



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105906824 A

(43) 申请公布日 2016. 08. 31

(21) 申请号 201610020881. 2

(22) 申请日 2016. 01. 13

(71) 申请人 上海其胜生物制剂有限公司

地址 201106 上海市闵行区吴淞路 1008 号

(72) 发明人 魏长征 吴祎 宋瑞瑞 蒋丽霞

(51) Int. Cl.

*C08J 3/24*(2006. 01)

*C08J 3/075*(2006. 01)

*C08L 5/08*(2006. 01)

*C08B 37/08*(2006. 01)

*A61K 8/73*(2006. 01)

*A61K 9/06*(2006. 01)

*A61K 47/36*(2006. 01)

*A61L 27/20*(2006. 01)

*A61L 27/52*(2006. 01)

*A61Q 19/08*(2006. 01)

*A61P 39/06*(2006. 01)

权利要求书2页 说明书4页 附图2页

### (54) 发明名称

一种可注射原位自组装透明质酸钠水凝胶的制备方法

### (57) 摘要

本发明涉及一种可注射的自组装透明质酸钠水凝胶的制备方法,该方法为透明质酸钠通过偶联试剂 4-(4, 6-二甲氧基三嗪-2-基)-4-甲基吗啉盐酸盐(DMTMM)的活化作用,与胱胺制备得到透明质酸衍生物,再经二硫苏糖醇(DTT)还原得到透明质酸巯基衍生物;同时透明质酸钠通过偶联试剂 DMTMM 的活化作用,与多巴胺反应制备得到儿茶酚化透明质酸衍生物,两者在无其它交联剂参与下,互相混合形成水凝胶。

1. 一种可注射的自组装透明质酸钠水凝胶的制备方法,其主要特征在于是特定条件下巯基和儿茶酚基团之间的快速化学交联反应。

2. 权利要求1所述的可注射的自组装透明质酸钠水凝胶的制备方法,其特征在于采用下述方法制备巯基化透明质酸衍生物(组分A)和儿茶酚基团改性的透明质酸衍生物(组分B),其步骤包括:

(1) 巯基化透明质酸的制备:

0.1%~10%(w/v)透明质酸水溶液中加入胱胺二盐酸盐和4-(4,6-二甲氧基三嗪-2-基)-4-甲基吗啉盐酸盐(DMTMM);搅拌均匀后,置于2~50℃环境下反应一段时间;再通过二硫苏糖醇(DTT)还原,得到透明质酸的巯基衍生物,再配制成不同浓度的巯基化透明质酸溶液;

(2) 儿茶酚化透明质酸的制备:

0.1%~10%(w/v)透明质酸水溶液中加入多巴胺盐酸盐和4-(4,6-二甲氧基三嗪-2-基)-4-甲基吗啉盐酸盐(DMTMM);搅拌均匀后,置于2~50℃环境下反应一段时间,透析后冷冻干燥,即得到不同接枝率的透明质酸的儿茶酚衍生物,再配制成不同浓度的儿茶酚化透明质酸溶液;

(3) 原位交联透明质酸水凝胶的制备:

取0.1~10%(w/v)巯基化透明质酸溶液与0.1~10%(w/v)儿茶酚化透明质酸溶液混合成凝胶。

3. 如权利要求2所述的可注射的自组装透明质酸钠水凝胶,其特征在于制备巯基化透明质酸使用的修饰试剂为胱胺或胱胺盐酸盐,与透明质酸钠的比例为1/10~5/1(mol/mol)。

4. 如权利要求2所述的可注射的自组装透明质酸钠水凝胶,其特征在于用于制备巯基化透明质酸反应的溶液体系的pH为3~9。

5. 如权利要求2所述的可注射的自组装透明质酸钠水凝胶,其特征在于使用的透明质酸钠起始反应浓度为0.1~10%(m/m%)。

6. 如权利要求2所述的可注射的自组装透明质酸钠水凝胶,其特征在于使用的偶联试剂4-(4,6-二甲氧基三嗪-2-基)-4-甲基吗啉盐酸盐(DMTMM)与透明质酸钠的比例为1/10~5/1(mol/mol)。

7. 如权利要求2所述的可注射的自组装透明质酸钠水凝胶,其特征在于反应的温度范围为2~50℃。

8. 如权利要求2所述的可注射的自组装透明质酸钠水凝胶,其特征在于制备反应的时间范围为2~120 h。

9. 如权利要求2所述的可注射的自组装透明质酸钠水凝胶,其特征在于制备巯基化透明质酸的二硫苏糖醇的加入量与透明质酸钠的比例为1/5~10/1(mol/mol)。

10. 如权利要求2所述的可注射的自组装透明质酸钠水凝胶,其特征在于制备儿茶酚化透明质酸使用的修饰试剂为多巴胺盐酸盐,与透明质酸钠的比例为1/10~5/1(mol/mol)。

11. 如权利要求2所述的可注射的自组装透明质酸钠水凝胶,其特征在于用于制备儿茶酚化透明质酸反应的溶液体系的pH为2~7。

12. 如权利要求2所述的可注射的自组装透明质酸钠水凝胶,其特征在于所述的透析方法为在含有2.5~15克NaCl的pH为2~5的盐酸水溶液中透析1~5天,在pH为2~5的盐酸水溶液中透析1~5天。

13. 如权利要求2所述的可注射的自组装透明质酸钠水凝胶,其特征在於所述冷冻干燥得冷阱温度为 $-40\sim-60^{\circ}\text{C}$ ,真空度为 $<40\text{ Pa}$ 。

## 一种可注射原位自组装透明质酸钠水凝胶的制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及医用生物材料技术领域,具体涉及一种自组装、可注射、具有可点击性的原位交联透明质酸钠水凝胶的制备方法,该透明质酸钠在抗衰老、药物缓释、关节腔润滑液、注射美容等方面有潜在应用价值。

### 背景技术

[0002] 高分子凝胶是一类常见的水凝胶,其内部含有大量水但不溶于水。其三维交联网络由高分子主链及侧链上的亲水性和疏水性基团或解离基团组成,溶剂被固定在分子网络中。高分子凝胶的交联网络点,可以由共价键组成化学交联,也可以是物理交联,如静电作用、氢键作用、疏水作用等。

[0003] 水凝胶,尤其是以细胞间基质材料制备得的高分子水凝胶,具备很多优点,如可模拟生物体内的天然环境、高含水量、良好的通透性、更好的生物相容性以及可调节的酶降解性能等。同时,细胞间基质具有生物诱导作用,可以定向和诱导组织的特异性修复。例如透明质酸钠具有管理细胞粘附和迁移、调节细胞分裂和分化等生物学功能,以此制备的水凝胶在生物医药领域达到了越来越多的重视。透明质酸是一种天然的高分子直链多糖,它是由N-乙酰基-D-葡萄糖胺和D-葡萄糖醛酸交替连结而成的线型多糖。其以不同形式和不同浓度广泛存在于机体的各种组织中,具有特殊的生理功能。

[0004] 随着医学技术的不断发展,越来越多的医生和病人倾向于微创手术,可注射的水凝胶生物医用材料产品可以通过内窥镜的方式使用,也可以结合微创手术使用,同时适用于一些复杂形状的三维伤口,可以很好地粘附于创面,有着广泛的应用前景。例如,现市面上有着多种以透明质酸钠为原料制备的可注射交联水凝胶,作为新一代的除皱填充材料,在医疗美容方面得到了广泛的应用。然而,大部分这些水凝胶类生物医用材料产品的制备都采用先化学交联,后纯化去除残余交联剂和副产物的工艺,这类工艺难以保证彻底去除残余交联剂,或者部分官能团发生交联反应的残余交联剂被共价键固定在水凝胶中无法去除。这会导致临床使用上的炎症反应等毒副作用。其局限性使得产品制备上需要复杂的纯化工艺,同时提高了临床使用上的风险。

[0005] 多巴胺,即4-(2-氨基乙基)-1,2-苯二酚,是贻贝粘附蛋白的衍生物,其粘附性主要是由于儿茶酚基团对有机生物体的强亲和作用力。其在氧化条件下,儿茶酚基团会转化成醌,并伴随着分子结构重排。儿茶酚氧化后的醌结构对很多官能团都能通过迈克尔加成或席夫碱反应产生高效活性,如巯基、氨基以及醌本身。而儿茶酚-巯基反应因其快速又坚固的性能成为一种制备交联水凝胶的有效方法。

### 发明内容

[0006] 本发明的目的在于制备一种自组装、可注射、具有可点击性的原位交联透明质酸钠水凝胶,其基本化学原理是特定条件下巯基和儿茶酚基团之间的快速化学交联反应。本发明提供的原位交联透明质酸钠水凝胶的有效组成是巯基化透明质酸衍生物(组分A)和儿

茶酚基团改性的透明质酸衍生物(组分B)。本发明具有生物相容性好、不产生副产物、稳定性好、使用方便、成本低廉等许多优点。

[0007] 在本发明中,组分A是指由巯基改性的透明质酸溶液,组分B是指儿茶酚基团改性的透明质酸溶液。两者都以水为主要溶剂,也可含有一些盐成分(如氯化钠、磷酸缓冲盐成分等),起调节溶液渗透压和稳定溶液pH值等功能。

[0008] 本发明提供的制备方法步骤包括:

(1)巯基化透明质酸的制备:

0.01%~10%(w/v)透明质酸水溶液中加入胱胺二盐酸盐和4-(4,6-二甲氧基三嗪-2-基)-4-甲基吗啉盐酸盐(DMTMM)(透明质酸单元与胱胺二盐酸盐的摩尔比为1:0.1~3,透明质酸单元与DMTMM的摩尔比1:0.1~3)。搅拌均匀后,置于4~50℃环境下反应一段时间。再通过二巯苏糖醇(DTT)(DTT与透明质酸单元的摩尔比大于等于1:5)还原,得到透明质酸的巯基衍生物。

[0009] (2)儿茶酚化透明质酸的制备:

0.01%~10%(w/v)透明质酸水溶液中加入多巴胺盐酸盐和4-(4,6-二甲氧基三嗪-2-基)-4-甲基吗啉盐酸盐(DMTMM)(透明质酸单元与多巴胺盐酸盐的摩尔比为1:0.1~3,透明质酸单元与DMTMM的摩尔比1:0.1~3)。搅拌均匀后,置于4~50℃环境下反应一段时间,透析后冷冻干燥,即得到不同接枝率的透明质酸的儿茶酚衍生物,再配制成不同浓度的儿茶酚化透明质酸溶液。

[0010] (3)原位交联透明质酸水凝胶的制备:

取0.1~10%(w/v)巯基化透明质酸溶液与0.1~10%(w/v)儿茶酚化透明质酸溶液混合成凝胶。

## 附图说明

[0011] 图1 流变学时间扫描图谱。

[0012] 图2 样品不同时间流变图谱。

[0013] 图3 弹性模量流变图谱。

## 具体实施方式

[0014] 现结合实施例,对本发明作详细描述,但本发明的实施不仅限于此。

[0015] 实施例一

将胱胺二盐酸盐0.5 g溶解于15 mL水中,调节pH为4,称取1 g透明质酸钠干粉(分子量1,300,000 DA),搅拌均匀,称取DMTMM 1 g用5 mL水完全溶解并将pH值调为4,然后加入混合液中,待完全搅拌均匀后,4℃下反应2天。将反应好的凝胶切成块后,用PBS缓冲液透析,每1 h更换透析液1次并称重,直到凝胶质量不再增加时,终止透析。将该凝胶粉碎制粒后,用1 M的 NaOH水溶液调节凝胶pH值为8,混合均匀后,加入二巯苏糖醇2 g,室温下过夜反应,得到的反应液用盐酸溶液调节pH到3左右后,将溶液转移到透析袋中(截留分子量10000),用1 mM的盐酸和0.3 M的氯化钠溶液透析2天,最后用1 mM的盐酸透析1天。收集透析好的溶液并冷冻干燥得样品A,待用。

[0016] 将0.5 g透明质酸钠干粉(分子量1,300,000 DA)溶解于25 mL水中,并调节pH值至

5,再加入0.25 g多巴胺盐酸盐和0.5 g DMTMM,避光条件下搅拌反应24 h后,用1 mM的盐酸透析3天,冷冻干燥,得样品B,待用。

[0017] 将0.1 g样品A和0.1 g样品B分别溶于5 mL PBS溶液,并快速混合两者溶液,于室温下得水凝胶。

#### [0018] 实施例二

将胱胺二盐酸盐0.25 g溶解于15 mL水中,调节pH为6,称取1g透明质酸钠干粉(分子量310,000 DA),搅拌均匀,称取DMTMM 0.5 g用5mL水完全溶解并将pH值调为6,然后加入混合液中,待完全搅拌均匀后,室温下反应1天。将反应好的凝胶切成块后,用PBS缓冲液透析,每1 h更换透析液1次并称重,直到凝胶质量不再增加时,终止透析。将该凝胶粉碎制粒后,用1 M的 NaOH水溶液调节凝胶pH值为8,混合均匀后,加入二硫苏糖醇1.5 g,室温下过夜反应,得到的反应液用盐酸溶液调节pH到3左右后,将溶液转移到透析袋中(截留分子量10000),用1 mM的盐酸和0.3 M的氯化钠溶液透析2天,最后用1 mM的盐酸透析1天。收集透析好的溶液并冷冻干燥得样品A,待用。

[0019] 将0.5 g透明质酸钠干粉(分子量310,000 DA)溶解于25 mL水中,并调节pH值至5,再加入0.5 g多巴胺盐酸盐和0.5 g DMTMM,避光条件下搅拌反应48 h后,用1 mM的盐酸透析3天,冷冻干燥得样品B,待用。

[0020] 将0.1 g样品A和0.1 g样品B分别溶于5 mL PBS溶液,并快速混合两者溶液,于室温下得水凝胶。

#### [0021] 实施例三

将胱胺二盐酸盐1 g溶解于15 mL水中,调节pH为7,称取1.2 g透明质酸钠干粉(分子量710,000 DA),搅拌均匀,称取DMTMM 1 g用5 mL水完全溶解并将pH值调为7,然后加入混合液中,待完全搅拌均匀后,4℃下反应3天。将反应好的凝胶切成块后,用PBS缓冲液透析,每1 h更换透析液1次并称重,直到凝胶质量不再增加时,终止透析。将该凝胶粉碎制粒后,用1 M的 NaOH水溶液调节凝胶pH值为8,混合均匀后,加入二硫苏糖醇2.5 g,室温下过夜反应,得到的反应液用盐酸溶液调节pH到3左右后,将溶液转移到透析袋中(截留分子量10000),用1 mM的盐酸和0.3 M的氯化钠溶液透析2天,最后用1 mM的盐酸透析1天。收集透析好的溶液并冷冻干燥得样品A,待用。

[0022] 将0.6 g透明质酸钠干粉(分子量710,000 DA)溶解于25 mL水中,并调节pH值至5,再加入0.5 g多巴胺盐酸盐和1 g DMTMM,避光条件下搅拌反应24 h后,用1 mM的盐酸透析3天,冷冻干燥得样品B,待用。

[0023] 将0.1 g样品A和0.1 g样品B分别溶于5 mL PBS溶液,并快速混合两者溶液,于室温下得水凝胶。

#### [0024] 实施例四

将胱胺二盐酸盐1.5 g溶解于15 mL水中,调节pH为7,称取1.4 g透明质酸钠干粉(分子量470,000 DA),搅拌均匀,称取DMTMM 1.5 g用5 mL水完全溶解并将pH值调为7,然后加入混合液中,待完全搅拌均匀后,于4℃下反应2天。将反应好的凝胶切成块后,用PBS缓冲液透析,每1 h更换透析液1次并称重,直到凝胶质量不再增加时,终止透析。将该凝胶粉碎制粒后,用1 M的 NaOH水溶液调节凝胶pH值为8,混合均匀后,加入二硫苏糖醇2 g,室温下过夜反应,得到的反应液用盐酸溶液调节pH到3左右后,将溶液转移到透析袋中(截留分子量

10000),用1 mM的盐酸和0.3 M的氯化钠溶液透析3天,最后用1 mM的盐酸透析2天。收集透析好的溶液并冷冻干燥得样品A,待用。

[0025] 将0.4 g透明质酸钠干粉(分子量470,000 DA)溶解于25 mL水中,并调节pH值至5,再加入0.5 g多巴胺盐酸盐和1 g DMTMM,避光条件下搅拌反应16 h后,用1 mM的盐酸透析5天,冷冻干燥得样品B,待用。

[0026] 将0.1 g样品A和0.1 g样品B分别溶于5 mL PBS溶液,并快速混合两者溶液,于室温下得水凝胶。

#### [0027] 实施例五

将实施例一中所制备的白色絮状固体样品A(巯基化透明质酸)用玛瑙研钵研磨至细,随后放入105℃烘箱恒重至干燥,取出放入干燥皿中冷却20分钟。各精密称取3份2,5-双(5-叔丁基-1,3-苯并噁唑-2-基)噻吩(BBOT标准品)和样品(2.5±0.5)mg,放入锡囊中,挤压包裹,放入元素分析仪进样检测。经元素分析法计算而得,制备样品的巯基含量为24.19%。

#### [0028] 实施例六

将实施例二得到0.1 g样品A和0.1 g样品B分别溶于5 mL PBS溶液,并快速混合两者溶液,于旋转流变仪下检测其储存模量 $G'$ ,损耗模量 $G''$ 随时间变化曲线,如图1所示。

#### [0029] 实施例七

由实施例二得到的水凝胶,分别检测两组分混合2小时、6小时、24小时后得到的水凝胶的弹性模量,其储存模量 $G'$ ,损耗模量 $G''$ 随频率的变化曲线如图2所示。

#### [0030] 实施例八

由实施例二、三、四得到的水凝胶,分别检测其弹性模量,其储存模量 $G'$ ,损耗模量 $G''$ 随频率的变化曲线如图3所示。

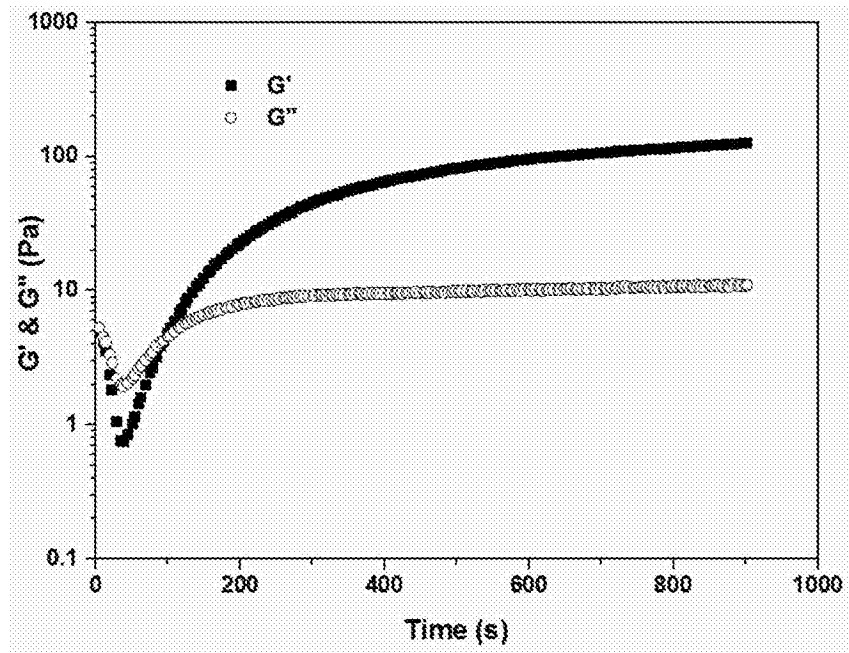


图1

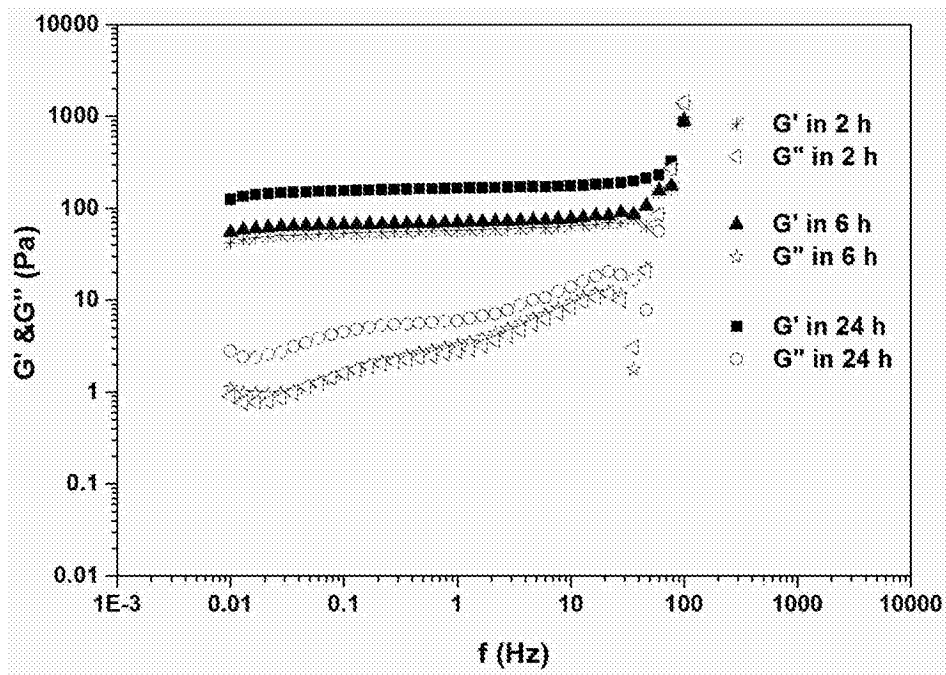


图2



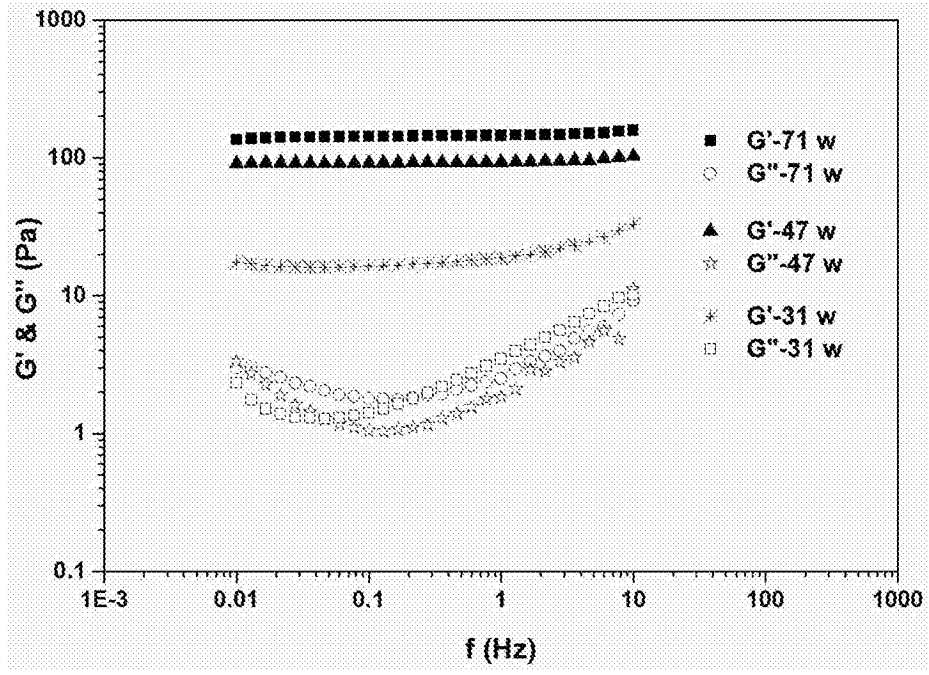


图3