



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102784414 A

(43) 申请公布日 2012. 11. 21

(21) 申请号 201210272173. X

(22) 申请日 2012. 08. 02

(71) 申请人 东华大学

地址 201620 上海市松江区松江新城人民北路 2999 号

(72) 发明人 莫秀梅 耿晓华

(74) 专利代理机构 上海泰能知识产权代理事务所 31233

代理人 黄志达 谢文凯

(51) Int. Cl.

A61L 27/52(2006. 01)

A61L 27/22(2006. 01)

A61L 27/20(2006. 01)

A61L 27/18(2006. 01)

C08B 37/02(2006. 01)

C08H 1/00(2006. 01)

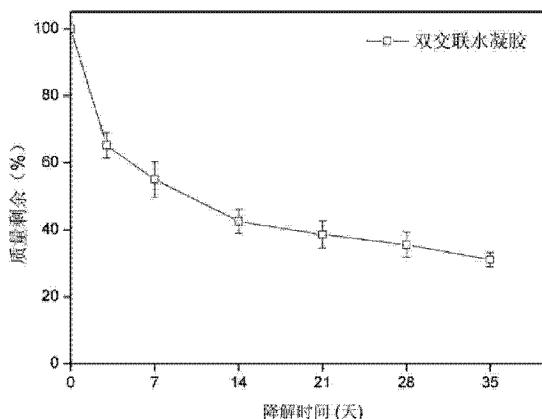
权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 3 页

(54) 发明名称

一种可用于组织工程的可注射性双交联水凝胶的制备方法

(57) 摘要

本发明涉及一种可用于组织工程的可注射性双交联水凝胶的制备方法,包括:将胺基化明胶的水溶液、醛基化葡聚糖的水溶液和端基乙烯基化四壁聚乙二醇的水溶液按体积比 4:4:3 混合,然后在 35-40℃下交联 10-20min,最后进行紫外照射交联 3-8min,即得。本发明的制备方法操作工艺简单,实施条件温和;本发明得到的双交联水凝胶无毒,可生物降解,具有良好的机械性能和生物相容性,可用于组织工程中的可注射性水凝胶支架。



1. 一种可用于组织工程的可注射性双交联水凝胶的制备方法,包括:

将胺基化明胶的水溶液、醛基化葡聚糖的水溶液和端基乙烯基化四壁聚乙二醇的水溶液按体积比 4:4:3 混合,然后在 35-40℃ 下交联 10-20min,最后进行紫外照射交联 3-8min,即得。

2. 根据权利要求 1 所述的一种可用于组织工程的可注射性双交联水凝胶的制备方法,其特征在于:所述的紫外照射交联中紫外线发生器为波长 365nm、功率 5mW/cm<sup>2</sup> 的紫外灯。

3. 根据权利要求 1 所述的一种可用于组织工程的可注射性双交联水凝胶的制备方法,其特征在于:所述的胺基化明胶的水溶液的质量百分比浓度为 15-25%,醛基化葡聚糖的水溶液的质量百分比浓度为 8-15%,端基乙烯基化四壁聚乙二醇的水溶液的质量百分比浓度为 15-25%。

4. 根据权利要求 1 所述的一种可用于组织工程的可注射性双交联水凝胶的制备方法,其特征在于:所述的胺基化明胶的制备方法包括:将乙二胺和碳化二亚胺加入明胶水溶液中,使明胶上的羧基、乙二胺和碳化二亚胺的摩尔比为 1:10-50:1.2-5;然后室温下反应过夜,透析、冷冻干燥,即得。

5. 根据权利要求 4 所述的一种可用于组织工程的可注射性双交联水凝胶的制备方法,其特征在于:所述明胶水溶液的质量百分比浓度为 2-5%。

6. 根据权利要求 1 所述的一种可用于组织工程的可注射性双交联水凝胶的制备方法,其特征在于:所述的醛基化葡聚糖制备方法包括:将高碘酸钠加入葡聚糖水溶液中,使高碘酸钠与葡聚糖的结构单元的摩尔比为 0.2-1:1;然后室温下反应,透析、冷冻干燥,即可。

7. 根据权利要求 6 所述的一种可用于组织工程的可注射性双交联水凝胶的制备方法,其特征在于:所述葡聚糖水溶液的质量百分比浓度为 0.05-2%。

8. 根据权利要求 4 或 6 所述的一种可用于组织工程的可注射性双交联水凝胶的制备方法,其特征在于:所述的透析为采用截留分子量为 3500 的透析袋透 3 天。

9. 根据权利要求 1 所述的一种可用于组织工程的可注射性双交联水凝胶的制备方法,其特征在于:所述的端基乙烯基化四壁聚乙二醇的制备方法包括:将四壁聚乙二醇、三乙胺、丙烯酰氯溶于无水二氯甲烷中,其中四壁聚乙二醇、三乙胺和丙烯酰氯的摩尔比为 1:1-6:1-10;然后室温下反应后用过量乙醚沉淀提纯,再次溶于二氯甲烷,用过量乙醚沉淀,重复三次,室温下减压真空干燥,即得。

10. 根据权利要求 1 所述的一种可用于组织工程的可注射性双交联水凝胶的制备方法,其特征在于:所述的紫外照射交联中采用的光引发剂为艳加固 2959。

## 一种可用于组织工程的可注射性双交联水凝胶的制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于水凝胶的制备领域,特别涉及一种可用于组织工程的可注射性双交联水凝胶的制备方法。

### 背景技术

[0002] 水凝胶是亲水的聚合物网络,它能够吸收大量的水分,但由于聚合物链间的物理交联和化学交联作用而不会溶解于水中,只能溶胀且保持一定的形状。水凝胶具有良好的生物相容性、水渗透性,而且通过人工合成可得到不同微观结构和性能的水凝胶材料,这些性质使水凝胶在生物医学领域获得了广泛的应用。

[0003] 用于组织工程的可注射水凝胶是将细胞 / 载体复合物注射入机体内,形成新的组织,从而达到修复机体缺损的目的。该方法具有创伤小和操作简单的特点,在修复不规则缺损时,可注射软骨可直接注入缺损区,在固化前进行局部塑形,具有可塑性强的优点。此外,水凝胶溶液还可与各种治疗药物混合,通过注射器直接注射到特定位置。因此可原位成型的水凝胶在组织工程中有广泛的应用前景。

[0004] 目前,可注射性水凝胶材料的成型方式主要包括化学交联、辐射交联,光引发聚合和物理交联四种方式。采用的水凝胶材料包括天然材料如海藻酸盐、胶原、透明质酸、琼脂、壳聚糖、葡聚糖和明胶等以及聚合物材料如聚反丁烯二酸丙二醇酯、聚乙二醇以及聚氧化乙烯氧化丙烯共聚物等。

### 发明内容

[0005] 本发明所要解决的技术问题是提供一种可用于组织工程的可注射性双交联水凝胶的制备方法,该方法操作简单,实施条件温和,该水凝胶生物相容性好,易降解,合成高分子材料生物惰性好,机械性能强。

[0006] 本发明的一种可用于组织工程的可注射性双交联水凝胶的制备方法,包括:

[0007] 将胺基化明胶的水溶液、醛基化葡聚糖的水溶液和端基乙烯基化四壁聚乙二醇的水溶液按体积比 4:4:3 混合,然后在 35-40℃ 下交联 10-20min,最后进行紫外照射交联 3-8min,即得。

[0008] 所述的紫外照射交联中紫外线发生器为波长 365nm、功率 5mW/cm<sup>2</sup> 的紫外灯。

[0009] 所述的胺基化明胶的水溶液的质量百分比浓度为 15-25%,醛基化葡聚糖的水溶液的质量百分比浓度为 8-15%,端基乙烯基化四壁聚乙二醇的水溶液的质量百分比浓度为 15-25%。

[0010] 所述的胺基化明胶的制备方法包括:将乙二胺和碳化二亚胺加入明胶水溶液中,使明胶上的羧基、乙二胺和碳化二亚胺的摩尔比为 1:10-50:1.2-5;然后室温下反应过夜,透析、-60℃ 冷冻干燥,即得。

[0011] 上述明胶水溶液的质量百分比浓度为 2-5%。

[0012] 上述的透析为采用截留分子量为 3500 的透析袋透 3 天。

[0013] 所述的醛基化葡聚糖制备方法包括：将高碘酸钠加入葡聚糖水溶液中，使高碘酸钠与葡聚糖的结构单元的摩尔比为 0.2-1:1；然后室温下反应 2-5h，透析、-60℃冷冻干燥，即可。

[0014] 上述葡聚糖水溶液的质量百分比浓度为 0.05-2%。

[0015] 上述的透析为采用截留分子量为 3500 的透析袋透析 3 天。

[0016] 所述的端基乙烯基化四壁聚乙二醇的制备方法包括：将四壁聚乙二醇(上海景宇生物科技有限公司, 上海, 中国)、三乙胺、丙烯酰氯溶于无水二氯甲烷中, 其中四壁聚乙二醇、三乙胺和丙烯酰氯的摩尔比为 1:1-6:1-10；然后室温下反应 40-60h 后用过量乙醚沉淀提纯, 再次溶于二氯甲烷, 用过量乙醚沉淀, 重复三次, 室温下减压真空干燥, 即得。

[0017] 所述的紫外照射交联中采用的光引发剂为艳加固 2959 (Sigma 公司, 上海, 中国)。

[0018] 本发明的可注射性双交联水凝胶的制备方法中葡聚糖由  $\text{NaIO}_4$  氧化相邻羟基形成醛基；明胶在碳化二亚胺存在下与乙二胺缩合形成氨基化明胶；四壁聚乙二醇在三乙胺的存在下与丙烯酰氯反应形成端基乙烯基化四壁聚乙二醇。首先, 醛基化葡聚糖与胺基化明胶通过醛基与氨基之间的希夫碱反应发生交联形成第一网络水凝胶。然后, 端基乙烯基化四壁聚乙二醇在光引发剂艳加固 2959 (I 2959) 的存在下利用 365nm 紫外光引发交联, 形成第二网络水凝胶。

[0019] 本发明的双交联水凝胶的设计可以使得实际操作中, 开始阶段能够自发快速成胶, 可防止发生溶液的到处移动。

[0020] 本发明的双交联水凝胶的设计可以使最终得到的凝胶具有较强的力学性能, 实际测试中, 在水中浸泡 12h 后的水凝胶仍具有 20kPa 的压缩模量值。

[0021] 本发明的双交联水凝胶的设计使得水凝胶支架可以通过调节组份的含量达到可控的降解性能。

[0022] 有益效果：

[0023] (1) 本发明方法操作工艺简单, 实施条件温和；

[0024] (2) 本发明的双交联水凝胶的天然材料生物相容性好, 易降解, 合成高分子材料生物惰性好, 机械性能强, 有望应用于组织工程中的可注射水凝胶支架。

## 附图说明

[0025] 图 1a 是醛基化葡聚糖的制备示意图；

[0026] 图 1b 是胺基化明胶的制备示意图；

[0027] 图 1c 是端基乙烯基化四壁聚乙二醇的制备示意图；

[0028] 图 2 是双交联水凝胶的成胶过程示意图；

[0029] 图 3 是双交联水凝胶在 PBS 中的降解示意图；

[0030] 图 4 是成骨前提细胞在双交联水凝胶表面培养 24h 后的生长情况示意图；

[0031] 图 5 是成骨前提细胞在双交联水凝胶中培养 4 天和 8 天后的生长情况示意图；

[0032] 其中, 图 1 和图 2 中的 I2959 表示艳加固 2959, ODex 表示醛基化葡聚糖, MGe1 表示胺基化明胶, 4A-PEGDA 表示端基乙烯基化四壁聚乙二醇。

## 具体实施方式

[0033] 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。此外应理解,在阅读了本发明讲授的内容之后,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。

#### [0034] 实施例 1

[0035] 如图 1a 所示,取葡聚糖加入去离子水中,磁力搅拌直至葡聚糖溶解完全,配成质量百分比浓度 1% 的葡聚糖水溶液。加入高碘酸钠 ( $\text{NaIO}_4$ ),其中高碘酸钠与葡聚糖的结构单元的摩尔比为 1:2,常温 (25℃) 下避光搅拌反应 4h 后加入 5ml 乙二醇,继续搅拌 15min 用于终止反应。将产物装入透析袋 (截留分子量为 3500) 中透析 3 天,每天换水 4 次。然后将产物取出置于塑料培养皿中,在低温冰箱中预冻 12h,并将预冻物冷冻干燥,最终获得部分醛基化葡聚糖白色产物。

#### [0036] 实施例 2

[0037] 如图 1b 所示,取明胶溶解在 0.1M 磷酸盐溶液 (pH5.0) 中,得到质量百分比浓度为 4% 的明胶水溶液,待完全溶解 (溶液呈透明液体) 后,加入乙二胺 (ED)。磁力搅拌混合均匀,用 6M 的 HCl 调至 pH=5.0,然后加入碳化二亚胺 (EDC),常温下反应 4h;其中明胶上的羧基、乙二胺和碳化二亚胺的摩尔比为 1:40:2。将产物装入透析袋 (cut off Mw=3500) 中透析 3 天,每天换水 3~4 次。透析完全后,将透析液倒入塑料表面皿中,放入低温冰箱预冻 24h,将预冻物冷冻干燥,最终获得改性明胶的白色产物。

#### [0038] 实施例 3

[0039] 如图 1c 所示,取 8g 四壁聚乙二醇溶于 200ml 的无水二氯甲烷中,通过共沸蒸馏出去四壁聚乙二醇中的微量水,冷却至室温,加入三乙胺,然后在氮气保护下滴加丙烯酰氯,室温下反应 48h,其中四壁聚乙二醇、三乙胺和丙烯酰氯的摩尔比为 1:4:8。之后用过量乙醚沉淀提纯,再次溶于二氯甲烷,用过量乙醚沉淀,提纯过程重复三次,室温下减压真空干燥,既得白色产物。

#### [0040] 实施例 4

[0041] 如图 2 所示,先将质量百分比浓度为 20% 的胺基化明胶水溶液,质量百分比浓度为 10% 醛基化葡聚糖水溶液和质量百分比浓度为 20% 的端基乙烯基化四壁聚乙二醇水溶液按体积比 4:4:3 混合,然后加入艳加固 2595 光交联引发剂 (Sigma 公司,上海,中国) 并使其最终浓度为 0.1% (w/v)。在 37℃ 下交联 15 分钟,然后在 365nm 波长,  $5\text{mW}/\text{cm}^2$  功率的紫外灯下照射 5 分钟交联,既得双交联水凝胶。

#### [0042] 实施例 5

[0043] 根据实施例 4 所示方法,制备圆柱形双交联水凝胶块,室温下在磷酸盐缓冲液 (pH=7.4) 中浸泡 24h 之后,使用万能材料试验机 (Dejie DXLL-20000) 对水凝胶进行压缩试验,得出水凝胶的压缩模量为 19.84kPa。

#### [0044] 实施例 6

[0045] 根据实施例 4 所示方法,制备双交联水凝胶块,并且通过改变其中端基乙烯基化四壁聚乙二醇的含量作为对照组,然后浸泡在 37℃ 的磷酸盐缓冲液 (pH=7.4) 中,定期取出,冷冻干燥,称重,计算得出降解曲线。如图 3 所示,双交联水凝胶在最初的两个周降解掉 60% 的质量,随后质量损失减缓,在第五周时仍保持大约 30% 的质量。

**[0046] 实施例 7**

**[0047]** 在离心管中加入分别使用 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤灭菌后的醛基化葡聚糖水溶液 (400  $\mu\text{l}$ ), 胺基化明胶水溶液 (400  $\mu\text{l}$ ), 端基乙烯基化四壁聚乙二醇和艳加固 2595 光引发剂混合水溶液 (300  $\mu\text{l}$ )。混合均匀后, 用移液器注入 48 孔细胞培养板中, 然后根据实施例 4 所示方法, 制备圆柱形双交联水凝胶块。将成骨前提细胞种植与水凝胶表面上, 细胞密度设定为 10,000 个 /ml。培养 24h 后, 利用死活细胞试剂盒染色, 在荧光显微镜下观察细胞形态。如图 4 所示, 成骨前提细胞可以很好的在双交联水凝胶上粘附, 铺展, 并保持成活。证明了双交联水凝胶具有很好的表面生物相容性。

**[0048] 实施例 8**

**[0049]** 在离心管中加入经过计数后高浓度细胞悬液, 然后加入分别使用 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤灭菌后的醛基化葡聚糖水溶液 (400  $\mu\text{l}$ ), 胺基化明胶水溶液 (400  $\mu\text{l}$ ), 端基乙烯基化四壁聚乙二醇和艳加固 2595 光引发剂混合水溶液 (300  $\mu\text{l}$ ), 使得最终的细胞密度稀释为  $5 \times 10^6$ 。将混合后的溶液注入 48 孔板内, 根据实施例 4 所示方法制备出内部包裹细胞的双交联水凝胶块。之后, 迅速往 48 孔板中加入 1ml 含有 10% 牛血清蛋白的  $\alpha$ -MEM, 放入培养箱培养。30min 后换液一次, 再过 60min 换液一次, 以后每天换液一次。分别在第四天(图 5a)和第八天(图 5b)对细胞用 phalloidin-Alexa568 和 DAPI 进行免疫荧光染色后, 用激光共聚焦显微镜进行观察拍摄。如图 5 所示, 成骨前体细胞可以在双交联水凝胶中成活并铺展, 随培养时间增加而增长变大。证明了所制备的双交联水凝胶具有很好的生物相容性, 并能够支持成骨细胞在其内部生长。

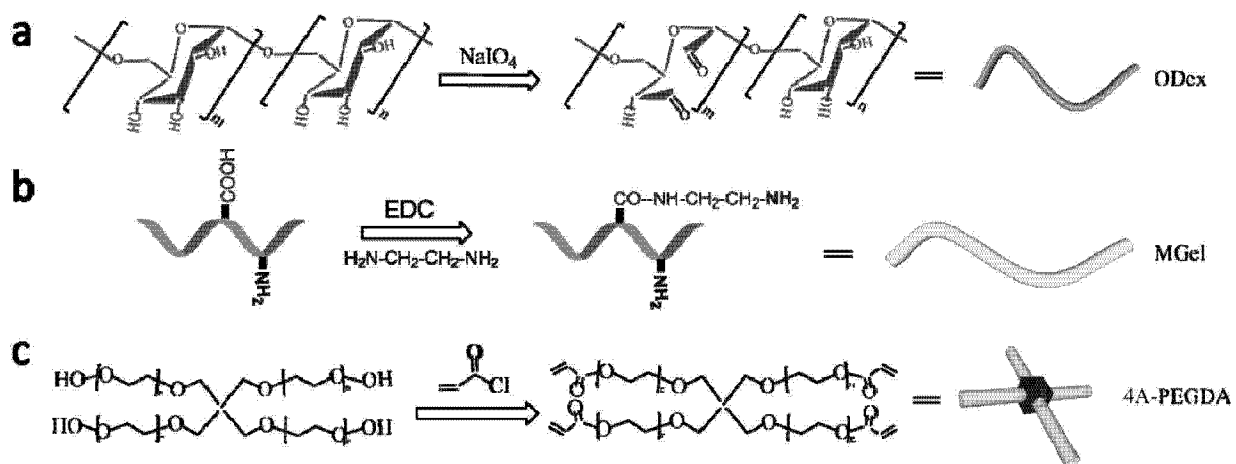


图 1

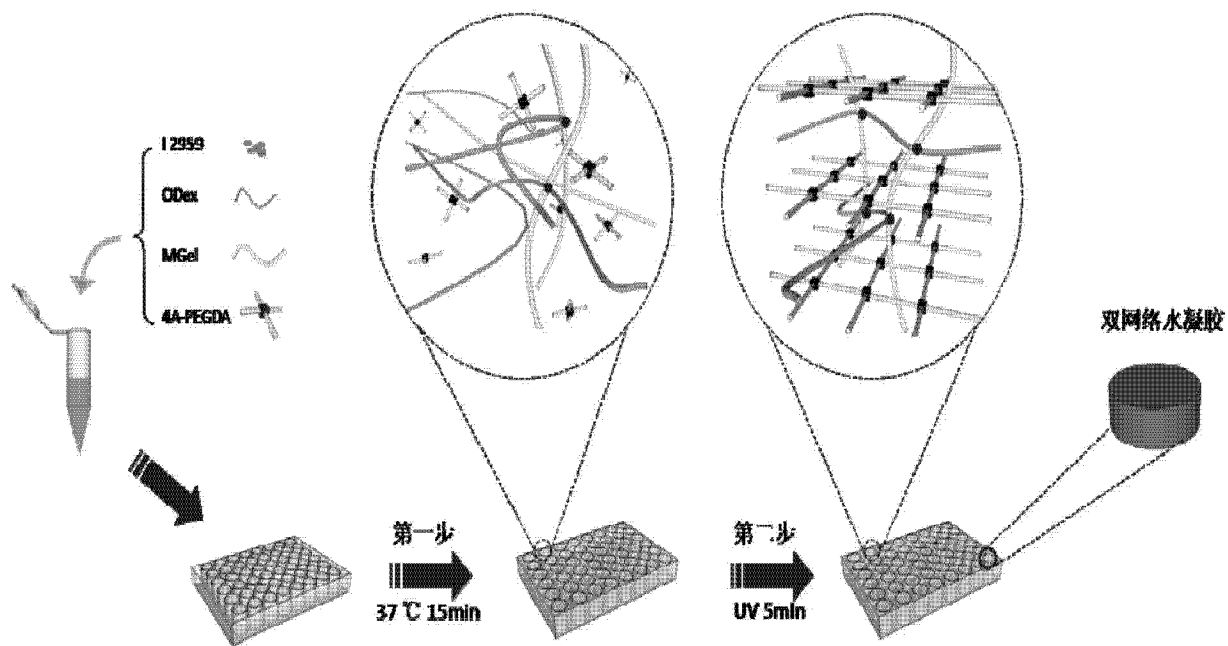


图 2

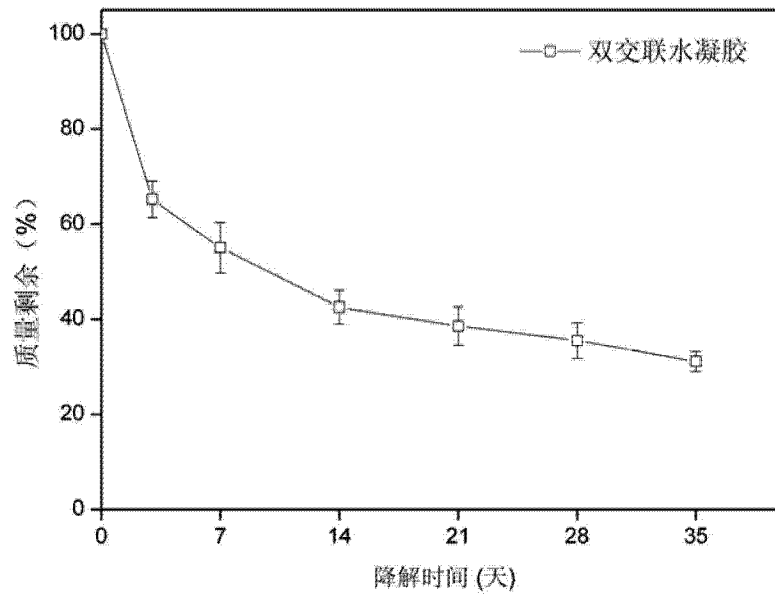


图 3

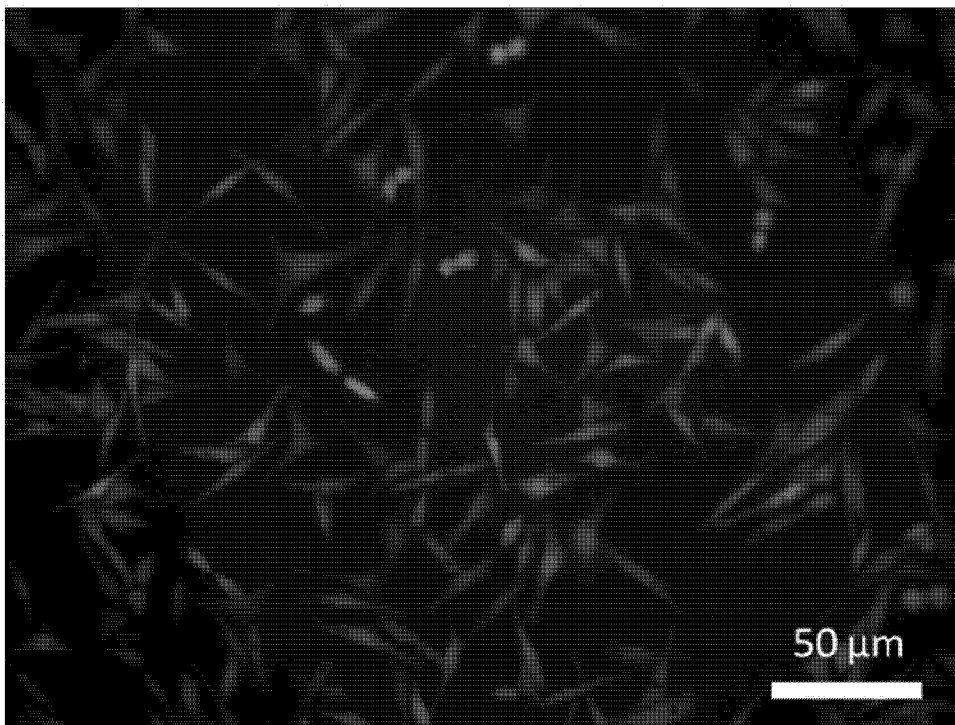


图 4



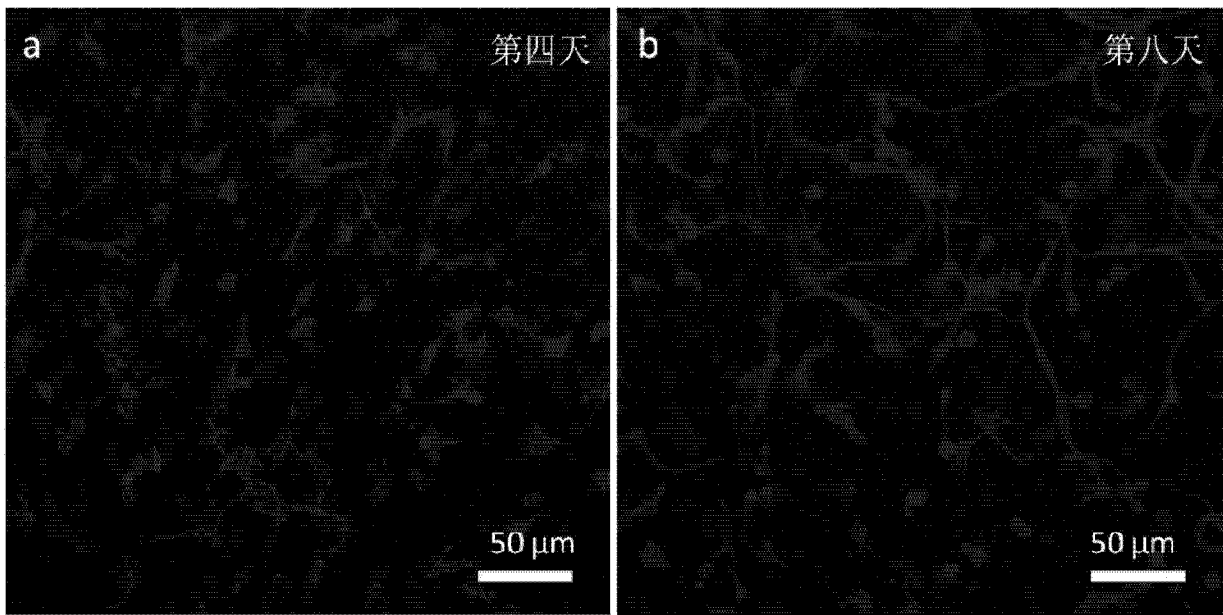


图 5