

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

C08B 37/08

C08B 37/10

A61L 31/00 A61K 47/48

# [12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 93102682.2

[45] 授权公告日 2002 年 4 月 24 日

[11] 授权公告号 CN 1083455C

[22] 申请日 1993.2.5 [24] 颁证日 2002.4.24

[21] 申请号 93102682.2

[30] 优先权

[32] 1992.2.5 [33] JP [31] 47744/92

[32] 1992.7.8 [33] JP [31] 203209/92

[32] 1992.12.21 [33] JP [31] 355441/92

[73] 专利权人 生化学工业株式会社

地址 日本东京

[72] 发明人 松田武久 M·J·莫加丹姆

樱井胜清

[56] 参考文献

JP 昭 56-47439A 1981.4.30 C08L5/08

JP 昭 60-219202A 1985.11.1 C08B37/00

US3960685 1976.6.1 C08L1/00

US4331697 1982.5.25 A01N1/02

审查员 郭 俭

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 姜建成

权利要求书 6 页 说明书 59 页 附图页数 23 页

[54] 发明名称 可光固化的葡糖氨基聚糖衍生物,其交联物及制法和应用

[57] 摘要

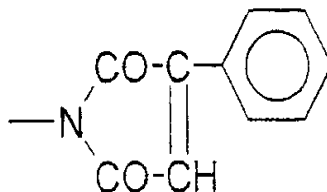
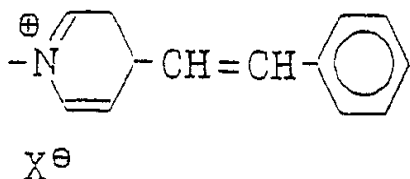
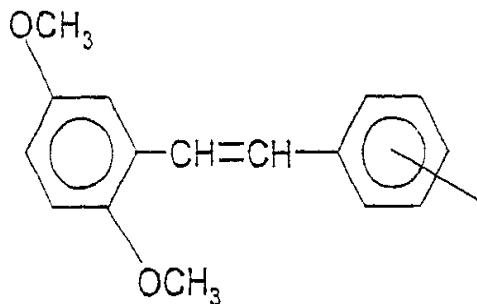
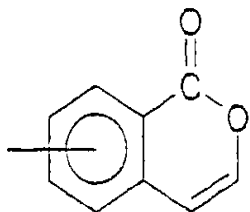
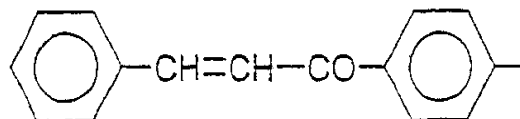
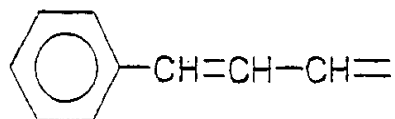
提供了高度安全和生物相容的可光固化的葡糖氨基聚糖(GAG)衍生物和交联的葡糖氨基聚糖,制备交联的GAG的方法及以可光固化的GAG衍生物或交联的GAG为基础的医用材料。包含葡糖氨基聚糖和与其键合的光反应活性化合物的可光固化的GAG衍生物可以例如通过使葡糖氨基聚糖的羟基或羧基基团分别与光反应活性化合物进行酯化反应或酰胺化反应而生产。交联的GAG通过将可光固化的GAG衍生物中所键合的光反应活性化合物进行分子间交联而衍生得到。

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

# 权利要求书

1. 一种可光固化的葡糖氨基聚糖衍生物，其包含葡糖氨基聚糖和含有光反应活性基团的光反应活性化合物，

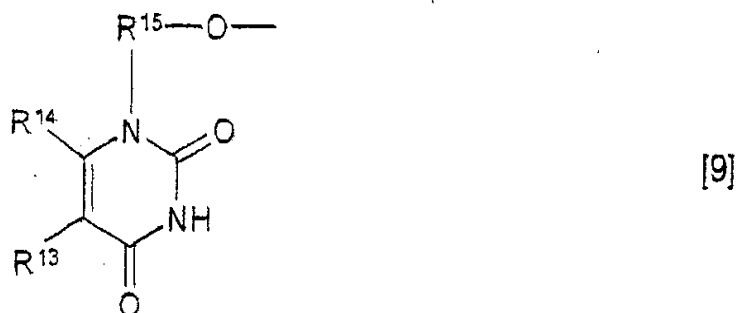
其中所述葡糖氨基聚糖选自透明质酸、软骨素、硫酸软骨素、硫酸皮肤素、肝素、硫酸乙酰肝素、硫酸角质、多硫酸角质及它们的衍生物中的至少一种，所述光反应活性化合物选自取代或未取代的肉桂酸及其反应活性衍生物、在 1 位上具有羧基烷基作为取代基的尿嘧啶衍生物及其反应活性衍生物、在 7 位上具有羧基烷基作取代基的香豆素衍生物及其反应活性衍生物、以及含有下列光反应活性基团的光反应活性化合物中的至少一种，所述光反应活性基团选自：



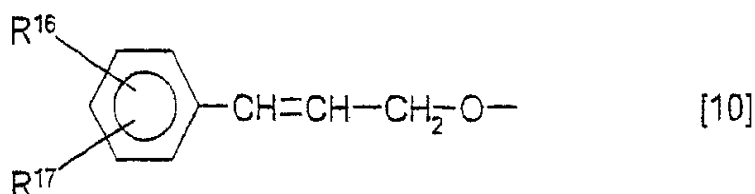




其中 gag-和 R<sup>3</sup> 定义同上, -O-R<sup>1</sup> 表示下式:



其中 R<sup>13</sup>、R<sup>14</sup> 和 R<sup>15</sup> 的定义分别同 R<sup>6</sup>、R<sup>7</sup> 和 R<sup>8</sup>; 或



其中 R<sup>16</sup> 和 R<sup>17</sup> 的定义同 R<sup>4</sup> 和 R<sup>5</sup>。

5. 权利要求 4 的可光固化的葡糖氨基聚糖衍生物, 其中可光固化的葡糖氨基聚糖衍生物是式[1]、[4c]、[5c]、[5d]、[5e]和[5f]。

6. 权利要求 4 或 5 的可光固化的葡糖氨基聚糖衍生物, 其中-CO-R<sup>1</sup> 是式[6]。

7. 权利要求 2-6 中任一权项的可光固化的葡糖氨基聚糖衍生物, 其中葡糖氨基聚糖是透明质酸、硫酸软骨素或肝素。

8. 通过用光照射权利要求 1-4 的可光固化的葡糖氨基聚糖衍生物而得到的交联的葡糖氨基聚糖衍生物。

9. 一种生产交联的葡糖氨基聚糖的方法, 其包括用波长为 260 至 400 纳米的光照射浓度为 1-30%的权利要求 1 的可光固化的葡糖氨基聚糖衍生物, 由此引起所述光反应活性化合物的分子间和/或分子内的二聚交联。

10. 权利要求 9 的生产交联的葡糖氨基聚糖的方法, 其包括: 在溶于 DMF、吡啶、DMSO、HMPA 或其与水的混合溶剂的

碱性催化剂存在下，在 0—100°C 下，将权利要求 1 中定义的葡糖氨基聚糖与含有羧基的权利要求 1 中定义的光反应活性化合物，或与光反应活性化合物共价结合并含有羧基的间隔基反应，其中每摩尔的葡糖氨基聚糖对应的光反应活性化合物的量是 0.5 至 5 摩尔，

葡糖氨基聚糖的羟基与光反应活性化合物的羧基或间隔基的羧基通过酯化而结合，得到权利要求 1 的可光固化的葡糖氨基聚糖，并

用光照射所得的可光固化的葡糖氨基聚糖。

11. 权利要求 9 的生产交联的葡糖氨基聚糖的方法，其包括：

在溶于 DMF、吡啶、DMSO、HMPA 或其与水的混合溶剂的碱性催化剂存在下，在 0—100°C 下，将权利要求 1 中定义的葡糖氨基聚糖，与含有羟基的权利要求 1 中定义的光反应活性化合物，或与光反应活性化合物共价结合并含有羟基的间隔基反应，

葡糖氨基聚糖的羧基与光反应活性化合物的羟基或间隔基的羟基通过酯化而结合，得到权利要求 1 的可光固化的葡糖氨基聚糖，并

用光照射所得的可光固化的葡糖氨基聚糖。

12. 权利要求 9 的生产交联的葡糖氨基聚糖的方法，其包括：

在缩合剂存在下，在 0—50°C 下，将权利要求 1 中定义的葡糖氨基聚糖，与含有氨基的权利要求 1 中定义的光反应活性化合物，或与光反应活性化合物共价结合并含有氨基的间隔基反应，

葡糖氨基聚糖的羧基与光反应活性化合物的氨基或间隔基的氨基通过酰胺化作用而结合，得到权利要求 1 的可光固化的葡糖氨基聚糖，并

用光照射所得的可光固化的葡糖氨基聚糖。

13. 权利要求 12 的生产交联的葡糖氨基聚糖的方法，其中缩合剂是二环己基碳二亚胺或 1-乙基-3-(二甲基氨基丙基)碳二亚胺。

14. 权利要求 12 或 13 的生产交联的葡糖氨基聚糖的方法，其中在 N-羟基琥珀酰亚胺或 N-羟基邻苯二甲酰亚胺的存在下进一步形成酰胺键。

15. 权利要求 8 的交联的葡糖氨基聚糖在制备预防细胞和/或组织粘连的药物组合物中的应用。

16. 权利要求 8 的交联的葡糖氨基聚糖在制备用作受控药物释放载体的药物组合物中的应用。

# 说明书

可光固化的葡糖氨基聚糖衍生物，

其交联物及制法和应用

本发明涉及通过将一光反应活性的化合物以化学方法连接到一葡糖氨基聚糖（以后有时缩写为“GAG”）上而制备的各种可光固化的葡糖氨基聚糖，和通过使所述衍生物进行光化反应使光反应活性化合物进行二聚而得到的具有三维网状结构的交联葡糖氨基聚糖，涉及制备它们的方法，进一步地，涉及含有它们的医用的良好生物相容材料。

含有疏水聚合物体系以进行光二聚作用而交联的可光固化的树脂迄今已被尤其用于平版印刷，绘画和印刷。相反，只有很少的已知例子其中亲水聚合物被光交联。

另一方面，人们曾试图通过醛、环氧化合物、二乙烯基醚化合物等交联 GAGs，它们是典型的亲水联合物，以延长 GAGs 在体内的作用，或用于制备作医用的以膜或粉末形式的材料，例如用于防止组织粘连。然而，由于 GAGs 是大分子，而形成的交联的 GAG 衍生物的分子量更高，这使得从交联的 GAG 衍生物中完全除去未反应物和/或催化剂十分困难。因而当给生物体给药或移植时，所述衍生物将不断产生副作用，故它们不适于实际应用。另外，交联的 GAG 衍生物以凝胶或固体存在，因而在交联后不易塑模，故不适于实际应用。此外，至于它们在持续或受控制释放的药物制剂（JP-A-62-129226 对应于美国专利 5128326；这里所用的术语“JP-A”表示未审查的日本公开特许）中作载体时，活性成份的持续释放只有利用交联的 GAG 衍生



物的粘性才能获得，这一缺点使得它们不适于实际应用。这些方法和交联的 GAG 衍生物很难控制药物的释放速度。

已知通过微生物或植物衍生的多糖如支链淀粉，直链淀粉和甘露聚糖的羟基与作为光二聚功能基的肉桂酰基酯化而制备的光敏材料可用作吸附剂，酶载体或色谱的载体或用于生产 PS 板或光刻胶或其它应用 [JP-B-56-14969，对应于美国专利 3960685，(这里所用的术语“JP-B”表示审定的日本特许)，JP-A-60-219202]。

然而，上述光敏材料有一个保证安全性的问题，难以控制细胞粘接且在人体内的生物相容性差，因而它们不适于用作直接应用于生物体的医用材料，尤其是人造器官，用于覆盖伤口或外科中的医用产品，药物制剂中的载体，或用于其它医疗的其它材料。

据此，本发明的一个目的是提供可光固化的葡糖氨基聚糖衍生物和从其衍生的交联的葡糖氨基聚糖，它具有高度的安全性和生物相容性。

本发明的另一目的是提供一制备在需要时容易塑模，例如通过用溶剂铸造，的可光固化的葡糖氨基聚糖衍生物的方法，通过该方法，尤其将产生副作用的未反应物可以容易地除去，以及一种从其生产交联的 GAGs 的方法。

本发明的第三个目的是提供医用的材料，它们以所述的可固化的 GAG 衍生物或交联的 GAGs 为基础，并可广泛应用于各种目的。

本发明的第四个目的是提供含有交联的葡糖氨基聚糖的无粘性防护材料，它与组织粘连但随创伤愈合的速度而生物降解，它们的机械强度可以根据应用部位的机械张力而容易地调节，以及含有在体内经光照射时容易转变成交联的葡糖氨基聚糖的可光固化的葡糖氨基聚糖

衍生物的无粘性防护材料。

本发明的第五个目的是提供用于实现受控药物释放的材料或制剂，它们含有交联的葡糖氨基聚糖并使药物释放的速率适合于其中包括，夹带或包埋的药物，并适合于药物应用的目的，以及含有可光固化的葡糖氨基聚糖的用于实现受控药物释放的材料，在上述材料或制剂中用作载体或作为原料。

本发明提供一种可光固化的葡糖氨基聚糖衍生物（以后有时简称为“可光固化的 GAG”）它包括一葡糖氨基聚糖的与其结合的光反应活性化合物，以及交联的葡糖氨基聚糖（以后有时简称为“交联的 GAG”），它通过使所述可光固化的 GAG 与所述光反应活性化合物进行交联反应而制备。所述可光固化的 GAG 最好通过使葡糖氨基聚糖的羟基或羧基与光反应活性化合物的酯化反应，通过活化葡糖氨基聚糖的羧基并使该活化的羧基与光反应活性化合物酰胺化，或通过使葡糖氨基聚糖的羧基与光反应活性的化合物在缩合剂的存在下酰胺化而制备。交联的葡糖氨基聚糖可通过用光照射可光固化的 GAG，由此引发光反应活性化合物部分之间的交联反应而制备。以所述交联的 GAG 为基础的材料适于医用。给出所述交联的 GAG 的可光固化的 GAG 也可用作医用材料。

附图 1 给出在实施例 1 中用于测定结合的肉桂酸的量的  $^1\text{H-NMR}$  光谱。

附图 2 给出 UV/VIS 光谱，说明实施例 1 中所制备交联的透明质酸膜曝光时在 279 nm 的衰减吸收。

附图 3 图示了接触角与在各种交联的透明质酸膜中肉桂酸残基取

代度 (D S) 的关系。

附图 4 图示了溶胀性与在各种交联的透明质酸膜中肉桂酸残基的 D S 之间的关系。

附图 5 包括显示细胞形态的照片, 它说明随着在交联的透明质酸膜中肉桂酸残基 D S 的不同而引起内皮细胞粘着的不同。

附图 6 图示了在硫酸软骨素-肉桂酸酯(组分 CS-Cin-2)光固化时凝胶化程度(%)与其在 PBS 溶液中浓度的关系。

附图 7 图示了在交联的硫酸软骨素凝胶形成中的凝胶化程度(%)及溶胀度与硫酸软骨素-肉桂酸酯(组分 CS-Cin-3)在 PBS 中曝光时间的关系。

附图 8 图示了在交联的硫酸软骨素凝胶形成中的凝胶化程度(%)及溶胀度与肉桂酸残基的 D S 的关系。

附图 9 图示了溶胀度与交联的硫酸软骨素膜中 D S 的关系。

附图 10 图示了接触角与实施例 8 中得到的交联的硫酸软骨素膜中肉桂酸残基的 D S 的关系。

附图 11 图示了胸腺嘧啶二聚物形成百分数与在实施例 14 中通过将 HA-Thym-1 曝露于紫外线中以形成交联的透明质酸膜的过程中 UV (紫外线)照射时间的关系。

附图 12 图示了 1-(2-羧乙基)胸腺嘧啶/HA 摩尔比与实施例 16 合成的 HA-Thym 的 D S 之间的关系。

附图 13 图示了 1-(2-羧乙基)胸腺嘧啶/CS 摩尔比与实施例 17 合成的 CS-Thym 的 D S 之间的关系。

附图 14 图示了实施例 18 中胸腺嘧啶吸收(于 270 nm)变化与 CS-Thym 膜曝光过程的照射时间之间的关系。

附图 1 5 图示了实施例 1 8 中凝胶化程度 (%) 与 CS - Thym 膜曝光过程中的照射时间之间的关系。

附图 1 6 图示了实施例 1 8 中凝胶化程度 (%) 与另一 CS-Thym 膜曝光过程中照射时间之间的关系。

附图 1 7 图示了实施例 1 8 中溶胀度与 HA - Thym 膜曝光过程中照射时间之间的关系。

附图 1 8 图示了实施例 1 8 中溶胀度与 HA - Thym 膜曝光前后的 DS 之间的关系。

附图 1 9 给出了实施例 2 0 中制备的硫酸软骨素 - (7 - 香豆氧基) 乙酸酯的  $^1\text{H}$  NMR 谱。

附图 2 0 图示了酰基氯形式香豆素 / 硫酸软骨素羟基 (CS - OH) 摩尔比与酯形式的 DS 之间的关系。

附图 2 1 图示了在实施例 2 1 中香豆素的吸收 (在 320 nm) 变化与硫酸软骨素 - (7 - 香豆氧基) 乙酸酯薄膜曝光照射时间之间的关系。

附图 2 2 图示了实施例 2 1 中溶胀度与硫酸软骨素 - (7 - 香豆氧基) 乙酸酯薄膜曝光照射时间之间的关系。

附图 2 3 图示了实施例 2 1 中溶胀度与硫酸软骨素 - (7 - 香豆氧基) 乙酸酯薄膜曝光时的 DS 之间的关系。

附图 2 4 图示了实施例 2 1 中凝胶化程度 (%) 与硫酸软骨素 - (7 - 香豆氧基) 乙酸酯薄膜曝光时间之间的关系。

附图 2 5 图示了实施例 2 1 中凝胶化程度 (%) 与含有所述酯的薄膜在曝光时硫酸软骨素 - (7 - 香豆氧基) 乙酸酯的浓度之间的关系。

附图 2 6 图示了从具有如实施例 2 8 中测定的 1 0 % 或 5 0 % 的药物含量的光交联的 HA - Thym 膜 ( D S = 0 . 7 ) 释放药物的速率, 与时间的函数关系, 所述的速率以吸收度 ( 在 2 6 9 n m ) 的变化来表示。

附图 2 7 图示了从具有如实施例 2 8 中测定的 1 0 % 或 5 0 % 的药物含量的光交联的 HA - Thym 膜 ( D S = 2 . 2 ) 释放药物的速度, 作时间的函数, 所说的速度以吸收度 ( 在 2 6 9 n m ) 的变化表示。

附图 2 8 图示了从具有如实施例 2 8 中测定的 1 0 % 或 5 0 % 的药物含量光交联的 CS - Thym 膜 ( D S = 0 . 8 ) 释放药物的速度作时间的函数, 所说的速度以吸收度 ( 在 2 6 9 n m ) 的变化来表示。

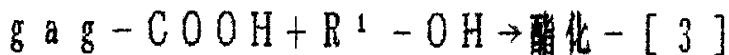
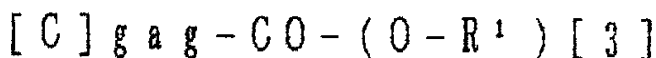
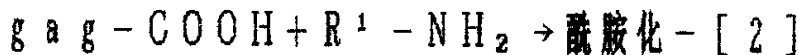
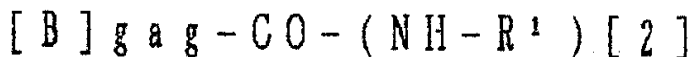
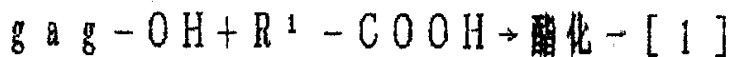
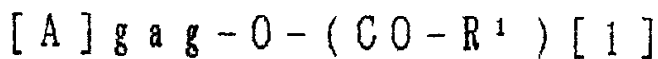
附图 2 9 图示了从具有如实施例 2 8 中测定的 1 0 % 或 5 0 % 的药物含量的光交联的 CS - Thym 膜 ( D S = 1 . 3 ) 释放药物的速度作时间的函数, 所说的速度以吸收度 ( 在 2 6 9 n m ) 的变化来表示。

附图 3 0 图示了从具有如实施例 2 8 测定的 1 0 % 或 5 0 % 的药物含量的光交联的 CS - Thym 膜 ( D S = 1 . 8 ) 释放药物的速度作时间的函数, 所说的速度以吸收度 ( 在 2 6 9 n m ) 上的变化来表示。

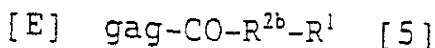
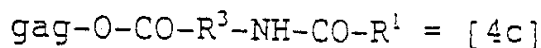
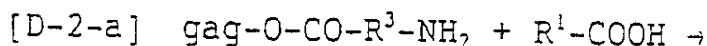
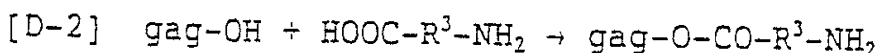
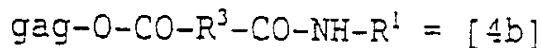
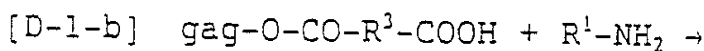
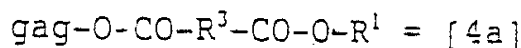
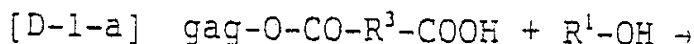
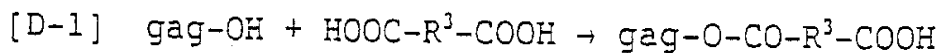
这里所用的术语“医用材料”包括, 尤其用于制造用于治疗目的的诊断器的医用设备或人造器官 ( 人造血管, 人造心脏, 人造皮肤, 等 ) 的材料, 构成创伤覆盖物, 修复术的材料, 无粘性材料或用于控制药物释放的器材, 及人造细胞外基质或在形成混合人造器官时用于内皮细胞, 上皮细胞和平滑肌细胞的粘附和繁殖的人造基膜。

本发明的可光固化的 GAG 最好具有由下面给出的式 [1] 至 [5] 中之一代表的部分结构, 当进行光反应时, 给出交联的 GAG。在所述各式的下面, 给出了相应的反应类型, 其中 gag 表示任何葡糖氨基

聚糖的部份结构， $R^1$  是光反应活性基团（即含有至少一个 1, 2-亚乙烯基的基团），而  $R^1 - COOH$ ， $R^1 - NH_2$  和  $R^1 - OH$  分别表示光反应活性化合物。

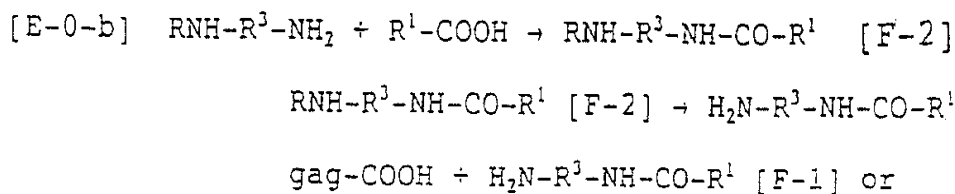
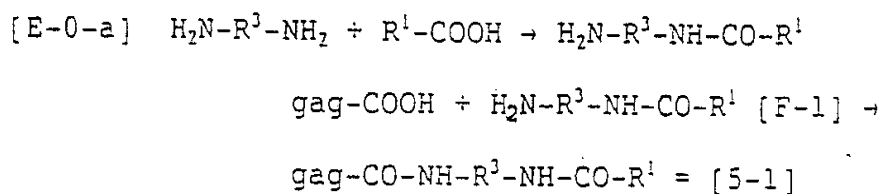


$R^{2a}$  代表由具有与  $\text{gag-OH}$ （如  $\text{HOOC-R}^3 - \text{COOH}$ ， $\text{HOOC-R}^3 - \text{NH}_2$ ）反应能力的间隔基和光反应活性化合物的功能基衍生出的基团。

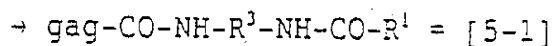


R 2b代表由具有与 gag - COOH (如 HO-R<sup>3</sup> -COOH, HO-R<sup>3</sup> -OH, HO - R<sup>3</sup> -NH<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> N - R<sup>3</sup> -NH<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> N - R<sup>3</sup> -COOH) 反应能力的间隔和光反应活性化合物的功能基衍生出的基团。

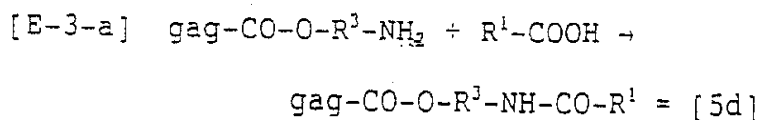
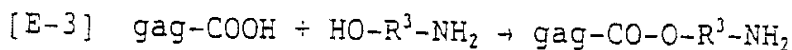
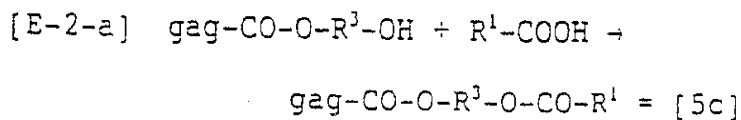
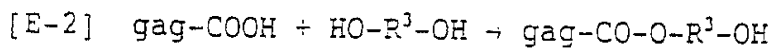
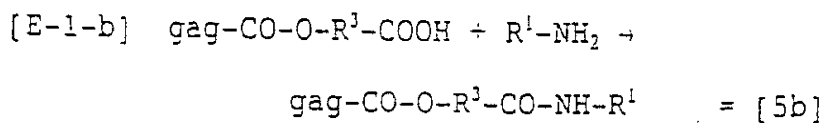
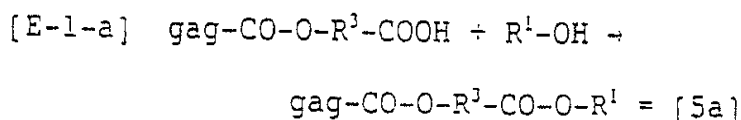
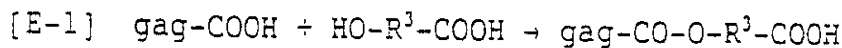
[E-0]

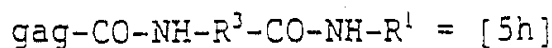
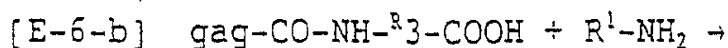
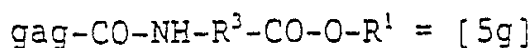
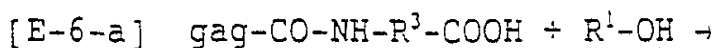
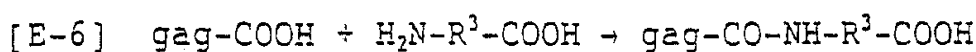
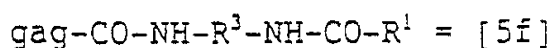
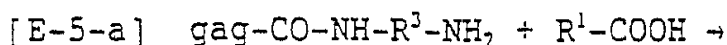
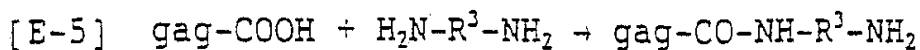
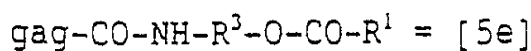
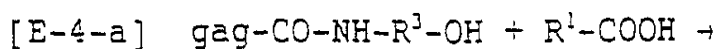
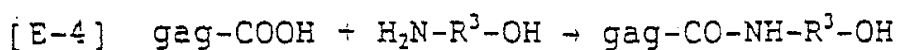


[F-2]



R is a protective group.





$\text{R}^3$  优选地为下列之一：



$\text{R}^{3b}$ ：- (CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub> CHY- (Y 为 COOH 或 NH<sub>2</sub> 以及 p 为 1 至 10)；

$\text{R}^{3c}$ ：- (CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>- (CH<sub>2</sub>)<sub>l</sub>- (m = 1 至 10, l = 1 至 10)。

尽管在上面的例子中，只用了一个间隔基，但也可用多个间隔基。

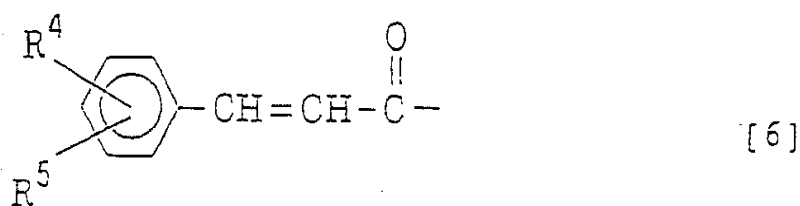
在制备式 [4 b]，[5 b] 或 [5 h] 产物时，上述光反应活性的化合物 [F-1] 或 [F-2] 可用于代替  $\text{R}^1\text{-NH}_2$ 。

原则上，作为光反应活性基团的  $\text{R}^1$  可以是任意基团，条件是它至少在曝光时进行分子间和/或分子内二聚形成环丁烷环。

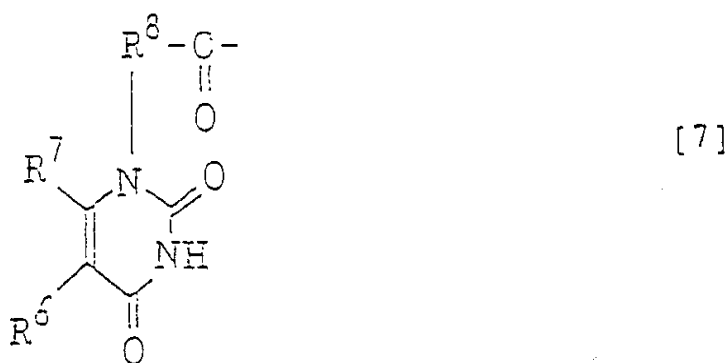


在上述各式中， $-COOH$ 可以能与羟基或氨基反应的反应活性衍生物的形式（例如卤化物，酸酐，活性酯）存在。

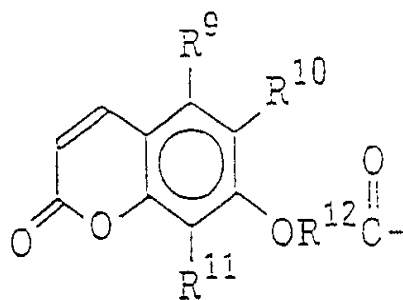
作为在式 [ 1 ]， [ 4 c ]， [ 5 c ] 至 [ 5 f ]，等中存在的  $R^1 - CO -$  的特别优选的例子，可以是具有下述结构的基团：



其中  $R^4$  的  $R^5$  可以相同或不同，各自为氢原子或低级烷基或低级烷氧基或硝基或氨基；



其中  $R^6$  为氢或卤原子或低级烷基或卤代低级烷基， $R^7$  为氢或卤原子或氰基，羧基，低级烷氧羰基，低级烷基或卤代低级烷基，而  $R^8$  为低级亚烷基；

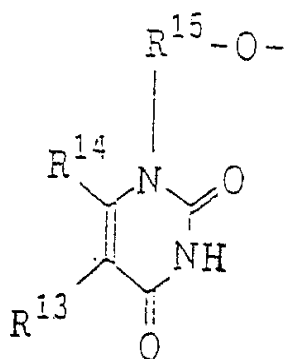


[8]

其中  $R^9$ ,  $R^{10}$  和  $R^{11}$  可以相同或不同, 各自独立地为氢原子或低级烷基, 而  $R^{12}$  为低级亚烷基。

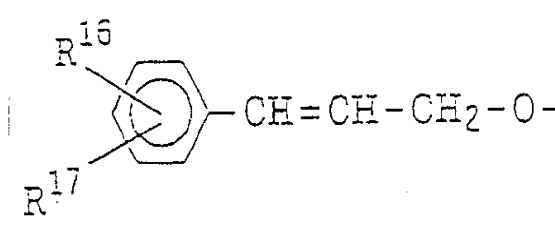
上述式 [6] 至 [8] 的基团作为与式 [2] 的相应的  $R^{1a}-CO-NH-R^3-NH$  中的  $R^{1a}-CO-$  ( $R^{1a}$  为光反应活性基团) 及作为式 [5-1] 中的  $R^1-CO-$  是特别优选的, 而  $R^{3a}$  或  $R^{3b}$  优选作为  $R^3$ 。当  $R^3$  为  $R^{3b}$  时,  $COOH$  优选作为  $y$ 。

作为式 [3], [4a], [5a], [5g], 等中的  $R^1-O-$  优选例子, 可以是具有下述结构的残基:



[9]

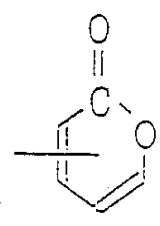
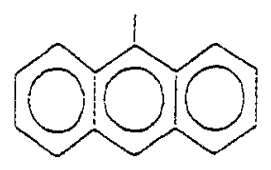
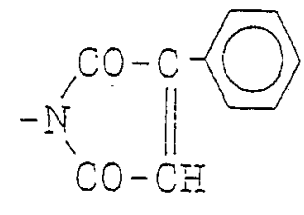
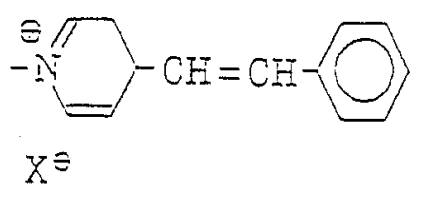
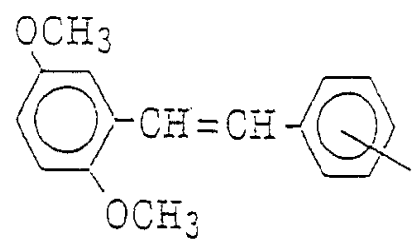
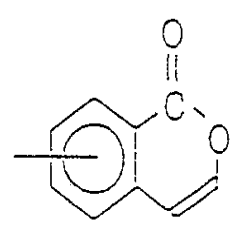
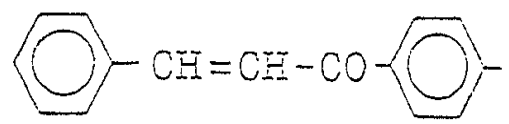
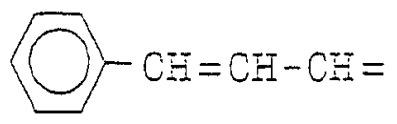
其中  $R^{13}$  是氢或卤原子或低级烷基或卤代低级烷基,  $R^{14}$  为氢或卤原子或氨基, 羧基, 低级烷氧羰基, 低级烷基或卤代低级烷基, 而  $R^{15}$  为低级亚烷基;



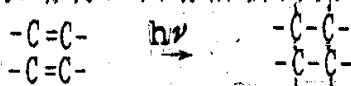
[10]

其中  $R^{16}$  和  $R^{17}$  可以相同或不同，各自为氢原子或低级烷基或低级烷氧基或硝基或氨基。

下面举例给出的式子的基团也可作为  $R^1$  的构成单元：



本发明可光固化的 GAG 在曝光时可分子间二聚，于是包含在光反应活性化合物分子中的光反应活性基团（至少含有一个乙烯基的基团）成对反应，以下面给出的方程形成环丁烷环，给出相应的交联的 GAG，它们具有二或三维网状结构，具有所需的交联度。分子内的二聚也与光固化有关。



因此，根据本发明，具有所需交联度，因而具有所需物理性质（例如，机械结构支撑性，水保留性，亲水性，润滑性，药物释放速度）和适于其应用的所需生物学性质（例如细胞粘连，生物降解性—吸收性、生理活性）的生物相容的光交联 GAGs 可通过选择或控制光反应活性化合物和 GAG（例如化学结构，分子量等）和其中的光反应活性化合物的含量（由光反应活性化合物取代的程度（DS））而形成。这里所用的术语“取代程度（DS）”定义为连接在 GAG 中每个重复的二糖单元（每单元含一个糖醛酸和一个己糖胺）上的光反应活性化合物或基团的摩尔数。因而，例如，每个这种二糖元具有 4 个羟基（可取代的羟基）的透明质酸当用光反应活性的化合物或基团在所有羟基上连接时，给出 DS 为 4，而硫酸软骨素每个二糖单元中的三个羟基被光反应活性化合物或基团完全连接时产生的 DS 为 3。

这里所用的术语“葡糖氨基聚糖”或“GAG”包括多聚乙酰神经氨酸糖酸，透明质酸（HA），软骨素，硫酸软骨素（CS），糖醛酸磷壁酸质，硫酸皮肤素，肝素，硫酸乙酰肝素，硫酸角质（硫酸角质素），多硫酸角质，几丁质，脱乙酰几丁质，及它们的衍生物（酰化衍生物，多硫酸化物，去硫酸产品，去酰化产品，等）。术语“低级”指上述的碳链，可以是直链或支链的，由 1 至 6 个碳原子组成。术语“卤原子”包括氯，溴和碘原子以及术语“卤代”用于指一个或多个氢原

子被这些卤原子取代。

在式 [6] 与式 [1], [4c], [5-1], [5C] 至 [5f] 等的结合体中,  $R^1 CO-$  为, 例如, 由取代的或未取代的肉桂酸或其反应活性衍生物衍生的残基。作为取代的肉桂酸残基, 它们是那些在苯环的任何位置上有一或二个低级烷基, 低级烷氧基, 硝基或氨基的基团。然而, 从肉桂酸衍生的  $R^1 CO-$  是特别优选的。

在式 [7] 与式 [1], [4C], [5-1], [5C] 至 [5f], 等的结合体中,  $R^1 CO-$  为, 例如, 由在 1-位有一个羧基烷基作为取代基的尿嘧啶衍生物或其反应活性衍生物衍生的残基, 在嘧啶环的 5-位有由  $R^6$  表示的氢或卤原子或低级烷基或卤代低级烷基, 在 6-位有由  $R^7$  表示的氢或卤原子或氰基, 羧基, 低级烷氧羰基, 低级烷基或卤代低级烷基, 而低级亚烷基  $R^8$  是由羧基烷基衍生的, 并与 gag 的羟基在 1-位形成酯键。尤其由 1-(2-羧基乙基)胸腺嘧啶衍生的  $R^1 CO-$  是优选的。

在式 [8] 与式 [1], [4C], [5-1], [5C] 至 [5f], 等的结合体中,  $R^1 CO-$  为, 例如, 由在 7-羧基烷氧基取代的香豆素衍生物或其反应活性衍生物衍生的残基, 在香豆素环的 5, 6 和 8 位各自独立地有分别由  $R^9$ ,  $R^{10}$ ,  $R^{11}$  表示的氢原子或低级烷基, 相应地在 7 位, 有由羧基烷氧基衍生的低级亚烷基  $R^{12}$ , 并与 gag 的羟基形成酯键。特别优选的  $R^1 CO-$  基团是由 7-香豆氧基乙酸衍生的基团。

在式 [10] 与式 [3], [4a], [5a], [5g], 等的结合体中,  $R^1 O-$  是由在 1-羟基烷基取代的尿嘧啶衍生物或其反应活性衍生物衍生的残基, 在嘧啶环的 5 位有由  $R^{13}$  代表的氢或卤原子或低级烷

基或卤代低级烷基，在 6 位有由  $R^{14}$  代表的氢或卤原子或氨基，羧基，低级烷氧羰基，低级烷基或卤代低级烷基，在 1 位有由羟基烷基衍生的低级亚烷基  $R^{15}$ ，并与 gag 的羧基形成酯键。

在式 [II] 与式 [3], [4a], [5a], [5g], 等的结合体中， $R^1 O-$  为，例如，由取代或未取代的肉桂基醇或其反应活性衍生物衍生的残基。取代的肉桂基醇残基为，例如，在苯环的任何位置有一或两个低级烷基，低级烷氧基，硝基或氨基的基团。

### 原起始化合物

#### GAGs

GAGs 不限其来源或分子量。根据所需目的而选择的 GAGs 既可以单独使用也可以其两种或多种的混合形式使用。但通常使用天然来源（动物器官提取物，发酵产品、等）的 GAGs，需要时也用化学或酶促合成的 GAGs 或用半合成方法合成的 GAGs。通过改变上述这些 GAGs 官能团而衍生的产物也可使用。

GAG 可以原有形式与光反应活性化合物反应，但经常使用的形式为其与碱金属如钠，钾等，碱土金属如镁，钙，等，叔胺如三正丁基胺，三乙胺、吡啶，等形成的盐。

当与 GAG 键合的光反应活性化合物不溶于水时，将光反应活性的化合物加到含有 GAG 的有机溶剂中进行反应。

含有 GAG 的有机溶剂是这样制备的：例如，通过用阳离子交换剂处理 GAG 钠盐的水溶液形成羧酸根或硫酸根，将它们加到可与水混溶的有机溶剂 [例如二甲基甲酰胺 (DMF)，二甲亚砜 (DMSO)，六甲基磷酰胺 (HMPA)，吡啶，等] 和叔胺（例如三正丁基胺）中形

成 GAG 的铵盐再蒸去水。

当光反应活性化合物是水溶性时，反应可通过将光反应活性化合物加到 GAG（如钠盐）的水溶液中而进行。

### 光反应活性化合物

如前所述被用于与 GAGs 或连接或可连接到 GAGs 上的间隔基的 -OH, -COOH 或 -NH<sub>2</sub> 这类基团成键的光反应活性化合物，具有 -OH, -COOH 或 -NH<sub>2</sub> 这类基团。

(1) 当 -COOH 为功能团时：

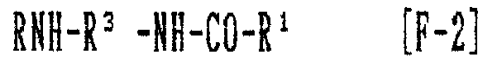
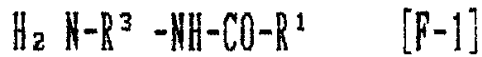
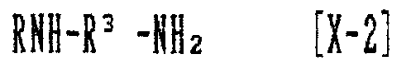
光反应活性的化合物以酯的形式连接在 GAGs 或间隔基上，如式 [1], [5-1], [5c], [5d], [5e] 和 [5f], 包括具有其中的 OH 或卤素，例如，连接在式 [6] 至 [8] 的基团上的化学结构的化合物，即为取代或未取代的肉桂酸，1-羧基烷基取代的尿嘧啶和 7-羧基烷氧基取代的香豆素（7-香豆氧基羧酸），和其反应活性衍生物。作为反应活性衍生物，可以是酰基卤（如酰氯等）和酸酐。

上述 7-香豆氧基羧酸的酰基卤可通过将相应的，任意取代的 7-羟基香豆素与卤代羧酸酯在碱存在下缩合并水解产生的 7-香豆氧基羧酸酯而得到 7-香豆氧基羧酸，或通过将相应的任意取代的 7-羟基香豆素与卤代羧酸缩合得到 7-香豆氧基羧酸，然后将这样得到的，对应于式 [8]，可任意地带有一个或多个取代基的 7-香豆氧基羧酸与亚硫酸酯（参见如 JP-A-3-48674）反应而合成。

(2) 当 -NH<sub>2</sub> 为功能团时：

下面给出的式 [F-1] 的光反应活性化合物可以这样得到：将前述取代或未取代的肉桂酸，1-羧基烷基取代的尿嘧啶或 7-羧基烷

氧基取代的香豆素（7-香豆氧基羧酸），或其反应活性衍生物与式 [X-1] 化合物或通过将其氨基用叔丁氧羰基或苄氧羰基之类的氨基保护基保护而衍生的式 [X-2] 化合物反应，如果需要再去保护。



(3) 当 -OH 为功能团时：

相应于式 [9] 的反应活性衍生物可用作光反应活性化合物。例如，可用在嘧啶环的 1 和 2 位间形成的环状醚化合物。具体例子有 1, 2-O-桥亚乙基尿嘧啶，1, 2-O-桥亚乙基胸腺嘧啶，1, 2-O-桥亚乙基-5-氯尿嘧啶，1, 2-O-桥亚乙基-5-三氯甲基尿嘧啶，1, 2-O-桥亚乙基-6-氰基尿嘧啶，1, 2-O-桥亚乙基-6-氯甲基尿嘧啶和 1, 2-O-桥亚乙基-6-三氯甲基尿嘧啶。

也要提到对应于式 [10] 的取代或未取代的肉桂基醇。

(4) 优选的光反应活性化合物

尽管根据所需目的，所用的光反应活性化合物应从上述那些化合物中选择，但从医用观点上优选的是由即使当以未反应形式保留在交联的 GAGs 中也最不可能产生副作用的化合物，如肉桂酸，胸腺嘧啶和香豆素衍生出的光活性化合物。

在本发明的实际应用中，可光固化的 GAGs 可含有一个或多个连



接在同一个 GAG 分子或多个不同的 GAG 分子上的光反应活性化合物。这也适用于上面的式 [1] 至 [3]。因此，应注意到本发明的交联的 GAGs 在其意义上包括通过这类可光固化的 GAGs 的交联得到的产物。

### [反应 ( 导入光反应活性基团 )]

#### ( 1 ) 与 gag-OH 的酯化反应

将一合适的 GAG 的叔胺盐 ( 例如三正丁基胺盐, 三乙胺盐, 吡啶盐, 等 ) 溶于一合适的溶剂 ( 例如 DMF, 吡啶, DMSO, HMPA, 等 ), GAG 的羟基与具有式 [6] 部分结构的取代或未取代的肉桂酸, 以每摩尔 GAG 的羟基 0.5 至 5 摩尔的量, 或其反应活性衍生物, 例如酰卤, 在碱性催化剂 ( 例如无水吡啶等 ) 存在下进行酯化反应, 或用具有式 [7] 或 [8] 部分结构的  $R^1$  COOH 或其反应活性衍生物在碱性催化剂 ( 例如 2-氯-1-甲基吡啶鎓碘化物, 吡啶, 等 ), 在 0 至 100°C, 优选 70 至 90°C, 反应几十分钟至几十小时, 优选 1 至 10 小时酯化, 给出本发明的可光固化的 GAG。

根据需要, 每种可光固化的 GAG 中的取代度 (DS) 可通过控制反应条件而控制。例如, DS 可通过增加  $R^1$  COOH 或其反应活性衍生物相对起始 GAG 的摩尔比和 / 或延长反应时间而增加。

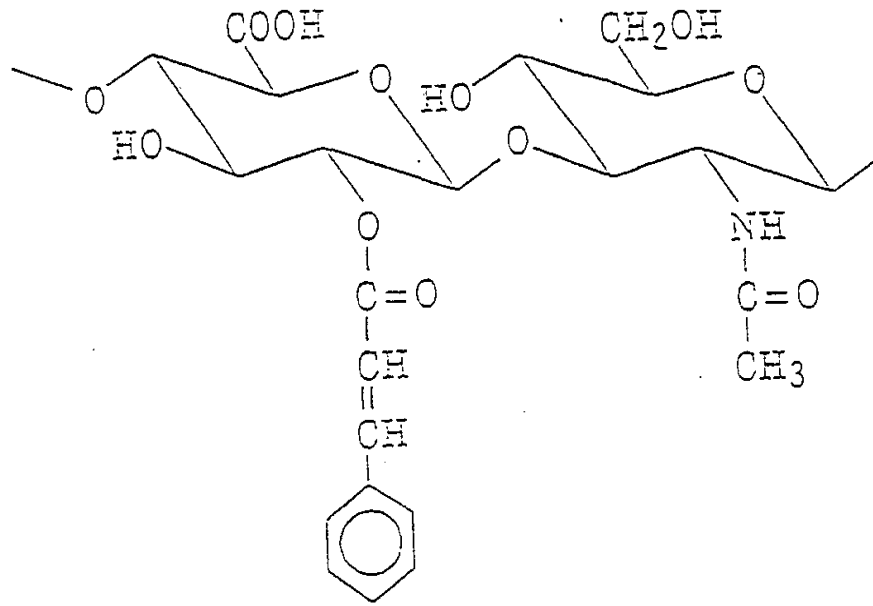
反应后, 往反应混合物中加入例如乙酸钠饱和乙醇, 乙醇, 或甲醇, 过滤收集产生的沉淀, 用乙醇或甲醇洗涤, 然后减压干燥, 这样所需产品可以白色粉末的形式得到。

产生式 [5c] 或 [5e] 化合物的反应可以与上述基本相同的方式进行。

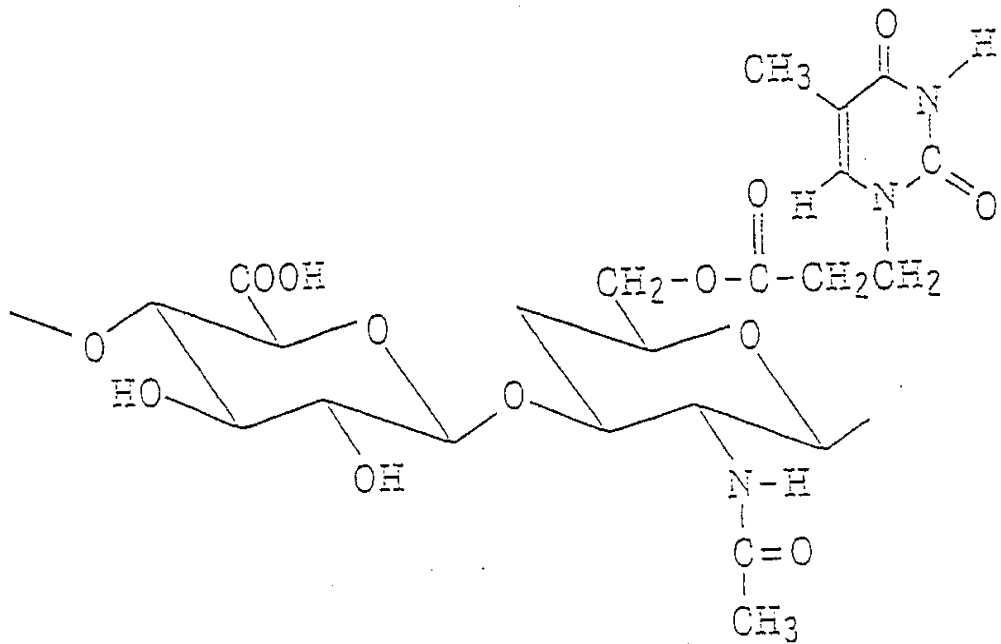
这样得到的, 其中每个二糖单元由一分子光反应活性化合物取代

的可光固化的 GAG 的一些具体例子以单元的结构式在下面示出。结构不同的结构单元，例如在所键合的光反应活性基团的数目上和/或其键合位置上不同的单元可以出现在同一分子中。

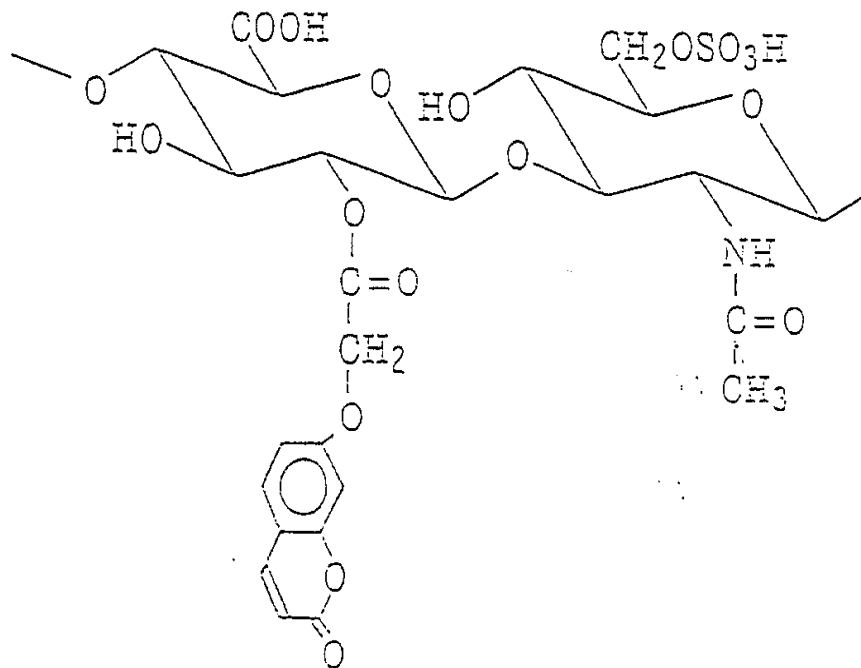
1) 由将肉桂酸引入透明质酸产生的可光固化的 GAG (HA-Cin)



2) 由将 1-(2-羧基乙基)胸腺嘧啶引入透明质酸产生的可光固化的 GAG (HA-Thym)



3) 由将 7-香豆氧基乙酸引入硫酸软骨素中产生的可光固化的 GAG



(2) 用 gag-COOH 酰胺化 [尤其是当光反应活性化合物被连到间隔基上时]; 参见式 [5-1]

(2-1): 当  $R^3 = R^{3a}$  时:

当式 [X-1] 或 [X-2] 的化合物为亚烷基二胺 (如 1, 2-乙二胺) 时, 将 GAG 的合适叔胺盐 (如三正丁基胺盐, 三乙胺盐, 吡啶盐, 等) 如上面方法 (1) 溶于适当溶剂 (如 DMF, 吡啶, DMSO, HMPA, 等), 然后加入相对于 GAG 的羧基摩尔数稍过量的羟基化合物 (如 N-羧基琥珀酰亚胺, N-羧基邻苯二甲酰亚胺, 等), 和缩合剂 (如二环己基碳二亚胺, 1-乙基-3-(二甲基氨基丙基)碳二亚胺, 等), 反应在 0 至 50 °C 进行 1 至 20 小时, 给出其羧基被活化

改进的GAG。然后将该改进的GAG与式[F-1]或[F-2]化合物的氨基在0至50℃进行酰胺化反应30分钟至20小时，给出可光固化的GAG。

可光固化的GAG也可通过用GAG的水溶液并使式[F-1]或[F-2]化合物的氨基与GAG的羧基在缩合剂[如水溶性碳二亚胺如1-乙基-3-(二甲基氨基丙基)碳二亚胺]的存在下于0至50℃进行酰胺化反应1至20小时而制备。

(2-2): 当  $R^3 = R^{3b} (Y = COOH)$  :

当式[X-1]或[X-2]化合物为例如碱性氨基酸(例如L-赖氨酸)时，GAG以水溶液的形式使用，式[F-1]或[F-2]化合物的氨基与GAG的羧基在0至50℃于缩合剂[例如水溶性碳二亚胺如1-乙基-3-(二甲基氨基丙基)碳二亚胺]存在下进行酰胺化反应而给出可光固化的GAG。

可光固化的GAG也可以象方法(2-1)中那样，通过GAG以合适的叔胺盐的形式与羟基化合物如N-羧基琥珀酰亚胺在合适的溶剂如DMF中在缩合剂如二环己基碳二亚胺存在下反应，并使产生的在其羧基上活化的GAG与式[F-1]或[F-2]化合物的氨基进行酰胺化反应而制备。

与式[2], [4b], [5b]或[5h]有关的反应可以基本上与前述相同的方式进行。

(3) 与  $gag-COOH$  的酯化作用

与前述方法(1)相似，将合适的GAG叔胺盐(例如三正丁基胺盐，三乙胺盐，吡啶盐，等)溶于适当的溶剂(如DMF，吡啶，DMSO，HMPA，等)中，式[9]尿嘧啶衍生物的反应活性衍生物，例

如环状醚化合物，或取代或未取代的式 [10] 的肉桂基醇或其反应活性衍生物与 GAG 的羧基在 0 至 100°C 于碱性催化剂（例如无水吡啶等）存在下进行酯化反应。

与式 [4a], [5a] 或 [5g] 有关的反应可以基本与前述相同的方式进行。

#### [可光固化的 GAGs 的分离和纯化]

上述反应之后，所形成的可光固化的 GAGs 可用任何通常用于分离和纯化 GAGs 的方法来分离和纯化，没有任何特殊限制。

因而，例如，可光固化的 GAGs，即所要产物，可与未反应的 GAGs 或未反应的光反应活性化合物分离，并可这样纯化：用阴离子或阳离子交换剂色谱的方法，利用其在有机溶剂中溶解性不同的方法（例如醇沉淀法），盐析或渗析。

当本领域已知的那些交联的葡糖氨基聚糖以凝胶或固体存在，因而未反应物，催化剂，污染的微生物，热原和其它杂质很难从中除去，而本发明的可光固化的 GAGs 由于可溶于水和/或有机溶剂因而可以较容易纯化。由于这样纯化的可光固化的 GAGs 在曝光时可发生光反应活性基团的分子间或分子内二聚作用，因而容易产生被未反应物，催化剂，污染的微生物，热原等最低程度污染的交联的 GAGs。

#### [可光固化的 GAGs 的物理性质]

以上面方法合成和纯化的可光固化的 GAGs 的物理性质随用作原料的 GAG，其分子量，所用的光反应活性化合物，其用量及其它因素而变化，并可根据需要调节，使其适于预期的目的。一般地，它们的

分子量范围为 4000 至 2,000,000, 优选 10,000 至 1,000,000, 由光反应活性基团取代的程度 (DS) 范围为 0.1 至 4.0, 优选 0.1 至 3.0, 并能溶于水和 / 或有机溶剂。溶解性可以根据需要控制。一般地, 增加 DS 导致水溶性降低, 但在有机溶剂如 DMF 中的溶解性增加。当光反应活性基为式 [6] 的肉桂酸衍生物, 式 [8] 的 7-香豆氧基羧酸或式 [11] 的肉桂基醇衍生物时, 所得可光固化的 GAGs 是相对疏水的。反之, 当光反应活性基团为式 [7] 或式 [10] 的尿嘧啶衍生物 (尤其是胸腺嘧啶衍生物) 时, 产生的可光固化的 GAGs 是相对亲水的。

优选的 DSs 范围随可光固化的 GAG 或交联的 GAG 的预期用途, 及所用的 GAG 和光反应活性化合物而变化。对于生产对细胞非粘连的交联的 GAGs 并将它们用作组织的非粘连材料, 例如, DS 在透明质酸-肉桂酸酯 (HA-Cin) 的情况下, 优选为约 0.1 至 0.5, 在硫酸软骨素-肉桂酸酯 (CS-Cin) 的情况下约 0.1 至 3.0, 在透明质酸-胸腺嘧啶衍生物酯 (HA-Thym) 的情况下约 0.2 至 1.0, 在硫酸软骨素-胸腺嘧啶衍生物酯 (CS-Thym) 的情况下约 0.2 至 1.0。为了将生物物质, 药物等包埋在交联的 GAGs 的三维网状结构中, 从而得到它们的控制释放, 1.0 至 2.5 的 DS 对上述每个交联的 GAGs 是优选的。

更准确地说, 当可光固化的 GAG 是式 [1] 的可光固化的透明质酸衍生物时, 分子量优选在 100,000 至 1,000,000 的范围, 而由光反应活性化合物的取代度 (DS) 优选在 0.1 至 3.0 的范围。当可光固化的 GAG 为式 [1] 的可光固化的硫酸软骨素衍生物时, 分子量优选的范围为 10,000 至 60,000, 而 DS 在 0.1 至 3.0 的范围。

在用作医用材料时，可光固化的 GAGs 和交联的 GAGs 可具有任何形式。因此它们可以各种形式应用，如溶液，凝胶，固体，等。基于所述可光固化的 GAGs 或交联的 GAGs 的本发明医用材料根据需要可含有各种溶剂（如水，缓冲液，PBS，DMF，DMSO，等），载体（如纱布，编织或纺织纤维，非纺织纤维，软填料或棉花状材料，长丝或纱线，薄膜，多孔海绵，橡胶，塑料，金属，人造器官，生物体组织表面，生物体的切口或伤口），生物物质（胶原，明胶，肝素，硫酸软骨素，透明质酸，硫酸皮肤素，等），药物，等等。

#### [可光固化的 GAGs 的塑模（用溶剂铸造）等]

对于用作医用材料，可光固化的 GAGs 可以塑模成特定形状（膜状，管状，粒状）或施加于，覆盖在，粘帖或包埋其它物质或如上所述的载体材料在内。在这类情况下，可光固化的 GAGs 在光反应之前将它们溶于水（优选净化水），缓冲溶液（例如磷酸盐缓冲液，碳酸盐缓冲液）或医学上可接受级别的有机溶剂（例如，DMF，DMSO），将该溶液在由玻璃，石英，聚氯乙烯，聚苯乙烯，聚氨基甲酸乙酯等制成的平板或表面或容器中放置或展开，并将其风干或用其它方法干燥来模塑，给出厚度为  $1\ \mu\text{m}$  至  $1\ \text{mm}$  的膜。

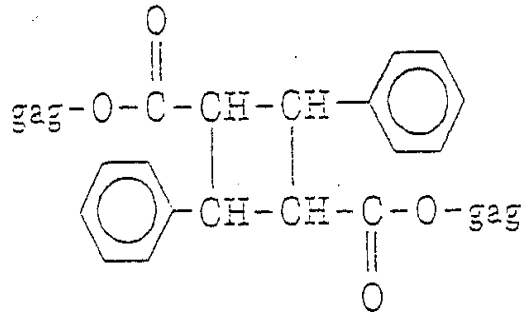
#### [交联的 GAGs 的产生（光反应）]

交联的 GAGs 可通过将用上述方法塑模的或溶液形式的可光固化的 GAGs 在用于光交联的射线或辐射曝光，从而引发光二聚反应而产生。所用波长或波长范围随光反应活性基团的性质而改变，但一般落在约 260 至 400nm 的范围内。更准确地说，例如，高压汞灯（450W）

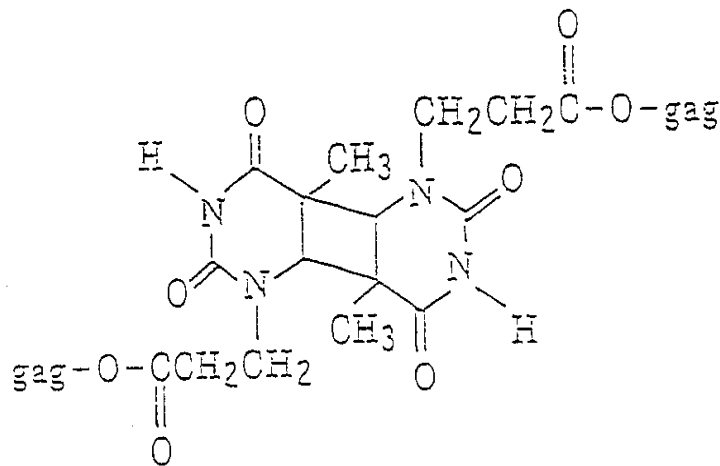
发出的光线可用于曝光（照射），但应滤去波长短于 260-270 nm 的射线。尽管所需的曝光（反应）时间随波长范围，温度和离光源的距离等因素而变化，但优选能使反应在 30 分钟内完成的条件。凝胶化（固化）程度可通过在光反应时调节可光固化的 GAG 的浓度而控制。通常，所述浓度为 1 至 30%，优选为约 2 至 20%。

由可光固化的 GAGs 的光反应而产生的二聚物结构具体例子如下：

1) 当光反应活性化合物是肉桂酸时：

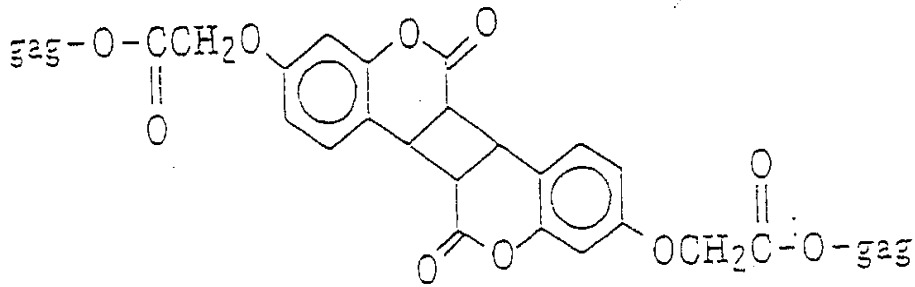


2) 当光反应活性化合物为 1-(2-羧基乙基)胸腺嘧啶时：





3) 当光反应活性化合物为 7-香豆基氧基乙酸时:



#### [交联的 GAGs 的物理性质]

这样制备的本发明交联的 GAGs 的物理性质可通过如 GAG 的性质, 光反应活性基团(化合物)的性质, 可光固化的 GAG 的浓度, 由光反应活性化合物取代的程度 (DS), 交联度及光反应时间等因素而控制。然而, 一般地, 它们显示出的溶胀性 = [(溶胀态的重量 - 干燥态的重量) / 干燥态的重量] 在一定范围 (0.1 至 200) 内, 因而其中可包括和存留的水的量在一定范围。

随由光反应活性基团(化合物)的 DS 和交联度的增加, 溶胀性值降低。

它们也显示出与水的接触角在一定范围内（ $10^{\circ}$  至  $100^{\circ}$ ）。接触角反映了交联的 GAG 表面的疏水性/亲水性。光反应活性基团的交联（二聚）速率的增加导致接触角值的增加，即疏水程度的增加。

交联度（前述光反应活性基团进行二聚化的百分数）可通过增加 DS 而增加。它还可通过控制所述光反应而进一步控制。

因而，交联的 GAGs 的生物功能可通过改变交联度而控制。例如，内皮细胞之类的细胞倾向于与显示高交联度的交联的 GAGs 粘连，尽管这一趋势根据 GAG 和光反应活性化合物的性质而不同。这种趋势对不含硫酸基团的透明质酸是明显的。（参见实施例部分的照片），而这种趋势对含硫酸的 GAGs（例如硫酸软骨素）是很小的。基于这一点，也可通过结合使用两种或多种 GAGs 以促进或抑制细胞粘连。而且，这一性质可以用来在功能上区分人造血管的内膜（最里面的壁）和外膜，即通过选择 GAGs 和光反应活性的基团并控制 DS 和/或交联度而制备细胞粘连性不同的不同的交联的 GAGs 覆盖内膜和外膜。这样，例如，内膜可以作成对细胞非粘性的以防止血栓形成，而外膜可作成对细胞粘连的，因而允许纤维细胞与其粘连使其不漏血。

#### [作为医用材料的应用]

本发明可光固化的 GAGs 和交联的 GAGs 可作为医用材料，除了上面所述的用于制造人造血管的内膜和外膜的材料外，还包括尤其用于制作人造皮肤，组织非粘性膜或材料，创伤愈合促进材料，混合的人造器官，人造细胞外基质和人造基膜。而且，药物包埋可以通过将可光固化的 GAG 溶液与生理活性物质（如肝素，硫酸皮肤素，硫酸乙

酰肝素，抗癌剂，抗炎剂，细胞激动素，激素，生长因子，或酶如组织血纤维蛋白溶酶原活化素，超氧化物歧化酶，或尿激酶）混合，并使这样的溶液或由其得到的塑模进行交联的光反应而实现。因此，可光固化的 GAGs 和交联的 GAGs 也可用作实现包埋于其中的药物控制释放的载体。

一些典型应用由下更具体描述

#### [非粘连材料]

本发明的交联GAGs可作为非粘连材料用于防治外科创伤不希望发生的粘连并促进愈合，例如，使用交联 GAGs 膜覆盖腹膜壁和腹膜内器官（如肝等），借此保护腹膜中的损伤（缺损），从而防止粘连并促进创伤愈合。所述膜可根据创伤愈合速率被降解和吸收。

溶液形式的可光固化的 GAGs 可用与上所述的相同目的，通过向创伤部位注射该溶液并覆盖表面，然后用光照射同一部位从而导致在体内形成交联膜。更具体讲，这种技术可用于防止粘连和/或填塞内窥镜操作中的缺损。

对于其作为非粘连材料的应用，交联GAGs（包括体内交联GAGs在内）最好应具有适当的强度，以防止膜破裂，并阻止组织（细胞）粘连，及正比于伤口愈合速度的生物降解能力；生物降解产物应当基本上是无毒的，即使当其被活有机体吸收时也如此。通过选择可光硫化的GAG（选择 GAG 种类和光反应活性化合物，以及 DS）以及照射条件（如离光源的距离，光源种类，强度，膜厚度等）来控制这些功能。

#### [受控药物释放]

本发明的交联 GAGs 可做为包嵌药物在其三维网状结构中以达到受控释放药物目的的材料（载体或赋形剂）。因而，包嵌或包合的药物可依据药物性质和使用方式在一定时间内释放出来，并在需要药物的药物释放的周围维持一定范围的药物浓度。

受控药物释放的速率可通过选择可光固化的 GAG（选择 GAG 种类和光反应活性基团，以及 DS）和照射条件（如曝光时间，离光源的距离，光源功率等）来控制。既然如此，尽管释放速率通常随着药物的分子量和药物与交联 GAG 之间的静电引力的增加而降低，但所述速率通过按照其相应的化学结构（根据分子量，电荷状态（亲水度或疏水度），等）选择上述与药物结合的可光固化的 GAG 来控制达到预定范围。

在本发明的该目的中，药物在温和条件下被固定，因而在药物分解的过程中药物是稳定的，并且与先有技术相比可以防止其中活性的降低。

受控释放药物材料或制剂各自包含交联 GAG 和包嵌在其内的药物，根据药物性质和使用方式，它们可制成任何所要形式。因此，例如，它们可被制成膜（膜，涂层），凝胶，冻胶，乳膏，悬浮剂，微胶囊，片剂，粒剂，粉剂等等。也可以通过用包含可光固化的 GAG 和药物的组合物浸渍载体（如沙布，敷料材料，编织或纺织纤维，纸，棉花，非纺织品，膜，多孔海绵）或者把所述组合物施加到这种载体上使可光固化的 GAG 成为备用状态，随后通过照射转换成交联 GAG。此外，包含可光固化的 GAG 和药物的组合物可被施加到这种如人工器官（如人造血管，人工心脏）的结构的面和内部，然后进行固化（交联）。

为包嵌药物在本发明交联 GAG 之内，药物溶在或悬浮在水溶液或有机溶剂（如 DMF）溶液中，所述溶液含有约 1 至 30% 重量。例如，相应可光固化的 GAG 和药物的浓度约 0.001 至 80%，在加入所需要的各种添加剂之后，将形成的组合物塑模，干燥，然后用光照射。交联后，模制品就此应用或视需要得到固体，半固体或悬浮体形式的受控释放药物材料。

本发明的受控释放药物材料可用作药物制剂。那么，包含药物的交联 GAGs 可以本身单独制剂或与常规药学上可接受的添加剂如防腐剂，稳定剂，局部麻醉剂，分散剂，模压性能改性剂，加溶剂等等一同制剂成所要剂型。例如，在调节其粒度为约 0.5 至 40  $\mu\text{m}$  之后，包含药物的交联 GAGs 可与分散剂（如吐温 80，HCO60 (Nippon Chemicals)，羧甲基纤维素，藻酸钠等），防腐剂（如对羟苯甲酸甲酯，对羟苯甲酸丙酯，苜醇，2-三氯叔丁醇等），等渗张剂（isotonizing agents）（如氯化钠，甘油，山梨醇，葡萄糖等）以及其它可能需要的添加剂一同配制水悬（浮）液，或者通过将其分散在植物油如橄榄油，芝麻油，花生油，棉子油，玉米油，或丙二醇等中配制油悬（浮）液。包含药物的交联 GAGs 也可单独或与赋形剂（如淀粉，碳酸钙等），粘合剂（如淀粉，阿拉伯树脂，羧甲基纤维素，聚乙烯吡咯烷酮，羟丙纤维素等），润滑剂（如滑石，硬脂酸镁，聚乙二醇 6000 等）和/或类似物的混合物通过直接压模制备片剂或制备粉剂，粒剂等。如将粉剂，粒剂或其它制剂填入胶囊内便得到包含药物的胶囊。此外，包含药物的交联 GAGs 本身也可塑模成膜或固定在一些其它载体上，从而得到可用于经皮吸收的制剂，眼制剂（如角膜创伤愈合促进剂），用于包嵌在生物体内的制剂，或可

被插入到体腔内的制剂（如栓剂）。这些材料尤其可用作创伤敷料，药物释放斑（如粘合带）以及避孕用具。

在配制含有包含药物的交联 GAGs 的上述的药物制剂中所用的药物不局限于任何特定种类，但还可以是需要经常给药以达到有效血液浓度或有效局部浓度的药物，其条件是药物应充分保持在交联 GAGs 的网状结构内并以控制方式释放。下述内容可作为具体例子。

1. 退热止痛消炎药如消炎痛，扑湿痛，醋炎痛，烯氯苯乙酸，布洛芬，盐酸羟哌苯噻酮，苯并丁酮酸，甲噻啉唑，水杨酸等；

2. 抗恶性肿瘤药如氮甲蝶呤，氟尿嘧啶，硫酸长春新碱，丝裂霉素 C，放线菌素 C，盐酸柔红霉素等；

3. 抗溃疡药如乙酰谷酰胺铝，左旋谷酰胺，对-（反式-4-氨基甲基环己基羰基）苯基丙酸氢氯化物，氮己烷羧苯酯盐酸化物，止呕灵，合欢香叶酯，甲氩咪胍等；

4. 酶制剂如糜蛋白酶，链激酶，盐酸溶解酶，菠萝酶，尿激酶，纤维蛋白激酶（tissue plasminogen activator）等；

5. 抗高血压药如氯压定盐酸化物，丁苄肼心安盐酸化物，哌唑嗪盐酸化物，疏甲丙脯酸，苄二甲胍硫酸盐，美多心胺酒石酸盐，甲基多巴等；

6. 用于泌尿器官的药如黄酮哌酯盐酸化物等；

7. 抗凝（血）剂如肝素，乙酰肝素硫酸盐，血栓调节蛋白，双香豆素，苄丙酮香豆素等；

8. 抗动脉硬化药如安妥明，双安妥明，弹性酶，烟酸环己醇酯等；

9. 用于循环器官的药如硝吡胺甲酯盐酸化物，硝苯吡酯盐酸化

物，细胞色素 C，烟酸维生素 E 等；

10. 类固醇如氢化可的松，去氢氢化可的松，地塞米松，倍他米松等；

11. 创伤愈合促进剂如生长因子，胶原等（参看 JP-A-60-222425）。

此外，上述药物还包括具有生理活性的多肽，激素，结核菌抑制药，止血药，抗糖尿病药，血管舒张药，抗心律不齐药，强心剂，抗过敏剂，抗抑郁药，镇痉药，肌肉松弛药，镇咳祛痰药，抗生素等等。

本发明的受控释放药物材料可作为医学材料用作制备如人工器官（如人工血管，人工心脏等）之类结构的成分（如表面）。在这种情况下，它们尤其用作形成与血液接触的表面的医学材料，其中抗凝剂（如肝素，乙酰肝素硫酸盐，血栓调节蛋白）；纤维蛋白溶解激活剂（如纤维蛋白激酶，尿激酶）和/或抗血小板物质可包嵌在交联 GAGs 内以得到控制释放这些物质的目的和使所述表面变为抗血栓形成。

#### [人工细胞外基质和人工基膜]

或与细胞粘性蛋白如胶原，明胶和纤维结合素混合的或者在化学结合此处所述的这类蛋白质之后的本发明可光固化的 GAGs 可转换成交联 GAGs，这种 GAGs 可用作容许细胞（内皮细胞，上皮细胞，平滑肌细胞等）粘连和生长的人工细胞外基质和人工基膜（参看 JP-A-1-124465，61-128974，和 62-270162）。它们还可用作杂种类型的人工器官（人工血管，人工皮肤等）。

下述实施例用于进一步说明本发明，但不能认为限制本发明的范

围。

实施例中，一些典型的物理特性和生理功能按照下述方法利用下面给定的仪器测定或评估。

$^1\text{H}$  NMR 光谱使用 JOEL JNM-JX270 FTNMR 光谱仪测量，UV/VIS 光谱利用 JASCO Ubest-30 UV/VIS 光谱仪测量。

各个光反应活性化合物的取代度 (DS) 依据  $^1\text{H}$  NMR 或 UV 数据计算，也可通过比较低分子量的典型化合物 (GAG 降解产物) 和所连接的光反应活性化合物的紫外吸收数据测定取代度。

各个交联 GAGs 衍生物的溶胀度按下所述测定：

溶胀度 =  $[W_g(\text{溶胀}) - W_g(\text{干燥})] / W_g(\text{干燥})$  其中  $W_g(\text{干燥})$  表示干燥的经光照射所制备的交联 GAG 膜的重量，以及

$W_g(\text{溶胀})$  表示交联 GAG 膜在纯化的水中浸渍 24 小时后的重量。

至于接触角，前置接触角和后退接触角通过利用接触角测角计 (静态 Kyowa 接触角仪 CA-D, Kyowa Kaimen Kagaku K.K.) 按液滴方法测量。当单独使用术语“接触角”时，一般是指“前进接触角”。

内皮细胞粘连实验按下述方法进行。各种可光固化的 GAG 通过从溶剂中铸型制成膜，并将该膜固定在由聚苯乙烯 (TCPS) 制造的组织培养皿的底部。利用从牛主动脉上取得的内皮细胞在无菌条件下接种。所用的培养基是补充有 10 - 15 % 胎儿的脐肠血清 (FCS) 的 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)。在 37 °C 培育 24 小时后，通过借助相衬显微镜观察判断细胞粘连是否发生。对于细胞生长的评价，使用 1 - 2 天后的生长速率。



### 实施例 1

制备透明质酸-肉桂酸酯以及通过它们的光化反应制备交联透明质酸

#### (1) 制备透明质酸-肉桂酸酯

将无水吡啶 (30 ml) 加到透明质酸 (分子量 880,000) 三正丁基胺盐的二甲基甲酰胺 (DMF) (150 mg/ 35 ml) 溶液中, 随后于室温在剧烈搅拌的情况下加入 26.64 mg 肉桂酰氯。在 75 °C 将酯化反应进行 2 小时, 然后向反应混合物中加入被乙酸钠饱和的乙醇, 收集产生的沉淀并用乙醇充分洗涤以除去未反应的肉桂酰氯, 得到透明质酸的肉桂酸酯。

组份 (lot):	HA-Cin-3
产量:	95.6 mg
结合的肉桂酸:	11.0 Wt.%(基于 <sup>1</sup> H NMR 光谱)
D S:	0.50

上述产物的 <sup>1</sup>H NMR 光谱见附图 1 所示。典型的特征吸收见下:

6-8 ppm: 归因于肉桂酸苯环和肉桂酸双键上的质子;

2 ppm: 归因于透明质酸 N-乙酰基上甲基的质子。

计算这些质子数量之间的比值并用于测定由上给出的结合的肉桂酸量, D S 值。

#### (2) 制备固化 (交联) 的透明质酸膜

将 30 mg 组分 HA-Cin-3 的 DMF 溶液置于载玻片上 (24 mm × 24 mm) 并使用无菌空气加热至 40 °C 干燥。使用 450-W 高压汞灯通过被水覆盖的派热克斯滤光片照射, 使所形成的膜曝光, 上述滤光片

用来滤去 270 nm 以前波长的光。这样得到固化(即交联)的透明质酸膜。

279 nm 的吸收峰随着照射而衰减(附图 2)。当衰减百分率稳定后停止照射(照射时间: 30 分钟)。

组分: HA-Cin-3-2

### 实施例 2

使用相同原料和实施例 1 中所用的方法制备透明质酸-肉桂酸酯, 但透明质酸与肉桂酸间的用量比按下列表 1 中所述变化(透明质酸的用量保持 150 mg)。并且按实施例 1 的方法制备固化(交联)的透明质酸膜

表 1

透明质酸-肉桂酸酯		交联的透明质酸		
组 分	产 率	结合肉桂酸	D S	组 分
HA-Cin-1	92.3mg	2.0 Wt%	0.10	HA-Cin-1-2
2	97.3	6.5	0.35	2-2
4	111.4	14.0	0.87	4-2
5	117.0	22.5	1.28	5-2
6	139.2	36.0	2.43	6-2
7	149.7	46.0	3.65	7-2

### 实施例 3

固化的透明质酸膜的接触角

测定由实施例 1 和 2 所得的各种固化的透明质酸膜的前进和后退接触角。结果列于附图 3。两种接触角很清楚地随着肉桂酸残基的 DS 增加而增加。

接触角的增加反映出膜表面疏水性的增加。

#### 实施例 4

##### 固化的透明质酸膜的溶胀度的测量

通过将由实施例 1 和 2 所得到的各种固化的透明质酸膜在纯化水中溶胀 24 小时测量它们的溶胀度。结果见附图 4 所示。

如附图 4 所示，溶胀度随着肉桂酸残基 DS 的增加而降低。

溶胀度的降低反映出所述膜的疏水性的增加。

#### 实施例 5

##### 内皮细胞对固化的透明质酸膜的粘连

培育 24 小时之后，评估内皮细胞对实施例 1 和 2 所得到的固化的透明质酸膜 [组分：HA-Cin-3-2 (DS=0.5)，4-2 (DS=0.87)，5-2 (DS=1.28)，和 6-2 (DS=2.43)] 的粘连力或附着力。结果见附图 5 所示 (像片)。

如附图 5 所示，内皮细胞的粘连力随着肉桂酸残基的 DS 值的增加而趋于增加。

DS=0.5 的膜 HA-Cin-3-2 显示出足够的细胞非粘连效果。从而被发现具有组织防粘材料所需要的基本特性。

所得资料也可作为与利用本发明的交联 GAGs 与细胞粘性蛋白质如胶原，明胶和纤维结合素结合制备人工细胞外基质或人工基膜，并

容许内皮细胞，上皮细胞，平滑肌细胞粘附于生长于上所述基质或膜，提供杂种 (hybrid type) 人工器官 (人工血管，人工皮肤等) 有关的基本资料。

### 实施例 6

制备硫酸软骨素-肉桂酸酯以及通过它们的光化反应制备交联的硫酸软骨素

#### (1) 制备硫酸软骨素-肉桂酸酯

将无水吡啶 (30 ml) 加到硫酸软骨素 (分子量 = 60,000) 的三正丁基胺盐的二甲基甲酰胺 (247 mg/15 ml) 溶液中。随后在室温及剧烈搅拌下，向混合物中加入 19.78 mg 肉桂酰氯。反应在 75 °C 进行 2 小时。向反应混合物中加入被乙酸钠饱和的乙醇，收集产生的沉淀，用乙醇充分洗涤，减压干燥。

组分:	CS-Cin-1
产量:	152 mg
结合肉桂酸:	7.52 Wt.%
D S:	0.33

#### (2) 制备交联的硫酸软骨素膜

将上述步骤 (1) 中制备的产物 CS-Cin-1 溶在磷酸盐缓冲溶液中，浓度 1.5%，然后使用与实施例 1 中所用的相同汞灯照射产生凝胶体。

组分:	CS-Cin-1-2
-----	------------

### 实施例 7

使用与实施例 6 中所用的相同材料和方法制备硫酸软骨素-肉桂酸酯，但硫酸软骨素与肉桂酸间的用量比按下表 2 中所述变化（硫酸软骨素的用量保持 247 mg），并从此按与实施例 1 所用的相同方法制备交联硫酸软骨素膜。

表 2

组 分	硫酸软骨素-肉桂酸酯			DS	交联的硫酸软骨素 组 分
	产 量	结合的肉桂酸			
CS-Cin-2	165.7mg	11.59 wt %		0.51	CS-Cin-2-2
3	170.0	14.0		0.65	3-2
4	195.3	25.8		1.37	4-2
5	233.8	38.6		2.43	5-2

将组分 CS-Cin-2 (DS=0.51) 溶于磷酸盐缓冲盐水(PBS)中，形成不同浓度的溶液，将溶液用光照射 30 分钟，然后检查胶凝度 (degree of gelation)，所得结果见附图 6 所示。如附图 6 所示，胶凝度随着浓度的增加而增加。

胶凝度 (%) 按下式计算：

$$\text{百分胶凝度 (\%)} = 100 \times (A-X) / (A-B)$$

其中 A = 照射前吸光度 (OD 275 nm)

B = 充分照射至吸光度达到稳定常数后得到的吸光度 (OD 275 nm)，以及

X = 照射 30 分钟后吸光度 (OD 275 nm)。

将组分 CS-Cin-3 ( $DS=0.65$ ) 的 PBS 1.5% 溶液用光照射, 凝胶状态遵循时间函数。因而, 在每次曝光周期之后, 将所形成的凝胶体在去离子水中浸渍 24 小时, 除去凝胶体表面的水份后称重。然后干燥凝胶体, 计算溶胀度。同时也测定胶凝度。所得结果见附图 7 所示。

胶凝度随着曝光时间的延长而增加, 但溶胀度却随着曝光时间的延长而降低。

对组份 CS-Cin-1 至 5 也评估了它们在 PBS 中的胶凝特性, 以及产生的凝胶体的溶胀度。从而所发现的胶凝度或溶胀度与肉桂酸残基 (摩尔比以载有双糖的硫酸软骨素单位为基准) 的  $DS$  值间的关系见附图 8 所示。

肉桂酸残基的  $DS$  值的增加导致胶凝度增加, 但溶胀度迅速降低。

## 实施例 8

### 固化的硫酸软骨素膜的溶胀度评估

将实施例 6 和 7 中所合成的硫酸软骨素-肉桂酸酯塑模成可光固化膜, 然后将该膜用光照射 30 分钟进行交联, 得到固化的硫酸软骨素膜。

测量这些固化的软骨素膜的溶胀度, 结果见附图 9 所示。

结果表明与固化的透明质酸膜不同, 固化的硫酸软骨素膜的溶胀度在既使当肉桂酸残基的  $DS$  值增加时也不象固化的透明质酸膜那样迅速降低。这大概是由于固化的硫酸软骨素膜具有硫酸根以及比固化透明质酸膜高的亲水性的原因。

## 实施例 9

测量实施例 8 中所得到的固化的硫酸软骨素膜的接触角，并画出其对肉桂酸残基的 D S 值的关系曲线。结果见附图 10 所示。附图 10 中的图解表示表明交联硫酸软骨素与交联透明质酸比较，显示出较小的接触角。这大概也是由于亲水性不同的原因。

## 实施例 10

### 内皮细胞对固化的硫酸软骨素膜的粘连

按与实施 5 所述的相同方法，检查内皮细胞对实施 8 所得的固化的硫酸软骨素膜的粘连。与固化的透明质酸膜不同，观察到与肉桂酸残基的 D S 值无关的非粘连性。

## 实施例 11

### 肉桂酸衍生物与透明质酸的羧基的结合及交联

#### (1) 合成肉桂酰基乙二胺酰胺

将肉桂酰氯 (1.666g) 溶于 100 ml 氯仿中，并在 0 °C 向溶液中滴加入 6 g 1,2-乙二胺的氯仿溶液。在 40 °C 搅拌 20 小时后，反应混合物用饱和碳酸氢钠溶液洗涤，然后用水充分洗涤。减压浓缩有机溶剂层，残余物用乙醇重结晶，得到所要产物 (1.58g，以下称作化合物 A)。

#### (2) 合成 N $\alpha$ -肉桂酰基-L-赖氨酸

将 N $\epsilon$ -叔丁氧羰基-L-赖氨酸 (2.58g) 溶于 50 ml 二甲基甲酰胺中，向该溶液中加入 30 ml 无水吡啶。向混合物中加入肉桂酰氯的氯仿溶液 (1.665g / 20ml)，反应在 40 °C 下进行。减压浓缩反应混合物至干，将残余物溶在 3.6N HCl / 二噁烷 (33 ml) 中，

放置 4 小时后，减压浓缩溶液，得到所要产物（2.43g，以下称作化合物 B）。

(3) 将肉桂酰基乙二胺酰胺与透明质酸结合

将 150 mg 透明质酸钠（分子量 = 1,200,000）溶在 30 ml 水中，随后加入 42.75 mg 化合物 A 和 71.9 mg 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳化二亚胺盐酸盐。反应在室温下进行 20 小时。向反应混合物中加入 1 M 碳酸氢钠水溶液，室温放置 1 小时后，再加入乙酸钠饱和的乙醇。收集产生的白色沉淀，并用乙醇充分洗涤。

组分：	HA-CinA-1
产量：	176.2 mg
结合的化合物 A：	16.58 Wt. %
DS：	0.5

(4) 将 Na-肉桂酰基-L-赖氨酸与透明质酸结合

向透明质酸的三正丁基胺盐（分子量 = 880,000）的二甲基甲酰胺溶液（150 mg/ 35 ml）内加入 1.224 g N-羧基琥珀酰亚胺和 55 mg 二环己基碳化二亚胺，并将反应先在 0℃ 进行 1 小时，然后在室温进行 10 小时，用于活化透明质酸的羧基。向反应混合物中加入乙醚并收集产生的沉淀，乙醚洗涤，减压干燥，得到相应的活化的透明质酸酯。

将该活化的透明质酸溶于二甲基甲酰胺中，向该溶液中加入化合物 B 的二甲基甲酰胺溶液（44 mg/ 50 ml），反应在室温下进行 20 小时。向反应混合物中加入乙酸钠饱和的乙醇，滤出所产生的沉淀并



用乙醇洗涤纯化。

组分：	HA-CinB-1
产量：	122.1 mg
结合的化合物B：	25.92 Wt.%
D S：	0.5

#### (5) 制备固化的透明质酸膜

按与实施例1所述的相同方法，将组分 HA-CinA-1 和 HA-CinB-1 (各自 30 mg) 模塑成膜，并利用光照射交联。

如此制备的固化的透明质酸膜(组分：各自为 HA-CinA-1-2 和 HA-CinB-1-2) 各自显示出溶胀度值为 1.2 和 1.4g H<sub>2</sub>O/g 凝胶体。

#### 实施例 1 2

##### 合成透明质酸-[(1-(2-羧乙基)胸腺嘧啶)]酯(1)

向含有 0.317g 碘化 2-氯-1-甲基吡啶鎓的透明质酸(分子量 1,000,000)(以下称作 HA100)二甲基甲酰胺(DMF)溶液(175mg/50 ml)中加入 0.245g 1-(2-羧乙基)胸腺嘧啶和 0.461g 三乙胺，反应在 90℃进行 4 小时。减压除去 DMF，加入过量乙醇，收集所产生的沉淀，用乙醇洗涤，减压干燥。所得到的白色沉淀是透明质酸-[1-(2-羧乙基)胸腺嘧啶]酯。

组分：	HA-Thym-1
产量：	160.0 mg

结合的胸腺嘧啶： 9.1 Wt. %

DS： 0.46

( DS 值依据由  $^1\text{H NMR}$  所测定的胸腺嘧啶的甲基质子的数目与透明质酸的乙酰基质子的数目间的比率来测定。 )

### 实施例 1 3

#### 合成透明质酸 - [1 - (2 - 羧乙基) 胸腺嘧啶] 酯 ( 2 )

按与实施例 1 2 中所述的相同方法, 制备几组透明质酸 - [1 - (2 - 羧乙基) 胸腺嘧啶] 酯, 但使用表 3 中所述条件。

表 3

组 份	反应条件			DS	物理特性	
	胸腺嘧啶/ HA OH 摩尔比	温度 ( $^{\circ}\text{C}$ )	时间 (hrs)		溶解度 (mg/ml)	水
HA-Thym-2	0.5/1.0	90	3	0.05	1	20
3	1.0/1.0	75	2	0.125	10	80
4	2.0/1.0	75	2	0.14	10	80
5	0.67/1.0	90	4	0.17	50	80
6	1.0/1.0	90	3	0.26	20	80
7	1.0/1.0	90	6	0.35	20	80
8	0.67/1.0	100	4	0.37	50	80
9	3.0/1.0	90	3	2.40	0	100

#### 实施例 1 4

利用透明质酸 - [1 - (2 - 羧乙基) 胸腺嘧啶] 酯 (1) 的光化反应制备交联的透明质酸

按照与实施例 1 中所述的相同方法, 利用组份 HA-Thym-1 (DS = 0.46) 制备膜, 并将膜用氙灯放射出的紫外 (UV) 射线照射。胸腺嘧啶二聚体形成的过程被发现可作为曝光时间的函数, 见附图 1 1 所示。

#### 实施例 1 5

利用透明质酸 - [1 - (2 - 羧乙基) 胸腺嘧啶] 酯 (2) 的光固化作用 (光化反应) 制备固化的透明质酸膜

按与实施 1 中所述的相同方法, 将实施例 1 3 中所制得的组分 HA-Thym-3, 4, 6, 7, 8 和 9 (DS 值各自为 0.125, 0.14, 0.26, 0.35, 0.37 和 2.40) 各自模塑成膜, 并将各膜利用氙灯用 UV 照射。如此得到的固化的透明质酸膜各自被称作组分 HA-Thym-3-2, 4-2, 6-2, 7-2, 8-2 和 9-2。这些膜的胶凝度 (%) 和溶胀度数见下表 4 所示。

表 4

组 分	胶凝度 (%)	溶胀度
HA-Thym-3-2	75.39	34.76
4-2	74.5	45.00
6-2	88.9	32.63
7-2	94.0	40.17
8-2	99.4	32.17
9-2	98.0	0.56

### 实施例 16

#### 合成透明质酸-[1-(2-羧乙基)胸腺嘧啶]酯(3)

将透明质酸的 DMF 溶液 (1.0 mM) 在分子筛预干燥后再进一步脱气 4 小时充分脱水。单独将含有 1-(2-羧乙基)-胸腺嘧啶 (相对于透明质酸的各羟基基团改变摩尔比率, 参看附图 12), 碘化 2-氯-1-甲基吡啶鎓 (1.2 mM) 和三乙胺 (1.2 mM) 的 DMF 溶液在室温搅拌 30 分钟。将该溶液滴加到补充有三乙胺 (1.2 mM) 的上述透明质酸溶液。将形成的混合物在 90 °C 搅拌 3, 5 或 8 小时。减压浓缩反应混合物并向残余物中加入甲醇。滤出所生成的沉淀, 甲醇洗涤, 干燥。在该情况下, 得到 DS 值不同的透明质酸-[1-(2-羧乙基)胸腺嘧啶]酯 (HA-Thym; DS=0.2, 0.4, 0.6, 0.7, 0.9, 1.3, 1.8, 2.2)。

所用的 1-(2-羧乙基)胸腺嘧啶的摩尔比率与 DS 值之间的关系曲线的例子见附图 12 所示。

### 实施例 17

#### 合成硫酸软骨素-[1-(2-羧乙基)胸腺嘧啶]酯

使用硫酸软骨素(分子量=60,000)进行实施例16的步骤,1-(2-羧乙基)胸腺嘧啶的摩尔比相对于硫酸软骨素的各羟基基团而变化,且酯化反应时间为3,5或9小时。向各反应混合物中加入甲醇或二乙醚用于沉淀产物。当使用二乙醚时,沉淀用甲醇充分洗涤。这样得到DS值不同的硫酸软骨素-[1-(2-羧乙基)胸腺嘧啶]酯(CS-Thym; DS=0.09, 0.4, 0.8, 0.9, 1.3, 1.7, 1.8, 2.2)。

所用的1-(2-羧乙基)胸腺嘧啶的摩尔比率与DS值之间的关系曲线的例子见附图13所示。

DS-溶解性(在水或DMF中)的关系见表5所示。

表 5

DS	溶解性	
	水	DMF
0.4	溶解	溶解
0.9	溶解	溶解
1.3	微溶	溶解
1.7	不溶	溶解

### 实施例 18

#### 利用胸腺嘧啶衍生物制备固化的透明质酸膜和固化的硫酸软骨素膜

使用实施例16或17中所得到的各种GAG的1-(2-羧乙基)胸腺嘧啶酯制备上述膜。

例如，将各种透明质酸-[1-(2-羧乙基)胸腺嘧啶]酯 (HA-Thym; DS=0.2, 0.4, 0.6, 0.7, 0.9, 1.3, 1.8, 2.2) 和硫酸软骨素-[1-(2-羧乙基)胸腺嘧啶]酯 (CS-Thym; DS=0.09, 0.4, 0.8, 0.9, 1.3, 1.7, 1.8, 2.2) 溶在 DMF 中，得到 5% 溶液，将 200  $\mu$ l 溶液置于载片上 (直径 14 mm)，用灭菌空气在 35  $^{\circ}$ C 干燥。所生成的膜用来自 400 W 高压汞灯通过被水覆盖的派热克斯滤光片的射线照射，得到交联的 GAG 膜。

已发现当按上述方式照射干燥的薄的硫酸软骨素-[1-(2-羧乙基)胸腺嘧啶]酯 (CS-Thym) 膜 (DS=0.09, 厚度=2-3  $\mu$ m) 时，在 270 nm 的吸收变化与曝光时间的关系，曲线见附图 14 所示。并发现在那种情况下，胶凝度 (%) 与曝光时间的关系曲线见附图 15 所示。具有适合实际应用厚度 (10-12  $\mu$ m) 的 CS-Thym (DS=0.09) 膜也按相同方式照射；胶凝度 (%) 与曝光时间的关系曲线见附图 16 所示。

按照相同方式照射干燥的透明质酸-[1-(2-羧乙基)胸腺嘧啶]酯 (HA-Thym) 膜 (DS=0.9, 厚度=10-12  $\mu$ m)，所得到的溶胀度-曝光时间的关系曲线见附图 17 所示。在照射前和照射后 (3 小时) 测量各种 DS 值不同的 HA-Thym 膜的溶胀度，并画出 DS 对所得数值的关系曲线，所得曲线见附图 18 所示。

本实施例中所得到的且 DS 值不同的几种 HA-Thym-或 CS-Thym-衍生的光固化的膜的接触角和溶胀度值见表 6 所示。

表 6

可光固化的GAG	接触角(度)±SD	溶胀度
HA-Thym(0.6)	-	32±7
HA-Thym(0.9)	-	13±4
HA-Thym(1.3)	-	7
HA-Thym(1.8)	54±3	0
CS-Thym(0.9)	-	40±13
CS-Thym(1.3)	-	22±5
CS-Thym(1.8)	-	
CS-Thym(2.2)	70±2	3

### 实施例 19

#### 内皮细胞对交联的透明质酸膜的粘连性

将内皮细胞在如实施例 18 中用胸腺嘧啶衍生物制备的 DS 值不同的交联的透明质酸膜 (DS=0.4, 0.6, 1.3, 1.8) 中培养, 待培养 6 小时后评估细胞的粘连度。

结果, 在任何 DS 值不同的交联透明质酸膜上基本上没有观察到细胞的粘连, 增大(扩展)及生长。相反, 在对比 TCPS 的孔中发现正常结合, 增大(扩展)和生长。

### 实施例 20

#### 合成硫酸软骨素-(7-香豆氧基乙酸)酯 [Chondroitin Sulfate-(7-Coumaryloxyacetic acid) ester]

将硫酸软骨素三正丁基胺盐的 DMF 溶液 (10.25 mg/ml) 用分子

筛预干燥，并将 70 ml 该溶液在 100 ml 三口烧瓶中于室温且搅拌下真空干燥。在烧瓶内空气被氮气赶走，加入 15 ml 蒸馏过的吡啶。向该溶液中加入相对于硫酸软骨素的各羟基基团为 1 摩尔当量的 7-香豆氧基乙酰氯 [酰氯式香豆素] (1.12 g) 的 5ml DMF 溶液。反应通过在氮气氛下于 80 °C 回流混合物进行 3 小时。然后浓缩反应混合物并滴加入二乙醚，回收所产生的沉淀，并溶在去离子水中，用流动水渗析 3 天。将滤析液冷冻干燥，得到硫酸软骨素-(7-香豆氧基乙酸)酯，白色固体。

产量：965.1 mg

DS：0.021

溶胀度：2.8g H<sub>2</sub>O/g 干燥胶凝体

<sup>1</sup>H-NMR 光谱：见附图 19

重复上述步骤，但改变酰基氯式香豆素与硫酸软骨素的羟基基团的摩尔比并画出摩尔比对 DS 值的关系曲线。结果见附图 20 所示。

## 实施例 21

由硫酸软骨素-(7-香豆氧基乙酸)酯制备可光固化的硫酸软骨素膜

将实施例 20 中合成得到的硫酸软骨素-(7-香豆氧基乙酸)酯按实施例 1 中所述制成干燥膜，将膜用紫外光 (320 nm) 照射，得到可光固化的硫酸软骨素膜。

曝光时间与香豆素的吸收光谱 (320 nm) 变化间的关系曲线见附图 21 所示。测定所制备膜的溶胀度 (g H<sub>2</sub>O/g 干燥胶凝体) 并画出曝光时间和 DS 值对溶胀度的关系曲线。结果各自见附图 22 和



23所示。此外，还测定了胶凝度(%)并画出曝光时间和硫酸软骨素-(7-香豆氧基乙酸)酯的浓度对胶凝度(%)的关系曲线，结果各自见附图24和25所示。

## 实施例22

### 交联的透明质酸/硫酸软骨素膜

将实施例1中所得的HA-Cin-3(DS=0.5)溶于20%DMF水溶液中，最终浓度为5%重量比。然后，将实施例7所得的CS-Cin-4(DS=1.37)溶在上述溶液中，最终浓度达到5%重量比，得到了透明质酸/肉桂酸酯和硫酸软骨素-肉桂酸酯的混合溶液。将该溶液按实施例1所述方法进行压片和照射，得到交联的透明质酸/硫酸软骨素膜。

同样制备含有比率为2:1或1:2(重量比)的HA-Cin-3和CS-Cin-4的混合溶液并测定各制备膜的防粘连效果(见下文所述)。

## 实施例23

### 合成肝素-肉桂酸酯和制备交联的肝素膜

#### (1)制备肝素-肉桂酸酯

向肝素三正丁基胺盐的二甲基甲酰胺(DMF)溶液(500mg/125ml)中加入20ml吡啶，将混合物减压脱水。然后于室温和剧烈搅拌下加入69.35mg肉桂酰氯。反应在75℃进行2小时，然后在40℃将反应混合物减压浓缩至30ml。向该残余物中加入乙醚，回收所生成的沉淀，减压干燥。将沉淀溶于5mlDMF中，随后加入40mlPBS，将溶液充分搅拌。将溶液通过渗析膜渗析以彻底除去低

分子化合物，然后冷冻干燥，得到 440 mg 所要的酯化合物。

组分：Hep-Cin-1

结合的肉桂酸量（由<sup>1</sup>H-NMR 测量），DS 和溶解性见表 7 所示。

表 7

组 分	结合肉桂酸 (重量%)	DS	溶 解 性	
			DMF	水
Hep-Cin-1	12.4	0.5	0	△
2	21.7	1.1	0	x
3	31.7	1.8	0	x
4	40.2	2.5	0	x

0 : 完全溶解

△ : 非完全溶解但为类凝胶

x : 不溶

## (2) 制备交联的肝素膜

在 DMF 中溶解 30 mg 组分 (Hep-Cin-1) 并将溶液置于玻璃载片 (24 mm × 24 mm) 上并在 40 °C 用灭菌热空气干燥。所形成的膜用 450 W 高压汞灯通过被水覆盖的派热克斯滤光片照射，得到交联肝素膜。

组分：Hep-Cin-1-2

接触角（前进和后退接触角）和水溶胀度见表 8 所示。

表 8

组 分	接触角 (°)		水 溶 胀 度
	前进接触角	后退接触角	
Hep-Cin-1-2	89.3	54.8	0.13
2-2	76.2	41.5	0.02
3-2	90.3	56.5	0.05

(3) 使用与上述相同的原料和方法, 但改变肝素与肉桂酰氯的比率 (肝素保持为 500 mg) 来制备酯 (Hep-Cin-2, Hep-Cin-3, Hep-Cin-4)。测定结果也见表 7 所示。此外, 按相同方式制备交联肝素膜 (Hep-Cin-2-2, Hep-Cin-3-2), 这些膜的物理特性也见表 8 所示。

#### 实施例 2.4 用肉桂酸酐合成透明质酸肉桂酸酯

将透明质酸三正丁基铵盐 (1.5 g 相应于 10 mmol OH 基团) 的干燥 DMF (200 ml) 溶液保持在氩气中并冷却至 0 °C, 依次加入 4-二甲氨基-吡啶 (0.305 g, 2.5 mmol), 肉桂酸酐 (2.78 g, 10 mmol), 和三正丁基胺 (4.76 ml, 10 mmol), 反应在室温下进行 2-4 小时。冷至 0 °C 后, 逐渐加入溶在水 (100 ml) 中的 5% NaHCO<sub>3</sub> 并将溶液在室温下搅拌 4-8 小时。通过逐步加入 1M HCl 消去过量的 NaHCO<sub>3</sub> 至 pH 4, 加入 1M NaOH 至 pH 7。在搅拌下加入冷乙醇。倾析后将沉淀溶在水中, 用乙醇重复沉淀步骤。离心出沉淀并溶于水中, 在 4 °C 通过 Dowex 50 (H<sup>+</sup>) 阳离子交换树脂柱。酸用 1M NaOH 中和并冷冻干燥。所得产物是透明质酸肉桂酸酯。

## 实施例 2 5

### 光固化的透明质酸膜的非粘连效果

按与实施例 1 制备组分 HA-Cin-3-2 的相同方法制备可光固化的透明质酸-肉桂酸酯膜, 将该膜用作非粘连材料并进行下列试验。

在麻醉条件下剖腹鼠并将腹膜壁机械损伤制备一外露肌层部位。该部位用上述制备的非粘连材料覆盖。覆盖后 1 周和 2 周移开植入物, 利用光学显微术 (在用苏木精-曙红染色之后) 和电子显微术检查评估对膜表面的组织粘合程度。将损伤部位没被覆盖的鼠用于比较。

在使用本发明非粘连材料的试验中, 样品覆盖一周和两周后, 所有样品基本上没发现有纤维蛋白沉淀和细胞粘连。两周后的发现证明膜的生物降解作用早已发生。

另一方面, 在对比试验中, 损伤部位相继发生纤维蛋白沉淀, 浆细胞侵入, 成纤维细胞等。一周后胶原蛋白产物和肠道紧密地粘附于损伤部位。

重复上述试验, 但使用实施例 2 2 所制备的交联 HA-Cin-3 / CS-Cin-4 膜。与上述同类 HA-Cin-3 膜 (HA-Cin-3-2) 比较, 生物降解能力增强, 结果膜的生物降解作用在移植后一周内已发生, 附带细胞侵入膜内, 降解进程在两周时已十分明显。

## 实施例 2 6

### 光固化的硫酸软骨素膜 (原地胶化) 的非粘连效果

将实施例 7 所制备的硫酸软骨素-肉桂酸酯组分 CS-Cin-3 (DS = 0.65) 溶在磷酸盐缓冲液中, 最终浓度为 20% 重量, 得到溶液形式的非粘连材料。

制备如实施例 2 5 中所用的动物损伤器官样本并将损伤部位用上  
述非粘连材料涂层。然后用紫外光照射这种材料 1 5 分钟，原地发生  
胶化作用。显微解剖学检查显示出形成了—与腹部腹膜组织表面紧密  
接触的胶层。

按与实施例 2 5 中所用的方法相同顺序观察损伤部位，与实施例  
2 5 相同显示出非粘连性。

### 实施例 2 7

光固化（交联）的透明质酸膜和光固化（交联）的硫酸软骨素膜的非  
粘连效果。

将按与实施例 1 和 2 所述的相同方法制备的光固化的透明质酸—  
肉桂酸酯（HA-Cin）膜（DS=0.1, 0.5）和按与实施例 1 8 所述的相  
同方法制备的光固化的透明质酸—胸腺嘧啶衍生物酯（HA-Thym; DS  
=0.2, 0.6, 0.9, 1.8）和光固化的硫酸软骨素—胸腺嘧啶衍生物酯  
（CS-Thym; DS=0.4, 0.9）膜用作非粘连材料并进行下述试验。而  
且将各种光固化膜（直径：14 mm；厚度 15 - 20  $\mu$ m）通过在 7 0 %  
乙醇中浸渍 3 0 分钟，然后在无菌水中漂浮 1 小时灭菌。至于低 DS  
值样品，它们在浸渍在水中以除去乙醇之后进行干燥并在动物试验之  
前，在无菌水中浸渍漂浮 1 0 分钟。吸收水的膜溶胀形成水凝胶。

将患有白化化病的 Wistar 雄鼠（300 g）用乙醚麻醉并在手术  
前用乙醚和氧气维持麻醉状态。每种样品使用一只鼠。在鼠腹部切割  
出一垂直正中切口以使暴露出肝。将外露肝表面机械损伤，构成一损伤  
的腹部部位（1 平方厘米），并施加上述溶胀的光固化膜。由于膜不能  
被固定在损伤部位上，故在四个角上点上聚氨基甲酸酯粘合剂以固定

上述膜。然后，用尿龙缝合施行腹壁缝合术。植入后一周和两周，将鼠杀死并将缝合部位切割开。肉眼检查覆盖着肝的膜，将覆盖部分及其周围组织割去，利用光显微术进行组织检查，结果见表 9 所示。

表 9

光交联膜 DS	移植后时间	肉眼观察		显微镜观察	
		粘连性	粘连性	生物降解能力	膜开裂
HA-Cin 0.1	1 week	-	-	+	-
HA-Cin 0.5	1 week	+	-	-	-, +
HA-Thym 0.2	1 week	-	-	++	-
HA-Thym 0.6	1 week	-	-	+	-
HA-Thym 0.6	2 weeks	-	-		
HA-Thym 0.9	1 week	-	-	+	-
HA-Thym 0.9	2 weeks	-	-	++	-
HA-Thym 1.8	1 week	+	-		
CS-Thym 0.4	1 week	-	-	++	-
CS-Thym 0.9	1 week	-	-	+	-

- : 没有

+ : 附加或观察到 (Added or observed)

++ : 明显

光固化 HA-Cin (DS=0.1) 膜的组织检查，例如，在移植后一周显示出膜表面上完全没有细胞粘连，且膜的生物降解作用已经发生，

并观察到组织侵入。对于光固化的 HA-Thym (DS=0.2) 膜, 同腹壁细胞一样, 在最外层观察到有扁细胞 (flat cells), 且生物降解作用已经发生, 以及仅有少许中心部分保留。

使用未覆盖的损伤部位作为比较, 1 周后进行类似观察。结果, 在肝损伤表面与腹壁之间发现有不能被钝手术操作 (如利用手术刀或手掌背面, 而不用刀切割的手术) 分离开的粘连。

## 实施例 2 8

利用光固化的透明质酸和光固化的硫酸软骨素膜作为载体的药物的受控释放

### (1) 消炎痛的受控释放

将实施例 1 6 所得到的具有变动 DS 值的 HA-Thym 溶于 DMF 中, 且最终浓度为 5%, 并将  $1 \mu\text{g}$  消炎痛溶于  $200 \mu\text{l}$  上述溶液中。将产生的溶液置于玻璃载片上 (直径 15 mm), 利用灭菌热空气在  $35^\circ\text{C}$  空气干燥。这样所得的膜按与实施例 1 8 所述的相同方法照射, 得到包含消炎痛的交联透明质酸膜。药物含量控制在 10%。按相同方式制备含有 30%, 50% 和 73% 药物的交联的透明质酸膜。此外, 利用实施例 1 7 所得到具有变动 DS 值的 CS-Thym, 按相同方式制备含有 10%, 30% 和 50% 药物的交联的硫酸软骨素膜。

药物从各种制备膜中释放的试验按下述方法进行。例如, 将测试膜悬浮在水 ( $20^\circ\text{C}$ ) 或磷酸盐-缓冲的盐水中 (PBS) ( $37^\circ\text{C}$ ) 并搅拌。在预定时间间隔将液相采样并测量其在 269 nm 的紫外吸收光谱。

表 1 0 显示了具有 30% 药物含量的光固化的透明质酸膜 (DS=0.7, 1.3, 1.8) 的水溶解试验数据与 DS 和溶胀度的关系。至于溶

解试验数据是指当20%药物从所用膜中释放出时的时间。

表 10

DS	溶胀度	20% 释放时间(分)
0.7	8	25
1.3	5	120
1.8	0.2	360

从表10可以看出,很明显作为一种趋势,DS值越高,交联度也越高,因此膜就越硬,其结果溶胀度降低以及药物的释放速率也协同降低。该发现说明膜的吸水容量对药物释放速率是一重要指数。关于DS值为1.3和1.8的膜,药物释放速率趋向于随着药物含量的增加而降低。

比较光固化的透明质酸膜(DS=0.7, 2.2)和光固化的硫酸软骨素膜(DS=0.8, 1.3, 1.8)当药物含量为10%和50%时在PBS中的药物释放速率。结果见附图2.6至3.0所示。根据这些图,很明显可以看出:对于具有不小于一定限度DS值的膜(对于CS-Thym, DS=1.3),药物受控释放是可行的。

## (2) 肝素的受控释放

在20% DMF水溶液中溶解实施例7所得的硫酸软骨素-肉桂酸酯[CS-Cin-4 (DS=1.37) CS-Cin-5 (DS=2.43)], 最终浓度为20%重量比, 以及溶解实施例1和2中所得的透明质酸-肉桂酸酯[HA-Cin-3(DS=0.50), HA-Cin-5(DS=1.28), HA-Cin-6(DS=2.43)], 其最终浓度达到10%重量比。向各10 ml这些溶液中加入100 mg



肝素并将溶液涂层在玻璃上 (10 cm × 10 cm), 室温干燥 1 小时得到膜。该膜用 450W 高压汞灯照射 30 分钟。各膜的厚度大约为 100 μm。

将各个载在玻璃片上的膜完全浸入在含有 100 ml 水的容器内并以 60 rpm 搅拌。按照咪唑-硫酸法, 测量随着时间变化肝素的释放量。结果表明所有膜都保证肝素的受控释放。

此外, 各种上述控制肝素释放膜在试管内壁上形成, 然后, 按照 JP-A-4-41432, 加入柠檬酸化血液并测量凝结时间。所有样品都显示出抗血栓形成活性。

### (3) 生长激素释放因子的控制释放

在 20% DMF 水溶液中溶解透明质酸-肉桂酸酯 [HA-Cin-3 (DS=0.50)], 其最终浓度达到 10% (重量比), 1 ml 上述溶液内混合 1 mg 生长激素释放因子 (GRF, 人体; 分子量: 5039.8)。然后将混合物在玻璃片 (3 cm × 3 cm) 上涂层并在室温下干燥 1 小时, 得到膜。该膜用 450W 高压汞灯照射 30 分钟。该膜厚度为 110 μm。

将上述载于玻璃片上的膜完全浸入在含有 10 ml 水的容器内, 并以 60 rpm 搅拌。借助高效液相色谱测定随时间变化释放的 GRF 并计算释放的累积量。已发现 GRF 的控制释放可以成功地完成。

## 实施例 29

### 人造血管

将具有小腔 (内径 3 mm) 的人工血管的内表面用实施例 1 所制得的 HA-Cin-3 溶液通过旋转涂层技术涂层, 干燥后, 涂层膜利用紫外线辐射器使用小口径光学纤维固化, 从而得到内部被固化的透明质酸涂层的人造血管。

### [发明效果]

本发明很容易通过选择这里具体描述的作为高度安全和生物相容原料的这些光活性化合物和氨基葡聚糖，并将前者与后者结合提供易纯化的可光固化的 GAGs。本发明通过利用光照射上述可光固化的 GAGs 进一步提供了医用材料。该材料具有两或三维网状结构并且是高度安全，生物相容和生物可降解/吸收的。本发明通过适当选择 GAG 分子量，光活性化合物的 DS 值，以及其它因素还进一步提供了具有医学材料所需要的理想物理特性的交联 GAG 基础材料，因此本发明在医学的不同领域具有十分宽广的应用前景。

说明书附图

图 1

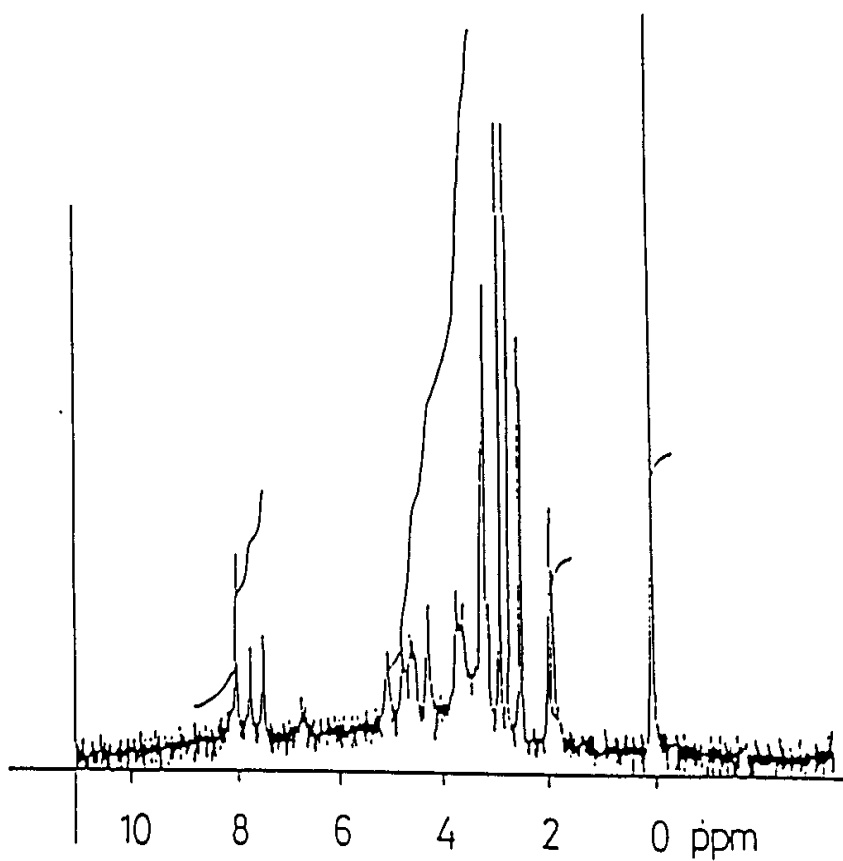


图 2

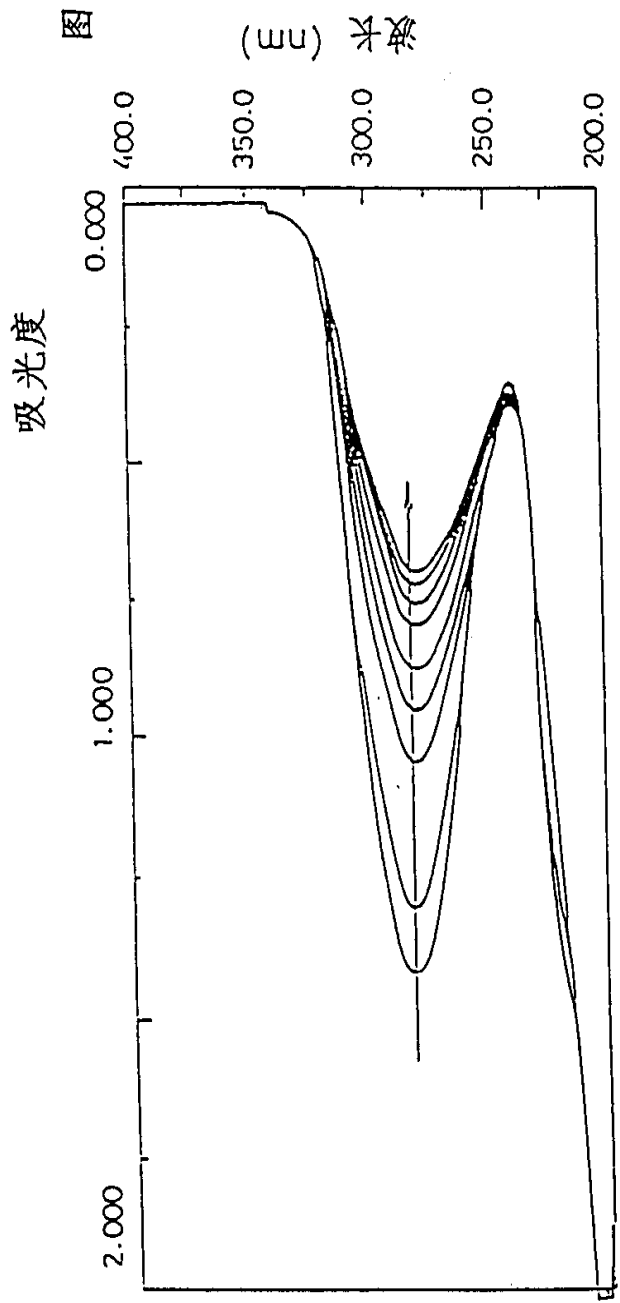


图 3

○ 前进接触角  
● 后退接触角

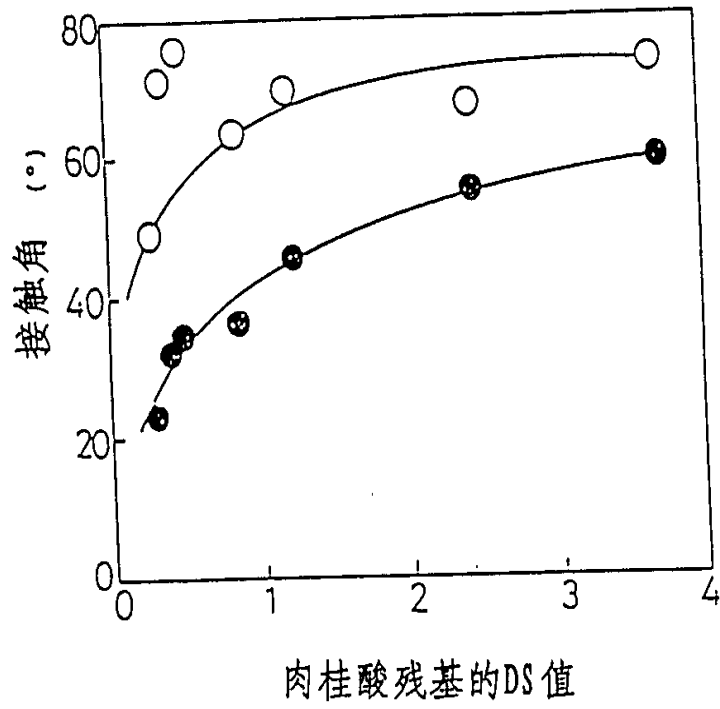
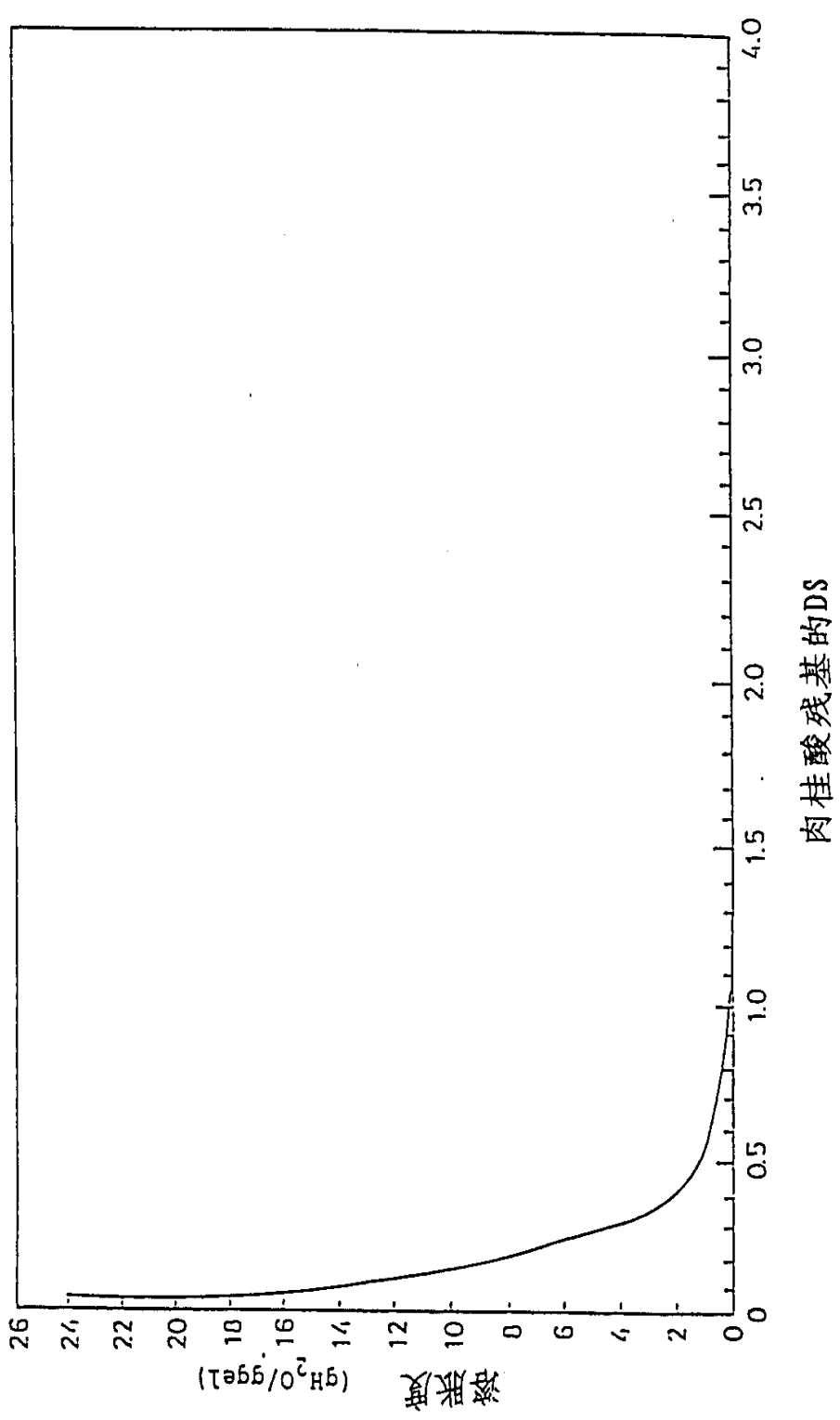


图 4



5



DS=0.87



DS=2.43

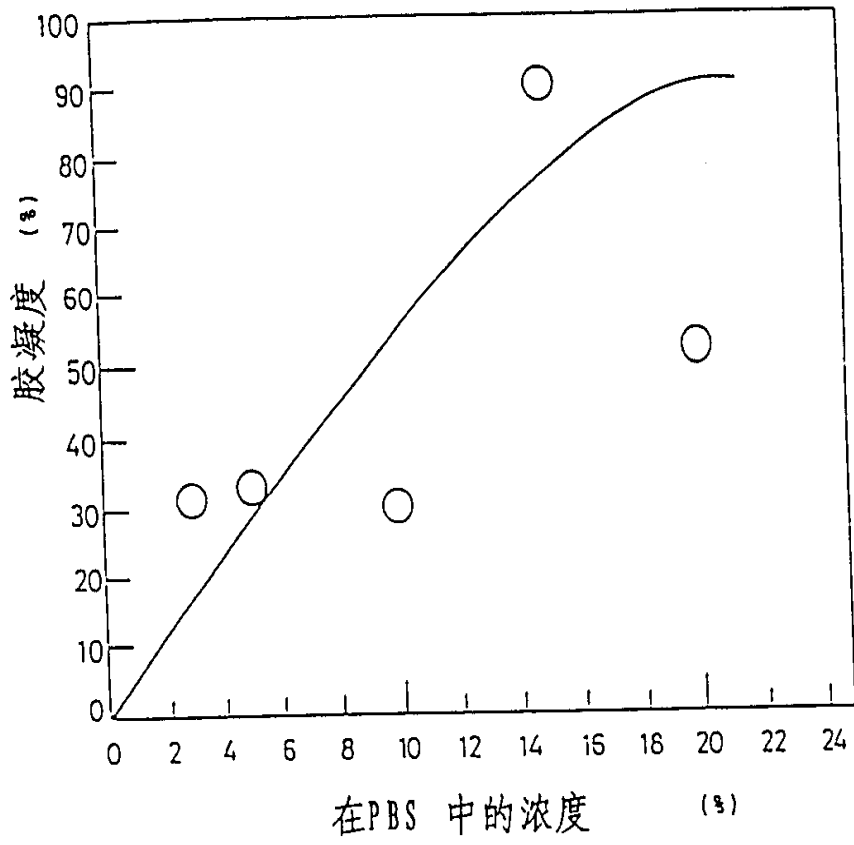


DS=0.5



DS=1.28

图 6





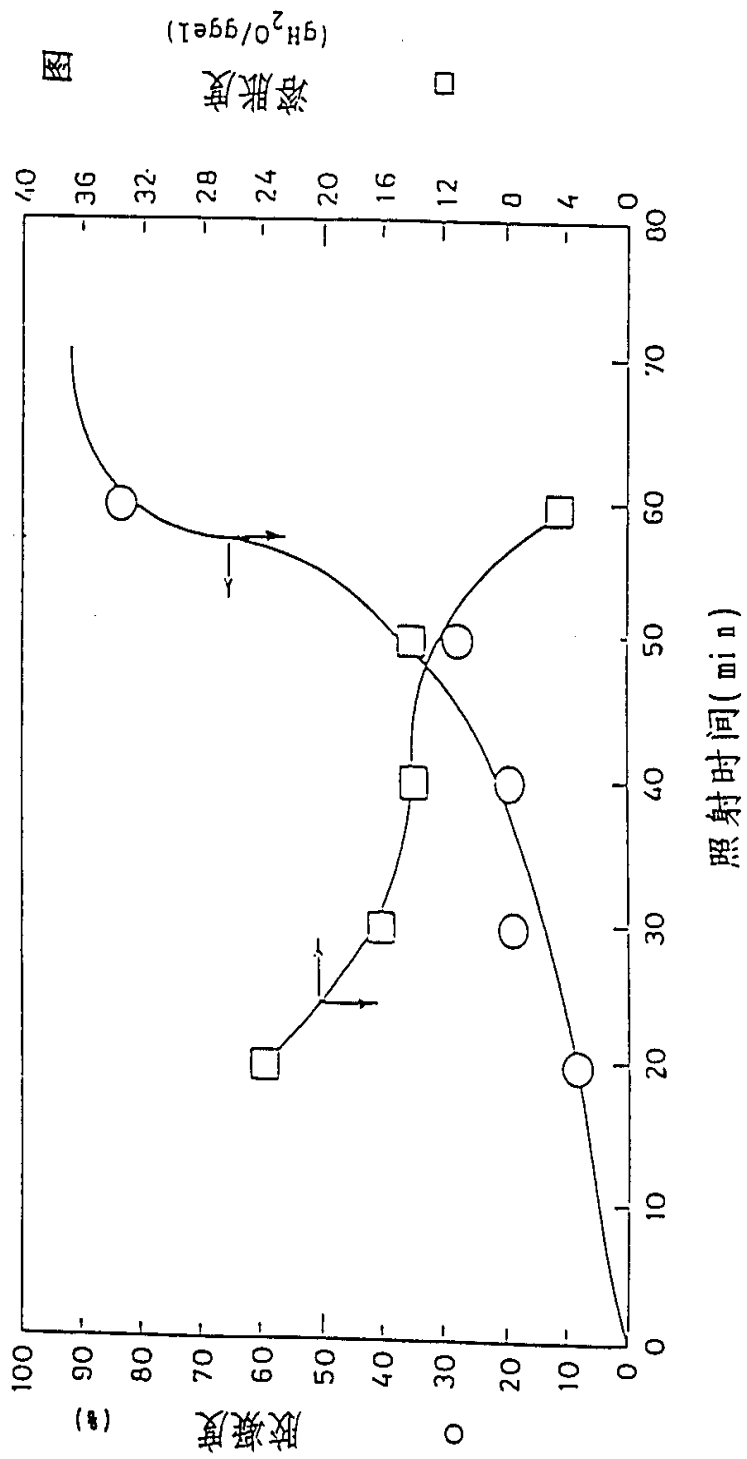


图 7

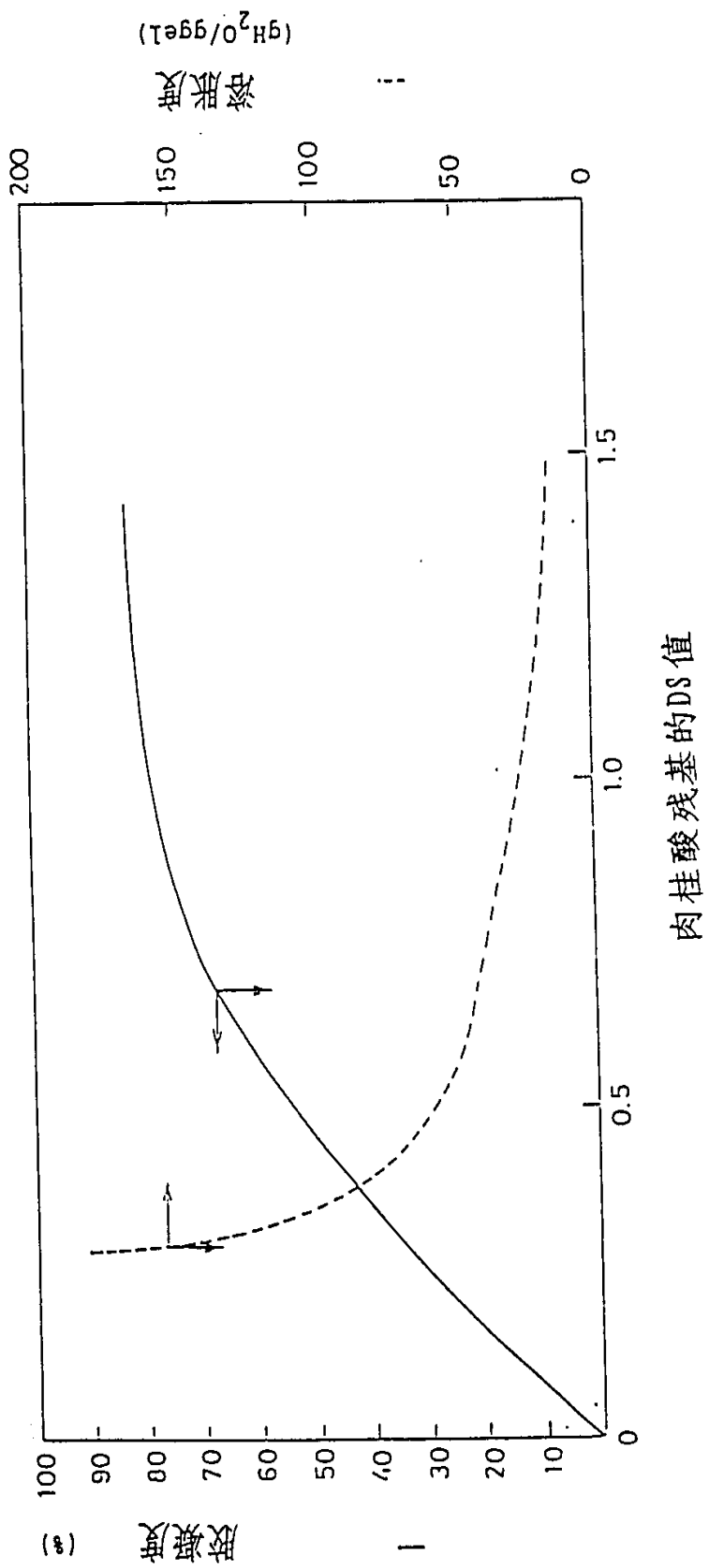


图 8

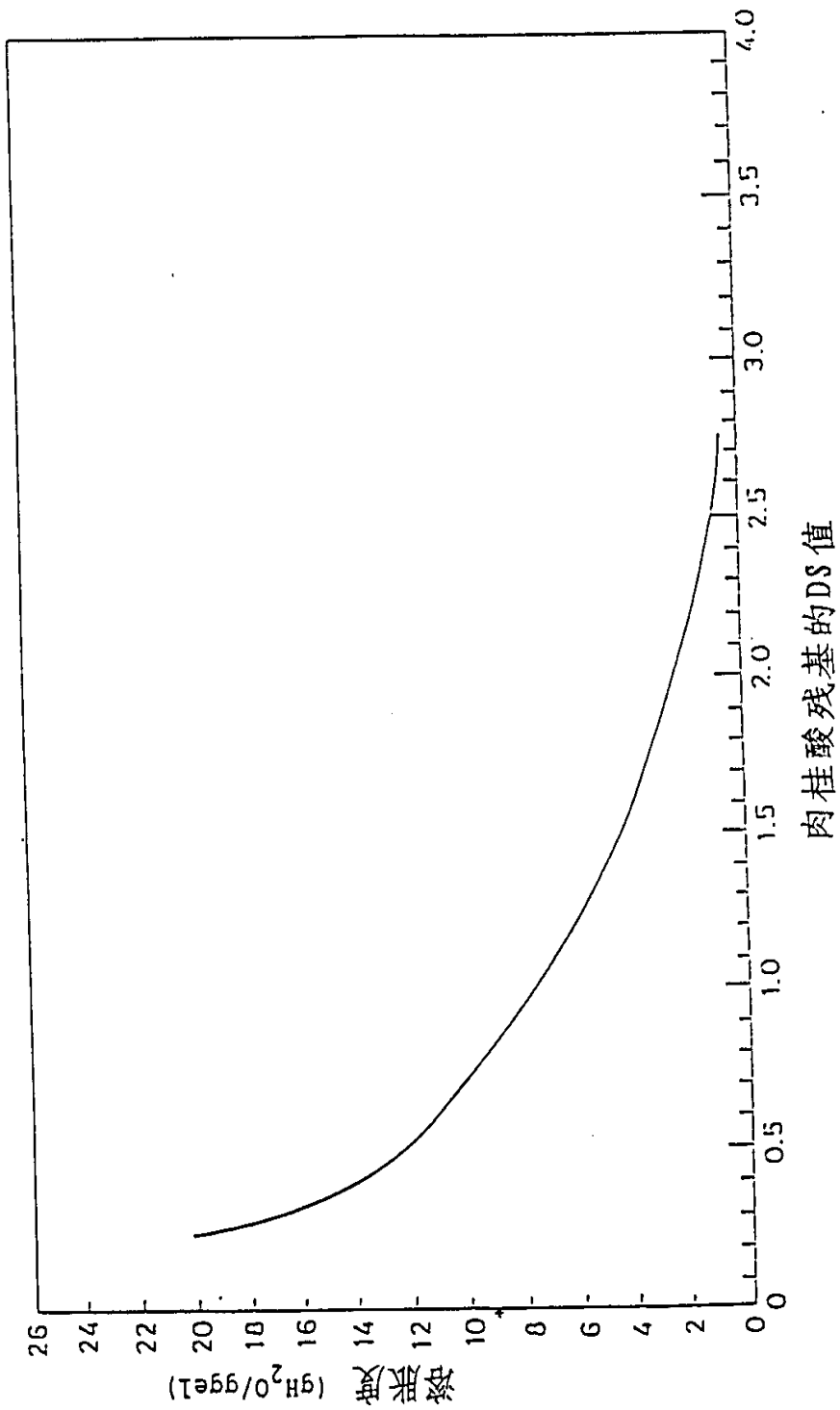


图 9

图 10

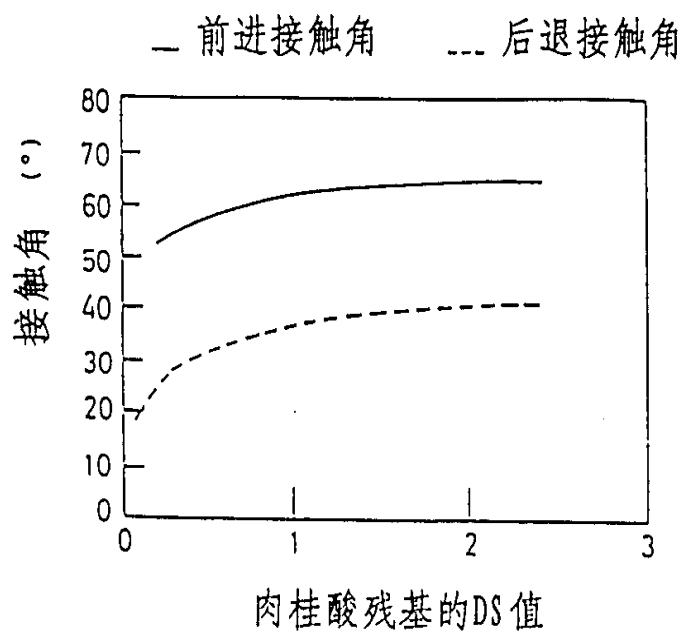


图 11

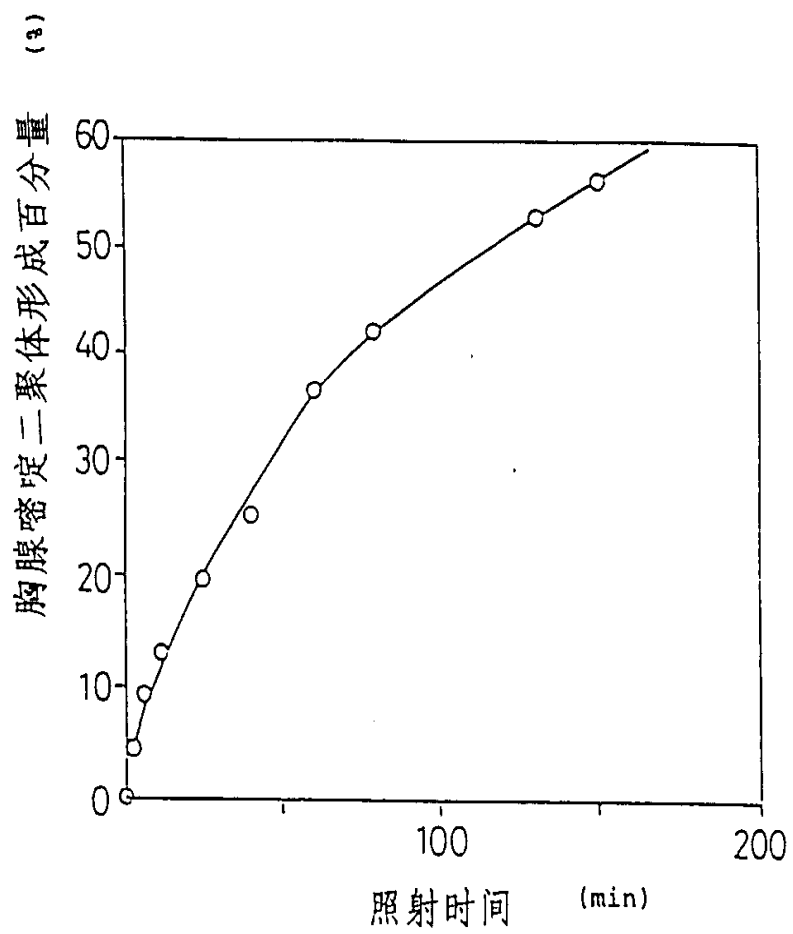


图 12

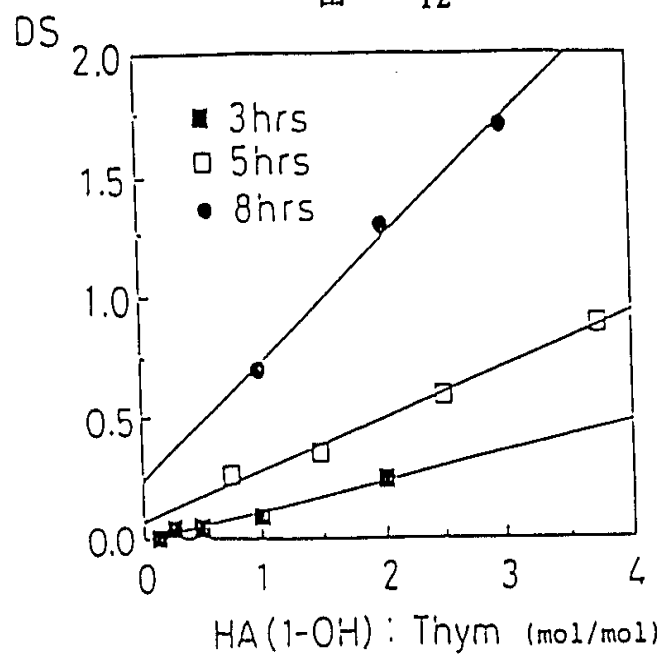


图 13

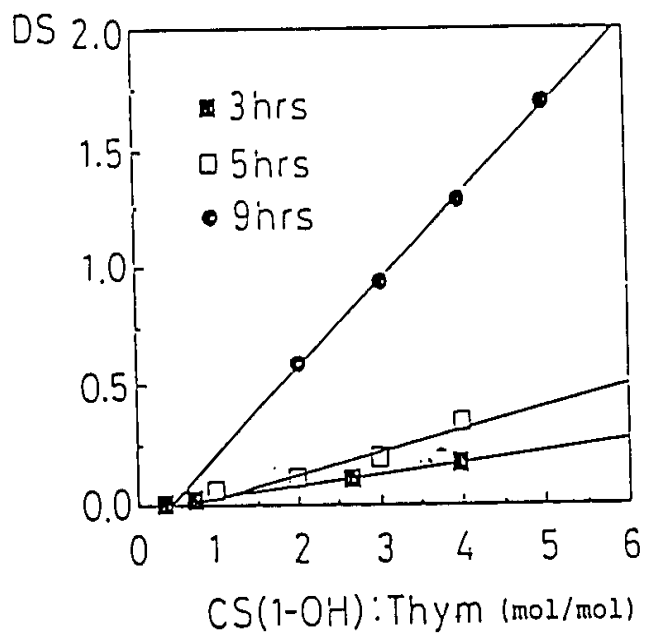


图 1.4

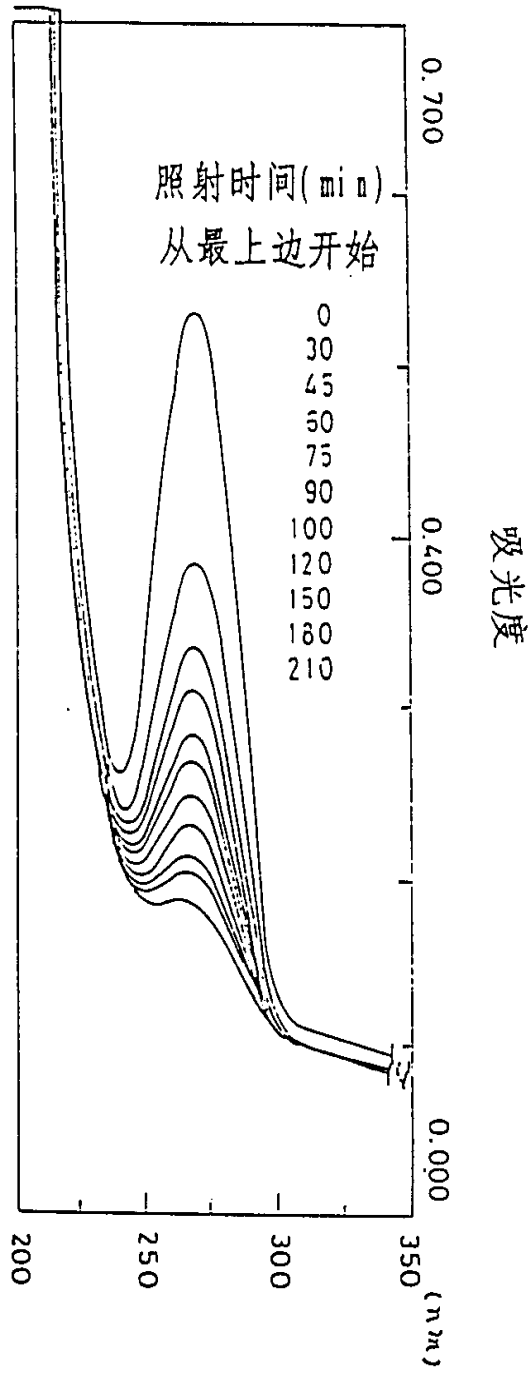


图 15

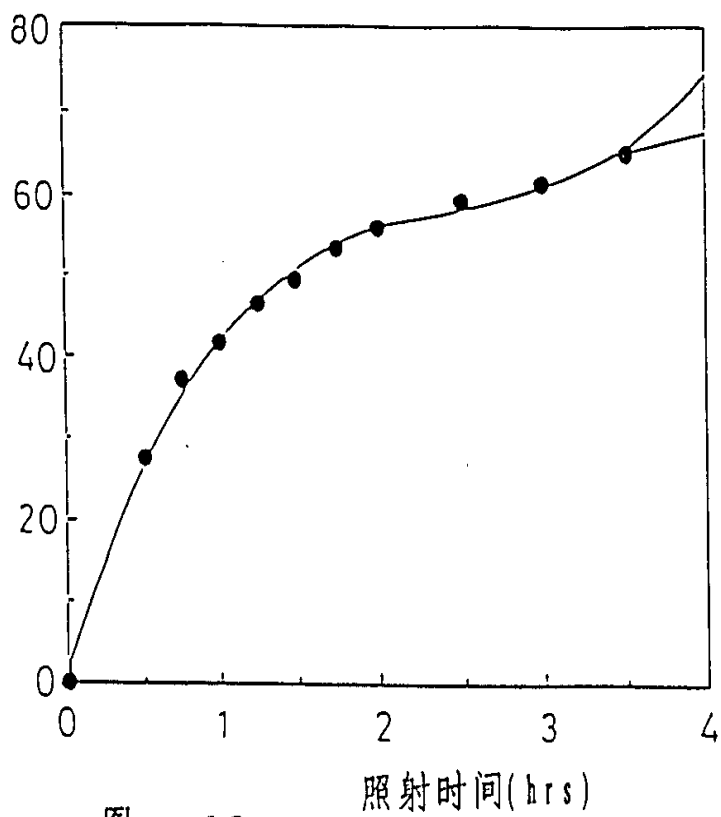


图 16

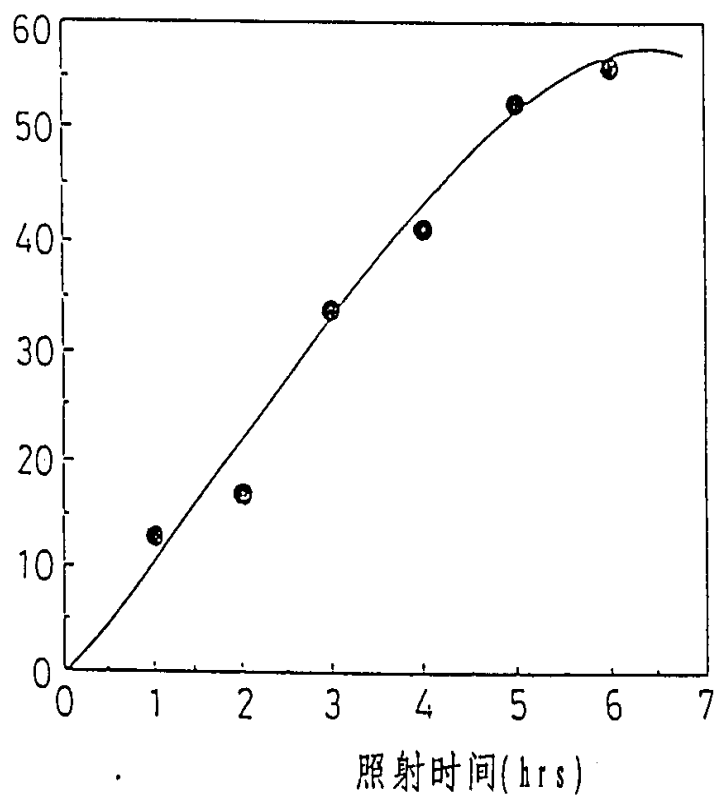




图 17

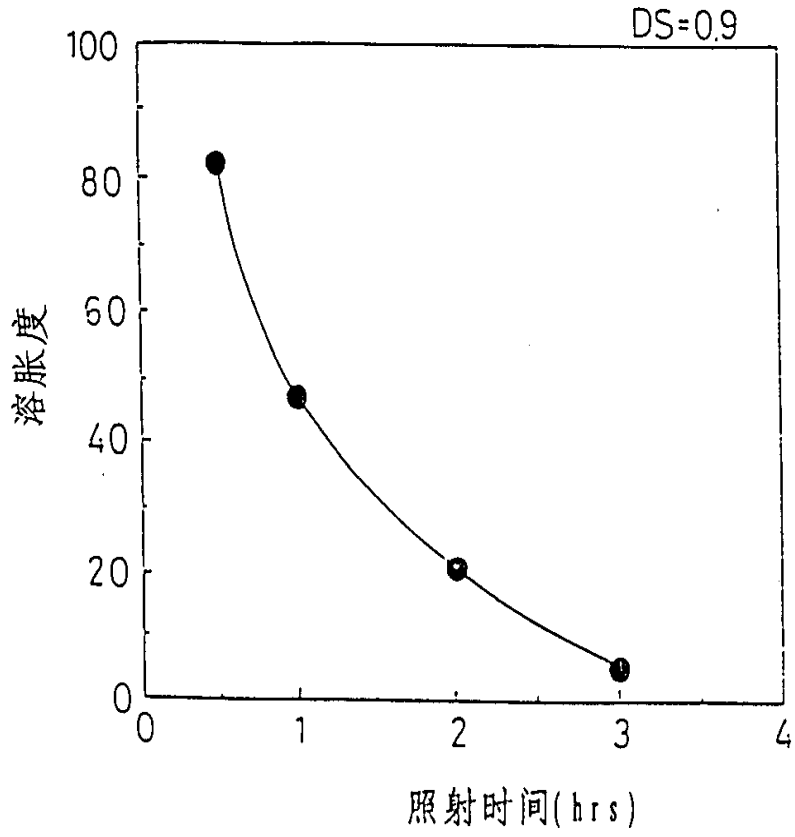


图 18

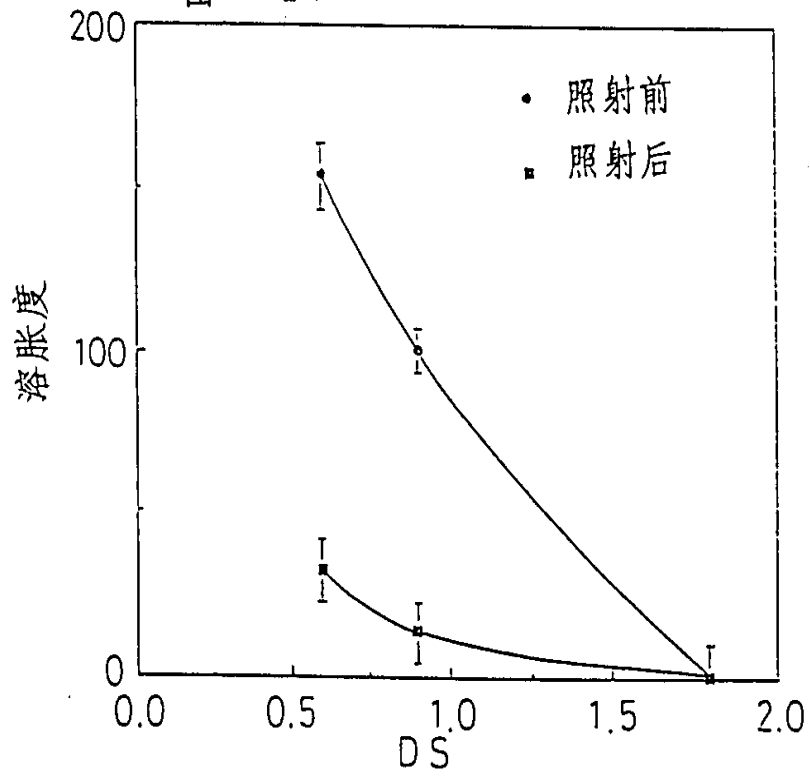


图 19

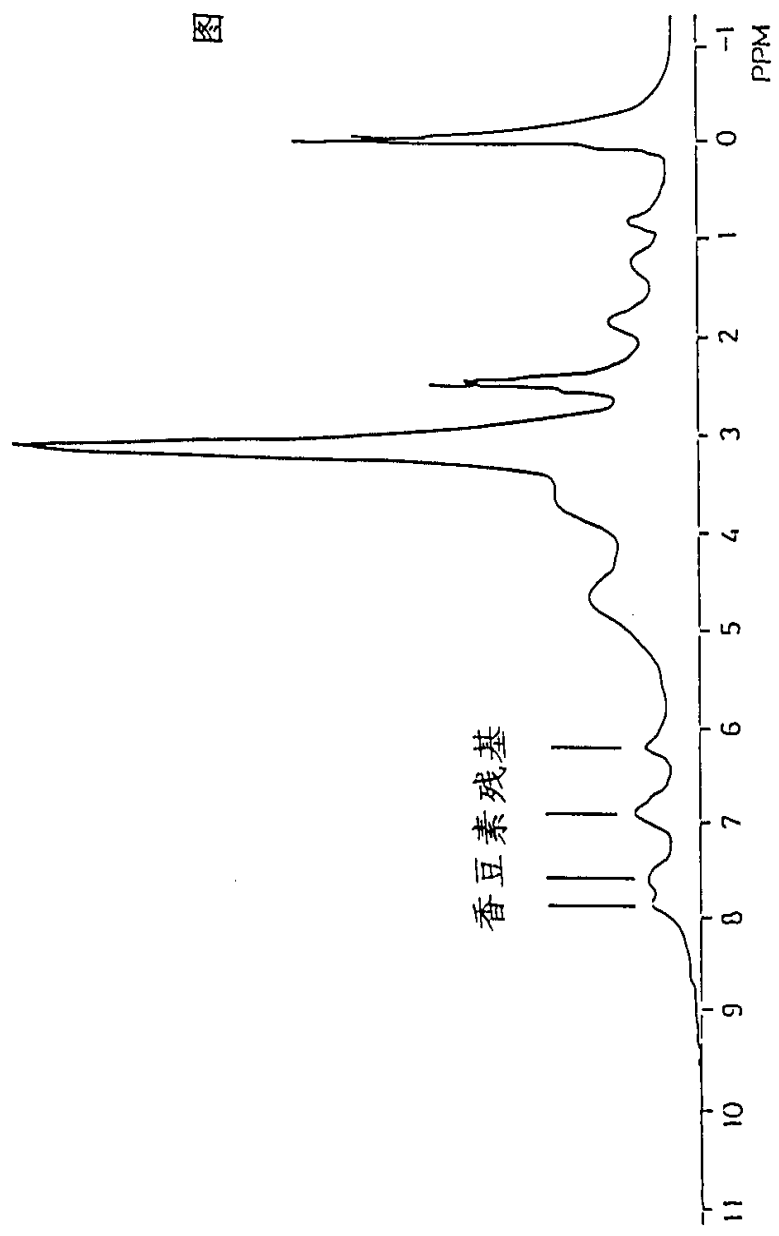


图 20

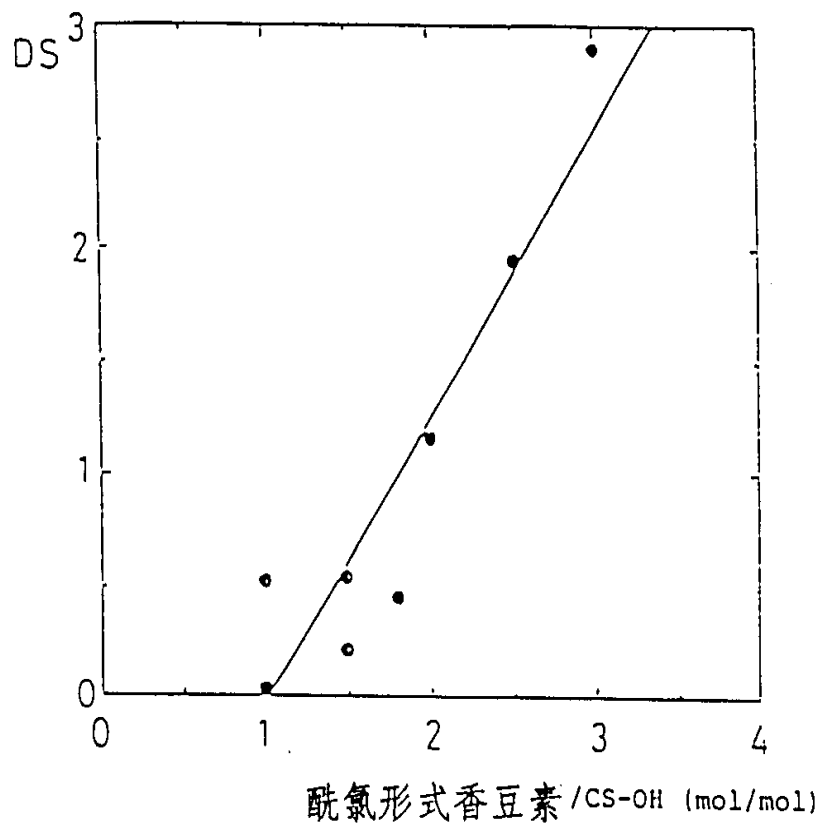


图 21

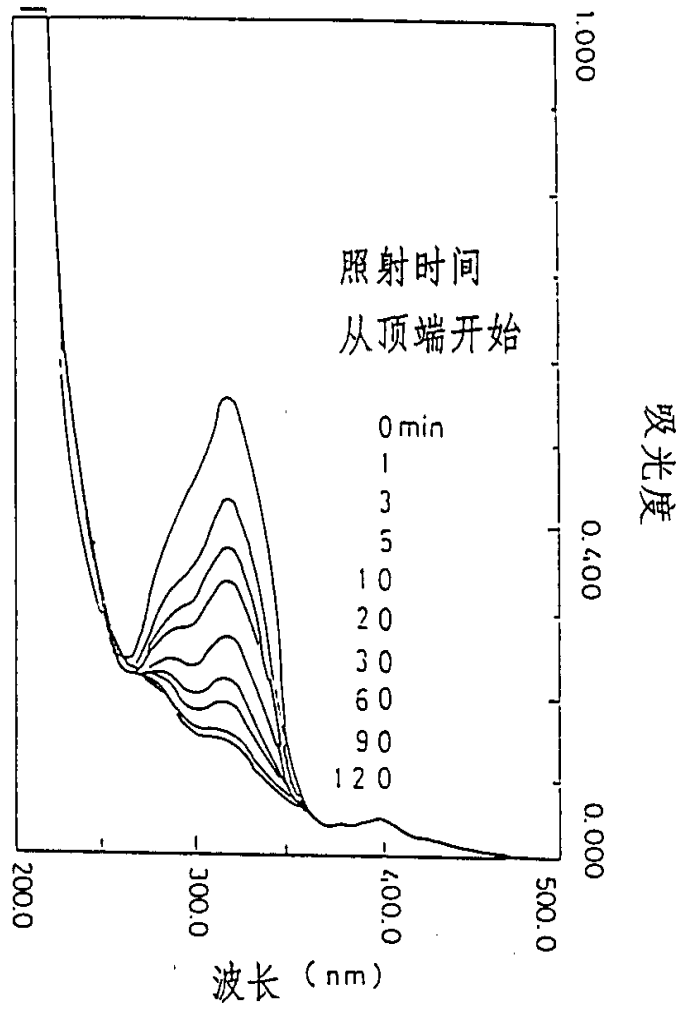


图 22

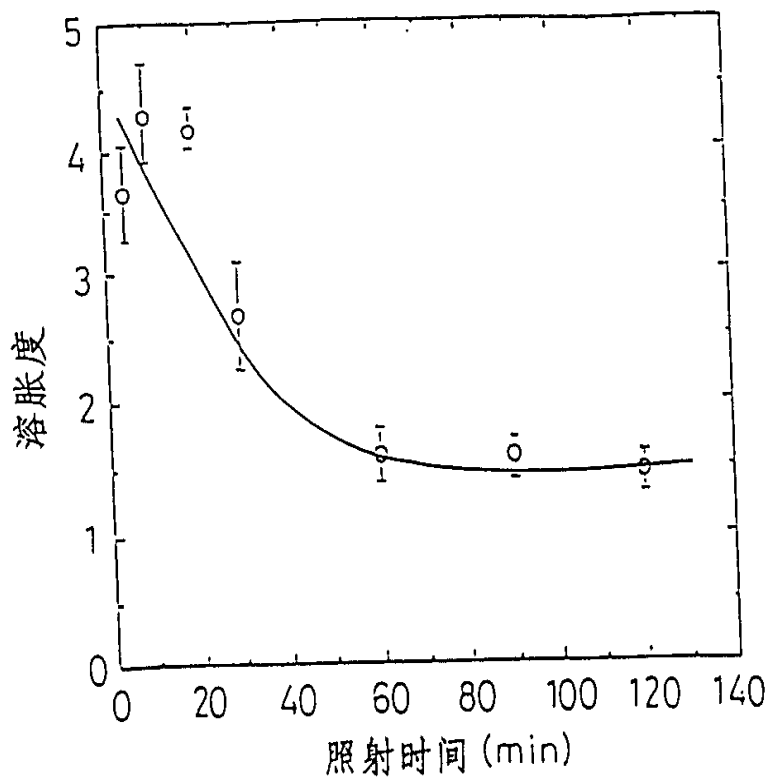


图 23

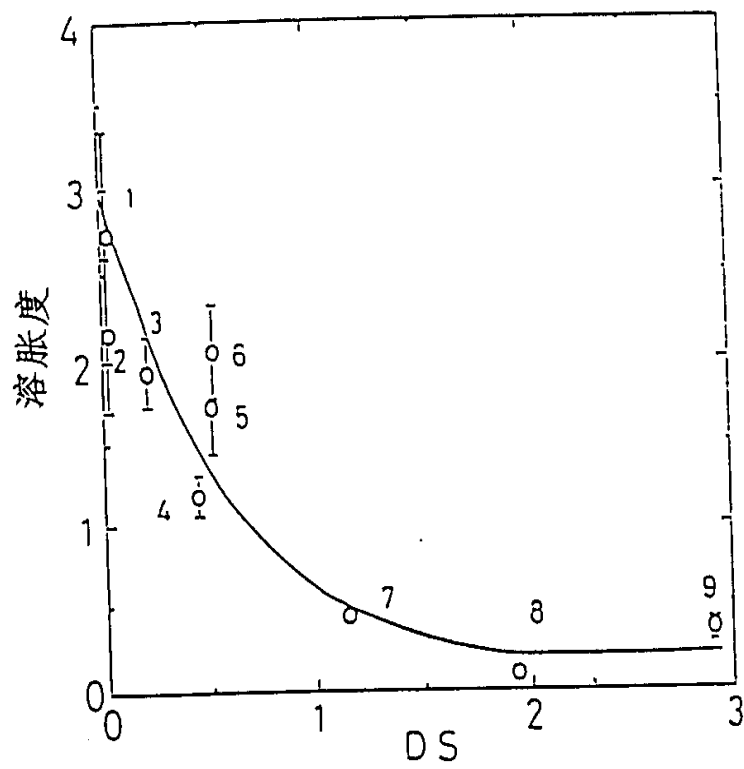


图 24

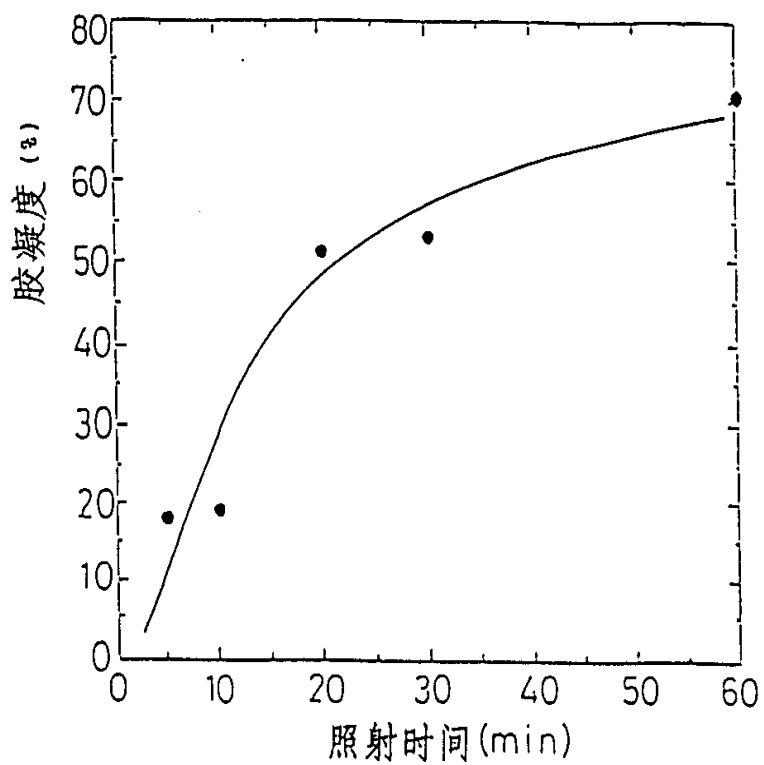


图 25

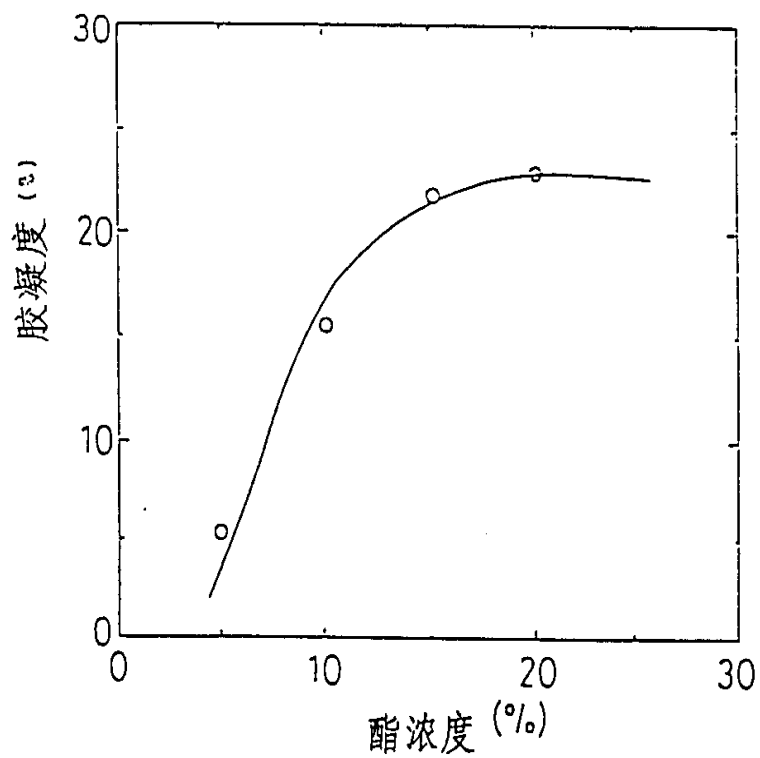


图 26

DS=0.7

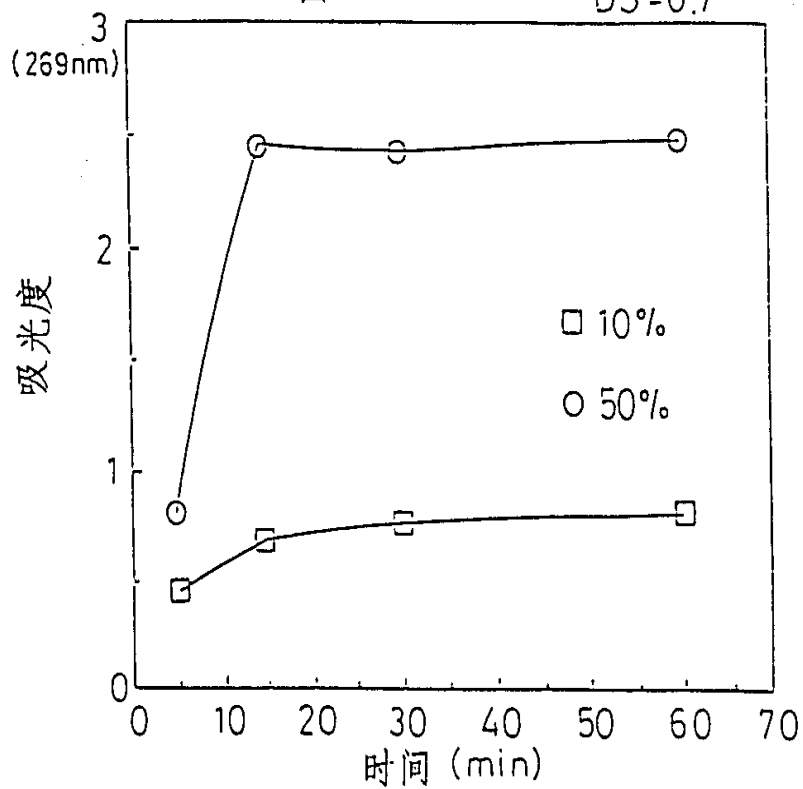


图 27

DS=2.2

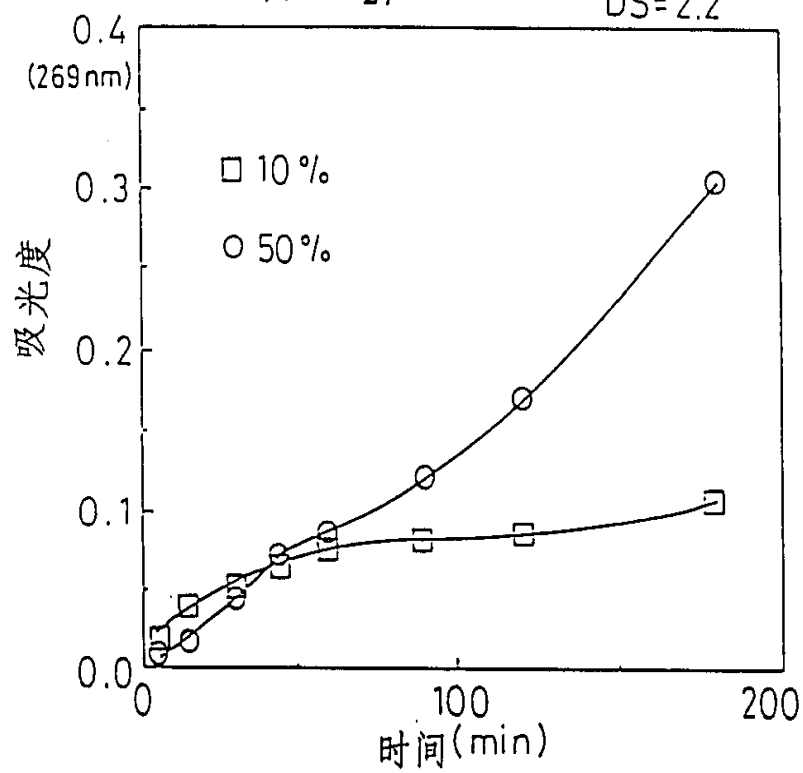


图 28

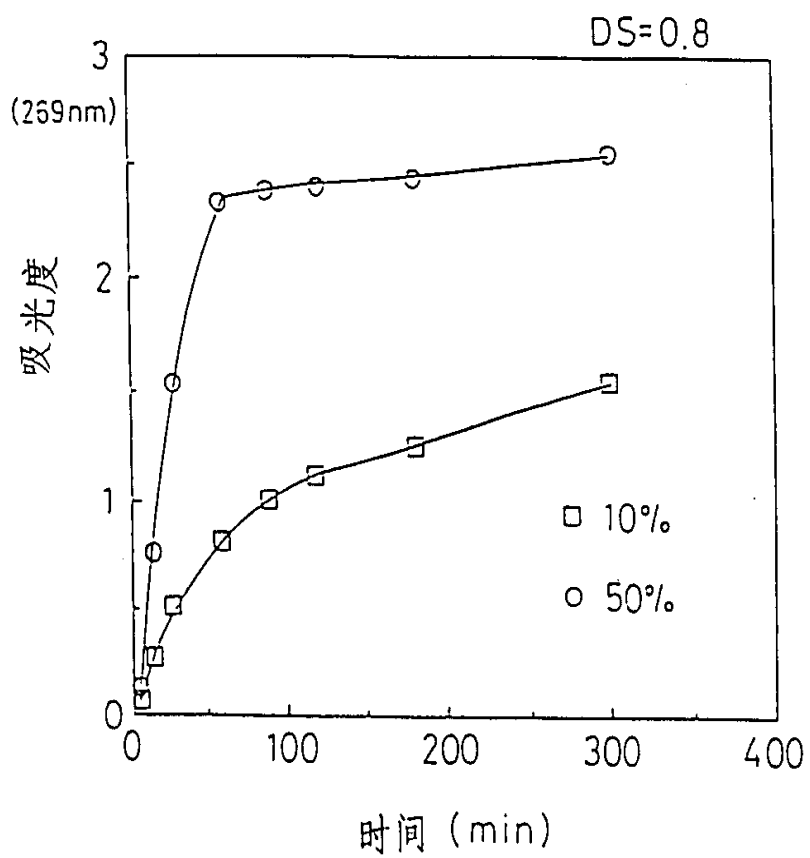




图 29

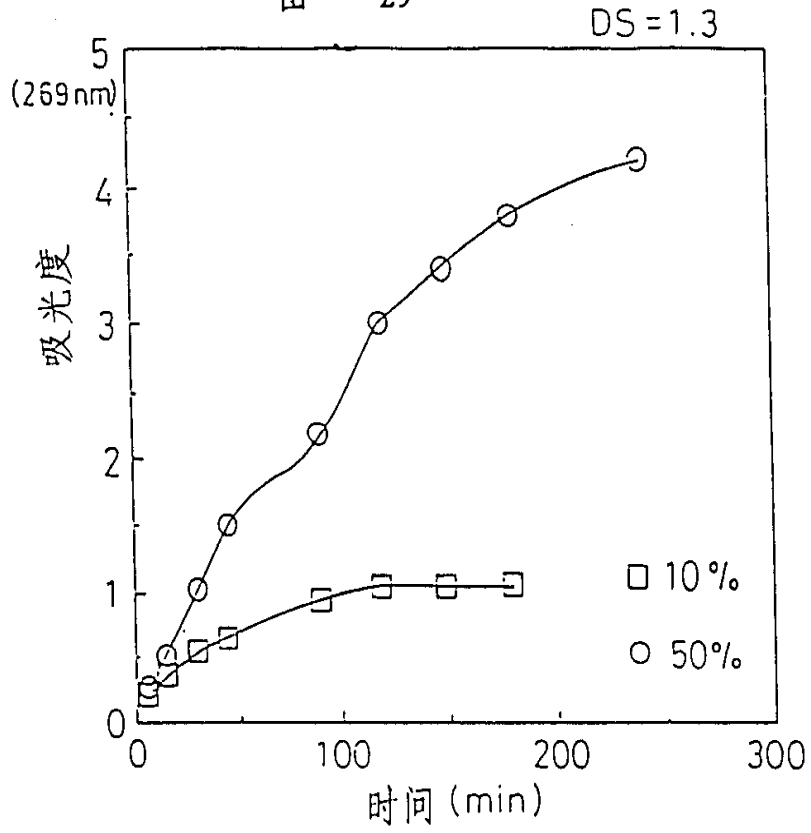


图 30

