



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111481737 A

(43)申请公布日 2020.08.04

(21)申请号 202010377000.9

(22)申请日 2020.05.07

(71)申请人 华东理工大学

地址 200237 上海市徐汇区梅陇路130号

(72)发明人 刘劲刚 喻雅婷 史淑文 唐奇

张海琳 王祎

(74)专利代理机构 上海一平知识产权代理有限

公司 31266

代理人 徐迅 马莉华

(51) Int. Cl.

A61L 26/00(2006.01)

权利要求书1页 说明书11页 附图5页

(54)发明名称

近红外光控释放一氧化氮的磁性温敏性水凝胶及其制备和应用

(57)摘要

本发明提供了一种近红外光控释放一氧化氮的磁性温敏性水凝胶的制备方法及其应用。该水凝胶体系以水凝胶为基体,基体中包含有纳米复合材料载体和与载体相链接的金属亚硝酰NO供体。该水凝胶体系可在人体温下(37℃)、3分钟内迅速成型,且具有优良的稳定性和生物相容性,在近红外光照射下能够迅速释放NO分子,且对革兰氏阳性的金黄色葡萄球菌与革兰氏阴性的大肠杆菌具有明显的抗菌作用。在有关NO抗菌、促进伤口愈合等领域中具有潜在的应用价值。

1. 一种近红外光控释放一氧化氮的磁性温敏性水凝胶体系,其特征在于,所述的水凝胶体系包括:

温敏性水凝胶基体;和

磁性纳米粒子,其中所述的磁性纳米粒子上负载有外源的NO供体,所述的NO供体在近红外光照射下,以可控方式释放一氧化氮。

2. 如权利要求1所述的水凝胶体系,其特征在于,所述的水凝胶基体选自下组:壳聚糖-聚乙烯醇温敏性水凝胶、有机聚合物温敏性水凝胶、羧化壳聚糖-聚乙烯亚胺型水凝胶、海藻酸钠型水凝胶、丝素蛋白型水凝胶或其组合。

3. 如权利要求1所述的水凝胶体系,其特征在于,磁性纳米粒子是选自下组的纳米载体:四氧化三铁磁性纳米粒子、三氧化二铁磁性纳米粒子或锰锌铁氧体纳米材料;较佳地,所述的磁性纳米粒子复合材料载体表面具有多巴胺修饰。

4. 如权利要求1所述的水凝胶体系,其特征在于,所述外源NO供体为金属钕亚硝酰化合物。

5. 一种如权利要求1-4中任一所述的水凝胶体系的制备方法,其特征在于,所述方法包括步骤:

(a) 提供温敏性水凝胶基体材料和磁性纳米粒子,其中所述的磁性纳米粒子上负载有外源的NO供体,所述的NO供体在近红外光照射下,以可控方式释放一氧化氮;和

(b) 将所述温敏性水凝胶基体材料、磁性纳米粒子和水进行混合,从而形成权利要求1所述的近红外光控释放一氧化氮的磁性温敏性水凝胶体系。

6. 如权利要求5所述的制备方法,其特征在于,所述的壳聚糖-聚乙烯醇溶胶通过以下步骤制备:

(a1) 提供壳聚糖乙酸溶液、聚乙烯醇水溶液、 $\text{NaHCO}_3$ 水溶液;

(a2) 在冰浴条件下,将壳聚糖乙酸溶液与聚乙烯醇水溶液混合搅拌并用 $\text{NaHCO}_3$ 水溶液调节pH,形成混合溶液;

(a3) 将混合溶液脱气处理后,得到所述的壳聚糖-聚乙烯醇溶胶。

7. 一种水凝胶组合物,其特征在于,包括:如权利要求1-4任一所述的水凝胶体系,和药学上可接受的载体。

8. 如权利要求7所述的水凝胶组合物,其特征在于,所述的水凝胶组合物在近红外光照射下可控释放出NO。

9. 如权利要求1-4任一所述的水凝胶体系的用途,其特征在于,用于制备抗菌和/或促进伤口愈合的药物组合物。

10. 一种制品,其特征在于,所述制品含有权利要求1所述的近红外光控释放一氧化氮的磁性温敏性水凝胶体系,或由所述近红外光控释放一氧化氮的磁性温敏性水凝胶体系制成。

## 近红外光控释放一氧化氮的磁性温敏性水凝胶及其制备和应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及材料领域及生物领域。具体地,本发明提供了近红外光控释放一氧化氮的磁性温敏性水凝胶及其制备和应用。

### 背景技术

[0002] 水凝胶是一种具有三维网络结构的高分子材料,通过物理或化学交联将聚合物连接形成,它具有良好的生物相容性、吸水能力、降解性以及低细胞毒性,在水溶液中能够溶胀并保持大量水分而又不会溶解,因此可以维持水分和体液,从而促进新生血管形成和皮肤再生。

[0003] 温敏性水凝胶是一种具有温度敏感性的水凝胶,会随温度变化进行可逆性溶胶-凝胶转换。通常,当温度降低时,其为溶胶状态(像液体),当温度较高时则形成水凝胶。温敏性水凝胶易于使用,特别是可用于不规则表面的伤口,不仅可以轻松附着在不规则表面的伤口上,而且还可以抵抗细菌的入侵,从而避免伤口的继发性创伤。因此,把温敏性水凝胶作为局部抗菌药物的输送载体成为了新的研究热点。

[0004] 综合以上分析,研发一种用于抗菌、可近红外光控释放NO的磁性温敏性水凝胶体系尤为重要。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种具有抗菌作用的近红外光控释放一氧化氮的磁性温敏性水凝胶及其制备方法。

[0006] 在本发明的第一方面,提供了一种近红外光控释放一氧化氮的磁性温敏性水凝胶体系,所述的水凝胶体系包括:

[0007] 温敏性水凝胶基体;和

[0008] 磁性纳米粒子,其中所述的磁性纳米粒子上负载有外源的NO供体,所述的NO供体在近红外光照射下,以可控方式释放一氧化氮。

[0009] 在另一优选例中,所述的外源的NO供体与所述的磁性纳米粒子通过化学交联方式连接。

[0010] 在另一优选例中,所述的水凝胶体系包括溶胶状态或凝胶状态。

[0011] 在另一优选例中,所述的水凝胶基体选自下组:壳聚糖-聚乙烯醇温敏性水凝胶、有机聚合物温敏性水凝胶、羧化壳聚糖-聚乙烯亚胺型水凝胶、海藻酸钠型水凝胶、丝素蛋白型水凝胶或其组合。

[0012] 在另一优选例中,所述的水凝胶体系,磁性纳米粒子是选自下组的纳米载体:四氧化三铁磁性纳米粒子、三氧化二铁磁性纳米粒子或锰锌铁氧体纳米材料;较佳地,所述的磁性纳米粒子复合材料载体表面具有多巴胺修饰。

[0013] 在另一优选例中,所述磁性纳米粒子复合材料载体是四氧化三铁磁性纳米粒子。

[0014] 在另一优选例中,所述磁性纳米粒子复合材料载体与所述壳聚糖-聚乙烯醇溶胶的重量比为0.008-0.02:1。

[0015] 在另一优选例中,所述磁性纳米粒子复合材料载体与所述外源NO供体的重量比为1-2.5:1。

[0016] 在另一优选例中,所述的基体中的纳米复合材料粒径为100-350nm,较佳地为220-235nm。

[0017] 在另一优选例中,所述的水凝胶体系,所述外源NO供体为金属钌亚硝酰化合物。

[0018] 在另一优选例中,所述基体中的纳米复合材料载体通过共价键与所述外源NO供体相链接。

[0019] 在本发明的第二方面,提供了一种如第一方面所述的水凝胶体系的制备方法,所述方法包括步骤:

[0020] (a) 提供温敏性水凝胶基体材料和磁性纳米粒子,其中所述的磁性纳米粒子上负载有外源的NO供体,所述的NO供体在近红外光照射下,以可控方式释放一氧化氮;和

[0021] (b) 将所述温敏性水凝胶基体材料、磁性纳米粒子和水进行混合,从而形成权利要求1所述的近红外光控释放一氧化氮的磁性温敏性水凝胶体系。

[0022] 在另一优选例中,步骤(b)在室温下进行。

[0023] 在另一优选例中,所述方法还包括:

[0024] (c) 将步骤(b)的磁性温敏性水凝胶体系置于第一相变温度下,从而使得液态(或溶胶状态)的水凝胶体系转变为凝胶状态的磁性温敏性水凝胶体系。

[0025] 在另一优选例中,所述的第一相变温度为30-40℃。

[0026] 在另一优选例中,所述方法包括:

[0027] (1) 提供壳聚糖-聚乙烯醇溶胶、磁性纳米粒子载体和外源NO供体;

[0028] (2) 在溶剂存在下,将所述外源NO供体共价负载于所述磁性纳米粒子载体,形成纳米复合材料;

[0029] (3) 将上述纳米复合材料均匀分散于壳聚糖-聚乙烯醇溶胶中,搅拌脱气形成第一混合物;

[0030] (4) 将第一混合物于凝胶温度下放置一段时间,从而形成如权利要求1所述的水凝胶体系。

[0031] 在另一优选例中,步骤(1)中所述的磁性纳米粒子载体为 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @PDA复合材料。

[0032] 在另一优选例中,步骤(1)中所述的外源NO供体是金属钌亚硝酰化合物( $\text{Ru-NO}$ )。

[0033] 在另一优选例中,所述步骤(2)中,将所述的外源NO供体与表面多巴胺修饰的磁性纳米粒子载体进行酰胺化反应,从而制得所述的纳米复合材料。

[0034] 在另一优选例中,所述步骤(2)中,所述基体中的纳米复合材料载体与所述外源NO供体的重量比为1-2.5:1,更佳地1:1。

[0035] 在另一优选例中,所述的步骤(2)在偶联剂存在下进行。

[0036] 在另一优选例中,步骤(2)所述的溶剂是N,N-二甲基甲酰胺(DMF)溶剂。

[0037] 在另一优选例中,所述的偶联剂选自下组:EDC/NHS,其中EDC为1-乙基-3-[3-二甲基氨基丙基]碳化二亚胺盐酸化物,NHS为N-羟基琥珀酰亚胺。

[0038] 在另一优选例中,步骤(2)中形成的磁性纳米粒子复合材料为 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @PDA@Ru-NO复

合材料。

[0039] 在另一优选例中,所述步骤(3)中的均匀分散使用的是超声分散。

[0040] 在另一优选例中,所述步骤(3)中的搅拌时间为0.5-2小时。

[0041] 在另一优选例中,所述步骤(4)中,所述水凝胶体系的凝胶温度为35-40℃。

[0042] 在另一优选例中,所述步骤(4)中,所述水凝胶体系的凝胶时间为1-5min。

[0043] 在另一优选例中,所述步骤(4)中,所述基体中的纳米复合材料与所述壳聚糖-聚乙烯醇溶胶的重量比为0.008-0.02:1。

[0044] 在另一优选例中,所述的壳聚糖-聚乙烯醇溶胶通过以下步骤制备:

[0045] (a1) 提供壳聚糖乙酸溶液、聚乙烯醇水溶液、NaHCO<sub>3</sub>水溶液;

[0046] (a2) 在冰浴条件下,将壳聚糖乙酸溶液与聚乙烯醇水溶液混合搅拌并用NaHCO<sub>3</sub>水溶液调节pH,形成混合溶液;

[0047] (a3) 将混合溶液脱气处理后,得到所述的壳聚糖-聚乙烯醇溶胶。

[0048] 在另一优选例中,步骤a1)中所述的壳聚糖乙酸溶液浓度为1%-10%,较佳地1.5%-5%,更佳地2%。

[0049] 在另一优选例中,步骤a1)中所述聚乙烯醇水溶液浓度为1%-10%,较佳地1.5%-5%,更佳地2%。

[0050] 在另一优选例中,步骤a1)中所述聚乙烯醇水溶液是将聚乙烯醇加入超纯水中,于85℃的水浴锅中搅拌2小时得到的。

[0051] 在另一优选例中,步骤a1)中所述NaHCO<sub>3</sub>水溶液浓度为0.1-100mol/L,较佳地0.1-10mol/L,更佳地1mol/L。

[0052] 在另一优选例中,步骤(a2)中,所述壳聚糖乙酸溶液与所述聚乙烯醇水溶液的体积比为4:1。

[0053] 在另一优选例中,步骤(a2)中,所述混合溶液的最终pH值为7。

[0054] 在另一优选例中,步骤(a2)中,冰浴搅拌的时间为30min。

[0055] 在另一优选例中,所述的磁性纳米粒子载体通过以下步骤制备:

[0056] b1) 将盐酸多巴胺与四氧化三铁磁性纳米粒子在缓冲溶液中反应,得到第一混合液;

[0057] b2) 用磁铁吸引第一混合液中的磁性纳米粒子,得到所述的磁性纳米粒子载体。

[0058] 在另一优选例中,b1)中的缓冲溶液为Tris-HCl缓冲液(10×10<sup>-3</sup>M,pH 8.5,500mL)。

[0059] 在另一优选例中,b1)中盐酸多巴胺与四氧化三铁磁性纳米粒子在室温下反应0.5-2h。

[0060] 在另一优选例中,b1)中盐酸多巴胺与四氧化三铁磁性纳米粒子的质量比为4-5:1。

[0061] 在另一优选例中,b2)所述磁性纳米粒子复合物载体为Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@PDA磁性纳米粒子。

[0062] 在另一优选例中,b1)之前还包括溶剂热法合成Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>磁性纳米粒子,具体步骤如下:

[0063] c1) 将FeCl<sub>3</sub>水合物,柠檬酸三钠和无水乙酸钠在乙二醇中搅拌溶解得到悬浊液;

[0064] c2) 将所述悬浊放入高压釜中,再放入马弗炉中加热反应,得到第一产物;

- [0065] c3)用磁铁收集第一产物,并用乙醇和水洗涤,得到 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 磁性纳米粒子。
- [0066] 在另一优选例中,c1)中 $\text{FeCl}_3$ 水合物,柠檬酸三钠和无水乙酸钠的质量比为2-2.5:1:5。
- [0067] 在另一优选例中,c1)所述的高压釜为聚四氟乙烯高压釜。
- [0068] 在另一优选例中,c2)中的加热反应温度为180-220℃。
- [0069] 在另一优选例中,c2)中的加热反应时间为8-12h。
- [0070] 在本发明的第三方面,提供了一种水凝胶组合物,包括:本发明第一方面所述的水凝胶体系,和药学上可接受的载体。
- [0071] 在另一优选例中,所述的水凝胶组合物还包括其他作为活性成分的水凝胶体系。
- [0072] 在另一优选例中,所述的水凝胶组合物在近红外光照射下可控释放出 $\text{NO}$ 。
- [0073] 在另一优选例中,所述的近红外光的波长为780-980nm。
- [0074] 在另一优选例中,所述的方法是非治疗性和非诊断性的。
- [0075] 在另一优选例中,所述的释放是在体外,对溶液中水凝胶体系进行光照,从而释放 $\text{NO}$ 。
- [0076] 在另一优选例中,照射方式为持续照射或间隔照射。
- [0077] 在另一优选例中,照射的光强为10-500毫瓦/平方厘米。
- [0078] 在本发明的第四方面,提供了一种第一方面所述的水凝胶体系的用途,即用于制备抗菌和/或促进伤口愈合的药物组合物。
- [0079] 在另一优选例中,所述的药物组合物用于和细菌一起孵育,从而抑制细菌生长和/或细菌增殖。
- [0080] 在另一优选例中,所述的水凝胶体系用近红外光照射,可释放 $\text{NO}$ 。
- [0081] 在另一优选例中,所述的水凝胶体系用于抗菌及促进伤口愈合。
- [0082] 在另一优选例中,所述细菌为革兰氏阳性的金黄色葡萄球菌。
- [0083] 在另一优选例中,所述细菌为革兰氏阴性的大肠杆菌。
- [0084] 在另一优选例中,所述的孵育条件为 $37 \pm 2^\circ\text{C}$  (较佳地 $37^\circ\text{C}$ ), $16 \pm 1$ 小时。
- [0085] 在本发明的第五方面,提供了一种制品,所述制品含有第一方面所述的近红外光控释放一氧化氮的磁性温敏性水凝胶体系,或由所述近红外光控释放一氧化氮的磁性温敏性水凝胶体系制成。
- [0086] 在另一优选例中,所述的制品为医疗产品、皮肤外用产品、化妆品。
- [0087] 在另一优选例中,所述的医疗产品包括伤口护理产品(如液态创可贴)。
- [0088] 应理解,在本发明范围内中,本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合,从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅,在此不再一一累述。

## 附图说明

[0089] 图1显示了近红外光控释放一氧化氮的磁性温敏性水凝胶体系结构示意图,显示了该体系以水凝胶为基体,基体中包含有纳米复合材料载体和与所述载体相链接(如共价连接)的金属亚硝酰 $\text{NO}$ 供体。

[0090] 图2显示了优选 $\{\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PDA}@\text{Ru}-\text{NO}\}$ 纳米粒子的透射电镜图及粒径分布,显示其粒

径为220-235纳米。

[0091] 图3显示了优选CS/PVA-NO水凝胶体系在不同温度下的照片及其透射电镜图,其中,

[0092] A为优选CS/PVA-NO溶胶的照片;

[0093] B为优选CS/PVA-NO水凝胶体系的照片;

[0094] C为优选CS/PVA-NO水凝胶体系的透射电镜图。

[0095] 图4显示了优选CS/PVA-NO水凝胶体系在超纯水中的近红外光照NO释放,其中,

[0096] A为近红外光持续照射时,水凝胶体系的NO释放效果。 $\{Fe_3O_4@PDA@Ru-NO\}$ 的质量分数:2%;光强:50-150毫瓦/平方厘米, $\lambda=808nm$ 。

[0097] B为近红外光持续照射时,水凝胶体系的NO释放效果。 $\{Fe_3O_4@PDA@Ru-NO\}$ 的质量分数:0.8-2%;光强:100毫瓦/平方厘米, $\lambda=808nm$ 。

[0098] 图5显示了优选CS/PVA-NO水凝胶体系的溶胀度随时间的变化曲线。

[0099] 图6显示了优选CS/PVA-NO水凝胶体系的抗菌性能测试结果图,其中,

[0100] A为革兰氏阳性的金黄色葡萄球菌与优选CS/PVA-NO水凝胶体系(I、II、III组)以及对照CS/PVA水凝胶(IV、V、VI组)共孵育,CS-PVA/NO水凝胶中 $\{Fe_3O_4@PDA@Ru-NO\}$ 的质量分数为2%。在黑暗下(III、VI组)和在808nm近红外光下(I、II、IV、V组)照射8分钟后的条件下的抗菌性能测试结果(光强:1瓦/平方厘米, $\lambda=808nm$ );

[0101] B为革兰氏阴性的大肠杆菌与优选CS/PVA-NO水凝胶体系(I、II、III组)以及对照CS/PVA水凝胶(IV、V、VI组)共孵育,CS-PVA/NO水凝胶中 $\{Fe_3O_4@PDA@Ru-NO\}$ 的质量分数为2%。在黑暗下(III、VI组)和在808nm近红外光下(I、II、IV、V组)照射8分钟后的条件下的抗菌性能测试结果(光强:1瓦/平方厘米, $\lambda=808nm$ )。

### 具体实施方式

[0102] 本发明人经过广泛而深入的研究,通过大量筛选和测试,首次制得了一种新型的近红外光可控释放一氧化氮的磁性温敏性水凝胶体系,所述水凝胶体系包括水凝胶基体、基体中的磁性纳米复合材料载体以及与所述载体相链接(如共价连接)的金属亚硝酰NO供体。本发明的水凝胶体系不仅可在近红外光照射下能够迅速可控释放NO分子,还可通过调节光照时间和光照强度来调节释放NO浓度;并可多次可控释放NO分子。此外,本发明的水凝胶体系还具有具有良好的生物兼容性和稳定性等优点以及可将红外治疗、磁疗以及抗菌治疗合三为一,从而获得协同治疗效果。在此基础上完成了本发明。

[0103] 术语

[0104] 如本文所用,“纳米粒子”、“纳米粒子载体”、“磁性纳米粒子”、“磁性纳米粒子载体”可互换使用,均指的是用于负载NO的纳米粒子材料。

[0105] “药学上可接受的载体”指的是:一种或多种相容性固体或液体填料,它们适合于人使用,而且必须有足够的纯度和足够低的毒性。“相容性”在此指的是组合物中各组份能和本发明的水凝胶体系以及它们之间相互掺和,而不明显降低活性成分的药效。

[0106] 如本文所用,术语“水凝胶体系”、“水凝胶组合物”、“本发明体系”、“近红外光控释放一氧化氮的磁性温敏性水凝胶体系”和“近红外光控释放一氧化氮的磁性温敏性水凝胶”可互换使用,均指以水凝胶为基体,以及基体中的纳米复合材料载体和与所述载体相链接

(如共价连接)的金属亚硝酰NO供体的组合物。

[0107] 如本文所用,术语“基体中的复合材料”、“基体中的纳米复合材料”、“纳米复合材料”可互换使用,均指基体中纳米粒子载体和与所述纳米粒子载体相链接(如共价连接)的金属亚硝酰NO供体的组合物。

[0108] 如本文所用,术语“基体中的复合材料载体”、“基体中的纳米复合材料载体”、“纳米粒子载体”和“纳米复合材料载体”可互换使用。适用于本发明的纳米粒子载体没有特别限制,可以是本领域常用的各种纳米粒子载体。代表性的例子包括但不限于:磁性纳米粒子、二氧化钛纳米粒子、碳量子点、上转换纳米粒子、石墨烯量子点、或其组合。

[0109] 典型地,纳米粒子载体的粒径为3-350nm,较佳地为150-250nm。

[0110] 一类优选的纳米粒子载体为表面多巴胺修饰的载体。

[0111] 金属亚硝酰NO供体

[0112] 适用于本发明的外源NO供体是金属亚硝酰化合物,例如采用金属钪亚硝酰化合物或金属锰亚硝酰化合物。

[0113] 在本发明中,纳米粒子载体与外源NO供体的重量比为1-2.5:1。

[0114] 水凝胶体系

[0115] 本发明的水凝胶体系均指以水凝胶为基体,以及基体中的纳米复合材料载体和与所述载体相链接(如共价连接)的金属亚硝酰NO供体的水凝胶。

[0116] 一种简化的水凝胶体系的示意图如图1所示。

[0117] 磁性纳米粒子和磁性水凝胶

[0118] 磁性纳米粒子是一种生物相容性良好的纳米材料,因其具有较大比表面积、较小粒径、无毒、可进行磁性回收等特点,广泛应用于抗菌复合体系的制备当中。

[0119] 磁性水凝胶是由磁性纳米材料和水凝胶复合而成的一种具有无机/有机杂化结构的复合材料,同时具备磁性材料和水凝胶的性质特点,具有优良的生物相容性和磁学性能,可以实现磁响应、磁靶向及磁热疗等功能,作为新一代的药物载体在药物控制释放、抗菌、抗癌等领域具有广阔的应用前景。

[0120] 制备方法

[0121] 本发明还提供了本发明所述水凝胶体系的制备方法,通常包括以下步骤:

[0122] (a) 提供温敏性水凝胶基体材料和磁性纳米粒子,其中所述的磁性纳米粒子上负载有外源的NO供体,所述的NO供体在近红外光照射下,以可控方式释放一氧化氮;和

[0123] (b) 将所述温敏性水凝胶基体材料、磁性纳米粒子和水进行混合,从而形成权利要求1所述的近红外光控释放一氧化氮的磁性温敏性水凝胶体系。

[0124] 在另一优选例中,步骤(b)在室温下进行。

[0125] 在另一优选例中,所述方法还包括:

[0126] (c) 将步骤(b)的磁性温敏性水凝胶体系置于第一相变温度下,从而使得液态(或溶胶状态)的水凝胶体系转变为凝胶状态的磁性温敏性水凝胶体系。

[0127] 在另一优选例中,所述的第一相变温度为30-40℃。

[0128] 在另一优选例中,所述方法包括:

[0129] (1) 提供壳聚糖-聚乙烯醇溶胶、纳米粒子载体和外源NO供体;

[0130] (2) 在溶剂存在下,将所述外源NO供体共价负载于所述纳米粒子载体,形成纳米复



合材料；

[0131] (3) 将上述纳米复合材料均匀分散于壳聚糖-聚乙烯醇溶胶中,搅拌脱气形成第一混合物

[0132] (4) 将第一混合物于凝胶温度下放置一段时间,从而形成如权利要求1所述的水凝胶体系。

[0133] 在另一优选例中,步骤(1)中所述的纳米粒子载体为 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @PDA复合材料。

[0134] 在另一优选例中,步骤(1)中所述的外源NO供体是金属钌亚硝酰化合物( $\text{Ru-NO}$ )

[0135] 在另一优选例中,所述步骤(2)中,将所述的外源NO供体与表面多巴胺修饰的纳米粒子载体进行酰胺化反应,从而制得所述的纳米复合材料。

[0136] 在另一优选例中,所述步骤(2)中,所述基体中的纳米复合材料载体与所述外源NO供体的重量比为1-2.5:1,更佳地1:1。

[0137] 在另一优选例中,所述的步骤(2)在偶联剂存在下进行。

[0138] 在另一优选例中,步骤(2)所述的溶剂是N,N-二甲基甲酰胺(DMF)溶剂。

[0139] 在另一优选例中,所述的偶联剂选自下组:EDC/NHS,其中EDC为1-乙基-3-[3-二甲氨基基丙基]碳化二亚胺盐酸化物,NHS为N-羟基琥珀酰亚胺。

[0140] 在另一优选例中,步骤(2)中形成的纳米粒子复合材料为 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @PDA@Ru-NO复合材料

[0141] 在另一优选例中,所述步骤(3)中的均匀分散使用的是超声分散。

[0142] 在另一优选例中,所述步骤(3)中的搅拌时间为1小时。

[0143] 在另一优选例中,所述步骤(4)中,所述水凝胶体系的凝胶温度为 $37^\circ\text{C}$ 。

[0144] 在另一优选例中,所述步骤(4)中,所述水凝胶体系的凝胶时间为3min。

[0145] 在另一优选例中,所述步骤(4)中,所述基体中的纳米复合材料与所述壳聚糖-聚乙烯醇溶胶的重量比为0.008-0.02:1。

[0146] 本发明的主要优点包括:

[0147] (1) 本发明的水凝胶体系可在合适地温度(如约 $37^\circ\text{C}$ 的人体温度),快速(约2-3分钟)迅速成型。

[0148] (2) 本发明的水凝胶体系,可在近红外光照射下能够迅速释放NO分子,并可通过调节光照时间和光照强度来调节释放NO浓度。

[0149] (3) 在近红外光照射下,本发明的水凝胶体系对病原体(如细菌,例如革兰氏阳性的金黄色葡萄球菌与革兰氏阴性的大肠杆菌)具有明显的抗菌作用。

[0150] (4) 本发明的水凝胶体系具有良好的生物兼容性和稳定性,并且磁性纳米粒子均匀分散于溶胶状态或凝胶状态的水凝胶体系中。

[0151] (5) 本发明的水凝胶体系可多次释放NO分子。在本发明中,在首次近红外光之后,可间隔一定时间再次进行或多次进行近红外光照射,从而再次或多次以可控方式释放NO分子,免除频繁换抗菌药物的麻烦。

[0152] (6) 本发明的水凝胶体系首次将红外治疗、磁疗以及抗菌治疗合三为一,从而获得协同治疗效果。采用本发明近红外光可控释放一氧化氮的磁性温敏性水凝胶体系制备的制品(如医疗产品或护理产品),通过施用在皮肤表面,快速形成水凝胶,并红外治疗(尤其是800-820nm近红外线)时,可以进一步获得可控的NO释放以及相应的抗菌效果,配合磁疗时,

可协同地获得红外光热治疗、磁疗以及抗菌治疗的综合效应。

[0153] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明,否则百分比和份数是重量百分比和重量份数。

[0154] 除非另行定义,文中所使用的所有专业与科学用语与本领域熟练人员所熟悉的意义相同。此外,任何与所记载内容相似或均等的方法及材料皆可应用于本发明方法中。文中所述的较佳实施方法与材料仅作示范之用。

[0155] 实施例1

[0156] 纳米复合材料 {Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@PDA@Ru-NO} 的合成

[0157] (1) {Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@PDA} 的合成

[0158] 使用溶剂热法合成Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>纳米粒子。将FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O (0.54g),柠檬酸三钠(0.24g)和无水乙酸钠(1.2g)溶解在乙二醇(20mL)中。磁力搅拌半小时得到均匀分散的悬浊液,转移到聚四氟乙烯高压釜中,将高压釜放入马弗炉中,设置温度为200℃,反应时间为10h。将所获得的产物用磁铁收集,并用乙醇和水洗涤三次,得到Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>纳米粒子。将Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(25mg)分散在Tris-HCl缓冲液(10×10<sup>-3</sup>M,pH 8.5,500mL)中,加入盐酸多巴胺(125mg),将混合液在室温下连续搅拌反应1h后,用磁铁收集产物并用去离子水洗涤数次,冷冻干燥后得到Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@PDA纳米粒子。

[0159] (2) 金属钌亚硝酰化合物(Ru-NO)的合成:

[0160] (tpy<sup>COOH</sup>为4'-甲酸-2,2':6',2''-三联吡啶;MDAB为3,4-二氨基苯甲酸甲酯):

[0161] 向100mL的三口烧瓶中加入Ru(tpy<sup>COOH</sup>)Cl<sub>3</sub>(150mg,0.31mmol)、MDAB(55mg,0.33mmol)、LiCl(5mg,2.0mmol)和Et<sub>3</sub>N 0.4mL,加入40mL的EtOH/H<sub>2</sub>O(3:1,v/v),在N<sub>2</sub>氛围中回流8小时,趁热抽滤,得到的深红色滤液浓缩到几毫升,待冷却到室温后,加入过量的饱和NH<sub>4</sub>PF<sub>6</sub>溶液,将此混合物放置在5℃的冰箱中过夜。过滤出红棕色沉淀,用H<sub>2</sub>O和Et<sub>2</sub>O分别洗涤三次,真空干燥。得到产物Ru-Cl 137mg,产率为61%。

[0162] 将Ru-Cl(100mg,0.14mmol)和过量的AgNO<sub>3</sub>(238mg,1.4mmol)加入到100mL的圆底烧瓶中,加入30mL CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O(1:1,v/v),加热回流2小时,溶液颜色由红色逐渐变成紫色,将此混合物冷却到室温,过滤出灰白色的AgCl,向滤液中加入过量的NaNO<sub>2</sub>(69mg,1mmol),加热回流6小时,待溶液冷却至室温,将溶液浓缩到几毫升,加入过量的饱和NH<sub>4</sub>PF<sub>6</sub>溶液,将此混合物放置在5℃的冰箱中过夜。过滤出红棕色沉淀,用H<sub>2</sub>O和Et<sub>2</sub>O分别洗涤三次,真空干燥。得到产物Ru-NO<sub>2</sub> 77.7mg,产率为75%。

[0163] 在273K温度下,将Ru-NO<sub>2</sub>(100mg,0.14mmol)加入到25mL的圆底烧瓶中,然后逐滴滴加2mL HNO<sub>3</sub>(2mol·L<sup>-1</sup>)于上述固体中,搅拌30分钟后,加入过量的饱和NH<sub>4</sub>PF<sub>6</sub>溶液,将此混合物放置在5℃的冰箱中过夜。过滤出红棕色沉淀,用H<sub>2</sub>O和Et<sub>2</sub>O分别洗涤三次,真空干燥。得到产物Ru-NO 55.7mg,产率为55%。

[0164] (3) {Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@PDA@Ru-NO} 的合成

[0165] 将Ru-NO(100mg)溶于2mL DMF中,加入EDC/NHS后室温活化40min。然后加入上述制得的Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@PDA(100mg),室温下搅拌48h。反应后,用磁铁收集Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@PDA@Ru-NO产物并用乙醇和去离子水洗涤数次。最后,通过冷冻干燥得到产物Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@PDA@Ru-NO。

[0166] 本实施例的 {Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@PDA@Ru-NO} 纳米粒子的透射电镜图及粒径分布如图2所示,显示其粒径为220-235纳米。

[0167] 实施例2水凝胶体系CS/PVA-NO的合成

[0168] (1) 壳聚糖-聚乙烯醇溶胶制备

[0169] 将壳聚糖加入的0.1mol/L的乙酸溶液中,室温条件下搅拌4小时,得到质量浓度为2%的壳聚糖乙酸溶液。将聚乙烯醇加入超纯水中,于85℃的水浴锅中搅拌2小时得到浓度为2%的聚乙烯醇溶液。称取1.68g NaHCO<sub>3</sub>固体,加入20mL超纯水溶解,配成浓度为1mol/L的NaHCO<sub>3</sub>水溶液。取40mL壳聚糖乙酸溶液与10mL聚乙烯醇溶液混合,冰浴条件下搅拌30min,逐滴加入NaHCO<sub>3</sub>水溶液调节溶液的pH为7.0,得到壳聚糖-聚乙烯醇溶胶。

[0170] (2) CS/PVA-NO水凝胶体系制备

[0171] 称取2mg的 {Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@PDA@Ru-NO} 纳米粒子超声分散于少量超纯水中,再加入到98mg壳聚糖-聚乙烯醇溶胶中,搅拌1h后进行脱气处理,得到CS/PVA-NO溶胶,然后置于37℃的恒温水浴锅中3min,最终得到CS/PVA-NO水凝胶体系({Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@PDA@Ru-NO}的质量分数:2%)。

[0172] 本实施例的CS/PVA-NO溶胶的照片如图3A所示,而在37℃下3min快速成型的CS/PVA-NO水凝胶体系的照片及其透射电镜图分布如图3中B与C所示。

[0173] 实施例3 CS/PVA-NO水凝胶体系持续光照释放NO

[0174] 3.1方法

[0175] 将上述方法制备的CS/PVA-NO水凝胶体系({Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@PDA@Ru-NO}的质量分数:2%)切成长度为3cm,厚度为3mm,宽度为1cm的形状,贴壁放入盛有2mL超纯水的比色皿中,通过波长为808nm,强度分别为50,100,150毫瓦/平方厘米的近红外激光照射水凝胶,引发NO释放。使用NO敏感电极测量不同光强照射下,水凝胶体系释放的NO量。

[0176] 3.2结果

[0177] 图4中A显示,用50毫瓦/平方厘米持续近红外光照射质量分数为2%的水凝胶体系,可获得280纳摩尔/升的一氧化氮溶液;用100毫瓦/平方厘米持续近红外光照射质量分数为2%的水凝胶体系,可获得370纳摩尔/升的一氧化氮溶液;用150毫瓦/平方厘米持续近红外光照射质量分数为2%的水凝胶体系,可获得510纳摩尔/升的一氧化氮溶液。这表明,用同样波长的近红外光照射本发明的同一质量分数水凝胶体系时,光强越强,水凝胶体系释放的一氧化氮越多。

[0178] 实施例4 CS/PVA-NO水凝胶体系持续光照释放NO

[0179] 4.1方法

[0180] 将上述方法制备的CS/PVA-NO水凝胶体系({Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@PDA@Ru-NO}的质量分数分别为:0.8%、1.2%、2%)切成长度为3cm,厚度为3mm,宽度为1cm的形状,贴壁放入盛有2mL超纯水的比色皿中,用波长808nm,强度为100毫瓦/平方厘米的近红外激光照射水凝胶,引发NO释放。使用NO敏感电极测量释放的NO量。

[0181] 4.2结果

[0182] 图4中B显示,用波长808nm,强度为100毫瓦/平方厘米的近红外激光照射 {Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@PDA@Ru-NO} 的质量分数为0.8%水凝胶体系时,可获得140纳摩尔/升的一氧化氮溶液;用波长808nm,强度为100毫瓦/平方厘米的近红外激光照射 {Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@PDA@Ru-NO} 的质量分数为1.2%水凝胶体系时,可获得260纳摩尔/升的一氧化氮溶液;用波长808nm,强度为100毫瓦/

平方厘米的近红外激光照射 {Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@PDA@Ru-NO} 的质量分数为2%水凝胶体系时,可获得370纳摩尔/升的一氧化氮溶液。这表明,用同样波长同样强度的近红外光照射 {Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@PDA@Ru-NO} 质量分数不同的水凝胶体系时,水凝胶中 {Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@PDA@Ru-NO} 质量分数越高,释放的一氧化氮越多。

[0183] 实施例5 CS/PVA-NO水凝胶体系溶胀度测试

[0184] 方法

[0185] 准确称取1.50g干燥的CS-PVA/NO水凝胶,浸泡于100mL超纯水中,室温下放置一定的时间后取出,用滤纸擦干,称量此时的水凝胶质量;再次浸入水中,重复以上步骤,直至水凝胶的质量不在变化,即达到溶胀平衡状态。按公式:  $SR = [(W_1 - W_2) / W_2] \times 100\%$  计算溶胀度,其中SR为凝胶的溶胀度, W<sub>1</sub>为湿凝胶的质量, W<sub>2</sub>为干凝胶的质量。

[0186] 结果

[0187] 如图5中所示,CS-PVA/NO水凝胶体系的溶胀度随时间的变化而变化,前60min内水凝胶的溶胀度增长速度很快,10h后,溶胀度基本不再变化,且测得CS-PVA/NO水凝胶体系的平衡溶胀度为1050。CS-PVA/NO水凝胶体系的溶胀的实验结果表明,本发明的CS-PVA/NO水凝胶体系具有优良的溶胀性能。

[0188] 实施例6 {CS/PVA-NO} 水凝胶体系的抗菌性能测试

[0189] 方法

[0190] 将熔化的固体培养基倒入细菌培养皿中并均匀铺平,接入大肠杆菌和金黄色葡萄球菌,用涂布棒涂匀并挖孔,细菌浓度均为1x10<sup>8</sup> CFU/mL。吸取CS-PVA溶胶300μL,CS-PVA/NO溶胶300μL于孔中,放入37℃的恒温培养箱5min至孔内的溶胶转化为凝胶,CS-PVA/NO水凝胶中 {Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@PDA@Ru-NO} 的质量分数为2%。对于需要光照的样品采用功率密度为1.0W cm<sup>-2</sup>的808nm激光照射水凝胶8分钟。将培养基置于37℃恒温箱培养16h后取出,水凝胶的抗菌性能即可由抑菌圈的大小来决定。毒性测试如图6中所示。在图6中,A为水凝胶对金黄色葡萄球菌的测试结果,而B为大肠杆菌的测试结果,第I、II、III组加入的是CS-PVA/NO水凝胶,第IV、V、VI组是对照CS-PVA水凝胶,其中第I、II、IV、V组为光照组,而第III、VI组为黑暗组。

[0191] 结果:

[0192] 黑暗组的抑菌圈(III和VI)大小均未出现变化,说明在黑暗条件下水凝胶体系对于大肠杆菌和金黄色葡萄球菌都没有明显抑制作用。

[0193] 与添加了对照CS-PVA水凝胶的光照组的抑菌圈(IV和V)相比,CS-PVA/NO水凝胶光照组的抑菌圈(I和II)明显变大,说明CS-PVA/NO水凝胶在近红外光照下对于大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的具有明显的抗菌性能,这表明,光照引发了本发明的CS-PVA/NO水凝胶内NO的释放,从而抑制细菌的生长。

[0194] 讨论

[0195] 一氧化氮(NO)是一种重要的内源性生物小分子,它参与调控免疫及炎症反应、神经传导、细胞凋亡等多种生理过程。NO的治疗作用和生物安全性在很大程度上取决于其递送部位的浓度,高浓度的NO可以显著抑制细菌的生长,而低浓度的NO则可以促进血管舒张、伤口愈合等。抗生素与基于银的抗菌剂虽是广为应用的抗菌敷料,但由于细菌生物膜引起的细菌耐药性和对宿主细胞的毒性,它们的进一步应用受到了限制。气态的NO小分子可以

穿透细菌生物膜中的基质,这使其比抗生素和基于银的抗菌剂更具优势。然而,NO作为一种双原子自由基,它的半衰期非常短且在生物环境中化学性质不稳定,因此大大限制了它在临床应用中的治疗效果。所以,研发人员希望开发一种可响应外界刺激、在指定位置释放出适合剂量的NO的释放体系,从而用于NO介导的治疗。

[0196] 目前,已有一些可释放NO的水凝胶,但是其采用的NO供体分别为亚硝基谷胱甘肽(GSNO)、微囊化的亚硝酸盐以及通过加压反应负载的NO,这些水凝胶体系均不能通过外界刺激可控释放NO,并且也无法多次地可控释放NO。

[0197] 本发明将光热疗法的红外线与抗菌、磁疗和温敏水凝胶等合而为一,采用红外光来单次或多次地可控释放NO。光刺激作为一种易调控且非入侵的手段受到了更多的青睐,而其中近红外(NIR)光具有比短波光更高的组织穿透性和较低的光毒性。本发明的温敏水凝胶可采用特定波长的近红外光(尤其是约808nm近红外光),可获得更佳的治疗效果,并避免近红外光对水造成的过热效应(与常用的980nm近红外光相比,808nm近红外光的水的过热效应最小)。

[0198] (1) 本发明的水凝胶体系可在合适的温度(如约37℃的人体温度),快速(约2-3分钟)迅速成型。

[0199] (2) 本发明的水凝胶体系,可在近红外光照射下能够迅速释放NO分子,并可通过调节光照时间和光照强度来调节释放NO浓度。

[0200] (3) 在近红外光照射下,本发明的水凝胶体系对病原体(如细菌,例如革兰氏阳性的金黄色葡萄球菌与革兰氏阴性的大肠杆菌)具有明显的抗菌作用。

[0201] (4) 本发明的水凝胶体系具有良好的生物兼容性和稳定性,并且磁性纳米粒子均匀分散于溶胶状态或凝胶状态的水凝胶体系中。

[0202] (5) 本发明的水凝胶体系可多次释放NO分子。在本发明中,在首次近红外光之后,可间隔一定时间再次进行或多次进行近红外光照射,从而再次或多次以可控方式释放NO分子,免除频繁换抗菌药物的麻烦。

[0203] (6) 本发明的水凝胶体系首次将红外光热治疗、磁疗以及抗菌治疗合三为一,从而获得协同治疗效果。采用本发明近红外光可控释放一氧化氮的磁性温敏性水凝胶体系制备的制品(如医疗产品或护理产品),通过施用在皮肤表面,快速形成水凝胶,并经红外光治疗(尤其是800-820nm近红外线)时,可以进一步获得可控的NO释放以及相应的抗菌效果,配合磁疗时,可协同地获得红外光热治疗、磁疗以及抗菌治疗的综合效应。

[0204] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考,就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解,在阅读了本发明的上述讲授内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

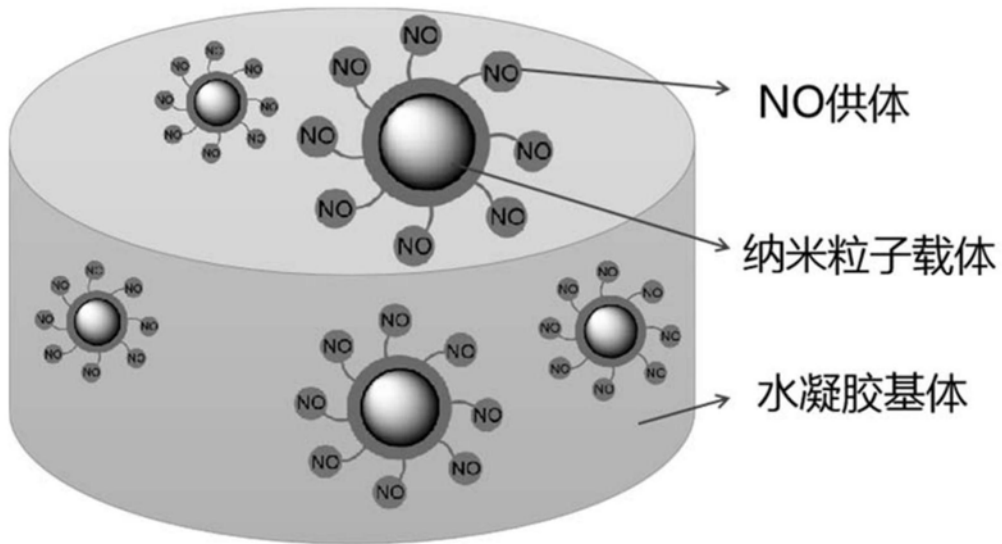


图1

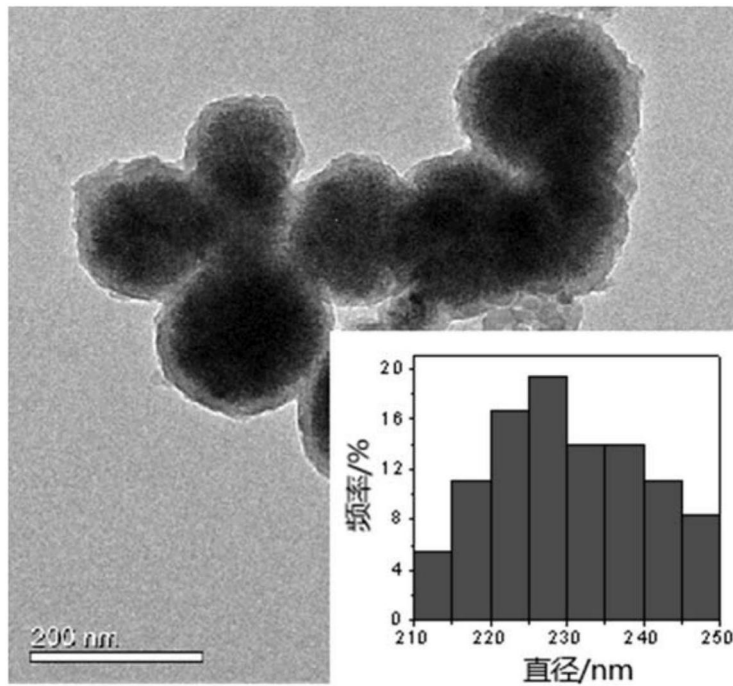


图2

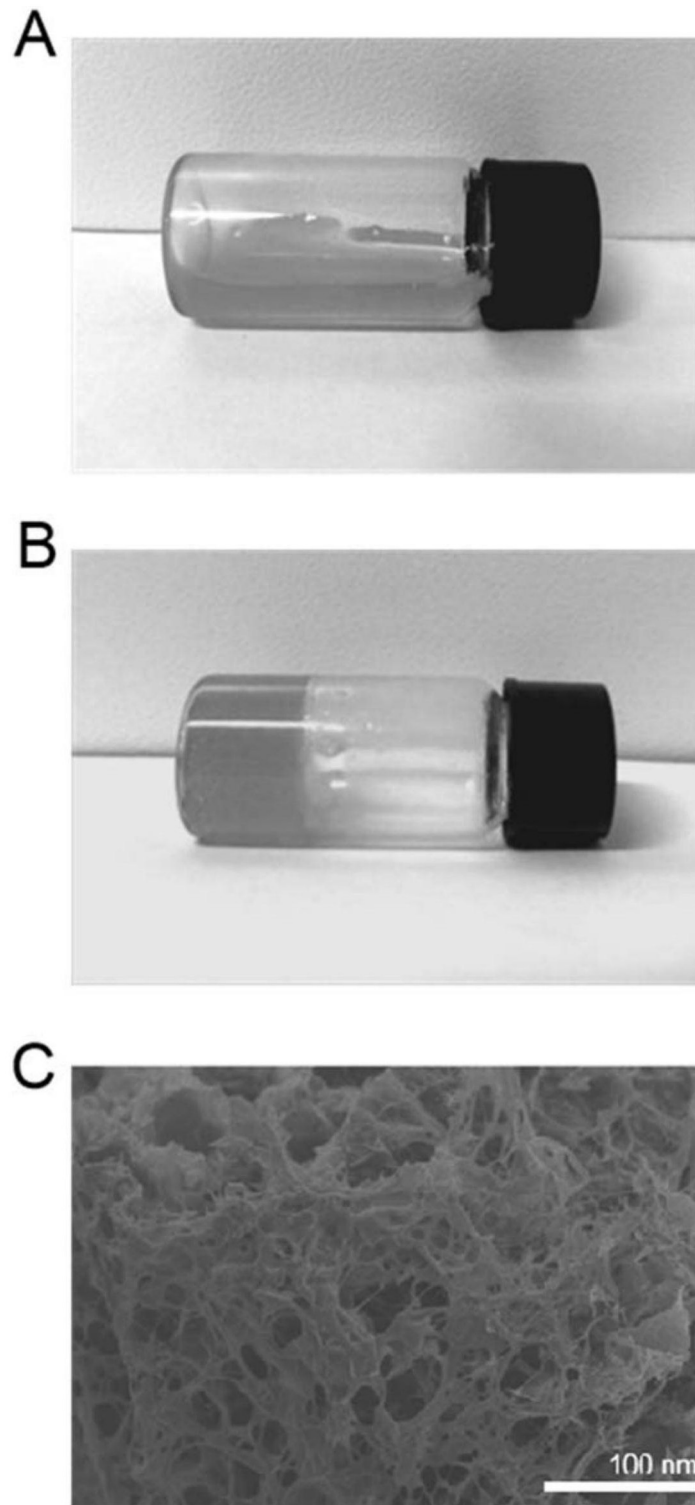


图3

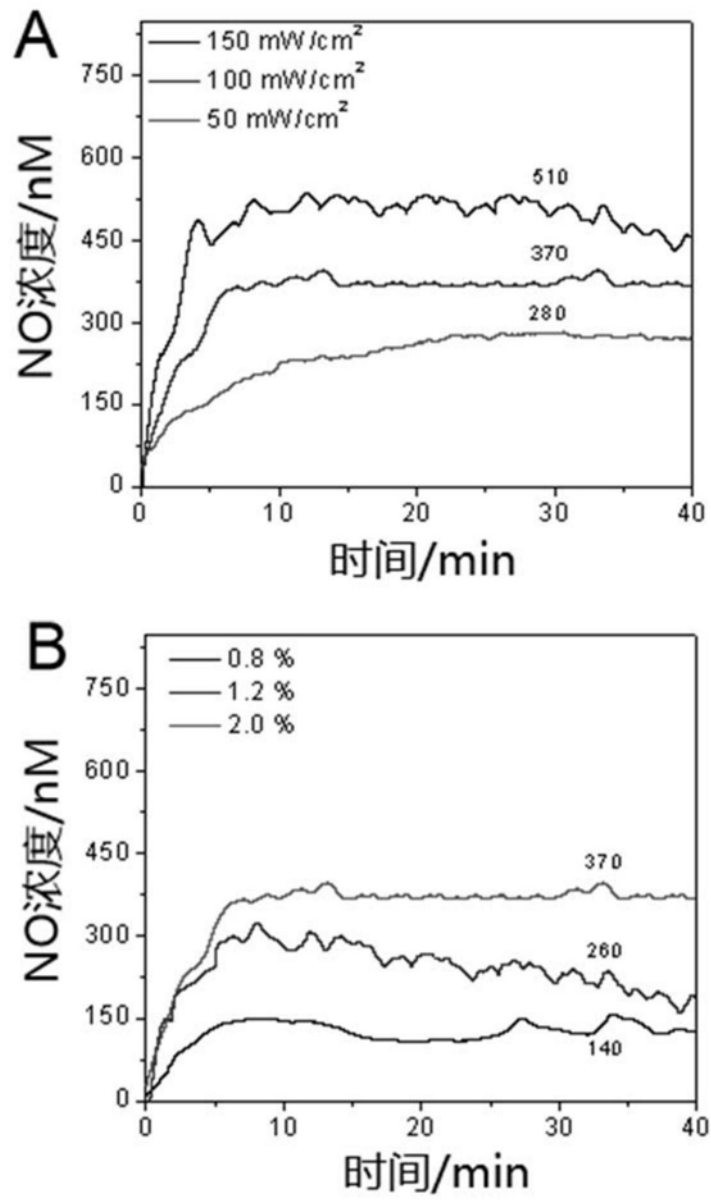


图4



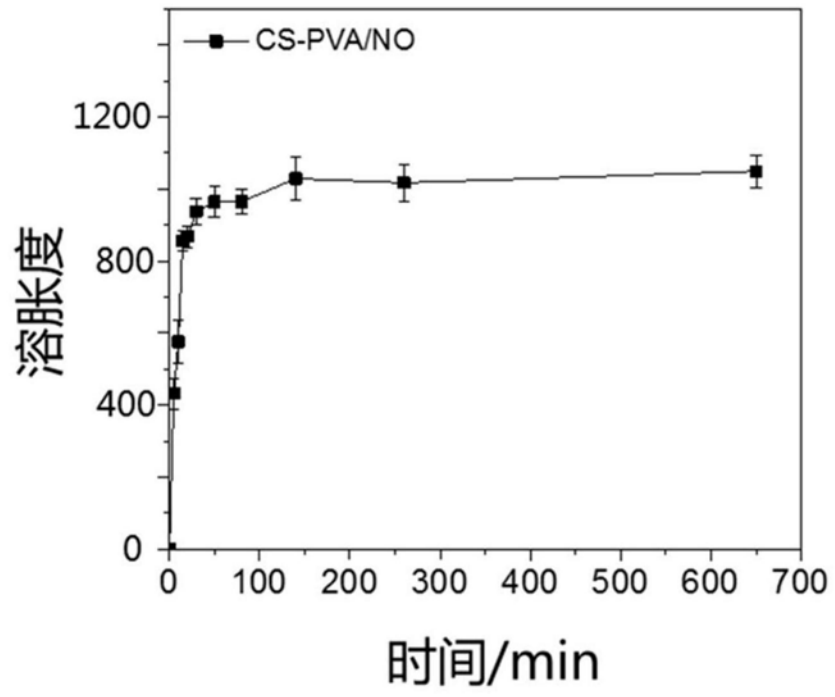


图5

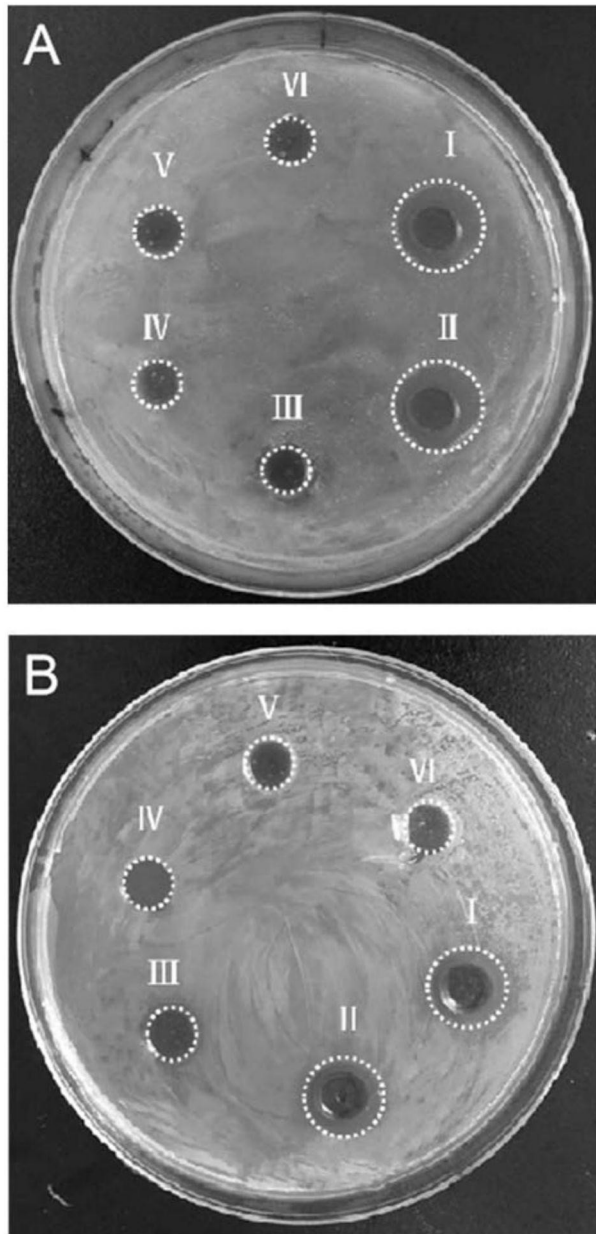


图6