



(45) 授权公告日 2021.06.11

权利要求书1页 说明书12页 附图8页

Figure 1 illustrates the synthesis of the polymeric hydrogel. The process begins with the synthesis of MPEG-g-HA, which involves the reaction of a poly(2-hydroxyethyl methacrylate) (PMMA) chain with methacryloyl chloride (CH<sub>2</sub>=CHCOCl) in the presence of triethylamine (N(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) in water at room temperature for 3 days. This results in the formation of MPEG-g-HA, where the PMMA backbone is grafted with methacrylate groups. Subsequently, the MPEG-g-HA is reacted with different crosslinkers in water at room temperature for 24 hours to form various hydrogels: 1) MPEG-g-HA/α-CD-PPRX hydrogel, formed by reacting with α-CD; 2) MPEG-g-HA/α-CD/SIM-PPRX hydrogel, formed by reacting with α-CD-SIM; and 3) MPEG-g-HA/α-CD/HP-β-CD-IC-SIM-PPRX hydrogel, formed by reacting with α-CD-aq-HP-β-CD-IC-SIM. The hydrogels are depicted as cylindrical networks of crosslinked polymer chains.

1. 一种水凝胶组合物, 包含由具有聚轮烷或准聚轮烷结构的超分子构成的水凝胶和布置在所述水凝胶内的骨形成促进药物, 其特征在于,

所述具有聚轮烷或准聚轮烷结构的超分子由线性高分子以支链形态结合到作为主链的生物相容性高分子上而得的接枝共聚物及被镶套到所述接枝共聚物的线性高分子上的多个环形分子构成,

所述生物相容性高分子具有羧基, 并且

所述骨形成促进药物以被包含到用作主体分子的环形分子中的包含物的形态被配置在水凝胶内。

2. 根据权利要求1所述的水凝胶组合物, 其特征在于,

所述生物相容性高分子选自透明质酸、透明质酸盐或其混合物。

3. 根据权利要求2所述的水凝胶组合物, 其特征在于,

所述透明质酸或所述透明质酸盐的重均分子量 (Mw) 选自50000至1000000的范围内。

4. 根据权利要求1所述的水凝胶组合物, 其特征在于,

所述线性高分子在一末端具有非反应性基团并且另一末端具有反应性基团, 所述反应性基团能够通过与所述生物相容性高分子的羧基反应而形成酯键或酰胺键。

5. 根据权利要求4所述的水凝胶组合物, 其特征在于,

所述线性高分子为在一末端导入有烷基并在另一末端导入有氨基的改性聚亚烷基二醇。

6. 根据权利要求1所述的水凝胶组合物, 其特征在于,

所述环形分子为环糊精或环糊精衍生物。

7. 根据权利要求1所述的水凝胶组合物, 其特征在于,

所述骨形成促进药物为选自由阿仑膦酸盐、利塞膦酸盐、唑来膦酸盐、依替膦酸盐、氯屈膦酸盐、替鲁膦酸盐、帕米膦酸盐、奥帕膦酸盐、伊班膦酸盐、氟伐他汀、洛伐他汀、匹伐他汀、普伐他汀、瑞舒伐他汀、辛伐他汀、前列腺素E<sub>2</sub>、新巴罗门汀、焦磷酸盐、亚甲基二膦酸盐、羟亚甲基二膦酸盐及氧化固醇组成的组中的一者以上。

8. 根据权利要求7所述的水凝胶组合物, 其特征在于,

用作所述主体分子的环形分子为环糊精或环糊精衍生物。

9. 根据权利要求8所述的水凝胶组合物, 其特征在于,

用作所述主体分子的环形分子由选自2,6-二甲基-β-环糊精、2-羟乙基-β-环糊精、2-羟丙基-β-环糊精、2-羟乙基-γ-环糊精、2-羟丙基-γ-环糊精、(2-羧甲氧基)丙基-β-环糊精和磺丁基醚-7-β-环糊精中的一者以上构成。

10. 一种用于骨组织再生的支架, 包含根据权利要求1至9中的任一项所述的水凝胶组合物。

## 基于超分子的水凝胶组合物及其用途

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种基于超分子的水凝胶组合物等,更详细而言,涉及一种具有在聚轮烷(polyrotaxane)或准聚轮烷(Pseudopolyrotaxane,PPRX)结构的超分子水凝胶内包含骨形成促进化合物的形态的组合物及其骨组织再生用途。

### 背景技术

[0002] 因骨疾病及骨折导致的骨丢失为在矫形外科、神经外科、整形外科或牙科中常见的诊断。可利用药物或物理治疗等的传统方法来诱导骨再生,在广范围的骨丢失的情况下,可通过手术来去除该骨。与其他可采取的方法相比,自体移植(Autografting)为治疗骨丢失的理想方法。但是,手术治疗方法由于对患者的组织带来损伤而存在若干限制。此外,作为其他两种类型的移植法的同种移植(allografting)和异种移植(xenografting)由于具有免疫排斥反应和传播病原菌的危险而在临床应用方面存在局限性。近年来,组织工程学成为能够克服这种问题的理想方法。

[0003] 在组织工程学用途的支架(Scaffold)中,水凝胶(hydrogel)具有能够赋予柔软性、强度及最佳水分含量的三维网络。根据有关报道的研究结果,水凝胶尤其均含有骨再生生长因子及药物,因此水凝胶作为骨组织工程学用途的支架特别重要。根据是否交联结合,水凝胶可以被分类为物理物质或化学物质。化学水凝胶通过添加交联结合剂而形成。化学水凝胶因存在未反应物质而诱发细胞毒性。相反,由于物理水凝胶通过改变静电相互作用或如pH及温度等的物理特性而形成,或者物理水凝胶被形成为包合物(inclusion complexes)形态,因此物理水凝胶不具有细胞毒性。

[0004] 准聚轮烷(Pseudopolyrotaxane,PPRX)或聚轮烷(polyrotaxane,PRX)为物理水凝胶,并且由主体(host)分子与客体(guest)分子之间的包合物形态构成。在包合物中,如相当于客体的聚乙二醇(polyethylene glycol,PEG)及聚丙二醇(polypropylene glycol,PPG)等的高分子贯穿以嵌入相当于主体的 $\alpha$ -环糊精、 $\beta$ -环糊精及 $\gamma$ -环糊精[T.Higashi, F.Hirayama, S.Misumi, H.Arima, 和 K.Uekama, Design and evaluation of polypseudorotaxanes of pegylated insulin with cyclodextrins as sustained release system(具有环糊精的聚乙二醇胰岛素的聚准轮烷作为持续释放系统的设计与评估).Biomaterials(生物材料)29,3866(2008).;A.Harada和M.Kamachi,Complex formation between poly(ethylene glycol)and $\alpha$ -cyclodextrin(聚乙二醇与 $\alpha$ -环糊精之间的络合物形成).Macromolecules(大分子)23,2821(1990).;A.Harada, J.Li和M.Kamachi,The molecular necklace:a rotaxane containing many threaded $\alpha$ -cyclodextrins(分子项链:含多个被贯穿的 $\alpha$ -环糊精的轮烷).Nature(自然)356,325(1992).]。由于水凝胶具有独特的结构性质,因此一直以来引入水凝胶,以不仅作为体外(in vitro)组织工程学用途的支架来导入,而且还作为用于传递药物/遗传物质的载体。但是,将水凝胶应用到活体的示例非常少见。

[0005] 如果查看将由具有准聚轮烷或聚轮烷结构的超分子构成的水凝胶用作组织再生

用途的现有技术,则在韩国授权专利公报第10-0714742号中公开了如下的组织再生用基质:对于在贯穿多个环形分子(例如, $\alpha$ -环糊精)的线性分子(例如,聚乙二醇)的两侧末端通过可水解键而导入有具有体积大的取代基的生物亲和性基团(例如,氨基酸或寡肽等)的聚轮烷而言,包含具有网眼结构的聚轮烷水凝胶,该聚轮烷水凝胶通过交联用线性分子(例如,聚乙二醇双胺)且利用交联结合来交联相邻的一个聚轮烷分子中包含的环形分子而成。此外,在韩国授权专利公报第10-1263639号中公开了牙科用植入材料,其特征在于,包括:植入基座,其能够埋植到人体内;聚轮烷,其被化学结合到所述植入基座的表面,并且包含生物相容性线性高分子、镶套到所述生物相容性线性高分子的环形分子和封端分子,所述封端分子以可水解的方式化学结合到所述生物相容性线性高分子的两侧末端,使得所述环形分子不会脱离所述生物相容性线性高分子;以及生物活性物质,其以可水解的方式化学结合到所述聚轮烷,其中,所述聚轮烷通过人体内的酶来水解。

## 发明内容

### [0006] 技术问题

[0007] 本发明是在这种现有技术背景下提出的,本发明的目的在于提供一种水凝胶组合物及其用途,该水凝胶组合物能够长期持续地释放骨形成促进药物的同时,能够增强新生骨形成。

### [0008] 技术方案

[0009] 本发明人通过使被接枝结合到透明质酸上的甲氧基聚乙二醇的线性链贯穿 $\alpha$ -环糊精而制备了具有准聚轮烷结构的超分子水凝胶,且通过在所述水凝胶内封装辛伐他汀(Simvastatin, SIM)或2-羟丙基- $\beta$ -环糊精与辛伐他汀的包合物(HP- $\beta$ -CD-ic-SIM)而制备了基于超分子的水凝胶组合物。然后,将超分子水凝胶及基于超分子的水凝胶组合物植入到骨缺损部位,通过微型CT分析和组织学分析来评价骨形成活性,并且确认基于超分子的水凝胶组合物能够用作活体内的骨组织工程学支架,由此完成了本发明。

[0010] 为了实现上述目的,本发明的一例提供一种包含由具有聚轮烷或准聚轮烷结构的超分子构成的水凝胶及配置在所述水凝胶内的骨形成促进药物的水凝胶组合物。所述具有聚轮烷或准聚轮烷结构的超分子由线性高分子以支链形态结合到作为主链的生物相容性高分子上而得的接枝共聚物以及被镶套到所述接枝共聚物的线性高分子上的多个环形分子构成,所述生物相容性高分子具有羧基。

### [0011] 有益效果

[0012] 本发明所涉及的基于具有聚轮烷或准聚轮烷结构的超分子的水凝胶组合物能够通过改善被封装到水凝胶内的骨形成促进化合物的水溶解度而长期持续地释放骨形成促进化合物。特别是,在骨形成促进化合物以包合物的形态被封装到水凝胶内而得的水凝胶组合物中,快速释放骨形成促进化合物并增强新生骨形成。因此,本发明所涉及的基于超分子的水凝胶组合物可以作为用于骨组织再生的生物亲和性支架来使用。

## 附图说明

[0013] 图1示意性地表示MPEG-g-HA/ $\alpha$ -CD准聚轮烷、MPEG-g-HA/ $\alpha$ -CD/SIM准聚轮烷及MPEG-g-HA/ $\alpha$ -CD/HP- $\beta$ -CD-ic-SIM准聚轮烷的制备过程。

[0014] 图2表示作为两种类型的水凝胶的MPEG-g-HA/ $\alpha$ -CD/SIM PPRX和MPEG-g-HA/ $\alpha$ -CD/HP- $\beta$ -CD-ic-SIM PPRX释放辛伐他汀的动力学。

[0015] 图3是将三种类型的PPRX水凝胶移植到实验动物并在四周后作出评价的四种样品各自的代表性CT图像。

[0016] 图4是将三种类型的PPRX水凝胶植入到实验动物并在四周后作出评价的四种样品的骨体积(Bone volume, BV), 图5表示骨表面积(bone surface, BS), 图6表示骨小梁数目(trabecular number, Tb.N), 图7表示骨小梁厚度(trabecular thickness, Tb.Th), 图8表示骨小梁间隔(trabecular separation, Tb.Sp)。

[0017] 图9表示在植入水凝胶样品四周之后利用苏木素-伊红(Haematoxylin and eosin, H&E)进行染色的头盖骨缺损部位的照片, 图10表示利用戈尔德三色(Goldner's trichrome)进行染色的头盖骨缺损部位的图像。

### 具体实施方式

[0018] 作为本发明中使用的术语的准聚轮烷是指具有在线性高分子链上以串形态镶套有多个环形分子的结构化合物, 聚轮烷是指具有在准聚轮烷的两侧末端以环形分子不会脱离的方式导入有体积大的封端基团的结构化合物。所述线性高分子可选自由聚乙二醇、聚异戊二烯、聚异丁烯、聚丁二烯、聚丙二醇、聚四氢呋喃、聚二甲基硅氧烷、聚乙二醇与聚丙二醇的共聚物、聚甲基乙烯基醚、聚乙烯及聚丙烯组成的组, 但并不一定限定于此。此外, 所述环形分子可选自由 $\alpha$ -环糊精、 $\beta$ -环糊精及 $\gamma$ -环糊精组成的组, 但并不一定限定于此。此外, 所述封端基团可选自由二硝基苯基类、环糊精类、金刚烷基类、三苯甲基类、荧光素类、茈类、取代苯类、可取代的多核芳香族类及类固醇类组成的组, 但并不一定限定于此。作为所述封端基团的具体例, 具有2,4-二硝基苯基、3,5-二硝基苯基、苄氧羰基、9-苄甲氧基羰基、苄酯基、叔丁基羰基或氨基酸叔丁酯基等。

[0019] 作为本发明所使用的术语包合物是指具有客体分子位于主体分子所具有的空洞(cavity)内的形态的复合物。作为形成包合物的代表性的主体分子具有环糊精。

#### [0020] 基于超分子的水凝胶组合物

[0021] 本发明的一方面提供一种基于超分子(Supramolecule)的水凝胶组合物。本发明的一例所涉及的水凝胶组合物包含由具有聚轮烷或准聚轮烷结构的超分子构成的水凝胶及配置在所述水凝胶内的骨形成促进药物。以下, 按主要构成成分对本发明所涉及的水凝胶组合物进行说明。

[0022] (1) 由具有聚轮烷或准聚轮烷结构的超分子构成的水凝胶

[0023] 在本发明的一例所涉及的水凝胶组合物中, 形成水凝胶的具有聚轮烷或准聚轮烷结构的超分子由线性高分子以支链形态结合到作为主链的生物相容性高分子上而得的接枝共聚物和镶套到所述接枝共聚物的线性高分子上的多个环形分子构成。

[0024] 只要所述生物相容性高分子具有能够与线性高分子的末端反应的羧基, 则并不大幅限制所述生物相容性高分子的种类, 例如具有透明质酸(Hyaluronic acid)、聚天冬氨酸[Poly(aspartic acid)]、聚丙烯酸[Poly(acrylic acid)]、聚谷氨酸[Poly(glutamic acid)]、羧甲基纤维素(Carboxymethyl cellulose)、壳聚糖(Chitosan)及其衍生物、乙二醇壳聚糖(Glycol chitosan)等。在本发明中, 当考虑水凝胶生成能力及生物相容性高分子

与线性高分子的结合性、生物相容性等时,生物相容性高分子优选选自透明质酸(hyaluronic acid)、透明质酸盐(hyaluronic acid salt)或它们的混合物。所述透明质酸盐可由选自透明质酸钠、透明质酸钙、透明质酸镁、透明质酸锌、透明质酸钴或透明质酸四丁基铵中的一者以上构成,当考虑水凝胶制备的便利性时,优选透明质酸钠。此外,当考虑透明质酸或透明质酸盐与线性高分子的反应性等时,透明质酸或透明质酸盐的分子量(Mw)优选选自50000至1000000的范围,更优选选自100000至500000的范围。

[0025] 只要所述线性高分子在一末端具有非反应性基团并且在另一末端具有通过与生物相容性高分子的羧基反应而形成酯键或酰胺键的反应性基团,则并不大幅限制所述线性高分子的种类。所述非反应性基团可选自不与生物相容性高分子的羧基反应的-H、烷基、烷氧基、羧基或酯基等,但并不一定限定于此。此外,所述反应性基团可选自-OH及胺基(特别是,氨基)等。在本发明中,当考虑与透明质酸的反应性乃至与环形分子的包含性等时,优选所述线性高分子为在如聚乙二醇、聚丙二醇或聚丁二醇等的聚亚烷基二醇的两侧末端分别导入有非反应性基团和反应性基团的改性聚亚烷基二醇。例如,在改性聚亚烷基二醇的一末端可导入有烷基(例如,碳原子数为1至4的烷基),在改性聚亚烷基二醇的另一末端可导入有氨基。作为本发明中使用的改性聚亚烷基二醇的具体例,具有甲氧基聚乙二醇胺(Methoxy polyethylene glycol amine)、甲氧基聚丙二醇胺(Methoxy polypropylene glycol amine)、甲氧基聚丁二醇胺(Methoxy polybutylene glycol amine)、乙氧基聚乙二醇胺(Ethoxy polyethylene glycol amine)或乙氧基聚丙二醇胺(Ethoxy polypropylene glycol amine)等,当考虑改性聚亚烷基二醇与透明质酸的反应性、生物亲和性乃至与环形分子的包含性等时,优选为甲氧基聚乙二醇胺(Methoxy polyethylene glycol amine)。当考虑甲氧基聚乙二醇胺与透明质酸的反应性乃至与环形分子的包含性等时,优选所述甲氧基聚乙二醇胺(Methoxy polyethylene glycol amine)的重量平均分子量(Mw)选自1000至10000的范围,更优选选自1500至5000的范围。在本发明中,通过甲氧基聚乙二醇胺(Methoxy polyethylene glycol amine)与透明质酸结合而形成接枝共聚物的情况下,优选透明质酸与甲氧基聚乙二醇胺的摩尔比为1:50至1:200,更优选为1:75至1:150,但并不一定限定于此。此外,在本发明中,通过甲氧基聚乙二醇胺(Methoxy polyethylene glycol amine)与透明质酸结合而形成接枝共聚物的情况下,优选透明质酸与甲氧基聚乙二醇胺的重量比为1:0.5至1:2.5,更优选为1:1至1:2。

[0026] 只要镶套到所述接枝共聚物的线性高分子上的多个环形分子具有能够被线性高分子贯穿的规定的空洞,则并不大幅限制多个环形分子的种类,当考虑生物亲和性乃至被包含性时,优选为环糊精。例如,所述环形分子可由选自 $\alpha$ -环糊精( $\alpha$ -cyclodextrin)、 $\beta$ -环糊精或 $\gamma$ -环糊精中的一者以上构成,当考虑被包含性时,优选为 $\alpha$ -环糊精。此外,所述环形分子也可以选自如二甲基环糊精及葡糖基环糊精等的环糊精衍生物。在本发明中,构成接枝共聚物的线性高分子为甲氧基聚乙二醇胺,在镶套到构成接枝共聚物的线性高分子链上的环形分子为 $\alpha$ -环糊精的情况下,优选线性高分子与环形分子的重量比为1:1至1:4,更优选为1:1.5至1:2.5。此外,在本发明中,接枝共聚物为由甲氧基聚乙二醇接枝的透明质酸,在镶套到甲氧基聚乙二醇链中的环形分子为 $\alpha$ -环糊精的情况下,优选接枝共聚物与环形分子的重量比为1:0.5至1:2,更优选为1:0.8至1:1.5。

[0027] (2) 骨形成促进药物

[0028] 在本发明的一例所涉及的水凝胶组合物中,骨形成促进药物被均匀地配置在由具有聚轮烷或准聚轮烷结构的超分子构成的水凝胶内,优选骨形成促进药物通过水凝胶来封装。只要所述骨形成促进药物是作为促进骨形成而公知的低分子量化合物,则并不大幅限制所述骨形成促进药物的种类,优选选自水溶解度低的药物。例如,所述骨形成促进药物可选自双膦酸盐类药物或他汀类药物等,具体而言可以是选自由阿仑膦酸盐(alendronate)、利塞膦酸盐(risedronate)、唑来膦酸盐(zoledronate)、依替膦酸盐(Etidronate)、氯屈膦酸盐(Clodronate)、替鲁膦酸盐(Tiludronate)、帕米膦酸盐(Pamidronate)、奥帕膦酸盐(Olpadronate)、伊班膦酸盐(Ibadronate)、氟伐他汀(Fluvastatin)、洛伐他汀(Lovastatin)、匹伐他汀(pitavastatin)、普伐他汀(pravastatin)、瑞舒伐他汀(rosuvastatin)、辛伐他汀(simvastatin)、前列腺素E2(Prostaglandin E2,PGE2)、新巴罗门汀(shinbarometin)、焦磷酸盐(pyrophosphate)、亚甲基二膦酸盐(medronate)、羟亚甲基二膦酸盐(oxidronate)及氧化固醇(Oxysterol)组成的组中的一者以上。此外,当考虑向水凝胶内的封装容易性乃至新生骨形成活性等时,优选所述骨形成促进药物选自他汀类药物,更优选为辛伐他汀。在本发明的一例所涉及的水凝胶组合物中,优选所述骨形成促进药物在每100g水凝胶中的含量为1~20mg,更优选为2~10mg。

[0029] 此外,在本发明的一例所涉及的水凝胶组合物中,当考虑药物的释放行为时,骨形成促进药物优选以包合物形态被配置在水凝胶内,更优选在维持包合物形态的状态下通过水凝胶来封装骨形成促进药物。例如,所述骨形成促进药物以被包含到用作主体分子的环形分子中的包合物形态被配置在水凝胶内。包含到所述主体分子中的骨形成促进药物可以是选自由阿仑膦酸盐、利塞膦酸盐、唑来膦酸盐、依替膦酸盐、氯屈膦酸盐、替鲁膦酸盐、帕米膦酸盐、奥帕膦酸盐、伊班膦酸盐、氟伐他汀、洛伐他汀、匹伐他汀、普伐他汀、瑞舒伐他汀、辛伐他汀、前列腺素E2、新巴罗门汀、焦磷酸盐、亚甲基二膦酸盐、羟亚甲基二膦酸盐及氧化固醇组成的组中的一者以上,但并不一定限定于此。在本发明中,用作所述主体分子的环形分子可选自环糊精或环糊精衍生物等,从提高配置在水凝胶内的骨形成促进药物的水溶解度并维持长期持续的骨形成促进药物的释放特性的同时使释放速度加速化的观点来看,优选用作所述主体分子的环形分子为环糊精衍生物。用作所述主体分子的环糊精衍生物可由选自2,6-二甲基- $\beta$ -环糊精、2-羟乙基- $\beta$ -环糊精、2-羟丙基- $\beta$ -环糊精、2-羟乙基- $\gamma$ -环糊精、2-羟丙基- $\gamma$ -环糊精、(2-羧甲氧基)丙基- $\beta$ -环糊精和磺丁基醚-7- $\beta$ -环糊精中的一者以上构成,优选为2-羟丙基- $\beta$ -环糊精。在本发明中,骨形成促进药物为辛伐他汀,在包含辛伐他汀的主体分子为2-羟丙基- $\beta$ -环糊精的情况下,骨形成促进药物与主体分子的混合重量比为1:1至1:5,更优选为1:2至1:4。

[0030] 在本发明的优选的一例所涉及的水凝胶组合物的情况下,所述生物相容性高分子选自透明质酸、透明质酸盐或它们的混合物,所述线性高分子为在一末端导入有烷基并在另一末端导入有氨基的改性聚亚烷基二醇,所述环形分子选自 $\alpha$ -环糊精、 $\beta$ -环糊精或 $\gamma$ -环糊精,所述骨形成促进药物选自氟伐他汀、洛伐他汀、匹伐他汀、普伐他汀、瑞舒伐他汀或辛伐他汀。此外,在本发明的优选的一例所涉及的水凝胶组合物中,骨形成促进药物以被包含到用作主体分子的环形分子中的包合物形态而通过水凝胶来封装。此时,优选用作主体分子的环形分子选自2,6-二甲基- $\beta$ -环糊精、2-羟乙基- $\beta$ -环糊精、2-羟丙基- $\beta$ -环糊精、2-羟乙基- $\gamma$ -环糊精、2-羟丙基- $\gamma$ -环糊精、(2-羧甲氧基)丙基- $\beta$ -环糊精或磺丁基醚-7- $\beta$ -环

糊精。

[0031] 基于超分子的水凝胶组合物的制备方法

[0032] 本发明的一方面提供一种基于超分子的水凝胶组合物的制备方法。本发明的一例所涉及的基于超分子的水凝胶组合物的制备方法包括以下步骤：在线性高分子以支链形态结合到作为主链的生物相容性高分子上而得的接枝共聚物的水溶液内添加环形分子及骨形成促进药物溶液并使之反应。此外，本发明的另一例所涉及的基于超分子的水凝胶组合物的制备方法包括以下步骤：在线性高分子以支链形态结合到作为主链的生物相容性高分子上而得的接枝共聚物的水溶液内添加环形分子及包合物溶液并使之反应，其中，所述包合物溶液为骨形成促进药物被包合到主体分子中而形成的。本发明所涉及的基于超分子的水凝胶组合物的制备方法可进一步包括以下步骤：通过冻结干燥反应产物而形成水凝胶组合物。在本发明所涉及的基于超分子的水凝胶组合物的制备方法中，通过使环形分子镶套到构成接枝共聚物的线性分子上而形成由具有准聚轮烷结构的超分子构成的水凝胶，同时骨形成促进药物或含有骨形成促进药物的包合物被封装到水凝胶内。另外，本发明所涉及的基于超分子的水凝胶组合物的制备方法可进一步包括以下步骤：通过在冻结干燥反应产物之前，向具有准聚轮烷结构的超分子的两末端导入封端基团，从而将由具有准聚轮烷结构的超分子构成的水凝胶转化为由具有聚轮烷结构的超分子构成的水凝胶。

[0033] 在本发明所涉及的基于超分子的水凝胶组合物的制备方法中，构成接枝共聚物的生物相容性高分子、线性高分子、镶套到线性高分子上的环形分子、配置在水凝胶内的骨形成促进药物、以及用于包合骨形成促进药物的主体分子的种类和使用量与在基于超分子的水凝胶组合物中叙述的内容相同，因此省略具体说明。

[0034] 在本发明所涉及的基于超分子的水凝胶组合物的制备方法中使用的、线性高分子以支链形态结合到作为主链的生物相容性高分子上而得的接枝共聚物可通过由以下步骤构成的方法来制备：(a) 通过在具有羧基的生物相容性高分子及羧基激活剂的混合水溶液中添加线性高分子并使之反应，从而在生物相容性高分子的羧基与存在于线性高分子的末端的氨基之间形成酰胺键；以及 (b) 通过渗析反应产物而去除杂质并进行冻结干燥。所述羧基激活剂为含有1,3,5-三嗪 (1,3,5-triazine) 环的化合物，发挥将存在于如透明质酸那样的生物相容性高分子中的羧基转化为作为反应性中间体的酯基的作用。作为这种羧基激活剂的种类，具有三聚氰氯 (Cyanuric chloride)、2-氯-4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪 (2-chloro-4,6-dimethoxy-1,3,5-triazine)、2-氯-4,6-二苯基-1,3,5-三嗪 (2-chloro-4,6-diphenyl-1,3,5-triazine)、2-氯-4-甲氧基-6-苯基-1,3,5-三嗪 (2-chloro-4-methoxy-6-phenyl-1,3,5-triazine)、2-氯-4-苯基-6-甲氧基-1,3,5-三嗪 (2-chloro-4-phenyl-6-methoxy-1,3,5-triazine) 或4-(4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪-2-基)-4-甲基吗啡啉盐酸盐 [4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloride, DMT-MM] 等，当考虑羧基激活水平时，优选4-(4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪-2-基)-4-甲基吗啡啉盐酸盐。

[0035] 此外，由于骨形成促进药物的水溶解性较低，因此优选通过使骨形成促进药物溶解于碳原子数为1至4的低级醇而制备本发明的一例所涉及的基于超分子的水凝胶组合物的制备方法中使用的骨形成促进药物溶液。

[0036] 此外，通过将骨形成促进药物溶液添加并混合到主体分子水溶液中，而制备本发

明的另一例所涉及的基于超分子的水凝胶组合物的制备方法中使用的包合物溶液。此时，由于骨形成促进药物的水溶解性较低，因此优选通过使促进骨形成药物溶解于碳原子数为1至4的低级醇，而制备骨形成促进药物溶液。

#### [0037] 用于骨组织再生的支架

[0038] 本发明的一方面提供一种用于骨组织再生的支架，在如颅骨缺损等那样产生骨损伤乃至骨丢失时，该支架被植入到骨缺损部位而支撑骨缺损部位，并且从骨缺损部位周围的自我组织中诱导自我骨再生。本发明的一例所涉及的用于骨组织再生的支架可包含前述的基于超分子的水凝胶组合物，或者可由基于超分子的水凝胶组合物构成。特别是，在本发明的一例所涉及的基于超分子的水凝胶组合物中，骨形成促进药物以被包含到用作主体分子的环形分子中的包合物形态由水凝胶封装，骨形成促进药物的水溶解度增加并提高释放特性，由此提高用于骨组织再生的支架的新生骨形成活性。

[0039] 下面，通过实施例对本发明进行更具体说明。但是，下述实施例只是用于更清楚地举例说明本发明的技术特征，并不限定本发明的保护范围。

#### [0040] 1. 实验材料

[0041] 分别从Lifecore Biomedical, LLC公司(查斯卡, 明尼苏达州, 美国)和Creative PEGWorks公司(北卡罗来纳州, 美国)购买透明质酸(Hyaluronic acid, HA; Mw: 100~150kDa)和甲氧基聚乙二醇胺(Methoxy polyethylene glycol amine, MPEG-amine; Mw: 2000)。从Sigma-Aldrich公司(密苏里州, 美国)购买 $\alpha$ -环糊精( $\alpha$ -cyclodextrin,  $\alpha$ -CD)、2-羟丙基- $\beta$ -环糊精(2-Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin, HP- $\beta$ -CD)及辛伐他汀(Simvastatin, SIM)。由Wako Pure Chemical Industries公司(大阪, 日本)供应4-(4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪-2-基)-4-甲基吗啡啉盐酸盐[4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloride, DMT-MM]。在动物实验中使用Ketalar<sup>TM</sup>和Lidocaine<sup>TM</sup>(Yuhan公司, 首尔, 韩国)、Rompun<sup>TM</sup>(Bayer Korea公司, 首尔, 韩国)、Betadine<sup>®</sup>(Purdue Pharma L.P. 公司, 加利福尼亚, 美国)以及Ethicon Vicryl<sup>®</sup>和Ethicon Ethilon<sup>®</sup>(Johnson&Johnson Services公司, 新泽西州, 美国)。以在没有进一步纯化的情况下受到供应的状态使用所有化学物质。

#### [0042] 2. 制备MPEG-g-HA/ $\alpha$ -CD准聚轮烷、MPEG-g-HA/ $\alpha$ -CD/SIM准聚轮烷及MPEG-g-HA/ $\alpha$ -CD/HP- $\beta$ -CD-ic-SIM准聚轮烷

[0043] 图1示意性地表示MPEG-g-HA/ $\alpha$ -CD准聚轮烷、MPEG-g-HA/ $\alpha$ -CD/SIM准聚轮烷及MPEG-g-HA/ $\alpha$ -CD/HP- $\beta$ -CD-ic-SIM准聚轮烷的制备过程。

[0044] 在使透明质酸(HA) 6.7 $\mu$ mol (1.0g) 和DMT-MM 0.7mmol (0.2g) 溶解于蒸馏水300 mL的溶液中，添加甲氧基聚乙二醇胺(Methoxy polyethylene glycol amine, MPEG-amine) 0.7mmol (1.4g)，并且在常温下使混合物反应三天。上述反应为存在于甲氧基聚乙二醇胺的一末端的胺基与透明质酸的羧基之间的缩合反应，通过该缩合反应形成酰胺键(amide bond)。利用渗析管(MWCO: 2000)对反应产物进行渗析三天来去除DMT-MM。通过在-90℃下对纯化后的反应产物进行冻结干燥7天，而获取具有甲氧基聚乙二醇经酰胺键被接枝到透明质酸上的形态的改性透明质酸(MPEG-g-HA)。

[0045] 为了制备第一种准聚轮烷，通过使所述透明质酸衍生物(MPEG-g-HA) 100mg溶解于

蒸馏水20ml而制备MPEG-g-HA水溶液。然后,在MPEG-g-HA水溶液中添加 $\alpha$ -环糊精0.1mmol (0.1g)之后,在常温下搅拌1天,从而生成具有 $\alpha$ -环糊精的开口部被镶套到MPEG-g-HA的MPEG线性链上的形态的MPEG-g-HA/ $\alpha$ -CD PPRX水凝胶。然后,在-90℃下冻结干燥反应产物7天之后,直至使用前为止在-20℃下冷冻保存。

[0046] 为了制备第二种准聚轮烷,通过使所述透明质酸衍生物(MPEG-g-HA) 100mg溶解于蒸馏水20ml而制备MPEG-g-HA水溶液。此外,通过使辛伐他汀0.02mmol (10mg) 溶解于乙醇10ml而制备辛伐他汀溶液。然后,在MPEG-g-HA水溶液中添加 $\alpha$ -环糊精0.1mmol (0.1g) 和辛伐他汀溶液,并且在常温下搅拌1天,而生成由具有 $\alpha$ -环糊精的开口部被镶套到MPEG-g-HA的MPEG线性链上的形态的MPEG-g-HA/ $\alpha$ -CD PPRX水凝胶及被封装到所述水凝胶内的辛伐他汀构成的MPEG-g-HA/ $\alpha$ -CD/SIM PPRX水凝胶。然后,在-90℃下冻结干燥反应产物7天之后,直至使用前为止在-20℃下冷冻保存。

[0047] 为了制备第三种准聚轮烷,通过使所述透明质酸衍生物(MPEG-g-HA) 100mg溶解于蒸馏水20ml而制备MPEG-g-HA水溶液。此外,在使辛伐他汀0.02mmol (10mg) 溶解于乙醇10ml而制备辛伐他汀溶液之后,通过将辛伐他汀溶液缓慢地滴加并混合到2-羟丙基- $\beta$ -环糊精水溶液(通过在蒸馏水10ml中溶解HP- $\beta$ -CD 28mg而制备),而制备2-羟丙基- $\beta$ -环糊精与辛伐他汀的包合物(HP- $\beta$ -CD-ic-SIM)溶液。然后,在MPEG-g-HA水溶液中添加 $\alpha$ -环糊精0.1mmol (0.1g) 和HP- $\beta$ -CD-ic-SIM溶液,并且在常温下搅拌1天,从而生成由具有 $\alpha$ -环糊精的开口部被镶套到MPEG-g-HA的MPEG线性链上的形态的MPEG-g-HA/ $\alpha$ -CD PPRX水凝胶及被封装到所述水凝胶内的HP- $\beta$ -CD-ic-SIM构成的MPEG-g-HA/ $\alpha$ -CD/HP- $\beta$ -CD-ic-SIM PPRX水凝胶。然后,在-90℃下冻结干燥反应产物7天之后,直至使用前为止在-20℃下冷冻保存。

[0048] 在制备所述第二种准聚轮烷及第三种准聚轮烷的过程中,在使 $\alpha$ -环糊精的开口部镶套到透明质酸衍生物(MPEG-g-HA)的MPEG线性链上而形成MPEG-g-HA/ $\alpha$ -CD PPRX水凝胶的期间,辛伐他汀或2-羟丙基- $\beta$ -环糊精与辛伐他汀的包合物(HP- $\beta$ -CD-ic-SIM)被封装到MPEG-g-HA/ $\alpha$ -CD PPRX水凝胶内。

[0049] 2. 辛伐他汀的体外释放动力学

[0050] 利用由渗析膜(MWC0:20kDa)和锥形瓶(conical vial)构成的变型扩散装置来研究辛伐他汀的体外释放动力学。

[0051] 将作为两种类型的水凝胶的MPEG-g-HA/ $\alpha$ -CD/SIM PPRX和MPEG-g-HA/ $\alpha$ -CD/HP- $\beta$ -CD-ic-SIM PPRX 100mg分别加入到各个渗析膜中,并封锁渗析膜的入口。然后,将渗析膜放置于37℃的磷酸缓冲溶液(PBS, pH 7.4, 50ml)中,并且以预先设定的时间间隔提取PBS 5ml,附加与提取出的PBS相同体积的新介质。利用紫外可见光(Ultraviolet-Visible, UV-Vis)分光光度计(Spectrophotometer)在235nm的波长下测量提取出的PBS的吸光度。

[0052] 图2表示作为两种类型的水凝胶的MPEG-g-HA/ $\alpha$ -CD/SIM PPRX和MPEG-g-HA/ $\alpha$ -CD/HP- $\beta$ -CD-ic-SIM PPRX释放辛伐他汀的动力学。如图2所示,与MPEG-g-HA/ $\alpha$ -CD/SIM PPRX相比,在MPEG-g-HA/ $\alpha$ -CD/HP- $\beta$ -CD-ic-SIM PPRX中更迅速地释放辛伐他汀。在1天以内从作为两种类型的准聚轮烷水凝胶的MPEG-g-HA/ $\alpha$ -CD/SIM PPRX和MPEG-g-HA/ $\alpha$ -CD/HP- $\beta$ -CD-ic-SIM PPRX释放出的辛伐他汀的初期爆释(initial burst)分别为53.7%及40.5%。从两种类型的水凝胶中释放辛伐他汀持续28天,从MPEG-g-HA/ $\alpha$ -CD/SIM PPRX和MPEG-g-HA/ $\alpha$ -CD/HP- $\beta$ -CD-ic-SIM PPRX释放出的辛伐他汀的累积量分别为9.05mg和9.33mg。

### [0053] 3.体内 (in vivo) 动物实验

#### [0054] (1) 准聚轮烷水凝胶的移植

[0055] 体内动物实验得到位于江东的庆熙大学医院的实验动物管理和使用委员会 (IACUC) (Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) of the KyungHee University Hospital at Gangdong (no.KHNMC AP 2014-004)) 的批准。通过对16只白鼠 ( $\sim 30\text{g}$ ,  $n=4$ , 韩国) 肌肉注射由91%的盐酸氯胺酮 (ketamine hydrochloride) (Ketalar<sup>TM</sup>) 和9%的甲苯噻嗪 (xylazine) (Rumpun<sup>TM</sup>) 构成的溶液而使之麻醉。在利用聚维酮碘 (betadine) 消毒手术部位之后, 将2%的利多卡因 (lidocaine) 溶液作为局部麻醉剂来应用。然后, 为了进行微型CT (Micro-CT) 和组织学评价 (Histological evaluation), 将MPEG-g-HA/ $\alpha$ -CD PPRX、MPEG-g-HA/ $\alpha$ -CD/SIM PPRX及MPEG-g-HA/ $\alpha$ -CD/HP- $\beta$ -CD-ic-SIM PPRX植入到颅骨缺损部位。利用再吸收性爱惜康薇乔缝线 (Ethicon Vicryl) 缝合骨膜, 并且利用爱惜康爱惜良 (Ethicon Ethilon) 缝合皮肤。在移植四周以后, 使白鼠牺牲。

#### [0056] (2) 微型CT分析

[0057] 在使白鼠牺牲之后, 将颅骨缺损部位固定到10% (v/v) 的中性缓冲福尔马林 (neutral buffered formalin) 溶液中。通过回收后的样品的微型CT (Micro-CT; SkyScan 1173, SKYSCAN, Kartuizersweg 3B 2550 Kontich, 比利时) 分析, 来检查骨体积、骨表面积、骨小梁数目、骨小梁厚度及骨小梁间隔。利用Skyscan<sup>TM</sup>CT分析软件 (Skyscan<sup>TM</sup>CT-analyser software) 来分析扫描材料。

[0058] 图3是将三种类型的PPRX水凝胶移植到实验动物并在四周后评价的四种样本各自的代表性CT图像。如图3所示, 通过将MPEG-g-HA/ $\alpha$ -CD PPRX水凝胶注入到颅骨缺损部位而增强骨形成活性度。这种结果表示MPEG-g-HA/ $\alpha$ -CD PPRX水凝胶自身对新生骨形成发挥重要的作用。而被封装到水凝胶内的辛伐他汀则示出为增强骨形成活性度。特别是, 辛伐他汀的经改善的水溶解度对骨形成活性度的增强带来强烈的影响。图4表示将三种类型的PPRX水凝胶植入到实验动物并在四周后评价的四种样品的骨体积 (Bone volume, BV), 图5表示骨表面积, 图6表示骨小梁数目, 图7表示骨小梁厚度, 图8表示骨小梁间隔。在图4至图8中, “PPRX I”是指MPEG-g-HA/ $\alpha$ -CD PPRX, “PPRX II”是指MPEG-g-HA/ $\alpha$ -CD/SIM PPRX, “PPRX III”是指MPEG-g-HA/ $\alpha$ -CD/HP- $\beta$ -CD-ic-SIM PPRX。如图4至图8所示, MPEG-g-HA/ $\alpha$ -CD/HP- $\beta$ -CD-ic-SIM PPRX具有比MPEG-g-HA/ $\alpha$ -CD/SIM PPRX大1.17倍的骨体积及比MPEG-g-HA/ $\alpha$ -CD/SIM PPRX大1.02倍的骨表面积。尤其, 在包含辛伐他汀的水凝胶中大幅提高骨小梁数目及骨小梁厚度。另外, 包含辛伐他汀的水凝胶呈现更小的骨小梁间隔。

#### [0059] (3) 苏木素-伊红 (H&E) 染色及戈尔德三色染色

[0060] 在使鼠牺牲之后, 将颅骨缺损部位固定到10% (v/v) 的中性缓冲福尔马林溶液中。在4℃下将组织固定一晚上之后, 使之悬浮于磷酸缓冲溶液 (PBS)。将钙化的样品包埋到石蜡内, 并且根据标准协议利用苏木素-伊红 (H&E) 溶液及戈尔德三色溶液对40 $\mu\text{m}$ 厚度的组织切片进行染色。利用荧光显微镜 (fluorescence microscopy; AX70, TR-62A02, 奥林巴斯, 东京, 日本) 来进行染色后的组织切片的可视化。

[0061] 图9是在植入水凝胶样品四周之后利用苏木素-伊红染色的颅骨缺损部位的图像, 图10是利用戈尔德三色染色的颅骨缺损部位的图像。在利用H&E染色的所有样品中观察到作为与骨形成及骨吸收相关联的三种类型细胞的成骨细胞 (osteoblasts, Ob)、骨细胞

(osteocytes, Oc) 及破骨细胞 (osteoclasts, Ocl)。呈圆形的骨单位 (osteons) 和骨细胞位于骨陷窝 (lacunae), 并且被成骨细胞 (osteoblast) 包围。特别是, 当植入 MPEG-g-HA/ $\alpha$ -CD/HP- $\beta$ -CD-ic-SIM PPRX 时, 新生骨 (red color (红色)) 生长从两侧边缘位置向内侧最活跃地进展, 该进展通过戈尔德三色染色来确认。与未植入 PPRX 的对照组部位相比, 在四周之后, 在植入三种类型的 PPRX 的缺损部位中明显填充有细胞和骨单位。在填充有 MPEG-g-HA/ $\alpha$ -CD/HP- $\beta$ -CD-ic-SIM PPRX 的多个区域的颅骨缺损部位中增加了骨形成活性度。

#### [0062] 4. 讨论 (Discussion)

[0063] 作为 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A (3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A, HMG-CoA) 还原酶 (reductase) 的抑制剂的辛伐他汀属于为了降低胆固醇数值而使用的他汀类 (statin) 药物。此外, 已知辛伐他汀通过增加重组人骨形成蛋白 2 (recombinant human bone morphogenetic protein-2, rhBMP-2) 而促进成骨细胞的分化并在体外 (in vitro) 及体内 (in vivo) 上促进新生骨形成 [G. Mundy, R. Garrett, S. Harris, J. Chan, D. Chen, G. Rossini, B. Boyce, M. Zhao 和 G. Gutierrez, Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins (他汀类药物在体外和啮齿动物中对骨形成的刺激). Science (科学) 286, 1946 (1999)]。

[0064] 但是, 由于辛伐他汀的低水溶解度而生物利用率较低。为了改善脂溶性药物的水溶解度及生物利用率, 脂溶性药物被封装到高分子水凝胶、固体分散体、微乳液、超临界流体、环糊精包合物、树枝状分子复合物 (dendrimer complexes)、微粒子或纳米粒子的内侧 [M. S. Bae, D. H. Yang, J. B. Lee, D. N. Heo, Y. D. Kwon, I. C. Youn, K. Choi, J. H. Hong, G. T. Kim, Y. S. Choi, E. H. Hwang 和 I. K. Kwon, Photo-cured hyaluronic acid-based hydrogels containing simvastatin as a bone tissue regeneration scaffold (含有辛伐他汀的经光固化的透明质酸类水凝胶作为骨组织再生支架). Biomaterials (生物材料) 32, 8161 (2011) ]。

[0065] 本发明人设计了用于改善辛伐他汀的水溶解度的双重系统 (dual system)。所述双重系统由辛伐他汀与 2-羟丙基- $\beta$ -环糊精之间的包合物 (HP- $\beta$ -CD-ic-SIM) 及被封装到 MPEG-g-HA/ $\alpha$ -CD/SIM PPRX 水凝胶 [T. Nakama, T. Ooya 和 N. Yui, Temperature- and pH-controlled hydrogelation of poly(ethylene glycol)-grafted hyaluronic acid by inclusion complexation with  $\alpha$ -cyclodextrin (借助与  $\alpha$ -环糊精的包合作用来对经聚乙二醇接枝的透明质酸进行的温度和 pH 受控的水凝胶化). Polymer J (聚合物杂志). 36, 338 (2004) ] 内的 HP- $\beta$ -CD-ic-SIM 构成。在评价新生骨形成时, 由于准聚轮烷在不饱和水溶液内解离, 因此无法执行体外实验。因此, 利用颅骨缺损模型兔来执行体内 (in vivo) 动物实验, 并且将 MPEG-g-HA/ $\alpha$ -CD/HP- $\beta$ -CD-ic-SIM PPRX 的新生骨形成提高效果与 MPEG-g-HA/ $\alpha$ -CD PPRX 及 MPEG-g-HA/ $\alpha$ -CD/SIM PPRX 的效果进行了比较。

[0066] 已知辛伐他汀能够被填充到 2-羟丙基- $\beta$ -环糊精的内部空间而增加水溶解度这一事实 [S. W. Jun, M. S. Kim, J. S. Kim, H. J. Park, S. Lee, J. S. Woo 和 S. J. Hwang, Preparation and characterization of simvastatin/hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex using supercritical antisolvent (SAS) process (利用超临界抗溶剂过程来执行的辛伐他汀/羟丙基- $\beta$ -环糊精包合物的制备和鉴定). Eur. J. Pharm (欧洲药理学杂志). 66, 413 (2007) ]。此外, 如果以被甲氧基聚乙二醇胺链贯穿的形态镶套  $\alpha$ -环糊精, 则形成

准聚轮烷。

[0067] MPEG-g-HA/ $\alpha$ -CD/HP- $\beta$ -CD-ic-SIM PPRX释放辛伐他汀的动力学呈现与MPEG-g-HA/ $\alpha$ -CD/SIM PPRX的结果不同的结果。与SIM相比,从水凝胶中更快地释放HP- $\beta$ -CD-ic-SIM,这是因为在形成包合物之后提高了水溶解度。从MPEG-g-HA/ $\alpha$ -CD/HP- $\beta$ -CD-ic-SIM PPRX快速释放HP- $\beta$ -CD-ic-SIM会增加rhBMP-2的表达,最终会诱发新生骨形成的增强(参照图2及图3)。相反,为了从MPEG-g-HA/ $\alpha$ -CD/SIM PPRX释放SIM,需要解离MPEG-g-HA/ $\alpha$ -CD/SIM PPRX,如果PPRX水凝胶维持其结构,则阻碍SIM的释放。

[0068] 微型CT是为了进行三维骨小梁(Trabecular Bone)结构分析及非破坏性评价而能够使用的逐渐崛起的技术[I.Kallai, O.Mizrahi, W.Tawackoli, Z.Gazit, G.Pelled和D.Gazit, Microcomputed tomography-based structural analysis of various bone tissue regeneration models (对于各种骨组织再生模型的基于微型CT的结构分析). Nature Protocols (自然实验手册) 6, 105 (2011) .]。MPEG-g-HA/ $\alpha$ -CD/HP- $\beta$ -CD-ic-SIM PPRX呈现最高的BV、BS、Tb.N及Tb.Th,并且呈现最低的Tb.Sp。这种事项为定量分析新生骨形成时很重要的因素[J.H.Lee, S.-J.Jang, H.-R.Baek, K.M.Lee, B.-S.Chang和C.-K.Lee, Synergistic induction of early stage of bone formation by combination of recombinant human bone morphogenetic protein-2 and epidermal growth factor (重组人骨形态发生蛋白和表皮生长因子的组合对骨形成早期阶段的协同诱导). J.Tissue Eng. Regen. Med. (组织工程与再生医学杂志) 9, 447 (2015) .]。以如BV及BS等的参数为基础, 本发明人作出如下的结论: 在植入有MPEG-g-HA/ $\alpha$ -CD/HP- $\beta$ -CD-ic-SIM PPRX的颅骨缺损部位更活跃地形成新生骨。此外, Tb.N、Tb.Th及Tb.Sp结果表示在新生骨的三维网络内更致密地形成有新生骨小梁带(trabecular rods)。

[0069] 身体新生骨通过间充质干细胞(mesenchymal stem cell)连续分化为骨先质细胞(osteoprogenitors)、前成骨细胞(preosteoblasts)、成骨细胞(osteoblasts)或骨细胞性成骨细胞(streocytic osteoblasts)以及最终分化为骨细胞(osteocytes)而形成[T.J.Heino和T.A.Hentunen, Differentiation of osteoblasts and osteocytes form mesenchymal stem cells (成骨细胞和骨细胞从间充质干细胞的分化). Current Stem Cell Research & Therapy (当前干细胞研究 & 治疗) 3, 131 (2008) .]。BMP-2对总体分化过程带来影响并促进新生骨形成。SIM可提供诱导干细胞的骨形成分化所需的契机。当与MPEG-g-HA/ $\alpha$ -CD/SIM PPRX进行比较时, 从MPEG-g-HA/ $\alpha$ -CD/HP- $\beta$ -CD-ic-SIM PPRX释放的SIM因更低的水溶解度而能够在颅骨缺损部位周围刺激干细胞的骨形成分化。

[0070] 在骨的重构过程中, 通过破骨细胞(osteoclasts)来再吸收小骨, 接着聚集能够代替再吸收后的骨的破骨细胞。在整个骨骼中非同步地(asynchronously)产生骨重构过程。在骨先质细胞中诱导骨细胞, 在成熟骨中最普遍地发现骨细胞。

[0071] 通过H&E染色可知在所有样品中存在成骨细胞、骨细胞及破骨细胞, 这表示新生骨在所有样品中通过骨重构过程而形成。尤其, 新生骨向这三种细胞类型的颅骨缺损部位活跃地扩散, 在植入有MPEG-g-HA/ $\alpha$ -CD/HP- $\beta$ -CD-ic-SIM PPRX的部位生成了更丰富的新生骨。本发明人作出如下的结论: SIM的水溶解度对增强颅骨缺损部位的新生骨形成方面发挥重要的作用。

[0072] 5. 结论 (Conclusion)

[0073] 本发明人以辛伐他汀与2-羟丙基- $\beta$ -环糊精之间的包合物(HP- $\beta$ -CD-ic-SIM)以及由MPEG-g-HA高分子和 $\alpha$ -CD构成的超分子水凝胶为基础,设计并制备了双重系统。然后,本发明人利用兔子模型动物来调查双重系统对增强颅骨缺损部位的新生骨形成的影响。通过微型CT、H&E染色及戈尔德三色染色来评价该影响,其结果在植入有MPEG-g-HA/ $\alpha$ -CD/HP- $\beta$ -CD-ic-SIM PPRX的颅骨缺损部位中生成更丰富的新生骨。本发明人的结果表示SIM的水溶解度对新生骨形成带来影响。

[0074] 如上所述,通过上述实施例对本发明进行了说明,但本发明并不一定限于此,当然在不脱离本发明的范畴和思想的范围内能够实施各种变形。因此,本发明的保护范围并非由特定实施方式来限制,应解释为属于所附的权利要求书范围内的所有实施方式包含在本发明中。

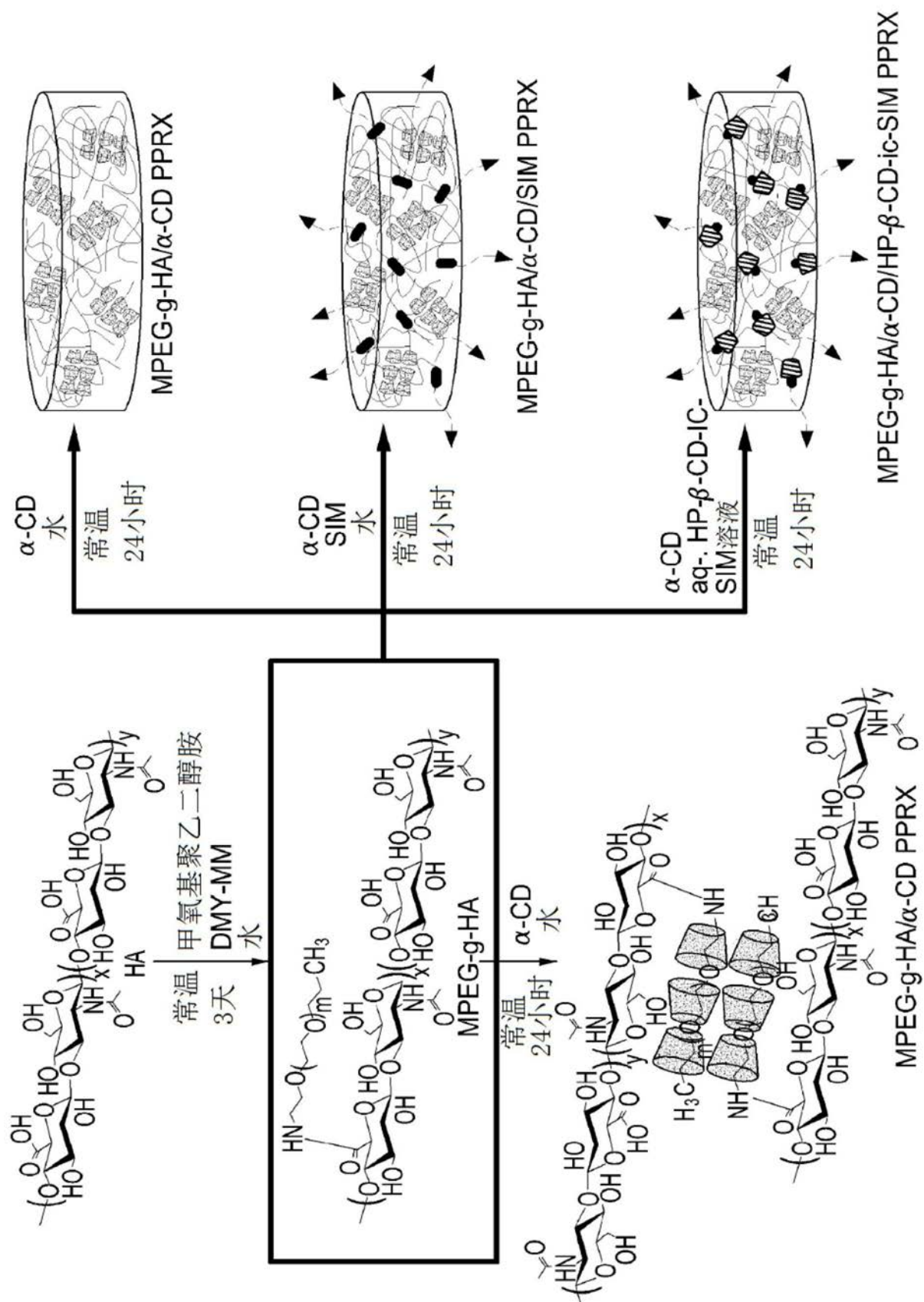


图1

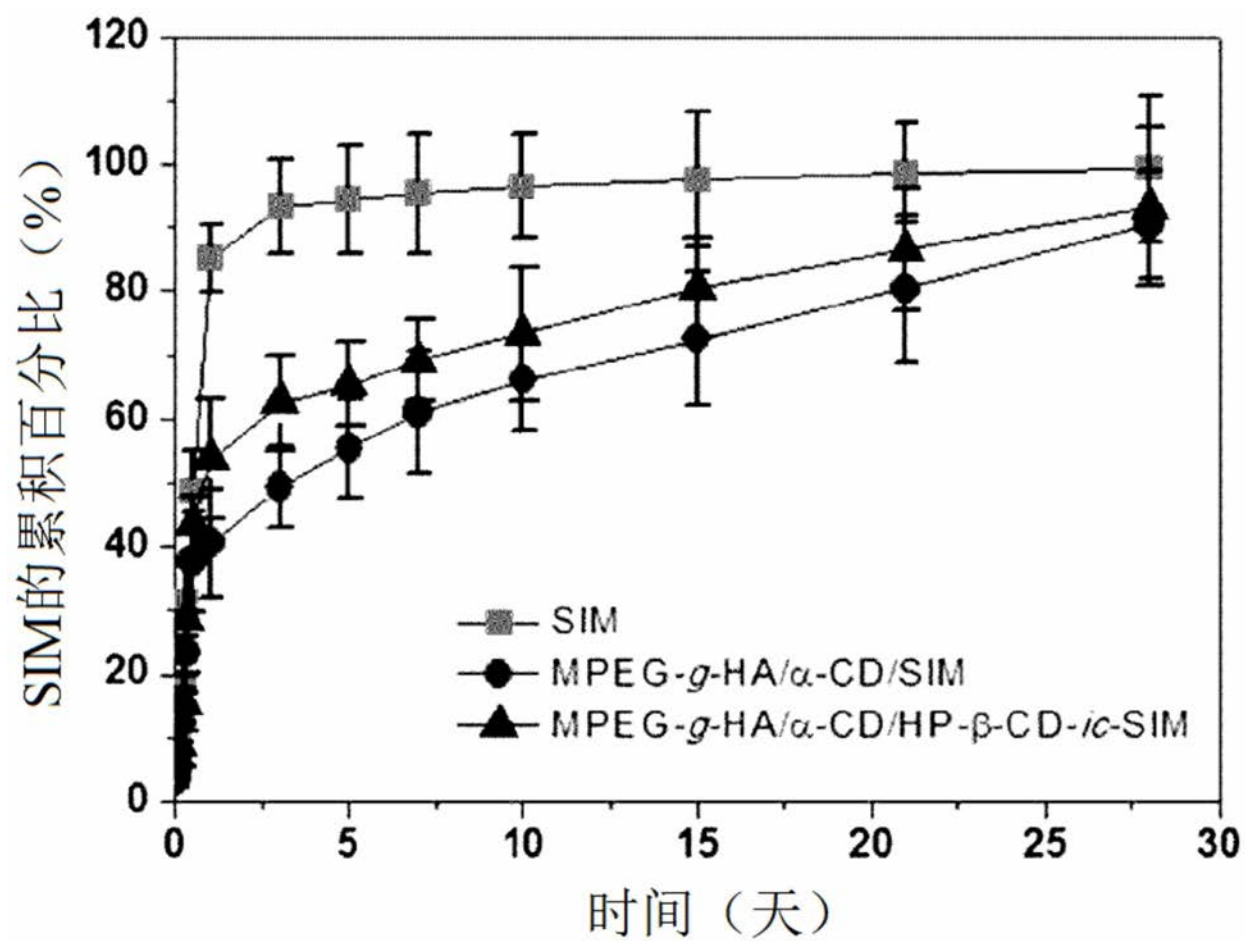


图2

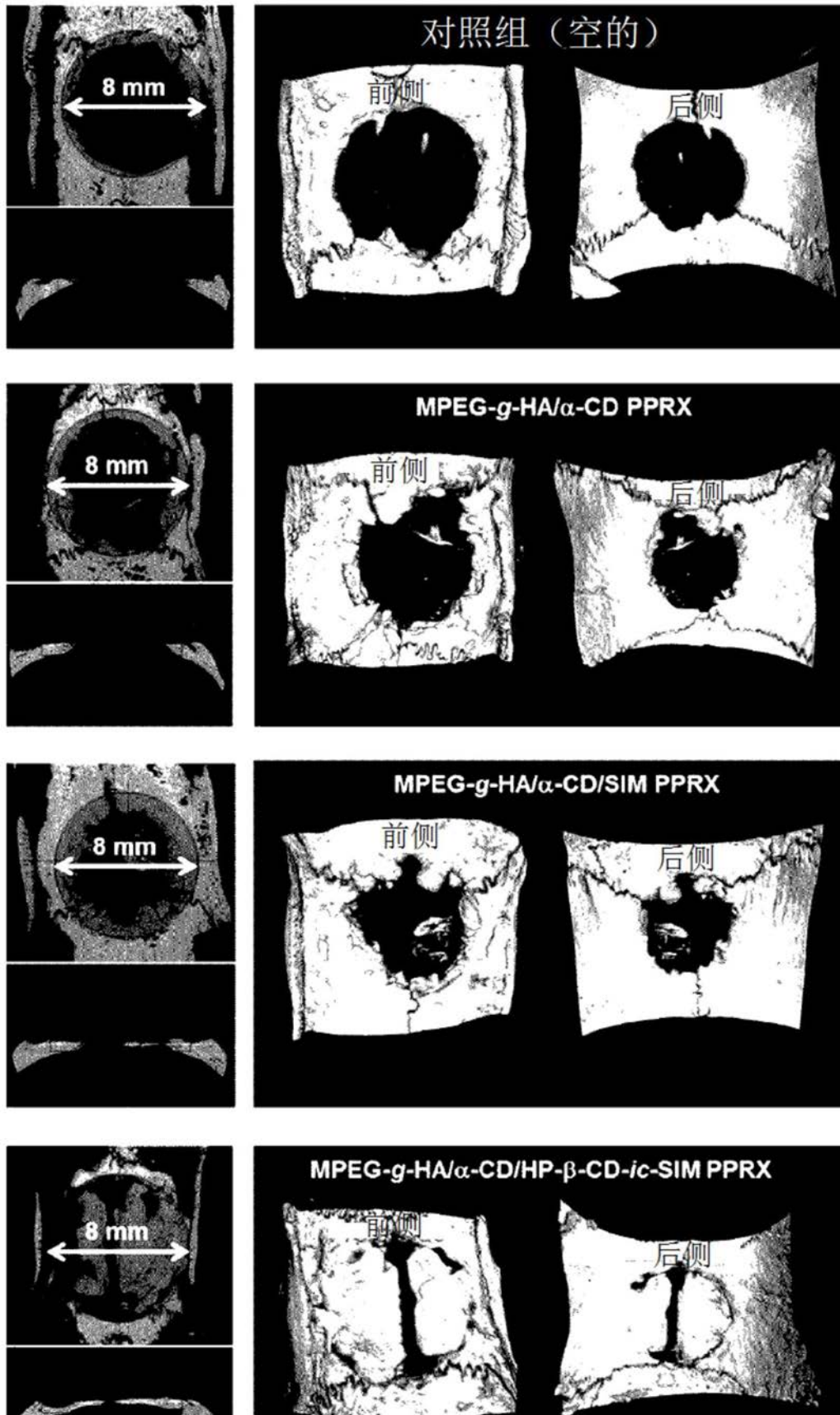


图3

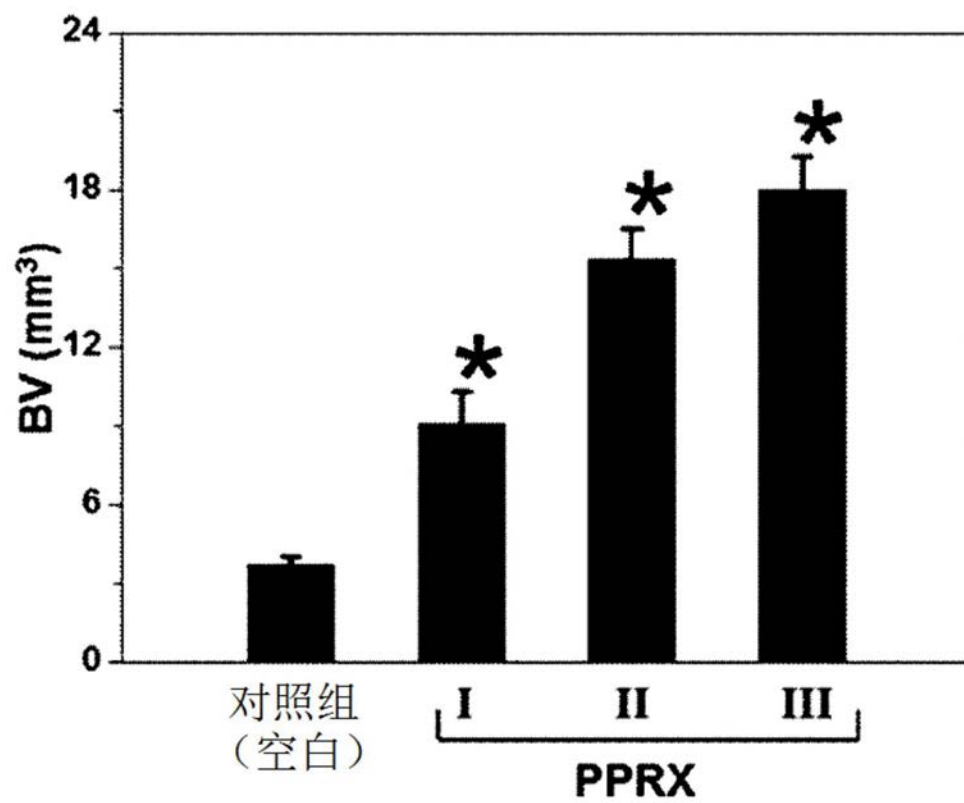


图4

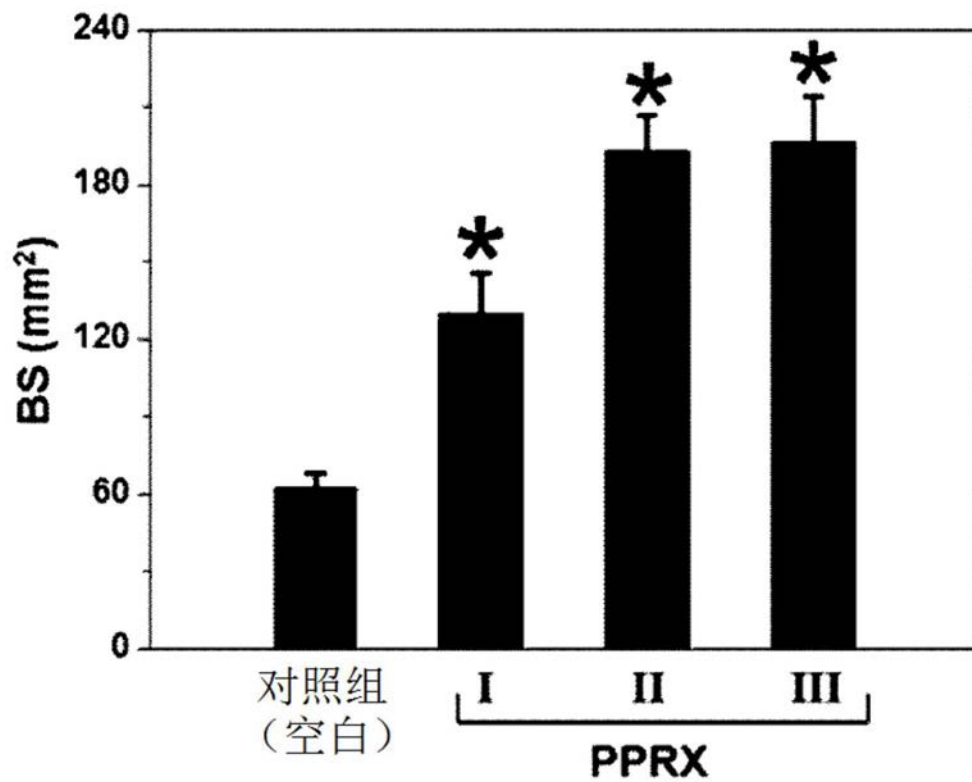


图5

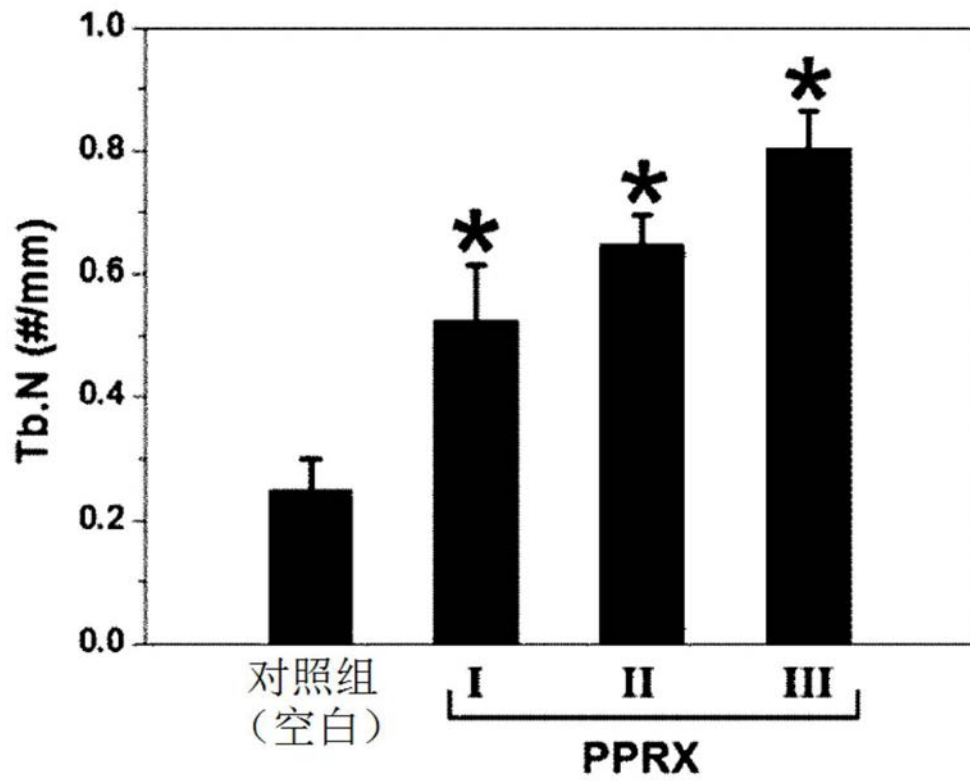


图6

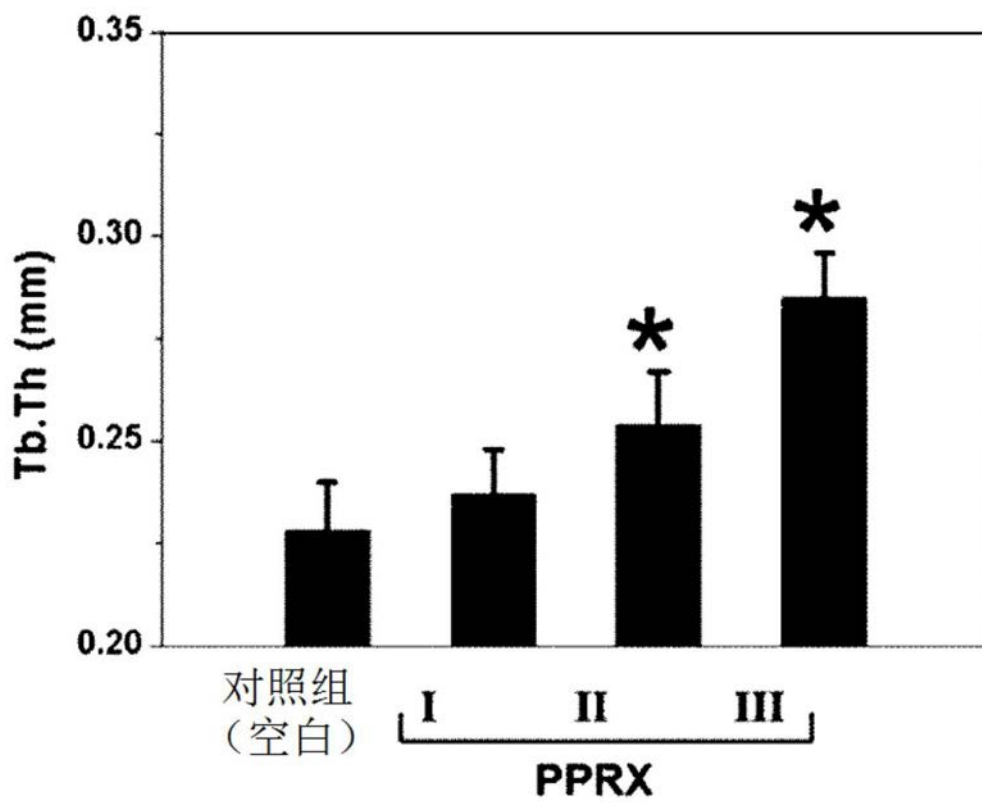


图7

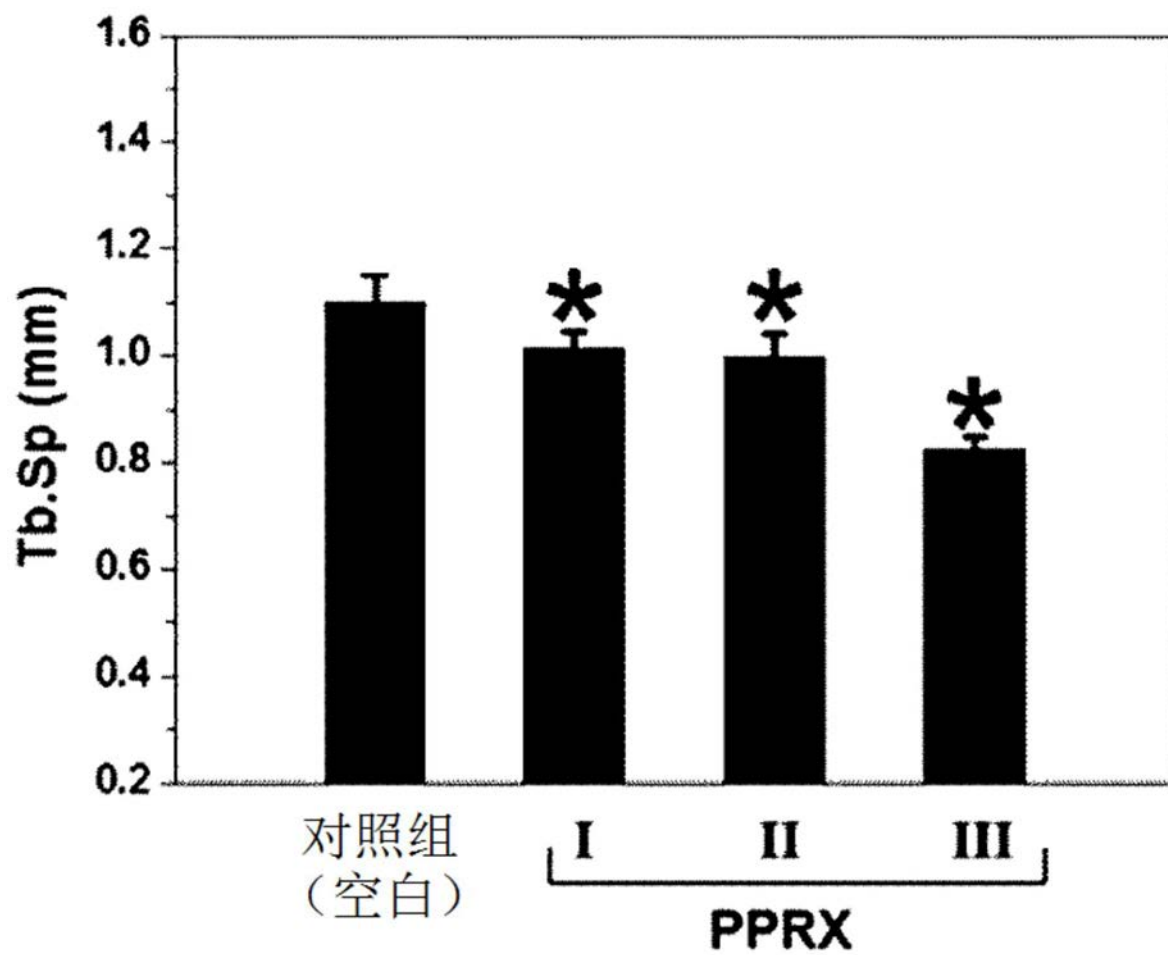


图8

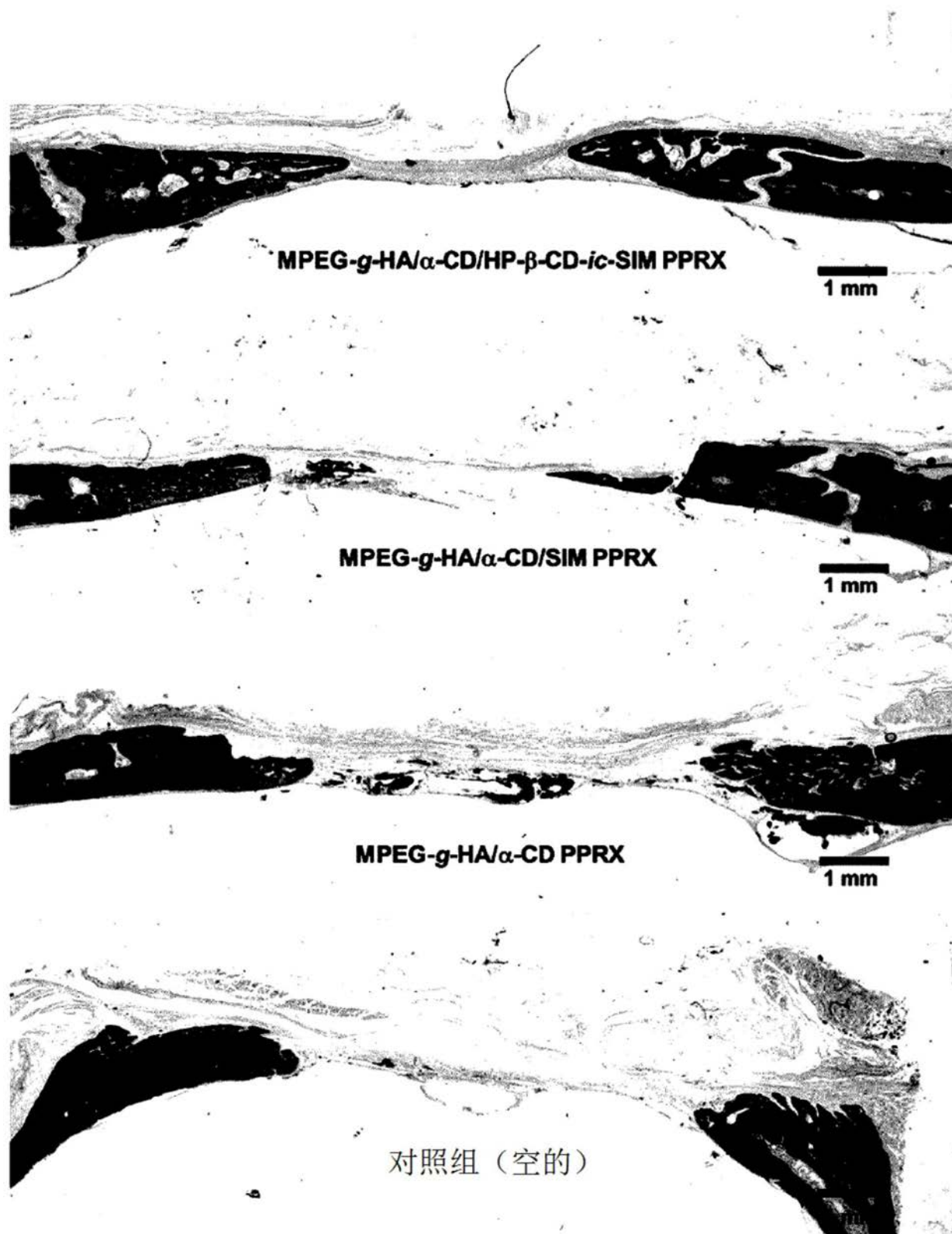


图9

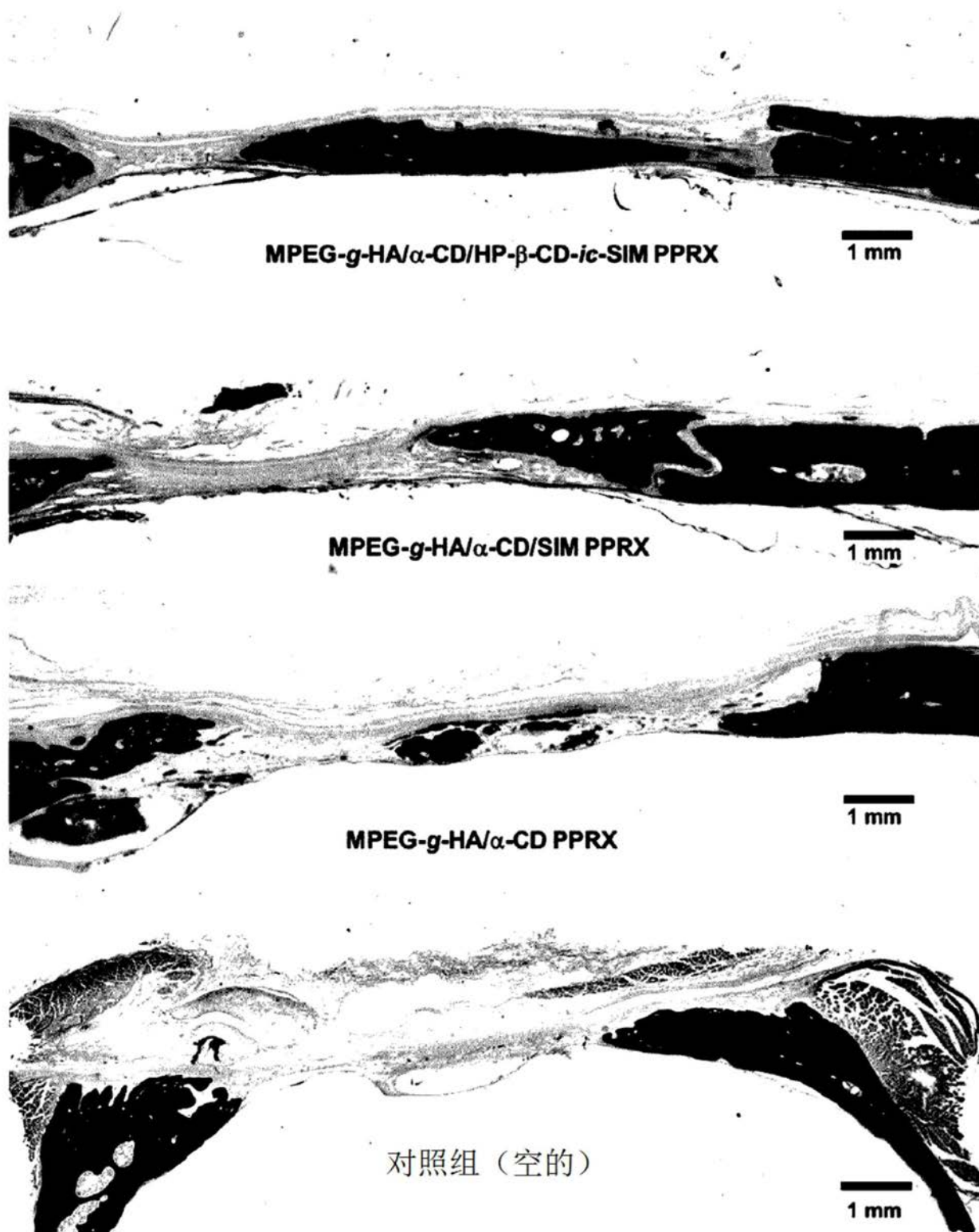


图10