

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **046991**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.05.20

(21) Номер заявки
202092832

(22) Дата подачи заявки
2019.05.29

(51) Int. Cl. **C08L 89/06** (2006.01)
A61L 27/22 (2006.01)
A61L 27/24 (2006.01)
A61L 27/52 (2006.01)
C08H 1/06 (2006.01)
C08J 3/075 (2006.01)

**(54) БИФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ПОЛИМЕРЫ НА ОСНОВЕ
БИОПОЛИМЕРОВ И СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ГИДРОГЕЛЕЙ ИЗ ТАКИХ
БИФУНКЦИОНАЛЬНЫХ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ПОЛИМЕРОВ НА ОСНОВЕ
БИОПОЛИМЕРОВ**

(31) **18175368.2**(32) **2018.05.31**(33) **EP**(43) **2021.03.01**(86) **PCT/EP2019/063995**(87) **WO 2019/229140 2019.12.05**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**УНИВЕРСИТЕЙТ ГЕНТ; ВРЕЙЕ
УНИВЕРСИТЕЙТ БРЮССЕЛЬ (BE)**

(72) Изобретатель:
**Ван Хорик Яспер, Ван Влирбергхе
Сандра (BE)**

(74) Представитель:
Носырева Е.Л. (RU)

(56) JASPER VAN HOORICK ET AL.: "Cross-Linkable Gelatins with Superior Mechanical Properties Through Carboxylic Acid Modification: Increasing the Two-Photon Polymerization Potential", *BIOMACROMOLECULES*, vol. 18, no. 10, 29 August 2017 (2017-08-29), pages 3260-3272, XP055520273, US, ISSN: 1525-7797, DOI: 10.1021/acs.biomac.7b00905, abstract, page 3261; figure 1, Materials and Methods; page 3262
US-A1-2012225101

RUSSO LAURA ET AL.: "Gelatin hydrogels via thiol-ene chemistry", *MONATSHEFTE FÜR CHEMIE = CHEMICAL MONTHLY, SPRINGER VIENNA, VIENNA*, vol. 147, no. 3, 9 December 2015 (2015-12-09), pages 587-592, XP035888784, ISSN: 0026-9247, DOI: 10.1007/S00706-015-1614-5 [retrieved on 2015-12-09] the whole document

ZACHARY M'UNOZ ET AL.: "Gelatin hydrogels formed by orthogonal thiol-norbornene photochemistry for cell encapsulation", *BIOMATERIALS SCIENCE*, vol. 2, no. 8, 23 April 2014 (2014-04-23), pages 1063-1072, XP055520286, GB, ISSN: 2047-4830, DOI: 10.1039/C4BM00070F, the whole document

WO-A2-2006034128

(57) Изобретение относится к бифункциональному модифицированному полимеру на основе биополимера, содержащему по меньшей мере одну полимерную цепь, содержащую n функциональных групп первого типа и m функциональных групп второго типа. Функциональные группы первого типа включают группы, способные к сшиванию по радикальному механизму после свободнорадикальной полимеризации с ростом цепи. Функциональные группы второго типа включают группы, способные к тиол-еновому сшиванию. Предпочтительные бифункциональные модифицированные полимеры на основе биополимеров включают бифункциональный модифицированный желатин и бифункциональный модифицированный коллаген. Изобретение дополнительно относится к способу получения такого бифункционального модифицированного полимера на основе биополимера и к способу получения гидрогеля из такого бифункционального модифицированного полимера на основе биополимера.

B1**046991****046991****B1**

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к бифункциональным модифицированным полимерам на основе биополимеров, в частности, биополимеров, таких как бифункциональный модифицированный желатин и бифункциональный модифицированный коллаген, и к способу получения таких бифункциональных модифицированных полимеров на основе биополимеров. Настоящее изобретение дополнительно относится к способу получения гидрогелей из таких бифункциональных модифицированных полимеров на основе биополимеров.

Предшествующий уровень техники

Желатин представляет собой биополимерный материал природного происхождения с выдающимися свойствами взаимодействия с клетками и способностью к образованию гидрогеля. Он широко применяется в пищевой и фармацевтической индустрии из-за его широкой доступности и экономической эффективности. В результате, материал стал одним из стандартов в области тканевой инженерии и биологического производства. Однако, поскольку желатин характеризуется верхней критической температурой растворения ниже физиологической температуры ($\pm 30^\circ\text{C}$), гидрогели на основе желатина не подходят для биомедицинских применений, таких как тканевая инженерия. Для пригодности в биомедицинских применениях необходимо повысить стабильность и механические свойства желатина при физиологических условиях. Следовательно, возникло множество стратегий для ковалентного сшивания желатина. Применение стратегий фотосшивания представляет собой конкретный интерес, поскольку такие способы в общем характеризуются относительно мягкими условиями, обеспечивая инкапсулирование клеток в гидрогель. Кроме того, некоторые (высокого разрешения) методики аддитивного изготовления, включая стереолитографию и двухфотонную полимеризацию (2PP), требуют фотосшивания для структурирования материала.

Известные стратегии фотосшивания в общем можно разделить на две основные категории в зависимости от механизма сшивания: полимеризация с ростом цепи и ступенчатая полимеризация. Исторически, основная часть стратегий фотоиндуцированного сшивания желатина осуществляется с применением полимеризации с ростом цепи (опосредованная радикалами фотополимеризация с ростом цепи). В этом отношении часто упоминаемое производное желатина представляет собой желатин-метакриламид (Gel-MOD или Gel-MA), в котором первичные аминогруппы желатина функционализированы с применением метакрилового ангидрида с получением сшиваемых метакриламидов.

В последнее десятилетие все больший интерес вызывают тиоленовые гидрогели, полученные посредством ступенчатой полимеризации, такие как гидрогели, полученные посредством тиол-еновой (фото-)клик-реакции. Они, как правило, характеризуются повышенной реакционной способностью и образованием более гомогенных сетей из-за их ортогональной природы. Следовательно, они демонстрируют превосходящую совместимость в отношении инкапсулирования клеток, поскольку реакция характеризуется более низкими концентрациями радикалов, и в отличие от гидрогелей, полученных посредством полимеризации с ростом цепи, реакция может эффективно происходить в присутствии кислорода. Для осуществления тиол-еновой химии особый интерес представляют функциональные группы норборнена. С одной стороны, они не подвержены конкурентной гомополимеризации. С другой стороны, снятие напряжения кольца в ходе реакции с тиолом, в комбинации с последующим быстрым переносом протона, дополнительно повышает их тиол-еновую реакционную способность.

Желатин-метакриламидные гели (gel-MOD или gel-MA) в целом более жесткие по сравнению с тиол-еновыми гидрогелями (gel-NB) из-за природы сшивания. Тиоленовые гидрогели, такие как желатин-норборненовые гидрогели (gel-NB), имеют преимущество в обеспечении контроля количества сшитых функциональных групп и демонстрируют улучшенные возможности для обработки в отношении методик аддитивного изготовления с использованием света.

Кроме того, в целом тиол-еновые гидрогели (gel-NB) характеризуются пониженной способностью к набуханию по сравнению с метакриламидными гелями (gel-MOD) из-за наличия более гидрофобных функциональных групп норборнена.

Более того, из-за контроля количества прореагировавших функциональных групп в тиол-еновых гидрогелях (gel-NB) посредством варьирования соотношения тиол-енов, непрореагировавшие реакционно способные функциональные группы норборнена могут быть получены после сшивания, которые могут применяться для последующего фотопрививания тиолированных компонентов (например, последовательностей, взаимодействующих с клетками, активных фармацевтических компонентов, антиоксидантов, ...). Однако при уменьшении соотношения тиол-енов гидрогелевый материал характеризуется еще более неудовлетворительными механическими свойствами в комбинации с повышенной способностью к поглощению воды. Вследствие этого материал может терять некоторые преимущества при аддитивном изготовлении высокого разрешения, поскольку набухание после получения увеличит размеры конструкции с одной стороны, а с другой напряжение, индуцированное набуханием внутри конструкции, может привести к деформациям. Кроме того, из-за неудовлетворительных механических свойств материал может быть не способен поддерживать свой собственный вес, при этом образуя конструкции с меньшими размерами элементов.

Другим недостатком применения тиол-еновых гидрогелей (gel-NB) является их ограниченная ста-

бильность при хранении при повышенных температурах в ходе обработки, что может быть необходимым для аддитивного изготовления с применением экструзии/отложения с либо без инкапсулирования клеток, из-за образования дисульфида в тиолированном сшивающем средстве. Вследствие этого материал может либо подвергаться преждевременному сшиванию, либо тиол-еновое соотношение больше не контролируется.

В Jasper Van Hoorick et al: "Cross-Linkable Gelatins with Superior Mechanical Properties Through Carboxylic Acid Modification: Increasing the Two-Photon Polymerization Potential", *Biomacromolecules*, vol. 18, № 10, 29 августа 2017 г., ст. 3260-3272 описывается конкретный бифункциональный модифицированный биополимер, называемый GEL-MOD-AEMA, содержащий метакриламид в качестве первой функциональной группы и метакрилаты в качестве второй функциональной группы, образованный с помощью реакции карбоновых кислот с 2-аминоэтилметакрилатом. Данный бифункциональный модифицированный биополимер демонстрирует более быструю кинетику сшивания по сравнению с более традиционными биополимерами, полученными посредством полимеризации с ростом цепи gel-MOD, известными из уровня техники.

Краткое описание изобретения

Целью настоящего изобретения является обеспечение модифицированных полимеров на основе биополимеров, таких как, например, модифицированного желатина, без недостатков, известных из предшествующего уровня техники.

Другой целью настоящего изобретения является обеспечение модифицированных полимеров на основе биополимеров, в которых сочетаются два типа функциональных групп: функциональная группа первого типа, обеспечивающая традиционную свободнорадикальную полимеризацию с ростом цепи, и функциональная группа второго типа, подверженная ступенчатой полимеризации посредством тиол-еновой клик-реакции, например, тиол-еновой фотоклик-реакции.

Дополнительной целью настоящего изобретения является обеспечение модифицированных полимеров на основе биополимеров, которые обеспечивают проведение контролируемого прививания после сшивания после свободнорадикальной полимеризации.

Еще одной дополнительной целью настоящего изобретения является обеспечение объединения модифицированного желатина, сочетающего преимущества в отношении осуществления манипуляций с материалом и (механической) стабильности желатин-метакриламида (gel-MOD), с желатин-норборненом, полученным с помощью ортогональной клик-химии (gel-NB).

Еще одной целью настоящего изобретения является обеспечение модифицированных полимеров на основе биополимеров, подходящих для получения гидрогеля, который обеспечивает локальное и контролируемое введение определенных функциональных групп посредством тиол-енового фотопрививания.

Еще одной целью настоящего изобретения является обеспечение гидрогеля, характеризующегося интересными механическими свойствами, такими как прочность и жесткость. В частности, еще одной целью является обеспечение гидрогеля, характеризующегося улучшенными механическими свойствами по сравнению с желатин-норборненом, вне зависимости от тиол-енового соотношения, при этом все еще демонстрируя способность к тиол-еновому прививанию.

Еще одной дополнительной целью настоящего изобретения является обеспечение гидрогеля с контролируемой способностью к набуханию и/или поглощению воды.

Дополнительно, целью настоящего изобретения является обеспечение гидрогеля с улучшенной стабильностью при хранении, в частности, при повышенных температурах.

В соответствии с первым аспектом настоящего изобретения предусмотрен бифункциональный модифицированный полимер на основе биополимера. Бифункциональный желатин содержит по меньшей мере одну полимерную цепь. По меньшей мере одна полимерная цепь содержит по меньшей мере два типа функциональных групп: n первых функциональных групп и m вторых функциональных групп, при этом ни n , ни m не равняется нулю. Функциональные группы первого типа включают группы, способные к сшиванию по радикальному механизму после свободнорадикальной полимеризации с ростом цепи. Функциональные группы второго типа содержат тиол-еновые сшитые группы, которые остаются непрореагировавшими в ходе свободнорадикальной полимеризации с ростом цепи указанных функциональных групп первого типа.

Предпочтительно, бифункциональный модифицированный полимер на основе биополимера характеризуется степенью замещения функциональных групп первого типа в диапазоне 1-95% и более предпочтительно в диапазоне 5-75%, например, в диапазоне 15-75% или в диапазоне 15-50%.

Бифункциональный модифицированный полимер на основе биополимера, например, бифункционального модифицированного желатина или бифункционального модифицированного коллагена, содержит по меньшей мере одну функциональную группу первого типа в полимерной цепи и предпочтительно более одной функциональной группы первого типа в полимерной цепи. Бифункциональный модифицированный полимер на основе биополимера, например, бифункциональный модифицированный желатин, содержит по меньшей мере одну функциональную группу первого типа в цепи полимера и содержит предпочтительно более одной функциональной группы первого типа, например, 5, 10, 20, 30, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 функциональных групп первого типа в полимерной цепи. Предпочтительно, бифункцио-

нальный модифицированный полимер на основе биополимера характеризуется степенью замещения функциональных групп второго типа в диапазоне 5-95% и более предпочтительно в диапазоне 5-75%, например, в диапазоне 15-75% или в диапазоне 15-50%.

Бифункциональный модифицированный полимер на основе биополимера, например, бифункционального модифицированного желатина или бифункционального модифицированного коллагена, содержит по меньшей мере одну функциональную группу второго типа в полимерной цепи и более предпочтительно более одной функциональной группы второго типа в полимерной цепи. Бифункциональный модифицированный полимер на основе биополимера, например, бифункциональный модифицированный желатин, содержит по меньшей мере одну функциональную группу второго типа и содержит предпочтительно более одной функциональной группы второго типа, например, 5, 10, 20, 30, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 функциональных групп второго типа в полимерной цепи.

Бифункциональный модифицированный полимер на основе биополимера в соответствии с настоящим изобретением обладает преимуществом, заключающемся в сочетании двух типов функциональных групп: функциональной группы первого типа, обеспечивающей традиционную свободнорадикальную полимеризацию, и функциональной группы второго типа, подверженной тиол-еновой клик-реакции, например, тиол-еновой фотоклик-реакции. Функциональные группы второго типа остаются непрореагировавшими в ходе свободнорадикальной полимеризации и обеспечивают получение прививания после сшивания. Функциональные группы второго типа обеспечивают введение определенных тиолированных функциональных групп. Функциональные группы второго типа обеспечивают, например, прививание после обработки, такое как прививание после обработки биоактивных молекул для дополнительной адаптации полимера на основе биополимера под конкретные требования.

Бифункциональный полимер на основе биополимера в соответствии с настоящим изобретением может содержать любой тип биополимера или полимерной биомолекулы, способных к функционализации с функциональными группами первого и второго типа. Биополимеры и полимерные биополимеры включают полимеры природного происхождения. Для цели настоящего изобретения термины "биополимер" и "полимерная биомолекула" применяются взаимозаменяемо. Для целей настоящего изобретения термин "полимеры на основе биополимеров" относится ко всем типам биополимеров, производным биополимеров, рекомбинантным аналогам биополимеров, синтетическим аналогам полимерных биополимеров.

Химические производные биополимеров включают без ограничения биополимеры с функционализированной боковой цепью, а также продукты гидролиза биополимеров.

Рекомбинантные аналоги биополимеров включают биополимеры, которые были получены посредством кодирования определенных синтетических последовательностей ДНК в организме, что привело к синтезу биополимера или белка с определенной аминокислотной последовательностью.

Синтетические аналоги биополимеров включают полимеры, которые были синтетически созданы с помощью связывания разных мономеров друг с другом, что привело к получению полимера, содержащего разные функциональные группы в его боковых цепях. Пример такого синтеза включает твердофазный синтез пептидов.

Примеры полимеров на основе биополимеров включают полисахариды, нуклеиновые кислоты, желатины, коллагены, альгинаты, декстраны, агарозу, гликозаминогликаны (например, гиалуроновую кислоту), хитозаны и каррагинаны и их производные, рекомбинантные аналоги и синтетические аналоги полисахаридов, нуклеиновых кислот, желатинов, коллагенов, альгинатов, декстранов, агарозы, гликозаминогликанов (например, гиалуроновой кислоты), хитозанов и каррагинанов.

Для цели настоящего изобретения биологически совместимые полимеры также рассматриваются в качестве полимеров на основе биополимеров. Конкретные предпочтительные полимеры на основе биополимеров включают желатин и коллаген, рекомбинантный желатин и рекомбинантный коллаген.

Функциональные группы первого типа могут включать любой тип функциональных групп, способных или подверженных сшиванию по радикальному механизму после свободнорадикальной полимеризации с ростом цепи. Предпочтительные примеры функциональных групп первого типа включают функциональные группы метакриламида, функциональные группы акриламида, функциональные группы метакрилата и/или функциональные группы акрилата. В частности, предпочтительные функциональные группы первого типа включают функциональные группы метакриламида и/или функциональные группы акриламида. В некоторых вариантах осуществления бифункциональный модифицированный полимер на основе биополимера, например, бифункционального модифицированного желатина, содержит только один тип функциональных групп первого типа, например, функциональные группы метакриламида, или функциональные группы акриламида, или функциональные группы метакрилата, или функциональные группы акрилата. В других вариантах осуществления бифункциональный модифицированный полимер на основе биополимера, например, бифункционального модифицированного желатина, содержит комбинацию разных функциональных групп первого типа, например, комбинацию функциональных групп метакриламида и функциональных групп акриламида.

Функциональные группы второго типа могут включать любой тип функциональных групп, которые способны к тиол-еновому сшиванию или подвержены ему. Предпочтительно, функциональные группы

второго типа включают функциональные группы, способные к тиол-еновому сшиванию или подверженные ему, без способности претерпевать конкурентную гомополимеризацию. Функциональные группы второго типа включают, например, функциональные группы норборнена, функциональные группы винилового простого эфира, функциональные группы винилового сложного эфира, функциональные группы алилового простого эфира, функциональные группы пропенилового простого эфира, и/или функциональные группы алкена, и/или функциональные группы N-виниламида. В частности, предпочтительные функциональные группы второго типа включают функциональные группы норборнена и/или функциональные группы винилового простого эфира. В некоторых вариантах осуществления бифункциональный модифицированный полимер на основе биополимера, например, бифункционального модифицированного желатина, содержит только один тип функциональных групп второго типа, например, функциональные группы норборнена, или функциональные группы винилового простого эфира, или функциональные группы винилового сложного эфира, или функциональные группы алкена, или функциональные группы N-виниламида. В других вариантах осуществления бифункциональный модифицированный полимер на основе биополимера, например, бифункционального модифицированного желатина, содержит комбинацию разных функциональных групп второго типа, например, комбинацию функциональных групп норборнена и функциональных групп винилового сложного эфира.

В предпочтительных вариантах осуществления бифункциональный модифицированный полимер на основе биополимера содержит метакриламиды в качестве функциональных групп первого типа и функциональные группы норборнена в качестве функциональных групп второго типа.

В других вариантах осуществления бифункциональный модифицированный полимер на основе биополимера содержит метакриламиды в качестве функциональных групп первого типа и функциональные группы винилового сложного эфира в качестве функциональных групп второго типа.

В дополнительных вариантах осуществления бифункциональный модифицированный полимер на основе биополимера содержит акриламиды в качестве функциональных групп первого типа и функциональные группы норборнена в качестве функциональных групп второго типа.

В других дополнительных вариантах осуществления бифункциональный модифицированный полимер на основе биополимера содержит акриламиды в качестве функциональных групп первого типа и функциональные группы винилового сложного эфира в качестве функциональных групп второго типа.

Бифункциональный модифицированный желатин в соответствии с настоящим изобретением характеризуется общей степенью замещения функциональных групп первого типа и функциональных групп второго типа выше 2%. Под общей степенью замещения функциональной группы первого типа и функциональных групп второго типа подразумевается сумма степени замещения функциональных групп первого типа и степени замещения функциональных групп второго типа. Общая степень замещения находится в диапазоне 2-100% например, в диапазоне 5-100% или в диапазоне 5-95%, например, 20%, 40%, 50%, 60%, 70% или 80%.

Бифункциональный модифицированный полимер на основе биополимера, например, бифункционального модифицированного желатина, содержит по меньшей мере одну функциональную группу первого типа в полимерной цепи и предпочтительно более одной функциональной группы первого типа в полимерной цепи, и содержит по меньшей мере одну функциональную группу второго типа в полимерной цепи и предпочтительно более одной функциональной группы второго типа в полимерной цепи. Бифункциональный модифицированный полимер на основе биополимера содержит, например, 5, 10, 20, 30, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 функциональных групп первого типа и 5, 10, 20, 30, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 функциональных групп второго типа в полимерной цепи.

Бифункциональный модифицированный полимер на основе биополимера в соответствии с настоящим изобретением может содержать одну полимерную цепь или может содержать несколько полимерных цепей. В любом случае полимерная цепь содержит как функциональные группы первого типа, так и функциональные группы второго типа. Благодаря введению функциональных групп первого типа и функциональных групп второго типа в одну полимерную цепь полимер на основе биополимера не подвергается разделению фаз.

Бифункциональные модифицированные полимеры на основе биополимеров в соответствии с настоящим изобретением имеют особое значение для получения гидрогелей. Две функциональные группы полимеров на основе биополимеров делают их привлекательными для большого числа применений.

Бифункциональные модифицированные полимеры на основе биополимеров обеспечивают, например, локальное и контролируемое введение определенных функциональных групп, например, с получением лучшего имитатора природного внеклеточного матрикса.

Бифункциональные модифицированные полимеры на основе биополимеров также обеспечивают введение локальных и контролируемых зон прочности и/или жесткости за счет преимущества дополнительного тиол-енового сшивания.

Кроме того, бифункциональные модифицированные полимеры на основе биополимеров обеспечивают непосредственную обработку материала в комбинации с непосредственной функционализацией после получения.

Дополнительно, бифункциональные модифицированные полимеры на основе биополимеров обес-

печивают контроль способности поглощения воды конечным материалом и совместимости с растворителем посредством прививания после сшивания гидрофильных или гидрофобных функциональных групп.

В соответствии со вторым аспектом настоящего изобретения предусмотрен способ получения бифункционального модифицированного полимера на основе биополимера. Способ включает стадии:

а) обеспечения полимера на основе биополимера, содержащего по меньшей мере одну полимерную цепь, при этом указанная полимерная цепь содержит первичные функциональные группы;

б) функционализации первой части указанных первичных функциональных групп с введением n функциональных групп первого типа, при этом n не равняется нулю, указанные функциональные группы первого типа способны к сшиванию по радикальному механизму после свободнорадикальной полимеризации с ростом цепи;

с) функционализации второй части указанных первичных функциональных групп с введением m функциональных групп второго типа, при этом m не равняется нулю, указанные функциональные группы второго типа включают способные к тиол-еновому сшиванию группы.

Где стадию б) и стадию с) могут осуществлять одновременно или где стадию б) могут осуществлять до или после стадии с). В предпочтительных способах стадию б) осуществляют перед стадией с). В альтернативном способе стадию с) осуществляют перед стадией б). Способ, в котором стадию с) осуществляют перед стадией б), обладает преимуществом для введения функциональной группы до реакции с функциональными группами первого типа. Это может быть важным для влияния на гидрофобность материала до сшивания или для введения фотообратимых групп с помощью тиол-еновой химии, которые способны расщепляться после сшивания для введения зон с пониженными механическими свойствами с пространственно-временным контролем.

Первичные функциональные группы полимера на основе биополимера включают, например, функциональные аминогруппы, например, функциональные группы первичных аминов, функциональные группы карбоновой кислоты, гидроксильные функциональные группы или их комбинацию.

В предпочтительном способе первичные функциональные группы полимера на основе биополимера включают функциональные аминогруппы, и стадия б) предусматривает реакцию этих функциональных аминогрупп или части этих функциональных аминогрупп, например, с метакриловым ангидридом.

В других предпочтительных способах первичные функциональные группы полимера на основе биополимера включают функциональные группы карбоновой кислоты, и стадия б) предусматривает реакцию с участием этих функциональных групп карбоновой кислоты или части этих функциональных групп карбоновой кислоты.

В дополнительном предпочтительном способе первичные функциональные группы полимера на основе биополимера включают гидроксильные функциональные группы, и стадия б) предусматривает реакцию с участием этих гидроксильных функциональных групп или части этих гидроксильных функциональных групп.

Ясно, что если первичные функциональные группы включают комбинацию первичных функциональных групп, например, комбинацию функциональных аминогрупп, функциональных групп карбоновой кислоты и/или гидроксильных функциональных групп, то стадия б) может предусматривать комбинацию реакций, например, реакцию функциональных аминогрупп или части функциональных аминогрупп, например, с метакриловым ангидридом, и/или реакцию функциональных групп карбоновой кислоты или части функциональных групп карбоновой кислоты и/или реакцию гидроксильных функциональных групп или части гидроксильных функциональных групп.

В другом предпочтительном способе первичные функциональные группы полимера на основе биополимера включают функциональные аминогруппы, и стадия с) предусматривает реакцию этих функциональных аминогрупп или части этих функциональных аминогрупп, например, с 5-норборнен-2-карбоновой кислотой. В предпочтительной реакции с участием функциональных аминогрупп или части функциональных аминогрупп используют химию сочетания с карбодиимидом (например, с применением 1-этил-3-(3-диметиламинопил)-карбодиимидгидрохлорида (EDC)/N-гидроксисукцинимидом (NHS)) для сочетания 5-норборнен-2-карбоновой кислоты с функциональными аминогруппами.

В другом предпочтительном способе первичные функциональные группы полимера на основе биополимера включают функциональные аминогруппы, и стадия с) предусматривает реакцию функциональных аминогрупп или части функциональных аминогрупп с ангидридом карбоновой кислоты.

В еще одном дополнительном предпочтительном способе первичные функциональные группы полимера на основе биополимера включают функциональные группы карбоновой кислоты, и стадия с) предусматривает реакцию этих функциональных групп карбоновой кислоты или части этих функциональных групп карбоновой кислоты, например, с 5-норборнен-2-метиламином. В предпочтительной реакции функциональных групп карбоновой кислоты или части функциональных групп карбоновой кислоты используют химию сочетания с карбодиимидом для сочетания 5-норборнен-2-метиламина с функциональными группами карбоновой кислоты.

В еще одном дополнительном предпочтительном способе первичные функциональные группы полимера на основе биополимера включают гидроксильную группу и стадия с) предусматривает реакцию таких гидроксильных функциональных групп или части таких гидроксильных функциональных групп.

Ясно, что если первичные функциональные группы включают комбинацию первичных функциональных групп, например, комбинацию функциональных аминогрупп, карбоксильных функциональных групп и/или гидроксильных функциональных групп, то стадия с) может предусматривать комбинацию реакций, например, комбинацию вышеописанных реакций, например, комбинацию реакции функциональных аминогрупп или части функциональных аминогрупп, например, с 5-норборнен-2-карбоновой кислотой, например, с использованием химии сочетания с карбодимидом, и/или реакции функциональных групп карбоновой кислоты или части этих функциональных групп карбоновой кислоты, например, с 5-норборнен-2-метиламином, например, посредством применения химии сочетания с карбодимидом, и/или реакции гидроксильных функциональных групп или части гидроксильных функциональных групп.

В конкретном предпочтительном способе первичные функциональные группы полимера на основе биополимера включают функциональные аминогруппы, и стадия b) предусматривает реакцию части этих функциональных аминогрупп, например, с метакриловым ангидридом, при этом стадия с) предусматривает реакцию части этих функциональных аминогрупп, например, с 5-норборнен-2-карбоновой кислотой, или стадия с) предусматривает реакцию части таких функциональных аминогрупп с ангидридом карбоновой кислоты.

В другом особенно предпочтительном способе первичные функциональные группы полимера на основе биополимера включают функциональные группы карбоновой кислоты, и стадия b) предусматривает реакцию части этих функциональных групп карбоновой кислоты, например, с 2-аминоэтилметакрилатом, при этом стадия с) предусматривает реакцию части этих функциональных групп карбоновой кислоты, например, с 5-норборнен-2-метиламином.

В дополнительных особенно предпочтительных способах первичные функциональные группы полимера на основе биополимера включают функциональные аминогруппы и/или функциональные группы карбоновой кислоты, и стадия b) предусматривает реакцию части этих функциональных аминогрупп, например, с метакриловым ангидридом, и/или реакцию части этих функциональных групп карбоновой кислоты, например, с 2-аминоэтилметакрилатом, при этом стадия с) предусматривает реакцию части функциональных аминогрупп, например, с 5-норборнен-2-карбоновой кислотой, и реакцию части функциональных групп карбоновой кислоты, например, с 5-норборнен-2-метиламином.

Предпочтительный способ относится к способу получения бифункционального модифицированного желатина. Способ включает стадии:

a) получения желатина, содержащего по меньшей мере одну полимерную цепь, при этом указанная полимерная цепь содержит первичные функциональные группы, например, функциональные аминогруппы, и/или функциональные группы карбоновых кислот;

b) функционализации первой части указанных первичных функциональных групп с введением n функциональных групп первого типа, при этом n не равняется нулю, указанные функциональные группы первого типа способны к сшиванию по радикальному механизму после свободнорадикальной полимеризации с ростом цепи;

c) функционализации второй части указанных первичных функциональных групп с введением m функциональных групп второго типа, при этом m не равняется нулю, указанные функциональные группы второго типа включают способные к тиол-еновому сшиванию группы.

Где стадию b) и стадию c) могут осуществлять одновременно или где стадию b) могут осуществлять до или после стадии c). В предпочтительных способах стадию b) осуществляют перед стадией c). В альтернативном способе стадию c) осуществляют перед стадией b).

Первичные функциональные группы желатина включают, например, функциональные аминогруппы, например, функциональные группы первичных аминов, функциональные группы карбоновой кислоты, гидроксильные функциональные группы или их комбинацию.

В предпочтительном способе первичные функциональные группы желатина включают функциональные аминогруппы, и стадия b) предусматривает реакцию этих функциональных аминогрупп или части этих функциональных аминогрупп, например, с метакриловым ангидридом.

В других предпочтительных способах первичные функциональные группы желатина включают функциональные группы карбоновой кислоты, и стадия b) предусматривает реакцию с участием этих функциональных групп карбоновой кислоты или части этих функциональных групп карбоновой кислоты.

Ясно, что если первичные функциональные группы желатина включают комбинацию разных функциональных групп, например, комбинацию функциональных аминогрупп, и/или функциональных групп карбоновой кислоты, и/или гидроксильных функциональных групп, то стадия b) может предусматривать комбинацию реакций, например, реакцию функциональных аминогрупп или части функциональных аминогрупп, например, с метакриловым ангидридом, и/или реакцию функциональных групп карбоновой кислоты или части функциональных групп карбоновой кислоты, например, с 2-аминоэтилметакрилатом. Если желатин содержит дополнительные первичные функциональные группы, то стадия b) может дополнительно предусматривать реакцию с участием этих дополнительных первичных функциональных групп или части этих дополнительных первичных функциональных групп.

В другом предпочтительном способе первичные функциональные группы желатина включают

функциональные аминокруппы, и стадия с) предусматривает реакцию этих функциональных аминокрупп или части этих функциональных аминокрупп, например, с 5-норборнен-2-карбоновой кислотой. В предпочтительной реакции с участием функциональных аминокрупп или части функциональных аминокрупп используют химию сочетания с карбодимидом (например, с применением 1-этил-3-(3-диметиламино)пропил)-карбодимидгидрохлорида (EDC)/N-гидроксисукцинимидом (NHS)) для сочетания 5-норборнен-2-карбоновой кислоты с функциональными аминокруппами.

В дополнительном предпочтительном способе первичные функциональные группы желатина включают функциональные группы карбоновой кислоты, и стадия с) предусматривает реакцию этих функциональных групп карбоновой кислоты или части этих функциональных групп карбоновой кислоты, например, с 5-норборнен-2-метиламином. В предпочтительной реакции функциональных групп карбоновой кислоты или части функциональных групп карбоновой кислоты используют химию сочетания с карбодимидом для сочетания 5-норборнен-2-метиламина с функциональными группами карбоновой кислоты.

В другом предпочтительном способе первичные функциональные группы желатина включают функциональные аминокруппы, и стадия с) предусматривает реакцию функциональных аминокрупп или части функциональных аминокрупп с ангидридом карбоновой кислоты.

Ясно, что если первичные функциональные группы включают комбинацию функциональных аминокрупп и функциональных групп карбоновой кислоты, то стадия с) может предусматривать комбинацию реакций, т.е. реакцию или комбинацию описанных выше реакций, например, комбинацию реакции функциональных аминокрупп или части функциональных аминокрупп, например, с 5-норборнен-2-карбоновой кислотой, например, с использованием химии сочетания с карбодимидом, и реакции функциональных групп карбоновой кислоты или части этих функциональных групп карбоновой кислоты, например, с 5-норборнен-2-метиламином, например, посредством применения химии сочетания с карбодимидом. Если желатин содержит дополнительные первичные функциональные группы, то стадия с) может дополнительно предусматривать реакцию с участием этих дополнительных первичных функциональных групп или части этих дополнительных первичных функциональных групп.

В конкретном предпочтительном способе первичные функциональные группы желатина включают функциональные аминокруппы, и стадия b) предусматривает реакцию части этих функциональных аминокрупп, например, с метакриловым ангидридом, при этом стадия с) предусматривает реакцию части этих функциональных аминокрупп с 5-норборнен-2-карбоновой кислотой, или стадия с) предусматривает реакцию части таких функциональных аминокрупп с ангидридом карбоновой кислоты.

В другом особенно предпочтительном способе первичные функциональные группы желатина включают функциональные группы карбоновой кислоты, и стадия b) предусматривает реакцию с участием части этих функциональных групп карбоновой кислоты, при этом стадия с) предусматривает реакцию части этих функциональных групп карбоновой кислоты с 5-норборнен-2-метиламином.

В дополнительных особенно предпочтительных способах первичные функциональные группы желатина включают функциональные аминокруппы и функциональные группы карбоновой кислоты, и стадия b) предусматривает реакцию части этих функциональных аминокрупп, например, с метакриловым ангидридом, и реакцию части этих функциональных групп карбоновой кислоты, например, с 2-аминоэтилметакрилатом, при этом стадия с) предусматривает реакцию части функциональных аминокрупп с 5-норборнен-2-карбоновой кислотой, и реакцию части функциональных групп карбоновой кислоты с 5-норборнен-2-метиламином.

Дополнительный предпочтительный способ относится к способу получения бифункционального модифицированного коллагена. Для получения бифункционального модифицированного коллагена могут рассматриваться те же или подобные способы, как и для получения бифункционального модифицированного желатина.

В соответствии с третьим аспектом настоящего изобретения предусмотрен способ получения гидрогеля. Способ включает стадии:

а) получения бифункционального модифицированного полимера на основе биополимера, например, бифункционального модифицированного желатина или бифункционального модифицированного коллагена, как описано выше;

б) сшивания по меньшей мере части указанных n функциональных групп первого типа указанного бифункционального модифицированного полимера на основе биополимера посредством свободнорадикальной полимеризации с ростом цепи;

с) сшивания и/или функционализации по меньшей мере части указанных m функциональных групп второго типа.

Преимущество способа получения гидрогеля в соответствии с настоящим изобретением заключается в том, что бифункциональный модифицированный полимер на основе биополимера может быть сшит, как указано в стадии b), при этом сохраняя способность к сшиванию и/или способность к функционализации, как указано в стадии с).

Другое преимущество способа получения гидрогеля в соответствии с настоящим изобретением заключается в том, что сшивание можно осуществлять в отсутствие тиолированного сшивающего средства

с применением свободнорадикальной полимеризации с ростом цепи на стадии b). Тиол-еновые биополимеры или полимеры на основе биополимеров, например, тиол-енового желатина, напротив, требуют применения тиолированного сшивающего средства перед сшиванием.

Поскольку сшиваемый раствор в соответствии с настоящим изобретением не требует тиолированного сшивающего средства, сшиваемый раствор остается более стабильным по сравнению с тиол-еновыми сшиваемыми биополимерами, поскольку некоторые биополимеры (например, желатин) необходимо нагревать до более 30°C или даже до более 40°C для поддержания их в растворенном состоянии. При температурах выше 30°C образование дисульфидов может происходить при участии тиолированных сшивающих средств. Это считается существенным недостатком тиол-еновых сшиваемых биополимеров, поскольку образование дисульфидов снижает контроль над количеством прореагировавших функциональных групп в ходе сшивания и приводит к получению еще более слабых гидрогелей.

Дополнительным недостатком тиол-еновых сшиваемых биополимеров или полимеров на основе биополимеров является то, что количество сшивающих средств нужно рассчитывать точно для соответствия количеству еновых функциональных групп, которые должны быть сшиты.

В предпочтительном способе стадия b) включает сшивание в присутствии живых клеток, включая, например, стволовые клетки, клетки хрящевой ткани, фибробласты, Для этого получают суспензию клеток в растворе образца с последующим УФ-индуцированным сшиванием, тем самым не уничтожая суспендированные клетки. В результате можно получить равномерное распределение клеток в гидрогелях.

Стадия c) способа получения гидрогеля может предусматривать либо сшивание, либо функционализацию, или может включать комбинацию сшивания и функционализации посредством сшивания первой части m функциональных групп и посредством функционализации второй части m функциональных групп.

В частности, предпочтительный тип функционализации включает прививание, в частности, фотопрививание, например, с применением литографии и/или многофотонного вспомогательного фотопрививания (двухфотонной полимеризации).

Гидрогель в соответствии с настоящим изобретением обеспечивает, например, введение локальных зон повышенной прочности и/или зон повышенной жесткости контролируемым способом. Это может, например, достигаться посредством обеспечения набухания сшитого гидрогеля в растворе, содержащем полифункциональный тиол, с последующим локализованным прививанием.

Локализованное прививание можно осуществлять с применением либо фотомаски, либо многофотонной литографии, тем самым обеспечивая введение зон более плотного сшивания.

Кроме того, гидрогель обеспечивает локальное введение факторов роста или зон клеточной адгезии (например, последовательностей RGD).

Функционализация обеспечивает введение активных соединений, например, посредством ковалентной иммобилизации активного соединения с применением тиол-енового механизма. Активные соединения содержат, например, фармацевтические соединения, которые могут постепенно высвобождаться при деградации гидрогеля.

Кроме того, посредством прививания гидрофильных групп (например, PEG) или гидрофобных групп (например, 7-меркапто-4-метилкумарина) можно оказывать влияние на способность к поглощению воды.

Гидрогель (функционализированный) в соответствии с настоящим изобретением имеет особое значение для биомедицинских применений, например, тканевой инженерии. Гидрогель (функционализированный), например, адаптируют в качестве раневой повязки. m функциональных групп второго типа или часть m функциональных групп второго типа способны, кроме того, обеспечивать дополнительную функцию.

Сшиваемый раствор, получаемый из бифункционального модифицированного полимера в соответствии с настоящим изобретением, обладает высокой стабильностью также при повышенной температуре (выше 30°C или выше 40°C), бифункциональный модифицированный полимер подходит для 3D-печати. Это является важным преимуществом над гидрогелями, такими как, например, тиол-еновые гидрогели, известные из уровня техники, поскольку 3D-печать тиол-еновых гидрогелей является сложной из-за их ограниченной стабильности при повышенных температурах, что может оказывать влияние на свойства материала.

Краткое описание графических материалов

Настоящее изобретение будет рассмотрено более подробно ниже со ссылкой на прилагаемые графические материалы, в которых:

на фиг. 1 показаны динамический модуль упругости G' (сверху) и соотношение масса/набухание различных производных желатина (снизу) в состоянии набухания и равновесия (все гидрогели были сшиты при концентрации 10 вес/об.%) в присутствии 2 мол.% (относительно количества фотосшиваемых групп) фотоинициатора Li-TPO-L;

на фиг. 2 показаны изображения, полученные с помощью флуоресцентной микроскопии (слева), и изображения многофотонного вспомогательного прививания флуоресцентного 7-метил-4-

меркаптокумарина в грануле сшитого gel-MOD-NB при разных пространственно-временных уровнях энергии, полученные с помощью обычной оптической микроскопии (справа);

на фиг. 3 показана жизнеспособность клеток с применением разных концентраций желатина для разных производных желатина.

Описание вариантов осуществления

Настоящее изобретение будет описано в отношении конкретных вариантов осуществления и со ссылкой на определенные фигуры, но настоящее изобретение ими не ограничено, а ограничено только формулой изобретения.

Пример 1. Способ получения бифункционального желатина (gel-MOD-NB).

Материалы.

Применяли следующие химические вещества.

Желатин типа В, выделенный из тяжелого кожсырья посредством щелочной обработки, предоставленный Rousselot (Гент, Бельгия).

Метакриловый ангидрид, 5-норборнен-2-карбоновая кислота, 1-этил-3-(3-диметиламино)пропил)-карбодиимидгидрохлорид (EDC), D,L-дителиотреитол (DTT) от Sigma-Aldrich (Дигем, Бельгия).

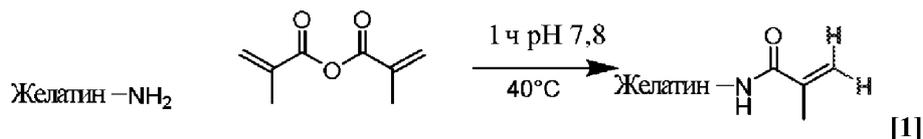
Диметилсульфоксид (DMSO) (99,85%) и N-гидрокси-сукцинимид (98%) (NHS), приобретенный у Acros (Гел, Бельгия).

Irgacure 2959 (1-[4-(2-гидроксиэтокси)-фенил]-2-гидрокси-2-метил-1-пропан-1-он) от BASF.

Диализные мембраны Spectra/por (MWCO 12-14 кДа) были получены от polyab (Антверпен, Бельгия).

Получение gel-MOD.

Gel-MOD с DS (степень замещения), составляющей 72%, синтезировали согласно протоколу, описанному в A.I. Van Den Bulcke, B. Bogdanov, N. De Rooze, E.H. Schacht, M. Cornelissen, и H. Berghmans, "Structural and Rheological Properties of Methacrylamide Modified Gelatin Hydrogels", vol. 1, № 1, с. 31-38, Март, 2000 г., и в соответствии со следующей реакцией:



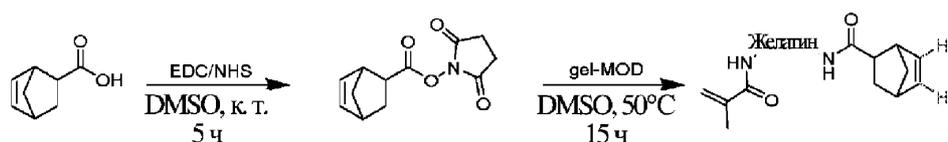
Вкратце, 100 г желатина типа В растворяли в 1 л фосфатного буфера (pH 7,8) при 40°C. После полного растворения добавляли 1 экв. метакрилового ангидрида относительно первичных аминов, присутствующих в боковых цепях(гидрокси-)лизина и орнитина, и энергично перемешивали смесь. После 1 ч смесь разбавляли с применением 1 л дважды дистиллированной воды (DDW) и пропускали через диализные мембраны (Spectra/por MWCO 12-14 кДа) в течение 24 ч относительно DDW. После диализа pH смеси доводили до 7,4 для более точной имитации природного ECM с применением NaOH и gel-MOD выделяли с применением лиофилизации (лиофилизатор Christ Alpha 2-4 LSC).

Получение Gel-MOD-NB.

Для получения 10 г gel-MOD-NB сначала активировали 5-норборнен-2-карбоновую кислоту до ее сукцинимидилового сложного эфира. Для этого сначала 1,6-кратный избыток 5-норборнен-2-карбоновой кислоты (638 мг, 4,62 ммоль) относительно добавляемого EDC растворяли в 50 мл сухого DMSO (полученного посредством вакуумной перегонки с применением CaH₂ в качестве высушивающего средства). После полного растворения добавляли 0,75 экв. EDC (555 мг, 2,9 ммоль) (относительно исходных первичных аминов, присутствующих в 10 г желатина, т.е. 0,38 ммоль/г желатина) и 1,5 экв. NHS (относительно EDC) с последующим дегазированием 3 раза. Реакцию осуществляли в течение по меньшей мере 25 ч для удаления любых непрореагировавших функциональных групп EDC, которые могут привести к сшиванию желатина в ходе следующей стадии реакции.

После 25 ч реакции 10 г gel-MOD с известным значением DS растворяли в 150 мл сухого DMSO (полученного посредством вакуумной перегонки с применением CaH₂ в качестве высушивающего средства) при 50°C в инертной атмосфере (Ar) при нагревании с обратным холодильником. После добавления установку дегазировали 3 раза и помещали в атмосферу аргона. После полного растворения полученную смесь с 5-норборнен-2-сукцинимидиловым сложным эфиром добавляли в раствор желатина с последующим дегазированием 3 раза. Обеспечивали осуществление реакции смеси при 50°C в инертной атмосфере и при нагревании с обратным холодильником в течение 5-20 ч.

После реакции смесь осаждали в десятикратном избытке ацетона, фильтровали через фильтровальную бумагу (VWR, размер пор: 12-15 мкм) с применением фильтра Бюхнера, растворяли в DDW и подвергали диализу (Spectra/por 4: MWCO 12-14 кДа) в течение 24 ч при 40°C относительно DDW. После диализа pH доводили до 7,4 с применением NaOH с последующим замораживанием и лиофилизацией (лиофилизатор Christ Alpha 2-4 LSC). Получение gel-MOD-NB проиллюстрировано с помощью реакции [2]:



[2]

Свойства Gel-MOD-NB.

На фиг. 1 показаны динамический модуль упругости G' (сверху) и соотношение масса/набухание различных производных желатина (снизу). Динамический модуль упругости G' соответствует динамическому модулю упругости 10 вес/об.% сшитого желатина в состоянии равновесного набухания после 30 мин сшивания (с применением 2 мол.% (относительно количества сшиваемых функциональных групп) Li-TPO-L в качестве фотоинициатора и 24 ч инкубации в milliQ для соответственно gel-MOD DS 72, gel-NB DS 90 + DTT (тиол/ен: 1), gel-MOD-NB DS 72 перед и после дополнительных 30 мин сшивания в присутствии 5 мМ DTT с последующим равновесным набуханием и gel-MOD DS 95.

Соотношение масса/набухание gel-MOD DS 72, gel-MOD DS 95 и gel-MOD-NB DS 72 показано на нижней панели фиг. 1.

После сшивания первых функциональных групп метакриламида и равновесного набухания производное gel-MOD-NB проявляет немного более высокую жесткость по сравнению с gel-MOD с подобным значением DS, хотя полимеризовались только метакриламиды. Хотя авторы настоящего изобретения не желают ограничиваться какой-либо теорией, ожидается, что данное улучшение механических свойств является следствием наличия гидрофобных функциональных групп норборнена, что приводит к снижению способности к поглощению воды гелем по сравнению с нормальным gel-MOD, как показано на фиг. 1.

Кроме того, необходимо отметить, что gel-MOD-NB проявляет большую жесткость по сравнению с полностью сшитым gel-NB с большей степенью замещения (например, 90%). Дополнительно, механические свойства gel-MOD-NB находятся в диапазоне таковых для gel-MOD с подобным значением DS, но ниже жесткости gel-MOD, который полностью функционализирован (см. фиг. 1). Кроме того, в качестве доказательства концепции бифункциональной природы дополнительная жесткость может вводиться после УФ-облучения в присутствии DTT после равновесного набухания, что является преимуществом при тиол-еновом фотопрививании (см. фиг. 1). Однако все еще низкие механические свойства являются следствием природы образованных дополнительных сшивок, поскольку тиол-еновое сшивание приводит к получению более гомогенной сети, характеризующейся более низкой плотностью сшивок по сравнению с традиционными гидрогелями, полученными посредством полимеризации с ростом цепи.

На фиг. 2 показаны результаты вспомогательного фотопрививания с использованием двухфотонной полимеризации флуоресцентного 7-метил-4-меркаптокумарина внутри гранулы сшитого бифункционального модифицированного желатина (gel-MOD-NB) в соответствии с настоящим изобретением при разных пространственно-временных уровнях энергии, с получением преимущества от функциональных групп норборнена.

На левом изображении на фиг. 2 показаны изображения, полученные с помощью флуоресцентной микроскопии. На данных изображениях отмечено присутствие кумарина с высокой степенью пространственно-временного контроля.

На правом изображении на фиг. 2 показаны изображения, полученные с помощью обычной микроскопии, где прививание кумарина приводит к локальному сокращению, приводящему к наблюдаемой разнице в показателе преломления. Нужно отметить, что несмотря на то, что не наблюдается разницы в показателе преломления при всех значениях скорости записи при низкой мощности лазера (например, 25 мВт), флуоресцентная микроскопия четко указывает на успешное прививание соединения.

Из представленного на фиг. 2 (левое и правое изображение) можно установить, что бифункциональный модифицированный желатин (gel-MOD-NB) обеспечивает прививание после получения с высокой степенью пространственно-временного контроля, что доказывает, что функциональные группы норборнена не затронуты на начальной стадии сшивания.

Нужно отметить, что при высоких уровнях энергии прививание менее успешно вследствие локального избыточного воздействия, что приводит к удалению части материала.

На фиг. 3 показана метаболическая активность, измеренная на стволовых клетках, полученных из конфлюентной жировой ткани с применением анализа PrestoBlue после 2 ч в присутствии различных предшественников и после 24 ч восстановления при отсутствии различных предшественников. Для этого сначала получали конфлюентный монослой меченых с помощью GFP стволовых клеток, полученных из конфлюентной жировой ткани, (пассаж 17) посредством высевания 100 мкл суспензии клеток в количестве 2 млн клеток/мл среды на 96 лунок. Далее обеспечивали достижение конфлюентности клеток после 24 ч инкубации. Далее 100 мкл раствора, содержащего предшественник гидрогеля, помещали сверху с последующей инкубацией еще 2 ч. После 24 ч инкубации измеряли метаболическую активность с применением анализа PrestoBlue, после чего материал удаляли из лунок планшета. После еще 24 ч инкубации метаболическую активность измеряли с применением анализа PrestoBlue в качестве по-

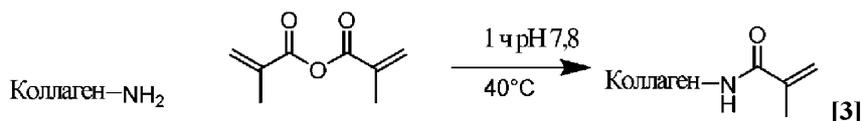
казателя индуцированного повреждения клеток во время первых 2 ч инкубации в присутствии предшественника гидрогеля.

На фиг. 3 указано, что бифункциональный модифицированный желатин в соответствии с настоящим изобретением (gel-MOD-NB) проявляет цитотоксичность, сравнимую с gel-MOD, который может рассматриваться как один из золотых стандартов в тканевой инженерии и регенеративной медицине. Кроме того, в целом обеспечивается более высокая жизнеспособность клеток по сравнению с gel-NB, который традиционно считается цитосовместимым в литературе.

Пример 2. Способ получения бифункционального коллагена (col-MOD-NB).

Получение col-MOD.

Col-MOD синтезировали посредством адаптации протокола, описанного в A.I. Van Den Bulcke, B. Bogdanov, N. De Rooze, E. H. Schacht, M. Cornelissen, и H. Berghmans, "Structural and Rheological Properties of Methacrylamide Modified Gelatin Hydrogels", vol. 1, № 1, с. 31-38, Март, 2000 г., и в соответствии со следующей реакцией:



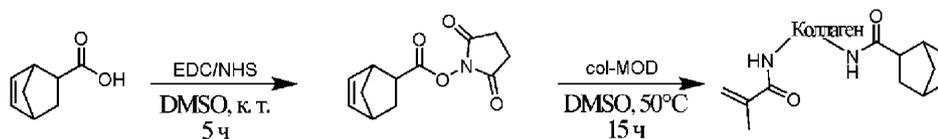
Вкратце, 100 г коллагена растворяли в 1 л фосфатного буфера (pH 7,8) при 40°C. После полного растворения добавляли 1, 2 или 5 экв. метакрилового ангидрида относительно первичных аминов, присутствующих в боковых цепях (гидрокси-)лизина, и энергично перемешивали смесь. После 1 ч смесь разбавляли с применением 1 л дважды дистиллированной воды (DDW) и пропускали через диализные мембраны (Spectra/por MWCO 12-14 кДа) в течение 24 ч относительно DDW. После диализа pH смеси доводили до 7,4 для более точной имитации природного ECM с применением NaOH и col-MOD выделяли с применением лиофилизации (лиофилизатор Christ Alpha 2-4 LSC).

Получение col-MOD-NB.

Для получения 10 г col-MOD-NB сначала активировали 5-норборнен-2-карбоновую кислоту до ее сукцинимидилового сложного эфира. Для этого сначала 1,6-кратный избыток 5-норборнен-2-карбоновой кислоты относительно добавляемого EDC растворяли в 50 мл сухого DMSO (полученного посредством вакуумной перегонки с применением CaH₂ в качестве высушивающего средства). После полного растворения добавляли 0,75 экв. EDC (относительно исходных первичных аминов, присутствующих в 10 г коллагена) и 1,5 экв. NHS (относительно EDC) с последующим дегазированием 3 раза. Реакцию осуществляли в течение по меньшей мере 25 ч для удаления любых непрореагировавших функциональных групп EDC, которые могут привести к сшиванию коллагена в ходе следующей стадии реакции.

После 25 ч реакции 10 г col-MOD с известным значением DS растворяли в 150 мл сухого DMSO (полученного посредством вакуумной перегонки с применением CaH₂ в качестве высушивающего средства) при 50°C в инертной атмосфере (Ar) при нагревании с обратным холодильником. После добавления установку дегазировали 3 раза и помещали в атмосферу аргона. После полного растворения полученную смесь с 5-норборнен-2-сукцинимидиловым сложным эфиром добавляли в раствор коллагена с последующим дегазированием 3 раза. Обеспечивали осуществление реакции смеси при 50°C в инертной атмосфере и при нагревании с обратным холодильником в течение 5-20 ч.

После реакции смесь осаждали в десятикратном избытке ацетона, фильтровали через фильтровальную бумагу (VWR, размер пор: 12-15 мкм) с применением фильтра Бюхнера, растворяли в DDW и подвергали диализу (Spectra/por 4: MWCO 12-14 кДа) в течение 24 ч при 40°C относительно DDW. После диализа pH доводили до 7,4 с применением NaOH с последующим замораживанием и лиофилизацией (лиофилизатор Christ Alpha 2-4 LSC). Получение col-MOD-NB проиллюстрировано с помощью реакции [4]:



ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Бифункциональный модифицированный полимер на основе биополимера, содержащий по меньшей мере одну полимерную цепь, при этом по меньшей мере одна указанная полимерная цепь содержит *n* функциональных групп первого типа и *m* функциональных групп второго типа, при этом *n* и *m* не равняются нулю, причем указанные функциональные группы первого типа включают группы, способные к сшиванию по радикальному механизму после свободнорадикальной полимеризации с ростом цепи, и

указанные функциональные группы второго типа включают группы, способные к тиол-еновому сшиванию, при этом указанные функциональные группы второго типа остаются непрореагировавшими во время свободнорадикальной полимеризации с ростом цепи указанных функциональных групп первого типа; где указанные функциональные группы первого типа включают функциональные группы метакриламида и/или метакрилата и указанные функциональные группы второго типа включают функциональные группы норборнена.

2. Бифункциональный модифицированный полимер на основе биополимера по п.1, где указанный полимер на основе биополимера выбран из группы, состоящей из полипептидов, белков, полисахаридов, нуклеиновых кислот, желатинов, коллагенов, альгинатов, декстранов, агарозы, гликозаминогликанов, хитозанов и каррагинанов.

3. Бифункциональный модифицированный полимер на основе биополимера по п.1 или 2, где указанный полимер на основе биополимера содержит одну полимерную цепь.

4. Способ получения бифункционального модифицированного полимера на основе биополимера по любому из пп.1-3, при этом указанный способ включает стадии:

а) получения биополимера на основе биополимера, содержащего по меньшей мере одну полимерную цепь, содержащую первичные функциональные группы;

б) функционализации первой части указанных первичных функциональных групп с введением n функциональных групп первого типа, при этом n не равняется нулю, причем указанные функциональные группы первого типа способны к сшиванию по радикальному механизму после свободнорадикальной полимеризации с ростом цепи;

в) функционализации второй части указанных первичных функциональных групп с введением m функциональных групп второго типа, при этом m не равняется нулю, причем указанные функциональные группы второго типа включают способные к тиол-еновому сшиванию группы, при этом указанные функциональные группы второго типа остаются непрореагировавшими во время свободнорадикальной полимеризации с ростом цепи указанных функциональных групп первого типа;

где стадию б) и стадию в) могут осуществлять одновременно или где стадию б) могут осуществлять до или после стадии в).

5. Способ по п.4, где указанные первичные функциональные группы содержат функциональные аминогруппы, и/или функциональные группы карбоновой кислоты, и/или гидроксильные функциональные группы, и стадия в) предусматривает реакцию с участием указанных функциональных аминогрупп, и/или реакцию с участием указанных функциональных групп карбоновой кислоты, и/или реакцию с участием указанных гидроксильных функциональных групп.

6. Способ по п.4 или 5, где указанные первичные функциональные группы включают функциональные аминогруппы, и/или функциональные группы карбоновой кислоты, и/или гидроксильные функциональные группы, и стадия в) предусматривает реакцию с участием указанных функциональных аминогрупп, и/или реакцию с участием указанных функциональных групп карбоновой кислоты, и/или реакцию с участием указанных гидроксильных функциональных групп.

7. Способ по п.6, где для осуществления указанной реакции с участием указанных функциональных аминогрупп, и/или указанной реакции с участием указанных функциональных групп карбоновой кислоты, и/или указанной реакции с участием указанных гидроксильных функциональных групп применяют химию сочетания с карбодимидом.

8. Способ получения гидрогеля, при этом указанный способ включает стадии:

а) получения бифункционального модифицированного полимера на основе биополимера по любому из пп.1-3,

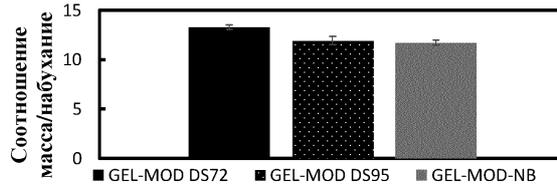
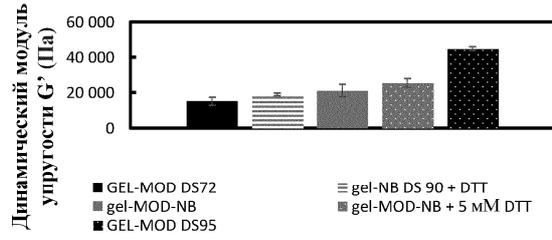
б) сшивания по меньшей мере части указанных n функциональных групп первого типа указанного бифункционального модифицированного полимера на основе биополимера посредством свободнорадикальной полимеризации с ростом цепи,

в) сшивания и/или прививания по меньшей мере части указанных m функциональных групп второго типа.

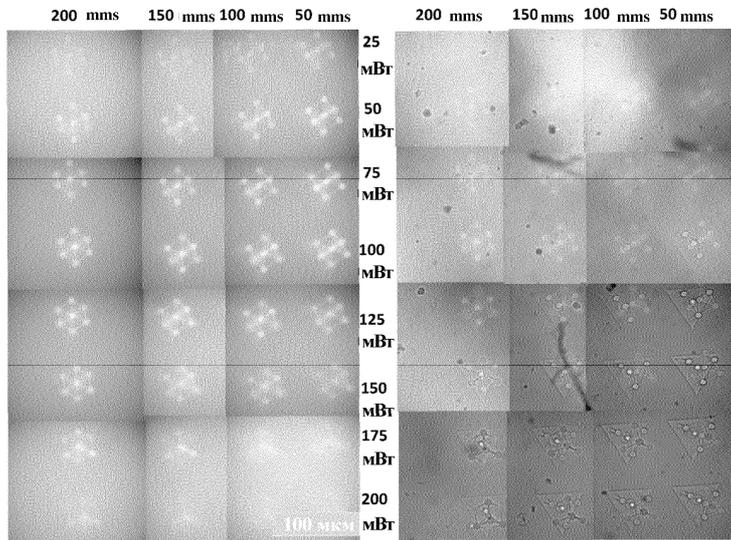
9. Способ по п.8, где стадия в) предусматривает сшивание по меньшей мере части указанных m функциональных групп второго типа.

10. Способ по п.8, где стадия в) предусматривает прививание по меньшей мере части указанных m функциональных групп.

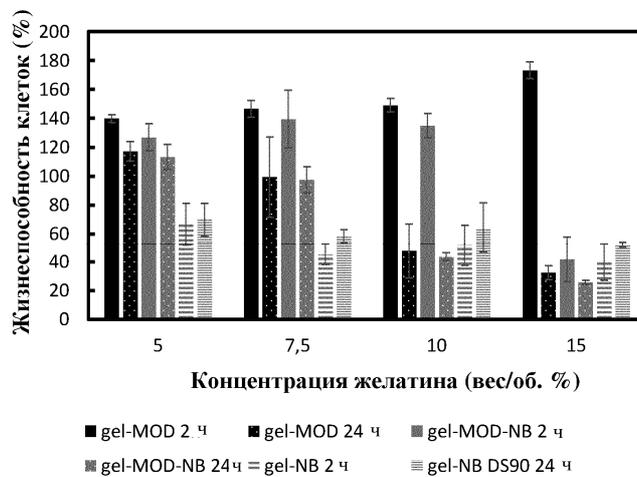
11. Способ по п.8, где стадия в) предусматривает сшивание первой части указанных m функциональных групп и прививание второй части указанных m функциональных групп.



Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3

