



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105597156 B

(45)授权公告日 2018.11.16

(21)申请号 201510986012.0

A61L 27/02(2006.01)

(22)申请日 2015.12.25

A61L 27/54(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105597156 A

(43)申请公布日 2016.05.25

(73)专利权人 深圳清华大学研究院

地址 518057 广东省深圳市南山区高新技术产业园南区深圳清华大学研究院大楼A302室

(72)发明人 李小丽 陈昌盛 刘伟强

(74)专利代理机构 深圳市鼎言知识产权代理有限公司 44311

代理人 叶小勤

(51)Int. Cl.

A61L 27/52(2006.01)

A61L 27/58(2006.01)

A61L 27/50(2006.01)

A61L 27/20(2006.01)

A61L 27/24(2006.01)

A61L 27/22(2006.01)

(56)对比文件

CN 103910894 A,2014.07.09,

CN 104059234 A,2014.09.24,

CN 102321248 A,2012.01.18,

Eric Westhaus et al..Triggered

release of calcium from lipid vesicles: a bioinspired strategy for rapid gelation of polysaccharide and protein hydrogels.《Biomaterials》.2001,第22卷第453-462页.

Eric Westhaus et al..Triggered release of calcium from lipid vesicles: a bioinspired strategy for rapid gelation of polysaccharide and protein hydrogels.《Biomaterials》.2001,第22卷第453-462页.

贾东明等.国外即型水凝胶—温度敏感系统综述.《中国医院药学杂志》.2007,第27卷(第4期),

审查员 买芳

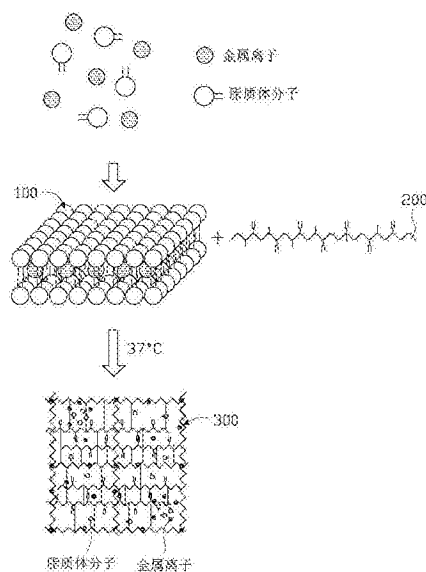
权利要求书1页 说明书9页 附图2页

(54)发明名称

水凝胶及其制备方法和应用

(57)摘要

一种水凝胶,其包括包载生物可兼容的金属离子的脂质体、生物可用高分子材料和水,所述脂质体与所述生物可用高分子材料相互交联,所述生物可用高分子材料的体积百分数为10~49%,所述包载生物可兼容的金属离子的脂质体的体积百分数为5~49%,所述水的体积百分数为2~85%。一种水凝胶的制备方法和其应用。本发明的水凝胶中包载的生物可兼容金属离子可以束缚脂质体调节凝胶的形成和性能。该水凝胶能够在注射入人体后,在体温37℃下特定释放金属离子促发高分子交联形成网络结构,即能够通过感知体内温度变化而迅速凝胶化,具有较好的温敏特性。



1. 一种水凝胶,其包括生物可用高分子材料、包载生物可兼容的金属离子的脂质体和水,所述脂质体与所述生物可用高分子材料相互交联,所述生物可用高分子材料的体积百分数为10~49%,所述包载生物可兼容的金属离子的脂质体的体积百分数为5~49%,所述水的体积百分数为2~85%,所述生物可用高分子材料包括天然高分子材料、具有活性醛基的高分子材料、具有生物配体的高分子材料和具有活性醛基及生物配体的高分子材料中的两种或两种以上,所述天然高分子材料包括海藻酸、透明质酸、硫酸软骨素、胶原、壳聚糖、明胶、丝素蛋白、角质蛋白、淀粉、多肽和其盐中的一种或多种,所述生物配体包括盐酸多巴胺和贻贝粘附蛋白中的一种或两种,所述生物可兼容金属离子包括 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Zn^{2+} 和 Mn^{3+} 中的一种或几种。

2. 如权利要求1所述的水凝胶,其特征在于,所述贻贝粘附蛋白包括翡翠贻贝足丝蛋白、厚壳贻贝足丝蛋白1、厚壳贻贝足丝蛋白2、厚壳贻贝足丝蛋白3、厚壳贻贝足丝蛋白4、厚壳贻贝足丝蛋白5和厚壳贻贝足丝蛋白6中的一种或几种。

3. 一种如权利要求1所述水凝胶的制备方法,包括如下步骤:

制备包载生物可兼容的金属离子的脂质体;

向含有生物可用高分子材料的溶液中,加入包载生物可兼容的金属离子的脂质体并混合均匀,得到混合液,所述生物可用高分子材料包括天然高分子材料、具有活性醛基的高分子材料、具有生物配体的高分子材料和具有活性醛基及生物配体的高分子材料中的两种或两种以上,所述天然高分子材料包括海藻酸、透明质酸、硫酸软骨素、胶原、壳聚糖、明胶、丝素蛋白、角质蛋白、淀粉、多肽和其盐中的一种或多种,所述生物配体包括盐酸多巴胺和贻贝粘附蛋白中的一种或两种,所述生物可兼容金属离子包括 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Zn^{2+} 和 Mn^{3+} 中的一种或几种;

将混合液孵化,得到水凝胶。

4. 如权利要求3所述的制备方法,其特征在于,所述具有活性醛基的高分子材料通过如下步骤制成:将天然高分子材料溶于溶剂,加入氧化剂进行氧化反应,得到具有活性醛基高分子材料。

5. 如权利要求4所述的制备方法,其特征在于,所述氧化剂包括氯酸钾、三氧化铬、双氧水和高碘酸钠中的一种或几种。

6. 如权利要求5所述的制备方法,其特征在于,所述具有生物配体的高分子材料或具有活性醛基及生物配体的高分子材料通过如下步骤制成:将天然高分子材料或具有活性醛基的高分子材料溶于溶剂中,调节pH值,通入氮气,再加入生物配体,避光反应,得到具有生物配体的高分子材料或具有活性醛基及生物配体的高分子材料。

7. 如权利要求3所述的制备方法,其特征在于,向含有生物可用高分子材料的溶剂中,按预设比例加入包载生物可兼容的金属离子的脂质体,所述比例根据包载生物可兼容的金属离子的脂质体的包载率、金属离子在体内的释放率和金属离子的价态进行计算。

8. 一种如权利要求1所述的水凝胶在作为生物组织材料中的应用。

水凝胶及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医用材料领域,特别是涉及一种水凝胶及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 水凝胶具有三维网状结构和一定力学性能,为细胞营养物质、氧气及代谢产物的输送与交换提供良好的运输通道,同时为细胞营造三维生长环境,部分水凝胶尚具有促进新生血管形成等生物物理学特性,因此水凝胶在作为细胞载体方面具有一定的优势,例如可作为塑型支架的材料。

[0003] 传统水凝胶支架大多为体外预先塑型,然后通过手术的方式植入至体内预定位置,然而由于人体缺损组织或器官通常形状十分不规整,支架材料的形状往往与目标部位无法完全吻合,并且很难避免手术过程中造成对患者的二次创伤。

发明内容

[0004] 有鉴于此,本发明提供一种可在注入体内后凝胶化的水凝胶。

[0005] 一种水凝胶,其包括生物可用高分子材料、包载生物可兼容的金属离子的脂质体和水,所述脂质体与所述生物可用高分子材料相互交联,其中生物可用高分子材料的体积百分数为10~49%,所述包载生物可兼容的金属离子的脂质体的体积百分数为5~49%,所述水的体积百分数为2~85%,所述生物可用高分子材料包括天然高分子材料、具有活性醛基的高分子材料、具有生物配体的高分子材料和具有活性醛基及生物配体的高分子材料中的两种或两种以上,所述天然高分子材料包括海藻酸、透明质酸、硫酸软骨素、胶原、壳聚糖、明胶、丝素蛋白、角质蛋白、淀粉、多肽和其盐中的一种或多种,所述生物配体包括盐酸多巴胺和贻贝粘附蛋白中的一种或两种,所述生物可兼容金属离子包括 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Zn^{2+} 和 Mn^{3+} 中的一种或几种。

[0006] 一种上述水凝胶的制备方法,包括如下步骤:

[0007] 制备包载生物可兼容的金属离子的脂质体;

[0008] 向含有生物可用高分子材料的溶剂中,加入包载生物可兼容的金属离子的脂质体并混合均匀,得到混合液,所述生物可用高分子材料包括天然高分子材料、具有活性醛基的高分子材料、具有生物配体的高分子材料和具有活性醛基及生物配体的高分子材料中的两种或两种以上,所述天然高分子材料包括海藻酸、透明质酸、硫酸软骨素、胶原、壳聚糖、明胶、丝素蛋白、角质蛋白、淀粉、多肽和其盐中的一种或多种,所述生物配体包括盐酸多巴胺和贻贝粘附蛋白中的一种或两种,所述生物可兼容金属离子包括 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Zn^{2+} 和 Mn^{3+} 中的一种或几种;

[0009] 将混合液升温反应,得到水凝胶。

[0010] 一种水凝胶在作为生物组织材料中的应用。

[0011] 本发明的水凝胶中包载的生物可兼容金属离子,可以束缚脂质体调节凝胶的形成和性能。该水凝胶能够在注射入人体后,在体温 37°C 下特定释放金属离子促发高分子交联

形成网络结构,即能够通过感知体内温度变化而迅速凝胶化,具有较好的温敏特性。因此,本发明的水凝胶可采用微创手术直接注射到需求部位,根据温度的变化在体内原位成胶,适应个体化形状成型,克服了传统水凝胶体外预塑、支架材料的形状与目标部位不能完全吻合等问题,避免患者的二次创伤。

附图说明

[0012] 图1具有活性醛基及生物配体的水凝胶温敏性动力学示意图。

[0013] 图2具有活性醛基及生物配体的水凝胶的制备流程示意图。

[0014] 主要元件符号说明

[0015]

包载生物可兼容的金属离子的脂质体	100
具有活性醛基及生物配体的高分子材料	200
具有活性醛基及生物配体的水凝胶	300
天然高分子材料	400
具有活性醛基的高分子材料	500
生物配体	600
混合液	700

[0016] 如下具体实施方式将结合上述附图进一步说明本发明。

具体实施方式

[0017] 本发明保护的一种水凝胶,其包括生物可用高分子材料、包载生物可兼容的金属离子的脂质体和水,所述脂质体与所述生物可用高分子材料相互交联,所述生物可用高分子材料的体积百分数为10~49%,其中包载生物可兼容的金属离子的脂质体的体积百分数为5~49%,所述水的体积百分数为2~85%。

[0018] 上述包载生物可兼容的金属离子的脂质体中的脂质体包括但不限于二棕榈酰磷脂酰胆碱(Dipalmitoyl phosphatidyl choline, DPPC)、二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱(1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DMPC)、二肉豆蔻酰基三甲基铵丙烷(1,2-dimyristoyl-3-trimethylammonium propane, DMTAP)和二硬脂酰磷脂酰胆碱(Distearoyl Phosphatidylcholine, DSPC)中的一种或多种。

[0019] 所述生物可兼容金属离子为生物体可吸收并不会造成危害的金属离子。包括但不限于和人体生物可兼容性较好的1价、2价或3价金属离子,尤其是钠离子(Na^+)、钾离子(K^+)、钙离子(Ca^{2+})、铁离子(Fe^{3+})、锌离子(Zn^{2+})和锰离子(Mn^{3+})中的一种或多种。

[0020] 现有技术中的水凝胶较多在体外凝固或形成交联结构,只能通过体外塑性再移植入体内。本发明的水凝胶包载的生物可兼容金属离子可以束缚脂质体调节凝胶的形成和性能。该水凝胶能够在注射入人体后,在体温 37°C 下特定释放金属离子促发高分子交联形成网络结构,即能够通过感知体内温度变化而迅速凝胶化,具有较好的温度敏感性,即温敏性。因此,本发明的水凝胶可采用微创手术直接注射到需求部位,根据温度的变化在体内原位成胶,适应个体化形状成型,克服了传统水凝胶体外预塑、支架材料的形状与目标部位不能完全吻合等问题,避免患者的二次创伤。

[0021] 进一步的,所述生物可用高分子材料包括天然高分子材料、具有活性醛基的高分子材料、具有生物配体的高分子材料和具有活性醛基及生物配体的高分子材料中的两种或两种以上。

[0022] 上述生物配体包括但不限于盐酸多巴胺和贻贝粘附蛋白的一种或多种,尤其是盐酸多巴胺(Dopamine Hydrochloride,DOPA)、翡翠贻贝足丝蛋白(*Perna viridis* foot protein,Pvfp)和贻贝粘附蛋白(mussel adhesive protein,MAP)中的一种或多种。其中MAP包括但不限于厚壳贻贝足丝蛋白1(*Mytilus coruscus* foot protein 1,McfP1)、厚壳贻贝足丝蛋白2(McfP2)、厚壳贻贝足丝蛋白3(McfP3)、厚壳贻贝足丝蛋白4(McfP4)、厚壳贻贝足丝蛋白5(McfP5)和厚壳贻贝足丝蛋白6(McfP6)中的一种或多种。优选为McfP3、McfP4、McfP5中的一种或多种。所述生物配体均含有较多的盐酸多巴胺(DOPA)和羟脯氨酸(hydroxyproline,Hyp),能够与生物组织中的蛋白质等极性聚合物形成很强的氢键,具有较强的粘附活性。

[0023] 上述天然高分子材料包括但不限于多糖、蛋白质和其盐的一种或多种。尤其是海藻酸、透明质酸、硫酸软骨素、胶原、壳聚糖、明胶、丝素蛋白、角质蛋白、淀粉、多肽和其盐中的一种或多种。所述多糖、蛋白质和其盐均具有良好的人体生物可兼容性。

[0024] 因此本发明中具有生物配体的高分子材料制备的水凝胶,具有超强的粘附性能,水凝胶中含有的生物配体与包载生物可兼容的金属离子的脂质体发生螯合作用,进行化学交联,形成互穿网络的结构,进一步加强水凝胶的稳定性和粘附性,实现了在湿态下的化学动态自修复功能,进而延长水凝胶在体内的使用寿命,提高细胞在体内的滞留及活性。

[0025] 另外,本发明中具有活性醛基的高分子材料制备的水凝胶中的醛基能够与组织蛋白中的氨基及其他天然高分子材料中的氨基发生席夫碱反应形成共价交联的水凝胶,提高了水凝胶的力学性能和细胞亲和力。

[0026] 进一步的,本发明中具有活性醛基及生物配体的高分子材料制备的水凝胶同时具备可注射性、温敏性和自愈性的特点,是一种新型可注射温敏自愈性多功能水凝胶,其温敏性动力学示意图如图1所示,生物可兼容金属离子和脂质体在体外生成包载生物可兼容的金属离子的脂质体100,其再与具有活性醛基及生物配体的高分子材料200生成具有活性醛基及生物配体的水凝胶300,该水凝胶在体内37℃下特定释放金属离子促发高分子交联形成网络结构。该水凝胶模仿生物体损伤愈合的原理,材料一旦产生缺陷,在无外界作用的情况下,实现微裂纹的自愈合。这一功能能够延长材料在体内的使用寿命。

[0027] 进一步的,本发明中的水凝胶,均采用具有良好生物可兼容性的天然材料制备,其具有优异的生物可兼容性、降解性能、特异的细胞作用位点。

[0028] 本发明进一步提供了上述水凝胶的制备方法,包括如下步骤:

[0029] 1、制备包载生物可兼容的金属离子的脂质体;

[0030] 上述制备方法中,所述制备包载生物可兼容的金属离子的脂质体通过如下步骤制成:将脂质体化合物溶于有机溶剂,加入含有生物可兼容的金属离子的水溶液,混合均匀,得到包载生物可兼容的金属离子的脂质体。

[0031] 所述有机溶剂包括但不限于二氯甲烷和三氯甲烷中的一种或几种。

[0032] 所述脂质体化合物溶于有机溶剂后的浓度为1~500mg/mL、1~400mg/mL、1~300mg/mL、1~200mg/mL、1~100mg/mL或1~50mg/mL。

[0033] 进一步的,还可将脂质体化合物的有机溶液制成干燥物,其方法可以采用任何本领域技术人员常用的方法,例如,升温、真空干燥等。本发明优选采用旋蒸的方法,将脂质体化合物有机溶液制成脂质体薄膜。旋蒸温度为20~70℃,转速为50~200rpm。

[0034] 所述生物可兼容的金属离子的水溶液的浓度为0.1~25mol/L、0.1~20mol/L、0.1~15mol/L、0.1~10mol/L、0.1~5mol/L或0.1~2.5mol/L。

[0035] 进一步的,为促进脂质体与金属离子充分反应,在反应中可升温至一定温度,此温度优选为40~80℃。进一步的,还可以将反应体系置于超声发生器中超声,直至液体透明。优选的,超声的温度为40~80℃,超声探头的直径为2~5mm,超声时间为10~120min,超声的功率为50~200w。

[0036] 若反应时有升温,待反应结束,可将混合溶液冷却至室温。

[0037] 本领域技术人员可以理解,反应完全后,进一步还可以包括纯化、干燥。纯化的方法,可以采用任何本领域技术人员常用的方法,例如,过滤,洗涤,离心等。本发明优选采用离心去除多余的金属离子,离心力为1000~30000g。再将沉淀物溶于醇类有机溶剂中,优选为乙醇,浓度为2~8mol/L,得到白色悬浊液。将白色悬浊液通入氮气,去除醇类有机溶剂。最后用等渗透生理盐水洗涤,离心,此步骤可循环多次。所述等渗透生理盐水配方为:10mol/L 4-羟乙基哌嗪乙磺酸(4-(2-hydroxyethyl) piperazine-1-erhaesulfonic acid, HEPES),1mmol/L乙二胺四乙酸二钠(Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt, EDTA),浓度为0.9%的氯化钠,pH值7.4。

[0038] 干燥制得包载生物可兼容的金属离子的脂质体的方法优选为冷冻干燥。

[0039] 2、向含有生物可用高分子材料的溶剂中,加入包载生物可兼容的金属离子的脂质体并混合均匀,得到混合液;

[0040] 所述生物可用高分子材料包括天然高分子材料、具有活性醛基的高分子材料、具有生物配体的高分子材料和具有活性醛基及生物配体的高分子材料中的两种或两种以上。

[0041] 所述天然高分子材料包括但不限于海藻酸、透明质酸、硫酸软骨素、胶原、壳聚糖、明胶、丝素蛋白、角质蛋白、淀粉、多肽和其盐中的一种或多种。

[0042] 进一步的,所述具有活性醛基的高分子材料通过如下步骤制成:将天然高分子材料溶于溶剂,加入氧化剂进行氧化反应,得到具有活性醛基高分子材料。进一步的,将天然高分子材料氧化可选用本领域技术人员所熟知的氧化剂,例如氯酸钾、三氧化铬、双氧水、高碘酸钠等,优选为高碘酸钠。

[0043] 在具体的实施例中,不同的天然高分子材料应溶于不同的溶剂。例如用有机酸溶解壳聚糖、丝素蛋白、角质蛋白、胶原蛋白、多肽等。用水溶解透明质酸或其盐、海藻酸或其盐、淀粉、硫酸软骨素或其盐等。所述有机酸优选为醋酸或丙二酸。

[0044] 进一步的,至反应一段时间,还可加入一定量的乙二醇终止反应。本领域技术人员可以理解的,反应结束后可采用任何本领域技术人员常用的方法将生成物分离纯化,去除杂质,例如采用一定分子量的透析袋透析,也可采用色谱分离或超滤膜等。优选所用透析袋的分子量为3000~8000Da。

[0045] 进一步的,分离纯化后还可以进行干燥,优选冷冻干燥,制得具有活性醛基的高分子材料。所述冷冻干燥是在零下40~90℃超低温下冷冻2h,冷冻后放入冷冻干燥机内,在零下50~60℃条件下冷冻干燥24h。

[0046] 上述天然高分子材料溶于溶剂的浓度为0.2~1wt%，优选透明质酸盐的浓度为0.01~1%wt%，分子量为 $1.0 \times 10^4 \sim 1.5 \times 10^6$ Da。上述加入氧化剂的量是天然高分子材料加入摩尔量的0.1~10倍，反应时间为0.5~12h。加入乙二醇的摩尔量是高碘酸钠摩尔量的1~5倍。

[0047] 进一步的，所述具有生物配体的高分子材料或具有活性醛基及生物配体的高分子材料通过如下步骤制成：将天然高分子材料或具有活性醛基的高分子材料溶于溶剂中，调节pH，通入氮气，再加入生物配体，避光反应，得到具有生物配体的高分子材料或具有活性醛基及生物配体的高分子材料。

[0048] 上述不同的具有活性醛基的高分子材料应溶于不同的溶剂。例如用有机酸溶解具有活性醛基的壳聚糖、丝素蛋白、角质蛋白、胶原蛋白、多肽等；用水溶解具有活性醛基的透明质酸或其盐、海藻酸或其盐、硫酸软骨素或其盐、淀粉等。所述有机酸优选为醋酸或丙二酸。不同的天然高分子材料溶于溶剂的方法如前所述。

[0049] 进一步的，还可加入羧基活化剂，如碳化二亚胺 (Carbodiimide, EDC) 和N-羟基苯并三氮唑 (N-Hydroxybenzotriazole, HOBt) 的一种或几种，增加天然高分子材料或具有活性醛基的高分子材料与生物配体反应发生率。进一步的还可以加入N-羟基丁二酰亚胺 (N-Hydroxysuccinimide, 简称NHS) 减少副反应发生。

[0050] 本领域技术人员可以理解，调节pH的方法可以使用本领域技术人员通常采用的方法，例如用一定浓度的氢氧化钠或盐酸调节。

[0051] 本领域技术人员可以理解的，反应结束后还可采用任何本领域技术人员常用的方法分离纯化，去除杂质，例如采用一定分子量的透析袋透析，也可采用色谱分离或超滤膜等。优选所用透析袋的分子量为3000~8000Da。

[0052] 进一步的，分离纯化后还可以进行干燥，优选冷冻干燥，制得具有生物配体的高分子材料。所述冷冻干燥是在零下40~90℃超低温下冷冻2h，冷冻后放入冷冻干燥机内，在零下50~60℃条件下冷冻干燥24h。

[0053] 进一步的，所述生物配体为盐酸多巴胺、翡翠贻贝角质蛋白和贻贝粘附蛋白中的一种或多种。进一步的，所述贻贝粘附蛋白为McfP1、McfP2、McfP3、McfP4、McfP5和McfP6中的一种或多种。优选为McfP3、McfP4、McfP5中的一种或多种。

[0054] 当天然高分子材料或具有活性醛基的高分子材料的溶液的浓度为0.2~1wt%时，脱水剂的量是天然高分子材料或具有活性醛基的高分子材料的2倍，如EDC的加入量是聚合物摩尔量的2倍，而NHS的加入量为EDC加入摩尔量的2倍。上述加入的pH调节剂如氢氧化钠的浓度为1~5mol/L或盐酸的浓度0.5~2mol/L，pH值为3~6。

[0055] 所述加入的生物配体的量根据生物配体的分子量而有所不同。例如DOPA的加入量为天然高分子材料或具有活性醛基的高分子材料摩尔量的0.1~10倍；Pvfp的加入量为天然高分子材料或具有活性醛基的高分子材料的摩尔量的0.1~5倍；McfP-3、McfP-4、McfP-5的加入量为天然高分子材料或具有活性醛基的高分子材料摩尔量的0.1~8倍。避光反应的时间为1~24h。

[0056] 本领域技术人员可以理解的，天然高分子材料或具有活性醛基的高分子材料和生物配体混合，及与包载金属离子脂质体混合的先后顺序并不限定。例如，在具体的实施例中，可先将天然高分子材料或具有活性醛基的高分子材料和生物配体混合，再与包载生物

可兼容的金属离子的脂质体混合。也可先将天然高分子材料或具有活性醛基的高分子材料和包载生物可兼容的金属离子的脂质体混合,再与生物配体混合。也可先将部分天然高分子材料或具有活性醛基的高分子材料和包载生物可兼容的金属离子的脂质体混合,再与剩余部分天然高分子材料或具有活性醛基的高分子材料,生物配体混合。

[0057] 进一步的,将具有生物配体的高分子材料与包载生物可兼容的金属离子的脂质体混合,可先将具有生物配体的高分子材料溶于溶剂。不同的具有生物配体的高分子材料应溶于不同的溶剂,例如用有机酸溶解具有生物配体的壳聚糖、丝素蛋白、角质蛋白、胶原蛋白、多肽等;用水溶解具有生物配体的透明质酸或其盐、海藻酸或其盐、硫酸软骨素或其盐、淀粉等。所述有机酸优选为醋酸或丙二酸。同理,天然高分子材料和具有活性醛基的高分子材料的溶液的配制如前所述。

[0058] 进一步的,向含有生物可用高分子材料的溶剂中,按预设比例加入包载生物可兼容的金属离子的脂质体。所述比例根据包载生物可兼容的金属离子的脂质体的包载率、金属离子在体内的释放率和金属离子的价态进行计算。例如,生物可用高分子材料与含金属离子脂质体溶液的体积比为1:0.1~10,其中脂质体粒子大小为0.3~500 μm ,金属离子的包载率为10~80%,金属离子的释放率为80~90%。

[0059] 3、将混合液孵化,得到水凝胶。

[0060] 所述孵化的温度为30~60 $^{\circ}\text{C}$,所述反应时间即凝胶时间为0.1~24h。所述水凝胶为化学交联状态。

[0061] 所述孵化为在30~60 $^{\circ}\text{C}$ 的恒温恒湿箱中进行反应。进一步的,所述孵化的温度为体温范围,即为36~38 $^{\circ}\text{C}$ 。

[0062] 本发明具有活性醛基及生物配体的水凝胶的制备流程示意图如图2所示,天然高分子材料400被氧化生成具有活性醛基的高分子材料500,再与生物配体600发生接枝反应,生成具有活性醛基及生物配体的高分子材料200。具有活性醛基及生物配体的高分子材料200与天然高分子材料400、包载生物可兼容的金属离子的脂质体100在20 $^{\circ}\text{C}$ 混合,得到混合液700,混合液700在37 $^{\circ}\text{C}$ 下释放金属离子,形成交联网状结构的水凝胶300。

[0063] 本发明所制备的水凝胶具有以下特点:(1)具有良好的可注射性,可以通过微创手术注射到人体;(2)可感知体温发生内部化学交联而凝胶化,具有较高的力学强度;(3)具有良好的自修复性,在体内即使被破坏亦可实现自愈,可避免再次手术,有利于促进血管化,具有较长的使用寿命,并且可装载多种生物活性物质;(4)具有良好的生物可兼容性、生物降解性。

[0064] 本发明进一步提供了上述水凝胶在作为生物医学、组织工程材料中的应用。尤其是在医学组织的修复材料、组织工程细胞载体及因子或药物的传递中的应用。

[0065] 实施例

[0066] 为了让本发明更明显易懂,以下特举较佳实施例,作详细说明,本发明的保护范围不受以下实施例的限制。凡在本发明的精髓和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

[0067] 实施例1

[0068] (1) 包载生物可兼容的金属离子的脂质体的制备

[0069] 量取10mL三氯甲烷,配置浓度为2%的脂质体溶液,其中DPPC与DMPC的质量比为9:

1;然后溶液减压旋蒸,旋蒸温度为50℃,转速为60rpm。最后得到一张透明脂质体薄膜,待用。配置浓度为0.4mol/L的氯化钙溶液,在55℃温度下,将脂质体薄膜与氯化钙溶液混合,并用探头式超声发生器超声处理30min后,功率为100w;然后将混合溶液冷却至室温,用4000g离心力进行离心,得到的沉淀物加入无水酒精,使溶液形成4mol/L乙醇的悬浊液;将悬浊液加热至50℃,然后鼓入干燥的氮气,待酒精完全除去;最后在冰浴下,用等渗透缓冲液对浓缩液进行洗涤,并在5000g的离心力下离心清洗,重复3次。渗透生理盐水缓冲液制备方法为配制0.9%氯化钠溶液1L,然后加入10mmol/L HEPES和1mmol/L EDTA,待完全溶解,用5mol/L氢氧化钠调节溶液pH值,使其pH值为7.4。最后得到含钙离子脂质体的粒径大小为0.1~100μm。

[0070] (2) 水凝胶的制备

[0071] 配置浓度为5%的海藻酸盐水溶液,海藻酸盐的分子量为 3×10^5 Da,备用;然后加入包载钙离子脂质体粉体,钙离子的浓度为0.1mol/L,待溶液混合均匀,在37℃下孵化,30min后得到海藻酸水凝胶。

[0072] 实施例2

[0073] (1) 包载金属离子脂质体的制备如实施例1所示。

[0074] (2) 具有活性醛基的高分子材料的制备

[0075] 用0.1wt%的醋酸配置浓度为5mg/mL的胶原蛋白溶液,胶原蛋白为冷冻干燥后的胶原固体。然后加入高碘酸钠对其进行氧化,高碘酸钠的加入量是胶原蛋白加入摩尔量的1.5倍,氧化反应时间为1h,然后加入乙二醇终止反应,乙二醇加入的量与高碘酸钠加入量的摩尔比为1:1,然后用截留分子量为8000Da的透析袋进行透析,每天换三次水,透析三天;最后在-80℃冷冻2h,再冷冻干燥72h,得到具有活性醛基的胶原蛋白化合物。

[0076] (3) 水凝胶的制备

[0077] 用0.1wt%的醋酸溶解具有活性醛基的胶原蛋白化合物,配置成浓度为5mg/mL的具有活性醛基的胶原溶液,用50mmol/L的HEPES,0.75mol/L NaCl和0.75mol/L KCl配置HEPES缓冲溶液,备用;将胶原蛋白溶液与HEPES缓冲按照体积比为2:1混合,再用0.28mol/L的NaOH调节pH 7.4,制备胶原蛋白凝胶的前驱体;最后将包载金属离子的脂质体粉体与胶原蛋白凝胶的前驱体混合,体积比按照1:2混合,在37℃孵化,4~8h后得到具有活性醛基的胶原蛋白水凝胶。

[0078] 实施例3

[0079] (1) 包载生物可兼容的金属离子的脂质体的制备如实施例1

[0080] 所示。

[0081] (2) 水凝胶的制备

[0082] 配置浓度为3%的海藻酸盐水溶液,海藻酸盐的分子量为 3×10^5 Da,备用;然后加入包载钙离子脂质体粉体,钙离子的浓度为0.1mol/L,得到混合溶液A,备用;用0.5mol/L的醋酸溶液溶解贻贝粘附蛋白McfP-3,McfP-3的浓度为3mg/mL,得到混合溶液B,将溶液A和溶液B按照体积比为3:1混合,待混合完全,在37℃下孵化,30min后得到具有生物配体的海藻酸水凝胶。

[0083] 实施例4

[0084] (1) 包载生物可兼容的金属离子的脂质体的制备如实施例1所示。

[0085] (2) 水凝胶的制备

[0086] 配置浓度为3%的海藻酸盐水溶液,海藻酸盐的分子量为 3×10^5 Da,备用;然后加入包载钙离子脂质体粉体,钙离子的浓度为0.1mol/L,得到混合溶液A,备用;用水配置浓度为5%的透明质酸盐溶液C,其中透明质酸的分子量为 1×10^6 Da;用5%的醋酸溶液溶解贻贝粘附蛋白McfP-4,McfP-4的浓度为4mg/ml,得到混合溶液E,将溶液A、溶液C和溶液E按照体积比为3:1:1混合,待混合完全,在37℃下孵化,30min后得到具有生物配体的海藻酸/透明质酸水凝胶。

[0087] 实施例5

[0088] (1) 包载生物可兼容的金属离子的脂质体的制备如实施例1所示,将其中的0.4mol/L氯化钙溶液改为0.8mol/L氯化铁溶液;

[0089] (2) 具有活性醛基的高分子材料的制备

[0090] 用水配置浓度为3%的透明质酸盐溶液,然后加入高碘酸钠对其进行氧化,高碘酸钠的加入量是透明质酸加入摩尔量的1.3倍,氧化反应时间为0.5h,然后加入乙二醇终止反应,乙二醇加入的量与高碘酸钠加入量的摩尔比为1:1,然后用截留分子量为8000Da的透析袋进行透析,每天换三次水,透析三天;最后在-80℃冷冻2h,再冷冻干燥72h,得到具有活性醛基的透明质酸化合物。

[0091] (3) 具有活性醛基及生物配体高分子材料的制备

[0092] 称量0.2g具有活性醛基的透明质酸化合物,将其溶解在8mL水中,待完全溶解;然后加入0.2g EDC和0.2g NHS,使其充分溶解,用0.1mol/L氢氧化钠调节其pH,使其pH值为5.5,再通入氮气30min,去除溶液中的氧气,然后加入DOPA,加入DOPA与透明质酸醛的摩尔比为1:2,避光反应24h,将反应后的溶液用截留分子量为3500Da的透析袋进行透析,每天换三次水,透析三天;最后在-80℃冷冻2h,再冷冻干燥72h,得到白色海绵状具有活性醛基及生物配体的透明质酸化合物。

[0093] (4) 水凝胶的制备

[0094] 用水配制浓度为5%具有活性醛基及生物配体的透明质酸化合物溶液;然后加入包载三价铁离子脂质体粉末,铁离子的浓度为0.15mol/L,然后在37℃下孵化,30min后得到具有活性醛基及生物配体的透明质酸水凝胶。

[0095] 实施例6

[0096] (1) 包载生物可兼容的金属离子的脂质体的制备如实施例1所示。

[0097] (2) 具有活性醛基的高分子材料的制备如实施例5所示。

[0098] (3) 具有活性醛基及生物配体高分子材料的制备如实施例5所示。

[0099] (4) 水凝胶的制备。

[0100] 用水溶解具有活性醛基及生物配体的透明质酸化合物得到浓度为6%的溶液;用水配置浓度为8%的海藻酸盐溶液,按照体积比为2:1混合,得到混合溶液I,然后加入含有钙离子的脂质体溶液,钙离子的浓度为0.18mol/L,最后在37℃下孵化,30min后得到海藻酸/具有活性醛基及生物配体的透明质酸水凝胶。

[0101] 实施例7

[0102] (1) 包载生物可兼容的金属离子的脂质体的制备如实施例5所示。

[0103] (2) 具有活性醛基的高分子材料的制备如实施例5所示。

[0104] (3) 具有活性醛基及生物配体高分子材料的制备如实施例5所示。

[0105] (4) 水凝胶的制备。

[0106] 用水溶解具有活性醛基及生物配体的透明质酸化合物得到浓度为6%的溶液；用醋酸配置浓度为3%的壳聚糖盐溶液，按照体积比为1:1混合，得到混合溶液F，然后加入含有钙离子的脂质体溶液，钙离子的浓度为0.2mol/L，最后在37℃下孵化，6h后得到壳聚糖/具有活性醛基及生物配体的透明质酸水凝胶。

[0107] 实施例8

[0108] (1) 包载生物可兼容的金属离子的脂质体的制备如实施例1所示。

[0109] (2) 具有活性醛基的高分子材料的制备如实施例5所示。

[0110] (3) 具有生物配体高分子材料的制备如实施例5所示。

[0111] (4) 水凝胶的制备。

[0112] 用水溶解具有活性醛基的透明质酸化合物得到浓度为6%的溶液；用水配置浓度为8%的海藻酸盐溶液，按照体积比为2:1混合，得到混合溶液J，然后加入含有钙离子的脂质体溶液，钙离子的浓度为0.18mol/L，最后在37℃下孵化，30min后得到海藻酸/具有活性醛基的透明质酸水凝胶。

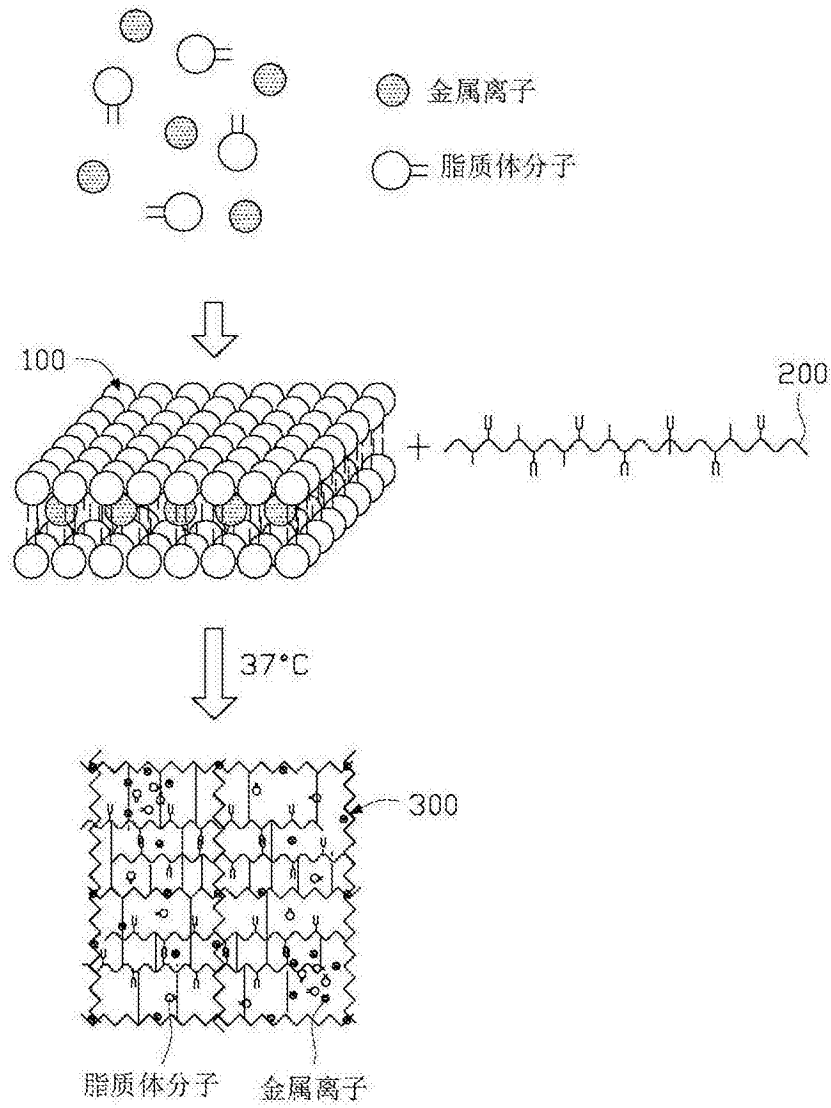


图1

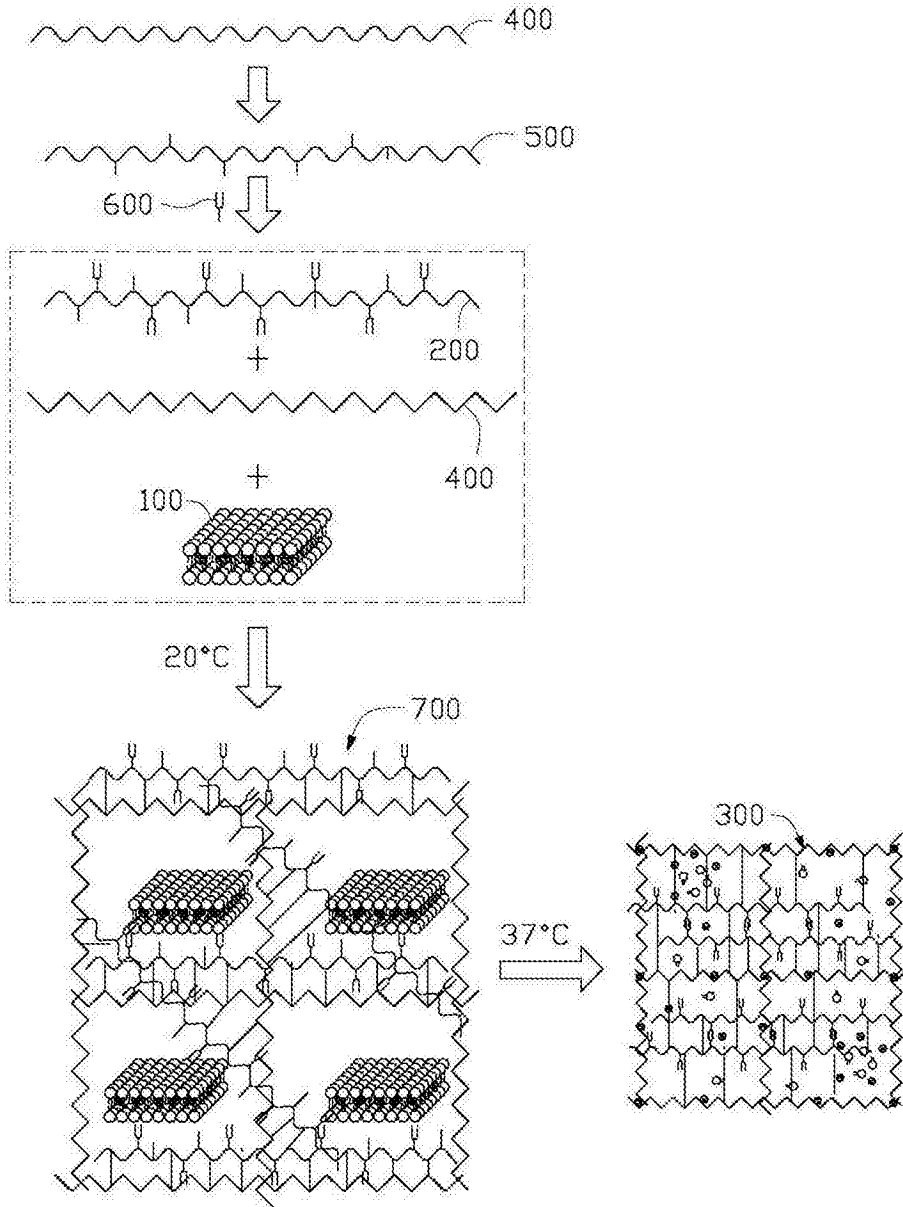


图2