



## (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107522880 B

(45)授权公告日 2020.07.24

(21)申请号 201710650215.1

(74)专利代理机构 北京润平知识产权代理有限公司 11283

(22)申请日 2013.01.25

代理人 李婉婉 刘依云

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 107522880 A

(51)Int.Cl.

C08J 3/24(2006.01)

(43)申请公布日 2017.12.29

C08J 3/075(2006.01)

(30)优先权数据

C08L 5/08(2006.01)

61/590,379 2012.01.25 US

C08B 37/08(2006.01)

(62)分案原申请数据

C08F 299/00(2006.01)

201380014883.5 2013.01.25

C08F 2/48(2006.01)

(73)专利权人 阿克伦大学

(56)对比文件

地址 美国俄亥俄州

WO 2000016818 A1, 2000.03.30,

(72)发明人 N·莱比锡 A·维杰孔

US 2003199687 A1, 2003.10.23,

CN 102083862 A, 2011.06.01,

审查员 梁俊实

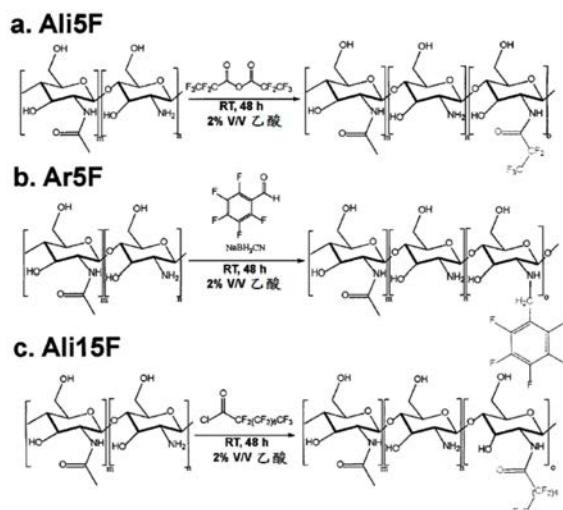
权利要求书6页 说明书22页 附图17页

## (54)发明名称

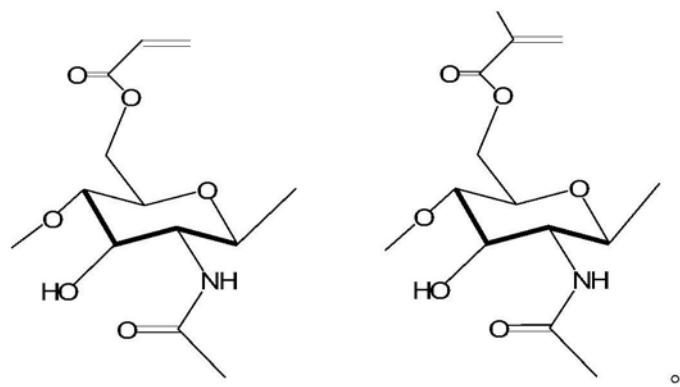
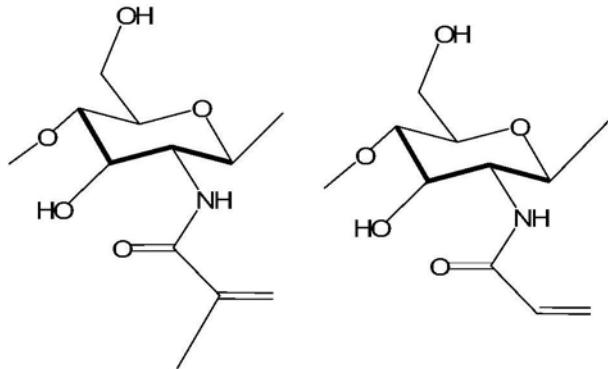
水凝胶及其制备方法

## (57)摘要

本发明属于水凝胶领域,公开了水凝胶及其制备方法。制备水凝胶的方法包括使包含氟侧基和可交联基团的多糖交联。所述水凝胶包含交联多糖,其中所述多糖具有氟侧基。氟化水凝胶用于溶解氧或其他含氧小分子。所述氟化水凝胶可在暴露于低张力环境时释放出所述溶解氧或其他含氧小分子。所述氟化水凝胶在伤口愈合中具有特定的应用,其中所述氟化水凝胶可用作伤口敷料。



1. 一种制备水凝胶的方法, 其特征在于, 该方法包括: 使包含氟侧基和可交联基团的多糖交联; 其中, 所述多糖还包括具有烯烃基团的糖单元, 所述糖单元选自由以下组成的组中:

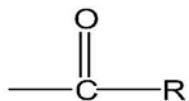


2. 根据权利要求1所述的方法, 其中, 使所述多糖交联的步骤通过光引发法而引发。

3. 根据权利要求1所述的方法, 其中, 所述氟侧基选自:

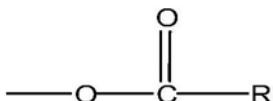
氟烃基;

由下式定义的羰基:



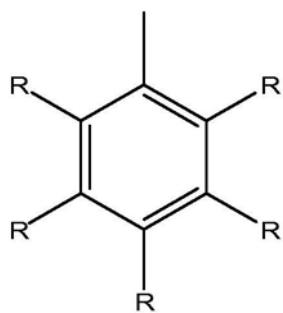
其中R为氟烃基; 以及

由下式定义的羧酸根基团:



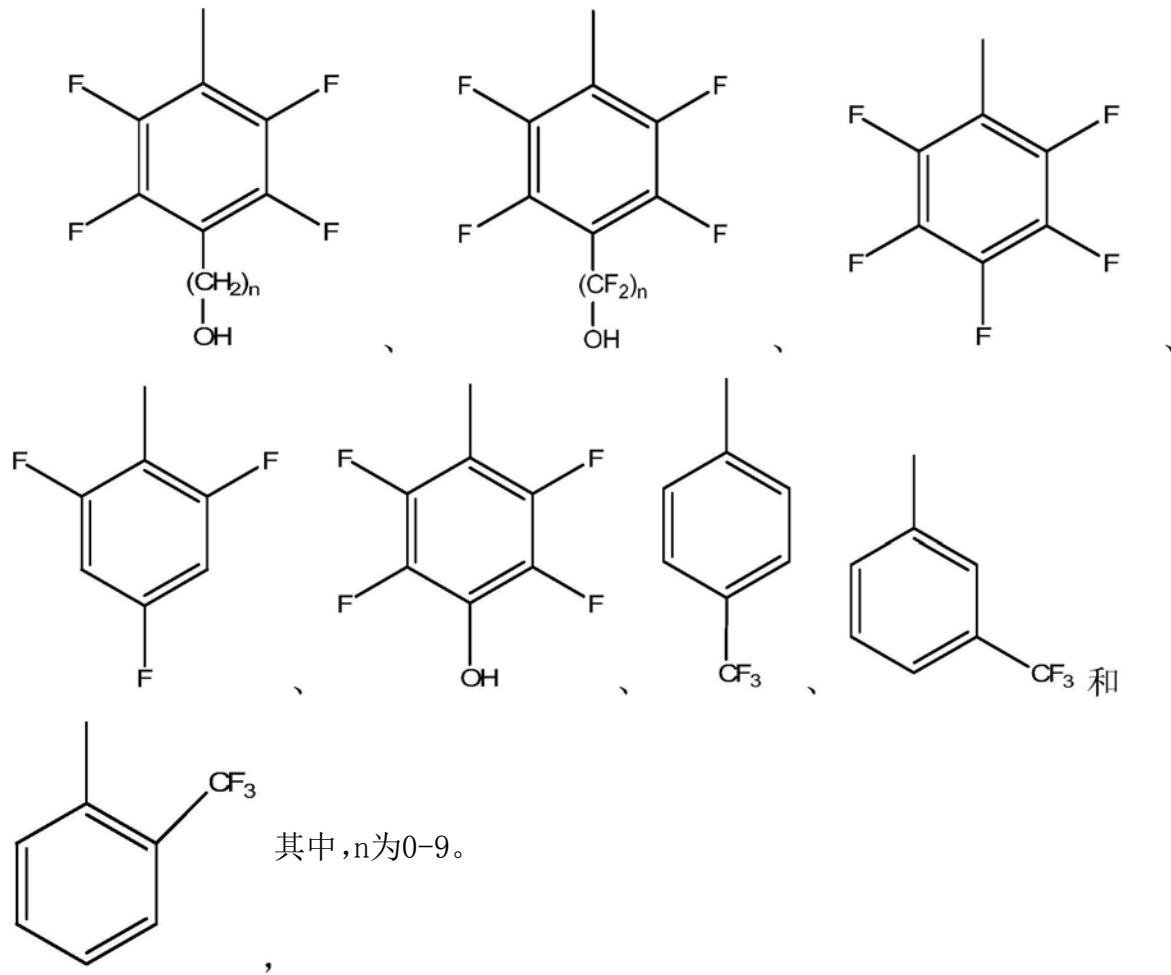
其中R为氟烃基。

4. 根据权利要求1所述的方法, 其中, 所述氟侧基为由下式定义的氟烃基:

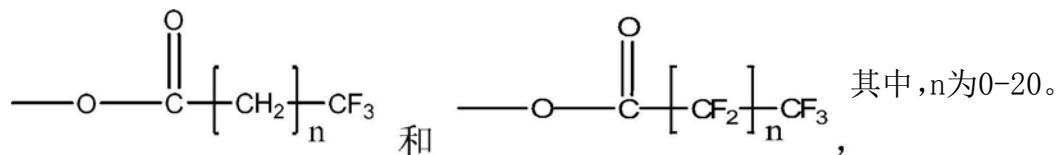


其中各R单独地为氢原子、氟原子、羟基、烃基或氟烃基,且至少一个R为氟原子。

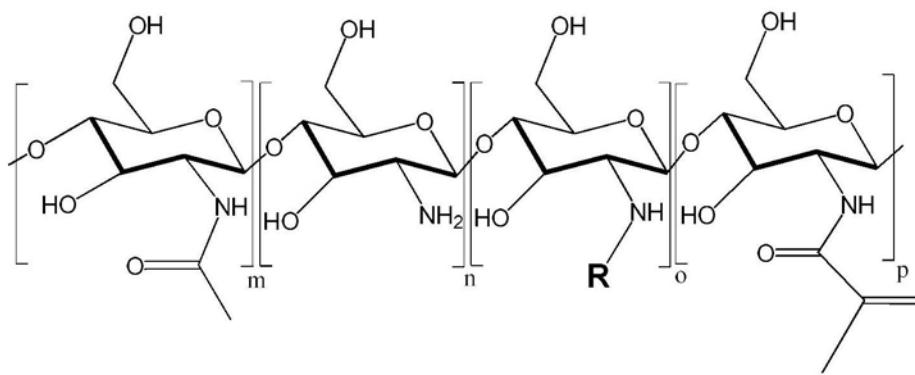
5. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述氟侧基为选自由以下组成的组中的芳族氟烃基:



6. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述氟侧基为选自由以下组成的组中的羧酸根基团:



7. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述多糖为由下式定义的糖单元的无规共聚物:

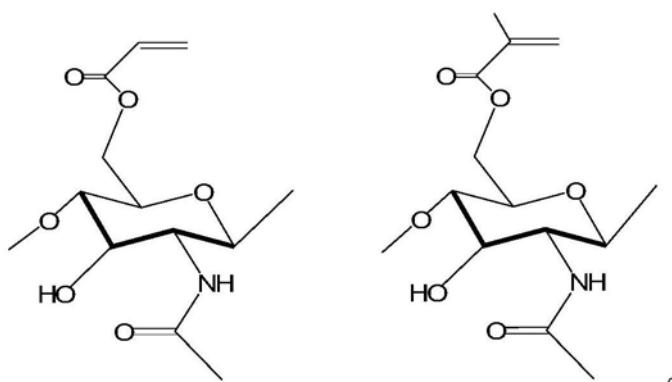
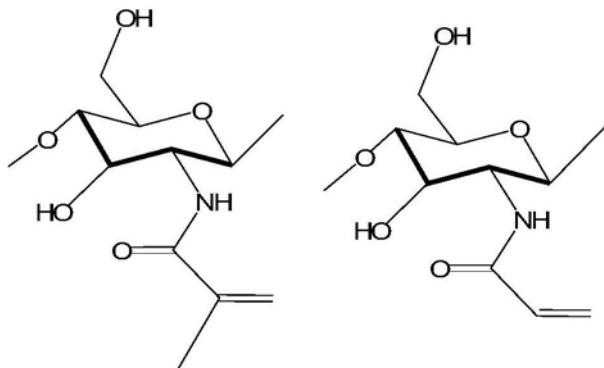


其中, R为氟基团, m为总糖单体单元的10%至20%, n为总糖单体单元的15%至70%, o为总糖单体单元的10%至40%, 并且p为总糖单体单元的10%至25%。

8. 一种水凝胶, 其特征在于, 该水凝胶包含:

交联多糖, 其中所述多糖具有氟侧基;

其中, 所述多糖还包括具有烯烃基团的糖单元, 所述糖单元选自由以下组成的组中:



9. 根据权利要求8所述的水凝胶, 其中, 所述多糖具有乙酰氨基侧基。

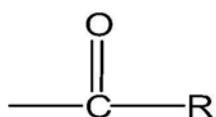
10. 根据权利要求8所述的水凝胶, 其中, 所述多糖具有氨基侧基。

11. 根据权利要求8所述的水凝胶, 其中, 所述多糖选自壳聚糖、葡聚糖、透明质酸、琼脂糖、海藻酸盐、淀粉、纤维素、糖原、角叉菜胶、半乳甘露聚糖以及它们的组合。

12. 根据权利要求8所述的水凝胶, 其中, 所述氟侧基选自:

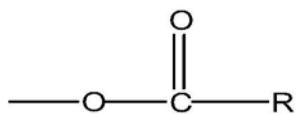
氟烃基;

由下式定义的羰基:



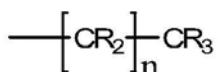
其中R为氟烃基;以及

由下式定义的羧酸根基团:



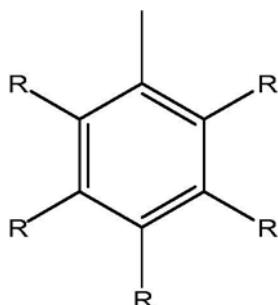
其中R为氟烃基。

13. 根据权利要求12所述的水凝胶,其中,所述氟侧基为由下式定义的氟烃基:



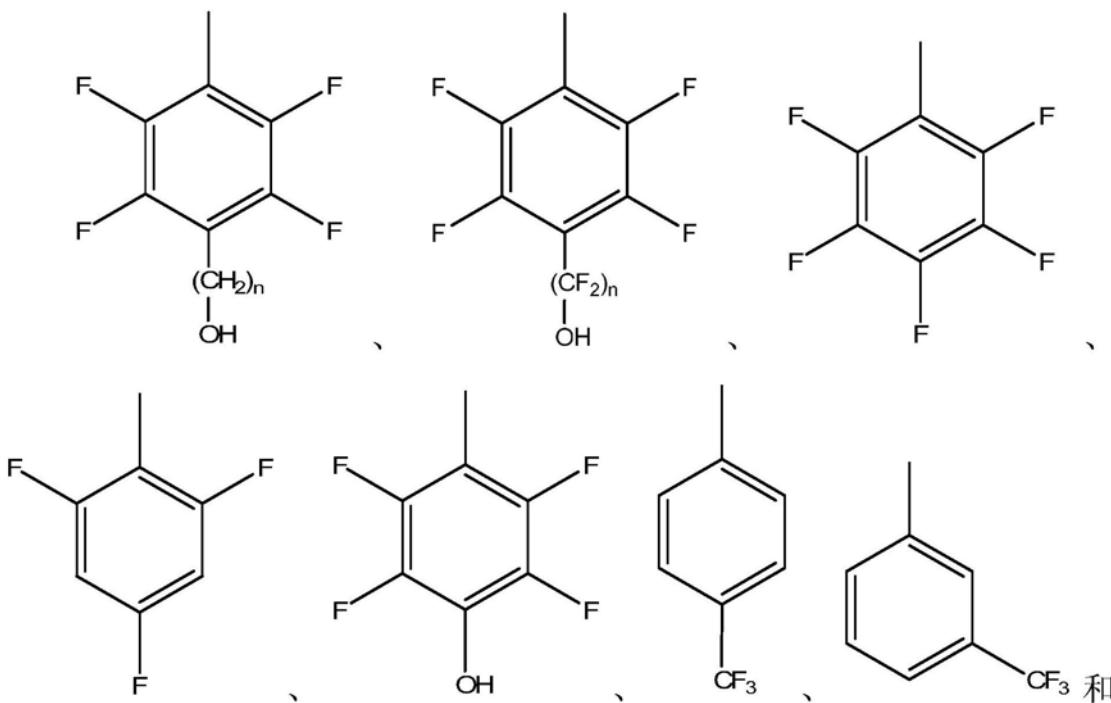
其中各R单独地为氢原子或氟原子,且至少一个R为氟原子。

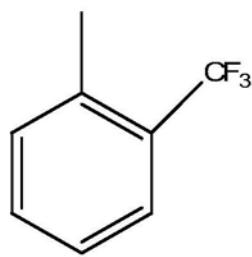
14. 根据权利要求12所述的水凝胶,其中,所述氟侧基为由下式定义的氟烃基:



其中各R单独地为氢原子、氟原子、羟基、烃基或氟烃基,且至少一个R为氟原子。

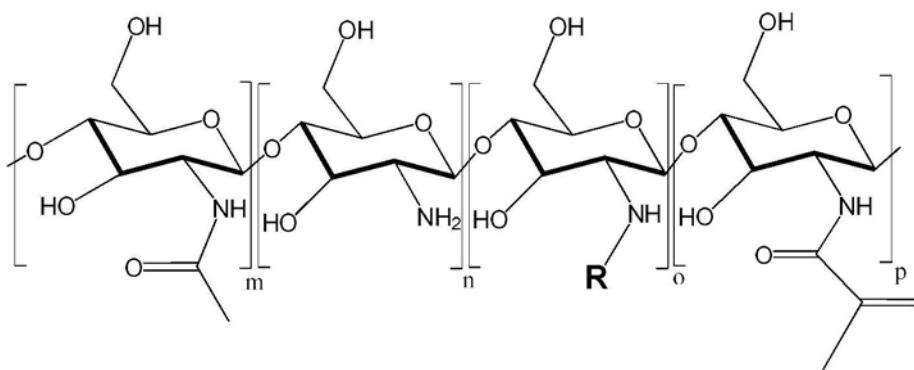
15. 根据权利要求8所述的水凝胶,其中,所述氟侧基为选自由以下组成的组中的芳族氟烃基:





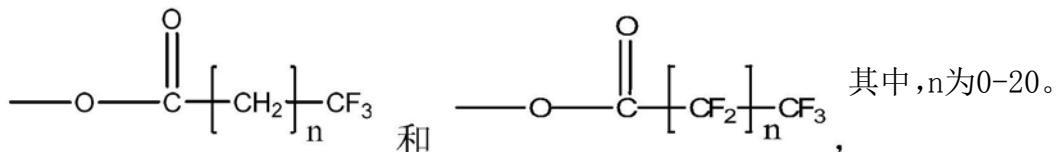
其中,n为0-9。

16. 根据权利要求8所述的水凝胶,其中,所述多糖为由下式定义的糖单元的无规共聚物:



其中,R为氟基团,m为总糖单体单元的10%至20%,n为总糖单体单元的15%至70%,o为总糖单体单元的10%至40%,并且p为总糖单体单元的10%至25%。

17. 根据权利要求8所述的水凝胶,其中,所述氟侧基为选自由以下组成的组中的羧酸根基团:



18. 一种水凝胶,其特征在于,该水凝胶包含:

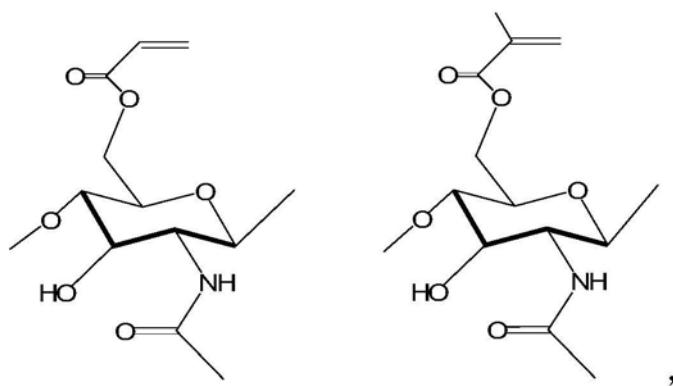
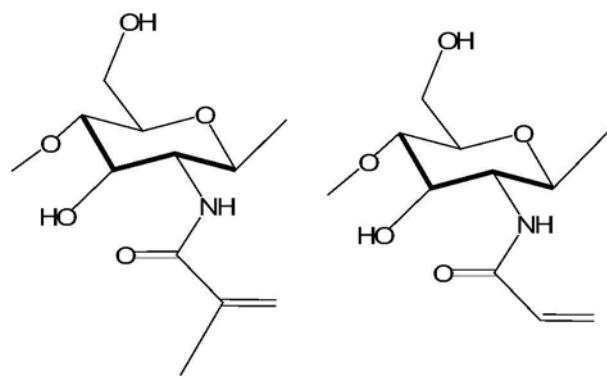
交联多糖,其中所述多糖具有氟侧基;

且所述交联多糖为选自五氟丙酸酐改性的甲基丙烯酰胺壳聚糖、2,3,4,5,6-五氟苯甲醛改性的甲基丙烯酰胺壳聚糖和全氟辛酰氯改性的甲基丙烯酰胺壳聚糖的交联聚合物。

19. 一种水凝胶,其特征在于,该水凝胶包含:

交联多糖,其中所述多糖具有氟侧基;

其中,在交联前,所述多糖还包括具有烯烃基团的糖单元,所述糖单元选自由以下组成的组中:



其中,所述交联多糖中,所述烯烃基团形成共价键交联。

## 水凝胶及其制备方法

[0001] 本申请为申请日为2013年01月25日、申请号为201380014883.5、名称为“用于伤口敷料的氟化聚合性水凝胶及其制备方法”的中国发明专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本专利申请要求于2012年1月25日提交的美国临时专利申请No. 61/590,379的优先权，该临时专利申请的内容以引用方式并入本文。

### 技术领域

[0004] 本发明的一个或多个实施方案涉及氟化水凝胶，制备氟化水凝胶的方法，在氟化水凝胶内加载氧和含氧小分子的方法，从加载的氟化水凝胶释放氧和含氧小分子的方法以及氟化水凝胶的用途。

### 背景技术

[0005] 富氧环境对于伤口愈合以及对于再生医学至关重要。许多实验和临床发现已经确立了氧疗法(高压、局部或敷料)在促进和加速急性与慢性伤口中的组织再生和愈合方面可提供明显的优势。愈合缓慢的大伤口的优选治疗包括清创，这将产生多种不同的结果。已经证实，氧治疗通过增强代谢、细胞外基质(ECM)合成以及从尚待开发的支持基质跨过伤口的氧合而促进愈合。因此，对在伤口护理领域中实现平台技术以支持单个总包装中的再生水平的氧合非常需要。

### 发明内容

[0006] 本发明的第一实施方案提供包含交联聚合物的水凝胶，其中所述聚合物具有氟侧基。

[0007] 第二实施方案提供如在第一实施方案中的水凝胶，其中所述聚合物具有乙酰氨基侧基。

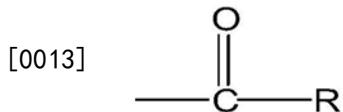
[0008] 第三实施方案提供如在第一实施方案或第二实施方案中的水凝胶，其中所述聚合物具有氨基侧基。

[0009] 第四实施方案提供如在第一至第三实施方案任一者中的水凝胶，其中所述交联聚合物选自聚乙二醇、聚(N-异丙基丙烯酰胺)、聚丙烯酰胺、肽以及它们的组合。

[0010] 第五实施方案提供如在第一至第四实施方案任一者中的水凝胶，其中所述交联聚合物为多糖使得所述氟侧基附接到多糖链。

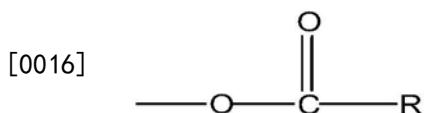
[0011] 第六实施方案提供如在第一至第五实施方案任一者中的水凝胶，其中所述多糖选自壳聚糖、葡聚糖、透明质酸、琼脂糖以及它们的组合。

[0012] 第七实施方案提供如在第一至第六实施方案任一者中的水凝胶，其中所述氟侧基选自氟烃基；由下式定义的羧基：



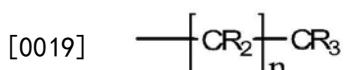
[0014] 其中R为氟烃基;以及

[0015] 由下式定义的羧酸根基团:



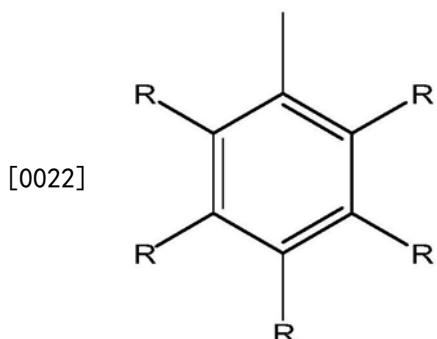
[0017] 其中R为氟烃基。

[0018] 第八实施方案提供如在第一至第七实施方案任一者中的水凝胶,其中所述氟侧基为由下式定义的氟烃基:



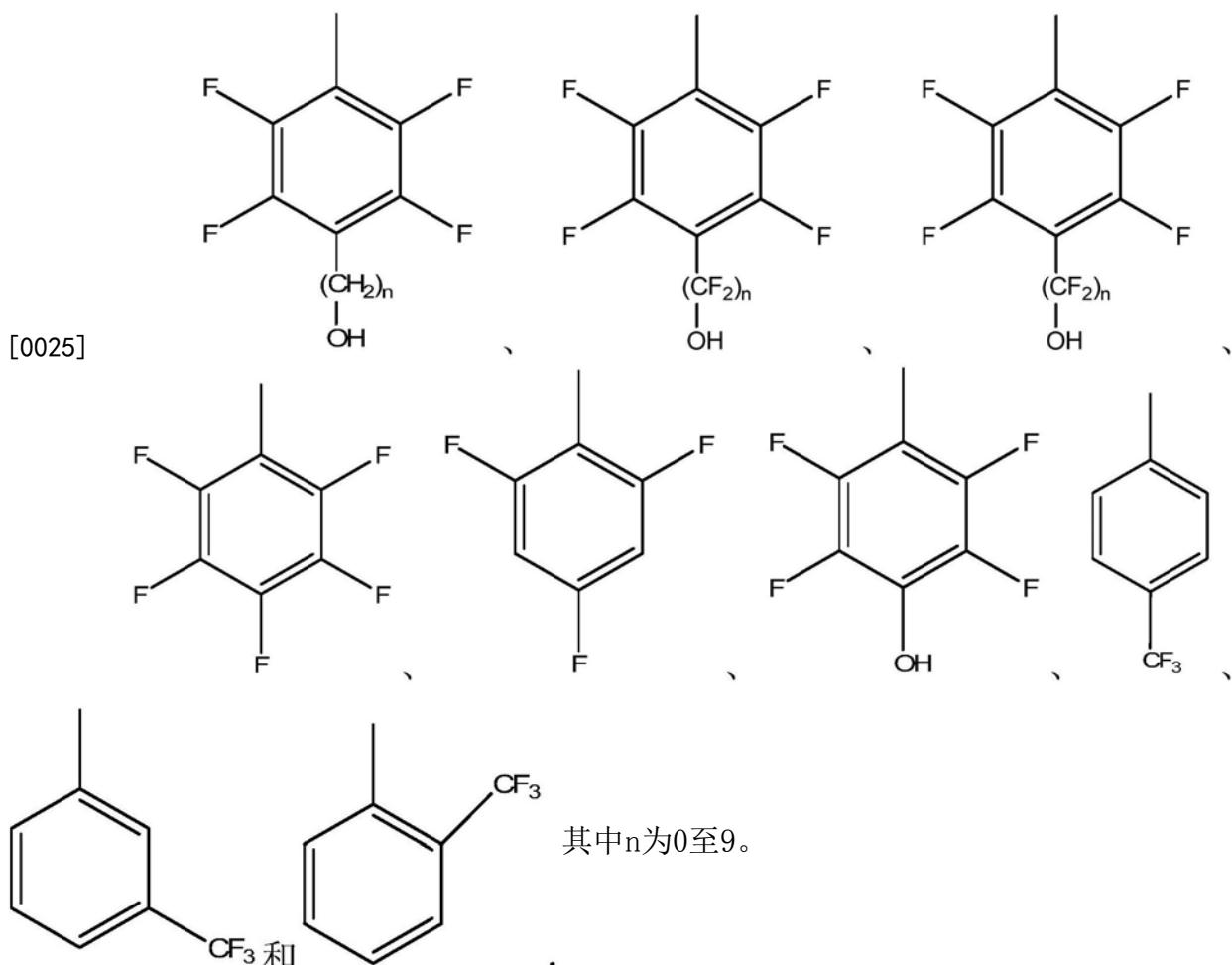
[0020] 其中各R单独地为氢原子或氟原子。

[0021] 第九实施方案提供如在第一至第八实施方案任一者中的水凝胶,其中所述氟侧基为由下式定义的氟烃基:

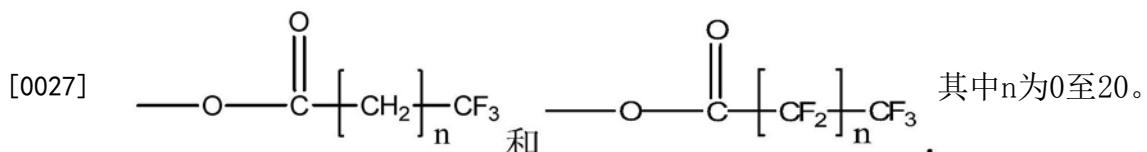


[0023] 其中各R单独地为氢原子、氟原子、羟基、烃基或氟烃基。

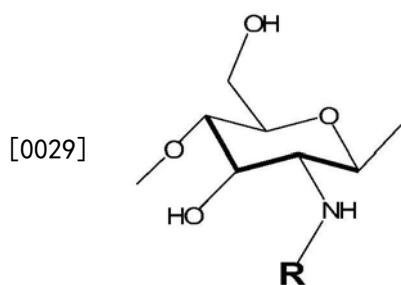
[0024] 第十实施方案提供如在第一至第九实施方案任一者中的水凝胶,其中所述氟侧基为选自以下的芳族氟烃基:



[0026] 第十一实施方案提供如在第一至第十实施方案任一者中的水凝胶,其中所述氟侧基为选自以下的羧酸根基团:



[0028] 第十二实施方案提供如在第一至第十一实施方案任一者中的水凝胶,其中所述氟侧基经由由下式定义的多糖单元附接到多糖链:



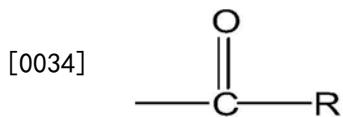
[0030] 其中R为氟基团。

[0031] 第十三实施方案提供制备水凝胶的方法,包括使包含氟侧基和可交联基团的聚合物交联。

[0032] 第十四实施方案提供如在第十三实施方案中的方法,其中使聚合物交联的步骤通

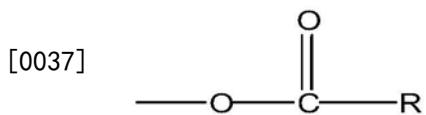
过光引发法引发。

[0033] 第十五实施方案提供如在第十三实施方案或第十四实施方案中的方法,其中所述氟侧基选自氟烃基;由下式定义的羰基:



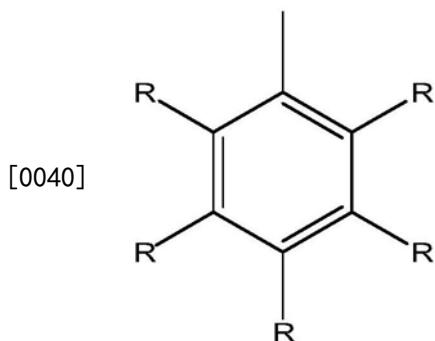
[0035] 其中R为氟烃基;以及

[0036] 由下式定义的羧酸根基团:



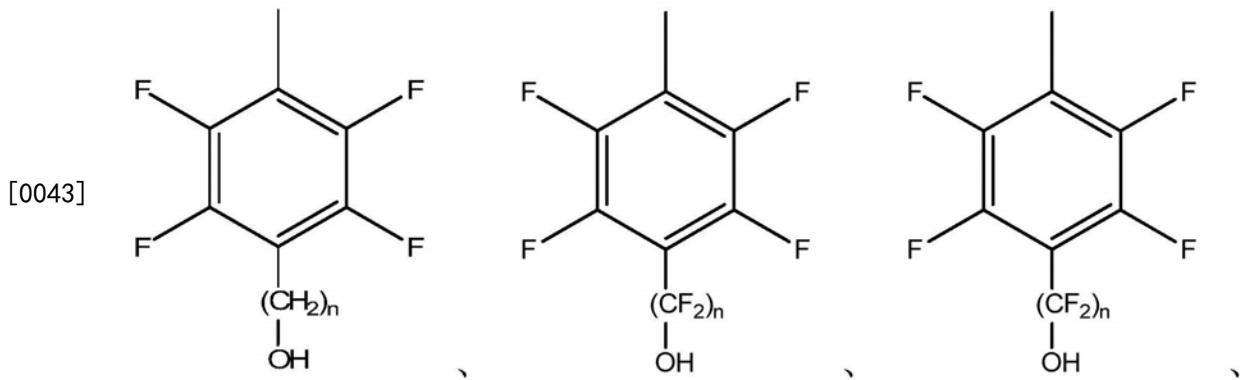
[0038] 其中R为氟烃基。

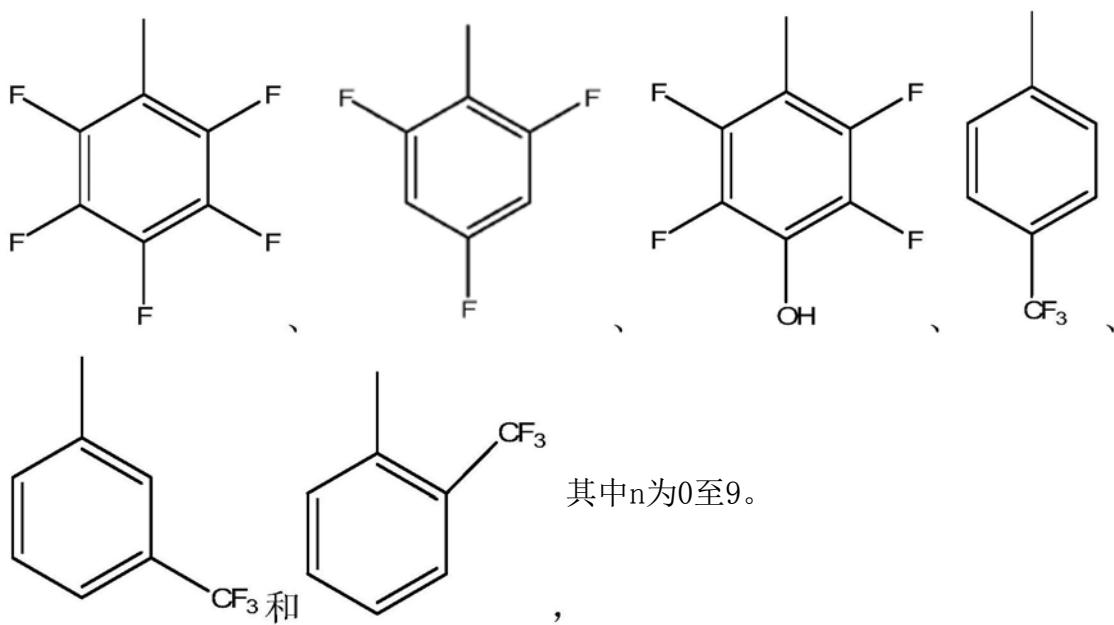
[0039] 第十六实施方案提供如在第十三至第十五实施方案任一者中的方法,其中所述氟侧基为由下式定义的氟烃基:



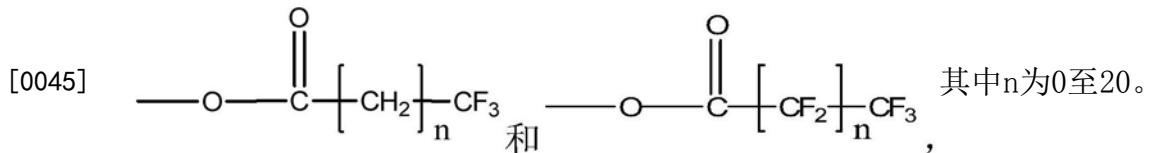
[0041] 其中各R单独地为氢原子、氟原子、羟基、烃基或氟烃基。

[0042] 第十七实施方案提供如在第十三至第十六实施方案任一者中的方法,其中氟侧基为选自以下的芳族氟烃基:





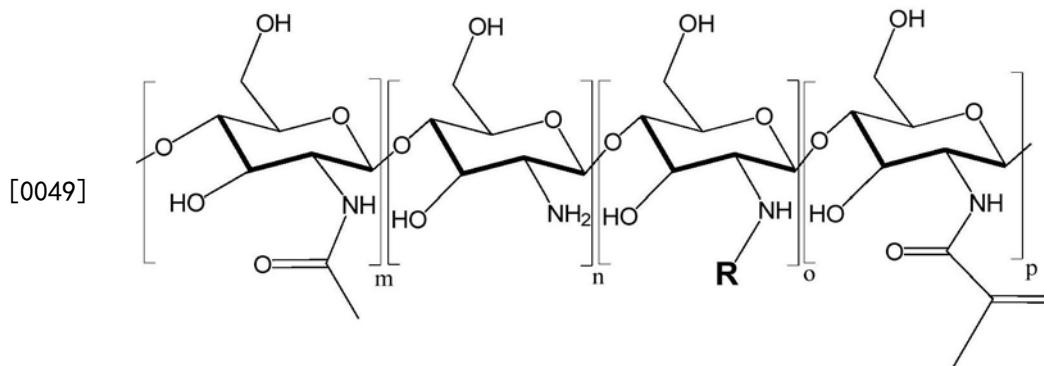
[0044] 第十八实施方案提供如在第十三至第十七实施方案任一者中的方法,其中所述氟侧基为选自以下的羧酸根基团:



[0046] 第十九实施方案提供如在第十三至第十八实施方案任一者中的方法,其中所述交联聚合物选自聚乙二醇、聚(N-异丙基丙烯酰胺)、聚丙烯酰胺、肽以及它们的组合。

[0047] 第二十实施方案提供如在第十三至第十九实施方案任一者中的方法,其中所述聚合物为多糖使得所述氟侧基附接到多糖链,并且所述可交联基团附接到多糖链。

[0048] 第二十一实施方案提供如在第十三至第二十实施方案任一者中的方法,其中所述多糖聚合物为由下式定义的糖单元的无规共聚物:



[0050] 其中R为氟基团,m为总糖单元的约10%至约20%,n为总糖单元的15%至约70%,o为总糖单元的约10%至约40%,并且p为总糖单元的约10%至约25%。

#### 附图说明

[0051] 图1提供形成一个或多个实施方案的合成方法。

[0052] 图2提供形成一个或多个实施方案的合成方法。

[0053] 图3提供氧摄取/释放室的示意图。将端口附接到具有允许开关的阀门的管子。检测点与连接到计算机以采集数据的光学痕量氧传感器交界。

[0054] 图4提供一个或多个实施方案MAC (Al15) F的高分辨率<sup>19</sup>F NMR光谱,从而确认了氟取代。

[0055] 图5提供一个或多个实施方案MAC (Ar5F) 的高分辨率<sup>19</sup>F NMR光谱,从而确认了氟取代。

[0056] 图6提供一个或多个实施方案MAC (Al115) F的高分辨率<sup>19</sup>F NMR光谱,从而确认了氟取代。

[0057] 图7提供了比较和一个或多个实施方案MAC、MAC (Al15) F、MAC (Ar5) F和MAC (Al115) F (I、II、III和IV) 在室温下在5%CO<sub>2</sub>/95%空气中在室温静态条件下的氧摄取。水凝胶由2重量%的MAC或MACF构成,而水凝胶体积为9.6cm<sup>3</sup>。每个数据点表示n=3,平均值±SD。

[0058] 图8提供了比较和一个或多个实施方案MAC、MAC (Al15) F (I\*和II\*) 在室温下在5%CO<sub>2</sub>/95%空气中在室温静态条件下的氧解吸。水凝胶由2重量%的MAC或MACF构成,而水凝胶体积为9.6cm<sup>3</sup>。每个数据点表示n=3,平均值±SD。

[0059] 图9提供了一个或多个实施方案MAC (Ar5) F (III\*) 在室温下在5%CO<sub>2</sub>/95%空气中在室温静态条件下的氧解吸。水凝胶由2重量%的MAC构成,而水凝胶体积为9.6cm<sup>3</sup>。每个数据点表示n=3,平均值±SD。

[0060] 图10提供了一个或多个实施方案MAC (Al15) F (IIII\*) 在室温下在5%CO<sub>2</sub>/95%空气中在室温静态条件下的氧解吸。水凝胶由2重量%的MAC构成,而水凝胶体积为9.6cm<sup>3</sup>。每个数据点表示n=3,平均值±SD。

[0061] 图11提供了一个或多个实施方案MAC (Al15) F的三个反复氧摄取和释放循环,显示了在室温下的摄取 (II) 和相应的释放 (II\*)。每个数据点表示n=3,平均值±SD。

[0062] 图12提供了一个或多个实施方案MAC (Ar5) F的三个反复氧摄取和释放循环,显示了在室温下的摄取 (III) 和相应的释放 (III\*)。每个数据点表示n=3,平均值±SD。

[0063] 图13提供了一个或多个实施方案MAC (Al115) F的三个反复氧摄取和释放循环,显示了在室温下的摄取 (IV) 和相应的释放 (IV\*)。每个数据点表示n=3,平均值±SD。

[0064] 图14提供一个或多个实施方案的成纤维细胞培养物的 (A) MTT代谢和 (B) PicoGreen总dsDNA测定。这些实施方案为:未重新加载氧 (-O<sub>2</sub>) 或以4min天<sup>-1</sup>重新加载氧 (+O<sub>2</sub>) 的MAC (Al15) F、MAC (Ar5) F和MAC (Al115) F,但MAC (Al115) F例外,其接受了4min 4天<sup>-1</sup>。最初,将9.5×10<sup>3</sup>个细胞接种(虚线)到水凝胶上,并在正常条件(5%CO<sub>2</sub>, 37°C)下培养4天。\*\*\*P<0.0001下的显著性差异;\*\*P=0.007下的显著性差异)。分组括号之上的字母通过多因素ANOVA (P<0.0001) 表明彼此显著不同。所有数据n=3,平均值±SD。

[0065] 图15提供了一个或多个实施方案MAC/MAC (Al15) F的曲线图,显示了通过更多的氟和补充氧而增强的代谢。结果报告为与100%MAC-O<sub>2</sub>区相比的倍数变化。\*\*\*三因素ANOVA表明的显著性差异 (P<0.0001)。所有数据n=3,平均值±SD。

[0066] 图16提供了一个或多个实施方案MAC/MAC (Ar5) F的曲线图,显示了通过更多的氟和补充氧而增强的代谢。结果报告为与100%MAC-O<sub>2</sub>区相比的倍数变化。\*\*\*三因素ANOVA表明的显著性差异 (P<0.0001)。所有数据n=3,平均值±SD。

[0067] 图17提供了一个或多个实施方案MAC/MAC (Al115) F的曲线图,显示了通过更多的

氟和补充氧而增强的代谢。结果报告为与100%MAC-0<sub>2</sub>区相比的倍数变化。\*\*\*三因素ANOVA表明的显著性差异 (P<0.0001)。所有数据n=3, 平均值±SD。

### 具体实施方式

[0068] 在一个或多个实施方案中,本发明提供由含有氟侧基的交联聚合物形成的水凝胶。氟允许水凝胶溶解氧,后者随后可从水凝胶中释放到氧浓度较低的区域。在一个或多个实施方案中,该水凝胶可向伤口释放氧。在一个或多个实施方案中,该水凝胶包含乙酰氨基。在这些或其他实施方案中,该水凝胶包含氨基。出于本说明书的目的,由具有氟侧基的交联聚合物形成的水凝胶称为氟化水凝胶。

[0069] 在一个或多个实施方案中,包含氟侧基的交联聚合物为在很大程度上包含水的氟化水凝胶。在一个或多个实施方案中,包含氟侧基的交联聚合物为可包含至少90%的水的氟化水凝胶。在一个或多个实施方案中,包含氟侧基的交联聚合物为可包含至少97%的水的氟化水凝胶。在一个或多个实施方案中,包含氟侧基的交联聚合物为可包含至少99%的水的氟化水凝胶。出于本说明书的目的,包含氟侧基的交联聚合物可称为氟化水凝胶聚合物。

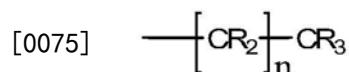
[0070] 通过认识到水凝胶为吸水聚合物基质或交联聚合物,在一个或多个实施方案中,氟化水凝胶为至少部分干燥的交联聚合物,它能够很像海绵一样吸收水性介质。本领域技术人员可将此称之为溶胀行为。至少部分地干燥的氟化水凝胶可称为干燥的氟化水凝胶或海绵。在一个实施方案中,干燥的氟化水凝胶可很大程度地脱水或完全脱水。

[0071] 氟化水凝胶可在从初始环境移动到氧张力较高的环境时吸收氧。氟化水凝胶在暴露于氧张力较低的环境时则可释放氧。

[0072] 以其最广泛的含义,氟基团应被理解为包含至少一个氟原子的基团。在一个或多个实施方案中,氟直接键合到碳原子。在一个或多个实施方案中,氟基团为氟侧基。氟侧基接到聚合物或水凝胶。换句话讲,氟侧基为附接到聚合物或水凝胶的主链的侧链。

[0073] 在一个或多个实施方案中,氟基团可以为氟烃基。在一个或多个实施方案中,氟烃基可以为其中一个或多个氢原子被氟原子取代的烃基。可被氟原子取代的合适的氟烃基包括诸如甲基、乙基、丙基、异丙基、异丁基、叔丁基、正丁基、仲丁基、异戊基、叔戊基、正戊基、仲戊基、叔己基、正己基、异己基和仲己基的烷基。出于本公开的目的,术语氟烃和全氟化碳可互换使用。为了简单起见,全氟化碳可缩写为PFC。

[0074] 在一个或多个实施方案中,氟烃基可由下式定义:

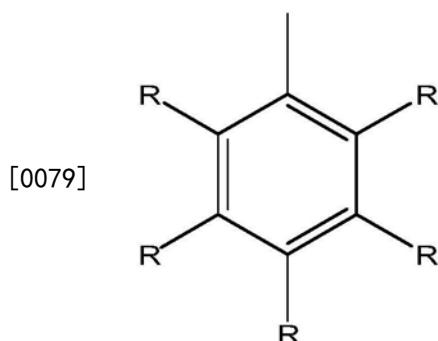


[0076] 其中各R单独地为氢原子或氟原子。在一个或多个实施方案中,n可在0至20的范围内。在一个或多个实施方案中,n可在1至9的范围内。在一个或多个实施方案中,n可在6至8的范围内。

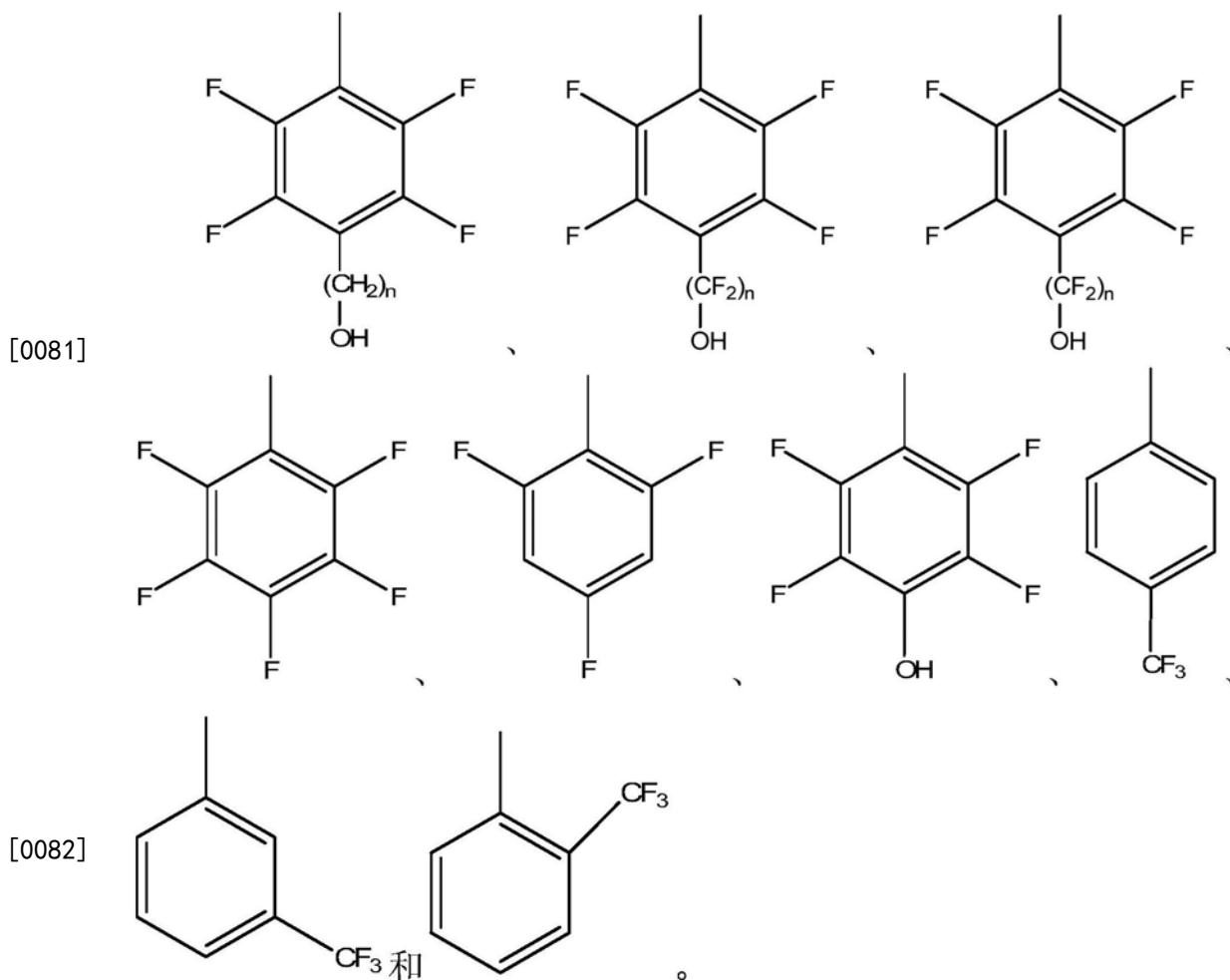
[0077] 氟烃基的具体实例包括-CF<sub>3</sub>、-(CF<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-CF<sub>3</sub>、-(CF<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-CF<sub>3</sub>、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-CF<sub>3</sub>和-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-(CF<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-CF<sub>3</sub>。在一个或多个实施方案中,n可在0至20的范围内。在一个或多个实施方案中,n可在1至9的范围内。在一个或多个实施方案中,n可在6至8的范围内。

[0078] 在一个或多个实施方案中,氟烃可以为芳族氟烃基。在一个或多个实施方案中,芳

族氟烃基可定义为其中一个或多个氢原子被氟原子取代的芳族基团。在一个或多个实施方案中,芳族氟烃基可由下式定义:



[0080] 其中各R单独地为氢原子、氟原子、羟基、烃基或氟烃基。芳族氟烃基的具体实例包括

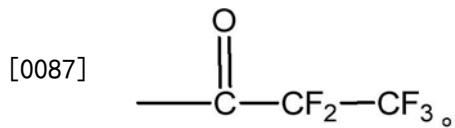


[0083] 在一个或多个实施方案中,n可在0至9的范围内。在一个或多个实施方案中,n可在1至6的范围内。在一个或多个实施方案中,n可在2至4的范围内。

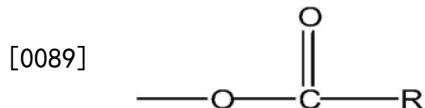
[0084] 在一个或多个实施方案中,氟基团可以为由下式定义的羰基:



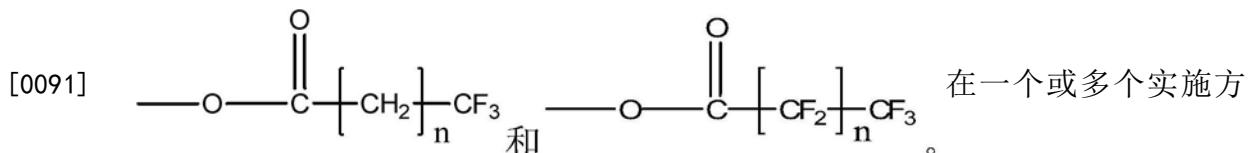
[0086] 其中R为氟烃基。由上式定义的羰基的具体实例包括



[0088] 在一个或多个实施方案中,氟基团可以为由下式定义的羧酸根基团:



[0090] 其中R为氟烃基。由上式定义的羧酸根基团的具体实例包括



[0092] 在一个或多个实施方案中,氟基团可首先附接到可任选地与其他共聚单体聚合的单体。在其他实施方案中,氟烃基可附接到预先形成的聚合物或水凝胶。

[0093] 在一个或多个实施方案中,氟基团可附接到包含可反应部分的单体、聚合物或水凝胶。合适的可反应部分包括羟基、氨基、羧酸基团、巯基、马来酰亚胺基团和酪氨酸基团。在这些或其他实施方案中,氟化合物通过可反应部分附接到单体、聚合物或水凝胶。合适的氟化合物可选自包含氟基团以及选自卤素基团、羧酸基团、醇基团、醛基团和酰基卤的基团的化合物。其他合适的氟化合物为氟化羧酸的酸酐。

[0094] 在一个或多个实施方案中,氟化水凝胶可通过使包含氟基团和能够交联的基团的聚合物交联而形成。在一个或多个实施方案中,能够交联的基团可首先附接到可任选地与其他共聚单体聚合的单体。在这些或其他实施方案中,氟化基团可附接到单体并与能够在聚合后交联或加成的基团共聚。在其他实施方案中,能够交联的基团可附接到预先形成的聚合物。在这些或其他实施方案中,聚合物可以已经含有氟化基团。在一个或多个实施方案中,氟化水凝胶可在形成水凝胶之前或之后附接。

[0095] 在一个或多个实施方案中,氟化水凝胶可通过用自由基引发剂使聚合物交联而制备。合适的自由基引发剂包括偶氮化合物和有机过氧化物。自由基引发剂的实例可包括过硫酸铵和焦亚硫酸钠,或固定剂,比如戊二醛、甲醛、丙酮、甲醇和乙醇。

[0096] 在某些实施方案中,用于使聚合物交联的自由基引发剂可以为光引发剂。在这些或其他实施方案中,氟化水凝胶可通过使交联剂暴露于光以引发交联反应而制备。合适的光引发剂包括常用于生物应用的光引发剂。光引发剂的实例包括4-(2-羟基乙氧基)苯基-(2-羟基-2-丙基)甲酮、1-羟基环己基苯甲酮和2,2-二甲氧基-1,2-二(苯基)乙酮。

[0097] 在一个或多个实施方案中,能够交联的基团为烯烃基团。在一个或多个实施方案中,烯烃基团为包含至少一个碳碳双键的烃基或取代的烃基。取代的烃基包括其中碳或氢被杂原子代替的基团。示例性杂原子包括氮、氧、硫、磷、氯、溴和碘。在一个或多个实施方案中,烯烃基团为乙烯基。在一个或多个实施方案中,烯烃基团为 $\alpha,\beta$ -不饱和羰基。烯烃基团的具体实例包括甲基丙烯酸或丙烯酸基团。

[0098] 在某些实施方案中,水凝胶可通过迈克尔加成使聚合物交联而制备。在这些或其他实施方案中,具有至少两个亲核基团的交联分子可使含有烯烃基团的聚合物交联。交联分子可以为具有至少两个巯基的分子。

[0099] 在一个或多个实施方案中,能够交联的基团为巯基。本领域技术人员将会认识到巯基也可以称为硫醇基团。交联可以经由通过巯基(-SH)的氧化形成的二硫键而实现。在一个或多个实施方案中,可添加具有巯基封端的任一末端的单独的交联分子以经由两个二硫键的形成而使聚合物链交联在一起。单独的交联分子的实例包括但不限于短氨基酸序列/肽、PEG、烃链。pH在3与8之间的含水条件对于稳定的共价键形成是优选的。

[0100] 在一个或多个实施方案中,巯基可与另一聚合物链或单独的交联剂分子上的烯烃基团反应以形成共价键交联。本领域技术人员将之称为迈克尔加成或迈克尔反应。pH在3与8之间的含水条件对于稳定的共价键形成是优选的。

[0101] 在一个或多个实施方案中,巯基可与另一聚合物链或单独的交联剂分子上的马来酰亚胺基团反应以形成共价键交联。pH在3与8之间的含水条件对于稳定的共价键形成是优选的。

[0102] 在一个或多个实施方案中,能够交联的基团为酪氨酸基团。酪氨酸基团可与另一聚合物链或单独的交联剂分子上的酪氨酸基团反应以形成共价键交联。合适的交联条件是存在1-50mM的辣根过氧化物酶和过氧化物(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)。

[0103] 在一个或多个实施方案中,氟化水凝胶通过使包含可交联基团和氟基团的聚合物交联而制备。在一个或多个实施方案中,聚合物还包含乙酰氨基。在一个或多个实施方案中,乙酰氨基可侧接到聚合物。在这些或其他实施方案中,聚合物还包含氨基。在一个或多个实施方案中,氨基可侧接到聚合物。在一个或多个实施方案中,聚合物为水溶性的。

[0104] 在一个或多个实施方案中,可交联基团与氟基团的比率为约1:1至1:5或5:1。在一个或多个实施方案中,可交联基团与氟基团的比率为约1:1至1:3或3:1。在一个或多个实施方案中,可交联基团与氟基团的比率为约1:1至1:2或2:1。

[0105] 氟基团的量也可以联想到被取代的基团的百分比。在一个或多个实施方案中,包含可交联基团和氟基团的聚合物可以包含10%至25%的可交联基团和10%至40%的氟基团。在一个或多个实施方案中,如果包含可交联基团和氟基团的聚合物还包含乙酰氨基,则乙酰氨基可以最多20%的量存在。在一个或多个实施方案中,如果包含可交联基团和氟基团的聚合物还包含氨基,则氨基可以15%至70%的量存在。

[0106] 在一个或多个实施方案中,聚合物具有约5,000至40,000Da的平均分子量。在一个或多个实施方案中,聚合物具有约10,000至30,000Da的平均分子量。在一个或多个实施方案中,聚合物具有约15,000至25,000Da的平均分子量。

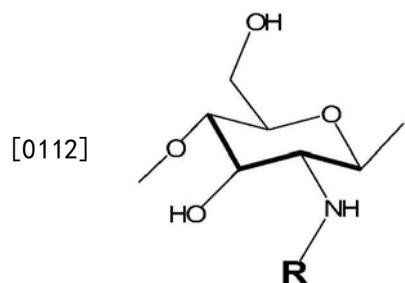
[0107] 在一个或多个实施方案中,聚合物包括具有可反应部分的那些。合适的可反应部分包括羟基、氨基、羧酸基团、巯基、马来酰亚胺基团和酪氨酸基团或它们的组合。

[0108] 示例性聚合物包括聚乙二醇、聚(N-异丙基丙烯酰胺)、聚丙烯酰胺、肽或它们的组合。

[0109] 在一个或多个实施方案中,聚合物可以为多糖。示例性多糖包括壳聚糖、葡聚糖、透明质酸、琼脂糖、海藻酸盐、淀粉、纤维素、糖原、角叉菜胶、半乳甘露聚糖以及它们的组合。

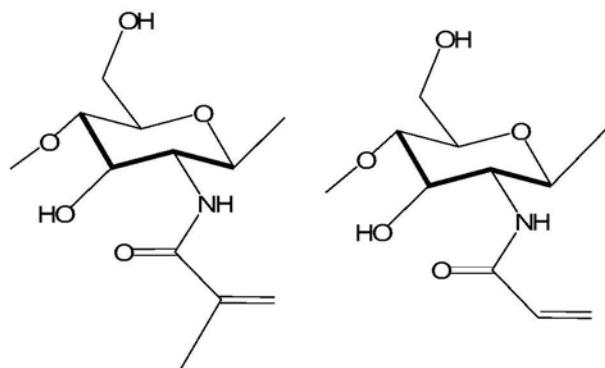
[0110] 在一个或多个实施方案中,多糖由聚合的糖单元构成。出于本说明书的目的,糖单元为多糖聚合物的mer单元。在一个或多个实施方案中,多糖聚合物可由具有官能团的糖单元构成。在这些或其他实施方案中,多糖聚合物可包含含有氟烃基的糖单元和含有烯烃基团的糖单元。在一个或多个实施方案中,多糖聚合物还可以包含含有乙酰氨基的糖单元。在这些或其他实施方案中,多糖聚合物还可以包含含有氨基的糖单元。

[0111] 在一个或多个实施方案中,多糖可包含由下式定义的含有氟烃基的糖单元:

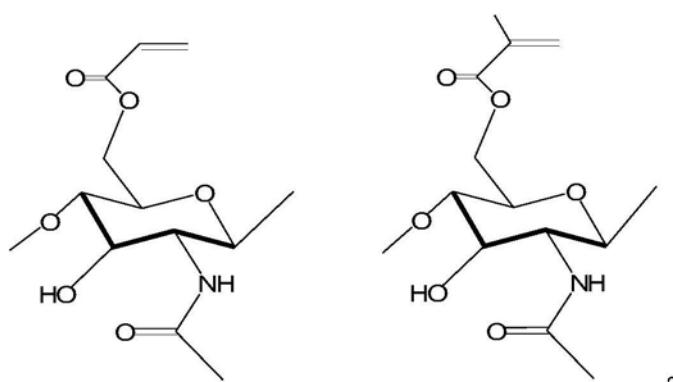


[0113] 其中R为氟基团。

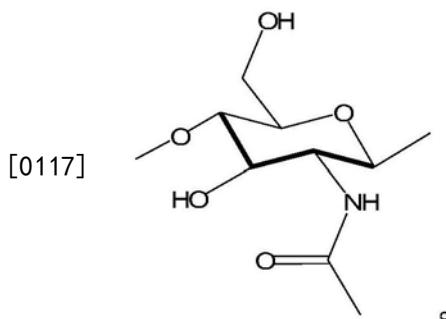
[0114] 在一个或多个实施方案中,多糖可包含由下式之一定义的含有烯烃基团的糖单元:



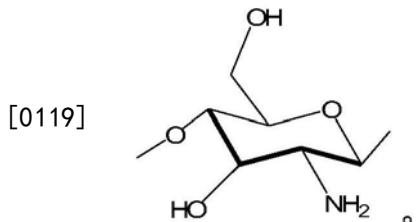
[0115]



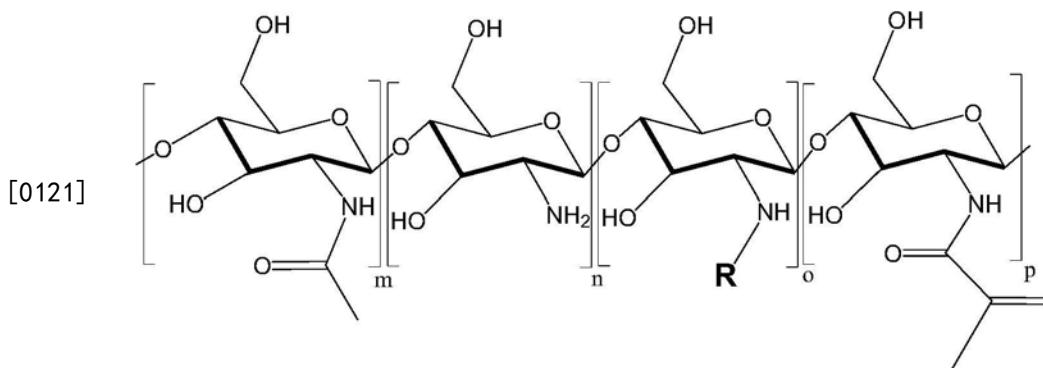
[0116] 在一个或多个实施方案中,多糖可包含由下式定义的含有乙酰氨基的糖单元:



[0118] 在一个或多个实施方案中,多糖可包含由下式定义的含有氨基的糖单元:



[0120] 在一个或多个实施方案中,多糖聚合物为由下式定义的糖单元的无规共聚物:



[0122] 其中R为氟基团,m为总糖单元的约0%至约20%,n为总糖单元的15%至约70%,o为总糖单元的约10%至约40%,并且p为总糖单元的约10%至约25%。

[0123] 在一个或多个实施方案中,氟化水凝胶可通过以下方式加载氧:将包含含有氟侧基的交联聚合物的氟化水凝胶或脱水聚合物海绵置于水溶液中。在添加包含含有氟侧基的交联聚合物的氟化水凝胶或脱水聚合物海绵之前或期间,可通过以下方式向水溶液中添加氧:向溶液中鼓入氧气或添加接触聚合物的含氧溶液。含氟水凝胶还可以通过以下方式加载氧:增大氟化水凝胶周围环境中的氧气的分压。

[0124] 在一个或多个实施方案中,氟化水凝胶具有摄氧能力。摄氧能力是指每单位质量的干燥氟化水凝胶所对应的由氟化水凝胶吸收的氧的分压。在一个或多个实施方案中,氟化水凝胶在20℃和760mmHg下可以具有至少2mmHg氧分压( $PO_2$ )/mg聚合物的摄氧能力。在一个或多个实施方案中,氟化水凝胶在20℃和760mmHg下可以具有至少20mmHg  $PO_2$ /mg聚合物的摄氧能力。在一个或多个实施方案中,氟化水凝胶在20℃和760mmHg下可以具有至少20mmHg  $PO_2$ /mg聚合物的摄氧能力。

[0125] 氟化水凝胶的使用是有利的,因为氟化水凝胶可反复加载溶解氧然后释放所述氧。氟化水凝胶加载溶解氧的能力可称为再生循环。在一个或多个实施方案中,氟化水凝胶可经历3个或更多个再生循环,而氧容量损失低于10%。在一个或多个实施方案中,氟化水

凝胶可经历3个或更多个再生循环,而氧容量损失低于7%。在一个或多个实施方案中,氟化水凝胶可经历3个或更多个再生循环,而氧容量损失低于5%。

[0126] 在一个或多个实施方案中,氟化水凝胶的氧溶解度可比非氟化水凝胶的氧溶解度提高至少一个数量级。氧溶解度可以用溶解氧传感器或其他既定的比色法加以测量。

[0127] 氟化水凝胶通过扩散而溶解O<sub>2</sub>以及其他含氧物质,诸如CO<sub>2</sub>、CO和NO。因此,氟化水凝胶不仅可用于递送氧,还可用于清除二氧化碳废气或减少反应性氧物质。氟化水凝胶的氟化基团还可用于单独地或与O<sub>2</sub>相结合溶解其他分子,诸如CO<sub>2</sub>、CO或NO。例如,可制备向伤口同时施加NO和O<sub>2</sub>的伤口敷料。

[0128] 在一个或多个实施方案中,氟化水凝胶具有有利的止血性质。在这些或其他实施方案中,氟化水凝胶可包含胺基。据信,壳聚糖上游离伯胺的净正电荷导致更多的蛋白吸附,这将驱动血小板募集和整个愈合通路。

[0129] 在一个或多个实施方案中,氟化水凝胶或海绵可用于制备伤口敷料。可将氟化水凝胶或海绵切割成形以制备伤口敷料。或者,可将包含可交联基团和氟侧基的聚合物置于模具中然后交联。

[0130] 在一个或多个实施方案中,可使由氟化水凝胶制备的伤口敷料加载氧然后密封在气密包装中。然后可在无氧损失的情况下储存伤口敷料,并在随后置于伤口部位上。

[0131] 在一个或多个实施方案中,伤口敷料可通过以下方式制备:将含有氟侧基的聚合物施用到伤口部位,然后使聚合物交联以在伤口部位制备氟化水凝胶。可在交联步骤之前或之后使氟化水凝胶加载氧。

[0132] 在一个或多个实施方案中,伤口敷料可由包含含有氟侧基的交联聚合物的海绵制备。在一个或多个实施方案中,可使由海绵制备的伤口敷料水化然后施加到伤口。在其他实施方案中,由海绵制备的伤口敷料可通过伤口分泌的水分而水化。

[0133] 伤口敷料可任选地具有背衬。在一个或多个实施方案中,伤口敷料背衬可提供一个或多个有利的特征,诸如刚度不可渗透(rigidity impermeable)的气体交换以及与敞开大气环境有限的气体交换。在这些或其他实施方案中,可将粘合剂施加到伤口敷料的背衬上。

[0134] 在一个或多个实施方案中,氟化水凝胶的氧加载可通过化学方式发生。在这些或其他实施方案中,可将金属过氧化物与水凝胶结合使用以在水化时产生氧。适于在水化时产生氧的金属过氧化物的实例包括CaO<sub>2</sub>、MgO<sub>2</sub>以及它们的组合。

[0135] 在特定实施方案中,可将金属过氧化物置于密封膜中,在水化时,该金属过氧化物将反应而形成并释放氧。密封膜可附接到氟化水凝胶。例如,可制备包含附接到干燥水凝胶的密封膜的伤口敷料。该伤口敷料可任选地包含背衬。在使膜和干燥的氟化水凝胶水化时,形成并释放氧。氧然后可被氟化水凝胶溶解。也可以单独地包括密封膜,然后施加到水凝胶。

[0136] 在一个或多个实施方案中,可将金属过氧化物包含在氟化水凝胶中。例如,金属过氧化物可在交联时一道包封在水凝胶中。

[0137] 根据前述内容,应当认识到,本发明通过提供以多种方式在结构和功能上得以改进的氟化水凝胶而大大推动了现有技术。虽然已在本文详细公开了本发明的特定实施方案,但是应当认识到,本发明不限于此或这些方面,因为本领域的普通技术人员将容易地认

识到本发明的变型形式。本发明的范围应通过以下权利要求书而认识到。

[0138] 实施例

[0139] 1. 材料和方法

[0140] 通过以下方式合成了光致聚合型甲基丙烯酰胺壳聚糖(MAC)：用甲基丙烯酸酐(Sigma)对中分子量壳聚糖(MW 190,000-230,000Da, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)改性以得到含有23%甲基丙烯酸基团的MAC。壳聚糖的脱乙酰化程度通过如前人所述的<sup>1</sup>H NMR测定，并测得为84%。简而言之，将MAC以0.5% (w/v) 溶于0.25% DC1的D2O溶液，然后记录<sup>1</sup>H NMR光谱(Varian 400MHz NMR光谱仪, Palo Alto, CA)。甲基丙烯酰化程度通过将2.8-4.0p.p.m.的H2-H6峰的积分面积与5.6和6.0p.p.m.的亚甲基峰的积分面积相比较而计算。为了添加PFC部分，首先将壳聚糖用氟化配体(五氟丙酸酐、2,3,4,5,6-五氟苯甲醛和全氟辛酰氯)(Sigma-Aldrich)改性，然后用甲基丙烯酸酐改性以得到氟化甲基丙烯酰胺壳聚糖(MACF)。构思合成方法(图1和图2)以使得能够通过自由基聚合形成MACF水凝胶。

[0141] 1.1. 五氟丙酸酐改性的甲基丙烯酰胺壳聚糖(MAC (Al15) F)的制备

[0142] 首先将壳聚糖以3%w/v溶于2体积%的乙酸/水。对之前报道的合成方法进行修改以制备MAC (Al15) F。对于反应，将0.141M的五氟丙酸酐加入壳聚糖溶液，然后在低速(60rpm)和室温(RT)下搅拌48h。然后将该溶液置于透析膜(12,000-14,000截留分子量Spectra/Por, Spectrum Labs, Rancho Dominguez, CA)中，用去离子水透析3天(每天更换三次)，然后冻干。将该产物溶于2体积%的乙酸/水中，如上所述用甲基丙烯酸酐改性，然后冷冻干燥得到MAC (Al15) F。

[0143] 1.2.2,3,4,5,6-五氟苯甲醛改性的甲基丙烯酰胺壳聚糖(MAC (Ar5) F)的制备

[0144] 首先将0.04M 2,3,4,5,6-五氟苯甲醛和0.085M氰基硼氢化钠与10mL100%甲醇混合。然后将10.58g 3%w/v的壳聚糖/乙酸溶液加入，以低速(60rpm)在室温下搅拌48h。该合成方法基于之前报道的工作。然后将该反应混合物用去离子水透析3天(每天更换三次)，然后冻干。将含有壳聚糖的冻干产物溶于2体积%的乙酸/水，并与甲基丙烯酸酐进一步反应以得到MAC (Ar5) F。

[0145] 1.3. 全氟辛酰氯改性的甲基丙烯酰胺壳聚糖(MAC (Al15) F)的制备

[0146] 将21.53g 3%w/v的壳聚糖/乙酸溶液与0.14M全氟辛酰氯混合。将该反应混合物以低速(60rpm)在室温下搅拌24h。然后将该溶液用去离子水透析3天(每天更换三次)，然后冻干。将该冻干的含氟壳聚糖如上所述进一步用甲基丙烯酸酐改性，以得到产物MAC (Al15) F。

[0147] 1.4. 水凝胶和梯度水凝胶的制备

[0148] 对于水凝胶形成，首先将MAC/MACF以2%w/v溶于超纯水(MilliQ Direct 8系统，18MX电阻, Millipore, Billerica, MA)，然后进行高压蒸汽灭菌。将光引发剂溶液—300mg mL<sup>-1</sup>的1-羟基环己基苯基酮(Sigma-Aldrich)的1-乙烯基-2-吡咯烷酮(Sigma-Aldrich)溶液以3μL g<sup>-1</sup>(引发剂/聚合物溶液)加入所有溶液。将这些溶液彻底混合并脱气(1min, 3000rpm, Speed Mixer DAC 150FVZ, Hauschild Engineering, Hamm, Germany)。在聚合之前，将样品用过量的N<sub>2</sub>吹扫以除去系统中的溶解氧。将溶液转移到孔板中以进行成型，并通过暴露于紫外光(365nm) 20min而实现聚合。

[0149] 通过使用喂入单一出口的双变量注射泵(Cole Palmer, Court Vernon Hills, IL)

连续混合而制备了梯度水凝胶体系MAC/MAC (Al i5) F、MAC/MAC (Ar5) F和MAC/MAC (Al i15) F。对于含有MAC和MACF的两个通道,分别将流速从0调至1或从1调至0ml min<sup>-1</sup>。通过当出口在以长度方向经过孔时将各组分的流速每4.0mm调整到±10%而在20×40mm矩形培养板中形成了梯度。

[0150] 1.5. MACF的高分辨率<sup>19</sup>F NMR研究

[0151] 对于所有NMR定量,将壳聚糖、MAC和MACF溶于2体积%的氘代乙酸/D<sub>2</sub>O。氟取代的存在以及MACF结构的确认通过高分辨率<sup>19</sup>F NMR(脉冲Varian 400MHz)得到。将相应的峰面积用于计算取代程度,与使用<sup>1</sup>H NMR计算脱乙酰化程度相似。简而言之,使用以下公式计算氟化程度(DF):

[0152]  $DF = \sum [1 + \{ (I_{CFn}) / (I_{ref}/m_{ref}) \}] \times 100\%$

[0153] 其中I<sub>CFn</sub>表示每个氟峰的积分强度,并且m为每个峰中的氟个数。I<sub>ref</sub>表示参比CF基团的积分强度。我们采用了三氯氟甲烷(CFC1<sub>3</sub>)作为参比,并且m<sub>ref</sub>=1。

[0154] 1.6. 氧摄取和释放研究

[0155] 通过以下方式间接地测量了水凝胶(在6孔板中以2%w/v形成,3.5cm直径×1cm高)的氧容量:使用连接到运行OxyView PST6-V5.41的计算机以采集数据的痕量氧传感器(PreSens, Regensburg, Germany)在密封室内研究周围溶液的氧摄取和释放动力学(图3)。在所有摄取和释放测量过程中,将室保持不流动以形成类似于培养条件或伤口敷料的环境。通过以下方式测量氧摄取:首先将氮气吹扫过的聚合水凝胶置于密封系统内的氧饱和的超纯水(用纯O<sub>2</sub>在258mmHg下鼓泡15min)中,然后测量溶液被吸附到水凝胶中时从溶液中移除的氧的量。在室温下连续监测溶液的P<sub>O<sub>2</sub></sub>。采集P<sub>O<sub>2</sub></sub>数据直到系统达到平衡。接下来,通过将系统中的水更换为无氧的5%CO<sub>2</sub>超纯水(用5%CO<sub>2</sub>/95%空气在258mm Hg下鼓泡15min)而测量氧释放。记录P<sub>O<sub>2</sub></sub>氧释放数据直到关闭的系统达到平衡。在三个循环中测量反复的MACF水凝胶氧摄取和释放反应,以查看水凝胶氧容量或动力学是否发生了任何变化。设计这些研究以测试MACF水凝胶是否可用作可重新加载的氧递送系统。

表 1. 氟化甲基丙烯酰胺壳聚糖

[0156]

名称	缩写	每单位单体的 PFC取代程度(%)	O <sub>2</sub> 吸附能力 (mmHg)	O <sub>2</sub> 吸附能力 (mmHg)
甲基丙烯酸酐改性的壳聚糖	MAC	0	0	0
五氟丙烯酸酐改性的甲基丙烯酰胺壳聚糖	MAC(Ali5)F	37~40	47.34 ± 1.08	0.88 ± 0.21
2,3,4,5,6-五氟苯甲醛改性的甲基丙烯酰胺壳聚糖	MAC(Ar5)F	40~43	89.10 ± 2.11	3.79 ± 0.55
全氟辛酰氯改性的甲基丙烯酰胺壳聚糖	MAC(Ali15)F	39~43	134.20 ± 6.07	0.81 ± 0.37

[0157] 1.7. 水凝胶流变性、溶胀和扫描电子显微术(SEM)实验

[0158] 为了制备用于流变测量的样品, 将10ml MAC/MACF溶液倒入硅树脂模具中, 并如上

所述进行交联。将所得的水凝胶片材从模具中移除，在磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中平衡过夜。使用圆形活检穿孔器从水凝胶片材切下8mm直径的凝胶，通过流变仪 (Rheometric Scientific RFS-III, Piscataway, NJ) 测定各水凝胶组的机械性质。测试提供了储能模量 ( $G'$ ) 和损耗模量 ( $G''$ )。计算了  $G^*$ ，因为其结合了储能模量和损耗模量两者，并使用勾股定理通过流变测量软件 (TA Orchestrator) 直接计算：

$$[0159] \quad G^* = \sqrt{(G')^2 + (G'')^2}$$

[0160] 为了估计溶胀比，使500 $\mu$ l水凝胶交联20min，然后冷冻干燥。接下来，测量其干质量 ( $M_D$ )，然后将之前的干水凝胶支架在1×PBS中在37°C下溶胀。溶胀在24h内完成，使得在此时间点之后观察到无明显的水凝胶质量变化。将样品在50 $\mu$ m细胞过滤网上离心 (1500rpm) 以除去任何残余的PBS。当质量不再变化时测定了溶胀后的质量 ( $M_s$ )，并如下计算溶胀比 ( $Q_M$ )：

$$[0161] \quad Q_M = M_s / M_D$$

[0162] 通过如上所述使水凝胶交联然后冷冻干燥而制备了用于SEM的样品。使用FEI Quanta 200环境SEM (FEI, Hillsboro, OR) 对样品成像。

#### [0163] 1.8. 体外生物相容性测试

[0164] 将NIH-3T3成纤维细胞在MACF水凝胶上培养以首先确认结合了PFC的水凝胶实际上是否无毒，其次确定PFC是否在增强细胞增殖和活力方面提供了任何有益效果。在48孔板 (11mm直径×5mm高) 中经由光聚合形成了MACF和MAC水凝胶，用PBS洗涤，然后用2.361g  $\text{ml}^{-1}$  的大鼠尾胶原包被5h，最后用PBS洗涤。添加胶原以提供细胞整合素附着从而最大程度提高细胞与材料的相互作用。之前已证实这一浓度在用于此目的的最佳范围内。将成纤维细胞以1×10<sup>4</sup>个细胞 $\text{cm}^{-2}$ 的真实细胞密度接种到MAC和所有三种MACF水凝胶的表面上。将含有1%青霉素/链霉素 (Life Technologies, Grand Island, NY) 的化学成分确定的培养基用于所有细胞培养 (Thera PEAK, Lonza, Basal, Switzerland)。将接种后的水凝胶置于维持在37°C的细胞培养箱 (5% CO<sub>2</sub>) 中。一半的MAC和MACF水凝胶通过将纯氧鼓入培养孔中4min而接受了氧加载。接受了初始氧合的MAC、MAC (Al15) F和MAC (Ar5) F处理组每24h再次补充4min的氧。将水凝胶总共培养4天作为初步测试，揭露了成纤维细胞在此时间中在表面上以最大的增殖接近了汇合。在培养期结束时，将培养物用亮视野显微镜 (Olympus IX-81, Tokyo, Japan) 成像并制备用于溴化3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四氮唑 (MMT) (Sigma-Aldrich) 或Quant-iT PicoGreen (Life Technologies) 总双链DNA (dsDNA) 测定。

#### [0165] 1.9. MTT分析

[0166] 使用MTT测定法估计了在4天培养后各水凝胶上细胞的总代谢活性。简而言之，在PBS中配制了MTT的储液 (5mg  $\text{ml}^{-1}$ )，并通过0.21μm过滤器除菌过滤，然后加到各孔中。将细胞接种的水凝胶和未接种的对照在化学成分确定的培养基 (无酚红的培养基) 中在5% CO<sub>2</sub>培养箱中在37°C下孵育5h，以允许测定法显紫色甲臜盐。接下来，将培养基小心移除，通过添加100μl DMSO并孵育15min而使甲臜盐溶解。用酶标仪 (Infinite M200, Tecan, Grödig, Austria) 在570和690nm处测量了溶液的吸光度。在使用未接种的对照校正后，将结果报告为与未氧合的细胞接种MAC对照相比的代谢活性的倍数变化。采用了类似的方案来测定在梯度水凝胶中的细胞代谢活性。将各梯度水凝胶在凝胶的整个40mm长度上小心切成八个5

×20mm的条,将各条切成三个相等的块。接下来,将各块转移到24孔板的单独的孔中,如上所述进行了MTT测定。将结果报告为与未氧合的梯度水凝胶的100%MAC区相比的代谢活性的倍数变化。

[0167] 1.10.PicoGreen总dsDNA分析

[0168] 使用Quant-iT PicoGreen dsDNA试剂盒对总细胞数定量。通过将浓缩缓冲液用无菌无DNA酶的超纯水稀释20倍制备了1x TE工作溶液(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 7.5)。通过在TE中将浓缩的DMSO溶液进行200倍稀释制备了Quant-iTPicoGreen试剂的工作溶液,并避光。使用供应的λ-DNA标准品绘制了标准曲线。将工作溶液加到各孔中,并在室温避光条件下孵育了5min。使用480nm的激发波长和520nm的发射波长通过酶标仪(Infinite M200)测量了荧光。在用未接种的对照校正后通过用标准曲线关联测定了总dsDNA浓度,并使用6.6pg DNA每个细胞的转换因子转换成了总细胞数。

[0169] 1.11.统计学

[0170] 所有统计分析均使用JMP 9 (SAS Institute, Cary, NC) 进行。进行了ANOVA与Tukey事后分析以检测组之间的显著性差异。将0.05的α水平用于确定组之间的显著性。当检测到多个显著性差异时,将大写字母用于表示显著性。不同的字母暗示在组之间存在显著性差异。数据报告为平均值±标准偏差 (SD)。

[0171] 2.结果

[0172] 2.1.MACF的合成和表征

[0173] 表1汇总了在这些研究中合成的MACF材料。高分辨率<sup>19</sup>F NMR光谱(图4至图6)揭露了对于所有三种MACF而言PFC取代程度均在37-43%的范围内。在PFC共轭过程中,各MACF反应混合物在整个反应期间保持低粘度均匀混合。因此,假设PFC配体在整个聚合物网络中均匀分配。这通过<sup>19</sup>F NMR光谱得到了确认,该光谱表明不存在另外的峰(图4至图6)。

[0174] 2.2.MACF氧摄取和释放行为

[0175] 我们利用了我们的定制装置(图3)来确定添加PFC实际上是否赋予了从高氧张力溶液摄取氧然后将氧释放到低氧张力水性环境中的能力。MAC (Al<sub>1</sub>i<sub>5</sub>) F、MAC (Ar<sub>5</sub>) F、MAC (Al<sub>1</sub>i<sub>15</sub>) F和未改性的MAC水凝胶的静态氧摄取和释放在图7至图9和图10中示出。单独的MAC无氟取代,因此不摄取氧。包含最少数量的氟取代的MAC (Al<sub>1</sub>i<sub>5</sub>) F显示出32.31±1.2mm Hg的摄取能力。令人感兴趣的是,在芳族PFC中具有相似数量的氟的材料MAC (Ar<sub>5</sub>) F能够摄取112.5±1.8mm Hg的氧。我们的最多氟取代的材料MAC (Al<sub>1</sub>i<sub>15</sub>) F显示出137.50±3.07mm Hg的摄取能力。所有的平衡氧摄取能力通过单因素ANOVA (P<0.0001) 表明彼此显著不同。

[0176] 从我们的材料中的氧释放表明:在静态条件下MAC (Al<sub>1</sub>i<sub>5</sub>) F水凝胶释放了8.21±0.80mm Hg氧,MAC (Ar<sub>5</sub>) F释放了89.10±2.45mm Hg氧以及MAC (Al<sub>1</sub>i<sub>15</sub>) F释放了134.20±3.73mm Hg氧。所有的平衡释放 $P_{O_2}$ 数据通过单因素ANOVA (P<0.0001) 表明彼此显著不同。最少氟化的材料MAC (Al<sub>1</sub>i<sub>5</sub>) F显示出在3.5h内达到平衡释放。MAC (Ar<sub>5</sub>) F和MAC (Al<sub>1</sub>i<sub>15</sub>) F分别显示出在13.2和120h(5天)内达到平衡氧释放。为了了解我们的MACF水凝胶体系是否可以使用多次,我们对得自各MACF组的样品重复了摄取和释放程序(图11至图13)。我们的研究表明了对于所有合并的材料而言以2.5±1.5%的O<sub>2</sub>容量损失实现了三个成功的再生循环。

[0177] 2.3.MACF流变性、溶胀性和SEM

[0178] 流变和溶胀结果以及伴随的统计分析在表2中汇总。对于测试的所有四种材料,在

流变测试的整个频率范围中  $G'$  均大于  $G''$ ，从而表明了凝胶性质。MAC 产生了最硬的水凝胶，而 MAC(Ar5) F 产生了最软的水凝胶 ( $P < 0.0001$ )。一般来讲，对于 MACF，每次添加的氟的数量越大，则水凝胶越硬。氟化水凝胶的溶胀还显示出每次添加的氟数量与溶胀比之间的关联。统计分析表明 MAC(A1i5) F 具有比所测试的其他水凝胶明显更高的溶胀比 ( $P < 0.0001$ )。

[0179] SEM 成像表明 MAC 非常有序，与其不具有相互作用的侧链的事实相符。MAC(A1i5) F 显示出无序和多孔的表面。对于 MAC(A1i15) F，也观察到了该无序组合物。在两种脂族 MACF 中均观察到了聚合物密度的差异。MAC(A1i15) F 显示出无规结构并且孔隙度不是很高。最后，MAC(Ar5) F 具有非常多的孔并且最有序的 MACF。孔与其他 MACF 相比较大，并且虽然交联结构不如纯 MAC 有序，但是仍显示出一定的组织度，而不同于脂族 MACF 的无序结构。

[0180] 表2. 流变性和溶胀结果汇总

[0181]

材料	$G^*$ (Pa)	统计学	溶胀比	统计学
MAC	$2451.9 \pm 604.7$	A	$11.3 \pm 0.3$	B
MAC(A1i5) F	$1497.2 \pm 508.7$	B C	$14.6 \pm 0.6$	A
MAC(Ar5) F	$963.4 \pm 79.7$	C	$11.1 \pm 0.6$	B
MAC(A1i15) F	$2105.1 \pm 877.4$	A B	$10.6 \pm 0.2$	B

[0182] 流变测量数据  $n=10$ ，溶胀数据  $n=5$ ，平均值  $\pm$  SD。

[0183] 通过多因素 ANOVA ( $P < 0.0001$ )，不同的字母彼此显著不同。

[0184] 2.4. 对 MACF 的细胞反应

[0185] 第4天的显微图像表明成纤维细胞偏好每次PFC取代具有更多氟的MACF。各种类型的 MACF 水凝胶所支持的细胞的代谢速率和总数在图14中给出。将三因素 ANOVA (材料类型、 $O_2$ 再生、材料类型  $\times$   $O_2$ 再生，所有的均具有显著的影响力  $P < 0.0001$ ) 用于分析代谢活性。将双因素 ANOVA (材料类型、 $O_2$ 再生，所有的均具有显著的影响力  $P < 0.0001$ ) 用于分析总细胞数数据。代谢活性 (图14A) 通过材料类型/每次添加的氟数量 ( $P < 0.0001$ ) 以及在规定间隔的  $O_2$  重新加载 ( $P < 0.0001$ ) 而增强。各水凝胶支持的总细胞数 (图14B) 对于所有 MACF 而言与 MAC 对照相比 ( $P < 0.0001$ ) 均具有显著性，并且  $O_2$  重新加载具有显著性 ( $P = 0.007$ )。

[0186] 3.5. 对 MACF 梯度的细胞反应

[0187] 为了展示氟取代量如何在空间水平上控制从生物材料水凝胶的氧释放，我们开发了一系列梯度凝胶体系。将三因素 ANOVA (位置、 $O_2$ 再生、位置  $\times$   $O_2$ 再生，所有的均具有显著的影响力  $P < 0.0001$ ) 用于分析在梯度上的代谢活性。我们的研究表明细胞代谢活性随着 MACF 百分比的增加而增加 (图15至图17) ( $P < 0.0001$ )。这一反应在 MAC/MAC(A1i15) F 梯度中最明显，其中将更多的 PFC 掺入到了水凝胶的右侧中 (图17)。这些结果进一步表明了氧处理的梯度体系与在培养期中未给予氧的梯度凝胶相比具有更大的代谢活性 (图16和图17) ( $P < 0.0001$ )。

[0188] 3. 讨论

[0189] MAC 的 PFC 改性形成可注射和可模塑的体系，该体系可通过既定的技术形成水凝胶。PFC 在交联的生物材料上的固定提供了稳定的支撑结构以有利于氧递送，而这在体内难以通过胶态 PFC 悬浮液实现。另外，我们证实了可使 PFC 改性发生变化以改变氧摄取和释放能力及动力学。

[0190] 壳聚糖是一种在自然界中丰富的多糖，它含有许多反应性位点 (游离的胺和羟基)

以共价结合各种小分子(诸如PFC),并且在不同的领域已经报道了许多具有多种应用的基于壳聚糖的材料。壳聚糖本身已在皮肤创伤病愈合中得到了深入研究,因为其具有止血和抗菌作用。我们之前已经研究了改性的光致聚合型壳聚糖MAC及其在组织工程中的实用性,并且本研究的结果正是基于这项工作。MAC可溶于水性缓冲液,并通常形成水凝胶。之前已经报道了氟化壳聚糖和类似的氟衍生化材料,但是,这些材料的氧摄取和释放性质在其支持细胞或在伤口愈合应用中的能力方面尚未得到充分表征或广泛研究。

[0191] 之前对氟化壳聚糖体系的研究已证实了氟取代为了支持细胞的最佳范围为40-45%,高于此取代范围将观察到不良影响。我们的取代落在此理想范围内(表1),并且我们假设PFC配体在整个聚合物网络中均匀分配,因为对反应物进行了连续搅拌,而未观察到沉淀。另外,在稀乙酸中达成反应条件,稀乙酸的pH使得相比于壳聚糖中的任何其他潜在反应性基团只有利于伯胺的反应。均匀的氟取代对于促进均匀的以及在空间上可控的氧摄取和释放尤其是对于引导细胞反应至关重要。

[0192] 氧摄取和释放研究的结果(图7至图10)表明了为了调整容量和总释放时间而选择合适的PFC取代的重要性。摄取迅速发生,在2-6h内达到了 $P_{O_2}$ 平衡,然后在12-120h内以1-25mm Hg  $h^{-1}$ 的 $P_{O_2}$ 较缓慢地释放到周围环境(5%CO<sub>2</sub>/95%空气)中。这表明我们的方法可实现优异的系统调整,这对于伤口愈合和组织再生中的各种应用具有重要意义。

[0193] 摄取和释放行为证实了与配体类型和附接到PFC分子的氟的量的正相关。令人感兴趣的是,键合的配体的运动动力学在此过程中发挥着重要的作用。这有助于解释在比较MAC (Ar5) F和MAC (A1i5) F时氧摄取和释放的巨大差异(图7至图10)。MAC (Ar5) F表现出甚至比MAC (A1i15) F更大的解离速率,并显示出明显的拖尾,与MAC (A1i5) F和MAC (A1i15) F相似(图8至图10)。MAC (Ar5) F含有氟化芳环,其与线性PFC链相比具有比较受限的运动性。因此,芳族PFC改性使所有氟原子在单一平面中取向,从而使得可非常容易地接近氧。这与MAC (A1i5) F形成直接对比,后者由每次PFC改性相同数量的氟构成,然而,这些氟化配体具有高度的运动性,从而导致不太稳定的F-O<sub>2</sub>相互作用并因此导致降低的氧摄取能力和加速的释放(图7和图8)。MAC (A1i15) F包含长氟化碳链,从而由于甚至更具运动性的PFC配体而与MAC (Ar5) F相比甚至更不易接近氧。然而,MAC (A1i15) F的每次取代包含更多的氟,因此,该体系需要更长的时间才能达到其摄取和释放平衡点(图4)。

[0194] 我们的静态 $P_{O_2}$ 摄取和释放测量证实了对于所有凝胶体系而言氧的解吸始终低于吸附(图7至13)。这确认了在达到平衡释放后一定百分比的氧留在水凝胶内部。这在细胞培养过程中是有利的,因为多余的氧始终可用于细胞增殖。之前已证实皮肤成纤维细胞对氧水平敏感,并在超过50mm Hg的 $P_{O_2}$ 下表现出增强的代谢活性。另外,释放研究表明了我们的体系表现出S形氧解离曲线,其类似于血液中的氧解离。PFC乳液体系未表现出这种行为,并提供线性释放。我们的MACF体系与血红蛋白相似的氧转运特征受到细胞的偏爱,如在进化过程中所选择的。

[0195] 我们的摄取/释放循环实验的结果(图11至13)对于确认我们的材料在再生时的表现相似至关重要。图11至图13中的结果进一步表明了我们的水凝胶可供长期使用,并仍保持相似的氧递送特征。这具有重要的意义,因为在我们的实验中,材料被重新加载了多达四次(图14至17)。这项工作进一步表明,可将MACF用来增强长期和短期伤口愈合治疗。以仅5-

10mm Hg的 $P_{O_2}$ 增量增加伤口氧合水平对于急性和慢性伤口均显示出明显的愈合有益效果。

[0196] 虽然我们的溶胀和流变学结果(表1)并未彼此完全平行,但是在两项研究中均存在重要的趋势。流变学表明MAC水凝胶最硬,从而表明最少取代的壳聚糖聚合物链在自由基聚合过程中可实现更少的抑制并因此实现更大的交联。取代MAC链上的PFC减少了化学交联,从而产生了不太硬的水凝胶。在研究PFC取代的材料(MACF)的结果时观察到了另一重要的行为,从而表明更长、运动性更高的PFC为水凝胶带来弹性。基于这一概念,我们相信MAC(A1i15)F是PFC取代的水凝胶中最硬的这一事实讲得通,因为虽然在MAC上的额外取代减少了化学交联,但是链越长,存在的分子间作用力越大。然后是,MAC(A1i5)F的硬度次之,因为其组成相似,但具有更短的PFC链。MAC(Ar5)F是最软的水凝胶,从而表明分子间作用力因稳定性和芳族分子的性质而较低。

[0197] 氟化水凝胶的溶胀表明MAC(A1i5)F的溶胀最多,并且明显高于表现出彼此相似的结果的其他三种水凝胶。可以预计,溶胀结果将与报告的G\*值负相关,然而,如通过流变测量所观察到,由于PFC的添加不同地破坏自由基引发的交联的方式以及各PFC的取代增加与水凝胶的不同分子间相互作用的方式,发生了令人感兴趣的相互作用。我们预计,每次取代的氟的数量越大将导致更硬的水凝胶和更少的溶胀。同样,更少的氟将会因为空间位阻而产生更软的凝胶,并因此,应导致更大的溶胀,如通过MAC(A1i5)F所观察到的。然而,MAC(Ar5)F并不完全符合该行为。我们相信这是因为MAC(Ar5)F中的芳环显示出最够强的缔合以至于影响了溶胀,但强度又不足以影响机械性质,如通过流变测量所测得的。因此,MAC(Ar5)F具有有序的结构,但不及MAC的程度。MAC(Ar5)F不能实现较大的溶胀度并同时为较软的材料。将来应开展更多的测试以更好地了解PFC改性如何在分子水平上改变水凝胶性质。

[0198] 我们的工作表明,增加共轭氟的总数将增加MACF水凝胶上的细胞的总数(图14B)以及细胞代谢活性(图14A和图15至图16)。细胞形态比通常在培养板或更硬的水凝胶上所见的更圆。然而,观察到了活性细胞反应(图14),并且它们与下面的水凝胶的硬度无关。这表明,局部氧合压倒了之前在聚合物基底上所报道的不提高氧水平的硬度效应。另外,令人感兴趣的是,增强的代谢和细胞性与培养期中的氧重新加载无关。这些发现非常吸引人,并且我们不相信之前通过胶态PFC体系所报道的这一结果。这些结果使我们想到,PFC改性有利于从周围介质/空气中获取氧,从而使得有更多的氧可供细胞使用。在各MACF的梯度表面上的代谢反应(图15至图17)表明了MACF介导的氧水平对于在毫米空间尺度上(如果不是更低)改变细胞增殖反应足够敏感。这对于塑造体外环境尤其宝贵,在体外环境中氧梯度驱动发育和修复反应,诸如血管形成和骨折愈合。重要的是要指出,细胞反应通过每次添加的更多的氟而增强(图14至图17),以及对MAC(Ar5)F与MAC(A1i5)F更好的反应,然而,这些反应不像各材料的 $O_2$ 摄取/释放数据(图7至图10)一样不同。我们相信这是由于以下事实所致:摄取和释放实验在关闭的系统中进行,而细胞实验在开放的系统中进行。起初,转运驱动力在摄取/释放实验中较大,从而导致了在具有更理想的PFC改性的组中增强的 $O_2$ 转运。

[0199] 我们的使用生物材料的氧递送方法与之前的工作相比具有独特性,并且我们的系统允许更大的灵活性。我们相信,将我们的MACF系统应用于深层伤口可支持长期的细胞存活,直到实现宿主血管新生。已证实,我们的聚合物MAC在生理酶条件下28天后表现出50%

的降解,因此MACF应提供数天(如果不是数周)的伤口愈合有益效果。由于PFC溶解氧以及其他含氧物质(比如NO、CO<sub>2</sub>和CO),因此可将MACF不仅用于递送氧,还可用于递送其他有益气体,以清除废气或减少对反应性氧物质的暴露。除了PFC乳液之外,其他以氧递送为中心的工作已经研究了有利于氧生成反应的生物材料。最近的工作已证实,包封的过氧化钙和过氯碳酸盐(perchlorocarbonate)可在接触水性溶液时产生氧。然而,所产生的副产物在生物学上是不利的,并已知会在组织中聚集。此外,过氧化物分解快速,并因此可产生过量的氧以及能量。因此,氧生成反应物的浓度需要加以仔细监控,以避免有害水平的氧化应激。最后,在这些氧生成体系中,过氧化物分解过程还改变局部pH水平,从而在不当地缓冲时可能形成有害的环境。

[0200] 4. 结论

[0201] 在本研究中,我们报道了生物相容性、临床相关、可高度调整的富氧生物材料的开发。这一类新的氟化和生物衍生化壳聚糖材料可形成可注射或可模塑的光交联水凝胶。我们的方法不同于现有的方法(例如,PFC悬浮液或氧气发生器),因为我们可以同时通过改变水凝胶网络中PFC取代的类型而控制水凝胶内部的氧含量。这使得我们能够同时控制氧递送的容量和速率,从而提供长达5天的有益PO<sub>2</sub>水平。由于这些体系能够不止一次重新加载氧,因此它们可供长期使用(可能数周)。我们展示了,成纤维细胞对MACF所形成的高氧环境有利地反应,甚至在无补充氧的情况下也是如此,这应当直接转化成加速的体内伤口愈合。

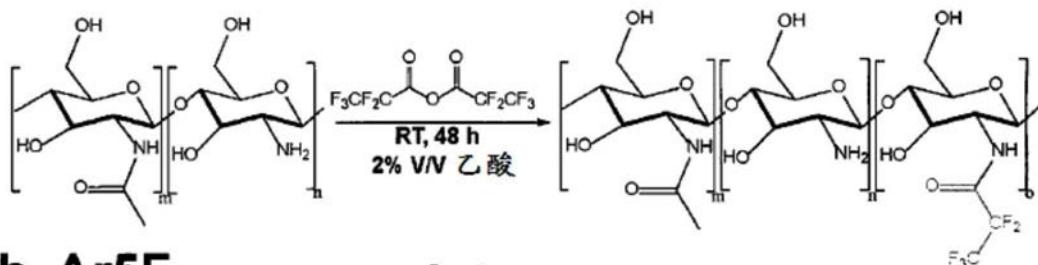
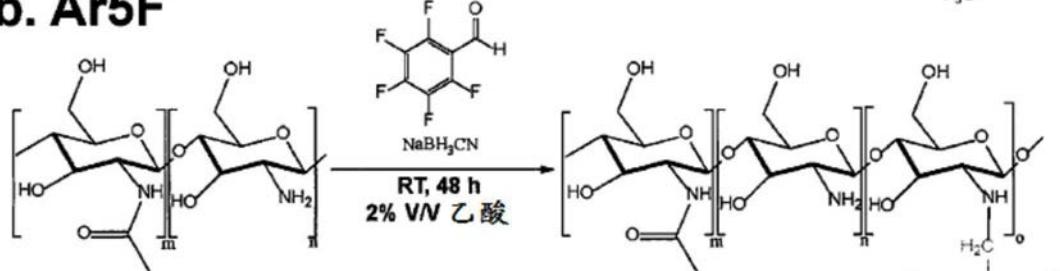
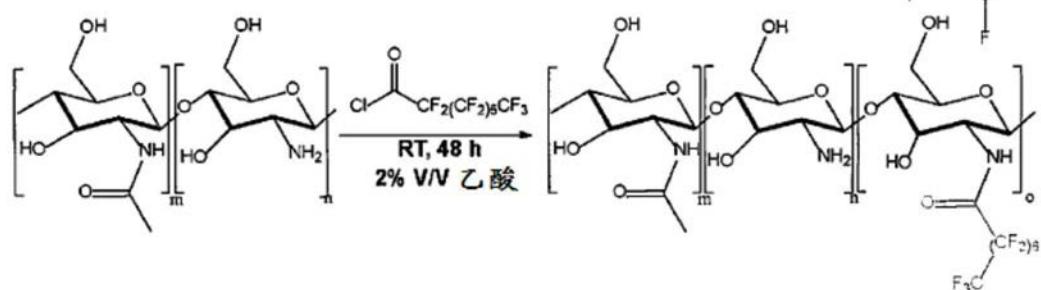
**a. Ali5F****b. Ar5F****c. Ali15F**

图1

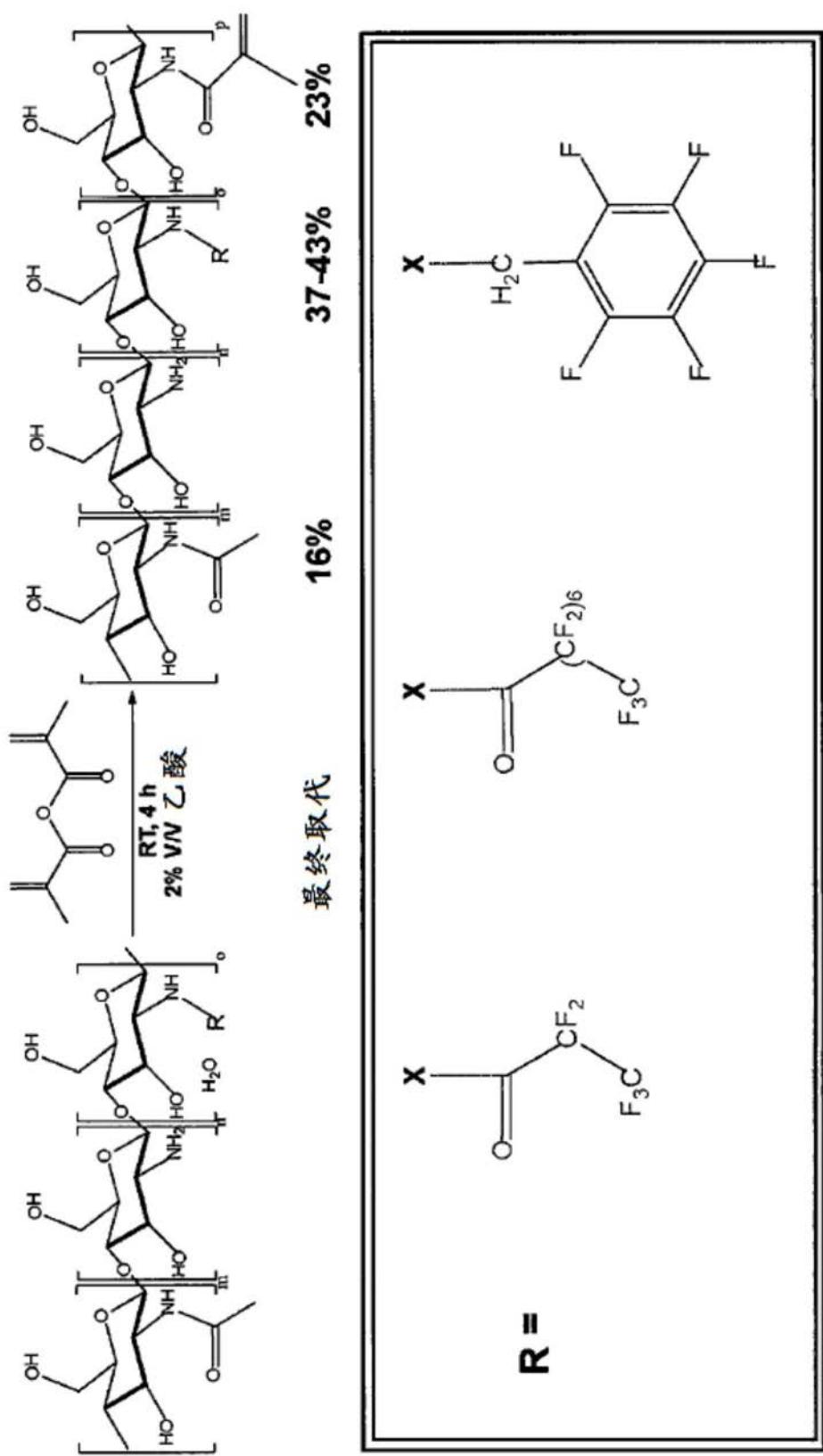


图2

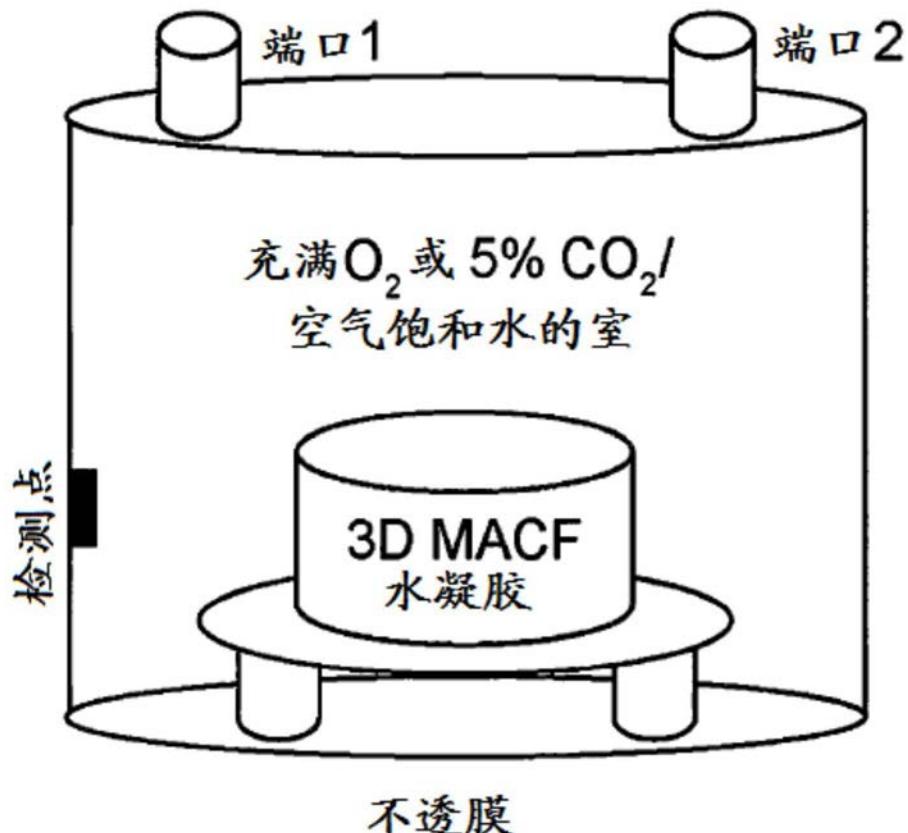


图3

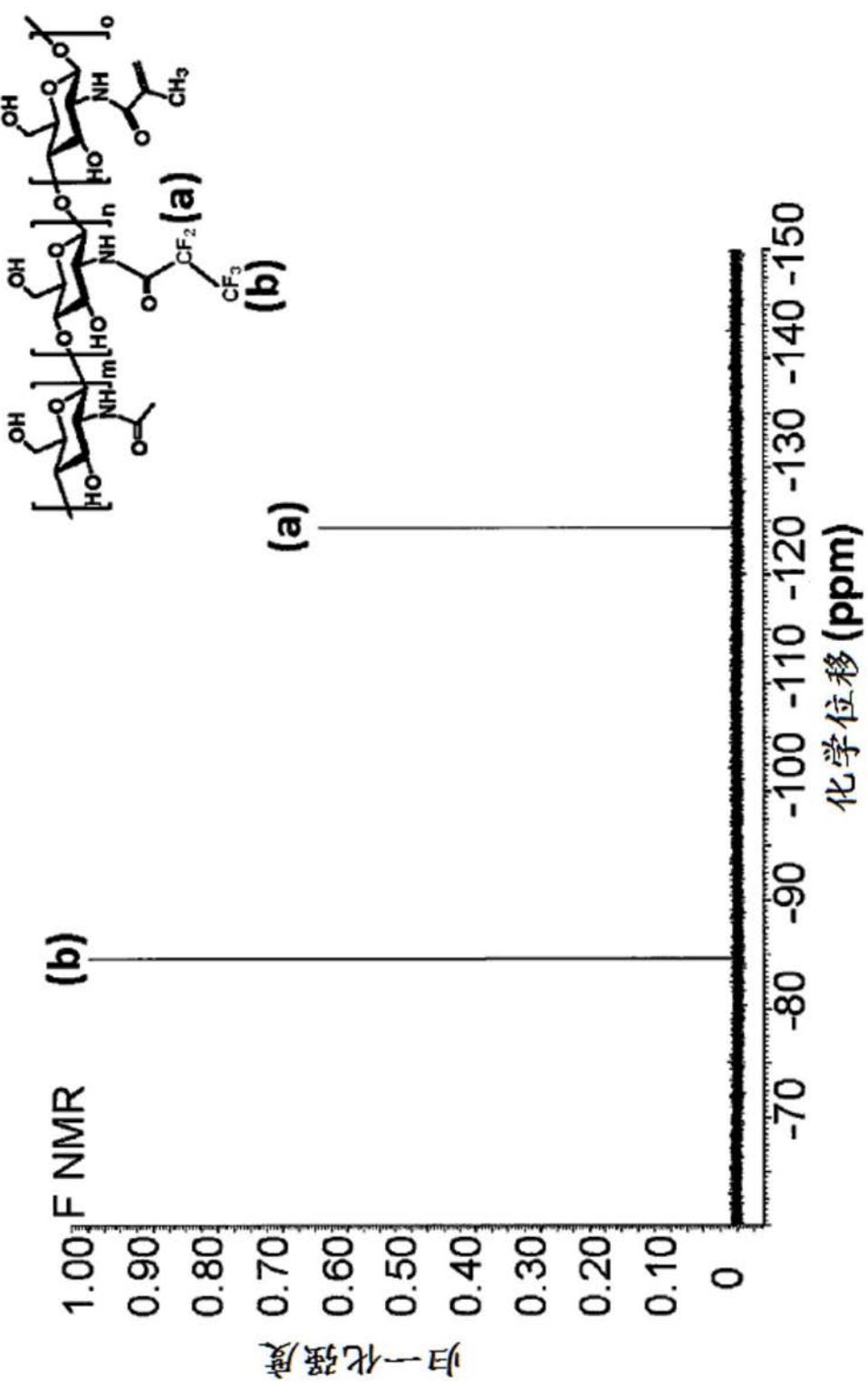


图4

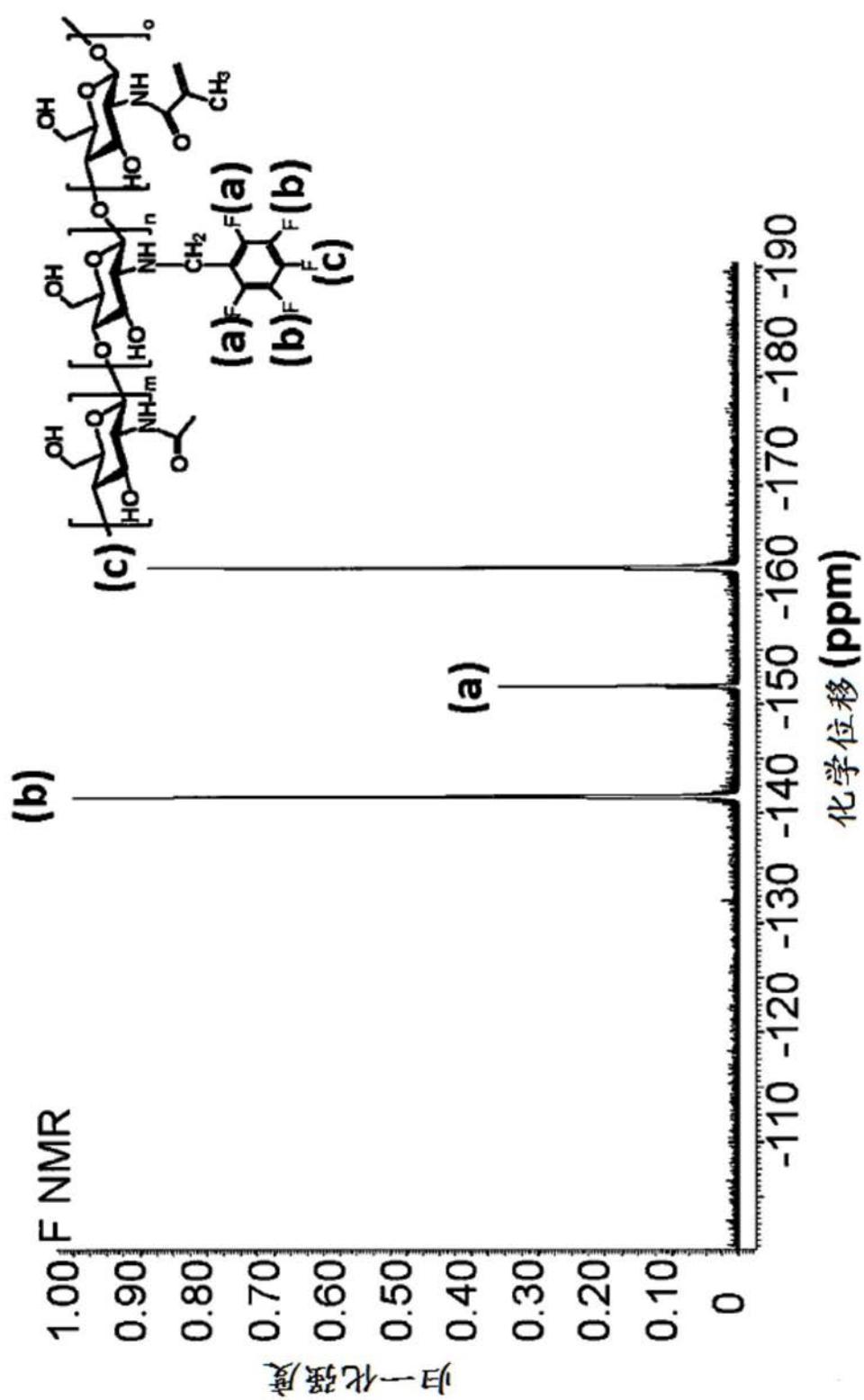


图5

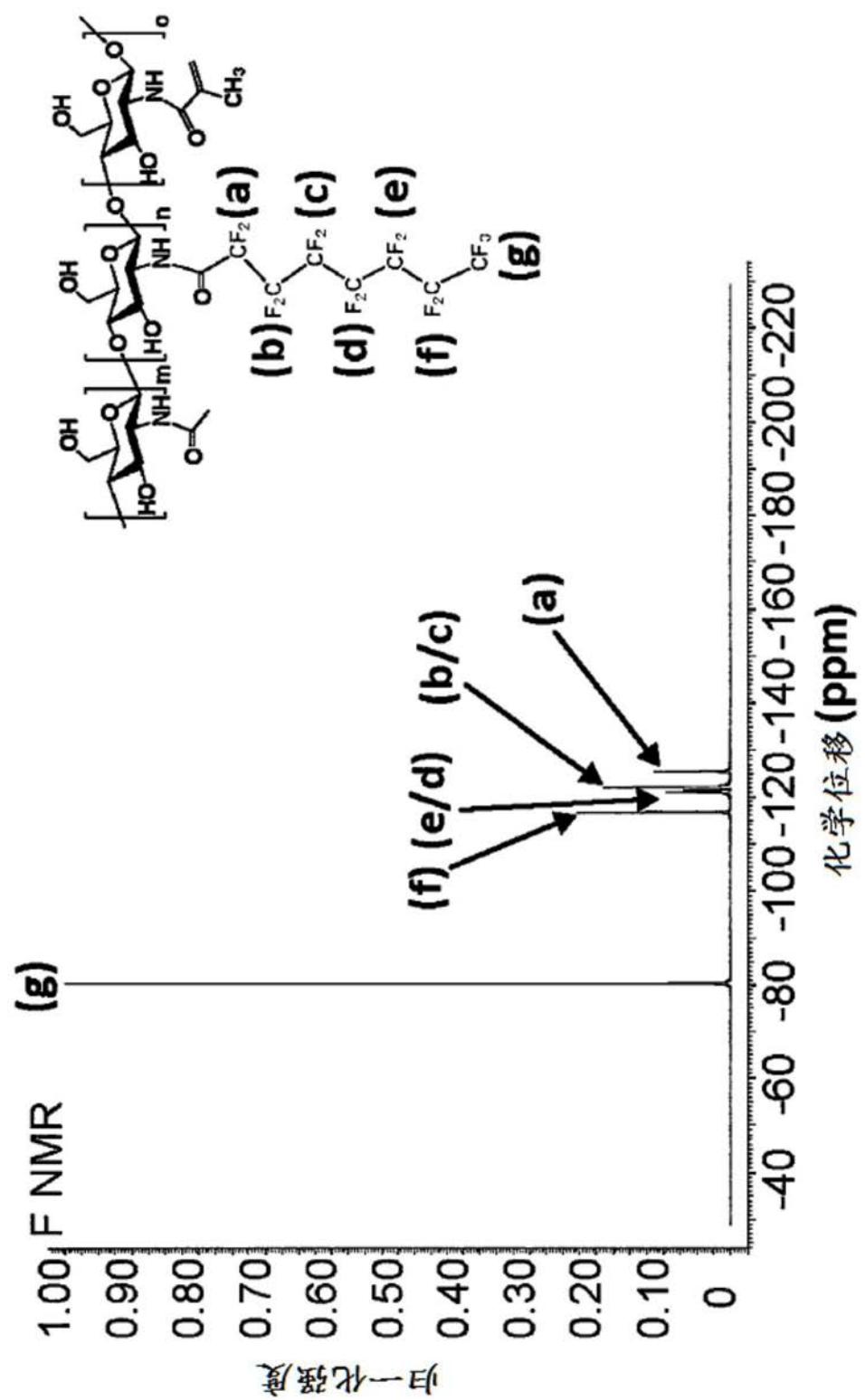


图6

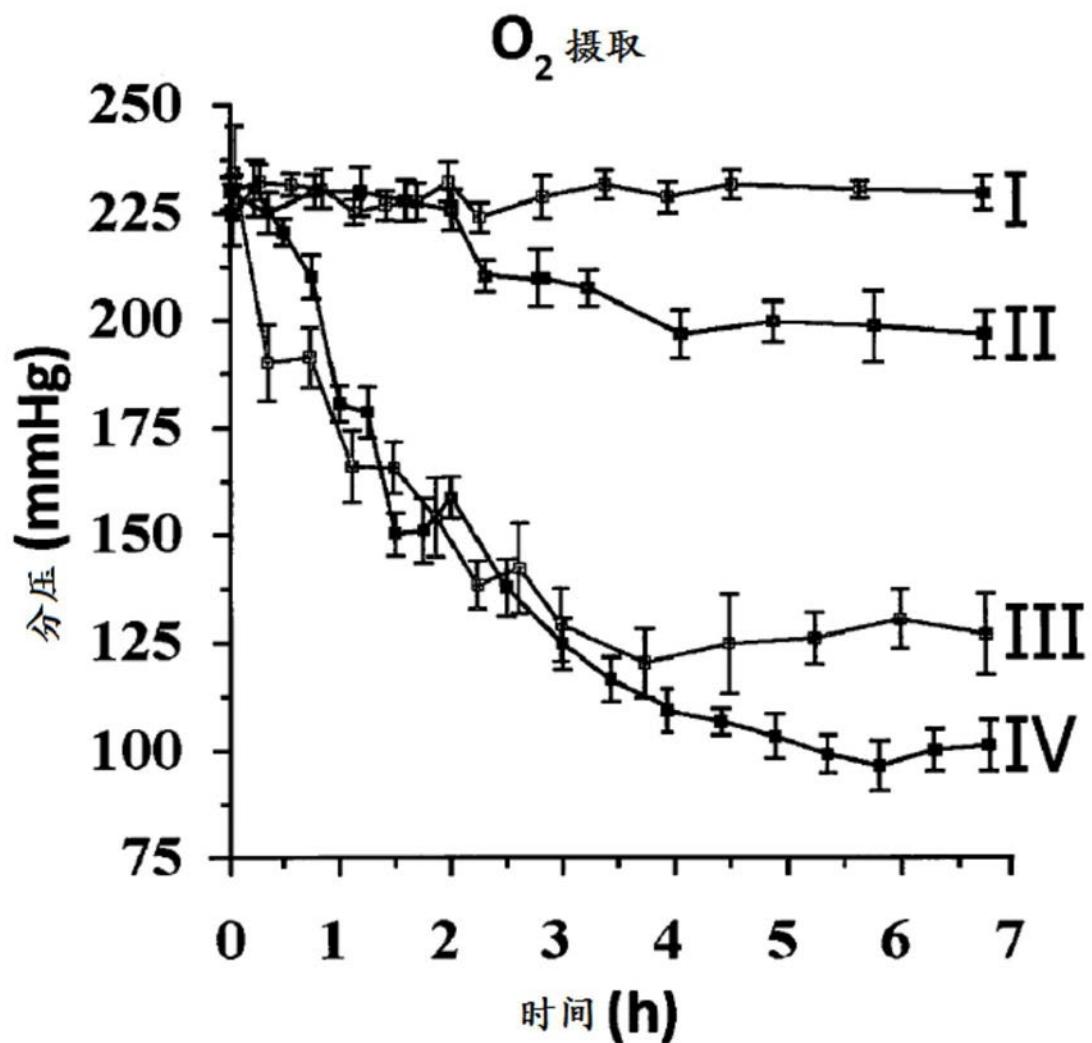


图7

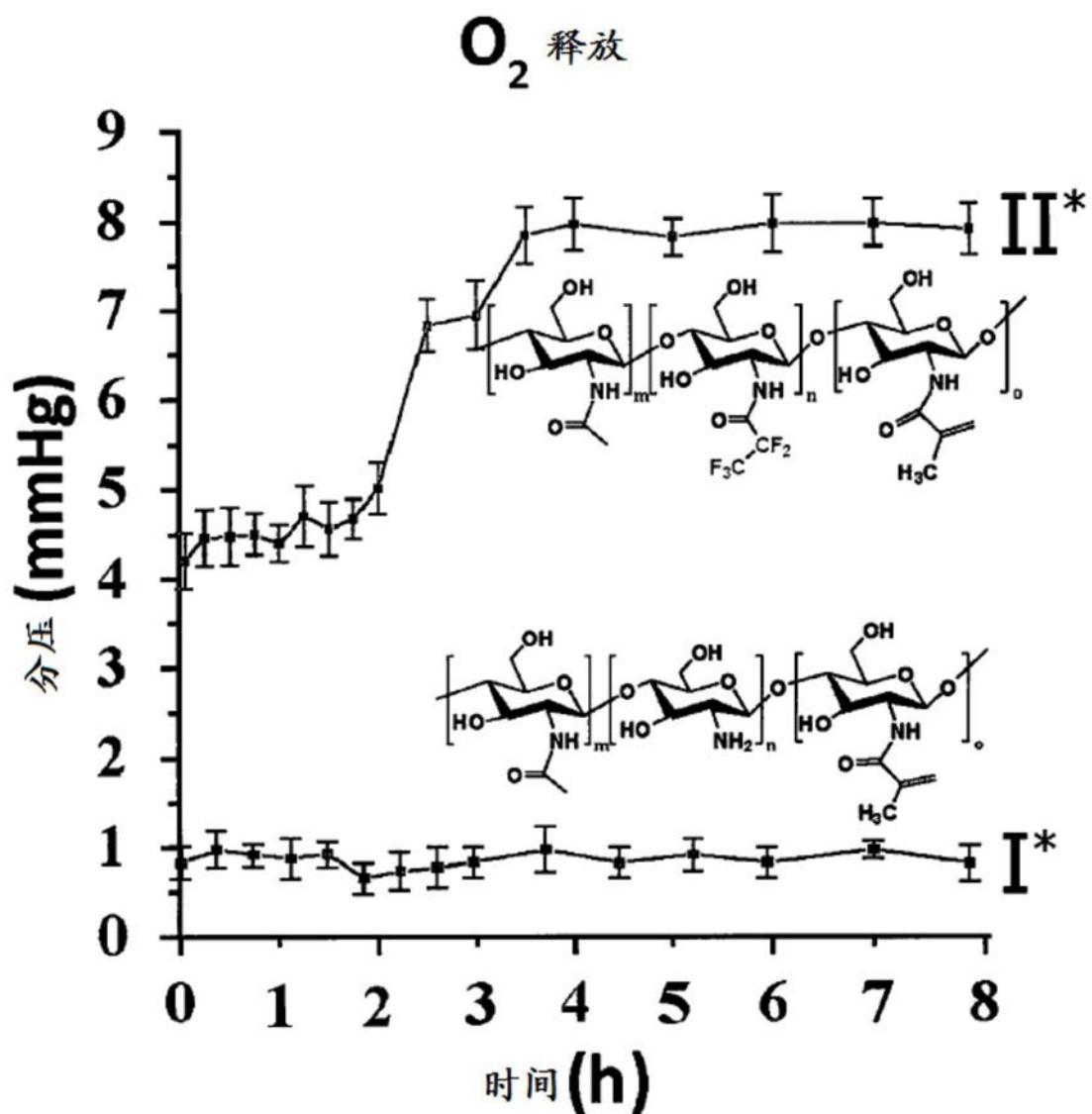


图8

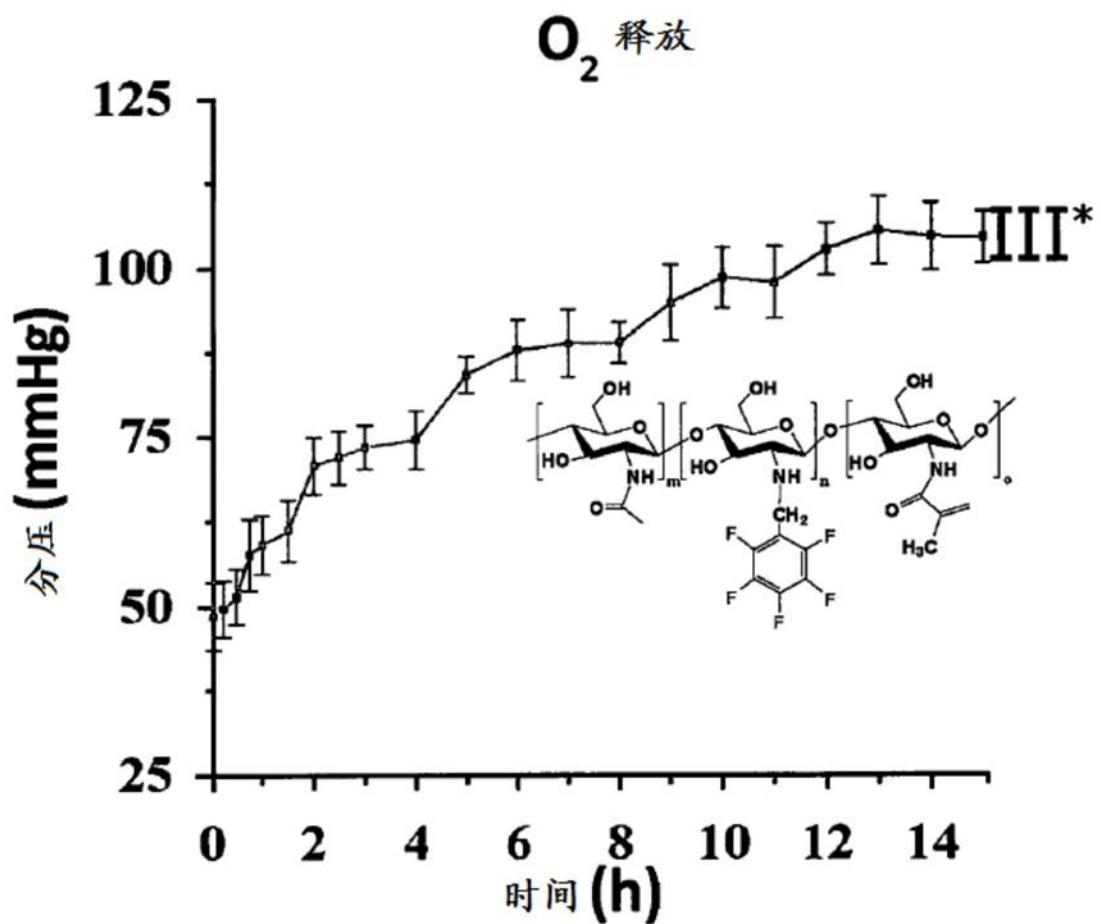


图9

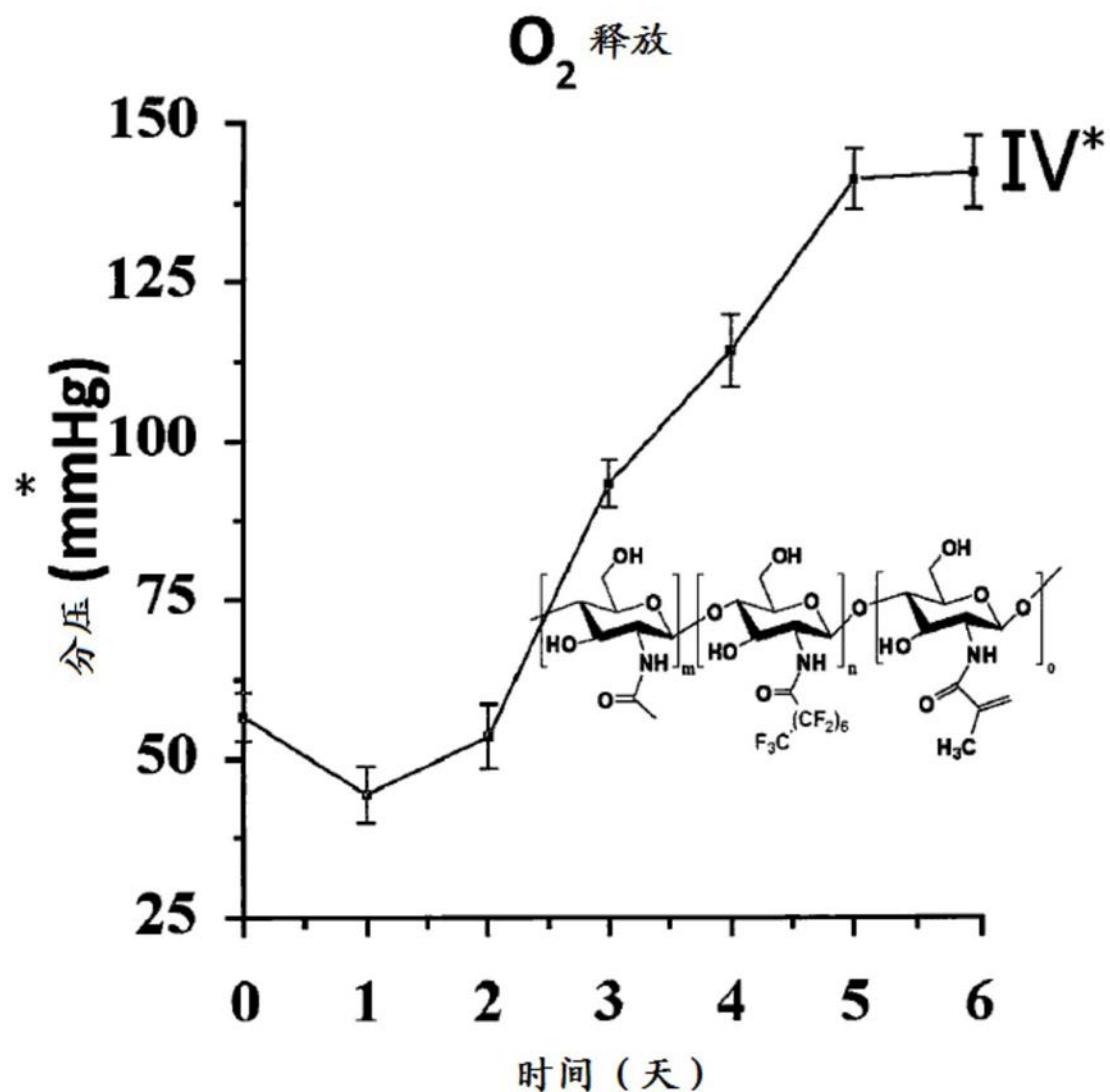


图10

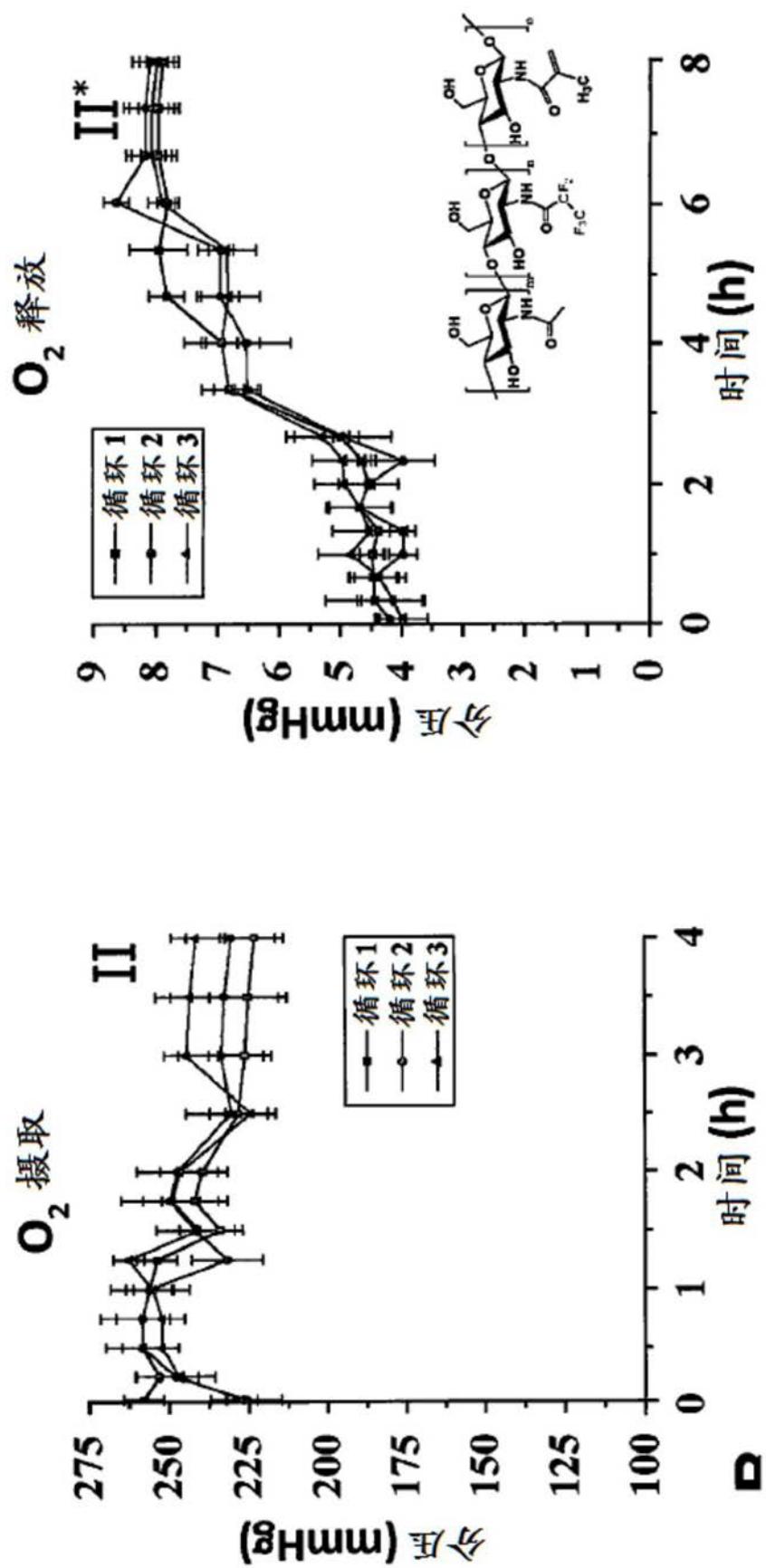


图11

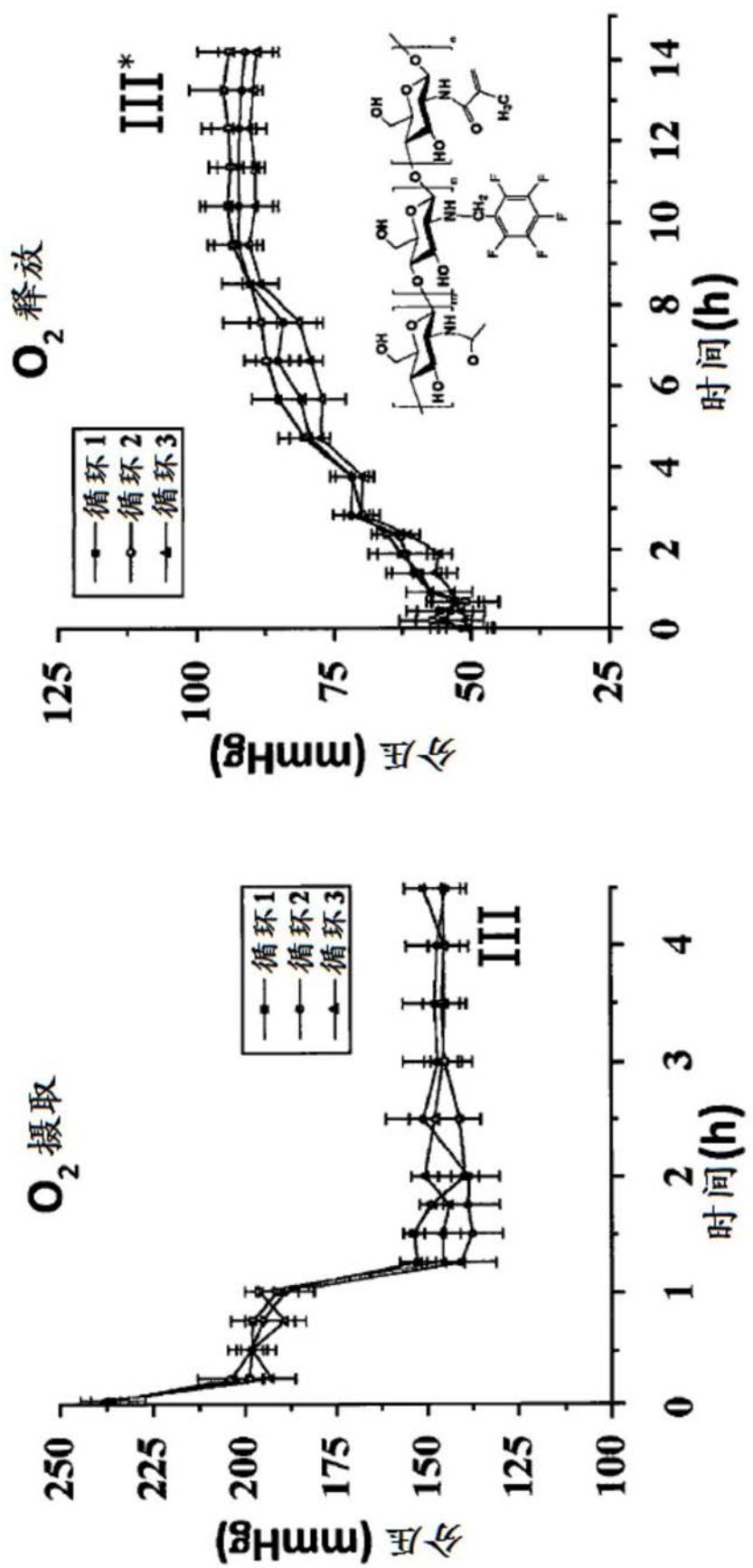


图12

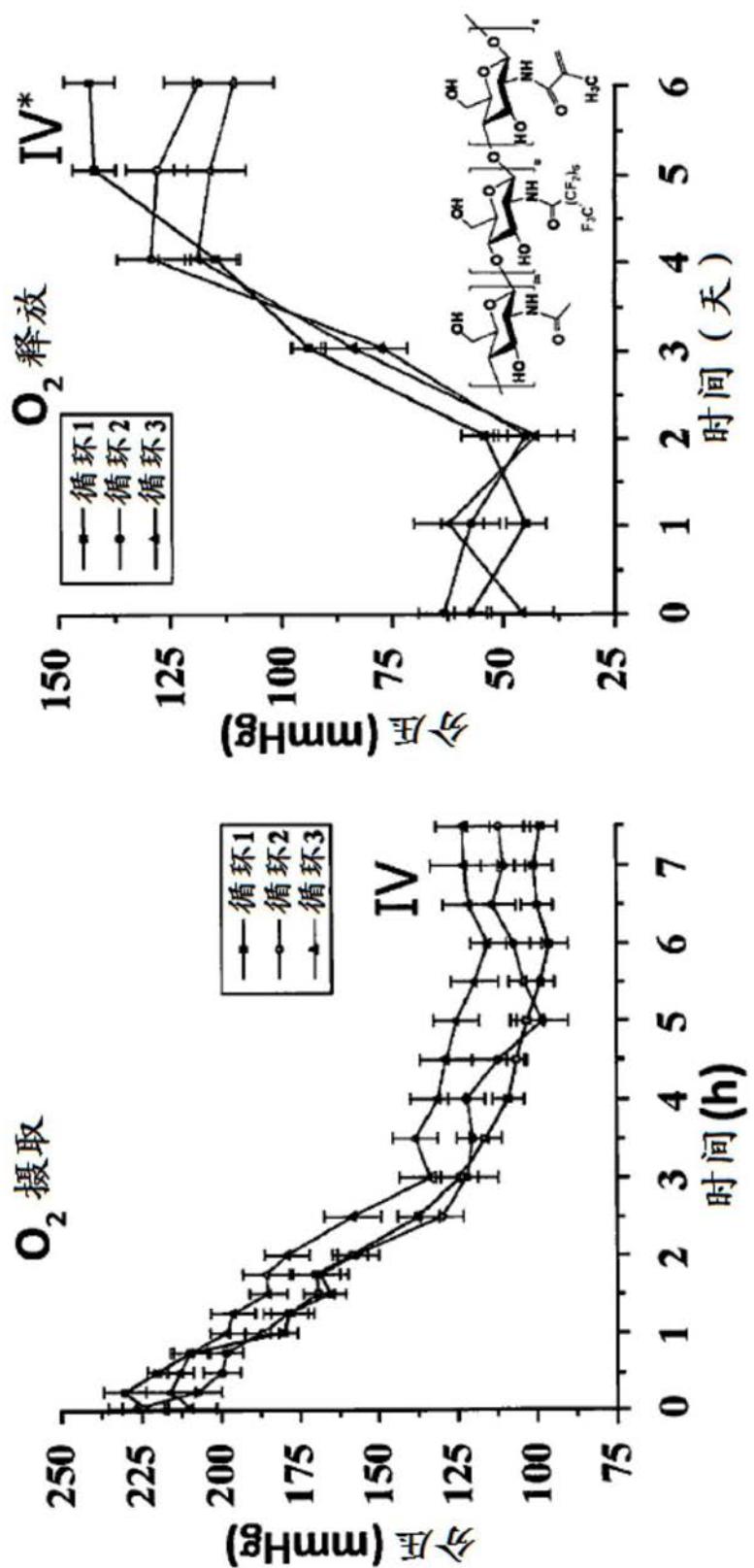


图13

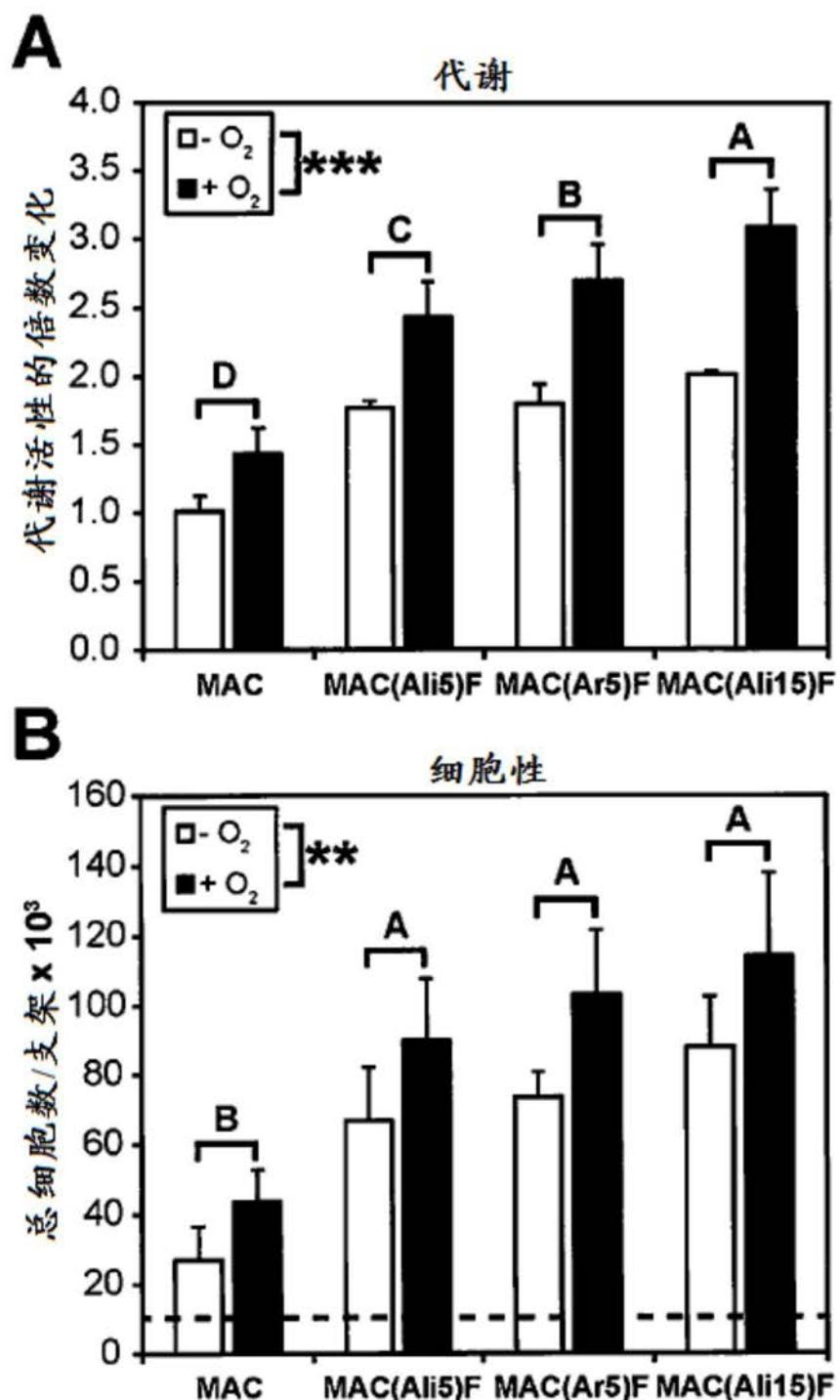


图14

