



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113574109 B

(45) 授权公告日 2023. 01. 06

(21) 申请号 202080021249.4
 (22) 申请日 2020.03.13
 (65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 113574109 A
 (43) 申请公布日 2021.10.29
 (30) 优先权数据
 10-2019-0029214 2019.03.14 KR
 (85) PCT国际申请进入国家阶段日
 2021.09.14
 (86) PCT国际申请的申请数据
 PCT/KR2020/003549 2020.03.13
 (87) PCT国际申请的公布数据
 W02020/185041 KO 2020.09.17
 (73) 专利权人 赛拉尔研究有限公司
 地址 韩国首尔市
 (72) 发明人 赵胜禹 安秀焕
 (74) 专利代理机构 北京品源专利代理有限公司
 11332
 专利代理师 吕琳 田英爱

(51) Int. Cl.
 A61K 47/36 (2006.01)
 (56) 对比文件
 US 2015000561 A1, 2015.01.01
 WO 2018143736 A1, 2018.08.09
 KR 20170136178 A, 2017.12.11
 WO 2018098299 A1, 2018.05.31
 KR 20180105090 A, 2018.09.27
 李永全等. 辣根过氧化物酶催化的透明质酸水凝胶的制备及表征.《华西药学杂志》.2017,第32卷(第05期),第467-470页.
 Soohwan An等. "A serotonin-modified hyaluronic acid hydrogel for multifunctional hemostatic adhesives inspired by a platelet coagulation mediator".《Materials Horizons》.2019,第6卷第1169-1178页.

审查员 袁烈梅

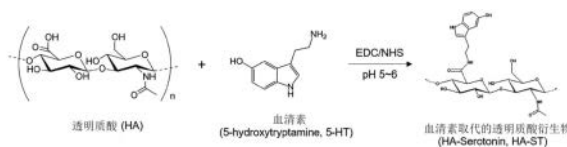
权利要求书2页 说明书12页 附图17页

(54) 发明名称

包含经血清素修饰的透明质酸的水凝胶及其用途

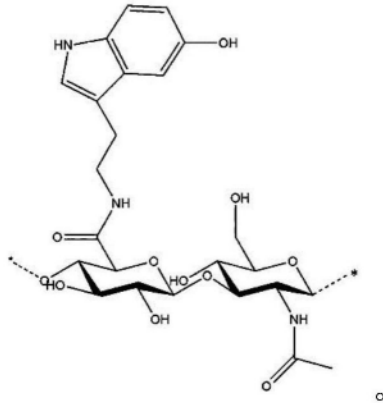
(57) 摘要

本发明涉及一种包含经血清素修饰的透明质酸的水凝胶、其用途及其制备方法。



1. 一种止血剂组合物,通过促进血液凝固来止血,其中,包括:
水凝胶,其含有经血清素修饰的透明质酸,
上述修饰的透明质酸含有以下化学式1的重复单元结构,

【化学式1】



2. 根据权利要求1中所述的止血剂组合物,其中,所述水凝胶是上述修饰的透明质酸通过上述血清素的5-羟基吲哚部分之间的化学键来相互交联的水凝胶。

3. 根据权利要求1中所述的止血剂组合物,其中,上述水凝胶具有粘附性或生物降解性。

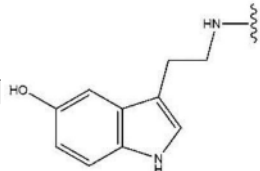
4. 根据权利要求1中所述的止血剂组合物,其中,上述止血剂具有防止组织间粘连的效果。

5. 根据权利要求1中所述的止血剂组合物,其中,上述止血剂是粘附性贴剂或膜形态。

6. 一种止血剂组合物的制备方法,上述止血剂组合物通过促进血液凝固来止血,其中,包括:

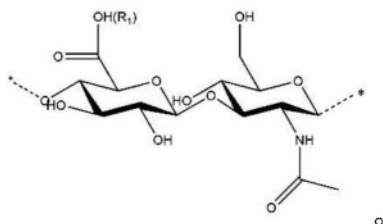
(a) 通过用血清素取代透明质酸中的羟基来制备含有经血清素修饰的透明质酸的溶液的步骤;及

(b) 通过使上述溶液中的经修饰的上述透明质酸进行交联并结合以形成水凝胶的步骤,

其中,上述步骤(a)中用  来取代包含以下化学式2的重复单元结构的

透明质酸中位于R₁处的羟基,

【化学式2】



7. 根据权利要求6中所述的止血剂组合物的制备方法,其中,

上述步骤(b)中交联通过利用氧化剂的氧化反应来进行,上述氧化剂选自由过氧化氢、过氧化物酶和高碘酸钠组成的组合中的一种以上。

包含经血清素修饰的透明质酸的水凝胶及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及一种包含经血清素修饰的透明质酸的水凝胶、其用途及其制备方法。

背景技术

[0002] 外科手术和治疗对功能性医疗用制剂的需求日益增加,已经有各种类型的产品被开发并应用于临床。

[0003] 其中,目前市售的止血剂大多由纤维蛋白类衍生物组成,将纤维蛋白原蛋白溶液和凝血酶蛋白溶液混合并进行反应来形成纤维蛋白团块,并通过以物理方式进行的简单凝血方式来阻断出血部位。在这种情况下,为了获得充分的止血效果,需要大量的止血剂,并且由此形成的纤维蛋白团块可能具有减缓伤口再生或以后与周围组织发生粘连的副作用。

[0004] 另外,在需要使用止血剂的情况下,使用传统的纤维蛋白类止血剂时,容易发生组织粘连,因此除了止血剂之外,还必须用抗粘连剂进行附加处理。由于需要进行这种附加处理而存在临床便利性降低以及伴随经济负担的问题。

[0005] 为了克服以物理方式诱导止血的传统止血剂所存在的问题,迫切需要一种新技术来提高止血剂的止血性能并解决因纤维蛋白团块过多所引起的副作用。进而,能够作为单一产品执行上述复合功能的功能性医疗用制剂的需求正在增加。

[0006] 现有技术文献

[0007] 专利文献

[0008] (专利文献1):韩国公开专利第10-2014-0127286号

[0009] (专利文献2):韩国授权专利第10-1040561号

发明内容

[0010] 发明所要解决的问题

[0011] 本发明的目的在于提供包含经血清素修饰的透明质酸的水凝胶。

[0012] 本发明的另一个目的在于提供包含上述水凝胶的止血剂组合物。

[0013] 本发明的另一个目的在于提供包含上述水凝胶的组织粘合剂组合物。

[0014] 本发明的另一个目的在于提供包含上述水凝胶的用于促进细胞分化的组合物。

[0015] 本发明的另一个目的在于提供包含上述水凝胶的用于细胞培养的组合物。

[0016] 本发明的另一个目的在于提供包含上述水凝胶的用于药物递送的组合物。

[0017] 本发明的另一个目的在于提供上述水凝胶的制备方法。

[0018] 用于解决问题的方案

[0019] 为了实现上述本发明的目的,本发明一方面涉及一种包含经血清素修饰的透明质酸的水凝胶。

[0020] 在本发明中,“血清素(serotonin,5-羟色胺)”是从作为氨基酸的色氨酸衍生的化学物质,它存在于大脑、内脏组织、血小板和肥大细胞中,也称为5-羟色胺。血清素主要存在于人和动物的胃肠道、血小板和中枢神经系统中,是一种使人感到幸福的分子,虽然血清素

不是激素,但也被称为幸福激素(happiness hormone)。此外,据报道,血清素是精神疾病(抑郁症、攻击性、惊恐发作、强迫症、精神病、精神分裂症、自杀意念)、神经退行性疾病(阿尔茨海默病型痴呆、帕金森病、亨廷顿舞蹈病)、厌食症、多食症、酒精中毒相关疾病、脑血管意外和偏头痛等各种病理疾病的重要因素(Meltzer, *Neuropsychopharmacology*, 21:106S-115S (1999); Barnes&Sharp, *Neuropharmacology*, 38:1083-1152 (1999); Glennon, *Neurosci.Biobehavioral Rev.*, 14:35 (1990))。

[0021] 在本发明中,作为由氨基酸和糖醛酸组成的复杂多糖类的一种的“透明质酸”是由N-乙酰氨基葡萄糖和葡萄糖醛酸组成的高分子化合物。作为生物源性高分子,在适用于生物体时几乎不产生副作用,并且由于含糖结构而具有亲水性。此外,由于含有大量水分,在关节中具有物理缓冲作用和润滑作用,并且已知还与皮肤的柔韧性有关。作为存在于生物体内的代表性细胞外基质成分中的一种,可以在体内分解,因此长期诱导免疫反应或干扰组织再生的风险很小。进而,由于上述透明质酸是通过透明质酸酶来进行生物降解,因此可以通过将各种药物与透明质酸结合来用作药物递送系统的重要材料。

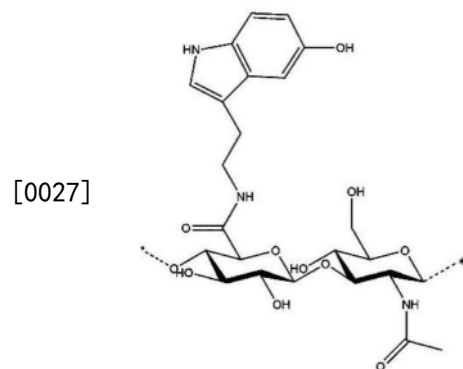
[0022] 在本发明中,“水凝胶(hydrogel)”是分散介质为水或以水为基本成分的凝胶,本发明的水凝胶含有经血清素修饰的透明质酸。

[0023] 具体地,水凝胶可以是上述修饰的透明质酸通过上述血清素的5-羟基吲哚部分之间的化学键而相互交联的水凝胶,这种交联可以通过使用氧化剂的氧化反应来进行,上述氧化剂选自由过氧化氢(H₂O₂)、过氧化物酶(Peroxidase)和NaIO₄(sodium periodate)组成的组中的一种以上。

[0024] 此外,水凝胶的物理性质,如弹性和粘附性,对于用作支架的水凝胶来说是非常重要的因素,其中上述支架用于治疗如关节软骨或骨骼等暴露于更高负荷的特定组织的缺陷。本发明的水凝胶可以通过调节氧化条件来调节物理性质,因此可以根据条件来制造和使用。

[0025] 具体地,经上述血清素修饰的透明质酸衍生物可具有以下化学式1的结构:

[0026] 【化学式1】



[0028] 更具体地,上述水凝胶可以包含上述式1的重复单元结构。重复单元没有特别限制,并且可以根据需要适当改变重复数来进行应用。例如,当需要适用较大范围的水凝胶时,可能需要多个重复单元,而适用于局部部位的情况下,可以包括相对少量的重复单元。

[0029] 另外,具体地,上述水凝胶可以显示出选自由促进凝血、止血、防止组织粘连、促进细胞分化、细胞培养和药物递送组成的组中的一种以上的用途。另外,具体地,上述水凝胶可以是粘附性的。

[0030] 在本发明的一实施例中,当处理本发明的水凝胶时,确认了凝血因子的分泌量增加,并确认了与其他所有组相比发生了量最多的凝血(图14)。此外,当将本发明的经血清素修饰的透明质酸水凝胶或其贴剂粘附于肝出血动物的出血部位时,确认了与现有的常用的基于纤维蛋白的止血剂相比,表现出显著优秀的止血效果(图15至图17)。由以上结果得以证实,本发明的水凝胶可用于促进血液凝固和/或止血。

[0031] 另外,关于止血过程中出现的组织粘连,现有止血剂出现组织粘连,然而,在本发明的一实施例中,证实了当用本发明的水凝胶来进行处理时,未发生组织之间的粘连(图18),证实了上述水凝胶可用于防止组织粘连。

[0032] 另外,在本发明的一实施例中,将人神经干细胞(human neural stem cell;hNSC)封装在本发明的水凝胶内并进行三维培养,其结果证实,其促进上述人类神经干细胞分化,从而使神经细胞特异性标志物(TUJ1)高度表达,神经突起生长良好(图22),证实了上述水凝胶可用于促进细胞分化。

[0033] 另外,在本发明的一实施列中,将人脂肪源干细胞(hADSCs)和人血管内皮细胞(HUVEC细胞)封装在本发明的水凝胶内进行三维培养,其结果证实,各个细胞分别在维持固有的特异性形态的同时进行了增殖(图23),证实了上述水凝胶可用于细胞培养。

[0034] 另外,在本发明的一实施例中证实了,在类似于体内环境,可以分解透明质酸的环境中,负载于水凝胶内的因子随着水凝胶的生物降解而缓慢释放(图24),证实了上述水凝胶可用于药物递送。

[0035] 并且,具体地,上述水凝胶是可生物降解性的。

[0036] 在本发明的一实施例中,证实了本发明的水凝胶在类似于体内环境的可以分解透明质酸的环境中,随时间缓慢分解(图20)。此外,本发明的水凝胶没有细胞毒性(图21),因此具有优异的生物相容性。

[0037] 本发明的另一方面,涉及包含上述水凝胶的止血剂组合物。具体地,上述止血剂可以表现出防止组织间粘连的作用。对于本发明的止血作用和防止组织间粘连的作用如上所述。

[0038] 另外,具体地,上述止血剂可以是贴剂(即,冻干状态)或膜的形态。

[0039] 在本发明的一实施例中,证实了以可以附着的形态适用于动物模型,从而表现出优异的止血效果的同时,没有出现止血剂特有的组织间粘连(图12和图13),由此能够以附着在表面的形式进行适用。上述表面可以是身体所有组织的表面,不限于特定部位。

[0040] 本发明的另一方面,涉及包含上述水凝胶的组织粘合剂组合物。具体地,上述组织粘合剂可表现出防止组织间的粘附作用。对于本发明的防止组织间粘连作用如上所述。

[0041] 本发明的另一方面,涉及包含上述水凝胶的促进细胞分化的组合物。具体地,上述细胞可以是干细胞、胎儿干细胞、诱导性多功能干细胞、胚胎干细胞或成体干细胞。对于本发明的促进细胞分化效果如上所述。

[0042] 本发明的另一方面,涉及包含上述水凝胶的用于细胞培养的组合物。具体地,上述培养可以是三维培养。

[0043] 另外,具体地,上述可作为培养对象的细胞为干细胞、造血干细胞、肝细胞、纤维细胞、上皮细胞、间皮细胞、内皮细胞、肌肉细胞、神经细胞、免疫细胞、脂肪细胞、软骨细胞、骨细胞、血液细胞或皮肤细胞,但不限于此,并且与细胞种类无关,可适用于能够在本发明的

水凝胶中可生长的所有细胞。更具体地,上述培养可以是同时培养两种以上的细胞。

[0044] 在本发明的一实施例中,将人脂肪源干细胞(hADSCs)和人血管内皮细胞(HUVEC细胞)同时封装在水凝胶中进行三维培养,证实了各个细胞分别在维持其固有的特定形态的同时进行了增殖(图23),本发明的水凝胶可用于细胞培养,也可用于两种以上的复合培养。

[0045] 本发明的另一方面,涉及包含上述水凝胶的用于药物递送的组合物。

[0046] 具体地,上述药物可以封装在水凝胶中,并可以选自由免疫细胞激活剂、抗癌剂、治疗性抗体、抗生素、抗菌剂、抗病毒剂、抗炎剂、造影剂、蛋白药物、生长因子、细胞因子、肽类药物、生发剂及它们的组合组成的组,但不限于此,并且任何可以封装或负载在水凝胶中的药物均可适用。

[0047] 在本发明的一实施例中,作为药物示例,将血管内皮生长因子(一种生长因子)负载于水凝胶内,然后确认了释放状态,并确认了在类似于体内环境的环境中,随着水凝胶的生物降解,使生长因子缓慢释放(图24),因此证实了上述水凝胶可用于药物递送。进而,证实了上述药物释放也能够以延迟释放、缓释释放的形式进行适用。

[0048] 另外,上述药物可以负载、搭载或封装于本发明的水凝胶内,并且可根据需要以适当的形式进行使用。

[0049] 根据本发明的药物组合物可以使用本领域公知的方法制备成药物剂型,以便在施用于哺乳动物之后能够提供活性成分的快速、持续或延迟释放。在制剂的制备中,根据本发明的药物组合物在不抑制活性成分功能的范围内可以进一步包含药学上可接受的载体。

[0050] 上述药学上可接受的载体可以包含常规所使用的,如乳糖、右旋糖、蔗糖、山梨糖醇、甘露醇、木糖醇、赤藓糖醇、麦芽糖醇、淀粉、阿拉伯胶、海藻酸盐、明胶、磷酸钙、硅酸钙、纤维素、甲基纤维素、微晶纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、水、羟苯甲酸甲酯、羟苯甲酸丙酯、滑石、硬脂酸镁和矿物油等,但不限于此。此外,本发明的药物组合物可包含如填充剂、增量剂、结合剂、润湿剂、崩解剂、表面活性剂等稀释剂或赋形剂、其他药学上可接受的添加剂。

[0051] 本发明的药物组合物的给药方式是可根据药物有效剂量进行给药。“药物有效剂量”是指通过可适用于医学治疗的合理的受益/危险比率来预防或治疗疾病的足够的量。有效剂量水平可由本领域技术人员根据制剂方法、患者的状态和体重、患者的性别、年龄、疾病的程度、药物形态、给药途径和持续时间、排泄速率、反应敏感性等因素进行多样的选择。如技术人员所理解的,有效量可以根据治疗途径、赋形剂的使用以及与其他药剂一起使用的可能性而变化。

[0052] 本发明的药物组合物可以通过各种途径施用于小鼠、家畜、人等哺乳动物。具体地,本发明的药物组合物可以口服或肠胃外给药(例如,涂覆或静脉内、皮下、腹腔内注射),但优选口服给药。为预防和治疗阴道炎,可阴道内给药。用于口服给药的固体制剂可包括散剂、颗粒剂、片剂、胶囊剂、软胶囊剂、丸剂等。用于口服的液体制剂可以包括混悬剂、内服溶液剂、乳剂、糖浆剂、气雾剂等,除作为常用的简单稀释剂的水和液体石蜡外,可以包括润湿剂、甜味剂、香料、防腐剂等各种赋形剂。作为用于肠胃外给药的制剂可以按照常规方法分别以灭菌水溶液、液剂、非水性溶剂、混悬液、乳剂、滴眼液、眼软膏、糖浆、栓剂、气雾剂等外用剂和灭菌注射制剂的形式进行剂型化并进行使用。具体地,可以通过制备膏、凝胶、贴剂、喷雾剂、软膏剂、硬膏剂、乳液、搽剂、眼软膏剂、滴眼剂、糊剂或泥敷剂等药物组合物来进行使用,但不限于此。根据临床处方,用于局部给药的制剂可以是无水性或水性。作为非水性

溶剂、混悬剂,可使用丙二醇、聚乙二醇、植物油(例如橄榄油)、可注射的酯(例如油酸乙酯)等。作为栓剂的基质,可以使用witepsol、聚乙二醇(Macrogol)、吐温(tween)61、可可脂、月桂酸酯、甘油明胶等。

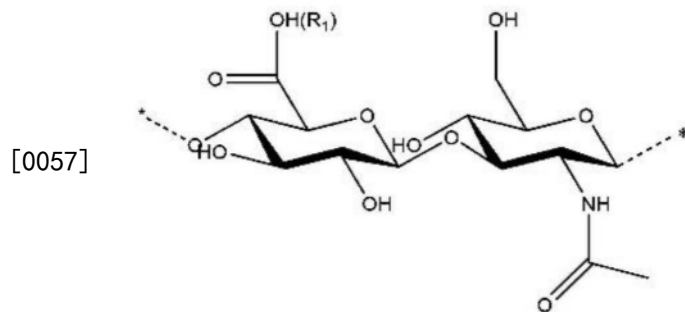
[0053] 具体地,本发明的药物组合物可以是粘附性贴剂(即冻干状态)或膜的形态。在本发明的一实施例中,证实了上述药物组合物示出优异的表面粘附性的同时(图12),即使附着在组织上,也没有造成相互不同组织之间的粘连(图13),因此能够以附着在表面的形式进行适用。上述表面包括身体所有部位的皮肤、组织内外的表面等,并且不限于特定部位。

[0054] 本发明的另一方面涉及一种包含经血清素修饰的透明质酸的水凝胶的制备方法,其包括:(a)通过用血清素取代透明质酸中的羟基(-OH)来制备含有经血清素修饰的透明质酸的溶液的步骤;及(b)通过将经修饰的上述透明质酸在上述溶液中进行交联(cross-linking)并结合以形成水凝胶的步骤。

[0055] 具体地,在步骤(a)中,可以用  来取代包含以下化学式2的重复

单元结构的透明质酸中位于R₁处的羟基。

[0056] 【化学式2】



[0058] 此时,对于上述溶液,经修饰的透明质酸的浓度可以为0.1(w/v)%至10(w/v)%。

[0059] 另外,在步骤(b)中,交联可以通过利用氧化剂的氧化反应来进行,上述氧化剂选自自由过氧化氢(H₂O₂)、过氧化物酶和高碘酸钠(NaIO₄)组成的组合中的一种以上。此时,对于上述溶液,加入的过氧化氢(H₂O₂)的浓度可以是0.1mM至50mM,加入的过氧化物酶的浓度可以是1U/ml至100U/ml(优选10U/ml至30U/ml)。

[0060] 本发明的一实施例中,在透明质酸中引入血清素后,通过上述透明质酸的交联结合来制备含有经血清素修饰的透明质酸的水凝胶(图1),并且在水凝胶的交联反应中通过调节氧化条件,可以根据需要适当调节水凝胶的弹性、膨胀状况等物理性质来进行使用。

[0061] 进而,本发明提供一种在止血剂组合物、组织粘合剂组合物、用于促进细胞分化的组合物、用于细胞培养的组合物或用于药物递送的组合物中使用的含有经血清素修饰的透明质酸的水凝胶的用途。

[0062] 另外,本发明提供一种止血方法、组织粘附方法、促进细胞分化方法、细胞培养方法或药物递送方法,这些方法包括将含有经血清素修饰的透明质酸的水凝胶附着或施用于个体的步骤。

[0063] 在本发明中,“个体”是指需要适用上述水凝胶的对象,更具体地是指,人或非人灵

长类、小鼠、大鼠、狗、猫、马、牛等哺乳类。

[0064] 发明效果

[0065] 本发明的含有经血清素修饰的透明质酸的水凝胶可以通过调节氧化条件对交联程度、交联速率和水凝胶的物理性质进行调节来使用。

[0066] 另外,本发明的水凝胶具有止血、促进血液凝固、防止组织粘连、药物递送、促进细胞分化等多种效果,从而能够以单一或复合用途来使用。此外,由于本发明几乎没有细胞毒性的同时可以在体内分解,因此具有非常优秀的生物相容性,从而可利用性很高。

[0067] 本发明的效果不限于上述效果,并且应当理解,本发明的效果包括可以从本发明的详细描述或权利要求中所记载的发明的结构中能够推论的所有效果。

附图说明

[0068] 图1是示出经血清素修饰的透明质酸衍生物的合成过程的示意图。

[0069] 图2是示出为了确认经血清素修饰的透明质酸是否正确合成,而进行¹H-NMR分析的结果((1):透明质酸骨架中甲基的氢质子,(2):血清素的芳香环的氢质子)。

[0070] 图3是示出为了形成水凝胶而使经血清素修饰的透明质酸衍生物进行交联的过程的化学结构。

[0071] 图4是示出通过使用光电子能谱分析法(XPS分析)对氧化之前和氧化之后的光谱进行比较来确认经血清素修饰的透明质酸的水凝胶的交联的结果。

[0072] 图5是示出通过使用傅里叶变换红外光谱法(FTIR)对氧化之前和氧化之后的光谱进行比较来确认经血清素修饰的透明质酸的水凝胶的交联的结果。

[0073] 图6是示出使用UV-vis(紫外-可见光谱)来确认经血清素修饰的透明质酸的水凝胶的交联的结果。

[0074] 图7示出了通过氧化交联方法制备的经血清素修饰的透明质酸水凝胶。

[0075] 图8是示出根据经血清素修饰的透明质酸的水凝胶制备过程中的氧化条件来比较交联速率的结果。

[0076] 图9是示出根据经血清素修饰的透明质酸水凝胶制备过程中的氧化条件来比较弹性的结果。

[0077] 图10是示出根据经血清素修饰的透明质酸水凝胶制备过程中的氧化条件下的膨胀状况的图。

[0078] 图11是示出根据过氧化氢和HRP的浓度测量水凝胶粘附力变化的结果。

[0079] 图12是示出确认经血清素修饰的透明质酸水凝胶对组织的生物粘附性的结果(A:确认组织粘附性,B:确认H&E组织染色)。

[0080] 图13是示出对经血清素修饰透明质酸水凝胶的防止组织间粘连的效果进行确认的结果(A:确认组织间粘连与否的图,B:物理方式测量粘连程度的图)。

[0081] 图14是示出确认经血清素修饰的透明质酸水凝胶在体外促进血液凝固效果的结果(A:血小板因子4的测量图,B:因子V的测量图,C:对组织中的凝血量进行测量的图)。

[0082] 图15是示出在肝出血小鼠模型中确认经血清素修饰的透明质酸水凝胶的止血效果的结果(A:实验示意图,B:测量出血量的图,C:测量凝血时间)。

[0083] 图16是示出在肝出血小鼠模型中确认经血清素修饰的透明质酸水凝胶贴剂的止

血效果的结果(A:确认止血效果的组织图,B:测量凝血时间,C和D:测量出血量的图)。

[0084] 图17是示出在血友病下肝出血小鼠模型中确认经血清素修饰的透明质酸水凝胶的止血效果的结果(A:确认止血效果的组织图,B:测量出血量的图,C:测量凝血时间,D:H&E组织染色结果)。

[0085] 图18是示出确认在体内防止组织间粘连效果的结果。

[0086] 图19是示出通过免疫巨噬细胞染色(甲苯胺蓝染色)来确认止血部位的巨噬细胞浸润程度的结果。

[0087] 图20是示出确认经血清素修饰的透明质酸水凝胶随时间而降解的程度的结果。

[0088] 图21是示出确认经血清素修饰的透明质酸水凝胶无细胞毒性的结果(A:HepG2细胞,B:人脂肪间充质干细胞(hADSC),C:人诱导多能干细胞-衍生肝细胞(hiPSC-derived hepatocyte),D:人神经干细胞(hNSC))。

[0089] 图22是示出确认经血清素修饰的透明质酸水凝胶的细胞分化诱导效果的结果。

[0090] 图23是示出确认经血清素修饰的透明质酸水凝胶的细胞培养效果的结果。

[0091] 图24是示出确认经血清素修饰的透明质酸水凝胶的药物递送效果和缓释释放效果的结果。

具体实施方式

[0092] 以下,通过实施例详细说明本发明。然而,以下实施例仅用于示例本发明,本发明不限于以下实施例。

[0093] 实施例1.经血清素修饰的透明质酸衍生物(HA-ST)的合成

[0094] 为了合成经血清素修饰的透明质酸衍生物(HA-ST),将分子量为200kDa的透明质酸(美国伊利诺伊州Lifecore Biomedical)溶解在三级蒸馏水(TDW)中,使其浓度为1mg/ml。

[0095] 将1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride,EDC,美国马萨诸塞州沃尔瑟姆,赛默飞世尔科技公司,)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS,美国密苏里州圣路易斯,西格玛-奥德里奇)以与透明质酸相同的摩尔比加入上述溶液中,并在pH 5.5-6.0条件下搅拌30分钟。

[0096] 将血清素盐酸盐和透明质酸以1:1的摩尔比加入上述溶液中,在pH 5.5-6.0的室温下搅拌过夜,获得经血清素修饰的透明质酸(图1)。

[0097] 在pH 5.0的PBS缓冲溶液中通过使用Cellu Sep T2透析膜来去除反应副产物和未反应的化学物质。上述过程中所合成的产物进行冷冻干燥,并在4°C下保存。

[0098] 为了确认通过上述过程是否正确合成了血清素取代的透明质酸,而进行了¹H-NMR(300MHz,美国马萨诸塞州比尔里卡,布鲁克(bruker))分析。上述合成过程示意图如图1所示,通过如图2所示合成的结果,确认了血清素与透明质酸结合,从而分别具有各自的峰值。

[0099] 实施例2.经血清素修饰的透明质酸水凝胶及其贴剂的制备

[0100] 通过交联上述实施例1的经血清素修饰的透明质酸衍生物制备透明质酸水凝胶。具体地,为此,通过利用过氧化氢(H₂O₂)和过氧化物酶(辣根过氧化物酶,HRP)的氧化反应来诱导交联并制备水凝胶。

[0101] 如图3所示,上述透明质酸衍生物的交联是通过血清素的5-羟基吡啶部分之间的

化学键进行的,并确认所得到的水凝胶呈淡黄色。

[0102] 为了具体确认上述透明质酸水凝胶的交联,而通过光电子能谱分析法(XPS分析)、傅里叶变换红外光谱法(FTIR)和UV-vis(紫外-可见光谱)对氧化前、后的光谱进行了比较。

[0103] 结果,通过XPS分析和FTIR分析来确认了与作为通过交联反应产生的键的C-C键与C-O-C键对应的峰值增加(图4和图5),并通过UV-vis分析,确认了对应于醌的峰值(~400nm)的增加(图6),因此,确认在血清素的5-羟基吡啶部分之间产生了化学键。

[0104] 此外,确认了通过如上所述的氧化交联方法制备了经血清素修饰的透明质酸水凝胶(图7)。

[0105] 一方面,将2%经血清素修饰的透明质酸溶液与24U/ml HRP和水以8:1:1的比例混合后,将混合的混合液以能够充分填满培养皿(Petri dish)底部的适当体积(35mm培养皿为基准3-4ml)来倒入培养皿中,以使培养皿底部平整,然后将其冷冻并通过冷冻干燥来制备贴剂。

[0106] 实施例3. 确认根据氧化条件的交联速度变化

[0107] 根据上述实施例2的水凝胶制备步骤中,将经血清素修饰的透明质酸溶液的浓度固定在2重量%,且改变过氧化氢(H₂O₂)和HRP的摩尔浓度比,测量经血清素修饰的透明质酸衍生物的凝胶-溶胶转变时间和完成凝胶化的时间。

[0108] 其结果,确认了过氧化氢的浓度并不会显著影响经血清素修饰的透明质酸水凝胶的形成速率,但高度依赖HRP的浓度。

[0109] 具体地,如图8所示,可以确认当HRP的浓度为12、18和24U/ml时,凝胶时间小于30秒,但在6U/ml的情况下,完成凝胶化则需要50秒。相反,根据过氧化氢浓度变化,交联速度变化幅度并不大。

[0110] 实施例4. 确认根据氧化条件的水凝胶的弹性变化

[0111] 利用流变仪(MCR 102流变仪,安东帕,美国弗吉尼亚州阿什兰)分别在0.1至1Hz的频率范围内通过测量扫频模式(frequency sweep mode)内的储存弹性模量(G')和损失弹性模量(G'')来分析经血清素修饰的透明质酸水凝胶的粘弹性模量。通过计算1Hz(n=3)下的平均储存弹性模量来表示水凝胶的弹性。

[0112] 如图9所示,确认了表示水凝胶强度的弹性模量在氧化条件下随着过氧化氢浓度的增加而增加,从而确认通过调节过氧化氢和HRP的浓度,可以调节水凝胶的强度和弹力。

[0113] 实施例5. 确认根据氧化条件的水凝胶的膨胀状况

[0114] 确认了根据氧化条件观察到相反的膨胀状况。通过测量特定时间点(0、1、3、5和7天)上所剩余的水凝胶的重量来评价膨胀状况。具体的,在1mM过氧化氢和12U/ml HRP的条件下,通过仅将经血清素修饰的透明质酸溶液的浓度改变为1重量%或2重量%来形成水凝胶,并确认所形成的水凝胶的膨胀状况。

[0115] 结果,如图10所示,当使用2重量%的经血清素修饰的透明质酸溶液时,观察到水凝胶膨胀的状况,而当使用1重量%的经血清素修饰的透明质酸溶液时,水凝胶收缩。因此证实,根据经血清素修饰的透明质酸溶液的浓度条件,可以调节水凝胶的膨胀状况。

[0116] 实施例6. 分析水凝胶的粘附性

[0117] 为了评价本发明制备的水凝胶的粘附性,在流变仪(MCR 102流变仪,安东帕,美国弗吉尼亚州阿什兰)的探针和板之间对水凝胶进行交联,并以10μm/s(n=3)的方式增加上

述板的间隔的同时,测量施加到其中的力。

[0118] 为了确认根据氧化条件的粘附性的差异,通过将过氧化氢的浓度固定为1mM,仅改变HRP的浓度为12U/ml、18U/ml和24U/ml来形成水凝胶,并测量所形成的水凝胶的粘附力。其结果,如图11的A所示,可以确认在1mM的过氧化氢浓度下,12U/ml的HRP条件下的水凝胶的粘附力表现出最高的粘附力。

[0119] 此外,通过将HRP的浓度固定为12U/ml,并将过氧化氢的浓度分别改变为1mM、2mM、3mM和4mM来形成水凝胶,并对所形成的水凝胶的粘附力进行了测量。结果,如图11的B所示,在12U/ml的HRP条件下,过氧化氢浓度为1mM时,表现出最高的粘附力。

[0120] 上述结果表明,水凝胶的粘附力可以通过调节过氧化氢和HRP的浓度来进行调节,并且可以利用其进行改变的同时获得所需程度的粘附力。

[0121] 实施例7. 确认水凝胶对生物组织的粘附性

[0122] 确认了本发明的经血清素修饰的透明质酸水凝胶在体内组织中是否也具有足够的粘附力。

[0123] 具体地,将上述水凝胶涂覆于腹膜组织后,通过拉拽所附着的水凝胶来测量水凝胶是否很好地附着在组织上。结果,如图12的A所示,可以确认上述水凝胶与组织的粘附性高,且附着良好。

[0124] 此外,通过对粘附水凝胶的腹膜组织进行组织学染色(H&E染色),确认水凝胶是否粘附在组织上,结果,如图12的B所示,确认了经血清素修饰的透明质酸水凝胶与组织牢固地粘附在一起。

[0125] 因此可以确认,血清素分子被氧化时所发生的化学反应而使经血清素修饰的透明质酸水凝胶与组织表面的蛋白质结合,因此具有组织粘附性,并且可在组织表面形成水凝胶膜,从而可以具有能够很好地粘附并维持在体内组织的程度的足够的粘附力。

[0126] 实施例8. 确认水凝胶的防止组织间粘连的效果

[0127] 确认了本发明的经血清素修饰的透明质酸水凝胶是否可以防止组织间的异常粘连。利用小鼠腹膜损伤模型来进行了实验,具体地,在小鼠腹膜损伤模型中诱导损伤组织表面与其他组织之间的粘连,并确认了有或没有用本发明的水凝胶进行处理所带来的差异。

[0128] 结果,如图13的A所示,当通过小鼠腹膜损伤模型来诱导损伤组织表面与其他组织之间的粘连时,未进行任何处理(NT)的情况下几乎所有动物都发生了异常的组织粘连,而用本发明的透明质酸水凝胶来处理(HA-ST)的所有动物均未发生组织粘连。

[0129] 此外,如上所述的粘连程度也通过定量的方式进行了确认,并且如图13的B所示,通过数值也确认了当用本发明的经血清素修饰的透明质酸的水凝胶进行处理时,完全没有发生粘连。

[0130] 这些结果表明,根据通过透明质酸来防止生物粘连的机制,在组织表面形成的基于透明质酸的水凝胶薄膜具有防止粘连的作用。

[0131] 实施例9. 确认在体外促进凝血的效果

[0132] 为了确认经血清素修饰的透明质酸水凝胶的止血效果,将从血液中分离的富含血小板的血浆(PRP)和对照组(PBS)、血清素溶液、透明质酸溶液(HA)及经血清素修饰的透明质酸溶液(HA-ST)混合并进行反应,并通过分离反应样品的上清液来进行用于蛋白质定量的ELISA分析,并测量作为从血小板分泌的主要凝血因子的血小板因子4(Platelet factor

4) 和因子V的量。

[0133] 结果,如图14的A所示,可以确认当用经血清素修饰的透明质酸水凝胶来进行处理时,与其他所有组相比,分泌了显著高水平的血小板因子4。此外,如图14的B所示,可以确认当用经血清素修饰的透明质酸水凝胶进行处理时,与仅用单纯水凝胶进行处理的情况相比,因子V的分泌量是约2倍以上。

[0134] 此外,将血液和各样品(对照组(PBS)、血清素溶液、透明质酸溶液(HA)、经血清素修饰的透明质酸溶液(HA-ST))在基板上混合并进行反应后,洗涤未凝固的血液并测量凝固后残留物的重量。结果,如图14的C所示,可以确认当用本发明的经血清素修饰的透明质酸水凝胶来进行处理时,发生了最大量的血液凝固。

[0135] 上述结果表明,本发明的经血清素修饰的透明质酸通过促进血清素介导的血小板活性来促进血液凝固作用。

[0136] 实施例10. 确认体内止血效果

[0137] 为了确认经血清素修饰的透明质酸水凝胶(及其贴剂)在体内的止血效果,通过使用4周龄雌性ICR小鼠(Orient Bio,韩国城南市)来制备了肝出血模型。具体地,将小鼠麻醉并切开腹部,然后将灭菌滤纸置于肝下,并利用18G针来诱导出血,然后立即用经血清素修饰的透明质酸水凝胶(及其贴剂)或纤维素粘合剂(TISSEEL,奥地利维也纳巴克斯特)来覆盖受损部位。之后,每30秒更换一次滤纸直至观察结束,通过测量收集的滤纸的重量来测量出血量。在完成对出血的评估后,用6-0脯氨酸缝合线缝合腹膜和切开部位。未接受治疗的小鼠用作对照组。治疗7天后,处死小鼠并检查其生理学状态。

[0138] 如图15的A所示,针对上述小鼠肝出血模型,制备了对照组(NT)、常规化的基于纤维蛋白的止血剂(纤维蛋白胶)和经血清素修饰的透明质酸水凝胶(HA-ST)处理组,然后测量出血量。

[0139] 结果,如图15的B所示,可以定量性地确认,当用经血清素修饰的透明质酸水凝胶进行处理时,与常规化的基于纤维蛋白的止血剂相比,表现出显著优异的止血效果。

[0140] 此外,按时间顺序对用于检查出血量的吸血用滤纸的图进行了检查,结果,如图15的C所示,可以确认,当用经血清素修饰的透明质酸水凝胶进行时,出血在短时间内停止。

[0141] 一方面,如图16的A所示,确认了当用经血清素修饰的透明质酸水凝胶贴剂(HA-ST Patch)进行处理时表现出优异的止血效果。如图16的B所示,可以确认,与对照组相比明显在更短的时间内停止出血。另外,如图16的C和D所示,可以定量性地确认,止血效果显著优于对照组(NT)或常规化的基于纤维蛋白的现有的止血剂(Fibrin)。

[0142] 进一步,将6周龄血友病小鼠(B6;129S-F8^{tm1Kaz}/J,杰克逊实验室,美国缅因州巴尔港)作为对象以与上述方法相同的方式制备肝出血模型,以检查在血友病情况下肝出血模型中的止血效果。

[0143] 结果,如图17的A所示,可以确认,同样地,在由于缺乏凝血因子而止血效果不佳的血友病小鼠模型中,与对照组相比表现出优异的止血效果,并且,如图17的B所示,确认了出血量也显著减少。

[0144] 此外,如图17的C所示,可以确认,当用本发明的经血清素修饰的透明质酸水凝胶进行处理时,与对照组相比明显在更短的时间内停止出血。进而,如图17的D所示,通过H&E组织染色来确认,经血清素修饰的透明质酸水凝胶止血剂通过诱导出血部位形成血栓,可

以有效止血。

[0145] 实施例11. 确认在体内防止组织间粘连的效果

[0146] 现有的止血剂存在因止血过程中形成的纤维蛋白团块而诱发的与周围组织粘连的副作用。因此,为了确认本发明的经血清素修饰的透明质酸止血剂除了具有止血作用以外是否还具有防止粘连作用,于对上述肝出血模型小鼠进行止血剂处理后的第1、3、7天,分别对9只小鼠中的任意3只的组织粘连程度进行了确认。

[0147] 结果,如图18所示,证实了与未使用止血剂进行处理的对照组(NT)和现有的市售地纤维蛋白止血剂(纤维蛋白胶)相比,经血清素修饰的透明质酸水凝胶止血剂的防止粘连效果优异。

[0148] 实施例12. 确认水凝胶生物相容性

[0149] 在上述止血效果实验中,通过对止血剂处理后第3天采集的肝组织样本进行免疫巨噬细胞染色(甲苯胺蓝染色)来对巨噬细胞进行染色,从而确认巨噬细胞在止血部位的浸润的程度。

[0150] 结果,如图19所示,可以确认,在用经血清素修饰的透明质酸水凝胶进行处理的组织部位中,白色箭头所示的巨噬细胞的浸润程度与正常组织相比没有表现出特别的差异,这表明没有发生对本发明的经血清素修饰的透明质酸水凝胶敏感的免疫反应,因此具有优异的生物相容性。

[0151] 另外,确认了通过将2重量%的经血清素修饰的透明质酸溶液、1mM过氧化氢和12U/ml HRP按8:1:1的体积比进行混合而制备的经血清素修饰的透明质酸水凝胶的酶降解状况。结果,如图20所示,可以确认,本发明的经血清素修饰的透明质酸水凝胶经过数小时被透明质酸分解酶降解,从而确认可以在体内被降解。上述结果表明在不发生对本发明的水凝胶敏感的免疫反应的同时,会随着时间的流逝在体内被降解,因此,生物相容性优异。

[0152] 实施例13. 确认细胞毒性

[0153] 为了评价本发明的经血清素修饰的透明质酸水凝胶的细胞毒性和生物相容性,将HepG2细胞和人脂肪源干细胞(人脂肪间充质干细胞,hADSC)(1.0×10^6 细胞/水凝胶100 μ l)封装在12U/ml HRP和1mM过氧化氢条件下交联的经血清素修饰的透明质酸水凝胶内,在进行三维培养的同时进行活/细胞染色(Live/Dead染色)。具体地,根据制造商的指示,利用活/死细胞活力/毒性试剂盒(英杰,美国加利福尼亚卡尔斯巴德)测量第0天和第7天的细胞存活。通过使用IX73型荧光显微镜(奥林巴斯,日本东京)观察被染色的细胞,并且通过手动计算的方式从显微镜获得的图像($n=3$)中,对绿色标记的活细胞与红色标记的死细胞的比率进行定量化。将HepG2细胞在补充有10%胎牛血清(英杰)和1%青霉素/链霉素(英杰)的高葡萄糖达尔伯克(氏)改良伊格尔(氏)(Dulbecco's Modified Eagle's)培养基中进行培养,将人脂肪间充质干细胞(hADSCs)在MesenPRO-RSTM培养基中进行培养。

[0154] 确认毒性的结果,如图21的A和21的B所示,即使在经过7天后HepG2细胞和人脂肪间充质干细胞(hADSCs)也均显示出约100%的存活率,从而确认本发明的经血清素修饰的透明质酸水凝胶几乎没有细胞毒性。

[0155] 另外,将从人诱导多能干细胞分化诱导的肝细胞(hiPSC来源的肝细胞)封装在本发明的经血清素修饰的透明质酸水凝胶中,进行三维培养的同时,与上述相同的方式进行活细胞/死细胞染色。结果,如图21的C所示,几乎没有出现死细胞,因此可以确认没有细胞

毒性。

[0156] 另外,将人神经干细胞 (human neural stem cell;hNSC) 封装在本发明的经血清素修饰的透明质酸水凝胶中,进行三维培养的同时,与上述相同的方式进行活细胞/死细胞染色。结果,即使在经过7天后,不容易维持存活的人神经干细胞也显示出约80%的存活率。与上述相同,可以确认本发明的经血清素修饰的透明质酸水凝胶没有细胞毒性。

[0157] 实施例14. 确认细胞分化诱导效果

[0158] 将人神经干细胞 (hNSC) 封装在经血清素修饰的透明质酸水凝胶中,进行三维培养的同时进行免疫染色 (ICC)。结果,如图22所示,神经细胞特异性标志物 (TUJ1) 高度表达并且神经突起生长良好。这表示本发明的经血清素修饰的透明质酸水凝胶对干细胞的维持和分化是有效的,并且可以用作干细胞三维培养和用于移植的支架。

[0159] 实施例15. 确认细胞培养效果

[0160] 将人脂肪源干细胞 (hADSCs) 和人类血管内皮细胞 (HUVEC细胞) 同时封装在经血清素修饰的透明质酸水凝胶内,进行三维共培养后进行免疫染色。

[0161] 结果,如图23所示,确认了每个细胞在保持固有特异性形态的同时,通过彼此相互作用来诱导血管网络的形成,同时确认了该细胞标志物正常表达。

[0162] 从上述结果可以确认,使用本发明的经血清素修饰的透明质酸水凝胶可以进行各种细胞的三维共培养。

[0163] 实施例16. 确认药物递送效果

[0164] 为了确认经血清素修饰的透明质酸水凝胶的药物递送效果,将生长因子之一的血管内皮生长因子 (VEGF) 作为药物示例负载于经血清素修饰的透明质酸水凝胶内,并确认了在37°C条件下的透明质酸酶 (Hyaluronidase) (0.5U/ml) 溶液和PBS溶液中的释放情况。

[0165] 结果,如图24所示,可以确认,由于对蛋白质的优异的结合能力,在水凝胶不降解的条件 (PBS) 下几乎不释放生长因子,但作为透明质酸能够分解的体内环境中,在透明质酸酶存在的情况下,随着水凝胶被生物降解,负载与其中的生长因子被缓慢释放。

[0166] 上述结果意味着,本发明的经血清素修饰的透明质酸水凝胶不仅可以有效地负载药物而且可以控制药物在体内缓慢释放。因此作为药物递送系统具有很高的可应用性。

[0167] 上述本发明的说明是示例性的,对于本发明所属领域的技术人员来说应该可以理解,在不改变本发明的技术思想或必要特征的情况下,本发明可以容易地修改为其他具体形式。因此,应当理解为上述实施例在所有方面都是示例性的而不是限制性的。例如,描述为单一型的各组成要素可以以分散的形式实施,同样描述为分散的组成要素也可以以结合的形式实施。

[0168] 本发明的范围是由所附的权利要求书来表示,凡由权利要求的含义及范围,以及其均等概念中导出的所有变更或变形的形态,都应被解释为包含在本发明范围之内。

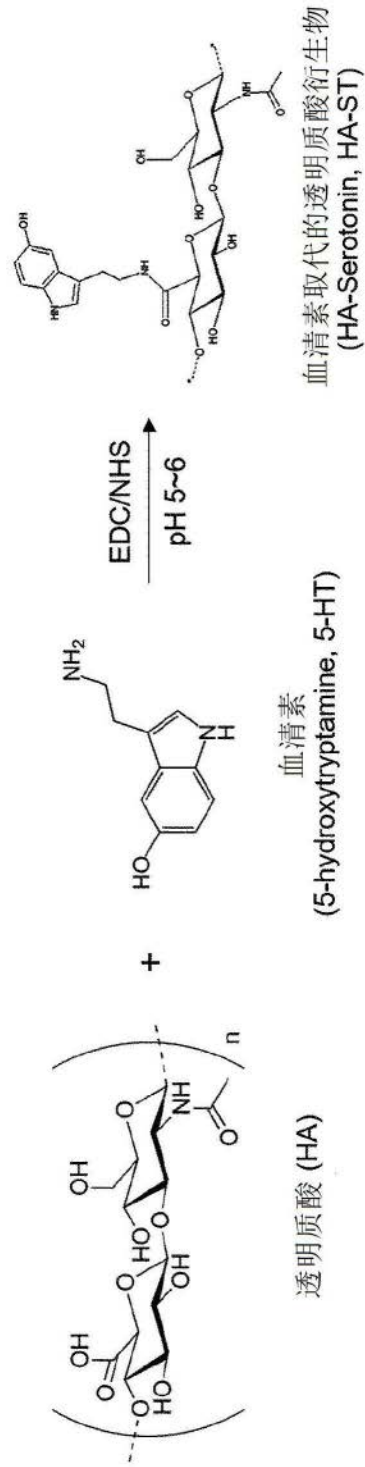


图1

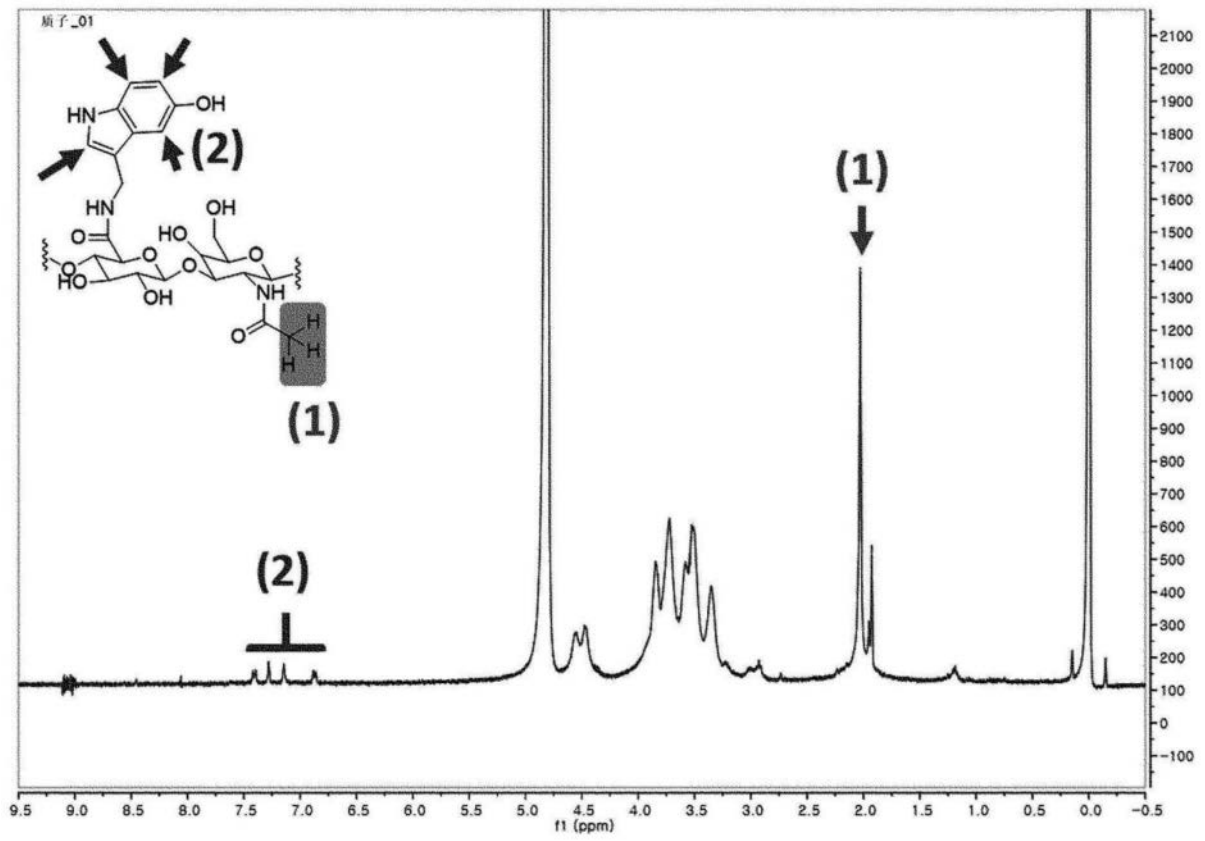


图2

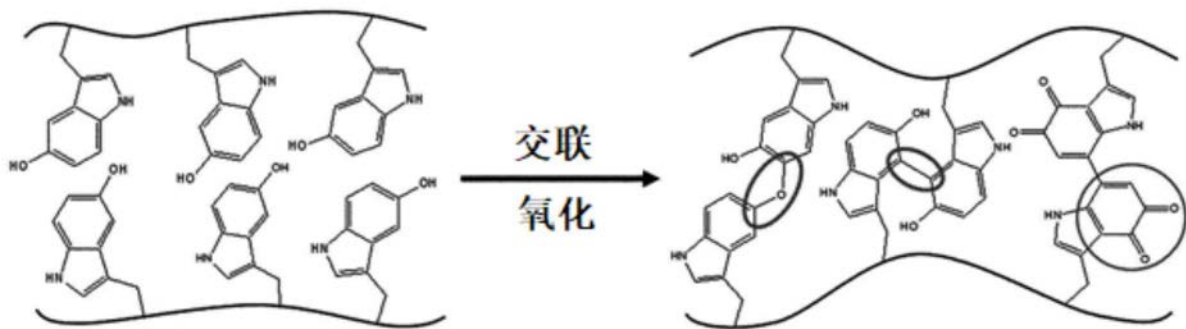


图3

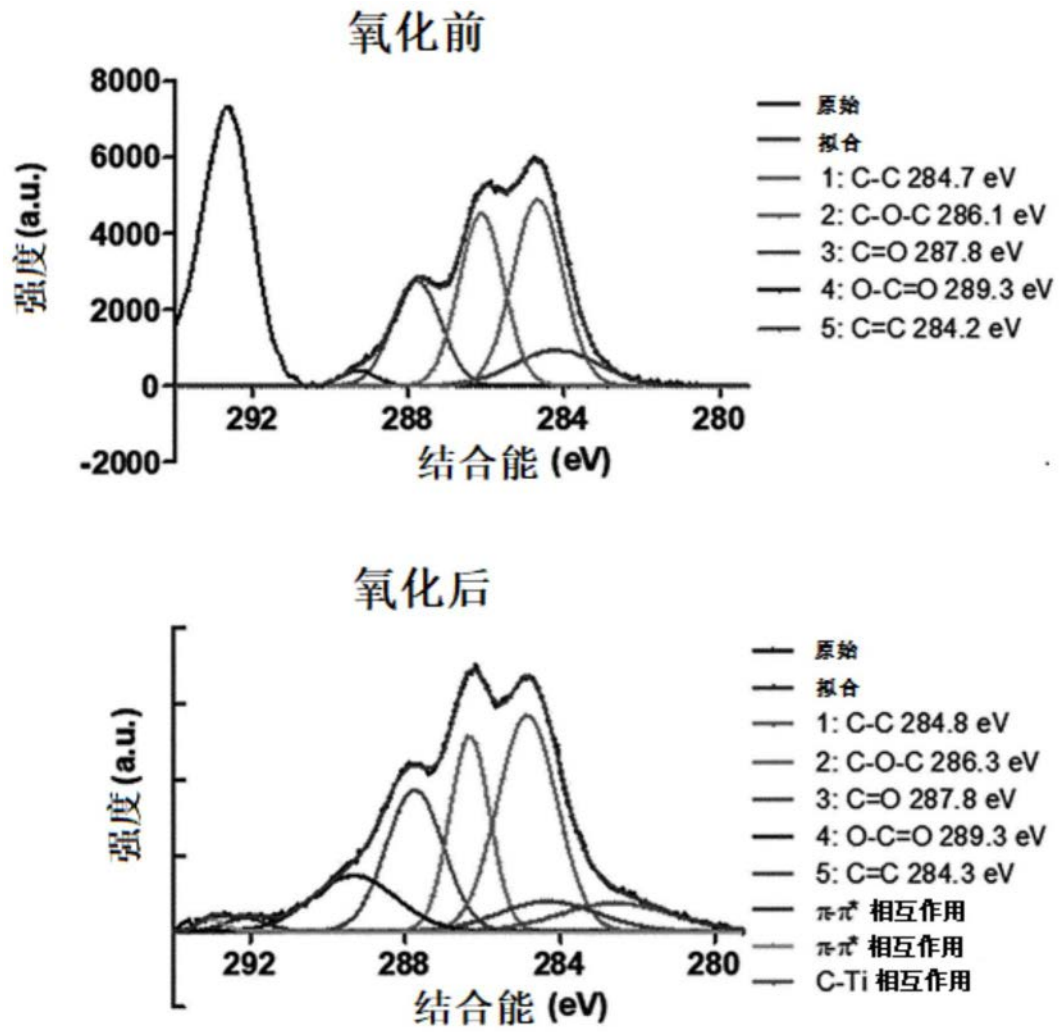


图4

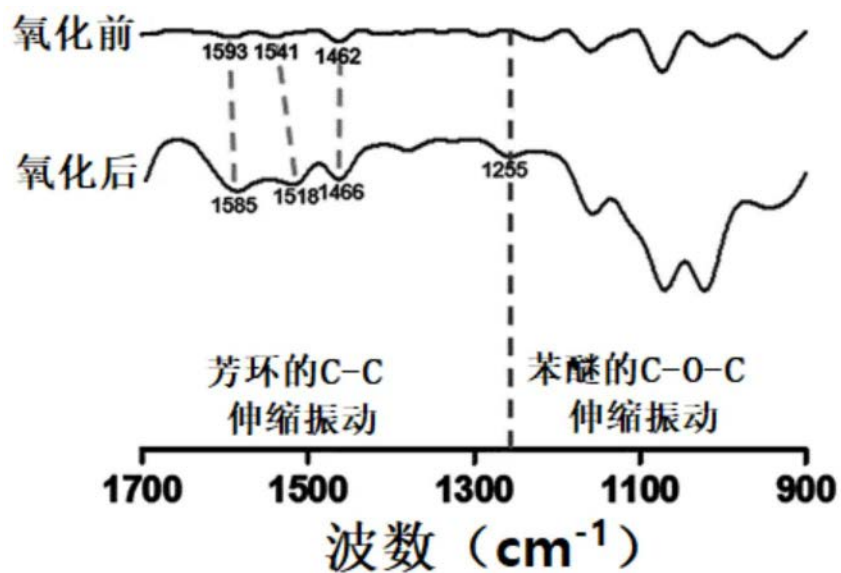


图5

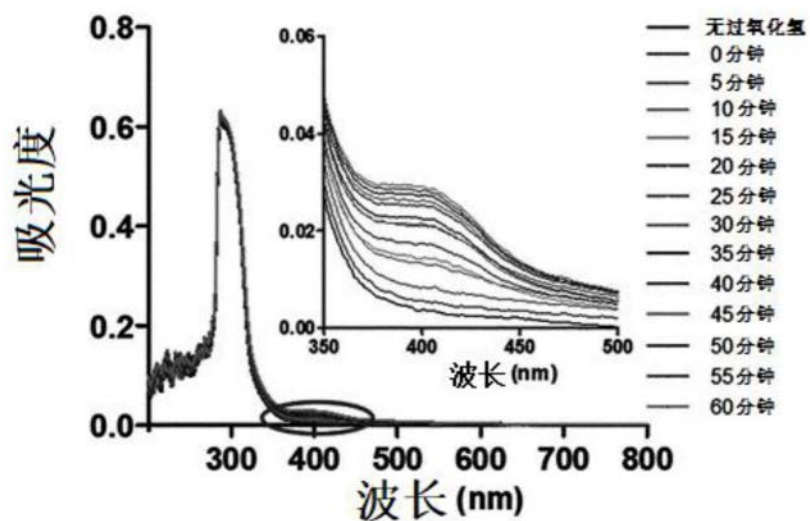


图6

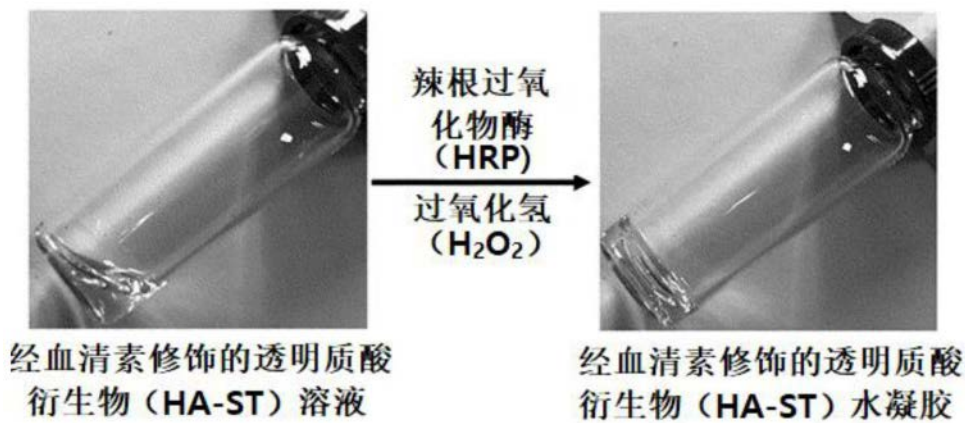


图7

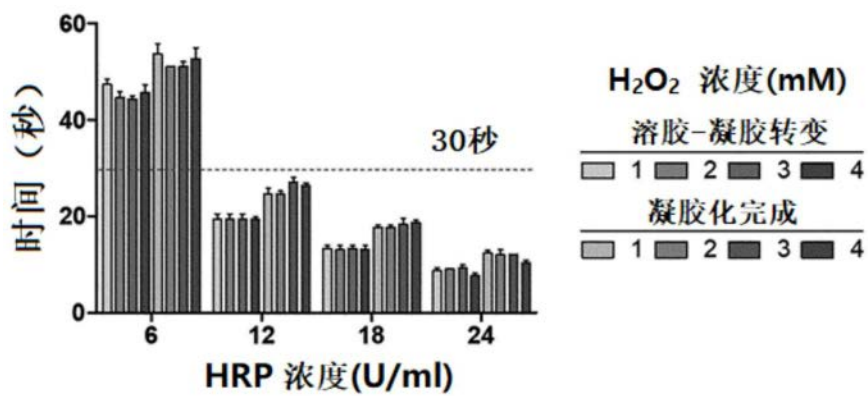


图8

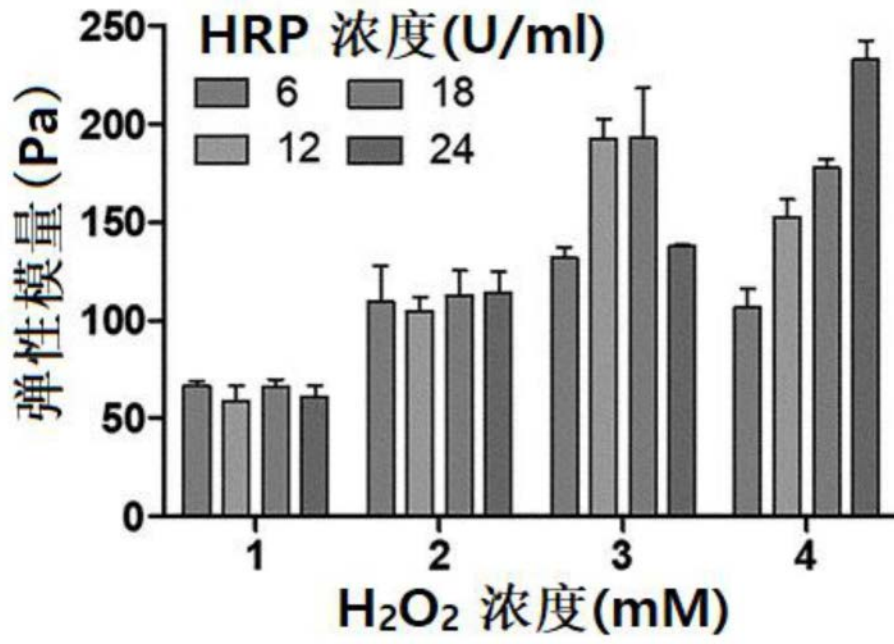


图9

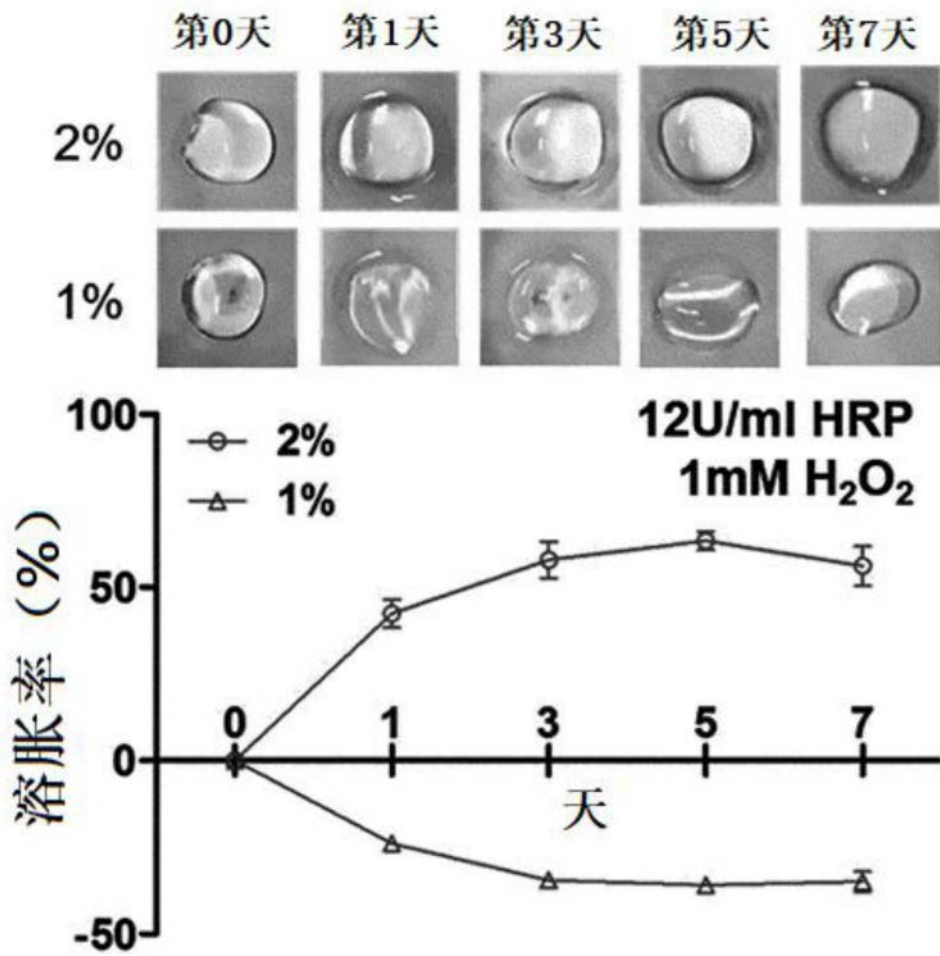


图10

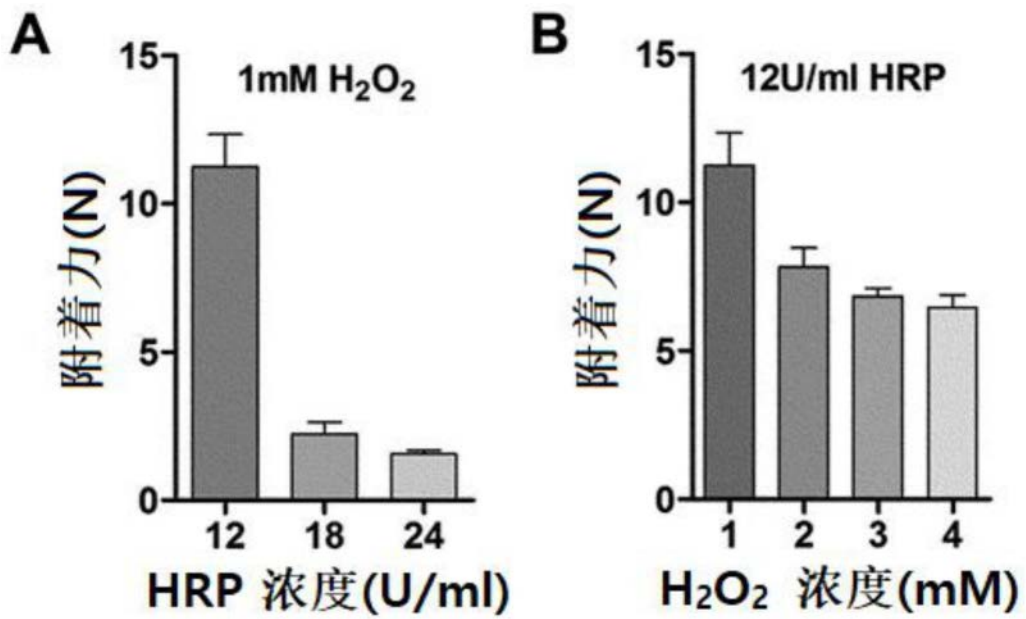
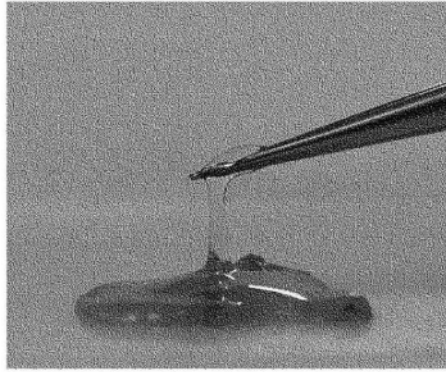


图11

A



B

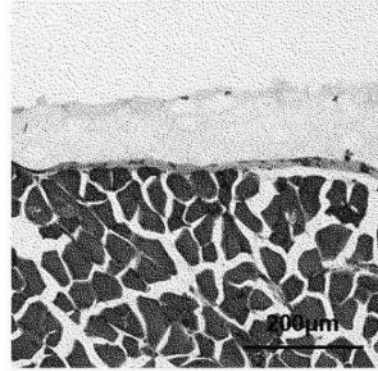


图12

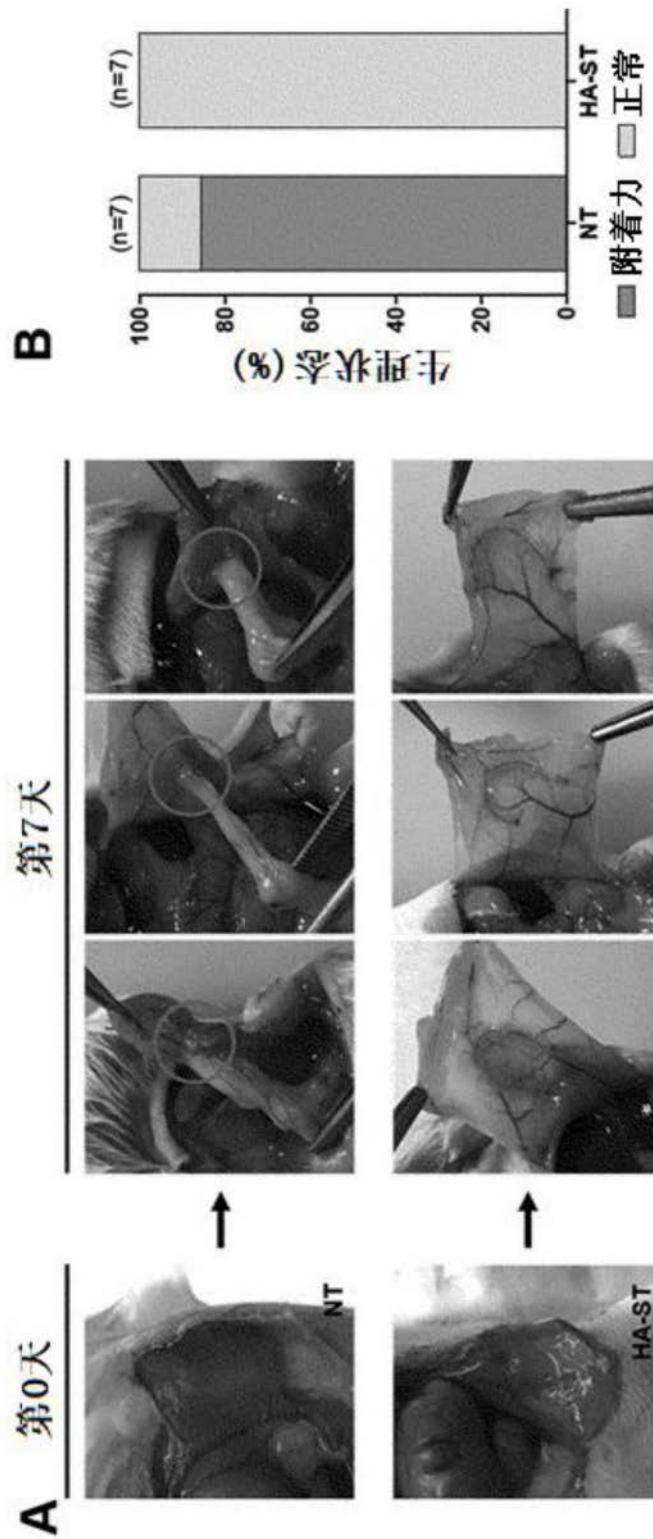


图13

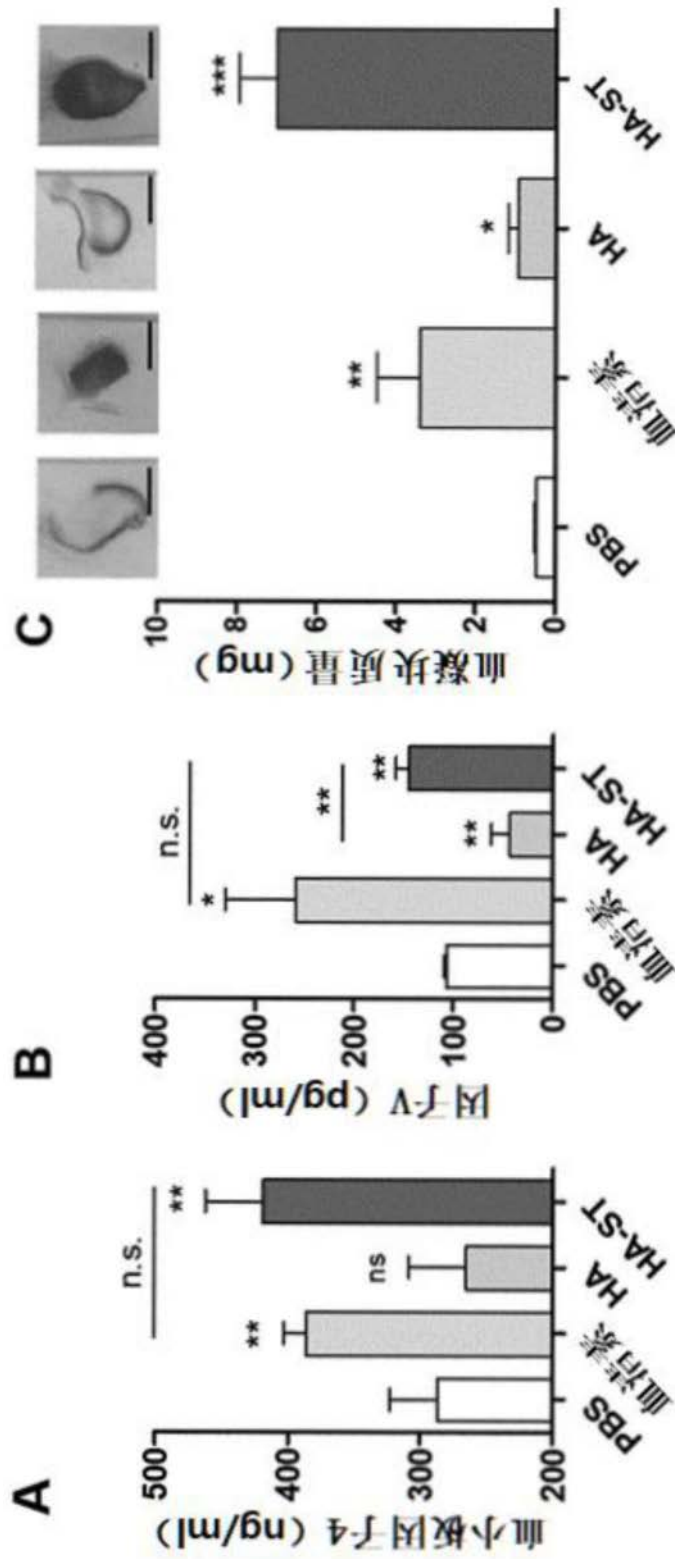


图14

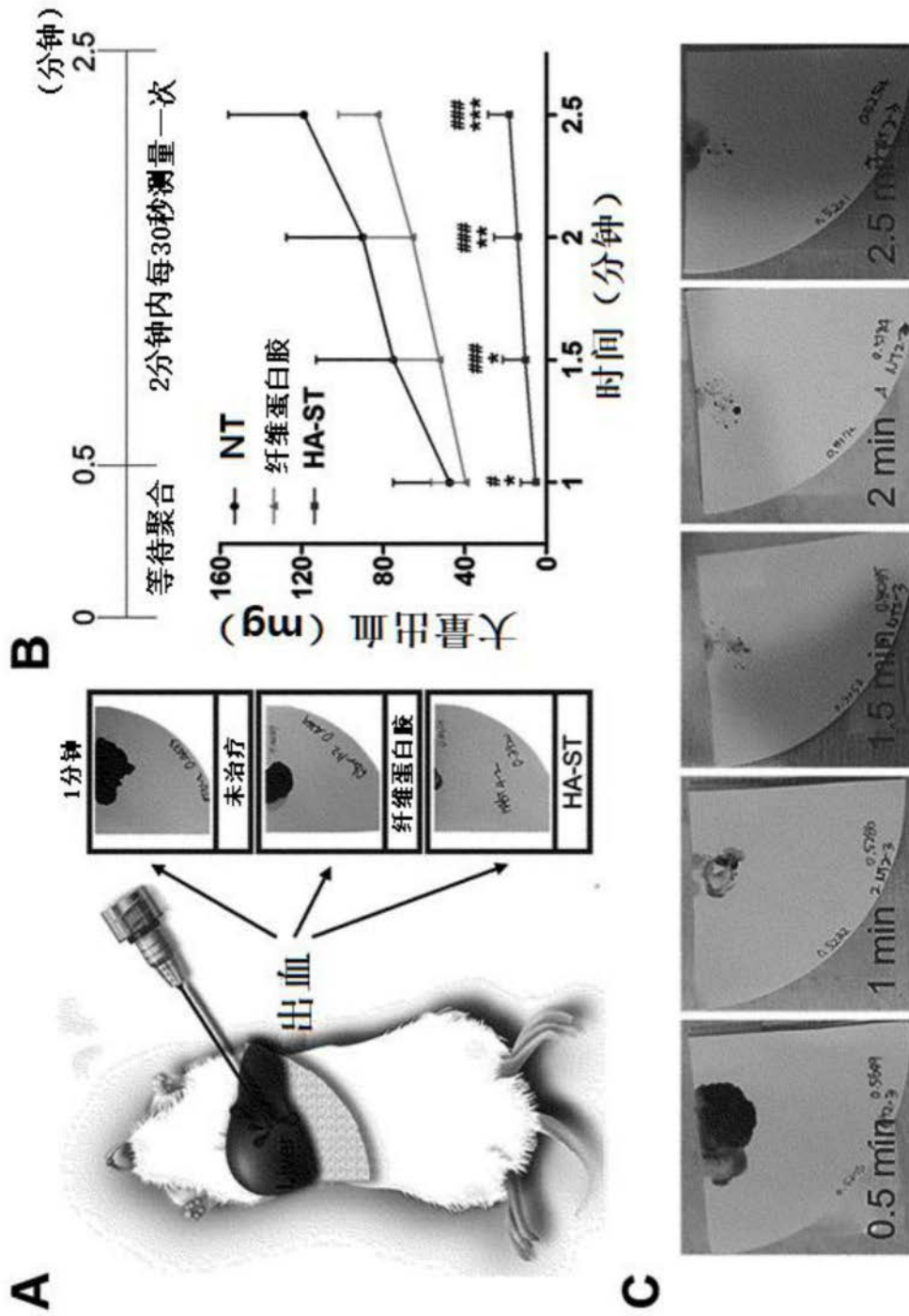


图15

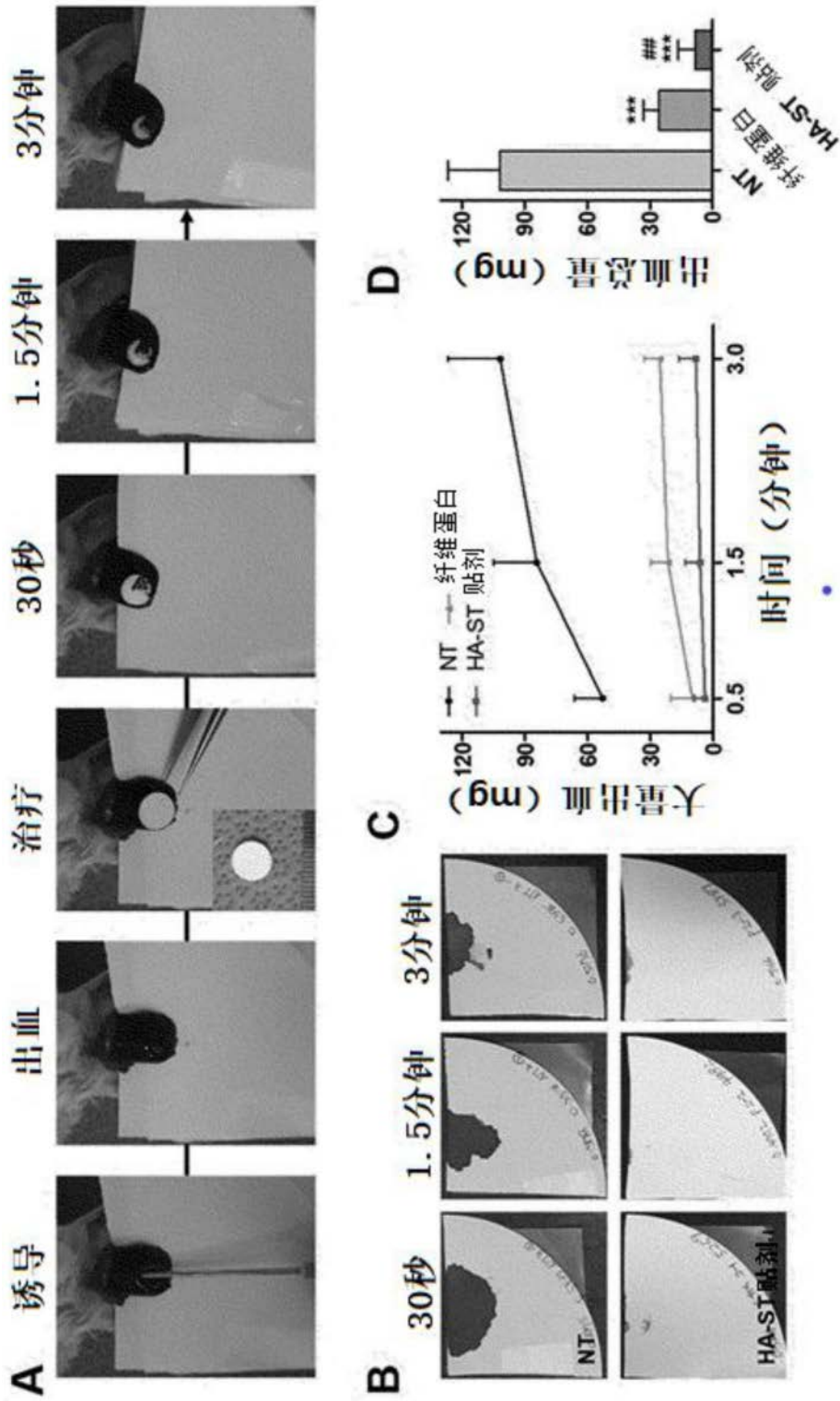


图16

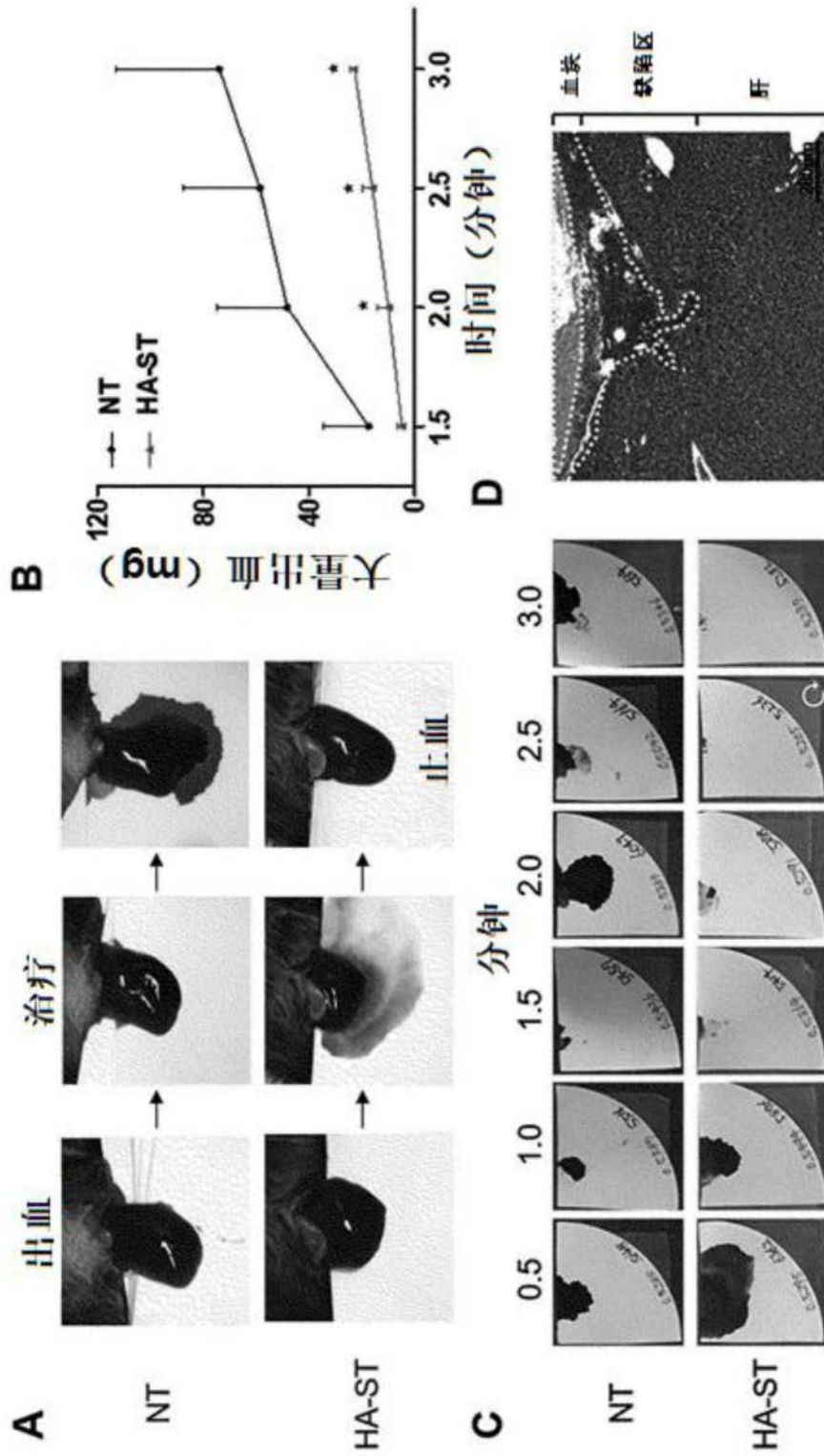


图17

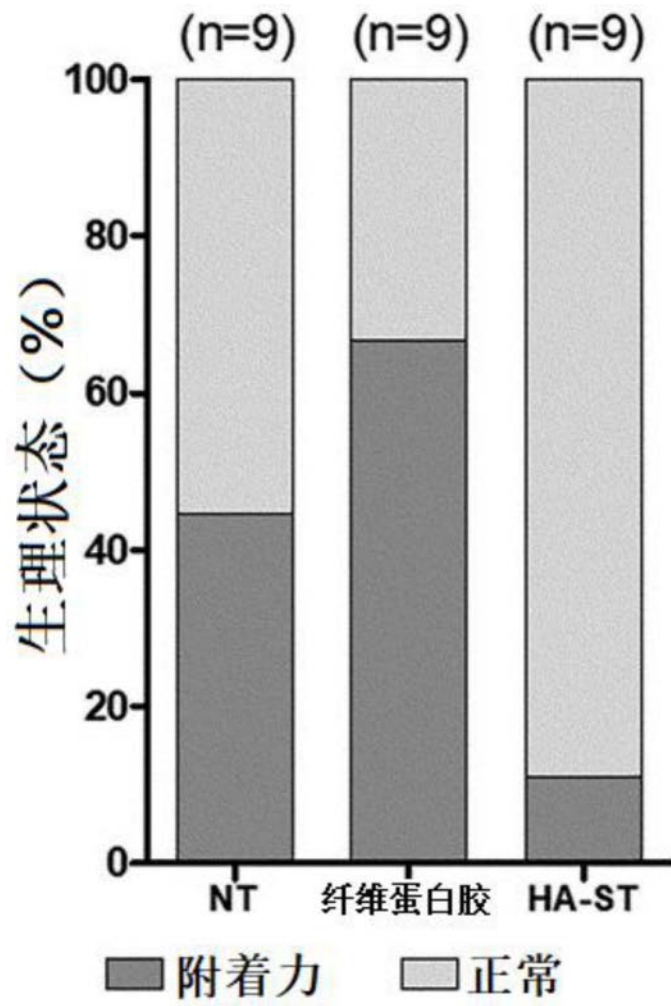


图18

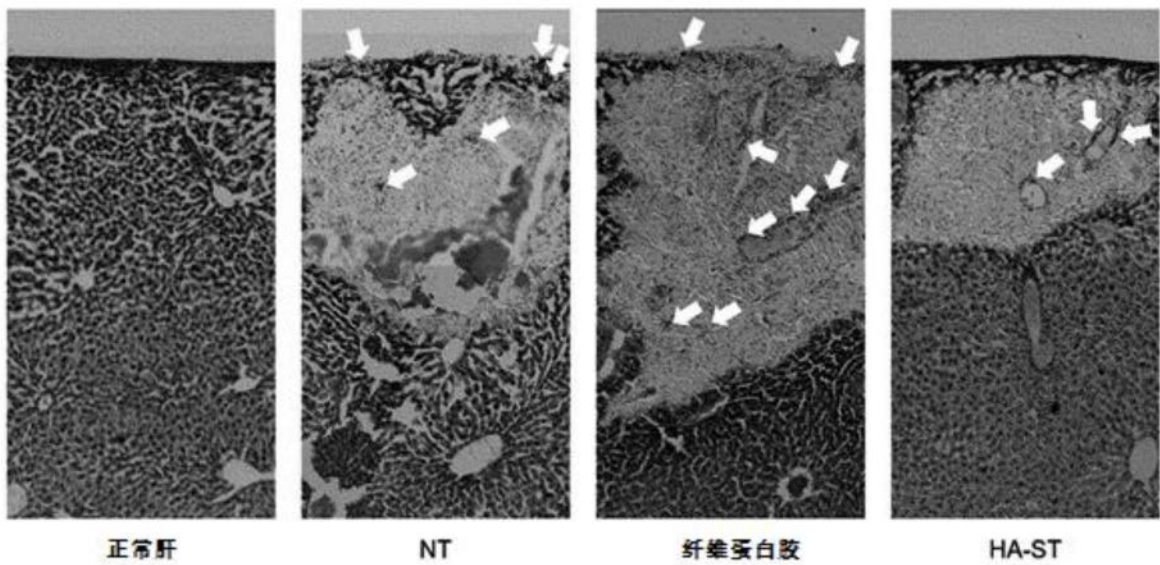


图19

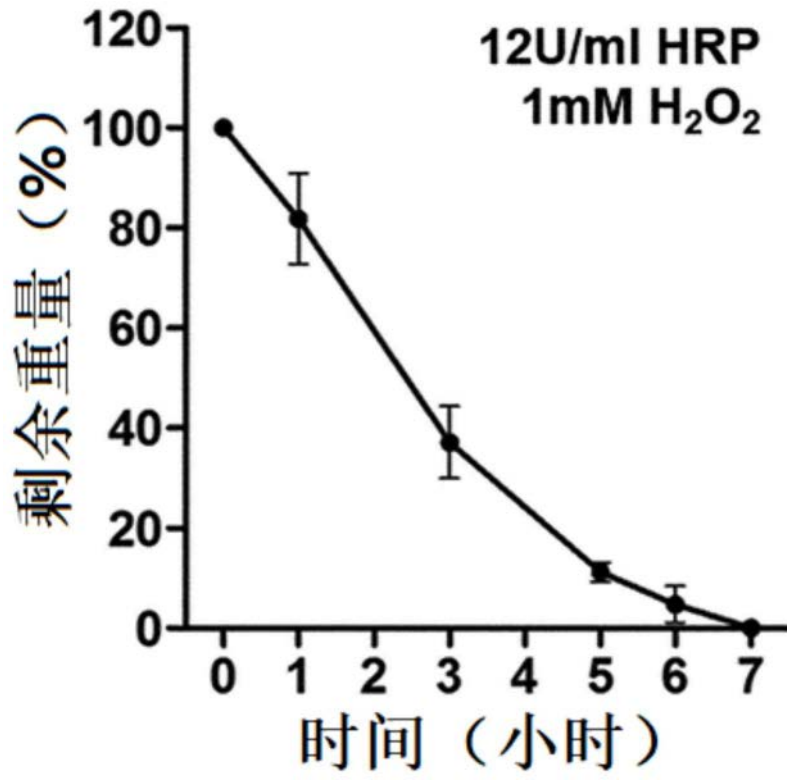


图20

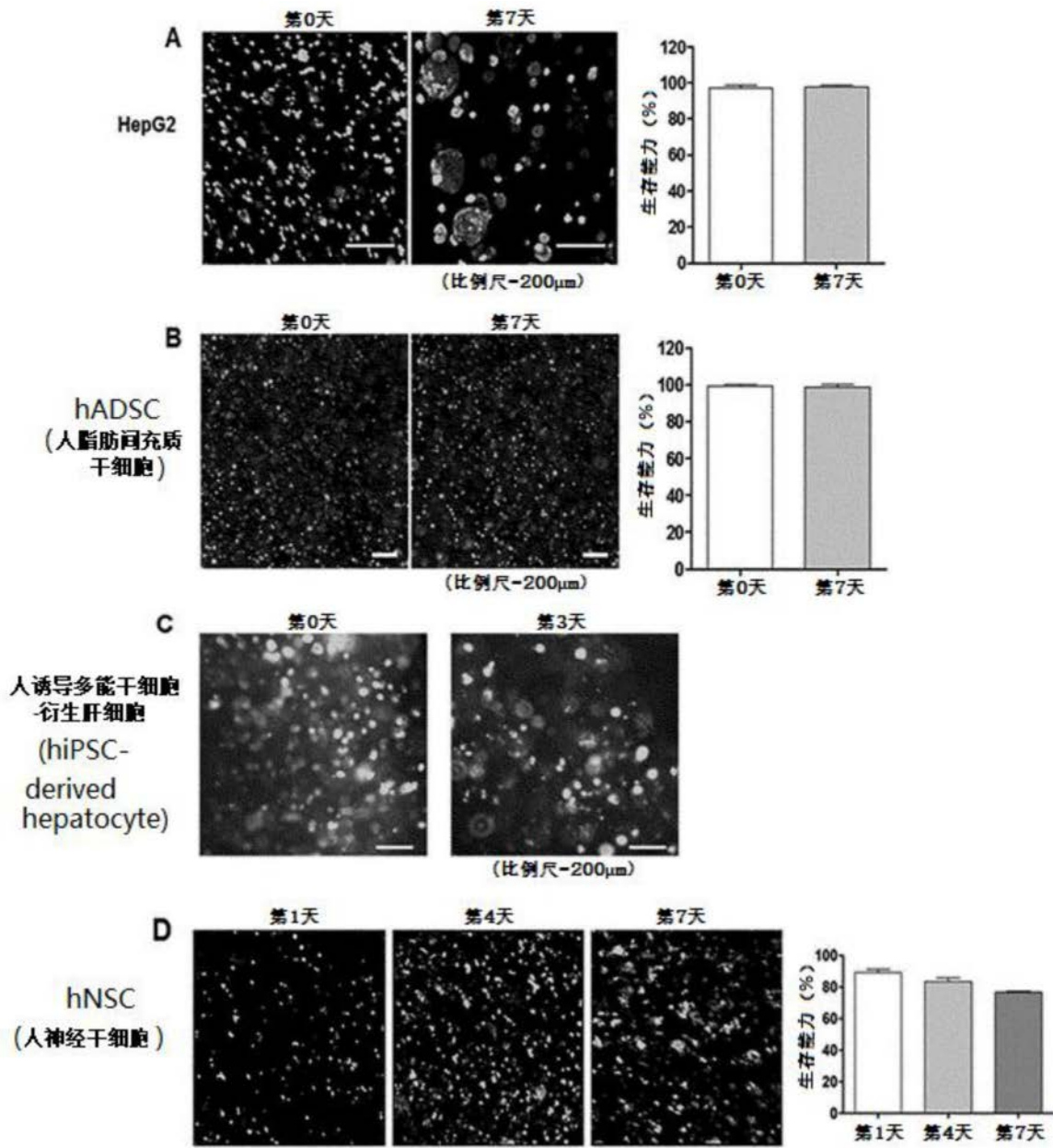


图21

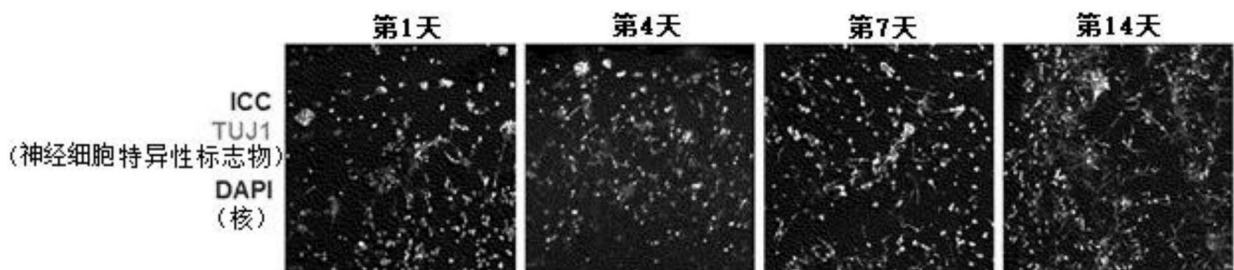
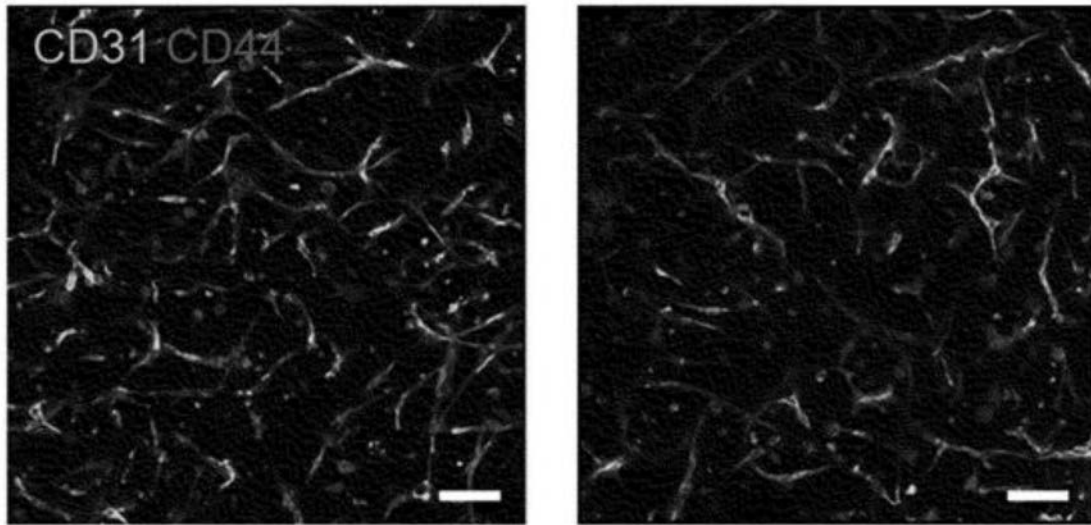


图22

CD31: 内皮标志物
CD44: 间充质干细胞标志物



(比例尺=100 μ m)

图23

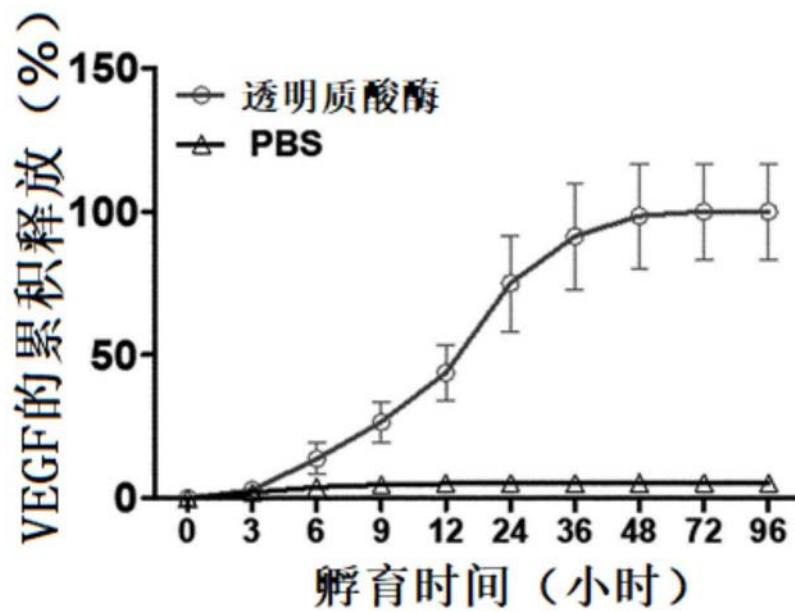


图24