



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 115073769 B

(45) 授权公告日 2025.06.10

(21) 申请号 202210600715.5

C08L 5/08 (2006.01)

(22) 申请日 2022.05.30

A61K 9/06 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

A61K 31/713 (2006.01)

申请公布号 CN 115073769 A

A61K 45/00 (2006.01)

(43) 申请公布日 2022.09.20

A61K 47/36 (2006.01)

(73) 专利权人 浙江大学

A61K 47/40 (2006.01)

地址 310058 浙江省杭州市西湖区余杭塘路866号

A61P 1/00 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

(72) 发明人 高长有 汪凯

(74) 专利代理机构 杭州求是专利事务所有限公司 33200

(56) 对比文件

US 2016279868 A1, 2016.09.29

CN 110885455 A, 2020.03.17

专利代理师 万尾甜 韩介梅

审查员 赵佳睿

(51) Int. Cl.

C08J 3/075 (2006.01)

C08L 87/00 (2006.01)

权利要求书2页 说明书5页 附图5页

(54) 发明名称

一种促组织再生的活性氧响应超分子水凝胶及其制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种促组织再生的活性氧响应超分子水凝胶及其制备方法。首先合成一种含有双键端基的活性氧响应的超支化聚合物;通过超支化聚合物的端基双键与己二胺化的环糊精反应得到端基为环糊精的超支化聚合物;通过金刚烷乙酸与透明质酸间的酯交换反应得到金刚烷修饰的透明质酸;通过己二胺化的环糊精与透明质酸间的酰化反应得到环糊精修饰的透明质酸;于水中溶解所制得的超支化聚合物、金刚烷修饰的透明质酸、环糊精修饰的透明质酸和促进再生的miRNA、药物或者超枝化聚赖氨酸,充分混合,原位孵育形成水凝胶。该水凝胶生物相容性良好,可消除微环境中的过量活性氧和促进再生;结合抗炎治疗策略和促再生治疗策略显示出优异的治疗效果,在组织工程再生中具有广泛的应用前景。

1. 一种促组织再生的活性氧响应超分子水凝胶的制备方法,其特征在于,所述的制备方法为:通过聚乙二醇二丙烯酸酯与活性氧响应小分子二胺间的迈克尔加成反应得到一种含有双键端基的活性氧响应的超支化聚合物;通过超支化聚合物的端基双键与己二胺化的环糊精(CD-HDA)的迈克尔加成反应得到端基为环糊精的超支化聚合物;通过金刚烷乙酸与透明质酸间的酯交换反应得到金刚烷修饰的透明质酸;通过己二胺化的环糊精与透明质酸间的酰化反应得到环糊精修饰的透明质酸;于水中溶解所制得的超支化聚合物、金刚烷修饰的透明质酸、环糊精修饰的透明质酸以及促进再生的miRNA、药物或超支化聚赖氨酸,充分混合,通过原位孵育形成促组织再生的超分子活性氧响应的水凝胶。

2. 根据权利要求1所述的一种促组织再生的活性氧响应超分子水凝胶的制备方法,其特征在于,所述端基为环糊精的超支化聚合物的制备方法为:将聚乙二醇二丙烯酸酯与活性氧响应小分子二胺溶于二甲基亚砜中,搅拌均匀,60-100°C油浴反应6-10小时;将反应液滴加至沉降剂甲基叔丁基醚中进行沉降并弃去上层废液,重复该沉降过程3-5次,得到的沉降产物再通过旋蒸去除少量残留沉降剂,即得到端基双键的超支化聚合物;将得到的超支化聚合物与己二胺化的环糊精溶于二甲基亚砜中,搅拌均匀,60-100°C油浴反应6-10小时;将反应液滴加至沉降剂甲基叔丁基醚中进行沉降并弃去上层废液,重复该沉降过程3-5次,得到的沉降产物再通过旋蒸去除残留沉降剂,溶于无水甲醇后,反复离心去除剩余的己二胺化环糊精,通过旋蒸去除甲醇,即得到端基为环糊精的超支化聚合物。

3. 根据权利要求2所述的一种促组织再生的活性氧响应超分子水凝胶的制备方法,其特征在于,所述的聚乙二醇二丙烯酸酯与活性氧响应小分子二胺的摩尔比为2.2-2.5:1,活性氧小分子二胺与二甲基亚砜的质量比为1:16.5,端基双键的超支化聚合物与己二胺化环糊精的摩尔比为1:2-2.5;活性氧小分子二胺为含有二硒键、二硫键、单硒、单硫或其他具有活性氧响应性结构的两端端基为氨基的小分子。

4. 根据权利要求1所述的一种促组织再生的活性氧响应超分子水凝胶的制备方法,其特征在于,环糊精修饰的透明质酸(CD-HA)的具体制备方法为:将强酸性离子交换树脂Dowex 50w×8-200加入HA水溶液中,室温搅拌8小时,过滤除掉树脂,然后用0.2M四丁基氢氧化铵水溶液(TBA-OH)调节pH至7.02-7.05,得到的水溶液立即冷冻冻干,得到透明质酸TBA盐(HA-TBA),将HA-TBA和己二胺化环糊精溶于无水二甲基亚砜中,完全溶解后在溶液中加入卡特缩合剂,反应3小时后加入去离子水停止反应,转移至透析袋中,透析纯化,冷冻干燥得到。

5. 如权利要求4所述的一种促组织再生的活性氧响应超分子水凝胶的制备方法,其特征在于,所述环糊精修饰的透明质酸(CD-HA)的具体制备方法中:透明质酸的质量体积分数为1-2%;强酸性离子交换树脂的总质量至少是透明质酸的3倍;己二胺化环糊精的摩尔量至少是HA-TBA的1.3倍;卡特缩合剂的摩尔量与己二胺化环糊精相同;透析在室温下进行,8-10小时换一次水,透析时间14天后冻干。

6. 根据权利要求1所述的一种促组织再生的活性氧响应超分子水凝胶的制备方法,其特征在于,金刚烷修饰的透明质酸(Ad-HA)的具体制备方法为:将强酸性离子交换树脂Dowex 50w×8-200加入HA水溶液中,室温搅拌8小时,过滤除掉树脂,然后用0.2M四丁基氢氧化铵水溶液(TBA-OH)调节pH至7.02-7.05,得到的水溶液立即冷冻冻干,得到透明质酸TBA盐(HA-TBA),将HA-TBA、4-二甲氨基吡啶和金刚烷乙酸溶于无水二甲基亚砜中,完全溶解后在

溶液中加入二碳酸二叔丁酯,45°C油浴反应20小时后转移至透析袋中,透析纯化,冷冻干燥得到。

7.如权利要求6所述的一种促组织再生的活性氧响应超分子水凝胶的制备方法,其特征在于,所述金刚烷修饰的透明质酸(Ad-HA)的具体制备方法中:透明质酸的质量体积分数为1-2%;强酸性离子交换树脂的总质量至少是透明质酸的3倍;金刚烷乙酸的质量是HA-TBA的0.5-2.5倍;4-二甲氨基吡啶的摩尔量至少是HA-TBA的0.5-2.5倍;透析在室温下进行,8-10小时换一次水,透析两周后冻干。

8.如权利要求1所述的一种促组织再生的活性氧响应超分子水凝胶的制备方法,其特征在于,所述的miRNA为mir199a-3p、mir-590-3p、mir19a/b中的至少一种,所述的药物为脯氨酰-4-羟化酶抑制剂、脑苷肌肽、脑蛋白水解物中的至少一种。

9.如权利要求1所述的一种促组织再生的活性氧响应超分子水凝胶的制备方法,其特征在于:于超纯水中溶解最终质量体积分数分别为1%-20%的超支化聚合物、5%-10%的Ad-HA即金刚烷修饰的透明质酸、5-10%的CD-HA即环糊精修饰的透明质酸,10-1000 $\mu\text{mol}$ 的miRNA,药物或者超支化聚赖氨酸,充分混合后孵育一段时间,即可得到促再生的活性氧响应水凝胶。

10.如权利要求1所述方法制得的水凝胶的用途,其特征在于,用于制备治疗组织微环境活性氧过量表达的疾病的药物,所述疾病包括心梗、心衰、脑损伤、脊髓损伤、脑梗、关节炎、肠炎。

## 一种促组织再生的活性氧响应超分子水凝胶及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物医用高分子材料领域,特别涉及一种促组织再生的活性氧响应超分子水凝胶及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 活性氧产生于各种人体的生理活动,并在调控氧化还原平衡方面发挥着重要作用。活性氧形式多样,主要包括超氧阴离子自由基、过氧化氢、羟基自由基和氮氧自由基等。人体内存在各种活性氧消除酶和小分子抗氧化物来维持细胞内外活性氧产生与清除的动态平衡,一旦平衡被打破,特别是组织微环境中过量表达活性氧时,会形成慢性炎症,最终导致细胞凋亡和组织损伤,抑制组织正常修复进程。大量研究表明,心肌梗死、心衰、脊髓损伤、脑梗、关节炎、肠炎等各类炎症性疾病的机理均与组织微环境内过量表达的活性氧密切相关。因此,及时而有效地调控病理微环境的活性氧水平并维持在正常水平具有重要意义。另外,根据组织微环境活性氧过量表达的特点,设计一种含有活性氧响应结构的生物医用材料不仅可以作为药物输送载体进行有针对性的治疗,也可以作为一种响应性材料抑制炎症、促进损伤组织的正常修复。

[0003] 目前一些活性氧响应的生物材料包括水凝胶、补片和纳米粒子都对炎症治疗有一定的积极作用,但是由于抗炎治疗策略和生物材料本身的局限性,单独的抗炎调节可以防止持续的损害,但不能完全恢复受损的组织。

[0004] 其他的各种治疗方法,如再生治疗,包括细胞移植、RNA干扰和再生药物,已被探索用于治疗心肌梗死和恢复心功能,并取得了不同程度的成功。MicroRNAs(miRNAs)是一种短的单链rna,可以与mrna中的互补序列退火,从而抑制蛋白质的表达。单个mirna参与众多mRNA靶点,通常编码复杂细胞内网络的多种成分。它们还与免疫细胞发育和功能、免疫紊乱、神经发育和神经疾病等复杂的生物学过程有关。RNA干扰靶向治疗是治疗各种疾病的一种非常有前途的方法。其余的一些参与再生通路的药物也被研制和研究用于治疗组织疾病。

[0005] 单独的抗炎治疗无法完全恢复受损的组织,而促进再生在组织工程中有很好的治疗前景。因此,我们通过使用ROS响应的生物材料的抗炎治疗和促再生mirna和药物的再生治疗的结合,实现疾病后受损组织的长期改善。

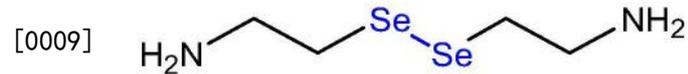
### 发明内容

[0006] 本发明的目的是提供一种促组织再生的活性氧响应超分子水凝胶及其制备方法。该水凝胶可实现活性氧响应和抗炎,通过响应降解释放促再生的miRNA、药物和超枝化聚赖氨酸(HBPL),在促进炎症相关疾病的治疗和组织修复方面有良好应用前景。

[0007] 本发明的一种促组织再生的活性氧响应超分子水凝胶的制备方法:通过聚乙二醇二丙烯酸酯(PEGDA)与活性氧响应小分子二胺间的迈克尔加成反应得到一种含有双键端基的活性氧响应的超支化聚合物;通过超支化聚合物的端基双键与己二胺化的环糊精(CD-

HDA)的迈克尔加成反应得到端基为环糊精的超支化聚合物;通过金刚烷乙酸与透明质酸间的酯交换反应得到金刚烷修饰的透明质酸;通过己二胺化的环糊精与透明质酸间的酰化反应得到环糊精修饰的透明质酸;于水中溶解所制得的超支化聚合物、金刚烷修饰的透明质酸、环糊精修饰的透明质酸以及促进再生的miRNA、药物或HBPL,充分混合,进而通过原位孵育形成促组织再生的超分子活性氧响应的水凝胶。

[0008] 本发明的制备方法中,活性氧响应小分子可以为含有二硒键或其他具有活性氧响应性结构的两端端基为氨基的小分子。其中,含有二硒键的二胺小分子结构式为:



[0010] 本发明的制备方法中,所述端基为环糊精的超支化聚合物的具体制备方法为:将聚乙二醇二丙烯酸酯与活性氧响应小分子二胺溶于二甲基亚砷中,搅拌均匀,60-100°C油浴反应6-10小时;将反应液滴加至沉降剂甲基叔丁基醚中进行沉降并弃去上层废液,重复该沉降过程3-5次,得到的沉降产物再通过旋蒸去除少量残留沉降剂,即得到端基双键的超支化聚合物。将得到的超支化聚合物与己二胺化的环糊精溶于二甲基亚砷中,搅拌均匀,60-100°C油浴反应6-10小时;将反应液滴加至沉降剂甲基叔丁基醚中进行沉降并弃去上层废液,重复该沉降过程3-5次,得到的沉降产物再通过旋蒸去除少量残留沉降剂,溶于无水甲醇后,反复离心去除剩余的己二胺化环糊精,通过旋蒸去除甲醇,即得到端基为环糊精的超支化聚合物。

[0011] 本发明的制备方法中,聚乙二醇二丙烯酸酯与活性氧响应小分子二胺的摩尔比为2.2-2.5:1,活性氧小分子二胺与二甲基亚砷的质量比为1:16.5,端基双键的超支化聚合物与己二胺化环糊精的摩尔比为1:2-2.5。

[0012] 本发明的制备方法中,环糊精修饰的透明质酸(CD-HA)的具体制备方法为:将强酸性离子交换树脂Dowex 50w×8-200加入HA水溶液中,室温搅拌8小时。过滤除掉树脂,然后用0.2M四丁基氢氧化铵水溶液(TBA-OH)调节pH至7.02-7.05。得到的水溶液立即冷冻冻干,得到透明质酸TBA盐(HA-TBA)。将HA-TBA和己二胺化环糊精溶于无水二甲基亚砷中,完全溶解后在溶液中加入卡特缩合剂,反应3小时后加入去离子水停止反应,转移至透析袋中,透析纯化,冷冻干燥得到。

[0013] 本发明的制备方法中,环糊精修饰的透明质酸的具体制备方法中,透明质酸的质量体积分数为1-2%;强酸性离子交换树脂的总质量至少是透明质酸的3倍;己二胺化环糊精的分子量至少是HA-TBA的1.3倍;卡特缩合剂的分子量与己二胺化环糊精相同。透析在室温下进行,8-10小时换一次水,透析总两周后冻干。

[0014] 本发明的制备方法中,金刚烷修饰的透明质酸(Ad-HA)的具体制备方法为:将强酸性离子交换树脂Dowex 50w×8-200加入HA水溶液中,室温搅拌8小时。过滤除掉树脂,然后用0.2M四丁基氢氧化铵水溶液(TBA-OH)调节pH至7.02-7.05。得到的水溶液立即冷冻冻干,得到透明质酸TBA盐(HA-TBA)。将HA-TBA、4-二甲氨基吡啶和金刚烷乙酸溶于无水二甲基亚砷中,完全溶解后在溶液中加入二碳酸二叔丁酯,45°C油浴反应20小时后转移至透析袋中,透析纯化,冷冻干燥得到。

[0015] 本发明的制备方法中,金刚烷修饰的透明质酸的具体制备方法中,透明质酸的质量体积分数为1-2%;强酸性离子交换树脂的总质量至少是透明质酸的3倍;金刚烷乙酸的

摩尔量至少是HA-TBA的2.5倍;4-二甲氨基吡啶的摩尔量至少是HA-TBA的0.8倍。透析在室温下进行,8-10小时换一次水,透析两周。

[0016] 本发明的制备方法中:进一步的,于超纯水中溶解最终质量体积分数分别为5%-20%的超支化聚合物、5%-10%的Ad-HA、0-10%的CD-HA和10-1000 $\mu$ M的miRNA、药物或者HBPL,充分混合后孵育一段时间,即可得到超分子的活性氧响应水凝胶。所述药物可以为1,4-DPCA(HIF-1 $\alpha$ 通路调节药物)、神经节苷脂、生长因子等。

[0017] 本发明的有益效果是:

[0018] 本发明首次将抗炎治疗策略和促组织再生治疗策略结合,制得的水凝胶生物相容性良好,显示出优异的治疗效果;所制备的超分子活性氧响应水凝胶,可在活性氧环境下有效的响应降解;可快速成胶,在成胶过程中可通过调节组分含量调控力学性能;所成凝胶可注射。因而该凝胶在活性氧过量表达的疾病如心梗、心衰、脑损伤、脊髓损伤、脑梗、关节炎、肠炎等的治疗中具有良好应用前景。

### 附图说明

[0019] 图1为含有二硒键的二胺小分子的核磁氢谱;

[0020] 图2为实施例1中含有二硒超支化聚合物HBPASe的GPC谱图;

[0021] 图3为实施例1中含有二硒超支化聚合物HBPASe和CD-HBPASe的核磁氢谱;

[0022] 图4为实施例1中环糊精和金刚烷修饰的透明质酸CD-HA和Ad-HA的核磁氢谱;

[0023] 图5为实施例1中于注射器中制备的水凝胶及其可注射挤出的宏观照片;

[0024] 图6为实施例1中制备的水凝胶的降解情况;

[0025] 图7为实施例1中制备的水凝胶的促再生情况。

### 具体实施方式

[0026] 以下结合实施例进一步说明本发明的技术方案,但这些实施例并不用于限制本发明。

[0027] 实施例1:

[0028] 活性氧响应超支化聚合物CD-HBPASe的合成:称取2.5g聚乙二醇二丙烯酸酯(PEGDA)与0.5g含有硒代胱胺于7.5mL二甲基亚砷中,充分搅拌溶解;100 $^{\circ}$ C油浴反应8小时后,反应液冷却至室温;将反应液滴加至5倍体积的沉降剂甲基叔丁基醚中进行沉降,弃去上层废液,重复该沉降过程3-5次,得到的沉降产物再通过旋蒸去除少量残留沉降剂,得到双键封端的超支化聚合物HBPASe。将1g HBPASe与2.5g CD-HDA溶于二甲基亚砷中,搅拌均匀,60-100 $^{\circ}$ C油浴反应6-10小时;将反应液滴加至沉降剂甲基叔丁基醚中进行沉降并弃去上层废液,重复该沉降过程3-5次,得到的沉降产物再通过旋蒸去除少量残留沉降剂,加入甲醇溶解超支化聚合物后,离心三次去除多余的CD-HDA,在通过旋蒸去除甲醇,得到活性氧响应超支化聚合物CD-HBPASe。

[0029] 环糊精修饰的透明质酸CD-HA的合成:将3g透明质酸溶解在150毫升去离子水中,室温下搅拌均匀;加入9.0g Dowex 50WX8离子交换树脂,室温搅拌8小时。过滤除掉树脂,然后用0.2M四丁基氢氧化铵水溶液(TBA-OH)调节pH至7.02-7.05。得到的水溶液立即冷冻冻干,得到透明质酸TBA盐(HA-TBA)。向烧瓶中加入2.5g HA-TBA和2.96g CD-HDA溶于125mL无

水DMSO。1.06g的BOP完全溶于20mL的无水DMSO后,加入至HA-TBA/CD-HDA溶液中,在室温搅拌3小时。用10毫升冷去离子水进行冷却,然后将溶液转移到截留分子量3500g/mol的透析袋中,每隔6-8小时换一次水,透析两周,冷冻干燥即可。

[0030] 金刚烷修饰的透明质酸Ad-HA的合成:将3g透明质酸溶解在150毫升去离子水中,室温下搅拌均匀;加入9.0g Dowex 50WX8离子交换树脂,室温搅拌8小时。过滤除掉树脂,然后用0.2M四丁基氢氧化铵水溶液(TBA-OH)调节pH至7.02-7.05。得到的水溶液立即冷冻干燥,得到透明质酸TBA盐(HA-TBA)。加入2.5g HA-TBA,2.04g金刚烷乙酸和0.32g 4-二甲氨基吡啶溶于125毫升无水DMSO。完全溶解后,将0.35mL碳酸酐二叔丁酯加入到反应中,在45°C的油浴中搅拌20小时,然后将溶液转移到截留分子量3500g/mol的透析袋中,每隔6-8小时换一次水,透析两周,冷冻干燥即可。

[0031] 活性氧响应水凝胶的制备:于水中溶解最终质量体积分数分别为10%的CD-HBPASe、10%的Ad-HA、10%的CD-HA,200 $\mu$ M的mir19充分混合。将混合液吸入注射器中,混合均匀后,注射器内即可成胶。

[0032] 本实施例中合成的HBPASe的GPC谱图与核磁氢谱如图2、图3所示。本实施例中合成的HA-CD和HA-Ad的核磁氢谱如图4所示。本实施例中于注射器中制备的水凝胶及其可注射挤出的宏观照片如图5所示。水凝胶的可注射性主要使手术易于进行,便于操作。将本实施例中制备的活性氧响应水凝胶分别置于水和50mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>水溶液中,凝胶的降解情况如图6所示。结果表明,该水凝胶在两种溶液中均有降解,但在50mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>水溶液中降解的更快,说明凝胶同时存在水解和活性氧降解,能够有效的响应活性氧环境。水凝胶的治疗效果如图7所示,相比较于单纯抗炎水凝胶(R+/M-)和促再生水凝胶(R-/M+),本发明制得的抗炎促再生水凝胶(R+/M+)对心梗后的心肌再生起到更好的促再生效果。通过免疫荧光检测有丝分裂标记物磷酸化组蛋白3(pH3)、Ki67和Aurora B表征,发现pH3、Ki67和Aurora B阳性信号明显高于其他对照组,表明抗炎和促组织再生治疗策略的结合对心梗后的促再生效果更加优异。

[0033] 实施例2:

[0034] 活性氧响应超支化聚合物CD-HBPASe,环糊精修饰的透明质酸CD-HA和金刚烷修饰的透明质酸Ad-HA的合成如实施例1。

[0035] 活性氧响应水凝胶的制备:于超纯水中溶解最终质量体积分数分别为10%的CD-HBPASe、5%的Ad-HA、5%的CD-HA,200 $\mu$ M的mir19充分混合。将混合液吸入注射器中,混合均匀后,注射器内即可成胶。

[0036] 实施例3:

[0037] 活性氧响应超支化聚合物CD-HBPASe,环糊精修饰的透明质酸CD-HA和金刚烷修饰的透明质酸Ad-HA的合成如实施例1。

[0038] 活性氧响应水凝胶的制备:于超纯水中溶解最终质量体积分数分别为5%的CD-HBPASe、5%的Ad-HA,5%的CD-HA,200 $\mu$ M的mir19充分混合。将混合液吸入注射器中,混合均匀后,注射器内即可成胶。

[0039] 实施例4:

[0040] 活性氧响应超支化聚合物CD-HBPASe,环糊精修饰的透明质酸CD-HA和金刚烷修饰的透明质酸Ad-HA的合成如实施例1。

[0041] 活性氧响应水凝胶的制备:于超纯水中溶解最终质量体积分数分别为5%的CD-HBPASe、10%的Ad-HA、10%的CD-HA,200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的HBPL充分混合。将混合液吸入注射器中,混合均匀后,注射器内即可成胶。

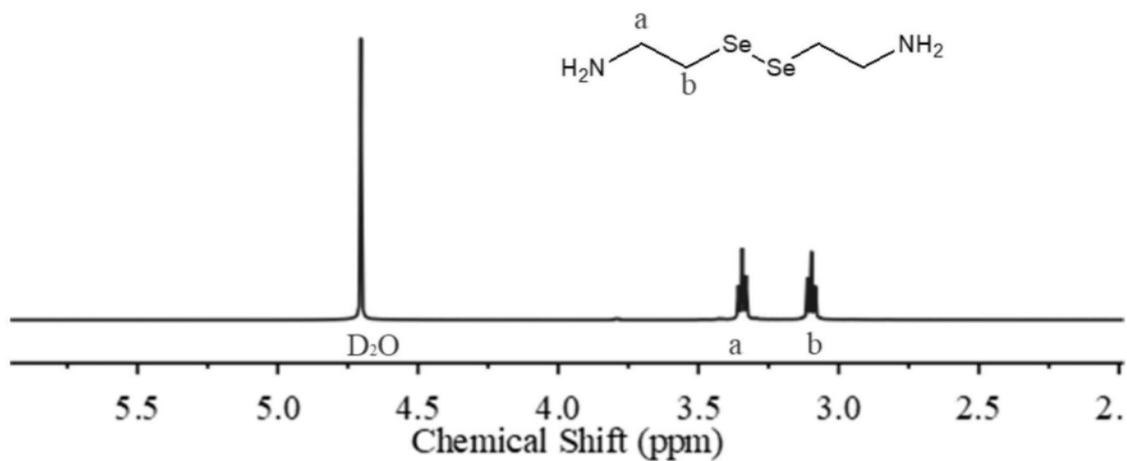


图1

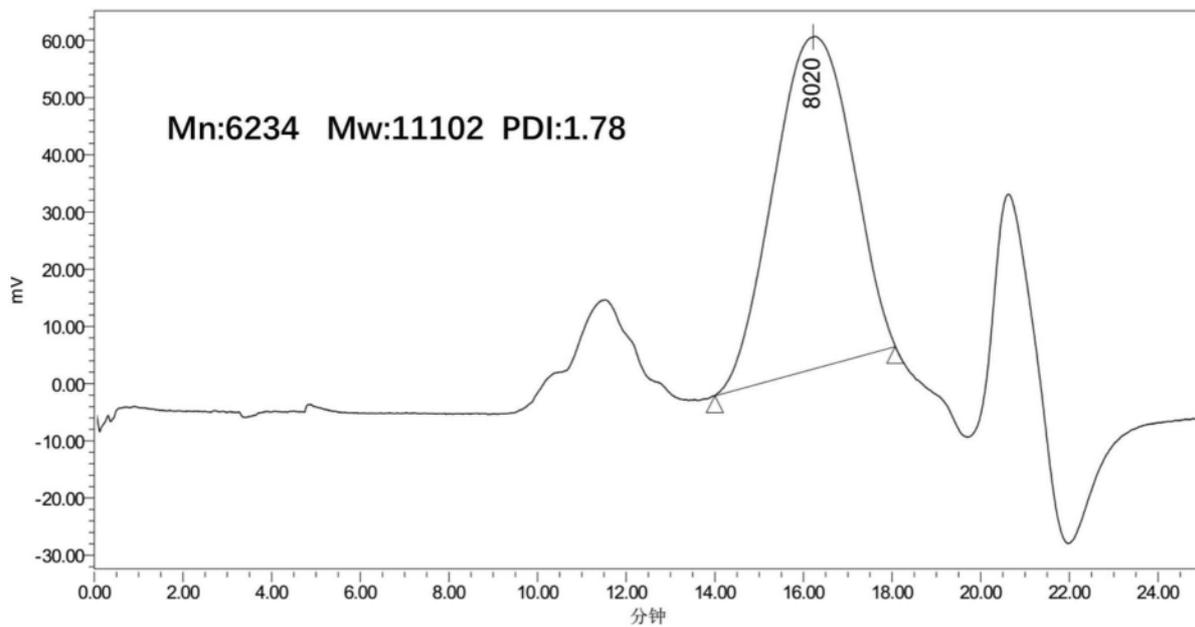


图2

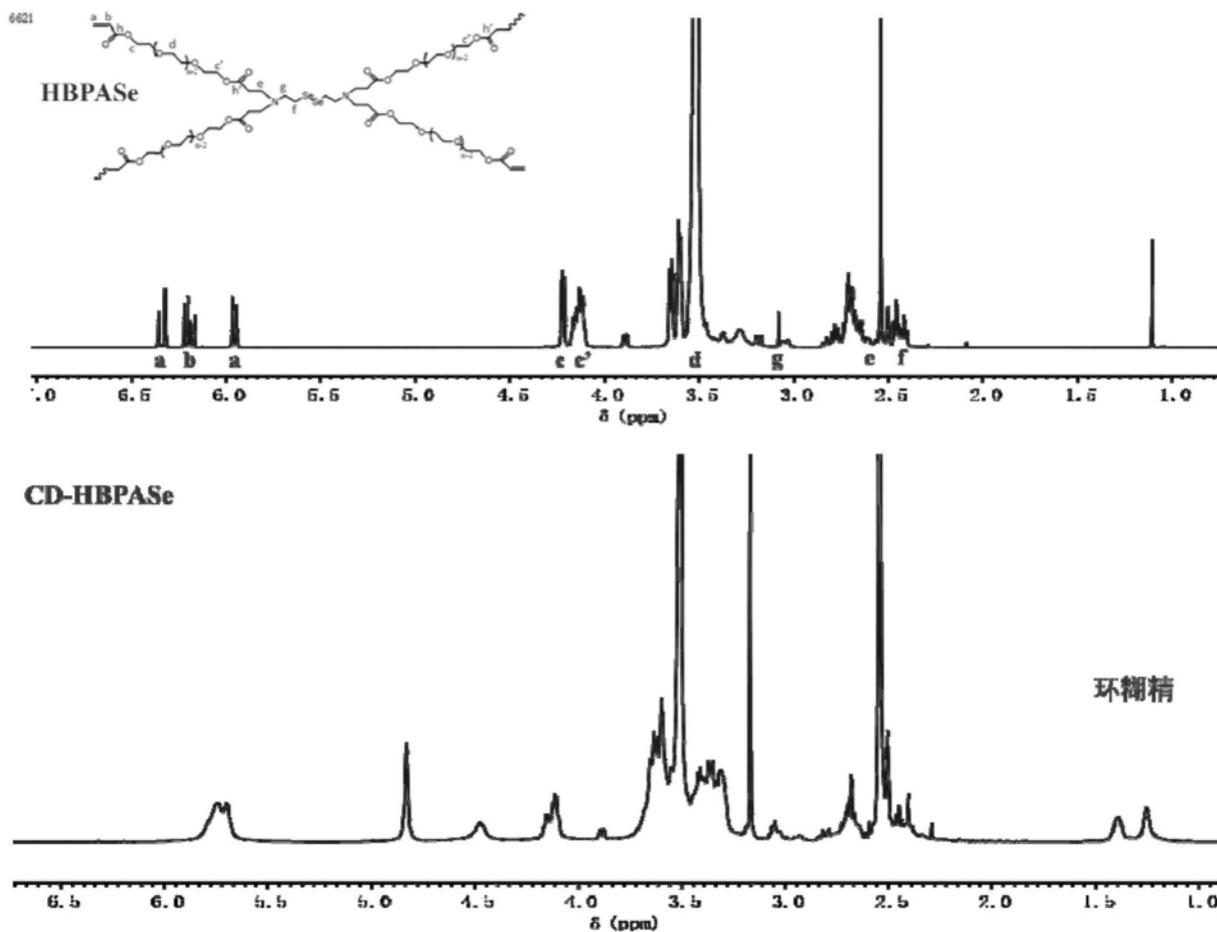
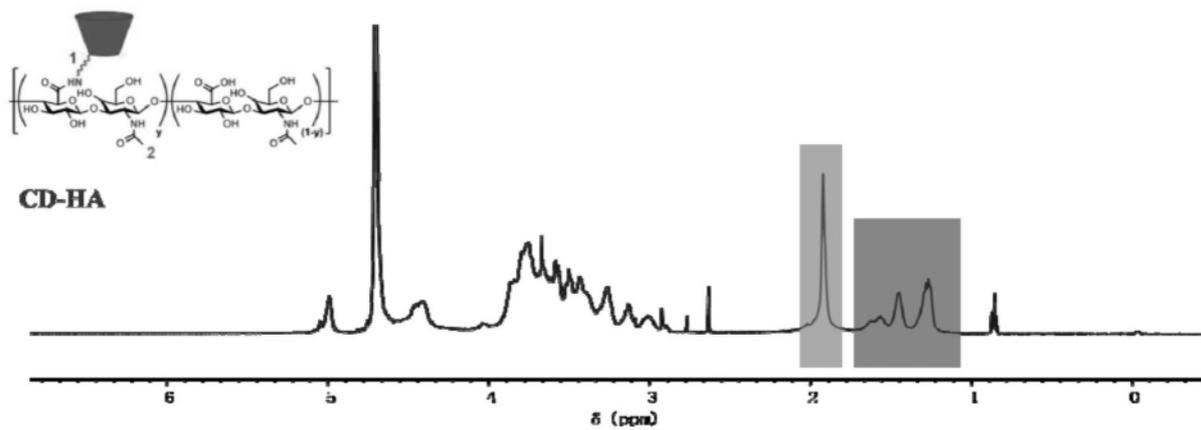


图3



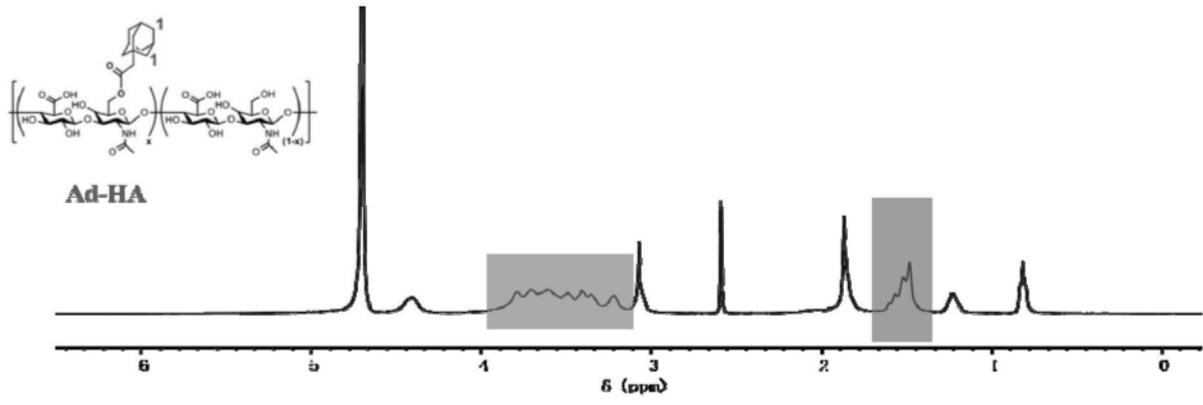


图4

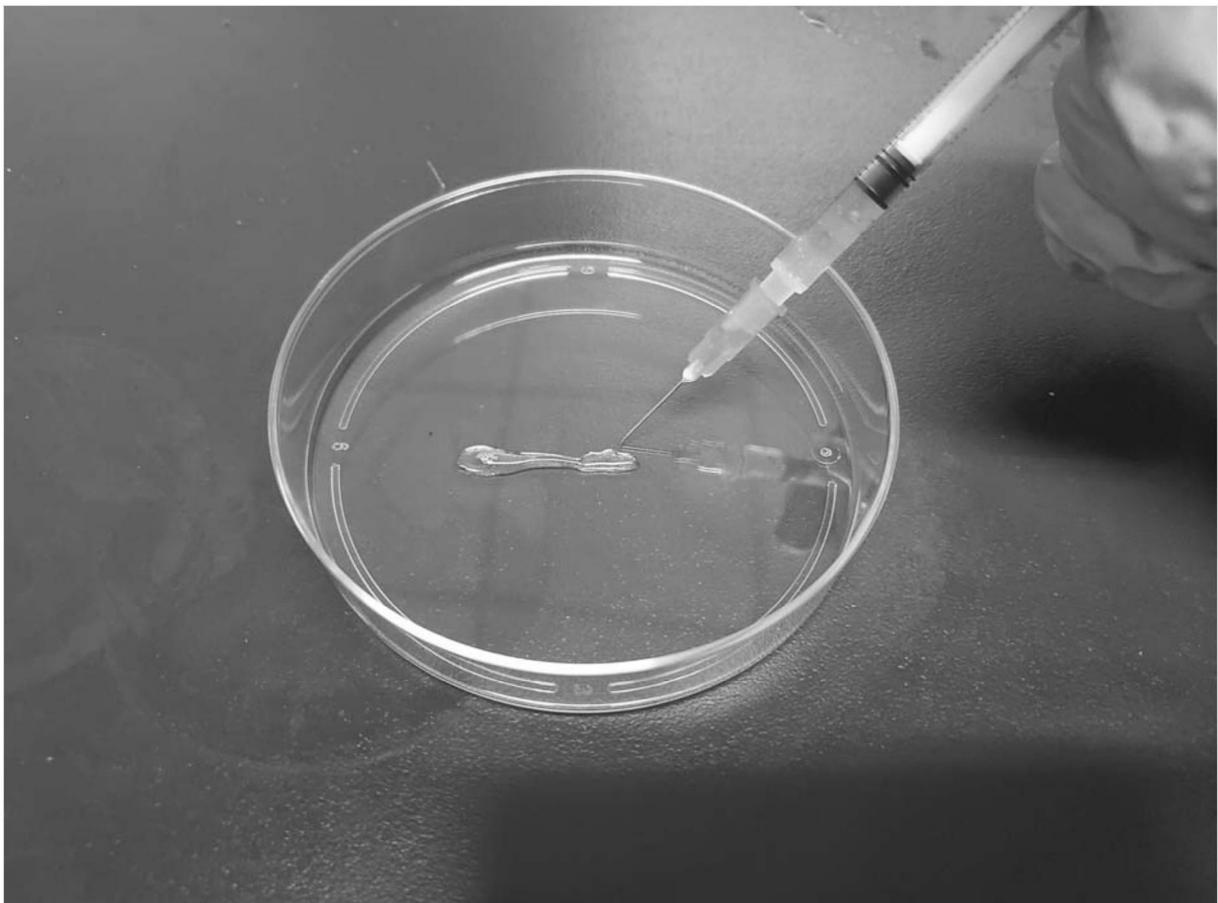


图5

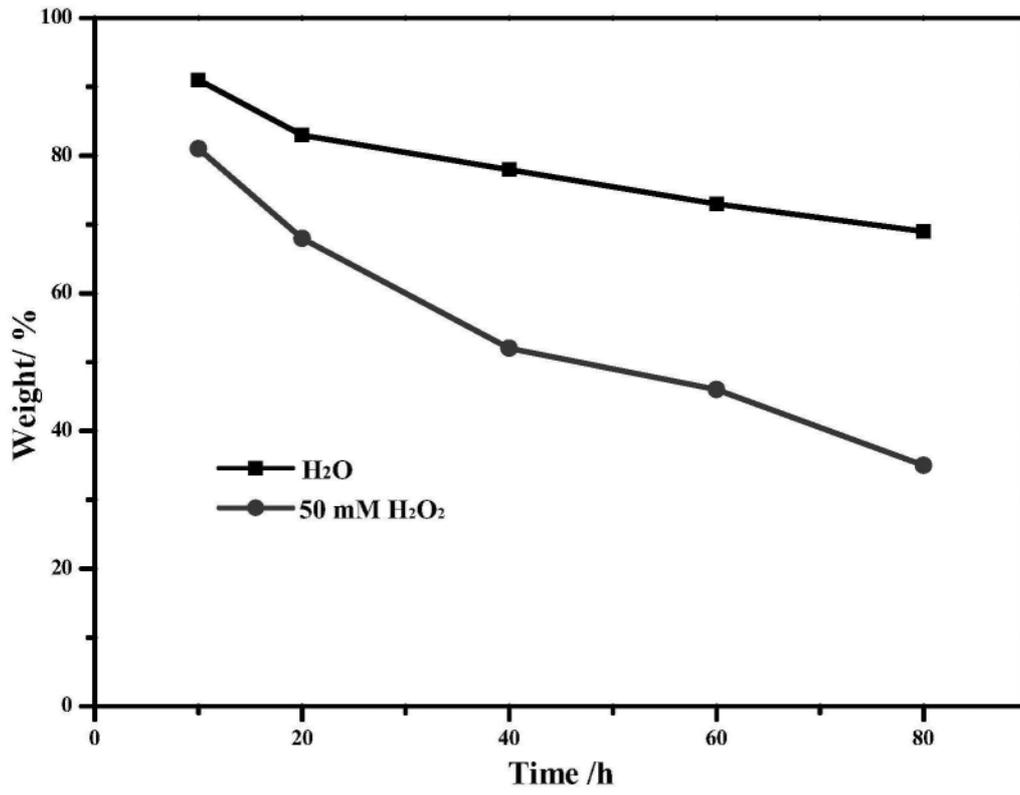


图6

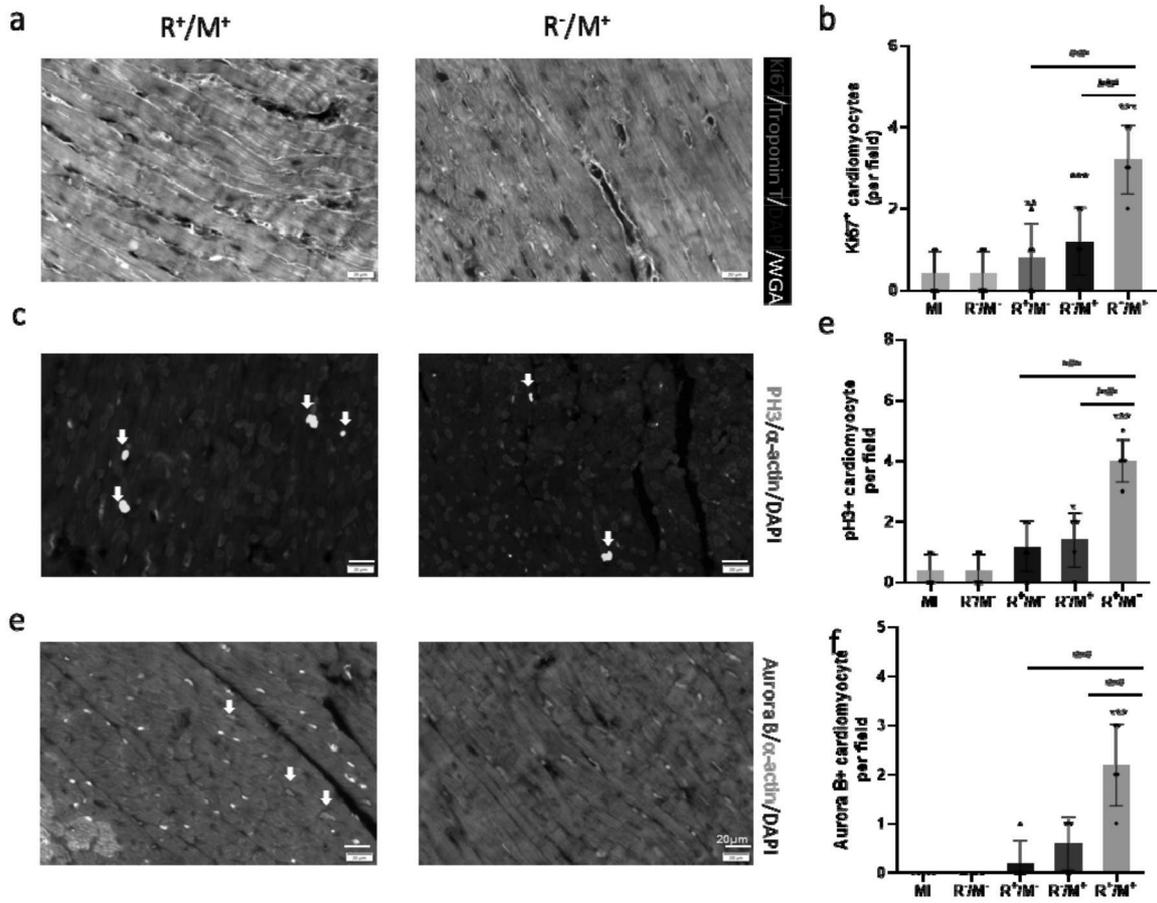


图7