



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101248019 B

(45) 授权公告日 2012. 12. 26

(21) 申请号 200680028504. 8

(22) 申请日 2006. 06. 14

(30) 优先权数据

7895 2005. 06. 14 IS

(85) PCT申请进入国家阶段日

2008. 02. 02

(86) PCT申请的申请数据

PCT/IS2006/000013 2006. 06. 14

(87) PCT申请的公布数据

W02006/134614 EN 2006. 12. 21

(73) 专利权人 杰尼斯 EHF 公司

地址 冰岛雷克亚未克

(72) 发明人 约翰内斯·吉斯拉松

乔恩·M·埃纳尔松 Ng·泉·豪

斯文·巴尔克

(74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限

责任公司 11219

代理人 杨青 樊卫民

(51) Int. Cl.

C03B 37/08 (2006. 01)

(56) 对比文件

US 2795579 , 1957. 06. 11, 说明书第 1 栏第 52 行至第 71 行 .

US 5077052 , 1991. 12. 31, 说明书第 5 栏实施例 1-1.

CN 1554267 A, 2004. 12. 15, 权利要求 1-6.

CN 1554267 A, 2004. 12. 15, 权利要求 1-6.

审查员 刘宏伟

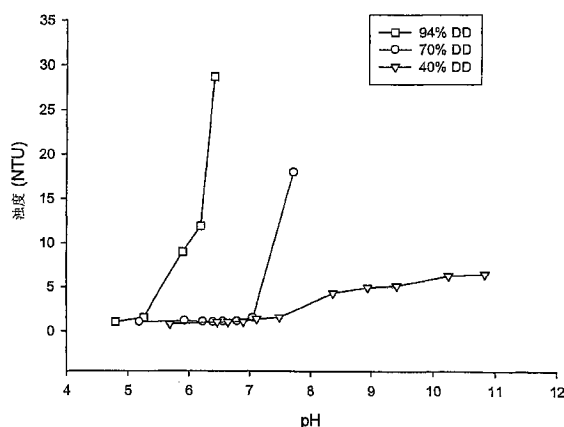
权利要求书 2 页 说明书 30 页 附图 19 页

(54) 发明名称

部分脱乙酰化壳多糖衍生物的组合物

(57) 摘要

本发明涉及含有生物活性的壳多糖低聚物及其除去内毒素且部分脱乙酰化的壳多糖多聚物前体的组合物, 还涉及它们在药物组合物, 生物材料组合物和医疗设备中的应用以及生产所述低聚物的方法。更具体地, 本发明涉及新型组合物和生产所述组合物的方法。所述组合物含有药用异多聚物和异低聚物的组合物, 该组合物含有 N- 乙酰葡萄糖胺和葡萄糖胺的特异序列, 被开发用于优化对于所述组合物治疗活性起着重要作用的化学和结构特性。此外, 本发明提供了使用部分脱乙酰化壳多糖聚合物的脱乙酰化程度来调节用于骨移植应用中的磷酸钙复合物的物理和生物参数的方法。



1. 一种回收高纯度和完全可溶的部分脱乙酰化壳多糖聚合物的方法,该聚合物脱乙酰化程度(DD)介于30-60%之间,所述方法包括步骤如下:

- 中和部分脱乙酰化壳多糖
- 将部分脱乙酰化壳多糖溶解于酸性溶液中
- 通过连续过滤步骤去除未溶解的颗粒
- 调节溶液的 pH 值至 8 以上
- 通过升温 and 加盐使完全溶解和纯化的部分脱乙酰化的壳多糖沉淀析出,其中沉淀后通过过筛或离心来回收沉淀物,其中沉淀步骤期间的温度超过 50℃。

2. 权利要求 1 的方法,其中所述部分脱乙酰化的壳多糖的分子量大于 10kDa。

3. 权利要求 1 的方法,其中对所述部分脱乙酰化的壳多糖溶液的升温包括升高温度至 50-100℃之间。

4. 权利要求 1 的方法,其中对所述部分脱乙酰化的壳多糖溶液的调节包括升高 pH 值至 8-13 之间。

5. 权利要求 1 的方法,其中用于盐析的盐为任何高离液度的盐;或任何用于溶解所述聚合物的酸的盐,或任何其他高离液度的盐。

6. 权利要求 5 的方法,其中高离液度的盐为氯化钠。

7. 权利要求 5 的方法,其中用于溶解所述聚合物的酸的盐为三羧酸或二羧酸或单羧酸有机酸的盐。

8. 权利要求 7 的方法,其中的三羧酸为柠檬酸。

9. 权利要求 7 的方法,其中的二羧酸为苹果酸。

10. 权利要求 7 的方法,其中的单羧酸为乙酸。

11. 权利要求 5 的方法,其中其他高离液度的盐为硫酸铵,尿素,盐酸胍。

12. 权利要求 1 的方法,其中盐浓度介于 2%至饱和之间。

13. 权利要求 1 的方法,其中壳多糖在脱乙酰化步骤之前采用无机酸或有机酸处理。

14. 权利要求 1 的方法,其中在进行权利要求 1 的回收步骤之前,所述部分脱乙酰化的壳多糖聚合物进一步地采用第 18 家族内源壳多糖酶进行广泛的处理。

15. 权利要求 1 的方法,其中在脱乙酰化前,通过将壳多糖原料基本溶解于碱性溶液中而控制第 18 家族内源壳多糖酶处理过程中形成的有治疗活性的杂多聚物和杂低聚物的相对产量。

16. 权利要求 1 的方法,其中所述脱乙酰化程度为 30-100% DD 的部分脱乙酰化壳多糖聚合物与磷酸钙复合物混合,用以调节最终复合物的物理化学性质,机械性质和生物性质。

17. 权利要求 1-16 任一项的方法生产的部分脱乙酰化壳多糖聚合物的组合物,其中在权利要求 1 的回收步骤之前用第 18 家族内源壳多糖酶对部分脱乙酰化壳多糖聚合物进一步进行广泛的处理。

18. 能经权利要求 14 的方法获得的含有具有 N- 乙酰葡萄糖胺(A)和葡萄糖胺(D)的治疗活性壳低聚物的组合物,其中:

- 所述壳低聚物具有 5-20 单体残基范围内的链长,
- 每条壳低聚物链在低聚物链两端之一或两端具有两个 N- 乙酰葡萄糖胺残基(AA),
- 所述内部链的序列使得 N- 乙酰葡萄糖胺残基(A)与另外的 N- 乙酰葡萄糖胺残基不相

邻,

- 所述壳低聚物的其余内部部分具有最大量的 A 残基。

19. 药物组合物, 含有权利要求 17 所述的部分脱乙酰化的壳多糖聚合物。

20. 药物组合物, 含有权利要求 18 所述的部分脱乙酰化的壳多糖聚合物。

21. 权利要求 19 或 20 的所述药物组合物, 其形式为粉剂, 悬浮剂, 凝胶剂, 溶胶剂, 气溶胶剂, 膏剂, 膜剂, 泡沫剂, 片剂和胶囊剂。

22. 权利要求 19 或 20 的所述药物组合物, 包含药用的赋形剂。

23. 权利要求 18 的组合物, 用于生产生物材料 / 药物。

24. 权利要求 23 的所述组合物, 用于生产生物材料 / 药物, 以促进组织再生。

25. 权利要求 24 的所述组合物, 其中所述生物材料在治疗哺乳动物断裂骨或切裂骨时促进骨再生和止血。

26. 权利要求 24 的所述组合物, 其中所述生物材料进一步包括选自下列任何物质的组分: 包括羟基磷灰石在内的磷酸钙、硫酸钙、三聚磷酸钠、海藻酸盐、胶原和透明质酸等。

27. 权利要求 18 的组合物, 用于处理在使用医疗器械时暴露于生物材料和 / 或组织的表面。

部分脱乙酰化壳多糖衍生物的组合物

发明领域

[0001] 本发明涉及一种从溶液中回收聚合物脱乙酰壳多糖的新颖方法。本发明进一步涉及按本发明所述方法生产的含生物活性的壳多糖多聚物和低聚物的组合物,它们在药物组合物,生物材料组合物和医疗设备中的应用以及生产所述多聚物和低聚物的方法。

[0002] 发明背景

[0003] 脱乙酰壳多糖是一种天然来源的生物聚合物,它来自于可从甲壳动物外壳获得的壳多糖,但也可以从其他无脊椎动物和真菌获得。经对壳多糖聚合物的 N- 乙酰葡萄糖胺残基脱乙酰化后制得脱乙酰壳多糖,一般情况下采用浓碱水解 N- 乙酰键制得脱乙酰壳多糖。按照定义,脱乙酰壳多糖一般被描述为 D- 葡萄糖胺 (D) 和 N- 乙酰-D- 葡萄糖胺 (A) 的共聚物,它在 pH 大于 6.2 时(此 pH 值为游离氨基的等电点)不溶于水,但在 pH 小于约 6.2 时可以溶解。一般情况下,普通脱乙酰壳多糖共聚物中 70-100% 的单体为 D- 葡萄糖胺,此种脱乙酰壳多糖可以描述为具有 70-100% 的脱乙酰化程度的 70-100% 脱乙酰化的脱乙酰壳多糖。当脱乙酰化程度低于约 70% 时,所述脱乙酰壳多糖聚合物表现出不同的溶解性质,升高的生物活性和一般而言更高的生物降解性。

[0004] 脱乙酰壳多糖的化学和生物性质直接受脱乙酰化程度 (DD) 和聚合程度 (DP) 的影响,后者即聚合物的链长。在 pH 小于 6.2 的溶液中,并当 D- 葡萄糖胺残基的胺基被质子化后,脱乙酰壳多糖为带正电的聚合物。脱乙酰壳多糖作为胺类,是一种弱碱,可与酸比如羧酸和无机酸反应形成盐。这些盐大多数为水溶性的。壳多糖的天然形式不溶于水。但是它可通过碱处理经部分脱乙酰化成为水溶性的。具 35-50% DD 的部分脱乙酰化的壳多糖可在宽泛的 pH 范围下溶解于水。这种部分脱乙酰化的壳多糖形式已被表明具有生物活性,可潜在应用于各个领域,比如生物医学、制药和美容等。

[0005] 大于 60-70% DD 的脱乙酰壳多糖制剂的缺点之一是其往往在 pH6.2 以上沉淀。这限制了它在需要于中性或高 pH 下溶解时的应用范围。在这方面,部分脱乙酰化的壳多糖比具更高 DD 的脱乙酰壳多糖拥有更大的优势,这是因为它的溶解度曲线涵盖了更宽泛的 pH 范围。它继承了脱乙酰壳多糖的大多数物理化学性质,与普通脱乙酰壳多糖相比它具有更高的涵水能力,与水接触后可导致快速膨胀。与常规的更高 DD 的脱乙酰壳多糖相比,它还具有平衡的疏水/亲水性质。这些性质代表了其在各种应用领域如生物医学、制药、美容和其他相关行业中巨大的应用前景。

[0006] 壳多糖和脱乙酰壳多糖的生物活性在文献中已有许多记载,而且越来越多的证据表明随着 DD 下降,其生物活性升高。这与其在生理 pH 值下改善的溶解性质相一致。

[0007] 脱乙酰壳多糖的纯化通常包括溶出过程,以便将不溶物或杂质从溶液中去除。随后通过将脱乙酰壳多糖从溶液中沉淀下来进行回收步骤。可继而冲洗沉淀形式的脱乙酰壳多糖回收物至中性 pH 值并除盐。一般对于 55% 及以上 DD 的脱乙酰壳多糖,该回收不会出现问题,这是因为溶液 pH 值增加到 6.2 以上后它可以轻易地被沉淀下来。但是对于部分乙酰化的壳多糖,pH 值的调节并不有效,通常需要有机溶剂来辅助沉淀过程。专利 CN1554267 报道了使用乙醇来洗涤聚合物,更多使用溶剂的例子可见于 JP10072502, CN1371922 等专

利。或者,在一种不太充分的方法中,所述溶液只是过滤并干燥,因此盐将出现在产物中(JP2022301)。

[0008] 已发现脱乙酰壳多糖可生物互容和可生物降解,这使其成为应用于生物工程中的生物材料中的组分具有吸引力的选择。生物材料一般定义为用于替代生物体的部分或与活组织密切接触发挥其功能的合成材料,而脱乙酰壳多糖一般认为是生物材料制剂中适宜的惰性组分或用作其他物质或组分的基质。有人提出将脱乙酰壳多糖用作药物输送载体,因为它通过吸收或者通过简单化学反应共价结合于生物活性物质可以固定大多数的此类活性物质。

[0009] WO2004/028578 公开了一种用于骨延长中骨形成和骨加固的组合物,它包括脱乙酰壳多糖,三聚磷酸盐和骨成形蛋白(BMP)。美国专利 2003/0124172 进一步公开了一种生产基于脱乙酰壳多糖的膜的方法,该膜含有可生物降解的聚合物和 BMP,用于增强牙植入物或创伤时的骨整合。

[0010] 例如欧洲专利 1435976 已经表明源自壳多糖材料的生物活性,此专利公开了含有 N-乙酰-葡萄糖胺和葡萄糖胺杂低聚物的壳低聚物(chitooligomer)的组合物。该组合物具有生物活性,并被建议用作治疗结缔组织疾病特别是关节炎和骨关节炎的药物的活性成分。

[0011] 在另外一个专利申请中,有人提出人和其他脊椎动物基因组表达的壳多糖酶样蛋白代表了参与这些壳多糖低聚物生物活性的靶受体,当结合上壳多糖低聚物时这些壳多糖酶样蛋白诱导信号传导反应。这些壳多糖酶样蛋白源自大多数活生物体内表达第 18 家族壳多糖酶的一族基因。第 18 家族壳多糖酶的活性侧在这些 CLP 中得到了很好的保留,除了大多数这些蛋白因活性侧的关键突变而失去其催化活性。然而,在人体内,至少两种此类蛋白保持其壳多糖裂解活性,即哺乳动物乙酸壳多糖酶(AMCase)和壳三糖苷酶。

[0012] 发明概述

[0013] 本发明的目标在于提供用于治疗用途的高度纯化的部分脱乙酰化壳多糖的方法和组合物。体外或体内条件下,在用第 18 家族壳多糖酶进行广泛水解后,所述部分脱乙酰化聚合组合物将生成具有治疗活性的壳杂多糖。因此本发明提供了两种形式的组合物;基本从有机污染物如细菌内毒素中纯化而来的聚合组合物,适合移植用的生物材料的活性成分,和适于全身给药的低聚组合物。这些多聚和低聚组合物在本说明书中称为“壳生物聚合物(chitobiomers)”,它们含有生物学相关的特点,这些特点显著不同于普通脱乙酰壳多糖和现有技术下来源于壳多糖的材料。而且,本发明提供的所述低聚组合物代表了整个壳生物聚合物组合物的治疗活性的优化,其优化包括生物利用度,生物稳定性和生物活性。这些低聚组合物在本说明书中称为“治疗用壳低聚糖”(T-ChOS)。所述多聚组合物提供了出色的原位输送体系,借此由局部巨噬细胞特异表达的内源第 18 家族壳多糖酶逐渐在原位降解所述多聚底物,生成有治疗活性的 T-ChOS,后者可防止疤痕组织形成并诱导受伤软骨和骨组织的再生。这涉及通过 T-ChOS 组合物降低或抑制受损组织处成纤维细胞的活性,与此同时涉及活化组织特异性软骨和骨前体细胞。但低聚组合物也可以商业化在体外通过第 18 家族壳多糖酶对多聚壳生物聚合物组合物进行广泛水解后生成,提供 T-ChOS 用于任何种类的全身输送,比如口服,肌内,皮下或静脉给药,或在移植组合物中提供局部输送。

[0014] 本发明的第一方面,提供了生产部分脱乙酰化的壳多糖杂聚合物(壳生物聚合物)方法的优化。所述优化包括用于纯化完全溶解并部分脱乙酰化的壳多糖聚合物的方

法,其中所述方法包括步骤 a) 脱乙酰化后中和部分脱乙酰化的壳多糖;b) 将所述部分脱乙酰化壳多糖溶解于酸性溶液中;c) 通过连续过滤步骤去除未溶解颗粒;d) 调节溶液的 pH 至 8 以上;以及 e) 通过升温 and 加盐增加所述溶液的离液因子来沉淀已溶的部分脱乙酰化的壳多糖。所述方法的特征在于沉淀后通过过筛或离心回收沉淀,其中沉淀的温度超过 50℃。这种优化是通过集中于由第 18 家族壳多糖酶广泛水解聚合壳生物聚合物生成的水解产物而特别得到的。所述底物将降解为杂低聚物,它对所有第 18 家族壳多糖酶具有很强的抵抗力。通过从均匀性和脱乙酰化程度两个方面来精心控制所提供方法中的脱乙酰化步骤,可控制水解步骤中生成的 T-ChOS 组合物的相对产量。这提供了壳生物聚合物的组合物的治疗活性的优化方法。所定义的多聚壳生物聚合物组合物限于 30-70%范围内的脱乙酰化程度,表现出与普通脱乙酰壳多糖显著不同的溶解性质。根据此定义,所有壳生物聚合物组合物在生理 pH 下表现出可溶性。

[0015] 本发明的第二方面提供了部分脱乙酰化的壳多糖聚合物组合物,它根据本发明所述方法生产而成。在本发明的一个具体实施方式中,所述组合物含有 N-乙酰葡萄糖胺(A)和葡萄糖胺(D)的具生物活性的壳低聚物。所述壳低聚物组合物须符合下述所有标准(a-d):

[0016] a) 所述低聚物具有 5-20 个单体残基范围内的链长

[0017] b) 每条低聚物链在其低聚物链两端之一或两端可具有两个 N-乙酰葡萄糖胺残基(AA),

[0018] c) 所述低聚物其余内部部分具有最大量的 A 残基

[0019] d) 所述内部链的序列排列为使得 N-乙酰葡萄糖胺残基(A)与另外的 N-乙酰葡萄糖胺残基(比如 AA)不相邻。

[0020] 本发明的第三方面提供了用于制造生物材料/药物的本发明组合物的应用。

[0021] 本发明的第四方面提供了根据本发明所述方法生产的药物组合物,它含有壳生物聚合物的低聚组合物。

[0022] 本发明的另一个方面,使用所述壳生物聚合物的多聚组合物来调节磷酸钙复合物中的水活度。壳生物聚合物的多聚组合物与由巨噬细胞局部表达的第 18 家族壳多糖酶作用的壳生物聚合物的降解一起将限制该复合物在凝固和硬化过程中形成晶体的大小;这增强了该复合物的生物降解性并帮助游走细胞穿过支架,增强其骨传导性。

[0023] 发明详述

[0024] 下述的具体实施方式和定义涉及本发明中的所述方法和组合物及其用途。

[0025] 本发明的一个具体实施方式中,部分脱乙酰化壳多糖聚合物的脱乙酰化的程度(DD)介于 25 至 70%之间,比如位于 30 到 65%之间,又比如位于 30 到 60%之间,又比如位于 30 到 55%之间,其中 DD 指的是部分脱乙酰化的壳多糖可溶组分的平均 DD,而且壳生物聚合物的分子量高于 10kDa。

[0026] 在本申请文件中,关于脱乙酰化后的部分脱乙酰化壳多糖混合物的术语“中和”系指通过水洗或加强酸降低脱乙酰化的过程中强碱溶液的 pH 值。

[0027] 本发明的一个具体实施方式中,部分脱乙酰化壳多糖的加热包括将温度升高至 45-100℃之间或者甚至煮沸,比如 55-90℃,或比如 60-80℃或优选地为 60 到 70℃之间。

[0028] 本发明的一个具体实施方式中,部分脱乙酰化壳多糖溶液的调节包括将 pH 值升高至 pH 8-13,比如介于 pH 9-12 或 10-11 之间。

[0029] 本发明的一个具体实施方式中,通过向所述溶液中加盐或中和溶液中溶解的酸来实现盐析,其中用于盐析的盐为氯化钠或任何用于溶解部分脱乙酰化壳多糖的有机酸比如乙酸,或优选地为二或三羧酸,比如苹果酸或柠檬酸的盐。这些盐可经适宜的碱中和所述溶液而生成。而且,所述盐浓度系指任何可引起所述多聚物沉淀的盐浓度,其中盐浓度介于2%至饱和之间。

[0030] 本发明的一个具体实施方式中,壳多糖在脱乙酰化步骤前经无机酸处理得到具有极低内毒素水平的产物,比如介于1和60EU/g之间或低于30EU/g。酸打开多聚物,暴露并破坏内毒素。

[0031] 可以使用可导致壳多糖聚合物溶解的任何浓度的酸,比如HCl、磷酸,甲酸,硝酸,硫酸。内毒素的水平以EU单位表示为EU/ml,或EU/g。

[0032] 本发明的另一具体实施方式中,所述方法应用于生物材料/药物的制造,以促进哺乳动物断裂骨或切裂骨治疗时的骨再生和止血。所述药物通过活化组织特异性前体细胞经软骨内骨化促进骨形成。

[0033] 本发明的一个具体实施方式中,所述生物材料进一步包括选自含羟基磷灰石的磷酸钙、硫酸钙、三聚磷酸钠、海藻酸盐、胶原和透明质酸的组分。

[0034] 某种特定物质的生物利用度或通过生物膜的能力与该分子的疏水性有关。由于所有的生物膜主要为疏水性质,一般规律是物质越疏水,它透过该类生物膜的能力越好。N-乙酰葡萄糖胺和完全乙酰化的壳多糖低聚物比其对应的葡萄糖胺单体或高度脱乙酰化的脱乙酰壳多糖低聚物更加疏水,表明壳杂低聚物随乙酰化程度升高,其生物利用度也上升。因此,T-ChOS制剂经优化在其分子结构中含有最大数目的N-乙酰葡萄糖胺,以最大程度地增加其生物利用度,而不会破坏其生物稳定性。本发明提供了独特的数据表明T-ChOS组合物在人自愿者身上其生物利用度有了相对提高。

[0035] 有机化合物的生物稳定性系指它在活生物体内对内源酶的敏感性及其它在该生物体内的半衰期($t^{1/2}$)。若该化合物对内源酶越敏感,则越不稳定。人体内的壳多糖裂解酶可分为两类:具有高度壳多糖裂解特异性的酶,比如第18家族壳多糖酶(AMCase,壳三糖苷酶),它们具有很高的特异活性,或者是具有较低壳多糖裂解特异性的酶,比如溶菌酶和一些蛋白酶,它们可以降解壳多糖和脱乙酰壳多糖,但比活性较低。T-ChOS组合物经部分脱乙酰化,已优化出具有抵抗第18家族壳多糖酶水解的最大稳定性。由于这些酶需要两个或更多连续的N-乙酰葡萄糖胺残基的一段序列作为切割识别位点,因此T-ChOS组合物经专门优化,其分子内部部分不含此类序列。

[0036] 有机物质或配体的生物活性与该配体对靶受体的亲和力直接相关,该亲和力可触发生物反应。目前对壳多糖类化合物在人体内的生物作用知之甚少,尽管某些研究表明壳多糖低聚物在胚胎发育过程中起着至关重要的作用。这表明人类基因组可表达出特异受体,当结合上壳多糖低聚物时该类受体被特异活化。人体内已知的唯一壳多糖结合蛋白为壳多糖酶样蛋白(CLPs),遗传上属于第18家族壳多糖酶,但大多数已失去其酶活性。

[0037] 这些蛋白中的壳多糖结合结构域是高度保守的,与第18家族壳多糖酶的活性侧只有一到几个氨基酸的差异。完全乙酰化的壳多糖低聚糖结合到这类蛋白质的活性位点后,一般会诱导这类蛋白质结构的构象发生变化,表明这种相互作用起着信号传导的作用。本发明提供了数据表明这类壳多糖酶样蛋白(YKL-40或HC gp-39) 其中之一的结合

侧对部分脱乙酰化的 T-ChOS 组合物几乎具有与完全乙酰化壳多糖低聚糖相同的强亲和力 (90%)。第 18 家族壳多糖酶对壳多糖类底物表现出高度活性,并需要相邻的 N-乙酰基作为水解的识别位点,并且其中一个乙酰基将作为质子供体参与到水解反应中。这表明完全乙酰化的壳多糖低聚物可在人体内快速降解(具有弱生物稳定性),特别是因为壳多糖类结构可能会诱导其对应内源第 18 家族壳多糖酶的表达。但是,壳多糖低聚物的部分脱乙酰化将增加其生物稳定性,特别是如果部分脱乙酰化生成了低聚物分子内没有相邻乙酰基的序列。这将生成不会被诸如第 18 家族壳多糖酶的特异壳多糖裂解酶切割的分子,它只会被可切割壳多糖以及脱乙酰壳多糖的低特异性且极低比活性的酶缓慢降解。这表明 T-ChOS 组合物具有发挥治疗活性所要求的生物利用度,生物稳定性和生物活性。

[0038] 在骨植入物中,多聚壳生物聚合物将被源自巨噬细胞的第 18 家族壳多糖酶逐渐水解,生成 T-ChOS 组合物的大部分。这些高度可溶的低聚物将在复合物和临近组织内扩散,作为巨噬细胞、软骨和位于骨髓以及骨内膜和骨外膜处的骨前体细胞的趋化因子或刺激剂。这为骨移植入复合物提供了骨传导性。

[0039] 含有治疗用的壳低聚物及其多聚前体(一起称为壳生物聚合物)的本发明所述组合物由一种基于几步关键处理步骤的方法生产而成,这些关键步骤从根本上影响了组合物和生成材料的性质,比如溶解度和纯度。为了达到最大纯度,本发明提供了一种可选的预处理步骤,其中源自适宜来源的壳多糖基本溶解在适宜的酸性溶液中,优选地为无机酸比如盐酸(HCl),但也可使用其他酸,包括羧酸和/或无机酸比如硫酸,磷酸或硝酸。使用 HCl 时,其浓度通常为约 15-37% (wt/wt) 比如 25% 或更高,其他酸的浓度经适宜调整以获得类似效果。在一具体实施方式中,溶解于酸液中的壳多糖以氧化剂处理,优选地为过氧化氢,但也可使用其他氧化剂,比如碱金属过氧化物,碱土金属和碱金属过硼酸盐,过碳酸盐,过氧化单硫酸盐,过硫酸盐,溴酸盐,次卤酸盐和二卤-异氰尿酸。壳多糖的酸性溶液将打开其晶体结构并将包埋在壳多糖中的内毒素分子暴露出来,实现内毒素杂质的有效提取和降解。可选的氧化剂处理旨在辅助内毒素分子的降解,并因此进一步降低最终产物的内毒素含量。多聚物链的某些断裂将发生在该方法中的这一步骤。基本溶解的壳多糖溶液优选地采用足量的纯水或碱性水溶液快速稀释和基本中和,比如以基本溶解的壳多糖冲流该溶液,使其流入大体积的中和水溶液中,使得壳多糖原料的大部分以无定型胶体壳多糖沉淀下来。所述水一般处于升高的温度比如 40-100°C 内,比如 50-100°C 范围内,又比如 50-80°C 范围内。温度将影响胶体壳多糖的紧密度和凝固。胶体壳多糖在足量的纯水中洗涤后(优选地为连续洗涤),可用于脱乙酰化。

[0040] 本发明的一个具体实施方式中,具有 30 到 100% DD 脱乙酰化程度的所述部分脱乙酰化壳多糖和/或脱乙酰壳多糖,与磷酸钙复合物混合以调节最终复合物的物理化学性质、机械性质和生物性质。通过将具不同脱乙酰化程度的壳生物聚合物或脱乙酰壳多糖混合成所述复合物,该方法提供用于控制磷酸钙复合物的机械和生物性质。这为调节该复合物的关键性质提供了强大的工具,这些性质包括凝固时间,硬化时间、硬度和强度以及生物降解性和对于来自宿主组织的迁移细胞的可及性。调节这些基本性质之所以成为可能,是因脱乙酰化程度从 30% 增加到了 100% DD,从而显著降低了脱乙酰化壳多糖衍生物的涵水能力,即 DD 越低,涵水能力越高。由于磷酸钙的结晶过程涉及与水反应,复合物中水的可及性将影响结晶形成。部分脱乙酰化的壳多糖涵水越多,复合物中的晶体越小。这又反过来

又影响复合物的机械性质和生物降解性。壳生物聚合物的脱乙酰化程度 (DD) 越低,例如巨噬细胞等吞噬细胞越容易侵入复合物的基质,从而为其他迁移细胞比如软骨和骨前体细胞以及血管内皮细胞打开新的孔道。这是一种关键的性质,因为它将促进该复合物重塑为健康的有功能组织。通过壳生物聚合物在脱乙酰化步骤中的优化,有可能增加所述复合物重塑过程中生成的 T-ChOS 产量,为骨质缺损中的软骨内骨再生提供了有效刺激。

[0041] 因此我们总结通过精心控制用于所述复合物中的部分脱乙酰化壳多糖的脱乙酰程度,有可能实现该复合物骨传导性和骨诱导性的最优化。

[0042] 脱乙酰化通常是在溶解了壳多糖原料的碱性反应介质中进行的。该碱一般为氢氧化钠,但也可使用其他适宜的碱,包括 KOH, LiOH, $\text{Ca}(\text{OH})_2$, Na_3PO_4 和 NH_4OH 。干物质与碱的比例在某些具体实施方式中可在 1 : 5 到 1 : 100 的范围内。混合前碱液应优选被冷却。研究发现通过冷冻碱-壳多糖混合液并随后冻融和温育进行脱乙酰化后,脱乙酰化的均一性将显著提高。但脱乙酰化过程的温育温度可在一相对较为宽泛的 0-100℃ 范围内调节,而温育时间也相应进行调节(脱乙酰化温度越低,温育时间越长,反之亦然)。在一些具体实施方式中脱乙酰化反应是在 5-50℃ 的温度范围内进行的,更优选地为 10-40℃ 或 20-50℃ 范围内,比如 10-30℃ 的范围内或 10-25℃ 范围内,更加优选地则落在 12-25℃ 范围内,比如 15-25℃ 范围内。部分脱乙酰化的壳多糖在足量的纯水中沉淀下来,优选地在升高的温度下,比如 30-80℃ 范围内,包括约 35-65℃ 范围内,比如约 45-60℃ 或 40-50℃ 范围内,并随后用足量的纯水冲洗。正如前文所述,还可往溶液中加入盐以进一步辅助回收沉淀物中的聚合物。该材料可随后洗涤,根据下一步用途它可冷冻干燥或喷雾干燥。

[0043] 上述的方法实现了非常均匀的脱乙酰化,即意味着聚合物中的 N-乙酰葡萄糖胺残基 (A) 和葡萄糖胺残基 (D) 基本呈均一分布,影响该聚合物接下来水解为治疗用的壳低聚物。这为在用第 18 家族壳多糖酶水解时精心调节部分脱乙酰化壳多糖的脱乙酰化的平均程度以优化 T-ChOS 的产量提供了机会。所述水解可发生在使用前(即体外,比如下面介绍的情形),或在体内使用获得的聚合前体(壳生物聚合物)作为药物、生物材料或医疗设备的组分时。所述壳生物聚合物将被内源酶比如壳三糖苷酶缓慢水解,在原位生成具有疗效的壳低聚物。

[0044] 本说明书所使用的术语“离液剂”是一种引起分子结构被破坏的物质;具体而言,以非键力比如氢键,范德华力和疏水作用形成的分子结构。通常比如由圆二色性等方法检测的结构特征可通过离液剂浓度依赖的方式滴定。

[0045] 使用最多的离液剂是 6-8M 的尿素和 6M 的盐酸胍,其中尿素为不带电分子,盐酸胍为盐酸盐。

[0046] 高普盐 (generic salt) 通过屏蔽电荷和阻止盐桥稳定可具有高离液性质。氢键在非极性介质下作用更强,因此增加溶剂偶极矩的盐也可使氢键失去稳定。

[0047] 在本说明书中,术语“离液剂比如盐的添加”系指添加选自但不限于 NaOH、硫酸铵、尿素、盐酸胍和酸的任何盐类,优选地为三羧酸盐(比如柠檬酸),然后是二羧酸的盐(苹果酸)再然后是单羧酸的盐。高离液度的盐。

[0048] 得到的部分脱乙酰化的壳生物聚合物具有鲜明的特点。脱乙酰化之前,壳多糖的预溶解、胶体壳多糖的形成以及随后在碱液中的溶解,显著地打开了壳多糖的晶体结构并有效地降低了壳多糖原料中的细菌内毒素,生成了可应用于移植的生物材料制剂和/或医

疗设备的聚合物纯度。

[0049] 治疗用壳低聚物的序列模式直接影响其生物活性,即它们如何被转运过生物膜(生物利用度),它们如何在活系统内快速降解(生物稳定性)以及它们如何与结合壳多糖序列的壳多糖酶样蛋白和其他特异受体相互作用(生物活性)。

[0050] 就第 18 家族壳多糖酶的活性机制而言,底物分子切割位点的识别需要两个或多个相邻 N-乙酰-D-葡萄糖胺基(AA)的序列。切割在生成产物的还原端上形成了两个乙酰基,这意味着假如酶催化下的水解完成后,所述低聚物的大多数将在还原端具有两个 N-乙酰-D-葡萄糖胺基。这意味着本发明中具有最佳生物利用度、生物稳定性和生物活性的治疗用壳低聚物将是具有最大乙酰化程度的部分乙酰化的壳低聚物,其分子内部结构不具两个相邻的乙酰基。因此当两个单体在内部分子结构以其分子序列交替出现(即-DADADADA-),简单地计算就可得出在大约 50%的乙酰化。当该结构与第 18 家族壳多糖酶, YKL-40 或任何任一其 CLP 类似物的结合结构域相互作用时,-DADADADA-结构与与几乎全为 D 的序列相比(即-DDDDDA-),前者与结合位点具有更强的亲和力。治疗用壳低聚物的生物利用度同样也是如此,因为增加的乙酰化程度也增加了该分子的疏水性。本发明提供的数据表明结合到 CLP 结合结构域上的亲和力随着 A 残基相对数目(F_A)的增加而增加。但是,我们的数据也证实当以完全乙酰化的壳多糖六聚物(A_6)来衡量, T-ChOS 组合物具有至少 90%的结合亲和力。

[0051] 在细菌内毒素污染方面,需要特别注意植入用的壳多糖和脱乙酰壳多糖材料,因为来自外骨骼的壳多糖以及来自枪乌贼和乌贼的壳多糖一般含有很高水平的细菌内毒素。此外脱乙酰壳多糖在脱乙酰化过程中及之后还会显著增加对细菌内毒素的亲和力。因此任何旨在生产植入用的足够纯的脱乙酰壳多糖的方法都需要加入特殊的步骤以从原材料底物中提取并减少其中绝大部分的细菌内毒素。

[0052] 本说明书所描述的药物组合物包括本发明中的治疗用壳低聚物(T-ChOS)。它们可全身给药并结合到内源 CLPs 上,其中许多此类蛋白已被表明或暗示参与了几种疾病。在这些与 CLPs 表达上升相关的疾病中就包括退行性疾病,比如包括关节炎(比如类风湿性关节炎和骨关节炎)在内的退行性关节病。已发现 T-ChOS 组合物对治疗和/或矫正这些疾病以及与骨组织形成相关的疾病比如手术干预或创伤后的骨再生有效。

[0053] 所述组合物可进一步包括药用的赋形剂比如操作助剂或稳定剂,稀释剂,调味剂,营养剂或着色剂或适宜的额外生物活性或非活性组分。

[0054] 所述药物组合物将优选地为适合口服给药的形式,比如容易溶解于比如一杯水中的干粉形式。这些形式还包括干粉剂、悬浮剂、凝胶剂、膜剂、泡沫剂、溶胶剂、气溶胶剂、颗粒剂、片剂、纤维剂和膏剂形式。但是所述组合物还可包含在药片或胶囊中。所述药物组合物可进一步包括药用的赋形剂。

[0055] 在其他有用的具体实施方式中,本发明中的所述组合物为适宜全身给药比如肌肉、皮下或静脉给药的其他形式。根据标准药物实践,这些适宜的剂型为含有药用载体或赋形剂的溶液剂形式。所述溶液剂是灭菌的, pH 也经适宜调节和缓冲。静脉给药时,溶质的总浓度应控制为使该制剂等渗的浓度。

[0056] 本发明中的 T-ChOS 可方便地提供为近乎完全干燥的剂型,包括可以胶囊或药片形式给药的粉剂、片剂或纤维剂,或溶解或悬浮于水溶液中用于服药的形式。这样的组合

物可基本仅由前述的治疗用壳低聚物组成,即含约 80-100 重量%的壳低聚物。在有用的具体实施方式中,所述组合物含有 20-100%按重量计的 T-ChOS,包括约 25-95 重量%,比如 50-90 重量%。

[0057] 本发明 T-ChOS 的口服给药需要 T-ChOS 的分子结构符合几项要求:具有足够的生物利用度,即转运过胃肠道生物膜的量足够,具有足够的生物稳定性以在胃肠道的最初降解中保存下来,以及在其降解和从机体内清除前在体液中有效地分布,最后它们还须结合到靶受体上以具有适宜的生物活性。符合所有这些标准需要一些妥协,即某些或全部标准只能在次优水平上达到。这需要对产物的优化概念有个全盘统筹的观念,以获得可克服吸收和生物降解困难的最佳组合物,确保 T-ChOS 到达靶受体并与靶受体相互作用。

[0058] 在本说明书中,术语“医疗设备”一般系指仪器,器械,器具,机器,发明,植入物,体外试剂,或其他类似或相关物品,包括用于人或其他动物疾病的诊断、治愈、缓和、治疗或预防,或用于影响人或其他动物身体结构或任何功能的组件或附件。在本说明书中,术语“生物材料产品”与术语“医疗设备”可以互换使用。

[0059] 本发明中的壳生物聚合物(多聚物或低聚物)对于用于各种用途的生物材料特别有效。除了表现出普通脱乙酰壳多糖的所有优点(生物相容性,可与其他组分混合形成用于医疗设备比如机械植入物和药物输送设备等的适宜混合物),正如上文所述,因其与体内 CLPs 的高亲和力,它们的溶解度和生物或治疗活性显著提高。

[0060] 生物材料的制剂可适宜地包括其他有机和无机组分,比如各种生物聚合物(海藻酸盐和其他多糖腐蚀剂)、胶原、含羟基磷灰石在内的磷酸钙、硫酸钙、三聚磷酸钠、磷酸二氢钠、甘油磷酸钠、氧化钙、氢氧化钙和各种有机酸或羧酸等。

[0061] 得益于生物材料组合物中所含壳聚合物的性质,本发明中的生物材料可用于各种医疗设备上。

[0062] 在骨和其他组织的再生中,有两种主要类型的骨:松质骨和皮质骨。松质骨呈海绵状,组成了包括脊椎在内的多数骨的内部主要成分;而皮质骨结构致密,形成了骨骼的表面。小梁网为骨骼中形成血液的成分提供了支撑。

[0063] 术语“膜内骨化”系指新骨形成的过程,它起源于骨前体细胞,后者在适宜信号触发下,直接分化为新骨。这条骨化途径发生在胚胎发育期,尤其是在扁骨比如头盖骨中颅骨的生长过程中。

[0064] 术语“软骨内骨化”系指骨形成过程,其中软骨首先发育成最终骨骼的框架。软骨组织在其发育和维持阶段比成熟骨组织需要更少的局部氧分压,因此在血液供应系统还没有达到最终发育阶段的地方,软骨将取代骨骼。只有在血管化达到其最终阶段后,软骨会为新的骨所取代,以保证发育中组织所必需的氧气供应。这种骨形成的过程在胚胎发育过程中也是很常见的,尤其是在脊椎,长骨和胸骨等骨骼中。

[0065] 实施例

[0066] 实施例 1:高纯度的部分脱乙酰化壳多糖多聚物的生产(壳生物聚合物)

[0067] 1.1 使用均匀脱乙酰化条件,以提高壳生物聚合物组合物的产量,并在脱乙酰化过程中极大地降低细菌内毒素的水平

[0068] 将壳多糖粉(1)加入到(2)15℃的 50% NaOH(3)中(壳多糖/NaOH 比例,1:15, w/w),并在 36rpm(4)的匀速下混合 1 小时(5)。随后,精细碾碎的 3-10mm 冰(碱/冰比例,

1 : 3, w/w) 加入到碱浆液中以溶解壳多糖。2 小时后,当壳多糖已溶解且细菌内毒素充分暴露给碱液时,升高温度 (7), 在 16°C 下进行 40 小时的脱乙酰化反应。脱乙酰化步骤完成后且内毒素显著降低后 ($< 30\text{EU/g}$), 进一步调节 pH 至 3.8 (8)。随后进行连续过滤步骤 (9) 以除去外源颗粒和未溶解的聚合物。该聚合物以盐析方法沉淀回收。回收后, 冲洗并均化该聚合物。最后该悬液经喷雾干燥 (10) 以得到纯化的聚合物。与非均一的脱乙酰化方法相比, 该方法经济可行, 还可增加完全可溶的壳生物聚合物组合物的产量 60%。内毒素的水平也会在这一过程中显著降低, 这可能是与非均一的脱乙酰化方法相比, 内毒素分子更多地暴露于苛性钠溶液所致, 其中前者中的壳多糖原料在整个过程中维持其晶体结构且内毒素分子可能被锁在固相壳多糖结构中, 从而保护其不受反应溶液中苛性钠所作用。

[0069] 注意 括号中的数字代表依据下表可以变动的方法步骤

[0070] (1) 粉末的颗粒大小可为 2mm 及以下。壳多糖的来源包括虾、蟹、乌贼、枪乌贼、磷虾和其他适宜动物。

[0071] (2) 符合卫生标准的反应器

[0072] (3) 碱的终浓度可介于 5-90% (w/w)。最适宜的碱为氯化钠。其他碱也适合, 这些碱包括浓 KOH, LiOH, $\text{Ca}(\text{OH})_2$, Na_3PO_4 和 NH_4OH 。干物质与碱的比例可介于从 1 : 3 到 1 : 100 的范围。碱的温度可介于 2 到 35°C 的范围。

[0073] (4) 混合速度可介于 0-80rpm。本方法最适宜的范围是 20-40rpm。

[0074] (5) 脱乙酰化的时间可介于 0.5 到 1000 小时, 这主要取决于碱的温度和浓度。

[0075] (6) 粉碎冰的大小可介于 0.5 到 50mm。碱与冰的比例可介于 1 : 1 到 1 : 30 范围内。

[0076] (7) 脱乙酰化的温度可介于 10 到 100°C, 最佳温度范围为 5-30°C, 脱乙酰化的时间可介于 0.1 到 1000 小时。这取决于所采用的温度和时间组合。

[0077] (8) 该步酸化步骤可使用各种酸, 这些酸包括浓羧酸和浓无机酸。最适宜的酸为盐酸。HCl 的浓度可介于 0.01 到 37% (w/w)

[0078] (9) 可采用各种过滤技术, 包括超滤和纳米过滤

[0079] (10) 可采用冷冻干燥或喷雾干燥器, 或其他任何适宜的干燥技术进行干燥。

[0080] 1.2 盐酸预处理壳多糖原料, 以进一步促进细菌内毒素的降低

[0081] 本实施例提供了预处理壳多糖原料的附加步骤, 包括将壳多糖粉溶解于强盐酸液中, 有效地从溶解的壳多糖结构中提取出细菌内毒素并随后破坏与 HCl 和可选氧化剂 (比如过氧化氢) 接触的内毒素。而且在随后的液相脱乙酰化步骤中, 溶解于碱液中的壳多糖可允许进一步提取和破坏经 HCl 处理后残留下的内毒素。该方法对于处理已经失去新鲜且在收集、储存或运输过程中暴露于细菌生长的原料时特别有效。

[0082] 详细制造方法的实施例

[0083] 粉末状壳多糖 ($< 150\mu\text{m}$) (1) 在室温下溶解于 30% 的盐酸 (2) 中 (壳多糖 /HCl 比例 : 1 : 20, w/w)。10 分钟后, 加入过氧化氢 (H_2O_2 终浓度 2%, w/w) (3), 并使其反应 15 (4) 分钟, 然后将溶液冲流进 75% IPA 中 (壳多糖溶液 : 50% IPA 溶液为 1 : 40) (5), 洗涤至中性 pH。继而以不含内毒素的 70°C (6) 水冲洗沉淀。除去过量水后, 往胶体壳多糖加入浓碱液 (碱液终浓度 25% w/w) (7)。之后使混合物达到 -25°C (8)。然后进行除霜, 溶解胶体壳多糖并在 60°C 下进行 6 小时的脱乙酰化反应 (9)。脱乙酰化反应后, 将部分脱乙酰化壳多

糖倾入热水 (70°C) (10) 进行回收,并洗涤至中性 pH。最后,将中和的悬液转移到冷冻干燥器 / 喷雾干燥器以得到干物质。

[0084] 经 LAL 分析方法检测,获得的壳生物聚合物产物中的内毒素水平一般远低于 30EU/g 部分脱乙酰化壳多糖。

[0085] 1.3 经盐析方法纯化部分脱乙酰化壳多糖溶液和回收聚合物

[0086] 本发明所述组合物可适宜地取自壳质 (chitinous) 原料比如虾壳。壳多糖有利地是被强碱脱乙酰化,以获得部分脱乙酰化壳多糖聚合物。或随后,该材料可为按照本实施例 1.1 或 1.2 中的产物,以增加可溶性壳生物聚合物的产量并在纯化前降低细菌内毒素 (EU) 的水平。反应时间和壳多糖的浓度可依所需脱乙酰化程度变化,可轻松地优化以用于任何特殊的处理单元和具体所需的脱乙酰化程度。或以热水洗涤得到的部分脱乙酰化壳多糖或加入适宜的酸以中和 pH 值,使该脱乙酰化反应停止。然后将得到的聚合物溶解于酸液中并过滤溶液以除去外源或不溶物质,进行纯化。

[0087] 为了回收部分脱乙酰化壳多糖聚合物,首先将过滤后溶液的温度升高到 55°C 上。然后调节其 pH 值到 8 以上,优选地 pH 为 10-11,最后加入适宜的盐以启动沉淀过程。然后使用热水洗涤沉淀物直至得到中性和不含盐的材料。洗涤后,可采用合适的常规干燥方法干燥该材料。

[0088] 该实施例说明了不使用有机溶剂,如何从所述过滤后的聚合物溶液中回收高度可溶的部分脱乙酰化壳多糖 (脱乙酰化平均程度介于 30 到 55%)。盐 (NaCl) 的可选加入是用于促进沉淀物的紧密性,以在实现商用方法中更简单的回收。

[0089] 选择的实施例

[0090] 1.3.1 1 克 43% DD 的部分脱乙酰化壳多糖 (批次 G060307P) 分散于 100 克水中。加入柠檬酸 (2 克) 以溶解该聚合物。升高温度至 60°C,并逐滴加入 NaOH (35% 溶液),以将 pH 调节到 11。这导致聚合物沉淀下来,该沉淀物可用热水洗涤至近中性。

[0091] 1.3.2 在采用 1 千克壳多糖进行的中试规模实验中 (批次 G060307P),壳多糖首先脱乙酰化,洗涤并溶解于 1% 的柠檬酸溶液。随后经多步过滤步骤得到澄清溶液。加热该溶液至 65°C 后,加入 350 克 NaOH,使 pH 调节到 10.5。随后加入 4.5 千克的 NaCl,促进白色块状沉淀的形成。反复以 70°C 水冲洗沉淀物直至中性 pH。随后均化该沉淀物并使其喷雾干燥,以生成白色粉末状的部分脱乙酰化壳多糖。该制剂分析如下:

[0092] 干燥粉末的平均颗粒大小为 5 μ m (分布在 3-10 μ m 之间),脱乙酰化程度为 43%,表观粘度为 540 cps (以 1% 乙酸溶解的 1% 产物),浊度 (1% 产物) < 15NTU。

[0093] 附图 1 说明了与 70% 脱乙酰化和 94% 脱乙酰化的脱乙酰壳多糖相比下该产品 (43% DD) 的溶解度。所述 43% DD 聚合物在生理 pH 7.4 下完全可溶 (浊度没有变化)。70% DD 聚合物在 pH 7.4 时部分可溶,但 94% DD 脱乙酰壳多糖聚合物形成沉淀 (浊度 > 1000NTU)。

[0094] 这些结果表明壳多糖聚合物溶解于碱液和冰后,可进行均匀的脱乙酰化反应,使得其余 N-乙酰-葡萄糖胺的分布得到控制。这些实验还表明了该方法可在工业规模上进行,而且该脱乙酰化的方法可用于增加壳多糖酶处理得到的壳低聚物制剂中的 T-ChOS 的产量。

[0095] 实施例 2 T-ChOS 的生产和鉴定

[0096] 2.1 批次 G020418 的生产 ;非均一 ChOS 检测批号 ;同系物的定量和测序

[0097] 生产

[0098] 25kg 氢氧化钠溶解于盛有 25kg 水的 80L 混合器中,并加热至 60℃。加入来自北方长额虾 (*P. borealis*) (Genis ehf.) 的 2.5kg 虾壳多糖并以 15rpm 的速度搅拌 40min。然后用水冷却浆液并在干酪布袋中 (200×40cm) 洗涤 10-15min。将壳多糖凝胶转移到 200L 的混合器中,加入 30% HCl 调节 pH 值到 4.0,并加入水使混合液的体积为 100L。加入第 18 家族壳多糖酶 (10,000 单位 /kg 底物),在 30℃ 下搅拌凝胶 22 小时。将 pH 值调节到 5.4 并在 80℃ 下加热溶液 10 分钟,使酶变性。冷却后,将该低聚物溶液 (ChOS) 倒入 280 μm 网孔大小的筛网。采用 DSSLabStak M20 纳米过滤单元在 pH4.8 下以 0.72cm² 大小且截留分子量为 500Da 的透析膜除去溶液中的盐。然后使用旋转雾化喷雾干燥单元对该溶液进行喷雾干燥,吸入空气温度为 190℃,排出空气温度为 80℃。得到 2kg (80%) 白细 ChOS 粉末,于室温下保存。经直接滴定法测得其脱乙酰化程度为 37% (或 FA 0.63)。

[0099] 分析方法

[0100] BioGel P4 凝胶渗透层析分析 (GPC)

[0101] 将 2.16g 的 ChOS 粉溶解于 180ml 的 0.05M, pH 4.2 的醋酸铵缓冲液中。顺序通过 0.8 μm, 0.2 μm 醋酸纤维素膜 (Schleicher&Schuell) 过滤该得到的溶液,继而以截留分子量 3000 Da 的膜 (Amicon) 进行超滤。冻干滤液。产量为 0.74g (34%)。生成的粉末 (350mg 批次) 然后以精细级 Biogel P4 凝胶 (BioRad, München, Germany) 进行凝胶渗透层析分离。层析柱尺寸 :5×200cm ;流动相为 0.05M 的醋酸铵缓冲液,该缓冲液以 0.23M 的醋酸调节 pH 值到 4.2 ;流速为 60ml / 小时 ;折光率检测器为 Shimadzu RID 6A。收集 20ml 的级分,将其适宜合并和浓缩成小体积溶液并最终冻干。

[0102] 同系物的制备 - 离子交换层析

[0103] 将得自 GPC 的 4g 冻干级分溶解于 200 μL, pH 3.0 的盐酸水溶液中。采用带尼龙膜 (Nalgene) 的 0.45 μm 注射滤器过滤该溶液。该同系物在 Resource S 层析柱 (Amersham Pharmacia Biotech, Sweden) 进行高效离子交换层析分离 (HP-IEC)。柱的床体积 :1ml ;流动相 :pH 3.0 的盐酸水溶液 (A), 1M 氯化钠水溶液, pH3.04 (B) ;洗脱曲线 :0-5min 100% A, 5-45min 100% -50% A, 45-46min 50% -0% A, 46-55min 0% A, 55-56min 0% -100% A, 56-80min 100% A ;流速 60mL×h⁻¹ ;紫外检测器为 JascoUV-MD-910。收集 500 μL 的级分并经适宜合并,于 floatalyzers™ (SpectraPor) 上对水 (2L, 4 天) 透析,浓缩为小体积并最终冻干。该样品分成 4mg 每批进行 HP-IEC。产量见于结果和讨论部分。

[0104] 2-氨基吡啶酮 (AMAC) 对 ChOS 进行还原性氨基化

[0105] 将 30nmol 纯 ChOS 或 60-80nmol 的 ChOS 混合物溶解到醋酸 /DMSO (v/v 3 : 17) 配制的 20 μL 的 0.1M 2-氨基吡啶酮溶液中,手动搅动 30 秒,随后加入以水配制的 20 μL 的 1M 氰基硼氢化钠溶液,并进一步搅拌 30 秒。于 90℃ 下避光加热该混合物 30 分钟。然后冷却反应容器至 -20℃,冻干反应混合液。将残留物溶解到 1ml 水中,用 1L 水透析 48h 并最终冻干,生成淡黄色粉末。样品或立即用于分析或避光保存在 -20℃ 下。

[0106] 质谱分析

[0107] 将冻干的 AMAC- 低聚糖衍生物重新溶解于 200-500 μL 的甲醇 / 水中 (v/v 50 : 50)。一部分溶液 (0.5 μL) 与作为基质 (15mg×mL⁻¹) 的配制于 30% 的乙醇水溶液中

的 2 μ L DHB 溶液在靶上混合,液滴在中等流速的气流中干燥。基质的晶体结构往往自发形成。在某些情况下,仅在原样品溶液以甲醇 / 水 (v/v 50 : 50) ca. 五倍稀释后才能观察到结晶。

[0108] 用 Bruker Reflex II (Bruker Daltonik, Bremen, Germany) 以阳离子模式记录 MALDI TOF 质谱。使用氮激光 (337nm, 3ns 脉冲宽度, 3Hz) 进行电离。为了优化质谱效果,激光或对准样品的中部区域或晶棱最外侧。采用外标校正 (血管紧张素 II) 以反射模式记录所有质谱。

[0109] ChOS 同系物的测序 - 同量异位素

[0110] 按照文献¹中的详细方法对所有在 MALDI-TOF 质谱中出现适宜信号的从 DP3 到 DP8 的同系物进行测序。简而言之,以 2-氨基吡啶酮对 60-80nmol 的每份冻干 GPC 级分 F3-F10 进行还原氨基化,在其还原端生成同系物²。(GPC 级分 F7-AMAC 的 MALDI-TOF 质谱如下,其他组分未列出)。采用 MALDI 串联质谱分析所有组分。在质谱仪的四极杆上选择目的同系物的单钠化假分子离子,并使其在碰撞室内断裂成片段,于是在非还原端形成 A-, B- 和 C- 型离子,在还原端则形成 X-, Y- 和 Z- 型离子。由于在还原端具有标签, Y- 型离子可通过 194Da 质量增加而得到鉴定。低聚糖序列可通过序列树从还原端读出。

[0111] 结果

[0112] 表 1 显示了每个 ChOS 的 DP, 各级分的同系物以及 F1-F10 组分的质量分布。表 2 显示了同量异位素的序列,这是由 ChOS 同系物的序列分析而得出的。

[0113] 对于位于 DP5 和 DP7 之间的 ChOS 主要化合物,这些结果可以定量 (D2A3, D3A3, D2A4, D3A4)。

[0114] 为了得到同量异位素混合物的定量信息,还需进行假 MS: 样品在源中断裂 (未预选择离子), 在质谱仪的四极杆选择碎片离子,使其在碰撞室内断裂,记录最后片段的质谱。

[0115] 由于第一次断裂时没有预选择离子,该样品需要为纯的同系物。特别是低于分析物质量的离子不应出现在 MALDI-TOF 质谱中。

[0116] 出于这一原因,在进行定量序列分析之前,需要纯化 GPC 级分。GPC 级分 F6-F9 的同系物在阳离子交换 HPLC 柱上按电荷数进行分离,得到纯的 D2A3 (F6)、D3A3 (F7)、D2A4 (F8) 和 D3A4 (F9)。表 3 收集了 GPC 组分 F6-F9 在 HP-IEC 分离之后的结果。

[0117] 2-氨基吡啶酮对纯同系物 D2A3、D3A3、D2A4 和 D3A4 进行还原氨基化,在其还原端生成衍生物 (D3A3-AMAC 的 MALDI-TOF 质谱见下,其他同系物未给出) 标签。采用假 MALDI 质谱按上述方法对衍生的同系物进行测序。

[0118] 根据评价软件指定同系物碎片离子的相对强度 [%]。相对峰强度的重复性经反复断裂得到证实。平均标准偏差为 1%。附图 2 给出了 D3A3 的序列树,对因不同序列的碎片离子引起的峰强度进行了定量。对于 Y2 型离子, DA 的相对含量 (7.5%) 和 AA 的相对含量 (92.5%) 可直接从 D1A1-AMAC 和 A2-AMAC 的相对峰强度上读出。

[0119] 对于 Y3 型离子, DDA (5.9%) 和 AAA (6.5%) 的相对含量可直接从 D2A1-AMAC 和 A3-AMAC 的相对峰强度上读出。ADA (1.6%) 的相对含量可从方程 $[DDA] + [ADA] = 7.5\%$ 推断得出, DAA 的相对含量可从方程 $[DAA] + [AAA] = 92.5\%$ 推断得出。

[0120] 对于 Y4 型离子, DDDA 的相对含量 (0.9%) 可从 D3A1-AMAC 的相对峰强度直接读出。ADDA 的相对含量 (5.0%) 可从方程 $[DDDA] + [ADDA] = 5.9\%$ 推断得出。DAAA 的相对

含量为 6.5%，因为只有 DAAA-AMAC 生成 A3-AMAC，后者相对峰强度指定为 6.5%。

[0121] 表 1. ChOS 级分 F1-F10 的组成和质量分布。以 Biogel P4 凝胶进行 GPC 分离。根据透析和干燥级分的质量计算出产率。产物 G020418。

GPC 级份	收率 ^a [%]	低聚物	同系物
F1	16.3	DP1	A1
		DP2	A2
F2	22.2	DP2	A2
		DP3	D1A2
F3	24.6	DP2	A2
		DP3	D1A2, A3
		DP4	D3A1, D2A2
F4	11.2	DP3	D1A2, A3
		DP4	D2A2, D1A3
F5	13.1	DP3	A3
		DP4	D2A2, D1A3
		DP5	D3A2, D2A3
F6	4.5	DP3	A3
		DP4	D1A3, A4
		DP5	D3A2, D2A3,
F7	3.3	DP4	D1A3, A4
		DP5	D2A3, D1A4
		DP6	D3A3, D2A4
F8	2.3	DP5	A5
		DP6	D4A2, D3A3,
		DP7	D4A3, D3A4
F9	1.6	DP6	D2A4, D1A5
		DP7	D5A2, D4A3,
F10	0.9	DP7	D4A3, D3A4,
		DP8	D5A3, D4A4,
		DP9	D6A3, D5A4

[0122]

[0123] 表 2. ChOS 同系物的同量异位素的序列。产物 G020418

[0124]

DP	同系物	序列 ^a	同量异位素 的数目 ^b
DP3	D1A2	DAA	1 (3)
DP4	D2A2	(DDA)A	3 (6)
	D1A3	(DA)AA	2 (4)
DP5	D3A2	D(DDA)A	5 (10)
		D(DA)AD	
	D2A3	(DDAA)A	6 (10)
	D1A4	A(DA)AA	2 (5)
DP6	D4A2	D(DDDA)A	4 (15)
	D3A3	(DDDA)A	10 (20)
	D2A4	(DDAAA)A	10 (15)
	D1A5	(DAAA)AA	4 (6)
DP7	D4A3	(DDDDA)AA	18 (35)
		(DDDA)A(DA)	
		(DDA)AD(DA)	
	D3A4	(DDDDA)AA	20 (35)
		(DDAAA)DA	
	D2A5	A(DA)(DA)AA	4 (21)
DP8	D5A3	D(DDDDA)AA	
		D(DDDA)ADA	12 (36)
		D(DDA)ADDA	
	D4A4	D(DA)(DDA)AA	
		D(DA)(DAA)DA	15 (70)
		DAAD(DDA)A	
	D3A5	AADD(DA)AA	10 (56)
		(DA)(DA)(DA)AA	

[0125] a 括号中的序列表示置换 (permutation) 位置:(DDA)A 等价于 DDAA 和 DADA 和 ADDA。表格右侧给出了每条序列的还原端。

[0126] b 括号的数字表示对于同系物 D_NA_M : $(N+M)! / (N! \times M!)$ 计算得出的同量异位素的最大数目

[0127] 表 3. 从 GPC 分离的级分在阳离子交换柱 (Resource S) 分离后的同系物级分的组成和质量分布。产物 Product G020418。

[0128]

GPC 级分	收率 ^a [%]	HPIEC 级分	同系物 ^b	收率 ^c [%]	收率 ^d [%]
F6	78	F6F11	A3, A4	14	9
		F6F12	D1A3, D1A4	25	24
		F6F13	D2A3	51	54
		F6F14	D3A2	10	13
F7	82	F7F11	A4	17	12
		F7F12	D1A3, D1A4	30	28
		F7F13	D2A3, D2A4	13	15
		F7F14	D3A3	40	45
F8	71	F8F11	A5	12	8
		F8F12	D2A4	42	47
		F8F13	D3A3, D3A4	35	31
		F8F14	D4A2, D4A3	11	14
F9	73	F9F11	A6	12	7
		F9F12	D2A4	40	37
		F9F13	D3A4	32	35
		F9F14	D4A3, D5A2	16	21

[0129] a 列在表格中的所有透析 HPIEC 级分的干重总和

[0130] b MALDI-TOF 质谱分析 (D3A3 的 MALDI-TOF 质谱分析数据如下, 未给出其他组分)

[0131] c 根据紫外检测的峰面积计算得出的产率 (根据分子内乙酰基的不同数目导致不同的摩尔吸收系数)

[0132] d 按照级分质量计算得出的产率。

[0133] 在 D1A3-AMAC 的假 MS3 中, D1A1-AMAC 和 A2-AMAC 的相对峰强度分别为 1.0% 和 99.0%。在 D3A3-AMAC 的 MALDI 串联质谱中, D1A3-AMAC 的相对峰强度为 22.1%。AADA 是 D1A3(AADA, ADAA, DAAA) 唯一生成 D1A1-AMAC 片段的序列。因此, AADA 的相对含量为 $22.1\% \times 1\% = 0.2\%$ 。DADA 的相对含量 (1.4%) 可从方程 $[AADA] + [DADA] = 1.6\%$ 计算得出。ADAA (15.4%) 的相对含量可从方程 $[AADA] + [ADAA] + [DAAA] = 22.1\%$ 计算得出。最后, DDAA (70.6%) 的相对含量可从方程 $[ADAA] + [DDAA] = 86.0\%$ 计算得出。对于 Y5 型离子, ADDDA 的相对含量为 0.9%, 因为只有 ADDDA-AMAC 生成 DDDA-AMAC, 后者的相对峰强度指定为 0.9%。按照类似的方法, 得到 DAADA (0.2%), DADAA (15.4%) 和 DDAAA (6.5%) 的相对含量。

[0134] 在 D2A3-AMAC 的假 MS3 中, D2A1-AMAC, D1A2-AMAC 和 A3-AMAC 的相对峰强度分别为 2.6%, 88.0% 和 9.4%。在 D3A3-AMAC 的 MALDI 串联质谱中, D2A3-AMAC 的相对峰强度为 82.0%。AADDA 是 D2A3(AADDA, ADADA, DAADA, ADDAA, DADAA 和 DDAAA) 生成 D2A1-AMAC 片段的唯一序列。因此 AADDA 的相对含量为 $82.0\% \times 2.6\% = 2.1\%$ 。DADDA 的相对含量 (2.9%) 可从方程 $[DADDA] + [AADDA] = 5.0\%$ 计算得出。在 D2A3-AMAC 的假 MS3 中, D1A1-AMAC 和 A2-AMAC 的相对峰强度分别为 3.9% 和 96.1%。ADDAA、DADAA 和 DDAAA 是

D2A3 生成 A2-AMAC 的唯一序列。因此 ADDAA+DADAA+DDAAA 的相对含量为 $82.0\% \times 96.1\% = 78.8\%$ 。根据该方程可计算出 ADDAA 的相对含量 (56.9%)。DDDAA 的相对含量 (13.7%) 可从方程 $[\text{DDDAA}] + [\text{ADDAA}] = 70.6\%$ 计算得出。DDADA 的相对含量 (0.5%) 可从方程 $[\text{DDADA}] + [\text{ADDDA}] + [\text{DADDA}] + [\text{DDDAA}] = 18.0\%$ 计算得出, 而 ADADA 的相对含量 (0.9%) 可从方程 $[\text{DDADA}] + [\text{ADADA}] = 1.4\%$ 计算得出。

[0135] 附图 3a-3d 显示同系物 D2A3、D3A3、D2A4 和 D3A4 的同量异位素的相对含量。图表上不包括计算出含量低于 1% 的同量异位素。因为该方法的重复性不允许测量小于 1% 的相对峰强度。

[0136] 2.2 批次 G050421 的生产: 经均一的脱乙酰化提高 T-ChOS 的产率

[0137] 生产均一的壳低聚糖 G050421

[0138] 按照实施例 1 描述的方法进行脱乙酰化。脱乙酰化完成后, 采用盐酸进一步调节 pH 值到 3.8, 并把温度调节至 35°C。往该溶液中加入第 18 家族壳多糖酶 (10,000 单位/kg 底物), 进行持续 22h 的水解反应, 以使水解完全。随后进行连续过滤除去固体颗粒, 之后超滤除去酶蛋白和其他聚合物的残余物。最后喷雾干燥溶液得到粉末状的治疗用壳低聚糖 (T-ChOS) (G050421)。

[0139] 分析方法

[0140] 按照前述方法以 Biogel P4 凝胶进行 GPC 分部分离。按照前述方法进行 GPC 级分的 MALDI-TOF 质谱分析。

[0141] 结果

[0142] 以直接滴定法测得非均一脱乙酰化的 ChOS 的脱乙酰化程度为 39%, 均一化脱乙酰化的低聚物 (G050421) 脱乙酰化程度为 40%。

[0143] 非均一脱乙酰化的低聚物 (G050421) 的低聚物峰分布和同系物分析的结果见于附图 4, 均一脱乙酰化的低聚物 (G050421) 的相应结果见于附图 5。两者峰分布的最明显区别在于更长的低聚物上。对于非均一脱乙酰化的低聚物, DP 11 到 22 占了总材料的 35.5% (附图 4 中的峰面积 0), 且数量随着 DP11 到 22 的增加而增加。至于均一脱乙酰化的低聚物, DP 11 到 22 (附图 5 中的峰面积 0 到 -3) 只占了总材料的 12.9%, 且其数量随着 DP 11 到 22 的增加而降低, 实际上已没有 DP 18 或更高的级分。这同样也反映在高度活性的低聚物的值上 (DP 5-10)。均一低聚物具有 41% 的 DP 5-10, 而非均一低聚物仅具有 28% 的 DP 5-10。

[0144] 附图 6 给出了两种脱乙酰化方法得到的低聚物的同系物分布。对于非均一低聚物, DP4 (A_2D_2 和 A_3D) 和 DP5 (A_3D_2) 以及 DP7 (A_3D_4) 和 DP8 (A_4D_4) 显著少于均一化低聚物 (附图 6)。

[0145] 总而言之, 均一脱乙酰化方法比非均一脱乙酰化方法得到更高生物活性的 ChOS 的可能性高得多。该方法还能显著降低较高 DP > 15 低聚物等副产物的生成。

[0146] 2.3 超滤增加 T-ChOS 的相对含量 (批次 G0511281)

[0147] 为了提高 T-ChOS (DP5-15) 的相对含量, 另外加入了超滤步骤, 其中 T-ChOS (DP5-15) 溶液在 1kDa 的 UF 膜 (Helicon, Millipore) 上过滤和浓缩, 这一过程极大地降低了小的壳低聚物 (DP2-5) 含量并除去了单体。然后弃去渗透液, 收集渗余物进行喷雾干燥。

[0148] 分析待检物质时,应用 Beckman Gold 系统和 TSK-oligo 层析柱 (TosoHaas, Japan) 进行 HPLC,按照 ChOS 的分子量 (DPI, DP2 等) 进行分离。溶剂为 5mM, pH 10.0 的氢氧化铵,流速为 0.5ml/min,光吸收波长为 205nm,注入体积为 20 μ l, ChOS 浓度为 10mg/ml。

[0149] 附图 7 显示了每一 DP 在超滤步骤前后的相对含量。单体被清除,小的低聚物 (DP2-5) 也显著减少。

[0150] 实施例 3. 治疗用壳低聚糖在人体内的吸收

[0151] 方法

[0152] 壳低聚物

[0153] 以 N-乙酰葡萄糖胺和葡萄糖胺组成的壳低聚物由冰岛雷克雅未克 Genis 公司制备。简而言之,壳多糖首先在碱液中部分脱乙酰化,洗涤,并由壳多糖酶水解成低聚物。之后对低聚物进行超滤,脱盐和喷雾干燥成白色细粉末。脱乙酰的平均程度为 47% (F_A 0.53)。按照分析和定量血液的方法对该低聚物 and 同系物进行分析和定量。利用得到的数据比较血液对不同同系物的吸收。

[0154] 普通血液标本处理

[0155] 自愿者连续 4 周每日服用 1.8g ChOS (Genis ehf; S041124-1K)。在 6 周内收集血样。服用 ChOS 前收集首份样品。随后的 4 份样品从第一次服用后开始每周收集一次。停止服用 ChOS 两周后采集第 6 份样品。每份样品的体积为 7.0ml。血样以 3000rpm 转速离心 30 分钟。收集血清。往血清中加入甲醇和氯化钠,使甲醇和氯化钠的终浓度分别为 30% 和 0.1mg/ml。随即进行离心。500 μ l 的样品以截留分子量为 3kDa 的滤膜 (超滤) 进行过滤。补充 3 次上清液。收集适宜的滤液,真空下除去甲醇,并最终冻干样品。

[0156] MALDI-TOF 质谱

[0157] 将冻干样品 (约 100 μ g) 重新溶解在 100 μ l 的甲醇/水 (v/v 50 : 50) 中。一部分溶液与配制在 30% 乙醇水溶液 (15mg*mg⁻¹) 中的 2 μ l DHB 溶液在靶上混合。液滴在中等流速的气流中干燥。Bruker Reflex II (BrukerDaltonik, Bremen, Germany) 以阳离子模式记录 MALDI-TOF 质谱。使用氮激光 (337nm, 3ns 脉冲宽度, 3Hz) 进行电离。采用外标校正以反射模式记录所有质谱。所有质谱均以单同位素峰标记。

[0158] MALDI-TOF 质谱测定同系物

[0159] 将冻干样品 (约 100 μ g) 重新溶解到 100 μ l 的甲醇/重水 (v/v 50 : 50) 中。加入 10 倍摩尔过量的六氟醋酸酐以及 3 滴四氘冰醋酸。该溶液在 30°C 下搅拌 12h。加入等摩尔量的氨水终止反应。然后冻干该溶液使其重新溶解于 100 μ l 氨水中。将氨水的浓度设为 10 倍过量于 N-乙酰葡萄糖胺单体残基 (GlcNAc 或 A) 的摩尔量。该溶液于 22°C 下搅拌过夜。真空下除去氨水,随后冻干溶液。如果 MALDI-TOF 质谱仍显示出 O-乙酰基,重新将冻干物溶解于氢氧化钠水溶液 (100 μ l)。氢氧化钾的浓度设为 2 倍过量子 GlcNAc 单体的摩尔量。在室温下搅拌该溶液 10h,加入阳离子交换树脂 (H⁺ 型) 中和该溶液,然后进行过滤,并冻干滤液。

[0160] 按照实施例 4 描述方法进行 MALDI-TOF 质谱操作。相对信号强度的定量生成了混合物中同系物的构成。

[0161] MALDI-TOF 质谱进行 ChOS 定量

[0162] 按照 MALDI-TOF 质谱测定同系物所描述方法制备样品。随后每份样品中都加入标

准品。该标准品为壳多糖的低聚物 (An), 需具有与分析物相同的 DP+/-1。使用了标准品的连续稀释液。比较分析物与标准品的信号强度, 得出分析物的浓度。

[0163] 凝胶渗透层析 (GPC)

[0164] 按照实施例 2 中描述方法, 在 Biogel P4 凝胶上采用凝胶渗透层析 (GPC) 对低聚物进行分离。合并适宜的级分。真空下减少样品体积, 随后冻干至恒重, 以除去醋酸铵。

[0165] 高效离子交换层析 (HPIEC) 来自 GPC 分离的同系物 (和低聚物) 混合物采用 HPIEC 进行分析。条件: 固定相: Resource S (Pharmacia, Uppsala, Sweden), 柱床体积 1ml, 流动相: pH3.5 的盐酸, 从 5-60 分钟氯化钠梯度为 0-1M, 流速 1ml/min; 设备: HPLC 色谱仪 (Jasco, Gross-Umstadt, Germany), 带紫外检测器 (检测波长为 210nm)。冻干 HPLC 层析级分。或在某些情况下经透析 (Floatalyzer[®], SpektraPor, Germany) 对级分进行脱盐。

[0166] HPIEC 方法定量测定同系物

[0167] 基本按照高效离子交换层析 (HPIEC) 这部分描述方法进行实验。每份样品中都加入标准品。标准品需介于与分析物相同的浓度范围。比较标准品与分析物的峰面积计算出分析物浓度。峰面积与分析物分子中乙酰基数目呈线性关系。

[0168] 结果

[0169] 服用 ChOS 前采集血样的 MALDI-TOF 质谱没有显示任何 ChOS 信号。

[0170] 1 周后

[0171] 服用 ChOS 1 周后, 在血样中仅观察到痕量低聚物 DP2 (A2 同系物) 和 DP3 (D1A2 同系物) (数据未显示)。

[0172] 2 周后

[0173] 服用 ChOS 两周后所采集的血样经 MALDI-TOF 质谱检测表现出非均一壳低聚物的明显迹象。附图 8 显示了 DP2-DP5 的同系物; DP2 的同系物 (同系物 A2) 至 DP12 (同系物 D7A5) 的同系物清楚地显示在质谱图上。采用各种方法 (参看方法章节) 进行的同系物定量测定揭示服用 ChOS 2 周后总 ChOS 的浓度为 0.16mg/ml 血清。假设血液总体积为 5L, 吸收的 ChOS 总量为 0.80g 或每日剂量的 44%。

[0174] 3 周后

[0175] MALDI-TOF 质谱揭示了从 DP2 到 DP12 的低聚物 (附图 9)。附图 10 比较了服用 ChOS 3 周后血样中低聚物和同系物的相对质谱信号强度。观察到与原始混合物相比, 血样中的乙酰化程度更高 (FA 值) 的同系物明显增多。3 周后的血样中发现有痕量的高至 DP15 的同系物。经各种方法 (参看表 4 和方法章节) 进行的同系物定量测定揭示了服用 3 周后 ChOS 的总浓度为 0.19mg/ml 血清。

[0176] 表 4. 服用 ChOS 3 周后采集血样中的级分、低聚物和同系物的绝对质量。根据相对 GPC 峰面积和相对 MS 信号强度对每 7.0ml 血中总质量 1.34mg 的血样计算质量。

[0177]

					3: 通过GPC, HPIEC和MALDI-TOF定量测定ChOS					
GPC 级分	1	1	2	2	GPC 级分	质量 wt. [μ g]	浓度 [μ g/mL]	HPIEC 同系物	质量 calc [μ g]	浓度 [μ g/mL]
	质量 est. [μ g]	浓度 [μ g/mL]	质量 wt. [μ g]	浓度 [μ g/mL]						
1	150	21	130	19	2	270	39	A2	270	39
2	160	23	150	21	3	110	15	D1A2	80	11
3	190	27	180	26				A3	30	4
4	110	16	100	14	4	230	33	D2A2	120	17
5	130	19	120	17				D1A3	110	16
6	120	17	120	17	5	100	14	D3A2	10	1
7	90	13	100	14				D2A3	90	13
8	90	13	100	14	6	280	40	D4A2	30	4
9	30	4	70	10				D3A3	200	29
10	270	39	570	81				D2A4	50	7
					7	180	26	D5A2	10	1
								D4A3	80	11
								D3A4	90	13
					8	70	10	D5A3	30	4
								D4A4	40	6
					9	20	3	D6A3	10	1
								D5A4	10	1

[0178] 1. MALDI-TOF 质谱进行同系物测定 2: GPC 和 MALDI-TOF 质谱进行 ChOS 定重测定

[0179] 结论

[0180] 每日服用的 1.8gChOS 导致这些糖被吸收到血流中。服用 1 周后, 明显可见痕量 DP2 和 DP3 低聚物。服用开始后, 2 周时达到了最大吸收的 84%, 3 周时达到了 ChOS 最大吸收平台 (100%)。总最大浓度为 ca. 190 μ g/ml 血, 表明每日服用后为最大吸收率的 53% (5L 血体积)。DP2-7 低聚物浓度 (均相同) 为 14-40 μ g/ml 血。DP 8-9 低聚物浓度低, 为 3-10 μ g/ml。血样中可见高达 DP15 的低聚物。比较服用的天然样品和血样中的同系物, 发现乙酰化程度更高的同系物优先地渗透进血液循环。

[0181] 停止服用两周后, 血液中未再检测出壳低聚物。

[0182] 我们推断, 与含有不同组成, 比如不同 F_A 值的非均一低聚物组合物相比, T-ChOS 组合物更易被生物体利用。这反过来又支持了以下结论, 即与其他非均一低聚物组合物相比, T-ChOS 组合物含有更高的治疗活性。

[0183] 实施例 4. T-ChOS 同系物作为壳多糖酶 A 活性的阻断剂; T-ChOS 组合物生物稳定性的模型

[0184] 材料和方法

[0185] 采用阳离子交换层析或凝胶渗透层析或结合这两种方法将壳低聚糖 (ChOS) (批次编号 G020418 和 G020218) 分级为同系物级分。然后将产物冻干并以 MALDI-TOF 质谱分析其结构和序列。Genis 公司生产的其他三种未分级的 ChOS 样品也采用相同的 MALDI-TOF 质谱方法进行分析 (批次编号 G040823, G050421 和 G050421UF; 其中 UF 表示以 1kDa 滤膜进行超滤以降低 DP $\leq$ 5 的含量)。

[0186] 对部分脱乙酰壳多糖产品经水解制备的 G050421 批次产品进行超滤, 其中脱乙酰化为均一脱乙酰化。简而言之, 将 16g ChOS 溶解于 180ml 蒸馏水中并以 1kDa 再生纤维素

膜 (Millipore, USA) 在 Amicon 小室内进行透滤。滤余液终体积为 65ml, 生成 0.582g 的 ChOS (收率 = 33%)。总渗透液的体积为 970ml。按照实施例 4 中描述方法, 对总渗透液和终滤余液进行 P4 Biogel 层析和 MALDI-TOF 质谱分析。冻干最终的滤余液, 并将其命名为 G050421UF。

[0187] 来自粘质沙雷菌 (*S. marcescens*) 的纯化壳多糖酶 A 制剂用作标准的第 18 家族壳多糖酶, 4-甲基伞形基- β -D-N, N'-三乙酰基壳三糖苷 (4-MU-A3) 是一种壳多糖四聚体 (A4) 类似物, 用作标准的壳多糖底物。

[0188] 标准的壳多糖酶 A 溶液为 0.5nM (500pM) 的 0.1mg/ml BSA, pH7.4, 50mM 的磷酸缓冲液 (Chit-A 溶胶)。底物溶液为 40 μ M 4-MU-A3 的 pH7.4, 50mM 磷酸缓冲液。

[0189] 将每种纯 ChOS 同系物的不同浓度 (通常为 0, 25, 50, 100, 200, 400 和 800 μ M) 配制于底物缓冲液中。检测时, 将 25 μ l 的 Chit-A 溶液与 25 μ l 的底物/抑制溶液混合, 并于 37°C 下温育 10 分钟。加入 1.95ml 的 0.2M 碳酸氢钠缓冲液 (Na_2CO_3) 终止该反应。在 Perken-Elmer LS 50B 荧光计上读取每个反应中生成的产物 4-甲基伞形酮 (4-MU)。激发波长为 380nm (以 5nm 为调整间隔), 发射波长为 460nm (以 4nm 为调整间隔)。每个反应重复读取三次。为了估算抑制效果, 采用非线性拟合方程 $f = y_0 + a \cdot \exp(-b \cdot x)$ 计算每个 ChOS 同系物的 50% 抑制浓度 (IC₅₀), 其中 x 表示壳多糖酶的比活性, f 表示低聚糖浓度 (μ M)。计算每个同系物的亲和力, 作为 IC₅₀ 的倒数。使用的公式为 $1/\text{IC}_{50} \cdot 1000$ 。

[0190] 结果和讨论

[0191] 尽管壳多糖酶 A 最佳活性位于 pH5.5, 阻断试验中采用的 pH 值调节到了 7.4。这是为了使 ChOS 的胺基释放出质子, 因为先前在 pH 5.5 下进行的中试试验表明 ChOS 同系物具有低阻断活性。此外该 pH 还更好地模拟了血液和其他体液的生理 pH, 且更好地反应了低聚糖在人体内的表现。

[0192] 附图 11 给出了 ChOS 对壳多糖酶活性的典型阻断。A4D2 同系物的 IC₅₀ 为 17 μ M。表 5 总结了所有受检同系物的 DP, 同系物, IC₅₀, 计算出的亲和力和序列。附图 12 给出了每个受检同系物的计算亲和力。附图 13 给出了与附图 12 相同的结果, 此外还给出了包含每个同系物的所有序列 (同量异位素)。由于不同同系物的阻断活性, 可以得出两条主要规律。随着 DP 增加, 阻断效应越强, 与此同时同系物乙酰化程度越高 (每分子中所含的 A 单位越多), 其亲和性越强。因此 D6, D9 和 D12 都是弱阻断剂。而 A4D2、A4D3、A5D7 和 A6D9 (DP 6-12) 表现出最强的抑制效果。由于这些同系物对壳多糖酶活性侧具有强亲和力, 它们可被认为具有最高的生物活性。DP12 (A5D7) 表现出最高的亲和力, DP15 (A5D7) 的亲和力并没有显著增加 (附图 12 和 13)。根据 MALDI-TOF 质谱结果, 同低聚物 A6 由壳多糖酶 A 切割为 A3、A2 和 A1。

[0193] 但是, MALDI-TOF 质谱结果表明, 壳多糖酶 A 在检测条件下 (pH5.5 和 pH 7.4) 并不切割任何杂低聚物, 表明同系物具有良好的生物稳定性。它们的生物稳定性之所以高, 其原因在于 ChOS 的生产过程中第 18 家族壳多糖酶催化的底物完全水解。

[0194] 当采用相同的酶系统检测未分级的 ChOS 制剂时, G040823 的 IC₅₀ 为 70 μ g/ml (附图 14), G050421 则为 105 μ g/ml, 超滤后的 G050421UF 则为 67 μ g/ml。这表明该方法可用于评价 ChOS 混合物中同系物的阻断活性和生物稳定性, 而且不需要在分析前将其分级为同系物。因此, 该方法可用于评价含有杂壳低聚糖不同同系物混合物的 ChOS 制剂的平均阻

显著高于壳多糖低聚物（仅含 A 单元或同低聚糖）。因此本工作目的在于研究 ChOS 对 HC gp-39 的亲合力在多大程度上受到杂壳低聚糖 F_A 和 DP 的影响。

[0208] 材料和方法

[0209] 按照前述描述方法（实施例 4）进行杂壳低聚糖的定量和定性序列分析

[0210] 亲合力研究

[0211] 利用该蛋白在结合条件下序列内部色氨酸荧光的变化，分析 ChOS 和 HC gp-39 形成的非共价复合物的亲合力。荧光强度的变化是由配体诱导的覆盖色氨酸残基的溶剂的变化引起的，与糖浓度呈正相关。

[0212] 将 HC gp-39 溶解于含 1mM 二硫苏糖醇的 pH7.4, 25mM Tris-HCl 缓冲液中，使该蛋白终浓度为 1.00 μ M（蛋白溶液）。将不同浓度的同系物配制于含 1mM 二硫苏糖醇的 pH7.4, 25mM Tris-HCl 缓冲液中（糖溶液）。每个同系物配制四个不同浓度：溶液 I : 1.3–2.0 μ M, 溶液 II : 6.5–16.0 μ M, 溶液 III : 52.0–80.0 μ M 和溶液 IV : 130.0–200.0 μ M（不同同系物间的浓度不相同）。检测时，50 μ L 蛋白质溶液和 50 μ L 每种糖溶液（溶液 I–IV）分别于 25°C 下在加热振荡器中预温育 15 分钟。然后将 50 μ L 温度已恒定的蛋白质溶液与 50 μ L 的糖溶液（依次为溶液 I–IV）混合。将该混合物于 25°C 下在加热振荡器中温育 7 分钟。以 Perkin-Elmer LS 50B 荧光光度计（Perkin-Elmer, Überlingen, Germany）读取每个反应的荧光。激发波长为 295nm（5nm 为调整间隔），发射波长为 340nm（10nm 为调整间隔），截止波长为 290nm。每个反应重复测量三次。

[0213] 解离常数的计算

[0214] 从原始荧光数据中减去空白荧光。以 $F-F_0$ 为纵坐标，同系物浓度为横坐标，绘制曲线。应用 SigmaPlot[®] 软件将数据以非线性回归拟合为单点饱和模型，以得到结合等温线。

[0215] $y = B_{\max} * x / (K_d + x)$

[0216] $B_{\max}$: HC gp-39 饱和结合结构域的荧光强度

[0217] K_d : 解离常数

[0218] K_d 与 F_A 之间的相关性

[0219] 根据 A 单位的数目，一系列 DP6 同系物（ D_6 、 D_3A_3 、 D_2A_4 和 A_6 ）的解离常数数据以非线性回归（SigmaPlot[®] 软件）拟合为双参数的双曲线衰变。

[0220] $y = a * b / (b + x)$

[0221] 相对亲和力和 F_A 之间的相关性

[0222] 将解离常数数据转换为相对强度的百分数，其中对于 A_6 相对强度为 100%， D_6 相对强度为 0%。 D_3A_3 和 D_2A_4 的相对亲和力根据该虚拟比例进行计算，以 A 单位的数目为横坐标进行绘图。按非线性回归（SigmaPlot[®] 软件）将该数据拟合为双参数单一矩形双曲线函数。

[0223] $y = a * x / (b + x)$

[0224] 结果

[0225] 进行亲合力研究之前，分析用于本研究中的所有 ChOS 的纯度和序列组成。在亲合力研究前纯化和分析壳多糖低聚物 A6 (Seikagaku Co., Japan)。检测所有低聚物的纯度。

表 6 给出了检测的 ChOS 的序列组成。

[0226] 利用该蛋白质内部色氨酸荧光分析 ChOS 和 HC gp-39 形成复合物的亲和力。荧光强度的变化取决于糖浓度,并解释为在非结合条件下覆盖色氨酸表面的溶剂分子重排。²⁴ 浓度依赖的荧光数据按非线性回归拟合为单点饱和模型 (SigmaPlot[®] 程序,参看附图 15)。

D₆、D₃A₃、D₂A₄、A₆ 和 D₅A₆ 的解离常数全都在 μmolar 范围内 (附图 16)。

[0227] 正如所料,解离常数值随 ChOS 的 F_A 升高而下降。一系列 DP6 同系物 (D₆、D₃A₃、D₂A₄ 和 A₆) 随 F_A 升高其解离常数的下降不符合线性函数。这些数据最佳拟合于双曲线衰减函数 ($y = a*b/(b+x)$; a:419.932; b:0.3839; R²:0.9986;附图 17)。附图 17 中的小插图表示 D₃A₃ 在其最大亲和力 90.8% 时的相对亲和力 [%] (D₆ = 0% 和 A₆ = 100%)。

[0228] 解离常数的值也随 DP 和恒量 F_A 升高而下降,正如 D₃A₃ (F_A 0.5; K_d 51.1 μM) 和 D₅A₆ (F_A 0.55; K_d 6.9 μM) 之间的比较所显示。有意思的是, K_d 值甚至也随 D 单位数目而非 A 单位的常数上升而下降,正如 A₆ (6 A 残基; K_d 13.6 μM) 和 D₅A₆ (6A 残基; K_d 6.9 μM) 之间的比较所示 (D₅A₆ 的 K_d 是 D₃A₃ K_d 值的 14%)。

[0229] 表 6. 用于研究 HC gp-39 结合的 ChOS 序列 / 组成

低聚物	同系物	序列/组成 [mol-%]			
[0230]	6	D6	DDDDDD 100%		
	6	D3A3	DDADAA 49% DADDAA 51%		
	6	D2A4	ADADAA 30%	DADAAA 25%	
			AADDAA 18%	ADDAAA 17%	
			DAADAA 7%		
			DDAAAA 3%		
	6	A6	AAAAAA 100%		
	11	D5A6	*		

[0231] * 序列 / 组合物未测定

[0232] 结论

[0233] ChOS 的亲和力在 μmolar 范围 (解离常数) 内结合到 HC gp-39 上。该亲和力随 F_A 和 DP 升高而升高,甚至随 D 单位数目而非 A 单位的常数升高而升高。对于 DP6 同系物系列, FA (A6 □ D3A3) 50% 的下降只引起亲和力 9.2% 的下降。因此 FA0.5 到 0.75 的 ChOS 是人体内结合 HCgp-39 的最佳配体。它们保留了超过 90+% 的最大结合能力,并含有足够的 D 单位 (因此结合键为 D-D, D-A, A-D) 以在人体内表现出显著上升的生物稳定性。这些组合物提供了最佳的治疗活性,因此在本说明书中称为治疗用壳低聚糖 (T-ChOS)。

[0234] 图例

[0235] 附图 15. D6, D3A3, D2A4, A6 和 D5A6 结合到 HC gp-39 的结合等温线。上标 B_{max} 和结合位点饱和时的相对荧光强度。

[0236] 附图 16. 根据同系物 / 低聚物的 F_A, ChOS 结合到 HC gp-39 上的解离常数 (K_d 表

示为对数坐标)。虚线连接 DP6 同系物的数据点。

[0237] 附图 17. DP6 同系物的解离常数作为 F_A (A 单位数目) 的函数。数据以非线性回归拟合为双曲线衰减。其中的小插图表示 DP6 同系物的相对亲和力与 A 单位数目之间的函数。

[0238] 实施例 6. 壳生物聚合物组分的脱乙酰化程度对磷酸钙 - 壳生物聚合物复合物性质的影响

[0239] 混合固相级分 (含 5% 壳生物聚合物或脱乙酰壳多糖 (80% DD), 磷酸钙和矿物质) 和相应量的酸性介质制得壳生物聚合物 / 磷酸钙复合物。

[0240] 表 7 总结了本实施例中检测的组合物。混合后该膏剂为海绵状, 有弹性, 其固化时间随 DD 升高而显著降低。其机械强度也随 DD 升高而显著升高 (40% DD << 70% DD < 80% DD)。

[0241] 正如附图 18 所示, 该断裂面呈多孔状, 而且该复合物中含有丰富的大孔 (孔径大于 50 μ m)。

[0242] 在由不同脱乙酰化程度聚合物制备而成的复合物中观察到不同类型 (或大小) 的晶体 (附图 19)。具部分脱乙酰化壳多糖的复合物主要为棒状晶体或颗粒 (附图 20(a)), 而具 80% DD 的脱乙酰壳多糖的复合物 (附图 20(c)) 致密堆积大量的片状晶体。至于 70% DD 的壳生物聚合物制剂 (附图 20(b)), 它的晶体结构介于 40% DD 壳生物聚合物和 80% DD 脱乙酰壳多糖复合物的中间体, 既含有棒状晶体也含有片状晶体。这表明脱乙酰壳多糖的脱乙酰化程度影响了复合物的晶体形成, 70% DD 时明显从棒状晶体转变为片状结构。这种差异可能与 40-70% DD 的壳生物聚合物的水结合能力高于脱乙酰壳多糖 (80% DD) 有关。这影响了水的利用度, 从而影响了该复合物中晶体的发育。

[0243] 复合物中晶体形成的差异特别重要, 因为这可影响复合物的强度及其生物降解性。

[0244] 该实施例表明复合物的强度是如何受壳生物聚合物或脱乙酰壳多糖的脱乙酰化程度所控制的。这可以用于控制复合物骨架的生物降解能力, 并因此影响迁移细胞比如巨噬细胞和成骨细胞进入并渗透入复合物, 从而形成小孔供软骨和骨前体细胞以及表皮细胞穿过, 形成骨发育所需的血管化作用。

[0245] 表 7. 检测的三种脱乙酰壳多糖 / 磷酸钙复合物制剂

[0246]

	具有80%DD 的组合物	具有70%DD 的组合物	具有40%DD 的组合物
固体组分			
磷酸四钙	1.08	1.08	1.08
α -磷酸三钙	0.84	0.84	0.84
甘油磷酸钠	0.26	0.26	0.26
脱乙酰壳多糖 (80%DD)	0.23	PDC(70%DD)	PDC (40%DD)
小计	2.41	2.41	2.42
液体组分 (84.6% 水 2.4% Ca(OH) ₂ 和 13% H ₃ PO ₄)	2.16	2.16	2.40
总计	4.57	4.57	4.82

[0247] 图例

[0248] 附图 18. 含 5% 壳生物聚合物 (40% DD) 的脱乙酰壳多糖 / 磷酸钙复合物的断裂表面。37°C 下温育 7 天后拍摄的 SEM 图片。放大倍数 1000×。

[0249] 附图 19. DD 对晶体形成的影响。37°C 下温育 7 天后拍摄的 SEM 图片。(a) 壳生物聚合物 (40% DD), 放大倍数 10K× 和 (b) 80% DD 的脱乙酰壳多糖, 放大倍数 9.43K×。

[0250] 附图 20. 37°C 下温育 7 天后拍摄的 SEM 图片。(a) 40% DD 的壳生物聚合物, (b) 70% DD 的壳生物聚合物, 和 (c) 80% DD 的脱乙酰壳多糖。放大倍数 100K×。

[0251] 实施例 7 大鼠股骨经软骨内固化进行骨修复

[0252] 利用 80 只雌性大鼠来检测含 5% 壳生物聚合物和磷酸钙 (CAP) 的复合物的作用。将全部大鼠分为三个亚组: I. 对照组 (不加处理); II 以磷酸钙处理; 和 III 含 5% 壳生物聚合物的 CAP 处理。在手术室内将壳生物聚合物与 CAP 混合, 将该混合物搅拌为生面团样的稠度。

[0253] 麻醉所有动物, 暴露股骨中段。使用压缩空气驱动的 2mm 钻头, 进行单皮质钻孔。钻头穿进骨髓腔, 刚钻出的孔单用 CAP 或用含 5% 壳生物聚合物的 CAP 填充。在一组大鼠中, 钻出的孔不加任何处理, 但控制所有动物的局部出血。逐层缝合肌肉和其上的皮肤, 允许动物在其各自笼中自由运动。钻穿某些动物的两层皮质 (穿出再穿出), 并将原钻孔直径加宽到 5mm, 故意扩大这些动物的局部伤口。这些动物被认为出现大段骨缺损, 相比之下其他动物组的骨钻孔得到很好控制, 没有损伤伤口处的对侧皮质骨。

[0254] 上述三个动物组进一步分组并在术后 2、3、4 和 5 周后处死。处死后, 目测观察所有标本, 此后加以处理在显微镜下观察。

[0255] 结果

[0256] 组 I: 未加处理的对照组 (单钻孔)

[0257] 2 周时, 骨钻孔的开口含有新骨不规则颗粒的骨岛, 但骨钻孔与从骨外的附近组织没有很好地隔绝开来。此外, 受伤区域内有明显的新骨髓组织。3 周时, 可见一层薄骨层跨

连骨钻孔。受伤部位几乎看不到新的松质骨。4 周时,前面观测到的特点变得更加明显。新的骨桥变得更脆,此外还有新的松质骨位于其下(附图 21)。手术处原股骨皮质仍可见明显的裂痕。5 周时,闭合骨钻孔的新骨桥看上去仍是脆弱的组织,没有明显的骨髓,而皮质骨表现出多处腔隙,表明有骨囊肿损伤和死亡。

[0258] 组 II:CAP 处理的动物(单钻孔)

[0259] 2 周时,组织反应局限于骨受伤位置,在植入 CAP 膏剂下方的骨髓腔内生成了大量新的松质骨。其植入位点即骨钻孔内发现有大量的 CAP。皮质骨边界外即沿骨外膜未见有细胞反应。3 周时,反应特点与上述类似,但有更多的骨组织参与到钻孔的“桥连”中来。4 周时,新的骨桥将受伤骨髓从外界环境隔绝开来,看上去更有组织性,并表现为连续层和健康骨骼(附图 22)。此外,在原钻孔位点下方,沿分散的松质骨有明显的新近发育的骨髓组织。在这个时间段,已见不到植入 CAP 的残留物。5 周时,发育模式大体上与前两周相同。新骨桥的重新形成看上去已经完成,因此将修复骨髓组织从周围环境隔绝开来。此时明显可见新的骨髓组织而骨髓腔内的骨小梁表现出多处裂缝。

[0260] 组 III:壳生物聚合物 CAP 处理的动物(单钻孔)

[0261] 2 周时,受伤部位表现出组织反应的明显迹象,表现为伴随新的骨髓组织形成新的软骨和骨骼(附图 23)。钻穿部位已完全闭合。在此阶段还发现有一明显特点,即原骨髓组织的明显反应,其中骨髓组织为新的发育完好的骨小梁网所占据。后者包埋在富含骨髓的组织,该组织含有单核细胞、脂肪细胞和毛细血管;还有另外一个特点与原皮质组织内的细胞反应有关。这表现为皮质内出现大量细胞即骨细胞、结缔组织细胞和毛细血管。3 周时,骨桥连完成。该骨桥含有新的骨小梁网,连接到钻孔两侧的原有皮质骨上。在骨髓腔内,新的骨小梁连接到原皮质的内部表面。有明显的发育良好的骨髓组织。5 周时,松质骨的坚固桥连完全闭合钻孔部位,新的松质骨“环带”围绕着原有皮质。壳生物聚合物的残留物在原植入位点仍然可见。附图 24 显示了术后 4 周时新的健康骨组织的组织学。

[0262] 大段骨缺损

[0263] 2 周时,检测在一侧骨皮质诱导出的并以 CP+ 壳生物聚合物处理的一段骨缺损(5-6mm)。此时整个骨髓腔出现大块的新松质骨,经钻孔它与皮质外表面的新骨小梁形成连续。原骨皮质大部分被新的骨小梁层所吞并,该新骨小梁与骨皮质的外表面直接联通。与单用 CAP 处理的动物组中出现的编织骨相比,骨髓腔内的新骨小梁看上去更有组织且更致密。该区域股骨的原有骨皮质表现出多处抑制骨细胞的腔隙。还在骨皮质内发现含有红细胞的毛细血管。同一实验组的另一只动物(2 周,壳生物聚合物,大段骨损伤)在股骨轮廓的外侧出现大块的软骨。这一特点可能是壳生物聚合物对骨外膜内的前体细胞诱导刺激的结果。这种新形成的软骨随后矿化并转化为软骨内骨化的活性位点。股骨外侧的新骨形成的区域如此广泛,它最终形成了连接到原股骨上的外生骨疣。

[0264] 3 周时,我们检测了钻头穿过两侧骨皮质的一例动物。发现它有相对较大的未缺损骨皮质,作为单独的实体离原有骨较远。毫无疑问,所观察到的最鲜明特点之一是大块新合成的软骨,它起源于骨皮质脱落部分和原有股骨皮质的骨外膜,并与这二者的骨外膜保持接触。新形成的软骨在骨髓腔内与新的软骨组织保持其连续性。新的软骨表现出该组织所特有的组织分化的所有阶段。首先是软骨前体细胞,其次是幼成软骨细胞,然后是成熟成软骨细胞,再接着是肥大软骨细胞然后是基质物质矿化,紧接着是骨化过程,后者呈典型的软

骨内骨化特征。

[0265] 上述整个过程仅持续 3 周,表明了壳生物聚合物诱导骨外膜和骨髓组织中前体细胞形成新软骨的巨大潜力。似乎壳生物聚合物具有强的骨诱导潜力,特别是在更广泛和复杂的损伤中;其中机体原有机制不能通过真正再生原有组织即骨骼的过程来修复危重损伤;而只能实现非联合的修复过程。

[0266] 而且,作为壳生物聚合物载体的 CAP 自身也不能实现壳生物聚合物处理的标本所表现的效果。CAP 是一种良好的骨传导材料但缺乏壳生物聚合物所具有的诱导软骨形成和随后诱导软骨骨化的能力。

[0267] 总而言之,使用成年雌性作为模型的体内实验发现,壳生物聚合物具有骨诱导性质,这与 BMP 有很大程度上的类似。它的靶点是骨外膜、骨内膜和骨髓组织内遗传确定的细胞,它们在适宜触发剂的作用下分化为软骨细胞,并最终骨化。本研究中所使用的浓度:5%表现出高度潜力,需要进行剂量效应研究以确定实现上述发现所需要的壳生物聚合物的最佳百分比。

[0268] 使用偏振光在显微镜下观察骨切片,分析胶原纤维(I 型胶原)的朝向。在完整骨骼中,这些纤维具有规则的朝向,而在更为“原始”的胚胎型骨骼中,则没有这种朝向。该附图显示了这些纤维具有规则的朝向,表明所发生的骨形成采取了软骨内骨化途径。巨噬细胞被证实侵入了 CAP-壳生物聚合物复合物,因壳生物聚合物被新的软骨和骨组织所取代,导致其逐步降解。

[0269] 结论

[0270] 总而言之,使用成年雌性大鼠作为模型的体内实验发现,壳生物聚合物具有骨诱导属性,这与 BMP 有很大程度上的类似。正如组织学图片所显示,骨形成采取了软骨内骨化的途径。软骨内骨化的过程其特征在于软骨形成发生在骨形成之前。相比于骨形成阶段,软骨形成不需要氧气。因此在软骨转化为骨骼之前,需要新的血管的形成。

[0271] 对壳生物聚合物的反应的特征在于,壳生物聚合物的植入物内形成了新的软骨组织,并在新的软骨内诱导大量形成了新的血管组织,导致新的组织取代壳生物聚合物,在植入物中仅能检测到壳生物聚合物的残留物。而且,软骨细胞在壳生物聚合物残留物的附近形成,且在新形成的骨组织附近检测到矿化的软骨,证明了新骨形成采取了软骨内骨化途径。壳生物聚合物具有诱导骨髓组织和骨外膜中成骨细胞的性质。软骨细胞在骨形成之前形成软骨。而位于成骨细胞-软骨细胞边界的软骨细胞经终末分化成为肥大软骨细胞,后者表达 II 型胶原并分泌促血管生成因子,该因子矿化已钙化的软骨。

[0272] 图例

[0273] 附图 21. 术后 4 周时,未处理的动物。该图显示了植入物的侧面,一种脆性组织桥连骨缺口,修复特征为非联合。

[0274] 附图 22. 术后 4 周时,磷酸钙处理的动物。该图显示了植入物的侧面,磷酸钙晶体的残留物嵌入桥连骨缺口的脆性组织中。修复特征为非联合。

[0275] 附图 23. 术后 2 周时,以磷酸钙-壳生物聚合物复合物处理的动物。该图显示了植入物的侧面,皮质骨以位于新骨皮质下的致密松质骨覆盖骨缺口。修复特征为完全联合。

[0276] 附图 24. 术后 4 周时,以磷酸钙-壳生物聚合物处理的动物。该图显示了健康的新松质骨。

[0277] 实施例 8. 采用 II 型胶原诱导的大鼠关节炎模型研究 T-ChOS 对类风湿性关节炎的影响

[0278] 材料和方法

[0279] 按照实施例 2 (批次 G051128) Genis 公司制备含 $\geq 60\%$ 的 T-ChOS 组合物的壳低聚物制剂。附图 25 显示了该组合物。本研究中受试动物为雌性 Lewis 大鼠, 研究第 0 天时体重 159-179g (平均体重 171g)。在动物尾部基部以明显数字标明动物分组及编号。随机分组后, 所有饲养笼均以适宜的颜色编码标以方案编号、分组和动物编号。

[0280] 每笼 4-5 只饲养的动物 (关节炎组 10 只, 正常组 4 只) 以异氟烷麻醉, 并在第 0 天和第 6 天在尾部基部和背部的 2 个部位注射含 2mg/ml II 型牛胶原的 300 μ l 弗氏不完全佐剂。水中 T-ChOS 处理始于研究的第 0 天, 并持续至第 17 天, 并在第 0、6 和 9-17 天 (称重日) 调整浓度。

[0281] 实验分组显示在表 8 中

[0282] 表 8. 实验设计。该表显示了分组编号, 每组个体数和每组的处理方式。不同剂量以每天每千克大鼠服用的毫克数表示。

[0283]

组	N	在水处理的第 0-17 天
1	4	正常对照+水
2	10	关节炎+水
3	10	关节炎 +0.125 (3.57 mg/kg/day)
4	10	关节炎 +0.25 (7.14 mg/kg/day)
5	10	关节炎 +0.5 (14.29 mg/kg/day)
6	10	关节炎 +1 (28.57 mg/kg/day)
7	10	关节炎 +2 (57.14 mg/kg/day)

[0284] 检测的主要参数为大鼠后爪的左右踝关节直径, 在炎症期间每日测量这些参数。其他测量参数是第 17 天时测量的组织学评分。对踝关节和膝关节进行组织学评价。从纵向 (踝关节) 或额平面 (膝关节) 将关节切成两半。对样品进行保存, 脱钙 (5% 甲酸), 逐级乙醇和澄清剂处理, 石蜡渗透和包埋, 切片和甲苯胺蓝染色。在显微镜下观察来自所有动物的所有组织, 观测结果输入计算机辅助数据检索系统。

[0285] 对踝关节直径数据进行 ANOVA 和 t 检验 (参数或非参数检验), 分析 T-ChOS 对炎症的影响。

[0286] 结果

[0287] 附图 26 给出了监测炎症 (关节炎评分) 的主要方法。从第 9 天起测量左右踝关节的直径。附图 27 显示了注射胶原但无其他处理的大鼠的 RA 评分。第 10 天检测到炎症并逐渐加重直到第 15-17 天。

[0288] 附图 28 显示了 T-ChOS 不同剂量对早期踝关节炎症发病率的影响 (第 10-12 天)。从 AW 组 (剂量 0) 到 A 0.25 组有明显的剂量依赖效应, 其中炎症发病率下降 58%, 极为显著 ($p < 0.01$)。其次, 更高剂量下该效应逐渐消失。

[0289] 附图 29 显示了 T-ChOS 不同剂量对晚期踝关节炎症发病率的效应 (第 12-17 天)。先前观察到的剂量依赖效应已经消失。

[0290] 此外还进行了踝关节炎整个线性期（第 9-15 天）的分析。唯一一组在此阶段表现出炎症发病率显著下降的是 A 0.25 组，该组 T-ChOS 引起的下降效应为 28%（t-检验； $p < 0.05$ ，参看表 9）。

[0291] 表 9 总结了从第 17 天起大多数活性组的组织学炎症和损伤评分的主要结果。这些组是 A 0.25 组。骨重吸收（骨组织的降解）下降了 48%，而这是对所有组织学参数中的影响中最强的。附图 30 显示了这一明显的剂量效应，但是 A 0.25 组似乎不处于这一阶段。炎症组织的炎症下降了 28%，疤痕组织的形成（血管翳）降低了 40%。T-ChOS 降低了 29% 的软骨损伤，但这种剂量效应没有达到统计学上的显著关系。最后，组织病理学评分显著下降（33%），但该因素是每只大鼠炎症、血管翳、软骨损伤和骨重吸收评分的总和。

[0292] 表 9. 本研究检测的主要参数的总结。该表比较了 A 0.25 组和 AW 组（关节炎和水组）的平均值，症状的减少（%），统计学差异（0 = 差异不显著，* = 差异显著（ $p < 0.05$ ），** = 差异极显著（ $p < 0.01$ ））。

[0293]

检查的参数	平均 AW	平均 A0.25	降附	A 0.25 vs AW
炎症率 (9-15d)	0.0124	0.00888	28%	*
炎症	4.2	3.1	26%	*
血管翳	1.75	1.05	40%	*
软骨损伤	2.1	1.5	29%	0
管重吸收	1.75	0.9	49%	**
组织病理评分	9.3	6.55	33%	*

[0294] 结论

[0295] T-ChOS 对 II 型胶原引起的大鼠早期关节炎有很显著的效果。踝关节炎的降低在早期最多达到了 58%。这种效应呈剂量相关，在 A0.25 组这种效应表现的最为明显，这组的剂量相当于人每日服用 0.5g。但在更高剂量下该效应却逐渐消失。但在试验的最后，作为对最佳 T-ChOS 剂量的反应，除一个之外其他所有的组织学评分都表明关节炎病情显著减轻。骨退行性变化减少（48%）和血管翳预防（40%）表现出最强的效应。

[0296] 我们推断口服的 T-ChOS 制剂在发炎关节中显著减少了关节退行性变化并减少了疤痕组织的形成。这支持了其他结果，证实了 T-ChOS 的组织再生活性（实施例 7）和组织培养中成纤维细胞生长的减少（实施例 9）。

[0297] 图例

[0298] 附图 25. 受检 T-ChOS 材料的 HPLC 分析，批次 G051128。该附图给出了从 DP2 到 ca. 15 的不同分子量的糖的相对含量。

[0299] 附图 26. 测量作为炎症指征（关节炎评分）的踝关节直径。

[0300] 附图 27. AD(踝关节直径)关节炎评分。第 0 天时 10 只注射胶原大鼠(组 2;关节炎+水)的踝关节直径(左+右踝关节)。

[0301] 附图 28. T-ChOS(所有剂量)对大鼠早期踝关节炎症发病率的影响。(早期炎症发病率表示为左右踝关节从第 10、11 和 12 天时的平均增大)。标出平均值和标准误。

[0302] 附图 29. T-ChOS(所有剂量)对大鼠晚期踝关节炎症发病率的影响。(早期炎症发病率表示为左右踝关节从第 12-17 天时的平均增大)。标出平均值和标准误。

[0303] 附图 30. 根据组织学检测评价的 T-ChOS(所有剂量)对骨重吸收的影响。标出平均值和标准误。

[0304] 实施例 9. 固定的 T-ChOS 对成纤维细胞增殖的抑制

[0305] 材料和方法

[0306] 微孔板包被:

[0307] 将明胶(Bio-Rad, USA)溶解于 37℃的 Hanks 平衡盐溶液中(HBSS),配制成终浓度为 0.1%的用于微孔板的包被液。一半溶液中加入 T-ChOS,使其终浓度为 1000 $\mu\text{g/ml}$,另一半溶液作为对照。经超滤(0.22 μm Nalgene 滤膜)对所有溶液灭菌。

[0308] 往微孔板(96 孔, Nunc, 丹麦)中每孔加入 100 μl 明胶溶液进行包被,并于 40℃下孵育过夜。弃去过量溶液,将装有 HBSS 的微孔板存放于 4℃下。

[0309] 成纤维细胞铺板和计数

[0310] 胰酶消化收集 T-25 培养瓶中融合的人成纤维细胞,以 1×10^5 细胞/ ml 含 10% 血清的 RPMI 1640 培养基的密度接种到包被的培养板孔中。在 37℃, 5% CO_2 下细胞培养三天,然后在光学显微镜下计数细胞的数目。每个实验条件重复八个孔。

[0311] 计数八个培养孔中每个孔中一个确定视野内的细胞数目(成纤维细胞密度)。分别于培养 1 天、2 天和 3 天后进行细胞计数。数据采用 ANOVA 进行统计学分析。

[0312] 结果

[0313] 统计学分析表明数据为非正态分布。因此采用 ANOVA 秩和检验和 Kruskal-Wallis One Way Analysis 秩和检验。正如附图 31 和 32 所示,明胶中固定的 T-ChOS 显著地终止了成纤维细胞的生长。

[0314] 结论

[0315] 在本实验中我们得以证实当将 T-ChOS 嵌入包被培养板的明胶中后,它们可以显著降低明胶表面成纤维细胞的增殖。

[0316] 综合脱乙酰壳多糖对伤口修复的科学报道,我们前期研究低聚物和高聚物形式的壳生物聚合物的经验以及本实验结果,我们推断 T-ChOS 能够抑制成纤维细胞形成的纤维组织,同时促进真正组织比如骨骼、软骨和其他软硬组织的再生。这种伤口修复机制非常有利,因为它不会导致疤痕组织的形成,且保留了原有组织的完整性和功能。

[0317] 图例

[0318] 附图 31. 加或不加 100 $\mu\text{g/ml}$ 固定的 T-ChOS 后,成纤维细胞在明胶层上的生长(密度 vs 时间)。平均值($n = 7-8$), +/- 标准误

[0319] 附图 32. T-ChOS 在三天培养期间(d1-d3)对成纤维细胞增殖的效应的统计学分析。C 表示未处理的细胞, O 表示处理的细胞。

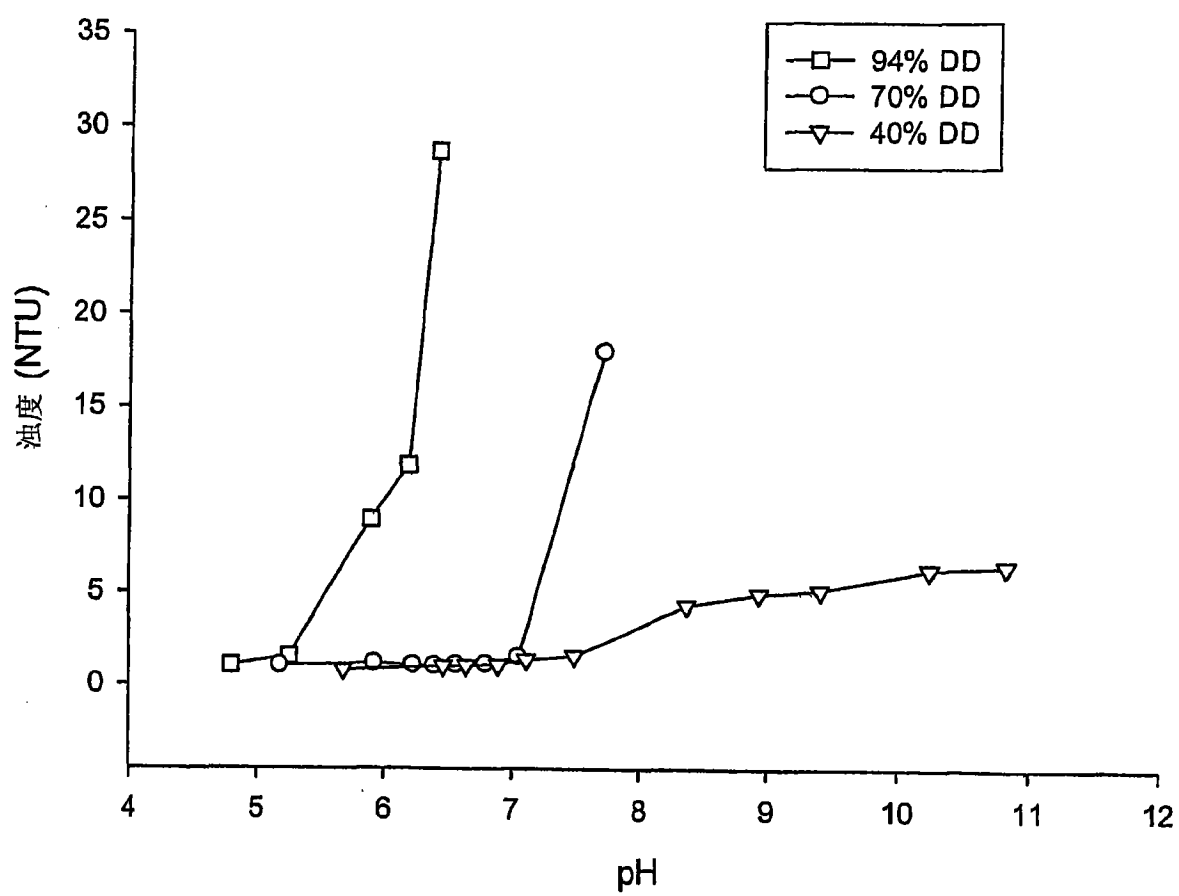
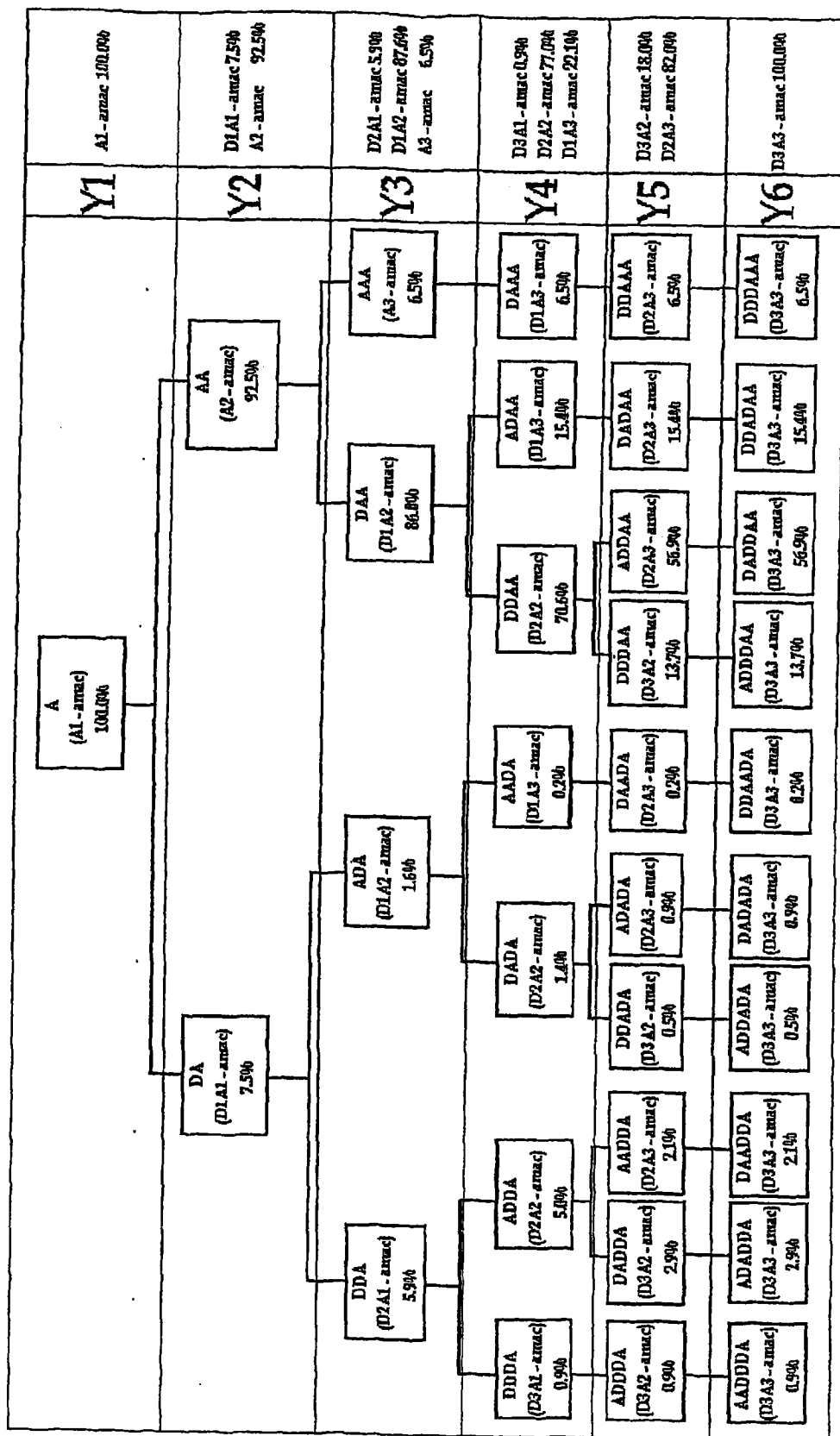


图1



2

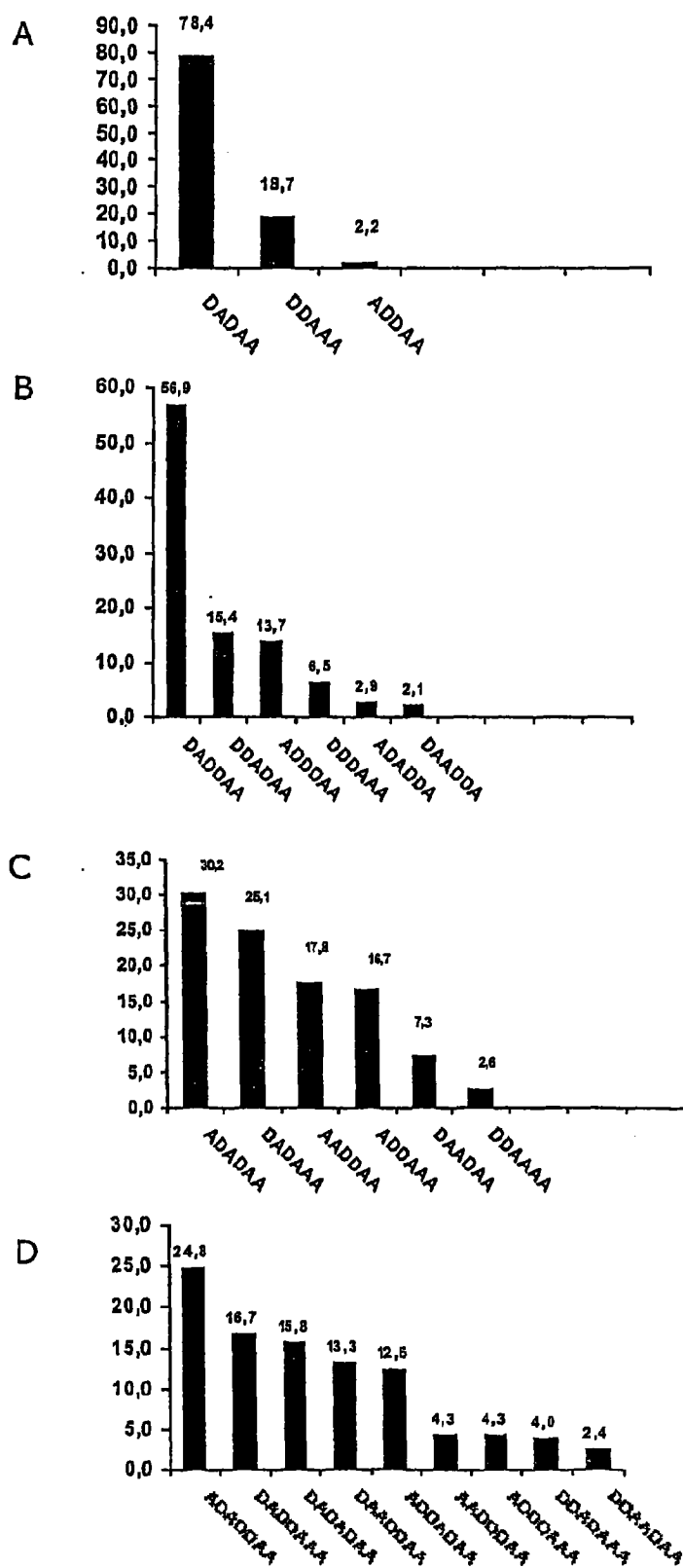
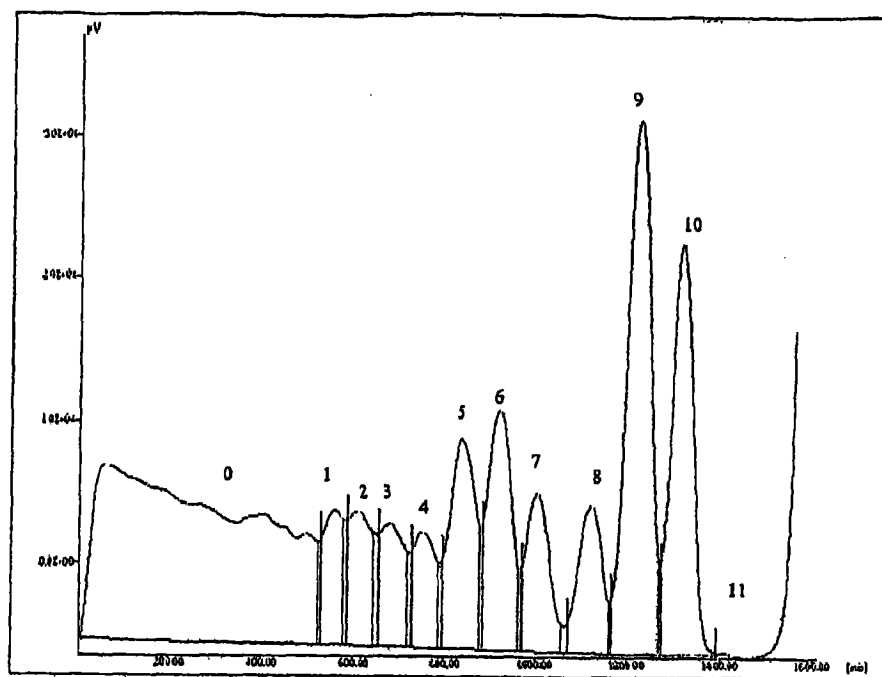
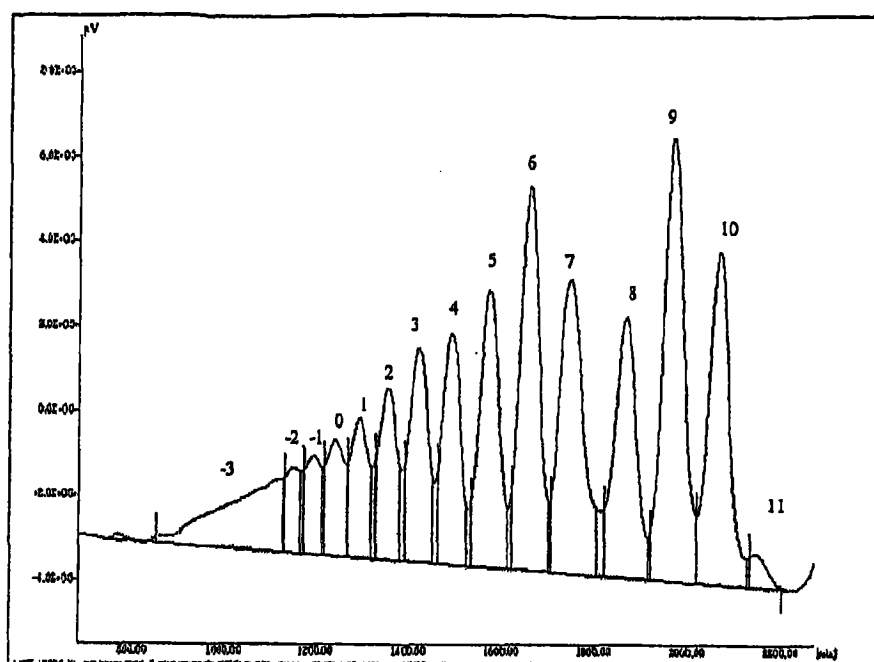


图3



峰号	保留时间 (min)	面积 (%)	同系物	DP	DP5-10 (%)
11	1390	0.08	A	1	
10	1316	11.23	A2	2	28.0
9	1223	15.80	A2D	3	
8	1121	4.62	A2D2	4	
7	1003	4.76	A3D	4	
6	921	7.29	A3D2	5	
5	838	6.95	A3D3	6	
4	752	0.65	A4D2	6	
4		1.01	A3D4	7	
4		0.91	A4D3	7	
4		0.53	A3D5	8	
3	680	1.41	A4D3	7	
3		1.06	A3D5	8	
3		1.20	A4D4	8	
2	609	0.70	A4D4	8	
2		0.73	A3D6	9	
2		2.34	A4D5	9	
1	556	0.63	A4D5	9	
		1.01	A5D4	9	
		1.62	A4D6	10	
0	61-550	35.46		12-22	

图4



峰号	保留时间	面积 (%)	同系物	DP	DP5-10 (%)
11	2142	1,03	A	1	
10	2066	10,79	A2	2	40,9
9	1968	14,48	A2D	3	
8	1866	8,77	A2D2	4	
7	1745	11,13	A3D	4	
6	1659	11,50	A3D2	5	
5	1574	2,17	A3D2	5	
5		4,86	A3D3	6	
5		1,35	A2D5	7	
4	1491	2,37	A4D2	6	
4		4,04	A3D4	7	
3	1420	1,38	A4D3	7	
3		1,94	A3D5	8	
3		2,73	A4D4	8	
2	1355	1,63	A4D4	8	
2		1,58	A3D6	9	
2		1,48	A4D5	9	
1	1294	1,18	A4D5	9	
1		1,19	A5D4	9	
1		0,84	A3D7	10	
1		0,83	A4D6	10	
0	1240	2,8			
-1	1193	2,3			
-2	1148	1,66			
-3	140-883	8,11		12-22	

图5

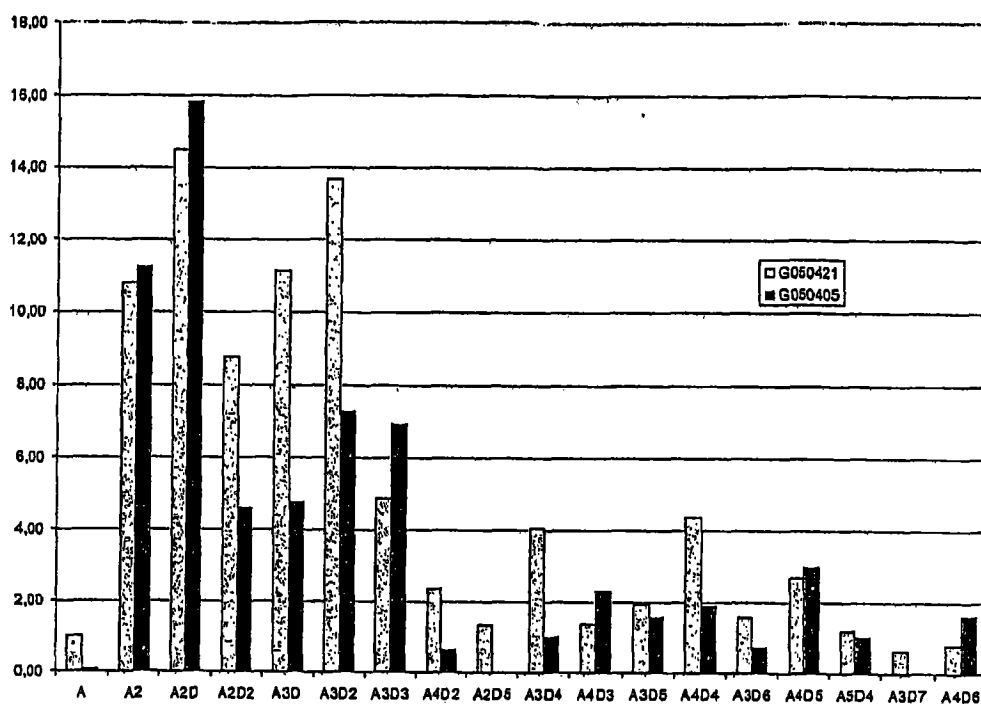


图6

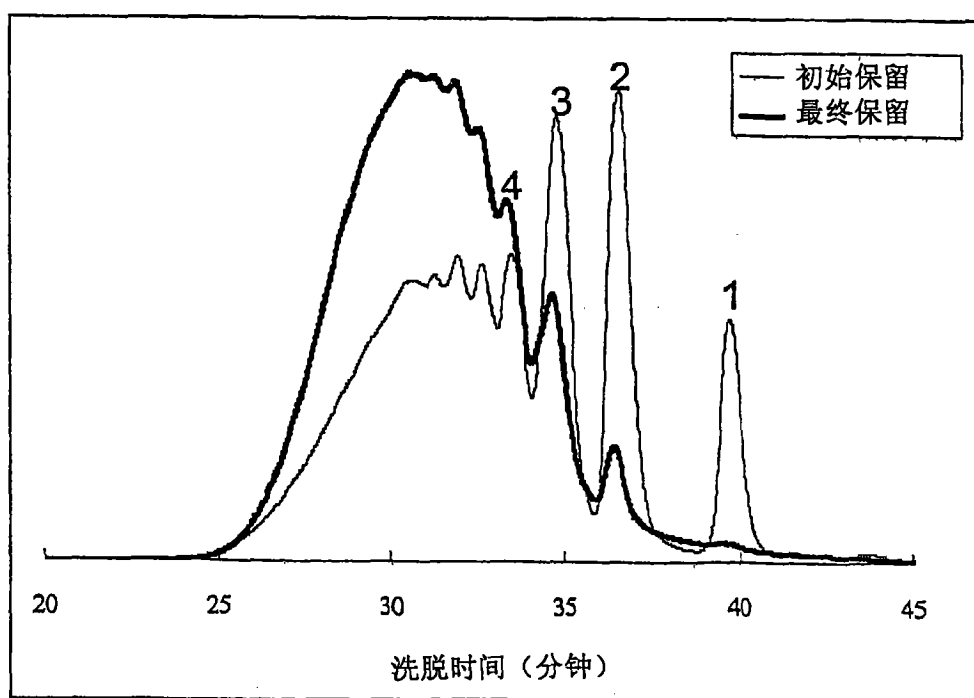


图7

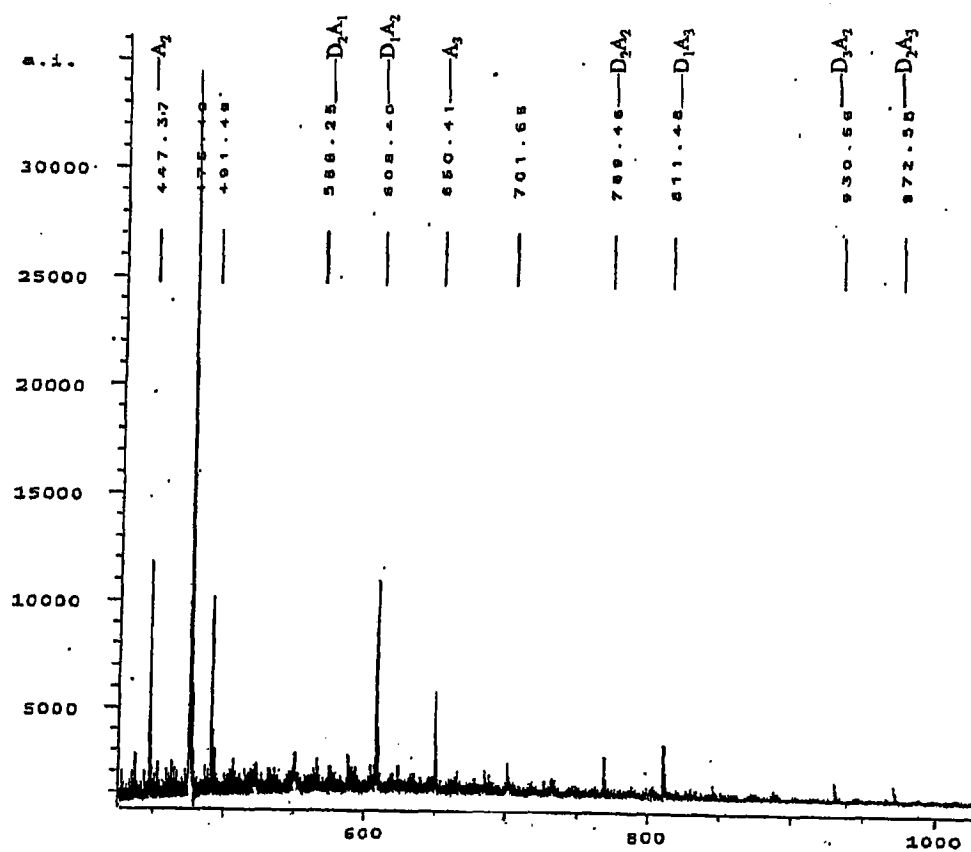


图8

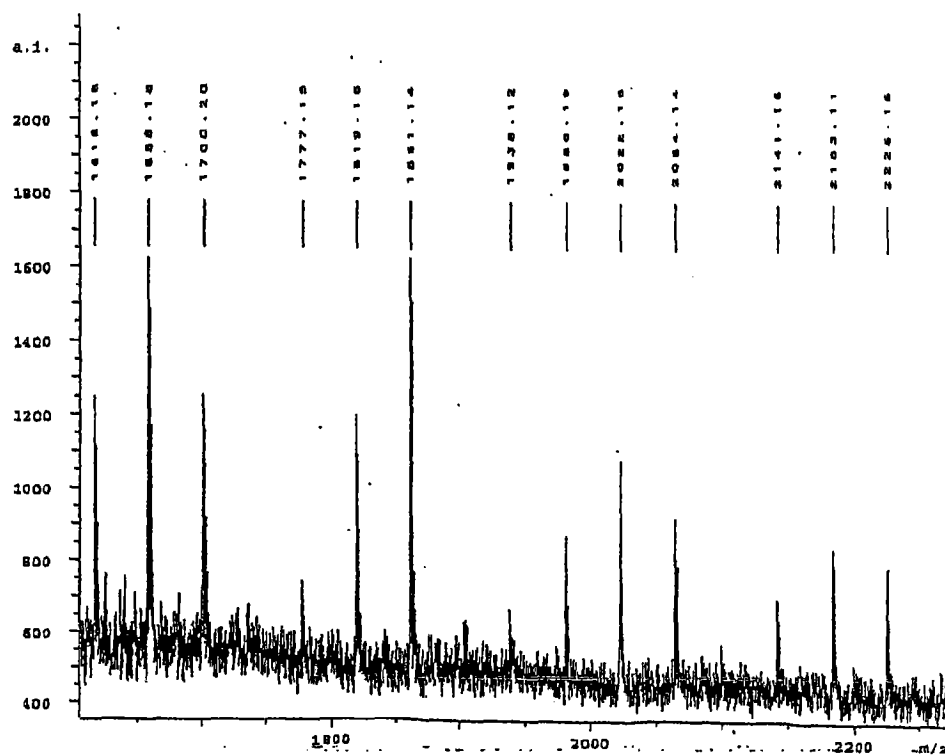


图9

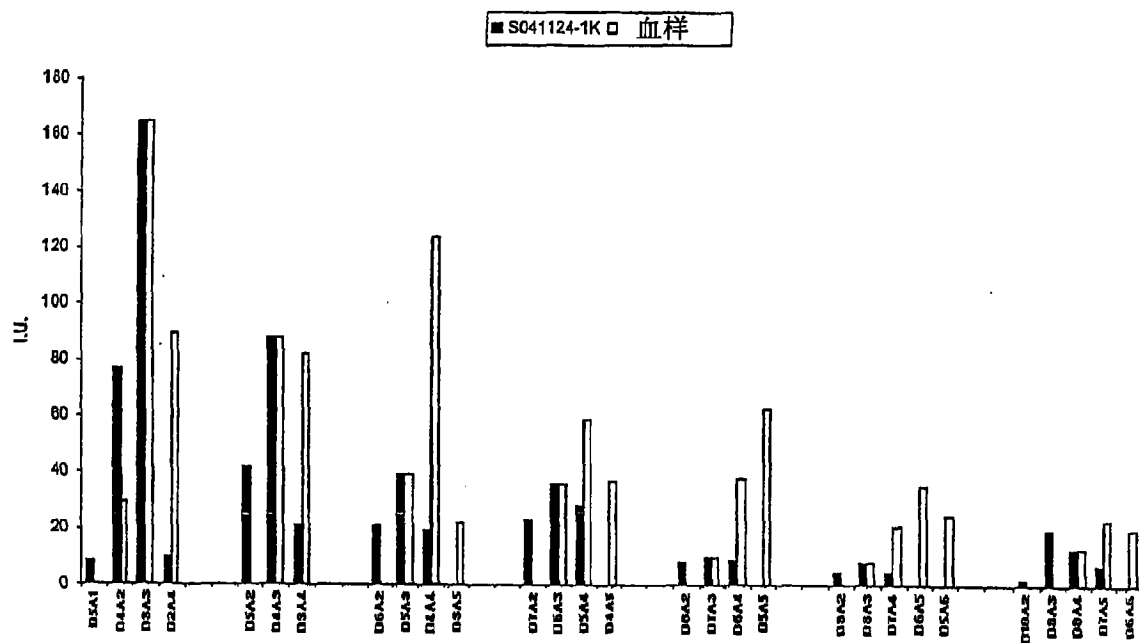


图10

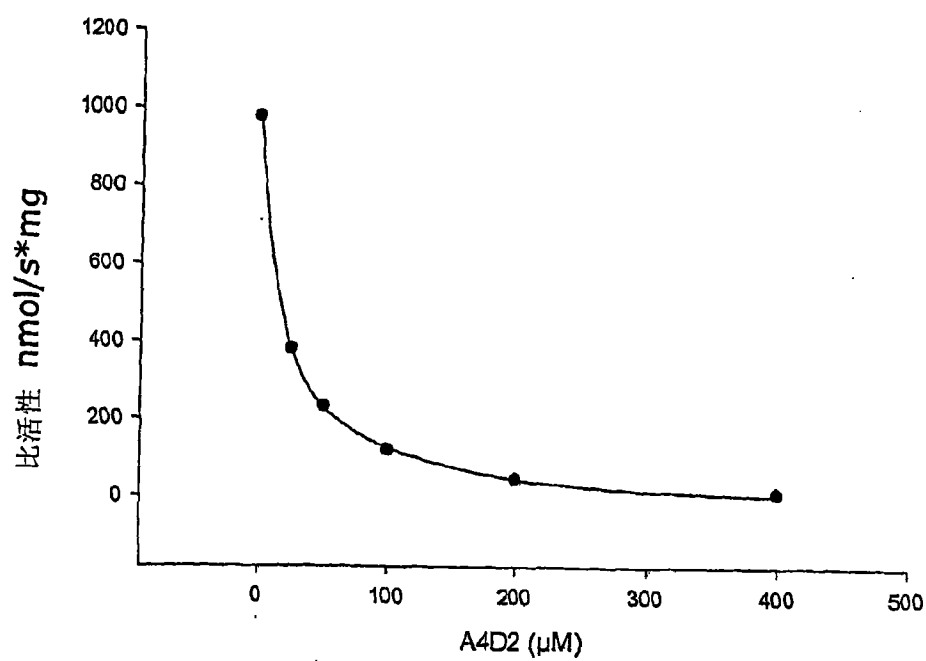


图11

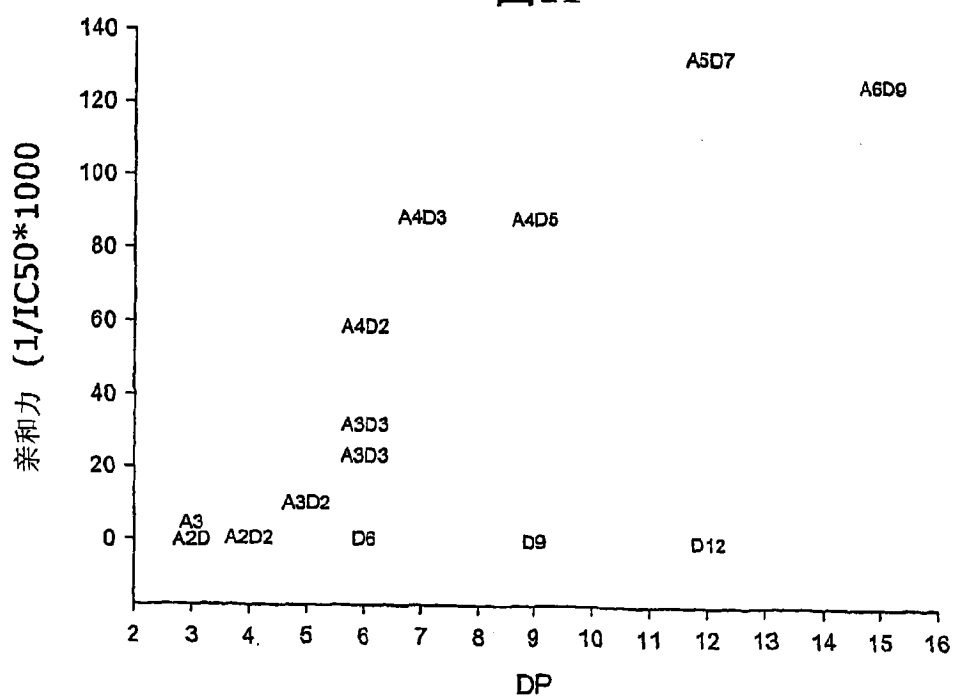


图12

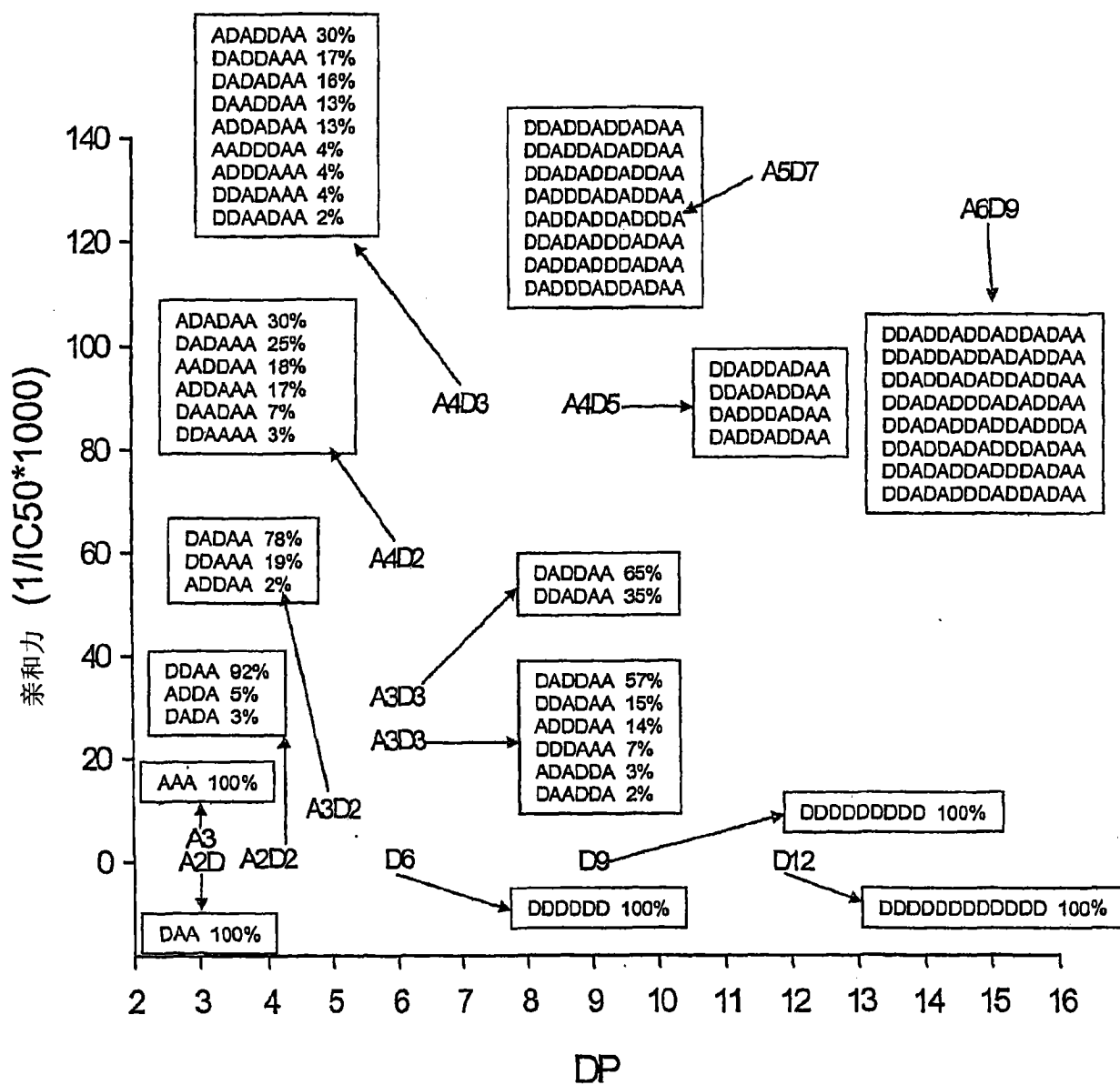


图13

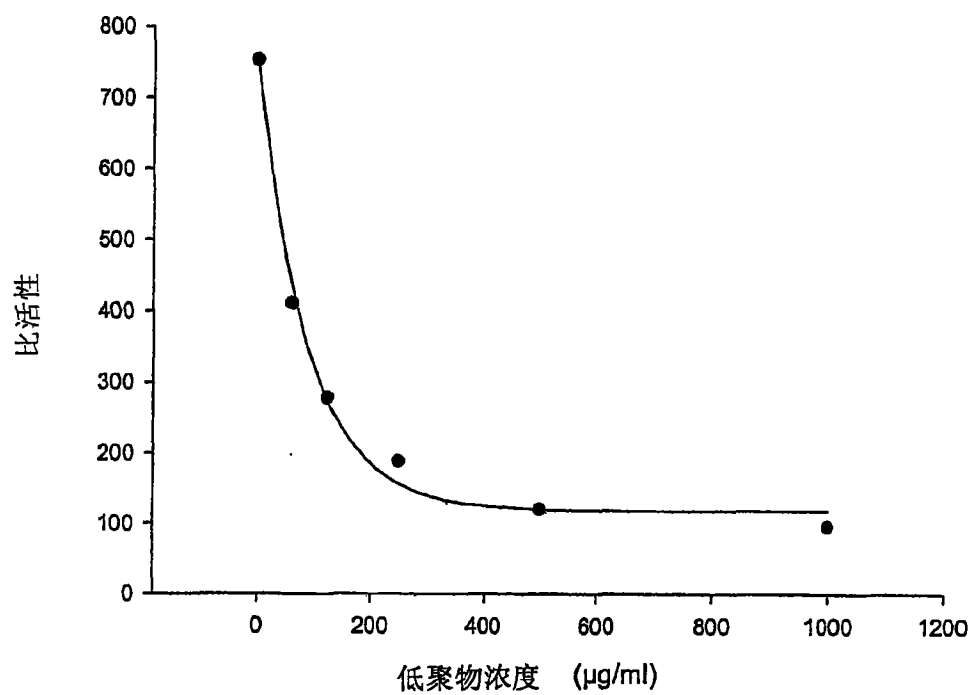


图14

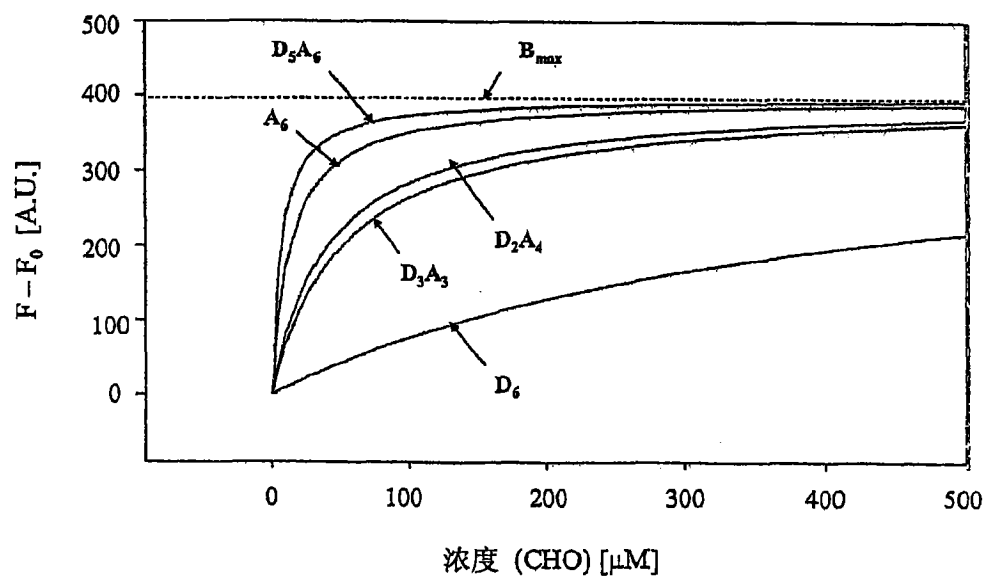


图15

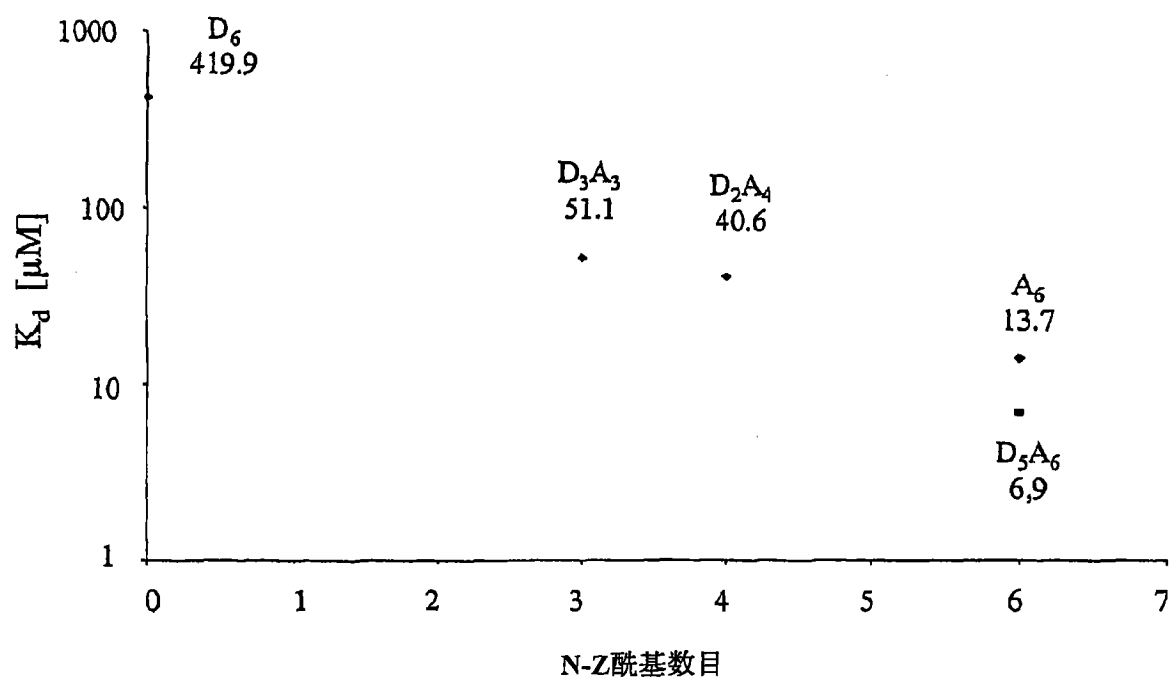


图16

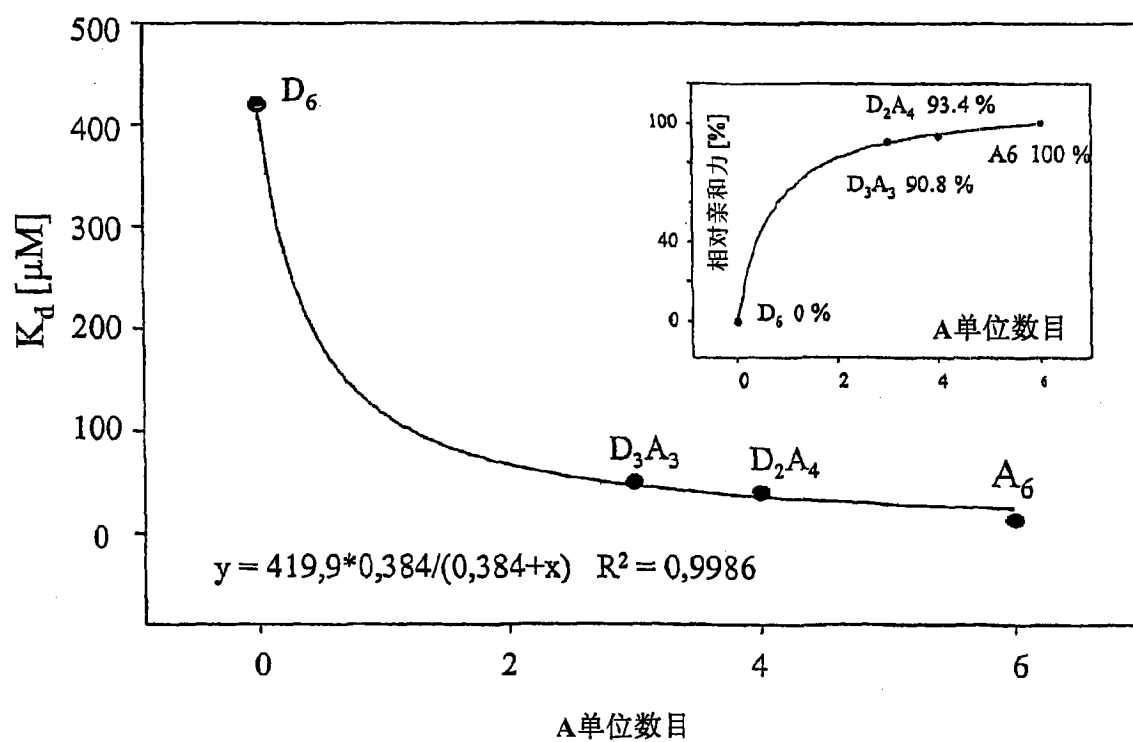


图17

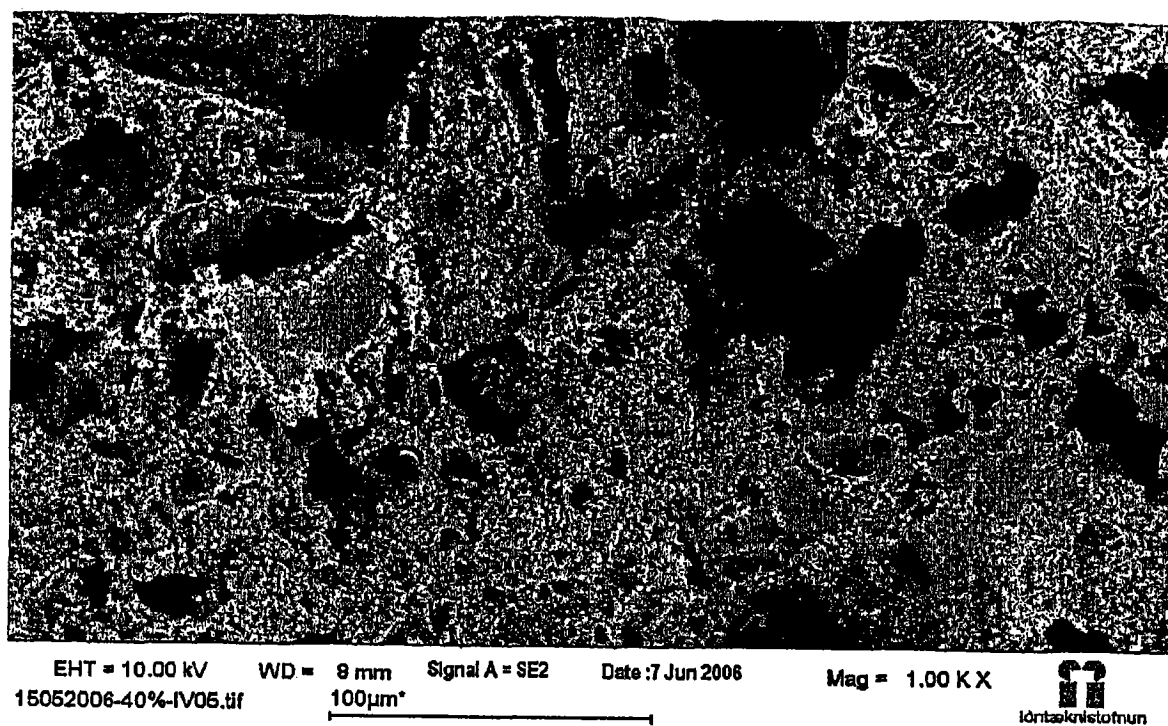


图18



图19

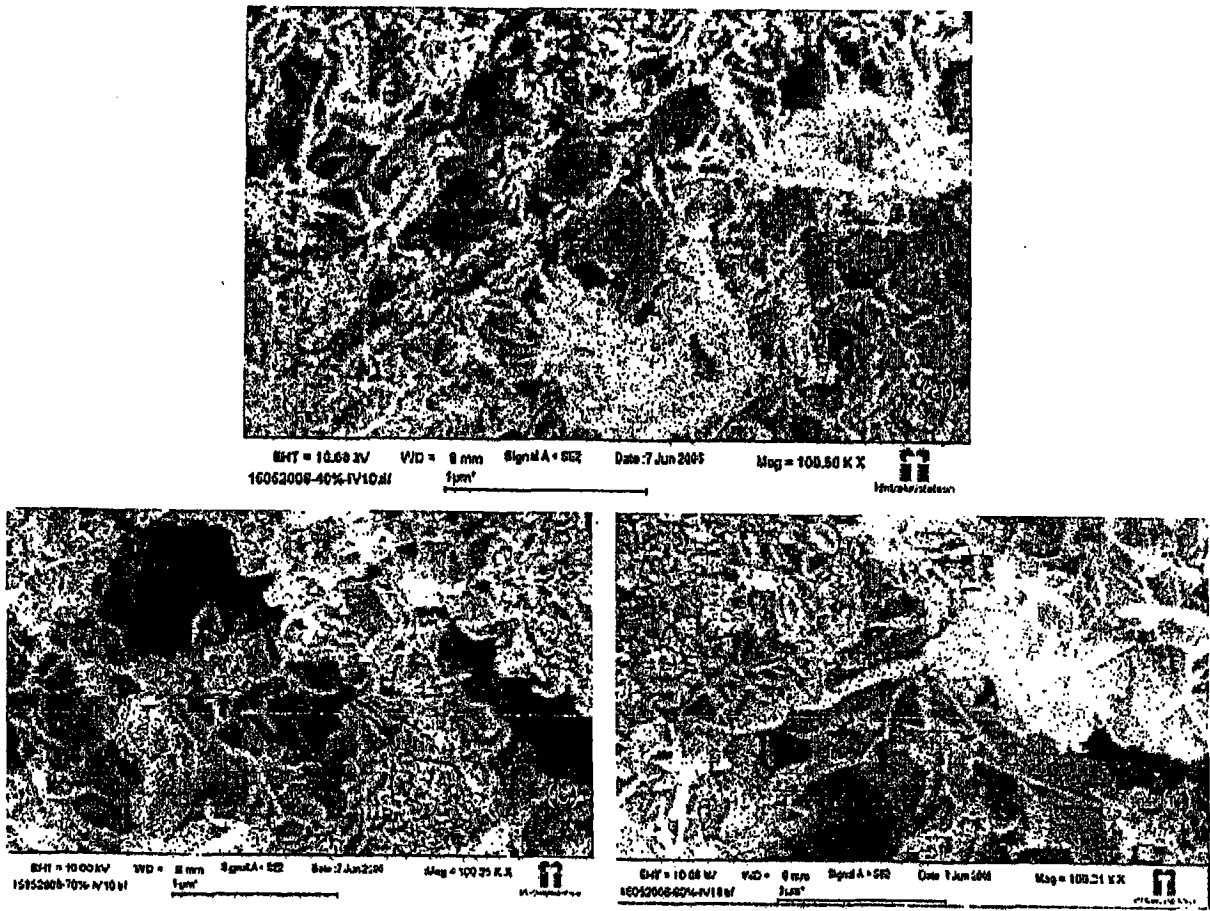


图20



图21



图22



图23

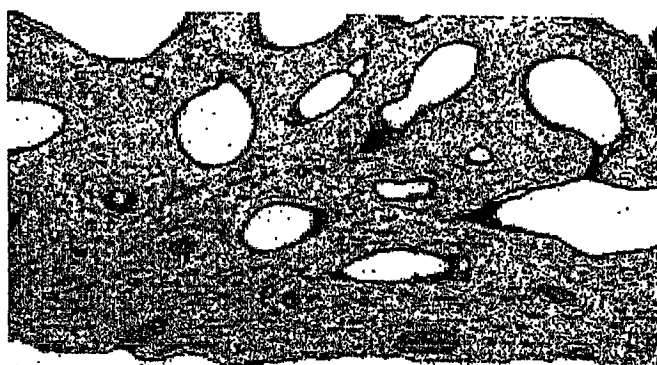


图24

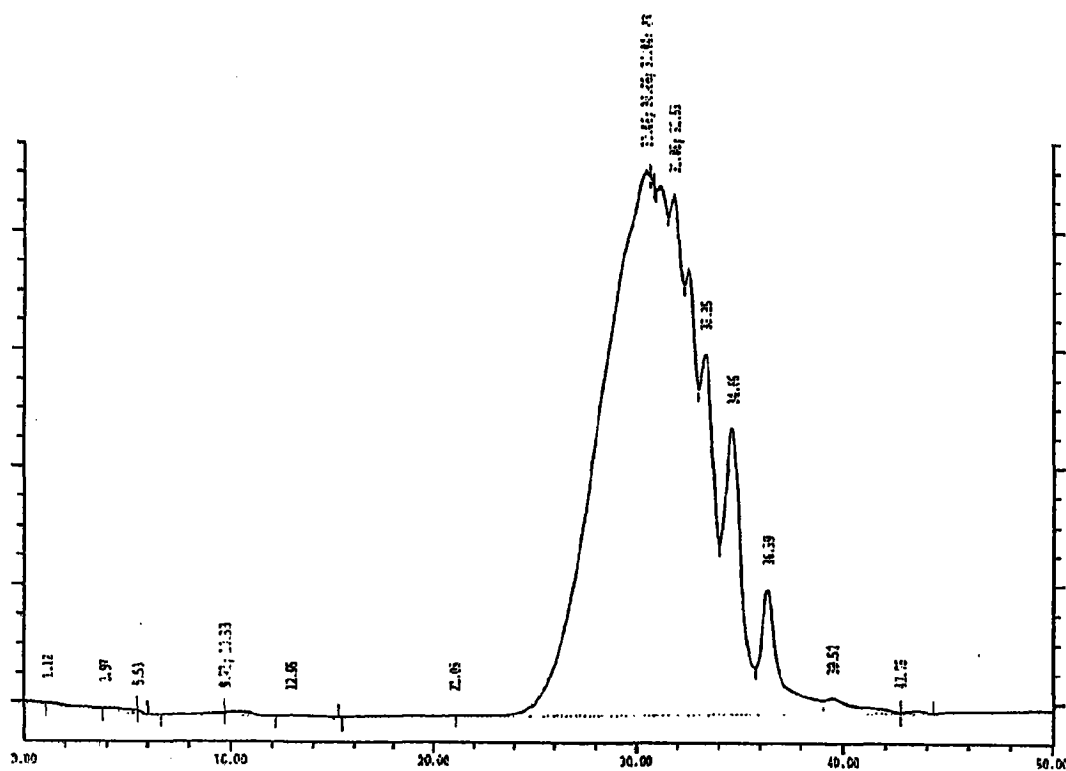


图25

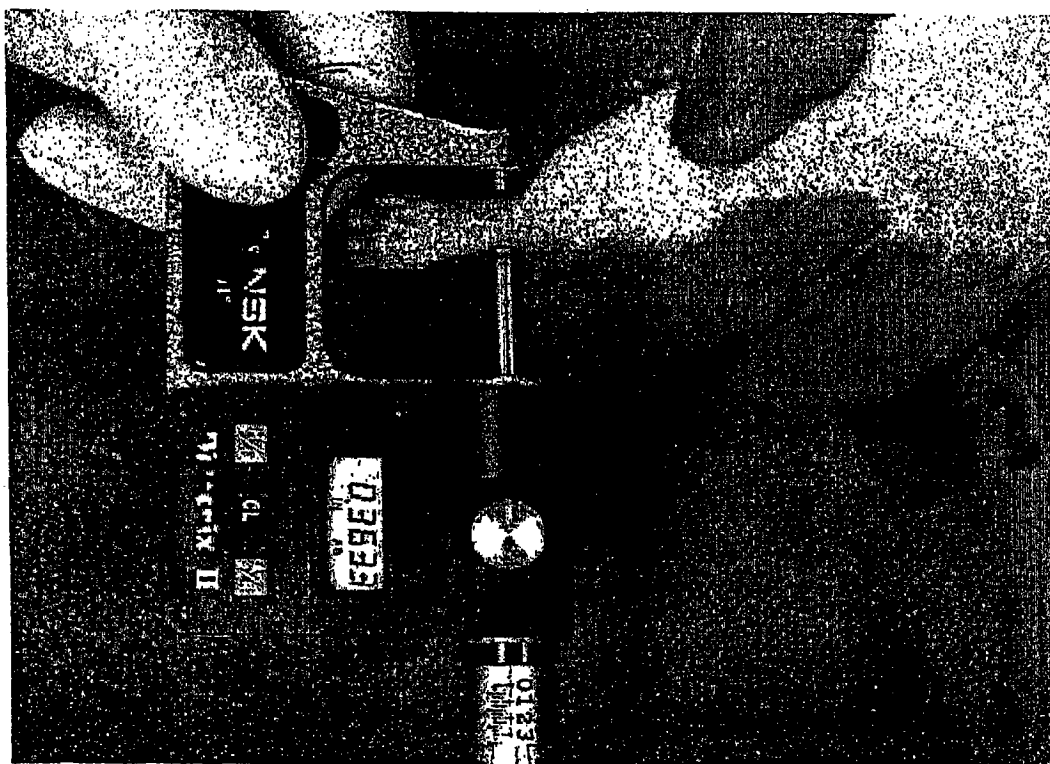
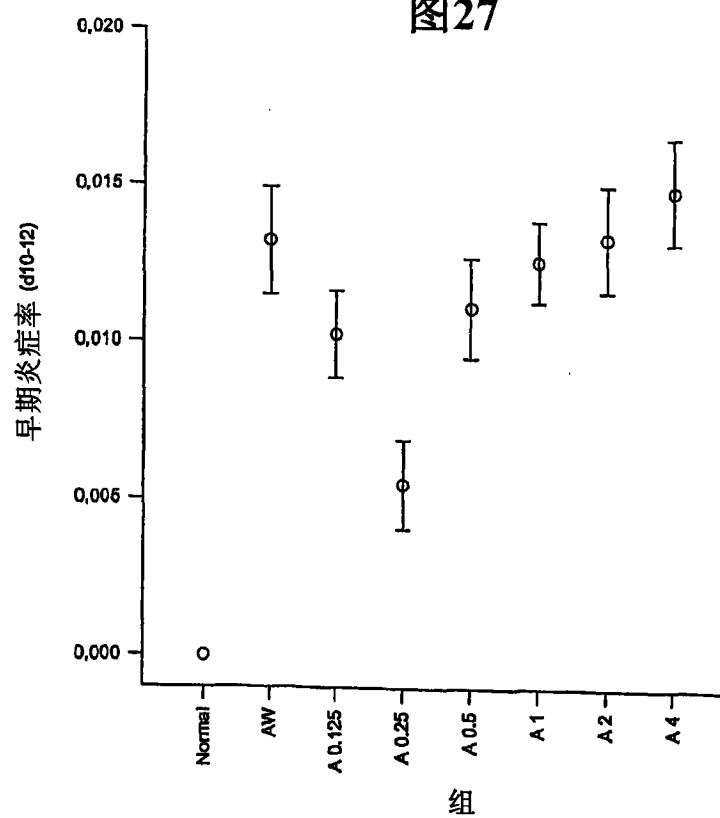
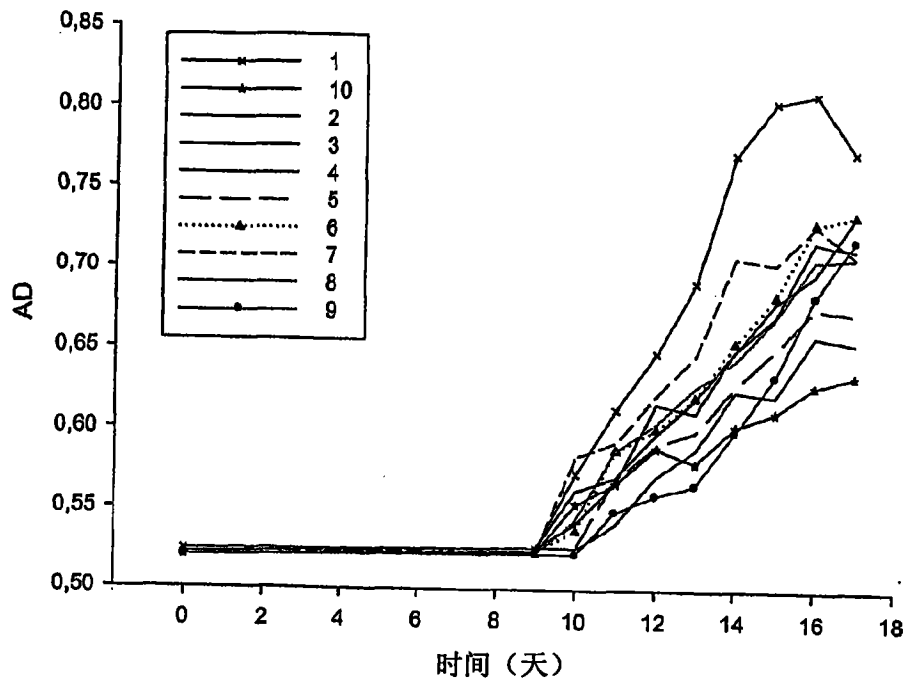
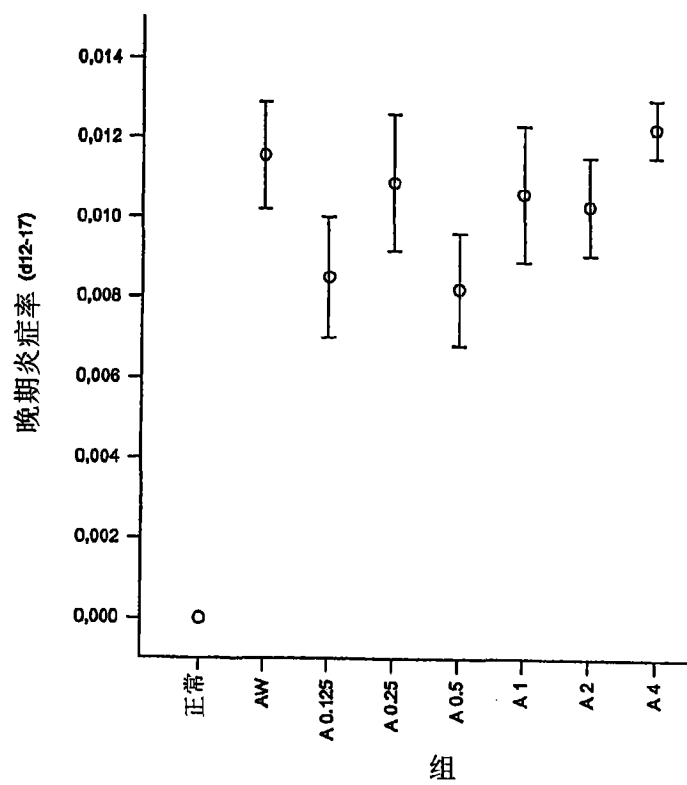


图26

AW
Paw 1+2





骨重吸收平均值

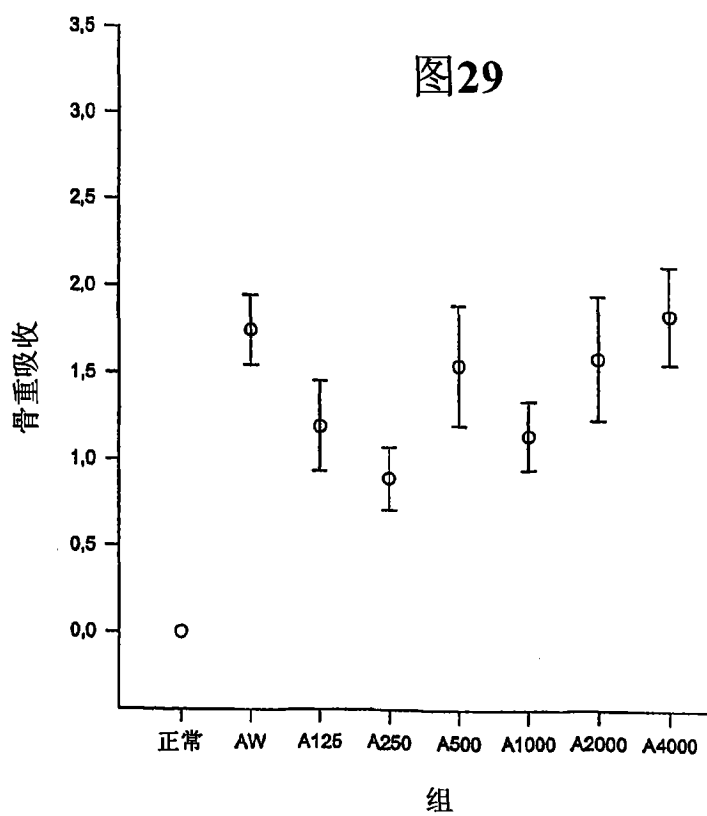


图29

图30

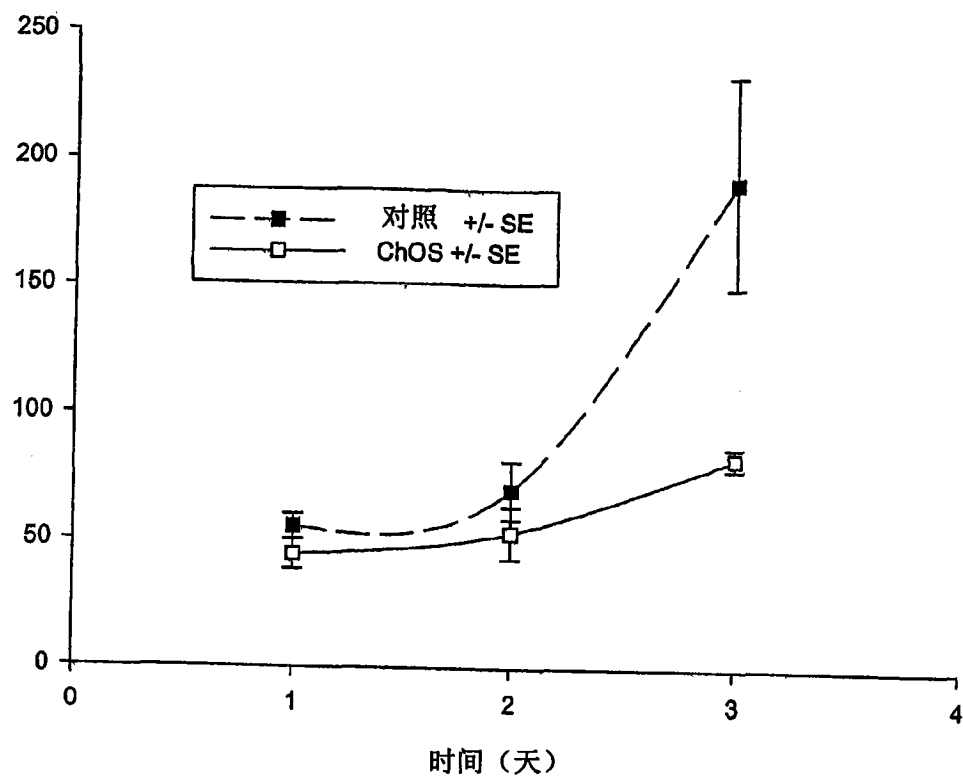


图31

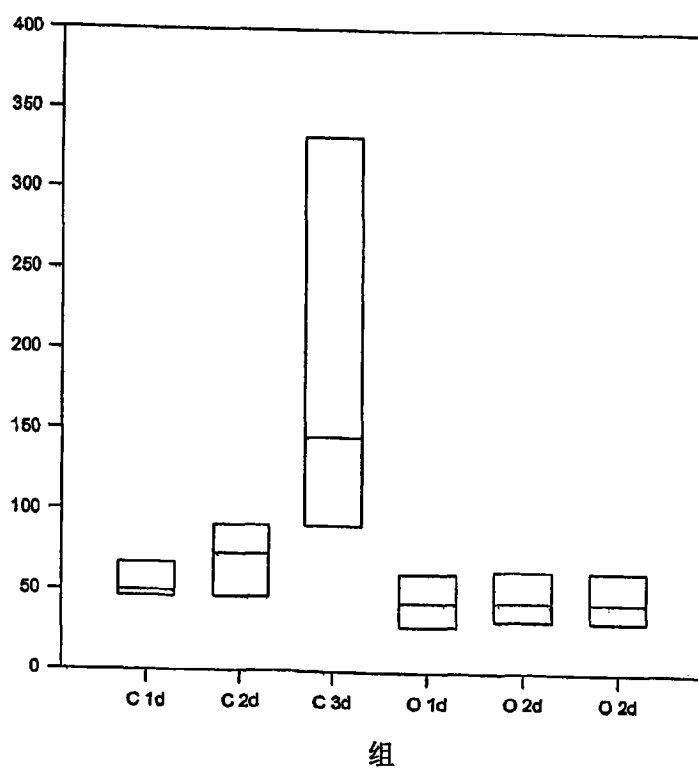


图32