以单个口服或静脉内剂量对小鼠和大鼠施用的软骨素的急性毒性的研究设计。

[0135] 处理期间，每 24 小时检查动物，持续 40 天，未观察到毒性迹象或死亡。在处理结束时，对动物实施安乐死，并进行彻底的尸体剖检。两类动物的 LD_{50} 值都超过 2,000mg/Kg（对于 p.o. 施用）和 160mg/Kg（对于 i.v. 施用）。总的来说，本研究证明软骨素在急性施用条件下使用的剂量下无毒性。

[0136] 亚急性毒性研究 - 通过口服 (p.o.) 和肌内 (i.m.) 施用软骨素来在大鼠上进行本研究。对于两个研究中的每一个，将动物 (Sprague Dawley 大鼠）分入 4 个由 15 只雄性和 15 只雌性形成的组；对前 3 组施用浓度分别为 50、100 和 200mg/Kg 的软骨素，对第四组仅施用载体；施用体积为 10mL/Kg（对于 p.o. 施用）和 5mL/Kg（对于 i.m. 施用）。每日施用持续 30 天。所用剂量是人治疗剂量的至多 20 倍。每天监测所处理的动物的一般健康状态和行为，每 5 天评价体重变化、血液学状态和尿。整个处理期中未发生死亡，且动物未显示任何显著的行为改变或异常的体重变化。类似地，与对照动物相比，化学临床参数未显示任何统计上显著的变化。在研究结束时，对所有动物实施安乐死，并进行尸体剖检和主要器官（肺、心脏、肝、卵巢、子宫、睾丸、肾和垂体腺）的组织病理学分析。这些评价没有一项显示用软骨素处理的动物和仅接受载体的对照动物之间的任何显著差异。总的来说，本研究证明软骨素在亚急性施用条件下使用的剂量下无毒性。

[0137] 慢性毒性研究 - 本研究在每天按 50 至 200mg/Kg 的剂量用 p.o. 施用（通过管饲法）的软骨素处理 26 周的大鼠 (Sprague Dawley) 上进行。每天监测所处理的动物的一般健康状态和行为，每 7 天评价体重变化、血液学状态和尿。整个处理期中未发生死亡，且动物未显示任何显著的行为改变或异常的体重变化。类似地，与对照动物相比，化学临床参数未显示任何统计上显著的变化。在研究结束时，对所有动物实施安乐死，并进行尸体剖检和主要器官（肺、心脏、肝、卵巢、子宫、睾丸、肾、垂体腺、淋巴结和胃肠道）的组织病理学分析。这些评价没有一项显示用软骨素处理的动物和仅接受载体的对照动物之间的任何显著差异。总的来说，本研究证明软骨素在慢性施用条件下使用的剂量下无毒性。

[0138] 实施例 8- 诱变性和基因毒性研究

[0139] 在不同的体外和体内诱变性和基因毒性模型 (Sirtori C., File **CONDRAL®**, Vol. IV-Reproductive Toxicity and Mutagenesis; Slater E. 等, Rapid detection of mutagens and carcinogens, Cancer Res. 1971, 31:970-973) 上进行了软骨素诱变性研究。

[0140] 体外试验，Ames 试验 - 在有和无代谢激活的情况下在鼠伤寒沙门氏菌的 5 个菌株

上进行试验。按 2.0μg/ 平板和 2.0mg/ 平板之间的浓度测试了软骨素。在不同剂量下和对照中获得的逆向突变的分析未显示各组中组氨酸回复体数目的任何显著差异。本研究证明，软骨素和它可以产生的代谢物不在所测试的鼠伤寒沙门氏菌菌株上诱导特异性点逆向突变。

[0141] 体外试验，染色体畸变试验－在有和无代谢激活的情况下在两个不同实验中在人淋巴细胞上进行了染色体畸变试验。研究设计报道在表 10 中。

[0142]

	无 S9 混合物			有 S9 混合物	
	实验 I		实验 II	实验 I	实验 II
暴露期	4 小时	22 小时	46 小时	4 小时	4 小时
恢复	18 小时	-	-	18 小时	42 小时
准备间隔	22 小时	22 小时	46 小时	22 小时	46 小时

[0143] 表 10- 用于评价软骨素的诱变性的染色体畸变试验的实验设计。

[0144] 在两个实验的每一个中平行分析了两个培养物。按 1997 年 7 月 21 日的 OECD 指导 #473 中所述选择所测试的 1.6 和 5.0μg/mL 之间的软骨素剂量。即使在所测试的最高软骨素浓度下，也未在双独立研究中观察到携带染色体畸变的细胞数目的显著增加。

[0145] 体外试验，DNA 修复试验－用对诱变物质的作用敏感的大肠杆菌菌株进行了 DNA 改变试验。在本研究中，用丝裂霉素 C 作为阳性对照，青霉素 G 作为阴性对照。按 Slater 等 (Slater E. 等 ,Rapid detection of mutagens and carcinogens,Cancer Res.1971,31:970-973,1971) 所述的浓度在有和无代谢激活的情况下测试了软骨素。结果证明，即使在最高剂量下，软骨素也不与 DNA 相互作用，不改变 DNA。

[0146] 体内试验，微核试验－用小鼠作为实验模型，在早期微核试验中按 20 至 80mg/Kg 范围内的剂量施用软骨素，对 5 组 Swiss 小鼠（每组 5 只）腹膜内 (i.p.) 施用。进行间隔 24 小时的两次施用，用三乙醇胺作为阳性对照。第二次施用后 6 小时，对动物实施安乐死，按 RCC-CCR Study 105303,2007 中所述制备骨髓。在每只动物总计 2,000 个红细胞上测定微核细胞的频率。研究中未在处理组和仅接受载体的对照之间观察到任何显著差异。总的来说，数据证明，可以认为软骨素在早期微核试验中无诱变性。

[0147] 实施例 9- 致癌性研究

[0148] 在大鼠上进行的亚慢性和慢性试验（实施例 6）的组织病理学检查证明所有重要器官中完全没有潜在的致癌性变质。尤其是慢性研究，即使在最高剂量下也证明完全没有胃肠道刺激的症状，胃肠道刺激的症状从长远看通常预示可能的肿瘤（如胃肠道癌）的发展。类似地，重要的是要考虑，软骨素的水解分解代谢与硫酸软骨素的水解分解代谢没有不同，所获得的寡糖和糖是天然存在于身体中的化学种类。

[0149] 实施例 10- 生殖系统毒性研究

[0150] 生育和生殖能力研究－在 200 只 Wistar 大鼠 (160 只雌性和 40 只雄性）上进行了软骨素对雄性生育能力和雌性生殖能力可能的影响的毒理学研究，200 只 Wistar 大鼠随机分入四组，每组由 40 只雌性和 10 只雄性组成，用 0、50、100 或 200mg/Kg 的软骨素处理。每组雌性大鼠进一步分为两个 20 只动物的亚组；第一组从交配期开始前第 14 天直至妊娠的第 19 天每天接受产品，第二组接受产品直至出生后第 21 天。所有雄性在交配前 60 天和

雌性的整个妊娠期内用软骨素处理。所使用的流程遵循 EEC 85/571 指令的指导。结果未显示对照和三个处理组之间的任何统计上显著的差异，或每个组内的两个雌性亚组和对照之间的任何统计上显著的差异。出生后在第 21 天安乐死的幼崽的组织病理学分析未显示对照和处理的动物之间的任何差异，证明完全没有畸形。根据这些结果，可以得出结论，即使按 200mg/Kg 的剂量每天口服施用软骨素 60 天对雄性大鼠的生育能力也没有影响；类似地，在交配前 15 天直至泌乳的第 21 天每天施用至多 200mg/Kg 的软骨素对雌性的生殖能力没有影响。

[0151] 胚胎 - 胎儿发育 - 在 50 只怀孕的 5 月龄新西兰大鼠上进行了胎儿毒性研究，大鼠随机分入 12 个个体的 4 个组，从妊娠的第 6 天至第 27 天每天一次按 0、25、50 和 100mg/Kg 的剂量用 i.m. 软骨素处理。在第 28 天，通过剖腹产取出胎儿，并对其进行完整的组织病理学试验。在处理期评价了以下参数：孕鼠体重的增加、黄体和植入的数目、活产胎儿、平均体重、活产胎儿的性别、吸回的数目和死产胎儿的数目。结果未显示处理组和仅接受 i.m. 载体处理的对照组之间任何统计上显著的差异。未在 4 个组的胎儿中观察到外部改变或骨骼器官或内脏的改变。数据的总体评价产生这样的结论，即使在所测试的 100mg/Kg 的最大剂量下，软骨素也未显示致畸活性。

[0152] 出生后发育 - 在从妊娠第 15 天直至泌乳期结束（即产后 21 天）进行口服处理的 48 只雌性 Wistar 大鼠上进行了出生后毒性研究。将动物分为四组，每天接受 0、50、100 或 200mg/Kg 的 p.o. 软骨素。在泌乳期结束时，对所有雌性实施安乐死，评价幼崽的形态学及骨骼和内脏的畸形。随时间推移观察的参数是泌乳雌性的体重及出生的大鼠的数目、性别和体重。结果未显示处理组之间或处理组和对照组之间的任何差异。泌乳期间未观察到幼崽发育的畸形。可以得出结论，在从妊娠第 15 天直至泌乳期结束施用 50、100 和 200mg/Kg/天的口服剂量后，软骨素在大鼠中无致畸作用。

[0153] 实施例 11- 致敏

[0154] 在豚鼠上评价了软骨素的全身和皮肤致敏活性。

[0155] 全身致敏和过敏反应 - 按下文所报道在 6 只豚鼠上进行了软骨素诱发的超致敏的试验。肌内注射 100μL 含 100μg 卵清蛋白 +5mg 软骨素的缓冲至 pH 6.8 的盐溶液来致敏六只动物。致敏动物后 10 天获得血清。用之前致敏的动物的超免疫血清皮内处理另外 24 只豚鼠，豚鼠分为每组 6 只的 4 个组（组 A：阴性对照；组 B：用 0.5mg/mL 软骨素测试；组 C：用 50mg/mL 软骨素测试；组 D：阳性对照）。用超致敏血清皮内注射 3 小时后，按以下 i.v. 处理四个组的动物：组 A：1mL 0.9% NaCl+0.2% 伊文思蓝溶液；组 B：1mL 0.5mg/mL 软骨素 +0.2% 伊文思蓝溶液；组 C：1mL 50mg/mL 软骨素 +0.2% 伊文思蓝溶液；组 D：1mL 0.1mg/mL 卵清蛋白 +0.2% 伊文思蓝溶液。i.v. 注射卵清蛋白抗原和伊文思蓝 24 小时后，组 D 中的所有动物显示伊文思蓝标记在注射超免疫血清的皮肤区域渗出。但是，软骨素未在所处理的任何动物中诱发过敏反应或超敏反应。

[0156] 皮肤致敏 - 按下文所报道在豚鼠上进行了软骨素诱发的皮肤超致敏的试验。皮内注射 0.1mL 含和不含弗氏佐剂的 0.9% NaCl 中的 5.0mg 软骨素来致敏 20 只动物。7 天后通过对致敏动物之前注射的皮肤区域应用 0.5mL 50mg/mL 的软骨素溶液来完成致敏的诱发。将 0.5mL 0.9% NaCl 溶液应用于对照组。21 天后，在腹部左侧用 0.5mL 50% 软骨素溶液和在腹部右侧用 0.5mL 50% NaCl 溶液处理所有动物。未在所处理的动物中观察到皮肤致敏

的迹象。

[0157] 实施例 12- 创伤修复

[0158] 用微型猪（体重 25-28Kg 的动物）（用于创伤修复研究的有效性被广泛认可的模型）作为实验模型来评价软骨素加速损伤的皮肤组织的修复过程的能力。在全身麻醉下从动物的背部操作，刮去毛发，用 10％碘 - 聚乙烯吡咯烷酮复合物溶液然后用异丙醇彻底洗涤刮净的区域。在动物的刮净、消毒的背部产生 12 个 20mm 长和 6mm 宽的椭圆形创伤（每侧六个）。创伤穿透远到皮下脂肪，距背中线约 4cm，创伤的较长侧与脊柱线平行。然后用两条缝线缝合切口，以封闭皮肤平面。7 天后去除表面的缝线。然后用胶布固定的不粘连的敷料覆盖创伤，并用弹性绷带保护动物的身体。选择了 8 只动物并分为每组 4 只的两个组，按表 11 中显示的流程中所述用软骨素（第一组）或硫酸软骨素（第二组）局部处理。从动物的头部开始，两侧的前两个创伤仅用由 2.5mL 盐水组成的载体处理，两侧的中间两个创伤用 2.5mL 软骨素在盐水中的 30mg/mL 溶液（第一组）或用 2.5mL 硫酸软骨素在盐水中的 30mg/mL 溶液（第二组）处理，两侧的后两个创伤用 2.5mL 软骨素在盐水中的 60mg/mL 溶液（第一组）或 2.5mL 硫酸软骨素在盐水中的 60mg/mL 溶液（第二组）处理。通过每天两次将溶液缓慢滴入创伤并用纱布敷料擦拭来进行处理，然后用该纱布敷料覆盖创伤，使得活性成分更长时间保持在原位。研究持续 6 周，然后对动物实施安乐死。4 周后取下约 4mm 的活检组织，同时从安乐死的动物取下 12 个背部创伤的整个区域用于组织学试验。对所处理的动物进行了以下评价：

[0159] a) 由 4 名皮肤病学家进行的 4 和 6 周后的评价，皮肤病学家独立地在 5 分的量表上评估创伤的质量（颜色、纹理、边缘、扭曲）和周围组织的外观；

[0160] b) 由两名兽医在 1 至 3 的量表上对动物安乐死后取下的组织进行的病理学评价，以评价异常组织病理学状况的存在（肉芽组织和炎症反应的量，得分从最佳愈合的 3 分至持续的炎症症状和丰富的肉芽组织的 1 分）；

[0161] c)4 周的活检组织和动物安乐死后取下的组织的组织学分析，由两名组织学家独立地进行，组织学家在 3 分的量表上评价胶原的组织。类似于正常模型但小于正常真皮的胶原纤维组织（最佳愈合）得分为 3，中间排列的纤维编织得分为 2，几条纤维排列在平行束中或平面上得分为 1。

[0162]

组	两侧的前两个创伤用以下 2.5 mL 刺激:	两侧的中间两个创伤用以下 2.5 mL 刺激:	两侧的后两个创伤用以下 2.5 mL 刺激:
1	盐水	30 mg/mL C	60 mg/mL C
2	盐水	30 mg/mL CS	60 mg/mL CS

[0163] 表 11- 评价软骨素和硫酸软骨素在创伤修复中的功效的研究的设计。每组由 4 只动物组成。第一组用软骨素 (C) 处理，第二组用硫酸软骨素 (CS) 处理。

[0164] 表 12 显示创伤质量评价

[0165]

评价	盐水	30 mg/mL		60 mg/mL	
		C	CS	C	CS
a)4 周后的创伤质量评价	2.3±0.1	3.8±0.4	2.6±0.2	4.1±0.3	2.9±0.2
b) 6 周后的创伤质量评价	3.5±0.3	4.5±0.3	3.4±0.3	4.9±0.1	3.7±0.3
c) 6 周后的组织病理学评价	1.7±0.2	2.3±0.1	1.7±0.2	3.0±0.2	2.3±0.2
d) 4 周后的活检组织组织学评价	1.3±0.1	2.3±0.2	1.3±0.1	2.7±0.1	1.3±0.1
e) 6 周后的活检组织组织学评价	1.7±0.2	2.7±0.1	1.7±0.2	3.0±0.2	1.7±0.1

[0166] 表 12- 用软骨素 (C) 和硫酸软骨素 (CS) 处理后创伤的皮肤病学、组织病理学和组织学评价 ;a-b)4 和 6 周后,4 名皮肤病学家独立地在 5 分的量表上评价创伤的质量 (颜色、纹理、边缘、扭曲) 和周围组织的外观,其中 5 代表优质 ;b) 由两名兽医在 1 至 3 的量表上对动物安乐死后取下的组织进行的组织病理学评价,以评价异常组织病理学状况的存在 (肉芽组织和炎症反应的量,其中 3 表示最佳愈合,1 表示持续的炎症症状和丰富的肉芽组织) ;d/e)4 周的活检组织和动物安乐死后取下的组织的组织学分析,由两名组织学家独立地进行,组织学家在 3 分的量表上评价胶原的组织,其中 3 代表类似于正常模型但小于正常真皮的胶原纤维组织 (最佳愈合),2 代表中间排列的纤维编织,1 分代表几条纤维排列在平行束中或平面。

[0167] 创伤愈合的皮肤病学评价证明,软骨素存在下创伤愈合过程的质量好得多,其更快,且表征为创伤边缘和周围组织在质量上更好的外观。

[0168] 在用软骨素处理的情况下,组织病理学评价显示含量更低的肉芽组织和非常有限的炎症症状。

[0169] 组织学评价证明,在用软骨素处理的情况下,胶原纤维的组织非常类似于正常组织的组织,显示非常先进的创伤愈合过程。

[0170] 实施例 13- 软骨素在治疗关节病中的治疗潜能

[0171] 在犬实验模型 (其中与变性关节病 (DJD) 相关的变性或炎性矫形问题在幼龄和老龄时都尤其多发) 中评价了软骨素在治疗关节病中的治疗潜能。

[0172] 在 90 只动物上进行本研究,动物平均体重 30±10Kg,平均年龄约 8 岁,属于不同品种,有雄性和雌性,全都患有肩、髋和 / 或后膝关节的 DJD,随机分为 30 只动物的三个组,用 15mg/Kg/ 天的软骨素 (C 组)、15mg/Kg/ 天的硫酸软骨素 (CS 组) 或 15mg/Kg/ 天的淀粉 (安慰剂组) 处理。动物随它们的食物接受日剂量。对本研究中所包括的所有动物初步进行了 X 射线和 DJD 的一组诊断试验。动物在研究前三周内不接受任何药理学处理,在研究期间不接受除所测试的那些之外的任何处理。研究持续 6 个月 ;处理期间,由独立评价动物状态的三名兽医监测动物 (由其主人照料)。动物的主人和三名兽医每月填写问卷,在 1-5 的量表上为一组参数分配分值。主人每月一次在 1 至 5 的量表上评价动物的跛行、其玩耍的意愿、负荷耐受性和指示疼痛症状的行为。兽医每月一次在 1 至 5 的量表上评价疾病的消退、关节病的类型和程度的表征及动物的疼痛和补偿能力。在研究结束时,通过 X 射线和 DJD 的一组诊断试验来验证疾病的状态。根据问卷和最终的临床评价,三名兽医在 1 至 10 的量表上表述三组动物中疾病消退的平均总体得分,其中从 3 至 1 的值表示临床症状从开始试验起逐渐恶化,从 3 至 10 递增的值表示向完全治愈演进。对照组具有 2.5±1.3 的平均得分,CS 组的平均得分为 5.3±2.3,C 组的平均得分为 8.5±2.1。总的来说,患有 DJD 的

犬的试验表明，按 15mg/Kg 的日剂量用软骨素口服处理 6 个月显著有助于改善临床症状，具有良好的疾病消退。

[0173] 实施例 14- 包括皮内微量注射软骨素的皮肤生物复活处理

[0174] 通过与基于透明质酸的类似处理比较来评价源自软骨素微量注射的皮肤生物复活活性。将 60 名年龄在 50 和 70 岁之间的志愿者招募至试验，并接受美容皮肤生物复活处理，该处理涉及在 6 个月时期内每两周微量注射 2mL 无致热原、无菌的软骨素 (MW 35KDa) 溶液 20mg/mL(C-20) 或 60mg/mL(C-60) 的三个周期，用 2mL 透明质酸 20mg/mL 1,200KDa(HA-20) 的相似的常规处理周期作为阳性参考。志愿者在研究之前的 5 个月内未接受过类似处理或化学去皮处理。在 6 个月的处理期内，招募的所有志愿者使用相同的保湿霜，在上午和晚上应用。在研究开始时及 6 个月后在相同的实验室中进行 TEWL（经皮水分流失）和组织纹理及皮肤表面硅酮复制物的仪器测量来记录皮肤粗糙度。0、2、4 和 6 个月后，进行处理的美容医生和患者独立地填写问卷来在 1 至 5 的量表上评价总体美容状况，其中 1 表示处理无结果，5 表示完全成功。这些评价与仪器数据一起产生所获得的结果的总体评价。表 13 显示所获得的结果的平均值。

[0175]

照	评价											
	患者				医生				仪器			
	月											
	0	2	4	6	0	2	4	6	0	2	4	6
HA-20	1.4±0.1	2.8±0.2	3.5±0.3	4.1±0.3	1.3±0.1	3.0±0.2	4.1±0.1	4.3±0.2	1.6±0.1	3.0±0.2	4.0±0.2	4.1±0.1
C-20	1.2±0.1	3.1±0.1	4.5±0.2	4.5±0.3	1.5±0.2	3.8±0.4	4.5±0.2	4.7±0.1	1.5±0.2	4.1±0.3	4.6±0.4	4.7±0.1
C-60	1.3±0.2	4.0±0.5	4.9±0.1	5.0±0.0	1.2±0.1	4.0±0.2	5.0±0.0	5.0±0.0	1.1±0.1	4.5±0.1	5.0±0.0	5.0±0.0

[0176] 表 13- 将 60 名年龄在 50 和 70 岁之间的志愿者招募至试验，并接受美容皮肤生物复活处理，该处理涉及在 6 个月时期内每两周微量注射 2mL 无致热原、无菌的软骨素 (MW 35KDa) 溶液 20mg/mL(C-20) 或 60mg/mL(C-60) 的三个周期，用 2mL 透明质酸 20mg/mL 1,200KDa(HA-20) 的相似的常规处理周期作为阳性参考。0、2、4 和 6 个月后，进行处理的美容医生和患者独立地填写问卷来在 1 至 5 的量表上评价总体美容状况，其中 1 表示处理无结果，5 表示完全成功。在研究开始时及 6 个月后在相同的实验室中进行 TEWL（经皮水分流失）和组织纹理及皮肤表面硅酮复制物的仪器测量来记录皮肤粗糙度。同样，以皮肤病学家的意见表述评价，该皮肤病学家比较性地评价数据，并在 1 至 5 的量表上对总结果评分。每个数字代表所检查的 10 个案例的平均值。

[0177] 如可见，在与透明质酸相同的浓度下，软骨素具有更早和持续时间更长的生物复活作用 (HA-20 与 C-20 相比)，而在更高浓度 (C-60) 下，生物复活作用大得多，关于医生和患者的评价及仪器结果，达到了如来自第二种处理的优良结果。

[0178] 实施例 15- 软骨素作为加强抗肿瘤活性成分的活性的物质

[0179] 研究了软骨素 (C) 和硫酸软骨素 (CS) 加强吉西他滨 (GEM) 和丝裂霉素 -C(MMC)（两种用于膀胱内治疗非肌肉膀胱肿瘤的抗肿瘤药）的凋亡作用的能力。用人膀胱癌细胞系 HT-1376 作为系统模型，评价 GEM 或 MCC 和 C 或 CS 的不同组合抑制生长的能力。

[0180] 将人膀胱癌细胞系 HT-1376(American Type Tissue Cultures Collection,Rockville,MD) 培养在补充了 10％热灭活胎牛血清 (FBS)、20mM 4,2- 羟乙基 -1- 哌嗪基 - 乙磺酸 (HEPES)、100U/mL 青霉素、100pg/mL 链霉素、1％ w/v L- 谷氨酰胺

钠和 1% w/v 丙酮酸的 DMEM 中。在含有 95%空气 /5% CO_2 的湿空气中 37℃培养细胞。对于 C 或 CS 和 MMC 或 GEM 在抑制 HT-1376 的生长中的协同作用的研究，按 $6*10^3$ 细胞 / 孔的密度将细胞接种在 96 孔板中。37℃孵育 24 小时后，用不同浓度的 C 或 CS 或 GEM 或 MMC 及其多糖 - 抗肿瘤药组合处理细胞。多糖 - 抗肿瘤药协同作用的评价基于用 Calcusyn 计算机程序 (Biosoft,Ferguson,MO) 进行的处理 72 小时后存活细胞对抗肿瘤药浓度的部分曲线的分析。<1、1 和 >1 的组合指数值 (CI) 分别表示多糖 - 抗肿瘤药相互作用中的协同作用、附加作用和拮抗作用。通过计算增强因子 (PF) 来确定多种成分 C、CS、GEM 和 MMC 对多种组合的细胞毒性的具体贡献，增强因子定义为单独获得的 C、CS、GEM 或 MMC 的 IC_{50}（生长的 50%抑制）与组合 C/GEM、C/MMC、CS/GEM 和 CS/MMC 的 IC_{50} 之间的比值；越高的 PF 值表示越大的细胞毒性。

[0181] 用流式细胞术来评价凋亡或坏死细胞的数量。用异硫氰酸荧光素（膜联蛋白 V-FITC) 与碘化丙啶 (PI) 组合作为标记；凋亡细胞为膜联蛋白 V-FITC 阳性和 PI 阴性，坏死细胞为膜联蛋白 V-FITC 阳性和 PI 阳性。通过在环境温度下用膜联蛋白 V-FITC(Diagnostics MedSystems) 和 PI(Sigma) 在结合缓冲液 (10mM HEPES、pH 7.4、150mM NaCl、5mM KCl、1mM $MgCl_2$、2.5mM $CaCl_2$) 中孵育它们 10 分钟，然后在相同的缓冲液中洗涤和重悬细胞材料来标记细胞。通过流式细胞术 (FACScan,Becton-Dickinson) 来分析凋亡和坏死的细胞，每个样品获取平均 $2x10^4$ 个事件，在三个分开的实验中一式三份地测定。

[0182] 开始处理后 48 和 72 小时评价了单独获得的 C、CS、GEM 和 MMC 对 HT-1376 的生长的影响。所有产品都导致生长的时间依赖性和剂量依赖性抑制。72 小时后，在 12mg/mL 的浓度下，C 的 IC_{50} 为 2mg/mL，CS 的 IC_{50} 为 12mg/mL，MMC 的 IC_{50} 为 18μ/mL，GEM 的 IC_{50} 为 0.5μ/mL。在该浓度下，细胞毒性作用适中，如果从培养基去除测试产品，则细胞生长重新开始。

[0183] 根据这些结果评价了多糖 - 抗肿瘤药组合对抑制 HT-1376 生长的协同作用。具体而言，用 Calcusyn 作为数据分析软件，研究了 72 小时后与 MMC 或 GEM 组合的不同浓度的 C 或 CS 诱导的生长抑制。在使用相对于 MMC 过量的多糖时，C 或 CS 与 MMC 的结合具有强烈的协同作用，C 和 CS 的 IC_{50} 值分别为 0.1 和 0.4，这表明 C 的协同作用好于 CS 的协同作用。在将 C 或 CS 与 GEM 组合时观察到了不同的行为；在这种情况下，在使用相对于多糖过量的 GEM 时，存在协同相互作用。按产生协同相互作用的比例操作（多糖比抗肿瘤药少），获得了 C 和 CS 的分别为 0.2 和 0.7 的 IC_{50} 值，再次确认了 C 的协同作用好于 CS 的协同作用。

[0184] 如表 14 中所示，C 或 CS 和 GEM 的协同组合表征为在单独使用活性成分时未观察到的重要的凋亡作用。

[0185]

处理	细胞状态			
	存活	坏死	凋亡	
			早期	晚期
未处理	91±3	5±1	1±1	3±1
C	59±2	28±3	6±1	7±2
CS	68±4	23±2	4±1	5±1
GEM	81±3	16±3	1±1	2±1
C+GEM	16±2	30±2	9±2	45±6
CS+GEM	29±2	27±4	8±1	36±5

[0186] 表 14- 用细胞分选仪评价的用 0.04μg/mL C 或 CS 和 0.15μg/mL GEM 单独或在多糖 -GEM 组合中处理 48 小时的 HT-1376 细胞的细胞状态。

[0187] 在 C 或 CS 与 MMC 的协同组合（多糖相对于抗肿瘤药过量）的情况下观察到了不同的行为。在这种情况下，如表 15 中所示，多糖 - 抗肿瘤药组合导致在协同组合 C-MMC 的情况下最大的大范围细胞坏死。

[0188]

处理	细胞状态			
	存活	坏死	凋亡	
			早期	晚期
未处理	90±4	7±1	1±1	2±1
C	56±3	41±2	1±1	2±1
CS	62±4	36±2	1±1	1±1
MMC	64±5	33±1	1±1	2±1
C+MMC	36±2	62±3	1±1	1±1
CS+MMC	46±1	51±2	1±1	2±1

[0189] 表 15- 用细胞分选仪评价的用单独或在多糖 -MMC 组合中的 5.7μg/mL C 或 CS 和 1.7μg/mL MMC 处理 48 小时的 HT-1376 细胞的细胞状态。

[0190] 试验作为整体证明 :a) 抗肿瘤药和 C 或 CS 的组合对抑制肿瘤细胞生长具有强烈的作用 ;b) 协同条件取决于所使用的抗肿瘤药而不同 ;c) 多糖 -GEM 协同作用主要导致细胞经历凋亡，而 MMC 多糖协同作用导致细胞经历坏死 ;d)C 的协同作用显著高于 CS 的协同作用 ;e)C 与 GEM 或 MMC 的协同结合可代表表面膀胱肿瘤领域有前景的治疗途径。

[0191] 实施例 16- 粘弹性补充疗法和软骨修复

[0192] 本研究的目的是评价透明质酸 - 软骨素组合 (HA-C) 在与关节软骨成分损伤相关的关节病中的治疗潜能。在患有伴随软骨成分损伤、明显的持续炎症症状、肿胀和疼痛的膝关节严重受损的 30 名志愿者上进行研究。将年龄在 25 和 45 岁之间的两种性别的志愿者随机分为 10 名志愿者的三个组 ;对照组用盐水处理，HA 组用透明质酸处理，HA-C 组用透明质酸和软骨素的混合物处理。通过将 2mL 无菌、无致热原的溶液注射入关节来按 2 个月的间隔进行 3 次粘弹性补充疗法处理，对于对照组，该溶液由盐溶液 (0.9% NaCl) 组成，对于 HA 组，该溶液由透明质酸 1,200KDa 的 20mg/mL 溶液组成，对于 HA-C 组，该溶液由 20mg/mL 透明质酸 1,200KDa+20mg/mL 软骨素的溶液组成。在 6 个月的研究之前及结束时，对志愿者进行关节的 X 射线和 MRI 扫描。三名矫形外科医生独立地随时间推移（处理前及 3 和 6 个月后）在 1 至 5 的量表（其中 1 代表无愈合，5 表示病理学症状的完全消退和软骨组织损伤

的完全修复）上评价病理学症状（疼痛、炎症状态和肿胀）的发展和软骨损伤的修复。表16显示研究的结论数据。该数据证明，在软骨损伤的粘弹性补充疗法处理中，软骨素的存在导致关节软骨成分的优良修复水平和病理学症状随时间推移的全面改善。

[0193]

组	疼痛			炎症			肿胀			软骨修复		
	月											
	0	3	6	0	3	6	0	3	6	0	3	6
对照	1.0±0.1	1.3±0.2	1.3±0.1	1.5±0.2	1.0±0.2	1.4±0.1	1.5±0.2	1.0±0.1	1.8±0.2	1.0±0.1	1.5±0.2	1.6±0.1
HA	1.6±0.2	3.1±0.4	4.0±0.3	1.3±0.2	3.1±0.2	4.1±0.5	1.2±0.1	3.1±0.3	4.20.5	1.0±0.1	1.5±0.2	1.4±0.3
HA-C	1.5±0.1	3.5±0.4	5.0±0.0	1.6±0.2	4.1±0.4	5.0±0.0	1.4±0.2	4.2±0.2	5.0±0.0	1.1±0.1	3.2±0.5	5.0±0.0

[0194] 表16- 通过将2mL无菌、无致热原的溶液注射入关节来按2个月的间隔进行3次粘弹性补充疗法处理，对于对照组，该溶液由盐溶液（0.9％ NaCl）组成，对于HA组，该溶液由透明质酸1,200KDa的20mg/mL溶液组成，对于HA-C组，该溶液由20mg/mL透明质酸1,200KDa+20mg/mL软骨素的溶液组成。三名矫形外科医生独立地随时间推移（处理前及3和6个月后）在1至5的量表（其中1代表无愈合，5表示病理学症状的完全消退和软骨组织损伤的完全修复）上评价病理学症状（疼痛、炎症状态和肿胀）的发展和软骨损伤的修复。所报道的值是3个独立评价的平均值。

[0195] 实施例17- 软骨素用于治疗间质性膀胱炎

[0196] 将已根据尿动力学、临床和内窥镜参数（后者显示伴随膀胱扩张的膀胱镜检查中存在出血点）确诊非溃疡性间质性膀胱炎的10名年龄在35和60岁之间的女性招募至本研究。将个体随机分为5个个体的2个组；第一组通过将含有40mg透明质酸MW 1.800KDa(HA)和40mg硫酸软骨素（CS）的溶液（40mL）通过导管滴入膀胱来治疗，第二组用含有40mg透明质酸MW 1.800KDa(HA)和40mg软骨素（C）的溶液（40mL）治疗。此治疗每周重复，持续6周，然后每月重复，再持续5个月。在治疗开始时及研究结束时，进行伴随膀胱扩张的膀胱镜检查来验证上皮组织的状态，并取膀胱壁活检组织来确定验证状态。在治疗之前及治疗后2、5和7个月，泌尿学家通过与患者达成一致来填写临床表格，以定量尿动力学（尿急感、频率和夜尿症）及刺痛和膀胱疼痛的存在。在0至6的量表上评价所有参数，其中0表示无病理学症状。表17显示所获得的数据。

[0197] 在治疗前和治疗后进行的伴随膀胱扩张的膀胱镜检查的比较证明，HA-C组中的患者的病理状态比HA-CS组更全面、更好地消除，这是通过膀胱壁活检组织的组织学评价确认的发现，其证明炎症过程在HA-C组中比在HA-CS组中更好地消除。表11中报道的临床数据也与此评价一致，证明就尿动力学和残痛而言，HA-C组的病理学症状更彻底、更快地消除。

[0198]

时间(月)	尿急感		频率		夜尿症		刺痛		疼痛	
	排尿						膀胱			
	HA-C	HA-CS	HA-C	HA-CS	HA-C	HA-CS	HA-C	HA-CS	HA-C	HA-CS
0	5.7±0.2	5.8±0.3	5.7±0.2	5.9±0.1	5.8±0.2	5.7±0.1	5.9±	5.8±0.2	5.7±0.3	5.7±0.2
2	2.4±0.4	4.4±0.2	2.1±0.3	3.2±0.3	2.0±0.6	3.5±0.3	2.4±0.1	4.3±0.3	1.8±0.2	3.7±0.3
5	1.3±0.1	3.2±0.3	0.9±0.2	2.4±0.4	1.3±0.2	3.1±0.1	0.9±0.1	3.0±0.3	0.7±0.1	2.6±0.1
7	1.1±0.1	2.6±0.3	0.9±0.1	1.9±0.2	1.0±0.1	2.8±0.2	0.5±0.1	2.6±0.2	0.6±0.3	2.1±0.1

[0199] 表 17- 将 10 名患有非溃疡性间质性膀胱炎的女性志愿者随机分为 5 个个体的 2 个组 ;第一组 (HA-C) 通过将含有 40mg 透明质酸 MW 1.800KDa(HA) 和 40mg 硫酸软骨素 (CS) 的溶液 (40mL) 通过导管滴入膀胱来治疗,第二组 (HA-CS) 用含有 40mg 透明质酸 MW 1.800KDa(HA) 和 40mg 软骨素 (C) 的溶液 (40mL) 治疗。此治疗每周重复,持续 6 周,然后每月重复,再持续 5 个月。在治疗之前及治疗后 2、5 和 7 个月,泌尿学家通过与患者达成一致来填写临床表格,以定量尿动力学 (尿急感、频率和夜尿症) 及刺痛和膀胱疼痛的存在。在 0 至 6 的量表上评价所有参数,其中 0 表示无病理学症状。

[0200] 实施例 18- 眼科制剂

[0201] 制备了两种眼科制剂 :基于透明质酸的常规制剂和基于软骨素的制剂,二者都按在 pH 7.4 的 NaCl 盐溶液中 3% w/v 的浓度。滴眼液配制在高压灭菌锅中灭菌的单剂量包装中。

[0202] 在 30 名患有干眼病的志愿者上进行研究,每天对这些志愿者施用滴眼液 4 次,持续 30 天。将年龄在 45 和 60 岁之间的两种性别的志愿者随机分为 15 名志愿者的两个组,并用两类滴眼液治疗。在医疗控制下,在治疗开始和结束时评价角膜表面的炎症状态,并记录所治疗的患者的涉及耐受性、湿润作用持续时间和应用后的视力改变的评价。用 1 至 5 的量表进行临床评价和患者评价,其中 5 代表病理状态及其后遗症的最佳消除。

[0203] 如表 18 中报道的实验结果所证明,基于软骨素 (C) 的滴眼液在临床评价和所治疗的患者的主观评价上都显示最好的评价指数。

[0204]

时 间 (天)	医生		患者					
	角膜炎症		耐受性		湿润作用		无视力改变	
	HA	C	HA	C	HA	C	HA	C
0	1,0±0,1	1,1±0,2	-	-	-	-	-	-
10	-	-	3,8±0,2	4,7±0,2	4,0±0,2	4,8±0,3	3,5±0,2	4,6±0,2
20	-	-	3,7±0,3	4,5±0,5	4,1±0,3	4,6±0,2	3,2±0,1	4,7±0,1
30	3,5±0,2	4,2±0,3	3,9±0,3	4,8±0,1	4,4±0,3	4,9±0,1	3,6±0,2	4,8±0,1

[0205] 表 18- 在 30 名患有干眼病的年龄在 45 至 60 岁之间的两种性别的志愿者上进行研究。将志愿者随机分为 15 名志愿者的两个组,每天对这些志愿者施用滴眼液 4 次,持续 30 天。第一组 (HA) 用基于 pH 7.4 的 NaCl 盐溶液中的 3% w/v 透明质酸的滴眼液治疗。第一组 (C) 用基于 pH 7.4 的 NaCl 盐溶液中的 3% w/v 软骨素的滴眼液治疗。滴眼液配制在高压灭菌锅中灭菌的单剂量包装中。

[0206] 在医疗控制下,在治疗开始和结束时评价角膜表面的炎症状态,并记录所治疗的患者的涉及耐受性、湿润作用持续时间和应用后的视力改变的评价。用 1 至 5 的量表进行临床评价和患者评价,其中 5 代表病理状态及其后遗症的最佳消除。

[0207] 实施例 19- 腹膜内透析液中的软骨素的保护作用

[0208] 本研究的目的是评价腹膜中与葡萄糖、软骨素或硫酸软骨素在腹膜透析液中的存在相关的过氧化损伤。用 4 类制剂处理的 8 周龄雄性 Wistar 大鼠作为实验模型,评价了腹膜组织中的脂质在反复的腹膜透析处理后的过氧化作用 :a) 葡萄糖 2.5% w/v、硫酸软骨素 MW 20-40KDa 0.1% w/v、钠 135.0mEq/L、镁 1.5mEq/L、钙 4.0mEq/L、氯 105.5mEq/L、乳酸 35.0mEq/L、pH 7.0-7.3、π 溶液 / π 盐水 1.4-1.6 ;b) 葡萄糖 2.5% w/v、软骨素

MW 20-40KDa 0.1％ w/v、钠 135.0mEq/L、镁 1.5mEq/L、钙 4.0mEq/L、氯 105.5mEq/L、乳酸 5.0mEq/L、pH 7.0-7.3、π 溶液 / π 盐水 1.4-1.6 ;c) 硫酸软骨素 MW 20-40KDa 2.5％ w/v、钠 135.0mEq/L、镁 1.5mEq/L、钙 4.0mEq/L、氯 105.5mEq/L、乳酸 35.0mEq/L、pH 7.0-7.3，加入 NaCl 直至 π 溶液 / π 盐水比值在 1.4-1.6 的范围内 ;d) 硫酸软骨素 MW 20-40KDa2.5％ w/v、钠 135.0mEq/L、镁 1.5mEq/L、钙 4.0mEq/L、氯 105.5mEq/L、乳酸 35.0mEq/L、pH 7.0-7.3，加入 NaCl 直至 π 溶液 / π 盐水比值在 1.4-1.6 的范围内 ;将 40 只动物随机分为 10 只动物的 4 个组，在乙醚麻醉下将 15mL 溶液注射入每只动物的腹膜腔，持续连续 10 天。在研究结束时，取出安乐死的动物的腹膜，使用 OxiSelect TBARS Assay Kit(Cell Biolabs Inc.)，通过硫代巴比妥酸 (TBA) 法在组织上定量评价脂质过氧化。脂质过氧化是众所周知的细胞损伤机制。脂质过氧化物是细胞氧化应激的不稳定指示物，其在分解时形成反应性化合物，如脂质过氧化的主要标记丙二酰二醛 (MDA)。基于 MDA 与硫代巴比妥酸 (TBARS- 硫代巴比妥酸反应性物质) 形成可通过分光光度法测定的 1:2 复合物的能力，所使用的试剂盒提供了测定组织匀浆样品中的 MDA，从而测定脂质氧化的简单、可重现的系统。试剂盒包含用作阳性对照和用于校准曲线的 MDA 标准品。在 95℃下短暂孵育，包含在样品中的 MDA 和 MDA 标准品与 TBA 反应，这导致 TBARS 复合物的形成，通过与标准曲线比较进行定量测定和分光光度法测定。用含有 PBS 的肝素溶液反复洗涤新鲜腹膜组织样品来去除血红蛋白，重悬 (100mg/mL) 在含有 1x BHT 溶液 (在试剂盒中提供来防止脂质在样品处理过程中进一步氧化) 的 PBS 中，然后在冰上匀浆，10,000 转 / 分钟离心 5 分钟，收集上清，测定上清中的 TBARS 水平。以含 2.5％ w/v 葡萄糖和 0.1％ w/v 硫酸软骨素的溶液 a) 处理中每克组织的脂质过氧化物的值作为 1，用含 2.5％ w/v 葡萄糖和 0.1％ w/v 软骨素的溶液 b) 获得的相应的值为 0.7，而用含 2.5％ w/v 硫酸软骨素的溶液 c) 获得的值为 0.5，用含 2.5％ w/v 软骨素的溶液 d) 获得的值为 0.1。这些数据证明，在腹膜内透析中，软骨素可以作为渗压剂代替葡萄糖，就在全身腹膜内透析中保护腹膜组织免受脂质过氧化而言具有优良的结果 ;但是，通过使用具有相似分子量特征的硫酸软骨素不能获得同样令人满意的结果。