

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

A61K 47/36 (2006.01)

A61K 9/62 (2006.01)



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200610084646.8

[43] 公开日 2006年12月13日

[11] 公开号 CN 1876185A

[22] 申请日 2004.2.12

[21] 申请号 200610084646.8

分案原申请号 200410004235.4

[30] 优先权

[32] 2003.12.4 [33] GB [31] 0328168.0

[71] 申请人 财团法人工业技术研究院

地址 台湾省新竹县

[72] 发明人 陈瑞祥 蔡秉宏 张学曾 陈慕兰

陈毓华 詹淑华 刘美君

[74] 专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司

代理人 黄 健

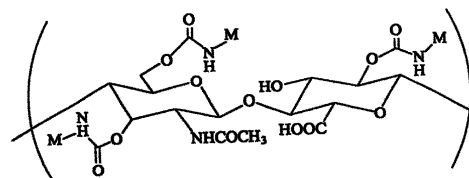
权利要求书 2 页 说明书 24 页 附图 15 页

[54] 发明名称

生物分解性聚合微胶粒组合物和药学组合物

[57] 摘要

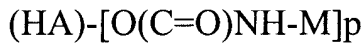
本发明涉及一种生物分解性聚合微胶粒组合物，其包括亲水性介质和一生物分解性透明质酸衍生物，该衍生物包括至少一种以下化学式所示的改质透明质酸重复单元(HA) - [O(C=O)NH-M]_p，其中 HA 为包括 N-乙酰基-D-葡萄糖胺和 D-葡萄糖醛酸的单元，M 为改质部分，包括 C₂₋₁₆ 烷基或生物分解性亲油性预聚物；p 为 1 至 4 的整数；本发明还涉及一种药学或生理活性组合物，其包括上述生物分解性聚合微胶粒组合物和被包埋于上述衍生物所形成的微胶粒内的药学活性分子或生理活性分子。



1.一种生物分解性聚合微胶粒组合物，其包括：

一亲水性介质；

一生物分解性透明质酸衍生物，其包括至少一种以下化学式的改质透明质酸重复单元；



其中 HA 为包括 N-乙酰基-D-葡萄糖胺和 D-葡萄糖醛酸的单元，M 为改质部分，包括 C₂₋₁₆ 烷基或生物分解性亲油性预聚物；p 为 1 至 4 的整数；

其中该生物分解性透明质酸衍生物形成微胶粒。

2.如权利要求 1 所述的生物分解性聚合微胶粒组合物，其中该生物分解性透明质酸衍生物的浓度大于临界微胶粒浓度。

3.如权利要求 2 所述的生物分解性聚合微胶粒组合物，其中该生物分解性透明质酸衍生物的浓度为 0.005 重量%至 0.5 重量%之间。

4.如权利要求 3 所述的生物分解性聚合微胶粒组合物，其中该生物分解性透明质酸衍生物的浓度为 0.005 重量%至 0.3 重量%之间。

5.如权利要求 1 所述的生物分解性聚合微胶粒组合物，其中该生物分解性透明质酸衍生物为梳子状接枝共聚物。

6.如权利要求 1 所述的生物分解性聚合微胶粒组合物，其中该生物分解性预聚物为相同或不同，且为聚己内酯、聚-左旋-乳酸交酯、聚乳酸、聚羟基乙酸、聚-乳酸-共-羟基乙酸共聚物或聚己内酯-聚乳酸共聚物。

7.如权利要求 1 所述的生物分解性聚合微胶粒组合物，其中生物分解性预聚物的分子量为 500 至 200000 Dalton 之间。

8.如权利要求 1 所述的生物分解性聚合微胶粒组合物，其中该亲水性介质为水或水溶液。

9.一种药学或生理活性组合物，其包括：

一亲水性介质；

一生物分解性透明质酸衍生物，其包括至少一种以下化学式所示的改质透明质酸重复单元；

$(HA)-[O(C=O)NH-M]_p$ ，其中 HA 为包括 N-乙酰基-D-葡糖胺和 D-葡糖醛酸的单元，M 为改质部分，包括 C_{2-16} 烃基或一生物分解性亲油性预聚物；p 为 1 至 4 的整数；

一药学活性分子或生理活性分子，被包埋于该生物分解性透明质酸衍生物所形成的微胶粒内。

10.如权利要求 9 所述的药学或生理活性组合物，其中 M 包括一生物分解性亲油性预聚物。

11.如权利要求 10 所述的药学或生理活性组合物，其中该生物分解性亲油性预聚物为相同或不同，且为聚己内酯、聚-左旋-乳酸交酯、聚乳酸、聚羟基乙酸、聚-乳酸-共-羟基乙酸共聚物或聚己内酯-聚乳酸共聚物。

12.如权利要求 11 所述的药学或生理活性组合物，其中该亲水性介质为水或水溶液。

13.如权利要求 9 所述的药学或生理活性组合物，其中该生物分解性透明质酸衍生物的浓度为 0.005 重量%至 0.5 重量%之间。

14.如权利要求 13 所述的药学或生理活性组合物，其中该生物分解性透明质酸衍生物的浓度为 0.005 重量%至 0.3 重量%之间。

15.如权利要求9所述的药学或生理活性组合物，其中该药学活性或生物活性分子为亲油性的。

生物分解性聚合微胶粒组合物和药学组合物

本发明为申请号为 200410004235.4, 申请日为 2004 年 2 月 12 日, 发明名称“生物分解性透明质酸衍生物及其聚合微胶粒组合物和药学组合物”的分案申请。

技术领域

本发明有关一种生物分解性聚合微胶粒组合物, 特别是包括一种由透明质酸中的氢氧基和含异氰酸基化合物中的异氰酸酯基(isocyanate group)经由氨基甲酸乙酯(urethane)键合的反应得到的生物分解性透明质酸衍生物和亲水性介质的聚合微胶粒组合物, 以及包括该聚合微胶粒组合物的药学组合物。

背景技术

透明质酸(hyaluronan 或 hyaluronic acid; 简称 HA)是一种由 N-乙酰基-D-葡萄糖胺(N-acetyl-D-glucosamine)与 D-葡萄糖醛酸(D-glucuronic acid)重复单元所组成的线性粘多糖(linear mucopolysaccharide)。透明质酸一开始于 1934 年, 由 Meyer 与 Palmer 于牛眼球的玻璃体中首度发现, 之后便陆陆续续在其它组织中发现, 如细胞间质 (ECM)、关节滑液等。它的水溶液为粘弹性流体, 填充在细胞与胶原纤维空间之中且覆盖在某些表皮组织上。在动物体, 其主要功能是保护及润滑细胞, 调节细胞在此粘弹性基质上的移动, 稳定胶原网状结构及保护它免于受到机械性的破坏。透明质酸为天然性润滑以及吸震高分子, 在肌腱、肌腱鞘及粘滑膜表面作为润滑剂。

透明质酸可由天然组织(例如鸡冠)中萃取出, 或者可由某些细菌中萃取。因其取材有限, 以及繁复的纯化步骤, 所以透明质酸的价格昂贵。另外, 透明质酸的分子量会随来源与分离方法的不同而有差异性, 一般介于数百万至数千万 Dalton 之间。

透明质酸其分子部分(molecular fractions)及其盐类已用于药学、外科、和化妆品等领域，也用于生物分解性(biodegradable)聚合物质的领域。然而，由于透明质酸的价格昂贵，且生物降解速度快，应用相对受限。数十年以来，许许多多有关透明质酸的研究，发展出许许多多改良透明质酸的方法，以增加其对生物降解(biodegradation)的抵抗性。

US Patent 5,462,976 中，利用离子交换法，制备葡糖胺聚糖 (glycosamino glycan; GAG) 的叔胺盐，如硫酸软骨素 (chondroitin sulfate)、透明质酸 (hyaluronic acid) 等的叔胺盐。在有机溶剂中，GAG 上的 OH、COOH、NH₂ 等官能基，与光敏性反应基进行酯化反应，形成化学键。酯化产物可在紫外光的作用下，形成架桥，因此可产生非水溶性的 GAG 衍生物。

US Patent 4,851,521 中，Francesco della Valle 等人披露了一种酯化透明质酸 (esters of hyaluronic acid) 的制法。在此专利中，先将透明质酸转换为可溶于有机溶剂的透明质酸盐 (salt of hyaluronic acid)，接着再将脂肪族醇类化合物 (aliphatic type alcohol) 与透明质酸盐分子结构中的羧基 COOH (羧基) 部分或全部反应形成酯键 (ester linkage)，得到酯化透明质酸产物。此专利中还披露了酯化透明质酸产物可应用于化妆品 (cosmetics)，外科手术 (surgery) 及医学 (medicine) 用途。

US Patent 4,957,744 中，Francesco della Valle 等人披露一种交链酯化透明质酸 (cross-linked esters of hyaluronic acid) 制法，在此专利中先将透明质酸转换为可溶于有机溶剂的透明质酸盐 (salt of hyaluronic acid)，接着再使用多元醇 polyhydric alcohols 类化合物，与多糖类透明质酸盐分子结构中的两个以上的羧基 COOH 反应，形成一种具交链结构的交链性酯化透明质酸材料。

US Patent 的 5,122,598 中，Francesco della Valle 等人披露了一种酯化多糖类 (polysaccharide esters) 的制法。此专利中先将多糖类高分子，例如羧甲纤维素 (carboxymethylcellulose) 及羧甲壳多糖 (carboxymethylchitin) 转换为可溶于有机溶剂的多糖类 (salt of polysaccharide)，接着再使用乙醇类化合物，与

多糖类高分子分子结构中的羧基 COOH 反应而形成一种具酯化多糖类材料。

US Patent 的 5,202,431 中, Francesco della Valle 等人披露一种部分酯化透明质酸(partial esters of hyaluronic acid)的制法。于此专利中, 先将透明质酸转换为可溶于有机溶剂的透明质酸盐(salt of hyaluronic acid), 接着再使用脂肪醇 aliphatic alcohols 类化合物与多糖类透明质酸盐分子结构中羧基 COOH 反应, 而形成一种酯化透明质酸材料。亦或可使用具药理活性物质, 例如: 肾上腺皮质激素 (cortisone) 或皮质醇 (hydrocortisone) 与多糖类透明质酸盐分子结构中羧基 COOH, 反应而形成一种将药理活性物质以酯键(ester linkage)连结于透明质酸高分子的部分酯化透明质酸材料。此专利还披露可将酯化透明质酸与酯键连结药理活性物质的透明质酸高分子相互混合使用。

US Patent 的 5,336,767 中, Francesco della Valle 等人披露一种部分或全部酯化透明质酸(total or partial esters of hyaluronic acid)的制法。此专利中, 主要是将药理活性物质, 例如: 肾上腺皮质激素, 皮质醇, 去氢可的松等药物与透明质酸盐分子结构中的羧基 COOH 反应, 形成一种药理活性物质以酯键连结于透明质酸高分子的部分酯化透明质酸材料。

US Patent 的 5,442,053 中, Francesco della Valle 等人披露一种包括透明质酸和具药理活性物质的组合物。此专利中揭示, 分子量介于 50,000-100,000 的透明质酸与药理活性物质组合特别适用于伤口愈合(wound healing), 分子量介于 500,000-730,000 的透明质酸与药理活性物质组合特别适用于关节内注射(intraarticular injection)。

US Patent 的 5,856,299 中, Zefferino Righetto 等人披露一种高反应性酯化多糖 (highly reactive esters of carboxy polysaccharides) 及其衍生物制法。此专利中, 先将透明质酸转换为可溶于有机溶剂的透明质酸盐(salt of hyaluronic acid), 接着再使用芳香族醇类(aromatic alcohols)化合物与多糖类透明质酸盐分子结构中的羧基反应, 而形成一种高反应性酯化透明质酸多糖类材料, 适合作生物医学或药物领域产品应用。

尽管如此，仍有必要将已有的透明质酸加以修饰，使其成为改质透明质酸，以使之具有改良的性质并可用于多种用途。

发明内容

综上所述，本发明藉由透明质酸中的氢氧基和含异氰酸基化合物中的异氰酸酯基(isocyanate group)经由氨基甲酸乙酯(urethane)键合的反应，得到一种生物分解性透明质酸衍生物，实现了将透明质酸加以修饰，使其具有改良的性质并可用于多种用途的目的，并提出其酯化透明质酸产物与药理活性物质并用形成药学组合物等的应用。

本发明的目的在于提供一种生物分解性透明质酸衍生物，其为由氨基甲酸乙酯(urethane)键合从而将一短链基取代在氢氧基位置上得到的产物；以及一种新颖的藉由氨基甲酸乙酯(urethane)键合而将一预聚物接枝于氢氧基位置上的生物分解性透明质酸衍生物。

本发明的目的还在于提供一种生物分解性聚合微胶粒组合物，该组合物由透明质酸衍生物在亲水性介质中所形成。

本发明的目的还在于提供一种药学或生理活性组合物，其包括一药学活性分子或生理活性分子，该分子被包埋于上述生物分解性透明质酸衍生物所形成的微胶粒内。

为达成上述目的，本发明提供的一种生物分解性透明质酸衍生物，其包括至少一种以下化学式所示的改质透明质酸重复单元

$(HA)-[O(C=O)NH-M]_p$ ，其中 HA 为包括 N-乙酰基-D-葡糖胺(N-acetyl-D-glucosamine)和 D-葡糖醛酸(glucuronic acid)的单元，M 为包括 C_{2-16} 烷基或一预聚物的一改质部分，p 为 1 至 4 的整数。

本发明提供的生物分解性聚合微胶粒组合物包括：

一亲水性介质；

一生物分解性透明质酸衍生物，其包括至少一种以下化学式所示的改质透明质酸重复单元： $(HA)-[O(C=O)NH-M]_p$ ，其中 HA 为包括 N-乙酰基-D-

葡糖胺(N-acetyl-D-glucosamine)和 D-葡糖醛酸(glucuronic acid)的单元, M 为包括 C₂₋₁₆ 烷基或一生物分解性亲油性预聚物的改质部分, p 为 1 至 4 的整数;

所述生物分解性透明质酸衍生物在亲水性介质中自行组合形成微胶粒。

本发明提供的药学或生理活性组合物包括:

一亲水性介质;

一生物分解性透明质酸衍生物, 其包括至少一种下式所示的改质透明质酸重复单元 (HA)-[O(C=O)NH-M]_p, 其中 HA 为包括 N-乙酰基-D-葡糖胺(N-acetyl-D-glucosamine)和 D-葡糖醛酸(glucuronic acid)单元, M 为包括 C₂₋₁₆ 烷基或一生物分解性亲油性预聚物的一改质部分, p 为 1 至 4 的整数;

一药学活性分子或生理活性分子, 该活性分子被包埋于生物分解性透明质酸衍生物所形成的微胶粒内。

本发明提供的生物分解性透明质酸衍生物, 是藉由透明质酸中的氢氧基和含异氰酸基化合物中的异氰酸酯基经由氨基甲酸乙酯键合的反应得到的产物, 其具有改良的透明质酸的性能, 同时提供的含有该生物分解性透明质酸衍生物的生物分解性聚合微胶粒组合物及其药学或生理活性组合物也揭示了该透明质酸衍生物可与药理活性物质并用, 提示了该修饰后的产物具有更广泛的用途。

上述的生物分解性透明质酸衍生物, 其还包括一自然透明质酸重复单元, 该单元包括 N-乙酰基-D-葡糖胺和 D-葡糖醛酸。

本发明产物的化学式中的 M 包括 C₂₋₁₆ 烷基, 其中 M 可以为 C₂₋₁₆ 烷基, 优选为 C₄₋₁₂ 烷基, 更优选为丁基、仲丁基、辛基或十二烷基; M 还可以是一生物分解性预聚物, 该生物分解性预聚物可以相同或不同, 其可为亲油性、亲水性或两亲的。

生物分解性含聚酯的亲油性预聚物包括聚己内酯、聚-左旋-乳酸交酯、聚乳酸、聚羟基乙酸、聚-乳酸-共-羟基乙酸共聚物和聚己内酯-聚乳酸共聚物。

生物分解性亲水预聚物包括聚乙烯吡咯酮、聚乙二醇和聚乙烯醇。

生物分解性两亲预聚物包括聚己内酯-聚乙二醇共聚物、聚乳酸-聚乙二醇共聚物和聚羟基乙酸-聚乙二醇共聚物。

所述的生物分解性预聚物的分子量为 500 至 200000 Dalton。

上述的生物分解性聚合微胶粒组合物，其中该生物分解性透明质酸衍生物的浓度大于临界微胶粒浓度，该浓度可以为 0.005 重量%至 0.5 重量%之间，优选浓度为 0.005 重量%至 0.3 重量%之间；其中该生物分解性透明质酸衍生物为梳子状接枝共聚物；所述生物分解性预聚物为相同或不同，且为聚己内酯、聚-左旋-乳酸交酯、聚乳酸、聚羟基乙酸、聚-乳酸-共-羟基乙酸共聚物或聚己内酯-聚乳酸共聚物，其分子量为 500 至 200000 Dalton 之间；其中该亲水性介质为水或水溶液。

上述的药学或生理活性组合物，其中 M 包括一生物分解性亲油性预聚物，该生物分解性亲油性预聚物可相同或不同，且为聚己内酯、聚-左旋-乳酸交酯、聚乳酸、聚羟基乙酸、聚-乳酸-共-羟基乙酸共聚物或聚己内酯-聚乳酸共聚物，其中所述亲水性介质为水或水溶液；该生物分解性透明质酸衍生物的浓度为 0.005 重量%至 0.5 重量%之间，优选浓度为 0.005 重量%至 0.3 重量%之间；所述的药学活性或生物活性分子为亲油性的。

本发明中藉由氨基甲酸乙酯(urethane)键合而将短链部分或预聚物导入在-OH 基上而改质自然透明质酸。所述透明质酸衍生物没有细胞毒性反应。另外，将有生物分解性亲油性预聚物接枝的透明质酸衍生物溶在亲水性介质中，可形成微胶粒，且临界微胶粒浓度低，因此，可将药学活性或生理活性分子包覆在透明质酸衍生物微胶粒内，以形成药学活性或生理活性组成物，有稳定释放的效果。

附图说明

图 1a 显示没有改质的自然透明质酸重复单元；

图 1b 显示了改质的透明质酸重复单元，有一个改质部分(M)藉由氨基甲酸乙酯键合而连于其上；

图 1c 显示了改质的透明质酸重复单元，有三个改质部分(M)藉由氨基甲酸乙酯键合而连于其上；

图 1d 显示了改质的透明质酸重复单元，有丁基藉由氨基甲酸乙酯键合而连于其上；

图 1e 为梳子状透明质酸接枝共聚物的化学结构；

图 2 显示有预聚物接枝的透明质酸衍生物的微胶粒构造；

图 3 为实施例 A-1 所制得透明质酸的 100%取代丁基氨基甲酸乙酯衍生物(C4-HA)的 IR 光谱图；

图 4a 和 4b 为实施例 A-1 所制得冷冻干燥的 C4-HA 的 SEM 照片；

图 5 显示实施例 A-1 所制得 C4-HA 的膨胀率和 pH 值的关系；

图 6 显示有 PCL 预聚物接枝的透明质酸共聚物的合成路径；

图 7 显示实施例 B-1 所得有 PCL 预聚物接枝的透明质酸共聚物的临界微胶粒浓度(CMC)的测量结果；

图 8 显示 C4-HA 的化学构造，其中氢位置以 a, b, c, d 标示；

图 9 显示 C12-HA 的化学构造，其中氢位置以 a, b, c, d 标示；

图 10 显示单官能基 PCL 的化学构造，其中氢位置以 a, b, c, d, e, f, g, h, h' 标示；

图 11 显示单官能基 PLLA 的化学构造，其中氢位置以 a, b, c, d, e, f, g 标示；

图 12 显示 HA-接枝-PCL 的化学构造，其中氢位置以 a, b, c, d, e, f, g, h, i, k 标示；

图 13 显示 HA-接枝-PLLA 的化学构造，其中氢位置以 a, b, c, d, e, f, g 标示。

具体实施方式

以下结合具体实施例详细说明本发明，但不限定本发明的实施范围。

自然(native)透明质酸是一种由 N-乙酰基-D-葡糖胺(N-acetyl-D-glucosamine)与 D-葡糖醛酸(D-glucuronic acid)重复单元所组成的线性粘多糖(linear mucopolysaccharide)，如图 1a 所示。

本发明藉由氨基甲酸乙酯键合(urethane linkage; $-\text{O}(\text{C}=\text{O})\text{NH}-$)而将一改

质部分导入在自然透明质酸的氢氧基(-OH)位置上,此改质部分可包括 C₂₋₁₆ 烃基或一预聚物。

换言之,本发明的改质透明质酸(透明质酸衍生物)包括以下化学式所示的改质透明质酸重复单元:



其中 HA 为包括 N-乙酰基-D-葡萄糖胺(N-acetyl-D-glucosamine)和 D-葡萄糖醛酸(glucuronic acid)的单元, M 为包括 C₂₋₁₆ 烃基或一预聚物的一改质部分, p 为 1 至 4 的整数。

图 1b 显示化学式(1)的化学结构,其中 p 为 1。

在本发明透明质酸衍生物中,-COOH 基和-NHCOCH₃ 基可保持不变,或者,某些-COOH 基和/或某些-NHCOCH₃ 基可依据实际需要而有取代。例如,-COOH 基可被转变为-COOM₁ 基,其中 M₁ 可为碱金属、碱土金属、铵(ammonium)或铝。本发明透明质酸衍生物的盐类也涵盖在本发明范围内。

此外,依据本发明,自然透明质酸的-OH 基可被完全或部分改质,完全改质表示自然透明质酸中的所有-OH 基都如上所述藉由氨基甲酸乙酯(urethane)键合而被改质(p=4)。

部分改质表示自然透明质酸中的一些-OH 基被改质,而一些-OH 基没有被改质。即,本发明的透明质酸衍生物可包括复数个自然透明质酸重复单元(p=0,如图 1a 所示)以及复数个经改质的透明质酸重复单元。经改质的透明质酸重复单元可具有不同的改质程度。亦即,在透明质酸衍生物中,可能存在有不同 p 值(p=1、2、3、4)的经改质的透明质酸重复单元。图 1b 显示一经改质的透明质酸重复单元,有一个改质部分(M)藉由氨基甲酸乙酯(urethane)键合而连于其上(p=1)。图 1c 显示一经改质的透明质酸重复单元,有三个改质部分(M)藉由氨基甲酸乙酯(urethane)键合而连于其上(p=3)。

此外,所有的透明质酸重复单元可被改质(即没有自然透明质酸重复单元留下),但是自然透明质酸中的-OH 基并不需要全部被改质。例如,本发明的

透明质酸衍生物可包括一第一经改质透明质酸重复单元(图 1b, $p=1$)、一第二经改质透明质酸重复单元($p=2$)、一第三经改质透明质酸重复单元($p=3$)、一第四经改质透明质酸重复单元($p=4$)或上述的组合,但没有自然透明质酸重复单元($p=0$)存在。

为了方便起见,本发明生物分解性透明质酸衍生物可分为以下两类:

(A)有短链部分取代的生物分解性透明质酸衍生物(此时 M 为包括 C_{2-16} 烃基的改质部分);

(B)有预聚物接枝的生物分解性透明质酸共聚物(此时 M 为包括预聚物的改质部分)。

(A)类: 有短链部分取代的透明质酸衍生物

本发明(A)类的透明质酸衍生物包括以下化学式所示的经改质透明质酸重复单元



其中 HA 为包括 N-乙酰基-D-葡糖胺(N-acetyl-D-glucosamine)和 D-葡糖醛酸(glucuronic acid)的单元, M 为包括 C_{2-16} 烃基的一改质部分, p 为 1 至 4 的整数。

图 1d 显示本发明(A)类的化学式(1)的一个例子,其中 M 为丁基, p 为 1。

M 最好为 C_{2-16} 烷基,更优选为 C_{4-12} 烷基。

以下叙述本发明(A)类生物分解性透明质酸衍生物的制备方法。使具有氢氧基(-OH)之一透明质酸与一 C_{2-16} 烃基异氰酸酯(hydrocarbyl isocyanate)反应(此 C_{2-16} 烃基异氰酸酯可由 C_{2-16} 醇类和含有异氰酸基的化合物反应而得)。于是, C_{2-16} 烃基(短链部分)就会藉由氨基甲酸乙酯(urethane) $[-O(C=O)-NH-]$ 键合而被导入在氢氧基上,而形成(A)类的生物分解性透明质酸衍生物。

透明质酸起始物并不需要是自然透明质酸,而可为透明质酸衍生物,也就是说,起始物可为其内的-COOH 基或-NHCOCH₃ 基被取代的一透明质酸,而且,只要仍有残余的-OH 基可供作藉由氨基甲酸乙酯(urethane)键合的短链

部分的导入，透明质酸起始物上的-OH基也可以被部分取代。

例如，为了使反应可在有机溶剂中进行，透明质酸起始物可为一透明质酸盐类，能溶于有机溶剂中。例如，具有氢氧基的透明质酸(起始物)可为透明质酸的季铵盐，即自然透明质酸上的-COOH基被转变为-COONH₄基。

具有氢氧基的透明质酸(起始物)的分子量可为2,000至3,500,000之间。

C₂₋₁₆烷基异氰酸酯(改质化合物)最好为一C₂₋₁₆烷基异氰酸酯，更优选为C₄₋₁₂烷基异氰酸酯。具体例子包括异氰酸丁酯(butyl isocyanate)，异氰酸仲丁酯(sec-butyl isocyanate)，异氰酸辛酯(octyl isocyanate)和异氰酸十二烷基酯(异氰酸十二烷基酯 dodecyl isocyanate)。

反应可在温度10℃至90℃有触媒存在下进行。适合触媒的具体例子为二-n-丁基锡二月桂酸盐(di-n-butyltin dilaurate)，二-n-丁基锡乙酸盐(di-n-butyltin diacetate)，苯酚钠(sodium phenate)，氯化铁(ferric chloride)，乙酰丙酮铜(copper acetylacetonate)，环烷酸锌(zinc naphthenate)或三丁基磷(tributyl phosphine)。

(B)类：有生物分解性预聚物接枝的透明质酸衍生物

本发明(B)类的透明质酸衍生物包括以下化学式所示的经改质透明质酸重复单元



其中HA为包括N-乙酰基-D-葡糖胺(N-acetyl-D-glucosamine)和D-葡糖醛酸(glucuronic acid)的单元，M为包括一预聚物的一改质部分，p为1至4的整数。

当M包括一预聚物的改质部分时，包括复数个化学式(1)重复单元的透明质酸衍生物可构成一梳子状或刷子状的接枝共聚物，如图1e所示。

依据本发明，接枝到透明质酸的-OH位置上的预聚物可为亲油性的(hydrophobic)，亲水性的(hydrophilic)或两亲的(amphiphilic)。适用的预聚物最好是生物分解性的，可相同或不同。例如，生物分解性亲油性预聚物可为一生物分解性含聚酯的预聚物。生物分解性含聚酯的亲油性预聚物的适合例子

包括 PCL (polycaprolactone; 聚己内酯), PLLA (poly L-lactide; 聚-左旋-乳酸交酯), PLA (polylactic acid; 聚乳酸), PGA (polyglycolic acid; 聚羟基乙酸), PLGA 共聚合物(poly-lactic-co-glycolic acid copolymer; 聚-乳酸-共-羟基乙酸共聚合物)和 PCL-PLA 共聚合物(polycaprolactone-poly-lactic acid copolymer; 聚己内酯-聚乳酸共聚合物)。

生物分解性亲水预聚物具体包括聚乙烯吡咯酮(polyvinylpyrrolidone), 聚乙二醇(polyethylene glycol)和聚乙烯醇(polyvinylalcohol)。生物分解性两亲预聚物具体包括 PCL-PEG 共聚合物(polycaprolactone-polyethylene glycol copolymer; 聚己内酯-聚乙二醇共聚合物), PLA-PEG 共聚合物(polylactic acid-polyethylene glycol copolymer; 聚乳酸-聚乙二醇共聚合物)和 PGA-PEG 共聚合物(polyglycolic acid-polyethylene glycol copolymer; 聚羟基乙酸-聚乙二醇共聚合物)。

生物分解性预聚物的分子量可为 500 至 200000 Dalton, 优选为 500 至 50000 Dalton。

本发明(B)类生物分解性透明质酸衍生物的制备方法如下所述。

提供具有羟基的一预聚物; 然后, 将具有羟基的预聚物与二异氰酸化合物(diisocyanate compound)反应, 而藉由氨基甲酸乙酯(urethane)键合(-O(C=O)-NH)形成具有异氰酸基(isocyanate; -N=C=O)的改性化合物; 最后, 将具有羟基(-OH)的一透明质酸与具有异氰酸酯基的改性化合物反应, 而藉由 urethane 键合形成(B)类的生物分解性透明质酸衍生物。

接枝在透明质酸的-OH 位置上的生物分解性预聚物可为相同或不同。可混合不同的预聚物, 然后同时接枝在透明质酸上; 或者, 不同的预聚物可依序分次接枝在透明质酸上。

适用于本发明的二异氰酸(diisocyanate)可为脂肪型二异氰酸, 例如六亚甲基二异氰酸酯(hexamethylene diisocyanate)或 4,4-亚甲基-双(亚苯基异氰酸酯) [4,4-methylene-bis(phenylene isocyanate)]。

透明质酸起始物并不需要是自然透明质酸, 而可为透明质酸衍生物。也

就是说,起始物可为其内的-COOH基或-NHCOCH₃基被取代的一透明质酸。而且,只要仍有残余-OH基可供作藉由氨基甲酸乙酯(urethane)键合的预聚物的导入,透明质酸起始物上的-OH基也可以被部分取代。

例如,为了使反应可在有机溶剂中进行,透明质酸起始物可为透明质酸盐类,能溶于有机溶剂中。例如,具有氢氧基的透明质酸(起始物)可为透明质酸的季铵盐。即自然透明质酸上的-COOH基被转变为-COON(Bu)₄基。

具有氢氧基的透明质酸(起始物)分子量可为2,000至3,500,000 Dalton。

适用于本发明的预聚物可为生物分解性,且可为亲油性、亲水性或两亲的。具有氢氧基的生物分解性预聚物的分子量可为500至200000 Dalton,优选为500至50000 Dalton。

具有氢氧基的生物分解性亲油预聚物的具体例子包括PCL (polycaprolactone; 聚己内酯), PLLA (poly L-lactide; 聚-左旋-乳酸交酯), PLA (polylactic acid; 聚乳酸), PGA (polyglycolic acid; 聚羟基乙酸), PLGA 共聚物(poly-lactic-co-glycolic acid copolymer; 聚-乳酸-共-羟基乙酸共聚物)和 PCL-PLA 共聚物(polycaprolactone-polylactic acid copolymer; 聚己内酯-聚乳酸共聚物)。具有氢氧基的生物分解性亲水预聚物的具体例子包括聚乙烯吡咯酮(polyvinylpyrrolidone), 聚乙二醇(polyethylene glycol)和聚乙烯醇(polyvinylalcohol)。具有氢氧基的生物分解性两亲预聚物的具体例子包括PCL-PEG 共聚物(polycaprolactone-polyethylene glycol copolymer; 聚己内酯-聚乙二醇共聚物), PLA-PEG 共聚物(polylactic acid-polyethylene glycol copolymer; 聚乳酸-聚乙二醇共聚物)和PGA-PEG 共聚物(polyglycolic acid-polyethylene glycol copolymer; 聚羟基乙酸-聚乙二醇共聚物)。

反应可在温度10°C至90°C有触媒存在下进行。适合触媒的具体例子为二-n-丁基锡二月桂酸盐(di-n-butyltin dilaurate)、二-n-丁基锡乙酸盐(di-n-butyltin diacetate)、苯酚钠(sodium phenate)、氯化铁(ferric chloride)、乙酰丙酮铜(copper acetylacetonate)、环烷酸锌(zinc naphthenate)或三丁基磷(tributylphosphine)。

生物分解性聚合微胶粒组合物:

透明质酸衍生物, 不论是上述(A)类的有短链部分(C₂₋₁₆ 烷基)取代的, 或是上述(B)类的有生物分解性亲油预聚物接枝的, 都可溶于一亲水性介质中。于是, 透明质酸衍生物会形成微胶粒(micelles)。

例如, 当生物分解性透明质酸衍生物为上述梳子状接枝共聚物, 溶于一亲水性介质中, 且浓度大于临界微胶粒浓度(critical micelle concentration)时, 此梳子状接枝共聚物会自行组合(self assembled)成为微胶粒。图 2 显示微胶粒的示意图。透明质酸主链形成在外亲水层, 而生物分解性亲油预聚物则形成在内亲油层, 亲油层内则形成了一亲油核。

在此微胶粒组合物中, 透明质酸衍生物可具有低的临界微胶粒浓度, 范围为 0.005 重量%至 1.0 重量%, 优选在 0.005 重量%至 0.5 重量%, 更优选为 0.005 重量%至 0.3 重量%。透明质酸衍生物微胶粒的尺寸可为 10 nm 至 500 nm, 优选是 50 nm 至 400 nm, 更优选为 50 nm 至 300 nm。

亲水性介质可为水或一水溶液。

药学或生理活性组合物:

如上所述的透明质酸衍生物, 不论是上述(A)类的有短链部分(C₂₋₁₆ 烷基)取代者, 或是上述(B)类的有生物分解性亲油预聚物接枝的, 当溶于一亲水性介质中, 会形成微胶粒, 并有一亲油核。因此, 此种微胶粒可用来包覆药学活性或生理活性分子。

于是, 本发明提供一种药学或生理活性组合物, 其包括:

一亲水性介质;

一生物分解性透明质酸衍生物, 其包括至少一种以下化学式所示的改质透明质酸重复单元

(HA)-[O(C=O)NH-M]_p, 其中 HA 为包括 N-乙酰基-D-葡糖胺 (N-acetyl-D-glucosamine)和 D-葡糖醛酸(glucuronic acid)的单元, M 为包括 C₂₋₁₆ 烷基或一生物分解性亲油性预聚物的改质部分, p 为 1 至 4 的整数;

药学活性分子或生理活性分子，被包埋于生物分解性透明质酸衍生物所形成的微胶粒内。

优选生物分解性透明质酸衍生物是梳子状接枝共聚物，药学活性或生理活性分子是亲油性的，例如抗肿瘤药，抗排斥药，非鸦片麻醉止痛剂(opioid analgesics)。

以下，本发明将举实施例以说明本发明的方法、特征及优点，但并非用以限定本发明的范围，本发明的范围应以后附的权利要求为准。

实施例 A: 有短链烷基取代的透明质酸

制备实施例 1: 透明质酸的季胺盐的制备

0.5 克的透明质酸钠盐溶解于 400 毫升去离子水中，充分搅拌均匀溶解之后，利用 DOWEX 50 × 8 的离子交换树脂 (H⁺ form, 填充成 25 公分管柱)，将透明质酸分子上的钠离子交换成氢离子，随后以四丁基氢氧化铵溶液 (tetrabutylammonium hydroxide solution) (浓度为 40%) 滴定至中性。之后以冷冻干燥法干燥。产物为 0.667 克。

实施例 A-1: 透明质酸 100% 取代的丁基氨基甲酸乙酯 (butyl urethane) 衍生物 (C4-HA)

将 0.30 克制备实施例 1 所得透明质酸 (3×10^{-3} meq, 化学计量 100% 取代) 季胺盐，溶于 60 毫升 DMSO (dimethylsulfoxide) 中，待溶解后，加入 0.3 克异氰酸丁酯 (butyl isocyanate) (3×10^{-3} meq)，随后加入 100 μ l 的二-n-二月桂酸二丁锡 (di-n-butyltin dilaurate) (触媒)，反应温度为摄氏 65 度，8 小时后，加入 D B A (di-butyl amine) 终止反应。之后利用透析膜 (MWCO= 12,000 ~ 14,000) 在饱和食盐水中透析，除去杂质及将季胺盐交换成钠盐，冷冻干燥，得到 C4-HA 粉末。IR 图谱如图 3 所示，1710 cm^{-1} 处可见氨基甲酸乙酯 (urethane) 键合。

图 8 显示 C4-HA 的化学结构，其中氢位置以 a, b, c, d 标示。

C4-HA 的 ¹H NMR 结构分析:

4.36~2.98(m, hyaluronic acid backbone), 1.49~1.53(m, H-a), 1.32~1.35(m, H-b), 1.18~1.26(m, H-c), 0.74~0.83(m, H-d).

图 4a 和 4b 为冷冻干燥的 C4-HA (透明质酸 100%取代的丁基氨基甲酸乙酯衍生物)的 SEM 照片。可发现透明质酸衍生物为多孔状,适合作为“细胞或组织的支架”(“scaffold for cell or tissue”)(生物分解性多孔基材)。

图 5 显示 C4-HA 的膨胀率(swelling ratio)和 pH 值的关系。

细胞毒性试验:

依 ASTM F895 规范,以 L929 细胞株测试 C4-HA 的细胞毒性反应指数,于 6-well 培养盘中进行细胞培养,约 24 小时后可生长成融合的单层细胞 (confluent monolayer); 将培养液吸出并以 2ml 琼脂培养基平覆于细胞上,使其固化; 将 C4-HA 粉末平铺于培养盘正中央一公分直径的圆形区域范围内,在 37°C 二氧化碳培养箱中培养一天后,以中性红试剂 (neutral red) 染色法评估细胞毒性。细胞毒性反应指数(response index)=区域指数(zone index) / 溶解指数(lysis index)。Zone index=0 表示试样附近或试样之下没有可检测出的区域。实验结果显示 C4-HA 材料没有细胞毒性反应。

实施例 A-2: 透明质酸 100%取代的仲丁基氨基甲酸乙酯衍生物

将 0.30 克由制备实施例 1 所得的透明质酸 (3×10^{-3} meq, 化学计量 100%取代)的季胺盐,溶于 60 毫升 DMSO 中,待溶解之后,加入 0.3 克的异氰酸仲丁酯(sec-butyl isocyanate) (3×10^{-3} meq),随后加入 100 μ l 的二-n-丁基锡二月桂酸盐(di-n-butyltin dilaurate),反应温度为摄氏 65 度,8 小时之后,加入 D B A 终止反应,之后利用透析膜 (MWCO=12,000~14,000) 在饱和食盐水中透析,除去杂质以及将季胺盐交换成钠盐,冷冻干燥。

实施例 A-3: 透明质酸 100%取代的辛基氨基甲酸乙酯衍生物

将 0.37 克由制备实施例 1 所得的透明质酸 (3.7×10^{-3} meq)的季胺盐,溶于 60 毫升的 DMSO 中,待溶解之后,加入 0.58 克的异氰酸辛酯(octyl isocyanate) (3.7×10^{-3} meq),随后加入 100 μ l 的二-n-丁基锡二月桂酸盐(di-n-butyltin dilaurate),反应温度为摄氏 65 度,8 小时之后,加入 D B A 终止反应,之后利用透析膜 (MWCO=12,000~14,000) 在饱和食盐水中透析,

除去杂质以及将季胺盐交换成钠盐，冷冻干燥。

实施例 A-4: 透明质酸 50% 取代的辛基氨基甲酸乙酯衍生物

将 0.37 克制备实施例 1 所得的透明质酸 (3.7×10^{-3} meq) 的季胺盐，溶于 60 毫升 DMSO 中，待溶解之后，加入 0.29 克辛基异氰酸酯 (1.85×10^{-3} meq)，随后加入 100 μ l 的二-n-丁基锡二月桂酸盐(di-n-butyltin dilaurate)，反应温度为摄氏 65 度，8 小时之后，加入 D B A 终止反应，之后利用透析膜

(MWCO=12,000~14,000) 在饱和食盐水中透析，除去杂质以及将季胺盐交换成钠盐，冷冻干燥。

实施例 A-5: 透明质酸 10% 取代的辛基氨基甲酸乙酯衍生物

将 0.37 克制备实施例 1 所得的透明质酸 (3.7×10^{-3} meq) 的季胺盐，溶于 60 毫升 DMSO 中，待溶解之后，加入 0.058 克的辛基异氰酸酯 (3.7×10^{-4} meq)，随后加入 100 μ l 的二-n-丁基锡二月桂酸盐(di-n-butyltin dilaurate)，反应温度为摄氏 65 度，8 小时之后，加入 D B A 终止反应，之后利用透析膜

(MWCO=12,000~14,000) 在饱和食盐水中透析，除去杂质以及将季胺盐交换成钠盐，冷冻干燥。

实施例 A-6: 透明质酸 100% 取代的十二烷基氨基甲酸乙酯 (dodecyl urethane) 衍生物(C12-HA)

将 0.35 克制备实施例 1 所得的透明质酸 (3.54×10^{-3} meq) 的季胺盐，溶于 100 毫升 DMSO 中，待溶解之后，加入 0.75 克的异氰酸十二烷基酯(异氰酸十二烷基酯 dodecyl isocyanate) (3.54×10^{-3} meq)，随后加入 100 μ l 的二-n-丁基锡二月桂酸盐(di-n-butyltin dilaurate)，反应温度为摄氏 65 度，8 小时之后，加入 D B A 终止反应。之后利用透析膜 (MWCO=12,000~14,000) 在饱和食盐水中透析，除去杂质以及将季胺盐交换成钠盐，冷冻干燥。

图 9 显示 C12-HA 的化学结构，其中氢位置以 a, b, c, d 标示。

C12-HA 的 ^1H NMR 结构分析:

$\delta = 4.36\sim 2.98(\text{m, hyaluronic backbone}), 1.49\sim 1.53(\text{m, H-a}), 1.32\sim 1.35(\text{m, H-b})$

H-b), 1.18~1.26(m, H-c), 0.74~0.83(m, H-d).

实施例 A-7: 透明质酸 50% 取代的十二烷基氨基甲酸乙酯(dodecyl urethane)衍生物

将 0.35 克制备实施例 1 所得的透明质酸 (3.54×10^{-3} meq) 的季胺盐, 溶于 100 毫升 DMSO 中, 待溶解之后, 加入 0.375 克异氰酸十二烷基酯 dodecyl isocyanate (1.77×10^{-3} meq), 随后加入 100 μ l 的二-n-丁基锡二月桂酸盐 (di-n-butyltin dilaurate), 反应温度为摄氏 65 度, 8 小时之后, 加入 D B A 终止反应。之后利用透析膜 (MWCO=12,000~14,000) 在饱和食盐水中透析, 除去杂质以及将季胺盐交换成钠盐, 冷冻干燥。

实施例 A-8: 透明质酸 10% 取代的十二烷基氨基甲酸乙酯 (dodecyl urethane) 衍生物

将 0.35 克制备实施例 1 所得的透明质酸 (3.54×10^{-3} meq) 的季胺盐, 溶于 100 毫升的 DMSO 中, 待溶解之后, 加入 0.075 克的异氰酸十二烷基酯 dodecyl isocyanate (3.54×10^{-4} meq), 随后加入 100 μ l 的二-n-丁基锡二月桂酸盐 (di-n-butyltin dilaurate), 反应温度为摄氏 65 度, 8 小时之后, 加入 D B A 终止反应。之后利用透析膜 (MWCO=12,000~14,000) 在饱和食盐水中透析, 除去杂质以及将季胺盐交换成钠盐, 冷冻干燥。

B 系列实施例

有预聚物接枝的透明质酸

制备实施例 2: 单官能基 PCL (polycaprolactone; 聚己内酯) 的合成

将 200g (1.75mole) 己内酯(caprolactone)单体置于反应瓶内, 加入 32.65g (0.175mole) 1-十二烷醇(1-dodecanol)作为起始剂及 0.71g(1.75×10^{-3} mole)辛酸亚锡(stannous octanoate)做为触媒, 反应温度设为 120 $^{\circ}$ C, 反应时间 2hrs。反应后加入氯仿(chloroform)溶解再倒入乙醚中再沉淀。合成路径如图 6 所示, 图中所示的重复数目例如是 2,凝胶渗透层析(GPC; gel permeation chromatography)分析显示, Mn 为 2352, Mw 为 3012, PDI (Mw/Mn)=1.28。

图 10 显示单官能基 PCL 的化学结构，其中氢位置以 a, b, c, d, e, f, g, h, h' 标示。

PCL 的 NMR 结构分析:

δ 0.76(t, J=7.0HZ, H-a), 1.16(S, H-b), 3.96(t, J=6.8HZ, H-c), 2.20(t, J=7.4HZ, H-d), 1.56(m, H-e,g), 1.30(m, H-f), 3.96(t, J=6.8HZ, H-h), 3.53(t, J=7.0Hz, H-h').

制备实施例 3: 单官能基 PLLA (poly L-lactide; 聚-左旋-丙交酯)的合成
将 200g (1.39mole)丙交酯单体置于反应瓶内，加入 25.82g (0.139mole) 1-dodecanol 作为起始剂及 0.562g(1.39×10^{-3} mole) stannous octanoate 做为触媒，反应温度设为 120℃，反应时间 2hrs。反应后加入氯仿溶解再倒入乙醚中再沉淀。GPC 分析结果显示，Mn 为 2189，Mw 为 2797，PDI (Mw/Mn)值为 1.28。

图 11 为单官能基 PLLA 的化学结构，其中氢位置以 a, b, c, d, e, f, g 标示。

NMR 分析:

PLLA: δ 0.76(t, J=7.0HZ, H-a), 1.14(S, H-b), 1.38(m, H-c), 4.01(m, H-d), 5.06(m, H-e), 1.47(d, J=7.2HZ, H-f), 4.24(m, H-g).

实施例 B-1: 有 PCL 预聚物接枝的透明质酸共聚物
(HA_{220,000}-g-100%-PCL_{2,300})的合成

以透明质酸的伯醇与 PCL 当量比 1:1 的化学计量，将 5.75 克(2.5×10^{-3} mole) 制备实施例 2 所得的单官能基 PCL (M-PCL-OH) (Mw=2300)溶于 50 毫升的 NMP 中，溶解后加入 0.42 克六亚甲基二异氰酸酯(六亚甲基二异氰酸酯 (hexamethylene diisocyanate; H12MDI); H12MDI) (2.5×10^{-3} mole)，随后加入 100 μ l 的二-n-丁基锡二月桂酸盐(di-n-butyltin dilaurate)，反应温度 60℃，反应时间 5 小时。5 小时之后，再将 1 克(2.5×10^{-3} mole)分子量为 22 万的透明质酸季胺盐溶于 150 毫升的 DMSO 中，加入先前溶液中，随后再加入 100 μ l 的二-n-丁基锡二月桂酸盐，反应温度为摄氏 60℃。12 小时之后，加入 DBA 终止反应，得到 HA_{220,000}-g-100%-PCL_{2,300} 共聚合物。之后利用透析膜 (MWCO=3500)在饱和食盐水中透析，除去杂质以及将季胺盐交换成钠盐，冷

冻干燥。合成路径如图 6 所示。

图 12 显示 HA-接枝-PCL 的化学结构,其中氢位置以 a, b, c, d, e, f, g, h, i, k 标示。

NMR 数据:

δ 4.58(m, H-1), 4.49(m, H-1'), 4.07(m, H-2), 3.21(m, H-2'), 3.94(m, H-3), 3.60(m, H-3'), 3.52(m, H-4), 3.60(m, H-4'), 3.36(m, H-5), 3.52(m, H-5'), 4.16(m, H-6a), 3.92(m, H-6b), 2.28(m, H-f), 3.90(m, H-b), 1.60(m, H-c, e), 1.45(m, H-d), 3.89(m, H-g), 1.40(m, H-h), 0.86(m, H-i), 2.03(s, H-k).

临界微胶粒浓度 (CMC) 的测量:

将 $\text{HA}_{220,000}\text{-g-100\%-PCL}_{2,300}$ 共聚合物溶于 $4\ \mu\text{M}$ 的二苯基己三烯(diphenyl hexatriene; DPH)溶液中,浓度分别为 0.001%、0.005%、0.01%、0.025%、0.05%、0.1%、0.5%、1%。利用 UV-VIS 光谱仪于波长 356 nm 测量其吸收值,由吸收值对浓度作图得图 7,求内差可得临界微胶粒浓度(CMC)为 0.22 重量%。

实施例 B-2: 有 PCL 预聚物接枝的透明质酸共聚合物

($\text{HA}_{220,000}\text{-g-10\%-PCL}_{2,300}$ -)共聚合物

以透明质酸的伯醇与 PCL 当量比 1:0.1 的化学计量,将 0.58 克(2.5×10^{-4} mole)单官能基 PCL ($M_w=2300$)溶于 50 毫升 NMP 中,溶解后加入 0.042 克六亚甲基二异氰酸酯(hexamethylene diisocyanate; H12MDI) (2.5×10^{-4} mole),随后加入 $100\ \mu\text{l}$ 的二-n-丁基锡二月桂酸盐(di-n-butyltin dilaurate),反应温度 60°C ,反应时间 5 小时。5 小时之后,再将 1 克(2.5×10^{-3} mole)分子量为 22 万的透明质酸季胺盐溶于 150 毫升 DMSO 中,加入先前溶液中,随后再加入 $100\ \mu\text{l}$ 的二-n-丁基锡二月桂酸盐(di-n-butyltin dilaurate),反应温度为 60°C ,12 小时之后,加入 D B A 终止反应,得到 $\text{HA}_{220,000}\text{-g-10\%-PCL}_{2,300}$ 共聚合物。之后利用透析膜($MWCO=3500$)在饱和食盐水中透析,除去杂质以及将季胺盐交换成钠盐,冷冻干燥。

HA-PCL 的 NMR 结构分析:

δ 4.58(m, H-1), 4.49(m, H-1'), 4.07(m, H-2), 3.21(m, H-2'), 3.94(m, H-3), 3.60(m, H-3'), 3.52(m, H-4), 3.60(m, H-4'), 3.36(m, H-5), 3.52(m, H-5'), 4.16(m, H-6a), 3.92(m, H-6b), 2.28(m, H-f), 3.90(m, H-b), 1.60(m, H-c, e), 1.45(m, H-d), 3.89(m, H-g), 1.40(m, H-h), 0.86(m, H-i), 2.03(s, H-k).

细胞毒性测试:

以 L929 细胞株测试 HA-PCL copolymer(10%接枝率)及其形成微胶粒 (micelle) 后的细胞毒性反应。将 L929 细胞株以 1×10^5 的细胞密度种在 24-well 细胞培养盘中, 置于 37°C 、5% CO_2 浓度的培养箱中进行细胞培养, 约 24 小时后可生长成融合的单层细胞 (confluent monolayer)。

以 UV 灭菌的 HA-PCL copolymer(10%接枝率)粉末溶于培养液中, 依序置备成 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} g/ml 等浓度的溶液。

将培养盘中的培养液全数吸出, 加入含不同浓度 HA-PCL (10%接枝率)的培养液 2ml, 再置于二氧化碳培养箱中培养, 24 小时后, 细胞的存活率以 MTT 颜色分析法比较细胞毒性, 结果显示, HA-PCL 共聚物微胶粒在不同浓度下都没有细胞毒性反应。

临界微胶粒浓度 (CMC) 的测量:

将 HA220,000-g-10%-PCL2,300 共聚合物溶于 $4 \mu\text{M}$ 的二苯基己三烯 (diphenyl hexatriene, DPH) 溶液中, 浓度分别为 0.001%、0.005%、0.01%、0.025%、0.05%、0.1%、0.5%、1%, 利用 UV-VIS 光谱仪于波长 356 nm 测量其吸收值, 由吸收值对浓度作图, 求其内差, 可得临界微胶粒浓度(CMC)为 0.0851 重量%。

实施例 B-3: 有 PCL 预聚物接枝的透明质酸共聚物 (HA_{50,000}-g-20%-PCL_{10,000} 共聚合物)的合成

以透明质酸的伯醇与 PCL 当量比 1:0.2 的化学计量, 将 1 克(1×10^{-4} mole)单官能基 PCL ($M_w=10000$)溶于 100 毫升 NMP 中, 溶解后加入 0.017 克六亚甲基二异氰酸酯(hexamethylene diisocyanate; H12MDI)(1×10^{-4} mole), 随后加入

100 μ l 二-n-丁基锡二月桂酸盐(di-n-butyltin dilaurate), 反应温度 60 $^{\circ}$ C, 反应时间 5 小时。5 小时之后, 再将 0.2 克(2.5×10^{-3} mole) 分子量为 5 万的透明质酸己胺盐溶于 100 毫升 DMSO 中, 加入先前溶液中, 随后再加入 100 μ l 的二-n-丁基锡二月桂酸盐(di-n-butyltin dilaurate), 反应温度为 60 $^{\circ}$ C, 12 小时之后, 加入 D B A 终止反应而得到 HA_{50,000}-g-20%-PCL_{10,000}, 之后利用透析膜 (MWCO=3500) 在饱和食盐水中透析, 除去杂质以及将季胺盐交换成钠盐, 冷冻干燥。

HA-PCL 的 NMR 数据:

δ 4.58(m, H-1), 4.49(m, H-1'), 4.07(m, H-2), 3.21(m, H-2'), 3.94(m, H-3), 3.60(m, H-3'), 3.52(m, H-4), 3.60(m, H-4'), 3.36(m, H-5), 3.52(m, H-5'), 4.16(m, H-6a), 3.92(m, H-6b), 2.28(m, H-f), 3.90(m, H-b), 1.60(m, H-c, e), 1.45(m, H-d), 3.89(m, H-g), 1.40(m, H-h), 0.86(m, H-i), 2.03(s, H-k).

实施例 B-4: 有 PCL 预聚物接枝的透明质酸共聚物
(HA_{50,000}-g-100%-PCL_{2,300} 共聚合物)的合成

以透明质酸的伯醇与 PCL 当量比 1:1 的化学计量, 将 1.15 克(5×10^{-4} mole) 单官能基 PCL (Mw=2300) 溶于 50 毫升 NMP 中, 溶解后加入 0.084 克六亚甲基二异氰酸酯(hexamethylene diisocyanate; H12MDI)(5×10^{-4} mole), 随后加入 100 μ l 的二-n-丁基锡二月桂酸盐(di-n-butyltin dilaurate), 反应温度 60 $^{\circ}$ C, 反应时间 5 小时。5 小时之后, 再将 0.2 克(5×10^{-4} mole) 分子量为 5 万的透明质酸季胺盐溶于 100 毫升 DMSO, 加入先前溶液中, 随后再加入 100 μ l 的二-n-丁基锡二月桂酸盐(di-n-butyltin dilaurate), 反应温度为 60 $^{\circ}$ C, 12 小时之后, 加入 DBA 终止反应而得到 HA_{50,000}-g-100%-PCL_{2,300}, 之后利用透析膜 (MWCO=3500) 在饱和食盐水中透析, 除去杂质以及将季胺盐交换成钠盐, 冷冻干燥。

临界微胶粒浓度 (CMC) 的测量:

将 HA_{50,000}-g-100%-PCL_{2,300} 溶于 4 μ M 的二苯基己三烯(diphenyl hexatriene,

DPH)溶液中, 浓度分别为 0.001%、0.005%、0.01%、0.025%、0.05%、0.1%、0.5%、1%, 利用 UV-VIS 光谱仪于波长 356 nm 测量其吸收值, 由吸收值对浓度作图, 求其内差, 可得临界微胶粒浓度(CMC)为 0.0794 重量%。

实施例 B-5: 有 PLLA 预聚物接枝的透明质酸共聚物

(HA_{220,000}-g-100%-PLLA_{2,300})的合成

以透明质酸的伯醇与 PLLA 当量比 1:1 的化学计量, 将 5.75 克(2.5×10^{-3} mole)单官能基 PLLA (Mw=2300)溶于 50 毫升 NMP 中, 溶解后加入 0.42 克六亚甲基二异氰酸酯(hexamethylene diisocyanate; H12MDI)(2.5×10^{-3} mole), 随后加入 100 μ l 的二-n-丁基锡二月桂酸盐(di-n-butyltin dilaurate), 反应温度 60°C, 反应时间 5 小时。5 小时之后, 再将 1 克(2.5×10^{-3} mole)分子量为 22 万的透明质酸季胺盐溶于 150 毫升 DMSO 中, 加入先前溶液中, 随后再加入 100 μ l 的二-n-丁基锡二月桂酸盐(di-n-butyltin dilaurate), 反应温度 60°C, 12 小时之后, 加入 DBA 终止反应, 而得到 HA_{220,000}-g-100%-PLLA_{2,300} 共聚合物, 之后利用透析膜(MWCO=3500)在饱和食盐水中透析, 除去杂质以及将季胺盐交换成钠盐, 冷冻干燥。

图 13 显示 HA-接枝-PLLA 的化学结构, 其中氢位置以 a, b, c, d, e, f, g 标示。

HA-PLLA 的 NMR 结构分析:

δ 4.59(m, H-1), 4.50(m, H-1'), 4.07(m, H-2), 3.22(m, H-2'), 3.94(m, H-3), 3.60(m, H-3'), 3.52(m, H-4), 3.60(m, H-4'), 3.37(m, H-5), 3.52(m, H-5'), 4.16(m, H-6a), 3.92(m, H-6b), 1.65(m, H-a), 5.02(m, H-b), 1.47(d, J=7.2HZ, H-c), 4.01(m, H-d), 1.15(s, H-e), 0.76(t, J=7.0HZ, H-f), 2.13(s, H-g).

实施例 B-6: 有 PCL 预聚物接枝的透明质酸共聚物

(HA_{20,000}-g-100%-PCL_{2,300})的合成

以透明质酸的伯醇与 PCL 当量比 1:1 的化学计量, 将 1.15 克(5×10^{-4} mole)单官能基 PCL (Mw=2300)溶于 50 毫升 NMP 中, 溶解后加入 0.084 克六亚甲基二异氰酸酯(hexamethylene diisocyanate; H12MDI)(5×10^{-4} mole), 随后加入

100 μ l 的二-n-丁基锡二月桂酸盐(di-n-butyltin dilaurate), 反应温度 60 $^{\circ}$ C, 反应时间 5 小时, 之后, 再将 0.2 克(5×10^{-4} mole)分子量为 2 万的透明质酸季胺盐溶于 100 毫升 DMSO 中, 加入先前溶液中, 随后再加入 100 μ l 的二-n-丁基锡二月桂酸盐, 反应温度为 60 $^{\circ}$ C, 12 小时之后, 加入 DBA 终止反应, 而得到 HA_{20,000}-g-100%-PCL_{2,300} 共聚合物, 之后利用透析膜(MWCO=3500)在饱和食盐水中透析, 除去杂质以及将季胺盐交换成钠盐, 冷冻干燥。

临界微胶粒浓度 (CMC) 的测量:

将 HA_{20,000}-g-100%-PCL_{2,300} 溶于 4 μ M 二苯基己三烯(diphenyl hexatriene, DPH)溶液中, 浓度分别为 0.001%、0.005%、0.01%、0.025%、0.05%、0.1%、0.5%、1%, 利用 UV-VIS 光谱仪于波长 356 nm 测量其吸收值, 由吸收值对浓度作图, 求其内差, 可得临界微胶粒浓度(CMC)为 0.432 重量%。

实施例 B-7: 有 PCL 预聚物接枝的透明质酸共聚合物(HA_{20,000}-g-50%-PCL_{2,300})的合成

以透明质酸的伯醇与 PCL 当量比 1:0.5 的化学计量, 将 0.58 克(2.5×10^{-4} mole)单官能基 PCL (Mw=2300)溶于 50 毫升 NMP 中, 溶解后加入 0.042 克六亚甲基二异氰酸酯(hexamethylene diisocyanate; H12MDI)(2.5×10^{-4} mole), 随后加入 100 μ l 二-n-丁基锡二月桂酸盐(di-n-butyltin dilaurate), 反应温度 60 $^{\circ}$ C, 反应时间 5 小时, 5 小时之后, 再将 0.2 克(5×10^{-4} mole)分子量为 5 万的透明质酸季胺盐溶于 100 毫升 DMSO, 加入先前溶液中, 随后再加入 100 μ l 的二-n-丁基锡二月桂酸盐(di-n-butyltin dilaurate), 反应温度为 60 $^{\circ}$ C, 12 小时之后, 加入 DBA 终止反应, 而得到 HA_{20,000}-g-50%-PCL_{2,300} 共聚合物, 之后利用透析膜(MWCO=3500)在饱和食盐水中透析, 除去杂质以及将季胺盐交换成钠盐, 冷冻干燥。

临界微胶粒浓度 (CMC) 的测量:

将 HA_{20,000}-g-50%-PCL_{2,300} 共聚合物溶于 4 μ M 的二苯基己三烯(diphenyl hexatriene, DPH)溶液中, 浓度分别为 0.001%、0.005%、0.01%、0.025%、

0.05%、0.1%、0.5%、1%。用 UV-VIS 光谱仪于波长 356 nm 测量其吸收值，由吸收值对浓度作图，求其内差，可得临界微胶粒浓度为 0.255 重量%。

综上所述，本发明藉由氨基甲酸乙酯(urethane)键合而将短链部分或预聚物导入在-OH基上而改质自然透明质酸。本发明的透明质酸衍生物没有细胞毒性反应。另外，将有生物分解性亲油性预聚物接枝的透明质酸衍生物溶在亲水性介质中，可形成微胶粒，且临界微胶粒浓度低。因此，可将药学活性或生理活性分子包覆在透明质酸衍生物微胶粒内，以形成药学活性或生理活性组成物，有稳定释放的效果。

以上描述了本发明的优选实施例，然其并非用以限定本发明。本领域技术人员对在此公开的实施方案可进行并不偏离本发明范畴和精神的改进和变化。

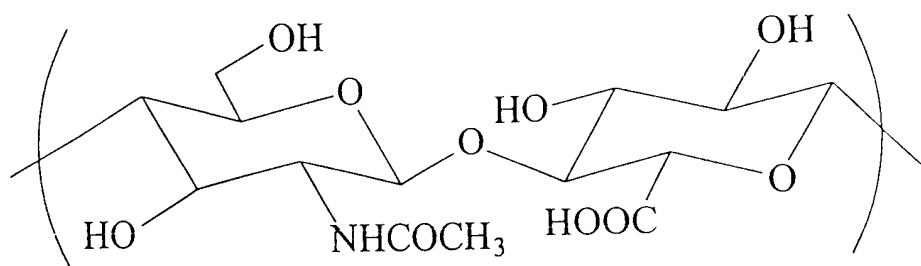


图1a

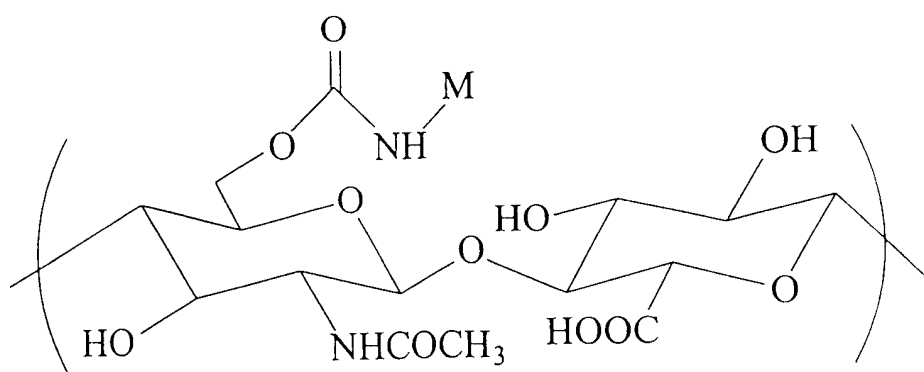


图1b

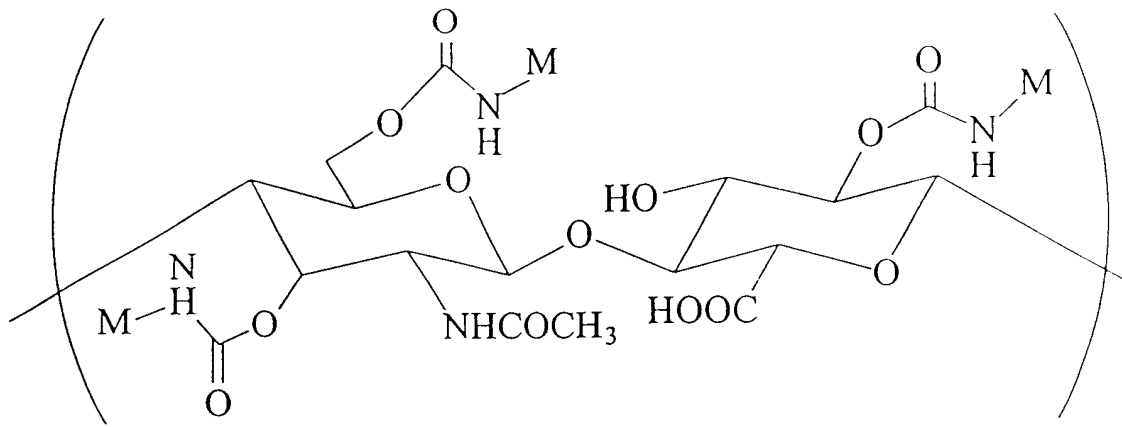


图1c

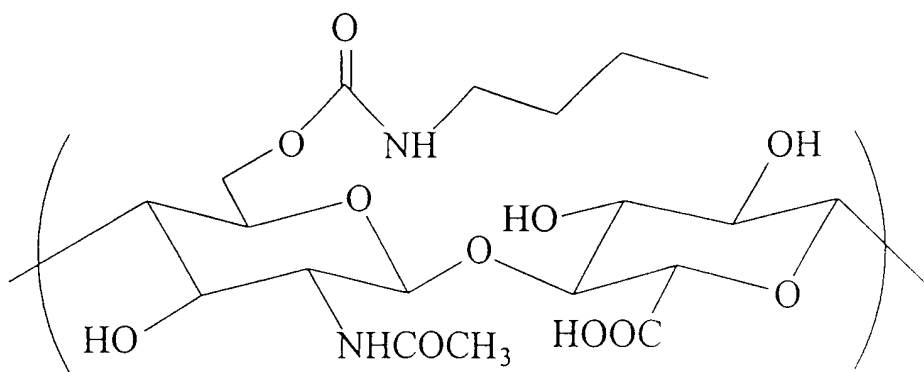


图1d

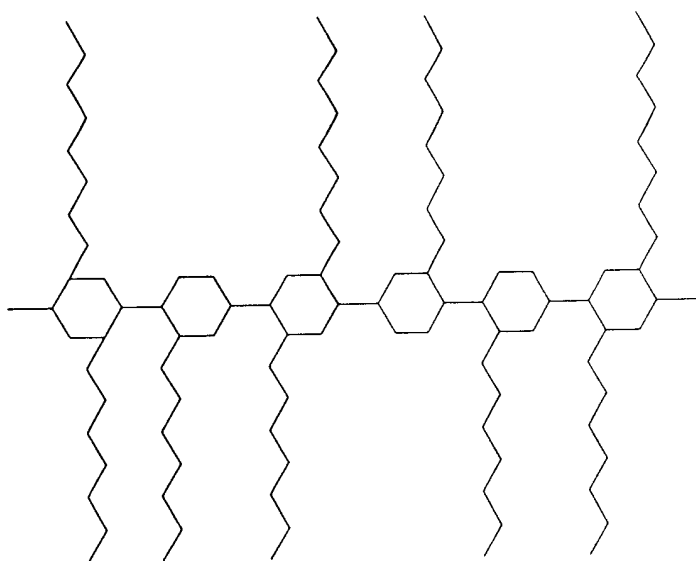


图1e

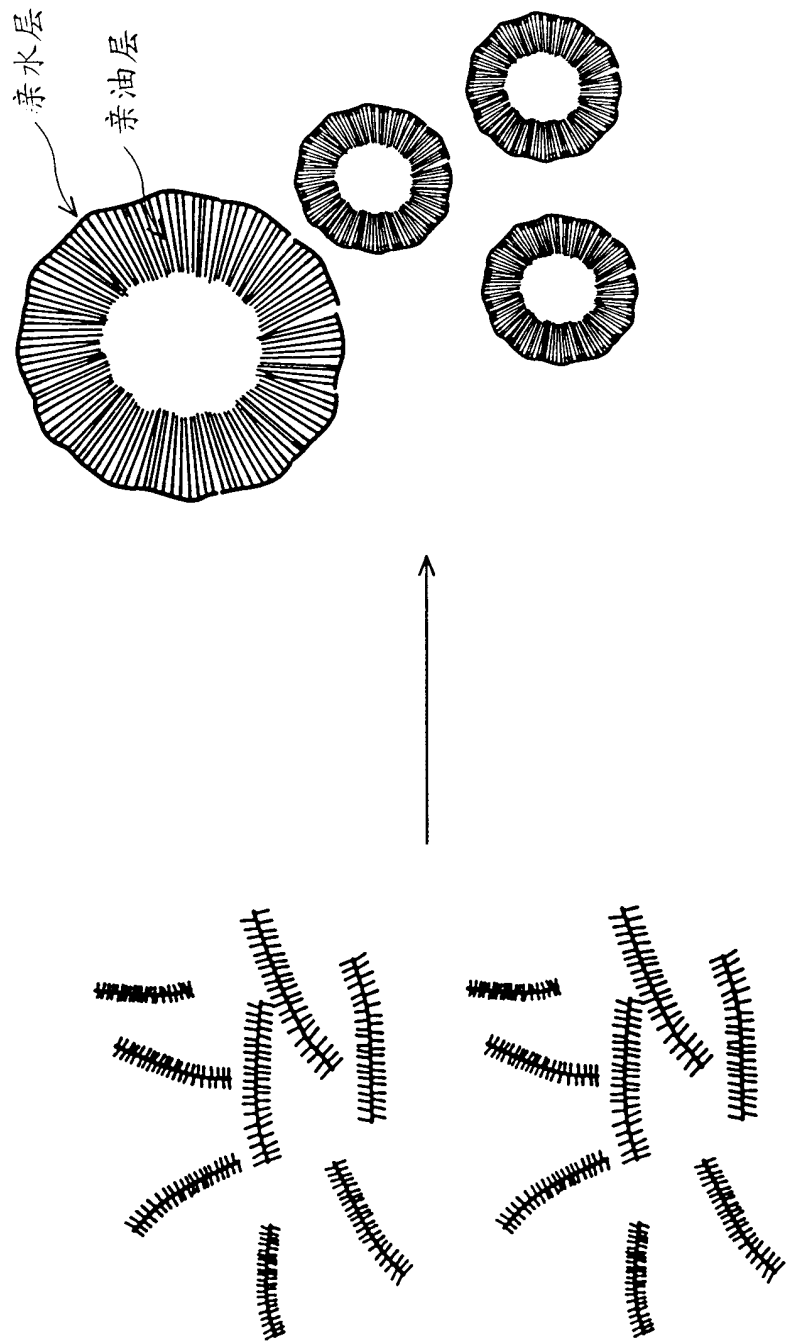


图2

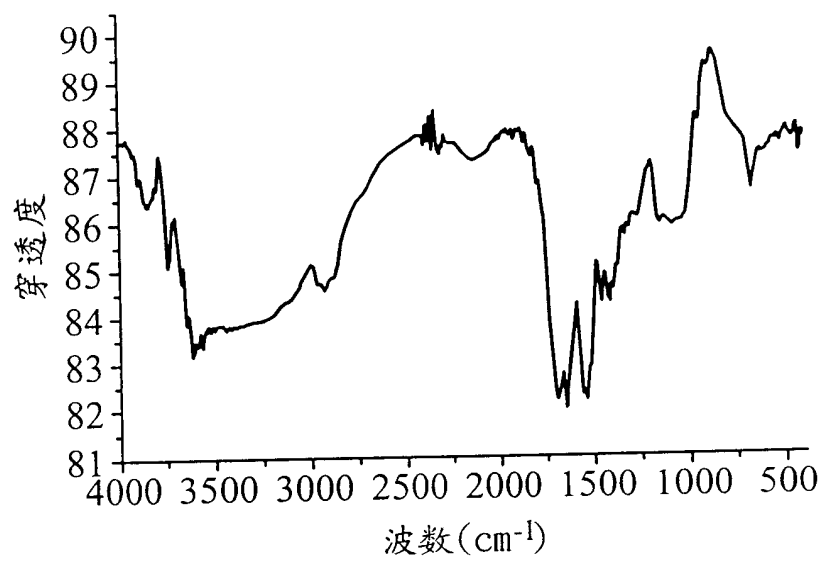


图3

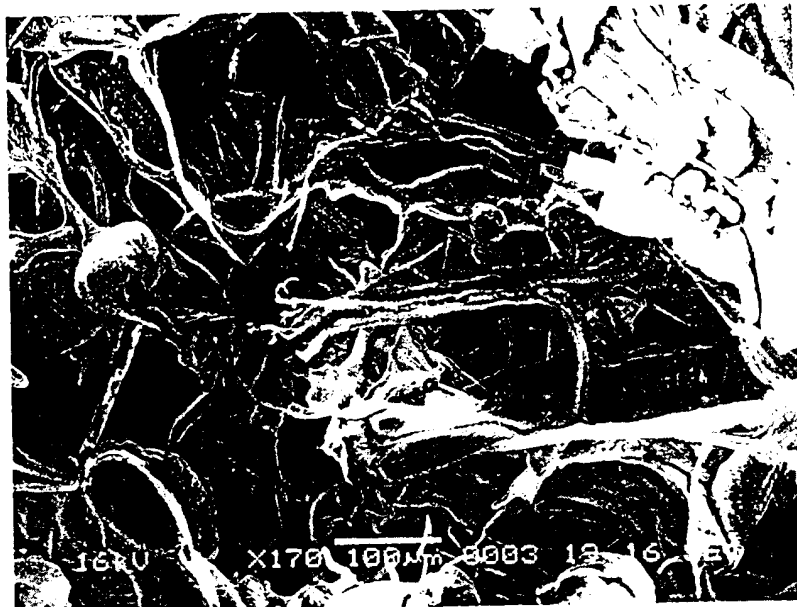


图4a

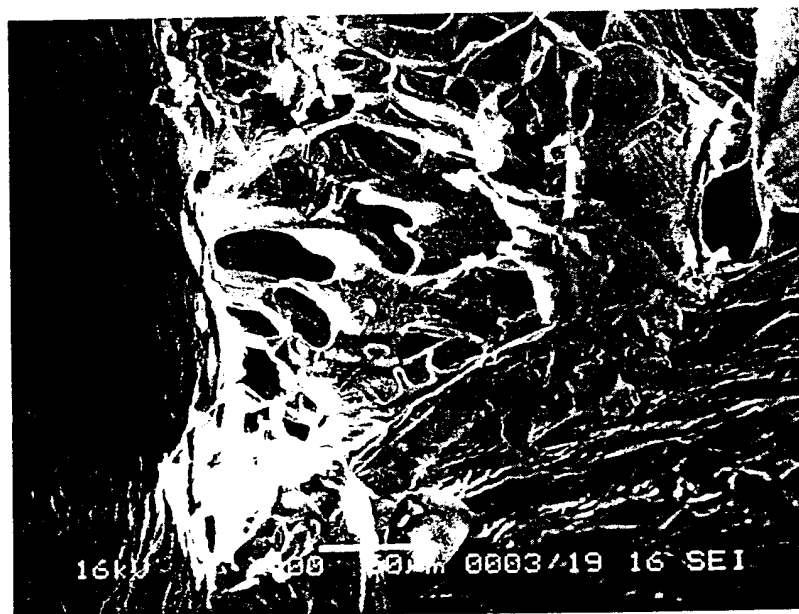


图4b

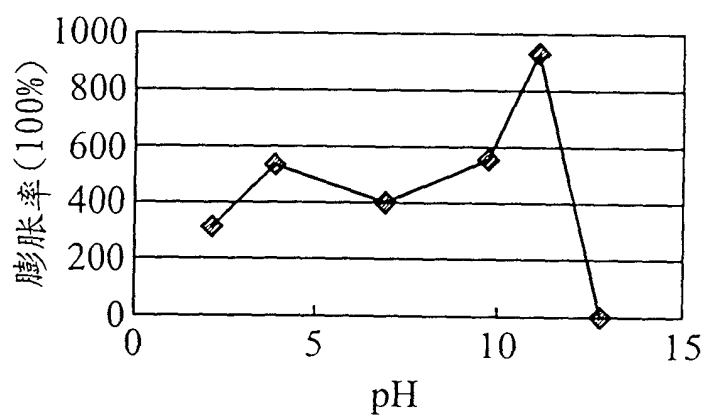


图5

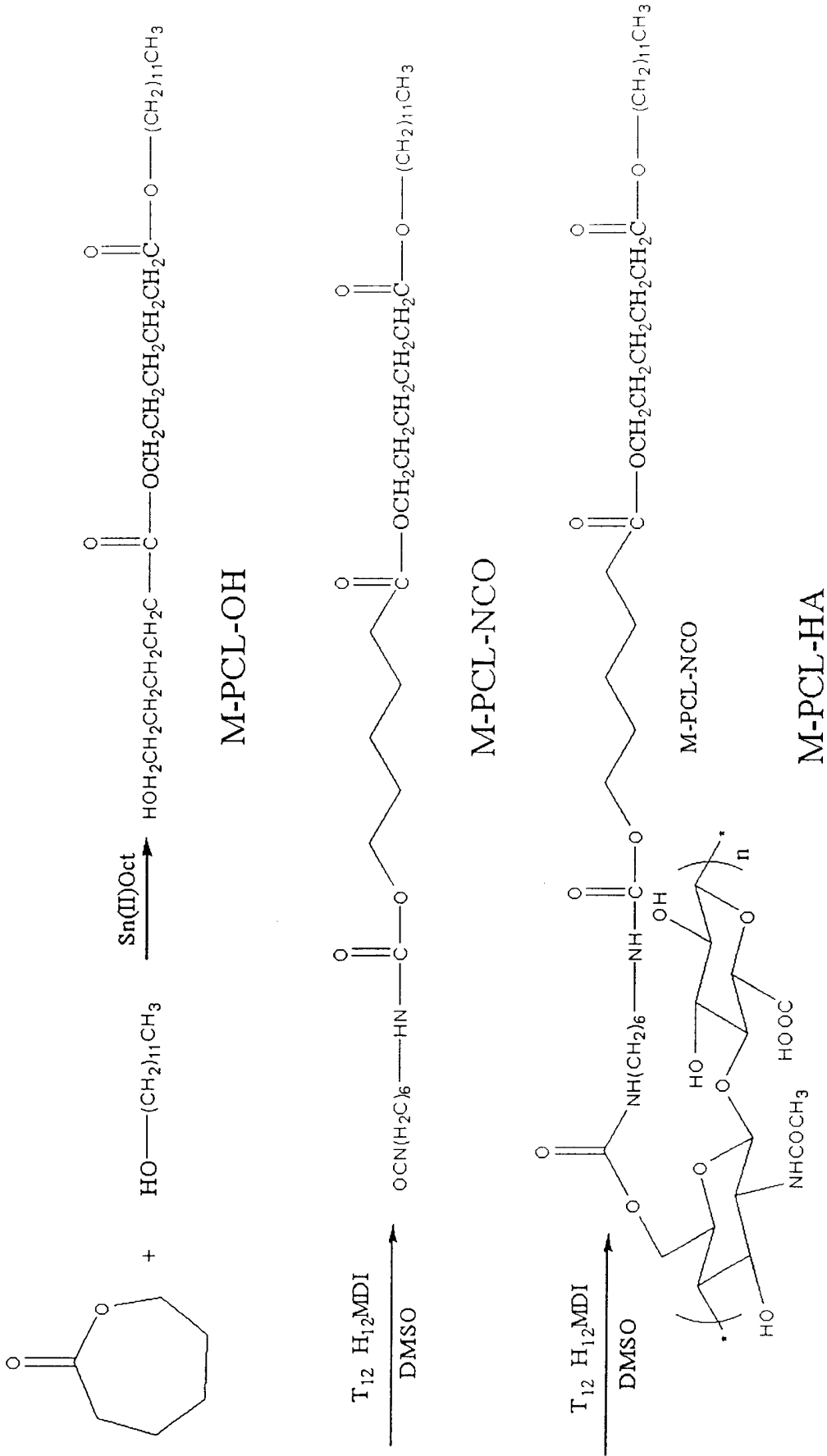


图6

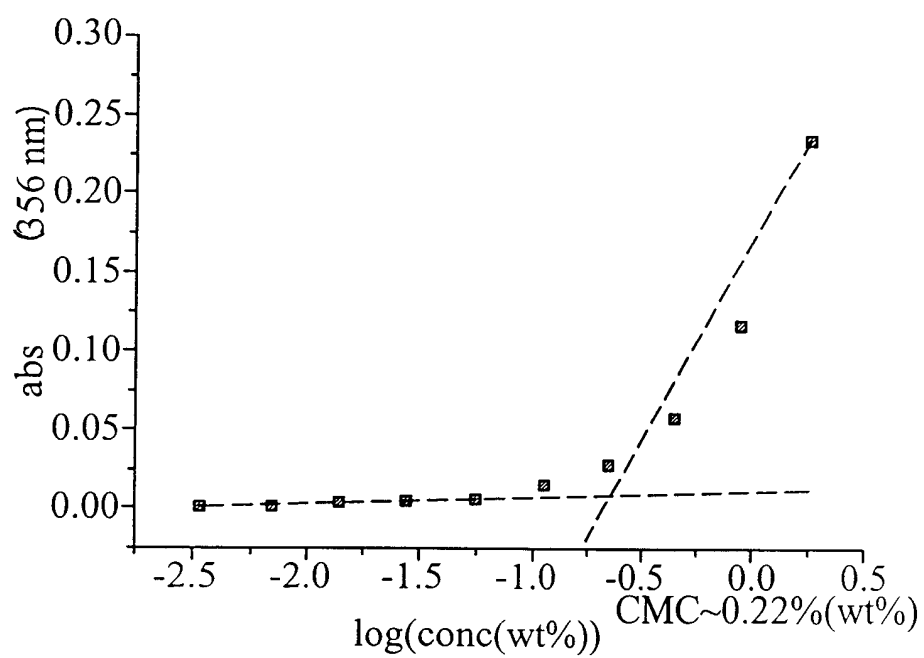


图7

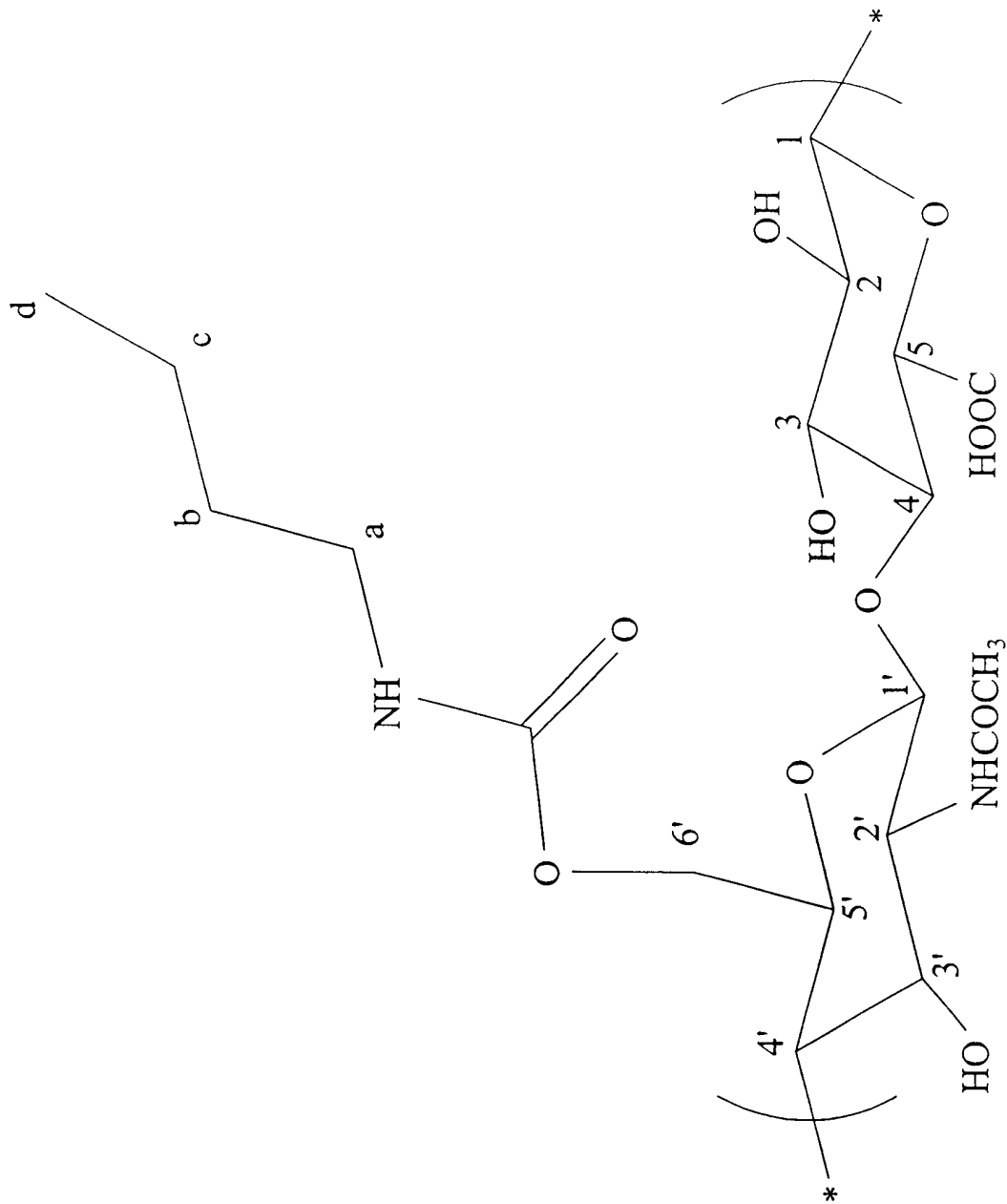


图8

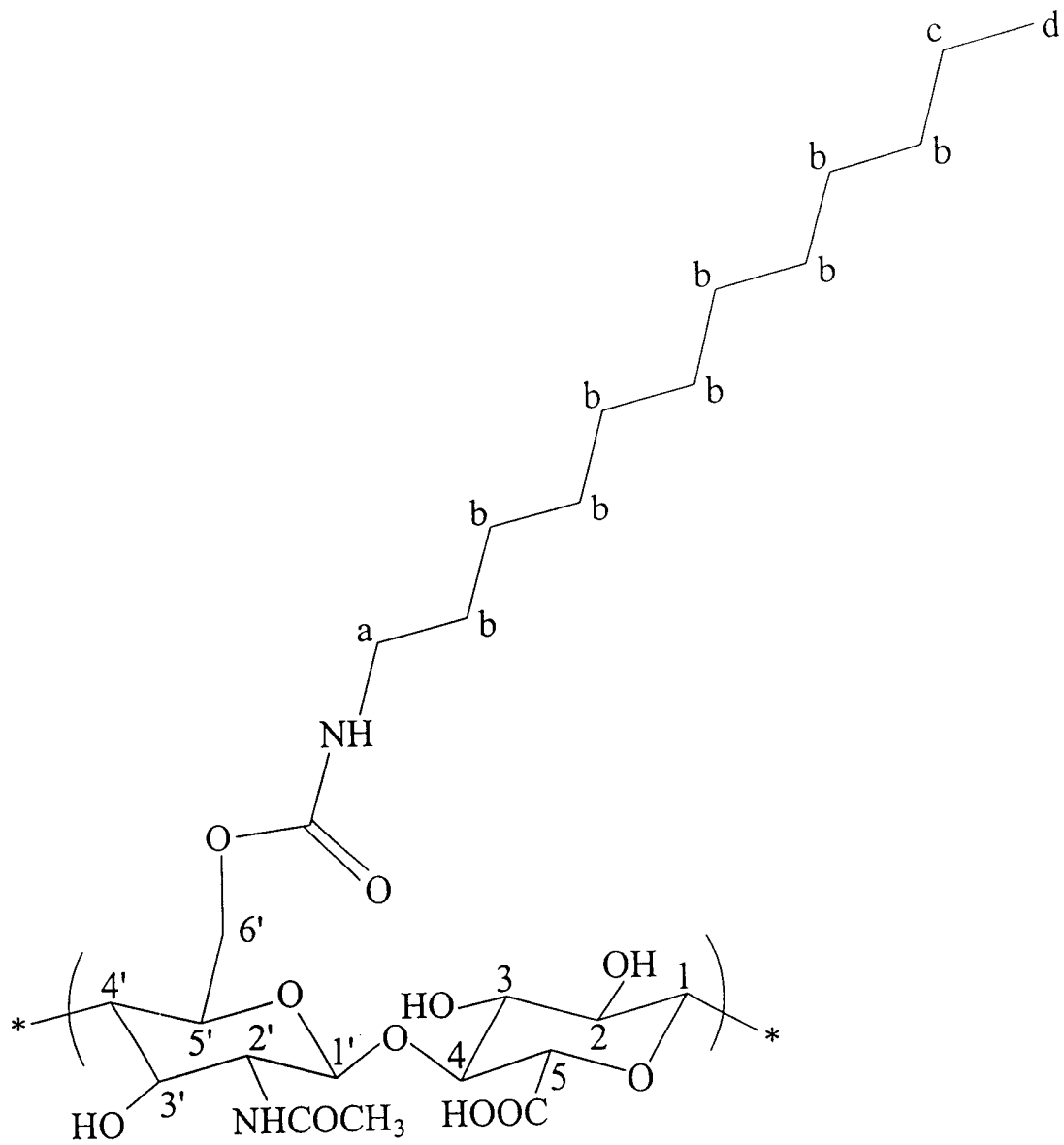


图9

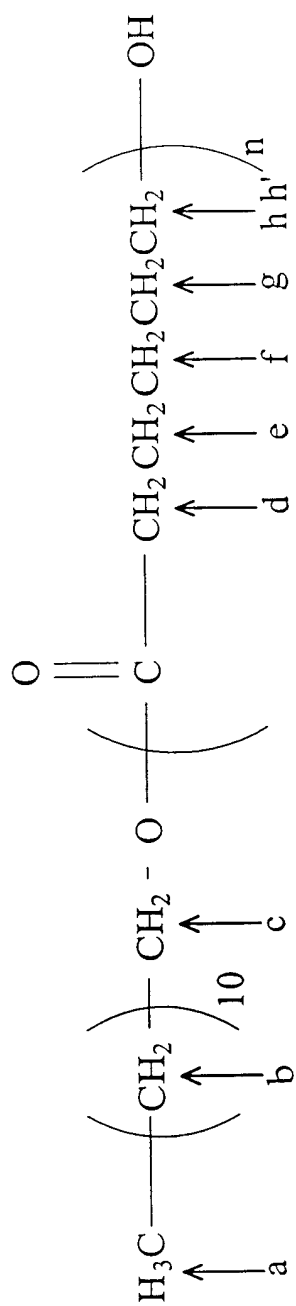


图10

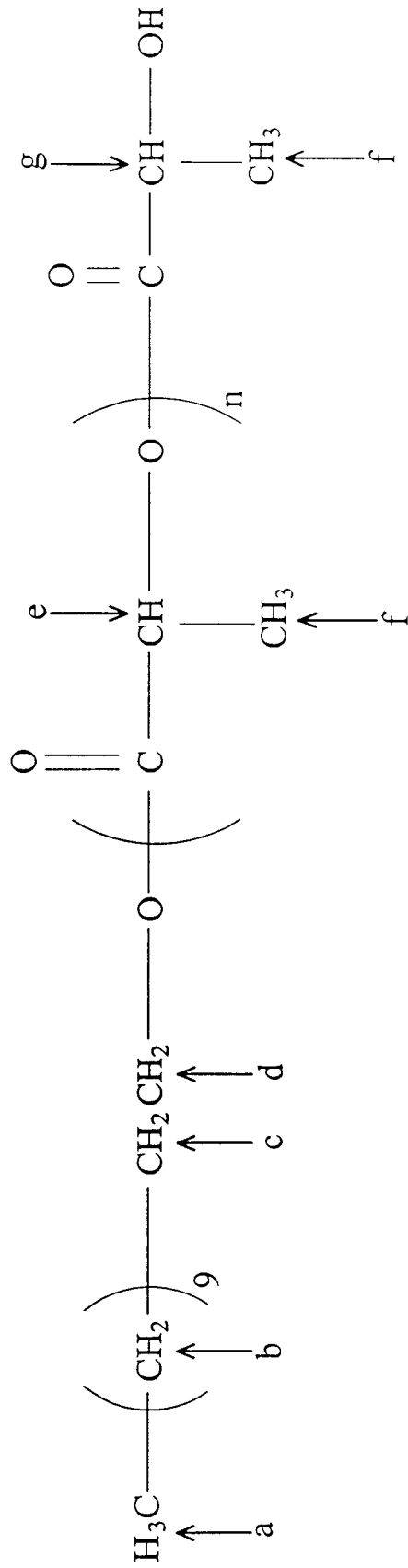


图11

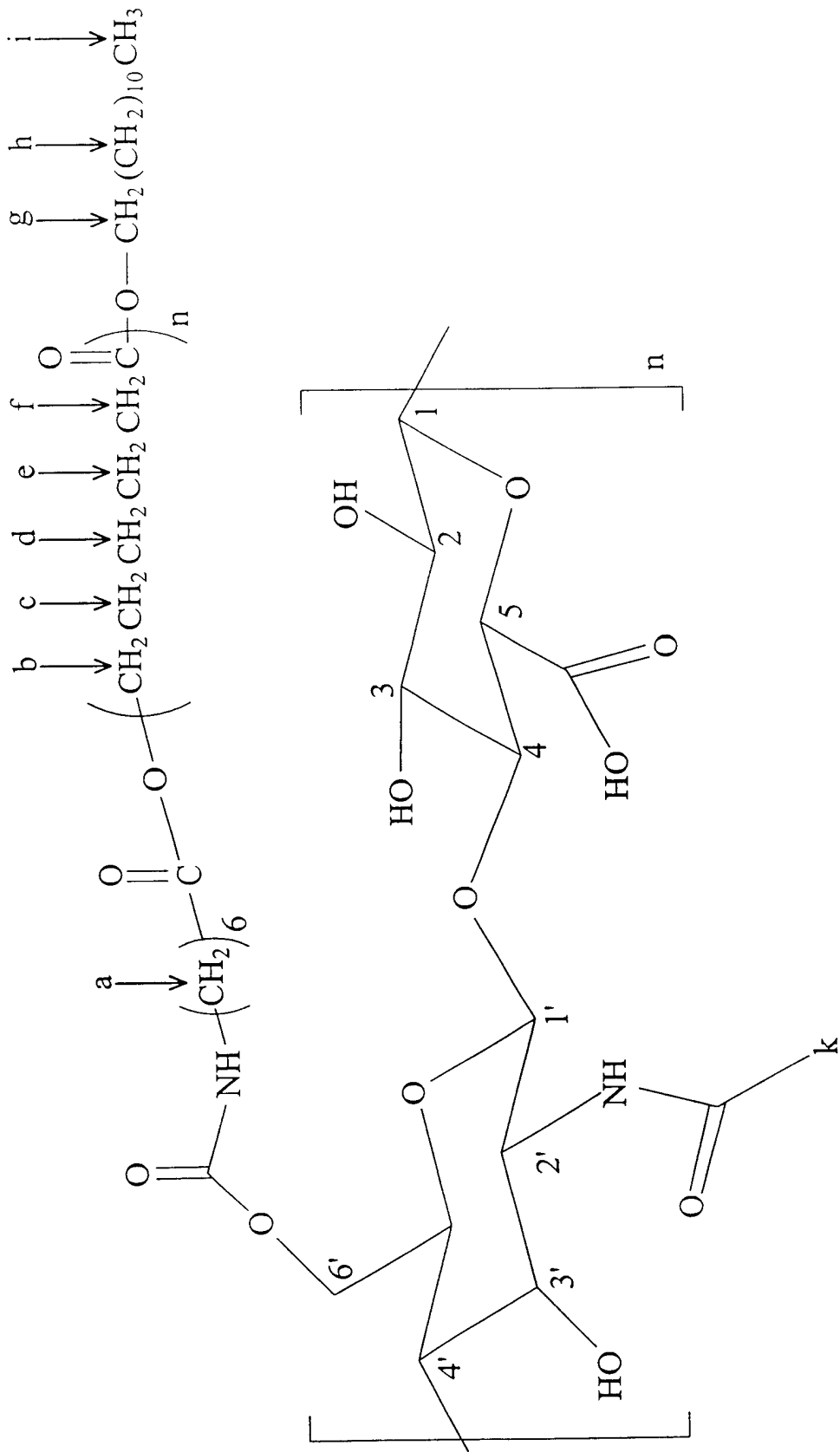


图12

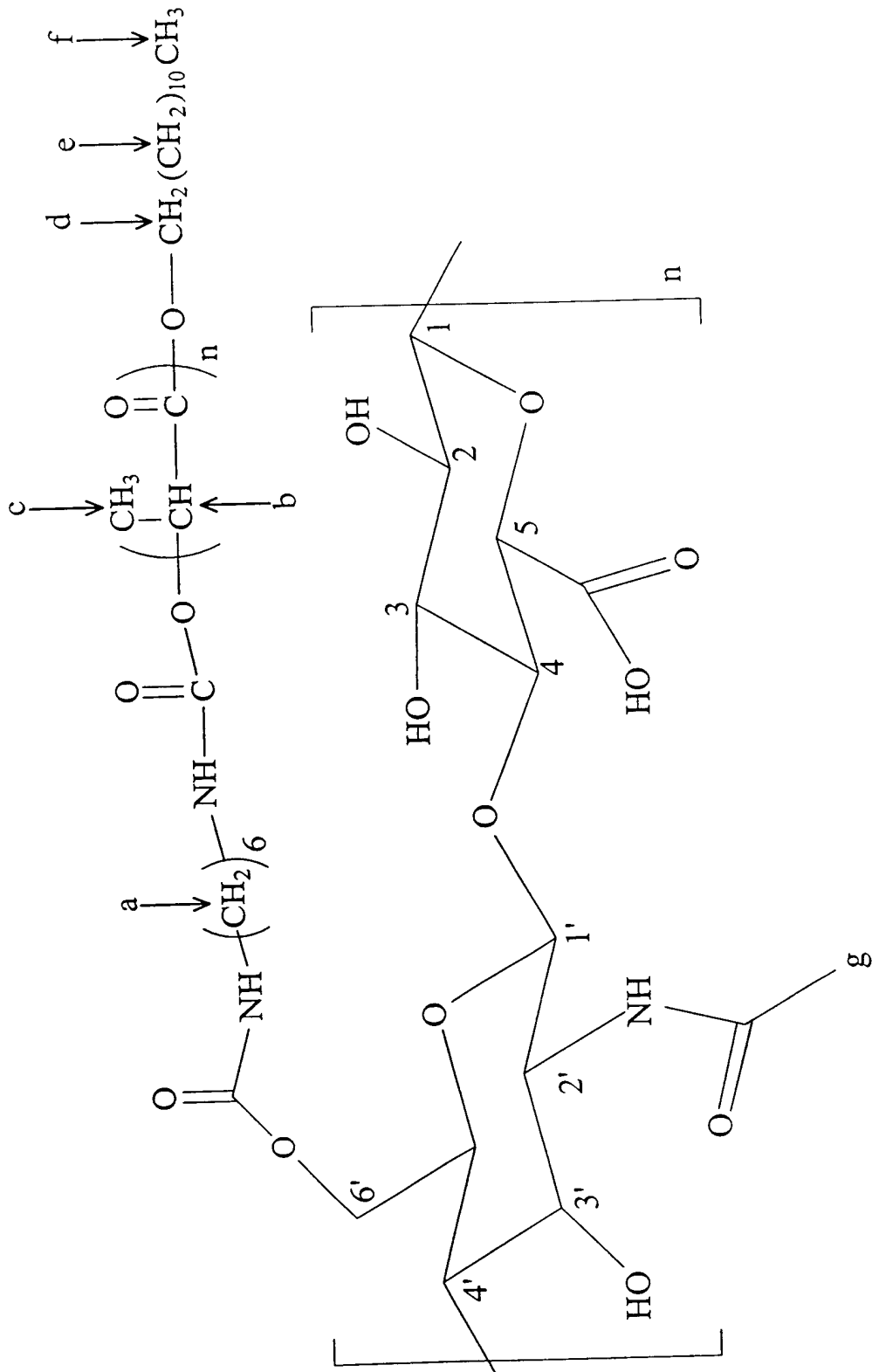


图13