



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101868298 A

(43) 申请公布日 2010. 10. 20

(21) 申请号 200880106169. 8

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2008. 07. 07

B01J 13/14(2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 9/52(2006. 01)

60/948, 336 2007. 07. 06 US

A61K 9/50(2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 03. 01

(86) PCT申请的申请数据

PCT/CN2008/001277 2008. 07. 07

(87) PCT申请的公布数据

W02009/006792 EN 2009. 01. 15

(71) 申请人 香港大学

地址 中国香港薄扶林道

(72) 发明人 陈佩 陈卓铭 苏国辉

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

司 72001

代理人 吴娟 李炳爱

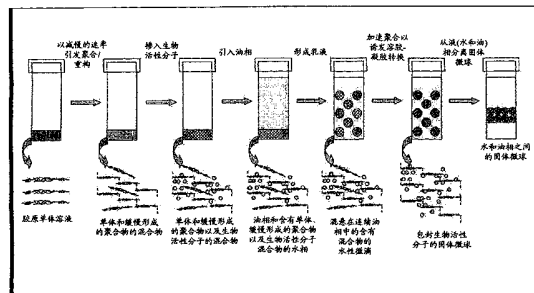
权利要求书 2 页 说明书 12 页 附图 9 页

(54) 发明名称

基于胶原的微球及其制备方法和用途

(57) 摘要

本发明开发了用于药物递送的包含生物活性分子的 ECM 微粒的制备方法,其使用改进的乳化方法或油包水相分离方法。将微球光化学交联来控制生物活性分子的释放,以期更好的药物递送而不损害交联结构的生物相容性。该方法使用温和的生产条件和简单的工艺,没有植入后可能导致细胞毒性和钙化的有毒化学交联试剂,没有可能降低药物利用度和生物活性的有机溶剂,并且没有剧烈搅拌作用,该作用可使材料碎裂致使形状和机械稳定性差,从而使乳液不稳定。由此产生的微粒或微球有受控的大小、受控的释放、高生物相容性,并可用于药物递送和细胞培养。



1. 制备基于天然细胞外基质的微球的方法,其包含  
提供一种或多种天然细胞外基质组分的水溶液;  
引发所述基质组分的溶胶-凝胶转换,以形成水凝胶混合物;  
使所述溶胶-凝胶转换过程减速;  
将治疗、预防或诊断分子掺入所述水凝胶混合物中;  
采用搅拌混合所述水凝胶混合物与油相,形成油包水乳液;  
加速所述溶胶-凝胶转换过程;以及  
从所述油相和水相分离所述固体微球。
2. 权利要求1的方法,其进一步包括光化学交联所述微球,以降低所述分子从所述微球的突释效应或控制所述分子从所述微球的释放。
3. 权利要求2的方法,其包括用光敏试剂平衡所述微球;和  
以有效地交联一些或所有所述细胞外基质组分的一段时间使用光源辐照所述微球。
4. 权利要求1的方法,其进一步包括使所述微球脱水。
5. 权利要求4的方法,其中通过浸没在乙醇或丙三醇中来将所述微球脱水。
6. 权利要求1的方法,其中所述天然细胞外基质选自胶原蛋白、明胶、蛋白多糖、透明质酸和弹性蛋白。
7. 权利要求1的方法,其中所述细胞外基质溶液含有单体或溶解状态的细胞外基质组分。
8. 权利要求6的方法,其中所述细胞外基质组分是胶原蛋白 I、II、III 型或其混合物。
9. 权利要求1的方法,其中所述溶胶-凝胶转换由聚合、沉淀或聚集引发。
10. 权利要求9的方法,其中根据所述基质组分的溶胶-凝胶转换特性,通过控制 pH、温度或离子强度而引发所述溶胶-凝胶转换。
11. 权利要求10的方法,其中通过增加 pH 或离子强度或温度,例如 37°C,来引发酸溶胶原的溶胶-凝胶转换。
12. 权利要求1的方法,其中在引发所述溶胶-凝胶转换后使所述基质组分的溶胶-凝胶转换减速。
13. 权利要求12的方法,其中通过控制所述基质组分混合物的 pH、温度、离子强度或动力学运动而使所述基质组分的溶胶-凝胶转换减速。
14. 权利要求1的方法,其中将所述水凝胶混合物与所述油相混合形成乳液,而不使所述凝胶混合物破裂且不干扰所述溶胶-凝胶转换过程。
15. 权利要求1的方法,其中乳液形成后,使所述溶胶-凝胶转换加速。
16. 权利要求2的方法,其中所述光源是在  $0.0001\text{W}/\text{cm}^2$  至  $10\text{W}/\text{cm}^2$ 、优选  $0.2\text{W}/\text{cm}^2$  的辐照度变化下运行的 UV 或可见光源,并且  
其中所述辐照能量变化为  $0.0001\text{J}$  至  $10000\text{J}$ , 优选  $25\text{J}$ , 进行辐照的时间的变化为 3 秒至 100 小时, 优选 60 秒。
17. 通过权利要求1的方法形成的微球群。
18. 权利要求17的群,其中所述微球大小分布变化为 5 至 2000 微米。
19. 权利要求17的群,其中与非光化学交联的微球相比,所述光化学交联的微球以显著降低的初始突释效应释放所掺入的分子。

20. 权利要求 17 的群,其中与非光化学交联的微球相比,所述光化学交联的微球以显著降低的速率释放所掺入的生物活性分子。

21. 权利要求 17 的群,其中所述光化学交联的微球以一级释放动力学释放所掺入的分子。

22. 权利要求 17 的群,其中与非光化学交联的微球相比,所述光化学交联的微球在所述基质中保留更多的生物活性分子。

23. 权利要求 17 的群,其中在光化学交联的微球中,所掺入的生物活性分子保留其生物活性。

24. 形成用于组织工程学的结构的权利要求 17 的群。

## 基于胶原的微球及其制备方法和用途

### 发明领域

[0001] 本申请通常涉及由提供控释和所需机械特性的细胞外基质材料形成的微粒,及其制备方法和用途。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求 2007 年 7 月 6 日提交的 U. S. S. N. 60/948, 336 的权益和优先权,并且是 2005 年 9 月 14 日提交的 U. S. S. N. 11/225, 108 的接续专利, U. S. S. N. 11/225, 108 要求 2004 年 9 月 14 日提交的 U. S. S. N. 60/609, 600 的权益和优先权。以上所列的申请中的公开在此引作参考。

[0004] 发明背景

[0005] 基于微球的药物递送体系由于其注射能力以及在控制所装载药物释放方式上的多用性,所以是有利的 (Sinha 和 Trehan, *J. Control. Release*, 90(3) :261-80(2003))。这就减少了多次注射的侵害。生物相容性和生物降解性对于选择药物载体而言是必要标准。如聚乳酸和聚乙醇酸的合成聚合物,以及如壳聚糖和藻酸盐的天然聚合物均可用来制备用于药物递送的微球 (Sinha 和 Trehan, *J. Control. Release*, 90(3) :261-80(2003))。由于已经用作缝合材料多年,所以聚乳酸-羟基乙酸 (PLGA) 微球在此领域占主导地位 (Pean 等, *J. Control. Release*, 56(1-3) :175-87(1998) ;Sinha 和 Trehan, *J. Control. Release*, 90(3) :261-80(2003) ;Jiang 等, *Adv. Drug Deliv. Rev.* ,57(3) :391-410(2005))。但是,作为聚酯,PLGA 有不可避免的固有缺点 (Sinha 和 Trehan, *J. Control. Release*, 90(3) :261-80(2003)),例如由于蛋白在疏水 PLGA 基质中有限的溶解性和稳定性所导致的低蛋白聚合物相容性,以及可破坏细胞并使蛋白变性的在局部受伤部位降解产物的极端酸性。通常由双乳化技术制备的 PLGA 微球往往显示低包封效率,并且包封蛋白生物活性保留差。以前的报告已证实,早在 48 小时时,就有神经生长因子 (“NGF”) 释放的高突释效应和生物活性损失 (Pean 等, *J. Control. Release*, 56(1-3) :175-87(1998) ;Hadlock 等, *J. Reconstr. Microsurg.* ,19(3) :179-84 ;discussion 185-6(2003))。除了蛋白药物的不稳定性外,高初始突发的和不完全的释放也影响基于微球的药物递送系统的效率 (Yeo 和 Park, *Arch. Pharm. Res.* ,27(1) :1-12(2004))。

[0006] 已经报道了旨在改进初始快速损失的策略,其使用提高蛋白在整个聚合物基质分布的方法 (Fu 等, *J. Pharm. Sci.* ,92(8) :1582-91(2003))。聚合、乳化、喷雾干燥和溶剂提取或这些工艺的组合是通常使用的制备聚合物微球的方法 (Freiberg 和 Zhu, *Int. J. Pharm.* ,282(1-2) :1-18(2004))。Seo 等的美国专利号 6,630,156 公开了通过乳化并随后溶剂提取来制备掺入生理活性分子的聚合物微球的方法。这些方法涉及使用有机溶剂、乳化稳定剂和剧烈搅拌。这些产生能对许多药物、特别是蛋白的构象和生物的完整性施加破坏作用的化学和机械应力 (Yeo 和 Park, *Arch. Pharm. Res.* ,27(1) :1-12(2004))。此外,降解的聚合物中的酸性和疏水微环境能够进一步破坏装载的药物 (Freiberg 和 Zhu, *Int. J. Pharm.* ,282(1-2) :1-18(2004))。

[0007] 天然细胞外基质,如胶原蛋白具有良好的生物相容性和可忽略的免疫原性 (Sano

等, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 31(3) :247-266 (1998) ;Lee 等 2001), 以及极佳的蛋白相容性。因此, 它们是非常好的蛋白递送装置的候选物。这些材料提供了稳定蛋白并增强或提高蛋白药物如生长因子活性的天然细胞外环境 (Lee 等, *Int. J. Pharm.*, 221(1-2) :1-22 (2001) ;Jones 等, *J. Physiol.*, 533(1) :83-9 (2001) ;Milev 等, *J. Biol. Chem.*, 273(34) :21439-42 (1998))。此外, 在不产生局部损伤或炎症的中性 pH 下, 这些材料的降解产生天然存在的单体。此外, 这些材料促进细胞黏着、附着和生长, 其可有助于有效传递调节细胞活性的信号。但是, 因为这些天然细胞外基质生物材料的空间和机械稳定性差, 以及迅速溶胀的特性, 所以它们作为药物递送装置的发展不及聚合物的进展 (Yannas 等 IV. Natural materials. In :Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE, editors. *Biomaterials Sciences-Anintroduction to materials in medicine*. California : Academic Press, 1996 :84-93)。这是因为大多数微球制造方法需要可使这些材料破碎的剧烈混合 (Freiberg 和 Zhu, *Int. J. Pharm.*, 282(1-2) :1-18 (2004))。因此, 使用这些材料制造微球几乎是不可能的, 除非已经使用化学交联。然而, 与残留化学交联剂有关的毒性阻碍了其在药物递送方面的使用 (Sinha 和 Trehan, *J. Control. Release*, 90(3) :261-80 (2003))。Yang 和 Mark 提出的美国专利申请 20060222680 公开了制备化学交联胶原微球的方法。使用戊二醛的化学交联在交联具有增强的机械和形状稳定性的聚合物方面是有效的。然而, 它损害了交联结构的生物相容性, 因为有毒的残余化学品和降解产物诱导细胞毒性和钙化 (Simmons 等, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 17(Pt 1) :23-9 (1993))。

[0008] 药物从基质载体释放是由扩散或降解或在许多情况下这二者的组合控制的。包括药物、基质和环境因素的许多制剂参数影响初始突释和释放速率 (Yeo 和 Park, *Arch. Pharm. Res.*, 27(1) :1-12 (2004))。诸如药物连续相中的表面电荷、疏水性、装载和溶解性的药物因素可能影响药物和基质间相互作用, 并因此影响初始突释和释放速率。诸如基质的亲水性、浓度、孔隙度、密度、筛目大小和溶胀性能的基质因素也影响药物和基质间相互作用, 因此影响初始突释和释放速率。

[0009] 因此, 本发明的目的是提供由 ECM 材料形成的微粒及其制造方法和用途, 所述材料提供生物活性材料的控释并具有理想机械特性。

[0010] 本发明另一目标是提供与生物活性材料、尤其是肽、多肽和蛋白呈高相容性的 ECM 材料所形成的微粒。

[0011] 本发明的又一目标是提供无需剧烈搅拌或有机溶剂的简单、温和且无毒的制备方法。

[0012] 发明概述

[0013] 掺入用于药物递送和 / 或组织工程学的生物活性分子的 ECM 微球的制备方法已得以发展, 其采用改进的乳化方法或油包水相分离方法。将所述微球光化学交联, 以为了用于更好的药物递送而控制生物活性分子的释放, 并不损害交联结构生物相容性地形成结构。该方法使用温和制备条件和简单工艺, 没有植入后可能导致细胞毒性和钙化的有毒化学交联试剂, 没有可能降低药物利用度和生物活性的有机溶剂, 并且没有剧烈搅拌作用, 该作用可能使材料碎裂致使形状和机械稳定性差, 从而破坏乳化。由此得到的微粒或微球有受控的大小、受控的释放、高生物相容性, 并可用于药物递送和细胞培养。

## 附图说明

[0014] 图 1 是显示使用本文公开的方法制备微球的过程的流程图。

[0015] 图 2 是显示微球的光化学交联方法的流程图。

[0016] 图 3 是显示具有 1% **TWEEN®** 20 (-◆-) 或不具有 **TWEEN®** 20 (-■-) 的微球大小分布的线图。将大小分布以微球比例 (百分比) 作为大小 (微米) 的函数来作图。

[0017] 图 4 是显示 BSA 的控释以及降低的突释效应 (包封的 BSA 的百分比) 的线图, 其得自具有 (-■-) 或不具有 (-◆-) 0.01% 光交联剂 (“PC”) 玫瑰红 (“RB”) 的微球。将 BSA 从微球释放的速率以释放的包封 BSA (百分比) 作为时间 (小时) 的函数来作图。

[0018] 图 5 是 BSA 释放方式的 RB 的剂量依赖性的线图。RB 的检测浓度为 0% (-◆-)、0.01% (-▲-)、0.001% (-x-)、0.0001% (-\*-)、0.00001% (-■-) 和 0.000001% (-+-)。将 BSA 从微球的释放以 BSA 浓度 / 微克对时间 (小时) 作图。

[0019] 图 6 是显示具有以及不具有 PC 的微球的控释和降低的突释效应的线图。RB 的检测浓度为 0% (-◆-)、0.01% (-■-)、0.001% (-▲-) 和 0.0001% (-x-)。将 BSA 从微球的释放以 BSA 的释放量 (微克) 作为时间 (小时) 的函数来作图。

[0020] 图 7 是显示神经生长因子 (NGF) 生物活性作为 NGF 浓度 (ng/ml) 的函数的标准曲线的线图。使用 1.5626、3.125、6.25、12.5 和 25ng/ml 的 NGF, 以具有生长超过一个体长的神经突的 PC12 细胞的比例来测量 NGF 生物活性。每组中计算超过 100 个细胞。

[0021] 图 8 是显示将包封效率的控制 (百分比) 作为蛋白装载量 (1000、500、100 和 75 微克) 的函数的柱状图。

[0022] 图 9 是显示具有或不具有光化学交联的胶原微球中 NGF 的分布百分比的柱状图 (n = 5)。

[0023] 发明详述

[0024] I. 定义

[0025] 本文使用的细胞外基质 (“ECM”) 指细胞产生并分泌到周围环境中的任何材料, 但通常适用于动物组织的非细胞部分。结缔组织 ECM 尤其广泛, ECM 的性质决定了组织的特性。从广义上讲有三个主要组成部分: 纤维成分 (尤其是胶原蛋白、弹性蛋白或网硬蛋白)、连接蛋白 (如纤维连接蛋白、层粘连蛋白) 以及空间填充分子 (通常是氨基多糖)。

[0026] 本文使用的“微粒”包括微球 (通常为球形) 和微囊 (通常为球形空心) 以及不规则形状的颗粒, 典型的直径范围为 0.5 至小于 1000 微米。

[0027] II. 制备方法

[0028] 如图 1 所示, 制备胶原以及胶原和其它细胞外基质组分混合物的微球的方法, 包括以下步骤:

[0029] (1) 提供胶原单体或胶原单体和其它天然细胞外基质组分混合物的溶液;

[0030] (2) 引发胶原的溶胶-凝胶转换或胶原和其它基质组分的沉淀;

[0031] (3) 使溶胶-凝胶转换或沉淀过程减速适当的一段时间;

[0032] (4) 在适当的时间将一种或多种生物活性分子掺入水凝胶混合物中;

[0033] (5) 在有或没有表面活性剂的存在下, 将水相与粘度适当的油相以适当的搅动速率混合适当的时间;

[0034] (6) 在适当的一段时间后加速溶胶-凝胶转换或沉淀过程;

[0035] (7) 通过如在适当速率下离心混合物的方法,从由油相和水相组成的液相分离固体微球。

[0036] 虽然参照微粒进行描述,但可形成其它结构,和 / 或可以将微粒形成入诸如包衣的其它结构中,包封或掺入其它起粘合剂作用的材料中,例如用作组织工程基质。

[0037] A. 材料

[0038] 1. ECM 材料

[0039] 天然细胞外基质组分包括但不限于诸如 I、II 和 III 型的不同表型的胶原、变性胶原明胶、蛋白多糖、透明质酸、弹性蛋白,其是从天然存在的来源如人或动物组织提取的或是合成的。这些可使用公开的方法获得,或从任何几个供应商处购买。在某些特定条件下,一些诸如胶原、明胶和透明质酸的细胞外基质组分可被诱发进行溶胶-凝胶转换,而在其它特定条件下,其他诸如胶原和 GAGs(氨基多糖)的天然细胞外基质组分彼此共同沉淀。

[0040] 在优选实施方案中,细胞外基质是胶原 I 型、II 型、III 型或其混合物。这可能是人或动物或合成来源的。在一个实施方案中,胶原来自大鼠尾巴、牛跟腱、猪皮或人类胎盘,以及来自提取胶原的不同级分,例如酸溶性级分、经胃蛋白酶消化的级分和不溶性级分。在另一实施方案中,蛋白多糖来自鲨鱼软骨。胶原单体可来自自由动物来源提取的胶原级分,如酸溶性级分、经胃蛋白酶消化的级分或不溶性级分。

[0041] 2. 生物活性材料

[0042] 任何治疗、预防或诊断材料可掺入微球。这些可能是蛋白或肽,糖和多糖,脂或其缀合物或复合物,如 DNA、RNA 或其复合物的核酸,或其他无机或有机分子,例如抗生素、化疗药物等。

[0043] 微球使用尤其适合包封蛋白质生物活性材料的温和制备条件制备。在一个实施方案中,包封的治疗、预防或诊断材料是肽、多肽或蛋白。优选的材料包括生长因子,例如但不限于细胞因子和生长因子,例如神经生长因子(NGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、血小板源性生长因子(PDGF)、转换生长因子  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 和胰岛素样生长因子 I(IGF-I)。这些因子因素通常是水溶性的并会与胶凝混合物彻底混合,这样乳化过程中形成的任何微滴会含有均匀分布的因子。稳定这些生物活性因子的分子也可包括在内,如稳定 NGF 的牛血清白蛋白("BSA")或人血清白蛋白("HSA")。

[0044] 3. 油、表面活性剂和其它乳化剂

[0045] 油相通常包括如橄榄油或玉米油的植物油、如石蜡油的有机油、如硅油的合成油或不同油的混合物,其取决于胶凝混合物的粘度,例如石蜡油体积比在 1 : 1 至 1 : 100 之间,优选 1 : 6 至 1 : 10。

[0046] 溶液应该优选具有 1-1000mPas(单位毫帕斯卡秒)的粘度,最优选 20-100mPas。本文提及的体积比是 ECM 组分(胶原)-生物活性蛋白混合物与油的体积比。

[0047] 表面活性剂可加到水溶液或油的二者之一或两者中。优选的表面活性剂是 **TWEEN®** 20 或 180、SDS 或 **TRITON®** X-100,最优选 **TWEEN®** 20,加至液体混合物的 0.1%、1%、10%、20%,优选 10%。

[0048] B. 反应条件

[0049] 1. 提供胶原单体或胶原单体与其他天然细胞外基质组分混合物的溶液。

[0050] ECM 材料以单体的水溶液提供,优选 0.5-30mg/ml,更优选 7mg/ml。酸可溶性胶原

的 pH 为约 3。通常不需要分散剂或缓冲剂。胶原水溶液通常用诸如 0.02N 乙酸的酸性溶液调至酸性 pH。

[0051] 2. 引发胶原的溶胶 - 凝胶转换或胶原和其它基质组分的沉淀。

[0052] 溶胶 - 凝胶转换或沉淀过程通常由化学和 / 或物理反应引发。在一个实施方案中, 通过提高 pH (例如加入氢氧化钠或碳酸氢钠)、增加离子强度或温度, 引发胶原单体以聚合或重构形成原生纤维。在另一实施方案中, 胶原单体与 GAGs 混合, 沉淀通过机械作用例如搅拌、涡旋、搅动、旋转引发。在另一实施方案中, 酸溶性胶原 I 型和 II 型混合物的溶胶 - 凝胶转换是通过使用碱提高混合物的 pH 引发, 所述碱为例如氢氧化钠或碳酸氢钠或氢氧化胺, 优选 pH 为 4 至 14, 最优选 8 至 14。在另一实施方案中, 通过提高溶液温度引发胶原单体或与其它 EMC 组分混合的胶原单体来聚合或重构为原生纤维。

[0053] 3. 使溶胶 - 凝胶转换或沉淀过程减速适当的一段时间。

[0054] 这些天然的细胞外基质组分在聚合、溶胶 - 凝胶转换和沉淀过程中固化, 直到该过程完成或直到一段时间后达到平衡。这些组分完全固化前, 通过控制相同的或另一参数, 使混合物经历聚合或沉淀过程减慢甚至暂时受抑制的状态。该步骤是为了将生物活性分子掺入混合物中以及形成乳液。

[0055] 使过程减速的方法包括使温度保持尽可能低, 例如在 2-25°C 之间、最优选 4°C 以下但高于 0°C。其他方法包括调节 pH 至低于 7, 例如 4, 或降低溶液离子强度, 例如通过使用 0.1X PBS。

[0056] 在一个实施方案中, 胶原胶凝混合物经历更低温度 (例如 4°C) 的环境。在另一实施方案中, 胶原和 GAGs 混合物经历无机械干扰的环境。在另一实施方案中, 在溶胶 - 凝胶转换重新开始前的整个其它步骤中, 基质组分的溶胶 - 凝胶转换在 0、1、10 或 60 秒, 3、5、10 或 60 分钟, 2、4、8 或 24 小时, 或 2、4、7 或 14 天时减慢。在优选实施方案中, 溶胶 - 凝胶转换在 15 分钟时减慢。

[0057] 4. 在适当的时间将一种或多种生物活性分子掺入水胶凝混合物。

[0058] 单个或多个生物活性分子可以以液体或粉末掺入混合物。添加生物活性分子至治疗有效浓度。在许多情况下, 如对于大多数蛋白生长因子, 这些都是在皮克至纳克水平有效。生物活性材料也可能以毫克水平掺入。这些通常均匀地分散, 尤其在分子是水溶性的情况下。

[0059] 5. 在有或没有表面活性剂的存在下, 将水相与粘度适合的油相在适当搅动速率下混合合适的时间。

[0060] 通过如下方法在天然细胞外基质组分和油相的混合物的胶凝或沉淀之间形成乳液, 所述方法包括但不限于振动、搅动、混合、搅拌和涡旋的不使胶凝混合物破碎并干扰溶胶 - 凝胶转换工艺, 优选加样装置, 以适当体积比、适当粘度, 在适当搅拌速率下进行适当时间。粘度通常是 1-1000mPas (单位毫帕斯卡秒), 优选 20-100mPas, 搅动速率 800-10,000rpm, 优选 2000rpm, 进行 1 秒至 24 小时的一段时间, 优选 10 秒, 含水蛋白混合物与油的体积比为 1 : 1 至 1 : 100, 优选 1 : 10。

[0061] 在一个实施方案中, 根据 ECM 胶凝混合物的粘度, 将所述胶凝混合物与油相如橄榄油、硅油、玉米油或不同油的混合物混合。油相通常会包括如橄榄油或玉米油的植物油、如石蜡油的有机油、如硅油的合成油或不同油的混合物, 根据胶凝混合物的粘度, 例如石



蜡油体积比为 1 : 1 至 1 : 100, 优选 1 : 6 至 1 : 10。优选的材料是体积比 1 : 1 至 1 : 100、优选 1 : 10 的石蜡油, 混合如 1、10、20、30、40、50 或 60 秒, 1、2、5、10 或 60 分钟, 或 2、4、8 或 24 小时的一段时间。这段时间由溶胶-凝胶转换速率、胶原混合物和油的总体积、胶原蛋白混合物的粘度和油相的粘度、机械混合设备的功率和频率、装载混合物的容器的大小和质量、温度等决定。这些实例说明了基于如下参数的范围: 订制混合设备最大功率, 在 10ml 塑料容器中, 具有 25mg BSA 的 7mg/ml 胶原, 胶原混合物和油的体积比为 1 : 6, 在 25°C 下。在优选实施方案中, 以此订制混合设备的最大搅动速率的四分之一混合材料 10 秒。如果速度太低, 将无法提供足够的能量来乳化混合物。如果速度太快, 会发生相转变, 使得油滴被捕集于胶原胶凝混合物微滴中并得到胶原碎片。如果乳化时间太短, 材料将合并, 形成大直径微球。如果乳化时间太长, 会发生相转换和破碎。

[0062] 为了进一步稳定形成的乳液, 在此过程中, 可引入浓度 1%、10%、20%、优选 1% 的表面活性剂, 其包括但不限于 **TWEEN® 20**。

[0063] 6. 在适当的一段时间后加速溶胶-凝胶转换或沉淀过程。

[0064] 乳液形成后立即使乳液经受环境加速 (environment accelerating) 或以最大速率重新开始溶胶-凝胶转换或沉淀过程一段时间。这是为了固化乳液中的微滴, 从而包封掺入微球的均相固体材料中的生物活性分子。这还防止合并, 从而减小微球的大小。控制同样的工艺参数。

[0065] 在一个实施方案中, 使胶原乳液经受具有 12°C、25°C、37°C、优选 37°C 的高温的环境一段时间, 诸如 10、30 或 60 秒, 2、5、10、30 或 60 分钟, 2、4、8 或 24 小时, 或 2、4 或 7 天, 优选 45 分钟, 直到完成溶胶-凝胶转变或达到平衡, 从而形成固化的微球, 这取决于基质组分的溶胶-凝胶转换特性。在另一实施方案中, 胶原微球的胶凝速率通过改变磷酸盐缓冲液浓度 (“PBS”, 0.01M 磷酸盐缓冲液, NaCl 0.138M ; KCl 0.0027M ; pH 7.4, 25°C) 进行控制, 所使用的缓冲液为 1X、5X 和 10X, 优选 5X。在另一实施方案中, 通过将乳液在充满用于固化的氨的碱性室中温育 (incubating), 使乳液经受 pH 增加到 pH 14 的环境。

[0066] 7. 从由油相和水相组成的液相分离固体微球。

[0067] 将固化的微球使用如过滤、沉淀、离心等标准技术分离。

[0068] 这种方法提供了简易工艺, 其不涉及已知降低药物、尤其是蛋白药物的生物活性的有机溶剂以及剧烈机械和化学应力。固化的微球易于从由水相和油相组成的各液相分离。在一个实施方案中, 将混合物以不使微球破碎的速度离心一段时间, 所述速度如 1、10、100、1000 或 10000rpm, 优选 4000rpm, 所述时间如 1、5、10、30 或 60 秒, 2、5、10、30 或 60 分钟, 或 2、4、8 或 24 小时, 优选 10 分钟。

[0069] III. 进一步修饰微球的方法

[0070] 得到微球, 其直径大小分布为 0.05 至 1000 微米, 优选 50 至 100 微米。脱水时, 这些微球有光滑或粗糙的表面。

[0071] 初始突释效应可以降低, 并且可通过如下方法控制从微球释放生物活性分子的方式, 所述方法包括但不限于光化学交联, 其包括步骤: (1) 以合适剂量的光敏剂平衡微球; (2) 彻底冲洗微球以去除多余的光敏剂; 以及 (3) 用合适能量水平的光源辐照微球一段时间。

[0072] A. 试剂

[0073] 光敏试剂包括能够被特定波长的光子激活的发色团,包括但不限于荧光素、曙红、玫瑰红(“RB”)和亚甲蓝。光敏试剂包括吸收光谱高达约 600nm 的 RB。除了 UV 区,在大约 514nm 和 550nm 有两个吸收峰。

[0074] RB 有高吸收效率,因此是非常有效的光敏试剂。玫瑰红是重要的已用于临床诊断眼科疾病几十年的染料(Lansche R. K.,“VitalStaining in Normal Eyes and in Keratoconjunctivitis Sicca”, Am. J. Ophthalmol. 60(3):520-5(1965))。它是能使用的安全试剂。玫瑰红是水溶性的荧光光敏试剂。但是,聚集体可能在高浓度例如 > 1% (w/v) 下形成,因此玫瑰红的优选浓度为 0.00001% 至 0.01%。玫瑰红溶液在暗处使用溶液制备,所述溶液如蒸馏水或 PBS 和乙醇、优选水。

[0075] B. 交联的方法

[0076] 1. 将微球浸泡在光敏剂中

[0077] 将微球浸没在光敏剂溶液中 1、10、30 或 60 秒,2、5、10、30 或 60 分钟,或 2、4、8 或 24 小时,优选 10 分钟。光敏剂浓度范围为 0.00001% 至 1%,优选 0.001%。代表性光敏剂包括荧光素、玫瑰红、亚甲蓝、曙红和卟啉。

[0078] 优选地将微球接触光敏剂 5 秒至 100 小时的一段时间,优选 10 分钟。最优选将过量试剂通过洗涤去除。

[0079] 光化学交联是无热、无毒和快速的技术,其交联基于胶原的材料但不损害生物相容性。这种方法已在美国公开专利申请号 20060099268 中公开。光化学交联的胶原已证明具有显著增强的理化性质(Chan 和 So, J. Biomed. Mater. Res. A, 75(3):689-701(2005), Chan 等, Tissue Eng., (1):73-85(2007))。除了增加的机械性能、热和化学稳定性之外,已显示该技术大大降低胶原结构的孔径和溶胀率,其改变胶原网和装载蛋白之间的相互作用。这些特性是影响药物的初始突释和释放速率的重要基质参数。

[0080] 2. 微球接触光源

[0081] 把水或等渗溶液中的微球置于光源下,如 UV 源、激光、LED 或其他可见光源。由于其与光子数量成正比,所以光的量和功率强度影响交联的程度。合适的光源包括波长 514nm 的氩激光器,或多谱线绿激光器。也可使用玫瑰红可吸收的其它激光。氩激光器可为连续的或脉冲的。激光在辐照度 0.0001、0.001、0.01、0.1、1 或 10W/cm<sup>2</sup>,优选 0.2W/cm<sup>2</sup> 时发射。辐照持续时间 1、10、100、1000 或 10000 秒,优选 100 秒。传递给微球的总光能为 0.5、1、5、10、100 或 1000J,优选 20J。

[0082] 整个过程可在无菌条件下进行。交联过程中,激光将通过透明容器传递到微球。

[0083] C. 光交联的微球

[0084] 光化学交联的微球直径大小分布为 0.05 至 1000 微米,优选 50 至 100 微米。脱水时,光化学交联的微球有光滑或粗糙度的表面。

[0085] 光化学交联通过扩散和降解,降低了掺入的生物活性分子的释放速率。光化学交联强化了胶原纤维,导致具有微米大小孔径的超精细微结构与冻干结构中纳米大小的纤维网络相互连接。这可能会减低扩散速度,因而降低从被捕集于纤维网中的液相释放掺入的生物活性分子。光化学交联也减少了生理相关条件下胶原结构的分解速率。光化学交联还提高了生物活性分子在基质网中的保留。这减少了脱水样品再水化时掺入的生物活性分子释放的量和速率。经交联的微球以明显减少的突释效应和一级释放动力学释放掺入的生物

活性分子。光化学交联没有改变微球中水合胶原纤维网的筛目大小,但可能会改变交联胶原结构和装载的蛋白之间的相互作用(如离子、静电和疏水相互作用),从而阻碍蛋白的释放。释放可以长时间维持而不损害掺入的生物活性分子的生物活性。

[0086] 具有掺入的生物活性分子的未交联的微球和光化学交联的微球可通过直接注射到受伤部位系统(injury site system)以递送生物活性分子,所述受伤部位系统包括但不限于神经系统和肌肉骨骼系统。

[0087] D. 微球的保存

[0088] 微球可进一步处理和保存,例如通过浸没在无水乙醇或逐渐增加浓度的乙醇中,冻干,临界点干燥,烘箱干燥,空气干燥,丙酮干燥,或分散在甘油中,或不使微球的基质组分和掺入的生物活性分子变性的其他条件迅速或逐渐使微球脱水。乙醇脱水法从微球中吸取水,通过浸没在无水乙醇中进行几次冲洗,或浸没在一系列增加浓度的从 10% 到 100%,优选 50% 至 100% 的乙醇中,每次 1 分钟到 10 天,优选 30 分钟的一段时间。微球可以以浆状物或使用梯度脱水法干燥保存。

[0089] E. 微球的应用

[0090] 微球用于药物递送以及三维细胞培养和移植,因为这些微球与化学交联的微球不同,没有毒性。

[0091] 通过参考以下非限制性实施例进一步理解本发明。

## 实施例

[0092] 实施例 1. 制备掺入 BSA 或肌红蛋白的胶原微球

[0093] 将浓度为 7mg/ml 鼠尾胶原 I 型的 0.02N 乙酸溶液在 10X 的磷酸盐缓冲液存在下,用 1N 氢氧化钠中和,使终浓度为 0.5X。该胶凝混合物放置在 4°C 冰水浴中,以减慢聚合速率 1 分钟。能将样品蛋白如 BSA 和肌红蛋白掺入。将 BSA(4mg) 加到混合物中,并充分混合。

[0094] 将比例为 1 : 1 的橄榄油和硅油混合物以 6 : 1 的体积比加入含水胶凝混合物。乳化前将非离子表面活性剂 Tween 吐温 20 加到水相中。将混合物的容器放在混合装置上。将混合物以最大速度(3000rpm)搅动 30 秒。然后将所形成的乳液置于 37°C 水浴中以加速聚合。将混合物温育 30 分钟,直到平衡。将混合物在 4000rpm 短暂离心 10 分钟,从包含水相和油相的液相分离固体微球。弃去油相和液相后,将微球冲洗两次,准备注射或随后的释放实验。

[0095] 实施例 2. 胶原微球的光化学交联

[0096] 从实施例 1 所述操作中获得的微球浸泡在浓度 0.001% (w/v) 的玫瑰红(光交联反应剂,“PC”)溶液中 10 分钟。弃去过量的玫瑰红,冲洗微球。将微球再悬浮在水中,并置于 4 孔板培养皿中。采用 514nm 氩激光以 0.02W/cm<sup>2</sup> 辐照微球 100 秒。辐照后紧接着在水中冲洗微球。然后微球准备用于注射或随后的实验。

[0097] 实施例 3. 胶原微球的脱水

[0098] 将微球浸泡在 100% 乙醇中 30 分钟,重复三次由微球中提取水。逐渐增加乙醇浓度用于改善微球表面光滑度。将胶原微球浸泡在 50% v/v 乙醇中 20 分钟,70% 乙醇中 30 分钟两次,80% 乙醇两次,90% 乙醇两次以及 100% 乙醇两次。

[0099] 实施例 4. 微球的形态学分析

[0100] 室温下将微球在 0.25% 戊二醛中固定 4 小时, 然后通过临界点干燥进行干燥。接着用大量水彻底冲洗微球。将微球通过临界点干燥脱水, 并置于具有碳糊 (carbon cement) 的样品台上。向样品溅射金并用扫描电子显微镜 (SEM) 分析。结果表明, 该微球在交联时更牢固, 并有更小的孔隙率。

[0101] 实施例 5. 光化学交联的胶原的微观结构鉴定

[0102] 将重构的胶原凝胶通过改变光敏剂和光剂量进行光化学交联。戊二醛用作化学交联的阳性对照。将经处理的结构冷冻干燥。将胶原支架的横截面溅射金, 以进行多孔结构的 SEM 分析。该分析表明, 戊二醛交联胶原支架和光化学交联胶原支架均有精细的微观结构, 该结构具有有着纳米纤维和微米孔的互相连接的纤维。在对照组中, 只发现有着膜样结构的宏观结构。

[0103] 表 1-3 显示了光化学交联后胶原微观结构的变化、对光敏剂浓度以及光流量 (fluence) 的剂量依赖性。表 4 显示了光化学交联和表面活性剂处理后纤维大小和筛目大小的变化。

[0104] 表 1- 胶原支架的孔径分布

[0105]

处理组	孔径大小 (微米) / 平均值 ±SD	
	长轴	短轴
对照	366±61	224±44
仅激光	398±18	279±11
仅染色	267±12	170±10
光化学交联(20J, 0.01%染料)	1.9±0.1	1.2±0.1
戊二醛(0.25%, 2 小时)	1.8±0.0	1.3±0.0

[0106] 表 2- 有不同激光能量剂量和辐照后温育时间的胶原支架的孔径分布

[0107]

温育持续时 间	0 小时		3 小时		24 小时	
	长轴	短轴	长轴	短轴	长轴	短轴
0	无微观结构		无微观结构		无微观结构	
0.2	无微观结构		无微观结构		3.4±1.2	2.2±0.7
2	无微观结构		2.8±0.8	2.0±0.7	3.3±1.2	2.3±0.7
20	1.9±0.5	1.4±0.4	2.0±0.5	1.5±0.5	1.8±0.5	1.2±0.3

[0108] 表 3- 不同光敏剂剂量的胶原支架的孔径分布

	长轴	短轴
[RB]/ $\mu\text{M}$	孔径大小(微米)	
0.1572	--	--
0.786	2.5+0.9	1.7+0.7
3.93	2.4+0.8	1.9+0.7

19.65	2.7+0.9	1.9+0.6
98.25	2.2+0.8	1.5+0.6

[0111] 表 4- 不同处理组的胶原微球中纤维网的纤维大小、体积分数和筛目大小 (n = 3)

		纤维大小 (nm)	体积分数	筛目大小 (nm)
[0112] 未使用 PC	未使用	49.45 $\pm$	0.0079 $\pm$	414.11 $\pm$
	Tween 20	9.80	0.0006	18.27
	使用	44.31 $\pm$	0.0086 $\pm$	353.39 $\pm$
	Tween 20	7.77	0.0007	15.72
使用 PC	未使用	51.70 $\pm$	0.0094 $\pm$	395.83 $\pm$
	Tween 20	8.76	0.0016	37.88
	使用	42.28 $\pm$	0.0088 $\pm$	332.17 $\pm$
	Tween 20	7.77	0.0004	8.89

[0113] 实施例 6. BSA 释放方式

[0114] 如实施例 1 所述,将 25mg BSA 掺入 1mg/ml 胶原微球中。将胶原微球在 Eppendoff 管内重新混悬于 5ml 1X PBS 中,在 37°C 水浴、200rpm 常规搅动下温育。在 0.5、1、2、4、8、24 小时,2、4、7、14 和 35 天时,抛弃并补充 2ml 上清。将上清稀释到适当范围,使用 Bio-Rad 蛋白检测试剂盒检测 BSA 的浓度。

[0115] 图 4、5 和 6 表明,光化学交联的胶原微球初始突释显著降低,BSA 几乎为一级释放动力学。对于未交联的微球,初始突释效应导致约 40% 总装载量的损失,这大大降低了药物递送装置中特定贵重蛋白药物的效力。光化学交联的微球中,释放曲线持续超过 35 天并且释放仍然呈线性。

[0116] 实施例 7. 光化学交联和表面活性剂处理后 NGF 生物活性的保留

[0117] 如实施例 1 所述,将含有 2.5g NGF 的 5mg BSA 掺入胶原微球。光化学交联如实施例 2 中所述进行。另一组使用 1% Tween20 作表面活性剂。微球混悬在 1ml 介质中,37°C 水浴温育 1-4 天。

[0118] 温育结束时,上清被取出,用于孵育 PC12 细胞。PC12 细胞在 24 孔板上的添加了 15% 马血清、2.5% 胎牛血清和 1% PBS 的 81.5% F12K 培养基中保持生长。细胞在 37°C 下,水饱和的 5% CO<sub>2</sub>,95% 空气气氛中培养,以大约每孔 3,000 个细胞 (800 μl 中) 的密度铺板。1-3 天后,将这些细胞固定,在相差显微镜下观察。将神经突生长超过细胞一个体长的细胞计数,记录有神经突生长的 PC12 细胞的百分比。使用已知浓度的 NGF 以标准曲线校准有神经突生长的 PC12 细胞的量。标准曲线如图 7 中所示。将部分从微球释放的 NGF 与 PC12 细胞一起孵育,而部分样本用于使用 ELISA 测量 NGF。这允许测定所释放的保留生物活性的 NGF 的量。

[0119] 通过与对照比较对 PC12 分化和神经突生长的刺激,结果表明了 NGF 保留其生物活性。表 5 显示,与对照中的类似,从光化学交联或表面活性剂处理的微球释放的 NGF 保留差不多所有其期望的生物活性。

[0120] 表 5- 包封的 NGF 的生物活性的保留

[0121]

	ELISA 测量的 NGF 量 (ng) (平均值 ± SD)	PC12 检测测量的 NGF 生物活性 (ng) (平均值 ± SD)
对照	28.67 ± 4.26	25.48 ± 11.63
Tween 20	6.31 ± 0.73	5.42 ± 7.91
PC	3.14 ± 0.55	3.42 ± 4.9

[0122] 实施例 8. 固定在胶原微球内部的 NGF 的生物活性的保留

[0123] 在单独的实验中,掺入胶原微球的 NGF 在 37°C 下温育 1、2、3 和 4 天。在每个时间点结束时,弃去上清液,将微球用 200U/ml 的细菌胶原酶消化 5 小时。然后消化混合物稀释到适当的范围。部分样品用于与 PC12 细胞一起孵育,而部分样品使用 ELISA 试剂盒测量浓度。

[0124] 结果表明,保留在胶原微球中的 NGF 即使 4 天后仍有生物活性,因为它诱导 PC12 细胞中神经突生长。

[0125] 实施例 9. 包封效率测量

[0126] 如实施例 1 中所述形成胶原微球。微球分离的水相并且合并油相和微球洗涤液。合并的溶液涡旋震荡充分混合,对等份洗涤物测量掺入的 BSA 或肌红蛋白。然后包封效率如下计算:

[0127]  $[(\text{总装载量} - \text{洗涤物中的量}) / \text{总装载量}] \times 100\%$ 。

[0128] 改变装载的蛋白总量和微球形成中使用的胶原浓度,以研究它们对包封效率的影响。图 8 显示,由于待装载的蛋白的量增加,所以包封效率下降。图 9 显示,光化学交联微球中保留的 NGF 的量比未交联微球中的高。

[0129] 实施例 10. 表面活性剂的作用

[0130] 除了额外使用非离子表面活性剂 **TWEEN®** 20 外,如实施例 1 所述地制备胶原微球。掺入生物活性分子后,在加入油相之前将不同浓度的 **TWEEN®** 20 (1、5 和 10%) 与

水相混合。如实施例 1 所述地形成乳液,并将微球通过离心从液相分离。分析表面活性剂存在下形成的微球的形态学和释放方式。

[0131] 结果表明,如更少的相转换和更均匀的微球群所示,表面活性剂浓度增加产生更稳定的乳液。此外,由于表面活性剂浓度增加,微球的大小分布已被证明向更小的中间值转变。

[0132] 除非另有规定,本文使用的所有技术和科学术语与所公开的发明所属领域的技术人员通常所理解的意思相同。将本文引用的出版物和引用它们的资料特别地引作参考。

[0133] 本领域技术人员将认识到或者使用不超过常规实验而能够确定本文所述发明具体实施方案的许多等价方案。这种等价方案意欲包括在所提交的权利要求中。

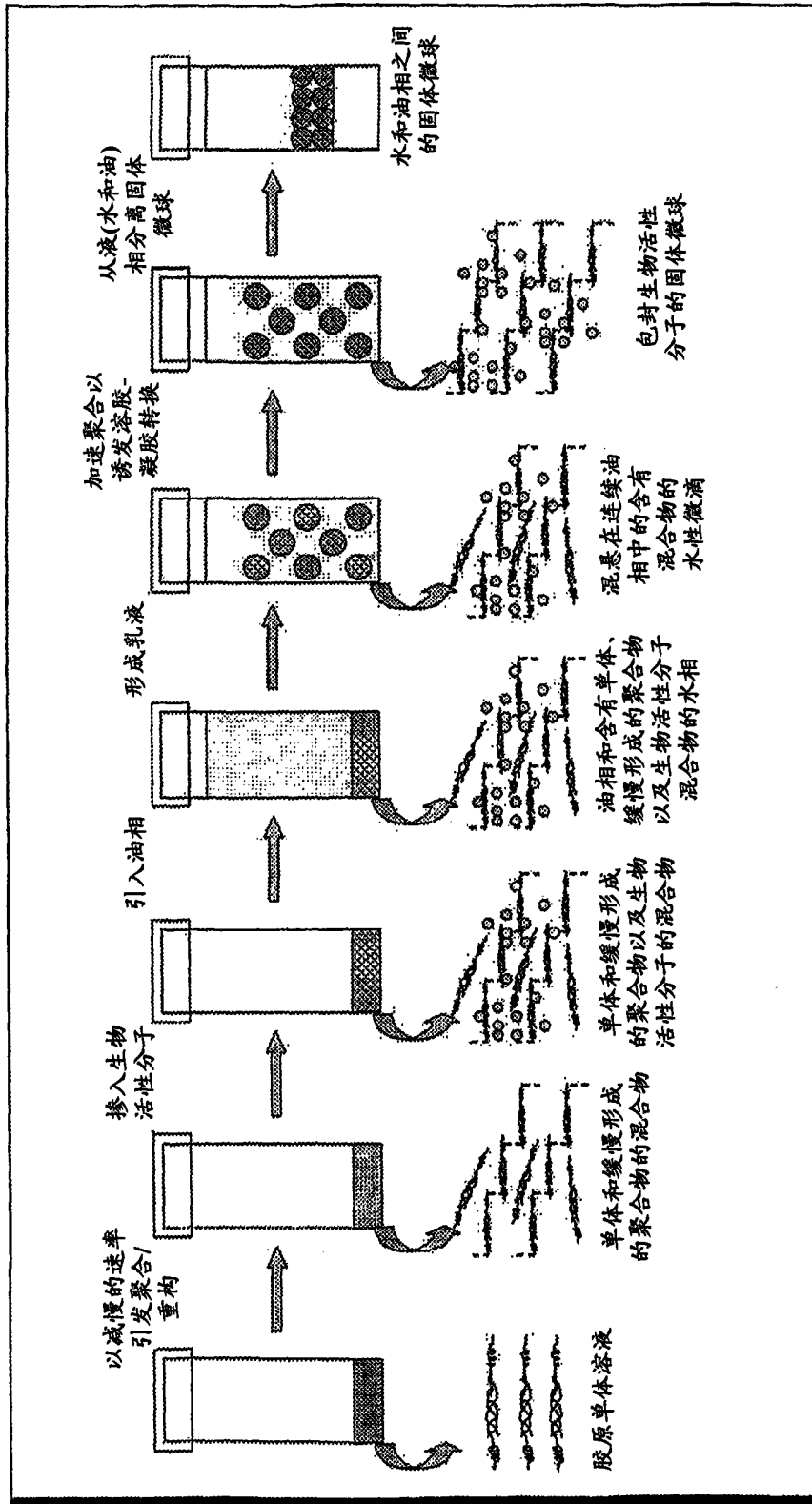


图 1



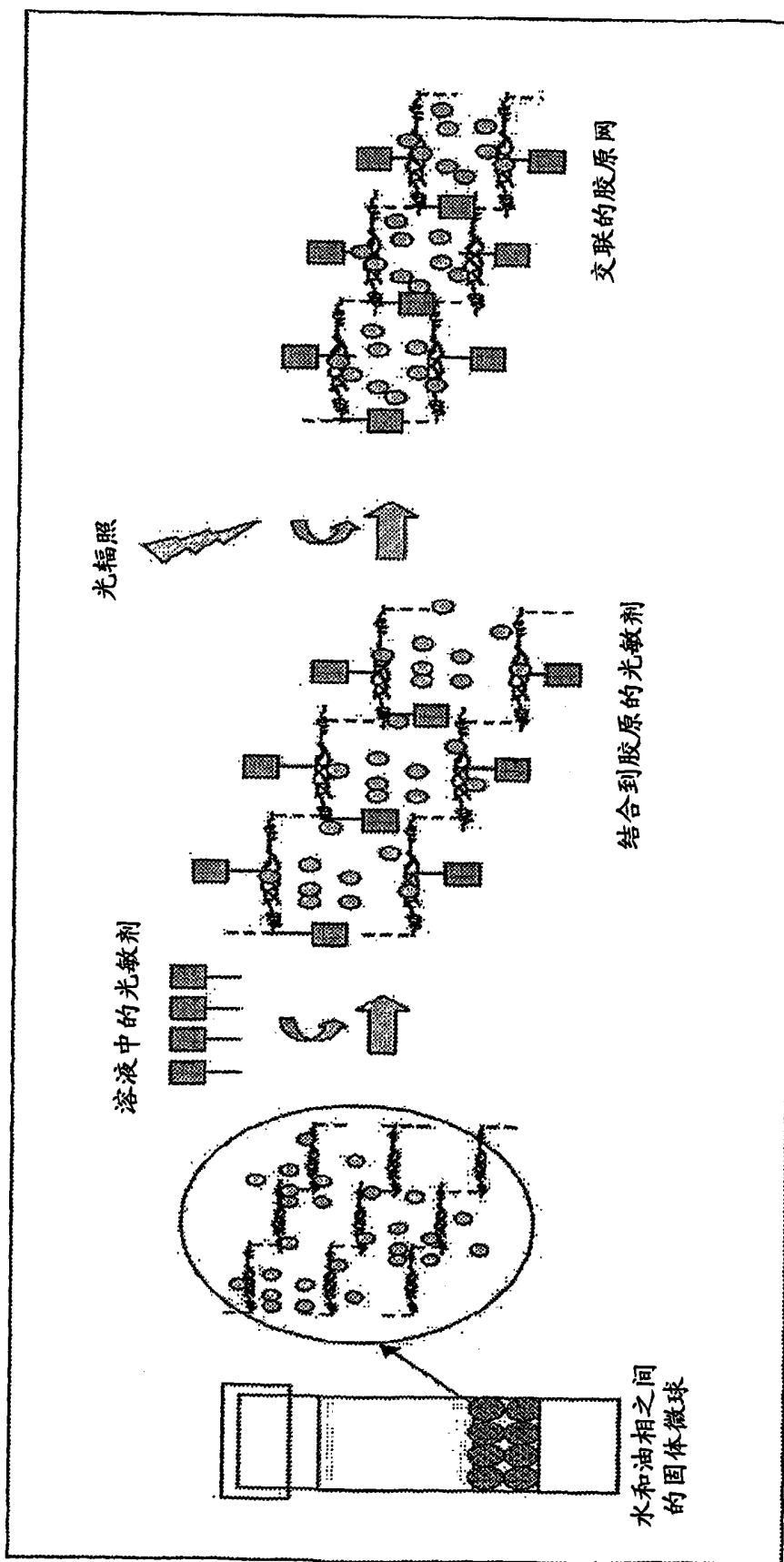


图 2

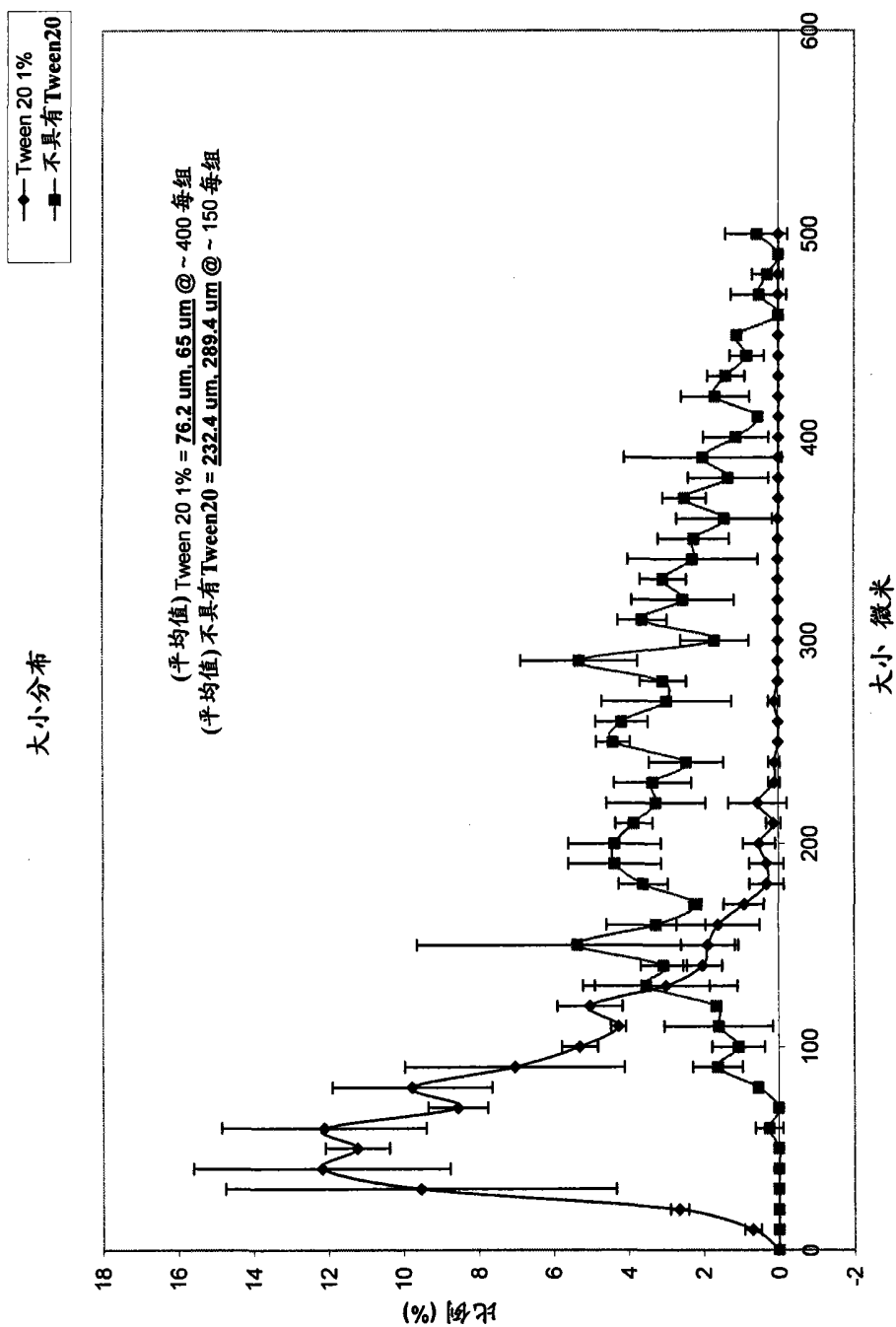


图 3

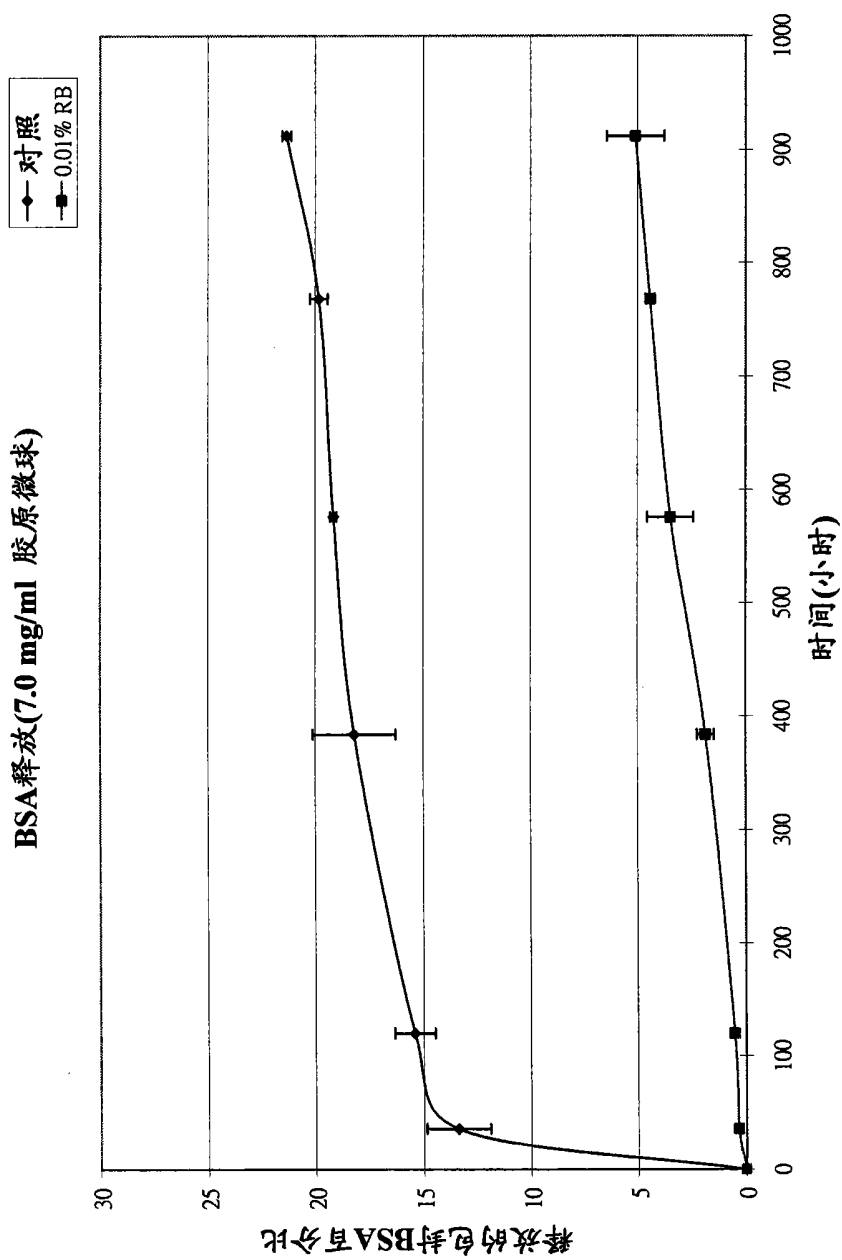


图 4

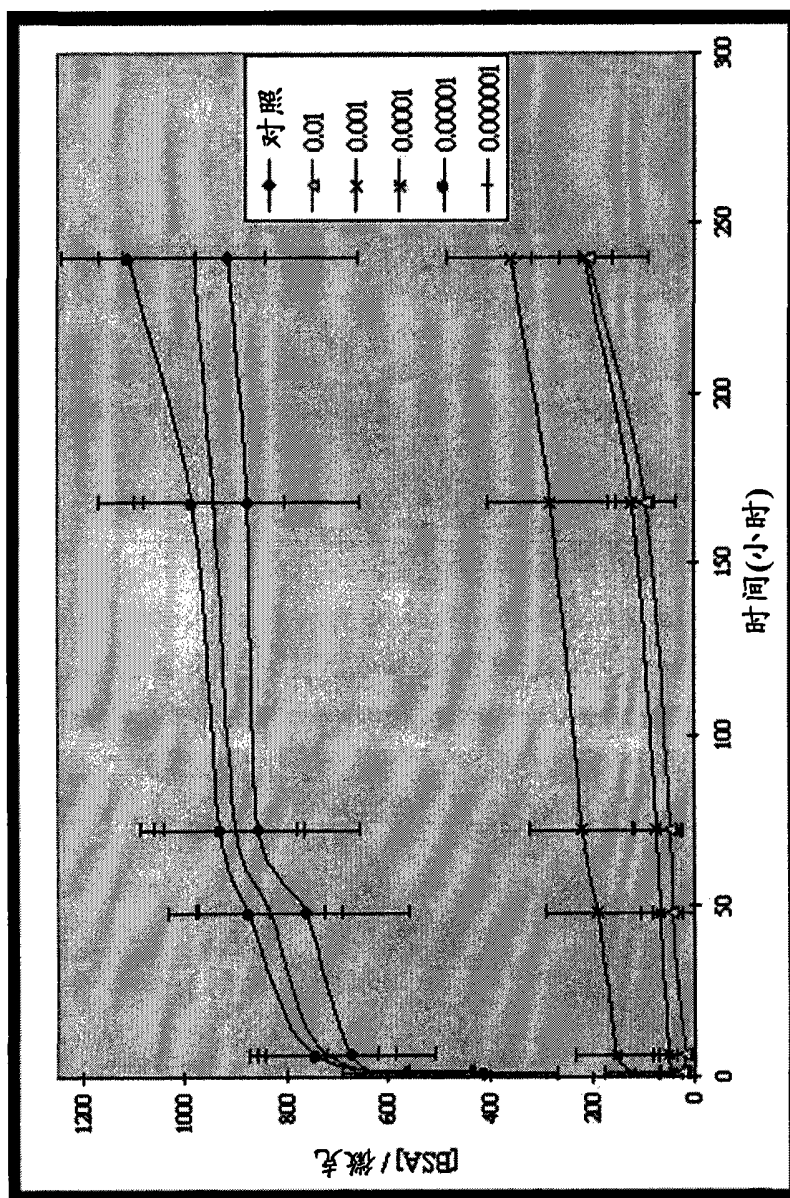


图 5

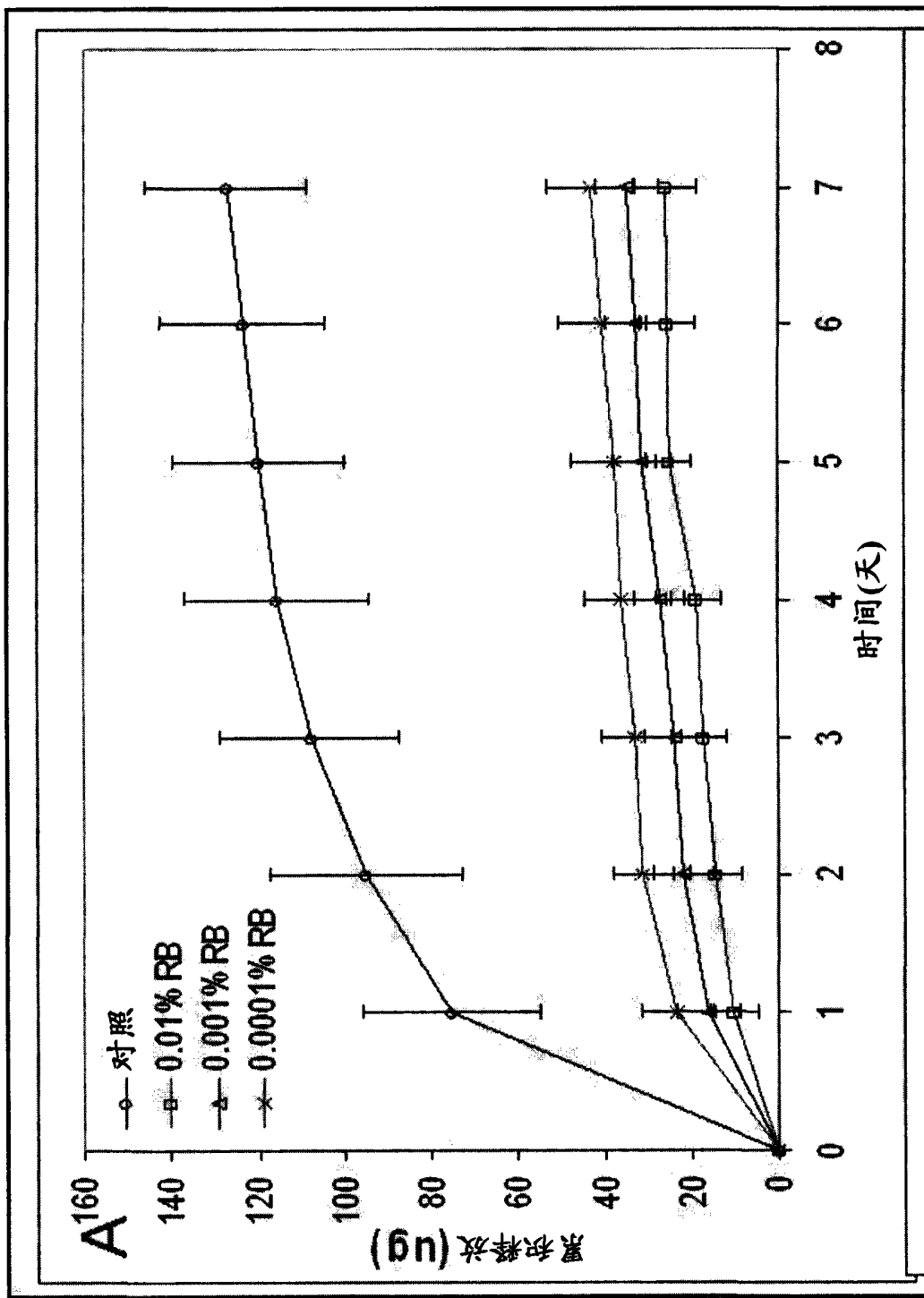


图 6

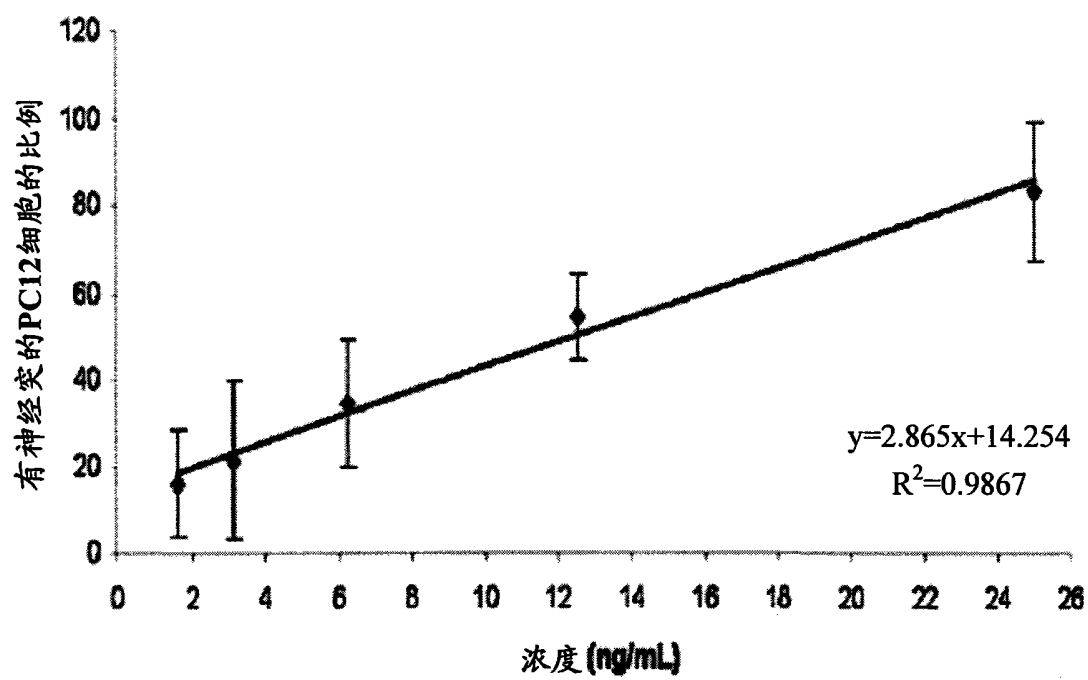


图 7

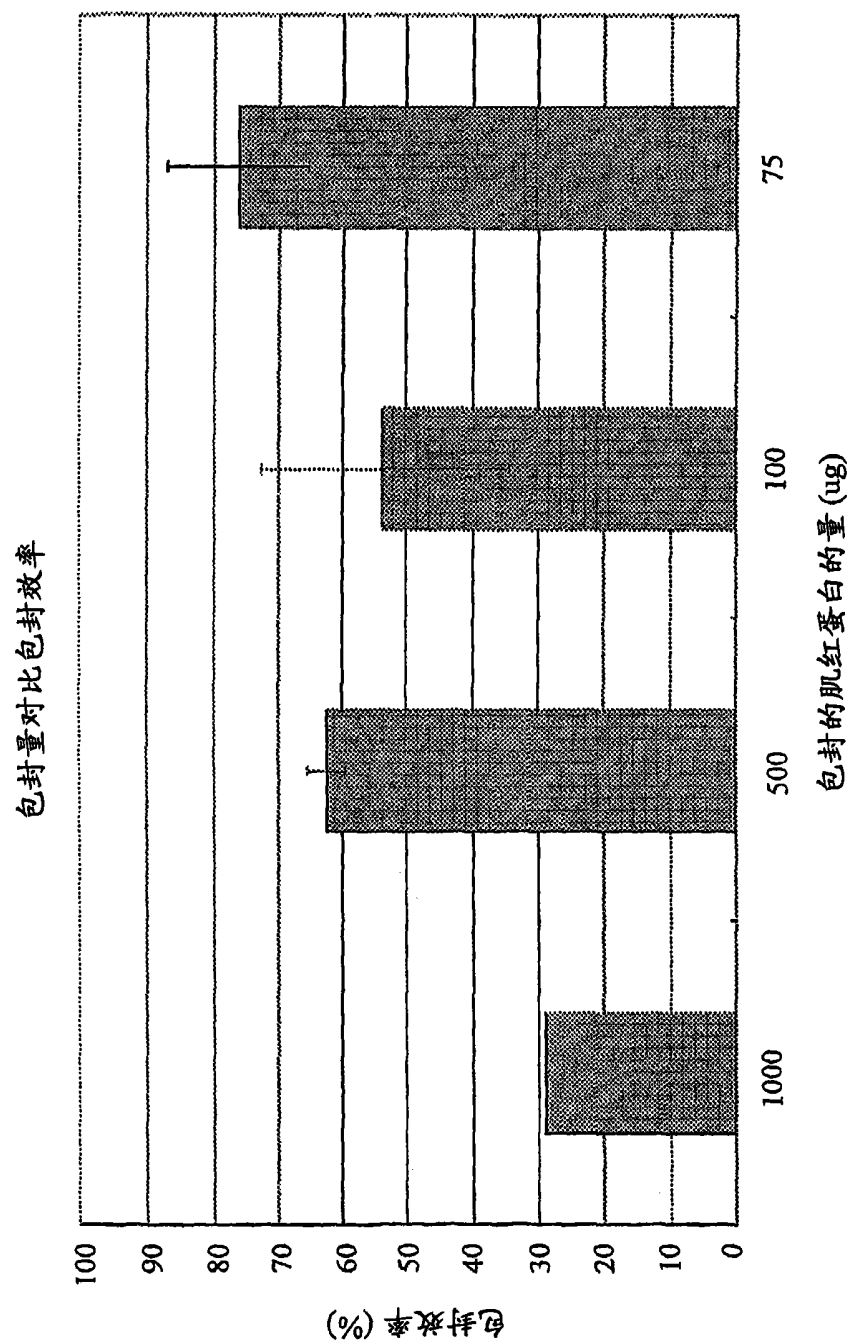


图 8

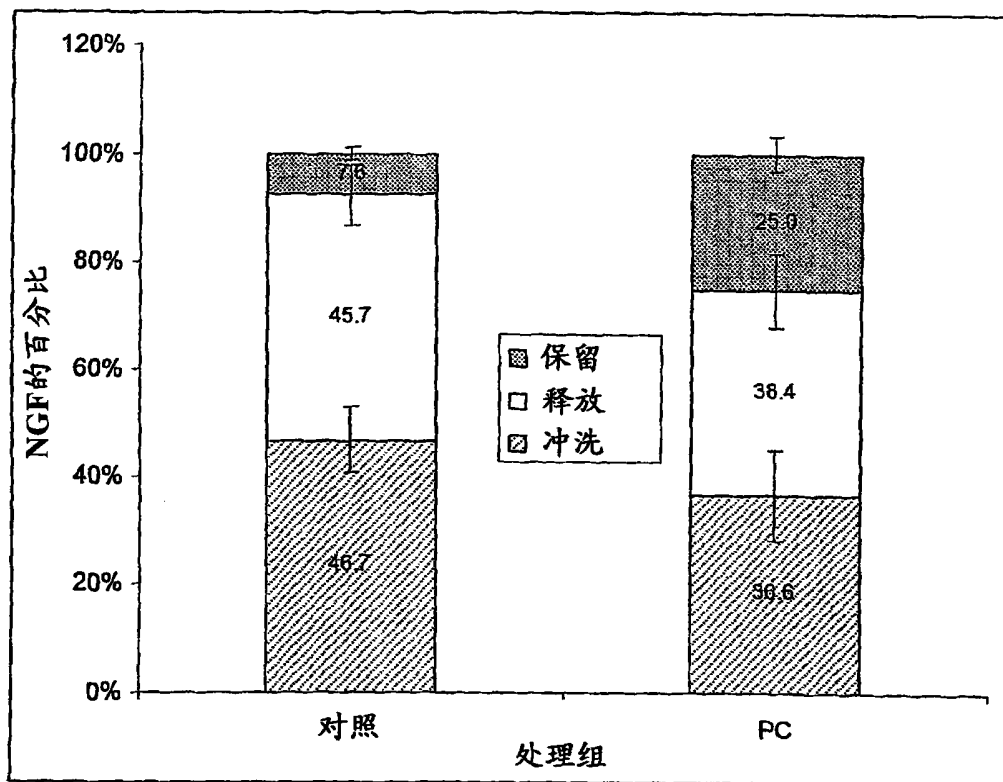


图 9