

[19] Patents Registry
The Hong Kong Special Administrative Region
香港特別行政區
專利註冊處

[11] 40050737 B
CN 112513165 B

[12] **STANDARD PATENT (R) SPECIFICATION**
轉錄標準專利說明書

[21] Application no. 申請編號
62021038843.0

[51] Int. Cl.
C08L 5/00 (2006.01) A61K 31/737 (2006.01)

[22] Date of filing 提交日期
14.09.2021

A61P 41/00 (2006.01) C08B 37/00 (2006.01)

[54] HIGH-MOLECULAR-WEIGHT FUCANS FOR TREATING FIBROUS ADHESIONS AND OTHER DISEASES AND CONDITIONS
用於治療纖維性粘連和其他疾病和病症的高分子量褐藻糖膠

[30] Priority 優先權

27.07.2018 US 62/711,335
27.07.2018 US 62/711,364
27.07.2018 US 62/711,372
01.08.2018 US 62/713,392
01.08.2018 US 62/713,399
01.08.2018 US 62/713,413
23.08.2018 US 62/722,135
23.08.2018 US 62/722,137
02.11.2018 US 62/755,311
02.11.2018 US 62/755,318
02.11.2018 US 62/755,328
17.01.2019 US 62/793,514
17.01.2019 US 62/793,654
13.06.2019 US 62/861,223
13.06.2019 US 62/861,228
13.06.2019 US 62/861,235

[43] Date of publication of application 申請發表日期
31.12.2021

[45] Date of publication of grant of patent 批予專利的發表日期
01.12.2023

[86] International application no. 國際申請編號
PCT/CA2019/051027

[87] International publication no. and date 國際申請發表編號及日期
WO2020/019078 30.01.2020

CN Application no. & date 中國專利申請編號及日期

CN 201980050281.2 24.07.2019

CN Publication no. & date 中國專利申請發表編號及日期

CN 112513165 16.03.2021

Date of grant in designated patent office 指定專利當局批予專利日

[73] Proprietor 專利所有人

ARC MEDICAL DEVICES INC.
ARC 医疗器械股份有限公司
UNIT 8, 3071 NO. 5 ROAD
RICHMOND, BRITISH COLUMBIA V6X 2T4
CANADA

[72] Inventor 發明人

SPRINGATE, CHRISTOPHER MICHAEL KEVIN
C · M · K · 斯普林加特
MILLET, IAN I · 米莱特
DASWANI, SAILESH HARESH S · H · 达斯瓦尼
SUN, HESONG H · 孙

[74] Agent and / or address for service 代理人及/或送達地址
CLT PATENT & TRADEMARK (H.K.) LIMITED
Unit 09, 34/F., Office Tower, Convention Plaza
1 Harbour Road, Wanchai
HONG KONG

| | |
|---|--|
| 期 | |
|---|--|

| | |
|------------|--|
| 25.04.2023 | |
|------------|--|



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112513165 B

(45) 授权公告日 2023.04.25

(21) 申请号 201980050281.2

(22) 申请日 2019.07.24

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 112513165 A

(43) 申请公布日 2021.03.16

(30) 优先权数据

62/711,335 2018.07.27 US

62/711,364 2018.07.27 US

62/711,372 2018.07.27 US

62/713,392 2018.08.01 US

62/713,399 2018.08.01 US

62/713,413 2018.08.01 US

62/722,135 2018.08.23 US

62/722,137 2018.08.23 US

62/755,311 2018.11.02 US

62/755,318 2018.11.02 US

62/755,328 2018.11.02 US

62/793,514 2019.01.17 US

62/793,654 2019.01.17 US

62/861,223 2019.06.13 US

62/861,228 2019.06.13 US

62/861,235 2019.06.13 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2021.01.27

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/CA2019/051027 2019.07.24

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/019078 EN 2020.01.30

(73) 专利权人 ARC医疗器械股份有限公司
地址 加拿大不列颠哥伦比亚省(72) 发明人 C.M.K.斯普林加特 I.米莱特
S.H.达斯瓦尼 H.孙(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所
有限公司 11038
专利代理师 谭玮

(51) Int.Cl.

C08L 5/00 (2006.01)

A61K 31/737 (2006.01)

A61P 41/00 (2006.01)

C08B 37/00 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 1985846 A, 2007.06.27

CN 1985846 A, 2007.06.27

CN 102665733 A, 2012.09.12

CN 105399848 A, 2016.03.16

(续)

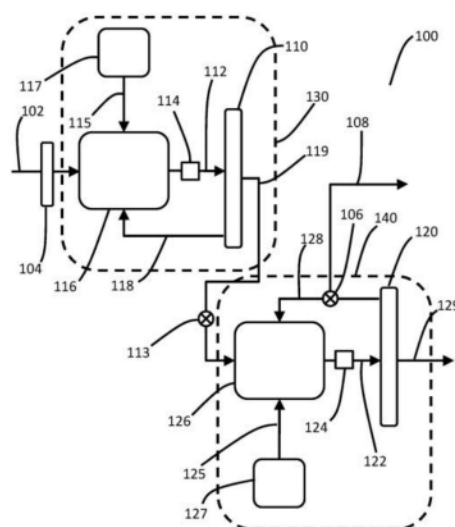
审查员 徐立超

权利要求书3页 说明书73页 附图11页

(54) 发明名称

用于治疗纤维性粘连和其他疾病和病症的
高分子量褐藻糖胶

(57) 摘要

高分子量褐藻糖胶组合物包括治疗有效的、
医疗上可接受的褐藻糖胶,在组合物中包括,其
中,例如,所述褐藻糖胶具有分子量分布,其中,
大于60%w/w的所述组合物具有大于100kDa的分
子量。

[转续页]

[接上页]

(56) 对比文件

US 2009215720 A1,2009.08.27

KR 20140033692 A,2014.03.19

CN 106255490 A,2016.12.21

Mingyi Wu 等.Structural Analysis and Anticoagulant Activities of the Novel Sulfated Fucan Possessing a Regular Well-Defined Repeating Unit from Sea Cucumber.《marine drugs》.2015,第13卷2063-2084页.

Mariana S. Pereira 等.Is there a correlation between structure and anticoagulant action of sulfated galactans and sulfated fucans.《Glycobiology》.2002,第12卷(第10期),573-580页.

Kyung-Tae Kim 等.Molecular weight and

sulfate content modulate the inhibition of α -amylase by fucoidan relevant for type 2 diabetes management.

《PharmaNutrition》.2015,第3卷108-114页.

Chen Yang等.Effects of molecular weight and hydrolysis conditions on anticancer activity of fucoidans from sporophyll of Undaria pinnatifida.

《International Journal of Biological Macromolecules》.2008,第43卷433-437页.

Marcel Tutor Ale等.Importance Determinants for Fucoidan Bioactivity: A Critical Review of Structure-Function Relations and Extraction Methods for Fucose-Containing Sulfated Polysaccharides from Brown Seaweeds.《Marine Drugs》.2011,2106-2130页.

1. 一种高分子量褐藻糖胶, 其中所述高分子量褐藻糖胶由分子量分布组成, 其中, 当使用水性凝胶渗透色谱法装置测量时:

(i) 所述褐藻糖胶的分子量分布的至少92%w/w大于100kDa, 并且

(ii) 所述高分子量褐藻糖胶具有370kDa至10,000kDa的重均分子量,

所述水性凝胶渗透色谱法装置由以下组成:

具有7.8mm内径的一个300mm分析型凝胶渗透色谱柱, 装填有羟基化聚甲基丙烯酸酯基凝胶, 具有50kDa至5,000kDa的有效分子量范围; 具有7.8mm内径的一个300mm分析型凝胶渗透色谱柱, 装填有羟基化聚甲基丙烯酸酯基凝胶, 具有1kDa至6,000kDa的有效分子量范围; 以及具有6mm内径的一个40mm保护柱, 装填有羟基化聚甲基丙烯酸酯基凝胶, 所述两个分析型凝胶渗透色谱柱及所述一个保护柱被容纳在处于30℃的柱室中;

折射率检测器, 处于30℃;

0.1M硝酸钠流动相, 以0.6mL/min运行; 以及

相对于峰分子量标准曲线进行量化, 所述峰分子量标准曲线由以下组成: 第一右旋糖酐标准物, 具有的峰分子量为2,200kDa; 第二右旋糖酐标准物, 具有的峰分子量为720kDa至760kDa; 第三右旋糖酐标准物, 具有的峰分子量为470kDa至510kDa; 第四右旋糖酐标准物, 具有的峰分子量为370kDa至410kDa; 第五右旋糖酐标准物, 具有的峰分子量为180kDa至220kDa; 以及第六右旋糖酐标准物, 具有的峰分子量为40kDa至55kDa,

其中所述褐藻糖胶的硫酸酯含量为20%w/w至60%w/w,

所述褐藻糖胶的总碳水化合物含量为27%w/w至80%w/w,

所述褐藻糖胶的总岩藻糖含量占总碳水化合物含量的百分比为至少30%w/w,

所述褐藻糖胶的总半乳糖含量占总碳水化合物含量的百分比低于60%w/w,

所述褐藻糖胶的葡糖醛酸、甘露糖、鼠李糖、葡萄糖和木糖的总含量占总碳水化合物含量的百分比低于30%w/w, 并且

所述褐藻糖胶包括小于5%w/w的乙酰基含量。

2. 根据权利要求1所述的高分子量褐藻糖胶, 包括的重均分子量为370kDa至5300kDa。

3. 根据权利要求2所述的高分子量褐藻糖胶, 其中, 所述重均分子量为370kDa至1900kDa。

4. 根据权利要求1所述的高分子量褐藻糖胶, 包括的数均分子量为140kDa至3,000kDa。

5. 根据权利要求1所述的高分子量褐藻糖胶, 其中, 所述分布的至少55%w/w大于200kDa。

6. 根据权利要求1所述的高分子量褐藻糖胶, 其中, 所述分布的至少22%w/w大于500kDa。

7. 一种高分子量褐藻糖胶, 其中所述高分子量褐藻糖胶由分子量分布组成, 其中, 当使用水性凝胶渗透色谱法装置测量时:

(i) 所述褐藻糖胶的分子量分布的61%w/w至80%w/w为200kDa至1600kDa, 并且

(ii) 所述高分子量褐藻糖胶具有370kDa至10,000kDa的重均分子量,

所述水性凝胶渗透色谱法装置由以下组成:

具有7.8mm内径的一个300mm分析型凝胶渗透色谱柱, 装填有羟基化聚甲基丙烯酸酯基凝胶, 具有50kDa至5,000kDa的有效分子量范围; 具有7.8mm内径的一个300mm分析型凝胶渗透

透色谱柱,装填有羟基化聚甲基丙烯酸酯基凝胶,具有1kDa至6,000kDa的有效分子量范围;以及具有6mm内径的一个40mm保护柱,装填有羟基化聚甲基丙烯酸酯基凝胶,所述两个分析型凝胶渗透色谱柱及所述一个保护柱被容纳在处于30℃的柱室中;

折射率检测器,处于30℃;

0.1M硝酸钠流动相,以0.6mL/min运行;以及

相对于峰分子量标准曲线进行量化,所述峰分子量标准曲线由以下组成:第一右旋糖酐标准物,具有的峰分子量为2,200kDa;第二右旋糖酐标准物,具有的峰分子量为720kDa至760kDa;第三右旋糖酐标准物,具有的峰分子量为470kDa至510kDa;第四右旋糖酐标准物,具有的峰分子量为370kDa至410kDa;第五右旋糖酐标准物,具有的峰分子量为180kDa至220kDa;以及第六右旋糖酐标准物,具有的峰分子量为40kDa至55kDa,

其中所述褐藻糖胶的硫酸酯含量为20%w/w至60%w/w,

所述褐藻糖胶的总碳水化合物含量为27%w/w至80%w/w,

所述褐藻糖胶的总岩藻糖含量占总碳水化合物含量的百分比为至少30%w/w,

所述褐藻糖胶的总半乳糖含量占总碳水化合物含量的百分比低于60%w/w,

所述褐藻糖胶的葡糖醛酸、甘露糖、鼠李糖、葡萄糖和木糖的总含量占总碳水化合物含量的百分比低于30%w/w,并且

所述褐藻糖胶包括小于5%w/w的乙酰基含量。

8.一种高分子量褐藻糖胶,其中所述高分子量褐藻糖胶由分子量分布组成,其中,当使用水性凝胶渗透色谱法装置测量时:

(i)所述褐藻糖胶的分子量分布的至少60%w/w大于1600kDa,并且

(ii)所述高分子量褐藻糖胶具有370kDa至10,000kDa的重均分子量,

所述水性凝胶渗透色谱法装置由以下组成:

具有7.8mm内径的一个300mm分析型凝胶渗透色谱柱,装填有羟基化聚甲基丙烯酸酯基凝胶,具有50kDa至5,000kDa的有效分子量范围;具有7.8mm内径的一个300mm分析型凝胶渗透色谱柱,装填有羟基化聚甲基丙烯酸酯基凝胶,具有1kDa至6,000kDa的有效分子量范围;以及具有6mm内径的一个40mm保护柱,装填有羟基化聚甲基丙烯酸酯基凝胶,所述两个分析型凝胶渗透色谱柱及所述一个保护柱被容纳在处于30℃的柱室中;

折射率检测器,处于30℃;

0.1M硝酸钠流动相,以0.6mL/min运行;以及

相对于峰分子量标准曲线进行量化,所述峰分子量标准曲线由以下组成:第一右旋糖酐标准物,具有的峰分子量为2,200kDa;第二右旋糖酐标准物,具有的峰分子量为720kDa至760kDa;第三右旋糖酐标准物,具有的峰分子量为470kDa至510kDa;第四右旋糖酐标准物,具有的峰分子量为370kDa至410kDa;第五右旋糖酐标准物,具有的峰分子量为180kDa至220kDa;以及第六右旋糖酐标准物,具有的峰分子量为40kDa至55kDa,

其中所述褐藻糖胶的硫酸酯含量为20%w/w至60%w/w,

所述褐藻糖胶的总碳水化合物含量为27%w/w至80%w/w,

所述褐藻糖胶的总岩藻糖含量占总碳水化合物含量的百分比为至少30%w/w,

所述褐藻糖胶的总半乳糖含量占总碳水化合物含量的百分比低于60%w/w,

所述褐藻糖胶的葡糖醛酸、甘露糖、鼠李糖、葡萄糖和木糖的总含量占总碳水化合物含

量的百分比低于30%w/w,并且

所述褐藻糖胶包括小于5%w/w的乙酰基含量。

9. 根据权利要求1所述的高分子量褐藻糖胶,其中,当以50mg/mL的浓度溶解在水中时,所述高分子量褐藻糖胶的粘度为4cP至50cP。

10. 根据权利要求1所述的高分子量褐藻糖胶,其中,所述高分子量褐藻糖胶为白色固体。

11. 根据权利要求1所述的高分子量褐藻糖胶,其中,当以1mg/mL至100mg/mL的浓度溶解在水中时,所述高分子量褐藻糖胶形成一种澄清无色的溶液。

12. 根据权利要求1所述的高分子量褐藻糖胶,其中,当在70℃下伴随溶剂信号抑制在配备有5-mm冷探针的600MHz光谱仪上在碳尺寸10-30ppm范围内以256-512的8次增量扫描每次通过2D ^1H - ^{13}C 异核多量子相干测量时,所述褐藻糖胶包括的乙酰基含量为0%w/w。

13. 一种医疗上可接受的褐藻糖胶组合物,包括医疗上可接受的缓冲剂或稀释剂中的治疗有效量的权利要求1至12中任一项所述的高分子量褐藻糖胶。

14. 一种医疗组合物,包括0.02mg/mL至100mg/mL的权利要求1至12中任一项所述的高分子量褐藻糖胶,其中,所述医疗组合物被配置和构成为治疗动物的疾病或病症。

15. 根据权利要求14所述的医疗组合物,其中,所述疾病或病症是纤维性粘连。

用于治疗纤维性粘连和其他疾病和病症的高分子量褐藻糖胶

[0001] 要求优先权

[0002] 本申请要求共同审查中的于2018年7月27日提交的美国临时专利申请号62,711,364;于2018年7月27日提交的美国临时专利申请号62,711,372;于2018年7月27日提交的美国临时专利申请号62/711,335;于2018年8月1日提交的美国临时专利申请序列号62/713,399;于2018年8月23日提交的美国临时专利申请号62/722,135;于2018年11月2日提交的美国临时专利申请号62/755,311;于2019年1月17日提交的美国临时专利申请号62/793,514;于2019年6月13日提交的美国临时专利申请号62/861,223;共同审查中的于2018年8月1日提交的美国临时专利申请序列号62/713,392;于2018年8月1日提交的美国临时专利申请号62/713,413;于2018年8月23日提交的美国临时专利申请号62/722,137;于2018年11月2日提交的美国临时专利申请号62/755,318;于2019年6月13日提交的美国临时专利申请号62/861,228;共同审查中的于2018年11月2日提交的美国临时专利申请序列号62/755,328;于2019年1月17日提交的美国临时专利申请号62/793,654;以及于2019年6月13日提交的美国临时专利申请号62/861,235,上述专利申请的内容通过引用整体并入本文。

背景技术

[0003] 褐藻糖胶(包括岩藻多糖)是硫酸酯化的多糖。一般而言,这意味着褐藻糖胶是由许多糖基团组成的分子,并且还具有附接到糖基团上的硫原子。主要的糖基团称为“岩藻糖”,它是具有6个碳原子并且具有化学式 $C_6H_{12}O_5$ 的糖。“岩藻多糖”(或墨角藻多糖)指示衍生自褐藻(海藻)的褐藻糖胶。褐藻糖胶可以单独存在,或者存在于其他糖的混合物中,例如存在于诸如木糖、半乳糖、葡萄糖、葡糖醛酸和/或甘露糖之类的糖的混合物中。这些其他糖可以与褐藻糖胶一起提取自海藻或其他来源。尽管褐藻糖胶目前衍生自天然来源诸如本文提及的褐藻(海藻)、海参等,但“褐藻糖胶”包括具有如本文所讨论的褐藻糖胶的化学和结构基序的聚合物分子,而与褐藻糖胶的一种或多种最终来源无关。

[0004] 岩藻多糖可获自多种褐藻物种,包括但不限于:小腺囊藻(*Adenocystis utricularis*)、泡叶藻(*Ascophyllum nodosum*)、绳藻(*Chorda filum*)、*Cystoseira* *marina*、南极公牛藻(*Durvillaea antarctica*)、褐藻门昆布(*Ecklonia kurome*)、极大昆布(*Ecklonia maxima*)、爱森藻(*Eisenia bicyclis*)、岩藻(*Fucus evanescens*)、墨角藻(*Fucus vesiculosus*)、羊栖菜(*Hizikia fusiforme*)、伸长海条藻(*Himantalia elongata*)、笼目海带(*Kjellmaniella crassifolia*)、*Laminaria brasiliensis*、拟菊苣海带(*Laminaria cichorioides*)、极北海带(*Laminaria hyperborea*)、日本真海带(*Laminaria japonica*)、糖海带(*Laminaria saccharina*)、*Lessonia trabeculata*、巨藻(*Macrocystis pyrifera*)、*Pelvetia fastigiata*、沟鹿角菜(*Pelvetia canaliculata*)、*Saccharina japonica*、糖海带(*Saccharina latissima*)、*Sargassum stenophyllum*、鼠尾藻(*Sargassum thunbergii*)、海蒿子(*Sargassum confusum*)、马尾藻科植物羊栖菜(*Sargassum fusiforme*)及裙带菜(*Undaria pinnatifida*)。这些示例性物种均来自分类纲褐藻纲(*Phaeophyceae*)且这些物种中的大部

分属于以下科：墨角藻目 (Fucales) 及海带科 (Laminariaceae)。

[0005] 包括岩藻多糖的褐藻糖胶已示出有效用于抑制、预防、去除、减少或以其他方式治疗纤维性粘连的形成。还发现其用于治疗其他相关疾病及病症。

[0006] 因此,对包含具有所需高分子量的褐藻糖胶的组合物的需求尚未得到满足,在一些实施方式中,包括将此类组合物修饰为具有所需的硫酸酯化水平和/或医疗上可行的低内毒素水平。本发明的组合物、系统和方法等提供了这些和/或其他优点。

发明内容

[0007] 本发明的组合物、系统、器械、材料和方法等提供了高分子量褐藻糖胶。此类高分子量褐藻糖胶可以从这样的原料褐藻糖胶组合物或其他起始或初始褐藻糖胶组合物获得:其具有的褐藻糖胶具有宽分子量分布,包括所需的高分子量区段/部分(即,可以衍生出高分子量褐藻糖胶的宽分子量褐藻糖胶组合物;此类起始褐藻糖胶组合物可以是或可以不是粗制的,或者已被预先处理或纯化)。所需的高分子量褐藻糖胶具有的分子量分布基本上由起始褐藻糖胶宽分子量分布的所需的高分子量区段/部分组成,其中,在低分子量末端处的大量的宽分子量分布已被消除、抑制或减弱,以使任何剩余量都无关紧要。

[0008] 在一些方面,本文的组合物、系统、方法等包括高分子量褐藻糖胶,例如岩藻多糖,其可以包括分子量分布、基本上由分子量分布组成、或者由分子量分布组成,其中,当使用水性凝胶渗透色谱法装置测量时,所述分布的至少60%w/w大于100kDa,所述水性凝胶渗透色谱法装置基本上由以下各项组成:

[0009] 一根内径为7.8mm的300mm分析型凝胶渗透色谱柱,其装填有羟基化聚甲基丙烯酸酯基凝胶,有效分子量范围为约50kDa至约5,000kDa;一根内径为7.8mm的300mm分析型凝胶渗透色谱柱,其装填有羟基化聚甲基丙烯酸酯基凝胶,有效分子量范围为约1kDa至约6,000kDa;以及一根内径为6mm的40mm保护柱,其装填有羟基化聚甲基丙烯酸酯基凝胶,所述两根分析型凝胶渗透色谱柱和所述一根保护柱被容纳在处于约30℃的柱室中;

[0010] 处于约30℃的折射率检测器;

[0011] 以0.6mL/min运行的0.1M硝酸钠流动相;以及

[0012] 相对于峰分子量标准曲线进行量化,所述峰分子量标准曲线基本上由以下各项组成:第一右旋糖酐标准物,具有的峰分子量为约2,200kDa;第二右旋糖酐标准物,具有的峰分子量为约720kDa至约760kDa;第三右旋糖酐标准物,具有的峰分子量为约470kDa至约510kDa;第四右旋糖酐标准物,具有的峰分子量为约370kDa至约410kDa;第五右旋糖酐标准物,具有的峰分子量为约180kDa至约220kDa;以及第六右旋糖酐标准物,具有的峰分子量为约40kDa至55kDa。

[0013] 在一些实施方式中,所述分布的至少约70%w/w、80%w/w、90%w/w、93%w/w、94%w/w、95%w/w、97%w/w、98%w/w或99%w/w可以大于100kDa。所述重均分子量可以为约100kDa至10,000kDa;约140kDa至8,100kDa;约370kDa至8100kDa;约370kDa至5300kDa;约370kDa至8100kDa;约370kDa至5300kDa;约370kDa至1900kDa;约590kDa至1600kDa;约590kDa至1600kDa;或约860kDa至1600kDa。在一些实施方式中,所述重均分子量可以为约1,100kDa、约1,200kDa、或约1,300kDa。所述数均分子量可以为约50kDa至3,000kDa;约60kDa至2,000kDa;约140kDa至2,000kDa;约140kDa至520kDa;或约230kDa至450kDa。所述分布的

至少55%w/w、71%w/w或91%w/w可以大于约200kDa。所述分布的至少22%、54%w/w或90%w/w可以大于约500kDa。

[0014] 在一些实施方式中,所述高分子量褐藻糖胶可以基本上由分子量分布组成、包括分子量分布或由分子量分布组成,当使用上文和本文其他地方阐述的水性凝胶渗透色谱法装置测量时,所述分布的约61%w/w至80%w/w为约200kDa至1600kDa。所述高分子量褐藻糖胶可以基本上由分子量分布组成、包括分子量分布或由分子量分布组成,其中,当使用上文和本文其他地方阐述的水性凝胶渗透色谱法装置测量时,所述分布的至少60%w/w可以大于约1600kDa。

[0015] 所述硫酸酯含量可以为约20%w/w至60%w/w、约30%w/w至55%w/w、或约32%w/w至52%w/w。所述总碳水化合物含量可以为约27%w/w至80%w/w。所述总岩藻糖含量占所述总碳水化合物含量的百分比可以为至少约30%w/w、50%w/w、70%w/w、80%w/w、90%w/w或95%w/w。所述总半乳糖含量占所述总碳水化合物含量的百分比可以低于约60%w/w、或可以为约2%w/w至20%w/w、或可以低于约10%w/w。葡糖醛酸、甘露糖、鼠李糖、葡萄糖和木糖的总含量占所述总碳水化合物含量的百分比可以低于约30%w/w。

[0016] 当以50mg/mL的浓度溶于水中时,所述高分子量褐藻糖胶的粘度可为约4cP至50cP;约10cP至40cP;或约15cP至30cP。所述高分子量褐藻糖胶可为白色固体,并且当以1mg/mL至100mg/mL的浓度溶于水中时,所述高分子量褐藻糖胶可形成一种澄清无色的溶液。所述褐藻糖胶可包含少于5%或2%w/w的乙酰基含量。另外,当在70°C下伴随溶剂信号抑制在配备有5-mm冷探针的600MHz光谱仪上在碳尺寸10-30ppm范围内以256-512的8次增量扫描每次通过2D ^1H - ^{13}C 异核多量子相干测量时,所述褐藻糖胶包含的乙酰基含量基本为0%w/w。

[0017] 本文还包括这样的方法,所述方法可以包括:制备或使用本文的高分子量褐藻糖胶,包括用于治疗纤维性粘连。本文还包括医疗上可接受的褐藻糖胶组合物,其可以包括医疗上可接受的缓冲剂或稀释剂中的治疗有效量的高分子量褐藻糖胶。方法还包括治疗动物的病症或疾病,其可以包括:选择本文的医疗上可接受的褐藻糖胶组合物以治疗所述病症或疾病,以及给药包括约0.5mg/kg至50mg/kg;0.04mg/kg至25mg/kg;0.2mg/kg至10mg/kg;1mg/kg至5mg/kg;1.5mg/kg至3mg/kg;5mg/kg至10mg/kg的治疗有效量。

[0018] 所述病症或疾病可以是所述动物的目标部位处的纤维性粘连,并且所述给药可以包括:向所述目标部位给药所述治疗有效量。

[0019] 所述医疗组合物可以是约0.02mg/mL至100mg/mL的高分子量褐藻糖胶,其中,所述医疗组合物被配置和构成为治疗动物的疾病或病症。所述医疗组合物还可为约0.5mg/mL至5mg/mL、或约2.5mg/mL的高分子量褐藻糖胶。

[0020] 所述医疗组合物可以是包括液体医疗器械的医疗器械。所述医疗组合物可以是药物组合物,其可以是液体药物组合物。

[0021] 本文的方法还包括:包括约0.01mL/kg至15mL/kg;约0.03mL/kg至4mL/kg;约0.06mL/kg至2mL/kg;或约2mL/kg至4mL/kg的剂量范围的医疗组合物用于治疗动物的疾病或病症的用途。

[0022] 用于治疗患者的纤维性粘连的方法可以包括:将医疗组合物给药于患者的目标部位。所述目标部位可以是外科手术部位,并且所述给药可以在以下情况中的至少一种情况

下进行:a)在所述外科手术部位处打开外科手术伤口后,b)在手术期间,以及c)在闭合所述外科手术伤口之后。所述给药可以在外科手术之后但在闭合所述外科手术伤口之前进行。所述给药可以耗时少于3分钟、2分钟或1分钟。所述目标部位可以是病变部位、擦伤部位和损伤部位中的至少一种。所述目标部位可以是骨盆腔、腹腔、背侧腔、颅腔、脊髓腔、腹侧腔、胸腔、胸膜腔、心包腔、皮肤、关节、肌肉、肌腱和韧带。

[0023] 在进一步的实施方式中,本文的方法包括用于获得高分子量褐藻糖胶的方法。这些方法可以包括:

[0024] 以起始溶液的形式提供具有宽分子量分布的起始褐藻糖胶组合物,所述宽分子量分布包括所需高分子量褐藻糖胶区段;

[0025] 使所述起始溶液通过第一较高截留分子量切向流过滤过滤器进行第一切向流过滤,以产生第一渗透褐藻糖胶组合物;以及

[0026] 使所述第一渗透褐藻糖胶组合物通过第二较低截留分子量切向流过滤过滤器进行第二切向流过滤,以产生基本上由所述所需高分子量褐藻糖胶组成的第二渗透褐藻糖胶组合物。

[0027] 所述方法还可以包括:收集基本上由所述所需高分子量褐藻糖胶组成的所述第二渗透褐藻糖胶组合物,并且所述第一较高截留分子量切向流过滤过滤器的较高截留分子量可以为约50kDa至约1000kDa,并且所述第二较低截留分子量切向流过滤过滤器的较低截留分子量可以为约30kDa至约100kDa。所述较高截留分子量可以为约300kDa,并且所述较低截留分子量可以为约100kDa。

[0028] 用于获得高分子量褐藻糖胶的方法,可以包括:

[0029] 以起始溶液的形式提供具有宽分子量分布的起始褐藻糖胶组合物,所述宽分子量分布包括所需高分子量褐藻糖胶区段;

[0030] 使所述起始溶液通过第一较低截留分子量切向流过滤过滤器进行切向流过滤,以产生第一渗透褐藻糖胶组合物;以及

[0031] 使所述第一渗透褐藻糖胶组合物通过第二较高截留分子量切向流过滤过滤器进行切向流过滤,以产生基本上由所述所需高分子量褐藻糖胶组成的第二渗透褐藻糖胶组合物。

[0032] 所述方法还可以包括:收集基本上由所述所需高分子量褐藻糖胶组成的所述第二渗透褐藻糖胶组合物。所述第一切向流过滤可包括:使所述起始溶液通过所述第一较低截留分子量切向流过滤过滤器进行渗透。所述第二切向流过滤可包括:使所述第一渗透褐藻糖胶组合物通过所述第二较高截留分子量切向流过滤过滤器进行渗透。所述第一较低截留分子量切向流过滤过滤器的较低截留分子量可以为约30kDa至约100kDa,并且所述第二较高截留分子量切向流过滤过滤器的较高截留分子量可以为约50kDa至约1000kDa。所述较低截留分子量可以为约100kDa,并且所述较高截留分子量可以为约300kDa。

[0033] 用于获得高分子量褐藻糖胶的方法,可以包括:

[0034] 以起始溶液的形式提供具有宽分子量分布的起始褐藻糖胶组合物,所述宽分子量分布包括所需高分子量褐藻糖胶区段,所述起始褐藻糖胶组合物可以包括与所述组合物中的褐藻糖胶上的硫酸酯基团离子键合的低原子量阳离子;以及

[0035] 使所述起始溶液相对于阳离子添加剂溶液进行切向流过滤,所述阳离子添加剂溶

液可以包括具有比所述低原子量阳离子大的分子量的阳离子添加剂,以产生基本上由所需高分子量褐藻糖胶组成的渗余褐藻糖胶组合物。

[0036] 所述方法还可以包括:收集基本上由所述所需高分子量褐藻糖胶组成的所述渗余褐藻糖胶组合物。所述低原子量阳离子包括碱金属、碱土金属、铝和铵中的至少一种。所述阳离子添加剂可以包括胆碱、聚乙烯吡咯烷酮、牛磺酸、多胺、壳聚糖、组蛋白和胶原蛋白中的至少一种。所述方法还可以包括:在使所述起始溶液进行切向流过滤之前,将所述阳离子添加剂添加到所述起始溶液中。所述切向流过滤可以包括:将所述起始溶液相对于所述阳离子添加剂溶液进行渗滤。所述方法还可以包括:通过在第二切向流过滤过滤器上将所述渗余褐藻糖胶组合物相对于盐溶液进行渗滤来去除所述阳离子添加剂,所述第二切向流过滤过滤器的截留分子量可以低于所述第一切向流过滤过滤器的截留分子量。

[0037] 所述盐溶液可以包括碱金属、碱土金属、铝和/或铵的氯化物、溴化物、碘化物、氟化物、硫酸盐、亚硫酸盐、碳酸盐、碳酸氢盐、磷酸盐、硝酸盐、亚硝酸盐、乙酸盐、柠檬酸盐、硅酸盐和/或氰化物。所述方法还可以包括:通过将所述渗余褐藻糖胶组合物相对于低离子强度溶液进行渗滤来去除盐。

[0038] 用于获得高分子量褐藻糖胶的方法可以包括:

[0039] 提供离心容器,所述离心容器可以包括底端和顶端以及在其间的可渗透屏障,所述可渗透屏障可以在其间包括梯度材料;

[0040] 将具有宽分子量分布的起始褐藻糖胶组合物置于所述离心容器中和所述可渗透屏障上方,所述宽分子量分布包括所需高分子量褐藻糖胶区段;以及

[0041] 将所述离心容器离心足够长的时间段以产生基本上由所需高分子量褐藻糖胶组成的沉淀物。

[0042] 所述方法还可以包括:从所述离心容器中收集所需高分子量褐藻糖胶。所述可渗透屏障可以包括梯度材料的单个区段。所述可渗透屏障可以包括梯度材料的多个区段。所述梯度材料可以包括蔗糖、聚蔗糖、甘油、山梨糖醇、CsCl、Cs₂SO₄、KBr、泛影酸盐、Nycodenz[®]和碘克沙醇中的至少一种。离心力可以为约10,000重力至约1,000,000重力。离心力可以为60,000重力至约500,000重力。

[0043] 用于获得高分子量褐藻糖胶的方法可以包括:

[0044] 提供包括底端和顶端的离心容器;

[0045] 将起始溶液形式的具有宽分子量分布的起始褐藻糖胶组合物置于所述离心容器中,所述宽分子量分布包括所需高分子量褐藻糖胶区段;以及

[0046] 将所述离心容器离心足够长的时间段以产生基本上由所需高分子量褐藻糖胶组成的沉淀物。

[0047] 所述方法还可以包括:从所述离心容器中收集作为沉淀物的所需高分子量褐藻糖胶。离心力可以为约60,000重力至约1,000,000重力。离心力可以为200,000重力至约500,000重力。

[0048] 用于获得高分子量褐藻糖胶的方法可以包括:

[0049] 使具有宽分子量分布的起始褐藻糖胶组合物进行凝胶电泳,所述宽分子量分布包括所需高分子量褐藻糖胶区段,其中,所述起始褐藻糖胶组合物可以根据电泳凝胶上的质荷比进行置换;

[0050] 选择所述电泳凝胶的一部分,其基本上由所需高分子量褐藻糖胶组成;以及

[0051] 从所述电泳凝胶的选择的部分提取所需高分子量褐藻糖胶。

[0052] 所述使所述起始褐藻糖胶组合物进行凝胶电泳可包括:在所述电泳凝胶上施加电势差,所述电势差可以为约10伏/cm至200伏/cm。所述电泳凝胶可以包括琼脂糖、聚丙烯酰胺、聚二甲基丙烯酰胺和淀粉中的至少一种。所述电泳凝胶还可以包括三乙酸酯EDTA、三硼酸EDTA和磷酸盐缓冲盐水中的至少一种。从所述电泳凝胶的选择的部分中提取所需高分子量褐藻糖胶可以包括:在溶剂中搅动所述电泳凝胶的选择的部分。所述溶剂可以包括水、甲醇、乙醇和异丙醇中的至少一种。

[0053] 用于获得高分子量褐藻糖胶的方法可以包括:

[0054] 提供具有宽分子量分布的起始褐藻糖胶组合物和离子交换大孔树脂,所述宽分子量分布包括所需高分子量褐藻糖胶区段;以及

[0055] 使所述起始褐藻糖胶组合物与所述离子交换大孔树脂进行离子交换,以获得经离子交换处理的基本上由所需高分子量褐藻糖胶组成的褐藻糖胶组合物。

[0056] 所述方法还可以包括:从经离子交换处理的褐藻糖胶组合物中收集所需高分子量褐藻糖胶。提供所述初始褐藻糖胶组合物还可以包括:在使所述起始褐藻糖胶组合物进行离子交换之前使所述起始褐藻糖胶组合物脱盐。所述起始褐藻糖胶组合物:离子交换大孔树脂的质量比可以为约1:100至约10:1。所述质量比可以为约1:10至约5:1。可以使所述起始褐藻糖胶组合物进行离子交换的时间段为约5分钟至约100小时。所述离子交换大孔树脂可以包括阴离子交换大孔树脂和混合电荷大孔树脂中的至少一种。所述阴离子交换大孔树脂可以是强碱大孔树脂。所述强碱大孔树脂可以包括季胺基。所述阴离子交换大孔树脂可以是弱碱大孔树脂。所述弱碱大孔树脂可以包括伯、仲或叔胺基中的至少一种。所述离子交换大孔树脂可以包括苯乙烯、琼脂糖、右旋糖酐、丙烯酸酯、甲基丙烯酸酯、甲基丙烯酸甲酯、甲基丙烯酸丁酯、二乙烯基苯、纤维素、二氧化硅和陶瓷中的至少一种。所述离子交换大孔树脂的孔径可以为约5nm至约1000nm、约10nm至约100nm、或约15nm至约50nm。所述离子交换大孔树脂的排阻极限可以为约50kDa至约50,000kDa、约1,000kDa至约9,000kDa、或约100kDa至约1,000kDa。可以使所述起始褐藻糖胶组合物进行阴离子交换的时间段为约5分钟至约100小时或约1小时至约30小时。

[0057] 用于获得高分子量褐藻糖胶的方法可以包括:

[0058] 以起始溶液的形式提供具有宽分子量分布的起始褐藻糖胶组合物和凝胶介质,所述宽分子量分布包括所需高分子量褐藻糖胶区段;

[0059] 使所述起始溶液进行制备型凝胶渗透色谱法,其中,所述起始褐藻糖胶组合物可以根据分子量在所述凝胶介质上从第一输入端到第二输出端进行置换;以及

[0060] 从所述第二输出端收集至少一个等分部分,所述等分部分基本上由所需高分子量褐藻糖胶区段组成。

[0061] 该方法还可以包括:收集多个等分部分并将这些等分部分合并。所述凝胶介质可以被容纳在色谱柱中。所述凝胶介质可以包括聚甲基丙烯酸甲酯、磺化的苯乙烯-二乙烯基苯、二氧化硅、亲水性键合相或聚合物、聚苯乙烯、二乙烯基苯、甲基丙烯酸酯、甲基丙烯酸甲酯、甲基丙烯酸丁酯、纤维素、陶瓷、琼脂糖和右旋糖酐中的至少一种。所述凝胶介质的孔径可以为约3nm至约3000nm、3nm至约3000nm、约5nm至约10,000nm、约10nm至约100nm、约

50nm至约500nm、约200nm至约2,000nm、或约500nm至约5,000nm。所述凝胶介质的排阻极限可以为约100Da至约100,000kDa、约100kDa至约30,000kDa、约1,000kDa至约100,000kDa、约1,000kDa至约10,000kDa、或约5,000kDa至约50,000kDa。

[0062] 在本申请中阐述了这些和其他方面、特征和实施方式,包括以下具体实施方式和附图。除非另有明确说明,否则所有实施方式、方面、特征等都可以以任何期望的方式混合和匹配、组合和置换。

附图说明

[0063] 图1示意性地描绘了示例性的两过滤器系统,其用于使用顺序切向流过滤基于分子量将起始褐藻糖胶组合物进行分段,所述起始褐藻糖胶具有宽分子量分布。

[0064] 图2示意性地描绘了两过滤器系统的另一示例性实施方式,其用于使用顺序切向流过滤基于分子量对起始褐藻糖胶组合物进行分段,所述起始褐藻糖胶具有宽分子量分布。

[0065] 图3示意性地描绘了示例性系统,其用于使用阳离子增强的切向流过滤从起始褐藻糖胶组合物中获得所需高分子量褐藻糖胶,所述起始褐藻糖胶具有宽分子量分布。

[0066] 图4示意性地描绘了示例性系统,其用于使用梯度材料的多区段屏障从起始褐藻糖胶组合物中离心沉淀高分子量褐藻糖胶,所述起始褐藻糖胶具有宽分子量分布。

[0067] 图5示意性地描绘了示例性系统,其用于使用单区段屏障从起始褐藻糖胶组合物中离心沉淀高分子量褐藻糖胶,所述起始褐藻糖胶具有宽分子量分布。

[0068] 图6示意性地描绘了示例性系统,其用于通过凝胶电泳提取从起始褐藻糖胶组合物中获得高分子量褐藻糖胶,所述起始褐藻糖胶具有宽分子量分布。

[0069] 图7示意性地描绘了示例性系统,其用于通过透析从起始褐藻糖胶组合物中获得高分子量褐藻糖胶,所述起始褐藻糖胶具有宽分子量分布。

[0070] 图8示意性地描绘了示例性系统,其用于使用离子吸附从起始褐藻糖胶组合物中获得所需高分子量褐藻糖胶,所述起始褐藻糖胶具有宽分子量分布。

[0071] 图9A示出了NMR结果,表明根据本文的方法处理的某些褐藻糖胶经历了褐藻糖胶的结构变化。

[0072] 图9B描绘了2-D NMR结果,表明根据本文的方法处理的某些褐藻糖胶经历了褐藻糖胶的化学结构变化。

[0073] 图10示出了示例性系统,其用于使用多区段蔗糖屏障从起始褐藻糖胶组合物中离心沉淀高分子量褐藻糖胶,所述起始褐藻糖胶具有宽分子量分布。

[0074] 附图呈现了本公开的示例性实施方式。附图不一定按比例,并且某些特征可以以有助于例示和解释本发明系统、方法等的方式被放大或以其他方式表示。本文的系统、方法等的实际实施方式可以包括附图中未示出的另外的特征或步骤。本文陈述的范例以一种或多种形式例示了系统、方法等的实施方式,并且这样的范例不应被解释为以任何方式限制本公开的范围。本文的实施方式不是穷举性的,并且不将本公开限制为例如在以下详细描述中公开的精确形式。

具体实施方式

[0075] 本文呈现的当前组合物、系统、方法等包括高分子量褐藻糖胶。本发明组合物可对医疗治疗、术后治疗、疾病抑制等有效。在一些实施方式中,褐藻糖胶为岩藻多糖。本发明的高分子量褐藻糖胶可自身为医疗器械、医疗材料、组合产品,或可包括于医疗器械、医疗材料、组合产品之上或之中,或可包括于药物学上可接受的、治疗上和/或医疗上有效的组合物中。

[0076] 以下段落转向对一些方法学的简要讨论,这些方法学可用于通过各种方法从起始褐藻糖胶和组合物产生本文的高分子量褐藻糖胶和组合物,所述各种方法可以使用任何合适的反应混合物(例如溶液、悬浮液、固体、凝胶或其他形态,具体取决于所选择的方法)来执行。

[0077] 组合物

[0078] 在某些实施方式中,本文呈现的当前组合物、系统等提供褐藻糖胶及医疗上可接受的高分子量褐藻糖胶和组合物,其包括治疗有效量的高分子量褐藻糖胶,以用于治疗纤维性粘连(诸如外科手术粘连)、关节炎、牛皮癣或视需要的其他疾病。

[0079] 本文呈现的高分子量褐藻糖胶可用于多种应用,包括抑制、预防、去除、减少或以其他方式治疗纤维性粘连及其他目标、疾病和/或病症。治疗包括所述高分子量褐藻糖胶减小或预防目标疾病或其他病症的发展,诸如减小或预防目标部位处形成纤维性粘连,该目标部位通常为由外科医生或其他从业者确认为包括或相当易患纤维性粘连(或者其他疾病或病症)的选择的目标部位,并且还包括消除现有疾病或其他病症,包括(例如)消除已存在的纤维性粘连。对于这样的抑制、预防、去除、减少或以其他方式的处理,高分子量褐藻糖胶通常以医疗上可接受的医疗器械、组合产品或药物学上有效的组合物来提供,其包含附加组分,诸如粘结剂、佐剂、赋形剂等,以及(视需要)附加的医疗上的活性物质,诸如包含于该组合物中但不附接至褐藻糖胶和/或可附接至褐藻糖胶的次要药品。

[0080] 高分子量褐藻糖胶的分子量分布可使用任何所需的、适当的测量系统来测量。不同系统当以不同方式测量时可由具有基本上相同构成的不同组合物或甚至由同一批产生不同读数或结果。一种合适的测量系统为水性凝胶渗透色谱法装置,其基本上由以下组成:具有7.8mm内径的一个300mm分析型凝胶渗透色谱柱,装填有羟基化聚甲基丙烯酸酯基凝胶,具有约50kDa至约5,000kDa的有效分子量范围;具有7.8mm内径的一个300mm分析型凝胶渗透色谱柱,装填有羟基化聚甲基丙烯酸酯基凝胶,具有约1kDa至约6,000kDa的有效分子量范围;以及具有6mm内径的一个40mm保护柱,装填有羟基化聚甲基丙烯酸酯基凝胶,所述两个分析型凝胶渗透色谱柱和所述一个保护柱被容纳在约30℃下的柱室中;折射率检测器,在约30℃下;0.1M硝酸钠流动相,以0.6mL/min运行;以及相对于峰分子量标准曲线进行量化,该峰分子量标准曲线基本上由以下组成:第一右旋糖酐标准物,峰分子量为约2,200kDa;第二右旋糖酐标准物,峰分子量为约720kDa至约760kDa;第三右旋糖酐标准物,峰分子量为约470kDa至约510kDa;第四右旋糖酐标准物,峰分子量为约370kDa至约410kDa;第五右旋糖酐标准物,峰分子量为约180kDa至约220kDa;以及第六右旋糖酐标准物,峰分子量为约40kDa至55kDa。峰分子量标准曲线还可以包括峰分子量为3kDa至5kDa的右旋糖酐标准物。

[0081] 本文的高分子量褐藻糖胶可具有超过100kDa的重均分子量,并且其分子量分布的

约50%w/w或更多高于100kDa。与在相同剂量下重均分子量低于100kDa且其分子量分布的小于约50%高于100kDa的的褐藻糖胶相比,此类高分子量褐藻糖胶在抑制、预防、去除、减少和/或以其他方式治疗纤维性粘连方面显示出更大的功效。在相同剂量下,重均分子量高于300kDa、其分子量分布的约70%或更多高于100kDa的高分子量褐藻糖胶在抑制、预防、去除、减少和/或以其他方式治疗纤维性粘连方面显示出更高的功效。

[0082] 在一些实施方式中,本文的高分子量褐藻糖胶被配置用于抑制、预防、去除、减少或以其他方式治疗纤维性粘连,其引起大于约65%、70%、80%、90%、95%或99%的手术后粘连的预防、抑制或其他治疗有效。此类高分子量褐藻糖胶也可以被配置用于其他目标的这种治疗。

[0083] 本文中的高分子量褐藻糖胶可以包括分子量分布,其中,大于约60%、70%、75%、80%、90%、95或99%w/w的褐藻糖胶具有高于100kDa的分子量。

[0084] 在其他实施方式中,本文的高分子量褐藻糖胶可以包括的重均分子量为约100kDa至10,000kDa、约140kDa或200kDa至9,000kDa、约350kDa或370kDa至8,000kDa、约450kDa至7,000kDa、约580kDa至5,300kDa或6,000kDa、约580kDa或590kDa至5,500kDa、约400kDa至2,800kDa、或约800kDa或860kDa至约2,000kDa,例如约850kDa、约930kDa、约1100kDa、约1200kDa、约1300kDa、约1600kDa和约1800kDa。

[0085] 在其他实施方式中,本文的高分子量褐藻糖胶可以包括的峰分子量为约60kDa或70kDa至7,000kDa、约100kDa或140kDa至6000kDa、约200kDa或230kDa至5000kDa、约250kDa至4000kDa、约350kDa至3000kDa、约500kDa至2000kDa、或约400kDa至约1000kDa,例如约450kDa、500kDa、550kDa、600kDa、650kDa、700kDa和750kDa。

[0086] 在其他实施方式中,本文的高分子量褐藻糖胶可以包括的数均分子量为约50kDa至3,000kDa、约100kDa至2,000kDa、约200kDa至1,500kDa、约300kDa至2,000kDa、约400kDa和1,000kDa、或约250kDa至约600kDa,例如,约300kDa、350kDa、400kDa、450kDa、500kDa和550kDa。

[0087] 在其他实施方式中,本文的高分子量褐藻糖胶可以包括分子量分布,其中,大于约55%w/w或60%w/w的褐藻糖胶可具有高于200kDa的分子量,大于约70%w/w或71%w/w的褐藻糖胶可具有高于200kDa的分子量。在其他实施方式中,本文的高分子量褐藻糖胶可以包括分子量分布,其中,大于22%w/w或30%w/w的褐藻糖胶可具有大于500kDa的分子量,或大于50%w/w或54%w/w的褐藻糖胶可具有大于500kDa的分子量。

[0088] 在其他实施方式中,本文的高分子量褐藻糖胶可以包括分子量分布,其中,小于约10%w/w的褐藻糖胶具有小于50kDa的分子量,或小于约5%w/w的褐藻糖胶具有小于50kDa的分子量,或小于约2%w/w的褐藻糖胶具有小于50kDa的分子量。

[0089] 在其他实施方式中,本文的高分子量褐藻糖胶可以包括分子量分布,其中,小于约5%w/w的褐藻糖胶的分子量低于10kDa,或小于约2%w/w的褐藻糖胶的分子量低于10kDa。

[0090] 在其他实施方式中,本文的高分子量褐藻糖胶可包含分子量分布,其中小于约5%w/w的褐藻糖胶的分子量低于5kDa,或小于约2%w/w的褐藻糖胶的分子量低于5kDa。

[0091] 在另一方面,本文的高分子量褐藻糖胶可包含分子量分布,其中,61%w/w至80%w/w或85%w/w的褐藻糖胶的分子量为200kDa至1600kDa。更特别地,大于70%w/w的褐藻糖胶可具有高于200kDa的分子量,并且大于30%的褐藻糖胶可具有高于500kDa的分子量。

[0092] 在另一方面,本文中的高分子量褐藻糖胶可包含分子量分布,其中大于约20%w/w、40%w/w或60%w/w的褐藻糖胶具有的分子量大于1600kDa。更特别地,大于约70%w/w的褐藻糖胶可具有高于200kDa的分子量,或大于约80%w/w的褐藻糖胶可具有高于200kDa的分子量。

[0093] 本文中的高分子量褐藻糖胶可具有的硫酸酯化水平为约14%w/w至70%w/w、约20%w/w至60%w/w、约30%w/w至55%w/w、或约32%w/w或35%w/w至52%w/w。

[0094] 本文的高分子量褐藻糖胶可具有的总岩藻糖:总硫酸酯的摩尔比为1:0.5至1:4、约1:0.8至1:3.5、约1:1至1:2.5、约1:1.2至1:2.0、或约1:1.5至1:3。

[0095] 本文中的高分子量褐藻糖胶可具有的总岩藻糖和半乳糖:总硫酸酯的摩尔比为约1:0.5至1:4、约1:0.8至1:3.5、约1:1至1:2.5、约1:1.2至1:2.0、或约1:1.5至1:3。

[0096] 本文中的高分子量褐藻糖胶可具有的总碳水化合物含量为27%w/w至80%w/w、约30%w/w至70%w/w、约40%w/w至90%w/w、或约50%w/w至96%w/w。

[0097] 本文中的高分子量褐藻糖胶可具有的岩藻糖含量占总碳水化合物的百分比为约30%w/w至100%w/w、约40%w/w至95%w/w、约50%w/w至90%w/w、约80%w/w至100%w/w、或约90%w/w至100%w/w。

[0098] 本文中的高分子量褐藻糖胶可具有的半乳糖含量占总碳水化合物的百分比为约0%w/w至60%w/w、约3%w/w至30%w/w、约2%w/w至20%w/w、或约5%w/w至10%w/w。

[0099] 本文的高分子量褐藻糖胶可具有的葡糖醛酸含量占总碳水化合物含量的百分比为约0%w/w至10%w/w,甘露糖含量占总碳水化合物含量的百分比为约0%w/w至7%w/w,鼠李糖含量占总碳水化合物含量的百分比为0%w/w至4%w/w,并且木糖含量占总碳水化合物含量的百分比为0%w/w至20%w/w。本文的高分子量褐藻糖胶可具有的葡糖醛酸、甘露糖、鼠李糖、葡萄糖和木糖的总含量占总碳水化合物含量的百分比低于约30%w/w或低于约12%w/w。

[0100] 在一些实施方式中,当以50mg/mL浓度溶解于水中时,本文的高分子量褐藻糖胶具有以下粘度:约4cP至约50cP、约5cP至约40cP、约10cP至约30cP、约15cP、约20cP及约25cP。在某些实施方式中,当以1mg/mL至100mg/mL溶解于水中时,本文的高分子量褐藻糖胶形成一种澄清且无色、澄清且淡黄色、或澄清且浅棕色的溶液。

[0101] 在某些实施方式中,本文的高分子量褐藻糖胶可具有小于约5%w/w、小于约2%w/w和约0%w/w的乙酰基含量。在一些实施方式中,当在70°C下伴随溶剂信号抑制在配备有5-mm冷探针的600MHz光谱仪上在碳尺寸10-30ppm范围内以256-512的8次增量扫描每次通过2D ^1H - ^{13}C 异核多量子相干测量时,本文的高分子量褐藻糖胶包含的乙酰基含量基本为0%w/w。

[0102] 方法

[0103] 提出了用于从起始褐藻糖胶组合物(例如原料褐藻糖胶组合物)获得高分子量褐藻糖胶的方法、系统等,其具有宽分子量分布(宽分子量分布起始褐藻糖胶),其涵盖并延伸超过所需高分子量区段,所需高分子量区段是宽分子量分布的一部分,其中,在低分子量末端处的宽分子量分布的量已被消除、抑制或减弱。这些方法中的至少一种可用于制备高分子量褐藻糖胶,例如,其分子量分布的约60%、70%、80%、90%或95%w/w高于100kDa。在一些实施方式中,本公开提出了适用于医疗和外科手术应用(例如,预防外科手术粘连)的高

分子量褐藻糖胶。

[0104] 切向流过滤

[0105] 本文所论述的方法中的一些利用切向流过滤(TFF)。与切向流过滤(TFF)过滤器的典型识别一致,给定TFF过滤器的标称截留分子量(MWCO)值将在其截留物侧上选择性地保留包含未穿过过滤器屏障的分子的溶液,且因此通常具有大于穿过/渗透屏障至渗透物侧的分子的分子量的分子量和/或大小。因此,TFF过滤器的截留分子量值典型地对于任何给定聚合物或标称截留值并不绝对:给定TFF过滤器将通过或保留高于及低于标称截留分子量两者的一些分子。用于具体聚合物的标称TFF过滤器的实际截留/选择性值及影响可针对具体聚合物来常规地决定。

[0106] 大量因素可影响TFF过滤器的渗透行为。这些因素可取决于TFF过滤器自身或取决于目标聚合物的属性,例如目标聚合物的折叠行为及折叠结构可影响目标聚合物在穿过/不穿过TFF过滤器的MWCO屏障中的行为。如已知的,关于TFF过滤器自身,大量因素可影响TFF过滤器的渗透行为。例如,制造方法可导致特定TFF过滤器内的各种孔大小,其变体可包括大于及小于标称MWCO的两种孔。因此,具有标称截留分子量值的TFF过滤器将基本上通过/保留处于标称截留分子量值的分子,但还可通过/保留低于和/或高于这样的值的一些分子。

[0107] 凝胶渗透色谱法

[0108] 凝胶渗透色谱法用于评估实验实施例获得的分子量分布。存在大量可用于凝胶渗透色谱法的不同参数、色谱柱及标准物,引起多种仪器装置可用于分子量的分析。对于本文的分子量测定,使用以下参数进行GPC:流动相为以0.6mL/min运行的0.1M硝酸钠。柱室及检测器处于30℃。Waters 2414折射率检测器用于检测。

[0109] 合适的GPC柱包括与水性溶剂兼容的GPC柱,例如装填有以下中的至少一种的色谱柱:磺化苯乙烯-二乙烯基苯、NH官能化的丙烯酸酯共聚物网络、修饰的二氧化硅及羟基化聚甲基丙烯酸酯基凝胶。对于本文的分析,串联使用三个色谱柱,包括具有6mm内径(ID)的一个40mm长的保护柱,装填有6 μ m粒度的羟基化聚甲基丙烯酸酯基凝胶;接着是具有7.8mm ID的第一300mm分析型GPC柱,装填有12 μ m粒度的羟基化聚甲基丙烯酸酯基凝胶,其具有约7,000kDa的排阻极限以及约50kDa至约5,000kDa的有效分子量范围;接着是具有7.8mm ID的第二300mm分析型GPC柱,装填有10 μ m粒度的羟基化聚甲基丙烯酸酯基凝胶,其具有约7,000kDa的排阻极限以及约1kDa至约6,000kDa的有效分子量范围。色谱柱装置的总有效分子量范围为约1kDa至约6,000kDa。此色谱柱装置的实例可为串联连接的 **Ultrahydrogel[®]** 保护柱-**Ultrahydrogel[®]** 2000-**Ultrahydrogel[®]** 线性柱。

[0110] 相对于包括来自American Polymer Standards Corporation的可追踪标准物的标准曲线来量化样品运行:DXT3755K(峰分子量=2164kDa)、DXT820K(峰分子量=745kDa)、DXT760K(峰分子量=621kDa)、DXT670K(峰分子量=401kDa)、DXT530K(峰分子量=490kDa)、DXT500K(峰分子量=390kDa)、DXT270K(峰分子量=196kDa)、DXT225K(峰分子量=213kDa)、DXT150K(峰分子量=124kDa)、DXT55K(峰分子量=50kDa)、DXT50K(峰分子量=44kDa)和DXT5K(峰分子量=4kDa),这些标准物的峰分子量为约4kDa至约2,200kDa。所使用标准曲线可例如包括Dextran 3755kDa,Dextran 50kDa及Dextran 55kDa中的至少一种及

在3至6个之间的本文所论述的附加可追踪标准物,校正点为所使用校正物的峰分子量。示例性校正曲线可由以下组成:DXT3755K、DXT820K、DXT530K、DXT500K、DXT225K及DXT55K。本文中所使用的色谱柱具有涵盖且延伸超出用于褐藻糖胶的量化的标准物的峰分子量范围的总有效分子量范围。

[0111] 规定用于本文的褐藻糖胶/岩藻多糖聚合物的分子量为这样的分子量值,在该分子量值附近将始终存在较高及较低分子量的分子分布,随着分子量远离指定分子量增大或减小而在数量或百分比上增大或减小。分布可以(但并非必需)具有通常的高斯或失真(distorted)高斯形状。

[0112] 本文的表格中的结果包含用于分子量分布的某些特征的缩写。凝胶渗透色谱法由GPC表示,峰截留时间由PRT表示,峰分子量由PMW表示,重均分子量由WAMW表示,数均分子量由NAMW表示,分布百分比由%分布(%dist.)表示,分子量由MW表示,多分散性指数由PDI表示,并且截留分子量由MWC0表示。

[0113] 以下段落转向对可用于产生本文中的高分子量褐藻糖胶的一些方法学的简要一般性讨论。

[0114] 顺序切向流过滤分段

[0115] 可以通过顺序TFF分段方法从宽分子量分布起始褐藻糖胶组合物获得高分子量褐藻糖胶。所述方法可以包括:提供包含所需分子量区段(例如高分子量区段)的起始褐藻糖胶组合物,该起始褐藻糖胶组合物具有起始宽分子量分布;使起始褐藻糖胶组合物通过第一较高MWC0切向流过滤过滤器进行切向流过滤,该过滤器具有在起始分子量分布内的平均截留分子量;从第一TFF过滤器中收集第一渗透褐藻糖胶组合物,其与起始褐藻糖胶组合物相比包含降低比例的高分子量褐藻糖胶;使第一渗透褐藻糖胶组合物通过第二较低MWC0切向流过滤过滤器进行切向流过滤,该过滤器具有比第一TFF过滤器低的在起始分子量分布内的平均截留分子量;以及从第二TFF过滤器中收集在渗余褐藻糖胶组合物中具有所需分子量区段的褐藻糖胶。

[0116] 所述方法可以根据需要包括其他步骤,例如通过能够过滤掉大于所需尺寸的颗粒或部分或其他不需要的材料的预过滤器来预过滤起始褐藻糖胶组合物。使起始褐藻糖胶组合物通过第一TFF过滤器可包括:在将压力施加至起始褐藻糖胶组合物的同时,使起始褐藻糖胶组合物通过TFF过滤器。使第一TFF过滤器的渗透褐藻糖胶组合物通过第二TFF过滤器可以包括:在将压力施加至第一TFF过滤器的渗透褐藻糖胶组合物的同时,使第一TFF过滤器的渗透褐藻糖胶组合物通过第二TFF过滤器。

[0117] 使起始褐藻糖胶组合物通过第一TFF过滤器可包括:使第一TFF过滤器的渗余褐藻糖胶组合物在第一TFF过滤器上再循环。使第一TFF过滤器的渗余褐藻糖胶组合物在第一TFF过滤器上再循环可以包括:在第一TFF过滤器上对渗余褐藻糖胶组合物进行渗滤。使第一TFF过滤器的渗余褐藻糖胶组合物在第一TFF过滤器上再循环可以包括:确定第一TFF过滤器的渗透褐藻糖胶组合物的重均分子量。使第一TFF过滤器的渗余褐藻糖胶组合物在第一TFF过滤器上再循环可以包括:使第一TFF过滤器的渗余褐藻糖胶组合物在第一TFF过滤器上再循环,直到第一TFF过滤器的渗透褐藻糖胶组合物中的褐藻糖胶的重均分子量具有预定的期望值。

[0118] 使来自第一TFF过滤器的渗透褐藻糖胶组合物通过第二TFF过滤器可包括:使渗透

褐藻糖胶组合在第二TFF过滤器上再循环。使渗透褐藻糖胶组合在第二TFF过滤器上再循环可以包括：在第二TFF过滤器上对渗透褐藻糖胶组合进行渗滤。使渗透褐藻糖胶组合在第二TFF过滤器上再循环可以包括：确定第二TFF过滤器的渗余褐藻糖胶组合物的重均分子量。使渗透褐藻糖胶组合在第二TFF过滤器上再循环可以包括：使褐藻糖胶在第二TFF过滤器上再循环，直到第二TFF过滤器的渗余褐藻糖胶组合物的重均分子量具有预定的期望值。

[0119] 图1示意性地示出了示例性的基于分子量的分段系统(较高至较低)100,其包括两个不同的(较高和较低的)截留分子量(MWC0) TFF过滤器,其在所示的实施方式中被提供为较高截留分子量TFF过滤器110和较低截留分子量TFF过滤器120;TFF过滤器可以任何可接受的形式提供,当前示例使用盒件。较高截留分子量TFF过滤器110的MWC0大于较低截留分子量TFF过滤器120的MWC0。举例来说,较高截留分子量TFF过滤器110的MWC0可以为30千道尔顿(kDa)、50kDa、70kDa、100kDa、300kDa和1000kDa,而较低截留分子量TFF过滤器120的MWC0可以为,例如5kDa、10kDa、30kDa、50kDa和100kDa。举例来说,选择较高截留分子量TFF过滤器和较低截留分子量TFF过滤器的组合,可以使用基于分子量的分段系统(较高至较低)100来获得截留分子量TFF过滤器之间的分子量区段:5-30kDa、10-30kDa、5-50kDa、10-50kDa、30-50kDa、10-70kDa、30-70kDa、50-70kDa、5-100kDa、10-100kDa、30-100kDa、50-100kDa、70-100kDa、5-300kDa、10-300kDa、30-300kDa、50-300kDa、70-300kDa和100-300kDa。在一些实施方式中,分子量区段可以是高分子量区段。

[0120] 起始褐藻糖胶组合作为溶液经由输入供应管线102供应至较高MWC0子系统褐藻糖胶容器116。起始褐藻糖胶可以以以下浓度存在于合适的溶剂中:0.1%w/v至30%w/v的浓度,例如1%w/v至10%w/v,例如5%w/v。可以通过预过滤器104对在合适溶剂中的起始褐藻糖胶进行预过滤以去除不希望有的颗粒物质。含有起始褐藻糖胶组合物的溶液可根据需要包含其他非褐藻糖胶组分,例如所需的缓冲剂、稀释剂等,例如用于褐藻糖胶的其他褐藻糖胶处理步骤或下游用途。预过滤器的规格(有效孔径)通常大于要通过基于分子量的分段系统(较高至较低)100分离的最大聚合物分子。

[0121] 较高MWC0子系统泵114通过较高MWC0 TFF过滤器供应管线112将包含起始褐藻糖胶组合物的溶液泵送到较高MWC0 TFF子系统130的较高截留分子量TFF过滤器110。通常以盒件形式提供较高截留分子量TFF过滤器110,该盒件被设计为允许输入流体通过其截留侧的过滤器。截留分子量过滤器的形式可以是但不限于:板框系统;螺旋盘绕药筒系统;中空纤维系统;流通池系统;和离心过滤系统。渗透物通过较高MWC0子系统渗透物输出管线119离开,并且经处理的输入流体(即截留流体)通过较高MWC0子系统截留物返回管线118离开。较高MWC0子系统泵114在其截留侧和渗透侧之间在较高截留分子量TFF过滤器110上提供一定的压力水平。在图1中,来自较高截留分子量TFF过滤器110的截留流体通过较高MWC0子系统截留物返回管线118返回到较高MWC0子系统褐藻糖胶容器116,而通过较高MWC0子系统渗透物输出管线119产生渗透流体以在较高MWC0 TFF子系统130外部使用。虽然较高MWC0子系统泵114在较高截留分子量TFF过滤器110上再循环预过滤的褐藻糖胶和截留物,但溶剂可以从较高MWC0子系统溶剂容器117经由较高MWC0子系统溶剂供应管线115供应,例如以补充通过渗透物损失的溶剂和/或确保预定透析体积(diavolumes)量的输入起始褐藻糖胶和溶剂在较高截留分子量TFF过滤器110上循环。

[0122] 在以上处理期间,较高至较低MWC0子系统间阀113可以被切断(关闭),并且来自较高MWC0 TFF子系统130的较高截留分子量TFF过滤器110的渗透流体可以被收集到容器(未示出)中用于储存或其他用途,然后再供应给较低MWC0 TFF子系统140的较低MWC0子系统褐藻糖胶容器126。可以根据需要通过较高MWC0 TFF子系统130将起始褐藻糖胶组合物循环多次。

[0123] 然后,可以将来自较高MWC0 TFF子系统130的收集的渗透物通过较高MWC0子系统渗透物输出管线119供应到较低MWC0 TFF子系统140的较低MWC0子系统褐藻糖胶容器126中。在其他实施方式中,收集的渗透物可以在容器(未示出)中被转移到较低MWC0子系统褐藻糖胶容器126。在系统的其他实施方式中,较高至较低MWC0子系统间阀113可保持打开,并且较高截留分子量TFF过滤器110的渗透物可通过较高MWC0子系统渗透物输出管线119被连续地供应给较低MWC0子系统褐藻糖胶容器126。与起始褐藻糖胶组合物中较高分子量的分布相比,较高截留分子量TFF过滤器110的渗透物中较高分子量的分子的分布被减弱或抑制。

[0124] 供应到较低MWC0 TFF子系统140的渗透物以与以上针对较高截留分子量TFF过滤器110所讨论的类似的方式在较低截留分子量TFF过滤器120上过滤。也就是说,在将来自较高MWC0 TFF子系统130的渗透物供应至较低MWC0子系统褐藻糖胶容器126之后,较低MWC0子系统泵124将其通过较低MWC0 TFF过滤器供应管线122泵送到较低MWC0 TFF子系统140的较低截留分子量TFF过滤器120。较低MWC0子系统泵124在其截留侧和渗透侧之间在较低截留分子量TFF过滤器120上维持一定的压力水平。在图1中,较低截留分子量TFF过滤器120的截留物通过较低MWC0子系统截留物返回管线128返回到较低MWC0子系统褐藻糖胶容器126,同时通过较低MWC0子系统渗透物输出管线129产生渗透物以用于在较低MWC0 TFF子系统140之外进一步使用或丢弃。如果较低MWC0子系统泵124使来自较高截留分子量TFF过滤器110的渗透物和来自较低截留分子量TFF过滤器120的截留物再循环,以再次通过较低截留分子量TFF过滤器120(利用较高截留分子量过滤过滤器,可以根据需要多次重复这种再循环),则可以从较低MWC0子系统溶剂容器127通过较低MWC0子系统溶剂供应管线125和较低MWC0子系统褐藻糖胶容器126供应溶剂,以补充通过较低MWC0子系统渗透物输出管线129损失的溶剂和/或确保较低截留分子量TFF过滤器120的预定透析体积量的截留物和溶剂在较低截留分子量TFF过滤器120上循环。

[0125] 在较低MWC0 TFF子系统140的切向流过滤操作期间,较低MWC0子系统截留物管线阀106可以关闭。当从较高MWC0 TFF子系统130供应至较低MWC0 TFF子系统140的渗透物已过滤至所需程度时,较低MWC0子系统截留物管线阀106被打开,并且较低截留分子量TFF过滤器120的截留物通过较低MWC0子系统截留物输出管线108供应。这从起始褐藻糖胶组合物(例如高分子量褐藻糖胶)提供具有所需分子量区段的褐藻糖胶。

[0126] 输出褐藻糖胶具有所需分子量区段,其分子量分布通常主要在较高截留分子量TFF过滤器110的平均截留分子量与较低截留分子量TFF过滤器120的平均截留分子量的之间。但是,考虑到起始褐藻糖胶分子量分布的宽度和复杂性以及聚合物行为和TFF过滤器的可变性,输出聚合物分子量分布可能不会在这两个TFF过滤器的平均截留分子量之间达到峰值。例如,褐藻糖胶的过高或过低的折叠会导致在所需分子量区段中选择适当大小但异常稠密(或否)的褐藻糖胶。因此,就本文所述的顺序TFF之后存在的褐藻糖胶而言,输出所

需分子量区段基本上由衍生自原始起始褐藻糖胶组合物的所需分子量区段组成,其被供应至基于分子量的分离系统(较高至较低)100。

[0127] 进一步的实施方式可包括:提供包含所需分子量区段(例如高分子量区段)的起始褐藻糖胶组合物,所述起始褐藻糖胶组合物具有起始分子量分布;使所述起始褐藻糖胶组合物通过第一切向流过滤过滤器进行切向流过滤,该过滤器具有在起始分子量分布内的平均截留分子量;从第一TFF过滤器中收集第一渗余褐藻糖胶组合物,与起始褐藻糖胶组合物相比,该组合物包含降低比例的低分子量褐藻糖胶;使第一渗余褐藻糖胶组合物通过第二切向流过滤过滤器进行切向流过滤,该过滤器具有比第一TFF过滤器高的在起始分子量分布内的平均截留分子量;以及从第二TFF过滤器收集在渗透褐藻糖胶组合物中具有所需分子量区段的褐藻糖胶。

[0128] 该方法可以进一步包括:通过能够过滤出大于期望尺寸的部分的预过滤器来预过滤起始褐藻糖胶组合物。使起始褐藻糖胶组合物通过第一TFF过滤器可以包括:在将压力施加至起始褐藻糖胶组合物的同时,使起始褐藻糖胶组合物通过第一TFF过滤器。使第一MCWO过滤器的渗余褐藻糖胶组合物通过第二TFF过滤器可以包括:在第二TFF过滤器中向第一TFF过滤器的渗余褐藻糖胶组合物施加压力的同时,使第一TFF过滤器的渗余褐藻糖胶组合物通过第二TFF过滤器。

[0129] 使起始褐藻糖胶组合物通过第一TFF过滤器可包括:使第一TFF过滤器的渗余褐藻糖胶组合物在第一TFF过滤器上再循环。使第一TFF过滤器的渗余褐藻糖胶组合物在第一TFF过滤器上再循环可以包括:在第一TFF过滤器上对渗余褐藻糖胶组合物进行渗滤。在第一TFF过滤器上再循环第一TFF过滤器的渗余褐藻糖胶组合物可以包括:确定第一TFF过滤器的渗余褐藻糖胶组合物的重均分子量。在第一TFF过滤器上再循环第一TFF过滤器的渗余褐藻糖胶组合物可以包括:在第一TFF过滤器上再循环第一TFF过滤器的渗余褐藻糖胶组合物,直到第一TFF过滤器的渗余褐藻糖胶组合物中的褐藻糖胶的重均分子量具有预定的期望值。

[0130] 使来自第一TFF过滤器的渗余褐藻糖胶组合物通过第二TFF过滤器,可以包括:使渗余褐藻糖胶组合物在第二TFF过滤器上再循环。在第二TFF过滤器上再循环渗余褐藻糖胶组合物可以包括:在第二TFF过滤器上对渗余褐藻糖胶组合物进行渗滤。在第二TFF过滤器上再循环渗余褐藻糖胶组合物可以包括:确定第二TFF过滤器的渗透褐藻糖胶组合物的重均分子量。在第二TFF过滤器上再循环渗余褐藻糖胶组合物可以包括:在第二TFF过滤器上再循环渗余褐藻糖胶组合物,直到第二TFF过滤器的渗透褐藻糖胶组合物的渗透褐藻糖胶的重均分子量具有预定的期望值。

[0131] 图2示出了本文的方法、系统等的另一实施方式。在图2中,图1的子系统130和140的处理顺序相反,以形成基于分子量的分段系统(较高至较低)100'。如在图1中讨论的方法中,起始褐藻糖胶通过输入供应管线102进入系统,并被预过滤器104预过滤。然而,与上文图1的方法相反,首先在较低MWC0 TFF子系统140中处理预过滤的起始褐藻糖胶,然后在较高MWC0 TFF子系统130中对其进行处理。在较低MWC0 TFF子系统140中,起始褐藻糖胶组合物通过较低截留分子量TFF过滤器120,其是具有较低平均MWC0值的TFF过滤器。在该实施方式中,是较低截留分子量TFF过滤器120的截留物而不是渗透物离开较低MWC0子系统截留物输出管线121上的较低MWC0 TFF子系统140。这种截留物通过较低至较高MWC0子系统间阀

123离开,其将被供应到较高MWC0 TFF子系统130的较高MWC0子系统褐藻糖胶容器116。截留物然后由较高MWC0子系统泵114经由较高MWC0 TFF过滤器供应管线112泵送通过较高截留分子量TFF过滤器110,其是较高MWC0的TFF过滤器。

[0132] 在较低MWC0 TFF子系统140中,较低MWC0子系统泵124通过较低MWC0 TFF过滤器供应管线122将渗透物从较低MWC0子系统褐藻糖胶容器126泵送到较低截留分子量TFF过滤器120。在图2中,较低截留分子量TFF过滤器120的截留物通过较低MWC0子系统截留物返回管线128返回到较低MWC0子系统褐藻糖胶容器126,而渗透物通过较低MWC0子系统渗透物输出管线129产生,以用于在较低MWC0 TFF子系统140外部进一步使用或丢弃。如果截留物再次循环通过较低截留分子量TFF过滤器120,则可以通过较低MWC0子系统溶剂供应管线125和较低MWC0子系统褐藻糖胶容器126从较低MWC0子系统溶剂容器127供应溶剂,以补充通过较低MWC0子系统渗透物输出管线129损失的溶剂和/或确保较低截留分子量TFF过滤器120的预定透析体积量的截留物和溶剂在较低截留分子量TFF过滤器120上循环。

[0133] 在上述处理期间,可以关闭较高至较低MWC0子系统间阀123,并且可以将较低MWC0 TFF子系统140的较低截留分子量TFF过滤器120的截留物收集到容器(未示出)中,然后供应给较高MWC0 TFF子系统130的较高MWC0子系统褐藻糖胶容器116。将收集的截留物通过物理较低MWC0子系统截留物输出管线121供应至较高MWC0 TFF子系统130的较高MWC0子系统褐藻糖胶容器116。在其他实施方式中,收集的截留物可以在容器(未示出)中转移到较高MWC0子系统褐藻糖胶容器116。在又一些实施方式中,较低至较高MWC0子系统间阀123可以保持打开,并且较低截留分子量TFF过滤器120的截留物通过较低MWC0子系统截留物输出管线121连续地供应到较高MWC0子系统褐藻糖胶容器116。与起始褐藻糖胶中的较低分子量的分布相比,来自较低截留分子量TFF过滤器120的截留物中的较低分子量的分布被减弱或抑制。

[0134] 当较高MWC0 TFF子系统130处理来自较低MWC0 TFF子系统140的较低截留分子量TFF过滤器120的截留物时,较高截留分子量TFF过滤器110的渗透物在较高MWC0子系统渗透物输出管线119上产生。当较高MWC0子系统泵114在较高截留分子量TFF过滤器110上循环较低MWC0 TFF子系统140的渗余褐藻糖胶时,可以通过较高MWC0子系统溶剂供应管线115从较高MWC0子系统溶剂容器117供应溶剂,以补充经由渗透物损失的溶剂和/或确保较低MWC0 TFF子系统140的预定透析体积量的渗余褐藻糖胶和溶剂在较高截留分子量TFF过滤器110上循环。

[0135] 在图2中,来自较高截留分子量TFF过滤器110的截留流体通过较高MWC0子系统截留物返回管线118返回至较高MWC0子系统褐藻糖胶容器116,而渗透流体则通过较高MWC0子系统渗透物输出管线119产生以用于在较高MWC0 TFF子系统130的外部使用。在图2中,通过较高MWC0子系统渗透物输出管线119产生的具有所需分子量区段的输出褐藻糖胶,其分子量分布主要在第一较高截留分子量TFF过滤器110的平均截留分子量与第二较低截留分子量TFF过滤器120的平均截留分子量之间。但是,考虑到起始褐藻糖胶分子量分布的宽度和复杂性以及聚合物行为和TFF过滤器的可变性,输出聚合物分子量分布可能不会在这两个TFF过滤器的平均截留分子量之间达到峰值。例如,褐藻糖胶的过高或过低的折叠会导致在所需分子量区段中选择适当大小但异常稠密(或否)的褐藻糖胶。因此,就本文所述的连续TFF之后存在的褐藻糖胶而言,输出褐藻糖胶基本上由衍生自原始起始褐藻糖胶组合物的

褐藻糖胶的所需分子量区段组成,其被供应至基于分子量的分段系统(较低至较高)100'。具有所需分子量区段的该输出褐藻糖胶也可以从由预过滤器104进行预过滤之后产生的经预过滤的起始褐藻糖胶组合物中获得,然后供应给较低MWCOTFF子系统140。

[0136] 阳离子增强的切向流过滤

[0137] 可以通过阳离子增强的TFF从宽分子量分布起始褐藻糖胶获得高分子量褐藻糖胶,所述方法包括:提供起始褐藻糖胶组合物,其具有低分子量阳离子和分子量分布,所述分子量分布包括所需高分子量区段;用具有比低原子量阳离子更大分子量的阳离子的阳离子添加剂对起始褐藻糖胶组合物进行阳离子处理,以用添加剂阳离子代替低原子量阳离子;使经阳离子处理的褐藻糖胶组合物通过第一切向流过滤过滤器进行切向流过滤,该过滤器具有基于所需高分子量褐藻糖胶区段的分子量分布的平均截留分子量,以产生第一渗余褐藻糖胶组合物;使第一渗余褐藻糖胶组合物通过第二较低MWCOTFF切向流过滤过滤器进行切向流过滤,该过滤器具有基于阳离子添加剂的分子量分布的平均截留分子量,以产生第二渗余褐藻糖胶组合物;用盐溶液使第二渗余褐藻糖胶组合物渗滤以产生第三渗余褐藻糖胶组合物;用低电导率渗滤溶液使所述第三褐藻糖胶截留组合物在相同的第二切向流过滤器中进行渗滤,以产生第四渗余褐藻糖胶组合物;以及收集包含所需高分子量褐藻糖胶的第四截留溶液。

[0138] 所述方法可以根据需要包括其他步骤,例如通过能够滤出大于所需尺寸的颗粒或部分的预过滤器或其他不需要的材料对起始褐藻糖胶组合物进行预过滤。使起始褐藻糖胶组合物通过第一TFF过滤器可包括:在将压力施加至起始褐藻糖胶组合物的同时,使起始褐藻糖胶组合物通过TFF过滤器。使第一TFF过滤器的渗余褐藻糖胶组合物通过第二TFF过滤器可以包括:在向第一TFF过滤器的渗余褐藻糖胶组合物施加压力的同时,使第一TFF过滤器的渗余褐藻糖胶组合物通过第二TFF过滤器。

[0139] 可以使第一渗余褐藻糖胶组合物通过第二切向流过滤器进行切向流过滤并用盐溶液处理第二渗余褐藻糖胶组合物。用盐处理第二渗余褐藻糖胶组合物可以包括:用碱金属、碱土金属、铝和/或铵的氯化物、溴化物、碘化物、氟化物、硫酸盐、亚硫酸盐、碳酸盐、碳酸氢盐、磷酸盐、硝酸盐、亚硝酸盐、乙酸盐、柠檬酸盐、硅酸盐和/或氰化物处理第二渗余褐藻糖胶组合物。用钠盐处理第一渗余褐藻糖胶组合物可以包括:用氯化钠处理第一渗余褐藻糖胶组合物。

[0140] 用阳离子添加剂对起始褐藻糖胶组合物进行阳离子处理可包括:用阳离子添加剂处理起始褐藻糖胶,所述阳离子添加剂的分子量大于起始褐藻糖胶内的低原子量阳离子。阳离子添加剂可以是聚阳离子添加剂。用阳离子添加剂处理起始褐藻糖胶组合物的阳离子可包括:用两性离子添加剂处理起始褐藻糖胶,该两性离子的分子量大于起始褐藻糖胶内的低原子量阳离子的分子量。

[0141] 使经阳离子处理的褐藻糖胶组合物通过第一切向流过滤器进行切向流过滤可以包括:使经阳离子处理的褐藻糖胶组合物在第一TFF过滤器上再循环。在第一TFF过滤器上再循环经阳离子处理的褐藻糖胶组合物可以包括:用阳离子添加剂的溶液在第一TFF过滤器上对经阳离子处理的褐藻糖胶组合物进行渗滤。在第一TFF过滤器上再循环经阳离子处理的褐藻糖胶组合物可以包括:确定经阳离子处理的褐藻糖胶组合物中的褐藻糖胶的重均分子量。在第一TFF过滤器上再循环经阳离子处理的褐藻糖胶组合物可以包括:在第一TFF

过滤器上再循环经阳离子处理的褐藻糖胶组合物,直到经阳离子处理的褐藻糖胶组合物中的经阳离子处理的褐藻糖胶的重均分子量具有预定的期望值,从而产生第一渗余褐藻糖胶组合物。

[0142] 使第一渗余褐藻糖胶组合物通过第二较低MWC0切向流过滤过滤器进行切向流过滤可包括:使第一渗余褐藻糖胶组合物在第二TFF过滤器上再循环。在第二TFF过滤器上再循环第一渗余褐藻糖胶组合物可以包括:用盐溶液渗滤第二TFF过滤器的第一渗余褐藻糖胶组合物。在第二TFF过滤器上再循环第一渗余褐藻糖胶组合物可以包括:确定第一渗余褐藻糖胶组合物中褐藻糖胶的重均分子量。在第二TFF过滤器上再循环第一渗余褐藻糖胶组合物可以包括:在第二TFF过滤器上再循环第一渗余褐藻糖胶组合物,直到来自第一渗余褐藻糖胶组合物的褐藻糖胶的重均分子量具有预定的期望值,从而产生第二渗余褐藻糖胶组合物。

[0143] 用盐溶液对第二渗余褐藻糖胶组合物进行渗滤可包括:使第二渗余褐藻糖胶组合物在第二TFF过滤器上再循环。在第二TFF过滤器上再循环第二渗余褐藻糖胶组合物可以包括:用盐溶液渗滤第一TFF过滤器的第二渗余褐藻糖胶组合物,所述盐溶液包括碱金属、碱土金属、铝和铵的氯化物、溴化物、碘化物、氟化物、硫酸盐、亚硫酸盐、碳酸盐、碳酸氢盐、磷酸盐和硝酸盐中的至少一种,例如氯化钠。使第三渗余褐藻糖胶组合物通过第二MWC0切向流过滤过滤器进行切向流过滤可包括:使第三渗余褐藻糖胶组合物在第二TFF过滤器上再循环。在第二TFF过滤器上再循环第三渗余褐藻糖胶组合物可以包括:用低电导率溶液渗滤第二TFF过滤器的第三渗余褐藻糖胶组合物。低电导率溶液可以是去离子水。

[0144] 用阳离子添加剂对起始褐藻糖胶组合物进行阳离子处理可包括:用胆碱、聚乙烯吡咯烷酮、牛磺酸、多胺、壳聚糖、组蛋白和胶原中的至少一种处理输入褐藻糖胶。

[0145] 图3示出了用于基于分子量分离褐藻糖胶的阳离子增强的TFF系统(CATS) 100”的示意图。CATS 100”采用了许多已经在图1和图2的前面讨论过的要素。将包含起始褐藻糖胶组合物的溶液通过输入供应管线102供应至较高MWC0子系统褐藻糖胶容器116。可以通过预过滤器104将合适溶剂中的起始褐藻糖胶组合物进行预过滤,以去除不希望有的颗粒物质。含有起始褐藻糖胶组合物的溶液可根据需要包含其他非褐藻糖胶组分,例如所需的缓冲剂、稀释剂等,例如用于褐藻糖胶的其他褐藻糖胶处理步骤或下游用途。预过滤器的规格通常大于要通过CATS 100”分离的最大聚合物分子。

[0146] 可以将阳离子添加剂,例如胆碱、聚乙烯吡咯烷酮、聚苯胺,添加到较高MWC0子系统褐藻糖胶容器116中的预过滤的起始褐藻糖胶组合物中。较高MWC0子系统泵114通过较高MWC0 TFF过滤器供应管线112将褐藻糖胶泵至较高MWC0 TFF子系统130’的较高MWC0 TFF过滤器150。较高MWC0 TFF过滤器150通常作为盒体供应,其被设计为允许供应给它的输入流体通过其截留侧的过滤器,同时允许渗透物通过一个输出管线排出,并且经处理的输入流体通过另一个输出管线作为截留物离开。截留分子量过滤器的形式可以是但不限于板框系统;螺旋盘绕药筒系统;中空纤维系统;流通池系统;和离心过滤系统。对于该实施方式,选择较高MWC0 TFF过滤器150的截留分子量以分离通过用阳离子添加剂处理预过滤的起始褐藻糖胶而获得的经阳离子处理的褐藻糖胶的高分子量末端的所需部分。

[0147] 较高MWC0子系统泵114在其截留侧和渗透侧之间提供较高MWC0 TFF过滤器150上的压力水平。在图3中,较高MWC0 TFF过滤器150的截留物通过较高MWC0子系统截留物返回

管线118返回到较高MWC0子系统褐藻糖胶容器116,而渗透物通过较高MWC0子系统渗透物输出管线119产生,以在较高MWC0 TFF子系统130'之外使用或被丢弃。当较高MWC0子系统泵114在较高MWC0 TFF过滤器150上再循环预过滤的起始褐藻糖胶组合物和截留物时,可通过阳离子添加剂冲洗溶液供应管线135供应来自阳离子添加剂冲洗溶液容器137的阳离子添加剂冲洗溶液,例如以补充经由较高MWC0子系统渗透物输出管线119损失的溶剂和/或确保在较高MWC0 TFF过滤器150上循环预定透析体积量的输入起始褐藻糖胶和阳离子添加剂冲洗溶液。通过控制阳离子添加剂冲洗溶液阀136,可以在脉冲过程中添加阳离子添加剂冲洗溶液。在其他实施方式中,阳离子添加剂冲洗溶液可以以连续模式添加。在其他实施方式中,阳离子添加剂冲洗溶液可以一次全部添加。如果已经选择胆碱作为输入起始褐藻糖胶的阳离子添加剂,则所用的阳离子添加剂冲洗溶液是胆碱溶液,例如氯化胆碱溶液。可以预先确定要在较高MWC0 TFF过滤器150上处理的截留物和胆碱冲洗溶液的透析体积量,四透析体积通常是有用的。

[0148] 较高至较低MWC0子系统间阀113可在以上处理期间切断(关闭),并且将较高MWC0 TFF子系统130'的较高MWC0 TFF过滤器150的截留物收集到容器(未示出)中,然后供应至较低MWC0 TFF子系统140'的较低MWC0子系统褐藻糖胶容器126。然后可以通过较高MWC0子系统截留物输出管线111将收集的截留物供应至较低MWC0 TFF子系统140'的较低MWC0子系统褐藻糖胶容器116。在其他实施方式中,可以将收集的截留物在容器(未示出)中转移至较低MWC0子系统褐藻糖胶容器126。在该系统的其他实施方式中,较高至较低MWC0子系统间阀113可以保持打开,并且较高MWC0 TFF过滤器150的截留物可以通过较高MWC0子系统截留物输出管线111连续地供应给较低MWC0子系统褐藻糖胶容器126。与起始褐藻糖胶组合物中较低分子量的分布相比,较高MWC0 TFF过滤器150的截留物中较低分子量的分布被减弱或抑制。

[0149] 较低MWC0 TFF子系统140'从经阳离子处理的褐藻糖胶中去除胆碱阳离子,并将钠阳离子恢复到褐藻糖胶中,从而使经阳离子处理的褐藻糖胶返回至大约其原始离子组分,但是具有不同的所需高分子重量分布。在较低MWC0 TFF子系统140'处理褐藻糖胶溶液期间,可以关闭较低MWC0子系统输出阀106',其从较低MWC0子系统褐藻糖胶容器126控制较低MWC0子系统截留物输出管线108。当较低MWC0 TFF子系统140'处理来自较高MWC0 TFF子系统130'的较高MWC0 TFF过滤器150的截留物时,较低MWC0 TFF过滤器160的渗透物在较低MWC0子系统渗透物输出管线129上产生,通过该管线在其他地方使用或丢弃。

[0150] 当较低MWC0子系统泵114在较低MWC0 TFF过滤器160上循环较低MWC0 TFF子系统140'的截留物时,可以通过适当地控制钠盐溶液控制阀144通过钠盐溶液供应管线146从钠盐溶液容器142供应钠盐溶液,例如2MNaCl溶液。对于该方法,选择较低MWC0 TFF过滤器160的截留分子量,以分离通过钠盐处理从褐藻糖胶中释放的阳离子添加剂。随着较低MWC0 TFF子系统140'的过程的进行,由来自NaCl的钠阳离子取代在褐藻糖胶上的胆碱阳离子而产生的游离胆碱氯化物转移至较低MWC0 TFF过滤器160的渗透物,并通过较低MWC0子系统渗透物输出管线129离开CATS 100"。可以使用钠盐溶液,例如以补充通过较低MWC0子系统渗透物输出管线129上的渗透液损失的溶液,和/或确保来自较高MWC0 TFF子系统130'的预定透析体积量的钠盐溶液和截留物在较低MWC0 TFF过滤器160上循环。通过控制钠盐溶液控制阀144,可以以脉冲过程添加钠盐溶液。在其他实施方式中,可以以连续模式添加钠盐

溶液。当适当透析体积量的钠盐溶液和截留物已经在较低MWC0 TFF过滤器160上循环时,可以关闭钠盐溶液控制阀144并打开低电导率渗滤溶液阀145。可以预先确定要在较低MWC0 TFF过滤器160上处理的钠盐溶液的透析体积量。较低MWC0子系统泵124在较低MWC0 TFF过滤器160的截留侧和渗透侧之间提供一定水平的压力。在图3中,较低MWC0 TFF过滤器160的截留物通过较低MWC0子系统截留物返回管线128返回到较低MWC0子系统褐藻糖胶容器126,而渗透物通过较低MWC0子系统渗透物输出管线129产生,以在较低MWC0 TFF子系统140'外部使用或被丢弃。

[0151] 可以打开低电导率渗滤溶液阀145以允许来自低电导率渗滤溶液容器143的低电导率渗滤溶液通过低电导率渗滤溶液供应管线147进入较低MWC0子系统褐藻糖胶容器126,截留物和低电导率渗滤溶液可以在较低MWC0 TFF过滤器160上进行处理以去除在较低MWC0 TFF过滤器160的截留物的钠盐处理期间产生的游离钠盐。低电导率渗滤溶液可以是例如去离子水。为此,可以测量较低MWC0子系统渗透物输出管线129上的渗透物的电导率,以确保其下降到所需水平,这用于表明钠盐已经被去除到合适的程度。可以预先确定在较低MWC0 TFF过滤器160上处理的低电导率渗滤溶液的透析体积量。当已经从较低MWC0 TFF过滤器160的截留物中适当去除钠盐时,低电导率渗滤溶液阀145可以关闭并且较低MWC0子系统截留物输出管线108打开以将CATS 100'的产物输送到较低MWC0子系统截留物输出管线108上。

[0152] 离心沉淀

[0153] 可以通过离心沉淀从宽分布的起始褐藻糖胶中获得高分子量褐藻糖胶。

[0154] 转向图4,示出了用于从起始褐藻糖胶组合物中离心沉淀高分子量褐藻糖胶的离心沉淀系统600。系统600包括具有分级的可渗透屏障620的离心容器610。可渗透屏障可基于密度来分级,密度从离心容器610的第一底端630朝向第二顶端640减小。分级的可渗透屏障620可以由不同密度的不同材料组成。分级的可渗透屏障620可以由溶解在合适溶剂中的不同浓度的一种溶质的溶液组成。合适的溶剂可以是例如但不限于水和水-乙醇溶液中的一种。溶质,也称为“梯度材料”,例如但不限于可以是甘油、山梨糖醇、CsCl、Cs₂SO₄、KBr、泛影酸盐、Niocodenz[®]、碘克沙醇和合适的糖类(包括(聚)蔗糖)中的一种或多种。分级的可渗透屏障620可包括从离心容器610的第一底端630到第二顶端640的梯度材料浓度递减的连续梯度。在其他实施方式中,分级的可渗透屏障620可包括多个不同的密度的等级,例如分级的可渗透屏障区段620a、620b和620c,如图4所示。将包含起始褐藻糖胶组合物的溶液适当地通过预过滤器进行预过滤以去除颗粒物质,将其设置为紧邻离心容器610的第二顶端640并与分级的可渗透屏障620接触的起始褐藻糖胶组合物650。预过滤器可以是例如但不限于0.22μm的颗粒过滤器。

[0155] 在操作中,离心容器受到离心力,该离心力具有从容器的第二顶端640指向容器的第一底端630的力分量,如图4中的离心力箭头660所示。这可以在合适的离心机中实现,该离心机在图4中示意性地示出为离心机箱670,并适于容纳离心容器610。合适的离心机在本领域中是众所周知的,因此在此不再赘述。离心力可以为约1,000重力至约1,000,000重力,例如约10,000重力至约200,000重力、大约60,000重力至约500,000重力、以及约190,000重力至约800,000重力。

[0156] 与图4的系统相关联,用于从起始褐藻糖胶组合物离心沉淀高分子量褐藻糖胶的

方法包括：在离心容器610内建立梯度材料的分级的可渗透屏障620，其具有与离心容器610的第一底端630接触的第一底部分级可渗透屏障材料端622；将包含所需高分子量区段的起始褐藻糖胶组合物设置为与邻近离心容器610的第二顶端640的分级的可渗透屏障620的相对的第二顶部分级的可渗透屏障材料端624接触；使离心容器610受到从离心容器610的第二顶端640指向第一底端630的离心力660；以及在离心容器610的第一底端630处收集沉淀的高分子量褐藻糖胶。将起始褐藻糖胶组合物650设置为与最低密度梯度材料接触可以包括：通过合适的预过滤器对起始褐藻糖胶组合物进行预过滤。

[0157] 在离心容器610内建立梯度材料的分级的可渗透屏障620可包括：建立多个梯度材料区段，梯度材料区段的密度从离心容器610的第一底端630朝向离心容器610的第二顶端640减小。在离心容器610中建立梯度材料的分级的可渗透屏障620可以包括：在离心容器610中建立糖的分级的可渗透屏障620。在离心容器610中建立梯度材料的分级的可渗透屏障620可包括：在离心容器610内建立蔗糖的分级的可渗透屏障620。在离心容器610内建立梯度材料的分级的可渗透屏障620可包括：在离心容器610内建立甘油、山梨糖醇、CsCl、Cs₂SO₄、KBr、泛铝酸盐、Nycodenz[®]和碘克沙石中的至少一种的分级的可渗透屏障620。在离心容器610内建立梯度材料的分级的可渗透屏障620可以包括：在离心容器610内建立由溶剂溶解的梯度材料的分级的可渗透屏障620。在离心容器610内建立梯度材料的分级的可渗透屏障620可包括：在离心容器610内建立由溶解在水和水-乙醇溶液之一中的梯度材料的分级的可渗透屏障620。

[0158] 图5示出了离心沉淀系统600'的另一个实施方式，该离心沉淀系统用于从起始褐藻糖胶组合物中离心沉淀高分子量褐藻糖胶。使用与图4中类似的编号，该实施方式使用具有梯度材料的单个屏障区段620c'的可渗透屏障620'，其第一底部可渗透屏障材料端622'与离心容器610的第一底端630接触。在一个实施方式中，起始褐藻糖胶组合物直接与可渗透屏障620'的相对的第二顶部可渗透屏障材料末端624'接触。在该实施方式中，该方法包括：使离心容器610承受被引导为从离心容器610的第二顶端640到第一底端630的离心力660，并在离心容器610的第一底端630收集沉淀的高分子量褐藻糖胶。将起始褐藻糖胶组合物650设置为与最低密度梯度材料接触可以包括：通过合适的预过滤器预过滤起始褐藻糖胶组合物。

[0159] 其他实施方式不需要采用屏障，并且将具有起始褐藻糖胶组合物的容器离心以使离心容器610受到被引导为从离心容器610的第二顶端640到第一底端630的离心力660，并在离心容器610的第一底端630收集沉淀的高分子量褐藻糖胶。

[0160] 凝胶电泳提取

[0161] 可以通过凝胶电泳提取从宽分子量分布的起始褐藻糖胶获得高分子量褐藻糖胶。所述方法可以包括：使包含所需高分子量区段的起始褐藻糖胶组合物进行凝胶电泳，其中，所述起始褐藻糖胶组合物通过施加的电势差的作用根据质荷比进行置换；根据电势差和所需高分子量褐藻糖胶选择电泳凝胶的一部分；以及从选择的凝胶部分中提取所需高分子量褐藻糖胶。

[0162] 使起始褐藻糖胶组合物进行凝胶电泳可包括：首先通过预过滤器将溶液形式的起始褐藻糖胶组合物进行预过滤以去除不希望有的颗粒物质。使起始褐藻糖胶组合物进行凝胶电泳可包括：以浓度在0.1%w/v至30%w/v之间的溶液制备起始褐藻糖胶组合物。提取所

需高分子量褐藻糖胶可以包括：从沿着电势差的方向延伸0.1mm至1000mm的距离的凝胶部分提取所需高分子量褐藻糖胶。提取所需高分子量褐藻糖胶可包括：使用水、甲醇、乙醇、异丙醇、水/醇混合物和盐溶液中的一种提取凝胶部分。

[0163] 使起始褐藻糖胶组合物进行凝胶电泳可包括：将起始褐藻糖胶组合物在溶液中置换预定的时间。使起始褐藻糖胶组合物在整个电泳凝胶上进行凝胶电泳可包括：在凝胶浸入缓冲溶液中的同时在整个电泳凝胶上置换起始褐藻糖胶组合物。使起始褐藻糖胶组合物在整个电泳凝胶上进行凝胶电泳可包括：由凝胶材料和缓冲溶液制备凝胶。由凝胶材料和缓冲溶液制备凝胶可包括：由缓冲剂和琼脂糖、聚丙烯酰胺、聚二甲基丙烯酰胺和淀粉中的一种制备凝胶。由凝胶材料和缓冲溶液制备凝胶可包括：由三乙酸酯EDTA、三硼酸EDTA和磷酸盐缓冲盐水中的一种与凝胶材料一起制备凝胶。在施加的电势差的作用下置换起始褐藻糖胶组合物可包括在这样的电场强度的作用下置换起始褐藻糖胶组合物：约1伏/cm至约500伏/cm，例如约5伏/cm至约50伏/cm、约10伏/cm至约200伏/cm、以及约50伏/cm至约300伏/cm。

[0164] 在图6中示出了用于从起始褐藻糖胶组合物获得所需的高分子量褐藻糖胶的电泳提取系统900。电泳提取系统900包括显示为透明且包含电泳凝胶916的电泳室910和电泳缓冲液918。电泳凝胶916材料可以是例如但不限于琼脂糖、聚丙烯酰胺和淀粉中的一种。电泳缓冲液918可以是例如但不限于三乙酸酯EDTA、三硼酸EDTA和磷酸盐缓冲盐水中的一种。在电泳凝胶916内接近并平行于电泳凝胶916的第一侧形成孔912，在该孔中放置溶液形式的起始褐藻糖胶组合物。

[0165] 直流电源920通过阴极922和阳极924在电泳室910中的电泳缓冲液918上施加电势差。阴极922和阳极924之间的电势差引发了起始褐藻糖胶组合物中的褐藻糖胶阴离子沿迁移方向箭头926给出的方向沿着凝胶迁移远离阴极922并朝阳极924迁移，这样，如果在给定的时间段内保持电势差，则起始褐藻糖胶组合物的不同分子量分子将以朝向阳极924的不同距离从孔912被置换。置换速率由褐藻糖胶分子的质荷比确定。较低分子量的褐藻糖胶将更迅速地置换，并且在电势差的作用下经过固定的时间段之后，其将比较高分子量的褐藻糖胶更多地置换。理论位移距离914表示不同分子量的褐藻糖胶分子的置换的不同理论距离，在任何给定的时间段，较低分子量的褐藻糖胶分子从阴极922进一步置换。

[0166] 为了从电泳后的起始褐藻糖胶组合物获得所需的高分子量褐藻糖胶，选择电泳凝胶916的相应部分，并从该凝胶的该部分中提取高分子量褐藻糖胶。一种非限制性的方法是将电泳凝胶916的一部分浸没在萃取剂溶液中并搅动凝胶溶液混合物。在一个实施方式中，搅拌可通过摇动完成。在另一个实施方式中，可以通过高剪切混合来完成搅拌。

[0167] 膜透析

[0168] 可以通过膜透析从宽分子量分布的起始褐藻糖胶获得高分子量褐藻糖胶。与典型的透析膜鉴定相一致，给定透析膜的标称MWC0值将选择性地允许溶液通过，该溶液所含分子的分子量通常小于不穿过/渗透透析膜的分子的分子量。对于任何给定的聚合物或标称截留值，透析膜的分子量截留值通常不是绝对的：给定的透析膜将通过或保留高于或低于标称分子量截留的一些分子。对于特定聚合物，可以常规地确定特定聚合物的标称MWC0透析膜的实际截留/选择性值和效果。

[0169] 许多因素可以影响透析膜的渗透行为。这些因素可能取决于透析膜本身或取决于

目标聚合物的属性,例如目标聚合物的折叠行为和折叠结构会影响目标聚合物在穿越/不穿越透析膜的MWC0屏障方面的行为。关于透析膜本身,例如,制造方法会在特定的透析膜内引起各种尺寸的孔,该各种孔可包括比标称MWC0截留大和小的孔。因此,具有标称分子量截留的透析膜将大体上允许低于标称分子量截留的分子通过,但是也可以使低于和/或高于该值的一些分子通过/保留。

[0170] 该方法可以包括使包含所需高分子量区段的起始褐藻糖胶组合物通过截留分子量大于100kDa的膜针对透析液进行透析,以产生包含该高分子量褐藻糖胶的透析褐藻糖胶组合物;以及收集包含高分子量的褐藻糖胶的透析的褐藻糖胶组合物。

[0171] 转向图7,示出了用于从起始褐藻糖胶组合物获得高分子量褐藻糖胶的膜透析系统800。系统800包括具有透析膜825的透析单元820,其允许低分子量褐藻糖胶分子通过。合适溶剂中的起始褐藻糖胶组合物进入膜透析系统800,并通过输入供应管线801并通过预过滤器802进入褐藻糖胶容器810。该预过滤器可以是例如0.22 μ m的预过滤器,以去除不希望有的颗粒物。

[0172] 通过透析系统泵814,通过透析系统供应管线812和透析液返回管线816,将预过滤的起始褐藻糖胶组合物循环通过透析膜825的第一侧上的透析单元820。通过透析液供应管线832通过透析液供应管线832从透析液容器830通过透析膜825的第二侧上的透析单元820循环透析液。透析液泵834选择透析液流体自由地流过透析膜825。合适的透析液包括但不限于去离子水和氯化钠、磷酸盐缓冲液、磷酸钠、磷酸盐缓冲盐水、tris-HCl缓冲液、柠檬酸钠、柠檬酸盐缓冲液、抗坏血酸钠、抗坏血酸、亚硫酸钠和乙二胺四乙酸(EDTA)。合适的透析膜的孔径被选择为优先阻止分子量大于200kDa的褐藻糖胶分子通过。其他合适的透析膜具有优先阻止分子量大于300kDa、500kDa和1000kDa的分子通过的孔径。这些膜中的每一种都可以用于从起始的褐藻糖胶组合物获得相应的高分子量褐藻糖胶,所述起始褐藻糖胶组合物包含较少的褐藻糖胶分子,其分子量小于透析膜的孔径或相对于宽的起始分子量分布的截留分子量。透析膜可以是但不限于纤维素酯和再生纤维素膜中的一种。包含起始褐藻糖胶组合物的溶液的浓度可以在0.1%w/v与30%w/v之间。

[0173] 当褐藻糖胶分子通过透析膜825时,其浓度在透析液中积累,并且这开始与透析过程相反。在期望的时间点,透析液供应阀845可以被打开以允许新鲜的透析液经由透析液供应管线842从透析液供应容器840进入透析液容器830。

[0174] 在适当的透析时间段之后,可以打开透析液输出阀815以允许通过透析液输出管线818从透析系统800中抽取透析的褐藻糖胶组合物。可以打开透析液输出阀835以允许含有低分子量褐藻糖胶分子的透析液被抽取到透析液输出管线838上。

[0175] 选择性沉淀

[0176] 可以通过选择性沉淀从宽分子量分布的起始褐藻糖胶获得高分子量褐藻糖胶。所述方法可以包括:以起始褐藻糖胶组合物在水中的溶液的形式提供包含所需的高分子量区段的起始褐藻糖胶组合物;向包含起始褐藻糖胶组合物的溶液中添加褐藻糖胶沉淀剂以获得过饱和的褐藻糖胶-溶剂混合物;通过将离子沉淀触发化合物添加到过饱和的褐藻糖胶-溶剂混合物中来触发一部分宽分子量分布的起始褐藻糖胶的沉淀,以从起始褐藻糖胶组合物和含有剩余褐藻糖胶的溶液中产生沉淀的高分子量褐藻糖胶;以及从混合物中提取沉淀出的高分子量褐藻糖胶。合适的褐藻糖胶沉淀剂包括相对极性小于0.765的溶剂,例如乙

醇、异丙醇、丙醇、丙酮、甲醇、二甲基亚砷、二甲基甲酰胺、乙二醇、四氢呋喃、乙腈、甘醇二甲醚、二甘醇二甲醚和二恶烷,褐藻糖胶的溶解度随着沉淀液极性的降低而降低。相对极性的值可以通过吸收光谱的溶剂位移的测量来归一化。参见例如Christian Reichardt, *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry* (《有机化学中的溶剂和溶剂作用》), Wiley-VCH Publishers, 第3版, 2003年。合适的离子沉淀触发化合物包括但不限于单价、二价和三价阳离子的盐和碱,例如碱金属、碱土金属、铝和/或铵的氯化物、溴化物、碘化物、氟化物、硫酸盐、亚硫酸盐、碳酸盐、碳酸氢盐、磷酸盐、硝酸盐、亚硝酸盐、乙酸盐、柠檬酸盐、硅酸盐、氢氧化物、氧化物和/或氰化物。在一些实施方式中,离子沉淀触发化合物包含NaCl、KCl、NaOH、MgCl₂和CaCl₂中的至少一种。水中的起始褐藻糖胶组合物的合适浓度为0.01%w/v至30%w/v。适用于上述方法的特定褐藻糖胶包括但不限于岩藻多糖。

[0177] 所述方法可以进一步包括:在添加褐藻糖胶沉淀剂之前使起始褐藻糖胶组合物脱盐。脱盐可包括:使起始褐藻糖胶组合物通过截留分子量过滤器进行渗滤。渗滤可包括:用蒸馏水渗滤起始褐藻糖胶组合物。渗滤可包括:使起始褐藻糖胶组合物通过截留分子量过滤器进行渗滤,所述过滤器的截留分子量小于所需的高分子量褐藻糖胶中的所需分子量,例如5kDa、10kDa、30kDa、50kDa、70kDa、100kDa、200kDa或300kDa的截留分子量。所述方法可以进一步包括:通过合适的预过滤器预过滤包含起始褐藻糖胶组合物的溶液,以去除不希望有的颗粒物质。

[0178] 从混合物中提取沉淀的高分子量褐藻糖胶可包括离心、沉降、过滤和流体动力流分离中的至少一种。

[0179] 阴离子吸附

[0180] 可以通过阴离子吸附从宽分子量分布的起始褐藻糖胶中获得高分子量褐藻糖胶。所述方法可以包括:提供溶解在起始溶液中的具有宽起始分子量分布的起始褐藻糖胶组合物,所述起始分子量分布包含所需的高分子量区段;使起始溶液中的褐藻糖胶组合物与离子交换大孔树脂进行离子交换,该多孔树脂的孔径基于起始褐藻糖胶分子量分布内的所需分离分子量,以将褐藻糖胶组合物转化为经第一离子交换处理的褐藻糖胶组合物;收集包含所需的高分子量褐藻糖胶的第一经离子交换处理的褐藻糖胶组合物;与起始褐藻糖胶组合物进行离子交换后,将大孔树脂置于盐溶液中,从树脂中提取褐藻糖胶分子到盐溶液中,制得富含低分子量褐藻糖胶的盐溶液;使富含低分子量褐藻糖胶的褐藻糖胶盐溶液脱盐以形成第二经离子交换处理的褐藻糖胶组合物;以及收集包含低分子量褐藻糖胶的第二经离子交换处理的褐藻糖胶组合物。

[0181] 该方法可以进一步包括:在进行离子交换之前使起始褐藻糖胶组合物脱盐。脱盐可包括:使起始褐藻糖胶组合物通过截留分子量TFF过滤器进行渗滤。渗滤可以包括:在截留分子量TFF过滤器上渗滤起始褐藻糖胶组合物,所述过滤器的截留分子量小于高分子量褐藻糖胶中的所需分子量,例如5kDa、10kDa、30kDa、50kDa、70kDa、100kDa和/或300kDa的截留分子量TFF过滤器。

[0182] 在另一个实施方式中,从起始褐藻糖胶组合物产生所需的高分子量褐藻糖胶组合物的方法可以包括:提供溶解在起始溶液中的起始褐藻糖胶组合物,其具有宽起始分子量分布,所述宽起始分子量分布包括所需的高分子量区段;使溶解的起始褐藻糖胶组合物与在起始褐藻糖胶分子量分布内具有基于所需分离分子量的孔径的离子交换大孔树脂进行

离子交换,以将起始褐藻糖胶组合物转化为经离子交换处理的第一褐藻糖胶组合物;收集包含所需的高分子量褐藻糖胶的第一经离子交换处理的褐藻糖胶组合物。进一步的实施方式可以进一步包括:在进行离子交换之前使起始褐藻糖胶组合物脱盐。脱盐可包括:使起始褐藻糖胶组合物通过截留分子量TFF过滤器进行渗滤。渗滤可包括:在截留分子量TFF过滤器上渗滤起始褐藻糖胶组合物,所述过滤器的截留分子量小于所需的高分子量褐藻糖胶的分子量分布中的所需分子量,例如5kDa、10kDa、30kDa、50kDa、70kDa、100kDa和/或300kDa截留分子量TFF过滤器。

[0183] 使大孔树脂经受盐溶液可包括:使大孔树脂经受钠盐溶液,例如包含碱金属、碱土金属、铝和/或铵的氯化物、溴化物、碘化物、氟化物、硫酸盐、亚硫酸盐、碳酸盐、碳酸氢盐、磷酸盐、硝酸盐、亚硝酸盐、乙酸盐、柠檬酸盐、硅酸盐和/或氰化物中的至少一种的溶液。使大孔树脂经受钠盐溶液可包括:使大孔树脂经受氯化钠溶液。使富含低分子量褐藻糖胶的盐溶液脱盐可包括:使富含低分子量褐藻糖胶的盐溶液通过截留分子量TFF过滤器进行渗滤。渗滤可包括:在截留分子量TFF过滤器上渗滤富含低分子量褐藻糖胶的盐溶液,所述过滤器的截留分子量小于所需的富含低分子量褐藻糖胶的盐溶液的分子量分布中的所需分子量,例如5kDa、10kDa、30kDa、50kDa、70kDa和/或100kDa截留分子量TFF过滤器。

[0184] 使溶解的起始褐藻糖胶组合物与离子交换大孔树脂进行离子交换可包括:将起始褐藻糖胶与树脂的比例调节至预定的质量比。预定的质量比可以为约1:100的褐藻糖胶:树脂至约10:1的褐藻糖胶:树脂、5:1的褐藻糖胶:树脂、或2:1的褐藻糖胶:树脂。在其他实施方式中,预定质量比可以为约1:100的褐藻糖胶:树脂至约1:1的褐藻糖胶:树脂。在其他实施方式中,预定质量比可以为约1:100的褐藻糖胶:树脂至约1:2的褐藻糖胶:树脂。在另外的实施方式中,预定的质量比可以为约1:50的褐藻糖胶:树脂至约1:5的褐藻糖胶:树脂。在另外的实施方式中,预定的质量比可以为约1:20的褐藻糖胶:树脂至约1:1的褐藻糖胶:树脂,例如,约1:2的褐藻糖胶:树脂、1:4的褐藻糖胶:树脂、1:6的褐藻糖胶:树脂、1:8的褐藻糖胶:树脂和1:10的褐藻糖胶:树脂。

[0185] 使溶解的起始褐藻糖胶组合物与离子交换大孔树脂进行离子交换可包括:使溶解的起始褐藻糖胶组合物与树脂进行离子交换预定的时间段。预定时间段可以为零至300小时。在其他实施方式中,预定时间段可以为零至100小时。在其他实施方式中,预定时间段可以为5分钟至30小时,例如为约8小时至大约24小时。在另外的实施方式中,预定时间段可以为1至10小时,例如为约4小时至约10小时。在其他实施方式中,预定时间段可以为约2小时至约5小时。

[0186] 使溶解的起始褐藻糖胶组合物与离子交换大孔树脂进行离子交换可包括:使溶解的起始褐藻糖胶组合物与阴离子交换大孔树脂进行离子交换。使溶解的起始褐藻糖胶组合物与阴离子交换大孔树脂进行离子交换可包括:使溶解的起始褐藻糖胶组合物与强碱阴离子交换大孔树脂进行离子交换。使溶解的起始褐藻糖胶组合物与阴离子交换大孔树脂进行离子交换可包括:使溶解的起始褐藻糖胶组合物与弱碱阴离子交换大孔树脂进行离子交换。“强碱”和“弱碱”根据其通常含义使用,例如“强碱”是在任何典型的离子交换环境下都不会失去电荷的树脂,例如季胺官能化树脂,而“弱碱”是在高pH条件下会失去电荷的树脂,例如伯、仲或叔胺官能化树脂。使溶解的起始褐藻糖胶组合物进行离子交换可包括:使溶解的起始褐藻糖胶组合物与混合电荷大孔树脂进行离子交换。

[0187] 使溶解的起始褐藻糖胶组合物与阴离子交换大孔树脂进行离子交换可包括：使溶解的起始褐藻糖胶组合物与包含伯、仲、叔和季胺基中的至少一种的大孔树脂进行离子交换。伯胺基可以是 NH_2 基团。仲胺基可以是例如但不限于苄胺基和二甲基胺基中的至少一种。叔胺基可以是例如但不限于二乙基氨基乙基和二甲基氨基乙基中的至少一种。季胺基可以例如是但不限于三甲基铵和三乙基铵基。该树脂可以包括但不限于苯乙烯、琼脂糖、右旋糖酐、丙烯酸酯、甲基丙烯酸酯、甲基丙烯酸甲酯、甲基丙烯酸丁酯、二乙烯基苯、纤维素、二氧化硅和陶瓷中的一种或多种。

[0188] 使溶解的起始褐藻糖胶组合物与离子交换大孔树脂进行离子交换可包括：使溶解的起始褐藻糖胶组合物与孔径为5nm至1000nm的离子交换树脂进行离子交换，例如5nm至100nm、10nm或15nm至50nm、20nm至80nm、5nm至30nm、100nm至500nm、300nm至900nm、或200nm至400nm。使溶解的起始褐藻糖胶组合物与离子交换大孔树脂进行离子交换可包括：使溶解的起始褐藻糖胶组合物与离子交换树脂进行离子交换，所述离子交换树脂的排阻极限为50kDa至50,000kDa，例如50kDa至10,000kDa、100kDa至5,000kDa、10,000kDa至40,000kDa、1,000kDa至9,000kDa、2,000kDa至7,000kDa或500kDa至2,000kDa。排阻极限可以基于球状蛋白质的排阻极限。

[0189] 图8示出了用于基于分子量的褐藻糖胶的分段的示例性离子吸附系统300的示意图。包含起始褐藻糖胶组合物的溶液通过输入供应管线301和预过滤器306供应到TFF子系统褐藻糖胶容器176。在脱盐过程中，切向流过滤(TFF)子系统泵174通过TFF子系统过滤器供应管线172将起始褐藻糖胶组合物泵送到TFF子系统170的TFF过滤器171。TFF过滤器171的形式可以是但不限于以下各项中的任何一种：板框系统；螺旋盘绕药筒系统；中空纤维系统；流通池系统；和离心过滤系统。

[0190] 在图8的系统中，TFF子系统170用作脱盐子系统。TFF过滤器171通常被提供为盒体，该盒体被设计成允许供应给它的输入流体在其截留物侧通过其过滤器，同时允许渗透物通过一个输出管线排出，并且经处理的输入流体通过另一个输出管线作为截留物离开。对于本方法，选择TFF过滤器171的截留分子量以允许盐组分渗透到起始褐藻糖胶溶液中，同时将褐藻糖胶保留在截留物中，用于随后在离子交换子系统180中的离子吸附处理。TFF子系统泵174保持TFF过滤器171在其截留侧和渗透侧之间的压力水平。在图8中，TFF过滤器171的截留物通过TFF子系统截留物管线178返回到TFF子系统褐藻糖胶容器176，而含有不希望有的非褐藻糖胶组分的渗透物通过TFF子系统渗透物输出管线179产生，供在TFF子系统170外部使用或丢弃。

[0191] 当TFF子系统泵174在TFF过滤器171上再循环起始褐藻糖胶组合物和截留物时，可以通过TFF子系统溶剂供应管线175供应来自TFF子系统溶剂容器177的水或低电导率冲洗溶液。冲洗溶液用于补充通过TFF子系统渗透物输出管线179上的渗透物损失的截留物溶液，和/或确保在TFF过滤器171上循环预定透析体积量的输入起始褐藻糖胶和溶剂。通过控制TFF子系统溶剂供应阀173，冲洗溶液可以在脉冲过程中添加。在其他实施方式中，可以以连续模式添加溶剂。连续添加溶剂的方式具有效率优势。可以预先确定要在TFF过滤器171上处理的溶剂的透析体积量。在一些实施方式中，溶剂可以是去离子水。

[0192] 子系统间阀302可以在上述处理过程中关闭，并且在将TFF子系统170的TFF过滤器171的截留物收集到容器(未示出)中，然后再供应给离子交换子系统180的离子褐藻糖胶容

器186。然后将收集的截留物通过TFF子系统截留物输出管线303提供给离子交换子系统180的离子交换子系统褐藻糖胶容器186。在其他实施方式中,可以将收集的截留物在容器(未示出)中转移到离子交换子系统褐藻糖胶容器186中。在系统的其他实施方式中,子系统间阀302可以保持打开,并且TFF过滤器171的截留物可以连续地经由TFF子系统截留物输出管线303供应到离子交换子系统褐藻糖胶容器186。可以预期供应给离子交换子系统180的截留物具有较低的盐含量,这可能会干扰在离子交换子系统180中处理褐藻糖胶,并且其是脱盐的褐藻糖胶组合物。

[0193] 离子交换子系统180的离子交换容器181容纳一定体积的大孔离子交换树脂189。在一些实施方式中,大孔离子交换树脂是阴离子交换树脂。在一些实施方式中,大孔离子交换树脂是混合电荷树脂。选择大孔离子交换树脂189的孔径以优先从包含宽分子量分布的起始褐藻糖胶的溶液中吸附分子量低于预定值的褐藻糖胶分子,优先留在溶液中具有较大分子量的褐藻糖胶分子比预定值大。这类树脂的一种形式是基于基本上球形的苯乙烯颗粒,该颗粒与二乙烯基苯交联并且具有包含季铵基团的孔。在一些实施方式中,孔径可以为10nm至100nm。基于所述褐藻糖胶分子的流体动力尺寸,所述褐藻糖胶分子可以或可以不被优先吸附到树脂的孔中。

[0194] 在处理来自离子交换容器181中的TFF子系统170的脱盐褐藻糖胶组合物的过程中,控制来自离子交换子系统褐藻糖胶容器186的离子交换子系统输出管线305的离子交换子系统输出阀304可以关闭。离子交换子系统盐溶液供应阀183b和离子交换子系统盐溶液返回阀183c可以类似地关闭,而离子交换子系统褐藻糖胶返回阀183a可以打开。在离子交换子系统褐藻糖胶泵184a经由离子交换子系统褐藻糖胶供应管线182a和离子交换子系统褐藻糖胶泵184a通过离子交换容器181使包含脱盐的褐藻糖胶组合物的溶液再循环的同时,大孔离子交换树脂189吸附较低分子量的褐藻糖胶分子,从而使离子交换子系统褐藻糖胶返回管线188a中的溶液包含所需的高分子量褐藻糖胶。在流过离子交换容器181之后,包含所需的高分子量褐藻糖胶的溶液通过离子交换子系统褐藻糖胶返回管线188a返回到离子交换子系统褐藻糖胶容器186。

[0195] 可以测量或监测离子交换子系统褐藻糖胶容器186中褐藻糖胶的平均分子量。当使离子交换子系统褐藻糖胶容器186中的溶液循环一段合适的时间时,或者当溶液中的褐藻糖胶达到预定的所需平均分子量值时,可以打开离子交换子系统输出阀304以产生第一经由离子交换子系统输出管线305进行离子交换处理的褐藻糖胶组合物作为离子吸附系统300的第一输出产物。该第一输出产物包括例如具有分子量分布的高分子量褐藻糖胶,其中在低分子量末端处的输入起始褐藻糖胶的宽分子量分布的量已被抑制或减弱,使得所得分子量分布向输入供应管线301时供应至离子吸附系统300的输入起始褐藻糖胶组合物的分子量分布的较高端发生位移。

[0196] 离子交换子系统输出阀304可以再次关闭,离子交换子系统褐藻糖胶返回阀183a也可以关闭,离子交换子系统盐溶液供应阀183b和离子交换子系统盐溶液返回阀183c打开以允许盐溶液进行离子交换子系统盐溶液容器187通过离子交换子系统盐溶液供应管线182b进入离子交换子系统180中的循环。离子交换子系统盐溶液泵184b现在使盐溶液通过离子交换子系统盐溶液供应管线182b通过离子交换容器181中的大孔离子交换树脂189循环,并通过离子交换子系统盐溶液返回管线188b和离子交换子系统盐溶液返回阀183c返回

离子交换子系统盐溶液容器187。在该过程中,盐置换了吸附在大孔离子交换树脂的孔内的褐藻糖胶,并在离子交换子系统180中循环地将游离的褐藻糖胶释放到盐溶液中。盐溶液可以循环预定时间。在其他实施方式中,可以测量离子交换子系统180中的盐溶液中的褐藻糖胶的平均分子量,并且当盐溶液中的褐藻糖胶的平均分子量达到预定的期望值时,盐溶液的再循环终止。

[0197] 在一些实施方式中,在开始从离子交换子系统盐溶液容器187开始盐溶液的循环之前,可以使用预定量的低离子含量溶液来洗涤树脂。在一些实施方式中,该低离子含量溶液可以是去离子水。

[0198] 此时,离子交换子系统输出阀304可再次被打开,并且离子交换子系统180的泵和阀适当地操作以允许从离子交换子系统输出管线305抽取的离子吸附系统300的第二产物为以下形式:富含低分子量褐藻糖胶的盐溶液。可以将第二产物过滤,例如但不限于在合适的离心过滤器或切向流过滤器上的离心分离中,以将低分子量褐藻糖胶与不需要的盐分离。这产生了第二输出低分子量褐藻糖胶。与上面讨论的第一输出高分子量褐藻糖胶相比,该第二输出低分子量褐藻糖胶具有褐藻糖胶分子量分布,其中在分子量下一部分输入起始褐藻糖胶分子量分布较宽。末端分子量已被抑制或减弱,使得所得的分子量分布朝着在输入供应管线301上供应至离子吸附系统300的输入起始褐藻糖胶组合物的分子量分布的下端移动。

[0199] 考虑到起始褐藻糖胶分子量分布的宽度和复杂性以及聚合物行为和离子交换树脂的变化,在考虑大孔离子交换树脂的孔径的情况下,两种输出褐藻糖胶分子量分布可能不会达到峰值。但是,如果发生这种情况,则两种输出的褐藻糖胶分子量分布仍将相对于彼此发生位移,这表示将起始褐藻糖胶组合物区段为与第一产物相对应的相对较高分子量的褐藻糖胶和相对较低的分子量。褐藻糖胶对应于第二产物。第一产物对应于优先未被树脂吸附的大而重的褐藻糖胶分子,而第二产物相反对应于优选被树脂吸附的褐藻糖胶分子,并且平均比未吸附的分子更小、更轻。

[0200] 制备型凝胶渗透色谱

[0201] 可以通过制备性凝胶渗透色谱法从宽分子量分布的起始褐藻糖胶获得高分子量褐藻糖胶。该方法可以包括:以柱形式装填用于水溶液中聚合物的凝胶渗透色谱法(GPC)所指定的凝胶介质;提供起始褐藻糖胶组合物,其包含溶解在适合于凝胶介质上的凝胶渗透色谱法的水性溶剂中的所需的高分子量区段;使包含起始褐藻糖胶组合物的溶液经受制备型凝胶渗透色谱,其中,所述褐藻糖胶根据分子量在色谱柱的第一输入端和第二输出端之间以预定的流速在色谱柱中的凝胶介质上移位;基于所述起始褐藻糖胶组合物的期望区段,以预定的等分部分从所述色谱柱的第二输出端收集洗脱液,每个等分部分包括分段的褐藻糖胶组合物;基于起始褐藻糖胶组合物的期望分段,合并期望的等分部分,以获得包含期望的高分子量褐藻糖胶的合并的GPC等分部分组合物。

[0202] 使包含起始褐藻糖胶组合物的溶液经受制备型凝胶渗透色谱法可包括:首先通过预过滤器将溶液中的起始褐藻糖胶组合物预过滤以去除不希望有的颗粒物质。使包含起始褐藻糖胶组合物的溶液经受制备型凝胶渗透色谱法可以包括:以浓度在0.1%w/v至20%w/v之间的溶液制备起始褐藻糖胶组合物。使包含起始褐藻糖胶组合物的溶液经历制备型凝胶渗透色谱法可包括使用蠕动泵、等度泵、二元泵、四元泵和梯度泵中的至少一种来完成在

包含凝胶介质的色谱柱上的置换。从褐藻糖胶组合物开始进行制备型凝胶渗透色谱分析,可以包括将溶液以预定流速通过含有凝胶介质的色谱柱:每分钟每凝胶介质表面积0.0005毫升($\text{mL}/\text{min}/\text{cm}^2$)至 $5\text{mL}/\text{min}/\text{cm}^2$ 、 $0.005\text{mL}/\text{min}/\text{cm}^2$ 至 $0.5\text{mL}/\text{min}/\text{cm}^2$ 、 $0.01\text{mL}/\text{min}/\text{cm}^2$ 至 $0.25\text{mL}/\text{min}/\text{cm}^2$ 、 $0.05\text{mL}/\text{min}/\text{cm}^2$ 、 $0.1\text{mL}/\text{min}/\text{cm}^2$ 、 $0.15\text{mL}/\text{min}/\text{cm}^2$ 和 $0.2\text{mL}/\text{min}/\text{cm}^2$ 。

[0203] 从色谱柱的第二输出端收集洗脱液可包括收集约0.1mL至1000mL、约1mL至100mL、约5mL至50mL、约10mL、约20mL、约30mL和约40mL的洗脱液的等分部分。从色谱柱的第二输出端收集等分部分可以包括通过分析GPC测量等分部分的分子量分布。通过分析型GPC测量等分部分可与收集柱洗脱液同时进行。

[0204] 合并所需的等分部分可包括通过分析GPC测量等分部分的分子量分布,并仅合并具有所需分子量分布的等分部分。合并所需的等分部分可以与收集柱洗脱液同时进行。

[0205] 所使用的凝胶介质可以包括聚羟基甲基丙烯酸酯、磺化的苯乙烯-二乙烯基苯、二氧化硅、亲水键合相或聚合物、聚苯乙烯、二乙烯基苯、甲基丙烯酸酯、甲基丙烯酸甲酯、甲基丙烯酸丁酯、纤维素、陶瓷、琼脂糖和右旋糖酐中的至少一种。所使用的凝胶介质可以具有直径为约3nm、5nm、10nm、20nm、50nm、100nm、200nm、500nm、1,000nm、2,000nm、3,000nm、5,000nm和10,000nm中的至少之一的孔。所使用的凝胶介质可以具有排阻极限为约100Da、100kDa、1,000kDa、5,000kDa、10,000kDa、30,000kDa、50,000kDa和100,000kDa中至少之一的孔。排阻极限可以基于球状蛋白质或多糖例如右旋糖酐和/或普鲁兰多糖的排阻极限。

[0206] 用于溶解起始褐藻糖胶组合物的溶剂可包含水、硝酸钠、硝酸锂、磷酸二氢钠、磷酸二钠、磷酸三钠、氯化锂、溴化锂、碘化锂氯化钠、溴化钠、碘化钠、氯化钾、溴化钾、碘化钾、氢氧化钠、氢氧化锂、氢氧化钾、硫酸钠、亚硫酸钠、甲醇、乙醇和乙腈中的至少一种。

[0207] 化学结构修饰

[0208] 本文讨论的方法、系统等可包括对褐藻糖胶组合物,特别是褐藻糖胶组合物中的褐藻糖胶进行化学结构修饰。化学结构修饰可涉及从褐藻糖胶结构中去除官能团,例如,从褐藻糖胶结构中去除O-乙酰基、N-乙酰基、甲氧基、羟基、羧基和/或硫酸酯官能团。化学结构修饰可涉及多种化学试剂的使用,例如酸、碱、去污剂和/或氧化剂。

[0209] 疾病和病症

[0210] 纤维性粘连

[0211] 纤维性粘连通常是在外科手术后在身体的两个部位之间形成的一种疤痕类型(外科手术粘连)。纤维性粘连可能导致严重问题。例如,涉及女性生殖器官(卵巢、输卵管)的纤维性粘连可能导致不育、性交困难及严重的骨盆疼痛。在肠中出现的纤维性粘连可能导致肠梗阻或阻塞,且纤维性粘连还可能在其他位置,诸如心脏周围、脊椎及手部形成。除外科手术之外,纤维性粘连可能例如由于子宫内膜异位症、感染、化疗、放射、创伤及癌症引起。

[0212] 在本文档中,论述了各种纤维性粘连。诸如外科手术粘连、外科手术后粘连(post-surgical adhesion)、术后粘连(postoperative adhesion)、因盆腔炎所致的粘连、因机械性损伤所致的粘连、因放射所致的粘连、因放射治疗所致的粘连、因创伤所致的粘连以及因外来材料的存在所致的粘连等术语均是指因类似机制所致的组织间彼此粘连并且均包括在术语纤维性粘连中。

[0213] 纤维性粘连形成是复杂的过程,其中体内正常分离的组织生长至彼此中。外科手术粘连(也称为外科手术后粘连)是由组织对创伤的正常伤口愈合反应以外的反应发展而

来的并且已被报导在超过三分的二的全部腹部外科手术患者中出现(Ellis, H., Surg. Gynecol. Obstet. 133:497 (1971))。这些纤维性粘连的后果是变化的且取决于所涉及的外科手术部位或其他部位, 诸如疾病部位。面临的问题可能包括慢性疼痛、肠梗阻及甚至心脏外科手术后的死亡风险增大(diZerega, G.S., Prog. Clin. Biol. Res. 381:1-18 (1993); diZerega, G.S., Fertil. Steril. 61:219-235 (1994); Dobell, A.R., Jain, A.K., Ann. Thorac. Surg. 37:273-278 (1984))。据估计, 在生殖期女性中, 涉及子宫、输卵管或卵巢的纤维性粘连占全部不育情况的大约20% (Holtz, G., Fertil. Steril. 41:497-507 (1984); Weibel, M.A. 和 Majno, G. Am. J. Surg. 126:345-353 (1973))。

[0214] 纤维性粘连形成过程最初涉及建立纤维蛋白框架及正常组织修复。正常修复过程允许沿间皮修复的纤维蛋白溶解。然而, 在纤维性粘连形成中, 纤维蛋白基质随着成纤维细胞增殖成熟为网络且发生血管新生, 使得在约3至5天内建立经组织化的纤维性粘连(Buckman, R.F., 等人, J. Surg. Res. 21:67-76 (1976); Rafferty, A.T., J. Anat. 129:659-664 (1979))。炎性过程包括创伤组织中的中性粒细胞活化、纤维蛋白沉淀及邻接组织结合、巨噬细胞侵袭、成纤维细胞增殖至区域中、胶原沉淀、血管新生及建立永久纤维性粘连组织。

[0215] 已作出各种尝试以防止外科手术粘连。这些尝试涉及针对影响伴随外科手术创伤的生物化学及细胞事件的药理学方法以及用于分离受影响的组织的屏障方法。例如, 使用腹腔灌洗、肝素化溶液、促凝剂、诸如使用显微术或腹腔镜外科手术技术的修饰外科技术、消除来自外科手术用手套的滑石、使用更小的缝合线以及使用旨在最小化浆膜表面的并置的物理屏障(膜、凝胶或溶液)均已尝试。当前, 预防性疗法还包括预防纤维蛋白沉淀、减少炎性(类固醇及非类固醇抗炎药)及去除纤维蛋白沉淀物。

[0216] 防止形成外科手术后粘连的介入尝试已包括使用水浮选(hydroflotation)技术或屏障器械。水浮选涉及将较大体积的聚合物溶液, 诸如右旋糖酐(Adhesion Study Group, Fertil. Steril. 40:612-619 (1983))或羧甲基纤维素(Elkins, T.E., 等人, Fertil. Steril. 41:926-928 (1984))灌注至外科手术间隙中以尝试保持器官分开。由经氧化再生纤维素制成的合成屏障膜(例如, Interceed™)、聚四氟乙烯(戈尔-特克斯手术膜)及由经修饰的透明质酸/羧甲基纤维素(HA/CMC)组合制成的可完全再吸收的膜(Seprafilm™)也已用于减少动物及人类两者体内的外科手术后粘连形成(Burns, J.W., 等人, Eur. J. Surg. Suppl. 577:40-48 (1997); Burns, J.W., 等人, Fertil. Steril. 66:814-821 (1996); Becker, J.M., 等人, J. Am. Coll. Surg. 183:297-306 (1996))。这些HA/CMC膜的成功可能源自其能够在纤维性粘连形成时在腹膜伤口修复过程期间提供组织分离。据观察, 在应用后3-5天(与外科手术后粘连形成的时程兼容的时间段), 膜在受伤组织上形成清楚的粘性涂层(Ellis, H., Br. J. Surg. 50:10-16 (1963))。不幸地, 利用这些方法取得的成功有限。

[0217] 腹膜炎涉及腹膜的炎症。腹膜炎可能导致严重的问题。例如, 腹痛、腹部压痛及腹部防护。腹膜炎可能涉及自发性、解剖和/或腹膜透析相关的炎症。腹膜炎可能涉及感染, 例如, 空腔脏器穿孔、腹膜破裂、自发性细菌腹膜炎以及全身性感染可能引起感染及腹膜炎。腹膜炎还可能不涉及感染, 例如, 无菌体液渗漏至腹膜中, 以及无菌腹部外科手术可能引起腹膜炎。已作出各种尝试以预防和/或治疗腹膜炎。例如, 通用支持性测量诸如静脉内补液、抗生素及外科手术。未能满足对抑制或以其他方式治疗和/或预防腹膜炎, 优选更有效的且

副作用小的化合物、组合物和方法等(包括递送方法)的需求。

[0218] 本文讨论的高分子量褐藻糖胶可用于治疗患者中的纤维性粘连,并且可以作为高分子量褐藻糖胶医疗组合物、医疗器械、组合物或药物产品的组成部分或被配置和可以构成用于治疗纤维性粘连。例如,一种高分子量褐藻糖胶医疗组合物或医疗器械,其包含约0.02mg/mL至约100mg/mL,例如0.1mg/mL、0.2mg/mL、0.3mg/mL、0.5mg/mL、0.9mg/mL、1mg/mL、2.5mg/mL、5mg/mL、7.5mg/mL的本文中溶解在生理盐溶液中的高分子量褐藻糖胶。生理盐溶液可以是例如乳酸钠林格注射液USP (LRS)、生理盐水和生理右旋糖酐溶液。

[0219] 高分子量褐藻糖胶医疗组合物和医疗器械,其可以是液体医疗组合物和器械,在本文中可以包含药学上可接受的赋形剂,例如缓冲剂、稳定剂、防腐剂、佐剂等。此类高分子量褐藻糖胶医疗组合物和器械可以用于在手术前、手术中或手术后,通过在先前段落中给药约0.01mL/kg(每公斤患者或目标体重)至约10mL/kg或15mL/kg的褐藻糖胶医疗组合物或器械来治疗纤维性粘连。剂量和器械量包括例如约0.03mL/kg、0.1mL/kg、0.2mL/kg、0.4mL/kg、0.5mL/kg、0.6mL/kg、1mL/kg、1.2mL/kg、2mL/kg、3mL/kg、4mL/kg、5mL/kg、8mL/kg、10mL/kg和15mL/kg的高分子量褐藻糖胶医疗组合物或医疗器械到达患者的手术部位。在一些实施方式中,这样的高分子量褐藻糖胶医疗组合物和医疗器械可以用于通过给药约0.04mg/kg或0.1mg/kg至约25mg/kg或50mg/kg来治疗任何选择目标部位的纤维性粘连,例如损伤、擦伤、损伤部位、手术部位和手术后部位。这样的剂量的一些实例包括例如约0.04mg/kg、0.075mg/kg、0.1mg/kg、0.2mg/kg、0.5mg/kg、1mg/kg、1.3mg/kg、2mg/kg、3mg/kg、4mg/kg、5mg/kg、7.5mg/kg、8mg/kg、10mg/kg、15mg/kg、20mg/kg、25mg/kg和50mg/kg,可以例如通过在整个目标区域中一般注入液体医疗组合物或医疗器械来完成给药;例如,将本文所述的褐藻糖胶,包括例如本文的高分子量褐藻糖胶,给药至患者的手术部位。将液体医疗组合物或医疗器械引导到目标区域内的特定位置;一般或在目标区域内的特定位置喷涂液体医疗组合物或医疗器械;或者,通过施料器将液体医疗组合物或医疗器械喷雾或以其他方式递送,该施料器可以通过套管针、导管、内窥镜或其他微创器械通过喷雾器施加到外科医生或其他从业者特别确定的特定位置容易产生纤维性粘连或与之相关。在另一方面,可以在手术伤口张开之后但在手术程序之前进行给药。在手术过程中,或在手术过程之后但在手术伤口闭合之前。如果需要,也可以在手术完成后(例如通过注射器和针头)给药液体医疗组合物或医疗器械,也可以将其给药到非手术目标部位。患者的手术部位可以是例如骨盆腔、腹腔、背侧腔、颅腔、脊髓腔、腹侧腔、胸腔、胸膜腔、心包腔、皮肤、关节或肌肉中的至少之一。可以在不到约15分钟、10分钟、8分钟、6分钟、5分钟、4分钟、3分钟、2分钟、1分钟、45秒、30秒、20秒、15秒、10秒和5秒的时间内完成将高分子量褐藻糖胶医疗组合物或医疗器械给药于患者手术部位的操作。

[0220] 将高分子量褐藻糖胶医疗组合物或医疗器械给药于手术部位的实例包括但不限于在剖宫产手术方法的外科手术部位施予高分子量褐藻糖胶医疗组合物或医疗器械;无血管皮瓣再造外科手术、全层皮瓣移植手术、VY推进皮瓣外科手术、筋膜皮肤旋转皮瓣外科手术、人工关节置换外科手术、乳腺切除术外科手术、死骨切除术外科手术、椎间盘摘除术外科手术、截骨术外科手术、整形外科手术、髌骨切除术手术、滑膜切除术外科手术、囊膜切开术外科手术、腱或韧带修复外科手术、腱切术外科手术、腱切断术、筋膜切开术外科手术、半月板修复外科手术、椎骨切除外科手术、筛窦切除外科手术、Caldwell Luc氏手术外科手

术、泪囊鼻腔吻合术、溶胞鼻粘连外科手术、胸腺切除外科手术、肺气溶解手术、肺切除术、胸腔镜整形外科手术、双叶切除外科手术、门静脉高压手术外科手术、脾切除外科手术、食管切除外科手术、腹膜炎外科手术、胃切除外科手术、空肠空肠造口外科手术、腹腔镜胆囊切除外科总手术、腹腔镜手术外科手术、胃肠造口外科手术、减肥手术外科手术、肠切除和吻合外科手术手术、节段性肝切除外科手术手术、肺叶切除外科手术手术、胰腺外科手术、胰十二指肠切除外科手术手术、肿瘤切除外科手术、腹腔镜肾手术外科手术、腹部或骨盆粘连溶解手术、子宫输卵管造口术、输卵管成形术、异位妊娠腹腔镜外科手术、关节置换外科手术、断骨修复外科手术、子宫切除术外科手术、胆囊摘除外科手术、心脏搭桥外科手术、血管成形术外科手术、旋磨术外科手术、乳腺穿刺活检外科手术、颈动脉内膜切除术手术、白内障手术、冠状动脉搭桥手术、扩张刮宫手术、疝气修复手术、下背痛手术、局部结肠切除术、前列腺切除术和扁桃体切除术手术过程：在打开手术伤口后，在手术过程中，在关闭手术伤口之前和/或在关闭手术伤口之后。

[0221] 一般癌症

[0222] 癌症已成为美国死亡的第二主要原因且占全部死亡率的20%以上。癌症为增殖性疾病且其特征为某些细胞的不可控分裂，其可导致形成一种或多种肿瘤。大量方法用于治疗癌症，包括外科手术、放射、化疗及其组合。尽管外科手术是用于一些局部肿瘤的相对普遍的方法，但在肿瘤切除后仍存在明显肿瘤复发机率。

[0223] 治疗癌症及其他增殖性疾病受对非癌性、健康组织的潜在损伤或毒性限制。在放射及外科手术治疗中，手术总体上受限于肿瘤部位且靠近肿瘤部位。然而，对于经历手术去除癌性组织的患者来说，可能存在明显的风险（例如，在去除前列腺或脑瘤中，可能存在对于周围重要组织的明显的不可修复损伤风险，例如经由潜在地减小对切除非肿瘤组织的需求。另外，在作为前列腺癌的一线治疗的集中放射治疗中，存在类似风险。在癌症的化学治疗性治疗中，药物全身性给药，使得整个身体暴露于药物。这些药物经设计对癌细胞是有毒的，但其对非癌细胞（通常）也是有毒的，使得患者在经历用于癌症的药物治疗时变得非常虚弱。经由试验，肿瘤学家能够给予对一些患者耐受的这些药物的剂量。然而，这些剂量通常不能成功治疗癌症。

[0224] 任何治疗癌症的方法都存在的一个问题是疾病的局部复发。例如，每年大约700,000名美国人经诊断患有局部癌症（大约64%的全部癌症患者）且近似五十万患者使用外科手术方法进行治疗。不幸地，经手术治疗的32%患者在初始治疗后复发（大约21%在初始手术部位处复发及11%在远处转移性部位处复发）。每年接近100,000名患者死于癌症的局部复发。这在乳腺癌中更是如此，其中经历乳房肿瘤切除术的39%的患者将经受疾病的局部复发。

[0225] 分期为判定患者体内的癌症（实体肿瘤）的进展的方法。简化方法基于癌症已进展程度将患者分成三组或三期：

[0226] 1期：可以通过手术去除器官的部分来治疗癌症。这还称为可切除期。

[0227] 2期：癌症已进展超过可切除点但仍受限于器官本身。

[0228] 3期：肿瘤已扩散至其他器官。

[0229] 许多癌症采用抗增殖剂，包括例如，5-氟尿嘧啶(Efudex®)、长春花生物碱(vinca

alkaloid) (例如,长春新碱(vincristine)(**Oncovin[®]**))、蒽环素(anthracycline) (例如,阿霉素(**Adriamycin[®]**))、顺铂(**Platinol-AQ[®]**)、盐酸吉西他滨(gemcitabine hydrochloride) (**Gemzar[®]**)、甲胺喋呤及紫杉醇治疗。与抗增殖剂、甲胺喋呤及紫杉醇相关联的毒性的一些实例在本文中的其他地方论述。甲胺喋呤已用于治疗几种癌症,包括例如,膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、头部及颈部癌、肝癌、肺癌及睾丸癌。紫杉醇已用于治疗几种癌症,包括例如,卵巢癌、乳腺癌及非小细胞肺癌(Compendium of Pharmaceutical and Specialties Thirty-fifth Edition,2000)。

[0230] 因5-氟尿嘧啶所致的毒性可以包括心脏血管毒性,诸如心肌缺血;中枢神经系统毒性,诸如欣快感、急性小脑综合征及共济失调;皮肤病学毒性,诸如秃发症及皮炎;胃肠毒性,诸如恶心、呕吐及口腔或胃肠溃烂;血液毒性,诸如白细胞减少症、血小板减少及贫血症;超敏感性毒性,诸如全身性过敏反应及接触过敏;眼部毒性,诸如增加流泪、畏光及结膜炎;及其他毒性,诸如发热。5-氟尿嘧啶已用于治疗多种癌症,包括例如,乳腺癌、结肠直肠癌、胃癌、肝脏癌、膀胱癌、头部及颈部癌、非小细胞肺癌、卵巢癌、胰腺癌及前列腺癌(Compendium of Pharmaceutical and Specialties Thirty-fifth Edition,2000)。

[0231] 因长春新碱所致的毒性包括中枢神经系统毒性,诸如儿童癫痫及幻觉;皮肤病学毒性,诸如秃发症;外渗毒性,诸如水疱;胃肠毒性,诸如恶心、呕吐、便秘及口炎;血液毒性,诸如骨髓抑制;神经毒性,诸如周围神经病变及自主神经病;眼部毒性,诸如复视、瞬时目盲及视神经萎缩;肾/代谢毒性,诸如尿潴留、高尿酸血症及膀胱乏力;呼吸毒性,诸如呼吸短促;及其他毒性,诸如儿童发热。这种抗增殖剂已用于治疗几种癌症,包括例如,霍奇金病、小细胞肺癌、威尔姆肿瘤及睾丸癌(Compendium of Pharmaceutical and Specialties Thirty-fifth Edition,2000)。

[0232] 因阿霉素所致的毒性包括心脏血管毒性,诸如心电图异常及心肌病;皮肤病学毒性,诸如秃发症及指甲变化;外渗危害毒性,诸如水疱;胃肠毒性,诸如恶心、呕吐及口炎;泌尿生殖系统毒性,诸如尿液红色;血液毒性,诸如骨髓抑制;超敏感性毒性,诸如过敏反应及皮疹;眼部毒性,诸如结膜炎;生殖毒性,诸如不孕症;及其他毒性,诸如高尿酸血症。这种抗增殖剂已用于治疗几种癌症,包括例如,乳腺癌、小细胞肺癌及卵巢癌(Compendium of Pharmaceutical and Specialties Thirty-fifth Edition,2000)。

[0233] 因顺铂所致的毒性包括心脏血管毒性,诸如心电图变化;皮肤病学毒性,诸如色素沉着;外渗危害毒性,诸如刺激性;胃肠毒性,诸如恶心及呕吐;血液毒性,诸如骨髓抑制及溶血性贫血;超敏感性毒性,诸如过敏反应;神经肌肉毒性,诸如周围神经病及急性脑病;眼部毒性,诸如球后神经炎;耳科毒性,诸如听觉损失及耳鸣;肾/代谢毒性,诸如中毒性肾病及低钾血症;及其他毒性,诸如不育。这种抗增殖剂已用于治疗几种癌症,包括例如,膀胱癌、小细胞肺癌、卵巢癌、睾丸癌、脑癌、乳腺癌、宫颈癌、头部及颈部癌、肝母细胞瘤及甲状腺癌(Compendium of Pharmaceutical and Specialties Thirty-fifth Edition,2000)。因盐酸吉西他滨所致的毒性包括例如血液毒性,诸如骨髓抑制;胃肠毒性,诸如恶心、呕吐及口炎;肝毒性,诸如血清转氨酶的瞬时升高;肾毒性,诸如蛋白尿、血尿、溶血性尿毒症综合征及肾衰竭;皮肤病学毒性,诸如皮疹及秃发症;水肿毒性,诸如水肿及周围水肿;及其他毒性,诸如发热。这种抗增殖剂已用于治疗胰腺癌及非小细胞肺癌(Compendium of

Pharmaceutical and Specialties Thirty-fifth Edition,2000)。

[0234] 本发明论述包括预防或治疗可治疗的局部癌症或实体肿瘤,包括前列腺、乳腺、胰腺、肝、肾、泌尿生殖系统、脑、胃肠系统、呼吸系统及头部及颈部的局部癌症或实体肿瘤。本文中的组合物等可以通过允许在距目标肿瘤远处的部位处控制释放高分子量褐藻糖胶,通过允许有效浓度的高分子量褐藻糖胶利用扩散或甚至全身性输送达至肿瘤和/或转移瘤来预防或治疗癌症,包括转移瘤。在以下段落中进一步论述这些癌症中的一些。

[0235] 前列腺癌

[0236] 前列腺癌为在衬在前列腺腺体的细胞中产生的恶性肿瘤。在美国,今年估计200,000名患者将罹患前列腺癌,且超过30,000名患者将死于该疾病。前列腺癌的新发病例死亡率为15%。癌症可能保持在前列腺内,或其可能扩散至周围组织或远部位(最经常淋巴结及骨骼)。通常前列腺癌无症状地扩散,仅在其已进展超出前列腺时才产生症状。在一些研究中,若前列腺癌已在早期期间经诊断且经治疗,患者的5年存活率为94%。

[0237] 前列腺癌经常论述为超过50岁的男性疾病。实际上,患有前列腺癌的80%男性为60岁且更年长。男性在其寿命期间诊断患有前列腺癌的机率为约1/10,与女性患乳腺癌的机率大致相同。近年来,由于可以在疾病出现早期(经常在症状呈现的前很久)检测到疾病的改良测试,经报导的新病例的数目显著地上升。任一给定年份中罹患前列腺癌的可能性随着年龄增加,但在50岁后显著地上升。

[0238] 用于前列腺癌的当前治疗选项取决于疾病进展程度、患者的年龄及总体健康状况。仅患有早期癌症或受额外更严重疾病影响的老年患者可以保守治疗,然而癌症为晚期的老年患者可能经历更具侵袭性的治疗。前列腺癌已通过各种方法治疗,包括放射疗法(外部辐射束放射或近距离放射疗法)、激素戒断或去势(外科手术或化学品)、抗增殖剂、外科手术及期望治疗(即,“观察等待”)。没有任何治疗保证绝对治愈,且一些具有相当大的副作用。

[0239] 早期前列腺癌(即,肿瘤在前列腺局部)可以“观察等待”治疗。前列腺癌的外科手术经推荐用于总体健康状况在其他方面良好且肿瘤受限于前列腺腺体的患者。针对70岁以下的男性前列腺的局部癌症的普遍治疗为根治性前列腺切除术(即,外科手术去除前列腺)。

[0240] 其癌症为前列腺区域局部的患者通常以外部辐射束放射(EBR)治疗。放射杀灭癌细胞且缩小肿瘤。EBR占局部前列腺癌治疗的小于20%,其中这些患者中大约50%经历放射后疾病复发。与早期前列腺癌检测及来自患者的增加的需求组合,近距离放射疗法(即,局部放射疗法)的使用预期将会增加。在1995年,仅2.5%的新诊断患者使用近距离放射疗法治疗。近距离放射疗法涉及将放射性金属“种”植入前列腺肿瘤中。

[0241] 用于已扩散的前列腺癌的治疗涉及去除睾酮或激素疗法。两种皆用于抑制或终止驱动癌症生长的睾酮的产生。大约20%的全部前列腺癌患者经历激素戒断疗法。激素疗法包括醋酸戈舍瑞林乙(goserelin acetate) (Zoladex®)或醋酸亮丙瑞林(leuprolide acetate) (Lupron®)。用于治疗前列腺癌的抗增殖剂包括5-氟尿嘧啶。

[0242] 乳腺癌

[0243] 在美国,乳腺癌已成为女性当中最常见的癌症,其中每年诊断约180,000个新病例

(男性乳腺癌占全部经诊断乳腺癌的约5%)。乳腺癌已成为女性的仅次于肺癌的致死原因,且其已引起每年大约50,000起死亡。美国女人在其寿命期间具有1/8(或约13%)的罹患乳腺癌机率。在过去十年间,报导最多的乳腺癌为小、原发性(独立地产生;并非由转移瘤所引起)肿瘤。大致70%至80%的新诊断患者展现早期疾病(1期或2期),且大部分尚未涉及腋下(手臂下方)淋巴结。

[0244] 大部分乳腺癌为癌(即,从上皮组织中生长出的恶性肿瘤)。小于1%的乳腺癌为肉瘤或由结缔组织、骨骼、肌肉或脂肪产生的肿瘤。此外,大部分乳腺癌(约75%)为导管癌,在与乳导管并排的组织中产生。更小量的癌症(约7%)在乳小叶内发现且被称作小叶癌。佩吉特病(Paget's disease)(乳晕及乳头癌)及炎性癌占几乎全部其他形式的乳癌。

[0245] 乳腺癌治疗为复杂的且取决于多种因素。两个重要因素为肿瘤类型和进展阶段。尤其,肿瘤特征帮助将个体分为两个组:(1)处于癌症复发低风险的个体及(2)处于癌症复发高风险的个体。特定预后因素将患者置放在这些组中的任一者中。这些因素包括肿瘤大小;女性性激素雌激素及孕酮(ER/PR)受体的存在;细胞生长周期阶段(肿瘤细胞是否有效地分裂或处于“S阶段”);被称为“her-2-neu”蛋白的存在;肿瘤级别、肿瘤细胞分化或改变的指示物;及肿瘤倍性,肿瘤细胞内的基因物质的集合数目。

[0246] 已通过肿块切除术及放射疗法来治疗无明显淋巴结涉及的原发性疾病。更明显的淋巴结涉及可保证乳房切除术及去除辅助淋巴结。在此阶段,癌转移及局部复发的机率已经较高。涉及放射疗法及化疗的转移性疾病的治疗只是缓解性的,其为免疫抑止、细胞毒性及白血球减少。包括例如,5-氟尿嘧啶、阿霉素、甲胺喋呤及紫杉醇的抗增殖剂已被批准用于抗乳腺癌。

[0247] 胰腺癌

[0248] 胰腺为位于接近胃及小肠的消化系统的器官。其具有两个主要功能:产生酶和激素。胰腺癌可能出现在外分泌(即,酶)胰腺(例如,典型胰腺腺癌)中或可能出现在内分泌(即,激素)胰腺中。

[0249] 外分泌胰腺癌是极严重的健康问题。在美国,大约28,000名患者经诊断患有胰腺癌,同时每年约相同数目死于该疾病。胰腺癌同等地出现在男性及女性中。由于诊断困难、胰腺癌的固有侵袭性本质及稀少的可用全身性治疗选项,在诊断后,仅大约4%的经诊断患有胰腺癌的患者存活5年。胰腺癌已成为继乳腺癌、肺癌、结肠癌及前列腺癌之后的第5个癌症死亡的主要原因。

[0250] 对于胰腺癌的治疗选择很大程度上取决于肿瘤阶段。可能的治疗包括外科手术、抗增殖剂、放射及生物疗法。外科手术已通常保留用于其癌症视为可切除的1期患者。有时,在手术之前或之后给予疗法(诸如放射及抗增殖剂)的组合可以增大患者的存活机率。可以在临床试验中使用抗增殖剂治疗被视为不可切除的胰腺癌(通常II期或晚期)。诸如例如,吉西他滨或5-氟尿嘧啶的抗增殖剂对胰腺癌具有一些效果且吉西他滨已用作姑息性药剂。本文中其他地方论述因这些抗增殖剂所致的毒性。放射疗法在与化疗组合使用时对胰腺癌具有一些效果。仅放射疗法可以抑制症状。这种治疗形式也已经用于II期或晚期胰腺癌。

[0251] 膀胱癌

[0252] 在1998年,在美国估计将诊断出超过54,000个新的膀胱癌病例且约15,000例死亡将归因于该疾病。膀胱癌已成为美国男性中第四种最常见癌症且在美国女性中为第九种最

常见癌症。膀胱癌在男性中出现的频率为女性的三倍。主要地,年长男性疾病中,膀胱癌已成为显著疾病及死亡原因。膀胱癌风险随着年龄增长而大幅度增加(80%病例在大于50岁的人群中出现),其中超过二分之一的全部膀胱癌死亡在70岁后出现。在超过65岁的白人男性中,膀胱癌的年疾病率已为每1,000个人中有大约2个病例;这与65岁以下的每1,000个人中有0.1个病例的比率形成对比。在个人寿命期间,罹患膀胱癌的机率已大于3%;然而,膀胱癌的死亡机率较小(<1%)。膀胱癌罕见地出现在小于40岁的人群中。

[0253] 近期研究表明某些基因及遗传性代谢能力可能在膀胱癌中起作用。移行细胞癌(TCC)已为膀胱癌的最常见形式。TCC通常以浅表(表面)、乳头状(疣状)、茎状基底上的外生性(向外成长)块的形式出现。但在一些情况下,TCC可附接于宽广基底上或其可呈现溃疡(在凹痕式病变内)。乳头状TCC通常从增殖区域开始,随后去分化或失去个别细胞特征。仅约10%至30%的乳头状TCC发展成浸润性癌症。相比之下,非乳头状形式的TCC更可能变成浸润性的。如所述,此类TCC可能呈现溃疡或平整的。由退行性上皮组成的平整、非乳头状TCC已经被分类为原位癌(CIS或TIS)。CIS的组织包含大的具有明显核仁(细胞内的圆形体;涉及蛋白质合成)且缺少正常极性的细胞。

[0254] 膀胱癌的治疗取决于多种因素。这些因素中最重要的是呈现的肿瘤类型及其阶段。普遍治疗包括经尿道切除术(TUR)、电外科手术、激光手术、膀胱内治疗、抗增殖剂、外科手术疗法、膀胱切除术及放射疗法。用于治疗膀胱癌的抗增殖剂的实例包括例如5-氟尿嘧啶、顺铂及甲胺喋呤。因抗增殖剂、5-氟尿嘧啶、顺铂及甲胺喋呤所致的毒性在本文中其他地方论述。

[0255] 脑癌

[0256] 脑瘤经常为不可手术的且多于80%的患者在诊断后12个月内死亡。在美国,每年诊断出大约18,000例原发性颅内(脑)癌新病例。这相当于全部成年人癌症的2%。多于50%的这些癌症为高度神经胶质瘤(即,多形性胶质母细胞瘤及间变性星形细胞瘤肿瘤)。患有这些肿瘤的患者通常遭受严重残疾,诸如运动障碍、癫痫及视觉异常。

[0257] 在脑组织中开始的肿瘤被称为原发性脑瘤。原发性脑瘤通过其开始的组织类型进行分类。最常见脑瘤为开始于胶质(支持性)组织中的神经胶质瘤。其他的脑瘤包括星形细胞瘤、脑干神经胶质瘤、室管膜瘤及少突神经胶质瘤。

[0258] 已针对大部分类型及大部分位置建议外科手术去除脑瘤且应尽可能在保留神经功能的限制内完成。此规则的例外为深部肿瘤,诸如桥脑胶质瘤,其根据临床证据诊断且大约有50%的时间无需进行初次外科手术即可接受治疗。然而,在许多情况下,执行活组织检查诊断。立体定向的活组织检查可用于难以到达及切除的病变。患有脑瘤的罕见地可治愈或不可切除的患者应被视为用于评估辐射增敏剂、热疗或间质性近距离放射治疗结合外部辐射束放射疗法使用以改善肿瘤的局部控制的临床试验或用于评估新药物及生物反应调节剂的研究的候选者。

[0259] 放射疗法在治疗大部分肿瘤类型中具有主要作用且可增大治愈率或延长无病生存期。放射疗法还可以适用于治疗最初仅通过外科手术治疗的患者复发。可以在外科手术及放射疗法之前、期间或之后使用化疗。还通过化疗来治疗复发性肿瘤。用于治疗脑瘤的抗增殖剂包括顺铂。与这种抗增殖剂相关联的毒性的实例在本文中其他地方论述。

[0260] 再狭窄

[0261] 再狭窄为引起血管壁增厚和丧失由血管供应至组织的血流的慢性血管损伤形式。此炎性疾病可以响应于包括减轻血管梗阻的任何手术的血管重建手术而出现。因此,再狭窄已成为限制这些手术的有效性的主要限定性因素。

[0262] 本发明论述包括例如通过向血管给药治疗有效量的寡核苷酸治疗剂与抗炎剂的组合来预防或治疗再狭窄。适合的组合物包括可以以外科手术方式植入再狭窄部位或潜在再狭窄部位处或可以以聚合性糊剂或凝胶形式经由导管注射的聚合性载体。适合的组合物可以包括本文中所论述的高分子量褐藻糖胶。

[0263] 关节炎

[0264] 类风湿性关节炎(RA)为衰弱的慢性炎性疾病,其特征为关节组织的疼痛、肿胀、滑膜细胞增殖(血管翳形成)及破坏。在晚期,该疾病经常损害关键器官且可致命。该疾病涉及免疫系统(巨噬细胞/单核细胞、中性粒细胞、B细胞及T细胞)复杂的细胞介素相互作用及滑膜细胞功能失常及增殖的多个成员。已推荐用疾病修饰抗风湿药物(DMARD),诸如甲胺喋呤用于早期侵袭性治疗,该药物在本文中其他地方论述。

[0265] 结晶诱发的关节炎的特征为关节中结晶诱发的巨噬细胞及中性粒细胞活化且之后许多天伴随剧烈疼痛。疾病进展使得发作间隔变得更短且患者的发病率增加。此疾病总体上已通过非类固醇抗炎药(NSAID),诸如双氯芬酸钠(Voltaren®)对症治疗。此抗炎剂具有毒性,包括中枢神经系统毒性,诸如眩晕及头痛;皮肤病学毒性,诸如皮疹及瘙痒;胃肠毒性,诸如加重的溃疡性结肠炎及克罗恩病;泌尿生殖毒性,诸如急性肾衰竭及肾乳头坏死;血液毒性,诸如粒细胞缺乏、白血球减少及血小板减少;肝毒性,诸如升高的肝转氨酶及肝炎;及其他毒性,诸如哮喘及过敏反应。

[0266] 本发明论述包括例如经由向患者给药治疗有效量的寡核苷酸治疗剂及可选的抗炎剂来预防或治疗类风湿性关节炎。适合的组合物包括聚合性载体,其可以以抗炎剂及微颗粒的受控释放载体形式以寡核苷酸治疗剂的受控释放载体形式(其反过来已经并入于聚合性载体中)注射至关节中。适合的组合物可以包括本文中所论述的高分子量褐藻糖胶。所述聚合性载体可以采取聚合物微球体、糊剂或凝胶的形式。

[0267] 炎症病症

[0268] 本文中的组合物等可选地抑制或治疗涉及嗜中性白细胞的炎症病症,例如包含向患者给药包括寡核苷酸治疗剂及抗炎剂的组合物。所述病症的实例包括结晶诱发的关节炎;骨关节炎;非类风湿性炎性关节炎;混合结缔组织疾病;干燥综合征;强直性脊柱炎;贝赫切特综合征;结节病;银屑病;湿疹;炎性肠病;慢性炎性肺病;神经屏障及多发性硬化。在以下段落中进一步论述这些疾病中的一些。

[0269] 慢性炎性皮肤病(包括牛皮癣和湿疹)

[0270] 牛皮癣为常见的慢性炎性皮肤病,其特征为发痒、灼热、蜇伤且易于出血的突起的、增厚的及鳞片状病变。当这些疾病在疾病的晚期具有细胞增殖及血管生成组分时,患者通常具有伴随的关节炎病症。症状可以通过诸如泼尼松的类固醇抗炎剂或诸如甲胺喋呤的抗增殖剂来治疗,这些药剂在本文的其他地方论述。本文中的组合物还可以用于抑制或以其他方式治疗和/或预防慢性炎性皮肤病,例如银屑病和/或湿疹。

[0271] 以下提供可以通过本文中所论述的组合物治疗的炎性疾病的一些额外代表性实例,包括例如动静脉畸形(血管畸形)的动脉栓塞;月经过多;急性出血;中枢神经系统屏障

及脾功能亢进;炎性皮肤病,诸如银屑病;湿疹疾病(异位性皮炎、接触性皮炎、湿疹);免疫大疱疾病;及包括各种病症的炎性关节炎,所述病症包括类风湿性关节炎、混合结缔组织疾病、干燥综合征、强直性脊柱炎、贝赫切特综合征、结节病、结晶诱发的关节炎及骨关节炎(以上所有特征以发炎的疼痛关节为重要症状)。

[0272] 缺血

[0273] 缺血或局部缺血涉及血液供应限制,可以包括恰当组织功能所需的氧、葡萄糖及其他组分供应不足,使得组织损坏和/或功能不全。缺血可能导致严重问题。例如,组织可能变得缺氧、坏死且可形成结块。已作出各种尝试以预防和/或治疗缺血。例如,复原血流或再灌注。然而,复原血液涉及再引入氧,其可能导致因产生自由基所致的额外损坏,进而导致再灌注损伤。再灌注损伤可能导致严重问题。本文的组合物可以用于抑制或以其他方式治疗和/或预防缺血和/或再灌注损伤。

[0274] 内毒素血症

[0275] 内毒素血症是在血液中存在内毒素。内毒素血症可能导致严重问题。例如,内毒素血症可能引起败血症休克。本文中的组合物可以用于抑制或以其他方式治疗和/或预防内毒素血症。

[0276] 瘢痕疙瘩瘢痕

[0277] 瘢痕疙瘩特质致使伤口通过突起的瘢痕愈合。瘢痕疙瘩特质的突起瘢痕涉及异常纤维性瘢痕。瘢痕疙瘩特质导致严重问题,例如疼痛及外形损伤。本文中的组合物可用于抑制或以其他方式治疗和/或预防瘢痕疙瘩特质及其引起的突起的瘢痕。

[0278] 瘢痕疙瘩(瘢痕疙瘩瘢痕)是生长扩增超过正常皮肤的瘢痕类型。瘢痕疙瘩涉及异常胶原生长,包括I型及III型胶原异常生长。瘢痕疙瘩导致严重问题,例如疼痛、瘙痒,并且若经感染,则可能溃烂。已作出尝试以治疗或预防瘢痕疙瘩,包括使用外科手术、敷料、类固醇注射及激光疗法。本文中的组合物可以用于抑制或以其他方式治疗和/或预防瘢痕疙瘩。

[0279] 皮炎

[0280] 皮炎包括皮肤炎症,所属皮肤炎症包括特应性皮炎及接触性皮炎。例如,接触性皮炎涉及在皮肤与外来物质接触的后皮肤的局部皮疹和/或刺激。例如,特应性皮炎为长期复发性、瘙痒皮肤病。特应性皮炎有时被称作贝尼埃氏痒疹(prurigo Besnier)、神经性皮炎、内源性湿疹、曲湿疹、婴儿湿疹、儿童湿疹及痒疹病(prurigo diathetique)。湿疹为呈皮炎形式的疾病。其他类型的皮炎包括海绵性皮炎、脂溢性皮炎(头皮)、出汗屏障性皮炎(汗疱疹)、荨麻疹、泡状皮炎(大疱性皮炎)及流行性风疹。皮炎可能导致严重问题。例如,干燥皮肤、皮肤皮疹、皮肤水肿、皮肤发红、皮肤瘙痒、皮肤结痂、开裂、起泡、渗液及出血。已作出尝试以治疗或预防皮炎,包括使用皮质类固醇及煤焦油。本文中的组合物可以用于抑制或以其他方式治疗和/或预防皮炎,包括特应性皮炎、湿疹、接触性皮炎、海绵性皮炎、脂溢性皮炎、出汗屏障性皮炎、荨麻疹、泡状皮炎及流行性荨麻疹。

[0281] 红斑痤疮

[0282] 红斑痤疮为典型地特征化为面部红斑的慢性疾病或病症。红斑痤疮可能导致严重问题。例如,红斑痤疮通常从额头、鼻子或脸颊发红开始,还可能导致脖子、耳朵、头皮和胸部发红。红斑痤疮可能导致包括毛细管扩张、丘疹、脓包、疼痛感觉的额外症状,且在晚期病例中,可能产生肥大性酒渣鼻(红色分叶鼻)。红斑痤疮亚型包括红斑狼疮样红斑痤疮、脓包

性丘疹样红斑痤疮、结块性红斑痤疮及眼部红斑痤疮。已作出尝试以治疗或预防红斑痤疮，包括使用非类固醇抗炎药及抗生素。本文中的组合物可以用于抑制或以其他方式治疗和/或预防红斑痤疮，包括其红斑狼疮、脓包性丘疹、红斑痤疮及眼部亚型。

[0283] 医疗器械、医疗材料、组合和药物产品

[0284] 本文的论述还提供医疗器械、医疗材料、组合及药物产品，其包括在医疗器械、医疗材料、组合产品或药学上可接受的容器中的如本文所论述的组合物。该产品还可包括与容器相关联的注意事项，典型地以由监察医疗器械、医疗材料、组合及药剂或生物药剂的制造、使用或销售的管理机构规定的形式，从而该注意事项反映该组合物经该机构批准，诸如高分子量褐藻糖胶已经批准作为例如用于人类或兽医给药以治疗增殖性疾病或炎症性疾病（例如炎性关节炎、再狭窄、外科手术粘连、银屑病及腹膜炎）的抗增殖剂或抗炎剂的事项。还可以包括使用本文中的高分子量褐藻糖胶的说明书。所述说明书可以包括关于患者的给药及投药模式的信息。

[0285] 本申请进一步涉及制备本文讨论的高分子量褐藻糖胶，系统等的各种元件的方法，包括制备组合物本身，以及使用该组合物的方法，包括本文中对状况，疾病等的示例性治疗。

[0286] 本申请进一步包括用于治疗纤维性粘连、关节炎、银屑病或视需要的其他疾病的医疗器械、医疗材料、药物组合产品及药物产品，其包括本文中呈现的高分子量褐藻糖胶及高分子量褐藻糖胶组合物。所述材料等可以用于治疗纤维性粘连，诸如外科手术粘连、关节炎、银屑病或视需要的其他疾病的药物中。还提供制造且使用能够减少与患者，包括人类患者体内的纤维性粘连、关节炎及银屑病中的至少一种相关联的症状的所述药物的方法，所述方法包括将药学上有效量的褐藻糖胶，诸如如本文所论述的岩藻多糖与药学上可接受的赋形剂或缓冲剂组合。

[0287] 以下实施例提供了本文中某些实施方式的示例性讨论，但是本公开和权利要求书不限于此。

[0288] 实施例1：化学结构修饰

[0289] 渗出物-提取物获自极北海带 (*Laminaria Hyperborea*)。渗出物-提取物通过切向过滤 (TFF) 通过100kDa过滤器来过滤并去除小分子。将所得渗余物的样品冻干以获得以其他方式未修饰的样品A。通过添加10M NaOH溶液且在室温下静置16小时使所得渗余物达至0.25M NaOH。然后将所得样品通过50kDa过滤器离心过滤且收集所得渗余物并冻干以获得经碱处理的样品B。通过质子核磁共振光谱法 ($^1\text{H-NMR}$) 分析未修饰的样品A及经碱处理的样品B两者且图9A中示出所得 $^1\text{H-NMR}$ 光谱。

[0290] 图9A证明了已完成的褐藻糖胶的化学结构修饰：存在于未修饰的样品A中的具有约2.0ppm化学位移的较宽峰并不存在于经碱处理的样品B中。

[0291] 通过 $2\text{D}^1\text{H}-^{13}\text{C}$ 异核多量子相干 (HMQC) 进一步分析未修饰的样品A及经碱处理/修饰的样品B。在70°C下伴随溶剂信号抑制在配备有5-mm冷探针的600MHz光谱仪上获得图9B中示出的HMQC谱。在碳尺寸10-30ppm范围内以256-512的8次增量的扫描每次获得HMQC谱的大量扫描；这样的扫描经组合以产生图9B中的光谱。

[0292] 未修饰的样品A的HMQC谱具有对应于O-乙酰基的交叉峰，由图9B中的带圆圈信号指示。此交叉峰不存在于经碱处理的样品B的光谱中。这证明了从褐藻糖胶中去除乙酰基，

且因此通过NaOH处理来对经碱处理的样品B中的褐藻糖胶进行化学结构修饰。

[0293] 实施例2:切向流过滤

[0294] 可以通过切向流过滤获得高分子量的褐藻糖胶。将宽分布起始褐藻糖胶以50mg/mL的浓度溶于蒸馏水中。在此实施例中,在100kDa截留分子量(MWCO)切向流过滤器(TFF)盒上,对4透析体积的宽分布褐藻糖胶进行了蒸馏水渗滤,以去除不需要的较低分子量组分,并收集了TFF过程的截留物,其包含高分子量的褐藻糖胶。渗滤可以用任何所需的MWCO TFF过滤器完成,例如50kDa、70kDa、100kDa、300kDa、500kDa和1000kDa MWCO TFF盒。所得的高分子量褐藻糖胶具有比宽分子量分布起始褐藻糖胶更高的平均分子量。

[0295] 实施例3:顺序切向流过滤分段

[0296] 提供了输入宽分子量分布起始岩藻多糖,其平均分子量为365.6kDa,并且多分散指数(PDI)=3.58,其已通过0.22微米过滤器被预过滤。将华盛顿港的Pa11提供的100kDa MWCO的TFF过滤器盒用作较高MWCO TFF盒,并将华盛顿港的Pa11提供的50kDa的TFF盒用作较低MWCO TFF盒。对以下TFF盒对重复该过程:由马萨诸塞州伯灵顿的Millipore提供的MWCO 300kDa的TFF过滤器和由华盛顿港的Pa11提供的MWCO 100kDa的TFF过滤器,由华盛顿港的Pa11提供的MWCO 50kDa的TFF过滤器和由华盛顿港的Pa11提供的30kDa的过滤器,由华盛顿港的Pa11提供的30kDa的TFF过滤器和由华盛顿港的Pa11提供的10kDa的TFF过滤器。盒件均为聚醚砜(PES)类型。

[0297] 在如上所述的顺序切向流过滤之后,使用凝胶渗透色谱法(GPC)分析了各种获得的褐藻糖胶,包括包含起始褐藻糖胶分子量分布的高分子量区段的高分子量褐藻糖胶。结果显示在下表1中。

| | GPC PRT (分钟) | PMW (kDa) | WAMW (kDa) | NAMW (kDa) | % 分布 MW> 100 kDa | % 分布 MW> 200 kDa | % 分布 MW> 500 kDa | PDI |
|--|-----------------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|--|--|--|------------|
| [0298] 输入 | 25.51 | 299.6 | 365.6 | 102.2 | 76.3 | 57.2 | 23.1 | 3.58 |
| TFF 过滤 器对的 MWCO (kDa) | | | | | | | | |
| 300-100 | 25.62 | 278.3 | 394.2 | 151.9 | 83.5 | 63.3 | 24.9 | 2.60 |
| 100-50 | 27.96 | 59.8 | 125.1 | 42.6 | 37.3 | 17.4 | 3.3 | 2.94 |

| | | | | | | | | | |
|--------|--------------|-------|------|------|-----|-----|-----|-----|------|
| [0299] | 50-30 | 30.33 | 12.6 | 20.6 | 9.8 | 1.6 | 0.3 | 0.0 | 2.11 |
| | 30-10 | 34.22 | 1.0 | 2.1 | 1.2 | -- | -- | -- | 1.66 |

[0300] 表1. 岩藻多糖的TFF分段

[0301] 实施例4: 阳离子增强的切向流过滤

[0302] 提供了起始溶液形式的宽分子量分布输入起始岩藻多糖组合物, 其已通过0.22微米过滤器预过滤, 具有的重均分子量为436.4kDa且多分散指数(PDI)为3.24。生物相容性水溶性季铵盐胆碱被选作化学添加剂。将胆碱以1:2的胆碱:岩藻多糖质量比加入到预过滤的起始溶液中, 并将所得混合物搅拌直至胆碱溶解。胆碱可以或可以不结合到岩藻多糖分子上的硫酸酯位点。在第一TFF过程中, 然后将经胆碱处理的岩藻多糖溶液在300kDa的过滤器盒上进行切向流过滤, 以获得包含胆碱结合的高分子量岩藻多糖的第一截留物, 其为经胆碱处理的截留物。在该第一胆碱增强的TFF过程中, 将经胆碱处理的岩藻多糖溶液用4透析体积的1%w/v胆碱冲洗溶液的进行渗滤。收集第一TFF过程的经胆碱处理的截留物, 并进行第二TFF过程, 以用钠阳离子代替胆碱阳离子。

[0303] 第二TFF过程是脱胆碱的TFF过程, 包括在50kDa过滤器盒上渗滤第一TFF过程的经胆碱处理的截留物, 同时用NaCl处理截留物以用钠阳离子代替胆碱阳离子。在该实施例中, 用4体积的2M NaCl渗滤经胆碱处理的截留物, 以从高分子量岩藻多糖中去除胆碱添加剂。然后, 用去离子水对第二TFF过程的脱胆碱截留物进行渗滤, 直到渗透物的电导率降至5mS/cm以下, 以表明已去除过量的NaCl。在如上所述的阳离子增强的TFF之后, 使用凝胶渗透色谱法(GPC)分析包括高分子量褐藻糖胶的方法中的各种截留物的样品。

[0304] 结果示于下表2。

[0305]

| | GPC PRT (分 钟) | PMW (kDa) | WAMW (kDa) | NAMW (kDa) | % 分布 MW> 100 kDa | % 分布 MW> 200 kDa | % 分布 MW> 500 kDa | PDI |
|---|----------------------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|--|--|--|------------|
| 输入 | 24.67 | 436.4 | 490.7 | 151.3 | 82.3 | 66.1 | 34.8 | 3.24 |
| TFF 过 滤器截 留物的 MWCO (kDa) | | | | | | | | |
| 300 | 24.71 | 423.6 | 525.5 | 206.7 | 88.5 | 72.6 | 37.3 | 2.54 |
| 100 | 24.10 | 639.8 | 740.7 | 411.0 | 97.9 | 90.6 | 59.1 | 1.80 |

[0306] 表2. 岩藻多糖的阳离子增强的TFF分段

[0307] 实施例5: 离心沉淀

[0308] 提供了包含0.5%w/v的起始褐藻糖胶组合物的起始溶液, 该组合物已经通过0.22 μm 的预过滤器进行了预过滤。在离心管中在水中形成20%、10%和5%w/v蔗糖的逐步梯度, 其中5%的层是最顶层, 而20%的层在离心管的底部。然后将包含起始岩藻多糖组合物的0.5%起始溶液分层在5%w/v蔗糖层上。所得的层结构在图10中示出。然后将具有这四层的试管在190,000重力(g)下离心6小时。倒出上清液, 将残留在离心管中的沉淀物重新溶解在水中, 该沉淀物中含有所需的高分子量褐藻糖胶。然后通过凝胶渗透色谱法(GPC)分析重新溶解的高分子量褐藻糖胶。结果示于下表3。

| | GPC PRT (分钟) | PMW (kDa) | WAMW (kDa) | NAMW (kDa) | % 分布 MW> 100 kDa | % 分 布 MW> 200 kDa | % 分 布 MW> 500 kDa | PDI |
|--|-----------------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|--|---|---|------------|
| [0309] 输入 | 24.57 | 471.7 | 590.1 | 200.6 | 87.4 | 72.3 | 40.3 | 2.94 |
| 重新 溶解 的岩 藻多 糖沉 淀物 | 22.95 | 1472.9 | 1113.0 | 492.3 | 98.2 | 91.0 | 69.1 | 2.26 |

[0310] 表3. 使用5%-10%-20%蔗糖屏障的岩藻多糖的离心沉淀物

[0311] 实施例6:凝胶电泳提取

[0312] 提供了具有宽分子量分布的起始岩藻多糖组合物。将起始岩藻多糖组合物以50mg/mL溶解,通过0.22微米过滤器预过滤,并加载到由380mL琼脂糖铸成的0.5%琼脂糖凝胶上。将加载的凝胶浸入40mM三乙酸1mM EDTA的运行缓冲液中,该缓冲液也称为TAE缓冲液。将90V电压施加在缓冲液上50分钟,使阳极靠近起始岩藻多糖组合物孔。这使得岩藻多糖通过凝胶按质荷比分离。为了可视化,用亚甲基蓝对凝胶进行染色,亚甲基蓝是一种已知可以对岩藻多糖染色的染料。然后从孔开始1cm将琼脂糖凝胶切成与孔平行的1cm宽区段。将凝胶的区段在蒸馏水中搅拌,以通过摇动混合物从凝胶中提取岩藻多糖区段。

[0313] 通过凝胶渗透色谱法(GPC)分析了电泳提取的岩藻多糖区段,其可能包含高分子量岩藻多糖。结果显示在下表4中。

[0314]

| | GPC PRT (分钟) | PMW (kDa) | WAMW (kDa) | NAMW (kDa) | % 分 布 MW> 100 kDa | % 分 布 MW> 200 kDa | % 分 布 MW> 500 kDa | PDI |
|--------------------------------------|-----------------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|---|---|---|------------|
| 输入 | 24.67 | 462.6 | 581.3 | 170.9 | 86.7 | 73.0 | 40.8 | 3.40 |
| 凝胶 区段 距孔 的距 离 | | | | | | | | |
| 1-2 cm | 25.07 | 349.4 | 619.9 | 81.33 | 71.3 | 55.9 | 30.7 | 7.62 |
| 2-3 | 25.16 | 327.8 | 362.0 | 118.2 | 76.2 | 56.7 | 23.9 | 3.06 |

[0315]

| | | | | | | | | |
|-------------------|-------|-------|-------|-------|------|------|------|------|
| cm | | | | | | | | |
| 3-4 cm | 25.47 | 263.6 | 288.4 | 103.7 | 70.9 | 48.8 | 16.7 | 2.78 |
| 4-5 cm | 25.58 | 242.7 | 279.1 | 66.0 | 62.8 | 42.2 | 14.9 | 4.23 |

[0316] 表4. 使用TAE缓冲液在琼脂糖凝胶上通过预过滤的起始岩藻多糖进行电泳分离的GPC结果。

[0317] 实施例7:膜透析

[0318] 提供了包含已通过0.22微米过滤器预过滤的起始岩藻多糖组合物的5%w/v的起始溶液。将起始溶液置于标称截留分子量为300kDa的乙酸纤维素透析管中。将透析管密封并放置在装有20升去离子水的容器中。每12小时用新鲜的去离子水替换去离子水,以确保在膜孔中连续扩散。允许透析过程持续约5天。

[0319] 使用凝胶渗透色谱法(GPC)分析透析管中的预过滤的起始岩藻多糖组合物和透析后的高分子量岩藻多糖。结果示于下表5。

| | | | | | | | | | |
|--------|---------------------|-----------------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|--|--|--|------------|
| [0320] | | GPC PRT (分钟) | PMW (kDa) | WAMW (kDa) | NAMW (kDa) | % 分 布 MW> 100 kDa | % 分布 MW> 200 kDa | % 分 布 MW> 500 kDa | PDI |
| | | | | | | | | | |
| [0321] | 输入 | 24.57 | 471.7 | 590.1 | 200.6 | 87.4 | 72.4 | 40.3 | 2.94 |
| | 透析的 岩藻多糖 | 24.29 | 599.1 | 777.0 | 374.5 | 96.8 | 88.6 | 57.0 | 2.07 |

[0322] 表5. 岩藻多糖在300kDa膜上相对于去离子透析的GPC结果。

[0323] 实施例8: 选择性沉淀

[0324] 提供了起始岩藻多糖组合物, 其已经通过0.22 μ m的预过滤器进行了预过滤, 并且通过在100kDa TFF盒上用去离子水进行渗滤以进行脱盐以去除可能干扰沉淀过程的不想要的低分子量盐。准备了一系列相同的起始褐藻糖胶在蒸馏水中的预过滤和脱盐起始溶液。使溶剂组合物达到不同的乙醇预定浓度。这为从下表6所示的溶液组合物中沉淀出岩藻多糖制备了不同的溶剂环境。将最少量的NaCl形式的离子剂添加到每种溶液组合物中, 以引发岩藻多糖从溶液中的沉淀。将沉淀物和溶液组合物的混合物在2300重力下离心10分钟。分别倾析出液体上清液, 并收集固体岩藻多糖。

[0325] 将固体岩藻多糖重新溶解于蒸馏水中, 并通过凝胶渗透色谱法进行分析。结果显示在下表6中。

| | | | | | | | | | |
|--------|-------------|------------|------------|-------------|-------------|------------|------------|------------|------------|
| [0326] | %岩藻多 | GPC | PMW | WAMW | NAMW | % 分 | % 分 | % 分 | PDI |
|--------|-------------|------------|------------|-------------|-------------|------------|------------|------------|------------|

[0327]

| 糖溶液中的乙醇 | PRT (分钟) | (kDa) | (kDa) | (kDa) | 布 MW> 100 kDa | 布 MW> 200 kDa | 布 MW> 500 kDa | |
|---------|-------------|-------|-------|-------|------------------------|------------------------|------------------------|------|
| 40 | 24.85 | 394.1 | 447.0 | 133.5 | 76.6 | 62.5 | 31.3 | 3.35 |
| 50 | 25.96 | 182.1 | 347.9 | 149.2 | 80.8 | 53.9 | 20.3 | 2.33 |
| 60 | 25.43 | 263.1 | 335.5 | 119.1 | 73.9 | 51.9 | 20.0 | 2.82 |
| 70 | 24.91 | 376.1 | 382.6 | 117.2 | 75.7 | 56.8 | 25.4 | 3.26 |

[0328] 表6. 使用乙醇作为沉淀溶剂对岩藻多糖的选择性沉淀

[0329] 实施例9: 阴离子吸附

[0330] 将包含约500mg的宽分子量分布的脱盐的岩藻多糖的起始溶液在约14mL的DEAE-Sepharose®树脂上再循环约16小时, 以使低分子量岩藻多糖与树脂上的活性位点结合。约16小时后, 收集再循环溶液。这将高分子量岩藻多糖与已经与树脂键合的低分子量岩藻多糖分离。然后将10% w/v的NaCl在树脂上再循环4小时以从树脂上置换低分子量岩藻多糖。然后收集富含岩藻多糖的盐溶液, 并通过5kDa离心过滤器脱盐, 以将收集的低分子量岩藻多糖与不需要的盐分离。对脱盐的起始岩藻多糖、在离子交换过程中未吸附的高分子量岩藻多糖和从树脂中提取的低分子量岩藻多糖进行GPC。结果显示在下表7中。

[0331]

| | GPC | PMW | WAMW | NAMW | % 分 | % 分布 | % 分布 | PDI |
|--|-----|-----|------|------|-----|------|------|-----|
|--|-----|-----|------|------|-----|------|------|-----|

[0332]

| | PRT (分钟) | (kDa) | (kDa) | (kDa) | 布 MW> 100 kDa | MW> 200 kDa | MW> 500 kDa | |
|--------------------------------|---------------------|--------------|--------------|--------------|-------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|------|
| 输入 | 24.57 | 462.4 | 576.6 | 198.0 | 87.1 | 71.9 | 39.6 | 2.91 |
| 未吸 附的 岩藻 多糖 | 24.20 | 601.3 | 844.5 | 391.4 | 96.8 | 90.9 | 60.5 | 2.16 |
| 吸附 的岩 藻多 糖 | 25.82 | 193.6 | 245.8 | 119.2 | 73.0 | 43.8 | 10.7 | 2.06 |

[0333] 表7. 岩藻多糖的阴离子交换区段:DEAE-Sepharose作为树脂

[0334] 实施例10:阴离子吸附

[0335] 将含有约1g的宽分子量分布的脱盐岩藻多糖的起始溶液与约10g的 **Amberlyst®** A26树脂混合约16小时,以使低分子量岩藻多糖与树脂上的活性位点结合。随后通过倾析将包含高分子量岩藻多糖的溶液与树脂分离。然后将20%w/v的NaCl与树脂混合约4小时以从树脂上置换低分子量岩藻多糖。然后将富含岩藻多糖的盐溶液与树脂分离,并通过5kDa离心过滤器脱盐,以将收集的低分子量岩藻多糖与不需要的盐分离。对脱盐的起始岩藻多糖,在离子交换过程中未吸附的高分子量岩藻多糖和从树脂中提取的低分子量岩藻多糖进行GPC。结果显示在下表8中。

[0336]

| | GPC PRT (分钟) | PMW (kDa) | WAMW (kDa) | NAMW (kDa) | % 分 布 MW> 100 kDa | % 分布 MW> 200 kDa | % 分 布 MW> 500 kDa | PDI |
|----------------------|-----------------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|--|--|--|------------|
| 输入 | 25.02 | 517.7 | 536.9 | 148.2 | 82.7 | 67.7 | 38.1 | 3.62 |
| 未吸 附的 岩藻 多糖 | 24.73 | 625.8 | 867.4 | 463.1 | 98.7 | 93.0 | 62.6 | 1.87 |
| 吸附 的岩 藻多 糖 | 27.30 | 112.4 | 172.3 | 86.4 | 58.0 | 25.4 | 4.7 | 2.00 |

[0337] 表8.岩藻多糖的阴离子交换分离:Amberlyst™ A26 OH

[0338] 实施例11:阴离子吸附

[0339] 将含有约1g的宽分子量分布的脱盐岩藻多糖的起始溶液与约10g的三种不同的树脂在三个分开的容器中混合,分别是 **Amberlyst®** A26OH⁻、**Ambersep®** 9000H⁻ 和 **Lewatit®** VPOC 1065。将溶液-树脂混合物温育约16小时,以使低分子量岩藻多糖与树脂上的活性位点结合。随后通过倾析将包含高分子量岩藻多糖的溶液与树脂分离。**Amberlyst®** 和 **Ambersep®** 产品的孔具有季胺基,而Lewatit产品的孔具有伯苄胺基。前两种产品是强碱性阴离子交换树脂,而第三种是弱碱性阴离子交换树脂。然后通过GPC分析在离子交换过程中未吸附的岩藻多糖。结果显示在下表9中。

[0340]

| | GPC PRT (分 钟) | PMW (kDa) | WAMW (kDa) | NAMW (kDa) | % 分 布 MW> 100 kDa | % 分 布 MW> 200 kDa | % 分 布 MW> 500 kDa | PDI |
|---|----------------------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|---|---|---|------------|
| 输入 | 24.66 | 461.9 | 521.5 | 151.8 | 83.0 | 67.3 | 36.5 | 3.44 |
| 使用的树脂 | | | | | | | | |
| Ambersep[®] 900 OH⁻ | 24.51 | 513.0 | 609.1 | 323.6 | 96.1 | 85.5 | 47.3 | 1.88 |
| Amberlyst[®] A26 OH⁻ | 24.58 | 489.8 | 591.0 | 309.5 | 95.6 | 83.5 | 45.1 | 1.91 |
| Lewatit[®]VPOC 1065 | 24.54 | 501.2 | 585.6 | 219.6 | 89.5 | 75.3 | 42.4 | 2.67 |

[0341] 表9. 岩藻多糖的阴离子交换分离: 通过在3种树脂上再循环制备的岩藻多糖的比较。

[0342] 实施例12: 阴离子吸附

[0343] 将包含约1g的宽分子量分布的脱盐岩藻多糖的起始溶液与约10g的 **Ambersep[®]900 OH⁻** 混合达53小时。然后, 在阴离子吸附过程中的各个时间点, 通过GPC对离子交换过程中未吸附的混合物中的岩藻多糖进行分析。结果显示在下表10中。

[0344]

| | GPC PRT (分钟) | PMW (kDa) | WAMW (kDa) | NAMW (kDa) | % 分 布 MW> 100 kDa | % 分布 MW> 200 kDa | % 分布 MW> 500 kDa | PDI |
|---------------------------------------|-----------------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|---|--|--|------------|
| 输入 | 26.71 | 624.2 | 955.9 | 339.9 | 95.2 | 84.6 | 56.3 | 2.81 |
| 离子 交换 时间 (小 时) | | | | | | | | |
| 1 | 26.66 | 642.4 | 1049.2 | 386.0 | 96.6 | 87.3 | 59.5 | 2.72 |
| 4 | 26.42 | 756.4 | 1151.7 | 470.9 | 98.2 | 91.7 | 65.5 | 2.45 |
| 24 | 26.33 | 801.9 | 1205.2 | 589.9 | 99.5 | 95.9 | 72.1 | 2.04 |
| 53 | 26.25 | 843.6 | 1257.9 | 656.9 | 99.8 | 97.5 | 75.6 | 1.91 |

[0345] 表10. 岩藻多糖的阴离子交换分离: 阴离子交换时间的比较

[0346] 实施例13: 阴离子吸附

[0347] 将包含约1g的宽分子量分布的脱盐岩藻多糖的起始溶液与各种量的 Ambersep®900 OH⁻混合约16小时, 以使低分子量岩藻多糖与树脂上的活性位点结合。随后通过倾析将包含高分子量岩藻多糖的溶液与树脂分离。然后通过GPC分析在离子交换过程中未吸附的岩藻多糖。结果示于下表11。

[0348]

| | GPC PRT (分钟) | PMW (kDa) | WAMW (kDa) | NAMW (kDa) | % 分 布 MW> 100 kDa | % 分布 MW> 200 kDa | % 分布 MW> 500 kDa | PDI |
|--|-----------------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|--|--|--|------------|
| 输入 | 24.66 | 442.4 | 498.5 | 146.3 | 82.4 | 66.1 | 34.8 | 3.41 |
| 岩藻 多糖: 树脂 的质 量比 | | | | | | | | |
| 1:1 | 24.51 | 491.1 | 548.1 | 203.2 | 87.6 | 72.0 | 39.0 | 2.70 |
| 1:5 | 24.48 | 500.9 | 633.9 | 306.6 | 95.3 | 82.9 | 46.6 | 2.07 |
| 1:10 | 24.41 | 523.8 | 688.1 | 376.4 | 98.0 | 88.8 | 51.9 | 1.83 |

[0349] 表11. 岩藻多糖的阴离子交换分离: 不同的岩藻多糖与树脂比率的比较

[0350] 实施例14: 制备型凝胶渗透色谱法

[0351] 提供具有宽分子量分布的起始岩藻多糖组合物。将起始岩藻多糖组合物以10mg/mL的浓度溶于60mL的0.1M硝酸钠中。将含有起始岩藻多糖组合物的20mL起始溶液以40mL/min的速度泵入内径分别为50mm、长度为250mm的含有 **Sepax[®]** SRT-10/10C SEC-1000、**Agilent[®]** PL Aquagel[®]-OH MIXED-H和**TSKGel[®]** G4000SW的色谱柱中, 其均包含修饰的硅胶亲水键合相凝胶介质。使用0.1M硝酸钠以相同的流速进行洗脱。洗脱5分钟后, 收集40mL等分部分, 直到总共收集了1000mL或25等分部分。通过分析型GPC测量每个等分部分的分子量分布。合并重均分子量在200kDa和600kDa之间的等分部分。合并重均分子量在600kDa和1000kDa之间的等分部分。合并重均分子量在1000kDa和1400kDa之间的等分部分。合并重均分子量在1400kDa和1800kDa之间的等分部分。其余的等分部分均被丢弃。每种合并的制备GPC等分部分组合物均包含所需的高分子量褐藻糖胶。

[0352] 实施例15: 制备型凝胶渗透色谱

[0353] 提供了具有宽分子量分布的起始岩藻多糖组合物。将起始岩藻多糖组合物以10mg/mL的浓度溶于60mL 0.1M的硝酸钠中。将含有起始岩藻多糖组合物的20mL起始溶液以40mL/min的速度泵入内径分别为50mm、长度为250mm的含有 **Waters[®]** HSPgel AQ MB-H、**PSS[®]** Suprema[®] Combination Ultrahigh和**TSKGel[®]** GMPWXL的色谱柱中, 其均包含羟基

化聚甲基丙烯酸酯基凝胶介质。使用0.1M硝酸钠以相同的流速进行洗脱。洗脱5分钟后,收集40mL等分部分,直到总共收集了1000mL或25等分部分。通过分析型GPC测量每个等分部分的分子量分布。合并包含其分子量分布的至少90%大于100kDa、其分子量分布的至少80%大于200kDa和/或其分子量分布的至少50%大于500kDa的等分部分。其余的等分部分均被丢弃。每种合并的制备GPC等分部分组合物均包含所需的高分子量褐藻胶。

[0354] 实施例16:低和高分子量褐藻糖胶的制备

[0355] 本文所讨论的方法可以以任何方式使用、组合、修改和置换以获得高分子量的褐藻糖胶。

[0356] 从具有宽分子量分布的原料/起始褐藻糖胶组合物制备二十种具有高分子量和低分子量的褐藻糖胶,以评价高分子量和低分子量褐藻糖胶在医疗和外科手术应用中的功效。以下将这二十种褐藻糖胶称为褐藻糖胶1至褐藻糖胶20。褐藻糖胶1至褐藻糖胶5是浅棕色固体。褐藻糖胶6、褐藻糖胶8至褐藻糖胶15和褐藻糖胶17为白色固体。低分子量褐藻糖胶(即褐藻糖胶1制褐藻糖胶6)的制备涉及许多不同的方法学。从棕色海藻中提取了褐藻糖胶3,发现它是一种低分子量的褐藻糖胶。褐藻糖胶2获自FMC BioPolymer[®],并发现是低分子量褐藻糖胶。通过实施例3中讨论的方法,使用MWC0 TFF过滤器在100kDa下获得褐藻糖胶1和褐藻糖胶5。通过实施例10中讨论的方法获得褐藻糖胶4。通过用过氧化氢化学降解高分子量的褐藻糖胶获得褐藻糖胶6。

[0357] 高分子量褐藻糖胶(即褐藻糖胶7制褐藻糖胶20)的制备涉及许多不同的方法学,包括用氢氧化钠处理,在某些情况下还包括其他碱。褐藻糖胶7、褐藻糖胶8、褐藻糖胶11、褐藻糖胶12至褐藻糖胶17和褐藻糖胶20的制备涉及实施例12中讨论的方法与针对低离子强度溶液的切向流过滤的组合。褐藻糖胶10的制备涉及上述阳离子增强切向流过滤和顺序切向流过滤方法的组合。从棕色海藻中提取了褐藻糖胶9、褐藻糖胶18和褐藻糖胶19,然后通过低离子强度溶液进行切向流过滤进行进一步处理,发现它们是高分子量褐藻糖胶。

[0358] 实施例17:用于制备褐藻糖胶7至褐藻糖胶14的粗制褐藻糖胶的分子量测定

[0359] 使用凝胶渗透色谱法来评估用于制备褐藻糖胶7至14的粗制褐藻糖胶的分子量分布。粗制褐藻糖胶1是指用于制备褐藻糖胶7和褐藻糖胶8的粗制褐藻糖胶。粗制褐藻糖胶2是指用来制造褐藻糖胶9、褐藻糖胶10、褐藻糖胶11和褐藻糖胶13的粗制褐藻糖胶。粗制褐藻糖胶3是指用于制造褐藻糖胶12的粗制褐藻糖胶。粗制褐藻糖胶4是指用于制造褐藻糖胶14的粗制褐藻糖胶。在表12中示出了这种分析的结果。

[0360] 下表中的结果包含用于分子量分布的某些特征的缩写。凝胶渗透色谱法用GPC表示,峰分子量用PMW表示,重均分子量用WAMW表示,数均分子量用NAMW表示,百分比分布用%分布表示,分子量用MW表示,多分散指数由PDI表示。

[0361]

| | PM W (kDa) | WAM W (kDa) | NAM W (kDa) | % 分 布 <10 kDa | % 分 布 <20 kDa | % 分 布 <50 kDa | %分 布>10 0 kDa | %分 布>20 0 kDa | %分 布>50 0 kDa | PDI |
|--|--------------------------------|----------------------------|----------------------------|---|---|---|---------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|------------|
| 粗 制 褐 藻 糖 胶 1 | 92.0 | 259.3 | 22.1 | 8.3 | 14. 7 | 30. 4 | 52.3 | 34.7 | 14.5 | 11.7 |

[0362]

| | | | | | | | | | | |
|---------|-------|-------|-------|------|------|------|------|------|------|-------|
| 粗制褐藻糖胶2 | 512.3 | 535.3 | 128.5 | 0.5 | 2.1 | 8.9 | 80.4 | 65.1 | 36.6 | 4.2 |
| 粗制褐藻糖胶3 | 594.6 | 493.4 | 4.4 | 22.0 | 27.3 | 35.7 | 57.4 | 49.3 | 31.3 | 113.3 |
| 粗制褐藻糖胶4 | 662.5 | 790.6 | 245.4 | 0.1 | 0.5 | 3.4 | 90.9 | 80.2 | 52.0 | 3.2 |

[0363] 表12

[0364] 实施例18:低分子量和高分子量褐藻糖胶的分子量测定

[0365] 使用凝胶渗透色谱法来评估褐藻糖胶1至20的获得的分子量分布。

[0366] 表13和表14列出了针对二十种褐藻糖胶获得的分子量分布曲线。表14提供了与表13中所示相同的二十种褐藻糖胶的分子量分布曲线,并以与表13中所示方式不同的方式给出了分子量分布曲线,从而提供了各种褐藻糖胶分子量分布的两种不同观点。从结果可以看出,已经完成了在褐藻糖胶中的广泛范围的不同分子量分布。已经获得具有28kDa至8250kDa之间的重均分子量的具有多种分布曲线的褐藻糖胶。

[0367] 下表中的结果包含用于分子量分布的某些特征的缩写。凝胶渗透色谱法用GPC表示,峰分子量用PMW表示,重均分子量用WAMW表示,数均分子量用NAMW表示,百分比分布用%

分布表示,分子量用MW表示,多分散指数由PDI表示。

[0368]

| | PMW (kDa) | WAMW (kDa) | NAMW (kDa) | % 分 布 <10 kDa | % 分 布 <20 kDa | % 分 布 <50 kDa | %分 布>100 kDa | %分 布>200 kDa | %分 布>500 kDa | PDI |
|-------|--------------|---------------|---------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|------|
| 褐藻糖胶1 | 17.5 | 28.3 | 14.2 | 16.6 | 51.7 | 87.9 | 3.0 | 0.6 | 0.0 | 1.99 |
| 褐 | 21.0 | 72.4 | 9.9 | 26.5 | 44.0 | 67.3 | 18.4 | 9.1 | 2.3 | 7.29 |

[0369]

| | | | | | | | | | | |
|-----------------------|-------|-------|------|-----|-----|------|------|------|-----|------|
| 藻 糖 胶 2 | | | | | | | | | | |
| 褐 藻 糖 胶 3 | 70.4 | 105.9 | 52.4 | 0.6 | 5.8 | 33.1 | 35.3 | 12.1 | 1.3 | 2.02 |
| 褐 藻 糖 胶 4 | 107.1 | 136.1 | 79.9 | 0.1 | 1.5 | 15.4 | 53.4 | 19.8 | 1.1 | 1.70 |
| 褐 藻 糖 胶 5 | 80.2 | 171.9 | 60.4 | 0.8 | 5.3 | 26.5 | 47.9 | 25.4 | 6.6 | 2.84 |
| 褐 藻 糖 胶 | 195.1 | 192.1 | 87.4 | 0.4 | 2.3 | 14.0 | 64.4 | 35.8 | 5.5 | 2.20 |

[0370]

| | | | | | | | | | | |
|---------|-------|-------|-------|-----|-----|-----|------|------|------|------|
| 6 | | | | | | | | | | |
| 褐藻糖胶 7 | 242.5 | 366.5 | 137.2 | 0.0 | 0.5 | 7.0 | 77.7 | 54.6 | 21.9 | 2.67 |
| 褐藻糖胶 8 | 307.1 | 395.8 | 170.2 | 0.0 | 0.2 | 4.0 | 83.8 | 62.2 | 25.4 | 2.33 |
| 褐藻糖胶 9 | 459.3 | 514.0 | 198.5 | 0.1 | 0.4 | 3.4 | 87.8 | 71.4 | 37.2 | 2.62 |
| 褐藻糖胶 10 | 390.2 | 497.9 | 228.9 | 0.0 | 0.0 | 1.7 | 90.4 | 73.3 | 35.1 | 2.17 |
| 褐藻 | 457.3 | 592.8 | 300.9 | 0.0 | 0.0 | 0.7 | 95.4 | 82.9 | 43.8 | 1.97 |

[0371]

| | | | | | | | | | | |
|------------------------|-------|-------|-------|-----|-----|-----|------|------|------|------|
| 糖 胶 11 | | | | | | | | | | |
| 褐 藻 糖 胶 12 | 535.8 | 760.1 | 350.6 | 0.0 | 0.1 | 0.9 | 96.5 | 88.3 | 54.3 | 2.17 |
| 褐 藻 糖 胶 13 | 612.3 | 857.0 | 448.7 | 0.0 | 0.0 | 0.2 | 98.6 | 92.4 | 61.4 | 1.91 |
| 褐 藻 糖 胶 14 | 393.1 | 930.1 | 296.6 | 0.0 | 0.0 | 1.1 | 93.6 | 81.1 | 43.6 | 3.14 |
| 褐 藻 糖 胶 15 | 409.4 | 772.0 | 291.8 | 0.0 | 0.0 | 1.1 | 94.0 | 81.5 | 43.6 | 2.65 |

[0372]

| | | | | | | | | | | |
|--------|--------|--------|--------|-----|-----|-----|------|------|------|------|
| 褐藻糖胶16 | 743.0 | 1618.0 | 387.5 | 0.0 | 0.1 | 1.4 | 92.9 | 86.6 | 68.2 | 4.18 |
| 褐藻糖胶17 | 686.2 | 1876.7 | 524.9 | 0.0 | 0.0 | 0.3 | 98.4 | 93.0 | 69.9 | 3.58 |
| 褐藻糖胶18 | 6238.6 | 3957.4 | 519.7 | 0.0 | 0.1 | 1.7 | 82.3 | 78.8 | 71.4 | 7.61 |
| 褐藻糖胶19 | 4315.2 | 5336.8 | 2009.5 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 93.7 | 93.3 | 90.1 | 2.66 |
| 褐藻糖 | 6170.2 | 8101.9 | 846.3 | 0.0 | 0.0 | 0.3 | 94.7 | 91.1 | 83.6 | 9.57 |
| 胶20 | | | | | | | | | | |

[0373]

[0374] 表13:20种褐藻糖胶的分子量分布的第一个观点

[0375]

| | % 分布 <5 kDa | % 分布 5-60 kDa | % 分布 60- 200 kDa | % 分布 200- 1600 kDa | % 分 布>1600 kDa |
|------------|----------------|------------------|---------------------|-----------------------|----------------------|
| 褐藻糖 胶 1 | 3.5 | 87.9 | 8.1 | 0.6 | 0.0 |
| 褐藻糖 胶 2 | 13.0 | 58.6 | 19.4 | 9.0 | 0.0 |
| 褐藻糖 胶 3 | 0.0 | 41.3 | 46.6 | 12.1 | 0.0 |
| 褐藻糖 胶 4 | 0.0 | 20.9 | 59.1 | 20.1 | 0.0 |
| 褐藻糖 胶 5 | 0.1 | 32.8 | 41.7 | 25.0 | 0.4 |
| 褐藻糖 胶 6 | 0.0 | 18.5 | 45.6 | 35.8 | 0.0 |
| 褐藻糖 胶 7 | 0.0 | 10.0 | 35.4 | 52.3 | 2.4 |

[0376]

| | | | | | |
|-------------|-----|-----|------|------|------|
| 褐藻糖 胶 8 | 0.0 | 6.2 | 31.5 | 60.0 | 2.3 |
| 褐藻糖 胶 9 | 0.0 | 5.0 | 23.6 | 67.4 | 4.0 |
| 褐藻糖 胶 10 | 0.0 | 3.0 | 23.7 | 69.8 | 3.5 |
| 褐藻糖 胶 11 | 0.0 | 1.3 | 15.8 | 78.0 | 4.9 |
| 褐藻糖 胶 12 | 0.0 | 1.3 | 10.5 | 78.9 | 9.4 |
| 褐藻糖 胶 13 | 0.0 | 0.3 | 7.2 | 80.4 | 12.0 |
| 褐藻糖 胶 14 | 0.0 | 1.8 | 16.3 | 68.7 | 13.1 |
| 褐藻糖 胶 15 | 0.0 | 1.7 | 16.1 | 72.4 | 9.8 |
| 褐藻糖 胶 16 | 0.0 | 2.1 | 9.4 | 60.9 | 37.6 |
| 褐藻糖 胶 17 | 0.0 | 0.5 | 6.5 | 62.4 | 30.6 |
| 褐藻糖 胶 18 | 0.0 | 2.3 | 5.7 | 35.2 | 56.8 |

[0377]

| | | | | | |
|-------------|-----|-----|-----|------|------|
| 褐藻糖 胶 19 | 0.0 | 0.0 | 0.3 | 24.9 | 74.8 |
| 褐藻糖 胶 20 | 0.0 | 0.6 | 5.2 | 28.7 | 65.5 |

[0378] 表14:20种褐藻糖胶的分子量分布的第二个观点

[0379] 实施例19:高分子量褐藻糖胶的硫酸酯、总碳水化合物和单糖含量

[0380] 将高分子量褐藻糖胶褐藻糖胶7至褐藻糖胶18和褐藻糖胶20溶解在去离子水中,在酸性条件下水解,并通过电感耦合等离子体质谱法(ICP-MS)分析总硫含量%w/w,由不列颠哥伦比亚省本那比的ALS环境实验室执行。通过将硫含量乘以硫酸酯与硫的摩尔比,将硫含量转化为硫酸酯含量,以获得褐藻糖胶的%w/w硫酸酯含量。褐藻糖胶7至18和褐藻糖胶20的硫酸酯含量示于下表15中。

[0381]

| | 硫酸酯含量 (% w/w) |
|---------|---------------|
| 褐藻糖胶 7 | 23.93 |
| 褐藻糖胶 8 | 40.95 |
| 褐藻糖胶 9 | 40.32 |
| 褐藻糖胶 10 | 33.15 |

[0382]

| | |
|-------------|-------|
| 褐藻糖 胶 11 | 44.87 |
| 褐藻糖 胶 12 | 41.02 |
| 褐藻糖 胶 13 | 36.18 |
| 褐藻糖 胶 14 | 40.45 |
| 褐藻糖 胶 15 | 39.79 |
| 褐藻糖 胶 16 | 14.39 |
| 褐藻糖 胶 17 | 51.30 |
| 褐藻糖 胶 18 | 21.11 |
| 褐藻糖 胶 20 | 25.60 |

[0383] 表15-褐藻糖胶7至褐藻糖胶18和褐藻糖胶20的硫酸酯含量

[0384] 由佐治亚大学的复杂碳水化合物研究中心通过气相色谱-质谱法 (GC-MS) 分析了高分子量的褐藻糖胶褐藻糖胶7、褐藻糖胶11、褐藻糖胶16、褐藻糖胶18和褐藻糖胶20的总碳水化合物和单糖组成。通过酸性甲醇分解将高分子量褐藻糖胶聚糖衍生化,以产生O-三甲基甲硅烷基 (O-TMS) 衍生物。衍生化后,使用Supelco Equity-1熔融石英毛细管色谱柱 (30m, 内径0.25mm), 在连接到Agilent 5975C质谱检测器的Agilent 7890A气相色谱系统上分析褐藻糖胶。高分子量褐藻糖胶的总碳水化合物含量和单糖组成的结果示于下表16中。下表中的碳水化合物缩写为“carb.”。

[0385]

| | 总碳水化合物含量(褐藻糖胶的% w/w) | 岩藻糖(总碳水化合物含量的% w/w) | 半乳糖(总碳水化合物含量的% w/w) | 木糖(总碳水化合物含量的% w/w) | 甘露糖(总碳水化合物含量的% w/w) | 鼠李糖(总碳水化合物含量的% w/w) |
|---------|----------------------|---------------------|---------------------|--------------------|---------------------|---------------------|
| 褐藻糖胶 7 | 32.7 | 44.4 | 52.9 | 0.5 | 0.4 | 0.3 |
| 褐藻糖胶 11 | 59.5 | 91.9 | 8.1 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| 褐藻糖胶 16 | 25.9 | 48.3 | 9.9 | 15.5 | 5.9 | 0.3 |
| 褐藻糖胶 18 | 41.2 | 92.0 | 4.7 | 2.1 | 0.4 | 0.2 |
| 褐藻糖胶 20 | 30.1 | 84.7 | 10.6 | 3.3 | 0.9 | 0.0 |

[0386] 表16-五种褐藻糖胶的总碳水化合物和单糖组成

[0387] 实施例20:大鼠硬膜外粘连治疗

[0388] 使用实施例18中鉴定的二十种褐藻糖胶的岩藻多糖溶液在乳酸钠林格注射液USP (LRS)中制备。在LRS中以100mg/mL制备了褐藻糖胶1至褐藻糖胶16、褐藻糖胶18和褐藻糖胶20。在LRS中以50mg/mL制备褐藻糖胶19。在LRS中以500mg/mL制备褐藻糖胶17。对Sprague Dawley大鼠进行了椎板切除手术,大鼠的平均体重和以毫克每千克为单位的剂量在下表17中显示。用布比卡因溶液沿腰椎形成一个线阻滞。清洁大鼠的背部,然后用无菌盖布覆盖。通过中线皮肤切口打开腰筋膜,切开腰筋膜,并解剖腰旁肌,露出下面的椎板。去除椎骨中央的骨头。在整个过程中,通过使用乳酸钠林格注射液USP (LRS)冲洗并用棉签加压来维持止血。将裸露的硬脑膜直接用15微升LRS(对照)或岩藻多糖溶液处理。用缝线封闭肌肉和皮肤层,让大鼠恢复一周,然后处死以进行粘连量化。记录硬膜上粘连的存在和大小。记录粘连和暴露的硬膜的尺寸,并用于计算粘连覆盖率,即粘连面积占总暴露硬膜面积的百分比。

[0389] 等式1:粘连覆盖率(%) = 100x硬膜外粘连面积 ÷ 总暴露硬膜面积

[0390] 使用等式1确定接受LRS的对照组具有65%的粘连覆盖率。表13至表16中公开的二十种褐藻糖胶的粘连覆盖率示于下表17中,显示相对于对照组的粘连覆盖率降低。负值表示相对于对照组观察到的粘连覆盖率增加。

[0391]

| | 平均大鼠 重量 (kg) | 剂量(mg) | 每动物重量 的剂量 (mg/kg) | 评分大 鼠的数 量 | 与对照相比硬膜 外粘连覆盖率降 低% |
|--|-----------------|--------|-------------------------|-----------------|--------------------------|
|--|-----------------|--------|-------------------------|-----------------|--------------------------|

[0392]

| | | | | | |
|-------------|------|-----|-----|---|--------------------------------------|
| 褐藻糖 胶 1 | 0.41 | 1.5 | 3.7 | 4 | -40% (即, 与对 照相比, 纤维性 粘连增加 40%) |
| 褐藻糖 胶 2 | 0.59 | 1.5 | 2.5 | 3 | 9% |
| 褐藻糖 胶 3 | 0.39 | 1.5 | 3.8 | 4 | -10% |
| 褐藻糖 胶 4 | 0.65 | 1.5 | 2.3 | 4 | 83% |
| 褐藻糖 胶 5 | 0.53 | 1.5 | 2.9 | 4 | 46% (即, 与对 照相比, 纤维性 粘连降低 46%) |
| 褐藻糖 胶 6 | 0.46 | 1.5 | 3.3 | 4 | 44% |
| 褐藻糖 胶 7 | 0.47 | 1.5 | 3.2 | 3 | 100% |
| 褐藻糖 胶 8 | 0.36 | 1.5 | 4.2 | 3 | 100% |
| 褐藻糖 胶 9 | 0.39 | 1.5 | 3.8 | 2 | 100% |
| 褐藻糖 胶 10 | 0.40 | 1.5 | 3.8 | 4 | 100% |

[0393]

| | | | | | |
|-------------|------|-----|------|---|------|
| 褐藻糖 胶 11 | 0.58 | 1.5 | 2.6 | 2 | 100% |
| 褐藻糖 胶 12 | 0.44 | 1.5 | 3.4 | 2 | 100% |
| 褐藻糖 胶 13 | 0.64 | 1.5 | 2.3 | 3 | 100% |
| 褐藻糖 胶 14 | 0.37 | 1.5 | 4.0 | 4 | 100% |
| 褐藻糖 胶 15 | 0.50 | 1.5 | 3.0 | 3 | 100% |
| 褐藻糖 胶 16 | 0.45 | 1.5 | 3.3 | 3 | 100% |
| 褐藻糖 胶 17 | 0.59 | 7.5 | 12.8 | 3 | 100% |
| 褐藻糖 胶 18 | 0.59 | 1.5 | 2.5 | 2 | 100% |
| 褐藻糖 胶 19 | 0.39 | 0.8 | 1.9 | 3 | 100% |
| 褐藻糖 胶 20 | 0.56 | 1.5 | 2.7 | 2 | 100% |

[0394] 表17:使用20种不同的褐藻糖胶相对于对照LRS的大鼠硬膜外粘连降低

[0395] 通过将表17的结果与表13和表14中给出的褐藻糖胶的分子量进行比较可以看出,在相同剂量下,与包含约60%或更少的其分子量分布大于100kDa的重均分子量低于100kDa的褐藻糖胶相比,重均分子量大于130kDa和包含约60%或更多其分子量分布大于100kDa的褐藻糖胶在抑制、预防、去除、减少或以其他方式治疗大鼠硬膜外粘连方面显示出更大功效。还有进一步的迹象表明,在相同剂量下,重均分子量高于300kDa的褐藻糖胶,包含约70%或更多的其分子量分布高于100kDa,在抑制、预防、去除、减少或以其他方式治疗大鼠硬膜外粘连方面显示出更高的功效。

[0396] 实施例21:用褐藻糖胶1和褐藻糖胶10对兔子子宫角进行粘连治疗

[0397] 对每只兔子的两个子宫角进行子宫角手术。在手术之前,将兔子称重,然后通过氯胺酮和甲苯噻嗪的预用药准备进行手术。

[0398] 在乳酸钠林格注射液USP中以0.07mg/mL制备岩藻多糖溶液,通过过滤灭菌。所有仪器都是无菌的,并且在整个手术过程中都保持无菌区域。清洁腹部并通过中线腹部切口进入。子宫角被定位、外部化和刮擦以引起损伤。刮除子宫角附近的腹壁也被刮除。受损的子宫角和腹壁彼此相邻放置,并用缝合线固定。在切开切口之前,将每只兔子体重15mL/kg的岩藻多糖溶液给药于腹腔。术后两周评估粘连。用尺子测量子宫角粘连的长度。子宫角粘连覆盖率,即粘连长度占总受损子宫角长度的百分比,计算如下:

[0399] 等式2:粘连覆盖率(%) = 100x子宫角粘连长度 ÷ 总受损子宫角长度

[0400] 将相同的手术方法应用于3只新西兰白兔,接受15mL/kg的对照乳酸钠林格注射液USP (LRS) 代替岩藻多糖溶液。

[0401] 使用等式2确定接受LRS的对照组具有41%的粘连覆盖率。表18显示了使用以上讨论的针对褐藻糖胶褐藻糖胶1和褐藻糖胶10的方法所获得的结果,分别是这样的褐藻糖胶的代表性实例:大部分分子量分布低于100kDa甚至低于50kDa的褐藻糖胶,以及大部分分子量分布高于100kDa甚至高于200kDa的褐藻糖胶。下表中的结果显示为相对于对照组的粘连覆盖率降低。

| | 每动物体重的剂量 (mg/kg) | 子宫角数 | 与对照相比子宫角粘连覆盖率降低% |
|----------------------|---------------------|------|-----------------------------|
| [0402] 褐藻糖胶 1 – 低分子量 | 1 | 6 | 21% (即, 与对照相比, 纤维性粘连降低 21%) |
| 褐藻糖胶 10 – 高分子量 | 1 | 8 | 100% |

[0403] 表18: 相对于对照LRS,使用两种不同的褐藻糖胶减少兔子子宫角粘连

[0404] 从表18的结果可以看出,与在相同剂量下其大部分分布在100kDa或甚至在50kDa以下的褐藻糖胶相比,具有大部分分布高于100kDa或甚至高于200kDa的褐藻糖胶在抑制、预防、去除、减少或以其他方式治疗兔子子宫角粘连方面具有更高的功效。

[0405] 实施例22: 用褐藻糖胶17治疗兔子子宫角粘连

[0406] 为了确定高分子量褐藻糖胶17在抑制手术粘连中的功效,在总共三只新西兰白兔的两个角上进行了以下双子宫角(DUH)手术。在手术之前,将兔子称重,然后通过氯胺酮和甲苯噻嗪的预用药准备进行手术。

[0407] 在乳酸林格氏注射液USP (LRS) 中以5mg/mL制备岩藻多糖溶液,通过过滤灭菌。所有仪器都是无菌的,并且在整个手术过程中都保持无菌区域。清洁腹部并通过中线腹部切口进入。子宫角被定位、外部化和刮擦以引起损伤。刮除子宫角附近的腹壁也被刮除。受损的子宫角和腹壁彼此相邻放置,并用缝合线固定。闭合肌肉切口的顶部三分之一和底部三

分之一,并将每只兔子体重5mL/kg岩藻多糖溶液给药于腹腔。暂时关闭肌肉切口,将岩藻多糖溶液留在腹腔中30分钟。重新打开肌肉切口,并用10mL/kg LRS冲洗腹腔。在关闭切口之前,将腹腔中的大部分液体吸出。术后两周评估粘连形成。用直尺测量子宫角粘连的长度。使用公式2计算子宫角粘连覆盖率,即粘连长度占受损子宫角总长度的百分比。

[0408] 表19显示了使用以上讨论的针对褐藻糖胶17的方法获得的结果,所述褐藻糖胶是高分子量褐藻糖胶的代表性实例。下表中的结果显示为在所评分的6个子宫角上的平均粘连长度。

[0409] 表19提供了用褐藻糖胶17治疗六个子宫角的结果。

| | | | | |
|--------|------------|----------------|------|---------------|
| [0410] | | 剂 量 (mg/kg) | 子宫角数 | 平均粘连长度% |
| | 褐藻糖胶 17 | 25 | 6 | 0% (即, 未发现粘连) |

[0411] 表19:使用褐藻糖胶17的粘连长度

[0412] 从表19的结果可以看出,高分子量褐藻糖胶可用于成功地抑制、预防、去除、减少或以其他方式治疗手术后子宫角粘连。

[0413] 实施例23:用高分子量褐藻糖胶组合物治疗子宫角纤维性粘连

[0414] 为了确定包含约228kDa的数均分子量、约1210kDa的重均分子量、约575kDa的峰分子量和具有分子量分布(其中约89%的分布大于100kDa,其中约30%的分布大于1000kDa)的高分子量褐藻糖胶组合物在抑制手术粘连方面的功效,在总共二十只新西兰白兔的两个角上进行了以下双子宫角(DUH)手术。在手术之前,将兔子称重,然后通过用咪达唑仑和右美托咪定的处方药进行手术准备。

[0415] 在乳酸钠林格注射液USP (LRS) 中以0.02mg/mL、0.1mg/mL、0.5mg/mL或2.5mg/mL的每种浓度制备岩藻多糖溶液,通过过滤灭菌。所有仪器都是无菌的,并且在整个手术过程中都保持无菌区域。清洁腹部并通过中线腹部切口进入。子宫角被定位、外部化和刮擦以引起损伤。刮除子宫角附近的腹壁也被刮除。受损的子宫角和腹壁彼此相邻放置,并用缝合线固定。在切开切口之前,将每只兔子体重约2mL/kg的岩藻多糖溶液给药于腹腔。术后两周评估粘连。治疗五只兔子并评估每个岩藻多糖的浓度。用直尺测量子宫角粘连的长度。使用等式2计算子宫角粘连长度。

[0416] 将相同的手术方法应用于另外5只新西兰白兔作为对照,每只兔子接受约2mL/kg的对照乳酸钠林格注射液USP (LRS) 代替岩藻多糖溶液。使用等式2确定接受LRS的对照组具有100%的粘连覆盖率。表20显示了使用上述方法对不同浓度和剂量的高分子量褐藻糖胶组合物所获得的结果(总共治疗四十个子宫角,每种浓度的高分子量褐藻糖胶组合物各10个);结果显示为相对于对照组的粘连覆盖率降低。

| [0417] | 浓度(mg/mL) | 剂量 (mg/kg) | 子宫角数 | 与对照相比子宫角粘连覆盖率降低% |
|--------|-----------|---------------|------|---------------------------|
| | 0.02 | 0.04 | 10 | 10% (即, 与对照相比纤维性粘连降低 10%) |
| | 0.1 | 0.2 | 10 | 30% (即, 与对照相比纤维性粘连降低 30%) |
| | 0.5 | 1 | 10 | 71% (即, 与对照相比纤维性粘连降低 71%) |
| | 2.5 | 5 | 10 | 95% (即, 与对照相比纤维性粘连降低 95%) |

[0418] 表20: 相对于对照LRS, 使用高分子量褐藻糖胶组合物降低了兔子宫角粘连

[0419] 从表20的结果可以看出, 高分子量的褐藻糖胶组合物可以用于成功地抑制、预防、去除、减少或以其他方式治疗手术后子宫角粘连。

[0420] 附图标记列表:

- [0421] 100 基于分子量的分段系统(较高至较低)
- [0422] 100' 基于分子量的分段系统(较低至较高)
- [0423] 100'' 阳离子增强的TFF系统(CATS)
- [0424] 102 输入供应管线
- [0425] 104 预过滤器
- [0426] 106 较低MWCO子系统截留物管线阀
- [0427] 106' 较低MWCO子系统输出阀
- [0428] 108 较低MWCO子系统截留物输出管线
- [0429] 110 较高截留分子量TFF过滤器
- [0430] 111 较高MWCO子系统截留物输出管线
- [0431] 112 较高MWCO TFF过滤器供应管线
- [0432] 113 较高至较低MWCO子系统间阀
- [0433] 114 较高MWCO子系统泵
- [0434] 115 较高MWCO子系统溶剂供应管线
- [0435] 116 较高MWCO子系统褐藻糖胶容器
- [0436] 117 较高MWCO子系统溶剂容器
- [0437] 118 较高MWCO子系统截留物返回管线
- [0438] 119 较高MWCO子系统渗透物输出管线

| | | |
|--------|-------|-------------------------------|
| [0439] | 120 | 较低截留分子量TFF过滤器 |
| [0440] | 121 | 较低MWC0子系统截留物输出管线 |
| [0441] | 122 | 较低MWC0 TFF过滤器供应管线 |
| [0442] | 123 | 较低至较高MWC0子系统间阀门 |
| [0443] | 124 | 较低MWC0子系统泵 |
| [0444] | 125 | 较低MWC0子系统溶剂供应管线 |
| [0445] | 126 | 较低MWC0子系统褐藻糖胶容器 |
| [0446] | 127 | 较低MWC0子系统溶剂容器 |
| [0447] | 128 | 较低MWC0子系统截留物返回管线 |
| [0448] | 129 | 较低MWC0子系统渗透物输出管线 |
| [0449] | 130 | 较高MWC0 TFF子系统 |
| [0450] | 130' | 较高MWC0 TFF子系统(图3) |
| [0451] | 135 | 阳离子添加剂冲洗溶液供应管线 |
| [0452] | 136 | 阳离子添加剂冲洗溶液阀 |
| [0453] | 137 | 阳离子添加剂冲洗液容器 |
| [0454] | 140 | 较低MWC0子系统 |
| [0455] | 140' | 较低MWC0 TFF子系统(图3) |
| [0456] | 142 | 钠盐溶液容器 |
| [0457] | 143 | 低电导率渗滤溶液容器 |
| [0458] | 144 | 钠盐溶液控制阀 |
| [0459] | 145 | 低电导率渗滤溶液阀 |
| [0460] | 146 | 钠盐溶液供应管线 |
| [0461] | 147 | 低电导率渗滤溶液供应管线 |
| [0462] | 150 | 较高MWC0 TFF过滤器 |
| [0463] | 160 | 较低MWC0 TFF过滤器 |
| [0464] | 600 | 离心沉淀系统,用于从起始褐藻糖胶组合物获得高分子量褐藻糖胶 |
| [0465] | 600' | 离心沉淀系统,用于从起始褐藻糖胶组合物获得高分子量褐藻糖胶 |
| [0466] | 610 | 离心容器 |
| [0467] | 620 | 分级的可渗透屏障 |
| [0468] | 620' | 可渗透屏障 |
| [0469] | 620a | 屏障区段(第一-最高密度) |
| [0470] | 620b | 屏障区段(第二-中等密度) |
| [0471] | 620c | 屏障区段(第三-最低密度) |
| [0472] | 620c' | 单屏障区段 |
| [0473] | 622 | 第一底部分级的可渗透屏障材料端 |
| [0474] | 622' | 第一底部可渗透屏障材料端 |
| [0475] | 624 | 第二顶部分级的可渗透屏障材料端 |
| [0476] | 624' | 第二顶部可渗透屏障材料端 |
| [0477] | 630 | 离心容器610的第一底端 |

| | | |
|--------|-----|------------------------------|
| [0478] | 640 | 离心容器610的第二顶端 |
| [0479] | 650 | 起始褐藻糖胶组合物 |
| [0480] | 660 | 箭头指示容器610上的离心力方向 |
| [0481] | 670 | 离心盒 |
| [0482] | 900 | 电泳提取系统 |
| [0483] | 910 | 电泳室 |
| [0484] | 912 | 孔 |
| [0485] | 914 | 理论位移距离 |
| [0486] | 916 | 电泳凝胶 |
| [0487] | 918 | 电泳缓冲液 |
| [0488] | 920 | 直流电源 |
| [0489] | 922 | 阴极 |
| [0490] | 924 | 阳极 |
| [0491] | 926 | 迁移方向箭头(表示阴离子的位移方向) |
| [0492] | 800 | 膜透析系统,用于从起始褐藻糖胶组合物获得高分子量褐藻糖胶 |
| [0493] | 801 | 输入供应管线 |
| [0494] | 802 | 预过滤器 |
| [0495] | 810 | 褐藻糖胶容器 |
| [0496] | 812 | 透析系统供应管线 |
| [0497] | 814 | 透析系统泵 |
| [0498] | 815 | 透析液输出阀 |
| [0499] | 816 | 透析液返回管线 |
| [0500] | 818 | 透析液输出管线 |
| [0501] | 820 | 透析单元 |
| [0502] | 825 | 透析膜 |
| [0503] | 830 | 透析容器 |
| [0504] | 832 | 透析液供应管线 |
| [0505] | 834 | 透析泵 |
| [0506] | 835 | 透析液输出阀 |
| [0507] | 836 | 透析液返回管线 |
| [0508] | 838 | 透析液输出管线 |
| [0509] | 840 | 透析液容器 |
| [0510] | 842 | 透析液供应管线 |
| [0511] | 845 | 透析液供应阀 |
| [0512] | 170 | 切向流过滤(TFF)子系统 |
| [0513] | 171 | TFF过滤器 |
| [0514] | 172 | TFF子系统过滤器供应管线 |
| [0515] | 173 | TFF子系统溶剂供应阀 |
| [0516] | 174 | TFF子系统泵 |

| | | |
|--------|------|-----------------|
| [0517] | 175 | TFF子系统溶剂供应管线 |
| [0518] | 176 | TFF子系统褐藻糖胶容器 |
| [0519] | 177 | TFF子系统溶剂容器 |
| [0520] | 178 | TFF子系统截留物管线 |
| [0521] | 179 | TFF子系统渗透物输出管线 |
| [0522] | 180 | 离子交换子系统 |
| [0523] | 181 | 离子交换容器 |
| [0524] | 182a | 离子交换子系统褐藻糖胶供应管线 |
| [0525] | 182b | 离子交换子系统盐溶液供应管线 |
| [0526] | 183a | 离子交换子系统褐藻糖胶返回阀 |
| [0527] | 183b | 离子交换子系统盐溶液供应阀 |
| [0528] | 183c | 离子交换子系统盐溶液返回阀 |
| [0529] | 184a | 离子交换子系统褐藻糖胶泵 |
| [0530] | 184b | 离子交换子系统盐溶液泵 |
| [0531] | 186 | 离子交换子系统褐藻糖胶容器 |
| [0532] | 187 | 离子交换子系统盐溶液容器 |
| [0533] | 188a | 离子交换子系统褐藻糖胶返回管线 |
| [0534] | 188b | 离子交换子系统盐溶液返回管线 |
| [0535] | 189 | 大孔离子交换树脂 |
| [0536] | 300 | 离子吸附系统 |
| [0537] | 301 | 输入供应管线 |
| [0538] | 302 | 子系统间阀 |
| [0539] | 303 | TFF子系统截留物输出管线 |
| [0540] | 304 | 离子交换子系统输出阀 |
| [0541] | 305 | 离子交换子系统输出管线 |
| [0542] | 306 | 预过滤器 |

[0543] 除非上下文或定义另有清楚说明,否则本文中使用的所有术语均按照其普通含义使用。另外,除非另有明确说明,否则在说明书中使用的“或”包括“和”,反之亦然。除非另有明确指出或上下文另有清楚说明,否则非限制性术语不应解释为限制性的(例如,“包括(including)”、“具有”和“包含(comprising)”通常表示“包括但不限于”)。除非另有明确指出或上下文另有清楚说明,否则单数形式(包括在权利要求书中,诸如“一(a)”、“一(an)”和“该(the)”)包括复数引用。

[0544] 除非另有指出,否则本文中对实施方式的一个或多个特征的条件或关系特征进行修饰的形容词(诸如“基本上”和“约”)表示,该条件或特征被定义为,对于该实施方式针对预期应用的操作而言,处于可接受的允许范围内。

[0545] 本发明的方法、组合物、系统等的范围包括装置加功能以及步骤加功能这两种概念。然而,除非在权利要求中具体地陈述词语“装置(means)”,否则权利要求不应被解释为表示“装置加功能”的关系,而在权利要求中具体地陈述词语“装置”的情况下,权利要求应解释为表示“装置加功能”的关系。类似地,除非在权利要求中具体地陈述词语“步骤”,否则

权利要求不应解释为表示“步骤加功能”的关系,而在权利要求中具体地陈述词语“步骤”的情况下,权利要求应解释为表示“步骤加功能”的关系。

[0546] 根据以上所述,应当理解,尽管出于说明的目的已经在本文中讨论了具体的实施方式,但是可以在不背离本文所讨论的精神和范围的情况下进行各种修改。因此,系统和方法等包括对本文提出的主题所做的这样的修改以及所有排列和组合,并且仅受所附权利要求或在本文的讨论和附图中具有足够支持的其他权利要求的限制。

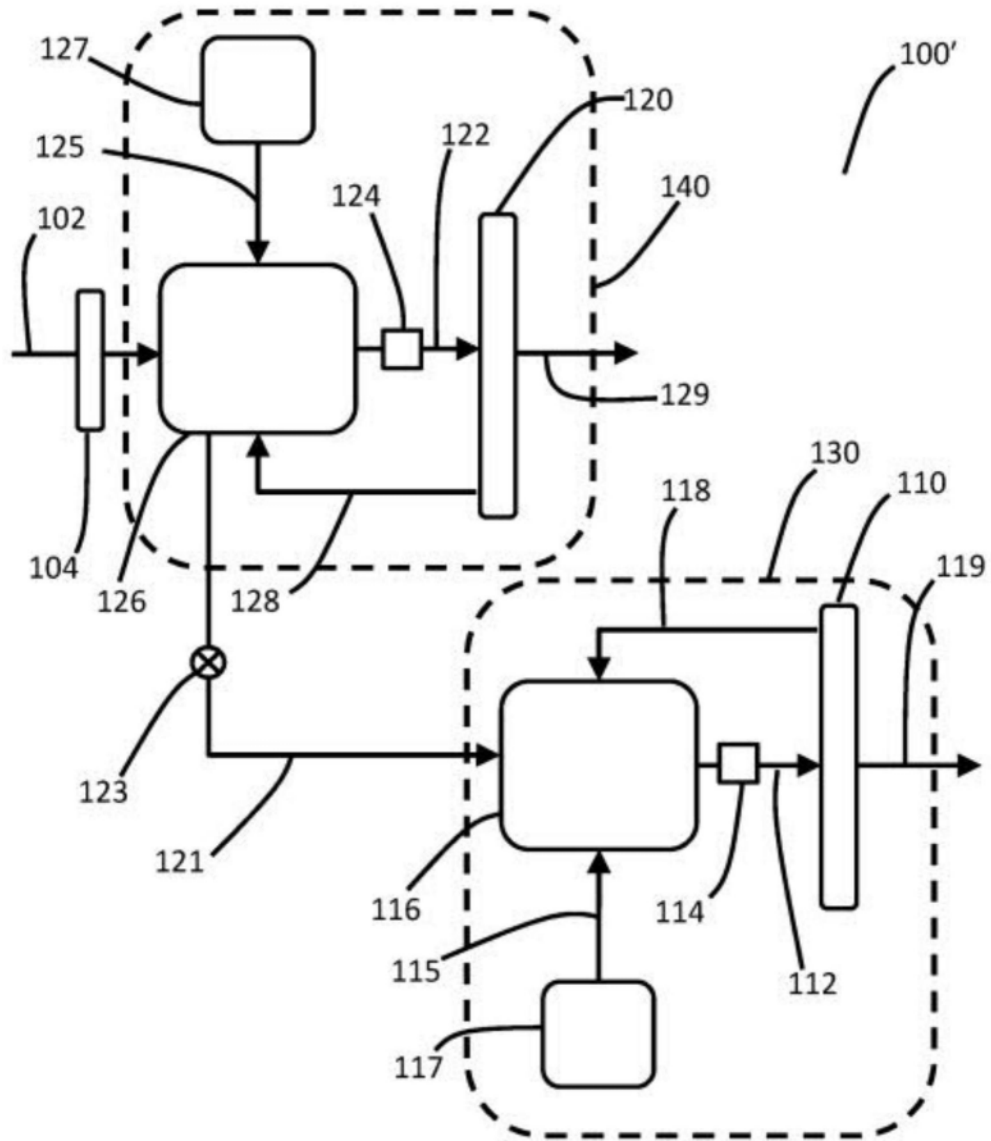


图2

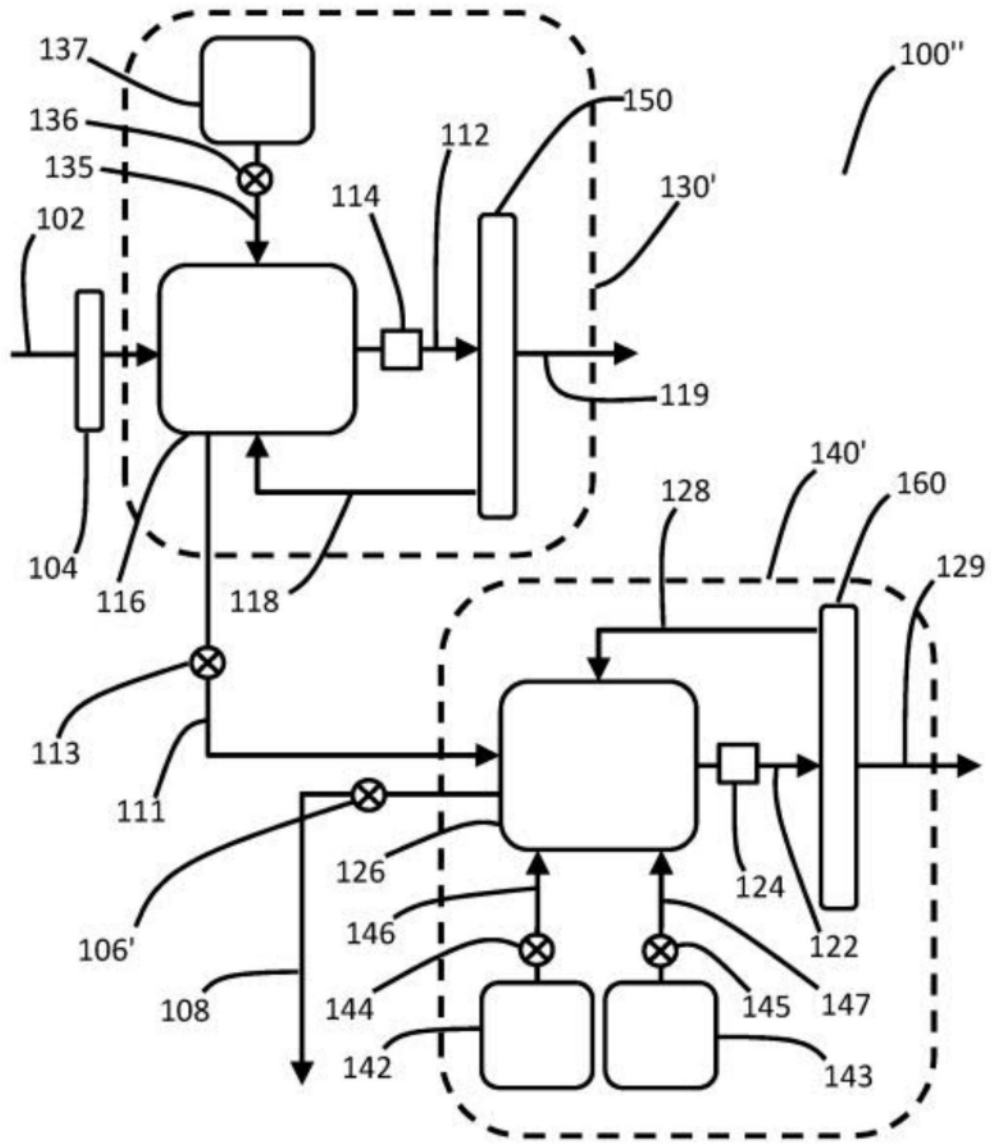


图3

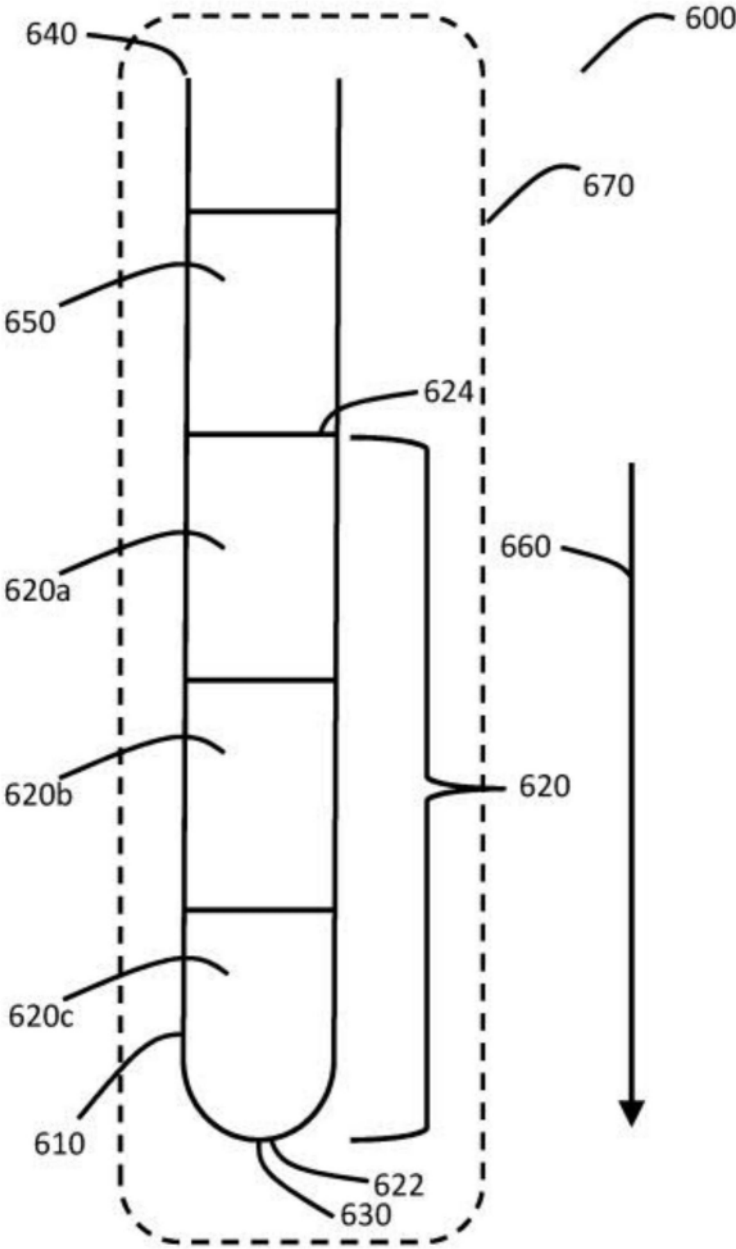


图4

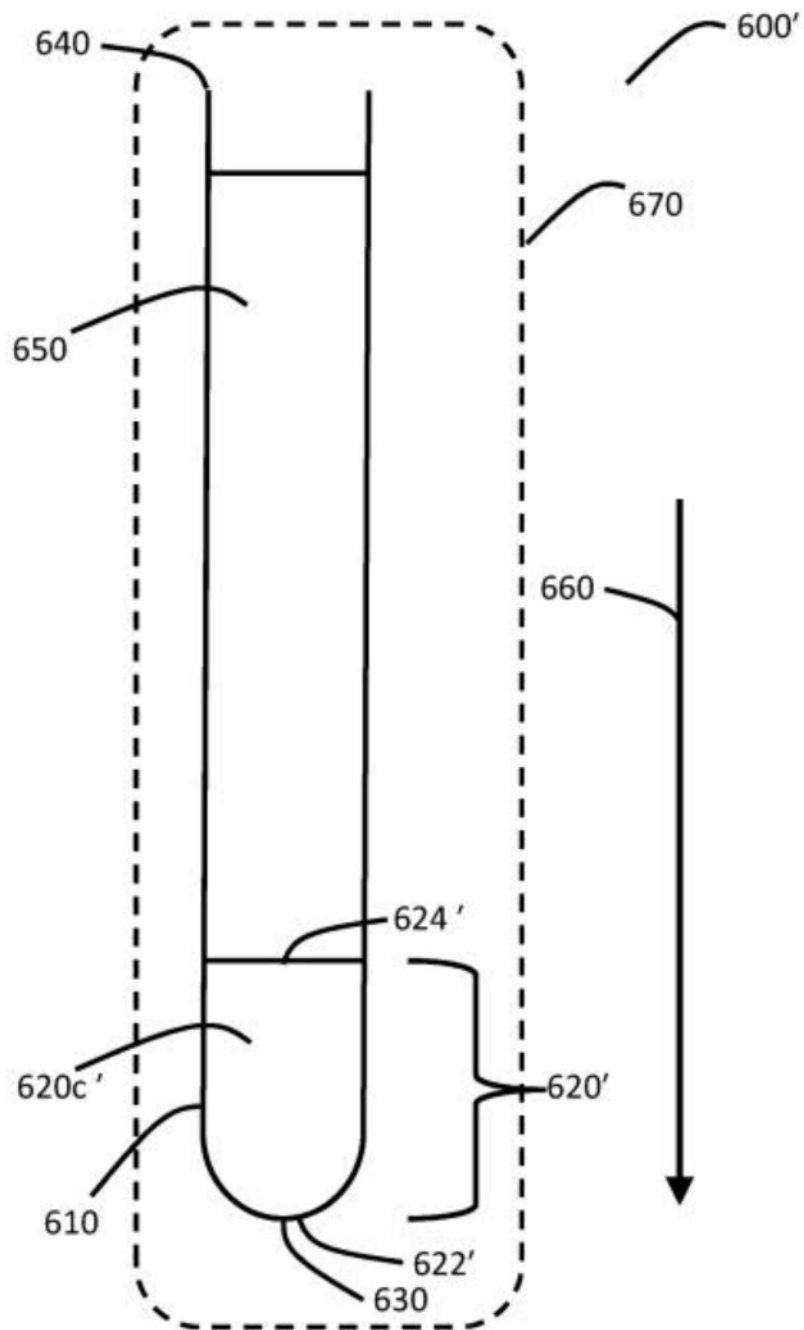


图5

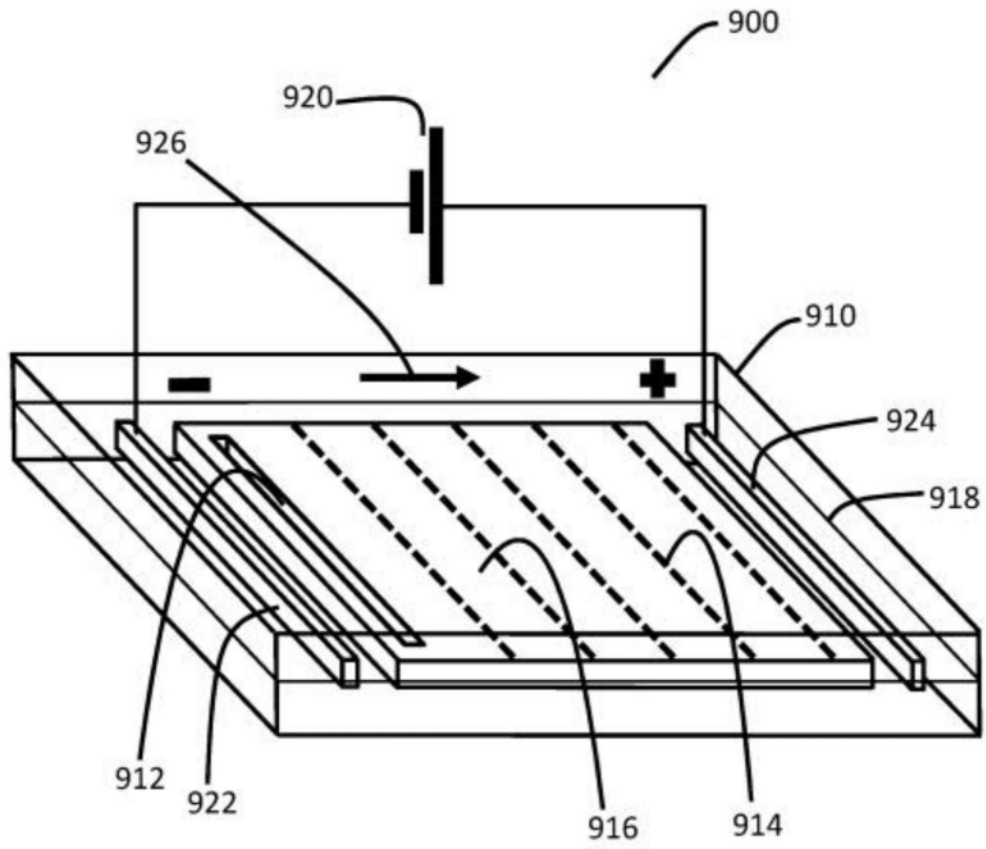


图6

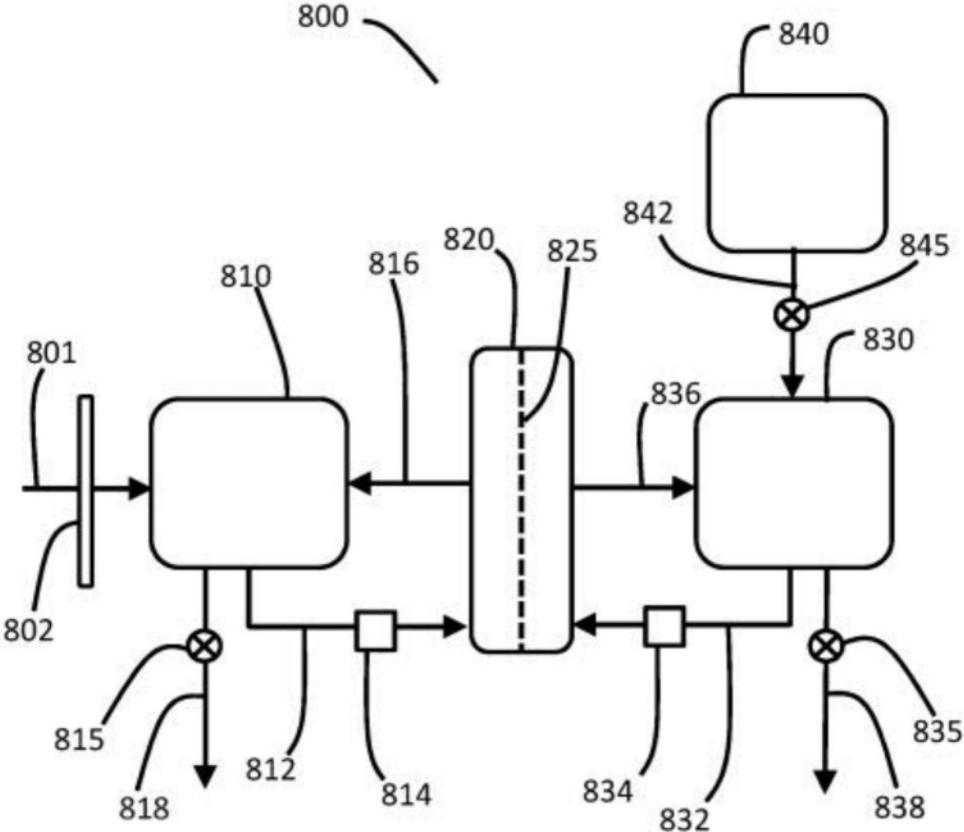


图7

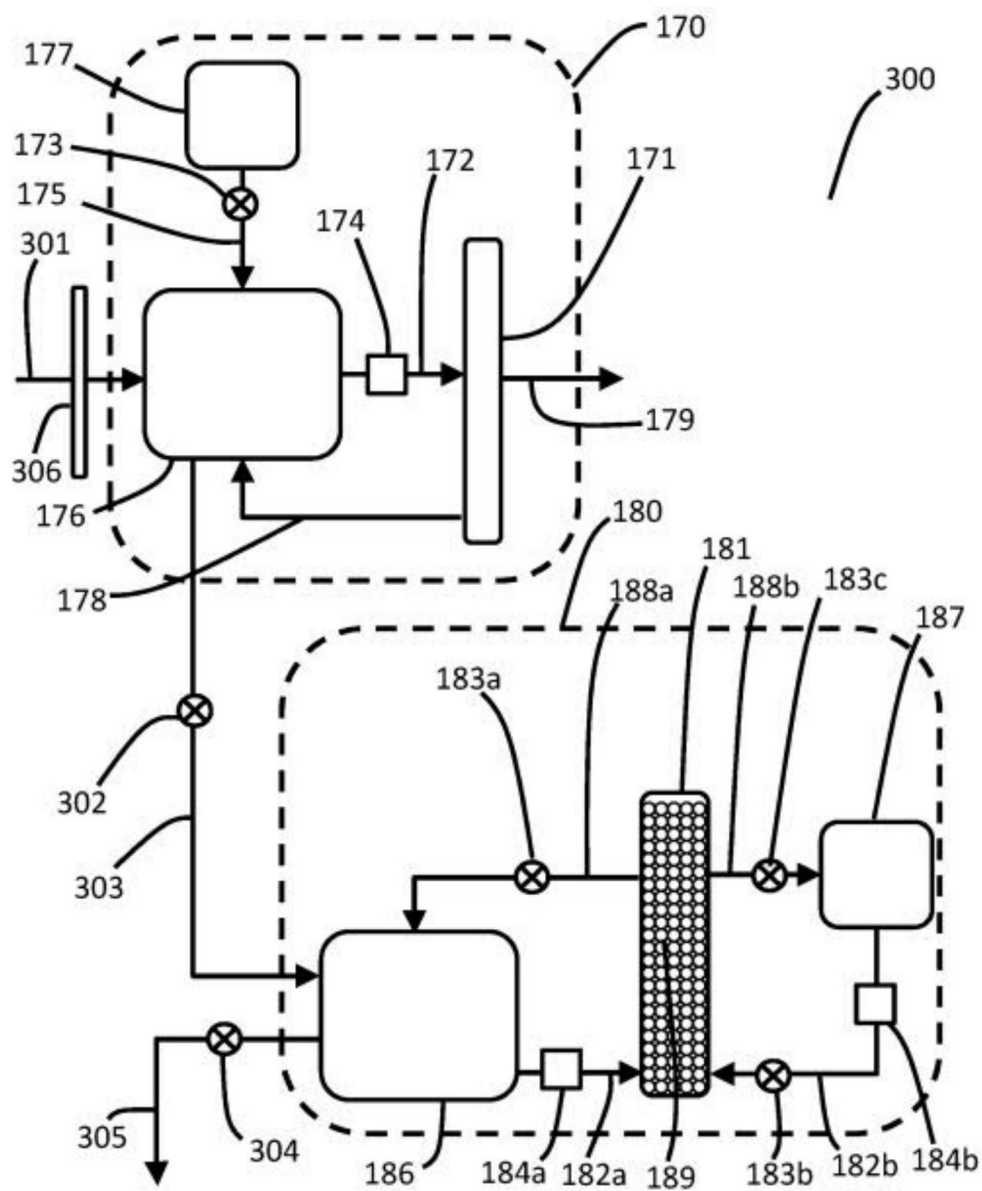


图8

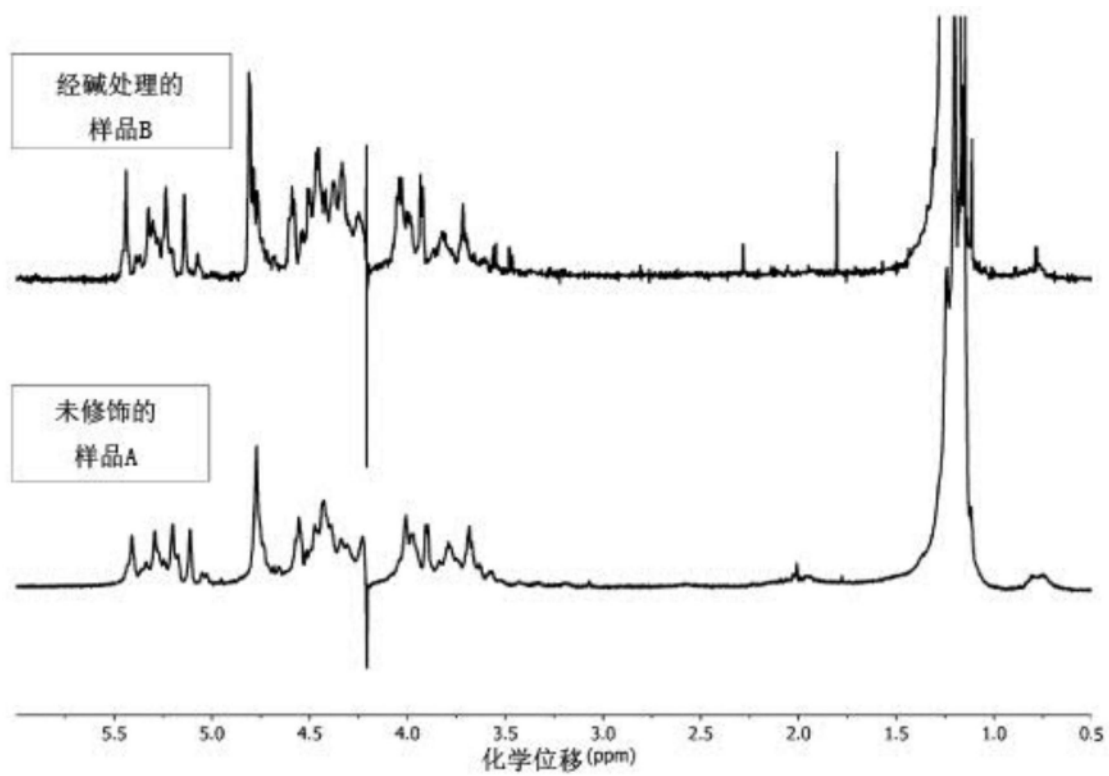
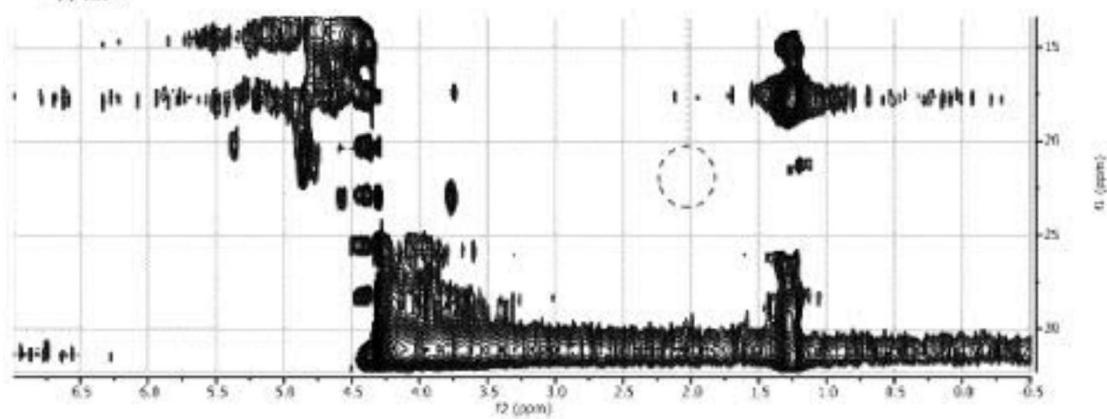


图9A

经碱处理的
样品B



未修饰的
样品A

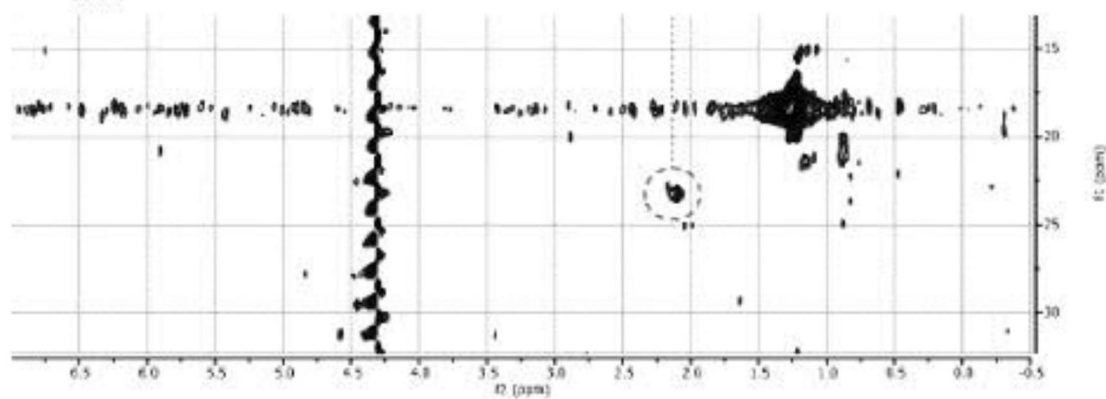


图9B

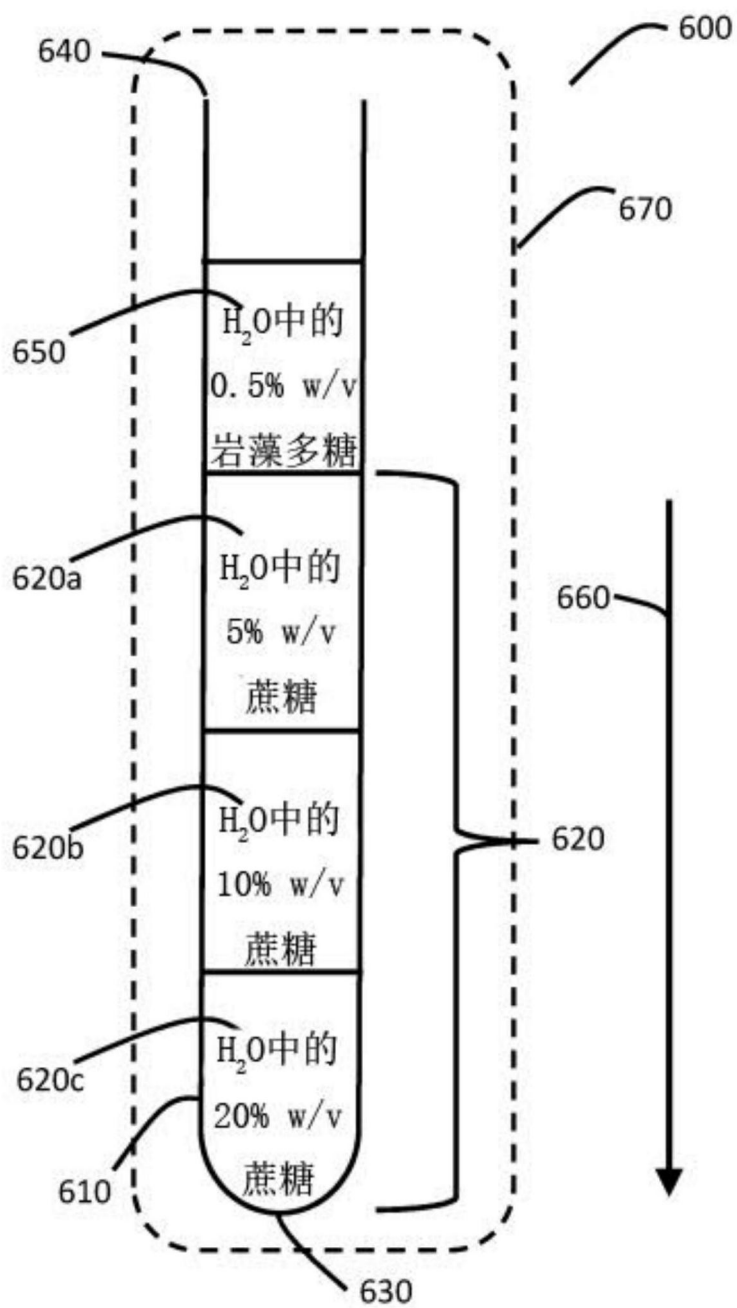


图10