



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111440334 B

(45) 授权公告日 2021.08.17

(21) 申请号 202010454896.6

C08L 71/02 (2006.01)

(22) 申请日 2020.05.26

C08B 37/08 (2006.01)

C08G 65/333 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 111440334 A

(56) 对比文件

(43) 申请公布日 2020.07.24

CN 109867822 A, 2019.06.11

CN 109867822 A, 2019.06.11

(73) 专利权人 中国科学院长春应用化学研究所

CN 110498936 A, 2019.11.26

地址 130022 吉林省长春市人民大街5625号

CN 109966558 A, 2019.07.05

CN 109517162 A, 2019.03.26

(72) 发明人 贺超良 任慧 张震 陈学思

CN 102596275 A, 2012.07.18

US 2018371117 A1, 2018.12.27

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

Fan, Ming et al..Injectable Multi-Arm

Poly(ethylene glycol)/Hyaluronic Acid

Hydrogels for Adipose Tissue Engineering.

《JOURNAL OF MACROMOLECULAR SCIENCE》.2015,

第52卷(第5期), 345-352.

代理人 任美玲

审查员 梁俊实

(51) Int.Cl.

C08J 3/075 (2006.01)

C08J 3/24 (2006.01)

C08L 5/08 (2006.01)

权利要求书3页 说明书16页 附图5页

(54) 发明名称

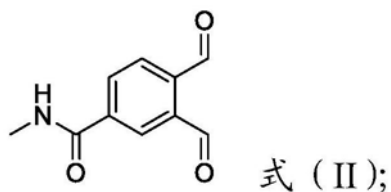
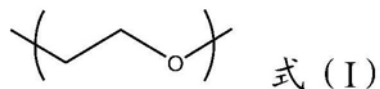
一种可注射透明质酸基水凝胶及其制备方法

(57) 摘要

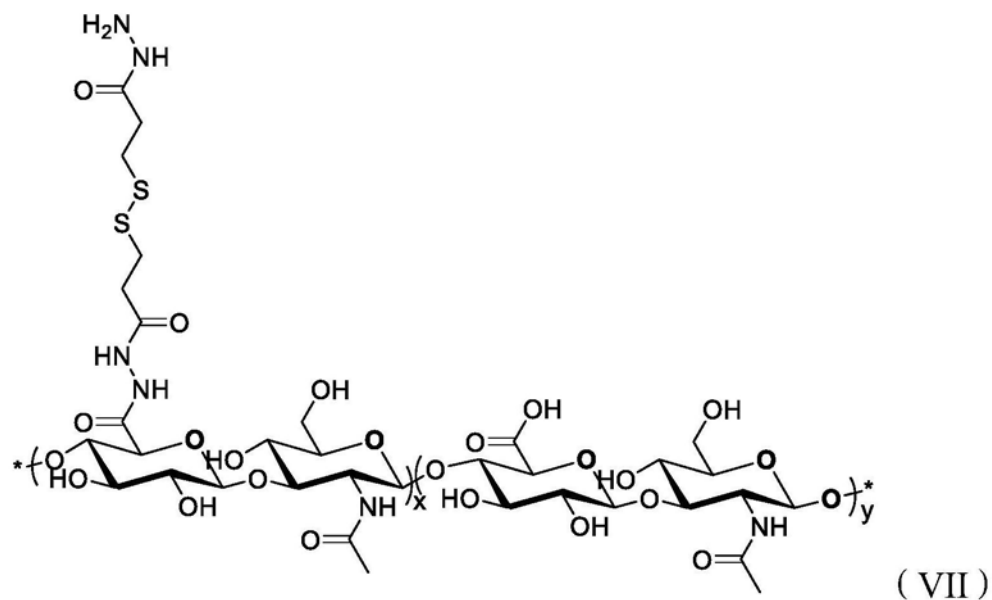
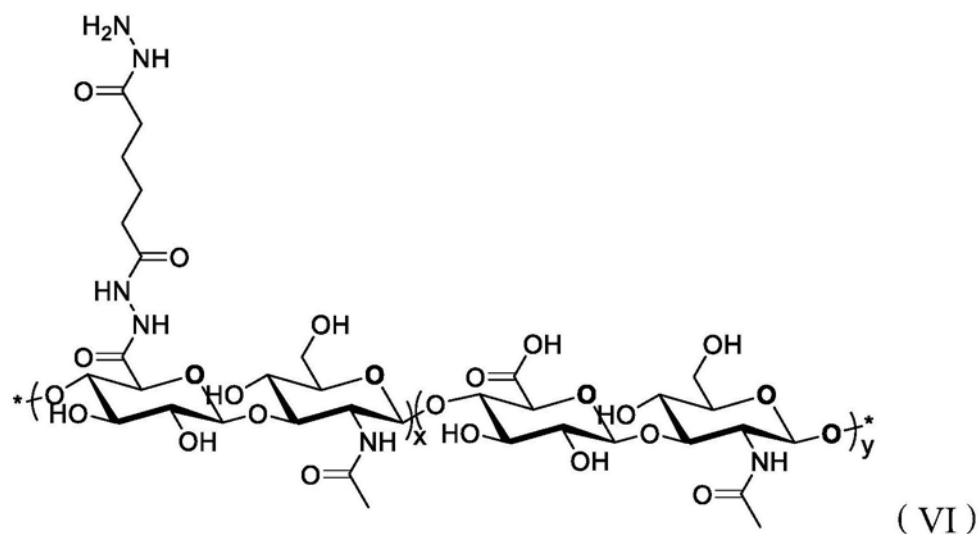
本发明提供了一种可注射透明质酸基水凝胶,由改性透明质酸、交联剂和溶剂混合制备得到;所述交联剂包含具有式(I)结构的重复单元和具有式(II)结构的端基。本发明提供的改性透明质酸水凝胶,其制备条件温和,制备方法简单,机械强度及降解速率可控,在生物医学领域具有较好的应用前景。并且,本发明提供的改性透明质酸水凝胶具有较高的可调空间,可根据不同的需求调节透明质酸的分子量、己二酸二酰肼或3,3'-二硫代二(丙酸肼)接枝率、交联剂的分子量等,从而制备具有各种不同物理化学性能的水凝胶材料。

1. 一种可注射透明质酸基水凝胶, 其特征在于, 由改性透明质酸、交联剂和溶剂混合制备得到;

所述交联剂包含具有式 (I) 结构的重复单元和具有式 (II) 结构的端基;



所述改性透明质酸选自具有式 (VI) 结构和/或式 (VII) 结构的化合物:

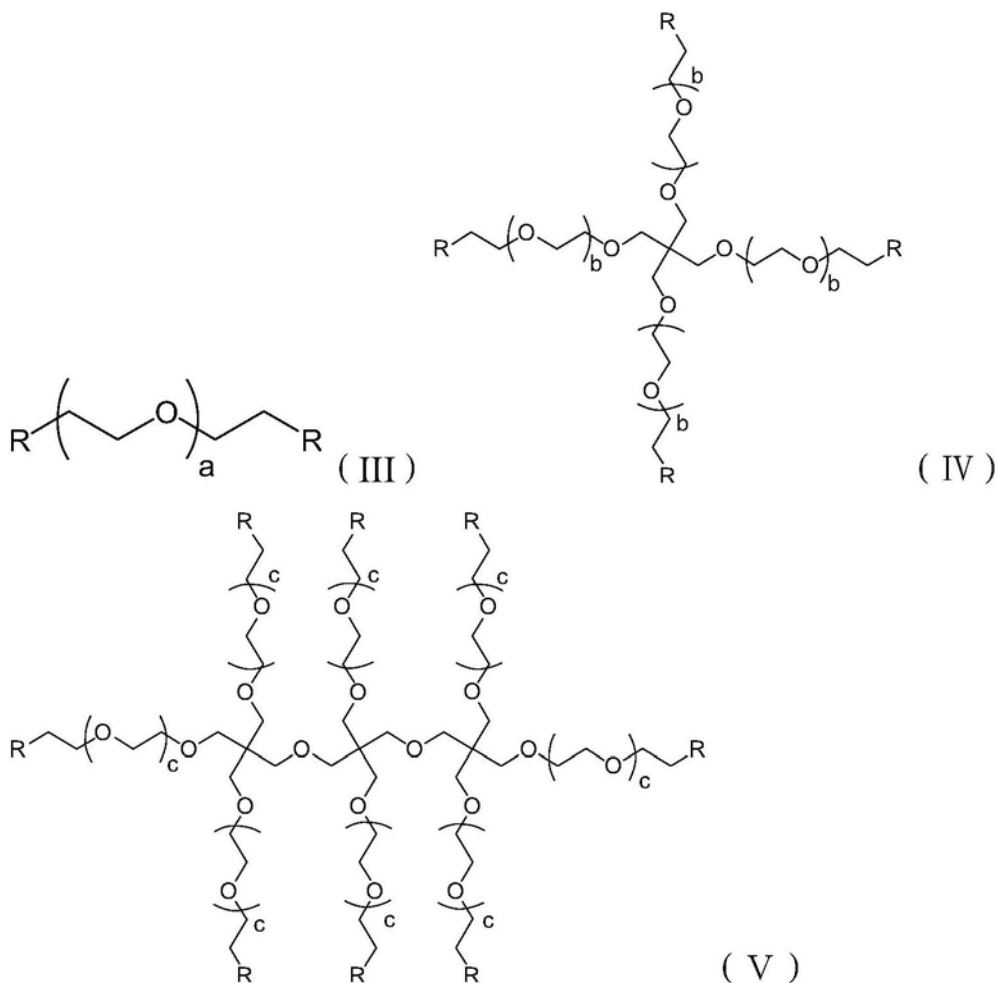


其中, x, y 为聚合度, $50 \leq x+y \leq 2500$;

所述改性透明质酸中己二酸二酰肼或3,3'-二硫代二(丙酸肼)的接枝率为5%~80%。

2. 根据权利要求1所述的水凝胶, 其特征在于, 所述交联剂选自具有式 (III) ~ 式 (V)

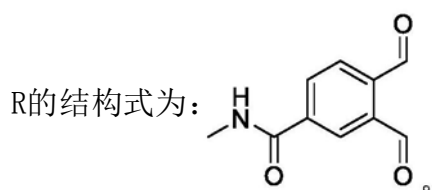
结构的化合物中的一种或多种；



其中, a 为聚合度, $40 \leq a \leq 1000$;

b 为聚合度, $13 \leq b \leq 333$;

c 为聚合度, $5 \leq c \leq 125$;



3. 根据权利要求1所述的水凝胶, 其特征在于, 所述改性透明质酸的制备方法为:

a) 将透明质酸钠与水按比例混合均匀, 在磁力搅拌下, 加入己二酸二酰肼或3,3'-二硫代二(丙酸肼)以及活化剂, 调节反应pH后, 进行酰胺化反应;

b) 将反应后的产物, 透析处理得到改性透明质酸。

4. 根据权利要求3所述的水凝胶, 其特征在于, 步骤a) 所述的透明质酸钠和水的质量体积比为1: (100~1000);

步骤a) 所述的活化剂包含两种组分, 其中第一种组分为1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐、N,N-二异丙基碳二亚胺、N,N-二环己基碳二亚胺中的一种或多种; 第二种组分为1-羟基苯并三唑、N-羟基琥珀酰亚胺、N-羟基硫代琥珀酰亚胺中的一种或多种;

步骤a) 的pH调节范围为: 4.0~8.0;

步骤a)所述的透明质酸钠、己二酸二酞肼或3,3'-二硫代二(丙酸肼)、活化剂的物质的量比为:1:(0.1~30):(0.1~1.5);

步骤a)所述的反应温度为10℃~40℃,反应时间为12h~72h。

5.根据权利要求1所述的水凝胶,其特征在于,所述溶剂为水、生理盐水或缓冲溶液。

6.一种如权利要求1~5任意一项所述的水凝胶的制备方法,其特征在于,将改性透明质酸溶液与交联剂溶液混合进行反应,得到可注射透明质酸基水凝胶。

7.根据权利要求6所述的制备方法,其特征在于,所述反应的温度为0℃~60℃。

8.根据权利要求6所述的制备方法,其特征在于,所述改性透明质酸的溶液中,改性透明质酸质量-体积浓度为0.5mg/mL~150mg/mL;所述交联剂溶液中,交联剂的质量-体积浓度为0.5mg/mL~1000mg/mL。

9.根据权利要求6所述的制备方法,其特征在于,所述改性透明质酸和交联剂的质量比为:1:(0.2~10.0)。

一种可注射透明质酸基水凝胶及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于多糖类高分子材料技术领域,具体涉及一种可注射透明质酸基水凝胶及其制备方法。

背景技术

[0002] 水凝胶是通过化学键、氢键、范德华力或物理缠结等方式交联的具有三维网络结构的一类特殊软湿性材料,可以在水或生物体液中溶胀但不溶解,兼具有固态和液态两种性质。这一特性使其广泛应用于组织工程、药物载体等生物医学领域。由于水凝胶三维空间网络结构和天然的细胞外基质相似,因此,水凝胶材料可以为细胞粘附、增殖、生长提供支撑作用和代谢空间。在溶胀状态下,水凝胶的网络中充满了大量水分,有利于氧气、营养物质和代谢产物的运输。水凝胶吸水膨胀的特性以及对小分子的渗透扩散使其具有良好的生物相容性,且水凝胶良好的柔韧性和高弹性可以极大的减少对细胞的损伤。因此,水凝胶可广泛应用于药物释放,三维细胞培养,组织工程修复等领域。

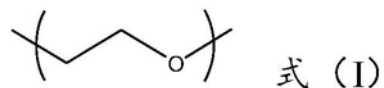
[0003] 透明质酸是一种天然高分子材料,是细胞外基质的主要成分之一,由于其生物相容性好,可塑性好,粘弹性高以及生物可降解性,使其在生物医学领域具有广泛的用途。但是,未交联的透明质酸能够被细胞内或血清中的透明质酸酶降解,使其在生物体内的存留时间过短,降解速率过快,从而限制了该类材料的应用范围。目前主要通过改性和交联两种方式来提高其机械强度和减缓其降解速率。目前透明质酸基水凝胶制备方法主要分为化学交联法和物理交联法,由于物理交联形成的水凝胶具有机械强度不高、稳定性差、降解速率不可控的特点,因此化学交联法应用范围更为广泛。但是,现有技术通过化学交联制备透明质酸基水凝胶存在合成步骤过于复杂,合成条件过于苛刻,以及只能通过控制交联网络密度来控制降解速率等问题。

发明内容

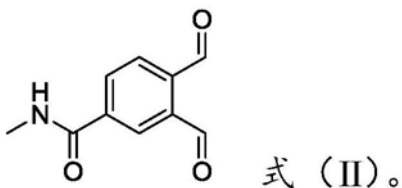
[0004] 有鉴于此,本发明要解决的技术问题在于提供一种可注射透明质酸基水凝胶及其制备方法,本发明提供的透明质酸基水凝胶制备条件温和,制备方法简单,机械强度及降解速率可控。

[0005] 本发明提供了一种可注射透明质酸基水凝胶,由改性透明质酸、交联剂和溶剂混合制备得到;

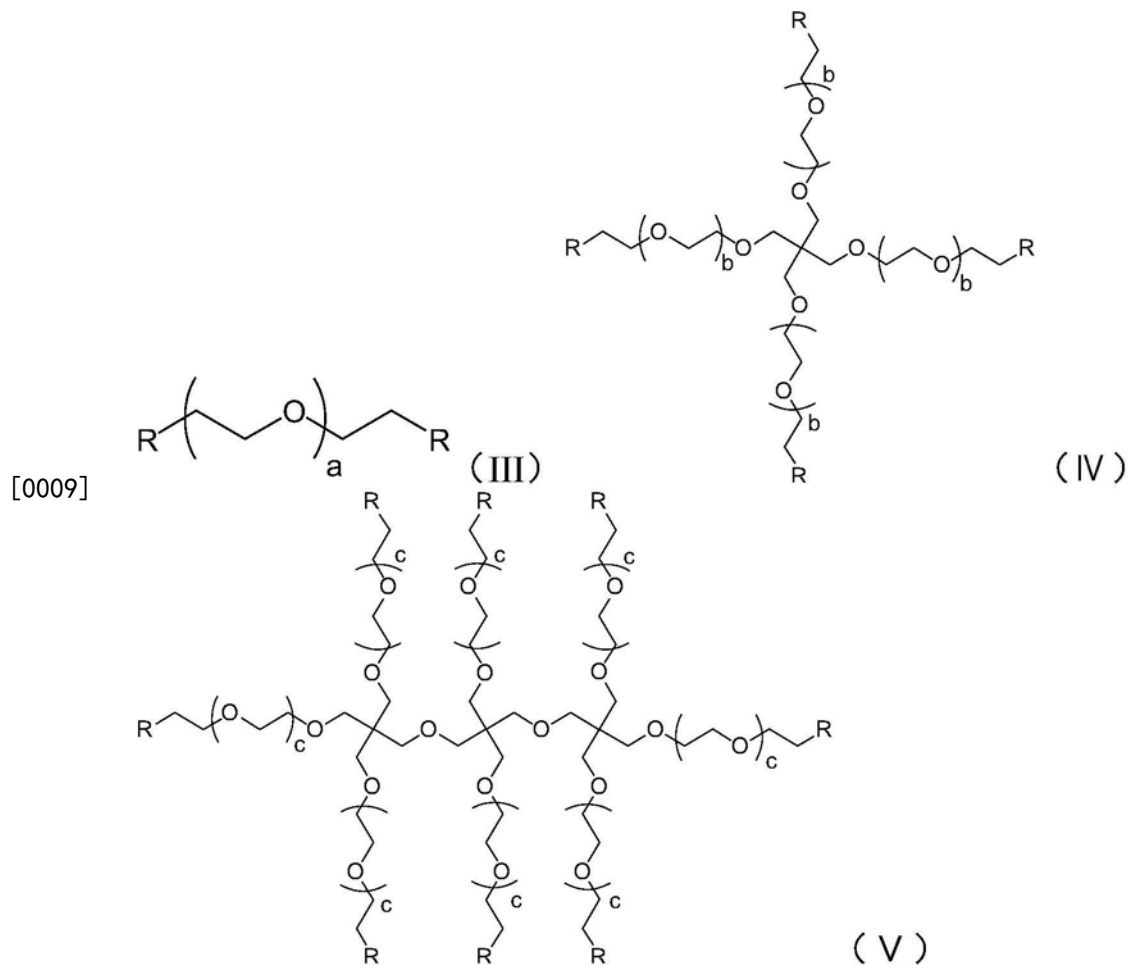
[0006] 所述交联剂包含具有式(I)结构的重复单元和具有式(II)结构的端基;



[0007]



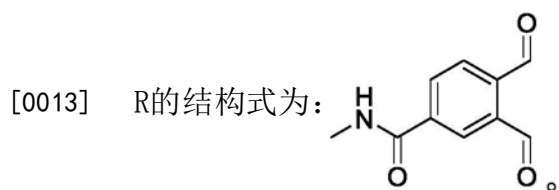
[0008] 优选的,所述交联剂选自具有式(III)~式(V)结构的化合物中的一种或多种;



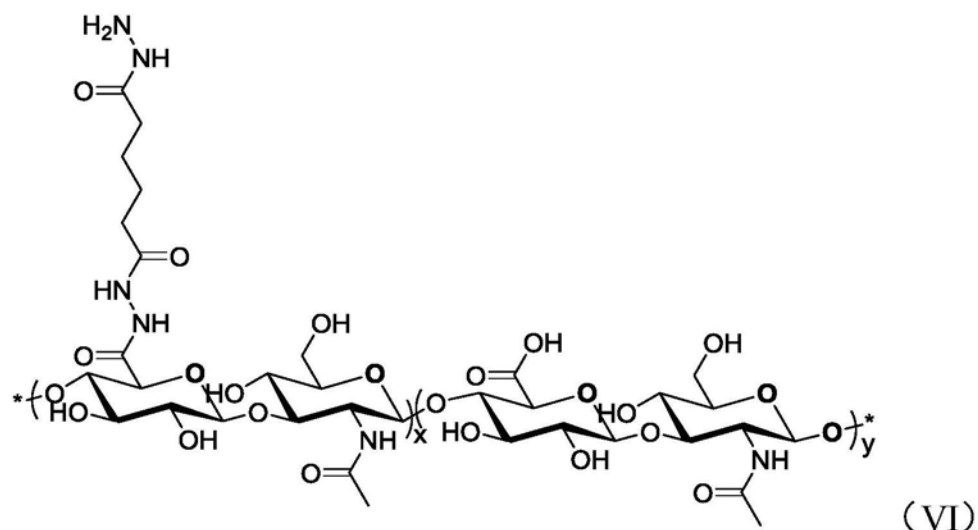
[0010] 其中,a为聚合度, $40 \leq a \leq 1000$;

[0011] b为聚合度, $10 \leq b \leq 250$;

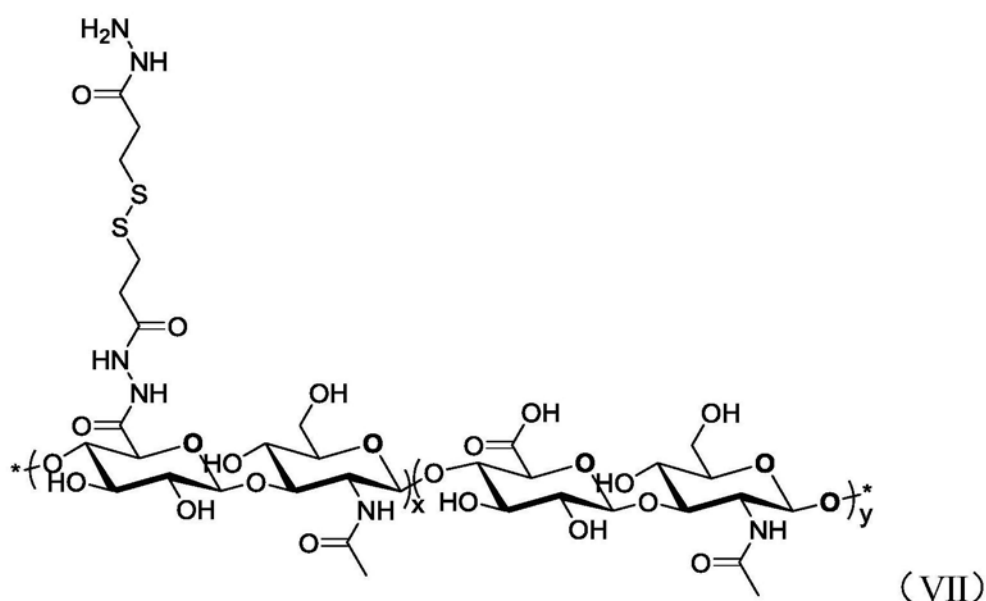
[0012] c为聚合度, $5 \leq c \leq 125$;



[0014] 优选的,所述改性透明质酸选自具有式(VI)结构和/或式(VII)结构的化合物:



[0015]

[0016] 其中, x, y 为聚合度, $50 \leq x+y \leq 2500$ 。

[0017] 所述改性透明质酸中己二酸二酰肼或3,3'-二硫代二(丙酸肼)的接枝率为5%~80%。

[0018] 优选的,所述改性透明质酸的制备方法为:

[0019] a) 将透明质酸钠与水按比例混合均匀,在磁力搅拌下,加入己二酸二酰肼或3,3'-二硫代二(丙酸肼)以及活化剂,调节反应pH后,进行酰胺化反应;

[0020] b) 将反应后的产物,透析处理得到改性透明质酸。

[0021] 优选的,步骤a)所述的透明质酸钠和水的质量体积比为1:(100~1000);

[0022] 步骤a)所述的活化剂包含两种组分,其中第一种组分为1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐、N,N-二异丙基碳二亚胺、N,N-二环己基碳二亚胺中的一种或多种;第二种组分为1-羟基苯并三唑、N-羟基琥珀酰亚胺、N-羟基硫代琥珀酰亚胺中的一种或多种;

[0023] 步骤a)的pH调节范围为:4.0~8.0;

[0024] 步骤a)所述的透明质酸钠、己二酸二酰肼或3,3'-二硫代二(丙酸肼)、活化剂的物质的量比为:1:(0.1~30):(0.1~1.5);

[0025] 步骤a) 所述的反应温度为 $10^{\circ}\text{C}\sim 40^{\circ}\text{C}$, 反应时间为 $12\text{h}\sim 72\text{h}$ 。

[0026] 优选的, 所述溶剂为水、生理盐水或缓冲溶液。

[0027] 本发明还提供了一种上述水凝胶的制备方法, 将改性透明质酸溶液与交联剂溶液混合进行反应, 得到可注射透明质酸基水凝胶。

[0028] 优选的, 所述反应的温度为 $0^{\circ}\text{C}\sim 60^{\circ}\text{C}$ 。

[0029] 优选的, 所述改性透明质酸的溶液中, 改性透明质酸质量-体积浓度为 $0.5\text{mg/mL}\sim 150\text{mg/mL}$; 所述交联剂溶液中, 交联剂的质量-体积浓度为 $0.5\text{mg/mL}\sim 1000\text{mg/mL}$ 。

[0030] 优选的, 所述改性透明质酸和交联剂的质量比为 $1:(0.2\sim 10.0)$ 。

[0031] 与现有技术相比, 本发明提供了一种可注射透明质酸基水凝胶, 由改性透明质酸、交联剂和溶剂混合制备得到; 所述交联剂包含具有式(I)结构的重复单元和具有式(II)结构的端基。本发明提供的改性透明质酸水凝胶, 其制备条件温和, 制备方法简单, 机械强度及降解速率可控, 在生物医学领域具有较好的应用前景。并且, 本发明提供的改性透明质酸水凝胶具有较高的可调空间, 可根据不同的需求调节透明质酸的分子量、己二酸二酰肼或 $3,3'$ -二硫代二(丙酸肼)接枝率、交联剂的分子量等, 从而制备具有各种不同物理化学性能的水凝胶材料。

附图说明

[0032] 图1为本发明实施例1中制备的 $3,3'$ -二硫代二(丙酸肼)的核磁共振氢谱图;

[0033] 图2为本发明实施例1制备的 $3,3'$ -二硫代二(丙酸肼)的质谱图;

[0034] 图3为本发明实施例3中制备的透明质酸-接枝-己二酸二酰肼的核磁共振氢谱.;

[0035] 图4为本发明实施例8中制备的透明质酸-接枝- $3,3'$ -二硫代二(丙酸肼)的核磁共振氢谱;

[0036] 图5为本发明实施例14中制备的 $1,3$ -二甲氧基- $1,3$ -二氢异苯并呋喃-5-羧酸琥珀酰亚胺酯的核磁共振氢谱;

[0037] 图6为本发明实施例16中制备的端基为邻苯二醛的四臂聚乙二醇的核磁共振氢谱;

[0038] 图7为本发明实施例20和实施例22制备的可注射透明质酸基水凝胶的流变学测试结果;

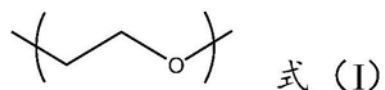
[0039] 图8为本发明实施例20中制备的可注射透明质酸基水凝胶的照片;

[0040] 图9为本发明实施例28中制备的可注射透明质酸基水凝胶的降解曲线。

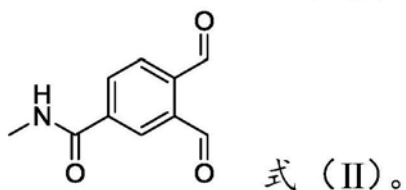
具体实施方式

[0041] 本发明提供了一种可注射透明质酸基水凝胶, 由改性透明质酸、交联剂和溶剂混合制备得到;

[0042] 所述交联剂包含具有式(I)结构的重复单元和具有式(II)结构的端基;

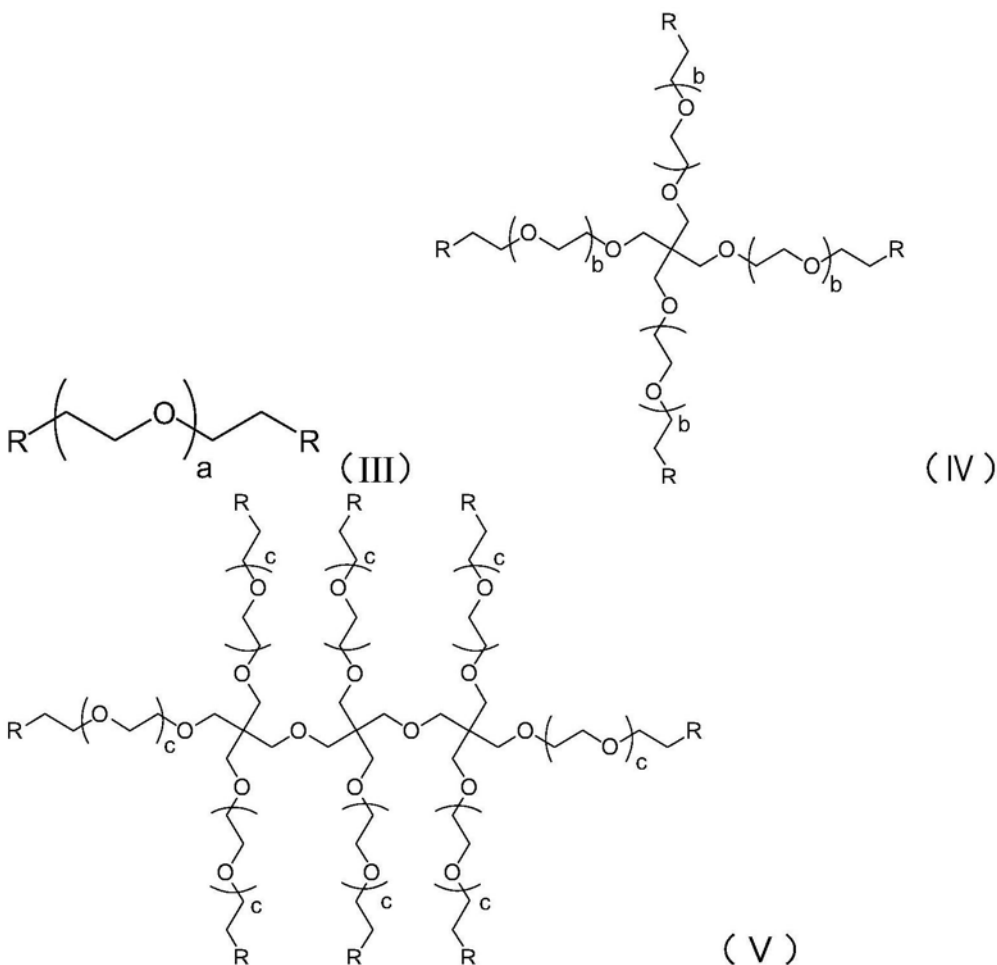


[0043]



[0044] 在本发明的一些具体实施方式中,所述交联剂选自具有式(III)~式(V)结构的化合物中的一种或多种;

[0045]

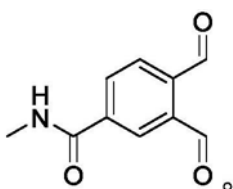


[0046] 其中,a为聚合度, $40 \leq a \leq 1000$;

[0047] b为聚合度, $10 \leq b \leq 250$;

[0048] c为聚合度, $5 \leq c \leq 125$;

[0049] R的结构式为:



[0050] 在本发明的一些具体实施方式中,所述交联剂选自具有式(IV)结构的化合物。

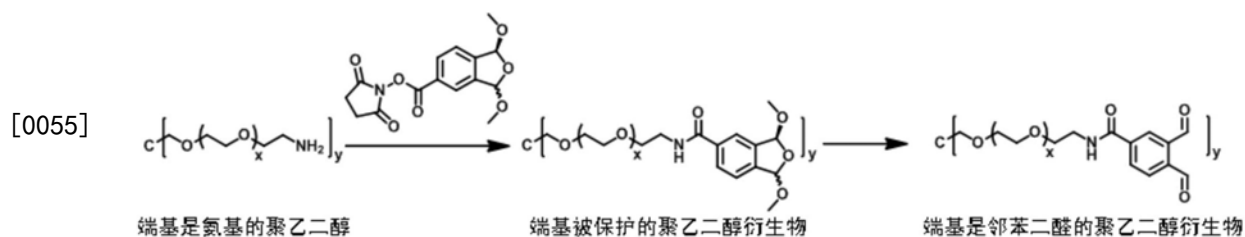
[0051] 所述交联剂的制备方法包括以下步骤:

[0052] A) 将1,3-二甲氧基-1,3-二氢异苯并呋喃-5-羧酸琥珀酰亚胺酯和端基是氨基的

聚乙二醇反应,得到反应产物;

[0053] B) 将所述反应产物脱保护,得到交联剂。

[0054] 其中,反应过程如下:



[0056] 本发明将1,3-二甲氧基-1,3-二氢异苯并呋喃-5-羧酸琥珀酰亚胺酯和端基是氨基的聚乙二醇溶于有机溶剂,在缚酸剂的存在下反应,沉降,得到反应产物。

[0057] 所述1,3-二甲氧基-1,3-二氢异苯并呋喃-5-羧酸琥珀酰亚胺酯的摩尔当量为端基是氨基的聚乙二醇中氨基的1.2~5倍,优选为2倍;所述有机溶剂优选为无水的二氯甲烷;所述缚酸剂优选为无水吡啶。

[0058] 所述反应的时间为24~72h,优选为48h;所述反应的温度为10~40℃,优选为25℃。

[0059] 本发明优选采用无水乙醚进行沉降;将沉降固体过滤,真空干燥,得到反应产物。

[0060] 得到反应产物后,本发明将所述反应产物进行脱保护,透析和冷冻干燥,得到聚乙二醇衍生物,即交联剂。

[0061] 所述脱保护采用本领域技术人员熟知的技术方案即可。本发明优选采用三氟乙酸和水的混合溶剂;所述混合溶剂的体积为反应产物质量的5~20倍,优选为5倍;所述脱保护的时间为0.5~3h,优选为1h;所述脱保护的温度为10~40℃,优选为25℃。

[0062] 所述透析和冷冻干燥采用本领域技术人员熟知的技术方案即可。

[0063] 在本发明中,所述1,3-二甲氧基-1,3-二氢异苯并呋喃-5-羧酸琥珀酰亚胺酯按照以下方法制备:

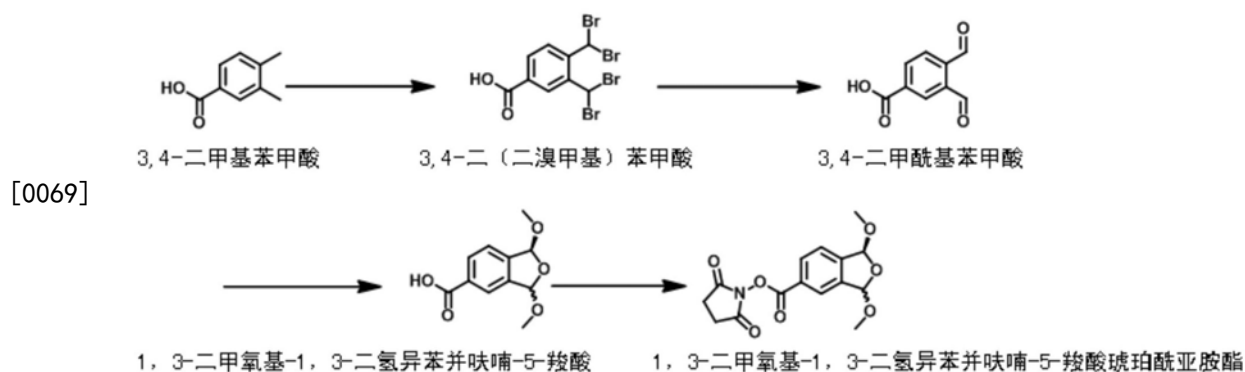
[0064] 1) 将3,4-二甲基苯甲酸通过溴代反应,制备3,4-二(二溴甲基)苯甲酸;

[0065] 2) 将3,4-二(二溴甲基)苯甲酸进行水解得到3,4-二甲酰基苯甲酸;

[0066] 3) 将3,4-二甲酰基苯甲酸与甲醇反应得到1,3-二甲氧基-1,3-二氢异苯并呋喃-5-羧酸;

[0067] 4) 将1,3-二甲氧基-1,3-二氢异苯并呋喃-5-羧酸与N-羟基丁二酰亚胺和缩合试剂反应,得到1,3-二甲氧基-1,3-二氢异苯并呋喃-5-羧酸琥珀酰亚胺酯。

[0068] 其中,反应过程如下:



[0070] 具体的,本发明将3,4-二甲基苯甲酸通过溴化反应,制备3,4-二(二溴甲基)苯甲酸。

[0071] 所述溴化反应采用本领域技术人员熟知的技术方案即可。本发明采用N-溴代丁二酰亚胺为溴化试剂,过氧化苯甲酰、偶氮二异丁腈中的任意一种为自由基引发剂,四氯化碳为溶剂进行溴化反应。

[0072] 所述N-溴代丁二酰亚胺的摩尔当量为3,4-二甲基苯甲酸的3~5倍,优选为4倍;所述过氧化苯甲酰的摩尔当量为3,4-二甲基苯甲酸的0.05~0.5倍,优选为0.1倍;所述四氯化碳的体积(ml)为3,4-二甲基苯甲酸质量(g)的10~50倍,优选为20倍。

[0073] 所述溴化反应的温度为70~90℃,优选为81℃;所述溴化反应的时间为10~20h,优选为15h。

[0074] 溴化反应结束后,将反应混合物过滤;滤饼选用苯、乙醚洗涤;将全部滤液合并浓缩后,真空抽干;将固体产物在乙腈中重结晶,得到3,4-二(二溴甲基)苯甲酸。

[0075] 本发明优选采用旋转蒸发仪进行浓缩;优选浓缩温度为30℃;优选浓缩至10%的液体体积。

[0076] 所述重结晶采用本领域技术人员熟知的技术方案即可。

[0077] 本发明将3,4-二(二溴甲基)苯甲酸进行水解反应得到3,4-二甲酰基苯甲酸。

[0078] 所述水解反应采用本领域技术人员熟知的技术方案即可。本发明优选将3,4-二(二溴甲基)苯甲酸溶于碳酸钠的水溶液进行水解反应。

[0079] 所述碳酸钠水溶液的质量-体积浓度为10%;所述碳酸钠水溶液的体积为3,4-二(二溴甲基)苯甲酸质量的5-20倍,优选为10倍。

[0080] 所述水解反应的温度为60~80℃,优选为70℃;所述水解反应的时间为3-5h,优选为4h。

[0081] 水解反应结束后,选用浓盐酸将反应液的pH调至0~3,优选为1;选用乙酸乙酯进行萃取;浓缩、真空抽干后得到3,4-二甲酰基苯甲酸。

[0082] 本发明将3,4-二甲酰基苯甲酸与甲醇、催化剂反应得到1,3-二甲氧基-1,3-二氢异苯并呋喃-5-羧酸。

[0083] 所述催化剂优选为三氟甲烷磺酸铈;所述反应的温度为10~40℃,优选为25℃;所述反应的时间为6~24h,优选为12h。

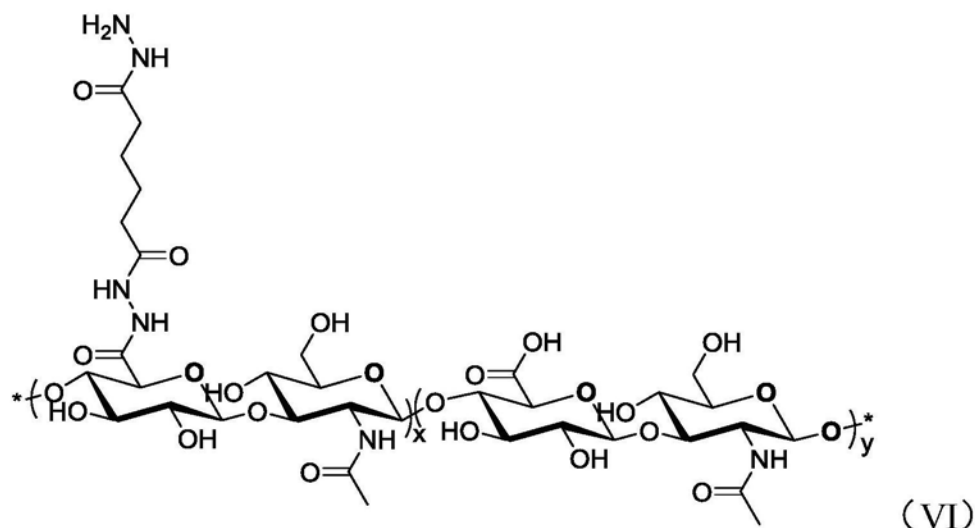
[0084] 本发明将1,3-二甲氧基-1,3-二氢异苯并呋喃-5-羧酸与N-羟基丁二酰亚胺、缩合试剂在有机溶剂中反应,得到1,3-二甲氧基-1,3-二氢异苯并呋喃-5-羧酸琥珀酰亚胺酯。

[0085] 所述缩合试剂为二环己基碳二亚胺、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐、二异丙基碳二亚胺中的任意一种,优选为1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐;所述有机溶剂为二甲基甲酰胺、二甲基亚砷、乙腈中的任意一种,优选为乙腈。

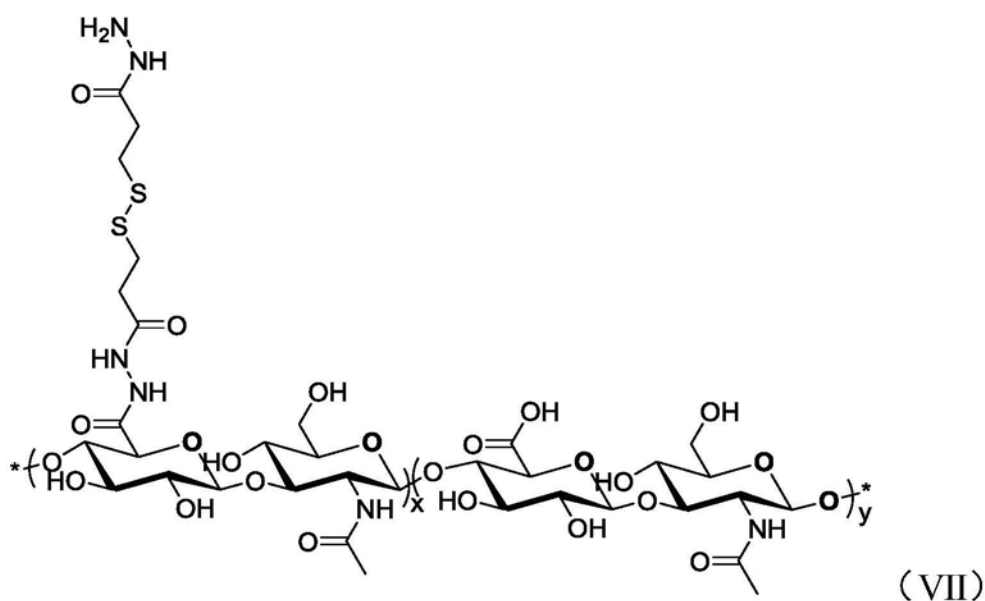
[0086] 所述反应的温度为10~40℃,优选为25℃;所述反应的时间为6~24h,优选为12h。

[0087] 反应结束后,粗产物通过硅胶柱层析进行提纯,得到1,3-二甲氧基-1,3-二氢异苯并呋喃-5-羧酸琥珀酰亚胺酯。所述柱层析的流动相优选为正己烷和乙酸乙酯,体积比为1:5~1:1,优选为1:3。

[0088] 在本发明中,所述可注射透明质酸基水凝胶的制备原料还包括改性透明质酸,在本发明中,所述改性透明质酸选自具有式(VI)结构和/或式(VII)结构的化合物:



[0089]



[0090] 其中, x, y 为聚合度, $50 \leq x+y \leq 2500$ 。

[0091] 所述改性透明质酸中己二酸二酰肼或 3,3'-二硫代二(丙酸肼)的接枝率为 5%~80%。

[0092] 在本发明的一些具体实施方式中,所述改性透明质酸选自具有式 (VI) 结构和式 (VII) 结构的化合物。其中,二者的质量比为 1:(0.1~10)。

[0093] 在本发明中,所述改性透明质酸的制备方法为:

[0094] a) 将透明质酸钠与水按比例混合均匀,在磁力搅拌下,加入己二酸二酰肼或 3,3'-二硫代二(丙酸肼)以及活化剂,调节反应 pH 后,进行酰胺化反应;

[0095] b) 将反应后的产物,透析处理得到改性透明质酸。

[0096] 在本发明中,所述透明质酸钠和水的质量体积比为 1:(100~1000),优选为 1:(300~1000),更优选为 1:(500~1000)。

[0097] 在本发明中,所述的活化剂包含两种组分,其中第一种组分为 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐、N,N-二异丙基碳二亚胺、N,N-二环己基碳二亚胺中的一种或多种;第二种组分为 1-羟基苯并三唑、N-羟基琥珀酰亚胺、N-羟基硫代琥珀酰亚胺中的一种

或多种。优选为1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐和N-羟基琥珀酰亚胺;1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐和1-羟基苯并三唑,更优选为1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐和1-羟基苯并三唑。

[0098] 在本发明中,所述的pH调节范围为:4.0~8.0,优选为4.5~5.0。

[0099] 在本发明中,所述3,3'-二硫代二(丙酸胍),是由以下步骤制备:

[0100] 称取水合胍置于反应器皿中,然后加入无水乙醇、3,3'-二硫代二丙酸二甲酯,搅拌回流条件下进行反应,所得产物通过重结晶进行纯化,制备3,3'-二硫代二(丙酸胍),其中水合胍与无水乙醇的质量比为1:(0.2~2.0),优选为1:(0.5~1.0),最优选为1:(0.6~0.8),其中所述反应温度为80~100℃,优选为90℃,其中反应时间为2~12h,优选为5~8h。

[0101] 在本发明中,所述透明质酸钠、己二酸二酰胍或3,3'-二硫代二(丙酸胍)、活化剂的物质的量比为:1:(0.1~30):(0.1~1.5),优选为1:(1~20):(0.2~1.0),最优选为1:(1~20):(0.2~0.8)。

[0102] 在本发明中,所述反应温度为10~40℃,优选为20~30℃,最优选为25℃,反应时间为12h~96h,优选为72h。

[0103] 在本发明中,所述可注射透明质酸基水凝胶的制备原料还包括溶剂,所述溶剂用于溶解改性透明质酸、交联剂。其中,所述溶剂为水、生理盐水和缓冲溶液。

[0104] 本发明还提供了一种上述水凝胶的制备方法,将改性透明质酸的溶液与交联剂溶液混合进行反应,得到可注射透明质酸基水凝胶。

[0105] 具体的,制备方法为:

[0106] a1) 将改性透明质酸溶于溶剂中,得到改性透明质酸溶液;

[0107] a2) 将交联剂溶于溶剂中,得到交联剂溶液;

[0108] a3) 将改性透明质酸溶液与交联剂溶液按照一定比例混合均匀,进行反应,得到可注射透明质酸基水凝胶。

[0109] 步骤a1)和步骤a2)中,所述溶剂为水、生理盐水、缓冲溶液、,优选为生理盐水和缓冲溶液,最优选为缓冲溶液。

[0110] 在本发明中,步骤a3)中,所述反应温度为0℃~60℃,优选为20℃~40℃,最优选为37℃。

[0111] 在本发明中,所述改性透明质酸的溶液中,所述改性透明质酸质量-体积浓度为0.5mg/mL~150mg/mL,优选为0.5mg/mL~100mg/mL,最优选为1mg/mL~100mg/mL;所述交联剂溶液中,交联剂的质量-体积浓度为0.5mg/mL~1000mg/mL,优选为0.5mg/mL~500mg/mL,最优选为0.5mg/mL~300mg/mL。

[0112] 在本发明中,所述改性透明质酸和交联剂的质量比为1:(0.2~10),优选为1:(0.5~10),更优选为1:(0.5~5)。

[0113] 在本发明提供的改性透明质酸水凝胶,可以引入生物活性基团,增强材料与细胞的相互作用,使其在三维细胞培养、组织工程修复和药物控释等领域具有巨大的应用前景。

[0114] 本发明提供了一种改性透明质酸水凝胶的制备方法和制备的改性透明质酸水凝胶,所述的改性透明质酸是指透明质酸上接枝己二酸二酰胍和/或3,3'-二硫代二(丙酸胍);所述的改性透明质酸水凝胶是由上述具有(VI)结构和式(VII)结构的改性透明质酸和交联剂制备得到的;所述交联剂为具有式(III)或(IV)或式(V)结构的聚乙二醇-接枝-邻

苯二醛。

[0115] 与现有技术相比,本发明提供的改性的透明质酸,不仅引入可交联的酰肼基团还引入了环境响应性的二硫键,拓宽了透明质酸水凝胶在生物医学领域的应用范围。本发明提供的改性透明质酸水凝胶可以引入生物活性基团,增强材料与细胞的相互作用,使其在三维细胞培养、组织工程修复和药物控释等领域具有巨大的应用前景。

[0116] 另外,本发明提供的改性透明质酸水凝胶具有较高的可调空间,可根据不同的需求调节透明质酸的分子量、己二酸二酰肼或3,3'-二硫代二(丙酸肼)接枝率、交联剂聚乙二醇-接枝-邻苯二醛中聚乙二醇的分子量以及邻苯二醛的接枝率等,从而制备具有各种不同物理化学性能的水凝胶材料。

[0117] 此外,本发明提供的一种改性透明质酸水凝胶,其制备条件温和,制备方法简单,机械强度及降解速率可控,在生物医学领域具有较好的应用前景。

[0118] 为了进一步理解本发明,下面结合实施例对本发明提供的可注射透明质酸基水凝胶及其制备方法进行说明,本发明的保护范围不受以下实施例的限制。

[0119] 实施例1

[0120] 在N₂气氛下,向圆底烧瓶中加入12.0g水合肼和20mL的无水乙醇溶液,将油浴温度调至90℃,加入10.0g 3,3'-二硫代二丙酸二甲酯,搅拌回流5h,所得产物用乙醇:水=5%(V/V)的混合溶液重结晶3次,制备3,3'-二硫代二(丙酸肼)。参见图1和图2,图1为本发明实施例1制备的制备3,3'-二硫代二(丙酸肼)的核磁共振氢谱图;图2为本发明实施例1制备的制备3,3'-二硫代二(丙酸肼)的质谱图。

[0121] 实施例2

[0122] 称取透明质酸钠1.2g加入200mL超纯水中搅拌至其完全溶解,然后加入5.2g己二酸二酰肼、0.4g 1-羟基苯并三唑、58mg 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐,搅拌使其完全溶解后使用0.01M的稀盐酸溶液调节体系pH=4.7,25℃条件下搅拌反应72h,得到产物用7000Da的透析袋透析72h,得到产物透明质酸-接枝-己二酸二酰肼。

[0123] 实施例3

[0124] 称取透明质酸钠1.2g加入200mL超纯水中搅拌至其完全溶解,然后加入5.2g己二酸二酰肼、0.4g 1-羟基苯并三唑、144mg 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐,搅拌使其完全溶解后使用0.01M的稀盐酸溶液调节体系pH=4.7,25℃条件下搅拌反应72h,得到产物用7000Da的透析袋透析72h,得到产物透明质酸-接枝-己二酸二酰肼。参见图3,图3为本发明实施例3中制备的透明质酸-接枝-己二酸二酰肼的核磁共振氢谱。

[0125] 实施例4

[0126] 称取透明质酸钠1.2g加入200mL超纯水中搅拌至其完全溶解,然后加入5.2g己二酸二酰肼、0.4g 1-羟基苯并三唑、288mg 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐,搅拌使其完全溶解后使用0.01M的稀盐酸溶液调节体系pH=4.7,25℃条件下搅拌反应72h,得到产物用7000Da的透析袋透析72h,得到产物透明质酸-接枝-己二酸二酰肼。

[0127] 实施例5

[0128] 称取透明质酸钠1.2g加入200mL超纯水中搅拌至其完全溶解,然后加入0.52g己二酸二酰肼、0.4g 1-羟基苯并三唑、144mg 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐,搅拌使其完全溶解后使用0.01M的稀盐酸溶液调节体系pH=4.7,25℃条件下搅拌反应72h,得

到产物用7000Da的透析袋透析72h,得到产物透明质酸-接枝-己二酸二酞肼。

[0129] 实施例6

[0130] 称取透明质酸钠1.2g加入200mL超纯水中搅拌至其完全溶解,然后加入2.6g己二酸二酞肼、0.4g 1-羟基苯并三唑、144mg 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐,搅拌使其完全溶解后使用0.01M的稀盐酸溶液调节体系pH=4.7,25℃条件下搅拌反应72h,得到产物用7000Da的透析袋透析72h,得到产物透明质酸-接枝-己二酸二酞肼

[0131] 实施例7

[0132] 称取透明质酸钠1.2g加入200mL超纯水中搅拌至其完全溶解,然后加入7.2g实施例1制备的3,3'-二硫代二(丙酸肼)、0.5g 1-羟基苯并三唑、144mg 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐,搅拌使其完全溶解后使用0.01M的稀盐酸溶液调节体系pH=4.7,25℃条件下搅拌反应72h,得到产物用7000Da的透析袋透析72h,得到产物透明质酸-接枝-3,3'-二硫代二(丙酸肼)。

[0133] 实施例8

[0134] 称取透明质酸钠1.2g加入200mL超纯水中搅拌至其完全溶解,然后加入7.2g实施例1制备的3,3'-二硫代二(丙酸肼)、0.5g 1-羟基苯并三唑、171mg 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐,搅拌使其完全溶解后使用0.01M的稀盐酸溶液调节体系pH=4.7,25℃条件下搅拌反应72 h,得到产物用7000Da的透析袋透析72h,得到产物透明质酸-接枝-3,3'-二硫代二(丙酸肼)。参见图4,图4为本发明实施例8中制备的透明质酸-接枝-3,3'-二硫代二(丙酸肼)的核磁共振氢谱。

[0135] 实施例9

[0136] 称取透明质酸钠1.2g加入200mL超纯水中搅拌至其完全溶解,然后加入7.2g实施例1制备的3,3'-二硫代二(丙酸肼)、0.5g 1-羟基苯并三唑、342mg 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐,搅拌使其完全溶解后使用0.01M的稀盐酸溶液调节体系pH=4.7,25℃条件下搅拌反应72h,得到产物用7000Da的透析袋透析72h,得到产物透明质酸-接枝-3,3'-二硫代二(丙酸肼)。

[0137] 实施例10

[0138] 称取透明质酸钠1.2g加入200mL超纯水中搅拌至其完全溶解,然后加入0.72g实施例1制备的3,3'-二硫代二(丙酸肼)、0.5g 1-羟基苯并三唑、342mg 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐,搅拌使其完全溶解后使用0.01M的稀盐酸溶液调节体系pH=4.7,25℃条件下搅拌反应72h,得到产物用7000Da的透析袋透析72h,得到产物透明质酸-接枝-3,3'-二硫代二(丙酸肼)。

[0139] 实施例11

[0140] 称取12.0g将3,4-二甲基苯甲酸和57.0g N-溴代丁二酰亚胺溶于200mL四氯化碳溶液,然后加入过氧化苯甲酰1.6g。混合物在81℃下回流反应15h。过滤之后通过旋转蒸发仪浓缩至剩余液体体积为70mL,再通过真空泵抽干至固体。将所得固体在乙腈中进行重结晶,得到3,4-二(二溴甲基)苯甲酸。

[0141] 实施例12

[0142] 将实施例11制备的13.0g 3,4-二(二溴甲基)苯甲酸溶于质量-体积浓度为10%的碳酸钠水溶液中,70℃条件下反应4h。通过浓盐酸将反应液的pH调至1,再用乙酸乙酯进行

萃取。有机相合并后,用饱和食盐水洗涤,无水硫酸钠干燥,过滤,真空抽干得到3,4-二甲酰基苯甲酸。

[0143] 实施例13

[0144] 将实施例12制备的2.8g的3,4-二(二溴甲基)苯甲酸溶于无水甲醇,然后加入420mg催化剂三氟甲烷磺酸铈,反应12h。真空抽干得到1,3-二甲氧基-1,3-二氢异苯并呋喃-5-羧酸。

[0145] 实施例14

[0146] 将实施例13制备的3.6g的1,3-二甲氧基-1,3-二氢异苯并呋喃-5-羧酸和N-羟基丁二酰亚胺溶于无水乙腈,然后加入4.5g的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐,反应12h。旋蒸除去大部分溶剂,剩余混合物溶于二氯甲烷,饱和食盐水洗涤3次,无水硫酸镁干燥。粗产物通过硅胶柱层析进行提纯,得到1,3-二甲氧基-1,3-二氢异苯并呋喃-5-羧酸琥珀酰亚胺酯流动相为正己烷和乙酸乙酯,体积比为1:3。参见图5,图5为本发明实施例14中制备的1,3-二甲氧基-1,3-二氢异苯并呋喃-5-羧酸琥珀酰亚胺酯的核磁共振氢谱。

[0147] 实施例15

[0148] 将2.0g的端基是氨基的线性聚乙二醇(数均分子量10000)溶于25mL二氯甲烷,加入1mL吡啶为缚酸剂,然后滴加实施例14制备的1.3g的1,3-二甲氧基-1,3-二氢异苯并呋喃-5-羧酸琥珀酰亚胺酯的二氯甲烷溶液,反应48h。将反应液倒入500mL的冰乙醚中沉降,经过滤,真空干燥,得到端基被保护的线性聚乙二醇衍生物。

[0149] 将端基被保护的线性聚乙二醇衍生物溶于5mL的水,然后滴加5mL的三氟乙酸。搅拌反应1h后,用水稀释至50mL,然后转移到截留分子量为3500的透析袋中透析48h,再冷冻干燥,得到端基为邻苯二醛的线性聚乙二醇。

[0150] 实施例16

[0151] 将2.0g的端基是氨基的四臂聚乙二醇(数均分子量10000)溶于25mL二氯甲烷,加入1mL吡啶为缚酸剂,然后滴加实施例14制备的1.3g的1,3-二甲氧基-1,3-二氢异苯并呋喃-5-羧酸琥珀酰亚胺酯的二氯甲烷溶液,反应48h。将反应液倒入500mL的冰乙醚中沉降,经过滤,真空干燥,得到端基被保护的四臂聚乙二醇衍生物。

[0152] 将端基被保护的四臂聚乙二醇衍生物溶于5mL的水,然后滴加5mL的三氟乙酸。搅拌反应1h后,用水稀释至50mL,然后转移到截留分子量为3500的透析袋中透析48h,再冷冻干燥,得到端基为邻苯二醛的四臂聚乙二醇。参见图6,图6为本发明实施例16中制备的端基为邻苯二醛的四臂聚乙二醇的核磁共振氢谱。

[0153] 实施例17

[0154] 将2.0g的端基是氨基的八臂聚乙二醇(数均分子量10000)溶于25mL二氯甲烷,加入1mL吡啶为缚酸剂,然后滴加实施例14制备的1.3g的1,3-二甲氧基-1,3-二氢异苯并呋喃-5-羧酸琥珀酰亚胺酯的二氯甲烷溶液,反应48h。将反应液倒入500mL的冰乙醚中沉降,经过滤,真空干燥,得到端基被保护的八臂聚乙二醇衍生物。

[0155] 将端基被保护的八臂聚乙二醇衍生物溶于5mL的水,然后滴加5mL的三氟乙酸。搅拌反应1h后,用水稀释至50mL,然后转移到截留分子量为3500的透析袋中透析48h,再冷冻干燥,得到端基为邻苯二醛的八臂聚乙二醇。

[0156] 实施例18:

[0157] 称取10.0mg实施例3中制备所得的透明质酸-接枝-己二酸二酰肼固体加入1.0mL pH=7.4的PBS溶液搅拌至完全溶解,将电热恒温水浴温度调至37℃,将得到的溶液放入37℃恒温水浴中得到第一组分混合溶液;称取10.0mg实施例16中制得的端基为邻苯二醛的四臂聚乙二醇固体加入1.0mL pH=7.4的PBS溶液搅拌至完全溶解,将电热恒温水浴温度调至37℃,将得到的溶液放入37℃恒温水浴中得到第二组分混合溶液;将第二组分混合溶液加入第一组分混合溶液中,使用涡旋仪使其混合均匀后放入37℃恒温水浴中制备可注射透明质酸基水凝胶。

[0158] 实施例19:

[0159] 称取20.0mg实施例3中制备所得的透明质酸-接枝-己二酸二酰肼固体加入1.0mL pH=7.4的PBS溶液搅拌至完全溶解,将电热恒温水浴温度调至37℃,将得到的溶液放入37℃恒温水浴中得到第一组分混合溶液;称取20.0mg实施例15中制备所得的端基为邻苯二醛的线性聚乙二醇固体加入1.0mL pH=7.4的PBS溶液搅拌至完全溶解,将电热恒温水浴温度调至37℃,将得到的溶液放入37℃恒温水浴中得到第二组分混合溶液;将第二组分混合溶液加入第一组分混合溶液中,使用涡旋仪使其混合均匀后放入37℃恒温水浴中制备可注射透明质酸基水凝胶。

[0160] 实施例20:

[0161] 称取20.0mg实施例3中制备所得的透明质酸-接枝-己二酸二酰肼固体加入1.0mL pH=7.4的PBS溶液搅拌至完全溶解,将电热恒温水浴温度调至37℃,将得到的溶液放入37℃恒温水浴中得到第一组分混合溶液;称取20.0mg实施例16中制备所得的端基为邻苯二醛的四臂聚乙二醇固体加入1.0mL pH=7.4的PBS溶液搅拌至完全溶解,将电热恒温水浴温度调至37℃,将得到的羧甲基壳聚糖溶液放入37℃恒温水浴中得到第二组分混合溶液;将第二组分混合溶液加入第一组分混合溶液中,使用涡旋仪使其混合均匀后放入37℃恒温水浴中制备可注射透明质酸基水凝胶。参见图7和图8,图7为本发明实施例20中制备的可注射透明质酸基水凝胶的流变学测试结果,结果显示实施例20中制备的透明质酸基水凝胶的储能模量为1400Pa (2G')。图8为本发明实施例20中制备的可注射透明质酸基水凝胶的照片。

[0162] 实施例21:

[0163] 称取20.0mg实施例3中制备所得的透明质酸-接枝-己二酸二酰肼固体加入1.0mL pH=7.4的PBS溶液搅拌至完全溶解,将电热恒温水浴温度调至37℃,将得到的溶液放入37℃恒温水浴中得到第一组分混合溶液;称取20.0mg实施例17中制备所得的端基为邻苯二醛的八臂聚乙二醇固体加入1.0mL pH=7.4的PBS溶液搅拌至完全溶解,将电热恒温水浴温度调至37℃,将得到的羧甲基壳聚糖溶液放入37℃恒温水浴中得到第二组分混合溶液;将第二组分混合溶液加入第一组分混合溶液中,使用涡旋仪使其混合均匀后放入37℃恒温水浴中制备可注射透明质酸基水凝胶。

[0164] 实施例22:

[0165] 称取40.0mg实施例3中制备所得的透明质酸-接枝-己二酸二酰肼固体加入1.0mL pH=7.4的PBS溶液搅拌至完全溶解,将电热恒温水浴温度调至37℃,将得到的溶液放入37℃恒温水浴中得到第一组分混合溶液;称取40.0mg实施例16中制备所得的端基为邻苯二醛的四臂聚乙二醇固体加入1.0mL pH=7.4的PBS溶液搅拌至完全溶解,将电热恒温水浴温度

调至37℃,将得到的溶液放入37℃恒温水浴中得到第二组分混合溶液;将第二组分混合溶液加入第一组分混合溶液中,使用涡旋仪使其混合均匀后放入37℃恒温水浴中制备可注射透明质酸基水凝胶。参见图7,图7为本发明实施例23中制备的可注射透明质酸基水凝胶的流变学测试结果。图7中,1G'为实施例22中制得的透明质酸基水凝胶的储能模量,1G''为实施例22中制得的透明质酸基水凝胶的损耗模量,2G'为实施例20中制得的透明质酸基水凝胶的储能模量,2G''为实施例20中制得的透明质酸基水凝胶的损耗模量,由图7可知,实施例20中制备的透明质酸基水凝胶的储能模量为1400Pa,实施例22中制备的透明质酸基水凝胶的储能模量为4000Pa,因此,可以通过改变聚合物浓度来改变透明质酸基水凝胶的机械强度。

[0166] 实施例23:

[0167] 称取20.0mg实施例3中制备所得的透明质酸-接枝-己二酸二酰肼固体加入1.0mL pH=7.4的PBS溶液搅拌至完全溶解,将电热恒温水浴温度调至37℃,将得到的溶液放入37℃恒温水浴中得到第一组分混合溶液;称取40.0mg实施例16中制备所得的端基为邻苯二醛的四臂聚乙二醇固体加入1.0mL pH=7.4的PBS溶液搅拌至完全溶解,将电热恒温水浴温度调至37℃,将得到的溶液放入37℃恒温水浴中得到第二组分混合溶液;将第二组分混合溶液加入第一组分混合溶液中,使用涡旋仪使其混合均匀后放入37℃恒温水浴中制备可注射透明质酸基水凝胶。

[0168] 实施例24:

[0169] 称取40.0mg实施例8中制备所得的透明质酸-接枝-3,3'-二硫代二(丙酸肼)-固体加入1.0mL pH=7.4的PBS溶液搅拌至完全溶解,将电热恒温水浴温度调至37℃,将得到的溶液放入37℃恒温水浴中得到第一组分混合溶液;称取40.0mg实施例16中制备所得的端基为邻苯二醛的四臂聚乙二醇固体加入1.0mL pH=7.4的PBS溶液搅拌至完全溶解,将电热恒温水浴温度调至37℃,将得到的溶液放入37℃恒温水浴中得到第二组分混合溶液;将第二组分混合溶液加入第一组分混合溶液中,使用涡旋仪使其混合均匀后放入37℃恒温水浴中制备可注射透明质酸基水凝胶。

[0170] 实施例25:

[0171] 称取40.0mg实施例3中制备所得的透明质酸-接枝-己二酸二酰肼固体加入1.0mL pH=7.4的PBS溶液搅拌至完全溶解,将电热恒温水浴温度调至37℃,将得到的溶液放入37℃恒温水浴中得到第一组分混合溶液;称取20.0mg实施例16中制备所得的端基为邻苯二醛的四臂聚乙二醇固体加入1.0mL pH=7.4的PBS溶液搅拌至完全溶解,将电热恒温水浴温度调至37℃,将得到的溶液放入37℃恒温水浴中得到第二组分混合溶液;将第二组分混合溶液加入第一组分混合溶液中,使用涡旋仪使其混合均匀后放入37℃恒温水浴中制备可注射透明质酸基水凝胶。

[0172] 实施例26:

[0173] 称取40.0mg实施例8中制备所得的透明质酸-接枝-3,3'-二硫代二(丙酸肼)-固体加入1.0mL pH=7.4的PBS溶液搅拌至完全溶解,将电热恒温水浴温度调至37℃,将得到的溶液放入37℃恒温水浴中得到第一组分混合溶液;称取20.0mg实施例16中制备所得的端基为邻苯二醛的四臂聚乙二醇加入1.0mL pH=7.4的PBS溶液搅拌至完全溶解,将电热恒温水浴温度调至37℃,将得到的溶液放入37℃恒温水浴中得到第二组分混合溶液;将第二组分

混合溶液加入第一组分混合溶液中,使用涡旋仪使其混合均匀后放入37℃恒温水浴中制备可注射透明质酸基水凝胶。

[0174] 实施例27

[0175] 取20.0mg实施例3中制备所得的透明质酸-接枝-己二酸二酰肼固体和20mg实施例8中制备所得的透明质酸-接枝-3,3'-二硫代二(丙酸肼)固体加入1.0mL pH=7.4的PBS溶液搅拌至完全溶解,将电热恒温水浴温度调至37℃,将得到的溶液放入37℃恒温水浴中得到第一组分混合溶液;称取40.0mg端基为实施例16中制备所得的邻苯二醛的四臂聚乙二醇固体加入1.0mL pH=7.4的PBS溶液搅拌至完全溶解,将电热恒温水浴温度调至37℃,将得到的溶液放入37℃恒温水浴中得到第二组分混合溶液;将第二组分混合溶液加入第一组分混合溶液中,使用涡旋仪使其混合均匀后放入37℃恒温水浴中制备可注射透明质酸基水凝胶。

[0176] 实施例28

[0177] 采用实施例18中制备水凝胶的方法,制备2组体积为300μl的可注射透明质酸基水凝胶,分别加入1ml的PBS溶液和含有10U透明质酸酶的PBS溶液且两天换液一次,观察透明质酸基水凝胶的降解行为。参见图9,图9为本发明实施例28中制备的可注射透明质酸基水凝胶的降解曲线。由图9可知,相比于PBS中透明质酸基水凝胶的降解曲线(方形),加入透明质酸酶可以加快透明质酸基水凝胶的降解(圆形),因此,可以通过透明质酸酶来控制透明质酸基水凝胶的降解行为。

[0178] 实施例29

[0179] 称取1.0mg实施例8中制备所得的透明质酸-接枝己二酸二酰肼固体加入0.1mL pH=7.4的PBS溶液搅拌至完全溶解,将电热恒温水浴温度调至37℃,将得到的溶液放入37℃恒温水浴中得到第一组分混合溶液;称取1.0mg实施例16中制备所得的端基为邻苯二醛的四臂聚乙二醇加入0.1mL pH=7.4的PBS溶液搅拌至完全溶解,将电热恒温水浴温度调至37℃,将得到的溶液放入37℃恒温水浴中得到第二组分混合溶液;称取40μL用pH=7.4的PBS溶液配置好的细胞溶液,将上述三种溶液混合均匀,吸取100μL混合液加入48孔培养板,待其成胶后加入1mL培养液培养,分别培养1天,4天,7天,加入10μL CCK8试剂后孵育4小时后用酶标仪检测490nm处吸光值,结果参见表1,表1为本发明实施例29中制备的透明质酸基水凝胶用于三维细胞培养的细胞增殖数据。

[0180] 表1

[0181]

	OD值	OD值	OD值
1D	0.3184	0.2911	0.2976
4D	0.441	0.4243	0.4703
7D	0.9422	0.7717	0.7947

[0182] 由以上实施例可知,本发明提供的改性透明质酸水凝胶具有较高的可调空间,可根据不同的需求调节透明质酸的分子量、己二酸二酰肼或3,3'-二硫代二(丙酸肼)接枝率、交联剂的分子量等,从而制备具有各种不同物理化学性能的水凝胶材料。本发明提供的改性的透明质酸,不仅引入可交联的酰肼基团还引入了环境响应性的二硫键,拓宽了透明质酸水凝胶在生物医学领域的应用范围。本发明提供的可注射透明质酸基水凝胶可以引入生物活性组分,增强材料与细胞的相互作用,使其在三维细胞培养、组织工程修复和药物控释

等领域具有巨大的应用前景。本发明提供的可注射透明质酸基水凝胶的制备条件温和,制备方法简单,机械强度及降解速率可控。使其在使其在生物医学领域具有巨大的应用前景

[0183] 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。

DTPH-20190508_1.fid

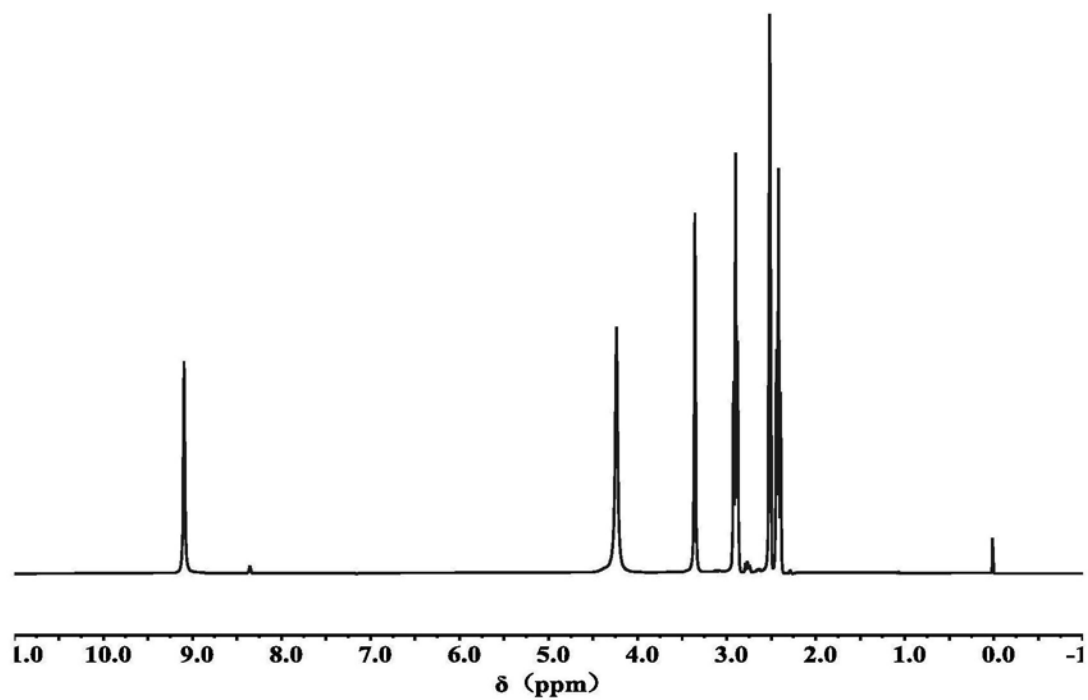


图1

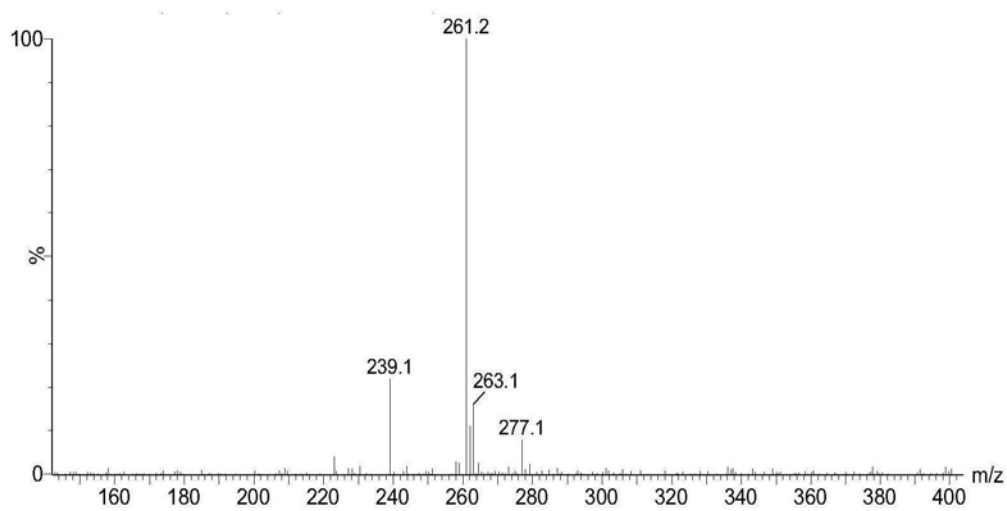


图2

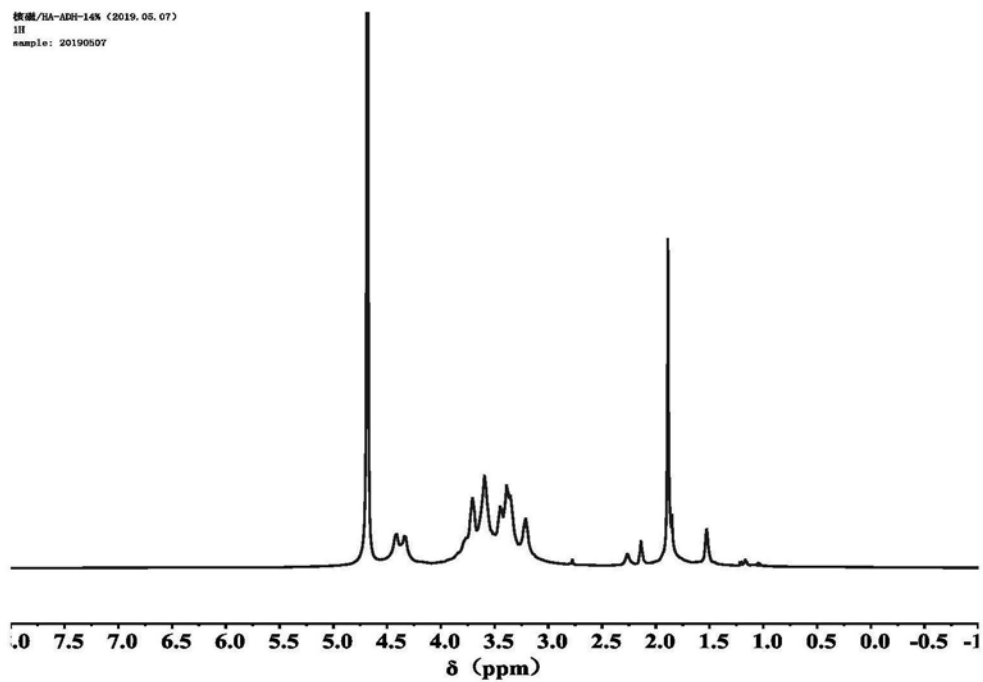


图3

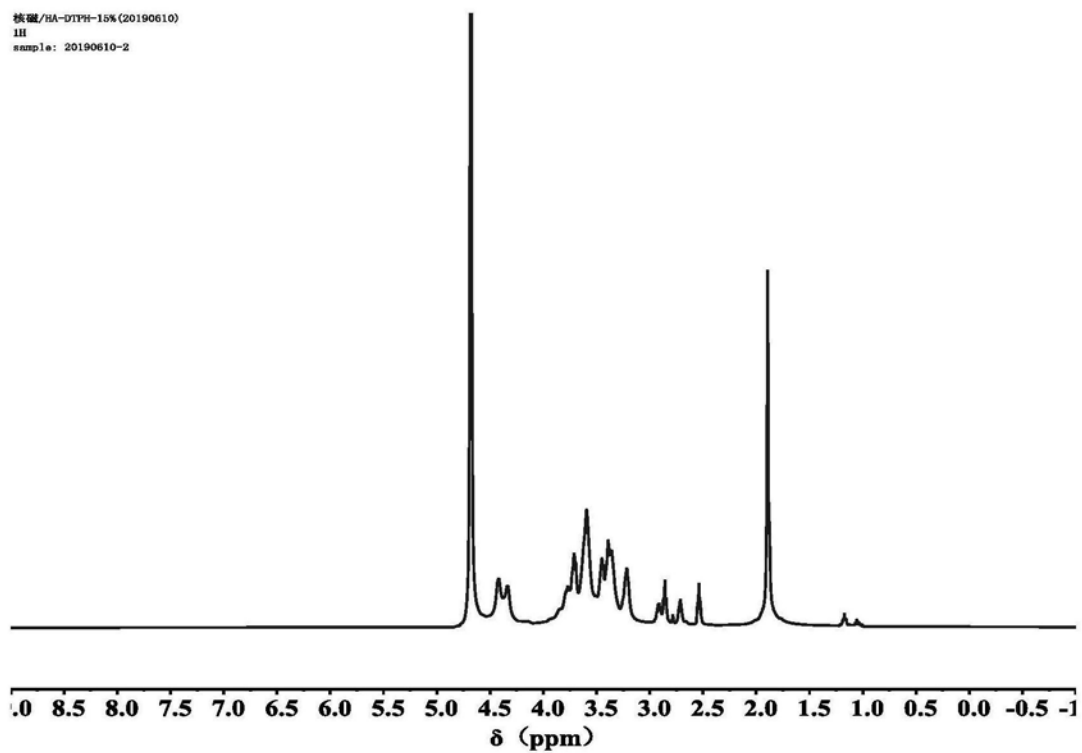


图4

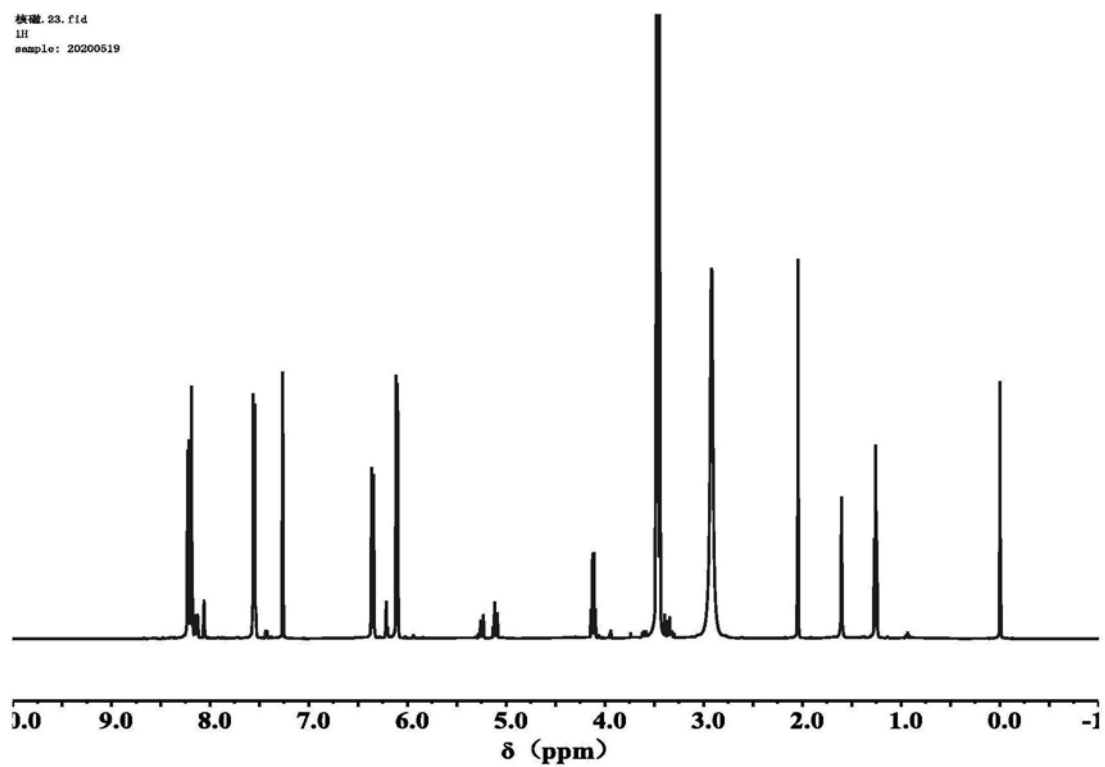


图5

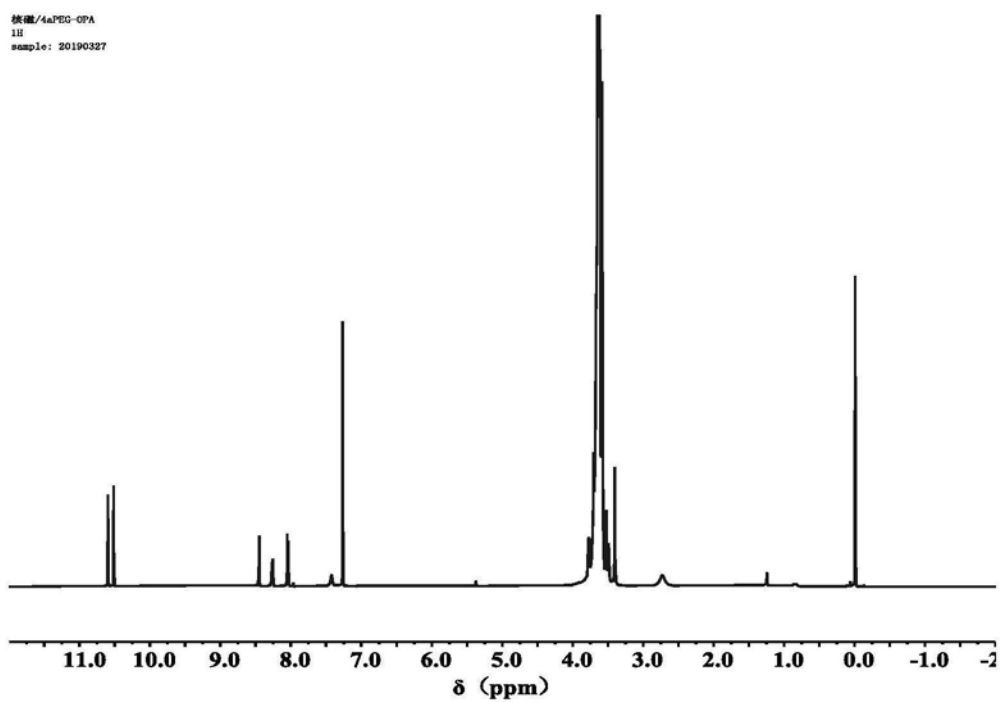


图6

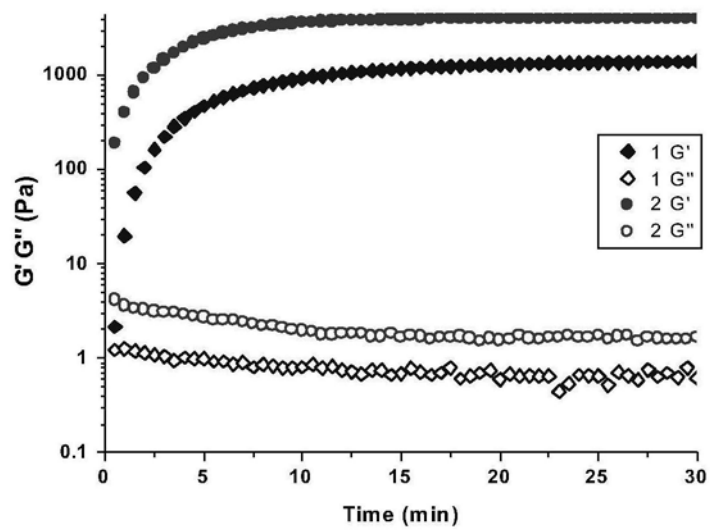


图7



图8

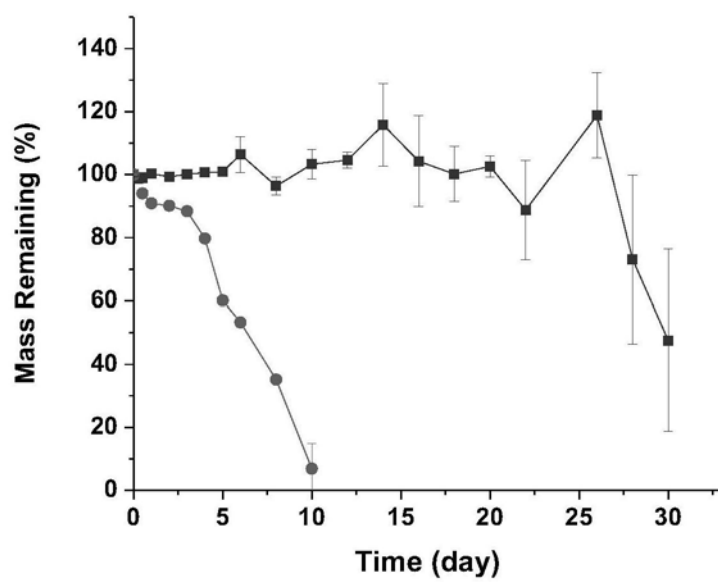


图9