

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C08B 37/00

A61K 7/00 A61K 7/06

A61K 7/02 A61K 9/00

A61L 27/20 A61L 27/52

C12N 5/00 A61P 27/02

A61K 31/722



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02816830.5

[43] 公开日 2004 年 11 月 24 日

[11] 公开号 CN 1549829A

[22] 申请日 2002.6.7 [21] 申请号 02816830.5

[30] 优先权

[32] 2001.8.31 [33] AT [31] A1384/2001

[86] 国际申请 PCT/EP2002/006250 2002.6.7

[87] 国际公布 WO2003/020771 英 2003.3.13

[85] 进入国家阶段日期 2004.2.27

[71] 申请人 穆考彼姆尔生物技术研究与发展有限公司

地址 奥地利莱奥伯吉耶尔山

[72] 发明人 M·普林兹

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

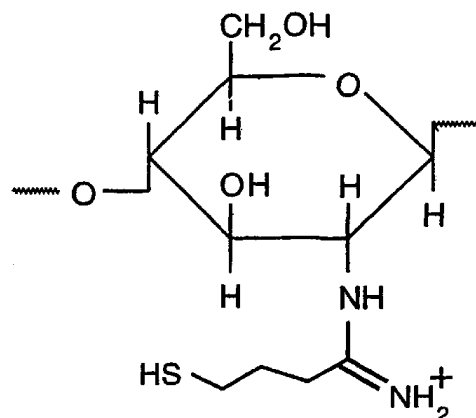
代理人 刘明海

权利要求书 2 页 说明书 7 页 附图 2 页

[54] 发明名称 壳聚糖 - 硫代 - 脒共轭体及其化妆品
和药物用途

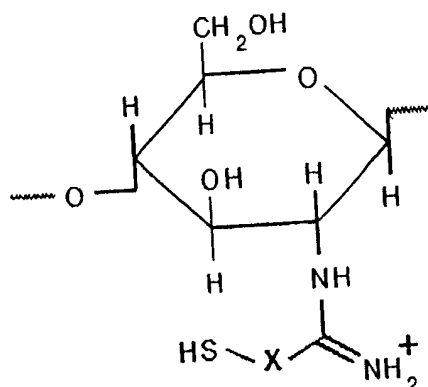
[57] 摘要

通过壳聚糖与亚氨基硫代内酯如 2 - 亚氨基硫杂环戊烷的反应, 硫醇基团可共价固定在聚合物上。 所得到的壳聚糖衍生物具有能够形成分子间和分子内二硫键的硫醇基团。 由于该交联过程, 聚合物溶液的粘度大大地提高。 此外, 聚合物的阳离子特性得以明显增强。 这些新型壳聚糖衍生物的优选应用是其化妆品和药物用途。



I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 在其整体结构中包含如下亚结构的聚合物：



式 中 ， $X = -\text{CR}_1\text{R}_2-\text{CR}_1\text{R}_2-\text{CR}_1\text{R}_2-\text{CR}_1\text{R}_2-\text{CR}_1\text{R}_2-\text{CR}_1\text{R}_2-$ 、
 $-\text{CR}_1\text{R}_2-\text{CR}_1\text{R}_2-\text{CR}_1\text{R}_2-\text{CR}_1\text{R}_2-\text{CR}_1\text{R}_2-$ 、 $-\text{CR}_1\text{R}_2-\text{CR}_1\text{R}_2-\text{CR}_1\text{R}_2-\text{CR}_1\text{R}_2-$ 、
 $-\text{CR}_1\text{R}_2-\text{CR}_1\text{R}_2-\text{CR}_1\text{R}_2-$ 、 $-\text{CR}_1\text{R}_2-\text{CR}_1\text{R}_2-$ 或 $-\text{CR}_1\text{R}_2-$ ，其中， R_1 和 R_2 各自或
 一起为选自氢、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{O}-\text{CH}_3$ 、 $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ 、 $-\text{O}-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 、
 $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ 、 $-\text{OOC}-\text{CH}_3$ 、 $-\text{OOC}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ 、 $-\text{OOC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ 、 $=\text{O}$ 、 $-\text{Cl}$ 、
 $-\text{Br}$ 、 $-\text{I}$ 、烷基、芳基或 O-芳基的取代基。

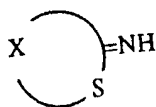
2. 权利要求 1 的聚合物，其中， $X = -\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 、
 $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CRH}-\text{CH}_2-$ ($\text{R} = \text{烷基-}$ 、芳基或 O-芳基残基)、或 $-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{CH}_2-$ 。

3. 在其整体化学结构中具有一个或几个权利要求 1-2 的亚结构的壳聚糖衍生物。

4. 权利要求 1-3 任一项的聚合物，其中，相对每克聚合物共轭体，共价连接的硫醇基团的浓度在 10-4200 微摩尔之间，和特别在 50-2000 微摩尔之间。

5. 权利要求 1-4 任一项的聚合物，其中，由于氧化作用，其 1% 的水溶液显示出大于 5 倍、特别是大于 50 倍的粘度增加。

6. 权利要求 1-5 任一项的聚合物的生产方法，包括使壳聚糖与如下通式结构的亚氨基硫代内酯反应的步骤：



其中，X如上定义。

7. 权利要求6的方法，其中，所述亚氨基硫代内酯是2-亚氨基硫杂环戊烷(Traut's试剂)。

8. 权利要求1-5任一项的聚合物用于化妆品制剂的用途。

9. 权利要求1-5任一项的聚合物在发胶中的用途。

10. 权利要求1-5任一项的聚合物在化妆品中的用途。

11. 权利要求1-5任一项的聚合物的药物用途。

12. 权利要求1-5任一项的聚合物用于制备滴眼剂的用途。

13. 权利要求1-5任一项的聚合物作为玻璃体替代物的用途。

14. 权利要求1-5任一项的聚合物作为移植片固定模用涂料的用途。

15. 权利要求1-5任一项的聚合物在组织工程中的用途。

16. 权利要求1-5任一项的聚合物用于细胞培养的用途。

17. 包含权利要求1-5任一项的聚合物和生物细胞或组织的支承物。

18. 权利要求1-5任一项的聚合物或权利要求17的支承物用于制备植入物的用途。

19. 通过与亚氨基硫杂环戊烷反应而化学改性壳聚糖的方法。

壳聚糖-硫代-脒共轭体及其 化妆品和药物用途

在化妆品和药物配方中使用聚合物已有很长的历史。起初，只是使用来自天然源的聚合物如淀粉和凝胶。而后，有机化学的发展产生了合成聚合物如聚丙烯酸酯。此外，由于天然聚合物的化学改性，其性质也能够得以很大的改善。例如，纤维素醚的产生导致形成了新型的化妆和药物用途的聚合物，其在水溶液中显示出强的胶凝性能。另一发明是壳多糖的脱乙酰作用，所述壳多可从蟹壳中分离得到。脱乙酰的壳多糖或所谓的壳聚糖在化妆品[Naidoo, N. T., Natural cosmetic constituents: seaweed, chitosan and rice. S. Afr. Pharm. J.; 59 (1992) 131-132]以及药物配方[Illum, L., Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. Pharm. Res. 15 (1998) 1326-1331]中用作胶凝聚合物。壳聚糖的化学改性导致形成三甲基化壳聚糖 [Thanou, M., Florea, B. I., Langemeyer, M.W., Verhoef, J. C., Junginger, H. E., N-trimethylated chitosan chloride (TMC) improves the intestinal permeation of the peptide drug buserelin in vitro (Caco-2 cells) and in vivo (rats). Pharm. Res. 17 (2000) 27-31]、一-N-羧甲基壳聚糖 [Thanou, M., Nihot, M.T., Jansen, M., Verhoef, J. C., Junginger, H. E., Mono-N-carboxymethyl chitosan (MCC), a polyampholytic chitosan derivative, enhances the intestinal absorption of low molecular weight heparin across intestinal epithelia in vitro and in vivo. J. Pharm. Sci. 90 (2001) 38-46]以及壳聚糖-EDTA共轭体 [Chitosan-Conjugates with Acidic Chelate-Complex Forming Agents; W09831712A2; Inventor(s): Bern-kop-Schnurch Andreas and Paikl Christina]。

一方面在其粘弹性和胶凝性能、另一方面在药物制备方法（尤其是在工业规模）中的加工性能方面，现有技术的壳聚糖和壳聚糖衍生物存在着缺陷。因此，本发明的目的是提供具有优异性能的聚合物，尤其是壳聚糖衍生的聚合物。

因此，本发明提供在权利要求 1-5 任一项中定义的聚合物。所述聚合物优选通过权利要求 6、7 或 19 任一项的方法来生产。本发明聚合物优选的用途通过权利要求 8-18 的主题来提供。

通过对本发明壳聚糖聚合物的化学改性，提供了具有优异性能和令人惊奇的加工性能的聚合物。

本文使用的术语“聚合物”涉及到某些分子，该分子具有至少为 1 kDa、优选至少 50 kDa、尤其是至少 200 kDa 的分子量，并且包含至少 5 个、优选至少 20 个、尤其是至少 100 个可识别单体部分，优选是碳水化合物(糖)单体实体(由此定义多糖)，尤其是衍生自在 C-2 原子上具有 N-取代基的葡萄糖(葡糖胺)结构的单体实体，并且具有至少 2 个、优选至少 10 个、尤其是至少 50 个权利要求 1 中所定义的硫代-脒-共轭的糖结构。烷基优选是线型或支链的 C_1-C_{10} 基团；“芳基”优选为没有杂原子的被取代的或未被取代的芳香环。

通过壳聚糖与亚氨基硫代内酯如 2-亚氨基硫杂环戊烷 (2-iminothiolane) 的反应，硫醇亚结构将共价地固定在聚合物上，并大大地改善聚合物的阳离子特性。优选改性的壳聚糖的化学结构如图 1 所示。壳聚糖-硫代-脒共轭体的提纯优选可通过聚合物从溶液中的渗析或沉淀来完成。令人惊奇的是，通过所述化学改性，将大大地改善壳聚糖的粘弹特性。这种壳聚糖衍生物的水凝胶在惰性条件下显示出低粘度，而在空气存在下，粘度将增加 500 倍以上。造成这种效应的原因在于在聚合物内形成了二硫键，导致聚合物链交联。此外，借助在聚合物的硫醇基和表面蛋白质的半胱氨酸亚单元之间形成二硫键，改性的壳聚糖将很好地粘附在皮肤和头发上。这些性能使硫醇盐化的壳聚糖成为发胶或化妆品有用的化合物，应用之后其自身应当稳定，避免抹掉和溶解。从药物的观点看，本发明的聚合物对于例如滴

眼剂提供了就地使赋形剂胶凝的优点。这样的滴眼剂能容易地以低粘度滴入,随后,借助空气的氧化过程在视角表面上变成高粘性。由于在视觉表面上改善的粘度,所述聚合物以及因此的掺入的药物将长时间地保留在目标组织上,这将大大地改善治疗效果。此外,在组织工程的情况下,基于本发明的聚合物将是特别有益的。在体外的低粘度下,细胞可用所述壳聚糖衍生物的水溶液来均匀化。在注入机体内或将悬浮液倒入模具内之后,聚合物/细胞混合物由于接触氧(或其它合适的氧化剂)将变成固体,这给细胞增殖提供了稳定的支承。此外,由于壳聚糖-硫代-脘共轭体优异的就地胶凝性能,它们能用作玻璃体的替代物,它们以水溶液的形式注入,并通过在眼中的氧化而变成固态。此外,本文描述的聚合物可用作提供植入药物控释的移植片固定模(stents)的涂料。

因此,本发明还包括这样的植入物、支承物(scaffolds)、移植片固定模、涂层和其它产品,尤其是药物或化妆品产品,它们包含或由本发明的聚合物制得。

在下面的实施例和附图中对本发明进行了进一步的描述,但本发明并不局限于此。

图1示出了本发明优选聚合物的化学结构;

图2示出了形成二硫键之后残余硫醇基团的浓度;

图3示出了由于形成二硫键而造成的浓度增加;和

图4示出了由包含本发明聚合物的片剂释放的克霉唑量。

实施例

实施例1:壳聚糖-4-硫代-丁基-脘共轭体的合成

以0.2%(m/v)的最终浓度,将分子质量为约150 kDa和脱乙酰化度为85%的壳聚糖溶解于1%的乙酸中。以0.7毫克/毫升的最终浓度,添加2-亚氨基硫杂环戊烷盐酸盐(Traut's 试剂)后,通过用氮气鼓泡2小时而除去溶液中的氧。用1 M的NaOH将pH调节至6.5并在惰性条件于室温下使反应进行8小时。借助相对2 mM的HCl然后相对软化水的渗析而分离所得的壳聚糖-4-硫代-丁基-脘共轭体(参见图1)。

将离析的聚合物冻干。由该方法生产的共轭体显示出 0.5 ± 0.2 mMol 固定的硫醇基团/g 聚合物。

实施例 2: 壳聚糖-4-硫代-丁基-脘共轭体衍生物的合成

以 0.2%(m/v) 的最终浓度, 将分子质量为约 150 kDa 和脱乙酰化度为 85% 的壳聚糖溶解于 1% 的乙酸中。以 1 毫克/毫升的最终浓度, 添加 5-甲基-2-亚氨基硫杂环戊烷盐酸盐、5,5-二甲基-2-亚氨基硫杂环戊烷盐酸盐、5-苯基-2-亚氨基硫杂环戊烷盐酸盐或 4-甲氧基-2-亚氨基硫杂环戊烷盐酸盐后, 通过用氮气鼓泡 2 小时而除去溶液中的氧。用 1 M 的 NaOH 将 pH 调节至 6.0 并在惰性条件下于室温下使反应进行 8 小时。借助相对 2 mM 的 HCl 然后相对软化水的渗析而分离所得的壳聚糖-4-硫代-丁基-脘共轭体衍生物。将离析的聚合物冻干。由该方法生产的共轭体显示出在 0.02 和 0.6 mMol 之间的固定的硫醇基团/g 聚合物。

实施例 3: 二硫键的形成

按如下来确定硫醇盐化壳聚糖内二硫键的形成。将壳聚糖-4-硫代-丁基-脘共轭体溶解于 80 mM 的醋酸盐缓冲剂 (pH 6.5) 中, 最终浓度为 0.5%(m/v)。然后, 通过添加 1 M 的 NaOH 将聚合物溶液的 pH 值调节至 6.5。在 37°C 对反应混合物进行培养, 并在实验开始和以后每小时抽取等分试样。在这些试样中残余硫醇基团的浓度通过 Ellman's 试剂 [5,5'-二硫代二(2-硝基苯甲酸)] 来测定。该研究的结果示于图 2 中。这些结果表明, 残余硫醇基的减少、即在聚合物网络之内二硫键的形成是时间的函数。在 4 小时内, 所有硫醇基的约 25% 被氧化成二硫键。

实施例 4: 粘度的增加

由于形成二硫键所致的粘度增加利用粘度计 (锥形/平板) 来测定。将壳聚糖-4-硫代-丁基-脘共轭体溶解于 80 mM 的磷酸盐缓冲剂 (pH 6.0) 中, 最终浓度为 1.5%(m/v)。该溶液的粘度的增加通过流动曲线在时间点 0、5 和 20 小时时进行测量。该研究的结果示于图 3 中。这些结果表明, 聚合物溶液粘度的明显增加是时间的函数。在培养 20

小时之后，聚合物溶液的粘度比起始点时的粘度高约 50 倍。这些就地胶凝性能的优点在于聚合物溶液能够以其液态应用，在应用之后变成固态。在化妆品领域，例如，以液态进行化妆，并在几分钟之后稳定于皮肤上。

实施例 5:发胶配方的制备

首先，将 2 克壳聚糖-4-硫代-丁基-脘共轭体溶解于 200 ml 不含氧的软化水中。通过添加 NaOH 将溶液的 pH 值调节至 7.0。在添加 80 毫升异丙醇之后，在惰性条件下，将得到的透明凝胶装填入 30 毫升的单组容器中。

实施例 6:化妆品配方的制备

首先，将 4 克壳聚糖-4-硫代-丁基-脘共轭体溶解于 200ml 不含氧的软化水中。然后添加 60 毫升彩色颜料溶液(30%悬浮液; Biotic Phoea, Marseille, France)。在借助真空除去剩余的氧之后，添加软化水，以使最终体积达到 200 毫升，并将 pH 值调节至 7.0。在惰性条件下，将化妆品配方装填入 1 毫升的单组容器中。

实施例 7:噻吗洛尔滴眼剂药物配方的制备

噻吗洛尔盐酸盐(3-叔-丁基氨基-1-[(4-吗啉代-1,2,5-噻二唑-3-基)氧]-2-丙醇)是用于治疗青光眼的 β -阻滞剂。以 0.5%(m/v)的最终浓度，将该药物溶解于 20 mM 的醋酸盐缓冲剂(pH 5.2)中。以 0.1%(m/v)的最终浓度添加壳聚糖-4-硫代-丁基-脘共轭体和以 0.03%(m/v)的最终浓度添加防腐剂之后，将 pH 值调节至 5.2。剩余的氧通过用氮气对溶液鼓泡而除去。在惰性条件下，将所得滴眼剂装填入 10 毫升的多元容器中。然后用铝箔对这些容器进行密封。

实施例 8:包含克霉唑的片剂的制备和表征

首先，将 500 毫克壳聚糖-4-硫代-丁基-脘共轭体(0.5%)水化于 40ml 软化水中并用 100 毫克溶解于 2ml 二恶烷中的克霉唑进行均匀化。在 -20℃ 对混合物进行冷冻并冻干。将如上所述的冻干聚合物/克霉唑混合物压成片剂。

对该药物输送体系的体外药物释放进行分析。将该剂型置于包含

6 毫升释放介质(80 mM 醋酸盐缓冲剂 pH6.0/二恶烷;7+3)的烧杯(Schott Duran 25ml, Germany)中。将该密闭容器置于振荡的水浴中并于 37℃ 进行培养。在研究期间,保持沉没状态。每小时抽取 400 μ l 的等分试样,共计 8 小时。用等体积的释放介质代替所述介质。通过在 256nm 处光度学地测量吸光率而对释放的克霉唑进行分析。通过标准曲线的内推法来计算浓度。释放研究的结果示于图 4 中。这些结果表明,能够保证从药物输送体系可控且持续地释放药物。

实施例 9: 组织工程

支承物的制备(方法 I)

用软化水使冷冻干燥的壳聚糖-4-硫代-丁基-脘共轭体重新水化,从而获得 3%(m/v)的聚合物凝胶。通过高压蒸煮压处理(10 分钟, 121℃)对获得的凝胶进行消毒,并在室温于无菌条件下储存,用于将来的使用。

支承物的制备(方法 II)

以下列方式对冷冻干燥的壳聚糖-4-硫代-丁基-脘共轭体进行消毒:用 96%(v/v)EtOH 对冷冻干燥的硫醇盐化壳聚糖小片培养 1 小时,然后用 70%(v/v)异丙醇培养 48 小时。为进一步储存,使用 70%(v/v)的 EtOH。

细胞培养研究

细胞培养研究在 24-孔培养板中进行。未处理的培养孔用作对比。将壳聚糖-4-硫代-丁基-脘共轭体的片切成 5 × 5mm 的小片,在培养容器中风干并用 PBS(磷酸盐缓冲盐水, pH 7.4; Life Technologies)漂洗三次,从而将 pH 调节至 7.4。使凝胶液化并将液滴(直径约 5 毫米)转移至培养板中。将 L-929 细胞(鼠成纤维细胞)再悬浮于 10 微升 DMEM (Life Technologies)+10% FCS (Life Technologies)中,并将 1×10^4 个细胞接种至每个包含壳聚糖-4-硫代-丁基-脘共轭体的容器上以及接种至对比容器上。在培养 2 小时之后,添加 750 微升介质。每隔两天,用显微镜研究支承物上的细胞生长。结果证明,在新型支承材料上细胞快速且致密的生长。

本发明聚合物的特征：

1. 壳聚糖-硫代-脘共轭体的酸性水溶液为透明澄清的凝胶。
2. 壳聚糖-硫代-脘共轭体的水溶液在氧存在下通过形成二硫键变成固态。
3. 壳聚糖-硫代-脘共轭体的制剂具有很强的就地胶凝性能。
4. 在惰性条件下，固定的硫醇基在壳聚糖-硫代-脘共轭体上保持稳定。
5. 壳聚糖-硫代-脘共轭体具有硫醇侧链和比壳聚糖更强的阳离子特性。

图 3

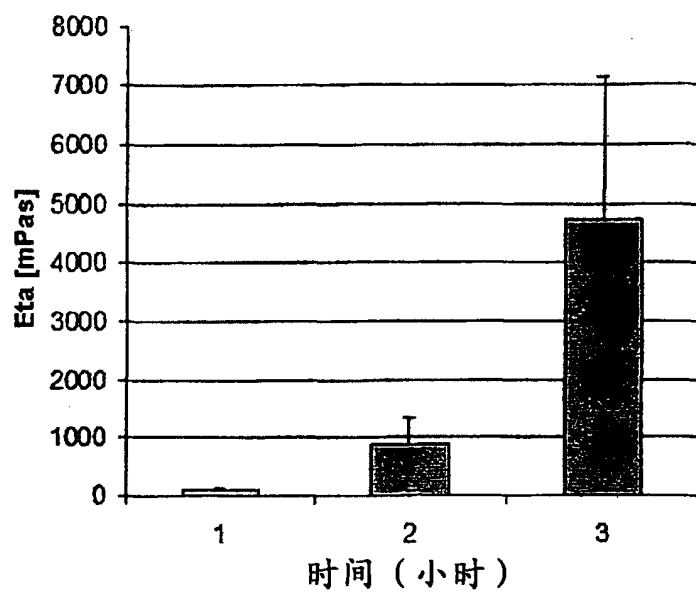


图 4

