



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106220868 A

(43)申请公布日 2016.12.14

(21)申请号 201610825869.9

(22)申请日 2016.09.18

(71)申请人 中国医学科学院生物医学工程研究所

地址 300192 天津市南开区白堤路236号

(72)发明人 王伟伟 宋会娟 黄平升 孔德领

(74)专利代理机构 天津市杰盈专利代理有限公司 12207

代理人 赵尊生

(51) Int. Cl.

C08J 3/075(2006.01)

C08L 77/00(2006.01)

C08G 69/40(2006.01)

A61K 47/34(2006.01)

A61K 9/06(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54)发明名称

聚乙二醇-聚L-缬氨酸嵌段共聚物水凝胶及其制备方法

(57)摘要

本发明涉及一种聚乙二醇-聚L-缬氨酸嵌段共聚物水凝胶及其制备方法。该共聚物水凝胶是以端基为甲氧基和氨基的聚乙二醇为引发剂,通过L-缬氨酸-N-羧基-环内酸酐的开环聚合反应制备出甲氧基聚乙二醇-聚L-缬氨酸两亲性共聚物,然后将其溶于分散介质,即得到聚乙二醇-聚L-缬氨酸嵌段共聚物水凝胶。聚乙二醇-聚L-缬氨酸嵌段共聚物在水凝胶体系中的浓度为50~300 mg/mL。本发明通过调控聚乙二醇分子量和多肽链段的长度,获得性质(相变温度、聚合物浓度、凝胶模量、粘度、降解速率等)可控的水凝胶载体。本发明具有良好的生物相容性,可作为药物或细胞因子递送和控释的载体材料,也可用于成纤维细胞、肿瘤细胞以及免疫细胞的三维培养。

1. 一种聚乙二醇-聚L-缬氨酸嵌段共聚物水凝胶,其特征在於它是以端基为甲氧基和氨基的聚乙二醇为引发剂,通过L-缬氨酸-N-羧基-环内酸酐的开环聚合反应制备出甲氧基聚乙二醇-聚L-缬氨酸两亲性共聚物,然后将其溶于分散介质,即得到聚乙二醇-聚L-缬氨酸嵌段共聚物水凝胶;所述的聚乙二醇-聚L-缬氨酸嵌段共聚物总分子量范围在696~14800 g/mol;所述的聚乙二醇-聚L-缬氨酸嵌段共聚物在水凝胶体系中的浓度为50~300 mg/mL。

2. 根据权利要求1所述的水凝胶,其特征在於所述的两亲性共聚物中聚L-缬氨酸的聚合度为2~100,聚L-缬氨酸的含量为38~66%。

3. 根据权利要求1所述的水凝胶,其特征在於所述的两亲性共聚物中聚乙二醇的含量是34~72%。

4. 根据权利要求1所述的水凝胶,其特征在於所述的分散介质为水、PBS缓冲液、氯化钠注射液以及葡萄糖注射液。

5. 权利要求1所述的聚乙二醇-聚L-缬氨酸嵌段共聚物水凝胶的制备方法,其特征在於包括以下步骤:

1) 按计量将端基为甲氧基和氨基聚乙二醇与L-缬氨酸-N-羧基-环内酸酐溶于无水N,N-二甲基甲酰胺中,于30~45 °C温度的水浴锅中,在氮气氛围下进行24~72小时的开环聚合反应;

2) 将步骤1)所得反应溶液滴加至冰乙醚中,沉淀,过滤,取沉淀,真空干燥;

3) 将干燥的聚合物产物粉末加入水中溶解,在去离子水中透析48小时,将透析液冷冻干燥;

4) 将步骤3)所得共聚物冻干粉以50~300 mg/mL的浓度溶于分散介质中,充分分散后获得聚乙二醇-聚L-缬氨酸嵌段共聚物水凝胶。

6. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在於步骤3)中所述透析袋截留分子量为1000 Da,透析时间为48 h。

7. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在於步骤4)所述的分散介质为水、PBS缓冲液、氯化钠注射液以及葡萄糖注射液。

8. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在於所述的端基为甲氧基和氨基的聚乙二醇的分子量为500~5000 g/mol;所述的甲氧基和氨基聚乙二醇与L-缬氨酸-N-羧基-环内酸酐的质量比为1:0.572~4.06。

9. 权利要求1所述的聚乙二醇-聚L-缬氨酸嵌段共聚物水凝胶的用途,其特征在於它是用于制造细胞培养的药剂,该药剂用于成纤维细胞,癌细胞以及免疫细胞的培养。

10. 根据权利要求9所述的聚乙二醇-聚L-缬氨酸嵌段共聚物水凝胶的用途,其特征在於用于成纤维细胞3T3、L929,癌细胞MCF-7、HepG2、SKOV-3以及免疫细胞DC、T细胞的培养。

聚乙二醇-聚L-缬氨酸嵌段共聚物水凝胶及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物医用高分子材料领域,特别涉及一种聚乙二醇-聚L-缬氨酸嵌段共聚物水凝胶及其制备方法。

背景技术

[0002] 水凝胶是一种在水介质中,由材料组分之间通过共价键或非共价键交联形成的具有三维交联网状结构的特殊材料。水凝胶在生物传感器,可控药物递送,三维细胞培养,以及组织再生与修复等领域均具有巨大的应用潜力。其中,由多肽自组装而成的水凝胶因其先天性优良的生物相容性和生物降解性而被广泛应用于生物医学领域。相比传统的固相多肽合成方法,氨基酸-N-羧基-环内酸酐的开环聚合提供了一个更为实用的合成方法来制备不同分子量的多肽,它具有可控的聚合速率,可预测的分子量,较窄的分子量分布,不变的氨基酸手性等优势。此外,根据多肽独特的二级结构,包括 α -螺旋, β -折叠和无规蜷缩,可以通过分子设计控制多肽链的长度,使其二级结构的构象变化和凝胶形成之间产生相关性,从而调控多肽水凝胶形成的机制和性质,比如转变温度与凝胶模量,这些因素对于水凝胶的具体应用具有重大的参考价值。

[0003] 相对于常用的细胞孔板中的二维细胞培养,三维培养更加能够模拟体内组织细胞的生长环境。满足细胞三维培养的水凝胶载体需要具备以下几个条件:(1)在细胞生长环境中成胶;(2)通过温和的,具有良好细胞相容性的方法成胶;(3)材料没有细胞毒性,在成胶过程中对细胞伤害最小;(4)为细胞增殖提供适宜的微环境;(5)可降解,植入体内发挥组织修复与再生功能后,免于手术取出水凝胶载体。如果达到上述要求,需要我们改变多肽共聚物的化学结构对其临界凝胶浓度、转变温度、凝胶模量、降解性等参数进行调控,从而获得适宜于细胞三维培养和其它生物医学用途的新型水凝胶体系。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种聚乙二醇-聚L-缬氨酸嵌段共聚物水凝胶及其制备方法。通过调控聚乙二醇分子量和多肽链段的长度,获得性质(相变温度、聚合物浓度、凝胶模量、粘度、降解速率等)可控的水凝胶载体。本发明得到的水凝胶具有良好的生物相容性,可作为药物或细胞因子递送和控释的载体材料,也可用于成纤维细胞、肿瘤细胞以及免疫细胞的三维培养。

[0005] 本发明提供的聚乙二醇-聚L-缬氨酸嵌段共聚物水凝胶是以端基为甲氧基和氨基的聚乙二醇为引发剂,通过L-缬氨酸-N-羧基-环内酸酐的开环聚合反应制备出甲氧基聚乙二醇-聚L-缬氨酸两亲性共聚物,然后将其溶于分散介质,即得到聚乙二醇(亲水性链段)-聚L-缬氨酸(疏水性链段)嵌段共聚物水凝胶。聚乙二醇-聚L-缬氨酸嵌段共聚物在水凝胶体系中的浓度为50~300 mg/mL。

[0006] 所述的聚乙二醇-聚L-缬氨酸嵌段共聚物总分子量范围在696~14800 g/mol。

[0007] 所述的疏水性链段聚L-缬氨酸的聚合度为2~100,分子量为196~9800 g/mol,在

共聚物中的含量为38~66%。

[0008] 所述的亲水性链段聚乙二醇的分子量为500~5000 g/mol,在共聚物中的含量是34~72%。

[0009] 本发明提供的聚乙二醇-聚L-缬氨酸嵌段共聚物水凝胶的制备方法包括以下步骤:

1)按计量将端基为甲氧基和氨基聚乙二醇(引发剂)与L-缬氨酸-N-羧基-环内酸酐溶于无水N,N-二甲基甲酰胺中,于30~45 °C温度的水浴锅中,在氮气氛围下进行24~72小时的开环聚合反应。

[0010] 2)将步骤1)所得反应溶液滴加至冰乙醚中,沉淀,过滤,取沉淀,真空干燥。

[0011] 3)将干燥的聚合物产物粉末加入水中溶解,在去离子水中透析48小时,将透析液冷冻干燥。

[0012] 4)将步骤3)所得共聚物冻干粉以50~300 mg/mL的浓度溶于分散介质中,充分分散后获得聚乙二醇-聚L-缬氨酸嵌段共聚物水凝胶。

[0013] 步骤3)中所述透析袋截留分子量为1000 Da,透析时间为48 h。

[0014] 步骤4)分散介质包括水、PBS缓冲液、氯化钠注射液以及葡萄糖注射液等。

[0015] 所述的端基为甲氧基和氨基的聚乙二醇的分子量为500~5000 g/mol;所述的甲氧基和氨基聚乙二醇与L-缬氨酸-N-羧基-环内酸酐的质量比为1:0.572~4.06。

[0016] 本发明提供的聚乙二醇-聚L-缬氨酸嵌段共聚物水凝胶的用途是用于细胞三维培养,包括成纤维细胞,癌细胞以及免疫细胞,即用于制造细胞培养的药剂,该药剂用于成纤维细胞3T3、L929,癌细胞MCF-7、HepG2、SKOV-3以及免疫细胞DC、T细胞的培养。

[0017] 本发明提供的聚乙二醇-聚L-缬氨酸嵌段共聚物水凝胶,其成胶速度、相转变温度以及粘性模量、弹性模量等参数可以通过改变聚乙二醇和聚L-缬氨酸的链长度进行精细的调控。

[0018] 本发明提供的聚乙二醇-聚L-缬氨酸嵌段共聚物水凝胶作为细胞三维培养基质的实验方法包括以下步骤:首先制备细胞悬液,然后取定量的多肽共聚合物材料加入细胞悬液中,低速下温和混匀至成胶。放置在37 °C二氧化碳培养箱中培养,用CCK-8试剂盒检测细胞不同时间点的增殖率。该水凝胶作为细胞三维培养基质,能够为细胞生长提供优良的微环境,促进细胞增殖。所述的多肽共聚合物在培养基中的浓度在1~1000 μg/mL范围内对3T3细胞没有明显的细胞毒性作用。

[0019] 本发明提供的聚乙二醇-聚L-缬氨酸嵌段共聚物水凝胶具有良好的细胞相容性,可用于细胞三维培养,具有可调控的成胶浓度、相转变温度、成胶速率以及模量等特性。本发明的水凝胶可作为药物或细胞因子递送和控释的载体材料,也可用于成纤维细胞、肿瘤细胞以及免疫细胞的三维培养。

附图说明

[0020] 图1 本发明聚乙二醇-聚L-缬氨酸共聚物的合成路线图。

[0021] 图2 本发明实施例的核磁共振氢谱¹H NMR谱图。

[0022] 图3 本发明实施例的流变学分析曲线(a,频率变化),(b,温度变化)。

[0023] 图4 本发明实施例的细胞毒性结果。

[0024] 图5 本发明实施例的三维细胞培养结果。

具体实施方式

[0025] 下面结合具体实施例,进一步详细阐述本发明,实施例的描述不对本发明的保护产生任何限制。实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件以及手册中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件;所用的通用设备、材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0026] 实施例1:聚乙二醇-聚缬氨酸共聚物mPEG500-P(L-Va1)(PEV1-1)的合成

聚乙二醇-聚缬氨酸共聚物的合成路线如图1所示。具体的合成方法是:称取L-缬氨酸-N-羧基-环内酸酐(572 mg),分子量为500 g/mol的端基为甲氧基和氨基的聚乙二醇(1 g),加入带有磁力搅拌的圆底烧瓶中,加入10 mL无水N,N-二甲基甲酰胺使其充分溶解;将反应容器置于30 °C的水浴锅中,在通氮气的条件下,反应72小时;将反应产物溶液滴加到200 mL冰乙醚中,沉淀,减压抽滤,在真空干燥箱中干燥至恒重;将干燥的粉末加水溶解、封装到透析袋中透析(透析袋截留分子量为1000 Da,透析时间为48 h,以下相同),然后冷冻干燥(温度,-50 °C)。通过上述步骤,得到共聚物PEV1-1。其核磁共振氢谱谱图结果如图2所示。

[0027] 实施例2:聚乙二醇-聚L-缬氨酸共聚物mPEG1000-P(L-Va1)(PEV2-3)的合成

与实施例1相同的步骤,将聚乙二醇分子量改变为1000 g/mol,投料量为1 g,L-缬氨酸-N-羧基-环内酸酐投料量为2.24 g,反应温度设定为40 °C,反应时间为36 h,开环反应制备出共聚物PEV2-3。

[0028] 实施例3:聚乙二醇-聚L-缬氨酸共聚物mPEG1500-P(L-Va1)(PEV3-3)的合成

与实施例1相同的步骤,将聚乙二醇分子量改变为1500 g/mol,投料量为1 g,L-缬氨酸-N-羧基-环内酸酐投料量为2.28 g,反应温度设定为40 °C,反应时间为48 h,开环反应制备出共聚物PEV3-3。

[0029] 实施例4:聚乙二醇-聚L-缬氨酸共聚物mPEG2000-P(L-Va1)(PEV4-2)的合成

与实施例1相同的步骤,将聚乙二醇分子量改变为2000 g/mol,投料量为1 g,L-缬氨酸-N-羧基-环内酸酐投料量为822.3 mg,反应温度设定为35 °C,反应时间为48 h,开环反应制备出共聚物PEV4-2。

[0030] 实施例5:聚乙二醇-聚L-缬氨酸共聚物mPEG5000-P(L-Va1)(PEV5-4)的合成

与实施例1相同的步骤,将聚乙二醇分子量改变为5000 g/mol,投料量为1 g,L-缬氨酸-N-羧基-环内酸酐投料量为2.86 g,反应温度设定为45 °C,反应时间为72 h,开环反应制备出PEV5-4。

表1 本发明所制备的一系列聚乙二醇-聚L-缬氨酸共聚物。

样品编号	PEG分子量 (g/mol)	L-缬氨酸 聚合度 ^a	数均分子量 (g/mol) ^a	分子量 分布系数 ^b
PEV1-1	500	2	694.4	1.13
PEV1-2	500	6.5	1130.5	1.20
PEV1-3	500	10.8	1547.2	1.17
PEV1-4	500	14.2	1877.3	1.20
PEV2-1	1000	4.6	1446.6	1.05
PEV2-2	1000	10	1970.7	1.07
PEV2-3	1000	15.5	2503.6	1.12
PEV2-4	1000	21.8	3114.5	1.29
PEV3-1	1500	4.5	1936.7	1.07
PEV3-2	1500	12.6	2722.5	1.10
PEV3-3	1500	23.9	3819.7	1.20
PEV3-4	1500	30.4	4448.3	1.30
PEV4-1	2000	5	2485.4	1.08
PEV4-2	2000	11.5	3115.3	1.08
PEV4-3	2000	27.6	4677.6	1.16
PEV4-4	2000	38.6	5744.8	1.24
PEV5-1	5000	38.2	8705.6	1.19
PEV5-2	5000	60.2	10839.8	1.21
PEV5-3	5000	85.6	13303.8	1.13
PEV5-4	5000	100	14700.8	1.29

[0031] ^a 由核磁共振氢谱¹H NMR计算;^b 由凝胶渗透色谱GPC测定。

[0032] 实施例6:嵌段共聚物体外成胶试验

将PEV4-2嵌段共聚物溶于水中,分别制备成300 mg/mL、200 mg/mL、100 mg/mL、50 mg/mL、25 mg/mL、12.5 mg/mL六种梯度溶液,置于10 °C水浴锅中,每隔半个小时升温一次,升温幅度为2 °C,当倒置试管三十秒内溶液不流动时,即认为凝胶形成,记录成胶的温度。

[0033] 实施例7:共聚物PEV4-2的流变学分析

配置浓度为200 mg/mL的聚合物溶液,将其置于动态流变仪(Anton paar MCR302)的直径为25毫米的平行圆盘间隙中,间隙距离设置为5毫米。固定剪切应力为1%,温度为25 °C,扫描模量随频率从1-100 Hz的变化。然后固定剪切应力为1%,频率为1 Hz,扫描模量在温度

范围25-60 °C内的变化曲线。如图3(a)所示,当频率从1增加至100 Hz时,PEV4-2的弹性模量 G' 与粘性模量 G'' 呈现增加的趋势,而且 G' 数值大于 G'' ,说明保持了凝胶态。如图3(b)所示,随着温度增加,PEV4-2凝胶的弹性模量呈现增长的趋势,说明该嵌段共聚物有一定的温敏性。

[0034] 实施例8:共聚物PEV4-2的体外细胞毒性试验

将小鼠成纤维细胞3T3制备成细胞悬液并计数,然后接种到96孔板中,每孔约100 μ L细胞悬液,设置三个平行样。然后放到37 °C培养箱中培养过夜(14-16小时),加入不同浓度(0、1、10、100、500、1000 μ g/mL)的共聚物溶液,继续在37 °C培养箱中培养24 h。然后,每孔加入10 μ L CCK-8 (Cell Counting Kit-8,日本同仁化学研究所),轻轻敲击培养板以帮助混匀。将培养板在培养箱内孵育半小时,用酶标仪(Thermo Varioskan Flash 3001)测定在450 nm处的吸光度。结果如图4所示,在浓度范围为1-1000 μ g/mL内,PEV4-2共聚物未见明显的细胞毒性。

[0035] 实施例9:水凝胶的三维细胞培养

将小鼠成纤维细胞3T3制备成细胞悬液并计数,将一定量共聚物PEV4-2加入细胞悬液中,混匀,每毫升水凝胶中有约 10^6 数量级的细胞数目。然后,将100 μ L混合物接种到96孔板中,设置三个平行样。放到37 °C培养箱中分别培养1, 3, 5, 7天后,用CCK-8检测细胞的增殖情况,方法如实施例8所述。结果如图5所示,随着培养时间的延长,细胞的OD值增加,说明细胞在水凝胶内进行了有效的增殖,此水凝胶体系具有良好的生物相容性,无毒性,可以作为细胞的三维培养支架。

[0036] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

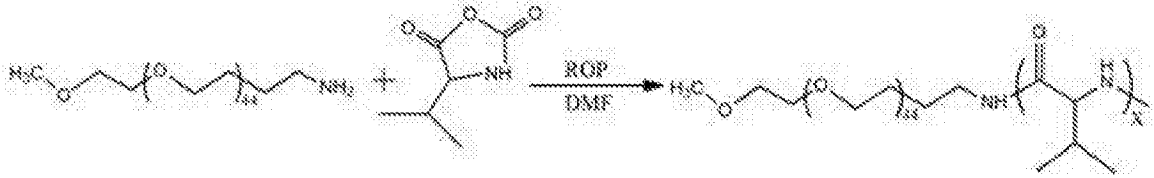


图1

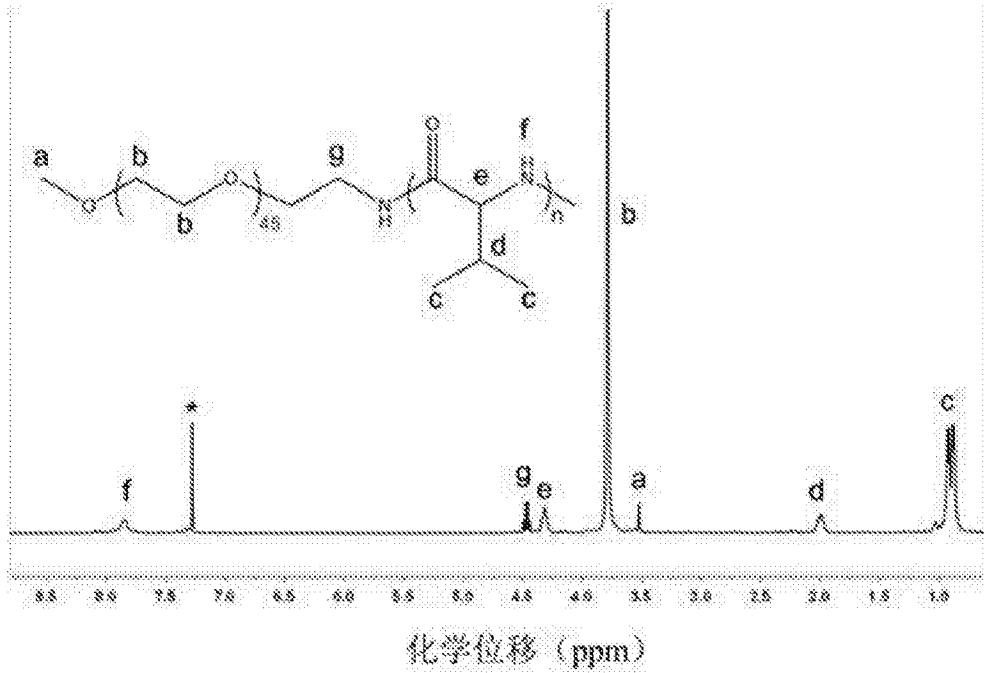


图2

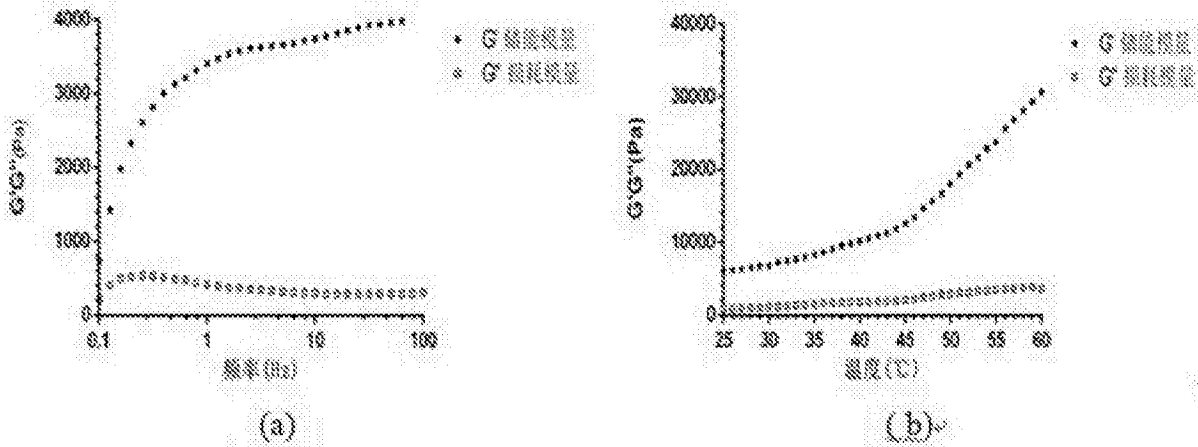


图3

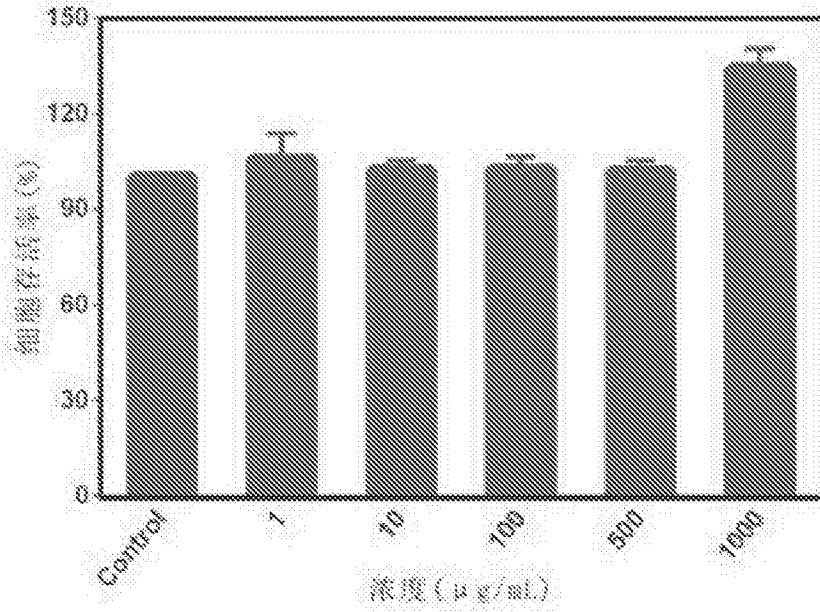


图4

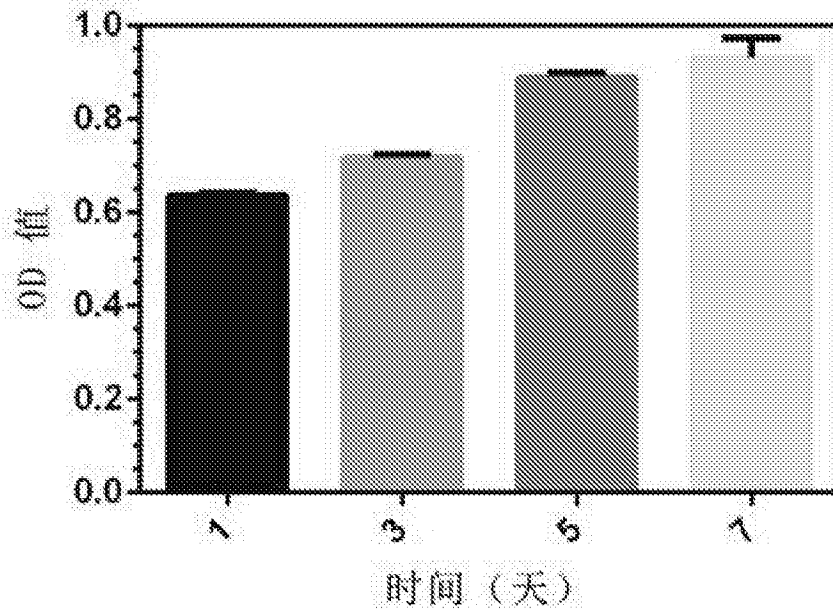


图5