[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl[7]
C08B 37/08

[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 00804642.5

[45] 授权公告日 2005 年 5 月 11 日

[11] 授权公告号 CN 1200951C

[22] 申请日 2000.2.3 [21] 申请号 00804642.5
[30] 优先权
[32] 1999. 2. 3 [33] GB [31] 9902412.7
[86] 国际申请 PCT/GB2000/000321 2000.2.3
[87] 国际公布 WO2000/046253 英 2000.8.10
[85] 进入国家阶段日期 2001.9.4
[71] 专利权人 曼特生物聚合物有限公司
地址 英国爱丁堡
[72] 发明人 赵晓斌
审查员 曹赞华

[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 黄淑辉

权利要求书 2 页 说明书 15 页 附图 4 页

[54] 发明名称 多重交联的透明质酸衍生物的生产方法

[57] 摘要

本发明提供制备交联的透明质酸(HA)衍生物，尤其多重(例如双重)交联的透明质酸衍生物的生产方法。 本发明还提供新型的交联的 HA 衍生物，包含它们的产品和它们用于化妆品、医药和药物应用中的用途。

ISSN1008-4274

知识产权出版社出版

1. 制备多重交联的透明质酸衍生物的方法，该方法包括利用两种或多种选自羟基、羧基和氨基的官能团将透明质酸交联，其中所述交联是通过使透明质酸与一种或多种化学交联剂接触而在所述透明质酸分子间形成两种或多种化学上不同的交联而实现的，且所述交联键是选自醚、酯、砜、胺、亚氨基和酰胺键的两种或多种。

2. 根据权利要求1的方法，其中所述化学交联剂选自甲醛、戊二醛、二乙烯基砜、聚酐、聚醛、多元醇、碳化二亚胺、表氯醇、乙二醇二缩水甘油基醚、丁二醇二缩水甘油基醚、聚甘油多缩水甘油基醚、聚乙二醇二缩水甘油基醚、聚丙二醇二缩水甘油基醚或双-或多环氧基交联剂。

3. 根据权利要求1的方法，其中醚键是使用选自双和多环氧基化物的交联剂在碱性条件下形成的。

4. 根据权利要求1的方法，其中酯键是使用选自双和多环氧基化物的交联剂在酸性条件下形成的。

5. 根据权利要求3或4的方法，其中该交联剂选自1,2,3,4-二环氧基丁烷和1,2,7,8-二环氧基辛烷。

6. 根据权利要求1的方法，其中醚键是使用戊二醛交联剂在酸性条件下形成的。

7. 根据权利要求1或2的方法，其中每一种类型的官能团的交联是顺序进行的，它包括利用第一种官能团将透明质酸交联和随后利用第二种官能团进一步交联该产物，其中该第一种和第二种官能团代表不同的化学实体。

8. 根据权利要求7的方法，其中透明质酸首先利用羟基通过形成醚键被交联和随后利用羧基通过形成酯键被交联。

9. 根据权利要求1或2的方法，其中每一种类型的官能团的交联是同时进行的。

10.根据权利要求1或2的方法，其中制备双重交联的透明质酸。

11. 根据权利要求10的方法，它包括:

(a) 利用第一官能团使透明质酸交联，和随后

(b) 利用第二种官能团进一步使(a)的产物交联，其中第一和第二官能团代表不同的化学实体。

12. 交联到另外的透明质酸分子上的透明质酸，其中该透明质酸利用至少两种选自羟基、羧基和氨基的官能团进行交联，且所述交联键选自醚、酯、砜、胺、亚氨基和酰胺键中的两种或多种。

13. 膜形式的根据权利要求12的多重交联透明质酸。

14. 凝胶形式的根据权利要求12的多重交联透明质酸。

15. 根据权利要求12的为双重交联透明质酸的透明质酸。

16. 包括根据权利要求12的多重交联透明质酸的产品。

17. 根据权利要求12的透明质酸在制备用于药物、医药或化妆品用途的产品中的用途。

18.根据权利要求17的用途，其中所述产品用于输送消炎剂、抗生素、止痛药、麻醉剂、伤口愈合促进剂、细胞生长抑制剂、免疫刺激剂、免疫抑制剂和抗病毒药。

19.根据权利要求18的用途，其中所述产品用于输送麻醉剂。

20. 根据权利要求12的透明质酸或根据权利要求16的产品在医药或外科手术领域中的用途。

多重交联的透明质酸衍生物的生产方法

技术领域

本发明涉及透明质酸（HA）衍生物，尤其多重例如双重交联透明质酸衍生物的生产方法，和涉及所获得的新型交联衍生物，涉及含有它们的产品和它们在化妆品、医药和药物应用中的用途。

背景技术

HA是已知为葡萄糖胺聚糖的一类聚合物中的一员。HA是长链线性多糖和通常作为钠盐形式存在，它具有分子式$(C_{14}H_{20}NNaO_{11})_n$，其中n根据来源、分离工艺和测定方法来变化。然而，已经报道了至多14×10^6的分子量。

HA和它的盐类能够从许多来源中分离出来，其中包括人脐带，公鸡鸡冠和几乎所有脊椎动物组织的结缔基质（ connective matrices）。HA也可以是细菌如链球菌的囊组分，如Kendall等人(1937)在Biochem. Biophys. Acta, 279,401405中所述；它因此也可通过发酵工艺操作法获得。例如，本申请人的US专利No. 5,411,874描述了由马链球菌的连续发酵生产透明质酸的方法。

HA是非致免疫的，因此在医药领域中有很大的应用潜力。因为它的粘弹性质，具有高分子量(在1百万以上)的HA已经被发现特别可用于各种临床领域，其中包括伤口治疗，眼外科和矫形外科。HA也有潜力用于各种非医学领域中，如化妆品应用。

然而，HA在某些领域中的使用受到以下事实的限制：在施用给人之后，HA快速被酶例如透明质酸酶和被自由基降解。此外，HA在室温下可溶于水，也能够使它适合于某些应用。所以进行各种尝试，尤其通过交联HA分子，来制备更稳定形式的HA。

因此，USP4,582,865（Biomatrix Inc.）描述了透明质酸的交联凝胶的制备方法，它们是通过交联HA本身来形成或使用二乙烯基砜作为交联剂与其它亲水聚合物混合。在这种情况下似乎是利用HA的羟基进行交联。

USP5,550,187（Collagen公司）描述了制备交联的生物材料组合物的

方法，它包括将生物相容性聚合物(它优选是胶原但可以选自包括透明质酸在内的其它聚合物)与无菌的干燥交联剂如合成亲水聚合物混合。

USP5,578,661(Nepera Inc.)描述了从三种主要组分形成的用作伤口敷料的凝胶形成用体系，第一种是水溶性聚合物，第二种是含酸的聚合物和第三种是多糖或含胺的聚合物如透明质酸。在这种情况下该交联似乎利用离子结合来实现的。

USP5,644,049(Italian Ministry for Universities and Scientific and Technology Research)描述包括互穿聚合物网络(IPN)的生物材料，其中聚合物组分中的一种是酸性多糖如透明质酸和第二种聚合物组分可以是合成化学聚合物。这两种组分可以(但是不一定)交联。

Tomihata和Ikada报道了使用水溶性碳化二亚胺作为交联剂来交联HA。推测交联是通过酯基来发生的。该交联反应也可在L-赖氨酸甲酯存在下进行，看起来利用酰胺键接于赖氨酸酯上来实现附加的交联。(J.Biomed.Mater.Res., 37,243-251,1997)。

US专利No. 5,800,541描述了使用多步反应制备的胶原-合成聚合物基质。第一步包括让胶原与合成亲水性聚合物反应；所获得的基质然后在第二步骤中改性，该第二步骤包括基质与合成聚合物的交联或结合，生物活性分子或葡萄糖胺聚糖偶联到基质上，使用普通的化学交联剂使基质交联或利用化学反应在基质中改性胶原。在这一方法中，最初的胶原-合成聚合物基质似乎利用仅仅一种类型的键进行交联，附加的工艺步骤用于引入其它的化学物质，可形成不同类型的键。然而，没有迹象表明，用于形成产物的那些物质中的任何两种将通过一种以上的键相互连接。

国际专利申请WO97/04012(Agerup)描述了多糖(尤其是透明质酸)凝胶组合物，它是通过形成多糖的水溶液，在多官能化交联剂存在下引发交联，在凝胶发生之前(例如通过稀释该溶液)在空间上妨碍交联反应使之不被终止和然后在引进空间无妨碍条件(例如通过蒸发溶液)继续交联形成粘弹性凝胶来最终制得。在这一申请中没有任何提示在两个交联阶段中形成了不同类型的键。

上述文献没有描述其中HA分子利用两种不同类型的交联键被相互连接的产物。

发明内容

我们现在发现透明质酸可通过两种不同类型的交联键实施交联，进行“双重交联”。不同类型的键的形成是利用不同官能团进行交联来实现的。如此形成的键因此能够表述为官能键。因此，例如，利用羟基交联形成了一种键，利用例如羧基交联形成了不同的官能键。这类多重交联已被发现导致了使HA有改进生物稳定性的高度交联。

所以在第一方面，本发明提供了制备多重交联的透明质酸衍生物的方法，该方法包括利用两种或多种不同的官能团将HA交联。

每一种类型的官能团的交联可通过HA与一种或多种交联剂同时或顺序接触来进行，这将在下文中更详细地描述。

在本说明书中，“多重交联的HA”是指其中HA分子利用两种或多种不同类型的官能键交联到另一个HA分子上的透明质酸衍生物。类似地，“双重交联的HA”是指其中HA分子利用两种不同类型的官能键交联到另一个HA分子上的透明质酸衍生物和“单交联的HA”是指其中HA分子利用仅一种官能键交联到另一HA分子上的透明质酸衍生物。

主要用于使HA分子交联的官能团是羟基和羧基。羟基可利用醚键交联和羧基能够利用酯键交联。如果需要，HA可在交联之前进行化学改性以形成其它化学活性基团。因此，例如，HA可用酸或碱处理，以使它接受至少部分的脱乙酰作用，导致存在游离氨基。该氨基可利用酰胺(-C(O)-NH-)；亚氨基(-N=CH-)或仲胺(-NH-CH-)键交联。亚氨基键是胺键的前身和亚氨基键能够在还原剂存在下转化成胺键。

可用于本发明的方法中的交联剂包括现有技术中众所周知的那些，例如甲醛，戊二醛，二乙烯基砜，聚酐，聚醛，多元醇，碳化二亚胺，表氯醇，乙二醇二缩水甘油基醚，丁二醇二缩水甘油基醚，聚甘油多缩水甘油基醚，聚乙二醇，聚丙二醇二缩水甘油基醚，或双-或多-环氧基交联剂如1,2,3,4 -二环氧基丁烷或1,2,7,8 -二环氧基辛烷。

为了形成醚键，该交联剂优选选自甲醛，戊二醛，二乙烯基砜和，在碱性条件，双和多环氧化物。优选该交联剂含有疏水性烃链段，例如

1,2,3,4-二环氧基丁烷，或最优选1,2,7,8-二环氧基辛烷。

为了形成酯键，该交联剂优选选自多元醇，碳化二亚胺，聚酐类，羧酰氯和，在酸性条件，双和多环氧化物。优选该交联剂含有疏水性烃链段，例如1,2,3,4-二环氧基丁烷，或最优选1,2,7,8-二环氧基辛烷。

酰胺键优选是通过使用选自碳化二亚胺(在胺存在下)、羧酸酐和羧酰氯(对于脱乙酰的HA)和二异氰酸酯的交联剂来形成的。

胺键优选是在脱乙酰化HA中的氨基存在下使用选自环氧化物或有还原剂的戊二醛的交联剂来形成的。

亚氨基键(席夫碱键)是在脱乙酰化HA中的氨基存在下使用戊二醛来形成的。

砜键优选使用磺酰氯形成的。

在本发明的一个实施方案中，不同的官能键能够在多步骤方法中顺序形成，这可通过在每一阶段中使用不同的交联剂或在每一阶段中使用同样的交联剂以及调节反应条件控制所需的特定交联反应来实现。

因此，为了在根据本发明的逐步方式中实现多重(例如双重)交联，第一次交联反应例如通过使用下述方法中的一种来进行。当这次反应结束时，或根据需要进一步延续时，将另外的交联剂加入到反应混合物中以进行第二次交联。另外的交联剂可与第一次的相同或不同。当使用不同的交联剂时，通常要求在不改变反应条件的前提下作出选择，它将形成不同类型的官能键。然而，当使用同样的交联剂来形成两种交联时，应该调节反应条件以形成不同类型的键。所属领域中的那些技术人员能够容易地选择合适的交联剂和合适的反应条件以形成所需要的键。

为了免除疑问，应该指出的是，如果在每一步骤中在同样反应条件下使用同样的交联剂，则导致形成仅仅一种键，即得到单种交联的产物，虽然在两个或多个步骤中生产的。

可以认识到的是，当顺序形成根据本发明的两种或多种官能键时，即在多步反应中，在第一反应阶段中形成的交联键应该足够强以便能够承受为形成第二或后续交联所需要的反应条件。因此，应该首先形成两种(或多种)键中的较强者。这对于所属领域的技术人员是显而易见的和

如果必要，能够通过常规的实验来确定。

因此，当利用羟基和羧基形成交联时，可以想到，第一阶段的交联应该利用羟基来进行以形成醚键和第二阶段的交联则利用羧基来进行以得到酯键。

醚键可通过在碱性条件下，优选在10或10以上的PH值下使用环氧化物交联剂来形成，或如果需要HA不含游离氨基，在酸性条件下例如在PH4或4以下使用戊二醛作为交联剂来形成。酯键可在酸性条件下(例如PH4或4以下)使用环氧化物交联剂来形成。

因此，例如，形成醚键的第一交联反应可在碱性条件下，优选在10或10以上的PH值下，例如在PH10至PH12范围内，使用环氧化物如1,2,7,8-二环氧基辛烷来进行。形成酯键的第二交联反应随后可使用同样的交联剂和调节反应介质的PH值到pH4或4以下，例如在PH4至PH2范围内来进行。另外，在每一步骤可使用不同的交联剂，在这种情况下没有必要调节反应条件。因此，例如，通过在酸性条件下使用戊二醛形成醚键，随后也在酸性条件下与环氧化物交联剂反应形成酯键，来进行第一交联反应。

在该方法的每一阶段中交联剂与HA的比率一般是在1:10到10:1(按重量计)范围内。

根据所属领域中已知的方法进行各个交联反应。

因此，用作起始原料的HA可以是膜形式或溶液形式。

当使用HA膜时，可将它与交联剂一起悬浮于合适的溶剂中。该反应介质优选包括与酸性或碱性水溶液混合的有机溶剂如丙酮，氯仿，或醇，例如乙醇或异丙醇。酸性水溶液优选具有4或4以下的PH值，碱性水溶液优选具有10或10以上的PH值。该交联反应适宜在15－30℃范围内的温度下进行，例如在环境温度下。

优选，当HA膜用作起始原料时，首先在碱性条件下用环氧化物或如果没有游离氨基存在的话在酸性条件下用戊二醛形成醚交联键，随后在酸性条件下使用环氧化物形成酯交联键。如果HA脱乙酰产生游离氨基，能够在酸性条件下使用戊二醛形成具有亚氨基键的席夫碱。亚氨基键能够使用还原剂转化成胺键。

HA也可以用作加入交联剂的酸性或碱性水溶液。在酸性条件下起始溶液的PH值优选是PH4或4以下和对于碱性溶液而言PH值优选是PH10或10以上。HA的浓度适宜在1－10%w/w范围内。该反应适宜在15－50℃范围内的温度下进行。交联反应的结束时间一般是约1小时至几天。

优选地，当使用HA的溶液时，首先在碱性条件下用环氧化物形成醚交联键，随后在酸性条件下使用环氧化物(优选与第一步中相同的环氧化物)形成酯交联键。

另外，HA溶液可以经历第一次交联反应，中间产物经过干燥形成膜和该膜进行如上所述的进一步交联反应得到膜形式的双重交联产物。优选，为了根据这一程序获得双重交联的HA衍生物，首先在碱性条件下用环氧化物形成醚交联键，随后在酸性条件下使用环氧化物(优选与第一步的环氧化物相同)形成酯交联键。

在本发明的另一实施方案中，HA的多重交联，尤其双重交联，可通过HA同时与适合在同样条件下交联两种不同官能团的两种不同交联剂接触，在单个步骤的反应中进行。因此，例如，为了在单个步骤中同时形成醚和酯基，HA与戊二醛和1,2,7,8-二环氧基辛烷的混合物接触。

在该方法的每一阶段中交联剂与HA的比率一般是在1:10到10:1(按重量计)范围内。

产物的准确性质可通过适当选择反应条件以控制交联度和进而控制产物的性能来变化。影响交联度和进而影响最终产物的性质的因素包括所使用的HA起始原料的形式，交联剂与HA的进料比，反应时间，温度和PH。该产物能够以凝胶或膜形式获得并可以是透明或不透明的。该吸水能力和生物稳定性将取决于产物的准确性质来变化。

根据本发明的产物能够通过使用溶液、膜或片形式的HA起始原料并在无搅拌下进行该方法而能够以膜或片形式获得。可以想到的是，当HA以膜或片形式使用时，在放入水溶液如PBS缓冲液中时它吸收水，进而溶胀形成凝胶。如果需要，在第一个交联步骤之后任选形成中间产物膜，如上所述。该产物可以是透明或不透明的，这取决于产生的交联度。高度交联的HA产物一般是不透明的和甚至是白色的。

凝胶形式的本发明产物可通过例如如上所述制备的膜的水合来获得。如有必要，该膜可分成小片以有利于吸收水。

为了获得不透明凝胶形式的本发明产物，该HA起始原料能够以溶液、膜或片形式使用，整个过程在搅拌下和在任何阶段没有形成膜的情况下进行。

无论使用哪一个交联方法，该反应的完成是通过现有技术中已知的方法由常规方式控制的，例如，通过中和反应混合物终止该反应和溶剂沉淀获得具有所需交联度的产物。

最终的产物可由常规方法从反应介质中分离出来。

在一个优选实施方案中本发明提供制备双重交联的HA的方法，该方法包括让HA与一种或多种交联剂在适合于在HA分子之间形成两种不同的键的条件下进行接触。优选这些交联反应是顺序进行。因此，本发明的该两阶段方法包括:

(a) 利用第一官能团让HA交联，和随后

(b) 利用第二种官能团进一步使(a)的产物交联，其中第一和第二官能团代表不同的化学实体。

可以理解，当要求含超过两种的不同的交联的产物时，它可以通过如上所述的顺序的或同时的交联反应的适当的结合来制备。

根据本发明制备的交联的HA含有至少两种类型的交联键，例如醚键和酯键。

可以相信，根据本发明制备的多重(例如双重)交联的HA衍生物本身是新型的。因此，在再一方面，本发明提供了可由前面所述的方法获得的多重交联的HA(即HA利用两种或多种不同的官能键交联)。优选本发明提供通过上述方法获得的双重交联的HA。

在再一方面，本发明提供交联至其本身(即另一HA分子)上的HA，其中HA利用至少两种不同类型的键进行交联。优选HA是双重交联的HA。

根据本发明的双重交联的HA可具有在10－50 %，例如15－30%，优选20－25%范围内的交联度(其中100%表示所有在C6位的OH基和所有在C5位的COOH基团的交联)。交联度可通过元素分析或固态NMR分析测量。

不同的官能键在产物的比率将根据所存在的官能键的类型和用于形成它们的反应条件来变化。对于含有醚和酯键的双重交联的产物，这些键的比率可在50:50到95:5，例如60:40到80:20的醚:酯键范围内变化。

一般来说，根据本发明的产物具有更高的交联度，也就是说，比单种交联的HA有更致密的交联网络。较高的交联度已经被发现会降低交联HA的吸水能力，导致在水溶液中更大的稳定性。另外，已经发现双重交联的HA在抵抗透明质酸酶的降解作用和防止由于自由基的降解作用方面显示出更大的稳定性，说明提高了生物稳定性。

本发明的不透明物产物一般比透明产物具有更高的交联度和因此更低的吸水能力和更高的稳定性。这样的产物适合于长期植入。

根据本发明的透明产物例如透明膜具有比不透明产物更高的吸水能力，此类产物特别地适合于皮肤植入、伤口愈合(渗出液的吸收)和可再吸收的短期植入物。

当需要具有较低吸水能力的高度交联的产物时，以上描述的该多步方法是优选的。同时的交联通常导致获得水不溶性的产物，但是比在类似条件下使用多阶段(例如两阶段)方法制备的产物有更高的吸水能力。

此外已经发现，使用第一次交联的HA膜用于第二次交联步骤可提供一种产物(它可以是膜形式或可转化成凝胶)，该产物比在类似交联条件下(即没有中间膜的形成)从HA溶液制备的双重交联HA产物有更低的吸水能力。的确已经发现，所获得的产物的吸收能力分别对于膜和凝胶起始原料能够在400%到1000%范围内变化。

根据本发明的交联HA衍生物可用于各种药物、医学(包括外科)和化妆品应用中。

因此，它们例如可用于促进伤口愈合，例如用作皮肤的伤口敷料。

它们也可用于防止粘合，例如在外科手术之后防止在器官之间的组织生长。

根据本发明的交联HA衍生物还发现可用于眼科领域中，例如用于玻璃体液置换，作为输送药物到眼内的角膜贴片或用作晶状体。

根据本发明的交联HA衍生物也可用于外科领域中，例如作为硬组织

增长的固体植入物(例如软骨或骨骼的修复或置换)，或用于软组织增长，作为乳房填充物，或用作希望长期在身体内使用的植入物的涂层，这些植入物例如有乳房填充物、导管、插管、骨骼修补物、软骨替代物、微型泵和其它药物输送装置、人工脏器和血管、组织增强用的网等。它们也可用作关节润滑剂用于关节炎的治疗。

本发明的衍生物的进一步用途是在于包括在任何前述应用中的治疗活性剂的输送。治疗活性剂可以是化学治疗剂或生物学上的活性因子(例如细胞素)并包括消炎剂，抗生素，止痛药，麻醉剂，伤口愈合促进剂，细胞生长抑制剂，免疫刺激剂，免疫抑制剂和抗病毒药。

该治疗活性因子能够通过现有技术中已知的方法结合于交联的HA衍生物上。

该交联的HA衍生物可以许多形式使用，其中包括薄膜、珠粒、海绵、管、片和成形的植入物。

附图说明

图1是未改性的纯透明质酸的NMR谱图。

图2是按实施例3的方法制备但没有进行第二次交联的样品的NMR谱图。

图3是按实施例2的方法制备的样品的NMR谱图（1毫秒接触时间）。

图4是按实施例2的方法制备的样品的NMR谱图（5毫秒接触时间）。

具体实施方式

现在通过下列非限制性的例子来说明本发明。

下列方法用于测量产物的稳定性。

方法

吸水能力的测量

将20mg (Wd)的每种干燥的交联样品在PBS(磷酸盐缓冲盐水)配方缓冲溶液中浸泡24小时以获得完全溶胀的凝胶。过滤出湿凝胶和使用纱纸除去表面上的残余水。将湿凝胶称量得到Ws。因此，吸水能力(WAC)(%)能够根据下式来计算:

$$WAC(\%)=(Ws-Wd)/Wd \times 100$$

耐透明质酸酶消化的功能

将20mg交联HA悬浮在含有1000U透明质酸酶的6ml PBS缓冲溶液(PH=7.2)中并在37℃下培养24小时。在那之后，取出该膜和用PBS缓冲液漂洗，收集全部的漂洗溶液获得总共10mL溶液。这一溶液被煮沸30分钟得到透明质酸酶沉淀物。该溶液然后在4000rpm/10min下离心处理。在容量瓶中使用PBS溶液将上层清液补充至25 ml。使用咔唑(Carbazole)分析测量HA浓度。

通过使用下式能够计算由于透明质酸酶消化所引起的HA重量损失:

HA重量损失(%) = [HA] × 25/$[HA]_0$ x 100

其中[HA]是HA的浓度，$[HA]_0$是初始HA含量(mg)。

抵抗自由基的能力

Ferton试剂用于产生自由基，它们是由25微升0.1抗坏血酸和0.25微升0.1M H_2O_2在5ml PBS溶液中形成的。将20mg的干燥样品加入到这一用于消化的溶液中。消化时间是在37℃下24小时。在此之后，取出该膜和用PBS缓冲液漂洗，收集全部的漂洗溶液，在容量瓶中使用PBS溶液补充至25mL。使用咔唑分析测量HA浓度。使用与透明质酸酶消化同样的公式可以计算HA重量损失。

实施例1

由HA膜形成双重交联的HA膜

将5ml HA(1%)在室温下流延4天得到HA膜。将得到的膜悬浮于$CHCl_3$溶剂/酸性或碱性溶液/1,2,7,8-二环氧基辛烷或戊二醛交联剂的混合物中。交联反应在室温下进行固定时间(24小时)。再加入一定量的交联剂，和如果需要调节pH，混合物在室温下再放置24小时，从完成第二次交联反应。详细的交联条件示于表1中。交联之后，样品用IPA和丙酮洗涤3次，浸入IPA/去离子水(60/40)中过夜，然后用丙酮洗涤并在37℃炉中干燥至恒重。

表1 从HA膜形成交联的HA（CHA）

	第一交联剂		第二交联剂		时间	温度	pH	吸水容量
	名称	进料比*	名称	进料比*	（小时）	（℃）		（%）
CHA-2	G	2.5/1	E	0.75/1	24h/24h	RT	H+	414.4
CHA-8	E	0.75/1	E	0.75/1	24h/24h	RT	OH-/H+	403.0
CHA-3	G	2.5/1	E	0.75/1	24h/24h	RT	H+/OH-	4430.0
CHA-5	E	0.75/1	G	2.5/1	24h/24h	RT	H+	1017.2
CHA-9	E	0.75/1	G	2.5/1	24h/24h	RT	OH-/H+	4400.0
参考实施例								
CHA-1	G	2.5/1	G	2.5/1	24h/24h	RT	H+	11132.5
CHA-4	E	0.75/1	E	0.75/1	24h/24h	RT	H+	781.9
CHA-6	E	0.75/1	E	0.75/1	24h/24h	RT	H+/OH-	溶解的
CHA-7	E	0.75/1	E	0.75/1	24h/24h	RT	OH-	11989.1

* 进料比：HA与交联剂的重量比

E:=1,2,7,8－二环氧基辛烷；G:=戊二醛

H＋代表pH约4，OH－代表pH约10

CHA－1，CHA－4和CHA－7都在每一交联步中采用相同的条件制备，得到仅一个醚键（单次交联）。

实施例2

由HA溶液形成双重交联的HA凝胶

将0.1g HA溶于0.25N NaOH溶液或0.25N HCl溶液中得到浓度10％或2.5%的HA溶液。加入交联剂并机械搅拌混合物。第一次交联反应在40℃进行约2小时。第二次交联反应采用另外量的相同交联剂进行，并调节反应条件。详细的反应条件列于表2。交联后，形成的凝胶用IPA、丙酮冲洗和用IPA/水提取过夜，然后用IPA和丙酮分别洗涤3次。样品在37℃炉中干燥至恒重。获得不透明的凝胶产品。

表2 从HA溶液形成交联的HA（CHA）

	第一交联剂		第二交联剂		时间	温度	pH	吸水容量
	名称	进料比*	名称	进料比*	（小时）	（℃）		（%）
CHA-11	E	1/1	E	1/1	2h/2h	40	OH-/H+	390.0
CHA-10	E	1/1	E	1/1	2h/2h	40	OH-/OH-	620.0
CHA-12	E	1/1	E	1/1	2h/2h	40	H+/OH-	1830.0
CHA-13	E	1/1	E	1/1	2h/2h	40	H+/H+	溶解的

E: 1，2，7，8－二环氧基辛烷

H＋代表pH约4; OH－代表pH约10

实施例3

通过HA膜从HA溶液形成双重交联的HA（CHA）

将0.1g HA溶于0.25N NaOH溶液或0.25N HCl溶液以获得浓度为10％或2.5％的HA溶液。加入交联剂，在替陪氏培养皿中在少许或无搅拌的条件下进行反应。第一次交联反应在室温下进行约48或72小时。干燥中间产物得到膜或片（取决于厚度）。第二次交联采用实施例1中所述的方法进行。详细的反应条件列于表3中。交联后，产品用IPA和丙酮洗涤（×3次）并用IPA/水提取过夜，然后用丙酮冲洗。样品在37℃炉中干燥至恒重，获得膜或片形式的产品。

表3 通过HA膜从HA溶液形成交联的HA（CHA）

	第一交联剂		第二交联剂		时间	温度	pH	吸水容量
	名称	进料比*	名称	进料比*	（小时）	（℃）		（%）
CHA-17	E	0.375/1	E	0.5/1	72/24	RT	OH-/H+	403.2
CHA-19	E-1	0.375/1	E	0.5/1	72/24	RT	OH-/H+	1030.0
CHA-14	E	0.375/1	/	/	72	RT	中性	2419.1
CHA-15	E	0.375/1	/	/	72	RT	H+	2128.3
CHA-16	E	0.375/1	/	/	72	RT	OH-	1318.6
CHA-18	E-1	0.375/1	/	/	72	RT	OH-	2600.4

E: 1，2，7，8－二环氧基辛烷；E－1：表氯醇

H+代表pH约4; OH-代表pH约10

表4 交联的HA抵抗透明酸酶和自由基的生物稳定性

NO	重量损失（%）	
	透明质酸酶消化	Ferton消化(自由基)
CHA-16	10. 45±0.21	7.89±1.92
CHA-17	1.45±0.92	5.63±2.73

实施例4

将0.1g HA溶于2ml 1N NaOH溶液中过夜得到5% HA碱性溶液。向该溶液中加入2ml 1,2,7,8-二环氧基辛烷。然后加入0.2ml氯仿同时在40℃搅拌30分钟。在形成醚交联键后，加入2.2ml 1N HCl将溶液的pH改变为3-4。再加入0.2ml 1,2,7,8-二环氧基辛烷和0.2ml氯仿同时在40℃下搅拌30分钟。在形成酯交联键后，用20ml丙酮沉淀形成的凝胶并且按实施例2中所述的相同程序纯化。

实施例5

向5ml HA/NaOH（1N）溶液中加入0.5ml表氯醇和0.2ml氯仿并在室温下混合10分钟。该溶液在替陪氏培养皿上流延并干燥成为交联的HA膜（CHA-18）。在用1N HCl中和后，将CHA-18样品悬浮于20ml氯仿/0.1N酸性水溶液（3/1 v/v）中，并且加入0.2ml 1,2,7,8-二环氧基辛烷并在室温下反应24小时。所得的样品CHA-19按实施例1中所述的相同的程序纯化。

实施例6

将20ml 2.5% HA/NaOH(1.0N)溶液与不同体积的1,2,7,8-二环氧基辛烷在搅拌下混合5分钟。然后将混合溶液铺展于7cm尺寸的聚苯乙烯非胶原涂布的带盖替陪氏培养皿上。在室温下24小时后，移去盖，交联的凝胶干燥48小时。具有可控厚度的干膜用丙酮/HCl溶液中和，并用丙酮/H_2O、丙酮和IPA纯化。然后将第一交联的片状材料放入pH5的丙酮/HCl溶液和

0.4ml 1,2,7,8-二环氧基辛烷中在室温下另外交联24小时。所得的片用丙酮/水、丙酮、和IPA/水、IPA纯化几次。

所得的双重交联的HA片不溶于水并且吸取10倍的水形成透明的凝胶。它总是体现十分好的机械强度，这对组织工程是十分重要的。

HA样品的固态^{13}C NMR分析

透明质酸原（hyaluroan）和双重交联样品的固态^{13}C NMR分析是采用Advance 200光谱仪在50MHz下进行的。采用1毫秒的接触时间按标准的交叉偏振（CP）脉冲序列获得的谱图示出图1－3中。采用5毫秒的接触时间也获得了含有内标物四（三甲基）硅烷（TKS，化学位移3.2ppm）的第3号样品的谱图（见图4）。参照TKS分配峰如下。

	化学位移，ppm
羧基和乙酰基中C＝O	170-180
改性样品酯基中的C＝O	165-170(肩峰)
C_1	95-110
改性剂中的C_2－C_5加OCH和OCH_2	65-90
C_6	60-65
C－N	53-60
改性剂中未键接至O上的CH_2	20-40
乙酰基中的CH_3	20-25

样品1（图1）是没改性的纯透明质酸。样品2和3的实际配方示于下表中:

	第一交联				第二交联			
	进料比	pH	反应温度(℃)	反应时间(小时)	进料比	pH	反应温度(℃)	反应时间(小时)
样品2	3/1	10	RT	72				
样品3	1/2	10	RT	2小时	1/2	4	RT	2小时

样品2（图2）是按实施例3的方法制备的，但没有进行第二次交联。进料比是HA与1,2,7,8-二环氧基辛烷的量之比。形成的膜冲成用于NMR分

析的细筛网。

样品3(图3和4)是按实施例2的方法制备的凝胶，它磨成细粉用于NMR分析。

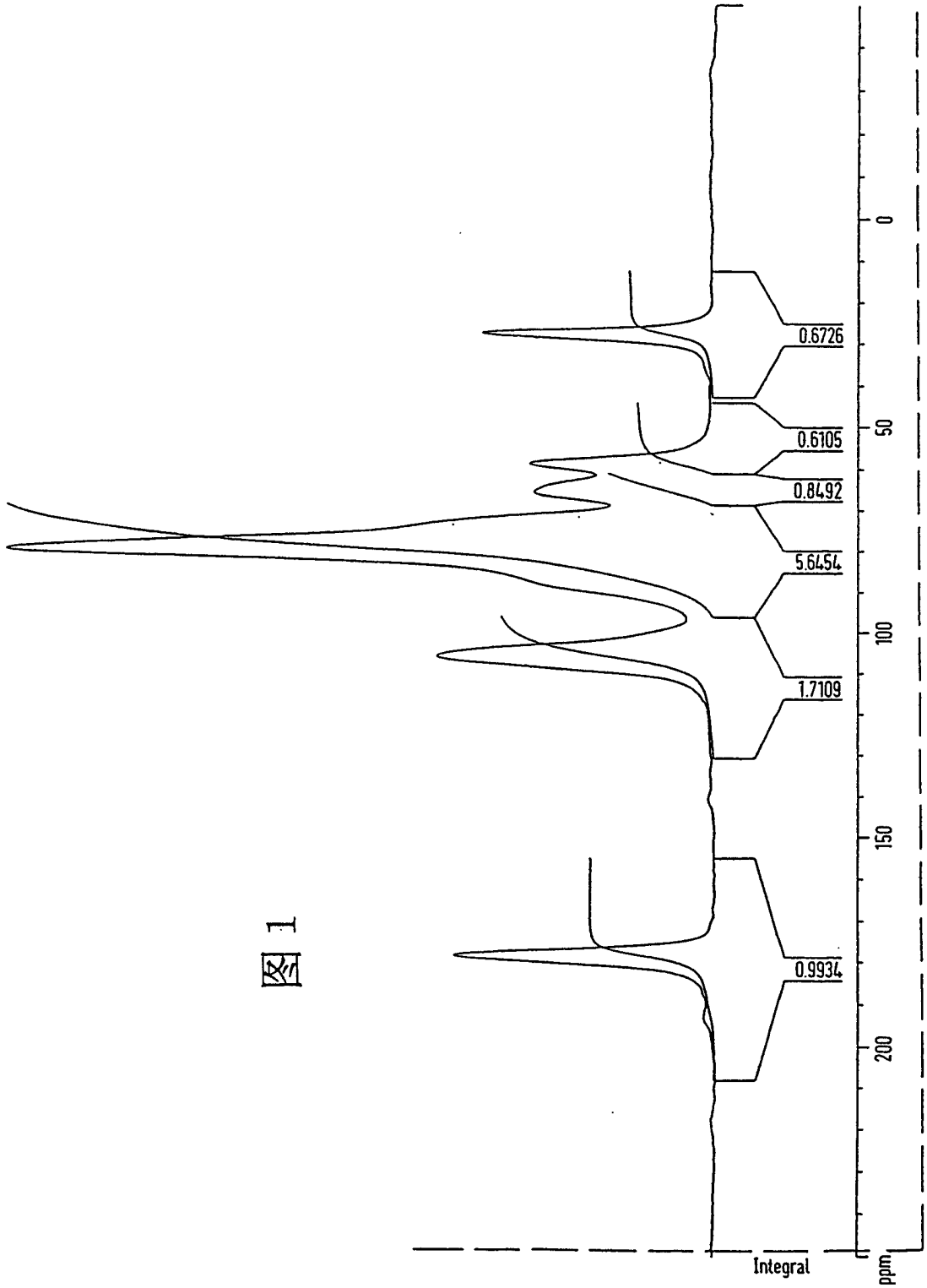
0.6726
0.6105
0.8492
5.6454
1.7109
0.9934
0
50
100
150
200
Integral
ppm

图 1

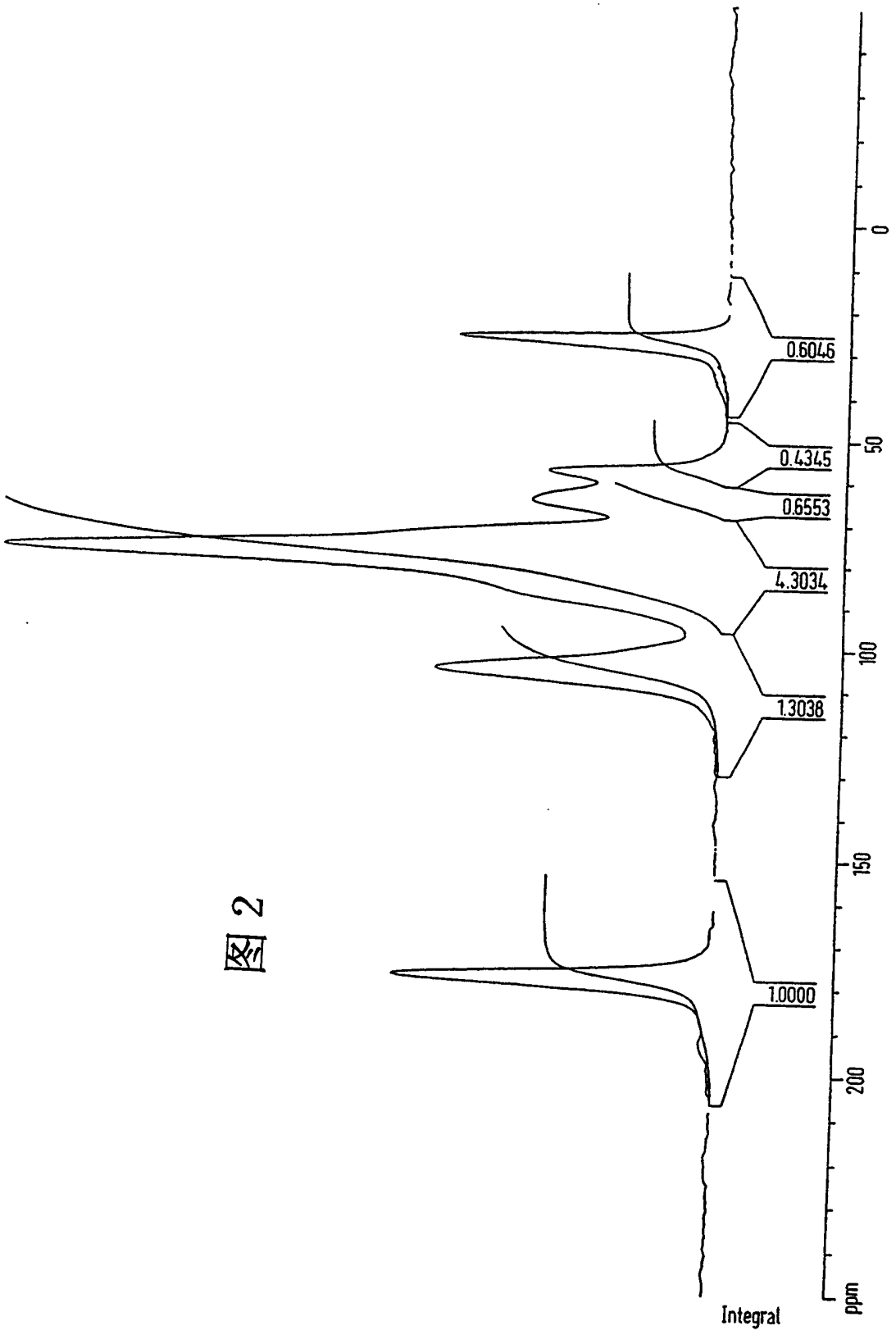
0.6046
0.4345
0.6553
4.3034
1.3038
1.0000
Integral
0
50
100
150
200
ppm

图 2

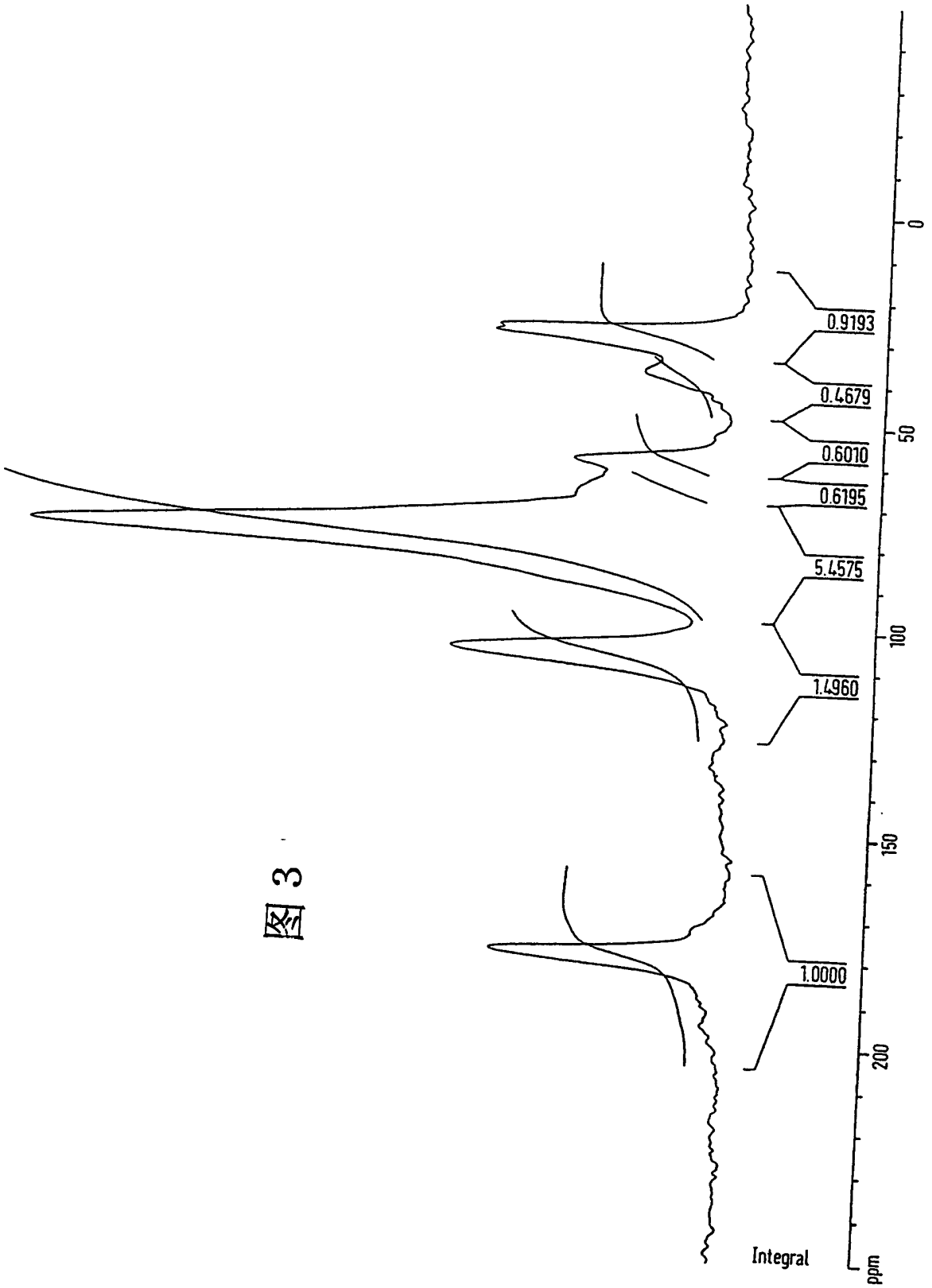
0.9193
0.4679
0.6010
0.6195
5.4575
1.4960
1.0000
Integral
ppm
0
50
100
150
200

图 3

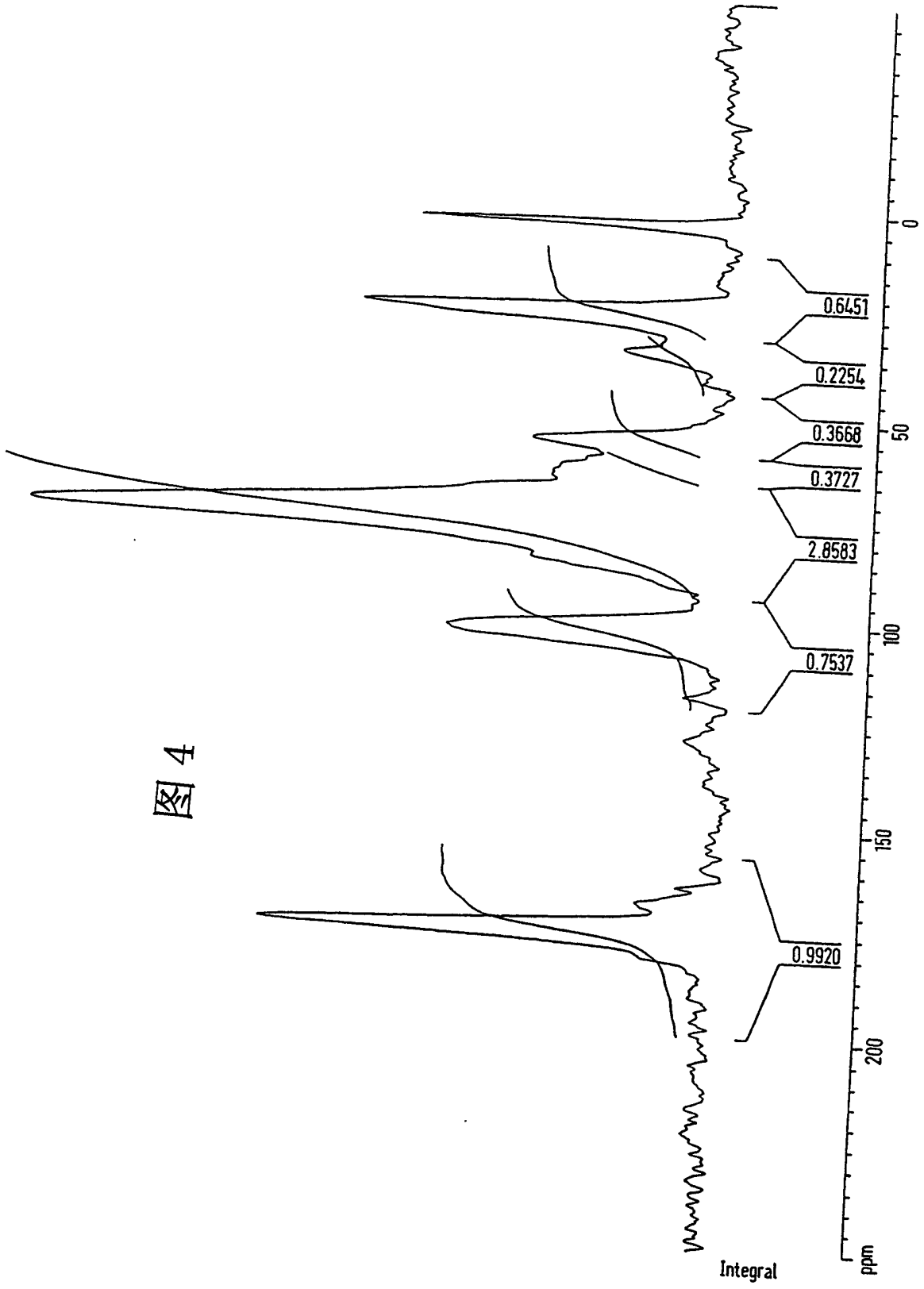
0.6451
0.2254
0.3668
0.3727
2.8583
0.7537
0.9920
Integral
0
50
100
150
200
ppm

图4