

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2022 年 5 月 12 日 (12.05.2022)



(10) 国际公布号
WO 2022/095151 A1

(51) 国际专利分类号:

A61L 27/18 (2006.01) A61L 27/50 (2006.01)
A61L 27/16 (2006.01) A61L 27/52 (2006.01)
A61L 27/22 (2006.01) A61L 27/54 (2006.01)
A61L 27/24 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2020/131330

(22) 国际申请日: 2020 年 11 月 25 日 (25.11.2020)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

202011228988.9 2020 年 11 月 6 日 (06.11.2020) CN

(71) 申请人: 浙江大学(ZHEJIANG UNIVERSITY) [CN/
CN]; 中国浙江省杭州市西湖区余杭塘路
866 号, Zhejiang 310000 (CN)。

(72) 发明人: 王绪化(WANG, Xuhua); 中国浙江省杭
州市西湖区余杭塘路 866 号, Zhejiang 310000
(CN)。 陈作兵(CHEN, Zuobing); 中国浙江省
杭州市西湖区余杭塘路 866 号, Zhejiang 310000
(CN)。 叶靖佳(YE, Jingjia); 中国浙江省杭州市
西湖区余杭塘路 866 号, Zhejiang 310000 (CN)。
靳爽(JIN, Shuang); 中国浙江省杭州市西湖区
余杭塘路 866 号, Zhejiang 310000 (CN)。 蔡万雄
(CAI, Wanxiong); 中国浙江省杭州市西湖区余杭
塘路 866 号, CN 310000 (CN)。 张天芳(ZHANG,
Tianfang); 中国浙江省杭州市西湖区余杭塘
路 866 号, Zhejiang 310000 (CN)。

(74) 代理人: 南京苏创专利代理事务所(普
通合伙)(NANJING SUCHUANG INTELLECTUAL
PROPERTY LAW FIRM); 中国江苏省南京市

(54) Title: INJECTABLE HYDROGEL FOR TREATING CENTRAL NERVOUS INJURY AND PREPARATION METHOD THEREFOR

(54) 发明名称: 一种治疗中枢神经损伤的可注射水凝胶及其制备方法

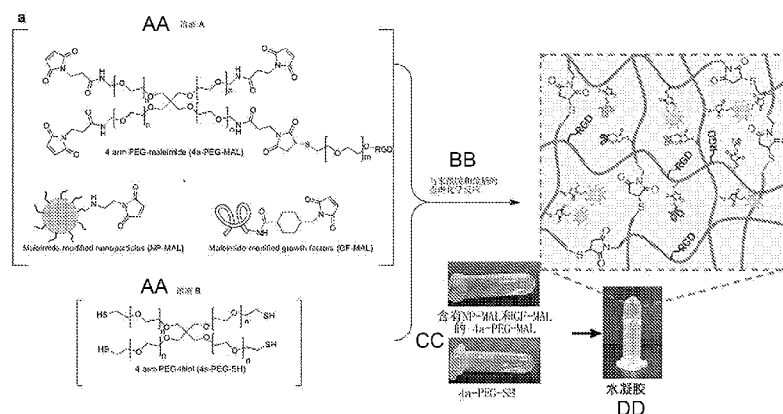


图 2

AA Solution

BB Click chemistry reaction of maleimide and sulfhydryl

CC 4a-PEG-MAL containing NP-MAL and GF-MAL

DD Hydrogel

(57) Abstract: An in-situ injectable hydrogel for treating central nervous injury and a preparation method therefor. The hydrogel is formed by means of performing click chemical coupling on arginine-glycine-aspartic acid-modified multi-arm polyethylene glycol-X and multi-arm polyethylene glycol-Y by means of functional groups, and the hydrogel is coated with nano/micro particles and growth factors of sustained-release immunomodulatory and/or antioxidant drugs loaded thereon by means of chemical coupling reaction. The injectable hydrogel delivers precise and sustained local release of immunomodulatory and/or antioxidant drugs and growth factors at the site of an injury, so that the formation of a cystic cavity after spinal cord injury is prevented, secondary injury caused by neuroinflammation is alleviated, residual spinal cord nerve tissues and axons are protected, and the formation of glial scar tissues is reduced. The hydrogel provides a permeable extracellular matrix environment for the regeneration of body nerve axons, thereby promoting the

江宁区麒麟科技创新园智汇路300号E座
3楼301, Jiangsu 210000 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

recovery of electrophysiological and motor functions, and can be used for the repair of injuries to soft tissues such as the spinal cord.

(57) 摘要: 一种治疗中枢神经损伤的可原位注射水凝胶及其制备方法, 所述水凝胶以精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸修饰过的多臂聚乙二醇-X与多臂聚乙二醇-Y通过官能团对X-Y点击化学偶联而形成, 所述水凝胶内包覆有通过化学偶联反应负载在其上的缓释免疫调节和/或抗氧化药物的纳米/微米粒子与生长因子。注射水凝胶在损伤部位局部精确缓释免疫调节和/或抗氧化药物与生长因子, 阻止了脊髓损伤后囊性空腔的形成, 减轻了神经炎症导致的二次损伤, 保护了残留的脊髓神经组织和轴突, 减少了胶质瘢痕组织的形成, 为本体神经轴突的再生提供了一种可穿透性的细胞外基质环境, 进而促进电生理和运动功能的恢复, 可用于脊髓等软组织损伤的修复。

一种治疗中枢神经损伤的可注射水凝胶及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及软组织修复工程技术领域，具体涉及一种治疗脊髓损伤的可注射水凝胶的制备及应用。

背景技术

[0002] 脊髓损伤（SCI）是一种严重致残性疾病，往往导致损伤节段以下肢体严重的生理功能障碍。据统计分析每年世界范围内 SCI 的发生概率是 40-50 人每百万人，目前全世界有超过 2700 万患者遭受瘫痪等后遗症的折磨，其中中国约有 400 万患者，并以每年 12 万左右的速度增加。

SCI 导致的严重神经炎症反应会诱导损伤部位神经元的凋亡产生有毒的细胞残体，进而破坏那些病灶附近未受物理损伤的脊髓组织，这些病理改变最终破坏了连接大脑和脊髓的神经环路，导致患者永久性的感觉和运动功能障碍，甚至出现致命的并发症，从而极大地影响患者的生命及其生活质量(Young et al., 1993, J Emerg Med)。最近的治疗 SCI 的临床试验发现，全身性的甲基强的松龙激素冲击疗法没有显示任何显著的好处，甚至有一些是有害的（Liu et al., 2019, Neurology; Fehlings et al., 2014, Neurosurgery; Hurlbert et al., 2000, J Neurosurg）。最近的研究发现，急性期的神经炎症信号也可能是有益的，因为它能促进坏死细胞碎片的清除，维持组织稳态，并限制进一步的组织/轴突损伤(Bellver-Lndete et al., 2019, Nat Comm; Anderson et al., 2016, Nature; Aguzzi et al. 2013, Science; Donnelly et al., 2008, Exp Neurol)。实验证明中枢神经创伤导致的神经炎症信号随着疾病的进展是一个动态的过程。急性 SCI 期(1-3 天)神经炎症信号介导坏死细胞碎片的清除，帮助脊髓组织的修复，在 3-7 天时神经炎症反应在达到高峰，引起神经元和胶质细胞凋亡，进而导致后急性期(1-2 周)抑制神经再生的囊腔空腔及星形胶质瘢痕形成(David et al, 2011, Nat Rev Neurol; Simon et al., 2017, Nat Rev Neurol)。因此，如何通过组织工程技术在精确的时间节点调节过度的神经炎性反应，既不影响坏死细胞碎片的清除，组织的修复，又保护残存的神经组织免受过度炎症反应的侵害及减少抑制神经再生的囊性空腔和胶质瘢痕的形成是一个世界性的难题(Donnelly et al., 2008, Exp Neurol; Simon et al., 2017, Nat Rev Neurol)。

最近,人们致力于开发人工脊髓样移植物,通过这种人工脊髓移植,损伤的脊髓神经可通过这种移植再生和介导功能恢复。例如,开发了以神经祖细胞为种子的三维打印仿生水凝胶脊髓支架,以支持SCI后的神经再生(Koffler et al., 2019/02, Nat. Med.)。目前,以干细胞为种子的方法在细胞资源可得性和安全性方面还存在很大争议(Sing et al., 2013/07, US 8,475,788 B2; Abbot et al., 2012/06, US 2012/0156230 A1; Wirth III et al., 2019/08, US 2019/0262405 A1),硬性植入移植物的外科手术容易损伤残存的组织/轴突,加重功能缺陷(Langer et al., 2015/04, US9,440,008 B2; Dai et al., 2020/05, CN 1111109424 A; Dai et al., 2019/11, CN 110404078 A; Cheng et al., 2019/08, CN 110101918 A)。另一方面,为了在手术过程中尽量减少组织损伤,注射合成聚合物原位形成水凝胶被建议为SCI临床治疗的首选。例如,基于持续递送神经营养因子和重建必须的细胞外基质(ECM)的方法,提出了可注射材料促进SCI动物模型轴突的再生的策略(Song et al., 2020/10, US10,799,529 B2; Wang et al., 2012/12, US8,333,962 B2; Criscione et al., 2016/02, US 2016/0045439 A1; Pritchard et al., 2013/12, US 2013/0324500 A1)。尽管这些生物材料具有巨大的潜力,但在这些生物材料的临床治疗方面取得的成功十分有限,主要是没有综合考虑SCI组织愈合过程中神经炎症微环境的时空特性,精准调节SCI导致的免疫微环境失衡。

技术问题

[0003] 针对现有技术存在的问题,本发明提供了一种治疗中枢神经损伤的可注射水凝胶及其制备方法。根据疾病的进展,该水凝胶能在正确的时间节点,在病灶部位精确缓释免疫调控药物抑制过度的炎症反应,保护残留神经组织或轴突,抑制囊性空腔和瘢痕组织的形成,并长时间地缓释细胞生长因子,促进神经的再生,从而达到一种无瘢痕的组织愈合。水凝胶注射可以让脊髓受损后的动物运动功能恢复达到一个较高的水平,而且皮层电刺激和肌电图记录实验证实脑到肌肉的神经回路的重新建立。本发明开发了一种精确缓释药物及生长因子的可注射水凝胶体系,有望用于中枢神经损伤的临床治疗。

技术解决方案

[0004] 为解决上述技术问题，本发明采用了以下技术方案：一种治疗中枢神经损伤的可注射水凝胶，以精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸修饰过的多臂聚乙二醇-X与多臂聚乙二醇-Y通过点击化学反应得到用于病灶原位形成水凝胶支架的聚合物，所述聚合物还负载有纳米/微米粒子和细胞生长因子，所述纳米/微米颗粒负载有免疫调控药物和/或抗氧化药物；

所述多臂聚乙二醇-X和多臂聚乙二醇-Y中发生点击化学反应的官能团对X与Y选自：巯基与马来酰胺基、巯基与烯、叠氮与炔环、共轭双烯与取代烯烃、醛与酰肼、四嗪与降冰片烯、四嗪与异脒；

所述多臂聚乙二醇-X为4-臂聚乙二醇-X或3-臂聚乙二醇-X；所述多臂聚乙二醇-Y为4-臂聚乙二醇-Y或3-臂聚乙二醇-Y；

所述多臂聚乙二醇-X与多臂聚乙二醇-Y中聚乙二醇的聚合度n为1-1000。

作为优选方案，所述纳米/微米粒子选自反应基团修饰过的高分子微米/纳米粒子和/或脂质体中一种或多种的混合。

作为优选方案，所述纳米/微米粒子采用聚乙烯、明胶、胶原聚乳酸或脂质体粒子中的一种或多种的混合。

作为优选方案，所述免疫调控类/抗氧化类药物选自甲基强的松龙琥珀酸钠（MPSS）、异丙嗪、地塞米松、氢化可的松、布洛芬、羟基保泰松、环孢菌素A、藤霉素、硫唑嘌呤、6-巯基嘌呤、环磷酰胺、他克莫司（KF506）、雷帕霉素、霉酚酸酯、茶多酚（TP）、生育酚、丁基羟基茴香醚（BHA）、二丁基羟基甲苯（BHT）和/或叔丁基对苯二酚（TBHQ）中一种或多种的混合。

作为优选方案，所述细胞生长因子选自：碱性成纤维生长因子（bFGF）、脑源性神经营养因子（BDNF）、血管内皮生长因子（VEGF）、酸性成纤维生长因子（aFGF）、肝细胞生长因子（HGF）、睫状神经营养因子（CNTF）、胶质细胞衍生神经营养因子（GDNF）、神经营养因子-3（NT-3）、表皮生长因子（EGF）、白介素3（IL-3）、转化生长因子- α （TGF- α ）、血小板衍生的生长因子（PDGF）、胰岛素样生长因子-1（IGF-1）、骨形态发生蛋白（BMP）、结缔组织生长因子（CTGF）、骨桥蛋白（OPN）和/或生长激素释放因子（GRF）中一种或多种的混合。

本发明还提供了一种优选的上述治疗中枢神经损伤的可注射水凝胶的制备方法，包括以下步骤：

步骤 1: 高分子纳米粒子 (NP) 的合成: 在反应容器中, 将 DMAEMA、ST、ACLT-PEG-NHS、NaSS、MBA 加入水中, 然后加入氧化还原引发剂 KPS 和 SPS, 在温度为 $50 \pm 10^\circ\text{C}$ 、氮气保护和搅拌下聚合反应 3h 以上, 通过透析膜去除未反应完的单体得到纳米粒子 NP;

步骤 2: 在纳米粒子 NP 的表面修饰马来酰亚胺: 继续加入摩尔比为 1:1~1.1 的 MAL-NH₂ 和 ACLT-PEG-NHS, 在搅拌下进行马来酰亚胺改性反应至少 1h, 继续通过透析膜去除未反应完单体并冻干, 得到冻干的马来酰亚胺改性纳米粒子 NP-MAL;

步骤 3: NP-MAL 粒子负载 MPSS: 在 MPSS 的 PBS 溶液中, 加入上述得到的纳米粒子 NP-MAL 并静置过夜, 然后经过离心收集处理得到负载 MPSS 的纳米粒子, 并经过冻干处理得到负载 MPSS 的纳米粒子 MM-NPs;

步骤 4: 生长因子 GFs 的马来酰亚胺改性: 将生长因子 GFs 按照 1:30~70 的摩尔比与 sulfo-SMCC 混合反应, 得到马来酰亚胺改性的生长因子 GF-MAL;

步骤 5: 将 4a-PEG-MAL 和 RGD-PEG-SH 按 1:1 摩尔比混合, 得到 RGD 修饰过的 4a-PEG-MAL, 然后加入步骤 3 得到 MM-NPs 纳米粒子与步骤 4 得到的马来酰亚胺改性的生长因子 GF-MAL 并混合均匀形成溶液 A;

步骤 6: 溶液 B 的制备: 将 4a-PEG-SH 溶于缓冲溶液, 混合均匀形成溶液 B;

步骤 7: 将步骤 5 与步骤 6 中的溶液 A 和 B 按 1:1 比例混合反应, 即得到偶联负载药物的纳米粒子与生长因子的可注射水凝胶 MPG-HD。

作为优选方案, 步骤 1 聚合反应中各反应物浓度为 5% (w/v) DMAEMA、10% (w/v) ST、3% (w/v) ACLT-PEG-NHS、0.4% (w/v) NaSS、0.4% (w/v) MBA、0.2% (w/v) KPS 和 0.1% (w/v) SPS;

作为优选方案, 步骤 2, 4, 5, 6, 7 提供一对点击化学偶联的官能团巯基与马来酰胺基, 选自: 巯基与马来酰胺基、巯基与烯、叠氮与炔环、共轭双烯与取代烯烃、醛与酰肼;

作为优选方案, 步骤 3 中作为免疫调节或抗氧化药物的 MPSS 可由异丙嗪、地塞米松、氢化可的松、布洛芬、羟基保泰松、环孢菌素 A、藤霉素、硫唑嘌呤、6-巯基嘌呤、环磷酰胺、他克莫司 (KF506)、雷帕霉素、霉酚酸酯、茶多酚 (TP)、生育酚、丁基羟基茴香醚 (BHA)、二丁基羟基甲苯 (BHT) 和/或 叔丁基对苯

二酚（TBHQ）中一种或多种的混合代替。

有益效果

[0005] 有益效果：本发明开发了一种可注射的空腔填充和 ECM 形成支架的用于治疗中枢神经损伤的可注射水凝胶 MPG-HD，并具有以下效果：1）MPSS 在急性期的快速释放以抑制炎症；2）长时间持续释放 GFs 以促进轴突再生；3）有效减少了囊性空腔与瘢痕组织的形成，促进了神经再生；4）皮层刺激和肌电图记录显示神经元从大脑到肌肉的神经回路连接。

附图说明

[0006] 图 1a 为本发明所述马来酰亚胺改性 MPSS 负载纳米粒子 MM-NPs 的合成路线图。

图 1b 为本发明实施例制备的马来酰亚胺改性前纳米粒子 NP 的微观形貌图。

图 1c 为本发明实施例制备的马来酰亚胺改性后纳米粒子 NP-MAL 的微观形貌图。

图 1d 为本发明实施例制备的马来酰亚胺改性 MPSS 负载纳米粒子 MM-NPs 的电位变化图。

图 1e 为本发明实施例制备的 MM-NPs 的粒径分布图。

图 1f 为本发明实施例制备的 MM-NPs 表面马来酰亚胺定量图。

图 1g 为本发明实施例制备的 MM-NPs 与 4a-PEG-SH 反应后的巯基减少定量图。

图 2a 为本发明所述可注射水凝胶 MPG-HD 的合成制备机理示意图。

图 2b 为本发明所述不同浓度可注射水凝胶的弹性模量图。

图 2c 为本发明所述可注射水凝胶的降解速率图。

图 2d 为本发明所述可注射水凝胶的溶胀速率图。

图 2e 为本发明所述可注射水凝胶中 MPSS 缓释速度图。

图 2f 为本发明所述可注射水凝胶的生长因子缓释速度图。

图 2g 为本发明所述可注射水凝胶浸出物用于细胞培养的活细胞指标图。

图 3a 为本发明实施例大鼠损伤部位注射 PBS、G-HD 和 MPG-HD 的试验流程示意图。

图 3b 为本发明实施例大鼠损伤部位注射 PBS、G-HD 和 MPG-HD 的试验示意图；

图 3c 为本发明实施例大鼠损伤部位注射 PBS、G-HD 和 MPG-HD 后损伤部位的 HE 染色图。

图 3d 为本发明实施例大鼠损伤部位注射 PBS、G-HD 和 MPG-HD 后脊髓形状变化图。

图 3e 为本发明实施例大鼠损伤部位注射 PBS、G-HD 和 MPG-HD 后脊髓三维重建图。

图 3f 为本发明实施例大鼠损伤部位注射 PBS、G-HD 和 MPG-HD 后各组织和空洞体积图。

图 3g 为本发明实施例大鼠损伤部位注射 PBS、G-HD 和 MPG-HD 后行为学评分图。

图 4a 为本发明所述损伤部位及前后的 5-HT 轴突再生状况免疫染色图。

图 4b 为本发明所述损伤部位及前后的本体神经轴突再生状况免疫染色图。

图 4c 为本发明所述损伤部位及前后的神经纤维再生状况免疫染色图。

图 4d 为本发明所述损伤前后的 5-HT 轴突的数量统计图。

图 4e 为本发明所述损伤前后的本体神经轴突的数量统计图。

图 4f 为本发明所述损伤前后的神经纤维的数量统计图。

图 5a 为本发明实施大鼠损伤部位注射 PBS、G-HD 和 MPG-HD 后大脑皮层诱发电位图。

图 5b 为本发明实施大鼠损伤部位注射 PBS、G-HD 和 MPG-HD 后后肢运动和肌电发放情况图。

本发明的最佳实施方式

[0007] 下面结合附图并以具体实施例，进一步阐明本发明。应理解这些实施例仅用于说明本发明而并不用于限制本发明的范围，在阅读了本发明之后，本领域技术人员对本发明的各种等价形式的修改均落于本申请所附权利要求所限定的范围。以下是物质英文缩写和中文名称注释：

英文缩写	中文名称注释
ST	苯乙烯
NaSS	4-乙烯基苯磺酸钠
SPS	焦亚硫酸钠
DMAEMA	甲基丙烯酸 2-二甲氨基乙酯
KPS	过硫酸钾
MBA	N, N'-亚甲基双丙烯酰胺
NH ₂ -MAL	1-(2-氨基乙基)-1H-吡咯-2,5-二酮盐酸盐
MPSS	甲基强的松龙琥珀酸钠
ACLT-PEG-NHS	丙烯酸酯-聚乙二醇-N-羟基琥珀酰亚胺酯
4-arm-PEG-MAL (4a-PEG-MAL)	4-臂聚乙二醇-马来酰亚胺
4-arm-PEG-SH (4a-PEG-SH)	4-臂聚乙二醇-硫醇
RGD-PEG-SH	精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸 (RGD)-聚乙二醇-硫醇
G-HD	负载生长因子的可注射水凝胶
MPG-HD	负载 MPSS 纳米颗粒与生长因子的可注射水凝胶
sulfq-SMCC	磺基琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸盐
MM-NPs	马来酰亚胺改性 MPSS 负载纳米粒子
NPs	纳米粒子
bEGF	碱性成纤维细胞生长因子
VEGF	血管内皮生长因子
BDNF	脑源性神经营养因子
ECM	细胞外基质
GFAP	胶质纤维酸性蛋白
mCherry	红色荧光蛋白
SCI	脊髓损伤
PBS	磷酸缓冲盐溶液
5-HT	5-羟色胺
NF	神经丝

一、马来酰亚胺改性 MPSS 纳米粒子的合成

马来酰亚胺改性 MPSS 负载纳米粒子 MM-NPs 的制备：采用无皂乳液一步聚合

法。

纳米粒子 NP 的合成（采用 DMAEMA、ST、ACLT-PEG-NHS、NaSS 和 MBA 合成纳米颗粒的核）：将 DMAEMA（w/v5%）、ST（w/v10%）、ACLT-PEG-NHS（w/v3%）、NaSS（w/v0.4%）、MBA（w/v0.4%）和水的混合物加入四颈烧瓶内，烧瓶设有氮气出口、进口和进料口；然后，将氧化还原引发剂 KPS（w/v0.2%）和 SPS（w/v0.1%）溶于水中，在反应混合物溶液和引发剂溶液中分别加入缓慢的氮气流 1 小时，接着将引发剂溶液加入反应混合物溶液中，并在 160 rpm 和 $50\pm5^{\circ}\text{C}$ 下进行聚合反应，反应 5 h 后，使用透析膜（MWCO 14 kDa）在去离子水中透析反应混合物 48 h，以去除未反应的单体。

马来酰亚胺改性：在反应混合物中加入 1mg/ml MAL-NH₂，摩尔比为 1:1 的 ACLT-PEG-NHS，室温搅拌 4h。然后，使用透析膜（14KDa）对去离子水透析反应混合物，并冻干，得到冻干的纳米粒子 NP-MAL。

马来酰亚胺改性后的 MPSS 负载：将 0.1g 冻干纳米粒 NP-MAL 浸入溶于 PBS 中的 4ml 浓度为 5mg/ml 的 MPSS 中过夜，并以 30000 rpm 离心收集 60min（美国 Beckman Beckman 的 Optimal MAX-XP），然后冻干（图 1a）。

如图 1b 和 1c 分别是马来酰亚胺改性前后纳米粒子的微观形貌，从图可知：马来酰亚胺改性前观察到边界清晰的粒子（图 1b），改性后观察到具有亲水层的粒子（图 1c），纳米颗粒的粒径为 110nm，与动态光散射的研究结果接近（图 1e）。

用 Elleman 试验也证实了本发明马来酰亚胺在纳米粒子表面的改性（图 1f）以及粒子与 4a-PEG-SH 中硫醇基的反应（图 1g）。计算了纳米颗粒表面马来酰亚胺基团浓度为 0.85mmol/g，加入纳米颗粒后，4a-PEG-SH 中巯基含量降低了 0.12mmol。

二、马来酰亚胺改性的生长因子及效率评价

生长因子 GFs 的马来酰亚胺改性：所述生长因子采用浓度为 50ng/ml 的 bFGF、BDNF 和 VEGF，生长因子 GFs 与 sulfo-SMCC 以 1:50 的摩尔比反应 5min，然后用 3T3、C6 和 HUVEC 细胞检测马来酰亚胺修饰 bFGF、BDNF 和 VEGF 的活性。将细胞分别接种于 96 孔无生长因子培养基上，孵育 24h 后，用 PBS 洗涤细胞。然后，将 0.1ml 改性或未改性的含有生长因子的培养基按所示形式加入

每个孔中，对照样品加入无生长因子培养基，将培养板在 37°C、含 5% CO₂ 的增湿空气中培养 24 小时，并使用细胞增殖试剂盒 I (MTT) 测量细胞活性，在 550 nm 波长下用微板阅读器测定吸光度。

细胞系	NIH 3T3	C6	HUVEC
中等	DMEM	DMEM	EGM-2
生长因子	bFGF (30ng/ml)	BDNF (100ng/ml)	VEGF (30 ng/ml)
细胞数 (细胞/孔)	40000 个	60000 个	40000 个

结果显示：经修饰的 GFs 与正常 GFs 培养的细胞活力无明显差异。在所有三种 GFs 中，非 GFs 条件下的存活率低于添加 GFs 的条件。

三、可注射水凝胶溶液 MPG-HD 的制备

MPG-HD 按以下方法制备：将 RGD-PEG-SH 以 1:1 的摩尔比添加到 4a-PEG-MAL (5%, wt%) 中，然后与 MM-NPs (20%, wt%) 混合，将马来酰亚胺修饰的 VEGF (10ng/μl)、BDNF (50ng/μl)、bFGF (10ng/μl) 加入形成溶液 A。将 4a-PEG-SH 溶于缓冲溶液中形成溶液 B (5%, wt%)。将溶液 A 和 B 按 1:1 的比例混合，进行聚合反应制成 MPG-HD (图 2a)。巯基马来酰亚胺 Michael 加成反应可在高浓度 (高于 2.5%) 下以小于 3 秒的凝胶速率形成水凝胶，在稀释条件下 (1%) 未观察到凝胶化。在弹性模量测试中，测量了浓度 2.5% 到 10% 的凝胶，5% 的凝胶显示出与脊髓组织相似的模量 (图 2b)。

本发明的实施方式

[0008] 本实施例可注射水凝胶 MPG-HD 的制备是通过具有反应基团对巯基 (-SH) 与马来酰胺基 (-MAL) 的 4-臂聚乙二醇进行点击化学反应耦合而成，因此需要指出的是：能发生点击化学反应耦合的反应基团对均可以代替，也属于本发明的保护范围。例如：巯基与烯、叠氮与炔环、共轭双烯与取代烯烃、醛与酰肼、四嗪与降冰片烯、四嗪与异脒。

另外，本发明可注射水凝胶 MPG-HD 制备过程通过多臂聚乙二醇-X 和多臂聚乙二醇-Y 中发生点击化学反应的官能团对 X-Y 进行耦联，而精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸 (RGD) 对多臂聚乙二醇-X 和/或多臂聚乙二醇-Y 进行修饰，目的是用于提高 MPG-HD 的粘性和生物亲近性。

本实施例制备的可注射水凝胶 MPG-HD 负载的免疫调节或抗氧化药物采用的是

MPSS, 而例举的异丙嗪、地塞米松、氢化可的松、布洛芬、羟基保泰松、环孢菌素 A、藤霉素、硫唑嘌呤、6-巯基嘌呤、环磷酰胺、他克莫司 (KF506)、雷帕霉素、霉酚酸酯、茶多酚 (TP)、生育酚、丁基羟基茴香醚 (BHA)、二丁基羟基甲苯 (BHT) 和/或 叔丁基对苯二酚 (TBHQ) 中一种或多种的混合作为免疫调节或抗氧化药物同样可以替换, 属于本发明的保护范围。

同样的, 本实施例制备的可注射水凝胶 MPG-HD 负载的细胞生长因子 GFs 可选用: 碱性成纤维生长因子 (bFGF)、脑源性神经营养因子 (BDNF)、血管内皮生长因子 (VEGF)、酸性成纤维生长因子 (aFGF)、肝细胞生长因子 (HGF)、睫状神经营养因子 (CNTF)、胶质细胞衍生神经营养因子 (GDNF)、神经营养因子-3 (NT-3)、表皮生长因子 (EGF)、白介素 3 (IL-3)、转化生长因子- α (TGF- α)、血小板衍生的生长因子 (PDGF)、胰岛素样生长因子-1 (IGF-1)、骨形态发生蛋白 (BMP)、结缔组织生长因子 (CTGF)、骨桥蛋白 (OPN) 和 / 或生长激素释放因子 (GRF) 中一种或多种的混合。

工业实用性

[0009] 四、可注射水凝胶溶液 MPG-HD 的在 SCI 治疗的治疗效果表征

a、可注射水凝胶 MPG-HD 的物化性质表征

采用万能材料测试机, 根据应力-应变曲线的线性部分计算了水凝胶的弹性模量。简单地说, 用 A 溶液和 B 溶液按 1:1 的比例混合, 制备了厚度为 1cm 的水凝胶 (w/v 2.5%, 5%, 10%)。采用万能材料试验机 (Roell Z020, Wick, Germany) 在 50N 静态称重传感器下, 以 0.5mm/min 的应变率测量应力-应变曲线。另外, 水凝胶的降解和溶胀通过以下方式测量, 将 2ml 水凝胶 (5%) 在 5ml PBS 中 37°C 孵育 60 天, 以评估水解降解。在 0、0.5、1、3、5、7、15、30、60 天, 分别测量湿凝胶和冻干凝胶的质量。冻干前, 水凝胶在蒸馏水中清洗, 以除去表面可能积聚的残留盐。通过与 0 天样品的干重进行比较, 确定每个样品的总干聚合物质量损失。溶胀率计算为 $(M_s - M_d) / M_d$ 。

在降解实验中, 水凝胶在 7 天内呈线性降解, 2 周后显著降低, 2 个月时降解达到 80% (图 2c), 这说明水凝胶可以支持细胞在 2 个月的慢性期迁移。

溶胀研究表明, 在 PBS 中浸泡 1 天后, 平衡低膨胀率达到 31%, 然后在 7 天后保持不变 (图 2d)。低溶胀率可避免大体积溶胀造成的组织损伤。因此, 本发

明制备的水凝胶具有适合脊髓损伤注射的特性。

b、可注射水凝胶 MPG-HD 在 SCI 治疗过程中的 MPSS 和生长因子的持续释放

通过以下方法研究并验证 MPSS 和生长因子在水凝胶中的释放动力学。按上述方法制备 200 μ l 水凝胶，其中含有上述 MPSS 和生长因子。在每根试管中加入 2ml PBS，并在 37 $^{\circ}$ C 下孵育。0、0.5、1、3、5、7、15、30、60 天后，提取上清液，并在 -80 $^{\circ}$ C 下保存在 Eppendorf 管中。根据现有程序使用高效液相色谱法分析 0、1、3、5、7 天的 MPSS 浓度。生长因子浓度的检测则使用 bFGF-ELISA 试剂盒按说明书测定 bFGF 浓度。结果显示：通过马来酰亚胺与硫醇的相互作用，使 bFGF 缓释 1 个月。在未改性条件下，GFs 以高速释放，在第 7 天达到最终浓度（图 2f）。与没有纳米颗粒的情况（1 天）相比，包埋在纳米颗粒中的 MPSS 显示出较慢的释放速率（3 天）（图 2e）。MPSS 在 NPs 条件下可以缓释 3 天，这足够覆盖脊髓损伤的急性期。

c、细胞毒性

细胞毒性评价：采用水凝胶和纳米颗粒复合浸泡培养基。用 MTT 比色法测定细胞活力，结果显示：水凝胶 MPG-HD 浸泡悬浮液培养的细胞显示出与非凝胶培养基相似的细胞活力（图 2g），这说明我们使用的材料没有或非常低的细胞毒性，并且在体内不会引起细胞死亡。

d、MPG-HD 减少挫伤性脊髓损伤后的空洞形成

雌性 sprague-dawley 大鼠（200-250g，二级，证书号：SCXK2008-0033，浙江省医学科学院实验动物中心，杭州市）撞伤后 1 周，在损伤部位注射 PBS、G-HD 或 MPG-HD（图 3a,b）。伤后 8 周，观察注射后脊髓组织空腔大小。

结果显示：

（1）脊髓注射 PBS 后，其形状严重变形，损伤部位完整组织大量丢失（图 3c-e）。

（2）G-HD 注射显示出比 PBS 对照组更小的空腔大小和更完整的脊髓组织（图 3c-e）。但是空腔仍然很大，大约 20% 的脊髓组织消失了。

（3）与其他两种情况相比，注射 MPG-HD 的脊髓更完整，变形更小（图 3c-e），在横切面图像中，注射 MPG-HD 使动物囊腔几乎完全消失（图 c,f）并充满了 ECM 组织。

在脊髓三维重建的定量结果中，G-HD 和 MPG-HD 注射后，空腔体积减小，

MPG-HD 注射使空腔体积减少到总体积的 0.8%，约为 PBS 腔的 1/40 和 G-HD 注射的 1/20。G-HD 和 MPG-HD 注射后，脊髓中病理组织体积（定义为无正常组织结构的体积）显著增加，残存的完整组织（包括白质和灰质）在这些脊髓中也显著增加（图 3f）。

在功能和行为方面，我们发现在治疗后的前 2-3 周内，这些治疗都没有使运动能力有显著改善。然而，与 PBS 对照组动物（主要表现为后肢瘫痪）相比，接受 G-HD 治疗的大鼠在 5 周时间点首先表现出大范围的踝关节运动，并在注射后 8 周达到平台，BBB 评分为 4-5 分，这和形态学上比 PBS 组表现出的更小的空腔大小和更少的脊柱形状变形是吻合的。而在 MPG-HD 治疗组中，动物表现出一致的后肢足底位置和负重步态，在 6 周的时间点后，10 只动物中有 6 只的 BBB 得分为 8-10（图 3g），这表明 MPG-HD 在脊髓损伤疾病进展后释放 GFs 和 MPSS 可显著改善后肢运动功能恢复，在严重损伤模型中，负重步行能力被认为是功能恢复的限制步骤。

e、可注射水凝胶 MPG-HD 抑制囊性空腔与瘢痕组织形成并促进轴突再生

为了进一步评估水凝胶注射诱导的再生，我们收集了损伤部位的脊髓和头、尾侧组织（图 4a-c）。取 3 种神经纤维，用 AAV2/9-mCherry 注入上胸椎脊髓追踪降支轴突（脊髓上或长本体脊髓），免疫染色观察 5-HT 轴突和神经丝阳性轴突（NF 轴突）。

结果显示：在注射 PBS 的对照脊髓中，损伤部位存在向头侧延伸的大空腔，没有任何组织基质，宿主和移植体之间形成的腔边缘致密的 GFAP⁺瘢痕（图 4a, b, c, PBS, 箭头标示），所有动物（n=10）均无轴突伸入腔内（图 4a, b, c, PBS）。相反，在 MPG-HD 治疗中，囊性空腔被 ECM 所替代，宿主和移植体之间形成的腔边缘呈现疏松状，没有致密 GFAP⁺瘢痕（图 4 a, b, c, MPG-HD, 箭头标示），在运动恢复中起重要作用的 5-羟色胺能（5-HT）轴突生长并延伸到纤维化基质中（图 4a, MPG-HD 线, a', a''）。此外，纤维化基质中央区域也观察到 mcherry 标记的红色固有脊髓轴突（图 4b, MPG-HD, b', b''）。在 MPG-HD 治疗中，大量 NF⁺的轴突纤维明显地重新长入纤维化基质，穿过损伤部位并延伸到损伤下方的脊髓节段，这在 PBS 注射的动物中没有观察到（图 4c, c', c''）。另一方面，与预期的 PBS 注射动物相比，G-HD 处理的脊髓显示出更小的空腔形成

和一些轴突再生。脊髓冠状面图像和损伤部位下方轴突密度的定量分析表明，MPG-HD 治疗的动物在损伤处的 5-HT、本体脊髓和 NF⁺轴突明显多于 G-HD 或 PBS 注射的动物，这可能不仅是由于改善了轴突再生造成的，也与有更多的轴突残留有关。

MPG-HD 治疗促进脊髓神经回路重建

电生理记录，以评估从中枢到外周神经元的神经回路的连接情况。结果显示：在皮层电刺激同时记录 TA 肌肉的电信号，证实经 MPG-HD 治疗的脊髓能更有效地将下行神经信号传递到腰椎段脊髓。本实验仅在注射 MPG-HD 的动物身上记录到与正常动物相比延迟更大，幅度更微弱的肌电信号，表明通过 MPG-HD 治疗重建的神经环路存在多个突触连接，而且能将部分皮层电刺激产生的电信号，传递给受伤动物腰段脊髓的运动神经元(图 5a)。在自由行走过程中，注射 PBS 的大鼠不能支撑体重，后肢无关节活动。在注射 G-HD 的大鼠中，捕捉到膝关节的轻微运动和体重的支撑。与之相对应，注射 MPG-HD 的大鼠能支撑体重，并能做与正常大鼠相似的步态。肌电图显示，注射 MPG-HD 后，大鼠 TA、GS 活动明显，后肢总步幅明显增加。与正常大鼠一样，记录了步态时 TA 和 GS 的交替激活。但 GS 信号明显弱于正常大鼠，提示 MPG-HD 注射大鼠出现了次优的后肢运动功能恢复(图 5b)。结果表明，注射 MPG-HD 可使严重脊髓挫伤模型动物的建立新的伸进环路连接，恢复部分负重步行能力。

以上结果表明本发明成功制备了具有药物释放能力的可注射水凝胶，能用于 SCI 的修复，具体特征如下：

- 1、通过本发明制备的可注射水凝胶 MPG-HD 能使脊髓损伤的原位凝胶化，确保了其能适配空腔的形状，从而使脊髓组织和凝胶之间的间隙最小化。在损伤部位注入的水凝胶为成纤维细胞的迁移和侵袭提供了支架，形成富含成纤维细胞的 ECM，从而减少孔洞产生。
- 2、本发明的可注射水凝胶 MPG-HD 具有合适的溶胀比，降低了损伤部位残留组织二次损伤风险。
- 3、本发明通过反应基团修饰的负载药物的纳米粒子/GFs 与水凝胶的反应基团通过点击化学耦合，使药物或生长因子能在损伤部位分时段释放，适应脊髓损伤后病理变化。

4、本发明制备的可注射水凝胶 MPG-HD 有助于减少瘢痕组织生成，促进脊髓神经再生。

5、本发明制备的可注射水凝胶 MPG-HD 有助于脊髓神经回路的重建，促进功能恢复。

权利要求书

1、一种治疗中枢神经损伤的可注射水凝胶，其特征在于：以精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸修饰过的多臂聚乙二醇-X与多臂聚乙二醇-Y通过点击化学反应得到用于病灶原位形成水凝胶支架的聚合物，所述聚合物还负载有纳米/微米粒子和细胞生长因子，所述纳米/微米颗粒负载有免疫调控药物和/或抗氧化药物；

所述多臂聚乙二醇-X和多臂聚乙二醇-Y中发生点击化学反应的官能团对X与Y选自：巯基与马来酰胺基、巯基与烯、叠氮与炔环、共轭双烯与取代烯烃、醛与酰肼、四嗪与降冰片烯、四嗪与异脒；

所述多臂聚乙二醇-X为4-臂聚乙二醇-X或3-臂聚乙二醇-X；所述多臂聚乙二醇-Y为4-臂聚乙二醇-Y或3-臂聚乙二醇-Y；

所述多臂聚乙二醇-X与多臂聚乙二醇-Y中聚乙二醇的聚合度n为1-1000。

2、根据权利要求1所述治疗中枢神经损伤的可注射水凝胶，其特征在于，所述纳米/微米粒子选自反应基团修饰过的高分子微米/纳米粒子和/或脂质体中一种或多种的混合。

3、根据权利要求2所述治疗中枢神经损伤的可注射水凝胶，其特征在于，所述纳米/微米粒子采用聚乙烯、明胶、胶原聚乳酸或脂质体粒子中的一种或多种的混合。

4、根据权利要求1所述治疗中枢神经损伤的可注射水凝胶，其特征在于，所述免疫调控类/抗氧化类药物选自甲基强的松龙琥珀酸钠(MPSS)、异丙嗪、地塞米松、氢化可的松、布洛芬、羟基保泰松、环孢菌素A、藤霉素、硫唑嘌呤、6-巯基嘌呤、环磷酰胺、他克莫司(KF506)、雷帕霉素、霉酚酸酯、茶多酚(TP)、生育酚、丁基羟基茴香醚(BHA)、二丁基羟基甲苯(BHT)和/或叔丁基对苯二酚(TBHQ)中一种或多种的混合。

5、根据权利要求1所述治疗中枢神经损伤的可注射水凝胶，其特征在于，所述细胞生长因子选自：碱性成纤维生长因子(bFGF)、脑源性神经营养因子(BDNF)、血管内皮生长因子(VEGF)、酸性成纤维生长因子(aFGF)、肝细胞生长因子(HGF)、睫状神经营养因子(CNTF)、胶质细胞衍生神经营养因子(GDNF)、神经营养因子-3(NT-3)、表皮生长因子(EGF)、白介素3(IL-3)、转化生长因子- α (TGF- α)、血小板衍生的生长因子(PDGF)、胰岛素样生长因子-1(IGF-1)、骨形态发生蛋白(BMP)、结缔组织生长因子(CTGF)、骨桥蛋

白 (OPN) 和 / 或生长激素释放因子 (GRF) 中一种或多种的混合。

6、一种权利要求 1~5 任一所述治疗中枢神经损伤的可注射水凝胶的制备方法, 包括以下步骤:

步骤 1: 高分子纳米粒子 (NP) 的合成: 在反应容器中, 将 DMAEMA、ST、ACLT-PEG-NHS、NaSS、MBA 加入水中, 然后加入氧化还原引发剂 KPS 和 SPS, 在温度为 $50\pm 10^{\circ}\text{C}$ 、氮气保护和搅拌下聚合反应 3h 以上, 通过透析膜去除未反应完的单体得到纳米粒子 NP;

步骤 2: 在纳米粒子 NP 的表面修饰马来酰亚胺: 继续加入摩尔比为 1:1~1.1 的 MAL-NH₂ 和 ACLT-PEG-NHS, 在搅拌下进行马来酰亚胺改性反应至少 1h, 继续通过透析膜去除未反应完单体并冻干, 得到冻干的马来酰亚胺改性纳米粒子 NP-MAL;

步骤 3: NP-MAL 粒子负载 MPSS: 在 MPSS 的 PBS 溶液中, 加入上述得到的纳米粒子 NP-MAL 并静置过夜, 然后经过离心收集处理得到负载 MPSS 的纳米粒子, 并经过冻干处理得到负载 MPSS 的纳米粒子 MM-NPs;

步骤 4: 生长因子 GFs 的马来酰亚胺改性: 将生长因子 GFs 按照 1:30~70 的摩尔比与 sulfo-SMCC 混合反应, 得到马来酰亚胺改性的生长因子 GF-MAL;

步骤 5: 将 4a-PEG-MAL 和 RGD-PEG-SH 按 1:1 摩尔比混合, 得到 RGD 修饰过的 4a-PEG-MAL, 然后加入步骤 3 得到 MM-NPs 纳米粒子与步骤 4 得到的马来酰亚胺改性的生长因子 GF-MAL 并混合均匀形成溶液 A;

步骤 6: 溶液 B 的制备: 将 4a-PEG-SH 溶于缓冲溶液, 混合均匀形成溶液 B;

步骤 7: 将步骤 5 与步骤 6 中的溶液 A 和 B 按 1:1 比例混合反应, 即得到偶联负载药物的纳米粒子与细胞生长因子的可注射水凝胶 MPG-HD。

7、根据权利要求 5 所述治疗中枢神经损伤的可注射水凝胶的制备方法, 其特征在于: 步骤 1 聚合反应中各反应物浓度为 5% (w/v) DMAEMA、10% (w/v) ST、3% (w/v) ACLT-PEG-NHS、0.4% (w/v) NaSS、0.4% (w/v) MBA、0.2% (w/v) KPS 和 0.1% (w/v) SPS。

8、根据权利要求 5 所述治疗中枢神经损伤的可注射水凝胶的制备方法, 其特征在于: 步骤 3、7 中的载药纳米/微米粒子通过偶联反应负载在水凝胶上。

9、根据权利要求 6 所述治疗中枢神经损伤的可注射水凝胶的制备方法，其特征在于：步骤 4、7 中生长因子通过偶联反应负载在水凝胶上。

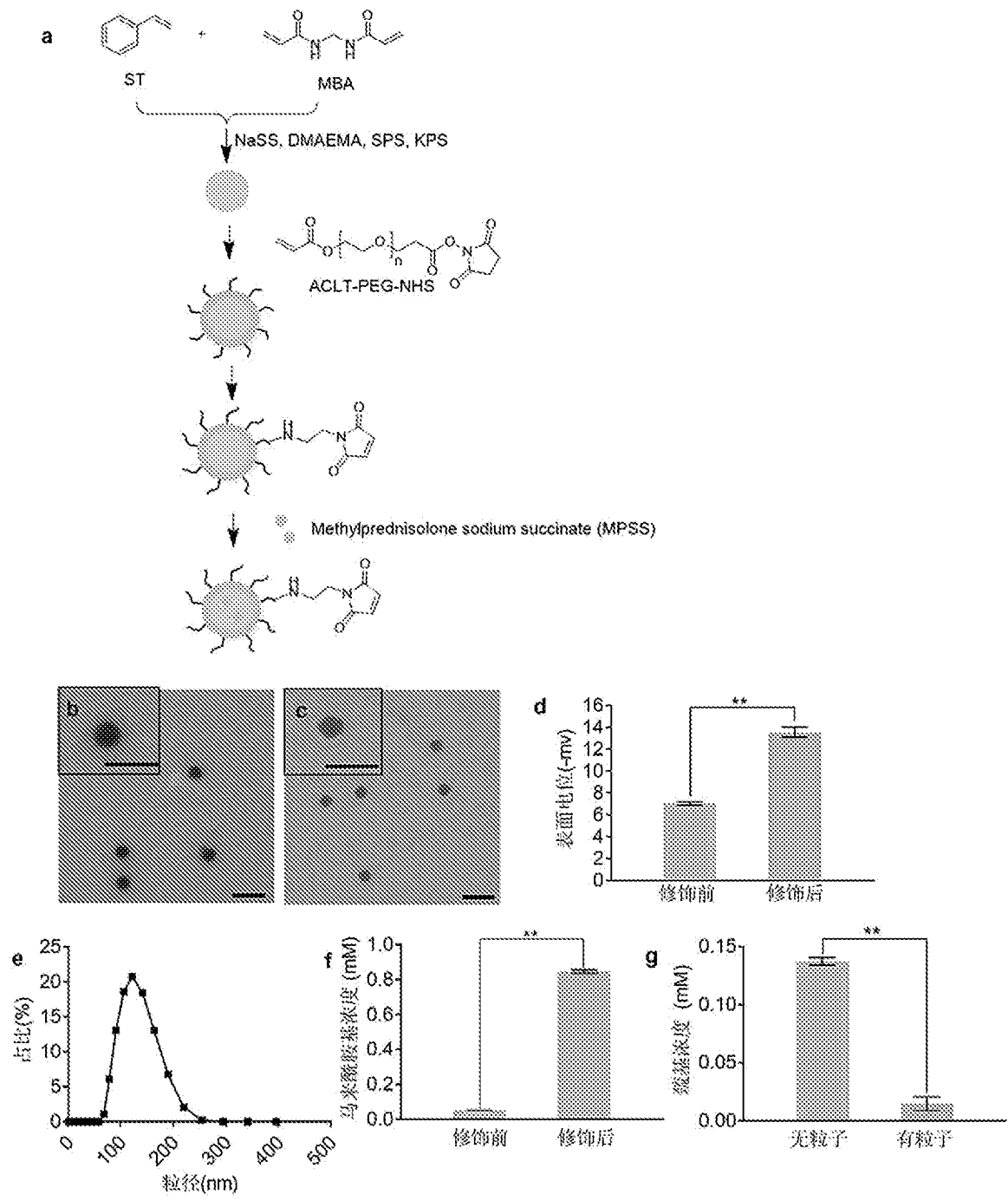


图 1

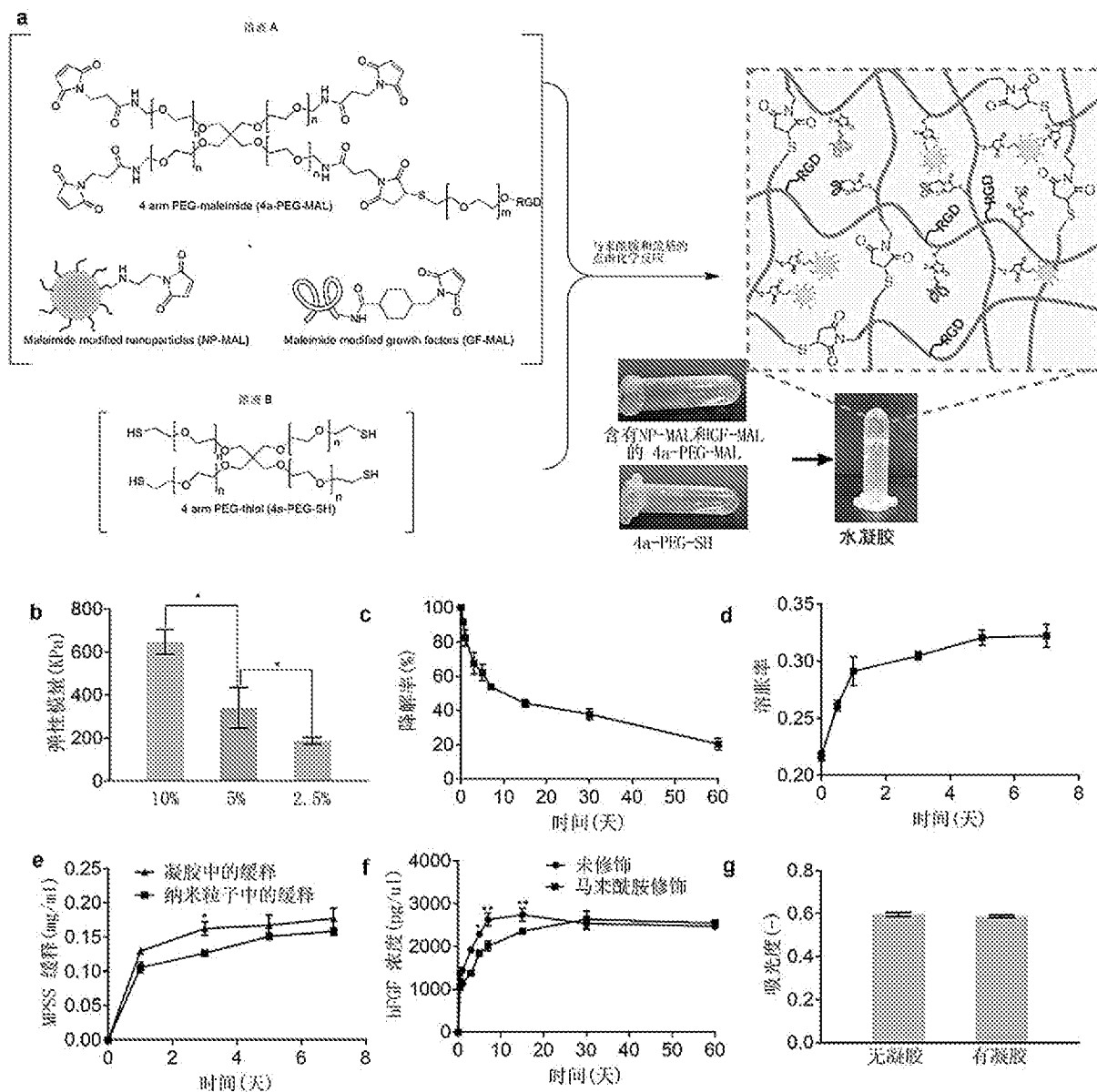


图 2

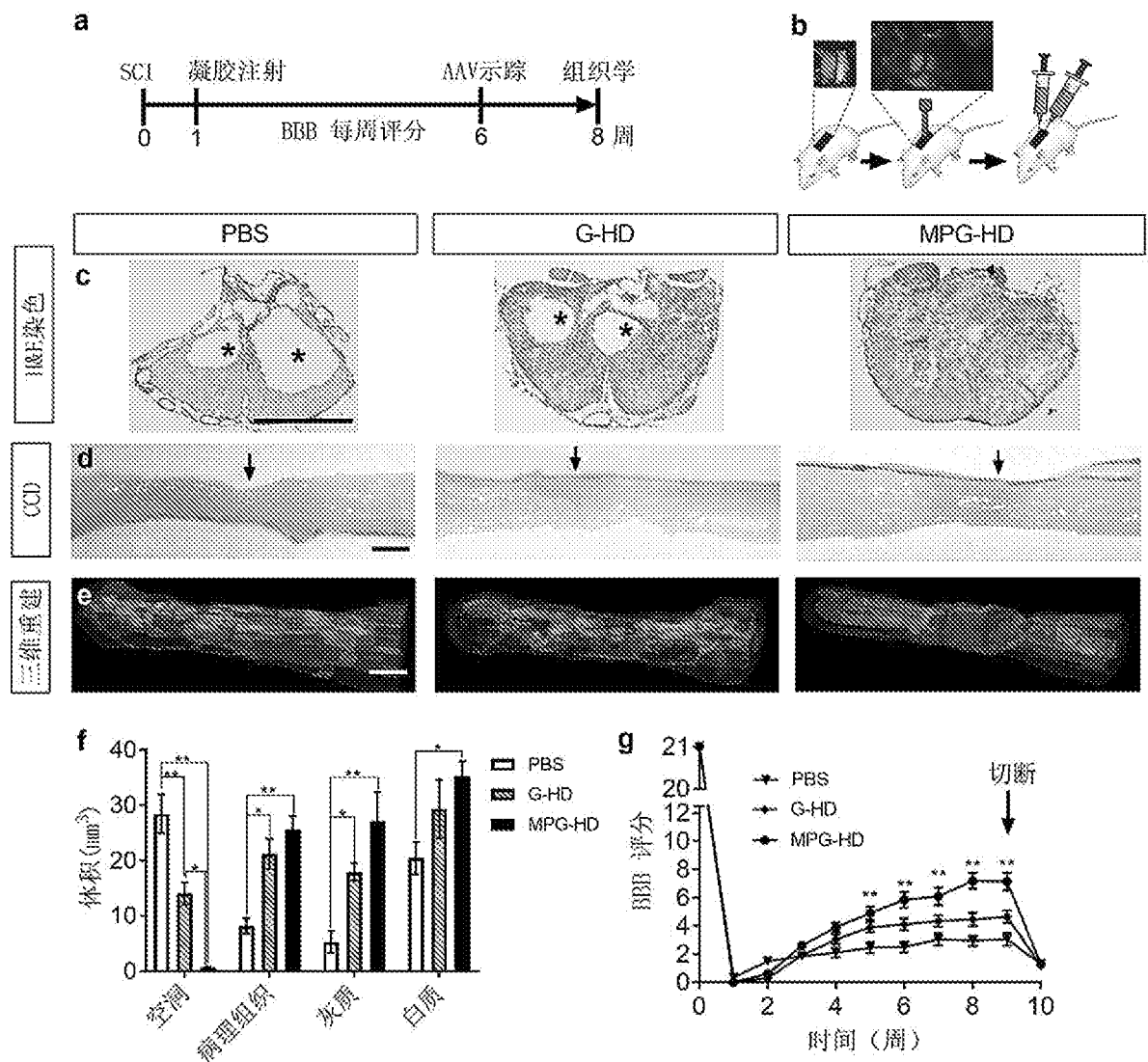


图 3

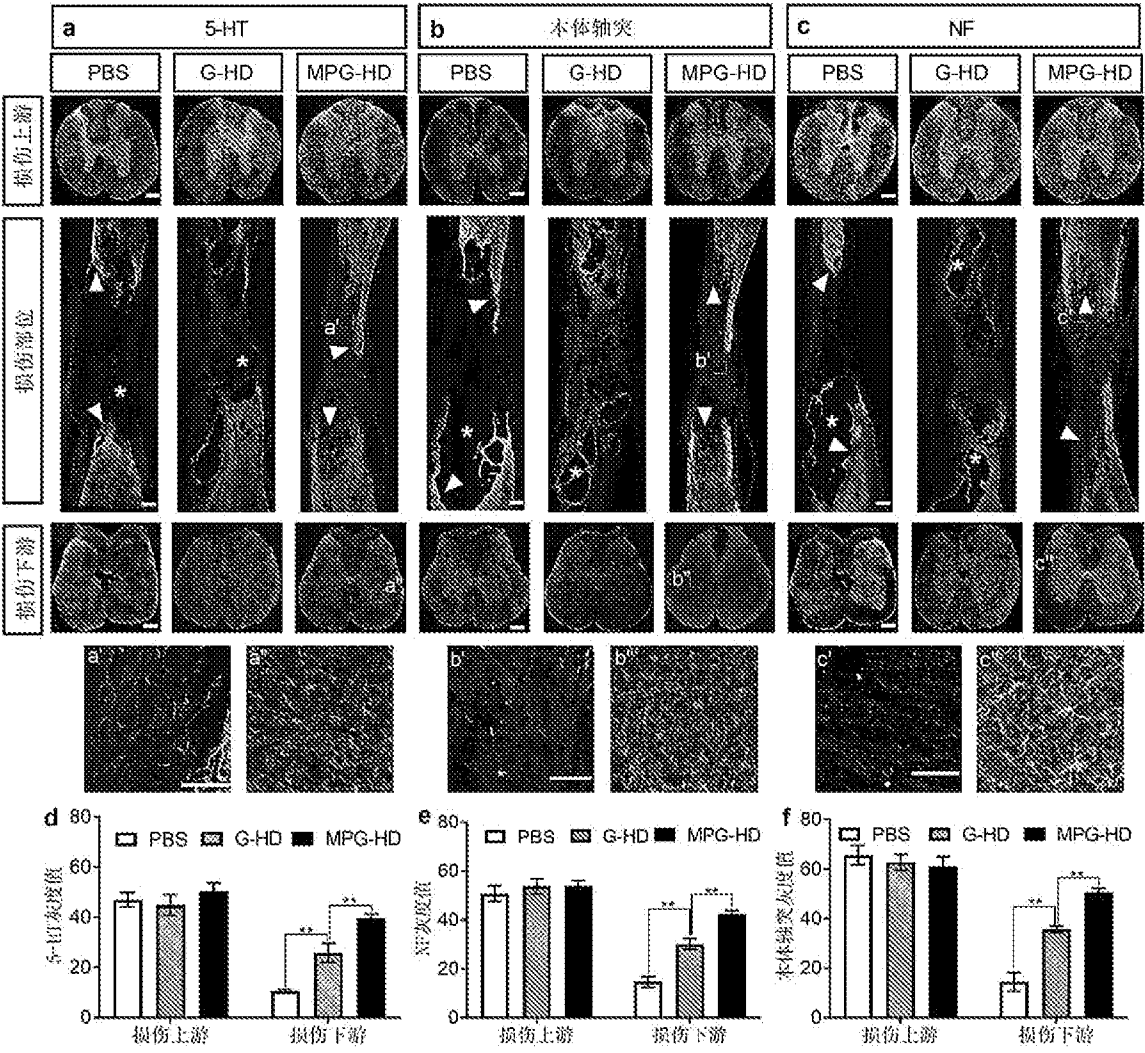


图 4

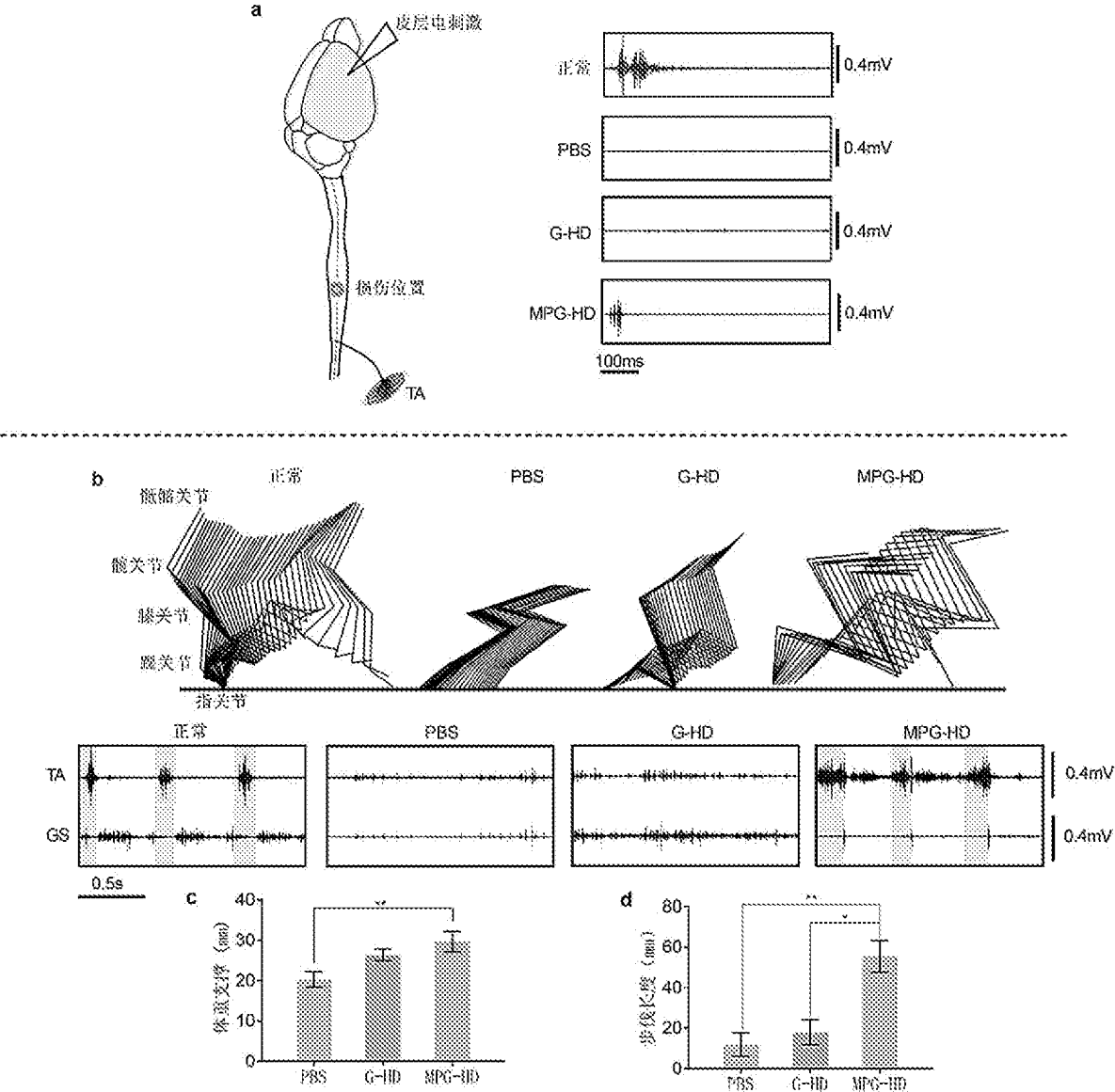


图 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/131330

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61L 27/18(2006.01)i; A61L 27/16(2006.01)i; A61L 27/22(2006.01)i; A61L 27/24(2006.01)i; A61L 27/50(2006.01)i;
A61L 27/52(2006.01)i; A61L 27/54(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS; CNTXT; SIPOABS; DWPI; WOTXT; USTXT; EPTXT; STNext; 百度学术: 精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸, RGD, 多臂聚乙二醇, 点击化学, 原位, 水凝胶, 甲基强的松龙, 细胞生长因子, multi-arm PEG, click chemistry, in situ, hydrogel, methylprednisolone, growth factor, 浙江大学, 王绪化, 陈作兵, 叶婧佳, 靳爽, 蔡万雄, 张天芳

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2015148317 A1 (INVIVO THERAPEUTICS CORPORATION et al.) 28 May 2015 (2015-05-28) claims 1, 7, 8, description paragraphs 32, 33, 42, 45, 49, 51	1-5
Y	US 2012282324 A1 (JIN Xing et al.) 08 November 2012 (2012-11-08) claims 1, 3-5, description paragraphs 68, 72, 116	1-5
Y	LIU, Shao Qiong et al., "Biodegradable poly(ethylene glycol)-peptide hydrogels with well-defined structure and properties for cell delivery," <i>Biomaterials</i> , Vol. 30, 31 December 2009 (2009-12-31), pp. 1453-1461	1-5
A	WO 2018144966 A1 (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY et al.) 09 August 2018 (2018-08-09) claims 1-76	1-9
A	CN 104399118 A (WUHAN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY) 11 March 2015 (2015-03-11) claims 1-10	1-9



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 July 2021

Date of mailing of the international search report

09 August 2021

Name and mailing address of the ISA/CN

**China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing
100088, China**

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/131330

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 108525017 A (WUHAN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY) 14 September 2018 (2018-09-14) claims 1-10	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2020/131330

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
US	2015148317	A1	28 May 2015	KR	20110081209	A	13 July 2011
				JP	2013234205	A	21 November 2013
				AU	2009296394	B2	09 January 2014
				US	2013324500	A1	05 December 2013
				CA	2738766	A1	01 April 2010
				BR	PI0913697	A2	11 October 2016
				EP	2346515	A1	27 July 2011
				US	2010196481	A1	05 August 2010
				AU	2009296394	A1	01 April 2010
				EP	2346515	A4	23 January 2013
				WO	2010036961	A1	01 April 2010
				CN	102858353	A	02 January 2013
				JP	5529874	B2	25 June 2014
				KR	20130056348	A	29 May 2013
				JP	2012506840	A	22 March 2012
				US	2013324509	A1	05 December 2013
				KR	101368736	B1	05 March 2014
US	2012282324	A1	08 November 2012	US	8680182	B2	25 March 2014
WO	2018144966	A1	09 August 2018	US	2020038484	A1	06 February 2020
CN	104399118	A	11 March 2015	CN	104399118	B	17 November 2017
CN	108525017	A	14 September 2018	CN	108525017	B	19 January 2021

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2020/131330

A. 主题的分类 A61L 27/18(2006.01)i; A61L 27/16(2006.01)i; A61L 27/22(2006.01)i; A61L 27/24(2006.01)i; A61L 27/50(2006.01)i; A61L 27/52(2006.01)i; A61L 27/54(2006.01)i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) A61L 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CNABS; CNTXT; SIPOABS; DWPI; WOTXT; USTXT; EPTXT; STNext; 百度学术: 精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸, RGD, 多臂聚乙二醇, 点击化学, 原位, 水凝胶, 甲基强的松龙, 细胞生长因子, multi-arm PEG, click chemistry, in situ, hydrogel, methylprednisolone, growth factor, 浙江大学, 王绪化, 陈作兵, 叶婧佳, 靳爽, 蔡万雄, 张天芳		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
Y	US 2015148317 A1 (INVIVO THERAPEUTICS CORPORATION等) 2015年 5月 28日 (2015 - 05 - 28) 权利要求1、7、8, 说明书第32、33、42、45、49、51段	1-5
Y	US 2012282324 A1 (JIN Xing等) 2012年 11月 8日 (2012 - 11 - 08) 权利要求1、3-5, 说明书第68、72、116段	1-5
Y	LIU, Shao Qiong等, . "Biodegradable poly(ethylene glycol) - peptide hydrogels with well-defined structure and properties for cell delivery, " Biomaterials, , 第30卷, 2009年 12月 31日 (2009 - 12 - 31), 第1453-1461页	1-5
A	WO 2018144966 A1 (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY等) 2018年 8月 9日 (2018 - 08 - 09) 权利要求1-76	1-9
A	CN 104399118 A (武汉大学) 2015年 3月 11日 (2015 - 03 - 11) 权利要求1-10	1-9
A	CN 108525017 A (武汉大学) 2018年 9月 14日 (2018 - 09 - 14) 权利要求1-10	1-9
☐ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 "L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 "T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 "X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 "Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 "&" 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期 2021年 7月 20日		国际检索报告邮寄日期 2021年 8月 9日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国 北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		受权官员 齐丹丹 电话号码 (86-10)53961871

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2020/131330

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
US	2015148317	A1	2015年 5月 28日	KR	20110081209	A	2011年 7月 13日
				JP	2013234205	A	2013年 11月 21日
				AU	2009296394	B2	2014年 1月 9日
				US	2013324500	A1	2013年 12月 5日
				CA	2738766	A1	2010年 4月 1日
				BR	PI0913697	A2	2016年 10月 11日
				EP	2346515	A1	2011年 7月 27日
				US	2010196481	A1	2010年 8月 5日
				AU	2009296394	A1	2010年 4月 1日
				EP	2346515	A4	2013年 1月 23日
				WO	2010036961	A1	2010年 4月 1日
				CN	102858353	A	2013年 1月 2日
				JP	5529874	B2	2014年 6月 25日
				KR	20130056348	A	2013年 5月 29日
				JP	2012506840	A	2012年 3月 22日
				US	2013324509	A1	2013年 12月 5日
				KR	101368736	B1	2014年 3月 5日
US	2012282324	A1	2012年 11月 8日	US	8680182	B2	2014年 3月 25日
WO	2018144966	A1	2018年 8月 9日	US	2020038484	A1	2020年 2月 6日
CN	104399118	A	2015年 3月 11日	CN	104399118	B	2017年 11月 17日
CN	108525017	A	2018年 9月 14日	CN	108525017	B	2021年 1月 19日