

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780038492.1

[51] Int. Cl.

C08B 37/00 (2006.01)

A61K 47/36 (2006.01)

A61L 27/52 (2006.01)

[43] 公开日 2009年9月9日

[11] 公开号 CN 101528780A

[22] 申请日 2007.9.5

[21] 申请号 200780038492.1

[30] 优先权

[32] 2006.9.11 [33] IT [31] MI2006A001726

[86] 国际申请 PCT/EP2007/007758 2007.9.5

[87] 国际公布 WO2008/031525 英 2008.3.20

[85] 进入国家阶段日期 2009.4.16

[71] 申请人 费迪亚医药股份公司

地址 意大利帕多瓦

[72] 发明人 V·克雷申齐 C·迪梅奥

D·加莱索

[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 任宗华

权利要求书6页 说明书31页 附图24页

[54] 发明名称

通过“点击化学”交联而获得的透明质酸衍生物

[57] 摘要

描述了借助“点击化学”类型反应而交联的多羧酸化多糖的交联衍生物，其中至少一个所述多糖链是由透明质酸或其衍生物组成的，及其在粘弹性补充治疗、整形外科、肿瘤外科和重建外科领域中的用途，以及在生物学和/或药理学活性分子和/或大分子的控制释放体系中作为基质的用途。

1. 一种制备多羧酸化多糖的交联衍生物的方法,其中至少一个多糖链由透明质酸或其衍生物组成,所述多羧酸化多糖的交联衍生物通过“点击化学”类型反应进行交联,所述方法包括下列阶段:

i) 合成透明质酸的部分衍生物(酯、酰胺、硫酯、酸酐),和任选地合成另一个多羧酸化多糖或各自的盐或衍生物;

ii)使阶段 i)中获得的衍生物之间进行环加成反应,从而在各个链之间形成共价键。

2. 根据权利要求1的方法,其特征在于在阶段 i)中获得的部分衍生物具有残基对,所述残基对含有在随后的阶段 ii)中能够通过一个或多个属于“点击化学”范围的环加成反应,优选狄尔斯-阿尔德环加成反应或1,3-偶极环加成反应而彼此反应,从而在链之间形成共价键。

3. 根据权利要求2的方法,其特征在于该残基对为一对(1,3-不饱和化合物,亲双烯体)型对,或(1,3-偶极体,亲偶极体)型对,其中:

- 所述1,3-不饱和化合物选自1,3-二烯(还称作共轭二烯)的衍生物,优选选自1,3-丁二烯、1-甲氧基-3-三甲基甲硅烷氧基-1,3-丁二烯、环戊二烯、环己二烯、呋喃;

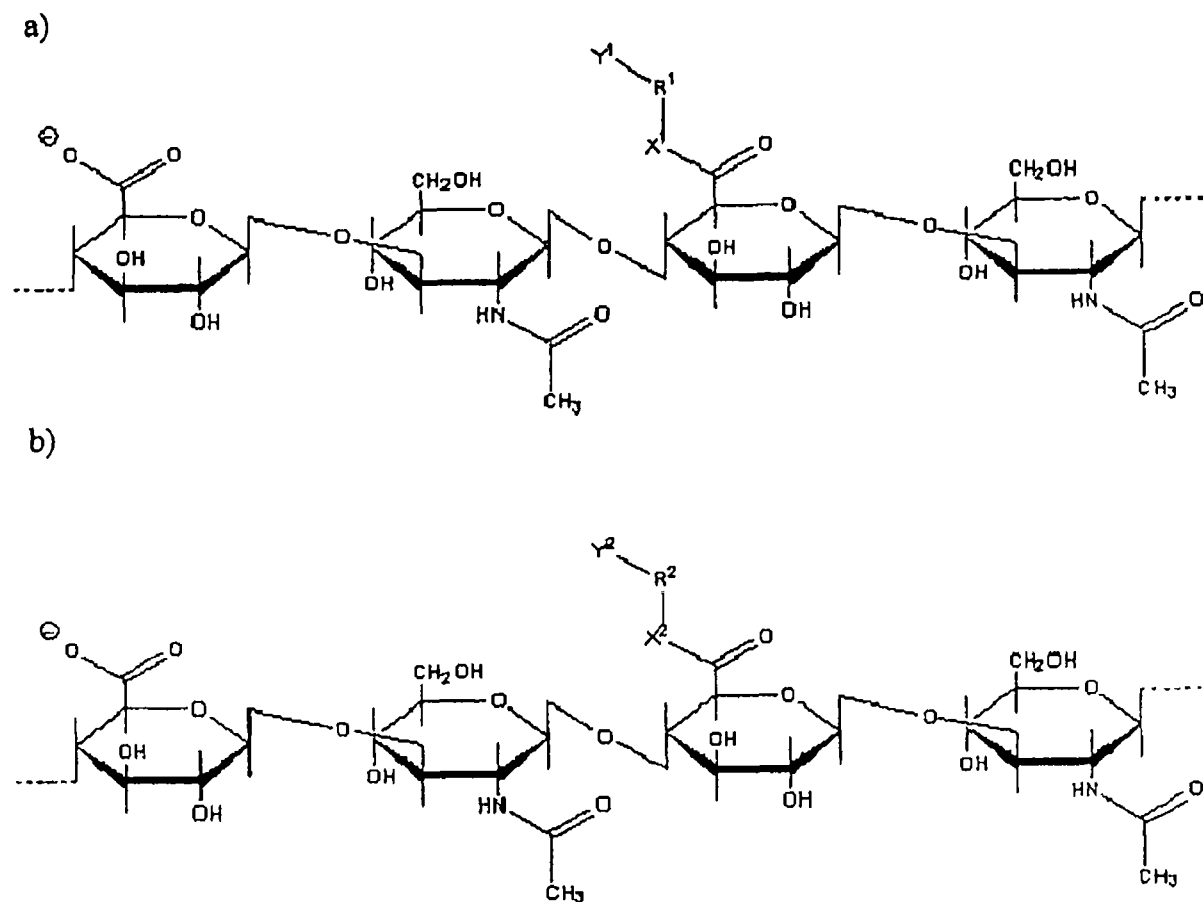
- 所述亲双烯体化合物选自烯烃、炔烃或双键或三键上连接有一个或多个吸电子基团的烯烃或炔烃衍生物,优选选自丙烯酸酯、丙烯酰胺、富马酸酯、乙烯基酮、硝基-烯烃、硝基-炔烃、马来酸酐和醌;

- 所述1,3-偶极化合物选自腈-氧化物、叠氮化物、重氮-烷烃、丙二烯和硝酮的衍生物,优选选自叠氮化物的衍生物;

- 所述亲偶极体化合物选自烯烃、炔烃或双键或三键上键合有一个或多个吸电子基团的烯烃或炔烃衍生物,优选选自丙烯酸酯、丙烯酰胺、富马酸酯、乙烯基酮、硝基-烯烃、硝基-炔烃、马来酸酐、甲

基乙炔和醌。

4. 根据权利要求 1 的方法，其特征在于在阶段 i) 中获得的部分衍生物为两个或多个改性的多糖模块，其分别具有下列化学结构(根据图 4)：



其中 X^1 、 R^1 和 Y^1 如此定义：

- X^1 和 X^2 独立地为 O、NH、OC(O)、S 基团；

- R^1 和 R^2 独立地为取代或非取代的、可以含有杂原子的 1-20 个碳原子的脂肪族链，或者芳香族、芳脂族、脂环族、杂环族系列的基团，尤其是三唑基团，并且它们还可以含有或者为生物活性分子的衍生物；

- Y^1 和 Y^2 为含有能够在狄尔斯-阿尔德环加成反应或 1,3-偶极环加成反应中彼此反应的基团的残基，优选所述 (Y^1 , Y^2) 对为 (1,3-不饱和化合物，亲双烯体) 型对，或 (1,3-偶极体，亲偶极体) 型对，其中：

- 所述 1, 3-不饱和化合物选自 1, 3-二烯的衍生物, 优选选自 1, 3-丁二烯、1-甲氧基-3-三甲基甲硅烷氧基-1, 3-丁二烯、环戊二烯、环己二烯、呋喃;

- 所述亲双烯体化合物选自烯烃、炔烃或双键或三键上连接有一个或多个亲电子基团的烯烃或炔烃衍生物, 优选选自丙烯酸酯、丙烯酰胺、富马酸酯、乙烯基酮、硝基-烯烃、硝基-炔烃、马来酸酐和醌;

- 所述 1, 3-偶极化合物选自腈-氧化物、叠氮化物、重氮-烷烃、丙二烯和硝酮的衍生物, 优选选自叠氮化物的衍生物;

- 所述亲偶极体化合物选自烯烃、炔烃或双键或三键上键合有一个或多个吸电子基团的烯烃或炔烃衍生物, 优选选自丙烯酸酯、富马酸酯、乙烯基酮、硝基-烯烃、硝基-炔烃、马来酸酐、甲基乙炔和醌。

5. 根据权利要求 1 的方法, 其特征在于在含水溶剂或非质子极性有机溶剂或在混合溶剂中进行阶段 ii)。

6. 根据权利要求 1 的方法, 其特征在于在多糖部分衍生物的存在下进行阶段 ii), 其中所述多糖部分衍生物是在阶段 i) 中获得的, 其在反应混合物中的浓度为 1 - 500mg/ml, 优选 5 - 100mg/ml。

7. 根据权利要求 1 的方法, 其特征在于两个阶段都在 4 - 60°C, 优选 15 - 40°C 的反应温度下进行。

8. 根据权利要求 1 的方法, 其特征在于用于形成交联产物和继而的水凝胶的阶段 ii) 具有从几秒钟 - 30 分钟, 优选从几秒钟 - 10 分钟的搅拌时间。

9. 根据权利要求 1 的方法, 其特征在于通过在于 Cu(I) 盐部分的催化作用来进行阶段 ii), 其中所述 Cu(I) 盐以 1 - 50mg/ml, 优选 1 - 5mg/ml 的终浓度存在于含水反应混合物中, 或者通过原位产生 Cu(I)

的体系，优选由催化浓度的 Cu(II) 盐(例如 CuSO_4)和抗坏血酸组成的体系的催化作用进行阶段 ii)。

10. 根据权利要求 1-9 中任一项的方法获得的多羧酸化多糖的交联衍生物，其中至少一个多糖链由透明质酸或其衍生物组成，所述多羧酸化多糖的交联衍生物通过“点击化学”类型反应进行交联。

11. 根据权利要求 10 的交联衍生物，其特征在于透明质酸及其衍生物的游离羧基以羧酸或四烷基铵羧酸盐的形式存在，或者以属于下组元素的阳离子的羧酸盐形式存在：碱金属或碱土金属，优选钠、钾、镁和钙的盐。

12. 根据权利要求 10 的交联衍生物，其特征在于另外的天然或合成的多羧酸化多糖的多糖链选自属于下组的那些：糖胺聚糖，优选软骨素、硫酸皮肤素、硫酸乙酰肝素和肝素，及其各自的盐，以及其它天然多糖，例如褐藻酸及其盐，和合成多糖，例如羧甲基纤维素(CMC)，或羟丙基甲基纤维素(HPMC)及其盐。

13. 根据权利要求 10-12 中任一项的交联衍生物，其特征在于它们为水凝胶形式。

14. 根据权利要求 13 的交联衍生物，其特征在于所述水凝胶为或多或少粘性和粘膜粘附性的流体，或者为壁-壁型紧密三维结构。

15. 根据权利要求 13 的交联衍生物，其特征在于在形成水凝胶的过程中，它们物理结合简单的生物学或药理学活性分子、肽、蛋白质、寡核苷酸和多核苷酸，其它聚合物和细胞材料。

16. 根据权利要求 13、14 或 15 的交联衍生物在粘弹性补充治疗、

整形外科、肿瘤外科和重建外科中的用途，在基因治疗或具有生物学或药理学活性的分子和/或大分子的控制释放体系中作为基质的用途，和作为用于组织工程的含有生物材料的细胞材料的用途。

17. 根据权利要求 16 的用途，在骨关节领域中用于粘弹性补充治疗。

18. 根据权利要求 17 的用途，其中通过在采用或不采用基于 Cu(I) 的催化剂的情况下，在关节内首先给药部分多糖衍生物，随后给药第二个物质，从而在滑液腔内直接形成由透明质酸(和/或其衍生物)组成的水凝胶。

19. 根据权利要求 16 的用途，其在整形外科中用作皮肤填充物。

20. 根据权利要求 16 的用途，其在肿瘤外科和重建外科中作为手术填充物。

21. 具有生物学或药理学活性的分子和/或大分子的控制释放体系，其包含根据权利要求 13 的水凝胶形式的交联衍生物作为基质。

22. 用于基因治疗中的寡核苷酸和多核苷酸的控制释放体系，其包含根据权利要求 13 的水凝胶形式的交联衍生物作为基质。

23. 水凝胶形式的基质，由根据权利要求 13 的交联衍生物组成，含有用于组织工程或再生的细胞材料。

24. 根据权利要求 21 的体系，其特征在于具有生物学或药理学活性的分子和/或大分子选自活性物质，例如蛋白质、生长因子、酶、抗肿瘤药物、细胞抑制剂、类固醇和非类固醇抗炎药物、抗生素、抗微

生物药物、抗病毒药物、抗真菌药物、麻醉剂、镇痛药、镇静剂、胆碱能和肾上腺素能激动药和拮抗药、抗血栓药物、抗凝血剂、止血药物、用于局部、皮下、肌肉内或关节内的纤维蛋白溶解药物和血栓溶解药物。

25. 根据权利要求 21、22 或 24 的凝胶形式的控制释放体系在皮肤病学、肿瘤学、肺病学和骨关节领域中的用途和用于组织工程的用途。

26. 根据权利要求 25 的用途, 通过关节内给药来实现, 其中所述凝胶含有用于治疗关节病和/或关节炎病状的活性物质, 例如抗炎物质、金属-蛋白酶抑制剂、NO 合成酶抑制剂, 或其它生物学或药理学活性分子。

27. 根据权利要求 25 的用途, 用于肿瘤重建外科或肿瘤神经外科中, 其中所述水凝胶含有抗肿瘤和/或细胞抑制药物和/或其前体作为药理学活性分子。

28. 根据权利要求 27 的用途, 其特征在于所述药理学活性分子选自紫杉醇、多柔比星、伊立替康、5-氟尿嘧啶、吉西他滨、长春新碱和甲氨喋呤。

29. 一种制备根据权利要求 21 的凝胶形式的控制释放体系的方法, 其特征在于将一种或多种生理学或药理学活性的分子与待交联的多糖部分衍生物一起溶解在反应溶剂中。

通过“点击化学”交联而获得的透明质酸衍生物

本发明涉及通过“点击化学”交联而获得的透明质酸衍生物。

尤其，本发明涉及透明质酸与其它多羧酸化多糖通过一种或多种“点击化学”类型反应，尤其是炔与叠氮化物衍生物之间进行的 1,3-偶极环加成反应而交联的交联衍生物，由上述衍生物获得的、具有可以由交联度来调节的物理-化学和流变学特性的生物相容的水凝胶，通过在两个适当的衍生化的多糖模块(block)之间形成共价键而制备上述水凝胶的方法，及其在粘弹性补充治疗、整形外科领域中的用途，以及在医学领域中作为细胞支持体和/或基质而用于生物学或药理学活性分子和/或大分子的控制释放体系中和在肿瘤重建外科中用作含药凝胶的用途。本发明还涉及一种方法，其中在多糖的上述交联以及继而形成水凝胶本身的过程中将这些生物活性的，即生物学或药理学活性的分子和/或大分子直接物理结合在水凝胶中。

发明领域

透明质酸(HA)是由 D-葡糖醛酸和 N-乙酰基-葡糖胺组成的天然直链杂多糖，就实际存在于我们有机体的每个区室中的透明质酸而言，其分子量根据其来源可以为 50,000 - 13,000,000Da。HA 在生理上发挥许多作用：对许多组织的细胞进行机械支持，例如润滑关节、调节许多生物学和药理学过程(其中有受其膜受体 CD44 介导的增殖、迁移和细胞分化)。HA 对于受病理学或外伤损害的关节软骨变性的保护作用也是公知的：在这种情况下，促炎因子，尤其是白细胞介素-1(IL-1)以很大浓度存在于关节腔中。其促进软骨自身的分解并抑制软骨细胞的增殖(van Beuningen H.M.等, Arthritis Rheum, 1991, 34: 606-615)。各种科学试验显示，透明质酸能够与 IL-1 作用相抵抗，显著降低其负面作用并向所注入的关节软骨组织上施加修缮作用(Stove J.

等人, J Orthop Res, 2002, 20: 551-555)。而且, 在关节位置处, 滑液中含有的透明质酸在缓慢运动过程中充当粘性润滑剂, 而由于其具有弹性, 因此其对可能的外伤或微外伤起到减震作用, 这种作用在快速运动过程中可以影响关节。

HA 的组织-水合作用和愈合功能也是普遍已知的, 并且被用于制备长期以来一直用于治疗创伤、溃疡和各种皮肤损伤的药物(例如, Balasz A. 等人, Cosmetics & Toiletries, 1984, 5: 8-17)。

本发明中使用的透明质酸可以衍生自任何来源; 其可以例如从小鸡鸡冠中萃取获得(EP 138572 B1), 或者通过发酵获得(EP 716688 B1), 并且其分子量可以为 50,000 - 3,000,000Da。

本专利申请的范围内使用的术语“透明质酸”指作为多羧酸形式的多糖及其盐, 例如钠、钾、镁和钙盐。

HA 分子可以进行的各种化学变型也是所属领域已知的, 其主要为:

- 与有机和/或无机碱成盐(EP 138572 B1);
- HA 与脂肪族、芳脂族、脂环族、芳香族、环状和杂环(HYAFF®)系列的醇进行酯化作用, 其中酯化作用的百分率可以根据所用醇的类型而变化(EP 216453 B1);
- HA 与脂肪族、芳脂族、脂环族、芳香族、环状和杂环(HYADD®)系列的胺进行酰胺化(amidation), 其中酰胺化的百分率为 0.1 - 50% (EP 1095064 B1);
- 可高达 4 次硫酸化度的、HA 的 O-硫酸化作用(EP 702699 B1);
- HA 的脱乙酰作用: 对 N-乙酰基-葡糖胺部分进行脱乙酰作用, 脱乙酰作用的百分率优选为 0.1 - 30% (EP 1313772 B1);
- 通过对 N-乙酰基-葡糖胺部分的伯羟基进行氧化而实现的 HA 的全羧化作用, 其中全羧化度为 0.1 - 100% (HYOXX®; 专利申请 EP 1339753)。

虽然保持了原料多糖的生物相容性、易处理性和使用方便性, 但是取决于施用于其上的化学改性作用, 由这些方法获得的聚合物在生

理学环境中还能够具有不同的降解速率、不同的水溶性、不同的机械特性。

HA 的进一步化学改性在于多糖链通过内部酯化发生交联 (EP 341745 B1)，从而形成密度取决于所达到的交联度的较高分子量的网 (ACP[®])；该方法可用于获得特征在于较低的生物降解速率，并且与原料基质相比具有较高粘弹性和粘膜粘附性 (mucoadhesive) 的生物材料。

在下述情况下通过引入双官能交联剂而进行的多糖的化学交联可以代表用于获得类似聚合特性的类似方法：如环氧化物 (De Belder 等，WO 86/00912)、在碱性溶液中的二乙烯基砷 (E. A. Balazs 等，US 4,582,865)、双-碳二亚胺 (J. W. Kuo 等，US 6,537,979)，和各种其它试剂，例如甲醛、二甲基脲、环氧乙烷、聚异氰酸酯 (E. A. Balazs 等，UK 8420560)。

下述文献中描述了由透明质酸的化学衍生物的交联来制备水凝胶的其它具体例子：D. Renier 等人 (WO 02/18450) 描述了使用部分 N-脱乙酰化的 HA 并且通过多组分反应来实现交联，和 D. Bellini 等人 (US 2005/0119219A1) 描述了通过对光-反应性的酯衍生物进行光化学处理而使多糖之间形成共价键，随后再形成凝胶。

在大部分的上述现有技术文献中，均描述了使用凝胶作为整形外科的皮肤填料、在关节内病状的治疗中作为粘弹性补充治疗液、在眼部手术中作为玻璃体的代用材料、在预防术后粘连中作为粘膜粘附性材料、在组织工程中作为制备支架的生物材料和/或作为生物活性分子释放体系的基质。

因此，本发明的目的还在于确定一种制备透明质酸的交联衍生物的替代性方法，用于替代所描述的和所属领域中使用的那些方法，其中所述替代性方法具有显著的优越性。

因此，本发明的目的涉及一种通过“点击化学”类型反应进行交联而制备多羧酸化多糖的交联衍生物的方法，其中至少一个多糖链由透明质酸或其衍生物组成，所述方法包括下列阶段：

i) 合成透明质酸的部分衍生物(酯、酰胺、硫酯、酐), 和任选地合成另一个多羧酸化多糖或各自的盐或衍生物;

ii) 使阶段 i) 中获得的衍生物之间进行环加成反应, 从而在各个链之间形成共价键。

本发明的进一步目的涉及在上述方法中, 通过“点击化学”类型反应进行交联而获得的所述多羧酸化多糖的交联衍生物, 其中所述多糖的至少一个链由透明质酸或其衍生物组成。

术语“点击化学”包括和确定了具有下述特征的各种化学反应: 例如快速性、区域选择性和高产率, 以及具有高的热力学驱动力, 通常大于或等于 20kcal/mol。

在“点击”反应中, 环加成反应, 例如狄尔斯-阿尔德 (Diels-Alder) 反应, 以及最重要的胡伊斯根 (Huisgen) 1, 3-偶极环加成反应在本发明中尤其重要。环加成的例子包括其中两个不饱和分子反应形成环状化合物并且借助 π 电子形成两个新的 σ 键的反应。

狄尔斯-阿尔德反应 (O. Diels, K. Alder, Ann. 1928, 460, 98; O. Diels, K. Alder, Ann. 1929, 470, 62; O. Diels, K. Alder, Ber. 1929, 62, 2081-2087) 是环加成 [4+2], 其意味着 4π 电子体系 (二烯) 和 2π 电子体系 (亲双烯体)。反应产物是取代的环己烷。所述亲双烯体还可以在碳和另一个原子 (例如氧) 之间含有双键, 同时形成杂环。

机理几乎完全一致并且为单步反应: 虽然不一定以相同程度形成碳-碳键, 但是在同一过渡态中均部分形成了新的碳-碳键。不仅由于狄尔斯-阿尔德反应形成环状化合物而使其可以被利用, 而且由于其可以非常便利地利用许多试剂而使其成为首选。亲双烯体中的吸电子取代基有利于所述反应, 但是简单的烯烃也可以反应; 反应通常通过试剂的简单混合而进行, 并产生热量。

1, 3-偶极环加成反应是在 1, 3-偶极体和亲偶极体之间进行的、形成部分或完全饱和的 5-原子芳香族杂环的热力学允许的环加成反应。1, 3-偶极体是可以借助八隅体或六隅体两性离子形式来描述并且可以为烯丙基型 (有角的结构) 或炔丙基-丙二烯型的化合物。1, 3-偶极体能

够具有 N、O 或 S 原子作为中心原子。带有氮原子作为中心原子的 1,3-偶极体是最重要的。炔丙基(直链)型氮 1,3-偶极体的例子为叠氮化物、nitrilide、腈亚胺(nitrilimine)、腈氧化物(nitriloxide)、重氮烷烃和氮的低价氧化物。1,3-偶极体环加成反应在异噁唑和吡唑环的构建中尤其重要,因为其具有区域选择性(通常为完全的立体选择性)和立体定向性(G.A. Pagani, A. Abboto, “Chimica Eterociclica”, Ed. Piccin)。

在这些类型的反应中,胡伊斯根[3+2] 1,3-偶极环加成反应是最有意义的(R. Huisgen 等, Chem. Ber. 1967, 100, 2494-2507): 其是有机叠氮化物与具有末端炔基的物质之间的缩合反应,其导致快速且高产率地形成特征在于二取代的 1,2,3-三唑环的单一衍生物(R, Huisgen, Pure Appl. Chem. 1989, 61, 613-628)。上述反应产生 1,4-和 1,5-二取代三唑环的混合物(参见图 1)。

为了控制区域选择性,人们进行了各种努力,直至在 2002 年发现使用铜(I)作为反应催化剂的可能性,其导致完全形成 1,4-二取代 1,2,3-三唑环(图 2)(V. Rostovtsev 等, Angew. Chem. Int. Ed., 2002, 41, 2596-2599; C.W. TorØe 等, J. Org. Chem., 2002, 67, 3057-3064; B.K. Sharples 等, WO 03/101972)。

在这种类型的反应中,使用取代的伯、仲和叔叠氮化物以及芳香族叠氮化物。许多具有末端炔基的化合物都可以用在所述反应中,其并不受各种官能团,例如酯、酸、烯、醇和胺的存在的损害。

在不存在催化剂的情况下,当所述炔烃具有吸电子取代基时,在含水环境的温和条件下叠氮化物与炔之间也发生该类型的反应(Z. Li 等, Tetrahedron Letters, 2004, 45, 3143-3146)。

该反应尤其与所谓的“点击化学”领域有关,其实际重要性来自于末端叠氮化物基团和炔基容易插入许多有机分子中的性质。在具有各种可能的官能度的其它物质存在下这些基团随后仍然彼此进行反应。据证实该特性在许多领域,从药物研发至表面科学中都特别有利,其中新键的形成,以及由此而得的新产物必然是区域选择性的、快速

的，并且必然高产率地进行。

事实上，近年来已经将胡伊斯根反应例如用于快速和有效地通过含有 1,2,3-三唑环的桥来配合单-和二-糖 (S. Chittaboina 等, *Tetrahedron Letters*, 2005, 46, 2331-2336)，从而用该方法将以其它方式难以引入的各官能团与直链 β -葡聚糖连接起来 (T. Hasegawa 等, *Carbohydrate Research*, 2006, 341, 35-40)，用于高产率、区域选择性地合成多种树形分子 (V. Fokin 等, WO 2006/005046)、用于使大分子，例如寡核苷酸和蛋白质与其它分子实体进行偶联 (W. Pieken 等, WO 98/30575)、用于借助含有三唑基团的交联剂使聚乙烯醇发生交联 (J. Ossipov 等, *Macromolecules*, 2006, 39(5), 1709-1718)。

虽然已知环加成反应是获得各种类型的化学衍生物的常用合成步骤，但是本发明的方法预计了借助多羧酸化多糖的“点击化学”反应而进行的交联，其中至少一个多糖链由透明质酸或其衍生物(如其它uronane和同类的多羧酸化物)的适当官能化的链组成，并且制备了具有可以充分调节的已知交联度的水凝胶。

根据本发明的方法的特殊有利方面在于下述事实：交联反应可以在不同分子存在下进行而不会形成不希望的副产物，从而除了其它有利方面之外还可以制备新型的生物相容的材料，并在形成水凝胶的阶段中直接将各种类型的生物活性分子以及细胞材料结合在用于释放体系的基质中和用于重建外科或用于基因治疗中的含药凝胶中。

发明详述

本发明涉及一种通过“点击化学”类型反应进行交联而制备多羧酸化多糖的方法，其中至少一个多糖链由透明质酸或其衍生物组成，所述方法包括下列阶段：

i) 合成透明质酸的部分衍生物(酯、酰胺、硫酯、酐)，和任选地合成另一种多羧酸化的多糖或其各自的盐或衍生物；

ii) 使阶段 i) 中获得的衍生物之间进行环加成反应，从而在各链

之间形成共价键。

本发明的目的还涉及通过“点击化学”类型反应进行交联而获得的多羧酸化多糖的交联衍生物，其中至少一个多糖链由透明质酸或其衍生物组成。

“点击化学”反应是在预先改性的相同多糖链之间进行的快速和有效的环加成反应，从而引入随后要参与所述反应的末端官能团。

本发明的目的还涉及水凝胶形式的所述交联多糖，及其在医学领域中，尤其是在粘弹性补充治疗、整形外科、肿瘤外科和重建外科中的用途，作为基因治疗的基质的用途，和在具有生物学或药理学活性的分子和/或大分子的控制释放体系中作为基质的用途，以及在组织工程或再生中作为用于细胞材料的生物材料和支持体的用途。

本发明的目的还涉及具有生物学或药理学活性的分子和/或大分子的控制释放体系，其包含作为基质的水凝胶形式的交联衍生物。尤其，本发明的目的还涉及用于基因治疗的寡核苷酸和多核苷酸的控制释放体系，其包含作为基质的水凝胶形式的交联衍生物。

交联衍生物(本发明的目的)及由其获得的水凝胶可以通过属于所谓的“点击化学”领域的简单、快速的反应，在含水溶剂中以高产率制得，这要感谢透明质酸(及其衍生物)和/或其它多羧酸化多糖的容易被极性衍生化的性质，其中所述多羧酸化多糖带有在一个“点击”反应中具有反应性末端基团的分子，例如叠氮化物、炔烃、二烯烃、烯烃、腈氧化物、偶氮烷烃。还惊讶地发现，在形成这些多糖衍生物和凝胶的过程中，在反应混合物中还可以存在具有多类与上述那些基团不同的官能团的其它分子，而不会形成不希望的副产物且不会影响速率、产率和可能的环加成反应的区域选择性。这表明在其制备过程中可以将多种简单的生物活性分子、肽、蛋白质、寡核苷酸和多核苷酸和其它聚合物直接物理结合在本发明的水凝胶中。

尤其，如此获得的材料的特征在于良好的生物相容性，因为其衍生自生物相容并且在有机体中可以降解且能够修复所述多糖的多糖，和具有低毒性或甚至在三唑的情况下具有抗菌活性的分子。

可用于本发明中的透明质酸可以衍生自任何来源，例如萃取自小鸡鸡冠 (EP 138572)，或者通过发酵 (EP 0716688)，而且其可以具有 400 - 3,000,000 Da，尤其是 50,000 - 1,000,000 Da 的分子量。

可用于制备对于本发明的交联衍生物的制备而言必须的中间体的透明质酸衍生物为下列物质：

1) 与有机和/或无机碱形成的并且还具有生物活性的盐 (EP 138572 B1)；

2) HYAFF[®]：透明质酸与脂肪族、芳脂族、脂环族、芳香族、环状和杂环系列的醇形成的酯，其酯化百分数可以根据醇的类型和所用醇的长度变化，但是不高于 90%，这是因为所述聚合物必须仍然是水溶性的并且必须包括羧酸基团 (EP 0216453 B1)；

3) HYADD[®]：透明质酸与脂肪族、芳脂族、环脂族、芳香族、环状和杂环系列的胺形成的酰胺，其酰胺化百分数不高于 50%，因为所述聚合物必须仍旧是水溶性的 (EP 1095064 B1)；

4) 透明质酸或其衍生物与属于不同族的具有抗癌活性的药物之间发生直接或间接合成 (经由分子间隔) 而得的生物共轭的产物 (意大利专利申请 PD2005A000242)；

5) 透明质酸的 O-硫酸化衍生物 (EP0702699 B1) 和 N-硫酸化衍生物 (EP 0971961 A1)；

6) ACP[®]：透明质酸的内酯，酯化百分数不高于 20%，因为所述聚合物必须仍然是水溶性的 (EP 0341745 B1)；

7) HA 的脱酰基化产物：对 N-乙酰基-葡糖胺部分进行脱乙酰化作用，优选脱乙酰化百分数为 0.1 - 30% (EP 1313772 B1)；

8) 对 N-乙酰基-葡糖胺部分的伯羟基进行氧化而得的 HA 的全羧酸化产物，全羧酸化程度为 0.1 - 100% (HYOXX[®] EP 1339753 A1)。

可用于本发明的交联方法中的上述透明质酸的游离羧基及其衍生物可以以羧酸、下列元素的阳离子的羧酸盐形式存在：碱金属或碱土金属，优选钠、钾、镁和钙，或者以四烷基铵离子，优选四丁基铵、苄烷铵、2-氯-1-甲基吡啶和十六烷基吡啶的羧酸盐形式存在。

其它可用于制备本发明的交联衍生物的天然或合成多羧酸化多糖例如为属于下组的那些：糖胺聚糖，优选软骨素、硫酸皮肤素、硫酸乙酰肝素和肝素（及其各自的盐），以及其它天然多糖，如褐藻酸及其盐，和合成多糖，如羧甲基纤维素（CMC）、羟丙基甲基纤维素（HPMC）及其盐。

因此，本发明涉及如图3中所一般性描述的、具有交联多糖结构的衍生物，其中正如所指示的，参与交联的两个链中的至少一个为透明质酸或之前描述的其衍生物（在这种情况下透明质酸盐仅仅是为了说明性目的），第二个链可以与其相同或者为任意的其它多羧酸化多糖，并且其中依次为：

- X^1 和 X^2 可以独立地为 O、NH、OC(O)、S 基团（或者所述羧酸衍生物可以分别为酯、酰胺、酸酐、硫酯）；

- R^1 和 R^2 可以独立地为取代或非取代的、可以含有杂原子的 1-20 个碳原子的脂肪族链，或者芳香族、芳脂族、脂环族、杂环族系列的基团，尤其是其它三唑基团，并且它们还可以含有或者为生物活性分子的衍生物；

- Cyc 可以为脂环族、芳香族或非芳族系列的饱和或不饱和、取代或非取代的残基，其中环内的碳原子数为 3-8，优选取代的环己烯或取代的环己烷；或者为杂环系列、芳香族或非芳族的饱和或不饱和、取代或非取代的残基，其环内的碳原子数为 2-7 并且环内的杂原子数为 1-7，优选取代的三唑。

Cyc 基团可能具有其自身的生物学活性；在任何情况下 Cyc 基团都必须如本发明专利申请中所定义的，是属于“点击化学”范围内的环加成反应的产物。

上述交联产物是通过一个或多个环加成反应而获得的，其中所述环加成反应在两个或多个改性多糖模块之间形成一个或多个共价键，从而使其各自具有所述化学结构（参见图4）。

仅仅为了说明的目的，在图4中，两个多糖模块均由其一些羧酸基团被官能化的适当官能化的透明质酸盐组成，但是两个模块中的一

个还可以由不同的类似改性的多羧酸化多糖代表。

在图 4 的结构中， X^1 、 R^1 和 Y^1 基团如此定义：

- X^1 和 X^2 可以独立地为 O、NH、OC(O)、S 基团(即，所述羧酸衍生物可以分别为酯、酰胺、酸酐、硫酸酯)；

- R^1 和 R^2 可以独立地为取代或非取代的、可能含有杂原子的 1-20 个碳原子的脂肪族链，或者芳香族、芳脂族、脂环族、杂环族系列的基团，尤其是其它三唑基团，而且其还可以含有或者为生物学活性分子；

- Y^1 和 Y^2 为含有能够在属于“点击化学”(如本专利申请中所定义的)范围内的环加成反应中彼此反应的基团的残基，优选为含有能够在狄尔斯-阿尔德环加成或 1,3-偶极环加成中彼此反应的残基。更具体地，(Y^1 , Y^2) 对为(1,3-不饱和化合物，亲双烯体)型对，或者为(1,3-偶极体，亲偶极体)型对，其中：

- 所述 1,3-不饱和化合物选自 1,3-二烯(还称作共轭二烯)衍生物，优选选自 1,3-丁二烯、1-甲氧基-3-三甲基甲硅烷氧基-1,3-丁二烯、环戊二烯、环己二烯、呋喃；

- 所述亲双烯体化合物选自烯烃、炔烃或双键或三键上连接有一个或多个吸电子基团的烯烃或炔烃衍生物，优选选自丙烯酸酯、丙烯酰胺、富马酸酯、乙烯基酮、硝基-烯烃、硝基-炔烃、马来酸酐和醌；

- 所述 1,3-偶极化合物选自腈-氧化物、叠氮化物、重氮-烷烃、丙二烯和硝酮的衍生物，优选选自叠氮化物的衍生物；

- 所述亲偶极体化合物选自烯烃、炔烃或双键或三键上键合有一个或多个吸电子基团的烯烃或炔烃衍生物，优选选自丙烯酸酯、丙烯酰胺、富马酸酯、乙烯基酮、硝基-烯烃、硝基-炔烃、马来酸酐、甲基乙炔和醌。

图 4 所示的多糖衍生物可以用作形成本发明的交联产物的模块，其中所述多糖衍生物可以以透明质酸 - 或其盐或衍生物 - 为原料，或者以另一种多羧酸化多糖 - 或其盐或衍生物 - 为原料通过下述方式容易地制得：按照所属领域已知的步骤和方法活化羧基本身，或者在酯

化的情况下活化酯化的醇，之后在羧基的水平上进行酯化、酰胺化、硫酸酯化反应，或者形成酸酐。

因此，用于制备本发明的交联衍生物的方法包括下列阶段：

i) 合成透明质酸的部分衍生物(酯、酰胺、硫酸酯、酸酐)，以及可能的另一种多羧酸化多糖或其各自的盐或衍生物；

ii) 使合成的衍生物之间进行环加成反应，从而在各链间形成共价键。

用于本发明的环加成反应属于所谓的“点击化学”范围，因此除了不会产生不希望的副产物的特性之外，其还具有快速、简单、有效的性质，并且如果对参与的基团进行适当选择，其还具有区域选择性。预计用于本专利申请的范围内的“点击”反应的理想条件是使用含水溶剂，但是如果参与合成的物质(多糖盐或衍生物)能够溶于其中，则不排除可选地采用有机溶剂的可能性，并且优选非质子极性有机溶剂，或混合溶剂。取决于多糖的类型和衍生物的类型，单独的多糖衍生物在反应混合物中的浓度通常为1-500mg/ml，优选为5-100mg/ml。两种情况下的反应温度通常为4-60℃，尤其为15-40℃，而交联产物以及随之的水凝胶的形成发生在搅拌时间之后，所述搅拌时间为几秒钟-30分钟，尤其是几秒钟-10分钟。

环加成反应可以通过Cu(I)盐成分的催化作用来进行，所述Cu(I)盐以1-50mg/ml，优选1-5mg/ml的终浓度存在于含水反应混合物中，或者可以通过原位产生Cu(I)的体系的催化作用来进行，所述体系优选由催化浓度的Cu(II)盐(例如CuSO₄)和抗坏血酸组成，或者如果在这些条件下上述反应性基团上的取代基导致该反应仍旧快速且有效地进行，则不采用任何催化剂。

作为本发明的目的并且由上述反应获得的水凝胶具有进一步吸收水或溶剂的能力并且发生溶胀，并且其特性之一依赖于粘弹性，该粘弹性可以根据达到的交联度来调节。尤其，这些水凝胶可以以或多或少具有粘性和粘膜粘附性的流体形式存在，或者为壁-壁型紧密三维结构，因此其具有更大的机械抵抗力(参见图5)。

简言之，可以获得作为本发明的目的的水凝胶并且考虑下列参数来进行调节：

- i. 原料多糖或其衍生物的分子量；
- ii. 就随后要用于产生交联的基团而言，原料多糖或其衍生物的衍生程度；
- iii. 就原料多糖的衍生物而言，与未进行交联的羧酸基团相连的分子的类型及其衍生程度；
- iv. 用于获得凝胶的原料的浓度；
- v. 可能在多糖和 Y^1 基团之间充当间隔的 R^1 基团的类型；
- vi. 在其中制备凝胶的溶液的类型。

由于如此合成的凝胶衍生自多糖基质，因此其被广泛用于医学领域，尤其是粘弹性补充治疗和整形外科、肿瘤外科和重建外科中。

优选将水凝胶形式的交联衍生物用在整形外科中作为皮肤填充物，在肿瘤外科和重建外科中作为填充物，在基因治疗中作为释放多核苷酸的基质，在组织工程中作为组织再生中含有支持体的细胞材料。

尤其，在骨关节病领域中，针对软骨和关节组织变性疾病的一个最广泛使用和有效的治疗类型是向关节内注射具有显著的粘弹性的化合物，已经证实通过改变上面详述的一个或多个参数来调节本文中描述的水凝胶的流变学特性的能力是研发创新性医学装置的有利手段。

此外，采用不同的方法，通过在关节内首先注射一个组分，然后注射第二个组分，在采用或不采用基于 $Cu(I)$ 的催化剂的情况下，可以将本发明中描述的交联方法用于在滑液腔内直接形成由透明质酸(和/或其衍生物)组成的水凝胶，其中由于所述注射是由初始粘度低的溶液组成的因此两次注射只是轻微疼痛。

将本发明的交联衍生物用在骨关节领域中的另一个优越性在于如下事实：相对于以流体形式注射并以原始多糖或者按照与本发明不同的方法交联的多糖为基础的粘弹性补充治疗化合物而言，水凝胶形式的交联透明质酸，尤其是如果以更稳定的键，例如酰胺键在羧基水平上进行了衍生化时，其具有更长的化学降解时间，从而可以在给药位

置处产生更长的停留时间。

37℃下在 0.2M PBS 中和在人造血浆中对 HA 的交联衍生物(如本专利申请实施例 3 中所述的,以水凝胶形式获得)进行体外降解研究,其结果可以证实近来的令人惊讶的特性。

事实上,在下表中看到了 ACP[®] 5% (自交联聚合物,含约 5% HA 的内酯)与所描述的作为实施例 3 的产物的衍生物之间的比较数据,其涉及在 37℃下、0.2M PBS 中所进行的降解试验,其中化学和流变学稳定性的评价参数分别为衍生物在羧基水平上的取代度和动态粘度。按照下述方式实现所述试验:将已知量的各个衍生物溶胀在已知体积的 H₂O 中并用 PBS 稀释所述水凝胶直至达到 10mg/ml 的物质浓度。在于 37℃下进行培养的过程中,在各次观察时监测衍生物取代度的降低和获得的水凝胶的粘度损失。

衍生物	参数	t = 0	t = 1g	t = 2gg	t = 3gg	t = 4gg	t = 5gg	t = 7gg	t = 10gg
ACP [®] 5%	取代度 (% mol/mol)	6.9	6.7	6.3	5.9	5.8	5.4	4.5	3.2
	动态粘度 (Pa·s)	12.5	10.4	7.1	4.6	3.1	2.0	1.2	0.7
通过 点击化学 进行交联	取代度 (% mol/mol)	11.2	11.1	11.4	11.1	10.8	10.9	10.8	10.7
	动态粘度 (Pa·s)	36.1	35.5	34.0	34.6	33.8	32.8	31.1	29.9

除了在生理学条件下具有明显的化学稳定性之外,还观察到流变学性能的维持时间大大延长。

因此,该多功能性、粘弹性、生物相容性和缓慢的生物降解特性使本发明的交联衍生物可以在整形外科中用作皮肤填充物。

本发明的水凝胶的一个重要特性在于如下事实:在多糖的交联过

程中可以向其中结合许多生物学或药理学活性分子而不会显著影响反应速率和产率,并且不会参与到所述过程中导致形成不希望的副产物。事实上,用在本发明的方法中的、参与环加成反应的官能团的特征在于高的特定反应性,或者可以对其进行任意选择从而使分子中存在的待结合的官能团本身是惰性的。

因此,本发明的目的涉及一种制备填充有一个或多个生物学或药理学活性分子的药理学活性分子的(由之前描述的方法获得的)凝胶形式的控制释放体系,其中这些分子在与待交联的部分多糖衍生物一起形成凝胶之前被溶解在反应溶剂中(无论是含水的或是有机溶剂),然后在交联之后仍保持物理地和均匀地结合在形成的聚合基质中。

在根据本发明的生物学和/或药理学活性分子和/或大分子的控制释放体系中,所述具有生物学或生理学活性的分子和/或大分子选自活性物质(principle),例如蛋白质、生长因子、酶、抗肿瘤药物、细胞抑制剂、类固醇和非类固醇抗炎药物、抗生素、抗菌药物、抗病毒药物、抗真菌药物、麻醉剂、镇痛药、镇静剂、胆碱能和肾上腺素能激动药和拮抗药、抗血栓药物、抗凝血剂、止血药物、用于局部、皮下、肌肉内或关节内的纤维蛋白溶解药物和血栓溶解药物。

为了说明的目的,下文中显示了结合在水凝胶形式的基质中的抗肿瘤药物(多柔比星)和抗炎药物(苄达明)的释放曲线,其中所述水凝胶是通过使适当的叠氮化物和透明质酸的炔衍生物进行胡伊斯根反应交联后而获得的(对于进一步和更多的详细描述可以参见有关的实施例部分,尤其是实施例13)。

在第一种情况中,在约50h时观察到释放了最大量的多柔比星盐酸盐,其等于初始结合在凝胶中的量的50%(参见图6)。

在第二个图中,在约6h时释放最大量的苄达明盐酸盐,其等于初始结合在凝胶中的药物量的80%(参见图7)。

这些凝胶形式的控制药物释放体系可以应用于许多领域中,但是尤其的是皮肤病学、肿瘤学、肺病学和骨关节病领域中。

尤其,在用于关节内的情况下,上述凝胶可以含有活性物质,例

如抗炎物质、金属-蛋白酶抑制剂、NO合成酶抑制剂或用于治疗关节和/或关节炎病状的其它生物学活性分子,从而获得与由所述凝胶提供的主要的机械粘弹性补充治疗作用有关的活性物质的缓慢释放。

尤其,本发明的目的涉及控制释放体系在肿瘤重建外科或肿瘤神经外科中,在除去癌物质之后的使用,其中所述水凝胶含有抗肿瘤药物和/或抑制细胞生长的药物和/或其前体作为药理学活性分子。

经证实,基于良好的生物相容性、缓慢的生物降解性和显著的粘膜粘附性所提供的特殊优越性,这些载有抗肿瘤药物和/或细胞生长抑制药物的控制释放体系在局部给药,例如在面部外科手术时特别有效和有利。

事实上,在这些形式的应用中,为了防止形成复发的肿瘤,交联多糖基质“填充物”本身的功能与被所述基质缓慢释放出的药物的活性有关。

之前描述的控制释放体系的可能给药位置包括由用以除去肿瘤物质的外科手术介入所产生的所有那些组织腔或间隙,其中适当的是引入具有结构和填充功能以及药理学活性的医药用水凝胶形式的生物相容性产品。尤其,在除去脑瘤(例如胶质瘤)之后进行鞘内给药是特别有益的,在除去腹部、膀胱、肝和胰腺肿瘤之后进行腹膜内给药是特别有益的,而对于重整性乳房整形外科而言,在除去乳腺肿瘤之后给药是特别有益的。

可以用在本发明的控制释放体系的该形式应用中的药理学活性分子例如为具有已知的抗肿瘤活性或细胞抑制活性的所有分子和/或其可能的前提,尤其是在治疗如上所列的肿瘤中药理学有效的分子,优选紫杉醇、多柔比星、伊立替康(irinotecan)、5-氟尿嘧啶、吉西他滨、长春新碱和甲氨喋呤。

提供下列实施例来更好地说明本发明。

实施例 1

在 EDC•HCl 和 NHS 存在下,在含水溶剂中于 pH = 4 的条件下用 11-

叠氮基-3, 6, 9-三氧杂十一烷-1-胺对 HANa 进行酰胺化

将 2g 700kDa 的 HA 钠盐溶解在 80ml 100mM、pH = 4 的 MES 缓冲液中。之后依次加入下列反应物：1.43g EDC•HCl (N-(3, 二甲基氨基丙基)-N'-乙基碳二亚胺盐酸盐) 和 0.86g NHS (N-羟基琥珀酰亚胺)，以及随后的 3.30ml 90% 的 11-叠氮基-3, 6, 9-三氧杂十一烷-1-胺。将混合物在室温下搅拌 24 小时，之后将其用饱和 NaCl 溶液进行透析 (MWCO = 12kDa) 24 小时，然后用蒸馏水进行透析至达到恒定的电导率。随后将溶液转移至烧瓶中，在液氮中冷冻并冻干。回收为白色粉末的产物 1 (参见图 8)。

产物 1 与炔丙基胺的反应

将 500mg 产物 1 溶解在 20ml 蒸馏水中。然后加入 2ml 炔丙基胺和 2ml 先前制备的 2% w/v 的 CuCl 水溶液。在室温下搅拌混合物 1 小时，将溶液用饱和 NaCl 溶液进行透析 (MWCO = 12kDa) 24 小时，然后用蒸馏水进行透析至达到恒定的电导率。随后将所述溶液转移至烧瓶中，在液氮中冷冻并冻干，回收为白色粉末的产物 (参见图 9)。

实施例 2

在 EDC•HCl 和 NHSS 存在下，在含水溶剂中于 pH = 4 的条件下用炔丙基胺对 HANa 进行酰胺化

将 1.43g EDC•HCl、1.62g NHSS 和随后的 1.04ml 炔丙基胺加入到溶于 80ml 100mM、pH = 4 的 MES 缓冲液中的 2g 200kDa HA 钠盐中。在室温下搅拌混合物 24 小时，然后将其转移至透析管 (MWCO = 12kDa) 中，将其用 NaCl 溶液透析 24 小时，之后用蒸馏水进行透析至达到恒定的电导率。随后在液氮中冷冻所述溶液并冻干，以回收为白色粉末的产物 2 (参见图 10)。

产物 2 与 11-叠氮基-3, 6, 9-三氧杂十一烷-1-胺的反应

将 500mg 产物 2 溶解在 20ml 蒸馏水中。然后加入 3ml 11-叠氮基-3, 6, 9-三氧杂十一烷-1-胺和 2ml 先前制备的 2% w/v 的 CuCl 水溶液。在室温下搅拌混合物 1 小时，将溶液用饱和 NaCl 溶液进行透析 (MWCO

= 12kDa) 24 小时, 之后用蒸馏水进行透析至达到恒定的电导率。随后将所述溶液转移至烧瓶中, 在液氮中冷冻并冻干, 回收为白色粉末的产物(参见图 11)。

实施例 3

在 EDC•HCl 和 NHS 存在下, 在含水溶剂中于 pH = 4 的条件下用 11-叠氮基-3, 6, 9-三氧杂十一烷-1-胺对 HANa 进行酰胺化

将 2g 69kDa 的 HA 钠盐溶解在 80ml 100mM、pH = 4 的 MES 缓冲液中。然后依次加入 1.43g EDC•HCl (N-(3, 二甲基氨基丙基)-N'-乙基碳二亚胺盐酸盐) 和 0.86g 的 NHS (N-羟基琥珀酰亚胺) 和随后的 3.30ml 90% 的 11-叠氮基-3, 6, 9-三氧杂十一烷-1-胺。将混合物在室温、搅拌下放置 24 小时, 然后用饱和 NaCl 溶液进行透析 (MWCO = 12kDa) 24 小时, 之后用蒸馏水进行透析至达到恒定的电导率。随后将所述溶液转移至烧瓶中, 在液氮中冷冻并冻干, 回收为白色粉末的产物 3 (与图 8 具有同样的化学结构)。

在 EDC•HCl 和 NHS 存在下, 在含水溶剂中于 pH = 4 的条件下用炔丙基胺对 HANa 进行酰胺化

将 1.43g EDC•HCl、0.86g NHS 和随后的 1.04ml 炔丙基胺加入到溶解在 80ml 100mM、pH = 4 的 MES 缓冲液中的 2g 69kDa HA 钠盐中。将反应在室温、搅拌下放置 24 小时, 然后将其转移至透析管中 12kDa, 将其用饱和 NaCl 溶液透析 24 小时, 之后用蒸馏水进行透析至达到恒定的电导率。随后在液氮中冷冻所述溶液并冻干, 以回收为白色粉末的产物 4 (与图 10 具有相同的化学结构)。

在含水溶剂中形成透明质酸的水凝胶

将 400mg 产物 3 和 400g 产物 4 分别溶解在 8ml 蒸馏水中, 直至完全溶解。将 30mg CuCl 单独溶解在 1.50ml 蒸馏水中。然后混合聚合物溶液, 随后加入 CuCl 溶液并旋转搅拌几分钟至形成凝胶(参见图 12)。然后使所述凝胶用蒸馏水进行透析以除去过量的 CuCl, 直至凝胶达到恒重为止。

实施例 4

在 EDC•HCl 和 NHSS 存在下, 在含水溶剂中于 pH = 6 的条件下用 11-叠氮基-3, 6, 9-三氧杂十一烷-1-胺对 HANa 进行酰胺化

将 1g 200kDa 的 HA 钠盐溶解在 80ml 100mM、pH = 6 的 MES 缓冲液中。然后加入 478mg EDC•HCl 和 540mg NHSS (N-羟基磺基琥珀酰亚胺) 和随后的 1.65ml 90% 的 11-叠氮基-3, 6, 9-三氧杂十一烷-1-胺。在室温下搅拌溶液 8 小时, 然后在 12kDa 的分割管 (cut-off tube) 中用饱和 NaCl 溶液进行透析, 之后用蒸馏水进行透析至达到恒定的电导率。随后将所述溶液转移至烧瓶中, 在液氮中冷冻并冻干, 回收为白色粉末的产物 5 (具有于图 8 相同的化学结构)。

在 EDC•HCl 和 NHSS 存在下, 在含水溶剂中于 pH = 6 的条件下用炔丙基胺对 HANa 进行酰胺化

将 1g 200kDa 的 HA 钠盐溶解在 80ml 100mM、pH = 6 的 MES 缓冲液中。然后加入 478mg EDC•HCl 和 540mg NHSS, 以及随后的 0.520ml 炔丙基胺。将体系在室温、搅拌下放置 8 小时, 然后用饱和 NaCl 溶液进行透析 (MWC0 = 12kDa) 24 小时, 之后用蒸馏水进行透析至达到恒定的电导率。随后冷冻被转移至烧瓶中的溶液并将其冻干, 以回收为白色粉末的产物 2。

在 BSA 存在下, 在含水溶剂中形成透明质酸的水凝胶

制备 20ml 牛血清白蛋白 (BSA) 的 1% w/v 水溶液; 然后将 300mg 产物 5 完全溶解在 6ml 上述溶液中, 之后对产物 2 进行类似的步骤。单独制备 2% w/v 的 CuCl 水溶液。混合所述聚合物溶液, 随后加入 1ml CuCl 溶液并旋转搅拌几分钟至形成图 12 的凝胶。然后使凝胶用蒸馏水进行透析至达到恒重。

实施例 5

在 EDC•HCl 和 NHS 存在下, 在含水溶剂中于 pH = 4 的条件下用 11-叠氮基-3, 6, 9-三氧杂十一烷-1-胺对 HANa 进行酰胺化

将 2g 69kDa 的 HA 钠盐溶解在 80ml 100mM、pH = 4 的 MES 缓冲液中。然后依次加入 1.43g EDC•HCl (N-(3, 二甲基氨基丙基)-N'-乙基碳二亚胺盐酸盐)、0.86g NHS (N-羟基琥珀酰亚胺) 和随后的 3.30ml 90% 的 11-叠氮基-3,6,9-三氧杂十一烷-1-胺。使反应在室温、搅拌下放置 24 小时, 之后用饱和 NaCl 溶液进行透析 (MWC0 = 12kDa) 24 小时, 然后用蒸馏水进行透析至达到恒定电导率。随后将所述溶液转移至烧瓶中, 在液氮中冷冻并冻干, 回收为白色粉末的产物 3 (与图 8 具有相同的化学结构)。

在 EDC•HCl 和 NHS 存在下, 在含水溶剂中于 pH = 4 的条件下用炔丙基胺对 HANa 进行酰胺化

将 1.43g EDC•HCl、0.86g NHS 和之后的 1.04ml 炔丙基胺加入到溶解在 80ml 100mM、pH = 4 的 MES 缓冲液中的 2g 69kDa HA 钠盐中。使反应在室温、搅拌下放置 24 小时, 然后将所述溶液转移至 12kDa 的分割透析管中并用饱和 NaCl 溶液进行透析 24 小时, 之后用蒸馏水进行透析至达到恒定电导率。随后在液氮中冷冻所述溶液并冻干, 以回收为白色粉末的产物 4 (与图 10 具有相同的化学结构)。

在 BSA 存在下, 在含水溶剂中形成透明质酸的水凝胶

制备 25ml 2% w/v 的牛血清白蛋白 (BSA) 水溶液; 然后将 400mg 产物 3 和 400mg 产物 4 完全溶解在 8ml 上述溶液中。将 30mg CuCl 单独溶解在 1.50ml 蒸馏水中。然后混合聚合物溶液, 随后加入 CuCl 溶液并旋转搅拌几分钟至形成图 12 的凝胶。然后使所述凝胶从蒸馏水中透析以除去过量的 CuCl。

实施例 6

在 EDC•HCl 和 NHS 存在下, 在含水溶剂中于 pH = 4 的条件下用 11-叠氮基-3,6,9-三氧杂十一烷-1-胺对 HANa 进行酰胺化

将 2g 69kDa 的 HA 钠盐溶解在 80ml 100mM、pH = 4 的 MES 缓冲液中。然后依次加入 1.43g EDC•HCl (N-(3, 二甲基氨基丙基)-N'-乙基碳二亚胺盐酸盐)、0.86mg NHS (N-羟基琥珀酰亚胺) 和随后的 3.30ml 90

%的 11-叠氮基-3,6,9-三氧杂十一烷-1-胺。使反应在室温、搅拌下放置 24 小时,之后用饱和 NaCl 溶液进行透析(MWCO = 12kDa) 24 小时,然后用蒸馏水进行透析至达到恒定的电导率。随后将所述溶液转移至烧瓶中,在液氮中冷冻并冻干,回收为白色粉末的产物 3(与图 8 具有相同的化学结构)。

在 EDC•HCl 和 NHS 存在下,在含水溶剂中于 pH = 4 的条件下用炔丙基胺对 HANa 进行酰胺化

将 1.43g EDC•HCl、0.86g NHS 和之后的 1.04ml 炔丙基胺加入到溶解在 80ml 100mM、pH = 4 的 MES 缓冲液中的 2g 69kDa HA 钠盐。使反应在室温、搅拌下放置 24 小时,然后将所述溶液转移至 12kDa 的分割透析管中,用饱和 NaCl 溶液进行透析 24 小时,之后用蒸馏水进行透析至达到恒定的电导率。随后在液氮中冷冻所述溶液并冻干,以回收为白色粉末的产物 4(与图 10 具有相同的化学结构)。

在 IL-2 存在下,在含水溶剂中形成透明质酸的水凝胶

将 400mg 产物 3 和 400mg 产物 4 分别溶解在 8ml 蒸馏水中直至完全溶解。将 0.5mg 白细胞介素 2(IL 2)也溶解在 0.5ml 水中。将 30mg CuCl 单独溶解在 1.50ml 蒸馏水中。然后混合聚合物溶液,随后加入白细胞介素 2 的溶液,并对混合物进行轻微搅拌。最后加入 CuCl 溶液,旋转搅拌几分钟直至形成凝胶(参见图 12)。然后使所述凝胶用蒸馏水进行透析以除去过量的 CuCl。

在多柔比星盐酸盐存在下,在含水溶剂中形成透明质酸的水凝胶

将 400mg 产物 3 和 400mg 产物 4 分别溶解在 8ml 蒸馏水中直至完全溶解。将 15mg 多柔比星也溶解在 1ml 水中。将 30mg CuCl 单独溶解在 1.50ml 蒸馏水中。然后混合物聚合物溶液,随后加入所述多柔比星盐酸盐溶液,对混合物进行轻微搅拌。最后加入 CuCl 溶液,旋转搅拌几分钟直至形成凝胶(参见图 12)。然后使所述凝胶用蒸馏水进行透析以除去过量的 CuCl。

实施例 7

在 EDC•HCl 和 NHS 存在下,在含水溶剂中于 pH = 4 的条件下用 11-叠氮基-3,6,9-三氧杂十一烷-1-胺对 CMC 进行酰胺化

将 2g CMC(羧甲基纤维素)溶解在 80ml 100mM、pH = 4 的 MES 缓冲液中。加入 1.57g EDC•HCl、0.94g NHS 和随后的 2.71ml 90% 的 11-叠氮基-3,6,9-三氧杂十一烷-1-胺。使溶液在室温、搅拌下放置 24 小时,然后用饱和 NaCl 溶液进行透析(MWCO = 12kDa) 24 小时,然后用蒸馏水进行透析至达到恒定的电导率。随后将所述溶液转移至烧瓶中,在液氮中冷冻并冻干,回收为白色粉末的产物 6。

在 EDC•HCl 和 NHS 存在下,在含水溶剂中于 pH = 4 的条件下用炔丙基胺对 HANa 进行酰胺化

将 2.87g EDC•HCl、1.72g NHS 和之后的 1.73ml 炔丙基胺加入到溶解在 80ml 100mM、pH = 4 的 MES 缓冲液中的 2g 69kDa HA 钠盐中。使反应在室温、搅拌下放置 24 小时,然后将所述溶液转移至透析管(MWCO = 12kDa)中,用饱和 NaCl 溶液进行透析 24 小时,之后用蒸馏水进行透析至达到恒定的电导率。随后在液氮中冷冻所述溶液并冻干,回收为白色粉末的产物 4(参见图 10)。

在含水溶剂中形成透明质酸和羧甲基纤维素的混合水凝胶

将 500mg 产物 6(CMC 的衍生物)溶解在 10ml 蒸馏水中,对产物 4 进行类似的操作。单独制备 2% w/v 的 CuCl 水溶液。将两个不同聚合物的溶液混合,然后加入 1.50ml CuCl 溶液,旋转搅拌几分钟至形成凝胶(图 13)。之后使所述凝胶用蒸馏水进行透析至达到恒重。

实施例 8

在 EDC•HCl 和 NHS 存在下,在含水溶剂中于 pH = 4 的条件下用 11-叠氮基-3,6,9-三氧杂十一烷-1-胺对 HANa 进行酰胺化

将 2g 200kDa 的 HA 钠盐溶解在 80ml 100mM、pH = 4 的 MES 缓冲液中。然后依次加入 1.43g EDC•HCl(N-(3,二甲基氨基丙基)-N'-乙基碳二亚胺盐酸盐)、0.86g NHS(N-羟基琥珀酰亚胺)和随后的 5.50ml 90% 的 11-叠氮基-3,6,9-三氧杂十一烷-1-胺。使反应在室温、搅拌下

放置 24 小时,之后用饱和 NaCl 溶液进行透析 24 小时,然后用蒸馏水进行透析至达到恒定的电导率。随后将所述溶液转移至烧瓶中,在液氮中冷冻并冻干,回收为白色粉末的产物 5(与图 8 具有相同的化学结构)。

在 EDC•HCl 和 NHS 存在下,在含水溶剂中于 pH = 4 的条件下用炔丙基胺对 CMC 进行酰胺化

将 2.36g EDC•HCl、1.41g NHS 和随后的 5.42ml 炔丙基胺加入到溶解在 80ml 100mM、pH = 4 的 MES 缓冲液中的 2g CMC 中。使反应在室温、搅拌下放置 24 小时,然后将所述溶液转移至透析管(MWCO = 12kDa)中并用饱和 NaCl 溶液进行透析 24 小时,之后用蒸馏水进行透析至达到恒定电导率。随后在液氮中冷冻所述溶液并冻干,回收作为白色粉末的产物 7。

在含水/有机溶剂中形成透明质酸和 CMC 的混合水凝胶

将 500mg 产物 5 和 500mg 产物 7(CMC 的衍生物)分别溶解在 5ml 蒸馏水和 5ml NMP 中。将 30mg CuCl 单独溶解在 1.50ml 蒸馏水中。然后混合聚合物的溶液,之后加入 CuCl 溶液,旋转搅拌几分钟至形成混合的透明质酸/羧甲基纤维素凝胶。然后使所述凝胶向着蒸馏水透析以除去 CuCl 和有机溶剂,所述透析进行至凝胶达到恒重为止。

实施例 9

在 EDC•HCl 和 NHS 存在下,在含水溶剂中于 pH = 4 的条件下用 11-叠氮基-3,6,9-三氧杂十一烷-1-胺对 Hyaff11p50 进行酰胺化

将 2g Hyaff11p50 溶解在 80ml 100mM、pH = 4 的 MES 缓冲液中。然后依次加入 1.32g EDC•HCl(N-(3,二甲基氨基丙基)-N'-乙基碳二亚胺盐酸盐)、0.79g NHS(N-羟基琥珀酰亚胺)和随后的 3.04ml 90%的 11-叠氮基-3,6,9-三氧杂十一烷-1-胺。使混合物在室温、搅拌下放置 24 小时,然后用饱和 NaCl 溶液进行透析(MWCO = 12kDa)24 小时,之后逆者蒸馏水透析至达到恒定的电导率。随后将所述溶液转移至烧瓶中,在液氮中冷冻并冻干,回收为白色粉末的产物 8。

在 EDC•HCl 和 NHS 存在下，在含水溶剂中于 pH = 4 的条件下用 3-氧杂十一烷-1-胺对 Hyaff11p50 进行酰胺化

将 1.32g EDC•HCl、0.79g NHS 和之后的 0.95ml 3-氧杂十一烷-1-胺加入到溶解在 80ml 100mM、pH = 4 的 MES 缓冲液中的 2g Hyaff11p50 中。使反应在室温、搅拌下放置 24 小时。然后将所述溶液转移至透析管 (MWCO = 12kDa) 中并用饱和 NaCl 溶液进行透析 24 小时，之后用蒸馏水进行透析至达到恒定电导率。随后在液氮中冷冻所述溶液并冻干，回收为白色粉末的产物 9。

在含水/有机溶剂中形成 Hyaff11p50 水凝胶

将 400mg 上述的衍生物 8 和 9 各自分别溶解在 4ml 蒸馏水和 4ml NMP 中。将 30mg CuCl 单独溶解在 1.50ml 蒸馏水中。然后混合聚合物的溶液，之后加入 CuCl 溶液并将混合物旋转搅拌几分钟至形成凝胶 (参见图 14)。然后使所述凝胶用蒸馏水进行透析以除去过量的 CuCl，直至所述凝胶达到恒重。

实施例 10

在 EDC•HCl 和 NHSS 存在下，在含水溶剂中于 pH = 6 的条件下用 11-叠氮基-3,6,9-三氧杂十一烷-1-胺对 Hyaff9p10 进行酰胺化

将 1g Hyaff9p10 溶解在 80ml 100mM、pH = 6 的 MES 缓冲液中。然后加入 470mg EDC•HCl、530mg NHSS (N-羟基磺基琥珀酰亚胺) 和随后的 1.60ml 90% 的 11-叠氮基-3,6,9-三氧杂十一烷-1-胺。使所述溶液在室温、搅拌下放置 8 小时，然后在试管 (分割点 12kDa) 中用饱和 NaCl 溶液进行透析，之后用蒸馏水进行透析至达到恒定的电导率。随后将所述溶液转移至烧瓶中，在液氮中冷冻并冻干。回收为白色粉末的产物 10。

在 EDC•HCl 和 NHSS 存在下，在含水溶剂中于 pH = 6 的条件下用 3-氧杂十一烷-1-胺对 Hyaff9p10 进行酰胺化

将 1g Hyaff9p10 溶解在 80ml 100mM、pH = 6 的 MES 缓冲液中。然后将 470mg EDC•HCl、540mg NHSS 和之后的 530ml (3x) 3-氧杂十一烷-1-胺加

入到所述溶液中。使体系在室温、搅拌下放置 8 小时并用饱和 NaCl 溶液进行透析 (MWC0 = 12kDa) 24 小时, 然后用蒸馏水进行透析至达到恒定的电导率。将所述溶液转移至烧瓶中, 随后冷冻并冻干, 以回收为白色粉末的产物 11。

在含水溶剂中形成 Hyaff9p10 水凝胶

使 300mg 产物 10 和 300mg 产物 11 分别完全溶解在 6ml 蒸馏水中。单独制备 2% w/v 的 CuCl 水溶液。然后混合聚合物溶液, 加入 1ml 所述 CuCl 溶液, 旋转搅拌所述混合物几分钟至形成凝胶 (参见图 15)。然后使所述凝胶用蒸馏水进行透析, 直至所述凝胶达到恒重。

实施例 11

在 EDC•HCl 和 NHS 存在下, 在含水溶剂中于 pH = 4 的条件下用 11-叠氮基-3, 6, 9-三氧杂十一烷-1-胺对 HANa 进行酰胺化

将 2g 200kDa 的 HA 钠盐溶解在 80ml 50mM、pH = 4 的 MES 缓冲液中。然后依次加入 2, 90g EDC•HCl (N-(3, 二甲基氨基丙基)-N'-乙基碳二亚胺盐酸盐)、1, 77g NHS (N-羟基琥珀酰亚胺) 和 5, 50ml 90% 的 11-叠氮基-3, 6, 9-三氧杂十一烷-1-胺。使反应在室温、搅拌下放置 48h, 然后用饱和 NaCl 溶液进行透析 (MWC0 = 14kDa) 24h, 和用蒸馏水进行透析至达到恒定的电导率。随后将所述溶液转移至烧瓶中, 在液氮中冷冻, 之后冻干。回收为白色粉末的产物 1 (参见图 16)。

在 EDC•HCl 和 NHS 存在下, 在含水溶剂中于 pH = 4 的条件下用炔丙基胺对 HANa 进行酰胺化

将 2, 90g EDC•HCl、1, 77g NHS 和之后的 1, 73ml 炔丙基胺加入到溶解在 80ml 50mM、pH = 4 的 MES 缓冲液中的 2g 200kDa HA 钠盐中。使反应在室温、搅拌下放置 48h, 然后将所述溶液转移至透析管 (MWC0 = 14kDa) 中并用饱和 NaCl 溶液进行透析 24h, 然后用蒸馏水进行透析至达到恒定电导率。随后在液氮中冷冻所述溶液并冻干, 以回收为白色粉末的产物 2 (参见图 17)。

在 BSA 存在下, 在含水溶剂中透明质酸与起催化作用的 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

和抗坏血酸形成水凝胶

制备 25ml 2% w/v 的牛血清白蛋白 (BSA) 水溶液; 然后将 500mg 产物 1 和 500mg 产物 2 溶解在 14ml 上述溶液中。随后加入 2ml 所得的水溶液以及 50mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 和 40mg 抗坏血酸的 4ml 水溶液, 旋转搅拌几分钟。将迅速形成的凝胶 (参见图 18) 结合在 BSA 蛋白质中。

在多柔比星盐酸盐存在下, 在含水溶剂中透明质酸与起催化作用的 CuCl 交联形成水凝胶

将 29mg 多柔比星盐酸盐溶解在 2ml 水中, 然后加入按上述方式合成的 50mg 产物 1 和 50mg 产物 2。随后将 830 μL 1% w/v 的 CuCl 溶液加入到所述溶液中, 几分钟后形成直接结合至存在于溶液中的药物中的凝胶。

测量药物多柔比星盐酸盐从水凝胶中的释放, 其中所述水凝胶基于与起催化作用的 CuCl 一起获得的交联透明质酸

采用 U.V. 分光光度测量法, 借助吸光度值内推法确定在 $\lambda = 486\text{nm}$ 处, 从溶于 100ml 蒸馏水中的水凝胶中释放出的多柔比星盐酸盐量, 其中所述吸光度值是以使用已知浓度的药物溶液构造的校准线为基础的。

在上面描述的水凝胶上测量药物的释放。

经过约 160h 释放出最大量的多柔比星盐酸盐, 其等于最初结合在凝胶中的药物量的 25% (参见图 19)。

在苜达明盐酸盐存在下, 在含水溶剂中透明质酸与起催化作用的 CuCl 交联形成水凝胶

将 69mg 苜达明盐酸盐溶解在 2ml 水中, 然后加入按照上述方式合成的 50mg 产物 1 和 50mg 产物 2。

随后将 830 μL 1% w/v 的 CuCl 溶液加入到溶液中, 几分钟后形成直接结合至药物中的凝胶。

测量药物苜达明盐酸盐从水凝胶中的释放, 其中所述水凝胶基于与起催化作用的 CuCl 一起获得的交联透明质酸

采用 U.V. 分光光度测量法, 借助吸光度值内推法确定在 $\lambda =$

308nm 处, 从溶于 100ml pH = 7.4 的磷酸缓冲溶液中的水凝胶中释放出的多柔比星盐酸盐量, 其中所述吸光度值是以使用已知浓度的药物溶液构造的校准线为基础的。

在上面描述的水凝胶上测量药物的释放。

经过约 3.5h 释放出最大量的多柔比星盐酸盐, 其等于最初结合在凝胶中的药物量的 88% (参见图 20)。

在苜达明盐酸盐存在下, 在含水溶剂中透明质酸与起催化作用的 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 和抗坏血酸交联形成水凝胶

将 50mg 产物 1 和 50mg 产物 2 溶解在 1, 3ml 蒸馏水中, 将 13, 8mg 苜达明盐酸盐单独溶解在 0, 5ml 蒸馏水中。使透明质酸溶液与苜达明盐酸盐溶液混合; 然后加入 0, 1ml 由 50mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 在 1ml H_2O 中获得的水溶液和 20mg 抗坏血酸的 0, 1ml 水溶液。

将所述混合物旋转搅拌几分钟。将迅速形成的凝胶结合至苜达明盐酸盐内部。

测量药物苜达明盐酸盐从水凝胶中的释放, 其中所述水凝胶基于与起催化作用的 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 一起获得的交联透明质酸

采用 U. V. 分光光度测量法, 借助吸光度值内推法确定在 $\lambda = 308\text{nm}$ 处, 从溶于 100ml 蒸馏水中的水凝胶中释放出的多柔比星盐酸盐量, 其中所述吸光度值是以使用已知浓度的药物溶液构造的校准线为基础的。

在上面描述的水凝胶上测量药物的释放。

经过约 5h 释放出最大量的多柔比星盐酸盐, 其等于最初结合在凝胶中的药物量的 70% (参见图 21)。

实施例 12

在 EDC \cdot HCl 和 NHS 存在下, 在 pH = 4 的条件下用 11-叠氮基-3, 6, 9-三氧杂十一烷-1-胺对 HANa 进行酰胺化

将 2g 200kDa HA 钠盐溶解在 80mL 50mM、pH = 4 的 MES 缓冲液中。随后依次加入 2, 90g EDC \cdot HCl (N-(3, 二甲基氨基丙基)-N'-乙基碳二

亚胺盐酸盐)、1,77g NHS (N-羧基琥珀酰亚胺)和 5,50ml 90%的 11-叠氮基-3,6,9-三氧杂十一烷-1-胺。使反应在室温、搅拌下放置 48h,然后用饱和 NaCl 溶液进行透析 (MWCO = 14kDa) 24h,和用蒸馏水进行透析至达到恒定的电导率。然后将所述溶液转移至烧瓶中,在液氮中冷冻,之后冻干。回收为白色粉末的产物 1。

在含水/有机溶剂中,产物 1 与 1,4-二乙炔基苯,和起催化作用的 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 和抗坏血酸使反应

将 500mg 产物 1 溶解在 45ml 蒸馏水中,将 150mg 1,4-二乙炔基苯溶解在 1,5ml DMSO 中。混合各溶液,然后加入 1,5ml 由 50mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 在 3ml H_2O 中获得的水溶液和 88mg 抗坏血酸的 2ml 水溶液。在室温下搅拌混合物 4h,然后将溶液用饱和 EDTA 溶液进行透析 (MWCO = 14kDa) 24h,之后用蒸馏水进行透析至达到恒定的电导率。随后将溶液转移至烧瓶中,在液氮中冷冻并冻干,回收为白色粉末的产物(参见图 22)。

在含水/有机溶剂中,产物 1 与 1,6-庚二炔,和起催化作用的 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 和抗坏血酸反应

将 500mg 产物 1 溶解在 45ml 蒸馏水中,将 0,13ml 1,6-庚二炔溶解在 1,5ml DMSO 中。混合各溶液,然后加入 1,5ml 由 50mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 在 3ml H_2O 中获得的水溶液和 88mg 抗坏血酸的 2ml 水溶液。在室温下搅拌混合物 4h,然后将溶液用饱和 EDTA 溶液进行透析 (MWCO = 14kDa) 24h,之后用蒸馏水进行透析至达到恒定的电导率。随后将所述溶液转移至烧瓶中,在液氮中冷冻并冻干,回收为白色粉末的产物(参见图 23)。

在含水/有机溶剂中,产物 1 与 1,8-壬二炔,和起催化作用的 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 和抗坏血酸反应

将 500mg 产物 1 溶解在 45ml 蒸馏水中,将 0,18ml 1,8-壬二炔溶解在 1,5ml DMSO 中。混合各溶液,随后加入 1,5ml 由 50mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 在 3ml H_2O 中获得的水溶液和 88mg 抗坏血酸的 2ml 水溶液。在室温下搅拌混合物 4h,将溶液用饱和 EDTA 溶液进行透析 (MWCO = 14kDa) 24h,

然后向着蒸馏水透析至达到恒定的电导率。然后将所述溶液转移至烧瓶中，在液氮中冷冻并冻干，回收为白色粉末的产物(参见图 24)。

在含水/有机溶剂中，产物 1 与炔丙基醚，和起催化作用的 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 和抗坏血酸反应

将 500mg 产物 1 溶解在 45ml 蒸馏水中，将 0,12ml 炔丙基醚溶解在 1,5ml DMSO 中。混合各溶液，随后加入 1,5ml 由 50mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 在 3ml H_2O 中获得的水溶液和 88mg 抗坏血酸的 2ml 水溶液。在室温下搅拌混合物 4h，然后将溶液用饱和 EDTA 进行透析(MWCO = 14kDa) 24h，之后用蒸馏水进行透析至达到恒定的电导率。然后将所述溶液转移至烧瓶中，在液氮中冷冻并冻干，回收为白色粉末的产物(参见图 25)。

实施例 13

在 EDC•HCl 和 NHS 存在下，在含水溶剂中于 pH = 4 的条件下用 11-叠氮基-3,6,9-三氧杂十一烷-1-胺对 HANa 进行酰胺化

将 2g 200kDa 的 HA 钠盐溶解在 80ml 50mM、pH = 4 的 MES 缓冲液中。随后依次加入 2,90g EDC•HCl (N-(3, 二甲基氨基丙基)-N'-乙基碳二亚胺盐酸盐)、1,77g NHS (N-羟基琥珀酰亚胺)和之后的 5,50ml 90% 的 11-叠氮基-3,6,9-三氧杂十一烷-1-胺。使反应在室温、搅拌下放置 48h，然后用饱和 NaCl 溶液进行透析(MWCO = 14kDa) 24h，和用蒸馏水进行透析至达到恒定的电导率。然后将所述溶液转移至烧瓶中，在液氮中冷冻，之后冻干。回收为白色粉末的产物 1。

在多柔比星盐酸盐存在下，在含水/有机溶剂中，透明质酸与 1,4-二乙炔基苯与起催化作用的 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 和抗坏血酸一起形成水凝胶

将 100mg 产物 1 溶解在 1,1ml 蒸馏水中，将 3mg 1,4-二乙炔基苯单独溶解在 0,2ml DMSO 中，而将 23,2mg 多柔比星盐酸盐溶解在 0,5ml 蒸馏水中。混合三个溶液，然后加入 0,1ml 由 50mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 在 1ml H_2O 中获得的水溶液和 20mg 抗坏血酸的 0,1ml 水溶液。旋转搅拌所述混合物几分钟。使迅速形成的凝胶(参见图 26)结合在多柔比星盐酸盐内部。

测量药物多柔比星盐酸盐从基于下述物质的水凝胶中的释放，其中在含水/有机溶剂中，根据上述结构进行交联而由透明质酸和 1,4-二乙炔基苯，和起催化作用的 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 和抗坏血酸一起获得所述水凝胶

采用 U.V. 分光光度测量法，借助吸光度值内推法确定在 $\lambda = 486\text{nm}$ 处，从溶于 100ml 蒸馏水中的水凝胶中释放出的多柔比星盐酸盐量，其中所述吸光度值是以使用已知浓度的药物溶液构造的校准线为基础的。

在上面描述的水凝胶上测量药物的释放。

经过约 50h 释放出最大量的多柔比星盐酸盐，其等于最初结合在凝胶中的药物量的 50% (参见图 27)。

在多柔比星盐酸盐存在下，在含水/有机溶剂中，透明质酸和 1,6-庚二炔与起催化作用的 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 和抗坏血酸形成水凝胶

将 100mg 产物 1 溶解在 1,1ml 蒸馏水中；单独制备 $140 \mu\text{l}$ 1,6-庚二炔在 9.86ml DMSO 中的溶液，而将 23,2mg 多柔比星盐酸盐溶解在 0,5ml 蒸馏水中。使透明质酸溶液与多柔比星溶液和 0.2ml 1,6-庚二炔溶液混合；然后加入 0,1ml 由 50mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 在 1ml H_2O 中获得的水溶液和 20mg 抗坏血酸的 0,1ml 水溶液。旋转搅拌所述混合物几分钟。使迅速形成的凝胶 (参见图 28) 结合在多柔比星盐酸盐内部。

测量药物多柔比星盐酸盐从水凝胶中的释放，其中所述水凝胶是基于透明质酸和 1,6-庚二炔和起催化作用的 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 和抗坏血酸而获得的

采用 U.V. 分光光度测量法，借助吸光度值内推法确定在 $\lambda = 486\text{nm}$ 处，从溶于 100ml 蒸馏水中的水凝胶中释放出的多柔比星盐酸盐量，其中所述吸光度值是以使用已知浓度的药物溶液构造的校准线为基础的。

经过约 250h 释放出最大量的多柔比星盐酸盐，其等于最初结合在凝胶中的药物量的 23% (参见图 29)。

在苄达明盐酸盐存在下，在含水/有机溶剂中，透明质酸和 1,6-

庚二炔与起催化作用的 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 一起形成水凝胶

将 100mg 产物 1 溶解在 1,1ml 蒸馏水中；单独制备 $140 \mu\text{l}$ 1,6-庚二炔在 9.86ml DMSO 中的溶液，而将 13,8mg 苄达明盐酸盐溶解在 0,5ml 蒸馏水中。使透明质酸溶液与苄达明溶液和 0.2ml 1,6-庚二炔溶液混合；然后加入 0,1ml 由 50mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 在 1ml H_2O 中获得的水溶液和 20mg 抗坏血酸的 0,1ml 水溶液。旋转搅拌所述混合物几分钟。使迅速形成的凝胶结合至苄达明盐酸盐内部。

测量药物苄达明盐酸盐从基于下述物质的水凝胶中的释放，其中根据上述结构进行交联而由透明质酸和 1,6-庚二炔和起催化作用的 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 和抗坏血酸一起获得所述水凝胶

采用 U.V. 分光光度测量法，借助吸光度值内推法确定在 $\lambda = 308\text{nm}$ 处，从溶于 100ml 蒸馏水中的水凝胶中释放出的苄达明盐酸盐量，其中所述吸光度值是以使用已知浓度的药物溶液构造的校准线为基础的。

经过约 6h 释放出最大量的苄达明盐酸盐，其等于最初结合在凝胶中的药物量的 80% (参见图 30)。

在多柔比星盐酸盐存在下，在含水/有机溶剂中，透明质酸和 1,8-壬二炔，与起催化作用的 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 和抗坏血酸一起形成水凝胶

将 100mg 产物 1 溶解在 1,1ml 蒸馏水中；单独制备 $200 \mu\text{l}$ 1,8-壬二炔在 11.23ml DMSO 中的溶液，而将 23,2mg 多柔比星盐酸盐溶解在 0,5ml 蒸馏水中。将透明质酸溶液与多柔比星溶液和 0.2ml 1,8-壬二炔溶液混合；然后加入 0,1ml 由 50mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 在 1ml H_2O 中获得的水溶液和 20mg 抗坏血酸的 0,1ml 水溶液。旋转搅拌所述混合物几分钟。使迅速形成的凝胶 (参见图 31) 结合至多柔比星盐酸盐内部。

测量药物多柔比星盐酸盐从水凝胶中的释放，其中所述水凝胶是基于透明质酸和 1,8-壬二炔和起催化作用的 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 而获得的

采用 U.V. 分光光度测量法，借助吸光度值内推法确定在 $\lambda = 486\text{nm}$ 处，从溶于 100ml 蒸馏水中的水凝胶中释放出的多柔比星盐酸盐量，其中所述吸光度值是以使用已知浓度的药物溶液构造的校准线

为基础的。

在上面描述的水凝胶上测量药物的释放。

经过约 100h 释放出最大量的多柔比星盐酸盐,其等于最初结合在凝胶中的药物量的 14% (参见图 32)。

通过胡伊斯根 1,3-偶极环加成形成 1,2,3-三唑

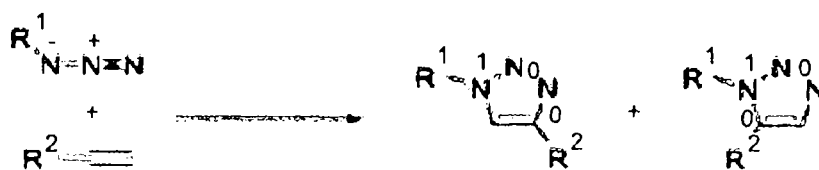
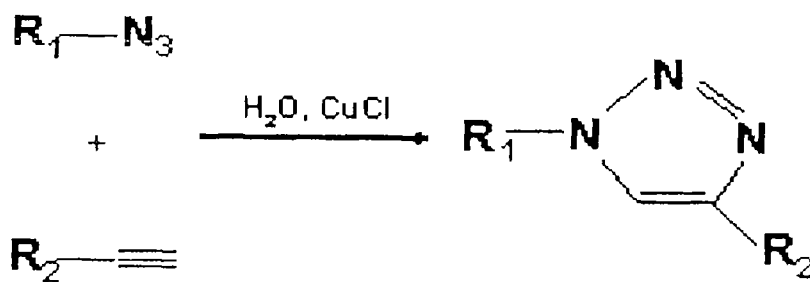
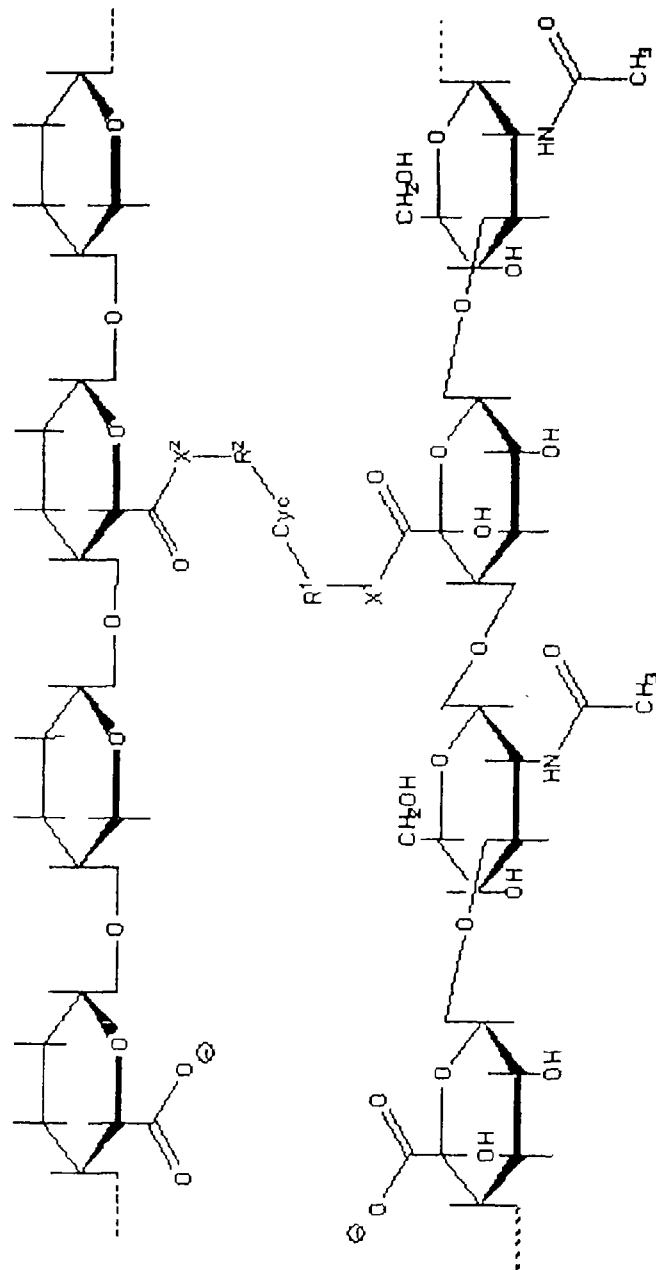


图 1



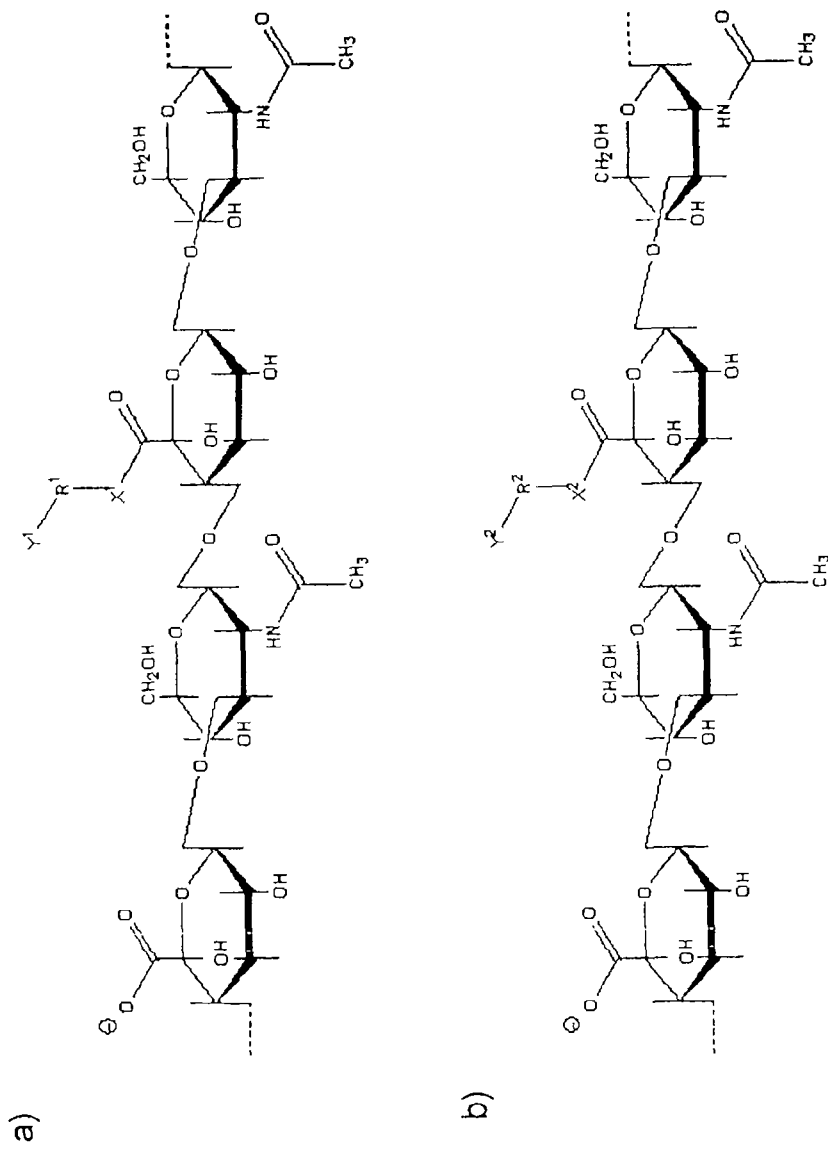
叠氮化物与炔烃之间的“点击化学”反应方案

图 2



本发明中描述的连接产物的一般结构

图3



可以在环加成反应中的多糖模块 a) 和 b) 的一般结构

图 4

4/24



通过胡伊斯根环加成(叠氮化物-炔烃)使透明质酸交联而获得的水凝胶

图5

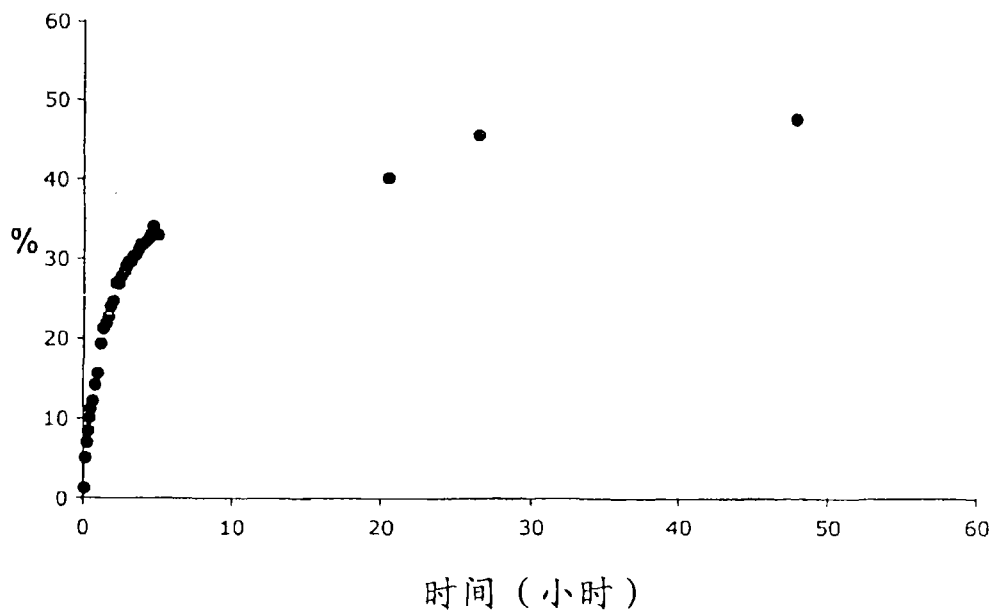


图6

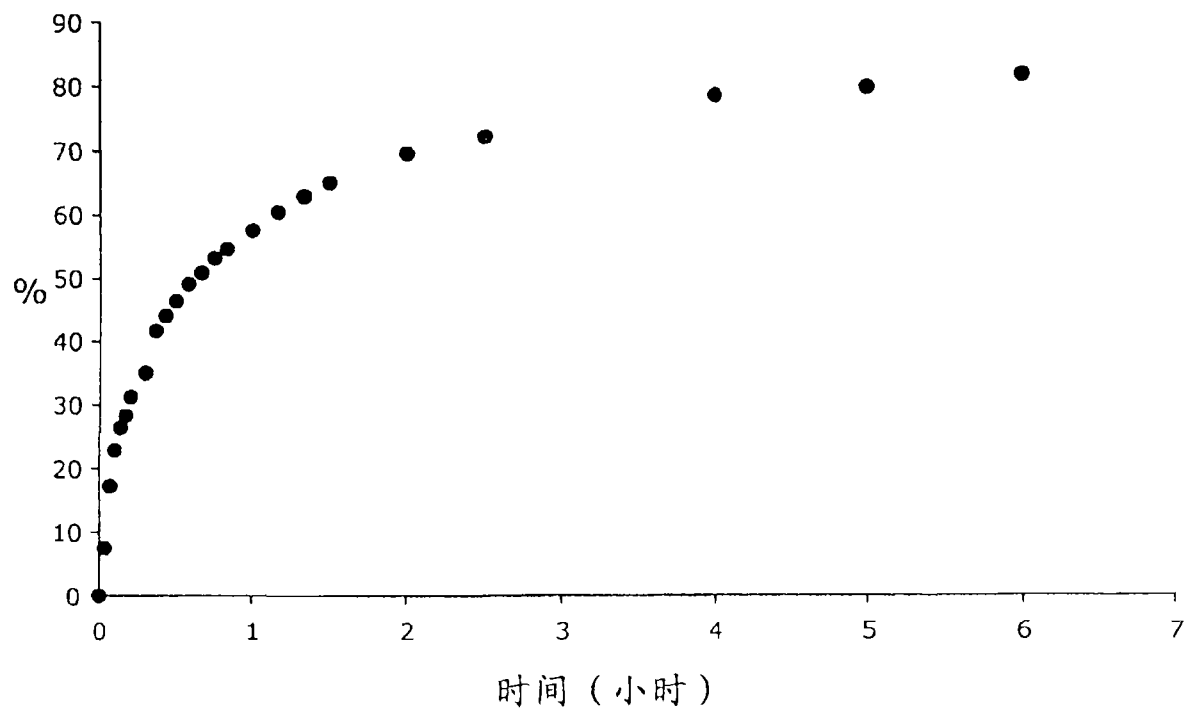


图 7

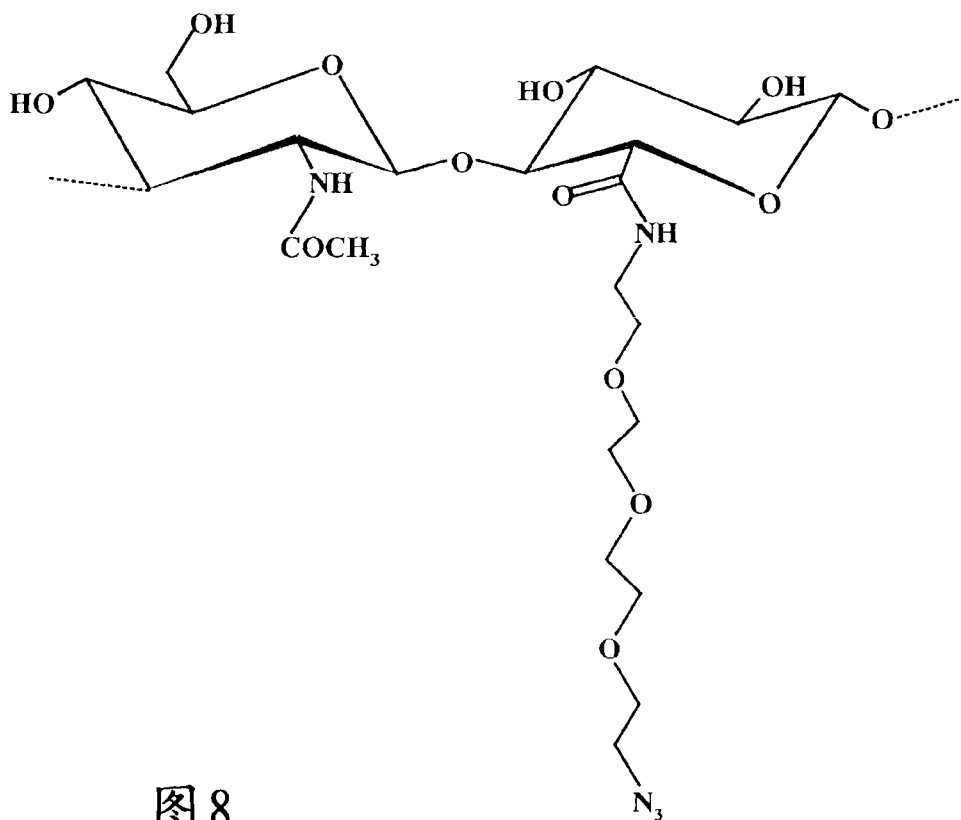


图 8

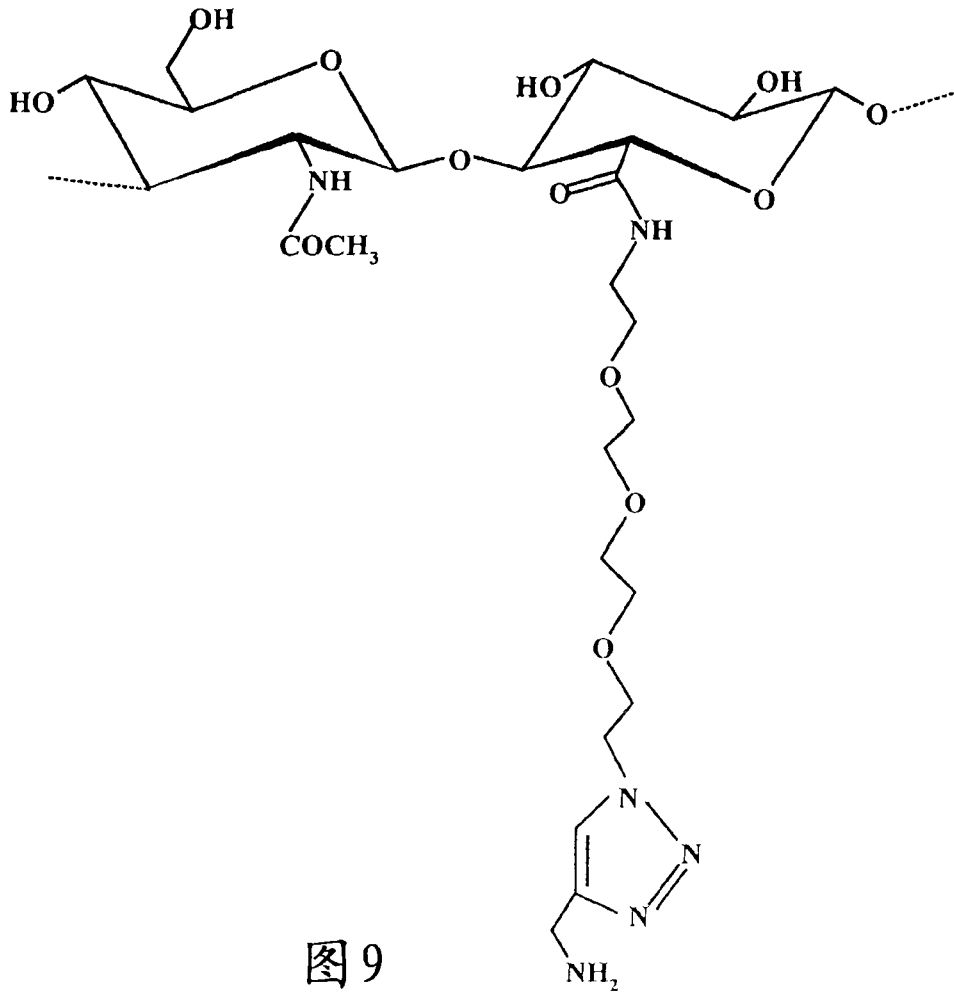


图9

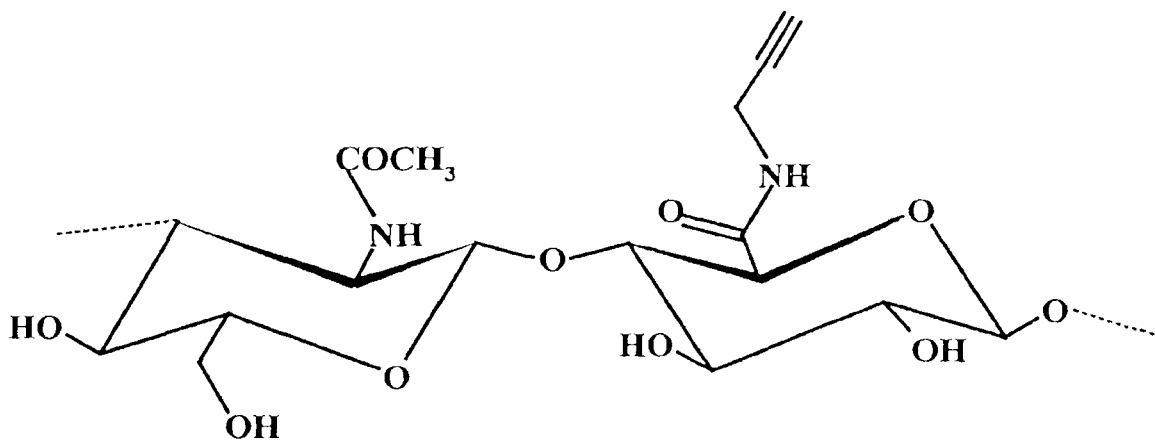


图10

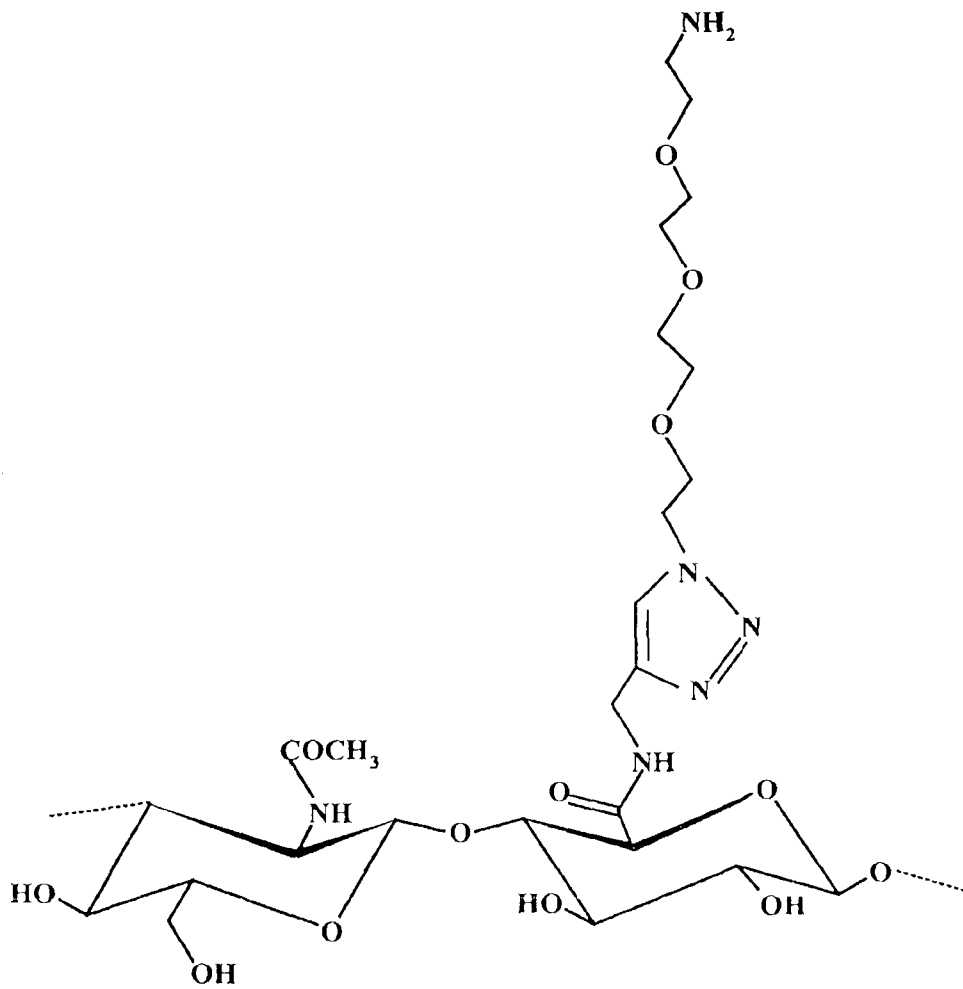


图 11

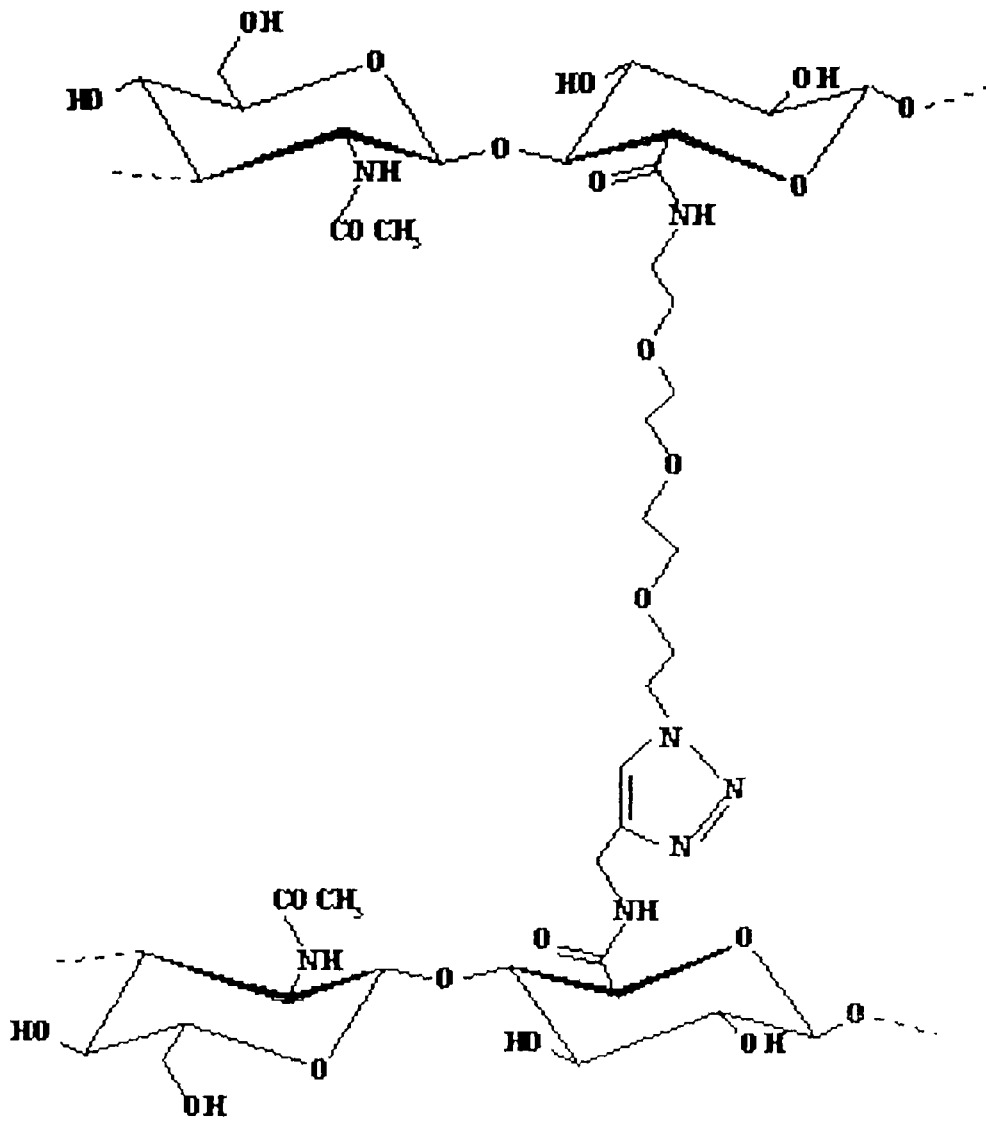


图12

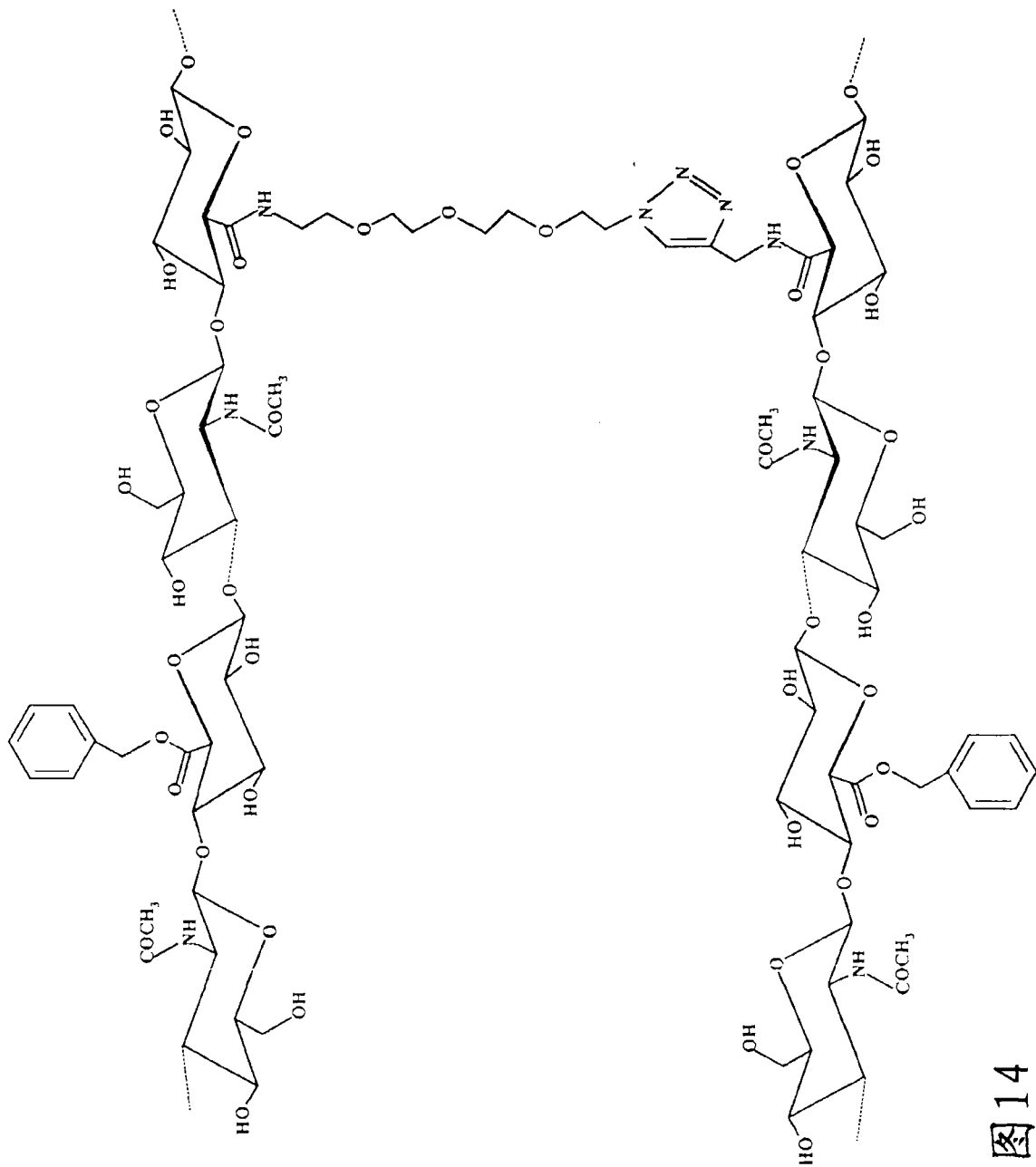


图14

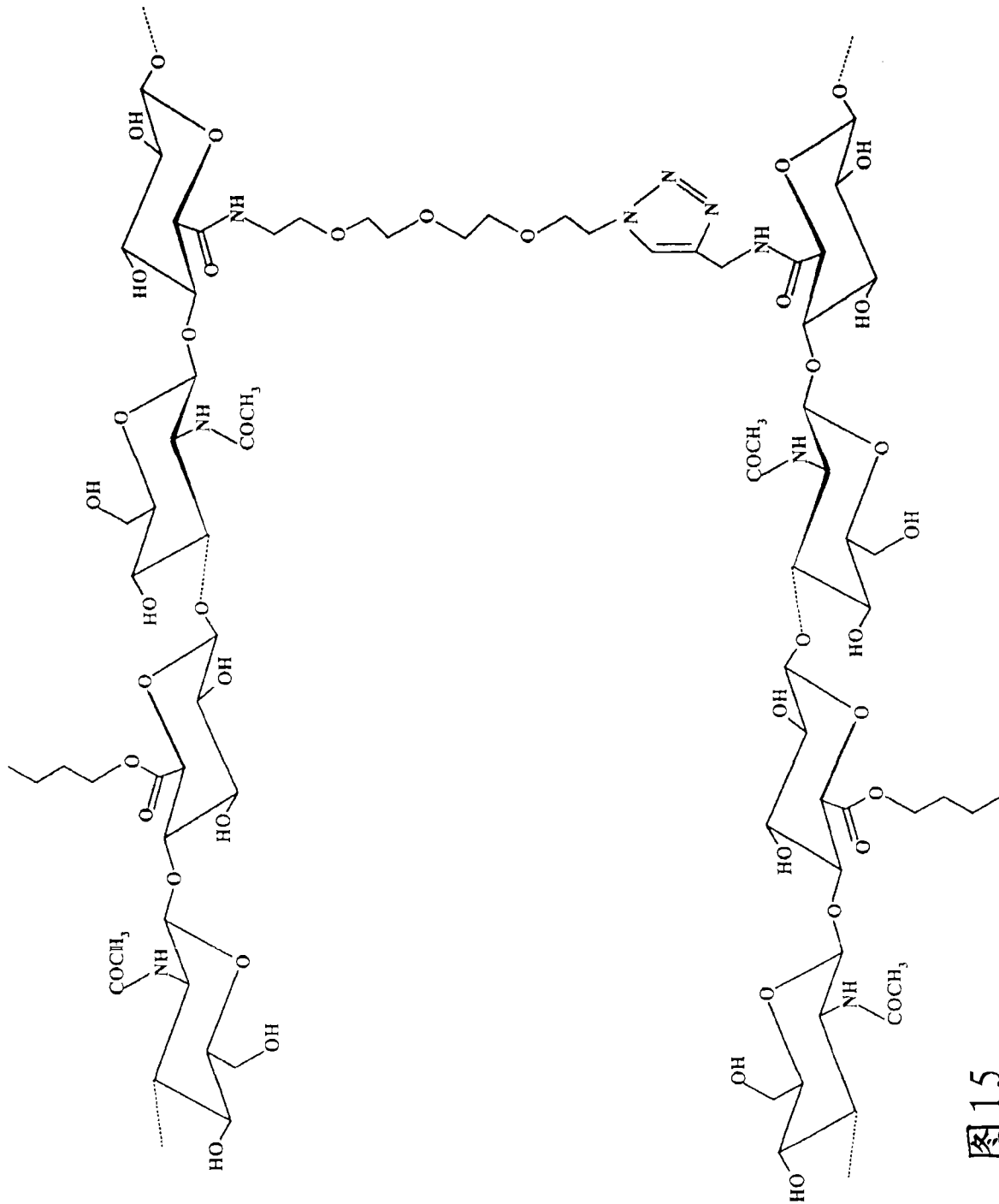


图15

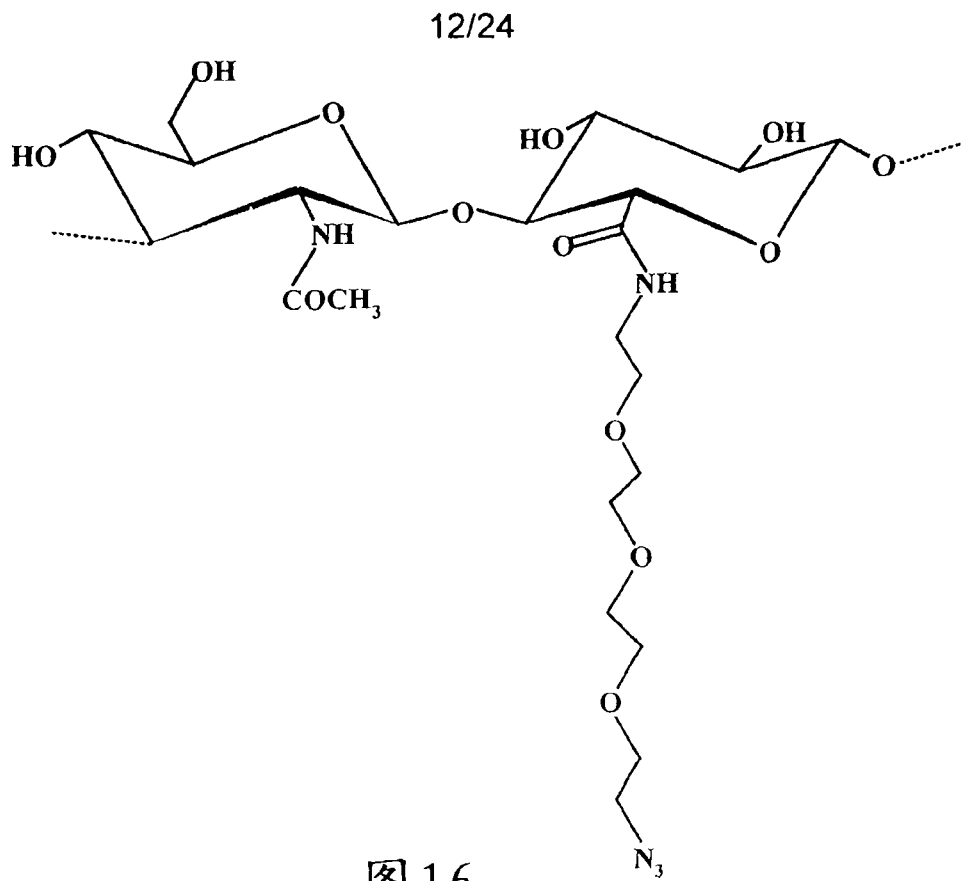


图 16

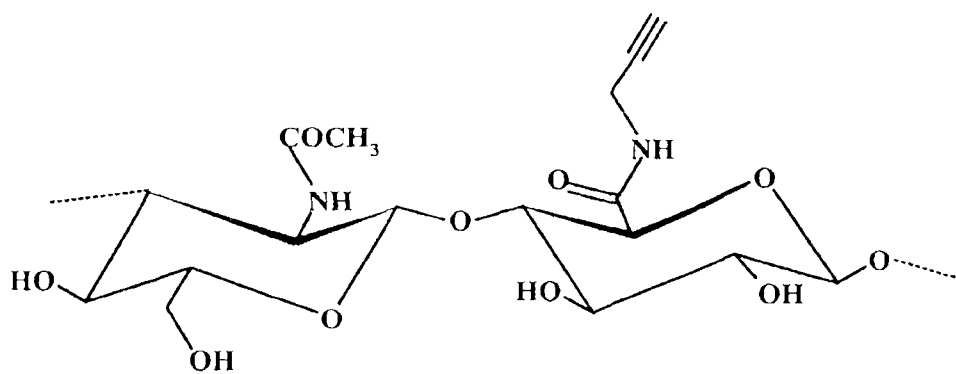


图 17

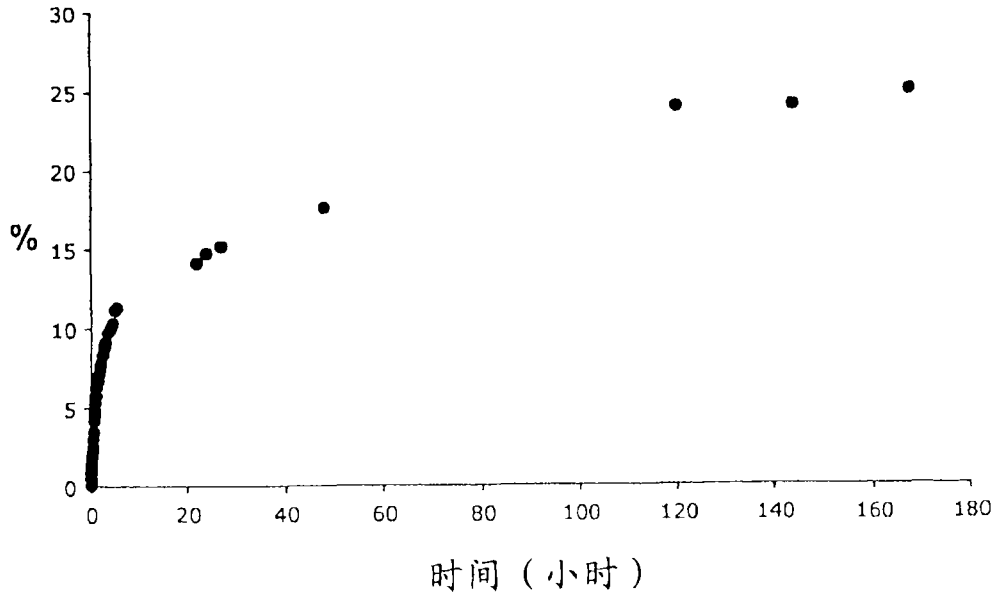


图19

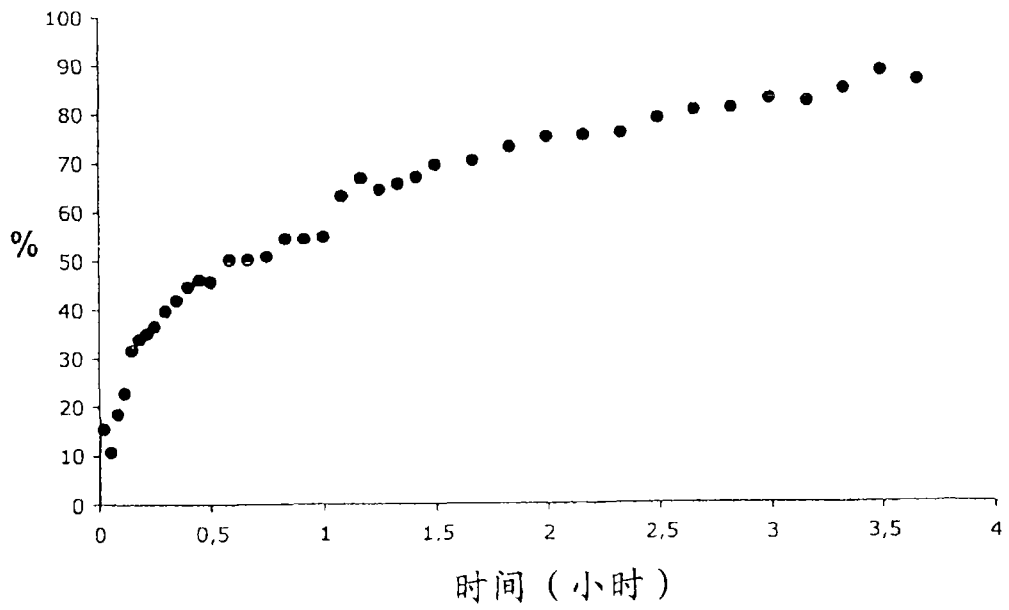


图20

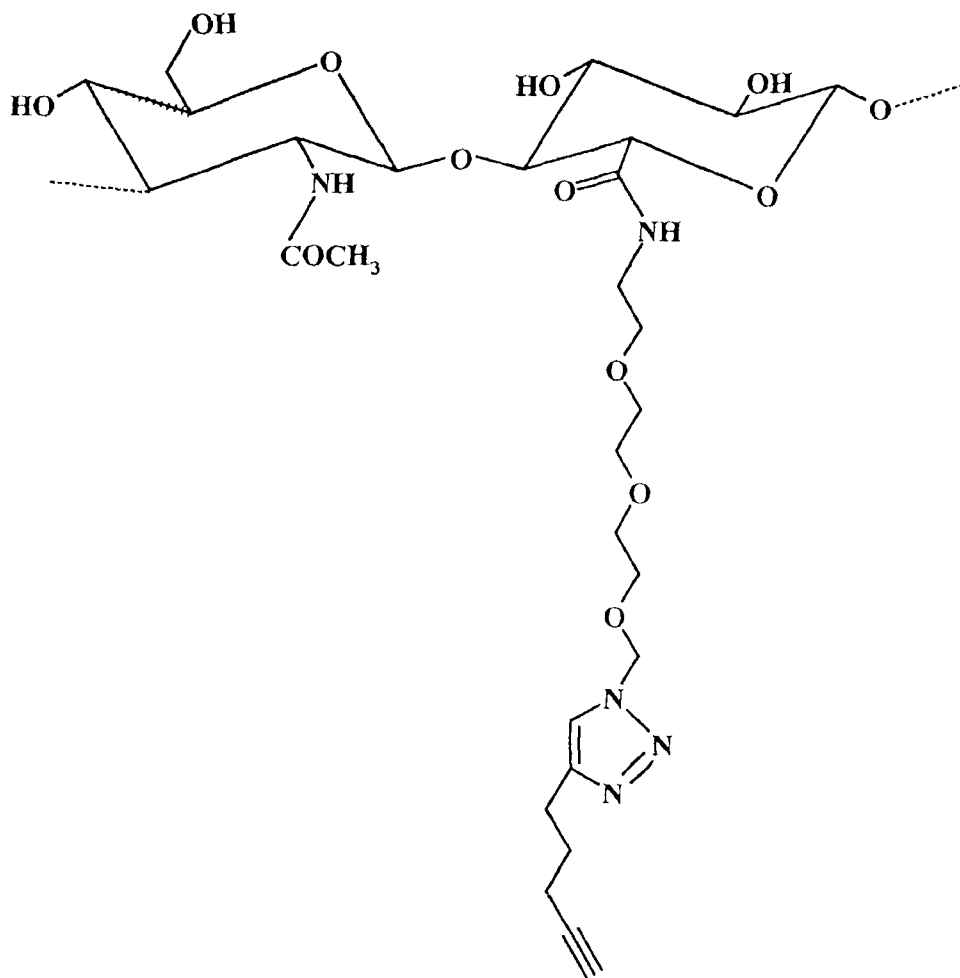


图 23

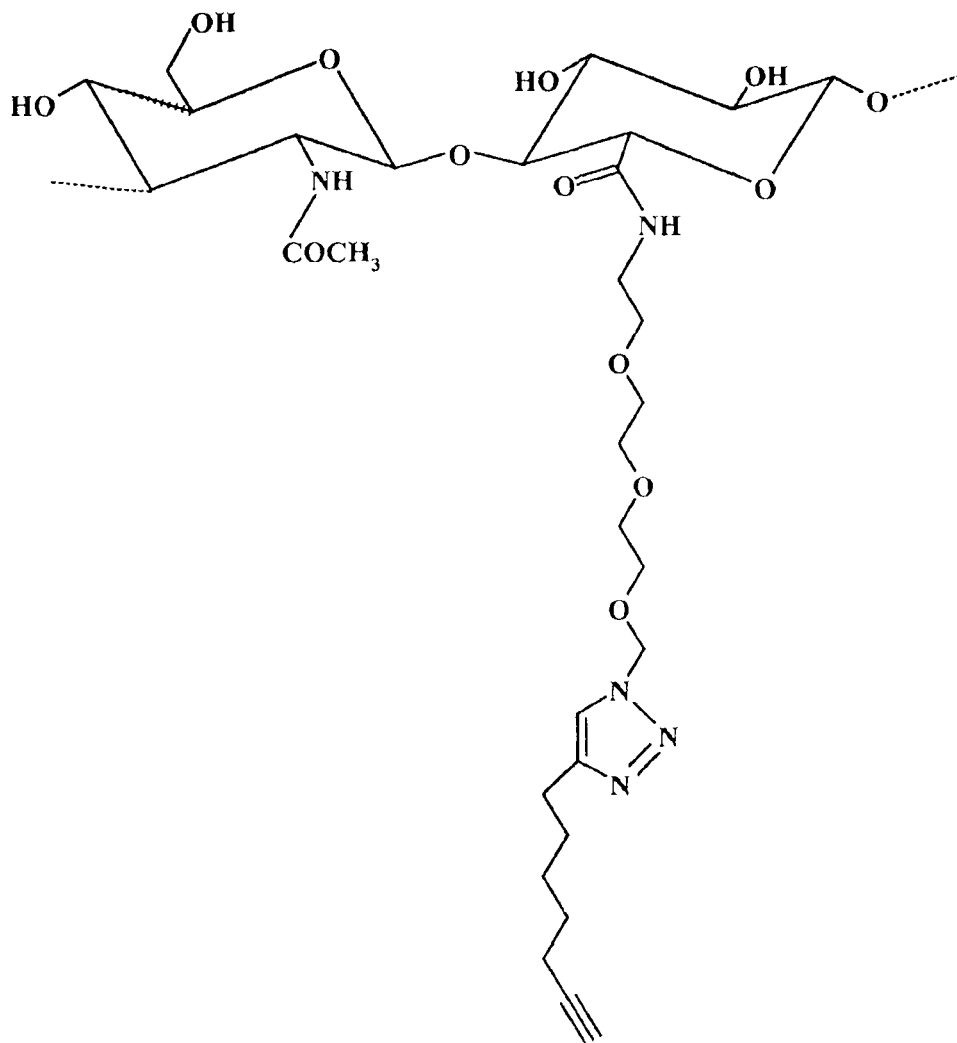


图 24

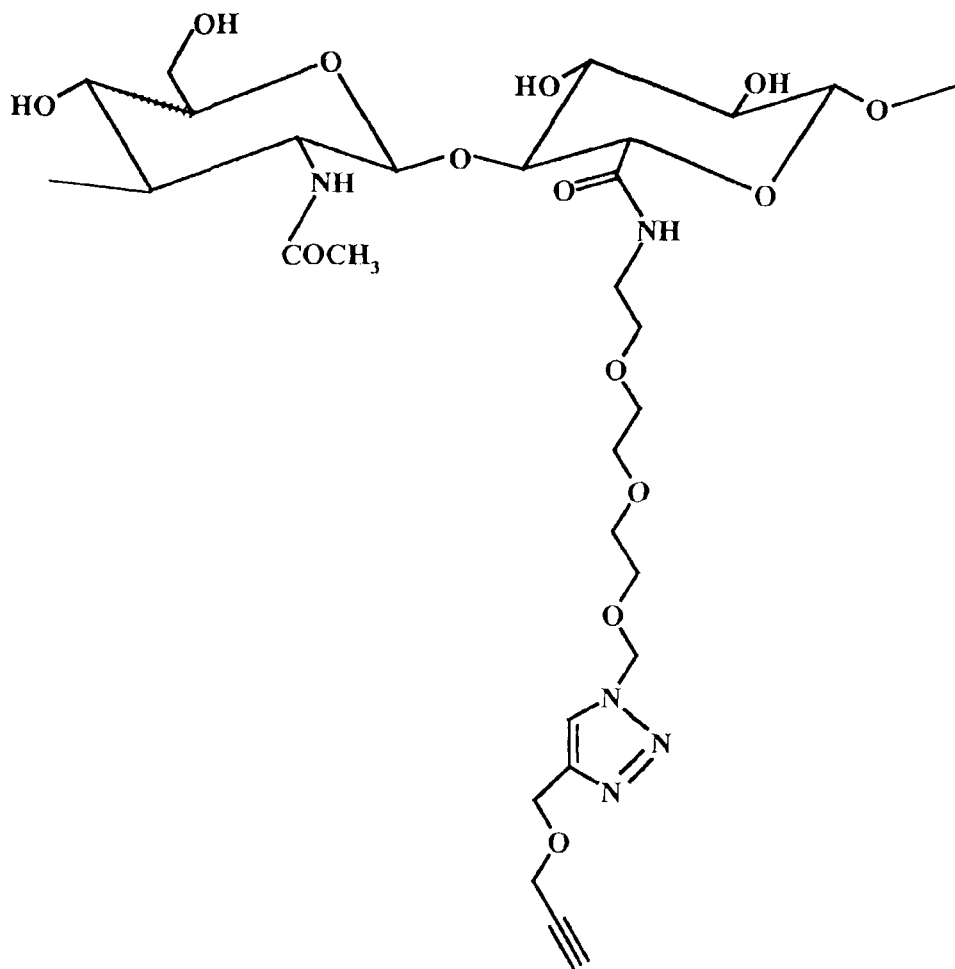


图 25

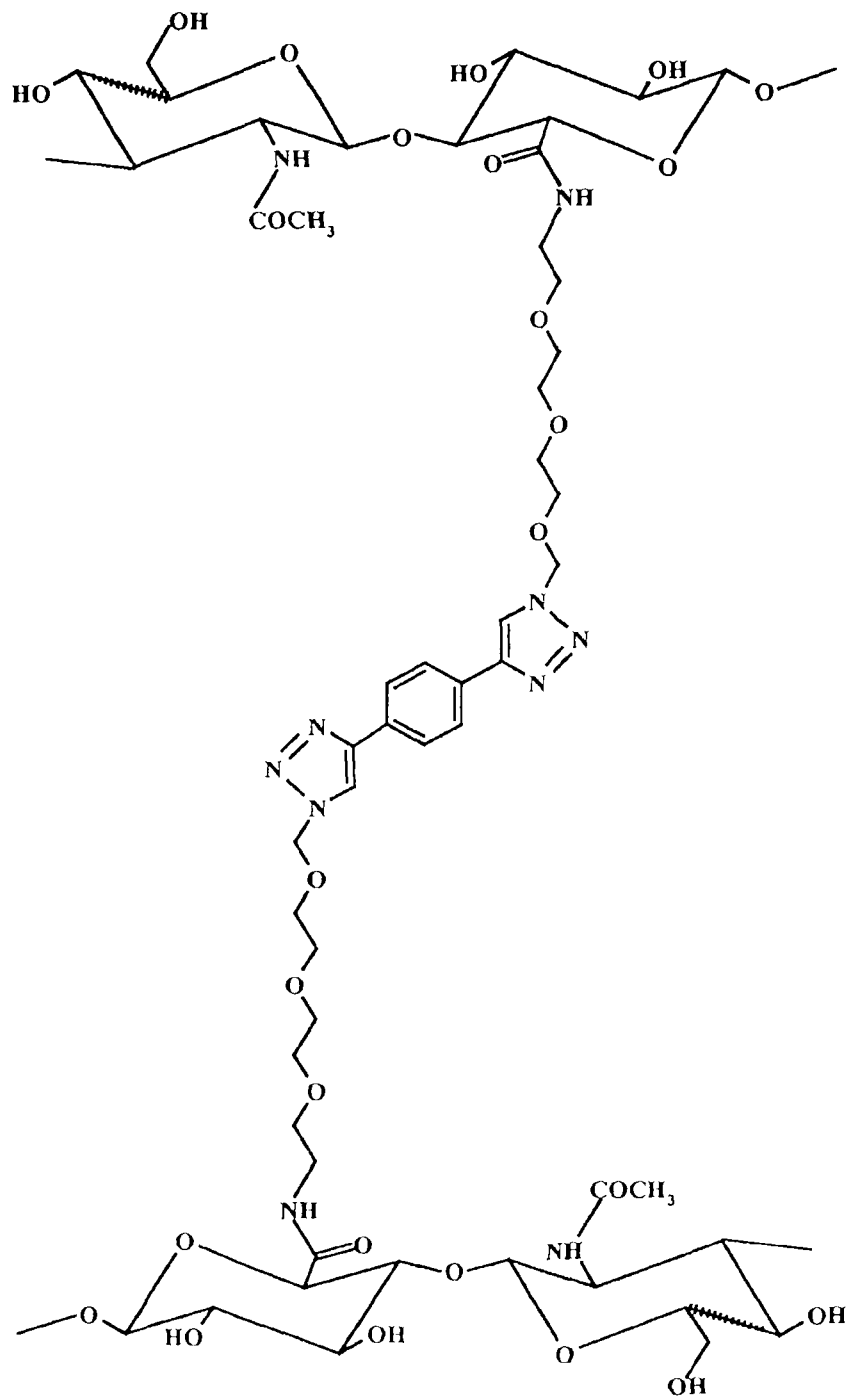


图 26

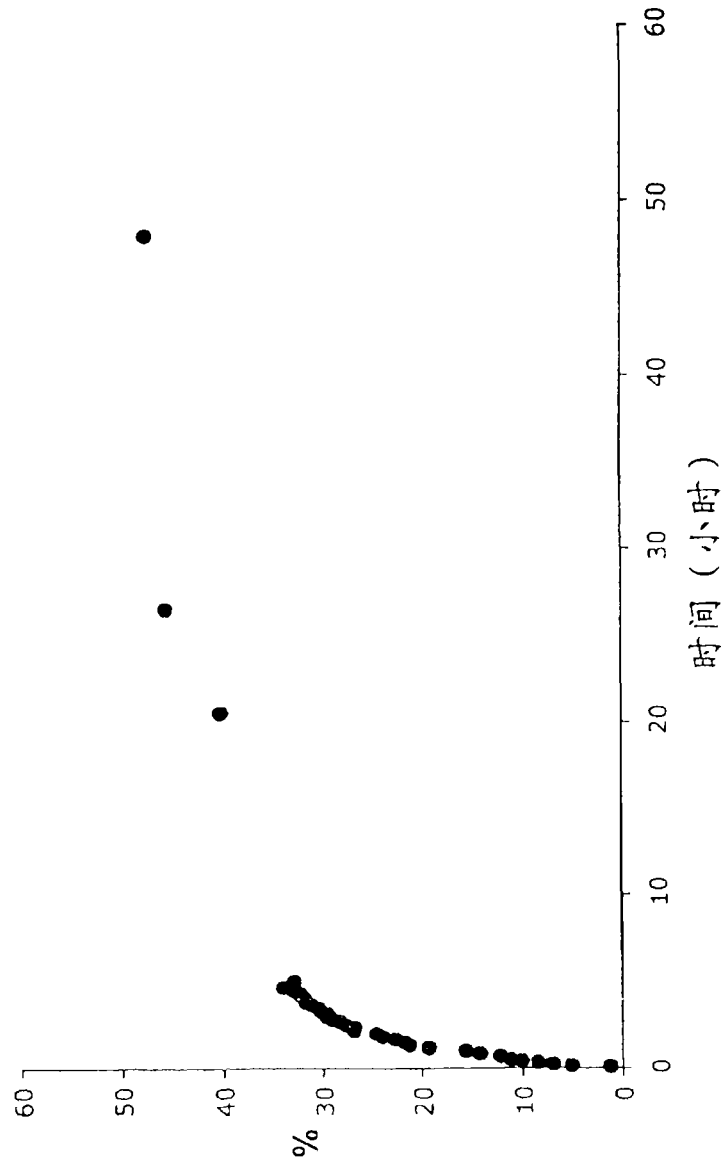


图27

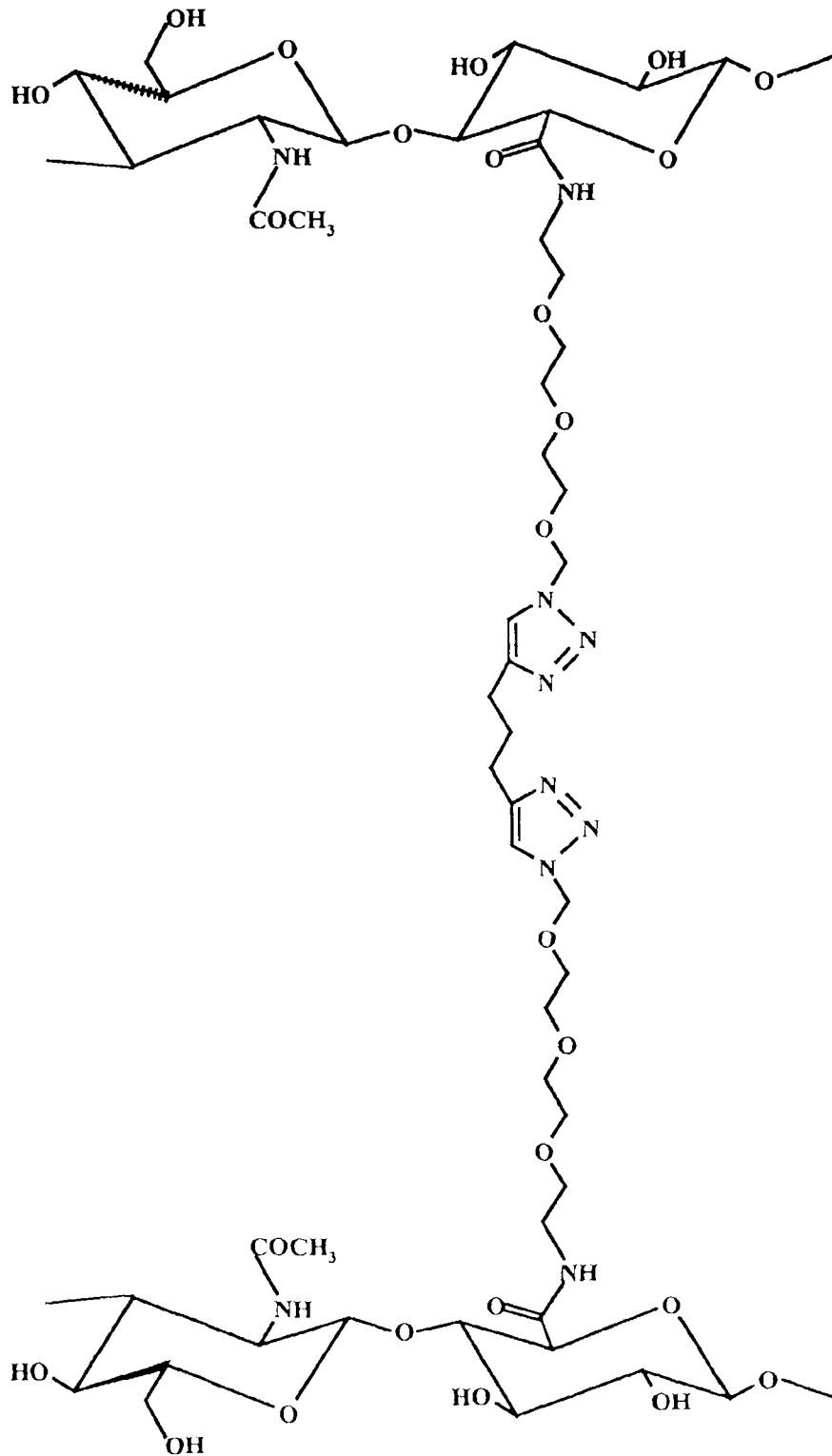


图 28

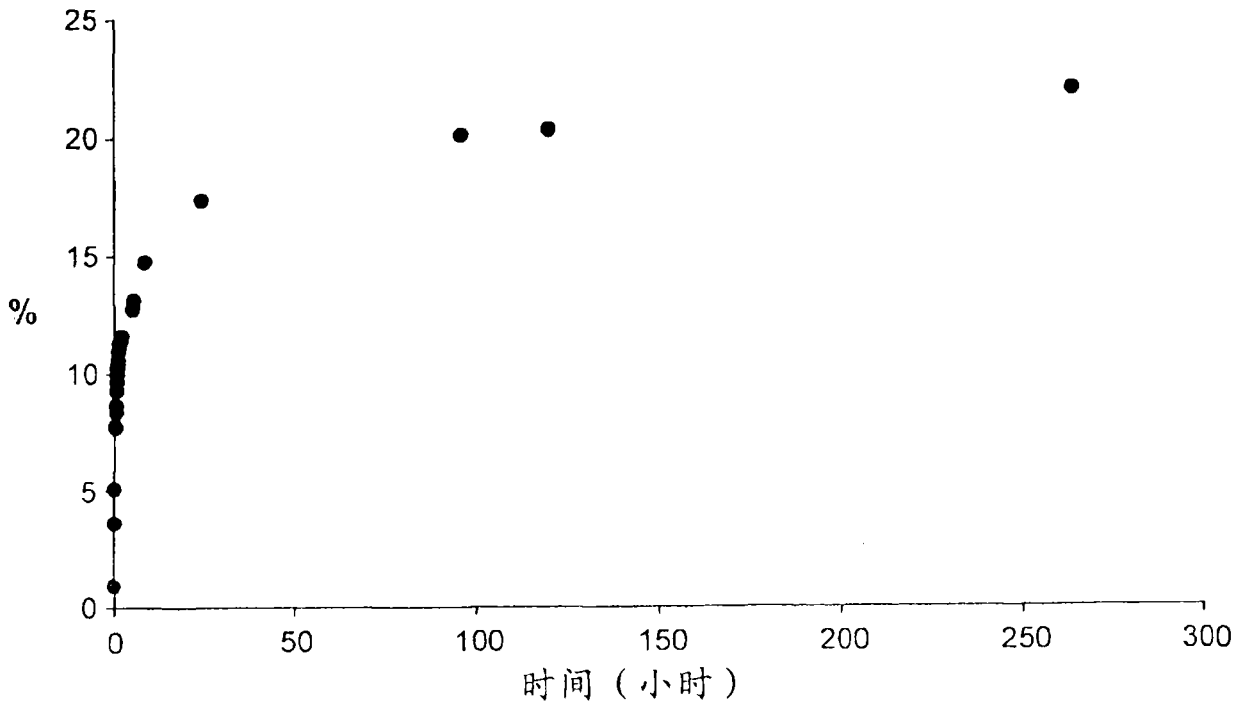


图 29

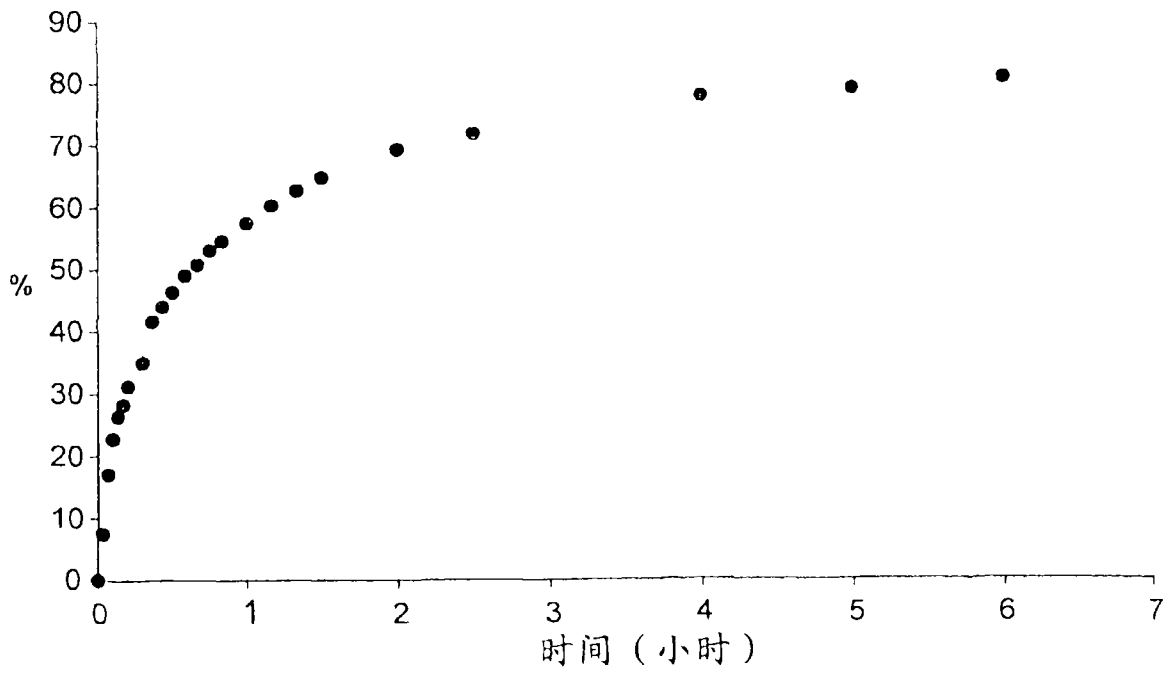


图 30

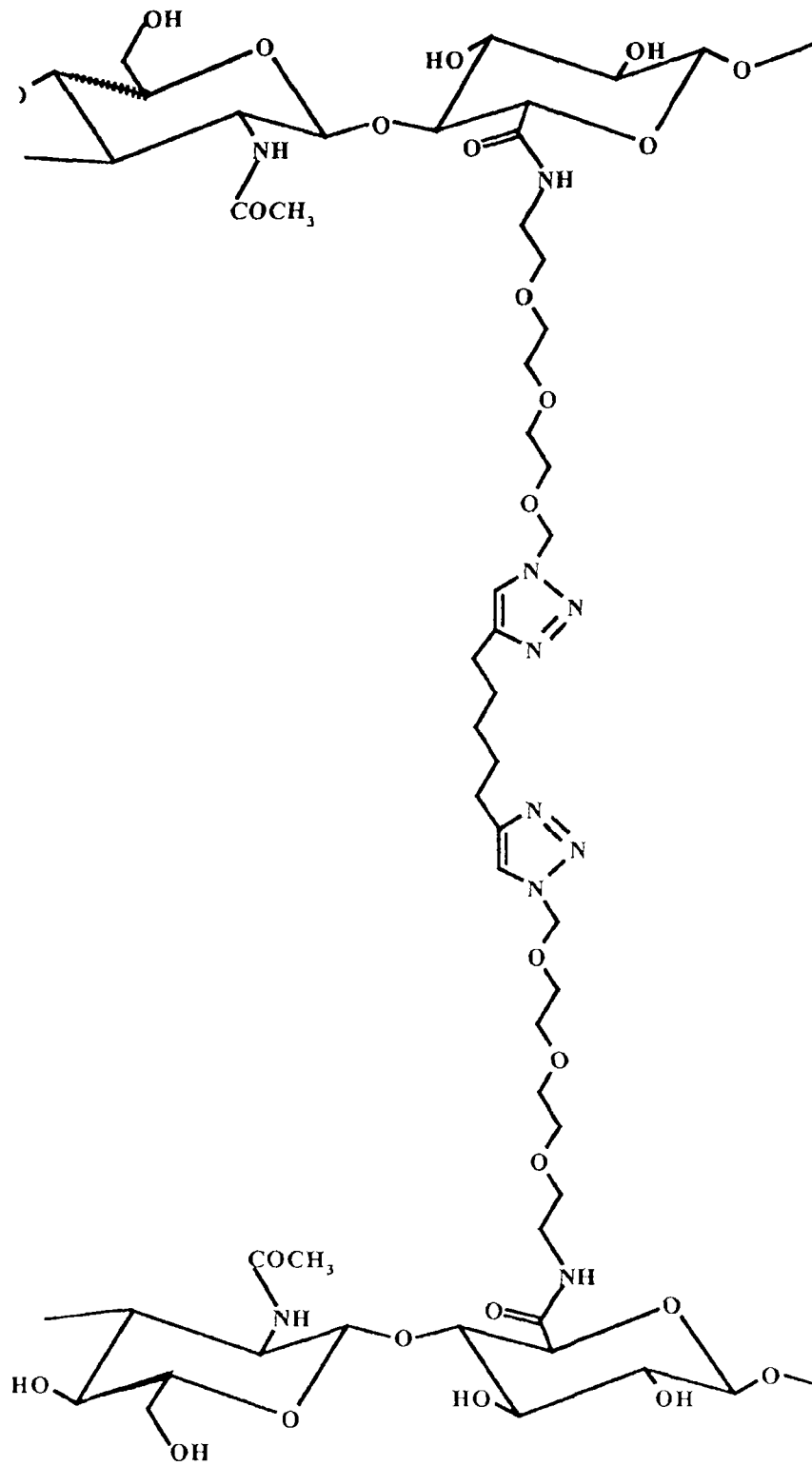


图 31

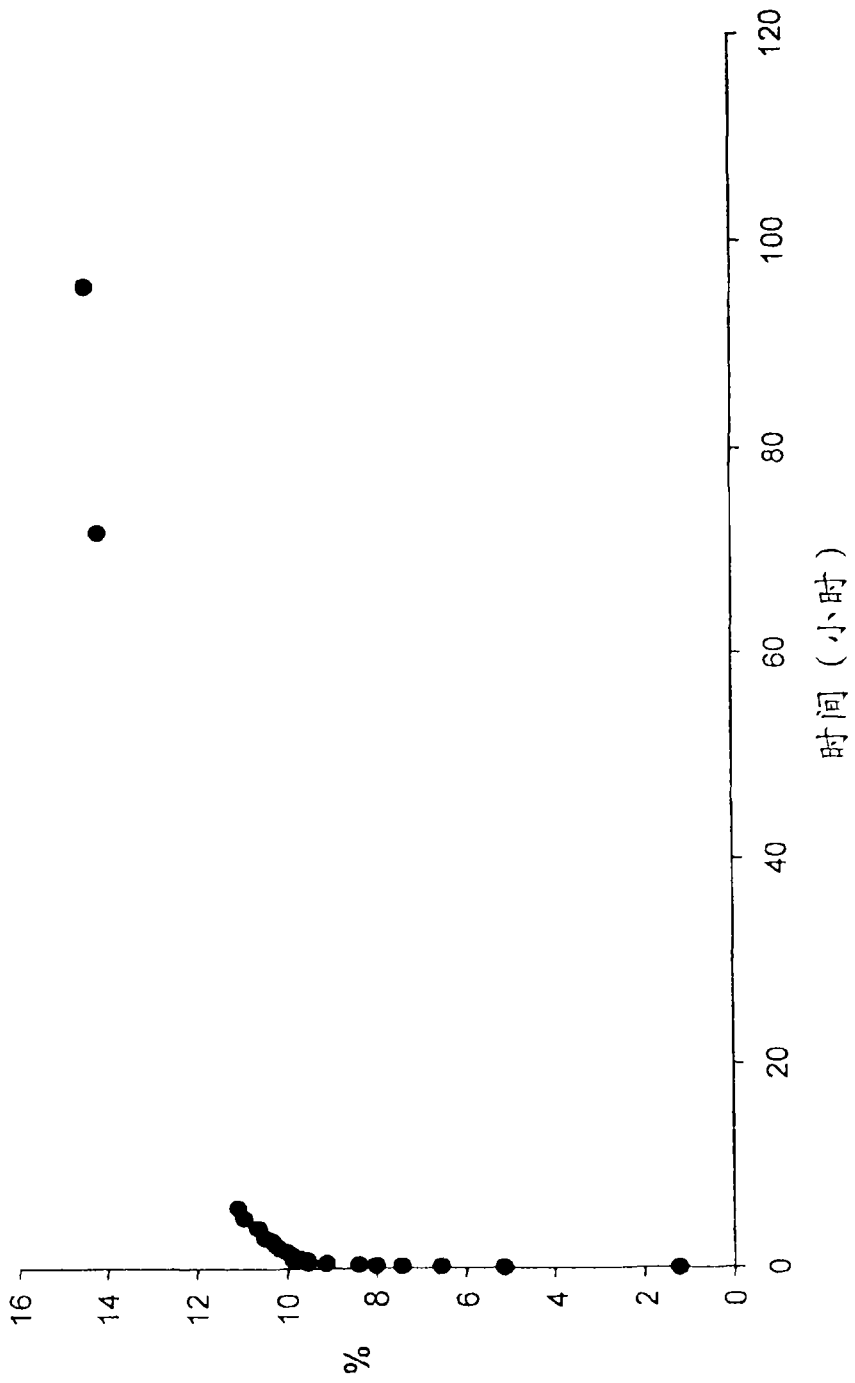


图 32