



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113304101 B

(45) 授权公告日 2023. 09. 26

(21) 申请号 202110181378.6  
(22) 申请日 2021.02.08  
(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 113304101 A  
(43) 申请公布日 2021.08.27  
(30) 优先权数据  
62/972,205 2020.02.10 US  
(73) 专利权人 香港理工大学  
地址 中国香港九龙  
(72) 发明人 黎永富 黄永德 邓国兴  
(74) 专利代理机构 北京世峰知识产权代理有限公司 11713  
专利代理师 卓霖 许向彤

(51) Int.Cl.  
A61K 9/06 (2006.01)  
A61K 31/65 (2006.01)  
A61K 47/38 (2006.01)  
A61K 47/36 (2006.01)  
A61K 47/34 (2017.01)  
A61P 17/02 (2006.01)  
A61P 31/04 (2006.01)  
A61L 15/42 (2006.01)

A61L 15/46 (2006.01)  
A61L 15/20 (2006.01)  
A61L 15/28 (2006.01)  
A61L 15/26 (2006.01)  
(56) 对比文件  
CN 106589163 A,2017.04.26  
WO 2018036021 A1,2018.03.01  
Shabnam Mombini et al.Chitosan-PVA-CNT nanofibers as electrically conductive scaffolds for cardiovascular tissue engineering.International Journal of Biological Macromolecules.2019,第140卷 278-287.  
Zhenguang Wang et al.Water-Soluble Biocompatible Copolymer Hypromellose Grafted Chitosan Able to Load Exogenous Agents and Copper Nanoclusters with Aggregation-Induced Emission.Adv. Funct. Mater..2018,1-7.

审查员 郝伯钧

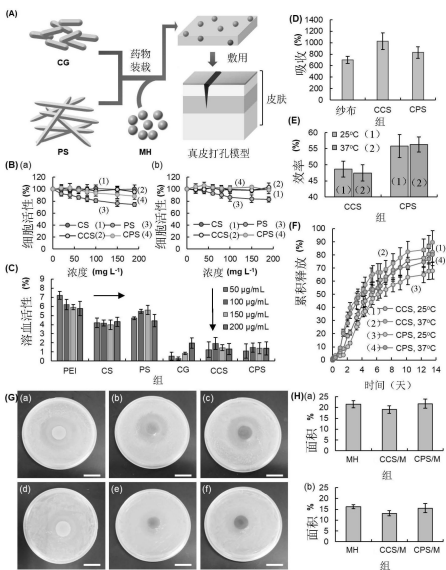
权利要求书1页 说明书11页 附图6页

(54) 发明名称

一种能监测与跟踪药物递送过程的载药材料与其制备方法

(57) 摘要

本发明公开一种材料、包含该材料的药物载体、药物递送和跟踪系统以及药物监测方法。该材料包括壳聚糖和乙醇酸纤维素,其中,所述壳聚糖与聚乙烯亚胺共价交联而形成交联的壳聚糖,所述交联的壳聚糖与所述乙醇酸纤维素离子交联。包含该材料的药物递送和跟踪系统能实现药物的释放和氧化状态的双相监测。



[转续页]

[接上页]

**(56) 对比文件**

陈晓红 等. 非典型发光化合物的簇聚诱导

发光. 化学进展. 2019, 第31卷(第11期), 1560-1575.

1. 一种材料,其包括壳聚糖和乙醇酸纤维素,其中,所述壳聚糖与聚乙烯亚胺共价交联而形成交联的壳聚糖,所述交联的壳聚糖与所述乙醇酸纤维素离子交联。

2. 根据权利要求1所述的材料,其中,所述壳聚糖通过氨基甲酸酯键与所述聚乙烯亚胺共价交联。

3. 根据权利要求1所述的材料,其中,所述壳聚糖包括75-85%脱乙酰壳聚糖,在25℃下在1% (v/v) 乙酸中的1% (w/v) 壳聚糖溶液的粘度为200-800cP,和/或所述乙醇酸纤维素为纤维素乙醇酸的钠盐并具有10,000的平均分子量以及0.7的取代度,和/或所述聚乙烯亚胺的分子量为1800Da。

4. 根据权利要求1所述的材料,其中,所述聚乙烯亚胺与壳聚糖的重量比为7:2。

5. 根据权利要求1所述的材料,其中,所述乙醇酸纤维素与所述壳聚糖的重量比为8:1。

6. 一种药物载体,其包括权利要求1-5任一项所述的材料。

7. 根据权利要求6所述的药物载体,其中,所述药物载体为凝胶的形式。

8. 一种用于治疗伤口的治疗凝胶,其包括根据权利要求6所述的药物载体以及装载在所述药物载体中的药物。

9. 根据权利要求8所述的治疗凝胶,其中,所述材料的发光强度跟随在药物载体中的药物的浓度和/或氧化状态的改变而改变。

10. 根据权利要求9所述的凝胶,其中,当在所述药物载体中的药物的浓度降低,所述材料的发光强度增大。

11. 根据权利要求9所述的治疗凝胶,其中,当在所述药物载体中的药物被氧化时,所述材料的发光强度降低。

12. 根据权利要求8所述的治疗凝胶,其中,所述药物是抗生素。

13. 根据权利要求8所述的治疗凝胶,其中,所述药物是四环素抗生素。

14. 根据权利要求8所述的治疗凝胶,其中,所述药物是米诺环素盐酸盐。

15. 一种用于治疗伤口的药物递送和/或跟踪系统,包括:

根据权利要求6或7所述的药物载体,其用于装载所述药物并将所述药物递送至所述伤口;

紫外光光源,用于产生紫外光,以照射所述材料;以及

检测器,用于测量所述材料的发光强度,从而监测药物从药物载体所释放的量和/或药物在药物载体中的氧化状态。

16. 一种绷带,其包括根据权利要求8-14任一项所述的治疗凝胶。

17. 一种用于制备权利要求1所述的材料的方法,包括:

将壳聚糖与聚乙烯亚胺共价交联从而生成交联的壳聚糖;以及

将所述交联的壳聚糖与乙醇酸纤维素离子交联从而生成所述材料。

18. 一种用于监测药物的释放和/或氧化状态的方法,包括:

提供权利要求6所述的药物载体,其中,所述药物被装载在所述药物载体中;

用紫外光照射所述材料并测量所述材料的发光强度,从而在第一时段内监测药物从药物载体所释放的量;以及

在第一时段之后,用紫外光照射所述材料并测量所述材料的发光强度,从而在第二时段内监测药物在所述药物载体中的氧化状态。

## 一种能监测与跟踪药物递送过程的载药材料与其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及药物载体、药物递送和跟踪系统以及药物监测方法。

### 背景技术

[0002] 在文献中已公开了用于伤口治疗的由聚合材料所产生的不同高分子系统。这些系统的一个共同特征是在聚合物链之间存在合理设计的共价化学键,并包容有生物活性分子。因为生成这样的系统需要光化学或化学触发,这导致化学或生物化学干扰到细胞活性和药物作用,并造成负载药物的结构变化。为了解决这些问题,近来已经采用聚合物基质来物理地包埋药物分子。然而,文献中大多数现有的基质要么机械强度太弱,导致药物释放的可持续性低,要么太强以至于大多数药物分子被困在基质中而无法发挥治疗作用。

[0003] 实际上,尽管自上世纪之初以来文献中已经公开了越来越多的递送跟踪系统,但是缺乏能够在治疗期间同时监测多个因素的材料。另外,目前大多数现有的递送跟踪的系统都依赖于复杂的设备(例如,正电子发射断层扫描(PET)/单光子发射计算机断层扫描(SPECT)扫描仪)和繁琐的测量程序。这阻碍了将递送监测过渡到常规临床实践的想法。许多系统都需要添加对比度增强剂或金属纳米晶体这一事实使这种情况更加恶化。如果任何毒性对比度增强剂和纳米晶体与药物一起释放到体内,这可能会干扰治疗化合物的加载和释放,更不用说增加药物加载系统毒性的可能性了。

### 发明内容

[0004] 为了解决上述问题并利用簇聚诱导发光(clusterization-triggered emission (CTE))的优点,本发明通过使用聚乙烯亚胺poly(ethylenimine) (PEI) 和乙醇酸纤维素cellulose glycolate(CG)双重交联壳聚糖chitosan(CS)来生成智能材料(即CPS)。本发明的材料显示出高的载药效率和高的药物释放可持续性,在紫外线照射下具有高发光性,可以持续监控伤口治疗中所用药物的释放度和氧化状态。

[0005] 与现有系统相反,仅根据本发明的材料的本征发光来实现由本系统的治疗状态的跟踪。在跟踪过程中,既不需要复杂的设备,也不需要额外的对比度增强剂。

[0006] 除此之外,与常规发光聚合物材料的发光来自 $\pi$ 共轭结构相反,本系统的发光被设计为仅基于CTE。这使本系统比用于临床的传统发光聚合物更有利。首先,本发明的聚合物没有 $\pi$ 共轭结构,其不包含这些传统的聚合物的平面构象(其固有地链接到共轭电子结构)。就此,其它发光聚合物在聚集状态下会发生发光猝灭,因此无法用作药物装载和释放的固态装置,但本材料可以用作伤口护理的发光药物载体,从而超越其它聚合物的极限。另外,常规发光聚合物中的扩展共轭常常伴随着更大的结构复杂性,费力的合成程序,并且还产生大量的废物,其结果可在使用时有害于人体。相反,本材料可以在体制造,这使得将其非常方便地应用于临床环境。除了临床前试验中证明的在伤口治疗中的有效性外,通过在治疗过程中持久且容易地监测药物释放过程,本材料还显示出巨大的潜力来切实提高伤口护理的效果。

[0007] 本发明公开一种材料,例如聚合材料诸如荧光聚合材料,其包括壳聚糖和乙醇酸纤维素,其中,所述壳聚糖与聚乙烯亚胺共价交联而形成交联的壳聚糖,所述交联的壳聚糖与所述乙醇酸纤维素离子交联。

[0008] 根据某些实施例,所述壳聚糖通过氨基甲酸酯键与所述聚乙烯亚胺共价交联。

[0009] 根据某些实施例,所述壳聚糖包括75-85%脱乙酰壳聚糖,在25℃下在1% (v/v) 乙酸中的1% (w/v) 壳聚糖溶液的粘度为200-800cP,和/或所述乙醇酸纤维素为纤维素乙醇酸的钠盐并具有10,000的平均分子量以及0.7的取代度,和/或所述聚乙烯亚胺的分子量为1800Da。

[0010] 根据某些实施例,所述聚乙烯亚胺与壳聚糖的壳聚糖的重量比为约7:2。

[0011] 根据某些实施例,所述乙醇酸纤维素与所述壳聚糖的重量比为约8:1。

[0012] 本发明公开一种药物载体,其包括上述的材料。

[0013] 根据某些实施例,所述药物载体为凝胶的形式。

[0014] 本发明公开一种用于治疗伤口的治疗凝胶,其包括上述的药物载体以及装载在所述药物载体中的药物。

[0015] 根据某些实施例,所述材料的发光强度例如荧光强度跟随在药物载体中的药物的浓度和/或氧化状态的改变而改变。

[0016] 根据某些实施例,当在药物载体中的药物的浓度降低,所述材料的发光强度例如荧光强度增大。

[0017] 根据某些实施例,当在所述药物载体中的药物被氧化时,所述材料的发光强度例如荧光强度降低。

[0018] 根据某些实施例,所述药物是抗生素。

[0019] 根据某些实施例,所述药物是四环素抗生素。

[0020] 根据某些实施例,所述药物是米诺环素盐酸盐。

[0021] 本发明公开一种用于治疗伤口的药物递送和/或跟踪系统,其包括:上述的药物载体,其用于装载所述药物并将所述药物递送至所述伤口;紫外光光源,用于产生紫外光,以照射所述材料;以及检测器,用于测量所述材料的发光强度,从而监测药物从药物载体所释放的量和/或药物在药物载体中的氧化状态。

[0022] 本发明公开一种绷带,其包括上述的治疗凝胶。

[0023] 本发明公开一种用于制备本文所述的材料的方法,其包括:将壳聚糖与聚乙烯亚胺共价交联从而生成交联的壳聚糖;以及将所述交联的壳聚糖与乙醇酸纤维素离子交联从而生成所述材料。

[0024] 本发明公开一种用于监测药物的释放和/或氧化状态的方法,其包括:上述的药物载体,其中,所述药物被装载在所述药物载体中;用紫外光照射所述材料并测量所述材料的发光强度,从而在第一时间段内监测药物从药物载体所释放的量;以及在第一时间段之后,用紫外光照射所述材料并测量所述材料的发光强度,从而在第二时段内监测药物在所述药物载体中的氧化状态。

## 附图说明

[0025] 应理解,本文描述的附图仅用于说明目的。附图不一定按比例绘制,通常将重点放

在说明本教导的原理上。附图无意以任何方式限制本公开的范围。

[0026] 图1: (A) 示出 (a) CS、(b) PS、(c) CMC、(d) CCS和 (e) CPS的傅立叶变换红外 (FTIR) 光谱; (B) 示出在D<sub>2</sub>O中的 (a) PEI和 (b) PS<sup>1</sup> H NMR光谱; (C) 示出CS和PS的水溶性; (D) 示出CS和PS的酸碱滴定曲线, NaCl溶液 (150mM) 用作溶剂和对照; (E) 示出 (a) CS和PS以及 (b) PS和CPS的TGA曲线。

[0027] 图2: (A) 示出 (a, e) CS溶液、(b, f) PS溶液、(c, g) CCS和 (d, h) CPS的光学照片 (a-d) 和荧光照片 (e-h); (B) 示出CS溶液和PS溶液的PL衰减曲线; (C) 示出CS和PS的光致发光光谱 (PL) 和光致发光激发光谱 (PLE); (D) 示出CG、CCS和CPS的PL光谱; (E) 示出CPS的PL和PLE光谱。

[0028] 图3: (A) 示出CCS和CPS的粘度在0.1至100rad s<sup>-1</sup>的变化; (B) 示出CCS和CPS的G'和G''值在0.1到100rad s<sup>-1</sup>的变化; (C) 示出CCS和CPS的拉伸应力-应变曲线; (D) 示出CCS和CPS的压缩应力-应变曲线; (E) 示出 (a) CS、(b) PS、(c) CCS和 (d) CPS的SEM显微照片, 比例尺=200μm; (F) 示出在25℃和37℃的CCS和CPS的水含量; (G) 示出在25℃和37℃的CCS和CPS的溶胀比。

[0029] 图4: (A) 为示意图, 其描绘了在皮肤打孔器模型中用米诺环素对CPS装载以用于伤口治疗; (B) 示出 (a) 进行24小时后处理孵育或 (b) 不进行24小时后处理孵育的用CS、PS、CCS和CPS处理后的3T3成纤维细胞的生存力; (C) 示出PEI、CS、PS、CG、CCS和CPS介导的溶血程度; (D) 示出CCS和CPS的血液吸收能力, 纱布用作对照; (E) 示出CCS和CPS的载药效率; (F) 示出在25℃和37℃的CCS和CPS的释放曲线; (G) 示出 (a, d) MH浸泡的滤纸, (b, e) CCS/M和 (c, f) CPS/M分别对 (a-c) 金黄色葡萄球菌和 (d-f) 大肠杆菌的抑菌区域的图像, 比例尺=20mm; (H) 示出由MH浸泡的滤纸, CCS/M和CPS/M分别对 (a) 金黄色葡萄球菌和 (b) 大肠杆菌的抑制区域的面积百分比。

[0030] 图5: (A) 示出在第0、3、6和9天的伤口照片, 每行代表一种处理方法, 每列代表摄影的获取时间, 比例尺=5mm; (B) 示出在手术后 (a) 3天、(b) 6天和 (c) 9天期间, 每组的伤口愈合率(%)。 (C) 示出手术后第九天, 新肉芽组织的H&E和马森三色染色 (Masson's trichrome stain), 正方形的放大图全部在原始图的右侧, 比例尺=100μm; (D) 示出微血管的数量; (E) 示出炎性细胞的数量; (F) 示出肉芽组织中胶原纤维的面积百分比。

[0031] 图6: (A) 示出具有不同MH浓度的PS溶液的光学和荧光图像, 数字表示每种溶液中MH的总浓度, 单位为μg/μL; (B) 示出具有不同MH浓度的CPS/H样品的光学和荧光图像, 数字表示每个样品中MH的总浓度, 单位为μg/μL; (C) 示出药物释放不同时期后CPS/H的光学和荧光图像。

### 具体实施方式

[0032] 本公开提供了新颖、智能、仿生的材料, 其显示了簇集诱导发光, 用于伤口治疗的实时双相监测。本公开的材料可为一种载药材料, 其发光强度 (如荧光强度) 可以与内部信号响应 (特别是其内部装载的药物的数量和氧化状态), 因此可以对治疗过程进行更全面的监控以填补现有技术的技术空白。由于本材料的设计 (其可以像活细胞一样对内部信号做出反应, 这与其它现有的只能对外部刺激做出反应的刺激反应材料相反), 本材料的成分, 以及用于药物递送过程的双相监控的本材料所采用的机制, 都是新颖的。这不仅有发明人

花的时间在微调,优化和表征本发明的成分,使簇集诱导发光和猝灭可以一起正常工作使本材料具有对内部信号做出反应的能力,还致力于阐明光学机制的细节,从而建立针对即将到来的临床前和临床工作的材料的进一步优化奠定了基础。

[0033] 本公开所述的智能材料具有许多优点,如:

[0034] • 由于CS和CG的充裕和低成本以及易于在体制造的优势,因此与现有同类产品相比,其价格更低廉且易于制造;

[0035] • 由于本发明具有使用户和医生能够实时跟踪递送过程以及所装载药物的氧化状态的能力,因此在控制伤口治疗方面更加准确和可靠,而无需使用任何繁琐的程序或复杂的程序设备;

[0036] • 由于在传输跟踪中应用了簇集诱导发光,而不是使用潜在的有毒发光材料,因此其毒性比其它跟踪传输的系统低;

[0037] • 更具可调性和多功能性,可进行个性化伤口护理;

[0038] • 本发明可以在使用前溶解在指定的溶剂中,并在注入水性介质后直接形成凝胶。这是高度用户友好的,并且便于临床使用,因为可以将制剂制备的先前技术培训减至最少;和

[0039] • 本发明允许药物高度持续释放。这减少了所需的重复给药次数,并消除了与定期给药相关的不适感,从而改善了患者的依从性。

[0040] 本发明公开一种材料,其包括壳聚糖和乙醇酸纤维素,其中,所述壳聚糖与聚乙烯亚胺共价交联而形成交联的壳聚糖,所述交联的壳聚糖与所述乙醇酸纤维素离子交联。

[0041] 本发明公开一种材料,其包括壳聚糖和乙醇酸纤维素,其中,所述壳聚糖与聚乙烯亚胺共价交联而形成交联的壳聚糖,所述交联的壳聚糖与所述乙醇酸纤维素物理交联。本发明公开一种材料,例如聚合材料诸如聚合荧光材料,其包括使用聚乙烯亚胺和乙醇酸纤维素双重交联的壳聚糖。

[0042] 本发明公开一种材料,例如聚合材料诸如聚合荧光材料,其由使用聚乙烯亚胺和乙醇酸纤维素双重交联的壳聚糖所组成。本发明公开一种材料,例如聚合材料诸如聚合荧光材料,其由壳聚糖和乙醇酸纤维素所组成,其中,所述壳聚糖与聚乙烯亚胺共价交联而形成交联的壳聚糖,所述交联的壳聚糖与所述乙醇酸纤维素离子交联。

[0043] 本发明公开一种荧光材料,例如聚合材料诸如聚合荧光材料,其包括壳聚糖和乙醇酸纤维素,其中,所述壳聚糖与聚乙烯亚胺共价交联而形成交联的壳聚糖,所述交联的壳聚糖与所述乙醇酸纤维素离子交联。

[0044] 本发明公开一种用于治疗伤口的药物载体的荧光聚合物材料,其包括壳聚糖和乙醇酸纤维素而形成交联的壳聚糖,其中,所述交联的壳聚糖与聚乙烯亚胺共价交联,所述交联的壳聚糖与所述乙醇酸纤维素离子交联。

[0045] 本发明提供一种载药材料,其用于治疗 and 药物递送过程的双相监测,该载药材料包括壳聚糖和乙醇酸纤维素,其中,所述壳聚糖与聚乙烯亚胺共价交联而形成交联的壳聚糖,所述交联的壳聚糖与所述乙醇酸纤维素离子交联。该载药材料的制备和使用方法在本公开进一步描述。

[0046] 根据某些实施例,所述壳聚糖通过氨基甲酸酯键与所述聚乙烯亚胺共价交联。

[0047] 根据某些实施例,所述壳聚糖包括75-85%脱乙酰壳聚糖,在25℃下在1% (v/v) 乙

酸中的1% (w/v) 壳聚糖溶液的粘度为200-800cP, 和/或所述乙醇酸纤维素为纤维素乙醇酸的钠盐并具有10,000的平均分子量为以及0.7的取代度为, 和/或所述聚乙烯亚胺的分子量为1800Da。

[0048] 根据某些实施例, 所述聚乙烯亚胺与所述壳聚糖的重量比为约7:2。

[0049] 根据某些实施例, 所述乙醇酸纤维素与所述壳聚糖的重量比为约8:1。

[0050] 本发明公开一种药物载体, 其包括上述的材料。

[0051] 根据某些实施例, 所述药物载体为凝胶的形式。

[0052] 本发明公开一种用于治疗伤口的治疗凝胶, 其包括上述的药物载体以及装载在上述药物载体中的药物。

[0053] 根据某些实施例, 所述材料的发光强度例如荧光强度跟随在药物载体中的药物的浓度和/或氧化状态的改变而改变。

[0054] 根据某些实施例, 所述药物载体中的药物的浓度与所述材料的发光强度呈负相关。当在所述药物载体中的药物的浓度降低, 所述材料的发光强度例如荧光强度增大。

[0055] 根据某些实施例, 所述药物载体中的氧化药物的积累水平与所述材料的发光强度呈负相关。当在所述药物载体中的药物被氧化时, 所述材料的发光强度例如荧光强度降低。

[0056] 根据某些实施例, 所述药物是抗生素。

[0057] 根据某些实施例, 所述药物是四环素抗生素。

[0058] 根据某些实施例, 所述药物是米诺环素盐酸盐。

[0059] 本发明公开一种用于治疗伤口的药物递送和跟踪的系统, 其包括: 上述的药物载体, 其用于装载所述药物并将所述药物递送至所述伤口; 紫外光光源, 用于产生紫外光, 以照射所述材料; 以及检测器, 用于测量所述材料的发光强度, 从而监测药物从药物载体所释放的量和药物在药物载体中的氧化状态。

[0060] 本发明公开一种用于治疗伤口的药物递送和/或跟踪系统, 包括: 上述的药物载体, 其用于装载所述药物并将所述药物递送至所述伤口; 以及荧光光谱仪, 用于测量所述材料的发光强度例如荧光强度, 从而监测药物从药物载体所释放的量和药物在药物载体中的氧化状态。

[0061] 本发明公开一种用于治疗伤口的绷带, 其包括上述的治疗凝胶。

[0062] 本发明公开一种用于制备本文所述的材料的方法, 包括: 将壳聚糖与聚乙烯亚胺共价交联从而生成交联的壳聚糖; 以及将所述交联的壳聚糖与乙醇酸纤维素离子交联从而生成所述材料。

[0063] 本发明公开一种用于制备本文所述的材料的方法, 包括: 添加脱气的二甲基亚砜(DMSO)、三甲胺和1,1'-羰基二咪唑(CDI)的DMSO溶液到溶于乙酸中的壳聚糖的溶液, 以生成第一混合溶液; 添加聚乙烯亚胺的DMSO溶液到所述第一混合溶液以生成交联的壳聚糖; 以及将所述交联的壳聚糖溶解在水中, 然后加入到乙醇酸纤维素的水溶液中从而生成所述材料。

[0064] 本发明公开一种用于监测药物的释放和/或氧化状态的方法, 包括: 上述的药物载体, 其中, 所述药物被装载在上述药物载体中; 用紫外光照射所述材料并测量所述材料的发光强度, 从而在第一时段内监测药物从药物载体所释放的量; 以及在第一时段之后, 用紫外光照射所述材料并测量所述材料的发光强度, 从而在第二时段内监测药物在药物载体中的



氧化状态。

[0065] CPS(即本公开的材料)的合成涉及交联的两个阶段。第一阶段涉及CS与PEI通过氨基甲酸酯键的共价交联以生成交联的CS(称为PS);而第二个涉及PS与CG的物理交联以生成CPS。交联的第二阶段本质上是离子性的,这决定了本文材料和CS对应物(称为CCS)之间在药物传递性能和发射性能方面的巨大差异。它为CPS提供了载药和持续释放的能力,还使CPS能够实现对药物递送过程进行双相监控所需的独特发光特性。PS和CPS的结构通过傅立叶变换红外光谱(FT-IR)进行了研究。CS光谱在 $2971-3700\text{cm}^{-1}$ 处显示一个宽峰(图1(A))。该峰被指定为O-H拉伸和N-H拉伸。由于C-H和C-N拉伸振动,在 $2,890\text{cm}^{-1}$ 处也发现一个峰值。在 $1590$ 和 $1070\text{cm}^{-1}$ 处观察到的峰值分别归因于N-H弯曲振动和C-O-C频带拉伸振动。通过PEI交联后,在 $2920\text{cm}^{-1}$ 处发现一个新信号。这被归因于来自PEI的 $\text{CH}_2$ 的不对称拉伸。另外,与CS相比,PS中分配给N-H弯曲振动的信号强度( $1590\text{cm}^{-1}$ )增加。这表明在通过PEI交联后CS的胺含量增加。PS的质子核磁共振波谱( $^1\text{H-NMR}$ )进一步证实了交联的成功(图1(B)),该图显示PEI的代表性信号约为 $2.5-2.7\text{ppm}$ ,CS的信号约为 $1.97\text{ppm}$ ( $\text{NCOCH}_3$ ), $3.13\text{ppm}$ ( $\text{H}_2$ ), $3.59-3.84\text{ppm}$ ( $\text{H}_3\text{H}_4\text{H}_5\text{H}_6$ )和 $4.82\text{ppm}$ ( $\text{H}_1$ )。在CG光谱中,由于-OH基团的拉伸频率,在 $2955-3682\text{cm}^{-1}$ 处发现了较宽的吸收带。在 $2918\text{cm}^{-1}$ 处的频带被指定为C-H拉伸振动。 $1585\text{cm}^{-1}$ 处的信号表明存在C=O-基团。 $1416$ 和 $1324\text{cm}^{-1}$ 处的谱带分别归因于 $-\text{CH}_2$ 剪切和-OH振动。将 $1005\text{cm}^{-1}$ 处的频带分配给CHO- $\text{CH}_2$ 拉伸振动。这些信号也可以在CCS和CPS的光谱中找到。

[0066] 与CS相比,PS的溶解度明显更高(图1(C))。这可能是由于PEI在共价交联过程中CS中的分子内和分子间氢键被破坏而造成的,但也可能是交联过程后由于胺基数量的增加(以及所得聚合物亲水性的增加)引起的。如茚三酮测试所建议,在共价交联过程后,氮的质量百分比增加了约4倍(从CS中的8%变为PS中的约30%)。由于胺含量的增加,PS的水溶性比CS高30倍以上。另外,与CS相比,PS显示出更高的pH缓冲能力(图1(D))。

[0067] 在CS的热重分析(TGA)曲线中,在 $40-113^\circ\text{C}$ 下观察到了明显的减重阶段(图1(E))。它归因于物理吸收或结合水的蒸发。由于CS的链降解开始,另一个重量损失步骤发生在 $256^\circ\text{C}$ 的开始温度下。在PS的TGA曲线中发现在 $120-249^\circ\text{C}$ 的额外减重阶段。这是由PEI的分解引起的。与CS相比,PS的热稳定性较低,这可能是因为PEI交联剂的存在改变了CS的结晶度。与CG交联后,由于聚合物网络结构刚性的提高,热稳定性提高。

[0068] 对于CS的5%(v/v)乙酸溶液,已记录到 $451\text{nm}$ 处的蓝光发射,PL激发峰值在 $386\text{nm}$ (图2(A)-(C))。与CS溶液的PL峰相比,PS溶液的峰从 $451\text{nm}$ 到 $480\text{nm}$ 出现红移。另外,在共价交联时,平均寿命从 $2.69\mu\text{s}$ 变为 $3.07\mu\text{s}$ (表1)。这些观察结果表明CTE现象的出现,其中CS分子内旋转的逐渐限制会影响PL特性。通过CG交联时,CS的发光几乎完全被淬灭;而PS仍然是高发光的(图2(D))。能量从CS或PS转移到CG的可能性不大,因为能量差异很大,而且CG的吸收与CS或PS的发射之间没有重叠。CCS中CS的发光损失(以及CPS中PS的发光保留)归因于PS具有比CS更高的胺含量和更紧密堆积的结构这一事实。在通过CG交联的过程中,CS与交联剂之间的离子相互作用较弱。CS分散的影响(由添加交联剂后整个系统体积的增加引起)超过了由CG物理交联导致的CS聚集的影响,导致CCS中发光性能的损失。相反,由于强的静电相互作用,PS有效地被CG交联,从而增强了PS的CTE,并使CPS可以用于后续的药物递送的两相监测。从CPS中发现 $490\text{nm}$ 处的强烈蓝光发射,且PL激发在 $380\text{nm}$ 处达到峰值(图2(E))。交联后PS的PL中发生红移的部分原因是PS与CG之间的电子转移,也归因于链间主链相互作用

促进的分子聚集。

[0069] 表1PL的寿命( $\tau_{1-3}$ ,  $\mu\text{m}$ )和发射强度的各个分数( $f_{1-3}$ , %), 其从PS和CS的5%乙酸溶液的PL衰减实验数据的三个指数拟合中获得。

	样品	$\tau_1$ ( $f_1$ )	$\tau_2$ ( $f_2$ )	$\tau_3$ ( $f_3$ )	$\tau$ 平均值
[0070]	PS	0.23 (86.56)	1.18 (12.24)	10.07 (1.20)	3.07
	CS	0.22 (86.29)	1.06 (12.56)	9.18 (1.15)	2.69

[0071] CPS的最大抗拉强度和断裂伸长率远高于CCS。这归因于CG对PS的分子链的更强的物理交联,从而使CPS能够提供更好的负载转移并抵抗分子链的滑动。低剪切速率下的CCS和CPS两者的表观粘度都高于高剪切速率下的表观粘度(图3(A))。这表明这些材料表现出假塑性行为。CPS的粘度略高于CCS。这可以通过在CPS中可用于与CG交联的大量胺基来解释,从而导致CPS的机械强度更高。图3(B)中示出了在不同剪切速率下 $G'$ 和 $G''$ 值的变化。结果表明,所有样品的 $G'$ 值均高于 $G''$ ,表明样品显示出类似固体的行为。与抗压强度为0.414MPa的CCS相比,CPS的抗压强度高1.2倍(图3(C))。与CCS相比,CPS还显示出更高的抗张强度,以及断裂伸长率的增加(图3(D))。所有这些表明,CPS是一种生物材料,其机械性能比CCS强得多。

[0072] 如SEM所示,常规CS显示出颗粒形态(图3(E))。接枝共聚过程之后,CS的粒状形态被扭曲,和被转变到的纤维状形态。这种扭曲部分是由于分子缠结程度的增加引起的。与CCS相比,CPS的结构更为紧凑。因此,水分子扩散到CPS的基质中变得更加困难。这解释了与CCS相比,CPS的水含量和溶胀率更高(图3(F)-(G))。

[0073] 米诺环素盐酸盐(Minocycline hydrochloride) (MH)-加载CPS和MH-加载CCS(分别地指定为CPS/M和CCS/M)被在体制造用于伤口处理,在此期间MH分子在物理交联过程中物理陷入PS所建立的聚合物基体中(图4(A))。通过使用MTS分析已经检查了CPS及其成分的细胞毒性。结果表明,在用CS、PS、CCS和CPS处理5小时后,未观察到细胞活力的显着损失,因此没有观察到急性细胞毒性(图4(B))。为了确定潜在的慢性细胞毒性,在治疗后24小时培育后,已进一步研究了处理过的细胞的活力。在所有测试浓度下均未观察到可检测的细胞毒性。这说明了生物医学中CPS的高安全性。PS的高生物相容性也通过其可忽略的溶血活性来证明(图4(C))。先前的研究表明,CS促进溶血。交联后,发现CCS和CPS的溶血活性均远低于CS和PS。这部分是因为该交联过程的该降低CS和PS与红细胞细胞膜可能的静电相互作用。此外,与纱布相比,CPS具有更高的血液吸收能力(图4(D))。

[0074] 当CPS被用作治疗剂的载体时,它显示出比CCS更高的负载效率和释放可持续性(图4(E)-(F))。这可以通过CPS的更紧凑的结构来解释,从而导致溶胀率、水含量和WAR的降低。这可以减少在药物加载和释放过程中吸附的药物分子的损失。为了确证药物装载过程后MH的治疗效果得以保持,革兰氏阳性(金黄色葡萄球菌)和革兰氏阴性(大肠埃希氏菌)细菌均用于检查CCS/M和CPS/M抑制细菌生长的能力(图4(G)-(H))。结果表明所有样品(包括CPS/M,CCS/M和对照)均显示一个抑制区。这表明药物加载过程的影响对MH的活性影响很小。与纱布相比,CPS除了在载药量和持续释放药物方面有效之外,还可以有效吸收血液。这有利于血液吸收产品的开发和止血应用,包括伤口治疗。

[0075] 为了证明CPS的生物学用途,采用了组织修复的皮肤打孔器模型。采用皮肤模型是因为它可以轻松监视组织修复过程。MH,其是半合成的四环素具有针对革兰氏阳性和革兰氏阴性细菌抗生素特性,并已用于皮肤溃疡的治疗临床检查,被加载到CCS和CPS以增强真皮打孔器模型中的伤口修复。在将MH装入CPS和CCS的过程中,材料中药物的最终浓度被控制为0.25% (w/v),高于用于在体外抗菌活动的MH的所报道的有效浓度(<0.0003%)。以前也采用了这种MH浓度,其将MH装入聚乙烯醇(PVA)/CS水凝胶中以治疗小鼠伤口,并表明该药物浓度足以用于伤口治疗。

[0076] 在整个临床前试验中,未发现任何治疗组的感染或坏死(图5(A)-(B))。在第3天,CPS/M组的伤口大小在所有测试组中最小。在第9天,CPS/M组的伤口几乎完全愈合,而其它组的伤口仍处于恢复阶段。为了进一步检查治疗期间不同组中伤口组织的组织形态的变化,使用了H&E染色和Masson三色染色(图5(C)-(F)),并计算了相对组织形态计量的值。与其它组相比,CPS/M组的伤口显示出较少的炎症细胞浸润和更多的胶原蛋白沉积。较低程度的炎症细胞浸润表明,在用CPS/M处理的伤口中炎症较轻。较高水平的胶原蛋白沉积还表明,用CPS/M处理后,伤口的愈合得到促进。

[0077] 尽管CPS增强了伤口愈合的过程,但是它还使得能够对治疗过程进行双相监测。在MH加载后,CPS的发光被显著地猝灭(图6(A)-(B))。MH和CPS之间的Förster共振能量转移(FRET)不太可能,因为MH吸收和CPS发射之间没有重叠。取而代之的是,预计猝灭过程将由MH和PS的络合产生的静态猝灭介导。释放载药后,CPS/M的发光被恢复。通过检查发光恢复率,可以跟踪药物释放过程。虽然MH的持续释放是伤口愈合所需要的,但是MH在体内容易被氧化,氧化产物会引起皮肤色素沉着。考虑到这一点,需要适当监测药物的氧化状态。本材料显示出发光的两阶段变化以满足这种需求(图6(C))。在监控过程的第一阶段,由于负载药物的释放而使发光恢复后,恢复的发光可以用作监测负载药物氧化状态的探针,发光强度与氧化药物的积累水平呈负相关。

#### [0078] 实施例

[0079] 材料:MH,CS(75-85%脱乙酰,在25℃下在1% (v/v) 乙酸中的1% (w/v) 的壳聚糖溶液的粘度为200-800cP),纤维素乙醇酸的钠盐(平均分子量 $M_w \sim 10,000$ ,取代度=0.7)购自Sigma-Aldrich(美国密苏里州圣路易斯)。PEI( $M_w=1800$ Da(道尔顿))从Aladdin(中国上海)获得。Dulbecco改良的Eagle培养基(DMEM;Gibco,格兰德岛),青霉素G-链霉素硫酸盐(美国Life Technologies Corporation)和胎牛血清(FBS,杭州四清生物工程材料有限公司,中国)作为细胞培养基。胰蛋白酶-EDTA(0.25%胰蛋白酶-EDTA)获自Invitrogen。

[0080] CPS的合成:将0.2g的CS溶于3mL 33%的乙酸中,然后添加15mL脱气的二甲基亚砜(DMSO)、100μL三甲胺和4mL 6.75% (w/v) 1,1'-羰基二咪唑(CDI)的DMSO溶液。该反应在环境条件下在惰性氮气气氛中进行3小时。之后,逐滴添加5mL的PEI的14% (w/v) DMSO溶液。将反应放置24小时,然后用水透析三天。冻干后,将PS以4% (w/v) 的浓度溶解在蒸馏水中。在剧烈搅拌下,将一份溶液加入到8份4% (w/v) CG的水溶液中。将混合物在环境条件下放置5分钟以产生CPS。使用相同的程序将CS与CG交联以生成CCS,但PS溶液被4% (w/v) CS的乙酸溶液代替。

[0081] 结构和形态分析:将PEI和PS溶解在氧化氘( $D_2O$ )中。使用NMR光谱仪(500MHz; Bruker Corporation,德国)记录 $^1H$ -NMR光谱。使用FT-IR光谱仪(Spectrum 2000,PERKIN

ELMER) 在环境条件下进行FT-IR光谱分析。使用溴化钾(KBr)压片技术进行分析。以 $2\text{cm}^{-1}$ 的分辨率获得光谱,并报告为16次扫描的平均值。通过使用茚三酮测试确定聚合物的氮含量,以估算CS和PS的电荷密度。为了进行测试,使用5% (v/v) 的乙酸溶液制备了100 $\mu\text{L}$ 的4% (w/v) 聚合物溶液。之后,将50 $\mu\text{L}$ 的茚三酮水溶液(5mg/mL)加入到聚合物溶液中。然后将混合物在环境条件下温育15分钟。混合物的吸光度是通过紫外-可见(UV-Vis)光谱在570nm处测定的。所有测量重复三次。使用JEOL JSM-6380(日本)显微镜在10kV的加速电压下操作,检查了CS,PS,CPS和CCS的形态。成像前,所有样品均用金进行溅射镀膜。在SEM分析之前,还将CPS和CCS冻干。

[0082] 热和光学性质的评估:CS、PEI、PS、CPS和CCS的热重分析(TGA)是使用配备有铂锅的Q50 TGA(TA Instruments,New Castle,美国特拉华州)进行的。测定是在氮气的惰性气氛中从40 $^{\circ}\text{C}$ 至600 $^{\circ}\text{C}$ 进行。加热速率为在所有情况下均匀的在10 $^{\circ}\text{Cmin}^{-1}$ 。使用Varian Cary 50UV-Vis分光光度计获得MH和CG的吸收光谱。通过使用Varian Cary Eclipse荧光光谱仪测量PL和PLE光谱。通过使用时间相关的单光子计数设置来记录时间分辨的PL衰减。膜样品的PL QY通过使用配备有积分球的分光荧光计FLS920P(Edinburgh Instruments)来测量。

[0083] 溶解度行为的评估:CS、PEI和PS以0.2mg/mL的浓度溶解在150mM NaCl溶液中。如先前报道的评估聚合物的pH缓冲能力。单独的NaCl溶液用作对照。为了确定溶解度,将过量的聚合物溶解在10mL蒸馏水中,并在环境条件下搅拌30分钟。在此之后,将溶液在10,000 $\times g$ 的相对离心力下进行10分钟的离心。除去上清液,并将沉淀物在65 $^{\circ}\text{C}$ 的烘箱中干燥两天。通过从最初添加的质量中减去保留的质量来确定聚合物的水溶性。

[0084] 机械性能测试:使用通用测试机(Testometric,英国)研究了CPS和CCS的机械性能。为了进行压缩试验,首先将CPS或CCS倒入模具中,然后冻干,制备成圆柱状的CPS或CCS(直径=2.8cm,高度=1.5cm)。将样品置于自流平板之间,并以10mm  $\text{min}^{-1}$ 的速率压缩,直至达到75%的压缩比。为了确定样品的拉伸强度,将CPS或CCS制备为矩形棱柱形(宽度=1.5cm,高度=0.5cm,长度=5cm),并经受以30mm  $\text{min}^{-1}$ 的应变速率,直到发生断裂。所有测量重复三次。为了进行压缩测试,在直径为2.8cm,长度为10cm的玻璃管中制备圆柱状的CCS和CPS样品。使用Instron 4465仪器,对切成高度为1.5cm的样品进行压缩测试。试验是在25 $^{\circ}\text{C}$ 下使用十字头速度、初始标距长度和最终规格长度分别为1cm  $\text{min}^{-1}$ 、15mm和1mm的2kN的测力传感器进行。

[0085] 流变学测量:使用具有主轴(CP-40)的Brookfield DV-III超可编程流变仪(Brookfield Engineering Laboratories Inc,Middleboro,MA,美国)测量CCS和CPS的粘度。在环境条件下,在不同的剪切速率下确定粘度参数,每个剪切速率下的平衡时间设为15s。还在0.1-100 $\text{rs}^{-1}$ 的频率范围内检查了样品的粘弹性。记录储能模量( $G'$ )和损耗模量( $G''$ )。

[0086] 溶胀性能的测定:将冻干并预先称重的CPS(0.05g)或CCS浸入50mL PBS(pH 7.4)中。在预设的时间间隔内,以4,000 $\times g$ 的相对离心力离心5分钟以回收样品,然后去除上清液。使用以下公式计算样品的溶胀率,水含量和吸水率(WAR):

$$[0087] \quad \text{溶胀率} = \frac{m_s}{m_d} \quad (1)$$

$$[0088] \quad \text{水含量}(\%) = \frac{m_s - m_d}{m_s} \times 100\% \quad (2)$$

$$[0089] \quad \text{WAR} = \frac{m_s - m_d}{m_d} \quad (3)$$

[0090] 其中 $m_s$ 和 $m_d$ 分别代表溶胀和干燥的敷料的质量。所有测量重复三次。平均值和标准偏差(SD)用于比较。

[0091] 细胞毒性测定：在补充有10%FBS, 100UI/mL青霉素, 100 $\mu$ g/mL链霉素和2mM L-谷氨酰胺的DMEM中培养3T3小鼠成纤维细胞。测定前24小时, 将细胞以每孔5,000个细胞的初始密度接种在96孔板中, 并在37 $^{\circ}$ C在5%CO<sub>2</sub>的湿润气氛下温育。在实验过程中, 用研钵和研杵研磨适量的CPS或CCS, 然后将其重新悬浮在新鲜的细胞培养基中, 以获得所需浓度的悬浮液。将悬浮液通过使用Millipore 0.22 $\mu$ m注射器式过滤器的过滤来灭菌。将每个孔中的生长培养基替换为100 $\mu$ L过滤后的悬浮液。将板在37 $^{\circ}$ C, 5%CO<sub>2</sub>的潮湿气氛下孵育5小时后, 将每个孔中的悬浮液替换为新鲜的生长培养基。根据制造商的说明, 立即或在处理后孵育24小时后进行CellTiter 96 AQueous非放射性细胞增殖分析(MTS分析; Promega Corp., 麦迪逊, 威斯康星州), 以确定在每个孔中的细胞活力(%)。所有测量重复三次。平均值和SD用于比较。

[0092] 药物装载效率和释放持续性的评价：MH溶解于4% (w/v) CG的水溶液以达到2.5mg/mL的浓度。如前所述, 然后将该溶液用于生成CPS和CCS。然后将载有药物的CPS和CCS冻干两天。冻干后, 将5mL蒸馏水添加至产物。将混合物轻轻搅拌30秒, 并在一个10,000 $\times$ g的相对离心力下离心5分钟。除去上清液。上清液中的MH浓度通过紫外可见光谱(UV-Vis)在280nm处测定。使用以下公式计算载药效率：

$$[0093] \quad \text{装载效率}(\%) = \frac{m_l}{m_t} \times 100\% \quad (4)$$

[0094] 其中, $m_l$ 是CPS或CCS成功携带的药物质量, $m_t$ 是载药的CPS或CCS的总质量。所有测量重复三次。平均值和SD用于比较。使用类似的方法确定药物释放的可持续性。简而言之, 如上所述制备了载有药物的CPS或CCS。之后, 加入20mL的PBS (pH 7.4)。该装置在5%CO<sub>2</sub>的湿润气氛下于37 $^{\circ}$ C培育。在预先设定的时间间隔, 200 $\mu$ L的PBS被清除用于测试, 并被200 $\mu$ L新鲜缓冲溶液替换。如上所述, 通过UV-Vis光谱法确定从装载MH的CPS或CCS所释放的MH的量。使用以下公式计算累积药物释放：

$$[0095] \quad \text{累积药物释放}(\%) = \frac{\sum_{t=0}^t m_t}{m_{\infty}} \times 100\% \quad (5)$$

[0096] 其中, $m_t$ 是在时间t从加载MH的CPS或CCS释放的MH量, 和 $m_{\infty}$ 是CPS或CCS中加载的MH量。所有测量重复三次。确定平均值和SD。

[0097] 抗菌测试：如上所述制备CPS、CCS、CPS/M和CCS/M并冻干。之后, 将样品切成圆柱状(直径=1.5cm, 高度=0.5cm)。任一金黄色葡萄球菌或大肠杆菌被擦拭在LB琼脂平板上。将样品放在板上并在37 $^{\circ}$ C下培养24小时后, 拍摄照片, 并测量抑制区域, 以确定样品周围细菌的生长。

[0098] 血液收集和溶血测定：通过心脏穿刺将麻醉小鼠的血液收集到含肝素的试管中,

并在4℃下以 $2,000 \times g$ 离心10分钟。用PBS (pH=7.4) 洗涤收集的红细胞,直到上清液是无色的。使用研钵和研杵在PBS中研磨不同量的CCS和CPS,并在使用前过滤所得溶液。然后将红细胞添加到滤液中,以达到8% (v/v) 的最终浓度。在37℃下培育1小时后,将混合物在 $2,000 \times g$ 下离心15分钟。在414nm处记录上清液的吸光度。实验一式三份进行。在PBS和0.1% Triton X-100中的溶血程度分别定义为0%和100%。

[0099] 临床前研究:8周大的ICR雌性小鼠购自中国的Chase Ray Co.Ltd,并被安置在具有充足水和食物的合适环境中。所有程序均已获得香港理工大学伦理委员会批准。在适应环境一周后,将小鼠随机分为四组,每组四只。将手术过程的日期指定为第0天。在该天,通过使用电动剃须刀去除每只小鼠的背毛,然后进行75%的乙醇消毒。然后使用直径8毫米的皮肤钻在每只小鼠的背部上制作伤口。在整个手术过程中,小鼠都接受异氟烷麻醉。使用前,所有手术器械均已消毒。在NaCl组和MH组的伤口分别使用100μL的0.9%NaCl溶液和0.25%MH溶液所处理。在CPS、CCS、CPS/M和CCS/M组的伤口分别被装载NaCl的CPS、装载NaCl的CCS、装载MH的CPS和装载MH的CCS覆盖。载有NaCl的CPS和CCS中NaCl的浓度为0.9%;在装有MH的CPS和CCS中,MH的含量为0.25%。最后,用无菌纱布和弹性绷带包扎小鼠。对乙酰氨基酚被添加到饮料中,以减轻外科手术后直至实验结束时小鼠的疼痛。在第0天、第3天、第6天和第9天使用数码相机观察伤口愈合的过程。确切的伤口面积是通过Adobe acrobat Pro测量的。根据以下公式计算伤口愈合率:

$$[0100] \quad \text{伤口愈合率}(\%) = \frac{S_0 - S_x}{S_0} \times 100\% \quad (6)$$

[0101] 其中 $S_0$ 和 $S_x$ 分别是初始时间(第0天)和第x天( $x=3,6$ 或 $9$ )的伤口大小。除了确定伤口愈合率之外,还对伤口组织进行组织学分析。简而言之,在第9天处死小鼠。通过外科手术切除包含新肉芽组织的伤口区域,并浸入4%多聚甲醛中以立即固定过夜。脱水后将固定的组织被石蜡包埋,然后切成3-4μm的部分。通过粘性载玻片选择代表性样品,并根据制造商的说明使用试剂盒(Beyotime Biotechnology,上海,中国)用苏木精和曙红(H&E)或Masson三色染色。此外,在显微镜下(Leica,德国)观察染色的组织玻片并拍照。使用Image-J分析图像中的炎性细胞以及再生胶原蛋白。

[0102] 统计分析:所有数据均表示为平均值±SD。进行学生t检验以评估统计显著性。 $p$ -值<0.05的差异被认为具有统计学意义。

[0103] 虽然本发明是通过具体实施例进行说明的,本领域技术人员应当明白,在不脱离本发明的范围的情况下,还可以对本发明进行各种变化及同等替代。另外,针对特定情形或材料,可以对本发明做各种修改,而不脱离本发明的范围。因此,本发明不局限于所公开的具体实施例,而应当包括落入本发明权利要求范围内的全部实施方式。

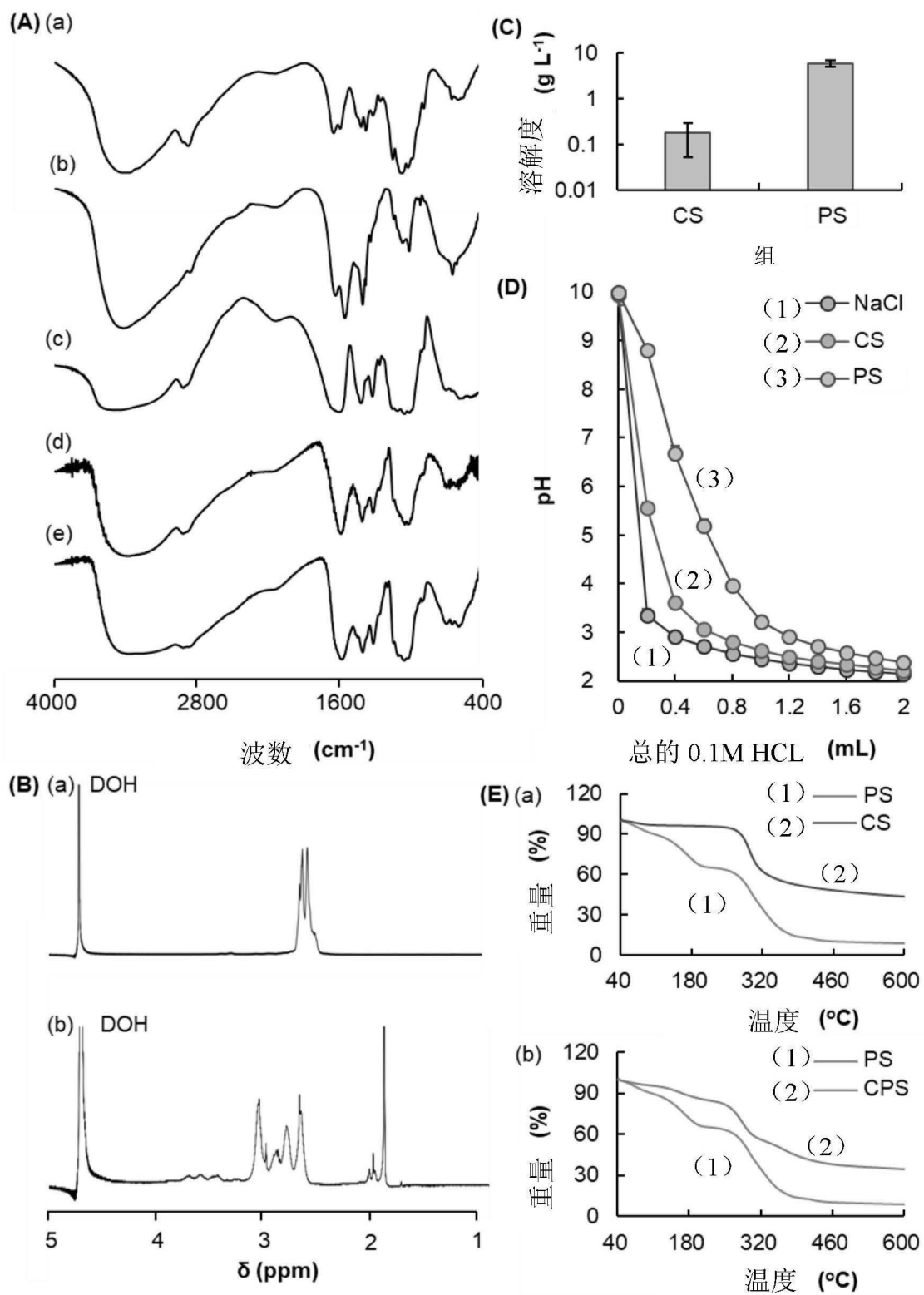


图1

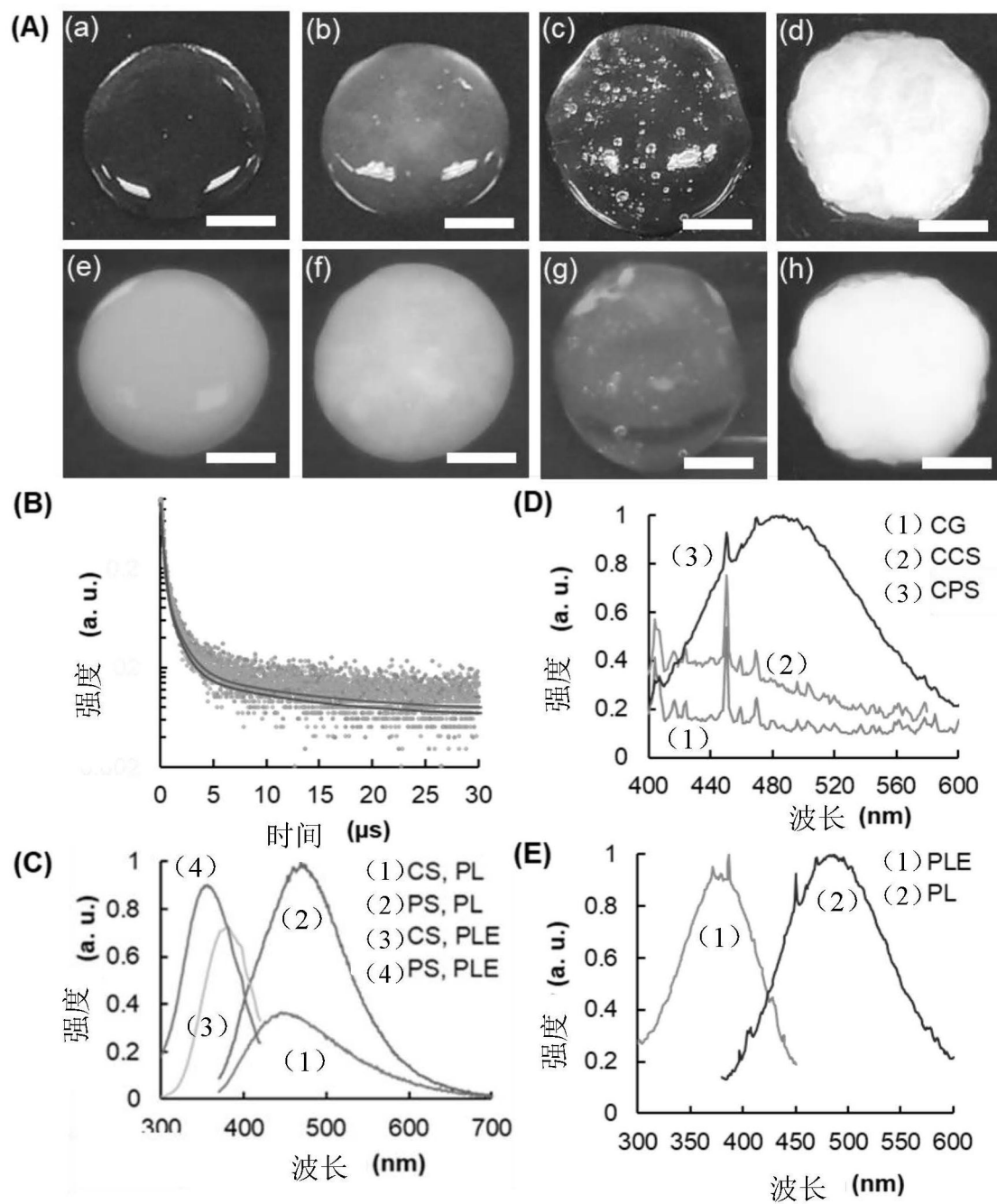


图2



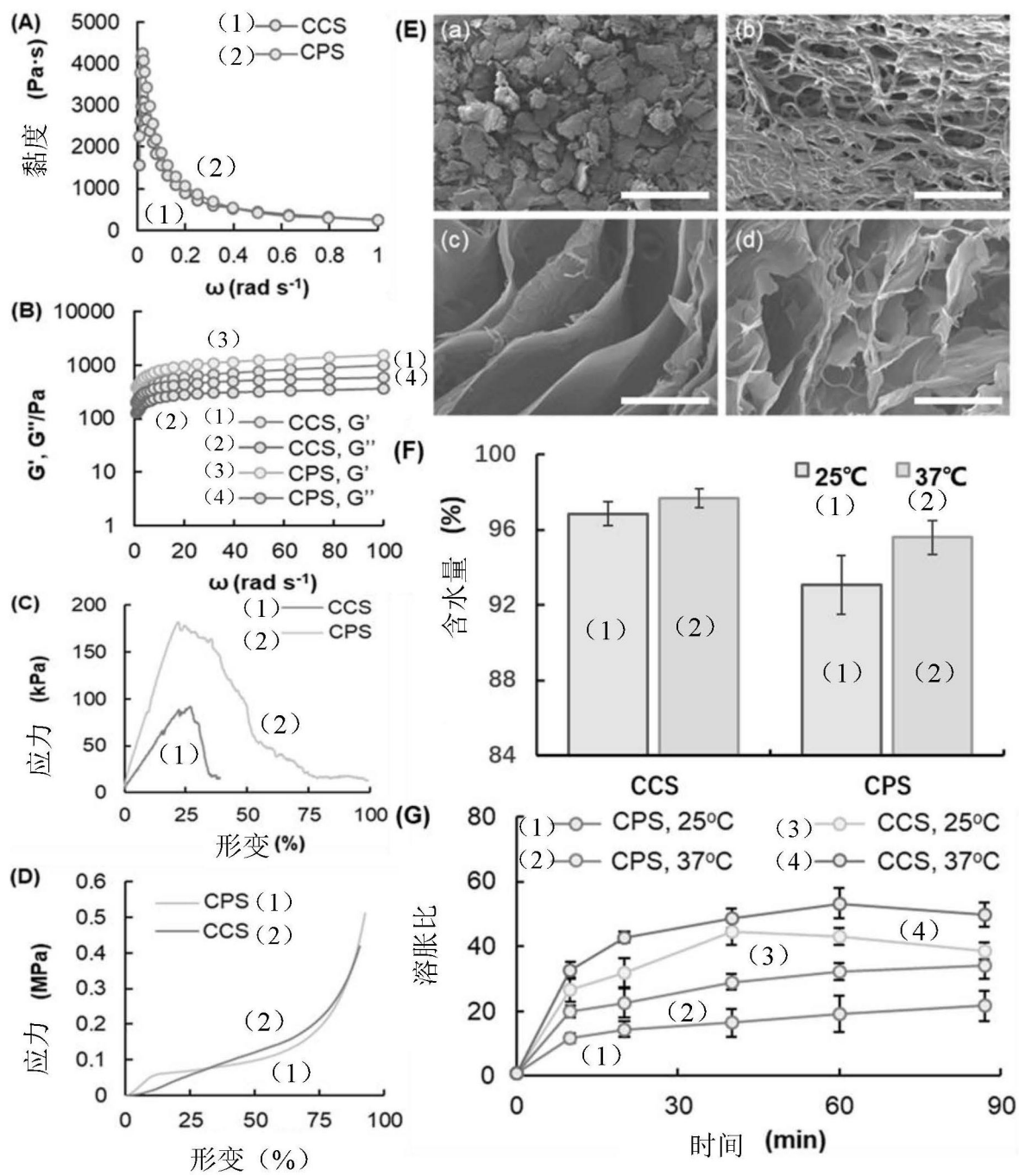


图3

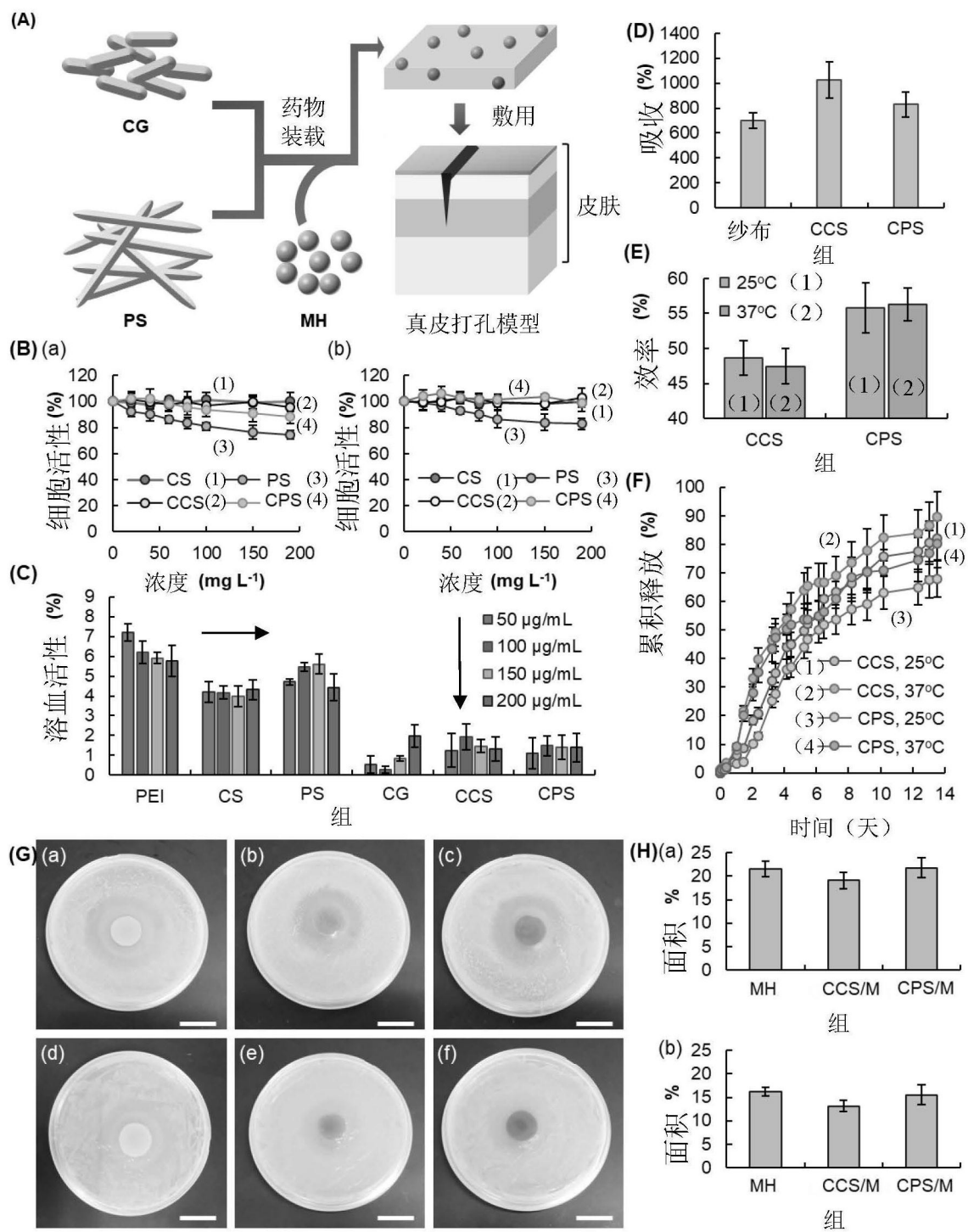


图4

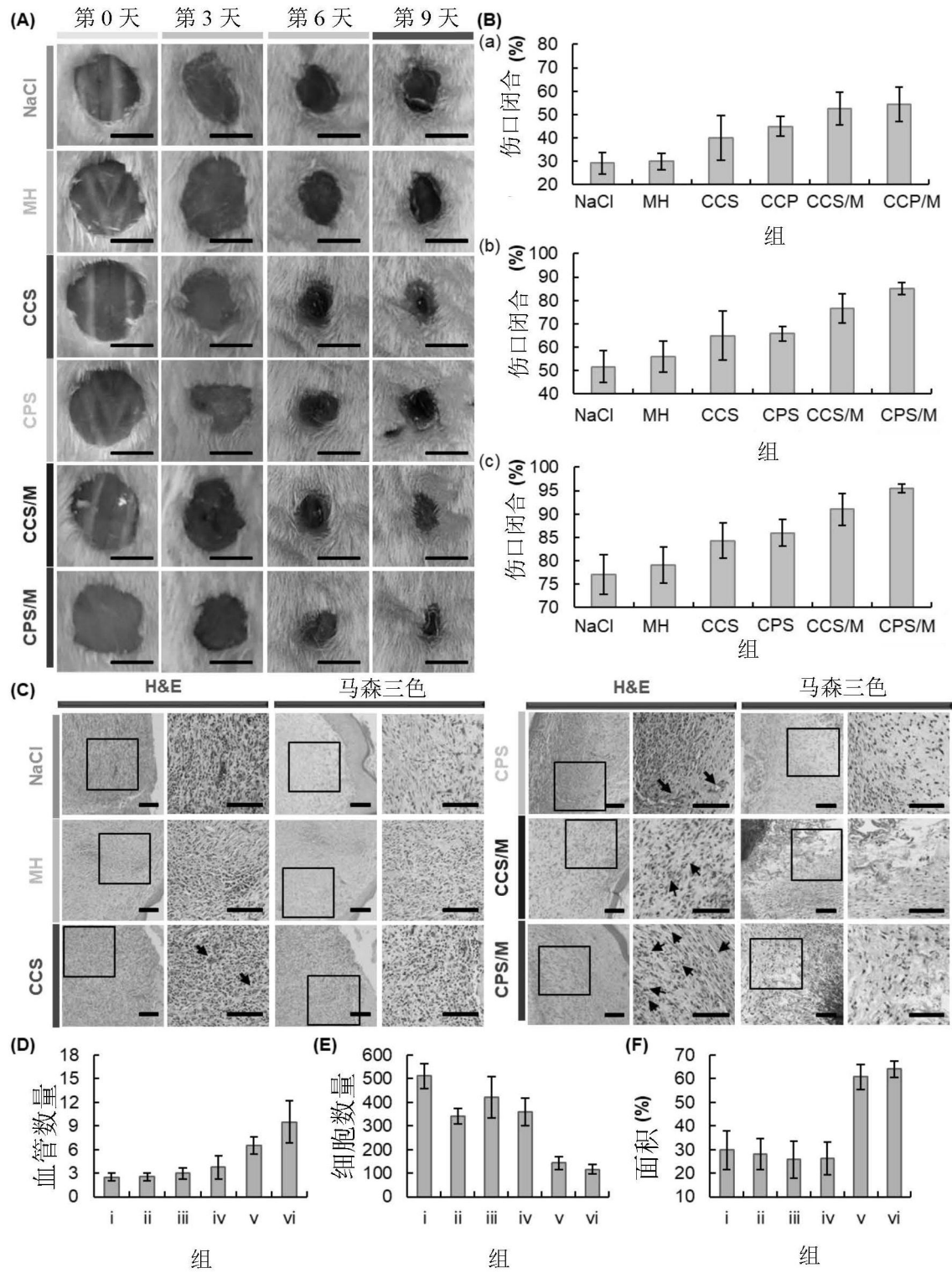


图5

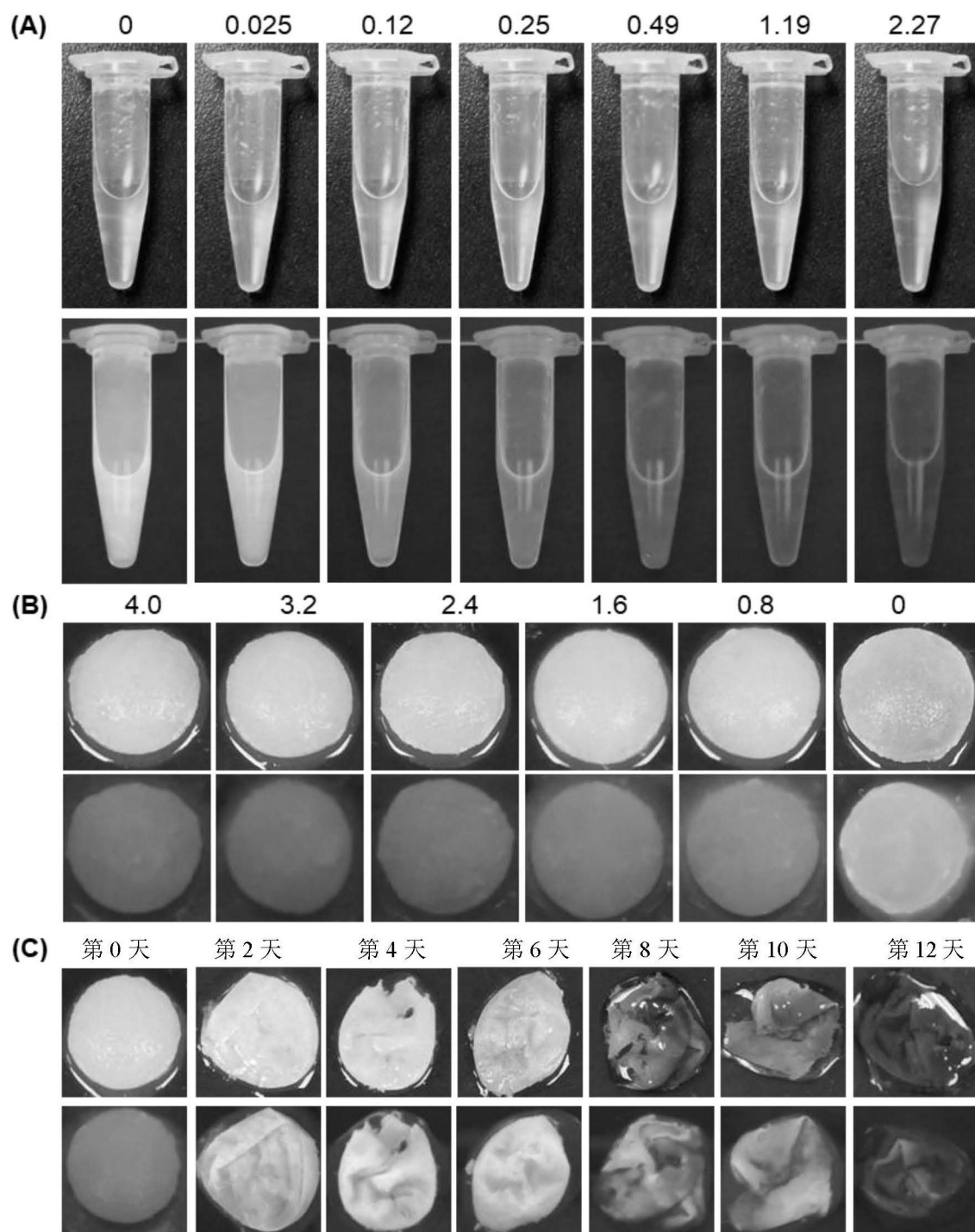


图6