

[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 200710093931.0

[51] Int. Cl.

C08J 3/24 (2006.01)
C08J 3/075 (2006.01)
C08L 5/08 (2006.01)
C08L 5/10 (2006.01)
C08L 5/04 (2006.01)
C08L 5/06 (2006.01)

[43] 公开日 2009年1月7日

[11] 公开号 CN 101338036A

[51] Int. Cl. (续)

C08L 1/26 (2006.01)

C08K 5/36 (2006.01)

A61K 31/715 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

[22] 申请日 2007.7.6

[21] 申请号 200710093931.0

[71] 申请人 舒晓正

地址 200120 上海市浦东新区乳山路 235 弄
33 号 402 室

[72] 发明人 舒晓正

[74] 专利代理机构 上海浦一知识产权代理有限公司
代理人 王 函

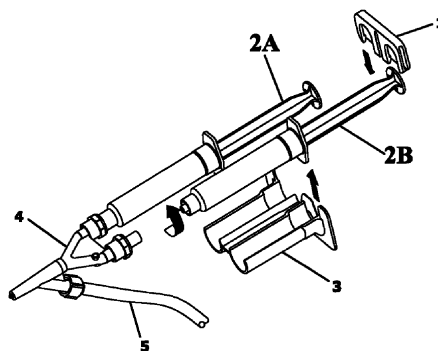
权利要求书 4 页 说明书 32 页 附图 1 页

[54] 发明名称

生物相容快速凝胶化水凝胶及其喷雾剂的制备方法

[57] 摘要

本发明公开了一种生物相容快速凝胶化水凝胶的制备方法，通过多个活性化合物组份在特定条件下混合及化学交联反应，快速化学交联形成水凝胶，包括以下步骤：(1) 含有生物相容高分子巯基化衍生物溶液(组份 A)和生物相容巯基反应活性交联剂(组份 B)相互混合形成具有特定交联条件的反应活性混合物；(2) 反应活性混合物形成水凝胶。本发明还公开了一种新颖的快速凝胶化水凝胶喷雾剂的制备方法及其在医学领域的应用。本发明具有生物相容性好、不产生副产物、稳定性能好、使用方便、原料用量少、适合于多种不同医学用途等许多优点。



1. 一种生物相容快速凝胶化水凝胶的制备方法，其特征在于，包括以下步骤：

(1) 组份 A 和组份 B 相互混合形成具有特定交联条件的反应活性混合物，组份 A 是含有生物相容高分子巯基化衍生物的溶液，组份 B 是生物相容巯基反应活性交联剂，组份 B 为固体或溶液，其中生物相容高分子巯基化衍生物由生物相容高分子通过巯基化改性制备，组份 A 的浓度小于 8% w/v，组份 A 的 pH 值小于 8.5，组份 A 中的巯基和组份 B 中巯基反应活性官能团产生化学交联反应，所述的反应活性混合物中生物相容高分子巯基化衍生物和生物相容巯基反应活性交联剂的浓度相加小于 6% w/v，所述的特定交联条件是指反应活性混合物溶液的 pH 值大于 7.0 或 pH 值 ≤ 7.0 ，当反应活性混合物的 pH 值大于 7.0 时，组份 B 的 pH 值大于组份 A 的 pH 值；

(2) 反应活性混合物形成水凝胶。

2. 按照权利要求 1 所述的生物相容快速凝胶化水凝胶的制备方法，其特征在于，所述的生物相容高分子巯基化衍生物至少含有三个巯基、分子量为 1,000~10,000,000。

3. 按照权利要求 1 所述的生物相容快速凝胶化水凝胶的制备方法，其特征在于，所述的生物相容高分子包括多糖以及它们的盐形式和化学改性形式、蛋白以及它们的化学改性形式、合成高分子以及它们的盐形式和化学改性形式。

4. 按照权利要求 3 所述的生物相容快速凝胶化水凝胶的制备方法，其特征在于，所述的多糖以及它们的盐形式和化学改性形式包括硫酸软骨素、肝素、类肝素、海藻酸、透明质酸、皮肤素、硫酸皮肤素、果胶、羧甲基纤维素、壳聚糖以及它们的钠盐、钾盐和羧甲基化改性、疏水化改性形式；所述的蛋白以及它们的化学改性形式包括碱性明胶蛋白、酸性明胶蛋白、碱性基因重组明胶蛋白、酸性基因重组明胶蛋白以及它们的氨基的羧酸化改性、疏水化改性形式；所述的合成高分子以及它们的盐形式和化学改性形式包括聚丙烯酸、聚天冬氨酸、聚酒石酸、聚谷氨酸、聚富马酸以及它们的钠盐、钾盐和羧甲基化改性、疏水化改性形式。

5. 按照权利要求 1 所述的生物相容快速凝胶化水凝胶的制备方法，其特征在于，所述的巯基化改性包括下述化学反应过程：生物相容高分子的侧链羧基在碳化二亚胺的活化下，和含有双硫键的二氨或二酰肼反应生成中间产物，然后把双硫键还原为巯基得到生物相容高分子巯基化衍生物。

6. 按照权利要求 5 所述的生物相容快速凝胶化水凝胶的制备方法，其特征在于，

所述的生物相容高分子包括透明质酸、羧甲基透明质酸、硫酸软骨素、碱性和酸性明胶蛋白、碱性和酸性基因重组明胶蛋白、聚天冬氨酸、聚谷氨酸，所述的碳化二亚胺是指1-乙基-3-(3-二甲胺丙基)碳二亚胺盐酸盐，所述的含有双硫键的二氨或二酰肼包括胱胺、胱氨酸二甲酯、胱氨酸二乙酯、二硫代二苯胺、二硫代二丙二酰肼、二硫代二丁二酰肼、二硫代二丙酸双酰甘氨酸二酰肼、二硫代二丙酸双酰丙氨酸二酰肼、二硫代二丙酸双酰(羟基)氨基乙酸二酰肼、二硫代二丙酸双酰氨基丙氨酸二酰肼、二硫代二丙酸双酰氨基丁氨酸二酰肼、二硫代二丁酸双酰甘氨酸二酰肼、二硫代二丁酸双酰氨基丙氨酸二酰肼、双丙二酸双酰胱胺二酰肼、双琥珀酸双酰胱胺二酰肼、双(甲基)丁二酸双酰胱胺二酰肼、双戊二酸双酰胱胺二酰肼、双己二酸双酰胱胺二酰肼、双庚二酸双酰胱胺二酰肼。

7. 按照权利要求1所述的生物相容快速凝胶化水凝胶的制备方法，其特征在于，所述的巯基化改性包括所述的生物相容高分子的侧链氨基直接通过化学反应改性为巯基。

8. 按照权利要求1所述的生物相容快速凝胶化水凝胶的制备方法，其特征在于，所述的组份A的浓度为0.5~5.0% w/v，pH值在2.5~7.0。

9. 按照权利要求8所述的生物相容快速凝胶化水凝胶的制备方法，其特征在于，所述的组份A的浓度为0.8~3.0% w/v，pH值在3.5~6.0。

10. 按照权利要求1所述的生物相容快速凝胶化水凝胶的制备方法，其特征在于，所述的生物相容巯基反应活性交联剂至少含有两个相同或不相同巯基反应活性官能团的双臂、三臂或更多臂的聚乙二醇衍生物，其中聚乙二醇衍生物的分子量为100到1,000,000，所述巯基反应活性官能团是指马来酰亚胺、乙烯砜、 α ， β 不饱和丙烯酸酯、 α ， β 不饱和甲基丙烯酸酯、 α ， β 不饱和丙烯酰胺、 α ， β 不饱和甲基丙烯酰胺、碘代丙酸酯、溴代丙酸酯、氯代丙酸酯、碘代丙酰胺、溴代丙酰胺、氯代丙酰胺。

11. 按照权利要求1所述的生物相容快速凝胶化水凝胶的制备方法，其特征在于，所述的组份A和组份B含有不同浓度的pH值缓冲物质或其它极性和亲水性物质。

12. 按照权利要求1所述的生物相容快速凝胶化水凝胶的制备方法，其特征在于，当反应活性混合物的pH值大于7.0时，组份B的浓度为0.5~8.0% w/v，pH值在8.0~12.0。

13. 按照权利要求12所述的生物相容快速凝胶化水凝胶的制备方法，其特征在

于, 组份 B 的浓度为 0.8~4.0% w/v, pH 值在 8.5~10.5。

14. 按照权利要求 1 所述的生物相容快速凝胶化水凝胶的制备方法, 其特征在于, 所述的化学交联反应是指巯基和巯基反应活性官能团之间的亲核加成反应和亲核取代反应。

15. 按照权利要求 1 所述的生物相容快速凝胶化水凝胶的制备方法, 其特征在于, 当反应活性混合物的 pH 值大于 7.0 时, 组分 B 是含有生物相容巯基反应活性交联剂的溶液。

16. 按照权利要求 15 所述的生物相容快速凝胶化水凝胶的制备方法, 其特征在于, 当反应活性混合物的 pH 值大于 7.0, 组分 A 的 pH 值大于 7.0 且小于 8.5 时, 组分 B 是含有生物相容巯基反应活性交联剂的溶液, pH 值 ≥ 8.5 。

17. 按照权利要求 15 所述的生物相容快速凝胶化水凝胶的制备方法, 其特征在于, 当反应活性混合物的 pH 值大于 7.0, 组分 A 的 pH 值 ≤ 7.0 时, 组分 B 是含有生物相容巯基反应活性交联剂的溶液, 组份 B 的 pH 值大于组份 A 的 pH 值。

18. 按照权利要求 17 所述的生物相容快速凝胶化水凝胶的制备方法, 其特征在于, 当反应活性混合物的 pH 值大于 7.0, 组分 A 的 pH 值 ≤ 7.0 时, 组分 B 是含有生物相容巯基反应活性交联剂的溶液, 组份 B 的 pH 值 ≥ 8.5 。

19. 按照权利要求 15 所述的生物相容快速凝胶化水凝胶的制备方法, 其特征在于, 所述的反应活性混合物的 pH 值在 8.0~12.0, 组分 B 是含有生物相容巯基反应活性交联剂的溶液, pH 值在 8.5~12.0。

20. 按照权利要求 19 所述的生物相容快速凝胶化水凝胶的制备方法, 其特征在于, 所述的反应活性混合物的 pH 值在 8.5~10.5。

21. 按照权利要求 1 所述的生物相容快速凝胶化水凝胶的制备方法, 其特征在于, 当所述的反应活性混合物的 pH 值大于 7.0 时, 所述的反应活性混合物的 pH 值由所述的组份 A 和组份 B 混合时所产生的或者混合前在组份 A、组份 B 中或混合后在反应活性混合物中或混合时加入酸碱调节产生。

22. 按照权利要求 1 所述的生物相容快速凝胶化水凝胶的制备方法, 其特征在于, 所述的反应活性混合物形成水凝胶是指在 1 分钟内形成水凝胶。

23. 按照权利要求 1 所述的生物相容快速凝胶化水凝胶的制备方法, 其特征在于, 当反应活性混合物的 pH 值 ≤ 7.0 , 组分 B 是生物相容交联剂溶液或固体, 此时, 在步

骤(1)和步骤(2)中增加一步:在反应活性混合物中加入碱或碱性缓冲溶液,调节溶液pH值为特定碱性范围。

24. 按照权利要求23所述的生物相容快速凝胶化水凝胶的制备方法,其特征在于,所述的反应活性混合物溶液的pH值在2.5~6.0之间。

25. 按照权利要求24所述的生物相容快速凝胶化水凝胶的制备方法,其特征在于,所述的反应活性混合物溶液的pH值在3.5~5.0之间。

26. 按照权利要求23所述的生物相容快速凝胶化水凝胶的制备方法,其特征在于,所述的特定碱性范围是pH值在8.0~12.0之间。

27. 按照权利要求26所述的生物相容快速凝胶化水凝胶的制备方法,其特征在于,所述的特定碱性范围是pH值在8.5~10.5之间。

28. 按照权利要求23所述的生物相容快速凝胶化水凝胶的制备方法,其特征在于,所述的碱或碱性缓冲溶液包括氢氧化钠溶液、氢氧化钾溶液、碳酸钠溶液、磷酸钠溶液及其碱性缓冲溶液。

29. 一种生物相容快速凝胶化水凝胶喷雾剂的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:将权利要求15所述的组份A和组份B分别装入多组份混合反应喷雾装置的针筒A和针筒B,然后通过一个四通装置挤出,在1~10大气压的空气或其它气体作用下雾化混合,喷涂在物体表面后即形成凝胶;或者包括如下步骤:将权利要求23所述的组份A和组份B混合形成的稳定的反应活性混合物装入多组份混合反应喷雾装置的一个针筒,碱或碱性缓冲溶液装入第二个针筒,然后两者通过一个四通装置挤出,在1~10个大气压的空气或其它气体作用下雾化混合,喷涂在物体表面后即形成凝胶。

生物相容快速凝胶化水凝胶及其喷雾剂的制备方法

技术领域

本发明涉及水凝胶的制备方法，尤其涉及生物相容快速凝胶化水凝胶的制备方法。本发明还涉及生物相容快速凝胶化水凝胶喷雾剂的制备方法。

背景技术

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

在很多的生物医药应用中，要求水凝胶在使用时是液体，但在到达指定部位后快速形成凝胶，失去流动性。这种快速凝胶化水凝胶具有极大的优点：适合于任何复杂形状的三维伤口；可以很好地粘附于伤口；可以通过内窥镜方式使用，避免了开放式手术等等。到目前为止，研究人员考察了多种方式来实现水凝胶的快速凝胶化。例如，水溶性聚乙二醇的不饱和衍生物通过光引发交联制备凝胶；特定组成的聚乙二醇和聚丙二醇的三嵌段共聚物（Pluronic poloxamer）的溶液具有温度变化引发的凝胶化行为（Leach等，*Am J Obstet Gynecol* 162,1317,1990）；氰丙烯酸盐可聚合交联形成凝胶，用于组织胶粘；明胶的戊二醛交联材料等等。一般说来，上述的这些水凝胶存在各种各样的缺陷，如较差的生物相容性，较差的生物降解性能等等。快速凝胶化通常需要高度活性的交联剂，而这些化合物通常具有较大的毒副作用。

巯基是在生物体内天然存在的具有良好生物相容性的官能团。它具有很好的反应活性，在相同的条件下其反应活性通常比氨基高好几个数量级。因此，为了提供实现快速

凝胶化所必需的快速化学交联时,相对惰性的氨基交联需要高度活性的交联剂(如醛类等),但这类交联剂有较大的毒性,会引起组织发炎等副作用;而巯基的交联则可以选择活性较低的生物相容交联剂,所制备的水凝胶具有更好的生物相容性。Wallace等把多臂(四臂或十二臂)聚乙二醇巯基衍生物(分子量10,000)溶解于0.3摩尔/升的磷酸钠/碳酸钠缓冲液(pH 9.6),多臂(四臂或十二臂)聚乙二醇丁二酰亚胺活化衍生物(分子量10,000)溶解于0.0005摩尔/升的磷酸钠缓冲液(pH 6.0),通过混合上述两种溶液制备了水凝胶,其生物相容性比采用相应的聚乙二醇氨基衍生物制备的水凝胶有了较大的提高(Wallace等, US6,624,245)。

虽然Wallace等公开的方法是制备快速凝胶化水凝胶的较好方法,但仍存在多种缺陷(Wallace等, US6,624,245)。其一是多臂聚乙二醇巯基衍生物和多臂聚乙二醇丁二酰亚胺活化衍生物的化学交联反应产生了N-羟基-丁二酰亚胺副产物,具有一定的毒副作用。其二是Wallace等采用的多臂聚乙二醇丁二酰亚胺活化衍生物溶液和多臂聚乙二醇巯基衍生物溶液都很不稳定,两者都需要新鲜配置,且前者溶液需要在一小时内使用完,后者接触空气后容易失去活性,使用很不方便。其三是多臂聚乙二醇巯基衍生物和多臂聚乙二醇丁二酰亚胺活化衍生物都很昂贵,只有这两种化合物的浓度分别高达10% w/v 以上(通常为20% w/v)时才能实现快速凝胶化,成本很高。

发明内容

本发明要解决的技术问题之一是提供一种新颖的生物相容快速凝胶化水凝胶的制备方法。

本发明要解决的技术问题之二是提供一种新颖的生物相容快速凝胶化水凝胶喷雾剂的制备方法。

在本发明中所使用的部分术语定义如下所述。

生物相容高分子巯基化衍生物是指生物相容高分子通过巯基化改性而得到的产物。所述的生物相容高分子巯基化衍生物至少含有三个巯基、分子量为1,000~10,000,000。

生物相容高分子是指多糖(硫酸软骨素、肝素、类肝素、海藻酸、透明质酸、皮肤素、硫酸皮肤素、果胶、羧甲基纤维素、壳聚糖)以及它们的盐形式(如钠盐,钾盐等)和化学改性形式(如羧甲基化改性、疏水化改性等)、蛋白(碱性明胶蛋白、酸性明胶蛋白、碱性基因重组明胶蛋白、酸性基因重组明胶蛋白)以及它们的化学改

性形式（如氨基的羧酸化改性、疏水化改性等）和合成高分子（聚丙烯酸、聚天冬氨酸、聚酒石酸、聚谷氨酸、聚富马酸等）以及它们的盐形式（如钠盐，钾盐等）和化学改性形式（如羧甲基化改性、疏水化改性等）。上述硫酸软骨素包括A型、B型、C型等各种形式。上述生物相容高分子不包括聚乙二醇及其衍生物以及含有半胱氨酸的低聚肽等（Lutolf等，Biomacromolecules, 4, 713, 2003）。

巯基化改性是指引入自由巯基的化学反应过程，通常包括下述化学反应过程：生物相容高分子的侧链羧基在碳化二亚胺的活化下，和含有双硫键的二巯或二酰肼反应生成中间产物，然后把双硫键还原为巯基得到生物相容高分子巯基化衍生物；或者包括所述的生物相容高分子的侧链氨基直接通过化学反应改性为巯基。

化学交联反应是指巯基和巯基反应活性官能团之间的亲核加成反应和亲核取代反应。

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

亚烷基是指 $-(CH_2)_n-$ （ n 是1~15的整数）。优选 n 是1~8的整数。

取代亚烷基是指至少一个氢原子被烷基、羟基、氨基、烷氧基、苯基、酯基等基团取代的亚烷基。

芳香基是指芳香族的苯基、萘基等。优选苯基。

聚醚基是指 $-[(CHR)_nO]_m-$ ，其中 R 是烷基， n 是1~10的整数， m 是1~500的整数。优选 R 为氢原子， n 分别等于2、3和4。

烷基是指具有1~15个碳原子的直链或支链的烷基。例如：甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、叔丁基、仲丁基、戊基、新戊基、己基、庚基、辛基等等。优选具有1~10个碳原子的直链或支链的烷基，特别优选甲基、乙基、丙基、丁基、戊基、己基、庚基、辛基。

烷氧基是指具有1~6个碳原子的直链或支链的烷氧基。例如：甲氧基、乙氧基、丙氧基、异丙氧基、丁氧基、异丁氧基、叔丁氧基、仲丁氧基、戊氧基、新戊氧基、己氧基等。优选具有1~4个碳原子的支链或直链的烷氧基，特别优选甲氧基和乙氧基。

酯基是指 $-C(O)OR$ ，其中 R 是上述低级烷基。优选甲酯基、乙酯基、丙酯基和丁酯基。

羧基是指羧酸基团 (-COOH) 和羧酸基团被碱中和后的羧基盐 (-COO⁻A⁺), 其中 A⁺ 包括钠离子、钾离子、锂离子和铵根离子等等。优选羧基、羧酸钠盐或羧酸甲盐。

含有一个酰氨键的连接基团是指 $\text{—R}'\text{—NH—}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C—R}''\text{—}$ 或 $\text{—R}'\text{—}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C—NH—R}''\text{—}$, 其中 R' 和 R'' 是上述亚烷基、取代亚烷基、芳香基或聚醚基;

聚酰胺基是指由二酸和二氨生成的基团。

本发明的生物相容快速凝胶化水凝胶制备方法的一种实现途径包括以下步骤:

(1) 组份 A 和组份 B 相互混合形成具有特定交联条件的反应活性混合物, 组份 A 是含有生物相容高分子巯基化衍生物的溶液, 组份 B 是生物相容巯基反应活性交联剂, 其中生物相容高分子巯基化衍生物由生物相容高分子通过巯基化改性制备, 组份 A 的浓度小于 8% w/v, 组份 A 的 pH 值小于 8.5, 组份 B 的 pH 值大于组份 A 的 pH 值, 组份 A 中的巯基和组份 B 中巯基反应活性官能团产生化学交联反应, 所述的反应活性混合物中生物相容高分子巯基化衍生物和生物相容巯基反应活性交联剂的浓度相加小于 6% w/v, 所述的特定交联条件是指反应活性混合物的溶液 pH 值大于 7.0;

(2) 反应活性混合物形成水凝胶。

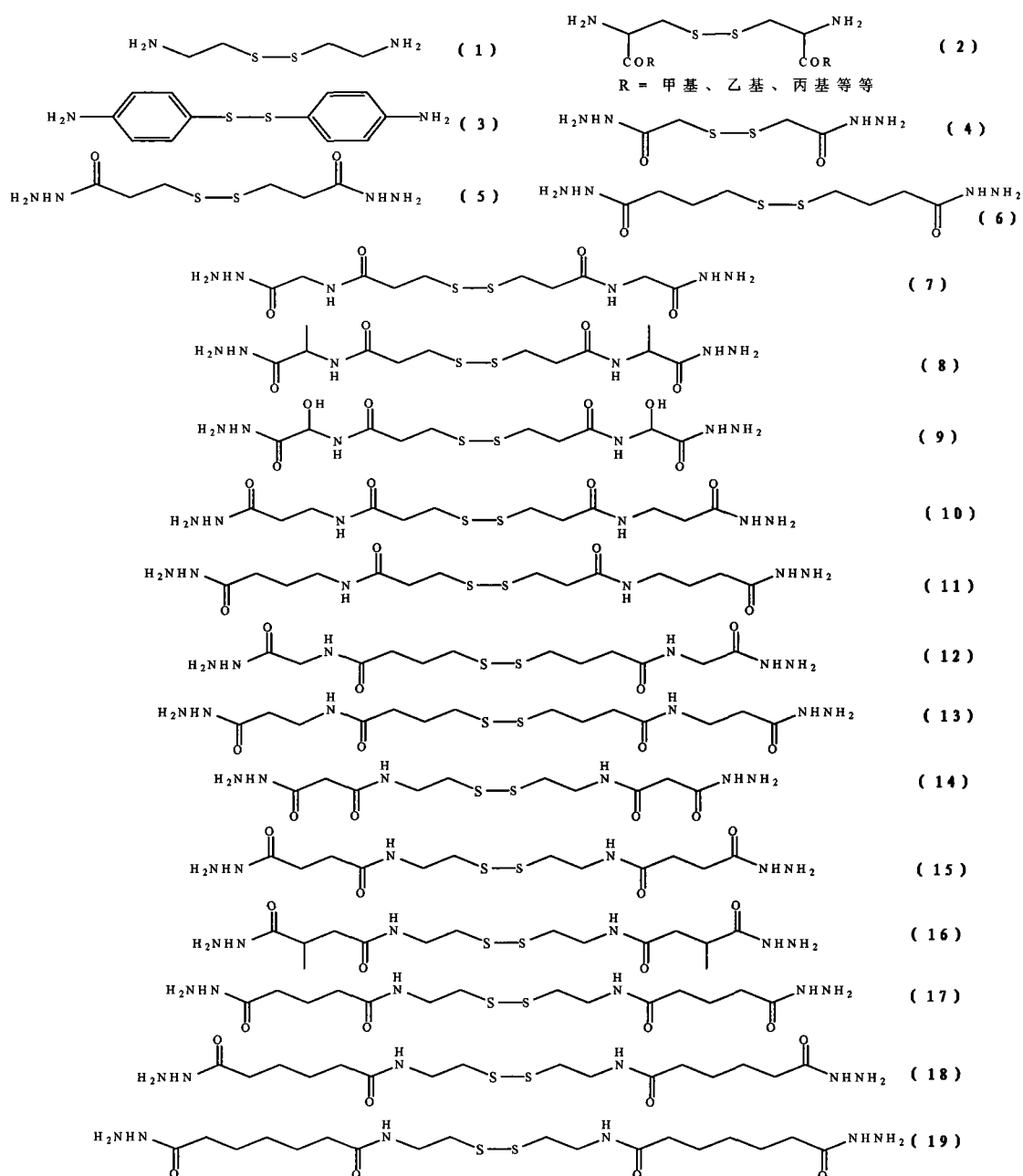
本发明的生物相容水凝胶的制备方法, 其基本化学原理是特定条件下巯基和生物相容巯基反应活性官能团之间的快速化学交联反应。在本发明中通常包括两个活性组份: 生物相容高分子巯基化衍生物溶液(组份 A)和生物相容巯基反应活性交联剂(组份 B)。组份 A 中至少含有三个巯基的生物相容高分子巯基化衍生物和组份 B 中至少含有两个巯基反应活性官能团的生物相容巯基反应活性交联剂在特定条件下相互混合化学交联, 即可实现本发明。本发明具有生物相容性好、不产生副产物、稳定性好、使用方便、成本低廉等许多优点。

在本发明中, 组分 A 是指含有生物相容高分子巯基化衍生物的溶液。上述溶液以水为主要溶剂, 也可含有一些盐成份(如氯化钠、pH 缓冲盐成份等), 起调节溶液渗透压和稳定溶液 pH 值等功能; 也可能含有其它一些极性、水溶性成份, 如乙醇等等。

在本发明中使用的生物相容高分子巯基化衍生物可通过生物相容高分子的巯基化改性来制备, 包括生物相容高分子侧链羧基、氨基等基团的直接巯基化改性。除此之外, 生物相容高分子的侧链氨基、羟基等基团还可以首先进行羧基化改性得到新的生物相容高分子, 然后再对羧基进行巯基化改性。生物相容高分子巯基化改性一般包

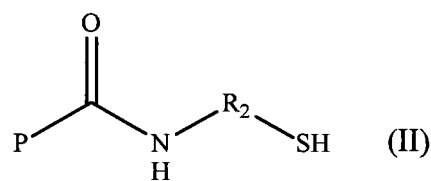
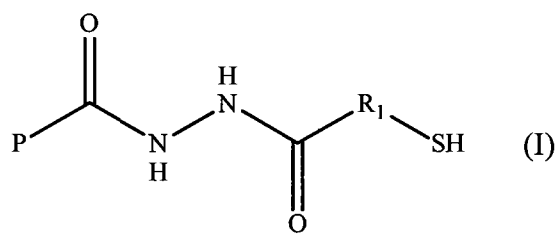
括以下几种常用方法。

方法一是侧链羧基的氨基(酰肼)/碳二亚胺偶合化学方法。其优选方式是羧基在碳化二亚胺的活化下形成中间产物,含有双硫键的二氨或二酰肼亲核取代生成中间产物,最后双硫键还原为巯基即可得到生物相容高分子巯基化衍生物(Shu等, *Biomacromolecules*, 3, 1304, 2002; Aeschlimann等, US 7,196,180 B1)。也可用巯基保护的伯氨代替含有双硫键的二氨或二酰肼,所得到的中间产物脱除巯基保护基团即可得到生物相容高分子巯基化衍生物(Gianolio等, *Bioconjugate Chemistry*, 16, 1512, 2005)。上述的碳化二亚胺通常是指1-乙基-3-(3-二甲胺丙基)碳二亚胺盐酸盐。可采用的部分含有双硫键的氨或酰肼参见如下结构:



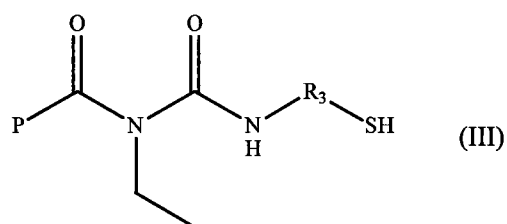
其中, (1) 是脘胺; (2) 是脘氨酸酯; (3) 是二硫代二苯氨; (4) 是二硫代二乙二酰肼; (5) 是二硫代二丙二酰肼; (6) 是二硫代二丁二酰肼; (7) 是二硫代二丙酸双酰甘氨酸二酰肼; (8) 是二硫代二丙酸双酰丙氨酸二酰肼; (9) 是二硫代二丙酸双酰(羟基)氨基乙酸二酰肼; (10) 是二硫代二丙酸双酰氨基丙酸二酰肼; (11) 是二硫代二丙酸双酰氨基丁酸二酰肼; (12) 是二硫代二丁酸双酰甘氨酸二酰肼; (13) 是二硫代二丁酸双酰氨基丙酸二酰肼; (14) 是双丙二酸双酰脘胺二酰肼; (15) 是双琥珀酸双酰脘胺二酰肼; (16) 是双(甲基)丁二酸双酰脘胺二酰肼; (17) 是双戊二酸双酰脘胺二酰肼; (18) 是双己二酸双酰脘胺二酰肼; (19) 是双庚二酸双酰脘胺二酰肼。

通过这种方式制备的高分子巯基化改性衍生物一般具有下述通式(I)或通式(II)的结构(Shu等, *Biomacromolecules*, 3, 1304, 2002; Prestwich等, WO 2004/03716; 宋等, 中国发明专利申请 200610119414.1)。



其中 R_1 和 R_2 包括亚烷基、取代亚烷基、芳香基、聚醚基、酰氨基、聚酰胺基等等。

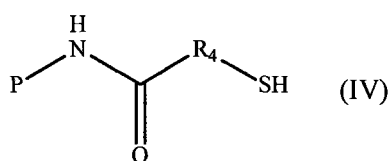
方法二是侧链羧基直接与含有双硫键的碳二亚胺(如 2,2'-二硫代双(N-乙基(N'-乙基碳二亚胺))等等)反应制备, 所制备的生物相容高分子巯基化改性衍生物具有下述通式(III)的结构(Bulpitt等, US 6884788)。



其中 R_3 包括亚烷基、取代亚烷基、芳香基等等。

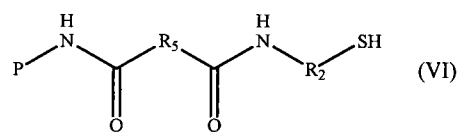
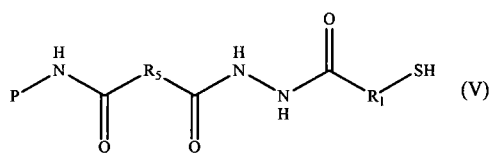
方法三是对侧链氨基的改性, 一般分为直接和间接改性两种方式。直接改性方式是指对侧链氨基的直接修饰, 引入巯基。例如双丁二酸双酰脘胺双羧二咪唑活化酯对胶原氨基的巯基化改性(Yamauchi等, *Biomaterials*, 22, 855, 2001; Nicolas等, *Biomaterials*, 18, 807, 1997)。直接改性方式制备的高分子巯基化衍生物通常具有如下通式(IV)

或与通式 (IV) 相类似的结构。



其中 R_4 包括亚烷基、取代亚烷基、芳香基、聚醚基、酰氨基、聚酰胺基等等。

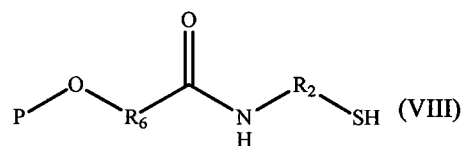
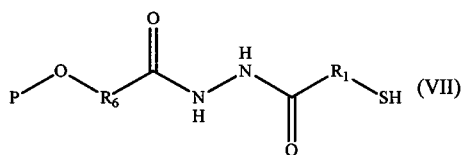
方法三中氨基的间接巯基化改性方式一般分为两个步骤。第一步是氨基的羧基化，第二步是羧基的巯基化改性。其中第二步羧基的巯基化改性与前述的方法一和方法二相同。所制备的生物相容高分子巯基化衍生物通常具有如下通式 (V) 或 (VI) 的结构。



其中 R_1 和 R_2 的定义同上述， R_5 包括亚烷基、取代亚烷基等基团。

对于同时具有侧链羧基和氨基的生物相容高分子，其巯基化衍生物可同时包括羧基巯基化改性结构 (通式 (I) 或 (II) 等) 和氨基的直接或间接巯基化改性结构 (通式 (III)、(IV)、(V) 或 (VI) 等) (宋等，中国发明专利申请 200710036276.5)。

方法四是侧链羟基的改性。通常的方法是羟基在强碱条件下的羧基化，然后羧基再按照前述方法一和方法二巯基化。例如，纤维素、透明质酸、甲壳素和壳聚糖等高分子的侧链羟基都可以羧甲基化，然后采用氨基 (酰肼) / 碳二亚胺碳化学反应进行巯基化改性，所制备的生物相容高分子巯基化衍生物通常具有如下通式 (VII) 或 (VIII) 的结构。



其中 R_1 和 R_2 的定义同上述， R_6 包括亚烷基、取代亚烷基等等基团。

对于同时具有羧基和羟基的生物相容高分子，其巯基化衍生物可同时包括羧基巯基化改性结构 (通式 (I) 或 (II) 等) 和羟基的巯基化改性结构 (通式 (VII) 或 (VIII) 等)。

在上述通式 (I) - (VIII) 中，P 是指生物相容高分子残基，其中至少两个生物相容高分子化合物的侧链羧基、氨基或羟基被直接或间接改性为巯基，分子量一般为 1,000~10,000,000。生物相容高分子的定义同前述。

上述通式(I) - (VIII)中, R_1 的优选结构是亚烷基 $-(CH_2)_m-$ 、酰氨基 $-(CH_2)_i \overset{O}{\parallel} N(CH_2)_j-$ 和 $-(CH_2)_i \overset{O}{\parallel} NHC(CH_2)_j-$, 其中 m 、 i 和 j 都是 1~15 的整数。当 m 是 1~3 的整数, i 是 1~5 的整数, j 是 2 和 3 时, 即是 R_1 的特别优选结构。

上述通式(I) - (VIII)中, R_2 的优选结构是芳香基、亚烷基 $-(CH_2)_m-$ 和取代亚烷基 $-\overset{O}{\parallel} CH(CR)CH_2-$, 其中 m 是 1~15 的整数, R 是甲基、乙基、丙基和丁基。 R_2 的特别优选结构是碳数为 2 的亚烷基、 R 是甲基和乙基的上述取代亚烷基。

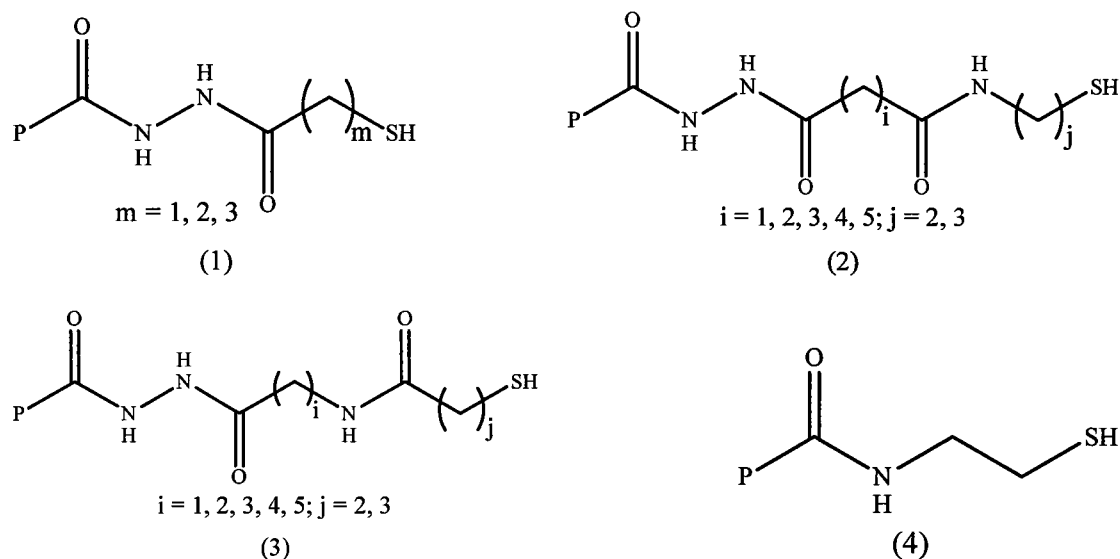
上述通式(I) - (VIII)中, R_3 的优选结构是芳香基和亚烷基 $-(CH_2)_m-$, 其中 m 是 1~15 的整数。 R_3 的特别优选结构是碳数为 2 的亚烷基。

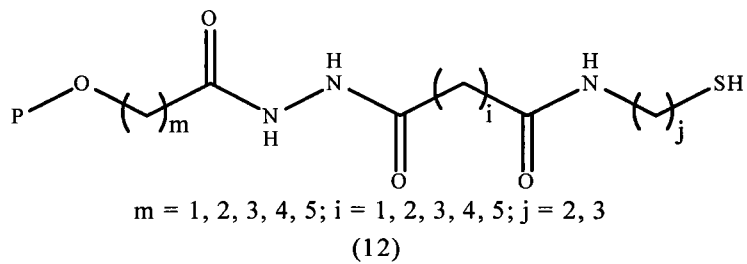
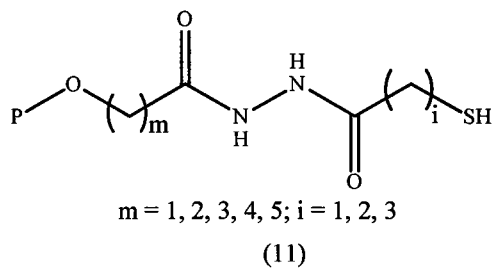
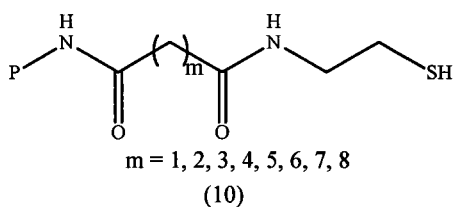
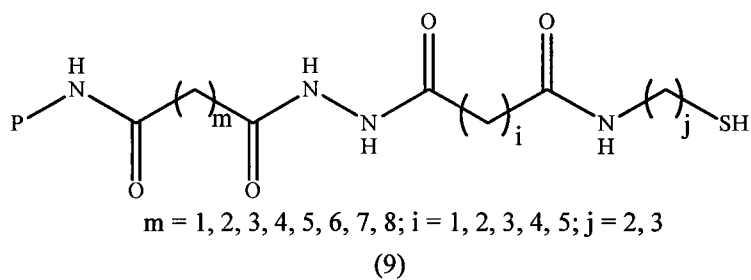
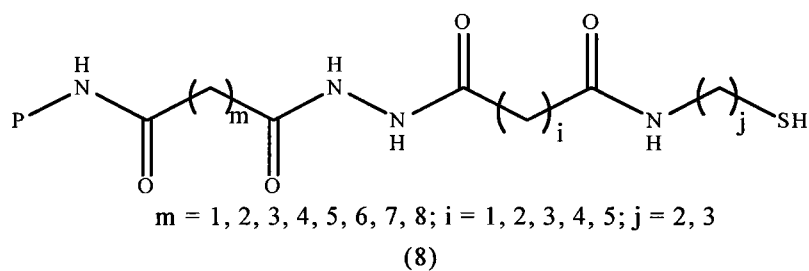
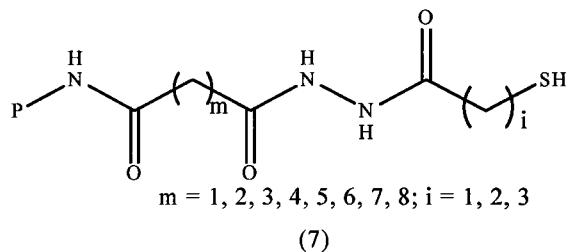
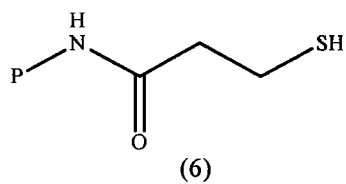
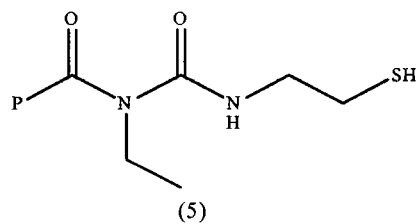
上述通式(I) - (VIII)中, R_4 的优选结构是亚烷基 $-(CH_2)_m-$ 、酰氨基 $-(CH_2)_i \overset{O}{\parallel} N(CH_2)_j-$ 和 $-(CH_2)_i \overset{O}{\parallel} NHC(CH_2)_j-$, 其中 m 、 i 和 j 都是 1~15 的整数。当 m 是 1~3 的整数, i 是 1~5 的整数, j 是 2 和 3 时, 即是 R_1 的特别优选结构。

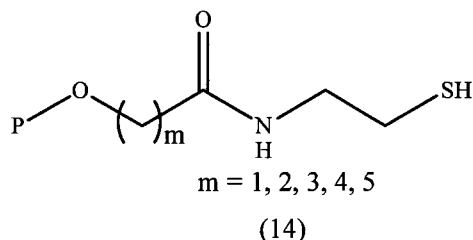
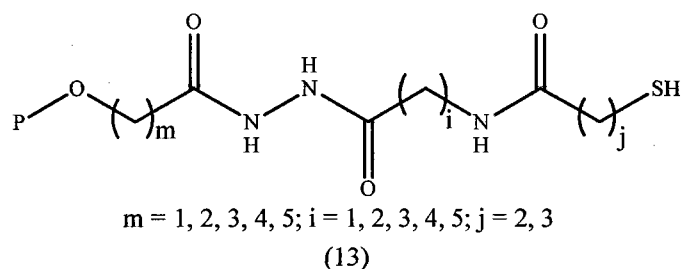
上述通式(I) - (VIII)中, R_5 的优选结构是亚烷基 $-(CH_2)_m-$, 其中 m 是 1~15 的整数。当 m 是 1~8 的整数时, 即是 R_5 的特别优选结构。

上述通式(I) - (VIII)中, R_6 的优选结构是亚烷基 $-(CH_2)_m-$, 其中 m 是 1~15 的整数。当 m 是 1~5 的整数时, 即是 R_5 的特别优选结构。

本发明所采用的生物相容高分子巯基化衍生物的部分特别优选化学结构如下所示:







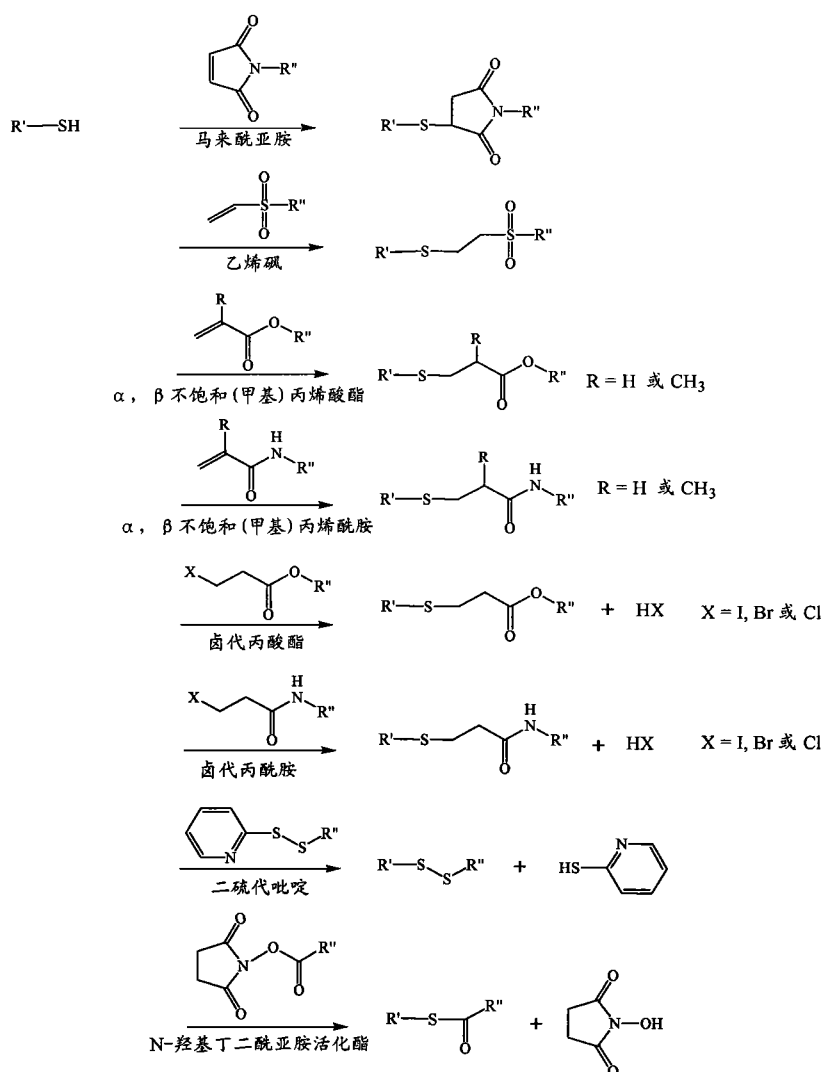
其中结构式(1)、(2)和(3)属于通式(I)的特别优选生物相容高分子巯基化衍生物;其中结构式(4)属于通式(II)的特别优选生物相容高分子巯基化衍生物;其中结构式(5)属于通式(III)的特别优选生物相容高分子巯基化衍生物;其中结构式(6)属于通式(IV)的特别优选生物相容高分子巯基化衍生物;其中结构式(7)、(8)和(9)属于通式(V)的特别优选生物相容高分子巯基化衍生物;其中结构式(10)属于通式(VI)的特别优选生物相容高分子巯基化衍生物;其中结构式(11)、(12)和(13)属于通式(VII)的特别优选生物相容高分子巯基化衍生物;其中结构式(14)属于通式(VIII)的特别优选生物相容高分子巯基化衍生物。

对于由同时具有羧基、氨基和羟基生物相容高分子制备的生物相容高分子巯基化衍生物,其特别优选结构可具有如上结构式(1)~(14)中的一种或一种以上结构。例如,透明质酸同时具有羧基和羟基,羟基可以羧甲基化引入羧基,然后采用氨基(酰肼)/碳化二亚胺化学进行巯基化改性,所制备的透明质酸巯基化衍生物同时具有结构式(1)、(2)或(3),以及结构式(11)、(12)或(13)的结构(Prestwich等,PCT Int. Appl. WO 2005/056608)。明胶同时具有羧基和氨基,羧基可以和二酸酐反应引入羧基,然后采用酰肼/碳化二亚胺化学进行巯基化改性,所制备的明胶巯基化衍生物同时具有结构式(1)、(2)或(3),以及结构式(7)、(8)或(9)的结构(宋等,中国专利申请200710036276.5)。

本发明所使用的组份B是生物相容巯基反应活性交联剂,至少含有两个巯基反应活性官能团。通常巯基反应活性官能团包括马来酰亚胺、乙烯砜、 α , β 不饱和丙烯酸酯、 α , β 不饱和甲基丙烯酸酯、卤代丙酸酯、卤代丙酰胺、二硫代吡啶、N-羟基丁二酰亚胺活化酯等等。其中马来酰亚胺、乙烯砜、碘代丙酸酯、碘代丙酰胺、二硫

代吡啶等官能团具有较高的巯基反应活性。上述官能团与巯基的反应可以分为三类：

(1) 巯基和活化不饱和双键的加成反应，属于这类反应的官能团包括马来酰亚胺、乙烯砜、 α ， β 不饱和丙烯酸酯、 α ， β 不饱和甲基丙烯酸酯等；(2) 巯基的取代反应，属于这类反应的官能团包括碘代丙酸酯、溴代丙酸酯、氯代丙酸酯、碘代丙酰胺、溴代丙酰胺、氯代丙酰胺、二硫代吡啶等；(3) 硫酯化反应，这类反应的官能团包括各种羧酸的活化酯，如 N-羟基丁二酰亚胺活化酯等等。巯基和上述巯基反应活性官能团的反应方程式如下所示：



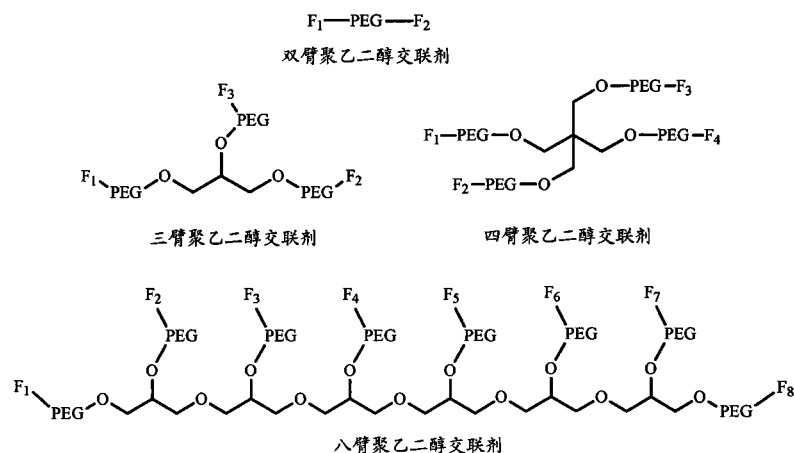
在上述巯基反应活性官能团中，N-羟基丁二酰亚胺活化酯的反应活性较强，与氨基和巯基都可以反应，不具有选择性，因而具有相当的毒副作用。同时N-羟基丁二酰亚胺活化酯与巯基反应时，还生成了副产物N-羟基丁二酰亚胺，从而可能产生毒副作用。此外，N-羟基丁二酰亚胺活化酯与巯基反应所形成的硫酯键不稳定，容易水解，在医药领域的应用受到了很多限制。虽然Wallace等(US6,624,245)采用聚乙二醇丁二酰亚胺活

化酯衍生物交联聚乙二醇巯基衍生物，但由于存在上述重大缺陷，本发明不采用N-羟基丁二酰亚胺活化酯作为巯基反应活性官能团。二硫代吡啶与巯基反应也生成了副产物，也可能产生毒副作用，因此在本发明中也不予采用。

本发明采用的巯基反应活性官能团包括马来酰亚胺、乙烯砜、 α , β 不饱和丙烯酸酯、 α , β 不饱和甲基丙烯酸酯、 α , β 不饱和丙烯酰胺、 α , β 不饱和甲基丙烯酰胺、碘代丙酸酯、溴代丙酸酯、氯代丙酸酯、碘代丙酰胺、溴代丙酰胺、氯代丙酰胺等。碘代丙酸酯、溴代丙酸酯、氯代丙酸酯、碘代丙酰胺、溴代丙酰胺、氯代丙酰胺等官能团与巯基反应时，虽然也产生了副产物，但这些副产物为卤代酸，在生理条件下形成氯离子、溴离子或碘离子，因而也具有较好的生物相容性。其中卤代丙酸酯具有比相应卤代丙酰胺更好的巯基反应活性，但稳定性稍差；碘代丙酸酯（或丙酰胺）具有比相应的溴代官能团更好的巯基反应活性，但稳定性稍差；氯代丙酸酯（或丙酰胺）的巯基反应活性最低，但稳定性较好。

本发明的优选巯基反应官能团是马来酰亚胺、乙烯砜、 α , β 不饱和丙烯酸酯、 α , β 不饱和甲基丙烯酸酯、 α , β 不饱和丙烯酰胺、 α , β 不饱和甲基丙烯酰胺等。这些官能团不仅具有较好的生物相容性，而且与巯基反应时不产生副产物。本发明的特别优选巯基反应官能团是乙烯砜、 α , β 不饱和丙烯酸酯、 α , β 不饱和甲基丙烯酸酯、 α , β 不饱和丙烯酰胺、 α , β 不饱和甲基丙烯酰胺等，它们不仅具有良好的生物相容性，而且稳定性能比N-羟基丁二酰亚胺活化酯有了很大的提高。

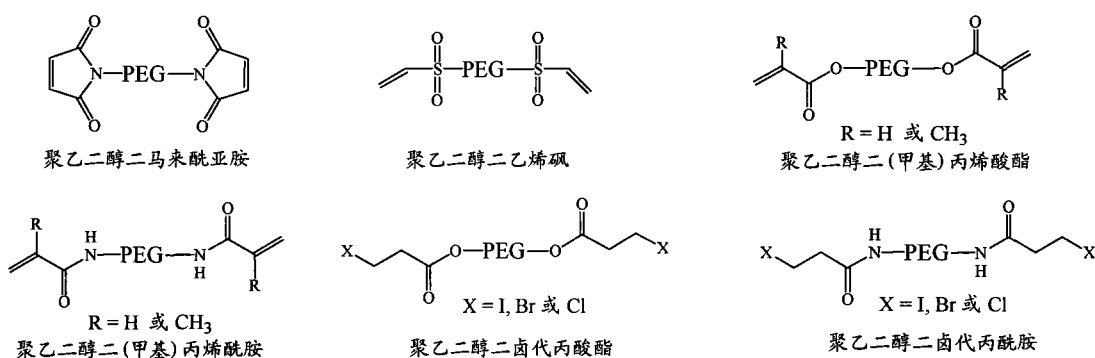
本发明采用含有一个以上巯基反应活性官能团的组份 B 通常是至少含有两个前述巯基反应活性官能团的聚乙二醇（简称 PEG）的衍生物，如双臂、三臂、四臂、八臂或更多臂的聚乙二醇衍生物，它们具有如下典型的化学结构：



其中 F₁、F₂、F₃、F₄、F₅、F₆、F₇ 和 F₈ 为前述巯基反应活性官能团如马来酰亚胺、

乙烯砜、 α , β 不饱和丙烯酸酯、 α , β 不饱和甲基丙烯酸酯、 α , β 不饱和丙烯酰胺、 α , β 不饱和甲基丙烯酰胺、碘代丙酸酯、溴代丙酸酯、氯代丙酸酯、碘代丙酰胺、溴代丙酰胺、氯代丙酰胺等, 它们可以具有全部相同、部分相同或全部不相同的化学结构; PEG 是指分子量为 100 到 1,000,000 的具有 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ 重复单元的链段。F₁、F₂、F₃、F₄、F₅、F₆、F₇ 和 F₈ 优选马来酰亚胺、乙烯砜、 α , β 不饱和丙烯酸酯、 α , β 不饱和甲基丙烯酸酯、 α , β 不饱和丙烯酰胺、 α , β 不饱和甲基丙烯酰胺等官能团; 特别优选乙烯砜、 α , β 不饱和丙烯酸酯、 α , β 不饱和甲基丙烯酸酯、 α , β 不饱和丙烯酰胺、 α , β 不饱和甲基丙烯酰胺等官能团。

以双臂的聚乙二醇为例, 本发明采用的常见交联剂包括聚乙二醇二马来酰亚胺、聚乙二醇二乙烯砜、聚乙二醇二(甲基)丙烯酸酯、聚乙二醇二(甲基)丙烯酰胺、聚乙二醇二卤代丙酸酯、聚乙二醇二卤代丙酰胺等。化学结构式如下所示:



上述本发明生物相容快速凝胶化水凝胶制备方法的一种实现途径的第一步是制备具有特定交联条件的反应活性混合物溶液。此处的特定交联条件的关键是通过调节组份 A 和组份 B 的性质使反应活性混合物溶液的 pH 值为弱碱性或碱性。反应混合物的溶液 pH 值优选 8.0~12.0, 特别优选 8.5~10.5。

如前所述, 在本发明中所选择的组份 A 和组份 B 都具有良好的生物相容性, 同时巯基和巯基反应活性官能团之间的化学交联反应也具有良好的生物相容性, 这就为本发明的良好生物相容性提供了坚实的基础。此外为了实现快速凝胶化, 还需要优化其它一些重要参数, 如组份 A 和 B 的浓度、溶液 pH 值、温度等等。

在本发明中, 所采用的温度通常是 0~50 摄氏度。提高化学交联反应温度, 可以加快凝胶化的速度。在实际使用过程中, 优选的温度通常在 10~40 摄氏度之间。本发明最常用的温度是室温, 通常在 25 摄氏度左右。

在 Wallace 等公开的快速凝胶化凝胶制备方法中, 为了实现快速凝胶化, 所使用的多

臂聚乙二醇巯基衍生物溶液的pH值必须为较强碱性(通常pH值为9.6),浓度必须为10% w/v以上(Wallace等, US6,624,245)。然而巯基在碱性尤其是较强碱性条件下不稳定,很容易形成双硫键后失去反应活性。因此多臂聚乙二醇巯基衍生物需要新鲜配置且接触空气后容易失去活性,使用很不方便。在本发明中,为了使用方便,组份A溶液不需临时配置,通常生物相容高分子巯基化衍生物先配置成组份A溶液,除菌后低温冷冻保存,使用前解冻即可。与Wallace等(Wallace等, US6,624,245)所采用的多臂聚乙二醇巯基衍生物不同(分子量10,000,最多12个巯基/10,000分子量链段),在本发明中所采用生物相容高分子巯基化衍生物通常具有较高的分子量(通常在10,000~1,000,000之间)和更多的巯基含量(可多达100个以上巯基/10,000分子量链段)(Shu等, *Biomacromolecules*, 3, 1304, 2002)。因此本发明中的组份A在较强碱性条件下非常不稳定,不能采用Wallace等公开的方法来实现快速凝胶化(Wallace等, US6,624,245)。

为了克服巯基化衍生物在较强碱性条件下不稳定的缺陷,本发明中采用的组份A的溶液pH值通常在8.5以下,优选pH值 ≤ 7.0 ,此时溶液具有一定的稳定性。更优选的pH值范围为2.5~7.0,此时溶液具有良好的稳定性,在零下30摄氏度可保存一年以上,溶液室温与空气接触可以保存2小时以上,室温不与空气接触可以保存5小时以上。特别优选的pH值范围在3.5~6.0,此条件下巯基很稳定,同时又基本避免了酸对生物相容高分子巯基衍生物的水解作用。在此特别优选的条件下,本发明采用的组份A的稳定性比Wallace等(Wallace等, US6,624,245)采用的易失活的多臂聚乙二醇巯基衍生物溶液有了本质的提高,在零下30摄氏度以下可保存两年以上,室温即使与空气接触可以保存24小时以上。

在本发明中,组份A在上述条件下保证了长期储存和使用前的良好稳定性。也可以在组份A和组份B混合前在上述组份A中加入碱性溶液或碱性物质,升高组份A的pH值(如大于8.5等),并立即与组份B混合制备水凝胶。

在本发明中,组份A中生物相容巯基改性高分子的浓度通常在8.0% w/v以下,优选浓度在0.5~5.0% w/v,特别优选浓度在0.8~3.0% w/v。而在Wallace等公开的快速凝胶化凝胶制备方法中,为了实现快速凝胶化,所使用的多臂聚乙二醇巯基衍生物溶液的浓度必须为10% w/v以上(通常为20% w/v)(Wallace等, US6,624,245)。在组份A的浓度为特别优选浓度时,本发明中生物相容巯基改性高分子的用量减少了80~90%,极大降低了成本。

在本发明中，组份A可以以水为溶剂，也可加入氯化钠、缓冲盐以及其它成份。通常使用低浓度的缓冲盐（如弱酸性的0.0005摩尔/升的磷酸钠缓冲液）稳定溶液pH值，氯化钠等可以调节溶液渗透压。

在本发明中，所采用的生物相容巯基反应活性交联剂在固体状态时低温很稳定，通常可以在零下30摄氏度以下长期保存（两年以上）；同时它们易溶解，因此组份B可以临时配置。组份B的pH值大于组份A的pH值，组份B的pH值一般大于8.0，通常 ≥ 8.5 ，室温的稳定时间一般在2小时以上。例如，本发明采用的聚乙二醇二丙烯酸酯溶液(pH 9.6)在室温保存4小时，对凝胶化时间没有影响。此外，在相同条件下，本发明所采用的聚乙二醇二甲基丙烯酸酯溶液、聚乙二醇二丙烯酰胺溶液、聚乙二醇二甲基丙烯酰胺溶液的稳定性依次提高，且都比聚乙二醇二丙烯酸酯溶液稳定。在本发明中，组份B的pH值优选8.0~12.0，特别优选8.5~10.5。

本发明所采用的组份B具有很大的优势。在Wallace等公开的快速凝胶化凝胶制备方法中，所使用的交联剂（多臂聚乙二醇丁二酰亚胺活化衍生物）在酸性和碱性条件下都很不稳定，必须溶解于0.0005摩尔/升的磷酸钠缓冲液得到弱酸性溶液（pH 6.0）。然而即使在此最优条件下，溶液稳定性也很差，需要新鲜配置，且必须在一小时内使用完。

在本发明中，组份B中生物相容巯基反应活性交联剂的浓度通常在10% w/v以下，优选浓度在0.5~8.0% w/v，特别优选浓度在0.8~4.0% w/v。而在Wallace等公开的方法中，为了实现快速凝胶化，所使用的交联剂（多臂聚乙二醇丁二酰亚胺活化衍生物）溶液浓度必须为10% w/v以上（通常为20% w/v）（Wallace等，US6,624,245）。在本发明中组份B的浓度为特别优选浓度时，交联剂的用量减少了60~96%，大大降低了成本。

在本发明中，组份B通常采用碱性缓冲溶液为溶剂，也可加入氯化钠以及其它成份调节溶液渗透压。所使用的缓冲溶液通常浓度较高，如0.3摩尔/升的磷酸钠/碳酸钠缓冲液（pH 9.0~10.0）（0.3摩尔/升的磷酸二氢钠溶液加入0.3摩尔/升的碳酸钠溶液至预定pH值）等。由于组份B中生物相容交联剂通常不改变溶液酸碱性，因此缓冲溶液的pH决定了组份B的溶液pH值。

当组份A和组份B相互混合时，即形成了具有特定交联条件的反应活性混合物。在室温条件下，反应活性混合物溶液的pH值基本决定了化学交联速度以及凝胶化速度，升高pH值加速了化学交联以及凝胶化过程。反应混合物的溶液pH值通常在7.0以上，优选8.0~12.0，特别优选8.5~10.5。

反应活性混合物的 pH 值由组份 A 和组份 B 混合时所产生或加入酸碱溶液调节产生。反应活性混合物溶液的 pH 值由初始的组份 A 和组份 B 的性质（如溶剂的类型、缓冲溶液的浓度、pH 值等等）决定。组份 A 和组份 B 溶液可含有不同浓度的 pH 值缓冲物质或不含有 pH 值缓冲物质，也可添加其它极性和亲水性物质。调节初始组份 A 和组份 B 溶液的性质，即可调节反应活性混合物溶液的酸碱性并达到特定 pH 值。例如当组份 A 为 pH 6.0 的水溶液，组份 B 的溶剂为 pH 9.6 的 0.3 摩尔/升的磷酸钠/碳酸钠缓冲液时，组份 A 和组份 B 的反应活性混合物溶液为碱性，pH 值通常在 9.0~9.6 之间；提高组份 B 的溶剂 pH 值即可提高反应活性混合物溶液的 pH 值，反之则会降低反应活性混合物溶液的 pH 值。

在本发明中，还可以在反应活性混合物溶液中、或者在混合前的组份 A 或组份 B、或者在组份 A 和组份 B 混合时加入一定浓度的酸碱溶液（如 0.2 摩尔/升的氢氧化钠溶液等等），调节反应活性混合溶液的 pH 并达到特定数值，从而达到合适的凝胶化速度。然而通常情况下并不需要这一步骤，通过调节初始组份 A 和组份 B 溶液的性质即可实现本发明。

在本发明中，生物相容高分子巯基化衍生物和生物相容巯基反应活性交联剂的使用量较少，在反应活性混合物中一般两者浓度相加小于 6% w/v，通常在 0.8~3.0 % w/v。

选择合适的生物相容巯基化改性高分子和生物相容巯基反应活性交联剂、调节组份 A 和组份 B 的溶液性质、以及可以选择性地加入酸碱进一步调节反应活性混合物溶液的 pH 值，即可在几秒到几分钟（甚至几十分钟）的时间范围内调节凝胶化时间，从而适合于不同的医学用途。例如本发明可以很方便地用于快速凝胶化水凝胶喷雾剂，可用于术后粘连并发症的治疗，实现小于 1 分钟的凝胶化时间。

本发明生物相容快速凝胶化水凝胶制备方法的另一种实现途径，包括以下 3 个步骤：

(1) 组份 A 和组份 B 相互混合形成具有特定交联条件的反应活性混合物，组份 A 是含有生物相容高分子巯基化衍生物的溶液，组份 B 是生物相容巯基反应活性交联剂，组份 B 为固体或溶液，其中生物相容高分子巯基化衍生物由生物相容高分子通过巯基化改性制备，组份 A 的浓度小于 8% w/v，组份 A 的 pH 值小于 8.5，组份 A 中的巯基和组份 B 中巯基反应活性官能团产生化学交联反应，所述的特定交联条件是指反应活性混合物的溶液 pH 值 ≤ 7.0 ；

(2) 调节反应活性混合物溶液 pH 值为特定碱性范围。

(3) 反应活性混合物形成水凝胶。

该途径的第一步是制备具有较好稳定性的反应活性混合物溶液，关键是控制反应活性混合物溶液的 pH 值为弱酸性。在该途径中，同前述途径的差别在于，生物相容交联剂（组份 B）可以是固体形式，或者是弱碱性、中性或弱酸性的溶液形式，且组份 A 和组份 B 相互混合形成的反应活性混合物溶液 pH 值 ≤ 7.0 。更优选的 pH 值范围为 2.5~6.0，此时反应活性混合物溶液具有较好的稳定性，在室温与空气接触可以保存 1 小时以上。特别优选的 pH 值范围为在 3.5~5.0 之间，此时反应活性混合物溶液具有良好的稳定性，通常室温与空气接触也可以保存 4 小时以上。

该途径的第二步是在具有较好稳定性的反应活性混合物溶液中加入碱或碱性缓冲溶液（如 0.2 摩尔 / 升的氢氧化钠溶液 / 氢氧化钾溶液、pH 值 9.0~12.0 的磷酸盐、碳酸盐缓冲液等等），调节溶液 pH 值为弱碱性或碱性，优选的 pH 值为 8.0~12.0，特别优选的溶液 pH 值为 8.5~10.5。

该途径的第三步是在上述条件下，反应活性混合物的组份 A 和组份 B 快速形成水凝胶。该途径所采用的生物相容高分子巯基化衍生物以及生物相容巯基反应活性交联剂同前述途径，该途径的其它条件同前述途径。

在本发明中，选择合适的生物相容巯基化改性高分子和生物相容巯基反应活性交联剂、调节组份 A 和组份 B 的性质、以及调节反应活性混合物溶液的 pH 值为特定值，即可在几秒到几分钟（甚至几十分钟）的时间范围内调节凝胶化时间，从而适合于不同的医学用途。例如本发明可以很方便地用于快速凝胶化水凝胶喷雾剂，可用于术后粘连并发症的治疗，实现小于 1 分钟的凝胶化时间。

本发明采用的组份 A 中的生物相容巯基化改性高分子通常具有较高的分子量和巯基含量，其分子量通常在 10,000 ~ 1,000,000 之间，巯基含量可多达 100 个以上巯基 / 10,000 分子量链段，即每个分子量为 50,000 生物相容巯基化改性高分子可具有 500 个巯基。与公开的聚乙二醇巯基化衍生物及含有半胱氨酸的低聚肽等相比（Wallace 等，US6,624,245；Gravett 等，US2004/0225077A1；Qiu 等，Biomaterials, 24, 11, 2003；Hubbell 等，US2003/0220245A1；Lutolf 等，Biomacromolecules, 4, 713, 2003），本发明采用的生物相容巯基化改性高分子的巯基含量提高了 8 倍以上，分子量也得到了很大程度的提高。因此在相同条件下，本发明采用的生物相容巯基化改性高分子的化学交联形成凝胶的能

力得到了很大的提高，凝胶的性能（如机械强度、稳定性、通透性等）也得到了很大的提高。在上述聚乙二醇巯基化衍生物及含有半胱氨酸的低聚肽等报道中，只有很高浓度（通常10% w/v以上）时才能确保快速交联凝胶化，并且其溶液为弱碱性或必须为碱性，稳定性差，必须新鲜配置且不能与空气接触；同时所使用的交联剂的浓度也很高（通常10% w/v以上），所制备的水凝胶中水含量一般在90%以下，通常在80%左右。与此相反，在本发明中，生物相容巯基化改性高分子和生物相容巯基反应活性交联剂的用量很少即可实现快速交联凝胶化，所制备的水凝胶中水含量一般在94%以上，通常在97%以上，具有更好的通透性以及生物相容性。此外，本发明采用的组份A中的生物相容巯基化改性高分子通常由细胞间质物质制备（如透明质酸等等），保留了细胞间质物质特定的生物学功能，如可以促进创伤的愈合、可以定向和诱导组织的特异性修复等等。

本发明采用的组份A中的生物相容巯基化改性高分子在较强碱性条件下非常不稳定，不能采用Wallace等公开的方法（Wallace等，US6,624,245）来实现快速凝胶化。例如透明质酸巯基化衍生物极易在强碱性条件下形成双硫键，从而失去活性（Shu等，Bio-macromolecules, 3, 1304, 2002）。一般说来，如果本发明中组份A的pH值大于8.5时，溶液很不稳定，使用很不方便，失去了实用价值。因此在本发明中组份A通常保存在近中性或弱酸性条件下，显著提高了组份A的长期储存稳定性和使用时的稳定性。然而在另一方面，快速凝胶化的实现又依赖于反应活性混合物具有较高的pH值（较强碱性）。因此在本发明的一种实现途径中，组份B通常具有较强的碱性，组份B的pH值必须大于组份A的pH值，这样组份A和组份B的反应活性混合物才能具有较高的pH值（较强碱性）。同时本发明采用的组份B中生物相容巯基反应活性交联剂必须在各种条件（包括较强碱性）下都具有良好的稳定性。通过调节组份A和组份B的溶液性质、以及可以选择性地加入酸碱进一步调节反应活性混合物溶液的pH值，即可实现本发明。

在本发明的另一种实现途径中，也可通过调节组份A和组份B的溶液性质，使组份A和组份B的反应活性混合物在弱酸性条件，既可保证组份A和组份B的长期储存稳定性和使用时的稳定性，又可显著提高反应活性混合物在使用时稳定性，然后加入碱进一步调节反应活性混合物溶液的pH值至较强碱性，实现快速凝胶化。

虽然目前已有少量报道公开了聚乙二醇二丙烯酸酯（或聚乙二醇二乙烯砜）交联的透明质酸巯基化衍生物、硫酸软骨素巯基化衍生物以及明胶巯基化衍生物。所采用的方法都是聚乙二醇二丙烯酸酯（或聚乙二醇二乙烯砜）和巯基化衍生物分别溶解于

缓冲溶液，并分别调节两种溶液至相同的近中性 pH 值（通常为 7.4），然后混合两种溶液制备水凝胶。然而在这种方法中，难于实现快速凝胶化。同时提高两种溶液的 pH 值（如 8.5 以上），可以加速凝胶化过程，但此时巯基化衍生物溶液不稳定，室温即使在不接触空气的条件下，几个小时后（通常约 0.5~4 小时）也会失去活性，长期保存困难，难于实现大规模工业化生产，使用也不方便。例如 Liu 等（Liu 等, *Fertility & Sterility*, 87, 940, 2007）报道了 Carbylan-SX（聚乙二醇二丙烯酸酯交联的改性透明质酸巯基化衍生物）水凝胶喷雾剂用于术后粘连的防治。所采用的方法是聚乙二醇二丙烯酸酯和改性透明质酸巯基化衍生物分别溶解于缓冲溶液，并分别调节两种溶液 pH 值为 7.4，过滤除菌，然后混合两种溶液，约在 5 分钟左右混合溶液的粘度逐渐提高，此时通过喷雾装置喷到伤口组织表面。然而此方法有很多显著缺陷，如凝胶化时间长且凝胶化过程难于控制，喷雾的时机很难掌握。喷雾只能在混合溶液粘度很大但尚未失去流动性的很窄时间范围内实现，混合溶液粘度不够大时喷雾后溶液易从伤口组织表面流走，混合溶液粘度太大时喷雾困难甚至不能喷雾。Connors 等也把上述同样的 Carbylan-SX 及其制备方法用于术后心包粘连的防治（Connors 等, *J Surg Res*, 140, 237, 2007），但也同样存在上述的缺陷。

本发明的有益效果是生物相容性好、不产生副产物或不产生有毒副作用的副产物、所使用的各组份稳定性能好、用量少、成本低廉、使用方便易于实现快速凝胶化、易于实现快速凝胶化喷雾剂的制备、适合于多种不同医学用途等等许多优点。与 Wallace 等公开的方法相比（Wallace 等, US6,624,245），本发明具有不产生副产物或不产生有毒副作用的副产物、更好的生物相容性、更稳定的交联化学键、所使用活性组份的更好稳定性、活性组份的更低使用量、更低的成本等许多优势。

本发明的有益效果还包括易于工业化大量生产。如前所述，本发明采用的组份 A 中的生物相容巯基化改性高分子在较强碱性条件下非常不稳定。因此当本发明采用的生物相容巯基化改性高分子的溶液为较强碱性时，易失去活性，不适合工业化大量生产。而在本发明中，含有生物相容巯基化改性高分子的组份 A 的 pH 值小于 8.5，通常为弱酸性，稳定性好，可以方便地完成工业化大量生产时除菌、罐注、包装、储存等多种工序。此外，本发明所采用的组份 A 可以在制备生物相容巯基化改性高分子的纯化工序后，不需要冷冻干燥，直接进入下一道工序，或者浓缩或者稀释至一定浓度后进入下一道工序。这样就避免了费时费力的冷冻干燥这一繁琐工序。

此外,本发明还提供一种新颖的生物相容快速凝胶化水凝胶喷雾剂制备方法,是将本发明前述的快速凝胶化水凝胶制备方法应用于快速凝胶化水凝胶喷雾剂的方法。

在该方法中,可以采用多种适用于多组份混合反应的喷雾装置。较为常用的喷雾装置包括 Spray Set for TISSEEL Fibrin Sealant (Baxter AG, 美国)、FibriJet (Micromedics, inc. 美国)等等。FibriJet 系列包括普通雾化装置和气体辅助雾化装置。FibriJet 系列普通雾化装置适用于低黏度溶液,喷雾头容易被堵塞,使用不方便。FibriJet 系列的气体辅助雾化装置的结构示意图如图 1 所示,包括针筒 2A 和 2B,针筒推杆底部夹套 1,针筒支座 3,四通装置 4 和压力气体进气管 5。针筒 2A 和 2B 分别用于装载两个组份,通过四通装置 4 分别挤出后雾化混合(或挤出混合后雾化),喷涂在物体表面(如创伤表面)后即形成凝胶。也可以加装与四通装置 4 相连接的喷雾头以提高雾化效果。

FibriJet 系列的气体辅助雾化装置的关键部件是一个四通装置(如图 2 所示)。两个进口分别连接两个针筒 2A 和 2B,用于装载两个组份,一个进口(压力气体进气管 5)接通压力气体(空气或其它气体),两个组份分别在出口挤出,在压力气体作用下雾化混合,喷涂在物体表面后即形成凝胶。所使用的气体压力越高,雾化效果越好,但气体压力太高时可能会对人体造成伤害。通常所使用的气体压力范围为 1~10 个大气压之间。当气体压力较小,接近一个大气压时,雾化不充分,形成较大液体颗粒,混合不够均匀;当气体压力提高到在 1.7 个大气压左右时,即可雾化成极微小的液体,混合很均匀。本发明的生物相容快速凝胶化水凝胶制备方法的一种实现途径中的组份 A 和组份 B 可以分别装入两个针筒,制备快速凝胶化水凝胶喷雾剂。也可采用本发明生物相容快速凝胶化水凝胶制备方法的另一种实现途径来实现喷雾。此时组份 A 和组份 B 混合形成的反应活性混合物装入一个针筒,碱或碱性缓冲溶液装入第二个针筒,然后两者分别在出口挤出,在压力气体作用下雾化混合,即可制备快速凝胶化水凝胶喷雾剂。

本发明的有益效果是具有前述本发明快速凝胶化水凝胶制备方法的优点,同时具有简单方便,易于使用、适用于多种医学用途,如术后粘连并发症的治疗等优点。此外气体辅助雾化喷雾制备方法还采用了雾化条件下的混合,不会堵塞喷头,可以多次使用。

附图说明

图 1 是 FibriJet 系列多组份混合反应气体辅助喷雾装置的部分结构示意图,其中

1 是针筒推杆底部夹套, 2 是针筒, 3 是针筒支座, 4 是四通装置, 5 是压力气体进气管。

图 2 是图 1 中四通装置的结构示意图。

具体实施方式

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

实施例 1 巯基化改性透明质酸(HA-DTPH)的制备

采用 Shu 等报道的方法制备 (Shu 等, *Biomacromolecules*, 3, 1304, 2002)。

透明质酸钠 (分子量约 150 万) 20 克溶解于 2 升蒸馏水中, 加入浓盐酸调节溶液 pH 值约为 0.5, 然后在 37 摄氏度、150 转/分钟的摇床中降解 24 小时。透析纯化冷冻干燥得到低分子量透明质酸 (重均分子量 24.6 万, 数均分子量 12 万)。

上述低分子量透明质酸 20 克溶解于 2 升蒸馏水。在上述溶液中加入 23.8 克二硫代二丙二酰肼 (按照 Shu 等人在 *Biomacromolecules*, 3, 1304, 2002 中公开的方法制备), 搅拌溶解。然后溶液的 pH 值用 0.1 摩尔/升盐酸调节至 4.75, 加入 19.2 克 1-乙基-3-(3-二甲胺丙基)碳二亚胺盐酸盐 (Aldrich, 美国), 电磁搅拌。在上述溶液中不断加入适量 0.1 摩尔/升盐酸, 使溶液的 pH 值保持在 4.75。加入 1.0 摩尔/升的氢氧化钠溶液到 pH 7.0 终止反应。然后加入 100 克二硫苏糖醇 (Diagnostic Chemical Limited, 美国) 和适量 1.0 摩尔/升的氢氧化钠溶液, 搅拌。调解溶液的 pH 值为 8.5。室温电磁搅拌反应 24 小时。此后, 在上述溶液中加入 1 摩尔/升的盐酸直至约 pH 3.5。上述溶液装入透析管 (截除分子量 3500, Sigma, 美国), 用大量 0.0003 摩尔/升的盐酸和 0.1 摩尔/升的氯化钠溶液透析 5 天, 每 8 小时换一次透析液; 然后再用大量的 0.0003 摩尔/升的盐酸溶液透析 3 天, 每 8 小时换透析液。最后收集透析管内的溶液, 冷冻干燥得到白色絮状固体(HA-DTPH)。

上述 HA-DTPH 溶解于蒸馏水中得到 1.0~2.5% w/v 溶液, 调节溶液的 pH 值为 2.0~7.0, 过滤除菌后, 冷冻保存待用 (通常零下 20 摄氏度以下)。或者在上述制备过程中, 透析纯化后的溶液再经透析柱脱水浓缩至合适浓度 (通常 1.0~2.5% w/v), 调节溶液的 pH 值为 2.0~7.0, 过滤除菌后, 冷冻保存待用 (通常零下 20 摄氏度以下)。

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

子量 6.1 万。

实施例 2 巯基反应活性生物相容交联剂的制备

聚乙二醇二丙烯酸酯、聚乙二醇二(甲基)丙烯酸酯、聚乙二醇二丙烯酰氨和聚乙二醇二(甲基)丙烯酰氨由相应的聚乙二醇(分子量 3,400 或 10,000, Sigma-Aldrich, 美国)和聚乙二醇二氨(分子量 3400, Nektar Therapeutics, 美国)制备, 多臂(4 臂和 8 臂)的聚乙二醇二丙烯酸酯和聚乙二醇二(甲基)丙烯酸酯由相应的多臂聚乙二醇(分子量 10,000)制备。其制备的一般过程是聚乙二醇或聚乙二醇二氨在三乙胺的作用下, 与丙烯酰氨或甲基丙烯酰氨反应, 纯化后即可得到产物, 详细过程参见 Shu 等, *Biomaterials*, 25, 1339, 2004。

用卤代酰氨(如碘代丙酰氨、溴代丙酰氨等等)代替相应的丙烯酰氨, 即可采用上述相同的过程制备聚乙二醇二碘代丙酸酯、聚乙二醇二溴代丙酸酯、聚乙二醇二氯代丙酸酯、聚乙二醇二碘代丙酰氨、聚乙二醇二溴代丙酰氨、聚乙二醇二氯代丙酰氨等巯基反应活性交联剂。

实施例 3 生物相容快速凝胶化水凝胶的制备

实施例 1 制备的 HA-DTPH 溶液(2.0% w/v, pH 5.0)室温解冻待用。聚乙二醇二丙烯酸酯(分子量 3400, Nektar Therapeutics, 美国)溶解于 0.3 摩尔/升的磷酸钠/碳酸钠缓冲液得到 2.0%w/v 的溶液(pH 9.6), 过滤除菌待用。在电磁搅拌下, 上述一种溶液(5 毫升)快速加入另外一种溶液(5 毫升), 继续搅拌 3 秒钟后停止搅拌, 反应活性混合物的 pH 值约为 9.4, 约 17 秒后混合溶液失去流动性形成凝胶。

实施例 4 生物相容快速凝胶化水凝胶的制备

实施例 1 制备的 HA-DTPH 溶液(1.5% w/v, pH 6.0)室温解冻待用。聚乙二醇二丙烯酸酯(分子量 3400, Nektar Therapeutics, 美国)溶解于 0.15 摩尔/升的磷酸钠/碳酸钠缓冲液得到 1.5%w/v 的溶液(pH 9.6), 过滤除菌待用。在电磁搅拌下, 上述一种溶液(5 毫升)快速加入另外一种溶液(5 毫升), 继续搅拌 3 秒钟后停止搅拌, 反应活性混合物的 pH 值约为 9.3, 约 27 秒后混合溶液失去流动性形成凝胶。

实施例 5 生物相容快速凝胶化水凝胶的制备

实施例 1 制备的 HA-DTPH 溶液(1.5% w/v, pH 3.0)室温解冻待用。聚乙二醇二丙烯酸酯(分子量 3400, Nektar Therapeutics, 美国)溶解于 0.3 摩尔/升的硼酸/氢氧化钠缓冲液得到 1.5%w/v 的溶液(pH 11.0), 过滤除菌待用。在电磁搅拌下, 上述

一种溶液（5 毫升）快速加入另外一种溶液（5 毫升），继续搅拌 3 秒钟后停止搅拌，反应活性混合物的 pH 值大于 10.5，混合溶液失去流动性形成凝胶的时间少于 10 秒。

实施例 6 生物相容快速凝胶化水凝胶的制备

实施例 1 制备的 HA-DTPH 溶液（1.0% w/v, pH 5.0）室温解冻待用。聚乙二醇二乙烯砜（分子量 3400, Nektar Therapeutics, 美国）溶解于 0.3 摩尔/升的磷酸钠/碳酸钠缓冲液得到 1.0%w/v 的溶液（pH 9.6），过滤除菌待用。在电磁搅拌下，上述一种溶液（5 毫升）快速加入另外一种溶液（5 毫升），继续搅拌 3 秒钟后停止搅拌，反应活性混合物的 pH 值约为 9.4，约 48 秒后混合溶液失去流动性形成凝胶。

实施例 7 生物相容快速凝胶化水凝胶的制备

实施例 1 制备的 HA-DTPH 溶液（2.5% w/v, pH 5.0）室温解冻待用。聚乙二醇二乙烯砜（分子量 3400, Nektar Therapeutics, 美国）溶解于 0.3 摩尔/升的磷酸盐缓冲液得到 2.0%w/v 的溶液（pH 7.4），过滤除菌待用。在电磁搅拌下，上述一种溶液（5 毫升）快速加入另外一种溶液（5 毫升），继续搅拌 3 秒钟后停止搅拌，反应活性混合物的 pH 值约为 7.2，约 5 分钟后混合溶液失去流动性形成凝胶。

实施例 8 生物相容快速凝胶化水凝胶的制备

实施例 1 制备的 HA-DTPH 溶液（2.0% w/v, pH 6.0）室温解冻待用。聚乙二醇二溴代丙酸酯（分子量 3400, Nektar Therapeutics, 美国）溶解于 0.15 摩尔/升的磷酸盐缓冲液得到 2.0%w/v 的溶液（pH 7.4），过滤除菌待用。在电磁搅拌下，上述一种溶液（5 毫升）快速加入另外一种溶液（5 毫升），继续搅拌 3 秒钟后停止搅拌，反应活性混合物的 pH 值约为 7.2，约 5 分钟后混合溶液失去流动性形成凝胶。

实施例 9 生物相容快速凝胶化水凝胶的制备

实施例 1 制备的 HA-DTPH 溶液（2.0% w/v, pH 7.0）室温解冻待用。聚乙二醇二乙烯砜（分子量 3400, Nektar Therapeutics, 美国）溶解于 0.15 摩尔/升的磷酸盐缓冲液得到 2.0%w/v 的溶液（pH 8.2），过滤除菌待用。在电磁搅拌下，上述一种溶液（5 毫升）快速加入另外一种溶液（5 毫升），继续搅拌 3 秒钟后停止搅拌，反应活性混合物的 pH 值约为 8.0，约 2 分钟后混合溶液失去流动性形成凝胶。

实施例 10 生物相容快速凝胶化水凝胶的制备

实施例 1 制备的 HA-DTPH 溶液（2.0% w/v, pH 5.0）室温解冻待用。聚乙二醇二丙烯酸酯（分子量 3400, Nektar Therapeutics, 美国）溶解于 0.0005 摩尔/升的磷酸

钠缓冲液 (pH 6.0) 得到 8.0%w/v 的溶液, 过滤除菌待用。在电磁搅拌下, 聚乙二醇二丙烯酸酯溶液 (1 毫升) 快速加入 HA-DTPH 溶液 (4 毫升), 反应活性混合物的 pH 值约为 5.4。然后加入 5 毫升 0.3 摩尔/升的磷酸钠/碳酸钠缓冲液 (pH 9.6) 继续搅拌 3 秒钟后停止搅拌, 反应活性混合物的 pH 值约为 9.3, 约 21 秒后混合溶液失去流动性形成凝胶。

实施例 11 生物相容快速凝胶化水凝胶的制备

实施例 1 制备的 HA-DTPH 溶液 (2.0% w/v, pH 3.0) 室温解冻待用。聚乙二醇二丙烯酸酯 (分子量 3400, Nektar Therapeutics, 美国) 溶解于 0.001 摩尔/升的盐酸溶液得到 8.0%w/v 的溶液, 过滤除菌待用。在电磁搅拌下, 聚乙二醇二丙烯酸酯溶液 (1 毫升) 快速加入 HA-DTPH 溶液 (4 毫升), 反应活性混合物的 pH 值约为 3.0。然后在电磁搅拌下加入适量 0.1 摩尔/升的氢氧化钠溶液, 调节上述反应活性混合物的 pH 值为 7.2, 约 6 分钟后混合溶液失去流动性形成凝胶。

实施例 12 生物相容快速凝胶化水凝胶的制备

实施例 1 制备的 HA-DTPH 溶液 (2.0% w/v, pH 3.0) 室温解冻待用。聚乙二醇二丙烯酸酯 (分子量 3400, Nektar Therapeutics, 美国) 溶解于 0.001 摩尔/升的盐酸溶液得到 8.0%w/v 的溶液, 过滤除菌待用。在电磁搅拌下, 聚乙二醇二丙烯酸酯溶液 (1 毫升) 快速加入 HA-DTPH 溶液 (4 毫升), 反应活性混合物的 pH 值约为 3.0。然后在电磁搅拌下加入适量 0.1 摩尔/升的氢氧化钠溶液, 调节上述反应活性混合物的 pH 值为 8.0, 约 2 分钟后混合溶液失去流动性形成凝胶。

实施例 13 生物相容快速凝胶化水凝胶的制备

实施例 1 制备的 HA-DTPH 溶液 (2.0% w/v, pH 4.0) 室温解冻待用。实施例 2 制备的聚乙二醇二(甲基)丙烯酸酯 (分子量 10,000) 溶解于 0.0001 摩尔/升的盐酸溶液得到 8.0%w/v 的溶液, 过滤除菌待用。在电磁搅拌下, 聚乙二醇二(甲基)丙烯酸酯溶液 (1 毫升) 快速加入 HA-DTPH 溶液 (4 毫升), 反应活性混合物的 pH 值约为 4.0。然后在电磁搅拌下加入适量 0.1 摩尔/升的氢氧化钠溶液, 调节上述反应活性混合物的 pH 值为约 11.3, 约 39 秒后混合溶液失去流动性形成凝胶。

实施例 14 生物相容快速凝胶化水凝胶的制备

实施例 1 制备的 HA-DTPH 溶液 (1.5% w/v, pH 4.0) 室温解冻待用。然后在上述 5 毫升上述溶液中加入 75 毫克聚乙二醇二丙烯酸酯 (分子量 3400, Nektar

Therapeutics, 美国), 手摇溶解得到混合溶液。在电磁搅拌下 5 毫升 0.3 摩尔/升的磷酸钠/碳酸钠缓冲液 (pH 9.6) 快速加入上述混合溶液, 继续搅拌 3 秒钟后停止搅拌, 反应活性混合物的 pH 值约为 9.3, 37 秒后溶液失去流动性形成凝胶。

实施例 15 快速凝胶化水凝胶喷雾剂的制备

实施例 1 制备的 HA-DTPH 溶液 (1.5% w/v, pH 5.0) 室温解冻待用。聚乙二醇二丙烯酸酯 (分子量 3400, Nektar Therapeutics, 美国) 溶解于 0.3 摩尔/升的磷酸钠/碳酸钠缓冲液得到 1.5%w/v 的溶液 (pH 9.6), 过滤除菌待用。上述两种溶液分别取 5 毫升装入 FibriJet 气体辅助喷雾装置(型号 SA-6110, Micromedics, inc. 美国), 然后在 1.5 个大气压氮气的作用下雾化喷涂在垂直树立的玻璃板上, 喷涂在玻璃板上的混合溶液几乎不流动, 并很快在玻璃板表面形成均匀的凝胶薄层。

实施例 16 快速凝胶化水凝胶喷雾剂的制备

实施例 1 制备的 HA-DTPH 溶液 (1.5% w/v, pH 4.0) 室温解冻待用。然后在上述 5 毫升上述溶液中加入 75 毫克聚乙二醇二丙烯酸酯 (分子量 3400, Nektar Therapeutics, 美国), 手摇溶解得到混合溶液。上述混合溶液和 0.3 摩尔/升的碳酸盐缓冲液 (pH 10.5) 取 5 毫升分别装入 FibriJet 气体辅助喷雾装置(型号 SA-6110, Micromedics, inc. 美国), 然后在压力约为 3 个大气压的空气作用下雾化喷涂在垂直树立的玻璃板上, 喷涂在玻璃板上的混合溶液几乎不流动, 并很快在玻璃板表面形成均匀的凝胶薄层。

实施例 17 快速凝胶化水凝胶喷雾剂的制备

实施例 1 制备的 HA-DTPH 溶液 (1.5% w/v, pH 5.0) 室温解冻待用。聚乙二醇二乙烯砜 (分子量 3400, Nektar Therapeutics, 美国) 溶解于 0.3 摩尔/升的磷酸钠/碳酸钠缓冲液得到 1.5%w/v 的溶液 (pH 10.0), 过滤除菌待用。上述两种溶液分别取 5 毫升装入 FibriJet 气体辅助喷雾装置(型号 SA-6110, Micromedics, inc. 美国), 然后在压力为 1.5 个大气压的氮气作用下雾化喷涂在垂直树立的玻璃板上, 喷涂在玻璃板上的混合溶液几乎不流动, 并很快在玻璃板表面形成均匀的凝胶薄层。

实施例 18 快速凝胶化水凝胶喷雾剂的制备

实施例 1 制备的 HA-DTPH 溶液 (1.5% w/v, pH 5.0) 室温解冻待用。实施例 1 制备的聚乙二醇二(甲基)丙烯酸酯 (分子量 3,400) 溶解于 0.3 摩尔/升的磷酸氢二钠/氢氧化钠缓冲液得到 1.5%w/v 的溶液 (pH 12.0), 过滤除菌待用。上述两种溶液分别

取 5 毫升装入 FibriJet 气体辅助喷雾装置(型号 SA-6110, Micromedics, inc. 美国), 然后在压力为 5 个大气压的氮气的作用下雾化喷涂在垂直树立的玻璃板上, 喷涂在玻璃板上的混合溶液几乎不流动, 并很快在玻璃板表面形成均匀的凝胶薄层。

实施例 19 快速凝胶化水凝胶喷雾剂的制备

实施例 1 制备的 HA-DTPH 溶液 (2.5% w/v, pH 5.0) 室温解冻待用。实施 2 制备的聚乙二醇二丙烯酰氨 (分子量 3,400) 溶解于 0.3 摩尔/升的磷酸氢二钠/氢氧化钠缓冲液得到 2.5%w/v 的溶液 (pH 12.0), 过滤除菌待用。上述两种溶液分别取 5 毫升装入 FibriJet 气体辅助喷雾装置(型号 SA-6110, Micromedics, inc. 美国), 然后在压力为 5 个大气压的氮气的作用下雾化喷涂在垂直树立的玻璃板上, 喷涂在玻璃板上的混合溶液几乎不流动, 并很快在玻璃板表面形成均匀的凝胶薄层。

实施例 20 合成双琥珀酸双酰肼胺二酰肼 (简称 DSCDH)

酰肼二盐酸盐 (Aldrich, 美国) 100 克溶解于 1500 毫升蒸馏水, 得到澄清透明溶液。在上述溶液中加入 4 摩尔/升的氢氧化钠直至溶液 pH 值为 10。然后在电磁搅拌下加入 133 克琥珀酸酐 (Aldrich, 美国), 同时不断加入 4 摩尔/升的氢氧化钠使溶液的 pH 值保持在 7~10。室温反应 2 小时后, 在溶液中加入 6 摩尔/升的盐酸。过滤收集白色沉淀产物, 用 2000 毫升蒸馏水洗两次。然后真空减压干燥, 得到白色产物固体产物合成双琥珀酸双酰肼胺酸 (简称 DSC) 约 150 克, 产率大于 90%。

在 250 毫升三颈圆底烧瓶中加入 100 克 DSC, 1200 毫升无水乙醇和 100 滴浓硫酸。氮气保护下回流 2 小时, 然后减压浓缩至小于 200 毫升。剩余溶液转移到 2500 毫升分液漏斗, 然后加入 600 毫升乙酸乙酯。有机相用 500 毫升水洗三次, 弃去水相, 有机相减压蒸馏得到白色腊状固体产物双琥珀酸双酰肼胺酸二乙酯 (简称 DSCDE) 约 93 克, 产率大于 80%。

在 150 毫升烧杯中加入 10 克 DSCDE, 80 毫升乙醇。室温搅拌溶解后再加入 10 毫升水合肼 (Aldrich, 美国), 反应过夜。过滤收集白色沉淀产物, 然后用 40 毫升乙醇淋洗四次。室温通风厨中挥发有机溶剂后, 真空减压干燥, 得到白色产物固体产物 DSCDH 约 8 克, 产率大于 75%。

实施例 21 巯基化改性透明质酸 (HA-DSCDH) 的制备

透明质酸钠 (分子量 62~115 万, NovaMatrix FMC BIOPOLYMER, 美国) 10 克溶解于 2000 毫升蒸馏水中, 得到澄清透明溶液。在上述溶液中加入 9.5 克实施例 20

制备的 DSCDH, 搅拌溶解。然后溶液的 pH 值用 1 摩尔/升盐酸调节至 4.75, 加入 2.88 克 1-乙基-3-(3-二甲胺丙基)碳二亚胺盐酸盐(Aldrich, 美国), 电磁搅拌。在上述溶液中不断加入适量 0.1 摩尔/升盐酸, 使溶液的 pH 值保持在 4.75。溶液黏度不断增加, 并在 10 分钟左右形成凝胶。凝胶形成后, 室温静置反应 2 小时。然后加入 100 克二硫苏糖醇 (Diagnostic Chemical Limited, 美国)和少量 1 摩尔/升的氢氧化钠溶液, 搅拌。凝胶逐渐溶解, 同时不断加入 1 摩尔/升的氢氧化钠溶液使溶液的 pH 值保持在 8.5。待凝胶全部溶解后, 室温电磁搅拌反应 24 小时。此后, 在上述溶液中加入 6 摩尔/升的盐酸直至约 pH 3.0。上述溶液装入透析管 (截除分子量 3500, Sigma, 美国), 用 20 升 0.001 摩尔/升的盐酸和 0.3 摩尔/升的氯化钠溶液透析 5 天, 每 8 小时换一次透析液; 然后再用 20 升 0.001 摩尔/升的盐酸溶液透析 3 天, 每 8 小时换透析液。最后透析管内的溶液经透析柱脱水浓缩至一定浓度(0.8~1.5% w/v), 并调节溶液 pH 值为 3.0~8.5, 过滤除菌后, 冷冻保存待用 (通常零下 20 摄氏度以下)。

采用 Shu 等人在 *Biomacromolecules*, 3, 1304, 2002 中报道的改进 Ellman 方法检测 HA-DSCDH 的活性巯基含量: 39.1 个巯基/100 个透明质酸二糖重复单元, 基本与氢谱核磁共振检测结果相符。

实施例 22 快速凝胶化水凝胶的制备

实施例 21 制备的 HA-DSCDH 溶液 (0.8% w/v, pH 值为 4.0) 室温解冻待用。实施例 2 制备的四臂聚乙二醇丙烯酸酯 (平均 3.6 个丙烯酸酯官能团/个四臂聚乙二醇分子, 分子量 10,000) 溶解于 0.3 摩尔/升的磷酸钠/碳酸钠缓冲液得到 1.0% w/v 溶液 (pH 9.6), 过滤除菌待用。在电磁搅拌下, 5 毫升 HA-DSCDH 溶液快速加入 5 毫升四臂聚乙二醇丙烯酸酯溶液, 继续搅拌 3 秒钟后停止搅拌, 反应活性混合物的 pH 值约为 9.3, 约 47 秒后反应活性混合溶液失去流动性形成凝胶。

实施例 23 快速凝胶化水凝胶的制备

实施例 21 制备的 HA-DSCDH 溶液 (0.5% w/v, pH 值为 7.0) 室温解冻待用。实施例 2 制备的四臂聚乙二醇丙烯酸酯 (平均 3.6 个丙烯酸酯官能团/个四臂聚乙二醇分子, 分子量 10,000) 溶解于 0.3 摩尔/升的磷酸氢二钠/氢氧化钠缓冲溶液得到 0.8% w/v 溶液 (pH 12.0), 过滤除菌待用。在电磁搅拌下, 5 毫升 HA-DSCDH 溶液快速加入 5 毫升四臂聚乙二醇丙烯酸酯溶液, 继续搅拌 3 秒钟后停止搅拌, 反应活性混合物的 pH 值约为 12.0, 约 17 秒后反应活性混合溶液失去流动性形成凝胶。

实施例 24 快速凝胶化水凝胶的制备

实施例 21 制备的 HA-DSCDH 溶液 (1.2% w/v, pH 值为 3.5) 室温解冻待用。实施例 2 制备的四臂聚乙二醇丙烯酸酯(平均 3.6 个丙烯酸酯官能团/四臂聚乙二醇分子, 分子量 10,000) 溶解于 0.15 摩尔/升的磷酸盐/碳酸盐缓冲溶液得到 1.2% w/v 溶液 (pH9.6), 过滤除菌待用。在电磁搅拌下, 5 毫升 HA-DSCDH 溶液快速加入 5 毫升四臂聚乙二醇丙烯酸酯溶液, 继续搅拌 3 秒钟后停止搅拌, 反应活性混合物的 pH 值约为 9.2, 约 29 秒后反应活性混合溶液失去流动性形成凝胶。

实施例 25 快速凝胶化水凝胶的制备

实施例 21 制备的 HA-DSCDH 溶液 (1.2% w/v, pH 值为 7.0) 室温解冻待用。实施例 2 制备的四臂聚乙二醇丙烯酸酯(平均 3.6 个丙烯酸酯官能团/四臂聚乙二醇分子, 分子量 10,000) 溶解于 0.30 摩尔/升的碳酸盐缓冲溶液得到 0.5% w/v 溶液 (pH 8.5), 过滤除菌待用。在电磁搅拌下, 5 毫升 HA-DSCDH 溶液快速加入 5 毫升四臂聚乙二醇丙烯酸酯溶液, 继续搅拌 3 秒钟后停止搅拌, 反应活性混合物的 pH 值约为 8.5, 约 3 分钟后反应活性混合溶液失去流动性形成凝胶。

实施例 26 快速凝胶化水凝胶的制备

实施例 21 制备的 HA-DSCDH 溶液 (1.2% w/v, pH 值为 7.0) 室温解冻待用。实施例 2 制备的四臂聚乙二醇丙烯酸酯(平均 3.6 个丙烯酸酯官能团/四臂聚乙二醇分子, 分子量 10,000) 溶解于 0.30 摩尔/升的磷酸盐缓冲溶液得到 1.2% w/v 溶液 (pH 8.0), 过滤除菌待用。在电磁搅拌下, 5 毫升 HA-DSCDH 溶液快速加入 5 毫升四臂聚乙二醇丙烯酸酯溶液, 继续搅拌 3 秒钟后停止搅拌, 反应活性混合物的 pH 值约为 8.0, 约 4 分钟后反应活性混合溶液失去流动性形成凝胶。

实施例 27 快速凝胶化水凝胶的制备

实施例 21 制备的 HA-DSCDH 溶液 (1.2% w/v, pH 值为 2.5) 室温解冻待用。实施例 2 制备的四臂聚乙二醇丙烯酸酯(平均 3.6 个丙烯酸酯官能团/四臂聚乙二醇分子, 分子量 10,000) 溶解于 0.3 摩尔/升的磷酸盐/碳酸盐缓冲溶液得到 1.0% w/v 溶液 (pH9.6), 过滤除菌待用。在电磁搅拌下, 5 毫升 HA-DSCDH 溶液快速加入 5 毫升四臂聚乙二醇丙烯酸酯溶液, 继续搅拌 3 秒钟后停止搅拌, 反应活性混合物的 pH 值约为 9.2, 约 32 秒后反应活性混合溶液失去流动性形成凝胶。

实施例 28 快速凝胶化水凝胶的制备

实施例 21 制备的 HA-DSCDH 溶液 (1.2% w/v, pH 值为 2.5) 室温解冻待用。实施例 2 制备的四臂聚乙二醇丙烯酸酯(平均 3.6 个丙烯酸酯官能团/四臂聚乙二醇分子, 分子量 10,000) 溶解于 pH 2.5 的盐酸溶液, 得到 1.0% w/v 溶液, 过滤除菌待用。在电磁搅拌下, 5 毫升 HA-DSCDH 溶液快速加入 5 毫升四臂聚乙二醇丙烯酸酯溶液, 反应活性混合物的 pH 值约为 2.5。在电磁搅拌下, 加入适量的 0.1 摩尔/升氢氧化钠溶液, 调节反应活性混合物的 pH 值为 10.5, 反应活性混合溶液很快失去流动性形成凝胶 (小于 10 秒)。

实施例 29 快速凝胶化水凝胶的制备

实施例 21 制备的 HA-DSCDH 溶液 (1.2% w/v, pH 值为 3.5) 室温解冻待用。实施例 2 制备的四臂聚乙二醇丙烯酸酯(平均 3.6 个丙烯酸酯官能团/四臂聚乙二醇分子, 分子量 10,000) 溶解于 pH 3.5 的盐酸溶液, 得到 1.0% w/v 溶液, 过滤除菌待用。在电磁搅拌下, 5 毫升 HA-DSCDH 溶液快速加入 5 毫升四臂聚乙二醇丙烯酸酯溶液, 反应活性混合物的 pH 值约为 3.5。在电磁搅拌下, 加入适量的 0.3 摩尔/升氢氧化钠溶液, 调节反应活性混合物的 pH 值为 12, 反应活性混合溶液再几秒内立即失去流动性形成凝胶。

实施例 30 快速凝胶化水凝胶喷雾剂的制备

实施例 21 制备的 HA-DSCDH 溶液 (1.0% w/v, pH 值为 8.0) 室温解冻待用。实施例 2 制备的四臂聚乙二醇丙烯酸酯(平均 3.6 个丙烯酸酯官能团/四臂聚乙二醇分子, 分子量 10,000) 溶解于 0.3 摩尔/升的碳酸盐缓冲液得到 1.0% w/v 溶液 (pH 10.5), 过滤除菌待用。HA-DSCDH 溶液和四臂聚乙二醇丙烯酸酯溶液分别取 5 毫升装入 FibriJet 气体辅助喷雾装置(型号 SA-6110, Micromedics, inc. 美国), 然后在压力为 4 个大气压的氮气的作用下雾化喷涂在垂直树立的玻璃板上, 喷涂在玻璃板上的混合溶液几乎不流动, 并很快在玻璃板表面形成均匀的凝胶薄层。

实施例 31 巯基化改性硫酸软骨素 (CS-DSCDH) 的合成和表征

硫酸软骨素 (c 型, 来自鲨鱼软骨, Sigma, 美国) 1 克溶解于 100 毫升蒸馏水中, 得到澄清透明溶液。在上述溶液中加入 0.704 克实施例 20 制备的 DSCDH, 搅拌溶解。然后溶液的 pH 值用 0.1 摩尔/升盐酸调节至 4.75, 加入 0.192 克 1-乙基-3-(3-二甲胺丙基)碳二亚胺盐酸盐(Aldrich, 美国), 电磁搅拌。在上述溶液中不断加入适量 0.1 摩尔/升盐酸, 使溶液的 pH 值保持在 4.75, 室温电磁搅拌反应 2 小时。然后加入 10 克

二硫苏糖醇 (Diagnostic Chemical Limited, 美国)和少量 0.1 摩尔/升的氢氧化钠溶液, 搅拌。凝胶逐渐溶解, 同时不断加入 0.1 摩尔/升的氢氧化钠溶液使溶液的 pH 值保持在 8.5。待凝胶全部溶解后, 室温电磁搅拌反应 24 小时。此后, 在上述溶液中加入 6 摩尔/升的盐酸直至约 pH 3.0。上述溶液装入透析管(截除分子量 3500, Sigma, 美国), 用 10 升 0.001 摩尔/升的盐酸和 0.3 摩尔/升的氯化钠溶液透析 5 天, 每 8 小时换一次透析液; 然后再用 10 升 0.001 摩尔/升的盐酸溶液透析 3 天, 每 8 小时换透析液。最后透析管内的溶液经透析柱脱水浓缩至一定浓度(3.0~6.0% w/v), 并调节溶液 pH 值为 3.0~8.5, 过滤除菌后, 冷冻保存待用(通常零下 20 摄氏度以下)。

以硫酸软骨素的乙酰基的特征甲基吸收峰为内标, 根据吸收峰的面积计算出合成的 CS-DGDTPDH 的侧链取代度为 47%。

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

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

实施例 32 快速凝胶化水凝胶的制备

实施例 31 制备的 CS-DSCDH 溶液 (6.0% w/v, pH 5.0) 室温溶液待用。实施例 2 制备的四臂聚乙二醇丙烯酸酯(平均 3.6 个丙烯酸酯官能团/四臂聚乙二醇分子, 分子量 10,000) 溶解于 0.3 摩尔/升的碳酸盐缓冲液得到 6.0% w/v 溶液 (pH 10.5), 过滤除菌待用。在电磁搅拌下, 上述一种溶液 (5 毫升) 快速加入另一种溶液 (5 毫升), 继续搅拌 3 秒钟后停止搅拌, 反应活性混合溶液在 10 秒内失去流动性形成凝胶。

实施例 33 快速凝胶化水凝胶的制备

实施例 31 制备的 CS-DSCDH 溶液 (3.0% w/v, pH 7.0) 室温溶液待用。实施例 2 制备的四臂聚乙二醇丙烯酸酯(平均 3.6 个丙烯酸酯官能团/四臂聚乙二醇分子, 分子量 10,000) 溶解于 0.005 摩尔/升的磷酸盐缓冲液得到 3.0% w/v 溶液 (pH 7.0), 过滤除菌待用。在电磁搅拌下, 上述一种溶液 (5 毫升) 快速加入另一种溶液 (5 毫升), 反应活性混合物的 pH 值为 7.0。在电磁搅拌下, 加入适量的 0.3 摩尔/升氢氧化钠溶液, 调节反应活性混合物的 pH 值为 10.5, 反应活性混合溶液立即失去流动性形成凝胶(小于 10 秒)。

实施例 34 快速凝胶化水凝胶的制备

实施例 31 制备的 CS-DSCDH 溶液 (3.0% w/v, pH 4.0) 室温溶液待用。实施例 2 制备的四臂聚乙二醇丙烯酸酯 (平均 3.6 个丙烯酸酯官能团/四臂聚乙二醇分子, 分子量 10,000) 溶解于 0.3 摩尔/升的硼酸/氢氧化钠缓冲液得到 3.0% w/v 溶液 (pH 11.0), 过滤除菌待用。在电磁搅拌下, CS-DSCDH 溶液的 pH 值用碱调节到 8.5, 然后快速加入四臂聚乙二醇丙烯酸酯溶液 (5 毫升), 反应活性混合物的 pH 值约为 11.0, 反应活性混合溶液立即失去流动性形成凝胶。

实施例 35 快速凝胶化水凝胶喷雾剂的制备

实施例 31 制备的 CS-DSCDH 溶液 (4.0% w/v, pH 8.0) 室温溶液待用。实施例 2 制备的四臂聚乙二醇丙烯酸酯 (平均 3.6 个丙烯酸酯官能团/四臂聚乙二醇分子, 分子量 10,000) 溶解于 0.3 摩尔/升的碳酸盐缓冲液得到 4.0% w/v 溶液 (pH 10.5), 过滤除菌待用。上述两种溶液分别取 5 毫升装入 FibriJet 气体辅助喷雾装置 (型号 SA-6110, Micromedics, inc. 美国), 然后在压力为 2 个大气压的氮气的作用下雾化喷涂在垂直树立的玻璃板上, 喷涂在玻璃板上的混合溶液几乎不流动, 并很快在玻璃板表面形成均匀的凝胶薄层。

实施例 36 巯基化改性明胶的制备

(1) 明胶的丁二酰羧基化改性

明胶 (B 型, 来自猪皮, Sigma, 美国) 1 克溶解于 100 毫升蒸馏水中 (约 30 摄氏度), 得到澄清透明溶液。用 1.0 摩尔/升的氢氧化钠溶液调节溶液的 pH 值为约 9.5, 然后在电磁搅拌下加入 0.05 克丁二酸酐 (分析纯), 不断加入适量 1.0 摩尔/升的氢氧化钠溶液, 保持溶液的 pH 值在弱碱性 (通常 8.0~9.5)。在约 30 摄氏度下搅拌反应 1 小时。此后上述溶液装入透析管 (截除分子量 3500, Fisher, 美国), 用蒸馏水透析, 每 8 小时换一次透析液; 直至凝胶液相色谱 (GPC) 检测 (纯水为流动相, 紫外 210 纳米吸收检测) 均未发现小分子杂质流出峰。最后收集透析管内的溶液, 冷冻干燥得到白色絮状固体 (丁二酰羧基化明胶) 约 0.7 克。

(2) 丁二酰羧基化明胶的巯基化改性

取上述丁二酰羧基化明胶 0.5 克溶解于 50 毫升蒸馏水中 (约 30 摄氏度)。在上述溶液中加入 1.2 克二硫代二丙酰肼 (按照 Shu 等人在 *Biomacromolecules*, 3, 1304, 2002 中公开的方法制备), 搅拌溶解。然后溶液的 pH 值用 0.1 摩尔/升盐酸调节至 4.75, 加入 0.75 克 1-乙基-3-(3-二甲胺丙基)碳二亚胺盐酸盐 (Aldrich, 美国), 电磁搅拌。在

上述溶液中不断加入适量 0.1 摩尔/升盐酸，使溶液的 pH 值保持在 4.75。电磁搅拌反应 2 小时后，加入 5 克二硫苏糖醇 (Diagnostic Chemical Limited, 美国)和 0.1 摩尔/升的氢氧化钠溶液，搅拌，调节溶液的 pH 值为 8.5。此后室温电磁搅拌反应 24 小时后，在上述溶液中加入 6 摩尔/升的盐酸直至 pH 值为约 3.0。将上述溶液装入透析管 (截除分子量 3500, Sigma, 美国)，用 10 升 0.001 摩尔/升的盐酸和 0.3 摩尔/升的氯化钠溶液透析 5 天，每 8 小时换一次透析液；然后再用 10 升 0.001 摩尔/升的盐酸溶液透析 3 天，每 8 小时换透析液，直至 GPC 检测 (纯水为流动相，紫外 210 纳米吸收检测) 均未发现小分子杂质流出峰。最后收集透析管内的溶液，冷冻干燥得到白色絮状固体约 0.33 克。上述产物溶解于蒸馏水中得到 3.0~5.0% w/v 溶液，调节溶液的 pH 值为 2.0~7.0，过滤除菌后，冷冻保存待用 (通常零下 20 摄氏度以下)。

采用 2,4,6-三硝基苯磺酸 (TNBS) 试剂测定丁二酰羧基化明胶的侧链氨基，约 45% 的氨基被丁二酰羧基化改性。

采用 Shu 等人在 *Biomacromolecules*, 3, 1304, 2002 中报道的改进 Ellman 方法检测丁二酰羧基化和巯基化明胶多重改性衍生物的活性巯基含量: 0.87 毫摩尔巯基/克。

实施例 37 快速凝胶化水凝胶的制备

实施例 36 制备的巯基化改性明胶溶液 (5.0% w/v, pH 值 7.0)。实施例 2 制备的四臂聚乙二醇丙烯酸酯 (平均 3.6 个丙烯酸酯官能团/四臂聚乙二醇分子，分子量 10,000) 溶解于 0.3 摩尔/升的硼酸/氢氧化钠缓冲液得到 4.0% w/v 溶液 (pH 11.0)。在电磁搅拌下，上述一种溶液 (5 毫升) 快速加入另一种溶液 (5 毫升)，继续搅拌 3 秒钟后停止搅拌，反应活性混合溶液在 12 秒内失去流动性形成凝胶。

实施例 38 快速凝胶化水凝胶喷雾剂在术后粘连防治中的应用。

采用 Dunn 等报道的大鼠盲肠模型 (Dunn 等, *Fertility & Sterility*, 75, 411, 2001), 其过程简述如下: 12 个大鼠盲肠的侧面和腹侧面用无菌纱布刮至表面出血，与此相对应的腹壁用手术刀片刮出 1×2 厘米的面积直至表面出血; 实施例 15 制备快速凝胶化水凝胶喷雾剂喷涂在 6 个大鼠的伤口表面及整个腹腔，最后缝合大鼠体表伤口，两周后处死大鼠，解剖观察粘连状况。每个大鼠的水凝胶使用量约为 1.5 毫升，剩余 6 个未治疗大鼠作为对照组。2 周后，大鼠解剖结果表明，对照组全部形成了致密的粘连，而治疗组未发现任何粘连。

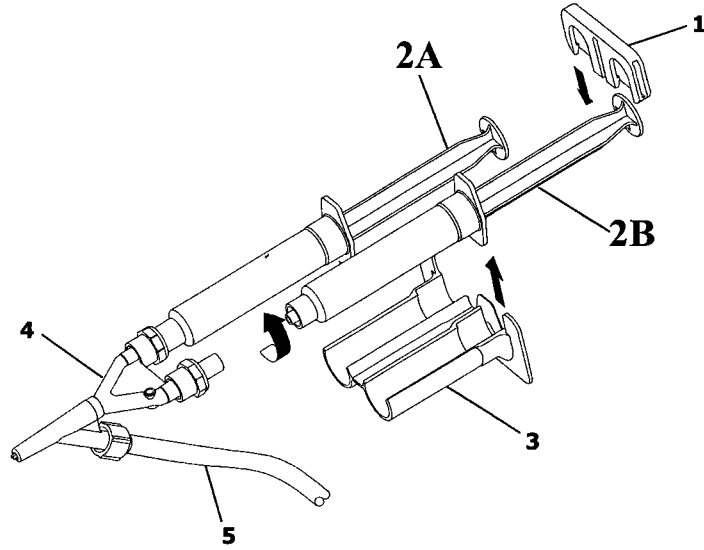


图 1

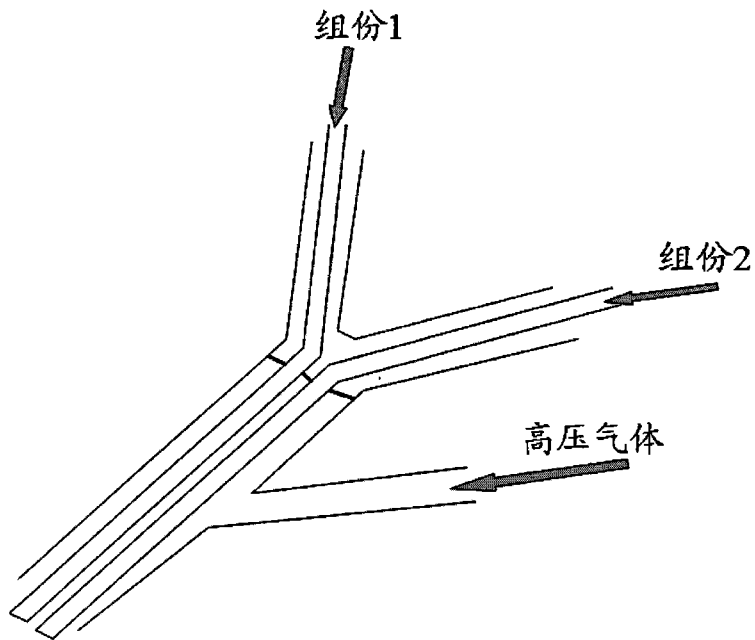


图 2