



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114099416 B

(45) 授权公告日 2023.03.28

(21) 申请号 202111265582.2

(22) 申请日 2021.10.28

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 114099416 A

(43) 申请公布日 2022.03.01

(73) 专利权人 四川大学
地址 610065 四川省成都市一环路南一段
24号

(72) 发明人 胡成 杨立 王云兵

(74) 专利代理机构 杭州合信专利代理事务所
(普通合伙) 33337

专利代理师 刘静静

(51) Int. Cl.

A61K 9/06 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 108152266 A, 2018.06.12

CN 111437438 A, 2020.07.24

CN 112843327 A, 2021.05.28

CN 113004579 A, 2021.06.22

审查员 毛骥

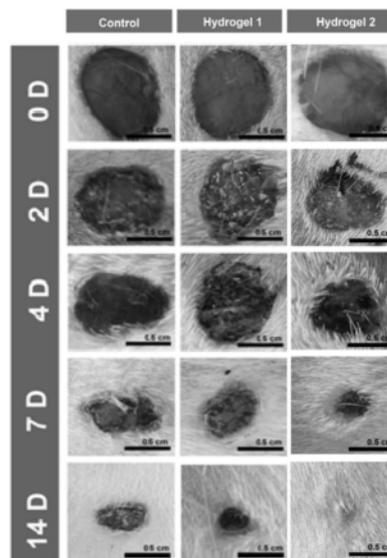
权利要求书1页 说明书13页 附图2页

(54) 发明名称

微环境响应的多功能可注射水凝胶及其制备方法和应用

(57) 摘要

本申请公开了一种微环境响应的多功能可注射水凝胶及其制备方法和应用,其中,微环境响应的多功能可注射水凝胶,由含苯硼酸和醛基基团的功能聚合物与含羟基的聚合物相互作用形成,所述多功能可注射水凝胶响应于酸性条件和/或活性氧条件,所述多功能可注射水凝胶上负载有治疗物质,所述治疗物质为亲水性药物、疏水性药物、生物活性物质、纳米粒子中的至少一种。所述可注射水凝胶实现慢性伤口更好更快的修复。



1. 一种微环境响应的多功能可注射水凝胶,其特征在於,采用如下制备方法制备得到;

10.0g透明质酸和8.0g高碘酸钠溶解在去离子水中,并在37℃搅拌4h,然后,加入1.2mL乙二醇于上述溶液中搅拌2小时以终止氧化反应,最后,用去离子水透析48h,冻干后得到HA-CHO;

5.00g HA-CHO溶于200mL水中,向其中加入1.5g 3-氨基苯硼酸,然后,在37℃条件下搅拌12h,最后在pH7.4的去离子水中透析3天,最后用冻干机对其进行冷冻干燥,得到HA-CHO-BA;

2mL浓度25-28wt%的氨水与40mL的乙醇和90mL的去离子水在30℃下轻度搅拌30min,将500mg盐酸多巴胺溶解在10mL去离子水中,缓慢滴入上述混合液中,反应进行24h后,以6000转/分钟的转速离心12min,用去离子水洗3次后,收集聚多巴胺纳米颗粒PDANPs;

将聚多巴胺纳米颗粒PDANPs与4mg/mL AgNO_3 在冰水浴中混合1小时得到PDA@AgNPs,然后将PDA@AgNPs在以6000转/分钟的转速离心12min,用去离子水冲洗三次,再将其分散到去离子水中,PDA@AgNPs的质量浓度为5%;

将4mL质量分数10%的聚乙烯醇、2mL含有III型胶原蛋白的HA-CHO-BA及2mL含有PDA@AgNPs的溶液互相混合,含有III型胶原蛋白的HA-CHO-BA中HA-CHO-BA的质量分数为20%,溶液混合后PDA@AgNPs的最终浓度为200 $\mu\text{g}/\text{mL}$,III型胶原蛋白的最终浓度为2mg/mL,得到多功能水凝胶。

微环境响应的多功能可注射水凝胶及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本申请涉及生物医用材料技术领域,特别是涉及一种微环境响应的多功能可注射水凝胶及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 当前,随着全球人口老龄化问题的不断加剧及糖尿病、肥胖症发病率的不断上升,其导致的糖尿病慢性伤口患者人数正在急剧上升,给全球医疗系统带来沉重的经济负担。据统计,目前发达国家有1-2%的人口正在遭受慢性创伤的困扰。糖尿病慢性伤口在美国已影响了超过650万的患者,其中65岁以上糖尿病患者中约有18%患有无法治愈的足部溃疡,每年造成的经济损失超过250亿美元。而在我国,50岁以上的糖尿病患者,糖尿病足的发病率高达8.1%,年死亡率高达11%,而截肢患者死亡率高达22%,成为糖尿病患者致残和致死的主要原因之一,且医疗费用巨大。目前在临床上,糖尿病慢性伤口的快速愈合及功能完整性恢复仍然是一个巨大的挑战。

[0003] 糖尿病慢性伤口由于具有细菌感染风险高、炎症反应不平衡、耐药性细菌生物膜易形成、血管再生较差以及真皮细胞和表皮细胞对修复刺激反应能力丧失等特征,严重影响了其快速愈合及功能完整性恢复。目前,抗生素被广泛应用于慢性伤口治疗中,但近些年,研究指出因抗生素滥用导致的细菌耐药性问题正在对人类健康构成严重威胁。如果细菌耐药性问题得不到有效控制,到2050年,世界经济的累计损失可能达到100万亿美元。水凝胶由于结构与人体组织具有天生的相似之处,在生物医学领域受到了极大关注,在过去的几十年里已被用来治疗慢性伤口。然而传统水凝胶受限于其功能单一、无法根据伤口微环境变化而调整药物释放量,因此无法满足不同伤口愈合阶段的需求,导致慢性伤口的治愈率不足30%,且复发率较高。

[0004] 近年来,多功能的智能载药水凝胶开发和在慢性伤口修复方面的应用一直是组织工程和再生医学研究领域的热点课题,具有巨大的应用潜力。智能载药水凝胶可根据体外环境(紫外线、近红外光辐射、磁场、超声)或伤口部位微环境(酸碱度(pH)值、酶、活性氧(ROS)、温度、葡萄糖)等单一/多重变化,通过电荷形成、电荷转化、亲疏水相互作用、氢键和主客体/宿主分子的结合/解离等许多不同的机制实现水凝胶材料形态或特性的相关变化,从而实现药物的响应可控释放。与传统载药水凝胶相比,智能响应载药水凝胶在提高慢性伤口疾病治疗效果的同时,还能减少给药频率和降低药物的副作用,富有极大的临床转化前景。随着精准医疗和精准给药概念的提出,迫切需要针对慢性伤口疾病微环境特点,个性化设计并构建微环境响应的多功能水凝胶去实现慢性伤口的精准治疗。可以预见,精准医疗技术的出现和成熟,将显著改善患者的诊疗体验和诊疗效果,这也将极大地促进微环境响应多功能水凝胶的发展和临床转化。

[0005] 另一方面,慢性伤口部位复杂的微环境以及止血、炎症、增生和重塑四个连续而又相互交叉的愈合阶段,导致其在不同愈合阶段对生物治疗物质的需求各有不同。因此理想的慢性伤口治疗方法还需要根据慢性伤口愈合阶段的变化及时调整不同治疗物质的释放

速率,从而满足伤口愈合不同阶段对抗菌、抗炎、促细胞增殖、迁移和促血管生成等需求,最后实现慢性伤口又快、又好地愈合。

[0006] 综上所述,针对糖尿病慢性伤口部位的微环境特点和多阶段性,开发一种能够在伤口部位快速响应且能程序性按需释放治疗物质的多功能水凝胶,对促进糖尿病慢性伤口快速修复,减轻患者痛苦,缩短病程,具有重要意义。

发明内容

[0007] 针对慢性伤口的康复问题,本申请提供一种微环境响应的多功能可注射水凝胶及其制备方法,实现慢性伤口更好更快的修复。

[0008] 一种微环境响应的多功能可注射水凝胶,由含苯硼酸和醛基基团的功能聚合物与含羟基的聚合物相互作用形成,所述多功能可注射水凝胶响应于酸性条件和/或活性氧条件,所述多功能可注射水凝胶上负载有治疗物质,所述治疗物质为亲水性药物、疏水性药物、生物活性物质、纳米粒子中的至少一种。

[0009] 所述功能聚合物与含羟基的聚合物之间通过苯硼酸与羟基之间的可逆共价键形成水凝胶,水凝胶响应于酸性条件和/或活性氧条件,可逆共价键解断裂后,水凝胶发生崩解。

[0010] 所述水凝胶具有良好的自修复和可注射性能,通过pH和ROS双响应介导的机制实现药物程序可控释放。

[0011] 水凝胶中负载的治疗物质,可以同时结合抗菌、抗炎、促细胞增殖、迁移、血管生成等多条途径来加速慢性伤口愈合,在细菌感染慢性伤口疾病方面具有很大的应用潜力。

[0012] 以下还提供了若干可选方式,但并不作为对上述总体方案的额外限定,仅仅是进一步的增补或优选,在没有技术或逻辑矛盾的前提下,各可选方式可单独针对上述总体方案进行组合,还可以是多个可选方式之间进行组合。

[0013] 所述水凝胶作用于慢性伤口,逐步释放水凝胶内负载的治疗物质,更好修复伤口。

[0014] 可注射水凝胶中负载的物质根据实际治疗目的的需要,选择性的选取一到多种负载在水凝胶中。

[0015] 可选的,所述治疗物质为亲水性药物、疏水性药物、生物活性物质、纳米粒子中的至少两种。

[0016] 糖尿病慢性伤口部位具有复杂的微环境,且愈合的过程呈现多阶段的特点,所述水凝胶上同时负载两种治疗物质,根据微环境的变化释放相应的治疗物质,实现不同治疗物质的程序性释放,以满足伤口愈合不同阶段所需要的治疗物质,达到集多种功能于一体且协同实现糖尿病慢性感染伤口更快、更好修复的需求。

[0017] 可选的,所述治疗物质为亲水性药物、疏水性药物、纳米粒子中的至少一种和生物活性物质。

[0018] 可选的,所述治疗物质为生物活性物质和纳米粒子。

[0019] 可选的,所述治疗物质为重组人源化胶原蛋白和纳米粒子。

[0020] 可选的,所述治疗物质为重组III型人源化胶原蛋白和多巴胺载银纳米粒子。

[0021] 所述多巴胺载银纳米粒子用于皮肤损伤部位抗菌、消炎,所述重组人源III型胶原蛋白促进成纤维细胞和内皮细胞增殖和迁移,多巴胺载银纳米粒子先释放,重组人源III型

胶原蛋白,二者相互作用,可以有效促进受损皮肤组织的修复。

[0022] 可选的,所述治疗物质为生物活性物质、纳米粒子以及亲水性药物。

[0023] 可选的,所述治疗物质为生物活性物质、纳米粒子以及疏水性药物。

[0024] 可选的,所述治疗物质为生物活性物质、纳米粒子、亲水性药物、以及疏水性药物。

[0025] 可选的,所述功能聚合物为含苯硼酸和醛基基团的海藻酸钠、壳聚糖、明胶、透明质酸、羧甲基纤维素、葡聚糖、甲基纤维素、淀粉、环糊精、龙胶、魔芋胶、阿拉伯树胶、木质素、白芨多糖及其改性产物中的至少一种。

[0026] 在中性或弱碱性条件下,苯硼酸与羟基基团通过形成硼酯键进而形成水凝胶,在酸性条件和/或活性氧条件,硼酯键断裂,水凝胶发生崩解,水凝胶中的治疗物质释放。

[0027] 本申请中,天然高分子应理解为包括其改性产物,即透明质酸包括未经修饰的透明质酸,也包括透明质酸的改性产物,同理,壳聚糖、明胶、海藻酸钠、透明质酸、肝素、羧甲基纤维素、葡聚糖、甲基纤维素、淀粉、环糊精、龙胶、魔芋胶、阿拉伯树胶、木质素、白芨多糖也都包括其相应的改性产物,改性产物本身不对水凝胶的形成和崩解产生不良影响。

[0028] 可选的,含羟基的聚合物为聚乙烯醇、海藻酸钠、透明质酸、淀粉、纤维素(例如羧甲基纤维素、甲基纤维素)、龙胶、魔芋胶、阿拉伯树胶、木质素、葡聚糖、环糊精、白芨多糖中的至少一种。

[0029] 可选的,所述生物活性物质为重组人源化胶原蛋白、动物胶原、氨基酸多肽、非胶原蛋白、弹性蛋白、蛋白聚糖、氨基聚糖中的至少一种。

[0030] 可选的,所述生物活性物质为重组人源化胶原蛋白。

[0031] 可选的,所述生物活性物质为重组I型人源化胶原蛋白、重组III型人源化胶原蛋白、重组XVII型人源化胶原蛋白中的至少一种。

[0032] 可选的,所述生物活性物质为重组III型人源化胶原蛋白。

[0033] 可选的,所述纳米粒子可以采用各种形态,例如凝胶、胶束、金属纳米材料等。

[0034] 可选的,所述纳米粒子为多巴胺载银纳米粒子。

[0035] 可选的,所述疏水性药物为布洛芬、对乙酰氨基酚、姜黄素、吡喹酮中的至少一种。

[0036] 可选的,所述疏水性药物以两亲性聚合物为载体组装成载药纳米胶束负载在所述水凝胶中。

[0037] 一种所述微环境响应的多功能可注射水凝胶在皮肤损伤修复中的应用。

[0038] 一种微环境响应的多功能可注射水凝胶的制备方法,包括以下步骤:

[0039] 制备含有苯硼酸和醛基基团的功能聚合物;

[0040] 将治疗物质、功能聚合物、含羟基的聚合物混合,得到所述水凝胶,所述治疗物质为亲水性药物、疏水性药物、生物活性物质、纳米粒子中的至少一种。

[0041] 所述含羟基的聚合物中含有多个羟基基团,功能聚合物与含羟基的聚合物混合后,即可形成凝胶。

[0042] 以下还提供了若干可选方式,但并不作为对上述总体方案的额外限定,仅仅是进一步的增补或优选,在没有技术或逻辑矛盾的前提下,各可选方式可单独针对上述总体方案进行组合,还可以是多个可选方式之间进行组合。

[0043] 可选的,所述功能聚合物的制备采用以下方法中的一种:

[0044] 第一种制备方法包括：

[0045] 步骤a1,含氨基和羟基的聚合物经氧化后,得到含氨基和醛基的聚合物；

[0046] 步骤a2,含氨基和醛基的聚合物与含羧基和/或氨基的苯硼酸反应,得到所述功能聚合物；

[0047] 第二种制备方法包括步骤：

[0048] 步骤b1,含羧基和羟基的聚合物经氧化后,得到含羧基和醛基的聚合物；

[0049] 步骤b2,含羧基和醛基的聚合物与含羟基和/或氨基的苯硼酸反应,得到所述功能聚合物。

[0050] 两种制备方法均能够在功能聚合物中引入苯硼酸基团,既可以通过氨基和羧基的酰胺化反应,也可以通过羟基和羧基的酯化反应,还可以通过醛基与氨基的席夫碱反应进行,因此,聚合物中含有氨基、醛基或羟基,苯硼酸中含有氨基或羧基,都可以在聚合物中引入苯硼酸基团。

[0051] 功能聚合物中存在多种基团,例如,氨基、醛基、羟基、羧基,形成水凝胶基于以下基团间的相互作用中的至少一种：

[0052] a、苯硼酸与羟基；

[0053] b、醛基与氨基。

[0054] 可选的,所述步骤a1和步骤b1在30~40℃条件下进行,所述步骤a2和步骤b2在30~40℃条件下进行。

[0055] 可选的,所述功能聚合物的制备采用以下方法中的一种：

[0056] 第一种制备方法包括：

[0057] 步骤a1,含氨基和羟基的聚合物溶解后,在氧化剂作用下,在30~40℃条件下反应2-9h,制备得到含氨基和羟基的聚合物；

[0058] 步骤a2,含氨基和醛基的聚合物溶解后,与含羧基和/或氨基的苯硼酸在30~40℃条件下反应12-36h,得到所述功能聚合物；

[0059] 第二种制备方法包括步骤：

[0060] 步骤b1,含羧基和羟基的聚合物溶解后,在氧化剂作用下,在30~40℃条件下反应2-9h,制备得到含羧基和羟基的聚合物；

[0061] 步骤b2,含羧基和醛基的聚合物溶解后,与含羟基和/或氨基的苯硼酸在30~40℃条件下反应12-36h,得到所述功能聚合物。

[0062] 两种制备方法反应结束后,需要进行适当的后处理,包括在去离子水中透析、冷冻干燥等,得到的功能聚合物中含有苯硼酸和醛基基团。

[0063] 聚合物中苯硼酸基团的数量会影响水凝胶的形成和解离,苯硼酸基团的引入数量需适当。

[0064] 可选的,步骤a1中,含氨基和羟基的聚合物与氧化剂的质量比为10:3~10:9；

[0065] 步骤b1中,含羧基和羟基的聚合物与氧化剂的质量比为10:3~10:9。

[0066] 可选的,所述氧化剂为高碘酸钠、氯铬酸吡啶盐(PCC)、高锰酸钾、双氧水中的一种。

[0067] 可选的,步骤a2中,含氨基和醛基的聚合物在缩合剂和催化剂的作用下与含羧基的苯硼酸反应,含氨基和醛基的聚合物、含羧基的苯硼酸、缩合剂、催化剂的质量比为7:(4-

5) : (2-3) : 1;

[0068] 含氨基和醛基的聚合物与含氨基的苯硼酸的质量比为10: (2-4) ;

[0069] 步骤b2中,含羧基和醛基的聚合物在缩合剂和催化剂的作用下与含羟基和/或羟基的苯硼酸反应,含羧基和醛基的聚合物、含羟基和/或羟基的苯硼酸、缩合剂、催化剂的质量比为7: (4-5) : (2-3) : 1;

[0070] 含羧基和醛基的聚合物与含氨基的苯硼酸的质量比为10: (2-4) 。

[0071] 可选的,所述缩合剂为1-乙基- (3-二甲基氨基丙基) 碳二亚胺盐酸盐、0-苯并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸酯、六氟磷酸苯并三唑-1-基-氧基三吡咯烷基磷、二环己基碳二亚胺中的至少一种。

[0072] 可选的,所述催化剂为4-二甲氨基吡啶、N-羟基琥珀酰亚胺、1-羟基苯并三氮唑中的至少一种。

[0073] 可选的,所述功能聚合物的制备方法如下:

[0074] 原料溶解后,在37℃条件下反应4小时后,在去离子水中透析3天,然后再进行冷冻干燥制备具有醛基基团的聚合物;其中:

[0075] 含氨基和羟基的聚合物与氧化剂的质量比为10:8;

[0076] 含羧基和羟基的聚合物与氧化剂的质量比为10:8。

[0077] 含氨基和醛基的聚合物、含羧基的苯硼酸、缩合剂、催化剂的质量比为7:4.5:2.5:1;

[0078] 含氨基和醛基的聚合物与含氨基的苯硼酸的质量比为10:3;

[0079] 含羧基和醛基的聚合物、含羟基和/或羟基的苯硼酸、缩合剂、催化剂的质量比为7:4.5:2.5:1;

[0080] 含羧基和醛基的聚合物与含氨基的苯硼酸的质量比为10:3。

[0081] 可选的,所述纳米粒子为多巴胺载银纳米粒子,所述多巴胺载银纳米粒子的制备方法包括:

[0082] 步骤1,制备多巴胺纳米粒子;

[0083] 步骤2,将多巴胺纳米粒子与硝酸银在0~10℃混合,得到多巴胺载银纳米粒子。

[0084] 可选的,制备多巴胺纳米粒子包括如下步骤:

[0085] 盐酸多巴胺缓慢加入氨水与乙醇的混合水溶液中,反应18~36h,得到多巴胺纳米粒子。

[0086] 所述氨水的质量分数为25~28%,将氨水、乙醇和水在30~40℃条件下搅拌0.5~2h,得到所述氨水与乙醇的混合水溶液,然后将盐酸多巴胺缓慢加入该混合水溶液。

[0087] 反应完毕后,在5000-8000转/分离心8-15min,用去离子水洗3-6次后,得到多巴胺纳米粒子。

[0088] 可选的,氨水与乙醇的混合水溶液中,氨水、乙醇、水的体积比为:1:15~30:35~55。

[0089] 可选的,氨水、乙醇、水的体积比为2:40:90。

[0090] 可选的,所述盐酸多巴胺以水溶液形式加入氨水与乙醇的混合水溶液中,盐酸多巴胺水溶液中,盐酸多巴胺的浓度为25~100mg/mL。

[0091] 可选的,步骤2中,将多巴胺纳米粒子与2~12mg/mL硝酸银在0~10℃混合0.5~

2h,得到多巴胺载银纳米粒子。

[0092] 多巴胺纳米粒子与硝酸银混合结束后,在5000~8000转/分离心8~15min,用去离子水洗3~6次后,得到多巴胺载银纳米粒子。

[0093] 可选的,所述多巴胺载银纳米粒子的制备方法包括:

[0094] 步骤1,氨水、乙醇、去离子水在30~40℃下轻度搅拌0.5-2h,将盐酸多巴胺水溶液缓慢滴入上述混合液中,溶液的颜色立即变为淡黄色,然后逐渐变为深棕色,反应进行18~36h后,在5000~8000转/分离心8-15min,用去离子水洗3~6次后,收集多巴胺纳米粒子,并保存备用。

[0095] 步骤2,将多巴胺纳米粒子与2~12mg/mL AgNO_3 在冰水浴中混合0.5-2h得到多巴胺载银纳米粒子,然后将其在5000-8000转/分离心8~15min,用去离子水洗3-6次后,收集并保存备用。

[0096] 亲水性药物、生物活性物质、纳米粒子等水溶性较好的物质可以与功能聚合物、含羟基的聚合物直接混合,得到可注射水凝胶,对于疏水性药物需要进行特殊处理后,与功能聚合物、含羟基的聚合物进行混合。

[0097] 可选的,所述疏水性药物以两亲性聚合物作为载体,制作为载药纳米胶束,载药纳米胶束与功能聚合物、含羟基的聚合物混合,制备得到含疏水性药物的所述可注射水凝胶。

[0098] 两亲性聚合物与疏水性药物之间通过自组装形式制备载药纳米胶束,两亲性聚合物为药物载体,疏水性药物为所包裹的药物。

[0099] 所述两亲性聚合物由亲水链段和疏水链段组成,亲水链段为聚乙二醇、聚乙烯醚、聚乙烯醇、聚乙烯亚胺、聚乙烯吡咯烷酮、聚丙烯酰胺中的至少一种,疏水链段为聚环氧丙烷、聚苯乙烯、聚硅氧烷、聚丁二烯、聚甲基丙烯酸甲酯、聚丙烯酸甲酯、聚丙烯酸丁酯中的至少一种。

[0100] 可选的,所述载药纳米胶束的制备方法包括:

[0101] 将两亲性聚合物和疏水性药物溶于适量体积的良性溶剂中,在持续搅拌状态下缓慢滴加入水中,透析后得到浓度为1-2mg/mL的载药纳米胶束溶液。

[0102] 所述良性溶剂为DMSO、DMF、甲醇、丙酮中的至少一种。进一步优选,所述良性溶剂为DMSO和/或丙酮。

[0103] 具体地,将两亲性聚合物和疏水性药物溶解于良性溶剂中,在持续搅拌条件下缓慢滴加到去离子水中,搅拌2-6小时,在去离子水中透析后,制得浓度为1-2mg/mL的载药纳米胶束。

[0104] 可选的,两亲性聚合物与疏水性药物的质量比为(3-7):1。

[0105] 具体地,将两亲性聚合物和疏水性药物溶解于良性溶剂中,在持续搅拌条件下缓慢滴加到去离子水中,搅拌4h,在去离子水中透析后,制得载药纳米胶束,两亲性聚合物和疏水性药物的质量比为5:1。

[0106] 可选的,将功能聚合物的水溶液与含羟基的聚合物的水溶液混合,得到所述可注射水凝胶,功能聚合物的水溶液中含有亲水性药物、疏水性药物、生物活性物质、纳米粒子中的至少一种,功能聚合物水溶液中,功能聚合物的质量浓度为0.5~30%w/v。

[0107] 可选的,将功能聚合物的水溶液与含羟基的聚合物的水溶液混合,得到所述可注射水凝胶,功能聚合物的水溶液中含有亲水性药物、疏水性药物、生物活性物质、纳米粒子

中的至少一种,功能聚合物水溶液中,功能聚合物的质量浓度为1~10%w/v。

[0108] 可选的,将功能聚合物的水溶液与含羟基的聚合物的水溶液混合,得到所述可注射水凝胶,功能聚合物的水溶液中含有亲水性药物、疏水性药物、生物活性物质、纳米粒子中的至少一种,功能聚合物水溶液中,功能聚合物的质量浓度为10~25%w/v。

[0109] 可选的,功能聚合物水溶液中,亲水性药物的质量浓度为0.1~500 μ g/mL。

[0110] 可选的,功能聚合物水溶液中,亲水性药物的质量浓度为0.2~300 μ g/mL。

[0111] 可选的,功能聚合物水溶液中,生物活性物质的质量浓度为1~6mg/mL。

[0112] 可选的,功能聚合物水溶液中,生物活性物质的质量浓度为1~3mg/mL。

[0113] 可选的,功能聚合物水溶液中,纳米粒子的质量浓度为10~400 μ g/mL。

[0114] 可选的,功能聚合物水溶液中,纳米粒子的质量浓度为50~250 μ g/mL。

[0115] 可选的,含羟基的聚合物的水溶液中,含羟基的聚合物的质量浓度为1~20%w/v。

[0116] 可选的,含羟基的聚合物的水溶液中,含羟基的聚合物的质量浓度为1~15%w/v。

[0117] 可选的,含羟基的聚合物的水溶液中,含羟基的聚合物的质量浓度为2~10%w/v。

[0118] 可选的,功能聚合物水溶液与含羟基的聚合物的水溶液的体积比为1:0.5~1.5。

[0119] 可选的,功能聚合物水溶液与含羟基的聚合物的水溶液的体积比为1:0.8~1.2。

[0120] 可选的,功能聚合物水溶液与含羟基的聚合物的水溶液的体积比为1:1。

[0121] 可选的,将功能聚合物的水溶液与聚乙烯醇水溶液混合,得到所述可注射水凝胶,功能聚合物的水溶液中含有亲水性药物、疏水性药物、生物活性物质、纳米粒子中的至少一种,功能聚合物水溶液中,功能聚合物的质量浓度为20%w/v,聚乙烯醇水溶液中,聚乙烯醇的质量浓度为10%w/v,功能聚合物水溶液与聚乙烯醇水溶液等体积混合,得到水凝胶。

[0122] 可选的,含氨基和羟基的聚合物为明胶、明胶衍生物、壳聚糖、壳聚糖衍生物中的至少一种。

[0123] 可选的,含羧基和羟基的聚合物为海藻酸钠、透明质酸、肝素、羧甲基纤维素中的至少一种。

[0124] 可选的,含羟基的聚合物为聚乙烯醇、海藻酸钠、透明质酸、淀粉、纤维素、龙胶、魔芋胶、阿拉伯树胶、木质素、葡聚糖、环糊精、白芨多糖中的至少一种

[0125] 可选的,含羧基的苯硼酸为4-羧基苯硼酸、2-羧基苯硼酸、3-羧基苯硼酸、4-羧基-3-氟苯硼酸、3-羧基-4-氟苯硼酸、5-羧基-2-氯苯硼酸及4-羧基-2-氯苯硼酸中的至少一种;

[0126] 含氨基的苯硼酸为4-氨基苯硼酸、2-氨基苯硼酸、3-氨基苯硼酸、3-氨基甲酰基苯硼酸、3-氨基-4-氟苯硼酸、3-氨基-4-甲基苯硼酸中的至少一种;

[0127] 含羟基的苯硼酸为4-羟基苯硼酸、3-氟-4-羟基苯硼酸、2-氟-3-羟基苯硼酸、2-氟-5-羟基苯硼酸、3-羟基-4-氯苯硼酸、3-氟-4-羟基苯硼酸中的至少一种。

[0128] 可选的,所述生物活性物质为重组人源化胶原蛋白、动物胶原、氨基酸多肽、非胶原蛋白、弹性蛋白、蛋白聚糖、氨基聚糖中的至少一种。

[0129] 可选的,所述生物活性物质为重组人源化胶原蛋白。

[0130] 可选的,所述疏水性药物为布洛芬、对乙酰氨基酚、姜黄素、吡哆美辛中的至少一种。

[0131] 一种微环境响应的多功能可注射水凝胶,采用所述制备方法制备得到。

[0132] 本申请提供一种微环境响应的多功能可注射水凝胶及其制备方法,所述水凝胶具有良好的注射性能,同时也可涂覆于伤口表面,实现慢性伤口更好更快的修复。

附图说明

[0133] 图1是本申请实施例1中水凝胶的成胶图;

[0134] 图2是本申请实施例1中不同水凝胶处理后的金黄色葡萄球菌和大肠杆菌在12小时的细菌平板菌落图;

[0135] 图3是本发明所述不同时间点伤口愈合的照片。

具体实施方式

[0136] 下面结合附图对本申请的具体实施方式做详细的说明。

[0137] 在以下实施例中,基体以外的化学试剂除特别声明的外均为化学纯。

[0138] 实施例1

[0139] 一种具有抗菌、抗炎及促血管生成功能的可注射水凝胶的制备方法,其制备步骤如下所示。

[0140] 1、氧化透明质酸(HA-CHO)的合成

[0141] 10.0g透明质酸和8.0g高碘酸钠溶解在去离子水中(DW)并在37℃搅拌4h。然后,加入1.2mL乙二醇于上述溶液中搅拌2小时以终止氧化反应。最后用去离子水透析48h,冻干后得到HA-CHO。

[0142] 2、接枝苯硼酸的氧化透明质酸(HA-CHO-BA)的合成

[0143] 精密称取氧化透明质酸HA-CHO 5.00g溶于200mL水中,向其中加入1.5g 3-氨基苯硼酸(BA)。然后,在37℃条件下搅拌12h,最后在去离子水中(pH7.4)透析3天,后用冻干机对其进行冷冻干燥,得到纯化的HA-CHO-BA。

[0144] 3、聚多巴胺纳米颗粒的制备

[0145] 2mL的氨水 NH_4OH (浓度25-28wt%)与40mL的乙醇和90mL的去离子水在30℃下轻度搅拌30min,将500mg的盐酸多巴胺溶解在10mL去离子水中,缓慢滴入上述混合液中。溶液的颜色立即变为淡黄色,然后逐渐变为深棕色。反应进行24h后在6000转/分离心12min,用去离子水洗3次后,收集聚多巴胺纳米颗粒PDANPs并保存备用。

[0146] 4、聚多巴胺银纳米颗粒的制备

[0147] Ag^+ 吸附在PDANPs表面,然后用PDA原位还原为AgNPs,具体包括以下步骤:

[0148] 将聚多巴胺纳米颗粒PDANPs与 AgNO_3 (4mg/mL)在冰水浴中混合1小时得到PDA@AgNPs。然后将PDA@AgNPs在6000转/分离心12min,用去离子水冲洗三次,再将其分散到去离子水中,质量浓度为5%,放在黑暗环境中以备进一步使用。

[0149] 5、聚多巴胺纳米颗粒和聚多巴胺银纳米颗粒的粒径和TEM

[0150] 纳米粒子(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的粒径由马尔文动态光散射粒度仪DLS检测。所有测量均重复3次。对于TEM检测,将其溶液滴在铜网上,用透射电镜观察其结构。

[0151] 6、水凝胶的制备

[0152] 将4mL质量分数10%的聚乙烯醇(PVA)、2mL含有III型胶原蛋白的HA-CHO-BA(HA-CHO-BA的质量分数为20%)及2mL含有PDA@AgNPs的溶液互相混合,多功能水凝胶可迅速形

成。PDA@Ag的最终浓度为200 μ g/mL, III型胶原蛋白(hCo1III)的最终浓度为2mg/mL。

[0153] 对照组水凝胶制备方法如下:将4mL质量分数10%的PVA水溶液和4mL质量分数10%的HA-CHO-BA溶液互相混合可立即制备。四种水凝胶,分别为水凝胶1:空白水凝胶;水凝胶2:水凝胶包封PDA@Ag;水凝胶3:水凝胶包封hCo1III;水凝胶4:水凝胶包封PDA@Ag和hCo1III。水凝胶,在制备过程中处于无菌的操作环境,且使用的溶剂均为无菌。

[0154] 实施例2

[0155] 一种具有抗菌、抗炎及促血管生成功能的可注射水凝胶的制备方法,其制备步骤如下所示。

[0156] 1、氧化海藻酸钠(ALG-CHO)的合成

[0157] 10.0g海藻酸钠和8.0g高碘酸钠溶解在去离子水中(DW)并在37 $^{\circ}$ C搅拌4h。然后,加入1.2mL乙二醇于上述溶液中搅拌2小时以终止氧化反应。最后用去离子水透析48h,冻干后得到ALG-CHO。

[0158] 2、接枝苯硼酸的氧化海藻酸钠(ALG-CHO-BA)的合成

[0159] 精密称取氧化海藻酸钠5.00g溶于200mL水中,向其中加入1.5g 3-氨基苯硼酸(BA)。然后,在37 $^{\circ}$ C条件下搅拌12h,最后在去离子水中(pH7.4)透析3天,后用冻干机对其进行冷冻干燥,得到纯化的ALG-CHO-BA。

[0160] 3、聚多巴胺纳米颗粒的制备

[0161] 2mL的氨水NH₄OH(浓度25-28wt%),与40mL的乙醇和90mL的去离子水在30 $^{\circ}$ C下轻度搅拌30min,将500mg的盐酸多巴胺溶解在10mL去离子水中,缓慢滴入上述混合液中。溶液的颜色立即变为淡黄色,然后逐渐变为深棕色。反应进行24h后在6000转/分离心12min,用去离子水洗3次后,收集PDANPs并保存备用。

[0162] 4、聚多巴胺银纳米颗粒的制备

[0163] Ag⁺吸附在PDANPs表面,然后用PDA原位还原为AgNPs,具体包括以下步骤:

[0164] 将聚多巴胺纳米颗粒与AgNO₃(4mg/mL)在冰水浴中混合1小时得到PDA@AgNPs。然后将PDA@AgNPs在6000转/分离心12min,用去离子水冲洗三次,再将其分散到去离子水中,质量浓度为5%,放在黑暗环境中以备进一步使用。

[0165] 5、聚多巴胺纳米颗粒和聚多巴胺银纳米颗粒的粒径和TEM

[0166] 纳米粒子(100 μ g/mL)的粒径由马尔文动态光散射粒度仪DLS检测。所有测量均重复3次。对于TEM检测,将其溶液滴在铜网上,用透射电镜观察其结构。

[0167] 6、水凝胶的制备

[0168] 将4mL质量分数10%的聚乙烯醇(PVA)、2mL含有III型胶原蛋白的ALG-CHO-BA(ALG-CHO-BA的质量分数为20%)及2mL含有PDA@Ag的溶液互相混合,多功能水凝胶可迅速形成。PDA@Ag的最终浓度为200 μ g/mL, III型胶原蛋白的最终浓度为2mg/mL。对照组水凝胶制备方法如下:将4mL质量分数10%的PVA和4mL质量分数10%的ALG-CHO-BA溶液互相混合可立即制备。水凝胶在制备过程中处于无菌的操作环境,且使用的溶剂均为无菌。

[0169] 实施例3

[0170] 一种具有抗菌、抗炎及促血管生成功能的可注射水凝胶的制备方法,其制备步骤如下所示。

[0171] 1、氧化羧甲基纤维素钠(CMC-CHO)的合成

[0172] 10.0g羧甲基纤维素钠和8.0g高碘酸钠溶解在去离子水中(DW)并在37℃搅拌4h。然后,加入1.2mL乙二醇于上述溶液中搅拌2小时以终止氧化反应。最后用去离子水透析48h,冻干后得到CMC-CHO。

[0173] 2、接枝苯硼酸的氧化羧甲基纤维素钠(CMC-CHO-BA)的合成

[0174] 精密称取氧化羧甲基纤维素钠5.00g溶于200mL水中,向其中加入1.5g 3-氨基苯硼酸(BA)。然后,在37℃条件下搅拌12h,最后在去离子水中(pH7.4)透析3天,后用冻干机对其进行冷冻干燥,得到纯化的CMC-CHO-BA。

[0175] 3、载药纳米粒子(PLGA@Nap)的制备

[0176] 将聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA,60mg)和萘普生(Nap,12mg)在37℃条件下完全溶解于DMSO(5mL)中,然后在搅拌条件下逐滴加入到15mL去离子水中,在37℃条件下连续搅拌4h;然后将其在水中透析3天,得到PLGA@Nap溶液,冻干后避光在4℃储存;

[0177] 4、水凝胶的制备

[0178] 将4mL质量分数10%的聚乙烯醇(PVA,2mL含有III型胶原蛋白的CMC-CHO-BA(CMC-CHO-BA的质量分数为20%)及2mL含有PLGA@Nap和阿米卡星的溶液互相混合,多功能水凝胶可迅速形成。PLGA@Nap和阿米卡星的最终浓度为200 μ g/mL,III型胶原蛋白的最终浓度为2mg/mL。对照组水凝胶制备方法如下:将4mL质量分数10%的PVA和4mL质量分数10%的ALG-CHO-BA溶液互相混合可立即制备。水凝胶在制备过程中处于无菌的操作环境,且使用的溶剂均为无菌。

[0179] 实施例4

[0180] 一种具有抗菌、抗炎及促血管生成功能的可注射水凝胶的制备方法,其制备步骤如下所示。

[0181] 1、氧化淀粉的合成

[0182] 10.0g淀粉和8.0g高碘酸钠溶解在去离子水中(DW)并在37℃搅拌4h。然后,加入1.2mL乙二醇于上述溶液中搅拌2小时以终止氧化反应。最后用去离子水透析48h,冻干后得到。

[0183] 2、接枝苯硼酸的氧化淀粉的合成

[0184] 精密称取氧化淀粉5.00g溶于200mL水中,向其中加入1.5g 3-氨基苯硼酸(BA)。然后,在37℃条件下搅拌12h,最后在去离子水中(pH7.4)透析3天,后用冻干机对其进行冷冻干燥得到纯化的产物。

[0185] 3、抗菌材料银纳米颗粒的制备

[0186] 将新鲜制备的硼氢化钠(NaBH_4 ,2.00mM)与柠檬酸三钠(TSC,4.28mM)水溶液混合,在黑暗环境中剧烈搅拌加热至60℃。30min后,逐滴加入2mL AgNO_3 (1.00mM)溶液,然后温度又升高到90℃,并将溶液的pH值调整到10.5。搅拌25分钟后,混合物溶液在室温下缓慢冷却。最后,将混合液以12000rpm/min的速度离心15分钟,沉淀即为银纳米颗粒(AgNPs),并将其重分散于去离子水中,以备将来使用。

[0187] 4、水凝胶的制备

[0188] 将4mL质量分数10%的聚乙烯醇(PVA),2mL含有III型胶原蛋白的接枝苯硼酸的氧化淀粉(接枝苯硼酸的氧化淀粉的质量分数为20%)及2mL含有银纳米颗粒的溶液互相混合,多功能水凝胶可迅速形成。银纳米颗粒的最终浓度为200 μ g/mL,III型胶原蛋白的最终

浓度为2mg/mL。

[0189] 对照组水凝胶制备方法如下:将4mL质量分数10%的PVA和4mL质量分数10%的接枝苯硼酸的氧化淀粉溶液互相混合可立即制备。水凝胶在制备过程中处于无菌的操作环境,且使用的溶剂均为无菌。

[0190] 实施例5

[0191] 一种具有抗菌、抗炎及促血管生成功能的可注射水凝胶的制备方法,其制备步骤如下所示。

[0192] 1、氧化羧甲基壳聚糖的合成

[0193] 10.0g羧甲基壳聚糖和8.0g高碘酸钠溶解在去离子水中(DW)并在37℃搅拌4h。然后,加入1.2mL乙二醇于上述溶液中搅拌2小时以终止氧化反应。最后用去离子水透析48h,冻干后得到。

[0194] 2、苯硼酸接枝氧化羧甲基壳聚糖

[0195] 精密称取氧化羧甲基壳聚糖(10.00g)和3-羧基苯硼酸(6.50g)溶于500mL的MES缓冲液(0.1mol, pH5.0)中,向其中加入1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC·HCl, 4.00g)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS, 1.5g)。然后,在37℃条件下搅拌48h,最后在去离子水中(pH7.4)透析3天,3天后用冻干机对其进行冷冻干燥,得到纯化的功能聚合物。

[0196] 3、抗菌材料介孔氧化锌的制备

[0197] 将50mM $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (六水合硝酸锌)和25mM HMT(六亚甲基四胺)溶解在100mL去离子水中,在密封条件下搅拌10分钟。在65℃的水浴中加热15分钟后,将0.14g $Na_3C_6H_5O_7$ (柠檬酸钠)、0.1gHPMC(羟丙基甲基纤维素)和0.025g碳添加到上述溶液中,并将其放在85℃水浴条件下保持10h。然后将混合物用无水乙醇洗涤两次,并用水洗涤两次,进行微波辐射15分钟(850瓦),在-80℃冷冻后,冷冻干燥12小时,最终获得氧化锌(ZnO)粉末。

[0198] 4、水凝胶的制备

[0199] 将4mL质量分数10%的聚乙烯醇(PVA),2mL含有III型胶原蛋白的接枝苯硼酸的氧化羧甲基壳聚糖(接枝苯硼酸的氧化羧甲基壳聚糖为20%)及2mL含有氧化锌纳米粒子的溶液互相混合,多功能水凝胶可迅速形成。氧化锌纳米粒子的最终浓度为200μg/mL,III型胶原蛋白的最终浓度为2mg/mL。

[0200] 对照组水凝胶制备方法如下:将4mL质量分数10%的PVA和4mL质量分数10%的接枝苯硼酸的氧化羧甲基壳聚糖溶液互相混合可立即制备。水凝胶在制备过程中处于无菌的操作环境,且使用的溶剂均为无菌。

[0201] 实施例6

[0202] 一种具有抗菌、抗炎及促血管生成功能的可注射水凝胶的制备方法,其制备步骤如下所示。

[0203] 1、氧化海藻酸钠的合成

[0204] 10.0g海藻酸钠和8.0g高碘酸钠溶解在去离子水中(DW)并在37℃搅拌4h。然后,加入1.2mL乙二醇于上述溶液中搅拌2小时以终止氧化反应。最后用去离子水透析48h,冻干后得到。

[0205] 2、苯硼酸接枝氧化海藻酸钠

[0206] 精密称取氧化海藻酸钠(10.00g)和3-氨基苯硼酸(6.50g)溶于500mL的MES缓冲液

(0.1mol, pH5.0) 中, 向其中加入1-乙基-(3-二甲基氨基丙基) 碳二亚胺盐酸盐 (EDC · HCl, 4.00g) 和N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS, 1.5g)。然后, 在37℃条件下搅拌48h, 最后在去离子水中 (pH7.4) 透析3天, 3天后用冻干机对其进行冷冻干燥, 得到纯化的功能聚合物。

[0207] 3、抗菌材料银纳米簇的制备

[0208] 将新制备的谷胱甘肽 (GSH, 300μL, 50mM) 和AgNO₃ (250μL, 20mM) 的水溶液在4.45mL的去离子水中剧烈搅拌混合。可立即观察到白色沉淀形成, 表明GSH-Ag (I) 配合物形成, 然后加入一定量的NaOH溶液 (180μL, 0.1M), 将溶液pH调至6.1, 几秒钟内白色沉淀溶解, 反应溶液变清。将反应溶液加热至175℃, 维持约5h, 然后在4℃孵育过夜, 制备银纳米簇。

[0209] 4、水凝胶的制备

[0210] 将4mL质量分数10%的聚乙烯醇 (PVA), 2mL含有III型胶原蛋白的接枝苯硼酸的氧化海藻酸钠 (接枝苯硼酸的氧化海藻酸钠的质量分数为20%) 及2mL含有银纳米簇的溶液互相混合, 多功能水凝胶可迅速形成。银纳米簇的最终浓度为200μg/mL, III型胶原蛋白的最终浓度为2mg/mL。

[0211] 对照组水凝胶制备方法如下: 将4mL质量分数10%的PVA和4mL质量分数10%的接枝苯硼酸的氧化海藻酸钠溶液互相混合可立即制备。水凝胶在制备过程中处于无菌的操作环境, 且使用的溶剂均为无菌。

[0212] 试验例1

[0213] 以实施例1中制得的物质为例, 进行检测, 具体操作过程及结果如下:

[0214] 以下实验图例, 如无特殊说明, 水凝胶组1-4组分别代表以下组合: 水凝胶组1 (Hydrogel1): 空白水凝胶; 水凝胶组2 (Hydrogel4): 装载多巴胺载银纳米粒子和重组人源III型胶原蛋白的水凝胶。

[0215] 一、对步骤(6) 制得的水凝胶的成胶性能和注射性能进行检测。

[0216] 图1为水凝胶的成胶图, 证明水凝胶的制备成功。

[0217] 二、水凝胶的抗菌性能检测

[0218] 选取金黄色葡萄球菌和大肠杆菌来评估水凝胶的抗菌效果。实验分为3组: 1、细菌组 (空白组) 2、细菌+空白水凝胶组 (水凝胶1组) 3、细菌+水凝胶@Ag&hColIII (水凝胶2组)。每组水凝胶样品与细菌在37℃共培养12h后, 用涂菌棒将处理后的细菌菌液均匀涂覆在LB固体培养基表面, 放在37℃细菌培养箱中倒置培养。12h后进行拍照。每组样本数为三个, 如图2所示, 琼脂平板菌落计数实验结果表明, 水凝胶2组琼脂平板上的菌落数最少, 说明其杀菌能力最强。

[0219] 三、水凝胶的体内促皮肤修复效果检测

[0220] 所有的动物实验程序均按照四川大学实验室动物管理和使用指南进行。通过尾静脉注射链脲佐菌素来建立2型糖尿病大鼠模型, 每天给药一次, 剂量为60μg/g, 直到大鼠空腹血糖水平超过16.7mM。用10%水合氯醛 (0.3mL/100g) 麻醉大鼠, 每只大鼠背部用医用夹具制作4个全层创面 (直径为1cm), 分为不同组, 每组老鼠为8只。在每只大鼠的伤口处滴加100μL的大肠杆菌 (1×10^8 CFU mL⁻¹) 引发感染, 一天后在感染的伤口分别涂覆不同的水凝胶样品进行治疗, 对照组创面不做任何处理。覆盖完水凝胶后在每个伤口上覆盖了一层 Tegaderm™ 透明膜, 防止伤口被污染。每两天给予水凝胶一次, 一共给药三次。在指定的时间点 (0、2、4、7和14天) 对大鼠伤口部位进行拍照并在透明绘图纸上追踪创面边界, 监测创

面大小。

[0221] 结果如图3所示,与其他组相比,水凝胶2组 (hydrogel@Ag&hColIII) 治疗组伤口愈合最快,而在第14天,水凝胶2组 (hydrogel@Ag&hColIII) 治疗组伤口已经几乎完全愈合,而其他组伤口都未愈合。这些结果表明水凝胶2组 (hydrogel@Ag&hColIII) 具有明显加速感染创面愈合的作用。

[0222] 以上内容仅仅是对本申请结构所作的举例和说明,所属本领域的技术人员不经创造性劳动即对所描述的具体实施例做的修改或补充或采用类似的方式替代仍属本专利的保护范围。

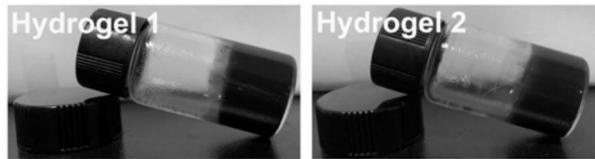


图1

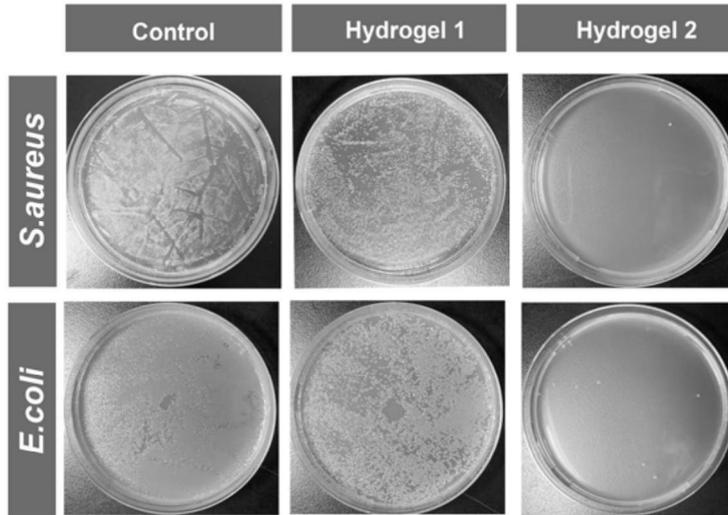


图2

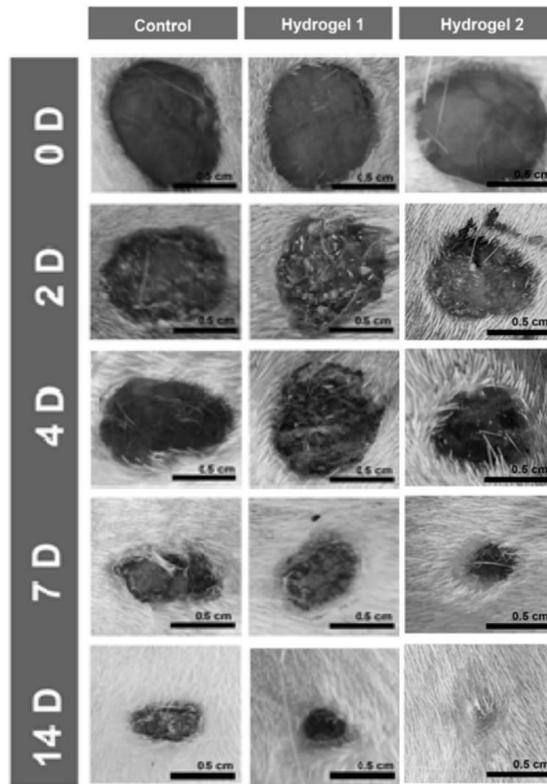


图3