

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2015 年 12 月 17 日 (17.12.2015)



(10) 国际公布号
WO 2015/188423 A1

- (51) 国际专利分类号:
A61K 47/48 (2006.01) *A61K 48/00* (2006.01)
A61K 31/155 (2006.01) *A61P 3/10* (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2014/082486
- (22) 国际申请日: 2014 年 7 月 18 日 (18.07.2014)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201410259274.2 2014 年 6 月 11 日 (11.06.2014) CN
- (71) 申请人: 中国药科大学 (CHINA PHARMACEUTICAL UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国江苏省南京市鼓楼区童家巷 24 号, Jiangsu 210009 (CN)。
- (72) 发明人: 姜虎林 (JIANG, Hulin); 中国江苏省南京市鼓楼区童家巷 24 号, Jiangsu 210009 (CN)。 王凤珍 (WANG, Fengzhen); 中国江苏省南京市鼓楼区童家巷 24 号, Jiangsu 210009 (CN)。 邢磊 (XING, Lei); 中国江苏省南京市鼓楼区童家巷 24 号, Jiangsu 210009 (CN)。

(74) 代理人: 南京纵横知识产权代理有限公司 (NANJING ZONGHENG INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY); 中国江苏省南京市鼓楼区山西路 8 号金山大厦 B 座 9 楼 D, Jiangsu 210009 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO,

[见续页]

(54) Title: GUANIDINE HYPOGLYCEMIC DRUG-POLYSACCHARIDE CONJUGATE, PREPARATION METHOD THEREFOR AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 胍类降糖药-多糖共轭物及其制备方法和用途

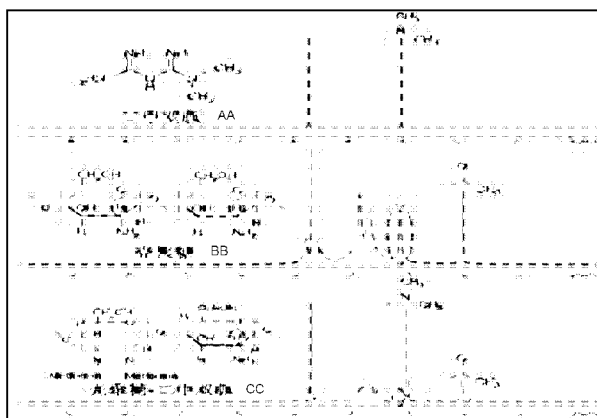


图 1 / Fig. 1

AA DIFORMIN
BB CHITOSAN

CC DIFORMIN-CHITOSAN

(57) Abstract: A guanidine hypoglycemic drug-polysaccharide conjugate, a preparation method therefor and a use thereof are disclosed. The conjugate is formed by connecting primary amine on guanidine drug and aldehyde group on oxidative polysaccharide through a Schiff base bond. Compared with an original guanidine hypoglycemic drug, on the one hand, the conjugate can be used as a hypoglycemic macromolecule prodrug with the enhanced pharmacologic action, less adverse reaction and higher safety; on the other hand, the conjugate can be combined with therapeutic gene for treating diabetes mellitus, in particular obese diabetic, and the curative effects of the conjugate on cellular level and animal model are better than those of the original guanidine hypoglycemic drug and the therapeutic gene. These results prove that the guanidine hypoglycemic drug-polysaccharide conjugate has great potential in the aspect of drug combined gene therapy of diabetes mellitus due to the excellent biocompatibility and high gene transfer efficiency. The synthesizing and preparing method of the conjugate is simple, the process is mature and the yield is high.

(57) 摘要:

[见续页]



WO 2015/188423 A1



RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, **本国际公布:**

CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, — 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。
TG)。

本发明公开了一种胍类降糖药-多糖共轭物及其制备方法和用途；该共轭物是胍类药物上的伯胺与氧化多糖上的醛基通过西弗碱键相连。与原胍类降糖药相比，该共轭物一方面可以作为降糖的高分子前药，且药理作用增强，不良反应少，安全性更高；另一方面该共轭物可以联合治疗基因用于糖尿病，尤其是肥胖症糖尿病的治疗，在细胞水平和模型动物上疗效好于原药和治疗基因。这些结果证明胍类降糖药-多糖共轭物由于具有优良的生物相容性和高效的基因传递效率，因此在糖尿病的药物联合基因治疗方面将具有巨大的潜力；且本发明合成和制备方法简单，工艺成熟，产率高。

胍类降糖药-多糖共轭物及其制备方法和用途

技术领域

本发明涉及一种胍类降糖药-多糖共轭物，具体涉及一种具备良好生理活性和生物可降解性的胍类降糖药-多糖共轭物作为高分子前药用作基因载体，本发明还涉及该共轭物的制备方法及其共轭物载基因用于糖尿病的治疗，属于药物与基因技术领域。

背景技术

据《美国医学会杂志》(JAMA)最新研究表明，中国已成为糖尿病人口大国，成人糖尿病患者数量估计超过1亿，其中II型糖尿病占90%以上。随着生活水平提高，人们饮食结构和生活方式发生了变化，导致肥胖症患者也逐年增加，有研究表明，80%以上的II型糖尿病患者同时伴有肥胖。肥胖症发病率的上升是诱发II型糖尿病的发病率迅速上升的最重要因素之一。肥胖者常伴有内分泌代谢紊乱、高胰岛素血症及脂肪、肌肉、肝细胞的胰岛素受体数目减少或其亲和力降低，对胰岛素不敏感，导致胰岛素抵抗(IR)，从而葡萄糖利用障碍，发生糖尿病，此多为非胰岛素依赖性糖尿病(NIDM)，即II型糖尿病。该病是一组以高血糖为特征的代谢性疾病，其典型症状是“三多一少”，即多饮、多食、多尿、消瘦。非典型症状：乏力、口干、视力下降、皮肤瘙痒、手脚麻木，疼，走路如踩棉花样等。

近年来，对糖尿病病理生理学的认识水平和在此基础上的治疗水平有了很大的提高。II型糖尿病早期患者可通过改善生活方式(如健康饮食、适量运动、安全减肥、戒烟及避免二手烟暴露等)得以控制。但大多数患

者需要口服降糖药物来帮助控制体内血糖，有些甚至仍需要胰岛素注射。然而，绝大多数II型糖尿病及糖尿病相关并发症（如导致失明和肾功能衰竭等）的发病原因还不清楚，尚无根治手段。近年来，随着基因重组技术及转基因技术的迅速发展，尤其是糖尿病相关基因的克隆的研究，糖尿病基因治疗有了较大的发展。

目前应用于基因治疗的载体主要有病毒载体和非病毒载体两种。病毒载体转染效率高，但存在免疫原性高、毒性大、目的基因容量小、靶向特异性差、制备较复杂及费用较高等缺点，因此人们愈来愈重视用于递送基因的非病毒载体研究。

发明内容

目的：为了克服现有技术中存在的不足，本发明提供一种胍类降糖药-多糖共轭物，该共轭物是由氧化多糖的醛基与胍类降糖药的伯胺反应通过西弗碱键生成，该共轭物荷较高的正电，可以进一步通过静电相互作用与基因结合形成复合物；从而提供一种新型有效递送基因用于 II 型糖尿病治疗的非病毒载体；该递送系统是一种对人体无毒副作用，尤其对肥胖症糖尿病有更好疗效的降糖药与基因共递送系统。

技术方案：为解决上述技术问题，本发明采用的技术方案为：

一种胍类降糖药-多糖共轭物，所述胍类降糖药-多糖共轭物为多糖氧化产生的醛基与胍类降糖药上的伯胺反应通过西弗碱键连接。

其中，胍类降糖药选自二甲双胍、丁双胍和苯乙双胍；

多糖选自壳聚糖、壳寡糖、葡聚糖、透明质酸、肝素、软骨素、琼脂糖、海藻酸中的一种或几种。

作为优选方案，所述胍类降糖药-多糖共轭物为二甲双胍-壳聚糖。

本发明还提供上述胍类降糖药-多糖共轭物的制备方法，包括以下步骤：

1) 氧化多糖的合成：将多糖溶于水或弱酸缓冲液中，然后加入一定量的氧化剂，在 4-90 °C 下搅拌适宜时间，过滤后加入过量还原剂继续搅拌一段时间，之后用水充分透析，冻干得粉末固体的氧化多糖；

2) 称取适量氧化多糖固体溶于一定溶剂后，加入胍类降糖药，搅拌适宜时间，透析冻干即得到共轭物。

所述弱酸缓冲液选自 NaAc-HAc、 NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 、 KH_2PO_4 - K_2HPO_4 ；和/或，所述氧化剂选自高碘酸钠、高碘酸钾；和/或，所述还原剂选自乙二醇、亚硫酸氢钠。所述的制备方法中，其中多糖单体与氧化剂的摩尔比介于 0.01-100。其中反应温度介于 4-90 °C。其中氧化时间介于 0.1-72 h。其中反应溶剂选自水，或不同 pH 的 (pH 1-pH 14) 溶液中，该溶液包括醋酸、磷酸、氢氧化钠等溶液。

所述的胍类降糖药-多糖共轭物胍类降糖药-多糖共轭物作为非病毒基因载体的应用。

所述的胍类降糖药-多糖共轭物在用于治疗 II 型糖尿病药物中的应用。

所述的胍类降糖药-多糖共轭物，用作治疗型聚合物前药，通过静脉注射，腹腔注射，粘膜给药或肺部吸入给药。

胍类降糖药-多糖共轭物/基因复合物的制备方法，步骤如下：将上述胍类降糖药-多糖共轭物用水配置成 0.001%-10% 的共轭物溶液，得到聚合物前药溶液；将治疗有效量的基因配置成 0.001%-10% 的基因溶液，与共轭物溶液混合，经涡旋处理，胍类降糖药-多糖共轭物与基因通过静电相互作用

进行复合得到 10-1000nm 复合物溶液。

所述基因选自固醇调控元件结合蛋白基因 (shSREBP-1a 、 shSREBP-1c 或 shSREBP-2)、瘦素基因 (leptin cDNA)、胰岛素基因 (insulin gene)、胰高糖素样肽-1 基因 (GLP-1 gene)、钙响应性激酶基因 (shCaMKII)。

具体方案如下:

多糖按照上述的氧化方法进行反应, 进一步在氧化多糖上引入胍类降糖药, 使其荷更多的正电, 在水溶液中可以通过静电相互作用与基因形成复合物。因此该胍类降糖药-多糖共轭物即是一种优良的聚合物前药, 又是一种良好的传递基因的载体材料。该共轭物可用于静脉注射, 腹腔注射, 粘膜给药或肺部给药。该共轭物与基因形成的复合物, 粒径在 10-1000nm, 均匀度好, 再分散性好, 载药量和载基因量高。

胍类降糖药-多糖共轭物的合成、表征及其与基因形成复合物的制备方法、表征及其细胞药效考察详细说明如下:

一、胍类降糖药-多糖共轭物的合成

1. 氧化多糖的合成

取一定量的多糖和氧化剂分别溶解于 25 mL 弱酸缓冲液中, 在 4 °C 通 N₂ 条件下溶解, 然后将氧化剂溶液慢慢滴加到多糖溶液中, 在 4 °C 下继续搅拌 48h 后, 加入过量的还原剂终止反应, 将所得产物用透析袋分别在含 0.2 M NaCl 的弱酸缓冲液和去离子水中透析; 最后将产品冻干, 保存在 -20 °C 下备用。

2. 胍类降糖药-多糖共轭物的合成

将胍类降糖药加到一定质量浓度的多糖溶液中, 4 °C 下搅拌反应 48h

后，用截留分子量 3500 的透析袋在去离子水中透析，冻干，将终产物保存在-20 °C 下备用。

本发明与传统治疗糖尿病的基因载体相比具有以下特点：

本发明制备胍类降糖药-多糖共轭物，作为非病毒载体，合成方法简单，反应步骤少，产率高，环境污染少。

二、胍类降糖药-多糖共轭物的表征及毒性考察

1. 胍类降糖药-多糖共轭物的表征方法

本发明制备胍类降糖药-多糖共轭物，可通过氢核磁鉴定结构及凝胶渗透色谱测定分子量进行表征。

2. 胍类降糖药-多糖共轭物的毒性考察

胍类降糖药-多糖共轭物的细胞毒性具体测定方法是：采用不同的细胞系评价胍类降糖药-多糖共轭物的细胞毒性。将细胞按 1×10^4 个细胞/孔的量接种在 96 孔平底板中，在 37 °C 下，5% CO₂ 培养箱，于 DMEM 培养基中培养 18h 后，加入用不同浓度的共轭物继续培养一定时间后，再加入 20 μL MTS，培养 4 h 后，用酶标仪在 490 nm 检测吸光值。

三、胍类降糖药-多糖共轭物与基因的复合物的制备方法

所有的胍类降糖药-多糖共轭物/基因复合物均是新鲜制备，具体方法是，将含基因溶液加到等体积下的共轭物溶液中，轻轻地涡旋 1 min，室温下保持 30 min。其中，基因选自固醇调控元件结合蛋白基因(shSREBP-1a 、 shSREBP-1c 或 shSREBP-2)，瘦素基因(leptin cDNA)，胰岛素基因(insulin gene)，胰高糖素样肽-1 基因(GLP-1 gene)，钙响应性激酶基因(shCaMKII)；

四、胍类降糖药-多糖共轭物与基因的复合物的表征方法

1. 胍类降糖药-多糖共轭物/基因粒径和电位表征。

将胍类降糖药-多糖共轭物 10 mg 溶解于 10 ml 水中，超声溶解，0.45 μm 滤膜过滤，作为储备液。分别将 1 mL 含 80 μg 的基因水溶液加入到等体积胍类降糖药-多糖共轭物水溶液中（其由储备液稀释制备，溶液中胍类降糖药-多糖共轭物与基因按不同的质量比配置），轻轻涡旋 1 min，室温下保持 30 min，用动态光散射分别测定其粒径和电位。

2. 胍类降糖药-多糖共轭物对基因压缩和保护能力通过电泳表征。

共轭物/DNA 的以不同的质量比，加入上样缓冲液，最后的体积为 12 μL 。为了评价聚合物对 DNA 的保护能力，DNaseI 作为降解酶。复合物被加到 1% 琼脂糖凝胶中，用 TAE 缓冲液作为电解质，50 V 下跑 40 min。

3. 胍类降糖药-多糖共轭物/基因复合物的形貌通过透射电镜观察。

取 1 滴胍类降糖药-多糖共轭物/DNA 复合物滴到铜网上，干燥 10 min，在电镜下观察其形态。

5. 胍类降糖药-多糖共轭物/基因复合物转染效率考察

采用特定细胞系评价胍类降糖药-多糖共轭物/基因复合物的体外转染效率。将细胞按 10×10^4 个细胞/孔的量接种在 24 孔平底板中，在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下，5% CO_2 培养箱下，于 DMEM 培养基中培养 18-24 h 后，吸取培养基，用无血清的含共轭物/pGL3 复合物培养基孵育 4 h 后，换用新鲜的含血清培养基，于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下培养一定时间。荧光素酶活性测定方法按照生产厂家的说明进行测定。用 BCA 蛋白测试试剂盒提取蛋白后，其浓度用酶标仪测定，再将每个样品荧光素酶活性进行标准化，考察转染效率。

6. 胍类降糖药-多糖共轭物/基因复合物细胞药效考察

采用特定细胞系评价胍类降糖药-多糖共轭物/功能基因复合物的细胞药效。将细胞按 30×10^4 个细胞/孔的量接种在 6 孔平底板中, 在 37 °C 下, 5% CO₂ 培养箱下, 于 DMEM 培养基中培养 18-24 h 后, 吸取培养基, 将该细胞按 30×10^4 个细胞/孔的量接种在 6 孔平底板中, 孵育 18-24 h 后, 吸取培养基, 用含胍类降糖药-多糖共轭物/基因复合物的无血清培养基培养一定时间后, 换用新鲜的含血清培养基, 于 37 °C 下继续孵育一定时间。蛋白和 RNA 的提取分别按照试剂盒的说明进行操作。用 western blot 检测细胞中的蛋白含量; 逆转录 RNA 后, 用 q-PCR 检测细胞中的 mRNA 含量。

有益效果: 本发明提供的胍类降糖药-多糖共轭物, 为基于生物相容性多糖载体材料, 具有很低的细胞毒性;

本发明为基因与降糖药共递送系统, 具有显著的转染效率;

本发明中药物的适应症: 糖尿病, 尤其适用于肥胖症的 II 型糖尿病;

本发明提供的胍类降糖药-多糖共轭物, 既可作为单一治疗型高分子前药, 又可作为基因递送的优良载体, 与降糖药达到协同治疗的目的;

本发明制备的胍类降糖药-多糖共轭物能有效地与基因形成复合物, 可用于静脉注射、腹腔注射、粘膜给药或肺部给药, 具有安全性高, 粒径控制在 10-1000 nm, 在基因治疗领域具有广阔的应用前景。

附图说明

图 1 为本发明实施例中的二甲双胍-壳聚糖的氢核磁表征;

图 2 为本发明实施例中的二甲双胍-壳聚糖的细胞毒性考察;

图 3 为二甲双胍-壳聚糖/DNA 复合物的电位表征;

图 4 为二甲双胍-壳聚糖/DNA 复合物的形态表征;

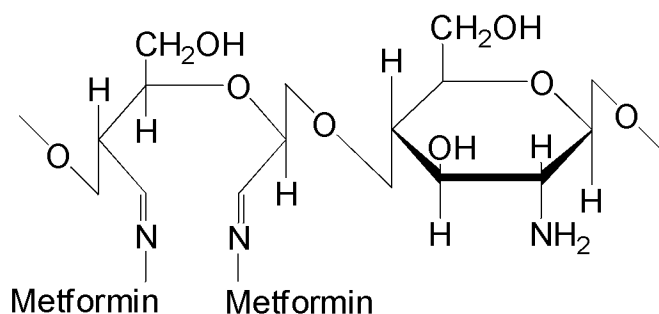
图 5 为二甲双胍-壳聚糖/基因复合物的细胞转染考察

图 6 为二甲双胍-壳聚糖/基因复合物的细胞药效考察。

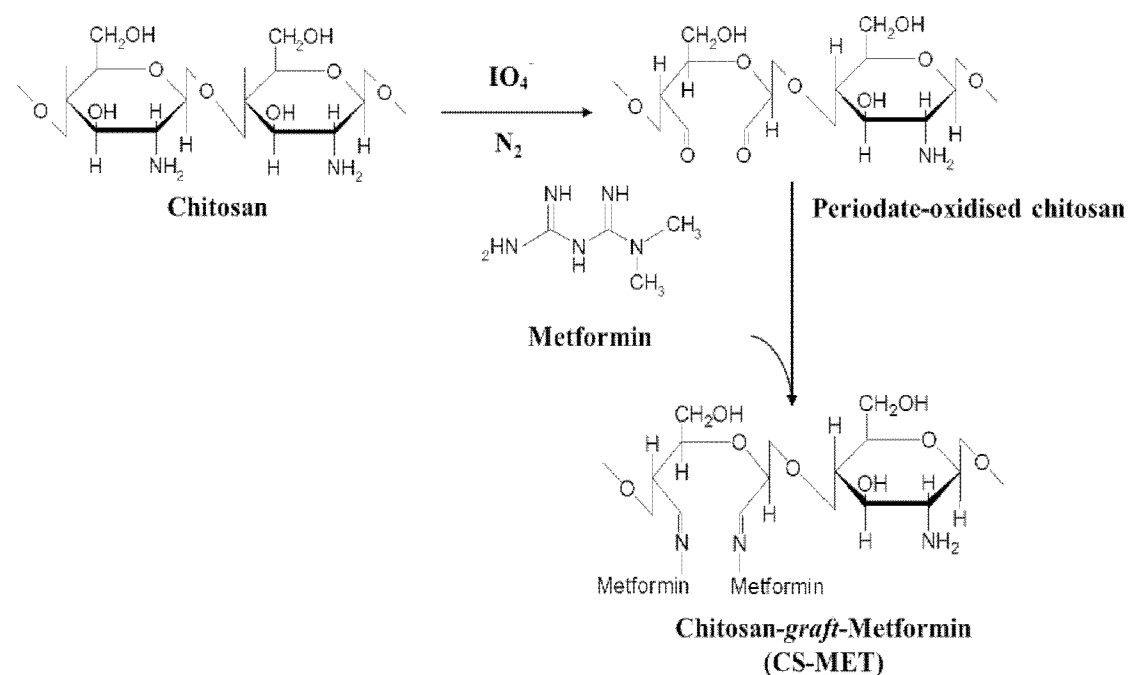
具体实施方式

下面结合附图对本发明作更进一步的说明。

实施例 1



二甲双胍-壳聚糖的合成:



将 0.209 g 壳聚糖和 0.575 g 高碘酸钾分别溶解于 25 mL pH 4.5 的醋酸缓冲液中 (分别含 0.05 mol/L 的壳聚糖单体和 0.1 mol/L 的高碘酸钠), 在 40℃ 下继续搅拌 1 h 后, 加入与高碘酸钾等摩尔的乙二醇终止反应, 将所得产物用截留分子量 3500 的透析袋在分别在含 0.2 M NaCl 的 pH 4.5 醋

酸缓冲液和去离子水中透析，冻干。称取一定量的氧化壳聚糖，溶解于 1M 的氢氧化钠溶液中，再加入一定量的二甲双胍（摩尔量为氧化壳聚糖单体摩尔量的 2 倍），4 °C 下搅拌反应 48 h 后，用截留分子量 3500 的透析袋在去离子水中透析，冻干，将终产物保存在 -20 °C 下备用。

实施例 2

二甲双胍-壳聚糖的结构鉴定和分子量表征

如图 1 所示，二甲双胍-壳聚糖共轭物通过氢核磁鉴定结构。与壳聚糖 2 位碳上质子信号峰（用虚线标示）相比，壳聚糖-二甲双胍结构中壳聚糖 2 位碳上质子信号峰基本消失（ $\delta_{\text{H}} = 3.2 \text{ ppm}$ ），说明该结构中壳聚糖上的 C-C 键成功的被高碘酸钾氧化断裂，通过壳聚糖-二甲双胍 ^1H NMR 图谱，分别显示了二甲双胍（ $\delta_{\text{H}} = 3.0 \text{ ppm}$; $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ）及壳聚糖（ $\delta_{\text{H}} = 2.0 \text{ ppm}$; $-\text{COCH}_3$ ）的特征信号峰，进一步表明壳聚糖-二甲双胍的形成。

壳聚糖-二甲双胍分子量通过凝胶渗透色谱检测：柱温为 25 °C，流速 0.5 mL/min，流动相为 0.5 M 乙酸铵溶液。壳聚糖原料分子量为 100 kDa，氧化后其重均分子量为 19.01 kDa，接枝二甲双胍后，形成的壳聚糖-二甲双胍重均分子量为 28.82 kDa。

壳聚糖的初始 分子量 (kDa)	氧化壳聚糖的 重均分子量 (kDa)	二甲双胍-壳聚 糖的重均分子 量 (kDa)
100	19.01	28.82

实施例 3

二甲双胍-壳聚糖的细胞毒性考察

采用 L02 和 HepG2 细胞系评价根据实施例 1 合成的二甲双胍-壳聚糖的细胞毒性。L02 和 HepG2 细胞分别为人正常肝细胞和人肝癌细胞。将这两种细胞以 1×10^4 个细胞/孔的量接种在 96 孔平底板中，在 37 °C，5 % CO₂ 培养箱中，用 DMEM 培养基孵育 18 h 后，用不同浓度的聚合物处理 24 h 后，用 20 μL MTS 溶液处理 4 h 后，用酶标仪检测其在 490 nm 下的吸光值。如图 2 所示，在浓度 0-100 μg/ml 范围内，二甲双胍-壳聚糖对 L02 和 HepG2 均无细胞毒性。

实施例 4

二甲双胍-壳聚糖与基因复合物的制备

将实施例 1 二甲双胍-壳聚糖 10 mg 溶解于 10 ml 水中，超声溶解，0.45 μm 滤膜过滤，作为储备液。分别将 1 mL 含 80 μg 的基因水溶液加入到等体积二甲双胍-壳聚糖共轭物水溶液中（其由储备液稀释制备，溶液中二甲双胍-壳聚糖共轭物与基因的质量比分别为 1:1, 1:5, 1:10, 1:20, 1:30），轻轻涡旋 1 min，室温下保持 30 min，用动态光散射测定复合物的大小和表面电荷。如图 3 所示，二甲双胍-壳聚糖基因复合物的粒径随质量比的增大而减小，电荷随质量比的增大而增大，最后二甲双胍-壳聚糖基因复合物的粒径和电荷均趋于稳定，约 100 nm 和 20 mV。

实施例 5

二甲双胍-壳聚糖共轭物对 DNA 压缩和保护能力通过电泳表征

将二甲双胍-壳聚糖与 DNA 按不同质量比（0.5-30）复合，然后将该复合物于 50 V 条件下在 1% 琼脂糖凝胶上跑 40 min，结果表明二甲双胍-壳聚糖共轭物在质量比 5:1 条件下对 DNA 就有结合能力。为了评价该共轭物对

DNA 的保护能力,将质量比为 5:1 的二甲双胍-壳聚糖/DNA 复合物与 DNaseI 酶复合 30 min 后,用 EDTA 将酶失活,然后用 SDS 解离二甲双胍-壳聚糖/DNA,于 50 V 条件下在 1%琼脂糖凝胶上跑 40 min,通过电泳考察二甲双胍-壳聚糖共轭物对 DNA 的结合能力 50 V 下跑 40 min,结果表明二甲双胍-壳聚糖共轭物对 DNA 有很好的保护能力。

实施例 6

二甲双胍-壳聚糖/基因复合物的表征

如图 4 所示,通过透射电镜观察按实施例 4 合成的二甲双胍-壳聚糖共轭物/DNA 复合物的形貌。取 1 滴二甲双胍-壳聚糖共轭物/DNA 复合物滴到铜网上,干燥 10 min,在电镜下观察,二甲双胍-壳聚糖/基因复合物呈类球形。

实施例 7

二甲双胍-壳聚糖/基因复合物的细胞转染考察

采用 L02 和 HepG2 细胞系评价根据实施例 1 合成的二甲双胍-壳聚糖的体外转染效率。L02 和 HepG2 细胞分别为人正常肝细胞和人肝癌细胞,在 37 °C 下,5% CO₂ 培养箱 (Thermo Scientific) 下,于 DMEM 培养基中培养。将两种细胞按 10×10^4 个细胞/孔的量接种在 24 孔平底板中,孵育 18 h 后,吸取培养基,用含共轭物/pGL3 复合物无血清培养基继续孵育 4 h,之后换用含血清的培养基,于 37 °C 下培养 24 h 后测定荧光素酶活性。其测定方法按照生产厂家的说明进行。如图 5 所示,用 BCA 蛋白测试试剂盒提取蛋白后,其浓度用酶标仪测定。最后将每个样品荧光素酶活性进行标准化,考察转染效率。结果表明二甲双胍-壳聚糖/DNA 复合物相对于壳聚糖/DNA 复合

物，在 L02 和 HepG2 细胞中均有很高的基因转染效率。

实施例 8

二甲双胍-壳聚糖/基因复合物的细胞药效考察

采用 L02 细胞系评价根据实施例 1 合成的二甲双胍-壳聚糖载功能基因的细胞药效。L02 为人正常肝细胞，在 37 °C 下，5 % CO₂ 培养箱（Thermo Scientific）下，于 DMEM 培养基中培养。将该细胞按 30×10^4 个细胞/孔的量接种在 6 孔平底板中，孵育 18 h 后，吸取培养基，用含共轭物/shSREBP-1c 复合物的无血清培养基继续培养 24 h。之后换用新鲜的含血清培养基，于 37 °C 下培养 24 h。蛋白和 RNA 的提取分别按照试剂盒的说明进行提取。用 western blot 检测细胞中的 AMPK、pAMPK 及 SREBP-1c 的蛋白含量；用 q-PCR 检测细胞中的 SREBP-1c 的 mRNA 含量。如图 6 所示，结果表明，二甲双胍-壳聚糖/shSREBP-1c 复合物能使 L02 细胞中的 AMPK 磷酸化，即提高 pAMPK 蛋白含量，同时该复合物下调 SREBP-1c 的蛋白含量，其相应的 SREBP-1c 的 mRNA 含量也降低。

其他胍类降糖药-多糖共轭物，因为胍类降糖药、多糖的物理化学性质相似，因此根据列举的实施例可以看出，都是可以实现和达到的。

以上所述仅是本发明的优选实施方式，应当指出：对于本技术领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明原理的前提下，还可以做出若干改进和润饰，这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

权 利 要 求 书

1. 一种胍类降糖药-多糖共轭物，其特征在于：所述胍类降糖药-多糖共轭物为多糖氧化产生的醛基与胍类降糖药上的伯胺反应通过西弗碱键连接。

2. 根据权利要求 1 所述的胍类降糖药-多糖共轭物，其特征在于：其中，胍类降糖药选自二甲双胍、丁双胍和苯乙双胍；

多糖选自壳聚糖、壳寡糖、葡聚糖、透明质酸、肝素、软骨素、琼脂糖、海藻酸中的一种或几种。

3. 根据权利要求 1 所述的胍类降糖药-多糖共轭物，其特征在于：所述胍类降糖药-多糖共轭物为二甲双胍-壳聚糖。

4. 一种胍类降糖药-多糖共轭物的制备方法，包括以下步骤：

1) 氧化多糖的合成：将多糖溶于水或弱酸缓冲液中，然后加入一定量的氧化剂，反应温度 4-90 °C 下搅拌适宜时间，过滤后加入过量还原剂继续搅拌一段时间，之后用水充分透析，冻干得粉末固体的氧化多糖；

2) 称取适量氧化多糖固体溶于一定溶剂后，加入胍类降糖药，搅拌适宜时间，透析冻干即得到共轭物。

5. 根据权利要求 4 所述的胍类降糖药-多糖共轭物的制备方法，其特征在于：所述弱酸缓冲液选自 NaAc-HAc、 NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 、 KH_2PO_4 - K_2HPO_4 ；和/或，所述氧化剂选自高碘酸钠、高碘酸钾；和/或，所述还原剂选自乙二醇、亚硫酸氢钠。

6. 权利要求 1-5 所述的胍类降糖药-多糖共轭物胍类降糖药-多糖共轭物作为非病毒基因载体的应用。

7. 权利要求 1-5 所述的胍类降糖药-多糖共轭物在用于治疗 II 型糖尿病药物中的应用。

8. 根据权利要求 7 所述的胍类降糖药-多糖共轭物，用作治疗型聚合物前药，通过静脉注射，腹腔注射，粘膜给药或肺部吸入给药。

9. 胍类降糖药-多糖共轭物/基因复合物的制备方法，步骤如下：将上述胍类降糖药-多糖共轭物用水配置成 0.001%-10% 的共轭物溶液，得到聚合物前药溶液；将治疗有效量的基因配置成 0.001%-10% 的基因溶液，与共轭物溶液混合，经涡旋处理，胍类降糖药-多糖共轭物与基因通过静电相互作用进行复合得到 10-1000nm 复合物溶液。

10. 根据权利要求 9 所述的胍类降糖药-多糖共轭物/基因复合物的制备方法，其特征在于：所述基因选自固醇调控元件结合蛋白基因、瘦素基因、胰岛素基因、胰高糖素样肽-1 基因、钙响应性激酶基因。

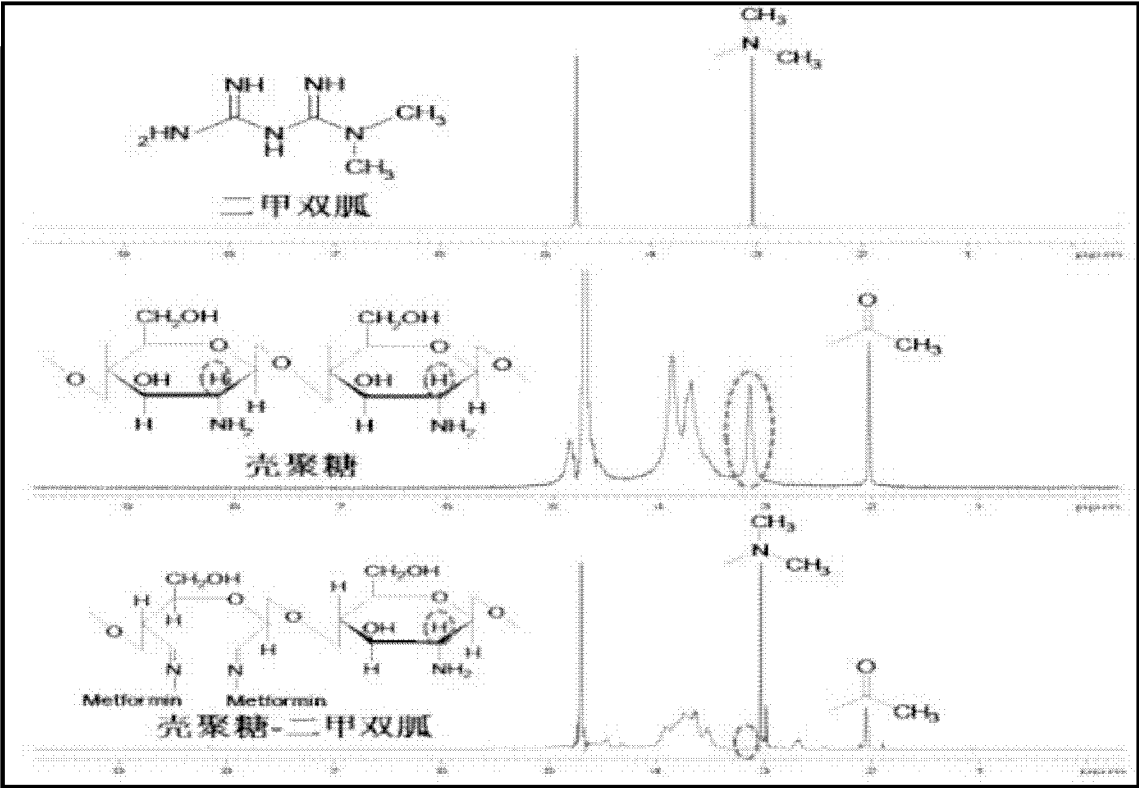


图 1

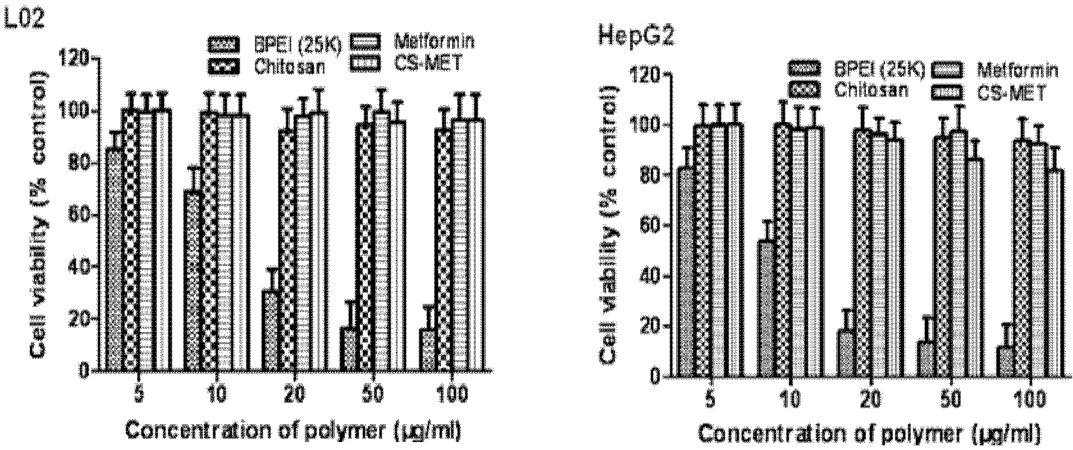


图 2

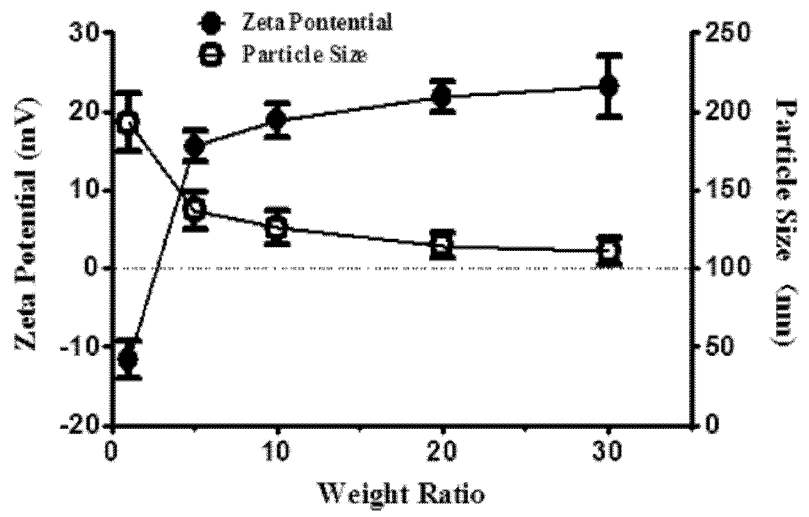


图 3

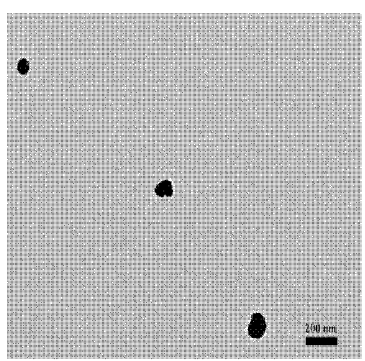


图 4

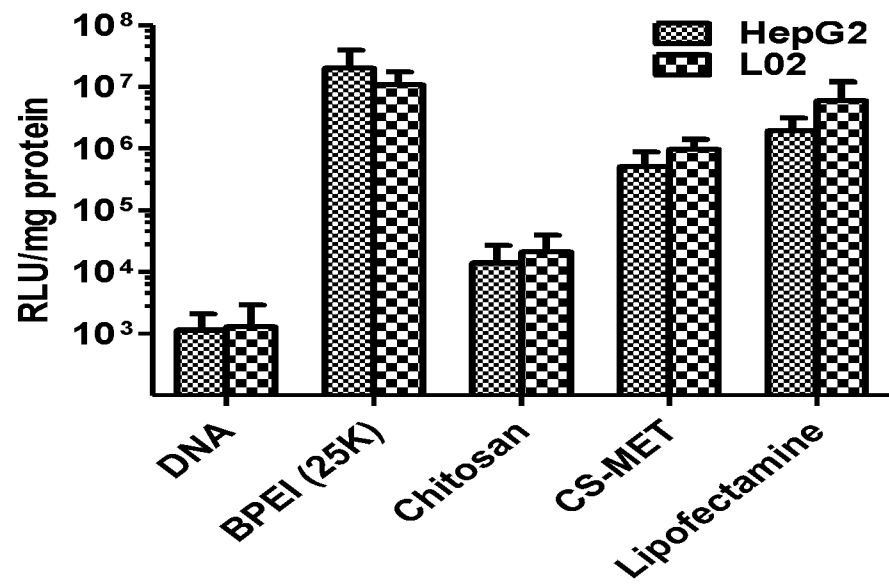


图 5

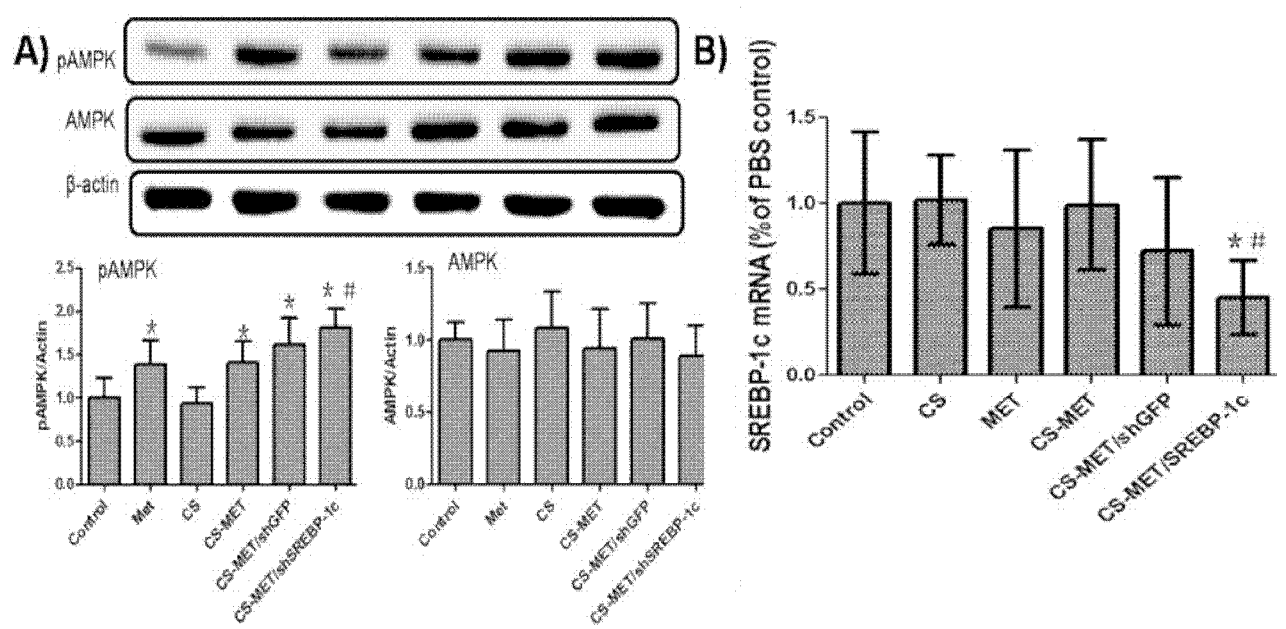


图 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2014/082486

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 47/48 (2006.01) i; A61K 31/155 (2006.01) i; A61K 48/00 (2006.01) i; A61P 3/10 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: A61K; A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS, CNKI: conjugate, guanidine hypoglycemic drug, metformin, buformin, polysaccharide, chitosan, chitosan oligosaccharide, glucan, hyaluronic acid, heparin, chondroitin, agarose, alginic acid, Schiff base, genetic carrier

DWPI, SIPOABS, CA, MEDLINE, EMBASE: conjugate, hypoglycemic, guanidines, metformin, butylbiguanide, buformin, polysaccharide, chitosan, chitosan oligosaccharide, dextran, glucan, polyglucosan, hyaluronic acid, heparin, chondrin, chondroitin, agarose, alginic acid, Schiff base, genetic carrier

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JIANG, Hulin, "Biocompatible polymers for gene delivery in cancer gene therapy", JOURNAL OF CHINA PHARMACEUTICAL UNIVERSITY, vol. 44, no. 3, 31 October 2013 (31.10.2013), page 477, right-hand column, lines 9 and 10	1-6, 9, 10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 03 March 2015 (03.03.2015)	Date of mailing of the international search report 17 March 2015 (17.03.2015)
Name and mailing address of the ISA/CN: State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No.: (86-10) 62019451	Authorized officer LIU, Qiming Telephone No.: (86-10) 62412173

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2014/082486

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 7 and 8
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
[1] Claims 7 and 8 relate to a method for treating a disease.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2014/082486

A. 主题的分类

A61K 47/48(2006.01)i; A61K 31/155(2006.01)i; A61K 48/00(2006.01)i; A61P 3/10(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

A61K; A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNABS, CNKI: 共轭物, 偶联物, 胍类降糖药, 二甲双胍, 丁双胍, 多糖, 壳聚糖, 壳寡糖, 葡聚糖, 透明质酸, 肝素, 软骨素, 琼脂糖, 海藻酸, 西弗碱键, 基因载体 DWPI, SIPOABS, CA, MEDLINE, EMBASE: conjugate, hypoglycemic, guanidines, metformin, butylbiguanide, buformin, polysaccharide, chitosan, chitosan oligosaccharide, dextran, glucan, polyglucosan, hyaluronic acid, heparin, chondrin, chondroitin, agarose, alginic acid, Schiff base, genetic carrier

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	姜虎林. "生物相容性高分子基因载体的研究进展" 中国药科大学学报, 第44卷卷, 第3期期, 2013年 10月 31日 (2013 - 10 - 31), 第477页右栏第9-10行	1-6, 9, 10

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。☐ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2015年 3月 3日

国际检索报告邮寄日期

2015年 3月 17日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)
北京市海淀区蓟门桥西土城路6号
100088 中国

传真号 (86-10)62019451

受权官员

刘启明

电话号码 (86-10)62412173

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☒ 权利要求： 7、8
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
[1] 权利要求7、8涉及疾病的治疗方法。
2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索， 具体地说：
3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。