



(12)发明专利



(10)授权公告号 CN 103347899 B

(45)授权公告日 2016.08.17

(21)申请号 201180056825.X

(22)申请日 2011.11.29

(30)优先权数据

1020191.1 2010.11.29 GB

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2013.05.24

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/GB2011/052358 2011.11.29

(87)PCT国际申请的公布数据

W02012/073019 EN 2012.06.07

(73)专利权人 生物科技药物学会

地址 挪威特罗姆瑟

(72)发明人 罗尔夫·英斯塔德

斯坦因·特勒·索利姆

达戈·埃里克·拉姆塞

(74)专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司

公司 11002

代理人 王朋飞 刘成春

(51)Int.Cl.

C08B 37/00(2006.01)

C08J 3/075(2006.01)

A61K 31/00(2006.01)

(56)对比文件

CN 101878033 A,2010.11.03,

CN 101426510 A,2009.05.06,

CN 101878033 A,2010.11.03,

US 5158772 A,1992.10.27,

US 2004023923 A1,2004.02.05,

CN 101353383 A,2009.01.28,

CN 101394898 A,2009.03.25,

CN 101394898 A,2009.03.25,

李卫旗.热凝胶多糖(Curdlan)生产工艺及其分子结构的研究.《中国优秀博硕士学位论文全文数据库(博士)工程科技I辑》.2004,(第03期),B018-4.

审查员 陈佳佳

权利要求书2页 说明书16页 附图12页

(54)发明名称

葡聚糖凝胶

(57)摘要

本发明涉及葡聚糖、其生产方法、其医疗用途,对其应用了葡聚糖或其上浸渍了葡聚糖的物理支持体,以及皮肤细胞的体外增殖方法,该方法包括使皮肤细胞群与葡聚糖接触,所述葡聚糖具有以单链基础计15,000至50,000g/mol的重均摩尔质量和在水溶液中以聚集体基础计4至20x10⁵g/mol的重均摩尔质量,并且在25℃和中性pH下以浓度≥1%的水溶液凝胶形式存在,并且当所述葡聚糖以2%的浓度溶解于水中时具有35至60℃的熔化温度(凝胶至溶胶)。

1. 一种生产凝胶葡聚糖产品的方法,所述方法包括以下步骤:
 - a)用离解葡聚糖的氢键的剂处理可溶性葡聚糖分子的水溶液;和
 - b)使步骤a)的产物与能够使所述葡聚糖内重新形成氢键的剂接触,其中在步骤a)中,所述葡聚糖衍生自酵母并且以浓度为1-6%的水溶液存在,所述葡聚糖具有以聚集体基础计 $4-20 \times 10^5 \text{g/mol}$ 的重均摩尔质量和以单链基础计15,000-50,000g/mol的重均摩尔质量。
2. 如权利要求1所述的方法,其中所述葡聚糖具有以单链基础计20,000至40,000g/mol的重均摩尔质量。
3. 如权利要求1所述的方法,其中所述凝胶具有40℃的凝胶至溶胶熔化温度。
4. 如权利要求1所述的方法,其中所述葡聚糖以浓度2-4%的水溶液存在。
5. 如权利要求1所述的方法,其中所述葡聚糖以浓度2%的水溶液存在。
6. 如权利要求1所述的方法,其中所述葡聚糖衍生自酿酒酵母。
7. 如权利要求1所述的方法,其中所述葡聚糖是包括 β -(1,3)-连接的葡糖基残基的骨架和包括2个或多个 β -(1,3)-连接的葡糖基残基的侧链的 β 葡聚糖,所述侧链通过 β -(1,6)-键合连接至所述骨架。
8. 如权利要求1所述的方法,其中在所述葡聚糖中小于6%的总葡糖基单元是重复的 β -(1,6)-连接的葡糖基残基。
9. 如权利要求1所述的方法,其中离解所述氢键的所述剂是碱金属盐、氰化钠、氨基钠、尿素或甲酰胺。
10. 如权利要求9所述的方法,其中所述碱金属盐是氢氧化钠。
11. 如权利要求1所述的方法,其中离解所述氢键的所述剂以高于50mM的终浓度使用。
12. 如权利要求11所述的方法,其中离解所述氢键的所述剂以150mM的终浓度使用。
13. 如权利要求1所述的方法,其中离解所述氢键的所述剂是强酸。
14. 如权利要求13所述的方法,其中所述酸是盐酸、甲酸、硫酸、磷酸、乙酸或柠檬酸。
15. 如权利要求1所述的方法,其中步骤b)导致在小于10分钟内凝胶形成。
16. 如权利要求1所述的方法,其中步骤a)和b)的剂以等摩尔量添加。
17. 如权利要求1所述的方法,所述方法之前存在甲醛分解步骤,其中微粒葡聚糖起始材料悬浮于甲酸中以去除 β -(1,6)-连接的葡糖基侧链并增加所述微粒葡聚糖的溶解度。
18. 一种可通过如权利要求1-17任一项所述的方法获得的凝胶葡聚糖产品。
19. 一种药物组合物,包含如权利要求18所述的凝胶葡聚糖产品和一种或多种药学上可接受的稀释剂或载体。
20. 如权利要求18所述的凝胶葡聚糖产品用于制造药物的用途。
21. 如权利要求18所述的凝胶葡聚糖产品用于制造辅助伤口或溃疡愈合或治疗口腔粘膜炎症或癌症的药物的用途。
22. 如权利要求21所述的用途,其中所述辅助或治疗包括将所述凝胶葡聚糖产品局部应用于受试者。
23. 如权利要求21所述的用途,其中所述溃疡是糖尿病溃疡。
24. 一种对其应用了或其中浸渍了如权利要求18所述的凝胶葡聚糖产品的物理支持体。

25.如权利要求24所述的物理支持体,其中所述物理支持体选自由以下组成的组:织造、非织造、编织、泡沫或粘合剂基底;贴片、敷料、贴膏、绷带、膜或纱布。

26.一种体外增殖皮肤细胞的方法,所述方法包括使皮肤细胞群与权利要求18所述的凝胶葡聚糖产品接触。

27.如权利要求18所述的凝胶葡聚糖产品用于制造辅助伤口或溃疡愈合或治疗口腔粘膜炎症或癌症的试剂盒的用途。

28.如权利要求27所述的用途,其中所述辅助或治疗包括将所述凝胶葡聚糖产品局部应用于受试者。

29.如权利要求27所述的用途,其中所述溃疡是糖尿病溃疡。

葡聚糖凝胶

[0001] 本发明涉及一种新的葡聚糖产品,其生产方法,以及其作为药物、加入医疗装置、作为营养品、美容产品等的用途。

[0002] 葡聚糖是在植物、细菌、真菌和原生动物的细胞壁中发现的一组异质的葡萄糖聚合物。葡聚糖具有骨架链,并且在一些情况下具有侧链,侧链根据葡聚糖的来源包括 $\beta(1,3)$ 、 $\beta(1,4)$ 和/或 $\beta(1,6)$ -连接的葡糖基单元。根据来源和分离方法, β -葡聚糖在骨架和侧链中具有不同的分支程度和键合类型。侧链中键合的频率和类型与分子的生物活性高度相关。葡聚糖在其分子量及其链聚集趋势方面高度不同,两者都是这些分子的效力谱的必要特征。大部分真菌和酵母来源的 β -葡聚糖在其天然状态下是不溶于水的,但是可以通过酸水解或者通过衍生化而变得可溶,所述衍生化将外来基团如-磷酸、-硫酸酯、-胺、-羧基甲基等引入分子。

[0003] 在欧洲、亚洲和美国,特别是来自面包酵母(Bakers Yeast)的 β -葡聚糖一直被用作动物饲料添加剂,用于美容产品中,用作人类膳食补充剂,例如在伤口治疗中作为免疫调节剂,以及作为皮肤乳霜制剂中的活性成分。如W002/058711所示,葡聚糖已经被用于治疗癌症。在该上下文中, β -葡聚糖被视为免疫刺激剂,部分地通过诱导定位于癌症的充分调节和部位限制的炎症反应而增加白细胞活性。其在治疗炎性肠病的用途也已经描述于W02009/063221。葡聚糖在伤口治疗中的进一步应用描述于EP815144和US6875754,以及用于治疗哮喘和过敏症的用途描述于US12/528,215。

[0004] 谷物葡聚糖一般包括 $\beta(1,3)$ 的未分支链和显著比例的 $\beta(1,4)$ 键合,而酵母葡聚糖主要由 $\beta(1,3)$ 连接的葡糖基残基与用作可以包括 $\beta(1,3)$ 和 $\beta(1,6)$ 连接的葡糖基残基的侧链分支点的 $\beta(1,6)$ 键合构成。被分类为葡聚糖的其他分子包括凝胶多糖(curdlan),一种由 $\beta(1,3)$ 连接的葡糖基残基构成而没有分支的基本上线性的分子。香菇多糖是具有 $\beta(1,3)$ 连接的骨架但加入了单个 $\beta(1,6)$ 连接的葡糖基残基的葡聚糖, $\beta(1,6)$ 连接的葡糖基残基与骨架基本上规律地连接产生该分子的发梳结构。与骨架连接的单个 $\beta(1,6)$ 连接的葡糖基残基等同于 $\beta(1,3,6)$ 键合点,但是没有其他分子与该键合点连接,因此如香菇多糖的葡聚糖没有侧链。该组葡聚糖的其他实例有硬葡聚糖、昆布多糖和裂褶菌素。

[0005] 侧链结构的分支和长度的变化导致形成对比的二级和三级结构和由此的生物活性。葡聚糖的高级结构显著变化,并且分子量、溶解度和粒度都将以一般不可预测的方式影响活性。一些产品是靶细胞中炎性细胞因子的非常有效的诱导剂,而其他产品具有相反作用,完全抑制细胞因子释放。对于许多不溶性 β -葡聚糖产品典型的是整个范围炎症反应的诱导,其中例如,不溶性 β -葡聚糖制剂的注射伴随肉芽肿形成、关节炎诱导和针对革兰氏阴性败血症增加的易感性。另一方面,未报道可溶性 β -葡聚糖受这种不良副作用的妨碍,但是已知其作为免疫刺激剂的效力明显变化。

[0006] 例如,已经显示(W095/30022),已经被葡聚糖酶处理修饰以选择性去除 $(1,6)$ 连接的侧链的衍生自酵母的葡聚糖产品在刺激鱼的免疫系统方面比具有完整 $(1,6)$ 连接的侧链的产品更有效。

[0007] 葡聚糖具有极大的作为治疗剂和佐剂的潜力,但是许多结构可变性、此类大且复

杂分子的分析问题以及缺乏对这些分子作用机制和受体的了解,意味着依然存在对具有定制生物活性的改良的葡聚糖产品和生产同类产品的可控且可重复方法的巨大需求。

[0008] 已知 β -葡聚糖是所谓的病原体相关的分子模式,因为它们存在于许多致病(微)生物、特别是真菌的表面。因此,高等生物体具有用于识别这些类型结构的进化机制以发现并摧毁属于这类生物体的入侵者。在哺乳动物中,所谓的先天免疫细胞表达识别 β -葡聚糖的特异性受体,并且最重要的受体之一被称为Dectin-1。其他受体也参与 β -葡聚糖诱导的识别或信号转导,这些中有CD11b/CD18(CR3)和toll受体2和4(TLR2和TLR4)。参与识别 β -葡聚糖的细胞有先天免疫系统的典型吞噬细胞,即,单核细胞、巨噬细胞、树突细胞和粒细胞,而且天然杀伤细胞以及许多内皮细胞和其他更加组织特异性的细胞具有表达 β -葡聚糖受体的能力。

[0009] 在靶细胞中诱导生物反应的关键步骤是与受体的初始结合,而且,似乎是 β -葡聚糖制剂交联足够数目的受体以诱导充分的信号转导进入细胞的能力。本发明描述了一种产品和制备产品的方法,所述产品具有交叉结合诱导特定类型的生物活性的受体的能力。这与能够通过交叉结合大量受体而诱导大规模反应并随后被吞噬的不溶性产品相反,这是由于不溶性(或“结晶样”)葡聚糖的性质导致诱导NLRP炎性激活的细胞内的溶酶体破裂。不溶性 β -葡聚糖还可以诱导ROS(活性氧类),ROS(活性氧类)还将触发炎性激活,导致不利的炎症反应。本发明描述了能够诱导显著炎症反应的 β -葡聚糖产品,炎症反应将激活几种免疫机制,但是不触发对于许多(聚集的不溶性) β -葡聚糖产品典型的炎性激活。

[0010] 本发明通过在最终产品中建立药学上有益的超分子结构而加强葡聚糖效力。

[0011] β -葡聚糖的高级结构的重要性和个体葡聚糖链或链和高级结构的特征对葡聚糖产品总体活性的贡献描述于Sletmoen等人,Biopolymers第89卷,第4期,pp310-321,2008。高级结构可以包括规则排列,例如三股螺旋或更松散的聚集。

[0012] 本发明提供了当遭遇靶细胞时被视为中等大小实体的葡聚糖制剂,但当被吞噬时,葡聚糖容易被摄取进入吞噬体而不诱导溶酶体破裂。因此,本发明描述了具有良好胶凝性质的高效可溶性 β -葡聚糖的新组织。不希望受理论束缚,似乎葡聚糖分子以一种更复杂和松散的“稻草堆”排列方式而排列,通过沿着葡聚糖骨架结构的频繁-OH基团之间的相对弱的氢键保持在一起。“稻草堆”组织具有在其表面呈现许多可用于靶细胞上特定葡聚糖受体识别的部位的潜力。然而,“稻草堆”组织的分子不具有不溶性产品的刚性,但是将更容易变得“降解”并因此在所述部位或者在吞噬之后“固定化”。这种大的高级组织与不溶性和已知的可溶性产品相比是有利的,因为它产生免疫调节反应,模拟许多使用微粒和不溶性 β -葡聚糖观察到的效应,但不诱导已知与不溶性 β -葡聚糖相关的较不可控和可能有害的效应。

[0013] 一方面,本发明提供了具有以单链基础计15,000至50,000g/mol的重均摩尔质量和在水溶液中以聚集体基础计4至 20×10^5 g/mol的重均摩尔质量的葡聚糖,所述葡聚糖在25℃和中性pH下以浓度 $\geq 1\%$ 在水中溶解时以凝胶形式存在,并且当所述葡聚糖以2%的浓度溶解于水中时具有高于30℃、优选35℃至80℃、更优选35至60℃、更优选37℃至60℃、最优选约40℃的熔化温度(凝胶至溶胶)。

[0014] 优选地,葡聚糖以1.5至6%、更优选1.5至5%、甚至更优选2至4%、最优选约2%的水溶液存在。要理解,“凝胶”形式可以被认为是水溶液。

[0015] 在一个优选方面,葡聚糖是 β 葡聚糖,优选地,它具有 $\beta(1,3)$ 连接的葡糖基残基的骨架和通过 $\beta(1,6)$ 键合与之连接的 $\beta(1,3)$ 连接的葡糖基残基的侧链(例如,至少2、5、10或20个连接的葡糖基残基的侧链)。

[0016] “中性pH”表示pH7。

[0017] “侧链”指个体葡聚糖分子,即,其中葡糖基残基共价连接的葡聚糖分子。“聚集体”通过氢键相互作用而形成,并且限定了超分子或高级结构。这种结合比共价键合所提供的结合较不持久,但是本文描述的方法得到了可识别的聚集模式,其平均摩尔质量可以使用本文提到的技术来分析。“水溶液”通常是pH7。

[0018] 换个角度,本发明提供了水溶液中包含浓度为1至6%的葡聚糖的凝胶葡聚糖产品,所述葡聚糖具有以聚集体计4至 20×10^5 g/mol的重均摩尔质量和以单链基础计15,000至50,000 g/mol的重均摩尔质量,所述凝胶葡聚糖产品具有高于30℃、优选35℃至80℃、更优选35至60℃、更优选37℃至60℃、最优选约40℃的熔化温度(凝胶至溶胶)。

[0019] 葡聚糖产品通常是微粒或在一些情况下可溶的。凝胶形式是极不常见的,但是已经发现本发明凝胶产品与其他葡聚糖产品相比提供优良的生物活性,特别是在伤口愈合中。在伤口愈合中,最重要的是以保证伤口湿润的方式应用药物或医疗装置,并且产品必须覆盖并粘附于伤口表面以避免感染并提供医疗工作者认为相关或根据伤口类型必要的施用特征。通常,微粒、半可溶或液体形式的葡聚糖不解决这些基本要求,因为它们不是有效的,或者它们处于不可用于伤口愈合目的的状态,或者两者。本发明的葡聚糖组合了这些必要特征,因此使它可用于其中纯的葡聚糖凝胶可以找到适当用途的所有应用。除了严格局部应用,其他可能的用途可以是口服施用和/或粘膜施用,例如除了已经发现本发明凝胶产品对其具有良好活性的癌症治疗以外,治疗胃肠道或口腔疾病。根据本发明的葡聚糖的优良的粘附性质使它能够覆盖作用部位的粘膜衬里,并因此加速愈合过程。因此,本发明的葡聚糖在治疗口腔粘膜炎症和影响粘膜的其他适应症中具有特定效用。

[0020] 根据本发明,可溶性葡聚糖成为凝胶结构的新组织可以通过用能够离解葡聚糖链间和链内的氢键的剂处理足够浓缩的可溶性葡聚糖溶液、随后添加能够快速恢复链间和链内氢键相互作用的剂来获得。葡聚糖的超分子三级或三维结构,本案中作为整体的葡聚糖产品内的分子链排列似乎对于效力而言是最重要的。不希望受理论束缚,似乎只有生物上有效的分子结构提供了对靶细胞不同受体的结合。单链、短链或没有适当的三维复杂方式结构的产品将不能以相同方式刺激机体免疫系统。

[0021] 存在表征由其单链构成的凝胶的三维(还定义为三级或超分子结构)分子结构的有限方式。描述这种凝胶的一般方式可以通过单链的平均摩尔质量和摩尔质量分布,以及物理特征,例如粘度。在免疫调节产品的情况下,凝胶还可以直接由其生物效力特征来描述,或者换言之测量所谓的“生物指纹”。当使用分子量作为定义性物理特征时,发现分析方法一般是破坏性的,导致凝胶产品的单链组分或较小聚集结构的分析,而不是给出产生生物有效的三维超分子结构所必要的、这些单链之间分子相互作用的详细图像。然而,包括与生物效力特征组合的其粘度的葡聚糖的几个其他物理特征的详细分析使技术人员能够区分许多不同的葡聚糖。这些标准之一是特定的分子量范围。可以不同的方式测定葡聚糖的摩尔质量。在可溶性葡聚糖产品的情况下,常规地通过SEC-MALS-RI(尺寸排阻色谱,具有多角度光散射和衍射系数检测)分析测量摩尔质量,并且这种分析提供了样品的重均摩尔质

量值(M_w)以及样品内不同分子量分布。在本发明中,重均分子量(M_w)被定义如下:

$$[0022] \quad M_w = \frac{\sum n_i M_i^2}{\sum n_i M_i} = \frac{\sum c_i M_i}{\sum c_i}$$

[0023] 其中 n_i 是具有摩尔质量 M_i 的分子的数目。具有摩尔质量 M_i 的分子的重量浓度 c_i 与摩尔质量 M_i 和分子数目 n_i 成比例。

$$[0024] \quad c_i = M_i n_i \Rightarrow n_i = c_i / M_i$$

[0025] 色谱的每个部分的重量浓度通过RI检测器来测量,而色谱中每个部分的摩尔质量通过MALS检测器与RI检测器的组合来测量。计算是基于光散射理论。

[0026] 具体地,根据本发明的平均摩尔质量(对于单链)通过SEC-MALS-RI在具有0,5% LiCl的DMAc(具有0,5%氯化锂的二甲基乙酰胺)中测定,假定葡聚糖在该溶剂中的 dn/dc 为0,12。DMAc/LiCl溶剂将所述葡聚糖完全溶解成单链,并且因此,使用具有0,5%LiCl的DMAc作为洗脱剂的随后SEC-MALS-RI分析给出了单链水平上的分子量分布的量度。简单说,DMAc/LiCl中的葡聚糖分析涉及干葡聚糖以大约3mg/ml的浓度溶解在溶剂中,在通过使用3 x PLgel Mixed-A LS柱和具有0,5%LiCl的DMAc作为洗脱剂的SEC-MALS-RI分析之前,通过在室温搅拌溶液过夜并在100℃加热1h。通过该方法测定的以单链基础计的本发明葡聚糖的重均摩尔质量是15,000至50,000g/mol、优选25,000至45,000g/mol和更优选30,000至40,000g/mol。

[0027] 在水溶液中,存在的主要高级结构和聚集体的重均摩尔质量是 $4-20 \times 10^5$ g/mol、优选 $5-15 \times 10^5$ g/mol和更优选 $6-12 \times 10^5$ g/mol。这些平均值优选在排除非常大的聚集体(即,摩尔质量高于 1.0×10^7 g/mol)时计算。水溶液中葡聚糖的分析涉及将凝胶溶液在具有0,02%NaN₃的0,1MNaNO₃中稀释至大约3mg/ml,在加帽的玻璃管中加热至100℃持续30min,冷却至室温,通过0,2μm注射器滤器过滤,并通过使用TSKgel G5000PWXL+TSKgel G4000PWXL柱和具有0,02%NaN₃的0,1M NaNO₃作为洗脱剂的SEC-MALS-RI分析。使用例如0,05M Na₂SO₄/0,01M EDTA作为溶剂/洗脱剂的类似设置得出等同的结果。水溶液中单链和高级结构/聚集体的摩尔质量值的组合产生了凝胶作为整体的分子和超分子结构的良好指示,并且有用地定义了本发明的葡聚糖。

[0028] 本发明葡聚糖进一步特征为在25℃和3至8的pH下为凝胶形式。本发明的葡聚糖凝胶进一步特征为其粘度特征,示例为凝胶的熔化温度(凝胶至溶胶)为高于30℃并高达约80℃、优选高于正常体温、更优选37℃至60℃、最优选39℃至60℃,例如40-50℃。针对水溶液中浓度为2%的葡聚糖凝胶给出上图。

[0029] 葡聚糖产品的凝胶熔点,即凝胶→溶胶转变温度,通常由小应变振动测量来测定,使用Stresstech HR流变仪或类似物并检查葡聚糖溶液冷却(70→10℃)和加热(10→70℃)期间的粘弹性变化。在这种实验中根据温度绘制的储能模量(G')的一个实例显示于图1。该特定样品的熔化温度等同于其中递增温度曲线的储能模量平稳时(大约0Pa),其大约40℃。测定凝胶的大致熔化温度的另一方式是测量凝胶在连续更高温度下的粘度(例如,使用旋转粘度计),直至粘度基本消失并且凝胶转变成溶液。凝胶熔化温度优选30-80℃、优选高于体温,以保证局部应用的稳定化葡聚糖凝胶。局部施用要求比口服施用或施用至感染部位相对更低的熔化温度。

[0030] 本发明的葡聚糖凝胶是水凝胶,而凝胶形式可以通过目视检查来确认,葡聚糖凝

胶的粘度特征和假塑性和触变性质还可以通过粘度测量来测定,例如通过使用旋转粘度计。根据本发明的2%葡聚糖凝胶具有至少1000cP、优选至少1500cP的粘度,使用具有小样品适配器和主轴SC4-31的Brookfield DV-II+Pro可编程粘度计在25℃和10rpm的旋转速度(对应于 $3,40\text{sec}^{-1}$ 的剪切速率)下测量。用于测量该假塑性和触变凝胶的粘度的常规方法是使用所谓的升-降速率斜坡,例如在2rpm开始并以2rpm的增量升至10rpm,然后再以2rpm幅度回降。该实验的数据可以说明凝胶的假塑性(随递增的剪切速率递减的粘度)和触变(在接受剪切的时随时间递减的粘度)特征,并且提供例如10rpm粘度的量度。

[0031] 本发明的葡聚糖通常衍生自酵母、优选酿酒酵母。这些葡聚糖的基本分子结构通常是 β -1,3-骨架(表示通过 β -1,3键合连接的葡萄糖分子的链)以及 β -1,3侧链(表示通过 β -1,3键合连接的至少两个葡萄糖分子的链)和将所述侧链连接至所述骨架的 β -1,3,6-键合点。此外,来自酵母的葡聚糖包括 β -1,6键合,其可以连接至侧链或者直接连接至骨架。其他类型的键合存在,但是以相对低的水平。可以提供葡聚糖来源的其他酵母包括啤酒酵母,假丝酵母属(*Candida* sp.)如白假丝酵母(*Candida albicans*)、*Candida cloacae*、热带假死酵母(*Candida tropicalis*)、产朊假丝酵母(*Candida utilis*)、汉森酵母属(*Hansenula* sp.)如温奇汉森酵母(*Hansenula wingei*)、阿尼汉森酵母(*Hansenula arni*)、*Hansenula henricii*和美洲汉森酵母(*Hansenula americana*)、组织胞浆菌属(*Histoplasma* sp.)、克勒克酵母属(*Kloeckera* sp.)、克鲁维酵母属(*Kluyveromyces* sp.)如乳酸克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis*)、脆壁克鲁维酵母(*Kluyveromyces fragilis*)、多孔克鲁维酵母(*Kluyveromyces polysporus*)、毕赤酵母属(*Pichia* sp.)、红酵母属(*Rhodotorula* sp.)、酵母属(*Saccharomyces* sp.)如德尔布酵母(*Saccharomyces delbruekii*)、罗斯酵母(*Saccharomyces rosei*)、(*Saccharomyces microellipsodes*)、卡尔斯伯酵母(*Saccharomyces carlsbergensis*)或不同的酵母菌株如酿酒酵母R4(NRRL Y-15903)和R4Ad(ATCC No.74181),裂褶菌属(*Schizophyllum* sp.)、裂殖酵母属(*Schizosaccharomyces* sp.)如栗酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)、色串孢属(*Torula* sp.)和球拟酵母属(*Torulopsis* sp.)。

[0032] 然而,本发明的凝胶葡聚糖可以衍生自其他适合的来源,例如细菌、真菌或谷物葡聚糖。各种葡聚糖的治疗活性在本领域充分记载,并且本发明方法一般可用于增强葡聚糖的活性,特别是在葡聚糖产品的物理形式和分子间结构被发明人显示为特别重要的伤口愈合中。不希望受理论束缚,经验法则是根据本发明使用的葡聚糖基于单链计的重均摩尔质量越高,可以产生越有效的葡聚糖凝胶。

[0033] 本发明的葡聚糖凝胶的侧链通常包括2个或多个 β (1,3)连接的葡糖基单元。根据本发明,与主链连接的单一分子不被视为“侧链”。

[0034] 本发明的葡聚糖优选具有 β (1,3)连接的葡糖基单元的侧链,即由或基本上由 β (1,3)连接的葡糖基单元组成。除了 β (1,3)连接的侧链,葡聚糖还可以具有一个或多个 β (1,6)连接的侧链。通过改变结构的链,可能改变最终产品的特征。存在许多改变葡聚糖的不同方式,包括酶处理、使用酸如甲酸或盐酸或不同的碱基以及通过其他方式。优选的葡聚糖是已经通过酸(例如甲酸)或酶或任何其他适合的方法处理以显著减少或消除葡聚糖内重复的(1,6)-连接的葡萄糖分子数目的那些。这些(1,6)-连接的葡糖基部分将正常存在于衍生自酵母的 β -葡聚糖的侧链。得到的葡聚糖具有 β (1,3)主链和通过单个 β (1,6)键合与之连接的

$\beta(1,3)$ 侧链,其通过消除处理而被切掉。

[0035] 优选的葡聚糖基本上不含重复的 $\beta(1,6)$ 连接的葡萄糖基残基。在分支点($\beta(1,3,6)$ -分支点)处的单个 $(1,6)$ 键合不提供“重复的” $\beta(1,6)$ 连接的葡萄糖基单元。“基本上不含”意思是小于总葡萄糖基单元的6%、优选小于4%和最优选小于3%。

[0036] 一些处理,例如酶处理,可能使侧链中最多4个 $\beta-1,6$ -连接的、但通常2个 $\beta 1,6$ 连接的葡萄糖基单元保持未切割。这样分子也是“基本上不含”重复的 $\beta 1,6$ -连接的葡萄糖基单元。

[0037] 本发明优选葡聚糖内键合的分布可以表示如下:

[0038]

连接的葡萄糖基残基的类型	%
$\beta(1,3)$	80-98
$\beta(1,6)$	0-6
$\beta(1,3,6)$	1-8
末端	0,01-6

[0039] $\beta(1,3,6)$ 指在骨架中 $(1,3)$ 连接并且参与 $(1,6)$ 连接以提供侧链的分支点残基。

[0040] 本发明的葡聚糖的形式可以是单一提取的级分或者具有不同的平均分子量的两种或多种不同的级分。

[0041] 葡聚糖在化学修饰基团方面是未衍生化的。

[0042] 本发明的葡聚糖由新方法产生。本发明人发现,用能够离解葡聚糖链间氢键的剂处理足够浓缩的可溶性葡聚糖溶液、随后添加能够恢复链间氢键相互作用的剂,获得了具有与其他类似的葡聚糖产品相比改善的活性的新凝胶葡聚糖产品。通过这样做,将产生不具有“退火的” β -葡聚糖链的典型三螺旋结构的高度随机组织的“稻草堆”凝胶。惊人地,发现该类型凝胶结构作为免疫调节剂比三螺旋构型或多螺旋构型的经典组织化可溶性 β -葡聚糖明显更有效。

[0043] 因此,在进一步方面,本发明提供了产生如上定义的凝胶葡聚糖产品的方法,其中将葡聚糖分子的水溶液用能够离解葡聚糖链间氢键的剂处理并然后用能够重新形成葡聚糖链之间氢键的剂处理。

[0044] 因此,本发明提供了产生葡聚糖凝胶的方法,包括以下步骤:

[0045] a)用能够离解氢键的剂处理葡聚糖分子的水溶液;和

[0046] b)添加能够快速重新形成氢键的剂。

[0047] 换个角度,本发明提供了产生本文定义的凝胶葡聚糖产品的方法,所述方法包括以下步骤:

[0048] a)用离解葡聚糖的氢键的剂处理葡聚糖分子的水溶液;和

[0049] b)使步骤a)的产物与能够使所述葡聚糖内重新形成氢键的剂接触。

[0050] 离解且重新形成的氢键可以是分子内的,即在单链内,或者是分子间的,在链之间,导致聚集体的形成。

[0051] 优选地,能够离解氢键的剂是碱金属盐。优选地,能够离解氢键的剂以高于50mM、优选约150mM的终浓度使用。

[0052] 步骤a)优选地在10℃至25℃、更优选15℃至20℃、最优选约18℃的温度下进行。

[0053] 能够离解氢键的剂的添加优选缓慢地、优选以1升每分钟的速率(溶解于10升水中

的24摩尔NaOH被添加至200升2%葡聚糖溶液)或者在体积或浓度不同时以相等速率进行。

[0054] 溶解聚葡萄糖链中OH基团之间氢键的一种这样的剂将是足够浓度的氢氧化钠(NaOH),其将使链中许多OH基团去质子化。这将导致对于这些高分子量葡聚糖而言典型的所有分子间键完全离解,导致溶液中链的随机组织化。通过添加酸以中和碱来中和溶液,重新形成OH基团,并且可以建立链之间的新的氢键。

[0055] 使用NaOH作为剂,通常将需要添加例如2M NaOH溶液至终浓度高于50mM或更优选约150mM,至水溶液中可溶性葡聚糖浓度为1-6%、更优选1,5-4%或最优选2-4%。

[0056] 重新形成氢键的步骤还可以被视为在添加能够离解氢键的剂之后中和溶液。

[0057] 因为能够离解氢键的剂优选是碱金属盐,那么优选地,能够快速重新形成氢键的剂,即中和步骤a)中产生的溶液的剂,是酸,优选强酸。优选地,方法中步骤a)和步骤b)中的剂以等摩尔量添加。例如,如果在步骤a)中添加2M NaOH溶液,则为了中和溶液,可以向溶液添加等摩尔量的例如2M盐酸(HCl)。优选地,中和步骤在搅拌下进行足以保证充分中和的短时段。对于1000ml的体积,该步骤可以在小于1分钟、例如小于30秒内进行。如实施例所示,更大的体积必然花费更长时间以使所有酸被添加并混合。此后,使溶液建立凝胶构象,对于1000ml的体积,凝胶形成所需时间可以是1至10分钟,更大体积需要更长时间。

[0058] 可以根据凝胶形成速度来评估氢键的快速重新形成。如果凝胶在自第一次添加剂(其可以被视为复性剂)后小于15分钟内形成,则这指示氢键的快速重新形成,但是“快速”通常表示小于10分钟,优选小于8或6分钟,更优选小于4分钟或3分钟。然而要理解,较大的体积一般需要更长的时段用于凝胶形成/氢键重新形成。

[0059] 具有离解氢键的能力的任何其他剂能够替代NaOH,并且能够允许快速重新建立氢键以形成“稻草堆”型凝胶的任何其他剂可以替代HCl。技术人员知道可以破坏并然后恢复氢键的其他剂,碱和酸是特别方便的,因为一个可以根据另一个而容易被平衡,以中和破坏了氢键的剂的作用。可以使用其他强酸,例如甲酸或硫酸。而且其他碱金属盐,包括但不限于氢氧化钾、氢氧化锂和氢氧化钙,以及可能的所谓超级碱例如氰化钠或氨基钠,可以是用于去质子化和破坏氢键的潜在剂。具有适当质量的任何酸可用于中和溶液以恢复氢键-这包括但不限于与磷酸、乙酸和柠檬酸。尿素或甲酰胺也常用于破坏氢键并且可能用于该过程。

[0060] 要理解,在涉及大且复杂的有机分子的系统中,保证所有氢键被破坏或者在应用能够使氢键恢复的条件之后所有分子链参与显著氢键是不可行或者不必要的。然而,应用的条件将是为了快速改变整个葡聚糖溶液中的氢键组织和程度。技术人员知道例如150mM NaOH对葡聚糖溶液的影响,并且可以相应地选择其他氢键破坏剂的浓度。当提供允许重新建立氢键的条件时,第二步的目的是有效地快速中和或逆转通过添加氢键破坏剂引起的对分子间静电相互作用电势的影响。因此,该第二剂的性质和浓度将遵循氢键破坏剂的选择。提到快速中和条件提供能量亚稳定的超分子结构的“冷冻”也是重要的,如果没有快速中和,所述超分子结构将趋于以能量更优、但较无生物活性的方式重新组织。当然,可以评价用于增加从根据本发明的处理得到的最终产品的稳定性的其他方法。可能的其他方法可以是添加稳定剂,或者建立能量更优分子结构的任何方法,从而增强最终产品的稳定性,而不太程度地损害其生物活性特征。

[0061] 在工业化方法中,所述步骤方便地在足够大以容纳整批产品的罐中进行。

[0062] 上述氢键破坏和然后恢复的步骤可以被例如再次重复。

[0063] 优选地,该方法包括其他步骤c),其中例如通过过滤去除在上述步骤a和b中添加的离子(例如 Na^+ 和 Cl^-)。过滤方法是本领域公知的,例如,产物可以根据所需纯化水的体积经切向滤器渗滤。

[0064] 在氢键破坏之前水溶液中葡聚糖的浓度优选是1.5-6%、更优选2至4%、最优选约2%。优选地,葡聚糖凝胶中葡聚糖的浓度是约2%,例如1.8%至2.2%。因此,优选地,在氢键破坏之前水溶液中葡聚糖的浓度也是约2%。上述方法步骤a)和b)中剂的添加可以增加水溶液的体积,并因此降低溶液中葡聚糖的浓度。然而,优选地,步骤a)和b)中添加的剂的体积不显著改变溶液体积,使得葡聚糖在起始产品和终产品中的浓度大致相等。当然,技术人员将理解,如果需要,可以在起始产品中使用更高浓度的葡聚糖,使得在步骤a)和b)中剂的添加导致最终产品中精确的、所需的葡聚糖浓度。技术人员能够计算起始产品中适当的葡聚糖浓度和步骤a)和b)中要添加以实现所得凝胶产品中所需葡聚糖浓度的剂的适当体积。

[0065] 上述氢键破坏和恢复可以对葡聚糖分子的任何水溶液进行;优选的葡聚糖,包括具有修饰分支的葡聚糖,在上文讨论,并且葡聚糖溶液优选是酵母葡聚糖溶液。其实材料可以是凝胶,在这种情况下,步骤a)导致非凝胶溶液并且步骤b)再诱导了凝胶状态。起始溶液中葡聚糖的重均摩尔质量(M_w)优选以单链基础计优选是高的,溶液中葡聚糖的重均摩尔质量高于15,000、更优选高于20,000、最优选高于25,000g/mol。测定这些质量值的适当方法在上文给出。

[0066] 本发明方法包括其中1%至4%可溶性 β -葡聚糖水溶液是起始材料的方法,向起始材料添加浓度约2M的NaOH至约150mM的终浓度,然后搅拌溶液,直至完全溶解且澄清。通过在搅拌下添加等摩尔量的HCl来重新建立凝胶形式,这得到具有物理渗透压和约7的pH的凝胶。该凝胶可以任何体积产生。

[0067] 当试剂,即起始材料和步骤a)和步骤b)中使用的剂作为试剂盒提供时,本发明凝胶还可以由外行人生产。因此,在进一步的方面,本发明提供了试剂盒,包括含有葡聚糖分子水溶液的密封容器,含有能够离解葡聚糖氢键的剂的第二密封容器,和含有能够在葡聚糖内重新形成氢键的剂的第三密封容器。构成试剂盒的葡聚糖分子的水溶液和两种剂可以如本文任何地方所定义。

[0068] 一个这样的试剂盒包括85ml 2.2% β 葡聚糖水溶液的瓶、7.5ml 2M NaOH的密封管和7.5ml 2M HCl的密封管,其中后两种试剂被顺序添加至2.2% β 葡聚糖的瓶,产生等渗的2%最终凝胶。进一步实例是包括含有70ml 14% β 葡聚糖水溶液的瓶、15ml 1M NaOH的密封管和15ml 1M HCl的密封管,当后两种试剂顺序添加至 β 葡聚糖的瓶时得到100ml浓度约(更小一些)3%的凝胶。

[0069] 葡聚糖一般以微粒形式从其来源材料(例如,真菌、酵母或谷物)提取,但是从微粒葡聚糖产生可溶性形式的方法是本领域已知的,并且包括酸或碱处理,例如W095/30022中描述的甲醛分解步骤和例如来自Sigma Chemical的来自谷物如大麦的各种类型葡聚糖。根据本发明,例如可以通过W095/30022的实施例1中的方案制备的微粒起始材料将优选通过在甲酸中加热至少两小时而被溶解。对微粒葡聚糖起始材料进行的甲醛分解可以常规地引起任何 $\beta(1,6)$ 连接的葡萄糖基侧链的选择性去除以及溶解微粒葡聚糖。

[0070] 本发明方法还任选包括加热步骤,其中甲酸处理的产品沸腾($>100^\circ\text{C}$)至少30分

钟。在产品冷却之后,其优选通过本领域已知的常规方法、例如通过离心或过滤处理以去除微粒材料。

[0071] 被处理以产生用于根据本发明加工的可溶形式的微粒葡聚糖优选衍生自细胞壁、特别是酵母细胞壁,其已经例如通过洗涤去除了蛋白组分和其他残余物如甘露糖和壳多糖。

[0072] 适合的微粒酵母葡聚糖产品的一个实例由Biotec Pharmacon ASA生产,其衍生自面包酵母(酿酒酵母)并被称为NBG Cos®。微粒葡聚糖原材料的另一实例是全葡聚糖颗粒如产品Imprime WGP™。该产品是天然的未衍生的(就化学修饰基团而言)微粒 $\beta(1,3)/(1,6)$ 葡聚糖,通过NMR和化学分析表征为由含有 $\beta-1,3$ 和 $\beta-1,6$ -连接的D-葡萄糖的侧链的 $\beta-1,3$ -连接的D-葡萄糖的聚合物组成。

[0073] 本发明的优选凝胶产品的视觉外观是坚硬、不透明、带白色的,对其他表面具有高粘附能力。

[0074] 在进一步的方面,本发明提供了通过前述方法的任何一种获得或可获得的葡聚糖产品。

[0075] 本发明的葡聚糖是有效的治疗剂,并且在进一步的方面,本发明提供了用于治疗,特别是用于治疗其中受试者需要系统或局部增强免疫应答、例如其中存在组织损伤或感染的病症的本文描述的葡聚糖。葡聚糖在辅助伤口或溃疡愈合和治疗口腔粘膜炎症和癌症或减少肿瘤大小中具有特别效用。

[0076] 因此,在进一步的方面,本发明提供了在有相应需要的受试者中辅助伤口或溃疡愈合或治疗口腔粘膜炎症的方法,该方法包括给所述受试者施用本文描述的本发明葡聚糖。

[0077] 提及“辅助”伤口或溃疡愈合是因为一些伤口或溃疡会自然愈合,而其他伤口或溃疡可能不会自然愈合,但已经显示本发明的葡聚糖加速伤口和溃疡愈合。在一些情况下,愈合在无治疗的情况下可能不会令人满意地发生。需要愈合治疗的此类伤口的一个实例是糖尿病性足溃疡。在该适应症中,患者基于糖尿病的潜在原因而发展伤口。由于经常未治疗的潜在原因和这些伤口存在于患者足上的事实,这些溃疡不会自我愈合并且引起患者的巨大问题,通常结果是足的切除。

[0078] 在进一步的方面,本发明提供了在受试者中治疗癌症或减少肿瘤大小的方法,该方法包括给所述受试者施用本文描述的本发明葡聚糖。优选地,口服施用葡聚糖。优选地,葡聚糖以5至200mg/kg/天、更优选20至100mg/kg/天的剂量施用。

[0079] 在进一步的方面,本发明还提供了药物组合物,包含如上定义的凝胶形式的葡聚糖和一种或多种药学上可接受的稀释剂或载体、优选水和任选一种或多种生理上可接受的稳定剂或其他稀释剂或载体。所述组合物可以常规配制成任何局部剂型。局部剂型可以是凝胶、糊剂、乳霜、喷雾剂、洗剂、溶液、软膏、膜等。

[0080] 在一些变化形式中,本文描述的组合物是软膏形式。软膏基质可以是含油基质、可乳化基质、乳液基质或水溶性基质。在其他变化形式中,根据本发明的组合物是乳霜形式。乳霜可以是粘性液体或水包油或油包水的半固体乳液。乳霜基质可以是可水洗的,并且含有油相、乳化剂和水相。而在进一步的变化形式中,本发明的组合物是洗剂形式。洗剂可以被配制为固体的悬液,并且含有悬浮剂以产生更好的分散液。根据本发明的组合物还可以被配制为糊剂。糊剂是其中活性剂悬浮于适当基质中的半固体剂型。根据基质性质,糊剂分

成脂肪糊剂或由单相水凝胶制成的那些。

[0081] 在一些变化形式中,组合物在伤口表面形成膜。该膜可以通过喷雾或其他适当方式应用。为了辅助膜形成,使用膜形成剂,例如但不限于丙烯酸及其衍生物、聚丙烯酸及其衍生物例如聚甲基丙烯酸丁酯和聚甲基丙烯酸、聚甲基丙烯酸酯、抗坏血酸棕榈酸酯、卡波姆、巴西棕榈蜡、纤维素衍生物例如醋酸纤维素、rosca甲基纤维素钠、羟乙基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、乙基纤维素和相关化合物、酞酸羟丙基甲基纤维素、酞酸羟丙甲纤维素、鲸蜡醇及衍生物、微晶蜡、泊洛沙姆、聚乙二醇、聚氨酯、聚醋酸乙烯酯、聚醋酸乙烯酞酸酯、聚乙烯醇、硅酮橡胶和衍生物、紫胶、甘油三酸酯衍生物及其组合。

[0082] 组合物还可以包括至少一种膜增塑剂,其可以用于软化由膜形成剂形成的聚合物膜,使得它足够柔韧以随应用机体区域移动,而不破裂或剥离。

[0083] 在一些变化形式中,组合物可以在应用至伤口之前被流延成膜,或者直接应用至伤口,其中组合物原位聚合。“铺展”膜当应用至皮肤时聚合,并且可以作为来自管的乳霜或软膏、滚涂和喷雾等递送。可以通过将硅酮橡胶加入外相而产生膜。在与外相混合后,允许得到的乳液固化并提供“铺展”膜,其当应用至伤口时聚合。乳液可以铺展在基底上以达到所需的厚度。

[0084] 在其他情况下,组合物可以预先形成层或贴片。贴片可以具有各种厚度。贴片还可以被切割以具有一般符合伤口边缘的形状。

[0085] 在一些变化形式中,贴片可以包括药学可接受的粘合剂材料,其用于将贴片固定于伤口或皮肤。还可以包括贴片支持层。

[0086] 组合物可以直接置于伤口上,或者置于应用于伤口上的基底上。任何基底(载体)可用于本文描述的组合物。例如,可以使用织造、非织造、编织、泡沫和粘合剂基底。还可以使用吸收或非吸收基底。在一些变化形式中,组合物被喷洒或铺展于基底上。在其他变化形式中,组合物被浸渍在基底内。

[0087] 伤口敷料可以被应用任何适当的时间段。例如,它们可以经一天的时段、经数日、经数周或者数月或更长的时段来应用。一般而言,伤口敷料被重复应用,直至伤口愈合。用本文描述的敷料治疗伤口的持续时间可以取决于如下因素:待治疗的伤口类型、伤口位置、伤口渗出物和被应用的组合物的形式。根据使用的形式,组合物可以从伤口用水去除,或者擦除或剥离。

[0088] 本文描述的组合物可用于治疗由任何病因导致的伤口。例如,伤口可以是由于烧伤、感染、局部缺血、淋巴水肿、赘生物、神经病变、放射损伤、外科手术、静脉机能不全和外伤。本发明组合物在辅助伤口或溃疡愈合中具有特别效用。

[0089] 本发明还提供了物理支持体,例如已经应用了(包括浸渍其中)本文定义的本发明葡聚糖的用于医疗用途的任何医疗装置或材料。

[0090] 这种 β 葡聚糖的一个重要特征是其持水量和即使在缺乏可能促进凝胶愈合的条件如非中性pH或阳离子下的凝胶形成特征。一些 β -葡聚糖将在低如1%、但更通常在2-4%范围内的浓度下形成凝胶。来自如本文描述的一种酵母的可溶性 β -葡聚糖在3-7的pH范围内以1-6%的浓度溶解于水溶液中时将形成触变和假塑性凝胶,不依赖阳离子的存在。

[0091] 本发明组合物包含水溶液中1.5-6%、优选1.5-5%的 β 葡聚糖,优选地,组合物包含水溶液中约2-3%葡聚糖。不同浓度的使用取决于目的和不同的施用方式。作为一般规则,在

水溶液中浓度超过4-6%且不含其它稳定物质的酵母葡聚糖将得到由于其固体凝胶性质而难以生产的最终凝胶产品。

[0092] 术语“伤口”和“溃疡”包括表面伤口、手术伤口、烧伤、开放性骨折、腿溃疡、口腔溃疡、糖尿病溃疡和褥疮溃疡。伤口可以作为损伤、手术或疾病的结果,但是全部以皮肤完整性缺失为特征,皮肤可以被撕裂、切割或穿孔,并且需要皮肤再生来封闭开口。已经显示本发明葡聚糖加速伤口闭合。如实施例所示,可以通过测量开放伤口的大小来容易地证明效力。

[0093] 组合物优选地被局部应用,例如作为凝胶、透皮贴片、洗剂、软膏、乳霜等。组合物可以每天、更频繁或更不频繁地例如每天两次或每两天一次应用,并且持续如临床医师或者在一些情况下由患者或其他健康顾问决定的持续时间。治疗持续时间取决于伤口或溃疡的性质和严重程度,进展一般通过目测检测而容易地确定。

[0094] 局部施用包括口腔施用,并且用于递送至口腔粘膜的适合的凝胶、糊剂、喷雾剂、锭剂等是本领域已知的。

[0095] 葡聚糖和含有葡聚糖的组合物在人药和兽药中具有效用。如本文使用的,术语“医疗”包括兽医应用和环境。人是优选的治疗受试者,但是可以被有效治疗的其他动物包括家畜和伴侣动物。

[0096] 本发明的葡聚糖和含有本发明葡聚糖的组合物可应用于或加入物理/固体支持体,例如贴片、敷料、贴膏、绷带、膜、纱布等,其可应用于伤口或溃疡部位,并且这样的产品构成了本发明的进一步方面。

[0097] 本发明的葡聚糖还在用于培养皮肤细胞系的体外应用中具有效用,例如用于皮肤移植。因此,在进一步的方面,本发明提供了繁殖皮肤细胞的体外方法,该方法包括使皮肤细胞群与本文描述的本发明葡聚糖接触。

[0098] 要理解,适用于本发明一个方面或实施方案的优选特征加以必要变更应用于所有方面和实施方案。

[0099] 如实施例所示,本发明的葡聚糖作为伤口愈合剂和抗癌剂具有优良的体内效力。实施例还显示了本发明葡聚糖刺激在许多治疗环境中是相关的细胞因子生成的能力。实施例显示,如细胞因子生成诱导所证明的,本发明的葡聚糖与表面类似的葡聚糖产品相比具有不同的生物活性,所述表面类似的葡聚糖产品也获自酵母,可溶的,并且已经被处理以选择性减少(1,6)连接的侧链,同时保留(1,3)连接的侧链。具体地,本发明葡聚糖可以诱导人类骨髓树突细胞向炎症表型分化,显著刺激TNF- α 分泌并诱导这些细胞的G-CSF和IL-10的表达,而CXCL-10的分泌基本上处于基线水平,并且似乎未受本文描述的处理的影响。这是重要的,并且说明优选的本发明葡聚糖刺激特定的细胞因子组或组合的分泌。本发明葡聚糖还可以刺激来自糖尿病小鼠(db/db)的巨噬细胞分泌CXCL2、PGE2和GM-CSF,其全部在伤口愈合中具有重要作用。此外,本发明的凝胶葡聚糖激活人类补体系统。优选的 β 葡聚糖对TNF α 释放的效应是剂量依赖性的,并且似乎在过表达 β 葡聚糖受体dectin-1的RAW细胞系变体中高于某一阈值、例如100 μ g/ml的葡聚糖浓度时减少。产生最大TNF α 分泌的浓度,以及响应的幅度,与使用未接受本文描述的处理的可溶性 β 葡聚糖所看到的相比更高。

[0100] 现在,在以下非限制性实施例和附图中进一步描述本发明,其中:

[0101] 图1显示了储能模量 G' (Pa),针对根据本发明的葡聚糖凝胶的温度绘制。通过使用

Stresstech HR流变仪的小应变振动测量和一下温度扫描获得数据:以1/3℃/min的速率70至10℃,在10℃保持2h,然后以1/3℃/min的速率10至70℃。基于当递增温度曲线平稳时($G' \approx 0\text{Pa}$),测定该凝胶(凝胶至溶胶)的熔化温度为大约40℃。

[0102] 图2a)至e)显示用不同批次和浓度的SG(081-5,252-7,342-8,421-4)和不同浓度SG-LS(421-4新)体外刺激人mDC。沿y轴指示分泌的a)TNF α 、b)G-CSF、c)IL-10、d)CXCL-10和e)IL-12p70的浓度。

[0103] 图3a)至e)显示用LPS和不同批次和浓度的SG(081-5,252-7,342-8,421-4)和不同浓度SG-LS(421-4新)体外刺激人mDC。沿y轴指示分泌的a)TNF α 、b)G-CSF、c)IL-10、d)CXCL-10和e)IL-12p70的浓度。

[0104] 图4显示用不同浓度SG和SG-LS刺激的db/db小鼠的巨噬细胞的CXCL2分泌。LS指SG-LS。 $*p < 0,05$ 。

[0105] 图5显示用不同浓度SG和SG-LS刺激的db/db小鼠的巨噬细胞的PGE2分泌。LS指SG-LS。

[0106] 图6显示用不同浓度SG和SG-LS刺激的db/db小鼠的巨噬细胞的GM-CSF分泌。LS指SG-LS。

[0107] 图7显示用SG(421-4)、SG-LS(421-4LS)刺激的过表达dectin-1的RAW细胞系的TNF α 分泌。磷酸盐缓冲盐水用作阴性对照。

[0108] 图8显示SG131-92%和加强的(L/S)131-92%与媒介物(水)和阳性对照(rh-PDGF-BB(10 μg)+rh-TGF- α (1 μg),于0.5%HPMC中),平均值 $\pm$ s.e.m。 $*p < 0,05$ 。 $**p < 0,01$ 。

[0109] 图9显示根据本发明产生的加强的葡聚糖与用碱和酸处理之前的起始葡聚糖一起在水溶液中的SEC-MALS-RI色谱。谱图类似,但明显的是,非常高分子量的聚集体已经通过程序被去除。

[0110] 图10显示皮内移植入裸小鼠中的异种BT474肿瘤细胞的生长。从第7天开始,每两天p.o.给予SG(09BP003)、SG-LS(09BP003)或水(溶剂对照),直至第38天。

[0111] 图11显示用DTAF-染色的SG(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)和SG-LS(20 $\mu\text{g}/\text{ml}$)饲养2小时的人类体外分化的血液单核细胞衍生的骨髓树突细胞中的荧光。通过FACS检测DTAF。研究了通过dectin-1结合抗体(拮抗剂)(a)或成熟mDC(b)预处理的不成熟细胞中的DTAF水平。用单独PBS预处理的葡聚糖饲养的不成熟细胞中的DTAF水平作为对照(100%)。Y轴指示与对照相比的百分比荧光。

[0112] 图12显示用DTAF-染色的SG(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、SG-LS(20 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、右旋糖酐和萤光素酶黄(LY)饲养2小时的人类体外分化的血液单核细胞衍生的骨髓树突细胞中的荧光。右旋糖酐是网格蛋白依赖性的对照配体,而LY是流体相(巨胞饮)标志物。通过FACS检测DTAF。研究了通过所示抑制剂预处理的不成熟细胞中的DTAF水平。用单独PBS预处理的葡聚糖饲养的不成熟细胞中的DTAF水平作为对照(100%)。Y轴指示与对照相比的百分比荧光。

实施例

[0113] 实施例1

[0114] 本发明的凝胶葡聚糖产品的(SG-LS)制备

[0115] 如下所述处理2%酵母葡聚糖分子的水溶液。通过甲醛分解以选择性去除 β -1,6侧

链并随后纯化和渗滤以从甲醛分解溶液去除微粒物质和低分子量组分,从微粒葡聚糖制品制备该水溶液。适合的甲醛分解步骤公开于EP0759089B1的实施例3。通过用碱、乙醇和水单独萃取而从面包酵母(啤酒酵母)细胞壁制备微粒葡聚糖本身,每次提取之后伴随适当的干燥(喷雾干燥和真空干燥)。

[0116] a. 通过添加氢氧化钠来破坏氢键

[0117] 调节葡聚糖浓度之后进行氢氧化钠的添加,在封闭且搅拌的800升罐中产生大约200升的产品体积,所述罐通过将蒸汽或水引入罐周围的夹套而被加热或冷却。

[0118] 将产品温度调节至18℃,通过罐中闸门缓慢倾倒(约1升每分钟)溶解于约10升纯化水中的24摩尔(960g)NaOH。

[0119] b. 通过添加盐酸而恢复氢键

[0120] 在最后的NaOH倾倒入罐中后,立即开始恢复过程。

[0121] 略低于24摩尔HCl、大约9升纯化水中2.4M溶液被相对快速地(在约2分钟内)倾倒入罐中,测量产物的pH,以小份添加更多酸,直至pH达到约4。

[0122] c. 去除盐

[0123] 为了去除步骤a和b中添加的离子(Na^+ 和 Cl^-),可以针对所需体积的纯化水经切向过滤器渗滤产物。

[0124] 人类树突细胞成熟的刺激

[0125] 可溶性 β -葡聚糖的不同制剂将单核细胞衍生的不成熟树突细胞(iDC)分化为成熟树突细胞(mDC)的效价不同。可以通过测量选定DC细胞表面标志物的表达来显示激活水平。

[0126] 通过淋巴细胞分离剂梯度、随后通过使用抗-CD14微珠的磁性细胞分选(MACS)纯化的人单核细胞与IL-4和重组人GM-CSF的组合培养5天以促进分化为不成熟树突细胞。以生理氧水平培养单核细胞衍生的不成熟树突细胞(iDC)。从第5天至第6天,用50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 可溶性 β -葡聚糖(SG)或10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 不可溶 β 葡聚糖(NG)刺激iDC。

[0127] 使用表面分子HLA-DR、CD83和CD86的表达来检查iDC分化为成熟DC,并通过荧光激活的细胞分选来分析。还分析了C型凝集素受体DC-SIGN的表达。

[0128] 与作为实施例1的甲醛分解、NaOH前处理的葡聚糖和以2%浓度存在于水溶液中的葡聚糖的阴性对照(PBS)可溶性葡聚糖(SG)相比,略微下调了CD83、CD86、II类MHC(HLA DR)和DC-SIGN。下调主要是因为更少数目表达该蛋白的细胞,而每个细胞的CD86蛋白的表达也略微下调。相反,根据本发明的且根据实施例1制备的葡聚糖SG-LS是强大的刺激剂,激活iDC以上调CD83、CD86和HLA-DR的表达。而且与SG相反,DC-SIGN的表达被SG-LS有效下调。来自酿酒酵母的不可溶性 β 葡聚糖激活与SG-LS类似的CD83、CD86、HLA-DR和DC-SIGN的蛋白表达模式,但是甚至更强大。DC-SIGN的下调结合CD83、CD86和II类MHC的上调是树突细胞激活的公认标志。因此,SG-LS体外激活树突细胞,而SG没有,并且SG-LS有关该功能的性质类似于来自酿酒酵母的不可溶性 β 葡聚糖颗粒。

[0129] 实施例3

[0130] 人类树突细胞(DC)的细胞因子分泌的刺激

[0131] 为了测定人类DC在体外分泌的细胞因子谱,使用标准方法分离外周血单核细胞并繁殖成mDC。随后用单独或与细菌脂多糖(LPS)(1 ng/ml^{-1})组合的不同浓度的可溶性 β -葡聚糖刺激mDC。使用Luminex系统,通过多重分析来测定细胞因子谱。图2显示,SG刺激导致TNF α 分

泌的弱诱导,而G-CSF、IL-10、CXCL-10和IL-12保持未受影响。相反,SG-LS(图2中“421-4新”)强烈刺激TNF α 分泌以及G-CSF和IL-10的低水平分泌。

[0132] SG不是根据本发明的葡聚糖,但是可以根据如SG-LS示例说明的展示方案来加强,SG-LS是根据本发明的并根据实施例1制备的凝胶葡聚糖产品。

[0133] 就SG而言,CXCL-10的分泌未受SG-LS刺激的影响,而IL-12的产生受到SG-LS的弱抑制。

[0134] 用SG或SG-LS以及LPS共刺激人mDC揭示了SG-LS对TNF α 、CXCL-10、IL-10和G-CSF的分泌具有协同或加和效应,而IL-12的分泌与单独LPS相比被弱下调(图3)。SG和LPS的共刺激没有诱导测试细胞因子任何一个的任何明显变化(图3)。

[0135] SG和SG-LS一起诱导来自体外刺激的人mDC的区别性的生物功能。

[0136] 该实施例显示,与未经受本文描述程序的可溶性葡聚糖相比,根据本发明产生的可溶性葡聚糖具有调节其他病原体相关分子模式的效应的更强能力。

[0137] 实施例4

[0138] 小鼠巨噬细胞的细胞因子分泌的刺激

[0139] 使用补充了EDTA的PBS,通过腹膜内灌洗收获来自糖尿病(db/db)小鼠(BKS.Cg-m Dock7^m+/+Lepr^{db}/J)的巨噬细胞。将细胞接种于微板,并用单独或与LPS组合的SG或SG-LS在37°C下刺激12h。通过ELISA分析上清液中参与伤口愈合和炎症的一系列信号传导分子。

[0140] SG和SG-LS都刺激了来自db/db小鼠的巨噬细胞分泌CXCL2(图4)。来自SG刺激的细胞的上清液中分泌的趋化因子的浓度与从仅给予磷酸盐缓冲盐水的细胞测量的显著不同。相反,给予SG-LS的细胞比对照细胞分泌显著更多的CXCL2。

[0141] 来自db/db小鼠的巨噬细胞被SG-LS刺激分泌PGE2(图5)和GM-CSF(图6)。由于测定中的高变异,上清液中任一信号传导分子的浓度与来自在磷酸盐缓冲盐水中孵育的细胞的上清液中的浓度显著不同。另一方面,SG没有刺激PGE2或GM-CSF的分泌(分别是图5和6)。

[0142] 实施例5

[0143] RAW/dectin-1细胞系的TNF α 分泌的刺激

[0144] RAW/dectin-1细胞系是过表达 β -葡聚糖受体dectin-1的RAW264.7小鼠淋巴单核细胞巨噬细胞系的稳定转染子。该细胞系对应于来自Invivogen的RAW blueTM细胞系。该细胞系适合测定可溶性 β 葡聚糖的不同制剂之间的个体差异,并且该细胞系产生的 β 葡聚糖响应指示与dectin-1受体的相互作用。

[0145] 如在37°C下刺激后24h在基于ELISA的测定中测量的,SG和SG-LS都诱导了TNF α 的分泌(图7)。两种制剂诱导了典型的剂量-响应。SG的最大效应由1-2 μ g/ml产生,并且在更低或更高浓度时下降。相比之下,SG-LS的最大效应在100 μ g/ml时看到,在细胞周围介质中产生5倍更高浓度的TNF α 。

[0146] 因此,SG和SG-LS都刺激过表达dectin-1的鼠细胞系分泌TNF α ,但是响应是特征性的并且可容易区分的。虽然对SG的响应在高于4 μ g/ml时减少,但对SG-LS的响应变得更强,直至100 μ g/ml。这表明SG和SG-LS与主要的 β 葡聚糖受体dectin-1不同地相互作用。

[0147] 实施例6

[0148] 体外伤口愈合

[0149] 通过在糖尿病(db/db)小鼠模型(即BKS.Cg-m Dock7^m+/+Lepr^{db}/J小鼠)中分析全

层切除皮肤伤口的修复来分别考察SG和SG-LS对伤口愈合的影响。适应后(5-7天,无干扰),根据Home Office法规和糖尿病动物的特定要求,分组圈养动物,每组5只动物。实验受伤之后,将动物圈养于个体笼子(笼子尺寸35x15x15cm,具有锯末底层,每两天更换一次),环境维持在23°C的环境温度,12小时明/暗循环。小鼠被自由供给食物(标准啮齿类动物饮食)和水。在所有麻醉事件之后,将动物置于温暖环境并监测,直至它们从程序完全恢复。所有动物在手术后接受适当镇痛药(丁丙诺啡叔丁啡)和如需要的其他镇痛药。所有动物程序在HomeOffice许可的机构中进行,Home Office许可证(PCD:50/2505;PPL:40/3300;PIL:50/3482;PIL:70/4934)。在整个研究期间,每天监测动物健康。

[0150] 在第0天,麻醉动物(异氟烷&空气),并且背部剃毛并用盐水浸泡的纱布清洁。在每个实验动物的左背侧皮肤中产生单个标准化的全层伤口(10.0mm x10.0mm)。随后用透明膜敷料Bioclusive™(Systagenix Wound Management,UK)的圆周条带包扎所有治疗组中的伤口;之后它们通过使用29号针头经由Bioclusive膜注射50μl纯水中的2%溶液而接受SG或SG-LS。使用适当软件将糖尿病动物随机分入治疗方案之一。对于接受SG或SG-LS的实验组,在受伤后第2、4和6天再次应用治疗。这些动物中的伤口部位被密切监测应用剂的过度累积和过度的伤口部位水化;如果过度应用的剂累积/水化明显,在再次应用之前通过抽吸去除之前应用的材料。对于阳性对照组,每天重复应用治疗,直至受伤后第6天,该组中的伤口接受总共7次生长因子组合治疗的应用。在受伤后第4、8和12天,所有动物被再次麻醉,去除它们的膜敷料和任何游离碎片,使用盐水浸泡的无菌纱布清洁它们的伤口。在第4和8天照相之后,如上使用Bioclusive 膜敷料再次包扎伤口。

[0151] 从在每个评估点对每个伤口拍摄的有刻度的伤口图像测定了伤口闭合数据。在给定时间点给定伤口的面积被表示为受伤后立即(即,第0天)受伤的面积的百分比。计算每组的保留的平均百分比伤口面积(&平均值的标准误差),并图形展示(图8)。每种葡聚糖制品的影响与接受以下的伤口的影响相比较:i)媒介物(水);和ii)PDGF-BB+TGF-α(阳性对照)。

[0152] 在所有评估的时间点,相对于接受SG131-92%的伤口,接受SG131-9LS2%的伤口表现出升高的伤口闭合(图8)。该观察到的差异在第4天和第8天是统计学上显著的(分别是 $p=0.015$ 和 0.001)。在早期时间点(第4天和第8天),SG131-9LS治疗的伤口的伤口闭合特征与阳性对照治疗的伤口相当。

[0153] 实施例7

[0154] 熔点的测定

[0155] 根据本发明生产的葡聚糖凝胶的熔点的测定如说明书所述进行,结果显示于图1。碱-酸处理一般增加葡聚糖凝胶的熔化温度(凝胶至溶胶)。

[0156] 实施例8

[0157] 使用在基质胶中具有 10^7 BT474细胞的皮内移植物的NMRI nu/nu小鼠考察了SG和SG-LS分别对抗肿瘤活性的影响。在7天直至可触及(80mm^3)的肿瘤生长期之后,通过口服管饲法每天施用SG和SG-LS。经31天时段没两天测量肿瘤直径,并测定体积。分析(图10)显示,与媒介物(水)相比,SG和SG-LS都延迟了肿瘤生长。还明显的是,与SG相比,SG-LS更有效抑制了生长速率,表明SG的抗癌性质也被本文描述的生产方法所增强。

[0158] 通过分析它们的细胞相互作用机制而考察了SG和SG-LS之间的效力差异,结果显示于图11和12。衍生自血液单核细胞(mDC)的人类体外产生的骨髓树突细胞中LS变体的摄

取被dectin-1拮抗剂(抗dectin-1抗体,图11a)抑制。SG的摄取仅被抗体略微抑制,表明SG主要通过不依赖dectin-1的机制而进入细胞。通过研究成熟mDC和未成熟mDC中荧光素标记的葡聚糖的摄取而进一步证明了该发现。公知的是,dectin-1的表面表达在成熟mDC中相对于未成熟mDC更低,因此,成熟mDC(~30%,图11b)中SG-LS的摄取与未成熟mDC(100%,未显示)相比被减少。成熟和未成熟mDC中的SG摄取类似,支持了dectin-1拮抗剂数据,并且表明SG-LS和SG不同地与细胞相互作用。

[0159] 使用特定抑制剂测定了精确机制(图12)。SG的摄取未受氯丙嗪影响,而SG-LS的胞吞受到该化合物的抑制。这表明,SG-LS通过网格蛋白介导的胞吞作用被摄取,而SG不是。另一方面,SG的摄取受干扰巨胞饮的卡马拉素抑制。SG-LS的细胞内累积不受卡马拉素影响。细胞松弛素D部分抑制两个配体的摄取,表明了对细胞骨架重排的要求,即吞噬作用,以进入细胞。这些结果一起证明SG和SG-LS通过不同的机制摄取,但吞噬作用是两者共有的。

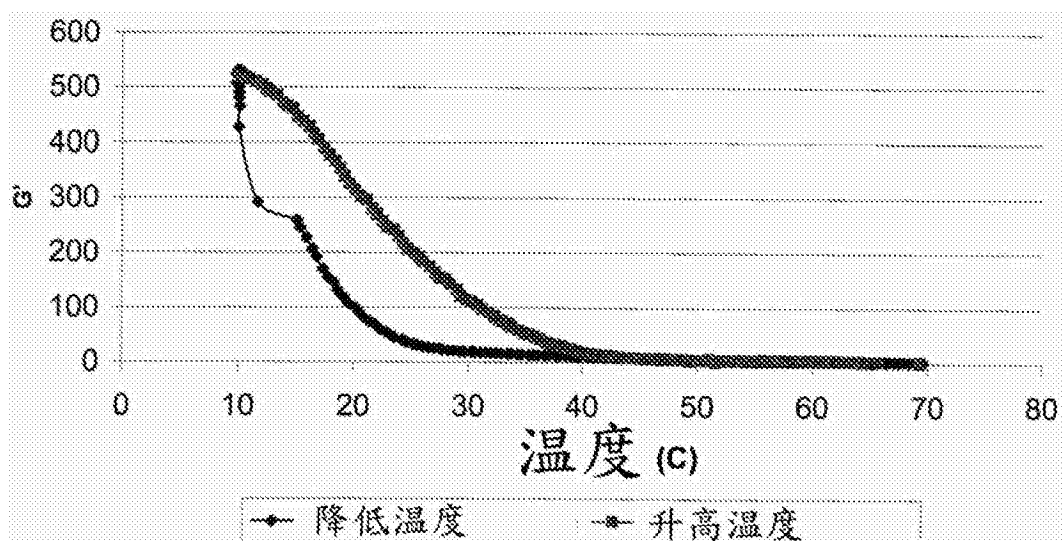


图1

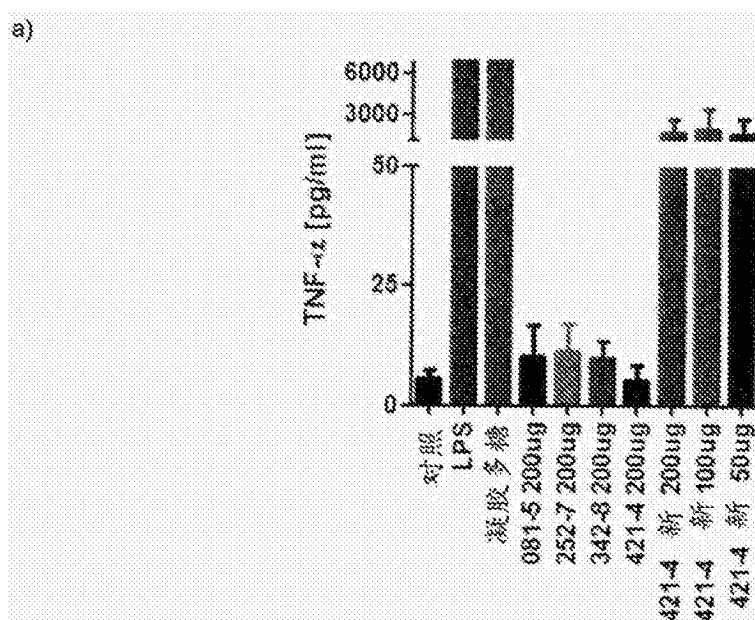


图2a

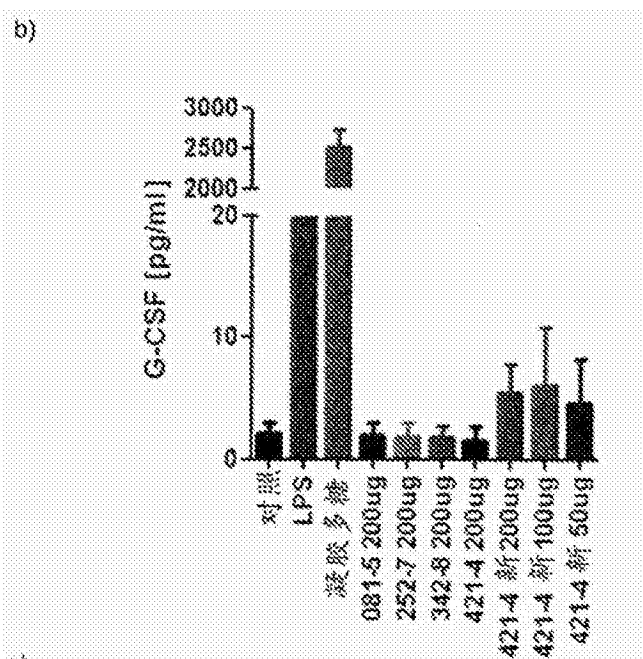


图 2b

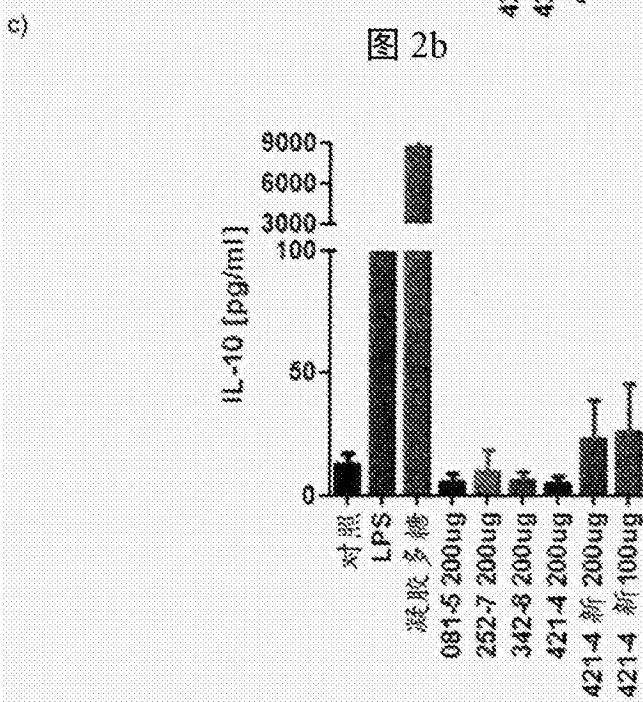


图 2c

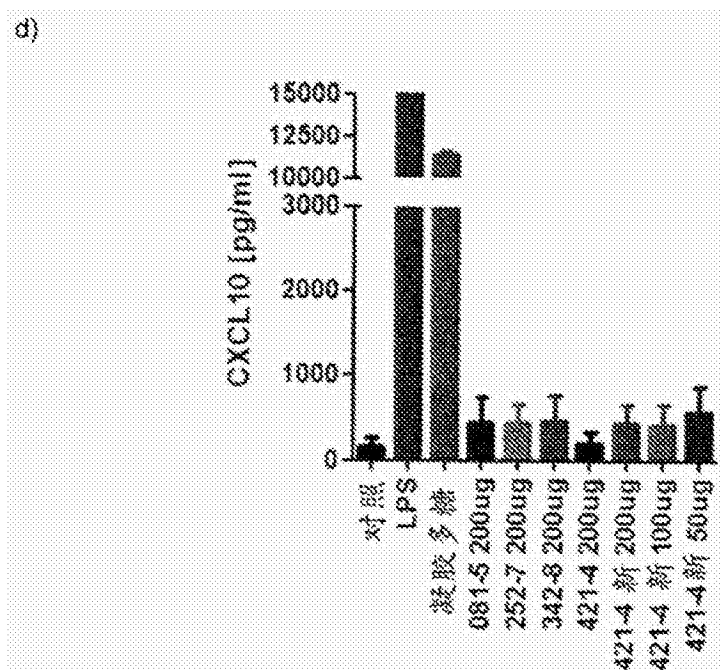


图2d

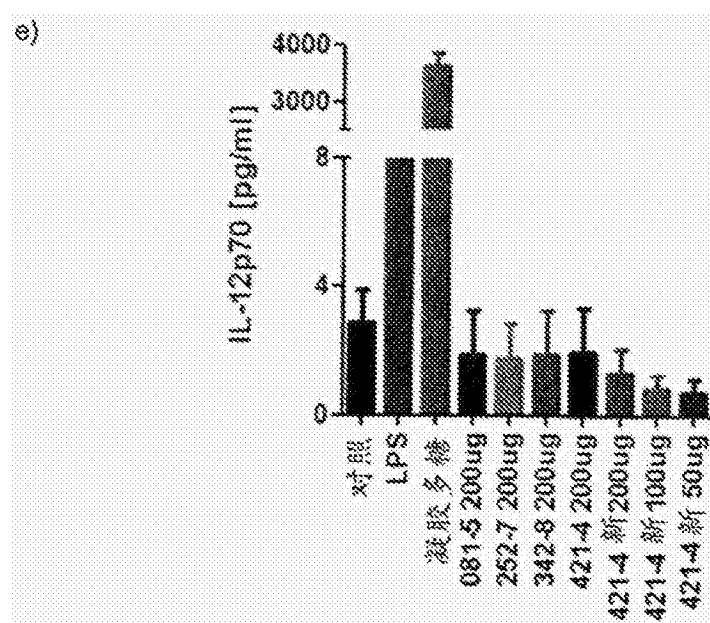


图2e

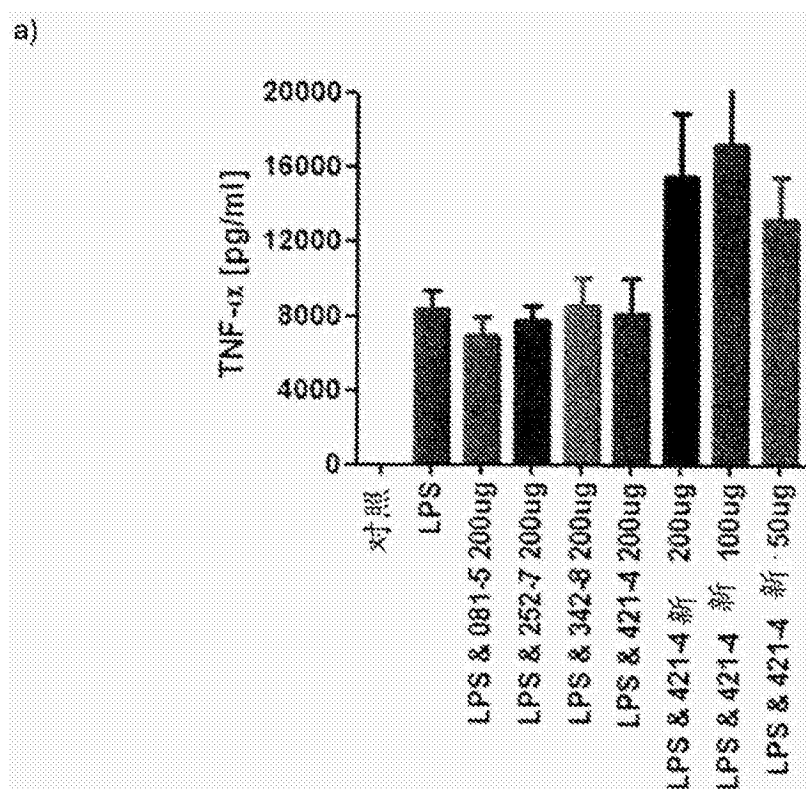


图3a

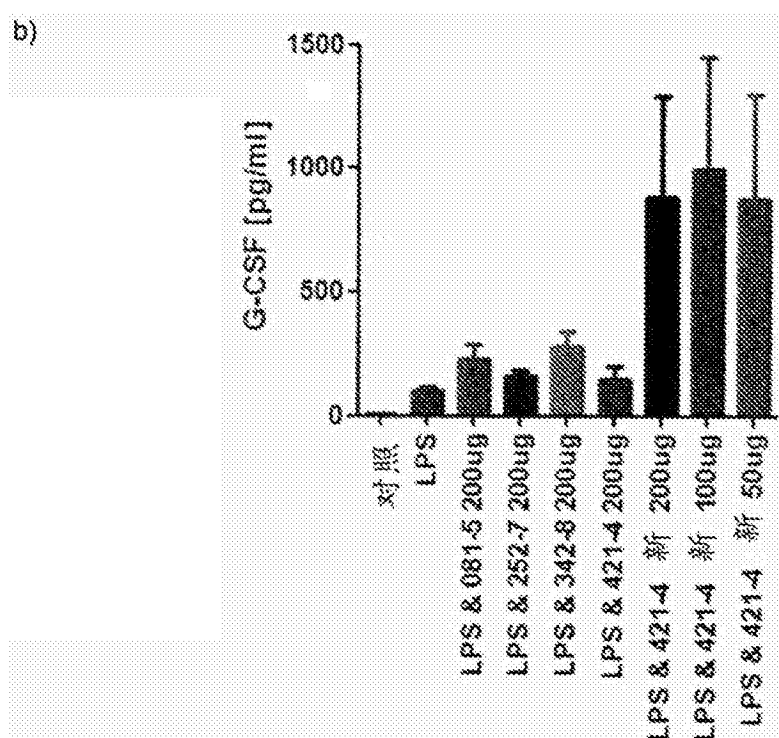


图3b

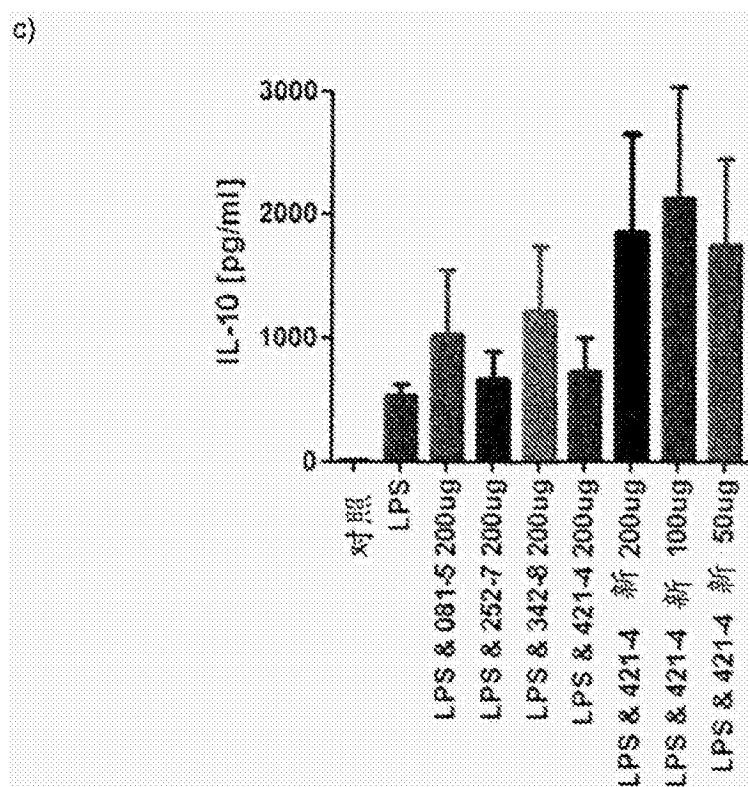


图3c

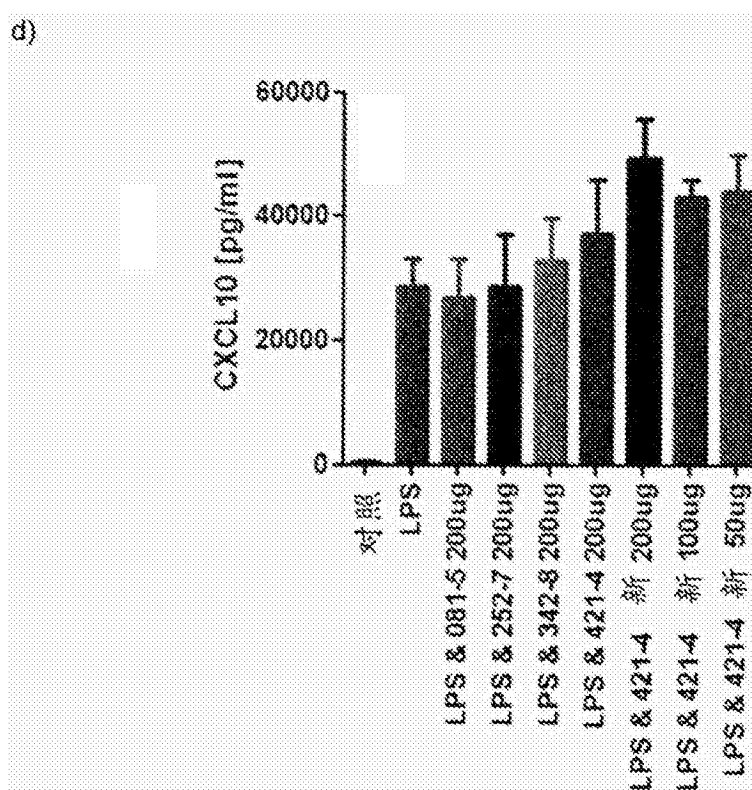


图3d

e)

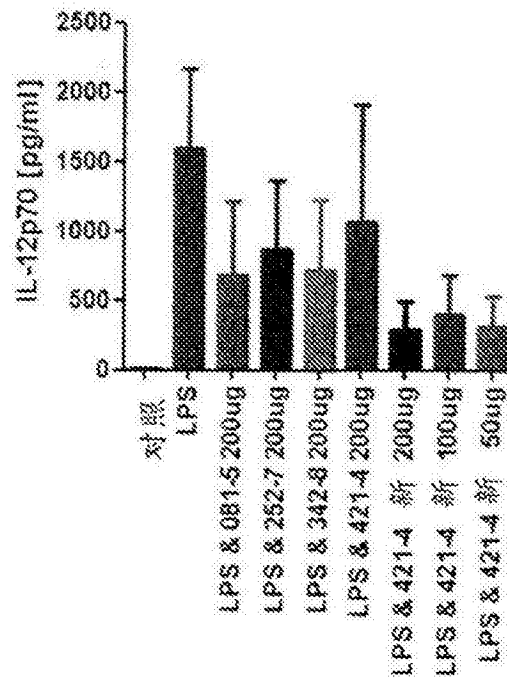


图3e

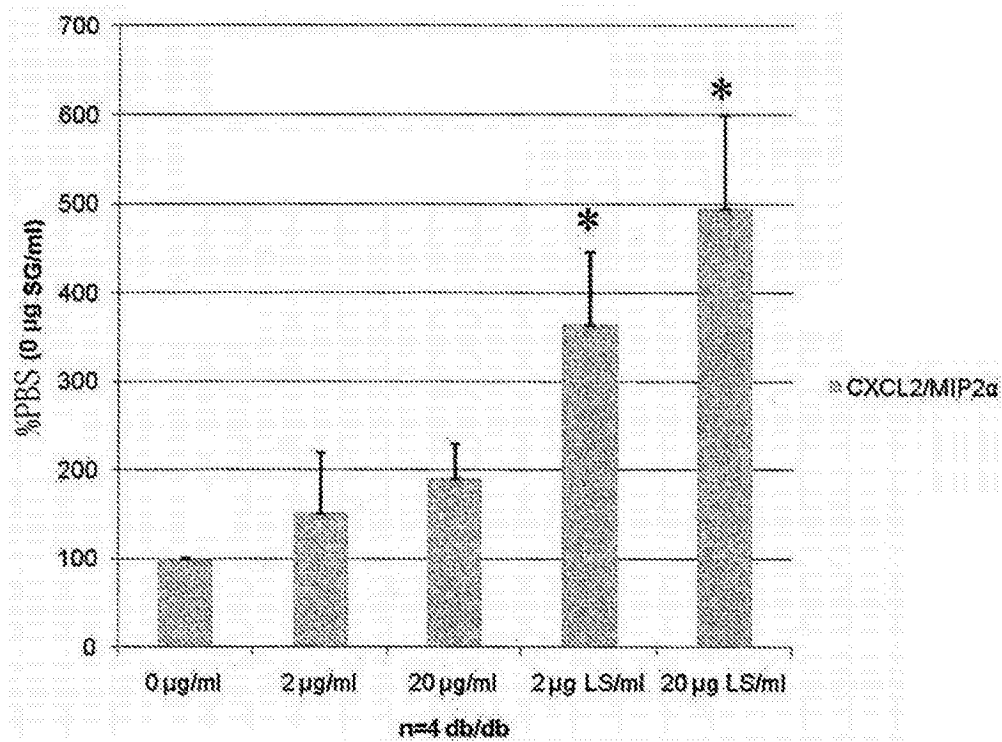


图4

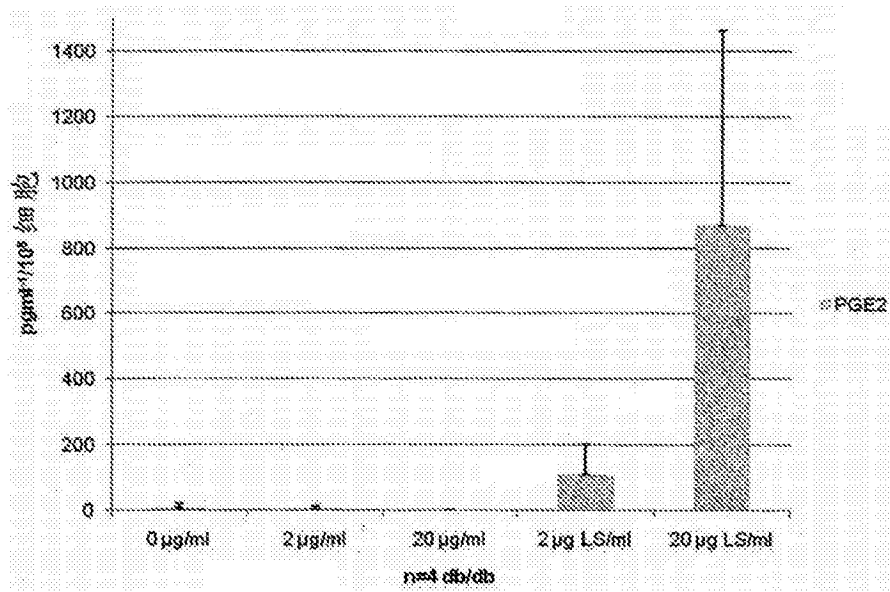


图5

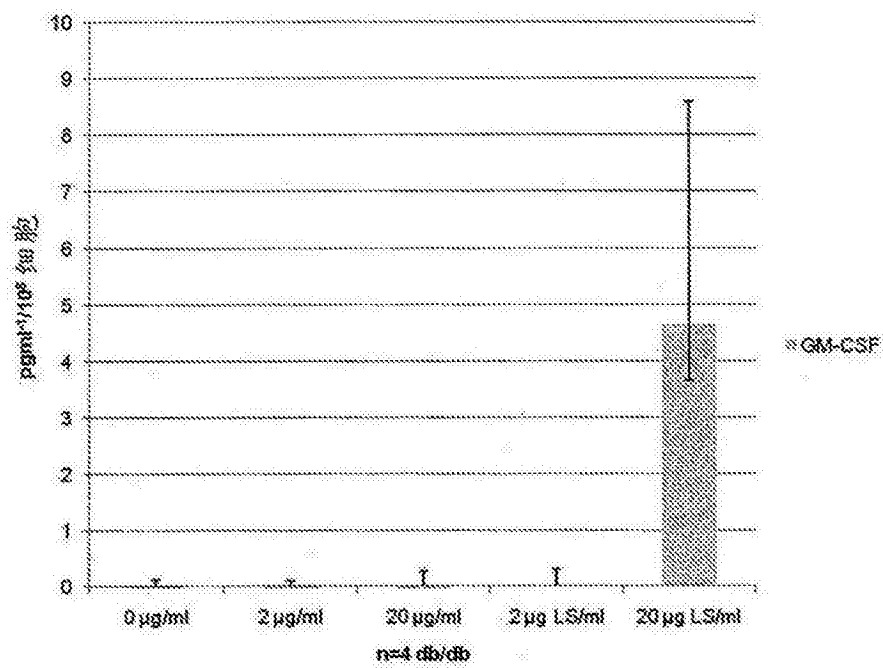


图6

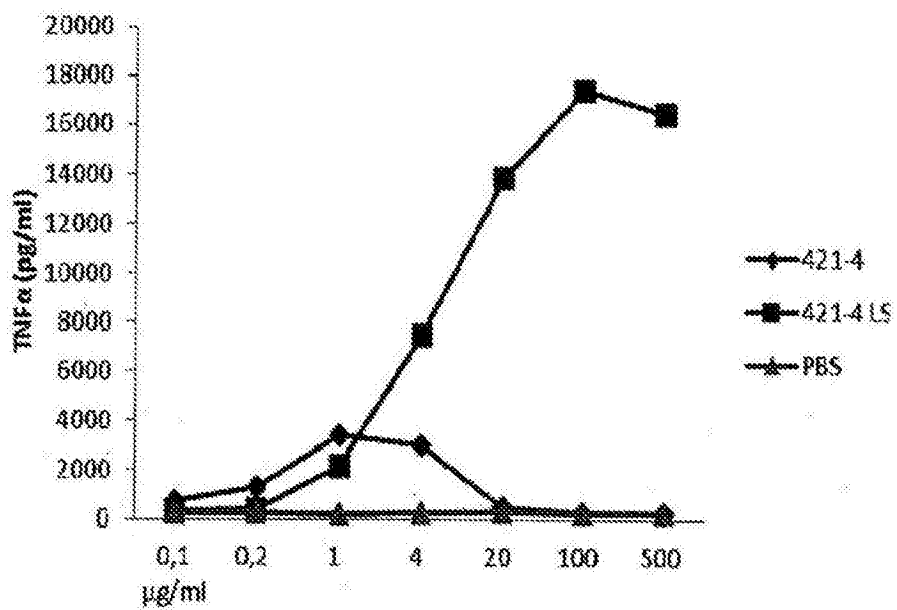


图7

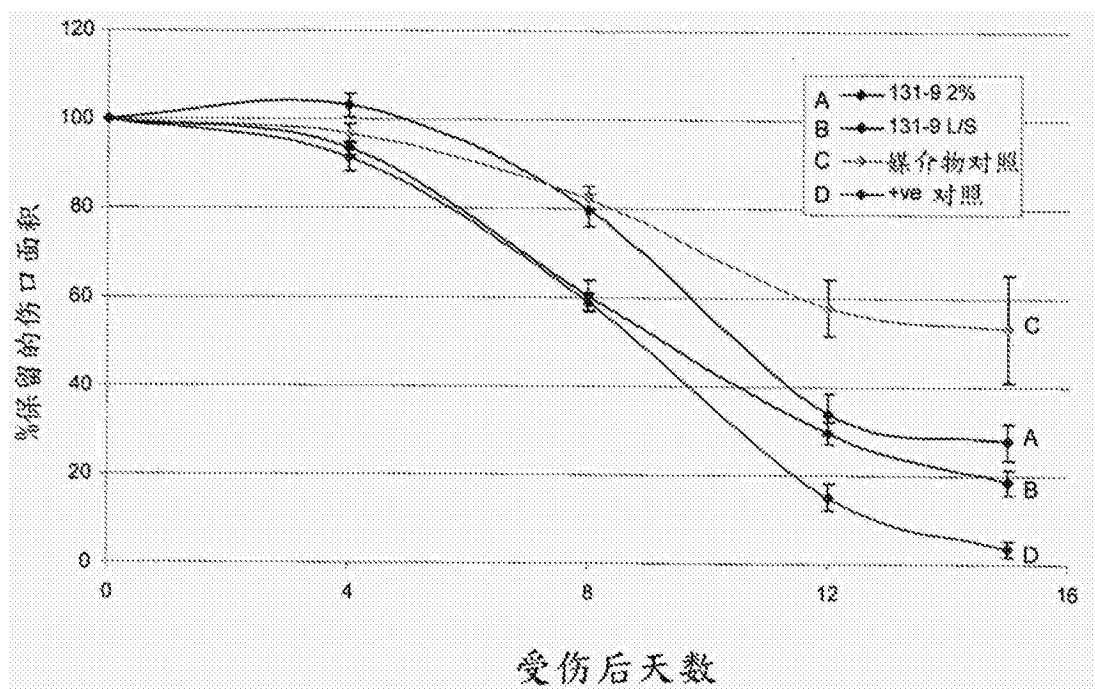


图8

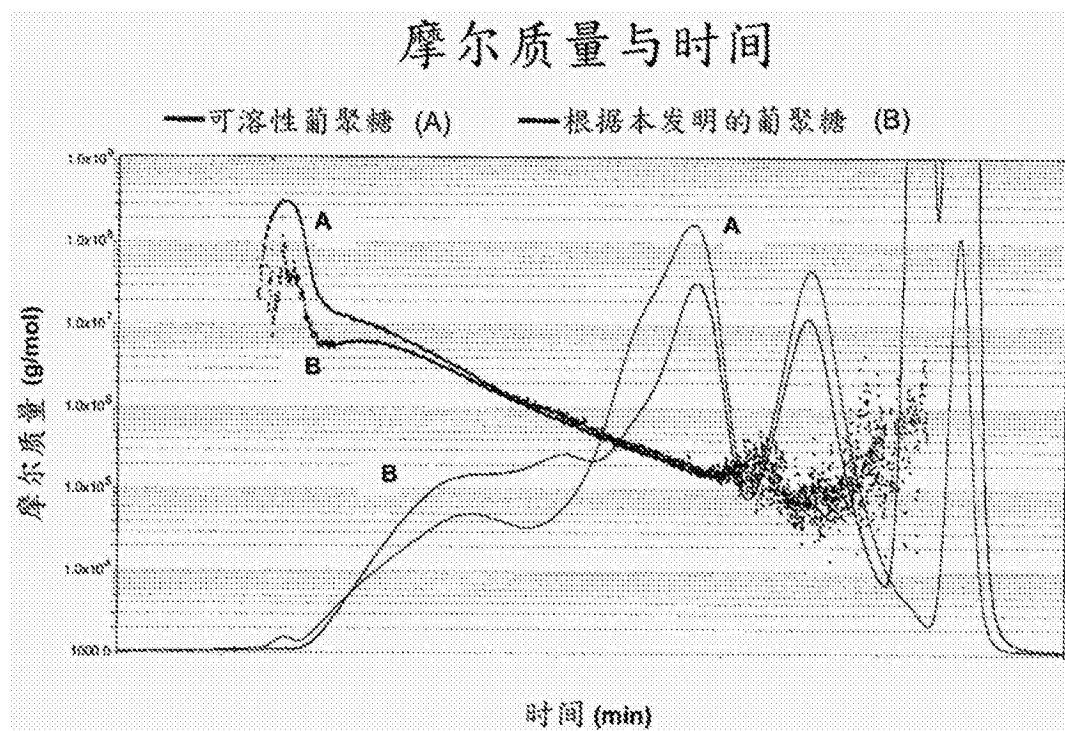


图9

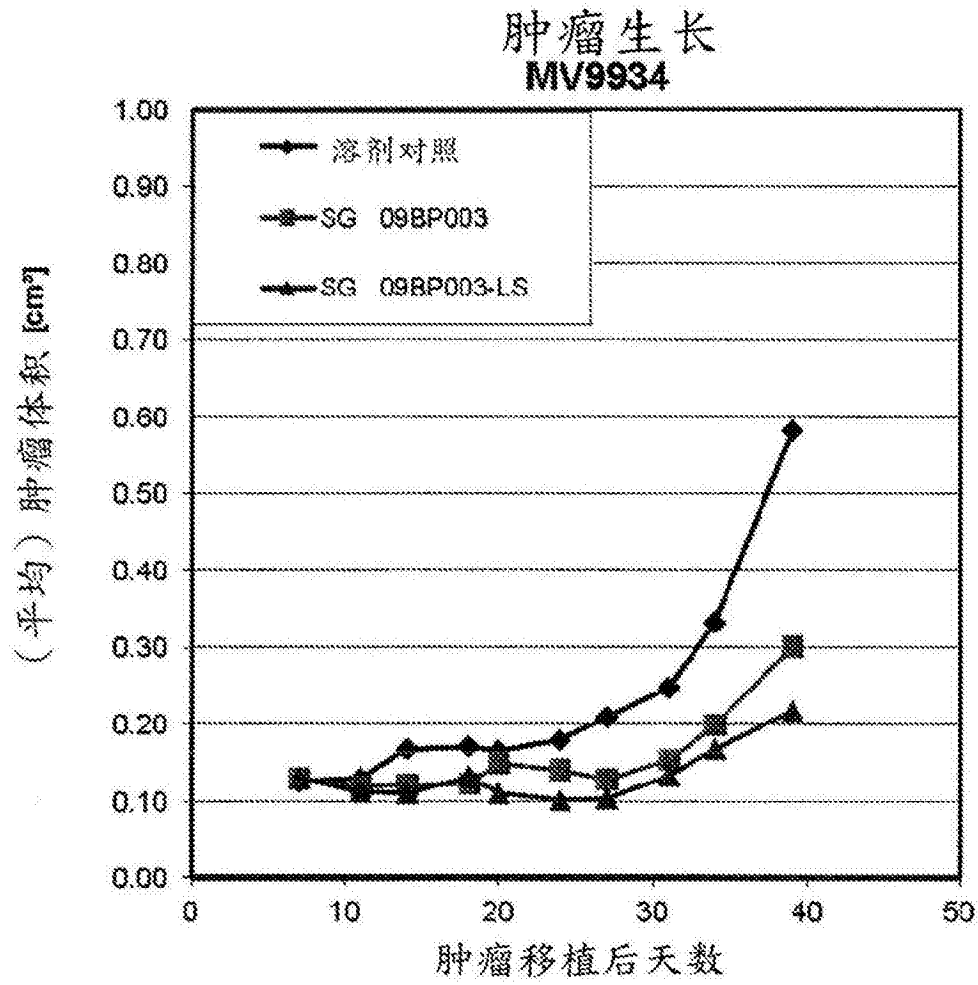


图10

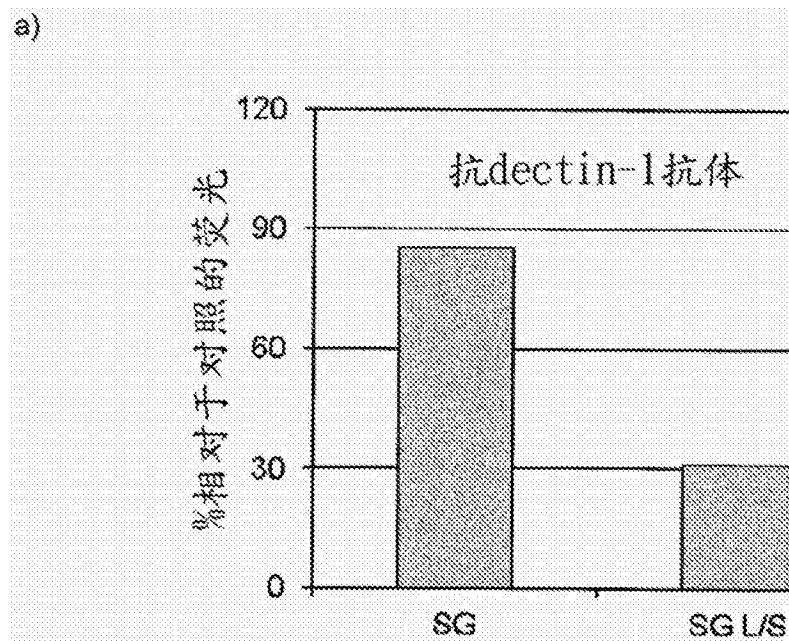


图11a

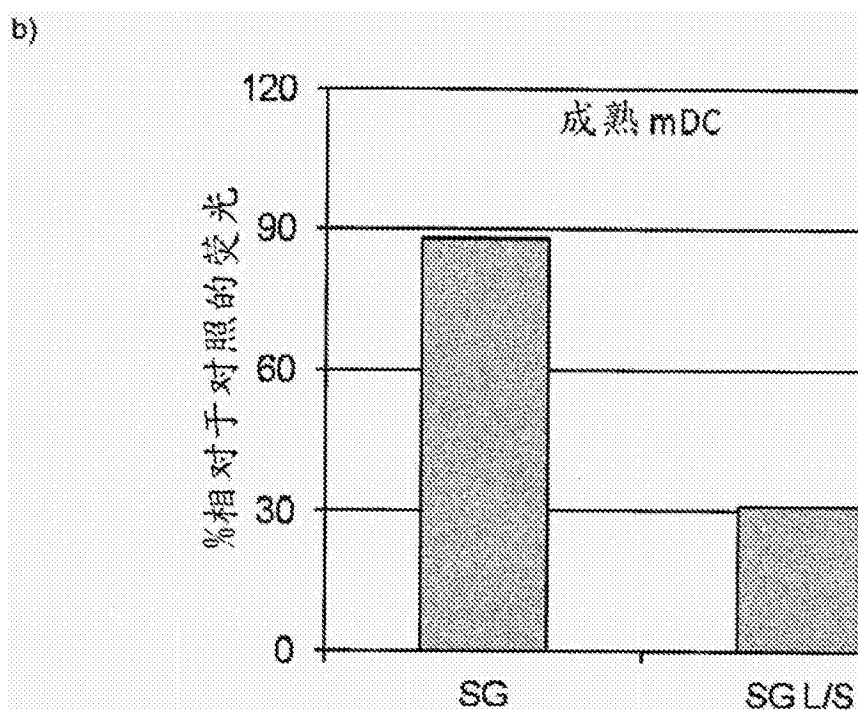


图11b

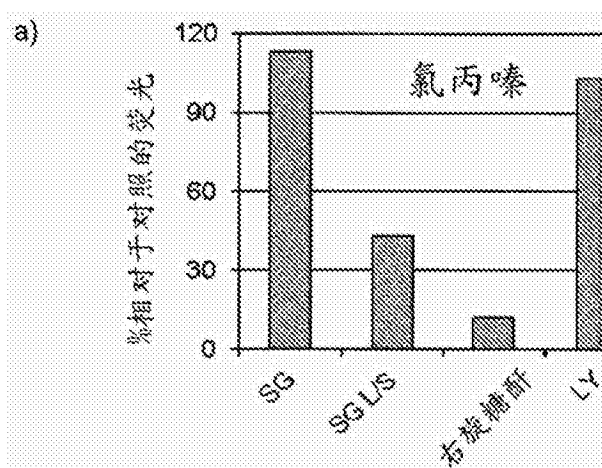


图12a

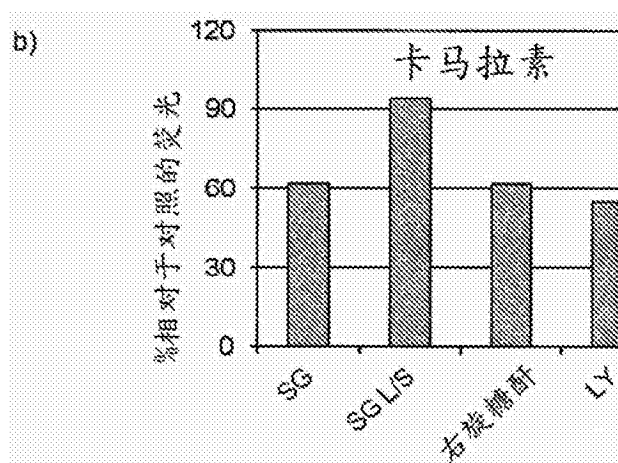


图12b

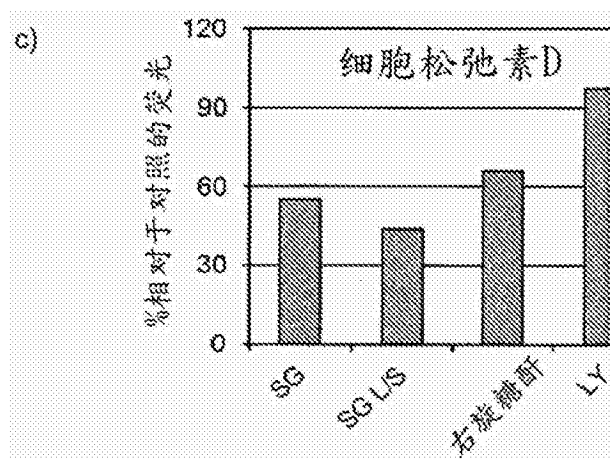


图12c