(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 101501075 B
(45)授权公告日 2013.07.10

(21)申请号 200780029157.5
(22)申请日 2007.07.13
(30)优先权数据
PA200601034 2006.08.04 DK
(85)PCT申请进入国家阶段日
2009.02.04
(86)PCT申请的申请数据
PCT/DK2007/000358 2007.07.13
(87)PCT申请的公布数据
WO2008/014787 EN 2008.02.07
(73)专利权人 诺维信生物制药丹麦公司
地址 丹麦鲍斯韦
(72)发明人 克里斯托弗·托梅拉斯
卡迪加·施瓦克-阿卜杜拉奥伊
(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所 11105
代理人 封新琴
(51)Int.Cl.
C08B 37/00(2006.01)

(56)对比文件
CN 1468262 A,2004.01.14, 实施例4.
Crescenzi等.New cross-linked and sulfated derivatives of partially deacetylated hyaluronan:Synthesis and preliminary characterization.《Biopolymers》.2002,86-94.

审查员 丛丽晓

权利要求书1页 说明书7页 附图1页

(54)发明名称

支化透明质酸和制造方法

(57)摘要

一种支化透明质酸,其中线性主链包含其中的一个或多个N-乙酰-葡糖胺已经脱乙酰为葡糖胺的透明质酸,分支侧链与所述脱乙酰的葡糖胺的伯胺共价连接,由此形成仲胺;一种用于产生所述支化透明质酸的前体;和一种用于产生所述支化透明质酸的方法。

CN 101501075 B

1. 支化透明质酸，其中线性主链包含其中的一个或多个 N- 乙酰 - 葡糖胺已经脱乙酰为葡糖胺的透明质酸，分支侧链与所述脱乙酰的葡糖胺的伯胺共价连接，由此形成仲胺，其中，所述分支侧链是透明质酸，而且所述线性透明质酸主链中 50％或更少的 N- 乙酰 - 葡糖胺脱乙酰为葡糖胺。

2. 用于产生支化透明质酸的方法，所述方法包括步骤：

a) 提供线性透明质酸主链，其中一个或多个 N- 乙酰 - 葡糖胺已经脱乙酰为葡糖胺，使得该线性透明质酸主链中 50％或更少的 N- 乙酰 - 葡糖胺脱乙酰为葡糖胺；和

b) 将包含至少一个游离的还原性醛基的生物相容性聚合物与 (a) 的一个或多个葡糖胺的伯胺通过还原性 N- 烷基化进行反应；从而形成支化透明质酸，其中所述生物相容性聚合物是透明质酸。

3. 权利要求 2 的方法，其中所述线性透明质酸主链具有 10-3,000 千道尔顿的平均分子量。

4. 权利要求 2 的方法，其中所述还原性 N- 烷基化反应在氰基硼氢化钠 $NaCNBH_3$ 存在下进行。

5. 权利要求 4 的方法，其中所述还原性 N- 烷基化反应在 pH 值为 4-10 进行。

6. 组合物，其包含如权利要求 1 中限定的支化透明质酸和活性成分。

7. 根据权利要求 6 的组合物，其还包含水溶性赋形剂。

8. 药物组合物，其包含有效量的如权利要求 1 中限定的支化透明质酸作为运载体，以及药理活性剂。

9. 一种化妆品，其包含如权利要求 1 中限定的支化透明质酸，或如权利要求 6-8 中任一项限定的组合物。

10. 一种化妆品，其包含有效量的如权利要求 1 中限定的支化透明质酸或如权利要求 6-8 中任一项限定的组合物作为活性成分。

11. 在皮肤施用化妆品的方法，其包括使用如权利要求 1 中限定的支化透明质酸，或如权利要求 6-8 中任一项限定的组合物。

12. 如权利要求 1 中限定的支化透明质酸或如权利要求 6-8 中任一项限定的组合物用于制备保湿剂的用途。

支化透明质酸和制造方法

发明领域

[0001] 本发明涉及通过还原性烷基化来支化脱乙酰透明质酸 (deHA),同样涉及支化透明质酸 (branched hyaluronic acid),还涉及它们的应用和用途,特别是在化妆品和生物医学工业中。

[0002] 发明背景

[0003] 人体最丰富的杂多糖是糖胺聚糖 (glycosaminoglycan)。糖胺聚糖是无支链的糖聚合物,由重复的二糖单元组成 (仅硫酸角质素在糖的核心区是分支的)。所述二糖单元通常包含两种修饰的糖 -N- 乙酰半乳糖胺 (GalNAc) 或 N- 乙酰葡糖胺 (GlcNAc) 之一,作为第一糖单元。另一单元通常是糖醛酸,例如葡糖醛酸 (GlcUA) 或艾杜糖醛酸 (iduronate)。

[0004] 糖胺聚糖是负电分子,并且在溶液中 (in solution) 时具有赋予高粘性的延伸构象。糖胺聚糖主要位于细胞表面上或胞外基质中。糖胺聚糖在溶液中还具有低压缩性,并因此是理想的生理润滑液体,例如关节 (joint)。糖胺聚糖的刚性为细胞提供结构的整体性并且提供细胞之间允许细胞迁移的通道。具有最高生理重要性的糖胺聚糖是乙酰透明质酸 (hyaluronan)、硫酸软骨素、肝素、硫酸乙酰肝素、硫酸皮肤素和硫酸角质素。多数糖胺聚糖通过特异的寡糖结构共价结合至蛋白聚糖核心蛋白。乙酰透明质酸与某些蛋白聚糖形成大聚集体 (large aggregate),但例外是游离糖链与蛋白聚糖形成非共价复合体。

[0005] 已鉴定了乙酰透明质酸在人体中的许多功能 (参见, Laurent T.C. 和 FraserJ. R.E.,1992,FASEB J.6 :2397-2404 ;和 Toole B.P.,1991,“Proteoglycans andhyaluronan in morphogenesis and differentiation.”In :Cell Biology of theExtracellular Matrix,第 305-341 页, Hay E.D.,编著, Plenum, New York)。乙酰透明质酸存在于透明软骨、滑膜关节液 (synovialjoint fluid) 以及真皮和表皮皮肤组织中。还猜测乙酰透明质酸在许多生理功能,例如粘附、发育、细胞运动性、癌症、血管发生和愈伤中具有作用。由于乙酰透明质酸独特的物理和生物特性,将其使用在眼外科和关节外科中,并且正在其它医学方法中对其进行评估。

[0006] 术语“乙酰透明质酸”或“透明质酸”用于文献中的意思是由 D- 葡糖醛酸和 N- 乙酰 -D- 葡糖胺 (D-glucuronic and N-acetyl-D-glucosamine acid) 的残基组成的具有不同分子量的酸性多糖,其天然存在于细胞表面、脊椎动物结缔组织的基础胞外物质 (basic extracellular substance)、关节的滑膜液、眼球内液 (endobulbar fluid ofthe eye)、人脐带组织和鸡冠 (cocks’comb) 中。

[0007] 术语“透明质酸”事实上通常用做意指具有不同分子量的带有交替 D- 葡糖醛酸和 N- 乙酰 -D- 葡糖胺残基的全系列多糖,或甚至其降解的级分,并且因此看上去使用复数术语“透明质酸”会更加恰当。然而该单数术语将仍然用在本说明书中 ;另外,缩写“HA(hyaluronic acid ;透明质酸)”将频繁地使用以代替此集合术语。

[0008] HA 在生物体中扮演重要的角色,作为许多组织 (例如皮肤、腱、肌肉和软骨) 的细胞的机械支持,它是胞间基质的主要成分。HA 在生物过程中同样扮演其它重要的角色,例如组织的湿润,以及润滑作用。

[0009] HA 可从上述天然组织中提取，尽管现今优选通过微生物方法制备 HA 以最小化传递传染剂的潜在风险，并且提高产品的均匀性、质量和可用性。

[0010] 已将 HA 和它不同分子大小的级分和它们各自的盐用作药物，特别在治疗关节病 (arthropathy) 方面；作为天然器官和组织的辅助和 / 或替代物，特别在眼科学和整容手术方面；以及作为化妆品制品中的作用剂 (agent)。也已开发了乙酰透明质酸的产品用于整形外科学 (orthopaedics)、风湿病学 (rheumatology) 和皮肤病学 (dermatology)。

[0011] HA 也可以作为多种用于卫生和外科物品的聚合材料 (例如聚氨酯、聚酯等) 的添加剂使用，具有赋予这些材料生物相容性的作用。

[0012] 使用肼进行的 HA 脱 N- 乙酰化已经在文献中有述 (Crescenzi 等 (2002)New cross-linked and sulfated derivatives of partially deacetylated hyaluronan : Synthesis and preliminary characterization, Biopolymers 64,86-94)。

[0013] 已经描述了通过还原性 HONO 降解和还原性 N- 烷基化来支化壳聚糖 (Tømmeraas 等 (2002)Carbohydrate Research 337,2455-2462)。

[0014] 发明概述

[0015] 对开发具有理想性质的新的生物相容性生物聚合物存在需求，所述性质例如与线性 HA 相比改进的粘弹性，例如，对剪切稀化 (shear thinning) 或离子强度变化较不敏感，或比相同 MW 的线性 HA 更低的粘性。相信这些性质在生物机械植入物 (biomechanical implant) 和在先进的化妆品、生物医学和药物配方中是有价值的。感兴趣的其它性质是改进的稳定泡沫的能力和与非亲水性材料混合的能力，例如通常使用在化妆品中。

[0016] 在第一方面，本发明提供支化透明质酸，其中线性主链包含其中的一个或多个 N- 乙酰 - 葡糖胺已经脱乙酰为葡糖胺的透明质酸，分支侧链与所述脱乙酰葡糖胺的伯胺共价连接，由此形成仲胺。

[0017] 本发明的第二方面涉及进入第三方面的方法的前体分子或中间分子，即部分或全部脱乙酰的透明质酸 (dHA)，其中一个或多个 N- 乙酰 - 葡糖胺已经脱乙酰为葡糖胺。

[0018] 在第三方面，本发明提供用于产生支化透明质酸的方法，所述方法包括步骤 :

[0019] a) 提供线性透明质酸主链，其中一个或多个 N- 乙酰 - 葡糖胺已经脱乙酰为葡糖胺 ; 和

[0020] b) 将包含至少一个游离的还原性醛基的生物相容性聚合物与 (a) 的一个或多个葡糖胺的伯胺通过还原性 N- 烷基化进行反应 ; 从而形成支化透明质酸。

[0021] 在第四方面，本发明涉及组合物，其包含如第一方面中限定的支化透明质酸，和活性成分，优选所述活性成分是药理活性剂。

[0022] 本发明的第五方面涉及药物组合物，其包含有效量的如第一方面限定的支化透明质酸，以及可药用的 (pharmaceutically acceptable vector) 载体、赋形剂或稀释剂。

[0023] 第六方面涉及药物组合物，其包含有效量的如第一方面限定的支化透明质酸作为运载体 (vehicle)，还包含药理活性剂。

[0024] 第七方面涉及化妆品，其包含作为活性成分的有效量的如第一方面限定的支化透明质酸，或如第二、第三或第四方面中任一方面限定的组合物。

[0025] 在第八方面中，本发明涉及卫生、医学和外科用品，其包含如第一方面限定的支化透明质酸，或如第二、第三或第四方面限定的组合物，优选所述物品是尿布 (diaper)、卫生

巾 (sanitary towel)、外科海绵 (surgical sponge)、愈伤海绵 (wound healing sponge)，或者包含在急救绷带 (band aid) 或其他创伤敷裹材料中的部分。

[0026] 一个重要的方面涉及药物胶囊或微胶囊，其包含如第一方面中限定的支化透明质酸或如第四至第六方面中任一方面中限定的组合物。

[0027] 本发明最后的方面涉及在眼科学中、在骨关节炎或癌症的治疗中执行程序的方法；处理创伤的方法；进行药理活性剂的皮肤施用或透皮施用，或化妆品的皮肤施用的方法的改进，所述改进包括使用如第一方面中限定的支化透明质酸，或者如第三至第六方面中任一项限定的组合物。

[0028] 多个方面涉及如第一方面中限定的支化透明质酸，或者如第四至第六方面中任一项限定的组合物的用途，用于制备治疗骨关节炎、癌症的药物，制备用于眼科治疗的药物，制备用于创伤处理的药物，制备用于血管发生的药物，或制备保湿剂 (moisturizer)。

[0029] 附图简述

[0030] 图 1 显示收缩因子 (contraction factor) ‘g’作为透明质酸分子量的函数 ($g = (R_{g,分支的})^2/(R_{g,线性的})^2$) 的图。小于 1 的 g 值说明聚合物的支化。如该图所示，收缩因子随着分子量的增加而增加，因此确认制得了支化 HA。样品 2.a、2.b 和 2.c 对应于已经进行了支化反应之后的实施例 2 的样品 A、B 和 C。

[0031] 发明详述

[0032] 透明质酸

[0033] “透明质酸”在本文定义为未硫酸化的糖胺聚糖，由 N- 乙酰葡糖胺 (GlcNAc) 和葡糖醛酸 (GlcUA) 的重复二糖单位组成，其通过交替的 β-1,4 和 β-1,3 糖苷键联接到一起。透明质酸也称作乙酰透明质酸、透明质酸盐或 HA。术语乙酰透明质酸和透明质酸在本文可以互换使用，用以描述该分子本身，以及其任何类型的盐。

[0034] 鸡冠是乙酰透明质酸重要的商业来源。微生物是可供选择的来源。美国专利 No.4,801,539 公开了用于制备透明质酸的发酵方法，其包含兽瘟链球菌 (Streptococcus zooepidemicus) 菌株，报道的产率是约 3.6g 透明质酸每升。欧洲专利 No.EP0694616 公开了使用改进的兽瘟链球菌菌株的发酵方法，报导的产率是约 3.5g 透明质酸每升。如完整并入本文的 WO 03/054163(Novozymes) 中所公开的，可以重组产生透明质酸或其盐，例如在革兰氏阳性芽孢杆菌属宿主中重组产生。

[0035] 乙酰透明质酸合酶已被描述来自于脊椎动物、细菌病原体和藻病毒 (DeAngelis, P.L.,1999, Cell.Mol.Life Sci.56:670-682)。WO 99/23227 公开了来自似马链球菌 (Streptococcus equisimilis) 的 I 组透明质酸盐合酶 (hyaluronatesynthase)。WO 99/51265 和 WO 00/27437 描述了来自多杀巴斯德氏菌 (Pasturella multocida) 的 II 组透明质酸盐合酶。Ferretti 等公开了酿脓链球菌 (Streptococcus pyogenes) 的乙酰透明质酸合酶操纵子，其由三个基因 hasA、hasB 和 has C 组成，分别编码透明质酸盐合酶、UDP 葡糖脱氢酶和 UDP- 葡糖焦磷酸化酶 (Proc.Natl.Acad.Sci.USA.98,4658-4663,2001)。WO 99/51265 描述了具有似马链球菌乙酰透明质酸合酶编码区的核酸区段。

[0036] 由于重组芽孢杆菌属细胞的乙酰透明质酸直接表达至培养基，可以使用简单的方法从该培养基中分离乙酰透明质酸。首先，将芽孢杆菌属细胞和细胞碎片从培养基中物理去除。如果期望，首先可将培养基稀释，以降低培养基的粘性。用于从培养基去除细胞的许

多方法对于本领域那些技术人员是已知的，例如离心和微滤 (microfiltration)。如果期望，然后可将剩余的上清液过滤，例如通过超滤，以从乙酰透明质酸浓缩和去除小分子污染物。去除细胞和细胞碎片之后，通过已知机制从培养基简单沉淀乙酰透明质酸。盐、醇或盐和醇的组合可用于从滤液沉淀乙酰透明质酸。一旦变为 (reduce to) 沉淀物，能够容易地将乙酰透明质酸通过物理方法从溶液中分离。可通过使用本领域已知的蒸发技术（例如喷雾干燥），从滤液溶液干燥或浓缩乙酰透明质酸。

[0037] 本发明的第一方面涉及支化透明质酸，其中线性主链包含其中的一个或多个 N- 乙酰 - 葡糖胺已经脱乙酰为葡糖胺的透明质酸，分支侧链与所述脱乙酰葡糖胺的伯胺共价连接，由此形成仲胺。

[0038] 在优选的实施方案中，分支侧链包含生物相容性聚合物，该生物相容性聚合物优选包含透明质酸。

[0039] 本发明的第二方面涉及在第三方面的方法中制备第一方面的支化 HA 必需的中间分子或前体分子，其是部分或全部脱乙酰的透明质酸 (dHA)，其中已经将一个或多个 N- 乙酰 - 葡糖胺脱乙酰为葡糖胺。

[0040] 优选已经通过化学和 / 或酶处理将一个或多个 N- 乙酰 - 葡糖胺脱乙酰，例如通过使用一水合肼连同硫酸肼，或通过使用具有 HA 脱乙酰酶活性的酶。

[0041] 优选的实施方案涉及第二方面的 dHA，其中已将线性透明质酸主链中 50％或更少的 N- 乙酰 - 葡糖胺脱乙酰为葡糖胺，优选已将线性主链中 40％或更少，更优选将 30％或更少，还更优选将 20％或更少，将 10％或更少，或最优选将 5％或更少的 N- 乙酰 - 葡糖胺脱乙酰为葡糖胺。

[0042] 另一个优选的实施方案涉及第二方面的 dHA，其具有 10-3,000 千道尔顿，优选 20-2,000kDa，并且最优选 20-1,000kDa，或者甚至更小的，例如 20-900kDa、20-800kDa、20-700kDa、20-600kDa、20-500kDa、20-400kDa、20-300kDa、20-200kDa 或 20-100kDa 的平均分子量。

[0043] 分子量

[0044] 透明质酸的水平可以根据改良的咔唑法测定 (Bitter 和 Muir，1962，AnalBiochem.4 :330-334)。此外，透明质酸的平均分子量可以使用本领域标准方法测定，例如由 Ueno 等，1988，Chem.Pharm.Bull.36，4971-4975 ；Wyatt，1993，Anal.Chim.Acta 272 :1-40 ；和 Wyatt Technologies，1999，“Light ScatteringUniversity DAWN Course Manual”and “DAWN EOS Manual”WyattTechnology Corporation，Santa Barbara，California 所述的那些。

[0045] 在某些情况下可能有利的是先降低线性透明质酸主链或其盐的平均分子量。例如，所谓的透明质酸低分子量级分的几位制造者已经声明，其能够穿过皮肤屏障来重建皮肤中透明质酸的天然含量，因此这些级分特别适合用于作为抗皮肤衰老和抗皱剂出售的化妆品组合物。对于食品应用，已经表明低 MW 透明质酸穿过胃肠屏障，因此增加了它的生物可用性 (bioavailability)。最后，低 MW 透明质酸显示出抗炎作用，并且在治疗炎性疾病方面有潜在应用。透明质酸或其衍生物或盐的平均分子量的降低可以通过本领域的标准方法来实现，例如，简单的热处理、酶降解、超声处理或酸水解。参见，例如，美国专利 6,020,484，其描述了包括 NaOCl 作为添加剂的对 HA 的超声处理技术，和 T.Miyazaki 等 (2001)Polymer

Degradation and Stability,74:77-85。

[0046] 本发明的第三方面涉及用于产生支化透明质酸的方法,所述方法包括步骤:

[0047] a)提供线性透明质酸主链,其中已经将一个或多个N-乙酰-葡糖胺脱乙酰为葡糖胺;和

[0048] b)将包含至少一个游离还原性醛基的生物相容性聚合物通过还原性N-烷基化与所述一个或多个葡糖胺的伯胺反应;从而形成支化透明质酸。

[0049] 优选地,在第三方面的方法中,已将线性透明质酸主链中50%或更少的N-乙酰-葡糖胺脱乙酰为葡糖胺,优选已将线性主链中40%或更少的,更优选30%或更少的,还更优选20%或更少的,10%或更少的,或最优选5%或更少的N-乙酰-葡糖胺脱乙酰为葡糖胺。

[0050] 在第三方面的优选实施方案中,线性透明质酸主链具有10-3,000千道尔顿,优选20-2,000kDa,并且最优选20-1,000kDa,或甚至更小的,例如20-900kDa、20-800kDa、20-700kDa、20-600kDa、20-500kDa、20-400kDa、20-300kDa、20-200kDa或20-100kDa的平均分子量。

[0051] 生物相容性聚合物是本领域公知的,包括天然产生或合成制备的所有类型的聚合物,其能够被生物体(例如人)降解和代谢,不具有任何毒性或有损健康的作用。

[0052] 另一优选的实施方案涉及第三方面的方法,其中还原性N-烷基化反应在氰基硼氢化钠$NaCNBH_3$存在下进行,优选在pH值为4-10,优选5-9,更优选6-8,并且最优选约7。

[0053] 其它成分

[0054] 在优选实施方案中,包含本发明的支化HA的组合物还可以包含其它成分,优选一种或多种活性成分,优选一种或多种药理学活性物质,并且还优选水溶性赋形剂,例如乳糖。

[0055] 可以在本发明中使用的活性成分或药理活性物质的非限定性实例包括蛋白质和/或肽药物,例如,人生长激素、牛生长激素、猪生长激素、生长激素释放激素/肽、粒细胞集落刺激因子、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子、巨噬细胞集落刺激因子、红细胞生成素、骨形态形成性蛋白质(bone morphogenicprotein)、干扰素或其衍生物、胰岛素或其衍生物、心房肽III(atriopeptin-III)、单克隆抗体、肿瘤坏死因子、巨噬细胞活化因子、白细胞介素、肿瘤退化因子(tumor degenerating factor)、胰岛素样生长因子、表皮生长因子、组织纤溶酶原激活物(tissue plasminigen activator)、因子VII、因子VIII和尿激酶。

[0056] 可包括水溶性赋形剂用于稳定活性成分的目的,这种赋形剂可包括蛋白质,例如,白蛋白或明胶;氨基酸,例如甘氨酸、丙氨酸、谷氨酸、精氨酸、赖氨酸和它们的盐;糖例如葡萄糖、乳糖、木糖、半乳糖、果糖、麦芽糖、蔗糖、葡聚糖、甘露醇、山梨醇、海藻糖和硫酸软骨素;无机盐例如磷酸盐;表面活性剂例如TWEEN®(ICI)、聚乙二醇,和它们的混合物。赋形剂或稳定剂可以以产品重量的0.001至99%的量使用。

[0057] 本发明的几个方面涉及各种组合物和药物,除了其它成分外,其包含有效量的如第一方面所限定的产品,和活性成分,优选所述活性成分是药理活性剂;可药用的载体、赋形剂或稀释剂,优选水溶性赋形剂,并且最优选乳糖。

[0058] 此外,本发明的多个方面涉及包含如第一方面所限定的支化HA或如上多个方面和实施方案中所限定的组合物的物品,例如,化妆品、卫生物品、医学或外科物品。在本发明

的最后方面涉及药物胶囊或微胶囊，其包含如第一方面所限定的产品或如本发明其它方面和实施方案所限定的组合物。

[0059] 实施例

[0060] 实施例 1. 制备脱乙酰 HA

[0061] 将 HA(6.0g) 与硫酸肼 (3.0g) 溶解在一水合肼 (300mL) 中，并且在 55℃保持搅拌 92 小时。通过用冷乙醇 (350mL) 沉淀来回收所得产物。添加 NaCl 饱和水溶液 (5mL) 以促进沉淀。将回收的沉淀物在新鲜乙醇 (250mL) 中洗涤并通过离心 (3000g，10 分钟) 回收。发现回收的物质 (780mg) 是脱乙酰的 HA(脱乙酰程度 13％)。

[0062] 实施例 2. 制备降解的脱乙酰 HA

[0063] 将如实施例 1 中所述的脱乙酰 HA(deHA) 使用以下方法通过亚硝酸降解 ：将 deHA 的三个样品 A、B 和 C(100mg) 溶解在 1％醋酸水溶液 (6mL) 中。根据表 1 添加亚硝酸 ($NaNO_2$)。将溶液在黑暗中放置 4 小时，其后将 pH 调节至大约 7。

[0064] 表 1. 向样品 A、B 和 C 添加的亚硝酸量和因此断裂的共价键数

[0065]

样品	$NaNO_2$ 量 (mg/100mg HA)	断裂的键％
A	1.38	4
B	0.690	2
C	0.345	0.5

[0066] 实施例 3. 制备支化 HA

[0067] 将实施例 2 中制备的降解的 deHA 样品 A、B 和 C 使用以下方法通过还原性烷基化来支化 ：向来自实施例 2 的调节过 pH 的溶液添加氰基硼氢化钠 $NaCNBH_3$(20.41mg)。使反应在终止之前持续进行 48 小时 (进行搅拌)，通过相对于去离子水进行透析来回收产物 (MWCO 12-14kDa)，然后冷冻干燥。

[0068] 实施例 4. 通过 SEC-MALLS-visc 分析

[0069] 通过大小排阻层析使用以下在线检测器来分析实施例 3 中制备的支化的产物 - 样品 2.a、2.b 和 2.c ：MALLS(多角度激光散射 (multi-angle laser lightscattering))、RI(折射率 (refractive index)) 和 visc(特性粘度检测器 (intrinsicviscosity detector))。将此用于评估产生的物质的构象和分子量，即，用于查看它们是否是分支的。图 1 显示了收缩因子 g 作为分子量的函数 ($g = (R_{g,\text{分支的}})^2/(R_{g,\text{线性的}})^2$) 的图。小于 1 的 g 值表示聚合物的支化。可以看出，收缩因子随着分子量的增加而增加，证明制得了支化 HA。

[0070] 表 2 总结了支化 HA 样品 2.a、2.b 和 2.c 的性质。表 2 中的参数“a”从 log R_g 相对于 log M_w 的点线图获得。该参数提供了所用溶剂中聚合物的构象的相关信息 (通常，随机卷曲 (random coil) ：0.5-0.6，刚性杆状 (stiff rod) ：1.0 和球体 (sphere) ：0.33)。对于起始物料 (常规 HA)，这个值是 0.5-0.6，正如对于随机卷曲构象的预期。对于随机高度支化的聚合物预期的数值约 0.25，进一步说明了样品 2.a、2.b 和 2.c 是支化产物。

[0071] 表 2. 支化 HA 样品 2.a、2.b 和 2.c 的主要特征 (Mr_w 是重量 - 平均分子量 ；PDI，多

分散性指数；R_g，z-平均回转半径；[η]重量-平均特性粘度；和 a，$R_g \sim M^a$ 方程式的指数）

[0072]

样品	M_w (kDa)	PDI (M_w/M_n)	R_g (nm)	[η] (dL/g)	a ($R_g \sim M^a$)
2.a	131	1.89	39.3	511	0.24
2.b	199	2.04	57.9	772	0.21
2.c	273	2.15	55.7	492	0.30

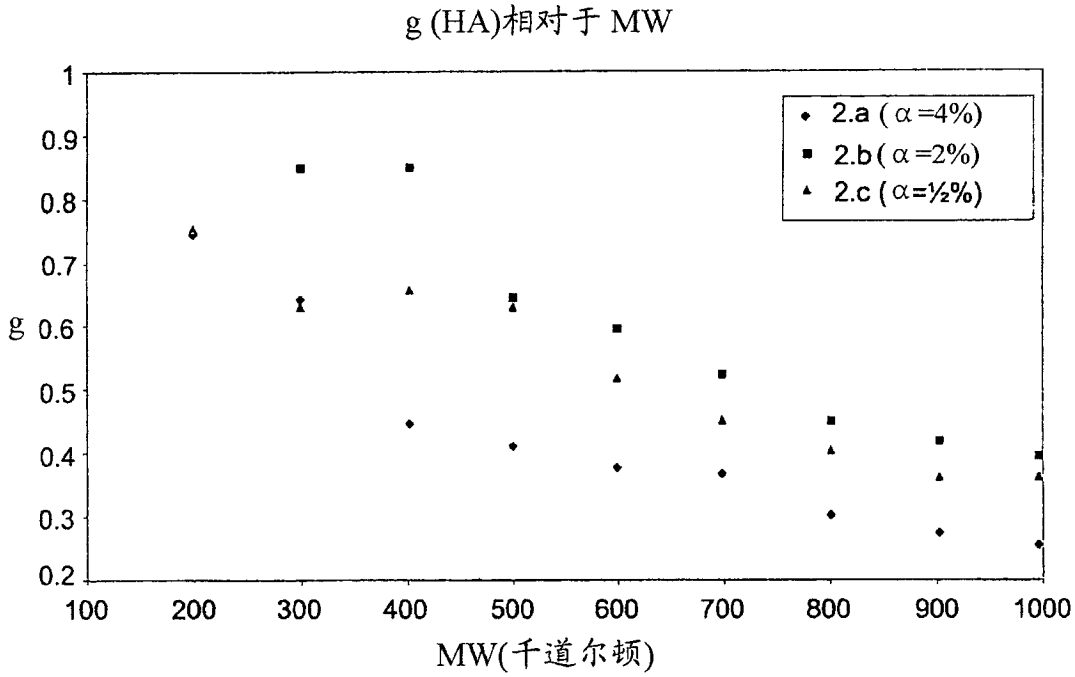

g (HA)相对于 MW
1
0.9
0.8
0.7
g 0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
100
200
300
400
500
600
700
800
900
1000
MW(千道尔顿)
2.a (α=4%)
2.b (α=2%)
2.c (α=½%)

图 1