

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.



[12] 发明专利说明书

A61L 31/04 (2006.01)
A61K 31/728 (2006.01)
C08B 37/08 (2006.01)

专利号 ZL 96197522.9

[45] 授权公告日 2007 年 2 月 21 日

[11] 授权公告号 CN 1301139C

[22] 申请日 1996.8.29 [21] 申请号 96197522.9
[30] 优先权
[32] 1995.8.29 [33] IT [31] PD95A000166
[32] 1995.8.29 [33] IT [31] PD95A000167
[86] 国际申请 PCT/EP1996/003805 1996.8.29
[87] 国际公布 WO1997/007833 英 1997.3.6
[85] 进入国家阶段日期 1998.4.9
[73] 专利权人 菲迪亚高级生物聚合物公司
地址 意大利布林迪西
[72] 发明人 D·普里萨托 A·帕维希奥
L·卡莱加罗
[56] 参考文献
WO 9302066 1994.2.17
WO9417837 1994.8.18
WO9311805 1993.6.24

US4886787 1989.12.12

EP0341745 1989.11.15

审查员 周文娟

[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 郭建新

权利要求书 1 页 说明书 35 页 附图 10 页

[54] 发明名称

包括透明质酸衍生物的用于预防手术后粘连
的生物材料

[57] 摘要

用于手术创面，特别是用于预防手术后粘连的
新型生物材料，主要由透明质酸的酯化衍生物或由
透明质酸的交联衍生物组成。

1. 一种用于预防组织的手术粘连的复合生物材料, 包括:

透明质酸苄酯, 其中, 透明质酸 80 - 99 % 的羧基被苄基酯化, 而至少 20 % 的羧基被 $C_{10} - C_{20}$ 脂族醇的烷基酯化, 条件是至少 80 % 的羧基被酯化,

其中所述生物材料为凝胶、膜、网状物或者纺织织物或无纺织物或其组合的形式。

2. 如权利要求 1 的复合生物材料, 其中 80 % 的羧基被苄基酯化。

3. 如权利要求 1 的复合生物材料, 其中 80 % 的羧基被苄基酯化, 其余 20 % 的羧基被 $C_{10} - C_{20}$ 脂族醇的脂族残基酯化。

4. 如权利要求 3 的复合生物材料, 其中, 所述醇是十八烷醇或棕榈醇。

5. 如权利要求 1 - 4 中任一项的复合生物材料, 还包括不能生物降解的合成聚合物。

6. 如权利要求 5 的复合生物材料, 其中, 所述合成聚合物选自聚丙烯、聚乙烯、聚酯和聚四氟乙烯。

7. 如权利要求 1 - 6 中任一项中所定义的复合生物材料或以下的复合生物材料在制备用于预防组织术后粘连的组合物中的用途, 所述的后一种复合生物材料包含透明质酸的自身交联衍生物, 其中透明质酸的 0.5-20% 的羧基与同一或不同透明质酸分子的羟基交联, 其中所述生物材料为凝胶、膜、网状物或者纺织织物或无纺织物或其组合的形式。

8. 权利要求 7 的用途, 其中所述自身交联衍生物中透明质酸分子的 4.5-5% 的羧基交联。

包括透明质酸衍生物的
用于预防手术后粘连的生物材料

本发明涉及用于手术创面、特别是用于预防手术后粘连的新型生物材料，它主要包括透明质酸的酯化衍生物或主要包括透明质酸的交联衍生物。

手术后粘连的产生是腹部或骨盆手术的常见并发症，它会导致大量发病。有很多因素会影响粘连的发展：已知机械创伤、化学剂、浆膜与血液的混合干燥、局部缺血、感染和外源材料可增加粘连的发生。其它原因有腹内炎性病和先天性畸形。其病理生理学机制尚不清楚，但已提出一种中央共同途径，在该管径中腹膜纤蛋白溶解作用起着重要作用。

组织的手术创伤会导致血清血液渗出物的释放，由其形成的纤维蛋白桥可存在几天时间，在此期间会出现细胞生长。如果在此期间所述渗出液未被吸收或溶解，它就会成为长在内的成纤维细胞，而随后的胶原沉积会导致连接两个相邻表面的永久性疤痕的产生，此即为粘连。总之，粘连的产生似乎是炎症反应的结果。

在后一种情形下，研究主要集中在寻找在活体内存在时间短的生物吸收性材料作为抑制粘连发生的屏障，直到伤口愈合；以期克服由非吸收性材料所导致的问题（感染、植入物的钙化、疤痕产生等）。

一种特别有希望的聚合物是透明质酸（HA），一种普通存在于人体内的胞外基质成分。已证实透明质酸溶液可减少腹腔手术后粘连的发生（Urman, B.等, Effect of Hyaluronic Acid on Postoperative Intra-peritoneal Adhesions Formation in the Rat Model, Fertil Steril. 1991; 56: 563; Shushan A.等, Hyaluronic Acid for Preventing Experimental Postoperative-intraperitoneal Adhesions, J. Reprod. Med. 1994; 39:398）和矫形手术后粘连的发生（Hagberg, L, Gerdin, B., Sodium

Hyaluronate as an adjunctive in adhesion prevention after flexor tendon surgery in rabbits, J. Hand. Surg. 1992; 17A: 935) 。

Fidia Advanced Biopolymers 已开发出透明质酸的化学衍生物，即内酯（ACP 系列）和与非活性醇的酯（HYAFF 系列）（Rastrelli, A. 等, Hyaluronic Acid Esters, A New Class of Semisynthetic Biopolymers: Chemical and Physico-chemical Properties, Clinical Implant Materials ,Advanced in Biomaterials , G. Heinrike, V.Sollz 和 AJC Lee(著),Elsevier, Amsterdam 1990; 9:199-205)，其具有不同于 HA 的生理化学特性（即：较长的驻留时间及较高的进行加工制成器械的能力，但仍具有原始生物学聚合物所特有的耐受性及生物相容特性）。而且，还从化学和毒理学角度对上述衍生物进行了鉴定。

本发明的目的在于研制各种 ACP 凝胶，以评价在预防粘连中的效果。

在手术后，在受创伤或局部缺血影响的相邻组织之间出现的粘连或纤维团，仍然是多种手术过程的最主要的并发症之一。为了避免这种并发症，已提出过多种方法，但这一问题依然未得到解决。

所提出的方法之一是在手术后将葡聚糖的悬浮液（diZerega G.S., “Contemporary adhesion prevention” Fertility and Sterility, Vol. 61, No. 2, February '94）注射到腹膜腔内。使用这种葡聚糖溶液的临床结果很不一致。而且，使用葡聚糖溶液通常会伴有包括水肿、腹痛和呼吸困难在内的并发症。

还有人提出过将特定结构形式的屏障（例如，网状物、膜）（diZerega G. S., “Contemporary adhesion prevention” Fertility and Sterility, Vol. 61, No.2, February '94）或粘性凝胶（Genzyme U. S.专利 4,937,270 -U.S.专利 5,017,229）放置在受伤的器官之间。不过，这种屏障通常被证实为无效的，因为它们会激发局部缺血性或炎性反应，这是由于外源体的存在所致。目前被批准用于临床使用的仅有的材料是基于氧化再生的纤维素的屏障（Interceed®）和基于膨胀的聚四氟乙烯（e-PTFE）（Goretex®-U.S. 专利 4,478,665 和 U.S.专利 4,482,516）或聚乙烯或聚丙烯的屏障。

除了对上述屏障效果的临床研究已得出很不一致的结果外,还必须指出的是,上述两种材料均与大的禁忌症相关。e - PTFE 或聚乙烯或聚丙烯屏障膜的使用,涉及一种合成材料的植入,该材料对人体来说是外源的,且不能由生物降解,而且由于不希望的炎性反应可能需要二次手术以取出所述屏障膜或改变其位置。

在临床前模型和临床模型中,已证实基于氧化再生的纤维素的网状物可有效预防粘连的发生,但是,其使用必须在彻底止血之后。

因此,已有人提出将高分子量透明质酸(HA)的粘稠溶液用作预防粘连的辅助物(Grainger D. A. 等,“The use of hyaluronic acid polymers to reduce postoperative adhesions”, J.of Gynecol. Surg., Vol. 7, No.2, 1991; Hurman B.等,“Effect of hyaluronic acid on postoperative intra-peritoneal adhesion formation in the rat model”, Fertility and Sterility, Vol. 56, No.3, Sept. 1991; Shushan A 等,

“Hyaluronic acid for preventing experimental postoperative intraperitoneal adhesions: J. of Reproductive Med., Vol. 39, No. 5, May 1994; Mitchell J.D.等,“Reduction in experimental pericardial adhesions using a hyaluronic acid bioabsorbable membrane”, Eur. J. Cardio-thorac.Surg., 8, 149-152, 1994)。不过,透明质酸本身的特征是非常迅速的吸收时间,这与预防粘连所需的驻留时间不一致。而且,天然透明质酸不能加工,而这样的透明质酸不能转化成生物材料形式。为了延长其降解时间,并使其能被加工成用于不同手术创面的各种物理形式,已开发出透明质酸的酯类和透明质酸的交联衍生物。其中所有或部分羧基被酯化的透明质酸的酯类的制备、其中部分羧基发生交联的透明质酸的交联衍生物的制备及其在药物、整容和手术创面上的应用和在可生物降解的塑料中的应用披露于美国专利 US4,851,521 和 US4,965,353, EP0216453 和 EP0341745 中。

本发明提供了用于预防手术后粘连的生物材料。该生物材料包括透明质酸的苄基酯和/或透明质酸的内部交联衍生物,并可以为凝胶、膜、机织织物或网状物及非织造织物形式。

附图说明

图 1-10 是大鼠动物模型粘连研究结果的图示。

图 1 描述了在大鼠肝擦伤模型中的粘连程度 (7-21 天)。处理组为未处理对照、Interceed、HYAFF 11p75 纱布和 HYAFF 11p75N.W.。

图 2 描述了在大鼠肝擦伤模型中的粘连程度 (7-21 天)，显示的结果来自于 Surgicel、Interceed+S、HYAFF 11p75 纱布+S 和 HYAFF11p75N.W.+S。

图 3 显示了在大鼠肝擦伤模型中的粘连程度 (7-21 天)。处理组为 Surgicel+肝素、Interceed+S+H、HYAFF 11p75 纱布+S+H 和 HYAFF 11p75N.W.+S+H。

图 4 显示了在大鼠肝擦伤模型中的粘连程度 (7-21 天)。显示的处理组为未处理、Surgicel、Surgicel+H、Interceed+S、Interceed+S+H、HYAFF7 纱布+S、HYAFF 7 纱布+S+H、HYAFF7N.W.+S 和 HYAFF7N.W.+S+H。

图 5 显示了在大鼠肝擦伤中的粘连程度 (14 天)。处理组为未处理、HA 低 MW、ACP5% (LOT 101/94)、ACP5% (LOT 102/94)、Transprocess、Transprocess+TAB、HA 高 MW、ACP5% (LOT 101/94) STRIPP 和 HYALOB 20。

图 6 显示了术后粘连预防: 在大鼠肝擦伤模型中粘连=2*的动物% (14 天)。处理组为未处理、H.A.低 M.W.、ACP5% (LOT 101/94)、ACP5% (LOT 102/94)、Transprocess、Transprocess+TAB、HA 高 M.W.、ACP5% (LOT 101/94) STR.、HYALOB.20。

图 7 显示了在大鼠腹膜模型病损中的粘连程度 (14 天)。处理组为 Prolene Mesh、Prolene+Hyalobarrier、Hyalobarrier Plus、Hyaloknitted 1 和 Halonowoven Barrier。

图 8 显示了术后粘连预防: 在大鼠腹膜模型病损中粘连>2*的动物% (14 天)。处理组为 Prolene Mesh、Prolene+Hyalobarrier、Hyalobarrier Plus、Hyaloknitted 1、Halononwoven Barrier。

图 9 显示了术后粘连预防: 在大鼠肝擦伤模型中的粘连程度 (14 天)。处理组为未处理、TC 7 Interceed、TC & Interceed+肝素、HYAL、Thermogel、ACP 5% (Batch 101/96)、ACP5% (Batch 104/96)。

图 10 显示了术后粘连预防:在大鼠肠损伤模型中的粘连程度(14 天)。处理组为未处理、TC 7 Interceed+肝素、HA(Mw 1,200,000)、Thermogel、ACP5% (Batch 101/94)、ACP5% (高分子量 (Batch 3/94))。

因此,本发明披露了基于透明质酸的苄基酯或基于透明质酸的交联衍生物的保健和手术用品的制备,将其单独使用或彼此混合后使用,其特征是高度的生物相容性及可转化成物理形式,这使其适于在手术中的多种用途,包括腹腔镜检手术(laprosopical surgery)。该材料可完全由生物降解,而且无须从使用部位取出,由此避免二次手术。当交联衍生物被制成凝胶形式时,其产生的材料粘性明显大于未改性的聚合物,而且,具有可变的降解时间。此外,本发明的基于苄基酯的材料和基于交联衍生物的材料可以为膜、机织织物或网状物及非织造织物形式(按照披露于如下专利中的方法制备: US4,851,521; US4,956,353; WO93/11804; WO93/11803; WO94/17837 和 EP 0341745),而且以下列技术参数为特征:

- 膜的厚度范围为 $10\mu\text{m} - 1.5\text{mm}$, 特别是 $20 - 50\mu\text{m}$;
- 织物或网状物的厚度范围为 $200\mu\text{m} - 1.5\text{mm}$;
- 非织造织物的基本特征是定量在 $20\text{g}/\text{m}^2 - 500\text{g}/\text{m}^2$ 范围内,厚度范围为 $0.2\text{mm} - 5\text{mm}$, 特别是 $< 1\text{mm}$ 。

上述材料可以单独使用或彼此结合后使用或与由合成聚合物构成的其它材料结合后使用(例如,基于交联的透明质酸的凝胶+聚丙烯,或主要由 HA 的酯化衍生物组成的膜+聚丙烯或由 HA 的酯化衍生物组成的膜,涂以自身交联的 HA 凝胶)。

事实上,本发明还涉及凝胶(对于交联的衍生物)、膜、机织织物或非织造织物形式的复合材料的应用,所述材料主要包括透明质酸的苄基酯或交联的衍生物与网状物或膜或非织造织物形式的不能生物降解的材料,如 e - PTFE、聚乙烯、聚丙烯、聚酯(Dacron®)。因此,本发明涉及用于手术领域的一种新型保健及手术用品,将其用于预防手术后粘连的发生。

材料 如上所述,本发明的特征是包括透明质酸衍生物、特别是苄基酯衍生物及内部交联的衍生物的材料。

文中所用术语“透明质酸”(以下称“HA”)是指具有各

种分子量的酸性多糖，它由 D - 葡萄糖醛酸和 N - 乙酰基 - D - 葡萄糖胺的残余物构成，其天然存在于细胞表面，脊椎动物结缔组织的碱性胞外物质中，关节的滑液中，眼睛的玻璃体液中，人体的脐带组织中和鸡冠状体（cocks' combs）中。

透明质酸在生物体内起着重要作用，首先，它是很多组织的细胞的机械支持体，所述组织如皮肤、腱、肌肉和软骨，因此，它是胞外基质的主要成分。但是，透明质酸还在生物学过程中起着其它作用，如组织水合作用、润滑作用、细胞迁移、细胞功能和分化。（例如，参见 A. Balazs 等，Cosmetics & Toiletries, No. 5/84, P8-17）。透明质酸可从上述天然组织，如鸡冠状体中提取，或是从某些细菌中提取。现在，透明质酸也可以通过微生物学方法制备。通过提取获得的全透明质酸的分子量为八百万 - 一千三百万。而且，这种多糖的分子链相当容易受各种物理和化学因素影响而被降解，如机械影响或辐射、水解、氧化或酶促剂影响。为此，在原始提取物的普通纯化方法中，会得到低分子量的降解级分。（见 Balazs 等，同上）。已将透明质酸、其分子级分及相应的盐用作药品，还有人提出将其用于整容术（例如，见上述 Balazs 的文章，及法国专利 2478486）。

尽管术语“透明质酸”常以如上述的不恰当定义、含义使用，将其理解为具有不同的 D - 葡萄糖醛酸和 N - 乙酰基 - D - 葡萄糖胺残基、分子量不同的全系列多糖或其降解级分以及复数形式的“透明质酸”似乎更合适，但在本文中仍将继续使用其单数形式来表示各种形式的透明质酸，包括其分子级分，略语“HA”也常被用于表示这一综合术语。

1. 苺基酯衍生物

本发明的第一种优选材料基于透明质酸的苺基酯，特别是 80 - 100 % 酯，其中，80 - 100 % 的 HA 羧基被酯化。那些其中 80 - 99 % 的 HA 羧基被苺基所酯化的苺基酯被称为“偏酯”，因为仅有部分羧基被酯化，其余羧基是游离的或与碱金属或碱土金属如钠、钙或钾成盐。

本发明生物材料的最佳形式是所谓的“全”苺基酯，其中，所有的 HA 羧基均被酯化。在这种全酯中，所有的 HA 羧基可以被苺基酯化（也被称为 HYAFF11）或者部分（75 - 99 %）羧基可以被苺基酯化而所有剩余羧基被源于 $C_{10} - C_{20}$ 的脂族醇的脂肪链/烷基残基酯化以形成所谓“混合酯”。所述脂族醇中以棕榈醇（ C_{16} - 十六烷基）和硬脂醇（ C_{18} 十八烷基）为最佳。上述混合酯也可以为偏酯形式，即其中部分（75 - 99 %）羧基被苺基酯化而其余部分（而非全部）羧基被 $C_{10} - C_{20}$ 脂族醇所酯化的衍生物。其中，以至少 75 % 的羧基被苺基酯化，至少 5 % 的羧基被 $C_{10} - C_{20}$ 脂族醇酯化的偏酯为最佳。

本发明的透明质酸苺基酯可以用已知的羧酸酯化方法制备，例如，在有诸如强无机酸或酸性离子交换剂这样的催化物质的条件下用醇（苺基和/或 $C_{10} - C_{20}$ 醇）处理游离透明质酸，或在有无机或有机碱的条件下用能够引入所需醇残基的醚化剂处理。

不过，所述透明质酸苺酯可以用披露于 EP0216453 中的特殊方法制备。该方法包括用一种醚化剂处理透明质酸的季铵盐，特别是在非质子传递有机溶剂中进行。

为了制备所述苺基酯，可以使用任何来源的透明质酸，例如，从上述天然原材料如鸡冠状体中提取的酸。文献披露了这种酸的制备：优选使用纯化的透明质酸。根据本发明，特别使用包括全酸的分子级分的透明质酸，所述全酸是通过直接提取有机材料而获得，该有机材料分子量的变化范围很宽，例如是分子量为 13 百万的全酸的分子量的大约 90 - 80 %（ $M=11.7 - 10.4$ 百万）至 0.2 %

（ $M=30,000$ ），优选在 5 % - 0.2 % 之间。这种级分可用披露于文献中的各种方法获得，如通过水解、氧化、酶解或物理方法获得，所述物理方法如机械或辐射方法。因此，在上述纯化方法中通常会形成原始提取物（例如，参见上文引用的 Balazs 等的文章，

“Cosmetics & Toiletries”）。所获得的分子级分的分离和纯化是通过已知方法，例如，分子过滤完成的。

例如，一种适用于本发明的纯化 HY 级分是被 Balazs 称为“非

炎性 - NIF - NaHA 透明质酸钠的级分 (参见一本名称为 “Healon” —A guide to its use in Ophthalmic Surgery 的小册子) ” D. Miller & R. Stegmann , 著, John Wiley & Sons, N. Y., 81983:P5。

作为苄基酯的原料, 特别重要的是两种可从透明质酸中获得的纯化级分, 例如, 自鸡冠状体中提取的所述级分被称作

“Hyalastine” 和 “Hyalectin”。Hyalastine 级分的平均分子量大约为 50,000 ~ 100,000, 而 Hyalectin 级分的分子量为大约 500,000 ~ 730,000。已分离出上述两种级分的混合级分, 其特征是平均分子量为约 250,000~约 350,000。该混合级分可以特定原料中所能得到的总透明质酸的 80 % 的产率获得, 而 Hyalectin 级分的得率为原始 HA 的 30 %, Hyalastine 的得率为原始 HA 的 50 %。这些级分的制备披露于 EP 0138572 中。

以下实施例披露了 HA 苄酯的制备。

例 1 透明质酸 (HA) 苄酯的制备。

将相当于 20m. Eq. 单体单位的 12.4g 分子量为 170,000 的 HA 四丁铵盐溶于 620ml 温度为 25° 的二甲基亚砜中, 加入 4.5g (25m. Eq.) 苄基溴和 0.2g 碘化四丁铵, 将该溶液在 30° 下保温 12 小时。

在稳定的搅拌条件下将所得混合物缓慢注入 3,500ml 乙酸乙酯中。生成一种沉淀, 过滤该沉淀, 并用 500ml 乙酸乙酯将其洗涤 4 遍, 最后在 30° 下真空干燥 24 小时。

最后得到 9g 标题中的苄基酯产物。按照披露于 Siggia S. 和 Hann J. G. 所著的 “Quantitative organic analysis via functional groups” (第 4 版, John Wiley and Sons) 一书的第 169 - 172 页上的方法进行酯基的定量测定。

例 2 制备透明质酸 (HA) 苄酯

将 3g 分子量为 162,000 的 HA 钾盐悬浮于 200ml 二甲基亚砜中; 加入 120mg 碘化四丁铵和 2.4g 苄基溴。

将该悬浮液在 30 °C 下在搅拌状态下保持 48 小时。在稳定搅拌条件下将所得到的混合物缓慢注入 1,000ml 乙酸乙酯中。生成一

种沉淀，过滤该沉淀，并用 150ml 乙酸乙酯洗涤 4 遍，最后在 30° 下真空干燥 24 小时。

得到 3.1g 标题中的苺基酯产物。按披露于由 Siggia.S 和 Hanna J. G. 所著的 “Quantitative organic analysis via functional groups” (第 4 版, John Wiley 和 Sons) 一书的第 1698 - 172 页上的方法进行酯基的定量测定。

例 3 制备一种透明质酸的衍生物, 其 75 % 羧基官能团被苺基醇酯化, 而其余的 25 % 被十八烷醇 (硬脂醇, $\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_{16} - \text{CH}_2 - \text{OH}$) 酯化。

在室温下将 6.21g 分子量为 180,000Da (10mEq) 的透明质酸的四丁铵盐溶于 248ml 二甲基亚砷 (DMSO) 中。

上述溶液补充了 0.89ml 苺基溴 (7.5mEq), 并将该溶液在 30 °C 下放置 12 小时。然后将该溶液冷却至室温, 并补充 0.83g 十八烷基溴 (2.5mEq)。将该溶液加热至 30 °C 保持 24 小时。然后加入 2.5% (w/w) 的 NaCl 水溶液, 并在搅拌状态下将所得混合物加入 750ml 丙酮中。生成一种沉淀, 过滤该沉淀, 并用 100ml 5:1 的丙酮/水中洗涤 3 次, 用 100ml 丙酮洗涤 3 次, 然后在 30 °C 下在高真空中干燥 24 小时。由此得到 5.1 克想要的产品。苺基醇和十六烷基醇的含量的定量测定是通过在碱解后通过气相色谱完成的。按照披露于 “Quantitative Organic analysis via functional group” (第 4 版, John, Wiley and Sons 出版) 一书的第 169 - 172 页上的皂化方法定量酯基的总含量。

例 4 制备透明质酸衍生物, 其 75 % 的羧基官能团被苺基醇酯化, 其余的 25 % 被十六烷基醇 (鲸蜡醇, $\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_{14} - \text{CH}_2 - \text{OH}$) 酯化。

在室温下, 将 6.21g 分子量为 180,000 Da (10mEq) 的透明质酸四丁铵盐溶于 248ml 二甲基亚砷 (DMSO) 中。

向该溶液中补充 0.89ml 苺基溴 (7.5mEq), 并将该溶液在 30 °C 下放置 12 小时。然后将该溶液冷却至室温, 并补充 0.76g 十六烷基溴 (2.5mEq)。将该溶液加热至 30 °C 保持 24 小时。然后

加入 2.5%(w/w)的 NaCl 水溶液,并在搅拌条件下将所得混合物注入 750ml 丙酮中。生成一种沉淀,过滤该沉淀,并在 100ml 5:1 的丙酮/水溶液中洗涤 3 次,用 100ml 丙酮洗涤 3 次,然后在 30℃ 下,在高真空中干燥 24 小时。由此获得 5 克想要的产品。苄基醇和十六烷基醇的定量测定是通过在碱解之后通过气相色谱完成的。按照披露于“Quantitative organic analysis via functional group”一书(第 4 版, John Wiley and Sons 出版)的第 169 - 172 页上的皂化方法定量酯基的总含量。

2. 内部交联的透明质酸衍生物:

用于本发明材料中的交联的透明质酸衍生物披露于 EP 0341745 中。该交联衍生物是透明质酸的分子间和/或分子内酯,其中,部分羧基被透明质酸的同一分子和/或不同分子的羟基酯化,由此形成内酯键或分子间酯键。其中没有插入其它醇的 OH 基的这些“内”酯也可称作“自身交联的透明质酸”,因为单或多分子交联的形成是上述内部酯化的结果。形容词“交联的”是指透明质酸分子的羧基与羟基之间的交叉连接。

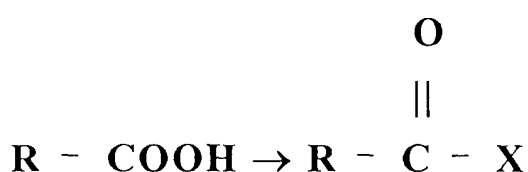
所述自身交联的产物特别是偏内酯,其中,交联键百分数优选为透明质酸中羧基数的 0.5-20%,特别是 4.5/5.0%。在所述制备方法中,通过加入能够引起激活反应的物质激活 HA 分子的羧基。加入催化剂之后和/或在提高温度之后,从上述激活反应获得的不稳定中间产物自发分离,与同一或其它透明质酸分子的羟基形成上述内酯键。根据需要的内酯化度,将全部或等分部分羧基官能团激活(所述等分部分是通过使用过量的激活物质或合适的调剂方法得到的)。

待转化成内酯基的羧基可以由含有游离羧基的透明质酸激活,或优选由含有盐化羧基的 HA 激活,例如,金属盐,优选为碱金属或碱土金属盐,特别是季铵盐,如下文所讲述的。不过,还可将与诸如胺的有机碱的盐用作原材料。

激活游离或盐化羧基的方法本身是已知的,特别是在肽合成领域,本领域技术人员可轻易确定哪一种方法最为合适,特别是确

定是否使用游离或盐化形式的原材料。例如，已知可用于肽合成方法并在本发明制备方法中有用的激活方法披露于以下文献中：

Bodanzkym, M., In Search of new Methods in peptide synthesis, Int. J. Peptide Protein Res. 25, 1985, 449-474; 和 Gross, E. 等, The Peptides, Analysis Synthesis, Biology, Academic Press, Inc., 1979, Vol. 1, Chapter 2. 根据上述方法，将一个羧基部分激活，即将一个羧基转换成活性形式。这种激活通常涉及一种酸与一种激活剂之间按照下式进行的反应：



其中，X是吸电子基团。因此，羧酸的大部分激活衍生物是混合酐，广义地讲还包括酰基叠氮和酰基氯，二者可被视为作为活化剂的叠氮酸和HCl的混合酐。另外，羧基组分的激活可通过生成中间“活化酯”而实现。上述“活化酯”可以是各种类型的，但特别有用的“活化酯”是用二环己基碳化二亚胺、对硝基苯酯、三氯苯酯、五氯苯酯，以及羟胺的O-乙酰基衍生物，特别是N-羟基琥珀酰亚胺的酯制备的。

上述各种类型的激活方法均可用于制备本发明的交联的HA，因为上述所有方法的重要特征涉及羧基与激活剂的反应，该反应主要是导致易与羟基反应的取代基的形成，以便易于产生本发明产物的内酯键特征，可被转化成内酯的羧基官能团数与活化的羧基官能团数成正比，而该数目取决于所用激活剂的质量。

因此，制备交联HA的优选方法的特征是，用一种能激活羧基功能的制剂处理具有游离的或盐化的羧基的HA，可能在有利于中间活化衍生物生成的助剂和/或叔有机或无机碱的条件下进行；对该混合物进行加热或辐射（特别是用紫外线）处理；如有必要的话，盐化游离羧基或游离盐化的羧基。作为可以激活羧基的物质，可以使用披露于文献中的常用类型的，例如，常用于肽合成的物质，不过，会改变或破坏起始HA的分子结构的物质除外，如用于

产生羧基卤化物的物质。例如，能导致活化酯生成的优选物质有：碳化二亚胺、二环己基碳化二亚胺、苄基异丙基碳化二亚胺、苄基-乙基-碳化二亚胺；乙氧基乙炔；Woodward's 试剂（N-乙基-5-苄基异噁唑啉-3-磺酸）或脂族、环脂族或芳香烃的卤素衍生物，或从通过一个或多个活化基的存在而使其流动的含卤素的杂环化合物得到的卤素衍生物，所述活化基例如氯乙腈基，特别是2-氯-N-烷基吡啶的盐如2-氯-N-甲基-吡啶的盐酸盐或其它具有低级烷基的烷基衍生物，如具有至多6个碳原子的烷基。当然可以使用其它卤素衍生物，如溴化衍生物取代上述氯化衍生物。

该活化反应可以在有机溶剂中进行，特别是在诸如二烷基亚砷、二烷基羧基酰胺的非质子传递溶剂中进行，如在特别低的烷基二烷基亚砷中进行，特别是二甲基亚砷，聚亚甲基亚砷如四亚甲基亚砷，二烷基或聚亚甲基砷如四亚甲基砷，环丁砷和低级脂族酸的低级烷基二烷基酰胺（其中，所述烷基最多有6个碳原子，如二甲基或二乙基甲酰胺或二甲基或二乙基乙酰胺）。不过，也可使用其它溶剂，并非总是必须为非质子传递溶剂，如醇、醚、酮、酯，如低级脂族二烷氧基氢碳化物，如二甲氧基乙烷，特别是脂族或杂环醇和低沸点的酮，如低级N-烷基-吡咯烷酮，如N-甲基吡咯烷酮或N-乙基-吡咯烷酮，六氟异丙醇和三氟乙醇。如果将卤素衍生物，特别是盐式卤素衍生物，如上述2-氯-N-甲基氯化吡啶鎓用作羧基活化物质，最好使用起始多糖的金属盐或有机碱的盐，特别是下文披露的季铵盐之一，如四丁铵盐。这种盐的特别优点是极溶于上述有机溶剂，所述交联反应在该溶剂中可得以最佳实施，由此确保较高的产率。建议向该混合物中加入能够扣除酸的物质，如有机碱、碳酸盐、碳酸氢盐或乙酸碱金属或碱土金属盐，或有机碱，特别是叔碱如吡啶及其同系物，如可力丁，或脂族胺碱，如三乙胺或N-甲基-哌嗪。

最佳方法是使用季铵盐。这种铵盐众所周知，并以与制备其它已知盐的相同方法制备。其由优选具有1-6个碳原子的烷基衍生

而来。优选使用四丁铵盐。使用季铵盐的上述方法的变型之一在于，在有催化量的季铵盐，如碘化四丁铵的条件下使碱性盐，如钠盐或钾盐反应。

待加入活化剂中、能催化羧基活化的物质在文献中有记载，这些物质同样优选为上文提及的碱。因此，例如，当羧基被异噻唑啉盐激活时，优选向反应混合物中加入某些三乙胺。

生成活化中间产物，例如，特别是酯的反应是在文献中推荐的温度下进行的，不过，该温度可以因环境不同而改变，正如可由本领域技术人员所轻易确定的。实际上，内酯键的生成可在很宽的温度范围内进行，例如，在 $0 - 150^{\circ}$ 之间，优选为室温或略高于室温，例如 $20 - 75^{\circ}$ 。提高温度有利于内酯键生成，用合适波长的辐射，如紫外线辐射也是如此。

透明质酸基质可以为任何来源，并可以为上述各种类型。优选 HA 原料的平均分子量为 $150,000 - 730,000\text{Da}$ ，特别是 $150,000 - 450,000\text{Da}$ 。

另外，内部交联量可以变化，但本发明的优选材料使用有 $4.5 - 5.0\%$ 的羧基发生交联的 HA。

以下的实施例披露了可用于生产本发明材料的交联 HY 制品的制备。

例 5 制备 1% 交联的透明质酸 (HA)

产物描述：

1% 羧基用于内酯化。

99% 羧基与钠成盐。

将分子量为 $170,000$ 、相当于 10mEq 的单体单位的 6.21g HA 四丁铵盐在 25°C 下溶于 248ml DMSO 中，加入 0.01g (0.1mEq) 三乙胺。

例 6 制备 5% 交联的透明质酸

产物描述：

5% 羧基用于内酯化。

95% 羧基与钠成盐。

将分子量为 85,000、相当于 10mEq 的单体单位的 HA 四丁铵盐在 25℃ 下溶于 248ml DMSO 中，加入 0.051g (0.5mEq) 三乙胺，并将所得溶液搅拌 30 分钟。

将由 0.128g (0.5mEq) 2-氯-1-甲基碘化吡啶鎓溶于 60ml DMSO 中组成的溶液缓慢滴加进去，用时 1 小时，并将该混合物在 30℃ 下保持 15 小时。

然后加入由 100ml 水和 2.5g NaCl 组成的溶液，再将所得混合物缓慢注入 750ml 丙酮中，并保持连续搅拌。生成一种沉淀，滤出沉淀，并在 5:1 的丙酮水中洗 3 次，再用 100ml 丙酮洗 3 次，最后在 30° 下真空干燥 24 小时。

得到 3.95g 标题中化合物。按照披露于 “Quantitative Organic Analysis Via Functional Groups” (第 4 版, John Wiley and Sons Publication) 一书的第 169 - 172 页上的皂化方法对酯基进行定量测定。

例 7 制备 10 % 交联的透明质酸 (HA)

产物描述:

10 % 羧基用于内酯化。

90 % 羧基与钠成盐。

将相当于 10mEq 单体单位的分子量为 620,000 的 HA 四丁铵盐 6.21g 在 25℃ 下溶于 248ml DMSO 中。加入 0.101g (1.0mEq) 三乙胺，然后将所得溶液搅拌 30 分钟。

将由 0.255g (1.0mEq) 2-氯-1-甲基-碘化吡啶鎓溶于 60ml DMSO 中组成的溶液在 1 小时内缓慢滴加进去，并将该混合物在 30℃ 下保持 15 小时。

然后加入由 100ml 水和 2.5g NaCl 组成的溶液，再将所得混合物缓慢注入 750ml 丙酮中，保持连续搅拌。生成一种沉淀，过滤该沉淀，并用 100ml 5:1 的丙酮水洗 3 次，再用 100ml 丙酮洗 3 次，最后在 30℃ 下真空干燥 24 小时。

得到 3.93g 标题化合物。按照披露于 “Quantitative Organic Analysis Via Functional Groups” (第 4 版, John Wiley and Sons Publication)

一书的第 169 - 172 页上的皂化方法对酯基进行定量测定。

例 8：制备 10 % 交联的透明质酸 (HA)

产物描述：

10 % 羧基用于内酯化。

90 % 羧基与钠成盐。

将相当于 10mEq 单体单位的分子量为 170,000 的 HA 四丁铵盐 6.21g 在 25 °C 溶于 248ml DMSO 中，加入 0.118g (1mEq) 氯化吡啶，并将所得溶液搅拌 30 分钟。

用 1 小时时间将溶于 20ml DMSO 中的 0.16g (mEq) N - 苄基 - N - 乙基碳化二亚胺溶液缓慢滴加到上述溶液中，并将该混合物在 30°下保持 45 小时。

加入由 100ml 水和 2.5 NaCl 组成的溶液，并将所得混合物缓慢注入 750ml 丙酮中，保持连续搅拌。生成一种沉淀，过滤该沉淀，并用 100ml 5:1 的丙酮/H₂O 洗涤 3 次，再用 100ml 丙酮洗 3 次，最后在 30°下真空干燥 24 小时。

得到 3.9g 标题化合物。按照披露于 “ Quantitative Organic Analysis Via Functional Groups ” (第 4 版, John Wiley and Sons 出版) 一书的第 169 - 172 页上的皂化方法定量测定总酯基。

3. 制备生物材料：

以下实施例披露了本发明手术/保健用品的制备，所述用品包括 HA 的总苄基酯或自身交联的 HA 衍生物，或其组合。如上所述，用于制备膜、机织织物、机织网状物和非织造织物的方法披露于以下专利中： US 4,851,521; US4,965,353, WO93/11804; WO93/11803; WO94/17837 和 EP0341745 .

例 9 制备一种基于 HYAFF 11 + 聚丙烯网状物的产品

制备由 HYAFF 11 (透明质酸的 100 % 苄基酯) 溶于 DMSO 中的溶液 (110mg/ml) 。一旦溶解结束，通过 20µm 的滤布过滤该溶液，并将其在真空中放置 2 小时脱气。倾出 5ml 该溶液，并将其涂布在玻璃板上，然后将聚丙烯网状物 (6 × 11cm) 放在上面，再将 10ml 该溶液倾在其上面。将其均匀涂布在网状物上，并清除所有多余的溶液。

将所述玻璃板浸入含有乙醇/H₂O (90 : 10) 的浴槽中 5 小时, 以使该制剂凝聚并使该玻璃板脱除; 然后将该制剂浸入无水乙醇中 16 小时。然后将其放在一块板上, 在 63 °C 下在真空中干燥 30 分钟。

例 10 制备覆有一层 HYAFF 11 薄膜的基于 HYAFF 11 机织织物的制品

制备由 HYAFF 11 和 DMSO 组成的溶液 (110µg/ml)。一旦完成溶解作用, 通过 20µm 滤布过滤该溶液, 并将其放置在真空中脱气 2 小时。将 5ml 溶液倾出, 并将其涂布在玻璃板上, 然后将 HYAFF 11 纱布 (10 × 20cm) 放在上面, 小心使其粘合, 不产生任何皱折或空气泡, 再将另外 10ml 溶液倾在它上面。将该溶液均匀涂在纱布上, 并除去所有多余溶液。

将上述玻璃板浸入装有乙醇的浴槽中 30 分钟, 使该制剂凝聚, 并使该玻璃板脱除。然后将该制剂在乙醇中放置 16 小时, 并在 63 °C 下, 在一块板上, 在真空条件下干燥 30 分钟。

例 11 由 HYAFF 7 加强的 HYAFF 11 膜

按照如下方法制备一种复合膜, 它包括透明质酸苄酯 HYAFF 11, 即用苄基醇 100 % 酯化的透明质酸, 以及包括透明质酸乙酯 HYAFF 7 (即用乙醇 100 % 酯化的透明质酸) 的网状物加强层, 该复合膜定量为 14mg/cm², 0.25mm 厚、在干燥状态下的最小断裂抗拉强度和伸长量分别为 400kg/cm² 和 7 %, 在湿润条件下的最小抗拉强度和伸长量分别为 50kg/cm² 和 55 %, 在干燥状态下的撕裂强度为 90kg/cm², 在湿润状态下的撕裂强度为 50kg/cm²。

由浓度为 125mg/ml 的 HYAFF 7 二甲基亚砷溶液获得 HYAFF 7 网状物。用一台齿轮计量泵将所述溶液输入用于湿挤压的由 100 个孔组成的喷丝头中, 每个孔的直径为 65µm。

将挤出的多重丝送入含无水乙醇的纺丝浴 (coagulation bath) 中, 然后通过输送辊进行 3 个连续的同样装有无水乙醇的漂洗浴中。第 3 个辊 (III) 与第 1 个辊 (I) 的速度之比被称作牵伸比, 其值为 1.05, 而单个辊的速度分别为: 23rpm (辊 I)、24rpm (辊 II 和 III)、25rpm (辊 IV)。一旦复合丝从漂洗浴中通过, 用 45 °C 的暖空气使其干燥, 并卷绕到卷绕架 (8) 上。所述丝为 237 旦。然后将该丝每米加捻 135 次, 并在一台织机上将其织成 14 号的光滑的针织物。从织机中出来的织物进入

一台压延机，以使其变薄。图 2 表示由上述方法制成的网状物。

通过两个气刷涂布聚合物基质，由所述气刷喷涂浓度为 40mg/ml 的 HYAFF 11 在二甲基砒中组成的溶液。由此喷涂过的网状物通过含有无水乙醇的纺丝浴，并通过装有纯蒸馏水的漂洗室，再进入温度为 50℃ 的特殊干燥室（17）。

例 12 由 HYAFF 11 组成的非织造织物

通过以下方法制备一种含有透明质酸苄酯 HYAFF11 的非织造织物，其重量为 40g/mq，0.5mm 厚。

在一个槽中制备浓度为 135mg/ml 的溶于二甲基亚砒中的 HYAFF11 溶液，并用一台齿轮计量泵将其输入用于湿挤压的喷丝头，该喷丝头由 3000 个孔组成，每个孔为 65 μ m。

挤出的丝团进入含有无水乙醇的纺丝浴中。然后通过输送辊进入 2 个连续的装有无水乙醇的漂洗浴中。第一辊的牵伸比被设定为 0，而其它辊之间的牵伸比设定为 1.05。一旦其通过了漂洗浴，即用温度为 45 - 50℃ 的热空气将丝束吹干，并用辊割刀将其切成 40mm 长的纤维。

由此获得的纤维团被倾入通向梳理/交叉卷板机的槽里，当其从上述机器中出来时成为厚 1mm，重 40mg/mq 的织物。然后用由 HYAFF 11 和二甲基亚砒组成的浓度为 80mg/ml 的溶液喷涂所述织物，放入乙醇纺丝浴中，浸入漂洗室中，并最终放在干燥室中。

该材料的最终厚度为 0.5mm。

例 13 由 HYAFF 11 和 HYAFF 7 组成的非织造织物

通过以下方法获得重 200g/mq、厚 1.5mm 的非织造织物，该织物包括等量的透明质酸乙酯即 HYAFF 7，和透明质酸苄酯即 HYAFF 11 组成的混合物。

在一个螺旋式混合器中充分混合通过例 10 所述纺丝方法获得的长 3mm 的 HYAFF 7 和 HYAFF 11 的纤维。将该纤维混合物输入梳理机中，由该梳理机出来时成为厚 1.8mm、重 200g/mq 的织物。

将该织物放入针刺机中，将其转变成厚 1.5mm、重 200g/mq 的非织造织物，使两种材料完美地混合在一起。

例 14 偏苄酯和全苄酯的非织造织物

通过以下方法制备重 40g/mq、厚 0.5mm 的非织造织物，该织物包括等百分比的透明质酸苄酯 HYAFF 11 和透明质酸偏（75 %）苄酯 HYAFF 11p75 组成的混合物。

HYAFF 11p75 的制备如下。将 10g 透明质酸四丁铵盐，MW=620.76，相当于 16.1nmole，溶于由 N-甲基吡咯烷酮/H₂O，90/10，2.5%（重量）组成的混合物中，得到 400ml 溶液。将该溶液冷却至 10℃，然后用纯化 N₂ 鼓泡通过该溶液，历时 30 分钟。然后用 1.49ml（相当于 12.54mmole）苄基溴酯化该溶液。在 15 - 20℃ 下将该溶液轻轻振荡 60 小时。

随后的纯化是这样进行的：加入 NaCl 饱和溶液后在乙酸乙酯中沉淀，然后用 80/20 的乙酸乙酯/无水乙醇混合物洗涤。过滤分离出固相，并用无水丙酮处理。由此获得 6.8g 产物，相当于产率约为 95 %。

在一个螺旋式混合器中充分混合用例 1 所述方法获得的 40mm 长的 HYAFF 11 和 HYAFF 11p75 纤维。

将该混合纤维输入梳理机中，该梳理机将其制成厚 1mm、重 40mg/mq 的织物。然后用由 HYAFF11 和二甲基亚砷组成的浓度为 80mg/ml 的溶液喷涂该织物，将其放入乙醇纺丝浴中，再放入含有水或比例为 10 - 95 % 乙醇的水和乙醇混合物的漂洗室里，最后放入干燥室里。

该材料的最终厚度为 0.5mm，并且 HYAFF 11 和 HYAFF11p75 纤维完美地混合并粘接在一起。

例 15 基于 HYAFF 11 的多层非织造织物

通过以下方法获得一种多层非织造织物，该织物由一层透明质酸苄酯 HYAFF11 和一层非织造粘胶（得自 ORSA 的 Jettex 2005）组成，其定量为 80g/mq，厚 2mm，吸水百分比为 560 %（重量）。

要接触皮肤的那层包括由湿纺技术生产的 HYAFF11 纤维，形式为 30g/mq 的片材。将纤维制成片材。

通过缝合将该层连接于定量为 30g/mq 的第二层非织造粘胶织物上。

由此获得的最后的非织造产品包括两个完美的粘合的层，其总定量为 80g/mq，厚 2mm，吸水百分比为 560 %（重量）。

例 16 基于 HYAFF 11 的多层非织造织物

通过以下方法制备一种多层非织造织物，该织物包括由透明质酸苄酯 HYAFF11 和藻酸钙以 1: 1 的比例组成的混合层，以及一种聚丙烯加强非织造织物（纺粘非织造基，50g/mq，购自 NEUBERGER），其定量为 70g/mq、厚 1.5mm，吸水百分比为 450 %（重量）。

混合用常规湿纺技术获得的长 40mm 的 HYAFF 11 纤维，将其制成 20g/mq 的片材，通过缝合使其接合于定量为 50g/mq 的纺粘非织造织物。

所得到的材料包括两层非织造织物，总定量为 70g/mq，厚 1.5mm，吸水百分比为 450 %（重量）。

例 17 基于 HYAFF 11 的多层非织造织物

通过以下方法得到一种多层非织造织物，其包括一层透明质酸苄酯 HYAFF11 和一层诸如 LYOBEND（得自 DELCON）的聚亚胺酯泡沫，其定量为 100g/mq，厚 6mm，吸水百分比为 860 %。

将与皮肤接触的那层包括用湿纺技术制成的 HYAFF11 纤维，并将其制成 45g/mq 的片材，通过缝合使其结合于第二层聚亚胺酯泡沫上。

所得到的非织造产品包括两个完美粘合在一起的层，其总定量为 100g/mq，厚为 6mm，吸水百分比为 860 %。

例 18 制备一种由透明质酸衍生物制成的膜，所述透明质酸 80 % 的羧基官能团被苄基醇（ $C_6H_5 - CH_2 - OH$ ）酯化，10 % 的羧基官能团参与内酯键的形成，其余 10 % 与钠成盐。

将 6.21g 分子量为 180,000Da（10mEq）的透明质酸四丁铵盐在室温下溶解于 248ml 二甲基亚砜（DMSO）中。向该溶液中加入 0.951ml 苄基溴（8.0mEq），并将该溶液在 30℃ 下放置 12 小时。加入 0.101g 三乙胺（1.0mEq），并搅拌该溶液 30 分钟。将由 0.255g（1.0mEq）2-氯-1-甲基-碘化吡啶溶于 60ml DMSO 中组成的溶液加入，并在 30℃ 下将该混合物放置 15 小时。

加入 2.5 %（w.v）的 NaCl 水溶液，并将所得混合物倾入 750ml 丙酮中，同时搅拌。生成一种沉淀，过滤该沉淀，并用 100ml 5: 1 的丙酮/水将其洗 3 次，用 100ml 丙酮洗 3 次，并最终在 30℃ 下真空干燥 24 小时。由此获得 4.5g 需要的产物。在碱解后通过气相色谱定量测定苄基醇的含量。按照披露于“Quantitative analysis via functional groups”（第 4 版，

John Wiley and Sons 出版) 一书的第 169 - 172 页上的皂化方法测定总酯基含量。

将由此制成的酯衍生物在 30 °C 下溶于 DMSO 中, 使其浓度为 150mg/ml。通过 20 μ m 的网状物过滤溶解的衍生物, 并放入与厚度<1mm 的薄膜挤出机连接的挤压反应器中。该产品被挤入装有能从产品中萃取出 DMSO 的溶剂(如乙醇)的纺丝浴中, 并将来自薄膜挤出机的材料卷缠到一系列装有风扇的辊上, 以干燥所述膜。

临床前研究

以下研究报道了显示本发明制品在预防手术后粘连方面的用途的结果, 并给出了表示该制品相对现有制品的改进的结果。

研究 1

该研究证实了在一种大鼠肝中诱发的损伤的模型中观察到的手术后粘连的高发生率, 将其作为阳性对照与源于 HA 的保健和手术用品在预防粘连发生方面的作用进行比较。

在这些实验中, 使用重 275 - 300g 的 Sprague Dawley 大鼠。使 21 只动物受伤。

在无菌条件下制备氯胺酮 100mg/kg 和塞拉嗪 11mg/kg 稀释液, 通过肌肉注射麻醉动物, 然后切腹对每只动物施行剖腹术。

对其肝脏进行定位并使其外露, 通过用无菌止血塞施加轻微压力在肝的下叶上产生擦伤, 直到血被吸出。在对创面止血后用型号为 3.0 的丝缝线缝合切口。7 - 21 天后杀死这些动物。

基于以下指标, 按照可用手术钳将所述肝叶的相邻表面(上和下表面)分开的难易程度评价粘连:

- 0 无粘连 — 可将两表面分开
- 1 轻度 — 中度粘连, 用手术钳可将两表面拉开;
- 2 两表面间的明显粘连, 任何将其分离的努力均会导致组织的撕裂;

在该动物模型中, 被定为 2 级的粘连被视为临床上显著。

在该阳性对照组(粘连发生), 21 只动物中的 17 只(80.9%)出现 2 级粘连。

研究 2

该研究证实了当单独或与止血 Surgicel™ 和肝素 50IU/ml 一起使用由交联的透明质酸 (ACP) 制成的凝胶或基于 HYAFF11 (HA 的苄酯) 时可明显减少粘连发生。将 ACP 凝胶涂在待治疗的表面。

将例 1 所述手术方案作为诱发粘连生成的动物模型。

在表 1 中示出了肝左叶相邻表面之间粘连生成的明显减少。

表 1

材料	动物数	明显粘连 (2 级) 的 %
HYAFF 11 机织织物	6	50 %
HYAFF 11 机织织物 + Surgicel™	6	16 %
HYAFF 11 机织织物 + Surgicel™+肝素	6	16 %
HYAFF 11 机织织物 + 肝素	6	33 %
HYAFF 11 膜 (20mm 厚)	11	36 %
HYAFF 11 非织造织物 + Surgicel™	6	33 %
ACP	24	20 %

可以看出, 用这种缓慢的生物可靠的生物材料作为两相邻表面间阻隔炎性细胞的屏障, 可降低粘连的发生, 而例 1 所述对照组的粘连发生为 80.9 %。

研究 3

该例证实了在一种大鼠腹壁上诱发的手术损伤模型中观察到的手术粘连发生的高发生率, 将其作为阳性对照, 与由本发明 HA 衍生物 (HYAFF11 + 聚丙烯网状物) 组成的保健品在预防粘连发生方面的作用进行比较。

共使 24 只动物 (12 只对照, 12 只试验) 受伤。

在无菌条件下制备氯胺酮 100mg/kg 和塞拉嗪 11mg/kg 稀释液, 通过

肌肉注射麻醉动物，然后通过切腹对每只动物施行剖腹术。

用两个手术钳支起切口左边的皮片，以使腹壁外露。用手术剪切除 $1.5\text{cm} \times 1.5\text{cm}$ 的腹膜表面，直到出现渗出液，但不切除肌肉束。在对照组中，为了确保腹壁的抗张能力，必须用型号为 6.0 的可生物吸收的 Vycil 缝线将聚丙烯网状物（大小为损伤部位的两倍）缝在受伤表面上。在使用材料之前，必须对创面进行彻底止血。

在第 14 天（即例 1 所述期间的中间时刻）杀死动物，然后按以下等级评价粘连：

- 0 无粘连发生；
- 1 无血管生成的轻度粘连，可轻易分离；
- 2 无血管生成的中度粘连，可用手工拉开；
- 3 牢固的粘连，不透明且有血管生成，难于分离，需要使用手术刀；
- 4 很牢固的粘连，厚、不透明且生成血管，只能用手术剪切开，因此会破坏组织。

大于 2 级的粘连被视为显著。

在阳性对照组（粘连发生）中，所有 12 只动物（100 %）均出现 2 级以上的粘连；如表 2 所示，当使用本发明的产品时，腹壁与内脏之间粘连的发生率显著降低。

表 2

材料	动物数	显著粘连（2 级）的 %
HYAFF 11 + 聚丙烯网状物	12	25 %
对照 - 聚丙烯网状物	12	100 %

可以看出，将所述本发明的 HYAFF 11 材料用作受伤的内表面与相邻器官之间的屏障（不能透过炎性细胞），可减少粘连的发生，形成对照的是，在仅用聚丙烯网状物处理的对照组中 100 % 发生粘连。

研究 4

该研究证明了在其盲肠受损的大鼠模型中，凝胶状的自身交联透明质酸（ACP）在被用作涂层时可减少手术粘连的发生。

正如随后将要披露的，当仅作盐水漂洗和止血处理时，这种类型的损伤会导致粘连的发生。

与例 1 一样，使用重 275 - 300g 的 Sprague Dawley 大鼠。在无菌条件下制备氯胺酮 100mg/kg 和塞拉嗪 11mg/kg 稀释液，通过肌肉注射将动物麻醉，然后通过切腹对每只动物施行剖腹术。定位盲肠并使其外露。用直径 1cm 的铜片使带有一固体的盲肠的表面受到热损伤，该铜片与一个焊接用具连接，并通电调温至 69.5 °C。让铜片与肠表面接触 15 秒。形成一个界限分明的受损部分，有渗出液流出。在用盐水漂洗受损部位后，用 Surgicel™ 止血，用型号为 3.0 的丝缝线缝合切口。

在 14 天（即例 1 所述期间的中间时刻）杀死动物后，按以下等级评价粘连：

0 无粘连；

1 轻度粘连，无血管生成，可轻易分离；

2 中度粘连，无血管生成，可用手工拉开；

3 牢固粘连，不透明且生成血管，难于分离，需要使用手术刀；

4 很牢固的粘连，厚，不透明且有血管生成，只能用手术剪切开，

结果会损伤组织。

在该动物模型中，将 2 级以上的粘连视为显著。

与仅用盐水漂洗和止血的对照相比，当把 ACP 凝胶用作屏障时可明显减少粘连的发生（表 3）。

表 3

材料	动物数	显著粘连（2 级）的 %
对照（盐水 + 止血）	17	70 %
ACP	11	40 %

可以看出，与仅用盐水漂洗和止血的对照相比，将所述材料用作屏障可减少粘连的发生。

研究 5 透明质酸衍生物 HYAFF - 7 和 HYAFF 11p75 在预防大鼠肝损伤

模型中的手术后粘连方面的作用

动物模型:

雄性 Harlan SD 大鼠, 重 250g。

损伤类型:

用碘液彻底清洁腹面, 然后切出约 3cm 的切口, 以露出肝脏。通过摩擦使肝的右下叶受损, 并用无菌木制药刀形成损伤, 直至出血。

试验材料:

实验 1: HYAFF 11p75, 纱布和非织造织物形式的透明质酸 75 % 偏苄酯。

实验 2: HYAFF 7, 纱布和非织造织物形式的透明质酸全乙酯。

材料的使用: 在用常规方法进行认真止血后, 将试验和对照材料放在下(创面)与上肝叶(相邻表面)之间, 不使用缝线, 以产生屏障作用, 并预防粘连发生。

评价和观察:

在手术后第 7 - 21 天之间进行观察。根据以下目测等级评价粘连的生成:

0= 无粘连

1= 轻度粘连

2= 明显存在粘连

除了通过粘连等级评价以外, 通过显微镜观察评价发炎程度(对使用材料的组织反应), 用苏木精/洋红和 Mallory's 三重染剂对组织学样品进行染色。

结果

实验 1:

对基于 HYAFF11p75 即透明质酸的偏苄酯的材料进行单独试验, 与 Surgicel 止血药混合试验, 并与止血药加上肝素饱和液 (1,000Uml) 混合试验。上述程序是外科学中的常用方法。

图 1 是表示单独使用所述生物材料时其性能的图示。在使用基于 HYAFF 11p75 和 Interceed 的生物材料时, 未发现预防粘连方面的效果, 在后一种情况下尽管无显著差别, 但似乎有好转趋势, 但肝叶完全粘连,

并能见到显著的炎性反应。在进行活组织检查的组织学观察时发现了相同的结果。其中，可以见到炎性细胞，嗜中性细胞和巨噬细胞和成熟胶原纤维。

在图 2 和 3 中，将所述材料与 Surgicel 和 Surgicel + 肝素组合使用。用基于 HYAFF 11p75 的材料证实了图 1 中观察到的倾向，但用肝素饱和的 Interceed 似乎效果更好。这种现象被组织学观察所证实。

总之，基于 HYAFF 11p75 的材料不能用于预防手术后粘连，因为所述炎性作用可能是由于低分子量透明质酸寡聚体的释放所至，鉴于该产品的降解时间极短。

实验 2

在实验 2 中，与 Surgicel 和 Surgicel + 肝素组合后对基于 HYAFF7 即透明质酸乙酯的生物材料进行了试验。在每一种情况下均未见到在预防手术后粘连方面的作用。与 Surgicel + 肝素一起使用的 Interceed 似乎更为有效（图 4）。

显微观察证实了上述结果，并显示，在用 HYAFF 7 治疗时释放出了大量的炎性细胞和胶原纤维。在这种情况下，基于 HYAFF 7 的生物材料最终不能用于预防手术后粘连，因为似乎有乙醇逐渐释放到机体内。

研究 6 基于 HYAFF 11 的生物材料在两种诱发损伤的不同动物模型中在预防手术后粘连方面的效力： 1) 大鼠的肝内擦伤； 2) 大鼠腹壁损伤动物模型 1

在用碘和乙醇对腹区进行消毒后，切开一个近中切口，使肝脏外露。

在该动物模型中，刮擦下肝叶的内表面，直到开始出现渗出液。用 Tabotamp(Ethicon)对受到擦伤的部位进行认真止血，并将所述材料放在受伤的表面上，不使用缝线，因为该产品具有高粘特性。

对两种基于 HYAFF 11 的制品进行试验，两种制品的商品形式为 20 μ m 厚的连续膜，被称为 Transprocess 和 Hyalobarrier 20。手术后 14 天进行肉眼检查，用上述分级系统确定粘连。进一步评价粘连为 2 级（显著粘连）的动物的百分比。

结果

图 5 是在上述实验中获得的粘连等级的图示。与未处理的对照和用高

- 和低-分子量的透明质酸进行的两种处理相比, Hyalobarrier 20可减少粘连发生的发生率。记录到了类似的结果, 不过从统计学上看, 与使用另一种 HYAFF 11 基材料即 Transprocess 无明显差异。

图 6 表示在每一处理组中 2 级粘连(手术上明显的粘连)的百分比。在这里再次证实了前面的图示(图 1)显示的倾向, 2 级粘连减少(对于 Hyalobarrier 20 和 Transprocess 处理来说, 其百分比低于 50 %。)

动物模型 2

用碘和乙醇对腹区进行消毒, 然后切开一个约 5cm 长的正中切口, 以露出腹壁和腹膜。

用手术刀切出 2cm × 2cm 的切口, 取出腹膜和肌肉层。在这种类型的手术中, 必须用一种材料缝合创面, 以利于组织生长, 同时确保适当的抗拉强度, 以防腹膜壁萎缩。通常, 使用带聚合物基质的非降解材料, 如聚丙烯、聚酯或膨胀的聚四氟乙烯网状物。然而, 单独使用上述材料不足以避免与肠环形成粘连, 结果造成肠阻塞和慢性疼痛。

在手术后 14 天进行肉眼评价, 使用 0 - 4 级的粘连分级标准。进一步评价 2 级以上粘连(明显粘连)动物的百分比。

结果:

该实验证实了合成 Prolene 网状物(聚丙烯网状物, 广泛应用于腹部手术)上的 HYAFF 11 涂层和缝合在 Prolene 网状物上的一层 HYAFF 11 可减少手术后粘连的发生。图 7 表明, 与仅用 Prolene 网状物相比, 被称为 Hyalobarrier Plus (HYAFF 11 涂布并凝聚在 Prolene 上)的组合制品和缝合在 Prolene 上的 Hyalobarrier 薄膜可显著减少粘连。图 8 证实了这一倾向, 在用 HYAFF 11 处理后 2 级以上粘连(显著粘连)的百分比低于仅用 Prolene 网状物处理的。

研究 7 在大鼠肝损伤模型和大鼠肠损伤模型中, ACP 凝胶生物材料在预防手术后粘连形成方面的作用。

该研究的目的是评价 ACP 凝胶基生物材料在减轻或预防手术后粘连发生方面的效果。对照高分子量透明质酸和市售生物材料 Oxidized Regenerated Cellulose (TC7 Interceed*)评价试验材料在用于腹部骨盆和妇科手术中预防粘连发生时的性能。

使用一种大鼠肝损伤模型和大鼠肠烧伤模型，因为它们是实验粘连诱导的典型模型。通过粗略观察损伤部位，用粘连等级评价试验材料和对照材料在预防手术后粘连方面的效果。

采用大鼠肝损伤模型（实验1）和大鼠肠损伤模型（实验2），因为它们是实验粘连诱导的标准化可再生模型。受伤后用 ACP 基生物材料作为肝叶与内脏相邻表面之间的屏障。

在两个实验中，评价 ACP 凝胶预防或减轻粘连发生的效果，通过与一种广泛用于临床实践的吸收性 Oxidized Cellulose 粘合屏障即 TC 7 Interceed、一种共聚溶液“Thermogel”、一种高分子量透明质酸溶液和一组未处理动物（模拟手术）进行比较。

实验1 大鼠肝擦伤

试验材料:

	1	2
产品代号	SMK 0002	SMK 0002
通用名	ACP 凝胶	ACP 凝胶
商品名	Hyalogel Barrier	Hyalogel Barrier
供应商	FAB	FAB
批号	101/96	104/96
有效期	20 - 02 - 96	20 - 02 - 96
保存	30 ℃ 以下	30 ℃ 以下
注意	无	无

以 60mg/ml 的浓度将 ACP 凝胶悬浮于水中。通过高压灭菌对所提供的试验材料进行灭菌，将入 5ml 注射器中，并在无菌条件下操作。在用 Tabotamp[®]对擦伤的肝叶表面止血后将 ACP 作为涂层涂在肝叶上。每只动物接受足以完全覆盖受损面的量（约 2ml）的 ACP 凝胶，在手术时一次使用。

对照材料:

	1	2	3
商品名	TC7 Interceed*	HYAL	Thermogel
生产商/ 供应商	Johnson & Johnson Patient Care, New Brunswick, NJ	FAB	BASF Pharma
说明	氧化再生的纤维素屏障	透明质酸 (M. W. 800,000)	Pluronic Acid
批号	2710TCM	0108 st	1/95
有效期	11 - 97	05 - 97	- -
保存	30°以下	30 以下	8 ℃ 以下
注意	无	无	

在无菌操作条件下切割 Interceed，单独使用并在肝素（500U/ml）中饱和后使用，以便保持肝叶的两相邻表面分离，使其尺寸超出受伤面范围几个毫米。HYAL 即高分子量透明质酸（以 10mg/ml 的浓度溶于水中）和 Thermogel 以装在无菌注射器中的形式购买。

直接使用 Interceed，无须手术缝合。在止血后用注射器将 HYAL 即，透明质酸和 Thermogel 涂在创面上（涂敷）。每只动物接受足以完全涂敷或覆盖创面的量的上述制品，在手术时一次使用。

实验设计

将 Sprague Dawley 大鼠（275 - 300g）用于该实验。根据在前面的实验中获得的经验，14天的时间被认为是评价这些动物模型的粘连生成的适当时间点。提供用于该研究所需的动物数，连续数日预备动物。

将总数为 78 只的动物用于以下方法:

组	处理	动物数
模拟处理	未处理	12
对照	仅用 TC7 Interceed™	12
对照	TC7 Interceed™ + 肝素	6
对照	HYAL®	12
对照	Thermogel	12
处理	ACP 5% (批号 101/96)	12
处理	ACP 5 % (批号 104/96)	12

预备动物:

通过肌肉注射氯胺酮 (Gellini Pharmaceutical) /赛拉嗪(Bayer)麻醉动物, 剃毛, 然后用碘液和乙醇消毒。在左侧剖腹, 将左肝叶向上翻起, 用木质涂布器轻擦左和近中肝叶, 直至有出血或血清渗出液的迹象。

使用材料:

在用 Surgicel®或 Tabotamp™止血后, 将试验及对照材料放在两肝叶的表面之间, 以便覆盖所有擦伤部位, 并在两肝叶之间形成屏障。

用 3.0 号的丝缝线将手术部位缝成两层。

在手术结束时服用抗生素(皮下注射 30,000I. U/大鼠的 Procacillina) 和止痛药 (肌肉注射 0.05mg/kg Temgesic) 4 天。

粘连等级:

手术后 14 天用 CO₂ 对动物实施安乐死。

通过粗略观察评价粘连等级。采用以下粘连等级:

0 = 无粘连

1 = 低至中度粘连。通过用镊子机械牵拉将两肝叶手术分离。

2 = 显著粘连, 两肝叶完全粘连在一起, 任何将其分开的企图都会导致组织的断裂。

通过目测评价所述材料的有无评价材料的再吸收性; 并对手术部位照相。

在做过粗略观察之后，手术切除整个肝脏，并放入 10 % 缓冲的福尔马林中 48 小时。固定之后，用解剖刀片从肝上切下包括擦伤部位的 2.0mm 的横切片。对由此获得的样品进行组织学分析。

组织分析:

组织学分析:

在中性缓冲的 10 % 福尔马林中固定样品，然后脱水，并用标准技术埋入石蜡中；用 Masson's Trichrome（用于组织炎性反应）并在必要时用甲苯胺蓝（用于存在的残留材料）对 8 μ m 切片进行染色。

实验 2 大鼠肠烧伤

试验材料:

产品代号	SMK 0002	SMK 0002
通用名	ACP 5 %，高分子量	ACP 5%
商品名	Hyalogel Barrier	Hyalogel Barrier
供应商	FAB	FAB
批号	3/94	ACP 5 % (批号 101/94)
有效期	07/95	07/95
保存	30 ℃ 以下	30 ℃ 以下
注意	无	无

将批号为 3/94 的 ACP 5 % 高分子量凝胶以 20mg/ml 的浓度悬浮于水中，批号为 101/94 的 ACP 5 % 以 50mg/ml 的浓度悬浮于水中。上述所有试验材料均高压灭菌，并以 5ml 注射器形式提供，并在无菌条件下操作。在用 Tabotamp[®] 止血以后将 ACP 凝胶涂在烧伤的肠表面上。每只动物接受足于完全覆盖受损部位量（约 2ml）的上述材料，在手术时以单次剂量使用。

对照材料:

	1	2	3
商品名	TC7 Interceed*	HYAL	Thermogel
生产商/供应商	Johnson & Johnson Patient Care, New Brunswick, NJ	FAB	BASF Pharma
说明	氧化再生的纤维 素屏障	透明质酸 (M.W.1,200,000)	Pluronic Acid
批号	2710TCM	0108 st	1/94
有效期	11-97	05 - 97	- -
保存	30°以下	30 以下	8 ℃ 以下
注意	无	无	

在无菌操作条件下切割 Interceed，将其单独使用或并在肝素（500U/ml）中饱和后使用，使肝叶的两相邻表面保持分离，分离部分的大小超出受损部分几个毫米。购买装在无菌注射器中的 HYAL 即高分子量透明质酸（以 10mg/ml 的浓度溶于水中）和 Thermogel。

在无手术缝合的条件下通过直接涂敷使用 Interceed。止血后用注射器将透明质酸和 Thermogel 涂在受伤表面（涂敷）。每只动物接受的用量足以完全涂敷或覆盖创面，在手述时通过单一剂量使用。

实验设计

将 Sprague Dawley 大鼠（275 - 300g）用于该实验。根据在前面的实验中获得的经验，将 14 天定为评价该动物模型的粘连发生的合适时间点。

提供该实验需要的动物数量，连续数日预备动物。

将总数为 59 只的动物用于以下方案：

实验 2：

组	处理	动物数
模拟手术	未处理	10
对照	TC7 Interceed™	6
对照	透明质酸 (M.W. 1 200 000)	12
对照	Thermogel	13
处理	ACP 5% (批号 101/94)	12
处理	ACP 5% ， 高分子量 (批号 3/94)	6

预备动物：

通过肌肉注射氯胺酮（ Gellini Pharmaceutical ）/赛拉嗪（ Bayer ）麻醉动物，剃毛，然后用碘液和乙醇消毒。透过皮肤和肌肉组织在腹部中线切出一个切口，使肠外露。用电控加热的铜片（直径 1cm ）在盲肠表面产生烧伤，用标准压力在 158°F（ 69.3 ℃ ）下灼 15 秒。

使用材料：

在用 Surgicel®或 Tabotamp™止血以后，将试验和对照材料放在肠表面上，不缝合，以盖住整个烧伤部位，并在腹膜与内脏之间形成屏障。

用连续的 3 - 0 丝缝线缝合肌腹膜层，皮层用皮肤和不连续的 3 - 0 丝缝线缝合。

在手术结束后服用抗生素（皮下注射 Procacillina 30,000 I.U./大鼠）和止痛药（肌肉注射 Temgesic 0.05mg/kg ） 4 天。

观察与测定

粘连等级：

手术后 14 天，用 CO₂ 对动物实施安乐死。

通过粗略观察评价粘连等级。采用以下粘连等级：

0 = 无粘连

1 = 轻度粘连，无血管，易于分离

2 = 中度粘连，无血管，连续的，可手工分离

3 = 不透明，有血管，难于分离，需要手术刀分离

4 = 致密，不透明，有血管，仅能用手术剪解剖，并会导致组织损伤。

通过目测估计所述材料的存在来评价该材料的再吸收性；而且，对处理部位照相。

结果

实验 1

在进行麻醉期间有一只动物死亡，易于放置所述生物材料。发现该材料粘连于下肝叶的组织上。用 ACP 处理的动物中在手术后未发现有临床症状或患病状态。

2 只用透明质酸处理的动物在手术后死去。尸体检查发现有内出血。

评价粘连的生成：在第 14 天评价组织受伤后在肝叶的两相邻表面之间产生的粘连。在观察时中止一切处理；用 ACP 5 %（批号 104/96）生物材料处理的动物的粘连等级（图 9）明显低于所有对照材料和未处理对照的。在 ACP 5 %（批号 101/96）处理中，粘连的减轻优于用肝素饱和的 TC 7 Interceed，但未发现统计学上的差异；不过，与对照和未处理相比，上述两种处理有显著差异（ $p < 0.05$ ）。

组织形态学观察：在手术后 14 天进行显微镜检查时，发现 ACP 处理具有高度生物相容性，并发现极低的炎性反应，具体地讲，仅存在少量炎性细胞，如嗜中性细胞和巨型细胞，在两肝叶的间隙里未发现这些细胞的迁移或增多，TC 7 Interceed* 被证实有组织反应性，因此，在很多场合肝表面被部分粘住；通过观察证实了组织化胶原纤维的存在，如果用肝素溶液饱和该处理的话，似乎可减轻炎性反应。载玻片上的大部分生物材料似乎被完全生物降解。未处理对照产生中 - 高度炎性反应。

实验 2

在进行麻醉时共有 2 只动物死亡，容易放置生物材料，并且在放置后不会移动。在手术后，在 ACP 处理组动物中，未发现发病的临床迹象或患

病迹象。

用分子量 1.2×10^6 的透明质酸处理的 4 只动物和用 Thermogel 处理的 3 只动物在手术后 2 - 5 天死亡。在所有动物上均可通过尸检发现内出血。

评价粘连发生：在该实验中，手术后 14 天（图 10），发现与分子量为 1.2×10^6 的透明质酸和未处理对照相比，批号为 101/94 和 3/94 的 ACP 5 % 凝胶的手术后粘连发生减轻，ACP 凝胶的性能可与肝素饱和的 Interceed Barrier 相比，在这些处理与未处理对照组之间存在统计学上的差异（ $p < 0.05$ ）；所有处理及对照均被完全吸收。

组织形态学观察：在第 14 天进行观察时，ACP 处理表现出很轻的组织炎性反应，粒化组织的厚度很薄，未发现肠上有不利反应，如与相邻的腹膜表面粘连。原纤维胶原开始形成组织，并完成愈合过程。在透明质酸处理中观察到炎性反应，并有大量诱发粘连的胶原纤维存在；可见厚的粘化组织。在未处理对照组中发现相同的组织形态学特征。

讨论

粘连的发生是在腹部骨盆手术后导致手术后发病的首要因素，通常会导致小肠梗阻及其它重病。当涉及到骨盆内脏时，这种粘连还会潜在损害生理功能，并导致不育。对于手术后粘连发生及再发生的机理还不十分了解。上述实验证据表明，在愈合过程中，两手术创面之间以自然对接形式产生粘连，因为将两个组织部位修复成单一的愈合部位更为有效，导致两相邻表面间的愈合粘连。

在该筛选中，发现手术后使用常规手术止血剂（Surgicel[®]），并接着放置可生物降解的透明质酸衍生物屏障，可避免粘连的生成。另外，该材料可与纤溶剂合并使用。与氧化再生的纤维素 TC 7 Interceed^{*} 相比，粘连明显减轻。

HYAFF[®] 11 生物材料表现出良好的生物相容性和极低的炎性反应。试验过的 FAB 生物材料降解速度不同并取决于该处理的物理形式；HYAFF 11[®] 生物材料可存在几周时间。用这类透明质酸衍生物可获得的受控降解速度的范围可用于预防在不同的解剖部位的手术后粘连，如生殖部位或腹部骨盆部位。

上述结果表明，透明质酸衍生物（HYAFF[®]11 网状物和膜）可用于预防手术后粘连的发生。

以上是对本发明的说明，很显然，可以很多方式对本发明加以变化。这种变化不被视为脱离了本发明的实质和范围，正如本领域技术人员会意识到的，所有这类改进均包括在以下权利要求范围内。

图 1

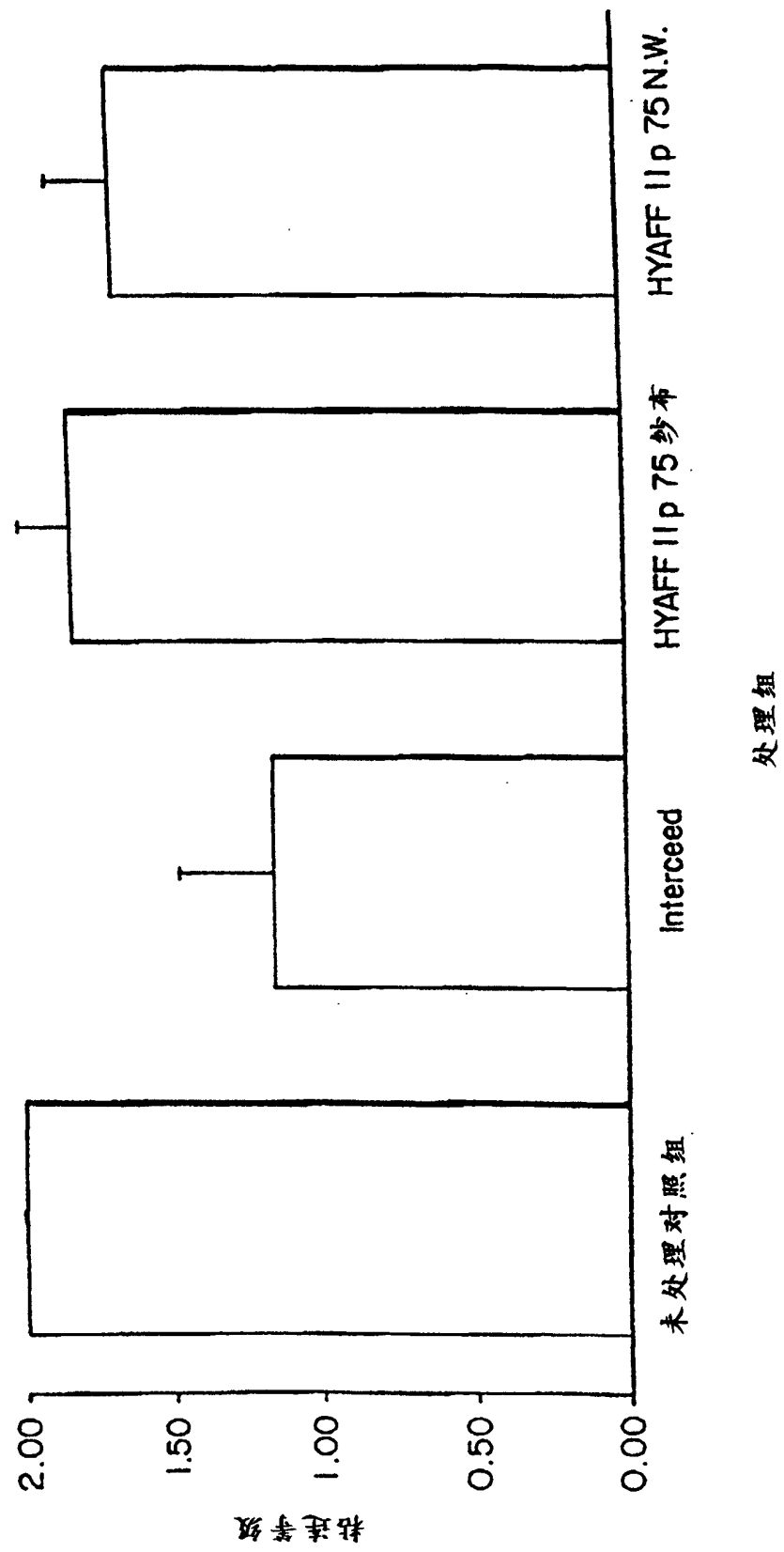


图 2

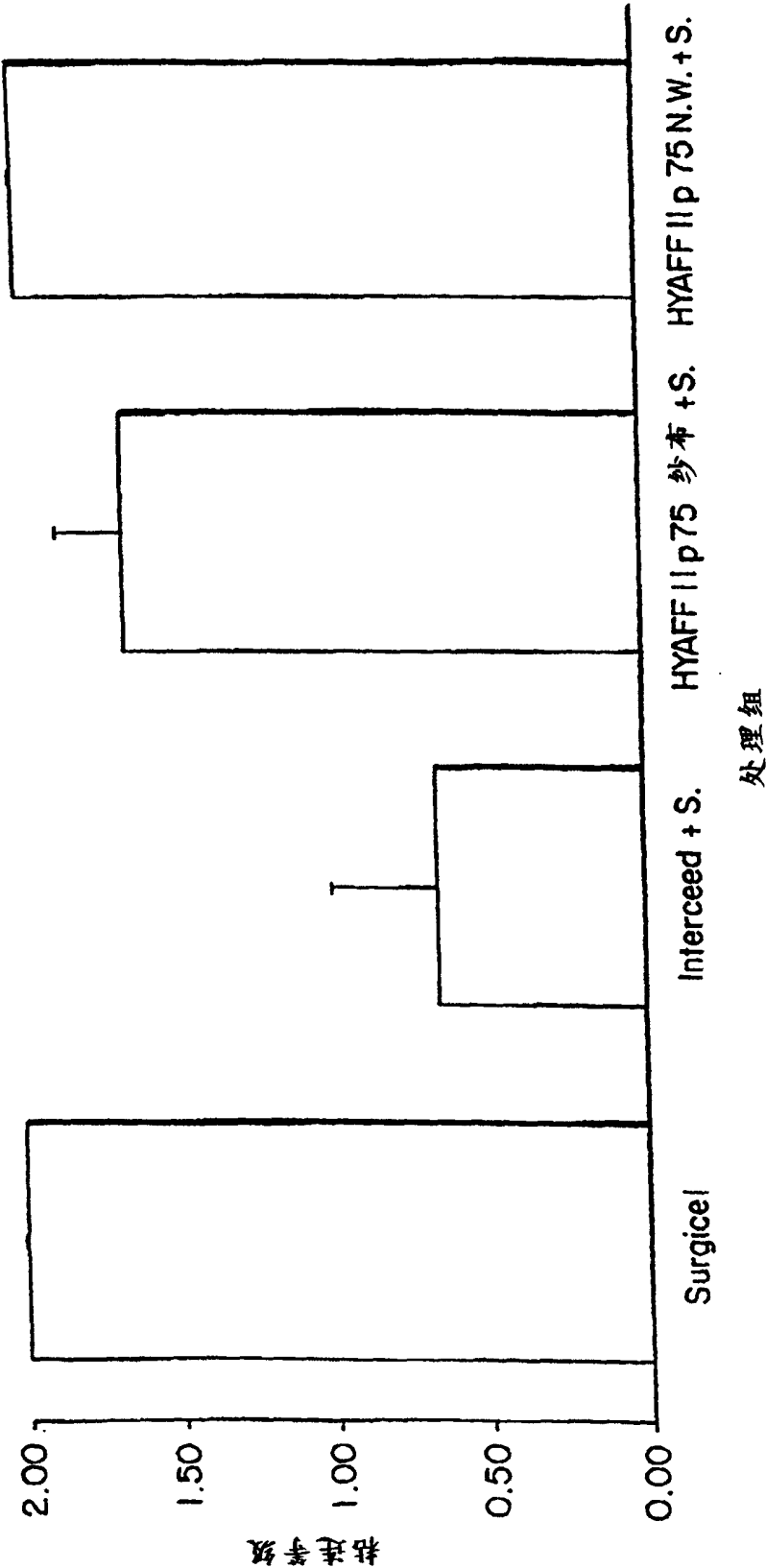


图 3

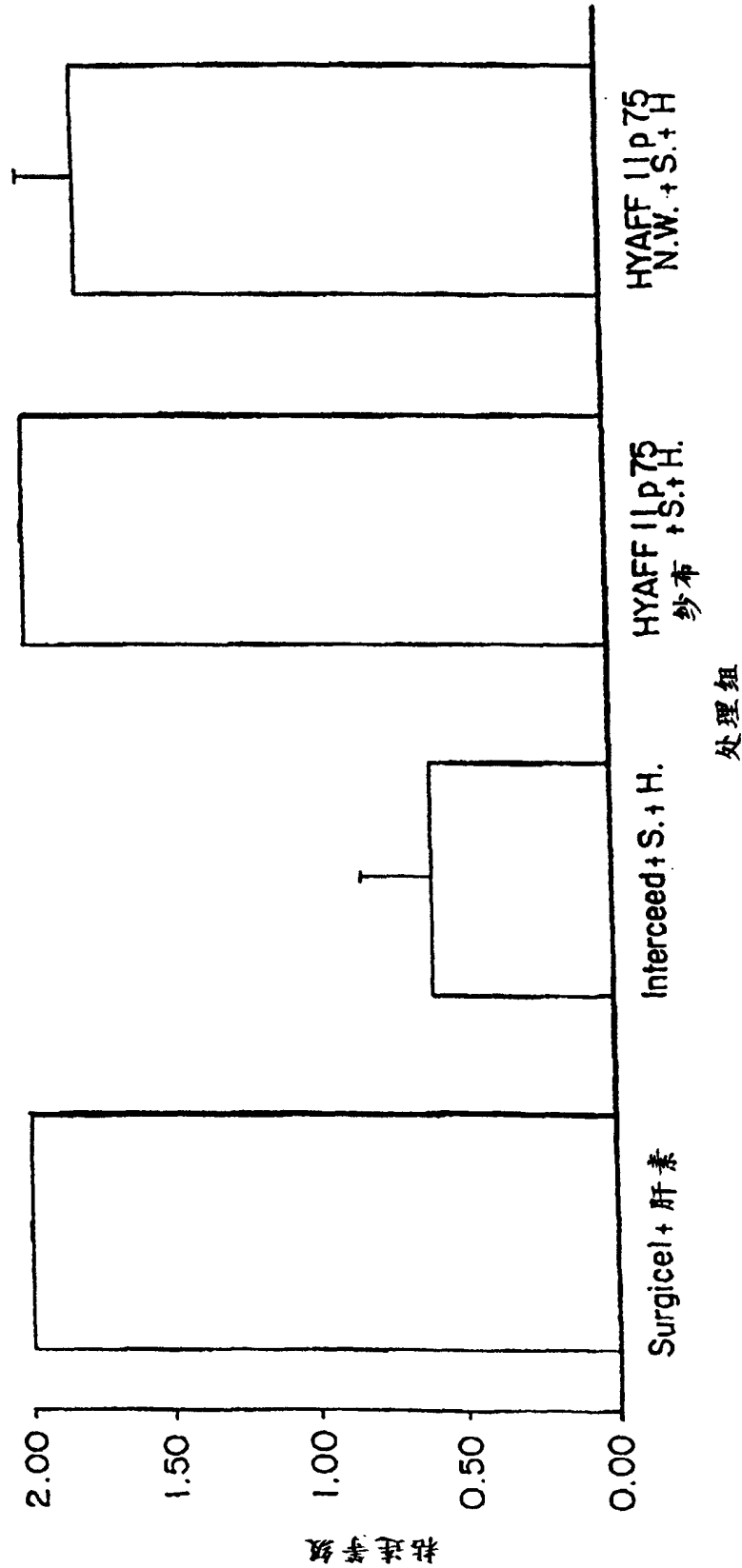
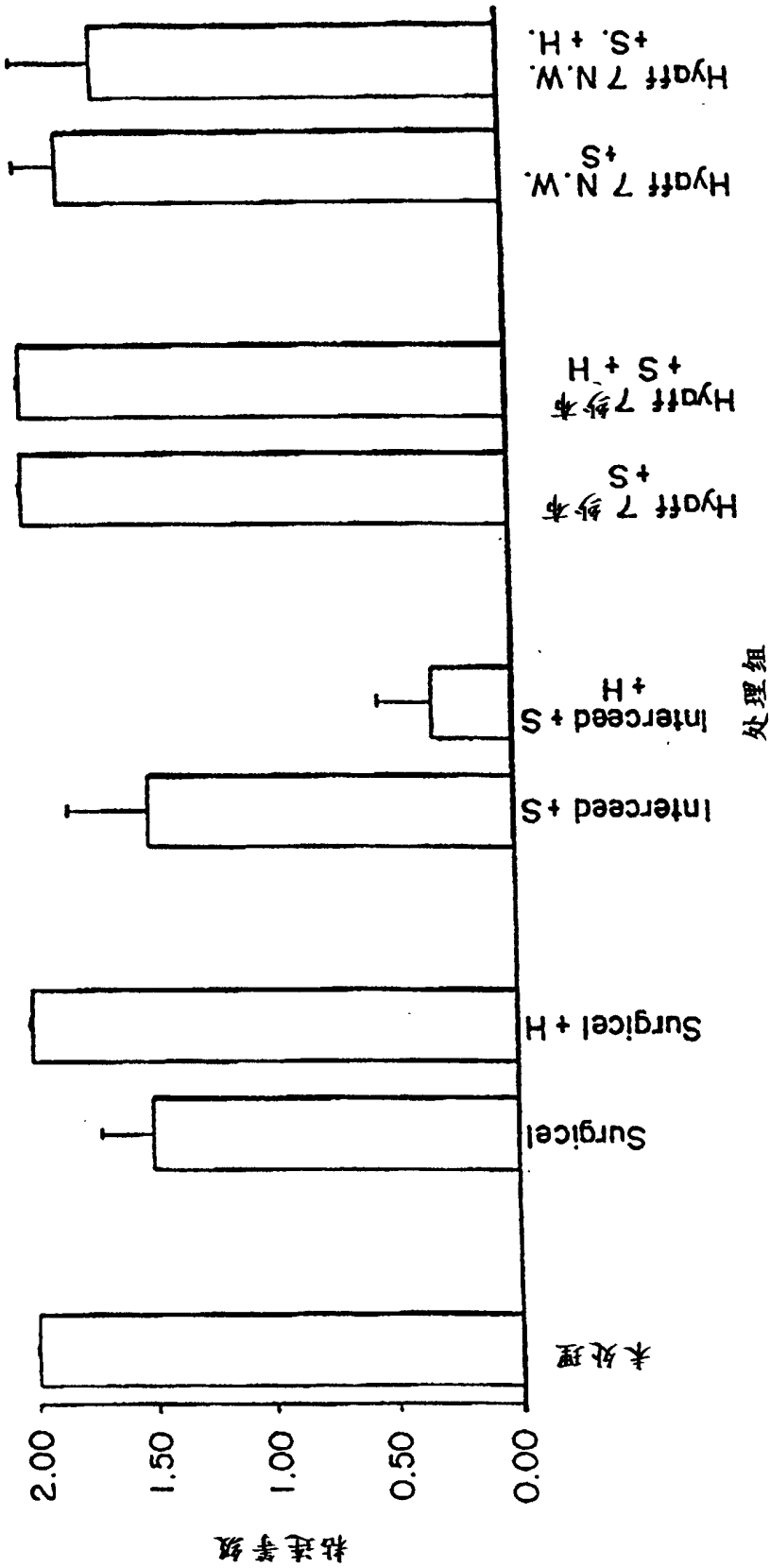


图 4



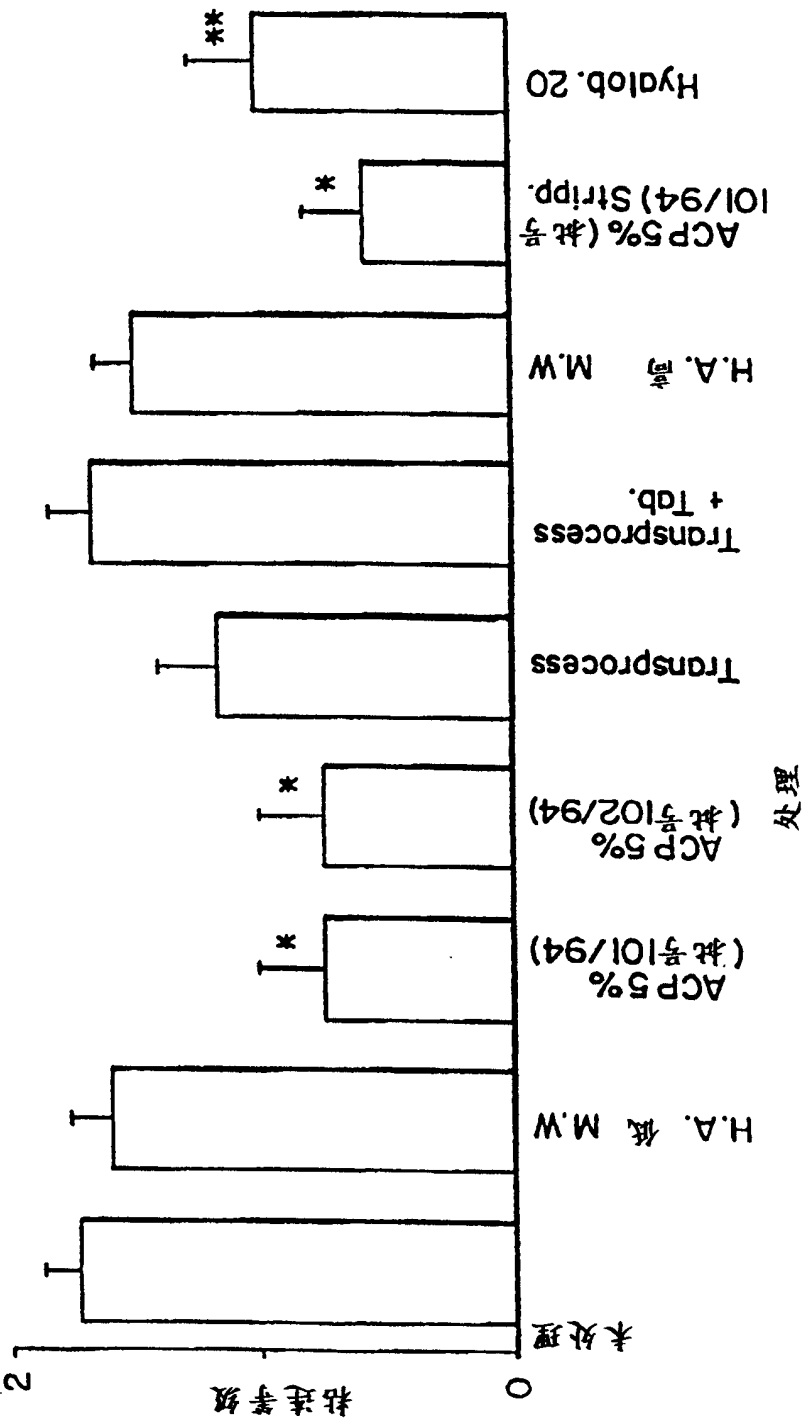


图 5

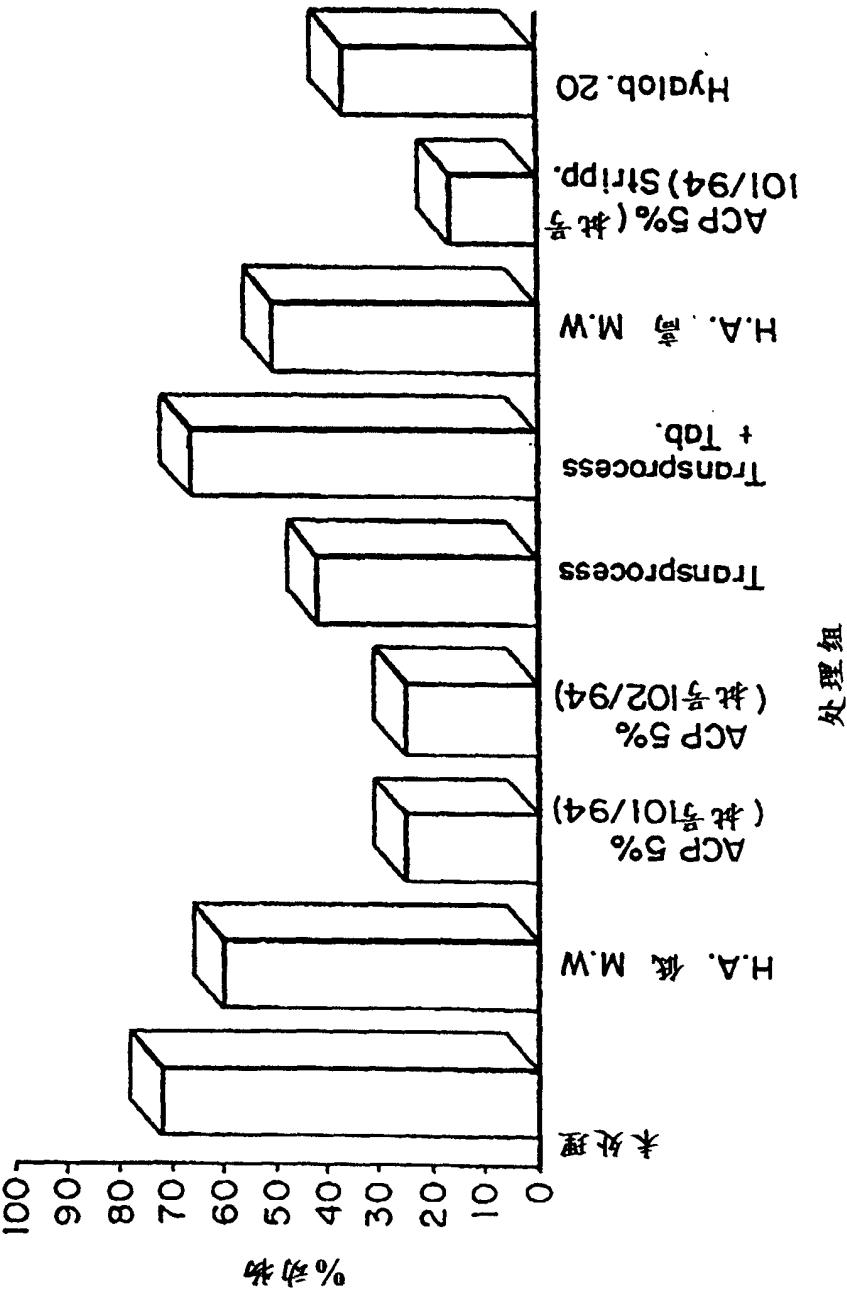


图 9

图 7

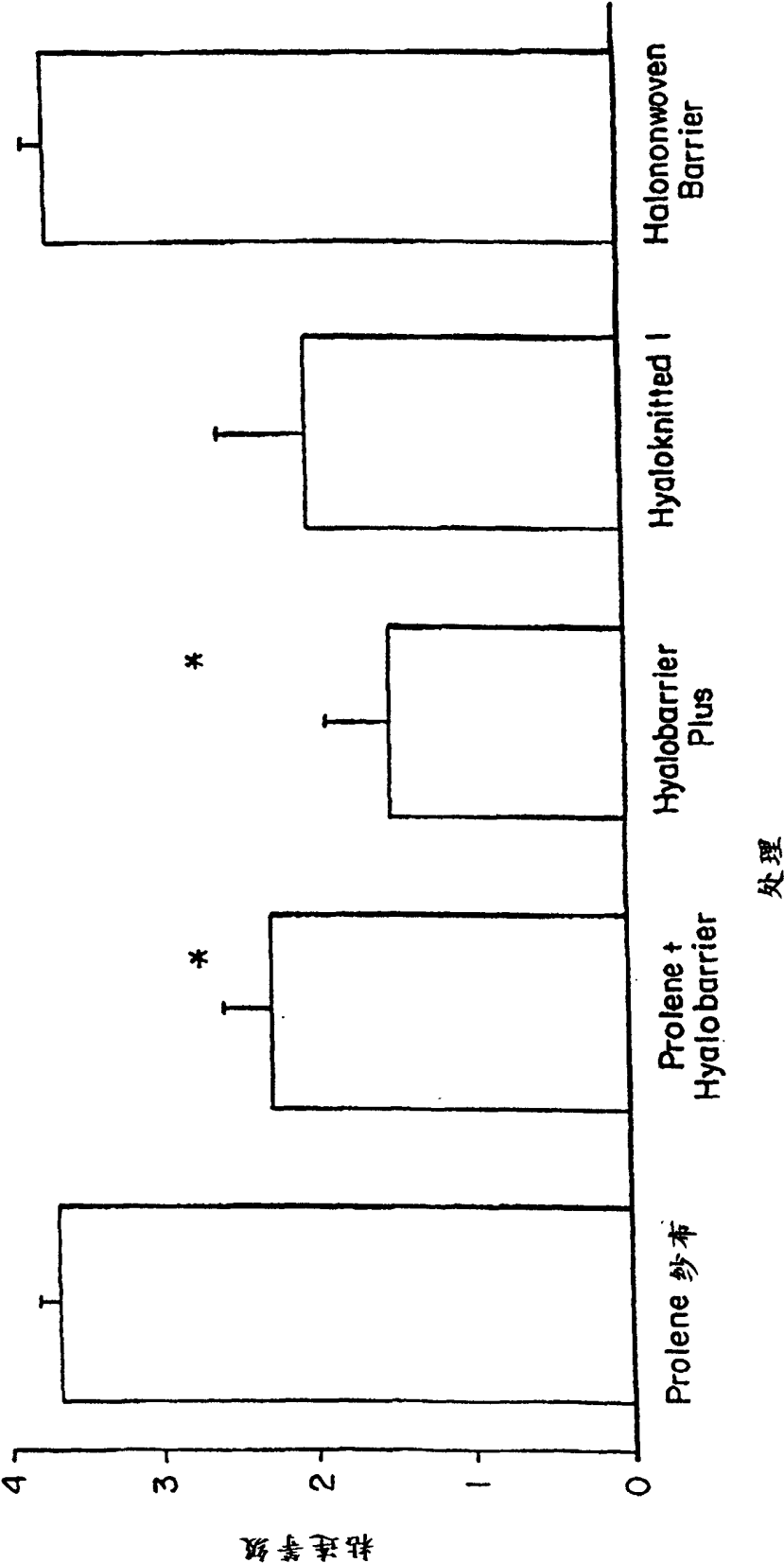


图 8

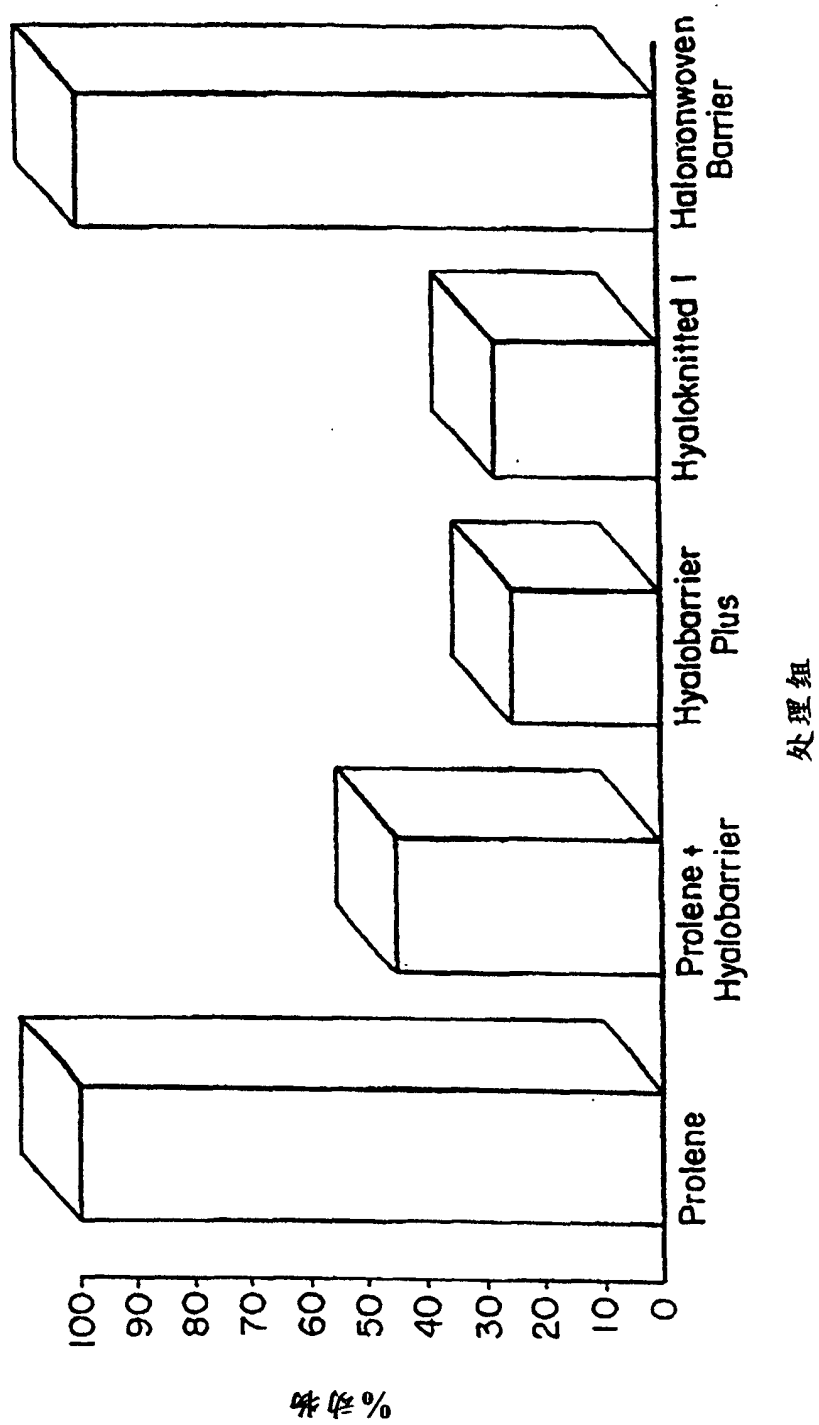


图 9

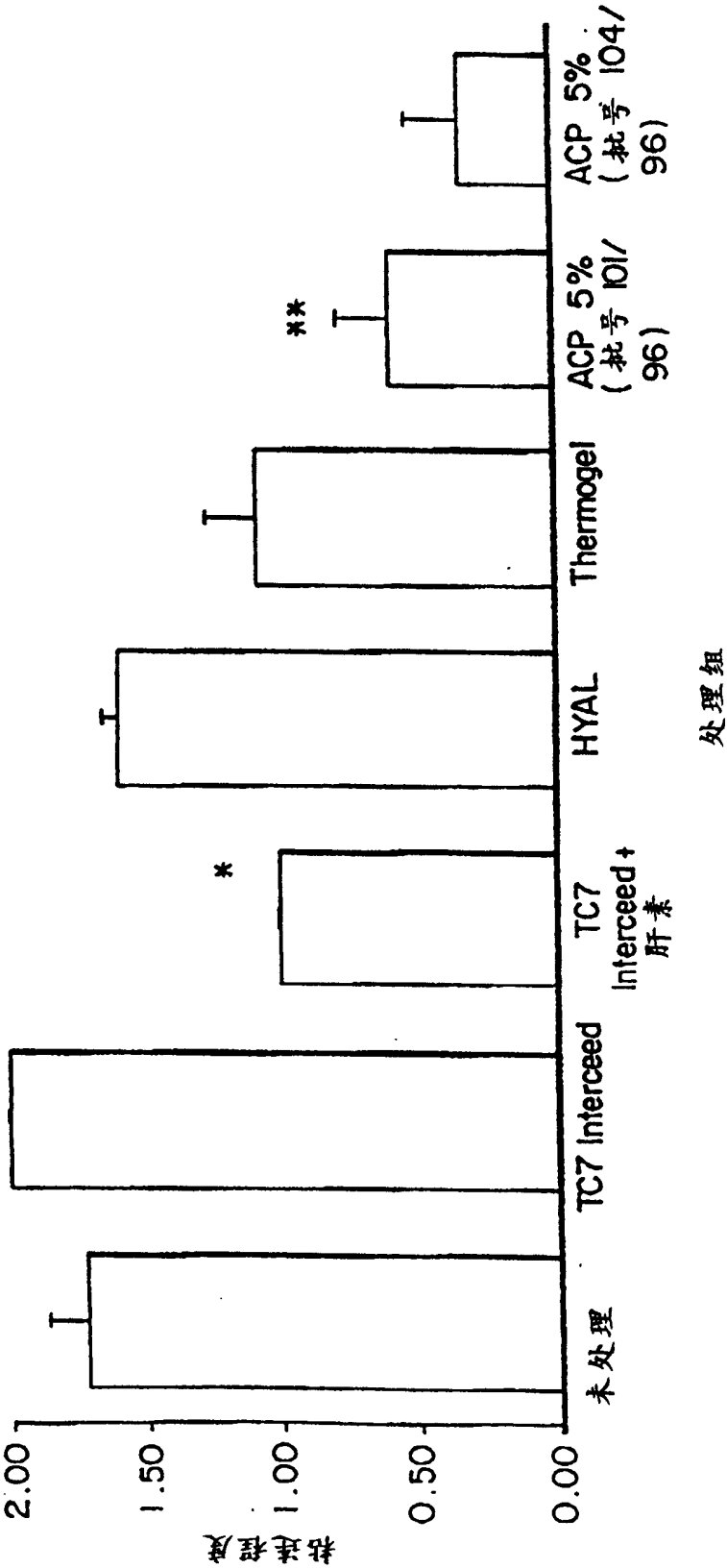


图 10

