



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101415732 B

(45) 授权公告日 2011. 10. 12

(21) 申请号 200780007610. 2

(22) 申请日 2007. 03. 02

(30) 优先权数据

PA200600305 2006. 03. 02 DK

PA200600312 2006. 03. 03 DK

(85) PCT申请进入国家阶段日

2008. 09. 02

(86) PCT申请的申请数据

PCT/DK2007/000108 2007. 03. 02

(87) PCT申请的公布数据

W02007/098770 EN 2007. 09. 07

(73) 专利权人 诺维信生物制药丹麦公司

地址 丹麦鲍斯韦

(72) 发明人 科琳·恩斯乔滕

莫滕·W·克里斯滕森

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 封新琴

(51) Int. Cl.

C08B 37/08 (2006. 01)

A61K 31/728 (2006. 01)

A61K 8/73 (2006. 01)

A61K 47/36 (2006. 01)

(56) 对比文件

US 6441207 B1, 2002. 08. 27, 实施例 1.

US 5128326 A, 1992. 07. 07, 实施例 1-12.

W0 2005/066215 A1, 2005. 07. 21, 表 1-2.

审查员 冯刚

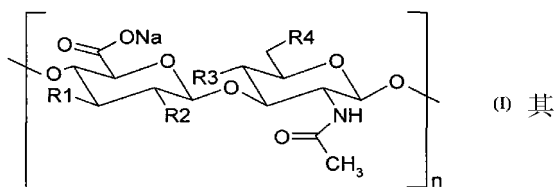
权利要求书 2 页 说明书 11 页 附图 6 页

(54) 发明名称

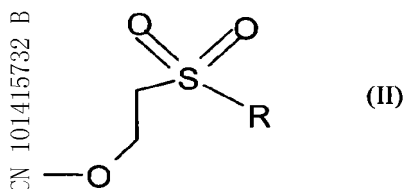
芳基 / 脂族烃基乙烯基砒透明质酸衍生物

(57) 摘要

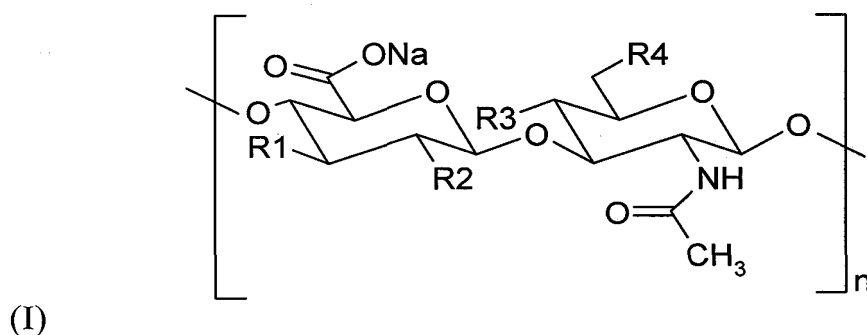
透明质酸衍生物, 以及产生和使用所述衍生物的方法, 该衍生物包含 n 个重复单元并且具有结构通式 (I):



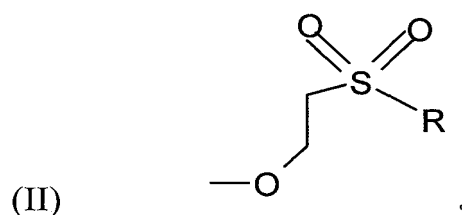
中, 在至少一个重复单元中, R1、R2、R3、R4 中的一个或多个包含醚键合的芳基 / 脂族烃基砒, 其具有结构通式 (II), 其中 R 包含脂族烃基或芳基, 否则 R1、R2、R3、R4 是羟基 OH。



1. 透明质酸衍生物,其包含 n 个重复单元并且具有结构通式 (I) :



其中,在至少一个重复单元中,R1、R2、R3、R4 中的一个或多个包含醚键合的芳基 / 脂族烷基磺,其具有结构通式 (II),其中 R 为 C_1 - C_{20} 脂族烷基或苯基或对甲苯甲酰基,并且 R1、R2、R3、R4 中其余的是羟基 OH :



2. 权利要求 1 的透明质酸衍生物,其中 R1、R2、R3、R4 中的两个或更多个包含具有结构通式 (II) 的一种或多种醚键合的芳基 / 脂族烷基磺。

3. 权利要求 1 或 2 的透明质酸衍生物,其中 R1、R2、R3、R4 中的三个或更多个包含具有结构通式 (II) 的一种或多种醚键合的芳基 / 脂族烷基磺。

4. 权利要求 1 的透明质酸衍生物,其中 R1、R2、R3、R4 全部包含具有结构通式 (II) 的一种或多种醚键合的芳基 / 脂族烷基磺。

5. 权利要求 1 的透明质酸衍生物,其中至少 R4 包含具有结构通式 (II) 的醚键合的芳基 / 脂族烷基磺。

6. 权利要求 1 的透明质酸衍生物,其中 R 是疏水的。

7. 权利要求 1 的透明质酸衍生物,其中所述 C_1 - C_{20} 脂族烷基为甲基、乙基、丙基、2- 辛烯基、2- 壬烯基、2- 十二碳烯基、2- 十六碳烯基或 2- 十八碳烯基。

8. 权利要求 1 的透明质酸衍生物,其具有 10,000-3,000,000Da 的平均分子量。

9. 权利要求 8 的透明质酸衍生物,其具有 10,000-50,000Da 的平均分子量。

10. 权利要求 8 的透明质酸衍生物,其具有 50,000-500,000Da 的平均分子量。

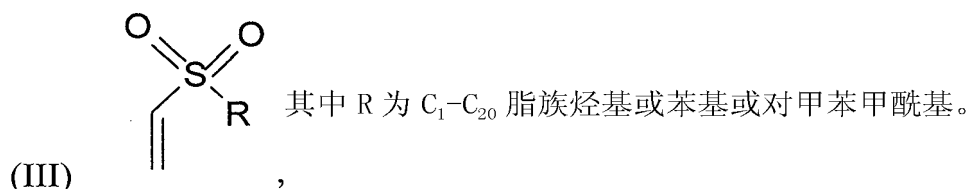
11. 权利要求 1 的透明质酸衍生物,其中透明质酸是重组产生的。

12. 权利要求 1 的透明质酸衍生物,其中透明质酸是在芽孢杆菌属宿主中重组产生。

13. 产生透明质酸衍生物的方法,所述方法包括步骤 :

(a) 在碱性条件下,在水溶液中,将透明质酸与具有结构通式 (III) 的一种或多种化合物反应,由此形成透明质酸衍生物 ;和

(b) 回收该透明质酸衍生物,



14. 权利要求 13 的方法, 其中所述 C_1-C_{20} 脂族烃基为甲基、乙基、丙基、2-辛烯基、2-壬烯基、2-十二碳烯基、2-十六碳烯基或 2-十八碳烯基。

15. 组合物, 其包含如权利要求 1-12 中任一项限定的透明质酸衍生物和活性成分。

16. 根据权利要求 15 的组合物, 其还包含水溶性赋形剂。

17. 药物组合物, 其包含有效量的如权利要求 1-12 中任一项限定的透明质酸衍生物, 以及可药用载体、赋形剂或稀释剂。

18. 药物组合物, 其包含有效量的如权利要求 1-12 中任一项限定的透明质酸衍生物作为媒介物, 以及药理活性剂。

19. 化妆用品, 其包含如权利要求 1-12 中任一项限定的透明质酸衍生物或如权利要求 15-18 中任一项限定的组合物。

20. 化妆用品, 其包含有效量的如权利要求 1-12 中任一项限定的透明质酸衍生物或如权利要求 15-18 中任一项限定的组合物作为活性成分。

21. 卫生用品、医疗用品或外科用品, 其包含如权利要求 1-12 中任一项限定的透明质酸衍生物或如权利要求 15-18 中任一项限定的组合物。

22. 药物胶囊或微胶囊, 其包含如权利要求 1-12 中任一项限定的透明质酸衍生物或如权利要求 15-18 中任一项限定的组合物。

23. 如权利要求 1-12 中任一项限定的透明质酸衍生物或如权利要求 15-18 中任一项限定的组合物在制备用于治疗骨关节炎, 癌症, 创伤, 脱发或秃顶, 眼科的药物中的用途。

24. 如权利要求 1-12 中任一项限定的透明质酸衍生物或如权利要求 15-18 限定的组合物在制备用于血管发生的药物中的用途。

25. 如权利要求 1-12 中任一项限定的透明质酸衍生物或如权利要求 15-18 中任一项限定的组合物用于制备润湿剂的用途。

芳基 / 脂族烃基乙烯基砒透明质酸衍生物

发明领域

[0001] 本发明涉及用芳基 - 或脂族烃基 - 乙烯基砒 (aryl-or alkyl-vinyl sulfone) 来修饰透明质酸 (HA) 以产生芳基 / 脂族烃基乙烯基砒 HA 衍生物 (aryl/alkyl vinylsulfone HA derivative ;AVS-HA), 涉及这样的 AVS-HA, 涉及它们的制备, 并涉及它们的应用和用途, 特别是在化妆品和生物医学工业中的应用和用途。

[0002] 发明背景

[0003] 人体最丰富的杂多糖是糖胺聚糖 (glycosaminoglycan)。糖胺聚糖是无支链的糖聚合物, 由重复的二糖单元组成 (仅硫酸角质素在糖的核心区是分支的)。所述二糖单元通常包含两种修饰的糖—N- 乙酰半乳糖胺 (GalNAc) 或 N- 乙酰葡萄糖胺 (GlcNAc) 之一, 作为第一糖单元。另一单元通常是糖醛酸, 例如葡萄糖醛酸 (GlcUA) 或艾杜糖醛酸 (iduronate)。

[0004] 糖胺聚糖是负电分子, 并且在溶液中 (in solution) 具有赋予高粘性的延伸构象。糖胺聚糖主要位于细胞表面上或胞外基质中。糖胺聚糖在溶液中还具有低压缩性, 并因此是理想的生理润滑液体, 例如关节 (joint)。糖胺聚糖的刚性为细胞提供结构的整体性并且提供细胞之间允许细胞迁移的通道。具有最高生理重要性的糖胺聚糖是乙酰透明质酸 (hyaluronan)、硫酸软骨素、肝素、硫酸乙酰肝素、硫酸皮肤素和硫酸角质素。多数糖胺聚糖通过特异的寡糖结构共价结合至蛋白聚糖核心蛋白。乙酰透明质酸与某些蛋白聚糖形成大聚集体 (large aggregate), 但例外是游离糖链与蛋白聚糖形成非共价复合体。

[0005] 已鉴定了乙酰透明质酸在人体中的许多功能 (参见, Laurent T. C. and Fraser J. R. E., 1992, FASEB J. 6 :2397-2404; 和 Toole B. P., 1991, “Proteoglycans and hyaluronan in morphogenesis and differentiation.” In :Cell Biology of the Extracellular Matrix, pp. 305-341, Hay E. D., ed., Plenum, New York)。乙酰透明质酸存在于透明软骨、滑膜关节液 (synovial joint fluid) 以及真皮和表皮皮肤组织中。还猜测乙酰透明质酸在许多生理功能, 例如粘附、发育、细胞运动性、癌症、血管发生和愈合中具有作用。由于乙酰透明质酸独特的物理和生物特性, 将其使用在眼外科和关节外科中, 并且正在其它医学方法中对其进行评估。

[0006] 术语“乙酰透明质酸”或“透明质酸”用于文献中的意思是由 D- 葡萄糖醛酸和 N- 乙酰 -D- 葡萄糖胺 (D-glucuronic and N-acetyl-D-glucosamine acid) 的残基组成的具有不同分子量的酸性多糖, 其天然存在于细胞表面、脊椎动物结缔组织的基础胞外物质 (basic extracellular substance)、关节的滑膜液、眼球内液 (endobulbar fluid of the eye)、人脐带组织和鸡冠 (cocks' comb) 中。

[0007] 术语“透明质酸”事实上通常用做意指具有不同分子量的带有交替 D- 葡萄糖醛酸和 N- 乙酰 -D- 葡萄糖胺酸残基的全系列多糖, 或甚至其降解的级分, 并且因此看上去使用复数术语“透明质酸”会更加恰当。然而该单数术语将仍然用在本说明书中; 另外, 缩写“HA (hyaluronic acid; 透明质酸)”将频繁地使用以代替此集合术语。

[0008] HA 在生物体中扮演重要的角色, 作为许多组织 (例如皮肤、腱、肌肉和软骨) 的细胞的机械支持, 它是胞间基质的主要成分。HA 在生物过程中同样扮演重要的角色, 例如组织

的湿润和润滑作用。

[0009] HA 可从上述天然组织中提取, 尽管现今优选通过微生物方法制备 HA 以最小化传递传染剂的潜在风险, 并且提高产品的均匀性、质量和可用性。

[0010] 已将 HA 和它不同分子大小的级分和它们各自的盐用作药物, 特别在治疗关节病 (arthropathy) 方面; 作为天然器官和组织的辅助和 / 或替代物, 特别在眼科学和整容手术方面; 以及作为化妆品制品中的作用剂 (agent)。也已开发乙酰透明质酸的产品用于整形外科 (orthopaedics)、风湿病学 (rheumatology) 和皮肤病学 (dermatology)。

[0011] 还可使用 HA 作为用于卫生和外科用品的多种聚合材料 (例如聚氨酯、聚酯等) 的添加剂, 其具有使这些材料生物相容的效果。

发明内容

[0012] 本发明涉及从单官能乙烯基砜试剂制备新一代衍生化的透明质酸。

[0013] 单官能乙烯基砜试剂具有通式 ($\text{CH}_2 = \text{CH}-\text{SO}_2-\text{R}$), 其中 R 是芳基或脂族烃基 (alkyl), 其优选是但不必需是疏水的。产生修饰的反应发生在砜试剂的反应性乙烯基和透明质酸的羟基部分之间。

[0014] 取决于 R 侧基的性质, 本发明能够用于制备多种衍生物。在市场上可以商业获得的化合物包括甲基、乙基、苯基、对 - 甲苯甲酰基、辛基和其它脂族烃基 / 芳基乙烯基砜。

[0015] 与二乙烯基砜 (DVS) 相反, R- 乙烯基砜试剂是单官能的, 从而避免 HA 的任何交联。

[0016] 用疏水基团修饰的所得衍生物能够应用于化妆品工业中作为乳化剂, 或应用于先进的递送系统, 例如纳米胶囊 (nanocapsule) 中。所得衍生物也可用于通过形成膜来增加皮肤水分 (skin moisturization)。衍生物的性质使得制备新生物材料同时保持原始乙酰透明质酸的生物相容性和生物可降解性。

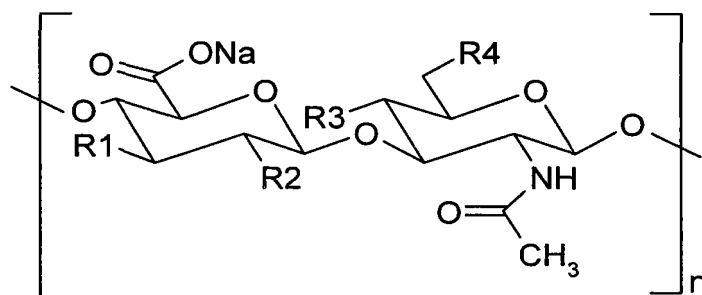
[0017] 所述方法基于沿用已久的化学方法 (将 DVS 用来交联 HA 已经超过 20 年), 并且该方法具有许多优点, 作为用途丰富的方法, 以其钠盐使用 HA, 其能够作为 “一锅合成 (one-pot synthesis)” 进行, 反应在室温进行, 其为一种简单而短暂的过程, 并且后续的纯化可以非常有效地进行, 不留下乙烯基砜试剂的残余物。

[0018] 对于较之未修饰的 HA 具有某些改变特性的基于透明质酸的化合物或衍生物存在着需求, 特别是在化妆品和生物医学工业中。感兴趣的性质是改进的稳定泡沫的能力, 以及与非疏水性材料混合的能力, 例如通常用在化妆产品中。

[0019] 本发明提供两亲性 HA 衍生物产品, 其具有有益于化妆品或生物医学应用的性质。这些产品与皮肤更有力地结合, 因此它们不那么容易被洗掉。AVS-HA 衍生物也适合用于更加先进的化妆品或生物医学制剂中, 例如用于递送活性化合物或药物的纳米胶囊 / 微胶囊 (nano/macro capsule) 或纳米球 / 微球 (nano/macro sphere) 中。较低分子量 (MW) 的 AVS-HA 衍生物与 MW 相当的非衍生 HA 相比将更有效地穿过皮肤。

[0020] 因此, 在第一个方面本发明涉及透明质酸衍生物, 其包含 n 个重复单元, 并且具有结构通式 (I):

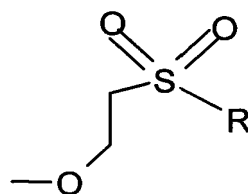
[0021]



(I)

[0022] 其中,在至少一个重复单元中,R1、R2、R3、R4 中的一个或多个包含醚键合的(etherbound)芳基/脂族烃基砜,其具有结构通式(II),其中R包含脂族烃基或芳基,并且其它的(otherwise)R1、R2、R3、R4 是羟基 OH:

[0023]



(II)

[0024] 换句话说,本发明的一个方面涉及透明质酸衍生物,其中已经将透明质酸的一个或多个羟基与一种和多种单官能脂族烃基/芳基乙烯基砜化合物反应,以在透明质酸和所得一种和多种脂族烃基/芳基砜化合物之间形成醚键。

[0025] 在第二个方面,本发明涉及透明质酸衍生物,其中在透明质酸的一个或多个羟基和一个或多个单官能芳基/脂族烃基乙烯基砜化合物之间发生加成反应,以在透明质酸和所得一个或多个芳基/脂族烃基砜化合物之间形成醚键。

[0026] 在第三个方面,本发明涉及产生透明质酸衍生物的方法,所述方法包括步骤:

[0027] (a) 在碱性条件下,在水溶液中,将透明质酸与具有结构通式(III)的一种或多种脂族烃基/芳基乙烯基砜化合物反应,从而形成所述透明质酸衍生物;和

[0028] (b) 回收该透明质酸衍生物。

[0029] 在第四个方面,本发明涉及组合物,其包含如第一或第二个方面中限定的透明质酸衍生物,和活性成分,优选所述活性成分是药理活性剂。

[0030] 本发明的第五个方面涉及药物组合物,其包含有效量的如第一或第二个方面中限定的透明质酸衍生物,连同可药用载体、赋形剂或稀释剂。

[0031] 第六个方面涉及药物组合物,其包含有效量的如第一或第二个方面中限定的透明质酸衍生物作为媒介物(vehicle),连同药理活性剂。

[0032] 第七个方面涉及化妆用品(cosmetic article),其包含有效量的如第一或第二个方面中限定的透明质酸衍生物,或者如第四、第五或第六个方面中任一项限定的组合物作为活性成分。

[0033] 在第八个方面,本发明涉及卫生用品、医疗用品或外科用品,其包含如第一或第二个方面中限定的透明质酸衍生物,或者如第四、第五或第六个方面中任一项限定的组合物,优选所述用品是尿布、卫生巾(sanitary towel)、外科海绵(surgical sponge)、愈伤海绵(wound healing sponge),或者急救绷带(bandaid)或其他创伤敷裹材料中包含的部分。

[0034] 一个重要的方面涉及药物胶囊或微胶囊 (microcapsule), 其包含如第一或第二个方面中限定的透明质酸衍生物, 或如第四、第五或第六个方面中限定的组合物。

[0035] 本发明最后一个方面涉及在眼科学中, 在骨关节炎或癌症、脱发或秃顶的治疗中进行操作的方法; 处理创伤的方法; 进行药理活性剂的皮肤施用或经皮施用, 或化妆品的皮肤施用的方法的改进, 其包括使用如第一或第二个方面中限定的透明质酸衍生物, 或者如第四、第五或第六个方面中任一项限定的组合物。

[0036] 多个方面涉及如第一或第二个方面中任一项限定的透明质酸衍生物, 或者如第四、第五或第六个方面中任一项限定的组合物的用途, 用于制备治疗骨关节炎、癌症的药物, 制备用于眼科治疗的药物, 制备用于创伤处理的药物, 制备用于血管发生的药物, 制备用于治疗脱发或秃顶的药物; 或制备润湿剂。

[0037] 附图简述

[0038] 图 1: ^1H NMR 谱 (HA, 300kDa)。

[0039] 图 2: ^1H NMR 谱, (来自 HA300kDa 的 PVS-HA) PVS:HA 比 1.5:1。

[0040] 图 3: ^1H NMR 谱, (来自 HA300kDa 的 PVS-HA) PVS:HA 比 1.5。

[0041] 图 4: ^1H NMR 谱, (来自 HA300kDa 的 PVS-HA) PVS:HA 比 10:1。

[0042] 图 5: IR 谱, (来自 HA300kDa 的 PVS-HA) PVS:HA 比 10:1。

[0043] 图 6: ^1H NMR 谱, (来自 HA300kDa 的 EVS-HA) EVS:HA 比 1.5:1。

[0044] 发明详述

[0045] 透明质酸

[0046] “透明质酸”在本文中定义为未硫酸化的糖胺聚糖, 由 N-乙酰葡萄糖胺 (GlcNAc) 和葡萄糖醛酸 (GlcUA) 的重复二糖单位组成, 其通过交替的 β -1,4 和 β -1,3 糖苷键联接到一起。透明质酸也称作乙酰透明质酸、透明质酸盐或 HA。术语乙酰透明质酸和透明质酸在本文可以互换使用。

[0047] 鸡冠是乙酰透明质酸重要的商业来源。微生物是可供选择的来源。美国专利 No. 4,801,539 公开了用于制备透明质酸的发酵方法, 其包含兽瘟链球菌 (*Streptococcus zooepidemicus*) 菌株, 报道的产率是约 3.6g 透明质酸每升。欧洲专利 No. EP0694616 公开了使用改进的兽瘟链球菌菌株的发酵方法, 报导的产率是约 3.5g 透明质酸每升。如完整并入本文的 W003/054163 (Novozymes) 中所公开的, 可以重组产生透明质酸或其盐, 例如在革兰氏阳性芽孢杆菌属宿主中重组产生。

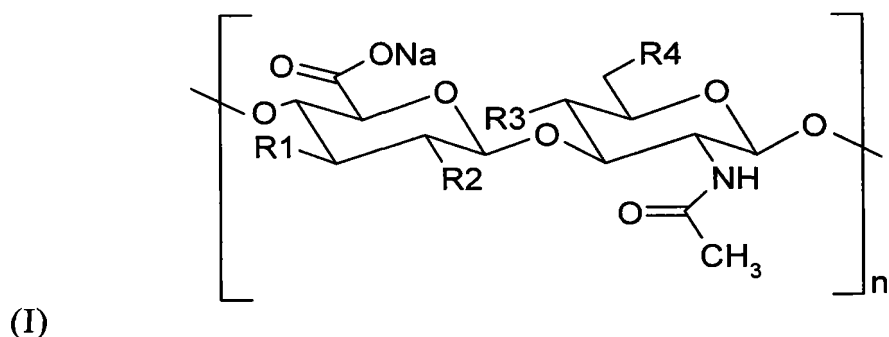
[0048] 乙酰透明质酸合酶已被描述来自于脊椎动物、细菌病原体和藻病毒 (DeAngelis, P. L., 1999, Cell. Mol. Life Sci. 56:670-682)。W099/23227 公开了来自似马链球菌 (*Streptococcus equisimilis*) 的 I 组透明质酸盐合酶 (hyaluronatesynthase)。W099/51265 和 W000/27437 描述了来自多杀巴斯德氏菌 (*Pasturella multocida*) 的 II 组透明质酸盐合酶。Ferretti 等公开了酿脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*) 的乙酰透明质酸合酶操纵子, 由三个基因 hasA、hasB 和 hasC 组成, 其分别编码透明质酸盐合酶、UDP 葡萄糖脱氢酶和 UDP-葡萄糖焦磷酸化酶 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98, 4658-4663, 2001)。W099/51265 描述了具有似马链球菌乙酰透明质酸合酶编码区的核酸片段。

[0049] 由于重组芽孢杆菌属细胞的乙酰透明质酸直接表达至培养基, 可以使用简单的方法从该培养基中分离乙酰透明质酸。首先, 将芽孢杆菌属细胞和细胞碎片从培养基中物理

去除。如果期望,首先可将培养基稀释,以减少培养基的粘性。用于从培养基去除细胞的许多方法对于本领域那些技术人员是已知的,例如离心和微滤 (microfiltration)。如果期望,然后可将剩余的上清液过滤,例如通过超滤,以从乙酰透明质酸浓缩和去除小分子污染物。去除细胞和细胞碎片之后,通过已知机制从培养基简单沉淀乙酰透明质酸。盐、醇或盐和醇的组合可用于从滤液沉淀乙酰透明质酸。一旦变为 (reduce to) 沉淀物,能够容易地将乙酰透明质酸通过物理方法从溶液中分离。可通过使用本领域已知的蒸发技术 (例如喷雾干燥),从滤液溶液干燥或浓缩乙酰透明质酸。

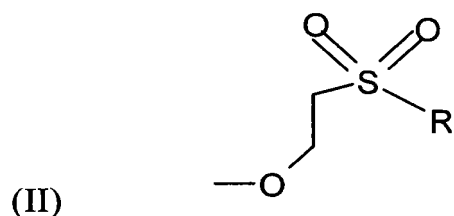
[0050] 本发明的第一个方面涉及透明质酸衍生物,其包含 n 个重复单元并且具有结构通式 (I) :

[0051]



[0052] 其中,在至少一个重复单元中, R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 中的一个或多个包含醚键合的芳基 / 脂族烃基磺,其具有结构通式 (II),其中 R 包含脂族烃基或芳基,并且其它的 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 是羟基 OH :

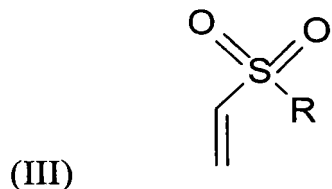
[0053]



[0054] 换句话说,本发明的一个方面涉及透明质酸衍生物,其中在透明质酸的一个或多个羟基与一种和多种单官能芳基 / 脂族烃基乙烯基磺化合物之间发生加成反应,以在透明质酸和所得一种和多种芳基 / 脂族烃基磺化合物之间形成醚键。

[0055] 优选的实施方式涉及本发明的透明质酸衍生物,其中一种或多种单官能芳基 / 脂族烃基乙烯基磺化合物具有结构通式 (III),其中 R 包含脂族烃基或芳基。

[0056]



[0057] 另一种优选实施方式涉及本发明的透明质酸衍生物,其中 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 中的两个或更多个包含具有结构通式 (II) 的一个或多个醚键合的芳基 / 脂族烃基磺;或者其中 R_1 、

R2、R3、R4 中的三个或更多个包含具有结构通式 (II) 的一个或多个醚键合的芳基 / 脂族烃基砜 ; 或者实际上其中 R1、R2、R3、R4 全部包含具有结构通式 (II) 的一个或多个醚键合的芳基 / 脂族烃基砜。

[0058] 本发明的方法中的主要反应或加成位点是透明质酸重复单元中的伯羟基, 同时作为 R4 示于结构式 (I) 中。

[0059] 因此, 优选的实施方式涉及本发明的 HA 衍生物, 其中至少 R4 包含具有结构通式 (II) 的醚键合的芳基 / 脂族烃基砜。

[0060] 预计许多不同的脂族烃基或芳基在用于本发明的单官能脂族烃基 / 芳基乙烯基砜化合物中是合适的。

[0061] 优选的实施方式涉及本发明的 HA 衍生物, 其中 R 包含脂族烃基, 优选所述脂族烃基是疏水的, 优选所述脂族烃基包含 C₁-C₂₀ 脂族烃基, 优选甲基、乙基、丙基、2- 辛烯基、2- 壬烯基、2- 十二碳烯基、2- 十六碳烯基或 2- 十八碳烯基。

[0062] 另一个优选的实施方式涉及本发明的 HA 衍生物, 其中 R 包含芳基, 优选所述芳基是疏水的, 并且更优选所述芳基是苯基或对甲苯甲酰基。

[0063] 分子量

[0064] 透明质酸的水平可以根据改良的味唑法测定 (Bitter and Muir, 1962, AnalBiochem. 4 :330-334)。此外, 透明质酸的平均分子量可以使用本领域标准方法测定, 例如由 Ueno et al., 1988, Chem. Pharm. Bull. 36, 4971-4975 ; Wyatt, 1993, Anal. Chim. Acta 272 :1-40 ; 和 Wyatt Technologies, 1999, "Light Scattering University DAWN Course Manual" and "DAWN EOS Manual" Wyatt Technology Corporation, Santa Barbara, California 所述的那些。

[0065] 在优选实施方式中, 通过本发明方法获得的透明质酸衍生物具有约 1, 000 至约 10, 000, 000Da 的分子量。在更优选的实施方式中, 通过本发明方法获得的透明质酸衍生物具有约 5, 000 至约 5, 000, 000Da 的分子量。在甚至更优选的实施方式中, 通过本发明方法获得的透明质酸衍生物具有约 10, 000 至约 3, 000, 000Da 的分子量。

[0066] 另一个优选的实施方式涉及第一个方面的产品, 其中透明质酸或其盐具有范围在 300, 000-3, 000, 000 的分子量 ; 优选范围在 400, 000-2, 500, 000 ; 更优选范围在 500, 000-2, 000, 000 ; 并且最优选范围在 600, 000-1, 800, 000Da。

[0067] 在本发明的方法中使用重组产生的透明质酸或其盐来制造本发明的产品或组合物时, 首先降低透明质酸或其衍生物或盐的平均分子量对于某些应用可能是有利的。例如, 所谓的透明质酸低分子量级分的几个制造商已经声称, 其能够穿过皮肤屏障以在皮肤中重建透明质酸的天然含量, 因此, 这样的级分特别适于作为抗皮肤老化剂和抗皱剂出售的化妆品组合物。对于食品应用, 已显示低 MW 透明质酸穿透胃肠屏障 (gastrointestinal barrier), 由此增加其生物可用性。最后, 低 MW 透明质酸显示抗炎作用 (anti-inflammatory effect) 并在炎症性疾病的治疗中具有潜在应用。减小透明质酸或其衍生物或盐的平均分子量可通过本领域的标准方法实现, 例如, 简单热处理、酶降解、超声处理 (ultrasound sonication) 或酸水解 (acid hydrolysis)。参见, 例如, 美国专利 6, 020, 484, 其描述了包括 NaOCl 作为添加剂的 HA 的超声处理技术 (ultrasonication technique), 和 T. Miyazaki 等 (2001) Polymer Degradation and Stability, 74 :77-85。

[0068] 因此,优选的实施方式涉及本发明的 HA 衍生物,其中透明质酸或其衍生物或盐具有低平均分子量,其范围是 10,000–3,000,000Da;优选 10,000–50,000Da;或优选 50,000–500,000Da;甚至更优选 80,000–300,000Da。

[0069] 取代程度 (Degree of Substitution ;DS)

[0070] 根据下文的实施例 6 通过 ^1H NMR 波谱学 (10mg/ml, D_2O , 80°C, 128 扫描, 400MHz) 测定 DS,其中使用 2D-NMR(gCOSY) 来确定 OSA 基团的峰。然后通过比较 OSA 的乙烯基质子的强度 (5.4 和 5.6ppm) 与乙酰基质子的强度 (2.0ppm) 来计算 DS。

[0071] 在优选的实施方式中,第一个方面的 HA 衍生物具有的取代程度为 0.1–100%,优选 1–90%,更优选 2–80%,还更优选 4–70%,甚至更优选 8–60%,或 10–50%、14–40%、16–30%,或最优选 18–25%。

[0072] 产生方法

[0073] 在本发明的方法中,可使用重组产生的 HA,其是通过如下方法产生的,其中使用本领域已知的方法在适于产生透明质酸的营养培养基中培养产生 HA 的宿主细胞。例如,可以通过在合适的培养基中以及允许涉及透明质酸合成的酶表达和允许透明质酸分离的条件下,在实验室中或工业发酵罐中进行的摇瓶培养、小规模或大规模发酵(包括连续、分批、补料分批或固态发酵)来培养细胞。在包含碳源和氮源和无机盐的合适的营养培养基中,使用本领域已知的方法进行培养。合适的培养基可以从商业供应商获得,或可以根据已公开的组成(例如,在美国典型培养物保藏中心的目录中)制备。分泌的透明质酸能够直接从培养基中回收。

[0074] 所得透明质酸可以通过本领域已知的方法分离。例如,透明质酸可以从营养培养基中通过常规方法分离,所述常规方法包括但不限于离心、过滤、提取、喷雾干燥、蒸发或沉淀。然后通过本领域已知的多种方法进一步纯化分离的透明质酸,所述方法包括但不限于层析(例如离子交换、亲和、疏水、层析聚焦和大小排阻)、电泳方法(例如,制备等电聚焦)、差示溶解度(例如,硫酸铵沉淀)或提取(参见,例如,Protein Purification, J.-C. Janson and Lars Ryden, editors, VCH Publishers, New York, 1989)。

[0075] 宿主细胞

[0076] 优选实施方案涉及其中所述透明质酸或其盐是重组产生的,优选通过革兰氏-阳性细菌或宿主细胞,更优选通过芽孢杆菌属 (genus *Bacillus*) 细菌重组产生。

[0077] 宿主细胞可以是适合用于重组产生透明质酸的任何芽孢杆菌属细胞。芽孢杆菌属宿主细胞可以是野生型芽孢杆菌属细胞或其突变体。在本发明的实践中有用的芽孢杆菌属细胞包括但不限于 *Bacillus agaradherens*、嗜碱芽孢杆菌 (*Bacillus alkalophilus*)、解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*)、短芽孢杆菌 (*Bacillus brevis*)、环状芽孢杆菌 (*Bacillus circulans*)、克劳氏芽孢杆菌 (*Bacillus clausii*)、凝结芽孢杆菌 (*Bacillus coagulans*)、坚强芽孢杆菌 (*Bacillus firmus*)、灿烂芽孢杆菌 (*Bacillus lautus*)、迟缓芽孢杆菌 (*Bacillus lentus*)、地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*)、巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*)、短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*)、嗜热脂肪芽孢杆菌 (*Bacillus stearothermophilus*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 和苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 细胞。特别适于重组表达的突变枯草芽孢杆菌细胞在 W098/22598 有所描述。无包囊 (non-encapsulating) 的芽孢杆菌属细胞在本发明中是特别

有用的。

[0078] 在优选的实施方式中,芽孢杆菌属宿主细胞是解淀粉芽孢杆菌、克劳氏芽孢杆菌、迟缓芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌或枯草芽孢杆菌细胞。在更加优选的实施方式中,芽孢杆菌属细胞是解淀粉芽孢杆菌细胞。在其它更加优选的实施方式中,芽孢杆菌属细胞是克劳氏芽孢杆菌细胞。在其它更加优选的实施方式中,芽孢杆菌属细胞是迟缓芽孢杆菌细胞。在其它更加优选的实施方式中,芽孢杆菌属细胞是地衣芽孢杆菌细胞。在其它更加优选的实施方式中,芽孢杆菌属细胞是枯草芽孢杆菌细胞。在最优选的实施方式中,芽孢杆菌属宿主细胞是枯草芽孢杆菌 A164 Δ 5 (参见,例如美国专利 No. 5,891,701) 或枯草芽孢杆菌 168 Δ 4。

[0079] 用本发明的核酸构建体转化芽孢杆菌属宿主细胞可以,例如,通过原生质体转化 (参见,例如 Chang and Cohen,1979, Molecular General Genetics 168:111-115),通过使用感受态细胞 (参见,例如 Young and Spizizen,1961, Journal of Bacteriology 81:823-829, 或 Dubnau and Davidoff-Abelson,1971, Journal of Molecular Biology 56:209-221),通过电穿孔 (参见,例如 Shigekawa and Dower,1988, Biotechniques 6:742-751) 或通过接合 (参见,例如 Koehler and Thorne,1987, Journal of Bacteriology 169:5271-5278) 来进行。

[0080] 衍生化方法

[0081] 在第三个方面,本发明涉及产生透明质酸衍生物的方法,所述方法包括步骤:

[0082] (a) 在碱性条件下,在水溶液中,将透明质酸与具有结构通式 (III) 的一种或多种脂族烃基 / 芳基乙烯基砜化合物反应,由此形成透明质酸衍生物;和

[0083] (b) 回收透明质酸衍生物。

[0084] 优选的实施方式涉及第三个方面的方法,其中脂族烃基 / 芳基,即 (III) 中的 R, 包含脂族烃基,优选疏水的脂族烃基,更优选所述脂族烃基包含 C_1 - C_{20} 脂族烃基,并且最优选所述脂族烃基包含甲基、乙基、丙基、2-辛烯基、2-壬烯基、2-十二碳烯基、2-十六碳烯基或 2-十八碳烯基;或其中脂族烃基 / 芳基包含芳基,优选疏水芳基,并且更优选所述芳基包含苯基和对甲苯甲酰基。

[0085] 同样优选的是可以同时采用不同的单官能乙烯基砜化合物,导致几种不同的脂族烃基或芳基砜化合物与 HA 分子加成。

[0086] 因此,优选的实施方式涉及第三个方面的方法,其中一种或多种脂族烃基 / 芳基乙烯基砜化合物包含两种或更多种不同的脂族烃基和 / 或芳基。优选地,所述两种或更多种不同的脂族烃基 / 芳基包含脂族烃基,优选疏水的脂族烃基,更优选所述脂族烃基包含 C_1 - C_{20} 脂族烃基,并且最优选所述脂族烃基包含甲基、乙基、丙基、2-辛烯基、2-壬烯基、2-十二碳烯基、2-十六碳烯基或 2-十八碳烯基;或者所述两种或更多种不同的脂族烃基 / 芳基包含芳基,优选疏水芳基,并且更优选所述芳基包含苯基和对甲苯甲酰基。

[0087] 其它成分

[0088] 在优选的实施方式中,包含本发明的 HA 衍生物的组合物还可以包含其它成分,优选一种或多种活性成分,优选一种或多种药理活性物质,并且还优选水溶性赋形剂,例如乳糖。

[0089] 可以用在本发明中的活性成分或药理活性物质的非限定性实例包括蛋白质

和 / 或肽药物,例如,人生长激素、牛生长激素、猪生长激素、生长激素释放激素 / 肽、粒细胞集落刺激因子、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子、巨噬细胞集落刺激因子、促红细胞生成素、骨形态发生蛋白、干扰素或其衍生物、胰岛素或其衍生物、心房肽激素-III(atriopeptin-III)、单克隆抗体、肿瘤坏死因子、巨噬细胞活化因子、白细胞介素、肿瘤变性因子(tumor degenerating factor)、胰岛素样生长因子、表皮生长因子、组织纤溶酶原激活物、因子 IIV、因子 IIIIV 和尿激酶。

[0090] 出于稳定活性成分的目的,可以将水溶性赋形剂包括在内,这种赋形剂可以包括蛋白质,例如,白蛋白或明胶;氨基酸,例如甘氨酸、丙氨酸、谷氨酸、精氨酸、赖氨酸和它们的盐;碳水化合物例如葡萄糖、乳糖、木糖、半乳糖、果糖、麦芽糖、蔗糖、右旋糖酐(dextran)、甘露醇、山梨糖醇、海藻糖和硫酸软骨素;无机盐例如磷酸盐;表面活性剂例如 TWEEN[®] (ICI)、聚乙二醇,和它们的混合物。赋形剂或稳定剂可以按产品重量计 0.001-99% 的量使用。

[0091] 本发明的几个方面涉及多种组合物和药物,除了其它成分之外,其还包含有效量的如第一个方面中限定的产品,和活性成分,优选所述活性成分是药理活性剂;可药用载体、赋形剂或稀释剂,优选水溶性赋形剂,并且最优选乳糖。

[0092] 另外,本发明的方面涉及包含如第一个方面中限定的 HA 衍生物或如上述方面和实施方式中限定的组合物的用品,例如化妆用品、卫生用品、医疗或外科用品。在最后一个方面本发明涉及药物胶囊或微胶囊,其包含如第一个方面中限定的产品或本发明的其它方面和实施方式中限定的组合物。

[0093] 实施例

[0094] 实施例 1. PVS:HA 比率 1.5:1 的苯基乙烯基砒(PVS)衍生化的 HA(PVS-HA)

[0095]

试剂	MW (Da)	Eq. (-OH)	n (mmol)	m 或 V (mg 或 mL)
HA	300000	1	0.25	100mg
NaOH	40	1	0.25	1.25mL
PVS	168	1.5	0.375	63.10mg

[0096] 表 1.

[0097] 将 HA 溶解在 milliQ 水 (10mL) 中在室温过夜。在搅拌条件下将 NaOH 添加至 HA 水溶液。将 PVS 溶解在丙酮 (10mL) 中,并且在 4-5 分钟之后使用分离漏斗 (separation funnel) 逐滴添加所得溶液。将混合物在室温过夜搅拌。然后在浸没于 milliQ 水 (7.5L) 中的透析袋 (Spectra/Por[®], 截留值 14kDa) 中纯化粗制混合物。更换 3 次 milliQ 水,在 3 小时之后,然后在一夜之后,最后是再过 3 小时之后。通过测量 milliQ 水的电导率来监测透析,当电导率低于 5 μ S/cm 时停止透析。最终将纯化的产物在 milliQ 水 (50mL) 中稀释并且冷冻干燥。

[0098] 反应产生了 94.5mg 白色海绵状物质,部分溶于 milliQ 水。通过 TLC 分析纯化产物的组成。保留时间的值显示没有残余的 PVS 剩余在纯化产物中。纯化产物的结构通过 ¹H NMR 来确认,揭示了取代程度 (DS) 为 11% 每个重复二糖单位 (图 2)。FT-IR 也被用来确认苯基-乙烯基砒衍生化的 HA 的形成。

[0099] 对反应中涉及的 PVS 的量的影响进行了研究。这种研究显示较高的 PVS 量产生了较高的取代程度。对于比率在 5:1-10:1 的 PVS:HA 比率 (实施例 2),这些取代程度通常在

11% -55%。

[0100] 实施例 2. PVS:HA 比率为 5:1 和 10:1 的苯基乙烯基砒 (PVS) 衍生化的 HA (PVS-HA)

[0101]

试剂	MW (Da)	Eq. (-OH)	n (mmol)	m 或 V (mg 或 mL)
HA	300000	1	0.25	100mg
NaOH	40	1	0.25	1.25mL
PVS	168	5	1.25	210mg
HA	300000	1	0.25	100mg
NaOH	40	1	0.25	1.25mL
PVS	168	10	2.50	421mg

[0102] 表 2.

[0103] 根据实施例 1 中描述的方法制备以上衍生物。NaOH:HA 比率为 1:1。该衍生物的取代程度示于表 3。

[0104]

PVS:HA	DS
5:1	19%
10:1	55%

[0105] 表 3 :来自 PVS:HA 比率 5:1 和 10:1 的 PVS-HA 衍生物的取代程度

[0106] 图 3 和图 4 表示了所述衍生物的 NMR 谱。图 5 表示了 IR 谱,其确认了 PVS 在 HA 链上的接枝。谱带的指定示于表 4。

[0107]

波数 (cm ⁻¹)	键和吸收模式	注释
1600	C=C 环拉伸 (第一吸收)	第一吸收最可能并入观察到的代表 C=O 拉伸的谱带中(1620 cm ⁻¹)
1450	C=C 环拉伸 (第二吸收)	弱带
1308	S=O 不对称拉伸	强带
1150	S=O 对称拉伸	这条谱带已经存在于 HA 谱上(C-O-C 糖苷拉伸)。在衍生物的谱上其强度明显增加。
730 690	C-H 平面外弯曲	这种双峰谱型(pattern)是典型的单取代环

[0108] 表 4. 与 HA 谱相比 PVA-HA 谱上观察到的额外谱带的波数和性质 (PVS:HA 比率 10:1)

[0109] 实施例 3 :EVS:HA 比率 1.5:1 的乙基乙烯基砒 (EVS) 衍生化的 HA (EVS-HA)

[0110]

试剂	M _w (Da)	Eq. (-OH,)	n (mmol)	m 或 V (mg 或 mL)
HA	300000	1	0.25	100mg
NaOH	40	1	0.25	1.25mL
EVS	120	1.5	0.375	40 μ g

[0111] 表 5

[0112] 根据实施例 1 中描述的方法制备 EVS-HA 衍生物。反应产生了白色海绵状物质,溶于 milliQ 水 (12.5g/L)。通过 ^1H NMR 来确定纯化产物的结构,揭示了每个重复二糖单位 13.4% 的取代程度 (图 6)。后者是通过将取代基上甲基质子的信号与 HA 上甲基质子的信号进行比较来计算的。

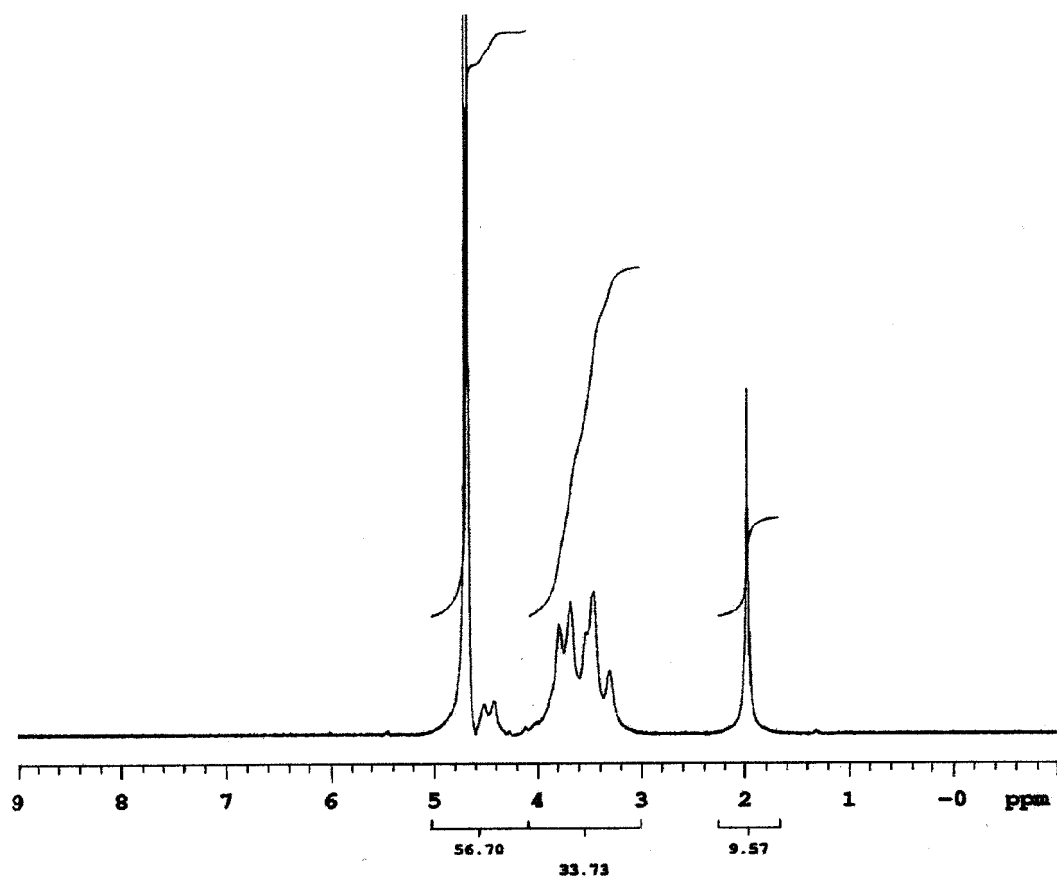


图 1 : ^1H NMR 谱 (HA, 300kDa)

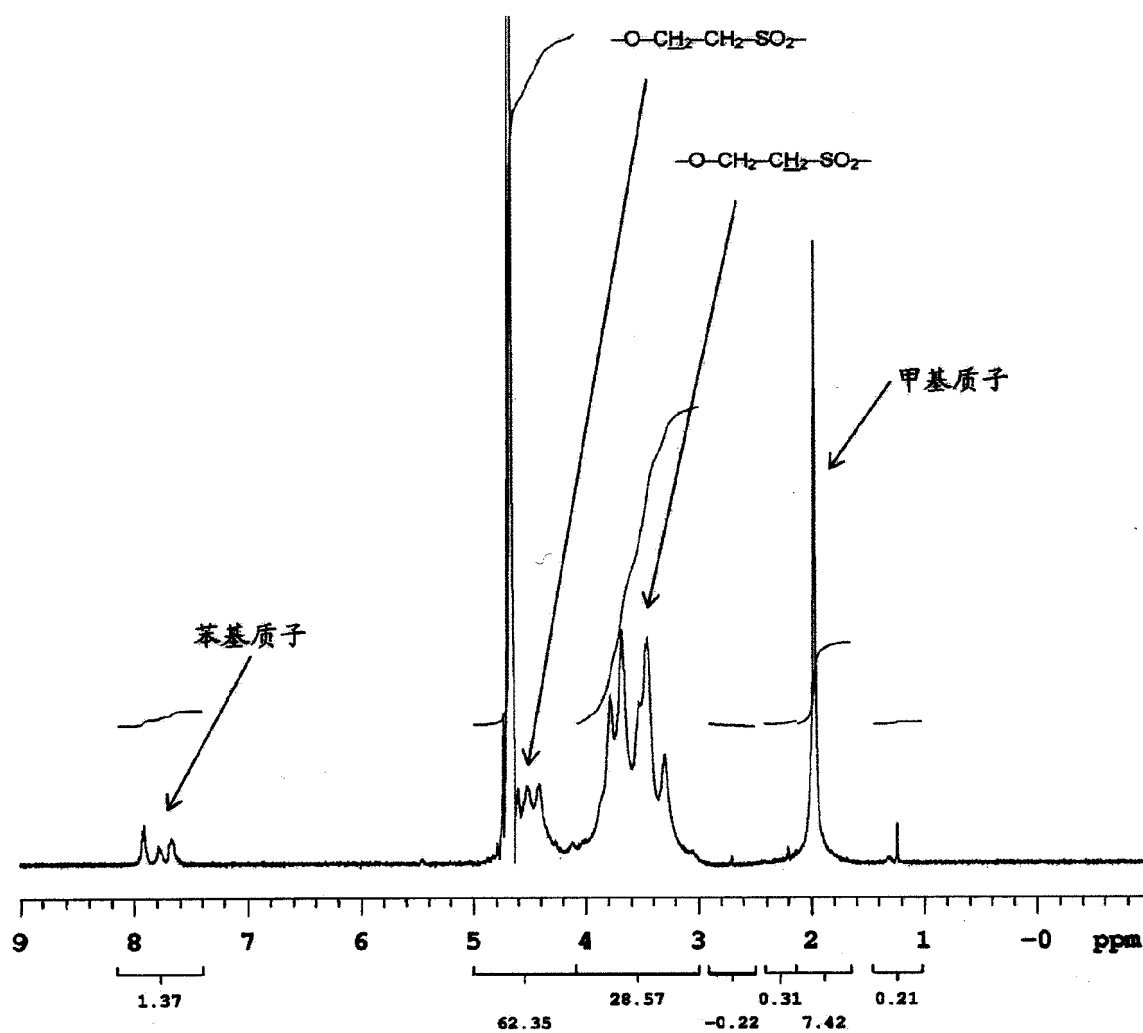


图 2 : ^1H NMR 谱 (来自 HA 300kDa 的 PVS-HA) PVS : HA 比率 1.5 : 1

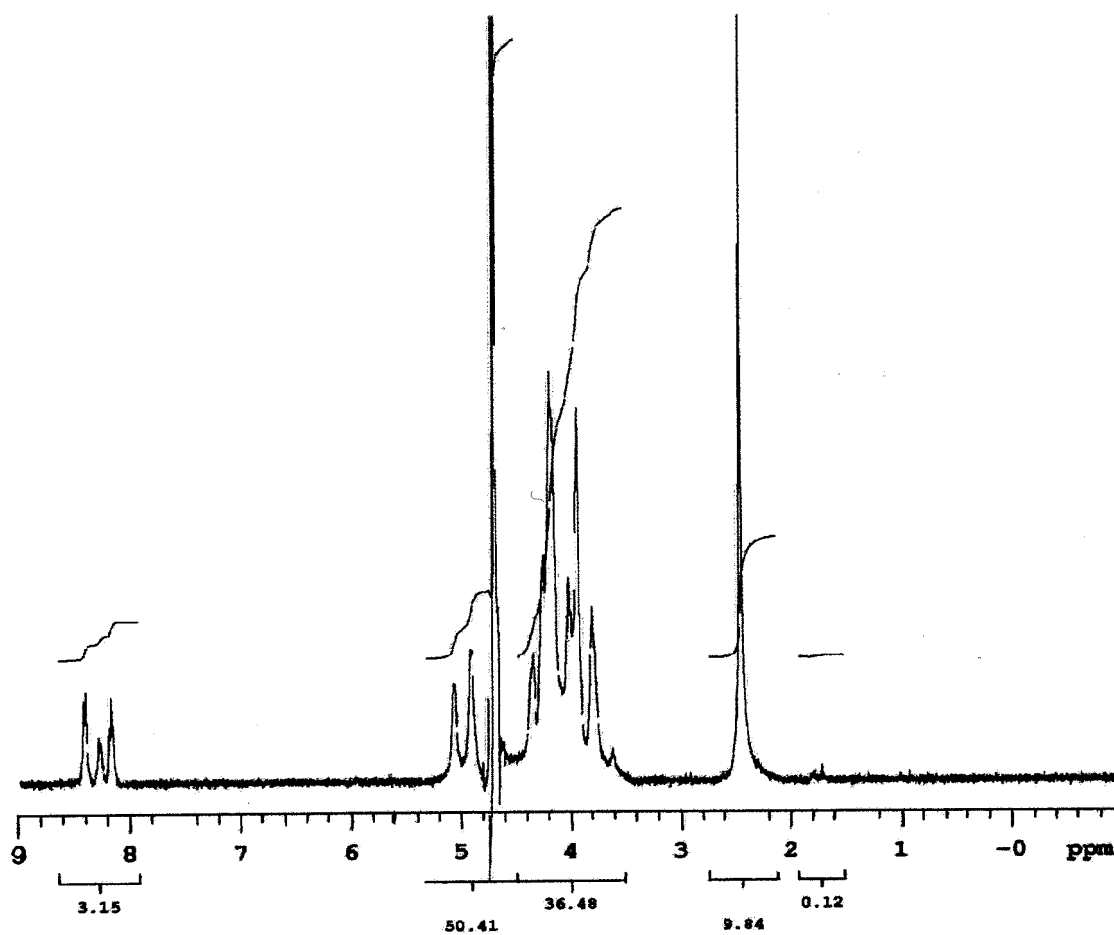


图3 : ^1H NMR 谱 (来自 HA 300kDa 的 PVS-HA)PVS : HA 比率 5 : 1

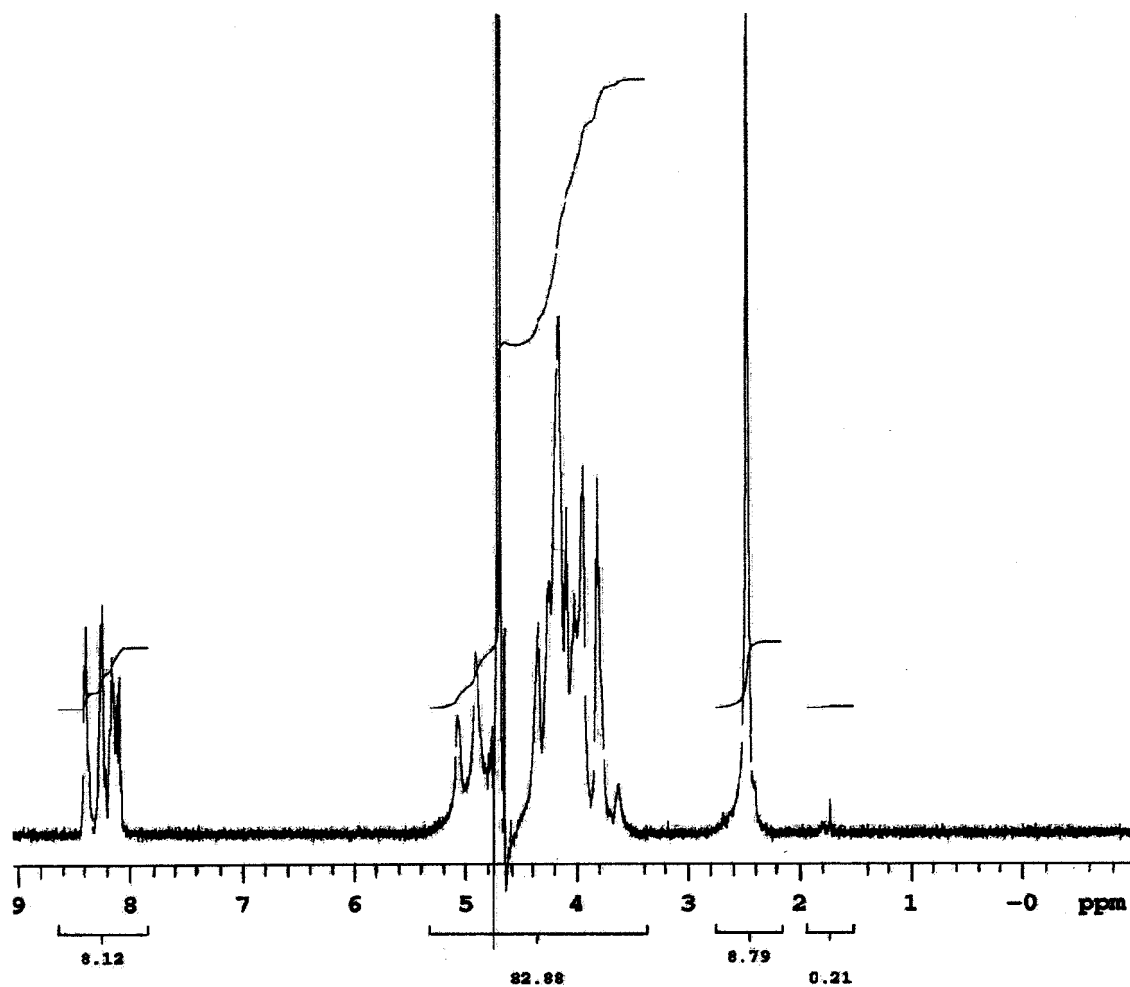


图4: ^1H NMR 谱 (来自 HA 300kDa 的 PVS-HA) PVS : HA 比率 10 : 1

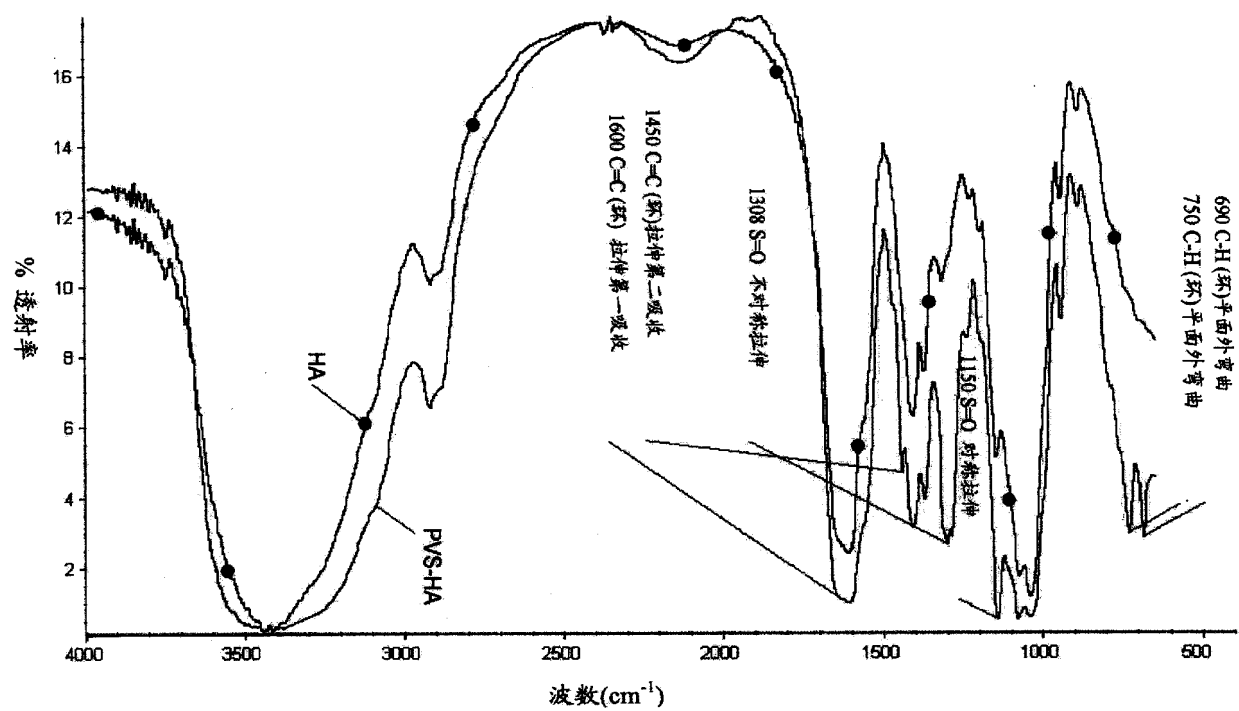


图 5: IR谱 (来自HA 300 kDa的PVS-HA) PVS: HA r比率10:1

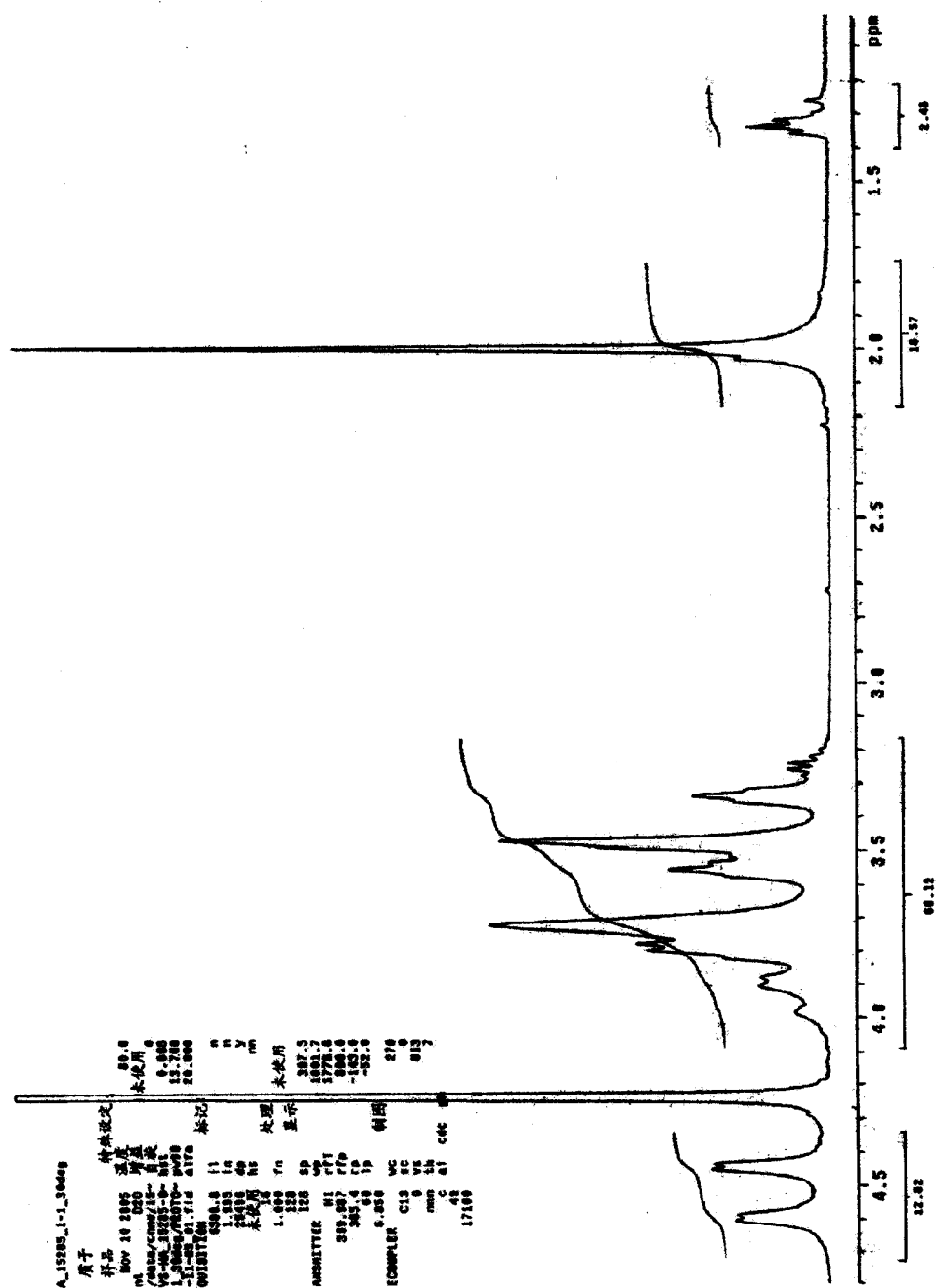


图 6: ^1H NMR 谱(来自 HA 300 kDa 的 EVS-HA) EVS: HA 比率 1.5:1