



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 87106919.9

[51]Int.Cl⁵

C08B 37/00

[45]授权公告日 1994年6月15日

[24]颁证日 94.4.1

[21]申请号 87106919.9

[22]申请日 87.10.13

[30]优先权

[32]86.10.13[33]IT[31]48546 A / 86

[73]专利权人 菲迪亚公司

地址 意大利阿巴诺特姆

[72]发明人 弗朗希斯科·迪拉·瓦尔

奥里利奥·罗米奥

G01N 33/50

[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 樊卫民 穆德俊

说明书页数:

附图页数:

[54]发明名称 制备透明质酸的交联酯类的方法

[57]摘要

本发明提供了制备透明质酸的全部或部分交联酯的方法,该方法包括:a)在催化剂存在下使透明质酸与一种多元醇反应或者在无机或有机碱存在下使透明质酸与一种由多元醇衍生物酯化剂反应,条件是所述多元醇不为异甲基环氧乙烷或二环氧化合物。

权利要求书

1.制备透明质酸的全部或部分交联酯的方法，该方法包括：

a) 在催化剂存在下使透明质酸与一种多元醇反应或者在无机或有机碱存在下使透明质酸与一种由多元醇衍生物酯化剂反应，条件是所述多元醇不为异甲基环氧乙烷或二环氧化合物。

2.根据权利要求1所述的方法，其中所述催化剂是一种强无机酸或酸型离子交换剂。

3.根据权利要求1所述的方法，其中所述碱是(a)碱金属，碱土金属或镁的水合物，(b)氧化银，(c)碱金属、碱土金属、镁或银的碱式盐，叔氮化碱或(d)碱型离子交换剂。

4.根据权利要求3所述的方法，其中所述的碱是碳酸盐，吡啶和可力丁。

5.制备透明质酸的全部或部分交联酯的方法，该方法包括在非质子传递溶剂中使透明质酸的钾盐或钠盐或季铵盐与一种由多元醇衍生的酯化剂反应，条件是所述多元醇不为异甲基环氧乙烷或二环氧化合物。

6.根据权利要求5所述的方法，其中所述的透明质酸盐是钾盐或钠盐，所述反应在催化剂量的季铵盐存在下进行。

7.根据权利要求6所述的方法，其中所述的季铵盐是碘化叔丁铵。

8.根据权利要求5~7中任一项所述的方法，其中所述的非质子传递溶剂是二烷基亚砷、二烷基甲酰胺，低级脂肪酸的低级烷基二烷基酰胺酰胺。

9.根据权利要求8所述的方法，其中所述的溶剂是二甲亚砷，二甲基或二乙基乙酰胺。

10.根据权利要求8所述的方法，其中所述反应在温度为0~

100℃下进行。

11.根据权利要求 1~7 中任一顶所述的方法，其中所述多元醇是脂族多元醇且所述的酯化剂是脂族多元醇的烷基卤化物。

12.根据权利要求 11 所述的方法，其中所述的脂族多元醇是二元醇。

13.根据权利要求 11 所述的方法，其中所述的脂族多元醇含 2 至 16 个碳原子。

14.根据权利要求 12 所述的方法，其中所述的二元醇选自乙二醇，丙二醇，丁二醇，由戊烷、己烷、庚烷和辛烷衍生获得的二元醇和其位置异构件。

15.根据权利要求 11 所述的方法，其中所述的脂族多元醇为甘油，赤藓醇和季戊四醇。

16.根据权利要求 1~7 中任一项所述的方法，其中所述的透明质酸或所述的透明质酸的部分交联酯用脂族醇、芳脂族醇或环脂族醇酯化。

17.根据权利要求 11 所述的方法，其中所述透明质酸或所述透明质酸的部分交联的酯用脂族醇、芳脂族醇或环脂族醇酯化。

18.根据权利要求 12 所述的方法，其中所述透明质酸或所述透明质酸的部分交联的酯用脂族醇，芳脂族醇或环脂族醇酯化。

19.根据权利要求 13 所述的方法，其中所述透明质酸或所述透明质酸的部分交联的酯用脂族醇，芳脂族醇或环脂族醇酯化。

20.根据权利要求 10 所述的方法，其中所述的脂族醇是最多具有 34 个碳原子的脂族醇，其中，所述的脂族醇可以是不取代的或被 1 个或 2 个官能团取代，且该脂族醇在碳原子链中可插入选自氧、硫和氮的杂原子，上述官能团选自氨基、羟基、巯基、醛基、酮基、羧基、烃基和二烃基氨基、醚基、酯基、硫醚基、硫酯基、乙缩醛基、酮缩醇基、烷酯基、脞基和被 1 个或 2 个烷基取代的脞基，这些改性的官能团中的烃基最多具有 6 个碳原子。

21.根据权利要求 20 所述的方法，其中所述的脂族醇是乙醇、丙醇、异丙醇、正丁醇、异丁醇、正戊醇、戊醇、己醇和辛醇。

22.根据权利要求 16 所述的方法，其中所述的芳脂族醇是仅具有一个苯基的芳脂族醇，其中，脂族链最多具有 4 个碳原子，苯基可被 1 至 3 个甲基或羟基、或被卤原子所取代，脂族链可被 1 个至 2 个选自游离基的氨基或者一或二乙基氨基的官能团，或被吡咯烷基或哌啶基取代。

23.根据权利要求 16 所述的方法，其中所述的环脂族醇是由最多具有 34 个碳原子的单环或多环烃衍生获得的环脂族醇或脂族-环脂族醇或杂环族醇，上述醇可以是未取代的或被 1 个或更多的官能团所取代，且在碳原子链上可插入选自氧、氮和硫的杂原子，而且可具有 1 个或多个芳香键，上述官能团选自氨基、羟基、巯基、醛基、酮基、羧基、炔基和二烷基氨基、醚基、酯基、硫醚基、硫酯基、乙缩醛基、酮缩醇基、烷酯基、脲基和被 1 个或两个烷基取代的脲基，这些改性官能团中的炔基最多具有 6 个碳原子。

24.根据权利要求 16 所述的方法，其中所述的用所述的不交联的限制性羧基酯化的醇是药理活性醇。

25.根据权利要求 16 所述的方法，其中所述的至少具有一个游离羧基的部分交联酯与碱金属或碱土金属、镁或铵成盐。

26.根据权利要求 1~7 中任一项所述的方法，其中所述的透明质酸是具有平均分子量为 50,000 至 730,000 的透明质酸馏分，且基本上无平均分子量低于 30,000 的透明质酸。

27.根据权利要求 8 所述的方法，其中所述的透明质酸是具有平均分子量为 50,000 至 730,000 的透明质酸馏分，且基本上无平均分子量低于 30,000 的透明质酸。

28.根据权利要求 11 所述的方法，其中所述的透明质酸是具有平均分子量为 50,000 至 730,000 的透明质酸馏分，且基本上无平均分子量低于 30,000 的透明质酸。

29.根据权利要求 12 所述的方法，其中所述的透明质酸是具有平均分子量为 50,000 至 730,000 的透明质酸馏分，且基本上无平均分子量低于 30,000 的透明质酸。

30.根据权利要求 16 所述的方法，其中所述的透明质酸是具有平均分子量为 50,000 至 730,000 的透明质酸馏分，且基本上无平均分子量低于 30,000 的透明质酸。

31.根据权利要求 26 所述的方法，其中所述的透明质酸是具有平均分子量为 50,000 至 730,000 的透明质酸馏分，且基本上无平均分子量低于 30,000 的透明质酸。

32.根据权利要求 27 所述的方法，其中所述的透明质酸是具有平均分子量为 50,000 至 730,000 的透明质酸馏分，且基本上无平均分子量低于 30,000 的透明质酸。

33.根据权利要求 28 所述的方法，其中所述的透明质酸是具有平均分子量为 50,000 至 730,000 的透明质酸馏分，且基本上无平均分子量低于 30,000 的透明质酸。

34.根据权利要求 29 所述的方法，其中所述的透明质酸是具有平均分子量为 50,000 至 730,000 的透明质酸馏分，且基本上无平均分子量低于 30,000 的透明质酸。

35.根据权利要求 30 所述的方法，其中所述的透明质酸是具有平均分子量为 50,000 至 730,000 的透明质酸馏分，且基本上无平均分子量低于 30,000 的透明质酸。

说 明 书

制备透明质酸的交联酯类的方法

本发明涉及透明质酸的多元醇的酯类，该酯类是由这类醇与透明质酸多糖类的两个或更多的羧基进行酯化反应而获得的。由于在相同的或不同的透明质酸分子的上述羧基官能团之间存在着桥键，该酯类也可用“交联”一词来描述。这些交联的酯类可以是全部交联或部分交联的，在后者情况下，另一些羧基官能团可用一元醇或多元醇进行酯化，而不形成交联（下文中也称之为“简单”酯基）。在两类部分交联的酯类中，未酯化的羧基官能团可以是游离的或与金属或有机碱成盐的。

本发明还涉及新的交联透明质酸酯在用于制造卫生用品和外科用品的可生物降解的塑料领域以及药物和化妆品领域的用途，此外还包括在这些领域用上述酯制得的各种物品。

该新酯的具体用途与交联酯化的程度有关，即与用上述多元醇酯化的羧基官能团的交联基团个数、简单酯化基团的个数以及成盐基团的个数有关，这种自身酯化或成盐的程度与产物的溶解度和它的粘弹性质有关。因此，例如全部交联的酯类极不溶于含水液体，且由于它们的分子结构，很适合用于制造塑料和树脂以及作为添加剂用于这些材料。具有平均或较低酯化度的酯类以及它们与无机碱或有机碱形成的盐在不同程度上溶于含水的条件且适用于制备凝胶，总的来说该凝胶可在化妆品和药理学领域以及医疗卫生领域具有许多用途。

欧洲专利申请0161887号（85年5月3日递交，85年11月21日公开）描述了某些透明质酸的交联衍生物，它是由表示为“多官能的”环氧化合物的反应而制得的。在上面的专利公开说明书中，“多官能环氧化合物”一词是指具有至少一个环氧官能团且在环氧官能团中还可能有可能转化的官

能团的烃类，通过环氧基团发生交联反应。在该专利中仅叙述了这些官能团中的卤素。在所述的专利申请中仅叙述了这些多官能环氧化合物中的几个例子，即：表氯醇、表溴醇、甲基表氯醇、甲基表溴醇、1,2-二(2,3-环氧丙氧基)-乙烷、1,4-二(2,3-环氧丙氧基)-丁烷、1,6-二(2,3-环氧丙氧基)-丁烷、1,6-二(2,3-环氧丙氧基)-己烷和双酚 A 和双酚 F 的缩水甘油醚。该专利申请所用的制备方法（在权利要求书中被限于使用 halomethyloxirane 或双环氧化合物的方法以及被它的可能应用所限制的方法）得到的透明质酸的交联酯具有较低的酯化度，事实上，从该专利申请的说明实施例中可以看出，在与表氯醇反应（实施例4）以获得具有较低溶解度的产物的情况下，达到的最大酯化度为4%。

本发明可有效地制备各类交联酯类，包括其中酯基含未被羟基取代的残基的特殊酯类（为上述环氧化物在透明质酸或其盐上进行反应的产物）。本发明重要的是提供了混合酯类，该酯类含交联的酯基和某些未交联的酯基的混合物，其中交联基团的百分率可超过所有透明质酸的二糖单元的10%。

英国专利申请2,151,244 A号（1984年8月13日递交，1985年7月17日公开）和德国专利申请公开3434082 A1（1984年9月17日递交，1985年7月11日公开）描述了透明质酸的某些交联衍生物，该衍生物可通过对同样的甲醛、二羟甲基脲、二羟甲基亚乙基脲、多氮丙啶、聚异氰酸酯和二乙烯基砜起作用而获得。该衍生物是不溶性的，且由于其生物相容性被建议以各种修复用品（如贲门瓣、血管类等）的形式在体内应用，或可被加入到各种用于制造这些用品的聚合材料中。该专利还提供了乙醚作为一种试剂以获得“交联”的应用，但没有说明步骤，也没有说明获得的产物的类型。其它交联衍生物的结构未作详细说明，且没有叙述形成的交联键的类型。在甲醛和上面取代的脲的情况下，这可能是指包括具有半缩醛结构的透明质酸的羧基在内的衍生物，而在其它情况下，这可能是指羟基的烷

基化产物。

因此，本发明的主要目的可定义为提供透明质酸与脂族多元醇的全部或部分交联的酯类。在部分交联的酯类中，可存在用脂族、脂环族、芳族或杂环族的一元或多元醇酯化的羧基，并且在部分酯中，可存在未酯化的、用无机碱或有机碱成盐的羧基，但通过halomethyloxyrane 或双环氧化物对透明质酸的作用获得的交联酯除外。

文献中所用的“透明质酸”一词是指具有不同分子量的由D- 葡糖醛酸和N- 乙酰基- D- 葡糖胺酸残基组成的酸性多糖类，它天然出现在细胞表面、脊椎动物的连接组织的碱性细胞外物质、关节的滑液、眼睛的内球液、人的脐带组织以及鸡冠中。透明质酸在生物器官内起重要的作用，作为许多组织（如皮肤、腱、肌肉和软骨）的细胞的机械载体，它是细胞内基质的主要成分，但还在生物过程（组织的湿润、润滑、细胞迁移、细胞功能和分化）中起其它重要作用（例如，见A. Balazs 等人的“Cosmetics & Toiletries”，意大利版5/84号，8 ~17页）。

透明质酸可从上述天然组织中（例如从鸡冠中或从某些细菌中）提取。如今也可用微生物方法制备透明质酸。用提取法获得的完整的透明质酸的分子量约为8 ~13百万。但是，通过各种物理和化学因素的方法（例如机械方法或辐射或在水解剂、氧化剂或酶解剂的影响下）可十分容易地降解该多糖类的分子链。因此，甚至使用通常原始的提取纯化步骤，获得的降解馏份具有较低的分子量（见上面引用的 Balazs 等人的著作）。

透明质酸、它的分子馏份和各自的盐类已被用作药物，且它们已被建议用作化妆品（例如，见 Balazs 等人的上述文章和法国专利2478468 号）。透明质酸和其盐作为治疗药剂特别适用于治疗关节病，例如在兽医领域治疗马的关节炎〔Acta Vet. Scand. 167, 379 (1976)〕。透明质酸和其分子馏份和它们的盐类作为天然器官和组织的辅助的和代用的治疗药剂被用于眼外科中（例如，见 Balazs 等人的“Modern Problems in O

phthalmology ”, 10卷, 1970, P.3- E. B. Strieff, S. Karger eds., Basel, 或 “Viscosurgery and the Use of Sodium Hyaluronate During Intraocular Lens Implantation”, 该论文在 International Congress and First Film Festival on Intraocular Implantation, Cannes, 1979 中介绍, 和具有 H Y 在眼科学中的应用的文献摘要的美国专利 4,328,803 号以及美国专利 4,141,973 号)。1985年4月24日的欧州专利公开 0138572 A3 描述了透明质酸的分子馏份, 例如作为钠盐, 它被分别在眼内和关节内注射, 适用作眼睛内球液的代用品并适宜治疗关节病。

透明质酸也可用于作用于卫生和外科用品的各种聚合材料 (例如聚氨酯类、聚醚类、聚烯烃、聚酰胺、聚硅氧烷、乙烯基和丙烯酸聚合物、具有使这些材料生物相容作用的碳纤维) 的添加剂。既然这样, 例如通过涂覆在这些材料的表面、或分散在这些材料中或采用这两种步骤的方法添加 H Y 或其盐。这些材料可用于制造各种卫生和医疗用品, 例如贲门瓣、眼内晶状体、血管夹、起搏器和类似用品 (见美国专利 4,500,676 号)。

“透明质酸”一词事实上通常用得不正确, 如已见到的, 应是指具有交替的 D- 葡萄糖醛酸和 N- 乙酰基- D- 葡萄糖胺酸 (具有可变的分子量) 的残基的整个多糖类或甚至其降解馏份, 因此, 用复数词 “透明质酸类” 似乎更正确, 但是在本说明书中所用的单数术语也都一样, 分子馏份的情况也类似, 另外, 将经常用缩写 “H Y” 代替该全称。

业已发现, 透明质酸与脂族、芳脂族、环脂族或杂环族醇类形成的酯类也具有类似于且甚至优于酸性多糖类本身的性质。这些酯类和其制备方法在共同未决美国专利申请 881,454 号 (1986年7月2日递交) 有所描述, 该申请在这里作为参考且并入本发明。具有高酯化度的酯类, 特别是全部酯化的酯类, 不象透明质酸, 在有机溶剂 (例如二甲亚砜) 中具有好的溶解度。因此, 例如在室温下, H Y 的苄酯溶于二甲亚砜 (DM S O) 中测

量值为200mg/ml。在一定有机溶剂中的该溶解度与特殊的和显著的粘弹性一起使得它能获得卫生、医疗和外科用品，这些用品不溶于盐水，且具有特殊的所希望的形式：首先在有机溶剂中制备HY酯的溶液，然后将该非常粘的溶液加工成最终用品所需的形状，最后用另一种与第一种溶剂混合的但HY酯不溶于其中的溶剂提取出该有机溶剂。这些优点还可在本发明的交联化合物中发现，可能程度更高。

本发明的交联酯可从任何脂族的多元醇衍生获得，但最好是从具有最多8个羟基官能团，尤其是4个羟基官能团且碳原子数最多为16的多元醇衍生获得。严格地说，“多羟基的”一词通常指具有三个或更多羟基的醇类，而“二羟基的”或“二元醇”一词是指具有两个羟基的醇类。但本文所用的“多羟基的”一词是指包括具有二个或更多羟基的醇类。因此，“多元”醇可以是二元醇、三元、四元、五元和六元醇。这些醇中应强调的有甘油、赤藓醇的三种异构体、季戊四醇、木糖醇的四种异构体和卫矛己六醇的十种异构体。

在新酯类中，“交联”可由各种上述多元醇衍生获得，但最好是制备其中所有“交联”都是由相同的多元醇得到的酯类。

最重要的新酯类是由二羟基醇即二元醇衍生出的酯类。该二元醇宜具有上述的最多16个碳原子，尤其是具有最多8个碳原子，这些二元醇最好是乙二醇，丙二醇，丁二醇，从戊烷、己烷、庚烷、辛烷和其位子异构体得到的二元醇。但这些二元醇也可具有一些双键，例如1至3个双键。

除交联基团外，也可存在简单酯基，它可由脂族、芳脂族、脂环族或杂环族的醇衍生获得且可以是取代的或未取代的，饱和的或未饱和的。脂族醇的例子有最多含34个碳原子的那些，它可以是饱和或不饱和的，且也可被其它游离官能团或改性官能团取代，这些官能团的例子有氨基、羧基、醛基、酮基、巯基、羰基；或被从例如烃基或二烃基氨基（这里和下文所用的“烃基”一词应不仅指一价烃基，如 $-C_n H_{2n+1}$ 型，而且还应指二

价或三价残基，如“亚烷基” - C_n H_{2n}- 或“亚烷基” = C_n H_{2n})、醚基或酯基、乙缩醛基或酮缩醇基、硫醚基或硫酯基和酯化的羧基或脲基(carbamidic)和被一个或二个羟基取代的脲基这些基团衍生获得的基团取代；或被腈基或被卤素取代。取代的醇中，最好选择具有一个或二个所述官能团的那些醇。

含羟基的所述基团中，最好是低级脂族残基(如烷基)，其碳原子数量最多为6。这类醇也可在碳原子链中插入杂原子(如氧、氮、硫)。在本发明限制范围内优先选用的上述基团的醇是最多含12个，尤其是6个碳原子的那些醇，和取代的那些醇，其中，在上述氨基、醚基、酯基、硫醚基、硫酯基、乙缩醛基或酮缩醇基中的烃基代表最多具有4个碳原子的烷基；在酯化的羧基或取代的脲基中的烃基也是具有相同数目碳原子的烷基；氨基或脲基可以是具有最多具有8个碳原子的亚烷基氨基或亚烷基-脲基。这些醇中首先应是饱和的和未取代的那些醇例如甲醇、乙醇、丙醇、异丙醇、正丁醇、异丁醇、叔丁醇、正戊醇、戊醇、己醇、辛醇、壬醇和十二烷醇，尤其是具有线型链的那些醇，如正亲醇和正十二烷醇。

取代的醇中，优选的是已叙述的二元醇，但其它也可用于形成“交联”的是多元醇(例如甘油)，醛醇(如羟基丙二醇)，羧基醇(例如乳酸如 α 羟基丙酸、羟基乙酸、马来酸、酒石酸、柠檬酸)，氨基醇(如氨基乙醇、氨基丙醇、正氨基丁醇和它们在氨基官能团上的二甲基或二乙基衍生物、胆碱、吡咯烷基乙醇、哌啶基乙醇、哌嗪基乙醇和正丙醇或正丁醇的相应衍生物)，一硫代乙二醇或其在巯基官能团上的烷基衍生物，如乙基衍生物。饱和高级脂族醇中优选的例子有十六烷醇和三十烷醇，但对本发明来说特别重要的是具有一个或二个双键的高级不饱和醇，尤其是在许多芳香油中所含的并与萜烯具有亲合力的那些醇，例如香芳醇、香叶醇、橙花醇、橙花叔醇、里哪醇、法呢醇和植醇。不饱和的低级醇中通常是烯丙醇和炔丙醇。

芳脂族醇中，尤其值得叙述的是所有仅具有一个苯基的那些醇，其中，脂族链最多含4个碳原子；苯基可被1至3个甲基或羟基，或被卤原子，特别是氯、溴或碘取代；脂族链可被1个或更多选自游离氨基或单或双甲基的官能团，或被吡咯烷基或哌啶基取代。这些醇中最好的是苜醇和苯乙醇。

环脂族醇（也包括环脂族-脂族醇）可由单环或多环烃衍生获得并且最多可含34个碳原子。就被取代的醇而言，取代基可以是叙述的用于脂族醇的那些基团。

由单环烃得到的醇中特别值得一提的是最多具有12个碳原子，环上最好具有5至7个碳原子的那些醇，它可以被例如1至3个低级烷基（如甲基、乙基、丙基或异丙基）取代。这组醇中优选的具体醇是环己醇、环己二醇、1,2,3-环己三醇和1,3,5-环己三醇（间环己烷三醇）、环己六醇。如果上面的环脂族或脂族-环脂族醇中的线型或环状链中插入1个或更多的杂原子（例如1至3个选自-O-、-S-、-N=和-NH-的杂原子）且在其中可含1个或多个双键（尤其是1至3个双键），则杂环族醇可被认为是由上述醇得到的，而且还包括具有芳族结构的杂环化合物。它们可以是简单醇，如糠醇，或具有更复杂结构的醇，如许多生物碱衍生物和许多药剂中所存在的。

如已陈述的，本发明的新交联衍生物可被用于所有适合于透明质酸或其盐或在上述共同未决美国专利申请所描述的酯应用的主要场合。因此，如已叙述的，新衍生物特别适合制备下列物品：

- 1) 药剂
- 2) 用于药剂的药物载体
- 3) 化妆品和用于化妆品的载体
- 4) 用于卫生、医疗和外科领域的塑料用品

且本发明尤其包括所有的这些用途。

显然可根据交联酯所用场合选择交联酯的类型。通常，透明质酸酯化度高到全部酯化增加它的亲油性，因此限制它在水中的溶解度。就药物和化妆品应用而言，虽然它与透明质酸或其盐相比确实不具有好的亲油性，但调节它的酯化度以确保在水中具有足够的溶解度是尤其重要的。不用说，应考虑酯化组份本身的分子大小，因为这通常以反比的关系影响水溶性。就有关药物应用而言，亲水性或亲油性的高或低的程度应与治疗组织的类型，例如需要用皮肤药的皮肤有关。

由于透明质酸组份本身固有的特性，新交联的衍生物可用作治疗药剂，例如用于治疗人和动物关节炎的药品。因此，它们可由不具有药理性质或具有可忽略的活性的脂族多元醇，尤其是具有2至8个碳原子的二元醇得到，其它可能存在的简单酯基也可由无药理作用的醇，例如由碳原子数最多为8的脂族一元醇得到。通过非肠道途径，更确切地说通过关节内途径给药。

本发明的其它交联衍生物也可由具有药理作用的醇，尤其是可由获得简单酯基的醇得到。它们具有定性类似于这些醇的性质，但作用范围的差别更大，确保更均衡、恒定和有规律的药理作用并通常具有明显的“延迟”作用。其它交联衍生物也还可含两种或更多本身具有或不具有药理作用的不同类型的醇的简单酯基。通过适当地配制用作酯化组份的不同类型的醇的比例，可获得具有药理活性的活性醇与无特定活性的透明质酸的酯类，它们具有上述的稳定性较好和相对于所需的活性生物药效率较高的性质以及药理活性醇的特性。

在这里所描述的由药理活性醇得到的衍生物中，交联透明质酸分子基本上用作药理活性组份的载体，因此，它们也可被包括在2)或3)组中。因为根据用途2)和3)，该新的交联衍生物实际上用作载体，所以它们最好也由无治疗活性的多元醇得到，由一元醇得到的酯基也最好能是无任何药理活性的。活性物质与新的衍生物进行机械混合，所得的药剂也可含其它成

分和常规药物制剂常用的赋形剂。可用一种组合活性物质代替一种活性物质。特别有效的是其中新透明质酸衍生物用作载体并含典型的活性物质的药剂。

用于羧基酯化但在新衍生物中不形成交联的药理活性醇，除已列出的外，可以是脂族-环脂族多环族醇，例如甾族化合物，如性激素和其合成的类似物，特别是皮质类甾醇和其衍生物，例如雄甾二醇和其甲基衍生物，在17位上的乙炔基或丙炔基衍生物，甾甾酮和其衍生物，如17- α -甲基-甾甾酮，17- α -乙炔基-甾甾酮，1',1,2-二脱氢-甾甾酮，18-甲炔诺酮，19-去甲甾甾酮，19-去甲-17- α -甲基-甾甾酮；抗激素如甲撑甾孕酮，可的松，氢化可的松，氟美松，倍他米松，派拉美松，氟甲松，氟新诺龙，氟倍他索，倍氟美松，阿法沙龙，7 α ,17-二甲基甾酮。其它治疗活性的醇的例子有维生素，如维生素A，维生素D₂和D₃，维生素B₁，维生素B₂，维生素C，核黄素，硫胺素和泛素。杂环族醇中也值得叙述的有阿托品，东莨菪碱，金鸡宁，金鸡尼丁，奎宁，吗啡，可待因，丙烯去甲吗啡，N-溴化东莨菪碱，缓脉灵；苯基乙基胺如麻黄碱、异丙去甲肾上腺素，肾上腺素，酚噻嗪药如奋乃静，哌普嗪，卡吩那嗪、高奋乃静，乙酰奋乃静，氟非那嗪，N-羟乙基异丙嗪氯化物；噻吨药如三氟噻吨，氟噻吨；抗惊厥药如美普芬醇；精神抑制药如阿丙哌醇；止吐药如奥昔喷地；止痛药如carbetidine和苯丙苯哌酯和美沙醇；安眠药如安太乐；减食欲剂如二苯基甲醇和diphenmethoxidine；较弱的安定药如hydroxizine；肌肉松弛药如桂麻黄碱，diphylline，麦酚生，舒筋灵，氟酚醚，2,2-二乙基-1,3-丙二醇，愈创木酚甘油醚，hydrocilamide；冠状血管扩张药如双嘧啶氨醇和医达明；肾上腺素能受体阻滞剂如萘心安，噻吗心安，吲哚心安，氟甲苯心安，阿替洛尔，美多心安，醋氨心安；抗肿瘤药如氟杂尿嘧啶核苷，阿糖胞苷，氟脱氧尿核；抗菌素如氟霉素，甲砒氟霉素，红霉素，夹竹桃霉素，林可霉素；抗病毒药如脱氧碘尿核；外周血管扩张药如异

烟醇；碳酸酐酶抑制制如氨磺苯氨甲酸羟乙酯；止喘药和抗炎药如羟哌苯噻酮，sulphamidics 如 2-p-sulphanyanilinoethanol。

当然这里所说的新交联衍生物可用在与游离醇的相同情况下。

本发明特别有利的一方面是能制得比迄今市售药物更稳定的药物。因此一方面可制得用作透明质酸本身典型适应症的交联衍生物如作关节内注射用，其中交联衍生物作润滑剂：因为将透明质酸酶与游离酸比较时该衍生物显得更稳定，因此可达到相当明显的长效作用。另一方面还可制得对上述还包含衍生自治疗活性醇的酯基的衍生物具有“延迟”作用的药物。在这种情况下药理活性醇借助酯酶非常缓慢地释放而进入生物体。对于按上述第4)点应用，新交联衍生物的制备首先是采用药理惰性醇如二元饱和脂族醇，特别是2~8碳原子的脂族醇，甘油以及一元醇，尤其是脂族醇。但也可采用某些上述化合物的未交联羧基部分酯化的其它化合物。在这最后提到的一组化合物中，特别有效的是不饱和醇如具有一个或多个双键的醇如乙烯基或烯丙基醇及其缩合衍生物特别是聚乙烯基醇和甘油等。在这种情况下也可按特殊用途而采用混合酯。还可采用脂环族醇如衍生自环戊烷和环己烷及其以低级烷基如1-4碳原子的烷基特别是甲基取代衍生物的脂环族醇。

如用于化妆品则优选采用基本上等同于上列用于卫生、医疗和外科用品的带酯基的交联衍生物。还可考虑采用萜烯醇如上述萜烯醇特别是用于制备香水和芳香奶油的芳香醇等。

在所有本发明交联衍生物中，未交联或未酯化羧基可为游离的或成盐。这种盐可能具有无机碱如碱金属（如钾特别是钠）和铵盐和碱土金属（如钙或镁盐）以及铝盐或有机碱特别是氮化碱如脂族，芳脂族，环脂族或杂环族胺。这些盐可衍生自治疗中适宜的无活性胺或具有治疗作用的胺。

前者可首先采用脂族胺如一，二和三烷基胺（烷基最多18个碳原子）或芳烷基胺（脂族烃部分中碳原子数相同且其中芳基为可由1~3个甲基

或卤原子或羟基取代的苯基)。用于成盐的生物惰性碱也可为环状如单环亚烷基胺(环中含4~6碳原子并可插入选自氮,氧和硫的杂原子)如形成吡啶,哌嗪或吗啉或可由氨基或羟基官能团等进行取代如形成氨基乙醇,乙二胺,麻黄碱或胆碱。

还可形成偏酯的季铵盐如具有上述碳原子数的四烷基铵盐,优选是同类型盐,其中第四烷基有1~4碳原子如甲基。

其治疗作用可加以作用的这些生物活性胺包括氮化和碱性药物如下列药物:

生物碱,肽,噻吩嗪,苯并二嗪,噻吨,激素,维生素,镇痉剂,精神病治疗剂,止吐剂,麻醉剂,安眠药,减食欲药,安定药,肌肉松弛剂,冠状血管舒张剂,抗肿瘤药,抗生素,抗菌素,抗病毒素,抗疟剂,碳酸脱水酶抑制剂,非甾族抗炎剂,血管收缩剂,胆碱功能兴奋剂,胆碱功能拮抗药,肾上腺素功能兴奋剂,肾上腺素能受体阻滞剂,麻醉拮抗药。

本发明上列的所有这些带碱性氮化基团的药物可作为酯用的例子。用治疗活性碱将未酯化羧基成盐可代替或整化用治疗活性醇酯化而得新交联衍生物的载体功能,并因而按第2)点代表了另一应用这些新型化合物作为治疗载体的特殊情况:这些活性碱可由添加化学计量的碱得到的中性盐,或添加过量碱形成的碱式盐或加碱量不足形成的酸式盐载带。

本发明的新透明质酸衍生物特别有用,因为这些衍生物可作为局部用药物特别是用于眼科,其中这些衍生物与角膜上皮的适应性很好并因此具有很好的耐药力,而又没有致酶作用。而且,当这些药物以具有弹性一粘性的浓缩液态或固态用药时,还可在角膜上皮上形成均匀,稳定且透明性以及粘性均极好的薄膜,从而保证了药物的持续生物利用率,所以说可制成具有延迟作用的极好制剂。

这些眼科药物具有特殊的应用价值特别是在兽医领域,因为目前还没有含化学制剂的兽医特效药。的确,人体用产物可用于动物,并且这些产

物总是不能保证具体的作用范围，因此有时在某些用药条件下不适用。例如，在治疗传染性角膜结膜炎，红眼或 IBK（牛，绵羊和山羊的一种常见传染病）时就是这种情况。现在假设，这三种动物都存在特定的病因，具体是：牛身上包含的微生物主要为 *Moraxella bovis*（当然并不排除其它病毒源如 *Rhinotracheitis virus*），绵羊身上为枝原体属，立克次氏体属和衣原体属，山羊身上为立克次氏体属。这种疾病本身表现为急性并趋于快速扩散：最初的症状特征为睑痉挛和过度流泪，然后是流脓，生结膜炎和角膜炎，常常还伴随发烧，食欲不振以及产奶量下降。特别严重的是角膜损伤，最终可导致角膜穿孔。临床疗程为几天至几星期。

采用包含化学制剂的大范围疗法并以局部途径（常常还伴随用甾族抗炎剂）以及全身途径用药如：四环素如土霉素，青霉素如氯苯唑青霉素和苜青霉素，磺胺，多粘菌素 B（伴随用双氯苯咪唑和脱氢皮质〔甾〕醇），氯霉素，泰氏菌素以及左旋霉素。这种疾病的局部治疗尽管特别简便，但仍是一个有待解决的问题，因为就迄今所用的眼科制剂而言，因某些原因还不可能在泪分泌过程中达到疗效的抗生素或磺胺的浓度。这一事实在溶液的情况下完全是可以理解的，只要考虑到上述动物头部明显倾斜位置就可明白这一点，但对于半固态药物来说也是这样，因为其中常用的赋形剂并不具备粘附到角膜表面的必要特性。这是因为其中常常没达到足够高的活性物质浓度，因此就不能达到良好的分布（出现分布梯度）。眼科药的常见 *colliriums* 的这些缺点已见于例如 Slatter et al 在 “*Austr. vet. J.*,” 1982, 59(3), 第69-72 页上的文章。而用本发明的酯，这些缺点均可克服。的确，透明质酸酯在眼科用药中作为载体存在可制成极好的制剂，其中不会出现活性物质浓度梯度，因此其均匀性和透明性均极好并能粘在角膜上皮上，而又没有致酶作用，而且活性物质可作为极好的载体，可能还会达到延迟作用。含这些新型衍生物并可用于眼科治疗的药物主要关心的是缩瞳，伤口愈合，抗炎症以及抗微生物/ 抗生作用。抗生物

质的某些具体例子包括碱性或非碱性抗生素如氨基糖苷，大环内酯，四环素和肽如庆大霉素，新霉素，链霉素，二氢链霉素，卡那霉素，氨基羟丁基卡那霉素 A，妥布霉素，特霉素，红霉素，夹竹桃霉素，碳霉素，螺旋霉素，土霉素，氢吡四环素，〔枯草〕杆菌肽，多粘菌素 B，短杆菌肽，粘杆菌素，氯霉素，林肯霉素，万古霉素，新生霉素，瑞斯托霉素，氯林肯霉素，两性霉素 B，灰黄霉素，制真菌素并可为它们的盐如硫酸盐或硝酸盐或这些抗生素的相同混合物或与其它主要成分如下述成分的混合物。

本发明可有效应用的其它眼科药物包括抗感染药如二乙碳酰嗪，甲苯咪唑，磺胺如磺胺醋酰，磺胺嘧啶，硫代异噻唑；抗病毒素和抗肿瘤素如碘〔代脱氧尿嘧啶核苷〕，腺嘌呤，阿拉伯糖苷，三氟胸〔腺嘧啶脱氧核〕苷，acyclovir, 乙基脱氧尿〔嘧啶核〕苷，溴乙烯基脱氧尿〔嘧啶核〕苷，5-碘-5'-氨基-2',5'-二脱氧尿〔嘧啶核〕苷，甾族抗炎剂如地塞米松，氢化可的松，脱氢皮质〔甾〕醇，氟甲龙, 6 α -甲-11 β -羟孕酮并可为其酯如磷酸酯；非甾族抗炎剂如消炎痛制剂，羟苯保泰松，氟联苯丙酸；伤口愈合剂如表皮生长因子 EGF；局部麻醉剂如丁氧普普卡

因，proparacaine 并可为其盐；胆碱功能兴奋药如毛果芸香碱，乙酰甲胆碱，氨基甲酰胆碱，喹核醇乙酸酯，毒扁豆碱，新斯的明，癸二胺苯脂并可为其盐；胆碱功能阻滞药如阿托品及其盐；肾上腺素功能兴奋药如去甲肾上腺素，肾上腺素，萘唑啉，美速胺并可为其盐；肾上腺素阻滞药如恩特来，噻吗心安，心复安，氯甲苯心安，阿替洛尔，美多心安，烯丙氧心安，醋心安，丁氧胺，心得怡，butadrin, labetalol 并可为其盐。

可单独用或本身混用或与皮肤病学上的其它活性成分混用的活性物质具体例子包括治疗剂如抗感染剂，抗生素，抗微生物剂，抗炎剂，细胞抑制剂，细胞毒素，抗病毒剂，麻醉剂以及保护剂如防晒剂，除臭剂，防腐剂和消毒剂。

从眼科和皮肤科所引的这些具体例子看来，完全有理由相应地假设，

本发明药物还适宜用在各个医学领域如耳鼻喉科，遗传生态学，脉管学，神经学或任何其它可通过局部用药如通过直肠作用进行治疗的内脏器官病理学。当然还可制得非肠道用治疗活性物质与本发明新衍生物的混合药剂。在这后一种情况下，为制得注射用水溶液，应选用低交联度和/或酯化度的透明质酸衍生物。微溶于水或完全不溶于水的衍生物可用来制备适于以有机物质溶液如油溶液形式给药的含活性物质混合药剂。

这里所说的局部用药类药物可为固态如仅含两种成分的混合或单独冻干粉。这些固态药物在与需治疗上皮接触时，按性质同于前述体外制得的溶液的具体上皮的特性，会或多或少形成浓缩物，这代表了本发明的另一特别有利的方面。这些溶液优选是用蒸馏水或无菌盐水制成，其中除含透明质酸酯或其一种盐而外优选是不含任何其它药物载体。这些溶液的浓度也可在例如0.01~75%之间变化，这既适用于两种成分单独取用时的每一成分，而且适用于混合药或盐。特别优选的是制成具有明显弹性-粘性的溶液如其中的药物或其每一成分的含量10~90%。特别重要的这类眼科用药，即处于无水载体（冻干粉）或成浓缩液态或稀释于水中或盐水中，其中还可添加添加剂或辅助物质特别是消毒物质或作为载体的无机盐或其它物质等等。

在本发明的药物中，优选的是根据情况而使其具有适宜于其应用环境的酸度即达到发现上可允许的pH值。例如，在上述带有碱性活性物质的透明质酸酯的盐中pH值可通过适当地调节多糖，其盐以及碱性物质本身的用量来进行调整。因此，如带有碱性物质的透明质酸酯盐的酸度太高，就需采用例如上述无机碱如钠或钾或铵水合物来中和过量的游离酸基。

制备本发明HY酯的方法

本发明新交联衍生物可用已知的方法将羧酸酯化而得，其中例如可在

催化剂如无机强酸或酸式离子交换剂存在下用上述多元醇处理游离透明质酸或在无机或有机碱存在下用能引入符合要求的醇残基的醚化剂处理游离透明质酸。可采用文献中列出的醚化剂特别是各种无机酸或有机酸如氢酸即烷基卤如甲基碘或上述二元醇碱中的其它烷基的酯等等。

反应可在适宜的溶剂如醇优选是对应引入羧基的烷基的醇中进行但也可在非极性溶剂如酮，醚如二噁烷或非质子传递溶剂如二甲亚砜中进行。作为碱可采用例如碱金属，碱土金属或镁的水合物或银氧化物或这些金属之一的碱性盐如碳酸盐，而在有机碱中可采用叔氮化碱如吡啶或可力丁。还可用碱式离子交换剂代替碱。

另一酯化方法包含采用带有机氮化碱的金属盐或盐类如铵盐或铵代用盐。优选采用碱金属或碱土金属盐但也可采用任何其它金属盐。醚化剂在这种情况下也是上述的那些醚化剂，而且所用溶剂亦相同。优选是采用非质子传递溶剂如二甲亚砜和二甲基甲酰胺。这些酯化方法当然还可用于制备上述的简单酯。

根据上述美国同未决申请中所述新型独创的透明质酸简单酯的制备方法，可有利地按以下方法进行制备，即开始在非质子传递溶剂中用醚化剂处理透明质酸的季铵盐，所说非质子传递溶剂如二烷基亚砜，二烷基羧基酰胺特别是二低级烷基亚砜首先采用二甲亚砜以及二低级烷基低级脂族酰胺如二甲基或二乙基甲酰胺或乙酰胺。反应优选在约0 ~ 100 °C下进行特别是在约25 ~ 75 °C如约30 °C下进行。优选是将酯化剂逐渐加入溶于上述溶剂之一如二甲亚砜中的上述铵盐中进行酯化反应。

这同一种方法还可用于制备本发明的典型交联酯即两羧基间的桥键很容易由衍生自上述多元醇的醚化物质在透明质酸的季铵盐上形成。作为起始的季铵盐优选采用四低级烷基铵化合物，其中烷基优选含1 ~ 6 碳原子。作用第一种选择应采用透明质酸四丁铵。这些季铵盐的制法是将透明质酸的金属盐，优选是上述之一特别是钠或钾盐在水溶液中与用季铵碱成盐

的磺酸型树脂反应。再将洗脱液冻干即可得透明质酸四烷基铵。

衍生自低级烷基特别是1 ~ 6 碳原子的烷基的透明质酸四烷基铵是新型的，因此构成本发明的另一目的。出乎意料的是，已证明这些盐在上述非质子传递溶剂中是可溶的，因此按上述方法将透明质酸酯化就特别容易并达到很高的收率。所以说仅用这一方法就可准确定出待酯化透明质酸羧基的数目。

上述具体方法的一种方案包括在催化量季铵盐如碘化四丁基铵存在下将悬浮于适宜溶剂如二甲亚砜中的透明质酸钾或钠盐与醚化剂反应。为了按照本发明制得新型酯，可采用任何来源的透明质酸如从上述天然起始物料如从鸡冠中提取出的酸。这些酸的制备过程已见于文献，优选是应采用提纯之后的透明质酸。根据本发明，优选的是采用直接通过提取分子量变化很大例如完整酸分子量在约90% ~ 80% 和0.2 % 之间优选在5 % 和0.2 % 之间的有机物料而得到的包括完整酸各分子馏份的透明质酸。这些份数可通过已见于文献的各种方法得到，即采用水解或氧化或酶催剂或物理方法如机械办法或采用辐射法，因此而在其提纯过程中往往形成原生提取物（参见上述 Balazs et al 在“Cosmetics & Toiletries”中发表的文章等）。所得的这些分子馏份的分离和提纯可用例如已知方法如分子过滤法来完成。

一种适用于本发明的提纯的HY馏份为例如 Balazs 在小册子“*Healon*” - 其在眼外科中的应用指南- D. Miller & R. Stegmann, eds. John Wiley & Sons N. Y. 81983, p.5中指明的“抗炎症透明质酸钠- N I F- Na H A”。就作为制备本发明酯的起始物料来说，非常重要的一点是从透明质酸如从鸡冠中提取出来的称为“*Hyalastine*”和“*Hyalectin*”的透明质酸得到的两种提纯馏份。*Hyalastine* 馏份的平均分子量为约50000 ~ 100000，而*Hyalectin*馏份的平均分子量为约500000 ~ 730000。还已分离出了与这离子馏份结合的另

一馏份，特点是其平均分子量为约250000~350000。这一结合馏份可在特定起始物料中使透明质酸总收率达到80%，而Hyalect in馏份的起始HY收率为30%，Hyalastine 馏份的起始HY收率为50%。这些馏份的制备方法见于实施例38和40。

在透明质酸的新交联衍生物中，非酯化羧基可为游离的或成盐或部分成盐，因此可得到各种不同的交联产物，即剩余羧基为游离羧基或成盐的产物，剩余羧基完全或部分成酯的产物，而且在后者情况下剩余基团又可为游离的或成盐。因此，可得到各种产物，其物理性质特别是其酸度，粘性-弹性以及其形成凝胶的能力。保持为游离基的酸基团数目对于制备具有特定pH值的药物是非常重要的。

新衍生物盐的制备可按已知方法如将透明质酸衍生物与计算碱性量的碱性水合物如碱金属的碱性盐如碳酸盐或碳酸氢盐进行反应来完成。例如可首先制得透明质酸衍生物和碱的水溶液，然后用适宜的离子交联剂将这些物质从其盐的水溶液中分离出来，再于低温如0~20℃下将两种溶液混合起来；如果这样得到的盐易溶于水，就将其冻干，而同时溶解度低的盐就可通过浓缩或过滤或倾析而分离出来，之后还可进行干燥。在采用以这些新交联衍生物进行载带的有机碱的情况下，作为这些碱与这些衍生物的盐而得到的药物可为中性，酸性或碱性，这要视添加量是否为化学计量或是否为碱量不足或碱过量而定。

按照本发明的特定方面，可用前述分离出来并可进行提纯的盐作起始物料制得上述类型的无水状态药物如无定形粉，这些药物在与欲治疗人体组织接触时可形成凝胶状并具有持续粘性-弹性的浓缩水溶液。这些性质的药物也可保持为高度稀释液并可代用上述无水盐，或多或少浓缩的水或盐水溶液，还可添加其它赋形剂或添加剂如其它调节pH值和渗透压的无机盐。当然还可用这些盐再加入其它常规药物制剂配方中所用的赋形剂或辅料制成凝胶，植入药物，乳膏或软膏等。

在本发明的新型产物中，上述酯及其盐以及下述实施例中表明的产物是特别重要的。

本发明还包括这些新酯及其盐制备方法的改进方案，其中的制备过程可在任何阶段中断或以中间产物作为起始物料来进行其余步骤或就地形成起始物料。

本发明现以下述非限制性实施例详加说明，其中DM S O为二甲亚砜。实施例所述产物中包括本发明交联酯，其中有一定百分比的透明质酸羧基用多元醇酯化，其余羧基成盐或用一元醇酯化。表1中列出了实施例1~37的各种产物，其中标明了用特定多元醇酯化的羧基数目以及用钠成盐和/或用特定一元醇酯化的羧基数目。

实施例1

用乙醇部分酯化并用1,3-丙二醇部分交联的透明质酸(H Y)的制备

在25°C于严格无湿的氮气气氛和避光条件下，将6.21g H Y的四丁铵盐(10m Eq)溶解于248ml的DM S O中。然后向其中加入0.078g碘乙烷(0.5mM)，将所得溶液于30°C下搅拌15小时。再加入0.074g的1,3-二碘丙烷(0.25mM，相当于0.5m Eq)，均化后将此溶液于30°C放置24小时。

为使残余四丁铵羧基转化为钠盐，向所得溶液中加入2.5g Na Cl的100ml蒸馏水溶液，同时从外部用冰水浴冷却。

加入500ml丙酮，过滤分离沉淀物，用100ml丙酮/水(5:1)洗涤3次并用100ml纯丙酮洗涤3次后进行真空干燥。

得到4.01g标题化合物。

按照Cundiff et al (Anal. Biochem. 33, 1028, 1961)的方法测定羟乙基，测得乙醇含量为0.56% w/w(理论值为0.574)。通过在50°C下与

过量 0.1 N 的 Na OH 皂化反应 30 分钟进行总酯基分析。以酚酞作为指示剂用 0.1 N 的 H Cl 滴定测定过量值。由此可测出总酯基含量为 0.24m Eq/g (理论值为 0.25)。

实施例 2

用乙醇部分酯化并用 1,3-丙二醇部分交联的透明质酸 (H Y) 的制备

在 25°C 于严格无湿的氮气气氛和避光条件下，将 6.21g H Y 的四丁铵盐 (10m Eq) 溶解于 248ml 的 DM S O 中。然后向其中加入 0.078g 碘乙烷 (0.5mM)，将所得溶液于 30°C 下搅拌 15 小时。再加入 0.148g 的 1,2-二碘丙烷 (0.5mM，相当于 1m Eq)，均化后将此溶液于 30°C 放置 24 小时。

为使残余四丁铵羧基转化为钠盐，向所得溶液中加入 2.5g Na Cl 的 100ml 蒸馏水溶液，同时从外部用冰水浴冷却。

加入 500ml 丙酮，过滤分离沉淀物，用 100ml 丙酮/水 (5:1) 洗涤 3 次并用 100ml 纯丙酮洗涤 3 次后进行真空干燥。

得到 3.99g 标题化合物。

按照 Cundiff et al 的方法测定羟乙基，测得乙醇含量为 0.56% w/w (理论值为 0.574)。通过在 50°C 下与过量 0.1 N 的 Na OH 皂化反应 30 分钟进行总酯基分析。以酚酞作为指示剂用 0.1 N 的 H Cl 滴定测定过量值。由此可测出总酯基含量为 0.36m Eq/g (理论值为 0.374)。

实施例 3

用乙醇部分酯化并用 1,3-丙二醇部分交联的透明质酸 (H Y) 的制备

在25℃于严格无湿的氮气气氛和避光条件下，将6.21g HY的四丁铵盐(10m Eq)溶解于248ml 的DM SO中。然后向其中加入0.078g碘乙烷(0.5mM),将所得溶液于30℃下搅拌15小时。再加入0.296g的1,3-二碘丙烷(1mM, 相当于2m Eq), 均化后将此溶液于30℃放置24小时。

为使残余四丁铵羧基转化为钠盐，向所得溶液中加入2.5g Na Cl 的100ml 蒸馏水溶液，同时从外部用冰水浴冷却。

加入500ml 丙酮，过滤分离沉淀物，用100ml 丙酮/ 水(5:1)洗涤3次并用100ml 纯丙酮洗涤3次后进行真空干燥。

得到3.98g 标题化合物。

按照 Cundiff et al的方法测定羟乙基，测得乙醇含量为0.56% w/w (理论值为0.574)。通过在50℃下与过量 0.1N的Na OH皂化反应30分钟进行总酯基分析。以酚酞作为指示剂用 0.1N的H Cl 滴定测定过量值。由此可测出总酯基含量为 0.61m Eq/g(理论值为0.623)。

实施例4

用乙醇部分酯化并用1,3-丙二醇部分交联的透明质酸(HY)的制备

在25℃于严格无湿的氮气气氛和避光条件下，将6.21g HY的四丁铵盐(10m Eq)溶解于248ml 的DM SO中。然后向其中加入0.156g碘乙烷(1mM),将所得溶液于30℃下搅拌15小时。再加入0.296g的1,3-二碘丙烷(1mM, 相当于2m Eq), 均化后将此溶液于30℃放置24小时。

为使残余四丁铵羧基转化为钠盐，向所得溶液中加入2.5g Na Cl 的100ml 蒸馏水溶液，同时从外部用冰水浴冷却。

加入500ml 丙酮，过滤分离沉淀物，用100ml 丙酮/ 水(5:1)洗涤3次并用100ml 纯丙酮洗涤3次后进行真空干燥。

得到4.00g 标题化合物。

按照 Cundiff et al的方法测定羟乙基，测得乙醇含量为1.08% w/w (理论值为1.15)。通过在50℃下与过量 0.1N的Na OH皂化反应30分钟进行总酯基分析。以酚酞作为指示剂用 0.1N的HCl 滴定测定过量值。由此可测出总酯基含量为0.735m Eq/g(理论值为0.747)。

实施例5

用乙醇部分酯化并用1,3-丙二醇部分交联的透明质酸 (HY) 的制备

在25℃于严格无湿的氮气气氛和避光条件下，将6.21g HY的四丁铵盐(10m Eq)溶解于248ml 的DM SO中。然后向其中加入0.312g碘乙烷(2mM)，将所得溶液于30℃下搅拌15小时。再加入0.296g的1,3-二碘丙烷(1mM，相当于2m Eq)，均化后将此溶液于30℃放置24小时。

为使残余四丁铵羧基转化为钠盐，向所得溶液中加入2.5g Na Cl 的100ml 蒸馏水溶液，同时从外部用冰水浴冷却。

加入500ml 丙酮，过滤分离沉淀物，用100ml 丙酮/水(5:1)洗涤3次并用100ml 纯丙酮洗涤3次后进行真空干燥。

得到4.01g 标题化合物。

按照 Cundiff et al的方法测定羟乙基，测得乙醇含量为2.18% w/w (理论值为2.29)。通过在50℃下与过量 0.1N的Na OH皂化反应30分钟进行总酯基分析。以酚酞作为指示剂用 0.1N的HCl 滴定测定过量值。由此可测出总酯基含量为 0.98m Eq/g(理论值为0.995)。

实施例6

用乙醇部分酯化的和用1,3-丙二醇部分交联的透明质酸 (HY) 的制备

在25℃于严格无湿的氮气气氛和避光条件下，将6.21g HY的四丁铵盐(10m Eq)溶解于248ml 的DM SO中。然后向其中加入0.624g碘乙烷(4mM)，将所得溶液于30℃下搅拌15小时。再加入0.296g的1,3-二碘丙烷(1mM，相当于2m Eq)，均化后，将此溶液在30℃下放置24小时。

为使残余四丁铵羧基转化为钠盐，向所得溶液中加入溶于100ml 蒸馏水中的2.5g Na Cl，同时从外部用水/冰浴将其冷却。

加入500ml 丙酮，通过过滤将沉淀物分离出，用100ml 丙酮/水(5:1)洗涤3次，再用100ml 纯丙酮洗涤3次，然后将其真空干燥。

得到4.00g 标题化合物。

按照 Cundiff et al的方法进行羟乙基测定，测得乙醇含量为4.5% (w/w)(理论值为4.57)。通过在50℃下与过量0.1N的Na OH皂化反应30分钟，进行总酯基分析。采用酚酞作为指示剂用0.1N的HCl 滴定测定Na OH的过量。由此，可测定出总酯基含量为1.43m Eq/g(理论值为1.49)。

实施例7

用乙醇部分酯化的和用1,3-丙二醇部分交联的透明质酸 (HY) 的制备

在25℃，绝对干燥状态，于氮气气氛和避光条件下，将6.21g HY的四丁铵盐(10m Eq)溶解于248ml 的DM SO中。然后向其中加入0.934g碘乙烷(6mM)，将所得溶液于30℃下搅拌15小时。再加入0.296g的1,3-二碘

丙烷 (1mM, 相当于2m Eq), 均化后, 将此溶液在30℃下放置24小时。

为使残余四丁铵羧基转化为钠盐, 向所得溶液中加入溶于100ml 蒸馏水中的2.5g Na Cl, 同时从外部用水/ 冰浴将其冷却。

加入500ml 丙酮, 通过过滤将沉淀分离出, 用100ml 丙酮/ 水(5:1) 洗涤3 次, 再用100ml 纯丙酮洗涤3 次, 然后将其真空干燥。

得到4.03g 标题化合物。

按照 Cundiff et al的方法进行羟乙基测定, 测得乙醇含量为6.74% (w/w)(理论值为6.83)。在50℃下用过量 0.1N的 Na OH皂化反应30分钟进行总酯基分析。以酚酞作为指示剂用 0.1N的 HCl 滴定测定 Na OH的过量。由此, 可测定出总酯基含量为 1.96m Eq/g(理论值为 1.98)。

实施例8

用乙醇部分酯化的和用1,3-丙二醇部分交联的透明质酸 (HY) 的制备

在25℃, 绝对干燥状态, 于氮气气氛和避光条件下, 将6.21g HY的四丁铵盐(10m Eq)溶解于248ml 的 DM SO中。然后向其中加入1.170g碘乙烷 (7.5mM), 将所得溶液于30℃下搅拌15小时。再加入0.296g的1,3-二碘丙烷 (1mM, 相当于2m Eq), 均化后, 将此溶液在30℃下放置24小时。

为使残余四丁铵羧基转化为钠盐, 向所得溶液中加入溶于100ml 蒸馏水中的2.5g Na Cl, 同时从外部用水/ 冰浴将其冷却。

加入500ml 丙酮, 通过过滤将沉淀分离出, 用100ml 丙酮/ 水(5:1) 洗涤3 次, 再用100ml 纯丙酮洗涤3 次, 然后将其真空干燥。

得到4.02g 标题化合物。

按照 Cundiff et al的方法进行羟乙基测定，测得乙醇含量为8.46% (w/w)(理论值为8.52)。在50℃下用过量 0.1N的Na OH皂化反应30分钟进行总酯基分析。以酚酞作为指示剂用 0.1N的HCl 滴定测定Na OH的过量。由此，可测定出总酯基含量为 2.28m Eq/g(理论值为2.34)。

实施例9

用乙醇部分酯化的和用1,3-丙二醇部分交联的透明质酸 (HY) 的制备

在25℃，绝对干燥状态，于氮气气氛和避光条件下，将6.21g HY的四丁铵盐(10m Eq)溶解于248ml 的DM SO中。然后向其中加入0.624g碘乙烷 (4mM),将所得溶液于30℃下搅拌15小时。再加入0.592g的1,3-二碘丙烷 (2mM，相当于4m Eq)，均化后，将此溶液于30℃下放置24小时。

为使残余四丁铵羧基转化为钠盐，向所得溶液中加入溶于100ml 蒸馏水中的2.5g Na Cl,同时从外部用水/冰浴将其冷却。

加入500ml 丙酮，用过滤法将沉淀分离出，用100ml 丙酮/水(5:1)洗涤3次，再用100ml 纯丙酮洗涤3次，然后将其真空干燥。

得到3.99g 标题化合物。

按照 Cundiff et al的方法进行羟乙基测定，测得乙醇含量为4.42% (w/w)(理论值为4.57)。在50℃下用过量 0.1N的Na OH皂化反应30分钟进行总酯基分析。以酚酞作为指示剂用 0.1N的HCl 滴定测定Na OH的过量。由此，可测定出总酯基含量为 1.96m Eq/g(理论值为1.99)。

实施例10

用乙醇部分酯化的和用1,4-丁二醇部分交联的透明质酸 (HY) 的制备

在25℃, 绝对干燥状态, 于氮气气氛和避光条件下, 将6.21g HY的四丁铵盐(10m Eq)溶解于248ml 的DM SO中。然后向其中加入0.312g碘乙烷(2mM), 将所得溶液于30℃下搅拌15小时。再加入0.310g的1,3-二碘丁烷(1mM, 相当于2m Eq), 均化后, 将此溶液于30℃下放置24小时。

为使残余四丁铵羧基转化为钠盐, 向所得溶液中加入溶于100ml 蒸馏水中的2.5g Na Cl, 同时从外部用水/ 冰浴将其冷却。

加入500ml 丙酮, 用过滤法将沉淀分离出, 用100ml 丙酮/ 水(5:1)洗涤3次, 再用100ml 纯丙酮洗涤3次, 然后将其真空干燥。

得到4.02g 标题化合物。

按照 Cundiff et al的方法进行羟乙基测定, 测得乙醇含量为2.3 % (w/w)(理论值为2.28)。在50℃下用过量 0.1N的Na OH皂化反应30分钟进行总酯基分析。以酚酞作为指示剂用 0.1N的HCl 滴定测定Na OH的过量。由此, 可测定出总酯基含量为 0.97m Eq/g(理论值为0.99)。

实施例11

用乙醇部分酯化的和用1,4-丁二醇部分交联的透明质酸 (HY) 的制备

在25℃, 绝对干燥状态, 于氮气气氛和避光条件下; 将6.21g HY的

四丁铵盐(10m Eq)溶解于248ml 的DM S O中。然后向其中加入0.624g碘乙烷(4mM),将所得溶液于30℃下搅拌15小时。再加入0.310g的1,4-二碘丁烷(1mM,相当于2m Eq),均化后,将此溶液于30℃下放置24小时。

为使残余四丁铵羧基转化为钠盐,向所得溶液中加入溶于100ml 蒸馏水中的2.5g Na Cl,同时从外部用水/冰浴将其冷却。

加入500ml 丙酮,用过滤法将沉淀分离出,用100ml 丙酮/水(5:1)洗涤3次,再用100ml 纯丙酮洗涤3次,然后将其真空干燥。

得到3.95g 标题化合物。

按照 Cundiff et al的方法进行羟乙基测定,测得乙醇含量为2.25%(w/w)(理论值为2.28)。在50℃下用过量 0.1N的Na OH皂化反应30分钟进行总酯基分析。以酚酞作为指示剂用 0.1N的H Cl 滴定测定Na OH的过量。由此,可测定出总酯基含量为 1.41m Eq/g(理论值为1.48)。

实施例12

用乙醇部分酯化的和用1,4-丁二醇部分交联的透明质酸(HY)的制备

在25℃,绝对干燥状态,于氮气气氛和避光条件下,将6.21g HY的四丁铵盐(10m Eq)溶解于248ml 的DM S O中。然后向其中加入0.936g碘乙烷(6mM),将所得溶液于30℃下搅拌15小时。再加入0.310g的1,4-二碘丁烷(1mM,相当于2m Eq),均化后,将此溶液于30℃下放置24小时。

为使残余四丁铵羧基转化为钠盐,向所得溶液中加入溶于100ml 蒸馏水中的2.5g Na Cl,同时从外部用水/冰浴将其冷却。

加入500ml 丙酮,用过滤法将沉淀分离出,用100ml 丙酮/水(5:1)

洗涤3次，再用100ml 纯丙酮洗涤3次，然后将其真空干燥。

得到3.98g 标题化合物。

按照 Cundiff et al的方法进行羟乙基测定，测得乙醇含量为6.69% (w/w)(理论值为6.81)。在50℃下用过量 0.1N的Na OH皂化反应30分钟进行总酯基分析。以酚酞作为指示剂用 0.1N的HCl 滴定测定Na OH的过量。由此，可测定出总酯基含量为 1.91m Eq/g(理论值为1.97)。

实施例13

用乙醇部分酯化的和用1,6-己二醇部分交联的透明质酸 (HY) 的制备

在25℃，绝对干燥状态，于氮气气氛和避光条件下，将6.21g HY的四丁铵盐(10m Eq)溶解于248ml 的DM SO中。然后向其中加入0.312g碘乙烷 (2mM),将所得溶液于30℃下搅拌15小时。再加入0.244g的1,6-二溴己烷 (1mM，相当于2m Eq)，均化后，将此溶液于30℃下放置24小时。

为使残余四丁铵羧基转化为钠盐，向所得溶液中加入溶于100ml 蒸馏水中的2.5g Na Cl,同时从外部用水/冰浴将其冷却。

加入500ml 丙酮，用过滤法将沉淀分离出，用100ml 丙酮/水(5:1)洗涤3次，再用100ml 纯丙酮洗涤3次，然后将其真空干燥。

得到4.05g 标题化合物。

按照 Cundiff et al的方法进行羟乙基测定，测得乙醇含量为2.18% (w/w)(理论值为2.27)。在50℃下用过量 0.1N的Na OH皂化反应30分钟进行总酯基分析。以酚酞作为指示剂用 0.1N的HCl 滴定测定Na OH的过量。由此，可测定出总酯基含量为 0.96m Eq/g(理论值为

0.985)。

实施例14

用乙醇部分酯化的和用1,6-己二醇部分交联的透明质酸 (HY) 的制备

在25℃，绝对干燥状态，于氮气气氛和避光条件下，将6.21g HY的四丁铵盐(10m Eq)溶解于248ml 的DM SO中。然后向其中加入0.624g碘乙烷(4mM)，将所得溶液于30℃下搅拌15小时。再加入0.244g的1,6-二溴己烷(1mM，相当于2m Eq)，均化后，将此溶液于30℃下放置24小时。

为使残余四丁铵羧基转化为钠盐，向所得溶液中加入溶于100ml 蒸馏水中的2.5g Na Cl，同时从外部用水/冰浴将其冷却。

加入500ml 丙酮，用过滤法将沉淀分离出，用100ml 丙酮/水(5:1)洗涤3次，再用100ml 纯丙酮洗涤3次，然后将其真空干燥。

得到4.02g 标题化合物。

按照 Cundiff et al的方法进行羟乙基测定，测得乙醇含量为4.46% (w/w)(理论值为4.52)。在50℃下用过量 0.1N的Na OH皂化反应30分钟进行总酯基分析。以酚酞作为指示剂用 0.1N的HCl 滴定测定Na OH的过量。由此，可测定出总酯基含量为 1.43m Eq/g(理论值为1.47)。

实施例15

用乙醇部分酯化的和用1,6-己二醇部分交联的透明质酸 (HY) 的制备

在25℃，绝对干燥状态，于氮气气氛和避光条件下，将6.21g HY的四丁铵盐(10m Eq)溶解于248ml 的DM SO中。然后向其中加入0.934g碘乙烷(6mM),将所得溶液于30℃下搅拌15小时。再加入0.244g的1,6-二溴己烷(1mM，相当于2m Eq)，均化后，将此溶液于30℃下放置24小时。

为使残余四丁铵羧基转化为钠盐，向所得溶液中加入溶于100ml 蒸馏水中的2.5g Na Cl,同时从外部用水/冰浴将其冷却。

加入500ml 丙酮，用过滤法将沉淀分离出，用100ml 丙酮/水(5:1)洗涤3次，再用100ml 纯丙酮洗涤3次，然后将其真空干燥。

得到4.00g 标题化合物。

按照 Cundiff et al的方法进行羟乙基测定，测得乙醇含量为6.68% (w/w)(理论值为6.76)。在50℃下用过量 0.1N的Na OH皂化反应30分钟进行总酯基分析。以酚酞作为指示剂用 0.1N的H Cl 滴定测定Na OH的过量。由此，可测定出总酯基含量为 1.91m Eq/g(理论值为1.96)。

实施例16

用乙醇部分酯化的和用1,8-辛二醇部分交联的透明质酸(HY)的制备

在25℃，绝对干燥状态，于氮气气氛和避光条件下，将6.21g HY的四丁铵盐(10m Eq)溶解于248ml 的DM SO中。然后向其中加入0.078g碘乙烷(0.5mM),将所得溶液于30℃下搅拌15小时。再加入0.068g的1,8-二溴辛烷(0.25mM，相当于0.5m Eq)，均化后，将此溶液于30℃下放置24小时。

为使残余四丁铵羧基转化为钠盐，向所得溶液中加入溶于100ml 蒸馏水中的2.5g Na Cl,同时从外部用水/冰浴将其冷却。

加入500ml 丙酮，用过滤法将沉淀分离出，用100ml 丙酮/水(5:1)洗涤3次，再用100ml 纯丙酮洗涤3次，然后将其真空干燥。

得到3.99g 标题化合物。

按照 Cundiff et al的方法进行羟乙基测定，测得乙醇含量为0.54% (w/w)(理论值为0.571)。在50℃下用过量 0.1N的 Na OH皂化反应30分钟进行总酯基分析。以酚酞作为指示剂用 0.1N的 H Cl 滴定测定 Na OH的过量。由此，可测定出总酯基含量为 0.23m Eq/g(理论值为 0.25)。

实施例17

用乙醇部分酯化的和用1,8-辛二醇部分交联的透明质酸 (HY) 的制备

在25℃，绝对干燥状态，于氮气气氛和避光条件下，将6.21g HY的四丁铵盐(10m Eq)溶解于248ml 的 DM SO中。然后向其中加入0.078g碘乙烷 (0.5mM),将所得溶液于30℃下搅拌15小时。再加入0.136g的1,8-二碘辛烷 (0.5mM, 相当于1m Eq),均化后，将此溶液于30℃下放置24小时。

为使残余四丁铵羧基转化为钠盐，向所得溶液中加入溶于100ml 蒸馏水中的2.5g Na Cl,同时从外部用水/冰浴将其冷却。

加入500ml 丙酮，用过滤法将沉淀分离出，用100ml 丙酮/水(5:1)洗涤3次，再用100ml 纯丙酮洗涤3次，然后将其真空干燥。

得到3.97g 标题化合物。

按照 Cundiff et al的方法进行羟乙基测定，测得乙醇含量为0.55%

(w/w)(理论值为0.569)。在50℃下用过量 0.1 N的 Na OH皂化反应30分钟进行总酯基分析。以酚酞作为指示剂用 0.1 N的 H Cl 滴定测定 Na OH的过量。由此，可测定出总酯基含量为 0.35m Eq/g(理论值为 0.37)。

实施例18

用乙醇部分酯化的和用1,8-辛二醇部分交联的透明质酸 (HY) 的制备

在25℃，绝对干燥状态，于氮气气氛和避光条件下，将6.21g HY的四丁铵盐(10m Eq)溶解于248ml 的 DM SO中。然后向其中加入0.078g碘乙烷 (0.5mM),将所得溶液于30℃下搅拌15小时。再加入0.272g的1,8-二溴辛烷 (1mM, 相当于2m Eq), 均化后，将此溶液于30℃下放置24小时。

为使残余四丁铵羧基转化为钠盐，向所得溶液中加入溶于100ml 蒸馏水中的2.5g Na Cl,同时从外部用水/冰浴将其冷却。

加入500ml 丙酮，用过滤法将沉淀分离出，用100ml 丙酮/水(5:1)洗涤3次，再用100ml 纯丙酮洗涤3次，然后将其真空干燥。

得到4.05g 标题化合物。

按照 Cundiff et al的方法进行羟乙基测定，测得乙醇含量为0.55% (w/w)(理论值为0.564)。在50℃下用过量 0.1 N的 Na OH皂化反应30分钟进行总酯基分析。以酚酞作为指示剂用 0.1 N的 H Cl 滴定测定 Na OH的过量。由此，可测定出总酯基含量为 0.60m Eq/g(理论值为 0.61)。

实施例19

用乙醇部分酯化的和用1,8-辛二醇部分交联的透明质酸 (HY) 的制备

在25℃, 绝对干燥状态, 于氮气气氛和避光条件下, 将6.21g HY的四丁铵盐(10m Eq)溶解于248ml 的DM SO中。然后向其中加入0.156g碘乙烷 (1mM), 将所得溶液于30℃下搅拌15小时。再加入0.272g的1,8-二溴辛烷 (1mM, 相当于2m Eq), 均化后, 将此溶液于30℃下放置24小时。

为使残余四丁铵羧基转化为钠盐, 向所得溶液中加入溶于100ml 蒸馏水中的2.5g Na Cl, 同时从外部用水/冰浴将其冷却。

加入500ml 丙酮, 用过滤法将沉淀分离出, 用100ml 丙酮/水(5:1)洗涤3次, 再用100ml 纯丙酮洗涤3次, 然后将其真空干燥。

得到4.01g 标题化合物。

按照 Cundiff et al的方法进行羟乙基测定, 测得乙醇含量为1.09% (w/w)(理论值为1.13)。在50℃下用过量 0.1N的Na OH皂化反应30分钟进行总酯基分析。以酚酞作为指示剂用 0.1N的H Cl 滴定测定Na OH的过量。由此, 可测定出总酯基含量为 0.70m Eq/g(理论值为0.73)。

实施例20

用乙醇部分酯化的和用1,8-辛二醇部分交联的透明质酸 (HY) 的制备

在25℃, 绝对干燥状态, 于氮气气氛和避光条件下, 将6.21g HY的四丁铵盐(10m Eq)溶解于248ml 的DM SO中。然后向其中加入0.312g碘

乙烷 (2mM), 将所得溶液于30℃下搅拌15小时。再加入0.272g的1,8-二溴辛烷 (1mM, 相当于2m Eq), 均化后, 将此溶液于30℃下放置24小时。

为使残余四丁铵羧基转化为钠盐, 向所得溶液中加入溶于100ml 蒸馏水中的2.5g Na Cl, 同时从外部用水/ 冰浴将其冷却。

加入500ml 丙酮, 用过滤法将沉淀分离出, 用100ml 丙酮/ 水(5:1) 洗涤3次, 再用100ml 纯丙酮洗涤3次, 然后将其真空干燥。

得到4.05g 标题化合物。

按照 Cundiff et al的方法进行羟乙基测定, 测得乙醇含量为2.05% (w/w)(理论值为2.25)。在50℃下用过量 0.1N的 Na OH皂化反应30分钟进行总酯基分析。以酚酞作为指示剂用 0.1N的 H Cl 滴定测定 Na OH的过量。由此, 可测定出总酯基含量为 0.96m Eq/g(理论值为 0.98)。

实施例21

用乙醇部分酯化的和用1,8-辛二醇部分交联的透明质酸 (HY) 的制备

在25℃, 绝对干燥状态, 于氮气气氛和避光条件下, 将6.21g HY的四丁铵盐(10m Eq)溶解于248ml 的 DM SO中。然后向其中加入0.624g碘乙烷 (4mM), 将所得溶液于30℃下搅拌15小时。再加入0.272g的1,8-二溴辛烷 (1mM, 相当于2m Eq), 均化后, 将此溶液于30℃下放置24小时。

为使残余四丁铵羧基转化为钠盐, 向所得溶液中加入溶于100ml 蒸馏水中的2.5g Na Cl, 同时从外部用水/ 冰浴将其冷却。

加入500ml 丙酮, 用过滤法将沉淀分离出, 用100ml 丙酮/ 水(5:1) 洗涤3次, 再用100ml 纯丙酮洗涤3次, 然后将其真空干燥。

得到3.99g 标题化合物。

按照 Cundiff et al的方法进行羟乙基测定，测得乙醇含量为4.39% (w/w)(理论值为4.49)。在50℃下用过量 0.1N的 Na OH皂化反应30分钟进行总酯基分析。以酚酞作为指示剂用 0.1N的 HCl 滴定测定 Na OH的过量。由此，可测定出总酯基含量为 1.43m Eq/g(理论值为 1.46)。

实施例22

用乙醇部分酯化的和用1,8-辛二醇部分交联的透明质酸 (HY) 的制备

在25℃，绝对干燥状态，于氮气气氛和避光条件下，将6.21g HY的四丁铵盐(10m Eq)溶解于248ml 的 DM SO中。然后向其中加入0.934g碘乙烷 (6mM),将所得溶液于30℃下搅拌15小时。再加入0.272g的1,8-二溴辛烷 (1mM，相当于2m Eq)，均化后，将此溶液于30℃下放置24小时。

为使残余四丁铵羧基转化为钠盐，向所得溶液中加入溶于100ml 蒸馏水中的2.5g Na Cl,同时从外部用水/冰浴将其冷却。

加入500ml 丙酮，用过滤法将沉淀分离出，用100ml 丙酮/水(5:1)洗涤3次，再用100ml 纯丙酮洗涤3次，然后将其真空干燥。

得到4.10g 标题化合物。

按照 Cundiff et al的方法进行羟乙基测定，测得乙醇含量为6.66% (w/w)(理论值为6.72)。在50℃下用过量 0.1N的 Na OH皂化反应30分钟进行总酯基分析。以酚酞作为指示剂用 0.1N的 HCl 滴定测定 Na OH的过量。由此，可测定出总酯基含量为 1.89m Eq/g(理论值为 1.94)。

实施例23

用乙醇部分酯化的和用1,8-辛二醇部分交联的透明质酸 (HY) 的制备

在25℃, 绝对干燥状态, 于氮气气氛和避光条件下, 将6.21g HY的四丁铵盐(10m Eq)溶解于248ml 的DM SO中。然后向其中加入1.170g碘乙烷 (7.5mM), 将所得溶液于30℃下搅拌15小时。再加入0.272g的1,8-二溴辛烷 (1mM, 相当于2m Eq), 均化后, 将此溶液于30℃下放置24小时。

为使残余四丁铵羧基转化为钠盐, 向所得溶液中加入溶于100ml 蒸馏水中的2.5g Na Cl, 同时从外部用水/ 冰浴将其冷却。

加入500ml 丙酮, 用过滤法将沉淀分离出, 用100ml 丙酮/ 水(5:1)洗涤3次, 再用100ml 纯丙酮洗涤3次, 然后将其真空干燥。

得到4.03g 标题化合物。

按照 Cundiff et al的方法进行羟乙基测定, 测得乙醇含量为8.27% (w/w)(理论值为8.38)。在50℃下用过量 0.1N的Na OH皂化反应30分钟进行总酯基分析。以酚酞作为指示剂用 0.1N的HCl 滴定测定Na OH的过量。由此, 可测定出总酯基含量为 2.05m Eq/g(理论值为2.3)。

实施例24

用乙醇部分酯化的和用1,8-辛二醇部分交联的透明质酸 (HY) 的制备

在25℃，绝对干燥状态，于氮气气氛和避光条件下，将6.21g HY的四丁铵盐(10m Eq)溶解于248ml 的DM SO中。然后向其中加入0.624g碘乙烷(4mM)，将所得溶液于30℃下搅拌15小时。再加入0.544g的1,8-二溴辛烷(1mM，相当于2m Eq)，均化后，将此溶液于30℃下放置24小时。

为使残余四丁铵羧基转化为钠盐，向所得溶液中加入溶于100ml 蒸馏水中的2.5g Na Cl,同时从外部用水/冰浴将其冷却。

加入500ml 丙酮，用过滤法将沉淀分离出，用100ml 丙酮/水(5:1)洗涤3次，再用100ml 纯丙酮洗涤3次，然后将其真空干燥。

得到4.15g 标题化合物。

按照 Cundiff et al的方法进行羟乙基测定，测得乙醇含量为4.36% (w/w)(理论值为4.42)。在50℃下用过量 0.1N的Na OH皂化反应30分钟进行总酯基分析。以酚酞作为指示剂用 0.1N的H Cl 滴定测定 Na OH的过量。由此，可测定出总酯基含量为 1.90m Eq/g(理论值为1.92)。

实施例25

用乙醇部分酯化的和用1,10-癸二醇部分交联的透明质酸(HY)的制备

在25℃，绝对干燥状态，于氮气气氛和避光条件下，将6.21g HY的四丁铵盐(10m Eq)溶解于248ml 的DM SO中。然后向其中加入0.312g碘乙烷(2mM)，将所得溶液于30℃下搅拌15小时。再加入0.300g的1,10-二溴癸烷(1mM，相当于2m Eq)，均化后，将此溶液于30℃下放置24小时。

为使残余四丁铵羧基转化为钠盐，向所得溶液中加入溶于100ml 蒸馏水中的2.5g Na Cl,同时从外部用水/冰浴将其冷却。

加入500ml 丙酮，用过滤法将沉淀分离出，用100ml 丙酮/水(5:1)洗涤3次，再用100ml 纯丙酮洗涤3次，然后将其真空干燥。

得到4.12g 标题化合物。

按照 Cundiff et al的方法进行羟乙基测定，测得乙醇含量为2.12% (w/w)(理论值为2.24)。在50℃下用过量 0.1N的 Na OH皂化反应30分钟进行总酯基分析。以酚酞作为指示剂用 0.1N的 H Cl 滴定测定 Na OH的过量。由此，可测定出总酯基含量为 0.94m Eq/g(理论值为 0.97)。

实施例26

用乙醇部分酯化的和用1,10-癸二醇部分交联的透明质酸 (HY) 的制备

在25℃，绝对干燥状态，于氮气气氛和避光条件下，将6.21g HY的四丁铵盐(10m Eq)溶解于248ml 的 DM SO中。然后向其中加入0.624g碘乙烷 (4mM),将所得溶液于30℃下搅拌15小时。再加入0.300g的1,10-二溴癸烷 (1mM, 相当于2m Eq),均化后，将此溶液于30℃下放置24小时。

为使残余四丁铵羧基转化为钠盐，向所得溶液中加入溶于100ml 蒸馏水中的2.5g Na Cl,同时从外部用水/冰浴将其冷却。

加入500ml 丙酮，用过滤法将沉淀分离出，用100ml 丙酮/水(5:1)洗涤3次，再用100ml 纯丙酮洗涤3次，然后将其真空干燥。

得到4.10g 标题化合物。

按照 Cundiff et al的方法进行羟乙基测定，测得乙醇含量为4.36%

(w/w)(理论值为4.46)。在50℃下用过量 0.1N的Na OH皂化反应30分钟进行总酯基分析。以酚酞作为指示剂用 0.1N的HCl 滴定测定Na OH的过量。由此，可测定出总酯基含量为 1.43m Eq/g(理论值为1.45)。

实施例27

用乙醇部分酯化的和用1,10- 癸二醇部分交联的透明质酸 (HY) 的制备

在25℃，绝对干燥状态，于氮气气氛和避光条件下，将6.21g HY的四丁铵盐(10m Eq)溶解于248ml 的DM SO中。然后向其中加入0.934g碘乙烷 (6mM)，将所得溶液于30℃下搅拌15小时。再加入0.300g的1,10- 二溴癸烷 (1mM，相当于2m Eq)，均化后，将此溶液于30℃下放置24小时。

为使残余四丁铵羧基转化为钠盐，向所得溶液中加入溶于100ml 蒸馏水中的2.5g Na Cl,同时从外部用水/ 冰浴将其冷却。

加入500ml 丙酮，用过滤法将沉淀分离出，用100ml 丙酮/ 水(5:1)洗涤3次，再用100ml 纯丙酮洗涤3次，然后将其真空干燥。

得到4.12g 标题化合物。

按照 Cundiff et al的方法进行羟乙基测定，测得乙醇含量为6.5 % (w/w)(理论值为6.67)。在50℃下用过量 0.1N的Na OH皂化反应30分钟进行总酯基分析。以酚酞作为指示剂用 0.1N的HCl 滴定测定Na OH的过量。由此，可测定出总酯基含量为 1.87m Eq/g(理论值为1.93)。

实施例28

与乙醇部分酯化并与 α , α' -二羟基对二甲苯部分交联的透明质酸 (HY) 的制备

在25℃, 绝对干燥, 氮气气氛和避光条件下, 将6.21g HY的四丁铵盐(10m Eq)溶解在248ml DM SO中。加入0.624g乙基碘(4mM)并在30℃下将该溶液搅拌15小时。加入0.264g α , α' -二溴对二甲苯(1mM, 相当于2m Eq)并在均化后将该溶液在30℃下放置24小时。

为了使残余四丁铵羧基转化为钠盐, 向得到的溶液中加入氯化钠溶液(将2.5g Na Cl 溶解在100ml 蒸馏水中), 并用水/ 冰浴从外部冷却之。

加入500ml 丙酮, 过滤分离沉淀, 用100ml 丙酮/ 水(5:1)洗涤3次并用100ml 纯丙酮洗涤3次, 然后真空干燥。可得到4.04g 标题化合物。

按照 Cundiff等人的方法进行羟乙基测定, 乙醇含量为4.4 % p/p(理论值为4.5)。通过在50℃下与过量氢氧化钠(0.1N)进行皂化反应30分钟进行总酯基分析。用酚酞作指示剂, 用0.1N盐酸滴定可确定过量。这样, 可测得总酯基含量为1.36 m Eq/g(理论值为1.47)。

实施例29

与苯甲醇部分酯化并与1,8-辛二醇部分交联的透明质酸 (HY) 的制备

在25℃, 绝对干燥, 氮气气氛和避光条件下, 将6.21g HY的四丁铵盐(10m Eq)溶解在248ml DM SO中。加入0.342克苄基溴(2mM)并将该溶液在30℃下搅拌15小时。加入0.272g二溴辛烷(1mM, 相当于2m Eq)并在均化后将该溶液在30℃下放置24小时。

为了使残余四丁铵羧基转化为钠盐，向得到的溶液中加入氯化钠溶液（将2.5g NaCl溶解在100ml蒸馏水中），并用水/冰浴从外部使之冷却。

加入500ml丙酮，过滤分离沉淀，用100ml丙酮/水（5：1）洗涤3次并用100ml纯丙酮洗涤3次，然后真空干燥。可得到4.15g标题化合物。

通过在50℃与过量氢氧化钠（0.1N）进行30分钟皂化反应进行总酯基分析。用酚酞作指示剂，用0.1N盐酸滴定确定过量。这样可测得总酯基含量为0.93 mEq/g（理论值为0.95）。

实施例30

与苯甲醇部分酯化并与 α ， α' -二羟基对二甲苯部分交联的透明质酸（HY）的制备

在25℃，绝对干燥，氮气气氛和避光条件下，将6.21g HY的四丁铵盐（10mEq）溶解在248ml DMSO中。加入0.342g苄基溴（2mM）并将该溶液在30℃下搅拌15小时。加入0.264g α ， α' -二溴对二甲苯（1mM，相当于2mEq）并在均化后将该溶液在30℃下放置24小时。

为了使残余四丁铵羧基转化为钠盐，向得到的溶液中加入氯化钠溶液（将2.5g NaCl溶解在100ml蒸馏水中），并用水/冰浴从外部使之冷却。

加入500ml丙酮，过滤分离沉淀，用100ml丙酮/水（5：1）洗涤3次并用100ml纯丙酮洗涤3次，然后真空干燥。可得到4.11g标题化合物。

通过在50℃与过量氢氧化钠（0.1N）进行30分钟皂化反应进行总酯基分析。用酚酞作指示剂，用0.1N盐酸滴定确定过量。这样可测得总酯基含量为0.92 mEq/g（理论值为0.95）。

实施例31

与1,3-丙二醇部分交联的透明质酸 (HY) 的制备

在25℃，绝对干燥，氮气气氛和避光条件下，将6.21g HY的四丁铵盐(10m Eq)溶解在248ml DM SO中。加入0.296g 1,3-二碘丙烷(1mM，相当于2毫克当量)并在均化后将该溶液在30℃下放置24小时。

为了使残余四丁铵羧基转化为钠盐，向得到的溶液中加入氯化钠溶液(将2.5g Na Cl溶解在100ml蒸馏水中)，并用水/冰浴从外部使之冷却。

加入500ml 丙酮，过滤分离沉淀，用100ml 丙酮/水(5:1)洗涤3次并用100ml 纯丙酮洗涤3次，然后真空干燥。可得到3.98g 标题化合物。

通过在50℃与过量氢氧化钠(0.1N)进行30分钟皂化反应进行总酯基分析。用酚酞作指示剂，用0.1N盐酸滴定确定过量。这样，可测得总酯基含量为0.47 m Eq/g(理论值为0.499)。

实施例32

与1,3-丙二醇部分交联的透明质酸 (HY) 的制备

在25℃，绝对干燥，氮气气氛和避光条件下，将6.21g HY的四丁铵盐(10m Eq)溶解在248ml DM SO中。加入0.740g 1,3-二碘丙烷(2.5mM，相当于5m Eq)并在均化后将该溶液在30℃下放置24小时。

为了使残余四丁铵羧基转化为钠盐，向得到的溶液中加入氯化钠溶液(将2.5g Na Cl溶解在100ml蒸馏水中)，并用水/冰浴从外部使之冷却。

加入500ml 丙酮，过滤分离沉淀，用100ml 丙酮/水(5:1)洗涤3次并用100ml 纯丙酮洗涤3次，然后真空干燥。可得到3.89g 标题化合物。

通过在50℃与过量氢氧化钠(0.1N)进行30分钟皂化反应进行总酯基

分析。用酚酞作指示剂，用 0.1 N 盐酸滴定确定过量。这样，可测得总酯基含量为 1.21 mEq/g (理论值为 1.25)。

实施例 33

与 1,3-丙二醇部分交联的透明质酸 (HY) 的制备

在 25°C，严格无潮湿，氮气气氛和避光条件下，将 6.21g HY 的四丁铵盐 (10mEq) 溶解在 248ml DM SO 中。加入 1.184g 1,3-二碘丙烷 (4mM，相当于 8mEq) 并在均化后将该溶液在 30°C 下放置 24 小时。

为了使残余四丁铵羧基转化为钠盐，向得到的溶液中加入氯化钠溶液 (将 2.5g NaCl 溶解在 100ml 蒸馏水中)，并用水/冰浴从外部使之冷却，加入 500ml 丙酮，过滤分离沉淀，用 100ml 丙酮/水 (5:1) 洗涤 3 次并用 100ml 纯丙酮洗涤 3 次，然后真空干燥。可得到 3.87g 标题化合物。

通过在 50°C 与过量氢氧化钠 (0.1 N) 进行 30 分钟皂化反应进行总酯基分析。用酚酞作指示剂，用 0.1 N 盐酸滴定确定过量。这样，可测得总酯基含量为 1.97 mEq/g (理论值为 2.00)。

实施例 34

与 1,4-丁二醇部分交联的透明质酸 (HY) 的制备

在 25°C，绝对干燥，氮气气氛和避光条件下，将 6.21g HY 的四丁铵盐 (10mEq) 溶解在 248ml DM SO 中。加入 0.310 克二碘丁烷 (1mM，相当于 2mEq) 并在均化后将该溶液在 30°C 下放置 24 小时。

为了使残余四丁铵羧基转化为钠盐，向得到的溶液中加入氯化钠溶液

(将2.5g Na Cl 溶解在100ml 蒸馏水中),并用水/冰浴从外部使之冷却。

加入500ml 丙酮,过滤分离沉淀,用100ml 丙酮/水(5:1)洗涤3次并用100ml 纯丙酮洗涤3次,然后真空干燥。可得到4.00g 标题化合物。

通过在50℃与过量氢氧化钠(0.1N)进行30分钟皂化反应进行总酯基分析。用酚酞作指示剂,用0.1N盐酸滴定确定过量。这样,可测得总酯基含量为0.492m Eq/g(理论值为0.497)。

实施例35

与1,6-己二醇部分交联的透明质酸(HY)的制备

在25℃,绝对干燥,氮气气氛和避光条件下,将6.21g HY的四丁铵盐(10m Eq)溶解在248ml DM SO中。加入0.370g碘化四丁铵(1mM)并将该溶液在20℃下搅拌1小时。加入0.244克1,6-二溴己烷(1mM,相当于2m Eq)并在均化后将该溶液在30℃下放置24小时。

为了使残余四丁铵羧基转化为钠盐,向得到的溶液中加入氯化钠溶液(将2.5g Na Cl 溶解在100ml 蒸馏水中),并用水/冰浴从外部使之冷却。

加入500ml 丙酮,过滤分离沉淀,用100ml 丙酮/水(5:1)洗涤3次并用100ml 纯丙酮洗涤3次,然后真空干燥。可得到4.01g 标题化合物。

通过在50℃与过量氢氧化钠(0.1N)进行30分钟皂化反应进行总酯基分析。用酚酞作指示剂,用0.1N盐酸滴定确定过量。这样,可测得总酯基含量为0.486m Eq/g(理论值为0.494)。

实施例36

与1,8-辛二醇部分交联的透明质酸(HY)的制备

在25℃，绝对干燥，氮气气氛和避光条件下，将6.21g HY的四丁铵盐(10m Eq)溶解在248ml DM SO中。加入0.370g碘化四丁铵(1mM)并将该溶液在20℃下搅拌1小时。加入0.272克1,8-二溴辛烷(1mM，相当于2m Eq)并在均化后将该溶液在30℃下放置24小时。

为了使残余四丁铵羧基转化为钠盐，向得到的溶液中加入氯化钠溶液(将2.5g Na Cl溶解在100ml蒸馏水中)，并用水/冰浴从外部使之冷却。

加入500ml丙酮，过滤分离沉淀，用100ml丙酮/水(5:1)洗涤3次并用100ml纯丙酮洗涤3次，然后真空干燥。可得到4.02g标题化合物。

通过在50℃与过量氢氧化钠(0.1N)进行30分钟皂化反应进行总酯基分析。用酚酞作指示剂，用0.1N盐酸滴定确定过量。这样，可测得总酯基含量为0.478m Eq/g(理论值为0.490)。

实施例37

与1,10-二癸醇部分交联的透明质酸(HY)的制备

在25℃，绝对干燥，氮气气氛和避光条件下，将6.21g HY的四丁铵盐(10m Eq)溶解在248ml DM SO中。加入0.369g碘化物(1mM)并将该溶液在20℃下搅拌1小时。加入0.300克1,10-二溴癸烷(1mM，相当于2m Eq)并在均化后将该溶液在30℃下放置24小时。

为了使残余四丁铵羧基转化为钠盐，向得到的溶液中加入氯化钠溶液(将2.5g Na Cl溶解在100ml蒸馏水中)，并用水/冰浴从外部使之冷却。

加入500ml丙酮，过滤分离沉淀，用100ml丙酮/水(5:1)洗涤3次并用100ml纯丙酮洗涤3次，然后真空干燥。可得到3.99g标题化合物。

通过在50℃与过量氢氧化钠(0.1N)进行30分钟皂化反应进行总酯基

分析。用酚酞作指示剂，用 0.1 N 盐酸滴定确定过量。这样，可测得总酯基含量为 0.476m Eq/g (理论值为 0.487)。

实施例 37 A

40% 的羧基用辛二醇酯化，20% 的羧基用可的松 (C₂₁) 酯化，40% 的羧基成盐 (Na) 的透明质酸 (HY) 的 (部分和混合的) 辛烷醇和可的松的酯的制备。

在 25°C 下将 6.2g 的分子量为 125,000, 相当于 10m Eq 单体单元的 HY 的四丁铵盐溶解于 310ml 二甲亚砜中，加入 1.09g (4m Eq) 的 1,8-二溴辛烷，将此溶液于 30°C 下放置 24 小时。再加入 0.85g (2m Eq) 的 21- 溴-4- 孕 (甾) 烯 -17 α -1,3,11,20- 三酮，将此溶液于 30°C 下保持 24 小时。

然后加入含 100ml 水和 5 克 Na Cl 的溶液，在稳定搅拌下，将得到的混合物缓慢倒入 2000ml 的丙酮中。将沉淀滤出，用 100ml 的丙酮/水 (5:1) 洗涤 3 次，再用 100ml 丙酮洗涤 3 次，最后在 30°C 下进行真空干燥 8 小时。

得到 4.5g 标题化合物。

用 Na₂CO₃ 的氢化醇溶液进行轻度碱性水解并用氯仿萃取后，按照 BRITISH PHARMACOPEA, 1980, P224, 进行可的松的定量测定。

表1

各种交联产物的百分比组成

实施例编号	每100个中与下列基团酯化的羧基的数目	每100个中与下列基团交联的羧基的数目	每100个中与钠成盐的羧基的数目
1	5 / CH ₃ -CH ₂ -	5 / -(CH ₂) ₃ -	90
2	5 / CH ₃ -CH ₂ -	10 / -(CH ₂) ₃ -	85
3	5 / CH ₃ -CH ₂ -	20 / -(CH ₂) ₃ -	75
4	10 / CH ₃ -CH ₂ -	20 / -(CH ₂) ₃ -	70
5	20 / CH ₃ -CH ₂ -	20 / -(CH ₂) ₃ -	60
6	40 / CH ₃ -CH ₂ -	20 / -(CH ₂) ₃ -	40
7	60 / CH ₃ -CH ₂ -	20 / -(CH ₂) ₃ -	20
8	75 / CH ₃ -CH ₂ -	20 / -(CH ₂) ₃ -	5
9	40 / CH ₃ -CH ₂ -	40 / -(CH ₂) ₃ -	20
10	20 / CH ₃ -CH ₂ -	20 / -(CH ₂) ₄ -	60
11	40 / CH ₃ -CH ₂ -	20 / -(CH ₂) ₄ -	40
12	60 / CH ₃ -CH ₂ -	20 / -(CH ₂) ₄ -	20
13	20 / CH ₃ -CH ₂ -	20 / -(CH ₂) ₆ -	60
14	40 / CH ₃ -CH ₂ -	20 / -(CH ₂) ₆ -	40
15	60 / CH ₃ -CH ₂ -	20 / -(CH ₂) ₆ -	20
16	5 / CH ₃ -CH ₂ -	5 / -(CH ₂) ₈ -	90
17	5 / CH ₃ -CH ₂ -	10 / -(CH ₂) ₈ -	85
18	5 / CH ₃ -CH ₂ -	20 / -(CH ₂) ₈ -	75
19	10 / CH ₃ -CH ₂ -	20 / -(CH ₂) ₈ -	70
20	20 / CH ₃ -CH ₂ -	20 / -(CH ₂) ₈ -	60
21	40 / CH ₃ -CH ₂ -	20 / -(CH ₂) ₈ -	40
22	60 / CH ₃ -CH ₂ -	20 / -(CH ₂) ₈ -	20
23	75 / CH ₃ -CH ₂ -	20 / -(CH ₂) ₈ -	5
24	40 / CH ₃ -CH ₂ -	40 / -(CH ₂) ₈ -	20
25	20 / CH ₃ -CH ₂ -	20 / -(CH ₂) ₁₀ -	60
26	40 / CH ₃ -CH ₂ -	20 / -(CH ₂) ₁₀ -	40
27	60 / CH ₃ -CH ₂ -	20 / -(CH ₂) ₁₀ -	20
28	40 / CH ₃ -CH ₂ -	20 / -(CH ₂ -O-CH ₂)-	40
29	20 / O-CH ₂ -	20 / -(CH ₂) ₈ -	60
30	20 / O-CH ₂ -	20 / -(CH ₂ -O-CH ₂)-	60
31	-	20 / -(CH ₂) ₃ -	80
32	-	50 / -(CH ₂) ₃ -	50
33	-	80 / -(CH ₂) ₃ -	20
34	-	20 / -(CH ₂) ₄ -	80
35	-	20 / -(CH ₂) ₆ -	80
36	-	20 / -(CH ₂) ₈ -	80
37	-	20 / -(CH ₂) ₁₀ -	80

实施例38

可获得无发炎活性的 Hyalastine 和 Hyalectin 馏分混合物的方法

用绞碎器将新鲜的或冷冻的鸡冠(3000 克)绞碎,然后在机械匀浆器中仔细搅匀。将所得糊状物放在美国钢铁学会(A I S I) 316 不锈钢容器或玻璃容器中并用10体积无水丙酮处理。以50转/分的速度搅拌6 小时。放置12小时使分离,然后通过虹吸去掉丙酮。重复经常丙酮提取直到弃去的丙酮达到正常的湿度为止(Karl-Fischer法)。然后离心并在一适宜温度下真空干燥5 ~8 小时。这样可获得约500 ~600 克鸡冠干粉。

在适量盐酸半胱氨酸存在下,在用磷酸盐缓冲的含水介质中用木瓜蛋白酶(0.2g)使300 克干粉酶解。在60~65℃的恒温下以60转/分的速度搅拌24小时。然后冷却至25℃并加入 Celite^R (60g),继续搅拌1 小时。将所得混合物过滤直到获得一澄清液体为止。用分子排阻限为30,000的膜将澄清液体进行分子超滤以使分子量在30,000以上的分子保留在膜上。

将5 ~6 倍原体积超滤,将蒸馏水连续加入到超滤的产物中。停止加水并继续超滤直到体积减少到原来的1/3 为止。加入氯化钠使残余液体达0.1 M并使温度达50℃。在60转/分的搅拌下,加入45g 氯化十六烷基吡啶噻。搅拌60分钟,然后加入50克 Celite^R。在搅拌下,整个体系的温度为25℃并收集离心后形成的沉淀。将所得沉淀物悬浮在含有0.5 % 氯化十六烷基吡啶噻的0.01M氯化钠溶液(5升)中。在50℃下搅拌60分钟;然后使温度达到25℃并将沉淀物离心。重复洗涤3 次,最后在一个盛有3 升0.05M氯化钠溶液(含有0.5 % 氯化十六烷基吡啶噻)的接受器中收集沉淀。

在 60 转 / 分下搅拌 60 分钟并使温度保持恒定在 25℃ 2 小时。离心除去上清液。用含有 0.5% 氯化十六烷基吡啶噻的 0.1M 氯化钠溶液重复该程序数次。将混合物离心并弃去上清液。将沉淀物分散在含有 0.5% 氯化十六烷基吡啶噻的 0.30M 氯化钠溶液 (3 升) 中。搅拌该混合物, 同时收集沉淀和澄清液体。每次用 0.5 升同样的水溶液重复提取沉淀物 3 次以上。

最后, 除去残余沉淀并在一个单独的容器中收集澄清液体。在不断搅拌下使液体温度达到 50℃。然后用氯化钠使液体达到 0.23M。加入 1g 氯化十六烷基吡啶噻, 连续搅拌 12 小时。

将混合物冷却至 25℃, 然后先用 Celite^R 过滤, 再用过滤器过滤。而后再用分子排阻限为 30, 000 的膜进行分子超滤, 加入 0.33M 氯化钠溶液使 3 倍初体积超滤。停止加入氯化钠溶液并使体积减少到初体积的 1 / 4。这样浓缩的溶液在搅拌 (60 转 / 分) 和 25℃ 条件下用 3 体积的乙醇 (95%) 沉淀。离心收集沉淀并弃去上清液。将沉淀物溶解在 1 升 0.1M 氯化钠溶液中并用 3 体积 95% 的乙醇重新沉淀。收集沉淀并先用 75% 的乙醇洗涤 3 次, 再用无水乙醇洗涤 3 次, 最后用无水丙酮洗涤 3 次。

这样得到的产物 (HYALASTINE+HYALECTIN 馏分) 具有 250, 000~350, 000 的平均分子量。

透明质酸的产率为原来新鲜组织的 0.6%。

实施例 39

用实施例 38 所述方法从所得混合物中获得馏分 Hyalastine 的方法

将用实施例 38 所述方法得到的混合物溶解在无热原蒸馏水中, 每 1ml 水溶解 10mg 产物。采用在膜的顶部不加水的浓缩方法, 将所得溶液通过分子排阻限为 200, 000 的滤膜进行分子过滤。在通过分子排阻限为 200, 000 的膜的超滤过程中, 分子量大于 200, 000 的分子不能通过, 而较小的分子则可与水一起通过膜。在过滤步骤中, 膜

顶部不加水，这样体积可减小，因此分子量大于 200,000 的分子的浓度增加。继续超滤直到膜顶部的体积减少到初体积的 10%。加入 2 体积无热原蒸馏水，再超滤直到体积减少到原来的 1/3 为止。重复操作两次以上。用氯化钠使通过膜的溶液达到 0.1M。然后用 4 体积 95% 的乙醇沉淀。将沉淀物用 75% 的乙醇洗涤 3 次，然后真空干燥。

这样得到的产物（HYALASTINE 馏分）具有 50,000~100,000 的平均分子量。

透明质酸的产率为原超始新鲜组织的 0.4%。

实施例 40

获得 Hyallectin 馏分的方法

将在分子排阻限为 200,000 的超滤膜顶部的容器中收集的浓缩溶液（见实施例 39）用水稀释，直到获得含有 5mg/ml 的透明质酸的溶液为止，通过基于葡糖醛酸剂量的定量分析可测得。

在氯化钠中使溶液达到 0.1M，然后用 4 体积 95% 的乙醇沉淀。将沉淀物用 75% 的乙醇洗涤 3 次，然后真空干燥。

这样得到的产物（HYALECTIN 馏分）具有 500,000~730,000 的分子量，相当于分子链长度约为 2,500~3,500 糖单位并具有高纯度的特殊的透明质酸馏分。透明质酸的产率为原起始新鲜组织的 0.2%。

实施例 41

与各种醇类部分酯化的透明质酸（HY）交联衍生物薄膜的制备
DMSO 溶液，在加入各种成分并均化后（如在实施例 6~15, 19~30 和 37 中所得到的），在所需厚度的玻璃盘中并在氮气、绝对干燥和避光条件下使之成层，历时 24 小时。

这样获得的交联并酯化的透明质酸衍生物薄膜（其中也有四丁铵羧基存在）先在 1% 的氯化钠中，再在蒸馏水中于 4℃ 下透析，定期更换溶液。然后将上述交联衍生物的含钠盐的薄膜放在两层赛璐玢膜

之间并在 37℃ 的厚板干燥器中真空干燥。

医疗产品和药物制剂

以本发明的新交联衍生物及其盐类作为有效成分的药物制剂，不但在可能与有治疗活性的醇类进一步酯化和 / 或成盐并预计与透明质酸本身适应症相同的交联衍生物情况下，而且在与有治疗活性的醇类所形成的酯（预计可用于相应于这类醇的适应症）的情况下，都含有普通的赋形剂并可用作口服、直肠使用、非肠道使用、皮下使用、局部使用、皮内使用或局部使用。因此它们可为固体或半固体形式，例如，丸剂、片剂、明胶胶囊剂、胶囊剂、栓剂、软明胶胶囊剂。对于非肠道使用和皮下使用，可能的使用形式是肌肉内给药或皮内给药，或适用于灌輸或静脉内注射，因此，有可能将活性化合物制成溶液或冻干粉，活性化合物可与一种或多种可药用的赋形剂或稀释剂混合，适合于上述用途并具有适合于生理液容积渗透克分子浓度的类型。对于局部使用，应考虑喷雾形式的制剂，例如喷鼻剂，乳剂或软膏（为适宜皮内使用所制成的局部使用的膏药）。

本发明的制剂可用于人或动物。作为溶液、喷雾剂、软膏和乳剂它们最好含有 0.01% ~ 10% 的有效成分，而作为固体形式的制剂含有 1% ~ 100%，最好含有 5% ~ 50% 的活性化合物。使用剂量取决于适应症，所要求的疗效和所选用的给药途径。这种制剂的日用量可从相应的用于相应的治疗（如用于人或马的关节炎的治疗）的透明质酸和有治疗活性的醇（其作用有待利用）的已知制剂的日用量推断出来。例如，与皮质酮形成的透明质酸酯的剂量可从其在该酯中的含量和其在已知药物制剂中的常用量中推出。

在化妆用品中，可将本发明的新交联衍生物及其盐类与常用于该工艺的赋形剂混合，例如，已在上面列出的用于药物制剂的那些。上述所有局部使用的乳剂，软膏，洗剂都可使用，其中本发明的新交联衍生物可构成化妆品的有效成分，可加入其它有化妆活性的成分，如甾类化合物，例如 17-乙炔甾酮，或上述成分之一。在这些制剂中，

本发明的新交联衍生物最好是与无任何化妆作用的醇（如低级脂族醇）所形成的酯类，例如上述衍生物之一。在这些制剂中，如在游离透明质酸及其盐类情况下，效果是由于多糖成分的固有化妆特性。

然而，化妆用品可基于具有不同于透明质酸的特殊作用的物质，例如消毒剂，防晒剂，防水或再生物质，或抗皱或散发气味的物质，尤其是香料。在这种情况下本发明的新交联衍生物本身又可为活性成分并可从具有这些特性的醇类（如香料中的高级脂族醇或萜烯醇）中衍生而来或可起具有上述特性物质并与之相结合的载体的作用。因此，特别重要的是类似于上述药物的化妆用组合物，其中有药理活性的成分可被一种美容因子和各种盐类所取代。

上述从用于香料工业的醇中衍生出的酯类的应用表示出向该技术迈进的一个重要步骤，因为它可使香味成分缓慢、恒定和持久的释放。

本发明的一个重要应用与上述的卫生用品和外科用品，它们的生产方法和应用有关。因此，本发明包括所有类似于市售的用品，如插入物或眼内晶状体，它们含有透明质酸，也含有代替游离酸或其盐的本发明的新交联衍生物。

根据本发明，新的外科用品和卫生用品完全可以用本发明的新交联衍生物来提供，这些衍生物可通过适当的有机溶液再生，能制成片状或线状，因而得到外科用的薄膜，片状物和线状物，在皮肤严重损伤（如烧伤）时可作为辅助物和取代物，或用作外科的缝合线。本发明尤其包括这些用途和这些物品的一种制备方法，该方法在于（a）在适宜的有机溶剂中形成透明质酸酯或它的一种盐的溶液，适宜的有机溶剂如酮，酯或非质子传递溶剂，如羧酸酰胺，尤其是具有1~5个碳原子的脂族酸的二烷基酰胺，它是从具有1~6个碳原子的烷基衍生而来的，一种最首要的溶剂是来自有机亚砷，即，最多具有6个碳原子烷基的二烷基亚砷，特别是二甲基亚砷或二乙基亚砷，再一个首要溶剂是具有低沸点的氟化溶剂，尤其是六氟异丙醇，（b）将该溶

液制成片状或线状和 (c) 有机溶剂与另一种有机或水溶剂接触而除去，该有机或水溶剂可与第一种溶剂混合并且其中的透明质酸酯不会溶解，特别是低级脂族醇，例如乙醇（湿纺法），或者若已用沸点不太高的溶剂来制备透明质酸衍生物溶液，则在除去该溶剂时要用气流并且特别是适当加热的氮气（干纺法）。采用干-湿纺法体系也可能更为有利。

用本发明的新交联衍生物所获得的线可用于棉绒制品，这些棉绒制品则可用于包扎伤口和手术。这种棉绒的使用在生物体中具有可生物降解的特殊优点。它们通过所含的酶起作用。这些酶可分解透明质酸，相应的醇和存在于生物体中的化合物，确切地说，一种无害化合物（如一种醇）中的酯。因此这种棉绒并包括上述的线还可在手术后放在生物体内，因为由于上述的降解过程，这些棉绒以后被缓慢吸收。

在上述卫生用品和外科用品的制备中，加入增塑物便于增强其机械特性，如对于线来说，可改善其对缠结的耐受性。例如这些增塑剂可以是脂肪酸的碱性盐，如硬脂酸钠或棕榈酸钠，具有多个碳原子的有机酸酯，等等。

本发明的新交联衍生物的另一个应用（其中它们的可降解性可被存在于生物体中的酯酶所利用）可以用于药物皮下埋植的胶囊制剂或用于注射（如皮下和肌肉内途径）的微胶囊制剂为代表。对于具有缓慢释放和随后“延迟”作用的皮下药物的应用，一直沿用由硅材料制成的胶囊，其缺点是这样的胶囊在生物体内易于移动并不可能重新找到它们。显然，用本发明的新交联衍生物不再存在这种危险。含有本发明的新交联衍生物的微胶囊制剂也是极为重要的，可避免通常与其使用有关的、到目前为止由于上述种种原因还或多或少受到限制的问题发生。该制剂可开辟一个新的将获得注射后“延迟”作用的应用领域。

本发明的新交联衍生物在内科学和外科学领域中的再一个应用可以各种固体插入物如板，盘，片等的制品为代表，这些插入物可代替

金属插入物，该金属插入物含有常用的合成塑料材料，且经过一段时间后打算除去该插入物。

含有动物胶原的制剂具有蛋白的性质，经常引起不良反应，如炎症或排斥。对于本发明的新交联衍生物，即使它们是起源于动物的透明质酸而不是人类的透明质酸，也不存在这种危险，因为在各种动物物种的多糖之间不存在不相容性。

另一个用途是克服缺陷和增强软组织。有一段时间一直觉得需要一些安全而有效的生物材料用来代替已除去或受损的软组织。许多异成型性材料（包括石蜡，聚四氟乙烯糊，硅和牛胶原蛋白）已被用来代替失去的软组织。然而，这些材料在皮肤组织发生不良和持久的变化，在原地移动并起负反应，因此需要有一种万能的生物材料用于医学方面。本发明的新交联衍生物可被安全而有效地用来克服软组织的这类缺陷，如座疮丘疹，手术后萎缩不齐，Mohs的化学外科，唇裂伤和由年龄引起的皱纹。

本发明的新交联衍生物在内科学和外科学领域中的应用还包括那些用膨胀材料，特别是海绵状材料制成的制剂用于各种类型的创伤或损伤的药物治疗。

下面是按本发明制备的配方的典型实例。

配方 1: 每 100ml 含可的松的洗眼剂含下列组分:

透明质酸与可的松和辛二醇的偏酯	0.300g
和混合酯(实施例 37A)对羟基苯甲酸乙酯	0.010g
对羟基苯甲酸甲酯	0.050g
氯化钠	0.900g
注射制剂用水 / Q、B、A	100ml

配方 2: 每 100 克含透明质酸与 1,3-丙二醇的偏酯的乳剂含下列组分:

透明质酸与 1,3-丙二醇	0.2g
的偏酯(实施例 31)一硬脂酸聚乙二醇酯 400	10.000g

CETIOL V	5.000g
LANETTE F.U.	2.000g
对羟基苯甲酸甲酯	0.075g
对羟基苯甲酸丙酯	0.050g
二氢乙酸钠	0.100g
GLYCERINE F.U.	1.500g
山梨醇 70	1.500g
试验乳油	0.050g
注射制剂用水	100.00g