



(10) 授权公告号 CN 112218908 B

(45) 授权公告日 2023.09.29

(21) 申请号 201980019226.7

(22) 申请日 2019.01.18

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 112218908 A

(43) 申请公布日 2021.01.12

(30) 优先权数据  
18152397.8 2018.01.18 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2020.09.14

(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/NL2019/050031 2019.01.18

(87) PCT国际申请的公布数据  
W02019/143247 EN 2019.07.25

(73) 专利权人 HY2保健公司  
地址 荷兰恩斯赫德市

(72) 发明人 T·坎伯曼 L·P·卡卡特

H·B·J·凯瑞亚

J·C·H·莱伊滕

P·J·迪克特拉 B·佐特比耶

(74) 专利代理机构 北京英创嘉友知识产权代理  
事务所(普通合伙) 11447

专利代理师 桑传标

(51) Int.Cl.

*G08J 3/075* (2006.01)

*A61K 9/00* (2006.01)

*A61K 9/16* (2006.01)

(56) 对比文件

WO 2016172143 A1, 2016.10.27

US 2012276069 A1, 2012.11.01

CN 102871951 A, 2013.01.16

审查员 梁俊实

权利要求书2页 说明书31页 附图12页

(54) 发明名称

用于降低选定生物分子的生物利用度的多  
孔亲和水凝胶颗粒

(57) 摘要

本发明涉及一种平均横截面直径在1微米  
( $\mu\text{m}$ )至1000微米范围内的水凝胶颗粒,其中该  
颗粒包括具有平均网孔尺寸的第一聚合物网络,  
该第一聚合物网络允许流体力学半径为1000纳  
米(nm)或更小的分子扩散到第一聚合物网络中,  
并且该颗粒含有一个或多个被聚合物网络固定  
的结合分子。所述水凝胶颗粒优选具有其中第一  
聚合物网络的平均网孔尺寸,该平均网孔尺寸能  
够防止平均水力半径大于1000纳米的分子扩散  
到第一聚合物网络中,优选该网孔尺寸能够防止  
流体力学半径大于100纳米,优选大于5纳米的分子  
扩散。本发明尤其涉及一种通过使用所述水凝  
胶颗粒来降低生物系统中一种或多种可溶性生  
物分子的生物利用率的方法。

1. 一种水凝胶颗粒,其平均横截面直径的范围为1微米( $\mu\text{m}$ )至1000 $\mu\text{m}$ ,其特征在于,该颗粒含有第一聚合物网络,所述第一聚合物网络具有允许流体力学半径为1000纳米(nm)以下的分子扩散到所述第一聚合物网络中的平均网孔尺寸,以及该颗粒含有被所述聚合物网络固定的结合分子,并且该结合分子特异性地结合流体力学半径为1000纳米(nm)以下的分子;水凝胶包括葡聚糖-酪胺水凝胶、透明质酸-酪胺水凝胶、PEG-酪胺水凝胶或它们的组合。

2. 根据权利要求1所述的水凝胶颗粒,其中,所述第一聚合物网络具有能够防止平均流体力学半径大于1000nm的分子扩散到所述第一聚合物网络中的平均网孔尺寸。

3. 根据权利要求2所述的水凝胶颗粒,其中,第一聚合物网络具有允许流体力学半径为100纳米(nm)以下的分子扩散到所述第一聚合物网络中的平均网孔尺寸,所述第一聚合物网络具有能够防止平均流体力学半径大于100nm的分子扩散到所述第一聚合物网络中的平均网孔尺寸。

4. 根据权利要求3所述的水凝胶颗粒,其中,第一聚合物网络具有允许流体力学半径为5纳米(nm)以下的分子扩散到所述第一聚合物网络中的平均网孔尺寸,所述第一聚合物网络具有能够防止平均流体力学半径大于5nm的分子扩散到所述第一聚合物网络中的平均网孔尺寸。

5. 根据权利要求1所述的水凝胶颗粒,其中,所述第一聚合物网络的所述网孔尺寸通过测量具有已知平均流体力学半径的分子的扩散确定。

6. 根据权利要求1所述的水凝胶颗粒,其中,所述结合分子是结合肽、抗体或其抗原结合部分、配体结合受体,或者适配体。

7. 根据权利要求6所述的水凝胶颗粒,其中,所述抗体或其抗原结合部分是单域抗体。

8. 根据权利要求7所述的水凝胶颗粒,其中,所述单域抗体是骆驼科或软骨鱼的单链抗体的重链抗体(a single chain heavy chain only antibody)的可变域。

9. 根据权利要求1所述的水凝胶颗粒,其中,所述颗粒含有围绕所述第一聚合物网络的第二聚合物网络,所述第二聚合物网络不含所述结合分子。

10. 根据权利要求9所述的水凝胶颗粒,其中,所述第二聚合物网络的网孔尺寸小于或等于所述第一聚合物网络的网孔尺寸。

11. 根据权利要求9所述的水凝胶颗粒,其中,所述第二聚合物网络的平均网孔尺寸对于平均流体力学半径大于100nm的分子来说是不可穿透的。

12. 根据权利要求11所述的水凝胶颗粒,其中,所述第二聚合物网络的平均网孔尺寸对于平均流体力学半径大于5nm的分子来说是不可穿透的。

13. 根据权利要求12所述的水凝胶颗粒,其中,所述第二聚合物网络的平均网孔尺寸对于平均流体力学半径大于4nm的分子来说是不可穿透的。

14. 根据权利要求9所述的水凝胶颗粒,其中,所述第二聚合物网络的厚度为1纳米至450 $\mu\text{m}$ 。

15. 根据权利要求9所述的水凝胶颗粒,其中,所述第二聚合物网络包含靶向部分或生物室保留分子。

16. 根据权利要求1所述的水凝胶颗粒,其中,所述结合分子能够结合细胞因子、可溶性抗原或自身抗体。

17. 一种水溶液,其特征在于,所述水溶液为含有权利要求1-16中任意一项所述的水凝胶颗粒的药物溶液。

18. 一种适于注射的水溶液,其特征在于,所述适于注射的水溶液含有权利要求1-16中任意一项所述的水凝胶颗粒。

## 用于降低选定生物分子的生物利用度的多孔亲和水凝胶颗粒

### 技术领域

[0001] 本发明涉及从直接环境中清除生物分子的手段和方法。更具体地说,涉及内含固定化结合分子的水凝胶颗粒,该颗粒可以结合和封存生物分子。该水凝胶颗粒可用于降低或抑制生物分子的生物活性。该水凝胶颗粒优选为可注射的。

### 背景技术

[0002] 许多(慢性/进行性)炎症性、感染性和遗传性疾病/病况(例如骨关节炎、炎症性关节炎、类风湿性关节炎、克罗恩病、哮喘、细菌感染、败血症和整器官衰竭、癌症和移植排斥)通过细胞信号分子(即促炎细胞因子和抗炎细胞因子以及生长因子、生长因子拮抗剂;本文中进一步称为可溶性因子)调节和维持的。使用抗体中和这些可溶性因子是稳定甚至治愈此类疾病的有效方法。为此已经研发了各种可溶性因子中和策略,有些甚至在先进的临床疗法中实施。这些可溶性因子中和疗法通常依赖于推注抗体或抗体释放剂/颗粒,例如已被广泛地用于治疗系统疾病,例如类风湿性关节炎。还测试了它们对炎症的局部调节作用,例如(膝盖)骨关节炎的情况。<sup>[1-3]</sup>在这些情况下,中和抗体被注射到关节内以使抗体保持在局部关节环境中。然而,由于关节内推注的中和抗体的快速清除,这些疗法的疗效有限。类似的高清除率发生在许多其他部位,在这些部位,大剂量注射的分子通过流体循环进入血管和淋巴系统,并在血管和淋巴系统内被迅速清除。此外,可以通过(免疫)细胞介导的吞噬作用快速清除推注的抗体。同时由于抗体在体液中的快速分解,在炎症部位的快速浓注也显得基本无效。为了延长注射抗体局部治疗炎症的治疗效果,已经研发了具有较长关节内滞留时间的各种抗体释放颗粒,<sup>[4-7]</sup>另外,也有将抗体共价系留(covalently tethered)在颗粒表面。<sup>[8-10]</sup>综上所述,目前存在两种方法控制细胞因子中和抗体发生:i)控制细胞因子中和部分的原位释放,以及ii)利用表面修饰的纳米颗粒捕获细胞因子,如图1所示。

[0003] 最先进的注射给药系统确实延长了细胞因子中和剂(如抗体)的体内/原位保留时间。然而,它们仍远未达到最佳效果。例如,抗体被直接释放到/暴露在恶劣的(如发炎的)体内环境中。因此,由于例如蛋白质变性,治疗剂的生物学功能受到损害。重要的是,受损的抗体甚至可以通过具有增加的免疫原性而引起反作用。此外,纳米颗粒可以诱导氧化应激和促炎症反应而导致毒性作用,并且相对较快地被清除(例如通过炎症组织中的“渗漏的脉管系统”),并且与微颗粒相比更容易被吞噬细胞清除。表面有抗体甚至促进吞噬作用,这是通过表面形成的免疫复合物介导的。此外,存在于纳米颗粒或微颗粒表面上的抗体无法避免与体液的非特异性相互作用,从而导致抗体对目标细胞因子的亲和力不理想。

[0004] 本发明提供了“可注射的生物分子池”,它们是用于局部隔离或消耗所选生物分子的亲和水凝胶颗粒。

### 发明内容

[0005] 本发明提供了一种平均横截面直径的范围为1微米( $\mu\text{m}$ )至1000微米的水凝胶颗粒,其中所述颗粒含有具有平均网孔尺寸的第一聚合物网络,所述第一聚合物的网孔尺寸

允许流体动力学半径为1000纳米 (nm) 以下的分子扩散到第一聚合物网络中,并且该颗粒含有被聚合物网络固定的结合分子。第一聚合物网络的网孔尺寸优选使流体动力学半径大于1000纳米的分子无法穿透,优选使流体动力学半径大于100纳米的分子无法穿透。所述结合分子优选结合生物分子。所述结合分子优选与生物分子特异性结合。这样的结合分子也被称为特异性结合分子。所述第一聚合物网络优选含有固定在所述第一聚合物网络中的结合分子。

[0006] 本发明还提供了一种平均横截面直径的范围为1微米( $\mu\text{m}$ )至1000微米的水凝胶颗粒,其中所述颗粒含有具有平均网孔尺寸的第一聚合物网络,该第一聚合物网络允许流体动力学半径为1000纳米 (nm) 以下的分子扩散到第一聚合物网络中,并且该颗粒含有由所述聚合物网络固定的结合分子,该结合分子与所述分子特异性地结合。所述分子是流体动力学半径为1000纳米 (nm) 以下的分子。

[0007] 水凝胶颗粒优选含有两个以上的结合分子,其中至少两个所述结合分子结合不同的靶生物分子。在一个优选的实施方案中,该颗粒包括三个以上的结合分子,其中至少三个所述结合分子结合不同的靶生物分子。如本文所述的水凝胶颗粒的使用方法和用途通常在以下情况下是有用的:如果同时减少颗粒的直接周围环境中的几种可溶性因子,则是有帮助的。在这种情况下,将一个以上的生物分子整合在同一颗粒中会很有帮助。

[0008] 出于许多目的要施用多个颗粒,特别是为了在较长时间内捕获大量的生物分子而施用多个颗粒。这些颗粒可以大致相同。因此,本发明还提供了水凝胶颗粒的组合物,该组合物含有多个如本文所述的水凝胶颗粒。

[0009] 本发明还提供了一种组合物,其含有如本文所述的至少两个水凝胶颗粒的集合(pool),其中所述集合的至少两个水凝胶颗粒含有结合不同生物分子的结合分子。

[0010] 还提供了如本文所述的水凝胶颗粒,或者药物溶液,或者含有所述水凝胶颗粒的组合物,或者含有本文所述集合的组合物,用于治疗免疫系统过度活跃的患者、癌症患者,或者具有过度活跃的激素和/或细胞因子产生细胞的患者,优选用于治疗炎症,优选用于治疗关节炎。免疫系统过度活跃的患者可以是自身免疫疾病患者、炎症患者或类似的患者。

[0011] 还提供了一种适合于注射的水溶液,其含有本文所述的水凝胶颗粒。

[0012] 还提供了一种用于降低生物系统中可溶性生物分子的生物利用度的方法,该方法包括向所述系统提供如本文所述的水凝胶颗粒,其中生物分子具有可以使其进入所述聚合物网络的流体动力学半径,并且所述结合分子可结合所述生物分子。

[0013] 还提供了一种如本文所述的水凝胶颗粒,或者药物溶液,或者含有所述水凝胶颗粒的组合物在用于降低生物系统中生物分子的生物利用度中的用途。

[0014] 还提供了一种水溶液,优选含有水凝胶颗粒的药物溶液。

[0015] 还提供了水溶液的用途,优选将含有水凝胶颗粒的油墨用于印刷或者作为制造应用的添加剂。

[0016] 还提供了将本文所述的水凝胶颗粒或水溶液作为体外细胞培养补充剂的用途。

[0017] 本发明的详细说明

[0018] 聚合物水凝胶已被证明在广泛的应用中非常有用,例如缓慢释放封装的药物并且/或者屏蔽封装的材料以保护材料免受宿主体内不利环境的影响。本发明的水凝胶可以形成为离散的颗粒。水凝胶颗粒包括但不限于球形。水凝胶颗粒优选为球形颗粒。本文所述

的水凝胶颗粒可具有约1微米( $\mu\text{m}$ )至1000 $\mu\text{m}$ 的平均横截面直径。本文所述的水凝胶颗粒优选具有约2-1000 $\mu\text{m}$ 的平均横截面直径。平均横截面直径优选为3-1000 $\mu\text{m}$ ,优选为5-1000 $\mu\text{m}$ ,更优选为10-1000 $\mu\text{m}$ 。在一种特别优选的具体实施方式中,所述水凝胶颗粒的横截面直径为1-250 $\mu\text{m}$ ,优选为2-250 $\mu\text{m}$ ,优选为3-250 $\mu\text{m}$ ,优选为5-250 $\mu\text{m}$ ,更优选为10-250 $\mu\text{m}$ 。在一种特别优选的具体实施方式中,所述水凝胶颗粒的横截面直径为1-100 $\mu\text{m}$ ,优选为2-100 $\mu\text{m}$ ,优选为3-100 $\mu\text{m}$ ,优选为5-100 $\mu\text{m}$ ,更优选为10-100 $\mu\text{m}$ 。在一些实施方式中,平均直径横截面直径为5-500 $\mu\text{m}$ 。在一种特别优选的具体实施方式中,横截面直径为5-250 $\mu\text{m}$ ,更优选为10-200 $\mu\text{m}$ 。所示尺寸的水凝胶颗粒易于注射而没有明显的剪切作用。这样的水凝胶颗粒有利于在注射部位的局部积累,特别适合于离散的注射部位,如肿瘤、炎症部位、滑膜或其它空腔以及工程组织内。后者通常与炎症有关,并且将本发明的颗粒与工程组织结合通过选择性地隔离一种或多种有害的生物分子而降低植入部位的有害环境。该水凝胶特别适用于关节内注射。本发明的水凝胶颗粒的直径大于2 $\mu\text{m}$ ,优选大于3 $\mu\text{m}$ 使其在注射后更有效地保留在关节内(Pradal等,2016:International journal of Pharmaceutics498:119-129.[http://dx/doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.12.015](http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.12.015))。在一种优选的具体实施方式中,水凝胶颗粒的直径至少为5 $\mu\text{m}$ ,优选至少10 $\mu\text{m}$ ,更优选至少15 $\mu\text{m}$ 、30 $\mu\text{m}$ 或100 $\mu\text{m}$ (见图23和图24)。

[0019] 水凝胶颗粒可以是中空的(即,空心的外壳)。结合分子可以存在于中空的空腔中,并通过设置第一聚合物网络的网孔尺寸被充分固定,该网孔尺寸可以防止结合分子向颗粒外部扩散,并允许结合分子结合的靶分子扩散。然后,聚合物外壳防止抗体和/或结合分子的扩散,同时允许待封存的分子扩散。这也有效地充当细胞因子库,并依靠于空间捕获。

[0020] 水凝胶直径取决于水合状态(干燥/膨胀)和测量水凝胶的溶剂。本文所述的水凝胶颗粒的直径是在生理盐水溶液(例如磷酸盐缓冲盐水,pH7.4)中孵育直到水凝胶直径达到平衡后(通常是在约1至24小时之后)测量的。水凝胶颗粒的横截面直径可以使用例如但不限于动态光散射、激光衍射、(数字)图像分析、筛分分析、沉淀法、电阻抗或显微镜来测量/确定。对于本发明,横截面直径优选通过显微镜与数字图像分析相结合的方法来测量,或者如实施例所述。颗粒集合的平均横截面直径优选地由集合中随机选择的代表性颗粒的横截面直径确定。代表性选择通常包括至少100个颗粒,但是在需要时可以扩展。集合中的颗粒的横截面直径包括但不限于以钟形曲线(即正态分布)的形式分布,其中与平均值的标准偏差决定了钟形曲线的宽度。水凝胶颗粒的横截面直径的代表性选择的分布,在本文中称为“归一化尺寸分布”,定义为代表性选择的横截面直径的标准偏差除以代表性选择的平均横截面直径。归一化尺寸分布小于90%,优选小于75%,优选小于50%,优选小于25%,优选小于10%,优选小于5%。可以组合具有两种不同的平均横截面直径和/或两种不同的归一化标准分布的水凝胶颗粒的集合。通过标出具有特定横截面直径的颗粒的数量,可以容易地识别出这种组合物。可以使用任意用于确定颗粒尺寸的方法来绘制此类图,但是优选地使用显微镜结合数字图像分析。

[0021] 由于它们的最小尺寸,本文所述的水凝胶颗粒提供了改善的溶质扩散速率,并且与传统的宏观材料相比,本文所述的水凝胶颗粒与许多标准显微镜技术直接兼容。例如,已经被证明减小颗粒尺寸可以改善载有细胞的凝胶的释放动力学<sup>[19,20]</sup>。在另一个方面,注射水凝胶颗粒的体内生物分布与它们的大小有关。大于5 $\mu\text{m}$ 的水凝胶颗粒通常具有保留时间延长的特点,因为它们不易通过例如吞噬作用、淋巴入口以及内渗和外渗而从注射部位被

快速清除<sup>[21,22]</sup>。

[0022] 水凝胶颗粒的制造过程包括两个步骤：(1) 将水凝胶前体（即聚合物）溶液分散成离散的液滴，以及(2) 通过原位交联使液滴胶凝。可以通过在固体基质上/中的进行图案化或成型、在（不混溶的）液体中的乳化或在气相中的雾化形成水凝胶前体液滴。<sup>[23,24]</sup>水凝胶的交联可以基于聚合物之间的分子相互作用进行分类，这种相互作用具有化学性质或物理性质。化学相互作用可以是不可逆的共价键，例如，通过互补基团形成（如迈克尔型加成、自由聚合、酶交联或辐照）。<sup>[25]</sup>

[0023] 本文所述的水凝胶颗粒可用于通过局部消耗驱动/维持这些过程的生物分子来中断、减少或减弱（慢性）炎症性、感染性和其他情况如遗传疾病的方法。水凝胶颗粒包括多孔的稳定交联的水凝胶网络。能够结合一个以上的生物分子的结合分子被固定在聚合物网络（也称为第一聚合物网络）中。结合分子的内部位置有效地将结合的生物分子与颗粒的局部环境隔离，从而防止其活性。结合分子可以以多种方式与聚合物网络连接。主体-客体化学经常用于结合分子。主体-客体化学描述了由两个以上的分子或离子组成的复合物，这些分子或离子通过不同于全共价键的力以独特的结构关系结合在一起。主体-客体化学包括分子识别和通过非共价键相互作用的思想。非共价键对维持大分子（例如蛋白质）的3D结构至关重要，并涉及许多生物过程，在这些过程中，大分子彼此特异性但短暂的结合。非共价相互作用通常有八种类型：金属配位键、氢键、离子键、范德华力、离子-偶极、偶极偶极、 $\pi$ - $\pi$ -叠加和疏水相互作用。主体-客体化学的非限制性例子是生物素/亲和素结合。生物素可以高亲和力结合抗生物素蛋白家族的成员。该特征在许多商业和非商业场合是有利地。例子是典型的生物素/链霉亲和素组合以及新型的脱硫生物素和四价中性亲和素组合。主体-客体化学的其它实例对于技术人员来说是容易获得的。在一些实施方式中，结合分子通过主体-客体化学结合到聚合物网络。在其它实施方式中，结合分子共价（化学）结合到聚合物网络。在另一些实施方式中，结合分子不与聚合物结合，而是被捕获在聚合物网络中。这可以有用地用于例如大的结合分子。

[0024] 结合分子可以是结合肽。这种肽通常很小，并且能够与靶标特异性结合。该肽可以与支撑物或支架（support or scaffold）相连。这样的支撑物或支架可以但不一定要帮助肽与靶标的结合。在这种情况下，支撑物或支架可以限制肽的折叠并促进其结合功能。肽可以是线性的或环状的。Reverdatto等人在文中（2015; Curr Top Med Chem. 15 (12) : 1082-1101和其中引用的文章）描述了结合分子，如适体和肽适体。结合分子可以是抗体或其抗原结合片段。它可以是单链Fv片段（scFv）、FAB-片段、抗癌素、所谓的纳米体<sup>TM</sup>、双环肽等。本文使用的术语“抗体”是指蛋白质分子，优选属于免疫球蛋白类蛋白质，免疫球蛋白类蛋白质含有一个或多个与抗原表位结合的可变域，其中所述域衍生自具有抗体的可变域的同源性序列或共享具有抗体的可变域的同源性序列。抗体片段至少含有抗体的可变域。结合分子也可以是配体/受体对的成员。由于受体通常与细胞结合并且可以结合可溶性配体，因此优选结合分子是受体。通常可以通过使细胞外部分与Fc尾等结合来修饰通常与膜结合的受体。这种修饰的蛋白质通常容易连接到聚合物网络。

[0025] 水凝胶的聚合物网络的网孔尺寸可以以不同的方式确定。在本发明中，给出的网孔大小是为了示出可以扩散到水凝胶颗粒中的分子的大小。在一些实施方案中，重要的是防止某些其他分子或细胞扩散到水凝胶颗粒中。在本发明中，网孔尺寸优选地由具有一定

流体力学半径的分子的扩散势来表征。可以使用动态光散射来确定分子的流体力学半径(DLS, Stetefeld等, Biophys Rev. 2016Dec; 8(4): 409-427. DOI: 10.1007/s12551-016-0218-6)。可以通过不同的方式监测具有给定流体力学半径的分子在聚合物网络中的扩散。可以做到这一点的一种方法是通过创建两个被聚合物网络分隔的液体隔室, 并将具有已知流体力学半径的标记分子加入到网络的一个液体隔室中, 并让系统与标记分子的分布达到(接近)平衡。具有两个隔室的合适系统的例子是具有由网络构成的壁的胶囊(例如见图13及其图例)或由聚合物网络分隔的两个液体容器。标记分子在另一个隔室中的存在是衡量分子是否能够通过聚合物网络扩散的量度。如果在达到平衡后, 在网络的另一侧检测到的分子量小于用100倍大的网孔尺寸获得的最大分子量的20%, 优选小于10%, 则称该分子不能扩散通过网络。如果24小时后仍未达到平衡, 则将24小时观察到的百分比视为已达到平衡。在这种情况下, 网络的网孔尺寸可防止具有指定流体力学半径的分子扩散通过网络。网络的网孔尺寸不允许此类分子渗透。网络具有防止具有给定流体力学半径的分子扩散到聚合物网络中的尺寸。

[0026] 如果在达到平衡状态后, 在网络的另一侧检测到的分子量为大于用100倍大的网孔尺寸获得的最大分子量的80%以上, 优选为90%以上, 则认为该分子可以扩散通过网络。如果在24小时后还没有达到平衡, 则将24小时观察到的百分比视为已经达到平衡。在这种情况下, 网络的网孔尺寸允许分子扩散到网络中。

[0027] 当然, 比较测试是在相近的情况下进行的, 网络是相同的, 但是需要改变分子以获得不同的网孔尺寸。

[0028] 第一聚合物网络可具有允许流体力学半径为1000纳米以下, 优选为500纳米以下, 优选为250纳米以下, 更优选为100纳米以下的分子扩散到第一聚合物网络中的平均网孔尺寸。第一聚合物网络优选具有允许分子的流体力学半径为50纳米以下, 优选20纳米以下, 优选10纳米以下, 更优选5纳米以下, 更优选4纳米以下的分子扩散到第一聚合物网络中的平均网孔尺寸。当需要捕获或封存抗体时, 平均网孔尺寸优选大于IgG的平均尺寸, 优选大于15纳米, 优选大于20纳米。如果要将抗体挡在颗粒之外, 则优选平均网孔尺寸小于典型抗体。优选为15纳米以下, 优选12、11或10纳米以下。优选为10纳米。

[0029] 第一聚合物网络具有能够防止平均流体力学半径大于1000nm的分子扩散到第一聚合物网络中的平均网孔尺寸, 优选具有能够防止平均流体力学半径大于500, 优选大于250, 优选大于100, 优选大于50, 优选大于20, 优选大于10, 优选大于5的分子扩散到第一聚合物网络中, 优选具有能够防止平均流体力学半径大于4纳米的分子扩散到第一聚合物网络中。限制较大分子进入的网络通常在更长的时间内处于活跃状态。限制较大分子进入的网络通常更耐磨损, 在人体内的撕裂。

[0030] 第一聚合物网络的筛孔尺寸可以通过测量具有已知平均流体力学半径的分子的扩散来确定。在本发明的上下文中, 如果水凝胶的聚合物网络允许流体力学半径为1000纳米以下的分子扩散到聚合物网络中, 则其平均网孔尺寸为至少为1000纳米。如果水凝胶的聚合物网络允许流体力学半径为500纳米以下的分子扩散到聚合物网络等中, 则其平均网孔尺寸至少为500纳米。

[0031] 在本发明的上下文中, 如果水凝胶的聚合物网络阻止平均流体力学半径大于1000nm的分子扩散以扩散到第一聚合物网络中, 则其平均网孔尺寸为1000nm或更小。如果

水凝胶的聚合物网络阻止平均流体力学半径大于100nm的分子扩散到聚合物网络等中,则其平均网孔尺寸为100nm或更小。

[0032] 平均水凝胶网孔尺寸也可以机械地或基于分子释放来确定(例如参见Grassi等人,2009年《分子》第14卷第3003-3017页:doi:10.3390/molecules14083003)。然而,确定孔径的另一种方法是使用由拉塞尔(Russell)(2005:Ind.Eng.Chem.Res.Vol 44:pp 8213-8217)描述的所谓的“单孔半径”模型。在本文中,本文所述的水凝胶具有网孔尺寸,该网孔尺寸仅由新方法确定,即,不通过测量具有给定流体力学半径的颗粒是否可以扩散到网络中来确定。在这种情况下,提供了具有平均横截面直径范围为1微米( $\mu\text{m}$ )至1000 $\mu\text{m}$ 的水凝胶颗粒,其中所述颗粒含有平均网孔尺寸为1000纳米以下,优选为500纳米以下,优选为250纳米以下,更优选100纳米以下,优选50纳米以下,优选20纳米以下,优选10纳米以下,更优选5纳米以下,更优选4纳米以下的第一聚合物网络,或更小优选根据Grassi等人(同上)或根据Russel等人的“单孔半径”模型(同上)机械地确定,其中颗粒含有由聚合物网络固定的结合分子。第一聚合物网络优选具有1000纳米,优选500纳米,优选250纳米,更优选100纳米,优选50纳米,优选20纳米,优选10纳米,更优选5纳米,更优选4纳米的平均网孔尺寸。定义水凝胶网孔尺寸的另一种方法是根据具有给定分子量(kDa)的分子是否能够扩散到聚合物网络中。颗粒半径和颗粒分子量的相关性由下式给出: $R_{\text{min}}=0.066\times M^{1/3}$ 给出(Erickson 2009, Biol.Procedure Online 11:32-51.Do:10.1007/s12575-009-9008-x)。在公式中,变量Rmin代表最小半径,M代表以道尔顿为单位的分子量。因此,本发明还提供了一种水凝胶颗粒,其平均横截面直径范围为1微米( $\mu\text{m}$ )至1000 $\mu\text{m}$ ,其中该颗粒含有第一聚合物网络,第一聚合物网络具有允许分子量不超过430gDa (gigadalton),优选不超过54gDa,优选不超过6,8gDa,优选不超过435MDa (兆道尔顿),优选不超过54MDa,优选不超过3,5MDa,优选不超过435kDa (千道尔顿),优选不超过54kDa,优选不超过28kDa的分子扩散通过的平均网孔尺寸。

[0033] 在一种优选的实施方式中,提供了一种水凝胶颗粒,其平均横截面直径的范围为1微米( $\mu\text{m}$ )至1000 $\mu\text{m}$ ,其中该颗粒含有第一聚合物网络,第一聚合物网络允许分子量具有允许分子量不超过900kDa、不超过320kDa、不超过200kDa、不超过180kDa、优选不超过150kDa的分子扩散通过的平均网孔尺寸。这些分别是免疫球蛋白(Ig)M、IgA、IgE、IgD和IgG的分子量。这种颗粒的优点是,结合分子和捕获的生物分子有效地与所述的抗体种类隔离。对于各自的抗体/网孔大小来说,忽略的宿主抗体(如果有的话)对颗粒(含量)响应的影响较小。

[0034] 本文所述的水凝胶颗粒中的第一聚合物网络优选具有允许分子量为100kDa,优选为70kDa,更优选为约15kDa的生物分子扩散的网孔尺寸。大多数细胞因子的分子量小于70kDa。

[0035] 水凝胶颗粒优选含有交联的水凝胶聚合物。交联是连接两条或更多聚合物链的过程。化学交联和物理交联都存在。此外,在选择水凝胶时,天然聚合物例如蛋白质或对水具有高亲和力的合成聚合物均可以用作。可以采用不同的交联方法设计水凝胶。根据定义,交联聚合物凝胶是不溶解于溶剂的高分子。由于在凝胶微结构中交联产生的聚合物结构域,凝胶具有更高化学稳定性。各种交联方法是本领域已知的,例如但不限于化学交联、光交联(通常为UV)、蛋白质相互作用、氢键等。

[0036] 交联部分优选为一种酚类化合物。可以使用催化剂(即过氧化物酶,例如但不限于辣根过氧化物酶)和氧化剂(例如过氧化氢)将一种酚类化合物与另一种酚类化合物进行酶

介导的共价偶联。其中酚类化合物的特征在于存在至少一个羟基取代的芳香族环系统,包括但不限于酚偶联大分子、酚偶联小分子、苯酚、酪胺、酪氨酸、多酚、对香豆酸、泛醇、维生素E、邻苯二酚、阿魏酸、辣椒素、丁子香醇、间苯二酚、金雀异黄素、表儿茶素、吡咯洛尔(pyrogallol)、没食子酸、没食子酸丙酯、五元葡萄糖、双酚A、丁基羟基甲苯、甲酚、雌二醇、愈创木酚、4-壬基苯酚、邻苯二酚、三硝基苯酚、酚酞、异丙酚、血清素、肾上腺素、百里香酚、二甲苯酚、己烯雌酚、左旋多巴(L-DOPA)、水杨酸甲酯、水杨酸、2-苄基-4-氯苯酚、4-氯-3,5-二甲基苯酚、丁基羟基茴香醚(hutylated hydroxyl anisole)、间苯二酚、4-己基间苯二酚、对苯二酚、1-萘酚、杯芳烃,但也包括多肽、合成或天然聚合物、荧光染料、药物、DNA、蛋白质、脂蛋白、抗体、单域抗体、适配体、纳米体,以及所有其他天然含有和/或被酚基修饰的分子(即羟基取代的芳香环系统)或其组合。优选用酪胺基团进行交联。

[0037] 大量聚合物可用于制备水凝胶。在本发明中,聚合物是生物相容性聚合物。该聚合物优选为葡聚糖、透明质酸和聚乙二醇(PEG)中的一种或多种。

[0038] 生物相容性水凝胶聚合物是与生物系统接触而不会产生明显不良影响的水凝胶聚合物。在本文中,生物相容性是指材料不会引起人体对所述生物材料的明显病理反应,或者说所述材料对患者无害。聚合物水凝胶已经使用了相当长的时间,其中包括在Laftah等人(2011年:《聚合物水凝胶:评论》,《聚合物塑料技术与工程》,50:14,1475-1486)进行了综述。优选的例子水凝胶聚合物在US8647271;US20060257488;W01999015211;W0 2011/049449;W02011/059325W02013/073941和US8440231中进行了描述。该水凝胶聚合物可以是接枝有葡聚糖-酪胺(Dex-TA)偶联物的透明质酸(HA)共聚物。该Dex-TA偶联物优选具有5-25的取代度(DS),取代度定义为每100个脱水葡萄糖环中偶联酪胺部分的数量。所述Dex-TA偶联物中的葡聚糖链优选具有5-80kDa的平均分子量。该水凝胶聚合物可以是Dex-TA偶联物和选自胶原-酪胺;壳聚糖-酪胺;壳聚糖-磷酸-明胶-酪胺和透明质酸-酪胺组成的组中的偶联物的组合物。所述水凝胶聚合物优选为偶联透明质酸、壳聚糖、葡聚糖、透明质酸、肝素或肝素淀粉、聚乳酸(PLA)、聚乙二醇(PEG)、聚环氧烷-聚烷基对苯二甲酸酯嵌段共聚物(优选为聚环氧乙烷-聚对苯二甲酸丁二醇酯嵌段共聚物)、聚L-乳酸(PLLA)、聚乙二醇乳酸(PGLA)、聚乙醇酸(PGA)、聚氨基酰胺(poly(amido amine)s)、聚己内酯、聚乙烯、藻酸酯、聚-N-异丙基丙烯酰胺或聚对苯二甲酸乙二醇酯和聚对苯二甲酸丁二醇酯的共聚物(PEGT-PBT或Polyactive®)。该偶联物优选具有交联基团,优选至少一个酪胺,优选更多。

[0039] 本文所述的水凝胶颗粒优选包括葡聚糖-酪胺水凝胶、透明质酸-酪胺水凝胶、PEG-酪胺水凝胶或其组合。

[0040] 水凝胶可以是化学稳定的水凝胶(Hoffman,2012:Advanced Drug Delivery Reviews 64:18-23)。当水凝胶是共价交联网络时,称为永久凝胶或化学凝胶。

[0041] 本发明还涉及含有水凝胶颗粒的水溶液。该溶液优选是可注射的溶液,即可以通过空心针的溶液,该空心针用于在医学领域中给人体注射液体。针可以是皮下注射针,它是一种细长的空心管,具有尖锐的尖端,在尖端的一端具有小开口。也存在无针系统,这些无针系统也使用本文所述的可注射水溶液。

[0042] 结合分子对生物分子的亲和力不一定要非常高。当结合分子不慎从结合分子中释放出来时,结合分子会迅速与结合分子重新结合或与另一个可利用的结合分子结合,从而有效地防止结合分子从颗粒中扩散出去。

[0043] 结合可以用特异性和亲和力来表示。特异性决定哪种抗原或其表位被结合域特异性结合。亲和力是与含有抗原或表位的特定靶标结合强度的量度。特异性结合通常要求对含有抗原的表位具有一定的亲和力。在本文所用的结合分子的情况下,结合是特异性的,即含有抗原的表位的亲和力(Kd)至少为 $1 \times 10e^{-6}M$ ,更优选为 $1 \times 10e^{-7}M$ , $1 \times 10e^{-8}M$ ,更优选为高于 $1 \times 10e^{-9}M$ 。结合分子优选以 $1 \times 10e^{-9}M$ 至 $100 \times 10e^{-9}M$ 的亲和力(Kd)结合含有表位的抗原,结合分子通常不会与不具有表位的抗原显著结合。与这种分子的结合通常小于含有抗原的表位的Kd。通常这种非特异性结合的强度小于 $1 \times 10e^{-6}M$ (如果有的话)。结合分子就可以特异性地结合其他抗原,只要这些抗原含有表位。

[0044] 结合分子优选与生物分子结合。被结合分子结合的分子优选为多肽或蛋白质。该生物分子、多肽或蛋白质优选可溶于体液中。这种分子可以扩散到颗粒的聚合物网络中。肽或蛋白质可以是基质的释放部分,如关节中的促炎基质降解产物。在一种优选的实施方式中,该蛋白质是细胞因子、可溶性抗原或自身抗体。在一种优选的实施方式中,该蛋白是基质降解产物。这种产物可能是促炎的。

[0045] 在一种优选的实施方式中,结合分子对细胞因子具有特异性。细胞因子是在细胞信号传递中重要的小蛋白家族(约5-70kDa)的成员。它们的释放会对周围细胞的行为产生影响。细胞因子可以参与自分泌信号、旁分泌信号和内分泌信号的传递。优选的细胞因子包括趋化因子、干扰素、白细胞介素、淋巴因子和肿瘤坏死因子,但一般不包括激素或生长因子。细胞因子可由多种细胞产生,包括例如巨噬细胞、B淋巴细胞、T淋巴细胞的免疫细胞,例如内皮细胞、成纤维细胞的肥大细胞和各种基质细胞。特定的细胞因子可由多种类型的细胞产生。细胞因子通常通过受体发挥作用,在免疫系统中尤为重要。细胞因子可以调节例如体液和基于细胞的免疫反应之间的平衡。细胞因子优选为与关节炎有关的细胞因子。细胞因子优选为TNF $\alpha$ 、IL1 $\beta$ 、抑癌素M、IL-6、IL-4、IL-10、IL-17、IL-8,以及例如S108或S109的警报蛋白。

[0046] 结合分子可以是生长因子或生长因子拮抗剂具有特异性的结合分子,例如Wnt分子Wnt拮抗剂、BMP、TGF $\beta$ 、GF或NGF,Wnt分子Wnt拮抗剂例如优选为DKK1、FRZB或硬化蛋白(sclerostin),BMP拮抗剂例如优选为Noggin、Gremlin或Chordin。

[0047] 结合分子确保生物分子结合在颗粒中,优选为结合在水凝胶的内部网络中。有效地避免了结合的生物分子与由于分子的尺寸或由于结合伴侣如细胞受体的活动性有限而无法穿透颗粒的结合伴侣(binding partners)结合。因此,结合分子与生物分子的结合不一定要与生物分子上的中和表位结合。结合可以是与中和表位结合,使得当结合分子被结合时,当结合分子不在水凝胶的内部网络中或不再在水凝胶的内部网络中时,生物分子也不能功能性地与结合伴侣例如受体结合。优选的是,结合分子与生物分子上的中和表位结合。该特征确保了当在生物分子失活之前颗粒被部分或全部降解时,生物分子的活性仍受结合分子抑制。

[0048] 结合分子优选与聚合物网络为物理或化学连接。物理连接可以通过多种方式实现。例如通过为结合分子提供可直接或间接与网络中的聚合物结合的官能团。该结合可以是亲和力结合,如典型的生物素/抗生物素蛋白结合或抗体结合。该结合也可以是化学键,如共价偶联。目前,肽/蛋白连接化学高度发展的,并且有许多不同的方法可供使用,非限制性实例是胺反应交联化学和碳二亚胺交联剂化学或靶向SH-基团的马来酰亚胺化学。特别

常见的方法是利用分子N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)或类似的分子如磺基-NHS。这种方法经常用于1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺(EDS)偶联方法。可以靶向交联的其他反应性基团是巯基(-SH)和羰基(CHO)。后者可通过氧化糖肽或糖蛋白中的碳水化合物基团而产生。

[0049] 水凝胶交联可以基于聚合物之间的分子相互作用,其可以具有化学性质或物理性质。化学相互作用是通过化学反应产生永久性的共价键而形成的。传统上,化学水凝胶是通过使用交联剂将具有反应性端基的单体自由聚合而形成的[Wichterle, O. 和 LÍM, D. (1960) 生物用亲水性凝胶, 自然185(4706), 117-118.]。基于自由基的交联可以但不一定与细胞毒性有关。通过酶促交联可以有效地消耗自由基,例如,用于过氧化物酶介导的酚类基团的交联[Henke, S. 等人. (2016) 对于载有细胞的微凝胶的片上生产, 聚合物缀合物的酶促交联优于离子或紫外线交联。高分子生物学16(10), 1524-1532]。方便地,还通过将形成自由基的光引发剂添加到不混溶的油相而不是充满细胞的水凝胶前体相中,以细胞相容的方式实现了基于自由基的单细胞封装。这种方法能够以从外到内的方式进行微凝胶交联,从而最大程度地减小封装细胞暴露于细胞毒性自由基中[11]。物理键是可逆的(即非共价键),并且尤其基于纠缠(entanglements)、静电(即离子键或氢键)、范德华力、疏水相互作用或它们的组合,例如在主体-客体相互作用中。

[0050] 结合分子优选为结合蛋白,优选为单域抗体。该单域抗体优选是骆驼科或软骨鱼的单链抗体的重链抗体的可变域。(也分别称为VHH和VNAR)。结合分子优选为VHH或VNAR。这些术语是指没有轻链的单重链可变域抗体。优选地,VHH或VNAR是在骆驼科或软骨鱼类中找到的抗体,该抗体天然没有轻链。VHH和VNAR目前是人工生成的,选自具有不同VHH或VNAR样分子的大型文库。VHH或VNAR目前也可以合成产生。目前有时也使用术语VHH来指另一物种的重链可变域,该重链可变域经修饰可以在没有功能性轻链的情况下发挥作用。VHH或VNAR优选通过化学或物理方式与水凝胶的聚合物连接,优选通过存在于VHH或VNAR上或提供给VHH或VNAR的官能团进行化学交联。对于VHH而言,所述官能团优选是存在于VHH的短环1、2、3、5之一处的糖基(参见图3及其描述)。该官能团也可以在VHH的另一部分,例如在VHH的C末端,优选取代C末端的最后10个氨基酸中的一个或多个。官能团也可以作为肽增加到所述VHH的C末端。功能残基可以是Cys或Met残基,其将通过S-S桥或胺基直接与生物材料结合。该官能团可以是能够通过NHS化学交联到聚合物中各个残基的酪胺-叠氮化物或酪胺-炔。

[0051] 水凝胶颗粒可以具有可调整的孔隙率,该孔隙率允许在几个道尔顿(Da)到150kDa的大小范围内的多种分子扩散。细胞因子的分子量范围通常为5kDa-70kDa,并且可以通过扩散轻松进入水凝胶。一旦进入水凝胶,它们就会被特异性亲和抗体片段捕获。不是结合分子的靶标的生物分子可以自由扩散出颗粒。高密度的结合分子(如抗体片段)和相关的亲和力可有效地防止进入并结合到水凝胶聚合物网络中的靶标离开颗粒。其他没有高亲和力的抗体片段的细胞因子可以自由地扩散入和扩散出水凝胶网络。与使用血液吸附例如细胞吸附(CytoSorb)相比,至少本文所述的一些方法通过其在捕获特定生物分子如细胞因子方面的高选择性和特异性,以及仅中和存在结合分子的分子的能力而明显地区别于其他方法。细胞吸附或类似的技术无法进行区分,并且无法消除所有细胞因子中的血清,因为这些技术依赖于非特异性的相互作用而不是本发明中使用的特异性结合分子。

[0052] 本文所述的水凝胶颗粒可以用作所谓的细胞因子沉陷(cytokine sinks)。如图2

所示,水凝胶是可注射的多孔微粒,能够隔离和/或清除目标(有害的)生物分子,同时保护结合分子免受有害的体内条件(例如炎症组织的)的影响。半透性水凝胶还提高针对目标细胞因子的亲和力,因为它提供了高度浓缩的抗体微环境,细胞外基质相关蛋白、细胞和大于网孔尺寸的非特异性相互作用的蛋白(该蛋白取决于网孔尺寸,例如内源性抗体/细胞因子结合蛋白)不能到达该微环境。本发明的颗粒的优点为微米以上。与其它颗粒相比,这有利于颗粒的长时间存在。例如,纳米颗粒通常更迅速地被清除和/或吞噬。

[0053] 生物相容性水凝胶聚合物是指具有与生物系统接触而不产生显著不良影响的水凝胶聚合物。在本文中,生物相容性是指材料不会引起身体对所述生物材料的重大病理反应,或者所述材料对患者无害。聚合物水凝胶已经使用了相当长的时间,并且在Laftah等人(2011年:《聚合物水凝胶:评论》,《聚合物塑料技术与工程》,50:14,1475-1486)进行了综述。在US8647271;US20060257488;W01999015211;W0 2011/049449;W02011/059325, W02013/073941和US8440231中描述了水凝胶聚合物的优选实例。该水凝胶聚合物可以是接枝有葡聚糖-酪胺(Dex-TA)偶联物的透明质酸(HA)共聚物。该Dex-TA偶联物优选具有取代度(DS),其定义为每100个5-25的脱水葡萄糖环的偶联的酪胺部分的数目。所述Dex-TA偶联物中的葡聚糖链优选具有5-80kDa的平均分子量。该水凝胶聚合物可以是包含Dex-TA共轭物和选自胶原-酪胺、壳聚糖-酪胺、壳聚糖-磷酸和明胶-酪胺组成的组的共轭物的组合物。所述水凝胶聚合物优选为偶联透明质酸、壳聚糖、葡聚糖、透明质酸、肝素或肝素淀粉、聚乳酸(PLA)、聚环氧烷-聚烷基-对苯二甲酸酯嵌段共聚物(优选为聚环氧乙烷-聚对苯二甲酸丁二醇酯嵌段共聚物)、聚乙二醇(PEG)、聚L-乳酸(PLLA)、聚乙二醇乳酸(PGLA)、聚乙醇酸(PGA)、聚氨基酰胺、聚己内酯、聚乙烯、藻酸酯、聚-N-异丙基丙烯酰胺或聚对苯二甲酸乙二醇酯和聚对苯二甲酸丁二醇酯的共聚物(PEGT-PBT或Polyactive®)。所述偶联物优选具有交联基团,优选酪胺。

[0054] 如本文所述的水凝胶颗粒可以包括围绕所述第一聚合物网络的第二聚合物网络,该第二聚合物网络不含所述结合分子。第二聚合物网络,有时也称为壳,围绕着第一聚合物网络,并且可以防止不能扩散通过第二聚合物网络的分子、颗粒和细胞进入第一聚合物网络。在第二聚合物网络具有可选择的网孔尺寸的情况下,如果需要的话,第一聚合物网络可以具有较大的网孔尺寸以减少扩散时间。因此,第二聚合物网络的网孔尺寸可以小于或等于第一聚合物网络的网孔尺寸。

[0055] 如本文所述的含有第一聚合物网络和第二聚合物网络的水凝胶颗粒,优选第二聚合物网络的平均网孔尺寸小于或等于第一聚合物网络的网孔尺寸。在这种情况下,第一聚合物网络优选具有允许流体力学半径为1000纳米以下的分子扩散到第一聚合物网络中的网孔尺寸,而第二聚合物网络具有能够防止平均流体力学半径大于1000纳米的分子扩散到第二聚合物网络中的网孔尺寸。优选地,第二聚合物网络的网孔尺寸能够防止平均流体力学半径大于500纳米、优选大于250纳米、优选大于100纳米、优选大于50纳米、优选大于20纳米、优选大于10纳米、优选大于5纳米的分子扩散到第二聚合物网络中。在一种优选的实施方式中,第二聚合物网络的网孔尺寸能够防止平均流体力学半径大于4纳米的分子扩散到第二聚合物网络中。当然,第一聚合物网络还可以具有小于允许流体力学半径为1000纳米以下的分子扩散到第一聚合物网络中的网孔尺寸。实例是允许流体力学半径为500纳米以下、250纳米以下、100纳米以下、50纳米以下、20纳米以下、10纳米以下、5纳米以下、优选4纳

米以下的分子扩散到第一聚合物网络中的网孔尺寸。平均横截面直径在1微米( $\mu\text{m}$ )至1000 $\mu\text{m}$ 范围内的水凝胶颗粒,其中所述颗粒含有平均网孔尺寸为1000纳米以下,优选500纳米以下,优选250纳米以下,更优选100纳米以下,优选50纳米以下,优选20纳米以下,优选10纳米或更小,更优选5纳米以下,更优选4纳米以下的第一聚合物网络,优选根据Grassi等人(同上)或根据Russek等人(同上)的“单孔半径”模型以机械方式确定平均网孔尺寸,其中颗粒含有被聚合物网络固定的结合分子,还可以含有围绕所述第一聚合物网络的第二聚合物网络,该第二聚合物网络不含所述结合分子。第二聚合物网络的平均网孔尺寸优选比第一聚合物网络的网孔尺寸小。第二聚合物网络的网孔尺寸优选为1000纳米以下,优选为500纳米以下,优选为250纳米以下,优选为100纳米以下,优选为50纳米以下,优选为20纳米以下,优选为10纳米以下,优选为5纳米以下。

[0056] 平均横截面直径在1微米( $\mu\text{m}$ )至1000 $\mu\text{m}$ 范围内的水凝胶颗粒,其中该颗粒含有第一聚合物网络,该网络的平均网孔尺寸允许扩散通过的分子的分子量不超过430gDa (gigadalton),优选不超过54gDa,优选不超过6.8gDa,优选不超过435MDa (兆道尔顿),优选不超过54MDa,优选不超过3.5MDa,优选不超过435kDa (千道尔顿),优选不超过54kDa,优选不超过28kDa,还可以含有围绕所述第一聚合物网络的第二聚合物网络,该第二聚合物网络不含所述结合分子。第二聚合物网络的平均网孔尺寸优选小于第一聚合物网络的网孔尺寸。第二聚合物网络优选具有允许分子量不超过430gDa (gigadalton),优选不超过54gDa,优选不超过6.8gDa,优选不超过435MDa (兆道尔顿),优选不超过54MDa,优选不超过3.5MDa,优选不超过435kDa (千道尔顿),优选不超过54kDa,优选不超过28kDa的分子扩散通过的网孔尺寸。

[0057] 第二聚合物网络优选具有1nm-450微米、1nm-50微米、1nm-5微米、1nm-500nm或1nm-50nm的厚度。第二聚合物网络优选具有5nm-450微米、25nm-50微米、100nm-5微米、100nm-500nm的厚度。该厚度优选为0.5-100微米,优选为0.5-50微米,更优选为0.5-20微米。

[0058] 第二聚合物网络可以包括靶向基团或生物区室保留分子。第二聚合物网络在第一聚合物网络处具有朝内指向的表面,并在另一侧具有朝外指向的表面。靶向基团或生物区室保留分子,优选固定在朝外的表面。在优选的实施方式中,靶向基团或生物区室保留分子与第二聚合物网络为化学连接或物理连接。本文其他地方描述了用于将分子连接至聚合物网络的手段和方法。靶向基团优选为对蛋白质分子具有特异性的结合分子,该结合分子存在于目标位置或与之目标位置化学连接或物理连接。该靶向基团优选是对细胞受体,或者化学连接或物理连接的基质蛋白具有特异性的结合分子。靶向基团优选对存在于滑膜腔内并与滑膜腔化学连接或物理连接的蛋白质分子具有特异性。这种靶向基团的例子包括但不限于抗体或其抗原结合片段。它可以是单链Fv片段(scFv)、FAB-片段、抗癌素(anticalin)、所谓的纳米体、双环肽等。本文所用的术语“抗体”是指蛋白质分子,优选属于免疫球蛋白类的蛋白质,其含有一个或多个与抗原表位结合的可变域,其中这些域衍生自具有抗体的可变域的同源性序列或与共享具有抗体的可变域的同源性序列。抗体片段至少含有抗体的可变域。该结合分子也可以是配体/受体对的成员。

[0059] 如本文所述的含有水凝胶颗粒的水溶液优选为可聚合溶液。这例如在生物墨水中有用的(参见例如Kamperman等人(Adv.Health.Mater.6;2017;1600913))。其他用途包括

但不限于改善水凝胶颗粒在体内特定位置的保留。此外可聚合水溶液可以用于工程组织中,并且可以通过将一个或多个池(sinks)放入工程组织中,使有害的炎症环境对植入物(工程组织)更加友好。

[0060] 本文所述的水溶液优选为药物溶液,优选地,药物组合物为含有本文所述的水凝胶颗粒和药学上可接受的载体或赋形剂。该水溶液、药物溶液或药物组合物优选为可注射溶液或组合物。可注射溶液是指可通过空心针的溶液,该空心针用于在医学领域中给人体注射液体。针可以是皮下注射针,它是一种细长的空心管,具有尖锐的尖端,在尖端的一端具有小开口。空心针通常与注射器、带有柱塞的手动装置一起使用,以向人体注射物质。水溶液是指溶剂为水的溶液。该水溶液优选为生理溶液(即包括与生物相容的渗透压)。常常使用生理盐溶液(每升(0.9%)溶液含盐9克)。当用磷酸盐缓冲液缓冲时,称为磷酸盐缓冲盐水或PBS。

[0061] 水溶液作为细胞因子库,以去除植入物周围环境中的耗尽的分子/细胞因子(通过将细胞因子库微凝胶掺入(不同的/次要的)墨水/生物材料中,以减少环境的有害性)。

[0062] 本发明还提供了本发明所述的水凝胶颗粒、药物溶液或药物组合物,用于治疗免疫系统过度活跃的患者、癌症患者或具有过度活跃的激素和/或细胞因子产生细胞的患者,优选用于治疗炎症,更优选用于治疗关节炎。免疫系统过度活跃的患者可以是自身免疫疾病患者、炎症患者、微生物诱导的免疫反应(例如细菌或酵母菌)、创伤诱导的免疫反应(急性应激导致炎症)、组织变性诱导的免疫反应(分解产物可以诱导炎症)等。

[0063] 免疫系统过度活跃是指免疫系统开始杀死人体内的细胞和组织,或者免疫反应处于“细胞因子风暴”模式,主要症状是高烧、肿胀、发红、极度疲劳和恶心。在某些情况下,免疫反应将是致命的。虽然有效的免疫系统是保证健康所必须的,但过度活跃的免疫系统本身就是一种威胁。免疫系统使我们的身体免受任何有害病毒和细菌的侵害。然而,有时我们的免疫系统会出现问题,开始攻击我们自己的身体组织和细胞。这可能导致各种自身免疫性疾病,各种休克症状和过敏。美国自身免疫相关疾病协会保留着自身免疫疾病的清单。其中大多数的典型的是(局部)存在促炎细胞因子或可溶性过敏原或抗原。可以通过在体内受影响的部位注射如本文所述的水凝胶颗粒、药物溶液或药物组合物,以及具有对一种或多种的细胞因子具有特异性的一种或多种的结合分子,可以从局部耗竭这些因子中的一种或多种。该局部耗竭至少减缓了至少局部的疾病的发展。局部耗竭至少在局部减轻了疾病的一种或多种症状。

[0064] 癌症没有具体的原因。然而,许多癌症的生长和维持的关键是它们对一种或多种细胞外刺激的依赖性。目前正在临床试验中评估癌细胞的靶向抗体。此类抗体通常针对存在于癌细胞或相关基质上的分子。本发明的水凝胶颗粒的第一聚合物网络中的结合分子通常不针对此类相关的标记物,因为这些标记物不能扩散到颗粒的聚合物网络中与大结构相连。相反,结合分子优选针对具有肿瘤维持或肿瘤生长作用或免疫反应抑制作用的可溶性肽或蛋白质。这种因子的非限制性例子是各种可溶性EGF或类EGF因子,各种反应蛋白、Bmps、TGFbs、WNTs、FGFs、VEGF、CXCLs、ARGs、CCLs、ILs、TNFs、MMPs、ADAMTs、ANGs、PDGFs、IGFs、HGFs、PlGFs和/或OPN。可以通过在体内受影响的部位注射如本文所述的水凝胶颗粒、药物溶液或药物组合物,以及具有对一种或多种的细胞因子具有特异性一种或多种的结合分子,以从局部耗竭这些细胞因子中的一种或多种。该局部耗竭至少在该局部减缓了至少

局部的癌症的发展。局部耗竭至少在局部减轻了癌症的一种或多种症状。

[0065] 治疗血管癌的另一方法是通过局部隔离和/或消耗脉管系统刺激性可溶性因子,如VEGF和/或FGF。可以隔离的其他刺激脉管系统的可溶性因子是Bmps、TGFbs、WNTs、FGFs、VEGF、CXCLs、ARGs、CCLs、ILs、TNFs、MMPs、ADAMTs、ANGs、PDGFs、IGFs、HGFs、PlGFs和/或OPN。这至少可以减少注射部位附近的新血管化形成。

[0066] 炎症是身体组织对有害刺激(如病原体、受损细胞或刺激物)的生物反应的一部分。这一种涉及免疫细胞、血管和分子介质的保护性反应。炎症通常有助于抵抗有害情况。然而,当炎症过强或慢性时,炎症本身可能是有害的。炎症是一个涉及细胞、基质和结构的各种相互作用的过程。它还涉及所谓的促炎细胞因子。通过在体内受影响的部位注射如本文所述的水凝胶颗粒、药物溶液或药物组合物,并且具有对一种或多种的细胞因子具有的特异性的一种或多种的结合分子,以从局部耗竭这些细胞因子中的一种或多种。该局部耗竭至少在该局部减缓了至少局部的炎症的发展。该局部耗竭至少在局部减轻了炎症的一种或多种症状。

[0067] 第一聚合物网络中的结合分子的细胞因子的非限制性和优选的实例是:白细胞介素-1(IL-1)、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-12、IL-13、IL-17和IL-18、肿瘤坏死因子(TNF)、干扰素 $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )、IFN- $\alpha$ 和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子。

[0068] 自身免疫性疾病优选为关节炎,优选为类风湿性关节炎。含有对促炎细胞因子具有特异性的结合分子的水凝胶颗粒特别适用于治疗关节炎,优选类风湿性关节炎的关节症状。

[0069] 该疾病最好是类风湿性关节炎、克罗恩病、哮喘、细菌感染、败血症、整器官衰竭、癌症或移植排斥。该疾病优选是可以植入工程组织或器官来治疗的疾病。

[0070] 含有对促炎细胞因子具有特异性的结合分子的水凝胶颗粒特别适用于治疗关节炎。

[0071] 本发明还提供了一种用过度活跃的免疫系统,癌症或过度活跃的激素和/或细胞因子产生细胞治疗受试者的方法,该方法包括给予有需要的受试者如本文所述的水凝胶颗粒或者含有所述水凝胶颗粒的药物溶液或组合物。优选通过局部注射的方式进行。优选为肿瘤、炎症的特定部位,例如关节炎的关节。所述炎症优选为关节炎。

[0072] 当植入例如肝脏这样高度血管化的区域时,微颗粒可用于全身治疗或“体内透析”。例如,通过注射到门静脉中,微颗粒被卡在肝脏的毛细血管床中,在那里它们可以消耗血液中的有害/“不需要的”细胞因子。在这种情况下,它们还可以通过从血液中捕获过敏原、组胺或诱导过敏的细胞因子来治疗过敏。血管内注射还可以有效地保留在肺部的毛细血管床中,这也可以用来例如通过减轻炎症减轻疾病的负担。

[0073] 在细胞生物学研究中,微颗粒可用于消耗细胞、组织培养物或来自特定的生长因子或细胞因子中工程组织。这允许严格控制细胞或细胞类型的串联,例如,细胞共培养物。

[0074] 细胞因子池也可以在手术期间/手术后作为预防(慢性)炎症的方法。除了注射外,亲和微颗粒还可以作为消化道的治疗剂进行优化(例如,调节肠道菌群/高级益生菌)。用于兽医目的:在屠宰前全身消耗生长因子/抗生素,以最大限度地减少肉/食品污染。如本文所述的水凝胶颗粒可用于滴眼液、局部使用(乳膏/乳液)。组合方法使用使用多功能细胞因子池或不同细胞因子池的混合物。作为在血液吸附装置中树脂的替代物,例如CytoSorb,允许

以特定方式消耗血液中的细胞因子。

[0075] 可在肿瘤、炎症部位、静脉内、肌肉内、腹腔内注射。

[0076] 可以采用任何合适的输送液体的方法进行本文所述的水凝胶颗粒的体外给药,例如具有可关闭孔口的容器。例如印刷喷嘴或印刷装置。

[0077] 本发明还提供了一种用于降低生物系统中可溶性生物分子的生物利用度的方法,该方法包括向所述系统提供如本文所述的水凝胶颗粒,其中生物分子包括可进入所述聚合物网络的流体力学半径,并且所述结合分子可结合所述生物分子。生物系统可以是体外细胞培养系统。这种系统固有地是封闭的,并且为水凝胶颗粒提供局部环境。该颗粒特别适合于从一种或多种有害的可溶性蛋白质因子中耗尽培养基。当不希望生长时,取决于培养的细胞类型,该因子可以是可溶性生长诱导因子。非限制性的实例是EGF和类胰岛素生长因子。当需要生长时,取决于所培养的细胞的类型,该因子可以是可溶性的生长抑制因子。例如,当培养和分化干细胞时,通过耗尽培养物中诱导分化成该不希望的谱系的分化因子,可以抑制分化成所需谱系以外的细胞。本发明还提供了本文所述的水凝胶颗粒、药物溶液或组合物在用于降低生物分子在生物系统中的生物利用度的用途。

[0078] 该生物系统也可以是人类或非人类动物。该生物系统也可以是器官芯片,优选由一个或多个器官组成,或者是旨在以离体方式复制人类生物学的工程生理系统。

[0079] 本发明还提供了一种降低生物分子在生物系统中的生物利用度的方法,该方法包括向所述系统提供如本文所述的水凝胶颗粒,其中所述生物分子的分子量为200道尔顿至150千道尔顿,并且所述结合分子与所述生物分子结合。

[0080] 本发明还提供了将本文所述的水凝胶颗粒作为细胞因子池的用途。

[0081] 如本文所述的水凝胶颗粒可以具有多孔表面和第一聚合物网络,该第一聚合物网络含有固定在第一内部聚合物网络中的结合分子。多孔表面中的孔的平均横截面直径可以为约0.1纳米(nm)至1000nm。多孔表面中孔的平均横截面直径优选为0.5-1000纳米,优选为2-300纳米,更优选为2-100纳米,更优选为5-50纳米。

[0082] IgG抗体通常具有150kDa的分子量和在10nm范围内的横截面直径。这样的分子可以容易地扩散到具有100nm的孔的水凝胶颗粒中。IgG分子的流体力学半径为约5.5nm。

[0083] 颗粒或孔的横截面直径是指垂直于其最长轴切割形成的表面的直径。如果表面不是大致的圆形,则直径是横截面上相对的两个点之间最长距离的长度和最短距离的长度之和的一半。横截面通常在最宽处。

[0084] 本文所指的横截面直径是指水合水凝胶颗粒的直径或在其中的直径。优选采用pH值为7-8的生理盐水水溶液,如pH7.4的磷酸盐缓冲盐水。

[0085] 肽的氨基酸比蛋白质少。肽和蛋白质之间的差别大小通常是任意的。在本发明中,肽被定义为由2至50个氨基酸组成的分子。蛋白质是指具有50个以上氨基酸的分子。

[0086] 生物分子是由有机体产生分子或可以由有机体产生的分子。肽和蛋白质在人工合成时也被认为是本发明中的生物分子。

[0087] 在一些实施方式中,水凝胶可以进一步含有可以从颗粒中扩散出来的分子,例如,除了提供颗粒向靶生物分子的“沉”功能外,还提供分子的缓慢释放。在一种实施方式中,通过生物素或生物素化分子置换脱硫生物素化分子,可以用于脱硫生物素化分子的按需和/或控制释放,以例如关闭其局部功能或实现其按需和/或控制释放。

[0088] 为了清晰和简明的目的, 本文中将特征作为相同或不同实施例的一部分进行描述, 但是, 应当理解的是, 本发明的范围可以包括具有所描述的全部或部分特征的组合的实施例。

[0089] 附图的简要说明

[0090] 图1: 现有技术中水凝胶颗粒的示意图。左图描绘了用于控制释放结合分子的水凝胶颗粒中结合分子的组织。右图描绘了暴露在纳米颗粒表面的结合分子, 旨在与抗原结合并呈递至外部。

[0091] 图2:A) 本发明的水凝胶颗粒的一种实施方式的示意图, 其中结合分子被固定在水凝胶的内部。B) 本发明水凝胶颗粒的一种实施方式的示意图, 其中结合分子被固定在水凝胶的内部, 并且该水凝胶被不含结合分子的第二水凝胶包围, 并且第二水凝胶具有可作为筛子的网孔尺寸, 允许目标分子进入颗粒并且阻止较大的分子进入颗粒。

[0092] 图3: 骆驼VHH的示意图。VHH被组织成9个与环连接的反平行 $\beta$ 链。这些环中的三个形成互补的决定区域(CDR1, CDR2和CDR3)。环L1、L2、L3和L5位于远离CDRs的位置, 并且适合于引入糖基化位点和引入糖基基团, 而不干扰VHH与其抗原的结合。环L4靠近CDRs, 对它的操作可能会影响VHH与其抗原的结合。

[0093] 图4: 靶向hBMP7的VHHs的特征。(A) 靶向hBMP7的VHH-G7的氨基酸序列。根据Chothia[39]指出了框架(FR)和互补决定区(CDR)。(B) 纯化的G7用15%的SDS-PAGE进行大小分离, 用考马斯亮蓝(Coomassie Brilliant Blue)染色。分子量标记(以kDa为单位)显示在左侧。(C) 在酶联免疫吸附测定(ELISA)中VHH-G7与hBMP7的特异性结合。数据表示为至少3个重复的平均值 $\pm$ 标准偏差。

[0094] 图5: 双头(bihead)G7-MA10的构建和生产。(A) VHH G7和MA10的氨基酸序列比对。根据Chothia[29]表示VHH的框架(FR)和互补决定区域(CDR)。(B) 示意性地表示了工程化的二价VHH。指示了G7在N端的位置和MA10在C端以及GS连接子的位置。(C) 预测生成的二价G7-MA10的3D蛋白模型, 其中GS连接子以黄色突出显示, G7和MA10的CDR3以黑色显示。(D) 重组表达的VHH G7、MA10和G7-MA10经15%SDS-PAGE进行大小分离, 用考马斯亮蓝染色。分子量标记(以kDa为单位)显示在左侧。一价和双特异性VHHs的计算分子量显示在右侧。(E) 通过ELISA检测双头VHHs与HA的结合特异性。数据表示为至少3个重复的平均值 $\pm$ 标准差。

[0095] 图6: VHH和BMP7的免疫组织化学染色。给小鼠注射双头VHH, 它同时与矿化骨、软骨和BMP7中的羟基磷灰石(生长因子BMP7或安慰剂)结合。在处死前一天(第20天), 向一半的动物注射生长因子BMP7。在第21天, 处死动物, 分离骨骼并使用抗VHH抗体(左图)或抗BMP7抗体进行免疫组织化学处理。仅注射双头的小鼠的VHH染色呈阳性(上图)。只有在20天前注射双头的小鼠中, 在矿化骨和软骨中富含BMP7(上, 右)。BMP7染色与VHH染色共定位, 证明即使在小鼠首次注射3周后VHH仍能与BMP7结合。仅注射BMP7(中图)或安慰剂(下图)未显示VHH染色, 也没有显示在矿化骨和软骨中BMP7的明显富集(中图)或完全没有BMP7。

[0096] 图7: (a) 用壳功能化的Dex-TA-生物素微凝胶(如RGD型肽), 而核心中的生物素部分保持游离, 这允许模块化微组织的进一步原位功能化。(b, c) 可以通过中性亲和素的扩散来控制功能化壳的厚度, 所述中性亲和素作为生物素化部分的反应性底物。(d) 使用这种简便的多步功能化方案, 可以使得Dex-TA-生物素微凝胶的壳和核具有不同的功能部分, (e) 分别使用FITC-(即绿色)和atto565标记(即红色)的壳和核来证明。通过设计非功能化的或

可替代地功能化的壳,可以尤其利用这种核-壳型功能化将核中的功能部分与微凝胶外部物理分离。黑色比例尺:100 $\mu\text{m}$ 。白色比例尺:20 $\mu\text{m}$ 。

[0097] 图8:控制功能化外壳(即第二聚合物网络)的厚度。比例尺:20微米。

[0098] 图9:使用四价中性抗生物素蛋白耦合到葡聚糖-酪胺微凝胶的荧光标记的脱硫生物素(DTB-FITC)被多种目标生物素化分子所取代,包括生物素-VHH@BMP7,这证明使用主体-客体(即物理)相互作用的化学交联微凝胶的成功功能化。

[0099] 图10:人类间充质干(基质)细胞的在使用(右图)和不使用(左图)葡聚糖-酪胺微凝胶的情况下进行培养。微凝胶是可见的白点。如未受影响的细胞形态所示,微凝胶(即“细胞因子池”)不影响体外细胞培养。

[0100] 图11:BMP报告细胞系(C2C12-BRE-Luc)的体外荧光素酶的产生对BMP7的反应,在使用和不使用葡聚糖-生物素微凝胶功能化的VHH@BMP7(即“细胞因子池”)。VHH功能化的微凝胶可以通过消耗局部环境中的生长因子(即细胞因子)防止细胞反应。

[0101] 图12:从左到右图a、b和c。使用近红外标记的葡聚糖偶联物制备直径为30 $\mu\text{m}$ 的微凝胶,并注入小鼠膝盖的滑膜腔。(a)三周后,使用荧光成像显示仍然可以在活体动物中追踪到微凝胶,表明微凝胶仍存在于注射的膝盖中,并且(b,c)使用组织学染色进行事后检验。微凝胶最终出现在滑膜中,如图c的左侧的深紫色的点。

[0102] 图13:(A)与具有不同的分子量(20kDa、40kDa、70kDa、150kDa、500kDa、2000kDa)和不同的IgG的FITC偶联葡聚糖孵育的空心PEG-TA(以PEG表示)和DexHA-TA(以DexHA或Dex表示)微凝胶的共聚焦切片。比例尺代表250 $\mu\text{m}$ 。(B)通过对图A中的共焦图像进行数字图像分析量化微凝胶的渗透性。被评估分子的分子量为[20kDa葡聚糖-FITC、40kDa葡聚糖-FITC、70kDa葡聚糖-FITC、150kDa葡聚糖-FITC、500kDa葡聚糖-FITC、2000kDa葡聚糖-FITC、150kDa IgG]和流体力学半径为[~3.3nm、~4.5nm、~5.8nm、~8.5nm、~14.7nm、~27.0nm、5.3nm]。\*DexHA(-酪胺)凝胶可渗透IgG,但由于IgG在凝胶核心中沉淀,因此无法进行定量。k表示千道尔顿(kDa)。

[0103] 图14:修改DEX和HA。

[0104] 示意图显示了Dex和HA的修改。

[0105] 我们合成了与酪胺和麦胺偶联的葡聚糖,然后利用该聚合物与游离的硫醇基团反应。聚合物VHH偶联物可以直接进行原位交联注射,也可以先在微凝胶中加工,然后再负载VHH。这样制备的微凝胶可以注射到关节空间。

[0106] 聚合物VHH偶联物可以直接进行原位交联注射,也可以先在可以注射的微凝胶中加工。

[0107] 图15:用PNC活化N-(2-氨基乙基)马来酰亚胺盐酸盐的示意图(通过 $^1\text{H-NMR}$ 确认)。随后与Dex-TA反应,得到Dex-TA-马来酰亚胺。

[0108] 图16:产物的 $^1\text{H-NMR}$ 分析证实了Dex-TA-马来酰亚胺的结构。大多数的Ma1-PNC与Dex-TA的酚类残基反应。光谱中显示了用于定量的峰。左侧插图显示了Dex-TA-马来酰亚胺与PEG-二硫醇的交联产物,证实了产物中马来酰亚胺残基的反应性。

[0109] 图17:用PNC活化葡聚糖替代合成Dex-TA-马来酰亚胺的反应方案。随后,使Dex-PNC与酪胺和马来酰亚胺-胺的混合物反应,生成Dex-TA-马来酰亚胺。

[0110] 图18:产物的 $^1\text{H-NMR}$ 分析证实了Dex-TA-马来酰亚胺的结构。光谱中显示了用于定

量的峰。

[0111] 图19:在DMTMM存在下,酪胺和马来酰亚胺对透明质酸功能化的反应方案。

[0112] 图20:产物的<sup>1</sup>H-NMR分析证实了HA-TA-马来酰亚胺的结构。圈出的区域表示用于量化酪胺和马来酰亚胺残基的信号。

[0113] 图21:具有游离Cys的荧光标记肽与HA-TA-马来酰亚胺的直接偶联的示意图。在SDS-PAGE上确认了成功的偶联。

[0114] 图22:具有游离半胱氨酸(Cys)的荧光标记肽与HA-TA-马来酰亚胺的定向偶联的示意图。在SDS-PAGE上确认了成功的偶联。

[0115] 图23:将含有近红外标记细胞的细胞(15μm)、30μm和100μm微凝胶注射到健康的大鼠和有骨关节炎的大鼠内。在此图中显示的是健康膝盖中近红外信号的保留情况。表明凝胶中标记的细胞存在至少11周。

[0116] 图24:骨关节炎膝盖的组织学分析表明,凝胶在12周后仍然大量存在。

## 具体实施方式

[0117] 实施例

[0118] 提供了三个实施例,它们描述了i)VHHs的体内应用和生物稳定性;ii)VHH-官能化水凝胶颗粒的制备及其在体内和体外的应用;iii)空心/核-壳水凝胶颗粒的制造以及这些网络的网孔尺寸或分子量截留的测量。

[0119] 实施例1

[0120] 水凝胶偶联的VHH需要具有在数周的时间内作为细胞因子池的能力,需要偶联的VHH在体内如此长时间内保持的生物活性。为了测试VHH在体内的稳定性,我们给小鼠注射了双功能VHH(双头),该VHH同时与骨骼中的羟基磷灰石和生长因子BMP7结合。

[0121] 材料和方法

[0122] 靶向BMP7的VHH的库构建和选择。

[0123] 所有的免疫都得到了乌得勒支大学伦理委员会批准用于动物实验。用重组人BMP7(R&D系统,#354-BP/CF)免疫两只美洲驼。将抗原与佐剂Stimune(CEDI Diagnostics, Lelystad, 荷兰)混合,并在第0、14、28和35天进行肌肉注射。在第44天,分离外周血淋巴细胞用于RNA提取和构建库。如前[1-3]所述产生VHH噬菌体显示的库,并通过电穿孔转移至大肠杆菌(E.colli)菌株TG1[hsd\_5thi(lac-proAB)F(traD36 proAB\_lacIq lacZ\_M15)]。

[0124] 通过淘选法选择与BMP7结合的噬菌体。将磷酸盐缓冲液(PBS,Gibco)中浓度不断降低的BMP7(5μg,2μg和0.2μg)涂布在MaxiSorp板(Nunc,Thermo Scientific)的孔中,在4℃下过夜。将大约10<sup>10</sup>个菌落形成单位(cfu)的噬菌体与包被的BMP7在室温(RT)下孵育2小时,并用PBS中4%的Marvel(干脱脂牛奶,Premier International Foods)阻断。彻底洗涤后,将与BMP7结合的噬菌体在100mM三乙胺(TEA)中于室温孵育15分钟而被洗脱。通过加入1M、pH为7.5的Tris-HCl立即中和洗脱的噬菌体。通过感染大肠杆菌TG1菌株并随后在琼脂平板上选择氨苄青霉素抗性来保全所选噬菌体的DNA信息。为了获得将VHH表达为与噬菌体基因III的融合蛋白的重组噬菌体,使被保全的TG1大肠杆菌生长至对数期,然后用辅助噬菌体VCSM13(Stratagene公司,美国加利福尼亚州拉霍亚)感染[4]。如上所述,将噬菌体颗粒用聚乙二醇(PEG)沉淀,并用于在涂有BMP7的孔上的第二轮选择中。对来自第二轮选择的单

个菌落的所选的噬菌体进行测序(Macrogen)。在分析了进一步特征后,在多个VHH候选克隆中,选定的一个被命名为VHH G7(G7)。

[0125] 靶向HA的VHH的选择。

[0126] 从非免疫的骆驼VHH噬菌体库中选择与HA结合的VHH(由BAC BV友好提供)。非免疫库的构建已经在之前描述过[5]。在HA板上进行了两轮选择。纯HA板的尺寸约 $1.5 \times 1.5$ mm,厚度为0.1mm,由英国Plasma Biotal Limited提供。将噬菌体与3个HA板在96孔微量滴定板的孔中一起孵育。后续步骤与VHH G7的选择相同。最后,选择一种名为VHH-MA10(MA 10)的VHH进行进一步研究。

[0127] 双头G7-MA10是通过的cDNA基因融合而构建的,编码与BMP7、G7结合的VHH,以及,与HA、MA10结合的VHH(图5),构建。采用PCR方法扩增VHH序列。设计了不同的引物组来扩增位于N-末端的VHH G7和位于C-末端的VHH MA10,以生成二价VHH(M13Rev:GAGGTGCAATTGGTGGAGTCTGGG;5GSBamRev:AGTAGGATCCGCCACCTCCTGAGGAGACCGTGACCTGGGTC CC;5GSBamFwd:TCTTGATCCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGG;TVSSRev: TGAGGAGACGGTGACCTGGGTC)。N末端VHH的3'和C末端VHH的5'处的引物编码一个由五肽“Gly-Gly-Gly-Gly-Ser”表示的柔性序列(GS连接子)。引物含有独特的限制性位点(BamHI)。PCR扩增后,用独特的N端限制性酶切位点(SfiI)和位于N端的VHH的BamHI消化生成的片段,用位于C端的VHH的BamHI和独特的C端限制性酶切位点(BstEII)对消化生成的片段。将这些片段连接到表达载体pMEK222中,用SfiI和BstEII消化该载体,然后将它们转化到大肠杆菌中进行表达。

[0128] 大肠杆菌TG1菌株用于质粒的维持、噬菌体的感染和蛋白质的表达。为了在接下来的检测中达到检测的目的,使用了具有不同标签的两种载体以特异性检测VHH。因此,将单独选择和分离的VHH的DNA信息亚克隆到含有C末端Myc和His标记的质粒pUR8100(用于MA10)或pMEK219(用于G7)中,以及,含有C端FLAG和His标记的pMEK222中。大肠杆菌TG1在LB培养基(LB,Luria Broth)或酵母提取物和胰蛋白胨(YT)培养基中生长,培养基含有2%(w/v)的葡萄糖和 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的氨苄西林。在非静态条件下,通过异丙基 $\beta$ -D-1-硫代半乳糖苷(IPTG)在 $37^\circ\text{C}$ 下诱导lac启动子4小时,从大肠杆菌TG1产生VHHs。通过钴亲和层析(TALON His-Tag纯化树脂,ClonTech),通过C-末端His-标记从周质级分中纯化出VHH蛋白。纯化的VHHs通过十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)进行分析。最终的VHHs浓度是根据280nm处的紫外光吸收(NanoDrop 1000分光光度计,Thermo Scientific)和理论质量消光系数确定的。

[0129] VHH结合特异性。

[0130] 在ELISA结合试验中测试了纯化的VHHs(G7、MA10、G7-MA10)的结合特异性。在小鼠胎儿跖骨上进一步测试了MA10与骨骼的结合。

[0131] VHH-G7或双头G7-MA10与BMP7的结合特异性。

[0132] MaxiSorp板孔用BMP7(30nM)在PBS中涂布,在 $4^\circ\text{C}$ 过夜,然后在室温下用PBS中的2%BSA阻断2小时,以阻断非特异性结合位点。随后,将孔与在1%BSA的PBS中连续稀释的VHHs(范围为0至 $7 \mu\text{M}$ )一起在室温下孵育2小时。用PBS吐温(PBST)和PBS洗涤孔。通过与兔抗VHH血清(K976)和与过氧化物酶偶联的驴抗兔抗体一起孵育来检测结合的VHH。辣根过氧化物酶(HRP)的量是通过添加四甲基联苯胺产生的(TMB,1-Step Ultra TMB-ELISA,赛默飞

公司(Thermo Scientific))。通过加入 $H_2SO_4$ 终止反应,并在450nm下测量(酶标仪, Micro Plate Reader)。解离常数(Kd)从随后的实验数据与特定结合模型的关联中获得。将数据归一化为无VHHs的条件。

[0133] VHH-MA10或双头G7GS10MA10与HA的结合特异性。

[0134] 为了阻断非特异性结合位点,将含有三个纯HA板的微量滴定板孔在室温下于PBS中用2%的BSA阻断2小时。作从G7至BMP7执行以下步骤。

[0135] VHH-MA10与小鼠胎儿跖骨结合

[0136] 在妊娠第17.5天从FVB小鼠胚胎(时间配对, Harlan)中分离出小鼠胎儿跖骨。(动物实验由当地动物伦理委员会批准)。分离后,在37℃的潮湿气氛和5% $CO_2$ 中,将跖骨分别在24孔板的200 $\mu$ L的 $\alpha$ -MEM中培养48小时,补充10%的FBS,100U/mL的青霉素,100mg/mL的链霉素和1%的谷氨酰胺(Glutamax, Invitrogen)。在此平衡期后,将跖骨在VHH(1微克/毫升)的存在下,在37℃、潮湿的气氛和5%的 $CO_2$ 中孵育2小时。为了实现可视化,在孵育之前,按照制造商的规程(Invitrogen)将Alexa Fluor 647随机标记VHH MA10和对照VHH 1B5。这产生了VHH MA10-647和1B5-647。用PBS彻底洗涤后,用BD Pathway (BD Biosciences)评估跖骨的荧光, BD Pathway具有628 $\pm$ 40nm的激发滤光片和692 $\pm$ 40nm的发射滤光片。

[0137] 双头G7GS10MA10对HA和BMP7的双重结合特异性。

[0138] 我们进一步测试了二价VHH的G7基团在被固定在HA板上后是否仍然能够与BMP7结合。为此目的,将纯HA板与系列浓度的VHHs(范围从0到7 $\mu$ M)在1%的BSA中的PBS中孵育两个小时,在室温中用2%的BSA阻断两小时,随后用4%的Marvel (Marvel原干脱脂牛奶)阻断一小时。随后,将HA板与hBMP7(300ng/mL)和小鼠抗hBMP7(1 $\mu$ g/mL)抗体在室温下孵育1小时。在这些步骤之间,将孔用PBST和PBS洗涤。通过与在1%BSA的PBS中与HRP偶联的驴抗小鼠抗体一起孵育来检测结合的抗hBMP7(1小时,室温)。在 $H_2O_2$ 存在下(30分钟,室温),通过添加OPD定量HRP的量。通过加入 $H_2SO_4$ 终止反应。在490nm处进行随后的测量。

[0139] VHH G7和双头G7-MA10的生物活性。

[0140] 碱性磷酸酶(ALP)测定。

[0141] C2C12细胞系用于成骨分化。将细胞在补充有10%的胎牛血清(FBS, Cambrex)、100U/mL的青霉素(Gibco)和100 $\mu$ g/mL的链霉素(Gibco)的DMEM(Gibco)中培养,并在37℃下、湿润的气氛和5%的 $CO_2$ 中孵育。为了进行分化测定,以10,000个细胞/ $cm^2$ (第0天)的密度接种细胞。汇合后(第4天),将细胞与抗坏血酸(50 $\mu$ g/mL; Sigma Aldrich)培养3天,并在存在或不存在VHH G7(1 $\mu$ g/mL)或G7GS10MA10的情况下用BMP7(300ng/ml; R&D Systems)刺激。在第7天,用PBS洗涤细胞,并用CDPStar裂解缓冲液(罗氏(Roche))裂解。为了评估ALP活性,将细胞裂解液添加到CDPStar试剂(罗氏)中,并使用矢量微孔板光度计(Promega)测量发光。校正发光单位的DNA含量。根据制造商的规程(CyQuant细胞增殖测定试剂盒, Invitrogen),通过增殖化验确定DNA浓度。

[0142] ALP染色和成像

[0143] 将纯HA板置于96孔板(平底)中,并用70%乙醇灭菌2小时。将C2C12培养基加入孔中2小时。在双头VHH(1 $\mu$ M)加入PBS中1%BSA的孔中,并在室温下放置2小时。将hBMP7(300ng/mL)加入PBS的孔中,并放置2小时。在这些步骤之间,用PBS洗涤孔。将C2C12细胞以10000个细胞/孔的接种密度与抗坏血酸一起添加到孔中。三天后,按照协议,通过Sigma

Alkaline磷酸酶试剂盒测定HA板上的ALP表达。用核固红对细胞核进行反染色后,通过立体显微镜拍摄图像。

[0144] VHHs体内实验。

[0145] 用近红外IRDye 800CW (IR) 标记MA10和双头G7GS10MA10。

[0146] 在VHH MA10和双头G7GS10MA10与矿化骨基质结合的良好结果的基础上,选择近红外IRDye 800CW来标记VHHs,以便在体内小鼠模型中进一步检测。VHH J3被用作非HA结合对照。为了避免干扰抗原-抗体相互作用,采用了直接标记策略,包括对VHH' s的C端进行定点标记。这是通过在VHH' s的C末端(MA10-CYS或G7GS10MA10-CYS)基因上引入未配对的半胱氨酸实现的,该半胱氨酸可与含有IRDye 800CW的马来酰亚胺偶联。使用在线程序I-TASSER对VHH MA10-CYS和G7GS10MA10-CYS进行蛋白质建模[6-8]。测试获得的VHH MA10-IR和G7GS10MA10-CYS-IR与HA结合,或者同时与HA和BMP7的结合,以证实遗传修饰和标记不会干扰VHH的功能。

[0147] MA10的体内表现。

[0148] 为了评估MA10靶向矿化骨的可能性,将MA10-IR静脉注射到两组无名氏C nu/nu小鼠(法国查尔斯河)中。一组注射VHH MA10-IR (70 $\mu$ g/100 $\mu$ L),另一组注射阴性对照VHH J3-IR (70 $\mu$ g/100 $\mu$ L)。使用PEARL脉冲成像相机(Li-Cor.Lincoln,Nebraska)对小鼠成像。用2%的异氟烷麻醉小鼠,并在注射后0、1、3、24、48和72小时以及7、16和20天在腹侧和背侧位置成像。用Pearl Impulse软件3.01分析结果。注射后20天,用CO<sub>2</sub>处死小鼠。分离器官和骨骼并进行成像。

[0149] G7GS10MA10的体内性能。

[0150] 该研究包括四个实验组。每组六只动物用于同时测量与骨头结合的(bihead bound)和BMP7的双重活性,因此通过双头靶向羟基磷灰石将BMP7导向骨区域。第1组的小鼠注射了IR标记的双头(20 $\mu$ g/100 $\mu$ L),第2组的小鼠只注射了BMP7 (15 $\mu$ g/100 $\mu$ L),第3组的小鼠注射了IR标记的双头和BMP7 (20 $\mu$ g bihead和15 $\mu$ g BMP7/100 $\mu$ L)的混合物;在注射前2小时制备混合物。第4组注射PBS作为阴性对照。在第20天(处死前24小时),每组3只小鼠再次注射BMP7 (15 $\mu$ g/100 $\mu$ L)。以规则的时间间隔进行IR成像:在第0、2、24、72、7、14、21天的腹侧和背侧位置。注射21天后将所有组处死,并收集大量的器官和骨骼进行成像。

[0151] IR-双头注射的小鼠骨骼的显微图像。

[0152] 为了检测荧光信号在骨骼内的位置,在甲基丙烯酸甲酯(MMA)嵌入后进行了显微成像。为了制作载玻片,将死后24小时的骨骼样本固定在10%的福尔马林中。样品用PBS冲洗并放入组织处理器中,在70%的乙醇中脱水4小时、80%的乙醇脱水4小时、90%的乙醇脱水4小时、96%的乙醇脱水4小时、100%乙的醇脱水4小时和100%乙醇中4小时。将脱水的骨架与MMA溶液(135ml K-plast A,15mL K-plast B,1.5g引发剂)在4 $^{\circ}$ C下孵育1周;每两天更换一次溶液。MMA完全渗入骨架后,MMA嵌入通过与MMA溶液在4 $^{\circ}$ C孵育过夜,然后在37 $^{\circ}$ C上进行水浴直至MMA硬化。用金刚石锯片(LEILA SP1600)从MMA嵌入式骨架上切下300 $\mu$ m的切片,并使用与显微镜连接的Odyssey近红外成像系统进行成像。

[0153] IR-双头注射小鼠骨骼的免疫化学。

[0154] 为了检测注射的BMP7是否已被双头引导至骨组织并触发了BMP7信号转导,使用了兔源抗VHH(QVQ)、抗BMP7(Peprotech)和抗SMAD 1(Santa Cruz)抗体用于免疫化学。在EDTA

溶液中脱钙3周后(每周更换一次溶液),将注入的小鼠骨架包埋在石蜡中并切成5 $\mu$ m的切片。将载玻片在二甲苯中脱蜡,并用分级乙醇再水化。用柠檬酸盐缓冲液(10mM pH6.0)在微波中2分钟回收抗原,然后冷却至室温。随后在室温下用3%的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>溶液处理15分钟阻断内源性过氧化物酶。用5%BSA in PBS中阻断1小时后,在4℃下,将样品与在阻断缓冲液和IgG对照抗体中稀释的初级特异性抗体(抗VHH 10 $\mu$ g/mL,抗BMP7 10ng/mL,抗SMAD1 10 $\mu$ g/mL)孵育过夜。然后加入生物素化的山羊抗兔IgG (Abcam) 30分钟,并在PBS (2 $\mu$ g/mL) 中加入HRP-strep 30分钟。将样品在DAB溶液 (Abcam) 中孵育10分钟,使用苏木精对细胞核进行染色10秒钟。在每个步骤之间用PBS将样品洗涤3次。用纳米聚酮拍摄图像。

[0155] 统计分析。

[0156] 使用Windows的GraphPad Prism 5.00版的GraphPad软件(加利福尼亚州,圣地亚哥)进行统计分析。分析基于单向方差分析和在所有样本之间或样本与对照之间的Tukey's Post-hoc检验( $p < 0.05$ )。误差线指示标准偏差。

[0157] 结果

[0158] 靶向BMP7的VHH (VHH-G7)的生产和表征。

[0159] VHH选自噬菌体显示库,噬菌体显示库是由用重组人BMP7免疫的骆驼PBLs中分离出的RNA构建的。经过两轮筛选,与空孔相比,包被抗原的孔中发现了明显的富集。利用与BMP7的结合,选择了几个克隆用于进一步筛选。从两块190个VHH克隆的模板中,根据限制性模式和ELISA结合试验进行分组,缩小单个克隆的大小。根据结合特异性选择了一个命名为VHH G7 (G7)的克隆进行进一步表征。将基因序列亚克隆到表达质粒中,并按材料和方法所示进行生产和纯化。克隆G7的序列如图4所示。通过SDS-PAGE和考马斯亮蓝染色评估重组产生的VHH的纯度(图4)。观察到大小为16kDa的清晰条带。为了确认VHH G7与hBMP7的特异性结合,进行了ELISA(图4)。数据表明,VHH G7以2.2nM的Kd与hBMP7结合。

[0160] 靶向VHH的HA (VHH MA10)的生产和表征。

[0161] VHH选自非免疫的噬菌体库。在放置在96孔微量滴定板孔中的HA板上进行筛选。在HA板上总共进行了两轮筛选,以富集与HA板结合的噬菌体。在筛选过程中选择了6个显示与HA结合的单克隆。在VHH表达和序列确定之后,选择克隆MA10用于进一步表征。使用TALON从大肠杆菌TG1的周质部分纯化VHH MA10。通过SDS-PAGE评估VHH的大小和纯度,其中检测到16kDa的单条带。通过ELISA测试了VHH MA10与HA的特异性结合。VHH MA10显示出以剂量依赖性方式与HA的结合,表观亲和力Kd=73.9nM。

[0162] 接下来,我们测试了MA10是否可用于通过植入的小鼠胎儿跖骨来可视化矿化的骨骼。为此,用Alexa fluor 647标记VHH MA10。另外,不相关的VHH被作为阴性对照VHH 1B5,并且也被标记。对于VHH MA10-647和1B5-647,获得的标记效率分别为30%和50%。接着将跖骨与两种VHHs一起培养。完整跖骨的荧光显微镜观察显示VHH MA10-647与主要骨化中心的矿化软骨基质特异性结合。另外,还观察到VHH MA10-647与发育中的骨领结合,矿化的骨基质沉积在骨领中。相反,VHH 1B5-647与矿化细胞外基质的结合显著降低,除了在矿化软骨和肥大软骨的边界处有一些非特异性荧光外,在骨领中也有微弱的荧光。有趣的是,使用692 $\pm$ 40nm的发射滤光片,Alexa Fluor 647没有显示任何明显的自发荧光。

[0163] 双头G7-MA10的生产和表征。

[0164] 为了探索具有双重特异性的VHH在生物材料表面功能化中的潜力,构建了由抗

BMP7和抗HA组成的双特异性VHH。如材料和方法所述(图5),使用PCR将两个VHHs的基因连接起来(图5),并在它们之间引入连接序列。所得的双头VHH在图5中进行了示意性说明。ITASSER预测了其结构,表明遗传融合不会影响参与抗原结合的互补决定区(CDR)的暴露[17-19]。将G7GS10MA10的融合基因亚克隆到表达质粒中,并按照材料和方法中的指示进行生产和纯化。如图5所示,如SDS-PAGE所示,所得到的双头VHH具有预期分子量为30kDa的大小,约为分子量为16kDa的单价VHH的两倍。

[0165] 为了表明在双特异性VHH中MA10和G7的组合是否影响双头VHH的MA10部分与HA的结合,相应地是否影响双头VHH的G7部分与BMP7的结合,使用ELISA测定结合特异性。如图6所示,双头VHHs分别表现出与HA的特异性结合,双头VHHs与HA的表观亲和力Kd为62.59nM,与hBMP7的表观亲和力Kd为0.4nM,这与各个组分的亲和力一致。为了表明双头VHHs是否也能够同时与HA和hBMP7结合,得到了hBMP7与首先被固定在HA盘上的双头的结合曲线。如图所示,双头能够与HA和hBMP7结合,尽管与HA的结合降低了G7对hBMP7的亲和力。

[0166] 在C2C12细胞中测试了VHH-G7或双头G7-MA10 hBMP7的生物活性。ALP是成骨分化的早期标志物,并且被hBMP7强烈诱导。在这里,我们确定了在培养基中存在或不存在hBMP7的情况下,VHH-G7或二价G7-MA10在7天的时间内对碱性磷酸酶活性(ALP)的影响。在hBMP7存在的情况下,ALP活性被诱导了约400倍。有趣的是,当细胞在VHH-G7或双头G7-MA10的存在的情况下与hBMP7共同处理时,观察到明显优于ALP的诱导作用:两种VHHs均增加了BMP7诱导的ALP活性,增幅为177%。G7和G7-MA10之间没有显著差异。

[0167] 我们接下来测试了当双头与HA结合时,是否保留了双头G7-MA10对hBMP7活性的增强作用。为此,将C2C12细胞与双头和/或hBMP7预孵育后在纯HA板上培养。在将细胞接种在顶部之前,在步骤之间用PBS充分清洗HA板。与对照相比,用hBMP7预处理HA盘可略微诱导ALP活性。在用双头和BMP7预处理的盘中发现了更强的ALP活性诱导。这表明双头能够将hBMP7隔离在生物材料表面的培养基中,并且这种局部富集足以在C2C12细胞中诱导ALP活性。

[0168] 红外标记的VHH MA10与矿化的骨骼结合。

[0169] 为了评估MA10作为骨组织光学成像探针的潜力,使用近红外标记物标记MA10,产生MA10-IR。该标记过程不影响通过ELISA测定VHH与HA的结合特异性。接下来,将裸鼠在尾静脉内注射MA10-IR,并在注射后几个时间点成像。以未结合的VHH J3-IR作为阴性对照,以相同的方式处理凋落物,并比较两组的图像。在早期时间点拍摄的图像显示,在MA10-IR(注射后最多7天)和J3-IR(注射后最多3天)的情况下,小鼠全身都有红外荧光。与注射J3-IR的小鼠相反,在第20天,在注射MA10-IR的小鼠的骨骼中仍可检测到荧光标记。死亡后,将骨骼和器官分离并成像。背侧和腹侧图像显示清晰明确的针对MA10-IR测得的高荧光的骨骼。MA10-IR的特异性积累发生在矿化的骨骼中。相比之下,在骨骼中未测量到VHH J3-IR的荧光。对于两种VHH,肝脏、脾脏和肾脏在20天后显示出荧光。两组肾脏荧光清晰可见。显然,J3-IR从体内清除的速度比MA10-IR快得多,这表明通过与结合羟基磷灰石靶向骨骼,将VHH在体内的保留时间大幅延长了至少20天。

[0170] 双头VHH通过靶向羟基磷灰石有效地将hBMP7引导至骨骼。

[0171] 为了评价hBMP7是否可以通过双头G7-MA10与BMP7和HA的双重结合活性是否能够将hBMP7导向骨区,将双头G7-MA10用IR标记为G7-MA10-IR。ELISA结果表明,该标记不影响双

头与HA的结合特异性。接下来,将hBMP7和IR标记的双头的混合物注射到小鼠中。仅注射hBMP7或仅注射标记双头作为对照。在第20天(处死前24小时),再次注射BMP7。在较早的时间点,整个体内都存在红外荧光;两周后,活体小鼠难以测量荧光信号。然而,在3周后处死后,在第1组和第3组小鼠的骨骼或例如肝、脾和肾等器官中仍可检测到荧光,所述含有荧光标记的双头。这意味着双头-IR的特异性积累发生在矿化的骨骼上。由于剂量比VHH-MA10-IR低4倍,所以标记的双头注射小鼠的信号比标记的MA10注射小鼠弱是合理的。为了进一步检测骨骼内部的荧光信号位置,进行了显微成像。大多数荧光信号来自骨小梁(trabecula),这强烈地表明双头的目标是活跃的骨重塑部位。

[0172] 免疫组织化学证实了骨中存在VHH。在处死前1天给半数小鼠注射生长因子BMP7。我们进行了免疫组织化学检测,使用抗VHH抗体检测VHH,使用抗BMP7抗体检测BMP7。如图6所示,注射双功能VHH后20天,使用兔抗VHH抗体的免疫组织化学表明VHH存在于矿化的含羟基磷灰石的骨骼和软骨中(左图,棕色点),而在按预期提前20天注射BMP7或与安慰剂的小鼠中没有观察到染色。当小鼠在第20天处死前1天在尾静脉注射BMP7时,免疫组织化学表明BMP7存在于矿化的骨和软骨中。BMP7染色与抗VHH染色共定位。此外,在20天前注射BMP7或安慰剂的小鼠中未发现BMP7。该实验证明,当靶向基质适宜时,VHH可以保留在体内,并且VHH仍具有生物活性。这提供了当VHH与水凝胶基质的骨架结合并在移植时它们仍保持生物学活性,并且仍可以通过长时间结合来中和促炎性细胞因子、生长因子或生长因子拮抗剂的证据。

[0173] 实施例2

[0174] 材料。

[0175] 葡聚糖(Dex;分子量15至25kg/mol-Mn 16kg/mol;使用前冻干)、4-硝基苯基氯甲酸酯(PNC;使用前升华)、LiCl(使用前在110°C干燥)、酪胺(TA)无水吡啶、无水N,N-二甲基甲酰胺(DMF)、三氟乙酸(TFA)、氢氧化钠(NaOH)、N-Boc-1,4-丁二胺(NH<sub>2</sub>-Boc)、碳酸氢钠(NaHCO<sub>3</sub>)、生物素-atto 565、生物素-4-荧光素(biotin-FITC)、6-氨基荧光素、辣根过氧化物酶(HRP,VI型)、过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,含抑制剂)、胎牛血清(FBS)、钙黄绿素AM、同二聚体乙锭-1(EthD-1)、福尔马林缓冲液、聚乙二醇辛基苯基醚(Triton X-100)和所有其他溶剂均购自Sigma-Aldrich。6-(生物素胺)己酸琥珀酰亚胺酯(生物素-LC-NHS)(Succinimidyl 6-(biotinamido)hexanoate(biotin-LC-NHS))购自ApexBio。N-羟基琥珀酰亚胺-脱硫生物素(EZ-Link NHS-脱硫生物素)和4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)购自Thermo Scientific。磷酸盐缓冲盐水(PBS)购自Lonza。最小的具有核苷(αMEM)、青霉素和链霉素的必需培养基α、GlutaMAX和胰蛋白酶-EDTA购自Gibco。碱性成纤维细胞生长因子(ISOKine bFGF)购自Neuromics。Phalloidin-AF647购自Molecular Probes。聚二甲基硅氧烷(PDMS,Sylgard 184)购自道康宁公司(Dow Corning)。Aquapel购自Vulcavite。Novec 7500工程流体中的Pico-Surf 1和Pico-Break 1购自Dolomite。气密性注射器(汉密尔顿(Hamilton))、氟化乙烯丙烯管(FEP,内径250μm,杜邦(DuPont))和连接器购自IDEX Health and Science。低压注射泵(neMESYS)购自Cetoni。

[0176] 葡聚糖-TA-生物素的合成和表征。

[0177] 首先,如前所述,用酪胺和1,4-丁二胺对葡聚糖进行功能化。[9,10]简而言之,用PNC活化葡聚糖,随后将其被酪胺和Boc保护的1,4-丁二胺取代,然后使用TFA并使用截留分

子量为3kDa的膜进行透析,通过将Dex-TA-NH<sub>2</sub>与20倍过量的生物素-LC-NHS在0.1M碳酸氢盐缓冲液(pH~8.5)中反应至少1小时,进一步用生物素功能化。然后用截留分子量为3kDa的旋转过滤柱纯化和浓缩Dex-TA-生物素。使用1H NMR(AVANCE III HD NanoBay 400MHz,布鲁克(Bruker))在DMSO-d<sub>6</sub>或D<sub>2</sub>O中证明了Dex-PNC、Dex-TA-NH<sub>2</sub>和Dex-TA-生物素的成功合成。通过计算分别来自葡聚糖( $\delta$ 4.0-5.8ppm)和酪胺基团( $\delta$ 6.66ppm和 $\delta$ 6.98ppm),以及葡聚糖和丁胺基团( $\delta$ 1.4-1.5ppm)的积分信号的比率,确定每100个葡聚糖脱水葡萄糖环中共轭酪胺和丁胺基团的数目。通过计算来自酪胺基团( $\delta$ 6.66ppm和 $\delta$ 6.98ppm)和偶联的6-氨基己酸间隔基( $\delta$ 2.13)的积分信号的比率,可以确定每100个葡聚糖脱水葡萄糖环中共轭生物素部分的数量。

[0178] 使用液滴微流控生产水凝胶颗粒并进行表征。

[0179] 所有的微流控芯片是由PDMS和玻璃使用标准的软光刻技术制造的。微流控混合器、液滴发生器和基于H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>扩散的交联芯片分别具有约100、约25 $\mu$ m和约100 $\mu$ m的高通道。在使用前将Aquapel引入芯片中以确保通道壁疏水性。使用FEP管,将芯片彼此连接并连接至气密注射器,这些气密注射器由低压注射器泵控制。所有的乳液都是使用2% (w/w) 含有Novoc 7500工程液的Pico-Surf 1生产的。为了生成水凝胶前体微滴,将含有5% (w/v) Dex-TA-生物素(约1mM生物素)和22U/ml HRP的PBS,和含有5% (w/v) Dex-TA(不含生物素)和22U/ml HRP的PBS在微流控混合器中结合,随后在连接的液滴发生器中使用含油表面活性剂以1:6的流量比进行乳化。使水凝胶前体微乳液以14 $\mu$ L/min的总速度流过连接的扩散平台,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>以30 $\mu$ L/min的速度从相反的方向供入该扩散平台。如前所述,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>从进料通道通过PDMS壁扩散到凝胶前体微乳液中,从而引发酪胺共轭聚合物的酶促交联。[11]通过用不含表面活性剂的氟碳油洗涤三次,随后在PBS存在下补充Pico-Break 1,PBS中含有用于保存的0.05% (w/v)的NaN<sub>3</sub>,用于防止聚集和粘连的1% (w/v)的BSA。使用立体显微镜设置(尼康SMZ800配备徕卡DFC300 FX相机)将芯片上的液滴可视化。使用相差显微镜对回收的水凝胶颗粒成像,并使用Matlab软件测量尺寸分布。

[0180] 水凝胶颗粒的功能化和表征。

[0181] 用含有1% (w/v) BSA的PBS过量的洗涤缓冲液洗涤Dex-TA-生物素水凝胶颗粒3次以去除NaN<sub>3</sub>,将其与1 $\mu$ M中性亲和素在洗涤缓冲液中连续孵育,用洗涤缓冲液洗涤,在洗涤缓冲液中与1 $\mu$ M目标生物素化或脱硫生物素化分子一起孵育,然后再次用洗涤缓冲液洗涤。如有必要,重复进行功能化操作,例如,以形成核-壳功能化水凝胶颗粒,如图7中进一步规定。对于荧光显微镜(EVOS FL)、荧光共聚焦显微镜(Zeiss LSM 510和Nikon A1+)和光漂白荧光恢复技术(FRAP,Zeiss LSM 510),将水凝胶颗粒用生物素-atto565、生物素-FITC和/或脱硫生物素-FITC进行功能化,该功能化是通过在1M碳酸氢盐缓冲液(pH值约8)中将脱硫生物素-NHS与6-氨基荧光素偶联而在内部产生的。通过将随时间变化的漂白点的荧光强度减去漂白前漂白率校正后的平均强度归一化背景得到FRAP曲线,背景归一化为漂白率校正前的平均强度,其中漂白速率是通过归一化样品的荧光强度来确定的,而漂白点是针对漂白前的平均强度而归一化的。为了表征脱硫生物素-生物素的置换,如上所述,将Dex-TA-生物素水凝胶颗粒依次用中性亲和素功能化,洗涤,用脱硫生物素-FITC功能化,洗涤,并用生物素-atto565功能化,同时使用荧光共聚焦显微镜成像。使用ImageJ软件测量所有荧光图像的强度。

[0182] 细胞分离和扩增。从新鲜的骨髓样品中分离出人间充质干细胞 (MSCs), 并按之前描述的方法进行培养。[12]使用的患者材料得到了Medisch Spectrum Twente当地伦理委员会的批准, 并获得了所有样本的书面同意。简而言之, 对骨髓抽吸物中的有核细胞进行计数, 以500,000细胞/cm<sup>2</sup>的密度接种在组织培养瓶中, 并在MSC增殖培养基中培养, MSC增殖培养基由10% (v/v) 的FBS、100U/mL的青霉素和100μg/mL的链霉素、1% (v/v) 的GlutaMAX、0.2mM的抗坏血酸和含有1ng/mL的bFGF (新鲜添加) 的αMEM组成, 在αMEM中培养。当细胞接近汇合时, 在37°C下使用0.25% (w/v) 的胰蛋白酶-EDTA分离细胞, 然后继代培养或用于实验。

[0183] 模块化组织工程。为了生产模块化的组织结构, 首先用c (RGDfK) 肽对含有约1mM生物素的Dex-TA-生物素微凝胶的外壳进行永久功能化。为此, 将微凝胶与1μM中性亲和素在洗涤缓冲液中孵育30分钟 (请参见上一节“微凝胶功能化和表征”), 洗涤, 随后用1μM生物素化的环状RGD肽生物素- (PEG) 2-c (RGDfK) 在洗涤缓冲液中孵育60分钟, 也如图7所示。用相同的功能化方法处理过的Dex-TA (即不含生物素) 微凝胶和已用生物素- (PEG) 2-c (RADfK) 功能化的Dex-TA-生物素微凝胶作为对照。然后将细胞粘附微凝胶与细胞共接种到非粘附性微孔芯片中, 如前所述, 该非粘附性微孔芯片是通过将3% (w/v) 的无菌琼脂糖浇注在内部制造的模具中的去离子水中生产的。[13]简而言之, 以每微孔50个单位的接种密度 (即细胞+凝胶) 将MSC和微凝胶均匀地接种到含有3000微孔 (200×200×200μm) 的琼脂糖构建体 (1.9cm<sup>2</sup>) 中。在增殖培养基中培养模块化微组织, 并使用荧光 (共聚焦) 显微镜观察。C2C12BRA实验。通过在PBS中用2μM钙黄绿素AM (活) 和4μM EthD-1 (死) 染色, 并使用荧光显微镜观察, 分析细胞的活力和代谢活性。对于其他荧光 (共聚焦) 分析, 首先用PBS洗涤构建体, 用10%中性福尔马林缓冲液固定, 使用0.1% Triton X-100进行透化, 随后用2.5U/mL鬼笔环肽-AF647和1μg/mL DAPI孵育30分钟, 以分别对F-肌动蛋白和细胞核进行染色。

[0184] 统计: 通过测量≥275微凝胶的直径获得微凝胶尺寸分布。在每种条件下对≥5微凝胶进行荧光共聚焦强度测量 (FRAP测量除外), 并报告为最高平均强度的平均值 (中性亲和素扩散实验的横截面) 或平均值±标准偏差 (所有其他实验)。通过技工对每种条件≥20微孔中的细胞和微凝胶进行计数来获得细胞接种分布, 并报告为每个微孔的平均单位总数 (细胞+微凝胶) 的平均值±标准偏差的归一化。使用ImageJ的“面积”和“形状描述符”测量功能, 从≥10个构建体中获得了模块化微聚集体的直径、面积、圆形度和坚固性, 并报告为平均值±标准偏差。使用OriginPro软件进行线性回归分析和ANOVA与Bonferroni的事后测试来分析统计学意义。

[0185] 结果

[0186] 我们着手设计微米大小的水凝胶颗粒 (微凝胶), 该微凝胶可以以细胞相容的方式进行生化调节。为此, 我们选择了葡聚糖作为生物惰性、生物相容性和易于修饰的聚合物骨架, 从而作为进一步功能化的理想模板材料。[14, 15] 酪胺和生物素被选为可通过酶促交联并进一步功能化的反应性侧基, 通过生物素/亲和素相互作用分别以完全正交和细胞相容的方式 [10, 16, 17] 实现酶促交联并进一步功能化。如前所述, 将葡聚糖聚合物赋予酪胺和1,4-丁二胺 (即Dex-TA-NH<sub>2</sub>), 然后使用胺反应性生物素进一步功能化, 胺反应性生物素含有长链间隔基 (生物素-LC-NHS)。使用<sup>1</sup>H NMR确认Dex-TA-生物素的成功合成。通过计算葡聚糖 (δ4.0-5.8ppm) 和酪胺 (δ6.66ppm和δ6.98ppm) 以及酪胺和偶联的6-氨基己酸间隔基 (δ

2.13)的积分信号的比率,确定每100个葡聚糖脱水葡萄糖环中共轭酰胺和生物素基团的数目分别为13和6。酰胺官能化的葡聚糖可以通过形成酰胺-酰胺键原位交联,使用辣根过氧化物酶(HRP)作为催化剂和 $H_2O_2$ 作为氧化剂。使用微流控液滴发生器生产由5% (w/v)的Dex-TA-生物素(即 $\sim 1$  mM生物素)和22U/mL的HRP组成的微滴。这些微凝胶前体液滴通过使用我们最近报道的基于扩散的微流控交联平台的 $H_2O_2$ 的控制补充进行固化,[11]这导致了使得形成直径为 $20.7 \pm 0.6 \mu\text{m}$ 的单分散Dex-TA-生物素微凝胶。

[0187] 在酶促交联之后,生物素基团仍然可用于通过超分子生物素/亲和素络合而用于随后的正交官能化(即,不影响酶促交联的水凝胶网络)。具体地,通过两步法分别将生物素化的微凝胶分别与四价中性亲和素(即抗生物素蛋白类似物)和荧光素标记的生物素(生物素-FITC)一起温育来进一步官能化。荧光共聚焦显微镜和光漂白荧光恢复技术(FRAP)证实生物素-FITC与Dex-TA-生物素微凝胶偶联,但未与非功能化(即Dex-TA)微凝胶偶联,这验证了Dex-TA-生物素微凝胶的成功生成和功能化。通过改变微凝胶中生物素的浓度或通过改变四价中性亲和素偶联的生物素化官能团的类型和数量,可以调节最终的功能化程度。为了控制微凝胶中生物素的浓度,我们使用连接到液滴发生器入口的微流体混合芯片来改变Dex-TA-生物素和Dex-TA水凝胶前体溶液的比例。如通过将生物素-FITC(即,绿色)或生物素-atto565(即,红色)偶联至微凝胶所测量的,所得的微凝胶中的生物素浓度与最终功能化程度线性相关( $R^2=0.99$ )。另外,可以通过改变生物素化的FITC和atto565的比例来改变生化组成,同时在微凝胶中保持相同的生物素浓度。原则上,两种方法都可用于调整微凝胶的生化特性,而不改变其生物力学特性。

[0188] 然后,我们的目标是创建可以可逆呈现和顺序呈现目标分子的智能微凝胶。为此,我们利用超分子脱硫生物素/亲和素络合物的可逆性,通过以快速且高度特异性的方式用生物素置换脱硫生物素。首先赋予微凝胶大量的中性亲和素,中性亲和素与微凝胶中的游离生物素特异性结合( $K_d \sim 10^{-15}$ )。然后洗涤微凝胶( $t=0$ 分钟),并使用荧光共聚焦成像连续成像以可视化和定量脱硫生物素的结合和及时置换。用 $1 \mu\text{M}$ 脱硫生物素-FITC(即绿色)与中性亲和素标记的微凝胶一起孵育,脱硫生物素-FITC可与微凝胶中剩余的四价中性亲和素自由结合袋(free binding pockets)结合( $K_d \sim 10^{-13}$ )。荧光强度达到平稳状态后( $t \sim 40$ 分钟),将生物素-atto565(即红色)以 $1 \mu\text{M}$ 的终浓度引入。生物素与中性亲和素( $K_d \sim 10^{-15}$ )的相互作用更强,导致生物素迅速取代了脱硫生物素。在添加生物素后的前10分钟内,超过80%的脱硫生物素-FITC被生物素-atto565取代,大约95%的脱硫生物素-FITC被生物素-atto565在60分钟内被取代。

[0189] 我们的目标是赋予微凝胶与永久且受空间控制的外壳(即第二个聚合物网络)。具体来说,我们预计,用生物素化的环状RGD肽生物素-(PEG)<sub>2</sub>-c(RGDfK)将使微凝胶的外壳功能化,使得微凝胶能够与细胞自组装,同时保留在微凝胶的核心中的生物素可用于进一步的原位功能化(图7),从而将核心的分子与粒子的环境隔离,同时为外壳提供辅助功能。通过调节中性亲和素的浓度和孵育时间,我们可以重复地控制其渗透到微凝胶中的深度。通过确定中性亲和素壳的厚度,该策略可以对微凝胶的生化成分进行2.5D控制,用作后续生物素化分子偶联的反应性底物。通过使用生物素-FITC(即绿色)标记和随后的荧光共聚焦成像(图7和图8)使得这种基于扩散的空间模板被可视化和量化。壳功能化后,微凝胶的核心仍然含有游离的生物素,可以通过延长中性亲和素的孵育步骤重复功能化方案,赋予该

生物素另一个基团。例如,通过使用如图7所述的多步骤功能化方案进行壳功能化,可以轻松制备核-壳多功能微凝胶。在使用荧光标记(图7)确认了核壳功能化方案的有效性后,使用相同的核壳功能化方案,以永久赋予微凝胶壳c(RGDfK)肽,使整合素介导的细胞粘附并促进自下而上的自组装。将微凝胶中生物素的浓度以及随之的c(RGDfK)的浓度设置为~1mM,因为已被证明这可以有效地使水凝胶具有细胞粘附特性。[18,19]

[0190] 通过控制中性亲和素的浓度和孵育时间,可以使Dex-TA-生物素水凝胶颗粒具有可调厚度的功能壳。实际上,如使用生物素-FITC(即绿色:图8)证明的那样,中性亲和素作为随后对目标的生物素化分子进行束缚的模板。

[0191] 或者,可以通过水凝胶颗粒表面上存在的酪胺部分的聚合作用,在水凝胶颗粒生产后对壳进行功能化/保护。

[0192] 使用脱硫生物素(DTB)/生物素置换方案,我们已经证明,生物素化的单域抗体(VHH)可以与葡聚糖-酪胺-生物素水凝胶颗粒结合(图9)。我们已经通过生物素连接剂将基因修饰的VHH偶连到先前交联且功能化的葡聚糖基水凝胶。除了引入用于交联单个葡聚糖的共轭物,这些分子还含有生物素共轭物(图9)。使用链霉亲和素(或类似分子)作为多价(通常为四价)中间体,生物素化的VHHs以超分子相互作用与聚合物主链连接。

[0193] 为了实现定向偶联,已经使用马来酰亚胺化学在与生物素分子结合的VHH的C末端尾部引入了游离的Cys。使用这种游离的Cys,VHHs也可以直接与在葡聚糖主链上引入的易感反应基团偶联。

[0194] VHH功能化的水凝胶颗粒可以通过消耗局部环境中的生长因子(即细胞因子)来防止细胞反应(请参见图10和图11)。材料和方法:将C2C12 BRE荧光素酶细胞以10,000细胞/cm<sup>2</sup>的密度接种在生长培养基(DMEM,20%FBS,1%青霉素和链霉素)中。24小时后,将细胞在含有0.5%FBS的生长培养基中饥饿12小时。饥饿后,在饥饿培养基中用BMP7(R&D系统,300ng/mL)刺激10-15小时。在将水凝胶颗粒添加到细胞培养物中之前,将水凝胶颗粒在10%FBS中孵育1小时,以阻断非特异性结合。与BMP7同时,水凝胶颗粒以10倍过量加入。刺激细胞后,裂解细胞,并使用制造商协议(Promega,荧光素酶测定系统)测定荧光素酶的表达。

[0195] 水凝胶微粒子在关节内注射后的长期保留也得到了证实。使用近红外标记的葡聚糖共轭物制备直径为30μm的微凝胶,并将其注射到小鼠膝盖的滑膜腔内。三周后,使用荧光成像仍可在活体动物中追踪到微凝胶,使用组织学染色(图12)进行验尸,表明在注射的膝盖中仍然存在微凝胶。微凝胶最终在滑膜中,如图c(图12)左侧的深紫色点。

[0196] 在某些应用中,脱硫生物素化分子被生物素或生物素化分子置换可用于脱硫生物素化分子的按需和/或控制释放,例如,以关闭其局部功能或实现其按需和/或控制释放。

[0197] 实施例3

[0198] 渗透性

[0199] 使用分子量为20、40、70、150、500和2000kDa(Sigma-Aldrich)的FITC共轭葡聚糖以及免疫球蛋白G(IgG,150kDa,Sigma-Aldrich)测试水凝胶网络的渗透性。制作共聚焦横截面,并使用定制的Matlab脚本将凝胶中心的荧光强度与背景的荧光强度进行比较。每个条件分析至少50个凝胶。

[0200] 分析表明,DexHA-TA胶囊尽管对于大分子来说扩散大约延迟了50%,但是对于

2000kDa和IgG(图13)以下的所有的FITC共轭物均具有渗透性。这表明,基于DexHA-TA的微水凝胶是可渗透的,并且几乎可以渗透到体内几乎所有相关分子,包括大蛋白,但可能会阻碍扩散。由于凝胶核心中的IgG沉淀,因此无法量化DexHA-TA中IgG的渗透率。然而,PEG-TA胶囊仅可渗透至150kDa的FITC共轭物。根据葡聚糖>500k和IgG孵育的PEG-TA胶囊中核心的荧光强度,其在背景水平附近,在这些胶囊中大分子的扩散似乎受到了严重危害(图13)。

#### [0201] 实施例4

[0202] 除了通过生物素-链霉亲和素-生物素相互作用间接偶联抗体片段或肽外,还探索了其他方法将生物分子直接和定向偶联到Dex-TA和HA-TA酪胺功能化聚合物的骨架上。

[0203] 图14中给出了获得可以在关节内注射的细胞因子库的一般方法。简而言之,将活性马来酰亚胺基团共轭到聚合物-酪胺共轭物的骨架上。以这种方式获得了Dex-TA-马来酰亚胺和HA-TA-马来酰亚胺聚合物的共轭物。随后可以采用两种方法。在第一种方法中,具有游离的未配对半胱氨酸残基的抗体或肽片段与聚合物-TA主链上的马来酰亚胺基反应。这就产生了聚合物-TA-蛋白质的共轭物。这些共轭物可与辣根过氧化物酶和微量的过氧化氢相结合直接注射在注射部位如关节间隙。这使得能够在注射部位,如关节间隙处原位形成微凝胶和大凝胶。另外,聚合物-TA-蛋白共轭物可用于首先生成微凝胶,如对葡聚糖-TA-生物素聚合物所述。因此,生成的微凝胶可以直接注入关节间隙中。在另一种方法中,首先将聚合物-TA-马来酰亚胺共轭物用于微凝胶形成,之后将具有游离的未配对半胱氨酸残基的特异性结合分子在微凝胶网络中扩散,并与聚合物骨架上的马来酰亚胺残基反应。

[0204] 采用两种方法在葡聚糖的骨架中引入马来酰亚胺和酪胺残基。首先,形成马来酰亚胺-PNC中间体。该中间体随后与葡聚糖-酪胺共轭物反应(图15)。如图16所示,得到了Dex-TA-马来酰亚胺共轭物。除此之外,马来酰亚胺-PNC中间体还与酚类残基反应(左图)。马来酰亚胺基团仍然是功能性的,正如一旦将聚合物共轭物与聚(乙二醇)二硫醇基团混合后迅速形成凝胶所证明的那样。因此制备的Dex-TA-马来酰亚胺共轭物可用于与具有游离半胱氨酸的肽和蛋白质反应。

[0205] 在第二种方法中,首先将葡聚糖与PNC反应,以获得Dex-PNC中间共轭物。随后,Dex-PNC与酪胺和马来酰亚胺-胺的混合物反应(图17)。在图18中,这种方法可得到Dex-TA-马来酰亚胺共轭物,其对酪胺的取代度为8%,对马来酰亚胺的取代度为4-5%(图18)。

[0206] 为了获得透明质酸(HA)酪胺-马来酰亚胺共轭物,使用了两步反应。采用了两步反应。首先,在DMTMM的存在下透明质酸与酪胺发生反应,形成HA-TA。随后,HA-TA在DMTMM的存在下再次与马来酰亚胺-胺反应(图19)。这导致HA-TA共轭物的TA取代度为4.5%,随后被马来酰亚胺官能团以12%的取代度进行修饰(图20)。

[0207] 因此,生成的马来酰亚胺功能化聚合物共轭物可用于与具有游离未配对的半胱氨酸残基的肽(图21)或抗体片段(VHH)的共轭,利用重组DNA技术在蛋白质的C端引入工程化的游离未配对的半胱氨酸(图22)。为了证明这一点,合成了具有游离的未配对半胱氨酸残基的肽,并用荧光染料标记。该肽与HA-TA-马来酰亚胺聚合物共轭物反应。这样形成的HA-TA-肽共轭物与未结合的肽并排进行SDS-PAGE凝胶电泳。随后将荧光用于可视化。如图21所示,与未结合的肽相比,HA-TA-肽共轭物的分子量增加,证明了成功的结合。类似地,在图22中显示,HA-TA-马来酰亚胺聚合物共轭物也与抗体片段(VHH)反应,其中未配对的半胱氨酸残基在其C-末端进行了工程改造。与基于SDS-PAGE凝胶电泳的游离的、未反应的VHH相比,

虽然不是所有的VHH都已经反应,使用马来酰亚胺化学将聚合物-TA共轭物与VHH的共轭,明显诱导了VHH分子量的增加。

[0208] 这些实施例表明,可以采用不同的方法获得可用于生成细胞因子库的聚合物共轭物,如基于透明质酸和葡聚糖聚合物的聚合物。

[0209] 引用的技术

[0210] 1.Grainger,D.W.,治疗性抗体的控释和局部递送。专家观点生物疗法,2004.4(7):p.1029-44。

[0211] 2.Chevalier,X等人,在膝盖关节炎的关节腔内注射安乃近:多中心、随机、双盲、安慰剂对照的研究。关节炎和风湿病,2009.61(3):p.344-52。

[0212] 3.Joosten,L.A等人,在DBA/1小鼠中建立的II型胶原诱导的关节炎的抗细胞因子治疗。使用抗TNF $\alpha$ 、抗IL-1 $\alpha/\beta$ 和IL-1Ra的比较研究。关节炎和风湿病,1996.39(5):p.797-809。

[0213] 4.Giteau,A等人,如何从基于PLGA的微粒中实现持续且完整的蛋白质释放?国际药理学杂志,2008.350(1):p.14-26。

[0214] 5.Samad,A.,Y.Sultana和M.Aqil,脂质体药物递送系统:最新评论,Curr Drug Deliv,2007.4(4):p.297-305。

[0215] 6.Bezemer,J.M.等人,由两亲多嵌段共聚物制备的蛋白质递送微球.1.制备技术对颗粒特性和蛋白递送的影响.控制释放杂志,2000.67(2-3):p.233-48。

[0216] 7.Brown,K.E.等人,用于将治疗性蛋白递送到关节的明胶/6-硫酸软骨素微球。关节炎和风湿病,1998.41(12):p.2185-95。

[0217] 8.Agarwal,R.等人,用于治疗骨关节炎的自组装IL-1Ra呈递纳米颗粒的合成。生物医学研究杂志A,2016.104(3):p.595-599。

[0218] 9.Singh,A.等人,用于增强关节内蛋白质的保留和递送纳米工程颗粒。Adv Healthc Mater,2014.3(10):p.1562-7,1525。

[0219] 10.Whitmire,R.E.等人,用于关节内递送抗炎蛋白的自组装纳米颗粒。生物材料,2012.33(30):p.7665-75。

[0220] 11.Kohane,D.S.,用于递送药物的微粒和纳米颗粒。生物技术,2007.96(2):p.203-9。

[0221] 12.Pradal,J.等人,在小鼠关节内注射后,粒径对纳米和微粒的生物分布的影响。国际药理学杂志,2016.498(1-2):p.119-29。

[0222] 13.Sousa,F.等人,用于递送治疗性抗体的纳米颗粒:教条还是有前途的策略?药物递送专家,2017.14(10):p.1163-1176。

[0223] 14.Helmick,C.G.等人,美国关节炎和其他风湿病患患病率的估计:第一部分。关节炎与风湿病,2008.58(1):p.15-25。

[0224] 15.CDC,骨关节炎成本统计。2015年,疾病控制与预防中心。

[0225] 16.Wang,R.,原位形成水凝胶的高分子工程,特温特大学发展生物工程学系,恩斯赫德,2016,p.180。

[0226] 17.Jin,R.等人,(2007)从葡聚糖-酪胺结合物的酶介导的水凝胶快速原位形成。生物材料28(18),2791-800。

- [0227] 18.Kamperman,T.等人,(2017)通过延迟交联将单细胞置于微凝胶中,通过防止细胞逃逸来支持长期3D培养.小13(22),1603711-n/a。
- [0228] 19.Chicheportiche,D.和Reach,G.(1988),微囊化大鼠胰岛的胰岛素释放的体外动力学:微胶囊大小的影响.糖尿病31(1),54-7。
- [0229] 20.Headen,D.M.等人。(2014)基于微流控的尺寸控制,用于细胞封装的生物功能化合成聚合物微凝胶.先进材料26(19),3003-8。
- [0230] 21.Pradal,J.等人。(2016)小鼠关节内注射后,粒径对纳米和微粒生物分布的影响.国际药学杂志498(1-2),119-29。
- [0231] 22.Formiga,F.R.等人。(2013)心肌缺血的大鼠模型中聚合物微粒的生物降解和心脏保留.欧洲医药生物制药85(3Pt A),665-72。
- [0232] 23.Tran,V.-T.等人。(2011)在药学领域为什么以及如何制备可生物降解的单分散聚合物微粒?国际药学杂志407(1-2),1-11。
- [0233] 24.Lima,A.C.等人。(2012)用于药物递送的聚合物和水凝胶颗粒的生产方法.药物递送专家9(2),231-48。
- [0234] 25.Buwalda,S.J.等人。(2014)历史上的水凝胶:从简单的网络到智能材料.控制释放杂志190,254-73。
- [0235] 实施例中的参考文献
- [0236] 1.Strokappe,N.等人。(2012)识别CD4bs各种表位的Llama抗体片段可中和多种HIV-1亚型A,B和C.PLoS One 7(3),e33298。
- [0237] 2.Frenken,L.G.等人。(2000)酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)的抗原特异性美洲驼VHH抗体片段的分离和它们的高水平分泌.生物技术杂志78(1),11-21。
- [0238] 3.Roovers,R.C.等人。(2007)拮抗性抗EGFR纳米抗体可有效抑制EGFR信号传导和肿瘤生长.癌症免疫治疗56(3),303-317。
- [0239] 4.El Khattabi,M.等人。(2006)阻断脂多糖结合和信号传导的骆驼单链抗体:治疗应用前景.临床疫苗免疫13(10),1079-86。
- [0240] 5.Oliveira,S.等人。(2013)用纳米抗体靶向肿瘤以用于癌症成像和治疗.控制释放杂志172(3),607-17。
- [0241] 6.Zhang,Y。(2008)用于蛋白质3D结构预测的I-TASSER服务器.BMC生物信息学9,40。
- [0242] 7.Roy,A.等人。(2010)I-TASSER:用于自动化蛋白质结构和功能预测的统一平台.Nat Protoc 5(4),725-38。
- [0243] 8.Roy,A.等人。(2012)COFACTOR:基于结构的蛋白质功能注释的准确比较算法.Nucleic Acids Res 40(Web服务器问题),W471-7。
- [0244] 9.Wang,R.,原位形成水凝胶的高分子工程,特温特大学展生物工程学系,恩斯赫德,2016,p.180。
- [0245] 10.Jin,R.等人。(2007)从葡聚糖-酪胺结合物的酶介导的水凝胶快速原位形成.生物材料28(18),2791-800。
- [0246] 11.Kamperman,T.等人。(2017)通过延迟交联将单细胞置于微凝胶中,通过防止细胞逃逸来支持长期3D培养.小13(22),1603711-n/a。

- [0247] 12.Both,S.K.等人。(2007)一种快速有效地扩增人间充质干细胞的方法。组织工程13(1),3-9。
- [0248] 13.Moreira Teixeira,L.S.等人。(2012)高通量产生的软骨细胞微聚集体在体外和体内刺激软骨形成。欧洲细胞材料23,387-99。
- [0249] 14.Cadee,J.A.等人。(2000)葡聚糖基水凝胶的体内生物相容性。生物医学材料研究杂志50(3),397-404。
- [0250] 15.De Groot,C.J.等人。(2001)用人成纤维细胞测试的可生物降解的葡聚糖基水凝胶的体外生物相容性。生物材料22(11),1197-203。
- [0251] 16.Segura,T.等人。(2005)交联的透明质酸水凝胶:功能化和模式化的策略。生物材料26(4),359-71。
- [0252] 17.Seidlits,S.K.等人。(2009)采用直写式光加工进行细胞指导的三维水凝胶高分辨率图案化。先进功能材料19(22),3543-3551。
- [0253] 18.Chaudhuri,O.等人。(2016)具有可调节应力松弛的水凝胶调节干细胞的命运和活性。Nat Mater 15(3),326-34。
- [0254] 19.Burdick,J.A.和Anseth,K.S。(2002)用于骨组织工程的可注射RGD修饰的PEG水凝胶中成骨细胞的光囊化。生物材料23(22),4315-23。

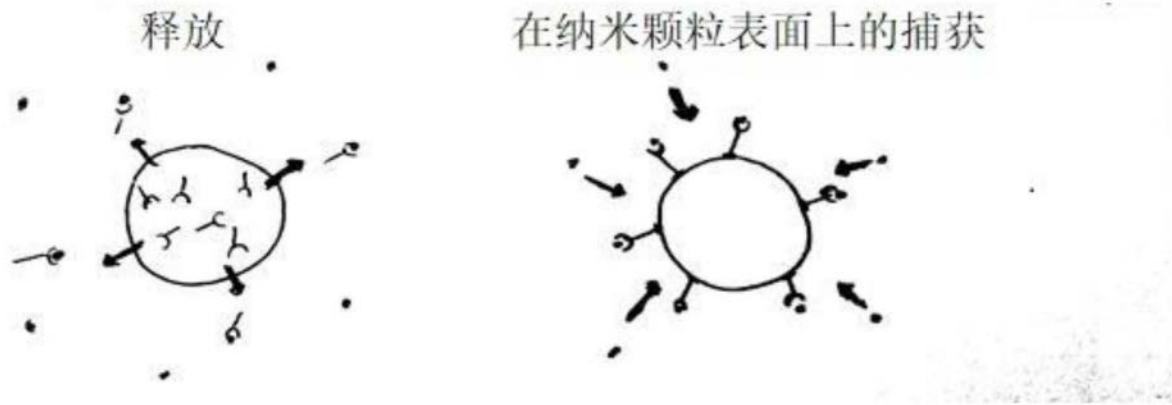


图1

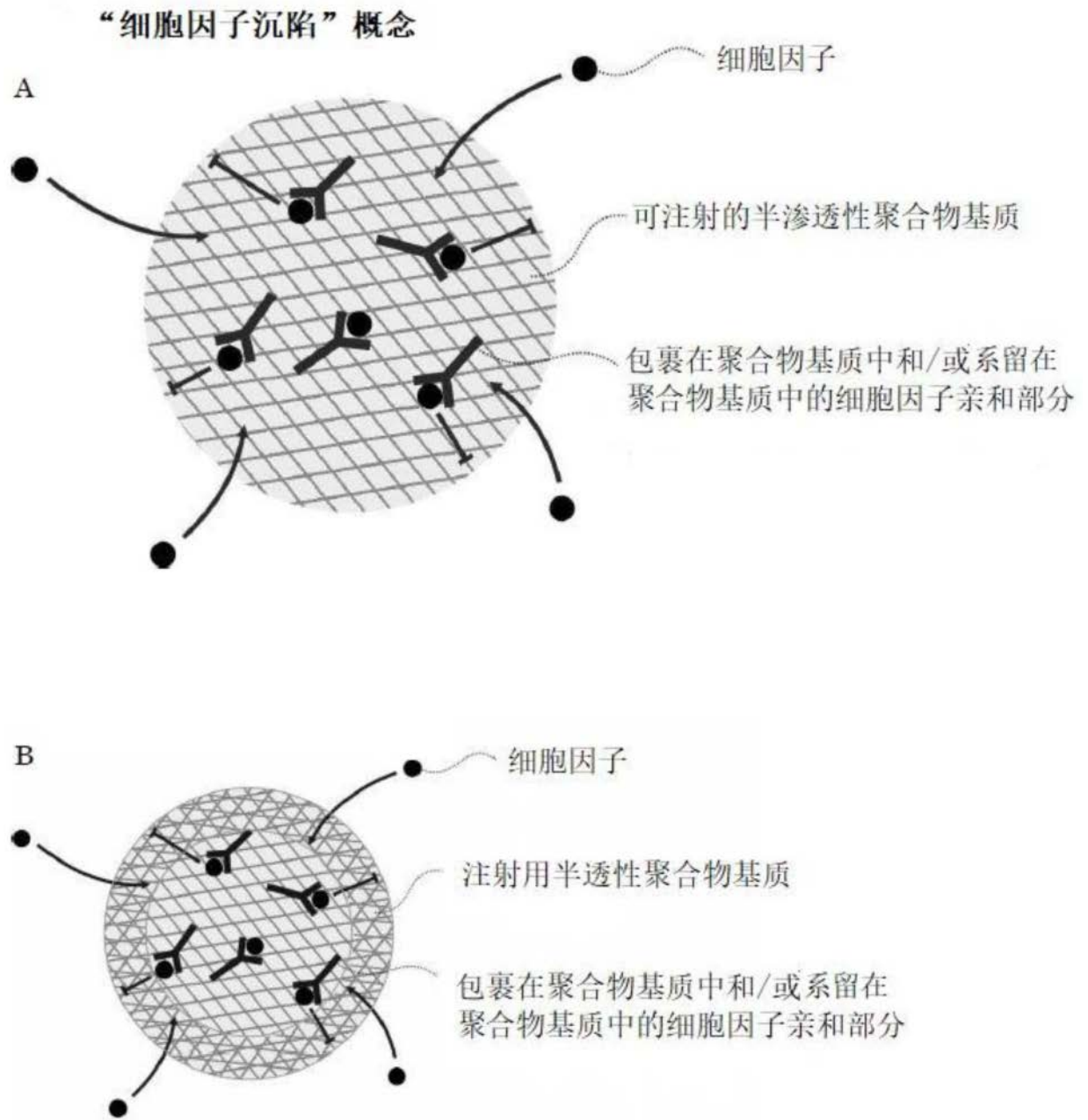


图2

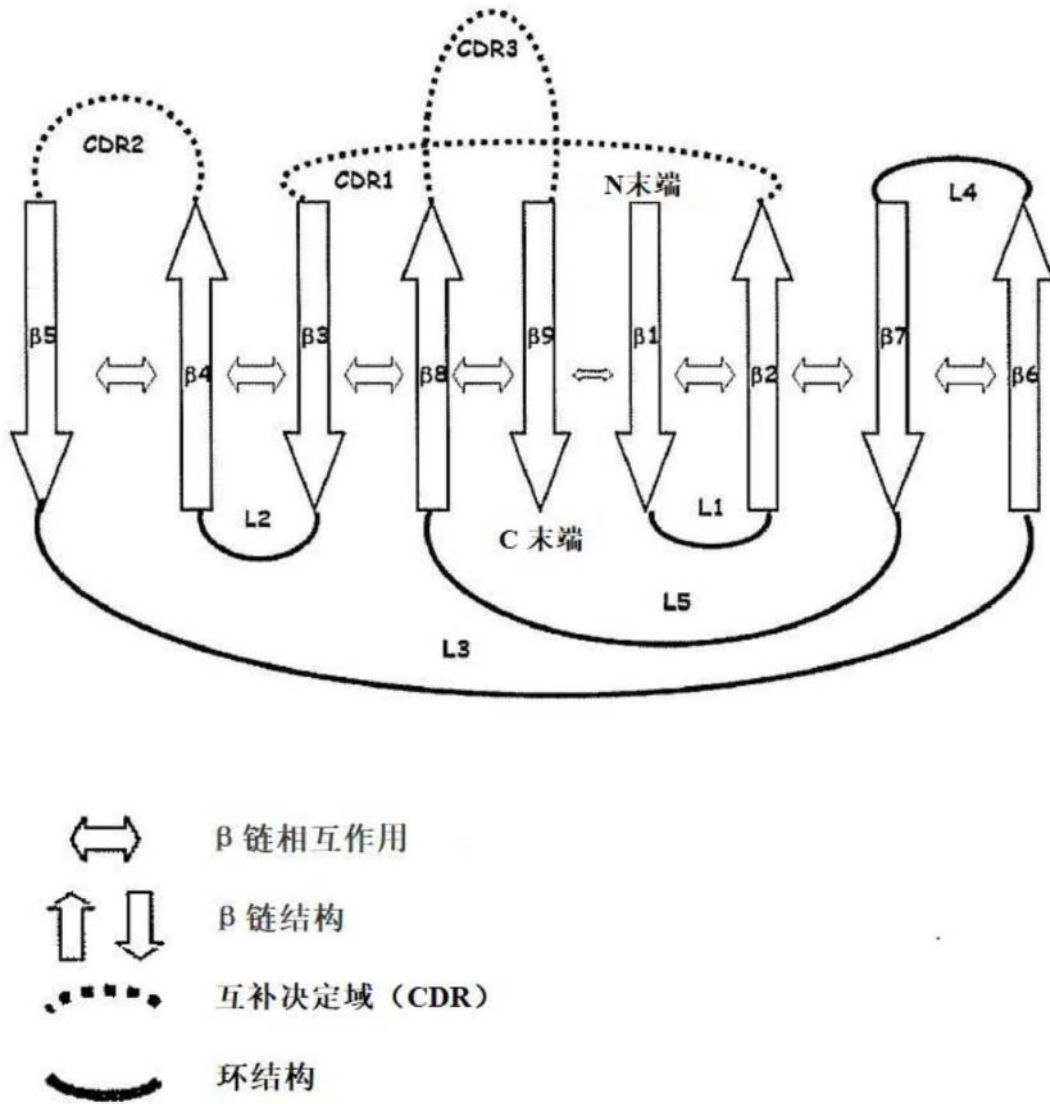


图3

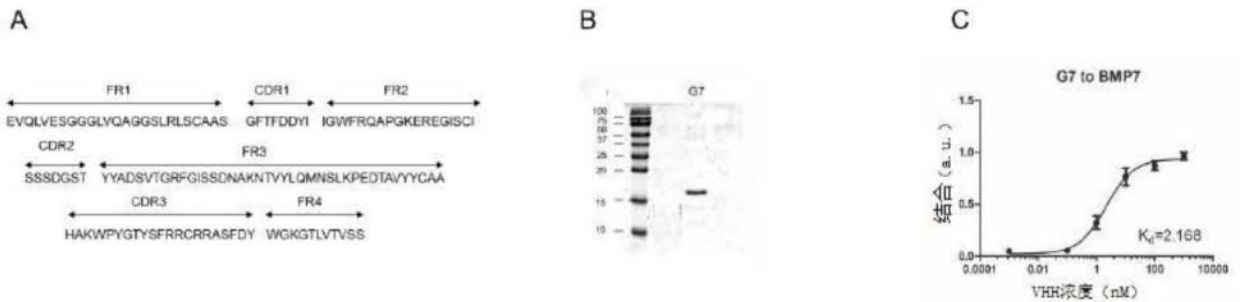


图4

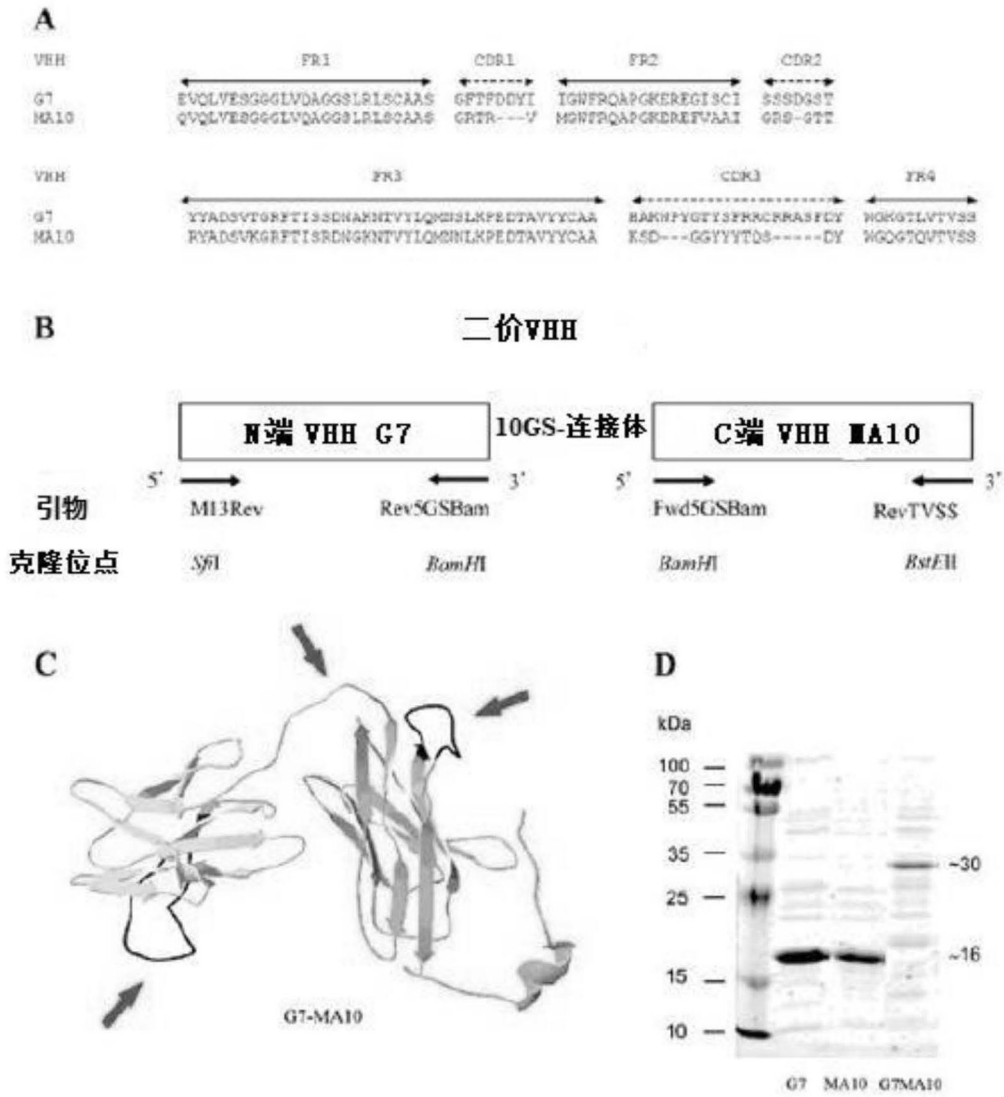


图5

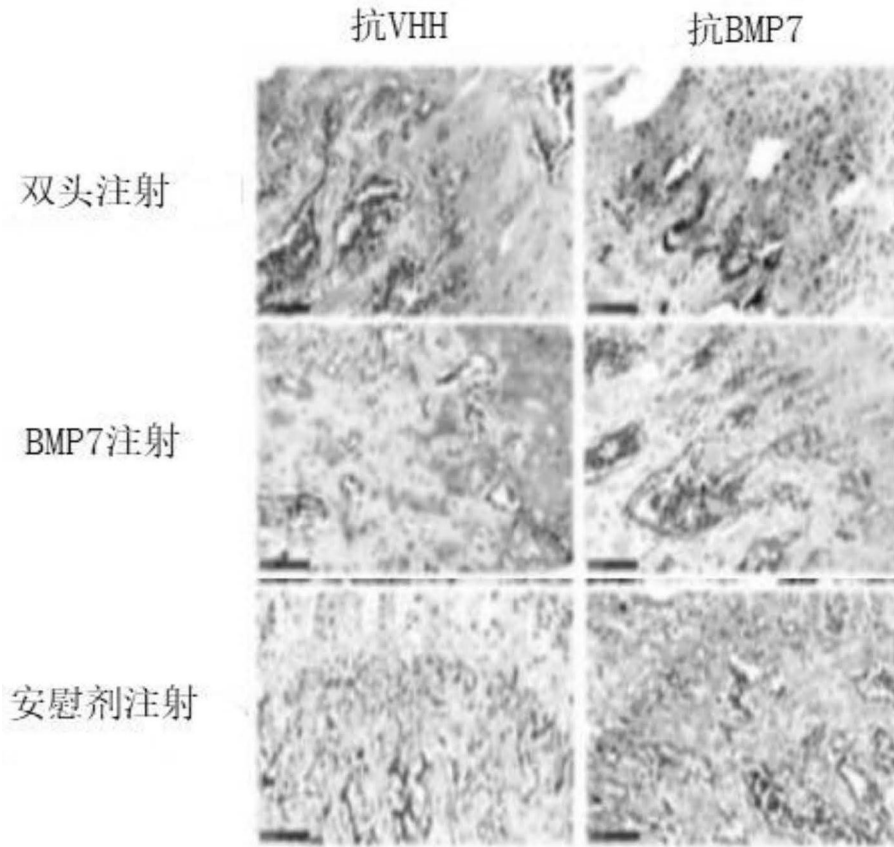


图6

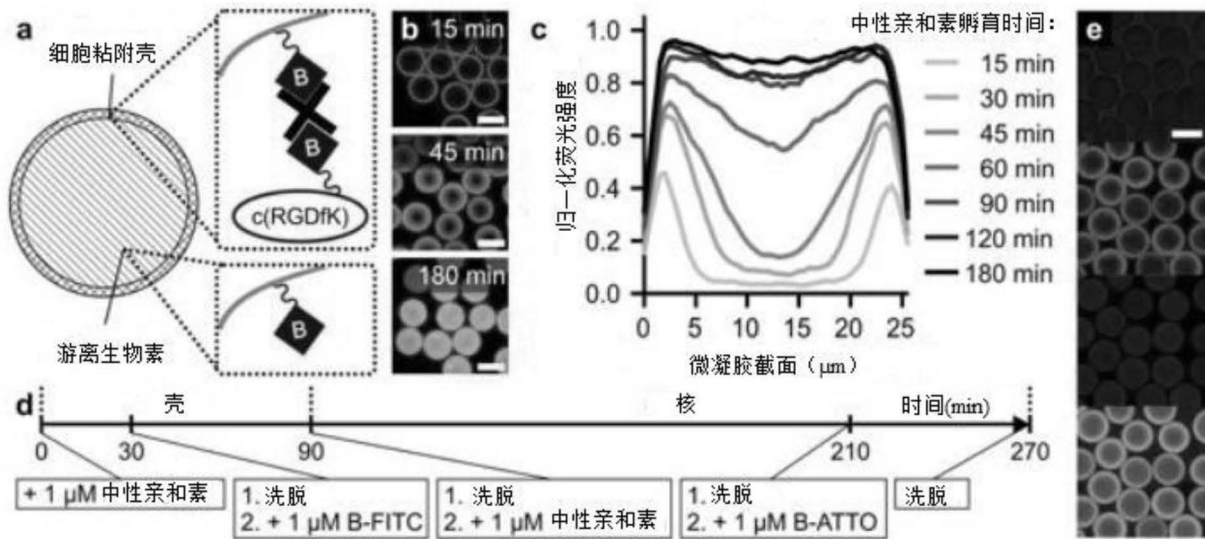


图7

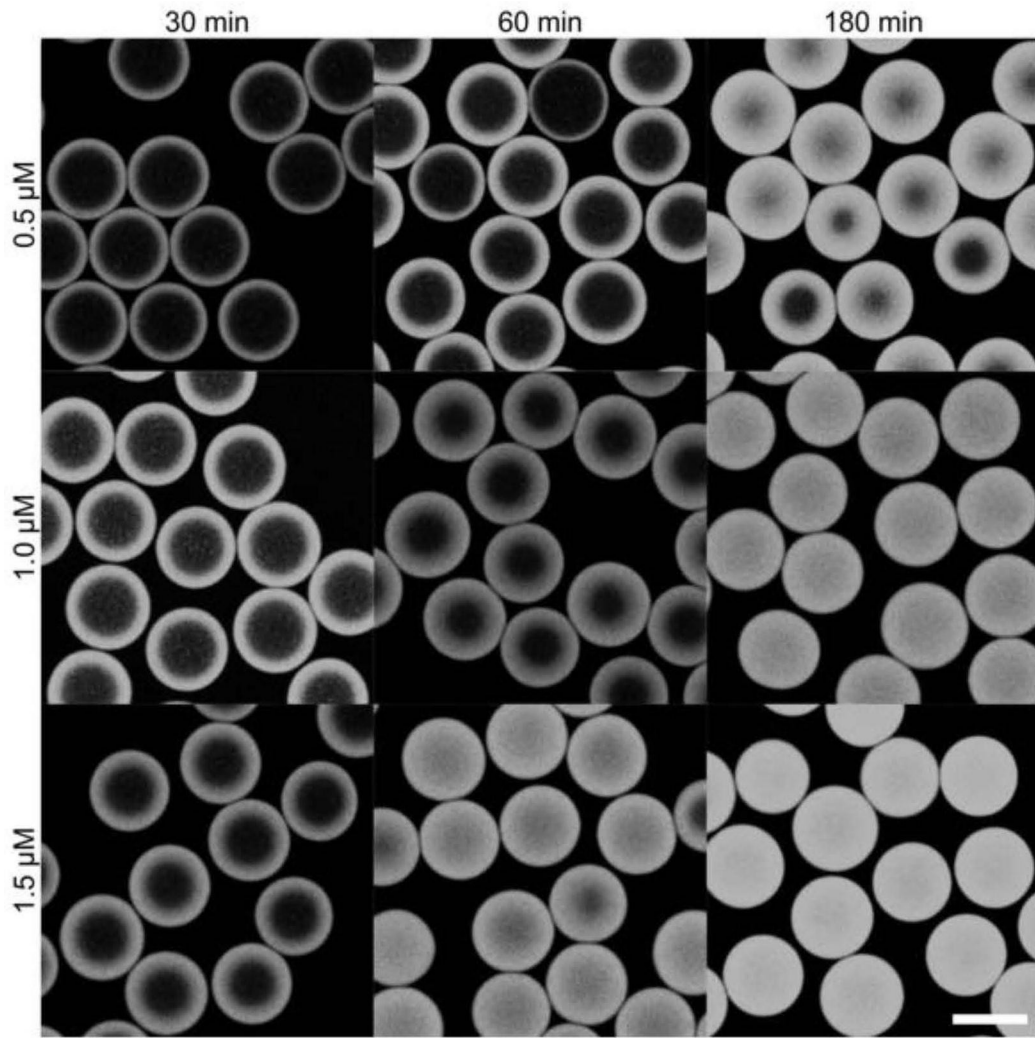


图8

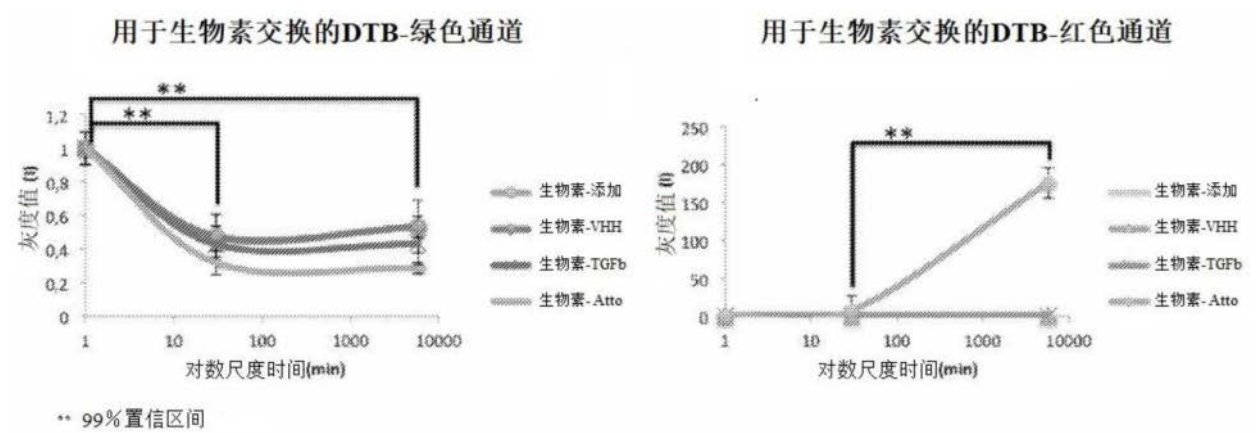


图9

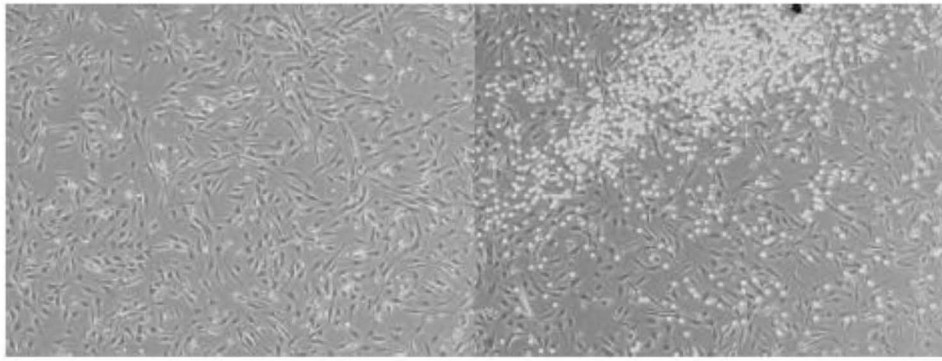


图10

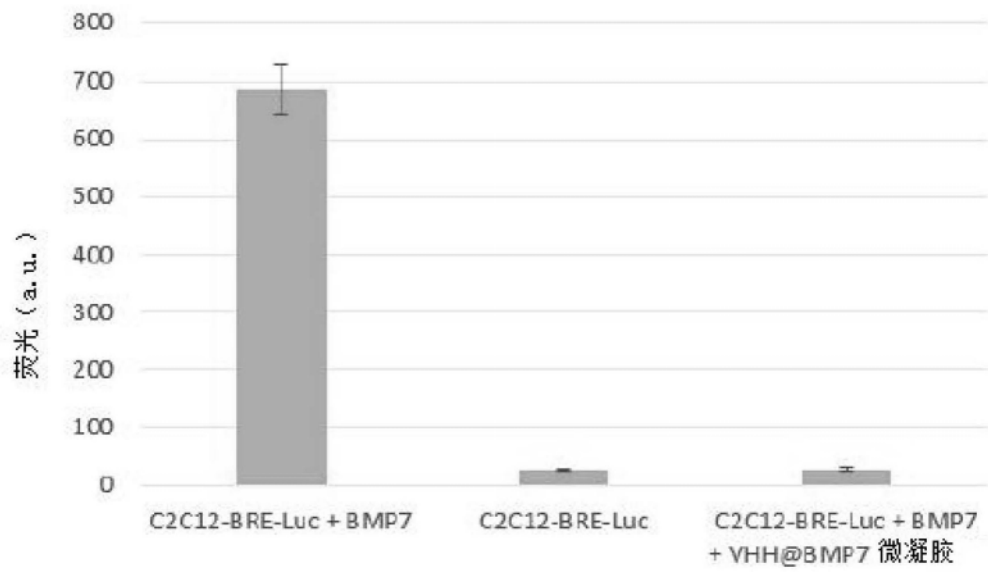


图11

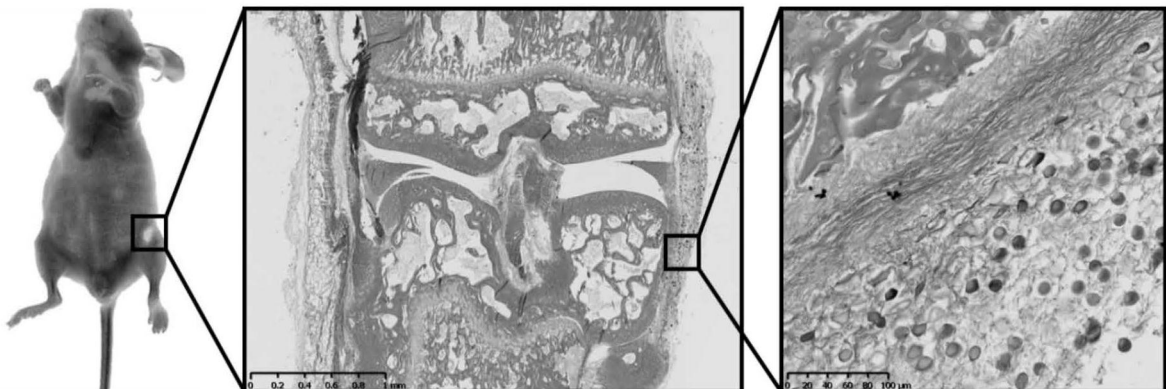


图12

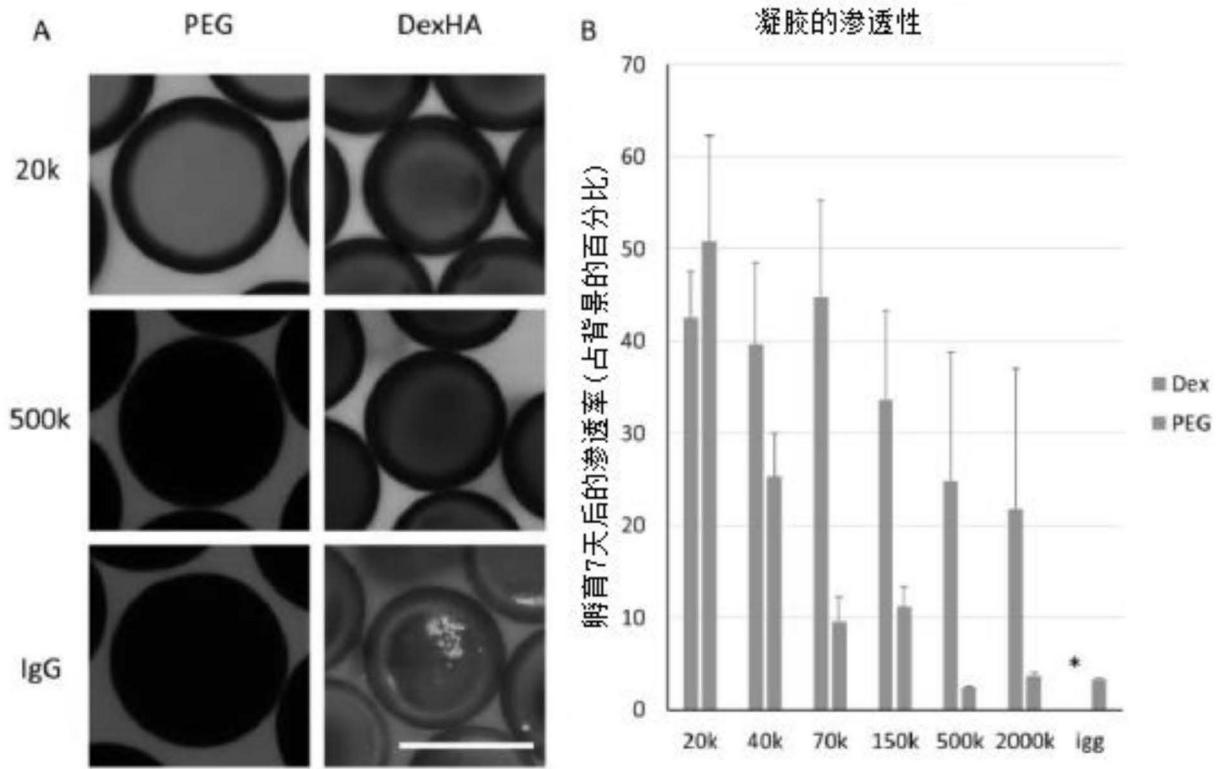


图13

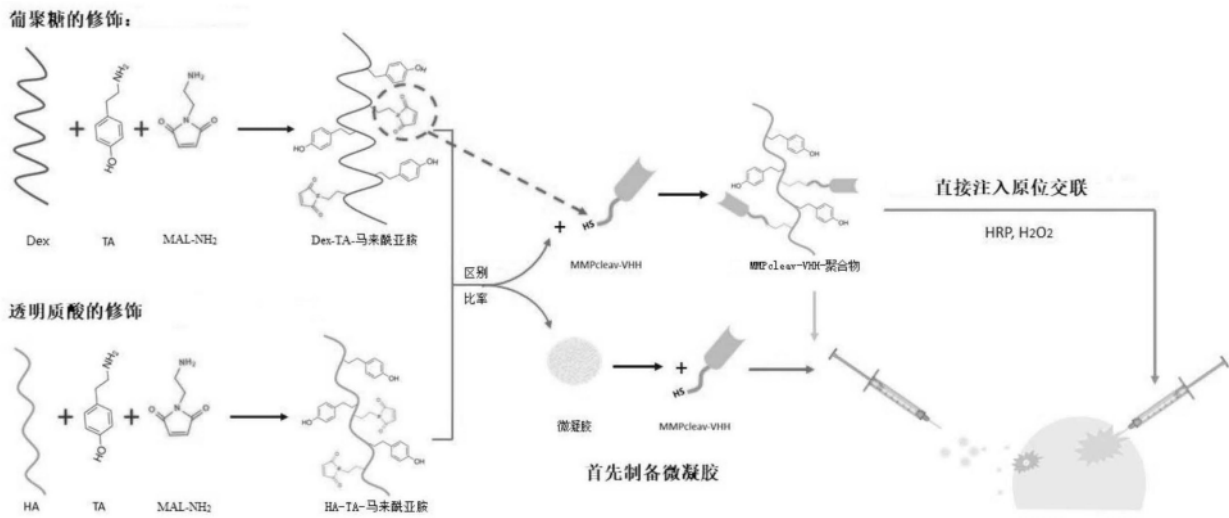


图14

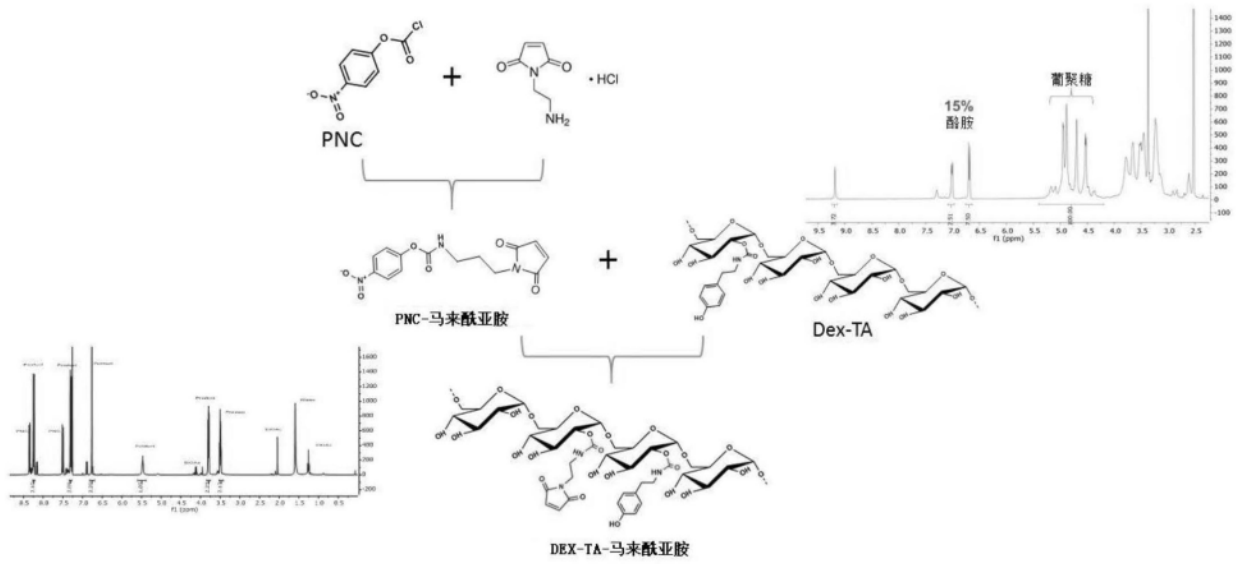


图15

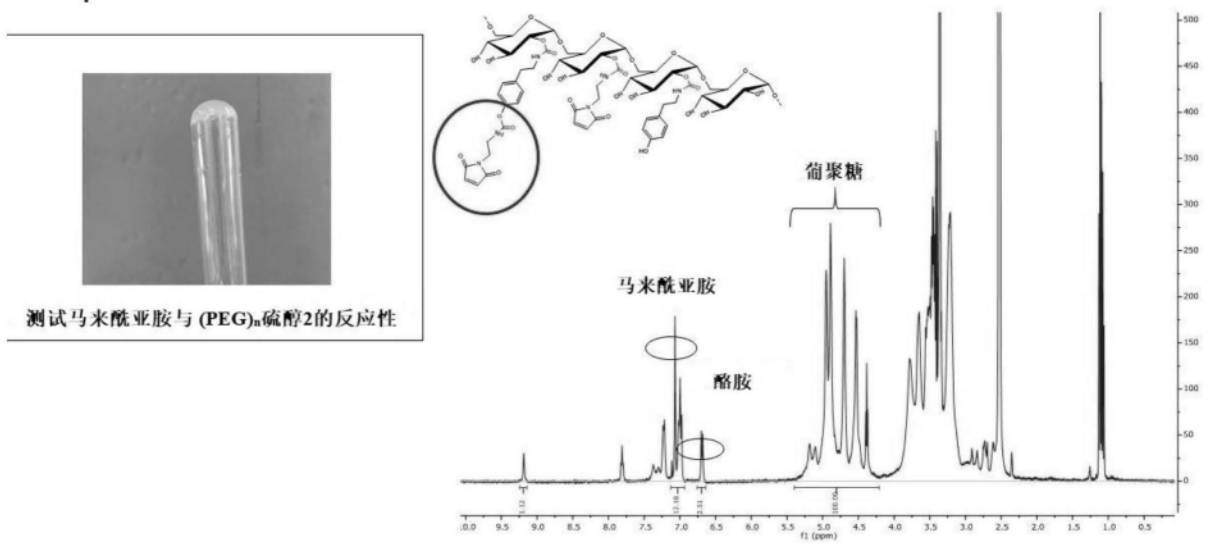


图16

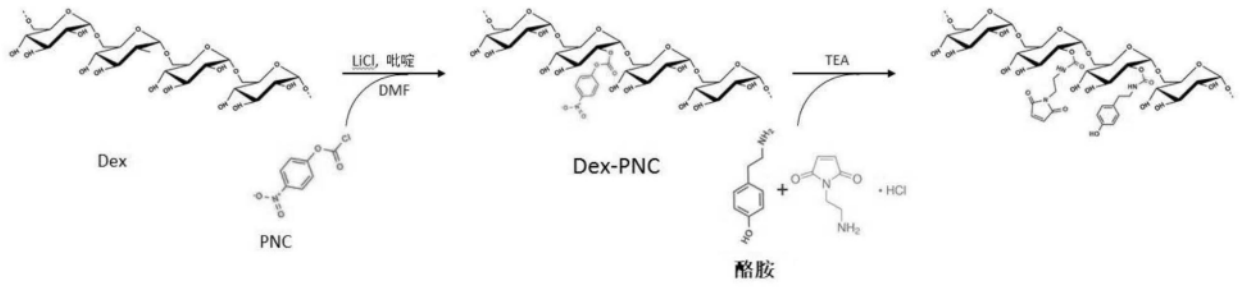


图17

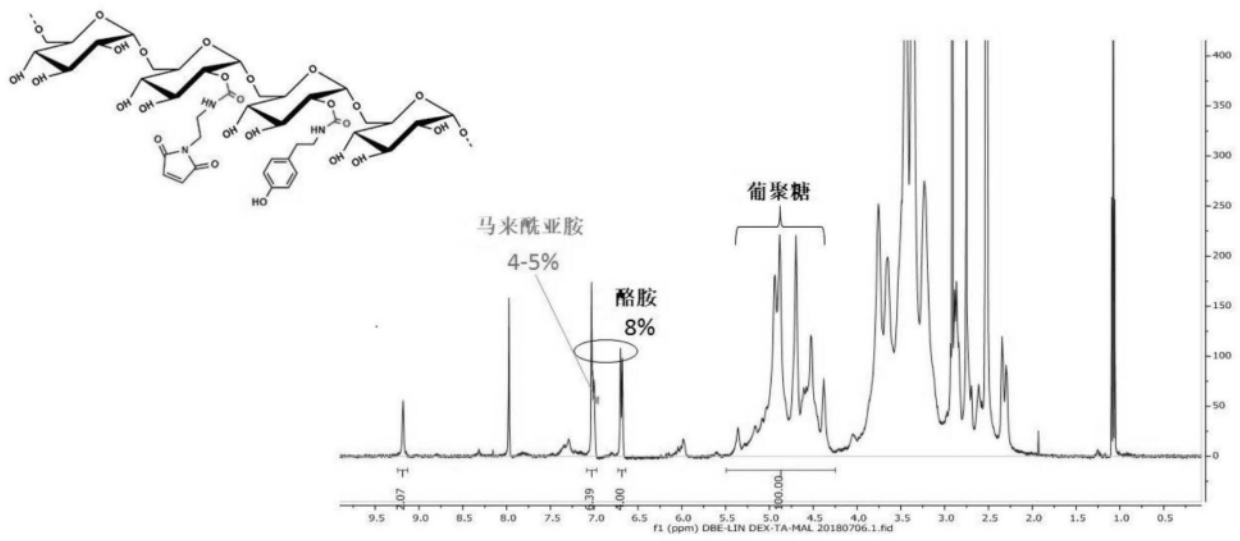


图18

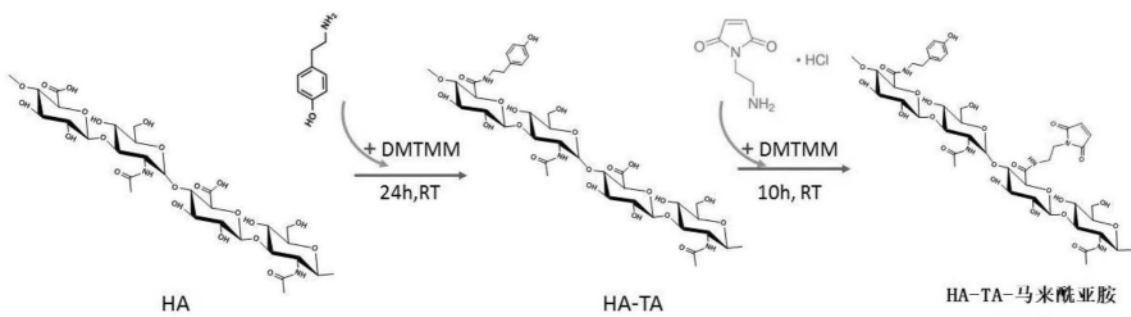


图19

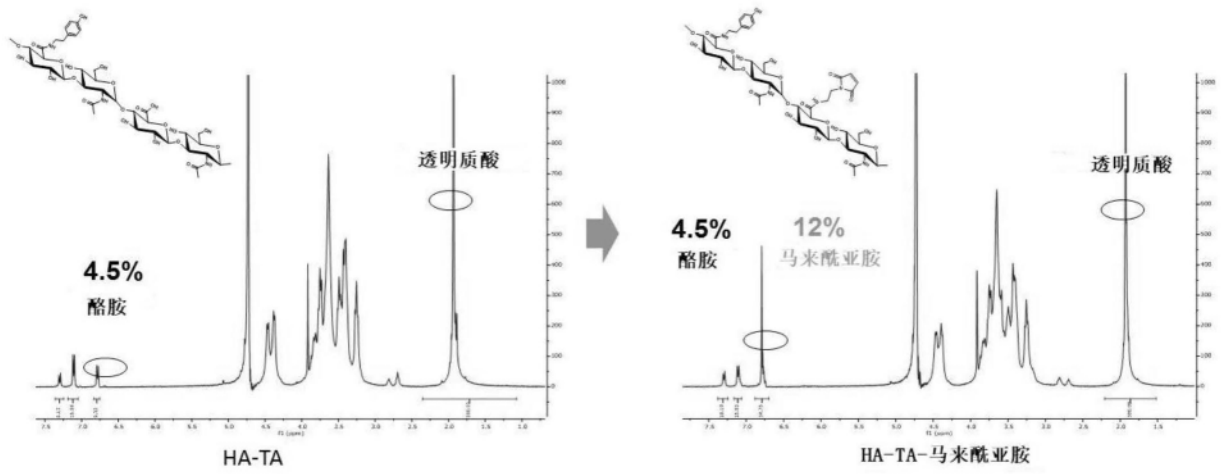


图20

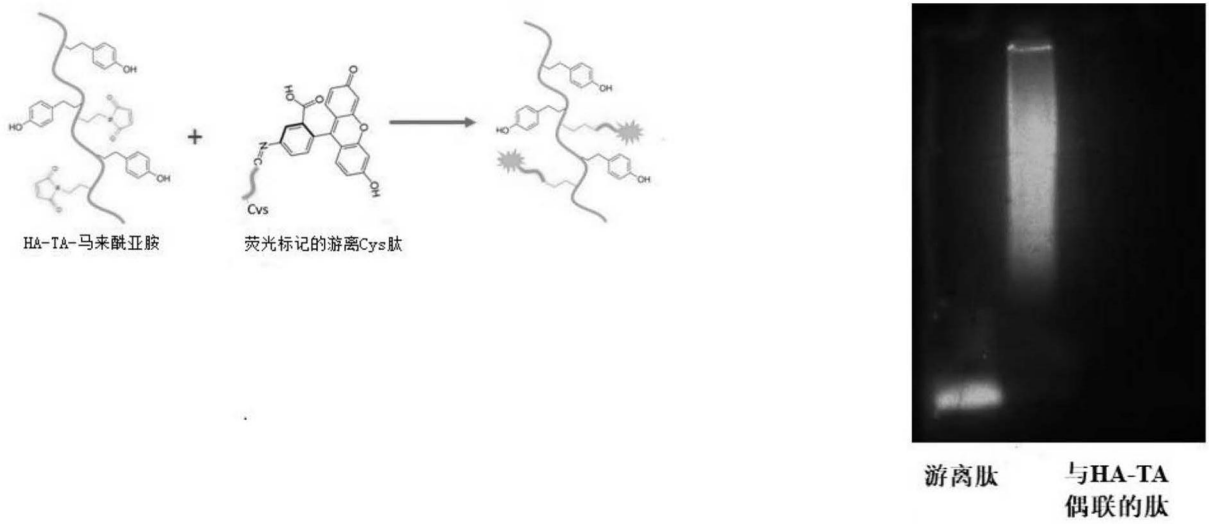


图21

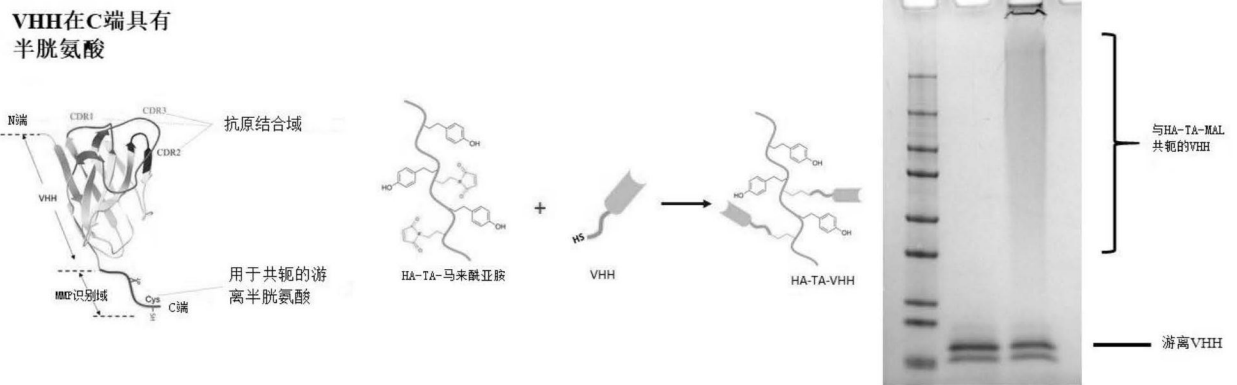


图22

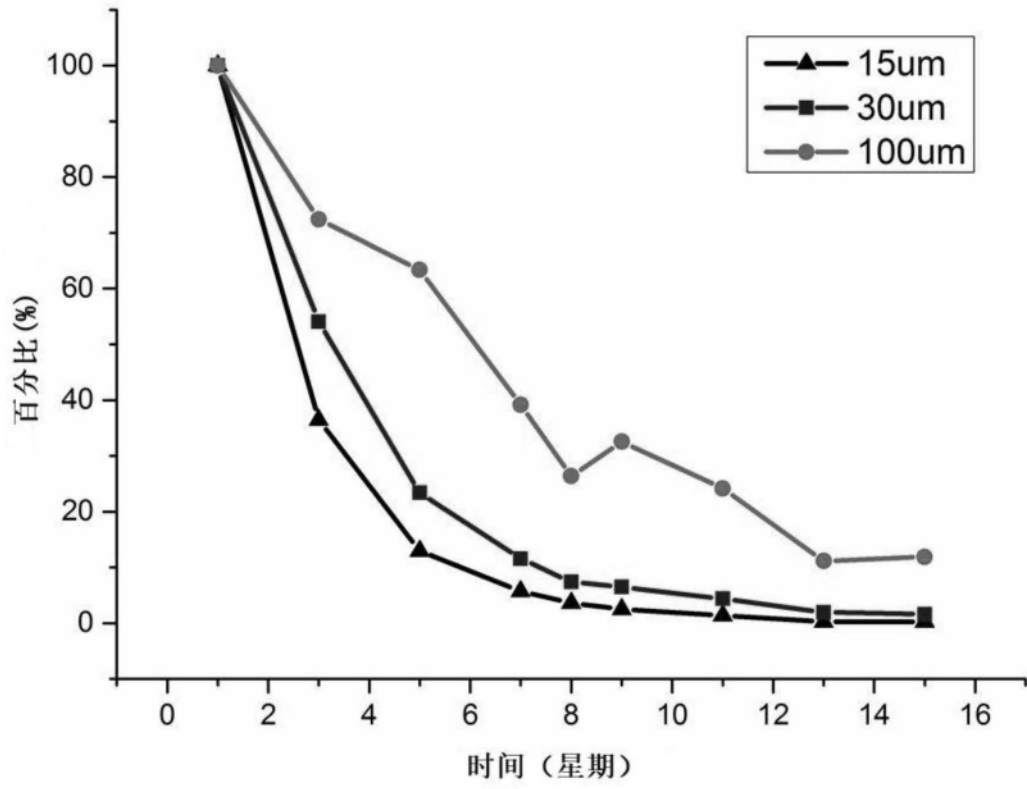


图23

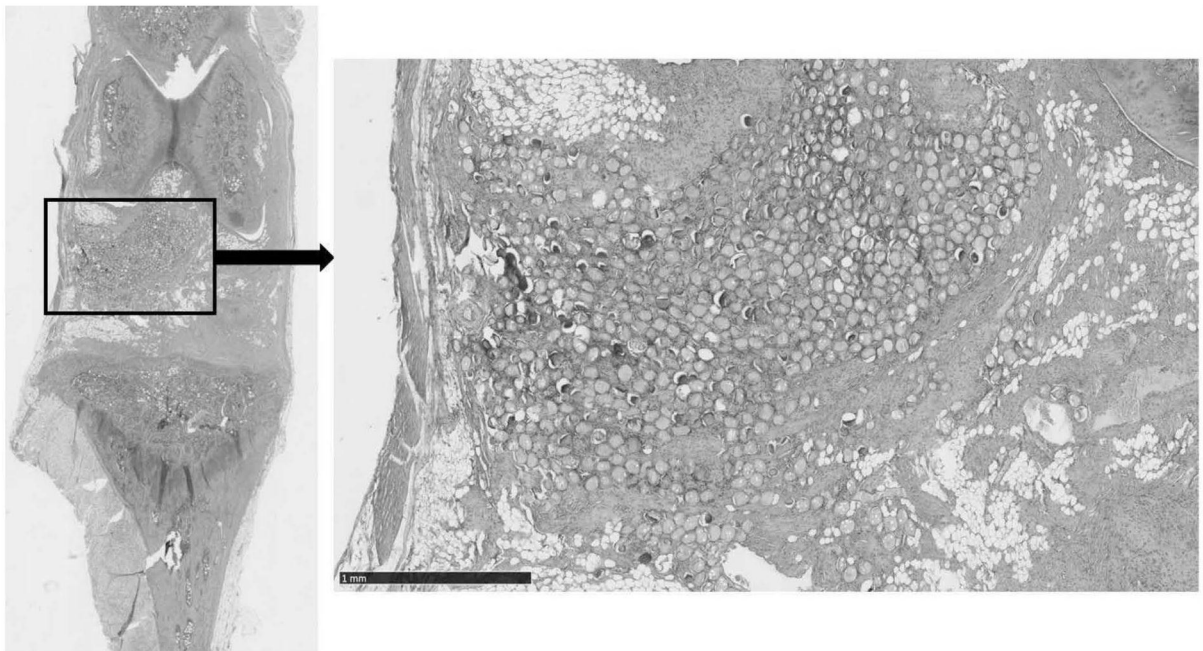


图24