



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104644545 A

(43) 申请公布日 2015. 05. 27

(21) 申请号 201510089733. 1

(22) 申请日 2015. 02. 27

(71) 申请人 苏州丝美特生物技术有限公司

地址 215000 江苏省苏州市星湖街 218 号生
物纳米园 B2 楼 204 室

(72) 发明人 王晓沁 石复辛

(74) 专利代理机构 苏州市中南伟业知识产权代
理事务所（普通合伙） 32257
代理人 李广

(51) Int. Cl.

A61K 9/06(2006. 01)

A61K 47/42(2006. 01)

A61P 27/16(2006. 01)

A61J 3/00(2006. 01)

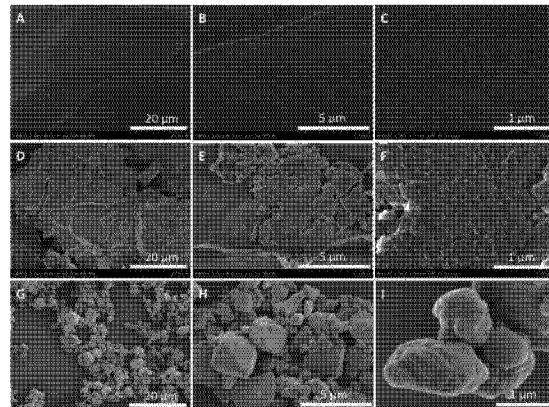
权利要求书1页 说明书10页 附图5页

(54) 发明名称

一种治疗内耳疾病的控释缓释丝素蛋白凝胶
制剂

(57) 摘要

本发明涉及一种治疗内耳疾病的制剂，尤其涉及一种治疗内耳疾病的控释缓释丝素蛋白凝胶制剂；本发明的治疗内耳疾病的控释缓释丝素蛋白凝胶制剂，包括制剂主体，所述制剂主体包括凝胶态的载体、以及分散或吸附在载体内的药物，所述药物为治疗内耳疾病的激素类药物，所述载体为丝素蛋白凝胶。本发明的治疗内耳疾病的控释缓释丝素蛋白凝胶制剂，药物释放时间较长、使用后对听力无影响、安全无害。



1. 一种治疗内耳疾病的控释缓释丝素蛋白凝胶制剂, 其特征在于: 包括制剂主体, 所述制剂主体包括凝胶态的载体、以及分散或吸附在载体内的药物, 所述药物为治疗内耳疾病的激素类药物, 所述载体为丝素蛋白凝胶。

2. 根据权利要求 1 所述的治疗内耳疾病的控释缓释丝素蛋白凝胶制剂, 其特征在于: 所述丝素蛋白凝胶以丝素蛋白溶液通过诱导成胶方式制成。

3. 根据权利要求 2 所述的治疗内耳疾病的控释缓释丝素蛋白凝胶制剂, 其特征在于: 所述诱导成胶方式包括 PH 值改变法、超声振荡法、电泳法、辣根过氧化酶 - 过氧化氢共混法、以及低分子量聚乙二醇共混法。

4. 根据权利要求 3 所述的治疗内耳疾病的控释缓释丝素蛋白凝胶制剂, 其特征在于: 所述诱导成胶方式为低分子量聚乙二醇共混法。

5. 根据权利要求 2 所述的治疗内耳疾病的控释缓释丝素蛋白凝胶制剂, 其特征在于: 所述制剂主体由所述药物以水溶液的形式、或者以不溶微球形式与丝素蛋白溶液混合后通过诱导成胶方式制成。

6. 根据权利要求 1 所述的治疗内耳疾病的控释缓释丝素蛋白凝胶制剂, 其特征在于: 所述制剂主体中丝素蛋白的浓度为 1-30%。

7. 根据权利要求 6 所述的治疗内耳疾病的控释缓释丝素蛋白凝胶制剂, 其特征在于: 所述制剂主体中丝素蛋白的浓度为 7.5-15%。

8. 根据权利要求 1 所述的治疗内耳疾病的控释缓释丝素蛋白凝胶制剂, 其特征在于: 所述激素类药物包括地塞米松、倍他米松、氢化波尼松、甲基强的松龙、去氧皮质酮、11-去氧皮质酮、18-H-11-去氧皮质酮、倍氯米松、曲安奈德以及其化学合成衍生物中的其中一种或多种。

9. 一种根据权利要求 1-6 任一项所述的治疗内耳疾病的控释缓释丝素蛋白凝胶制剂的制备方法, 其特征在于: 包括以下步骤:

1) 混合: 将治疗内耳疾病的激素类药物以水溶液的形式、或者以不溶微球形式与丝素蛋白溶液混合均匀, 得到药物悬液;

2) 成胶: 将药物悬液以诱导成胶的方式, 制成制剂主体。

10. 根据权利要求 9 所述的制备方法, 其特征在于: 所述混合步骤中激素类药物以不溶微球形式与丝素蛋白溶液混合均匀之前还进行涂层处理, 所述涂层处理包括以下步骤:

a) 将激素类药物微球悬浮于低浓度丝素蛋白溶液中, 混合均匀, 并超声处理一段时间以分散聚集成团的微球;

b) 将步骤 a) 得到的溶液, 经过振荡、离心、去上清、水洗和干燥后, 得到包被有丝素蛋白涂层的激素类药物微球。

一种治疗内耳疾病的控释缓释丝素蛋白凝胶制剂

技术领域

[0001] 本发明涉及一种治疗内耳疾病的制剂,尤其涉及一种治疗内耳疾病的控释缓释丝素蛋白凝胶制剂。

背景技术

[0002] 近几年来,通过鼓室 (IT) 将激素类药物向内耳给药以治疗突发性耳聋 (SSNHL) 的方案已经越来越多的得到应用,涵盖从一线治疗到难治突发性耳聋 (RSSNHL) 的急救等多个临床领域。相比于全身给药方式, IT 注射法不仅能使外淋巴液含有更高浓度的药物,而且增强了耳蜗的血流量和离子梯度,这些都有助于更好的恢复听力。然而,临床方面水溶性激素药物的 IT 给药受到了很大的限制,原因是部分药物可能会被鼓室的粘膜吸收,或者通过咽鼓管从鼓室流走,因而不能充分地与圆窗膜 (RWM) 接触,进而通过圆窗膜进入内耳。圆窗膜是从鼓室通往内耳的主要屏障,其吸收药物的多少直接决定了内耳内的药物浓度。直接注射的药物可能会被鼓室内的粘膜吸收,或者通过咽鼓管从鼓室流走,只有极少量能被圆窗膜吸收。由于药物扩散到内耳被限制,所以单独的鼓室注射并不能给予内耳充足的药物。临床中可以反复或者持续给药以维持内耳中药物浓度,即在鼓室植入一根连泵的导管,从而利用全植入式微导管连接微泵的连续给药。相比于反复注射,泵给药是可以达到持续递送药物的效果。但是,可植入微型泵在临幊上并没有得到广泛的认可,原因是插入和移除过程会给机体组织带来损伤。

[0003] 最近受到广泛关注的可降解生物材料控制药物持续释放,可以作为除了多次注射以及植入型微型泵的另一种方案。国内外的公司和研究单位正在积极研究多种合成或者天然的材料,以建立一种可临幊应用的内耳药物缓释控释系统。其基本构想是通过可降解材料包埋治疗分子,置于圆窗膜四周,材料可以粘附在圆窗膜上,并持续释放包埋的治疗分子至内耳。

[0004] 丝素蛋白是一种从家蚕丝分离出来的天然蛋白聚合物,具有组织修复以及药物递送载体所需要的一切特性,包括生物可降解性、生物相容性、稳定药物包埋、材料形式多样性以及加工简单、无需有机溶剂等。研究已经证实了注射用丝素蛋白凝胶的临幊应用可行性。丝素蛋白是已被 FDA 批准的生物材料,所以丝素凝胶应用于临幊是安全的。这些特性使丝素蛋白凝胶可以作为药物载体递送药物至内耳,通过 IT 延长药物在鼓室的停留时间,减少因流入咽鼓管造成的药物流失,然而,如何将药物与丝素蛋白凝胶形成稳定的控释缓释制剂,尚是一个难题。

[0005] 有鉴于上述的缺陷,本设计人,积极加以研究创新,以期创设一种治疗内耳疾病的控释缓释丝素蛋白凝胶制剂,使其更具有产业上的利用价值。

发明内容

[0006] 为解决上述技术问题,本发明的目的是提供一种药物释放时间较长、对听力无影响、安全无害的治疗内耳疾病的控释缓释丝素蛋白凝胶制剂。

[0007] 本发明的治疗内耳疾病的控释缓释丝素蛋白凝胶制剂，包括制剂主体，所述制剂主体包括凝胶态的载体、以及分散或吸附在载体内的药物，所述药物为治疗内耳疾病的激素类药物，所述载体为丝素蛋白凝胶。

[0008] 具体的，所述丝素蛋白凝胶以丝素蛋白溶液通过诱导成胶方式制成。

[0009] 具体的，所述诱导成胶方式包括 PH 值改变法、超声振荡法、电泳法、HRP(辣根过氧化酶)-H₂O₂(过氧化氢) 共混法、以及低分子量 PEG(聚乙二醇) 共混法。

[0010] 优选的，所述诱导成胶方式为低分子量 PEG(聚乙二醇) 共混法。

[0011] 具体的，所述制剂主体由所述药物以水溶液的形式、或者以不溶微球形式与丝素蛋白溶液混合后通过诱导成胶方式制成。

[0012] 具体的，所述制剂主体中丝素蛋白的浓度为 1-30%。

[0013] 优选的，所述制剂主体中丝素蛋白的浓度为 7.5-15%。

[0014] 具体的，所述疾病包括梅尼耳氏症、突发性耳聋 (SSNHL) 、美尼尔氏综合征、感觉神经性听力损失、以及自身免疫性内耳病 (AEID) ，所述激素类药物包括地塞米松、倍他米松、氢化波尼松、甲基强的松龙、去氧皮质酮、11- 去氧皮质酮、18-H-11- 去氧皮质酮、倍氯米松、曲安奈德以及其化学合成衍生物中的其中一种或多种。

[0015] 本发明还提供一种上述治疗内耳疾病的控释缓释丝素蛋白凝胶制剂的制备方法，包括以下步骤：

[0016] 1) 混合：将治疗内耳疾病的激素类药物以水溶液的形式、或者以不溶微球形式与丝素蛋白溶液混合均匀，得到药物悬液；

[0017] 2) 成胶：将药物悬液以诱导成胶的方式，制成制剂主体。

[0018] 进一步的，所述诱导成胶方式包括 PH 值改变法、超声振荡法、电泳法、HRP(辣根过氧化酶)-H₂O₂(过氧化氢) 共混法、以及低分子量 PEG(聚乙二醇) 共混法。

[0019] 进一步的，所述混合步骤中激素类药物以不溶微球形式与丝素蛋白溶液混合均匀之前还进行涂层处理，所述涂层处理包括以下步骤：

[0020] a) 将激素类药物微球悬浮于低浓度丝素蛋白溶液中，混合均匀，并超声处理一段时间以分散聚集成团的微球；

[0021] b) 将步骤 a) 得到的溶液，经过振荡、离心、去上清、水洗和干燥后，得到包被有丝素蛋白涂层的激素类药物微球。

[0022] 若需得到包被有多层丝素蛋白涂层的激素类药物微球，重复步骤 a-b 即可。

[0023] 本发明所述的治疗内耳疾病的控释缓释丝素蛋白凝胶制剂，其使用方法包括两种，一种为原位成胶，一种为预成胶，原位成胶和预成胶的成胶方式一样，仅在具体使用方式上存在不同，两者的区别点在于，预成胶在体外成胶后注射或植入内耳，而原位成胶是将药物悬液注射入圆窗龛的整个空间，继而形成合适形态的半固态凝胶，最大限度的接触圆窗膜的表面；预成胶不需要病人保持一定的姿势，因而更方便，但缺点是高浓度下较难通过细针头注射。

[0024] 借由上述方案，本发明至少具有以下优点：本发明药物作为控释缓释制剂，能够治疗内耳疾病。可注射丝素蛋白凝胶作为药物载体，丝素蛋白 -PEG 溶液成胶时间高度可控 (Wang X, Partlow B, Liu J, et al. Injectable silk-polyethylene glycol hydrogels. Acta Biomater. 2015 ;15(12):51-61) ；原位成胶的制备方案能达到零级释放的标准；药物

释放时间至少能达到 10 天；并且对听力无影响。同时作为药物载体，丝素蛋白 -PEG 凝胶安全无毒、降解缓慢。说明可注射丝素 -PEG 凝胶是一种有效安全的药物载体，可用于激素类缓释药物治疗内耳疾病。

[0025] 上述说明仅是本发明技术方案的概述，为了能够更清楚了解本发明的技术手段，并可依照说明书的内容予以实施，以下以本发明的较佳实施例并配合附图详细说明如后。

附图说明

- [0026] 图 1 是本发明实施例六中丝素 -PEG-mDEX 凝胶的扫描电子显微镜结果图；
- [0027] 图 2 是本发明实施例七中丝素 -PEG-mDEX 凝胶的体外释放试验结果图；
- [0028] 图 3 是本发明实施例八中不同时间点下外淋巴液中 DEX 的浓度结果图；
- [0029] 图 4 是本发明实施例八中假手术组和圆窗膜注射丝素 -PEG-mDEX 凝胶组对听阈的影响对比图；
- [0030] 图 5 是本发明实施例八中豚鼠鼓室和内耳样品的组织切片图；
- [0031] 图 6 是本发明实施例八中罗丹明 - 鬼笔环肽染色基膜荧光染色结果图；
- [0032] 图 7 是本发明实施例八中丝素 -PEG-mDEX 凝胶体内生物降解图。

具体实施方式

[0033] 下面结合附图和实施例，对本发明的具体实施方式作进一步详细描述。以下实施例用于说明本发明，但不用来限制本发明的范围。

实施例一

[0035] 本发明的治疗内耳疾病的控释缓释丝素蛋白凝胶制剂，包括制剂主体，制剂主体包括凝胶态的载体、以及分散或吸附在载体内的药物，药物为治疗内耳疾病的激素类药物，载体为丝素蛋白凝胶。其中，丝素蛋白凝胶以丝素蛋白溶液通过诱导成胶方式制成；诱导成胶方式包括 PH 值改变法、超声振荡法、电泳法、HRP(辣根过氧化酶)-H₂O₂(过氧化氢) 共混法、以及低分子量 PEG(聚乙二醇) 共混法。

[0036] 激素类药物分为水溶性药物和水难溶性药物，因而，制剂主体由药物以水溶液的形式、或者以不溶微球形式与丝素蛋白溶液混合后通过诱导成胶方式制成。考虑到药物需要长效释放，优化的药物形式为水难溶性药物，更优化选择微球态水难溶性药物，水难溶性药物可以通过喷雾干燥等手段制成微球形式。考虑到长效释放的功效，药物剂型可以做进一步的预处理，即将治疗药物的微球表层涂抹丝素蛋白，能更有效的促进药物在凝胶降解过程中的缓释功效。水难溶性药物以微球形式悬浮在合适的溶剂中，而后与丝素蛋白溶液混合后诱导成胶，合适的溶剂包括但不限于水、有机溶剂、增溶剂、增粘剂、以及促渗剂。

[0037] 根据不同药物的用量不同，药物溶液中，药物浓度的范围为 0.5% -15% (w/v)，其中，低载量的浓度为 0.5-2%；中载量：2-5%；高载量浓度为 5-15%。而制剂主体中丝素蛋白的浓度为 1-30%；制剂主体中丝素蛋白的浓度为 7.5-15%。

[0038] 本发明的治疗内耳疾病的控释缓释丝素蛋白凝胶制剂，可以应用的内耳疾病包括梅尼耳氏症、突发性耳聋 (SSNHL)、美尼尔氏综合征、感觉神经性听力损失、以及自身免疫性内耳病 (AEID) 等多种内耳疾病；相对应的，使用的激素类药物包括地塞米松、倍他米松、氢化波尼松、甲基强的松龙、去氧皮质酮、11- 去氧皮质酮、18-H-11- 去氧皮质酮、倍氯米松、

以及曲安奈德以及其化学合成衍生物中的其中一种或多种。

[0039] 本发明所述的治疗内耳疾病的控释缓释丝素蛋白凝胶制剂，其药物作用部位为内耳，药物制剂呈凝胶态，覆盖在耳蜗内的圆窗膜上及周围，可以通过耳蜗内圆窗龛注入药物制剂和 / 或通过鼓室注射；其使用方法包括两种，一种为原位成胶，一种为预成胶，两者的区别点在于，预成胶在体外成胶后注射或植入内耳，而原位成胶是将药物悬液注射入圆窗龛的整个空间，继而形成合适形态的半固态凝胶，最大限度的接触圆窗膜的表面。药物剂型为原位成胶时，在溶液态时包括但不限于普通注射器和微小针头注入鼓室给药、微量注射器给药。

[0040] 本发明所述的治疗内耳疾病的控释缓释丝素蛋白凝胶制剂，若采用低分子量 PEG(聚乙二醇)共混法并使用原位成胶，其药物作用机理为：注射后，丝素蛋白-PEG(聚乙二醇)混合液注满圆窗龛的整个空间，继而形成合适形态的半固态凝胶，最大限度的接触圆窗膜的表面；随着凝胶长期粘附在圆窗膜上，药物持续释放并进入内耳达到治疗疾病的效果。随着药物的释放，凝胶在体内被蛋白酶降解，降解产物为多肽及氨基酸。降解时间通过实验得知，第 10 天开始降解，21 天时药用部位只有少量残余凝胶存在，同时发现药物的控缓时间至少能达到 10 天。

[0041] 实施例二

[0042] 本发明提供一种治疗内耳疾病的控释缓释丝素蛋白凝胶制剂的制备方法，包括以下步骤：

[0043] 1) 混合：将治疗内耳疾病的激素类药物以水溶液的形式、或者以不溶微球形式与丝素蛋白溶液混合均匀，得到药物悬液；

[0044] 2) 成胶：将药物悬液以诱导成胶的方式，制成制剂主体。

[0045] 其中，诱导成胶方式包括 PH 值改变法、超声振荡法、电泳法、HRP(辣根过氧化酶)-H₂O₂(过氧化氢)共混法、以及低分子量 PEG(聚乙二醇)共混法。

[0046] 不同诱导成胶方式的操作步骤如下，对比结果如表 1 所示：

[0047] a) PH 值改变制备丝素蛋白凝胶

[0048] 用 20mL 的小烧杯取 10mL 5% (w/v) 的丝素蛋白溶液，用 NaH2PO4-Na2HP04 缓冲液调节溶液 PH 为 5.2，于室温下过夜，缓慢成胶。

[0049] b) 超声振荡制备丝素蛋白凝胶

[0050] 用 10mL 的试管取 5mL 5% (w/v) 的丝素蛋白溶液，用 JYD-900 智能型超声波细胞粉碎机在 500w 功率下进行超声波振荡 30-60sec(秒)，然后将小烧杯置于室温 25℃ 形成凝胶。

[0051] c) 电泳法制备丝素蛋白凝胶。

[0052] 电极浸入 8% (w/v) 丝素蛋白水溶液，25 伏直流电下通电 3min(分钟)。由于丝素蛋白溶液含水量高，通电过程中会发生水解，产生氧气和氢气，所以随着通电进行，两电极出现气泡。同时阳极位置出现成胶现象。

[0053] d) HRP(辣根过氧化酶)-H₂O₂(过氧化氢)成胶

[0054] HRP 冻干粉末加入到去离子水中形成浓度为 1000U/ml 溶液，后取适量 HRP 溶液加入 3% (w/v) 丝素蛋白溶液中，调制溶液中 HRP 终浓度为 10U/ml。然后向每毫升丝素蛋白溶液中加入 10 μl 过氧化氢溶液，达到 165nM 的过氧化氢终浓度，混合后制备成胶。

[0055] e) 低分子量 PEG(聚乙二醇)成胶

[0056] 15% (w/v) 丝素蛋白溶液混合同体积的 80% (w/w) PEG400(聚乙二醇 400) 溶液，在 37℃下孵化成胶。

[0057] 表 1 不同的丝素蛋白凝胶制备方法比较

[0058]

名称	制备方法	X-衍射测定主要结晶结构
改变 PH 值	丝素蛋白溶液中加入 NaH ₂ PO ₄ -Na ₂ HPO ₄ 缓冲液调节溶液，调节 pH 至 5.2，使溶液成胶	Silk II
超声振荡	丝素蛋白溶液在 800W 功率下超声成胶	Silk II
电泳	利用 25V 直流电压电解丝素蛋白水溶液，阳极部位先出现成胶现象。	Silk II
HRP-H2O2 成胶	将 HRP 粉末加入丝素蛋白溶液中，再加入 H ₂ O ₂ 溶液，随后溶液成胶	Silk II
低分子量 PEG 成胶	丝素蛋白溶液混合低分子量的 PEG 溶液，37℃下成胶	Silk II

[0059] 通过 X-衍射检查各种方法成胶后的主要结构得知，其主要结构均为 Silk II。Silk II 晶体结构含量是决定丝素蛋白生物材料的机械强度、降解速率及药物缓释控释性能的最重要因素，因此据此可知以上不同方法制备的丝素蛋白凝胶在材料性能上无差异化。由于低分子量 PEG(聚乙二醇)成胶法临床应用更为方便，可控，安全无毒，故下述实施例中诱导成胶的方法均采用丝素蛋白-PEG 凝胶法，其它方法不再赘述。另外，应当指出的是，当采用低分子量 PEG(聚乙二醇)共混法制备凝胶时，也可以将上述的激素类药物与聚乙二醇混合，或同时与丝素蛋白和聚乙二醇混合。

[0060] 实施例三

[0061] 本发明提供一种治疗内耳疾病的控释缓释丝素蛋白凝胶制剂的制备方法，应用于不同激素类药物制剂的制备：

[0062] a) 丝素蛋白-PEG-mDEX(micronized dexamethasone, 地塞米松微球)制备

[0063] 一定量的 mDEX 微球悬浮于 0.5ml 的 15% (w/v) 丝素蛋白水溶液，随后悬浮液与同体积的 0.5ml 80% (w/w) PEG400(聚乙二醇 400) 溶液混后成胶。

[0064] b) 丝素蛋白-PEG-DA(醋酸地塞米松)凝胶制备

[0065] 无菌的 DA(醋酸地塞米松)溶液与高浓度的丝素蛋白水溶液混合均匀达到一定的药物载量，丝蛋白终浓度为 15% (w/v)，再与同体积的 80% (w/w) PEG400(聚乙二醇 400) 溶液混后成胶。

[0066] c) 丝素蛋白-PEG-MPS(地塞米松磷酸钠)凝胶制备

[0067] 无菌的 DSP(地塞米松磷酸钠)溶液与高浓度的丝素蛋白水溶液混合均匀达到一定的药物载量，丝蛋白终浓度为 15% (w/v)，再与同体积的 80% (w/w) PEG400(聚乙二醇 400) 溶液混后成胶。

[0068] 由于不同药物的药效不同、用量不同，本发明难以对其进行一一举例详细说明，因而，在后续实施例中，仅以丝素蛋白-PEG-mDEX 的制备为例进行详细说明。

[0069] 实施例四

[0070] 本发明提供一种治疗内耳疾病的控释缓释丝素蛋白凝胶制剂的制备方法，用于丝

素蛋白 -PEG-mDEX 制备：

[0071] a) mDEX-丝素蛋白涂层制备：大约 20mg 的 mDEX 悬浮于 1ml 的 0.1% (w/v) 丝素蛋白溶液。悬浮液室温下缓慢振荡 2min。然后微球悬浮液超声大约 1min，以分散聚集成团的微球。再次振荡 2min 后溶液离心 2min (14000r. p. m)，以去除上层丝素蛋白溶液。微球以 1ml 水洗 2 次，振荡 1min，离心。洗后的微球以氮气干燥制得。以上涂层步骤可以重复多次，直到得到理想的涂层厚度及相应的药物释放速率。

[0072] b) 丝素蛋白 -PEG-mDEX 凝胶制备：制得的丝素蛋白涂层的 mDEX 悬浮于 0.5ml 的高浓度丝素蛋白水溶液，丝蛋白终浓度为 15% (w/v)，随后悬浮液与同体积的 0.5ml 180% (w/w) PEG400 (聚乙二醇 400) 溶液混后成胶。

[0073] 应当说明的是：上述步骤 b) 可以单独使用以制备无丝素蛋白涂层的丝素蛋白 -PEG-mDEX 凝胶，也可与步骤 a) 相结合，制备有丝素蛋白涂层的丝素蛋白 -PEG-mDEX 凝胶。

[0074] 实施例五

[0075] 本发明提供一种治疗内耳疾病的控释缓释丝素蛋白凝胶制剂的制备方法，用于丝素蛋白 -PEG-mDEX 制备，其方法与实施例四中的一致，其区别点在于：

[0076] 丝素蛋白的浓度调整为 1-30%，然而丝蛋白终浓度为 1% 时，由于凝胶浓度较低，载药性较差，药物的释放速度较快，当丝蛋白终浓度为 30% 时，由于凝胶浓度较高，载药性较高，对药物的吸附作用更为显著，药物的释放速度较慢，因此，优选为制剂主体中丝素蛋白的浓度为 7.5-15%。

[0077] 实施例六

[0078] 本发明提供一种治疗内耳疾病的控释缓释丝素蛋白凝胶制剂，采用实施例四中的制备方法制备，随后采用 SEM (扫描电子显微镜检查法) 对丝素 -PEG-mDEX 凝胶进行形态学检查。试验方法为：

[0079] 丝素蛋白 -PEG 凝胶 (7.5% w/v) 包埋 mDEX (0%、1.5% 载量) 按实施例四方法制备，将 200 μL 制备好的溶液滴入 24 孔板，放置在 37°C 环境下孵化直至溶液成胶。孔板浸入 1000ml 纯净水的玻璃烧杯中，缓慢搅拌超过 24 小时，期间置换 4 次纯净水，被洗过的凝胶在 -80°C 下冷冻过夜并冻干 48 小时。样品通过 SEM 观察。

[0080] 如图 1 所示，通过 SEM 观察形态学，PEG 在水洗后已经从凝胶中去除，导致剩下的凝胶呈多孔海绵状。如图 1A-1C 所示，分别为 20、5 和 1 μm 放大倍数下未包埋 mDEX 的丝素 -PEG 凝胶的扫描电子显微镜结果图，未包埋 mDEX 的丝素 -PEG 凝胶具有多孔结构，内有大约 100 μm 的相互联通的孔隙。如图 1D-1F 所示，分别为 20、5 和 1 μm 放大倍数下包埋 mDEX 的丝素 -PEG 凝胶的扫描电子显微镜结果图，而包埋了 mDEX 的丝素 -PEG 凝胶则呈现出相似的多孔叠层结构，微粒状的 mDEX (1-5 μm) 则嵌入在丝素蛋白的基质内。如图 1G-1I 所示，分别为 20、5 和 1 μm 放大倍数下未包埋的 mDEX 水不溶微球的扫描电子显微镜结果图，独自测量的 mDEX 微粒与嵌入在丝素蛋白凝胶中的微粒大小是一样的，这表明丝素蛋白凝胶形成的过程对 mDEX 微粒的大小和分散性没有影响。

[0081] 实施例七

[0082] 本发明提供实施例四中所述的治疗内耳疾病的控释缓释丝素蛋白凝胶制剂，在体外的控释、缓释效果的试验分析结果，丝素蛋白 -PEG-mDEX 凝胶制备方法与实施例四中

提供的方法一致,区别点在于药物的载药量不同,同时 mDEX 药物微球没有经过丝素蛋白涂层。体外释放试验如下所示:

[0083] 丝素蛋白-PEG-mDEX 凝胶,根据其载药量 mDEX 的不同分为低剂量(0.5%)和高剂量(2.5%),对于成胶方式的不同,分为原位成胶组和预成胶组。其中,对于原位成胶组,5 μl 的丝素蛋白-PEG-mDEX 溶液通过 25G 针头注射至 2-ml 的微量离心管,然后 37℃ 孵育,在 30 分钟内成胶。对于预成胶组,注射器内含有的丝素蛋白-PEG-mDEX 溶液先在 37℃ 的环境下在 30 分钟内孵育成胶,然后向 2-ml 微量离心管内注射 5ml 的凝胶(不带针头)。实验开始时,每个管中均加入 1ml PBS, PH = 7.4 的缓冲液,所有的离心管在 37℃ 下振荡。第 1、6、24 小时、2、3、4、5、6、7 天,抽取 0.95ml 的释放介质到一空白管,然后 4℃ 下储存,用于 LC/MS/MS 检测。恒温下再在原离心管中补充 0.95ml 的 PBS, PH 7.4 的缓冲液。

[0084] 结果如图 2 所示,其中图 2A 为不同时间下,4 种丝素蛋白-PEG-mDEX 凝胶在释放介质(PBS, pH 7.4)中 DEX 浓度(μg/ml)的对比检测结果图,图 2B 为不同时间下,4 种丝素蛋白-PEG-mDEX 凝胶在 144h 内 DEX 的累积释放量对比图。如图 2A 所示,载药量为 0.5% 的丝素蛋白-PEG-mDEX 凝胶在起始阶段显示出快速释放的过程,原位成胶和预成胶的模式下 2h 时都迅速达到最大的浓度值(大约 4 μg/ml),6h 后则迅速降低至基线值。当凝胶载药量为 2.5% 时,DEX 高浓度水平的持续释放时间更久,其中原位成胶模式下,DEX 的浓度在 96h 里在 5-10 μg/ml 内变化,在 144h 则跌落至 1.6 μg/ml,预成胶模式下,72h 内 DEX 的浓度在 5-10 μg/ml 变化,96h 时跌落至 2.2 μg/ml。在 mDEX 的载药量为 0.5% 时,原位成胶模式和与预成胶模式 2h 的累积释放量分别为 38% 和 25%(图 2B)。mDEX 载药量为 2.5% 时,原位成胶和预成胶几乎都达到了零级释放,在 144h 后,其释放率分别接近 44% 和 30%(图 2B)

[0085] 实施例八

[0086] 本发明提供实施例四中所述的治疗内耳疾病的控释缓释丝素蛋白凝胶制剂,在体内的控释、缓释效果的试验分析结果。丝素蛋白-PEG-mDEX 凝胶制备方法与实施例四中提供的方法一致,区别点在于载药量和丝素蛋白浓度不同,体内药代动力学试验方法如下:

[0087] a) 耳科手术:

[0088] 方法:

[0089] 丝素-PEG-mDEX 凝胶中,丝素蛋白浓度为 7.5% (w/v),mDEX 载量为 0.5% 和 2.5% (w/v),用于体内试验研究。对照组中 0.5% 和 2.5% mDEX 溶液的制备是以 mDEX 悬浮于 10mM PBS, PH7.4 制备。整个过程在无菌操作台进行的无菌操作。豚鼠腹腔注射 1% 戊巴比妥钠麻醉(35mg/kg)。整个手术过程中需要将动物放置在电热垫上(38℃)以保持体温,皮下注射 1% 利多卡因局麻,通过耳后手术暴露听泡,在听泡上钻出直径为 3mm 的一个小洞,以清晰看到圆窗龛。用结核菌素注射器(27G 针头)向圆窗膜上滴注 10 μl 的 mDEX 悬浮液(对照组)或者丝素-PEG-mDEX 混合悬浮液,注入后豚鼠固定此姿势约 30min,以等待溶液成胶,洞口用缝合线缝合并打上补齿水泥密封。

[0090] b) 取样和 DEX 浓度检测

[0091] 方法:豚鼠分为 2 组(50 只):丝素-PEG-mDEX 凝胶组(取样时间:1h、1、4、7、10、14 天)和 mDEX 对照组(取样时间:1、3、6、12h)。每次取样点为 5 只豚鼠(3 只凝胶组和 2 只对照组)取样分析。脑脊液(CSF)的抽取,在头顶后方正中线切口,剥离肌肉层,露出小脑延髓池,微量调节注射器抽取 CSF 20 μl。血样的提取为心脏穿刺抽取,血样转移至加入肝

素的离心管并离心 5min(3500rpm/s)。随后将上清的血清（约 100 μl 每只）移至空管中。外淋巴液取样时为避免脑脊液污染，采用离体提取。试验动物全麻后从颞骨分离耳蜗。在耳蜗顶圈开一小洞，用微量调节注射器泵抽取外淋巴 (5–7 μl)。所有样品检测前放置 -80°C 环境下保存。

[0092] 结果：

[0093] 在向豚鼠的圆窗膜注射丝素 -PEG-mDEX 凝胶和 mDEX 溶液（对照组）后，对豚鼠的外淋巴液、CSF（脑脊液）和血浆样品中 DEX 的浓度定时取样检测。如图 3 所示，为载药量为 0.5% 和 2.5% 的丝素 -PEG-mDEX 凝胶、以及 mDEX 溶液，在不同时间点下外淋巴液中释放的 DEX 浓度的对比图，图 3A 为 0–200h 的结果图，图 3B 为 0–30h 区域的局部放大的对比图。由图可知，对照组中，外淋巴 DEX 浓度 1h 就达到峰值 ($13.47 \pm 6.02 \mu\text{g/ml}$)，在 6h 时则降至 $2.984 \pm 1.33 \mu\text{g/ml}$ ，12h 就跌落到检测线以下。DEX 载量为 0.5% 的丝素 -PEG-mDEX 凝胶组中，外淋巴中 DEX 浓度 1h 为 $8.06 \pm 4.56 \mu\text{g/ml}$ ，12h 为 $2.70 \pm 0.97 \mu\text{g/ml}$ ，说明该组的 DEX 释放时间比对照组要长。当 DEX 载量升至 2.5% 时，在丝素 -PEG-mDEX 组中，DEX 在内耳的时间和浓度显著增加，外淋巴的 DEX 检测浓度 1h 为 $25.71 \pm 11.50 \mu\text{g/ml}$ ，4d 为 $6.46 \pm 2.89 \mu\text{g/ml}$ ，10d 达到了 $0.26 \pm 0.15 \mu\text{g/ml}$ 。局部给药后，DEX 在全身的浓度很低，丝素 -PEG-mDEX (2.5%) 组中耳注射后 1h，在 CSF 和血浆中分别检测到 DEX 的浓度为 0.23 ± 0.10 和 $0.032 \pm 0.014 \mu\text{g/ml}$ 。相比较在外淋巴液中的浓度，降低了大约 110 倍和 800 倍。2h 后则无法检测到 DEX。低载量 (0.5%) 的丝素 -PEG-mDEX 组在 1h 也都无法在 CSF 和血浆中检测到 DEX。这些结果表明丝素 -PEG 凝胶在耳蜗中缓释释放 DEX 多达 10 天以上。

[0094] c) 听脑干反应评估 (ABR)

[0095] 方法：

[0096] 为评价丝素 -PEG-mDEX 凝胶的安全性以及在听觉外科手术过程中应用产生的影响，在 4 个时间点通过 ABR 测试来评估听力功能：手术前、术后 1 天、术后 4 天、以及术后 14 天。12 只豚鼠分为 2 组：手术对照组（未加药物，n = 6）和丝素 -PEG-mDEX 凝胶组（n = 6）。利用 TDT-II 记录系统 (Alachua, FL, USA) 在特定的频率下 (4K、8K、16K、24K) 分析 ABR。腹腔注射 1% 戊巴比妥 (35mg/kg) 麻醉试验动物。试验动物放置在电热毯上 (38°C)，处于隔音室中测试。皮下植入 3 个针电极以便测量脑干活动：一只移植在耳后方（参考电极），一只移植在脑壳顶点（工作电极），一只在后腿的对侧（接地电极）。诱发电位通过带通滤波器滤过在 100–300Hz，平均 512 次。在每个给定的频率，猝发音强度开始在 90dB SPL，并逐步 5dB 减弱，直到达到阈值。ABR 的阈值定位在能够搜集到的最低强度的可再现波段 III。

[0097] 结果：

[0098] 实验中阈值随猝发音强度变化而变化的情况如图 4A 所示。手术对照组中，听力功能在所有的时间点（术前，1、4、14 天）和任何频率下都没有被影响（图 4B）。在丝素 -PEG-mDEX 高剂量 (2.5%) 凝胶组中 (Figure 4C)，4kHz 和 8kHz 频率段听力没有变化，没有出现阈值提升的情形。在 16K 和 24K 频率段，相比于术前阈值水平，凝胶注射后听力有一过性的小幅度下降，1 天内阈值上升了 5–15dB SPL (39.2 ± 6.6 vs 30.8 ± 5.8 at 16k Hz; 45.0 ± 7.1 vs 34.2 ± 6.6 at 24k Hz, p<0.01)。这种听阈提升的现象在第 4 天开始减弱 (37.5 ± 5.2 vs 30.8 ± 5.8 at 16k Hz; 41.7 ± 7.5 vs 34.2 ± 6.6 at 24k Hz, p<0.01)，

第 14 天完全消失 (34.2 ± 5.8 vs 30.8 ± 5.8 at $16k\text{ Hz}$; 35.8 ± 5.8 vs 34.2 ± 6.6 at $24k\text{ Hz}$, $p > 0.05$)，说明凝胶注射对听力功能的影响是暂时的，随着凝胶的降解和药物的释放而逐渐消失。

[0099] d) 组织学评估

[0100] 方法：

[0101] 试验动物致死后，快速分离耳蜗并灌注含有 4% 多聚甲醛的 PBS，然后浸泡在固定剂 4°C 过夜。为了取得全部的柯蒂氏器，基膜和柯蒂氏器在显微镜下仔细的解剖分开。罗丹明 - 鬼笔环肽 (Rhodamine phalloidin, 1:100) 染耳毛细胞，以辨认耳蜗毛细胞。每只耳蜗分别在 Leica TCS SPE 显微镜下检查。每只耳蜗 3 次随机选取 $200\mu\text{m}$ 的截面计数。活性毛发细胞百分率以活性毛发细胞数除以总毛发细胞数所得（活性细胞数加上内毛细胞）。耳蜗切片的制备是将耳蜗及中耳浸入 0.1M 的 EDTA 14 天以脱钙，并沿耳蜗纵轴部位切片，切片厚度为 $7\mu\text{m}$ ，H&E 染色，光学显微镜观察。

[0102] 结果：

[0103] 手术后第 10 天开始对中耳和内耳进行组织学评价。分析的重点在于可能在鼓室、圆窗龛、圆窗膜、鼓阶出现的炎症。同时评估丝素 -PEG-mDEX 凝胶对柯蒂氏器和螺旋神经节产生的影响。从结果看，在所有的组别中都没有出现明显的严重炎症反应（积液、水肿、纤维化等）。圆窗膜临近的鼓阶会出现少量的炎症细胞和血细胞，但是从实验组（丝素 -PEG-mDEX 凝胶，图 5B）和对照组（耳未处理，图 5A）的炎症细胞数比较，其数值也不具有显著差异。相比较于对照组 (mDEX 溶液组，图 5C)，凝胶给药组（图 5D）在尺寸、形态学和神经节细胞数上没有产生任何的改变。

[0104] 通过显微镜观察耳蜗的整体表面组织学，来研究注射丝素 -PEG-mDEX 凝胶后内、外毛发细胞产生损失的可能性。表 2 中的定量计数分析表明，治疗组以及空白组都被发现损失了一些外毛细胞，但并没有呈现出显著性差异 ($p < 0.01$)。如图 6 所示，所有组别的内毛细胞则没发生任何的变化 (A: 对照组；B: 治疗组)。

[0105] 表 2 注射丝素蛋白 -PEG-mDEX 凝胶后第 10 天内毛活细胞和外毛活细胞的百分比 ($n = 3$)

[0106]

	外毛活细胞 %		内毛活细胞 %	
	对照	凝胶	对照	凝胶
底圈	99.3 ± 1.5	99.3 ± 1.0	100 ± 0	100 ± 0
第二圈	98.8 ± 1.5	99.1 ± 1.1	100 ± 0	100 ± 0
第三圈	97.5 ± 1.7	97.7 ± 1.7	100 ± 0	100 ± 0
顶圈	97.0 ± 2.1	97.0 ± 3.0	100 ± 0	100 ± 0

[0107] e) 丝素 -PEG-mDEX 凝胶在体内的降解

[0108] 方法：

[0109] 凝胶注入 1h、4、7、10、14、21 天后处死动物，获取听泡。打开听泡暴露出耳蜗，通过显微镜观察残留在圆窗龛上的丝素 -PEG-mDEX 凝胶。

[0110] 结果：

[0111] 在分离听泡后,我们通过定时显微镜观察来监测丝素-PEG-mDEX 凝胶的生物降解性能。如图 7 所示,分别代表注射凝胶后 1 小时、4 天、7 天、10 天、14 天和 21 天丝素-PEG-mDEX 凝胶降解的情况,红色箭头指示的是圆窗龛位置及残留的凝胶。可以发现,注射凝胶后 1h 在圆窗龛能观察到白色的稳定凝胶态,第 10 天看到凝胶的体积发生变化,凝胶开始降解,直到第 14 天凝胶体积一直减少,第 21 天时在圆窗龛内基本看不到凝胶残留了。

[0112] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,并不用于限制本发明,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明技术原理的前提下,还可以做出若干改进和变型,这些改进和变型也应视为本发明的保护范围。

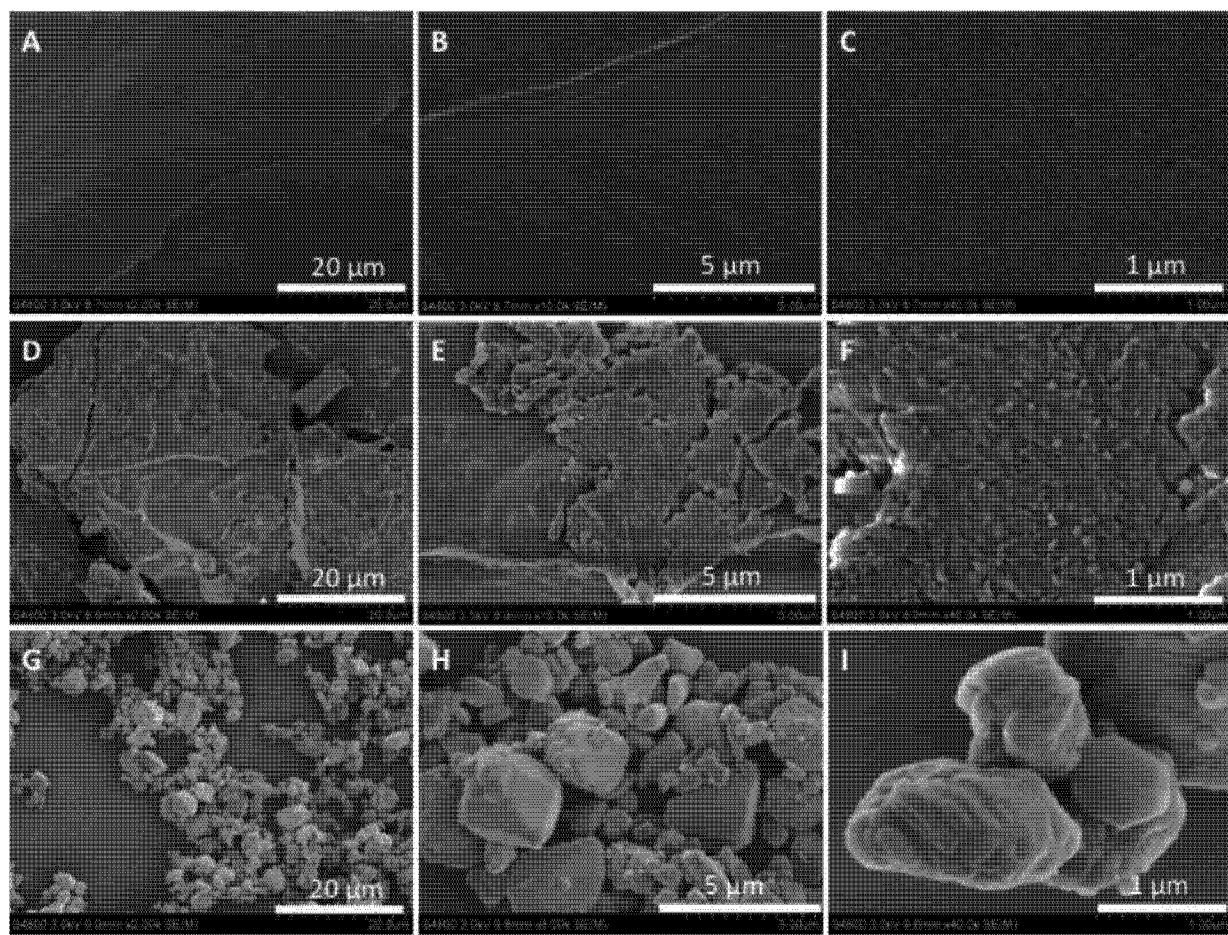


图 1

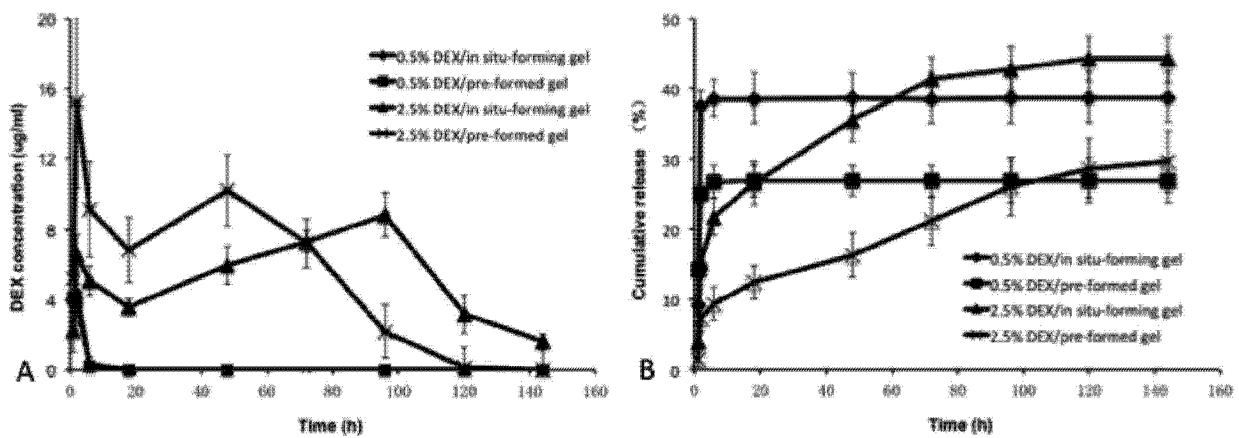


图 2

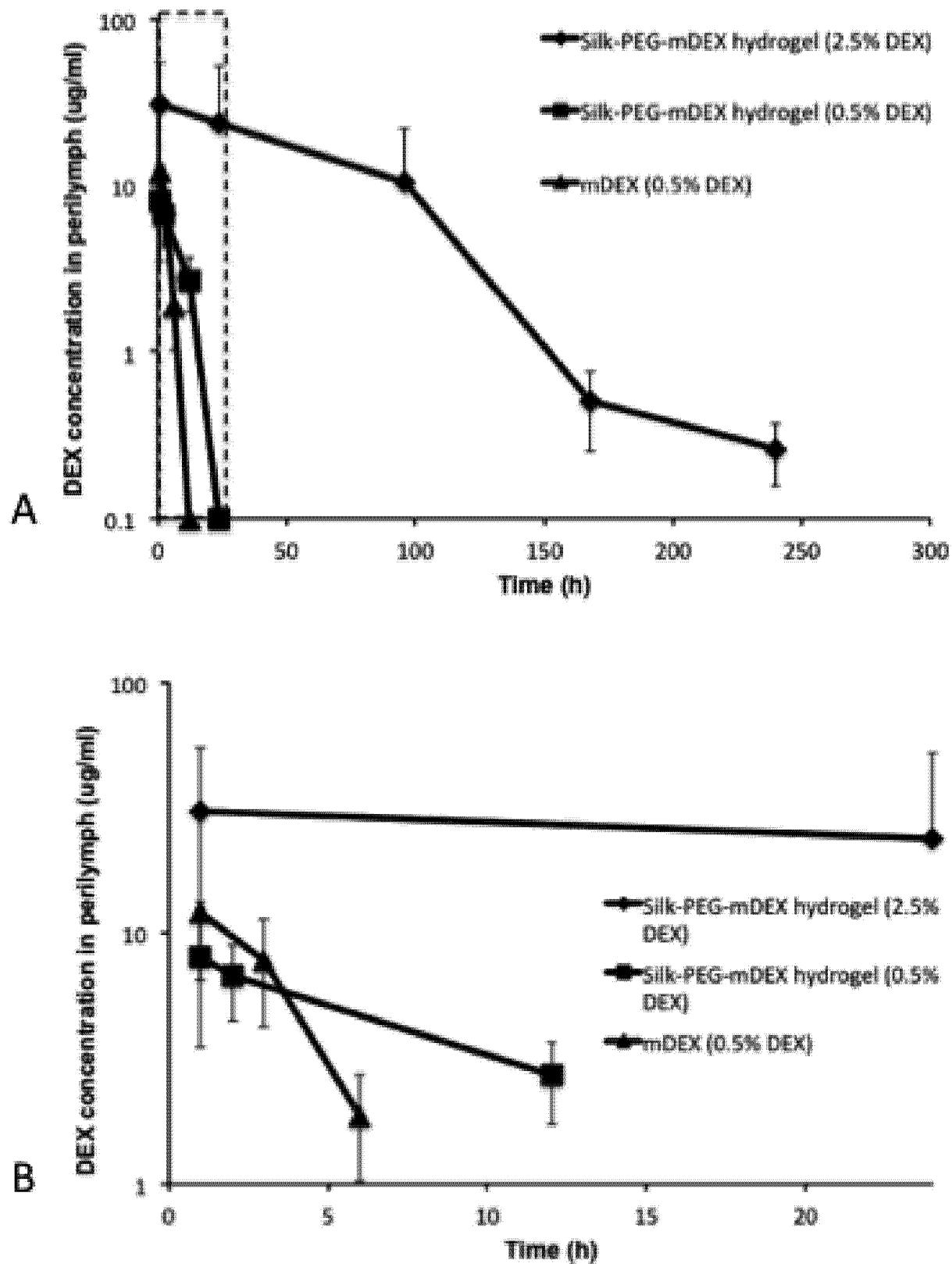


图 3

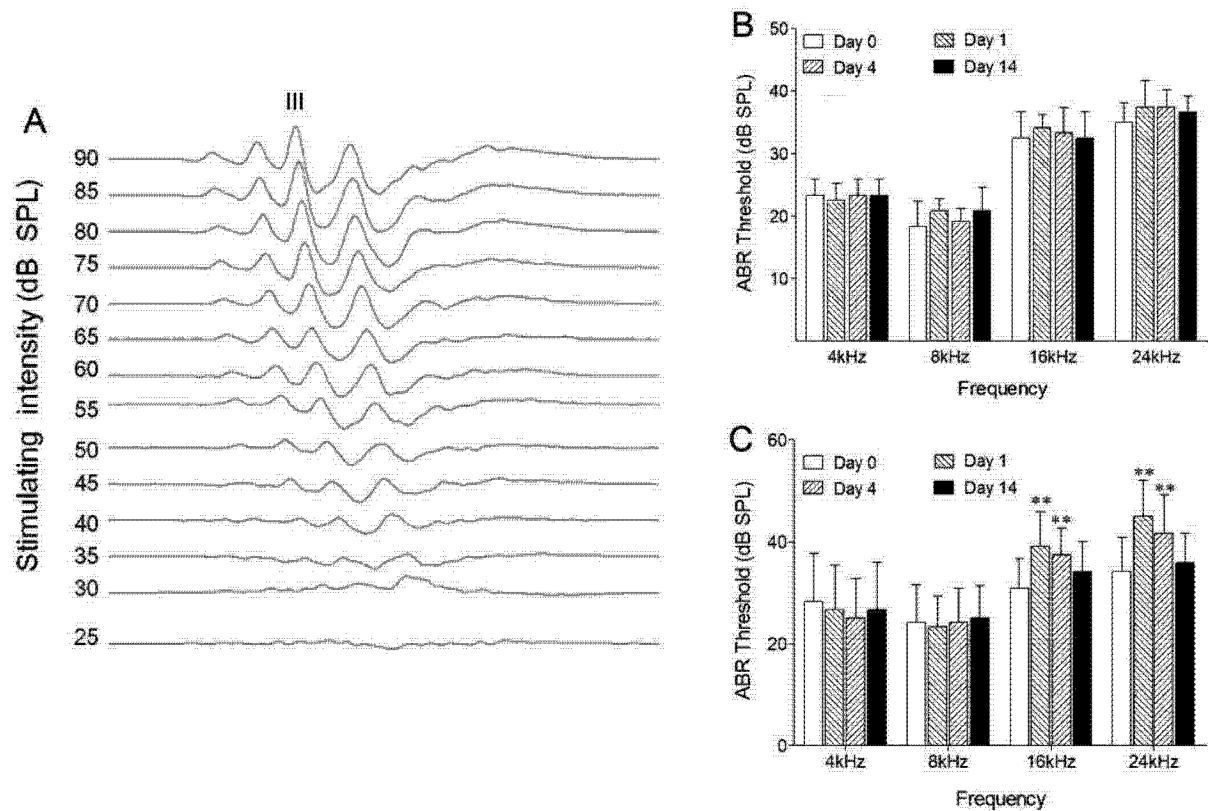


图 4

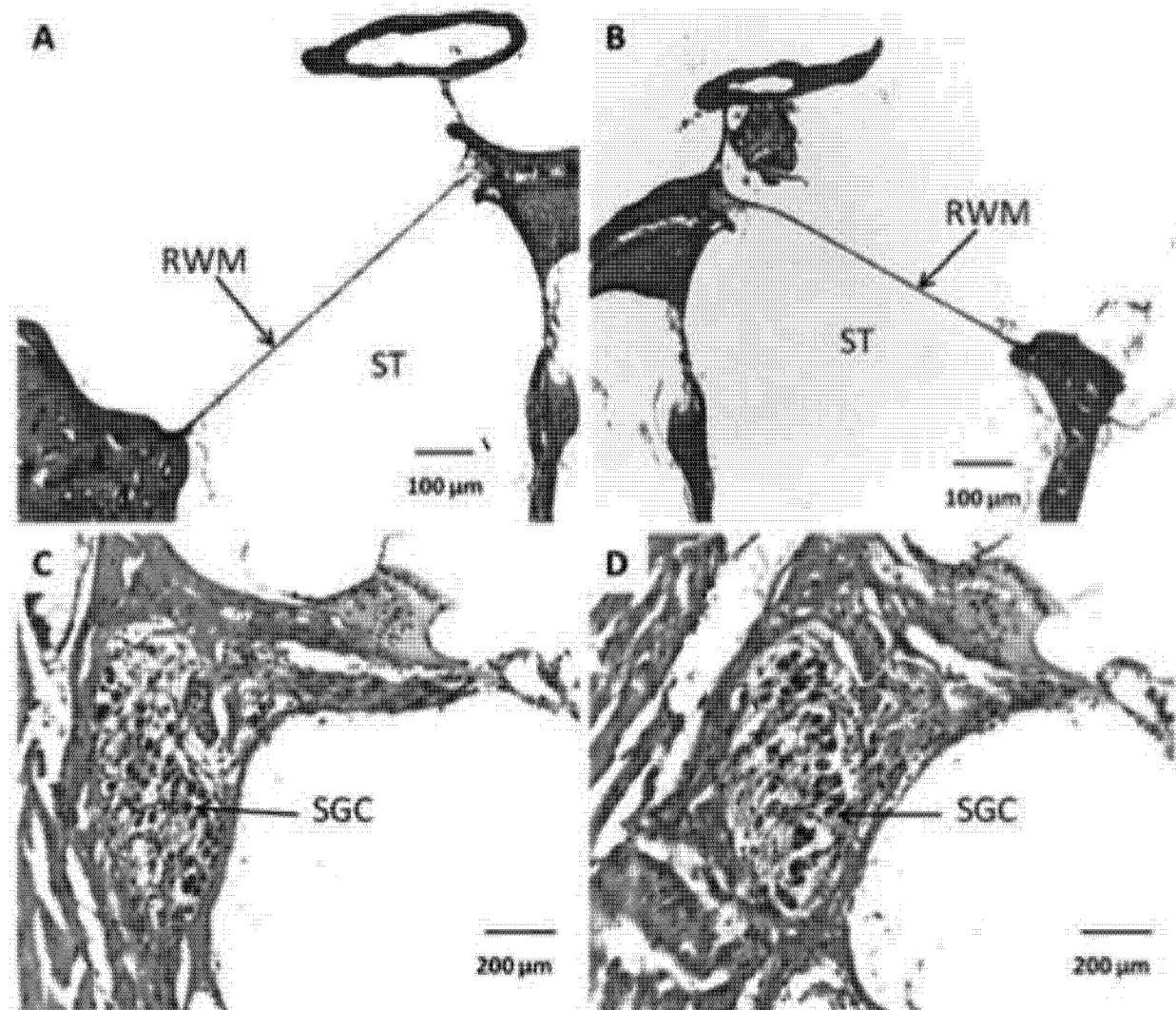


图 5

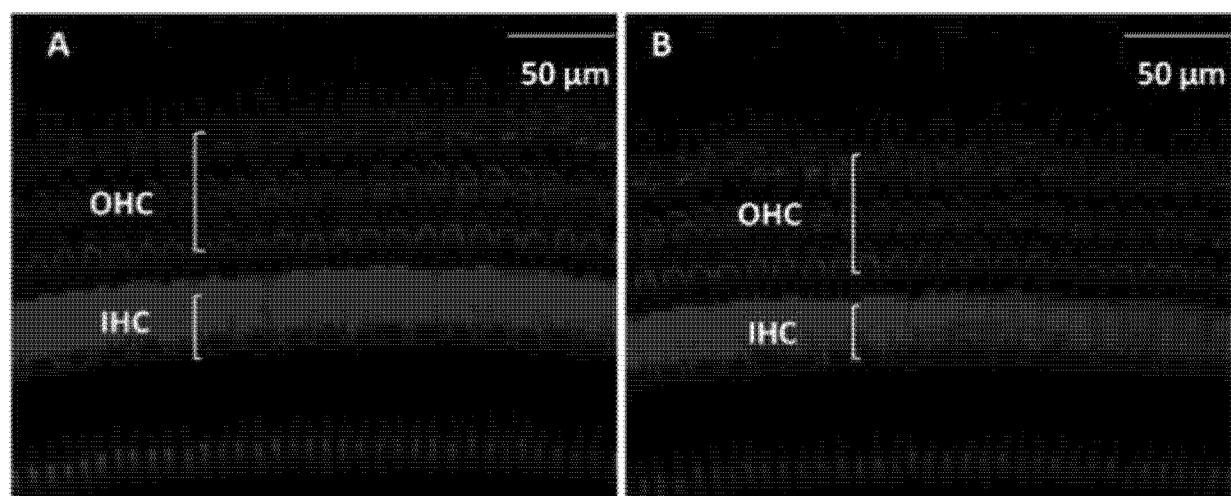


图 6

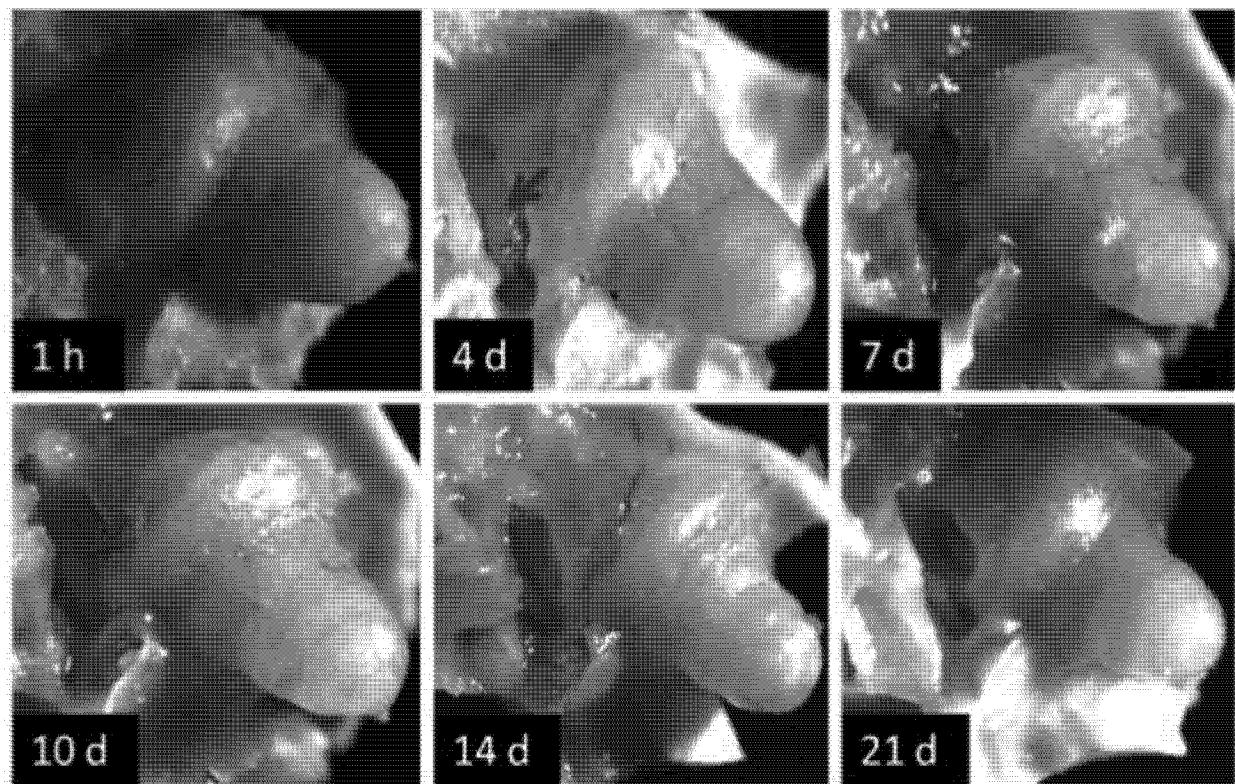


图 7