



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114958008 A

(43) 申请公布日 2022.08.30

(21) 申请号 202210667676.0

(22) 申请日 2022.06.14

(71) 申请人 中国科学院长春应用化学研究所  
地址 130022 吉林省长春市人民大街5625号

(72) 发明人 丁建勋 李若桃 许维国 栾嘉懿  
刘彬 陈学思

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227  
专利代理师 张雪娇

(51) Int. Cl.

C08L 87/00 (2006.01)

C08J 3/075 (2006.01)

C08G 81/00 (2006.01)

A61L 26/00 (2006.01)

权利要求书1页 说明书8页 附图4页

(54) 发明名称

一种活性氧响应的聚氨基酸键合糖胺聚糖水凝胶、其制备方法及应用

(57) 摘要

本发明提供了一种活性氧响应的聚氨基酸键合糖胺聚糖水凝胶,由嵌段共聚物与糖胺聚糖醛基化衍生物形成;所述嵌段共聚物包括聚乙二醇嵌段与聚氨基酸嵌段;所述聚氨基酸嵌段包括含有氨基的侧链与含有硫醚基团的侧链。与现有技术相比,本发明提供的聚氨基酸键合糖胺聚糖水凝胶的侧链含有硫醚基团,可被活性氧氧化成为亚砷或砷基团,继而减少活性氧的局部含量,使水凝胶具有活性氧响应作用;同时水凝胶中的糖胺聚糖可通过正负电荷作用吸附特定的趋化因子,从而使本发明提供的聚氨基酸键合糖胺聚糖水凝胶具有主动消除过度炎症反应的功能,进而可解决慢性创面持续炎症状态、药物耐受、难以愈合等诸多问题。

1. 一种活性氧响应的聚氨基酸键合糖胺聚糖水凝胶,其特征在于,由嵌段共聚物与糖胺聚糖醛基化衍生物形成;

所述嵌段共聚物包括聚乙二醇嵌段和/或多臂聚乙二醇嵌段与聚氨基酸嵌段;

所述聚氨基酸嵌段包括含有氨基的侧链与含有硫醚基团的侧链。

2. 根据权利要求1所述的聚氨基酸键合糖胺聚糖水凝胶,其特征在于,所述糖胺聚糖醛基化衍生物的醛基与聚氨基酸嵌段中氨基的摩尔比为1:3~3:1。

3. 根据权利要求1所述的聚氨基酸键合糖胺聚糖水凝胶,其特征在于,所述聚氨基酸嵌段的聚合度为15~200;所述聚乙二醇嵌段的分子量为300~50000Da;所述多臂聚乙二醇嵌段中每个臂的分子量为300~50000Da。

4. 根据权利要求1所述的聚氨基酸键合糖胺聚糖水凝胶,其特征在于,所述糖胺聚糖醛基化衍生物选自肝素、肝素衍生物、硫酸化葡聚糖、硫酸化葡聚糖衍生物、硫酸化透明质酸、硫酸化透明质酸衍生物、透明质酸、透明质酸衍生物、硫酸软骨素与硫酸软骨素衍生物中的一种或多种的醛基化衍生物。

5. 根据权利要求1所述的聚氨基酸键合糖胺聚糖水凝胶,其特征在于,所述聚氨基酸嵌段选自聚半胱氨酸嵌段、聚赖氨酸嵌段、聚天冬酰胺、聚谷氨酰胺与聚精氨酸中的一种或多种与聚甲硫氨酸。

6. 根据权利要求5所述的聚氨基酸键合糖胺聚糖水凝胶,其特征在于,所述聚氨基酸嵌段中聚甲硫氨酸的摩尔数为聚氨基酸嵌段摩尔数的60%~90%。

7. 一种活性氧响应的聚氨基酸键合糖胺聚糖水凝胶的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

将嵌段共聚物与糖胺聚糖醛基化衍生物在溶剂中混合后,静置,得到活性氧响应的聚氨基酸键合糖胺聚糖水凝胶;

所述嵌段共聚物包括聚乙二醇嵌段和/或多臂聚乙二醇嵌段与聚氨基酸嵌段;

所述聚氨基酸嵌段包括含有氨基的侧链与含有硫醚基团的侧链。

8. 根据权利要求7所述的制备方法,其特征在于,所述糖胺聚糖醛基化衍生物按照以下方法制备:

在避光的条件下,将糖胺聚糖与高碘酸盐在水中混合,反应,透析后得到糖胺聚糖醛基化衍生物。

9. 根据权利要求7所述的制备方法,其特征在于,所述嵌段共聚物按照以下方法制备:

将端氨基化的聚乙二醇和/或端氨基化的多臂聚乙二醇与包含硫醚基团侧链的氨基酸N-羧基环内酸酐反应后,再与侧链氨基被保护的氨基酸N-羧基环内酸酐反应,脱保护后,得到嵌段共聚物。

10. 一种敷料,其特征在于,包括权利要求1~6任意一项所述的活性氧响应的聚氨基酸键合糖胺聚糖水凝胶或权利要求7~9任意一项制备方法所制备的活性氧响应的聚氨基酸键合糖胺聚糖水凝胶。

## 一种活性氧响应的聚氨基酸键合糖胺聚糖水凝胶、其制备方法及应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于医用敷料技术领域,尤其涉及一种活性氧响应的聚氨基酸键合糖胺聚糖水凝胶、其制备方法及应用。

### 背景技术

[0002] 创面是由于外界致伤因子如外科手术、外力、热、低温、电流、化学物质及机体内在因素如局部血液供应障碍等作用导致人体组织或器官的损伤,其愈合过程包括了凝血期、炎症期、细胞增生期和新生组织重塑期四个阶段。创面的愈合速度受到创面类型、病理学条件和敷料类型等多方面的因素影响。随着科学技术的不断研究,创面敷料不但具有保护创面、止血、防止感染等作用,更具有促进创面愈合的功能。

[0003] 目前使用的创面敷料主要有传统敷料、天然合成敷料和人工合成敷料等。目前临床使用最广的传统敷料有纱布、棉垫和绷带等,它们具有成本低廉、制作工艺简单的优点,但是其无法保持创面湿润,肉芽组织易长入纱布的网眼中,敷料渗透时易导致外源性感染等缺点使其应用受到很大的局限性。天然合成敷料是通过天然材料加工提取成型而得到的,主要有动物皮类敷料、胶原类敷料和藻酸盐类敷料,尽管这类敷料具有一定的优异作用,但是由于动物皮类敷料难以解决排斥反应、血运重建和抗菌性能差,胶原类敷料吸收渗液能力差,不适用于渗出性和感染性创面,藻酸盐类敷料需辅助固定,不适用于干燥或有硬痂的创面,这些缺点大大限制了它们的临床应用。人工合成敷料主要有薄膜型敷料、泡沫型敷料、水凝胶型敷料和水胶体型敷料,与天然材料相比,人工合成敷料能更好的控制材料的合成过程、改善材料的性能,使其更加有利于作为各种创面的敷料并起到抗菌等作用。

[0004] 创伤区的氧合作用是创面愈合的关键因素之一。在生物领域,活性氧是氧正常代谢的副产物,在细胞信号传递和平衡中具有重要作用。它包含过氧化物、超氧化物、羟基自由基、 $\alpha$ -氧等,超生理浓度的活性氧与蛋白质、脂质、核酸和碳水化合物发生非特异性反应,产生其他具有潜在毒性作用的活性产物。过低的氧含量与过多的活性氧对于创面愈合都是有害的。

[0005] 另外,趋化因子液也会影响创面的愈合。趋化因子是一类信号分子,其中一部分在炎症过程中选择性地募集和激活细胞。在伤口愈合过程中,组织特异性细胞和常驻免疫细胞在损伤部位释放趋化因子,建立趋化梯度,促进血液来源的免疫细胞的侵袭,这对于急性伤口的初始炎症阶段至关重要。在慢性伤口中,愈合过程通常在不受限制的炎症反应中陷入僵局,持续的趋化梯度会促进免疫细胞进一步侵入伤口组织,从而使慢性炎症的恶性循环持续存在。

### 发明内容

[0006] 有鉴于此,本发明要解决的技术问题在于提供一种具有主动消除过度炎症反应的功能的活性氧响应的聚氨基酸键合糖胺聚糖水凝胶、其制备方法及应用。

[0007] 本发明提供了一种活性氧响应的聚氨基酸键合糖胺聚糖水凝胶,由嵌段共聚物与糖胺聚糖醛基化衍生物形成;

[0008] 所述嵌段共聚物包括聚乙二醇嵌段和/或多臂聚乙二醇嵌段与聚氨基酸嵌段;

[0009] 所述聚氨基酸嵌段包括含有氨基的侧链与含有硫醚基团的侧链。

[0010] 优选的,所述糖胺聚糖醛基化衍生物的醛基与聚氨基酸嵌段中氨基的摩尔比为1:3~3:1。

[0011] 优选的,所述聚氨基酸嵌段的聚合度为15~200;所述聚乙二醇嵌段的分子量为300~50000Da;所述多臂聚乙二醇嵌段中每个臂的分子量为300~50000Da。

[0012] 优选的,所述糖胺聚糖醛基化衍生物选自肝素、肝素衍生物、硫酸化葡聚糖、硫酸化葡聚糖衍生物、硫酸化透明质酸、硫酸化透明质酸衍生物、透明质酸、透明质酸衍生物、硫酸软骨素与硫酸软骨素衍生物中的一种或多种的醛基化衍生物。

[0013] 优选的,所述聚氨基酸嵌段选自聚半胱氨酸嵌段、聚赖氨酸嵌段、聚天冬酰胺、聚谷氨酰胺与聚精氨酸中的一种或多种与聚甲硫氨酸。

[0014] 优选的,所述聚氨基酸嵌段中聚甲硫氨酸的摩尔数为聚氨基酸嵌段摩尔数的60%~90%。

[0015] 本发明还提供了一种活性氧响应的聚氨基酸键合糖胺聚糖水凝胶的制备方法,包括以下步骤:

[0016] 将嵌段共聚物与糖胺聚糖醛基化衍生物在溶剂中混合后,静置,得到活性氧响应的聚氨基酸键合糖胺聚糖水凝胶;

[0017] 所述嵌段共聚物包括聚乙二醇嵌段和/或多臂聚乙二醇嵌段与聚氨基酸嵌段;

[0018] 所述聚氨基酸嵌段包括含有氨基的侧链与含有硫醚基团的侧链。

[0019] 优选的,所述糖胺聚糖醛基化衍生物按照以下方法制备:

[0020] 在避光的条件下,将糖胺聚糖与高碘酸盐在水中混合,反应,透析后得到糖胺聚糖醛基化衍生物。

[0021] 优选的,所述嵌段共聚物按照以下方法制备:

[0022] 将端氨基化的聚乙二醇和/或端氨基化的多臂聚乙二醇与包含硫醚基团侧链的氨基酸N-羧基环内酸酐反应后,再与侧链氨基被保护的氨基酸N-羧基环内酸酐反应,脱保护后,得到嵌段共聚物。

[0023] 本发明还提供了一种敷料,包括上述活性氧响应的聚氨基酸键合糖胺聚糖水凝胶。

[0024] 本发明提供了一种活性氧响应的聚氨基酸键合糖胺聚糖水凝胶,由嵌段共聚物与糖胺聚糖醛基化衍生物形成;所述嵌段共聚物包括聚乙二醇嵌段和/或端氨基化的多臂聚乙二醇与聚氨基酸嵌段;所述聚氨基酸嵌段包括含有氨基的侧链与含有硫醚基团的侧链。与现有技术相比,本发明提供的聚氨基酸键合糖胺聚糖水凝胶的侧链含有硫醚基团,可被活性氧化成为亚砷或砷基团,继而减少活性氧的局部含量,使水凝胶具有活性氧响应作用;同时水凝胶中的糖胺聚糖可通过正负电荷作用吸附特定的趋化因子,从而使本发明提供的聚氨基酸键合糖胺聚糖水凝胶具有主动消除过度炎症反应的功能,进而可解决慢性创面持续炎症状态、药物耐受、难以愈合等诸多问题。

### 附图说明

[0025] 图1为本发明实施例1中 $m\text{PEG}_{2k}\text{-b-P}(\text{Met}_{25}\text{-b-Lys}_5)$ 脱保护前的产物及 $m\text{PEG}_{2k}\text{-b-P}(\text{Met}_{25}\text{-b-Lys}_5)$ 的核磁共振氢谱图；

[0026] 图2为本发明实施例1中得到的聚氨基酸/糖胺聚糖水凝胶的结构图；

[0027] 图3为本发明实施例1中得到的 $m\text{PEG}_{2k}\text{-b-P}(\text{Met}_{25}\text{-b-Lys}_5)$ 、醛基化糖胺聚糖及聚氨基酸/糖胺聚糖水凝胶的傅里叶红外光谱图；

[0028] 图4为本发明实施例1中得到的聚氨基酸-糖胺聚糖水凝胶的小鼠创面治疗的效果图；

[0029] 图5为本发明实施例中醛基化糖胺聚糖氧化度为18.52%时得到的聚氨基酸/糖胺聚糖水凝胶的模量检测结果图；

[0030] 图6为本发明实施例中醛基化糖胺聚糖氧化度为29.43%时得到的聚氨基酸/糖胺聚糖水凝胶的模量检测结果图；

[0031] 图7为本发明实施例中醛基化糖胺聚糖氧化度为45.79%时得到的聚氨基酸/糖胺聚糖水凝胶的模量检测结果图；

[0032] 图8为本发明实施例2中得到的嵌段共聚物脱保护前后的核磁共振氢谱图。

### 具体实施方式

[0033] 下面将结合本发明实施例,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0034] 本发明提供了一种活性氧响应的聚氨基酸键合糖胺聚糖水凝胶,由嵌段共聚物与糖胺聚糖醛基化衍生物形成;所述嵌段共聚物包括聚乙二醇嵌段和/或端氨基化的多臂聚乙二醇与聚氨基酸嵌段;所述聚氨基酸嵌段包括含有氨基的侧链与含有硫醚基团的侧链。

[0035] 按照本发明,所述嵌段共聚物包括聚乙二醇嵌段和/或多臂聚乙二醇嵌段与聚氨基酸嵌段;其中,所述聚乙二醇嵌段的分子量优选为300~50000Da,更优选为800~10000Da,再优选为800~5000Da,再优选为1000~4000Da,最优选为2000~3000Da;所述多臂聚乙二醇嵌段优选为两臂聚乙二醇嵌段、四臂聚乙二醇嵌段与八臂聚乙二醇嵌段中的一种或多种;所述多臂聚乙二醇嵌段中每个臂的分子量优选为300~50000Da,更优选为800~10000Da,再优选为800~5000Da,再优选为1000~4000Da,最优选为2000~3000Da。

[0036] 所述聚氨基酸嵌段的聚合度优选为15~200,更优选为20~150,再优选为20~100,再优选为20~80,再优选为20~60,最优选为30~40;所述聚氨基酸嵌段包括含有氨基的侧链与含有硫醚基团的侧链;所述含有硫醚基团的侧链的摩尔数优选为聚氨基酸嵌段摩尔数的60%~90%,更优选为70%~90%,再优选为80%~85%,最优选为83%~84%;在本发明中,优选的,所述聚氨基酸嵌段为聚半胱氨酸嵌段、聚赖氨酸嵌段、聚天冬酰胺、聚谷氨酰胺与聚精氨酸中的一种或多种与聚甲硫氨酸;所述聚氨基酸嵌段中聚甲硫氨酸的摩尔数优选为聚氨基酸嵌段摩尔数的60%~90%,更优选为70%~90%,再优选为80%~85%,最优选为83%~84%;所述聚氨基酸嵌段中氨基酸的构型可为L型也可为D型,并无特殊的限制。

[0037] 在本发明中,所述嵌段共聚物可为两嵌段共聚物也可为三嵌段共聚物,并无特殊的限制;当所述嵌段共聚物包含多臂聚乙二醇嵌段时,多臂聚乙二醇嵌段可其中的任意一个臂接枝聚氨基酸嵌段,也可两个或两个以上的臂接枝聚氨基酸嵌段,并无特殊的限制。

[0038] 本发明提供的水凝胶通过嵌段共聚物侧链上的氨基与糖胺聚糖醛基化衍生物中的醛基反应得到;所述糖胺聚糖醛基化衍生物的醛基与聚氨基酸嵌段中氨基的摩尔比优选为1:3~3:1,更优选为1:2~2:1;所述糖胺聚糖醛基化衍生物优选为肝素、肝素衍生物、硫酸化葡聚糖、硫酸化葡聚糖衍生物、硫酸化透明质酸、硫酸化透明质酸衍生物、透明质酸、透明质酸衍生物、硫酸软骨素与硫酸软骨素衍生物中的一种或多种的醛基化衍生物。

[0039] 本发明提供的聚氨基酸键合糖胺聚糖水凝胶的侧链含有硫醚基团,可被活性氧化成为亚砷或砷基团,继而减少活性氧的局部含量,使水凝胶具有活性氧响应作用;同时水凝胶中的糖胺聚糖可通过正负电荷作用吸附特定的趋化因子,从而使本发明提供的聚氨基酸键合糖胺聚糖水凝胶具有主动消除过度炎症反应的功能,进而可解决慢性创面持续炎症状态、药物耐受、难以愈合等诸多问题。

[0040] 本发明还提供了一种上述活性氧响应的聚氨基酸键合糖胺聚糖水凝胶的制备方法,包括以下步骤:将嵌段共聚物与糖胺聚糖醛基化衍生物在溶剂中混合后,静置,得到活性氧响应的聚氨基酸键合糖胺聚糖水凝胶;所述嵌段共聚物包括聚乙二醇嵌段与聚氨基酸嵌段;所述聚氨基酸嵌段包括含有氨基的侧链与含有硫醚基团的侧链。

[0041] 其中,本发明对所有原料的来源并没有特殊的限制,为市售即可。

[0042] 在本发明中,所述嵌段共聚物优选按照以下方法制备:将端氨基化的聚乙二醇和/或端氨基化的多臂聚乙二醇与包含硫醚基团侧链的氨基酸N-羧基环内酸酐反应后,再与侧链氨基被保护的氨基酸N-羧基环内酸酐反应,脱保护后,得到嵌段共聚物。

[0043] 其中,所述端氨基化的聚乙二醇可为一端氨基化的聚乙二醇,也可为两端均氨基化的聚乙二醇,并无特殊的限制,在本发明中优选为一端氨基的聚乙二醇;所述端氨基化的多臂聚乙二醇为本领域技术人员熟知的端氨基化的多臂聚乙二醇即可,并无特殊的限制,本发明中优选为端氨基化的两臂聚乙二醇、端氨基化的四臂聚乙二醇与端氨基化的八臂聚乙二醇中的一种或多种;所述端氨基化的聚乙二醇与端氨基化的多臂聚乙二醇均按照本领域技术人员熟知的制备方法制备即可,并无特殊的限制,以端氨基化的聚乙二醇为例,在本发明中优选将聚乙二醇与取代的磺酰氯进行酯化反应,得到取代的磺酸聚乙二醇酯;将所述取代的磺酸聚乙二醇酯进行氨解反应,得到端氨基化的聚乙二醇。所述聚乙二醇的分子量优选为300~50000Da,更优选为800~10000Da,再优选为800~5000Da,再优选为1000~4000Da,最优选为2000~3000Da;所述取代的磺酰氯优选为对甲苯磺酰氯、甲基磺酰氯与乙基磺酰氯中的一种或多种;在本发明中,所述聚乙二醇与取代的磺酰氯优选在有机溶剂中进行酯化反应;所述聚乙二醇与取代的磺酰氯的质量比优选(3~6):1,更优选为(3~5):1,再优选为(3.5~4.5):1,最优选为(4~4.2):1;所述有机溶剂为本领域技术人员熟知的有机溶剂即可,并无特殊的限制,本发明中优选为二氯甲烷;所述聚乙二醇与有机溶剂的比例优选为1g:(4~6)mL,更优选为1g:5mL;在本发明中,所述酯化反应优选在碱性催化剂存在的条件下反应,所述碱性催化剂优选为碱金属氢氧化物,更优选为氢氧化钠和/或氢氧化钾;所述聚乙二醇与碱性催化剂的质量比优选为(10~20):1,更优选为(12~16):1,再优选为(14~15):1;在本发明中,优选先将聚乙二醇与有机溶剂混合溶解后,加入取代的磺酰氯

与碱性催化剂进行酯化反应;所述酯化反应的时间优选为5~10天,更优选为6~8天,再优选为7天;酯化反应后,优选用冰饱和氯化钠溶液洗涤,分液后,浓缩,用冰乙醚沉降,过滤后,得到取代的磺酸聚乙二醇酯;将所述取代的磺酸聚乙二醇酯进行氨解反应;在本发明中优选将所述取代的磺酸聚乙二醇酯与氨水进行氨解反应;为了促进取代的磺酸聚乙二醇在氨水中的溶解,优选在氯化铵存在的条件下进行氨解反应;所述取代的磺酸聚乙二醇与氨水的比例为1g:(5~30)mL,优选为1g:(10~20)mL;所述取代的磺酸聚乙二醇与氯化铵的质量比优选为1:(0.8~1.5),更优选为1:(0.8~1.2),再优选为1:1;所述氨解反应的温度优选为10~40℃,更优选为15~30℃;所述氨解反应的时间优选为5~10天,更优选为6~8天,再优选为7天;氨解反应后,优选用二氯甲烷萃取有机相,然后用冰饱和氯化钠溶液洗涤,冰乙醚沉降后,干燥得到端氨基化的聚乙二醇。所述端氨基化的多臂聚乙二醇的制备方法同上,只是将原料聚乙二醇替换为多臂聚乙二醇即可;所述多臂聚乙二醇中每个臂的分子量优选为300~50000Da,更优选为800~10000Da,再优选为800~5000Da,再优选为1000~4000Da,最优选为2000~3000Da

[0044] 所述包含硫醚基团侧链的氨基酸N-羧基环内酸酐优选按照以下方法制备:将包含硫醚基团侧链的氨基酸与双(三氯甲基)碳酸酯进行反应,得到包含硫醚基团侧链的氨基酸N-羧基环内酸酐;在本发明中,该反应优选在保护气氛中进行;所述保护气氛为本领域技术人员熟知的保护气氛即可,并无特殊的限制,本发明中优选为氮气;该反应优选在有机溶剂中进行;所述有机溶剂为本领域技术人员熟知的有机溶剂即可,并无特殊的限制,本发明中优选为四氢呋喃;所述包含硫醚基团侧链的氨基酸与双(三氯甲基)碳酸酯的摩尔比为1:(0.2~1.0),优选为1:(0.5~0.8);所述反应的温度优选为40~60℃;所述反应的时间优选为1~3h;反应结束后,用冰正己烷沉降,过滤后用冰乙酸乙酯溶解,饱和氯化钠溶液洗涤,无水硫酸镁干燥后,可经真空除去溶剂后重结晶提纯,也可经层析柱除杂后,真空除去溶剂,即可得到包含硫醚基团侧链的氨基酸N-羧基环内酸酐。

[0045] 所述侧链氨基被保护的氨基酸N-羧基环内酸酐的制备方法同上所述,在此不再赘述。

[0046] 将端氨基化的聚乙二醇和/或端氨基化的多臂聚乙二醇与包含硫醚基团侧链的氨基酸N-羧基环内酸酐反应;在本发明中,优选先将端氨基化的聚乙二醇除水后,再与包含硫醚基团侧链的氨基酸N-羧基环内酸酐反应;所述除水的方法为本领域技术人员熟知的方法即可,并无特殊的限制,本发明优选通过将端氨基化的聚乙二醇和/或端氨基化的多臂聚乙二醇与甲苯共沸除水,然后除去甲苯;所述共沸除水的温度优选为110~125℃;所述共沸除水的时间优选为2~3h;所述除去甲苯的方法优选为真空抽除;该反应优选在有机溶剂中进行;所述有机溶剂为本领域技术人员熟知的有机溶剂即可,并无特殊的限制,本发明中优选为N,N-二甲基甲酰胺;所述反应的温度优选为10~40℃,更优选为15~30℃;所述反应的时间优选为2~5天,更优选为3~4天。

[0047] 然后,加入侧链氨基被保护的氨基酸N-羧基环内酸酐反应;所述所述反应的温度优选为10~40℃,更优选为15~30℃;所述反应的时间优选为2~5天,更优选为3~4天。

[0048] 脱保护后,得到嵌段共聚物;所述脱保护的方法可根据氨基保护基团的种类进行选择即可;脱保护后,优选将产物溶于N,N-二甲基甲酰胺后进行透析;所述透析液优选为水;所述透析所用的透析袋优选为3500Da透析袋;所述透析的时间优选为2~4天,更优选为

3天;透析后,优选冷冻干燥,得到嵌段共聚物。

[0049] 按照本发明,所述糖胺聚糖醛基化衍生物优选按照以下方法制备:在避光的条件下,将糖胺聚糖与高碘酸盐在水中混合,反应,透析后得到糖胺聚糖醛基化衍生物。其中,所述糖胺聚糖优选为肝素、肝素衍生物、硫酸化葡聚糖、硫酸化葡聚糖衍生物、硫酸化透明质酸、硫酸化透明质酸衍生物、透明质酸、透明质酸衍生物、硫酸软骨素与硫酸软骨素衍生物中的一种或多种;所述高碘酸盐优选为高碘酸钠;在本发明中可通过加入高碘酸盐的量来得到含有不同醛基量的胺聚糖醛基衍生物;所述糖胺聚糖与高碘酸盐的质量比优选为5:(0.5~1.5),更优选为5:(0.5~1.2);在本发明提供的实施例中,所述糖胺聚糖与高碘酸盐的质量比具体为5:1.07、5:0.713或5:5.35;在本发明中,优选先将糖胺聚糖与高碘酸盐分别溶于水中,然后将两者的溶液混合进行反应;所述反应的温度优选为10~40℃,更优选为15~30℃;所述反应的时间优选为8~15h,更优选为10~12h;反应结束后,加入乙醇终止反应,在去离子水中透析,冷冻干燥后得到糖胺聚糖醛基化衍生物;所述透析的时间优选为30~60h,更优选为40~50h,再优选为45~50h,最优选为48h。

[0050] 将嵌段共聚物与糖胺聚糖醛基化衍生物在溶剂中混合后,静置,得到活性氧响应的聚氨基酸键合糖胺聚糖水凝胶;所述糖胺聚糖醛基化衍生物的醛基与聚氨基酸嵌段中氨基的摩尔比优选为1:3~3:1,更优选为1:2~2:1;所述溶剂为本领域技术人员熟知的溶剂即可,并无特殊的限制,本发明中优选为水、生理盐水、缓冲溶液、组织培养液与体液中的一种或多种;所述嵌段共聚物的质量优选为嵌段聚合物与溶剂总质量的5%~10%,更优选为8%;所述混合的温度优选为2~6℃,更优选为4℃;在本发明中优选通过脉冲涡旋混合;所述混合的时间优选为5~20s,更优选为10~15s;混合后静置,所述静置的温度优选为2~6℃,更优选为4℃。

[0051] 本发明还提供了一种敷料,包括上述的活性氧响应的聚氨基酸键合糖胺聚糖水凝胶。

[0052] 为了进一步说明本发明,以下结合实施例对本发明提供的一种活性氧响应的聚氨基酸键合糖胺聚糖水凝胶、其制备方法及应用进行详细描述。

[0053] 以下实施例中所用的试剂均为市售。

[0054] 实施例1mPEG<sub>2k</sub>-b-P(Met<sub>25</sub>-b-Lys<sub>5</sub>)的合成

[0055] 合成mPEG<sub>2k</sub>-b-P(Met<sub>25</sub>-b-Lys<sub>5</sub>)需要的主要单体原料有一端氨基化的mPEG<sub>2k</sub>(mPEG<sub>2k</sub>-NH<sub>2</sub>),L-甲硫氨酸-N-羧基环内酸酐(L-Met-N-carboxyanhydrides,L-Met NCA)和苄氧羰基-L-赖氨酸-N-羧基环内酸酐(Cbz-L-Lys-N-carboxyanhydrides,Z-L-Lys NCA)。

[0056] 合成氨基端的mPEG<sub>2k</sub>:将40g mPEG<sub>2k</sub>用200mL二氯甲烷充分溶解,依次加入9.6g对甲苯磺酰氯(p-ToluenesulfonylChloride,PTSC)和2.8g氢氧化钾,搅拌7d后倒入分液漏斗,用冰饱和氯化钠溶液洗涤6~8次,少量多次,使下层的有机相产物尽量澄清,分液后下层产物用无水硫酸镁(MgSO<sub>4</sub>)于室温干燥过夜。次日用砂芯漏斗将硫酸镁过滤掉,旋蒸浓缩,再用冰乙醚沉降液体,搅拌15分钟后布氏漏斗抽滤,室温下真空干燥12h后得到聚合物。将反应得到的聚合物用10倍聚合物质量体积的氨水充分溶解,加入等质量氯化铵,于室温反应7天后,二氯甲烷萃取有机相,再用冰饱和氯化钠溶液洗有机相2~3次,用无水MgSO<sub>4</sub>于室温干燥过夜。次日用砂芯漏斗将硫酸镁过滤掉,随后再次用冰乙醚沉降、布氏漏斗抽干、室温真空干燥,得到最终产物mPEG<sub>2k</sub>-NH<sub>2</sub>。



[0057] 合成两种氨基酸NCA:准备无水干燥的三口圆底烧瓶,通氮气,加入100mL四氢呋喃(Tetrahydrofuran, THF),称量15g L-Met(L-Lys(z)-OH)与20g三光气(Bis(trichloromethyl) carbonate, BTC)加入烧瓶中,60℃油浴,1h液体变透明,开大氮气流量,尽量吹走THF。剩余20~30mL THF时,用冰正己烷沉降,沉降过程中持续快速搅拌,倾倒入上层液体(赖氨酸采取布氏漏斗抽滤),产物用适量冰乙酸乙酯溶解,用无水饱和氯化钠溶液洗三次,加入到锥形瓶,加适量无水硫酸镁在-20℃干燥过夜。次日用G4砂芯漏斗抽滤,滤液连接冷阱用真空泵抽走溶剂,赖氨酸一般可直接抽出固体,再进行重结晶提纯,甲硫氨酸需要过无水层析柱除杂,再用真空泵抽走溶剂得到固体。

[0058] 将1g mPEG-NH<sub>2</sub>加入200mL干燥的甲苯中,于125℃共沸除水2~3h,用真空泵抽干甲苯,依次加入40mL干燥的无水N,N-二甲基甲酰胺(Dimethylformamide, DMF)和2.17g L-Met NCA,室温反应3天,抽换氮气三次,再加入0.77g Z-L-Lys NCA,继续室温反应3天。用冰乙醚沉降,布氏漏斗抽滤,真空干燥得到浅黄色聚合物,称量。之后对保护基团进行脱保护,将产物用10倍质量体积的三氟乙酸(Trifluoroacetic acid, TFA)溶解后加入三倍质量体积的氢溴酸/乙酸溶液反应1h后,再次用冰乙醚沉降,布氏漏斗抽滤,固体溶于适量DMF装入3500Da透析袋中,在去离子水中透析3天后冻干,得到mPEG<sub>2k</sub>-b-P(Met<sub>25</sub>-b-Lys<sub>5</sub>)。

[0059] 利用核磁共振对mPEG<sub>2k</sub>-b-P(Met<sub>25</sub>-b-Lys<sub>5</sub>)脱保护前的产物及mPEG<sub>2k</sub>-b-P(Met<sub>25</sub>-b-Lys<sub>5</sub>)进行分析,得到其核磁共振氢谱图如图1所示。

[0060] 醛基化糖胺聚糖的制备:将0.5g肝素钠用10mL二次蒸馏水充分溶解,分别将0.107g、0.0713g和0.0535g高碘酸钠(NaIO<sub>4</sub>)避光溶于1mL二次蒸馏水(MilliQ),避光缓慢将高碘酸钠加入肝素钠溶液中,室温反应12h,加入10mL乙醇终止反应,装入透析袋中,在去离子水中透析48h,冻干得到三种氧化程度的肝素。氧化度与醛基含量通过盐酸羟胺法测定,OHEP中的醛基与盐酸羟胺反应,生成化合物脎的同时释放一分子盐酸,通过测定酸碱滴定测定pH值可以间接测出OHEP的氧化度和醛基含量,氧化度分别为18.52%、29.43%与45.79%。

[0061] 聚氨基酸/糖胺聚糖水凝胶的制备:将氧化度约为29.43%的OHEP按照氨基与醛基1:1的比例混入8wt%聚氨基酸溶液脉冲涡旋10S至均匀,静置,以上操作均在4℃中进行,得到聚氨基酸/糖胺聚糖水凝胶,其结构如图2所示。

[0062] 水凝胶结构表征及功能验证:利用红外光谱对得到mPEG<sub>2k</sub>-b-P(Met<sub>25</sub>-b-Lys<sub>5</sub>)、醛基化糖胺聚糖及聚氨基酸/糖胺聚糖水凝胶进行分析,得到其傅里叶红外光谱图,如图3所示。由图3可知聚氨基酸与糖胺聚糖组分成功合成,并对两个组分结合后的产物以席夫碱方式成功结合。

[0063] 利用C57BL/6雄性小鼠,以腹腔注射链脲佐菌素(STZ)的方式建立了I型糖尿病小鼠模型,成模后在小鼠背部建立创面模型,涂覆聚氨基酸-糖胺聚糖水凝胶进行治疗,其治疗效果如图4所示,可见和无治疗措施的Control组相比,该材料具有良好的创面治疗效果。

[0064] 对嵌段聚合物的成胶性能进行验证,得到不同质量分数的前体聚氨基酸mPEG<sub>2k</sub>-b-PMet<sub>25</sub>的成胶温度如表1所示。

[0065] 表1不同嵌段聚合物成胶性能结果

[0066]

质量分数(wt.%)	成胶温度(℃)
7	35

8	26
9	24
10	20

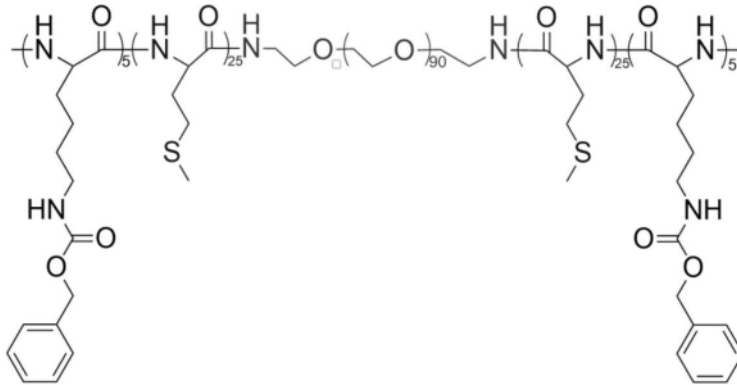
[0067] 按照实施例1的方法,将不同氧化度的醛基化糖胺聚糖与mPEG<sub>2k</sub>-b-P (Met<sub>25</sub>-b-Lys<sub>5</sub>)按照一定醛基与氨基的比例制备得到聚氨基酸/糖胺聚糖水凝胶,并对其模量进行检测,得到结果如图5~图7所示。

[0068] 随后我们对9组材料进行了模量随温度改变的流变学检测,通过图5~图7可以看出,9组材料均可在37℃之前发生溶液-凝胶相转变,但当肝素的氧化度为45.79%时,如图7,但由于氧化程度过高,分子量明显降低,多糖的生物学功能也会受到一定影响。在前两个图中,可以看出随着氨基比例的升高,机械强度也会随之降低。但是当醛基与氨基比例选定为1:1时,氧化度为18.52%的材料在相转变温度附近发生模量突变并不迅速,说明成胶可能并不完全,因此最终我们选择氧化程度为29.43%的肝素,且醛基与氨基的比例为1:1。

[0069] 实施例2

[0070] 按照实施例1的方法合成两端均含氨基的mPEG<sub>4k</sub>,最终合成下式所示的嵌段聚合物。

[0071]



[0072] 利用核磁共振对实施例2中得到的嵌段共聚物进行分析,得到其氢谱图如图8所示。

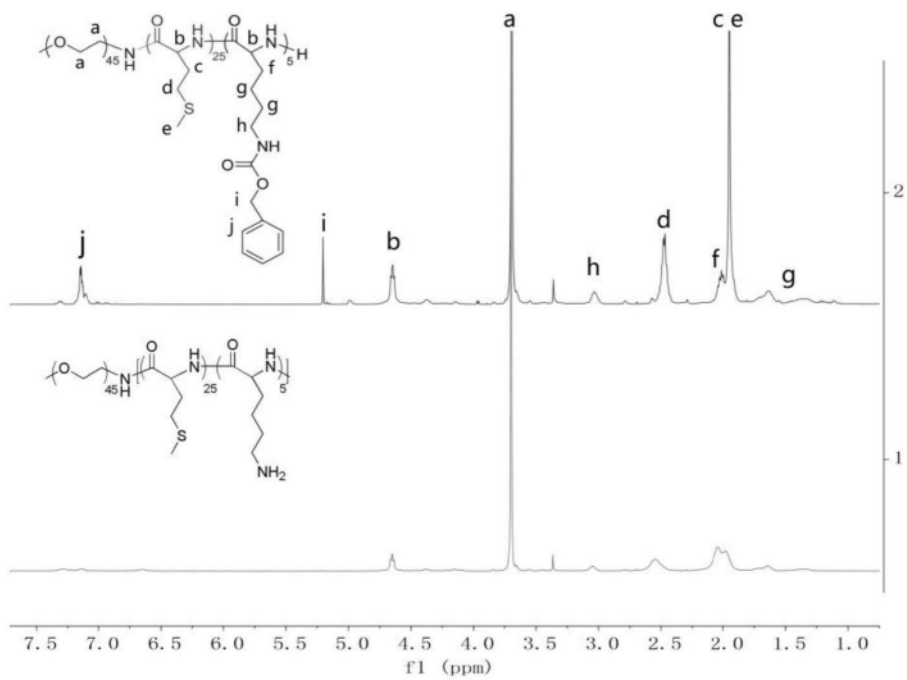


图1

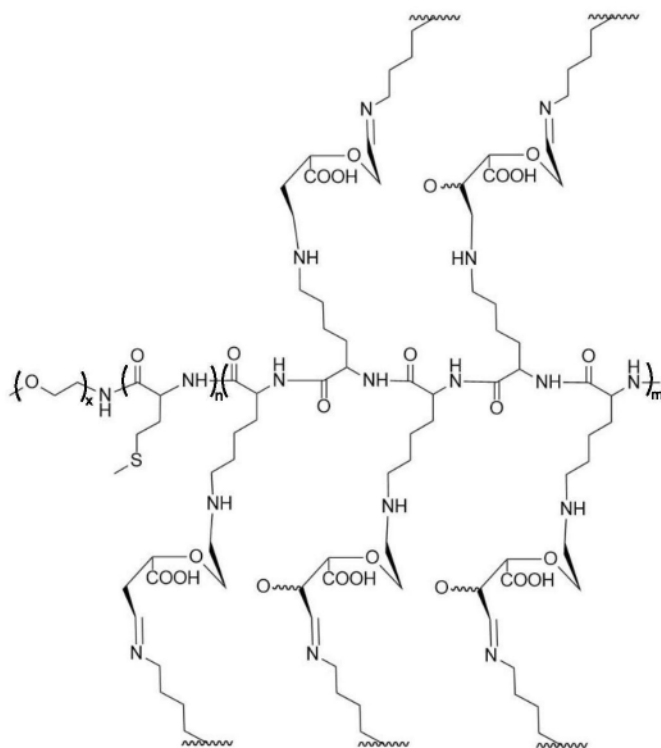


图2

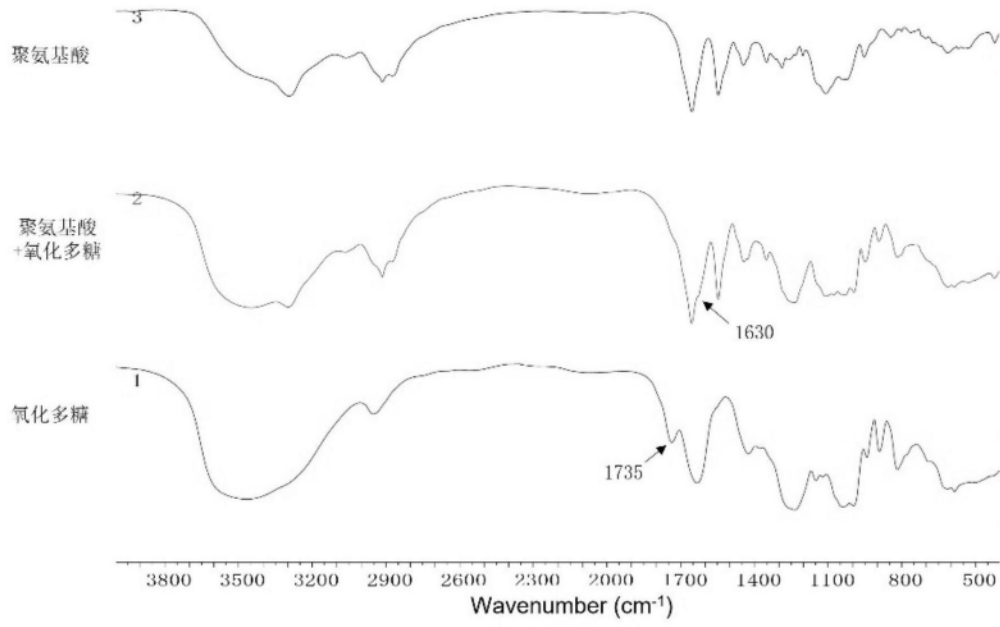


图3

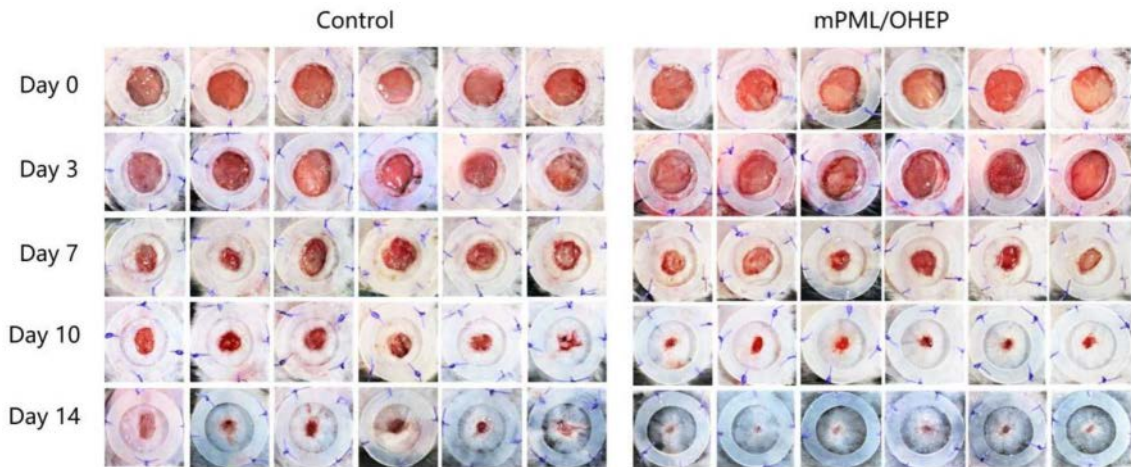


图4

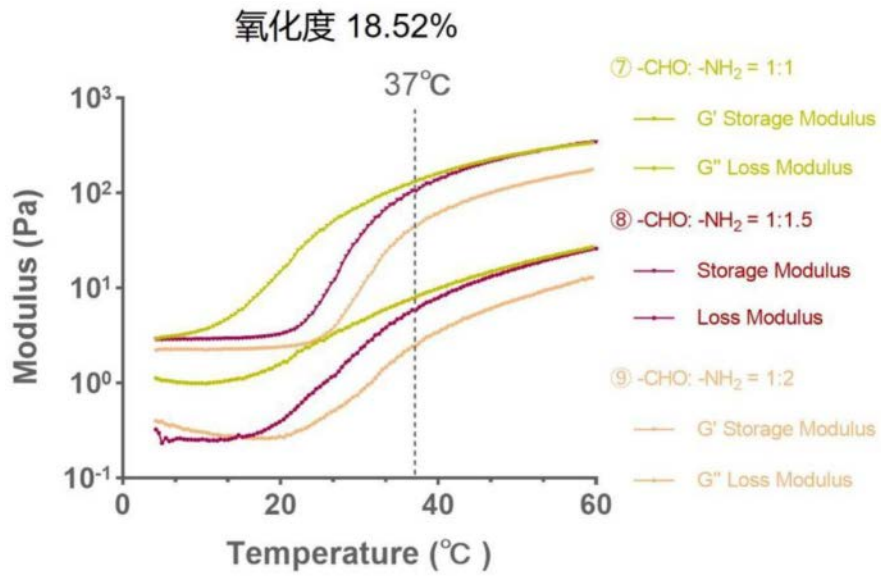


图5

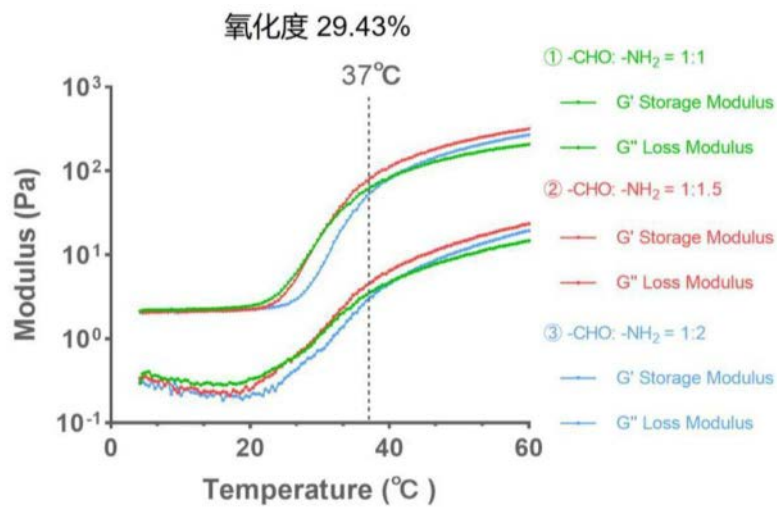


图6

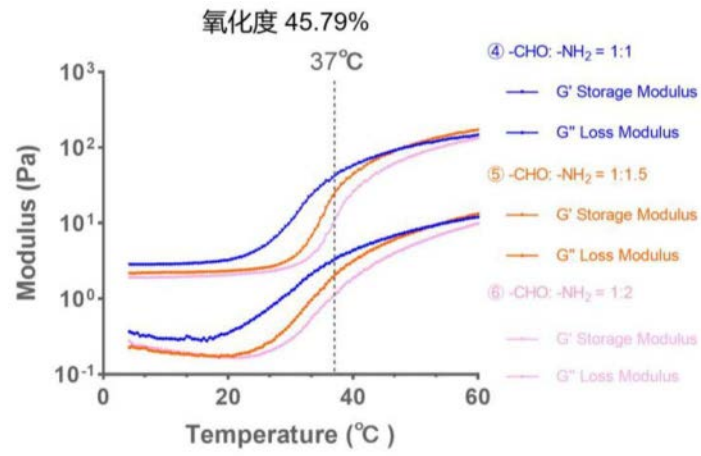


图7

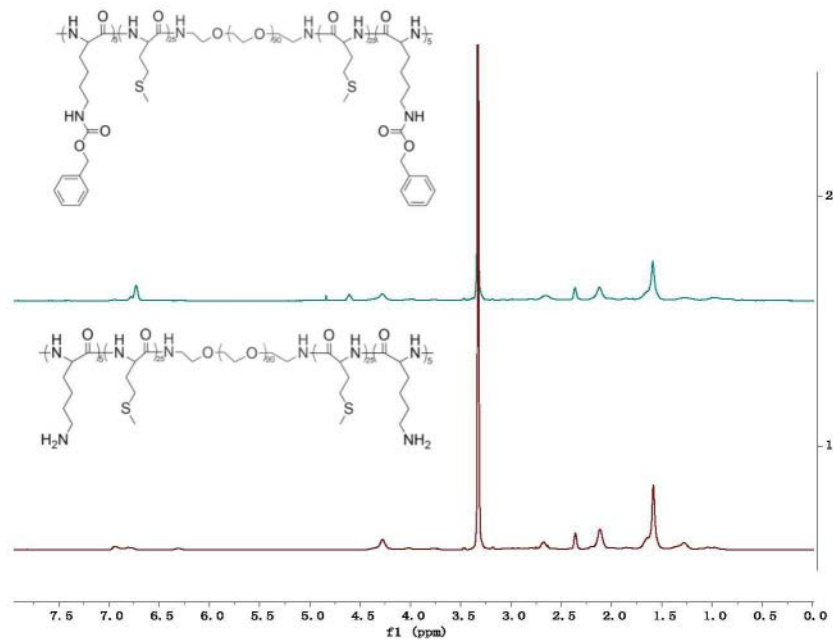


图8