



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106470666 A

(43)申请公布日 2017.03.01

(21)申请号 201580029584.8

(22)申请日 2015.06.03

(30)优先权数据

62/007,717 2014.06.04 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2016.12.02

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2015/034041 2015.06.03

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/187862 EN 2015.12.10

(71)申请人 立卡达有限责任公司

地址 美国堪萨斯州

(72)发明人 卡尔蒂克·拉马钱德兰

史蒂芬·迈克尔·哈林顿

(74)专利代理机构 北京超凡志成知识产权代理  
事务所(普通合伙) 11371

代理人 李丙林 王玉桂

(51)Int.Cl.

A61K 8/35(2006.01)

A61K 8/37(2006.01)

权利要求书2页 说明书10页 附图3页

(54)发明名称

微囊封装技术及其产品

(57)摘要

用于产生水凝胶微胶囊(亦称微珠)的由内而外胶凝方法。本文中描述了将生物材料封装在微珠3维水凝胶基质中的方法。该方法一般包含水凝胶前体化合物、任选的生物材料和二价阳离子的混合物的形成。混合物然后与海藻酸盐组合,以产生围绕混合物滴的海藻酸盐壳,随后是水凝胶前体核的胶凝,以及临时海藻酸盐壳的去除从而产生自持续微珠。

1. 一种将生物材料封装在3维水凝胶基质中的方法,所述方法包括:

提供水凝胶前体溶液,所述溶液包括分散或溶解于溶剂体系中的水凝胶前体化合物、所述生物材料和二价阳离子,所述二价阳离子选自由钙、钡、锶及其组合组成的组;

组合所述水凝胶前体溶液与海藻酸盐从而产生核/壳微粒,每个核/壳微粒包括海藻酸盐壳和包括所述水凝胶前体溶液的液体核;

使在所述液体核中的所述水凝胶前体化合物交联从而产生核/壳交联微粒,每个核/壳交联微粒包括所述海藻酸盐壳以及包括3维水凝胶基质和所述生物材料的核,所述生物材料被包覆在所述水凝胶基质中;以及

去除所述海藻酸盐壳从而产生自持续水凝胶微珠,每个水凝胶微珠包括所述3维水凝胶基质和包覆于其中的生物材料。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述水凝胶前体化合物为非海藻酸盐化合物。

3. 根据权利要求1所述的方法,其中所述水凝胶前体化合物为玻尿酸。

4. 根据权利要求1所述的方法,其中所述水凝胶前体溶液进一步包括纤连蛋白、层粘连蛋白、胶原蛋白、细胞外基质组分或其合成形式。

5. 根据权利要求1所述的方法,其中所述生物材料选自由细胞群、细胞簇、组织、其组合以及其片段组成的组。

6. 根据权利要求1所述的方法,其中所述生物材料选自由以下各项组成的组:胰岛,肝细胞,干细胞,内分泌细胞,与胰岛、肝细胞、干细胞、内分泌细胞相关的组织,和胰岛簇,肝细胞簇,干细胞簇,甲状腺簇,肾上腺簇,垂体簇及其组合。

7. 根据权利要求1所述的方法,其中所述水凝胶前体溶液主要由分散或溶解于所述溶剂体系中的所述水凝胶前体化合物、二价阳离子和生物材料组成。

8. 根据权利要求1所述的方法,其中所述水凝胶前体溶液进一步包括任选的水凝胶交联剂。

9. 根据权利要求1所述的方法,其中所述海藻酸盐为海藻酸钠。

10. 根据权利要求1所述的方法,其中所述组合包括将所述水凝胶前体溶液逐滴添加到海藻酸盐的溶液中从而产生所述核/壳微粒。

11. 根据权利要求10所述的方法,其中所述添加包括产生所述水凝胶前体溶液的液滴以及将所述液滴滴入所述海藻酸盐的溶液中从而产生所述核/壳微粒。

12. 根据权利要求11所述的方法,其中所述液滴的最大面对面尺寸小于约5mm。

13. 根据权利要求10所述的方法,其中在室温下所述水凝胶前体溶液的粘度与所述海藻酸盐溶液的粘度的比大于1。

14. 根据权利要求1所述的方法,其中所述交联包括使所述核/壳微粒与水凝胶基质交联剂接触。

15. 根据权利要求1所述的方法,其中所述交联包括使所述核/壳微粒暴露于活化辐射以引发交联。

16. 根据权利要求1所述的方法,其中所述去除包括使所述核/壳交联微粒与螯合剂接触以弱化、溶解或破坏所述海藻酸盐壳。

17. 根据权利要求16所述的方法,其中所述螯合剂选自由柠檬酸盐、EDTA、EGTA、磷酸盐及其混合物组成的组。

18. 根据权利要求1所述的方法,其中所述去除包括物理地搅动所述核/壳交联微粒以破坏所述海藻酸盐壳。

19. 根据权利要求1所述的方法,其中所述水凝胶微珠的最大面对面尺寸小于约5mm。

20. 一种根据权利要求1所述的方法制备的3维水凝胶微珠,所述微珠包括3维水凝胶基质和包覆于其中的生物材料。

21. 根据权利要求20所述的微珠,所述微珠的平均最大面对面尺寸为约50 $\mu\text{m}$ 到约2mm。

22. 一种用于在受试者中移植的组合物,其包括多个根据权利要求1所述的方法制备的3维水凝胶微珠,所述微珠中的每一个包括3维水凝胶基质和包覆于其中的生物材料。

## 微囊封装技术及其产品

### [0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求于2014年6月4日提交的题为微囊封装技术及其产品(MICROENCAPSULATION TECHNIQUE AND PRODUCTS THEREOF)的美国临时专利申请第62/007,717号的优先权权益,其以全文引用的方式并入本文中。

### 技术领域

[0003] 本发明涉及用于制备非海藻酸盐水凝胶微珠的方法和技术及其所得产品。

### 背景技术

[0004] 在再生医学中,出于两个关键原因,细胞封装在水凝胶微粒中是有前景的技术。第一,水凝胶基质的结构使得封装的细胞可与周围环境交换营养物和治疗性分子,而其它细胞类型即宿主免疫细胞不能穿透和介导移植时封装的细胞的免疫排斥反应。第二,水凝胶微粒很好地适用于封装的细胞的移植。它们的小物理尺寸和球形形状允许经由注射器和针头的简单且容易的递送而非侵入性外科手术操作。此外,与较大的“块状”凝胶构造体相比,这种小的物理尺寸产生到封装的细胞以及从封装的细胞的分子扩散的最小阻力。

[0005] 用于制造含细胞水凝胶微珠的当前方法高度受限。到目前为止,由于微珠独特且极简的胶凝机制,因此仅可使用海藻酸盐或琼脂糖聚合物来制造微珠。不利的是,这些材料中的任一者对于细胞健康或功能都不是期望的。就此而言,远优于海藻酸盐或琼脂糖的许多新颖水凝胶材料是可用的。然而,由于它们的特定胶凝机制,因此它们不能被制备为球形含活细胞的微珠。本发明提供用于产生此类构造体的方法,并且可适用于多种水凝胶形成材料。

### 发明内容

[0006] 本文中描述了将生物材料封装在3维水凝胶基质中的方法。该方法一般包括提供水凝胶前体溶液,所述水凝胶前体溶液包括分散或溶解于溶剂体系中的水凝胶前体化合物、生物材料和二价阳离子,所述二价阳离子选自由钙、钡、锶及其组合组成的组。水凝胶前体溶液与海藻酸盐组合从而产生核/壳微粒。核/壳微粒中的每一个包括海藻酸盐壳和包括水凝胶前体溶液的液体核。使在液体核中的水凝胶前体化合物交联从而产生核/壳交联微粒。核/壳交联微粒中的每一个包括海藻酸盐壳以及包括3维水凝胶基质和生物材料的核。有利的是,将生物材料悬浮、封装,亦称包覆在水凝胶基质中。然后去除临时海藻酸盐壳从而产生自持续水凝胶微珠。水凝胶微珠中的每一个包括3维水凝胶基质和包覆于其中的生物材料。

[0007] 本文中还描述了根据本发明的技术制备的3维水凝胶微珠。微珠为自支撑体,其包括3维水凝胶基质和包覆于其中的生物材料。

[0008] 本文还描述了用于在受试者中移植的组合物。该组合物包括多个根据本发明技术制备的3维水凝胶微珠。该微珠为自支撑体,其包括3维水凝胶基质和包覆于其中的生物材

料。

### 附图说明

[0009] 图1为来自实例1的具有海藻酸盐壳和包括水凝胶前体溶液的液体核的核/壳微粒的显微镜图像；

[0010] 图2为来自实例1的具有海藻酸盐壳和水凝胶核的核/壳交联微粒的显微镜图像；

[0011] 图3为来自实例1的核/壳交联微粒在柠檬酸盐中20分钟之后的显微镜图像；

[0012] 图4为来自实例1的核/壳交联微粒在柠檬酸盐中45分钟之后的显微镜图像；

[0013] 图5为微珠在壳去除之后的显微镜图像；以及

[0014] 图6为来自实例1的微珠在最终柠檬酸盐冲洗之后的显微镜图像，其仅示出剩余的水凝胶核。

### 具体实施方式

[0015] 本发明涉及产生水凝胶微胶囊(亦称微珠)的由内而外胶凝方法。更具体地说，本文描述了将生物材料封装在微珠3维水凝胶基质中的方法。该方法一般包括形成水凝胶前体化合物、任选的生物材料和二价阳离子的混合物。混合物然后与海藻酸盐组合，以产生围绕混合物滴的海藻酸盐壳，随后水凝胶前体核的胶凝化，以及海藻酸盐壳的去除从而产生自持续微珠。

[0016] 在一方面，提供水凝胶前体溶液。水凝胶前体溶液通过在与其它组分混合之前，将水凝胶前体化合物分散在溶剂体系中以形成溶液来制备。用于水凝胶前体溶液的优选溶剂体系包括水、缓冲剂(例如组氨酸, HEPES)、密度改性剂(例如碘克沙醇、菲科尔(ficoll))、粘度改性剂(例如PEG、羧甲基纤维素、三仙胶)或其混合物。以溶液的总容积计，水凝胶前体化合物将以约0.4重量/体积%到约4.0重量/体积%(4mg/mL-40mg/mL)的水平包括在溶液中。

[0017] 合适的水凝胶前体化合物包括水凝胶形成聚合物、寡聚物和/或单体，并且因此，能够通过聚合和/或交联形成交联或网络结构或基质(即，“水凝胶”)，其中液体和生物材料可滞留、悬浮、包覆和/或封装在所得胶凝化结构或基质的间隙空间或孔内。用于本发明中的水凝胶前体化合物优选地为非海藻酸盐水凝胶前体化合物。即，水凝胶前体溶液优选基本上不含海藻酸盐化合物，即，基于海藻酸盐、海藻酸或者其盐或衍生物的化合物。如本文所用的，术语“基本上不含”意指该成分并非有意添加到组合物中，但可存在附带杂质。在这样的实施例中，以乳液的总重量视为100重量%计，水凝胶前体溶液组合物包括小于约0.05重量%，优选小于约0.01重量%，并且更优选约0重量%的这样的成分。

[0018] 任何可交联水凝胶前体化合物将适用于本发明，其中优选的化合物为可生物相容的非海藻酸盐共聚物，并且特别是非海藻酸盐嵌段共聚物以及其它类型的可交联单体和/或寡聚物。示例性的前体化合物包括(但不限于)非海藻酸盐多糖、改性的玻尿酸、胶原蛋白/明胶、聚乙二醇、壳聚糖、琼脂糖等。特别优选的水凝胶前体化合物为玻尿酸。在一个或多个实施例中，水凝胶为缓慢胶凝水凝胶。依据水凝胶的指定最终用途，可生物相容的水凝胶也是特别优选的。如本文所用的，“生物相容性”意指对活组织无害，并且更具体来说其不是生物或另外不期望的，因为其可施用于受试者而无过度的毒性、刺激或过敏或免疫原性

反应,并且不以有害的方式引起与含有其的组合物的其它组分中的任一种的任何不期望的生物效果或相互作用。可生物相容的水凝胶将经选择以使生物材料的任何降解降到最低以及在受试者中的任何不良副作用降到最低,如本领域的技术人员所熟知的。可包括在水凝胶前体中的另外任意的成分包括纤连蛋白、层粘连蛋白、胶原蛋白、细胞外基质的其它组分等,包括其合成形式。

[0019] 水凝胶前体溶液进一步包括二价阳离子。用于本发明中的合适的二价阳离子包括在与海藻酸盐相互作用时能够形成凝胶的任何离子。更具体地说,二价阳离子优选为生物相容性的。在一个或多个实施例中,二价阳离子选自由钙、钡、锶及其组合组成的组。二价阳离子连同水凝胶前体化合物一起被分散或溶解在溶剂体系中。以溶液的总容积视为100%计,二价阳离子应以约0.025摩尔/升到约0.25摩尔/升的水平包括在溶液中。

[0020] 水凝胶前体溶液进一步包括生物材料。示例性的生物材料包括细胞群、细胞簇、组织、其组合以及其片段。生物材料可为天然衍生或分离的,或它们可为工程化或基因修饰的细胞、簇、组织等。用于本发明中的生物材料的非限制性实例包括胰岛、胰岛簇、肝细胞、干细胞和相关细胞与组织,以及内分泌细胞、干细胞簇、甲状腺簇、肾上腺簇、垂体簇以及用于组织工程或基于细胞的治疗的其它3维细胞簇。在本发明中还可使用细胞类型和/或组织的组合。

[0021] 在一个或多个实施例中,另外的添加剂、培养基、营养物、pH缓冲剂、密度改性剂、粘度改性剂等可包括在水凝胶前体溶液中。在一些实施例中,水凝胶前体溶液主要由分散或溶解于溶剂体系中的水凝胶前体化合物、二价阳离子和生物材料组成或者甚至由分散或溶解于溶剂体系中的水凝胶前体化合物、二价阳离子和生物材料组成。水凝胶前体溶液保持液体形式直到如下所述胶凝,并且因此,在一个或多个实施例中,溶液优选基本上不含水凝胶交联剂。在一个或多个实施例中,水凝胶前体溶液的密度“匹配”生物材料的密度,以改善维持悬浮在整个水凝胶前体溶液中(和在整个所得液滴中,下文论述)的生物材料的能力。因此,在一些实施例中,可期望充分增大水凝胶前体的粘度以便在如下文更详细论述的胶凝/交联之前,减缓或阻止生物材料迁移或“沉降”到液体核的边缘。

[0022] 水凝胶前体溶液然后与海藻酸盐组合。在一个或多个实施例中,将水凝胶前体溶液逐滴添加到海藻酸盐的溶液中以在水凝胶前体溶液的单个液滴上形成海藻酸盐壳。举例来说,从合适的装置挤出或分配液体水凝胶前体溶液从而形成液滴。可使用任何合适的装置,并且装置将一般包括用于保持水凝胶前体溶液的腔室,其中该室与终止于分配出口或顶端的流体通道流体连通。分配顶端将具有孔,水凝胶前体溶液通过该孔排出为液滴。可使用简单装置(如注射器和针头以及专门设计用于液滴产生的机器)执行该技术。可根据孔的横截面尺寸、水凝胶前体溶液的粘度和海藻酸盐溶液的相对粘度来控制液滴的期望尺寸。本发明特别适合于以下液滴,其最大面对面尺寸(即,就球形液滴而言,其直径)小于约5mm,优选小于约2mm,更优选小于约1mm,并且甚至更优选范围为约50 $\mu$ m到约750 $\mu$ m。

[0023] 一般来说,海藻酸盐的溶液将包括海藻酸钠溶液,并且优选分散于溶剂体系中的海藻酸钠的搅动或搅拌的溶液。可使用其它海藻酸盐(除海藻酸钙以外)。依据期望特性,在本发明中可使用各种类型的凝胶形成但可去交联的海藻酸盐。一般来说,低粘度/低分子量且高G海藻酸盐是优选的,如从极北海带(*Laminaria hyperborea*)中提取的那些海藻酸盐。根据海藻酸盐的不同特性可从各种来源商购海藻酸盐,包括FMC生物聚合物公司(宾夕法尼

亚州费城) (FMC BioPolymer (Philadelphia, PA))。海藻酸盐在溶液中的量可变化,但以溶液的总容积视为100%计,可从约0.1重量/体积%到约2.0重量/体积%变化。一般来说,海藻酸盐溶液的粘度应小于水凝胶前体溶液的粘度。海藻酸盐溶液的粘度取决于海藻酸盐浓度和海藻酸盐聚合物的平均分子量(即,海藻酸盐分子的长度或在链中单体单元的数目),其中在类似浓度下较长的链产生较高的粘度。在一个或多个实施例中,在室温( $\sim 20^{\circ}\text{C}$ 到 $25^{\circ}\text{C}$ )下海藻酸盐溶液的粘度将从约1cP到约20cP,并且优选从约1cP到约4cP变化。更具体来说,在室温下水凝胶前体溶液的粘度与海藻酸盐溶液的粘度的比应大于1。在再一个或多个实施例中,水凝胶前体溶液的粘度与海藻酸盐溶液的粘度的比为约1:1到约1000:1。在一个或多个实施例中,水凝胶前体的粘度的比为约20:1。在一个或多个实施例中,水凝胶前体溶液的粘度为约1cP最多到约500cP,其中在室温下约40cP到约100cP是特别优选的。

[0024] 有利的是,对于每个包括海藻酸盐壳和包括水凝胶前体溶液的液体核的液滴,在水凝胶前体溶液中的二价阳离子与海藻酸盐反应从而产生核/壳微粒。如果期望海藻酸盐壳的进一步硬化,那么核/壳微粒可放置在含有二价阳离子的另外的溶液中。无论如何,应了解这种方法具有显著的优点,在于其形成用于容纳水凝胶前体溶液的临时(可去除的)、多孔且基本上球形的模具或封装体。如应了解的,“基本上球形”意指核/壳微粒可为具有更“规则”形状的球形,或可具有更不规则的形状(椭圆形、长方形等)。

[0025] 应了解的是,对于通过海藻酸盐壳的成功封装,在被分配之后液滴“核”必须穿透海藻酸盐溶液的表面。即,液滴必须具有足够的速度和/或动量以打破海藻酸盐溶液的表面张力。本领域的技术人员将认识到,可操控若干变量以实现期望的结果。举例来说,可搅动或搅拌海藻酸盐溶液以降低溶液的表面张力。类似地,应了解,可调节液滴和海藻酸盐溶液的相对粘度以促进液滴进入海藻酸盐溶液。同样地,对于较大大小的液滴,必需的液滴速度将降低(即,具有更多质量的液滴,因此在较低速度下产生充足动量)。分配液滴的高度也可变化。在一个或多个实施例中,从约15cm到约20cm的高度(如从海藻酸盐溶液的表面到分配顶端计算)分配液滴。在一个或多个实施例中,对于液滴的目标速度为约1.5m/s到约5m/s,并且优选约1.5m/s到约4m/s。

[0026] 在液体核中的水凝胶前体化合物然后交联从而产生核/壳交联微粒。依据具体水凝胶前体化合物,交联可通过各种机制进行。在一个或多个实施例中,核/壳微粒与水凝胶基质交联剂(优选呈溶液形式)组合。交联剂通过海藻酸盐壳滤出到核/壳微粒中,引起水凝胶前体化合物的胶凝(交联)以形成3维水凝胶基质。交联剂将对应于水凝胶前体化合物,但可变化以控制在所得交联基质内实现的交联的速度和水平。合适的交联剂包括光引发交联剂或热引发交联剂、化学交联剂,如基于PEG的交联剂(例如,PEGDA)等。还可使用自交联水凝胶前体。

[0027] 还应了解,水凝胶交联剂可溶解于初始海藻酸盐溶液中以便在“单步”中在某种程度上促进同时水凝胶胶凝和海藻酸盐壳的形成,而不必将微粒转移到单独的容器用于水凝胶交联。同样地,水凝胶交联剂实际上可以以指定的pH(例如,pH<7)包括在初始水凝胶前体溶液中,以便有效暂停胶凝,而海藻酸盐溶液可在pH 8下制备,这显著减少了水凝胶前体的胶凝时间。类似地,可使用可光交联水凝胶体系,其将涉及将核/壳微粒暴露于活化辐射(例如UV光)以在液体核中引发水凝胶形成。

[0028] 还应了解,不同交联剂可用于改变胶凝/交联的速度。目前的数据表明,甚至大的

(例如3400道尔顿PEG)交联剂也能够扩散通过海藻酸盐壳并且与水凝胶前体化合物反应以引发胶凝。

[0029] 与所用的胶凝机制无关,每个核/壳交联微粒将包括不同海藻酸盐壳和包括3维水凝胶基质的现固化或“胶凝化”核,其中生物材料悬浮、包覆或封装在水凝胶基质中。应了解,这种方法具有显著的优点,在于其准许在生理条件下水凝胶前体溶液在多孔模具内的胶凝。所得的水凝胶基质被表征为可渗透液体和气体的半刚性网络,但其在稳定状态下呈现无流动且保持其完整性。水凝胶基质为3维自持续体。术语“自持续体”意指水凝胶基质,一旦形成,保持其形状而不需外部支撑结构,并且仅由于其自身的内部力或重量而不容易发生变形。自持续体是不可弯的、可持续变形或可流动的,如胶状物、油灰或糊状物,但有弹性,以使得基质体可在力下暂时弯曲或变形。换句话说,在较小压缩和/或挠曲之后,自持续体将回缩或回弹到形状一了解,水凝胶基质在足够的外部压力或力的施加下将开裂、破裂或剪切。

[0030] 然后从核/壳交联微粒去除海藻酸盐壳从而产生自持续水凝胶微珠。在一个或多个实施例中,核/壳交联微粒与适当的螯合剂(优选呈溶液形式)接触,并且维持足够的时间段以弱化、溶解或另外破坏(并且由此去除)海藻酸盐壳。优选地,核/壳交联微粒在搅动或搅拌下与适当的螯合剂接触。示例性的螯合剂包括柠檬酸盐以及对于二价阳离子(例如钙、钡或锶)的其它已知螯合剂,如EDTA(乙二胺四乙酸)、EGTA(乙二醇四乙酸)、磷酸盐(例如正磷酸盐、磷酸盐等)等。另外,在海藻酸盐壳的形成中使用的二价阳离子可随时间推移被排出(即使非常缓慢)在含有例如非常低钙浓度的盐水溶液中。还可使用微粒的机械搅动使海藻酸盐壳破裂和移位。核/壳交联微粒也可被收集在筛网或滤网上并且如果需要用另外的螯合剂溶液洗涤,直到去除海藻酸盐壳。

[0031] 与实施例无关,海藻酸盐壳的去除产生包括封装、包覆或悬浮在3维水凝胶基质内的生物组成的水凝胶微珠。应了解这种方法具有显著的优点,在于在水凝胶基质的成功胶凝之后,其准许多孔球形模具在生理条件下的溶解和去除。所得的水凝胶微珠为3维(例如基本上球形)基质型胶囊,意指其将填充材料保持在整个珠粒中,而非具有不同壳如在核-壳型胶囊中。如上所指出的,水凝胶微珠也是自持续体。可使用网筛或其它设备从溶液中收集所得水凝胶微珠,并且按需要可冲洗或悬浮于培养基或适当的营养物中。在一个或多个实施例中,所得微珠在形状上基本上为球形。有利的是,粒度可依据所选择的液滴产生器的能力来高度定制。在一个或多个实施例中,所得水凝胶微珠或微粒的平均(均值)最大面对面尺寸(即,就球形微珠而言,其直径)小于约5mm,优选小于约2mm,更优选约50 $\mu$ m到约2mm,甚至更优选从约50 $\mu$ m到约750 $\mu$ m,并且最优选从约50 $\mu$ m到约500 $\mu$ m变化。

[0032] 应了解,在以上方法期间形成的微珠或微粒可在该方法中的各种步骤之间过滤和/或洗涤以在前进到下一个步骤之前从形成溶液中分离微珠或微粒。

[0033] 综上所述,本文中所描述的方法允许在生物相关条件下制造非海藻酸盐水凝胶微球体。活细胞或组织的微囊封装在组织工程和基于细胞的治疗中具有非常广泛诉求,但当前能够被调配为微胶囊的材料主要限于海藻酸盐和在一些状况下琼脂糖,他们两者都不具有用于支持或指引细胞功能的重要生物线索。因此,这种方法的重要特征是用于细胞或细胞簇在非海藻酸盐水凝胶材料中的微囊封装以改善生物活性和生物相容性。另外,替代材料选项(例如共价交联水凝胶、可变交联剂尺寸和反应化学等)可潜在地实现所得微胶囊的



结构、机械和降解特性的更大水平的控制。有利的是,由于临时的海藻酸盐壳,甚至当使用缓慢胶凝水凝胶前体时也可形成微胶囊。

[0034] 另一关键优点为与使用有机溶剂或另外对活组织有毒的其它微球体制造方法相反,该方法可与细胞相容。所描述的方法的另外益处包括水凝胶微珠改善植入的生物材料的生物相容性,从而降低纤维化。此外,微珠允许在微珠中细胞和组织功能的增强的控制和支持,从而改善使用此类微珠形成的任何植入物的生物活性。此外,临时海藻酸盐壳的使用准许更多种水凝胶被用于形成微珠,这允许本领域技术人员对所得微珠的期望机械特性(例如弹性模量、韧性等)的更多控制。此外,本技术还准许本领域技术人员根据其它期望特征选择水凝胶,以便一旦植入就控制水凝胶的降解速率,(例如,通过能够在共价与离子交联凝胶之间选择用于长期免疫保护(细胞移植疗法)或短期细胞支持(组织工程))。类似地,通过能够在一系列水凝胶中选择,但仍形成微珠,本领域技术人员还具有对水凝胶基质的期望微观结构的更多控制,如所得微珠的孔尺寸和扩散特性。

[0035] 所得水凝胶微珠具有各种用途,包括但不限于借助封装的胰岛或胰岛细胞的糖尿病的恢复、用于骨或软骨修复的改性细胞或干细胞的递送、总体来说来自宿主免疫系统的移植治疗细胞或细胞簇的防护。

[0036] 在审阅本文的本公开和以下工作实例时,本发明的各种实施例的另外的优点将对本领域的技术人员是显而易见的。应了解,除非本文中另有指示,否则本文中所描述的各种实施例未必相互排斥。举例来说,在一个实施例中描述或描绘的特征也可包括在其它实施例中,但不一定包括在其中。因此,本发明涵盖本文中所描述的具体实施例的多种组合和/或整合。

[0037] 如本文所用的,短语“和/或”,当在两个或更多个项目的列表中使用,意指列出的项目中的任一项可单独地采用或可采用列出的项目中的两个或更多个的任何组合。举例来说,如果组合物被描述为含有或排除组分A、B和/或C,那么该组合物可仅含有或排除A;仅含有或排除B;仅含有或排除C;A与B的组合;A与C的组合;B与C的组合;或A、B和C的组合。

[0038] 本说明书还使用数值范围以定量与本发明的各种实施例相关的某些参数。应理解,当提供数值范围时,此类范围应被解释为,为仅叙述所述范围的下限值的权利要求限制以及仅叙述所述范围的上限值的权利要求限制提供文字支持。举例来说,所公开的约10到约100的数值范围为叙述“大于约10”(不具有上限范围)的权利要求及叙述“小于约100”(不具有下限范围)的权利要求提供文字支持。

[0039] 实例

[0040] 以下实例阐述根据本发明的方法。然而,应理解以说明方式提供这些实例,且其中任何实例都不应视为对本发明的全部范围的限制。

[0041] 实例1

[0042] 进行背景工作以评估液体核海藻酸盐胶囊。简单来说,将40%葡萄糖和25mM或50mM氯化钙的溶液滴入各种浓度下的低粘度海藻酸钠中。葡萄糖用于增大液体核溶液的粘度和密度,这似乎为必需的以便形成球形构造体。将钙溶解到液体核溶液中以在液滴进入海藻酸盐浴液中后以由内而外胶凝机制引发海藻酸盐的快速胶凝。葡萄糖实验的结果示出液体核和海藻酸盐壳的透明、平滑界面。然而,该构造体观察到尽管是大致圆的,但具有尾状特征。这最可能是由于非最佳流变特性。液体核构造体然后暴露于50mM柠檬酸钠并且轻

度搅动以评价是否可使用生理上相关浓度的柠檬酸盐溶解海藻酸盐壳。实际上,海藻酸盐壳最终溶解,未留下可观察痕迹的胶凝化构造体(液体葡萄糖核仅溶解回本体溶液中)。

[0043] 在已识别可接受的试剂浓度和一般技术之后,市售HA水凝胶(HyStem)被用作液体核溶液。由于其较大粘度(准确的度量未知),仅玻尿酸组分,Glycosil,用于增大在该实验中成功的概率。将GMP级Glycosil以1X(2mL)溶解于HTK溶液中,并且然后添加至含有氯化钙的小瓶中以便实现1X Glycosil和25mM氯化钙的最终液体核溶液(HTK溶液作为溶剂)。通过27G平头顶端针头将该溶液从1cm-2cm的高度逐滴添加到搅拌的0.25%海藻酸钠溶液(Protanal LF 10/60,低粘度、高G含量)中。大致球形的双层构造体形成于海藻酸盐溶液中。参见图1。大部分呈现具有小尾状特征,类似于在葡萄糖实验中观察到的那些。然而,小百分比的构造体呈现显著球形而无任何可见尾,这可表明这种具体调配物(配方)的流变特性接近本技术,但对于本技术不是非常适当调节的。

[0044] 该液体核-壳构造体保持搅拌5分钟,并且然后用250 $\mu$ M尼龙网筛收集,并转移到含有~10mM氯化钙的PBS中以增强海藻酸盐壳从而在核硬化期间保护构造体的完整性。

[0045] 构造体稍后转移到含有1X浓度的HyStem交联剂PEGDA的小瓶(即总体积2.5mL的1个小瓶)中以再形成正常交联剂浓度。PEGDA(3400道尔顿)渗透物(海藻酸盐壳和HyStem核两者)使交联剂最终扩散在整个构造体中。该参数明确具有可变性,因为总PEGDA与HyStem组分的比大大高于如果凝胶制成块状的情况。在这种情况下,仅几百微升的Glycosil在容器中,而非正常2.0mL的Glycosil+Gelin-S。无论如何,这仅选作开始点,并且可修改。

[0046] 在室温下孵育过周末之后,借助光学显微镜观察构造体。所得的构造体示于图2中。有趣的是,其呈现为如同核收缩或壳扩展,因为原先直接接触的两层之间存在空隙空间。将构造体转移到含有10mL的在PBS中的50mM柠檬酸钠的皮氏培养皿,且放在轨道上以低rpm摇动以形成轻度搅动和流体流动。观察构造体45分钟,在此时间期间,海藻酸盐壳显著劣化并且在一些状况下完全消失而HyStem核保持不变且处于其初始球形几何结构。参见图3。在45分钟之后,构造体收集在250 $\mu$ M尼龙网筛中(参见图4),返回到皮氏培养皿并且用新鲜10mL等分试样的50mM柠檬酸钠冲洗。参见图5。在此步骤之后不久(大约数分钟),几乎所有构造体不含任何可见壳,其中仅留下硬化的HyStem核。参见图6。

[0047] 然后转移HyStem微球体以清洗PBS用于进一步观察。

[0048] 实例2

[0049] A. 使用海藻酸盐模具产生水凝胶微球体的一般方案

[0050] 1. 制备期望的最终组分浓度的液体水凝胶聚合物溶液,调节以含有25mM钙离子。对于不同的液滴尺寸应调节阳离子浓度。举例来说,最多200mM钙离子和/或200mM钡离子已经用于平均尺寸范围为约400微米-600微米的液滴。

[0051] 2. 将溶液装入液滴产生器(例如注射器/针头,或微粒/微封装体设备)中并引发液滴形成,调节仪器设置以实现期望的液滴尺寸。

[0052] 3. 在室温下,将液滴收集在含有0.25%低粘度海藻酸钠(w/v)在不含钙缓冲液或培养基(例如PBS)中的溶液的搅拌溶液中。可调节海藻酸盐浓度。举例来说,0.125%w/v的海藻酸钠已经用于较小液滴。水凝胶聚合物(核)溶液的粘度和密度最后指示真正球形构造体是否可在与海藻酸盐溶液接触时形成。除此之外,下落高度,即从液滴产生出口到溶液表面的距离,还将在所得构造体的形态中起作用。这些参数的具体值还将依据液滴的尺寸、材

料的类型、海藻酸盐溶液的浓度和粘度等变化。必须考虑到这些因素并且其将最后限制目标水凝胶聚合物溶液的组成。

[0053] 4. 在将所有液滴收集在溶液中时,继续搅拌~5min以允许海藻酸盐壳完全形成并且减少或防止液体核-壳构造体的聚集。依据初始液滴的尺寸(体积),该步骤可为任选的。对于较大球体(1mm-3mm)进行该步确实看起来会限制构造体的聚集。搅拌的长度与在液滴中使用的二价阳离子浓度成反比。此外,已发现在过度搅拌的情况下液滴变形可出现。已发现约1分钟-2分钟的搅拌时间对于较小液滴是足够的。

[0054] 5. 使用适当尺寸的滤网或筛网从海藻酸盐溶液中分离构造体。

[0055] 6. 根据所使用的特定水凝胶溶液的具体要求使核水凝胶聚合物溶液交联/胶凝。该步骤将依据使用的水凝胶前体溶液的类型而变化。在一些情况下,其将涉及将液体核-壳构造体转移到核胶凝溶液或含有水凝胶交联剂的容器。无论如何,可能该步骤将非常类似于与每种材料相关的制造商的建议胶凝方案,其中仅略微修改以考虑海藻酸盐壳和构造体几何结构。不论任何情况,本文所用的培养基应含有至少一些量的钙离子以在硬化期间维持海藻酸盐壳的完整性。

[0056] 7. 任何另外期望的硬化、固化或孵育可在此时进行(例如如果封装需要平缓处理的活细胞)。否则,立即进行到步骤8。

[0057] 8. 然后去除临时海藻酸盐壳。举例来说,然后将核/壳构造体转移到溶液和/或用适当的螯合剂洗涤以去除海藻酸盐壳。将现在的固体核-壳构造体转移到25mM-50mM柠檬酸钠在PBS(或其它不含钙的缓冲液)中的溶液中,并且在24°C-37°C下轻度搅动20分钟-40分钟,同时视觉上监测壳降解的进展。微球体与柠檬酸盐溶液的比容积比尚未确定。鉴于柠檬酸盐的成本非常低,该步骤应仅使用相当大过量的柠檬酸盐溶液来进行以确保海藻酸盐壳的完全去除。

[0058] 9. 使用适当尺寸的滤网或筛网用另外的柠檬酸盐溶液冲洗构造体,在新鲜柠檬酸盐溶液中重复搅动直到通过目视检查壳完全溶解。可能在冲洗期间流体的机械剪切是为何该步骤在去除剩余的海藻酸盐壳材料中有效,而非“新鲜的”柠檬酸盐溶液。因此,较早地进行该冲洗步骤可潜在地缩短本方法。

[0059] 10. 微球体(微珠)现在准备待用。转移到期望的培养基或缓冲液以便使用。

[0060] B. 使用海藻酸盐模具方法用于产生“HyStem”微球体的实例程序

[0061] 1. 使用缓冲的器官保存溶液,以10mg/mL重建GMP级Glycosil(HyStem-C水凝胶的硫醇化玻尿酸聚合物组分)。该溶液是HTK保存溶液。

[0062] 2. 将氯化钙粉末添加到Glycosil溶液中以实现~25mM钙离子浓度。

[0063] 3. 然后使用注射器和27G平头尖端针头从1cm-2cm的高度,将Ca<sup>2+</sup>/Glycosil水凝胶聚合物溶液逐滴添加到搅拌的0.25% (w/v)海藻酸盐溶液(Protanal LF 10/60)中。此时,为了减小液滴尺寸,通过轻拍注射器机械干扰液滴。

[0064] 4. 在液滴与溶液接触时立即形成球形液体Glycosil核-海藻酸盐壳构造体,并且搅拌另外的5分钟以允许壳完全形成并降低聚集。虽然大致球形的构造体确实具有尾状特征,但一些构造体大于其它构造体。通过调节Glycosil溶液的粘度,例如浓度,或添加其它粘度改性剂,这些应容易被消除。

[0065] 5. 用250微米的尼龙网筛收集构造体并储存于在PBS中的10mM Ca<sup>2+</sup>中用于后续处

理(壳去除)。在一些情况下,该步骤可为任选的。

[0066] 6. 将构造体转移到含有最终浓度为1X的Extralink (3400g/mol PEG二丙烯酸酯)(即2.5mL的在步骤1中使用的所述缓冲溶液中的1小瓶的GMP级Extralink)的管,并且在室温下孵育2天。在某些实施例中,可使用更短的孵育时间。

[0067] 7. 然后将构造体转移到50mM柠檬酸钠在PBS中的溶液中并且在定轨振荡器上平缓地搅动~45分钟。借助光学显微镜监测海藻酸盐壳降解。在20分钟-45分钟之间未注意到显著改变。如在一般方案评论中所提到的,冲洗步骤似乎促进壳去除过程。

[0068] 8. 然后在250微米尼龙网筛中用新鲜柠檬酸盐溶液冲洗构造体,然后在柠檬酸钠中进一步搅动直到无海藻酸盐壳的视觉迹象保留,仅留下固体球形Glycosil核。可能仅通过冲洗步骤完全去除海藻酸盐。然而,在返回到柠檬酸盐溶液并搅动若干分钟之前,未借助显微法检验这一点。

[0069] 9. 在室温下,将Glycosil球体储存于PBS中。

[0070] C. 在交联剂在水凝胶前体中的情况下使用海藻酸盐模具方法用于产生“HyStem”微球体的实例程序

[0071] 1. 水凝胶前体溶液制备如下:1%w/v Glycosil (硫醇化的HA, MW~250kDa)、200mM氯化钙、100mM组氨酸和0.25%PEGDA 3400 (pH 6.5, 粘度~50cP)。

[0072] 2. 以在室温下约1.5m/s的初始速度将直径约600微米的水凝胶前体的液滴从17cm的高度滴入0.125%的Protanal LF 10/60低粘度海藻酸盐(粘度~2.5cP)的搅拌浴液以形成核/壳微粒。

[0073] 3. 将核壳微粒在海藻酸盐浴液中搅拌2分钟,并且然后使用250微米筛网收集。

[0074] 4. 将核/壳微粒转移到PBS (pH 7.4) 中并且孵育过夜以准许水凝胶 (Glycosil和PEGDA) 的交联。

[0075] 5. 在过夜孵育之后,将核/壳微粒转移到含有50mM柠檬酸钠的0.85%氯化钠(或不含钙的PBS)的搅拌浴液直到海藻酸盐壳完全溶解。

[0076] 实例3

[0077] A. 使用海藻酸盐模具方法用于产生UV-交联的“HyStem-C”微球体的实例程序

[0078] 1. 水凝胶前体溶液制备成具有以下组成和物理特性。

[0079] • 1.0% (w/v) Glycosil (水凝胶前体聚合物)

[0080] • 0.5% (w/v) Gelin-S (生物活性剂)

[0081] • 1.0% (w/v) 4-臂聚乙二醇降冰片烯 (羟基自由基催化的硫醇反应性交联剂, MW: 10kDa, 美国键凯 (JenKem USA))

[0082] • 12% (v/v) 碘克沙醇 (密度改性剂)

[0083] • 200mM CaCl<sub>2</sub>

[0084] • 10mM HEPES

[0085] • 在室温下, pH~7

[0086] • 在室温下, 密度=1.08g/mL

[0087] • 在室温下, 粘度~60cP

[0088] 2. 海藻酸盐浴液制备成具有以下组成和物理特性。

[0089] • 0.12% (w/v) Protanal LF 10/60低粘度海藻酸盐

- [0090] • 0.1%吐温20 (表面活性剂)
  - [0091] • 0.1%Irgacure 2959 (光引发剂,西格玛奥德里奇公司 (Sigma Aldrich))
  - [0092] • 10mM HEPES
  - [0093] • 在室温下, pH~7
  - [0094] • 在室温下, 密度~1.0g/mL
  - [0095] • 在室温下, 粘度~2.5cP
- [0096] 3. 使用液滴产生器从约20cm的高度将水凝胶前体溶液的液滴引入搅拌的海藻酸盐溶液中以产生约1mm纤芯直径的核/壳微粒。
- [0097] 4. 立即在核/壳颗粒形成之后, 用长波紫外灯 (紫外产品有限公司 (Ultraviolet Products, LLC), 型号UVL-56, 6瓦, 365nm) 通过含有颗粒和具有光引发剂 (Irgacure2959) 的海藻酸盐溶液的玻璃容器的侧壁照射搅拌溶液。继续搅拌5分钟。
- [0098] 5. 在5分钟的初始搅拌之后, 用含有10mM HEPES的盐水1:1稀释海藻酸盐溶液, 以防止海藻酸盐壳的聚集和过度生长。UV照射和搅拌继续另外25分钟。
- [0099] 6. 最后, 将1.0M的柠檬酸钠添加到溶液至25mM柠檬酸根离子的最终浓度。在约5分钟之后海藻酸盐壳完全溶解从而显露交联的HyStem水凝胶微珠。然后使用250微米筛网收集HyStem珠粒。

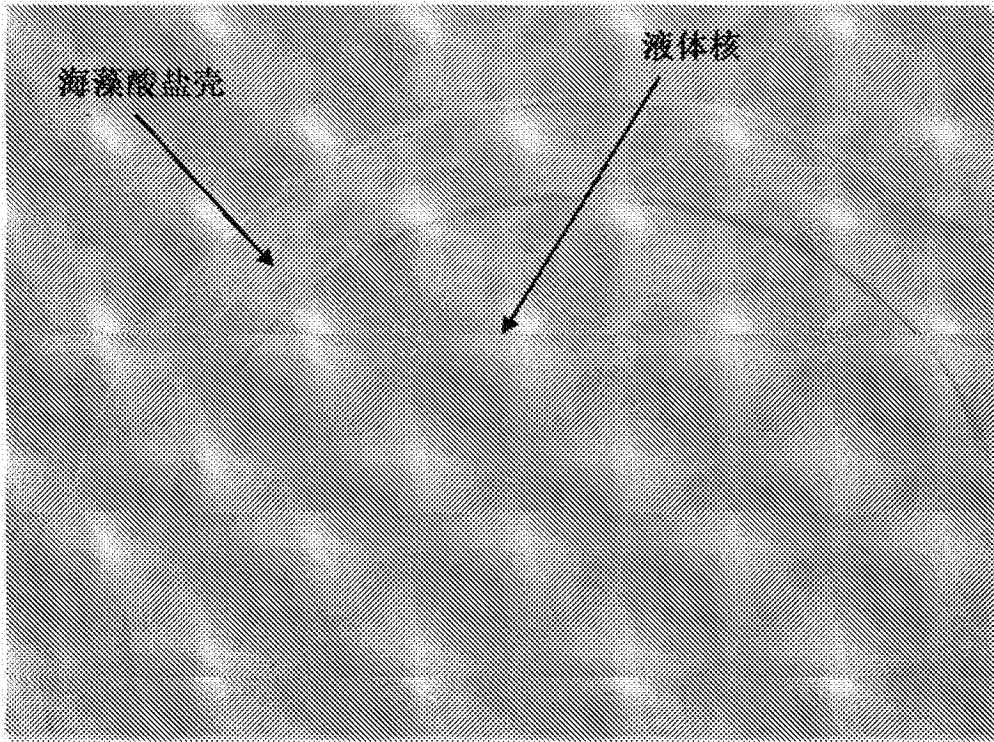


图1

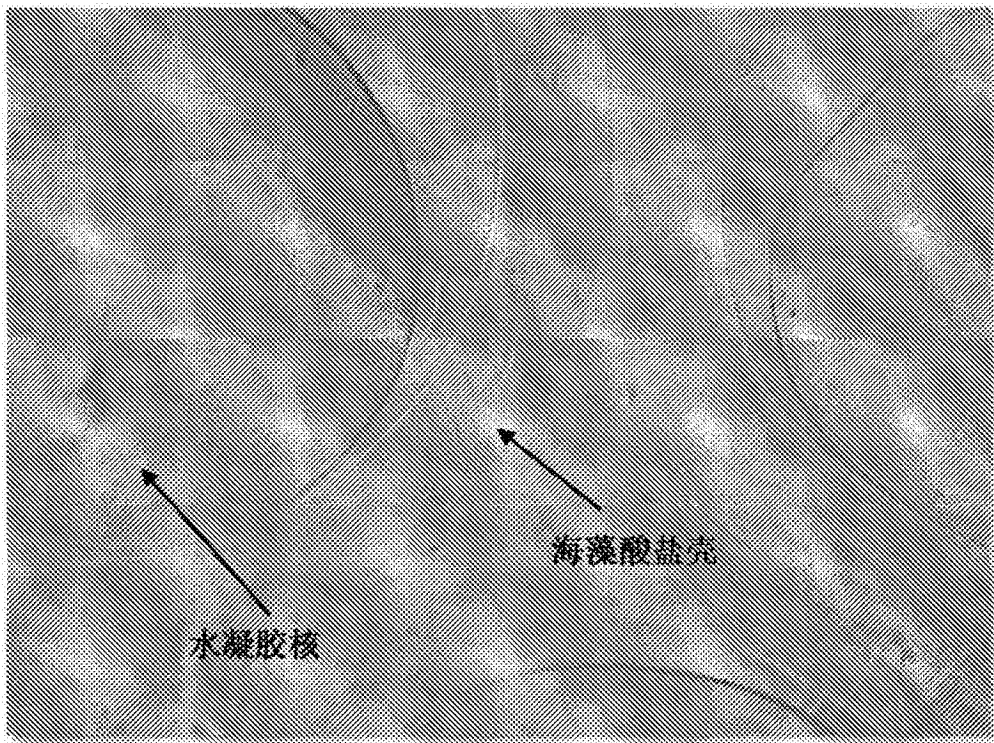


图2



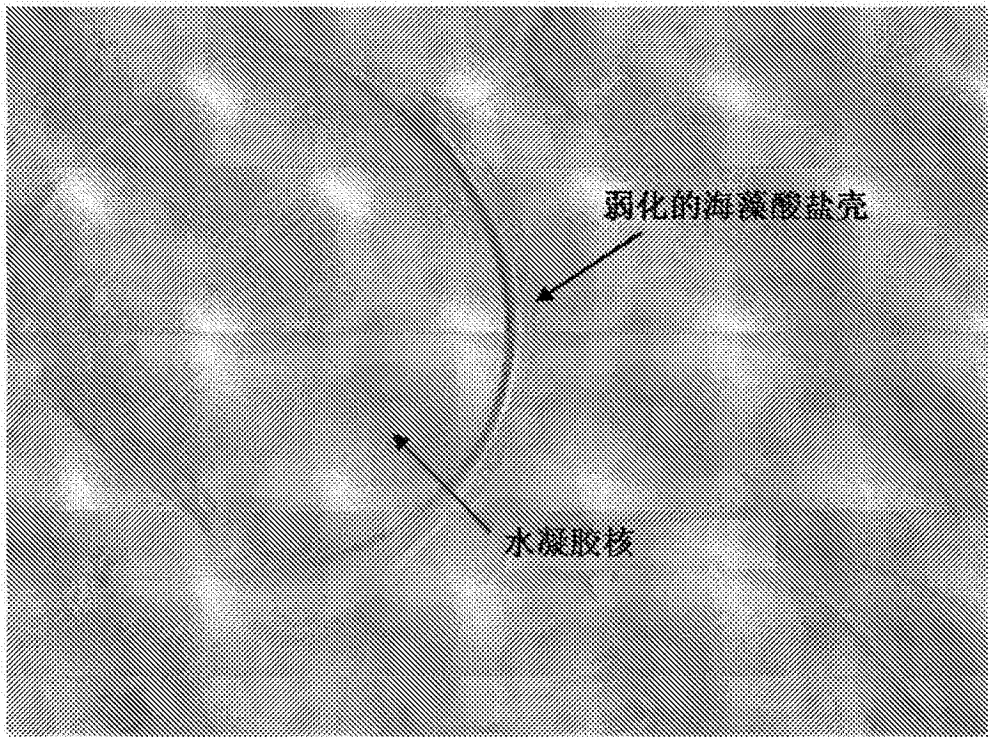


图3

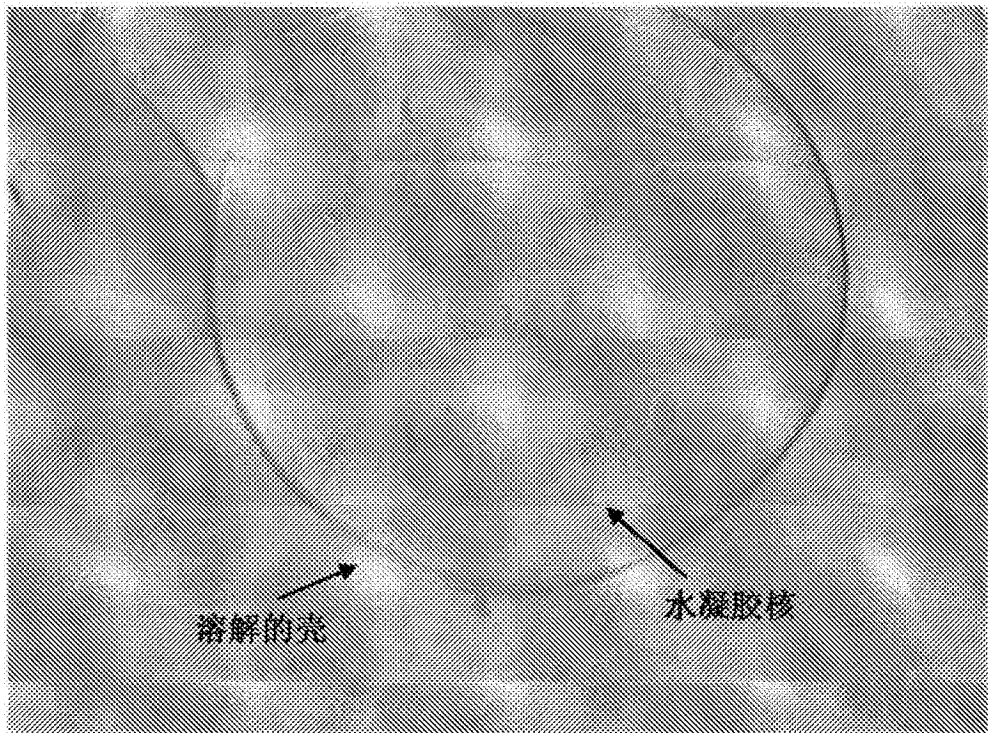


图4

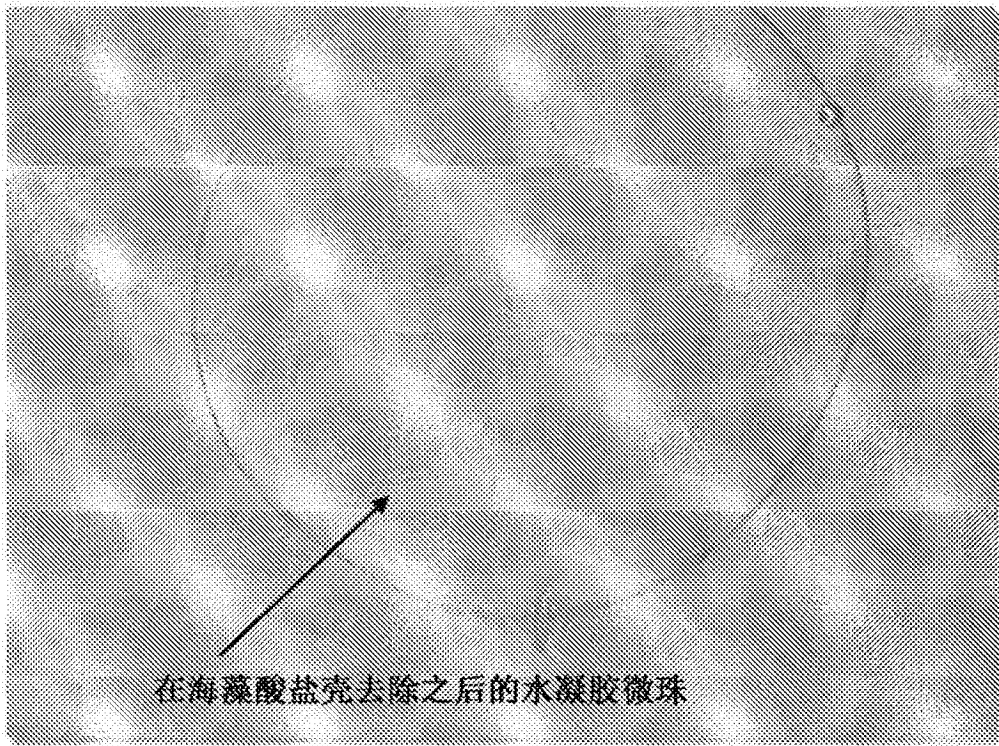


图5

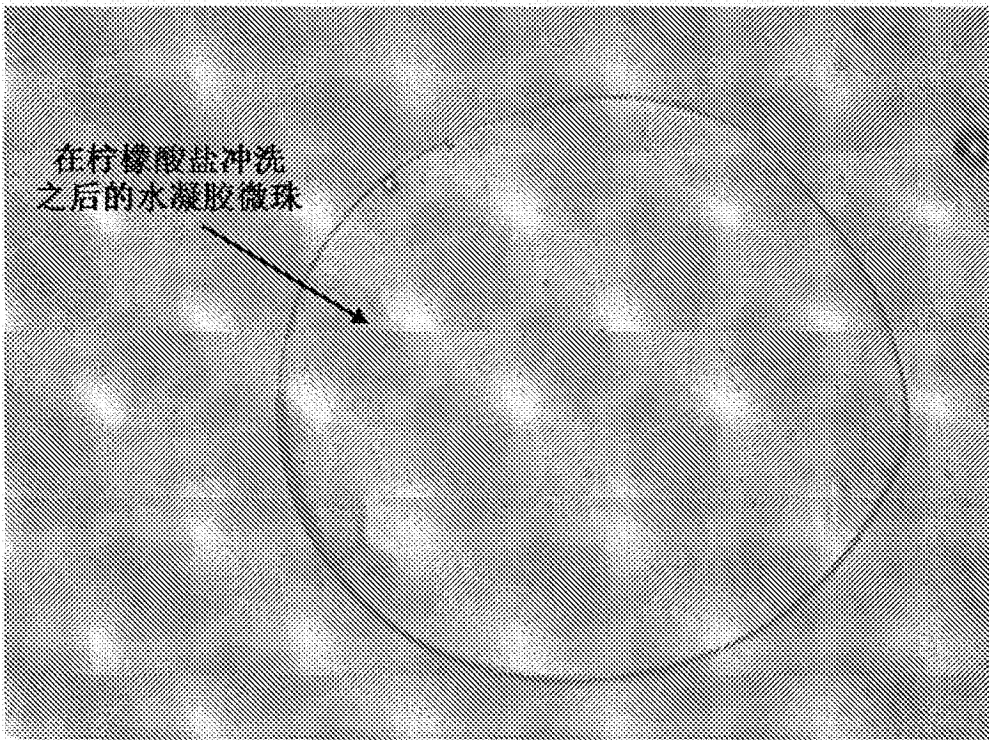


图6