

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03817257.7

C08L 5/16 (2006.01)
C08L 71/02 (2006.01)
C08L 67/04 (2006.01)
C08G 63/66 (2006.01)
C08G 81/00 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009 年 7 月 29 日

[11] 授权公告号 CN 100519643C

[22] 申请日 2003.7.18 [21] 申请号 03817257.7

[30] 优先权

[32] 2002. 7. 19 [33] US [31] 60/397,129

[32] 2003. 1. 10 [33] US [31] 60/439,171

[86] 国际申请 PCT/US2003/022561 2003. 7. 18

[87] 国际公布 WO2004/009664 英 2004. 1. 29

[85] 进入国家阶段日期 2005. 1. 19

[73] 专利权人 奥默罗斯公司

地址 美国华盛顿州

共同专利权人 材料研究及工程研究所

[72] 发明人 J·李 X·李 X·倪

K·W·梁

[56] 参考文献

US6346274B1 2002. 2. 12

US5702717A 1997. 12. 30

审查员 张 娜

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 刘维升 王景朝

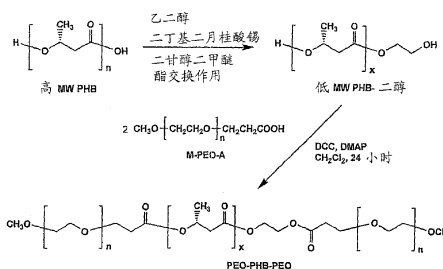
权利要求书 6 页 说明书 36 页 附图 24 页

[54] 发明名称

可生物降解的三嵌段共聚物, 它们的合成方法和从它制得的水凝胶和生物材料

[57] 摘要

包括从环糊精和两亲性共聚物形成的水凝胶和治疗有效量的紧密地包含在该水凝胶内的至少一种治疗剂的药物输送体系, 该两亲性共聚物包括含有聚(烯化氧)的 A 聚合物嵌段和含有聚(羟基链烷酸酯)的 B 聚合物嵌段。 在本发明的一个优选的实施方案中, 该 A 聚合物嵌段 10 是聚(环氧乙烷) (PEO) 和该 B 聚合物嵌段是聚 [(R) -3 -羟基丁酸酯] (PHB), 和共聚物是三嵌段 ABA 共聚物 PEO - PHB - PEO。 还提供了合成两亲性三嵌段共聚物的方法。



1. 药物输送体系, 包括:

从环糊精和两亲性共聚物形成的水凝胶, 其中共聚物包括含有聚(烯化氧)的 A 聚合物嵌段和含有聚(羟基链烷酸酯)的 B 聚合物嵌段, 其中所述 B 聚合物嵌段选自聚[(R)-3-羟基丁酸酯], 聚[(R)-4-羟基丁酸酯]; 聚[(R)-3-羟基戊酸酯]; 聚[(R)-3-羟基丁酸酯]-co-聚[(R)-3-羟基戊酸酯]; 聚[(R)-3-羟基己酸酯]; 聚[(R)-3-羟基庚酸酯]; 此类(R)对映异构体的每一种的(S)对映异构体; 此类(S)和(R)对映异构体的外消旋混合物; 或它们的混合物; 和

治疗有效量的紧密地包含在水凝胶中的至少一种治疗剂。

2. 权利要求 1 的体系, 进一步包括可药用的含水碱。

3. 权利要求 1 的体系, 其中该药物输送体系是可注射的。

4. 权利要求 3 的体系, 其中该水凝胶是触变的。

5. 权利要求 1 的体系, 其中该体系提供了在药物释放的起始之后在至少一个星期的时间中至少一种治疗剂的持续释放。

6. 权利要求 1 的体系, 其中该体系提供了在药物释放的起始之后在至少两个星期的时间中至少一种治疗剂的持续释放。

7. 权利要求 1 的体系, 其中该聚(烯化氧)是选自聚(环氧乙烷), 聚(四亚甲基氧化物)或聚(四氢呋喃)。

8. 权利要求 7 的体系, 其中该聚(烯化氧)是聚(环氧乙烷)。

9. 权利要求 1 的体系, 其中该聚(羟基链烷酸酯)选自: 聚[(R)-3-羟基丁酸酯]; 聚[(R)-4-羟基丁酸酯]; 此类(R)对映异构体的每一种的(S)对映异构体; 此类(S)和(R)对映异构体的外消旋混合物; 或它们的混合物。

10. 权利要求 1 的体系, 其中该聚(羟基链烷酸酯)是聚[(R)-3-羟基丁酸酯]。

11. 权利要求 1 的体系, 其中共聚物是包括 B 聚合物嵌段中间链段和两个 A 聚合物嵌段端链段的两亲性三嵌段共聚物。

12. 权利要求 11 的体系, 其中该聚(烯化氧) A 嵌段聚合物是选自聚(环氧乙烷), 聚(四亚甲基氧化物)或聚(四氢呋喃)。

13. 权利要求 12 的体系, 其中该聚(烯化氧) A 嵌段聚合物是聚(环氧乙烷)。

14. 权利要求 1 的体系，其中该聚(烯化氧)A 嵌段聚合物和该聚(羟基链烷酸酯)B 嵌段聚合物各具有 500 到 20,000 的分子量。

15. 权利要求 1 的体系，其中该聚(烯化氧)A 嵌段聚合物和该聚(羟基链烷酸酯)B 嵌段聚合物各具有 2,000 到 10,000 的分子量。

16. 权利要求 1 的体系，其中该聚(羟基链烷酸酯)B 嵌段聚合物具有 3,000 到 2,500 的分子量。

17. 权利要求 1 的体系，其中该环糊精是以共聚物重量的 5% - 80% 的量包含。

18. 权利要求 1 的体系，其中该环糊精是以共聚物重量的 5% - 50% 的量包含。

19. 权利要求 1 的体系，其中该水凝胶是水溶液，该水溶液含有 1% - 80wt% 的共聚物。

20. 权利要求 1 的体系，其中该水凝胶是水溶液，该水溶液含有 10% - 40wt% 的共聚物。

21. 权利要求 1 的体系，进一步包括与治疗剂配合和/或与治疗剂共轭的二级聚合物。

22. 权利要求 21 的体系，其中该二级聚合物是选自聚酯，聚氨酯，聚酰胺，聚醚，多糖，聚(氨基酸)，多肽，或蛋白质中的聚合物。

23. 权利要求 21 的体系，其中该二级聚合物是具有聚(乙二醇)链段的二-或单-官能化聚合物。

24. 权利要求 1 的体系，进一步包括 DNA 纳米球。

25. 权利要求 1 的体系，其中共聚物具有在 1,000 至 50,000 之间的分子量。

26. 权利要求 1 的体系，其中共聚物具有在 5,000 至 35,000 之间的分子量。

27. 权利要求 1 的体系，其中该至少一种治疗剂是选自蛋白质，基因，抗原，抗体和它们片段，DNA 或 RNA。

28. 权利要求 1 的体系，其中该至少一种治疗剂是高分子形式。

29. 权利要求 1 的体系，其中至少一种治疗剂选自镇痛药，麻醉剂，抗关节炎药，疾病改性抗风湿病药物，抗哮喘药物，抗凝血剂，抗惊厥药，抗抑郁药，抗糖尿病药，抗肿瘤药，抗精神病药，抗高血压药，抗生素，抗组胺剂，解充血药，抗炎药，肌肉松弛药，防寄生

的药物, 抗病毒药物, 抗再狭窄剂, 抗痉挛剂, 软骨保护剂, 防粘剂, 抗肿瘤细胞侵入剂, 血管舒张剂, 血管收缩剂或免疫抑制剂。

30. 权利要求 1 的体系, 其中该至少一种治疗剂是选自: 肽, 细胞活素, 生长因子, 血管生成因子, 可溶性受体, 抗体和它们的片段和人重组蛋白质。

31. 权利要求 1 的体系, 其中该水凝胶被应用于可植入的设备中。

32. 权利要求 31 的体系, 其中可植入的设备是选自支架, 导管, 气管, 管, 螺杆, 板, 分流器, 人造关节, 人造心脏或人工瓣膜。

33. 权利要求 1 的药物输送体系, 其中所述聚(烯化氧)是聚(环氧乙烷), 和所述聚(羟基链烷酸酯)是聚(羟基丁酸酯)。

34. 包含环糊精和两亲性共聚物的水凝胶, 其中共聚物包括含有聚(烯化氧)的 A 聚合物嵌段和含有聚(羟基链烷酸酯)的 B 聚合物嵌段, 其中所述 B 聚合物嵌段选自聚[(R)-3-羟基丁酸酯], 聚[(R)-4-羟基丁酸酯]; 聚[(R)-3-羟基戊酸酯]; 聚[(R)-3-羟基丁酸酯]-co-聚[(R)-3-羟基戊酸酯]; 聚[(R)-3-羟基己酸酯]; 聚[(R)-3-羟基庚酸酯]; 此类(R)对映异构体的每一种的(S)对映异构体; 此类(S)和(R)对映异构体的外消旋混合物; 或它们的混合物。

35. 合成两亲性 ABA 三嵌段共聚物的方法, 该共聚物包括作为 A 嵌段聚合物的聚(环氧乙烷)和作为 B 嵌段聚合物的聚(3-羟基链烷酸酯), 该方法包括:

将聚(3-羟基链烷酸酯)转化成具有较低分子量的链端官能化聚(3-羟基链烷酸酯)-二醇。

从甲氧基-聚(环氧乙烷)生产甲氧基-聚(环氧乙烷)-单羧酸; 和使用 1,3-二环己基碳二亚胺让聚(3-羟基链烷酸酯)-二醇与甲氧基-聚(环氧乙烷)-单羧酸偶联, 得到 ABA 三嵌段共聚物。

36. 权利要求 35 的方法, 其中该聚(3-羟基链烷酸酯)是聚(3-羟基丁酸酯), 和聚(3-羟基链烷酸酯)-二醇是聚(3-羟基丁酸酯)-二醇。

37. 权利要求 35 的方法, 其中该聚(3-羟基链烷酸酯)利用与乙二醇的酯交换反应被转化成链端官能化的聚(3-羟基链烷酸酯)-二醇。

38. 权利要求 35 的方法, 其中该甲氧基-聚(环氧乙烷)-单羧酸

是让甲氧基-聚(环氧乙烷)与琥珀酸酐在4-(二甲基氨基)吡啶和三乙胺存在下在1,4-二噁烷中反应来生产的。

39. 权利要求 35 的方法, 其中聚(3-羟基链烷酸酯)-二醇和甲氧基-聚(环氧乙烷)-单羧酸在偶联之前被干燥。

40. 权利要求 35 的方法, 其中聚(3-羟基链烷酸酯)-二醇和甲氧基-聚(环氧乙烷)-单羧酸在干燥二氯甲烷中偶联。

41. 权利要求 40 的方法, 其中聚(3-羟基链烷酸酯)-二醇和甲氧基-聚(环氧乙烷)-单羧酸在干燥二氯甲烷中在氮气气氛中偶联。

42. 权利要求 35 的方法, 其中聚(3-羟基链烷酸酯)-二醇和甲氧基-聚(环氧乙烷)-单羧酸与过量的甲氧基-聚(环氧乙烷)-单羧酸偶联。

43. 权利要求 35 的方法, 进一步包括使用选自甲醇/乙醚或氯仿/乙醚中的混合溶剂分离 ABA 三嵌段共聚物。

44. 药物输送体系, 包括:

从两亲性 ABA 共聚物形成的胶束, 其中共聚物包括含有聚(烯化氧)的 A 聚合物嵌段和含有聚(羟基链烷酸酯)的 B 聚合物嵌段; 该聚(羟基链烷酸酯)选自聚[(R)-3-羟基丁酸酯], 聚[(R)-4-羟基丁酸酯], 此类(R)对映异构体的每一种的(S)对映异构体, 此类(S)和(R)对映异构体的外消旋混合物, 或它们的混合物; 和

治疗有效量的紧密地包含在胶束中的至少一种治疗剂。

45. 权利要求 44 的体系, 进一步包括可药用的含水碱。

46. 权利要求 45 的体系, 其中该胶束在含水碱中有足够的浓度而形成水凝胶。

47. 权利要求 46 的体系, 其中该水凝胶被应用于可植入的设备中。

48. 权利要求 47 的体系, 其中可植入的设备是选自支架, 导管, 气管, 管, 螺杆, 板, 分流器, 人造关节, 人造心脏或人工瓣膜。

49. 权利要求 44 的体系, 其中该体系提供了在药物释放的起始之后在至少一个星期的时间中至少一种治疗剂的持续释放。

50. 权利要求 44 的体系, 其中该聚(烯化氧)是选自聚(环氧乙烷), 聚(四亚甲基氧化物)或聚(四氢呋喃)。

51. 权利要求 50 的体系, 其中该聚(烯化氧)是聚(环氧乙烷)。

52. 权利要求 51 的体系，其中该聚(羟基链烷酸酯)是聚[(R)-3-羟基丁酸酯]。

53. 权利要求 44 的体系，其中该聚(羟基链烷酸酯)是聚[(R)-3-羟基丁酸酯]。

54. 权利要求 44 的体系，其中该聚(烯化氧)A 嵌段聚合物和该聚(羟基链烷酸酯)B 嵌段聚合物各具有 500 到 20,000 的分子量。

55. 权利要求 44 的体系，其中该聚(烯化氧)A 嵌段聚合物和该聚(羟基链烷酸酯)B 嵌段聚合物各具有 2,000 到 10,000 的分子量。

56. 权利要求 44 的体系，其中该聚(羟基链烷酸酯)B 嵌段聚合物具有 3,000 到 2,500 的分子量。

57. 权利要求 44 的体系，进一步包括与治疗剂配合和/或与治疗剂共轭的二级聚合物。

58. 权利要求 44 的体系，其中该胶束形成了包封至少一种治疗剂的纳米颗粒或微粒。

59. 权利要求 44 的体系，其中共聚物具有在 1,000 至 50,000 之间的分子量。

60. 权利要求 44 的体系，其中共聚物具有在 5,000 至 35,000 之间的分子量。

61. 权利要求 44 的体系，其中该至少一种治疗剂是选自蛋白质，基因，抗原，抗体和它们片段，DNA，或 RNA。

62. 权利要求 44 的体系，其中该至少一种治疗剂是高分子形式。

63. 权利要求 44 的体系，其中至少一种治疗剂选自镇痛药，麻醉剂，抗关节炎药，疾病改性抗风湿病药物，抗哮喘药物，抗凝血剂，抗惊厥药，抗抑郁药，抗糖尿病药，抗肿瘤药，抗精神病药，抗高血压药，抗生素，抗组胺剂，解充血药，抗炎药，肌肉松弛药，防寄生的药物，抗病毒药物，抗再狭窄剂，抗痉挛剂，软骨保护剂，防粘剂，抗肿瘤细胞侵入剂，血管舒张剂，血管收缩剂或免疫抑制剂。

64. 权利要求 44 的体系，其中该至少一种治疗剂是选自：肽，细胞活素，生长因子，血管生成因子，可溶性受体，抗体和它们的片段和人重组蛋白质。

65. 权利要求 44 的体系，其中该胶束在 15℃到 45℃的温度范围内是稳定的。

66. 药物输送体系, 包括:

从两亲性 ABA 共聚物形成的胶束, 其中共聚物包括含有聚(烯化氧)的 A 聚合物嵌段和含有聚(羟基链烷酸酯)的 B 聚合物嵌段; 该聚(羟基链烷酸酯)选自聚[(R)-3-羟基丁酸酯], 聚[(R)-4-羟基丁酸酯], 此类(R)对映异构体的每一种的(S)对映异构体, 此类(S)和(R)对映异构体的外消旋混合物, 或它们的混合物; 和

紧密地包含在所述胶束内的至少一种疏水性小分子。

可生物降解的三嵌段共聚物，
它们的合成方法和从它制得的水凝胶和生物材料

本发明的领域

本发明涉及合成具有聚(羟基链烷酸酯)聚合物嵌段和聚(烯化氧)聚合物嵌段的两亲性共聚物的方法，由该聚合物与环糊精形成的水凝胶，以及包括以该聚合物和水凝胶为基础的可注射的水凝胶药物输送体系的生物材料。

本发明的背景

许多药物由一些方法配混来用于输送，该方法导致了在人或其它哺乳动物的体内中的治疗效果，它随着时间推移而显著变化。由静脉途径输送的药物会在血浆药物浓度中导致几乎瞬时峰，随后，随着药物被新陈代谢，在血浆水平中有逐渐的衰退。由口服或肌注途径输送的药物会导致药物的血浆浓度在该药物的系统吸收过程中慢慢地提高，随后从峰值血浆药物水平下降。药物按剂量给药可能需要在频繁的时间间隔，如每日，加以重复，但是这最多仅仅接近连续或恒定的治疗水平。

有益的是将许多类型的治疗剂输送在输送体系中，以使该治疗剂在较长时间内持续释放。用于药物的控制释放和输送的各种聚合物已经在过去20年中开发出来。大多数的聚合物形成为植入物或可注射的微粒。此类聚合物是，和必须是，可生物降解的和生物相容的。为了生产合适形式的聚合物，需要复杂的制造过程，它典型地牵涉到有机溶剂。然而，有机溶剂的使用会引起一些蛋白质药物的变性，和甚至痕量的有机溶剂是有毒的。

已经探索将聚合物水凝胶用于药物输送和控制释放。例如，化学交联的聚合物水凝胶已经用作植入物。一些可注射的药物输送体系在注射之后在体内形成化学交联的水凝胶，提供了药物储藏库。然而，由于这些聚合物中的一些的存在和/或断裂而在体内发生的化学反应会引起组织刺激和损坏。

物理聚合物水凝胶已经广泛地探索用于生物材料应用。实例包括

由对映异构化聚合物或多肽链段的络合所形成的水凝胶，和具有温度-或 pH-敏感性能的水凝胶。它们引起了对于控制药物输送的特别关注，因为在捕获精细生物活性试剂如蛋白质中所牵涉到的温和和含水性条件。

例如，从热敏性嵌段共聚物形成的现场所形成水凝胶也已经被推荐作为药物的持续释放基质。它们有下列优点，即没有在凝胶形成中所牵涉的化学反应。这些共聚物水凝胶通常为高分子药物如蛋白质和激素所设计。此类温度敏感凝胶的缺点是在注射中使用该凝胶的实践性。

新近，两亲性嵌段共聚物对于基础研究和应用已吸引了特殊关注，因为它们的独特的链层次结构和在固态下以及在溶液中的物理性能。Forster, S. 等人, *Adv. Mater.* 10: 195-217(1998); Alexandridis, P. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 1: 490-501(1996)。它们因为高度有序的自组合结构而已经广泛地作为在超分子的聚合物化学中的结构单元。Forster(1998), Alexandridis(1996); Vanhest, J. 等人, *W. Science* 268: 1592-1595(1995); Jenekhe, S. 等人, *Science* 283: 372-375(1999); Kukulka, H. 等人, *J. Am. Chem. Soc.* 124: 1658-1663(2002)。两亲性嵌段共聚物已经被认为利用这一自组合的生物材料的优点。该研究已经导致获得了具有新型的宏观特性的生物材料，它们用于控制的药物输送和组织工程技术。Jeong, B 等人, *Adv. Drug Delivery Rev.* 54: 27-51(2002); Kissel, T. 等人, *Adv. Drug Delivery Rev.* 54: 99-134(2002)。

聚(环氧乙烷)(PEO)广泛被用作亲水性和生物相容的聚醚。Herold, D 等人, *Biochem. Pharmacol.* 38: 73-76(1989)。包括 PEO 作为亲水性链段的两亲性 ABA 三嵌段共聚物以前进行了研究和被描述为用作生物材料。该术语 ABA 在这里用于指一种聚合物，它包括第一聚合物的中心链段，称作 B 嵌段共聚物，和第二聚合物的第一和第二端链段，称为 A 嵌段共聚物。作为典型的实例，商购的聚(环氧乙烷)-聚(环氧丙烷)-聚(环氧乙烷)(PEO-PP0-PEO, Pluronic™)三嵌段共聚物已经广泛地就它们的相特性和药物输送的潜在应用进行研究。Alexandridis, P 等人, *Colloids Surf.* 96: 1-46(1995); Bromberg,

L. 等人, *Adv. Drug Del Rev.* 31: 197-221 (1998)。最近, 更多的关注已经集中于具有可生物降解性聚酯的 PEO 的两亲性 ABA 三嵌段共聚物。由 PEO 和聚酯如聚(L-乳酸) (PLLA), 聚(乙醇酸) 或它们的共聚酯组成的三嵌段共聚物的合成和表征已进行了报导。Jeong, B 等人, *Nature* 388: 860-862 (1997); Jeong, B. 等人, *Macromolecules* 32: 7064-7069 (1999); US 专利 5, 384, 333; US 专利 5, 702, 717; US 专利 4, 716, 203; US 专利 5, 476, 909。此类两亲性嵌段共聚物倾向于在水中形成胶束或甚至凝胶剂, 它们潜在地可用于可注射的药物输送体系。

另一种有益的水凝胶体系是由线性聚合物如聚(环氧乙烷) (PEO) 穿透环糊精 (CD) 的内腔而形成具有项链状超分子结构的包含配合物所产生的 polyrotaxanes 组成。Harada A. 等人, *Nature* 356: 325 (1992); Li J. 等人, *Polym. J.* 26: 1019 (1994)。然而, 仅仅高分子量 PEO 能够与 α -CD 形成水凝胶, 和水凝胶在水溶液中的离解是快速的, 因为 PEO 的亲水性质。

使用相关的水凝胶的可注射的药物输送体系公开于 US 专利申请 2002/0019369 A1 中, 以发明人 Li 等人的名义, 标题为 *Injectable Drug Delivery Systems with Cyclodextrin-Polymer Based Hydrogels*, 它的公开内容被引入这里供参考。本申请公开了从 CD, 一种聚合物即聚(乙二醇) (PEG), PEG 衍生物, 或 PEG 共聚物, 和药物形成的环糊精聚合物基可注射的组合物。它涉及到将聚(丙二醇) 或其它聚(亚烷基二醇) 用作该体系中的聚合物。尽管在这一出版物中公开的聚合物水凝胶提供了有希望的持续释放体系, 但是它们还没有表明对于长于一个星期的持续释放提供优化的释放动力学。

聚[(R)-3-羟基丁酸酯] (PHB) 是由许多微生物作为碳和能量储存材料所合成的旋光活性可生物降解的聚酯。Doi, Y. *Microbial Polyesters*; VCH Publisher, New York (1990)。

授权于 Cha 等人的 US 专利 5, 702, 717 公开了由疏水性 A 聚合物嵌段(它是聚(α -羧基酸) 或聚(碳酸亚乙酯)), 和亲水性 B 聚合物嵌段(它是聚(乙二醇)) 组成的热敏的可生物降解的共聚物。这些聚合物被公开用于药物输送, 并表征为显示出反转热凝胶化行为。聚(α -羧基酸) 聚合物嵌段的潜在例子的所公开目录包括羟丁酸; 然而这是聚(β -

羟基链烷酸酯), 和不落在由 Cha 等人教导的聚合物种类之中, 也不可能显示出由 Cha 等人寻求的全部特征。此外, Cha 等人利用了实施环状单体的开环聚合的合成过程, 这导致了聚(α -羟基酸)的潜在地不希望有的外消旋作用。

本发明概述

本发明提供了药物输送体系, 它包括从环糊精和两亲性共聚物形成的水凝胶, 和治疗有效量的紧密地含在水凝胶中的至少一种治疗剂, 该共聚物包括包含聚(烯化氧)的 A 聚合物嵌段和包含聚(羟基链烷酸酯)的 B 聚合物嵌段。

本发明还提供了合成两亲性 ABA 三嵌段共聚物的方法, 其中包括作为 A 嵌段聚合物的聚(环氧乙烷)和作为 B 嵌段聚合物的聚(3-羟基丁酸酯)。该方法要求: 将聚(3-羟基丁酸酯)转化成具有低分子量的链端有官能基的聚(3-羟基丁酸酯)-二醇; 从甲氧基-聚(环氧乙烷)生产甲氧基-聚(环氧乙烷)-单羧酸; 使用 1, 3-二环己基碳二亚胺让聚(3-羟基丁酸酯)-二醇与甲氧基-聚(环氧乙烷)-单羧酸偶联, 得到 ABA 三嵌段共聚物。

本发明还提供了通过将环糊精, 治疗有效量的在含水碱液(aqueous base fluid)中的至少一种治疗剂, 和两亲性共聚物相掺混来形成水凝胶药物输送体系的方法, 其中该共聚物包括含有聚(烯化氧)的 A 聚合物嵌段和包含聚(羟基链烷酸酯)的 B 聚合物嵌段。

在本发明的另一个方面, 提供了用至少一种治疗剂治疗人或需要治疗的其它哺乳动物的方法。该方法用于将至少一种治疗剂施加在药物输送体系中, 该药物输送体系包括从环糊精和两亲性共聚物形成的水凝胶, 其中共聚物包括含有聚(烯化氧)的 A 聚合物嵌段和含有聚(羟基链烷酸酯)的 B 聚合物嵌段, 其中治疗有效量的至少一种治疗剂紧密地包含在该水凝胶内。

在本发明的一个优选实施方案中, A 聚合物嵌段是聚(环氧乙烷)(PEO)和 B 聚合物嵌段是聚[(R)-3-羟基丁酸酯](PHB)。在本实施方案中用于与 α -环糊精(α -CD)形成水凝胶的共聚物是三嵌段 PEO-PHB-PEO 共聚物。

本发明的实施方案的两亲性三嵌段共聚物, 通过使用 PEO 作为端

链段和 PHB 作为中间链段，具有有益的性能，因为 PHB 是高度结晶性的和疏水性的。另外，PHB 比 PLLA 和许多其它常用生物聚酯有更低的活体内降解速率。Gogolewski, S. 等人, J. Bionzed. Mat. Res. 27: 1135-1148 (1993)。因此，PEO-PHB-PEO 三嵌段共聚物对于长期植入或药物的控制输送而言比以前开发的聚合物更具前景。

除了在 α -CD 和 PEO 嵌段之间的配合物的自组装外，在 PHB 中间链嵌段之间的疏水性-疏水性相互作用进一步增强了该水凝胶网络。水凝胶的性能能够通过调节分子量以及 PHB 和 PEO 的摩尔比率来进行微调，使得它们更有潜力地用于各种生物医学应用，如用于蛋白质，肽，基因，小分子，抗体和它们的片段和人重组蛋白质，抗原，DNA，RNA 或 DNA 纳米颗粒的输送，和用于组织工程技术。

本发明的 PEO-PHB-PEO 水凝胶具有相对于其它已知水凝胶而言大大提高的持续释放特性，部分地归因于中间部分的增加的疏水性，到了令人吃惊的程度。这些水凝胶也显示出增强的稳定性，更快速地形成凝胶，和需要使用更少的环糊精，最大程度地减少了任何不希望有的副作用，如潜在的炎症(如果使用过量的环糊精的话可能会发生)。

本发明的 PEO-PHB-PEO 三嵌段共聚物具有在含水介质中胶束形成的强烈趋势。从本发明的共聚物的胶束形成是对温度不太敏感的。当与从其它聚(α -羟基链烷酸)如 PLLA 或 PGA 形成的胶束的相对温度不稳定性(Jeong (2002); Kissel (2002); Jeong (1997); Jeong (1999)) 相比时，这一温度不敏感性是出乎意外的，假定 PHB 和 PLLA 具有相似的化学结构。本发明的胶束因此很适合于药物输送，如在 15 到 45℃ 的范围内，因为它们在这一范围内的较高温度下不倾向于过早地破裂，并且在这一范围内的较低温度下不易聚集到较大尺寸。

附图的简述

当结合附图时通过阅读下列详细说明能够更容易地理解本发明的上述方面和许多伴随的优点，其中：

图 1 提供了根据本发明的实施方案的用于聚(环氧乙烷)-聚[(R)-3-羟基丁酸酯]-聚(环氧乙烷)(PEO-PHB-PEO) 共聚物的合成的化学反应历程；

图 2 提供了在实施例 1 中生产的 PEO-PHB-PEO 共聚物和相应预聚

物的凝胶渗透色谱法(GPC)色谱图;

图 3 提供了在实施例 1 中生产的 PEO-PHB-PEO 共聚物和相应预聚物的 ^1H NMR 谱;

图 4 提供了根据实施例 1 的过程生产的 PEO-PHB-PEO (2000-3900-2000) 共聚物和相应预聚物的 FTIR 谱;

图 5 提供了在根据实施例 1 的过程生产的 PEO-PHB-PEO 共聚物和相应预聚物的热重分析(TGA)过程中的失重曲线;

图 6 和 7 提供了根据实施例 1 的过程生产的不同分子量的 PEO-PHB-PEO 共聚物以及相应预聚物的差示扫描量热法(DSC)温谱图;

图 8 和 9 提供了根据实施例 1 的过程生产的不同分子量的 PEO-PHB-PEO 共聚物以及相应预聚物的广角 X 射线衍射(XRD)图;

图 10 说明了实施例 2 的从下列水凝胶中释放的 BSA-FITC (填充了 1.0 mg BSA-FITC 的 300 mg 水凝胶)的活体外释放分布图: α -CD-PEO (10000) 水凝胶 (●) (先有技术); α -CD-PEO (20000) 水凝胶 (◆) (先有技术); 根据本发明的实施方案的 α -CD-PEO-PHB-PEO (5000-2350-5000) 水凝胶 (▲); 和根据本发明的 α -CD-PEO-PHB-PEO (5000-3850-5000) 水凝胶 (■);

图 11 说明了实施例 3 的从下列水凝胶中释放的葡聚糖-FITC (填充 1.0 mg 葡聚糖-FITC (M_n 20,000) 的 300 mg 水凝胶)的活体外释放分布图: PEO-PHB-PEO (5000-5500-5000) 水凝胶 (■); 根据本发明实施方案的 α -CD-PEO-PHB-PEO (5000-5500-5000) 水凝胶 (●); 和根据本发明实施方案的 α -CD-PEO-PHB-PEO (5000-3800-5000) 水凝胶 (▲)。

图 12 和 13 提供了未配合 PEO-PHB-PEO 共聚物的 XRD 图, 相比于与 α -CD (图 12) 或 γ -CD (图 13) 配合的各种分子量的 PEO-PHB-PEO 共聚物;

图 14 和 15 提供了未配合 PEO-PHB-PEO 共聚物的 DSC 温谱图, 相比于与 α -CD (图 14) 或 γ -CD (图 15) 配合的各种分子量的 PEO-PHB-PEO 共聚物;

图 16 提供了未配合 α -CD 和与 PEO-PHB-PEO (2000-5200-2000) 共聚物配合的 α -CD 的 ^{13}C CP/MAS NMR 谱, 其中箭头显示了与单个构象应变的配糖键相邻的 C-1 和 C-4 的分辨共振;

图 17 提供了在 DMSO-d₆ 中与 PEO-PHB-PEO (2000-5200-2000) 共聚物配合的 α -CD 的 400 ¹H NMR 谱;

图 18 和 19 提供了未配合 PEO-PHB-PEO (2000-5200-2000) 共聚物的不同分辨率的 FTIR 谱, 相比于与 α -CD 或 γ -CD 配合的这一共聚物和与纯 α -CD 对比;

图 20 提供了纯 α -CD, 纯 PEO-PHB-PEO (2000-5200-2000) 共聚物和这一共聚物与 α -CD 的配合物的热重分析 (TGA) 曲线;

图 21 提供了在实施例 5 的 PEO-PHB-PEO 共聚物的水溶液中, 在各种浓度和 23°C 下, 苝探针 (6.0×10^{-7} M) 的在 373 nm 处监测的稳态荧光激发光谱;

图 22 说明了在 23°C 下, 实施例 5 的 PEO-PHB-PEO 共聚物的浓度对于在共聚物溶液中苝的 I_{337}/I_{334} 比率的影响;

图 22 说明了在不同的浓度下, 温度对于在实施例 5 的 PEO-PHB-PEO 共聚物的水溶液中苝的 I_{337}/I_{334} 比率的影响;

图 24a 提供了在磷酸盐缓冲盐水的关节内注射之后的一周过后, 显示兔膝关节的显微解剖图的图像(最初的放大倍数 $\times 10$); 和

图 24b 提供了在 α -CD-PEO-PHB-PEO (5000-2000-5000) 水凝胶的关节内注射之后的一周过后, 显示兔膝关节的显微解剖图的图像(最初的放大倍数 $\times 10$)。

优选实施方案的详细说明

本发明提供了药物输送体系, 它包括从环糊精和两亲性共聚物形成的水凝胶, 和治疗有效量的紧密地含在水凝胶中的至少一种治疗剂, 该共聚物包括包含聚(烯化氧)的 A 聚合物嵌段和包含聚(羟基链烷酸酯)的 B 聚合物嵌段。在本发明的一个优选实施方案中, A 聚合物嵌段是聚(环氧乙烷) (PEO) 和 B 聚合物嵌段是聚[(R)-3-羟基丁酸酯] (PHB), 和共聚物是三嵌段 ABA 共聚物 PEO-PHB-PEO。现在描述本发明的聚(烯化氧)-聚(羟基链烷酸酯)-聚(烯化氧)共聚物的 A 和 B 嵌段共聚物组分。

聚(烯化氧)

亲水性聚(烯化氧)末端链段结构(A 嵌段聚合物)用于本发明的三

嵌段共聚物中。聚(烯化氧)适宜地选自聚(环氧乙烷),聚(四亚甲基氧化物)和聚(四氢呋喃)。用于本发明的优选的聚(烯化氧)是聚(环氧乙烷)(PEO)或它的衍生物,和最优选是PEO。PEO也被称为聚(乙二醇),和在这里使用的术语聚(环氧乙烷)(和该缩写PEO)意图希望也指聚(乙二醇)(PEG)。

该聚(烯化氧)可具有不同的形式和不同的端基。例如,对于PEO,PEO衍生物可具有不同的结构,例如星形PEO,梳形PEO等。该聚(环氧乙烷)可以是改性分子的形式,例如PEG化的多糖,PEG化的聚(氨基酸),PEG化的蛋白质,等等。另外,PEO的多胺衍生物,例如PEG化的聚(亚乙基亚胺)或PEG化的聚赖氨酸,都可以使用。

在本发明的共聚物中用作A嵌段共聚物的PEO或其它聚(烯化氧)的相对分子量(Mr)适宜是500到2,000,和优选是2,000到10,000。

聚(羟基链烷酸酯)

高度疏水性聚(羟基链烷酸酯)中间段结构(B嵌段聚合物)用于本发明的三嵌段共聚物中。合适的聚(羟基链烷酸酯)是:a)相对疏水性的,因此在聚合物链之间的疏水性-疏水性相互作用促进高分子组装和降低所需CD的浓度;b)可生物降解的;和c)无毒的和生物相容的。

用于本发明的合适的疏水性B聚合物嵌段是聚(羟基链烷酸酯)。用于本发明的合适聚(羟基链烷酸酯)的例子包括:聚[(R)-3-羟基丁酸酯](PHB),也称为聚[(R)-3-羟基丁酸]或聚(β -羟基酸);聚[(R)-4-羟基丁酸酯](PGHB);聚[(R)-3-羟基戊酸酯](PHV);聚[(R)-3-羟基丁酸酯]-co-聚[(R)-3-羟基戊酸酯](PHB/HV);聚[(R)-3-羟基己酸酯](PHHx);聚[(R)-3-羟基庚酸酯](PHHp);以上(R)对映异构体的每一种的(S)对映异构体;以上(S)和(R)对映异构体的外消旋混合物;和以上聚(羟基链烷酸酯)的混合物。优选的聚(羟基链烷酸酯)是聚(β -羟基链烷酸酯),和更具体地说,是聚[(R)-3-羟基丁酸酯](PHB)和相关的聚[(R)-3-羟基链烷酸酯]。用于本发明的最优选的聚(羟基链烷酸酯)是PHB。

在本发明的共聚物中用作B嵌段聚合物的PHB或其它聚(羟基链烷酸酯)的相对分子量(Mr)适宜是500到2,000,优选是2,000到10,000,更优选2,500到7,500和最优选是3,000到5,000。

共聚物

本发明提供了用下面进一步描述的独特的合成工艺生产的聚(烯化氧)和聚(羟基链烷酸酯)的两亲性共聚物。优选地,这些共聚物是ABA三嵌段共聚物,例如PEO-PHB-PEO。本发明的此类三嵌段共聚物与环糊精形成水凝胶,和可用于持续释放药物输送和其它生物医学应用。本发明还涉及聚(烯化氧)和聚(羟基链烷酸酯)的AB嵌段共聚物,例如PEO-PHB。可以相信,此类AB嵌段共聚物也与环糊精形成有用的水凝胶。因此,尽管三嵌段ABA聚合物是优选的,这里描述的本发明的全部实施方案应该理解为同样适用于聚(烯化氧)和聚(羟基链烷酸酯)的AB嵌段共聚物。本发明的聚合物的其它变化形式也是可能的。例如,庞大的保护基团可以经由可生物降解的连接基例如L-苯基丙氨酸,L-色氨酸,烟碱基团等共轭到聚合物链的末端。

本发明的PEO-PHB-PEO聚合物的分子量适宜在1,000和50,000之间,和优选在5,000和35,000之间。

本发明的共聚物能够配制成可生物吸收的,可生物降解的,生物相容的,并且能够与环糊精形成水凝胶。可生物吸收的是指该聚合物能够从身体内它的最初施用位置上消失,有或者没有该分散聚合物分子的降解。可生物降解的是指该聚合物能够利用水解或酶催降解作用在身体内断裂或降解。生物相容的是指全部的组分在身体内是无毒的。

环糊精

环糊精(即,cyclodextrin)在本发明中用作配位剂,与三嵌段共聚物的链段配合。这些环糊精穿线连接的聚合物的簇聚作用然后形成水凝胶。环糊精是由 α 1,4连接基所连接的六个,七个,八个或更多个D(+)葡萄糖吡喃糖单元组成的一系列天然环状低聚糖。环糊精是可生物降解的和生物相容的和可以是天然的或人工合成的。环糊精可以由例如微生物自然地合成。环糊精可以人工地改性以调控它的性能,如改进溶解度,配合物-形成能力,和特异性。这里使用的环糊精指全部天然形式和人工改性的形式。合适的环糊精包括 α -环糊精, β -环糊精, γ -环糊精和它们的衍生物,其中包括疏水性衍生物,亲水性衍生

物，带电荷的环糊精等。优选的环糊精是 α -环糊精。

聚合物合成

PEO-PHB-PEO 三嵌段共聚物的合成程序在图 1 的反应历程中给出。为了合成根据本发明的 PEO-PHB-PEO 三嵌段共聚物，首先使用普通方法制备聚合物前体。天然来源 PHB 具有高分子量，并且具有一个羟基端基和一个羧基端基。天然来源 PHB 在光学活性上也是纯的。高分子量天然来源 PHB 通过使用已知的技术与乙二醇进行酯交换反应而被转化成较低分子量的链端羟基终端 PHB (PHB-二醇)。例如，该酯交换反应可以在二甘醇二甲醚中进行，其中二月桂酸二丁锡作为催化剂。该酯交换反应进行几个小时到一夜，生产出具有几百到几千的平均分子量的 PHB-二醇，由凝胶渗透色谱法 (GPC) 测定。甲氧基-PEO-单羧酸 (M-PEO-A) 预聚物适宜使用已知的技术由甲氧基-PEO 与琥珀酸酐在 4-(二甲基氨基)吡啶 (DMAP) 和三乙胺存在下在 1,4-二噁烷中的反应来制备。

这些聚合物前体即预聚物然后根据本发明的方法被偶联，得到所需的三嵌段共聚物。该预聚物 (PHB-二醇和 M-PEO-A) 优选首先加以干燥，因为偶联反应是湿度敏感的。该双官能化 PHB-二醇与 M-PEO-A 通过使用 1,3-二环己基碳二亚胺 (DCC) 作为偶联剂进行偶合，得到 PEO-PHB-PEO 三嵌段共聚物。再次，因为湿度敏感度，偶联反应是在干燥二氯甲烷中在氮气氛下进行。M-PEO-A 应该在偶联反应中是过量的，以确保全部的 PHB-二醇转化成该三嵌段共聚物。

目标三嵌段共聚物然后通过一次或多次沉淀和用混合溶剂 (适宜为甲醇/乙醚或氯仿/乙醚) 的小心分级来分离和提纯。聚合物的 PHB 嵌段保持了清晰的 (R) 外消旋构型。

除 PHB 的 (R) 对映异构体生产三嵌段共聚物之外，这一合成工艺也预计可用于 PHB 的 (S) 对映异构体以及 (S) 和 (R) 对映异构体的外消旋混合物和其它相关聚 (3-羟基链烷酸酯) 和它们的共聚物的生产。

水凝胶组装

在本发明的两亲性三嵌段共聚物和环糊精之间的超分子自组装 (supramolecular self-assembly) 会形成物理交联的可注射水凝

胶。超分子自组装涉及到多个分子组分的自发缔合成具有清晰的微观组织和宏观特性的特定相。在本发明的水凝胶中，PEO(例如)链段彼此自组装，而在PHB(例如)中间链段之间发生疏水性相互作用。药物能够以持续方式从由本发明的环糊精-聚合物基可注射水凝胶形成的活体内基质或载体中输送出来。

该环糊精-聚合物基可注射水凝胶组合物能够以任何合适的方式制备。对于没有药物的水凝胶的形成，环糊精与含水载液(例如，去离子水或盐水)相结合。

该环糊精溶液进行混合，然后添加两亲性共聚物组分(例如，PEO-PHB-PEO)。混合物一般被冷却到0℃到25℃的温度，和优选冷却到冷冻温度如4℃。所获得的产物是白色粘性的水凝胶。

如果该水凝胶被制备用于药物的输送，则在水溶液中的药物适宜最初与环糊精相结合，随后添加共聚物。另外地，该药物溶液首先与共聚物混合。药物最初包含在其中的水溶液是可药用的可注射含水流体。可药用的可注射含水流体可以是，但不限于，可注射的盐水。如果需要，该含水流体也可含有缓冲剂和/或防腐剂。合适的缓冲剂包括，但不限于，碱金属或碱土金属碳酸盐，磷酸盐，碳酸氢盐，柠檬酸盐，硼酸盐，乙酸盐，和琥珀酸盐。合适的防腐剂包括，但不限于，亚硫酸氢钠，硫代硫酸钠，抗坏血酸，洁尔灭，偕三氯叔丁醇，thimersol，硼酸苯汞，对羟基苯甲酸酯类，苜醇和苯基乙醇。如果使用，防腐剂和缓冲剂将部分地根据与所使用的治疗剂的相容性来进行选择。

优选地，聚合物是在水溶液中，它与环糊精形成水凝胶。例如，合适的含水聚合物溶液含有约1%到约80%聚合物，优选约10%到约40%。合适的水凝胶含有约1.0%到20%环糊精(w/w)(基于总溶液的重量)，优选约5%到15%环糊精。正如所指出，该水凝胶典型地通过使用含水的载液来形成。例如，典型的水溶液含有约1%到约80%聚合物，优选约10%到约40%。

根据本发明，环糊精和聚合物以足够的量和相对比例进行混合，得到了具有所需释放动力学(用于药物输送应用)和满足特殊应用需求的物理性能(即，溶胶粘度和凝胶-溶胶转变特性)的可注射水凝胶。当用于可注射的药物输送体系时，环糊精的用量足以得到一种凝胶，它

作为溶胶(由于剪切诱导的转变)可通过皮下注射针来注射。合适地,环糊精与聚合物的重量比是 0.05 : 1.0 到 0.5 : 1.0(即,该环糊精以聚合物重量的 5%-80%量包含)。优选地,该环糊精是以聚合物重量的 5% - 50%重量包含。

希望使用为了达到所期望的释放动力学(药物输送)和物理特性所必需的最少量的环糊精,以避免在活体内导致发炎响应的那一水平的环糊精。本发明的水凝胶被认为需要低得多的环糊精来形成凝胶,如 50%以下,与由环糊精和均聚 PEO 形成的普通水凝胶相比。作为一个极端的例子,具有某些 PEO/PHB 结合物的一些共聚物能够在没有 CD 的情况下形成凝胶。然而,对于 CD,凝胶获得显著地改进的释放动力学。这是重要的,因为 CD 的量能够选择以调节凝胶的释放动力学。

水凝胶性能和附加组分

本发明的水凝胶是可生物吸收的和可生物降解的,并且是生物相容的。它被认为是热敏的,是触变的,和在某些条件下在凝胶和溶胶之间回复。凝胶-溶胶转变温度一般高于室温,这取决于凝胶的组成,以及取决于共聚物的化学结构和分子量。从包括 PEO 作为 A 嵌段和 PHB 作为 B 嵌段的本发明的三嵌段 ABA 聚合物形成水凝胶已经被认为是对温度相对不敏感的。在 10 到 45°C 范围内的温度下,凝胶和胶束的形成主要取决于浓度,而不是温度。用这一聚合物形成的水凝胶和胶束,它在低温下难以离解和在高温下难于聚集成较大尺寸,因此是稳定的和容易处置以供药物输送用。

由于它的触变性质,该水凝胶在受到足够的剪切力时转变成溶胶,使得该水凝胶(和其中所含的任何药物)变成可注射的。例如,该水凝胶能够穿过小到 27 G 的针。

水凝胶的 pH 一般是约 6.5 到约 7.8,它是注入人体的合适的 pH 水平范围。该 pH 水平可以利用任何合适的酸或碱,如氢氟酸或氢氧化钠来调节。

该水凝胶组合物也可含有二级(secondary)聚合物,它可以与药物配合,与药物共轭,或两者。该二级聚合物适宜是聚酯,聚氨酯,聚酰胺,聚醚,多糖,聚(氨基酸),多肽,或蛋白质。优选该二级聚合物是二-或单-官能化聚合物或具有(聚乙二醇)链段的聚离子聚合物。

对于药物与水凝胶发生共轭或配合的情况，该水凝胶配制料不仅用作基质而且用作药物的载体。这意味着该药物不仅仅以物理方式夹含在该水凝胶中，而且配合或共轭到构成该水凝胶的分子上。该二级聚合物也可用于改变水凝胶基质的性能，如孔隙度和粘度。二级聚合物的量应该足以达到所期望的结果，例如，与药物配合和/或共轭的足够量。

水凝胶的性能可通过使用不同聚合物嵌段分子量，通过调节环糊精含量，和通过二级聚合物的使用来调整。例如，水凝胶可以调节成更柔性的水凝胶或更刚性的水凝胶。该水凝胶结构能够经过调整而具有可变的粘度和更长久的或更短的药物释放速度，正如下面所讨论。该聚(羟基链烷酸酯)的疏水度也可以为所期望的持续释放速度来进行选择。

该水凝胶也可携带 DNA 纳米球。DNA 纳米球是由 DNA 的盐诱导的配合凝聚所合成的纳米颗粒和作为基因送递媒介物的聚阳离子如明胶和脱乙酰壳多糖。Leong, K. 等人, *Journal of Controlled Release* 53: 183-193 (1998)。有 DNA 缩合或结合链段的 PEG 共聚物可以与环糊精形成水凝胶，而聚合物缩合或结合 DNA 并在该水凝胶内形成 DNA 纳米球。

治疗剂和持续药物释放的方法

本发明的水凝胶适合于用作药物的持续、控制释放基质。当这一水凝胶基质与紧密包含在其中的一种或多种治疗剂偶合时，得到了可生物降解的持续释放药物输送体系。该术语“持续释放”（即，延长的释放或控制释放）在这里用于指药物输送体系或组合物，它被引入到人或其它哺乳动物的体内，或它应用于开放性创伤、烧伤或组织表面或引入到体腔或潜在体内空间，以及它经过预定的一段时间和在足以在整个预定时间内达到所期望的治疗效果的治疗水平下连续地释放出一种或多种治疗剂的料流。对于连续释放料流的理解应该包括由于组合物或它的基质或组分的活体内生物降解，或由于治疗剂的代谢转化或溶解或治疗剂的共轭所引起的释放。

延长的释放持续时间取决于嵌段共聚物的分子量，尤其疏水性聚(羟基链烷酸酯)段(例如，PHB)的分子量。该释放速度可以根据本发明

来改变以达到治疗响应的期望持续时间，这通过作以下选择来实现：特殊的聚(羟基链烷酸酯)；所选择的聚(羟基链烷酸酯)的立体异构状态；所选择的聚(羟基链烷酸酯)的分子量；和用于该水凝胶中的环糊精的相对量，以实现持续释放的所期望的持续时间和速率。该亲水性聚(烯化氧)的分子量和选择也影响持续释放动力学，但在比疏水性聚(羟基链烷酸酯)组分更低的程度上。二级聚合物也可用于改变释放动力学，正如以上所讨论。本发明的水凝胶能够提供在一天或多天的时间内的持续释放，并且适宜地通过嵌段聚合物和共聚物的分子量以及在本发明的水凝胶内环糊精含量，和二级聚合物的有潜力的应用的调节，而提供了大于5天，更优选大于一个星期，再更优选两周或更长时间，和潜在地一个月或更长时间的延续释放。

各种治疗剂，即药物，可以在本发明的水凝胶中被输送。在这里使用的术语“治疗剂”和“药物”希望包括生物学上活性分子，其中包括肽，蛋白质(例如，细胞活素，生长因子，血管生成因子，可溶性受体，抗体和它们的片段和人重组蛋白质)，小分子，基因，抗原(例如，疫苗)，DNA，RNA和DNA纳米颗粒。这里使用的术语“药物”和“治疗剂”也希望不仅包括固有地药理学或生物学活性的化合物或物质，而且包括了包含一种或多种这些活性化合物或物质，以及它们的共轭物，改性物，和药理学活性链段和抗体衍生物的一些材料。

本发明还提供了从这里所述的两亲性三嵌段共聚物与环糊精和一种或多种治疗剂形成的药物的制造方法。本发明因此提供了以在环糊精和三嵌段共聚物之间的包含络合作用为基础的超分子水凝胶，在其中紧密地包含了一种或多种治疗剂。这些水凝胶有希望用于蛋白质或肽药物的控制输送。

对于药物输送体系，该治疗剂适宜在可药用的可注射的含水碱(aqueous base)中配混，和该治疗剂可以是适合于注射或其它给药模式的任何药物，或此类药物的结合物。合适的药物包括，但不限于，镇痛药，麻醉剂，抗关节炎药，疾病改性抗风湿病药物(DMARDS)，抗哮喘药物，抗凝血剂，抗惊厥药，抗抑郁药，抗糖尿病药，抗肿瘤药，抗精神病药，抗高血压药，抗生素，抗组胺剂，解充血药，抗炎药，肌肉松弛药，防寄生的药物，抗病毒药物，抗再狭窄剂，抗痉挛剂，软骨保护剂，防粘剂，抗肿瘤细胞侵入剂，血管舒张剂，血管收

缩剂，免疫抑制剂和其它生物学上活性分子，其中包括肽，蛋白质(例如，细胞活素，生长因子，血管生成因子，可溶性受体，抗体和它们的片段和人重组蛋白质)，小分子，基因，抗原(例如，疫苗)，DNA，RNA 和 DNA 纳米颗粒。

该药物适宜是高分子形式(即，通常是高分子的药物或属于已经共轭、PEG 化或另外转化成高分子的较小分子的药物)或是低分子量形式。高分子形式非常适合于在本发明的水凝胶中的输送。

因此高分子如蛋白质，它包括生长因子，细胞活素，抗体，酶等，可以在本发明的水凝胶中被输送。为了有效和均匀的持续释放，低分子量药物可以适宜地共轭于，比如共轭于例如聚(乙二醇)上，而形成高分子，然后被引入该水凝胶中。属于小分子的药物适宜包含或连接于微粒和/或纳米颗粒内，例如，DNA 纳米球，以便引入到本发明的水凝胶中。因为本发明的三嵌段共聚物的疏水性中间部分链段能够形成胶束，该水凝胶也能够捕获疏水性药物，例如，紫杉醇(Taxol™)，其中包括疏水性小分子。

适合在本发明的水凝胶中被输送的治疗剂的附加例子已公开于授权于 Demopoulos 等，标题为 Surgical Irrigation Solution and Method for Inhibition of Pain and Inflammation 的 US 专利 6,420,432，和以 Demopoulos 等名义，标题为 Solutions and Methods for Inhibition of Pain, Inflammation and Cartilage Degradation 的国际 PCT 专利申请 W001/07067 中，它们的公开内容特意地引入这里供参考。US 6,420,432 公开了单独被输送或联合被输送的止痛药，抗炎药，抗痉挛药，和抗再狭窄剂(restenotic agent)，以抑制疼痛，发炎，平滑肌痉挛或再狭窄。试剂的选择是为了抑制从任何损伤、症状或其它原因引起的所不希望有的机理的某些给定应用来决定，其中包括外科、手术、介入或诊断程序，如在关节内窥镜程序当中抗炎药/抗痛剂在关节内的给药，在泌尿生殖器程序当中抗炎/抗痛和/或抗痉挛药剂给予泌尿生殖道，在心血管程序当中抗痛/抗炎、抗痉挛和/或抗再狭窄剂在血管内的给药，或在普通外科、眼科、牙外科或其它普通外科程序当中抗痛/消炎药输送到伤口。公开的抗炎/止痛剂包括：血清素受体拮抗剂；血清素受体激动剂；组胺受体拮抗剂；血管舒缓激肽受体拮抗剂；激肽释放酶抑制剂；速激肽受体拮抗剂，包括神经激

肽, 和神经激肽₂受体亚型拮抗剂; 降血钙素基因-相关肽 (CGRP) 受体拮抗剂; 白细胞间介素受体拮抗剂; 在花生四烯酸代谢物的合成途径中的酶活性抑制剂, 包括 (a) 磷脂酶抑制剂, 其中包括 PLA₂ 对碘氧基苯甲醚抑制剂和 PLC γ 对碘氧基苯甲醚抑制剂, (b) 环加氧酶抑制剂, 和 (c) 脂氧化酶抑制剂; 前列腺素类受体拮抗剂, 其中包括 eicosanoid EP-1 和 EP-4 受体亚型拮抗剂和凝血酶受体亚型拮抗剂; 白细胞三烯受体拮抗剂, 其中包括白细胞三烯 B₄ 受体亚型拮抗剂和白细胞三烯 D₄ 受体亚型拮抗剂; 阿片样物质受体激动剂, 其中包括 μ -鴉片样物质, δ -鴉片样物质, 和 κ -阿片样物质受体亚型激动剂; purinoceptor 激动剂和拮抗剂, 其中包括 P_{2X} 受体拮抗剂和 P_{2Y} 受体激动剂; 和三磷酸腺苷 (ATP) 敏感的钾通道开启剂。公开的抗痉挛剂包括: 血清素受体拮抗剂; 速激肽受体拮抗剂; ATP-敏感的钾通道开启剂; 钙通道拮抗剂; 内皮缩血管肽 (endothelin) 受体拮抗剂; 钙通道拮抗剂; 和一氧化氮给体 (酶激活剂)。公开的抗再狭窄剂包括: 抗血小板剂, 其中包括: (a) 凝血酶抑制剂和受体拮抗剂, (b) 腺苷二磷酸酯 (ADP) 受体拮抗剂 (又已知为 purinoceptor₁ 受体拮抗剂), (c) 凝血酶抑制剂和受体拮抗剂和 (d) 血小板薄膜糖蛋白受体拮抗剂; 细胞粘着分子的抑制剂, 其中包括 (a) 选择蛋白抑制剂和 (b) 整联蛋白抑制剂; 抗趋化性剂; 白细胞间介素受体拮抗剂; 和细胞内信号抑制剂, 其中包括: (a) 蛋白激酶 C (PKC) 抑制剂和蛋白质酪氨酸磷酸酯酶, (b) 细胞内蛋白质酪氨酸激酶抑制剂的调节剂, (c) src 同源性 2 (SH₂) 畴的抑制剂, 和 (d) 钙通道拮抗剂。当此类组合物在泌尿科、普通外科或肿瘤科程序当中被输送时, 抗粘合或抗肿瘤侵入/粘合/转移试剂也可以包括在内, 单独或联合, 如: CD44 受体拮抗剂; 整联蛋白受体拮抗剂和选择蛋白受体拮抗剂; 蛋白酶抑制因子; 蛋白质酪氨酸激酶抑制剂; 蛋白激酶 C 抑制剂; 和促分裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 抑制剂。这些各种组合物和程序中的每一种可以通过在本发明的水凝胶中输送治疗剂来进行, 以提供延长的释放和作用持续时间。

W001/07067 公开了抑制软骨分解代谢或促进软骨合成代谢的软骨保护剂。公开的合成代谢促进软骨保护剂包括: 白细胞间介素 (IL) 激动剂; 转化生长因子 (TGF)- β 总科的成员, 其中包括 TGF- β 激动剂和骨头形态生成型蛋白质激动剂; 胰岛素样生长因子; 和成纤维细胞生

长因子。公开的分解代谢抑制性软骨保护剂包括：IL-1 受体拮抗剂；肿瘤坏死因子 (TNF)- α 受体拮抗剂；环加氧酶-2 特异抑制剂；MAP 激酶抑制剂；氧化氮合酶抑制剂；和核因子 kB 抑制剂；基质金属蛋白酶的抑制剂；细胞粘着分子，其中包括整联蛋白激动剂和整联蛋白拮抗剂；抗趋化性剂；细胞内信号抑制剂，其中包括蛋白激酶 C 抑制剂和蛋白质酪氨酸激酶抑制剂；细胞内蛋白质酪氨酸磷酸酯酶的抑制剂；和 SH₂ 畴的抑制剂。此类软骨保护组合物在本发明的水凝胶中被输送，如通过关节内注射，以提供延长的释放和作用持续时间。

本发明的水凝胶和治疗剂药物输送体系适宜注射或另外输送（例如通过植入，放置于体腔或潜在空间，涂敷身体的组织表面或涂敷可植入设备的表面）到患有疾病或症状的人或其它哺乳动物，包含在该药物输送体系中的药物对于这些疾病或症状是治疗有效的。借助于非限制性例子，包括合适的治疗剂的药物输送体系可以被输送以治疗患有创伤或慢性疼痛，关节炎，多发性硬化症和其它自身免疫病症，从创伤或外科或其它手术程序引起的发炎和/或疼痛，忧虑和/或其它神经学或心理学病症，心血管病或症状如高血压，泌尿科病症或妇科病症，接受化学治疗的癌症，机能性充血，激素病症或不平衡等等的人或其它哺乳动物。用于水凝胶中的特殊药物是人或其它哺乳动物为了人或其它哺乳动物所患有的症状的药物处置所需要的类型。

可注射的组合物能够以任何合适的方式被注入或植入到人或其它哺乳动物的体内，和优选通过皮下注射针进行注射。例如，该水凝胶可以通过注射或其它关节内方式，血管内，施用于该泌尿生殖道，皮下注射，肌内注射，透皮，颅内，心包内，胸膜内，或施用于任何体腔或潜在空间。另外地，水凝胶可以经由导管或注射器被引入到关节，如在关节内窥程序当中，或引入到泌尿生殖道，引入到脉管系统，引入到心包或肋膜空间，或引入到任何体腔或在身体内的潜在空间中，在手术、外科、诊断或介入程序当中。该水凝胶能够施用于封闭的区域或组织以达到药物的较高局部浓度，形成持续释放储藏库。在其它应用中，水凝胶可以局部施用于敞开的外科或创伤伤口，施用于烧伤，或施用于皮肤或其它组织表面。

附加生物材料应用

本发明的三嵌段共聚物将形成胶束，它保留在液体悬浮液中或聚集成凝胶，这取决于浓度。由上述合成方法生产的可生物降解的三嵌段共聚物形成的胶束本身可用于药物的包封，以实现控制释放，特别对于疏水性药物。该三嵌段共聚物胶束也可加以干燥而形成微球粒或纳米球以用于包封药物，从而作为持续释放配制料。可以相信，适合于使用本发明的三嵌段共聚物的微粒或纳米颗粒形成的技术可以采用用于其它聚合物的已知技术。此类技术的非限制性例子公开于：Song, C. 等人，*Journal of Controlled Release* 43: 197-212 (1997)；Kim, S. 等人，*Journal of Controlled Release* 56: 197-208 (1998)；Kim, I. 等人，*International Journal of Pharmaceutics* 205: 165-172 (2000)；和 Jeong, Y. 等人，*International Journal of Pharmaceutics* 188: 49-58 (1999)，它们的公开内容被引入这里供参考。可生物降解的三嵌段共聚物的胶束(或从其形成的微粒或纳米颗粒)因此能够用于系统给药，包括，非限制性的例子，血管内给药，吸入，口服，肌注和皮下给药途径。由可生物降解的三嵌段共聚物和环糊精形成的本发明的水凝胶也能够用作细胞培养和包封的介质，用于组织工程应用。在活体外或在活体内在水凝胶中形成的合成组织可以植入人或其它哺乳动物(如在合成软骨)中，或可以外部地施用(如在合成皮中)。治疗剂可以包括在使用本发明的三嵌段共聚物或水凝胶所形成的合成组织内，以协助组织生长、耐久性或愈合。

本发明的水凝胶也能够在外科程序中用作涂层用于防止粘合形成。一种或多种治疗剂也可包括在此类组合物中。

本发明的水凝胶，包括一种或多种治疗剂，也可用于涂敷可植入的设备，例如，支架(stent)，导管，气管，管，螺杆，板，分流器，人造关节，人造心脏或瓣膜，其它修复术，等等。此类设备可以由可生物吸收的或不可生物吸收的材料构成。其它生物材料和用于这里所述的水凝胶的生物学应用也被认为是在本发明的范围内。

实施例

本发明借助于下列实施例来更好地理解，它们说明了本发明的三嵌段聚合物和水凝胶的合成，和它们的性能。这些实施例仅仅是举例说明而已，不是本发明的整个反映。

实施例 1

三嵌段共聚物的合成和表征

a. 三嵌段共聚物的合成

具有各种分子量的链端羧基化 PHB (PHB-二醇) 预聚物是从天然 PHB 和 二甘醇与作为催化剂的二月桂酸二丁锡在二甘醇二甲醚中的酯基转移程序制备的,如以前所报道。Thomas, D. 等人, *Macromolecules* 701. *Chem. Phys.* 197: 1609-1614 (1996)。该酯交换反应进行几个小时到一夜,生产出具有几百到几千的平均分子量的 PHB-二醇,由 GPC 测定。具有 1820 和 4740 的 M_n 的 M-PEO-单羧酸 (M-PEO-A) 预聚物通过 M-PEO 与琥珀酸酐在 4-(二甲基氨基)吡啶 (DMAP) 和三乙胺存在下在 1,4-二噁烷中的反应来制备,如以前所报道。Bae, Y 等人, *J. Controlled Release* 64: 3-13 (2000)。

然后,作为本发明的一个例子,这些双官能化 PHB-二醇预聚物通过使用 1,3-二环己基碳二亚胺与 M-PEO-A 预聚物 ($M_n \sim 1820$ 和 4740) 偶合,得到 PEO-PHB-PEO 三嵌段共聚物。因为这一反应是湿度敏感的,它在干燥二氯甲烷中在氮气气氛下进行。目标三嵌段聚合物然后通过沉淀和从氯仿/二乙醚或甲醇/乙醚中的小心分级来从反应混合物中分离和提纯。

b. 三嵌段共聚物的分子表征

进行凝胶渗透色谱法 (GPC) 分析来测定该三嵌段共聚物的分子量和分子量分布。全部提纯三嵌段共聚物的 GPC 色谱分离谱显示出单模态的峰。图 2 显示了 PEO-PHB-PEO 三嵌段共聚物与相应预聚物一起的典型 GPC 色谱图。PEO-PHB-PEO 三嵌段共聚物的分子量高于它的 PEO 和 PHB 前体,对应于 ABA 三嵌段结构。

全部该三嵌段共聚物是由 ^1H NMR 谱学来分析,它证实了该三嵌段共聚物既含有 PEO 又含有 PHB 嵌段,并且给定了共聚物的中间 PHB 嵌段的长度。图 3 显示了 PEO-PHB-PEO 三嵌段共聚物和它的前体预聚物的 ^1H NMR 谱。因为用于这一实施例中的两种 M-PEG-A 预聚物几乎是单分散的 (平均分子量/数均 (M_w/M_n) = 1.03), 在共聚物中 PEO 嵌段的分子量被认为等于它们的 M-PEO-A 预聚物。因此,在共聚物中 PHB 嵌段

的分子量能够从 PHB 和 PEO 链段的峰的积分之间的比率确定。

该 ^1H NMR 谱也提供了 PHB-二醇的定量反应的强有力证据。在图 3b 中, PHB 羟基末端单元的质子对于 c' 清楚地出现在 1.26 ppm (双重线) 处和对于 b' 出现在 4.25 ppm (多重线态) 处 (Li, J. 等人, Bull. Chem. Soc. Jpn. 70: 1887-1893 (1997); Li, J. 等人, Bull. Chem. Soc. Jpn. 71: 1683-1689 (1998)), 而乙二醇端基能够对于 d 在 3.84 ppm (三重线态) 处和对于 e 在 4.26 ppm (三重线态) 处看见 (Thomas, D. 等人, Macromol. Chem. Phys. 197: 1659-1614 (1996))。在图 3c 中, PHB 羟基末端单元的全部峰消失, 和乙二醇端基的那些峰变成在 4.32 ppm 处的单个峰, 证实了 M-PEO-A 共轭到 PHB-二醇。

表 1 给出了在这一实施例中合成的全部三嵌段共聚物的分子量, 分子量分布, 和组成 (嵌段长度和 PHB 含量 (重量))。通过使用 Mn 1820 和 4740 的 M-PEO-A 合成两个系列的三嵌段共聚物。各系列的三嵌段共聚物具有从几百到超过 5000 的中间 PHB 嵌段长度。三嵌段共聚物的固态性能取决于随后在下面部分中描述的在 PHB/PEO 嵌段长度之间的组成和比率。

表 1

共聚物	Mn ^a	Mw ^a	Mw/Mn ^a	嵌段长度 (Mn)		PHB 含量 (wt%)	
				PEO ^a	PHB ^b	NMR ^b	TGA ^c
PEO-PHB-PEO (2000-0500-2000)	4500	4730	1.05	1820	470	11.4	12.6
PEO-PHB-PEO (2000-3900-2000)	7290	8000	1.10	1820	3910	51.8	52.0
PEO-PHB-PEO (2000-5200-2000)	8120	9260	1.14	1820	5230	59.0	58.3
PEO-PHB-PEO (5000-0800-5000)	10390	11200	1.08	4740	780	7.6	8.4
PEO-PHB-PEO (5000-3800-5000)	12720	13770	1.08	4740	3820	28.7	29.7
PEO-PHB-PEO (5000-5500-5000)	13390	16250	1.21	4740	5490	36.7	38.2

(a) 由 GPC 测定。(b) 由 ^1H NMR 和 GPC 结果的结合来测定。(c) 从 TGA

结果计算。

PEO-PHB-PEO (2000-3900-2000) 和它的起始 PEO 和 PHB 前体的 FTIR 谱示于图 4 中。PHB 和 PEO 前体的全部特征吸收出现在该三嵌段共聚物的谱中。对于共聚物和 PHB 前体, 该羰基拉伸发生在 1723cm^{-1} 处。对于共聚物和 PEO 前体, 该醚拉伸发生在 1102cm^{-1} 处。在 963 和 843cm^{-1} 处的谱带已知是 PEO 的结晶相的特征。Bailey, J. 等人, 聚(环氧乙烷), Academic Press, New York (1976)。这两个峰出现在共聚物的谱中, 和它们的强度与 PEO 嵌段含量和它的结晶度有关。结果与从 DSC 和 XRD 得到的结果非常吻合, 这些将在下面部分中进行讨论。

c. 热稳定性

三嵌段共聚物的热稳定性通过使用热重分析 (TGA) 来评价。图 5 显示了三嵌段共聚物以及 PEO 和 PHB 前体的重量损失曲线。该 PEO-PHB-PEO 三嵌段共聚物经历分段的热降解。该 PHB 嵌段首先在大约 260°C 下开始降解, 然后该 PEO 嵌段在大约 350°C 下开始降解。应该指出, 在 PHB 嵌段已经在 $310-320^\circ\text{C}$ 下完成其降解之后, PEO 嵌段开始降解。因此, 三嵌段共聚物的组成和 PHB 含量能够从这一两步骤降解行为计算, 正如对于在表 1 中的各种分子量共聚物所列出的。该结果与从 ^1H NMR 获得的那些非常一致。从 TGA 测定的共聚物的每一嵌段发生 10% 的质量损失的温度列于表 2 中。结果表明该三嵌段共聚物具有比它们的前体更好的热稳定性。

表 2

聚合物样品	T_m (°C) ^a		ΔH_m (J/g) ^b		X_c ^c		T_d (°C) ^d	
	PEG	PHB	PEG	PHB	PEG	PHB	PHB	PEO
M-PEO-A (Mn 1820)	53.2		149.6		73.0			372.2
M-PEO-A (Mn 4740)	58.8		165.5		80.7			379.4
PHB-二醇 (Mn 3800)		155.2		78.2		53.3	269.1	
PEO-PHB-PEO (2000-0500-2000)	52.0		135.4		66.0		280.6	383.3
PEO-PHB-PEO (2000-3900-2000)	25.4	142.3	69.1	92.2	33.7	62.8	279.8	382.9
PEO-PHB-PEO (2000-5200-2000)	23.3	153.6	58.3	97.8	28.4	66.7	278.2	378.0
PEO-PHB-PEO (5000-0800-5000)	57.7		148.7		72.5		284.8	384.7
PEO-PHB-PEO (5000-3800-5000)	54.1	140.2	119.4	97.8	58.2	66.7	283.8	391.0
PEO-PHB-PEO (5000-5500-5000)	50.4	153.2	111.0	107.8	54.1	73.6	286.0	387.8

d. 固态行为

进行差示扫描量热法 (DSC) 和广角 X 射线衍射 (XRD) 研究, 以便获得与共聚物中 PEO 和 PHB 嵌段的微相分离和结晶有关的信息。图 6 和 7 显示了具有不同组成的该 PEO 和 PHB 前体和该 PEO-PHB-PEO 三嵌段共聚物的 DSC 温谱图。另外, 与每一嵌段的热转化和结晶度对应的数值列于表 3 中。PEO 和 PHB 两者都是结晶聚合物。对于具有短 PHB 嵌段的共聚物 PEO-PHB-PEO (2000-0500-2000) 和 PEO-PHB-PEO (5000-0800-5000), 没有观察到 PHB 熔化转变峰, 表明该 PHB 结晶相没有形成。随着 PHB 嵌段长度的减少, PHB 嵌段的熔化转变温度 (T_m) 会下降。PHB 嵌段的熔化焓和结晶度在共聚物中会显著地增加, 与纯 PHB-二醇相比, 推测由软 PEO 嵌段的存在所引起。相反, 在全部三嵌段共聚物中的 PEO 嵌段具有更低的熔化焓和更低的结晶度, 与纯 PEO 前体相比。随着在共聚物中 PHB 嵌段长度的增加, 或 PHB 的含量的增加, PEO 嵌

段的全部该熔化温度、熔化焓和结晶度都下降。这些可以由硬 PHB 嵌段所引起，它压抑了在共聚物中 PEO 嵌段的结晶。

表 3

共聚物	温度 (°C)	临界胶束形成 (cmc) (g/L)
PEO-PHB-PEO (2000-0500-2000)	23	2.0×10^{-1}
PEO-PHB-PEO (5000-0800-5000)	23	4.0×10^{-2}
PEO-PHB-PEO (5000-3800-5000)	23	1.3×10^{-2}

图 8 和 9 显示了在本研究中合成的该 PEO 和 PHB 前体和该 PEO-PHB-PEO 三嵌段共聚物的 XRD 图解。PHB 嵌段的反射峰没有在具有短 PHB 链段的共聚物的图中出现(图 8c 和 9c)，表明 PHB 结晶相没有形成。对于具有较长 PHB 链段的共聚物，该 PHB 嵌段形成分离的结晶相，类似于它的前体 PHB-二醇。PEO 嵌段的反射峰表明在共聚物中的 PEO 结晶相具有与其均聚物相似的结构。对于 PEO-PHB-PEO (2000-3800-2000) 和 PEO-PHB-PEO (2000-5500-2000) 来说该 PEO 反射峰都没有出现，因为 PEO 嵌段的熔化温度是大约环境温度(在该温度下测量 XRD) (参见表 2)。XRD 结果与 DSC 测量非常吻合。

e. PEO-PHB-PEO 三嵌段共聚物的胶束形成

具有较低 PHB 含量的三嵌段共聚物，如 PEO-PHB-PEO (2000-0500-2000)，PEO-PHB-PEO (5000-0800-5000) 和 PEO-PHB-PEO (5000-3800-5000)，是水溶性的。它们可以在水溶液中在低浓度下形成胶束，这已通过染料溶解度实验来证实。胶束形成的驱动力被认为是在该 PHB 嵌段之间的强烈疏水性相互作用。在水溶液中嵌段共聚物的临界胶束浓度 (cmc) 是由使用芘作为探针分子的荧光技术来测定的。表 3 列出了三种水溶性三嵌段共聚物在室温下的 cmc 值。已经发现，该 cmc 强烈地取决于在共聚物中 PHB 嵌段长度，即，具有较长 PHB 嵌段的共聚物具有低得多的 cmc，因为 PHB 嵌段强烈地倾向于在水溶液

中聚集。

实施例 2

三嵌段共聚物和环糊精配合和释放动力学

a. 包含配合物的形成

下面再次是有关 PEO-PHB-PEO 三嵌段共聚物的合成的图 1 的反应历程。简单地, 高分子量 PHB 首先转化成较低分子量的 PHB-二醇。PHB-二醇然后与 PEO-单羧酸 (M_r 5000) 偶合, 得到 PEO-PHB-PEO 三嵌段共聚物。制备两种三嵌段共聚物 PEO-PHB-PEO (5000-2300-5000) 和 PEO-PHB-PEO (5000-3850-5000) 并由 NMR、GPC、FT-IR 和 DSC 表征。两共聚物在室温下都是水溶性的。它们可以在水溶液中在低浓度下形成胶束, 这已通过使用 1, 3, 5-二苯基己三烯和芘的染料溶解度实验来证实。胶束形成的驱动力被认为是在该 PHB 嵌段之间的强烈疏水性相互作用所引起的。

尽管有胶束的形成, 但是两种聚合物在水中的 10 wt% 溶液以良好的流动性保持透明。通过将 9.7 wt % 的 α -CD 添加到任一聚合物溶液中, 在室温下发生凝胶化。对其它均聚 PEO 相比, 凝胶化能够用这一共聚物在较低浓度下诱导。尽管不希望受理论的束缚, 但可以假定, 由 α -CD 和 PEO-PHB-PEO 三嵌段共聚物的 PEO 嵌段形成的包含配合物 (inclusion complexes) 聚集成微晶, 它用作物理交联和诱导超分子聚合物网络的形成, 因此导致水凝胶的形成。PHB 嵌段的胶束化被认为在共聚物和 α -CD 溶液的凝胶化中起重要作用。在 PHB 嵌段之间的疏水性相互作用促进聚合物网络的形成。因此, PEO-PHB-PEO 三嵌段共聚物和 α -CD 在水溶液中的凝胶化的驱动力被认为是在 α -CD 和 PEO 嵌段之间的包含配合以及该三嵌段共聚物的 PHB 嵌段的胶束化的结合。

在水凝胶中在 PEO-PHB-PEO 共聚物的 PEO 嵌段和 α -CD 之间的包含配合物形成是由水凝胶的广角 X 射线衍射研究来证实的。水凝胶的衍射图显示了 α -CD-PEO 配合物的图案, 有多个尖锐的反射峰和在 $2\theta = 19.4^\circ$ ($d=4.57$ 埃) 处的初级峰, 表示了 α -CD 和 PEO 的结晶性链状配合物的通道型结构。Li J. 等人, *Macromolecules* 34: 7236 (2001); Li J. 等人, *Macromolecules* 34: 8829 (2001)。这一图案提示了 α -CD 和 PEO 嵌段的包含配合物的存在。固体 PEO-PHB-PEG 的

图案显示了在 13.7° ($d=6.46$ 埃) 和 17.2° ($d=5.16$ 埃) 的两个尖锐反射峰, 它们来自于该 PHB 结晶相。有趣地, PHB 结晶相的图案也出现在 α -CD-PEO-PHB-PEO (5000-3850-5000) 水凝胶的谱图中, 虽然它是弱的。应该指出的是, PEO-PHB-PEO (5000-3850-5000) 的 10 wt% 水溶液的 X 射线衍射图没有显示锐利的反射峰。结果表明, 该超分子体系变得更高度有序, 而 α -CD 配合物与 PEO 嵌段的自组合则增强了该 PHB 嵌段的聚集。

b. 释放动力学

为了说明这些水凝胶的稳定性和输送特性, 对作为模型蛋白质药物的异硫氰酸酯荧光素标签的牛血清清蛋白 (BSA-FITC, 分子量 67,000) 的活体外释放进行研究 (图 10)。本发明的 α -CD-PEO-PHB-PEO 水凝胶的释放特性与已知的 (先有技术) α -CD-PEO 均聚物水凝胶的释放特性进行对比。 α -CD-PEO 均聚物水凝胶, 甚至具有 20,000 的 PEO Mr, 在两天内容于磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中。相反, α -CD-PEO-PHB-PEO 水凝胶对于 BSA-FITC 显示出持续的释放动力学。有趣地, PHB 嵌段的分子量较小差别 (仅仅 1500Mr) 在释放速率上引起显著下降。 α -CD-PEO-PHB-PEO (5000-2350-5000) 持续释放 4 天, 而 α -CD-PEO-PHB-PEO (5000-3850-5000) 持续释放超过 5 天的较长时间。在两个星期之后 BSA-FITC 没有显著的释放。这些结果表明本发明的超分子水凝胶的各项性能能够用不同的共聚物来微调, 扩展了应用范围。一些 PEG 化的蛋白质药物也可以是活性组分, 和该 PEO 链可以牵涉在与 α -CD 的配合中, 它们可以进一步改进配制料的控制释放性能。水凝胶的流变性质的进一步研究表明, 该凝胶是触变的, 即, 当水凝胶被剪切时水凝胶的粘度会下降, 使得该控制释放配制料可通过注射针注射。

实施例 3

另一种型号药物的水凝胶释放动力学

a. α -CD-PEO-PHB-PEO 水凝胶的制备

通过首先将 0.090 克的 PBS 添加到在 0.6 mL 比色杯内的根据实施例 1 的程序合成的 0.060 克三嵌段 PEO-PHB-PEO 共聚物中来制备共聚物溶液或凝胶。然后含有 14.5% 的 α -CD 和 0.5% 的葡聚糖-FITC (分子

量 20,000) 的 0.30 克 PBS 溶液被添加到在比色杯内的 PBS-共聚物混合物中。该溶液彻底地混合,然后在室温下静置一夜。混合物在比色杯中形成水凝胶,然后它的活体外释放动力学按下面进一步描述的那样进行研究。这一程序通过一次使用 PEO-PHB-PEO (5000-5500-5000) 共聚物和一次使用 PEO-PHB-PEO (5000-3800-5000) 共聚物来进行。

b. 纯 PEO-PHB-PEO 水凝胶的制备

通过将 0.090 克的 PBS 添加到在 0.6 mL 比色杯内的根据实施例 1 的程序合成的 0.060 克三嵌段 PEO-PHB-PEO 共聚物中来制备共聚物溶液或凝胶。然后含有 0.5% 的葡聚糖-FITC (分子量 20,000) 的 0.30 克 PBS 溶液被添加到在比色杯内的 PBS-共聚物混合物中。该溶液彻底地混合,然后在室温下静置一夜。混合物在比色杯中形成水凝胶,然后它的活体外释放动力学按下面进一步描述的那样进行研究。这一程序通过一次使用 PEO-PHB-PEO (5000-5500-5000) 共聚物和一次使用 PEO-PHB-PEO (5000-3800-5000) 共聚物来进行。

c. 释放动力学

对于活体外释放动力学研究,含有包括葡聚糖-FITC 的各自水凝胶的各比色杯被倒置在具有 12 mL PBS 的试管中并在 37°C 水浴中培养。该 PBS 以预定的时间间隔加以改变。在各间隔释放的葡聚糖-FITC 的浓度通过使用荧光微板读出器来分析。

当按照以上程序时,发现 PEO-PHB-PEO (5000-5500-5000) 在有或没有 α -CD 下形成水凝胶。PEO-PHB-PEO (5000-3800-5000) 仅仅与 α -CD 形成,和没有 α -CD 的 PEO-PHB-PEO (5000-3800-5000) 的溶液保持为透明溶液,这被认为不适合于药物的持续释放。图 11 显示了葡聚糖-FITC 从水凝胶中的活体外释放分布图。 α -CD-PEO-PHB-PEO (5000-5500-5000) 和 α -CD-PEO-PHB-PEO (5000-3800-5000) 水凝胶两者在几个星期中显示出葡聚糖-FITC 的持续释放,而纯 PEO-PHB-PEO (5000-5500-5000) 水凝胶在短于一个星期中释放葡聚糖-FITC。结果表明, α -CD 不仅协助该 PEO-PHB-PEO 三嵌段共聚物的凝胶化,而且与三嵌段共聚物形成更稳定的水凝胶,以便在多个星期中实现药物的持续释放。该 α -CD-PEO-PHB-PEO (5000-5500-5000) 水凝胶显示出

比 α -CD-PEO-PHB-PEO (5000-3800-5000) 水凝胶更缓慢的释放速度, 表明该超分子水凝胶的性能能够根据本发明使用不同的 PHB 长度来微调。

实施例 4

使用 α -和 γ -环糊精的包含配合物形成

正如所指出的那样, 环糊精 (CD) 是由被 α -1, 4-配糖键连接的六个到八个葡萄糖单元组成的环状分子, 并分别命名为 α -、 β -和 γ -CD。CD 系列具有环形的几何结构, 界定了疏水性空腔。虽然 CD 类的疏水性空腔的深度是相同的 (大约 7.0 埃), 但是空腔的内径是不同的, 对于 α -是大约 4.5 埃, 对于 β -是大约 7.0 埃, 和对于 γ -CD 是大约 8.5 埃。Bender, M. 等, Cyclodextrin Chemistry, Springer-Verlag: Berlin (1978)。已经发现在聚合物链的横截面积和 CD 类的空腔尺寸之间的相互关系在 IC 形成中起着重要作用。参见, 例如, Harada, A. 等人, Nature 370: 126 (1994)。在下面描述的实验中, 制备在 PEO-PHB-PEO 三嵌段共聚物和 α -CD 或 γ -CD 之间的包含配合物 (IC) 并表征, 来说明它们在形成本发明的水凝胶中的用处。这些实验说明, α -CD 和 γ -CD 两者优选包括该 PEO 嵌段, 而中心 PHB 嵌段是仅仅部分地被 CD 分子覆盖。

a. 包含配合物的制备

使用以上实施例 1 的程序制备 PEO-PHB-PEO 三嵌段共聚物。为这一实验制备的三嵌段共聚物的分子特征提供于表 4 中。PEO-PHB-PEO 三嵌段聚合物 (20 mg) 用 0.06 mL 的 H_2O 在室温下浸泡一夜。然后, 添加 3.0 ml 的 α -CD 或 γ -CD 的饱和水溶液, 和各混合物在水浴中声波处理 10 分钟, 随后在室温下静置 2 天。沉淀的产物通过离心作用被收集, 然后用水和丙酮洗涤。最后, 该产物在真空中在 $70^\circ C$ 下干燥 2 星期。

表 4

共聚物	Mn ^a	Mw ^a	Mw/Mn ^a	嵌段长度 (Mn)		T _m (C) ^c	
				PEO ^a	PHB ^b	PEO	PHB
PEO-PHB-PEO (2000-3900-2000)	7290	8000	1.10	1820	3910	25.4	142.3
PEO-PHB-PEO (2000-5200-2000)	8120	9260	1.14	1820	5230	23.3	153.6
PEO-PHB-PEO (2000-6800-2000)	9690	11770	1.21	1820	6840	25.3	155.2

(a) 由 GPC 测定。(b) 由 ¹H NMR 和 GPC 结果测定。(c) 在 DSC 第二升温轮次中测定。

b. 测量

通过使用 Siemens D5005 衍射计和 Ni-过滤的 Cu K α (1.540 51 埃) 辐射 (40kV, 40 mA) 进行 X 射线衍射 (XRD) 测量。粉末样品被装在试样容器上并以 1 秒/每步骤, 以 0.01 步进长度从 5° 扫描到 35° (2 θ)。

差示扫描量热法 (DSC) 测量通过使用装有自冷却配件的和用铟校正的 TA 仪器 2920 差示扫描量热计来进行。下列规程用于各样品: 以 20°C min⁻¹ 从室温加热到 200°C, 在 200°C 下维持 2 分钟, 以 5°C min⁻¹ 从 200°C 冷却至 -30°C, 和最终以 5°C min⁻¹ 从 -30°C 再加热到 200°C。在第二加热轮次中收集数据。转变温度被取作峰顶点。热重分析 (TGA) 通过使用 TA 仪器 SDT 2960 来进行。样品在动态氮气氛 (流速=70 ml min⁻¹) 中以 20°C min⁻¹ 从室温加热至 800°C。

配合物的 ¹H NMR 谱在 400 MHz 下被记录在 Bruker DPX-400 NMR 谱仪上。配合物的化学位移参比于 DMSO 的 $\delta = 2.50$ ppm。在室温下在 Bruker DPX-400 NMR 谱仪上获取 ¹³C CP/MAS NMR 谱, 其中样品纺丝速率为 8.0 kHz。该谱是以 2.75 μ s 质子 90° 脉冲, 3 毫秒接触时间, 和 3 秒重复时间来获取。

傅里叶转换红外 (FTIR) 谱是在 Bio-Rad 165 FTIR 分光光度计上记录的; 64 次扫描是在室温下以 2cm⁻¹ 的分辨率作信号平均的。通过将配合物分散在 KBr 中和将混合物压缩成盘来制备样品。

c. 结果和讨论

当 α -CD 或 γ -CD 的水溶液被添加到已用水浸泡的 PEO-PHB-PEO 三嵌段共聚物中并用声波处理 10 分钟时, 配合物形成为晶状沉淀。沉淀物的外观是在共聚物和 CD 之间晶体包含配合物(IC)的形成的指示。Harada, A. 等人, *Macromolecules*, 26: 5698(1993)。比较起来, 甚至在放置 2 星期之后在 β -CD 和 PEO-PHB-PEO 三嵌段共聚物溶液的混合物中没有形成沉淀物。这一观察表明该 PEO-PHB-PEO 三嵌段聚合物能够与 α -CD 和 γ -CD 形成 IC, 但不能与 β -CD 形成 IC。IC 形成的产量示于表 5 中。

表 5

共聚物	产量 (mg)		CH ₂ CH ₂ O/CD	
	α	γ	α	γ
PEO-PHB-PEO (2000-3900-2000)	75.0	60.6	1.2	2.1
PEO-PHB-PEO (2000-5200-2000)	67.9	56.3	1.4	2.6
PEO-PHB-PEO (2000-6800-2000)	65.8	60.0	1.1	2.3

CD-PEO-PHB-PEO IC 的形成强烈地受到 X 射线衍射(XRD)研究支持。图 12 显示了纯 PEO-PHB-PEO (2000-5200-2000), 以及 α -CD 与全部三种 PEO-PHB-PEO 三嵌段共聚物的 IC 的 XRD 图案, 与由 α -CD 和 PEO (Mn 2000) 形成的 IC 对比。在图 12e 中, 在 $2\theta=19.4^\circ$ 和 22.1° 处有两个主峰的多个尖锐反射峰提示了 α -CD 和 PEO 的结晶性项链状配合物的通道型结构。参见, 例如, Takeo, K. 等人, *Agric. Biol. Chem.*, 34: 1787(1970)。 α -CD-PEO-PHB-PEO IC 的类似衍射图的观察结果(图 12b-d)表明该 α -CD-PEO-PHB-PEO IC 属于与 α -CD-PEO IC 的结构类似的通道型结构。当与 α -CD-PEO IC 对比时, 在 $2\theta=13.6^\circ$ 和 17.0° 处的两个额外的小峰在 α -CD-PEO-PHB-PEO IC 的图案中出现。随着在 PEO-PHB-PEO 中 PHB 与 PEO 的比率提高, 两个峰的相对强度会增大。对于纯 PEO-PHB-PEO, 如图 12a 中所示, 在 13.6° 和 17.0°

° 处的峰是结晶性 PHB 的特征。因此，两个峰的存在被认为表示 PHB 嵌段的一部分聚集成结晶相，它与 IC 晶体共存。

γ -CD-PEO-PHB-PEO IC 的 XRD 图案示于图 13 中，与纯 PEO-PHB-PEO 和 γ -CD- PPO IC 的那些对比。虽然各峰的相对强度是不同的，但是 γ -CD-PEO-PHB-PEO IC 的 XRD 图案彼此非常类似并也类似于 γ -CD-PPO IC 的图案，其中建立了通道型结构。此外，观察到在 7.6° 处的特征峰，它是用作 γ -CD-聚合物 IC 的通道型结构的指纹谱的关键特征。参见，例如，Harada, A. 等人, *Macromolecules*, 29: 5611 (1996)。因此， γ -CD-PEO-PHB-PEO IC 被认为属于通道型结构。归属于结晶性 PHB 嵌段的在 $2\theta = 13.6^\circ$ 和 17.0° 处的两个峰也在 γ -CD-PEO-PHB-PEO IC 的 XRD 图案中观察到，与在 α -CD-PEO-PHB-PEO IC 中一样。与化学计量 α -CD-PEO 和 γ -CD- PPO IC 相比 α -CD-PEO-PHB-PEO 和 γ -CD-PEO-PHB-PEO IC 的变宽 XRD 图案(图 12e 和图 13e) 应归于 IC 的较低结晶度，很可能由未覆盖的 PHB 链段所引起，该链段“破碎”和缩短了 IC 中的通道。

纯 PEO-PHB-PEO (2000-5200-2000) 和 α -CD-PEO-PHB-PEO IC 的 DSC 曲线示于图 14 中。如图 14a 中所示，在纯 PEO-PHB-PEO (2000-5200-2000) 的 DSC 曲线中有两个分别在 23.3°C 和 153.6°C 处的吸热峰，分别对应于 PEO 和 PHB 嵌段的晶体熔化。在 IC 的形成之后，对应于 PEO 嵌段的吸热峰在图 14b-14d 中不存在。这是因为该 PEO 嵌段独立地包括在宿主 α -CD 晶格的通道内，和不能聚集形成结晶相。然而，对应于 PHB 嵌段的吸热峰仍然看得见(图 14b-14d)。但是，熔化温度移到较低范围，和焓变化导致该 α -CD-PEO-PHB-PEO IC 的显著下降。结果表明各 PHB 嵌段部分地被 α -CD 覆盖，和很可能该 PHB 嵌段的中间部分没有被 α -CD 配合。熔化温度的下降和焓变应归于因 PHB 嵌段的部分包合所引起的结晶的干扰。Shuai, X. 等人(*Macromolecules*, 35: 3778 (2002)) 已经报导了在 DMSO 中在聚[(R)-3-羟基丁酸酯]和 α -CD 之间的 IC 的形成。它们的结果表明 PHB 链仅仅部分地被 α -CD 包括。对于本发明的体系， α -CD 穿线于 PHB 嵌段上仍然受到 PHB 的疏水性妨碍，随后穿线于 PEO 嵌段上的 CD 能够进一步滑动到中心 PHB 嵌段上。在该 α -CD-PEO-PHB-PEO IC 上，随着中间 PHB 嵌段的链长度的增加，熔化温度和焓变倾向于提高。这是因为具有较长 PHB 嵌段的该 α

-CD-PEO-PHB-PEO IC 具有 PHB 链的较长未配合部分。

图 15 显示纯 PEO-PHB-PEO (2000-5200-2000) 和 γ -CD-PEO-PHB-PEO IC 的 DSC 曲线。获得了与图 14 的那些结果类似的结果。 α -CD-PEO-PHB-PEO 和 γ -CD-PEO-PHB-PEO IC 两者的全部 DSC 结果表明, PEO 嵌段完全地被 CD 覆盖, 而中心 PHB 嵌段部分地被覆盖, 它与 XRD 结果一致。

图 16 显示 α -CD 和 α -CD-PEO-PHB-PEO (2000-5200-2000) IC 的 ^{13}C CP/MAS NMR 谱。在未配合状态下的 α -CD 的谱显示了 C1 和 C4 的多个分辨共振。尤其在该谱中观察到与单个构象应变的配糖键邻近的 C1 和 C4 的共振。结果表明该 α -CD 在晶体未配合状态下具有较少对称的构象。相反地, 对于 α -CD-PEO-PHB-PEO (2000-5200-2000) IC, CD 的全部 C1-C6 显示单个未分辨的共振, 表明 α -CD 采取了更对称的构象和 α -CD 的各葡萄糖单元在 IC 中处于类似的环境中。

中心 PHB 嵌段被 α -CD 或 γ -CD 的部分覆盖也由 CD-PEO-PHB-PEO IC 的 ^1H NMR 谱验证。图 17 显示了在 DMSO- d_6 中 α -CD-PEO-PHB-PEO (2000-5200-2000) 的 ^1H NMR 谱。如图 17 中所示, 证实了属于 α -CD 和 PEO-PHB-PEO (2000-5200-2000) 两者的全部质子信号。在结晶 IC 中各成分的比率能够通过对比这些峰的积分来测定。如前面所报导, PEO 能够与 α -CD 和 γ -CD 形成包含配合物, 其中 PEO 重复单元与 CD 的比率分别是 2 和 4。参见, 例如, Harada 等人 (1994)。然而, 对于 α -CD-PEO-PHB-PEO (2000-5200-2000) IC 从图 17 获得的 PEO 重复单元与 α -CD 的比率是 1.4, 表明在 α -CD-PEO-PHB-PEO (2000-5200-2000) IC 中含有更多的 α -CD 分子, 而不是形成 α -CD 和 PEO 嵌段的化学计量配合物。另一方面, 该固态 ^{13}C CP/MAS NMR 测量显示, 在 IC 中的全部 α -CD 已经穿线于聚合物链上并采取通道结构。因此, 一些 α -CD 被认为滑移到中间 PHB 嵌段上。对于全部试验的 CD-PEO-PHB-PEO IC 的 PEO 重复单元与 CD 的比率总结于表 5 中。对于 IC 与 γ -CD 的情况, 比率是在 2.1 和 2.6 之间, 它表明一些 γ -CD 分子也滑动到该中心 PHB 嵌段之上。这些结果进一步支持了以下假设: PEO 嵌段被 α -CD 或 γ -CD 完全地覆盖, 而中心 PHB 嵌段在 CD-PEO-PHB-PEO IC 中被部分地覆盖。

图 18 显示了该 α -CD-PEO-PHB-PEO IC 的 FTIR 谱, 与纯 PEO-

PHB-PEO (20-52-20)和 α -CD相比。 α -CD的谱显示了由于对称和反对称的O-H伸缩方式所引起的在 3360cm^{-1} 的宽谱带。在IC的形成之后,在IC的谱中宽的羟基谱带迁移到在 3390cm^{-1} 的更高频率(图18b和c),最可能归因于在通道结构中在CD的羟基之间的氢键的形成。纯PEO-PHB-PEO (2000-5200-2000)的FTIR谱体现特征于在 1723cm^{-1} 处的增强的羰基拉伸谱带(图18a),它归属于在PEO-PHB-PEO (2000-5200-2000)中PHB部分。该羰基拉伸谱带被分辨成在 1723cm^{-1} 的增强的谱带和在 1736cm^{-1} 的弱肩峰,分别对应于结晶性PHB相的羰基拉伸谱带和无定形PHB区域的谱带。Ikejima, T.等人, *Macromol. Chem. Phys.*, 200: 413 (1999)。

图19显示了这些FTIR谱的羰基拉伸区域的扩大。与纯PEO-PHB-PEO (2000-5200-2000)对比,在 α -CD-PEO-PHB-PEO (2000-5200-2000)和 γ -CD-PEO-PHB-PEO (2000-5200-2000)的谱中,在 1723cm^{-1} 处的峰急剧地降低,与此同时在 1736cm^{-1} 处的肩峰急剧地提高。当形成IC时,一些PHB链段各个地位于IC通道中和因此不能聚集形成PHB晶体。在 1723cm^{-1} 处峰的存在表明仅仅一部分该PHB嵌段已经被CD覆盖和剩余PHB链段仍然聚集形成结晶相。这与以上讨论的XRD和DSC结果一致。

图20显示了 α -CD,纯PEO-PHB-PEO (2000-5200-2000)和它们的IC一直到 450°C 的热重分析(TGA)扫描的结果。如图20中所示, α -CD开始在 279.2°C 下分解。纯PEO-PHB-PEO (2000-5200-2000)显示出58.7%的初始重量损失而在加热时39.3%的第二次重量损失,其中分别在 222.4°C 和 243.8°C 下热分解开始。相信,第一次重量损失应归于PHB嵌段的分解和第二次重量损失应归于PEO嵌段。然而,在 α -CD-PEO-PHB-PEO IC中PHB嵌段,PEO嵌段和 α -CD的分解的开始分别在 247.2°C , 309.3°C 和 365.8°C 下观察到。它们全部分别高于在PEO-PHB-PEO (2000-5200-2000)中PHB和PEO嵌段和该纯 α -CD的那些。 α -CD-PEO-PHB-PEO IC的较高分解温度被认为应归于配合物形成对于 α -CD和PEO-PHB-PEO两者的热稳定性的贡献。对于 γ -CD-PEO-PHB-PEO IC也观察到类似的结果。

实施例 5

PEO-PHB-PEO 共聚物胶束表征

在含水介质中从根据实施例 1 的总体程序生产的 PEO-PHB-PEO 共聚物形成胶束, 然后表征, 如下所述:

a. 原料

天然来源聚[(R)-3-羟基丁酸酯] (PHB) 是从 Aldrich 购买的。通过溶于氯仿中, 随后过滤和在使用前在石油醚中沉淀, 来提纯 PHB 样品。该提纯 PHB 的 M_n 和 M_w 分别是 8.7×10^4 和 2.3×10^5 。具有大约 5000 分子量的甲氧基-聚(环氧乙烷)单丙酸 (M-PEO-A) 是从 Shearwater Polymers, Inc., USA 商购的。M-PEO-A 的 M_n 和 M_w 分别被测得是 4740 和 4880。双(2-甲氧基乙基)醚 (Diglyme, 99%), 乙二醇 (99%), 二月桂酸二丁锡 (95%), 1,3-N,N'-二环己基碳二亚胺 (DCC, 99%), 4-(二甲基氨基)吡啶 (DMAP, 99%), 琥珀酸酐 (97%), 和三乙胺 (99%) 是从 Aldrich 获得的。二甘醇二甲醚用分子筛干燥, 和二氯甲烷从 CaH_2 中馏出, 之后使用。

b. 纯 PEO-PHB-PEO 水凝胶的制备

具有低分子量的链端羟基化 PHB (PHB-二醇) 预聚物是从天然 PHB 和二甘醇与作为催化剂的二月桂酸二丁锡在二甘醇二甲醚中的酯基转移程序制备的 (产率, 80%)。该 PHB-二醇 (0.38 g, 1.2×10^{-4} mol, $M_n = 3220$), M-PEO-A (1.42 g, 3.0×10^{-4} mol, $M_n = 4740$), 和 DMAP (12 mg, 9.8×10^{-5} mol) 在 50ml 两颈烧瓶中在真空和 60°C (油浴) 下干燥一夜。无水二氯甲烷 (25-30 ml) 被添加到该烧瓶中, 然后通过蒸馏 (油浴, 75°C) 被除去, 以除去在该体系中的任何痕量水。

当烧瓶冷却时, 溶于 4 mL 无水二氯甲烷中的 DCC (0.098 g, 4.7×10^{-4} mol) 被添加进去, 和混合物在室温下和在氮气氛围中被搅拌一夜。沉淀的二环己脲 (DCU) 被过滤除去。聚合物两次从二乙醚中沉淀。所想望的三嵌段共聚物产物, 再溶解在甲醇或氯仿中, 进一步通过分馏来提纯。产量: 0.75 g, 56%。GPC (THF): $M_n = 12720$, M_n (PHB 嵌段) = 3820, M_n (PEO 嵌段) = 4740, $M_w = 13770$, $M_w/M_n = 1.08$ 。 $T_m = 54^\circ\text{C}$ (对于 PEO 嵌段) 和 140°C (对于 PHB 嵌段)。 $^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3): δ 5.29 (m, PHB 嵌段的次甲基 H), 4.32 (s, $-\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{COO}-$),

3.68 (s, PEO 嵌段的 $-\text{CH}_2\text{OCH}_2-$), 3.42 (s, $-\text{OCH}_3$ 端基), 2.48–2.67 (m, PHB 嵌段的亚甲基 H), 1.31 (d, PHB 嵌段的甲基 H)。IR (KBr): 2886, 1723, 1456, 1380, 1280, 1111, 1061, 962, 842, 516 cm^{-1} 。

c. 聚合物表征

凝胶渗透色谱法 (GPC) 分析是用装有串联的两根 Phenogelut 50 和 1000A 柱 (尺寸: $300 \times 4.6 \text{ mm}$) 的 Shimadzu SCL-10A 和 LC-8A 系统, 和 Shimadzu RID-10A 折光率检测器来进行的。THF 以 0.30 mL/分钟的流速在 40°C 下用作洗脱剂。单分散的聚(乙二醇)标准物用于获得校正曲线。该 ^1H NMR 谱在室温下在 400MHz 下被记录在 Bruker AV-400 NMR 谱仪上。该 ^1H NMR 测量是以 3.2 秒的截获时间, 2.0 秒的脉冲重复时间, 30° 脉冲宽度, 5208-Hz 谱宽, 和 32K 数据点来进行的。化学位移涉及溶剂峰 ($\delta = 7.3 \text{ ppm}$, 对于 CHCl_3)。

d. 荧光光谱学

稳态荧光光谱记录在 Shimadzu RF-5301PC 荧光光谱仪 (spectrofluorophotometer) 上。在 373 nm 下监测激发光谱。激发和发射侧两者的隙缝宽度维持在 1.5 nm。通过将预定量的嵌段共聚物溶于已知浓度的芘水溶液中来制备样品溶液, 和该溶液静置 1 天以进行平衡。

e. 结果和讨论

使用染料吸收技术来研究 PEO-PHB-PEO 三嵌段共聚物的胶束形成。在水溶液中 PEO-PHB-PEO 三嵌段共聚物的临界胶束浓度 (cmc) 值是由使用作为探针分子的芘的荧光激发光谱来测定的。Wilhelm, M. 等人, *Macromolecules* 24: 1033–1040 (1991); Noda, T. 等人, *Macromolecules* 33: 3694–3704 (2000)。这一方法是, 当芘溶于胶束相中时, 以在水中的芘的 0-0 最大吸收从 334 nm 迁移到 337 nm 为基础的。

图 21 显示在各种浓度的 PEO-PHB-PEO 共聚物下, 在水中芘的激发光谱。随着共聚物浓度的增加, 观察到 0-0 吸收谱带从 334 到 337 nm 的红移。

图 22 显示了芘激发光谱的 I_{337}/I_{334} 的强度比与共聚物浓度的对数的关系。 I_{337}/I_{334} vs. $\text{Log } C$ 描述曲线代表了 S 形曲线。在低浓度范围观察到 I_{337}/I_{334} 的强度比的可以忽略的改变。随着共聚物浓度的提高, 该强度比在某些浓度下显示出显著提高, 反映芘引入到胶束的疏水性核心区域。因此, 该 cmc 值是在图 22 中的低浓度范围下从交叉点测定的。非常低的 cmc 值 (1.4×10^{-5} g/mL) 表明三嵌段共聚物有强烈的趋势在含水环境中形成胶束。

胶束的形成出乎意料地被认为是对温度不太敏感的。如图 23 中所示, 在 15 到 45°C 的温度范围, 该 I_{337}/I_{334} 比率主要地取决于共聚物浓度, 而不是温度。因此, PEO-PHB-PEO 三嵌段共聚物的胶束形成是对温度不太敏感的。这与具有中间聚(α -羟基链烷酸)和侧翼有由 PLLA 或 PGA 组成的 PEO 嵌段的三嵌段共聚物(它们通常是热敏感的)十分不同。Jeong (2002); Kissel (2002); Jeong (1997); Jeong (1999)。尽管不希望受理论的束缚, 该发明人相信 PHB 具有比聚(α -羟基链烷酸)更高的结晶度和疏水性, 因此在嵌段共聚物中 PHB 链段的自组合的趋势是更强的和不取决于该温度变化。

总之, 已经说明了新型可生物降解的两亲性 PEO-PHB-PEO 三嵌段共聚物的对温度不敏感的胶束形成。虽然 PHB 具有与 PLLA 相关的化学结构, 但是 PEO-PHB-PEO 三嵌段共聚物的胶束行为完全不同于 PEO-PLLA-PEO 三嵌段共聚物。用该 PEO-PHB-PEO 三嵌段共聚物形成的该胶束, 它在低温下难以离解和在高温下不易聚集成较大尺寸, 因此是更稳定的和容易处置的。

实施例 6

α -CD-PEO-PHB-PEO 水凝胶的活体内组织生物相容性

根据实施例 2 的程序从 α -CD 和 PEO-PHB-PEO (5000-2000-5000) 形成的水凝胶经关节内注入到三个兔子的膝关节中。磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 用作负对照。该动物在注射后的 7 天被杀死。取下膝关节和由显微解剖学来考察。样品是在遮暗的条件下评价。

在兔膝关节中水凝胶的活体内生物相容性试验的代表性结果示于图 24a (PBS 对照) 和 24b (α -CD-PEO-PHB-PEO 水凝胶) 中。虽然如在图 24b 中的放映幻灯片中所示, 在暴露于 α -CD-PEO-PHB-PEO 水凝胶的

滑膜中有轻微的纤维化，但是在这两种样品之间没有显著差异。全面分析表明在水凝胶的注入之后在关节滑膜中没有明显地发炎性渗入。该结果显示了水凝胶在兔膝关节中的生物相容性。在注射了水凝胶和PBS的膝之间没有在组织和形态上的重大差别。

尽管已经说明和描述了本发明的优选实施方案，但是应该认识到，在不脱离本发明的精神和范围的前提下能够有各种变化。

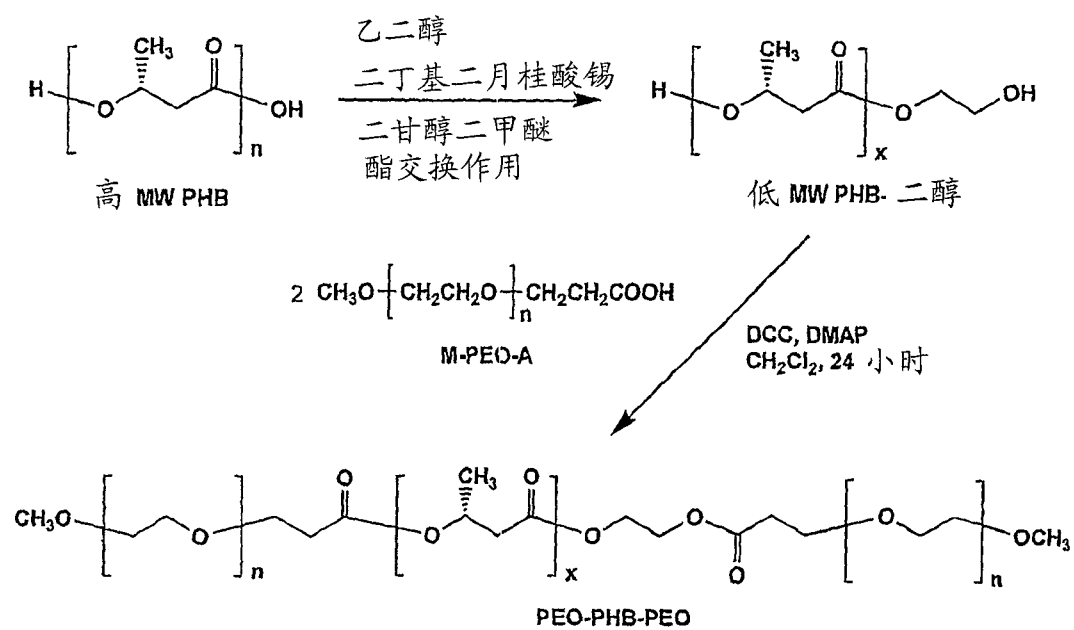


图 1

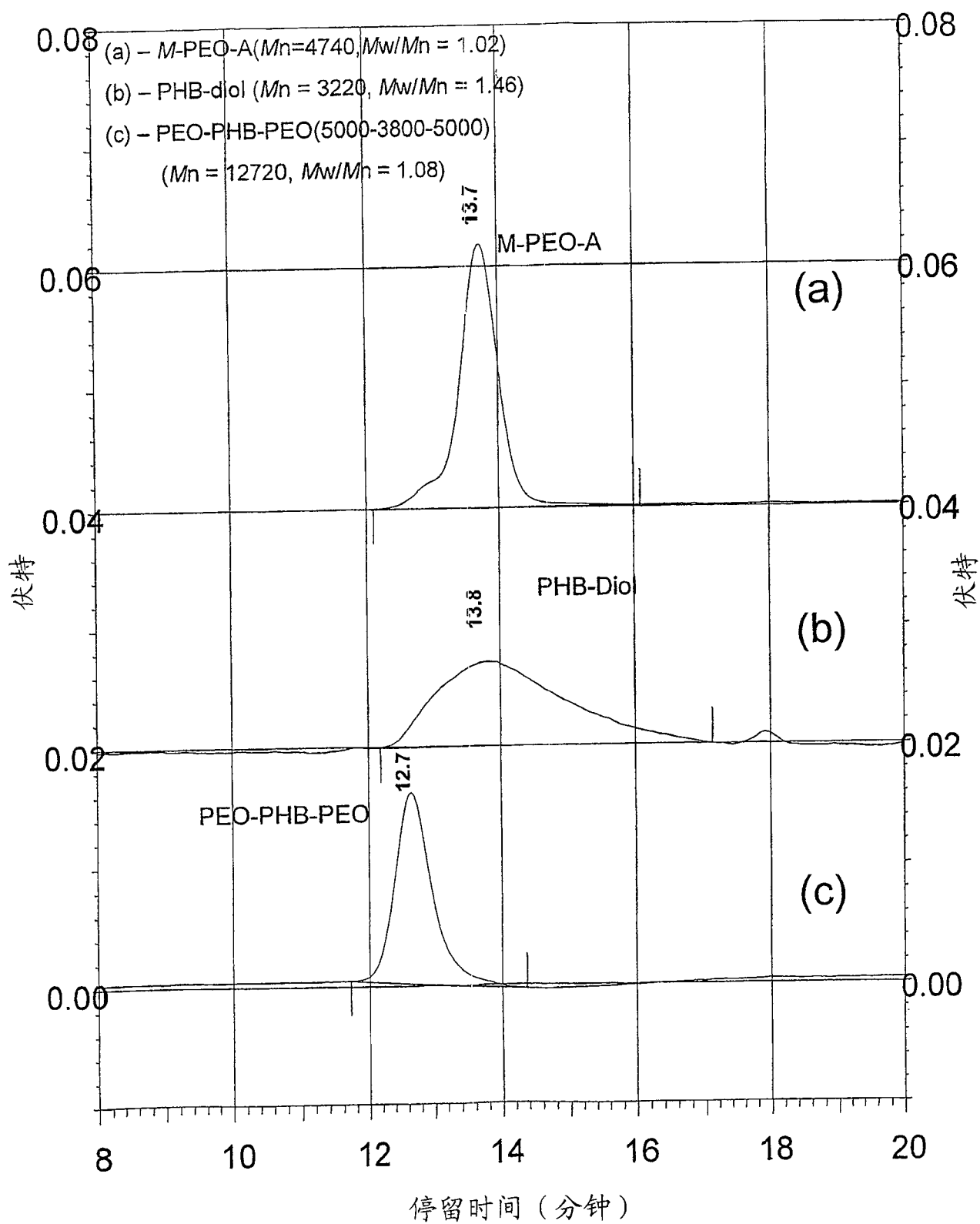


图 2

- (a) - M-PEO-A (M_n 4740)
 (b) - PHB-二醇 (M_n 3220)
 (c) - PEO-PHB-PEO
 (5000-3800-5000)

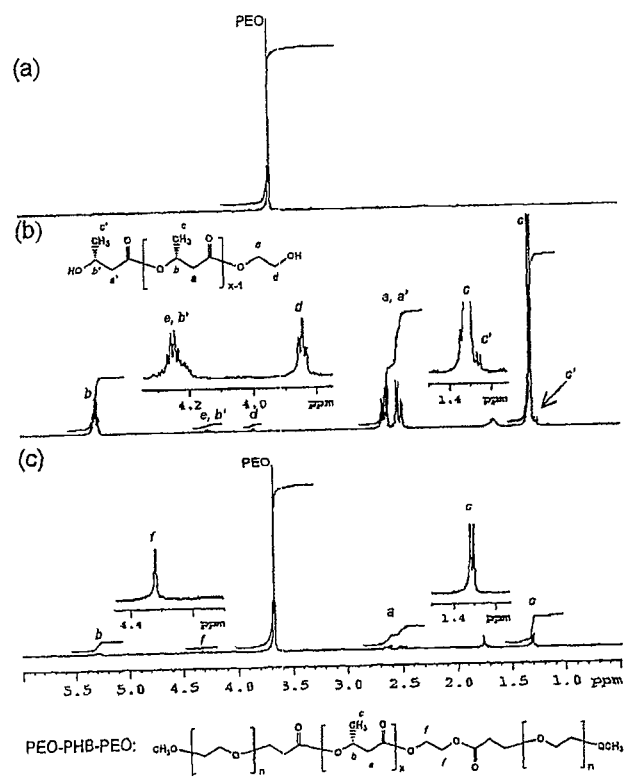


图 3

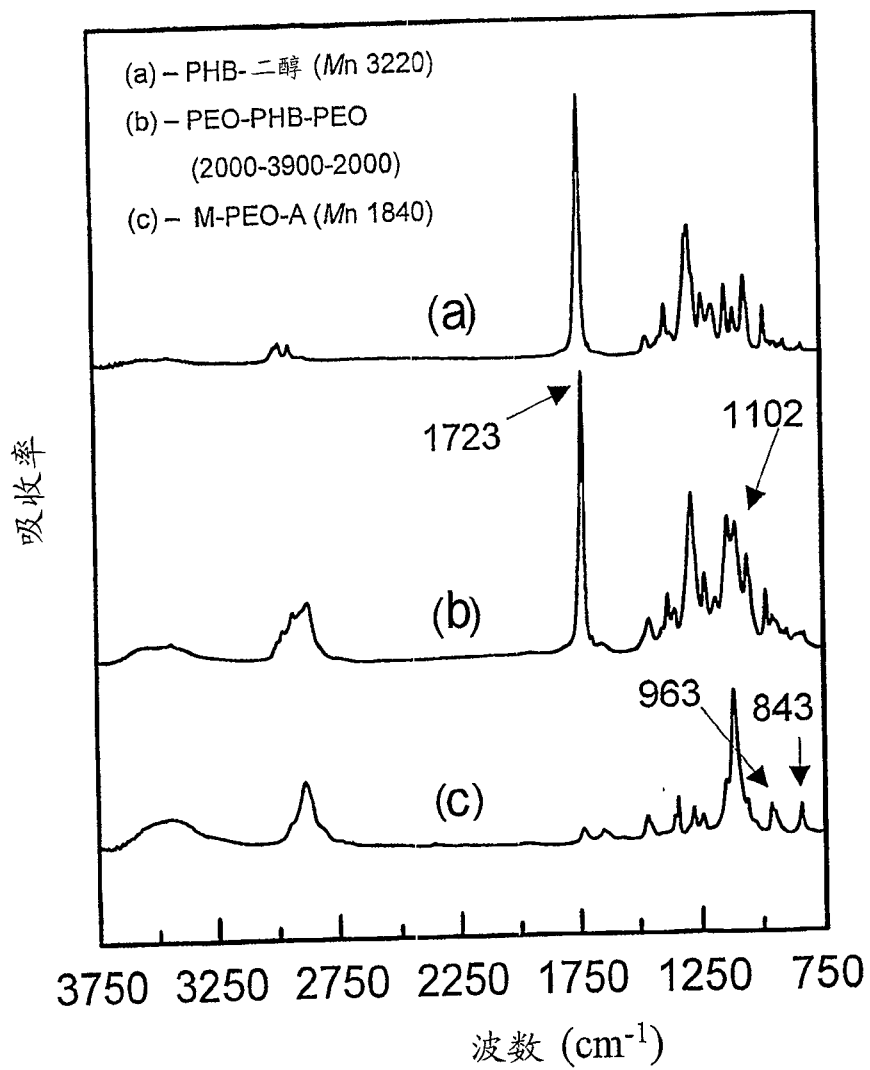


图 4

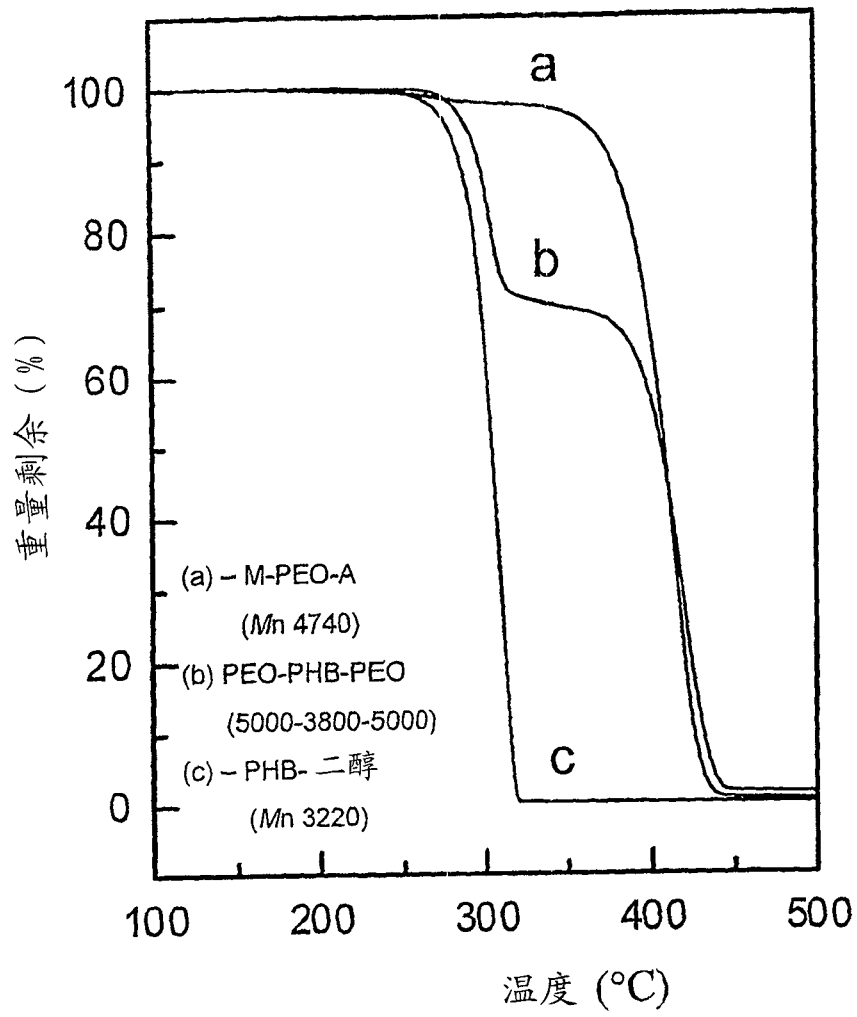


图 5

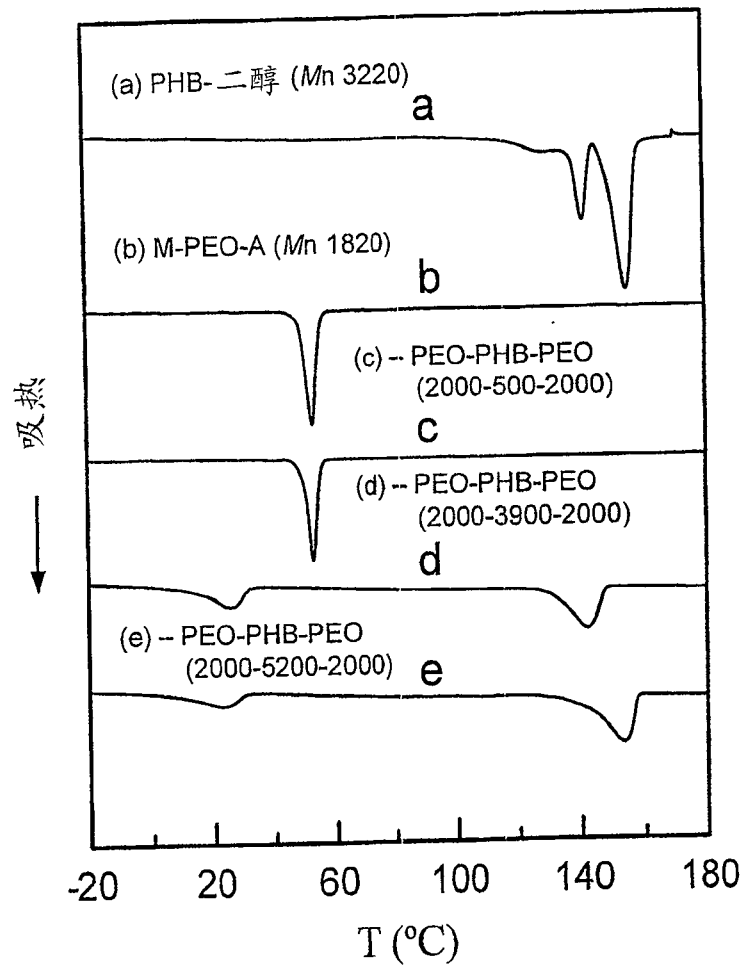


图 6

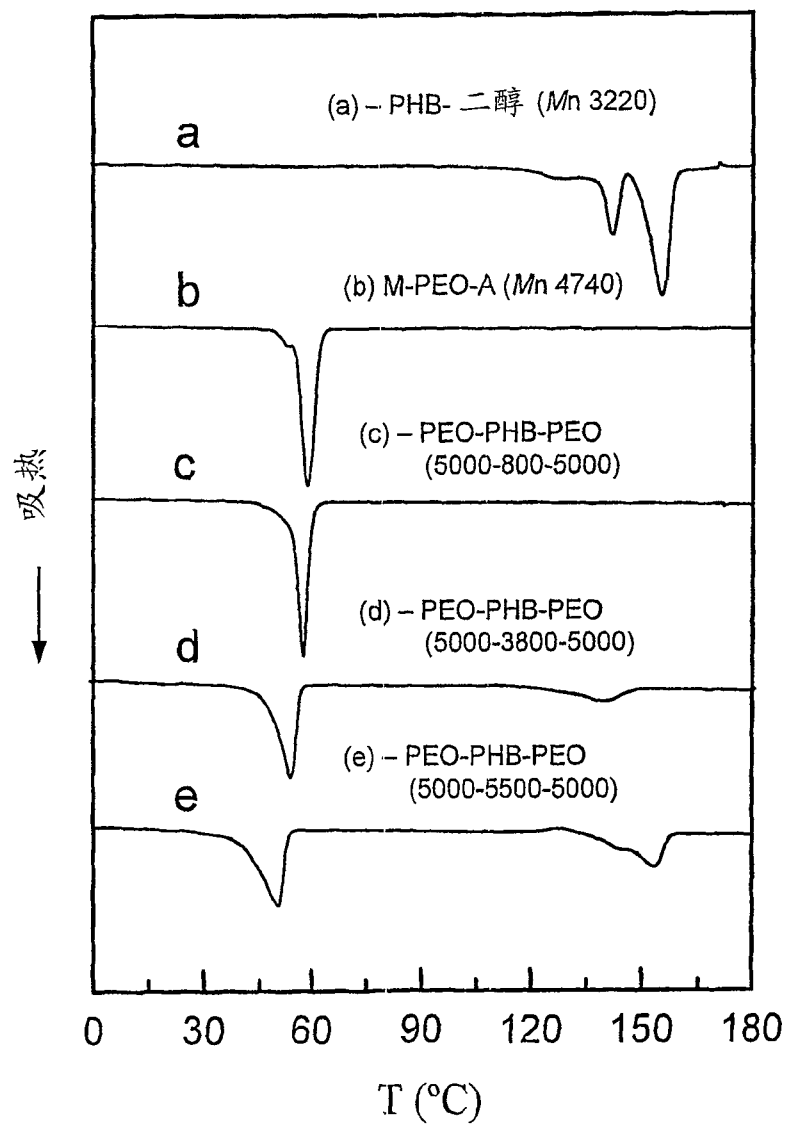


图 7

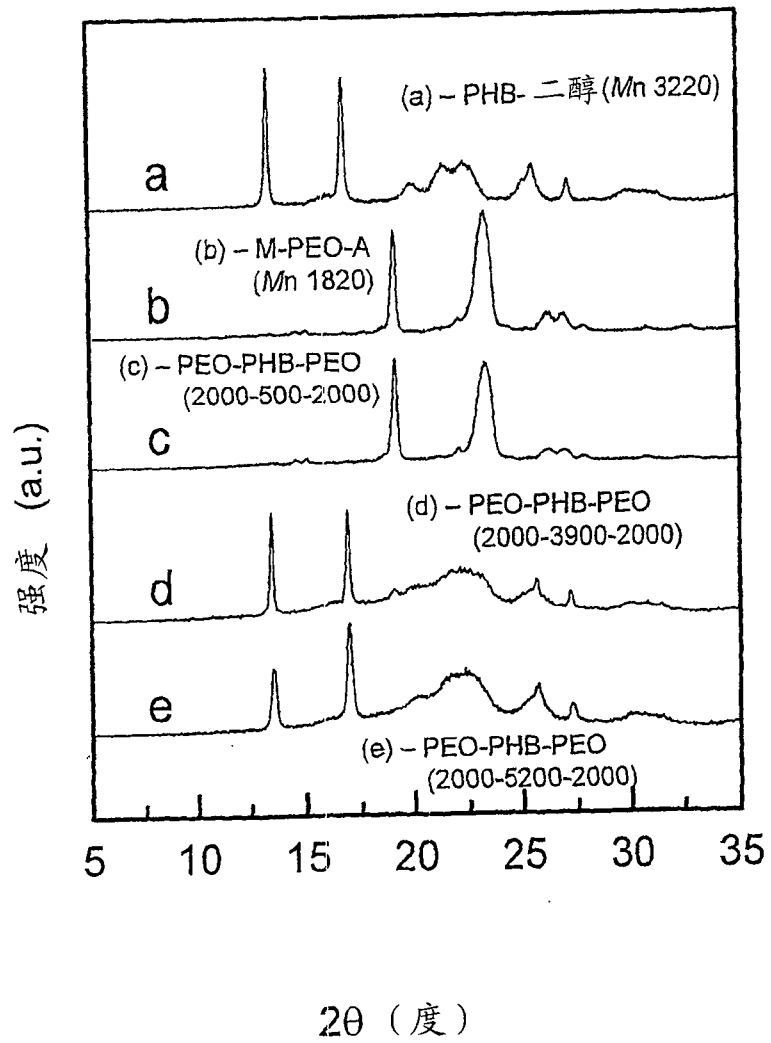


图 8

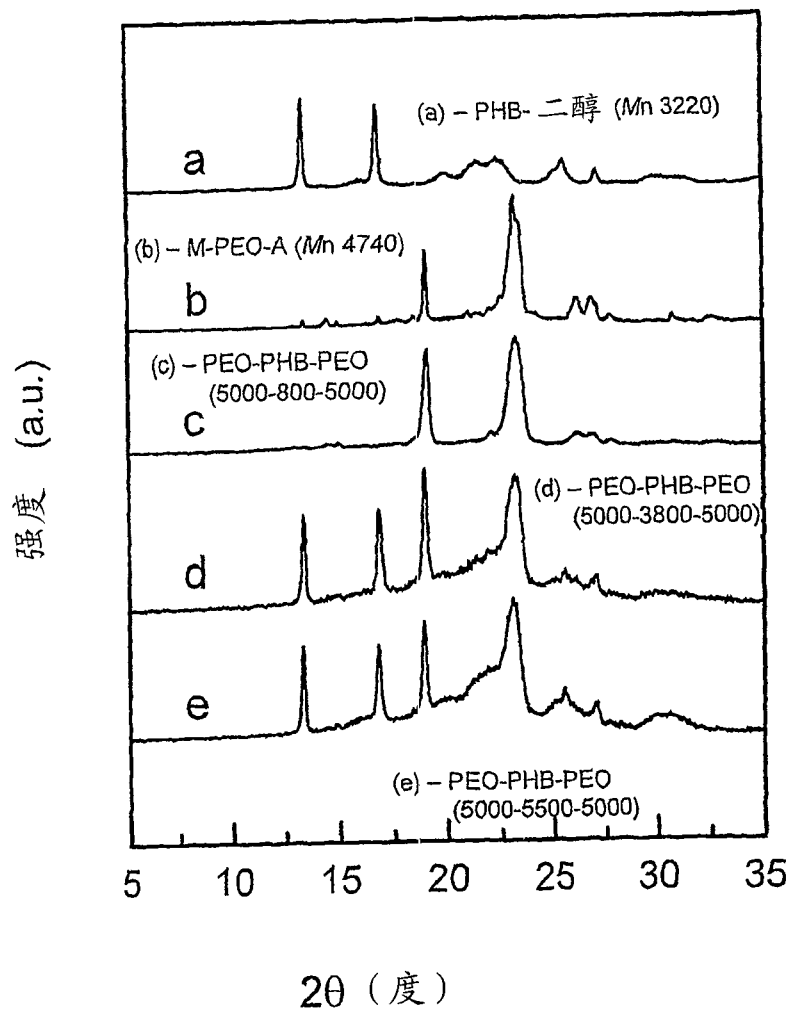


图 9

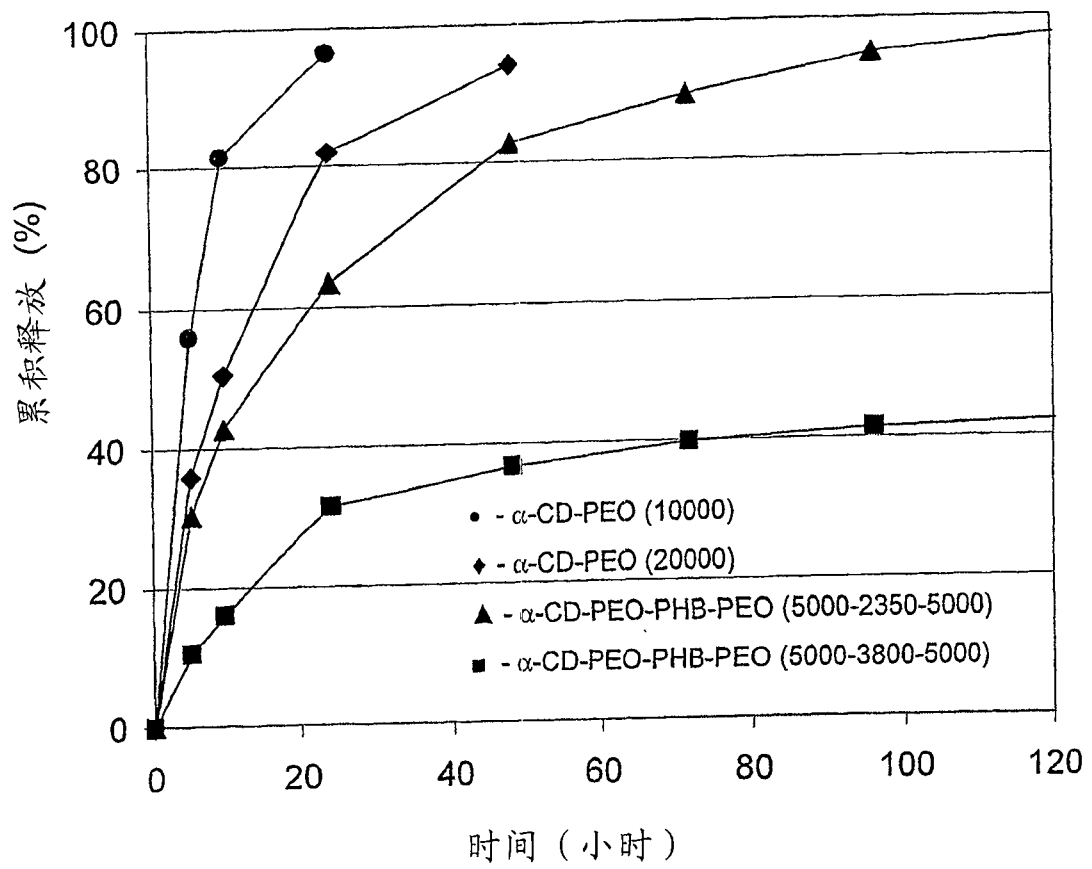


图 10

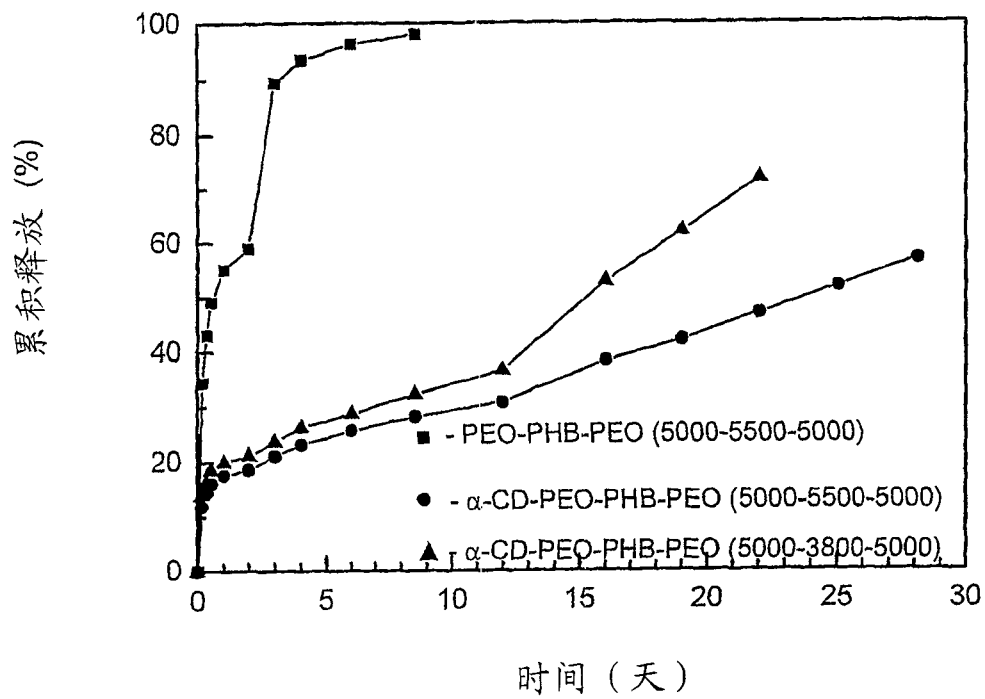


图 11

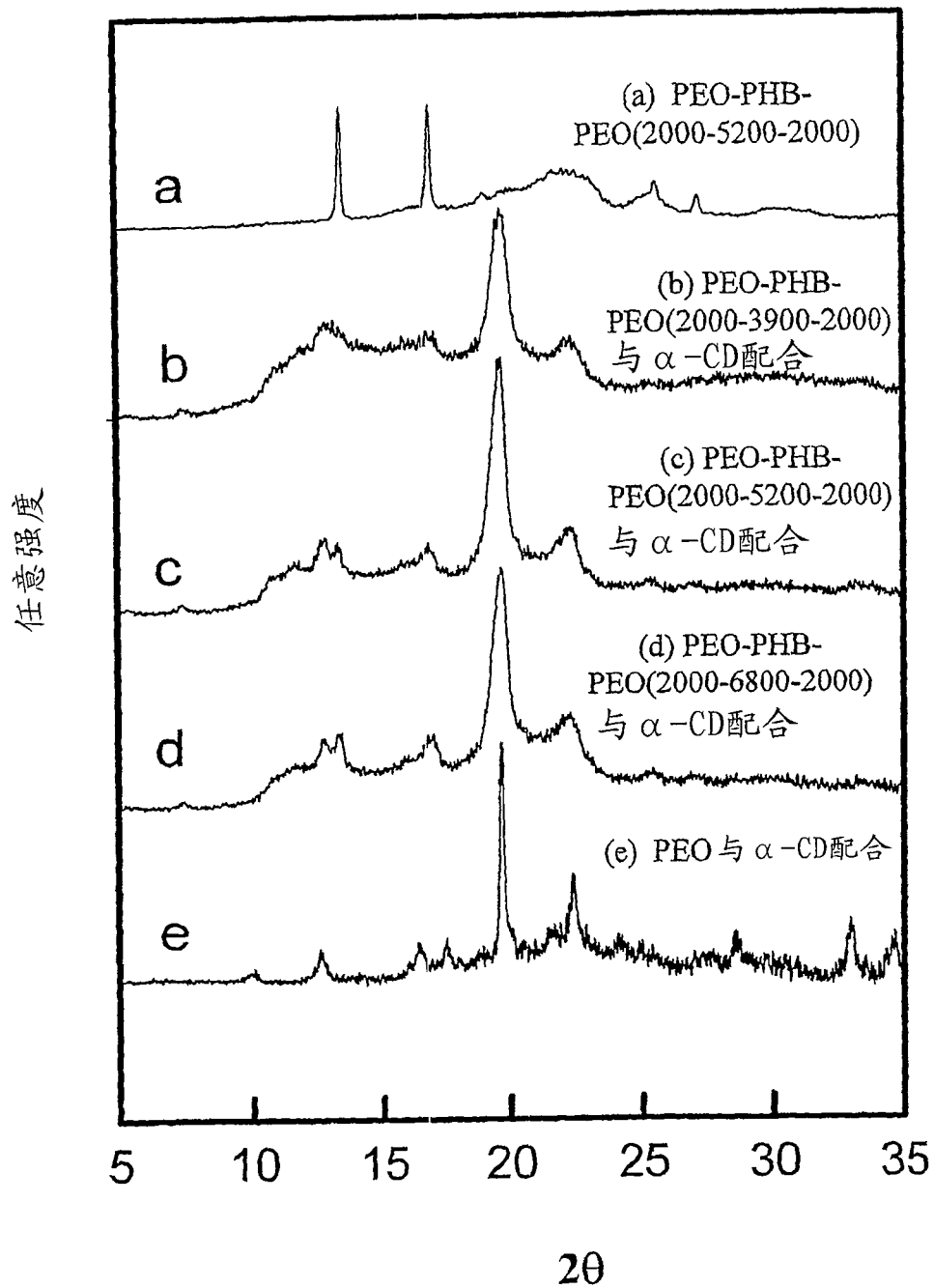


图 12

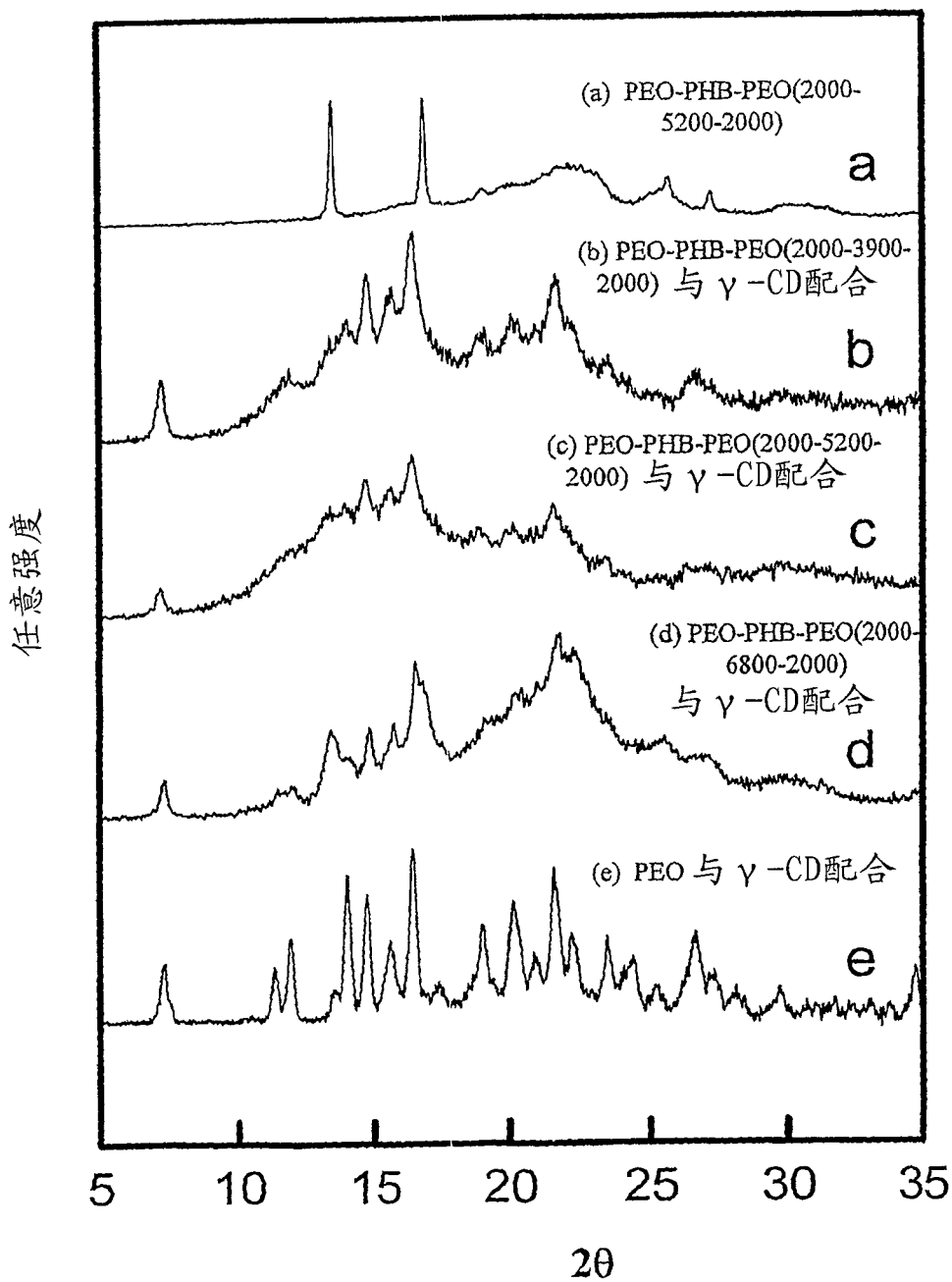


图 13

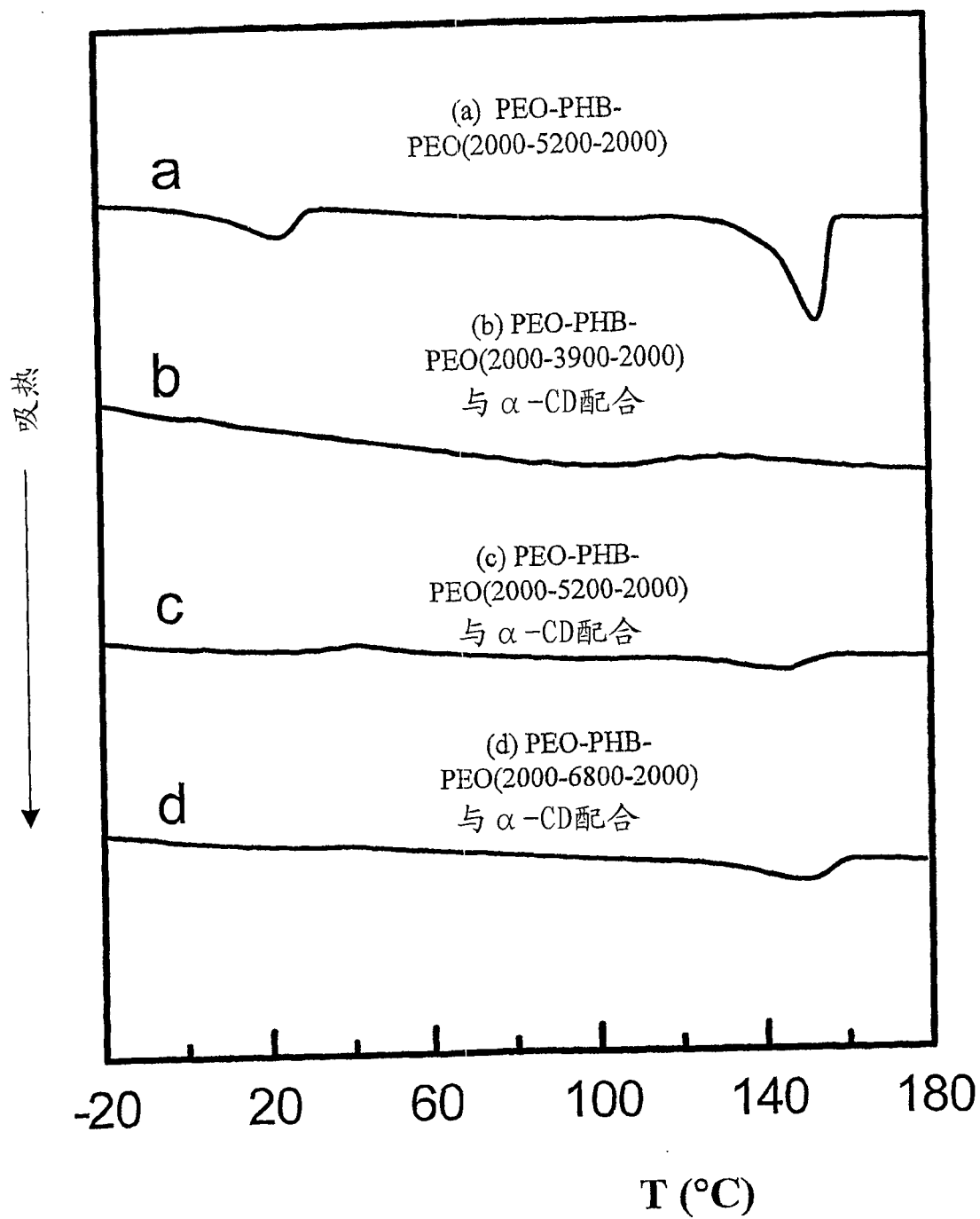


图 14

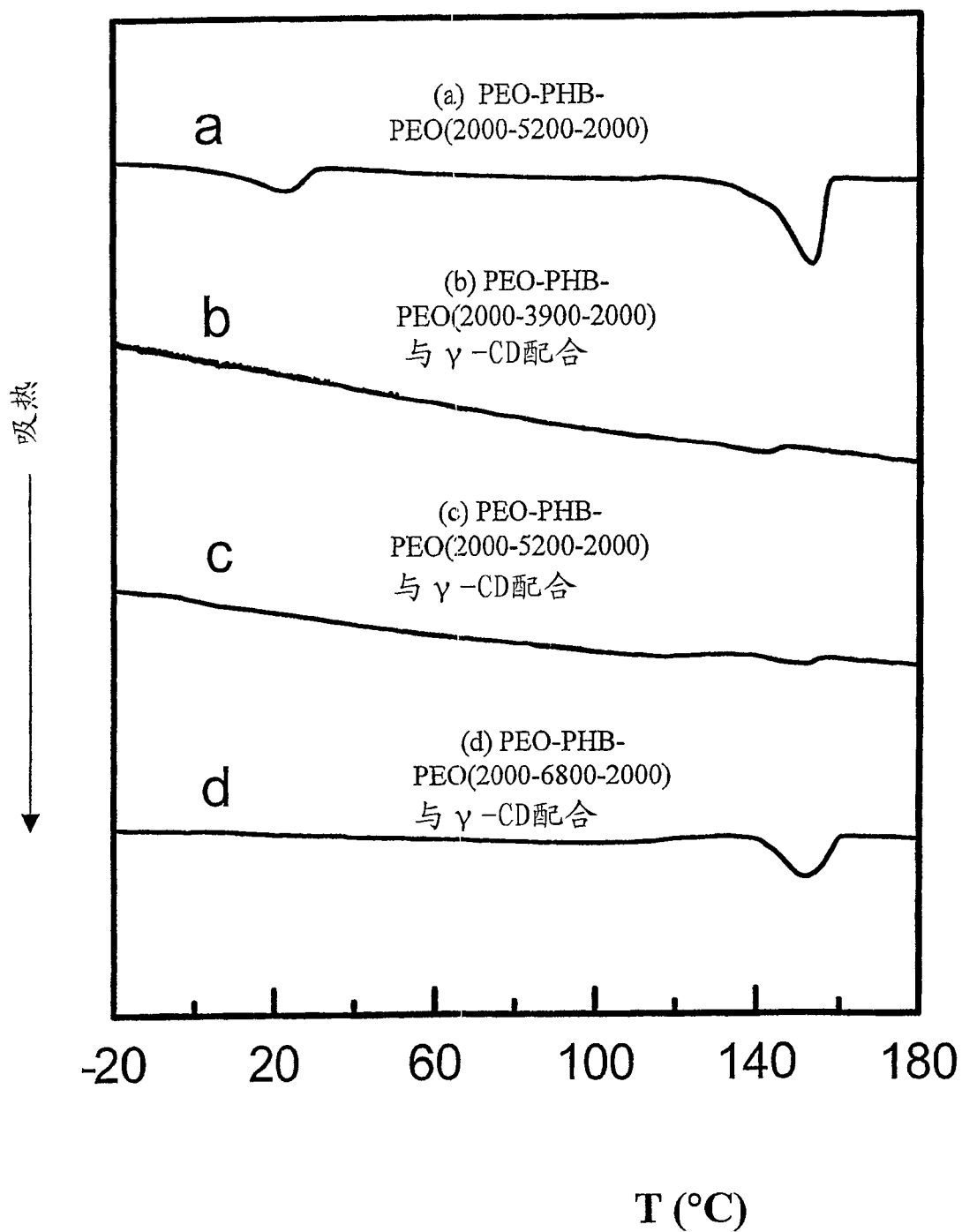


图 15

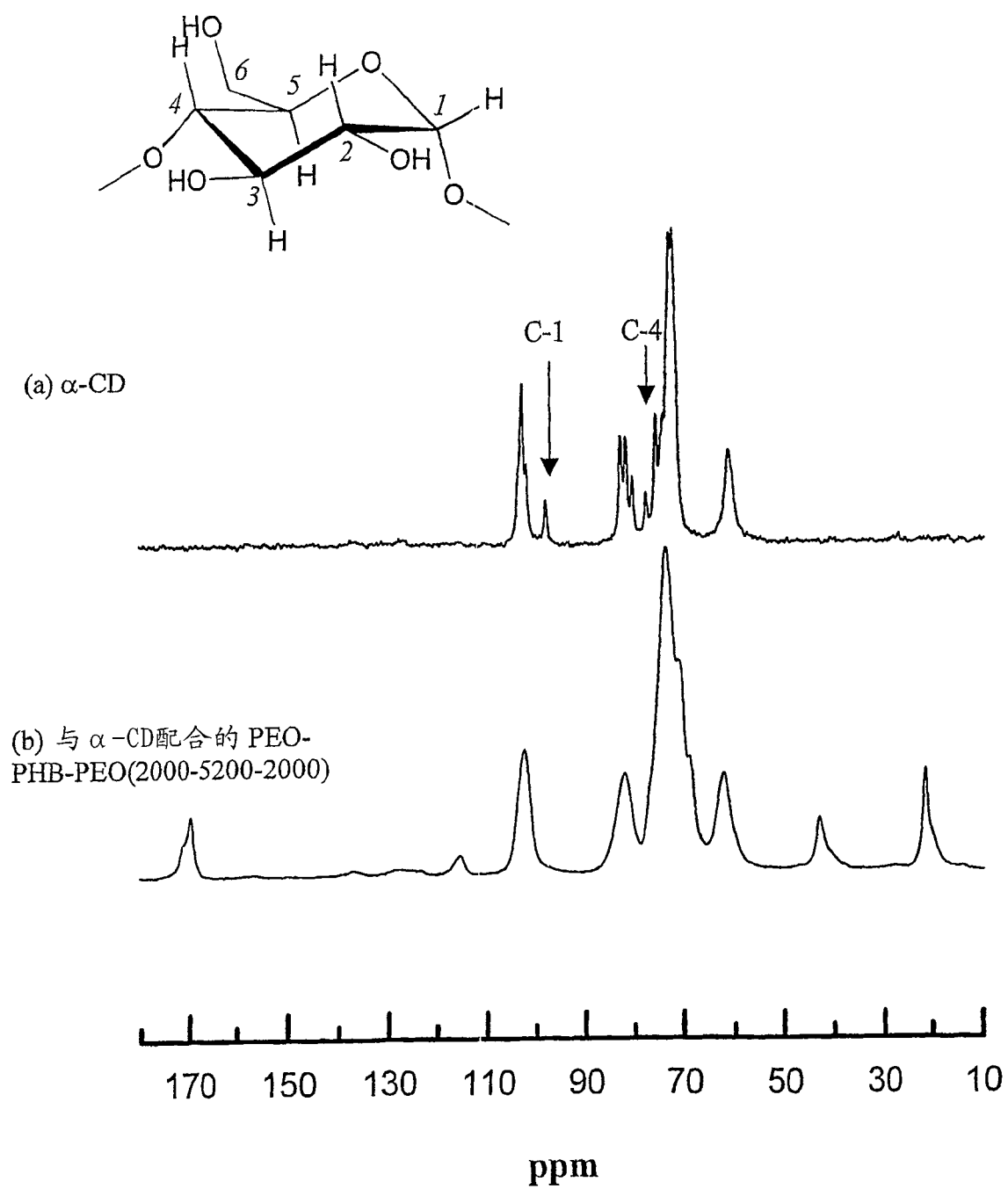


图 16

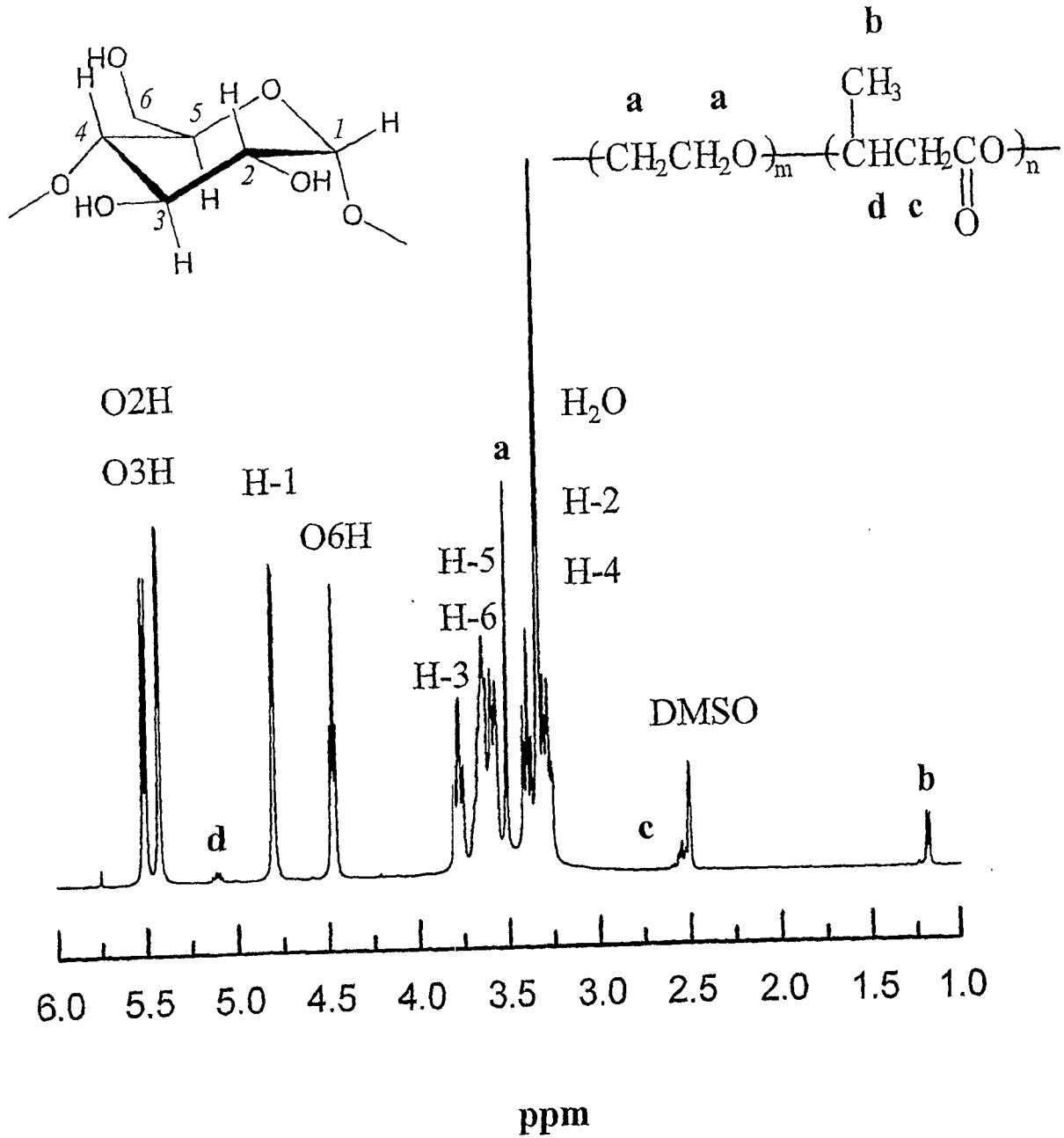


图 17

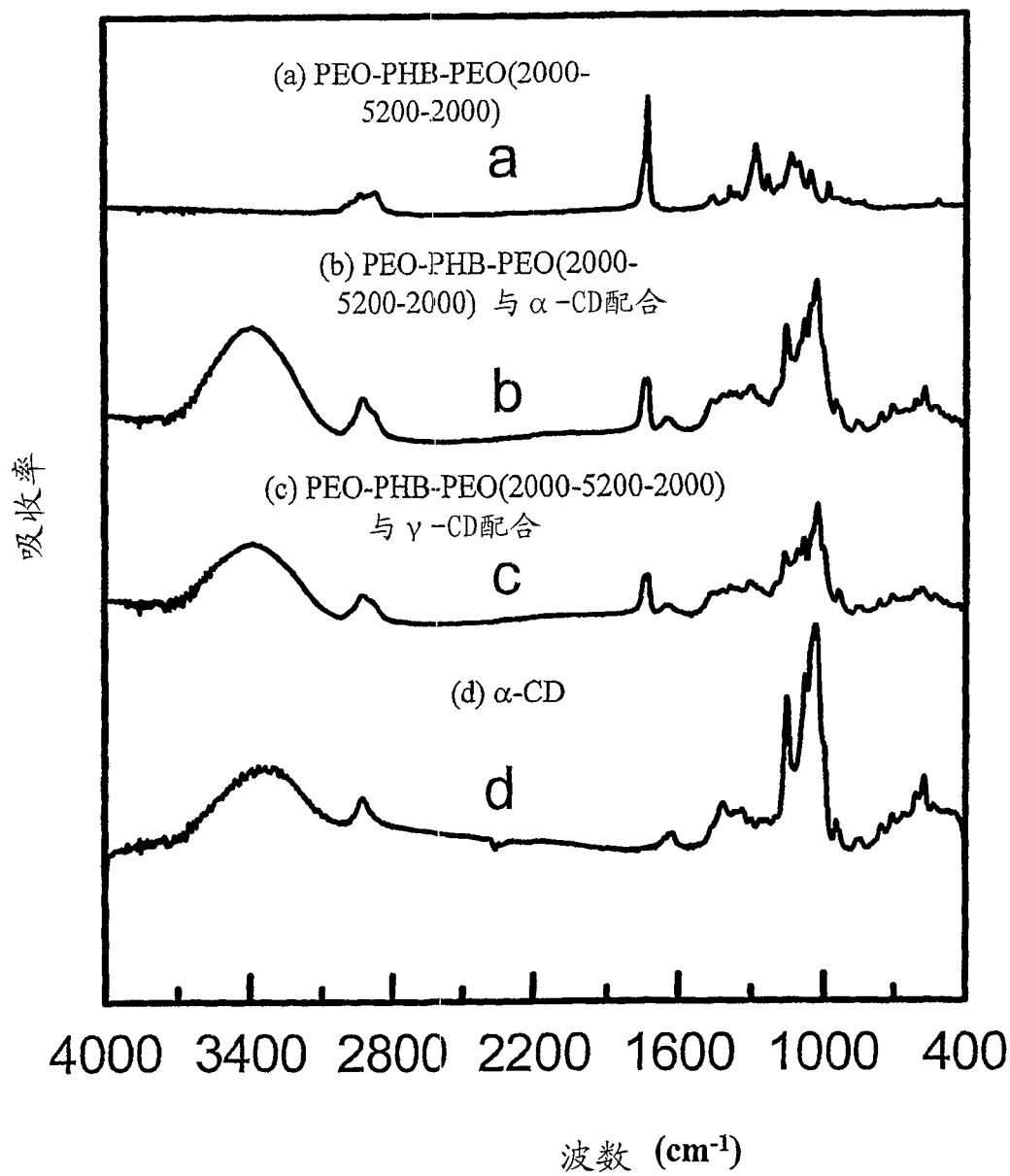


图 18

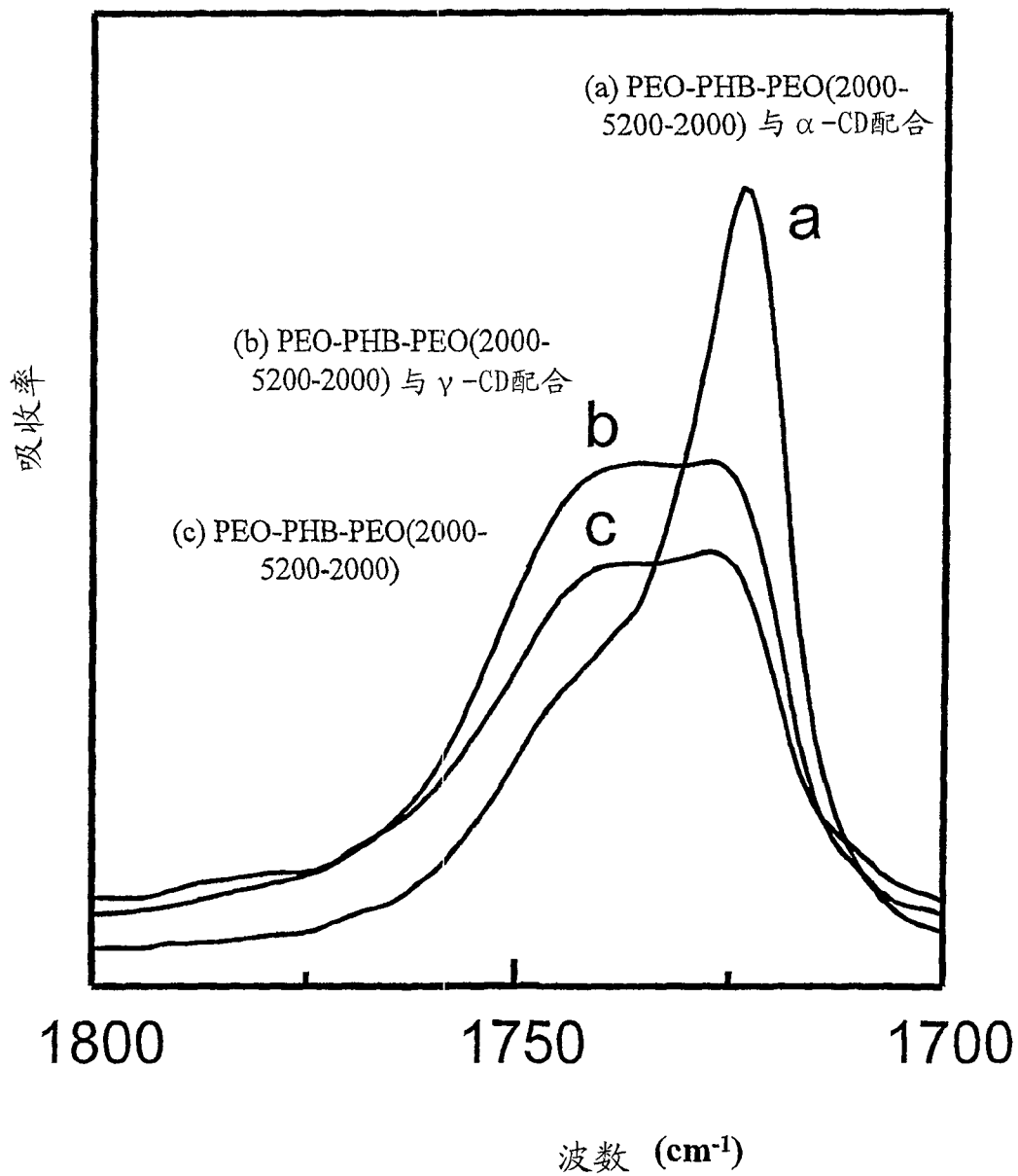


图 19

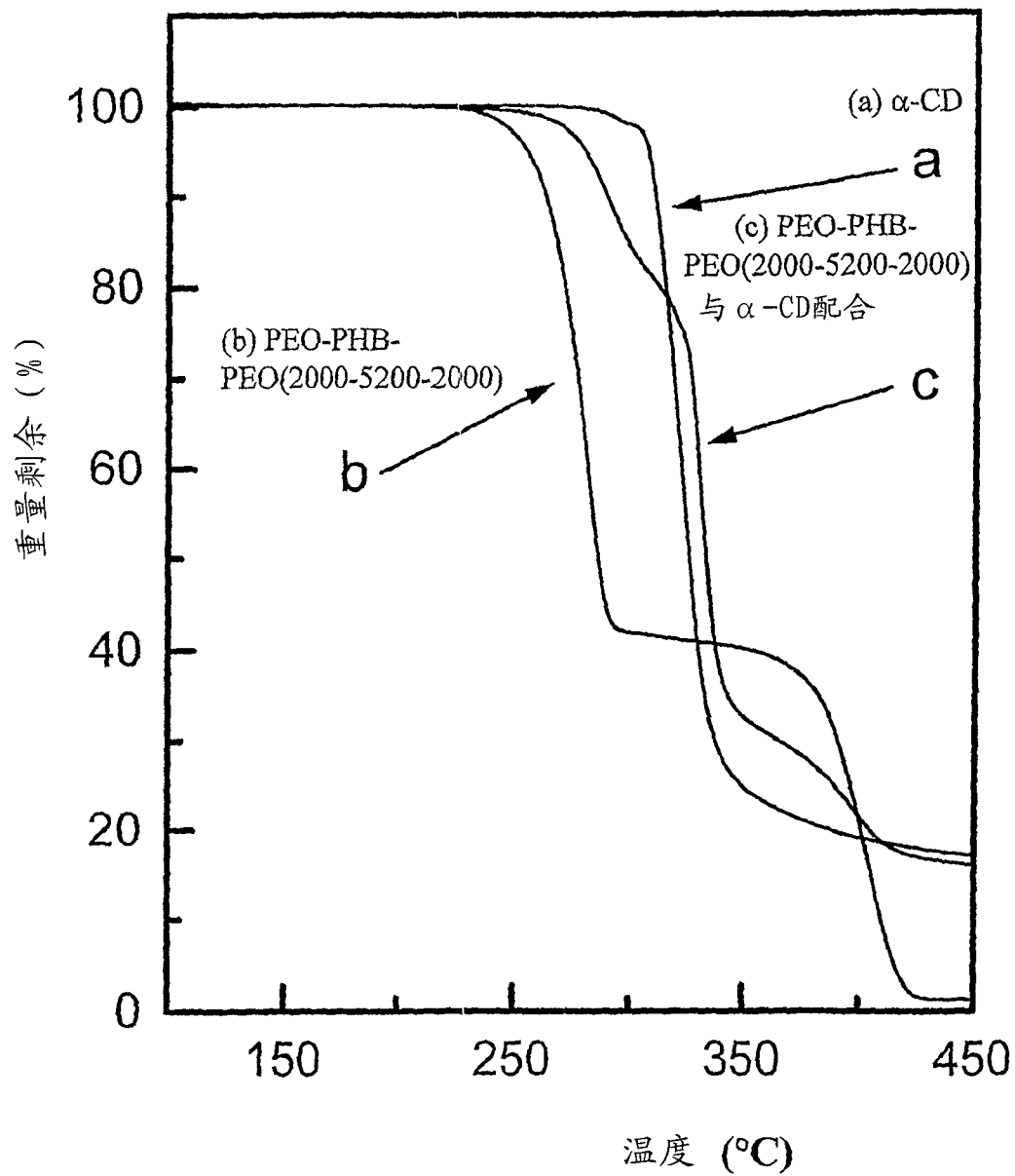


图 20

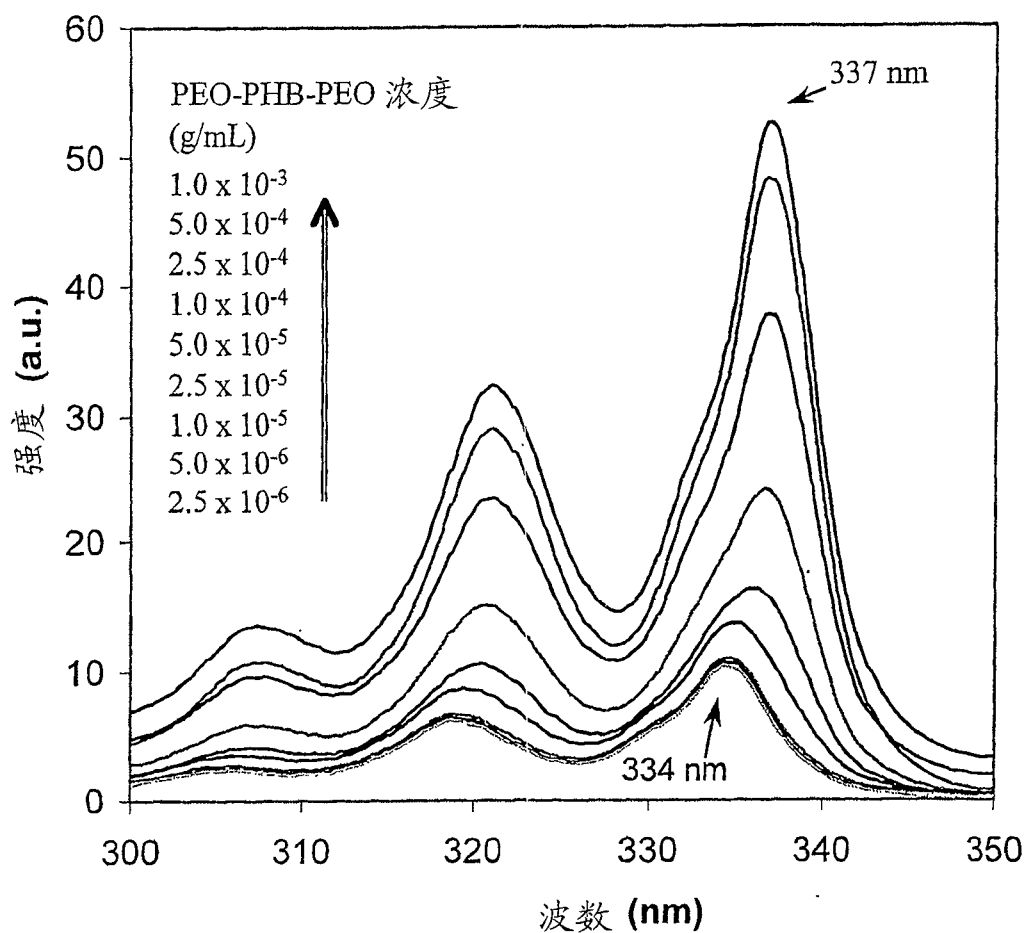


图 21

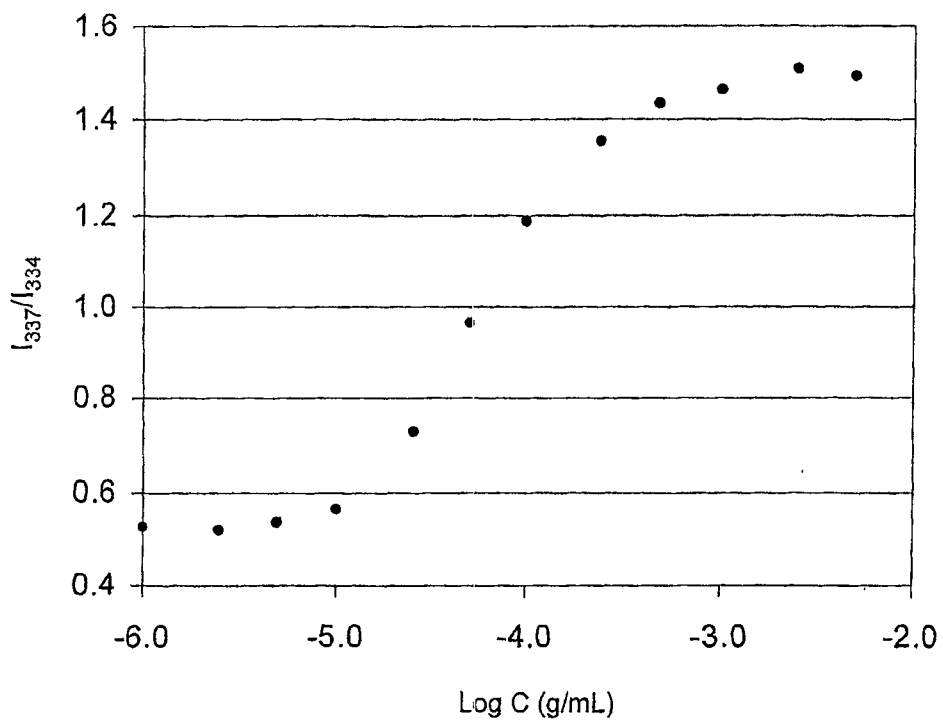


图 22

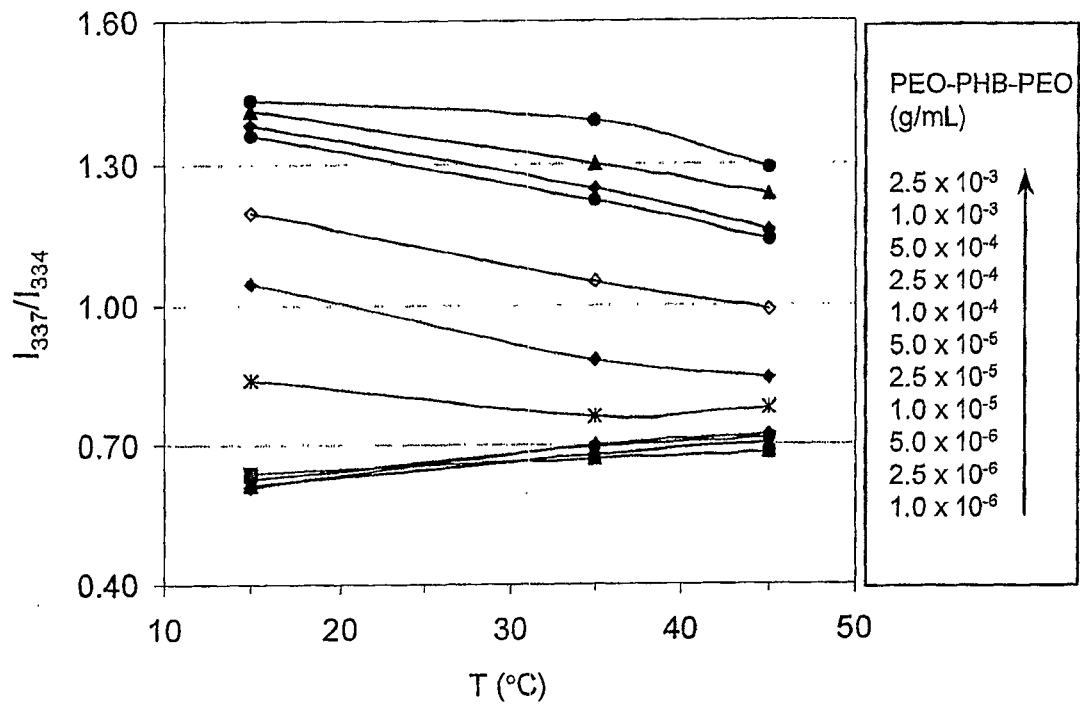


图 23

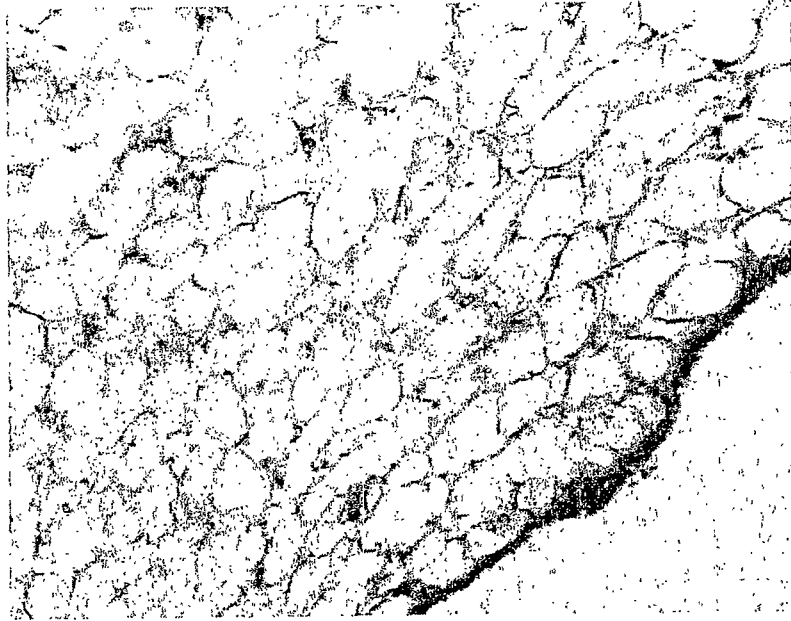


图 24a

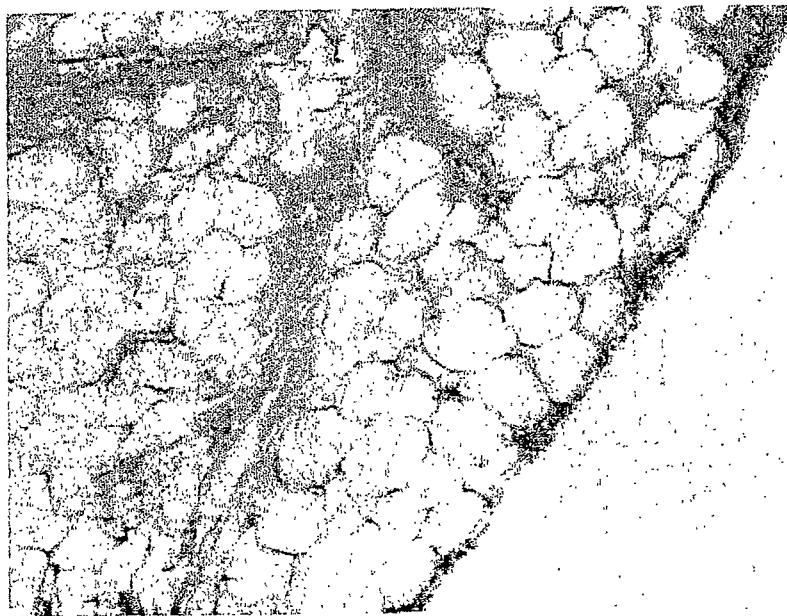


图 24b