

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710096370. X

[51] Int. Cl.

A61K 31/737 (2006.01)
A61K 38/13 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 9/08 (2006.01)
A61K 9/12 (2006.01)
A61K 9/14 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 9 月 5 日

[11] 公开号 CN 101028283A

[51] Int. Cl. (续)

A61K 9/70 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 47/38 (2006.01)
A61P 41/00 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)
A61P 19/04 (2006.01)
A61P 17/06 (2006.01)
A61K 31/12 (2006.01)
A61K 31/165 (2006.01)
A61K 31/337 (2006.01)
A61K 31/436 (2006.01)
A61K 31/4745 (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01)
A61K 31/56 (2006.01)

A61K 31/704 (2006.01)

A61K 31/7048 (2006.01)

[22] 申请日 2002.8.29

[21] 申请号 200710096370. X

分案原申请号 02816693.0

[30] 优先权

[32] 2001. 8.29 [33] US [31] 60/315,362

[71] 申请人 英属哥伦比亚大学

地址 加拿大英属哥伦比亚省

[72] 发明人 J·K·杰克逊 H·M·伯特

[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

代理人 黄革生 林柏楠

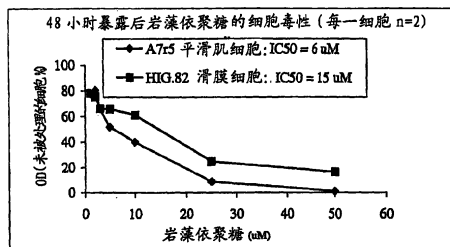
权利要求书 3 页 说明书 18 页 附图 3 页

[54] 发明名称

岩藻聚糖在治疗粘连、关节炎和牛皮癣中的用途

[57] 摘要

含有岩藻聚糖如岩藻依聚糖的组合物、方法等用于治疗粘连、关节炎和牛皮癣。



1. 岩藻聚糖的用途，用于制备治疗动物潜在疾病部位处的纤维性粘连的药物。

2. 权利要求 1 的用途，其中疾病部位是手术部位，并且岩藻聚糖制备为组合物直接递送到疾病部位。

3. 岩藻聚糖的用途，用于制备治疗动物疾病部位处的关节炎的药物。

4. 权利要求 3 的用途，其中关节炎为类风湿性关节炎。

5. 根据权利要求 1-4 中任意一项所述的用途，其中所述药物被制成口服给药的形式。

6. 根据权利要求 1-4 中任意一项所述的用途，其中所述药物被制成注射剂的形式。

7. 权利要求 1-4 中任意一项所述的用途，其中所述药物被制成可眼内、皮下、腹膜内、肌内、关节内、损伤内、阴道内、直肠或者局部施用的形式。

8. 岩藻聚糖的用途，用于制备治疗动物疾病部位处的牛皮癣的药物。

9. 权利要求 8 的用途，其中所述药物被制成局部给药的形式。

10. 权利要求 8 或 9 的用途，其中所述药物被制成贴剂形式。

11. 根据权利要求 1、3、8 中任意一项所述的用途，其中岩藻聚糖为岩藻依聚糖。

12. 根据权利要求 1、3、8 中任意一项所述的用途，其中所述药物被制成控释的聚合物剂型。

13. 权利要求 12 的用途，其中所述聚合物剂型包括膜剂、贴剂、糊剂、微球体、植入物、凝胶剂、喷雾剂或液体制剂。

14. 根据权利要求 1、3、8 中任意一项所述的用途，其中所述药物为包含至少一种霜、糊、可注射赋形剂和聚合物的药物组合物形式。

15. 根据权利要求 1、3、8 中任意一项所述的用途，其中所述药物为包含岩藻聚糖和治疗有效量的至少一种其他药物的药物组合物。

16. 权利要求 15 的用途，其中所述其他药物选自紫杉醇、阿霉素、

喜树碱和依托泊苷。

17. 权利要求 15 的用途, 其中所述其他药物选自米托蒽醌、氨甲蝶呤、甲萘醌、蓝雪醌、胡桃醌、 β -lapachone、环孢菌素、柳氮磺吡啶、类固醇、雷帕霉素、维甲类、多西他赛和秋水仙碱。

18. 权利要求 15 的用途, 其中所述其他药物选自反义寡核苷酸、核酶和寡核苷酸 RNA 抑制剂。

19. 根据权利要求 1、3、8 中任意一项所述的用途, 其中治疗有效量的岩藻聚糖作为药物组合物的一部分递送并且岩藻聚糖组成药物组合物的约 0.1% 到 35%w/v。

20. 根据权利要求 1、3、8 中任意一项所述的用途, 其中治疗有效量的岩藻聚糖作为药物组合物的一部分递送并且岩藻聚糖组成药物组合物的约 80% 到 100%w/v。

21. 根据权利要求 1、3、8 中任意一项所述的用途, 其中治疗有效量的岩藻聚糖作为药物组合物的一部分递送并且岩藻聚糖组成药物组合物的约 5% 到 50%w/v。

22. 根据权利要求 1、3、8 中任意一项所述的用途, 其中治疗有效量的岩藻聚糖作为药物组合物的一部分递送并且岩藻聚糖组成药物组合物的约 20% 到 80%w/v。

23. 根据权利要求 1、3、8 中任意一项所述的用途, 其中岩藻聚糖是还包含至少一种可药用赋形剂的药物组合物的一部分。

24. 权利要求 23 的用途, 其中可药用赋形剂选自普朗尼克、纤维素、藻酸盐、丙烯酸盐、透明质酸、聚乙二醇和脱乙酰壳多糖。

25. 根据权利要求 1、3、8 中任意一项所述的用途, 其中岩藻聚糖制备为用于直接递送到疾病部位。

26. 根据权利要求 1、3、8 中任意一项所述的用途, 其中动物为人。

27. 包含岩藻聚糖聚合物剂型的药物组合物, 其包含治疗有效量的岩藻聚糖和至少一种选自普朗尼克、纤维素、藻酸盐、丙烯酸盐、透明质酸、聚乙二醇和脱乙酰壳多糖的可药用赋形剂。

28. 权利要求 26 的药物组合物, 其中聚合物剂型包括膜剂、贴剂、

糊剂、微球体、植入物、凝胶剂、喷雾剂或液体制剂。

29. 权利要求 27 的药物组合物，其中岩藻聚糖为岩藻依聚糖。

30. 包含治疗有效量的岩藻聚糖和治疗有效量的至少一种其他药物的药物组合物，其中所述的至少一种其他药物包含至少一种反义寡核苷酸、核酶和寡核苷酸 RNA 抑制剂。

31. 权利要求 30 的药物组合物，其中岩藻聚糖为岩藻依聚糖。

32. 根据权利要求 27-31 中任意一项所述的药物组合物，其用于制备治疗纤维性粘连的药物。

33. 权利要求 32 的药物组合物，其中粘连为手术粘连。

34. 根据权利要求 27-31 中任意一项所述的药物组合物，其用于制备治疗关节炎的药物。

35. 根据权利要求 27-31 中任意一项所述的药物组合物，其用于制备治疗牛皮癣的药物。

36. 生产能够减轻与病人中纤维性粘连、关节炎和牛皮癣中的至少一种相关的症状的药物的方法，其包括组合药有效量的岩藻依聚糖、可药用赋形剂或缓冲剂。

37. 权利要求 36 的方法，其中症状和手术粘连相关。

38. 权利要求 36 的方法，其中症状和关节炎相关。

39. 权利要求 36 的方法，其中症状和牛皮癣相关。

岩藻聚糖在治疗粘连、关节炎和牛皮癣中的用途

本申请是中国专利申请 02816693.0 的分案申请，原申请的申请日是 2002 年 8 月 29 日，发明名称是“岩藻聚糖在治疗粘连、关节炎和牛皮癣中的用途”。

相关申请的交互参照

本申请要求 2001 年 8 月 29 日提交的美国临时专利申请编号为 60/315,362 的优先权。

发明背景

手术粘连是一种瘢痕，其通常于手术后在身体的两部分之间形成。粘连能引起严重的问题。例如，涉及女性生殖器官(卵巢、输卵管)的粘连能引起不育、性交困难(性交痛苦)和严重的骨盆疼痛。肠中发生的粘连能够引起肠梗阻或者堵塞，粘连还可以在其他地方如心脏、脊柱周围和手形成。除了手术，其他原因如子宫内膜异位症、感染、化学治疗、辐射和癌症也可引起粘连。

粘连和其他血管生成相关疾病如关节炎和牛皮癣可以持续数周、数月或数年，需要长期和高昂的照料。见 Cotran, R. S., Kumar, V., Robbins, S. L. 撰写的 *Robbins Pathological Basis of Disease*, 第 75 页 (W. B. Saunders Co., 1989)。这些疾病和症状能够发展成慢性炎症，对病人的心理和生理健康造成可怕的后果。不幸的是，对于患有手术粘连、关节炎和牛皮癣的病人几乎没有治疗选择。通常对病人用药物如类固醇或非类固醇消炎药物治疗以减轻疾病的症状。然而，这些治疗不可能提供足够的长期的好处并且如果使用太频繁可能还会导致严重的副作用(如非类固醇消炎药物导致的胃溃疡或者过度使用类固醇类导致的较严重毒性)。其他更强的抗增殖和

/或抗血管生成药物如抗癌药物紫杉醇、氨甲蝶呤、阿霉素、喜树碱和依托泊苷可以提供积极的治疗形式，但是对不威胁生命的疾病使用这些药物受到不希望有的毒性和副作用的限制。

这样，对治疗一种或多种这些疾病需要优选地更有效且副作用更小的化合物、组合物和方法等(包括递送方法)，该需要还未满足。本发明的化合物、组合物、方法等提供了这些长处中的一种或多种。

发明概述

含有岩藻聚糖、尤其是岩藻依聚糖(fucoidan)的组合物和方法用于治疗手术粘连、关节炎和牛皮癣。岩藻聚糖对这些疾病的每一种都提供了显著的疗效和低的副作用。

在一个方面，本发明提供了治疗动物(可以是人或其他所需要的受试者)体内粘连的方法，其包括对可能患有粘连的疾病位点施用治疗有效量的岩藻聚糖(可以是岩藻依聚糖)。该疾病位点可以是手术位点，岩藻聚糖可以作为组合物直接施用于疾病位点。岩藻聚糖通过从聚合物剂型的控释可基本上连续地施用于疾病位点，聚合物剂型可以是膜剂、贴剂、糊剂、微球体、植入物、凝胶剂、喷雾剂或液体制剂。可以将岩藻聚糖作为药物组合物施用，该药物组合物为包含至少一种霜剂、糊剂、可注射赋形剂和聚合物的形式。(除非另外说明或者在上下文中很清楚，所有的实施方案、方面、特征等可以以任何想要的方式混合和匹配、组合和排列。)

可以将岩藻聚糖作为含有岩藻聚糖和治疗有效量的至少一种其他药物的药物组合物施用。该药物可以是紫杉醇、阿霉素、喜树碱、依托泊苷、米托蒽醌、氨甲蝶呤、甲萘醌、蓝雪醌、胡桃醌、 β -laperchone、环孢菌素、柳氮磺吡啶、类固醇、雷帕霉素、维甲类(retinoid)、多西他赛(docetaxel)和秋水仙碱、反义寡核苷酸、核酶中的至少一种。治疗有效量的岩藻聚糖可以作为组合物的一部分递送，并且岩藻聚糖可以占组合物的约0.1%到35%、5%到50%、20-80%、80%-100%(w/v)。

该组合物还可以包含至少一种可药用赋形剂，如普朗尼克(pluronic)、

纤维素、藻酸盐、丙烯酸盐、透明质酸、聚乙二醇、可注射赋形剂和脱乙酰壳多糖。岩藻聚糖可以口服施用、直接施用至疾病位点、通过眼内、腹膜内、肌内、关节内、损伤内、皮下、阴道内、直肠或者局部注射至疾病位点、或者以其他希望的方式施用。

在另一方面，方法包括治疗关节炎、牛皮癣或者血管生成性眼病，包括向疾病位点施用有疗效量的岩藻聚糖。

在另一方面，本发明提供了包含岩藻聚糖的聚合物剂型的药物组合物，所述岩藻聚糖的聚合物剂型包含治疗有效量的岩藻聚糖和至少一种可药用赋形剂，该赋形剂选自普朗尼克、藻酸盐、丙烯酸盐、透明质酸、聚乙二醇、可注射的赋形剂和脱乙酰壳多糖。聚合物剂型可以是膜剂、糊剂、微球体、喷雾剂、洗剂、液体制剂或植入物或所希望的其他形式。该药物组合物也可以包含治疗有效量的至少一种其他药物，如反义寡核苷酸、核酶和寡核苷酸 RNA 抑制剂。

该组合物可以如所希望的那样用于制造治疗粘连（如手术粘连）、关节炎、牛皮癣或其他疾病的药物。还提供了生产能够减轻与病人粘连、关节炎和牛皮癣中的至少一种相关的症状的药物的方法，该生产方法包括组合药学上有效量的岩藻聚糖如岩藻依聚糖、可药用赋形剂或缓冲剂。

在本申请中提出了这些和其他方面、特征和实施方案，包括下面的“详述”和附图。而且，在此处包括在“相关申请的交互参照”中提出了讨论某些系统、仪器、方法和其他信息的各种参考文献；在此完整引入所有这些参考文献和所有它们的教导和公开作为参考，不管参考文献在本申请的何处出现。

附图简述

图 1 是 48 小时接触后在滑膜细胞和平滑肌细胞中岩藻依聚糖对细胞增殖的抑制图。

图 2 是岩藻依聚糖对佛波肉豆蔻酸酯(PMA)诱导的中性粒细胞活化的抑制图。

图 3 是描述浓度为 0.5%(w/v)的岩藻依聚糖对胶原酶和溶基质素表达的抑制而不过分抑制蛋白聚糖表达的照片。

图 4 是岩藻依聚糖从乙烯乙酸乙烯酯膜剂的释放图。

图 5 是岩藻依聚糖从聚己酸内酯糊剂的释放图。

发明详述

本发明包括组合物和方法, 该方法包括用已知为岩藻聚糖的硫酸化多糖抑制细胞增殖、炎症反应和血管生成的方法, 并且可用于治疗手术粘连、关节炎和牛皮癣。似乎岩藻聚糖如岩藻依聚糖可以抑制中性粒细胞活化、抑制炎症酶从关节炎相关细胞的释放和抑制鸡膜和手术粘连中血管生成。既然所有细胞都含有岩藻糖结合受体, 在一些实施方案中, 将岩藻聚糖直接递送到疾病位点通过从聚合物剂型的控释以提供目标组织与岩藻聚糖(如岩藻依聚糖)的基本连续的接触。由于岩藻聚糖有多种体内效应(尤其是影响血液凝血酶和补体), 岩藻聚糖的定点控释是全身施用的备选方案, 其可降低血液毒性。

下面将首先一般性地讨论岩藻聚糖、粘连、关节炎和牛皮癣, 然后讨论本发明的一些实施方案, 然后提供一些实施例。

对岩藻聚糖、粘连、关节炎和牛皮癣的一般性背景讨论

岩藻聚糖

岩藻聚糖(包括岩藻依聚糖)是从褐海藻中提取的高分子量硫酸化多糖。已报道这些化合物具有多种体内和体外抑制作用, 包括抗凝血酶、抗增殖、抗补体、抗癌和抗中性粒细胞迁移效果。岩藻聚糖可以阻断细胞表面的各种结合事件, 所述结合事件包括通过整合蛋白-选择蛋白分子的细胞-细胞结合, 岩藻聚糖或者通过结合血液中凝血酶或者补体或者细胞表面的岩藻糖受体而阻断细胞表面的结合事件。

认为这些活性决定着消炎特性, 因为这些活性通过(例如)抑制淋巴细胞或中性粒细胞与血管内皮细胞的结合而可防止这些细胞在发炎后随后侵入组织腔隙中。Patankar, M. S. 等, *J. Biol. Chem.* 268: 21770-21776 (1993);

Brandley, B. K.,等, *J. Cell Biol.* 105: 991-997 (1987)。最近的研究也表明岩藻聚糖抑制血管平滑肌细胞的增殖, Logeart, D.等, *Eur. J. Cell Biol.* 74: 376-384 & 385-390 (1997), 指出(但没证明)这些化合物可能的抗再狭窄的潜力。还表明岩藻聚糖在结合到内皮细胞和平滑肌细胞表面后, 慢慢在细胞中内化。Glabe, C. G. 等, *J. Cell Science* 61: 475-490 (1983); Logeart, D. 等, *Eur. J. Cell Biol.* 74: 376- 384(1997)。

Riou, D. 等, *Anticancer Res.*, 16 (3A): 1213-1218 (1996); Itoh, H., *Anticancer Res.*, 13 (6A): 2045-2052 (1993); Nishiro, T. 等, *Thromb. Res.*, 62: 765-773 (1991); Blondin, C. 等, *Mol. Immunol.*, 31: 247-253 (1994); Patankar, M. S. 等, *J. Biol. Chem.*, 268: 21770-21776 (1993)。在日本, 从各种海藻中提取的岩藻依聚糖被作为健康食品出售。还提出岩藻依聚糖可作为化妆品或者护肤品。JP 01031707 和 JP 01085905。据报道岩藻依聚糖是潜在的抗癌剂。Riou, D., *Anticancer Res.* 16: 3a 1213-18 (1996); Itoh, H., 等, *Anticancer Res.*, 15: 5b 1937-47 (1995)。据报道岩藻依聚糖在体外不抑制血管生成。Soeda, S.等, *Biochim. Biophysica Acta* (1): 127-134 (2000)。类似地, 发现岩藻依聚糖刺激血清诱导的 HUVE 细胞增殖(体外), 表明可能的前生血管作用(尽管当存在成纤维细胞生长因子时可能抑制)。Giroux, J. 当, *Eur. J. Cell Biol.* 77 4: 352-9 (1998)。研究还表明岩藻聚糖抑制内皮细胞单层结合。Glabe, C. G., *J. Cell Science*, 61: 475-490 (1983)。由于组成毛细血管的细胞是内皮细胞, 该报道表明体外细胞粘连的某些方面可被抑制, 但是这些数据不能证明岩藻依聚糖的任何体内抗血管生成效果。据报道岩藻依聚糖抑制螺旋杆菌(helicobacter)与胃细胞的结合, 暗示其抗胃溃疡效果。Shibat, H. J., *Nutr. Sci. Vitaminol.* 45: 325-336 (1999)。

其他包括支链和直链类型的硫酸化多糖被报道具有不同抗凝血活性。Pereira, M. S., *J. Biol. Chem.* 12: 7656-67 (1999)。已报道葡聚糖硫酸酯及其衍生物抑制癌细胞生长(Bittoun, P., *Carbohydrate Res.* (3-4): 247-255 (1999))并且具有抗凝血效果(Mauray, S., *J. Biomat. Sci. Poly ed.* 9: 373-87 (1998))。已提出将硫酸化多糖作为抗病毒剂以用于抗例如 AIDS。EP

00293826; JP 01313433.

粘连

粘连形成是一个复杂的过程,其中在身体中正常分开的组织长在一起。手术粘连(也叫做术后粘连)从组织的不正常伤口愈合应答发展为创伤而来并且在大于 2/3 的所有腹部手术病人中发生。Ellis, H. , *Surg. Gynecol. Obstet.* 133: 497 (1971); Wiebel, M-A. 和 Majno, G., *Am. J. Surg.* 126: 345 (1973)。这些粘连的后果不同,取决于所涉及的手术部位。问题可包括疼痛、不育、肠梗阻,甚至是心脏手术后死亡危险的增加。diZerega, G. S. , *Prog. Clin. Biol. Res.* 381: 1-18 (1993); diZerega, G. S., *Fertil. Steril.* 61: 219-235 (1994); Dobell, A. R. , Jain, A. K., *Ann. Thorac. Surg.* 37: 273-278 (1984)。

粘连形成的过程最初包括纤维蛋白构架的建立和正常的组织修复。正常的修复过程允许纤维蛋白溶解与间皮修复。然而,在手术粘连形成中,随着成纤维细胞增生成为网络 and 发生血管生成,纤维蛋白基质成熟,导致在 3 到 5 天内有组织的粘连的建立。Buckman, R. F. 等, *J. Surg. Res.* 21: 67-76 (1976); Rafferty, A. T. , *J. Anat.* 129: 659-664 (1979)。

炎症过程包括受伤组织中中性粒细胞的活化、纤维蛋白沉积和邻近组织的结合、巨噬细胞浸润、成纤维细胞增生到该区域、胶原沉积、血管生成和永久粘连组织的建立。现今,预防性治疗包括预防纤维蛋白的沉积、减轻炎症(类固醇和非类固醇消炎药物)和纤维蛋白沉积的去除。

预防术后粘连形成的干预性措施包括使用水漂浮(hydroflotation)技术或屏障设备。水漂浮法涉及到滴注大体积的聚合物溶液如葡聚糖(粘连研究小组, *Fertil. Steril.* 40: 612-619 (1983))或者羧甲基纤维素(Elkins, T. E. 等, *Fertil. Steril.* 41: 926-928 (1984))到手术空间以使器官保持分开。由氧化再生纤维素(InterceedTM)制备的合成屏障膜、聚四氟乙烯(Gore-tex 手术膜)和从经修饰的透明质酸/羧甲基纤维素(HA/CMC)组合物(SeprafilmTM)制备的完全再吸收膜也被用于降低动物和人术后粘连的形成。Burns, J. W. 等, *Eur. J. Surg. Suppl.* 577: 40-48 (1997); Burns, J. W. 等, *Fertil. Steril.* 66:

814- 821 (1996); Becker, J. M. 等, *J. Am. Coll. Surg.* 183: 297-306 (1996). 这些 HA/CMC 膜的成功可能是因为它们能够在腹膜伤口修复过程(此时粘连形成)使组织分开。发现应用后 3-5 天(该时间期和术后粘连形成的时程相匹配)膜在受伤组织上形成清楚的粘性薄层。Ellis, H., *Br. J. Surg.* 50: 10-16 (1963)。消炎剂如地塞米松或皮质类固醇的腹膜内施用产生了对粘连形成勉强够格的抑制。diZerega, G. S. *Fertil. Steril.* 61: 219-235 (1994); Hocker, M. *Ann. Chir. Gynecol.* 76: 306-313 (1987)。

关节炎

关节炎(如类风湿性关节炎, RA)是一种使人衰弱的慢性炎性疾病, 其影响世界人口的几乎 2%。该症状特征是疼痛、肿胀、滑膜细胞增殖(血管翳形成)、血管生成和关节组织的破坏。在晚期, 该疾病通常损害关键器官并且可以是致命的。该疾病涉及到免疫系统的多个成员(巨噬细胞/单核细胞、中性粒细胞、B 细胞和 T 细胞)、复杂的细胞因子相互作用和滑膜细胞功能失常和增殖。现在推荐用减轻疾病的抗风湿药物(DMARDs)如氨甲蝶呤和与环孢菌素或硫唑嘌呤的组合进行早期积极治疗。 *Arthritis and Rheumatism*, 39(5): 713-722 (1996)。

晶体诱导的关节炎侵袭约 1%的人口, 其特征是在关节中晶体诱导的巨噬细胞和中性粒细胞活化, 然后是许多天的剧痛。该疾病的恶化导致阵痛的间隔缩短, 病人的发病率增加到不可接受的水平。通常用 NSAID 治疗该疾病的症状。对于该疾病和其他形式的炎症性关节炎的病理生理的更详细讨论见, McCarty 等人撰写的关节炎及同类疾病(*Arthritis and Allied Conditions*), Lea 和 Febiger, 费城 1495 (1985)。

牛皮癣

牛皮癣是一种常见的慢性炎性皮肤病, 其特征是增高的、变厚的有鳞的损伤, 该损伤容易发痒、有灼烧感、刺痛和流血。大于 2%的美国人患有牛皮癣, 并且病人通常患有伴随的关节炎症状。该疾病的病因还不清楚, 现今还不能治愈该疾病。有证据支持其是自身免疫疾病。该疾病的其他特征是中性粒细胞活化、细胞增殖和血管形成。

皮肤细胞可遵循两条生长途径：正常生长和伤口愈合。在正常生长中，细胞在基底层产生并向上移动穿过表皮，到达皮肤表面。死细胞以和下面新生细胞相同的速度从表面脱落。伤口愈合期间，引发加速的生长和修复，导致皮肤细胞的快速更新、增加的血液供给和炎症。在一些方面，牛皮癣是扩大的伤口愈合过程。如果皮肤脱落皮肤细胞(角质细胞)不像这些细胞产生的那么快，那么将发生集结。这可导致有鳞损伤和血管生成(以增加血液供给)。同时，淋巴细胞、中性粒细胞和巨噬细胞可引起疼痛、肿胀和炎症。现今的药物治​​疗包括类固醇和非类固醇消炎剂的使用以治疗炎症症状。也使用氨甲蝶呤和环孢菌素，它们具有勉强够格的疗效。在美国现今治疗牛皮癣的费用为每年超过 30 亿美元。

一般性的讨论

本发明提供了岩藻聚糖(包括其衍生物和类似物)以治疗或预防手术粘连、类风湿性关节炎和牛皮癣(其中此处所用治疗包括治疗现存的疾病和抑制潜在的疾病)。如下面的实施例阐明的，岩藻聚糖(尤其是岩藻依聚糖)抑制包括例如在手术粘连中的细胞增殖、炎症反应/事件和血管生成。

在一个实施方案中，使用岩藻聚糖(如岩藻依聚糖)抑制或预防血管生成。在另一个实施方案中，岩藻聚糖(如岩藻依聚糖)被用于抑制或预防炎症细胞活化，这样在疾病位点引发炎症反应的细胞被抑制。这是重要的，例如，因为许多疾病如骨关节炎不一定和疾病位点的炎症细胞聚积有关。这样，岩藻聚糖的使用可以抑制或预防定居巨噬细胞、中性粒细胞和其他炎症引发细胞的长时间的活化，这种长时间的活化导致该疾病的慢性有害影响。在本文中，这些岩藻聚糖的活性被应用于手术粘连、关节炎和牛皮癣。

在本发明的一个实施方案中，可以将岩藻聚糖(包括其衍生物和类似物)制成控释制剂以在疾病位点提供持续有效浓度的该药物。在另一个实施方案中，岩藻依聚糖被用于治疗手术粘连。本文提供了实施例。这些实施例证明了岩藻依聚糖针对来自新生软骨的初级软骨细胞(参与类风湿性关节炎的细胞)的抑制性作用。这表明该药物可能作为抗关节炎药物。尤其是，

当胶原酶和溶基质素和/或其他金属蛋白酶的释放导致医疗问题时岩藻依聚糖明显的抑制胶原酶和溶基质素产生的能力提供了治疗方法。

在其他实施方案中, 可以将岩藻依聚糖和其他治疗药物组合使用以得到抗该疾病过程的更好的疗效和低的毒性。例如, 在治疗手术粘连时, 强抗增殖药物(如阿霉素、喜树碱、依托泊苷、米托蒽醌、氮甲蝶呤、甲萘醌、蓝雪醌、胡桃醌、 β -laperchone、环孢菌素、柳氮磺吡啶、类固醇、雷帕霉素、维甲类、紫杉醇、多西他赛、秋水仙碱和其他微管抑制剂)及它们的其他类似物和衍生物在没有岩藻聚糖存在时于抑制粘连过程所需的药物浓度下可能具有有害的毒性, 但是它们可以在低浓度下和岩藻聚糖(如岩藻依聚糖)组合得到所需效果。

在另一个实施方案中提出岩藻聚糖自身可以是药物的剂型。例如, 可以将岩藻聚糖制成可直接放在手术创伤区表面的薄膜剂, 以便岩藻聚糖的缓慢溶解使组织暴露于持续而有效的药物浓度。实际上, 该制剂可以作为自身(作为活性剂)或者可以置于该制剂中的其他药物(如紫杉醇)的控释药物递送系统。还可以将岩藻聚糖制成片剂、胶囊剂、微球体、糊剂、凝胶剂、粉剂、气雾剂的形式或者作为固体或溶液经口或者经直肠给药。

通常, 可以将岩藻聚糖单独或者作为组合物的部分施用, 可通过作为糊剂、凝胶剂、喷雾剂、微粒剂、膜剂、溶液、液体制剂、洗剂、霜剂或植入物应用或者注射。施用途径和施用部位包括经口施用、全身施用、眼内、皮下、腹膜内、肌肉、关节内、损伤内、阴道内、直肠或局部施用(如在贴剂中)。在某些情况下, 这些途径还可以是建议的岩藻聚糖或岩藻聚糖药物组合剂型的作用位点。治疗有效量的岩藻聚糖可以作为组合物的一部分递送, 并且可以占组合物的约5%到50%、20-80%、80%-100%(w/v)。岩藻聚糖可以在合适的容器中提供, 接下来可以将其在药盒中提供并提供一个标签, 优选地该标签是经相应的政府管理机构如美国食品及药品管理局的批准。

为了治疗粘连, 可以将岩藻聚糖或含有岩藻聚糖的组合物作为溶液、微粒剂、悬浮剂、膜剂、糊剂、凝胶剂、喷雾剂、液体制剂、洗剂、植入

物或其他想要的形式直接应用于疾病或手术部位。还可以用静脉内、皮下、肌内、腹膜内、经口的或其他想要的施用途径通过全身递送岩藻聚糖治疗粘连。为了治疗关节炎，可以将岩藻聚糖或含有岩藻聚糖的组合物作为糊剂、凝胶剂、喷雾剂、液体制剂、洗剂、溶液、悬浮剂或其他想要的形式直接注射入关节。可以用静脉内、肌内、腹膜内、皮下或经口施用途径通过全身递送岩藻聚糖治疗或预防关节炎。

在一些方面，本发明提供了治疗眼的血管生成性疾病。例如，糖尿病性视网膜病变是糖尿病的潜在致瞎性并发症，其破坏视网膜的血管后长出新的血管(血管生成)而导致视觉模糊或者视网膜破坏。黄斑变性由视网膜下面新血管的入侵导致，是美国和欧洲致瞎的主要原因，在美国每年有200,000个新病例，其中只有15%可用现今的激光疗法治疗。在一些实施方案中，本发明提供了使用适用于眼的本文中所讨论的方法和组合物治疗这些疾病的药学途径。例如，岩藻聚糖可以直接应用于眼表面或注射到眼中。这些系统的改进包括化学交联以减缓剂型的溶解速率或者和其他赋形剂如普朗尼克、藻酸盐、丙烯酸盐、纤维素、透明质酸、聚乙二醇、脱乙酰壳多糖(包括它们的类似物和衍生物)以及多种其他可药用制剂混合。

又在另一实施方案中，岩藻聚糖与带正电荷的赋形剂(例如，脱乙酰壳多糖或者聚-L-赖氨酸)形成带电荷的水性凝胶剂。药物(例如，反义寡核苷酸、核酶和寡核苷酸RNA抑制剂)可以掺入这种凝胶剂中以应用于疾病部位。备选地，可以将这种含有药物的凝胶剂或者溶于岩藻聚糖溶液的药物干燥并研磨成颗粒。这些颗粒可以应用于疾病位点以作为控释剂型，或者，该颗粒可以作为转染剂，因为结合岩藻聚糖的表面被摄入细胞中。通过使用可药用赋形剂如普朗尼克、纤维素、藻酸盐、丙烯酸盐、透明质酸、聚乙二醇、脱乙酰壳多糖、可注射赋形剂(包括它们的类似物和衍生物)的赋形剂和多种基于聚合物的载体进一步有利于这些颗粒的应用。

对于转染和含有核酸序列的岩藻聚糖药物的使用，已知为基因治疗的药物前沿受到药物递送问题的限制，因为基因片段或核酸链，如寡核苷酸(包括核酶、反义核苷酸和寡核苷酸RNA抑制剂)的细胞摄取由于这些化合

物的电荷和大分子量而受到抑制。最近,有人提出使用含有基因或核酸的微粒剂(如磷酸钙)作为转染剂以便它们结合到细胞表面并被胞吞或者内陷作用摄入,导致该基因或核酸进入细胞。大多数细胞在膜表面上含有岩藻糖受体。本发明提供了岩藻聚糖作为核酸链转染剂的用途。在一个实施方案中,核酸链可以结合或包封于岩藻依聚糖微粒剂中,并且可以对颗粒进行化学交联以在应用于目标细胞位点前抑制其溶解。

岩藻聚糖不管是单独地或者和其他药物组合,都可以与其他植入身体的材料组合。这些材料包括,但不限于,各种医疗设备如导管、分流器、膜、斯坦特固定模、海绵、填充剂、人工替换的关节及其部分和其他整形外科相关植入物。这些植入物可以含有岩藻聚糖或者用岩藻聚糖包衣,其中所述的岩藻聚糖可以是单独使用的或者与其他药物和赋形剂组合的。

除非另外指出,除了在权利要求书中,“或”的用法包括“和”,反之亦然。除非特别指明或者上下文中清楚地指出,否则不将非限定性术语理解为限定。(例如,“包括”、“具有”和“包含”通常表示“包括但不限于”。)除非特别指明或者上下文中清楚地指出,否则单数形式(包括在权利要求书中),如“一个”和“这个”包括复数意思。

本系统和方法等的范围包括方法加功能和步骤加功能的概念。然而,如果“方法”一词没有特别在权利要求书中陈述,本申请中提出的该术语在权利要求书中不应解释为表示“方法加功能”的关系,当“方法”一词在权利要求书中特别陈述时,应该在权利要求书中将这些术语解释为表示“方法加功能”的关系。类似地,如果“步骤”一词没有特别在权利要求书中陈述,本申请中提出的该术语在权利要求书中不应在方法权利要求中解释为表示“步骤加功能”的关系,当“步骤”一词在权利要求书中特别陈述时,应该在权利要求书中将这些术语解释为表示“步骤加功能”的关系。

实施例

实施例 1: 岩藻依聚糖对滑膜细胞和平滑肌细胞体外增殖的影响

用二甲基噻唑二苯基四唑溴化盐(MTT)增殖/细胞毒性测定法测定增殖。

第一天,在96孔板上每孔铺1500-2000个平滑肌细胞(A7r5大鼠胚胎胸主动脉)或者滑膜细胞(HIG.82兔),使第一列无细胞(空白)。将板置于37℃ CO₂培养箱中。第二天加入各种浓度的岩藻依聚糖。第一列(空白)和第二列(未处理的列)不加岩藻依聚糖用于对照。将细胞暴露48小时。在暴露期的后期,加入溶于培养基的50 μl二甲基噻唑二苯基四唑溴化盐(MTT)并在37℃下孵育4小时。然后,吸出培养基并加入200 μl二甲基亚砷(DMSO)。摇动平板30分钟并在562 nm读吸光度。用已知细胞数的标准光密度图将所测光密度转化成细胞数,细胞的存活力表达为%生长(该值为与对照细胞比较的%)。

如图1所示,48小时的暴露后,岩藻依聚糖对滑膜细胞和平滑肌细胞都诱导了依赖于浓度的细胞增殖的抑制。对增殖具有50%影响的抑制浓度(IC₅₀)分别为15 μM和6 μM。

实施例 2: 岩藻依聚糖对佛波肉豆蔻酸酯(PMA)诱导的中性粒细胞化学发光的影响

该实验将新鲜制备的人中性粒细胞与0.5%(w/v)岩藻依聚糖孵育后用PMA刺激细胞。细胞的刺激(或者活化)导致超氧化物阴离子的产生,其可通过光发射(化学发光)测量。这样,通过化学发光的抑制测定中性粒细胞功能的抑制。在整个研究中使用pH7.4的Hanks缓冲的盐溶液(HBSS)。除非另外说明,所有化学药品都购自Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO)。所有实验都在37℃下进行。中性粒细胞从新鲜收集的人柠檬酸缓冲的全血制备。简要地说,将400 ml血与80 ml溶于HBSS的4%的葡聚糖T500(Pharmacia LKB, Biotechnology AB Uppsala, Sweden)混合并静置1小时。不断收集血浆并取5 ml加入15 ml聚丙烯管(Corning, NY)中的5 ml菲可帕克(Ficoll Paque)(Pharmacia)。500 × g离心30分钟后,洗涤中性粒细胞沉淀,通过20秒低渗休克使无红血球。将中性粒细胞重悬于HBSS

中,冰上保持并在3小时内用于实验。中性粒细胞的存活力和纯度总是大于90%。

在37℃下用各种浓度的岩藻依聚糖孵育细胞15分钟后加入PMA。

在PMA为0.5 μM、细胞浓度为 5×10^6 个细胞/ml的HBSS中进行化学发光研究。向管中加入10 μL溶于在HBSS中的25% DMSO的鲁米诺使其终浓度为1 mM,混合样品以开始中性粒细胞的活化。在37℃下用LKB发光计(Model 1250)检测化学发光,测量前立即摇动。对照管含有细胞、岩藻依聚糖和鲁米诺。

如图2所示,岩藻依聚糖强烈抑制PMA诱导的中性粒细胞的活化。数据来自三次独立的PMA-中性粒细胞孵育。这些数据证明了岩藻依聚糖的消炎效果。

实施例3: 岩藻依聚糖对IL-1诱导的软骨细胞中胶原酶基因和溶基质素基因表达的影响

该分析中测量两个金属蛋白酶——胶原酶和溶基质素的RNA水平。这些基因的过表达导致这两种酶从关节软骨细胞中分泌出来并且这两种基因的过表达可代表类风湿性关节炎的部分病理生理。抑制胶原酶和溶基质素过表达的药物是潜在的抗关节炎药物。如果该药物还显著抑制蛋白聚糖基因表达,那么其抗关节炎潜力就降低了。蛋白聚糖基因表达是软骨细胞正常生理的一部分。原代软骨细胞培养物为从小牛软骨新鲜分离。将细胞铺在100×20 mm培养皿中(2.5×10^6 /ml)并在含有5%胎牛血清(FBS)的Ham's F12培养基中于37℃下孵育过夜。用无血清的培养基饥饿细胞过夜。用浓度为 10^{-6} M、 10^{-7} M和 10^{-8} M的喜树碱预处理细胞6小时。然后向每个平板中加入IL-1(20 ng/ml)并继续孵育平板18小时。通过酸化的异硫氰酸胍法分离总RNA并在变性凝胶上进行电泳。通过在1%的变性凝胶中的电泳分析变性RNA样品(15 μg),将其转移到尼龙膜上,并分别用³²P标记的胶原酶cDNA探针、³²P标记的溶基质素cDNA探针、³²P标记的蛋白聚糖cDNA探针和³²P标记的甘油醛磷酸脱氢酶(PAGDH)cDNA杂交。

PAGDH 水平作为内部标准以确保基本相等的加样。扫描 X 光片上的实验结果并用 HP ScanJet 分析。

如图 3 所示, 岩藻依聚糖在浓度为 0.5%(w/v)时完全抑制胶原酶和溶基质素的表达而不过分抑制蛋白聚糖的表达。在浓度为 0.1%(w/v)时, 对胶原酶和溶基质素的表达有强烈的抑制而对蛋白聚糖的表达无任何抑制作用。这些结果证明了岩藻依聚糖的消炎效果。

实施例 4: 岩藻依聚糖对鸡胚的尿囊绒膜中血管生成的影响(CAM 测定法)

从本地孵化场得到受精鸡蛋, 并将其置于带有自动旋转器的孵化器中, 37℃下保持 3.5 天后去壳或开窗。

将几张无菌蜡纸放在在气室产生的窗口上以防止污染和蛋内容物的脱水。通过用 70%的乙醇喷雾这些 4 cm × 4 cm 的纸张对它们进行消毒并将其在层流罩超静台上干燥。3 天后在孵化器中手工旋转这些鸡蛋以便它们的尖端朝上 5-10 分钟以使鸡蛋内容物从内膜分离。用 70%的乙醇和 Kimwipe 清扫整个蛋壳以清洁并消毒鸡蛋的外面。在层流罩超静台中, 使鸡蛋钝端向上并通过镊子末端小心弄破蛋壳在蛋的钝端弄一个孔。用镊子轻轻除去蛋壳残渣以便在钝端形成一个孔。该圆孔直径为 2 到 3 cm 并且不破坏内膜。一旦在壳中产生了该孔, 用镊子轻轻撕下并除去内部蛋壳膜(其容纳蛋内容物), 小心不要破坏尿囊绒膜(CAM)(其容纳蛋黄并发育鸡胚)。

然后通过轻轻拉伸 parafilm 并将其置于孔的周围, 用消毒的 parafilm 蜡纸将孔盖住。然后将鸡蛋放在孵化器(37℃)的蛋架上并以防止鸡蛋转动的方式将其放置。6 天后从孵化器(钝边向上)逐一取出每只鸡蛋, 并除去覆盖窗口的 parafilm 以便直接接触从胚的后肠产生的 CAM。通过在 60℃下溶化聚(ε-己内酯)(PCL)并将岩藻依聚糖物理混合到 PCL 中并通过冷却到室温使球丸变硬来制备载有岩藻依聚糖的 PCL 球丸。将岩藻依聚糖球丸放在正在生长的 CAM 毛细管床上。然后用 parafilm 重新密封鸡蛋内容物并

放回 37℃ 孵育器中。2 天后, 记录对 CAM 维管结构的分析(将药物放在 CAM 毛细血管床上 48 小时后)。用无血管等级评价药物对 CAM 的影响, 该等级将药物作用分为 0、1、2 或 3 级。无血管等级的赋值描述如下:

- 0 无抗血管生成活性
- 1 微管减少
- 2 药物球丸大小(直径 2 mm)的小的无血管区
- 3 直径为 4-5mm 的无血管区

如表 1 所示, 岩藻依聚糖强烈抑制 CAM 中血管生成。PCL 中的 2%W/W 的低浓度岩藻依聚糖分别对 4 个 CAM 部分抑制血管生成或对 2 个 CAM 完全抑制血管生成。

表 1: 岩藻依聚糖的抗血管生成活性。每列中的数字显示了无、部分或最大抑制血管生成的鸡蛋数(CAM 数)。

药物浓度	抗血管生成活性		
	无(0)	部分(1-2)	最大(3)
岩藻依聚糖 2.0%	-	4	2
岩藻依聚糖 5.0%	-	1	4
岩藻依聚糖 15.0%	-	2	3
岩藻依聚糖 30.0%	-	2	1
对照	11	-	-

这些数据证明了岩藻依聚糖的抗血管生成活性, 并表明岩藻依聚糖的聚合物缓释制剂是释放治疗有效浓度的药物而不引起过分毒性的有效方法。

实施例 5: 在乙烯乙酸乙烯酯膜剂和聚己内酯糊剂中包封岩藻依聚糖
将 5 mg 岩藻依聚糖(Sigma)和 45 mg 乙烯乙酸乙烯酯 (EVA, 分子量约 50 k, Polysciences)溶解/悬浮于 1 ml 二氯甲烷中。吸取 200 μ l 溶液到

直径为 1 cm 的特氟隆圆盘上并干燥过夜(溶剂蒸发)以形成弹性薄膜而得到厚度约 100 μm 的约 10 mg 膜剂。

将膜剂的部分 5 mg 置于含有 10 ml 磷酸缓冲液(PHS, pH 7.4)的 20ml 有盖玻璃管中以测定药物从这些膜剂的释放速率。将管盖上并置于定轨摇床(37℃)中。在特定时间取出管并通过吸收光谱法分析释放的药物量。岩藻依聚糖的释放图(图 4)的特征是最初为爆发性的药物释放,接着为缓慢的持续释放。岩藻依聚糖的这种剂型代表了一种生物适合的、生物可降解的、可注射的药物制剂,其以可控的方式释放药物。

PCL 糊剂: 在 60℃ 下用抹刀研磨将岩藻依聚糖混合进聚己内酯(PCL, Birmingham polymers, 分子量 54K), 所得浓度为 10%(w/w)。将混合物吸收到 1 ml 塑料注射器中并冷却。可以在 56℃ 下通过 18 号注射针头注射该制剂。

为了测量从 PCL 糊剂的药物释放, 将 10 mg 等分试样的熔化糊剂注射到 15 ml 玻璃管的底部, 冷却并固定。向每管中加入 15 ml PBS 并将管子盖上, 并在 37℃ 烘箱中上下翻转。在特定时间取出管并通过吸收光谱法分析释放的药物量。岩藻依聚糖的释放图见图 5 所示。岩藻依聚糖的释放特征是最初为爆发性的药物释放, 接着为缓慢的持续释放。岩藻依聚糖的这种剂型代表了一种生物适合的、生物可降解的、可注射的药物制剂, 其以可控的方式释放药物。

实施例 6: 用于治疗大鼠手术粘连的载有岩藻依聚糖的膜剂

用手术粘连的大鼠盲肠侧壁模型研究岩藻依聚糖对手术粘连的效果。在该模型中, 将 16 只大鼠分成两组, 每组 8 只。手术创伤后, 立即将大鼠用含有岩藻依聚糖的交联的透明质酸(HA)膜剂处理或者不处理(对照组)。

材料和方法 医药级的透明质酸钠得自 Lifecore Scientific。所有溶剂都是 HPLC 级且得自 Fisher。塑料培养皿得自 Fisher Scientific。乙基-3-(二甲氨基)碳二亚胺(EDAC)和岩藻依聚糖得自 Sigma(St. Louis, Mo)。

膜剂的制备 通过制备 0.6% w/v 岩藻依聚糖、0.4% w/v 透明质酸钠

和 0.15% w/v 甘油的水溶液来制备载有岩藻依聚糖的膜剂。通过制备 0.4% w/v 透明质酸钠和 0.15% w/v 甘油在水中的溶液或混合物来制备对照膜剂(无岩藻依聚糖)。每种溶液吸取 4g 到单独的直径为 2.5cm 的塑料培养皿中并在 60℃ 干燥 24 小时得到载有岩藻依聚糖的膜剂和对照膜剂。所含的交联剂 EDAC 为 4mM(终浓度)。然后用手术刀小心将每种干燥的膜剂从培养皿中移出。

消毒 将膜剂放在 5cm × 5cm 称量纸(Fisher scientific)中包好并在塑料包中热封。然后, 用钴-60 放射源的 γ 放射对膜剂进行最后的消毒并将其暴露于 2.5 Mrad 的辐射并在冰上冷却密封管。

动物研究 手术创伤诱导如下: 16 只成熟 Sprague Dawley 大鼠(每只重量为 225-350 g)得自 Charles River 实验室, Wilmington, MA。只将总体上正常的动物(即, 皮毛干净无皱、眼睛明亮清澈、姿态活跃)用于研究。将动物随机分配于两组中的一组, 称重并用盐酸氯胺酮(6 mg/kg)在大腿的大肌肉中单次注射以将其麻醉。对腹部剃毛并用醇清洗。从白线尾部约 2cm 处开始在皮肤上切开 4cm 的切口, 同时用镊子夹住肌肉。用机械摩擦设备(其允许操作人员在固定区域上方独立地、受控地摩擦)将盲肠在腹部和背部表面摩擦 4 次。估计盲肠的粘连并根据事先定义的打分系统打分:

0=无粘连

1=具有容易鉴定的平面的薄的粘连

2=具有可自由分割的平面的轻微粘连

3=具有难以分割的平面的中等粘连

4=具有不可分割的平面的紧密粘连

(1 级粘连是最低水平的可识别粘连(具有可鉴定的平面的薄的粘连))。

盲肠摩擦后, 组 1 中动物没有接受治疗。组 2 中动物接受上面所讨论的岩藻依聚糖-HA 膜剂。将膜剂围绕盲肠包裹。然后用 3.0 Dexon 缝合线将切开缝合。手术后第 7 天, 对动物执行安乐死并估计 2 级(或更高)的术后粘连的存在。2 级粘连定义为具有可自由分割的平面的轻微粘连。

结果:

表 2.

组	粘连 ≥ 2 的%	平均发生率 $\pm$ SEM	无粘连的%
对照	75	1.4 ± 0.4	25
载有岩藻依聚糖的膜剂	38	0.5 ± 0.4	50

· 膜仅仅包围约一半的盲肠

· 验尸时没有发现不正常(在盲肠上或者切口中线上都无残留物质、无腹水、无不正常愈合现象)

结果证明了载有岩藻依聚糖的膜剂有效抑制粘连的形成, 因为粘连的平均发生率降低了并且在使用岩藻依聚糖处理的大鼠中无粘连的大鼠百分数增加了。完全包围盲肠的载有岩藻依聚糖的膜剂可能在抑制粘连形成时更有效。

从前述可知, 虽然在本文中讨论了特定实施方案以进行阐明, 可以进行各种修改而不背离其精神和本公开的范围。所以, 在本文中提出包括这些修改以及主题的所有排列与组合的系统和方法等是不受到限制而只受附加的权利要求的限制。

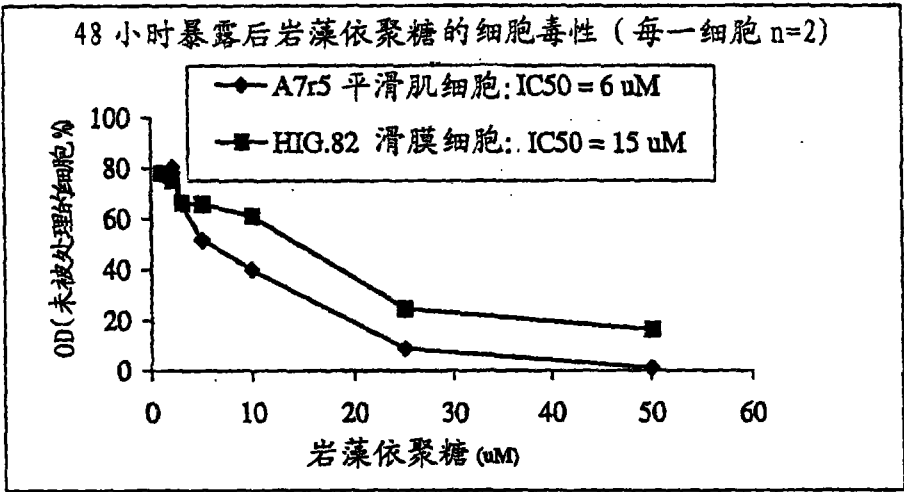


图 1

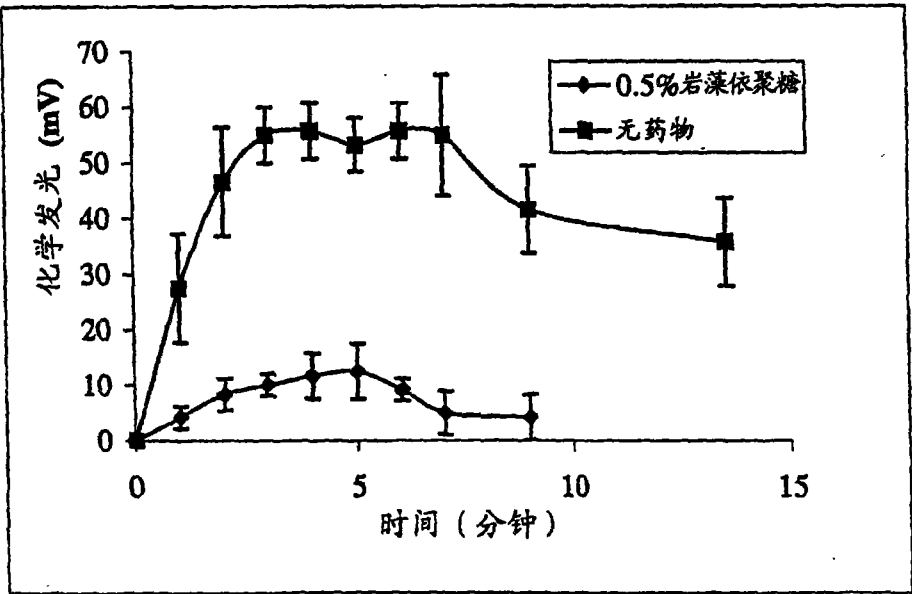


图 2

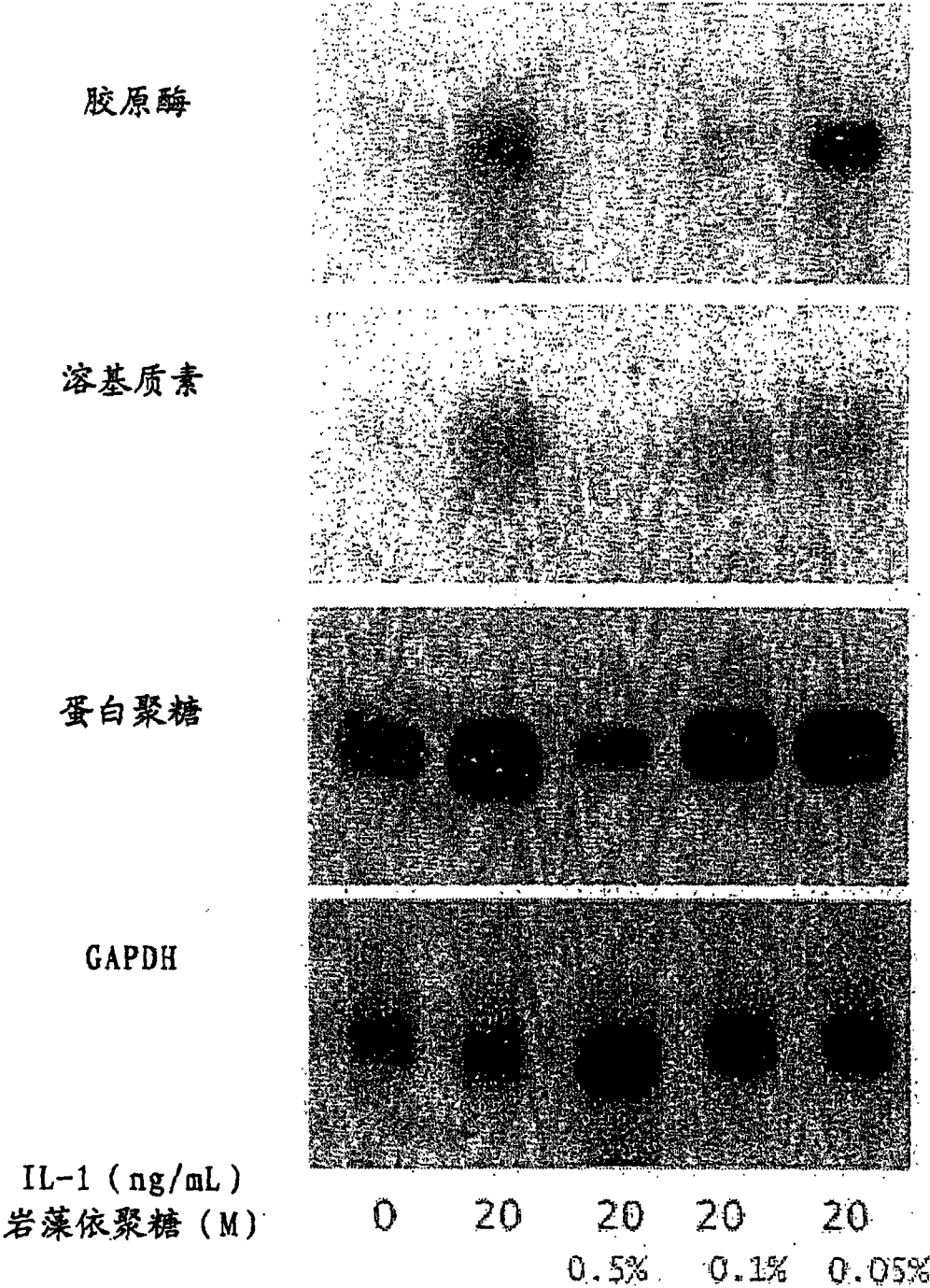


图 3

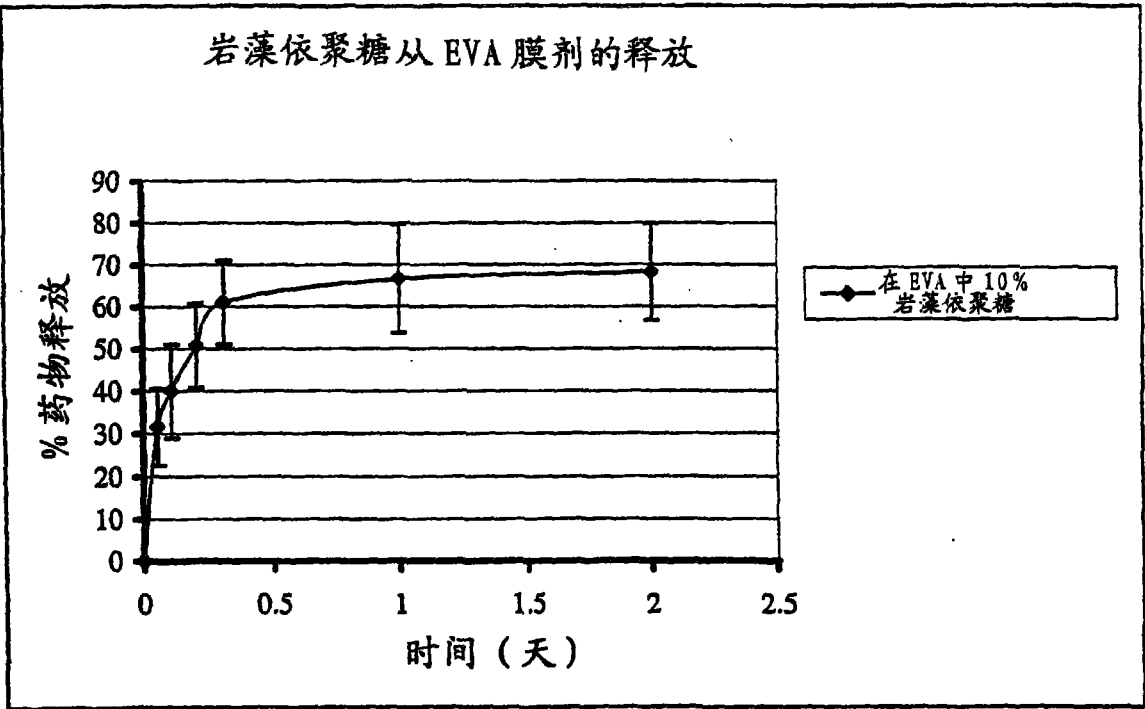


图 4

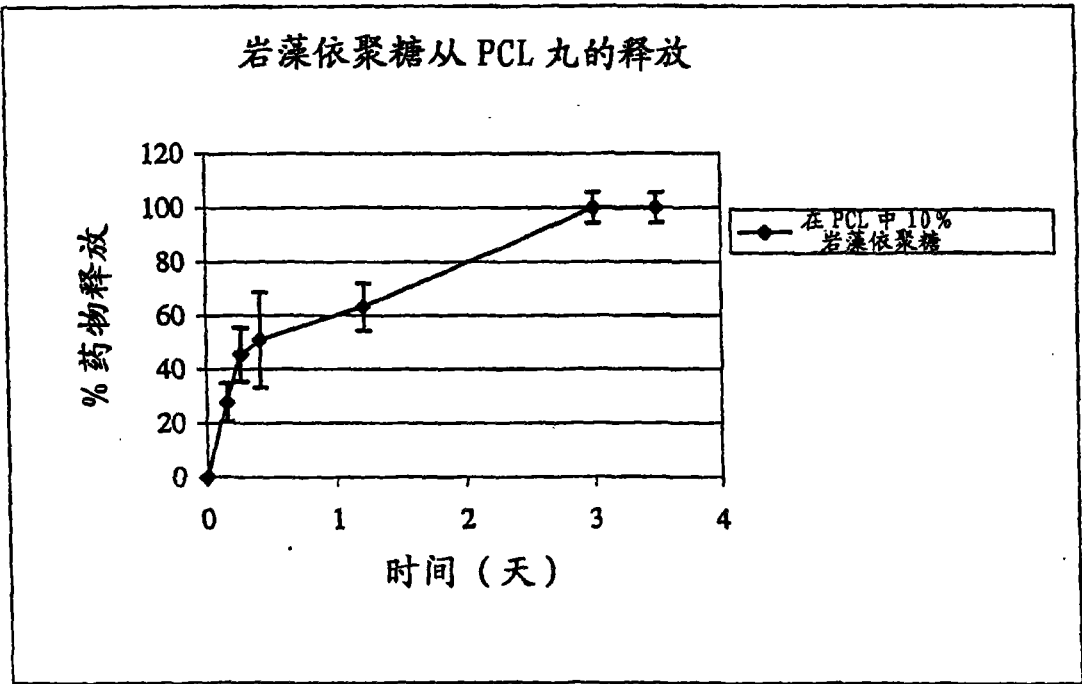


图 5