



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105085708 A

(43) 申请公布日 2015. 11. 25

(21) 申请号 201510432391. 9

(22) 申请日 2015. 07. 22

(71) 申请人 杭州美库生物技术有限公司

地址 310030 浙江省杭州市西湖区振中路
206 号

(72) 发明人 朱江

(74) 专利代理机构 上海旭诚知识产权代理有限
公司 31220

代理人 郑立

(51) Int. Cl.

C08B 37/08(2006. 01)

A61L 31/04(2006. 01)

A61L 24/08(2006. 01)

A61K 47/36(2006. 01)

权利要求书1页 说明书6页

(54) 发明名称

原性透明质酸接枝修饰聚合物及其衍生物的
制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种原性透明质酸接枝修饰聚
合物及其衍生物的制备方法,包括如下步骤:(1)
采用交联剂介导下,对透明质酸进行交联接枝修
饰反应,得到接枝修饰透明质酸;(2)对接枝修饰
透明质酸采用预切割式的温和透析,得到原性透
明质酸接枝修饰聚合物及其衍生物。接枝修饰后
的透明质酸聚合物或衍生物,由于形成了共价交
联网络,其特性表现为溶胀而不溶解。由于透明质
酸中存在大量的亲水基团,如-OH,-CONH₂等,因
此能够吸收并保持大量水分,使重量和体积都有
明显增加。使用预切割式的温和透析改变透明质
酸分子结构,可以调控透明质酸的溶胀度,这些性
质使得原性透明质酸接枝修饰衍生物可广泛应用
于生物医学和药剂学领域。

1. 一种原性透明质酸接枝修饰聚合物及其衍生物的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1) 采用交联剂介导下,对透明质酸进行交联接枝修饰反应,得到接枝修饰透明质酸;

(2) 对所述接枝修饰透明质酸进行预切割式的温和透析,得到原性透明质酸接枝修饰聚合物及其衍生物。

2. 根据权利要求1所述的一种原性透明质酸接枝修饰聚合物及其衍生物的制备方法,其特征在于,所述交联剂和所述透明质酸的用量比例范围为1:50~1:5000。

3. 根据权利要求1所述的一种原性透明质酸接枝修饰聚合物及其衍生物的制备方法,其特征在于,所述交联剂选自环氧化合物、酯类化合物、醚类化合物中的一种。

4. 根据权利要求3所述的一种原性透明质酸接枝修饰聚合物及其衍生物的制备方法,其特征在于,所述交联剂采用1,4-丁二醇二缩水甘油醚。

5. 根据权利要求1所述的一种原性透明质酸接枝修饰聚合物及其衍生物的制备方法,其特征在于,所述交联接枝修饰反应的温度范围在20℃~60℃;其中,在所述交联接枝修饰反应初期,在反应温度 $\geq 30^{\circ}\text{C}$ 条件下保持恒速搅拌或振荡2小时。

6. 根据权利要求1所述的一种原性透明质酸接枝修饰聚合物及其衍生物的制备方法,其特征在于,所述透析中使用的透析液由无机盐和水配制而成,所述无机盐为磷酸盐、硫酸盐或氯化钠,所述水为纯化水或注射用水。

7. 根据权利要求6所述的一种原性透明质酸接枝修饰聚合物及其衍生物的制备方法,其特征在于,所述透析液用量和所述接枝修饰透明质酸用量的比例为500:1~5000:1。

8. 一种透明质酸聚合物及其衍生物与药物分子的包合方法,其特征在于,所述透明质酸聚合物及其衍生物是根据上述权利要求1-7任一项所述的制备方法得到的所述原性透明质酸接枝修饰聚合物及其衍生物;通过静态反应、搅拌反应、机械振荡、超声波振荡之中的一种工艺处理方式将所述透明质酸聚合物及其衍生物与所述药物分子进行包合处理。

9. 根据权利要求8所述的一种透明质酸聚合物及其衍生物与药物分子的包合方法,其特征在于,采用超声波振荡进行所述包合处理,超声波频率范围30kHz~80kHz,超声波处理时间20~120秒,超声波处理次数1~3次。

10. 一种透明质酸聚合物及其衍生物的应用方法,其特征在于,所述透明质酸聚合物及其衍生物是根据上述权利要求1-7任一项所述的制备方法得到的所述原性透明质酸接枝修饰聚合物及其衍生物;所述透明质酸聚合物及其衍生物用作供局部递送生物活性剂的生物医学粘合剂和封闭剂。

原性透明质酸接枝修饰聚合物及其衍生物的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种透明质酸聚合物及其衍生物的制备方法,具体涉及一种原性透明质酸接枝修饰聚合物及其衍生物的制备方法。

背景技术

[0002] 透明质酸是在整个结缔组织、上皮组织和神经组织广泛分布的自然发生、阴离子、非硫酸化糖胺聚糖。体重 70kg 的人在体内大致具有 15 克透明质酸,透明质酸天然存在于身体的许多组织中。因此,其被公认为是生物相容非常好生物医学材料,但由于人体内部含透明质酸降解酶,使得其通常从体内快速被降解,从而影响了其作为生物材料的使用功效。例如,透明质酸钠作为关节功能改善剂已经在临床上得到了良好的应用,但注射入一周内会降解,因此必须每周注射一次。如何保持透明质酸的原性,又克服其在体内被快速降解的缺陷,这就需要在保留透明质酸原性的基础进行接枝修饰。

发明内容

[0003] 有鉴于现有技术的缺陷,本发明所要解决的技术问题是:提供一种原性透明质酸接枝修饰聚合物及其衍生物的制备方法,此方法制备的原性透明质酸接枝修饰聚合物及其衍生物,既能保持透明质酸的原性,又克服其在体内被快速降解的缺陷。

[0004] 本发明采用环氧化物交联剂(如 1,4-丁二醇二缩水甘油醚(BDDE))介导下,对天然透明质酸结构进行交联接枝修饰,并采用预切割式的温和透析,获得具有更优异的物理化学特性,同时保留透明质酸原有良好生物相容性,得到原性透明质酸接枝修饰聚合物及其衍生物。所得聚合物或衍生物可用作供局部递送生物活性剂的生物医学粘合剂和封闭剂,例如,促进伤口愈合剂,抑制细胞生长剂,免疫增强剂,免疫抑制剂,或其他形式生物材料产品,例如,凝胶膜片、凝胶颗粒、生物海绵材料、塑型植入材料等。

[0005] 本发明第一方面,提供了一种原性透明质酸接枝修饰聚合物及其衍生物的制备方法,包括如下步骤:

[0006] (1) 采用交联剂介导下,对透明质酸进行交联接枝修饰反应,得到接枝修饰透明质酸;

[0007] (2) 对接枝修饰透明质酸进行预切割式的温和透析,得到原性透明质酸接枝修饰聚合物及其衍生物。

[0008] 进一步地,交联剂和透明质酸的用量比例范围为 1 : 50 ~ 1 : 5000。

[0009] 进一步地,交联剂选自环氧化合物、酯类化合物、醚类化合物之中的一种。

[0010] 更进一步地,交联剂采用 1,4-丁二醇二缩水甘油醚。

[0011] 进一步地,交联接枝修饰反应的温度范围在 20℃ ~ 60℃;其中,在交联接枝修饰反应初期,在反应温度 $\geq 30^{\circ}\text{C}$ 条件下保持恒速搅拌或振荡 2 小时。

[0012] 进一步地,透析中使用的透析液由无机盐和水配制而成,无机盐为磷酸盐、硫酸盐或氯化钠,水为纯化水或注射用水。

[0013] 更进一步地,透析液用量和接枝修饰透明质酸用量的比例为 500 : 1 ~ 5000 : 1。

[0014] 本发明第二方面,提供了上述透明质酸聚合物及其衍生物与药物分子的包合方法,通过静态反应、搅拌反应、机械振荡、超声波振荡之中的一种工艺处理方式将透明质酸聚合物及其衍生物与药物分子进行包合处理。

[0015] 进一步地,采用超声波振荡进行包合处理,超声波频率范围 30kHz ~ 80kHz,超声波处理时间 20 ~ 120 秒,超声波处理次数 1 ~ 3 次。

[0016] 本发明的第三方面,提供了上述透明质酸聚合物及其衍生物的应用方法,透明质酸聚合物及其衍生物用作供局部递送生物活性剂的生物学粘合剂和封闭剂。

[0017] 本发明的有益效果是:

[0018] (1) 通过对交联接枝修饰和预切割式的温和透析,最终产生原性透明质酸聚合物及衍生物在保持原有透明质酸良好生物相容性的同时,产生均匀的立体网状结构,从而克服了透明质酸在体内易被降解吸收的缺陷。

[0019] (2) 在交联接枝修饰反应完成后,交联反应体系中未使用有机溶剂,对原性透明质酸聚合物及衍生物的后处理带来很大的便利,也大大增加了其使用的安全性。

[0020] (3) 预切割式的温和透析的采用,可较彻底地清除未反应的交联剂,增加了安全性。

[0021] (4) 通过超声波振荡的方法进行药物分子的包合反应,有效地保证了原性透明质酸聚合物及衍生物的包合效率,缩短了包合过程。

具体实施方式

[0022] 下面对本发明的实施例作详细说明,本实施例在以本发明技术方案为前提下进行实施,给出了详细的实施方式和具体的操作过程,但本发明的保护范围不限于下述的实施例。

[0023] 透明质酸与 BDDE 形成衍生化透明质酸 (HA-VS) 的反应

[0024] 接枝修饰后的透明质酸聚合物或衍生物,由于形成了共价交联网络,其特性表现为溶胀而不溶解。由于透明质酸中存在大量的亲水基团,如 -OH, -CONH₂等,因此能够吸收并保持大量水分,使重量和体积都有明显增加。使用预切割式的温和透析改变透明质酸分子结构,可以调控透明质酸的溶胀度,这些性质使得原性透明质酸接枝修饰衍生物可广泛应用于生物医学和药剂学领域。

[0025] HA-OH 基团的改性

[0026] 其中,原性透明质酸接枝修饰聚合物或衍生物包合药物的释放速率主要由其交联度、骨架松弛速率以及水分子扩散进入的速率决定。聚合物或衍生物骨架中某些化学键在特定环境中被酶解或水解,导致聚合物或衍生物骨架从表面或整体开始溶蚀,药物随着骨架的解体而向外释放,以到达缓释和控释的目的。

[0027] 本发明交联反应所选择的交联剂包括环氧化合物、酯类、醚类化合物。

[0028] 本发明中交联剂和反应物的用量比例范围为 1 : 50 ~ 1 : 5000。

[0029] 应用不同的交联剂和反应物的组合,以及不同的用量比例,产生的原性透明质酸接枝修饰聚合物及其衍生物,可用作供局部递送生物活性剂的生物学粘合剂和封闭剂,例如,促进伤口愈合剂,抑制细胞生长剂,免疫增强剂,免疫抑制剂,或其他形式生物材料产

品,例如,凝胶膜片、凝胶颗粒、生物海绵材料、塑型植入材料等。

[0030] 通过反应体系的选择和预切割式的温和透析工艺,保证其原有的生物相容性、安全性和不被体内快速降解,所得聚合物或衍生物可用作供局部递送生物活性剂的生物医学粘合剂和封闭剂,例如,促进伤口愈合剂,抑制细胞生长剂,免疫增强剂,免疫抑制剂,或其他形式生物材料产品,例如,凝胶膜片、凝胶颗粒、生物海绵材料、塑型植入材料等。

[0031] 本发明涉及的交联反应体系,其过程温度应控制在 20℃~60℃。

[0032] 加热装置应能够保证体系温度迅速到达设定温度并保持稳定。随着反应的进行,需要对体系温度进行变化。在体系反应的前期,要求温度不低于 30℃。

[0033] 交联反应的前期需要通过搅拌使反应物和交联剂充分接触。搅拌器的转速在某些情况下会对交联的程度以及网状结构产生影响,因而合适的转速因素应被充分考虑。而搅拌子或搅拌浆的形状会影响反应物和交联剂充分接触的效率,从而对最终交联产物的均一性产生作用。体系反应前期应保持恒速搅拌或者震荡保持 2 小时以上。

[0034] 在某些反应体系中,通过机械振荡的方法使反应物和交联剂充分接触也可以获得理想的效果。

[0035] 本发明中,交联反应可以在体系 pH 值 3.0~10.0 的范围内进行。在反应结束后,应将体系 pH 值调节到 6.5~8.5 的范围内。最终 pH 值的确定与原性透明质酸聚合物或衍生物的使用环境,以及预包合的药物分子相关。

[0036] 调节 pH 值的试剂为无机酸和无机碱。无机酸中常用为盐酸。无机碱中常用为氢氧化钠和氢氧化钾。无机酸和无机碱在使用前,应预先配制成 0.1mol/L~1mol/L。

[0037] 最终制得的原性透明质酸聚合物或衍生物需要经过透析处理过程。

[0038] 透析液由无机盐和水配制而成。其中,无机盐包括磷酸盐、硫酸盐和氯化钠;水为经过严格处理的纯化水或注射用水。

[0039] 透析过程可以是静态的或者是动态的;也可以在整个过程中采用不同的方式。

[0040] 透析液的用量和原性透明质酸量的比例为 500:1~5000:1。

[0041] 透析的均匀程度在整个原性透明质酸聚合物及其衍生物的制备工艺中至关重要。因此有必要对原性透明质酸进行预切割式的温和透析,以保证凝胶和透析液充分地接触。由于交联条件的不同,其透析过程中相应条件也需要调整,充分透析的凝胶才能够达到使用的安全性以及对药物分子的包合力的要求。

[0042] 本发明制备得到的原性透明质酸凝胶可以通过机械力过筛分级方式得不同的聚合物及衍生物。分级过程中使用的特定筛孔结构装置,其材质包括金属或高分子材料,或二种材料的复合物。

[0043] 分级过程中外加机械力由与筛孔结构装置相配合的装置提供,机械力施加过程中应保持均衡,以避免不规则、剧烈的机械力变化可能对筛孔结构装置的影响。

[0044] 根据以上工艺制备获得的原性透明质酸聚合物及其衍生物可以包合治疗性或预防性的药物分子,并在使用中控制药物的释放速率和药物的分布。

[0045] 被包合的药物分子应具有水溶性或兼性分子的特点。

[0046] 药物分子首先充分溶解于水溶液,并与加入的一定量的原性透明质酸聚合物及其衍生物进行包合反应。反应过程中应使药物分子和原性透明质酸聚合物或衍生物充分接触,并使其能够进入网络空间结构的内部。

[0047] 静态或机械振荡或搅拌的方式对原性透明质酸聚合物或衍生物包合反应有较理想的效果,但应对这个反应的时间进行控制,一般控制在 0.5 ~ 3 小时。

[0048] 超声波振荡的方式,能够获得理想的包合效果。

[0049] 应对超声波处理时间和频次进行控制。一般的单次处理时间为 20 ~ 120 秒,而且总的处理次数应不超过 3 次。

[0050] 进入原性透明质酸网络结构内部的药物分子,受到阻隔的作用,其释放速率收到控制。不同规格凝胶对包合的同一药物分子释放表现出不同的控制能力。当不同规格包合药物分子的凝胶以一定的比例组合使用时,其表现出对药物分子释放更高效的控制力。

[0051] 某些原性透明质酸聚合物或衍生物,当植入体内后,受到化学条件、生物酶等因素的作用而逐渐降解、代谢,其应用领域也更广泛。

[0052] 其中,某些透明质酸本身具有生物内源性的特点,可以临时补充或替代内源性成份。透明质酸是一种有代表性的多糖聚合物。这种特点保证了其聚合物或衍生物与生物体解除或植入的安全性,接触或植入的部位包括表皮层和真皮层。

[0053] 实施例 1

[0054] 原性透明质酸聚合物的制备一

[0055] 将 20 克透明质酸溶于 100 毫升 pH 为 8.0 的碱性缓冲液中,保持反应体系温度 35℃,搅拌使均匀,加入交联剂 BDDE,用量为 0.05%。继续搅拌 4 小时,获得原性透明质酸聚合物。

[0056] 实施例 2

[0057] 原性透明质酸聚合物的制备二

[0058] 将 20 克透明质酸溶于 60 毫升 pH 为 9.0 的碱性缓冲液中,保持反应体系温度 30℃,搅拌使均匀,加入交联剂 DVS,用量为 0.08%。继续搅拌 4 小时,获得原性透明质酸聚合物。

[0059] 实施例 3

[0060] 原性透明质酸聚合物的制备三

[0061] 称量 1.1 克透明质酸(平均分子量 230 万),加 10 毫升浓度 0.25M 氢氧化钠稀释,室温下搅拌器内反应 4 小时。边搅拌边在步骤 1 溶液中加入 1.0 毫升 BDDE,50 度恒温水浴 4 小时。取 500 毫升磷酸盐溶液,加入搅拌器,清洗纯化,得到水凝胶。反复冲洗 6 次,静置 2.5 天,滤去多余磷酸盐缓冲液,取出凝胶溶液放入搅拌器搅拌叶搅拌 4 小时。最终得到凝胶重量 55 克,高压灭菌后,灌注入注射器,可用于注射。

[0062] 实施例 4

[0063] 原性透明质酸纤维素的制备

[0064] 碱性条件下,将 20 克纤维素加入 5 倍体积溶液中,搅拌 4 小时使充分溶胀。加入 0.2% 浓度的环氧氯丙烷,保持匀速搅拌使交联反应完全。透析 24 小时以去除未反应交联剂。得到的水凝胶强度较高,具有较好的吸水性能。

[0065] 实施例 5

[0066] 透析液的制备

[0067] 透析液配方一:按每 10L 纯化水或注射用水中加入 Na_2HPO_4 7.55g, NaH_2PO_4 1.50g, NaCl 60.00g,经 0.45um 精密过滤后使用。

[0068] 透析液配方二:按每 10L 纯化水或注射用水中加入 NaOH 2.1g, NaH_2PO_4 3.3g,

NaCl 50.0g, 调节 pH 至 7.5, 经 0.45um 精密过滤后使用。

[0069] 透析液配方三: 按每 10L 纯化水或注射用水中加入 Na_2HPO_4 8.3g, NaH_2PO_4 22.5g, NaCl 60.00g, 调节 pH 至 6.7, 经 0.45um 精密过滤后使用。

[0070] 实施例 6

[0071] 交联透明质酸聚合物的预切割式的温和透析

[0072] 将完成交联反应的透明质酸溶液按 1 : 1000 的比例放入透析液一中, 透析 24 小时, 更换一次透析液。用气相色谱法或高效液相色谱法检测凝胶中的交联剂 BDDE 或 DVS, 符合控制要求。

[0073] 实施例 7

[0074] 原性透明质酸聚合物或衍生物机械力过筛分级

[0075] 选择具有合适孔径的筛孔结构装置, 将制备得到的原性透明质酸放入装置的环形槽中, 均匀分布。启动外机械力装置, 根据孔径规格和过筛凝胶量, 调节外机械力为 0.05 ~ 0.3MPa, 经高倍显微镜检测其粒径, 符合预设不同聚合物或衍生物的要求。

[0076] 实施例 8

[0077] 包合药物分子的原性透明质酸聚合物的制备

[0078] 将药物分子定量溶解, 加入预先制备完成的原性透明质酸聚合物, 采用超声波振荡法混合。选择超声波频率为 30 ~ 80kHz, 单次作用时间为 30 秒, 共作用 2 次, 间隔 5 分钟。过滤获得包合药物分子的原性透明质酸聚合物。

[0079] 实施例 9

[0080] 原性透明质酸尿素衍生物的制备

[0081] 以环氧氯丙烷为交联剂, 制备得到原性透明质酸, 加入尿素水溶液中, 持续搅拌 4 小时, 过滤获得包合尿素的原性透明质酸尿素衍生物。

[0082] 实施例 10

[0083] 原性透明质酸聚合物的释药控制

[0084] 将包含有氢化可的松的原性透明质酸聚合物进行体外及体内释药试验表明: 该聚合物均能被结肠部位特有的葡聚糖酶降解, 并发现调节聚合物的化学组成可控制聚合物在消化液中的膨胀性能和机械强度, 保证药物在胃及小肠内不释放或少量释放。

[0085] 实施例 11

[0086] EDC 介导下原性透明质酸衍生物的制备

[0087] (1) 称量透明质酸干粉 0.3 克 (平均分子量 206 万), 加 30ml 蒸馏水溶解, 室温下静置一夜, 得均匀透明浓度 1% 溶液。

[0088] (2) 称量乙二醇壳聚糖 1.5 克 (平均分子量 50 万), 加 100ml 蒸馏水溶液静置一夜, 得 pH 9.1, 浓度 1.5% 溶液。滤清液。

[0089] (3) 步骤 1 溶液, 加适量浓度为 0.1 摩尔盐酸溶液, 搅拌均匀, 调整 pH 值到 4.0 ~ 4.3 范围。

[0090] (4) 取 17ml 步骤 2 溶液, 加入步骤 3 溶液。得到透明溶液, pH 值 7.2 ~ 7.5 范围。

[0091] (5) 步骤 4 溶液搅拌 30 分钟。

[0092] (6) 称量 0.26 克 1-乙基-3-(二甲胺丙基) 碳二亚胺或 0.17 克 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基) 碳酰二亚胺盐酸盐, 加入 2ml 蒸馏水溶解。

[0093] (7) 步骤 6 溶液加入步骤 5 溶液, 室温下搅拌 4 小时, 得到水凝胶。

[0094] (8) 步骤 7 水凝胶浸泡入 pH 7.4 磷酸盐溶液, 除去残留的试剂, 以及少量小分子。水溶胀度 5400%。

[0095] 以上详细描述了本发明的较佳具体实施例。应当理解, 本领域的普通技术人员无需创造性劳动就可以根据本发明的构思作出诸多修改和变化。因此, 凡本技术领域中技术人员依本发明的构思在现有技术的基础上通过逻辑分析、推理或者有限的实验可以得到的技术方案, 皆应在由权利要求书所确定的保护范围内。