



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101512006 B

(45) 授权公告日 2012. 04. 11

(21) 申请号 200780033000. X

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2007. 07. 06

C12P 19/26 (2006. 01)

C08B 37/00 (2006. 01)

(30) 优先权数据

1065/MUM/2006 2006. 07. 06 IN

1874/MUM/2006 2006. 11. 13 IN

(56) 对比文件

CN 1786180 A, 2006. 06. 14,

(85) PCT申请进入国家阶段日

审查员 郭亮

2009. 03. 05

(86) PCT申请的申请数据

PCT/IN2007/000289 2007. 07. 06

(87) PCT申请的公布数据

W02008/035372 EN 2008. 03. 27

(73) 专利权人 利莱恩斯生命科学有限公司

地址 印度马哈拉施特拉邦

(72) 发明人 V·兰加斯瓦米 V·桑托什

J·达门德拉 V·纳塔拉

H·维兰卡 A·卡帕特

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

司 72001

代理人 权陆军 付磊

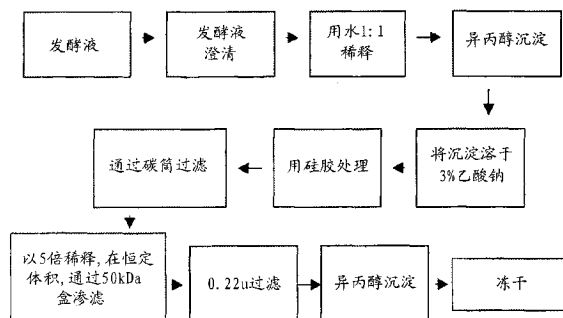
权利要求书 1 页 说明书 15 页 附图 4 页

(54) 发明名称

用于纯化高分子量透明质酸的有效方法

(57) 摘要

本发明提供了用于生产和纯化高分子量透明质酸(HA)的有效且改进的方法。一个实施方案涉及提供在兽瘟链球菌中生产高分子量HA的生长条件。例如,在包含更低的蛋白浓度(例如,1%酪蛋白水解物)和更高的糖浓度(例如,5%蔗糖)的培养基中生长,产生5-6g/L的高分子量HA,其范围是 $3.5-4.0 \times 10^6$ Da。本发明也提供了纯化HA的有效方法,其包含用硅胶处理、然后用活性炭处理,随后用更小体积的溶剂渗透。



1. 生产透明质酸 (HA) 或它的盐的方法, 该方法包含:
 - (a) 提供能生产 HA 的链球菌细菌;
 - (b) 提供营养培养基来培养细菌, 其中所述营养培养基包含二价锌离子盐、1% 酪蛋白水解物和 5% 选自乳糖和蔗糖的碳源;
 - (c) 在营养培养基中培养细菌; 和
 - (d) 在需氧条件下发酵营养培养基,其中所述透明质酸具有至少 100 万 Da 的分子量。
2. 权利要求 1 的方法, 其中所述发酵是连续的。
3. 权利要求 1 的方法, 其中所述盐是 ZnSO_4 。
4. 权利要求 1 的方法, 其中在 30-40°C 的温度、300-500rpm 的搅拌速率、1-3vvm 的通气和中性 pH, 进行所述发酵步骤至少 15 个小时。
5. 权利要求 1 的方法, 其中所述 HA 具有在约 $3.5 \times 10^6 \text{Da}$ 至 $4.0 \times 10^6 \text{Da}$ 范围内的分子量, 且该方法生产产量为至少 5g 高分子量 HA/ 升营养培养基。
6. 权利要求 5 的方法, 其中发酵 24 小时后, HA 的分子量是至少 $3 \times 10^6 \text{Da}$ 。
7. 权利要求 1 的方法, 其中所述细菌选自: 兽瘟链球菌、马链球菌和酿脓链球菌。
8. 权利要求 7 的方法, 其中所述细菌是兽瘟链球菌。
9. 生产透明质酸 (HA) 或它的盐的方法, 该方法包含:
 - (a) 提供能生产 HA 的链球菌细菌;
 - (b) 提供营养培养基来培养微生物源, 其中所述营养培养基包含二价锌离子盐、1% 酪蛋白水解物和 5% 选自乳糖和蔗糖的碳源;
 - (c) 在营养培养基中培养细菌;
 - (d) 在需氧条件下发酵营养培养基;
 - (e) 稀释和澄清营养培养基;
 - (f) 用溶剂沉淀在稀释的培养基中存在的 HA;
 - (g) 将沉淀的 HA 或它的盐溶于溶液;
 - (h) 将硅胶加入来自步骤 (g) 的 HA 溶液或 HA 盐溶液, 然后去除硅胶;
 - (i) 用活性炭处理来自步骤 (h) 的 HA 溶液或 HA 盐溶液; 和
 - (j) 使用溶剂渗滤来自步骤 (i) 的 HA 溶液或 HA 盐溶液;其中在没有任何去污剂或表面活性剂或福尔马林存在下和在中性 pH 进行该方法; 其中所述 HA 具有至少 100 万 Da 的分子量。
10. 生产透明质酸 (HA) 或它的盐的方法, 该方法包含:
 - (a) 提供能生产 HA 的链球菌细菌;
 - (b) 提供营养培养基来培养细菌, 其中所述营养培养基包含锌、浓度为 10g/L 的酪蛋白水解物和浓度为 50g/L 的选自乳糖和蔗糖的碳源;
 - (c) 在营养培养基中培养细菌; 和
 - (d) 在需氧条件下发酵营养培养基,其中所述透明质酸具有至少 100 万 Da 的分子量。
11. 通过权利要求 1 或 6 的方法生产的透明质酸或它的盐。

用于纯化高分子量透明质酸的有效方法

[0001] 与相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求 2006 年 7 月 6 日提交的印度临时申请号 1065/MUM/2006 和 2006 年 11 月 13 日提交的 1874/MUM/2006 的利益,其内容整体并入本文作为参考。

发明领域

[0003] 本发明涉及改进的用于生产和纯化透明质酸和它的盐的技术。本发明也涉及具有生物医学应用的透明质酸和它的盐的生产和工艺最优化和纯化。

[0004] 发明背景

[0005] 透明质酸 (HA) 是一种在细菌和包括人类在内的高等动物中具有生物功能的天然存在的生物聚合物。天然存在的 HA 可以在高等动物组织中发现,尤其作为胞间隙填充物 (Balazs, Viscosupplementation: a new concept in the treatment of osteoarthritis. J. Rheumatol. Suppl. ;39 :3-9, (Aug. 1993))。它在眼睛玻璃体液和关节滑液中的浓度最高 (O' Regan, M., Martini, I., Crescenzi, F., De Luca, C, 和 Lansing, M., Molecular mechanisms and genetics of hyaluronan biosynthesis. International Journal of Biological Macromolecules 16:283-286 (1994))。在革兰氏阳性的链球菌 (Streptococci) 中,发现它是围绕在细菌周围的粘液样荚膜。

[0006] 透明质酸也称作乙酰透明质酸或透明质酸盐,是一种在结缔组织、上皮组织和神经组织中广泛分布的糖胺聚糖。它是胞外基质的主要组分之一。它主要有助于细胞增殖和迁移,且也可以参与有些恶性肿瘤的进展。乙酰透明质酸天然地存在于许多身体组织中,例如皮肤、软骨和玻璃体液。因此它非常适用于靶向这些组织的生物医学应用。在二十世纪七十年代和八十年代开发了第一种乙酰透明质酸生物医学产品 **Healon®**,并批准用于眼外科手术 (即,角膜移植术、内障外科、青光眼外科手术和修复视网膜剥离的外科手术)。其它生物医学公司也生产用于眼外科手术的乙酰透明质酸品牌。

[0007] 乙酰透明质酸也用于治疗膝盖的骨关节炎。这样的治疗作为向膝关节中的注射过程来施用,且可以用于补充关节液的粘性,从而润滑关节、缓冲关节和产生镇痛作用。乙酰透明质酸也可以对软骨细胞具有积极的生化效应。

[0008] 由于它的高生物相容性和它常存在于组织的胞外基质中,乙酰透明质酸在组织工程研究中作为生物材料支架日益得到普及。在有些癌症中,乙酰透明质酸水平与恶性肿瘤和预后差非常相关。乙酰透明质酸可以用作前列腺癌和乳腺癌的肿瘤标记。它也可以用于监控这些疾病的进展。

[0009] 乙酰透明质酸也可以在手术后用于诱导组织愈合,特别在内障外科后。现有的伤口愈合模型提出,更大的透明质酸聚合物出现在愈合早期,以在物理上为介导免疫应答的白细胞腾出空间。乙酰透明质酸是皮肤护理产品中的常见成分。

[0010] 术语“透明质酸盐”是指透明质酸 (HA) 的共轭碱。因为该分子通常以它的聚阴离子形式存在于体内,所以它最常见地称作“乙酰透明质酸”。HA 包含由通过 β 1-3 和 β 1-4 糖苷键交替连接的葡萄糖醛酸 (GlcUA) 和 N-乙酰葡萄糖胺 (GlcNAc) 组成的线性的、不分支的、

聚阴离子二糖单元,如图 1 所示。HA 是糖胺聚糖家族的成员,该家族包括硫酸软骨素、硫酸皮肤素 (dermatin sulphate) 和硫酸乙酰肝素。不同于该家族的其它成员,它不共价结合蛋白。

[0011] 在中性水溶液中,由于氢键形成,水分子和邻近的羧基和 N-乙酰基赋予聚合物构象刚度,这限制了它的柔性。氢键形成导致聚合物的独特的水结合和保留能力。因而也断定,水结合能力与该分子的分子量直接相关。已知每克 HA 可以结合最高达 6 升水 (Sutherland, Novel and established applications of microbial polysaccharides. Trends Biotechnol 16 :41-46, 1998)。

[0012] 已经广泛研究了透明质酸 (HA) 和它的衍生物在生物医学实践中的应用。该聚合物的生物相容性特征已经引起整形外科的注意,因为它可以用于粘稠物质手术,并允许外科医生在组织之间安全地产生间隙。从 HA 构建粘稠物质手术植入物 (Balazs, Aug 1993, 同前)。HA 的粘弹性特征已经用于补充关节中的润滑。其也已经用于作为微囊的靶向药物递送。最后,因为它的高水保留能力,该 EPS (胞外多糖) 也在盈利的化妆品市场上占有一席之地。在 2003 年, FDA 批准乙酰透明质酸注射剂用于填充软组织缺陷,例如面部皱纹。Restylane®是该产品的常见商品名称。乙酰透明质酸注射剂通过增加皮肤下容积来暂时平滑皱纹,效果通常持续 6 个月。另外, HA 溶液的特征在于粘弹性和假塑性。甚至在该聚合物的非常稀的溶液 (其中形成非常粘稠的凝胶) 中,也发现了这些特征。通过 HA 的浓度和分子量,控制对于它作为生物材料的用途重要的 HA 溶液的粘弹性性质。来自不同来源的 HA 的分子量相差很大,其范围从 10^4 至 10^7 Da。随着它的产生经细胞膜挤出 HA,这允许不受拘束的聚合物延伸,这可以导致产生非常高分子量的 HA。

[0013] 分子量是最影响基于透明质酸的医学设备的物理性质的参数。分子量影响透明质酸溶液的粘度对浓度概况,且在它的其它粘弹性性质中起重要作用。具体地,如果分子量增加,其治疗功效需要给定粘度的溶液要求更低的透明质酸浓度。已经表明,这为眼和整形外科应用提供优点。能产生具有大于 750,000 道尔顿的分子量的医学级透明质酸的方法因而具有显著的商业潜力。在许多医药应用中,不希望在制剂中具有低分子量透明质酸,例如考虑到在美国专利号 4,141,973 中报道的低分子量 HA 的炎性作用。

[0014] 透明质酸用于有些销售得非常好的商业化产品,包括 Synvisc (Genzyme)、Orthovisc (Anika)、Septrafilm (Genzyme)、Restylane (Q-Med)、Healon (Pharmacia)、Amvisc (Med-Chem) 等。但是,由于它的高成本,它仅以非常低的浓度用于这些产品中。HA 具有比其它微生物 EPS 更高的商业价值。估计它的世界市场价值是 5 亿美元,每千克售价约 10 万美元。

[0015] 已经常规地从公鸡冠和牛玻璃体液提取 HA。但是,难以以工业上可行的速率从这些来源分离高分子量 HA,因为它与在动物组织中存在的蛋白聚糖形成复合物 (O' Regan 等人, 1994)。当它在动物组织中合成时,控制生物聚合物的分子量目前是不实际的。此外,动物衍生的生化试剂用于人治疗的用途已经产生了伦理问题,且遇到与日俱增的阻力。除了伦理问题以外,存在与动物衍生的生化试剂用于人治疗的用途有关的潜在传染病危险。在可以从动物组织得到 10MDa 链的条件下,有相当大的提高范围。

[0016] 上面讨论的缺点已经迫使工业上采用细菌发酵方法,希望得到商业上可行的生物聚合物。使用细菌发酵方法, HA 被释放进生长培养基,它辅助控制聚合物特征,并导致提高

的 HA 得率。通过上述途径可以生产的生物聚合物的量在理论上是无限的。但是,细菌发酵的应用确实具有缺点。最近的趋势是使用 Lancefield 氏 A 和 C 组链球菌,它天然地生产 HA 的粘液样荚膜。HA 荚膜是能使该革兰氏阳性细菌避免宿主免疫防御的生物相容性因子,且是它的特征性高毒力水平的原因。

[0017] 使用细菌的提取和纯化方法中的以前的后续提高已经导致 HA 的固有的分子量降低。链球菌发酵已经仅能生产范围为 1-4MDa 的平均分子量的 HA。如上面所讨论的,高分子量是 HA 生物聚合物的希望的性质。本发明提供了得到具有高分子量的 HA 的方法。

[0018] 链球菌是营养上难养的兼性厌氧菌,它生产乳酸作为葡萄糖分解代谢的副产物。因此通过这些细菌回收的能量比需氧细菌更低。使用以前已知的方法从细菌发酵得到的 HA 得率特征性地低 (0.1g/g 葡萄糖,0.15g/lh)。这样的低得率满足市场需求必然是费劲的。另外,发酵的严格营养需求通过禁止化学成分确知培养基用于生产规模发酵来影响经济,并限制可以采用的复杂培养基的选择。

[0019] 几个研究组已经提供了建议的工艺参数最优化,HA 的工艺模式的选择,通过复杂培养基设计来最优化得率,和基于 HA 的发酵控制的模型。Cooney, M. J., Goh, L. T., Lee, P. L., 和 Johns, R. R., Structure model-based analysis and control of the hyaluronic acid fermentation by *Streptococcus zooepidemicus*: Physiological implications of glucose and complex-nitrogen-limited growth, *Biotechnology Progress*, 15:898-910 (1999); Lars M. Blank, Richard L. McLaughlin, Lars K. Nielsen, Stable production of hyaluronic acid in *Streptococcus zooepidemicus* chemostat operated at high dilution rate, *Biotechnology and Bioengineering*, 90(6):685-693 (2005); Johns, M. R., Goh, L.-T., 和 Oeggerli, A., Effect of pH, agitation and aeration on hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus*. *Biotechnology Letters* 16:507-512 (1994); Kitchen, J. R., 和 Cysyk, R. L., Synthesis and release of hyaluronic acid by Swiss 3T3 fibroblasts, *Biochemical Journal*, 309:649-656 (1995); Armstrong D, Johns MR, Culture conditions affect the molecular weight properties of hyaluronic acid produced by *Streptococcus zooepidemicus*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 63:2759-2764 (1997)。

[0020] 随着时间的逝去,HA 分子量已经变成研究人员的主要研究领域。研究人员例如 Armstrong 和 Johns 已经检查了工艺参数的作用,以确定对 HA 的分子量的作用。Armstrong, D. C., 和 Johns, M. R., Effect of Culture Conditions on Molecular Weight of Hyaluronic Acid Produced by *Streptococcus zooepidemicus*, *Applied and Environmental Microbiology*, 63:2759-2764 (1997); Armstrong, D. C., 和 Johns, M. R., Improved molecular weight analysis of streptococcal hyaluronic acid by size exclusion chromatography, *Biotechnology Techniques*, 9:491-496 (1995)。

[0021] 这些研究组已经发现,某些发酵参数影响生产的 HA 的分子量。Armstrong 等人 (1997) 报道,诸如温度、通气和葡萄糖浓度的条件影响 HA 的分子量,而 pH 和搅拌不会。发现低生长温度 (28℃)、培养通气和高起始葡萄糖浓度 (40g/l) 导致兽瘟链球菌 (*S. zooepidemicus*) 生产更高分子量的 HA。以前的研究组也发现,培养 pH 和搅拌不影响 HA 发酵的分子量结果。具体地,Johns 等人 (1994) 以前报道, pH 和搅拌普遍地影响 HA 的生

产,但是不影响分子量。

[0022] 已知的事实是,细菌的比生长速率和 HA 的分子量成反比。该效应可以通过如图 2 所示的 HA 合成的基于资源的代谢模型来解释。以它的最简单的形式,在细菌细胞内发生 2 个竞争过程,即细胞生长和 HA 的生物合成。这 2 个过程竞争有限的资源,例如碳、氮和能量。在低比生长速率,细胞指导更多的葡萄糖-衍生的活化的前体(即 UDP-Glc 和 UDP-GlcNAc)进行 HA 合成而不是细胞壁合成。来自需氧葡萄糖分解代谢的更高的 ATP 得率有利于 UTP 形成,后者是 HA 合成的两种活化的前体(即 UDP-GlcUA 和 UDP-GlcNAc)的形成所必需的。通过厌氧生长下乳酸盐的生产,也耗尽了可以用于合成 HA 的葡萄糖。

[0023] 以前也观察到 HA 生产的比速率($\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$)随着比生长速率的降低而增加。在活化的 HA 合成酶的密度不太可能改变的事实条件下,更高的生产速率可以归因于通过每种合酶的更高的聚合速率。增加的合酶活性可以源自低生长速率导致的更高的细胞内底物浓度。

[0024] 通过合酶在它的寿命中可以聚合的前体的数目,确定生产的 HA 的分子量。基于该理论,合酶的超表达导致合成的 HA 的分子量的降低。实际上,它可以降低平均分子量,因为存在更多的酶竞争相同的资源。为重组大肠杆菌(*E. coli*)中聚羟基丁酸盐合酶的超表达报道了类似的效应(Sim 等人, PHA synthase activity controls the molecular weight and polydispersity of polyhydroxybutyrate in vivo, " Nature Biotech. 15:63-67, 1997)。

[0025] 美国专利号 4,897,349 证实,通过控制生产透明质酸的微生物的代谢可利用的氧,可以得到提高的 HA 总得率。可利用的氧限于刺激希望的透明质酸的不成比例的更大生产。没有研究关于碳源的培养条件。但是,该过程需要修改溶解氧,其通常不导致生产的 HA 的一致得率。

[0026] 欧洲专利 EP 0694616 采用 2.5%浓度的从保藏中心得到的兽瘟链球菌培养物。发酵在 37°C 进行约 24 小时,通过连续自动加入 NaOH,将 pH 维持在 7.00。在接种时加入 33%的葡萄糖,且连续施用剩余的葡萄糖。通过 HPLC 分析测得的该方法的得率低至 0.8g/l,估计的平均分子量是约 500,000Da。

[0027] 日本专利 JP62215397 证实,在搅拌下在培养基中需氧培养能生产透明质酸的微生物,由于向培养基中加入糖几次,培养基中糖的浓度总是保持在 0.1-3w/v%。收集在培养基中积累的透明质酸。优选的糖是葡萄糖或乳糖。通过分离多糖的常规方法,分离在培养混合物中积累的透明质酸。在该专利中呈现的过程是补料分批过程,且不适用于连续分批过程。

[0028] 日本专利 JP62257901 公开了一种生产 HA 的方法,其可以通过在含有碳水化合物的培养基(例如,pH 7.5,含有 0.50%酵母提取物、0.75%蛋白胨、0.02%亚硫酸钠和 1-3%葡萄糖)中培养透明质酸生产细菌来得到。

[0029] 日本专利 JP62289198 提出一种方法,其中将生产透明质酸的微生物菌株例如马链球菌(*Streptococcus equi*)NK-850214 接种进含有浓度为 0.01-1wt%的精氨酸和/或谷氨酸以及蛋白胨、NaCl、痕量维生素等的液体培养基中,培养过程包含以将整个培养过程中碳水化合物浓度恒定保持在 0.1-3w/v%的方式,在 ≥ 3 份剂量中每 1 升培养基加入 $\geq 20\text{g}$ 碳水化合物,例如葡萄糖。

[0030] 在日本专利 JP05276972 中,在含有表面活性剂的培养溶液中培养能生产透明质酸的微生物。在培养溶液中形成和积累透明质酸,并收集。

[0031] 日本专利 JP06038783 提供了一种在工业规模生产透明质酸的方法,其通过在营养培养基中培养属于链球菌属 (*Streptococcus*) 的生产透明质酸的微生物菌株实现。培养基在特定条件下含有特定量的糖组分(作为主要碳源),同时通过通气搅拌培养基。将属于链球菌属且能生产透明质酸的微生物菌株(例如,兽瘟链球菌)接种到含有 $\geq 3\%$ 糖组分作为主要碳源的营养培养基上,且在通气搅拌下在 pH 7 和 33°C 培养 4 天。通过该方法得到的产量是 2.1g/L。

[0032] 日本专利 JP06319579 提出了在含有葡萄糖和果糖作为主要碳源的培养基中生产透明质酸,以在培养混合物中积累高分子量的透明质酸。

[0033] 美国专利号 4,784,990 证实了得到透明质酸钠的方法,其包含在适当条件下在剧烈搅拌下在含有糖组分作为碳源的营养培养基中培养链球菌属的微生物。微生物生产大量高分子量透明质酸,且该专利涉及选择微生物的方法,所述微生物生产增加量的透明质酸,且缺少溶血活性。兽瘟链球菌 HA-116 ATCC 39920 是一种突变株。然后如下回收透明质酸钠:取出微生物和培养基中不溶的其它材料,从培养基沉淀透明质酸钠,例如使用有机溶剂,和回收沉淀。然后粉碎和干燥沉淀。通过这些方法,可以生产特征在于不存在致热性和炎性活性的透明质酸钠组合物。培养基具有基本上恒定的约 6.0 至 7.5 的 pH,且使用包含沉淀、再溶解和再沉淀透明质酸盐的方法,纯化生物分泌进培养基中的透明质酸钠。通过向培养基中加入第一种有机溶剂,例如异丙醇,可以使透明质酸钠从培养基或滤液中沉淀。将沉淀再溶解于 3% 含水乙酸钠,然后用第二种有机溶剂例如乙醇再沉淀。将第二次沉淀再溶解于 3% 含水乙酸钠,且加入活性炭,以形成悬浮液。过滤悬浮液,且加入第三种有机溶剂例如丙酮,以生产透明质酸钠沉淀。第一种、第二种和第三种有机溶剂各自可以是异丙醇、乙醇或丙酮。或者,可以在每个步骤中用相同的有机溶剂沉淀透明质酸盐。例如,在所有 3 个沉淀步骤中,使用异丙醇从培养基沉淀透明质酸钠。该专利中用于医学级 HA 的方法包含使用去污剂例如十六烷基氯化吡啶鎓,多溶剂沉淀步骤,硅酸镁载体 (florisil) 处理等。

[0034] 美国专利号 4,946,780 提供了通过采用表面活性剂例如十六烷基氯化吡啶鎓,从发酵生产 HA 的方法。该方法也包含下述纯化程序,所述纯化程序包含:使含有透明质酸钠的溶液接触氧化铝、活性炭或其混合物,然后接触二氧化硅,以形成纯化的透明质酸钠溶液。该方法然后将醇加入纯化的透明质酸钠溶液,以沉淀纯化的透明质酸钠,并干燥纯化的透明质酸钠。表面活性剂难以从产物去除,且使得需要用无致热原水多次洗涤的步骤。

[0035] 美国专利号 5,563,051 公开了一种方法,其中在发酵过程后,用特别合适的试剂杀死生物物质。用于杀死生物物质的试剂是甲醛,例如,以通常已知为福尔马林的水溶液形式。用含有阴离子表面活性剂即十二烷基硫酸钠的含水介质提取 HA。该专利另外公开了具有通常是 10,000 至 25,000 道尔顿、且优选 20,000 道尔顿的适当分子量截止的超滤膜的应用。用 8-20 体积的纯化水、优选约 10 体积的纯化水渗滤包含溶解的 HA 的过滤的溶液,其中连续抛弃滤液。

[0036] 美国专利号 6,489,467 要求保护从生物源纯化高分子量透明质酸的方法,其包括将含有来自生物源的高分子量透明质酸的水溶液的 pH 调节至 1.7 至 3.3 的 pH 范围的步骤。该方法另外包含使用具有 100,000 道尔顿的标称分子截止至 0.45 μ m 的孔径的滤器,渗滤在

相同 pH 的水溶液, 并从含有来自生物源的高分子量透明质酸的水溶液去除细胞。

[0037] 美国专利号 7, 002, 007 公开了一些方法, 它们包含: 使含有透明质酸盐的来源接触酸, 以产生酸性的透明质酸盐悬浮液, 在有酸性缓冲液存在下, 使该悬浮液接触阴离子交换介质, 且此后使所述介质接触具有更高盐含量的酸性缓冲液, 以从培养基解吸透明质酸盐。

[0038] 以前的生产 HA 的方法通常使用葡萄糖作为碳源。使用这些方法, 得到的 HA 的分子量经常是 2 至 4×10^5 Da, 即相对低的分子量。此外, HA 的固有粘度随着它的分子量的增加而增加。该增加的粘度已经在发酵过程以及 HA 纯化中产生主要障碍。尽管高分子量 HA 可能太大而不能穿透皮肤和血流, 但它具有许多有价值的用途。例如, 在局部用制剂中, 高分子量 HA 可以用于眼外科手术和化妆品。同样, 高分子量 HA 可以用于粘弹性薄膜, 以保留皮肤水分和阻断外来物质。

[0039] 因此, 提供一种生产高分子量 HA 的方法已经成为一项挑战和需要, 所述高分子量 HA 包括满足关于医学应用所述的规定的那些, 例如, 在英国药典 (British Pharmacopoeia) 2003 版中所述的规定。

[0040] 以前的纯化 HA 的方法包含至少 3 个连续的溶剂沉淀步骤, 由此导致增加数目的过程步骤和冷冻干燥机的过载。以前的沉淀发酵液 (fermentation broth) 的方法也包含使用表面活性剂或去污剂, 例如十六烷基氯化吡啶鎓 / 十六烷基三甲基溴化铵。剩余的去污剂或表面活性剂的去除增加所需的处理步骤的数目, 它已经造成复杂性和成本。

[0041] 另外, 以前已知的纯化程序, 例如用于实现高分子量 HA 的渗滤步骤, 包含使用大体积的有机溶剂。这样的溶剂的使用, 造成按比例放大操作中的处理问题, 并导致环境危险。

[0042] 本发明涉及生产和纯化 HA 的方法的改进, 所述 HA 例如高分子量 HA 和它的盐, 包括具有英国药典 2003 版所述的医学应用的那些。本发明提出了用于 HA 的高得率生产的简单且经济上可行的方法, 其通过在合适的培养基中连续发酵细菌, 例如兽瘟链球菌, 以生产高得率的高分子量 HA 实现。本发明的方法优于传统的分批培养, 在后者中, 降解酶可以开始分解链球菌属的细胞壁, 并将细胞内容物释放进发酵液 (fomenter broth) 中, 从而导致 HA 的纯化困难。此外, 本发明也提出了透明质酸的纯化方法, 它包括与活性炭处理相组合的硅胶过滤和随后的使用更少量溶剂的渗滤, 由此产生具有生物医学应用的更好质量的透明质酸。同样, 本发明提供了具有工业应用的透明质酸和它的盐的一种商业上可行的纯化方法。

[0043] 发明目的

[0044] 本发明的目的是, 提供生产透明质酸的方法, 所述透明质酸满足药典中关于医学应用的规定。

[0045] 同样, 本发明的目的是, 提供一种商业上可行的生产透明质酸和它的盐的方法。

[0046] 本发明的目的是, 提供由兽瘟链球菌生产的医学级高分子量透明质酸。

[0047] 本发明的目的是, 提供一种高分子量透明质酸, 在 HA 的生产过程中不使用表面活性剂或去污剂。

[0048] 本发明的目的是, 最优化各种条件对本发明下的 HA 的分子量的作用, 例如碳源、金属离子和培养基组成。

[0049] 本发明的目的是,提供透明质酸的纯化方法,产生具有生物医学应用的更好质量的透明质酸。

[0050] 本发明的目的是,提供通过采用硅胶纯化和碳处理两个步骤,从透明质酸去除蛋白杂质的有效方法。

[0051] 本发明的目的是,提供在透明质酸的纯化中使用更少量的溶剂的有效的渗滤方法。

[0052] 本发明的目的是,提供一种医学级高分子量透明质酸。

[0053] 本发明的目的是,提供一种不使用表面活性剂或去污剂的方法。

[0054] 本发明的目的是,提供用于纯化透明质酸的单个循环过程。

[0055] 本发明的目的是,提供一种方法,其包含最小量的溶剂。

[0056] 本发明的目的是,采用硅胶和活性炭处理,去除至少 90% 的蛋白杂质。

[0057] 本发明的目的是,提供一种导致高分子量 HA 的用于恒定体积渗滤的方法。

[0058] 本发明的目的也是,提供按照英国药典 2003 版的规定的 HA。

发明内容

[0059] 本发明提供了节省成本的生产高分子量透明质酸和它的盐的方法。本发明会产生不含有表面活性剂或去污剂的具有生物医学应用的更好质量的透明质酸。

[0060] 本发明包含下述生产医学级透明质酸的步骤。

[0061] a) 通过发酵制备 HA,

[0062] b) 去除蛋白杂质,

[0063] c) 渗滤。

[0064] 在一个实施方案中,本发明使用发酵技术,来使用细菌生产高分子量透明质酸。在一个实施方案中,所述细菌是兽瘟链球菌。

[0065] 在另一个实施方案中,本发明使用碳源、金属离子和培养基组成,其最优化高分子量 HA 的生产。

[0066] 在一个实施方案中,如下制备 HA:在合适的培养基中起始培养微生物兽瘟链球菌,随后在约 300-500rpm 搅拌和 1-3vvm(体积 / 体积 / 分钟 (vol/vol/min)) 通气下,通过将 pH 维持在中性范围,在 1-10 升发酵罐中在约 30-40℃ 将发酵液发酵约 15-28 小时。(通气速率 vvm = 每分钟每单位液体体积的气流体积 (体积 / 体积 / 分钟))。温育后,适当地用水稀释发酵液,并澄清。用等体积的合适的溶剂 (包括但不限于异丙醇) 再沉淀在澄清的发酵液中存在的 HA。然后将沉淀的高分子量 HA 转化成它的盐,其中它可以然后溶解,用于后续纯化程序。在一个实施方案中,通过加入 3% 乙酸钠和均化至完全溶解,将 HA 转化成它的钠盐。

[0067] 在一个实施方案中,本发明提供了最优化 HA 的产量和分子量的培养条件。已经发现,HA 的生产是生长相关的现象。通过控制培养条件,人们可以生产高分子量 HA。例如,生产的 HA 的分子量随着细菌生长而增加。在发酵过程开始时,更低的分子量群体 (~ 5000Da) 是总 HA 的约 60%。在发酵 22 小时结束时,约 70% 的总 HA 具有高分子量 (> 800KDa) (图 4)。

[0068] 另外,在 HA 的发酵过程中人们可以使用不同的金属。已知金属离子增强各种细菌

的荚膜生产。测试了在发酵 24 小时结束时 0.025%（终浓度）的 CuSO_4 、 MnSO_4 和 ZnSO_4 对 HA 的得率的作用。尽管在对照（没有加入金属）和用 CuSO_4 或 MnSO_4 处理的瓶之间没有显著差异，但发现在用 ZnSO_4 处理过的培养基中的总 HA 的相当大部分（60%）是在更高的分子量区域（ $> 800\text{kDa}$ ）（图 5）。

[0069] 同样，可以改变培养基中的碳源即糖。测试了在含有各种类型的糖的培养基中的生长和 HA 生产。培养基中的不同糖影响生产过程中 HA 的分子量。尽管在大多数糖（2% 终浓度）中的生长相当恒定，但乳糖和蔗糖给出比葡萄糖更好的高分子量 HA（ $> 800\text{kDa}$ ）得率，所述葡萄糖产生更低分子量的 HA（图 6）。与葡萄糖相比，使用蔗糖得到的 HA 的得率高至少 10- 倍，且发现 HA 的分子量高得多。如图 6 所示，通过本发明使用蔗糖得到的 HA 的分子量大于 $8 \times 10^5\text{Da}$ （即， 800kDa ），而在葡萄糖培养基中，发现分子量是 2 至 $4 \times 10^5\text{Da}$ （即， $200\text{--}400\text{kDa}$ ）。

[0070] 检查了培养基对高分子 HA 的生产的作用。在一个实验中，改变培养基中的糖和酪蛋白水解物酶含量。在该实验中，糖提供必需的能量，且酪蛋白酶水解物提供必需的氮源。图 7 显示了当培养基中的糖浓度从 2% 增加至 5% 且当酪蛋白水解物酶浓度从 2.5% 降低至 1% 时的结果。这些参数使 HA 产量增加了 5-6g/L（图 7）。图 7 中的“糖”是指蔗糖；“生物质”是指细胞密度，它反映微生物的生长。当糖浓度更低（2%）且酪蛋白酶水解物浓度更高（2.5%）时，或当仅糖浓度升高至 5% 时（数据未显示）时，产量更低。

[0071] 在一个实施方案中，如下制备 HA：在合适的培养基中起始培养微生物兽瘟链球菌，随后在约 300-500rpm 搅拌和 1-3vvm 通气下，通过将 pH 维持在中性范围，在 1-10 升发酵罐中在约 30-40°C 将发酵液发酵约 15-28 小时。

[0072] 在一个实施方案中，本发明提供了一种从透明质酸去除蛋白杂质的有效方法。本发明采用硅胶过滤和活性炭处理，用于有效地去除蛋白杂质。

[0073] 在一个实施方案中，本发明提供了一种通过渗滤纯化透明质酸的有效方法。本发明在该方法中采用更少量的溶剂。

[0074] 温育后，适当地用水稀释发酵液，并澄清。用等体积的合适的溶剂，包括但不限于异丙醇，再沉淀在澄清的发酵液中存在的 HA。

[0075] 然后将沉淀的高分子量 HA 转化成它的盐，其中它可以然后溶解，用于后续纯化程序。本发明通过加入 3% 乙酸钠和均化至完全溶解，将 HA 转化成它的钠盐。

[0076] 本发明也提供了一种从透明质酸去除蛋白杂质的有效纯化方法。该方法采用硅胶过滤和活性炭处理，用于有效地去除蛋白杂质。使用硅胶的初步处理会去除约 68-70% 的蛋白。离心去除硅胶后，用活性炭处理高分子量 HA，这去除 85-90% 的蛋白。在一个实施方案中，该方法包含使二氧化硅处理过的样品穿过浸渍在纤维素筒上的碳。

[0077] 在一个实施方案中，通过渗滤进一步纯化去除蛋白杂质后得到的溶液。本发明在该方法中采用更少量的溶剂。例如，在一个实施方案中，所述渗滤步骤包含，用溶剂（即无致热原水）稀释 HA 溶液，且该稀释仅进行 5 次，不同于美国专利号 6,489,467 (Carlino 等人 (2002), Process for purifying high molecular weight hyaluronic acid) 中所述的 10 次，从而显著减小处理体积。可以使用连续方式的渗滤，它包含用无菌的、无致热原的水稀释，例如 5 次。在一个实施方案中，该过程还包含，通过经 $0.22\mu\text{m}$ 孔过滤器的过滤，分离无菌的、纯化的透明质酸。在另一个实施方案中，通过无菌过滤，可以得到用于生物医学目

的透明质酸钠产物。

[0078] 任选地,可以用异丙醇再沉淀透明质酸钠,以产生纯化的高分子量 HA。可以冻干得到的 HA,直到水分含量小于 5%。

[0079] 总之,本发明提供了一种改进的 HA 纯化方法,其不采用酸性 pH 条件,且不使用任何去污剂和表面活性剂。蛋白杂质的去除步骤不使用任何有害的化学试剂,例如福尔马林。另外,所述纯化方法采用更少的溶剂稀释,且因此减少了冷冻干燥机的负载。

[0080] 附图简述

[0081] 下述附图构成本说明书的部分,且包括进来用于进一步证实本发明公开内容的某些方面。因而,参考这些附图中的一幅或多幅以及本文所述实施方案的详述,可以更好地理解本发明。

[0082] 图 1 :显示了包含 GlcUA 和 GlcNAc 的 HA 的二糖重复单元。

[0083] 图 2 :显示了链球菌中的 HA 生物合成途径。

[0084] 图 3 :说明了制备医学级高分子量透明质酸的方法的流程图。

[0085] 图 4. 在兽瘟链球菌生长过程中各种分子量的 HA 的分布。

[0086] 图 5. 金属离子对各种分子量的 HA 群体的作用。

[0087] 图 6. 来自含有不同碳源的培养基的 HA 的 HPLC 概况。培养基补加了终浓度为 2% 的葡萄糖、蔗糖、乳糖或果糖。

[0088] 图 7. 提高的 HA 产量的培养基最优化。起始蔗糖含量是 5%,且酪蛋白水解物的浓度是 1.0%。“%”对应着 g/100ml 培养基;“糖”是指蔗糖;且“生物质”是反映微生物的生长的细胞密度。酪蛋白水解物酶用作细菌生长过程中的氮源。

[0089] 发明详述

[0090] 本发明提供了从细菌发酵液得到医学级高分子量 HA 的高得率的方法。本发明也提供了一种节省成本的纯化 HA 的方法。

[0091] 定义:

[0092] 本文使用的术语“透明质酸”或“HA”是指从任意生物来源得到的透明质酸。

[0093] 本文使用的术语“透明质酸盐”是指 HA 的任意盐形式,例如 HA 的钠盐。

[0094] 本文使用的术语“高分子量”是指具有至少 1000KDa(100 万 Da) 分子量的 HA 或 HA 的盐。

[0095] 术语“硅胶”是指多孔的、颗粒状的二氧化硅,其从具有不同孔隙率的硅酸钠合成地生产,且保留可利用的最高容量吸附剂。一个实例是 Ineos 销售的硅胶。

[0096] 术语“活性炭”是指具有特别高的表面积的材料。仅 1 克活性炭就具有约 500m² 的表面积,通常通过氮气吸附来测定,且包括大量微孔。一个实例由 Millipore(Millistak+, Activated Carbon minicapsuleM40AC23HH3) 销售。

[0097] 术语“渗滤”是指一种交叉流过滤方法,其允许低分子量种类、水和 / 或溶剂穿过膜转移,而不改变溶液体积。该方法用于纯化保留的大分子量种类、增加低分子量种类的回收、缓冲液更换和简单改变给定溶液的性质。它可以通过例如 Sartocn slice cassette mod. No. 3051465001E-SG, 50kDa MWC0 来实现。

[0098] 术语“中性 pH”是指 pH 是 7.0。

[0099] 在一个实施方案中,微生物源是能生产高分子量透明质酸的链球菌属物种。例如,

所述微生物源可以选自兽瘟链球菌、马链球菌和酿脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*)。

[0100] 本文使用的术语“溶剂”是指任意有机或无机溶剂。在一个实施方案中,所述溶剂是异丙醇。

[0101] 如前面所指出的,HA 的生产是生长有关的现象,且与生长负相关。在本发明的一个实施方案中,选择平衡这 2 个过程的培养和发酵参数。

[0102] HA 的分子量随着培养时间过去而增加,在生长期中早期检测到更小的链,然后在生长的后面部分过程中检测到高分子量 HA。以前的研究,例如 Armstrong 和 Johns 的研究,已经表明当在细菌中生产 HA 时,温度、pH 和搅拌速率急剧影响 HA 的分子量。当将结果与 Armstrong 等人 (Armstrong 和 Johns, 1997) 进行的研究和其它常规方法的结果相对比时,其它研究人员发现,培养 pH 和搅拌速率在生产过程中不急影响 HA 的分子量。

[0103] 在本发明中,使用更低的温度和通气,以及其它参数,可以提高 HA 生产的得率,并增加生产的 HA 的分子量。

[0104] 以前的研究发现,起始葡萄糖浓度对 HA 的分子量有深远影响。一个研究组 Armstrong 和 Johns 提供了一种解释,即当激活的糖单体 UDP-GlcUA 和 UDP-GlcNAc 在高浓度存在时,HA 链持续延伸。外部葡萄糖浓度可能已经与这些单体的内部浓度相关联,因为它们源自葡萄糖,且它们的合成需要相当大量能量消耗 (Armstrong 和 Johns, 1997)。

[0105] 但是,在本发明中,发明人已经发现,就高分子量 HA 的生产而言,蔗糖和乳糖是比葡萄糖更好的碳源。因为蔗糖和乳糖是二糖,所以它们可以用作比葡萄糖更好的能量来源。本发明在一个实施方案中进一步提供,在更高浓度的蔗糖或乳糖和在更低浓度的蛋白(例如酪蛋白水解物)上生长,生成 5-6g/L 的高分子量 HA。发现 HA 的分子量在 $3.5-4.0 \times 10^6$ Da 范围内。

[0106] 还已经研究了各种金属离子对生产的 HA 的分子量的作用。在培养基中存在的金属离子是细菌的氧化应激的原因,由此在该过程期间释放出自由基,后者可以具有杀细菌作用。为了躲避,几种细菌、特别有些假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 物种生产 EPSs(胞外多糖),例如藻酸盐等,其辅助细菌侵入宿主并从而存活。Keith LMW, Bender CL. AlgT(ξ^{22}) Controls Alginate Production and Tolerance to Environmental Stress in *Pseudomonas syringae*, *J. Bacteriol.* 181:7176-7184(1999)。

[0107] 至少一个组已经暗示,链球菌和哺乳动物透明质酸盐合酶比其它金属离子更偏好镁离子用于生产高分子量 HA (Yamada 和 Kawasaki, *Microbial synthesis of hyaluronan and chitin: new approaches. J. Biosci. Bioeng.* 99:521-528, 2005)。Yamada T 和 Kawasaki, 2005 提供了用镁离子刺激的另一种新的生产 HA 的小球藻病毒系统,其生产约 0.5-1g/L 的 HA。在本发明中,金属离子例如 Cu 和 Mn 不诱导高分子量 HA 的生产,尽管含有 Zn 的培养基中的相当大群体的 HA 是在高分子量范围内。

[0108] 总之,本发明已经最优化了培养条件,其已经导致提高的高分子量 HA 产量,例如 5-6g HA/L。在一个实施方案中,降低培养基中的酪蛋白水解物酶,且增加培养基中的糖浓度。这些条件导致更低的生长速率。因为 HA 的生产与生长成负比,所以获得 HA 产量的增加。在一个实施方案中,发酵 24 小时后,通过本发明得到的 HA 的分子量是约 3.5×10^6 至 3.9×10^6 Da。

[0109] 在本发明的一个实施方案中,提供了生产具有至少 100 万 Da 分子量的高分子量透

明质酸 (HA) 或它的盐的方法, 该方法包含 : (a) 提供能生产 HA 的细菌 ; (b) 提供包含二价金属离子盐 (例如 MgSO_4 、 CuSO_4 、 MnSO_4 和 ZnSO_4)、酪蛋白水解物和碳源 (例如乳糖或蔗糖) 的营养培养基 ; (c) 在营养培养基中培养细菌 ; 和 (d) 在需氧条件下发酵、例如连续发酵营养培养基。能生产 HA 的细菌包括选自兽痘链球菌、马链球菌和酿脓链球菌的那些。

[0110] 在另一个实施方案中, 营养培养基包含 1% 酪蛋白水解物和 / 或 5% 乳糖或蔗糖。在另一个实施方案中, 营养培养基包含锌, 例如以 ZnSO_4 形式, 浓度为 10g/L 的酪蛋白水解物, 和浓度为 50g/L 的选自乳糖和蔗糖的碳源。在另一个实施方案中, 在 30-40°C 的温度、300-500rpm 的搅拌速率、1-3vvm 的通气 and 中性 pH, 进行所述发酵步骤至少 15 个小时。

[0111] 在另一个实施方案中, 该方法生产分子量在约 $3.5 \times 10^6 \text{Da}$ 至 $4.0 \times 10^6 \text{Da}$ 范围内的 HA 或它的盐。在一个实施方案中, 该方法产生至少 5g 高分子量 HA/ 升营养培养基。在一个实施方案中, 发酵 24 小时后, HA 的分子量是至少 $3 \times 10^6 \text{Da}$ 。

[0112] 本发明也提供了从生产的 HA 去除蛋白杂质的方法, 其包含硅胶处理、然后活性炭处理两步。后续的渗滤步骤也帮助确保高度纯化的 HA 的盐。然后可以无菌过滤这样得到的产物, 用于生物医学应用。

[0113] 以前已知的纯化方法使用去污剂或表面活性剂 (例如十六烷基氯化吡啶鎓 / 十六烷基三甲基溴化铵) 沉淀 HA。但是, 这需要多个步骤来去除残余的去污剂或表面活性剂。本发明提供了一种有效的 HA 纯化方法, 它不采用去污剂或表面活性剂。

[0114] 以前已知的使用渗滤技术纯化 HA 的方法已经包含用溶剂大量稀释, 例如稀释 10 次。参见美国专利号 6, 489, 467 (Carlino, 等人, Process for purifying high molecular weight hyaluronic acid (2002))。大体积溶剂的应用在更大规模的操作中产生问题, 例如更大的处理容器和更长的时间来完成过程, 和当然更高的生产成本。本发明通过使用更少的稀释, 避免了这种问题。

[0115] 在一个实施方案中, 从细菌发酵液纯化透明质酸 (HA) 或它的盐的方法包含 : (a) 稀释和澄清发酵液 ; (b) 用等体积的溶剂, 例如异丙醇、乙醇或丙酮, 沉淀在发酵液中存在的 HA ; (c) 将沉淀的 HA 或它的盐溶于溶液, 例如 3% 乙酸钠 ; (d) 将硅胶加入来自步骤 (c) 的 HA 溶液或 HA 盐溶液, 然后去除硅胶, 例如通过离心 ; (e) 用活性炭处理来自步骤 (d) 的 HA 溶液或 HA 盐溶液 ; 和 (f) 使用溶剂, 例如约 5 体积的无菌无致热原水, 渗滤来自步骤 (e) 的 HA 溶液或 HA 盐溶液 ; 其中在没有任何去污剂或表面活性剂或福尔马林存在下和在中性 pH 进行该过程。

[0116] 在另一个实施方案中, 该方法另外包含 : 将在步骤 (b) 中沉淀的 HA 转化成它的盐, 然后在步骤 (c) 的溶液中均化 HA 盐。在另一个实施方案中, 在步骤 (e) 中将活性炭浸渍在纤维素筒上。在另一个实施方案中, 该方法另外包含, 通过无菌过滤器过滤, 分离无菌的、纯化的 HA 或它的盐 ; 和 / 或冻干 HA 或它的盐, 直到水分含量小于 5%。

[0117] 包括下面的实施例用于证实本发明的优选实施方案。本领域技术人员应明白, 在下面的实施例中公开的技术代表发明人发现的在本发明的实践中较好发挥作用的技术, 且因而可以视作构成它的实践的优选模式。但是, 本领域技术人员根据本发明的公开内容应明白, 在不背离本发明的精神和范围的情况下, 在公开的特定实施方案中可以作出许多改变, 且仍然得到相似或类似的结果。

[0118] 实施例 1 : 细菌菌株和培养基。从美国典型培养物保藏中心得到马链球菌兽痘亚

种 ATCC 39920。在脑心浸液琼脂或胰酪胨培养液上维持细菌。

[0119] 实施例 2 :HA 的估计

[0120] 用等体积的异丙醇沉淀并再溶解于 3% 乙酸钠溶液后,通过味唑测定 (Bitter, T., 和 Muir, M., A modified uronic acid carbazole reaction. Anal Biochem 4 :330-334, 1962) 常规地估计发酵液中的 HA。

[0121] 实施例 3 :培养基最优化

[0122] 对于培养基最优化实验,在由 2.5% 酪蛋白水解物酶、1% 酵母提取物、0.2% K_2HPO_4 、0.15% NaCl、0.04% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 和 2% 碳源 (蔗糖) 组成的培养基中培养兽瘟链球菌。在 37°C、在 200rpm 在锥形瓶中培养生物 24 小时。为了评价金属离子对 HA 生产的作用,在 0.025% 的终浓度,将过滤除菌的 $CuSO_4$ 、 $ZnSO_4$ 和 $MnSO_4$ 溶液加入培养基。参见图 5。

[0123] 实施例 4 :分子量测定

[0124] 使用串联连接的 Shodex OH-Pak SB805-804HQ 柱,通过大小排阻层析在 HPLC 上测定 HA 的分子量。使用的流动相是 1M $NaNO_3$,流速为 1ml/ 分钟,且使用 RI 检测器检测峰。用不同分子量的支链淀粉标准校正柱。

[0125] 实施例 5 :蛋白杂质的去除

[0126] 硅胶处理

[0127] 用 2% 终浓度的用于吸附蛋白的硅胶,以分批模式处理部分均化的悬浮液 100ml。该步骤去除 68-70% 的蛋白。通过在 12,000rpm、在 4°C 离心 20 分钟,从透明质酸钠溶液分离硅胶。

[0128] 活性炭处理

[0129] 用炭吸附的 0.45 μ 过滤器集合 (Millipore, Millistak+, Activated Carbon minicapsule M40AC23HH3),进一步处理高分子量透明质酸溶液。流速是 14ml/ 分钟。该步骤去除 85-90% 的剩余蛋白。

[0130] 实施例 6 :纯化

[0131] 连续模式渗滤

[0132] 使用连续模式渗滤方法,进一步纯化穿过碳过滤器的流通物 (flowthrough)。将稀释的 HA 溶液泵入 (流速 15ml-20ml/ 分钟) 配有 50kDa 截止聚醚砜盒 (Sartocon slice cassette mod. No. 3051465001E-SG) 的交叉流过滤器架。在开始将水性发酵液供给过滤器时,关闭渗透阀,以再循环水性发酵液几次,直到系统稳定且在渗余物 (retentate) 中看不到气泡。10 分钟后打开渗透阀,且在进料储器中再循环水性发酵液另外 10 分钟,以确保没有透过渗透阀的跨膜 HA 泄漏。15 分钟后,分别收集渗透物和渗余物。在含有 HA 溶液的储器中,连续加入 5 个等价体积的无菌的、无致热原的蒸馏水。以与滤液的流出速率相同的流速,向 HA 溶液加入水。交叉流过滤器架的入口压力维持在约 0.5-1.5 巴 (bar)。渗余物用于进一步回收透明质酸,且抛弃渗透物。基本上,渗透物不含有 HA。将渗余物浓缩至原始体积,并分析纯度。渗滤步骤去除 80-85% 的剩余蛋白。

[0133] 无菌过滤

[0134] 最后对来自渗滤过程的浓缩的透明质酸溶液进行 0.22 μ m 无菌过滤 (Millipore stericup :SCGPU02RE, PVDF 过滤器材料),这产生合格用于生物医学应用的产物。冻干这样形成的产物,以得到医学级高分子量透明质酸钠。

[0135] 实施例 7 :最优化的制备和纯化 HA 的参数

[0136] 在由 1% 酵母提取物、1% 酪蛋白水解物酶、0.2% K_2HPO_4 、0.15% NaCl、0.04% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 和 5% 蔗糖组成的培养基中,培养兽瘟链球菌 ATCC 39920。在 1vvm 通气、400rpm、37℃,在 1L 培养基中培养生物 24 小时。通过连续加入 NaOH 水溶液,将培养基的 pH 维持在 7.0。温育后,用 1 体积的水稀释发酵液,并通过在 10,000rpm、4℃ 离心 20 分钟进行澄清。用等体积的异丙醇沉淀在澄清的发酵液中的 HA。使用机械匀浆器 (Kinematica-A. G., polytron P T 2100) 在 15000rpm,将通过在 10,000rpm、4℃ 离心 20 分钟分离的沉淀悬浮于 1L 3% 乙酸钠中 10 分钟,重复 3 个循环。用 2% 终浓度的用于吸附蛋白的硅胶,处理均化的溶液。该步骤去除 85% 的蛋白。通过在 12,000rpm、在 4℃ 离心 20 分钟,从透明质酸钠溶液分离硅胶。用碳吸附的 0.45u 过滤器集合 (Millipore, Millistak+, Activated Carbon minicapsule M40AC23HH3),进一步处理高分子量透明质酸溶液。流速是 14ml/ 分钟。该步骤去除 60% 的剩余蛋白。

[0137] 使用连续模式渗滤方法,进一步纯化来自碳过滤器的流通物。将稀释的 HA 溶液泵入 (流速 15ml-20ml/ 分钟) 配有 50kDa 截止聚醚砜盒 (Sartocon slice cassette mod. No. 3051465001E-SG) 的交叉流过滤器架。在开始将水性发酵液供给过滤器时,关闭渗透阀,以再循环水性发酵液几次,直到系统稳定且在渗余物中看不到气泡。10 分钟后打开渗透阀,且在进料储器中再循环水性发酵液另外 10 分钟,以确保没有透过渗透阀的跨膜 HA 泄漏。15 分钟后,分别收集渗透物和渗余物。在含有 HA 溶液的储器中,连续加入 5 个等价体积的无菌的、无致热原的蒸馏水。以与滤液的流出速率相同的流速,向 HA 溶液加入水。交叉流过滤器架的入口压力维持在约 0.5-1.5 巴。渗余物用于进一步回收透明质酸,且抛弃渗透物。基本上,渗透物不含有 HA。将渗余物浓缩至原始体积,并分析纯度。渗滤步骤去除 70% 的剩余蛋白。

[0138] 最后对来自渗滤过程的浓缩的透明质酸溶液进行 0.22 μm 无菌过滤 (Millipore stericup :SCGPU02RE,PVDF 过滤器材料),这产生合格用于生物医学应用的产物。冻干这样形成的产物,以得到医学级高分子量透明质酸钠,剩余蛋白相对于 HA 的含量是 0.031%,回收率是 51%。

[0139] 实施例 8

[0140] 将实施例 1 的方法按比例放大至 10L。可以再现 HA 的回收率和纯化概况。终产物导致相对于 HA 具有 0.066% 蛋白的产品,且 HA 的回收率是 82%。

[0141] 实施例 9 :相对分析

[0142] 下表是指相对分析 :

[0143]

S. No	用下述纯化的 / 处理的 HA	体积 ml	HA 产量 mg/ml	蛋白 mg/ml	总 HA mg	总蛋白 mg	%蛋白 w. r. t. HA
1	IPA	100	3.376	0.56	337.6	56	14.22
2	硅胶	90	3.22	0.15	289.8	13.5	4.45

3	碳	90	3.114	0.0187	280.26	1.68	0.6
4	渗滤 (5X)	128	1.716	0.0014	219.6	0.179	0.075
5	0.22 μ m 过滤	128	1.96	0.0011	250.88	0.14	0.056

[0144] “IPA”是指异丙醇；“S.No”是指步骤编号。

[0145] 实施例 10：产物规格

[0146] 测试终产物的蛋白、核酸、外观、pH、葡糖醛酸含量、分子量、IR 谱、氯化物含量和水分含量。生产具有 300-350 万道尔顿的分子量的 HA。上述试验和材料规范如英国药典 2003 版所述。下面列出了对比结果：

[0147]

SR. NO	试验	规格	结果
1	溶液外观	溶液澄清；在 600nm 测得的溶液吸光度不大于 0.01	溶液澄清；在 600nm 测得的溶液吸光度是 0.004
2	IR 分光光度法	试验物质的光谱对应透明质酸钠的参照谱	符合
3	pH	在 5.0-8.5 范围内	6.65
4	核酸	在 260nm 的吸光度不超过 0.5	0.033
5	蛋白	不超过 0.3%。如果要用于肠胃外制剂，不超过 0.1%。	0.056%
6	氯化物	0.5%（最高）	符合
7	干燥损失	不超过 20 重量%	18.2%
8	测定	参照干物质计算，不少于 95.0%且不超过 105.0%的透明质酸钠	99.2%

[0148] 分子量测定

[0149] 通过 HPLC，在 Shodex OH Pak SB804-805HQ 柱上通过大小排阻层析测定 HA 的分子量。使用的流动相是 0.1M NaNO₃，流速为 1ml/分钟，使用 RI 检测器。在 24 小时时，分子量是 3.9×10^6 Da。

[0150] 根据本发明公开内容，可以制备和执行本文公开和要求保护的所有组合物和方

法,而无需过度试验。尽管已经按照优选实施方案描述了本发明的组合物和方法,但本领域技术人员将明白,在不脱离本发明的概念、精神和范围的情况下,可以改变所述组合物和/或方法、和本文所述方法的步骤或步骤的次序。更具体地,应当明白,化学上或生理上有关的某些试剂可以替代本文所述的试剂,同时达到相同或类似的结果。认为对本领域技术人员而言显而易见的所有这样的类似的替换和修改都在本发明的精神、范围和概念内。

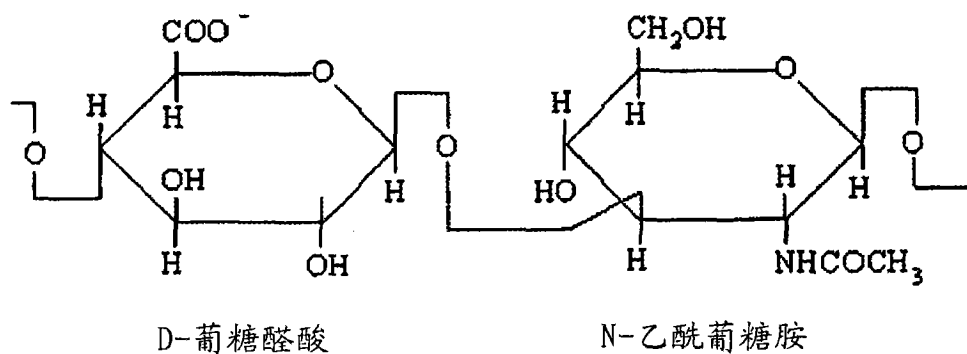


图 1

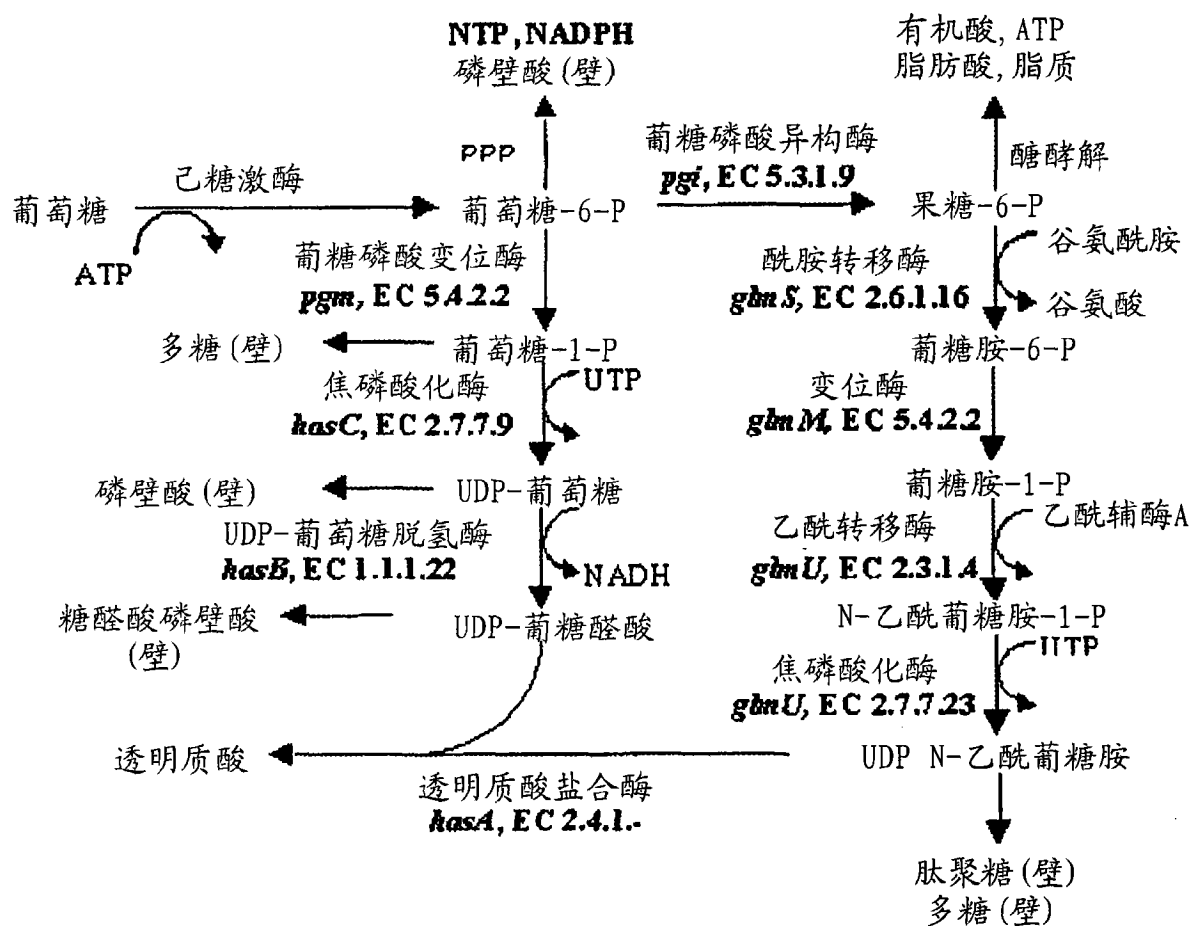


图 2

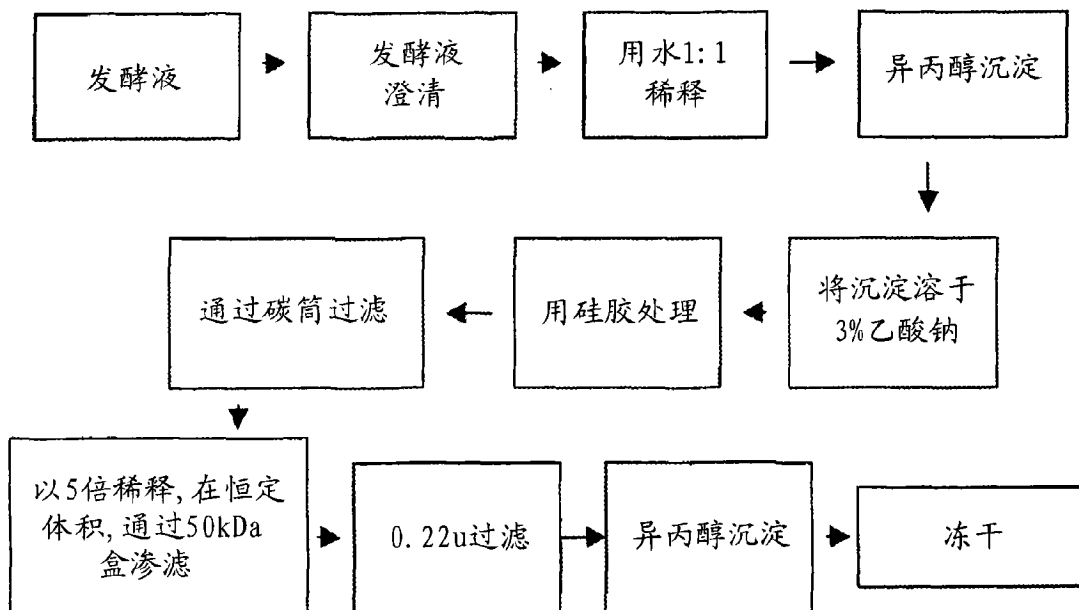


图 3

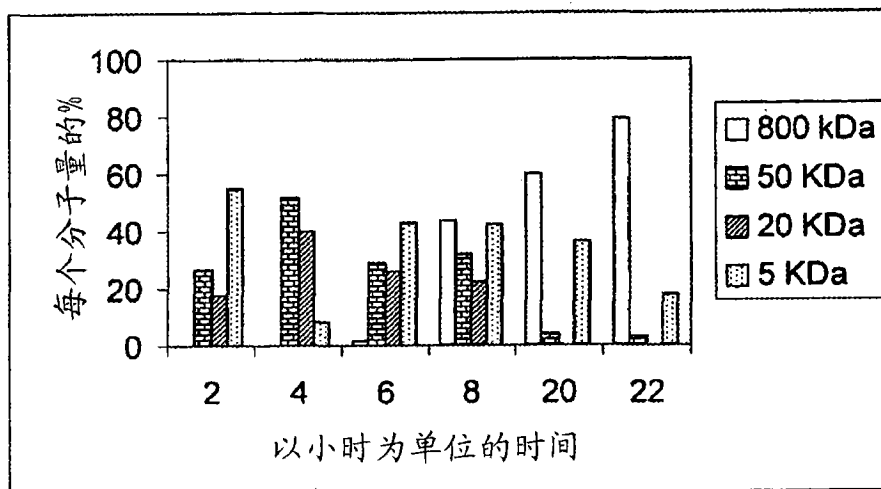


图 4

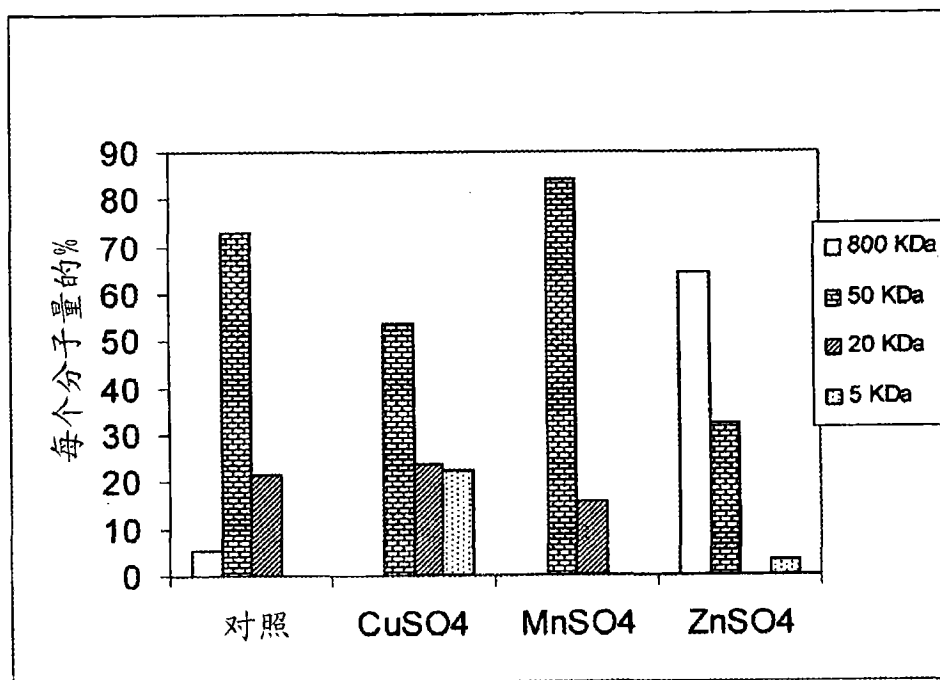


图 5

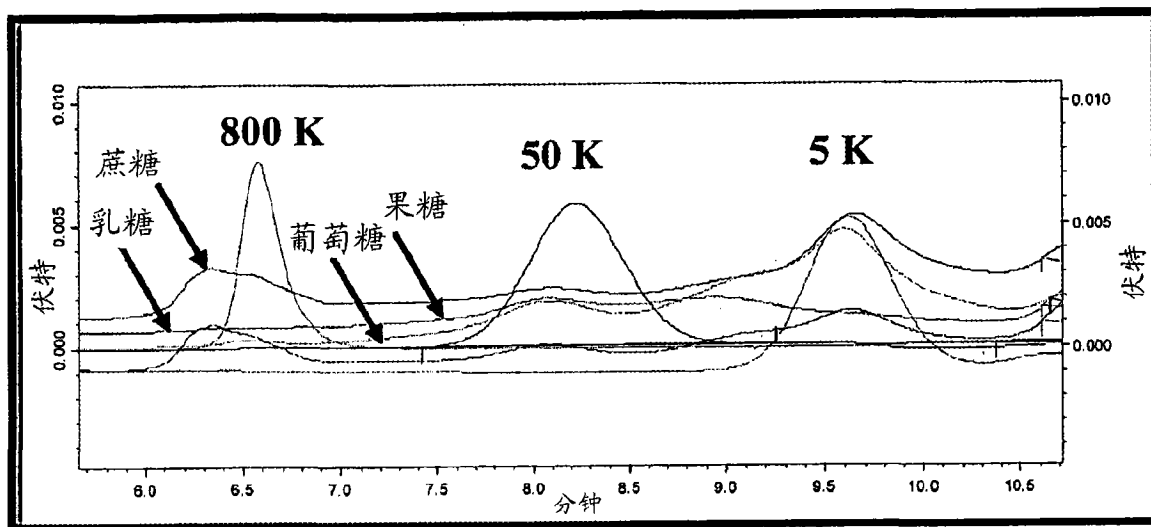


图 6

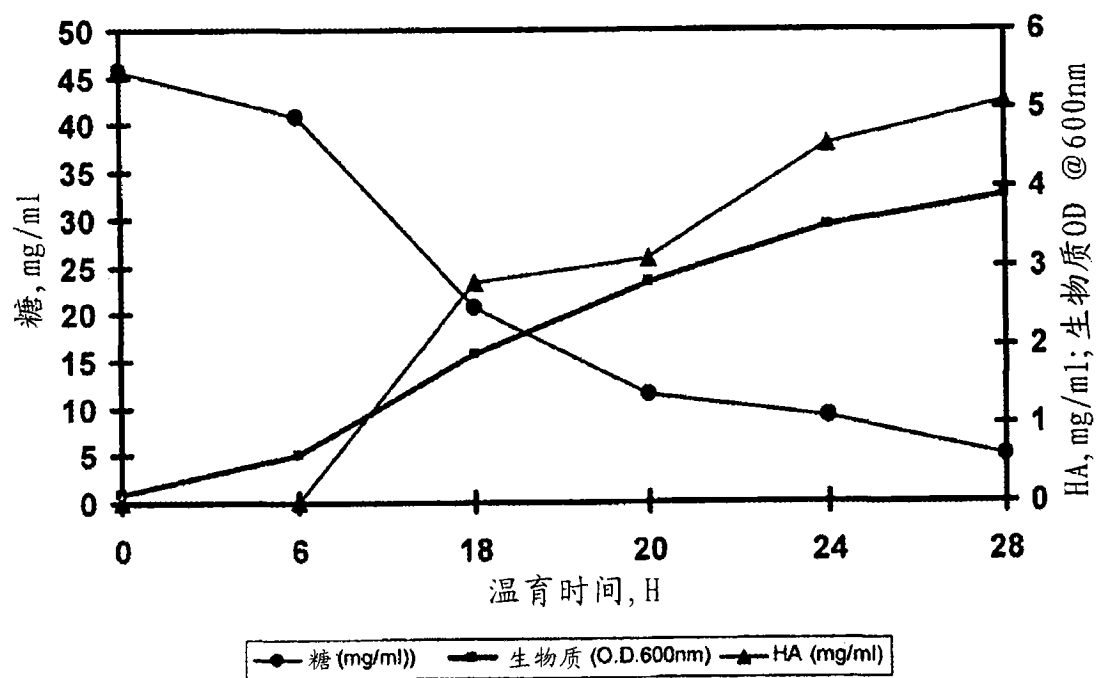


图 7