

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局



(43) 国际公布日
2010 年 4 月 22 日 (22.04.2010)

PCT

(10) 国际公布号
WO 2010/043106 A1

- (51) 国际专利分类号:
A61K 47/30 (2006.01) A61P 41/00 (2006.01)
A61K 47/36 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
A61K 47/42 (2006.01) C08J 3/24 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2009/001013
- (22) 国际申请日: 2009 年 9 月 8 日 (08.09.2009)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
200810043845.3 2008 年 10 月 16 日 (16.10.2008) CN
- (71) 申请人 (对除美国外的所有指定国): 常州百瑞吉生物医药有限公司 (BIOREGEN BIOMEDICAL (CHANGZHOU) CO., LTD.) [CN/CN]; 中国江苏省常州东方东路 165 号, Jiangsu 213025 (CN)。
- (72) 发明人: 及
- (75) 发明人/申请人 (仅对美国): 舒晓正 (SHU, Xiaozheng) [CN/CN]; 中国上海市浦东新区乳山路 235 弄 33 号 402 室, Shanghai 200120 (CN)。
- (74) 代理人: 上海浦一知识产权代理有限公司 (DING & ASSOCIATES PATENT TRADEMARK & LAW); 中国上海市张江高科技园区科苑路 201 号 2 楼, Shanghai 201203 (CN)。
- (81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。
- (84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。
- 根据细则 4.17 的声明:
— 发明人资格(细则 4.17(iv))
- 本国际公布:
— 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

(54) Title: INJECTABLE IN-SITU CROSSLINKED HYDROGEL AND THE PREPARATION METHOD AND USE THERE-OF

(54) 发明名称: 可注射原位交联水凝胶及其制备方法和用途

(57) Abstract: An injectable in-situ crosslinked hydrogel and the preparation method thereof. The method comprises the step of: filling the crosslinking active solution of at least one biocompatible macromolecule into an injectable container, wherein the macromolecule has more than two sulfhydryl groups in its side chain; forming the in-situ disulfide crosslinked hydrogel with the aid of the action of the dissolved oxygen. By controlling the parameters such as differential pressure of the oxygen, temperature, time etc., it can adjust the concentration of the dissolved oxygen and optimize the gelation process and the property of the gel. The uses of the injectable in-situ crosslinked hydrogel in medicines or surgeries are also disclosed.

(57) 摘要:

一种可注射原位交联水凝胶及其制备方法。该方法包括将至少含有一种侧链带有两个以上巯基生物相容高分子的交联活性溶液灌入可注射容器并密封, 在溶解氧的作用下形成原位双硫键交联水凝胶; 可通过控制氧气的分压、温度、时间等参数, 调节交联活性溶液中溶解氧浓度, 优化凝胶化过程和凝胶性能。还公开了该可注射原位交联水凝胶在医药或外科手术中的用途。

WO 2010/043106 A1

可注射原位交联水凝胶及其制备方法和用途

技术领域:

本发明涉及一种水凝胶,尤其涉及一种可注射原位双硫键交联水凝胶,此外本发明还涉及该可注射原位交联水凝胶的制备方法及其在医药或外科手术中的用途。

背景技术:

水凝胶是最常见也是最为重要的一种含有大量水但不溶于水的物质,它在水中可以吸收超出自重达几百倍的水仍能保持其形状。绝大多数的生物、植物内存在的天然凝胶以及许多化学合成的凝胶均属于水凝胶。高分子凝胶是一类常见的水凝胶,其结构是高分子之间组成的三维交联网络,其网络由高分子主链及侧链上有亲水(极性)基团和疏水性基团,或(和)有解离基团组成,溶剂被固定在分子网络中。高分子凝胶的交联网络点,可以由共价键组成化学交联,也可以是物理交联,如静电作用、氢键作用、疏水作用等等。

水凝胶,尤其是以细胞间质基质材料制备的高分子水凝胶,在生物医药领域具有非常广泛的应用。与合成材料制备的水凝胶相比,以细胞间质基质制备的水凝胶具有很多优点:如可以模拟生物体内的天然环境、很高的含水量、良好的通透性、更好的生物相容性、以及可调节的酶降解性能等等(Silva等, Curr Top Dev Biol, 64, 181, 2004; Drury等, Biomaterials, 24, 4337, 2003)。更重要的是,细胞间质基质可具有生物诱导作用,可以定向和诱导组织的特异性修复。例如透明质酸钠是一种天然细胞间质基质高分子,具有管理细胞粘附和迁移、调节细胞分裂和分化等生物学功能。高分子量的透明质酸钠可以诱导鸡胚胎肢干骨髓干细胞分化为软骨细胞(Kujawa等, Develop Biol, 114, 519, 1986)。因此以细胞间质基质制备的水凝胶在生物医药(尤其是组织工程)领域得到了越来越多的重视。

虽然水凝胶具有很多优点,然而使用方式却在相当程度上限制了水凝胶在生物医药领域的广泛应用。目前很多水凝胶医药产品都被制备成薄膜、多孔海绵等形式,如明胶海绵、胶原海绵等等。通常这些产品只能外用或结合开放式手术使用。然而随着医学技术的发展,越来越多的医生和病人倾向于微创手术,希望医

药产品也可以通过内窥镜方式的使用,这对生物医药产品的开发提出了新的挑战。

可注射的水凝胶医药产品可以通过内窥镜的方式使用,也可以结合微创手术使用,同时适合于任何复杂形状的三维伤口,可以很好地粘附于创面,在生物医药领域具有广泛的应用前景。例如多种以透明质酸钠为原料制备的可注射交联水凝胶,目前作为新一代的除皱填料,克服了胶原类除皱填料的免疫原性风险,在美容方面得到了广泛的应用。Restylane (Q-Med, 瑞典), Hylaform (Inamed Corporation, 美国), Juvederm (Leaderm, 法国), Belotero (Anteis, 瑞士), Puragen (Mentor Corporation, 美国) 均已在欧洲上市(其中 Restylane 和 Hylaform 还通过了美国 FDA 的审批),是这一类新一代除皱填料的代表性产品。

目前大多数水凝胶类生物医药产品的制备方法都采用先进行化学交联、然后纯化除去残余交联剂和副产物的工艺。然而化学交联剂通常有较大的毒副作用,即使是复杂的工艺也难以保证彻底除去残余交联剂。更为严重的是,对于部分官能团发生交联反应的残余交联剂,已经通过共价键固定在水凝胶中,无法除去。这些残余的交联剂可能在临床使用上引起发炎等毒副症状。例如,明胶海绵中微量的残余交联剂引起了生物体较为严重的炎症反应。前述的多种以透明质酸钠为原料制备的可注射交联水凝胶也均采用先交联后纯化的制备工艺。例如, Restylane 和 Hylaform 分别通过 1、4-丁二醇二环氧丙醚和二乙烯基亚砷与透明质酸钠羟基之间的化学反应制备 (Malson 等, EP0185070, 1985; Balazs 等, US 4582865, 1986; Balazs 等, US 4713448, 1987); 然而残余的 1、4-丁二醇二环氧丙醚和二乙烯基亚砷很难从水凝胶中彻底除去,同时单端反应的 1、4-丁二醇二环氧丙醚或二乙烯基亚砷已经通过共价键固定在水凝胶中,无法除去。上述的局限性不仅需要复杂的纯化工艺,同时还导致了临床使用的风险。

双硫键交联水凝胶近年来得到了一定的研究。双硫键是一种可逆的化学键,自由巯基可以氧化成双硫键,双硫键可以还原为自由巯基。例如双硫键交联的水凝胶目前已被用作细胞培养基质,加入细胞相容的双硫键还原剂即可非常方便地收集细胞。

氧化剂(如过氧化氢、碘、烷基过氧化物,过氧酸,二甲基亚砷, Fe^{3+} , Co^{3+} , Ce^{4+} 等)可以把巯基氧化成双硫键 (Capozzi G.; Modena G., In The Chemistry of the

Thiol Group Part II; Patai S. Ed.; Wiley: New York, 1974; pp785-839)。然而这些氧化剂通常有一定的毒副作用,如果残留在医药产品中会有较大的风险;同时这些氧化剂的氧化能力很强,反应过于激烈,会把双硫键进一步氧化为磺酸根等副产物(Shu 等, *Biomacromolecules*, 3, 1304, 2002; Capozzi 等, *The Chemistry of the Thiol Group Part II*, 785, 1974)。

氧气也可以把自由巯基氧化成双硫键。一分子氧气可以把四个巯基氧化成两个双硫键,同时产生两分子水,没有其它副产物。采用氧气作为氧化剂制备双硫键交联水凝胶,具有反应条件简单温和、不需要交联剂等许多优点。采用氧气作为交联剂制备双硫键交联水凝胶有望解决前述水凝胶制备工艺中交联剂残余的局限性。

双硫键交联水凝胶在生物医药领域具有很多潜在的应用前景,近年来受到了很多的关注。但到目前为止,尚未见临床实用报道,原因主要有两个方面。第一个原因是当前双硫键交联水凝胶的制备工艺不利于工业化生产。在生理条件下氧气把巯基氧化形成双硫键交联水凝胶是一个缓慢的过程,需要不断地消耗大量的氧气,研究人员普遍认为溶液敞口接触空气是形成双硫键交联凝胶的前提条件。在目前已公开的报道中,含有巯基的生物相容高分子溶液都需要敞口放置接触空气才能形成双硫键交联凝胶。例如透明质酸钠巯基化衍生物溶液可以在与空气敞口接触的条件下形成双硫键交联凝胶,干燥后可得到双硫键交联的薄膜(Shu 等, *Biomacromolecules*, 3, 1304, 2002);透明质酸钠巯基化衍生物和胶原蛋白巯基化衍生物的混合溶液可以在与空气敞口接触的条件下形成双硫键交联凝胶,常温干燥或冷冻干燥后即可得到双硫键交联的薄膜或多孔海绵(Shu 等, *Biomaterials*, 24, 3825, 2003; Liu 等, *Journal of Biomedical Materials Research*, 68, 142, 2004;)。第二个限制双硫键交联水凝胶进入临床实用的原因是产品的形式。目前所报道的双硫键交联凝胶大都以薄膜或海绵的形式出现,只能外用或结合开放式手术适用,不能满足很多临床治疗(尤其是微创手术)的需求。

到目前为止,研究人员普遍具有一种技术偏见:含有巯基的生物相容高分子溶液需要敞口接触空气才能形成双硫键交联水凝胶(Shu 等, *Biomaterials*, 24, 3825, 2003; Liu 等, *Journal of Biomedical Materials Research*, 68, 142, 2004; George 等, *PCT Int. Appl. WO 2008/098019*; Wallace 等, *US6624245*),这在很大

程度上限制了双硫键交联水凝胶的工业化大规模生产工艺。到目前为止还没有在密封的可注射容器内形成双硫键交联水凝胶的报道,而这种可注射的双硫键交联水凝胶在生物医药领域具有非常广泛的应用前景。

发明内容:

本发明要解决的技术问题之一是提供一种可注射原位双硫键交联水凝胶,其凝胶化过程在注射器内完成,具有可注射的性能,使用方便、不含杂质、生物相容性好、无毒副作用,在生物医药领域具有非常广泛的应用前景。

本发明要解决的技术问题之二是提供一种可注射原位双硫键交联水凝胶的制备方法,该方法克服了双硫键交联水凝胶的制备需要与空气敞口接触的技术偏见,解决了大规模工业化生产的技术难题,制备工艺简单。

本发明要解决的技术问题之三是提供一种可注射原位双硫键交联水凝胶在医药或外科手术中的用途。

在本发明的一方面,提供了一种可注射原位双硫键交联水凝胶的制备方法,包括以下步骤:

(1) 交联活性溶液灌入可注射容器,其中交联活性溶液中至少含有一种侧链带有两个以上巯基的生物相容高分子;

(2) 密封含有交联活性溶液的可注射容器;

(3) 在密封的可注射容器内交联活性溶液中的溶解氧把巯基氧化成双硫键形成交联水凝胶。

该方法特征是采用交联活性溶液中的溶解氧在密封的可注射容器内把巯基氧化形成原位双硫键交联水凝胶。同时可以方便地通过控制温度、氧气分压或接触时间等参数灵活调节交联活性溶液中的溶解氧浓度,从而调节双硫键交联过程和双硫键交联水凝胶的性能。

在本发明中所使用的部分术语定义如下所述。

水凝胶是指含有大量水的具有三维交联网络结构的物质,介于液态和固态之间,没有流动性;凝胶化是指从具有流动性的液态到失去流动性的凝胶态的过程,凝胶化时间是指从具有流动性的液态到失去流动性的凝胶态的时间。

在本发明中,交联活性溶液是指含有至少一种侧链带有两个以上巯基的生物相容高分子的溶液。交联活性溶液以水为主要溶剂,也可含有一些盐成份(如氯

化钠、pH 缓冲盐成份等), 起调节溶液渗透压和稳定溶液 pH 值等功能; 也可能含有其它一些极性、水溶性成份, 如乙醇等等。

在本发明中, 侧链带有两个以上巯基的生物相容高分子主要是指多糖、蛋白或合成高分子通过一种或一种以上化学改性得到的衍生物, 其中至少一种化学改性是巯基化改性。

多糖包括硫酸软骨素、肝素、类肝素、海藻酸、透明质酸、皮肤素、硫酸皮肤素、果胶、羧甲基纤维素、壳聚糖等以及它们的盐形式(如钠盐, 钾盐等); 蛋白包括胶原蛋白、碱性明胶蛋白、酸性明胶蛋白、基因重组明胶蛋白等; 合成高分子包括聚丙烯酸、聚天冬氨酸、聚酒石酸、聚谷氨酸、聚富马酸等以及它们的盐形式(如钠盐, 钾盐等)。上述硫酸软骨素包括 A 型、B 型、C 型等各种形式。所述的多糖、蛋白和合成高分子的分子量通常在 1,000~10,000,000 之间。上述的合成高分子不包括的聚乙二醇。

化学改性方式包括疏水化改性(如烷基化改性等)、羧基化改性(如羧甲基化改性等)、巯基化改性等。

巯基化改性是指引入自由巯基的化学改性过程, 通常多糖、蛋白和合成高分子的侧链基团(羧基、氨基、羟基等)可以通过适当的化学反应引入自由巯基。一种常见的巯基化改性主要包括下述化学反应过程: 多糖、蛋白和合成高分子的侧链羧基在碳化二亚胺的活化下, 和含有双硫键的二氨或二酰肼反应生成中间产物, 然后把双硫键还原为自由巯基(Shu 等, *Biomacromolecules*, 3, 1304, 2002; Aeschlimann 等, US 7196180; Prestwich 等, PCT Int. Appl. WO 2004/037164)。也可用巯基保护的伯氨代替含有双硫键的二氨或二酰肼, 所得到的中间产物脱除巯基保护基团即可得到生物相容高分子巯基化衍生物(Gianolio 等, *Bioconjugate Chemistry*, 16, 1512, 2005)。很多侧链含有羧基的多糖、蛋白和合成高分子都可以通过这种方法得到侧链带有两个以上巯基的衍生物, 如透明质酸钠巯基化衍生物、硫酸软骨素巯基化衍生物、明胶巯基化衍生物等等(Shu 等, *Biomacromolecules*, 3, 1304, 2002; Aeschlimann 等, US 7196180)。羧基直接与含有双硫键的碳化二亚胺(如 2,2'-二硫代双(N-乙基(N'-乙基碳二亚胺))等)反应、双硫键还原后也可以得到侧链带有两个以上巯基的衍生物(Bulpitt 等, US 6884788)。

另一种常见的巯基化改性是多糖、蛋白和合成高分子的侧链氨基的直接或间接化学改性。例如，胶原等蛋白的侧链氨基可以与含有双硫键的活化物（如双丁二酸双酰肼胺双羰二咪唑活化酯等）反应，还原双硫键为自由巯基，即可实现巯基化改性（Benesch 等，*Proc Natl Acad Sci USA*, 44, 848, 1958; Yamauchi 等，*Biomaterials*, 22, 855, 2001; Nicolas 等，*Biomaterials*, 8, 807, 1997; Kafedjiiski 等，*Biomaterials*, 26, 819, 2005）。多糖、蛋白和合成高分子侧链氨基的巯基化也可以通过间接方式实现，例如氨基首先羧基化，然后通过羧基的改性实现巯基化（宋等，CN101200504）。

多糖、蛋白和合成高分子的侧链羟基的巯基化改性也是一种常见的方式。例如纤维素、透明质酸、甲壳素和壳聚糖等多糖的侧链羟基在强碱条件下都可以进行羧基化，然后通过前述方法实现羧基的巯基化改性。Carbylan-S 既是通过这种方式制备的透明质酸钠的巯基化衍生物（Prestwich 等，*PCT Int. Appl. WO* 2005/056608）。侧链羟基也可以通过直接的化学反应实现巯基化，如聚乙烯醇的巯基化改性衍生物等（Ossipov 等，*Macromolecules*, 41, 3971, 2008）。

在本发明中，侧链含有两个以上巯基的生物相容高分子也可以通过基因工程发酵等方式制备。在基因工程中，可以按照理论设定的分子结构，通过控制基因的表达片断，采用发酵工程生产侧链含有两个以上巯基的生物相容高分子（Lutolf 等，*Nature Biotechnology*, 23, 47, 2005）。

在本发明中，侧链含有两个以上巯基的透明质酸钠巯基化衍生物、硫酸软骨素巯基化衍生物、肝素巯基化衍生物、壳聚糖巯基化衍生物、明胶巯基化衍生物、胶原巯基化衍生物等均可方便地通过本发明方法制备出可注射凝胶。

在本发明中，交联活性溶液中可以含有一种侧链带有两个以上巯基的生物相容高分子，也可以含有两种或两种以上侧链带有两个以上巯基的生物相容高分子。例如按照不同的应用要求，交联活性溶液中可以任意含有透明质酸钠巯基化衍生物、硫酸软骨素巯基化衍生物、肝素巯基化衍生物、明胶巯基化衍生物、胶原巯基化衍生物、壳聚糖巯基化衍生物中的一种或多种。

在本发明中，交联活性溶液中除了至少含有一种侧链带有两个以上巯基的生物相容高分子外，还可以含有一种或多种其它物质。这些物质可以是多糖、蛋白或高分子化合物，如透明质酸钠、硫酸软骨素、肝素钠、酸性明胶蛋白、碱性明

胶蛋白、基因重组明胶蛋白、聚丙烯酸、聚天冬氨酸、聚酒石酸、聚谷氨酸、聚富马酸等等；也可以是活性药物组份，包括类固醇、抗生物以及治疗肿瘤的药物，例如各种蛋白质药物，如各种生长因子（碱性生长因子、酸性生长因子、血管生长因子、成骨生长因子等）、核酸（如 RNA 等）等；又如各种小分子药物（抗生素、皮质激素等）等等。该活性药物组份可以固体颗粒形式分散在交联活性溶液中，也可以溶解在交联活性溶液中。

巯基是在生物体内天然存在的具有良好生物相容性的官能团，它具有很好的反应活性；双硫键是一种可逆的化学键。自由巯基可以氧化成双硫键，双硫键可以还原为自由巯基，这在生物学上具有重要的功能。双硫键交联的水凝胶在生物医药领域具有重要的应用前景，如可以用于促进创伤愈合、细胞培养载体、组织的修复再生等等。

氧气是一种温和的天然生物相容氧化剂，广泛存在人体的各个生理过程中。氧气也可以把自由巯基氧化成双硫键。一分子氧气可以把四个巯基氧化成两个双硫键，同时产生两分子水，没有其它副产物。本发明中采用氧气作为氧化剂，具有反应条件简单温和、不需要交联剂等许多优点。

对于以氧气作为氧化剂的双硫键交联水凝胶，研究人员普遍具有一种技术偏见：含有巯基的生物相容高分子溶液需要敞口接触空气才能形成双硫键交联水凝胶（Shu 等，*Biomaterials*, 24, 3825, 2003; Liu 等，*Journal of Biomedical Materials Research*, 68, 142, 2004; George 等，*PCT Int. Appl. WO 2008/098019*; Wallace 等，*US6,624,245*）。我们对双硫键交联的凝胶化过程进行了深入研究，结果表明主要是溶液中的溶解氧而不是空气中的氧气把巯基氧化为双硫键交联。这个发现给双硫键交联水凝胶的制备方法提供了新的思路，为大规模工业化生产工艺的研制提供了可能。

到目前为止还没有在密闭的条件下利用溶液中溶解氧形成双硫键交联水凝胶的研究报道。上述研究结果给我们指出了一个新的方向：交联活性溶液也有可能在与空气隔绝的状态下形成双硫键交联水凝胶，关键在于交联活性溶液中的溶解氧含量。例如，我们的研究结果表明，1.0%（w/v）透明质酸钠巯基化衍生物的中性溶液（45%的羧基改性为巯基）（Shu 等，*Biomacromolecules*, 3, 1304, 2002）装入注射器后隔绝空气密封，通常溶液在 2~7 天内逐渐失去流动性，形成

双硫键交联水凝胶。

进一步的分析表明,上述例子中 1.0% (w/v) 透明质酸钠巯基化衍生物的中性溶液中巯基含量约为 10 mmol/L (即 330 mg/L), 相应地需要 2.5 mmol/L (即 80 mg/L) 的溶解氧气才能把全部巯基氧化为双硫键。在常温 25℃ 时, 氧气在水中的饱和溶解度只有 8.4 mg/L (25℃), 理论上只能把上述透明质酸钠巯基化衍生物溶液中的 10% 自由巯基氧化为双硫键。虽然在实际过程中溶解氧浓度通常比饱和溶解度低, 但也足以在密封的条件下形成双硫键交联水凝胶, 只是水凝胶的强度较低, 凝胶化时间较长。

为了进一步调节凝胶化过程和凝胶的性能 (如强度等), 调节交联活性溶液中的溶解氧浓度是本发明的一个重要手段。一般说来, 氧气在水中的饱和溶解度可以按照亨利定律计算 ($C_{O_2} = K_{O_2} P_{O_2}$), 其中 C_{O_2} 是氧气在水中的饱和溶解度, K_{O_2} 是亨利常数, P_{O_2} 是氧气的分压。

例如, 在 1 个大气压下, 根据亨利定律可计算出氧在空气饱和的水中的溶解度。水蒸气在 25℃ 时的分压为 0.0313 大气压, 干燥空气中含 20.95% 的氧气, 则根据道尔顿分压定律, 氧的分压为: $P_{O_2} = (1.0000 \text{ 大气压} - 0.0313 \text{ 大气压}) \times 0.2095 = 0.2029 \text{ 大气压}$; 氧气在 25℃ 水中的亨利常数 $K_{O_2} = 1.28 \times 10^{-8} \text{ mol/(L} \cdot \text{Pa)}$ 。因此根据亨利定律, 氧气在水中的溶解度为: $C_{O_2} = K_{O_2} \cdot P_{O_2} = 1.28 \times 10^{-8} \times 0.2029 \times 1.013 \times 10^5 = 2.63 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$; 由于氧的分子量为 32, 所以其饱和溶解度为 8.4 mg/L。

温度是影响氧气在水中溶解度的一个重要因素, 这个效应可由克劳修斯-克拉

佩隆 (Clausius-Clapeyron) 方程显示: $\log \frac{c_1}{c_2} = \frac{\Delta H}{2.303R} \left[\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right]$, 式中: C_1 和 C_2 分别为绝对温度 T_1 和 T_2 下气体在水中的饱和溶解度 (mg/L); ΔH 是溶解热 (J/mol); R 是气体常数 (8.314 J/K.mol)。从上述公式可以看出, 随着温度的升高, 氧气在水中饱和溶解度逐渐降低。例如, 当温度从 4℃ 升高到 25℃ 时, 纯水中饱和溶解氧的浓度从 13.1 mg/L 降低到 8.4 mg/L。

压力是影响氧气在水中溶解度的关键因素。根据亨利定律: $C_{O_2} = K_{O_2} \cdot P_{O_2}$, 在特定温度下, 氧气在水中的饱和溶解度与氧气分压成正比。例如 25℃, 氧气在空气 (1 个大气压) 饱和的水中的溶解度为 8.4 mg/L, 而在氧气 (1 个大气压)

饱和的水中的溶解度提高了约 5 倍 (约 40 mg/L)。

水中的含盐量也会影响氧气在水中的饱和溶解度, 但影响不显著。随着含盐量增加, 氧在水中的溶解度降低。例如, 海水中饱和溶解氧一般为淡水中的 80 % 左右。

在本发明中, 通常通过控制氧气的分压和温度来调节交联活性溶液中溶解氧浓度。温度的降低可以增加溶解氧的饱和浓度, 常用的温度范围是 0~50℃, 最常用的温度为 4~40℃。氧气的分压是调节交联活性溶液中溶解氧浓度的最重要因素。根据亨利定律, 在相同条件下氧气在水中的饱和溶解度与氧气分压成正比, 通过调节氧气的分压, 即可方便地调节交联活性溶液中溶解氧的浓度, 从而调节自由巯基氧化为双硫键的凝胶化过程。例如 25℃ 时, 在 1 个大气压空气的条件下水中的溶解氧饱和浓度为 8.4 mg/L, 而在 1 个大气压氧气的条件下水中溶解氧饱和浓度提高了约 5 倍 (40 mg/L), 相当于 5 个大气压空气作用下的饱和溶解氧的浓度; 而抽真空 15 分钟则可几乎全部除去水中的溶解氧。在本发明中, 当交联活性溶液中的溶解氧浓度增加, 可以显著地加快凝胶化过程和提高凝胶的强度, 反之则延缓了凝胶化过程和降低了凝胶的强度。

本发明的制备方法的实现途径通常包括以下步骤:

- (1) 交联活性溶液灌入可注射容器;
- (2) 密封含有交联活性溶液的可注射容器;
- (3) 交联活性溶液中的溶解氧把巯基氧化成双硫键形成交联水凝胶;

本发明的实现途径可采用无菌工艺或终端灭菌的方式生产, 以满足不同临床医学要求。通常交联活性溶液可采用手工方式或医药工业罐装设备灌入可注射容器, 然后在注射器内原位双硫键交联形成凝胶。

本发明克服了双硫键交联水凝胶的制备需要与空气敞口接触的技术偏见, 为可注射双硫键交联凝胶的大规模工业化生产解决了技术障碍。通过本发明的制备方法, 采用医药工业常用的罐封生产线即可实现大规模工业化生产, 每小时产量可方便地达 3000 支以上。罐封生产线可选用高宁格公司的直线式全自动注射器预灌封生产线或蜂巢式注射器全自动预罐装和加塞设备、以及德国博世公司的预消毒灭菌注射器液体灌封机等等。可注射容器可以是玻璃材质, 也可以是塑料材质, 如 BD 公司的 Hypac SCF 类预消毒灭菌注射器。也可以用软胶袋等可挤出

容器代替注射器。

上述步骤(1)和(2)可以非常方便地在医药工业罐封设备上实现。在交联活性溶液灌入可注射容器密封的过程中,注射器的连接针头端通常是密封的,交联活性溶液从敞口端(注射器推杆端)灌入,然后用胶塞密封敞口端,最后装入推杆。上述步骤(3)是灌入注射器的交联活性溶液形成双硫键交联水凝胶。交联活性溶液在可注射容器内逐渐形成双硫键交联水凝胶的时间一般大于30分钟。升高温度可以促进凝胶化,凝胶化时间通常是几个小时到几天。采用光照或电子束辐照也会加快凝胶化过程。交联活性溶液的pH值、生物相容高分子的巯基含量等因素也对凝胶化过程有显著的影响。交联活性溶液的pH值越高,凝胶化过程越快,在本发明中通常采用微酸性、中性或微碱性的pH。生物相容高分子的巯基含量的增加也会显著促进凝胶化过程。

在本发明中,还可以根据实际需要在步骤(1)前后调节交联活性溶液中的溶解氧浓度以调节凝胶化过程和凝胶的性能。通过控制氧气的分压、温度、时间等参数,即可增加或减少交联活性溶液中溶解氧浓度。交联活性溶液与氧气分压小于常压空气中氧气分压的气体相互作用或抽真空可以减少交联活性溶液中溶解氧浓度。抽真空是最常见的一种减少溶解氧的方法。交联活性溶液在真空状态下保持一定时间即可除去大部分溶解氧,然后在惰性气体的保护下实现灌入可注射容器并密封。此时所制备的双硫键交联水凝胶凝胶化时间较长,强度较低。交联活性溶液与氧气分压大于常压空气中氧气分压的气体相互作用可以增加交联活性溶液中溶解氧浓度。与含有氧气气体相接触是增加交联活性溶液中溶解氧浓度的常用方法。含有氧气的气体可以是加压空气、纯氧气或其它含有氧气的气体,其中氧气分压大于常压空气中氧气的分压,加大氧气的分压即可显著地提高交联活性溶液中的溶解氧浓度。其操作过程可以是把含有氧气的气体通入交联活性溶液中或液面上方,搅拌可以加快氧气的溶解速度。在与含有氧气的气体相互接触的同时,交联活性溶液可以方便地灌入注射器,并快速地加胶塞密封,防止由于气压的变化导致溶解氧的逸出。

交联活性溶液灌入注射器后,罐装设备加塞时通常胶塞直达液面,加塞后的密闭注射器内不留有空隙。但也可根据实际需要灵活调整胶塞在注射器中的深度,留有特定体积的空隙。例如在10 ml的注射器中灌入5 ml交联活性溶液,

根据需要胶塞可以在 6 ml 或其它刻度处密封。采用现有的注射器预灌封生产设备, 可以方便地在注射器的空隙中充入气体 (如空气、纯氧气等等), 进一步调节交联活性溶液中的溶解氧。另外, 交联活性溶液在加胶塞密封前, 也可以与含有氧气的气体接触, 进一步调节交联活性溶液中的溶解氧浓度。例如, 在加胶塞的密闭容器中通入一定氧气分压的气体, 一定时间后再加胶塞密封等。但上述操作导致了工艺的复杂性, 一般不采用。

在本发明的另一方面, 提供了采用上述方法制备的可注射原位交联水凝胶。

在本发明中, 交联活性溶液中的侧链带有两个以上巯基的生物相容高分子可在溶液的状态下纯化, 现有的纯化工艺 (如超滤等) 可以彻底保证杂质的去除; 同时, 凝胶化过程不需要加入交联剂, 溶液中的溶解氧即可把巯基氧化为双硫键交联, 产物为水。因此与其它可注射交联凝胶相比, 本发明所制备的可注射原位交联凝胶具有显著的优势。

在本发明的另一方面, 还提供了上述可注射原位交联水凝胶在医药和外科手术中的应用。

本发明所制备的原位交联水凝胶在医学中的应用包括: 可以用于促进伤口愈合, 可用于皮肤或其它创伤的伤口敷料; 也可用于防止粘连, 包括外科手术 (例如鼻窦炎手术) 之后防止组织或器官之间的纤维性粘连; 也可用于组织的再生修复, 包括皮肤的再生、软骨的修复等; 也可用作关节润滑剂用于治疗关节炎等。

本发明所制备的原位交联水凝胶在药学中的应用包括作为各种活性治疗物质的载体, 实现缓慢释放的性能。活性治疗物质可以是化学药物或生物学上的活性因子, 包括消炎剂、抗生素、止痛药、麻醉剂、伤口愈合促进剂、细胞生长促进或抑制因子、免疫刺激剂、抗病毒药物等等。

实现本发明的最佳方式:

下面的实施例可以使本领域技术人员更全面地理解本发明, 但不以任何方式限制本发明。

实施例 1 巯基化改性透明质酸钠的制备

按照 Shu 等人在 *Biomacromolecules*, 3, 1304, 2002 中公开的方法制备。透明质酸 20 克溶解于 2 升蒸馏水, 加入 23.8 克二硫代二丙二酰肼, 搅拌溶解。然后溶液的 pH 值用 0.1 摩尔/升盐酸调节至 4.75, 加入 19.2 克 1-乙基-3-(3-二甲胺

丙基)碳二亚胺盐酸盐(Aldrich, 美国), 电磁搅拌。在上述溶液中不断加入适量 0.1 摩尔/升盐酸, 使溶液的 pH 值保持在 4.75。加入 1.0 摩尔/升的氢氧化钠溶液到 pH 7.0 终止反应。然后加入 100 克二硫苏糖醇(Diagnostic Chemical Limited, 美国)和适量 1.0 摩尔/升的氢氧化钠溶液, 搅拌。调解溶液的 pH 值为 8.5。室温电磁搅拌反应 24 小时。此后, 在上述溶液中加入 1 摩尔/升的盐酸直至约 pH 3.5。上述溶液装入透析管(截除分子量 3500, Sigma, 美国), 用大量 0.0003 摩尔/升的盐酸和 0.1 摩尔/升的氯化钠溶液透析 5 天, 每 8 小时换一次透析液; 然后再用大量的 0.0003 摩尔/升的盐酸溶液透析 3 天, 每 8 小时换透析液。最后收集透析管内的溶液, 冷冻干燥得到白色絮状固体。

上述白色絮状固体溶解于蒸馏水中得到 1.0~2.5% w/v 溶液, 调节溶液的 pH 值为 4.0~8.0, 过滤除菌后, 立即使用或冷冻保存待用。或者在上述制备过程中, 透析纯化后的溶液再经透析柱脱水浓缩至合适浓度(通常 1.0~2.5% w/v), 调节溶液的 pH 值(通常为 4.0~8.5), 过滤除菌后, 立即使用或冷冻保存待用。

氢谱核磁共振检测($^1\text{H-NMR}$)(D_2O 为溶剂)巯基化改性透明质酸钠侧链巯基取代度为 42/100 个重复二糖单元; 分子量及其分布(GPC 测定): 重均分子量 13.6 万、数均分子量 6.1 万。

实施例 2 巯基化改性硫酸软骨素的合成和表征

硫酸软骨素(c型, 来自鲨鱼软骨, Sigma, 美国)1 克溶解于 100 毫升蒸馏水中, 得到澄清透明溶液。在上述溶液中加入 0.704 克双琥珀酸双酰肼胺二酰肼(舒等, 中国发明专利 CN101190891), 搅拌溶解。然后溶液的 pH 值用 0.1 摩尔/升盐酸调节至 4.75, 加入 0.192 克 1-乙基-3-(3-二甲胺丙基)碳二亚胺盐酸盐(Aldrich, 美国); 电磁搅拌。在上述溶液中不断加入适量 0.1 摩尔/升盐酸, 使溶液的 pH 值保持在 4.75, 室温电磁搅拌反应 2 小时。然后加入 10 克二硫苏糖醇(Diagnostic Chemical Limited, 美国)和少量 0.1 摩尔/升的氢氧化钠溶液, 搅拌。凝胶逐渐溶解, 同时不断加入 0.1 摩尔/升的氢氧化钠溶液使溶液的 pH 值保持在 8.5。待凝胶全部溶解后, 室温电磁搅拌反应 24 小时。此后, 在上述溶液中加入 6 摩尔/升的盐酸直至约 pH 3.0。上述溶液装入透析管(截除分子量 2000, Sigma, 美国), 用 10 升 0.001 摩尔/升的盐酸和 0.3 摩尔/升的氯化钠溶液透析 5

天, 每 8 小时换一次透析液; 然后再用 10 升 0.001 摩尔/升的盐酸溶液透析 3 天, 每 8 小时换透析液。最后透析管内的溶液冷冻干燥或经透析柱脱水浓缩至一定浓度(3.0~6.0% w/v), 并调节溶液 pH 值(通产为 4.0~8.5), 过滤除菌后, 冷冻保存待用。

以硫酸软骨素的乙酰基的特征甲基吸收峰为内标, 根据吸收峰的面积计算出巯基化改性硫酸软骨素的侧链取代度为 47%。

用 GPC 测定分子量及其分布测定: 重均分子量 3.8 万, 数均分子量 1.7 万, 分子量分布 2.23。

采用 Shu 等人在 *Biomacromolecules*, 3, 1304, 2002 中报道的改进 Ellman 方法检测巯基化改性硫酸软骨素的活性巯基含量: 44.2 个巯基/100 个硫酸软骨素二糖重复单元。

实施例 3 巯基化改性明胶的制备

明胶(B 型, 来自猪皮, Sigma, 美国) 1 克溶解于 100 毫升蒸馏水中, 得到澄清透明溶液。在上述溶液中加入 0.75 克双琥珀酸双酰肼胺二酰肼(舒等, 中国发明专利 CN101190891), 搅拌溶解。然后溶液的 pH 值用 0.1 摩尔/升盐酸调节至 4.75, 加入 1 克 1-乙基-3-(3-二甲胺丙基)碳二亚胺盐酸盐(Aldrich, 美国), 电磁搅拌。在上述溶液中不断加入适量 0.1 摩尔/升盐酸, 使溶液的 pH 值保持在 4.75。溶液黏度不断增加, 并在 10 分钟左右形成凝胶。凝胶形成后, 室温静置反应 2 小时。然后加入 10 克二硫苏糖醇(Diagnostic Chemical Limited, 美国)和少量 0.1 摩尔/升的氢氧化钠溶液, 搅拌。凝胶逐渐溶解, 同时不断加入 0.1 摩尔/升的氢氧化钠溶液使溶液的 pH 值保持在 8.5。待凝胶全部溶解后, 室温电磁搅拌反应 24 小时。此后, 在上述溶液中加入 6 摩尔/升的盐酸直至约 pH 3.0。上述溶液装入透析管(截除分子量 2000, Sigma, 美国), 用 10 升 0.001 摩尔/升的盐酸和 0.3 摩尔/升的氯化钠溶液透析 5 天, 每 8 小时换一次透析液; 然后再用 10 升 0.001 摩尔/升的盐酸溶液透析 3 天, 每 8 小时换透析液。最后收集透析管内的溶液, 冷冻干燥得到白色絮状固体约 0.6 克。

上述白色絮状固体溶解于蒸馏水中得到 3.0~6.0% w/v 溶液, 调节溶液的 pH 值为 4.0~8.0, 过滤除菌后, 立即使用或冷冻保存待用。

GPC 检测（纯水为流动相，紫外 210 纳米吸收检测）均未发现小分子杂质流出峰，表明合成的巯基化改性明胶巯基化改性明胶为高度纯化，杂质低于仪器检测水平。

采用 Shu 等人在 *Biomacromolecules*, 3, 1304, 2002 中报道的改进 Ellman 方法检测巯基化改性明胶的活性巯基含量为 0.57 毫摩尔/克。

实施例 4 可注射原位交联水凝胶的制备

透明质酸钠凝胶：实施例 1 所制备的巯基化改性透明质酸钠溶液（pH 7.0, 1.0% w/v）在无菌过滤后立即灌入 1 毫升注射器，密封室温保存。一周后观察，密封注射器内的溶液失去流动性，已经形成凝胶。凝胶不溶于水，但可溶于二硫苏糖醇溶液，证实为双硫键交联。

硫酸软骨素凝胶：实施例 2 所制备的巯基化改性硫酸软骨素溶液（pH 7.0, 5.0% w/v）在无菌过滤后立即灌入 1 毫升注射器，密封室温保存。一周后观察，密封注射器内的溶液失去流动性，已经形成凝胶。凝胶不溶于水，但可溶于二硫苏糖醇溶液，证实为双硫键交联。

明胶凝胶：实施例 3 所制备的巯基化改性明胶溶液（pH 7.0, 5.0% w/v）在无菌过滤后立即灌入 1 毫升注射器，密封室温保存。一周后观察，密封注射器内的溶液失去流动性，已经形成凝胶。凝胶不溶于水，但可溶于二硫苏糖醇溶液，证实为双硫键交联。

实施例 5 可注射原位交联水凝胶的制备

透明质酸钠/明胶凝胶：实施例 1 所制备的巯基化改性透明质酸钠溶液（pH 7.0, 1.0% w/v）和实施例 3 所制备的巯基化改性明胶溶液（pH 7.0, 5.0% w/v）按照适当体积比（如 10:1、1:1 和 1:10 等）混合均匀，立即灌入 1 毫升注射器，密封室温保存。一周后观察，密封注射器内的溶液失去流动性，已经形成凝胶。凝胶不溶于水，但可溶于二硫苏糖醇溶液，证实为双硫键交联。

硫酸软骨素/明胶凝胶：实施例 2 所制备的巯基化改性硫酸软骨素溶液（pH 7.0, 5.0% w/v）和实施例 3 所制备的巯基化改性明胶溶液（pH 7.0, 5.0% w/v）按照适当体积比（如 10:1、1:1 和 1:10 等）混合均匀，立即灌入 1 毫升注射器，密封室温保存。一周后观察，密封注射器内的溶液失去流动性，已经形成凝胶。

凝胶不溶于水，但可溶于二硫苏糖醇溶液，证实为双硫键交联。

透明质酸钠/硫酸软骨素/明胶凝胶：实施例1所制备的巯基化改性透明质酸钠溶液（pH 7.0，1.0% w/v）、实施例2所制备的巯基化改性硫酸软骨素溶液（pH 7.0，5.0% w/v）和实施例3所制备的巯基化改性明胶溶液（pH 7.0，5.0% w/v）按照各种体积比（如 1:1:1 等）混合均匀，立即灌入1毫升注射器，密封室温保存。一周后观察，密封注射器内的溶液失去流动性，已经形成凝胶。凝胶不溶于水，但可溶于二硫苏糖醇溶液，证实为双硫键交联。

实施例6 可注射原位交联水凝胶的制备

含有硫酸软骨素的透明质酸钠凝胶：硫酸软骨素（c型，来自鲨鱼软骨，Sigma，美国）溶解于水中得到1.0% w/v溶液，然后与实施例1所制备的巯基化改性透明质酸钠溶液（pH 7.0，1.5% w/v）按体积比2:1混合后立即灌入1毫升注射器，密封室温保存。一周后观察，密封注射器内的溶液失去流动性，已经形成凝胶。凝胶不溶于水，但可溶于二硫苏糖醇溶液，证实为双硫键交联。

含有透明质酸钠的硫酸软骨素凝胶：透明质酸钠（分子量约100万，山东福瑞达生物化工有限公司）溶解于水中得到1.0% w/v溶液，然后与实施例2所制备的巯基化改性硫酸软骨素溶液（pH 7.0，6.0% w/v）在混合均匀后立即灌入1毫升注射器，密封室温保存。一周后观察，密封注射器内的溶液失去流动性，已经形成凝胶。凝胶不溶于水，但可溶于二硫苏糖醇溶液，证实为双硫键交联。

含有透明质酸钠的明胶凝胶：透明质酸钠（分子量约100万，山东福瑞达生物化工有限公司）溶解于0.9%的生理盐水中得到1.0% w/v溶液，然后与实施例3所制备的巯基化改性明胶溶液（pH 7.0，8.0% w/v）在混合均匀后立即灌入1毫升注射器，密封室温保存。一周后观察，密封注射器内的溶液失去流动性，已经形成凝胶。凝胶不溶于水，但可溶于含有氯化钠的二硫苏糖醇溶液，证实为双硫键交联。

实施例7 交联活性溶液中溶解氧浓度的调节

实施例1所制备的巯基化改性透明质酸钠溶液（pH 8.0，1.0% w/v）抽真空10分钟，然后室温敞口接触空气，电磁搅拌，间隔一定的时间采用溶解氧测定

仪 (HI 9143, HANNA 公司) 测定溶液中溶解氧的浓度。结果如下:

时间 (分钟)	0	5	10	15	20	25	30	35
溶解氧浓度 (mg/L)	0.28	2.77	4.73	5.82	6.50	7.00	7.22	7.33

实施例 8 可注射原位交联水凝胶的制备和表征

在实施例 6 中, 室温搅拌 5 分钟的溶液 (溶液 A) 和室温搅拌 20 分钟的溶液 (溶液 B) 分别灌入 1 毫升注射器, 密封室温保存。48 小时后观察, 溶液 A 变得很粘稠, 但还具有一定的流动性; 而溶液 B 则完全失去流动性, 形成了凝胶。按照 Shu 等人在 *Biomacromolecules*, 3, 1304, 2002 中所报道的方法测定溶液 A 和 B 中的双硫键的含量, 结果表明溶液 B 中的双硫键含量比溶液 A 高 15% 以上。

实施例 9 交联活性溶液中溶解氧浓度的调节

实施例 1 所制备的巯基化改性透明质酸钠溶液 (pH 8.0, 1.0% w/v) 在密闭容器中敞口接触一个大气压氧气, 电磁搅拌, 间隔一定的时间采用溶解氧测定仪 (HI 9143, HANNA 公司) 测定溶液中溶解氧的浓度。结果如下:

时间 (分钟)	0	5	10	15	20
溶解氧浓度 (mg/L)	7.38	13.92	18.73	24.82	28.50

实施例 10 可注射原位交联水凝胶的制备和表征

在实施例 8 中, 与一个大气压氧气接触搅拌 0 分钟的溶液 (溶液 A) 和搅拌 10 分钟的溶液 (溶液 B) 分别灌入 1 毫升注射器, 密封室温保存。溶液 B 在 24 小时内形成了凝胶, 而溶液 A 的凝胶化需要约 48 小时。在 48 小时后, 按照 Shu 等人在 *Biomacromolecules*, 3, 1304, 2002 中所报道的方法测定溶液 A 和 B 中的双硫键的含量, 结果表明溶液 B 中的双硫键含量比溶液 A 高 30% 以上。

实施例 11 含有药物的可注射原位交联水凝胶的制备

在 10 毫升实施例 1 所制备的巯基化改性透明质酸钠溶液中 (pH 7.0, 1.0% w/v) 中, 分别加入 50 毫克抗生素 (庆大霉素)、100 毫克抗肿瘤药物 (紫杉醇)

或 50 微克碱性生长因子，混合均匀后立即灌入 1 毫升注射器，密封室温保存。一周后观察，密封注射器内的溶液失去流动性，已经形成凝胶。

实施例 12 含有皮质激素的可注射原位交联水凝胶的制备和表征

在 10 毫升实施例 1 所制备的巯基化改性透明质酸钠溶液中 (pH 7.0, 1.0% w/v) 中，分别加入 0.1~10 毫克皮质激素 (如倍氯米松 Beclomethasone、倍氯美松双丙酸酯 Beclomethasone dipropionate; 布地奈德 Budesonide; 地塞米松 Dexamethasone; 泼尼松龙 Prednisolone、Prednisone 泼尼松等)，立即灌入 1 毫升注射器，密封室温保存。一周后观察，密封注射器内的溶液失去流动性，已经形成凝胶。

上述含药物凝胶 0.2 毫升放入 15 毫升塑料离心管，加入 10 毫升磷酸盐缓冲溶液，放入摇床 (37℃, 100 转/分钟)，间隔一定的时间测定上清液中药物的紫外吸收。测定波长如下：倍氯米松 Beclomethasone 246 nm、倍氯美松双丙酸酯 Beclomethasone dipropionate 240 nm; 布地奈德 Budesonide 248 nm; 地塞米松 Dexamethasone 242 nm; 泼尼松龙 Prednisolone 248 nm、Prednisone 泼尼松 244 nm。

药物在不同时间点的累积释放百分比如下：

时间 (天)	倍氯米松	倍氯美松 双丙酸酯	布地奈德	地塞米松	泼尼松龙	泼尼松
7	61%	<1%	21%	39%	95%	82%
14	82%	<1%	40%	61%	100%	95%
21	91%	<1%	57%	74%	100%	100%

从上述结果可以看出，可注射原位交联水凝胶是一种很多的药物缓释载体，对 6 种皮质激素均具有较好的缓释效果。根据药物疏水性的差异，药物从凝胶中释放的行为有很大的不同。药物疏水性越强，释放越为缓慢。例如对于相对较为亲水的泼尼松龙 Prednisolone，7 天内已基本释放完毕；而对于疏水性很强的倍氯美松双丙酸酯 Beclomethasone dipropionate，几乎检测不到释放。

实施例 13 可注射原位交联水凝胶防止鼻窦炎术后鼻窦口的再狭窄化

8 只雄性巴斯德灭菌的新西兰白兔, 体重 3.5-4.0 公斤, 肌肉注射氯胺酮 (35 毫克/公斤) 及甲苯唑嗪 (5 毫克/公斤) 麻醉, 剥离鼻外背面, 碘酒消毒, 然后以 3 毫升 1% 利多卡因与 1:100000 肾上腺素混合液麻醉。无菌条件下, 沿中线做 2.5 毫米垂直切口, 将覆盖于上颌窦的软组织及骨膜提起分离。用外科电钻打开上颌窦前壁, 以 4 毫米球面切割钻将上颌窦中壁与鼻腔打通, 从而形成一个直径 4 毫米边缘无黏膜的圆周形孔道。在 4 只兔子的孔道两侧中均填入实施例 4 所制备的透明质酸钠凝胶 (治疗组), 在 4 只兔子的孔道两侧中均不作填充 (对照组)。然后将骨膜以可吸收缝线间断缝合, 然后将皮肤以可吸收缝线缝合封闭上颌窦。不做其他包扎。术后给予动物正常饮食饮水。

术后两周, 处死兔子。处死后将愈合的伤口切开, 暴露窦腔。窦腔内的残留物用吸引器一边冲水一边轻轻吸出, 用 30 度鼻内窥镜检查鼻窦内侧壁并进行摄像。每个孔径均用毫米刻度的尺子进行测量。双盲法完成对孔径的观察及测量。治疗组和对照组的孔径测量结果如下:

	治疗组	对照组
鼻窦口直径 (毫米)	2.9 ± 1.32	0.7 ± 0.44

鼻窦口的再狭窄化是鼻窦炎临床手术的一个重要难题, 会影响手术疗效, 甚至导致鼻窦炎复发。上述结果表明可注射原位交联水凝胶可以非常显著地防止鼻窦口的狭窄化, 有望在临床上得到广泛的应用。

实施例 14 可注射原位交联水凝胶促进创伤愈合

采用 Kirker 等人在 Biomaterials, 23, 3661, 2002 所报道的动物模型。简述如下: 10 只重约 25 克的小鼠麻醉后, 用手术刀切除小鼠背部表皮和真皮, 得到直径为 1 厘米的创面。治疗组的创面填入 0.3 毫升实施例 4 所制备的透明质酸钠凝胶, 然后用 Tegaderm™ 辅料和纱布包扎; 空白对照组的创面直接用 Tegaderm™ 辅料和纱布包扎。术后 5 天和 10 天, 处死小鼠, 以表皮再生率 (新生表皮与原始创面的百分比) 表征创伤愈合状况。表皮再生率 (%) 结果如下:

时间 (天)	5	10
对照组	47 ± 15	79 ± 13
治疗组	80 ± 13	95 ± 10

可注射原位交联水凝胶显著促进了创伤的表皮再生,可以在临床上作为创伤辅料使用。

工业实用性:

本发明利用交联活性溶液中的溶解氧来实现巯基氧化为双硫键的凝胶化过程,这不仅克服了双硫键交联凝胶的制备需要与空气敞口接触的技术偏见;解决了大规模工业化生产的技术难题;同时可以方便地通过控制温度、氧气分压等参数灵活调节交联活性溶液中的溶解氧浓度,从而调节双硫键交联过程和双硫键交联水凝胶的性能;同时凝胶化过程在注射器内完成,具有可注射的性能。本发明的方法具有不需要交联剂、制备工艺简单、使用方便、不含杂质、生物相容性好、无毒副作用、在医学中具有广泛用途等许多优点。

本发明还包括凝胶化过程是在注射容器内完成,避免了二次污染,临床使用极为方便,使用时无交叉感染,病房中不洁净的空气接触不到产品,无需抽药,一次性使用等优点。

权利要求书

1. 一种可注射原位交联水凝胶的制备方法，其特征在于，包括以下步骤：

(1) 交联活性溶液灌入可注射容器，其中交联活性溶液中至少含有一种侧链带有两个以上巯基的生物相容高分子；

(2) 密封含有交联活性溶液的可注射容器；

(3) 在密封的可注射容器内交联活性溶液中的溶解氧把巯基氧化成双硫键形成交联水凝胶。

2. 按照权利要求1所述的可注射原位交联水凝胶的制备方法，其特征在于，在步骤(1)前后调节交联活性溶液中的溶解氧浓度。

3. 按照权利要求2所述的可注射原位交联水凝胶的制备方法，其特征在于，所述的调节交联活性溶液中溶解氧浓度包括增加或减少溶解氧浓度。

4. 按照权利要求2或3所述的可注射原位交联水凝胶的制备方法，其特征在于，所述交联活性溶液中的溶解氧浓度可通过调节温度、与交联活性溶液相接触的气体的氧气分压或接触时间来控制。

5. 按照权利要求3所述的可注射原位交联水凝胶的制备方法，其特征在于，所述的增加溶解氧浓度的方法包括交联活性溶液与氧气分压大于常压空气中氧气分压的气体相互作用。

6. 按照权利要求3所述的可注射原位交联水凝胶的制备方法，其特征在于，所述的减少溶解氧浓度的方法包括交联活性溶液与氧气分压小于常压空气中氧气分压的气体相互作用和抽真空。

7. 按照权利要求1所述的可注射原位交联水凝胶的制备方法，其特征在于，所述的可注射容器是指注射器、或可挤出的容器。

8. 按照权利要求1所述的可注射原位交联水凝胶的制备方法，其特征在于，所述的侧链带有两个以上巯基的生物相容高分子是指多糖、蛋白或合成高分子通过一种或一种以上化学改性得到的衍生物，其中至少一种化学改性是巯基化改性。

9. 按照权利要求8所述的可注射原位交联水凝胶的制备方法，其特征在于，所述的多糖是硫酸软骨素、肝素、类肝素、海藻酸、透明质酸、皮肤素、硫酸皮肤素、果胶、羧甲基纤维素、壳聚糖及它们的盐形式中的一种；所述的蛋白是胶

原蛋白、酸性明胶蛋白、碱性明胶蛋白和基因重组明胶蛋白中的一种；所述的合成高分子是聚丙烯酸、聚天冬氨酸、聚酒石酸、聚谷氨酸、聚富马酸及它们的盐形式中的一种。

10. 按照权利要求 8 所述的可注射原位交联水凝胶的制备方法，其特征在于，所述的巯基化改性包括下述化学反应过程制备：羧基在碳化二亚胺的活化下，和含有双硫键的二巯或二酰肼反应生成中间产物，然后双硫键还原为巯基，纯化后得到巯基化改性衍生物。

11. 按照权利要求 8 所述的可注射原位交联水凝胶的制备方法，其特征在于，所述的侧链带有两个以上巯基的生物相容高分子是侧链带有两个以上巯基的透明质酸钠巯基化改性衍生物、侧链带有两个以上巯基的硫酸软骨素巯基化改性衍生物、侧链带有两个以上巯基的明胶巯基化改性衍生物、侧链带有两个以上巯基的胶原巯基化改性衍生物、侧链带有两个以上巯基的壳聚糖巯基化改性衍生物或侧链含有两个以上巯基的肝素巯基化改性衍生物。

12. 按照权利要求 1 所述的可注射原位交联水凝胶的制备方法，其特征在于，所述的交联活性溶液含有两种或两种以上侧链带有两个以上巯基的生物相容高分子。

13. 按照权利要求 12 所述的可注射原位交联水凝胶的制备方法，其特征在于，所述的交联活性溶液含有透明质酸钠巯基化衍生物、硫酸软骨素巯基化衍生物、肝素巯基化衍生物、明胶巯基化衍生物、胶原巯基化衍生物、壳聚糖巯基化衍生物中的任意两种或两种以上。

14. 按照权利要求 1 或 12 或 13 所述的可注射原位交联水凝胶的制备方法，其特征在于，所述的交联活性溶液还含有一种或一种以上多糖、蛋白和合成高分子。

15. 按照权利要求 14 所述的可注射原位交联水凝胶的制备方法，其特征在于，所述的多糖是硫酸软骨素、肝素、类肝素、海藻酸、透明质酸、皮肤素、硫酸皮肤素、果胶、羧甲基纤维素、壳聚糖及它们的盐形式中的一种；所述的蛋白是胶原蛋白、酸性明胶蛋白、碱性明胶蛋白和基因重组明胶蛋白中的一种；所述的合成高分子是聚丙烯酸、聚天冬氨酸、聚酒石酸、聚谷氨酸、聚富马酸及它们的盐形式中的一种。

16. 按照权利要求 1 所述的可注射原位交联水凝胶的制备方法, 其特征在于, 所述的交联活性溶液在可注射容器内逐渐形成双硫键交联水凝胶的时间大于 30 分钟。

17. 按照权利要求 1 或 12 或 13 所述的可注射原位交联水凝胶的制备方法, 其特征在于, 所述的交联活性溶液含有活性药物组份。

18. 按照权利要求 14 所述的可注射原位交联水凝胶的制备方法, 其特征在于, 所述的交联活性溶液含有活性药物组份。

19. 按照权利要求 17 所述的可注射原位交联水凝胶的制备方法, 其特征在于, 所述的活性药物组份以固体颗粒形式分散在交联活性溶液中, 或者溶解在交联活性溶液中。

20. 按照权利要求 18 所述的可注射原位交联水凝胶的制备方法, 其特征在于, 所述的活性药物组份以固体颗粒形式分散在交联活性溶液中, 或者溶解在交联活性溶液中。

21. 按照权利要求 18-20 任一项所述的可注射原位交联水凝胶的制备方法, 其特征在于, 所述的活性药物组份包括类固醇、抗生物以及治疗肿瘤的药物。

22. 按照权利要求 17 所述的可注射原位交联水凝胶的制备方法, 其特征在于, 所述的活性药物组份包括类固醇、抗生物以及治疗肿瘤的药物。

23. 一种采用如权利要求 1-22 任一项所述的方法制备的可注射原位交联水凝胶。

24. 一种如权利要求 23 所述的可注射原位交联水凝胶在医药或外科手术中的用途。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2009/001013

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See the extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: A61K, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

DATABASE: WPI, EPODOC, PAJ, CNPAT(CN), CNKI(CN), CA, MEDLINE, EMBASE.

SEARCH TERMS: hydrogel, aquogel, lyogel, gel, injectable, crosslink+, disulfide, sulfhydryl, preparation, container, syringe, polysaccharide, protein, macromolecule, chondroitin sulfate, heparin, alginic acid, hyaluronic acid, hyaluronan, HA, dermatan, pectin, carboxymethyl cellulose, chitosan, collagen, polyacrylic acid, aspartic acid, tartaric acid, glutamic acid, fumaric acid

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SHU XiaoZheng et al., Disulfide Cross-Linked Hyaluronan Hydrogels. Biomacromolecules. 2002, Vol. 3, pages 1304-1311, ISSN: 15257797	23-24
A		1-22

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date	“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
“L” document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	“&” document member of the same patent family
“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 04 December 2009(04.12.2009)	Date of mailing of the international search report 17 Dec. 2009 (17.12.2009)
Name and mailing address of the ISA/CN The State Intellectual Property Office, the P.R.China 6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing, China 100088 Facsimile No. 86-10-62019451	Authorized officer LIANG Jingchen Telephone No. (86-10)62411134

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2009/001013

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SHU XiaoZheng et al., Disulfide-crosslinked hyaluronan-gelatin hydrogel films: a covalent mimic of the extracellular matrix for in vitro cell growth. Biomaterials, 2003, Vol. 24, pages 3825-3834, ISSN: 01429612	23-24
A		1-22
X	LIU YanChun et al., Biocompatibility and stability of disulfide-crosslinked hyaluronan films. Biomaterials, 2005, Vol. 26, pages 4737-4746, ISSN: 01429612	23-24
A		1-22
A	US 6624245B2 (Cohesion Technologies, Inc.), 23 September 2003 (23.09.2003), see the whole document	1-24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2009/001013

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The subject-matter of claim 24 relates to the method for treating the human or animal body, which is not required to carry out international search (Rule 39 PCT). The search has still been carried out based on the use of the disulfide crosslinked hydrogel for manufacturing medicaments.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International application No.
PCT/CN2009/001013

Form PCT/ISA /210 (patent family annex) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2009/001013

Continuation of classification of subject matter:

A61K 47/30 (2006. 01) i

A61K 47/36 (2006. 01) i

A61K 47/42 (2006. 01) i

A61P 41/00 (2006. 01) i

A61P 43/00 (2006. 01) i

C08J 3/24 (2006. 01) i

A. 主题的分类		
参见附加页		
按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类		
B. 检索领域		
检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)		
IPC: A61K, A61P		
包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献		
在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))		
数据库: WPI, EPODOC, PAJ, CNPAT(CN), CNKI(CN), CA, MEDLINE, EMBASE;		
检索词: 水凝胶, 可注射, 交联, 双硫, 巯基, 制备方法, 容器, 多糖, 蛋白, 合成高分子, 硫酸软骨素, 肝素, 海藻酸, 透明质酸, 皮肤素, 果胶, 羧甲基纤维素, 壳聚糖, 胶原蛋白, 聚丙烯酸, 聚天冬氨酸, 聚酒石酸, 聚谷氨酸, 聚富马酸, hydrogel, aquogel, lyogel, gel, injectable, crosslink+, disulfide, sulfhydryl, preparation, container, syringe, polysaccharide, protein, macromolecule, chondroitin sulfate, heparin, alginic acid, hyaluronic acid, hyaluronan, HA, dermatan, pectin, carboxymethyl cellulose, chitosan, collagen, polyacrylic acid, aspartic acid, tartaric acid, glutamic acid, fumaric acid		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	SHU XiaoZheng 等人, Disulfide Cross-Linked Hyaluronan Hydrogels. Biomacromolecules. 2002, 第 3 期, 第 1304-1311 页, ISSN: 15257797	23-24
A		1-22
☒ 其余文件在 C 栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期 04.12 月 2009 (04.12.2009)		国际检索报告邮寄日期 17.12 月 2009 (17.12.2009)
ISA/CN 的名称和邮寄地址: 中华人民共和国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088 传真号: (86-10)62019451		授权官员 梁敬臣 电话号码: (86-10) 62411134

C(续). 相关文件

类 型	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	SHU XiaoZheng 等人, Disulfide-crosslinked hyaluronan-gelatin hydrogel films: a covalent mimic of the extracellular matrix for in vitro cell growth. Biomaterials, 2003, 第 24 期, 第 3825-3834 页, ISSN: 01429612	23-24
A		1-22
X	LIU YanChun 等人, Biocompatibility and stability of disulfide-crosslinked hyaluronan films. Biomaterials, 2005, 第 26 期, 第 4737-4746 页, ISSN: 01429612	23-24
A		1-22
A	US 6624245B2 (Cohesion Technologies, Inc.), 23.9 月 2003 (23.09.2003), 参见全文	1-24

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☒ 权利要求：
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
权利要求24的主题涉及疾病治疗方法，属于无需进行国际检索的主题(PCT实施细则39.1(iv))。尽管如此，本国际检索单位仍然基于预期的制药用途进行了检索。
2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，具体地说：
3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

第III栏 缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明，即：

1. ☐ 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费，本国际检索报告涉及全部可作检索的权利要求。
2. ☐ 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索，本单位未通知缴纳任何附加费。
3. ☐ 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费，本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求。具体地说，是权利要求：
4. ☐ 申请人未按时缴纳被要求缴纳的附加检索费。因此，本国际检索报告仅涉及权利要求书中首先提及的发明；包含该发明的权利要求是：

关于异议的说明：☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，适用时，缴纳了异议费。
☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，但未在通知书规定的时间期限内缴纳异议费。
☐ 缴纳附加检索费时未提交异议书。

关于同族专利的信息

PCT/CN2009/001013

07.11.2002

续主题的分类:

A61K 47/30 (2006. 01) i

A61K 47/36 (2006. 01) i

A61K 47/42 (2006. 01) i

A61P 41/00 (2006. 01) i

A61P 43/00 (2006. 01) i

C08J 3/24 (2006. 01) i