

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780018934.6

[51] Int. Cl.

C08L 5/00 (2006.01)

C08L 5/08 (2006.01)

[43] 公开日 2009 年 6 月 10 日

[11] 公开号 CN 101454392A

[22] 申请日 2007.5.21

[21] 申请号 200780018934.6

[30] 优先权

[32] 2006.5.22 [33] IT [31] PD2006A000202

[86] 国际申请 PCT/EP2007/054860 2007.5.21

[87] 国际公布 WO2007/135116 英 2007.11.29

[85] 进入国家阶段日期 2008.11.24

[71] 申请人 的里雅斯特大学

地址 意大利的里雅斯特

[72] 发明人 塞乔·保莱蒂 伊万·多纳蒂

伊莲诺·马斯奇

[74] 专利代理机构 北京金之桥知识产权代理有限公司

代理人 耿慕白

权利要求书 3 页 说明书 17 页 附图 7 页

[54] 发明名称

阴离子和阳离子多糖聚合物混合物及其用途

[57] 摘要

本申请描述的组合物包括聚阴离子多糖和由壳聚糖寡糖衍生物组成的聚阳离子多糖的混合物。在本发明的组合物中，尽管所述酸性多糖和壳聚糖衍生物之间形成离子络合物，所述混合物被证实可溶于水性环境。虽然所述多糖具有相对低的平均分子量，所述组合物还被证实流变学特性的粘性和粘弹性意料不到地增加。从生物医药应用角度看，特别是粘弹性补充治疗以及特别是在关节病和眼科手术领域，本发明的组合物的所述可溶性和流变学特性特别有利。

1. 多糖组合物包括至少一个阴离子多糖和至少一个壳聚糖寡糖衍生物的混合物的水性溶液，其中所述壳聚糖衍生物的衍生度至少为 40%，其中水性溶液的离子强度至少为 50 mM 且不超过 175 mM，pH 值至少为 7。

2. 如权利要求 1 所述的多糖组合物，其中所述离子强度为 150 mM。

3. 如权利要求 1 所述的多糖组合物，其中所述离子强度是通过添加 NaCl 使其在所述水性溶液中浓度为 0.05 M -0.175 M 而得到的。

4. 如权利要求 2 所述的多糖组合物，其中所述离子强度是通过添加 NaCl 使其在所述水性溶液中的浓度为 0.15 M 而得到的。

5. 如权利要求 1 所述的多糖组合物，其中在至少一个阴离子多糖和至少一个壳聚糖寡糖衍生物的混合物中，所述阴离子多糖和所述壳聚糖寡糖衍生物的重量比范围是阴离子多糖比壳聚糖寡糖衍生物为 10:1 -1:1。

6. 如权利要求 5 所述的多糖组合物，其中所述至少一个阴离子多糖和至少一个壳聚糖寡糖衍生物的混合物中，所述阴离子多糖和所述壳聚糖寡糖衍生物的重量比范围是阴离子多糖比壳聚糖寡糖衍生物为 3:1-1:1。

7. 如权利要求 1 所述的多糖组合物，其中所述至少一个阴离子多糖和至少一个壳聚糖寡糖衍生物的混合物的水溶液的总聚合物浓度为 1.5% (w/v) -3% (w/v)。

8. 如权利要求 1 所述的多糖组合物，其中所述至少一个阴离子多糖和至少一个壳聚糖寡糖衍生物的混合物的水溶液的 pH 值为 7- 8。

9. 如权利要求 1 所述的多糖组合物，其中通过添加非离子溶质使得所述至少一个阴离子多糖和至少一个壳聚糖寡糖衍生物的混合物的水溶液的渗透压为 250-350 mM。

10. 如权利要求 6 所述的多糖组合物，其中非离子溶质是甘露醇。

11. 如权利要求 1 所述的多糖组合物，其中壳聚糖的取代度为 50% - 80%。

12. 如权利要求 11 所述的多糖组合物, 其中壳聚糖取代度为 70%。
13. 如权利要求 1 所述的多糖组合物, 其中所述壳聚糖寡糖衍生物由具有 2-4 糖苷单元的寡糖衍生壳聚糖而得。
14. 如权利要求 13 所述的多糖组合物, 其中所述寡糖选自乳糖、纤维二糖、纤维三糖、麦芽糖、麦芽三糖、麦芽四糖、壳二糖、壳三糖和蜜二糖组成的组。
15. 如权利要求 14 所述的多糖组合物, 其中所述寡糖是乳糖。
16. 如权利要求 13-15 所述的多糖组合物, 其中所述壳聚糖平均分子量达到 1500 kDa。
17. 如权利要求 16 所述的多糖组合物, 其中所述壳聚糖平均分子量为 400 kDa-1000 kDa。
18. 如权利要求 1 所述的多糖组合物, 其中所述阴离子多糖是羧化或硫酸盐化的多糖。
19. 如权利要求 18 所述的多糖组合物, 其羧化多糖选自透明质酸、藻酸盐、果胶、羧甲基纤维素和黄原胶组成的组。
20. 如权利要求 19 所述的多糖组合物, 其中羧化的多糖是透明质酸。
21. 如权利要求 18 所述的多糖组合物, 其中所述硫酸盐化的多糖选自卡拉胶、硫酸琼脂糖、硫酸角质素、硫酸皮肤素、硫酸酯改性淀粉、肝素、硫酸乙酰肝素组成的组。
22. 如权利要求 18-21 所述的多糖组合物, 其中所述阴离子多糖平均分子量达到 1500 kDa。
23. 如权利要求 22 所述的多糖组合物, 其中所述阴离子多糖平均分子量为 100 kDa - 1000 kDa。
24. 如权利要求 23 所述的多糖组合物, 其中所述阴离子多糖平均分子量为 900 kDa。
25. 如权利要求 1-24 中任一所述的多糖组合物在制备生物医药领域中用于人和非人哺乳动物可接受给药的产品中的用途。
26. 如权利要求 25 所述多糖组合物的用途, 其中所述应用是粘弹性

补充治疗在治疗炎症和/或外伤骨关节病中的应用。

27. 如权利要求 26 所述多糖组合物的应用, 其中所述骨关节并为骨关节炎、关节炎、半月板或韧带损伤。

28. 如权利要求 26-27 所述的多糖组合物的用途, 其中给药是通过关节内路径。

29. 如权利要求 25 所述的多糖组合物的用途, 其中所述应用是在眼科手术中的应用。

阴离子和阳离子多糖聚合物混合物及其用途

技术领域:

本发明涉及括多糖混合物组成的组合物及其生物医药用途,所述多糖混合物由阴离子和聚阳离子多糖组成,所述多糖具有适宜的理化特性,特别是具有高粘性和粘弹性。

背景技术:

已知多糖被认为是具有应用价值的生物高聚物,这是由于其高生物适用性及其特殊的理化特性,特别是其水溶液的粘性特性,也已知所谓的流变学特性主要与其分子量相关。从应用的角度看,这些生物高聚物中透明质酸是特别有用的生物适用聚合物,因而被广泛应用于生物医药领域,其水溶液具有独特的流变学特性,表现出令人感兴趣的粘性和粘弹性特性。已知多糖具有重复的由葡萄糖醛酸和 N-乙酰基-葡萄糖胺组成的二糖单元。由于多糖中存在糖醛单元,透明质酸在生理 pH 值下(即 7.4)具有净负电荷,因此是聚阴离子。由于其所述的特性(粘性和粘弹性)被广泛应用于化妆品和制药领域,或以本体使用或用作药物传输系统。特别的,透明质酸被发现广泛应用在眼科手术和骨关节病领域,这是由于其前述理化特性而用于滑液的粘弹性补充治疗。事实上,高分子量透明质酸(大于 2000kDa)浓缩液(1-2%)具有极好的粘弹性和高粘性。这些特性使得透明质酸特别适于治疗无论是炎症还是外伤导致的关节病,这是因为其可以提供和/或恢复足够的关节功能。用于骨关节领域的优选透明质酸制剂是通过关节内注射的可注射透明质酸溶液;在这种方法中,其独特的流变学特性(即粘性和粘弹性)可完全用于恢复关节的“机械”功能的目的。

然而获得并提纯高分子量透明质酸(至少 2000 kDa)同时还要避免其降解以及低分子量聚合物的形成和/或高多分散性,这涉及络合物和昂贵的

生产工艺,这在制备用于前述治疗的总成本中占很重比例。为克服这个问题,开始直接关注增加低分子量的更便宜的透明质酸溶液的粘性,使得可以使用通常被拒绝的用于低附加值应用(例如化妆品领域)的产品被使用并有明显的受益。已经广泛研究透明质酸衍生物,特别是与不同交联剂交联的衍生物,以改善/增加低平均分子量的透明质酸的流变学特性。

由于其水溶液/分散液的粘性特性,其它多糖也被广泛应用。由于量大和价低,用于制药和食品工业最多是藻酸盐和壳聚糖。

壳聚糖是一种多糖,广泛存在于自然界,由甲壳素(甲壳动物外骨骼的主要成分)去酰基化而得。其主要由分布着 N-乙酰基-葡萄糖胺单元(甲壳素处理残基)的葡萄糖胺单元组成。这种多糖不溶于水,除非添加有机或无机酸使得 $\text{pH} \leq 5$ 。降低 pH 值使得葡萄糖胺残基上的胺基质子化,因而可溶。由于被广泛使用,壳聚糖成为被研究最多的多糖,包括化学方面,以改善其特性,特别是对应用有用的粘性和水溶性。在过去的几年,不同壳聚糖衍生物通过对聚合链化学改性而得。对于这些改性,葡萄糖胺单元上胺基残基反应被广泛使用。特别是添加糖类单元(单糖和寡糖)作为侧链可得到可溶于水的壳聚糖衍生物而无需将 pH 降低到酸值(这会导致聚合物降解的问题)。

专利 US 4,424,346 (Hall, L.D.和 Yalpani, M.)第一次描述合成这些衍生物,及其在非酸环境下水溶性。

专利 US 6,277,792 (House, R.F.)中与专利 US 4,424,346 相似方法的改性壳聚糖被使用,没有与其它聚合物系统结合,无论是在溶液还是分散液中,以增加水溶液中的粘性。

专利 US 5,747,475 (Nordquist, R.E.等)中单糖或寡糖改性的壳聚糖制得的生物材料在免疫治疗中基于结合有敏感基质的激光系统被用作免疫佐剂。

为改善这些多糖(特别是透明质酸)的理化特性进而粘性和/或粘弹性,合并透明质酸和壳聚糖所得的组合物已经被描述。

专利 WO2004/022603 (Cho, K.等)中,为得到改善理化特性(特别是改善的粘弹性)的透明质酸,所制备的透明质酸衍生物是通过将适当胺基引入乙二醇形成胺基键而交联到乙二醇聚合物(PEG 或普朗尼克(Pluronic))。同

样在一个特定实施例中描述了透明质酸衍生物交联到第二个多糖,即低分子量(最多 5 kDa)壳聚糖。交联反应在 NHS (N-羟基丁二酰亚胺)存在下使用冷凝剂,例如 EDC (N-[3-二甲氨基丙基]-N'-乙基碳二亚胺氯)。交联的透明质酸衍生物具有高粘弹性并适于用于具有这些理化特性的透明质酸的各种典型用途中,包括用于粘弹性补充治疗治疗关节病。前述专利应用中的设置确定可以将两个多糖合并,利用它们理化特性同时通过共价键改善这些特性无需两个相反电荷多糖之间的离子相互反应。

需要注意的是,壳聚糖的聚阳离子特性使得很难与其它多糖特别是聚阴离子多糖(例如透明质酸)并存。在这方面,透明质酸(聚阴离子)水溶液和壳聚糖(聚阳离子)水溶液的结合可以立即形成不溶性凝聚。这是由于水性环境下正电荷和负电荷之间形成强相互反应。两个多糖的沉淀/凝聚使其不能制成可注射制剂。碱性多糖和酸性多糖之间的凝聚过程是已知并广泛描述中文献中。例如专利 US 5,620,706 (Severian, D.等)描述壳聚糖和黄原胶(一种侧链带负电荷的多糖)之间的凝聚,这用于获得不溶性水凝胶。

为增加壳聚糖水溶性,专利 US 6,756,363 (Nordquist, R.E., Carubelli, R.)提供糖化的壳聚糖单糖和/或寡糖衍生物,它们的半乳糖衍生物被描述为基于发明目的的优选衍生物。然而在后面这类反应中半乳糖是不可逆的改性形成半乳糖醇。这些衍生物的溶液具有用于粘性手术(特别是眼科粘性手术)所必需的特性。这些特性是生理渗透压为 250-350 mM, pH 值为 5.5-7.5。还提到合并使用混合有其它在粘性手术中可用材料(例如透明质酸、硫酸软骨素和羧甲基纤维素)的溶液。然而,这样的混合物没有形成,也没有已知的提到的阴离子和阳离子聚合物并存性问题。因此所述混合物所需条件没有形成凝聚或可能的层分离,且不可逆地损失混合物溶液分子分散的条件,而组合物流变学特性的改性也消失了。

专利 WO2005/061611 (White, B.J.等)描述制备水凝胶,其由包括水溶性交联碱性多糖衍生物和非交联阴离子多糖组合物组成。特别是,所述水凝胶是通过混合透明质酸和交联的壳聚糖的 N-羧甲基、O-羧甲基、O-羟乙基衍生物或特定的乙酰化壳聚糖而得。基于该发明,这些壳聚糖衍生物可与透明

质酸混合在溶液中,这是因为它们在例如在链上没有任何正电荷和避免形成离子络合物的 pH 条件下可溶。这样的凝聚由于其中一个聚合物上完全移除或补偿电荷则避免了聚阴离子。因而是聚阴离子/中性多糖或聚阴离子/聚两性电解质的溶液。

然而使用低或相对低分子量多糖(甚至是不同电荷混合物)以得到具有合适理化性能的可能性仍然是大量应用中所追求的,特别是在生物医药领域需要高粘性/粘弹性多糖溶液。基于这点,用于制备具有适于已知应用的理化特性的多糖溶液的新技术方案仍被积极研究中。

因此本发明第一个目的是制备水性多糖溶液,其具有适宜的粘性/粘弹性以便至少应用于炎症和外伤关节病的粘弹性补充治疗治疗中,也不排除其它已知的所述粘性和/或粘弹性溶液中生物医药领域的应用,例如眼科手术。

第二目的是由商业可用且廉价的低分子量或相对低分子量的多糖制备所述组合物,无需将所述多糖进行络合,而且改善其理化,明显节约成本。

发明内容:

为实现前述目的,本发明已经确定适宜的碱性多糖衍生物,当其与阴离子多糖物理混合时,在适当的条件下,提供多糖水性溶液而没有产生不溶性凝聚。

目标是通过阴离子多糖和壳聚糖寡糖衍生物实现的。此外,特定的条件可以用于得到改性聚阳离子多糖和聚阴离子多糖可溶性混合物。

令人惊讶的,同样提供组合物,其中,聚阴离子多糖和聚阳离子多糖衍生物物理混合物可溶于水溶性环境,所述组合物显示添加壳聚糖寡糖衍生物后显著增加了聚阴离子溶液的粘性。

本发明因而提高多糖组合物,其包括至少一个阴离子多糖和至少一个壳聚糖寡糖衍生物的混合物的水性溶液,其中所述壳聚糖衍生物的衍生度至少为 40%,其中水性溶液中离子强度至少为 50 mM 且不超过 175 mM, pH 值至少为 7。

本发明还提供所述多糖混合物组合物的在生物医学领域的用途,包括在

关节内粘弹性补充治疗治疗骨关节病和眼科手术中的用途。

附图说明:

图 1:含有透明质酸和乳糖改性的壳聚糖(以下简称基察克(chitlac))的溶液和单独聚合物(T_0)在下列条件下的透射率($\lambda=600\text{ nm}$)相对关系: A) (例 4) NaCl 0.15 M, Hepes 10 mM, pH 7.4; B) (例 5) NaCl 0.1 M, Hepes 10 mM, pH 7.4; C) (例 6) NaCl 0.05 M, Hepes 10 mM, pH 7.4; D) (例 7) NaCl 0.025 M, Hepes 10 mM, pH 7.4。总聚合物浓度: 2%。透明质酸和基察克重量比= 3:1。在所有溶液中渗透压值通过添加非离子溶质甘露醇保持在 300 mM。测量是通过 CaryE4 紫外-可见光分光光度计在 25℃ 下进行。

图 2:二元多糖混合物(基察克/聚阴离子)和下列生物聚合物中单独聚合物(T_0)透射率 ($\lambda=600\text{nm}$)相对关系: A) (例 8) 透明质酸; B) (例 9) 羧甲基纤维素; C) (例 10) 藻酸盐; D) (例 11)硫酸琼脂糖; E) (例 12)卡拉胶。条件: NaCl 0.15 M, Hepes 10 mM, pH 7.4。总聚合物浓度: 1.5%。聚阴离子和基察克重量比= 1:1。在 D) (例 11)情况下, 是在 50℃ 进行的混合。测量方法如图 1 所述。

图 3:二元多糖混合物(透明质酸/例 1、2、3 的壳聚糖衍生物)和下列衍生物单独聚合物(T_0)透射率($\lambda=600\text{nm}$)相对关系: 基察克 (通过胺化还原的由乳糖改性的壳聚糖; 例 1); 基塞尔(Chitcell) (通过胺化还原的由纤维二糖改性的壳聚糖; 例 2); 基麦尔 3(Chitmal3) (通过胺化还原的由麦芽三糖改性的壳聚糖; 例 3)。条件: NaCl 0.15 M, Hepes 10 mM, pH 7.4。总聚合物浓度: 1.5%。透明质酸和改性壳聚糖重量比= 1:1。测量方法如图 1 中所述。

图解 1: 图解示范了聚阴离子和聚阳离子或其可溶溶液之间凝聚的形成。

图 4: 二元多糖混合物和单独聚合物(T_0)在下列条件下透射率($\lambda=600\text{ nm}$)相对关系: A) (例 13) 透明质酸/基察克, 在去离子水中(pH ~ 5.5); B) (例 14) 透明质酸/基察克, Hepes 10 mM, pH 7.4; C) (例 8) 透明质酸/基察克, NaCl 0.15M, Hepes 10 mM, pH 7.4; D) (例 15) 透明质酸/聚-L-赖氨酸 (PLL), NaCl 0.15M, Hepes 10 mM, pH 7.4; 总聚合物浓度: 1.5%。透明质酸和聚阳离

子重量比= 1:1。测量方法如图 1 所述。

图 5: 发射光谱: 罗丹明 (rhodamine) 标记的藻酸盐(— —)(例 16) (0.75g/L)和荧光素标记的基察克(•—•) (例 17) (0.75 g/L), 与两个成分总理论值(•••)的对比, (——)为罗丹明标记的藻酸盐和荧光素标记的基察克混合物光谱(例 18) (总聚合物浓度 0.15g/L, 两个多糖质量比=1:1。条件: NaCl 0.015 M, Hepes 1 mM, pH 7.4)。激励波长 450 nm。仪器设置: 扫描率 50 nm/min, 发射间隙 4.5 nm, 激励间隙 4.5 nm。测量通过 Perkin Elmer 公司的 LS 50B 荧光分光光度计在 25℃ 下进行。

图 6:对透明质酸 (大约 $8-9 \times 10^5$ Mw)和基察克二元溶液(例 19)施用 Cox-Merz 规则。图例: (■) 粘度(η)是变形速度($\dot{\gamma}$)的函数, (Δ) 复合粘度(η^*)是角速度(ω)的函数。总聚合物浓度 2%。透明质酸与基察克重量比= 3:1 (透明质酸 1.5%, 基察克 0.5%)。测量通过 StressTech 流变计(生产商: Reologica Instruments AB, 22363, Lund, Sweden)在锥-板几何形(50 mm 半径, 1°角)25 °C 下进行。

图 7: (▼)含透明质酸 ($\sim 160,000$ Mw)和基察克的溶液(例 4)的粘度。总聚合物浓度: 2%。透明质酸与基察克重量比= 3:1 (透明质酸 1.5%, 基察克 0.5%)。(○)浓度 1.5%的透明质酸 ($\sim 160,000$ Mw) 溶液的粘度。(■) 浓度 0.5%的基察克溶液的粘度。条件: NaCl 0.15 M, Hepes 10 mM pH 7.4, 25℃。测量方法如图 6 中所述。

图 8: (▼) 含有透明质酸 ($\sim 8-9 \times 10^5$ Mw) 和基察克的溶液(例 19)的粘度。总聚合物浓度: 2%。透明质酸和基察克重量比= 3:1 (透明质酸 1.5%, 基察克 0.5%)。 (○) 浓度为 1.5%的透明质酸 ($\sim 8-9 \times 10^5$ Mw)溶液的粘度。条件: NaCl 0.15 M, Hepes 10 mM, pH 7.4, 25℃。测量方法如图 6 中所述。

图 9: (▼) 含有藻酸盐($\sim 130,000$ Mw)和基察克的溶液(例 20)的粘度。总聚合物浓度: 2%。藻酸盐与基察克重量比= 3:1 (藻酸盐 1.5%, 基察克 0.5%)。 (○)浓度 1.5%藻酸盐($\sim 130,000$ Mw)溶液的粘度。(■) 浓度 0.5%基察克溶液粘度。条件: NaCl 0.15 M, Hepes 10 mM, pH 7.4, 25℃。测量方法如图 6 中所述。

图 10: (▼) 含有透明质酸 (~ 250,000 M_w)和基察克的溶液(例 21)的粘度。总聚合物浓度: 3%。透明质酸和基察克重量比= 1:1 (透明质酸 1.5%, 基察克 1.5%)。 (○)浓度为 1.5%透明质酸(~ 250,000 M_w)溶液的粘度。 (■)浓度为 1.5%的基察克溶液的粘度。条件: NaCl 0.15 M, Hepes 10 mM, pH 7.4, 25°C。测量方法如图 6 中所述。

图 11: 粘弹性光谱: A)透明质酸 (~8-9x10⁵ M_w) 溶液(1.5%), B)透明质酸和基察克二元溶液(例 19)。总聚合物浓度 2%。透明质酸和基察克重量比= 3:1 (透明质酸 1.5%, 基察克 0.5%)。条件: NaCl 0.15 M, Hepes 10 mM, pH 7.4, 25°C。图例: (■) = G' , (○) = G'' , (▲) = η^* 。测量通过使用 StressTech 流变计(Reologica Instruments AB, 22363, Lund, Sweden), 板-锥几何形(50 nm 束, 1°角) 频率 0.01-30 Hz, 25°C。

具体实施方案:

本发明的多糖组合物的用途和优点在下述非限制性示例的详细描述中会更好理解, 一些组合物实例及其理化特性被描述。

为获得可溶于水性环境且具有适于多糖的各种用途(特别是, 但不限制于关节粘弹性补充治疗)的粘性和/或粘弹性并起始于非高平均分子量多糖但没有进行络合化学处理的聚阴离子多糖(例如透明质酸)组合物, 发明人发现使用壳聚糖寡糖衍生物的解决方案。

该目标的实现是通过组合物, 所述组合物包括酸性多糖和碱性多糖衍生物混合物组成, 即多糖组合物包括至少一种阴离子多糖和至少一种壳聚糖寡糖衍生物混合物的水溶液, 其中所述聚阳离子多糖衍生物的衍生度至少 40%, 其中所述水溶液的离子强度至少 50 mM 且不超过 175 mM, pH 值至少为 7。未得到本发明多糖混合物的水溶液, 所述阴离子多糖和壳聚糖衍生物中聚阴离子与寡糖衍生物的重量比范围是 10:1-1:1(聚阴离子:壳聚糖衍生物)。为了本发明之目的, 多糖间的优选重量比是 3:1-1:1, 而溶液的聚合物浓度是 1.5% w/v (g/mL)-3% w/v (g/mL)。

具有糖类侧基团的壳聚糖衍生物(例如通过还原胺化反应插入乳糖单

元)是已知的并且在US专利4,424,346中提到;还已知所述衍生物使得这种碱性多糖水溶性更大。本领域人员已知壳聚糖可以通过还原胺化反应还原具有1-4个糖苷单元的寡糖而衍生得来。特别是为了本发明的目的,所述寡糖含有2-4个糖苷单元,并且优选自乳糖、纤维二糖、纤维三糖、麦芽糖、麦芽三糖、麦芽四糖、壳二糖、壳三糖和蜜二糖组成的组。

用于制备前述寡糖衍生物的壳聚糖的平均分子量(以下标记为 M_w)可达1500 kDa,优选为400 kDa - 1000 kDa。另外,出于本发明的目的,壳聚糖的寡糖取代胺基的取代率超过40-45%(~45%)。优选的,寡糖取代壳聚糖的胺基的取代率为50%-80%,优选是70%。

所述壳聚糖寡糖衍生物制备工艺是已知工艺,包括在用还原性糖类(例如乳糖)在氰基硼氢化钠存在下处理壳聚糖乙酸(pH 4.5)溶液和壳聚糖甲醇溶液。壳聚糖胺基与乳糖醛基之间的反应使得形成不稳中间体,称为西弗碱(Schiff base)。硼氢化物存在下的还原使其形成稳定的仲胺。

关于聚阴离子多糖,本发明的多糖混合物组合物可以通过羧化的阴离子多糖(例如透明质酸、藻酸盐、果胶、羧甲基纤维素、黄原胶和其它微生物羧化的多糖)和硫酸盐(卡拉胶、硫酸琼脂糖、硫酸角质素、硫酸皮肤素、硫酸酯改性淀粉、肝素、硫酸乙酰肝素)得到。对于本发明的组合物,酸性多糖选自羧化的下列化合物透明质酸、藻酸盐、果胶和羧甲基纤维素以及卡拉胶和硫酸琼脂糖的硫酸盐。聚阴离子的平均分子(M_w)可达1500 kDa,优选100 kDa - 1000 kDa;更优选使用900 kDa。

出于本发明目的,壳聚糖衍生物和聚阴离子混合物的总聚合物浓度可达3% w/v (g/mL)。优选所述总聚合物浓度为1.5% w/v (g/mL) - 3% w/v (g/mL)。

通常两种不同聚合物在溶液中的并存的形成是在pH为7.4,在可形成至少50 mM离子强度的支撑盐存在下,比例优选为10:1(聚阴离子:壳聚糖衍生物)-1:1(聚阴离子:壳聚糖衍生物),更优选为3:1(聚阴离子:壳聚糖衍生物)-1:1(聚阴离子:壳聚糖衍生物)。

因此,基于本发明,混合两种聚合物溶液(即所述混合物形成水溶液)的条件是pH值为7-8,优选为生理pH值7.4左右,以及适宜的离子强度。

特别的, 为获得足够的离子强度[离子强度 = $\frac{1}{2}(\sum_i c_i z_i^2)$, 其中 c_i 是 i^{th} 离子浓度, z_i 是其电荷绝对值], 当总聚合物浓度为 1.5% - 3%, 包括本发明混合物的组合物含有一定浓度的简单支撑盐, 优选 NaCl, 浓度为 0.05 M (离子强度 = 50mM) - 0.175 M (离子强度 = 175 mM)。优选的, 对于总聚合物浓度达 3% 的溶液, 支撑盐浓度是 0.15 M (离子强度 = 150 mM)。对于多糖和支撑盐的溶液, 小量缓冲液也可以被添加。优选浓度为 10 mM 的 Hepes ((N-(2-羟乙基)哌嗪-N'-(2-己磺酸)钠盐) 被加入系统中以维持 pH 值不变, 优选 7-8, 更优选为 7.4。

另外, 为了所述组合物的生物医药用途, 优选通过进一步添加非离子溶质来确保本发明多糖混合物水性溶液的渗透压值为 250-350 mM。

一些壳聚糖寡糖衍生物的合成以及以及包括本发明多糖混合物的组合物的制备在下面非限制性示例中被描述。

例 1:合成壳聚糖乳糖衍生物 (称为基察克)

壳聚糖 (1.5 g, 乙酰化度 11%) 被溶解于 110 mL 甲醇 (55 mL) 和 1% 乙酸缓冲液 (pH 4.5 (55 mL)) 溶液中。60 mL 含有乳糖 (2.2 g) 和氰基硼氢化钠 (900 mg) 的甲醇 (30 mL) 和 1% 乙酸缓冲液 (pH 4.5 (30 mL)) 溶液被添加。混合物搅拌 24 小时, 转入渗析管(切断: 12000 Da) 由 0.1 M NaCl (2 次) 和去离子水渗析, 直到导电率为 4 μ S (4 $^{\circ}$ C)。最后溶液通过微孔 (0.45 μ m) 过滤器过滤, 冻干。

例 2: 合成壳聚糖纤维二糖衍生物 (下称基塞尔)

壳聚糖 (1.5 g, 乙酰化度 11%) 被溶于 110 mL 的甲醇 (55 mL) 和 1% 乙酸缓冲液 (pH 4.5 (55 mL)) 溶液中。60 mL 含有纤维二糖 (2.2 g) 和氰基硼氢化钠 (900 mg) 的甲醇 (30 mL), 1% 乙酸缓冲液 (pH 4.5 (30 mL)) 溶液被添加。混合物搅拌 24 小时, 转入渗析管(切断: 12000 Da), 有 NaCl 0.1 M (2 次) 和去离子水渗析, 直到导电率为 4 μ S (4 $^{\circ}$ C)。最后溶液通过微孔过滤器 (0.45 μ m) 过滤, 冻干。

例 3: 合成壳聚糖麦芽三糖衍生物(下称基麦尔 3)

壳聚糖 (300 mg, 乙酰化度 11%) 溶于 22 mL 的甲醇 (11 mL) 和 1% 乙酸

缓冲液 (pH 4.5 (11 mL)) 溶液中。含有麦芽三糖 (650 mg)和氰基硼氢化钠 (180 mg)的 12 mL 的甲醇 (6 mL), 1%乙酸缓冲液 (pH 4.5 (6 mL)) 被添加。混合物搅拌 24 小时, 转入渗析管(切断: 12000 Da), 有 NaCl 0.1 M (2 次) 和去离子水渗析, 直到导电率为 $4\mu\text{S}$ (4°C)。最后溶液通过微孔过滤器 ($0.45\mu\text{m}$) 过滤, 冻干。

下述多糖混合物的例子是通过前述壳聚糖衍生物和市售不同平均分子量的聚阴离子多糖所得。

例 4: 低 M_w 透明质酸: 基察克为 3:1 w/w 的混合物; 总多糖浓度 2% w/v (g/mL)

制备 20 mL 透明质酸 (600 mg, $M_w \sim 160,000$)溶液, 其含有 NaCl 0.15 M, Hepes 10 mM, pH 7.4。制备 20 mL 基察克 (200 mg, $M_w \sim 1.5 \times 10^6$, 例 1) 溶液, 其含有 NaCl 0.15 M, Hepes 10 mM, pH 7.4。两个溶液通过磁棒搅拌混合, 得到 40 mL 溶液, 其含有 1.5%的透明质酸和 0.5%的基察克(总聚合物浓度 2%), 全透明, 无沉淀和/或凝聚。

例 5: 低 M_w 透明质酸: 基察克为 3:1 w/w 的混合物; 总多糖浓度 2% w/v (g/mL)

制备 20 mL 透明质酸 (600 mg, $M_w \sim 160,000$)溶液, 其含有 NaCl 0.1 M, Hepes 10 mM, pH 7.4。制备 20 mL 基察克 (200 mg, $M_w \sim 1.5 \times 10^6$, 例 1) 溶液, 其含 NaCl 0.1 M, Hepes 10 mM (pH 7.4)。两个溶液通过磁棒搅拌混合物, 得到 40 mL 溶液, 其含有 1.5% 透明质酸和 0.5%基察克 (总聚合物浓度 2%), 全透明, 无沉淀和/或凝聚。

例 6: 3:1 w/w 混合物, 低 M_w 透明质酸: 基察克; 总多糖浓度 2% w/v (g/mL)

制备 20 mL 透明质酸 (600 mg, $M_w \sim 160,000$)溶液, 含有 NaCl 0.05 M, Hepes 10 mM, pH 7.4。制备 20 mL 基察克 (200 mg, $M_w \sim 1.5 \times 10^6$, 例 1)溶液, 其含有 NaCl 0.05 M, Hepes 10 mM (pH 7.4)。两个溶液通过磁力搅拌混合, 得到 40 mL 溶液, 其含有 1.5% 透明质酸和 0.5% 基察克 (总聚合物浓度 2%), 全透明, 无沉淀和/或凝聚。

例 7: 低 M_w 透明质酸: 基察克为 3:1 w/w 的混合物; 总多糖浓度 2% w/v (g/mL)

制备 20 mL 透明质酸 (600 mg, $M_w \sim 160,000$) 溶液, 其含有 NaCl 0.025 M, Hepes 10 mM, pH 7.4。制备 20 mL 基察克 (200 mg, $M_w \sim 1.5 \times 10^6$, 例 1) 溶液, 其含有 NaCl 0.025 M, Hepes 10 mM (pH 7.4)。两个溶液通过磁力搅拌混合得到 40 mL 溶液, 含有 1.5% 透明质酸和 0.5% 基察克(总聚合物浓度 2%), 其中观测到凝聚存在。

例 8: 低 M_w 透明质酸: 基察克为 1:1 w/w 的混合物; 总多糖浓度 1.5% w/v (g/mL)

制备 20 mL 透明质酸 (300 mg, $M_w \sim 160,000$) 溶液, 其含有 NaCl 0.15 M, Hepes 10 mM, pH 7.4。制备 20 mL 基察克 (300 mg, $M_w \sim 1.5 \times 10^6$, 例 1) 溶液, 其含有 NaCl 0.15 M, Hepes 10 mM (pH 7.4)。两个溶液通过磁力搅拌混合得到 40 mL 溶液, 其含有 0.75% 透明质酸和 0.75% 基察克 (总聚合物浓度 1.5%), 全透明, 无沉淀和/或凝聚。

例 9: 羧甲基纤维素: 基察克为 1:1 w/w 的混合物; 总多糖浓度 1.5% w/v (g/mL)

制备 20 mL 羧甲基纤维素 (300 mg, $M_w \sim 270,000$, d.s. 0.9) 溶液, 其含有 NaCl 0.15 M, Hepes 10 mM, pH 7.4。制备 20 mL 基察克 (300 mg, $M_w \sim 1.5 \times 10^6$, 例 1) 溶液, 其含有 NaCl 0.15 M, Hepes 10 mM (pH 7.4)。两个溶液通过磁力搅拌混合得到 40 mL 溶液, 其含有 0.75% 羧甲基纤维素和 0.75% 基察克 (总聚合物浓度 1.5%), 全透明, 无沉淀和/或凝聚。

例 10: 藻酸盐: 基察克为 1:1 w/w 的混合物; 总多糖浓度 1.5% w/v (g/mL)

制备 20 mL 藻酸盐 (300 mg, $M_w \sim 130,000$) 溶液, 其含有 NaCl 0.15 M, Hepes 10 mM, pH 7.4。制备 20 mL 基察克 (300 mg, $M_w \sim 1.5 \times 10^6$, 例 1) 溶液, 其含有 NaCl 0.15 M, Hepes 10 mM (pH 7.4)。两个溶液通过磁力搅拌混合得到 40 mL 溶液, 其含有 0.75% 藻酸盐和 0.75% 基察克 (总聚合物浓度 1.5%), 全透明, 无沉淀和/或凝聚。

例 11: 硫酸琼脂糖: 基察克为 1:1 w/w 的混合物; 总多糖浓度 1.5% w/v (g/mL)

在凝胶熔点以上的温度制备 20 mL 硫酸琼脂糖 (300 mg, 低凝胶点) 溶液, 其含有 NaCl 0.15 M, Hepes 10 mM (pH 7.4)。制备 20 mL 基察克 (300 mg, $M_w \sim 1.5 \times 10^6$, 例 1) 溶液, 其含有 NaCl 0.15 M, Hepes 10 mM, pH 7.4 并维持与前述溶液相同温度。两个溶液中加热条件下 ($\sim 50^\circ\text{C}$) 磁力搅拌得到 40 mL 溶液, 其含有 0.75% 硫酸琼脂糖和 0.75% 基察克 (总聚合物浓度 1.5%), 全透明, 无沉淀和/或凝聚。

例 12: κ -卡拉胶: 基察克为 1:1 w/w 的混合物; 总多糖浓度 1.5% w/v (g/mL)

制备 20 mL κ -卡拉胶 (300 mg, $M_w \sim 270,000$) 溶液, 其含有 NaCl 0.15 M, Hepes 10 mM (pH 7.4)。制备 20 mL 基察克 (300 mg, $M_w \sim 1.5 \times 10^6$, 例 1) 溶液, 其含有 NaCl 0.15 M, Hepes 10 mM, pH 7.4。两个溶液通过磁力搅拌混合得到 40 mL 溶液, 其含有 0.75% κ -卡拉胶和 0.75% 基察克 (总聚合物浓度 1.5%), 无沉淀。

例 13: 低 M_w 透明质酸: 基察克为 1:1 w/w 的混合物; 总多糖浓度 1.5% w/v (g/mL), 在去离子水中

在去离子水中制备 20 mL 透明质酸 (300 mg, $M_w \sim 160,000$) 溶液。在去离子水中制备 20 mL 基察克 (300 mg, $M_w \sim 1.5 \times 10^6$, 例 1) 溶液。两个溶液通过磁力搅拌混合得到 40 mL 混合物, 其含有 0.75% 透明质酸和 0.75% 基察克 (总聚合物浓度 1.5%), 其中观测到两个多糖之间形成凝聚/沉淀。

例 14: 低 M_w 透明质酸: 基察克为 1:1 w/w 的混合物; 总多糖浓度 1.5% w/v (g/mL), pH 7.4 且无支撑盐

制备 20 mL 透明质酸 (300 mg, $M_w \sim 160,000$) 溶液, 其含有 Hepes 10 mM, pH 7.4。制备 20 mL 基察克 (300 mg, $M_w \sim 1.5 \times 10^6$, 例 1) 溶液, 其含有 Hepes 10 mM (pH 7.4)。两个溶液通过磁力搅拌混合得到 40 mL 混合物, 其含有 0.75% 透明质酸和 0.75% 基察克 (总聚合物浓度 1.5%), 观测到两个多糖之间形成凝聚/沉淀。

例 15: 低 M_w 透明质酸: 聚-L-赖氨酸(PLL)为 1:1 w/w 的混合物; 总多糖浓度 1.5% w/v (g/mL)

制备 20 mL 透明质酸(300 mg, $M_w \sim 160,000$)溶液, 其含有 NaCl 0.15 M, Hepes 10 mM, pH 7.4。制备 20 mL 聚-L-赖氨酸 (PLL) (300 mg, $M_w \sim 20,000$) 溶液, 其含有 NaCl 0.15 M, Hepes 10 mM (pH 7.4)。两个溶液通过磁力搅拌混合得到 40mL 混合物, 其含有 0.75%透明质酸和 0.75% PLL (总聚合物浓度 1.5%), 观测到两个多糖之间形成凝聚/沉淀。

例 16: 罗丹明标记藻酸盐

足以标记每 1500 中 1 个藻酸盐糖醛基团的 123 罗丹明被添加到藻酸盐 (300 mg, $M_w \sim 130,000$)吗啉代乙磺酸 (MES, 100 mL)缓冲液溶液中, 其含有 10%乙醇, N- 羟基丁二酰亚胺 (NHS) 和 1-乙基-2-[3-(二甲基氨)丙基]碳二亚胺 (EDC) (摩尔比 $[EDC]/[\text{藻酸盐糖醛基}] = 1.5$; 摩尔比 $[NHS]/[EDC] = 1$)。溶液中黑暗中保持搅拌 24 小时, 由 NaHCO_3 0.05 M (3 次)和去离子水渗析, 直到导电率为 $4\mu\text{S}$ (4°C)。最后溶液通过微孔过滤器 ($0.45\mu\text{m}$) 过滤, 冻干。

例 17: 荧光素标记基察克

足以标记每 2000 个中 1 个改性胺基的异硫氰酸荧光素被添加到基察克 (200 mg, $M_w \sim 1.5 \times 10^6$, 例 1)的 NaHCO_3 0.5 M (65 mL)溶液中。溶液中黑暗中保持搅拌 24 小时, 由 NaHCO_3 0.05 M (3 次)和去离子水渗析, 直到导电率为 $4\mu\text{S}$ (4°C)。最后溶液通过微孔过滤器 ($0.45\mu\text{m}$) 过滤, 冻干。

例 18: 藻酸盐: 基察克为 1:1 w/w 的混合物; 总多糖浓度 0.15% w/v (g/mL)

制备 10 mL 罗丹明标记的藻酸盐(15 mg, $M_w \sim 130,000$, 例 16)溶液, 其含有 NaCl 0.015 M, Hepes 1 mM, pH 7.4。制备 10 mL 荧光素标记的基察克 (15 mg, $M_w \sim 1.5 \times 10^6$, 例 17)溶液, 其含有 NaCl 0.015 M, Hepes 1 mM (pH 7.4)。两个溶液通过磁力搅拌混合得到 20 mL 溶液, 其含有 0.075% 罗丹明标记的藻酸盐和 0.075%荧光素标记基察克(总聚合物浓度 0.15%), 全透明, 无沉淀和/或凝聚。

例 19: 高 M_w 透明质酸: 基察克为 3:1w/w 的混合物; 总多糖浓度 2% w/v (g/mL)

制备 20 mL 透明质酸 (600 mg, M_w 约为 $8-9 \times 10^5$) 溶液, 其含有 NaCl 0.15 M, Hepes 10 mM, pH 7.4。制备 20 mL 基察克 (200 mg, $M_w \sim 1.5 \times 10^6$, 例 1) 溶液, 其含有 NaCl 0.15 M, Hepes 10 mM (pH 7.4)。两个溶液通过磁力搅拌混合得到 40 mL 溶液, 其含有 1.5% 透明质酸和 0.5% 基察克(总聚合物浓度 2%), 全透明, 无沉淀和/或凝聚。

例 20: 藻酸盐: 基察克为 3:1 w/w 的混合物; 总多糖浓度 2% w/v (g/mL)

制备 20 mL 藻酸盐 (600 mg, $M_w \sim 130,000$) 溶液, 其含有 NaCl 0.15 M, Hepes 10 mM, pH 7.4。制备 20 mL 基察克 (200 mg, $M_w \sim 1.5 \times 10^6$, 例 1) 溶液, 其含有 NaCl 0.15 M, Hepes 10 mM (pH 7.4)。两个溶液通过磁力搅拌混合得到 40 mL 溶液, 其含有 1.5% 藻酸盐和 0.5% 基察克 (总聚合物浓度 2%), 全透明, 无沉淀和/或凝聚。

例 21: 透明质酸: 基察克为 1:1 w/w 的混合物; 总多糖浓度 3% w/v (g/mL)

制备 20 mL 透明质酸 (600 mg, $M_w \sim 240,000$) 溶液, 其含有 NaCl 0.15 M, Hepes 10 mM, pH 7.4。制备 20 mL 基察克 (600 mg, $M_w \sim 1.5 \times 10^6$, 例 1) 溶液, 其含有 NaCl 0.15 M, Hepes 10 mM (pH 7.4)。两个溶液通过磁力搅拌混合得到 40 mL 溶液, 其含有 1.5% 透明质酸和 1.5% 基察克(总聚合物浓度 3%), 全透明, 无沉淀和/或凝聚。

例 22: 透明质酸: 壳聚糖衍生物 (基察克; 基塞尔; 基麦尔 3) 为 1:1 w/w 的混合物

制备 20 mL 透明质酸 (300 mg, $M_w \sim 160,000$) 溶液, 其含有 NaCl 0.15 M, Hepes 10 mM, pH 7.4。制备 20 mL 基察克 (300 mg, $M_w \sim 1.5 \times 10^6$, 例 1) 溶液, 其含有 NaCl 0.15 M, Hepes 10 mM (pH 7.4)。两个溶液通过磁力搅拌混合得到 40 mL 溶液, 其含有 0.75% 透明质酸和 0.75% 基察克 (总聚合物浓度 1.5%), 全透明, 无沉淀和/或凝聚。

使用同样方法, 透明质酸和基塞尔(例 2)混合物, 透明质酸和基麦尔 3 (例

3)混合物也被制备,得到 40 mL 溶液,该溶液含有 0.75%透明质酸和 0.75%基塞尔或基麦尔 3 (总多糖浓度 1.5%),全透明,无沉淀和/或凝聚。

例 4-22 的多糖混合物理化特征与单一阴离子多糖和壳聚糖衍生物组合物理化特征对比:

a) 离子强度对多糖混合物溶解性的影响

为评估离子强度变化对本发明多糖混合物溶解性的影响,前述例 4-7 所制备的含有透明质酸和壳聚糖衍生物(基察克)的溶液的透射率(T) ($\lambda=600$ nm) 被测量。图 1 突出了聚阴离子和改性壳聚糖混合物的水溶性,该例中总聚合物浓度 2%且支撑盐浓度 ≥ 0.05 M。特别的,图中给出二元聚合物溶液与各自多糖的透射率(600 nm 时测量)。透射率等于或接近 1 显示在二元聚合物溶液中没有凝聚或沉淀。与之相反,当混合物中盐少于 0.05M,观测到凝聚到形成以及明显降低的透射率。

b)不同阴离子多糖和壳聚糖衍生物(基察克)1:1 w/w 混合物

为评估改变阴离子多糖类型对含有本发明的寡糖改性壳聚糖溶解性的影响,前述例 8-12 所制得的含有选自透明质酸、羧甲基纤维素、藻酸盐、硫酸琼脂糖以及卡拉胶的阴离子多糖和壳聚糖衍生物 (基察克) (1:1w/w) 的溶液的透射率 (T) ($\lambda=600$ nm) 被测量。图 2 显示多糖混合物的溶解性是得到保障的,即使当两个聚合物重量比为 1:1 且总聚合物浓度 1.5%。混合也可以通过维持不同聚阴离子(羧化或硫酸盐化)系统溶解性来完成。

c)聚阴离子多糖和壳聚糖衍生物 (基察克; 基塞尔; 基麦尔 3)1:1 w/w 混合物

本发明多糖混合物的溶解性(如前述所测量)证明不受不同壳聚糖衍生物影响,例 22 所制二元混合物显示相等的 T/T_0 值。对于这一点,图 3 显示制备聚阴离子和寡糖改性壳聚糖聚合物溶液的能力并不依赖于寡糖改性壳聚糖的化学特性。纤维二糖 (基塞尔)或麦芽三糖(基麦尔 3) (分别为二糖和三糖) 取代乳糖 (基察克)没有明显形成凝聚。

在适宜的条件下混合聚阴离子和壳聚糖寡糖衍生物得到溶液的可能性是基本基于三个因素。第一是被引入阳离子多糖的寡糖侧链的位阻。这会干

扰阴离子多糖的接近并防止两个聚合物体系沿链长耦合。这个影响显示在图 1 中。

另外，使用生理 pH 值（优选 pH 7.4）使得阳离子多糖（基察克）上的电荷减少，这维持糖类侧链的良好水溶性。最后，支撑盐（优选氯化钠）的存在使得两个聚合物上的电荷被屏蔽，进而限制了两个聚合物之间的静电作用，因此避免了凝聚/沉淀。通过结合这 3 个因素，可以得到聚阴离子/寡糖改性壳聚糖溶液。对于这点，如图 4 所示，尽管存在所述的位阻因素，在去离子水(pH ~ 5.5)中形成透明质酸和基察克聚合物混合物是不可行的。同样在欲得真溶液中没有支撑盐的情况下即使使用生理 pH 值(7.4)也不行。最后，使用不同于基察克的聚阳离子，例如在支撑盐存在下在生理 pH 可溶的聚-L-赖氨酸 (PLL)，如果存在聚阴离子时(图 4)，并不能得到所需溶液。

没有形成凝聚并不意味着聚阳离子（例如基察克）上的正电荷与聚阴离子（例如透明质酸或藻酸盐）上的负电荷之间没有反应。与之相反，FRET (荧光能量共振转移)实验显示存在这些基本的静电反应(库仑)(图 5)。在这个实验中，聚阴离子 (藻酸盐)由罗丹明标记，聚阳离子 (基察克)由荧光素标记。如果假定两个多糖混合而没发生相反电荷之间反应，混合物的荧光发射光谱强度与两个各自光谱的总和相应。反之，如果阴离子和阳离子多糖二元溶液的光谱低于两个聚合物各自光谱之和，这就意味着两个聚合物之间形成强短程相互反应(5nm 长度规模) (荧光猝灭)。典型的离子相互反应落入这一距离中。图 5 显示藻酸盐和基察克二元溶液发射光谱强度低于两个聚合物各自测得光谱强度之和，显示在基察克正电荷同藻酸盐负电荷之间存在离子相互反应。在这个意义上，本发明组合物可以制备阴离子和阳离子多糖溶液，其链上具有相反电荷，离子相互反应发生在其中以形成可溶配合物。与描述聚阴离子/电中性多糖溶液的专利 WO2005/061611 相反，在本发明情况下溶液即含有聚阴离子又含有聚阳离子，其相互反应形成稳定存在于溶液中的配合物。

在这一方面，图 6 显示所谓的 Cox-Merz 规则，该规则预估在无“大规格”团体的溶液中的复合粘度和绝对粘度的等同性，其可被用于二元溶液(含

有透明质酸和基察克，例 19)。相反的，在分散液中凝聚或微凝胶在这一规则下显示为缺少两种粘度（复合、绝对）之间的等同性，由流变计测量。

聚阴离子和寡糖改性壳聚糖形成可溶性络合物，可以发生在平均分子量可达 1500 kDa 的羧化或硫酸盐化多糖。

寡糖改性壳聚糖的正电荷与阴离子多糖（例如透明质酸或藻酸盐）的负电荷之间的相互作用的存在也是的阴离子和阳离子多糖混合物溶液的粘度相对于各自多糖聚合物溶液的粘度意想不到地升高。特别的，聚阴离子和寡糖改性壳聚糖聚合物混合物水性溶液的粘度被发现是高于构成混合物的单个聚合物的水性溶液的粘度之和。图 7、8、9 和 10 清楚显示这个不同重量比的不同聚阴离子和改性壳聚糖聚合物所得的协同增效效果。

另外，从图 11 推断可知所述组合物还具有粘弹性无可置疑的改进。事实上，例 19 的透明质酸和基察克二元溶液粘弹性光谱在图 11B 中显示第二多糖不仅没有明显干扰透明质酸的粘弹性，而且与单独的透明质酸溶液相比，其降低了 G' 和 G'' 彼此交叉处频率值，即系统开始显示弹性多于粘性时的频率。这一影响对于多糖的已知应用，特别是炎症和/或外伤关节疾病（例如骨关节炎、关节炎、半月板和韧带损伤）的粘弹性补充治疗治疗，是高度预期的。出于本发明的这一目的，本发明的组合物就这样使用或与适当的赋形剂或稀释剂结合以制备人类或非人类哺乳动物可接受的产品。为处理前述关节疾病，所述产品通过已知的关节内路径给药。另外，出于同一原因，前述组合物可以用于眼科手术。

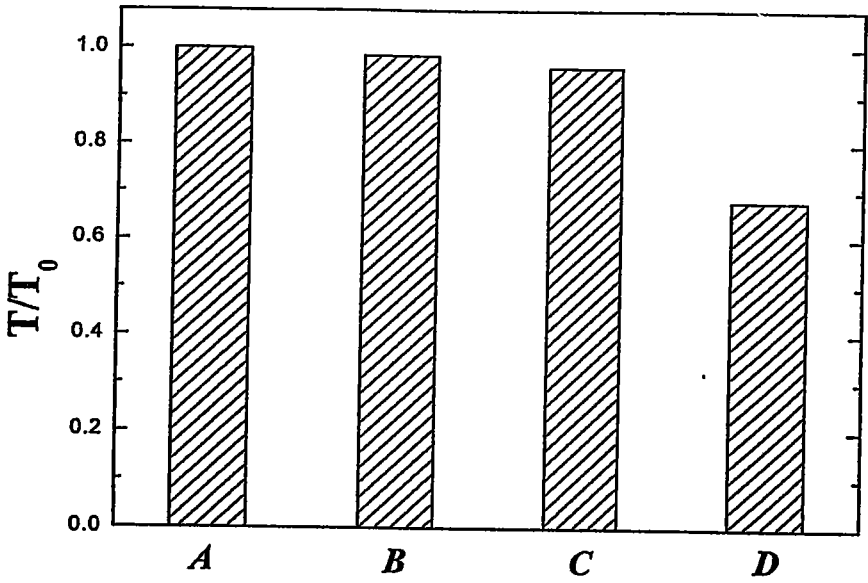


图 1

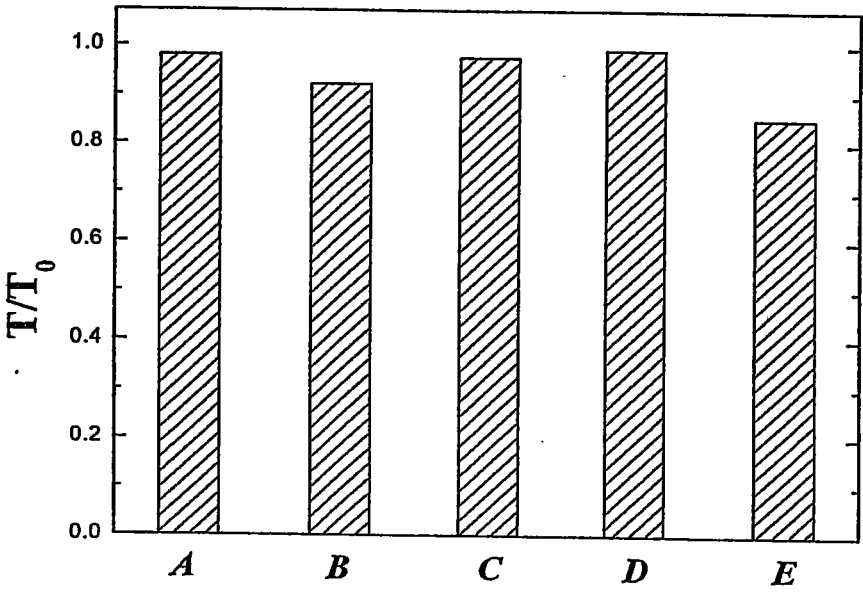


图 2

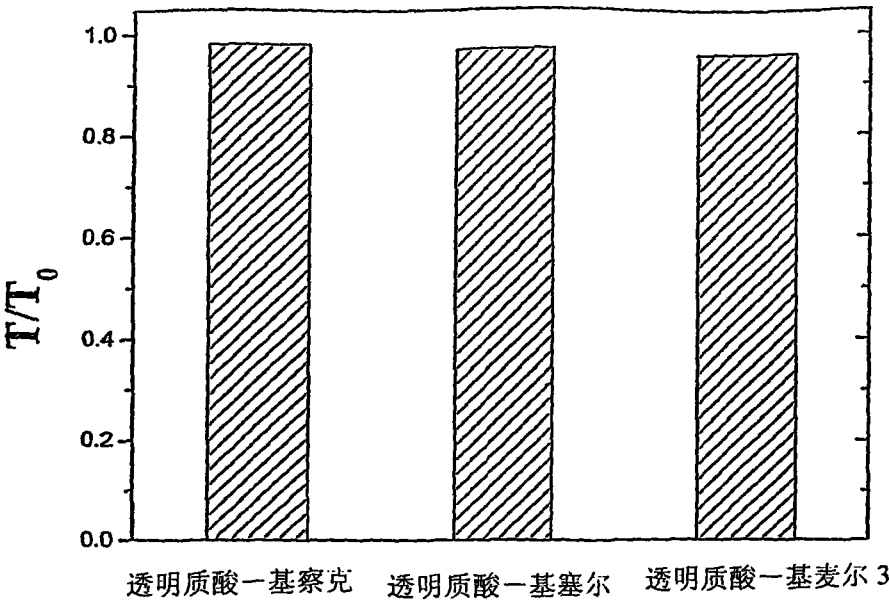
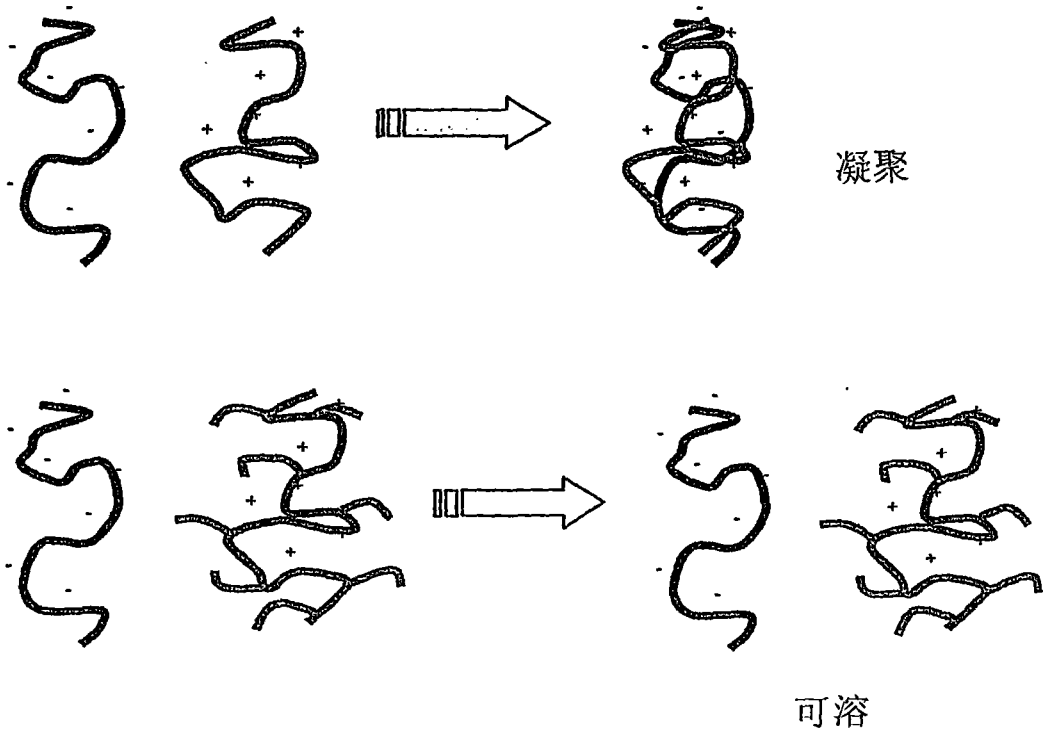


图 3

图解 1



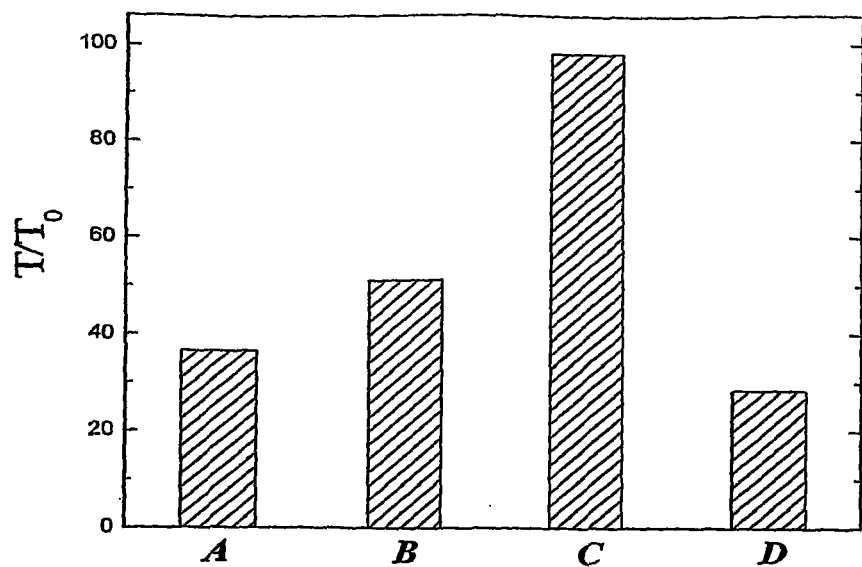


图 4

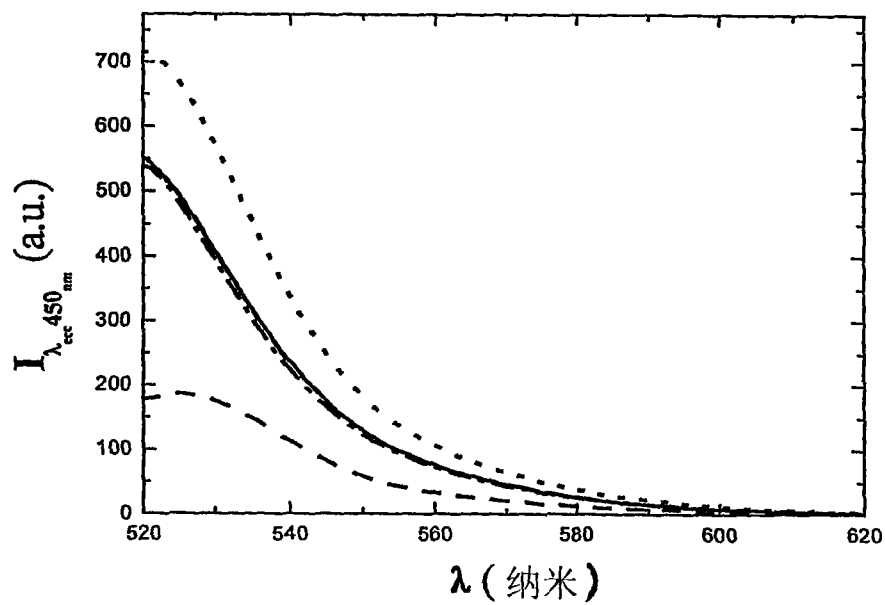


图 5

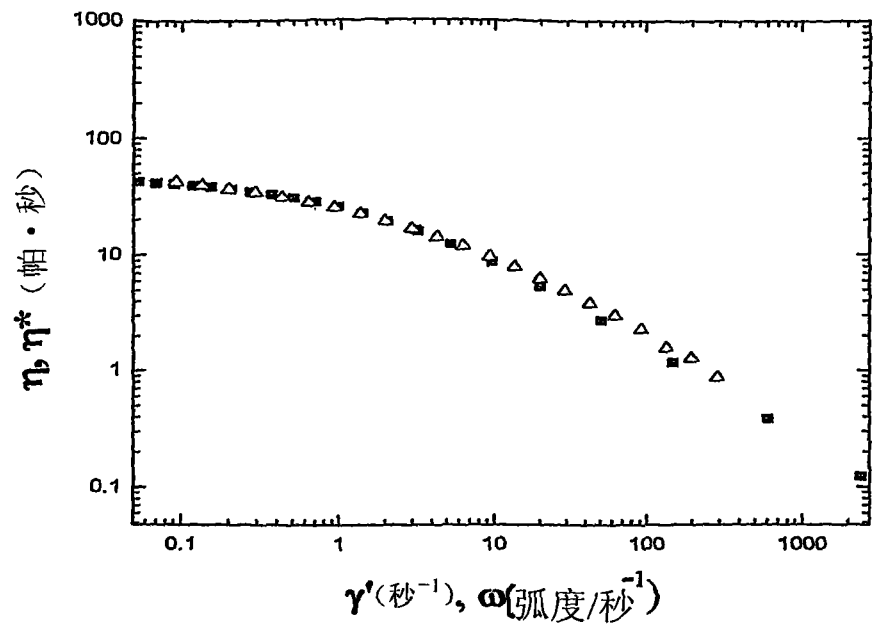


图 6

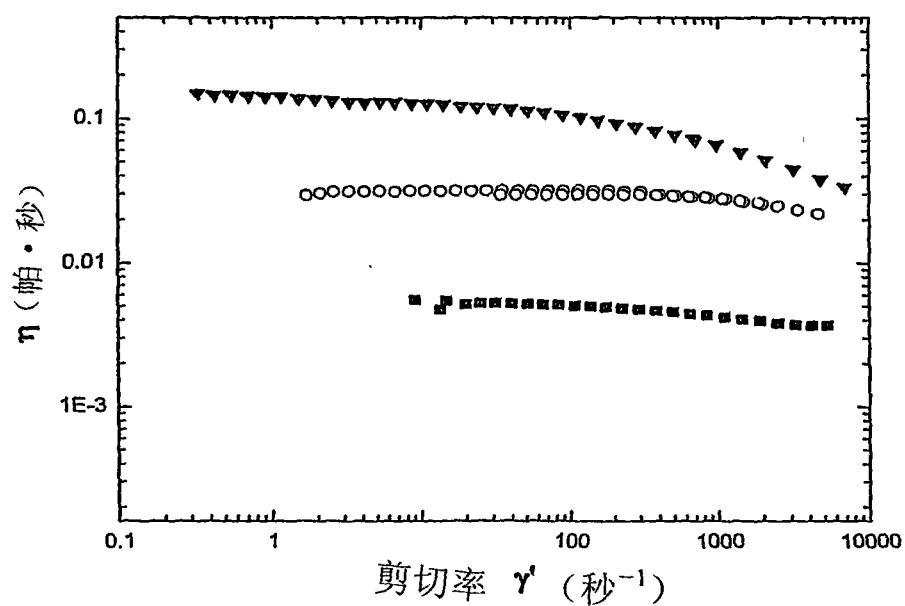


图 7

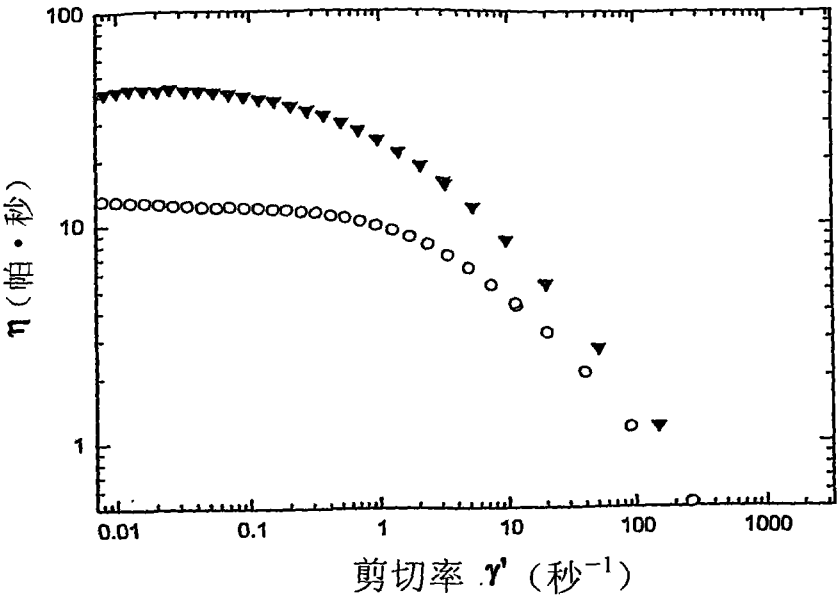


图 8

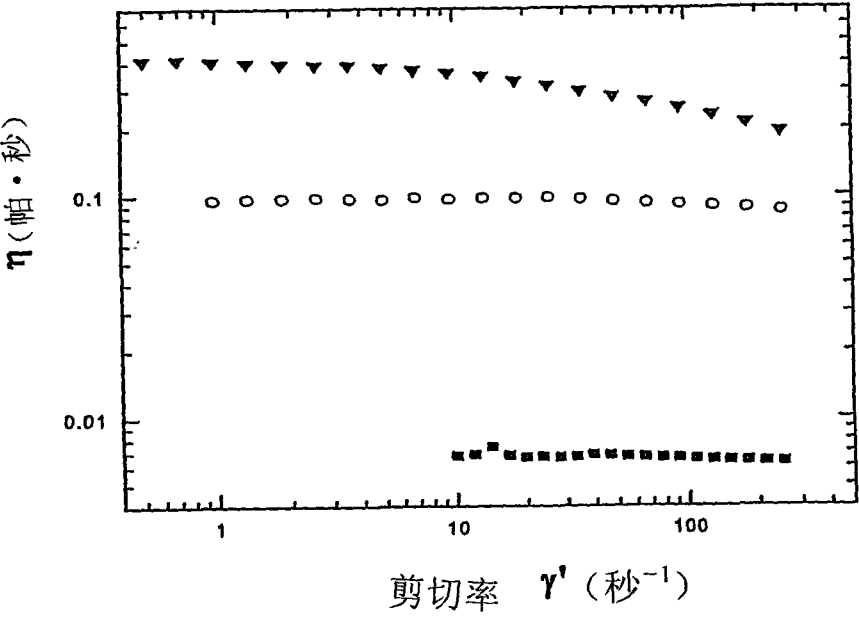


图 9

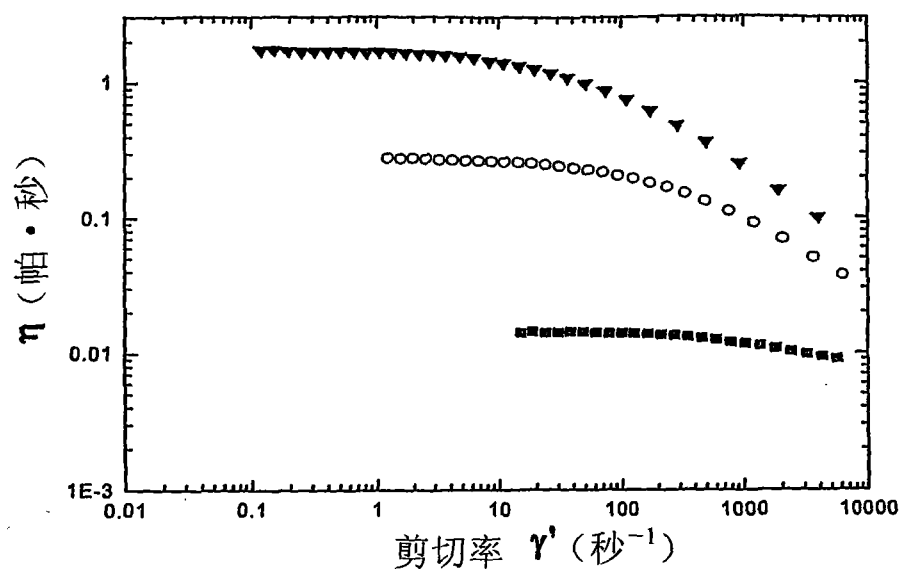


图 10

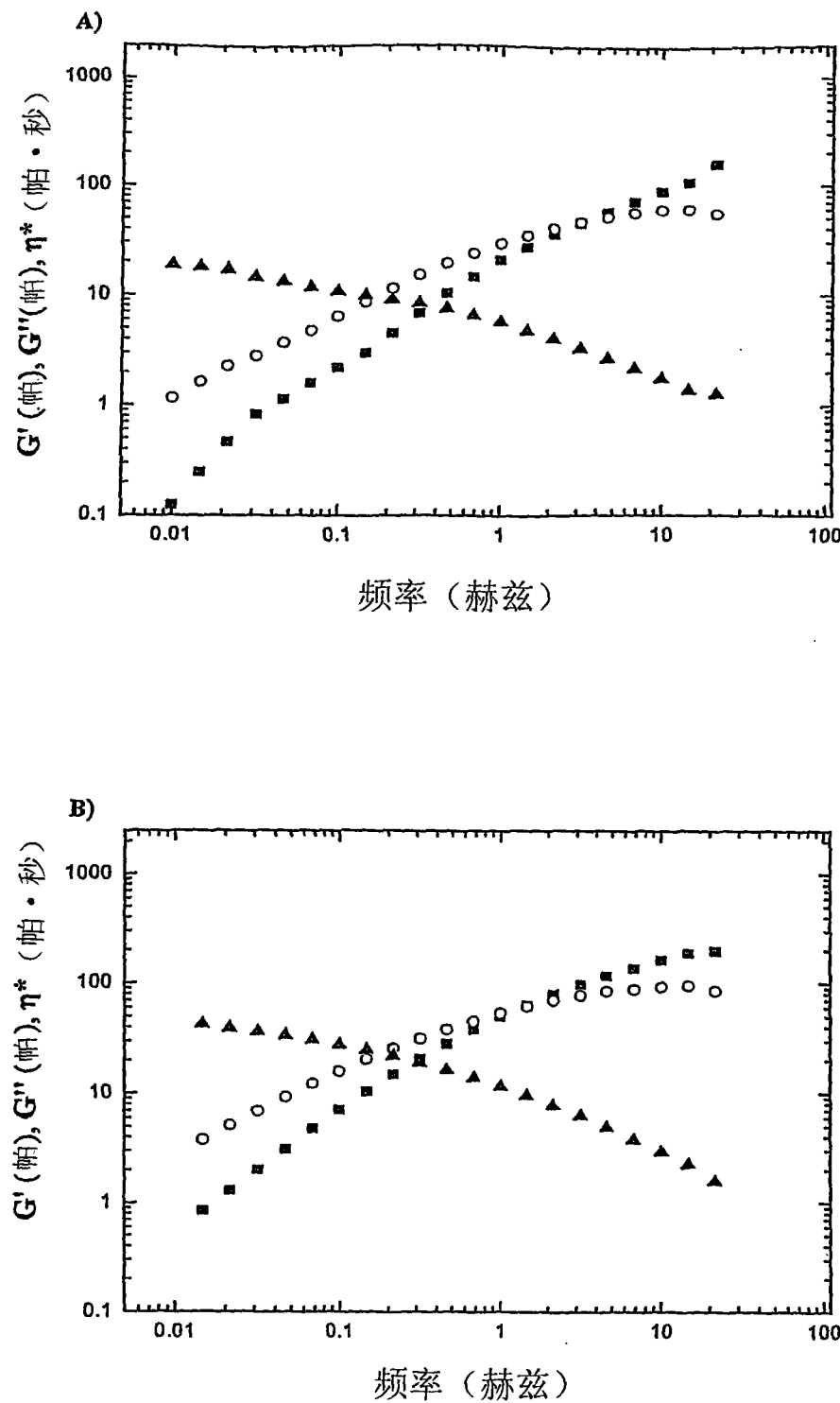


图 11