



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108938653 B

(45) 授权公告日 2021.03.02

(21) 申请号 201811136880.X

A61K 31/7016 (2006.01)

(22) 申请日 2018.09.28

A61K 31/702 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

A61K 31/716 (2006.01)

申请公布号 CN 108938653 A

A61P 25/28 (2006.01)

(43) 申请公布日 2018.12.07

审查员 王慧研

(73) 专利权人 苏州大学

地址 215000 江苏省苏州市相城区济学路8号

(72) 发明人 张真庆 唐蓉 郝杰 吴芳霞  
李笃信

(74) 专利代理机构 苏州翔远专利代理事务所  
(普通合伙) 32251

代理人 陆金星

(51) Int. Cl.

A61K 31/7012 (2006.01)

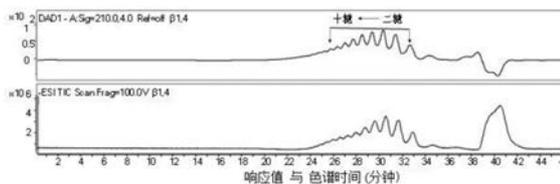
权利要求书1页 说明书17页 附图8页

(54) 发明名称

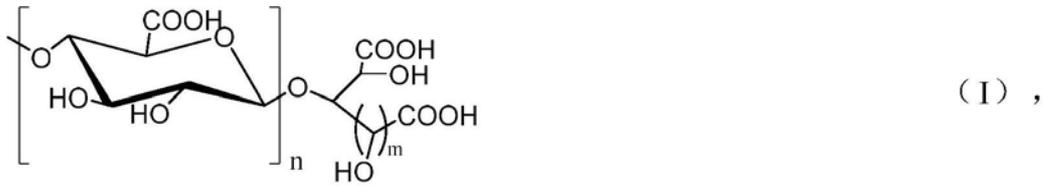
氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖在制备治疗阿尔茨海默病的药物中的应用

(57) 摘要

本发明公开了氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖在制备治疗阿尔茨海默病的药物中的应用, 以及其衍生物或其药学上可接受的盐在制备治疗阿尔茨海默病的药物中的应用。本发明涉及的氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖及其混合物均显著地提高了β淀粉样蛋白损伤的神经元细胞的存活率, 显著地改善AD模型小鼠的学习和记忆能力, 并且存在明显的剂量依赖关系; 而且结构简单、无明显的副作用基团, 更加安全、可控, 且在发挥抗AD疗效层面, 氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖的组合方式更加多样; 原料可由自然界中资源丰富的纤维素经特异性的氧化改造而获得, 相比于其他多糖, 更加安全、可控, 成药潜力较大。



1. 氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖或其药学上可接受的盐在制备治疗阿尔茨海默病的药物中的应用,其特征在於:所述氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖或其药学上可接受的盐包括如下通式(I)结构:



其中,

式(I)中的n选自0-19中的任意一个或多个整数;

m选自0、1或2;

通过n选择一个或多个整数获得一个或多个具有通式(I)结构的氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖或其药学上可接受的盐。

2. 根据权利要求1所述的氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖或其药学上可接受的盐在制备治疗阿尔茨海默病的药物中的应用,其特征在於:所述n选自1-9中的任意一个或多个整数。

3. 根据权利要求2所述的氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖或其药学上可接受的盐在制备治疗阿尔茨海默病的药物中的应用,其特征在於:所述n为1、2、3、4、5、6、7、8和9,分别对应氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖2、3、4、5、6、7、8、9和10糖。

4. 根据权利要求1所述的氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖或其药学上可接受的盐在制备治疗阿尔茨海默病的药物中的应用,其特征在於:n为1-9的组分占所述氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖或其药学上可接受的盐中的重量计为80%以上。

5. 根据权利要求4所述的氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖或其药学上可接受的盐在制备治疗阿尔茨海默病的药物中的应用,其特征在於:n为1-9的组分占所述氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖或其药学上可接受的盐中的重量计为90%以上。

6. 根据权利要求5所述的氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖或其药学上可接受的盐在制备治疗阿尔茨海默病的药物中的应用,其特征在於:n为1-9的组分占所述氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖或其药学上可接受的盐中的重量计为95%以上。

7. 根据权利要求1所述的氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖或其药学上可接受的盐在制备治疗阿尔茨海默病的药物中的应用,其特征在於:所述氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖或其药学上可接受的盐在提高β淀粉样蛋白损伤的神经元细胞的存活率中的应用。

## 氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖在制备治疗阿尔茨海默病的药物中的应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖及其衍生物、或其药学上可接受的盐在治疗阿尔茨海默病方面的应用。

### 背景技术

[0002] 阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD) 又称老年痴呆, 是一种发生于脑部的神经退行性疾病, 临床上主要表现为记忆障碍、失语、失用、认知功能障碍、性格行为改变等。随着年龄增加, AD的发病率逐渐增加, 据统计, 65~80岁人群发病率为5%~8%, 80岁以上人群发病率高达20%以上。随着人口老龄化进程的不断加快, 到2050年全球AD患者预计将超过1亿3千7百万, 届时, 全球对于这一疾病的总投入将高达上千亿美元, 给社会以及众多家庭造成沉重的负担。目前, 临床上用于AD防治的药物包括中枢兴奋剂、改善胆碱能的物质、中草药及吡咯烷酮类化合物等, 如安理申、美金刚、他克林等。然而, 这些药物只能一定程度上改善轻、中度AD的症状, 并不能阻止、逆转、甚至延缓疾病进程, 从而限制了他们的广泛应用。正因如此, AD成为了目前临床上无法治愈的疾病。面对如此严峻的AD发病与治疗现状, 研发能阻止、甚至逆转AD进程的药物变得迫在眉睫。近来, 随着对该疾病发病机制研究的不断深入, 不仅多种治疗靶点, 如β淀粉样蛋白、tau蛋白、肠道菌群、神经炎症等不断的被提出, 而且大量针对这些靶点的活性化合物也不断被报道。

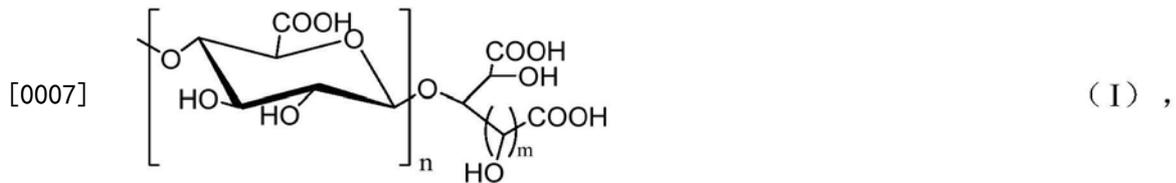
[0003] 纤维素是自然界中分布最广、含量最多的一种多糖, 占植物界碳含量的50%以上。其聚合度为3000~5000, 通过β1→4糖苷键结合的直链葡聚糖, 分子结构呈直线状, 具有一定的强度和刚性, 不易被稀酸或碱水解, 是植物细胞壁的重要组成成分。因为人类以及食肉类动物体内很少含有β糖苷酶, 故无法消化利用纤维素。微晶纤维素(MCC)是一种纯化的、部分解聚的纤维素, 主要成分以1,4-β-D-葡萄糖苷键结合的直链式多糖类物质, 白色、无臭、无味, 由多孔微粒组成的结晶粉末, 提高了纤维素的使用效率, 由于具有较低聚合度和较大的比表面积等特殊性质, 被广泛的应用于制药、化妆品、食品、轻化工等行业。

### 发明内容

[0004] 本发明目的是提供一种氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖及其衍生物或其药学上可接受的盐, 解决上述问题。

[0005] 本发明的一种技术方案是: 氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖及其衍生物或其药学上可接受的盐在制备治疗阿尔茨海默病的药物中的应用。

[0006] 进一步的, 所述氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖及其衍生物或其药学上可接受的盐包括如下通式(I)结构:



[0008] 其中,

[0009] 式(I)中的n选自0-19中的任意一个或多个整数;

[0010] m选自0、1或2;

[0011] 通过n选择一个或多个整数获得一个或多个具有通式(I)结构的氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖及其衍生物或其药学上可接受的盐。

[0012] 进一步的,所述n选自1-9中的任意一个或多个整数。

[0013] 进一步的,所述n为1、2、3、4、5、6、7、8和9,分别对应氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖2、3、4、5、6、7、8、9和10糖。

[0014] 进一步的,n为1-9的组分占所述氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖及其衍生物或其药学上可接受的盐中的重量计为80%以上。

[0015] 进一步的,n为1-9的组分占所述氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖及其衍生物或其药学上可接受的盐中的重量计为90%以上。

[0016] 进一步的,n为1-9的组分占所述氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖及其衍生物或其药学上可接受的盐中的重量计为95%以上。

[0017] 进一步的,所述氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖及其衍生物或其药学上可接受的盐在提高β淀粉样蛋白损伤的神经元细胞的存活率中的应用。

[0018] 氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖及其衍生物或其药学上可接受的盐在治疗阿尔茨海默病方面的应用,主要优点在于:

[0019] 1、本发明涉及的氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖及其混合物均显著地提高了β淀粉样蛋白损伤的神经元细胞的存活率,显著地改善AD模型小鼠的学习和记忆能力,并且存在明显的剂量依赖关系;

[0020] 2、本发明涉及的氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖结构简单、无明显的副作用基团,更加安全、可控,且在发挥抗AD疗效层面,氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖的组合方式更加多样;

[0021] 3、本发明涉及的氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖可由自然界中资源丰富的纤维素经特异性的氧化改造而获得,相比于其他多糖,氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖更加安全、可控,成药潜力较大。

## 附图说明

[0022] 为了更清楚地说明本发明实施例的技术方案,下面将对实施例描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图仅仅是本发明的一些实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动性的前提下,还可以根据这些附图获得其它的附图。其中,

[0023] 图1为氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖混合物SEC-LC色谱图,210nm;

[0024] 图2为氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖混合物中各聚合度寡糖的质谱图;

[0025] 图3为氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖单一聚合度寡糖的提取离子流色谱图(EIC);其中点虚线条表示OX1结构类型,实线条表示OX2结构类型,短线虚线条表示OX3结构类型;

[0026] 图4为氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖混合物抑制Aβ1-40聚集的THT荧光值变化曲线图;

[0027] 图5为氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖混合物对Aβ25-35引起SH-SY5Y细胞损伤的保护作用示意图;

[0028] 图6为氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖混合物对Bcl2、p53、Drp1、Parkin基因mRNA水平的调控作用示意图;

[0029] 图7为氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖混合物对Bcl2、p53、Drp1、Parkin基因蛋白水平的调控作用图;

[0030] 图8为氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖混合物对Aβ1-40引起小鼠认知障碍的改善作用,小鼠运动轨迹跟踪系统实验结果图。

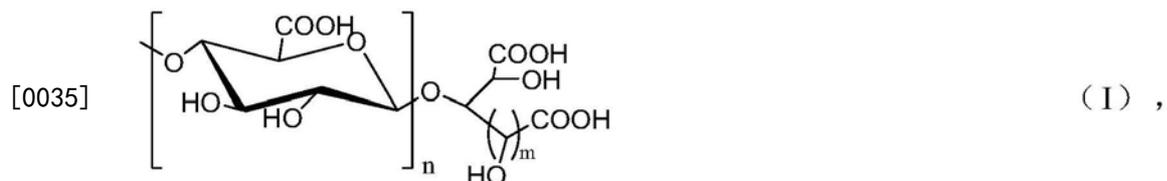
[0031] 图9为氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖混合物对Aβ1-40引起小鼠认知障碍的改善作用,Morris水迷宫之逃避潜伏期实验结果图。

[0032] 图10为氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖混合物对Aβ1-40引起小鼠认知障碍的改善作用,Morris水迷宫之穿越平台次数实验结果图。

[0033] 图11为单一聚合度氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖对Aβ25-35引起SH-SY5Y细胞损伤的保护作用示意图。

### 具体实施方式

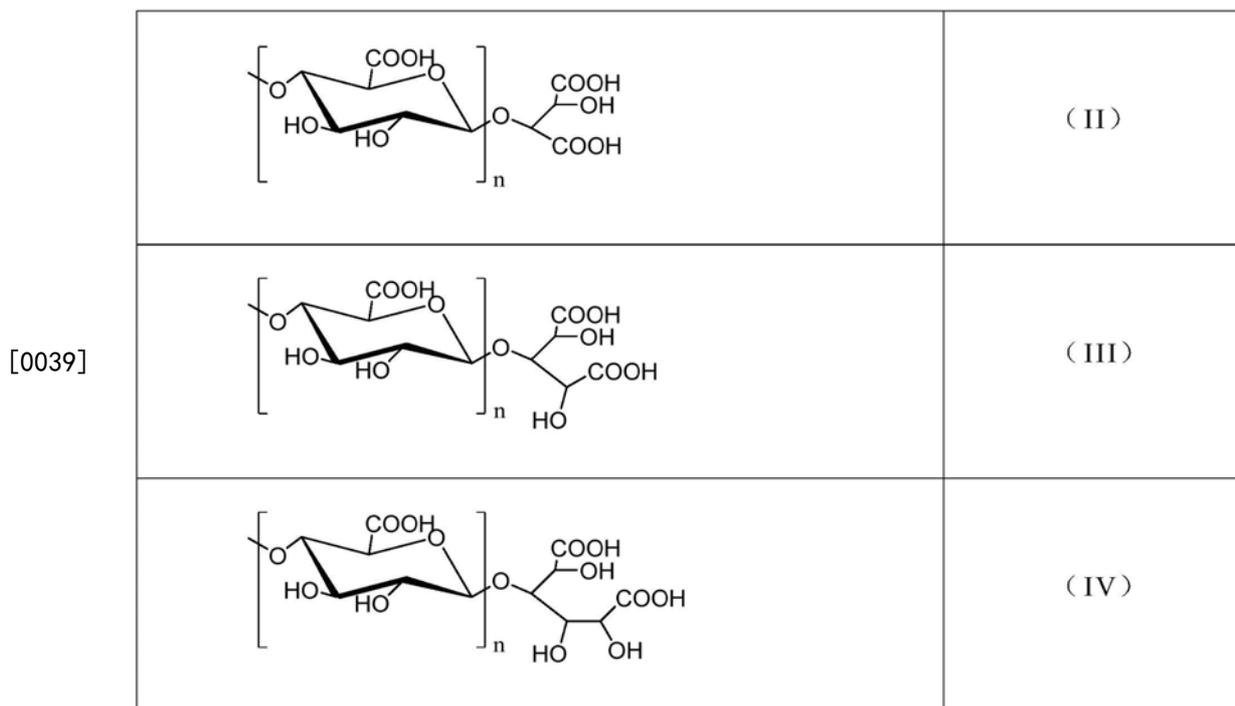
[0034] 本发明提供了一种氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖及其衍生物在治疗阿尔茨海默病中的用途。本发明所述的氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖及其衍生物或所述寡糖及其衍生物的药学上可接受的盐具有如结构式(I)所示的结构:



[0036] 式(I)中的n选自0-19的一个或多个整数;例如n是选自0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19的一个或多个整数。

[0037] 上述式(I)中,优选n=1-9,更优选n=2-8,最优选n=4。n=1-9的1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖(优选n=2-8,最优选n=4)的生物效果较佳的原因尚不清楚,可能是它们较易被机体细胞识别和接受。在一些实施方式中,n还可以是选自所述1-9范围内的一个或多个整数。式(I)中n选自1、2、3、4、5、6、7、8和9,分别对应氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖二糖、三糖、四糖、五糖、六糖、七糖、八糖、九糖和十糖。

[0038] 式(I)中m选自0、1或2。分别对应1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖-OX3、1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖-OX2和1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖-OX1,其结构分别如结构式(II)、(III)、(IV)所示:



[0040] 本发明所述的氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖是由纤维素经溴化钠(NaBr)-2,2,6,6-四甲基哌啶氧化物(TEMPO)-次氯酸钠(NaClO)系统特异性氧化而得,具体的制备工艺流程及结构分析方法可参考中国专利201510267009.3。

[0041] 在本发明的一个较佳实施方式中,结构式(I)所示的氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖的制备方法是:

[0042] (1) 称取微晶纤维素(MCC)粉末,丝光化处理制得丝光化后的MCC溶液,浓度为10~20mg/ml;

[0043] (2) 向步骤(1)中制得的丝光化后的MCC溶液中依次加入2,2,6,6-四甲基哌啶氧化物(TEMPO)和溴化钠,再使用碱性pH调节剂调节pH至10~11,之后加入次氯酸钠溶液于40~80℃条件下反应5~10小时,最后加入有机溶剂终止反应;

[0044] (3) 置于500Da的透析袋中透析,浓缩、超滤、冻干,由此得到氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸的混合物,或者任选地经色谱分离得到单一聚合度所述氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖。

[0045] 本发明所述式(I)氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖或其药学上可接受盐的衍生物包含一个或多个羟基被无机酸或有机酸酯化的酯。能与本发明式(I)氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖或其药学上可接受盐的一个或多个羟基形成酯的所述有机酸包括但不限于:甲酸、乙酸、草酸、羟基乙酸、丙酸、丙二酸、丁酸、丁二酸、戊酸、丙烯酸、草酸、马来酸、富马酸、苹果酸、琥珀酸、柠檬酸、酒石酸、乳酸、甲磺酸、乳酸、水杨酸、乙酰水杨酸、苯磺酸、对甲苯磺酸、丙酮酸、羟基丁酸、己二酸、邻苯二甲酸、扁桃酸、苯甲酸、硼酸等。能与本发明式(I)氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖或其药学上可接受盐的一个或多个羟基形成酯的所述无机酸包括但不限于:硫酸、亚硫酸、磷酸、偏磷酸、亚磷酸、次磷酸、焦磷酸、多聚磷酸等。

[0046] 本发明所述式(I)氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖及其衍生物的药学上可接受的盐包含:无机盐,如锂盐、钠盐、钾盐、铍盐、镁盐、钙盐、铁盐、锌盐、硒盐、钒盐、锡盐、硅盐、锑盐,或与赖氨酸、精氨酸、鸟氨酸等碱性氨基酸形成的碱性加成盐,其中优选钠盐。所述药

用盐可用常规方法制得。

[0047] 本发明所述用于治疗阿尔兹海默病的药物包含所述式(I)氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖及其衍生物、或所述寡糖及其衍生物的药理学上可接受的盐,以及一种或多种药理学上可接受载体。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。

[0048] 本发明所述药理学上可接受载体是指本领域技术人员熟知的药理学上可接受的载体,本发明的药理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、糖浆和黄蓍胶。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。

[0049] 制备各种含有各种比例活性成分的药物组合物的方法是已知的,或根据本发明的公开内容对于本领域技术人员是显而易见的。如Remington's Pharmaceutical Sciences, Martin, E.W., ed., Mack Publishing Company, 19th ed. (1995)所述。制备所述药物组合物的方法包括掺入适当的药理学赋形剂、载体、稀释剂等。

[0050] 以已知的方法制造本发明的药物制剂,包括常规的混合、溶解或冻干方法。

[0051] 本发明的药物以适于选定的施用方式的各种途径施用,例如口服或肠胃外(通过静脉内、肌内、局部或皮下途径)。

[0052] 因此,本发明的药物以适当的药理学上可以接受的载体(如惰性稀释剂或可食用的载体)可以全身施用,例如,口服。它们可以封闭在硬或软壳的明胶胶囊中,可以压为片剂。对于口服治疗施用,活性化合物可以结合一种或多种赋形剂,并以可吞咽的片剂、颊含片剂、含片、胶囊剂、酞剂、悬浮剂、糖浆、圆片等的形式使用。这种制剂应该包含至少0.1%的活性化合物。这种制剂中活性化合物的比例当然可以变化,可以占给定的单位剂型重量的大约0.01%至大约99%。在这种治疗有用的药物制剂中,活性化合物的量使得能够获得有效剂量水平。

[0053] 片剂、含片、丸剂、胶囊剂等也可以包含:粘合剂,如黄蓍胶、阿拉伯胶、玉米淀粉或明胶;赋形剂,如磷酸氢二钙;崩解剂,如玉米淀粉、马铃薯淀粉、藻酸等;润滑剂,如硬脂酸镁;和甜味剂,如蔗糖、果糖、乳糖或阿司帕坦;或调味剂,如薄荷、冬青油或樱桃香味。当单位剂型是胶囊时,除了上面类型的材料,它还可以包含液体载体,如植物油或聚乙二醇。各种其他材料可以存在,作为包衣,或以其他方式改变固体单位剂型的物理形式。例如,片剂、丸剂或胶囊剂可以用明胶、蜡、虫胶或糖等包衣。糖浆或酞剂可以包含活性化合物,蔗糖或

果糖作为甜味剂,对羟苯甲酸甲酯或对羟苯甲酸丙酯作为防腐剂,染料和调味剂(如樱桃香料或桔子香料)。当然,用于制备任何单位剂型的任何材料应该是药学上可以接受的且以应用的量为无毒。此外,活性化合物可以掺入缓释制剂和缓释装置中。

[0054] 活性化合物也可以通过输注或注射到静脉内或腹膜内施用。可以制备活性化合物或其盐的水溶液,任选可混和的无毒的表面活性剂。也可以制备在甘油、液体聚乙二醇、甘油三乙酸酯及其混合物以及油中的分散剂。在普通的储存和使用条件下,这些制剂包含防腐剂以防止微生物生长。

[0055] 适于注射或输注的药物剂型可以包括包含适于无菌的可注射或可输注的溶液或分散剂的即时制剂的活性成分(任选封装在脂质体中)的无菌水溶液或分散剂或无菌粉末。在所有情况下,最终的剂型在生产和储存条件下必须是无菌的、液体的和稳定的。液体载体可以是溶剂或液体分散介质,包括,例如水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇、液体聚乙二醇等)、植物油、无毒的甘油酯及其合适的混合物。可以维持合适的流动性,例如,通过脂质体的形成,通过在分散剂的情况下维持所需的粒子大小,或通过表面活性剂的使用。可以通过各种抗细菌剂和抗真菌剂(如对羟苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等)产生预防微生物的作用。在许多情况下,优选包括等渗剂,如糖、缓冲剂或氯化钠。通过使用延缓吸收剂的组合物(例如,单硬脂酸铝和明胶)可以产生可注射的组合物的延长吸收。

[0056] 通过将合适的溶剂中的需要量的活性化合物与需要的上面列举的各种其他成分结合,然后进行过滤灭菌,制备无菌可注射溶液。在用于制备无菌注射溶液的无菌粉末的情况下,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥技术,这会产生活性成分加上任何另外需要的无菌过滤溶液中存在的成分的粉末。

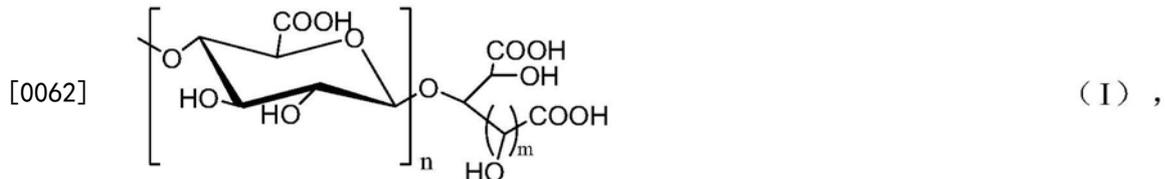
[0057] 有用的固体载体包括粉碎的固体(如滑石、粘土、微晶纤维素、二氧化硅、氧化铝等)。有用的液体载体包括水、乙醇或乙二醇或水-乙醇/乙二醇混合物,本发明的组合药物可以任选在无毒的表面活性剂的帮助下以有效含量溶解或分散在其中。可以加入佐剂(如香味)和另外的抗微生物剂来优化对于给定用途的性质。

[0058] 增稠剂(如合成的聚合物、脂肪酸、脂肪酸盐和酯、脂肪醇、改性纤维素或改性无机材料)也可和液体载体用于形成可涂覆的糊剂、凝胶、软膏、肥皂等,直接用于使用者的皮肤上。

[0059] 化合物或其活性盐或衍生物的治疗需要量,不仅取决于选择的特定的盐,而且取决于施药方式、待治疗的疾病的本质和患者的年龄和状态,最终取决于在场医师或临床医生的决定。

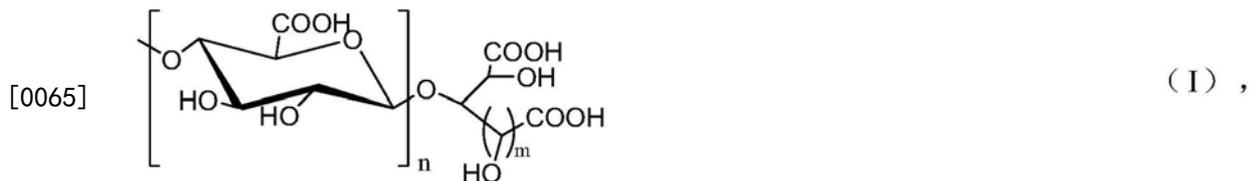
[0060] 上述制剂可以以单位剂型存在,该单位剂型是含有单位剂量的物理分散单元,适于向人体和其它哺乳动物体给药。单位剂型可以是胶囊或片剂,或是很多胶囊或片剂。根据所涉及的具体治疗,活性成分的单位剂量的量可以在大约0.01到大约1000毫克或更多之间进行变化或调整。

[0061] 在一些实施方式中,本发明还涉及用于治疗阿尔兹海默病的氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖及其衍生物或所述寡糖及其衍生物的药理学上可接受盐,所述用于治疗阿尔兹海默病的氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖及其衍生物或所述寡糖及其衍生物的药理学上可接受盐是下列结构式(I)表示的氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖及其衍生物、或所述寡糖及其衍生物的药理学上可接受的盐,



[0063] 其中,式(I)中的n是选自0-19的一个或多个整数。所述用于治疗阿尔兹海默病的式(I)表示的氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖及其衍生物、或所述寡糖及其衍生物的药学上可接受的盐中,n是选自1-9的一个或多个整数。所述用于治疗阿尔兹海默病的式(I)表示的氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖及其衍生物、或所述寡糖及其衍生物的药学上可接受的盐中,n是选自2-8的一个或多个整数。所述用于治疗阿尔兹海默病的式(I)表示的氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖及其衍生物、或所述寡糖及其衍生物的药学上可接受的盐中,n是4。

[0064] 在一些实施方式中,本发明还涉及一种治疗阿尔兹海默病的方法,包括给予需要治疗的患者治疗有效量的根据本发明所述的氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖及其衍生物或所述寡糖及其衍生物的药学上可接受盐。在一些实施方式,所述治疗阿尔兹海默病的方法,包括给予需要治疗的患者治疗有效量的根据本发明所述的氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖及其衍生物或所述寡糖及其衍生物的药学上可接受盐,其中所述氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖及其衍生物或所述寡糖及其衍生物的药学上可接受盐是下列结构式(I)表示的氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖及其衍生物、或所述寡糖及其衍生物的药学上可接受的盐,



[0066] 其中,式(I)中的n是选自0-19的一个或多个整数。在一些实施方式,所述治疗阿尔兹海默病的方法,包括给予需要治疗的患者治疗有效量的根据本发明所述的式(I)表示的氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖及其衍生物或所述寡糖及其衍生物的药学上可接受盐,其中所述式(I)表示的氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖及其衍生物、或所述寡糖及其衍生物的药学上可接受的盐中n是选自1-9的一个或多个整数。在一些实施方式,所述治疗阿尔兹海默病的方法,包括给予需要治疗的患者治疗有效量的根据本发明所述的式(I)表示的氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖及其衍生物或所述寡糖及其衍生物的药学上可接受盐,其中所述式(I)表示的氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖及其衍生物、或所述寡糖及其衍生物的药学上可接受的盐中n是选自2-8的一个或多个整数。在一些实施方式,所述治疗阿尔兹海默病的方法,包括给予需要治疗的患者治疗有效量的根据本发明所述的式(I)表示的氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖及其衍生物或所述寡糖及其衍生物的药学上可接受盐,其中所述式(I)表示的氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖及其衍生物、或所述寡糖及其衍生物的药学上可接受的盐中n是4。

[0067] 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。

[0068] 在本发明全部实施方式中,本发明所述的氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖及其衍生物还包括包含所述一种或多种氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖及其衍生物或所述寡糖及其衍生物的药学上可接受盐的混合物。例如,n和m还可以是选自各自所述数值范围内的多个整数;1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖-OX3,二到十糖,1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖-OX2,二到十糖,1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖-OX1,二到十糖,可按任意形式相互混合发挥作用。

[0069] 另一方面,在本发明的全部实施方式中,本发明所述数值范围意在涵盖所述范围内的任意整数。例如,在本发明的全部实施方式中,式(I)表示的氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖及其衍生物或所述寡糖及其衍生物的药学上可接受的盐中n可以是0-19范围内的任意整数,比如n可以是选自0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18和19的一个或多个整数。除非特别指定,本发明所述的百分含量是指重量百分含量。

[0070] 为使本发明的上述目的、特征和优点能够更加明显易懂,下面结合附图和实施例进一步说明本发明的技术方案。但是本发明不限于所列出的实施例,还应包括在本发明所要求的权利范围内其他任何公知的改变。

[0071] 首先,此处所称的“一个实施例”或“实施例”是指可包含于本发明至少一个实现方式中的特定特征、结构或特性。在本说明书中不同地方出现的“在一个实施例中”并非均指同一个实施例,也不是单独的或选择性的与其他实施例互相排斥的实施例。

[0072] 其次,本发明利用结构示意图等进行详细描述,在详述本发明实施例时,为便于说明,示意图会不依一般比例作局部放大,而且所述示意图只是实例,其在此不应限制本发明保护的范围。此外,在实际制作中应包含长度、宽度及深度的三维空间。

[0073] 实施例1

[0074] 氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖的制备:

[0075] (1) 称取10g MCC粉末,以500mL 10%NaOH溶液进行丝光化处理24h,制得丝光化后的MCC溶液;

[0076] (2) 将透析好的MCC溶液,加入约100mL浓盐酸溶液,调节pH至7.0,待冷却后加入到透析袋中,透析24h除盐。

[0077] (3) 向步骤(2)中制得的MCC溶液中依次加入320mg TEMPO和3.2g溴化钠,使用10%NaOH溶液调节pH至10.0,分5次加入85ml次氯酸钠溶液,其以活性次氯酸计的浓度为5%重量,于50℃条件下反应4小时,加入无水乙醇终止反应;

[0078] (4) 置于500Da的透析袋中透析,浓缩、冻干得到氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖混合物a。

[0079] (5) 称取上一步得到的氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖混合物样品(a) 1g,溶于10mL纯化水中,配置成100mg/mL样品溶液备用。每次上样0.6mL,用0.1M NaCl进行等度洗脱500mL(色谱柱:Superdex™ 30pg-Superdex™ 75pg)。采用仪器(AKTA pure M150)自带的96孔制备板进行自动收集,每孔收集2mL流动相。洗脱结束后,根据色谱峰的洗脱体积将同一色谱峰的组成合并在一起。

[0080] (6) 采用500Da的透析袋于纯水中对收集的组分进行脱盐处理,透析24h后,冷冻干燥,分别得到单一聚合度(dp2、3、4、5、6、7、8、9和10)下的寡糖混合物(OX1、OX2和OX3)白色粉末

[0081] 实施例2

[0082] 氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖混合物(a)以及单一聚合度(dp2、3、4、5、6、7、8、9和10)下的寡糖混合物(OX1、OX2和OX3)结构确认:

[0083] 称取待测样品4mg,分别用200μL超纯水充分涡旋溶解,过0.22μm滤膜后进行UPLC-Q/TOF-MS分析。样品的分离使用Agilent 1290超高压液相色谱系统色谱条件如下:Waters ACQUITY UPLC@BEH 125分子排阻色谱柱(1.7μm,4.6×300mm);流动相,80%50mM NH<sub>4</sub>OAc溶液和20%甲醇;流速0.1ml/min;进样量5μl;柱温25℃;检测波长210nm。质谱数据采集使用配备电喷雾电离源(ESI)的Agilent 6540Q/TOF-MS高分辨质谱,使用负离子模式进行采集,扫描质量数范围为m/z 100~3000。其余质谱参数如下:毛细管电压3500V;碎裂电压120V;干燥气流速8l/min;干燥气温度325℃;雾化气压力40psig。数据分析使用MassHunter软件。氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖混合物色谱及质谱图如图1、图2所示,单一聚合度寡糖混合物色谱图如图3所示。

[0084] 实施例3

[0085] 氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖混合物(a)抑制Aβ1-40聚集:

[0086] 1、实验材料

[0087] 按照实施例一的方法制备得到式I氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖(n=1-9,即图中的组分dp2-dp10,m=0,1,2)混合物,该混合物为白色粉末,易溶于水;SensoLyte Thioflavin Tβ-Amyloid(1-40) Aggregation Kit(含有Aβ1-40和THT),美国ANASPEC公司。

[0088] 2、实验方法

[0089] (1) 配制工作液

[0090] 配制THT工作液:取100μL 20mM ThT加入到900μL buffer中,得到2mM工作液。

[0091] Aβ1-40溶液配制:取1mL冰冷的buffer加入到Aβ1-40的玻璃瓶中,上下颠倒溶解,超声5min促进溶解,但是绝不可以涡旋。在四度离心机中10000rpm离心5min,吸取上清放置冰上备用。

[0092] (2) 准备聚集实验

[0093] 在黑色96孔板中,加入10μL 2mM ThT。

[0094] 加入85μL刚配制好的Aβ1-40和5μL氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖溶液,包含对照组。使得在100μL体系中,Aβ与样品(以混合物的平均分子质量计算)的摩尔比为1:4。

[0095] 另外设置一组10μL 2mM ThT+85μL buffer+5μL样品。用以排除样品本身对THT荧光值的干扰。

[0096] (3) 检测

[0097] 立即将混合好的96孔板转移到Biotek Cytation 5细胞成像微孔板检测系统中,此时系统已经预热至37℃。立即读取在Ex/Em=440nm/484nm处荧光值,记为0点。此后每隔10min读取一次荧光值,两次读值间隔震荡15s。处理并分析数据。

[0098] 3、实验结果

[0099] 氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖混合物(a)可以抑制Aβ1-40的聚集β淀粉样蛋白级联假说是阿尔茨海默病发病原因的主要假说之一,Aβ1-40在阿尔茨海默病发病过程中起着重要作用,其聚集到一定程度可以导致神经元细胞毒性。THT是一种荧光染料,可以与Aβ蛋白特异性结合,Aβ蛋白本身聚集程度越高,THT的荧光值越高,从而可以表征Aβ的聚集程

度。

[0100] 氧化型1,4- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸寡糖混合物(a)抑制A $\beta$ 1-40聚集的实验结果见表1。A $\beta$ 1-40在37℃孵育过程中逐渐发生聚集,随着时间的延长,聚集越明显,其表现就是Control组的荧光值平稳上升,从0min的12053升到180min时的56936,第三个小时内几乎达到平衡。加入氧化型1,4- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸寡糖混合物(a),可以在一定程度上抑制A $\beta$ 1-40的聚集,180min时,该组的荧光值为53257。

[0101] 表1.氧化型1,4- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸寡糖混合物(a)抑制A $\beta$ 1-40聚集

	时间 (min)	对照组	$\beta$ 1,4 组
	0	13161	12053
	10	17566	17375
	20	30442	30589
	30	39740	39323
	40	45321	44195
	50	49699	47036
	60	52196	49204
[0102]	70	54020	50267
	80	55840	51365
	90	56308	52393
	100	56775	52550
	110	56788	53096
	120	56923	53446
	130	57265	54251
	140	57149	53926
	150	57510	54063
	160	57331	53538
[0103]	170	57210	53484
	180	56936	53257

[0104] 实施例四

[0105] 氧化型1,4- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸寡糖混合物(a)对A $\beta$ 25-35引起SH-SY5Y细胞损伤的保护作用:

[0106] 1、实验材料

[0107] 细胞:人源神经母细胞瘤细胞系SH-SY5Y,ATCC来源。

[0108] 按照实施例一的方法制备得到式I'氧化型1,4- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸寡糖混合物(a)(n=1-9,即图中的组分dp2-dp10,m=0,1,2),该混合物为白色粉末,易溶于水; $\beta$ 淀粉样蛋白25-35(A $\beta$ 25-35),西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司生产;胎牛血清、DMEM培养基、青霉素/链霉素溶液,美国Gibco公司;CCK-8检测试剂盒,上海碧云天生物技术有限公司。

## [0109] 2、实验方法

[0110] (1) 将A $\beta$ 25-35按照试剂说明书溶解成1mg/mL的溶液,37℃孵育七天,老化成具有毒性的寡聚体形式。

[0111] (2) 取正常培养的SH-SY5Y细胞,调整细胞数目至 $5 \times 10^4$ 个/ml,按100 $\mu$ l/孔接种在96孔培养板上,每组设3个平行孔(n=3),设置对照组、模型组、给药组。

[0112] (3) 培养24h后,弃去旧培养基,加入无血清的培养基,给药组分别加入10 $\mu$ L的实施例一中获得的产物用培养基配制的不同浓度的样品溶液,使体系终浓度为25、50、100 $\mu$ g/mL,正常组加入相同体积的培养基。

[0113] (4) 继续培养2h后,模型组和给药组分别加入老化好的A $\beta$ 溶液,使A $\beta$ 终浓度为30 $\mu$ mol/L。

[0114] (5) 继续培养48h后,每孔加入10 $\mu$ L CCK-8溶液,4h后检测450nm处吸光度,并计算出细胞存活率。

## [0115] 3、统计学处理

[0116] 对结果进行统计分析,结果以“均值 $\pm$ 标准误”(mean $\pm$ SEM)表示,采用方差分析(ANOVA)进行比较。以 $p < 0.05$ 为差异有显著意义, $p < 0.01$ 为差异有极显著意义。

## [0117] 4、实验结果

[0118] 氧化型1,4- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸寡糖混合物(a)对A $\beta$ 25-35引起SH-SY5Y细胞损伤的保护作用。

[0119] A $\beta$ 25-35可诱导SH-SY5Y细胞损伤,造成细胞活力下降,表现为与对照组相比,模型组的吸光度降低。吸光度越低,表明细胞活力越差。

[0120] 氧化型1,4- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸寡糖混合物(a)对A $\beta$ 25-35引起SH-SY5Y细胞损伤的保护作用的实验结果见表2。氧化型1,4- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸寡糖混合物(a)对A $\beta$ 25-35引起SH-SY5Y细胞损伤的存在保护作用,并且各剂量组之间呈现剂量依赖关系,高剂量组效果最好。模型组与对照组相比,给药组与模型组比较,各组间细胞活力存在差异,且高剂量组具有统计学意义。表明氧化型1,4- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸寡糖混合物(a)对A $\beta$ 25-35引起SH-SY5Y细胞损伤的保护作用。

[0121] 表2. 氧化型1,4- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸寡糖混合物(a)对A $\beta$ 25-35引起SH-SY5Y细胞损伤的保护作用(n=3, mean $\pm$ SEM)

组别	浓度	细胞存活率(%)
对照组	-	100.00 $\pm$ 1.03
模型组(A $\beta$ 25-35)	30( $\mu$ M)	66.30 $\pm$ 5.58 ##
[0122]	25( $\mu$ g/mL)	77.85 $\pm$ 1.90
给药组	50( $\mu$ g/mL)	80.57 $\pm$ 2.81
	100( $\mu$ g/mL)	91.30 $\pm$ 2.59 *

[0123] 模型组与对照组比较:##,  $p < 0.01$ ;

[0124] 给药组与模型组比较:\*,  $p < 0.05$ 。

[0125] 实施例五

[0126] 氧化型1,4- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸寡糖混合物(a)通过调控相关基因的mRNA和蛋白水平,以保护神经元细胞。

[0127] 1、实验材料

[0128] 细胞:人源神经母细胞瘤细胞系SH-SY5Y,ATCC来源。

[0129] 按照实施例一的方法制备得到式I'氧化型1,4- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸寡糖混合物(a)(n=1-9,即图中的组分dp2-dp10,m=0,1,2),该混合物为白色粉末,易溶于水; $\beta$ 淀粉样蛋白25-35(A $\beta$ 25-35),西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司生产;胎牛血清、DMEM培养基、青霉素/链霉素溶液,美国Gibco公司;引物合成,美国Invitrogen公司;RNA提取试剂、反转录试剂盒和SYBR Green Mix试剂盒,日本TAKARA公司);Bcl2、p53、Drp1、Parkin和GAPDH的一抗和二抗,美国CST公司。

[0130] 2、实验方法

[0131] (1)将A $\beta$ 25-35按照试剂说明书溶解成1mg/mL的溶液,37℃孵育七天,老化成具有毒性的寡聚体形式。

[0132] (2)取正常培养的SH-SY5Y细胞,调整细胞数目至 $5 \times 10^4$ 个/mL,按500 $\mu$ L/孔接种在24孔培养板上,或者2mL/孔接种在6孔板上,每组设3个平行孔(n=3),设置对照组、模型组、给药组。

[0133] (3)培养24h后,弃去旧培养基,加入无血清的培养基,给药组分别加入实施例一中获得的产物用培养基配制的不同浓度的样品,使体系终浓度为25、50、100 $\mu$ g/mL,正常组加入相同体积的培养基。

[0134] (4)继续培养2h后,模型组和给药组分别加入老化好的A $\beta$ 溶液,使A $\beta$ 25-35终浓度为30 $\mu$ mol/L。

[0135] (5)继续培养48h后,24孔板中细胞用以提取总RNA;浓度定量后按试剂盒说明书反转录成cDNA;接着按照SYBR Green Mix试剂盒说明书和目的基因的引物,实时定量检测目的基因的mRNA水平。

[0136] (6)第(4)步后继续培养48h后的6孔板,细胞用于提取蛋白,定量每孔的总蛋白浓度并归一化;按照蛋白质免疫印迹(Western Blot)实验流程,检测各组间目的基因的蛋白水平变化。

[0137] 3、统计学处理

[0138] 对结果进行统计分析,结果以“均值 $\pm$ 标准误”(mean $\pm$ SEM)表示,采用方差分析(ANOVA)进行比较。以p<0.05为差异有显著意义,p<0.01为差异有极显著意义。

[0139] 4、实验结果

[0140] 氧化型1,4- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸寡糖混合物(a)可以通过调控B淋巴细胞瘤-2基因Bcl2、人体抑癌基因p53、线粒体动力学蛋白Drp1、和Parkin基因的mRNA和蛋白水平,来保护神经细胞,降低寡聚态 $\beta$ 淀粉样蛋白对神经细胞造成的损伤。

[0141] 寡聚态的A $\beta$ 25-35可以使神经细胞SH-SY5Y细胞中一些基因的mRNA水平变化,如表3、4、5、6所示(n=3,mean $\pm$ SEM),B淋巴细胞瘤-2基因Bcl2的mRNA水平下降、人体抑癌基因p53的mRNA水平升高、线粒体动力学蛋白Drp1的mRNA水平下降,以及Parkin基因的mRNA水平下降,而不同剂量的氧化型1,4- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸寡糖可以逆转该变化,具有剂量依赖关系,且高剂量组100 $\mu$ g/mL具有统计学意义。

[0142] 表3.氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖混合物(a)对Bcl2基因mRNA调控作用(n=3, mean±SEM)

组别	浓度	相对表达水平
对照组	-	1.48±0.12
模型组(Aβ 25-35)	30(μM)	0.55±0.11 ##
[0143]	25(μg/mL)	0.71±0.02
给药组	50(μg/mL)	0.85±0.15
	100(μg/mL)	1.41±0.08 **

[0144] 模型组与对照组比较:##,p<0.01;

[0145] 给药组与模型组比较:\*\*,p<0.01。

[0146] 表4.氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖混合物(a)对p53基因mRNA调控作用(n=3, mean±SEM)

组别	浓度	相对表达水平
对照组	-	0.79±0.18
模型组(Aβ 25-35)	30(μM)	2.19±0.33 #
[0147]	25(μg/mL)	1.64±0.32
给药组	50(μg/mL)	0.85±0.14 *
	100(μg/mL)	0.28±0.02 **

[0148] 模型组与对照组比较:#,p<0.05;

[0149] 给药组与模型组比较:\*,p<0.05;\*\*p<0.01。

[0150] 表5.氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖混合物(a)对Drp1基因mRNA调控作用(n=3, mean±SEM)

组别	浓度	相对表达水平
对照组	-	0.79±0.18
模型组(Aβ 25-35)	30(μM)	2.19±0.33 #
[0151]	25(μg/mL)	1.64±0.32
给药组	50(μg/mL)	0.85±0.14
	100(μg/mL)	0.28±0.02 *

[0152] 模型组与对照组比较:#,p<0.05;

[0153] 给药组与模型组比较:\*,p<0.05。

[0154] 表6.氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖混合物(a)对Parkin基因mRNA调控作用(n=3, mean±SEM)

	组别	浓度	相对表达水平
	对照组	-	1.49 ± 0.23
[0155]	模型组 (A $\beta$ 25-35)	30 ( $\mu$ M)	0.47 ± 0.04 #
		25 ( $\mu$ g/mL)	0.48 ± 0.05
	给药组	50 ( $\mu$ g/mL)	1.09 ± 0.61
		100 ( $\mu$ g/mL)	2.01 ± 0.11 **

[0156] 模型组与对照组比较: #,  $p < 0.05$ ;

[0157] 给药组与模型组比较: \*\*,  $p < 0.01$ 。

[0158] 蛋白质免疫印迹实验结果如图6所示,寡聚态的A $\beta$ 25-35可以使神经细胞SH-SY5Y细胞中Bcl2的蛋白水平下降、人体抑癌基因p53蛋白水平升高、线粒体动力学蛋白Drp1的水平下降,以及Parkin基因的蛋白水平下降,而不同剂量的氧化型1,4- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸寡糖可以逆转该变化,从而降低A $\beta$ 25-35对神经细胞的损伤,提高细胞活率。

[0159] 实施例六

[0160] 氧化型1,4- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸寡糖混合物(a)对A $\beta$ 1-40引起小鼠认知障碍的改善作用。

[0161] 1、实验材料

[0162] 1.1药品与试剂

[0163] 按照实施例一的方法制备得到式I'氧化型1,4- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸寡糖混合物(a) ( $n = 1-9$ ,即图中的组分dp2-dp10,  $m = 0, 1, 2$ ),该混合物为白色粉末,易溶于水; $\beta$ 淀粉样蛋白1-40(A $\beta$ 1-40)。

[0164] 1.2实验动物

[0165] C57小鼠,8周龄,雄性,体重 $\sim 22$ g,由上海灵畅生物科技有限公司提供。

[0166] 1.3实验仪器

[0167] 脑立体定位仪、微量注射泵,STOELTING;204型牙科钻,STRONG;小鼠运动轨迹跟踪系统EthoVision XT,Noldus;Morris水迷宫,上海欣软信息科技有限公司。

[0168] 2、试验方法

[0169] 2.1动物分组与给药

[0170] 取雄性C57小鼠,随机分为空白对照组,假手术组,模型组,给药组100、200、400mg/kg组,每组15只动物。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。

[0171] 2.2动物造模手术

[0172] 连续给药7天后,除空白对照组外,所有小鼠经水合氯醛400mg/kg腹腔注射麻醉后,将小鼠固定在立体定位仪上,头顶正中切口,逐层切开皮肤,于脑矢状缝中部开口暴露颅盖骨。在前囟后移2毫米,向右开1.5毫米处,用牙科钻插孔,然后将微量注射器向下1.5毫米,注射位置为海马CA1区,5分钟匀速注射3微升老化好的A $\beta$ 1-40(浓度为1.4mg/mL,老化5天)或PBS。所有操作均在无菌条件下进行。假手术组动物注射为PBS,模型组和给药组注射A $\beta$ 1-40,注射完毕停留5分钟再拔针,缝合头皮,涂抹适量庆大霉素消毒,放回笼内等待苏醒。

## [0173] 2.3行为学检测

[0174] 手术当天继续给药,手术后再给药10天,然后开展行为学实验检测小鼠的学习和记忆能力。

[0175] 首先为利用小鼠运动轨迹跟踪系统检测各组小鼠的学习能力,小鼠运动轨迹跟踪系统是将小鼠放于观察箱中,由观察箱顶部红外摄像头监视小鼠自发运动。观察箱左下角有一三角板,三角板处有三个洞,小鼠有钻洞的天性,当小鼠连续五次进入左洞,则系统奖励一颗食物,当小鼠进入左洞成功率达到80%时,则定义为学会该事件。通过比较小鼠学会该事件所总尝试的总进洞次数来判断小鼠的学习能力,总次数越少,说明小鼠学习能力越好。

[0176] 接着以Morris水迷宫检测小鼠的学习和空间记忆能力,通常前5天训练小鼠寻找平台,第六天休息,第七天撤去平台,检测小鼠逃避潜伏期和穿越平台次数。小鼠逃避潜伏期越短、穿越平台次数越多,则说明小鼠学习和空间记忆能力越好。

## [0177] 3、统计学处理

[0178] 对结果进行统计分析,结果以“均值±标准误”(mean±SEM)表示,采用方差分析(ANOVA)进行比较。以 $p < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

## [0179] 4、试验结果

[0180] 海马结构属于脑的边缘系统中的重要结构,左右对称,与学习、记忆、认知功能有关,尤其是短期记忆和空间记忆。本实验选择注射AB的位置是右侧海马的CA1区,为易损区,可在一定程度上模仿阿尔茨海默症。研究结果见表7和表8,在小鼠CA1区注射AB1-40明显导致小鼠的学习和记忆功能下降,其表现为模型组与对照组相比,在小鼠运动轨迹跟踪系统实验中学会事件需要尝试进洞总次数明显高于对照组;在水迷宫实验中,模型组的逃避潜伏期高于对照组,模型组的穿越平台次数低于对照组。而连续给药氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖可以逆转以上情况,对AB1-40引起小鼠认知障碍具有改善作用,且呈剂量依赖关系。说明氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖具有开发成为抗阿尔茨海默症药物的潜能。

[0181] 表7.氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖混合物(a)对AB1-40引起小鼠认知障碍的改善作用,小鼠运动轨迹跟踪系统实验结果。(n=15,mean±SEM)

	组别	剂量 (mg/kg)	进洞总次数
	对照组	-	533.3 ± 36.8
[0182]	假手术组	-	568.3 ± 35.7
	模型组	-	843.2 ± 68.0 ##
		100	739.7 ± 101.7
	给药组	200	500.8 ± 38.2 **
[0183]		400	506.0 ± 26.4 ***

[0184] 模型组与对照组比较:##,  $p < 0.01$ ;

[0185] 给药组与模型组比较:\*\*,  $p < 0.01$ ;\*\*\*,  $p < 0.001$ 。

[0186] 表8.氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖混合物(a)对AB1-40引起小鼠认知障碍的改善作用,Morris水迷宫实验结果。(n=15,mean±SEM)

组别	剂量 (mg/kg)	逃避潜伏期	穿越平台次数
对照组	-	20.92 ± 3.36	2.70 ± 0.40
假手术组	-	18.26 ± 3.37	1.86 ± 0.23
[0187] 模型组	-	43.07 ± 4.17 ###	0.85 ± 0.19 ##
	100	19.45 ± 3.35 ***	2.23 ± 0.38 *
给药组	200	13.83 ± 3.21 ***	3.00 ± 0.30 ***
	400	8.67 ± 2.07 ***	3.00 ± 0.46 ***

[0188] 模型组与对照组比较:##,p<0.01;###,p<0.001;

[0189] 给药组与模型组比较:\*,p<0.05;\*\*\*,p<0.001。

[0190] 实施例七

[0191] 单一聚合度(dp2、3、4、5、6、7、8、9和10)下的氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖混合物(OX1、OX2和OX3)对Aβ25-35引起SH-SY5Y细胞损伤的保护作用。

[0192] 1、实验材料

[0193] 细胞:人源神经母细胞瘤细胞系SH-SY5Y,ATCC来源。

[0194] 按照实施例一的方法制备得到结构如式I'所示的单一聚合度(n=1-9,即二糖、三糖、四糖、五糖、六糖、七糖、八糖、九糖、十糖)氧化1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖混合物(OX1、OX2和OX3),均为白色粉末,易溶于水;β淀粉样蛋白25-35(Aβ25-35),西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司生产;胎牛血清、DMEM培养基、青霉素/链霉素溶液,美国Gibco公司;CCK-8检测试剂盒,上海碧云天生物技术有限公司。

[0195] 2、实验方法

[0196] (1)将Aβ25-35按照试剂说明书溶解成1mg/mL的溶液,37℃孵育七天,老化成具有毒性的寡聚体形式。

[0197] (2)取正常培养的SH-SY5Y细胞,调整细胞数目至5×10<sup>4</sup>个/ml,按100μl/孔接种在96孔培养板上,每组设3个平行孔(n=3),设置对照组、模型组、给药组。

[0198] (3)培养24h后,弃去旧培养基,加入无血清的培养基,给药组分别加入10μL的实施例一中获得的产物用培养基配制的不同浓度的样品,使Aβ:寡糖摩尔比一致(按混合物终浓度为100μg/mL时的平均分子量折算),正常组加入相同体积的培养基。

[0199] (4)继续培养2h后,模型组和给药组分别加入老化好的Aβ溶解,使Aβ终浓度为30μmol/L。

[0200] (5)继续培养48h后,每孔加入10μL CCK-8溶液,4h后检测450nm处吸光度,并计算出细胞存活率。

[0201] 3、统计学处理

[0202] 对结果进行统计分析,结果以“均值±标准误”(mean±SEM)表示,采用方差分析(ANOVA)进行比较。以p<0.05为差异有显著意义,p<0.01为差异有极显著意义。

[0203] 4、实验结果

[0204] 单一聚合度氧化型1,4-β-D-葡萄糖醛酸寡糖混合物对Aβ25-35引起SH-SY5Y细胞损伤的保护作用

[0205] A $\beta$ 25-35可诱导SH-SY5Y细胞损伤,造成细胞活力下降,表现为与对照组相比,模型组的吸光度降低。不同聚合度的氧化型1,4- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸寡糖混合物对A $\beta$ 25-35引起SH-SY5Y细胞损伤的都具有保护作用,实验结果见表9,且聚合度越高,活性越好。

[0206] 表9.单一聚合度氧化型1,4- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸寡糖混合物对A $\beta$ 25-35引起SH-SY5Y细胞损伤的保护作用(n=3,mean $\pm$ SEM)

	组别	浓度	细胞存活率(%)
[0207]	对照组	-	100.00 $\pm$ 2.75
	模型组(A $\beta$ 25-35)	30 ( $\mu$ M)	57.77 $\pm$ 2.80 ###
	二糖	23.7 ( $\mu$ g/mL)	60.98 $\pm$ 2.31
	三糖	35.4 ( $\mu$ g/mL)	62.12 $\pm$ 2.15
	四糖	47.1 ( $\mu$ g/mL)	66.79 $\pm$ 2.52
	五糖	58.9 ( $\mu$ g/mL)	67.42 $\pm$ 2.58
[0208]	六糖	70.6 ( $\mu$ g/mL)	72.60 $\pm$ 1.42 *
	七糖	82.3 ( $\mu$ g/mL)	74.87 $\pm$ 0.77 **
	八糖	94.1 ( $\mu$ g/mL)	78.91 $\pm$ 2.32 ***
	九糖	105.8 ( $\mu$ g/mL)	80.81 $\pm$ 3.94 ***
	十糖	117.7 ( $\mu$ g/mL)	91.55 $\pm$ 1.96 ***

[0209] 模型组与对照组比较:###,p<0.001;

[0210] 给药组与模型组比较:\*,p<0.05;\*\* ,p<0.01;\*\*\*,p<0.001

[0211] 应说明的是,以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非限制,尽管参照较佳实施例对本发明进行了详细说明,本领域的普通技术人员应当理解,可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换,而不脱离本发明技术方案的精神和范围,其均应涵盖在本发明的权利要求范围当中。

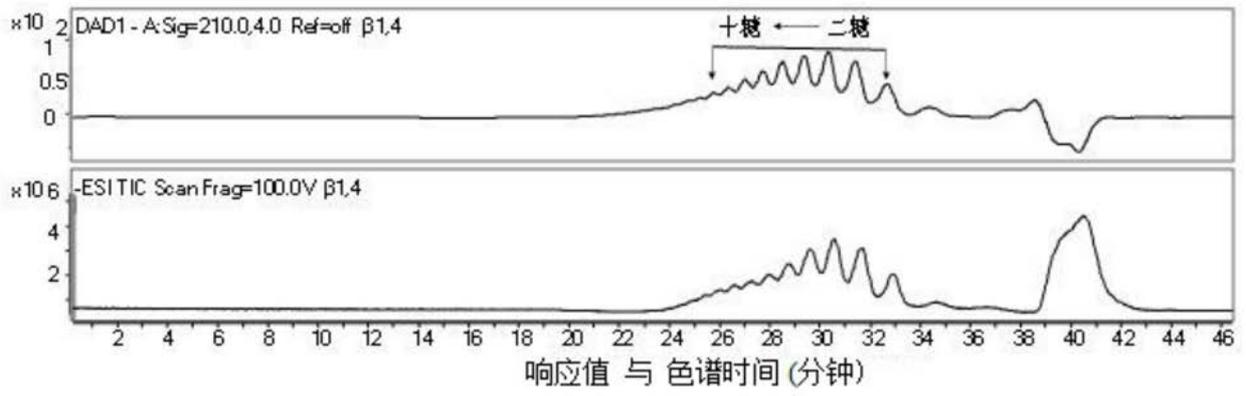


图1

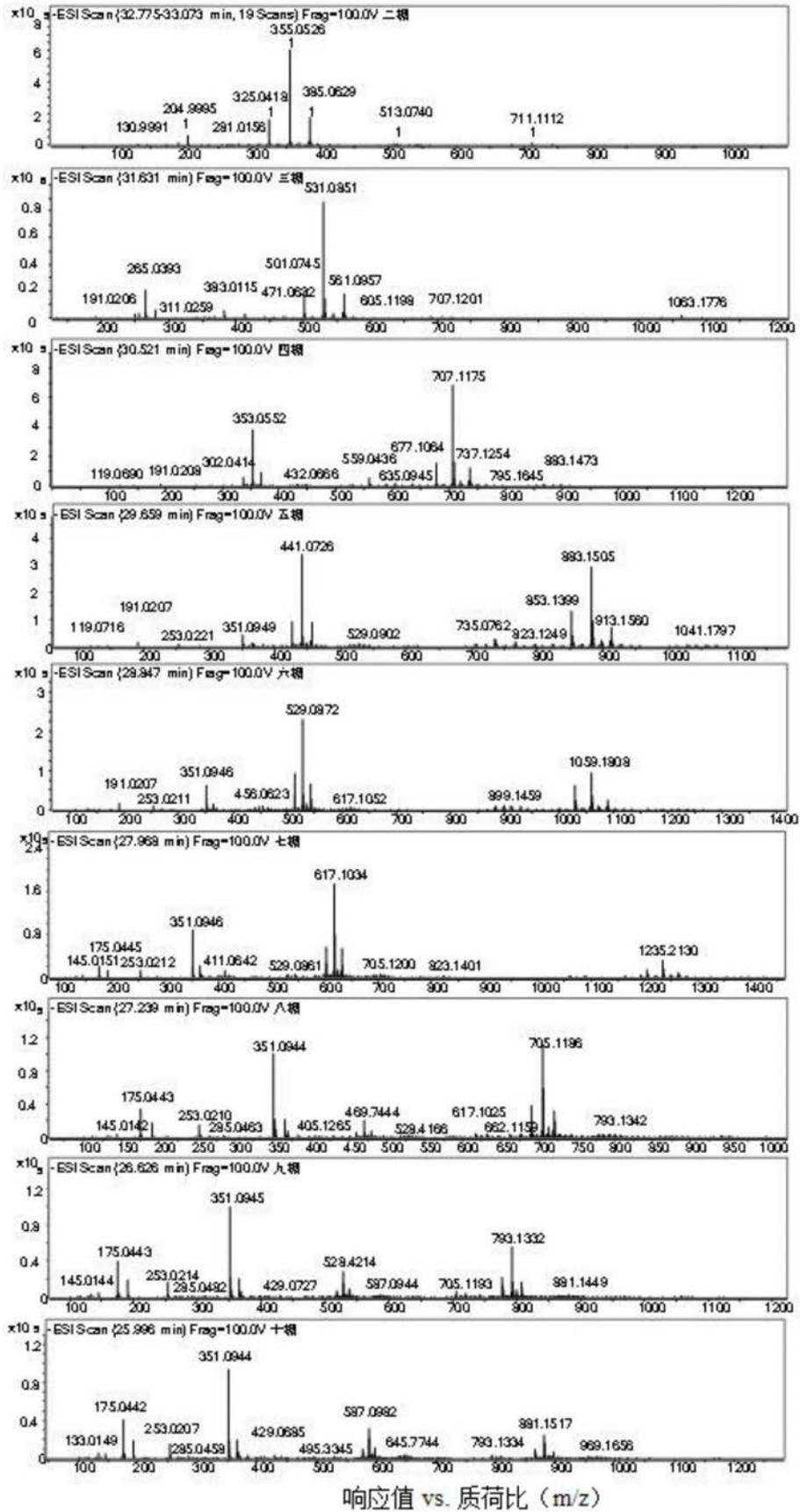
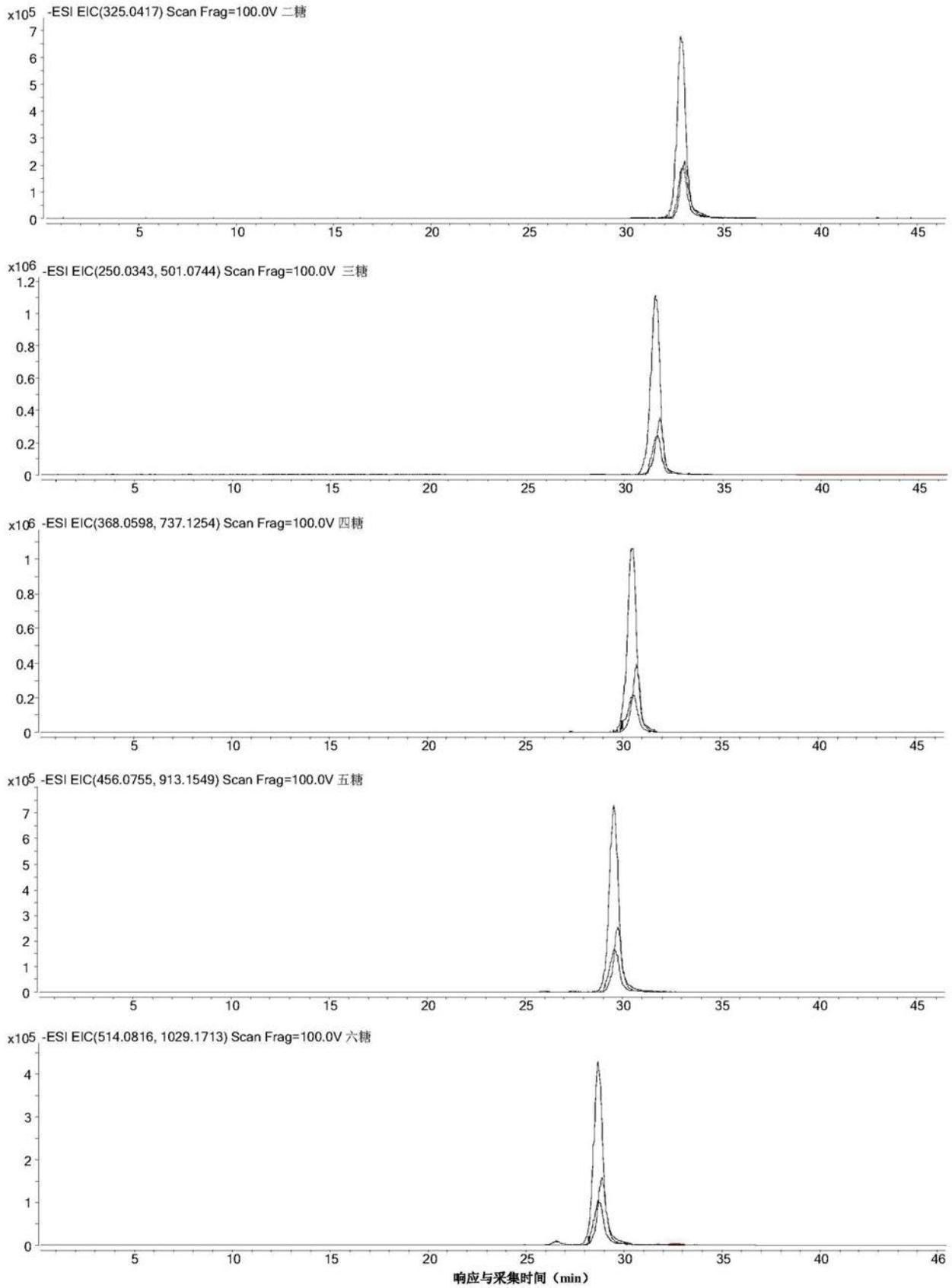


图2



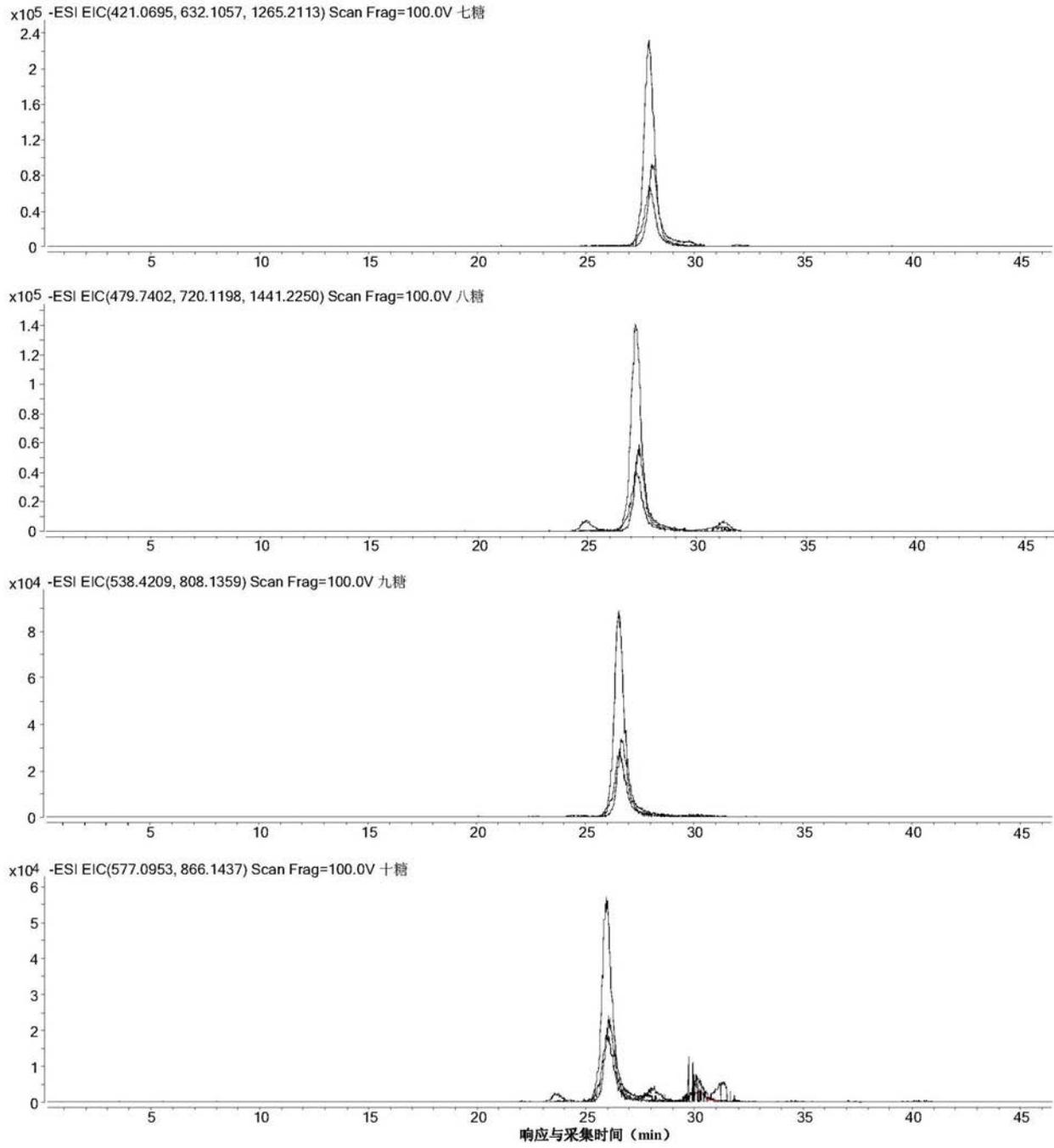


图3

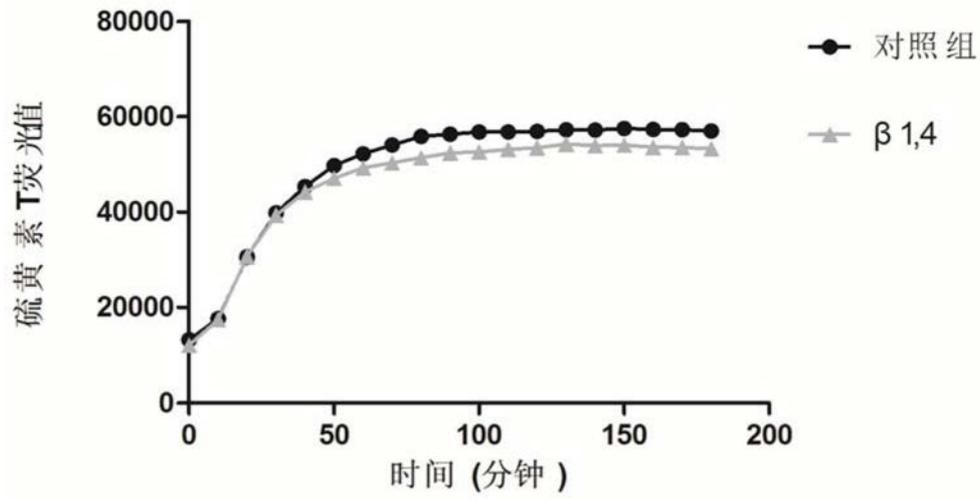


图4

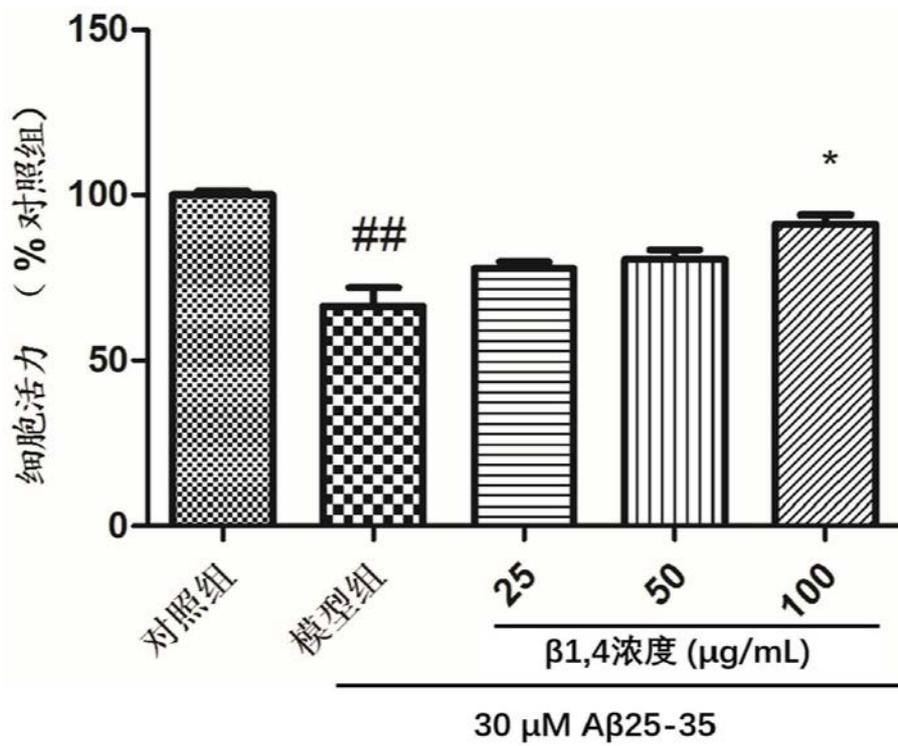


图5

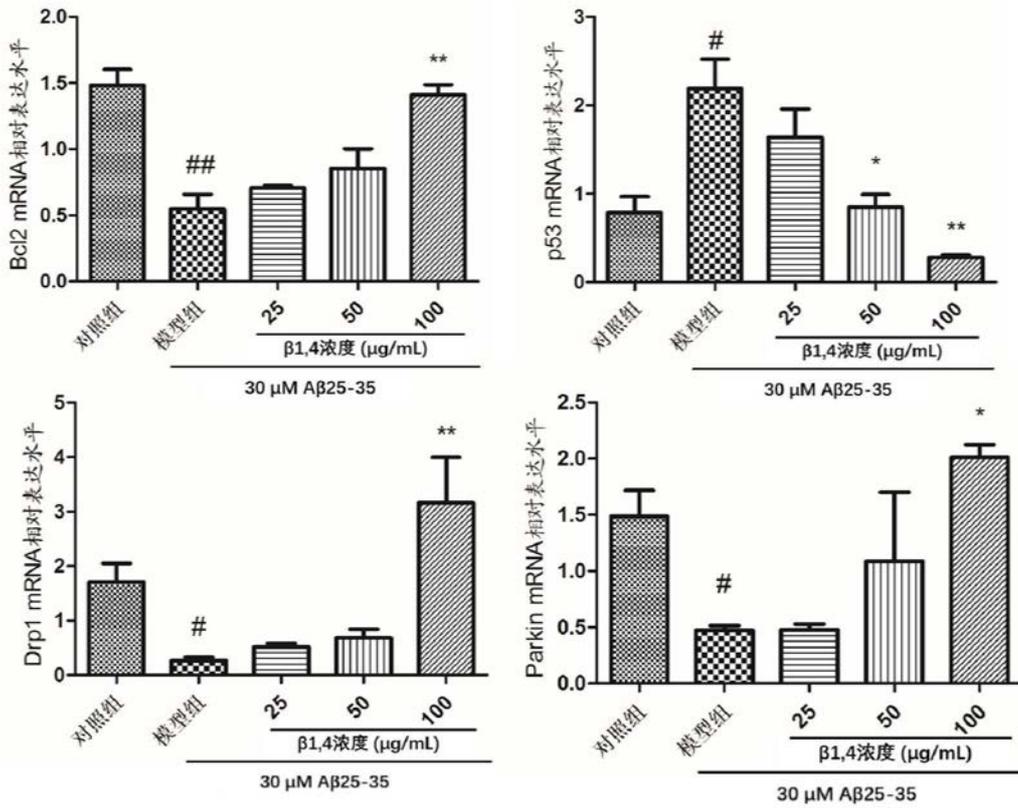


图6

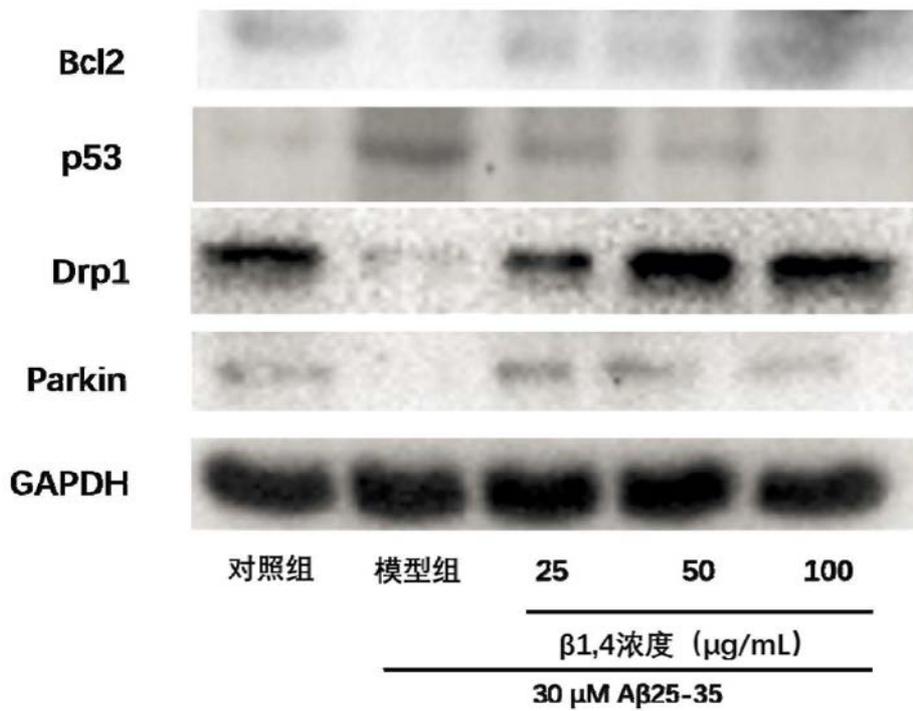


图7

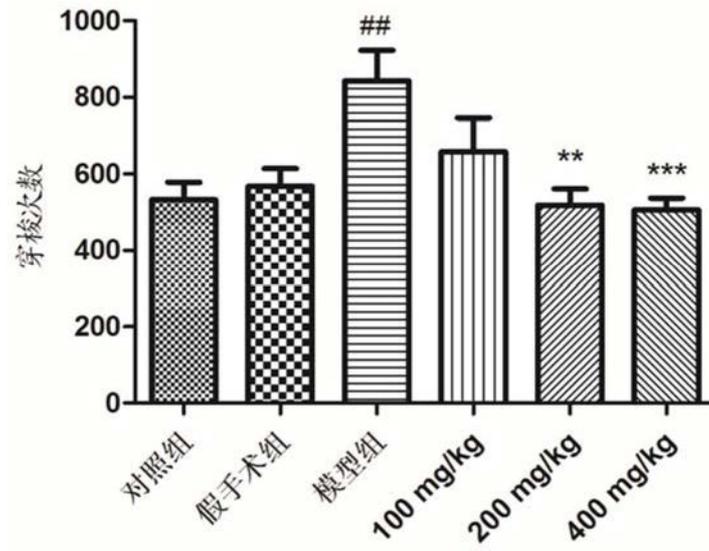


图8

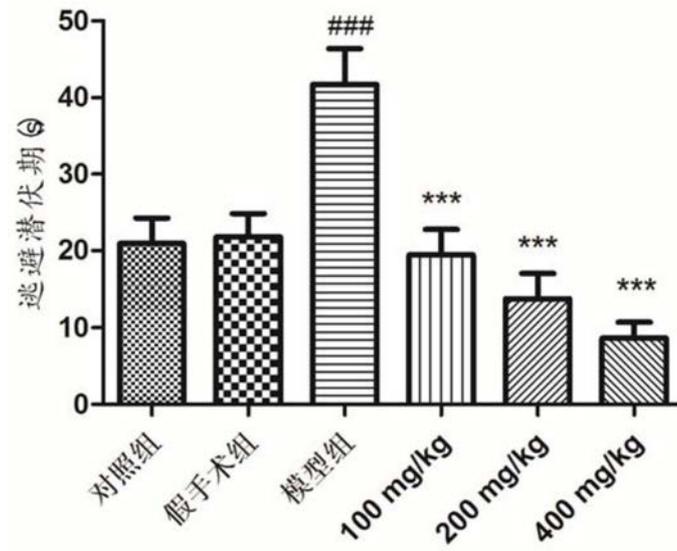


图9

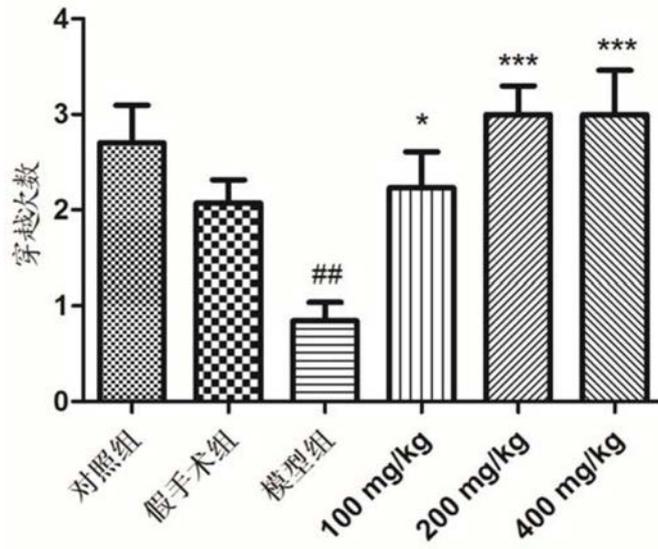


图10

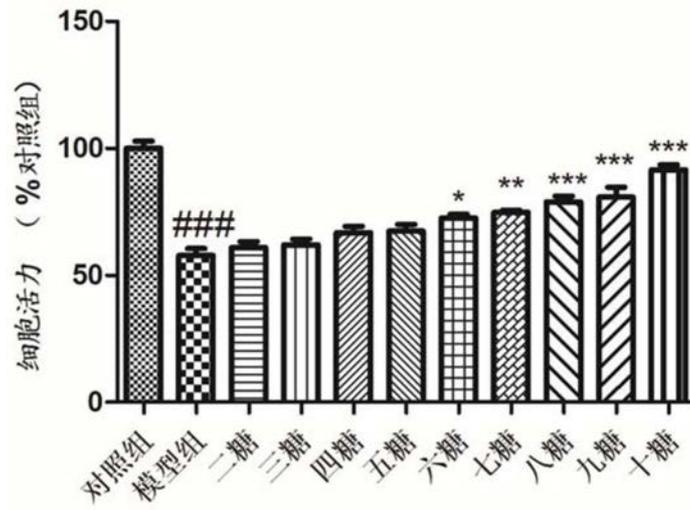


图11