(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111511773 A
(43)申请公布日 2020.08.07

(21)申请号 201880081841.6

(22)申请日 2018.12.18

(30)优先权数据
2017-244051 2017.12.20 JP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2020.06.18

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2018/046537 2018.12.18

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2019/124363 JA 2019.06.27

(71)申请人 王子控股株式会社
地址 日本东京都

(72)发明人 石川杰

(74)专利代理机构 北京林达刘知识产权代理事务所(普通合伙) 11277
代理人 刘新宇 李茂家

(51)Int.Cl.
C08B 37/00(2006.01)
A61K 31/7024(2006.01)
A61K 31/737(2006.01)
A61P 9/00(2006.01)
A61P 13/10(2006.01)
A61P 19/00(2006.01)
A61P 19/02(2006.01)
A61P 29/00(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61P 37/06(2006.01)
A61P 37/08(2006.01)
A61P 43/00(2006.01)
C07H 11/00(2006.01)

权利要求书2页 说明书18页 附图2页

(54)发明名称

戊聚糖多硫酸酯以及含有戊聚糖多硫酸酯的药物

(57)摘要

本发明提供具有7.0质量%～15.0质量%的糖醛酸含量和0质量%～2.0质量%的乙酰基含量的戊聚糖多硫酸酯或其药学上可接受的盐、或所述戊聚糖多硫酸酯或其药学上可接受的盐的药学上可接受的溶剂化物。所述戊聚糖多硫酸酯或其药学上可接受的盐、或所述戊聚糖多硫酸酯或其药学上可接受的盐的药学上可接受的溶剂化物,用作用于预防和/或治疗由于FGF-2功能的异常亢进引起的疾病的药物的有效成分、以及pH缓冲剂。

CN 111511773 A

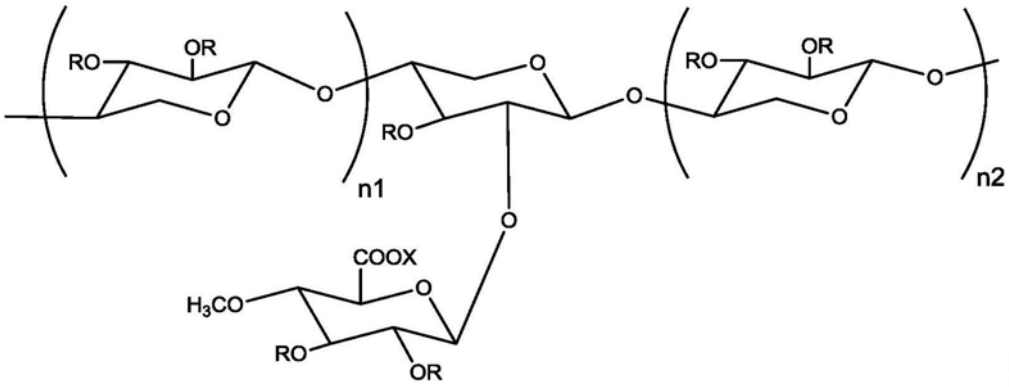
1.一种戊聚糖多硫酸酯、其药学上可接受的盐、或所述戊聚糖多硫酸酯或其药学上可接受的盐的药学上可接受的溶剂化物，所述戊聚糖多硫酸酯的糖醛酸含量为7.0质量％～15.0质量％，且乙酰基含量为0质量％～2.0质量％。

2.根据权利要求1所述的戊聚糖多硫酸酯、其药学上可接受的盐、或所述戊聚糖多硫酸酯或其药学上可接受的盐的药学上可接受的溶剂化物，其中所述戊聚糖多硫酸酯的糖醛酸含量为7.5质量％～13.0质量％。

3.根据权利要求1或2所述的戊聚糖多硫酸酯、其药学上可接受的盐、或所述戊聚糖多硫酸酯或其药学上可接受的盐的药学上可接受的溶剂化物，其中所述戊聚糖多硫酸酯的重均分子量为5000以下。

4.根据权利要求3所述的戊聚糖多硫酸酯、其药学上可接受的盐、或所述戊聚糖多硫酸酯或其药学上可接受的盐的药学上可接受的溶剂化物，其中所述戊聚糖多硫酸酯的乙酰基含量为0～0.3质量％。

5.根据权利要求1至4任一项所述的戊聚糖多硫酸酯、其药学上可接受的盐、或所述戊聚糖多硫酸酯或其药学上可接受的盐的药学上可接受的溶剂化物，其中所述戊聚糖多硫酸酯具有由通式II表示的结构：



通式II

其中R各自独立地表示氢原子、$-COCH_3$、或$-SO_3X^1$，并且一分子中至少一个R为$-SO_3X^1$，其中X^1表示氢原子或一价或二价金属；X表示氢原子或一价或二价金属；和

n1和n2各自独立地表示0以上且30以下的整数，并且n1和n2中的至少一者为1以上的整数。

6.根据权利要求5所述的戊聚糖多硫酸酯、其药学上可接受的盐、或所述戊聚糖多硫酸酯或其药学上可接受的盐的药学上可接受的溶剂化物，其中R各自独立地表示氢原子或$-SO_3X$。

7.根据权利要求5或6所述的戊聚糖多硫酸酯、其药学上可接受的盐、或所述戊聚糖多硫酸酯或其药学上可接受的盐的药学上可接受的溶剂化物，其中X为钠。

8.一种药物，其包括根据权利要求1至7任一项所述的戊聚糖多硫酸酯、其药学上可接受的盐、或所述戊聚糖多硫酸酯或其药学上可接受的盐的药学上可接受的溶剂化物作为有效成分。

9.根据权利要求8所述的药物，其用于由FGF-2功能的异常亢进引起的疾病的预防和/或治疗。

10.根据权利要求9所述的药物，其中所述由FGF-2功能的异常亢进引起的疾病为癌症、

自身免疫疾病、变应性疾病、炎性疾病、心脏发育异常、血管发育异常、或骨骼发育异常。

11.根据权利要求9所述的药物,其用于膀胱炎或关节炎的预防和/或治疗。

12.根据权利要求8至11任一项所述的药物,其为注射剂。

13.一种pH缓冲剂,其包括根据权利要求1至7任一项所述的戊聚糖多硫酸酯、其药学上可接受的盐、或所述戊聚糖多硫酸酯或其药学上可接受的盐的药学上可接受的溶剂化物。

戊聚糖多硫酸酯以及含有戊聚糖多硫酸酯的药物

技术领域

[0001] 本发明涉及戊聚糖多硫酸酯、和含有戊聚糖多硫酸酯的药物。

背景技术

[0002] 碱性成纤维细胞生长因子(FGF-2或b-FGF)已知参与与异常血管新生相关的疾病，例如肿瘤或关节炎(专利文献(PTL)1)。FGF-2是肝素结合生长因子，其通过结合硫酸乙酰肝素(heparan sulfate)来与细胞的FGF-2受体结合。

[0003] 戊聚糖多硫酸酯已知是使FGF-2失活的物质之一。已报道戊聚糖多硫酸酯抑制血管发生等(非专利文献(NPL)1～非专利文献(NPL)3)。戊聚糖多硫酸酯被认为与FGF-2结合，从而抑制FGF-2与硫酸乙酰肝素的结合。

[0004] 已报道戊聚糖多硫酸酯实际上抑制肿瘤的生长(专利文献(PTL)2和非专利文献(NPL)4)。

[0005] 通过从阔叶树(例如山毛榉)获得的木聚糖的化学硫酸化来生成戊聚糖多硫酸酯。戊聚糖多硫酸酯由其中β-D-吡喃木糖为直链键合的硫酸化直链多糖构成；并且大致每10个吡喃木糖单元具有4-O-甲基葡萄糖醛酸，即，糖醛酸(专利文献(PTL)3和专利文献(PTL)4)。专利文献(PTL)5公开了通过包括分馏市售的戊聚糖多硫酸酯(SP-54)来获得低分子量戊聚糖多硫酸酯的方法来获得具有4.3～6％的糖醛酸含量的戊聚糖多硫酸酯。

[0006] 现有技术文献

[0007] 专利文献

[0008] PTL 1:WO2013/186857

[0009] PTL 2:JPH3-20225A

[0010] PTL 3:WO2010/000013

[0011] PTL 4:JP2009-532467A

[0012] PTL 5:JPS61-197601A

[0013] 非专利文献

[0014] NPL 1:Gonzalez等人,Biol.Pharm.Bull.,2001;24;2;151-154

[0015] NPL 2:S.Swain等人,Annals of the New York Academy of Sciences,1993;698;63-67

[0016] NPL 3:G.Zugmaier等人,Annals of the New York Academy of Sciences,1999;886;243-248

[0017] NPL 4:G.Zugmaier等人,Journal of the National Cancer Institute,1992;84;22;1716-1724

发明内容

[0018] 发明要解决的问题

[0019] 本发明的目的在于提供对药物用途、或pH缓冲剂用途具有优选活性的新型戊聚糖

多硫酸酯。

[0020] 用于解决问题的方案

[0021] 作为解决上述问题的深入研究的结果，本发明人发现一种新型戊聚糖多硫酸酯，与常规戊聚糖多硫酸酯相比，其具有抑制FGF-2和硫酸乙酰肝素之间的结合的高抑制活性。本发明人进一步发现，该戊聚糖多硫酸酯也可作为pH缓冲剂起作用。基于这些发现完成本发明。

[0022] 具体地，本发明提供了以下[1]～[13]。

[0023] [1]一种戊聚糖多硫酸酯、其药学上可接受的盐、或所述戊聚糖多硫酸酯或其药学上可接受的盐的药学上可接受的溶剂化物，所述戊聚糖多硫酸酯的糖醛酸含量为7.0质量%～15.0质量%，且乙酰基含量为0质量%～2.0质量%。

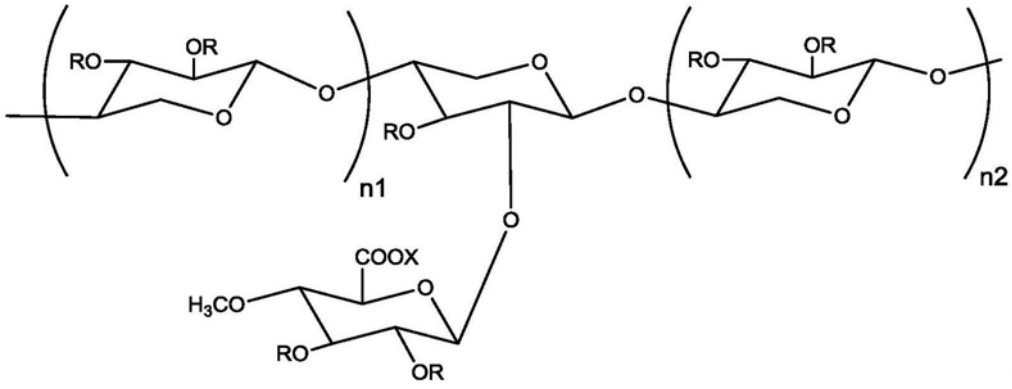
[0024] [2]根据[1]所述的戊聚糖多硫酸酯、其药学上可接受的盐、或所述戊聚糖多硫酸酯或其药学上可接受的盐的药学上可接受的溶剂化物，其中所述戊聚糖多硫酸酯的糖醛酸含量为7.5质量%～13.0质量%。

[0025] [3]根据[1]或[2]所述的戊聚糖多硫酸酯、其药学上可接受的盐、或所述戊聚糖多硫酸酯或其药学上可接受的盐的药学上可接受的溶剂化物，其中所述戊聚糖多硫酸酯的重均分子量为5000以下。

[0026] [4]根据[3]所述的戊聚糖多硫酸酯、其药学上可接受的盐、或者所述戊聚糖多硫酸酯或其药学上可接受的盐的药学上可接受的溶剂化物，其中所述戊聚糖多硫酸酯的乙酰基含量为0～0.3质量%。

[0027] [5]根据[1]至[4]任一项所述的戊聚糖多硫酸酯、其药学上可接受的盐、或所述戊聚糖多硫酸酯或其药学上可接受的盐的药学上可接受的溶剂化物，其中所述戊聚糖多硫酸酯具有由通式II表示的结构：

[0028]



通式II

[0029] 其中R各自独立地表示氢原子、$-COCH_3$、或$-SO_3X^1$，并且一分子中至少一个R为$-SO_3X^1$，其中X^1表示氢原子或一价或二价金属；X表示氢原子或一价或二价金属；并且n1和n2各自独立地表示0以上且30以下的整数，并且n1和n2中的至少一者为1以上的整数。

[0030] [6]根据[5]所述的戊聚糖多硫酸酯、其药学上可接受的盐、或所述戊聚糖多硫酸酯或其药学上可接受的盐的药学上可接受的溶剂化物，其中R各自独立地表示氢原子或$-SO_3X$。

[0031] [7]根据[5]或[6]所述的戊聚糖多硫酸酯、其药学上可接受的盐、或所述戊聚糖多硫酸酯或其药学上可接受的盐的药学上可接受的溶剂化物，其中X为钠。

[0032] [8]一种药物，其包括根据[1]至[7]任一项所述的戊聚糖多硫酸酯、其药学上可接受的盐、或所述戊聚糖多硫酸酯或其药学上可接受的盐的药学上可接受的溶剂化物作为有效成分。

[0033] [9]根据[8]所述的药物，其用于由FGF-2功能的异常亢进引起的疾病的预防和/或治疗。

[0034] [10]根据[9]所述的药物，其中所述由FGF-2功能的异常亢进引起的疾病为癌症、自身免疫疾病、变应性疾病、炎性疾病、心脏发育异常、血管发育异常、或骨骼发育异常。

[0035] [11]根据[9]所述的药物，其用于膀胱炎或关节炎的预防和/或治疗。

[0036] [12]根据[8]至[11]任一项所述的药物，其为注射剂。

[0037] [13]一种pH缓冲剂，其包括根据[1]至[7]任一项所述的戊聚糖多硫酸酯、其药学上可接受的盐、或所述戊聚糖多硫酸酯或其药学上可接受的盐的药学上可接受的溶剂化物。

[0038] 从另外的观点来看，本发明提供了：

[0039] 预防和/或治疗由FGF-2功能的异常亢进引起的疾病的方法，其包括向人类或动物施用有效量的根据[1]至[7]任一项所述的戊聚糖多硫酸酯、其药学上可接受的盐、或所述戊聚糖多硫酸酯或其药学上可接受的盐的药学上可接受的溶剂化物；

[0040] 根据[1]至[7]任一项所述的戊聚糖多硫酸酯、其药学上可接受的盐、或所述戊聚糖多硫酸酯或其药学上可接受的盐的药学上可接受的溶剂化物在制备用于预防和/或治疗由FGF-2功能的异常亢进引起的疾病的药物中的用途；

[0041] 根据[1]至[7]任一项所述的戊聚糖多硫酸酯、其药学上可接受的盐、或所述戊聚糖多硫酸酯或其药学上可接受的盐的药学上可接受的溶剂化物用于预防和/或治疗由FGF-2功能的异常亢进引起的疾病的用途；和

[0042] 根据[1]至[7]任一项所述的戊聚糖多硫酸酯、其药学上可接受的盐、或所述戊聚糖多硫酸酯或其药学上可接受的盐的药学上可接受的溶剂化物用作用于预防和/或治疗由FGF-2功能的异常亢进引起的疾病的药物。

[0043] 发明的效果

[0044] 本发明提供具有抑制FGF-2和硫酸乙酰肝素之间的结合的高抑制活性的戊聚糖多硫酸酯。本发明的戊聚糖多硫酸酯用作用于预防和/或治疗例如癌症或关节炎等由FGF-2功能的异常亢进引起的疾病的药物。此外，本发明的戊聚糖多硫酸酯也可用作pH缓冲剂。

附图说明

[0045] 图1是显示戊聚糖多硫酸的糖醛酸含量对抑制FGF-2和硫酸乙酰肝素之间的结合的抑制活性的影响的图。

[0046] 图2是显示戊聚糖多硫酸的乙酰基含量对抑制FGF-2和硫酸乙酰肝素之间的结合的抑制活性的影响的图。

[0047] 图3是显示戊聚糖多硫酸酯的糖醛酸含量、与在100mg/100mL戊聚糖多硫酸酯溶液的滴定中将pH从pH 6调节至pH 4所需的0.01N盐酸水溶液的量(mL)之间的关系的图。

具体实施方式

[0048] 以下详细地描述本发明。基于代表性的实施方案和具体实例，可以在以下描述构成特征；然而，本发明不限于这样的实施方案。

[0049] 在本说明书中，“包括...作为有效成分”是指作为主要有效成分含有，并且是指以表现出效果的量含有。

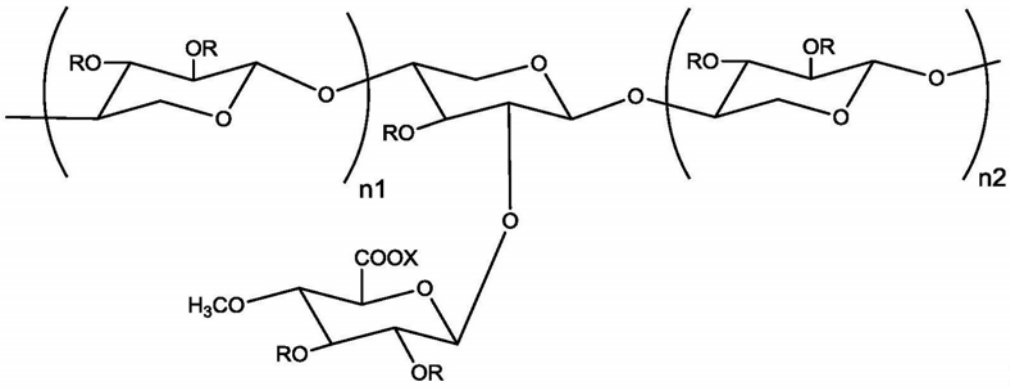
[0050] 短语“预防和/或治疗”是指“预防”、“治疗”、或“预防和治疗”。例如，“用于预防和/或治疗的药物”可仅作为预防剂、或作为治疗剂起作用；或可具有预防剂和治疗剂两者的功能。

[0051] <戊聚糖多硫酸酯>

[0052] 戊聚糖多硫酸酯是通过将低聚木糖的羟基中的至少一个硫酸化来获得的化合物。在本说明书中，戊聚糖多硫酸酯包括戊聚糖多硫酸酯的盐、戊聚糖多硫酸酯的溶剂化物、和戊聚糖多硫酸酯的盐的溶剂化物。戊聚糖多硫酸酯的盐优选为药学上可接受的盐，并且实例包括戊聚糖多硫酸酯钠、戊聚糖多硫酸酯钾、和戊聚糖多硫酸酯钙等。溶剂化物优选为药学上可接受的溶剂化物。溶剂的实例包括水。

[0053] 戊聚糖多硫酸酯具有由通式II表示的结构。戊聚糖多硫酸酯可以包含一个由通式II表示的结构、或者可以包含两个以上的由通式II表示的结构。当戊聚糖多硫酸酯包含两个以上的由通式II表示的结构时，由通式II表示的结构为表示戊聚糖多硫酸酯的重复单元的结构。

[0054]



通式II

[0055] 在通式II中，R各自独立地表示氢原子、$-COCH_3$或$-SO_3X^1$，并且一分子中至少一个R为$-SO_3X^1$，其中X^1表示氢原子或者一价或二价金属，并且X^1优选为氢原子、钠、钾或钙，更优选钠、钾或钙，并且特别优选钠；X为氢原子或一价或二价金属，且X优选钠、钾、或钙，并且特别优选钠；并且n1和n2各自独立地表示0以上且12以下的整数，并且n1和n2中的至少一者为1以上的整数。

[0056] 在通式II中，n1+n2优选为1～10，更优选2～8，并且甚至更优选3～6。

[0057] 由通式II表示的结构的末端的部分以及未与由通式II表示的结构键合的部分可以为-OR。即，-OR可以与通式II的左末端(n1侧)键合，而-R可以与通式II的右末端(n2侧)键合。特别优选$-OR^{1X}$与通式II的左末端(n1侧)键合，并且$-R^{1X}$与通式II的右末端(n2侧)键合。在通式II中，R^{1X}为氢原子或$-SO_3X^1$；X^1为氢原子或者一价或二价金属；并且X^1优选为氢原子、钠、钾或钙，更优选钠、钾、或钙，并且特别优选钠。

[0058] 在上述通式中，X优选一价或二价金属。优选戊聚糖多硫酸酯的药学上可接受的

盐。例如,X优选钠、钾、或钙。在该情况中,戊聚糖多硫酸酯的盐为戊聚糖多硫酸酯钠、戊聚糖多硫酸酯钾、和戊聚糖多硫酸酯钙。其中,戊聚糖多硫酸酯的盐特别优选戊聚糖多硫酸酯钠。

[0059] 本发明的戊聚糖多硫酸酯的糖醛酸含量为7.0质量%～15.0质量%。本发明的戊聚糖多硫酸酯的糖醛酸含量优选为7.5质量%～14.0质量%,并且更优选7.7质量%～13.0质量%。上述比例不需要在一分子中满足,但可由作为各个分子的整体混合物的戊聚糖多硫酸酯来满足。

[0060] 本发明的戊聚糖多硫酸酯可以是在n1和n2值、取代基R的种类、和/或取代度方面彼此不同的由通式II表示的各个分子的混合物。

[0061] 戊聚糖多硫酸酯具有通过将低聚木糖硫酸化而获得的结构。本发明的戊聚糖多硫酸酯优选通过将酸性低聚木糖硫酸化来获得。在具有通过将低聚木糖硫酸化来获得的结构的低聚木糖中,中性低聚木糖为不含糖醛酸的低聚木糖。酸性低聚木糖是其中一个低聚木糖分子中至少一个糖醛酸与至少一个木糖单元键合的低聚木糖。即,酸性低聚木糖在每个低聚木糖分子中具有一个以上的糖醛酸残基作为侧链。每个低聚木糖分子中包含的糖醛酸残基数可以通过咔唑-硫酸法、或使用四硼酸钠的比色法来测量。如实施例中所述,戊聚糖多硫酸酯的糖醛酸含量(质量%)是指由通过咔唑-硫酸法而获得的预定量的戊聚糖多硫酸酯中的糖醛酸残基数来算出的值。

[0062] 本发明的戊聚糖多硫酸酯的硫含量优选为10.0质量%以上、更优选12.0质量%以上、甚至更优选15.5质量%以上、且特别优选16.5质量%以上。戊聚糖多硫酸酯的硫含量优选为20.0质量%以下。这里,戊聚糖多硫酸酯的硫含量是根据日本药典(Japanese Pharmacopoeia)中记载的氧瓶燃烧法(oxygen flask combustion method)来测定的值。

[0063] 认为已知的戊聚糖多硫酸酯包含一定量的其中一个以上的乙酰基(-$COCH_3$)与糖醛酸残基键合在一起的木糖单元(参见,例如,WO2014/114723)。与此相反,本发明的戊聚糖多硫酸酯的乙酰基含量优选为0～2.0质量%、更优选0～1.0质量%、甚至更优选0～0.4质量%、甚至仍更优选0～0.3质量%、且特别优选实质上为0质量%。为了获得具有0～2.0质量%的乙酰基含量的戊聚糖多硫酸酯,本发明的戊聚糖多硫酸酯优选通过下述脱乙酰化步骤来制备。

[0064] 可以由^{1}H-NMR测量中的峰的积分比算出戊聚糖多硫酸酯中的乙酰基含量。具体地,首先,使用含有特定量的戊聚糖多硫酸酯和特定量的内标物质的^{1}H-NMR测量溶液来进行^{1}H-NMR测量。通过比较获得的光谱中的乙酰基的峰与内标物质的特定基团的峰以获得其积分比,获得溶液中的乙酰基的摩尔量。然后将乙酰基的摩尔量乘以43;并且将获得的值除以分别获得的平均分子量,从而获得乙酰基的质量%。

[0065] 对本发明的戊聚糖多硫酸酯的重均分子量(Mw)不特别限定,并且可以为,例如5000以下、4000以下、3900以下、或3800以下、或3750以下。在该情况下,戊聚糖多硫酸酯的重均分子量(Mw)的下限值优选为1000。

[0066] 对戊聚糖多硫酸酯的数均分子量(Mn)不特别限定,并且可以为,例如5000以下、4000以下、3900以下、3800以下、或3750以下。在该情况下,戊聚糖多硫酸酯的数均分子量(Mn)的下限值优选为300。

[0067] 本发明的戊聚糖多硫酸酯的重均分子量(Mw)和数均分子量(Mn)可以通过GPC(凝

胶渗透色谱)来测量。作为GPC柱,可以使用彼此连接的YMC-Pack Diol-300和YMC-Pack Diol-60(均由YMC制造)。GPC的条件可以为例如以下条件。

[0068] 洗脱液:25mM磷酸二氢钾/25mM磷酸氢二钾/50mM氯化钾

[0069] 流速:0.7mL/分

[0070] 测量温度:40℃

[0071] 检测器:示差折光检测器

[0072] 本发明的戊聚糖多硫酸酯的分散度优选为1.00以上且1.6以下、更优选1.00以上且1.5以下。戊聚糖多硫酸酯的分散度还优选1.00以上且1.4以下。通过下式来计算戊聚糖多硫酸酯的分散度(D)。

[0073] 分散度(D)=重均分子量(Mw)/数均分子量(Mn)

[0074] 通过后述的本发明的生产方法获得的戊聚糖多硫酸酯具有高的纯度,并且倾向于具有窄的分子量分布。通过本发明的生产方法获得的戊聚糖多硫酸酯具有优异的品质稳定性。

[0075] <戊聚糖多硫酸酯的用途:药物>

[0076] 本发明的戊聚糖多硫酸酯可以用于例如药物、食品、化妆品、及其他组合物的组分等用途。

[0077] 特别地,本发明的戊聚糖多硫酸酯用作药物的有效成分。

[0078] 药物的实例包括用于预防和/或治疗由FGF-2功能的异常亢进引起的疾病的药物。

[0079] FGF-2(碱性成纤维细胞生长因子)是一种生长因子,并且由各种细胞分泌。FGF-2在发育阶段深入参与细胞增殖和分化,并且在体内组织修复期间表现高表达。此外,FGF-2参与异常血管发生,并且对血管内皮细胞具有强烈的增殖和迁移促进作用。具有这些功能的FGF-2已知参与例如肿瘤等的疾病。已阐明促进血管新生及骨破坏的FGF-2是参与慢性类风湿性关节炎的病理的关键分子。已报道,在例如肾癌等的具有许多血管的肿瘤中具有特别高的血清FGF-2浓度。FGF-2也存在于各种其他肿瘤中,例如前列腺癌、乳腺癌、和肺癌。

[0080] FGF-2与FGF受体(FGFR)的结合诱导各种细胞因子和受体基因的表达。FGF-2具有肝素结合区,并与肝素和硫酸乙酰肝素结合。认为当与FGFR结合时,从细胞分泌的FGF-2首先与细胞外基质的硫酸乙酰肝素结合、浓缩、并被保护以免受蛋白酶的影响。因此,抑制FGF-2和硫酸乙酰肝素之间的结合的活性可以是用于判断预防和/或治疗由FGF-2功能的异常亢进引起的疾病的效果的指标。

[0081] 如实施例中所示,戊聚糖多硫酸酯具有抑制FGF-2和硫酸乙酰肝素之间的结合的活性;并且当戊聚糖多硫酸酯的糖醛酸含量为7.0～15.0质量%且乙酰基含量为0～2.0质量%时,该抑制活性高。因此,本发明的戊聚糖多硫酸酯对于预防和/或抑制由FGF-2功能的异常亢进引起的疾病是特别有用的。

[0082] FGF-2功能的异常亢进的具体实例包括由FGF-2引起的异常血管发生。FGF-2功能的异常亢进可例如通过使用血清FGF-2浓度的增加作为指标来判断。

[0083] 由FGF-2功能的异常亢进引起的疾病的具体实例包括肿瘤、例如关节炎等的慢性炎症、自身免疫疾病、变应性疾病、例如膀胱炎等的炎性疾病、心脏发育异常、血管发育异常、骨骼发育异常、牛皮癣、老年性黄斑变性、牙周病、硬皮病、和新生血管性青光眼等。

[0084] 本发明的戊聚糖多硫酸酯也用作用于预防和/或治疗膀胱炎、特别是间质性膀胱

炎的药物的有效成分。

[0085] 对本发明的药物的剂型没有特别限制，并且药物可以口服或肠胃外给药。优选地，药物可通过静脉注射或输注来肠胃外给药。

[0086] 本发明的药物可仅由作为有效成分的戊聚糖多硫酸酯组成。然而，优选地，可向戊聚糖多硫酸酯添加一种以上的适当的药理学和药学上可接受的添加剂来提供本领域技术人员公知的剂型的药物。

[0087] 药理学和药学上可接受的添加剂的实例包括赋形剂、崩解剂或崩解助剂、粘结剂、润滑剂、涂布剂、颜料、稀释剂、基剂(base)、增溶剂或增溶助剂、等渗剂、缓冲剂、pH调节剂、稳定剂、喷射剂、和粘合剂等。

[0088] 适用于口服给药的药物制剂的实例包括片剂、胶囊剂、散剂、细颗粒剂、颗粒剂、液体剂、和糖浆剂等。用于肠胃外给药的制剂的实例包括注射剂、滴注剂、栓剂、吸入剂、和贴剂(patches)等。为了制备适用于口服给药、经皮给药、或跨粘膜给药的制剂，例如，可添加以下药理学和药学上可接受的添加剂。添加剂的实例包括例如葡萄糖、乳糖、D-甘露糖醇、淀粉、和结晶纤维素等的赋形剂；例如羧甲基纤维素、淀粉、和羧甲基纤维素钙等的崩解剂或崩解助剂；例如羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、和明胶等的粘结剂；例如硬脂酸镁和滑石等的润滑剂；例如羟丙基甲基纤维素、蔗糖、聚乙二醇、和二氧化钛等的涂布剂；例如凡士林、石蜡油、聚乙二醇、明胶、高岭土、甘油、纯净水、和硬脂等的基剂。其他实例包括例如氯氟碳化合物(chlorofluorocarbon)、乙醚、或压缩气体等的喷射剂；例如聚丙烯酸钠、聚乙烯醇、甲基纤维素、聚异丁烯、和聚丁烯等的粘合剂；以及例如棉布和塑料片等的基布。可通过使用这些药物制剂用添加剂来制造药物制剂。

[0089] 为了制备适用于注射或输注的药物制剂，例如，可添加以下药物制剂用添加剂。合适的添加剂的实例包括可形成水性或即用型注射剂的增溶剂或增溶助剂，例如注射用蒸馏水、生理盐水、和丙二醇；例如葡萄糖、氯化钠、D-甘露糖醇、和甘油等的等渗剂；例如磷酸盐(例如，磷酸氢二钠和磷酸二氢钠)、柠檬酸盐、和乙酸盐等的缓冲剂；以及例如无机酸、有机酸、无机碱、和有机碱等的pH调节剂。

[0090] 如下文所述，本发明的戊聚糖多硫酸酯具有比具有较低糖醛酸含量的戊聚糖多硫酸酯更高的pH缓冲能力。因此，当需要调节pH时，例如，当以液体制剂、注射剂、滴注剂等形式提供本发明的戊聚糖多硫酸酯时，不必使用pH调节剂，或可减少所使用的的pH调节剂的量。

[0091] 对本发明的药物的剂量没有特别限制，并且可根据给药形式；患者的年龄、疾病的严重程度、症状、和体重；以及其他条件适当地选择。例如，当静脉内、皮下、或肌内给药时，可以以成年人每天以有效成分计为0.1～20mg/kg、优选0.2～10mg/kg的量的来给药药物。

[0092] <戊聚糖多硫酸酯的用途:抗凝剂>

[0093] 本发明的戊聚糖多硫酸酯可用作抗凝剂的有效成分。

[0094] 含有本发明的戊聚糖多硫酸酯的抗凝剂不仅可用作药物，还可用作医疗设备或医疗材料的表面处理剂。例如，这样的抗凝剂可用作可植入人造器官、人造血管、导管(catheters)、支架、血液袋、隐形眼镜、人工晶状体(intraocular lense)、和手术辅助器械的表面处理剂。将药物组合物固定在医疗设备或医疗材料的表面的方法的实例包括，包含使药物组合物与医疗设备或医疗材料相接触、并用放射线照射接触部分的方法。

[0095] <戊聚糖多硫酸酯的用途:pH缓冲剂>

[0096] 如实施例中所示,本发明的戊聚糖多硫酸酯具有比具有较低糖醛酸含量的戊聚糖多硫酸酯更高的pH缓冲能力。因此,本发明的戊聚糖多硫酸酯可用作pH缓冲剂。本发明的戊聚糖多硫酸酯表现出将pH维持在pH4～6的范围内的缓冲作用。例如,具有小于4的pH的注射剂使患者感到疼痛。本发明的戊聚糖多硫酸酯是药物的有效成分,并且在注射剂中还可以起到pH调节剂的功能。从稳定化和防止劣化的观点来看,本发明的戊聚糖多硫酸酯可用于pH必须维持在pH4～6的范围内的食品、药物、或任何其他组合物。

[0097] 作为pH缓冲剂而含有本发明的戊聚糖多硫酸酯的水溶液等组合物中的戊聚糖多硫酸酯的浓度优选为10～500mg/mL、且更优选50～300mg/mL。

[0098] <戊聚糖多硫酸酯的生产方法>

[0099] 本发明的戊聚糖多硫酸酯可以例如通过戊聚糖多硫酸酯的生产方法获得,所述方法包括从源自植物的原料获得酸性低聚木糖的第1工序、和从酸性低聚木糖获得戊聚糖多硫酸酯的第2工序;并且进一步包括脱乙酰化工序。在该方法中,第1工序包括使源自植物的原料解聚的工序。由于所述方法依次包括源自植物的原料的解聚工序和硫酸化工序,因此所述方法可以有效地制造戊聚糖多硫酸酯。戊聚糖多硫酸酯的生产方法可以进一步包括脱乙酰化工序。通过包括脱乙酰化工序,所述方法可以制造具有低乙酰基含量的戊聚糖多硫酸酯。

[0100] [源自植物的原料]

[0101] 可以通过使源自植物的原料解聚来获得酸性低聚木糖。源自植物的原料的实例包括源自木材的原料、源自种子的原料、源自谷物的原料、和源自果实的原料等。此外,可以使用的源自植物的原料的实例包括例如棉绒和皮棉等的棉;和例如洋麻、大麻、苎麻、和稻秆等的草本系植物;等。作为源自植物的原料,也可以将上述源自各种来源的原料组合使用。

[0102] 其中,优选使用源自木材的原料作为源自植物的原料。可用的源自木材的原料的实例包括例如针叶树和阔叶树等的木材原料。源自木材的原料优选为选自针叶树和阔叶树的至少一种;并且更优选使用阔叶树。源自木材的原料可以为针叶树和阔叶树的混合物。树皮也可以用作源自木材的原料。

[0103] 阔叶树的实例包括山毛榉、蓝桉(Eucalyptus globulus)、巨桉(Eucalyptus grandis)、尾巨桉(Eucalyptus urograndis)、粗皮桉(Eucalyptus pellita)、褐桉(Eucalyptus braciana)和黑荆(Acacia mearnsii)等。针叶树的实例包括日本柳杉、日本扁柏、松树、丝柏、和日本铁杉等。

[0104] 源自木材的原料的比重优选为450kg/m^3以上且700kg/m^3以下,并且更优选500kg/m^3以上且650kg/m^3以下。当源自木材的原料的比重在上述范围内时,可以进一步提高酸性低聚木糖的生产效率。

[0105] 源自木材的原料优选为通过将一种以上的上述木材破碎来获得的木材碎片(wood chips)。当使用木材碎片作为源自植物的原料时,可以有效地进行源自植物的原料的解聚,并且可以提高酸性低聚木糖的生产效率。

[0106] [第1工序]

[0107] (解聚工序)

[0108] 第1工序包括使源自植物的原料解聚的工序。在使源自植物的原料解聚的工序中,

使源自植物的原料化学和/或物理分解以生成酸性低聚木糖。化学和/或物理分解工序的实例包括加热处理工序、碱处理工序、酸处理工序、酶处理工序、离子液体处理工序、和催化剂处理工序等。在这些工序中，解聚工序优选为加热处理工序或酶处理工序；并且更优选为加热处理工序。加热处理工序可以为加热加压工序。

[0109] 解聚工序优选在非碱性条件下(在pH9以下，且优选pH8以下)进行。

[0110] 加热处理工序为将源自植物的原料在溶液的存在下加热的工序。由于在这样的加热处理工序中使源自植物的原料水解，因此加热处理工序有时称为水解处理工序或前水解处理工序。在加热处理工序中使用的溶液优选为水。水与源自植物的原料的比(质量比)优选在1:1～1:10的范围内。当将水与源自植物的原料的比设定在上述范围内时，水解反应可以有效地进行。在加热处理工序中使用的水可以为与源自植物的原料分开添加的水；或者水的一部分可以为最初包含在源自植物的原料中的水。

[0111] 在加热处理工序中，除了源自植物的原料和水以外，还可以添加其它化学品。这样的其它化学品的实例包括碱、酸和螯合剂。此外，还可以添加例如阻垢剂(scale inhibitor)、树脂控制剂(pitch control agent)、和离子液体等直接或间接辅助多糖的解聚的化学品。

[0112] 加热处理工序为将源自植物的原料在水的存在下加热的工序。该工序中的加热温度(液温)优选为30℃以上、更优选50℃以上、甚至更优选75℃以上、甚至还更优选90℃以上、特别优选100℃以上、并且最优选120℃以上。另一方面，加热温度(液温)优选为300℃以下、更优选250℃以下、并且甚至更优选200℃以下。

[0113] 加热处理工序中的处理时间可以根据处理温度适当地确定。处理时间例如为优选5分钟以上、更优选10分钟以上、并且甚至更优选20分钟以上。由下式表示的P因子为加热处理温度与加热处理时间的乘积。优选将P因子调整至优选范围内。

[0114] $$P=\int_{t_0}^{t}\frac{k_{H1(T)}}{k_{100℃}}\cdot dt=\int_{t_0}^{t}Exp\cdot\left(40.48-\frac{15106}{T}\right)\cdot dt$$

[0115] 在上式中，P表示P因子，T表示绝对温度(℃+273.5)，t表示加热处理时间，并且$K_{H1(T)}/K_{100℃}$表示糖苷键的水解的相对速度。

[0116] 在加热处理工序中，将P因子优选设定在200以上、更优选250以上、并且甚至更优选300以上。另一方面，P因子优选为1000以下。在加热处理工序中，适当调整P因子以使酸性低聚木糖的平均聚合度和分子量可以在期望的范围内，由此可以调整获得的戊聚糖多硫酸酯的分子量。

[0117] 在加热处理工序中，含有源自植物的原料的溶液的pH优选为9以下、更优选8以下、并且甚至更优选7以下。即，加热处理工序优选在非碱性条件下进行。上述pH值是指在进行加热处理之前的溶液的pH。

[0118] 在加热处理工序中，可以使源自原料的酸解离，并且酸水解可以至少部分地进行。源自植物原料的酸的实例包括例如乙酸和甲酸等有机酸。在该情况下，含有源自植物的原料的溶液的pH在酸水解后进一步降低。

[0119] 戊聚糖多硫酸酯的生产方法优选设置加热处理工序作为最初的工序。这可以提高酸性低聚木糖的生产效率，并且进一步提高戊聚糖多硫酸酯的生产效率。当所述方法设置加热处理工序作为最初的工序时，与常规方法相比，可以大幅削减生产酸性低聚木糖所需的工序数。通过设置在非碱性条件下的加热处理作为最初的工序，所述方法可以有效地生产着色得到抑制的酸性低聚木糖，这是因为酸性低聚木糖不会被己烯糖醛酸取代。

[0120] 解聚工序优选为加热处理工序；然而，其可以为除了加热处理工序以外的工序。例如，当解聚工序为酶处理工序时，解聚工序包括将源自植物的原料与酶混合的工序。可使用的酶的实例包括半纤维素酶等。具体实例包括市售的酶制剂，如Cellulosin HC100(商品名，由HBI Enzymes Inc.制造)、Cellulosin TP25(商品名，由HBI Enzymes Inc.制造)、Cellulosin HC(商品名，由HBI Enzymes Inc.制造)、Cartazyme(商品名，由Clariant AG制造)、Ecopulp(商品名，由Rohm Enzyme GmbH制造)、Sumizyme(商品名，由Shin Nihon Chemicals Corporation制造)、Pulpzyme(由Novo Nordisk制造)以及Multifect720(Genencor)；和通过属于木霉(Trichoderma)属、嗜热真菌(Thermomyces)属、短梗霉(Aureobasidium)属、链霉菌(Streptomyces)属、曲霉(Aspergillus)属、梭菌(Clostridium)属、芽胞杆菌(Bacillus)属、栖热孢菌(Thermotoga)属、热子囊菌(Thermoascus)属、热纤维菌(Caldocellum)属、或高温单孢菌(Thermomonospora)属等的微生物生产的木聚糖酶。

[0121] 在酶处理工序中，将酶添加至通过将源自植物的原料与水混合来制备的溶液中。在该处理期间溶液的温度优选为10℃以上且90℃以下、并且更优选30℃以上且60℃以下。溶液的温度优选为接近所使用的酶的最适温度的温度。还优选将溶液的pH调整至使酶的活性提高的范围。例如，优选将溶液的pH调整至pH为3以上且10以下。

[0122] 当解聚工序为碱处理工序或酸处理工序时，解聚工序包括将源自植物的原料与碱溶液或酸溶液混合的工序。在碱处理工序中，优选添加氢氧化钠或氢氧化钾。在酸处理工序中，优选添加盐酸、硫酸或乙酸等。在这样的情况下，也可以适当地进行加热或加压。

[0123] 当解聚工序为选自酶处理工序、碱处理工序和酸处理工序的至少一种时，生产方法在该处理工序之后可以进一步设置压榨工序、提取工序、加热工序、过滤工序、分离工序、纯化工序、浓缩工序、或脱盐工序等。所述方法可以进一步设置在该处理工序之后进行的分子量降低工序。其它工序的实例包括JP2003-183303A中记载的工序，其内容通过参考引入本说明书。

[0124] (过滤工序)

[0125] 第1工序可进一步包括在上述解聚工序之后进行的过滤工序。在过滤工序中，将反应混合物分离为源自植物的原料的固体成分和除了固体成分以外的溶液。更具体地，当第1工序设置在解聚工序之后进行的过滤工序时，将反应产物分离为用作浆原料的固体成分和滤液。对用作浆原料的固体成分进行作为后工序的蒸解工序等，以提供纤维素原料(溶解浆)。

[0126] 可以将回收的滤液分离为气体层和液层。由于气体层包含大量的糠醛类，因此可以通过从气体层回收这些糠醛类来将糠醛类分离。另一方面，液层包含大量含有酸性低聚木糖和中性低聚木糖的半纤维素。在后述工序中，可以将包含在该液层中的酸性低聚木糖分离纯化。

[0127] (分离纯化工序)

[0128] 第1工序进一步包括在上述解聚工序之后进行的分离纯化工序。当第1工序包括上述过滤工序时,优选在过滤工序之后设置分离纯化工序。

[0129] 第1工序可以在解聚工序之后立即设置分离纯化工序。然而,第1工序优选设置在解聚工序之后进行的过滤工序;并且设置从获得的滤液中分离酸性低聚木糖并且将酸性低聚木糖纯化的工序。过滤工序可以设置为分离纯化工序的一部分;或者可以设置为独立于分离纯化工序的一个工序。分离纯化工序为将酸性低聚木糖分离纯化的工序。由于在过滤工序中获得的滤液包含除了酸性低聚木糖以外的例如中性低聚木糖等各种糖类,因此分离纯化工序也是将这样的除了酸性低聚木糖以外的低聚木糖除去的工序。

[0130] 在分离纯化工序中,例如,优选使用离子交换色谱、亲和色谱、凝胶过滤、离子交换处理、NF膜处理、UF膜处理、RO膜处理、或活性炭处理等方法。在分离纯化工序中,还优选将以上方法组合进行。特别地,当在分离纯化工序中进行离子交换色谱时,可以将酸性低聚木糖选择性地分离纯化。在离子交换色谱中,酸性低聚木糖被吸附;因此,可以从糖液(滤液)主要获得酸性低聚木糖。更具体地,首先将糖液用强阳离子交换树脂处理以除去糖液中的金属离子。其后,使用强阴离子交换树脂,除去糖液中的硫酸根离子等。将所得糖液用弱阴离子交换树脂处理以使酸性低聚木糖吸附在树脂上。可通过用低浓度的盐(例如,NaCl、$CaCl_2$、KCl、或$MgCl_2$)洗脱吸附在树脂上的酸性低聚糖来得到具有较少杂质的酸性低聚木糖。

[0131] (浓缩工序)

[0132] 第1工序可进一步包括浓缩工序。优选例如在过滤工序之后且在分离纯化工序之前设置浓缩工序。当第1工序设置这样的浓缩工序时,可以更有效地进行分离纯化工序,从而提高戊聚糖多硫酸酯的生产效率。

[0133] 浓缩工序的实例包括使用NF膜、超滤膜或反渗透膜等的膜处理工序;和利用蒸发等的浓缩工序;等。

[0134] 在浓缩工序中,优选将溶液浓缩,以使酸性低聚木糖的含量相对于浓缩液的总质量为10%以上且80%以下、并且更优选20%以上且60%以下。

[0135] <脱水工序>

[0136] 在第1工序中,酸性低聚木糖可以以酸性低聚木糖溶液的形式获得;或者可以进行脱水工序,并且由此以酸性低聚木糖浓缩物或酸性低聚木糖粉末的形式获得。当要生产酸性低聚木糖粉末时,生产方法优选进一步设置在分离纯化工序之后进行的粉末化工序。当在本发明中设置脱水工序时,后述硫酸化工序中的硫酸化可以更有效地进行。

[0137] 在粉末化工序中,将在分离纯化工序中获得的酸性低聚木糖溶液例如使用喷雾干燥器、冷冻干燥机、热风干燥机、或水溶性的有机溶剂来处理,由此获得酸性低聚木糖粉末。

[0138] [第2工序]

[0139] (硫酸化工序)

[0140] 使在第1工序中获得的酸性低聚木糖在第2工序中硫酸化,由此获得戊聚糖多硫酸酯。即,第2工序包括硫酸化工序。

[0141] 优选根据作为最终产物而获得的戊聚糖多硫酸酯的分子量适当地调整待进行硫酸化的酸性低聚木糖的平均聚合度。

[0142] 酸性低聚木糖的平均聚合度可以通过将酸性低聚木糖的总糖量除以还原糖量来计算出。在总糖量的计算中，首先，使低聚木糖溶液维持在50℃并且以15000rpm离心15分钟。其后，将上清液的总糖量通过苯酚-硫酸法(“Kangento no Teiryo-Ho(还原糖的定量法)”;由学会出版中心发行)来定量。使用D-木糖(Wako Pure Chemical Industries,Ltd.)来制作要用于定量的校准曲线。将还原糖量通过Somogyi-Nelson法(“Kangento no Teiryo-Ho(还原糖的定量法)”;由学会出版中心发行)来定量。也使用D-木糖(Wako Pure Chemical Industries,Ltd.)来制作要用于该定量的校准曲线。

[0143] 在硫酸化工序中，将硫酸或硫酸衍生物添加至酸性低聚木糖溶液中，从而使酸性低聚木糖硫酸化。硫酸衍生物的实例包括三氧化硫吡啶络合物和氯磺酸等。在该工序中，酸性低聚木糖溶液的浓度优选为0.1质量％以上且20质量％以下，并且优选将硫酸以0.1质量％以上且50质量％以下的量添加至具有这样的浓度的酸性低聚木糖液中。添加硫酸之后的酸性低聚木糖液的pH优选为1以上且9以下。

[0144] (硫酸化后纯化工序)

[0145] 第2工序可进一步包括在硫酸化之后进行的硫酸化后纯化工序。当第2工序设置这样的硫酸化后纯化工序时，可以获得高纯度的戊聚糖多硫酸酯。

[0146] 在硫酸化后纯化工序中，优选使用例如离心分离、膜过滤、透析、水溶性有机溶剂处理、或活性炭处理等方法。其中，优选使用水溶性有机溶剂处理和活性炭处理，这是因为可以将硫酸化的戊聚糖多硫酸酯选择性地分离纯化。

[0147] (粉末化工序)

[0148] 在第2工序中，硫酸化的戊聚糖多硫酸酯可以以戊聚糖多硫酸酯溶液的形式获得；或者可以进行粉末化工序，并且由此以戊聚糖多硫酸酯粉末的形式获得。当要生产戊聚糖多硫酸酯粉末时，第2工序优选进一步设置在硫酸化后纯化工序之后进行的粉末化工序。

[0149] 在粉末化工序中，将在硫酸化后纯化工序中获得的戊聚糖多硫酸酯溶液可以例如使用喷雾干燥器、冷冻干燥机、热风干燥机、或水溶性的有机溶剂等来处理，由此获得戊聚糖多硫酸酯粉末。

[0150] 通过进行上述第2工序来获得戊聚糖多硫酸酯。由此获得的戊聚糖多硫酸酯的硫含量相对于戊聚糖多硫酸酯的总质量优选为10质量％以上且20质量％以下。可以通过日本药典通用试验法中的氧瓶燃烧法来测量戊聚糖多硫酸酯的硫含量。

[0151] [脱乙酰化工序]

[0152] 在戊聚糖多硫酸酯的生产中，优选进行脱乙酰化。脱乙酰化工序优选在解聚工序之后的任意阶段进行。脱乙酰化工序可以降低戊聚糖多硫酸酯的乙酰基含量。具体地，脱乙酰化工序为如下工序:将碱添加至含有例如酸性低聚木糖等从源自植物的原料获得的物质的溶液(本说明书中也称为“含有酸性低聚木糖等的溶液”)中，从而将溶液调整至pH 11以上。在脱乙酰化工序中，可以将解聚后获得的溶液、通过过滤工序获得的滤液、含有在分离纯化工序之后且在硫酸化工序之前的酸性低聚木糖的溶液、或含有在硫酸化工序之后的酸性低聚木糖(戊聚糖多硫酸酯)的溶液等调整至pH 11以上。在这些溶液中，当将含有在分离纯化工序之后且在硫酸化工序之前的酸性低聚木糖的溶液调整至pH 11以上时，可以获得具有稳定的品质且乙酰基含量降低的戊聚糖多硫酸酯，并且还可以将键合有乙酰基的部位硫酸化。因此，可以提高硫酸化的效率并且从而提高戊聚糖多硫酸酯的生产效率。当将含有

在硫酸化工序之后获得的酸性低聚木糖(戊聚糖多硫酸酯)的溶液调整至pH 11以上时,可以更有效地进行纯化工序。含有酸性低聚木糖等的溶液优选为水溶液。在本说明书中,含有酸性低聚木糖的溶液也可以称为酸性低聚木糖液。

[0153] 脱乙酰化工序中适用的pH优选为11～14、并且更优选12～13。优选将要进行脱乙酰化工序的溶液维持在pH 11以上0.5小时以上,更优选维持在pH 11以上1.0小时以上,甚至更优选维持在pH 11以上2.0小时以上,并且特别优选维持在pH 11以上3.0小时以上。特别地,当pH低于12时,优选将溶液维持1.0小时以上。特别优选的条件可以为例如使溶液在pH 12～13维持3小时以上的条件。

[0154] 在将上述溶液维持在上述pH范围内的同时,优选搅拌溶液。对在将溶液维持在上述pH范围内时适用的温度没有特别限定,但是优选为室温。

[0155] 在脱乙酰化工序中,可以将碱添加至要进行脱乙酰化工序的溶液(含有酸性低聚木糖的溶液等)中。对要添加的碱没有特别限定,只要可以达到期望的pH即可。所述碱优选为氢氧化钠。

[0156] 脱乙酰化工序可以包括在维持在上述pH之后将由于碱的添加而导致pH为11以上的溶液调整至小于pH 11的pH调整工序。在pH调整工序中,可以将溶液调整至例如pH 9以下、pH 8以下、pH 7以下、pH 6以下、pH 5以下或pH4以下。可以通过添加酸来进行调整。可用的酸的实例包括盐酸。

[0157] 脱乙酰化工序优选包括在pH调整工序之后进行的脱盐工序。可以例如使用透析膜或NF膜来进行脱盐。

[0158] 脱乙酰化工序可以进一步包括将生成物粉末化用于后续处理的工序。

[0159] [其它工序]

[0160] (分子量调整工序)

[0161] 戊聚糖多硫酸酯的生产方法可进一步包括在第1工序与第2工序之间的分子量调整工序。当戊聚糖多硫酸酯的生产方法包括脱乙酰化工序时,分子量调整工序可以在脱乙酰化工序之前或之后进行。在分子量调整工序中,调整在第1工序中获得的酸性低聚木糖的分子量。例如,在分子量调整工序中,可以使酸性低聚木糖的分子量降低。

[0162] 在分子量调整工序中,可以通过进行例如酸处理、碱处理、酶处理、NF膜处理、UF膜处理、RO膜处理、凝胶过滤处理、活性炭处理、离子交换处理、或电透析处理等来获得重均分子量为1000以上且5000以下的戊聚糖多硫酸酯。在分子量调整工序中,也可以采用通过进行膜处理等来选择性地回收具有期望的重均分子量的戊聚糖多硫酸酯的方法。

[0163] (分子量调整后分离纯化工序)

[0164] 戊聚糖多硫酸酯的生产方法可进一步包括在分子量调整工序之后进行的分子量调整后分离纯化工序。分子量调整后分离纯化工序的实例可以包括凝胶过滤、离子交换处理、NF膜处理、UF膜处理、RO膜处理、电透析处理、活性炭处理、水溶性有机溶剂处理、和色谱处理等。当生产方法设置这样的分子量调整后分离纯化工序时,可以选择性地回收在分子量调整工序中获得的具有期望的分子量的酸性低聚木糖,并且可以有效地获得具有窄的分子量分布的戊聚糖多硫酸酯。

[0165] 实施例

[0166] 以下参考生产例更具体地描述本发明的特征。可以适当地改变以下生产例中所示

的材料、使用量、比例、处理内容、和处理步骤等，达到这样的改变不偏离本发明的要旨的程度。因此，不应当将本发明的范围解释为受到以下具体实例限制。

[0167] <酸性低聚木糖(1)的生产>

[0168] 向10质量份木材碎片(阔叶树)添加50质量份水，并且在165℃下进行加热处理3小时。然后使用螺旋压榨机(由Shinryo Seisakusho制造:250×1000SPH-EN)将所得混合物进行固液分离，并且将滤液回收。使滤液通过微米率(micron rate)为1μm的袋滤器(由ISP Filters制造)来过滤。在添加5质量份活性炭(PM-SX;由Mikura Kasei Kabushiki Kaisha制造)从而将滤液在50℃下处理2小时之后，使包括活性炭的所得混合物通过微米率为0.2μm的陶瓷过滤器(由Nihon Pall Co.,Ltd.制造)来进一步过滤，从而回收澄清的滤液。在将澄清的滤液用反渗透膜(NTR-7450;由Nitto Denko Corporation制造)浓缩20倍以获得浓缩糖液之后，使浓缩糖液以SV 1.5通过由强阳离子树脂(PK-218;由Mitsubishi Chemical Corporation制造)、弱阴离子树脂(WA30;由Mitsubishi Chemical Corporation制造)、强阳离子树脂(PK-218;由Mitsubishi Chemical Corporation制造)和弱阴离子树脂(WA30;由Mitsubishi Chemical Corporation制造)组成的4床4塔式的离子交换树脂。酸性低聚木糖由此吸附在第2塔和第4塔的弱阴离子树脂上。然后使50mM氯化钠水溶液以SV 1.5通过第2塔和第4塔以回收酸性低聚木糖溶液。将氢氧化钠添加至获得的酸性低聚木糖溶液中以达到pH为13，并且将所得混合物在室温下搅拌3小时以进行脱乙酰化。在将盐酸添加至所得溶液中以达到pH小于5并且使用透析膜(Spectra/Por 7,CE膜,MWCO 100～500;由Spectrum制造)来进行脱盐之后，使用冷冻干燥机(由EYELA制造)将所得混合物粉末化。

[0169] <中性低聚木糖的生产>

[0170] 向10质量份木材碎片(阔叶树)添加50质量份水，并且在165℃下进行加热处理3小时。然后使用螺旋压榨机(由Shinryo Seisakusho制造:250×1000SPH-EN)将所得混合物进行固液分离，并且将滤液回收。使滤液通过微米率为1μm的袋滤器(由ISP Filters制造)来进一步过滤。在添加5质量份活性炭(PM-SX;由Mikura Kasei Kabushiki Kaisha制造)，从而在50℃下处理2小时，使包括活性炭的所得混合物通过微米率为0.2μm的陶瓷过滤器(由Nihon Pall Co.,Ltd.制造)来进一步过滤，从而回收澄清的滤液。在将澄清的滤液用反渗透膜(NTR-7450;由Nitto Denko Corporation制造)浓缩20倍以获得浓缩糖液之后，使浓缩糖液以SV 1.5通过由强阳离子树脂(PK-218;由Mitsubishi Chemical Corporation制造)、弱阴离子树脂(WA30;由Mitsubishi Chemical Corporation制造)、强阳离子树脂(PK-218;由Mitsubishi Chemical Corporation制造)和弱阴离子树脂(WA30;由Mitsubishi Chemical Corporation制造)组成的4床4塔式的离子交换树脂，由此回收中性低聚木糖液。将氢氧化钠添加至获得的中性低聚木糖液中以达到pH为13，并且将所得混合物在室温下搅拌3小时以进行脱乙酰化。在将盐酸添加至获得的溶液中以达到pH小于5并且使用透析膜(Spectra/Por 7,CE膜,MWCO 100～500;由Spectrum制造)来除去获得的盐之后，使用冷冻干燥机(由EYELA制造)将所得混合物粉末化。

[0171] <戊聚糖多硫酸酯钠的生产>

[0172] (比较例1)

[0173] 将25mL的N,N-二甲基甲酰胺、12.4g的三氧化硫吡啶络合物、和1.5g的通过前述的方法生产的中性低聚木糖粉末置于100mL可分离烧瓶中，并且使反应在40℃下进行3小时。

冷却后，将获得的反应混合物滴加至500mL乙醇中。通过过滤来收集生成的沉淀物，并且添加30mL水以使沉淀物溶解于其中。将氢氧化钠溶液添加至获得的溶液中以将pH调整为10。将所得溶液滴加至500mL乙醇中，然后通过过滤来收集获得的析出物。其后，添加30mL水从而使析出物溶解于其中；并且将活性炭添加至溶液中并搅拌，然后过滤。将滤液使用蒸发器来浓缩，并且使用冷冻干燥机(由EYELA制造)来粉末化。

[0174] (比较例2)

[0175] 除了使用1.125g中性低聚木糖粉末和0.375g酸性低聚木糖(1)的混合物替换比较例1的1.5g中性低聚木糖粉末以外，以与比较例1中相同的方式获得戊聚糖多硫酸酯钠。

[0176] (实施例1)

[0177] 除了使用0.375g中性低聚木糖粉末和1.125g酸性低聚木糖(1)的混合物替换比较例1的1.5g中性低聚木糖粉末以外，以与比较例1中相同的方式获得戊聚糖多硫酸酯钠。

[0178] (实施例2)

[0179] 除了使用1.5g酸性低聚木糖(1)替换比较例1的1.5g中性低聚木糖粉末以外，以与比较例1中相同的方式获得戊聚糖多硫酸酯钠。

[0180] <物理性质值>

[0181] 如下测量实施例1和2、及比较例1和2的戊聚糖多硫酸酯的糖醛酸含量、平均分子量、和硫含量。

[0182] (糖醛酸含量)

[0183] 称量约10mg的在各实施例和比较例中获得的戊聚糖多硫酸酯钠，并且将其溶解在蒸馏水中以使体积恰好为25mL。将1mL的每种溶液置于试管中。在使溶液在冰水中冷却的同时，添加5mL的0.025M的四硼酸钠在硫酸中的溶液并混合，并且将所得混合物在水浴中加热10分钟。加热后立即将所得混合物冰冷却，并且添加0.2mL咔唑试液并混合。将所得混合物在水浴中加热15分钟，然后冷却以获得样品溶液。单独地，制备浓度为10～100μg/mL的葡萄糖醛酸标准原液，并且进行与上述相同的步骤以获得标准溶液。还对1mL的蒸馏水进行相同的步骤，并且将所得液体用作对照液。测量在530nm的波长下的吸光度。由标准溶液的吸光度制作校准曲线，并且确定实施例和比较例中的葡萄糖醛酸量(g)。根据下式计算糖醛酸含量(质量%)。当定量值为负时，将其视作0%。

[0184] 糖醛酸含量(质量%)＝葡萄糖醛酸量(μg)/(戊聚糖多硫酸酯钠的称取量×1/25)/10

[0185] (硫含量)

[0186] 通过日本药典中记载的氧瓶燃烧法来测量硫含量。

[0187] (平均分子量)

[0188] 本发明的戊聚糖多硫酸酯的重均分子量(Mw)可以通过GPC(凝胶渗透色谱)来测量。可以使用彼此连接的YMC-Pack Diol-300和YMC-Pack Diol-60(均由YMC制造)作为GPC柱。例如，在以下条件下进行GPC。

[0189] 洗脱液：25mM磷酸二氢钾/25mM磷酸氢二钾/50mM氯化钾

[0190] 流速：0.7mL/分

[0191] 测量温度：40℃

[0192] 检测器：示差折光检测器

[0193] <抑制FGF-2和硫酸乙酰肝素之间的结合的抑制活性>

[0194] 将10mg的各实施例和比较例的戊聚糖多硫酸酯溶解于10mL生理盐水中。将所得溶液与生物素化的硫酸乙酰肝素混合，并在37℃下搅拌15分钟。作为空白(blank)，还制备通过仅将生理盐水与生物素化的硫酸乙酰肝素混合来得到的样品。将这些溶液添加至固定有FGF-2的板中，并将板在37℃下搅拌15分钟。在去除溶液并用0.1％Tween 20/PBS洗涤孔3次后，添加亲和素-HRP溶液，并将板在37℃下搅拌30分钟。在去除溶液并用0.1％Tween 20/PBS洗涤孔3次后，添加HRP用基质并在室温下显色约5分钟。在添加反应终止液并搅拌后，测量450nm波长下的吸光度(A450nm)。由下式计算抑制率。

[0195] 抑制率(％)＝(A450nm(空白)-A450nm(戊聚糖多硫酸酯))/A450nm(空白)

[0196] 所使用的生物素化的硫酸乙酰肝素、固定有FGF-2的板、亲和素-HRP溶液、和HRP基质是包括在肝素降解酶测定试剂盒(Heparan Degrading Enzyme Assay Kit)(Takara Bio Inc.)中的那些。所使用的Tween 20、PBS、和反应终止液是包含在无硫酸的ELISA用洗涤及终止溶液(Wash and Stop Solution for ELISA without Sulfuric Acid)(Takara Bio Inc.)中的那些。

[0197] 表1和图1显示结果。

[0198] 表1

[0199]

	比较例 1	比较例 2	实施例 1	实施例 2
糖醛酸含量(质量%)	0.00	1.64	7.94	12.61
平均分子量	2053	2168	2487	2781
硫含量(质量%)	15.34	15.09	14.33	13.28
FGF 抑制率(%)	81.8	90.8	94.5	95.4

[0200] 表1和图1中结果显示，糖醛酸含量为7.0质量％～15.0质量％的戊聚糖多硫酸钠表现高FGF抑制率。

[0201] <酸性低聚木糖(2)的生产>

[0202] 向10质量份木材碎片(阔叶树)添加50质量份水，并且在165℃下进行加热处理3小时。然后使用螺旋压榨机(由Shinryo Seisakusho制造:250×1000SPH-EN)将所得混合物进行固液分离，并且将滤液回收。使滤液通过微米率为1μm的袋滤器(由ISP Filters制造)来进一步过滤。在添加5质量份活性炭(PM-SX;由Mikura Kasei Kabushiki Kaisha制造)从而将滤液在50℃下处理2小时之后，使包括活性炭的所得混合物通过微米率为0.2μm的陶瓷过滤器(由Nihon Pall Co.,Ltd.制造)来进一步过滤，从而回收澄清的滤液。在将澄清的滤液用反渗透膜(NTR-7450;由Nitto Denko Corporation制造)浓缩20倍以获得浓缩糖液之后，使浓缩糖液以SV 1.5通过由强阳离子树脂(PK-218;由Mitsubishi Chemical Corporation制造)、弱阴离子树脂(WA30;由Mitsubishi Chemical Corporation制造)、强阳离子树脂(PK-218;由Mitsubishi Chemical Corporation制造)、和弱阴离子树脂(WA30;由Mitsubishi Chemical Corporation制造)组成的4床4塔式的离子交换树脂。酸性低聚木糖由此吸附在第2塔和第4塔的弱阴离子树脂上。然后使50mM氯化钠水溶液以SV 1.5通过第2塔和第4塔以回收酸性低聚木糖溶液。使用冷冻干燥机(由EYELA制造)将所得酸性低聚木糖

溶液粉末化。

[0203] <酸性低聚木糖(3)的生产>

[0204] 除了在pH 11下进行脱乙酰化1小时以外,以与酸性低聚木糖(1)的生产中相同的方式获得酸性低聚木糖(3)。

[0205] <酸性低聚木糖(4)的生产>

[0206] 除了在pH 11下进行脱乙酰化2小时以外,以与酸性低聚木糖(1)的生产中相同的方式获得酸性低聚木糖(4)。

[0207] <酸性低聚木糖(5)的生产>

[0208] 除了在pH 12下进行脱乙酰化1小时以外,以与酸性低聚木糖(1)的生产中相同的方式获得酸性低聚木糖(5)。

[0209] <戊聚糖多硫酸酯钠的生产2>

[0210] (比较例3)

[0211] 除了用1.5g的酸性低聚木糖(2)代替1.5g的比较例1的中性低聚木糖粉末以外,以与比较例1中相同的方式获得戊聚糖多硫酸酯钠。

[0212] (实施例3～5)

[0213] 除了用1.5g的酸性低聚木糖(3)～(5)代替1.5g的比较例1的中性低聚木糖粉末以外,以与比较例1中相同的方式获得实施例3～5的各自的戊聚糖多硫酸酯钠。

[0214] 物理性质值、以及抑制FGF-2和硫酸乙酰肝素之间的结合的抑制活性

[0215] 以与实施例1中的相同方式确定实施例3～5和比较例3的戊聚糖多硫酸酯的糖醛酸含量和平均分子量。以如下方式确定实施例2～5和比较例3的戊聚糖多硫酸酯的乙酰基含量。

[0216] 将35mg的3-(三甲基甲硅烷基)丙酸钠-2,2,3,3-d4(3-(trimethylsilyl)propionate-2,2,3,3-d4)(Isotec Corporation制造)溶解在重水(Kanto Kagaku制造)中。使用25mL容量瓶,稀释溶液来制备内标溶液。称量30mg的在各实施例和比较例中所得的戊聚糖多硫酸钠并溶解在1mL的内标溶液中来制备NMR用溶液。将所得溶液转移至NMR样品管(Kanto Kagaku制造),并使用FT-NMR(JNM-LA400;JEOL Ltd.制造)进行^{1}H-NMR测定。由内标物质的三甲基甲硅烷基的峰与戊聚糖多硫酸酯钠的乙酰基的峰的积分比来计算乙酰基含量。

[0217] 以与实施例1中的相同方式来确定实施例2～5和比较例3的戊聚糖多硫酸酯的糖醛酸含量、平均分子量、以及抑制FGF-2和硫酸乙酰肝素之间的结合的抑制活性。表2和图2显示结果。

[0218] 表2

[0219]

	比较例 3	实施例 3	实施例 4	实施例 5	实施例 2
平均分子量	2211	2356	2325	2129	2781
糖醛酸含量(质量%)	11.03	11.40	11.42	10.83	12.61
乙酰基含量(质量%)	2.74	1.62	0.87	0.22	0.00
FGF 抑制率(%)	87.8	94.4	92.2	91.0	95.4

[0220] <保存稳定性>

[0221] 将实施例2和4以及比较例3的各自的戊聚糖多硫酸酯钠溶解在纯净水中至100mg/mL的浓度，并且在螺口瓶(screw vial)中密封所得溶液。目视确认在40℃下保存1周和2周后的各个溶液的性质。

[0222] 表3

[0223]

		实施例 2	实施例 4	比较例 3
乙酰基含量(质量%)		0.00%	0.87%	2.74%
溶液的性质	初始	无色 透明	无色 透明	无色 透明
	40℃，1 周	无色 透明	无色 透明	略带黄色 透明
	40℃，2 周	略带黄色 透明	略带黄色 透明	黄色 透明

[0224] 表2和图2中的结果显示，任意乙酰基含量小于2.0％的戊聚糖多硫酸酯钠具有大于90％的FGF抑制率，因此表现高抑制率。表3显示，当低乙酰基含量的戊聚糖多硫酸酯钠水溶液在室温下或高于室温下保存时，几乎不发生着色，溶液高度稳定。

[0225] (戊聚糖多硫酸酯的pH缓冲作用)

[0226] 将100mg的在实施例1和2以及比较例1和2的各自中所得的戊聚糖多硫酸酯溶于水中以使总体积精确地为100mL。使用0.01N氢氧化钠水溶液(Kanto Kagaku制造)通过自动滴定仪(DKK Toa Corporation制造)调节该溶液至pH 10。然后，使用0.01N盐酸水溶液(Kanto Kagaku制造)通过自动滴定仪来进行滴定。计算将戊聚糖多硫酸酯溶液的pH从pH 6调节至pH 4所需的0.01N盐酸水溶液的量。

[0227] 图3显示结果。

[0228] 图3的结果清晰地表明，实施例的戊聚糖多硫酸酯表现高缓冲作用以将pH维持在pH 4～6的范围内。

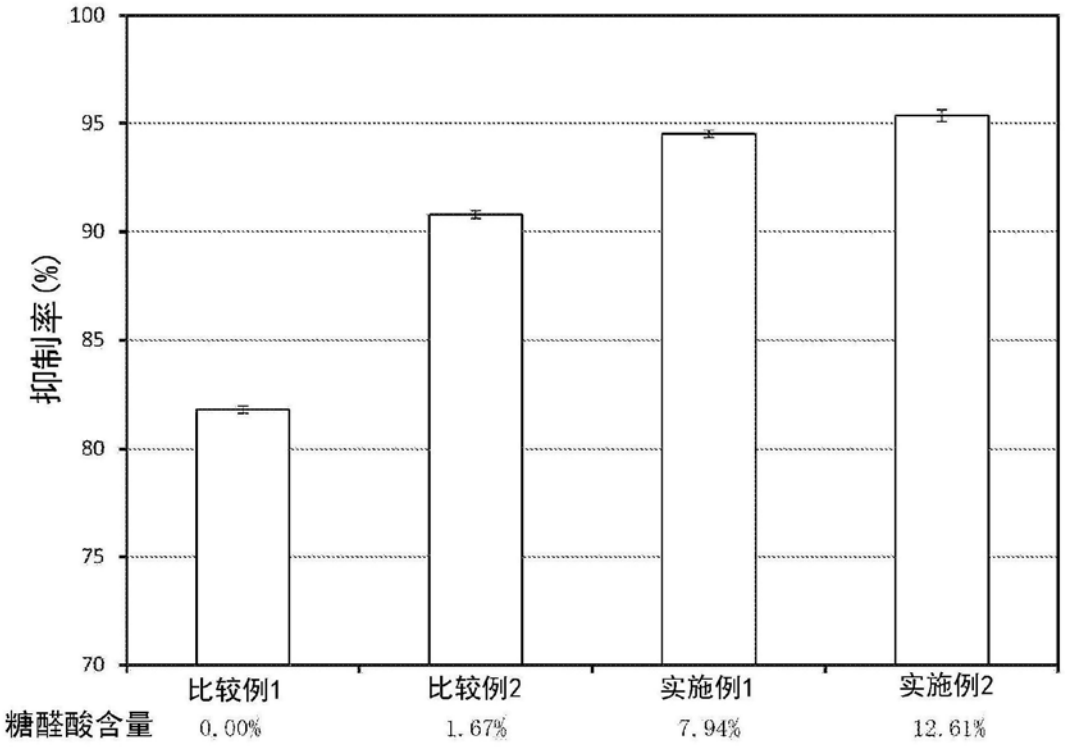

100
95
90
85
80
75
70
抑制率(%)
比较例1
比较例2
实施例1
实施例2
糖醛酸含量
0.00%
1.67%
7.94%
12.61%

图1

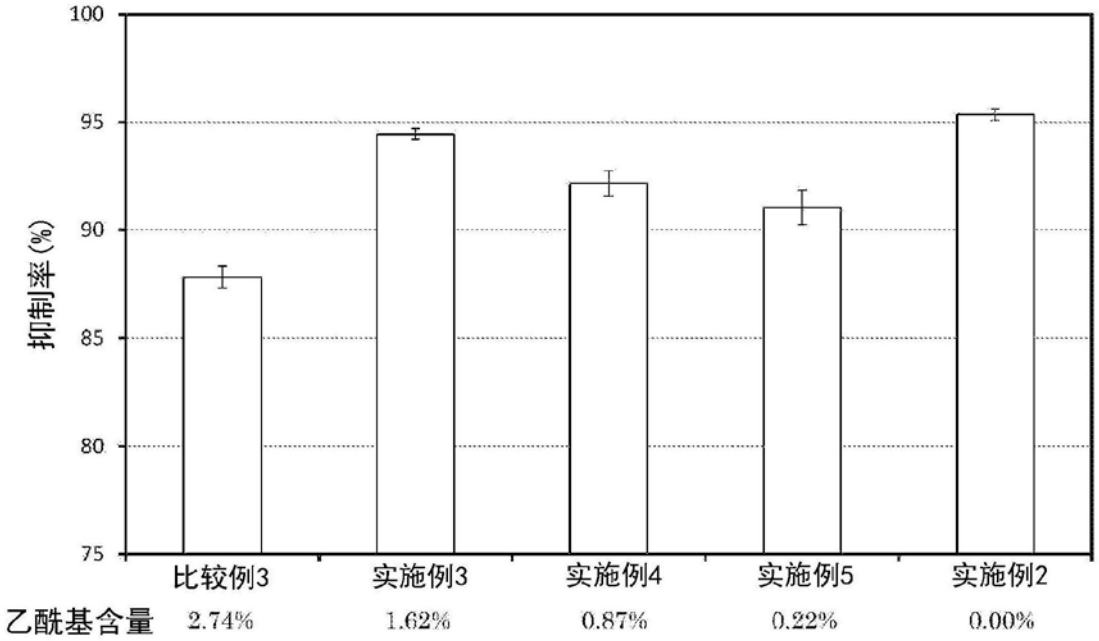

100
95
90
85
80
75
抑制率(%)
比较例3
实施例3
实施例4
实施例5
实施例2
乙酰基含量
2.74%
1.62%
0.87%
0.22%
0.00%

图2

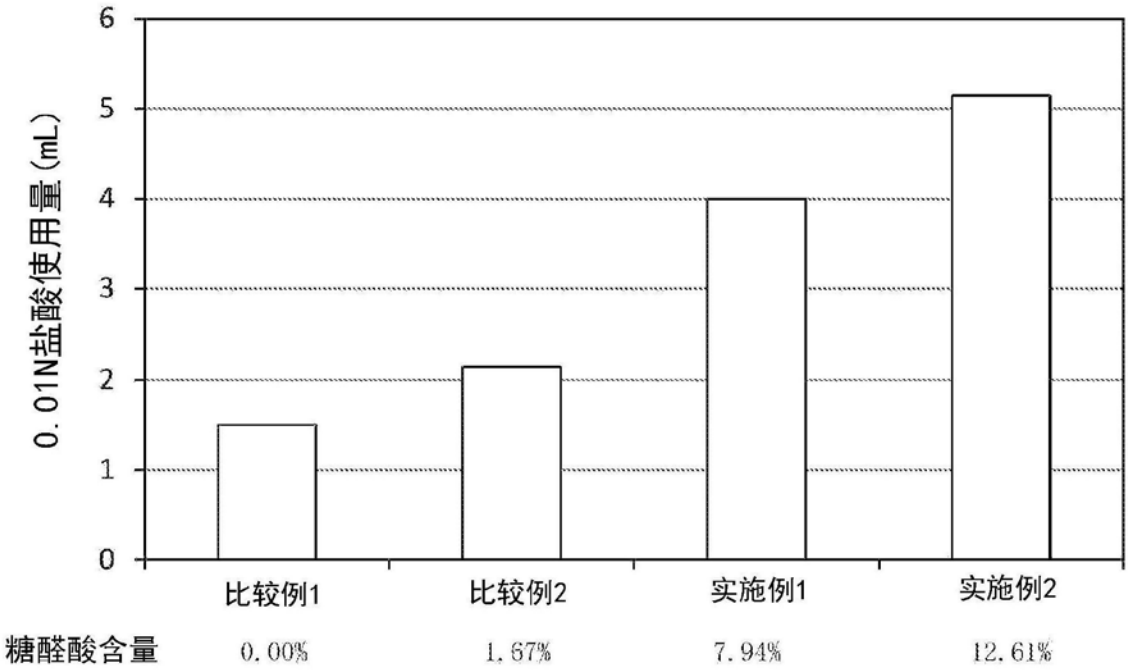

6
5
4
3
2
1
0
0.01N盐酸使用量(mL)
比较例1
比较例2
实施例1
实施例2
糖醛酸含量
0.00%
1.67%
7.94%
12.61%

图3