(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 115209873 A
(43)申请公布日 2022.10.18

(21)申请号 202180017478.3
(22)申请日 2021.02.25
(30)优先权数据
102020000004069 2020.02.27 IT
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.08.26
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/IB2021/051573 2021.02.25
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/171215 EN 2021.09.02
(71)申请人 瑞瑟医药有限公司
地址 意大利米兰
(72)发明人 R·切里尼
(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所 11247
专利代理师 张朔 黄革生
(51)Int.Cl.
A61K 9/00(2006.01)
A61K 31/365(2006.01)
A61K 31/685(2006.01)
A61K 31/728(2006.01)
A61P 17/00(2006.01)
A61Q 19/00(2006.01)

权利要求书1页 说明书14页

(54)发明名称

被设计成维持和/或恢复粘膜和受损表皮完整性的局部组合物

(57)摘要

公开了局部用粘膜粘附组合物,其包含透明质酸或其盐、甘磷酸胆碱、浓度范围在0.050%w/w和0.0004%w/w之间的抗坏血酸酯以及至少一种可药用赋形剂或载体。

CN 115209873 A

1.局部用粘膜粘附组合物,包含透明质酸或其盐、甘磷酸胆碱、浓度范围在0.050%w/w和0.0004%w/w之间的抗坏血酸酯以及至少一种可药用赋形剂或载体。

2.根据权利要求1的组合物,其中抗坏血酸酯是抗坏血酸棕榈酸酯。

3.根据权利要求1或2的组合物,其中透明质酸或其可药用盐的分子量为800,000至4,000,000Da。

4.根据权利要求3的组合物,其中透明质酸为钠盐形式,浓度范围为20.000%w/w至0.0005%w/w。

5.根据权利要求1至4任一项的组合物,其中甘磷酸胆碱的浓度在0.0005%w/w和10.000%w/w之间。

6.根据权利要求1至5任一项的组合物,其中所述可药用赋形剂或载体选自β-葡聚糖、羧甲基β-葡聚糖钠、壳聚糖、羧甲基壳聚糖、羧甲基纤维素、羟乙基纤维素、卡波姆、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚卡波非、PVM/MA共聚物(甲基乙烯基醚和马来酸酐的共聚物)和VP/二十碳烯共聚物(1-乙烯基-2-吡咯烷酮-1-二十碳烯(1:1))。

7.根据权利要求1至6任一项的组合物,其为水凝胶、脂质体凝胶(lipogel)、无水凝胶、O/W或W/O型乳剂、溶液或混悬剂的形式。

8.用于局部使用来用于维持和恢复粘膜和皮肤的完整性以及用于预防和治疗影响它们的炎性疾病的权利要求1-6的组合物。

9.根据权利要求8的用于使用的组合物,其中所述粘膜包括口、牙龈、鼻、眼、耳、阴道、外阴、肛门直肠和生殖器粘膜。

被设计成维持和/或恢复粘膜和受损表皮完整性的局部组合物

[0001] 本发明涉及用于维持和/或恢复受损粘膜和表皮完整性的局部组合物。

现有技术

[0002] 皮肤组织和粘膜的完整性可受到多种外源性和内源性原因的影响，例如维生素缺乏、饮食不正确、卫生条件差、细菌、病毒或真菌感染、肠道生态失调、粘膜微生物菌群的改变、内分泌失衡、衰弱性疾病、遗传因素、机械、物理、化学和创伤性因素、辐射等。

[0003] EP2646036公开了可用于维持和恢复粘膜和表皮完整性的组合物，其包含甘磷酸胆碱和透明质酸。

[0004] 甘磷酸胆碱已知是促智物质，能够改善脑细胞的营养(通过激活血液供应和细胞新陈代谢)和从而改善智力功能。WO93/19730公开了其在皮肤和毛发上的用途，具有保湿、润滑、弹性、修复、增加体积的作用。

[0005] 如WO93/19730中所公开，甘磷酸胆碱在实践上没有全身毒性，并且具有显著的局部用耐受性。在药学领域已知其在用于治疗认知功能改变的注射组合物和口服组合物中以及作为可能的生长激素分泌因子的使用。

[0006] 透明质酸广泛存在于各种人体和动物身体组织中，具有高的粘弹性，能够在水中保留高达自身重量1000倍的重量。由于其粘膜粘附、抗炎和修复特性，它被广泛用于美容化妆和药物配制物中，主要以透明质酸钠的形式使用。

[0007] 抗坏血酸棕榈酸酯(AP)是维生素C的脂溶性形式，可用于保护脂质免受过氧化，主要以1.0至0.1％w/w的浓度范围用于化妆品中，在抗衰老治疗中用于抗氧化和抗自由基目的。与脂质类似，它很容易穿透皮肤和粘膜，在那里发挥抗氧化作用，阻止细胞老化和胶原蛋白变性。抗坏血酸棕榈酸酯也以膳食补充剂的形式出售，以促进铁吸收、帮助血液循环和增强胶原蛋白形成，从而有助于避免关节疼痛和风湿病的发作。它还用作食品添加剂(E304)用于抗氧化目的。还已知抗坏血酸及其酯、特别是L-抗坏血酸棕榈酸酯具有对抗透明质酸酶的显著抑制活性，透明质酸酶是负责透明质酸降解的酶。

[0008] 尤其需要这样的组合物：其可用于维持和恢复粘膜完整性，适于用于不同应用部位的各种类型的制剂，并且具有成分之间的协同作用和改善的针对透明质酸酶的稳定性。

[0009] 发明描述

[0010] 现已发现，在受损粘膜和表皮上局部使用在生物/粘膜粘附基质中的高分子量透明质酸、浓度低于或等于0.05％w/w的抗坏血酸酯、优选抗坏血酸棕榈酸酯和甘磷酸胆碱的组合维持和恢复了粘膜和表皮组织的完整性，其功效和应用灵活性优于已知制剂。

[0011] 本发明的组合可特别用于治疗受损粘膜和表皮的刺激性/炎症性状态(灼伤、疮、热疹、皮炎等)。

[0012] 因此，本发明提供了如下的局部用粘膜粘附组合物：其包含透明质酸或其盐、甘磷酸胆碱、浓度范围在0.050％w/w和0.0004％w/w之间的抗坏血酸酯以及至少一种可药用赋形剂或载体。

[0013] 抗坏血酸酯、优选抗坏血酸棕榈酸酯以低于在常规化妆品和皮肤病学配制物中用作抗氧化剂和抗自由基剂常采用的浓度(0.500-0.100％w/w)的浓度存在于本发明的配制物中。

[0014] 配制物的抗透明质酸酶功效和粘膜粘附特性之间的最佳平衡被认为在指定的抗坏血酸酯浓度处得以实现。

[0015] 透明质酸的平均分子量优选在800,000和4,000,000Da之间。透明质酸可以以钠盐的形式、以20.000％w/w至0.0005％w/w的浓度范围存在于配制物中。

[0016] 甘磷酸胆碱以0.0005至10.000％w/w、优选0.001％至1.000％w/w的浓度范围存在。

[0017] 本发明的组合物还含有一种或多种选自如下的粘膜粘附剂:β-葡聚糖、羧甲基β-葡聚糖钠、壳聚糖、羧甲基壳聚糖、羧甲基纤维素、羟乙基纤维素、卡波姆、PVA(聚乙烯醇)、PVP(聚乙烯吡咯烷酮)、聚卡波非(聚丙烯酸与二乙烯二醇交联)、PVM/MA共聚物(甲基乙烯基醚和马来酸酐的共聚物)和VP/二十碳烯共聚物(1-乙烯基-2-吡咯烷酮-1-二十碳烯(1:1))。

[0018] 根据另一方面,本发明的组合物还可包括可用于局部治疗粘膜的其它活性成分,例如Martindale,The Complete Drug Reference,第34版中描述的那些。

[0019] 本发明的组合物可以按照熟知的常规方法以适合局部施用的方式配制,例如Remington,The Science and Practice of Pharmacy,第20版中描述的那些。

[0020] 还可以添加已知的赋形剂或载体,例如成膜剂,如Handbook of Pharmaceutical Excipients,第6版,Pharmaceutical Press中描述的那些,以优化组合物的具体使用。

[0021] 优选配制物的实例是凝胶、水包油(o/w)和油包水(w/o)乳剂、乳膏、软膏、喷雾剂、粉剂、乳液(lotions)和泡沫。

[0022] 特别优选的组合物是水性凝胶形式(水凝胶),其可以通过使用能够吸收大量水并因此粘附于粘膜(粘膜粘附)的可药用聚合物来获得。

[0023] 本发明的组合物的粘膜粘附确保了在粘膜上停留足够的时间,所述时间受到可减少活性成分停留时间的物理和机械因素的沥取作用(leaching action),例如在口粘膜的情况中。

[0024] 适于人或兽用的本发明的组合物将透明质酸的抗炎和组织修复作用与含有甘磷酸胆碱的生物/粘膜粘附配制物基质的成膜和保护作用以及低浓度抗坏血酸棕榈酸酯的抗透明质酸酶作用相结合。

[0025] 在优选的实施方案中,透明质酸和抗坏血酸酯、优选抗坏血酸棕榈酸酯的摩尔比(相对于透明质酸的二糖单元)为60:1至1:1。更优选地,透明质酸和抗坏血酸酯的摩尔比为20:1至1:1;所述比例获得了最佳的抗透明质酸酶活性。

[0026] 事实上,在透明质酸酶的存在下,透明质酸在仅5小时后就迅速降解高达95-97％。如将在下面的实施例中看到的那样,已经证明抗坏血酸棕榈酸酯在减缓酶促动力学和因此减少透明质酸的不希望的降解方面是显著有效的。事实上,在5小时后,含抗坏血酸棕榈酸酯的组合物显示出的HA降解比在单独使用或与甘磷酸胆碱组合使用的透明质酸样品中观察到的少50％。24小时后,含抗坏血酸棕榈酸酯的组合物显示出的HA降解比在单独使用或与甘磷酸胆碱组合使用的透明质酸样品中观察到的少27％。

[0027] 抗坏血酸棕榈酸酯的抗透明质酸酶活性与透明质酸(无论是组织内源性还是外源性)的作用相互协同。抗透明质酸酶作用对于提高透明质酸的抗炎和组织修复功效至关重要,其保护透明质酸免受内源性和细菌透明质酸酶的酶促作用,并确保长时间的原位功能性停留,因此具有更高的功效以及更高的生物利用度和结构完整性。

[0028] 而且,抗透明质酸酶作用还发挥抗菌/抗炎作用;事实上,很多细菌通过产生促进组织定殖的特定透明质酸酶来发挥炎性作用,从而促进局部水平的细菌感染/污染的发生和传播。

[0029] 基于上述考虑,HA的抗炎/组织修复作用被抗透明质酸酶作用和能够形成对组织保护和修复(创伤愈合)有利的环境的成膜和生物/粘膜粘附基质的存在所保护和强烈增强。

[0030] 本发明的组合物可应用于外粘膜,例如一般的口和口腔粘膜、鼻粘膜、眼粘膜、耳粘膜、生殖器粘膜、肛门和直肠粘膜。

[0031] 本发明的组合物可用于预防和治疗炎性疾病和/或涉及口粘膜损伤的那些,预防和/或治疗受损和/或发炎的牙龈,以及治疗辐射诱导的粘膜炎。

[0032] 口粘膜的炎症和损伤指例如龈炎、粘膜炎(口腔溃疡,包括复发性口腔溃疡)、口炎、舌炎等。这些疾病可具有不同的病因;例如,它们可具有机械、化学或病理原因(感染、口腔生态失调或肠道生态失调)。

[0033] 以下实施例进一步说明了本发明。百分比表示为组合物总体积的重量份数(w/w)。

[0034] 实施例1-用于口粘膜的液体组合物

[0035]

化合物	百分比
甘磷酸胆碱	1.000%
透明质酸钠(平均MW 1,500,000Da)	0.300%
抗坏血酸棕榈酸酯	0.005%
聚卡波非	0.050%
羧甲基壳聚糖	0.100%
PVP(聚乙烯吡咯烷酮)	0.500%
增溶剂	q.s.
防腐剂	q.s.
矫味剂	q.s.
去矿质水	q.s.到100%

[0036] 实施例2-用于治疗口腔溃疡的凝胶组合物

[0037]

化合物	**百分比**
透明质酸钠(平均 MW 1,500,000Da)	0.400%
抗坏血酸棕榈酸酯	0.040%
甘磷酸胆碱	0.200%

羧甲基纤维素	1.000%
聚卡波非	0.500%
PVP (聚乙烯吡咯烷酮)	1.000%
PVA (聚乙烯醇)	0.500%
木糖醇	7.000%
增溶剂	q.s.
防腐剂	q.s.
矫味剂	q.s.
去矿质水	q.s.到 100%

[0038]

[0039] 实施例3-用于治疗口粘膜炎的凝胶组合物

[0040]

化合物	百分比
透明质酸钠(平均MW 1,500,000Da)	0.500%
抗坏血酸棕榈酸酯	0.050%
甘磷酸胆碱	0.100%
羧甲基纤维素	1.000%
聚卡波非	0.400%
羧甲基壳聚糖	0.150%
PVP(聚乙烯吡咯烷酮)	1.500%
PVA(聚乙烯醇)	0.500%
木糖醇	7.500%
增溶剂	q.s.
防腐剂	q.s.
矫味剂	q.s.
去矿质水	q.s.到100%

[0041] 实施例4-用于治疗口腔粘膜炎的液体组合物

[0042]

化合物	**百分比**
透明质酸钠(平均 MW 1,500,000Da)	0.200%
抗坏血酸棕榈酸酯	0.020%

[0043]

甘磷酸胆碱	0.050%
聚卡波非	0.050%
羧甲基壳聚糖	0.050%
PVP (聚乙烯吡咯烷酮)	0.200%
PVA (聚乙烯醇)	0.100%
木糖醇	7.500%
增溶剂	q.s.
防腐剂	q.s.
矫味剂	q.s.
去矿质水	q.s.到 100%

[0044] 实施例5-用在鼻粘膜上的凝胶组合物

[0045]

化合物	百分比
甘磷酸胆碱	0.050%
透明质酸钠(平均MW 1,500,000Da)	0.200%
抗坏血酸棕榈酸酯	0.020%
羧甲基纤维素	4.500%
聚卡波非	0.300%
PVM/MA共聚物	0.150%
PVP(聚乙烯吡咯烷酮)	0.500%
PVA(聚乙烯醇)	0.100%
蒸馏水Euphrasia	10.000%
氯化钠	0.800%
磷酸氢二钠十二水合物	0.300%
磷酸二氢钠一水合物	0.030%
增溶剂	q.s.
防腐剂	q.s.
去矿质水	q.s.到100%

[0046] 实施例6-用在眼粘膜上的液体组合物

[0047]

化合物	百分比
甘磷酸胆碱	0.010%
透明质酸钠(平均MW 1,500,000Da)	0.150%
抗坏血酸棕榈酸酯	0.005%
聚卡波非	0.050%
羧甲基壳聚糖	0.050%
金缕梅蒸馏水	10.000%

甘菊蒸馏水	10.000%
氯化钠	0.800%
磷酸氢二钠十二水合物	0.300%
磷酸二氢钠一水合物	0.030%
EDTA	0.050%
去矿质水	q.s.到100%

[0048] 实施例7-用在耳粘膜上的液体组合物

[0049]

化合物	百分比
甘磷酸胆碱	0.100%
透明质酸钠(平均MW 1,500,000Da)	0.100%
抗坏血酸棕榈酸酯	0.015%
聚卡波非	0.050%
PVM/MA共聚物	0.150%
甘油	50.000%
去矿质水	q.s.到100%

[0050] 实施例8-用在阴道和外阴粘膜上的液体组合物

[0051]

化合物	**百分比**
甘磷酸胆碱	0.050%
透明质酸钠(平均 MW 1,500,000Da)	0.200%
抗坏血酸棕榈酸酯	0.010%
聚卡波非	0.100%
PVM/MA 共聚物	0.050%

[0052]

PVP (聚乙烯吡咯烷酮)	0.200%
PVA (聚乙烯醇)	0.100%
氯化钠	0.800%
防腐剂	q.s.
香味剂	q.s.
去矿质水	q.s.到 100%

[0053] 实施例9-用在阴道和外阴粘膜上的凝胶组合物

[0054]

化合物	百分比
甘磷酸胆碱	0.025%
透明质酸钠(平均MW 1,500,000Da)	0.150%
抗坏血酸棕榈酸酯	0.040%
羧甲基纤维素钠盐	4.500%

聚卡波非	0.250%
PVM/MA共聚物	0.150%
PVP(聚乙烯吡咯烷酮)	0.500%
PVA(聚乙烯醇)	0.100%
氯化钠	0.800%
增溶剂	q.s.
防腐剂	q.s.
香味剂	q.s.
去矿质水	q.s.到100%

[0055] 实施例10-用在男性生殖器粘膜上的凝胶组合物

[0056]

化合物	百分比
甘磷酸胆碱	0.500%
透明质酸钠(平均 MW 1,500,000Da)	0.250%
抗坏血酸棕榈酸酯	0.050%
羧甲基纤维素钠盐	4.500%
聚卡波非	0.250%

[0057]

PVM/MA 共聚物	0.150%
PVP (聚乙烯吡咯烷酮)	0.500%
PVA (聚乙烯醇)	0.100%
氯化钠	0.800%
增溶剂	q.s.
防腐剂	q.s.
去矿质水	q.s.到 100%

[0058] 实施例11-用在肛门直肠粘膜上的凝胶组合物

[0059]

化合物	百分比
甘磷酸胆碱	0.500%
透明质酸钠(平均MW 1,500,000Da)	0.250%
抗坏血酸棕榈酸酯	0.015%
羧甲基纤维素钠盐	4.500%
聚卡波非	0.250%
羧甲基壳聚糖	0.150%
PVM/MA共聚物	0.150%
PVP(聚乙烯吡咯烷酮)	0.500%
PVA(聚乙烯醇)	0.100%

白百里香蒸馏水	10.000%
薰衣草蒸馏水	10.000%
矢车菊蒸馏水	10.000%
氯化钠	0.800%
增溶剂	q.s.
防腐剂	q.s.
去矿质水	q.s.到100%

[0060] 实施例12-用于治疗牙龈发炎的凝胶组合物

[0061]

化合物	百分比
甘磷酸胆碱	0.250%
透明质酸钠(平均 MW 1,500,000Da)	0.450%
抗坏血酸棕榈酸酯	0.045%
木糖醇	7.500%
羧甲基纤维素钠盐	4.000%
聚乙烯醇	0.300%
聚卡波非	0.300%
VP/二十碳烯共聚物	0.100%
PVM/MA 共聚物	0.150%
PVP (聚乙烯吡咯烷酮)	0.500%
增溶剂	q.s.
防腐剂	q.s.
矫味剂	q.s.
着色剂	q.s.
去矿质水	q.s.到 100%

[0062]

[0063] 实施例13-用于治疗受损牙龈的凝胶组合物

[0064]

化合物	百分比
甘磷酸胆碱	0.500%
透明质酸钠(平均 MW 1,500,000Da)	0.350%
抗坏血酸棕榈酸酯	0.025%
木糖醇	7.500%
羧甲基纤维素钠盐	4.000%
聚乙烯醇	0.100%
聚卡波非	0.100%
VP/二十碳烯共聚物	0.100%
PVM/MA 共聚物	0.150%
PVP (聚乙烯吡咯烷酮)	0.500%
增溶剂	q.s.
防腐剂	q.s.
矫味剂	q.s.

[0065]

着色剂	q.s.
去矿质水	q.s.到 100

[0066] 实施例14-阴道栓

[0067]

化合物	百分比
甘磷酸胆碱	0.100%
透明质酸钠(平均MW 1,500,000Da)	0.200%
抗坏血酸棕榈酸酯	0.045%
羧甲基壳聚糖	0.050%
羧甲基β葡聚糖	0.050%
明胶	20.000%
甘油	70.000%
去矿质水	q.s.到100%

[0068] 实施例15-肛门直肠灌肠组合物

[0069]

化合物	百分比
甘磷酸胆碱	0.300%
透明质酸钠(平均MW 1,500,000Da)	0.300%
抗坏血酸棕榈酸酯	0.050%
胶体二氧化硅	1.700%
聚乙烯吡咯烷酮	0.840%

羧甲基纤维素	0.840%
聚卡波非	0.100%
羧甲基壳聚糖	0.050%
苯甲酸钠	0.400%
焦亚硫酸钾	0.250%
磷酸	0.100%
去矿质水	q.s.到100

[0070] 实施例16.含有甘油磷酸胆碱和抗坏血酸棕榈酸酯的制剂中透明质酸酶促降解的研究

[0071] 这项工作的目的是评价含不同成分的制剂中通过透明质酸酶(催化透明质酸多糖降解的酶家族)操作的两个不同批次的透明质酸(HA)的酶促降解。降解酸的分子量分布将通过使用与三检测器阵列(Triple Detector Array)偶联的高效尺寸排阻色谱法(High Performance Size Exclusion Chromatography)(HP-SEC-TDA)进行分析。

[0072] 以下是使用的试剂和材料名单：

[0073] -透明质酸(Mw 1.348.000Da),Contipro a.s.(捷克共和国)

[0074] -透明质酸(Mw 1.450.000Da),Lehvoss Italia S.r.l.(意大利)

[0075] -甘油磷酸胆碱

[0076] -抗坏血酸棕榈酸酯

[0077] -柠檬酸一水合物,Sigma Aldrich

[0078] -用Culligan仪器获得的去离子水；

[0079] -来自牛睾丸的透明质酸酶I-S型。400-1000个单位/毫克。Sigma Aldrich；

[0080] -$NaNO_3$。Sigma Aldrich；

[0081] -NaN_3。Sigma Aldrich；

[0082] -揿式(Snap-it)小瓶0.3ml,11.6×32毫米。Thermo Scientific；

[0083] -揿式(Snap-it)帽11mm,Thermo Scientific；

[0084] -柠檬酸钠二碘酸盐,Sigma Aldrich。

[0085] 样品制备和测试：

[0086] HA Contipro(溶液A)：将约50mg HA样品溶于50ml柠檬酸盐缓冲液(pH＝6.06)中，于38℃搅拌16小时；透明质酸溶液的浓度为约1mg/ml。将10ml溶液水解。

[0087] HA Levhoss(溶液B)：将约50mg HA样品溶于50ml柠檬酸盐缓冲液(pH＝6.06)中，于38℃搅拌16小时；透明质酸溶液的浓度为约1mg/ml。将10ml溶液水解。

[0088] HA Contipro+GPC(溶液C)：将7.5mg甘油磷酸胆碱加入10ml溶液A中。

[0089] HA Levhoss+GPC(溶液D)：将7.5mg甘油磷酸胆碱加入10ml溶液B中。

[0090] HA Contipro+GPC+AP(溶液E)：将5mg抗坏血酸棕榈酸酯和7.5mg甘油磷酸胆碱加入10ml溶液A中。

[0091] HA Levhoss+GPC+AP(溶液F)：将5mg抗坏血酸棕榈酸酯和7.5mg甘油磷酸胆碱加入10ml溶液B中。

[0092] 缓冲溶液制备：

[0093] 溶液1：于室温将420mg柠檬酸一水合物溶于100ml去离子水中达30’。

[0094] 溶液2:于室温将9.212g柠檬酸钠二水合物溶于100ml去离子水中达30’。

[0095] 缓冲溶液:将溶液1加入溶液2中,于室温搅拌30’。所得pH=6.06。

[0096] 酶溶液制备:

[0097] 透明质酸酶:将约10mg透明质酸酶溶于约1ml H_2O中,于室温搅拌3小时(10mg/ml)。

[0098] 酶促降解过程:

[0099] 将溶液于38℃油浴中搅拌约1小时,然后加入67μl酶溶液(HA/透明质酸酶15/1w/w)。

[0100] 在不同时间点(1h;2h;3h;4h;5h;6h,24h)收集溶液的不同等分式样,使用热摇床于100℃加热5分钟以使酶变性。过滤溶液以除去沉淀的酶(LLG-注射器过滤器CA孔径0.20μm.Ø13mm)。在HP-SEC-TDA分析之前,用流动相将溶液稀释至0.5mg/ml HA。

[0101] HP-SEC-TDA分析

[0102] 色谱条件

[0103] 使用了两个等同的HP-SEC-TDA仪器:

[0104] 1)Viscotek系统型号TDA305,配备有折射率、直角和低角光散射和粘度计检测器,在以下条件下使用:

[0105] 色谱柱:2根TSKGMPWXL 13μm柱.7mm ID x 30cm L.Tosoh Bioscience;

[0106] 流动相:0.1M $NaNO_3$+NaN_3 0.05%;

[0107] 进样量:100μl;

[0108] 温度:40℃;

[0109] 流速:0.6ml/min。

[0110] 2)OmniSEC Multi-detector System(Malvern Instruments Ltd.UK),配备有折射率、直角和低角光散射和粘度计检测器,在以下条件下使用:

[0111] 色谱柱:2根TSKGMPWXL 13μm柱.7mm ID x 30cm L.Tosoh Bioscience;

[0112] 流动相:0.1M $NaNO_3$+NaN_3 0.05%;

[0113] 进样量:100μl;

[0114] 温度:40℃;

[0115] 流速:0.6ml/min。

[0116] 该系统采用普鲁兰标准品进行了校准,其分子量、多分散指数和特性粘度经过了认证(PolyCAL-PullulanSTD-Malvern Panalytical)。

[0117] 色谱图制作

[0118] 采用OmniSEC软件4.6.2版获取和精心制作了来自TDA305的色谱图,采用OmniSEC软件10.10版获取和精心制作了来自OmniSEC多检测器系统的色谱图。

[0119] 结果

[0120] 分子量分布评价

[0121] -起始样品制备

[0122] 将约50mg透明质酸溶于50ml柠檬酸盐缓冲液,搅拌16小时,用流动相稀释至0.5mg/ml,一次性进样。为了评价透明质酸的分子量分布,使用文献已知的值0.155dn/dc(参考Theisen A.Johann C.Deacon MP.Harding SE.Refractive Increment Data-

Book.Nottingham University Press.2000)。

[0123] HA样品的洗脱时间为10至15ml之间,具有大的钟形色谱峰,相当高的多分散指数值的指数。在HA峰后,洗脱出流动相曲线。

[0124] 在表1中,分析结果以重均分子量(Mw Da)、数均分子量(Mn.Da)、峰值分子量(Mp.Da)和多分散指数(Mw/Mn)的形式报告;此外,由于TDA技术,特性粘度值([η],dl/g),流体动力学半径(Rh,nm)和回收%。还报告了分别代表Mark-Houwink曲线的斜率和截距常数的a值和logk值;结果是两种不同分析的平均值,Mn和Mw的值四舍五入到千道尔顿(Da)。

[0125] 表1.HA样品的HP-SEC-TDA HA结果

[0126]

样品	Mn (Da)	Mw (Da)	Mw/Mn	MH α	MH logk	[η] dl/g	Rh (nm)	回收 %
HA Contipro	1,034 kDa	1,348 kDa	1.3	0.65	-2.68	19.32	72.72	84.38
HA Lehvoss	1,097 kDa	1,450 kDa	1.32	0.66	-2.74	20.07	75.49	81.72

[0127] 酶促水解样品

[0128] 已经广泛研究和报道了透明质酸酶对透明质酸的作用;为了研究透明质酸酶对所制备样品的酶活性,通过HP-SEC-TDA技术监测了水解动力学。使用以下公式确定了多糖组分的分子量(以Mw表示)的百分比降低:

[0129] ((Mwt0-Mwtn)*100)/Mwt0

[0130] 其中Mwt0是0时间的重均分子量(Mw),$M_w$tn是n时间的M_w。

[0131] 透明质酸酶降解HP-SEC-TDA HA

[0132] 样品已经水解了两次,以验证重现性。在下表中,报告了两个实验的分子量平均值(四舍五入到百)和相应的百分比降低。

[0133] 表2.HP-SEC-TDA HA降解(溶液A)

[0134]

时间	M_w(Da)	M_w的降低%
0	1,348,000	0
1h	267,700	63%
2h	140,850	90%
3h	104,000	92%
4h	76,610	94%
5h	64,590	95%
17h	23,620	98%
24h	23,920	98%

[0135] 表3.HP-SEC-TDA HA降解(溶液B)

[0136]

时间	M_w(Da)	M_w的降低%
0	1,450,000	0
1h	213,500	86%
2h	107,595	93%
3h	74,920	95%
4h	59,620	96%

5h	50,480	97%
17h	18,200	99%
24h	24,980	98%

[0137] 表4.HP-SEC-TDA HA降解(溶液C)

[0138]

时间	M_w(Da)	M_w的降低%
0	1,348,000	0%
1h	269,500	80%
2h	169,200	87%
3h	95,840	93%
4h	92,710	93%
5h	85,790	94%
24h	29,100	98%

[0139] 表5.HP-SEC-TDA HA降解(溶液D)

[0140]

时间	M_w(Da)	M_w的降低%
0	1,450,000	0
1h	191,500	87%
2h	117,300	92%
3h	59,680	96%
4h	54,650	96%
5h	52,880	96%
24h	16,790	99%

[0141] 表6.HP-SEC-TDA HA降解(溶液E)

[0142]

时间	M_w (Da)	M_w 的降低 %
0	1,348,000	0%
1h	716,200	47%
3h	698,900	48%
5h	692,100	49%
20h	394,500	71%
24h	382,000	72%

[0143] 表7.HP-SEC-TDA HA降解(溶液F)

[0144]

时间	M_w(Da)	M_w的降低%
0	1,450,000	0%
1h	571,100	61%
3h	556,700	62%
5h	552,000	62%
20h	344,300	76%
24h	336,400	77%

[0145] 结论

[0146] 在透明质酸酶的存在下,两种透明质酸样品自身在5小时内迅速降解高达95-97%。Lehvoss透明质酸的降解略快于Contipro透明质酸,即使在24小时后Mw的下降也是非常相同的。

[0147] 甘油磷酸胆碱对酶促动力学没有任何贡献,如溶液C和D的结果所示。

[0148] 相反,添加抗坏血酸棕榈酸酯已经显示在减缓酶促动力学和减少不希望的HA降解方面是显著有效的。

[0149] 确实,在5小时后,溶液A到D均显示出高达97%的HA降解,而特征是抗坏血酸棕榈酸酯的溶液E和F分别显示出49%和62%的HA降解(与对HA产品自身、即溶液A和溶液B观察到的不同降解速率一致)。这意味着相对于不含抗坏血酸棕榈酸酯的溶液的改善高达50%。

[0150] 在24小时后,特征是抗坏血酸棕榈酸酯的溶液E和F分别显示出72%和77%的HA降解。这意味着相对于不含抗坏血酸棕榈酸酯的溶液的改善高达27%。