(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
2020 年 1 月 2 日 (02.01.2020)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2020/001639 A1

(51) 国际专利分类号:
A61K 31/702 (2006.01) *A61P 25/04* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2019/093799

(22) 国际申请日: 2019 年 6 月 28 日 (28.06.2019)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201810714008.2 2018年6月29日 (29.06.2018) CN

(71) 申请人: 上海绿谷制药有限公司 (SHANGHAI GREEN VALLEY PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [CN/CN]; 中国上海市浦东张江高科技园区牛顿路421号, Shanghai 201203 (CN)。 中国科学院上海药物研究所 (SHANGHAI INSTITUTE OF MATERIAL MEDICA, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) [CN/CN]; 中国上海市浦东新区张江高科技园区祖冲之路555号, Shanghai 201203 (CN)。

(72) 发明人: 耿美玉 (GENG, Meiyu); 中国上海市浦东张江高科技园区牛顿路421号, Shanghai 201203 (CN)。 辛现良 (XIN, Xianliang); 中国上海市浦东张江高科技园区牛顿路421号, Shanghai 201203 (CN)。 张真庆 (ZHANG, Zhenqing); 中国上海市浦东张江高科技园区牛顿路421号, Shanghai 201203 (CN)。 丁健 (DING, Jian); 中国上海市浦东张江高科技园区牛顿路421号, Shanghai 201203 (CN)。

(74) 代理人: 北京市金杜律师事务所 (KING & WOOD MALLESONS); 中国北京市朝阳区东三环中路1号环球金融中心办公楼东楼20层, Beijing 100020 (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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM,

(54) **Title:** USE OF MANNURONIC DIACID COMPOSITION IN TREATMENT OF PAIN

(54) 发明名称: 甘露糖醛二酸的组合物在治疗疼痛中的应用

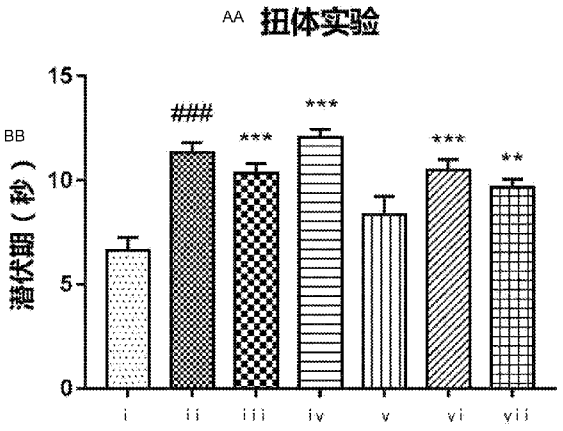


图 4

AA WRITHING TEST
BB LATENT PERIOD (SECONDS)

(57) **Abstract:** The present invention relates to the use of a mannuronic diacid oligosaccharide composition in the treatment of pain.

(57) 摘要: 本发明涉及一种甘露糖醛二酸寡糖组合在治疗疼痛方面的应用。

WO 2020/001639 A1

[见续页]

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, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

根据细则4.17的声明:

— 发明人资格(细则4.17(iv))

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

甘露糖醛二酸的组合物在治疗疼痛中的应用

技术领域

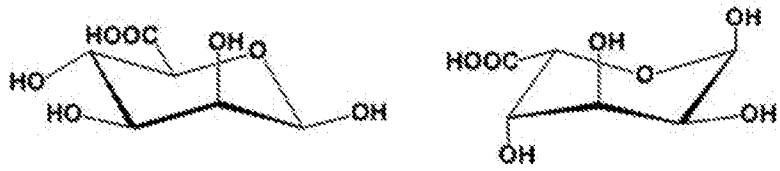
本发明涉及通过生物活性筛选的方法得到甘露糖醛二酸的最佳组合物在治疗疼痛方面的应用。

背景技术

疼痛（pain）是一种复杂的生理心理活动，是临床上最常见的症状之一。急性疼痛往往是其他疾病的一个症状，而慢性疼痛本身就是一种疾病。目前，全世界约有 30%的人患有慢性疼痛，我国至少有 1 亿以上疼痛患者。偏头痛是临床上常见的头痛类型之一。以反复发作性的头痛为特点，发作间歇期正常。偏头痛的确切发病原因尚不清楚，临床以发作时的对症治疗和预防性治疗为主，还没有理想的治疗药物。

甘露糖醛二酸由于其潜在的药用价值已经受到广泛的重视。甘露糖醛二酸通常以海藻酸为原料经过多步骤制得。

在原料海藻酸的多糖分子中，有由甘露糖醛酸（D-mannuronic acid）通过 β-1,4-糖苷键连接形成的 M 段、古罗糖醛酸（L-guluronic acid）通过 α-1,4-糖苷键连接形成的 G 段，以及由这两种糖杂合形成的 MG 段。甘露糖醛酸和古罗糖醛酸的结构式如下（Ⅰ）式所示：



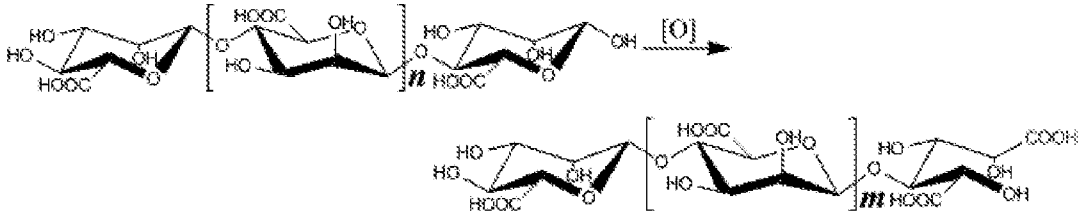
M：β-D-甘露糖醛酸　　G：α-L-古罗糖醛酸　（Ⅰ）

M 段和 G 段可以从原料海藻酸中分离。通常的方法可以简单描述为：将海藻酸初步降解后可得到聚甘露糖醛酸和聚古罗糖醛酸的混合多糖，混合多糖再经酸法沉淀后，可以除去其中的聚古罗糖醛酸，进一步精制可以得到纯度在 90%以上的均聚甘露糖醛酸（下文

中也称“M段中间体”）。例如，可参见中国专利申请No.98806637.8以及CN02823707.2所披露的方法。

制备寡聚甘露糖醛酸的做法如下：将上述得到的M段中间体在酸性条件下加热进一步酸解得到所需分子量范围的小片段甘露糖醛酸聚合物。另外，也有通过氧化降解的办法提升降解效率，同时可以将还原末端氧化为开环的糖二酸，详见耿美玉等人的中国专利申请200580009396.5（专利文献1）及美国专利US 8835403B2（专利文献2）。为了方便叙述，专利文献1和2在下文中统称为在先专利，它们以引证的方式全部并入本文。

在先专利披露的甘露糖醛二酸的反应过程可通过如下反应方程式（II）表示，即寡聚甘露糖醛酸多糖还原端的甘露糖醛酸C1-位醛基氧化成羧基。



（II）

在上述氧化转化过程中，常用的氧化剂有碱性硫酸铜溶液，即菲林试剂，在先专利即采用了该氧化方法，具体为：在碱性条件下，将反应底物聚甘露糖醛酸即上文的M段中间体加入硫酸铜溶液中，在沸水浴中反应15分钟至2小时。该法是以Cu^{2+}离子为氧化剂氧化醛基，反应中产生砖红色的氧化亚铜沉淀，这个反应常用于鉴定还原性糖。

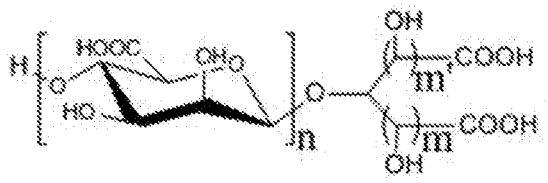
在先专利公开了甘露寡糖二酸具有抗阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)和抗糖尿病的作用。阿尔茨海默病与II型糖尿病的发病过程与淀粉样蛋白（β-amyloid及amylin）密切相关。淀粉样蛋白聚集以后产生蛋白寡聚体，进一步聚集形成纤维。这些蛋白聚集物有细胞毒性，在细胞内诱导氧化反应损伤线粒体以及引发疼痛反应等级联反应，造成大量的神经元和β细胞损伤，最终导致阿尔茨海默

病与II型糖尿病的发生。甘露寡糖二酸靶向淀粉样蛋白并拮抗其诱导的级联反应，由此具有预防和治疗阿尔茨海默病与II型糖尿病的作用。

在先专利 CN106344595A 公开了甘露寡糖酸在治疗疼痛方面的应用，并公开了四糖-十糖混合物在治疗疼痛方面的药效活性情况。

发明内容

本发明涉及一种甘露糖醛二酸寡糖组合物在治疗疼痛中的用途。申请人发现，具有特定组成的甘露糖醛二酸寡糖组合物具有治疗疼痛的作用，其包含具有式（III）的甘露糖醛二酸或其药学上可接受的盐：



式（III）

其中 n 为选自 1-9 的整数，m 选自 0，1 或 2，m'选自 0 或 1，并且其中，

n=1-5 的甘露糖醛二酸的重量总和占所述组合总重量的 60%以上；

n=1-2 的甘露糖醛二酸的重量总和占所述组合总重量的低于 60%。

本发明的另一方面涉及一种治疗患有疼痛的患者的方法，其包括给予需要的患者有效量的本发明中描述的甘露糖醛二酸寡糖组合物。

附图说明

图 1 是产品 A 中二糖、三糖和四糖的质谱图。

图 2 是产品 A 中五糖、六糖和七糖的质谱图。

图 3 是产品 A 中八糖、九糖和十糖的质谱图。

图 4 表示寡糖组合物、对比实验样品及六糖对醋酸所致小鼠扭

体反应潜伏期的影响；图中横坐标的编号分别对应的样品为：i:模型组；ii: 产品 A；iii: 产品 B；iv: 产品 C；v: 产品 D；vi:对比实验样品；vii: 六糖。

图 5 表示寡糖组合物、对比实验样品及六糖对醋酸所致小鼠扭体反应次数的影响；其中横坐标附图标记同图 4。

图 6 表示寡糖组合物、对比实验样品及六糖对硝酸甘油致偏头痛大鼠挠头次数的影响；图中横坐标的编号分别对应的样品为：i:对照组；ii: 模型组；iii: 产品 A；iv: 产品 B；v: 产品 C；vi: 产品 D；vii:对比实验样品；viii: 六糖。

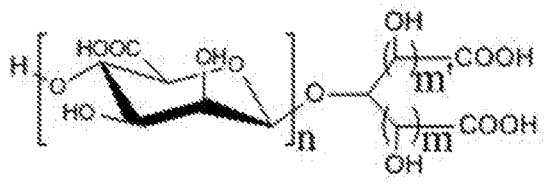
图 7 表示寡糖组合物、对比实验样品及六糖对电刺激三叉神经节致偏头痛大鼠三叉神经脊束核尾侧 c-fos 阳性细胞数的影响；其中横坐标附图标记同图 6。

具体实施方式

下文将对本发明的各个方面进行具体说明，但本发明并不限于这些具体的实施方式。本领域技术人员可以根据下文公开内容的实质对本发明进行一些修改和调整，这些调整也属于本发明的范围。

本发明涉及一种甘露糖醛二酸寡糖组合物在治疗疼痛中的用途。本发明还涉及一种治疗疼痛的方法，包括给予需要治疗的患者治疗有效量的本发明所述的甘露糖醛二酸寡糖组合物。

本发明使用的甘露糖醛二酸寡糖组合物具有特定的组成，包含具有式（III）的甘露糖醛二酸或其药学上可接受的盐：



式（III）

其中 n 为选自 1-9 的整数，m 选自 0，1 或 2，m'选自 0 或 1，

并且其中，

n=1-5 的甘露糖醛二酸的重量总和占所述组合总重量的 60%以上；

n=1-2 的甘露糖醛二酸的重量总和占所述组合总重量的低于 60%。

本发明涉及的甘露糖醛二酸寡糖组合是不同聚合度的甘露糖醛二酸的混合物，其主要成分是聚合度为 2 至 10 的甘露糖醛二酸寡糖。已知在甘露糖醛二酸中，活性最高的糖为 4-10 糖，特别是 6 糖。但是，发明人现发现，在活性最高的 4-10 糖基础上添加一定比例活性较低的 2-3 糖，同等质量的给药剂量下，生物活性不降低甚至还有提高。不囿于任何理论，推测这可能是由于分子量较小的 2-3 糖虽然不能单独起效，但跟其他寡糖混合后能起到协同增效的作用。但当 2-3 糖的比例过高时，组合物的整体活性降低。因此，组合物中 2-3 糖的比例必须控制在一定的范围之内。

在实际制备过程中，氧化降解反应中会产生大量的 2-3 糖，通常会因其活性低，为避免影响到产品的药效，而将从产物中分离后去除。而基于发明人的上述发现，可以不需要氧化降解产物中的 2-3 糖分离除去，而只需控制氧化降解反应的条件，将 2-3 糖的比例控制在一定的范围之内，获得的组合物活性能达到甚至优于在先申请所公开的组合物，且因不用将 2-3 糖作为杂质去除，产品得率理论上也显著高于在先申请所公开的产品得率，大大降低生产成本，减少废弃物的排放，在实际生产中更容易实现，更易于实现工业化大生产。

根据一个优选的实施方案，本发明的甘露糖醛二酸寡糖组合中 m+m'=1 或 2 的甘露糖醛二酸的重量总和不低于所述组合总重量的 50%以上，优选 60%-90%，更优选 70%-90%。特别地，本发明的甘露糖醛二酸寡糖组合中 m+m'=1 的甘露糖醛二酸的重量总和不低于所述组合总重量的 10%，优选 30-40%。在另一个优选实施方案中，本发明的甘露糖醛二酸寡糖组合中 m+m'= 2 的甘露糖醛二酸的重量总和不低于所述组合总重量的 10%，优选 30-50%。

根据一个优选实施方案，本发明的甘露糖醛二酸寡糖组合中n=1-5的甘露糖醛二酸寡糖的重量总和占所述组合总重量的80-95%。

根据一个优选实施方案，本发明的甘露糖醛二酸寡糖组合中n=1-2 的甘露糖醛二酸寡糖的重量总和所述组合总重量的 10-50%，优选 25-50%。

根据一个优选实施方案，本发明的甘露糖醛二酸寡糖组合中n=1-3 的甘露糖醛二酸寡糖的重量总和所述组合总重量的 20-70%。

根据一个优选实施方案，本发明的甘露糖醛二酸寡糖组合中n=1-3 的甘露糖醛二酸的重量总和与 n=4-7 的甘露糖醛二酸寡糖重量总和的比例在 1.0-3.5 之间，优选在 1.0-3.0 之间。

根据一个优选实施方案，本发明的甘露糖醛二酸寡糖组合中各聚合度甘露糖醛二酸寡糖在所述组合中的重量百分含量为：二糖 5-25%，三糖 15-30%，四糖 15-28%，五糖 5-25%，六糖 2-20%，七糖 2-20%，八糖 2-20%，九糖 2-20%，十糖 2-20%。特别地，组合中寡糖在所述组合中的重量百分含量为：二糖 5-25%，三糖 15-30%，四糖 15-28%，五糖 10-20%，六糖 5-15%，七糖 3-10%，八糖 2-5%，九糖 1-5%，十糖 1-5%。更优地，组合中寡糖在所述组合中的重量百分含量为：二糖 10-20%，三糖 18-30%，四糖 15-28%，五糖 15-20%，六糖 5-10%，七糖 3-5%，八糖 2-5%，九糖 1-3%，十糖 1-3%。

本发明的甘露糖醛二酸寡糖组合中，其中所述药学上可接受的盐是钠盐或钾盐。

本专利申请的发明人发现，当各单一聚合物的寡糖按照一定的比例进行复配，可以得到高活性的寡糖组合物，其活性比活性最好的六糖还要高；尤其是添加了一定比例二糖和三糖的组合物，其活性高于不含二糖和三糖的组合物。高活性寡糖组合物中的各寡糖比例需要按照如下的比例关系进行组合：

组合物中 n=1-5 的甘露糖醛二酸的重量总和占所述组合总重量的 60%以上，优选 80-95%。n=1-2 的甘露糖醛二酸的重量总和占所

述组合总重量的低于 60%，优选 10-50%，更优选 25-50%。n=1-3 的甘露糖醛二酸寡糖的重量总和所述组合总重量的 20-70%。其中 n=1-3 的甘露糖醛二酸寡糖的重量总和与 n=4-7 的甘露糖醛二酸寡糖重量总和的比例在 1.0-3.5 之间，优选在 1.0-3.0 之间。

本发明所述用于治疗疼痛的药物包含甘露糖醛二酸寡糖组合物，其包含具有式（III）的甘露糖醛二酸或其药学上可接受的盐，以及一种或多种药学上可接受载体。本发明所述药物可以是片剂、硬胶囊、软胶囊、肠溶胶囊、微囊剂、颗粒剂、糖浆剂、注射剂、颗粒剂、乳剂、悬浮液、溶液和用于口服或非口服给药的缓释制剂的形式。

本发明所述药学上可接受载体是指本领域技术人员熟知的药学上可接受的载体，本发明的药学上可接受载体包括但不限于：填充剂、润湿剂、黏合剂、崩解剂、润滑剂、粘合剂、助流剂、掩味剂、表面活性剂、防腐剂等。填充剂包括但不限于乳糖、微晶纤维素、淀粉、糖粉、糊精、甘露醇、硫酸钙等。润湿剂与黏合剂包括但不限于羧甲基纤维素钠、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、明胶、蔗糖、聚乙烯吡咯烷酮等。崩解剂包括但不限于羧甲基淀粉钠、交联聚乙烯吡咯烷酮、交联羧甲基纤维素钠、低取代羟丙基纤维素等。润滑剂包括但不限于硬脂酸镁、微粉硅胶、滑石粉、氢化植物油、聚乙二醇、月桂醇硫酸镁等。粘合剂包括但不限于阿拉伯胶、藻酸、羧甲基纤维素钙、羧甲基纤维素钠、葡萄糖结合剂、糊精、右旋糖、乙基纤维素、明胶、液体葡萄糖、瓜尔胶、羟乙基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、硅酸铝镁、麦芽糖糊精、甲基纤维素、聚甲基丙烯酸酯、聚乙烯吡咯烷酮、预明胶化淀粉、藻酸钠、山梨醇、淀粉、糖浆和黄著胶。助流剂包括但不限于胶体二氧化硅、粉状纤维素、三硅酸镁、二氧化硅和滑石粉。掩味剂包括但不限于阿斯巴坦、甜菊苷、果糖、葡萄糖、糖浆、蜂蜜、木糖醇、甘露醇、乳糖、山梨醇、麦芽糖醇、甘草甜素。表面活性剂包括但不限于吐温-80、泊洛沙姆。防腐剂包括但不限于尼泊金酯、苯甲酸钠、山梨

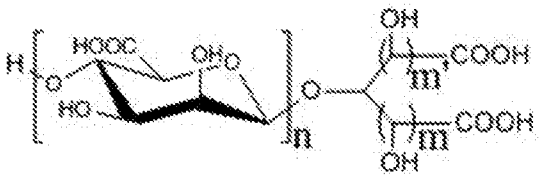
酸钾等。

本发明所述疼痛包括各种疼痛，包括但是急性疼痛、慢性疼痛、神经性疼痛、术后痛、慢性下背痛、丛集性头痛、疱疹神经痛、幻肢痛、中枢性痛、牙痛、阿片样物质抗性疼痛、内脏痛、手术痛、骨损伤痛、劳累和分娩过程中的疼痛、因灼伤包括晒伤导致的疼痛、产后痛、偏头痛、心绞痛和与泌尿生殖道相关的疼痛（包括膀胱炎）、血管性疼痛、三叉神经痛、肋间神经痛、手术切口痛、慢性筋膜炎痛、足跟痛、肌肉疼痛、骨骼疼痛、关节疼痛、癌性疼痛、非癌性疼痛等。

本文使用的术语“治疗”一般是指获得需要的药理和/或生理效应。该效应根据完全或部分地预防疾病或其症状，可以是预防性的；和/或根据部分或完全稳定或治愈疾病和/或由于疾病产生的副作用，可以是治疗性的。本文使用的“治疗”涵盖了对患者疾病的任何治疗，包括：(a)预防易感染疾病或症状但还没诊断出患病的患者所发生的疾病或症状；(b)抑制疾病的症状，即阻止其发展；或(c)缓解疾病的症状，即，导致疾病或症状退化。

甘露糖醛二酸寡糖组合

本发明所述用于治疗疼痛的甘露糖醛二酸寡糖组合物，其包含具有式（III）的甘露糖醛二酸或其药学上可接受的盐：



式（III）

其中 n 为选自 1-9 的整数，m 选自 0，1 或 2，m’选自 0 或 1，并且其中，

n=1-5 的甘露糖醛二酸的重量总和占所述组合总重量的 60%以上；

n=1-2 的甘露糖醛二酸的重量总和占所述组合总重量的低于

60%。

在一个示例性的实施方案中，本发明所述用于治疗疼痛的甘露糖醛二酸寡糖组合物的制备方法包括如下几个步骤：

（1）甘露糖醛二酸产品的制备：

M段中间体的制备。如前文所述，本发明中采用的原料M段中间体可以通过现有技术中已知的方法制备。例如中国专利申请No.98806637.8以及CN02823707.2所披露的方法。通常的方法可以简单描述为：将海藻酸初步降解后可得到聚甘露糖醛酸和聚古罗糖醛酸的混合多糖，混合多糖再经酸法沉淀后，可以除去其中的聚古罗糖醛酸，进一步精制可以得到纯度在90%以上的均聚甘露糖醛酸，即M段中间体。

臭氧氧化降解。在室温或者加热条件下使M段中间体溶解于适量的水中，搅拌，持续通入臭氧，反应开始进行。反应pH值可以通过滴加稀盐酸或者稀NaOH溶液调节至3-13之间，优选4-10，更优选6-8。温度优选为0-70℃，更优选10-45 ℃。反应完成以后，停止通入臭氧，调节pH至中性。

膜分离纯化。将上述所得的反应产物配成约 10%浓度的溶液，通过分子截留膜分离，去除单糖以下的降解产物，收集未透过液。所采用的分子截留膜MWCO规格为1000 Da-3000 Da，优选2000 Da。收集液经旋转蒸发仪浓缩、真空干燥即得寡聚甘露糖醛二酸混合物。经分析发现这些产品均是以二糖-十糖的寡糖且其含量是在一定比例范围的组合物。实施例1-3是该制备方法的实例。

（2）单一聚合度寡糖的制备

将步骤（1）所得的寡糖混合物溶解，配成约10%左右的浓度，经P6凝胶色谱柱分离，紫外检测，收集各流出组分，合并相同聚合度的组分。收集到2-10糖的9个组分，分别经G10凝胶柱层析脱盐，旋转蒸发仪浓缩，真空干燥即得。一个具体的纯化制备过程见实施例4。这些柱层析、脱盐和干燥等操作是本领域技术人员所已知的。

（3）寡糖组合物的活性比较

将本发明的寡糖组合物与经纯化的六糖同时比较药理活性，结果表明本发明的寡糖组合物比单一聚合度寡糖中活性最好的六糖还要好，而包含更高含量的二、三糖的组合物的活性略低于六糖。由此看出，单个寡糖经复配后能发挥协同增效的作用，当组合物中二-六糖的比例高于 60%以上，且二、三糖的比例低于 60%时，组合物的活性最高；但二、三糖的比例超过 60%时，组合物的活性也会降低。

动物模型及药效活性评价步骤

1、抗疼痛的药效评价动物模型—醋酸致小鼠疼痛模型

昆明种小鼠，雌雄各半，体重 18-22g，随机分组：空白对照组、模型组、给药组，每组 10 只。从分组当天起，空白对照组每天灌胃 20ml/kg 蒸馏水，其余各组灌胃给予相应药物，每天给药 1 次，连续给药 7 天。于末次给药后 1 小时，各组小鼠均腹腔注射 0.6%醋酸溶液 0.2ml，记录注射醋酸后 20 分钟内小鼠的扭体潜伏期(即从注射醋酸至扭体反应发生的时间)和扭体次数。

醋酸溶液等化学物质注射到小鼠腹腔，可刺激小鼠腹膜，引起间歇发作的持久性疼痛，表现为腹部收内凹、腹前壁紧贴笼底、臀部歪扭和后肢伸张，呈一种特殊姿势，称为扭体反应。扭体潜伏期(即从注射醋酸至扭体反应发生的时间)和一定时间内的扭体次数，可以代表疼痛的严重程度。扭体潜伏期越短，扭体次数越多，代表疼痛程度越严重。

2、抗疼痛的药效评价动物模型—硝酸甘油致大鼠偏头痛模型

SD 雄性大鼠，体重 180-220g，随机分组：空白对照组、模型组、给药组，每组 8 只。于分组当天开始给药，空白对照组和模型组灌胃给予蒸馏水，其余各组给予相应药物，每天给药 1 次，连续给药 28 天，末次药后 30 分钟，除空白对照组动物予生理盐水外，其余各

组均在右肩皮下注射硝酸甘油 10mg/kg 造模。观察大鼠造模后耳红出现时间和持续时间，以及造模后 30-45 分钟时间段中的挠头次数；采用荧光分光光度法测定脑组织中 5-HT 的含量。于 Ex356nm/Em 483nm 波长处测定，结果以 ng/g 脑重表示。

偏头痛是血管与神经机制相互作用下的一种血管、神经的功能紊乱疾病。硝酸甘油可以通过扩张脑膜血管、形成神经源性炎症及激活下丘脑、脑干及脊髓节段神经元功能等作用，引起三叉神经纤维的超敏性,造成偏头痛。硝酸甘油模型是 1995 年建立的一种动物模型，目前已成为经典的动物偏头痛模型。根据硝酸甘油致病机理，检测模型动物由于血管扩张引起的耳红时间、由于疼痛引起的挠头次数及脑组织致疼敏感因子 5-羟色胺（5-HT）含量，可以评估偏头痛的严重程度。耳红时间持续越长、挠头次数越多、5-HT 含量越高，代表偏头痛程度越严重。

3、抗疼痛的药效评价动物模型—电刺激三叉神经节致偏头痛大鼠模型

SD 大鼠，5 月龄，雄性，体重 200～240 g，随机分组：空白对照组、假手术组、模型组、给药组，每组 10 只。

各组均口服给予相应药物，空白对照组、假手术组、模型组口服蒸馏水。连续给药 10 天后，除空白对照组外，所有大鼠经水合氯醛 350mg/kg 腹腔注射麻醉后，将大鼠固定在立体定位仪上，头顶正中切口，逐层切开皮肤、肌肉，于脑矢状缝中部开口暴露颅盖骨。在前囟后移 3 毫米，旁开 3 毫米处，用牙科钻插孔，然后将电极插入三叉神经节（以硬脑膜算起深度为 9.5mm），术后持续麻醉。所有操作均在无菌条件下进行。调试好刺激电极，电刺激参数为周期 200 ms，幅度 10 v，波宽 5ms，刺激 10 分钟。假手术组动物只插入电极，不给刺激。刺激前 7 分钟右股静脉注射 50mg/kg 伊文氏蓝，刺激结束 20 分钟内灌注固定。

刺激结束后 5 分钟，左心室灌流 2 分钟，开颅，取全脑，固定，待做病理切片免疫组化测定 c-fos；另确定电极位置，分离电极插入

处及另一脑半球对应位置脑硬膜，去离子水洗涤后平铺在载玻片上，37 度干燥 15 分钟，70%甘油固定。共聚焦显微镜上以 647nm 激发波长，680nm 发射波长检测刺激侧及对照侧指定区域的荧光强度，计算刺激侧/对照侧荧光强度的比值，用以指示血浆蛋白渗出率（Plasma Protein Extravasation，PPE）。全脑连续冰冻冠状切片，片厚 10μm，免疫组化荧光标记 c-fos 阳性细胞。共聚焦显微镜下，随机选择 5 个视野，测定三叉神经脊束核尾侧实验侧及对照侧阳性细胞数目，再取 5 个视野的平均值，则为平均阳性细胞数。

三叉神经血管系统的激活是偏头痛患者疼痛产生的关键环节，其中脑膜的神经性炎症的发生在偏头痛的疼痛产生和维持中起着重要的作用。当分布于硬脑膜的三叉神经受到刺激时，释放血管活性物质，使脑膜血管扩张、血浆成分外渗、肥大细胞脱颗粒和血小板激活，产生偏头痛。另外，疼痛刺激后释放的神经递质与细胞膜上的相应受体结合，在第二信使作用下，C-fos mRNA 基因表达，在细胞核翻译合成 c-fos 蛋白，产生对机体长时程的生理效应。故偏头痛时，三叉神经脊束核和中缝大核的 C-fos mRNA 和 c-fos 蛋白表达的细胞数增多。因此，通过测定偏头痛动物硬脑膜血清蛋白渗出量及三叉神经脊束核尾侧 c-fos 阳性细胞数量可以反映偏头痛的程度。细胞数量越低代表偏头痛的程度越轻。

本发明的优点在以下非限制性的实施例中进一步进行说明。但实施例中采用的具体材料及其用量，以及其他实验条件并不应理解为对本发明的限制。除非特别指明，本发明中份数、比例、百分比等均以质量计。

实施例

实施例 1:

步骤 1）：甘露糖醛二酸寡糖混合物的制备

如在先专利所披露的方法制备 M 段中间体，具体操作简述如下：将 5 Kg 海藻酸钠配成约 10%的溶液，加稀盐酸调 pH 至 3.0 左右，升温至 80 ℃，搅拌，反应 10 hr，停止加热，冷却至室温后，加 NaOH 调 pH 值至 9.0，再加稀盐酸回调 pH 至 2.85，离心机 5000 rpm 离心 10 min，收集上清，加 HCl 调 pH 至 1.0，离心，收集沉淀，旋转蒸发仪浓缩，真空干燥得 M 段中间体 1500 g。称取 500g M-段中间体，加蒸馏水溶解后，配成 5 L 体积的溶液，NaOH 调 pH 至 6.5，水浴加热，控制反应温度到 75 ℃。调节氧气钢瓶出口的气流量和臭氧发生器的功率，使得臭氧质量浓度流量达到 8 g/hr，通入反应液中。反应 4 hr 后停止通入臭氧，加适量水调整溶液浓度至 10%左右，以截留分子量为 2000 Da 的超滤膜过滤，收集未透过液，旋转蒸发仪浓缩，真空干燥，得 350 g 甘露糖醛二酸产品 A。

步骤 2）：甘露糖醛二酸产品 A 中各聚合度寡糖的比例和结构分析

精密称取 100 mg 上述干燥的甘露糖醛二酸产品 A，加水溶解配制成 10 mg/mL 的浓度，过 0.22 um 滤膜，做为供试样品溶液。采用 Superdex peptide（GE 公司）分子排阻色谱联用多角度激光散射（MALS，怀雅特公司）测定组合物中不同聚合度寡糖的比例。实验方法如下：

色谱柱：Superdex peptide 10/300Gl

流动相：0.1 mol/L NaCl

进样量：10 uL

流速：0.3 mL/min

测试结果：二糖-十糖分别以 dp2-dp10 表示，分别为 dp2 为 19%，dp3 为 25%，dp4 为 22%，dp5 为 13%，dp6 为 9%，dp7 为 6%，dp8 为 3%，dp9 为 2%，dp10 为 1%。

步骤 3）：LC-MS 分析甘露糖醛二酸产品 A 中各聚合度寡糖的结构

实验条件：

色谱柱：Superdex peptide 10/300Gl

流动相：20%甲醇+80% 80mmol/L NH_4Ac

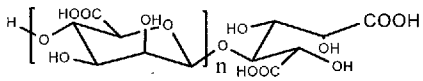
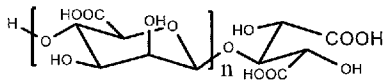
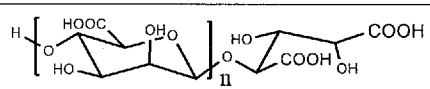
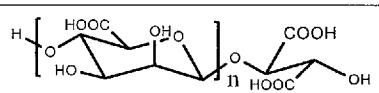
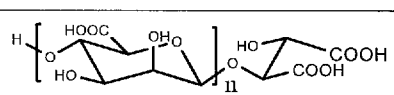
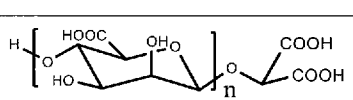
流速：0.1 mL/ min

柱温：25 ℃ ± 0.8 ℃。

质谱条件：Agilent 6540 QTOF；离子源：ESI 碰撞电压 120 V；负离子模式。采集信号（m/z）宽度为 100-1000。

各聚合度寡糖的质谱图见附图 1-3 所示。对质谱图中各信号峰进行归属，验证了产品 A 中所有寡糖的分子结构，即通式（III）所示的结构。信号归属及该信号所对应的结构见下表 1。

表 1 产品 A 中不同聚合度寡糖中的 6 种二酸结构及其在质谱中的质荷比

序号	分子结构	分子式	质荷比（m/z）								
			n=1 $[M-1]^-$	n=2 $[M-1]^-$	n=3 $[M-1]^-$	n=4 $[M-1]^-$	n=5 $[M-1]^-$	n=6 $[M-1]^-$	n=7 $[M-2]^{2-}$	n=8 $[M-2]^{2-}$	n=9 $[M-2]^{2-}$
1		$(C_6H_8O_6)_nC_6H_{10}O_8$ n=1-9	385	561	737	913	1089	1265	720	808	896
2		$(C_6H_8O_6)_nC_5H_8O_7$ n=1-9	355	531	707	883	1059	1235	705	793	881
3		$(C_6H_8O_6)_nC_5H_8O_7$ n=1-9	355	531	707	883	1059	1235	705	793	881
4		$(C_6H_8O_6)_nC_4H_6O_6$ n=1-9	325	501	677	853	1029	1205	690	778	866
5		$(C_6H_8O_6)_nC_4H_6O_6$ n=1-9	325	501	677	853	1029	1205	690	778	866
6		$(C_6H_8O_6)_nC_3H_4O_5$ n=1-9	295	471	647	823	999	1175	675	763	851

由上述质谱结构解析发现，产品 A 中糖链还原末端的甘露糖醛酸氧化为糖二酸结构（结构见通式Ⅲ），该糖二酸可以是含 6 个碳（m+m'=3）的甘露糖二酸结构，含量约为 10%~30%，也可以是甘露糖二酸的脱羧产物，即 5 个碳（m+m'=2）的糖二酸（30~50%）和 4 个碳（m+m'=1）的糖二酸（30%~40%）。

实施例 2:

称取 100 g 实施例 1 中的 M-段中间体，加蒸馏水溶解后，配成 0.8 L 体积的溶液，NaOH 调 pH 至 4.0，室温 25 ℃反应。调节氧气钢瓶出口的气流量和臭氧发生器的功率，使得臭氧质量浓度流量达到 1 g/hr，通入反应液中。反应 10 hr 后停止通入臭氧，加适量水调整溶液浓度至 15%左右，以截留分子量为 1000 Da 的超滤膜过滤，收集未透过液，旋转蒸发仪浓缩，真空干燥，得 80 g 甘露糖醛二酸产品 B。

采用 Superdex peptide（GE 公司）分子排阻色谱联用多角度激光散射（MALS，怀雅特公司）测定 B 中各聚合度寡糖组分的比例。测定方法同实施例 1 中相关部分。测试结果：二糖-十糖分别以 dp2-dp10 表示，分别为 dp2 为 20%，dp3 为 25%，dp4 为 19%，dp5 为 12%，dp6 为 9%，dp7 为 5%，dp8 为 5%，dp9 为 3%，dp10 为 2%

实施例 3:

称取 100 g 实施例 1 中的 M-段中间体，加蒸馏水溶解后，配成 1.5 L 体积的溶液，NaOH 调 pH 至 9.0，水浴 45 ℃反应。调节氧气钢瓶出口的气流量和臭氧发生器的功率，使得臭氧质量浓度流量达到 3 g/hr，通入反应液中。反应 2 hr 后停止通入臭氧，加适量水调整溶液浓度至 5%左右，以截留分子量为 3000 Da 的超滤膜过滤，收集未透过液，旋转蒸发仪浓缩，真空干燥，得 60 g 甘露糖醛二酸产品 C。

采用 Superdex peptide（GE 公司）分子排阻色谱联用多角度激光

散射（MALS，怀雅特公司）测定 C 中各聚合度寡糖组分的比例。测定方法同实施例 1 中相关部分。测试结果：二糖-十糖分别以 dp2-dp10 表示，分别为 dp2 为 8%，dp3 为 20%，dp4 为 28%，dp5 为 19%，dp6 为 13%，dp7 为 6%，dp8 为 3%，dp9 为 2%，dp10 为 1%。

实施例 4

单一聚合度的甘露糖醛二酸寡糖的制备，方法如下：

1、样品准备：由实施例 1 中制备得到的甘露糖醛二酸产品 A 中取出 300 g，加水溶解，配置成 1000 mL 的浓溶液，放置在 4 ℃冰箱备用。每次使用时取出 50 mL 加水稀释 1 倍后，用 0.22 um 超滤膜抽滤。

2、色谱分离条件：色谱仪为 AKTA pure 150（购置于 GE 公司），配 UV 检测器和自动收集器。分离色谱柱：1.2 kg BioGel P6（购于伯乐公司）用去离子水混合，真空脱气以后，手动填装到玻璃柱（10 cm 内径）中，纯水冲洗 10 倍柱体积以后，色谱柱床稳定，高度为 1.0 m。然后改用 0.02 M 的 NaCl 溶液为流动相，平衡 10 倍柱体积以后，开始上样。

3、上样和分离：泵的流速设置为 1 mL/min，将 100 mL 的样品溶液通过色谱仪自带的泵抽到色谱柱顶端后，切换到流动相，以 5 mL/min 的流速洗脱，待死水体积部分流出以后，开始自动收集，每管收集 50 mL。

4、重复上样，20 次重复制备以后，合并相同组分，旋转蒸发仪浓缩，冷冻干燥，得到二糖至十糖共 9 个单一聚合度的寡糖。

实施例 5

组合物与六糖之间的药理活性评价，考察组合物中不同聚合度寡糖之间的协同增效作用及寡糖比例范围。

样品准备：

(1) 组合物产品 D：实施例 4 中制备得到的单一聚合度的甘露糖醛二酸寡糖，按照聚合度的大小从二糖到十糖准确称量，各糖取出的重量如下：二糖 3.0 g，三糖 3.0 g，四糖 1.5 g，五糖 1.5 g，六糖 0.4 g，七糖 0.2 g，八糖 0.2 g，九糖 0.1 g，十糖 0.1 g，混匀得 10 g 组合物产品 D。

(2) 对比实验样品制备

参照在先专利 CN106344592A 实施例 1 和 2 披露的方法制备含四糖-十糖的混合物

称取 1g 多聚甘露糖醛酸钠盐（重均分子量 8235Da，上海绿谷制药有限公司提供），加入适量蒸馏水配成 1 %（重量百分比）的多聚甘露糖醛酸钠水溶液。用盐酸将所述 1 %的多聚甘露糖醛酸钠水溶液的 pH 值调节为 4，然后将该水溶液置于高压釜中。在 110℃温度下加热反应 4 小时。从高压釜中取出该反应后的溶液并使其冷却。冷却后，用 NaOH 溶液调节该反应后溶液的 pH 值得到中性液体。在搅拌条件下，将所述中性液体缓慢加入到该液体体积 4 倍体积量的乙醇中，进行醇沉并静置过夜。过滤分离醇沉所得固体物质，并在过滤分离时用无水乙醇洗涤过滤分离所得固体物质，最终得到白色滤饼。将该滤饼置于 60℃烘箱中干燥，得褐藻胶寡糖粗品。

取 5g 褐藻胶寡糖粗品配成 5 %（重量百分比）的水溶液。通过向 50ml 的 10%（重量百分比）氢氧化钠溶液中加入 25ml 的 5 %（重量百分比）的硫酸铜溶液并立即混匀制备得到新鲜氧化剂氢氧化铜。将该新鲜氧化剂氢氧化铜立即加入到 40ml 上述 5 %（重量百分比）的褐藻胶寡糖溶液中，同时通过沸水浴进行加热，直至不再有砖红色沉淀产生。将该反应体系进行离心处理以去除沉淀从而得到上清液。取少许上清液再次加入所述氧化剂，检查是否还有砖红色沉淀产生。若还有砖红色沉淀产生，则将上述离心所得全部上清液与另外部分的所述氧化剂继续进行反应，直至检验不再有砖红色沉淀产生为止。将最后得到的反应体系离心分离获得上清液。向上清液中加入 4 倍体积量的 95%乙醇进行醇沉，并静置过夜。过滤分离醇沉

所得固体物质，并用无水乙醇洗涤该固体物质。将所得固体物质置于60℃烘箱中烘干，得到式（II）所示褐藻胶寡糖粗品。

取上述褐藻胶寡糖粗品1g，配成10％（重量百分比）的水溶液，用 95%乙醇溶液再次进行醇沉，过滤分离再次醇沉所得沉淀物并任选地用无水乙醇洗涤。分离该沉淀物并干燥，得到固体物质。将该固体物质配成5 ％（重量百分比）的水溶液，用3 μm孔径膜过滤该水溶液并收集滤液。将该滤液在分子排阻色谱 Bio-Gel-P6 凝胶柱（1.6×180cm，购自 Bio-Rad 公司)上进行洗脱分离，作为流动相的洗脱液为 0.2mol• L-1NH_4HCO_3。依次使用多个5毫升试管从该柱色谱收集洗脱液，然后用硫酸-咔唑法检测所述各集液管中洗脱液的糖含量。根据该检测结果分别收集含有不同分子量褐藻胶寡糖组分的洗脱液。将含有不同分子量褐藻胶寡糖组分的洗脱液各自分别减压浓缩并冷冻干燥，弃去组分1，得到分别具有不同分子量的式（II）所示褐藻胶寡糖组分2-12（n分别具有0-10的值）收集并合并n=2-8的式（II）所示褐藻胶寡糖洗脱液并干燥，然后得到n=2-8的式（II）所示褐藻胶寡糖混合物（四-十糖混合物），作为对比实验样品。

采用 Superdex peptide（GE公司）分子排阻色谱联用多角度激光散射（MALS，怀雅特公司）测定对比实验样品中各聚合度寡糖组分的比例。测定方法同实施例1中相关部分。测试结果：四糖-十糖分别以dp4-dp10表示，分别为dp4为10%，dp5为12%，dp6为13%，dp7为14%，dp8为15%，dp9为19%，dp10为17%。

实施例1、2、3中分别制备得到的产品A、B、C、本实施例中的产品D以及对比实验样品的寡糖比例如下表2所示。

表2 甘露糖醛二酸寡糖组合物产品及对比试验样品中的寡糖百分比

比例 / 组合	二糖	三糖	四糖	五糖	六糖	七糖	八糖	九糖	十糖
A	19%	25%	22%	13%	9%	6%	3%	2%	1%

B	20%	25%	19%	12%	9%	5%	5%	3%	2%
C	8%	20%	28%	19%	13%	6%	3%	2%	1%
D	30%	30%	15%	15%	4%	2%	2%	1%	1%
对比实验样品	0	0	10%	12%	13%	14%	15%	19%	17%

以上 A、B、C、D 四个样品各取 10 g，按照“抗疼痛的药效评价动物模型”所描述的方法，比较这些组合物与六糖（6T）及对比实验样品的药理活性。

1、醋酸致小鼠疼痛模型

实验中，模型组与空白对照组相比，前者扭体潜伏期明显缩短，扭体次数明显增加，说明该评价模型造模成功。与模型组相比，各个给药组扭体潜伏期明显延长，扭体次数明显减少，见附图 4 和 5。

2、硝酸甘油致大鼠偏头痛模型

硝酸甘油皮下注射后 3 分钟左右，大鼠出现耳红，耳红持续 2.5 小时左右；模型组与空白组相比，造模后 30-45 分钟时间段中的挠头次数显著多于空白对照组；而给药组与模型组相比，大鼠耳红出现时显著延迟，耳红持续时间缩短，在 30-45 分钟时间段中的挠头次数减少，见附图 6。

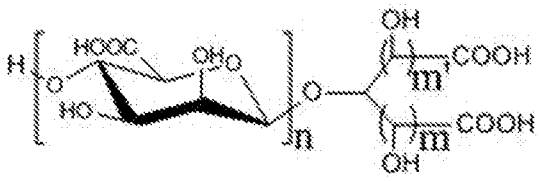
3、电刺激三叉神经节致偏头痛模型

电刺激大鼠三叉神经节明显导致硬脑膜血清蛋白渗出，模型组与空白对照组和假手术组相比，模型组 PPE 率明显升高，c-fos 表达阳性细胞数明显增加；而给药组与模型组相比，PPE 率明显降低，c-fos 表达阳性细胞数明显减少，见附图 7。

实验结果表明，产品 A、B、C 的药效活性均好于对比实验样品，且好于活性最高的单一聚合度的六糖，但产品 D 的活性弱于六糖，说明组合物中各寡糖之间的比例很重要，添加一定比例的二糖、三糖有协同增效作用，但当二糖、三糖的比例过高时则会降低组合物的活性。

权利要求书

1. 一种甘露糖醛二酸寡糖组合物用于制备治疗疼痛的药物的用途；其中所述甘露糖醛二酸寡糖组合物包含具有式（III）的甘露糖醛二酸或其药学上可接受的盐：



式（III）

其中 n 为选自 1-9 的整数，m 选自 0，1 或 2，m'选自 0 或 1，

并且其中，

n=1-5 的甘露糖醛二酸的重量总和占所述组合物总重量的 60%以上；

n=1-2 的甘露糖醛二酸的重量总和占所述组合物总重量的低于 60%。

2. 如权利要求 1 所述的用途，其中所述疼痛为是急性疼痛、慢性疼痛、神经性疼痛、术后痛、慢性下背痛、丛集性头痛、疱疹神经痛、幻肢痛、中枢性痛、牙痛、阿片样物质抗性疼痛、内脏痛、手术痛、骨损伤痛、劳累和分娩过程中的疼痛、因灼伤包括晒伤导致的疼痛、产后痛、偏头痛、心绞痛和与泌尿生殖道相关的疼痛（包括膀胱炎）、血管性疼痛、三叉神经痛、肋间神经痛、手术切口痛、慢性筋膜炎痛、足跟痛、肌肉疼痛、骨骼疼痛、关节疼痛、癌性疼痛、非癌性疼痛。

3. 根据权利要求 1 所述的用途，其中所述的甘露糖醛二酸寡糖组合物中，n=1-2 的甘露糖醛二酸的重量总和占所述组合物总重量的 10-50%，优选 25-50%。

4.根据权利要求 1 所述的用途，其中所述的甘露糖醛二酸寡糖组合物中，n=1-3 的甘露糖醛二酸的重量总和与 n=4-7 的甘露糖醛二酸重量总和的比例在 1.0-3.5 之间。

5. 根据权利要求 1 所述的用途，其中所述的甘露糖醛二酸寡糖组合物中，m+m’=1 或 2 的甘露糖醛二酸的重量总和不低于所述组合物总重量的 50%以上，优选 60%-90%，更优选 70%-90%。

6. 根据权利要求 5 所述的用途，其中 m+m’=1 的甘露糖醛二酸的重量总和不低于所述组合物总重量的 10%，优选 30-40%。

7. 根据权利要求 5 所述的用途，其中 m+m’=2 的甘露糖醛二酸的重量总和不低于所述组合物总重量的 10%，优选 30-50%。

8. 根据权利要求 1 所述的用途，其中 n=1-5 的甘露糖醛二酸的重量总和占所述组合物总重量的 80-95%。

9. 根据权利要求 1 所述的用途，其中 n=1-3 的甘露糖醛二酸的重量总和占所述组合物总重量的 20-70%。

10. 根据权利要求 4 所述的用途，其中 n=1-3 的甘露糖醛二酸的重量总和与 n=4-7 的甘露糖醛二酸重量总和的比例在 1.0-3.0 之间。

11. 根据权利要求 1-9 任一项所述的用途，其中各聚合度甘露糖醛二酸在所述组合物中的重量百分含量为：二糖 5-25%，三糖 15-30%，四糖 15-28%，五糖 5-25%，六糖 2-20%，七糖 2-20%，八糖 2-20%，九糖 2-20%，十糖 2-20%。

12. 据权利要求 11 所述的用途，其中各聚合度甘露糖醛二酸在所述组合物中的重量百分含量为：二糖 5-25%，三糖 15-30%，四糖 15-28%，五糖 10-20%，六糖 5-15%，七糖 3-10%，八糖 2-5%，九糖 1-5%，十糖 1-5%。

13. 根据权利要求 12 所述的用途，其中各聚合度甘露糖醛二酸在所述组合物中的重量百分含量为：二糖 10-20%，三糖 18-30%，四糖 15-28%，五糖 15-20%，六糖 5-10%，七糖 3-5%，八糖 2-5%，九糖 1-3%，十糖 1-3%。

14. 根据权利要求 1-13 所述的用途，其中所述药学上可接受的盐是钠盐或钾盐。

15. 一种治疗患有疼痛的患者的方法，其包括给予需要的患者有效量的根据权利要求 1-14 任一项所述的甘露糖醛二酸寡糖组合物。

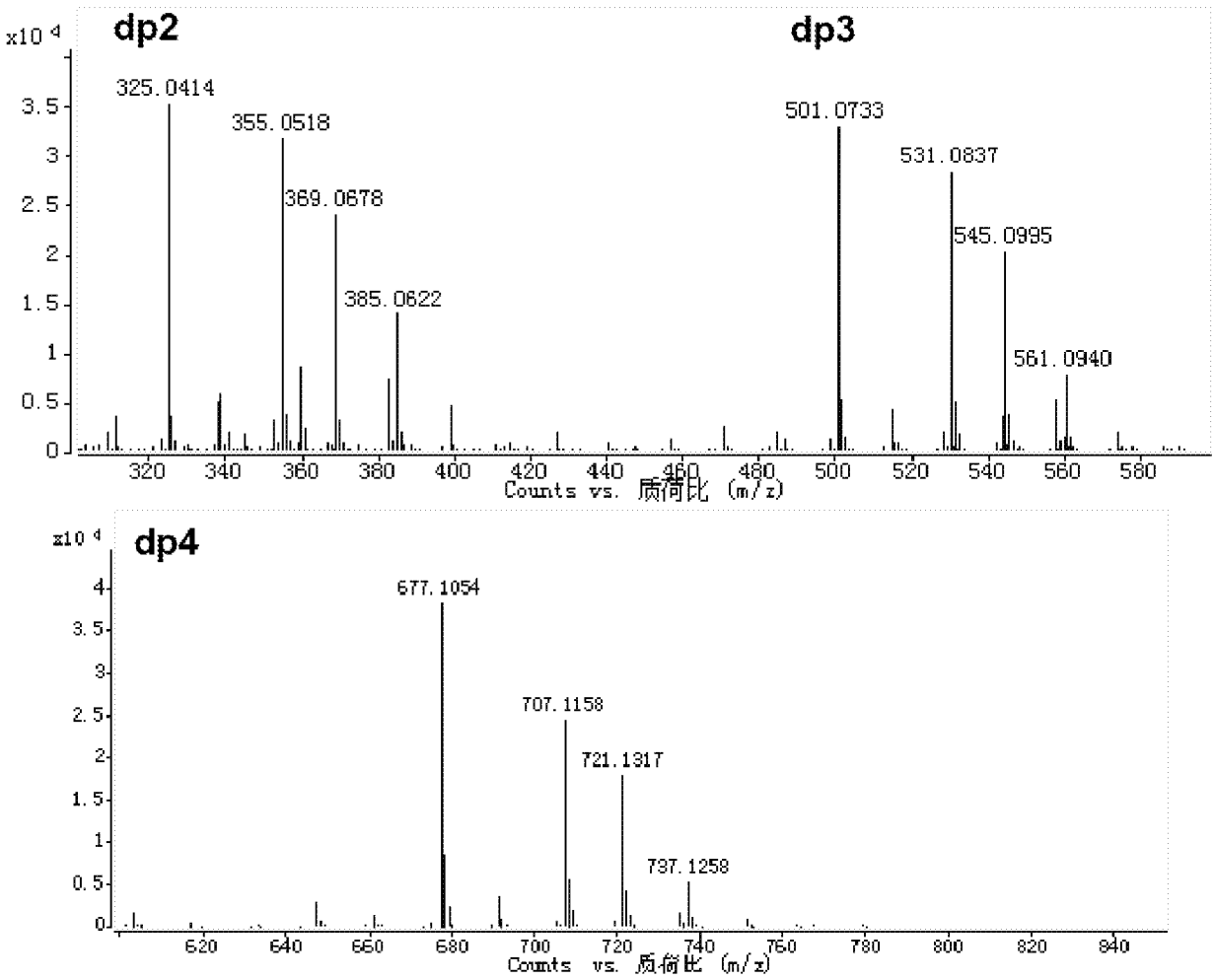

dp2
dp3
x10 4
325.0414
355.0518
369.0678
385.0622
501.0733
531.0837
545.0995
561.0940
Counts vs. 质荷比 (m/z)
dp4
677.1054
707.1158
721.1317
737.1258
Counts vs. 质荷比 (m/z)

图 1

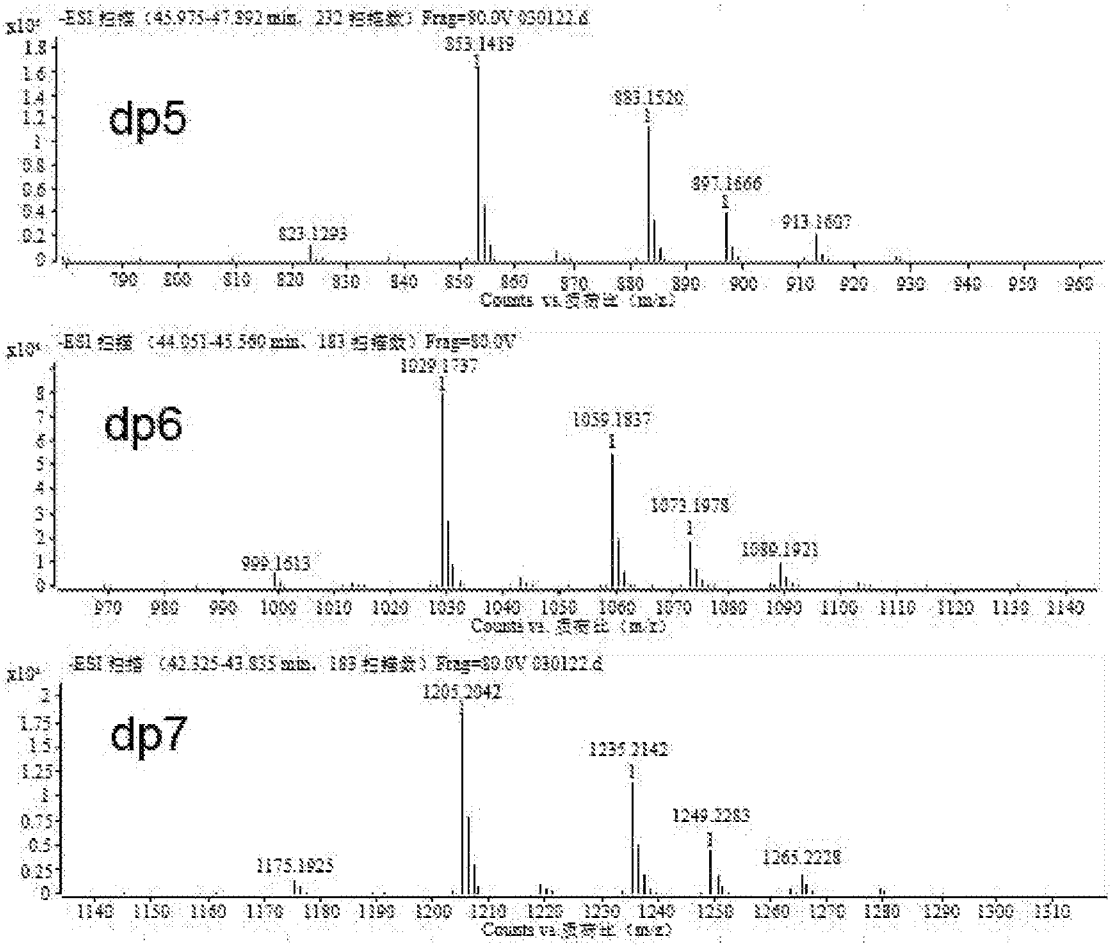

dp5
853.1419
883.1520
897.1666
913.1607
823.1293
dp6
1039.1737
1059.1837
1073.1978
1089.1931
999.1613
dp7
1205.2042
1235.2142
1249.2283
1265.2228
1175.1923

图 2

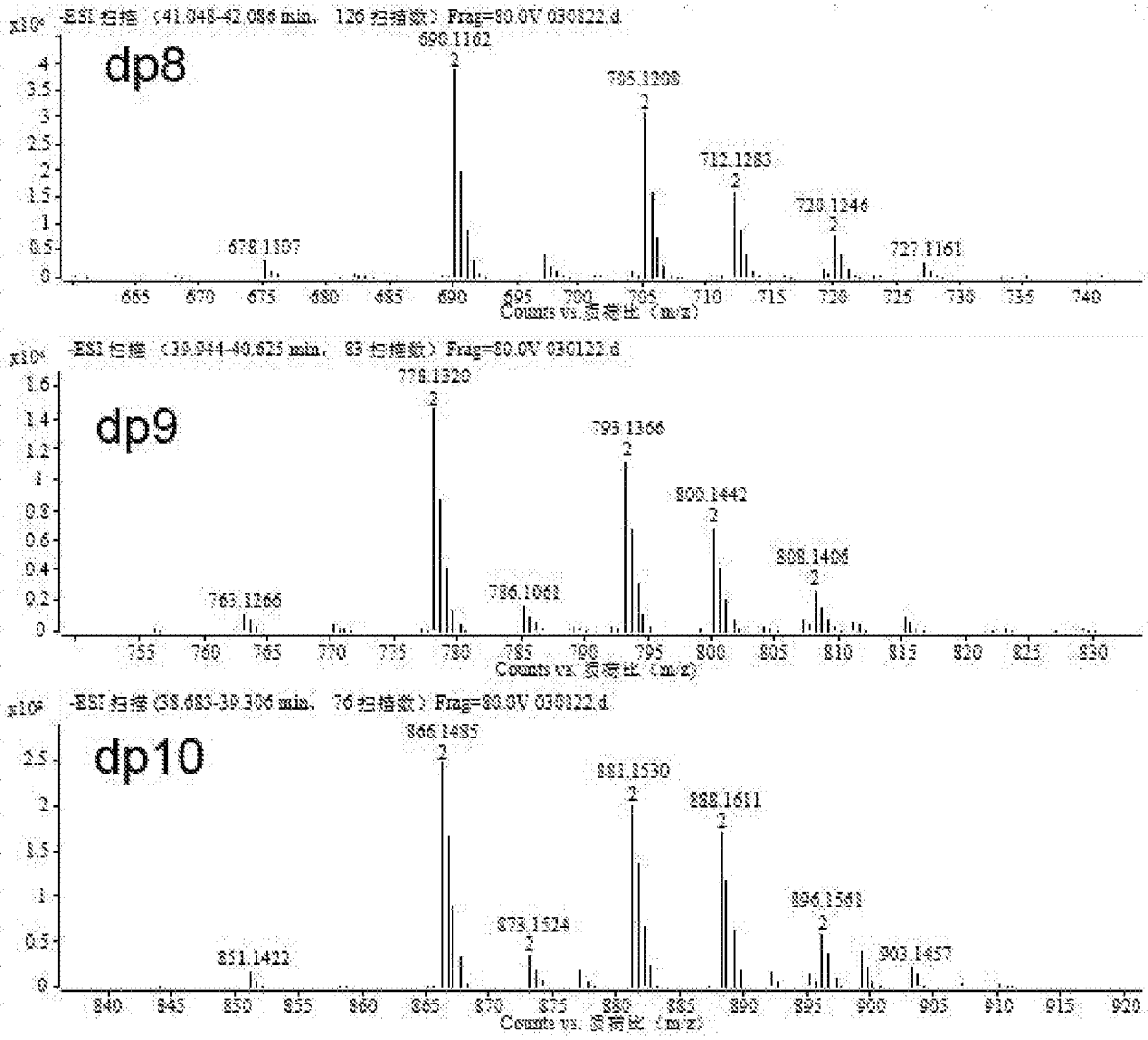

dp8
690.1162
705.1208
712.1283
720.1246
678.1107
727.1161
dp9
778.1320
793.1366
800.1442
808.1406
763.1265
786.1061
dp10
866.1485
881.1530
888.1611
896.1561
873.1524
851.1412
903.1457

图 3

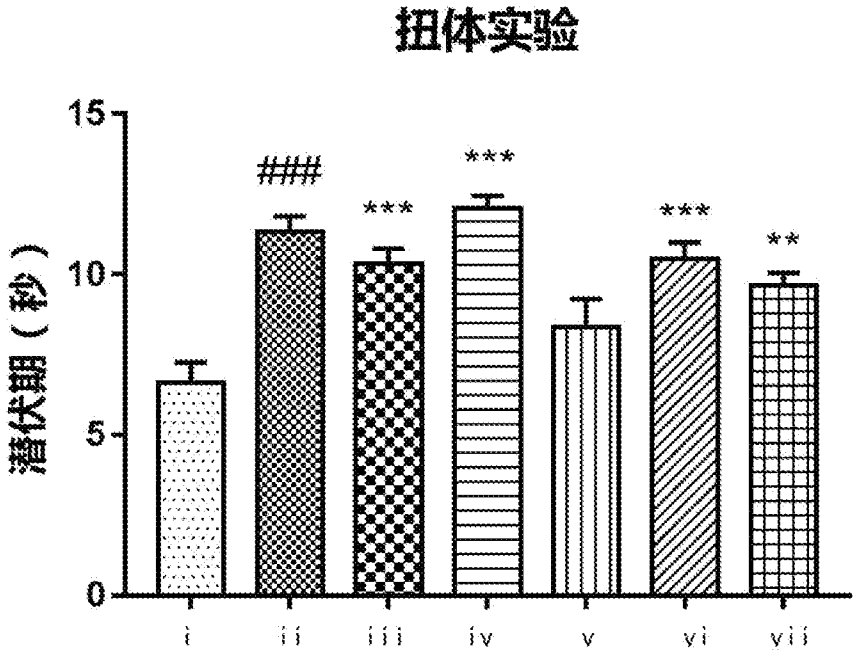

扭体实验
潜伏期（秒）
15
10
5
0
###
***
***
***
***
**
i
ii
iii
iv
v
vi
vii

图 4

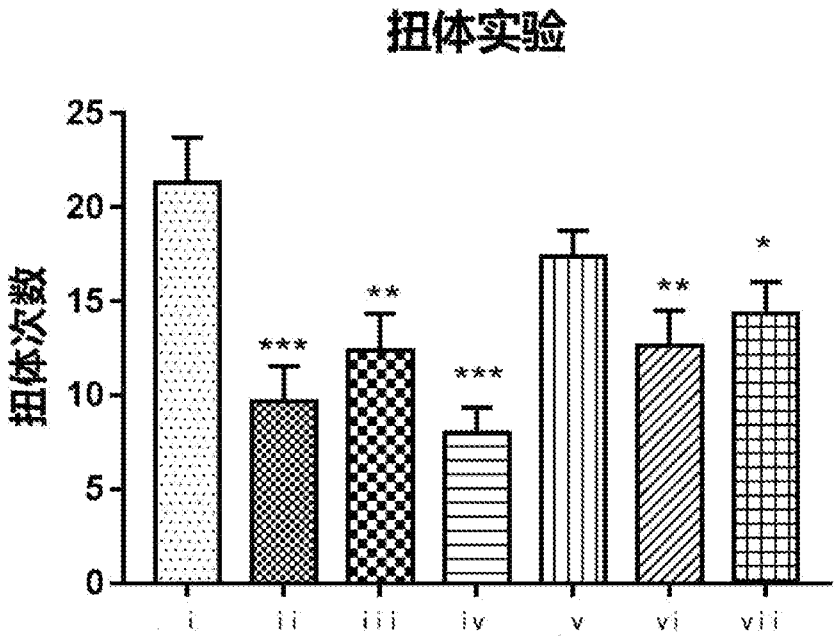

扭体实验
扭体次数
25
20
15
10
5
0
***
**
***
**
*
i
ii
iii
iv
v
vi
vii

图 5

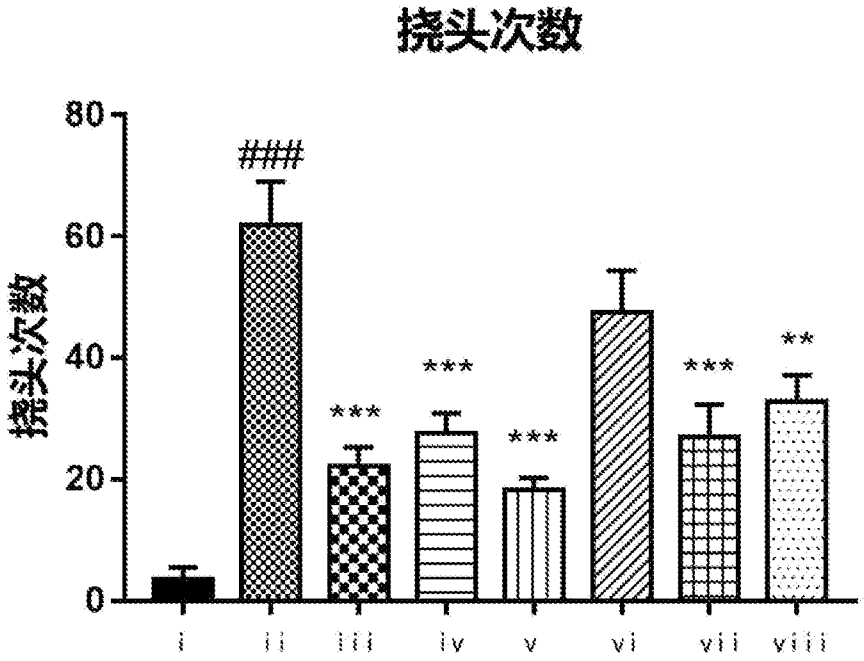

挠头次数
挠头次数
80
60
40
20
0
###
***
***
***
***
***
**
i
ii
iii
iv
v
vi
vii
viii

图 6

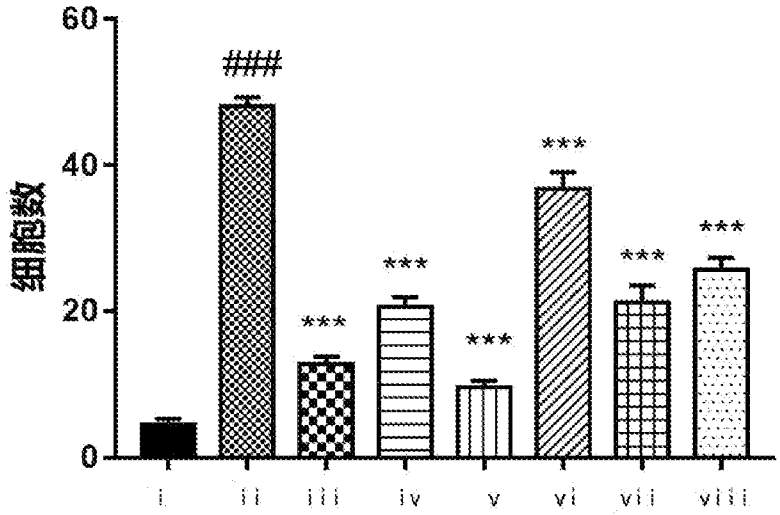

细胞数
60
40
20
0
###
***
***
***
***
***
***
i
ii
iii
iv
v
vi
vii
viii

图 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2019/093799

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 31/702(2006.01)i; A61P 25/04(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)

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, VEN(DWPI+SIPOABS), CNTXT, EPTXT, USTXT, WOTXT, 中国药物专利数据库, CTCMPD, CNKI, 百度学术搜索, BAIDU XUESHU SEARCH, ISI-WEB OF SCIENCE: +ache, arthralgia, intercostal neuralgia, myalgia, talalgia, myosalgia, trigeminal neuralgia, pain, tic douloureux, 痛, 疼, mannuron+, courbature, 甘露糖醛, trifacial neuralgia, myodynia

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 106344595 A (SHANGHAI GREEN VALLEY PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 25 January 2017 (2017-01-25) see the abstract, and claims 1-7	1-15
A	CN 1362860 A (KBP CO., LTD.) 07 August 2002 (2002-08-07) see entire document	1-15

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"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)

"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

"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

"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

"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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
16 September 2019	**09 October 2019**

Name and mailing address of the ISA/CN	Authorized officer
China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) **No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088** **China**	
Facsimile No. **(86-10)62019451**	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2019/093799

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.: **15**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

[1] The claim relates to methods of Treatment of pain, which is the subject matter that does not warrant a search (PCT Rule 39.1(iv). However, the search is still made on the use of the compositions in the preparation of a medicament for treating pain.

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).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2019/093799

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	106344595	A	25 January 2017	None			
CN	1362860	A	07 August 2002	US	2002137723	A1	26 September 2002
				EP	1175157	A1	30 January 2002
				US	6747015	B2	08 June 2004
				KR	100501584	B1	18 July 2005
				EP	1175157	A4	14 May 2003
				KR	20010077950	A	20 August 2001
				JP	2003521573	A	15 July 2003
				AU	3238001	A	14 August 2001
				WO	0156404	A1	09 August 2001

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2019/093799

A. 主题的分类

A61K 31/702(2006.01)i; A61P 25/04(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,VEN(DWPI+SIPOABS),CNTXT, EPTXT,USTXT,WOTXT,中国药物专利数据库,CNKI,百度学术搜索,ISI-WEB OF SCIENCE:+ache, arthralgia, intercostal neuralgia, myalgia, talalgia, myosalgia, trigeminal neuralgia, pain, tic douloureux, 痛, 疼, mannuron+, courbature, 甘露糖醛, trifacial neuralgia, myodynia

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
X	CN 106344595 A (上海绿谷制药有限公司) 2017年 1月 25日 (2017-01-25) 参见说明书摘要，权利要求1-7	1-15
A	CN 1362860 A (韩国生物高分子株式会社) 2002年 8月 7日 (2002-08-07) 参见全文	1-15

☐ 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	国际检索报告邮寄日期
2019年 9月 16日	2019年 10月 9日

ISA/CN的名称和邮寄地址	受权官员
中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088	修文
传真号 (86-10)62019451	电话号码 (86-10)62411076

表 PCT/ISA/210 (第2页) (2015年1月)

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2019/093799

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： 15
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：

[1] 该权利要求涉及治疗疼痛的方法，这属于不要求检索的主题(PCT细则39.1(iv))，但还是针对所述组合物在制备治疗疼痛的药物中的应用进行了检索。

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。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2019/093799

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	106344595	A	2017年 1月 25日	无			
CN	1362860	A	2002年 8月 7日	US	2002137723	A1	2002年 9月 26日
				EP	1175157	A1	2002年 1月 30日
				US	6747015	B2	2004年 6月 8日
				KR	100501584	B1	2005年 7月 18日
				EP	1175157	A4	2003年 5月 14日
				KR	20010077950	A	2001年 8月 20日
				JP	2003521573	A	2003年 7月 15日
				AU	3238001	A	2001年 8月 14日
				WO	0156404	A1	2001年 8月 9日