



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1961037 B

(45) 授权公告日 2014. 11. 26

(21) 申请号 200580017113. 1

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2005. 05. 26

C08L 5/08 (2006. 01)

(30) 优先权数据

C08B 37/08 (2006. 01)

PA200400833 2004. 05. 27 DK

A61K 9/16 (2006. 01)

PA200401003 2004. 06. 25 DK

审查员 李颀

PA200500223 2005. 02. 15 DK

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2006. 11. 27

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/DK2005/000350 2005. 05. 26

(87) PCT国际申请的公布数据

W02005/116131 EN 2005. 12. 08

(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 保罗·巴赫 埃里克·思韦茨

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 张文辉 巫肖南

权利要求书3页 说明书21页 附图5页

(54) 发明名称

干燥和团聚的透明质酸产品

(57) 摘要

包含透明质酸或其盐的产品, 该产品是如本文所定义的那样干燥和团聚的; 包含本发明的产品和组合物的多种组合物和物品, 生产本发明的产品的方法, 及其用途。

1. 包含透明质酸或其盐的产品,该产品是喷雾干燥和团聚的并且通过以下方法制备:
a) 喷雾干燥包含透明质酸或其盐的产品;和 b) 团聚该喷雾干燥的产品,所述喷雾干燥步骤是通过双流体喷嘴(TFN)喷雾干燥器完成的,所述团聚步骤使用流化床或者使用水-溶剂混合物完成的,其中喷雾干燥是在下面的条件范围进行的:

入口温度:	100 - 200℃
出口温度:	40 - 90℃
喷嘴喷雾压力:	2 - 10 bar
喷嘴气体温度:	40 - 100℃
进料温度:	40 - 100℃,

该产品在水性溶剂中具有少于 30 分钟的可分散性,在水性溶剂中具有少于 60 分钟的溶解性;

所述可分散性按照如下方法测定:将 0.1g 的干燥、团聚的产品加入 100ml 玻璃瓶中;加入 50ml 的 0.9% (v/v) 氯化钠溶液,将瓶密封,手工重复翻转 180 度,直到加入的所有颗粒都分散为单颗粒,即,肉眼检查没有团块(lump)残余,并在数据表上记录下翻转进行的时间;这样记录的时间就是该产品的可分散性;

所述溶解性按照如下方法测定:将 0.1g 的待测透明质酸粉末加入 100ml 的可密封玻璃烧瓶中;向含有待测透明质酸样品的烧瓶中加入 50ml 的 0.9% (w/v) 氯化钠,注射级水,无水乙醇,丙酮或醚;密封该烧瓶并用手进行 180 度翻转,直到肉眼检查到透明质酸进入溶液,并将翻转所用的时间记录在数据表上;所记录下的时间就是样品的溶解度。

2. 根据权利要求 1 的产品,其中当团聚步骤使用流化床完成时,所述流化床入口温度为 30-80℃,且其中所述粉末的水溶液以相应于出口温度 25-50℃的速率被喷射到干燥的粉末上。

3. 根据权利要求 1 的产品,其中当所述团聚步骤使用水-溶剂混合物完成时,所述水-溶剂混合物具有 0:100 到 50:50 的水:溶剂比。

4. 根据权利要求 1 的产品,其中当所述团聚步骤使用水-溶剂混合物完成时,所述水:溶剂比为 0:100 到 20:80。

5. 根据权利要求 1 的产品,其中当所述团聚步骤使用水-溶剂混合物完成时,所述溶剂是醇。

6. 根据权利要求 5 的产品,其中所述溶剂是异丙醇。

7. 根据权利要求 1 的产品,其中所述喷雾干燥和团聚在一个步骤中完成。

8. 根据权利要求 1 的产品,其中所述喷雾干燥和团聚使用流化喷雾干燥器完成。

9. 根据权利要求 1 的产品,其中所述透明质酸或其盐是重组生产的。

10. 根据权利要求 9 的产品,其中所述透明质酸或其盐是通过芽孢杆菌属的细菌生产的。

11. 根据权利要求 1 的产品,其中所述透明质酸或其盐具有 300,000-3,000,000Da 的分子量。

12. 根据权利要求 1 的产品,其中所述透明质酸或其盐具有 10,000-800,000Da 的平均

分子量。

13. 根据权利要求 1 的产品,其包含透明质酸的无机盐。

14. 根据权利要求 13 的产品,其中所述盐选自透明质酸钠、透明质酸钾、透明质酸铵、透明质酸钙、透明质酸镁、透明质酸锌、或透明质酸钴。

15. 根据权利要求 1 的产品,其包含交联的透明质酸。

16. 根据权利要求 1 的产品,其包含少于 5% 的水分,所述水分的量是指在 $102^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 下将产品干燥至恒重后损失的重量,以百分率表示。

17. 根据权利要求 1 的产品,该产品具有这样的粒度,其 50 百分位数,即 D_{50} , 为 10-1,000 微米,这是通过悬浮在异丙醇中的颗粒的激光衍射测量而确定的。

18. 根据权利要求 1 的产品,其还包含活性成分。

19. 根据权利要求 18 的产品,其中所述活性成分是药学活性物质。

20. 根据权利要求 18 的产品,其还包含水溶性赋形剂。

21. 根据权利要求 20 的产品,其中所述水溶性赋形剂是乳糖。

22. 组合物,包含如权利要求 1 至 21 的任一项所定义的产品及活性成分。

23. 药物组合物,其包含有效量的如权利要求 1 至 21 的任一项所定义的产品,及药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂。

24. 药物组合物,其包含有效量的如权利要求 1 至 21 的任一项所定义的产品作为媒介物,以及药学活性剂。

25. 化妆品,其包含有效量的如权利要求 1 至 21 的任一项所定义的产品或权利要求 22 至 24 的任一项所定义的组合物作为活性成分。

26. 卫生、医药或外科用品,包含如权利要求 1 至 21 的任一项所定义的产品或权利要求 22 至 24 的任一项所定义的组合物。

27. 根据权利要求 26 的用品,其中所述用品是尿布、卫生巾、外科用海绵、或急救绷带或其他伤口敷料材料中包含的部分。

28. 根据权利要求 27 的用品,其中所述用品是伤口愈合用海绵。

29. 药物胶囊或微胶囊,包含如权利要求 1 至 21 的任一项所定义的产品或权利要求 22 至 24 的任一项所定义的组合物。

30. 生产如权利要求 1 至 21 的任一项所定义的包含透明质酸或其盐的喷雾干燥和团聚的产品的的方法,该方法包括:

a) 喷雾干燥包含透明质酸或其盐的产品;和

b) 团聚该喷雾干燥的产品,

其中,所述喷雾干燥步骤是通过双流体喷嘴 (TFN) 喷雾干燥器完成的,所述团聚步骤使用流化床或者使用水-溶剂混合物完成的,其中喷雾干燥是在下面的条件范围进行的:

入口温度:	100 – 200℃
出口温度:	40 – 90℃
喷嘴喷雾压力:	2 – 10 bar
喷嘴气体温度:	40 – 100℃
进料温度:	40 – 100℃。

31. 根据权利要求 30 的方法,其中当团聚步骤使用流化床完成时,所述流化床入口温度为 30–80℃,且其中所述粉末的水溶液以相应于出口温度 25–50℃的速率被喷射到干燥的粉末上。

32. 根据权利要求 30 的方法,所述当所述团聚步骤是使用水–溶剂混合物完成时,水–溶剂混合物具有 0 : 100 到 50 : 50 的水:溶剂比。

33. 根据权利要求 30 的方法,其中当所述团聚步骤是使用水–溶剂混合物完成时,所述水:溶剂比为 0 : 100 到 20 : 80。

34. 根据权利要求 30 的方法,其中当所述团聚步骤是使用水–溶剂混合物完成时,所述溶剂是醇。

35. 根据权利要求 34 的方法,其中所述溶剂是异丙醇。

36. 根据权利要求 30 的方法,其中所述喷雾干燥和团聚在一个步骤中完成。

37. 根据权利要求 30 的方法,其中所述喷雾干燥和团聚使用流化喷雾干燥器完成。

38. 如权利要求 1 至 21 的任一项所定义的产品或权利要求 22 至 24 的任一项所定义的组合物在治疗骨关节炎用的药物的制备中的用途。

39. 如权利要求 1 至 21 的任一项所定义的产品或权利要求 22 至 24 的任一项所定义的组合物在眼科治疗用药物的制备中的用途。

40. 如权利要求 1 至 21 的任一项所定义的产品或权利要求 22 至 24 的任一项所定义的组合物在治疗癌症用的药物的制备中的用途。

41. 如权利要求 1 至 21 的任一项所定义的产品或权利要求 22 至 24 的任一项所定义的组合物在治疗伤口用的药物的制备中的用途。

42. 如权利要求 1 至 21 的任一项所定义的产品或权利要求 22 至 24 的任一项所定义的组合物在治疗血管发生用的药物的制备中的用途。

43. 如权利要求 1 至 21 的任一项所定义的产品或权利要求 22 至 24 的任一项所定义的组合物用于制备保湿剂的用途。

44. 如权利要求 1 至 21 的任一项所定义的产品或权利要求 22 至 24 的任一项所定义的组合物在治疗脱发或秃顶用的药物的制备中的用途。

干燥和团聚的透明质酸产品

技术领域

[0001] 本发明涉及包含透明质酸或其盐的干燥和团聚 (agglomerated) 的透明质酸产品, 以及包含本发明的产品或组合物的各种组合物和物品, 生产本发明的产品的方法, 及其用途。

背景技术

[0002] 身体最丰富的杂多糖是糖胺聚糖 (glycoaminoglycans)。糖胺聚糖是非分枝的糖聚合物, 由重复的二糖单位组成 (只有硫酸角质素在糖核心区域有分枝)。二糖单位一般包含两种修饰的糖 --N- 乙酰半乳糖胺 (GalNAc) 或 N- 乙酰葡萄糖胺 (GlcNAc) 之一作为第一糖单位。第二糖单位通常是糖醛酸, 例如葡萄糖醛酸 (GlcUA) 或艾杜糖醛酸 (iduronate)。

[0003] 糖胺聚糖是带负电的分子, 具有伸展的构象, 在溶液中该构象赋予高度的粘性。糖胺聚糖主要位于细胞表面或细胞外基质中。另外糖胺聚糖在溶液中具有低的可压缩性 (compressibility), 因此是一种理想的生理润滑液, 例如关节。糖胺聚糖的刚性为细胞提供结构完整性, 并提供细胞之间的通道 (passageways), 使细胞迁移成为可能。生理上最重要的糖胺聚糖是透明质酸, 硫酸软骨素、肝素、硫酸乙酰肝素、硫酸皮肤素和硫酸角质素。大多数糖胺聚糖 (粘多糖) 通过特异性的寡糖结构共价结合蛋白聚糖核心蛋白。透明质酸与特定的蛋白聚糖形成大型的聚集物 (aggregate), 但当游离的糖链与蛋白聚糖形成非共价复合物时是例外。

[0004] 已经鉴定了透明质酸在体内的多种角色 (参见 Laurent T. C. 和 Fraser J. R. E., 1992, FASEB J. 6 :2397-2404 ; 及 Toole B. P., 1991, "Proteoglycans and hyaluronan in morphogenesis and differentiation." 于 Cell Biology of the Extracellular Matrix, pp. 305-341, Hay E. D. 编, Plenum, New York)。透明质酸存在于透明软骨、滑膜关节液、和皮肤组织包括表皮和真皮中。透明质酸还被怀疑在多种生理功能中起作用, 例如粘附 (adhesion)、发育、细胞运动性、癌症、血管发生和伤口愈合。由于透明质酸的独特的物理和生物学性质, 其已被应用于眼和关节手术, 在其他的医学方法中也正在被评估。

[0005] 术语“透明质酸” (“hyaluronan” 或 “hyaluronic acid”) 在文献中被用来指具有不同分子量的、由 D- 葡萄糖醛酸和 N- 乙酰 -D- 葡萄糖胺酸残基构成的酸性多糖, 其天然存在于细胞表面、脊椎动物的结缔组织的细胞外基质 (basic extracellular substances)、滑膜关节液、眼球内液、人脐带组织和雄鸡鸡冠中。

[0006] 术语“透明质酸”实际上通常用来指整个一系列具有交替的 D- 葡萄糖醛酸和 N- 乙酰 -D- 葡萄糖胺酸残基和不同的分子量的多糖, 或甚至其降解的部分, 因此使用复数形式的术语“透明质酸类” (hyaluronic acids) 似乎更准确。但是在本说明书中还是会使用该术语的单数形式 ; 另外, 将经常用缩写 “HA” 来代替这个集合性的术语。

[0007] HA 在生物体中扮演着重要的角色, 作为多种组织, 例如皮肤、腱、肌肉和软骨的机械支持物, 它是细胞间基质的重要组分。HA 在生物过程中还起其他的重要作用, 例如湿润组织, 和润滑。

[0008] 尽管现今更优选通过微生物方法来制备 HA, HA 可以从上述的天然组织中提取, 以最大程度地减小传递感染性物质的潜在危险, 并提高产品的均一性、质量和可用性。

[0009] HA、HA 的各种分子大小的级分、及其各自的盐已被用作药物, 尤其是用在关节病的治疗中, 作为天然器官或组织的辅助和 / 或替代介质, 特别是在眼科和美容手术中, 以及作为化妆品制剂 (cosmetic preparations) 中的介质。还开发了用于整形外科、风湿病学和皮肤病学的透明质酸制品。

[0010] HA 还可以用作多种用于卫生和外科用品的聚合材料例如聚氨酯、聚酯等的添加剂, 具有使这些材料成为生物相容性的效果。

[0011] 包含透明质酸或其盐的水溶性凝胶形成材料是公知的并广泛地应用在卫生保健领域中, 例如在眼科、骨关节炎的治疗、以及制药和化妆品工业中。理想地, 这些材料当以干燥形式出售、运输和保存。但是, 含有透明质酸或其盐的干燥产品溶解缓慢是众所周知的。

[0012] 干燥的 HA 产品完全溶解所需的时间是一个重要参数, 尤其是在卫生保健工业中, 因此, 最大地减少总溶解时间, 即分散和溶解干燥的 HA 产品所需的时间, 是人们相当关心的。本发明可用于制造透明质酸或其盐的速溶产品, 和类似的水溶性凝胶形成材料。

[0013] 发明概述

[0014] 本发明要解决的一个问题是如何提供高度水溶性的干燥 HA 产品。

[0015] 本发明显示, 干燥的 HA 产品的团聚 (agglomeration) 大大地提高该产品的溶解性, 从而实现在水性溶剂, 优选为水或盐水中的快速溶解。

[0016] 因此, 本发明的第一个方面涉及包含透明质酸或其盐的产品, 该产品是干燥和团聚的, 优选如本文所公开的那样干燥和团聚的。

[0017] 在第二个方面, 本发明涉及组合物, 其包含如第一个方面中所定义的产品, 以及活性成分, 优选地, 该活性成分是药学活性成分。

[0018] 本发明的第三个方面涉及药物组合物, 其包含有效量的如第一方面中所定义的产品, 以及药学上可接受的载体, 赋形剂或稀释剂。

[0019] 本发明的第四个方面涉及药物组合物, 其包含有效量的如第一个方面中所定义的产品作为媒介物 (vehicle), 以及药学活性剂。

[0020] 本发明的第五个方面涉及化妆品 (cosmetic article), 其包含有效量的如第一个方面中所定义的产品或如第二、三、四个方面的任一个中所定义的组合物作为活性成分。

[0021] 在第六个方面中, 本发明涉及卫生、医药、内科或外科用品 (medical or surgical article), 其包含如第一个方面中所定义的产品或如第二、三、四个方面的任一个中所定义的组合物, 优选地, 所述产品是尿布 (diaper)、卫生巾 (sanitary towel)、外科用海绵、伤口愈合用海绵 (wound healing sponge)、或急救绷带 (band aid) 或其他伤口敷料材料 (wound dressing material) 中包含的部分。

[0022] 一个重要的方面涉及药物胶囊或微胶囊, 其包含如第一个方面中所定义的产品或如第二、三、四个方面的任一个中所定义的组合物。

[0023] 本发明的另一个重要的方面涉及生产包含透明质酸或其盐的干燥、团聚的产品的的方法, 该方法包括下列步骤:

[0024] a) 干燥包含透明质酸或其盐的产品 ; 和

[0025] b) 团聚该干燥的产品

[0026] 本发明的最后的方面涉及在眼科、骨关节炎或癌症、脱发 (hair loss) 或秃顶 (baldness) 的治疗, 伤口治疗, 药理学活性剂的皮肤或透皮施用 (dermal or transdermal), 或化妆品的皮肤施用中执行步骤的方法中的改进, 该改进包括使用如第一个方面中所定义的产品或如第二、三、四个方面的任一个中所定义的组合物。

[0027] 多个方面涉及如权利要求 1-12 中的任一个所定义的产品或如权利要求 13-16 的任一个所定义的组合物用于制备骨关节炎、癌症治疗用药物、制备眼科 (ophthalmological) 治疗用药物, 制备伤口治疗用药物、制备血管发生用药物、制备脱发或秃顶治疗用药物、和制备保湿剂 (moisturizer) 的用途。

[0028] 附图

[0029] 图 1: 如实施例 7 所述, 考察放射性标记的透明质酸的四种不同平均分子量的级分的皮肤渗透。结果分别如表 5 和图 1 所示。这些结果显示, 经皮转运 (percutaneous transport) (通量) 明显依赖于 HA 的分子量, 低分子量的种类显然渗透较好。对于任何 HA 的粒度级分, 在 5 小时和 22 小时测得的表现通量没有显著的差别。

[0030] 图 2: 在实施例 8 中, 使用激光扫描共聚焦显微术 (laser scanning confocal microscopy), 考察了荧光标记的 HA 的两种不同平均分子量的级分的皮肤摄取和分布。该 HA 级分的平均分子量为 300,000 和 50,000Da。50,000Da (F-HA 0.05) 的荧光标记 HA 仅在角质层的表面上肤浅、零星地可见, 但该 HA 级分在毛囊周围和 / 或毛囊中清晰可见。图 2, 画面 A 显示了皮肤表面 (角质层), 毛囊和毛干; 画面 B 清晰地显示来自 HA 的绿色荧光主要可见于毛囊周围和 / 或毛囊中。

[0031] 图 3: 图 2 所见的角质层表面的零星荧光在另一个皮肤样品中得到了确证, 该皮肤样品中不存在毛囊。图 3, 画面 A 显示了皮肤表面; 画面 B 显示只有有限的来自标记的 HA 的荧光可见于该表面上。

[0032] 图 4: 对 300,000Da (F-HA 0.30) 的荧光标记透明质酸进行了类似的观察, 其也清晰地可见于毛囊周围。图 4, 画面 A 显示皮肤表面 (角质层), 毛囊和毛干; 画面 B 显示来自毛囊周围标记的 HA 的绿色荧光。

[0033] 图 5: 然而, 虽然该 300,000Da 的标记的 HA 级分也仅是肤浅、零星地可见于皮肤表面上, 但其明显地显示在皮肤表面的角质形成细胞之间有优先的积累。图 5 画面 A 显示皮肤表面; 画面 B 显示, 当有限的来自标记的 HA 的荧光可见于该表面时, 其积累于角质形成细胞之间。

[0034] 定义

[0035] 核酸构建体

[0036] “核酸构建体”定义为单链或双链的核酸分子, 其分离自天然存在的基因, 或其已受到修饰从而含有以自然界中不存在的方式组合或并列的核酸片段。当核酸构建体含有表达编码序列所需的所有控制片段时, 术语“核酸构建体”可以与术语“表达盒”同义。术语“编码序列”在本文中定义为这样的核酸序列, 其被置于上述控制序列的控制之下时, 被转录为 mRNA 并翻译为目标酶。编码序列的界限通常由位于 mRNA 的 5' 端紧邻开放阅读框上游的核糖体结合位点和位于 mRNA 的 3' 端紧邻开放阅读框下游的转录终止子序列确定。编码序列可包含但不限于 DNA、cDNA 和重组核酸序列。

[0037] 用于分离或克隆编码多肽的核酸序列的技术是本领域公知的, 其包含, 例如, 从基

基因组 DNA 分离,从 cDNA 制备,或其组合。从这样的基因组 DNA 分离核酸序列可以通过,例如,使用抗体筛选表达文库以检测具有共有结构特征的克隆 DNA 片段,或公知的聚合酶链式反应 (PCR) 来实现。参见例如 Innis 等,1990,PCR Protocols:A Guide to Methods and Application,Academic Press,New York。也可以使用其他核酸扩增程序例如连接酶链式反应,连接激活的转录 (ligated activated transcription),和基于核酸序列的测序。克隆程序可涉及切出和分离包含编码多肽的核酸序列的所希望的核酸片段,将该片段插入载体分子,和将该重组载体纳入芽孢杆菌 (*Bacillus*) 宿主细胞,在该细胞中所述核酸序列的克隆将被扩增。所述核酸序列可以是基因组、cDNA、RNA、半合成和合成来源,或上述的任意组合。

[0038] 编码酶的分离的核酸序列可以接受各种形式的操作来为该酶的表达提供条件。在插入构建体或载体前对核酸序列进行操作可能是所希望的,或者必须的,这取决于所述表达载体或芽孢杆菌宿主细胞。利用克隆方法来修饰核酸序列的技术在本领域是熟知的。应当理解的是,也可以利用本领域公知的技术在宿主细胞中对核酸序列进行体内操作。

[0039] 透明质酸的生物合成涉及多种酶。这些酶包括透明质酸合成酶、UDP-葡萄糖 6-脱氢酶、UDP-葡萄糖焦磷酸化酶、UDP-N-乙酰葡萄糖胺焦磷酸化酶、葡萄糖-6-磷酸异构酶、己糖激酶、葡糖磷酸变位酶、酰胺转移酶、变位酶和乙酰基转移酶。透明质酸合成酶是透明质酸生产中的关键酶。

[0040] “透明质酸合成酶”(hyaluronan synthase) 在本文中定义为催化透明质酸链通过添加 GlcUA 和 GlcNAc 糖前体而延伸的合成酶。链球菌透明质酸合成酶、脊椎动物透明质酸合成酶和病毒透明质酸合成酶的氨基酸序列与巴斯德氏菌 (*Pasteurella*) 透明质酸合成酶不同,有人提出将它们分类为第 I 组和第 II 组透明质酸合成酶,其中第 I 组透明质酸合成酶包括链球菌透明质酸合成酶 (DeAngelis,1999)。对于在芽孢杆菌宿主细胞中生产透明质酸,真核来源的透明质酸合成酶,例如哺乳动物透明质酸合成酶,是很少优选的。

[0041] 编码透明质酸合成酶的序列可以是任何可以在芽孢杆菌宿主细胞中表达的核酸序列。所述核酸序列可以是任何来源的。优选的透明质酸合成酶基因包括第 I 组或第 II 组的任一种,例如来自似马链球菌 (*Streptococcus equisimilis*)、化脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*)、乳房链球菌 (*Streptococcus uberis*) 和马链球菌兽瘟亚种 (*Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*) 的第 I 组透明质酸合成酶基因,或多杀巴斯德氏菌 (*Pasteurella multocida*) 的第 II 组透明质酸合成酶基因。

[0042] 在本发明的 HA 的生产中优选地构建体,通过该构建体透明质酸的前体糖被供应给宿主细胞,构建体或者被加入培养基中,或者被芽孢杆菌宿主细胞中的内源基因,非内源基因,或内源基因和外源基因的组合所编码。所述前体糖可以是 D-葡萄糖醛酸或 N-乙酰葡萄糖胺。

[0043] 在本发明的方法中,所述核酸构建体还可以包含一种或多种编码透明质酸前体糖生物合成中的酶的基因。或者,所述芽孢杆菌宿主细胞还可以包含一种或多种第二核酸构建体,其包含编码前体糖合成中的酶的基因。使用构建体提高了透明质酸的产量,所述构建体具有一种或多种核酸序列,其编码指导透明质酸前体糖合成途径中的步骤的一种或多种基因。“指导透明质酸前体糖合成途径中的步骤”是指所述基因的表达蛋白在下述物质的形成中有活性:N-乙酰葡萄糖胺,或 D-葡萄糖醛酸,或作为 N-乙酰葡萄糖胺和 D-葡萄糖醛酸之一的

前体的糖。

[0044] 在一种供应前体糖的优选方法中,提供构建体以提高具有透明质酸合成酶的宿主细胞中的透明质酸生产,构建体的提供是通过培养具有重组构建体的宿主细胞,该重组构建体中异源启动子区可操作地连接于核酸序列,所述核酸序列编码指导透明质酸前体糖合成途径中的步骤的基因。在一种优选的方法中,宿主细胞还包含具有与透明质酸合成酶可操作地连接的启动子区的重组构建体,其可使用与 N-乙酰葡萄糖胺前体糖生物合成中涉及的合成酶的核酸序列相同或不同的启动子区。在一个进一步优选的实施方式中,宿主细胞可以具有重组构建体,其中启动子区域可操作地连接于编码涉及透明质酸前体糖合成的第二基因的不同核酸序列。

[0045] 由此,本发明还涉及构建体,其用于使用具有编码指导透明质酸前体糖合成途径中的步骤的基因的核酸序列的构建体来提高透明质酸生产。所述前体糖的核酸序列可以从与编码所述透明质酸合成酶的核酸序列相同的或不同的启动子表达。

[0046] 用于生产透明质酸的前体糖的生物合成所涉及的基因包括 UDP-葡萄糖 6-脱氢酶基因、UDP-葡萄糖焦磷酸化酶基因、UDP-N-乙酰葡萄糖胺焦磷酸化酶基因、葡萄糖-6-磷酸异构酶基因、己糖激酶基因、葡糖磷酸变位酶基因、酰胺转移酶基因、变位酶基因和乙酰基转移酶基因。

[0047] 在含有透明质酸合成酶的细胞中,可以表达下列任一种,或两种或两种以上的组合,来增加透明质酸合成酶可获得的前体糖的库(pool):hasB、hasC 和 hasD;或其同源物,例如枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)中分别为 tuaD、gtaB 和 gtaD;以及 hasE。枯草芽孢杆菌基因组记载在 Kunst 等人, *Nature* 390, 249-256, "The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*" (20 November 1997) 中。在一些情况下,例如宿主细胞没有天然的透明质酸合成酶活性时,构建物可包含 hasA 基因。

[0048] 编码所述生物合成酶的核酸序列可以是对于宿主细胞而言天然的,而在另外的情况下,也可使用异源序列。当两种或更多的基因被表达时,它们可能是天然的操纵子中相互关联的基因,例如似马链球菌 HAS 操纵子的基因,包括 hasA、hasB、hasC 和 hasD。其他情况下,可能希望使用前体基因序列的某些组合,而并非包括操纵子的每一个单元(element)。在另一些情况下,可能还优选使用一些宿主细胞的天然基因,和另一些外源基因。所作的选择取决于:特定的宿主细胞中可得的糖的库,细胞容纳过量表达而不影响宿主细胞其他功能的能力,以及该细胞对其天然基因和外源基因的表达的调节是否不同。

[0049] 例如,根据代谢上的需要和细胞的生长状况,以及可得的前体糖的库,通过表达编码 UDP-N-乙酰葡萄糖胺焦磷酸化酶的基因,例如 hasD 基因、芽孢杆菌 gcaD 基因及其同源物,来提高 N-乙酰-葡萄糖胺的生产,可能是理想的。或者,前体糖可以是 D-葡萄糖醛酸。在一个这样的实施方式中,所述核酸序列编码 UDP-葡萄糖 6-脱氢酶。这样的核酸序列包括芽孢杆菌 tuaD 基因,链球菌(*Streptococcus*)的 hasB 基因,及其同源物。核酸序列还可编码 UDP-葡萄糖焦磷酸化酶,例如在芽孢杆菌 gtaB 基因、链球菌 hasC 基因和其同源物中。在本发明的方法中,所述 UDP-葡萄糖 6-脱氢酶可以是 hasB 或 tuaD 基因;或其同源物。

[0050] 本发明中作下面的预想:所述透明质酸合成酶基因和所述一种或多种编码前体糖的基因在同一启动子的控制之下。或者,所述一种或多种编码前体糖的基因在同一启动子的控制之下,但该启动子与驱动所述透明质酸合成酶的启动子不同。又或者,所述透明质酸

合成酶基因,及所述每一种编码前体糖的基因,都在不同的启动子控制之下。在一个优选的实施方式中,所述透明质酸合成酶基因和所述一种或多种编码前体糖的基因在同一启动子的控制之下

[0051] 本发明还涉及这样的核酸构建体,其包含分离的核酸序列,该核酸序列编码透明质酸合成酶操纵子,该操纵子包含透明质酸合成酶基因和 UDP-葡萄糖 6-脱氢酶基因,和可选的一种或多种基因,其选自 UDP-葡萄糖焦磷酸化酶基因、UDP-N-乙酰葡萄糖胺焦磷酸化酶基因和葡萄糖-6-磷酸异构酶基因。

[0052] 在某些情况下,宿主细胞具有重组构建体,该构建体中异源启动子区可操作性地连接到编码基因的核酸序列,该基因指导透明质酸的前体糖的合成途径中的步骤,其可能与透明质酸合成酶从重组构建体的表达相一致。所述透明质酸合成酶可能是从与编码所述前体的生物合成中涉及的酶的核酸序列相同或不同的启动子区表达的。在另一个优选的实施方式中,所述宿主细胞可具有重组构建体,该构建体中启动子区可操作地连接到不同的核酸序列,该序列编码第二基因,该基因涉及透明质酸的前体糖的合成。

[0053] 编码所述一种或多种前体糖的生物合成中所涉及的所述酶的核酸序列,与编码所述透明质酸合成酶的核酸序列,可以从相同或者不同的启动子表达。在前一种意义下,构建“人工操纵子”;其可以模仿似马链球菌的操纵子,具有 hasA、hasB、hasC 和 hasD 或其同源物中的每一个,也可以使用似马链球菌操纵子中不到全部的成员。所述“人工操纵子”还可以包含葡萄糖 6-磷酸异构酶基因 (hasE) 和选自糖激酶基因、葡糖磷酸变位酶基因、酰胺转移酶基因、变位酶基因及乙酰基转移酶基因的一种或多种基因。在人工操纵子中,至少一个单元对其他单元而言是异源的,例如与编码的序列异源的启动子区。

[0054] 在一个优选的实施方式中,所述核酸构建体包括 hasA、tuaD 和 gtaB。在另一个优选的实施方式中,所述核酸构建体包括 hasA、tuaD、gtaB 和 gcaD。在另一个优选的实施方式中,所述核酸构建体包括 hasA 和 tuaD。在另一个优选的实施方式中,所述核酸构建体包括 hasA。在另一个优选的实施方式中,所述核酸构建体包括 hasA、tuaD、gtaB、gcaD 和 hasE。在另一个优选的实施方式中,所述核酸构建体包括 hasA、hasB、HasC 和 HasD。在另一个优选的实施方式中,所述核酸构建体包括 hasA、hasB、HasC、HasD 和 hasE。根据上述的优选实施方式,被提到的基因可以用其同源物代替。

[0055] 在本发明的方法中,所述核酸构建体包括编码透明质酸合成酶的序列,其可操作地连接于启动子序列,该启动子序列对该编码透明质酸合成酶的序列而言是外源的。该启动子序列可以是,例如,单个的启动子或串联的启动子。

[0056] “启动子”在本文中定义为参与 RNA 聚合酶的结合以启动基因转录的核酸序列。“串联的启动子”(tandem promoter) 在本文中定义为两个或更多的启动子序列,其中每一个都可操作地连接于编码序列并介导该编码序列转录成 mRNA。“可操作地连接”在本文中定义为这样的构型(configuration),其中控制序列,例如启动子序列,被置于相对编码序列的合适的位置,使得该控制序列指导该编码序列所编码的多肽的生产。如前面提到的,“编码序列”在本文中定义为这样的核酸序列,当其被置于上述合适的控制序列的控制之下时,被转录为 mRNA 并翻译为多肽。编码序列的界限通常由位于 mRNA 的 5' 端紧邻开放阅读框上游的核糖体结合位点和位于 mRNA 的 3' 端紧邻开放阅读框下游的转录终止子序列确定。编码序列可包含但不限于基因组 DNA、cDNA、半合成的、合成的和重组核酸序列。

[0057] 在一个优选的实施方式中,所述启动子序列可以得自细菌来源。在一个更优选的实施方式中,所述启动子序列可以得自革兰氏阳性细菌,例如芽孢杆菌属菌株,如 *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*)、*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、或苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) ;或链霉菌属 (*Streptomyces*) 菌株,例如浅青紫链霉菌 (*Streptomyces lividans*) 或鼠灰链霉菌 (*Streptomyces murinus*) ;或得自革兰氏阴性细菌,例如大肠杆菌或假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 的种。

[0058] 适用于在本发明的方法中指导核酸序列转录的启动子的例子有从大肠杆菌 *lac* 操纵子、天蓝色链霉菌 (*Streptomyces coelicolor*) 琼脂酶基因 (*dagA*)、迟缓芽孢杆菌或 *Bacillus clausii* 碱性蛋白酶基因 (*aprH*)、地衣芽孢杆菌碱性蛋白酶基因 (*Carlsberg* 枯草蛋白酶 (*sutilisin Carlsberg*) 基因)、枯草芽孢杆菌果聚糖蔗糖酶基因 (*sacB*)、枯草芽孢杆菌 α -淀粉酶基因 (*amyE*)、地衣芽孢杆菌 α -淀粉酶基因 (*amyL*)、嗜热脂肪芽孢杆菌生麦芽糖淀粉酶基因 (*amyM*)、解淀粉芽孢杆菌 α -淀粉酶基因 (*amyQ*)、地衣芽孢杆菌青霉素酶基因 (*penP*)、枯草芽孢杆菌 *xylA* 和 *xylB* 基因、苏云金芽孢杆菌粉虫亚种 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis*) 的 *CyrIII A* 基因 (*cryIII A*) 或其部分,和原核 β -内酰胺酶基因 (Villa-Kamaroff 等人,1978, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 75:3727-3731) 中获得的启动子。其他的例子还有 *spol* 噬菌体启动子的启动子和 *tac* 启动子 (DeBoer 等人,1983, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 80:21-25)。在“Useful proteins from recombinant bacteria”, *Scientific American*, 1980, 242:74-94 及 Sambrook, Fritsch 和 Maniatus, 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2d edition, Cold Spring Harbor, New York 中描述了更多的启动子。

[0059] 所述的启动子还可以是“共有的”(consensus) 启动子,具有“-35”区的 TTGACA 序列和“-10”区的 TATAAT 序列。该共有的启动子可以得自任何能够在芽孢杆菌宿主细胞中起作用的启动子。“共有的”启动子的构建可以这样实现:通过定点诱变创造启动子,其更完美地符合枯草芽孢杆菌营养生长“ σ^A 型”启动子“-10”和“-35”区的已确立的共有序列 (Voskuil 等人,1995, *Molecular Microbiology* 17:271-279)。

[0060] 在一个优选的实施方式中,所述“共有的”启动子是从得自下列的启动子获得的:大肠杆菌 *lac* 操纵子、天蓝色链霉菌琼脂酶基因 (*dagA*)、迟缓芽孢杆菌或 *Bacillus clausii* 碱性蛋白酶基因 (*aprH*)、地衣芽孢杆菌碱性蛋白酶基因 (*Carlsberg* 枯草蛋白酶基因)、枯草芽孢杆菌果聚糖蔗糖酶基因 *sacB*)、枯草芽孢杆菌 α -淀粉酶基因 (*amyE*)、地衣芽孢杆菌 α -淀粉酶基因 (*amyL*)、嗜热脂肪芽孢杆菌生麦芽糖淀粉酶基因 (*amyM*)、解淀粉芽孢杆菌 α -淀粉酶基因 (*amyQ*)、地衣芽孢杆菌青霉素酶基因 (*penP*)、枯草芽孢杆菌 *xylA* 和 *xylB* 基因、苏云金芽孢杆菌粉虫 (*tenebrionis*) 亚种的 *CyrIII A* 基因 (*cryIII A*) 或其部分,和原核 β -内酰胺酶基因 *spol* 噬菌体启动子。在一个更优选的实施方式中,所述“共有的”启动子得自解淀粉芽孢杆菌 α -淀粉酶基因 (*amyQ*)。

[0061] Widner 等人, 美国专利 No. 6, 255, 076 和 5, 955, 310 描述了串联的启动子和用于在芽孢杆菌细胞中表达的构建体和方法, 包括短的共有 amyQ 启动子 (又称 scBAN)。上述文献中还描述了 cryIIIA 稳定子序列 (stabilizer sequence) 及使用该序列的构建体用于提高芽孢杆菌中的生产的应用。

[0062] 串联的启动子的每一启动子可以是任何在所选的芽孢杆菌细胞中显示转录活性的核酸序列, 包括突变的、截短的和杂合的启动子, 且可以得自编码与该芽孢杆菌细胞同源或异源的胞外或胞内多肽的基因。每一启动子对于编码所述多肽可以是天然的或外来的, 对于所述芽孢杆菌细胞也可以是天然的或外来的。这些启动子序列可以是相同的或不同的启动子序列。

[0063] 所述串联的启动子的两个或多个启动子序列可以同时启动所述核酸序列的转录。或者, 所述串联的启动子的一个或多个启动子序列可以在所述芽孢杆菌细胞生长的不同阶段启动所述核酸序列的转录。

[0064] 在一个优选的实施方式中, 所述串联的启动子至少含有解淀粉芽孢杆菌 α -淀粉酶基因的 amyQ 启动子。在另一个优选的实施方式中, 所述串联的启动子至少含有“-35”区的 TTGACA 序列和“-10”区的 TATAAT 序列。在另一个优选的实施方式中, 所述串联的启动子至少含有地衣芽孢杆菌 α -淀粉酶基因的 amyL 启动子。在另一个优选的实施方式中, 所述串联的启动子至少含有 cryIIIA 启动子或其部分 (Agaisse 和 Lereclus, 1994, Molecular Microbiology 13 :97-107)。

[0065] 在一个更优选的实施方式中, 所述串联的启动子至少含有所述 amyL 启动子和 cryIIIA 启动子。在另一个更优选的实施方式中, 所述串联的启动子至少含有所述 amyQ 启动子和 cryIIIA 启动子。在另一个更优选的实施方式中, 所述串联的启动子至少含有具有“-35”区的 TTGACA 序列和“-10”区的 TATAAT 序列的“共有的”启动子, 及所述 cryIIIA 启动子。在另一个更优选的实施方式中, 所述串联的启动子至少含有两个拷贝的所述 amyL 启动子。在另一个更优选的实施方式中, 所述串联的启动子至少含有两个拷贝的所述 amyQ 启动子。在另一个更优选的实施方式中, 所述串联的启动子至少含有两个拷贝的具有“-35”区的 TTGACA 序列和“-10”区的 TATAAT 序列的“共有的”启动子。在另一个更优选的实施方式中, 所述串联的启动子至少含有两个拷贝的所述 cryIIIA 启动子。

[0066] “mRNA 加工 / 稳定序列” (mRNA processing/stabilizing sequence) 在本 文中定义为位于一个或多个启动子序列的下游及编码序列的上游的序列, 其可操作地连接到所述一个或多个启动子序列中的每一序列, 使得由每一启动子序列合成的所有 mRNA 可以被加工生成 mRNA 转录本, 该转录本的 5' 末端具有稳定子序列。mRNA 转录本的 5' 末端稳定子序列的存在延长了它们的半衰期 (Agaisse 和 Lereclus, 1994, 同上, Hue 等人, 1995, Journal of Bacteriology 177 :3465-3471)。mRNA 加工 / 稳定序列与细菌 16S 核糖体 RNA 的 3' 末端互补。在一个优选的实施方式中, 所述 mRNA 加工 / 稳定序列产生基本上单一大小的 (single-size) 转录本, 该转录本的 5' 末端具有稳定子序列。所述 mRNA 加工 / 稳定序列优选地是与细菌 16S 核糖体 RNA 的 3' 末端互补的。参考美国专利 No. 6, 255, 076 和 5, 955, 310。

[0067] 在一个更优选的实施方式中, 所述 mRNA 加工 / 稳定序列是 WO 94/25612 和 Agaisse 和 Lereclus, 1994 (同上) 中所公开的苏云金芽孢杆菌 cryIIIA mRNA 加工 / 稳定序

列,或其保留 mRNA 加工 / 稳定功能的部分。在另一个更优选的实施方式中,所述 mRNA 加工 / 稳定序列是 Hue 等人,1995(同上)所公开的枯草芽孢杆菌 SP82mRNA 加工 / 稳定序列,或其保持 mRNA 加工 / 稳定功能的部分。

[0068] 当所述 cryIIIA 启动子和其 mRNA 加工 / 稳定序列被用于本发明的方法中时,可以使用含有 WO 94/25612 和 Agaisse 和 Lereclus,1994(同上)中所公开的序列,或其保留启动子和 mRNA 加工 / 稳定功能的片段的 DNA 片段。进一步地,可以使用本领域熟知的方法制备仅含有 cryIIIA 启动子或仅含有 cryIIIA mRNA 加工 / 稳定序列的 DNA 片段,以构建多种串联启动子与 mRNA 加工 / 稳定序列的组合。在这个实施方式中,所述 cryIIIA 启动子和其 mRNA 加工 / 稳定序列优选地被置于组成该串联启动子的另外的一个或多个启动子序列的下游,和目的基因的编码序列的上游。

[0069] 然后,可以对编码参与透明质酸生产的所希望的酶的分离的核酸序列进行进一步操作以提高该核酸序列的表达。表达应当理解为包括多肽生产中涉及的任何步骤,包括但不限于转录、转录后修饰、翻译、翻译后修饰,和分泌。利用克隆方法来修饰核酸序列的技术在本领域是公知的。

[0070] 包含编码酶的核酸序列的核酸构建体可以与一种或多种控制序列可操作地连接,所述控制序列可以指导编码序列在与该控制序列相容的条件下于芽孢杆菌细胞中表达。

[0071] 术语“控制序列”在本文中定义为包括所有对于核酸序列的编码序列的表达而言是必须或有利的组分。每一控制序列对于所述编码酶的核酸序列而言可以是天然的或外来的。除了上述的启动子序列以外,这样的控制序列还包括但不限于,前导序列、信号序列和转录终止子。至少,控制序列包含启动子和转录和翻译终止信号。控制序列可以具有接头,用于导入特定的帮助连接控制序列与所述编码酶的核酸序列的编码区的位点。

[0072] 控制序列也可以是适当的转录终止子序列,即由芽孢杆菌细胞识别来终止转录的序列。终止子序列可操作地连接于编码所述酶或操纵子的最后一个酶的核酸序列的 3' 末端。在所选择的芽孢杆菌细胞中起作用的任何终止子都可用于本发明。

[0073] 控制序列还可以是适当的前导序列,即对芽孢杆菌细胞翻译重要的 mRNA 非翻译区。前导序列可操作地连接于编码所述酶的核酸序列的 5' 末端。在所选择的芽孢杆菌细胞中起作用的任何前导序列都可用于本发明。

[0074] 控制序列还可以是信号肽编码区,它编码氨基酸序列,该氨基酸序列连接于多肽的氨基末端并指导表达的多肽进入细胞的分泌途径。信号肽编码区域可以是对该多肽而言天然的,也可以从外部来源获得。核酸序列的编码序列的 5' 末端可固有地包含信号肽编码区,它与编码分泌多肽的编码区片段天然地按翻译阅读框连接。或者,编码序列的 5' 末端可以包含对编码序列的编码分泌多肽的部分而言是外来的信号肽编码区。如果编码序列正常地不含有信号肽编码区,则可能需要外来的信号肽编码区。或者,外来的信号肽编码区可简单的替换天然信号肽编码区,以使多肽分泌相对于所述编码序列正常关联的天然信号肽编码区得到提高。该信号肽编码区可以从来自芽孢杆菌属菌种的淀粉酶或蛋白酶基因获得。但是然而任何能够指导表达的多肽进入所选择的芽孢杆菌细胞分泌途径的信号肽编码区均可用于本发明。

[0075] 用于芽孢杆菌细胞有效的信号肽编码区是从芽孢杆菌 NCIB 11837 的生麦芽糖淀粉酶基因、嗜热脂肪芽孢杆菌的 α -淀粉酶基因、地衣芽孢杆菌的枯草杆菌蛋白酶

基因、地衣芽孢杆菌的 β -内酰胺酶基因、嗜热脂肪芽孢杆菌的中性蛋白酶基因 (nprT、nprS、nprM) 和枯草芽孢杆菌的 prsA 基因获得的信号肽编码区。Simonen 和 Palva, 1993, Microbiological Reviews 57:109-137 中描述了更多的信号肽。

[0076] 调控序列还可以是前肽编码区,其编码位于多肽氨基末端的氨基酸序列。所得到的多肽称为酶原 (proenzyme) 或多肽原 (有时称作酶原 (zymogen))。多肽原通常是无活性的,并可以通过催化或自主催化将前肽从多肽原中切割除去,而被转化为成熟的活性多肽。前肽编码区可获自枯草芽孢杆菌碱性蛋白酶基因 (aprE) 和枯草芽孢杆菌中性蛋白酶基因 (nprT)。

[0077] 当信号肽和前肽区都存在于多肽的氨基末端时,前肽区位于靠近多肽氨基末端的位置,而信号肽区位于靠近前肽区的氨基末端位置。

[0078] 加上调节序列以使多肽的表达可以相对于宿主细胞的生长进行调节,也可能是理想的。调节系统的实例是能响应化学或物理刺激,包括调节化合物的存在,而引起基因表达的开启或关闭的那些系统。在原核系统中,调节系统包括 lac、tac、和 trp 操纵子系统。

[0079] 生产

[0080] 在本发明的方法中,利用本领域众所周知的方法在适于产生透明质酸的培养基中培养细胞。例如,所述细胞可以通过摇瓶培养、小规模或大规模发酵 (包括连续的、分批的、补料-分批、或固态发酵) 来培养,上述培养在实验室或工业发酵罐中,于适当的培养基中,并在使得透明质酸合成中涉及的酶可以被表达且透明质酸可以被分离的条件下进行。培养可使用本领域已知的程序,在含有碳和氮源以及无机盐的合适营养培养基中进行。适宜的培养基可从商业供应商获得,或者可根据已公布的配方来制备 (例如美国典型培养物保藏中心的目录中)。被分泌的透明质酸可以直接从培养基中回收。

[0081] 所得透明质酸可通过本领域已知的方法回收。例如,透明质酸可通过常规方法,包括但不限于:离心、过滤、萃取、喷射-干燥、蒸发或沉淀,从营养培养基中回收。分离的透明质酸可以通过本领域已知的多种方法进一步纯化,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 (例如制备性等电聚焦)、溶解度差异 (例如硫酸铵沉淀)、SDS-PAGE、或萃取 (例如参见 Protein Purification, J.-C. Janson 和 Lars Ryden 编, VCH Publishers, New York, 1989)。

[0082] 发明详述

[0083] 透明质酸

[0084] “透明质酸” (hyaluronic acid) 在本文中定义为非硫酸化的糖胺聚糖,其由重复的 N-乙酰葡萄糖胺 (GlcNAc) 和葡萄糖醛酸 (GlcUA) 二糖单位组成,这些二糖单位由交替的 β -1,4 和 β -1,3 糖苷键连接到一起。透明质酸又被称为 hyaluronan, hyaluronate, 或 HA。在本文中术语 hyaluronan 和 hyaluronic acid 可以互换使用。

[0085] 雄鸡鸡冠是透明质酸的重要商业来源。可供选择的来源有微生物。美国专利 No. 4,801,539 公开了一种制备透明质酸的发酵方法,其涉及兽瘟链球菌 (Streptococcus zooepidemicus) 菌株,报道的产率为大约 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,报道的产率为大约 3.5g 透明质酸每升。如 WO 03/054163 (Novozymes) 所公开的 (其以全文并入本文),透明质酸或其盐可以重组地生产,例如在革兰氏阳性的芽孢杆菌宿主中。

[0086] 已经描述了来自脊椎动物、细菌病原体和藻类病毒的透明质酸合成酶 (DeAngelis, P. L., 1999, Cell. Mol. Life Sci. 56 :670--682)。WO 99/23227 公开了来自似马链球菌的第 I 组透明质酸合成酶。WO 99/51265 和 W000/27437 描述了来自多杀巴斯德氏菌的第 II 组透明质酸合成酶。Ferretti 等人描述了化脓链球菌的透明质酸合成酶操纵子,其由分别编码透明质酸合成酶、UDP 葡萄糖脱氢酶和 UDP- 葡萄糖焦磷酸化酶的三个基因 hasA、hasB 和 hasC 组成 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98, 4658-4663, 2001)。WO 99/51265 描述了具有似马链球菌透明质酸合成酶的编码区的核酸片段。

[0087] 由于重组芽孢杆菌细胞的透明质酸被直接表达达到培养基中,可以利用简单的方法来从培养基分离该透明质酸。首先,将芽孢杆菌细胞和细胞碎片从培养基中物理地去除。如果需要,该培养基可以先稀释以降低其粘度。本领域的技术人员知道很多从培养基中去除细胞的方法,例如离心或微过滤。然后如果需要,可以过滤剩下的上清,例如通过超滤,以浓缩并将小分子的污染物从透明质酸中去除。去除细胞和细胞碎片后,利用已知的机制将透明质酸从培养基中简单地沉淀下来。盐、醇或盐和醇的组合可以用来从滤液中沉淀透明质酸。一旦变为沉淀,透明质酸就可以通过物理手段容易地从溶液中分离出来。透明质酸可以通过本领域已知的蒸发技术,例如喷雾干燥 (spray drying),从滤液中干燥或浓缩。

[0088] 本发明的第一个方面涉及包含透明质酸或其盐的产品,该产物是如本文所定义的那样干燥和团聚的。

[0089] 宿主细胞

[0090] 一个优选的实施方式涉及所述第一个方面的产品,其中所述透明质酸或其盐是重组地生产的,优选地通过革兰氏阳性细菌或宿主细胞,更优选地通过芽孢杆菌属的细菌。

[0091] 所述宿主细胞可以是任何适于透明质酸的重组生产的芽孢杆菌细胞。该芽孢杆菌细胞可以是野生型的芽孢杆菌细胞或其突变体。在本发明的实施中有用的芽孢杆菌细胞包括但不限于, *Bacillus agaradherens*、嗜碱芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、短芽孢杆菌、环状芽孢杆菌、*Bacillus clausii*、凝结芽孢杆菌、坚强芽孢杆菌、灿烂芽孢杆菌、迟缓芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、短小芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌和苏云金芽孢杆菌细胞。WO 98/22598 描述了被特别改造以适于重组生产的突变枯草芽孢杆菌细胞。不产荚膜的 (non-encapsulating) 芽孢杆菌细胞在本发明中特别有用。

[0092] 在一个优选的实施方式中,所述芽孢杆菌宿主细胞是解淀粉芽孢杆菌、*Bacillus clausii*、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。在一个更优选的实施方式中,所述芽孢杆菌细胞是解淀粉芽孢杆菌细胞。在另一个更优选的实施方式中,所述芽孢杆菌细胞是 *Bacillus clausii* 细胞。在另一个更优选的实施方式中,所述芽孢杆菌细胞是迟缓芽孢杆菌细胞。在另一个更优选的实施方式中,所述芽孢杆菌细胞是地衣芽孢杆菌细胞。在另一个更优选的实施方式中,所述芽孢杆菌细胞是枯草芽孢杆菌细胞。在最优选的实施方式中,所述芽孢杆菌细胞是枯草芽孢杆菌 A164 Δ 5 (参见美国专利 No. 5, 891, 701) 或枯草芽孢杆菌 168 Δ 4。

[0093] 用本发明的核酸构建体转化芽孢杆菌宿主细胞可以通过,例如,原生质体转化 (参见,例如, Chang 和 Cohen, 1979, Molecular General Genetics 168 :111-115), 使用感受态细胞 (参见例如 Young 和 Spizizin, 1961, Journal of Bacteriology 81 :823-829, 或 Dubnar 和 Davidoff-Abelson, 1971, Journal of Molecular Biology 56 :209-221)、电穿孔

(参见如 Shigekawa 和 Dower, 1988, *Biotechniques* 6:742-751)、或接合(参见如 Koehler 和 Thorne, 1987, *Journal of Bacteriology* 169:5771-5278)来实现。

[0094] 分子量

[0095] 透明质酸的水平可以根据修改的咔唑法(carbazole)(Bitter 和 Muir, 1962, *Anal Biochem.* 4:330-334)来确定。另外,透明质酸的平均分子量可以使用本领域的标准方法来确定,例如 Ueno 等人, 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”和“DAWN EOSManual”Wyatt Technology Corporation, Santa Barbara, California 所描述的那些方法。

[0096] 在一个优选的实施方式中,通过本发明的方法获得的透明质酸具有大约 10,000 到大约 10,000,000Da 的分子量。在一个更优选的实施方式中,通过本发明的方法获得的透明质酸具有大约 25,000 到大约 5,000,000Da 的分子量。在最优选的实施方式中,通过本发明的方法获得的透明质酸具有大约 50,000 到大约 3,000,000Da 的分子量。

[0097] 一个优选的实施方式涉及所述第一个方面的产品,其中所述透明质酸或其盐具有 300,000-3,000,000, 优选 400,000-2,500,000, 更优选 500,000-2,000,000, 最优选 600,000-1,800,000Da 的分子量。

[0098] 当重组生产的透明质酸或其盐被用于本发明的方法中以生产本发明的产品或组合物时,在某些应用中,首先降低透明质酸或其盐的平均分子量可能是有利的。例如,某些所谓透明质酸低分子量级分的生产商生成其可以透过皮肤屏障以恢复皮肤内的天然透明质酸含量,因而这样的级分特别适合用于作为抗皮肤衰老剂和抗皱纹剂出售的化妆品组合物。关于食品上的应用,低分子量的透明质酸已经被证明能透过胃肠屏障(gastrointestinal barrier),从而增加其生物利用度。最后,低分子量透明质酸显示抗炎作用,其在炎症疾病的治疗中有潜在的应用。降低透明质酸或其盐的平均分子量可以通过本领域的标准技术来实现,例如简单热处理,酶降解,超声处理或酸水解。参见例如美国专利 6,020,484,其描述了一种透明质酸的超声处理技术,包括使用 NaOCl 作为添加剂;和 T. Miyazaki 等人, (2001) *Polymer Degradation and Stability*, 74:77-85。

[0099] 因此,一个优选的实施方式涉及所述第一个方面的产品,其中所述透明质酸或其盐具有 10,000-800,000Da, 优选 20,000-600,000Da, 更优选 30,000-500,000Da, 更优选 40,000-400,000Da, 最优选 50,000-300,000Da 的低平均分子量。

[0100] 盐和交联的 HA

[0101] 一个优选的实施方式涉及所述第一个方面的产品,其包含透明质酸的无机盐,优选透明质酸钠,透明质酸钾,透明质酸铵,透明质酸钙,透明质酸镁,透明质酸锌,或透明质酸钴。

[0102] EP0 161 887 B1 公开了交联的 HA 或其盐的制备,其是通过将 HA 与多官能环氧化合物交联而制备的。US 4,957,744 公开了 HA 与脂肪醇的交联全酯或偏酯(total or partial crosslinked esters),以及这样的偏酯(partial esters)与无机或有机碱成的盐。其他交联 HA 的方法在美国专利 No. 5,616,568, 5,652,347 和 5,874,417 中有记载。交联的 HA 也可以通过用硼酸处理透明质酸来制备,如下所述:

[0103] 将通过枯草芽孢杆菌发酵(WO 03/054163; Novozymes)重组生产的干燥的透明质

酸钠 (Na-HA, 203mg) 溶于 0.2M NaOH, 得到 4% 的溶液。加入硼酸 (35mg (大约 1 个当量的 HA 二糖)), 并将样品在室温下搅拌 1.5h, 然后在 5℃ 下保存约 2.5 天。完全依上述平行地制备一对样品, 但不加硼酸。

[0104] 用 Carrimed CSL 控制应力流变仪 (圆锥几何形状: 6cm, 2°) 在 25℃ 下测量所得的 HA- 硼酸水凝胶的粘度。粘度依赖于剪切速率, 其与对照样品相比, 透明质酸- 硼酸水凝胶中的粘度增加到至少 4 倍 (4.2 到 8.4 倍), 这显示交联网的形成。

[0105] 与标准的 Na-HA 光谱相比, 在 HA- 硼酸水凝胶的 FT-IR 光谱上的 1200 及 945cm⁻¹ 处观察到了新的峰, 与交联的 HA- 硼酸水凝胶中新形成的硼酸酯的存在相对应。

[0106] 由此, 一个优选的实施方式涉及所述第一个方面的产品, 其包含交联的透明质酸或其盐, 优选地, 该透明质酸与硼酸交联, 更优选地, 交联的透明质酸包含硼酸酯。

[0107] 水分测定

[0108] 根据本发明的干燥的产品粉末的水分含量是指在 102℃ ± 2℃ 下将该产品干燥至恒重后损失的重量, 以百分率表示。将具有底盖 (ground lid) 的空玻璃称量皿在烘箱中干燥, 然后冷却, 并在灵敏度至少 0.1mg 的分析天平上称量。将大约 3g 的干燥的产品粉末置于称量皿上称量。将带有该粉末的玻璃皿不带盖地放入烘箱并在 102℃ ± 2℃ 的温度下干燥 2 小时, 然后置于干燥器中冷却至室温, 然后再次称量。将带有粉末的玻璃皿不加盖地放入烘箱再干燥 1 小时 (1 more), 然后如前述冷却并称量; 重复上述过程直到重量保持恒定, 即, 直到两次相继的称量结果相差不超过 0.5mg。

[0109] 然后按 $(W2-W3)/(W2-W1) \times 100$ 计算水分百分率, 其中 W1 是空皿的重量, W2 是带有粉末的皿的重量。结果计算到小数点后两位 (2 decimal places), 该方法的重现性大约为 ±0.1%。

[0110] 优选地, 所述的第一个方面的干燥和团聚的产品, 如本文的测定, 包含少于 5% 的水分, 优选少于 2%, 最优选少于 1% 的水分。

[0111] 粒度 (particle size)

[0112] 优选的所述第一个方面的产品具有这样的颗粒大小, 该粒径的 50 百分位数 (percentile), D₅₀, 为 10-1,000 μm, 优选 100-1,000 μm, 更优选 150-900 μm, 更优选 200-800 μm, 其是如下面的实施例所示, 对悬浮于异丙醇中的颗粒进行激光衍射测量而测定的。

[0113] 在一个优选的实施方式中, 以 SPAN 值衡量所述第一个方面的产品的多分散性, SPAN 值根据下式计算: $SPAN = (D_{90} - D_{10}) / D_{50}$, 且 SPAN 值为 1.0-2.5, 优选 SPAN 值为 1.2-2.2, 更优选 SPAN 值为 1.5-1.9, 最优选 SPAN 值为 1.6-1.8。

[0114] 可分散性 (dispersibility)

[0115] 本发明的产品的可分散性如下测定: 将 0.1g 的干燥、团聚的产品加入 100ml 玻璃瓶中。加入 50ml 的 0.9% (v/v) 氯化钠溶液, 将瓶密封, 手工重复翻转 180 度, 直到加入的所有颗粒都分散为单颗粒, 即, 肉眼检查没有团块 (lump) 残余, 并在数据表上记录下翻转进行的时间。这样记录的时间就是该产品的可分散性。

[0116] 按照本文的测定, 优选的所述第一个方面的产品在水性溶剂中, 优选水中, 具有少于 30 分钟, 优选少于 20 分钟, 更优选少于 15 分钟, 更优选少于 10 分钟, 更优选少于 5 分钟, 更优选少于 3 分钟, 更优选少于 2 分钟, 最优选少于 1 分钟的可分散性。

[0117] 溶解性 (solubility)

[0118] 根据本发明的包含透明质酸的干燥的或干燥和团聚的产品或组合物在多种溶剂中的溶解性可以如下测定：

[0119] 将 0.1g 的待测透明质酸粉末加入 100ml 的可密封玻璃烧瓶中。向含有待测透明质酸样品的烧瓶中加入 50ml 的 0.9% (w/v) 氯化钠, 注射级水, 无水乙醇, 丙酮或醚。密封该烧瓶并用手进行 180 度翻转, 直到肉眼检查到透明质酸进入溶液, 并将翻转所用的时间记录在数据表上。所记录下的时间就是样品的溶解性。

[0120] 如本文所测定的, 优选的根据所述第一个方面的产品在水性溶剂中具有少于 60 分钟, 优选少于 45 分钟, 更优选少于 40 分钟, 更优选少于 35 分钟, 30 分钟, 25 分钟, 20 分钟, 15 分钟, 10 分钟, 及最选少于 5 分钟的溶解性。

[0121] 其他成分

[0122] 在一个优选的实施方式中, 本发明的干燥和团聚的产品还可以包含其他成分, 优选一种或多种活性成分, 优选一种或多种药学活性物质, 还优选地包含水溶性赋形剂, 例如乳糖。

[0123] 可用于本发明的活性成分或药学活性物质的非限制性例子包括蛋白质和 / 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, 红细胞生成素, 成骨蛋白, 干扰素或其衍生物, 胰岛素或其衍生物, 心房肽 (atriopeptin) III, 单克隆抗体, 肿瘤坏死因子, 巨噬细胞活化因子, 白介素, 肿瘤变性因子, 胰岛素样生长因子, 表皮生长因子, 组织纤维蛋白溶酶原激活剂, 因子 IIV, 因子 IIIIV, 和尿激酶。

[0124] 可以包含水溶性的赋形剂用来稳定所述活性成分, 这样的赋形剂可以包含蛋白质, 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、赖氨酸和其盐; 糖类例如葡萄糖、乳糖、木糖、半乳糖、果糖、麦芽糖、蔗糖、葡聚糖、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, 和其混合物。所述赋形剂或稳定剂可以以所述产品重量的 0.001-99% 的量使用。

[0125] 本发明的一些方面涉及多种组合物和药物, 其除了其他组分以外包含: 有效量的所述第一个方面的产品, 和活性成分, 优选该活性成分是药学活性剂; 药学上可接受的载体, 赋形剂或稀释剂, 优选为水溶性的赋形剂, 最优选为乳糖。

[0126] 本发明的一个优选的实施方式涉及本发明的产品或组合物, 其包含在泡腾片剂中, 该泡腾片剂可以另外地用本领域已知的方式配制。例如, 泡腾片剂可包含柠檬酸、碳酸氢钠和寡糖或其他糖类。泡腾片剂易于保存, 而且由于含有本发明的速溶产品, 它们能迅速溶解, 因此提供了一种理想的口服手段。

[0127] 另外, 本发明的一些方面涉及包含如所述第一个方面定义的产品或如上述方面和实施方式所定义的组合物的物品, 例如化妆品、卫生用品、内科或外科用品。本发明的最后一个方面涉及包含如所述第一个方面所定义的产品或如本发明其他方面和实施方式所定义的组合物的药物胶囊或微胶囊。

[0128] 生产方法

[0129] 本发明在另一个方面中提供了生产如上述本发明的第一个方面和 / 或其优选实施方式所定义的产品的方法, 该方法包括下列步骤:

[0130] a) 干燥包含透明质酸或其盐的产品 ;和

[0131] b) 团聚该干燥的产品。

[0132] 喷雾干燥和团聚

[0133] 在本发明的一个优选的实施方式中,所述干燥步骤是通过喷雾干燥器(spray-dryer),优选为双流体喷嘴(Two-Fluid-Nozzle(TFN))或旋转雾化器(rotary atomizer),且优选地,喷雾干燥使用TFN和下面的条件范围来进行:

[0134] 入口温度 100-200℃

[0135] 出口温度 40-90℃

[0136] 喷嘴喷雾压力 (nozzle atomization pressure) 2-10bar

[0137] 喷嘴空气温度 40-100℃

[0138] 进料温度 40-100℃

[0139] 另一个优选的实施方式涉及上述的方法,其中使用流化床(fluidised bed)来完成所述团聚步骤;优选其中所述流化床入口温度为30-80℃,且其中所述粉末的水溶液以相应于出口温度25-50℃的速率被喷射到干燥的粉末上。

[0140] 另一个优选的实施方式涉及上述的方法,其中所述团聚步骤是使用水-溶剂混合物完成的,该混合物优选地具有0:100-50:50的水-溶剂比,更优选具有0:100-20:80的水-溶剂比;优选地,该溶剂为醇;更优选地,该溶剂为异丙醇。

[0141] 所述干燥和团聚优选在一个步骤中完成,优选地使用流化喷雾干燥器(fluidised spray-dryer)。

[0142] 使用产品或组合物的方法

[0143] 本发明的多个方面涉及使用所述第一个方面的产品或使用本发明的组合物在例如医疗领域中执行治疗程序的方法。

[0144] 一个方面涉及执行眼科中的步骤的方法,其包括使用如所述第一个方面所定义的产品或本发明的组合物。

[0145] 另一个方面涉及执行骨关节炎的治疗中的步骤的方法,其包括使用如所述第一个方面所定义的产品或本发明的组合物。

[0146] 另一个方面涉及执行癌症治疗中的步骤的方法,其包括使用如所述第一个方面所定义的产品或本发明的组合物。

[0147] 另一个方面涉及执行脱发或秃顶的治疗中的步骤的方法,其包括使用如所述第一个方面所定义的产品或本发明的组合物。

[0148] 另一个方面涉及透皮(transdermal)或皮肤施用药学活性剂的方法,其包含使用如所述第一个方面所定义的产品或本发明的组合物。

[0149] 另一个方面涉及皮肤施用化妆品的方法,其包含使用如所述第一个方面所定义的产品或本发明的组合物。

[0150] 另一个方面涉及使用如所述第一个方面所定义的产品或本发明的组合物的眼科方法。

[0151] 另一个方面涉及治疗骨关节炎(osteoarthritis)的方法,包括对哺乳动物施用有效量的如所述第一个方面所定义的产品或本发明的组合物,优选通过皮肤、透皮、口服或注射施用。

[0152] 一个方面涉及治疗伤口的方法,包括对哺乳动物施用有效量的如所述第一个方面所定义的产品或本发明的组合物。

[0153] 另一个方面涉及治疗脱发或秃顶的方法,包括对哺乳动物施用有效量的如所述第一个方面所定义的产品或本发明的组合物,优选通过皮肤、透皮、口服或注射施用。

[0154] 其他方面涉及如所述第一个方面所定义的产品或本发明的组合物在制造治疗骨关节炎用的药物、眼科治疗用的药物、治疗癌症用的药物、治疗伤口用的药物、治疗血管发生用的药物、或治疗脱发或秃顶用的药物中的用途。

[0155] 最后一个方面涉及如所述第一个方面所定义的产品或本发明的组合物用于制造保湿剂的用途。

[0156] 实施例

[0157] 实施例 1

[0158] 由含有大约 8g/ 升的透明质酸钠溶液组成的液体进料用两种雾化技术进行喷雾干燥:1) 双流体喷嘴 (TFN) 和 B) 旋转雾化器。同时预想商业上可获得的各种喷雾干燥技术和设备也适用于本发明 (参见例如 NiroAtomizers Inc)。

[0159] 所得的干燥粉末显著不同。通过 TFN 生成的粉末具有显著较低的堆密度。通过下面进一步的分析揭示了这种不同的原因。

[0160]

雾化器 (批号)	颗粒密度 (g/ml)	溶解性 时间 (min)	粒度 (D_{50})
A) TFN (04PBAC0016)	0.210	15	95
B) 旋转雾化器 (MAG30012)	0.430	31	45

[0161] 发现使用 TFN 喷雾原理时,与旋转雾化器相比,溶解性时间显著降低。尽管粒度也更大,这通常会导致溶解性时间增加。溶解性时间的减少被发现是 TFN 喷雾干燥颗粒中包入的空气所导致的。这一点可以从 TFN 产品的颗粒密度看出,其不到用旋转雾化器产生的干燥产品的密度的一半。

[0162] 实施例 2

[0163] 由 75,000g 的透明质酸钠溶液组成的液体进料,其中有大约 8g/ 升的透明质酸钠和 2400g 的氯化钠,以恒定速率加入喷雾干燥器。所述透明质酸具有大约 690,000 (690,000) Da 的分子量。该喷雾干燥器具有大约 1.8m 的直径和大约 5m 的高度。选择双流体喷嘴 (TFN) 来讲进料雾化。调整干燥条件从而得到一个具有希望的粒度的干燥粉末批次 (批号 03PBAC0035-1) :

[0164] 入口温度 160℃

[0165] 出口温度 75℃

[0166] 喷嘴喷雾压力 4bar

[0167] 喷嘴空气温度 70℃

[0168] 进料温度 60℃

[0169] 利用该粉末在异戊醇中的悬液的激光衍射来测定所得的粒度分布 :

[0170] D10 :12 微米

[0171] D50 :39 微米

[0172] D90 :84 微米

[0173] 分子量 :631.000Da (631,000Da)

[0174] SPAN :1.77

[0175] 多分散性的量度是“SPAN”值, SPAN 值可根据下式计算:

[0176] $SPAN = (D_{90} - D_{10}) / D_{50}$

[0177] 在干燥操作中分子量几乎不变,因而显示虽然喷雾干燥过程使用高温,但其是非常温和的。

[0178] 实施例 3

[0179] 通过将 5g 实施例 2 中所制备的喷雾干燥粉末样品分别在 20ml 的每种下列溶剂-水混合物中悬浮来将该粉末样品团聚:

[0180] 100% 异丙醇 (IPA)

[0181] 90% 异丙醇

[0182] 87% 异丙醇

[0183] 然后将悬液过滤并真空干燥。干燥的滤饼被破碎并过筛以去除所有小于 150 微米和大于 600 微米的颗粒。

[0184] 令人惊奇地发现,这样制备的团聚颗粒在盐水中非常快速地分散和溶解。为了考察这种现象,使用该产品在纯 IPA 中的悬液的激光衍射来对粒度作更精确的测量。这样测得的粒度(第 10, 50 和 90 百分位数)如下表 1 所示。当所述溶剂-水混合物中的水含量从 0 增加到 13% 时,观察到了平均团聚粒度的显著增加。

[0185] 表 1

[0186]

粒度	D(v, 0.1) 微米	D(v, 0.5) 微米	D(v, 0.9) 微米
100% IPA	14	60	242
90% IPA	20	71	505
87% IPA	21	179	538

[0187] 为了实现足够快的分散,发现粒度应该高于大约 180 微米。因此,制备了用 87% IPA 团聚的批次中约 180-355 微米的筛分粒级。然后将该筛分粒级与除了未团聚之外其他相同的实施例 2 的产品比较。结果显示于下表 2。明显地,通过团聚过程,溶解性时间显著改善。

[0188] 表 2

[0189]

批次 (处理)	分散时间 秒	溶解性时间 分
03PBAC0035 (未团聚)	> 1 分	14.0
03PBAC0035 (团聚, 87% IPA)	< 1 秒	2.5

[0190] 实施例 4

[0191] 用如实施例 3 所述的方法来处理两个如实施例 1 所述的批次,来看是否可能改变纯的透明质酸产品的溶解性时间。在下表 3 中显示了团聚产品的 250-500 微米的筛分粒级的结果。显然,通过结合实施例 1 和 3 可以显著地减少溶解性时间。

[0192] 表 3

[0193]

雾化器 (批号)	溶解性时间 非团聚 (min)	溶解性时间 团聚 (min)
A) TFN (04PBAC0016)	15	9
B) 旋转雾化器 (MAG30012)	31	17

[0194] 实施例 5

[0195] 按下述处理实施例 1 中制备的粉末：将大约 100g 的干燥粉末加入 Strea 实验室流化床。入口温度为 55℃。然后将实施例 1 中制备的粉末的 1% 水溶液以相应于出口温度 35℃ 的速率喷到该干燥粉末上。检测所得的成形的团聚物的溶解性，它们与未处理的粉末相比显示了明显改善的溶解性。

[0196] 实施例 6

[0197] 由 75,000g 透明质酸钠溶液和 2,400 氯化钠组成的液体进料以恒定速率被加入流化喷雾干燥器 (FSD)。所述 FSD 喷雾干燥器在喷雾干燥塔下置有整合的流化床。干燥空气和被其带走的微粒从喷雾干燥器顶部被排出，然后经过旋风收尘器 (cyclone)，颗粒被旋风收尘器去除，并由空气被送回喷雾干燥器，在这里它们被射入喷嘴气雾 (nozzle cloud) 中。

[0198] 该透明质酸的分子量为 800kDa，浓度为大约 8g/升。该喷雾干燥器的直径为大约 1.8m，高度为大约 5m。调整干燥条件从而得到一个具有希望的粒度的干燥粉末批次（批号 04PBAC0014）：

[0199] 入口温度 160℃

[0200] 出口温度 68℃

[0201] 喷嘴喷雾压力 2.5bar

[0202] 喷嘴空气温度 50℃

[0203] 进料温度 60℃

[0204] 然后，利用该粉末在异戊醇中的悬液的激光衍射来测定所得的粒度分布：

[0205] D_{10} : 89 微米

[0206] D_{50} : 220 微米

[0207] D_{90} : 466 微米

[0208] 分子量 : 796kDa

[0209] 透明质酸浓度 : 493mg/g

[0210] 发现在干燥操作中分子量几乎不变，因而显示虽然喷雾干燥过程使用高温，但其是非常温和的。

[0211] 检测产品的 250–500 微米的级分的分散性 / 溶解性，如表 4 所示，发现其经过大约 2 分钟后分散和溶解，这比对于非团聚的喷雾干燥产品观察到的 15 分钟要快得多。还测量了所得溶液在 600nm 的吸收值，以确认溶液中没有残余微小颗粒（表 4）。

[0212] 表 4

[0213]

雾化器 (批号)	溶解性时间 (min)	吸收值 A_{600nm}
TFN (04PBAC0014)	2	0.005

[0214] 实施例 7 分子量和皮肤渗透

[0215] 考察了放射性标记的透明质酸的四种不同平均分子量级分的皮肤渗透，使用直径 2cm 的并排的 (side by side) 扩散池 (cell) (有效的皮肤面积 $3.14cm^2$)。接受相的体积为 8–8.5ml，供给室的体积为 1–1.5ml。

[0216] 从猪耳上用取皮机取得的皮肤 (750 毫米) 融化后置于扩散池的一面上。小心地用剪刀剪去任何可见的毛发。用硅盘将扩散池的另一面封闭。用 pH7.4 的磷酸盐缓冲盐水

(PBS) 充满接受相。并导入一磁力搅拌子。

[0217] 从供给相（其冷 / 热比为 5.64mg/ml 冷对 22.56 μ g/ml 热）中取 3 个 10 微升的样品来测定比活性。然后用提供的溶液充满供给相。对 5ml（接受到的体积），只能建立 3 到 4 个扩散池。

[0218] 将扩散池放在搅拌台上，在室温下进行实验。5 小时后，将所有的接受相抽出，并通过液体闪烁计数测量其中的放射性。然后再用 PBS 充满接受室并扩散过夜。

[0219] 22 小时后（即 5 小时 +17 小时），再次抽出接受溶液并分析其放射性。将扩散池拆开，将皮肤与 5 ml SOLUENE[®] (PerkinElmer) 保温 48 小时，或直到完全溶解，然后加入闪烁液计数测量放射性。四个不同分子量的透明质酸级分的实验结果总结在表 5 中。

[0220] 表 5. 考察放射性标记的 HA 在体外对切离的猪耳皮肤的渗透 5 小时 (5h) 和 22 小时 (22h) 之后的实验结果的总结。

[0221]		HA 1500 KDa	HA 800 KDa	HA 300 KDa	HA 50 KDa
[0222]		(ng/cm ²)	(ng/cm ²)	(ng/cm ²)	(ng/cm ²)
[0223]	R1. 5h	14.1	38.7	168.7	524.2
[0224]	R2. 5h	10.4	20.8	62.9	171.1
[0225]	R3. 5h	18.8	50.3	101.0	
[0226]	R4. 5h			63.4	
[0227]	平均值	14.4	36.6	99.0	347.6
[0228]	偏差	4.2	14.9	49.8	249.7
[0229]	平均通量	2.9	7.3	19.8	69.5
[0230]	以 ng/cm ² /h 计	0.8	3.0	10.0	49.9
[0231]	R1. 22h	77.4	233.2	733.3	2669.4
[0232]	R2. 22h	50.9	95.6	368.1	1007.8
[0233]	R3. 22h	93.4	273.6	544.1	
[0234]	R4. 22h			360.4	
[0235]	平均值	73.9	200.81	501.5	1838.6
[0236]	偏差	21.5	93.3	176.3	1174.9
[0237]	平均通量	3.4	9.1	22.8	83.6
[0238]	以 ng/cm ² /h 计	1.0	4.2	8.0	53.4
[0239]	皮肤 1	14307.3		3806.2	1212.2
[0240]	皮肤 2	14744.5		3337.5	1062.9
[0241]	皮肤 3	18049.1		5780.4	1840.9
[0242]	皮肤 4			4055.4	
[0243]	平均值	15700.3		4244.89	1372.0
[0244]	偏差	2045.8		1066.07	412.9

[0245] 通常得到 3 到 4 个重复（表 5 :R1,R2,R3）。但是有些时候实验中出现明显的问题（例如明显的皮肤穿孔，或从扩散池泄漏），此时只有两个重复是可能的。

[0246] 放射性的总回收率（“质量平衡”）为少于 100%，主要是因为供给相的粘性使其不能彻底地从扩散池小室中去除。当增加 HA 的分子量时这个问题也变大。

[0247] 结果如图 1 所示,这些结果显示,经皮转运明显依赖于 HA 分子量。分子量较低的种类明显渗透较好。对于任何透明质酸的粒度级分,在 5 小时和 22 小时测得的表现通量没有显著的差别。

[0248] 因此,总的来说,透明质酸的渗透依赖于 HA 的分子量。分子量越低皮肤渗透越好。

[0249] 但是,渗透皮肤的量相应于所施加的放射性的一小部分。

[0250] 实施例 8 不同分子量的 HA 级分的局部分布

[0251] 使用激光扫描共聚焦显微术考察了荧光标记的透明质酸的两种不同平均分子量的级分的皮肤摄取和分布,该 HA 级分的平均分子量为 300,000 和 50,000Da。

[0252] 所述荧光 HA 样品是浓度为 1mg/mL 的水溶液;该荧光 HA 溶液在施加前,先用溶于蒸馏水的相同分子量的非标记 HA 稀释 10 倍。

[0253] 用于 HA 施加的皮肤来自猪耳。每种透明质酸级分在至少 3 个不同的来自不同的动物的皮肤样品上进行施加和测试。皮肤样品是新鲜取得的,在使用前冷冻保存不长于 2 周。

[0254] 实验前,将融化的皮肤样品(大约 0.8cm^2)加在简单的玻璃扩散池的供给和接受相之间并保持在 32°C 。供给相为 0.1ml 的标记的 HA 溶液,接受相为 pH 7.4 的缓冲液。

[0255] 荧光 HA 溶液与皮肤样品保持接触 3 小时,然后除去过量的供给溶液,用 pH7.4 的缓冲液将皮肤洗涤 3 次,再用吸水纸轻柔地吸干。

[0256] 立即将皮肤加到载玻片上,角质层面朝上,不做进一步处理,用 LSM 410 倒置激光扫描显微镜(Carl Zeiss,德国)进行显微观察。该系统装备有氩-氦激光器,其具有 568nm 和 488nm 的激发波长,两个波长单独使用来分别观察皮肤和标记的 HA。

[0257] 用 Plan-neofluar 10x/0.3 和 40x/0.6 物镜成像,然后进行数字色彩标记,使得来自皮肤的荧光为红色,来自标记的 HA 的荧光为绿色。图像用 ZeissLSM 共聚焦软件进行色彩标记并重叠(或叠加)。

[0258] 在另外的实验中,在没有荧光探针存在下观察皮肤样品。来自猪皮肤的自身荧光使结构特征的鉴定成为可能。为了使荧光 HA 的分布可见,得到了 xy 平面内(即与皮肤表面平行)的共聚焦图像。皮肤表面($z = 0\mu\text{m}$)定义为具有最亮的荧光和角质层特征性表面形态的成像平面。对每次处理使用至少 3 个不同的皮肤块获取重复的图像。

[0259] 50,000Da(F-HA 0.05)的荧光标记 HA 仅在角质层的表面上肤浅、零星地可见,但该 HA 级分在毛囊周围和/或毛囊中清晰可见。图 2,画面 A 显示了皮肤表面(角质层),毛囊和毛干;画面 B 清晰地显示来自 HA 的绿色荧光主要可见于毛囊周围和/或毛囊中。

[0260] 在另一个皮肤样品中确证了角质层表面的零星荧光,该皮肤样品中不存在毛囊。图 3,画面 A 显示了皮肤表面;画面 B 显示只有有限的来自标记的 HA 的荧光可见于该表面上。

[0261] 对 300,000Da(F-HA 0.30)的荧光标记 HA 进行了类似的观察,其也清晰地可见于毛囊周围。图 4,画面 A 显示皮肤表面(角质层),毛囊和毛干;画面 B 显示来自毛囊周围标记的 HA 的绿色荧光。

[0262] 然而,虽然该 300,000Da 的标记的 HA 级分也仅是肤浅、零星地可见于皮肤表面上,但其明显地显示在皮肤表面的角质形成细胞之间有优先积累。图 5 画面 A 显示皮肤表面;画面 B 显示当有限的来自标记的 HA 的荧光可见于该表面时,其积累于角质形成细胞之间。

[0263] 结论是,低分子量的 HA 在皮肤中的毛囊结构上、内和周围显示一定的优先积累。这对于本发明的组合物的低分子量 HA 产品可能是一条可能的渗透途径,对于脱发或秃顶的治疗可能是特别令人感兴趣的。

[0264] 没有证据显示 0.05Mda 的低分子量 HA 被转运穿过完整的角质层,因为 HA 被除去后,只在表面层发现有很少的(few)荧光类物质肤浅地、零星地存在于表面层上。最后,0.30Mda 的 HA 显示在皮肤表面上的角质形成细胞中有优先的积累。这可能有助于皮肤水化(skin hydration)的改善,因为该 HA 屏障可以限制水分被动地穿过表皮而从皮肤损失。

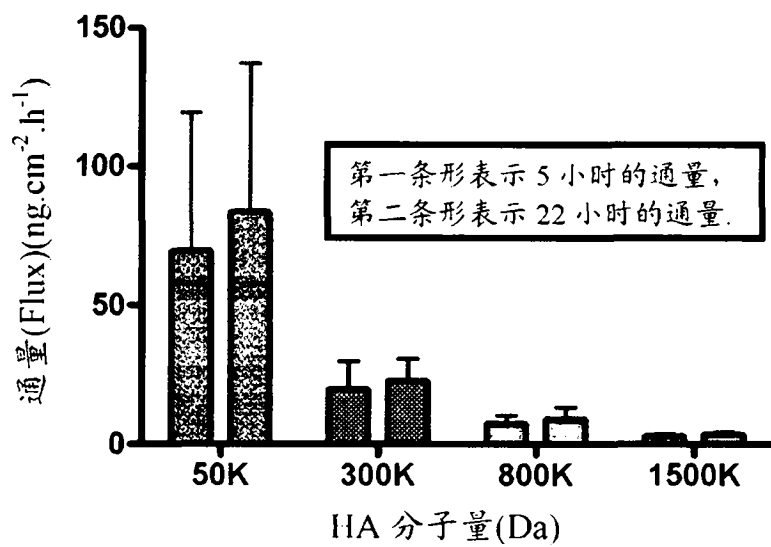


图 1

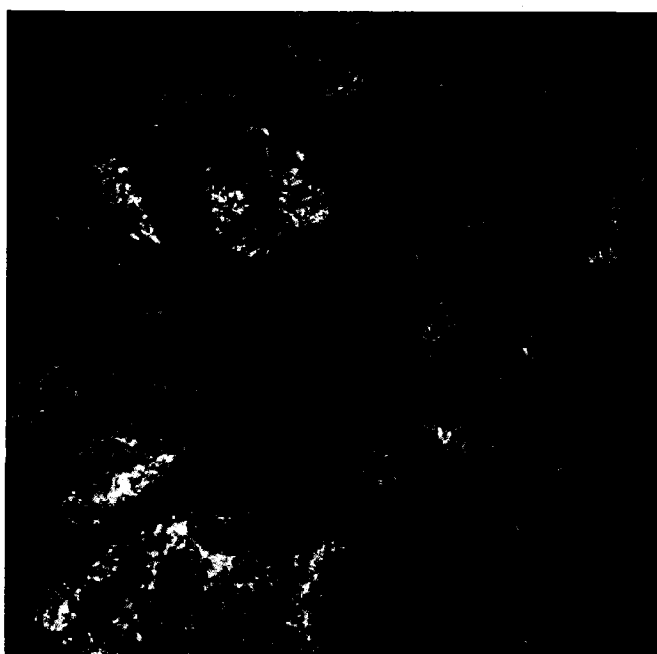


图 2- 画面 A



图 2- 画面 B

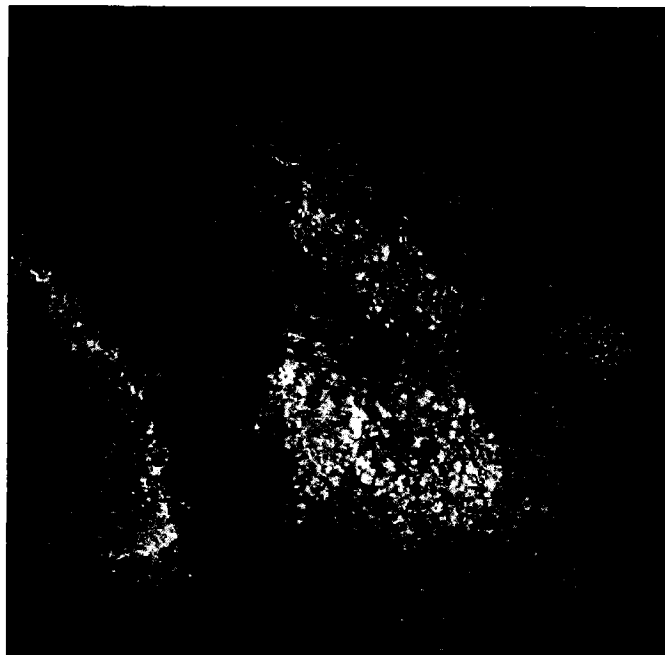


图 3- 画面 A

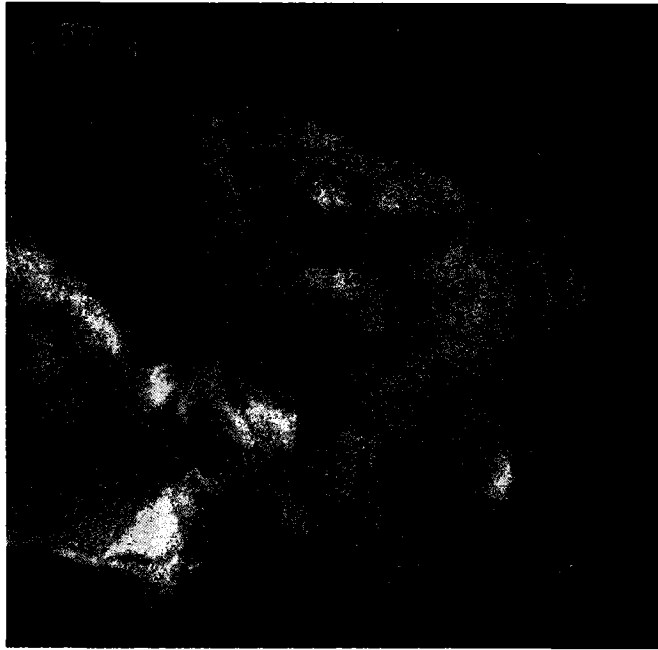


图 3- 画面 B

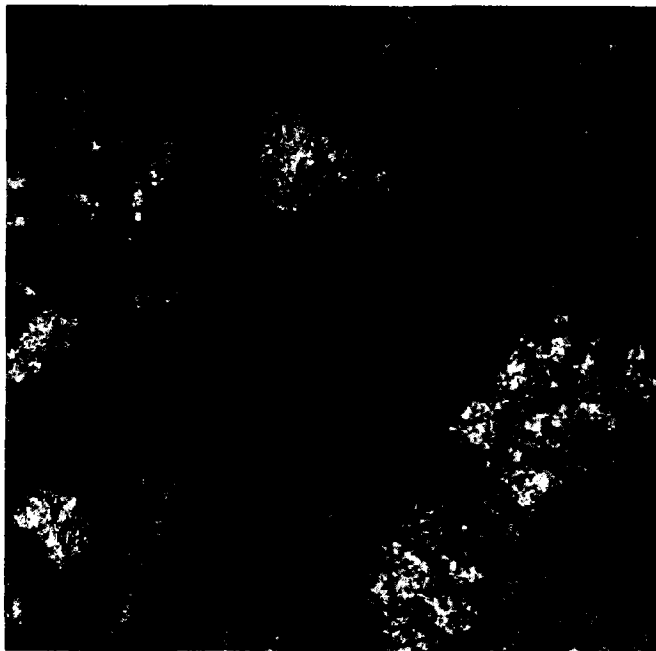


图 4- 画面 A

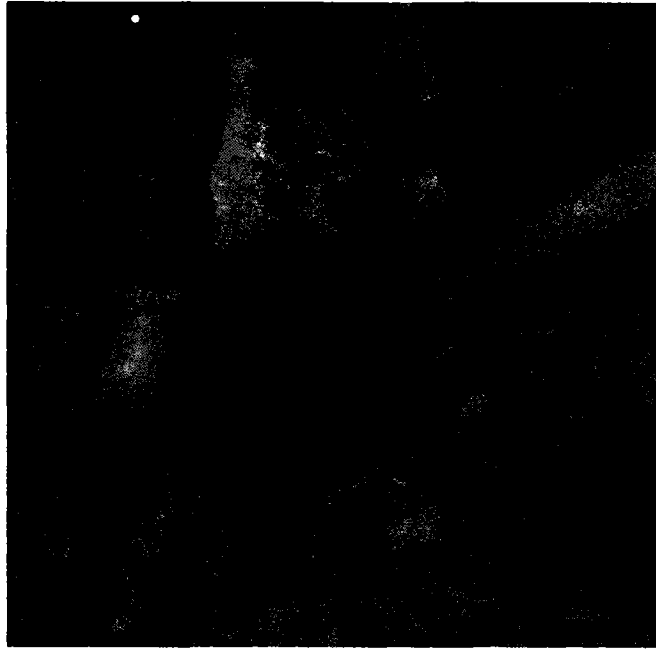


图 4- 画面 B

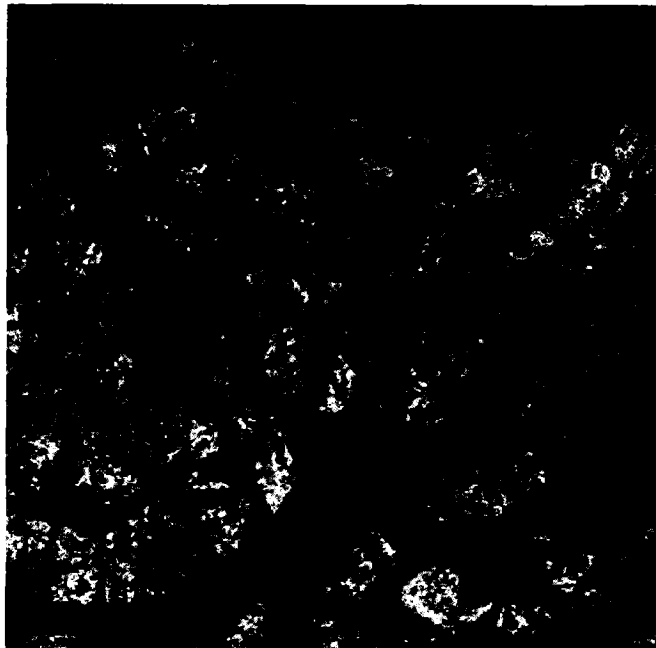


图 5- 画面 A

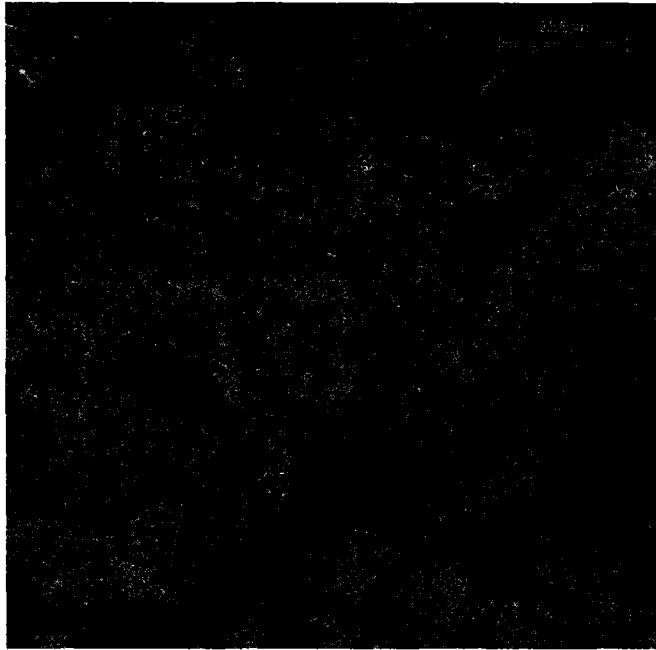


图 5- 画面 B