



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110049789 B

(45) 授权公告日 2022.07.19

(21) 申请号 201780076468.0

(22) 申请日 2017.12.13

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110049789 A

(43) 申请公布日 2019.07.23

(30) 优先权数据
62/433,449 2016.12.13 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2019.06.11

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2017/066072 2017.12.13

(87) PCT国际申请的公布数据
W02018/112026 EN 2018.06.21

(73) 专利权人 武田药品工业株式会社
地址 日本大阪府

(72) 发明人 V·R·加里加帕蒂 T·松浦

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
专利代理师 封新琴

(51) Int.Cl.
A61L 27/26 (2006.01)
A61L 27/36 (2006.01)
A61L 27/38 (2006.01)
A61L 27/52 (2006.01)
A61L 27/54 (2006.01)
A61L 27/58 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 104487093 A, 2015.04.01
CN 102239248 A, 2011.11.09
CN 1703175 A, 2005.11.30
CN 104530441 A, 2015.04.22
CN 104292454 A, 2015.01.21
CN 102164580 A, 2011.08.24
US 2015071997 A1, 2015.03.12
US 2014147483 A1, 2014.05.29
WO 2014041231 A1, 2014.03.20
WO 2016159380 A1, 2016.10.06
WO 2010099818 A1, 2010.09.10
范观铭等. “基于无铜点击反应的水凝胶合成”. 《化学进展》. 2014, 第26卷 (第7期),
Barker, Karolyn et al. “Biodegradable DNA-Enabled Poly(ethylene glycol) Hydrogels Prepared by Copper-Free Click Chemistry”. 《Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition》. 2016, 第27卷
Jianwen Xu et al. “Cytocompatible Poly(ethylene glycol)-co-polycarbonate Hydrogels Cross-Linked by Copper-Free, Strain-Promoted Click Chemistry”. 《Chem. Asian J》. 2011, 第6卷
Yujie Ma et al. “Artificial microniches for probing mesenchymal stem cell fate in 3D”. 《Biomaterials Science》. 2014, 第2卷

审查员 王液涛

权利要求书2页 说明书20页 附图23页

(54) 发明名称

生物表面的共形涂层

(57) 摘要

本发明尤其提供了超薄共形涂覆的生物表面, 诸如活细胞、细胞簇、组织、器官和杂合合成器官; 以及在不损坏或显著修改所述生物表面的条件下例如使用点击反应性水溶性聚合物制备所述生物表面的方法。在一些实施方案中, 所述

涂覆的生物表面适于递送至有需要的受试者。

1. 一种组合物,其包含涂覆有水凝胶共形涂层的一种或多种活细胞,

其中所述水凝胶共形涂层包含第一官能化多臂聚合物和第二官能化多臂聚合物的共价交联网络,所述第一官能化多臂聚合物和所述第二官能化多臂聚合物通过点击化学反应对之间的反应彼此交联,其中所述第一官能化多臂聚合物和所述第二官能化多臂聚合物选自4臂5-10kDa PEG;甲基丙烯酰氧基乙基磷酸胆碱共聚物,其为100-200kDa且60%-90%磷酸胆碱;及其组合,并且其中所述水凝胶共形涂层的厚度小于20 μ m。

2. 如权利要求1所述的组合物,其中所述第一官能化多臂聚合物利用二苯并环辛炔(DBCO)官能化。

3. 如权利要求1或2所述的组合物,其中第二官能化多臂聚合物利用叠氮化物官能化。

4. 如权利要求1或2所述的组合物,其中所述一种或多种活细胞是产生胰岛素的细胞。

5. 如权利要求1或2所述的组合物,其中所述一种或多种活细胞是多能干细胞。

6. 如权利要求1或2所述的组合物,其还包含药学上可接受的稀释剂或赋形剂,任选地其中所述一种或多种活细胞被容纳在注射器或生物相容性容器中。

7. 一种利用水凝胶共形涂层共形涂覆生物表面的方法,所述方法包括:

提供包含两个水层的体系,第一层包含以下物质的溶液:0.25%至2% (W/V) 的悬浮剂、1%至25% (W/V) 的第一官能化多臂聚合物和所述生物表面,所述悬浮剂增加水溶液的粘度,并且包括线性的、梳形的多价聚合物、分支的、均聚和嵌段聚合物,其中所述第一官能化多臂聚合物是聚乙二醇(PEG)、甲基丙烯酰氧基乙基磷酸胆碱共聚物或其组合,并且利用点击官能团官能化;

第二层包含糖垫和1%至25% (W/V) 的第二官能化多臂聚合物,其中所述第二官能化多臂聚合物是聚乙二醇(PEG)、甲基丙烯酰氧基乙基磷酸胆碱共聚物或其组合,并且利用点击官能团官能化,所述第二官能化多臂聚合物的点击官能团能够与所述第一官能化多臂聚合物的点击官能团在生理条件下反应,其中所述糖垫是单糖、二糖、三糖、寡糖或多糖的1%-15% (W/V) 溶液,

使所述生物表面进入所述第二层,从而使所述第一点击官能团和所述第二点击官能团通过点击化学反应进行反应并在所述生物表面上形成交联水凝胶共形涂层,并且其中所述水凝胶共形涂层的厚度小于20 μ m。

8. 如权利要求7所述的方法,其中所述第一官能化多臂聚合物是4臂5-10kDa PEG。

9. 如权利要求7所述的方法,其中所述第一官能化多臂聚合物是甲基丙烯酰氧基乙基磷酸胆碱共聚物,其为100-200kDa和60%-90%磷酸胆碱。

10. 如权利要求7-9中任一项所述的方法,其中所述第一官能化多臂聚合物的点击官能团是DBCO或叠氮化物。

11. 如权利要求7-9中任一项所述的方法,其中所述第二官能化多臂聚合物是4臂5-10kDa PEG。

12. 如权利要求7-9中任一项所述的方法,其中所述第二官能化多臂聚合物是甲基丙烯酰氧基乙基磷酸胆碱共聚物,其为100-200kDa和60%-90%磷酸胆碱。

13. 如权利要求7-9中任一项所述的方法,其中所述第二官能化多臂聚合物的点击官能团是叠氮化物或DBCO。

14. 如权利要求7-9中任一项所述的方法,其中所述第一官能化多臂聚合物或所述第二

官能化多臂聚合物中的一种包含叠氮化物基团,另一种包含DBCO基团。

15. 如权利要求7-9中任一项所述的方法,其中所述第二层包含第二悬浮剂,其中所述第二悬浮剂与所述第一层中的所述悬浮剂相同。

16. 如权利要求7-9中任一项所述的方法,其中所述体系包含在所述第一层与所述第二层之间的居间层,任选地其中所述居间层是气体层。

17. 如权利要求7-9中任一项所述的方法,其中所述悬浮剂是以1%存在的分子量为1-8MDa之间的PEO。

18. 如权利要求16所述的方法,其中所述第二层进一步包含0.25%至2% (W/V) 的悬浮剂的溶液;并且

其中所述第一官能化多臂聚合物是甲基丙烯酰氧基乙基磷酸胆碱共聚物。

19. 如权利要求18所述的方法,其中将所述第一层连续地添加至所述第二层,任选地其中所述第二层处于适于通过孔口尺寸被设计为允许混合物在离心力下行进的锥形侧臂添加所述第一层的容器内。

20. 如权利要求7-9中任一项所述的方法,其中通过离心使所述生物表面进入所述第二层。

21. 如权利要求7-9中任一项所述的方法,其中所述生物表面包括一种或多种活细胞。

22. 如权利要求21所述的方法,其中所述一种或多种活细胞是产生胰岛素的细胞。

23. 如权利要求21所述的方法,其中所述一种或多种活细胞是多能干细胞。

24. 如权利要求22所述的方法,其中在用2mM至20mM的葡萄糖刺激时,相对于未经历所述共形涂覆的一种或多种合适的对照细胞,所述一种或多种细胞以与所述一种或多种合适的对照细胞相似的动力学和/或浓度分泌胰岛素。

25. 一种具有共形涂层的生物表面,其通过如权利要求7-24中任一项所述的方法制备。

26. 如权利要求1-6中任一项所述的组合物在制备用于治疗以缺少或以其他方式缺乏生物功能为特征的病症的药物中的用途。

27. 如权利要求26所述的用途,其中所述病症为1型糖尿病。

生物表面的共形涂层

[0001] 在先申请

[0002] 本申请要求2016年12月13日提交的美国临时申请号62/433,449的权益。上述申请的完整教导以引用的方式并入本文。

发明领域

[0003] 本发明涉及具有薄的半透性表面的生物表面(例如细胞、细胞簇、组织、器官和杂合成器官)一共形涂覆的生物表面,及其相关制备方法。

背景技术

[0004] 基于细胞的治疗,诸如用于治疗胰岛素依赖性糖尿病的胰岛移植,至少部分地由于潜在的宿主免疫系统活性而受到限制。现有的基于屏障的用于从宿主免疫系统中分离移植细胞的方法取得的成功有限。应用于活细胞的微囊化方法具有一些严重的缺点,诸如由于其尺寸差异和微胶囊环境中细胞/簇的随机分布变化而导致的营养物质和氧气扩散的限制。这些问题通常对细胞的功能和寿命构成威胁。水凝胶共形涂层可以克服传统微囊化中通常涉及的问题。共形涂层的一些理论优势(虽然现有形态尚不能满足)包括对细胞的优异营养物质和氧气供应,延长使用期限,改善药物分泌细胞功能性以及有可能以小体积负载高细胞剂量。尽管共形涂层具有若干优点,但是没有合适的方法可应用于活细胞,并且现有的涉及共形涂层的方法通常非常厚并且还具微胶囊化的许多缺点。此外,现有方法诸如两相体系、基于乳液的方法和自由基/光引发的方法、微流控方法和液/液界面方法:1)修改活细胞并对活细胞产生有害作用,2)经常形成大于50至75微米的厚涂层,并且3)面临可再现性和可扩展性问题。因此,需要基本上不受修改或损害的具有共形涂层的生物表面及其相关制备方法,所述方法优选地可以在生理条件下进行,并且是可再现的、可扩展的且提供优异的结果。

发明内容

[0005] 本发明尤其提供了基本上不受修改或损坏的具有共形涂层的生物表面及其相关制备方法,即可以在生理条件下进行,并且是可再现的、可扩展的且提供优异的结果的方法。

[0006] 本发明提供的组合物将具有共形涂层,诸如水凝胶,所述共形涂层允许生物表面保留生物功能而几乎不受损坏或修改,例如不修改细胞表面分子,例如不使水凝胶与生物表面共价缀合或以以下其他方式改变表面:例如破坏二硫键,或修改官能羧酸、胺或羟基基团,或修改DNA(例如在需要光活化的过程中),这是用以在基质中嵌入细胞的许多过程中所固有的。技术人员已知的多种聚合物将适于水凝胶,这些聚合物包括如本文所例示的由例如多臂PEG分子和线性甲基丙烯酰氧基乙基共聚物形成的水凝胶,所述线性甲基丙烯酰氧基乙基共聚物例如具有磷酸胆碱或其他两性离子基团的甲基丙烯酰氧基乙基共聚物,例如具有磷酸胆碱和衍生的烯丙胺(例如具有附加的官能团诸如点击反应性基团,任选地具有

居间接头,以促进交联)的甲基丙烯酰氧基乙基共聚物。

[0007] 本文描述了形成本发明提供的组合物的多种方法。本发明提供的方法的优点包括便易性、可再现性、可扩展性和生理相容性。生物表面(诸如细胞或细胞簇)不暴露于苛刻条件下,因此维持优异的活力和功能性,同时避免了与其他涂覆方法相关的某些潜在的诱变步骤。本发明提供的某些方法的一个有利方面是使用水相和与多臂聚合物相关的点击反应性官能团,所述多臂聚合物诸如点击官能多臂PEG分子,和基于甲基丙烯酰氧基乙基磷酸胆碱和烯丙胺的点击官能线性共聚物(诸如可商购的 **LIPIDURE[®]**-NH01)。

[0008] 此外,在相关方面,可以在例如治疗或改善病症的方法中向受试者(诸如人)施用本发明提供的组合物。例如,可通过施用有效量的本发明提供的组合物(诸如包含共形涂覆的生物表面(例如产生胰岛素的细胞)的组合物)来治疗以缺少或以其他方式缺乏生物功能(例如胰岛素产生)为特征的病症(胰岛素缺乏,诸如1型糖尿病)。

附图说明

[0009] 图1是蔗糖介质中的涂覆的聚苯乙烯(PS)颗粒;4臂PEGNH₂/4臂PEGNHS的共聚焦显微照片。

[0010] 图2是涂覆的PS颗粒,PEO(8百万分子量),4臂PEG-NHS/4臂PEG-NH₂的共聚焦显微照片。

[0011] 图3是涂覆的PS颗粒,PEO(4百万分子量),4臂PEG-NHS/4臂PEG-NH₂的共聚焦显微照片。

[0012] 图4是涂覆的PS颗粒,PEO(1百万分子量),4臂PEG-NHS/4臂PEG-NH₂的共聚焦显微照片。

[0013] 图5是涂覆的PS颗粒,PEO(1百万分子量),4臂PEG-N₃/4臂PEG-DBCO的共聚焦显微照片。

[0014] 图6是涂覆的PS颗粒,PEO(8百万分子量),4臂PEG-N₃/4臂PEG-DBCO的共聚焦显微照片。

[0015] 图7是涂覆的HCT116球状体(500个细胞),PEO(1百万分子量),4臂PEG-N₃/4臂PEG-DBCO的共聚焦显微照片。

[0016] 图8是涂覆的HCT116球状体(500个细胞),PEO(4百万分子量),4臂PEG-N₃/4臂PEG-DBCO的共聚焦显微照片。

[0017] 图9是涂覆的HCT116球状体(500个细胞),PEO(8百万分子量),4臂PEG-N₃/4臂PEG-DBCO的共聚焦显微照片。

[0018] 图10是涂覆的HCT116(1000个细胞/球状体),PEO(8百万分子量),4臂PEG-DBCO:4臂PEG叠氮化物的共聚焦显微照片。

[0019] 图11是裸HCT116(1000个细胞/球状体);第3天细胞活力染色的共聚焦显微照片。

[0020] 图12是涂覆的HCT116(1000个细胞/球状体),PEO(8百万),4臂PEG-DBCO:4臂PEG叠氮化物;第3天细胞活力染色的共聚焦显微照片。

[0021] 图13是在常规荧光显微镜下的涂覆的大鼠胰岛素瘤细胞球状体的显微照片。

[0022] 图14是在常规荧光显微镜下的涂覆的大鼠胰岛的显微照片。

[0023] 图15是总结了大鼠胰岛素瘤细胞球状体的胰岛素分泌研究的条形图,提供了对于

以下物质对葡萄糖的胰岛素分泌响应的比较:共形涂覆的大鼠胰岛素瘤细胞球状体制剂、裸大鼠胰岛素瘤细胞球状体制剂和微胶囊化的大鼠胰岛素瘤细胞球状体制剂。

[0024] 图16是总结了大鼠胰岛素瘤细胞球状体的胰岛素分泌动力学的线图,其中在高葡萄糖缓冲液中测量了胰岛素分泌动力学,比较了共形涂覆的大鼠胰岛素瘤球状体制剂、裸大鼠胰岛素瘤球状体制剂和微胶囊化的大鼠胰岛素瘤球状体制剂。

[0025] 图17是总结了大鼠胰岛的胰岛素分泌研究的条形图,比较了以下物质中对葡萄糖的胰岛素分泌响应:共形涂覆的大鼠胰岛、裸大鼠胰岛或微胶囊化的大鼠胰岛。

[0026] 图18是总结了高葡萄糖缓冲液中大鼠胰岛胰岛素分泌动力学的线图,比较了共形涂覆的大鼠胰岛制剂、裸大鼠胰岛制剂和微胶囊化的大鼠胰岛制剂。

[0027] 图19-图21是涂覆的ARPE-19球状体的稳定性的共聚焦显微图像,所述ARPE-19球状体在第1层(顶层)中使用悬浮剂用有点击反应性MPC聚合物涂覆。

[0028] 图22-图28是ARPE-19球状体的稳定性的共聚焦显微图像,所述ARPE-19球状体在两个层中使用悬浮剂用有点击反应性MPC聚合物涂覆。

[0029] 图29是通过连续添加方法涂覆的ARPE-19球状体的共聚焦显微图像。

[0030] 图30-图33是通过连续添加方法使用MPC点击反应性聚合物涂覆的大鼠胰岛的稳定性的共聚焦显微图像。

[0031] 图34-图37是裸大鼠胰岛和涂覆的大鼠胰岛;通过连续添加方法使用点击反应性MPC聚合物涂覆的胰岛的活/死活力的共聚焦显微图像。

[0032] 图38-图39是总结了裸胰岛和通过连续添加方法使用点击反应性MPC聚合物涂覆的胰岛的大鼠胰岛胰岛素分泌的条形图。

[0033] 图40是用于合成荧光素标记的4臂PEG-NH₂的方案1的图示。

[0034] 图41是用于合成4臂-PEG- {NHC0- (PEG) 4-DBC0} 3-FITC的方案2的图示。

[0035] 图42是用于合成4臂PEG-NH-DBC0 (10K分子量)的方案3的图示。

[0036] 图43是用于合成4臂PEG-NH- (PEG) 4-DBC0的方案4的图示。

[0037] 图44是用于合成含有点击反应性DBC0基团与PEG接头的点击反应性甲基丙烯酰氧基磷酸胆碱-烯丙胺共聚物的方案5的图示。

[0038] 图45是用于合成含有点击反应性叠氮基与PEG接头的甲基丙烯酰氧基磷酸胆碱-烯丙胺共聚物的方案6的图示。

[0039] 图46是用于合成含有点击反应性DBC0基团与疏水链(C6)接头的点击反应性甲基丙烯酰氧基磷酸胆碱-烯丙胺共聚物的方案7的图示。

[0040] 图47是用于合成含有点击反应性DBC0基团与荧光素标签的点击反应性甲基丙烯酰氧基磷酸胆碱-烯丙胺共聚物的方案8的图示。

[0041] 图48是方案9的图示,示出了由本发明提供的两层体系和3三层体系的两种共形涂覆方法。

[0042] 图49是共形涂覆的连续添加方法的方案10的图示。

具体实施方式

[0043] 本发明至少部分地基于申请人的以下发现:生物表面的共形涂层以及在广泛的生理条件下制备这些共形涂覆的生物表面的方法,所述共形涂层是超薄的且半透性的、具有

高可再现性和可扩展性,并且未对生物表面(例如细胞)造成任何显著的损坏(结构变化)或修改(包括功能丧失/损害)。单独地,这些是“本发明提供的组合物”(或“本发明提供的生物表面”)和“本发明提供的方法”,并且统称为“本发明提供的组合物和方法”,等等。本发明提供的组合物和方法有利地克服了现有方法和组合物的困难和局限性,诸如对生物表面的损坏/差的生物相容性、可再现性、可扩展性以及厚度、渗透性或均匀性。参见,例如Tomei等人 Proceedings of the National Academy of Sciences (2014) 111 (29), 10514-10519; L.H.Granicka等人, (2011), Artificial Cells, Blood Substitutes and Biotechnology (2011) 39:274-280; Blasi等人, International Journal of Pharmaceutics (2013) 440, 141-147; Hubbell和Tomei, US2014/0147483A1; Garcia等人, US2015/0071997A1; Sang Van等人, US 8,216,558B2; Chaikof等人 US 7,824,672B2; Michael H. May, 1998, Ph.D. thesis, University of Toronto; Angelo S. Mao等人 Nature Materials, (2017), 16, 236-243; Green等人, Materials Today (2012), 15:60-66; Ribeiro等人, Applied Materials & Interface, (2017), 9:12967-12974。

[0044] 因此,在第一方面,本发明提供了包含具有水凝胶共形涂层的生物表面的组合物。相对于没有共形涂层的合适的对照生物表面,所述生物表面:i) 保留功能(即,生物功能,诸如例如响应于葡萄糖的胰岛素分泌),并且ii)基本上不含或仅具有可忽略不计量的损坏或其他形式的表面修改。例如,在一些实施方案中,生物表面上少于约25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.75%、0.5%、0.25%、0.1%的二硫键、胺(-NH₂)、羧基(-COOH)或羟基(-OH)部分(或1者、2者、3者或全部4者的组合)被修改。

[0045] “共形涂层”是薄的(小于50 μm ,在一些实施方案中小于约50、40、30、20或10 μm ;例如小于20 μm ,例如在约5与20 μm 之间,或者小于或约为10 μm)外源涂层,其在所涂覆的表面上基本上是均匀的,并且允许分子量筛分,即允许营养物质、某些蛋白质和氧气等通过,但不允许抗体或细胞通过。如本文所用,共形涂层不包括生物表面与共形涂层的显著共价连接或以其他方式共价修改生物表面的表面。相反,共形涂层包括交联网络,诸如水凝胶,其围绕生物表面而不以显著量(即,小于约10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.75%、0.5%、0.25%、0.1%,或优选地任意值,即低于检测限)交联至生物表面。在某些具体实施方案中,共形涂层不包括:光活化;使用自由基引发剂、表面活性剂、酸或碱催化剂、氧化剂或还原剂,或有机溶剂;并且优选地,可以在宽的温度范围(例如约4 $^{\circ}\text{C}$ 与37 $^{\circ}\text{C}$ 之间)内和合适的例如生理pH条件下发生。在某些实施方案中,构成共形涂层的水凝胶具有净中性电荷。通常,本发明提供的共形涂层(及其制备方法)基本上不(或根本不)影响生物表面(例如细胞)的功能性。也就是说,生物表面的生物学功能(诸如响应于葡萄糖的胰岛素分泌)受到的影响可忽略不计(如果有的话)。同样地,生物表面的物理结构,特别是其靠近共形涂层的外表面未被修改,例如二硫键基本上(或完全)保持完整,同时其他反应性基团诸如胺、羧基和羟基基本上(或完全)未被修改。在某些具体实施方案中,在应用共形涂层后生物表面上少于约25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.75%、0.5%、0.25%、0.1%的二硫键、胺(-NH₂)、羧基(-COOH)或羟基(-OH)部分(或1者、2者、3者或全部4者的组合)被修改。此外,本发明提供的共形涂层(及其制备方法)对于达约30、35、40、45、50、55、60、65、70kDa或更多(例

如75、80或85kDa)的分子(例如营养物质、氧气和某些分泌的分子,诸如分泌的蛋白质,诸如胰岛素)是可渗透的,但对于更大的分子(诸如抗体或细胞)是不可渗透的,因此对于约90、100、110、120、130、140、150kDa或更多的分子是不可渗透的。

[0046] “生物表面”包括活细胞(包括细菌、古细菌、真菌、植物或动物细胞,诸如昆虫或哺乳动物细胞,诸如来自灵长类动物诸如人的细胞、以及来自非人灵长类动物的细胞、以及来自非灵长类哺乳动物(诸如小鼠、大鼠、猪、绵羊、牛、犬、猫、骆驼科、野兔等)的细胞),其中活细胞可以是以下形式:单个细胞、细胞簇、类器官、细胞球状体、拟胚体、组织或组织碎片,包括天然组织外植体(包括整个器官或器官碎片,诸如肾、胰腺、肝脏或心脏)或体外培育的组织,以及生物人工/杂合器官或器官装置。在具体实施方案中,细胞是多能干细胞,诸如诱导的多能干细胞。生物表面还包括人工细胞,诸如与非活细胞诸如脂质体、水凝胶、固体(诸如塑料,诸如聚苯乙烯,或PLA、PGA或它们的组合)等连接的蛋白质(诸如酶)。生物表面,诸如细胞,通常(但不一定)基本上是球形的。细胞(以及细胞簇或球状体)的直径可以为约5 μ m至约1mm,例如约10 μ m至1mm,例如约100 μ m至约400 μ m,例如在一些实施方案中达约300 μ m,例如约100-300 μ m。在其他实施方案中,生物表面(细胞、细胞簇或细胞球状体)为约10 μ m至2mm、20 μ m至1mm、50至800 μ m或100至500 μ m。

[0047] 在一些实施方案中,本发明提供的组合物的水凝胶是诸如以下的多臂聚合物的共价交联网络:4臂5-10kDa PEG、甲基丙烯酰氧基乙基磷酸胆碱共聚物100-200kDa、60-90%磷酸胆碱(或其他两性离子基团;包括基于LIPIDURE[®]-NH01的聚合物),以及这些物质的组合。

[0048] 在另一方面,本发明提供了在水凝胶中共形涂覆生物表面的方法。这些方法包括:提供包含两个水层的体系,第一层包含以下物质的溶液:约0.25%至2%(W/V)的悬浮剂、约1%至约25%(W/V)的第一官能化多臂聚合物和所述生物表面;第二层包含糖垫(saccharide cushion)和约1%至约25%(W/V)的第二官能化多臂聚合物,所述第二官能化多臂聚合物的官能团可与所述第一官能化多臂聚合物的官能团在生理条件下反应;然后使所述生物表面进入所述第二层,从而使所述第一官能团和所述第二官能团反应并形成共形涂覆所述生物表面的交联水凝胶。如前所指出,本发明提供的方法可以使用多于两个层,诸如三个层或更多个层,并且可以包括多于一种糖垫。通常,水层基本上不含自由基和有机溶剂(例如,小于1.0%、0.9%、0.8%、0.7%、0.6%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%、0.1%、0.05%(V/V)的自由基或有机溶剂,或在一些实施方案中低于检测限)。

[0049] “悬浮剂”是增加水溶液粘度的化学品,并且包括线性的、梳形的多价聚合物、分支的、均聚和嵌段聚合物。示例性悬浮剂包括聚乙二醇(PEG),包括高分子量PEG(也称为聚环氧乙烷,PEO),以及PVA(聚乙烯醇)、PVP(聚乙烯吡咯烷酮)和HPMC(羟丙基甲基纤维素)。悬浮剂可以是线性的或分支的。悬浮剂以约0.05%至2.0%,例如约0.1%至2.0%、或约0.25%至2.0%、或约1%,例如0.5%至1.5%存在。在某些实施方案中,悬浮剂的分子量为约1MDa(兆道尔顿)至约10MDa,例如约1MDa至约8MDa。在具体实施方案中,悬浮剂是例如上述浓度的PEO,其分子量为约1MDa至10MDa,例如1MDa至8MDa。如本领域技术人员所理解的,可以使用其他悬浮剂以获得与本文针对高分子量PEO所述的结果相似的特性,例如约1%的约1MDa至约8MDa的悬浮剂。悬浮剂可以溶解在多种水溶液中,诸如例如盐水,例如0.9%盐水。在一些实施方案中,悬浮剂仅存在于第一层中,而在其他实施方案中,悬浮剂存在于第

一层和第二层中。在悬浮剂存在于两个层中的一些实施方案中，第一层中的悬浮剂与第二层中的悬浮剂相同，而在其他实施方案中，悬浮剂可以是不同的。

[0050] “糖垫”是单糖、二糖、三糖、寡糖或多糖(例如蔗糖、葡萄糖、海藻糖、甘露醇、右旋糖、果糖、乳糖、麦芽糖或它们的组合)的1%-15% (W/V) 溶液，其增加溶液的密度并促进如本文所述的水溶液的分层。在某些实施方案中，糖为溶液的约5%至约15%，例如约7.5%至约12.5%，例如约10%。在某些具体实施方案中，糖是蔗糖。基于例如在本文例示的特定浓度下实现与蔗糖相似的密度，可以使用其他糖垫。在一些实施方案中，本发明提供的方法使用两个层或更多个层，诸如三个层或更多个层。

[0051] “官能化多臂聚合物”是具有三个或更多个(例如3至12个，更特别地4或8个)臂的多臂聚合物，所述臂在臂的远端具有官能团。在一些实施方案中，所述臂可以从中心核心(诸如多臂PEG)发出，或者在其他实施方案中，沿着中心轴线聚合物的长度在不同点处脱离(如在梳形聚合物中，诸如共聚物)，在这种情况下，多臂聚合物可具有多于4个臂，例如约20、25、30、35、45、50、75、100、150、200、300、400、500、600、700、800、900个或更多个臂，并且共聚物包含沿其轴线在其完整尺寸/质量上基本均匀分布的不同聚合物，其尺寸/质量为例如约10kDa-1MDa、20kDa-800kDa、50-500kDa，例如约100-400kDa、100-300kDa、200-350kDa、200-300kDa，或约300kDa，例如约275-325kDa。官能化多臂聚合物在臂的远端具有官能团，例如在两个或更多个臂(例如两个至n个臂)的远端具有官能团，其中n是多臂聚合物上的臂的数量，例如当n=4时，2个、3个或所有4个臂可以在其远端具有官能团。在一些实施方案中，所有臂中约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%在其远端具有官能团，例如当多臂聚合物是大的梳形聚合物时，例如所有臂中约5%-15%在其远端具有官能团。官能化多臂聚合物以约1%至约25% (W/V)，例如约2.5%至约20%，更特别地约8%至约12%，或约10%存在于溶液中。在一些实施方案中，官能化多臂聚合物以约5%至约10%存在。在其他具体实施方案中，多臂聚合物以约2.5%至7.5%，例如约4%至约6%或约5%存在于溶液中。

[0052] 在某些实施方案中，官能化多臂聚合物是例如约5%或10%W/V的例如总分子量为约5-40、5-30、10-20、8-12或10kDa的PEG，例如分子量为约5-40、5-30、10-20、8-12或10kDa的4臂或8臂PEG。

[0053] 在其他实施方案中，官能化多臂聚合物是具有甲基丙烯酰氧基乙基或其他主链(诸如聚乙烯基或聚酰胺)的线性共聚物，诸如包含磷酸胆碱或其他两性离子基团的共聚物，例如其中约40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%的共聚物臂包括两性离子基团，例如60%-90%、70%-90%、75%-85%或约80%的臂(为简单起见)表示为聚合物中含有两性离子基团的臂的百分比，诸如磷酸胆碱的百分比，例如60%-90%的磷酸胆碱。在这些实施方案中，共聚物臂中剩余的60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%或5%含有官能团，诸如烯丙胺(诸如以 **LIPIDURE**[®]-NH01之名出售的共聚物)；或衍生物，诸如其中共聚物的烯丙胺单元的NH₂基团附加有点击官能团(诸如DBCO或叠氮化物)的官能化臂(任选地具有居间接头，诸如PEG，其中接头长度可以为约2-80、3-60、3-50、5-40、10-40、15-40、20-40、25-40、30-40、35-40或38个原子(诸如C、N、O、P、S或它们的组合))。在一些实施方案中，转化为官能化衍生物(例如具有附加的点击官能团，具有任选的居间接头)的官能团(例如诸如烯丙胺)的百分比为约25%、30%、

35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%或更多,例如约25%-75%、40%-60%、45%-55%或50%。因此,例如在共聚物的60%-90%是两性离子臂的实施方案中,共聚物的40%-10%的臂可用于转化以具有点击官能团,在一些实施方案中,这些臂中约50%附加有点击官能团,即,臂的总数的20%-5%具有附加的点击官能团。因此,在某些实施方案中,在梳形官能化多臂聚合物中约50、60、80、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200个臂或更多个臂,例如约70-150或80-90或约85个臂具有附加的点击官能团。

[0054] 在其他实施方案中,官能化多臂聚合物是甲基丙烯酰氧基乙基磷酸胆碱(MPC;例如在一些实施方案中被DBCO(诸如赖氨酸-DBCO)官能化,在其他实施方案中被烯丙胺共聚物官能化),例如在更具体的实施方案中,第一层中的官能化多臂聚合物是MPC(例如MPC-赖氨酸-DBCO),且第二层中的官能化多臂聚合物是PEG,例如4臂或8臂PEG(例如PEG-叠氮化物)。在其他实施方案中,官能化线性共聚物是共聚物的烯丙胺单元的NH₂基团被点击官能DBCO官能化而作为第一聚合物的甲基丙烯酰氧基乙基磷酸胆碱-烯丙胺(例如LIPIDURE[®]-NH01);和共聚物的烯丙胺单元的胺基被点击官能叠氮基团官能化而作为第二聚合物的官能化的线性共聚物甲基丙烯酰氧基乙基磷酸胆碱-烯丙胺(例如LIPIDURE[®]-NH01)。在一些实施方案中,甲基丙烯酰氧基乙基磷酸胆碱-烯丙胺的共聚物为约:80:20摩尔比;50:50摩尔比;20:80摩尔比。

[0055] 如本文所用的“多臂聚合物”包括官能化多臂聚合物,以及基本上相同但缺少官能团的聚合物,例如由交联的(即反应的)官能化多臂聚合物组成的水凝胶,这些多臂聚合物在聚合物臂的远端不再具有反应性官能团(即,小于约10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.75%、0.5%、0.25%、0.1%的未反应的官能团仍然存在)。在某些实施方案中,第一官能化多臂聚合物与第二官能化多臂聚合物相同,不同之处在于两种官能化多臂聚合物具有互补的(反应性的)官能团,诸如分别为DBCO和叠氮化物官能化的甲基丙烯酰氧基乙基共聚物,或分别为DBCO和叠氮化物官能化的多臂PEG。在其他实施方案中,第一官能化多臂聚合物与第二官能化多臂聚合物不同,例如DBCO或叠氮化物官能化的甲基丙烯酰氧基乙基共聚物与叠氮化物或DBCO官能化的多臂PEG。

[0056] 可用于本发明提供的方法的官能化多臂聚合物上的官能团是促进第一官能化多臂聚合物与第二官能化多臂聚合物之间有效交联以形成稳定水凝胶的反应性基团。技术人员将认识到多种合适的化学物质适于此目的。示例性化学物质包括NHS/活化酯,并且在具体实施方案中,包括点击官能团。

[0057] “点击官能”(有时称为点击反应性)基团是适于点击化学的化学部分,所述点击化学即特殊的单锅反应(single pot reaction),在生物条件下快速地进行(高热力学驱动力),不受水的干扰,并且不产生明显的毒性的或令人反感的副产物。合适的点击官能团经历化学反应,诸如环加成,诸如1,2-偶极环加成和杂狄尔斯阿尔德环加成(hetero-Diels alder cycloaddition);应变杂环亲电体诸如氮丙啶、环氧化物、环状硫酸盐、环硫等的亲核开环;形成脲、硫脲、氢脲、胍、酰胺和芳香杂环的非醇醛羰基化学反应;以及碳-碳多键的加成,诸如环氧化、氮丙啶化、二羟基化、硫基卤加成、亚硝酰基加成和迈克尔加成(Michael addition)。在某些实施方案中,点击化学反应对(即,第一和第二官能化多臂聚合物上的点击官能团)包括叠氮化物-DBCO(二苯并环辛炔)(产生三唑连接键)、硫醇-降冰片烯(迈克尔加成)和四嗪-降冰片烯(norborene)(吡唑连接键)。在某些具体实施方案中,

可用于本发明的点击官能团包括叠氮化物和DBCO。

[0058] 在本发明提供的方法的某些实施方案中,第一官能化多臂聚合物是4臂5-10kDa PEG。在更具体的实施方案中,第一官能化多臂聚合物的官能团是点击官能团,诸如DBCO或叠氮化物。在本发明提供的方法的其他具体实施方案中,第一官能化多臂聚合物是甲基丙烯酰氧基乙基磷酸胆碱共聚物,100-200kDa,60%-90%磷酸胆碱。在更具体的实施方案中,第一官能化多臂聚合物的官能团是点击官能团,诸如DBCO或叠氮化物。

[0059] 在本发明提供的方法的一些实施方案中,第二官能化多臂聚合物是4臂5-10kDa PEG。在更具体的实施方案中,第二官能化多臂聚合物的官能团是点击官能团,诸如叠氮化物或DBCO。在本发明提供的方法的其他具体实施方案中,第二官能化多臂聚合物是甲基丙烯酰氧基乙基磷酸胆碱共聚物,其为100-200kDa和60%-90%磷酸胆碱。在更具体的实施方案中,第二官能化多臂聚合物的官能团是点击官能团,诸如叠氮化物或DBCO。

[0060] 在本发明提供的方法的一些实施方案中,悬浮剂是以约1%存在的分子量为约1-8MDa之间的PEO。

[0061] 在本发明提供的方法的某些实施方案中,通过离心使生物表面进入第二层。

[0062] 在本发明提供的方法的某些实施方案中,在离心下将生物表面连续逐滴添加至底层。

[0063] 在某些实施方案中,离心小瓶被设计成适于通过插入孔口小到足以使混合物在离心力下逐滴行进的锥形侧臂来连续添加生物表面。

[0064] 因此,在另一方面,本发明还提供了在水凝胶中共形涂覆生物表面的方法,方式为:提供包含由居间层(诸如气体层)隔开的两个水层的体系,第一层包含以下物质的溶液:约0.25%至2%(W/V)的悬浮剂、约1%至约25%(W/V)的第一官能化多臂聚合物和所述生物表面;第二层包含以下物质的溶液:约0.25%至2%(W/V)的悬浮剂、糖垫和约1%至约25%(W/V)的第二官能化多臂聚合物,所述第二官能化多臂聚合物的官能团可与所述第一官能化多臂聚合物的官能团在生理条件下反应;并使所述生物表面进入所述第二层,从而使所述第一官能团和所述第二官能团反应并形成共形涂覆所述生物表面的交联水凝胶,其中所述第一官能化多臂聚合物是线性甲基丙烯酰氧基乙基磷酸胆碱共聚物。

[0065] 在这些方法的某些实施方案中,将第一层连续添加至第二层。在一些实施方案中,第二层处于适于通过孔口尺寸被设计为允许混合物在离心力下行进的锥形侧臂添加第一层的容器内。此类实施方案的一个例示是如图49所示的逐滴添加,以此方式生物表面进入含有悬浮剂的糖溶液中的第二官能化聚合物层。该过程避免了细胞被捕获在界面处并提供了高涂覆生物表面收率。在某些实施方案中,相对起始生物表面的量,将第一层以基本上连续的方式添加至第二层得到至少50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或更多的共形涂覆的生物表面收率,例如利用细胞(诸如胰岛)的连续添加方法使得至少50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或更多的起始(未涂覆的)细胞最后变为完全涂覆的细胞。在某些实施方案中,上孔口直径为200微米至5000微米;下孔直径为5微米至1000微米,优选为10微米至500微米。

[0066] 在本发明提供的组合物和方法的具体实施方案中,共形涂层的厚度小于约20 μm ,例如为约10-20 μm 、5-10 μm 、7.5-12.5 μm 或10 μm 。

[0067] 在本发明提供的组合物和方法的某些实施方案中,生物表面是活细胞(例如动物、

植物、细菌、酵母细胞)或细胞簇。在具体实施方案中,活细胞是动物细胞。在更具体的实施方案中,动物细胞是哺乳动物细胞。在更具体的实施方案中,哺乳动物细胞是人细胞。在生物表面是细胞的其他具体实施方案中,细胞是产生胰岛素的细胞。在生物表面是细胞的一些具体实施方案中,细胞是多能干细胞,诸如诱导的多能干细胞(iPSC),诸如哺乳动物 iPSC,诸如人 iPSC。

[0068] 在本发明提供的组合物和方法的其中细胞是产生胰岛素的细胞的具体实施方案中,在用约2mM至约20mM的葡萄糖刺激时,相对于未经共形涂覆的合适对照细胞,所述细胞以与合适对照细胞基本上相似的动力学和/或浓度分泌胰岛素,例如在约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25或30分钟内达到对照细胞的胰岛素分泌峰值和/或在对照细胞的胰岛素浓度的约5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%或50%内(例如,在10、20、60、90或120分钟时)。

[0069] 在相关方面,本发明提供了具有通过本发明提供的任何方法制备的水凝胶共形涂层的生物表面。

[0070] 在另一方面,本发明提供了包含本发明提供的生物表面和一种或多种药学上可接受的稀释剂或赋形剂的组合物,其例如用于通过施用治疗有效量的本发明提供的组合物治疗哺乳动物受试者。

[0071] 在另一方面,本发明提供了治疗有需要的受试者(例如,缺少或缺乏由本发明提供的组合物提供的某种生物学功能)的方法,所述方法包括提供改善受试者需要的本发明提供的组合物。在某些实施方案中,受试者是例如患有胰岛素依赖性糖尿病的人,诸如成人或儿童受试者。在这些方法中使用的本发明提供的组合物可以直接应用于受试者(例如通过注射或植入,在这种情况下,本发明提供的组合物被提供在适于施用于哺乳动物受试者诸如人的注射器中)或者可以被提供在植入受试者体内的生物相容性容器中,例如将本发明提供的组合物置于生物相容性容器内,所述生物相容性容器限制组合物在受试者体内的移动,不过是半透性的并且允许例如营养物质、氧气和治疗剂的扩散。

[0072] 实施例

[0073] 概述

[0074] 利用多臂点击反应性亲水聚合物实现超薄共形涂层,所述多臂点击反应性亲水聚合物能够在适合于特定活细胞的所需温度下在水性等渗体系中在中性pH下特异性地使一种聚合物与另一种聚合物反应。首先,使用聚苯乙烯颗粒(100至125微米范围)作为细胞球状体的模型,使用由4臂PEG-NHS和4臂PEG-NH₂组成的活化N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)酯方法来开展所述方法。为了实现这一点,初始将具有FITC标记的4臂PEG-NH₂层叠在颗粒表面上,发现这是该过程中的重要步骤。通过将颗粒与掺有4臂-PEG-(NH₂)₃-FITC(1%溶液)的5%4臂PEG-NH₂混合来完成此步骤。将混合物在30°C下真空干燥6小时。将所得粉末悬浮在含有4臂PEG-NHS(5%)的60%蔗糖溶液中。将混合物涡旋并用PBS缓冲液洗涤以除去过量的蔗糖、未反应的PEG和过量的荧光PEG聚合物及盐。收集颗粒并在共聚焦显微镜下在荧光场中可视化。显微图像证实,在颗粒表面上均匀形成了超薄涂层,其厚度范围为5至10微米,图1。由此证明了在水性体系中使用双反应性聚合物的共形涂层的概念,然而工作条件和诸如四PEG-NH₂、四-PEG-NHS酯的试剂以及真空干燥和高渗蔗糖60%溶液的使用对于活细胞而言是不可取的。

[0075] 研究了若干种悬浮介质来替换60%蔗糖溶液,据发现高分子量PEO(1百万至8百万)的1%溶液可用于替换高渗蔗糖溶液作为悬浮介质。此外,对以下进行了评估:用密度梯度方法替换真空干燥步骤,所述密度梯度方法为将第一聚合物与颗粒在高分子量PEO溶液中混合。这被视为一层。高分子量PEO的长聚合物链迫使4臂PEG-NH₂的短链暂时保留在颗粒表面上。当这些粒子如方案5(图23)所示行进到具有含4臂PEG-NHS的等渗蔗糖溶液的底层时,PEG-NHS分子穿透PEO链并与4臂PEG-NH₂快速反应,从而在颗粒表面上均匀地形成共价连接的水凝胶网络,图2、图3和图4。这证实了可以用1%PEO溶液替换高渗蔗糖(60%)溶液,并且可以通过使用密度梯度法消除真空干燥。虽然这种方法起作用并且是可再现的,但仍然对活细胞不理想,因为活化的酯可以与细胞表面蛋白质反应,因此期望通过更有利的聚合化学替换活化的酯。据信,点击化学将是适合活细胞的化学方法。

[0076] 诸如4臂PEG-DBCO(二苯并环辛炔)和4臂PEG-叠氮化物的点击反应性多臂PEG被认为可替换4臂PEG-NH₂和4臂PEG-NHS酯。点击反应在中性条件下进行,这对于活细胞是理想的。使用如上所述的密度梯度方法筛选若干种高分子量PEO(1百万至8百万)的不同浓度的溶液。这涉及在高分子量PEO溶液中将第一聚合物在颗粒表面上成层。高分子量PEO的长聚合物链迫使短链4臂PEG-DBCO暂时保留在颗粒表面上。当这些颗粒行进到具有含4臂PEG-叠氮化物的5%蔗糖溶液的底层时,PEG-叠氮化物分子穿透PEO链并与4臂PEG-DBCO快速反应,从而在颗粒表面上形成共价连接的水凝胶网络,图5和图6。发现这些条件对于活细胞的共形涂层是理想的。在将该共形涂层涂布到活细胞上之前,将点击化学方法应用于聚苯乙烯(PS)颗粒,发现它没有任何问题,图5和图6。然后将这些方法成功应用于HCT116细胞球状体(图7至图9)、胰岛素瘤细胞球状体(图13)和新鲜分离的大鼠胰岛(图14)。

[0077] 将HCT细胞球状体(hct116细胞系)、胰岛素瘤球状体(人源)或大鼠胰岛与4臂PEG-DBCO 5%溶液混合,该溶液掺有4臂PEG-(DBCO)3-FITC在PEO(1百万至8百万)1%溶液中的1%溶液。将混合物在10%蔗糖溶液中在4臂PEG-叠氮化物床上成层。高分子量PEO的长聚合物链可以在其行进到蔗糖层中时将短链4臂PEG-DBCO推向细胞表面,在蔗糖层中4臂PEG叠氮化物穿透并与4臂PEG-DBCO快速反应而在两种聚合物之间形成共价连接,从而在细胞球状体或胰岛周围均匀地形成薄涂层。通过离心力和PEO溶液的粘度来控制行进速率。涂层厚度可受颗粒行进速率、两种点击反应性PEG聚合物的浓度、悬浮剂聚合物分子量和粘度的影响。将涂覆的球状体沉降在底部,通过除去上清液收集这些涂覆的球状体。通过在4℃下离心,用缓冲液/血浆洗涤涂覆的球状体以除去添加剂,诸如PEO、蔗糖、盐和非反应性PEG。使用共聚焦显微镜以及常规荧光显微镜在荧光场下使涂覆的细胞球状体和胰岛可视化。在球状体周围均匀地形成了超薄涂层,其厚度范围为5至10微米。细胞在这些条件下存活并在涂覆后表现出它们全部的功能性。

[0078] 在第3天使用钙黄绿素(calcian)/乙啉同型二聚体-1(Ethd-1)在涂覆的HCT116球状体和相应的裸球状体中研究活/死细胞。发现涂覆的球状体具有高百分比的活细胞(呈绿色,图12),相比之下裸球状体具有显著高数量的死细胞(红色,图11)。该数据表明共形涂层为细胞提供了稳定性,因此与裸细胞相比在体外它们存活更长时间。

[0079] 将共形涂覆的胰岛素瘤球状体和大鼠胰岛的胰岛素分泌和释放动力学相应地与钡/藻酸盐微胶囊化的球状体/胰岛和未涂覆的球状体/胰岛进行比较。

[0080] 在低、中和高葡萄糖浓度下,响应于葡萄糖,共形涂覆的球状体和大鼠胰岛非常良

好地分泌胰岛素,与相应的未涂覆形式相当,但优于微胶囊化制剂(图15和图17)。

[0081] 发现共形涂覆制剂的胰岛素释放动力学优于裸制剂和钇/藻酸盐微胶囊化制剂(图16和图18)。

[0082] 材料和方法:

[0083] 4臂-PEG-NHS酯(分子量5k)、4臂-PEG-NHS酯(分子量5k和10k)、4臂PEG-叠氮化物(5k和10k),购自JenKem technology USA。4臂PEG-NH₂(5k和10k)购自Creative PEG Works。DBC0试剂和溶剂购自Sigma-Aldrich。聚苯乙烯颗粒(106至125微米尺寸)购自Polysciences Inc,PA,USA。在37°C,5%CO₂环境中,将培育为球状体的HCT 116细胞(购自Thermo Fisher Scientific)在掺有10%胎牛血清的McCoy 5a(Fisher Scientific)中培育72小时。

[0084] 实施例1:4臂-PEG-(NH₂)₃-FITC,[4臂-(PEG-NH₂)₃-PEG-NH-C(=S)=N-荧光素],分子量5k,方案1。

[0085] 将4臂PEG NH₂(分子量5k,0.5g,0.1mmol)溶解在DMF(10ml二甲基甲酰胺)中,在黑暗中向此添加异硫氰酸荧光素(39mg,0.1mmol)。将混合物在室温下搅拌6小时。将溶液使用1000分子量截留膜在去离子水中在黑暗中透析过夜,用去离子水交换4x1L。将溶液冻干。收集亮黄色粉末(512mg)并在-20°C下储存在琥珀色瓶中。

[0086] 实施例2:4臂-PEG-(NH₂)₃-FITC,[4臂-(PEG-NH₂)₃-PEG-NH-C(=S)=NH-荧光素],分子量10k,方案1。

[0087] 将4臂PEG NH₂(分子量10k,0.5g,0.05mmol)溶解在DMF(10ml)中,在黑暗中向此添加异硫氰酸荧光素(20mg,0.05mmol)。将混合物在室温下搅拌6小时。将溶液使用1000分子量截留膜在去离子水中在黑暗中透析过夜,用去离子水交换4x1L。将溶液冻干。收集亮黄色粉末(492mg)并在-20°C下储存在琥珀色瓶中。

[0088] 实施例3:-臂-PEG-(NHCO-PEG₄-DBC0)₃-NH₂,[4臂-聚乙二醇-{NH-CO-(CH₂CH₂-O)₃-CH₂CH₂NHCOCH₂CH₂CO-二苯并环辛炔}3-NH₂],分子量10k,方案2:

[0089] 将4臂PEG NH₂(分子量10k,1.0g,0.1mmol)溶解在二氯甲烷(20ml)中,向此添加DBC0-PEG₄-NHS酯(195mg,0.3mmol),并将混合物在室温下搅拌16小时。通过TLC监测反应。反应完成后,真空除去溶剂至5ml。将溶液逐滴倒入冷乙醚中。沉淀产物并通过过滤收集。用4x50ml乙醚彻底洗涤产物,并真空干燥4小时。得到的材料为淡黄色粉末1.1g。将其在-20°C下储存在琥珀色瓶中。

[0090] 实施例4:4臂-PEG-[NH-PEG₄-DBC0]₃-FITC,[4臂-聚乙二醇-NH-[CO-(CH₂CH₂-O)₃-CH₂CH₂NHCOCH₂CH₂CO-二苯并环辛炔]-硫氰酸荧光素],分子量10k,方案2。

[0091] 将4臂-PEG-{NHCO-PEG₄-DBC0}₃-NH₂(分子量10k,500mg,0.05mmol)溶解在DMF(5ml)中,在黑暗中向此添加异硫氰酸荧光素(20mg,0.05mmol)。在室温下搅拌混合物6小时。将溶液使用1000分子量截留膜在去离子水中在黑暗中透析过夜,用去离子水交换4x1L。将溶液冻干。收集亮黄色粉末(485mg)并在-20°C下储存在琥珀色瓶中。

[0092] 实施例5:4臂-PEG-NH-DBC0:4臂-聚乙二醇-{NH-CO-(CH₂)₄-co-二苯并环辛炔},分子量10k,方案3:

[0093] 将4臂PEG NH₂(分子量10k,1.4g,0.14mmol)溶解在磷酸盐缓冲液中,向此添加DBC0-磺基-NHS酯(0.30g,0.56mmol),并将混合物在室温下搅拌16小时。通过TLC监测反应。

反应完成后,将反应混合物逐滴倒入冷异丙醇(500ml)中,同时搅拌。沉淀产物,过滤收集产物。将产物再次溶解在 CH_2Cl_2 (20ml)中,并倒入冷乙醚(300ml)中。产物以粉末形式沉淀,过滤收集产物,用4x50ml乙醚彻底洗涤产物,并真空干燥4小时。得到的材料为淡黄色粉末1.65g。将其在 -20°C 下储存在琥珀色瓶中。

[0094] 实施例6:4臂-PEG-NH-PEG₄-DBCO:4臂-聚乙二醇-NH-CO-(CH₂CH₂-O)₃-CH₂CH₂NC₂COCH₂CH₂CO-二苯并环辛炔],分子量10k,方案4:

[0095] 将4臂PEG NH₂(分子量10k,1.4g,0.14mmol)溶解在二氯甲烷(30ml)中,向此添加DBCO-PEG₄-NHS酯(0.37g,0.56mmol),并将混合物在室温下搅拌16小时。通过TLC监测反应;反应完成后,真空除去溶剂至5ml。将溶液逐滴倒入冷乙醚中。沉淀产物,过滤收集产物,用4x50ml乙醚彻底洗涤,并真空干燥4小时。得到的材料为淡黄色粉末1.71g。将其在 -20°C 下储存在琥珀色瓶中。

[0096] 实施例7:含有点击反应性DBCO基团与PEG接头的点击反应性甲基丙烯酰氧基磷酸胆碱-烯丙胺共聚物的合成(方案5):

[0097] 将甲基丙烯酰氧基磷酸胆碱-烯丙胺共聚物的溶液(LIPIDURE[®]NH-01,5%聚合物溶液,20ml)加入圆底烧瓶中,向其中添加DBCO-PEG₄-NHS酯(400mg)的DMF(5ml)溶液,并在室温下用磁力搅拌棒搅拌混合物。立即向混合物中添加三乙胺(100 μL)以维持pH在约8.5,在室温下继续搅拌16小时。在反应结束时,将反应混合物透析(10K分子量截留膜)。将溶液冻干。得到的聚合物为白色粉末。¹H NMR(D₂O):0.96-1.16(m,CH₃);1.5-2.2m(主链CH₂);2.8-3.2m;3.8-4.4m;4.7m,6.8至7.3宽峰(芳族H)。

[0098] 实施例8:含有点击反应性叠氮基的甲基丙烯酰氧基磷酸胆碱-烯丙胺共聚物的合成(方案6):

[0099] 将甲基丙烯酰氧基磷酸胆碱-烯丙胺共聚物的溶液(LIPIDURE[®]NH-01,5%聚合物溶液,20ml)加入圆底烧瓶中,向其中添加叠氮基-PEG₁₂-NHS酯(400mg)的DMF(5ml)溶液,同时在室温下用磁力搅拌棒搅拌混合物。立即向混合物中添加三乙胺(100微升)以维持pH在约8.5,在室温下继续搅拌16小时。在反应结束时,将反应混合物透析(10K分子量截留膜)。将溶液冻干。得到的聚合物为白色粉末。¹H NMR(D₂O):3.15(s,季CH₃基团);3.58s,3.9-4.28(m,-CH₂)。

[0100] 实施例9:含有点击反应性DBCO基团与疏水烷基链接头的点击反应性甲基丙烯酰氧基磷酸胆碱-烯丙胺共聚物的合成(方案7):

[0101] 将甲基丙烯酰氧基磷酸胆碱-烯丙胺共聚物的溶液(LIPIDURE[®]NH-01,5%聚合物溶液,20ml)加入圆底烧瓶中,向其中添加DBCO-(C6-接头)-磺基N-羟基琥珀酰亚胺酯(400mg)粉末,并在室温下用磁力搅拌棒搅拌混合物。立即向混合物中添加NaHCO₃(100mg粉末)以维持pH在约7.4,在室温下继续搅拌16小时。在反应结束时,将反应混合物透析(10K分子量截留膜)。将溶液冻干。得到的聚合物为淡黄色棉状物质。¹H NMR(D₂O):0.98-1.18(m,CH₃);1.6-2.2m;2.8-3.4m;3.9-4.3m;4.8m,6.9至7.3m(芳族H)。

[0102] 实施例10:含有点击反应性DBCO基团与荧光素标签的点击反应性甲基丙烯酰氧基磷酸胆碱-烯丙胺共聚物的合成(方案8):

[0103] 在圆底烧瓶中装入含有点击反应性DBCO的甲基丙烯酰氧基磷酸胆碱-烯丙胺聚合

物(100mg)和磁力搅拌棒。向烧瓶中添加10ml去离子水并搅拌直至聚合物完全溶解。聚合物溶液的pH为7.1,用三乙胺将其调节至8.0。在小瓶中称量35mg异硫氰酸荧光素,并在黑暗中将其溶解在DMF(5ml)中。向聚合物溶液中添加异硫氰酸荧光素溶液,并将混合物在黑暗中搅拌过夜。在反应结束时,将反应混合物使用10K分子量截留膜在去离子水中在黑暗中透析。透析完成后,将透析袋的内容物冻干。得到的产物为明亮浅黄色海绵状物质(120mg)。通过与其他点击反应性聚合物混合直接使用该产品以涂覆生物表面。

[0104] 实施例11:HCT116球状体:HCT116细胞球状体的制备程序

[0105] 将HCT 116细胞系以每孔500、1000和1500个细胞的剂量接种到每个孔中,孔中含有100微升掺有10%胎牛血清的McCoy 5a缓冲液。将板在37°C,5%CO₂下孵育。72小时后,收集球状体并用PBS洗涤并立即用于共形涂覆。

[0106] 实施例12:大鼠胰岛素瘤细胞球状体:胰岛素瘤细胞球状体的制备程序

[0107] 将大鼠胰岛素瘤细胞(ins-1细胞)以每孔1000个的剂量接种到每个孔中,孔中含有100微升含有10%胎牛血清的DMEM培养基。将板在37°C,5%CO₂下孵育。72小时后,收集球状体并立即用于共形涂覆。

[0108] 实施例13:大鼠胰岛:直至进行涂覆前的胰岛分离和保存程序

[0109] 使用胶原酶消化法从Wistar大鼠分离大鼠胰岛。Carter等人,BIOLOGICAL PROCEDURES ONLINE,第11卷,第1期,2009。用导管插入近端胆总管并缓慢注射10ml冷胶原酶溶液。仔细进行全胰切除术以维持胰腺囊的完整性。将分离的胰腺组织在另外的5ml胶原酶溶液中于37°C下孵育20分钟,然后在剧烈摇动下使组织崩解。用30ml含有0.02%DNA酶I和1%牛血清白蛋白的冷HBSS缓冲液洗涤两次后,使其通过金属丝网筛,然后在4°C下以1300rpm离心3分钟。然后将物质悬浮在10ml histopaque-1077溶液中。用10ml含有0.02%DNA酶I和1%牛血清白蛋白的HBSS缓冲液覆盖组织悬浮液,然后在4°C下以1800rpm梯度离心3分钟。用移液管从顶层和第二层之间的界面收集纯化的胰岛,然后重复用RPMI-1640培养基洗涤。将洗涤过的胰岛冰藏保存,并立即用于共形涂覆。

[0110] 实施例14:共形涂覆方法:在用作悬浮介质的蔗糖中使用活化酯方法共形涂覆聚苯乙烯(PS)颗粒,然后真空干燥,之后涂覆。

[0111] 将聚苯乙烯(PS)颗粒(106至125微米尺寸,50mg)、4臂PEG-NH₂(5k,50mg)和4臂PEG(NH₂)₃-FITC(5k,200微升,1%溶液)与400微升水混合。将糊状物在30°C下在真空离心机上真空干燥6小时。将沉淀物悬浮在250微升蔗糖溶液(60%)中。将新鲜制备的活化的4臂PEG-NHS酯(5k)溶液(20mg溶解在80微升水中)添加到含PS颗粒的蔗糖溶液中,同时以2000rpm涡旋3分钟。将混合物在4°C下以3000rpm离心5分钟,并除去上清液。将沉淀物悬浮在PBS(2ml)中并涡旋以将涂覆的颗粒均匀地分散在溶液中并在4°C下以3000rpm再次离心5分钟。重复洗涤程序5次以除去过量的未反应的聚合物和蔗糖。将涂覆的颗粒转移到孔中用于显微评估。共聚焦显微图像显示,如在荧光场下可视化的,颗粒被均匀涂覆,图1。

[0112] 实施例15:在作为顶层悬浮介质的PEO(8百万分子量)1%溶液中用4臂PEG-NHS活化酯(10k)共形涂覆聚苯乙烯颗粒

[0113] 向2ml离心管中加入100微升15%蔗糖溶液(第3层)。在此层之上使200微升含4臂PEG-NHS(10k,20mg)的2.5%蔗糖溶液(第2层)成层。在其之上使含有以下物质的溶液的混合物成层:聚苯乙烯颗粒(1mg)、4臂PEG-NH₂(10k,5mg)、4臂PEG-(NH₂)₃-FITC(10k,5微升,

1%的去离子水溶液)和PEO(8百万分子量,50微升,1%溶液)(第1层)。将管密闭并在4℃下以1000rpm离心60分钟。

[0114] 将涂覆的PS颗粒沉降在底部,小心地除去上清液并用新鲜的去离子水(2ml)代替并涡旋以使床均匀分散在液体中并再次以1000rpm离心3分钟。除去上清液并用淡水替换并涡旋以分散床。洗涤程序重复4次。最后,将涂覆的颗粒置于孔中用于共聚焦显微研究。荧光场下的共聚焦显微图像显示,聚苯乙烯颗粒被均匀涂覆,图2。

[0115] 实施例16:在作为顶层悬浮介质的PEO(4百万分子量)1%溶液中用4臂PEG-NHS酯(10k)共形涂覆聚苯乙烯颗粒

[0116] 向2ml离心管中加入100微升15%蔗糖溶液(第3层)。在此层之上使200微升含4臂PEG-NHS(10k和20mg)的2.5%蔗糖溶液成层(第2层)。在其之上使含有以下物质的溶液的混合物成层:聚苯乙烯颗粒(1mg)、4臂PEG-NH₂(5mg,10k)、4臂PEG-(NH₂)₃-FITC(10k,5微升,1%的去离子水溶液)和PEO(4百万分子量,50微升,1%溶液)(第1层)。将管密闭并在4℃下以1000rpm离心60分钟。

[0117] 将涂覆的聚苯乙烯颗粒沉降在底部;小心地除去上清液,并用新鲜的去离子水(2ml)替换。将其涡旋以将床分散在液体中并再次以1000rpm离心3分钟。除去上清液并用淡水替换并涡旋以分散床。洗涤程序重复4次。最后,将涂覆的颗粒置于孔中用于共聚焦显微研究。荧光场下的共聚焦显微图像显示,颗粒被均匀涂覆,图3。

[0118] 实施例17:在作为顶层悬浮介质的PEO(1百万分子量)1%溶液中用4臂PEG-NHS活化酯(10k)共形涂覆聚苯乙烯颗粒

[0119] 向2ml离心管中加入100微升15%蔗糖溶液(第3层)。在其之上使200微升含4臂PEG-NHS(10k,20mg)的2.5%蔗糖溶液成层(第2层)。在其之上使含有以下物质的溶液的混合物成层:聚苯乙烯颗粒(1mg)、4臂PEG-NH₂(10k,5mg)、4臂PEG-(NH₂)₃-FITC(10k,5微升,1%的去离子水溶液)和PEO(1百万分子量,50微升,1%溶液)(第1层)。将管密闭并在4℃下以1000rpm离心60分钟。

[0120] 将涂覆的聚苯乙烯颗粒沉降在底部;小心地除去上清液,并用新鲜的去离子水(2ml)替换。将其涡旋以将床分散在液体中并再次以1000rpm离心3分钟。除去上清液并用淡水替换并涡旋以分散床。洗涤程序重复4次。最后,将涂覆的颗粒置于孔中用于共聚焦显微研究。荧光场下的共聚焦显微图像显示,与PEO(8百万或4百万)悬浮剂相比,在PEO(1百万分子量)悬浮剂中聚苯乙烯颗粒被均匀涂覆的程度较低,图4、图3和图2。

[0121] 实施例18:在作为顶层悬浮介质的PEO(1百万分子量)1%溶液中用点击反应性聚合物共形涂覆聚苯乙烯颗粒

[0122] 向2ml离心管中加入100微升10%蔗糖溶液(第3层)。在其之上使200微升含4臂PEG-叠氮化物(10k分子量,10mg)的5%蔗糖溶液成层(第2层)。再次在第2层之上使含有以下物质的溶液的混合物成层:PS颗粒(1mg)、4臂PEG-NH-DBCO(10k,1.25mg)、4臂-PEG-[NH-(PEG)₄-dbco]₃-FITC(10k,1.25微升,1%的去离子水溶液)和PEO(1百万分子量,50微升,1%溶液)(第1层)。将管密闭并在4℃下以1000rpm离心10分钟。

[0123] 将涂覆的颗粒沉降在底部。小心地除去上清液,并用新鲜的去离子水(2ml)替换。将其涡旋以将床分散在液体中并再次以1000rpm离心3分钟。除去上清液并用淡水替换并涡旋以分散床。洗涤程序重复4次。最后,将洗涤过的涂覆的颗粒置于孔中用于共聚焦显微研

究。荧光场下的共聚焦显微图像显示,珠粒被均匀涂覆。参见图5。

[0124] 实施例19:在作为顶层悬浮介质的PEO(8百万分子量)1%溶液中用点击反应性聚合物共形涂覆聚苯乙烯颗粒

[0125] 向2ml离心管中加入100微升10%蔗糖溶液(第3层)。在此层之上使200微升含4臂peg-叠氮化物(10k分子量,10mg)的5%蔗糖溶液成层(第2层)。在第2层之上含有以下物质的溶液的混合物成层:PS颗粒(1mg)、4臂PEG-NH-DBCO(10k,1.25mg)、4臂-PEG-[NH-(PEG)₄-DBCO]₃-FITC(10k,1.25微升,1%的去离子水溶液)和PEO(8百万分子量,50微升,1%溶液)(第1层)。将管密闭并在4℃下以1000rpm离心10分钟。

[0126] 将涂覆的珠粒沉降在底部。小心地除去上清液并用新鲜的去离子水(2mL)替换并涡旋以使床均匀分散在液体中并再次以1000rpm离心3分钟。除去上清液并用淡水替换并涡旋以分散床。洗涤程序重复4次。最后,将洗涤过的涂覆的颗粒置于孔中用于共聚焦显微研究。荧光场下的共聚焦显微图像显示,与PEO(1百万分子量)悬浮介质相比,在PEO(8百万分子量)悬浮介质中PS颗粒被均匀涂覆的程度较低。参见图5和图6。

[0127] 实施例20:在作为顶层悬浮介质的PEO(1百万分子量)1%溶液中用点击反应性聚合物共形涂覆HCT116细胞球状体(初始剂量每个球状体500个细胞)的方法

[0128] 向2ml离心管中加入200微升含4臂peg-叠氮化物(10k分子量,10mg)的10%蔗糖溶液(第2层)。在其之上使含有以下物质的溶液的混合物成层:HCT-116细胞球状体(30个球状体)、4臂PEG-NH-DBCO(10k,1.25mg)、4臂-PEG-[NH-(PEG)₄-DBCO]₃-FITC(10k,1.25微升,1%的去离子水溶液)和PEO(1百万分子量,50微升,1%的盐水溶液)(作为第1层)。将管密闭并在4℃下以1000rpm离心3分钟。

[0129] 将涂覆的细胞球状体沉降在底部。小心地除去上清液并用新鲜的McCoy 5a缓冲液(掺有10%胎牛血清,2ml)替换并涡旋以将床分散在液体中并再次以1000rpm离心3分钟。除去上清液并用3ml新鲜缓冲液替换并涡旋以分散床。洗涤程序重复4次。最后,将具有缓冲液的涂覆的细胞球状体置于孔中用于共聚焦显微研究。荧光场下的共聚焦显微图像显示,与PEO(4百万和8百万分子量)悬浮介质相比,HCT116细胞球状体被均匀涂覆的程度较低,图7。

[0130] 实施例21:在作为顶层悬浮介质的PEO(4百万分子量)1%溶液中用点击反应性聚合物共形涂覆HCT细胞116球状体(初始剂量每个球状体500个细胞)

[0131] 向2ml离心管中加入200微升含4臂PEG-叠氮化物(10k分子量,10mg)的10%蔗糖溶液(第2层,底层)。在其之上使含有以下物质的溶液的混合物成层:HCT-116球状体(30个球状体)、4臂PEG-NH-DBCO(1.25mg)、4臂-PEG-[NH-PEG₄-DBCO]₃-FITC(10k,1.25微升,1%的去离子水溶液)和PEO(1百万分子量,50微升,1%的盐水溶液)(第1层,顶层)。将管密闭并在4℃下以1000rpm离心3分钟。

[0132] 将涂覆的球状体沉降在底部。小心地除去上清液,并用新鲜的McCoy 5a缓冲液(掺有10%胎牛血清,2ml)替换。将其涡旋以将床分散在液体中并再次以1000rpm离心3分钟。除去上清液并用3ml新鲜缓冲液替换并涡旋以分散床。洗涤程序重复4次。最后,将具有缓冲液的涂覆的细胞球状体置于孔中用于共聚焦显微研究。荧光场下的共聚焦显微图像显示,HCT116细胞球状体被均匀涂覆,且发现与PEO(1百万分子量)悬浮介质相比效果更好,图8。

[0133] 实施例22:在作为顶层悬浮介质的PEO(8百万分子量)1%溶液中用点击反应性聚合物共形涂覆HCT116细胞球状体(初始剂量每个球状体500个细胞)

[0134] 向2ml离心管中加入200微升含4臂PEG-叠氮化物(10k分子量,10mg)的10%蔗糖溶液(第2层,底层)。在其之上使含有以下物质的溶液的混合物成层:HCT-116细胞球状体(30个球状体)、4臂PEG-NH-DBCO(1.25mg)、4臂-PEG-[NH-(PEG)₄-DBCO]₃-FITC(10k,1.25微升,1%的去离子水溶液)和PEO(8百万分子量,50微升,1%的盐水溶液)(第1层,顶层)。将管密闭并在4℃下以1000rpm离心3分钟。

[0135] 将涂覆的球状体沉降在底部。小心地除去上清液,并用新鲜的McCoy 5a缓冲液(掺有10%胎牛血清,2ml)替换。将其涡旋以将床分散在液体中并再次以1000rpm离心3分钟。除去上清液并用3ml缓冲液替换并涡旋以分散床。洗涤程序重复4次。最后,将具有缓冲液的涂覆的细胞球状体置于孔中用于共聚焦显微研究。荧光场下的共聚焦显微图像显示,HCT116细胞球状体被均匀涂覆,且发现与PEO(1百万)悬浮介质相比效果更好,图9。

[0136] 实施例23:在作为顶层中的悬浮介质的PEO(8百万分子量)1%溶液中用点击反应性聚合物共形涂覆HCT116细胞球状体(初始剂量每个球状体1000个细胞)

[0137] 向2ml离心管中加入200微升含4臂PEG-叠氮化物(10k分子量,20mg)的10%蔗糖溶液(第2层,底层)。在其之上使含有以下物质的溶液的混合物成层:HCT-116细胞球状体(30个球状体)、4臂PEG-NH-DBCO(2.5mg)、4臂-PEG-[NH-(PEG)₄-DBCO]₃-FITC(10k,2.5微升,1%的去离子水溶液)和PEO(8百万分子量,50微升,1%的盐水溶液)(第1层,顶层)。将管密闭并在4℃下以1000rpm离心3分钟。

[0138] 将涂覆的球状体沉降在底部,并小心地除去上清液,随后添加2ml新鲜的McCoy 5a缓冲液(掺有10%胎牛血清)。将管涡旋以将床均匀地分散在液体中并再次以1000rpm离心3分钟。除去上清液并用3ml新鲜的McCoy 5a缓冲液替换,并再次涡旋以分散床。洗涤程序重复4次。最后,将涂覆的球状体置于孔中用于共聚焦显微研究。荧光下的共聚焦显微图像显示,如图所示的被均匀涂覆,图10。

[0139] 实施例24:活/死细胞测定

[0140] 活细胞由细胞内酯酶活性加以区分,通过将实际上非荧光的钙黄绿素AM酶促转化为荧光钙黄绿素部分可确定该活性。钙黄绿素AM染料是一种多阴离子性染料,它保留在活细胞内并与细胞内酯酶反应,产生ex/em约495nm/约515nm的强烈的绿色荧光。相比之下,乙锭同型二聚体-1(EthD-1)进入具有死细胞受损膜的细胞,并且在与核酸结合后经历40倍的荧光增强,产生ex/em约495/约635nm的明亮的红色荧光。Ethd-1被活细胞的完整质膜排除。这两种染料的组合将提供给定样品的活/死细胞的图片。

[0141] 实施例25:活/死细胞测定程序

[0142] 将20微升的2mM Ethd-1储备溶液加入10ml无菌组织培养级Dulbecco PBS中。将5微升的4mM钙黄绿素AM的DMSO溶液添加到Ethd-1溶液中,并将混合物涡旋。所得活/死试剂在溶液中每4微摩尔Ethd-1含有2微摩尔钙黄绿素。向多孔板的每个孔中加入100微升含细胞的试验溶液,向其中添加100微升活/死试验试剂并在37℃下孵育30分钟。在共焦显微镜下在两个不同波长ex/em约495nm/约515nm和约495/约635nm下评估细胞。

[0143] 实施例26:涂覆的HCT116细胞球状体和裸HCT116细胞球状体的显微检查和活/死活力测定

[0144] 新鲜制备涂覆的HCT细胞116球状体(初始剂量1000个细胞/球状体)并分成两部分。如实施例19中所述,用4臂PEG-DBCO和4臂PEG叠氮化物向一部分涂布共形涂层。使用钙

黄绿素AM/EthD-1测定立即评估涂覆的球状体和裸细胞球状体的细胞活力。涂覆的球状体以及裸球状体初始具有活细胞并且没有死细胞。在于37℃,5%CO₂,McCoy 5a缓冲液中老化时,与涂覆的细胞球状体相比(图12),在第3天裸球状体中发生的细胞死亡相当高(图11)。

[0145] 实施例27:在作为顶层悬浮介质的PEO(1百万分子量)1%溶液中用点击反应性聚合物共形涂覆胰岛素瘤细胞球状体

[0146] 向2ml离心管中加入200微升含4臂PEG-叠氮化物(10k分子量,10mg)的10%蔗糖溶液(作为第2层,底层)。在其之上使含有以下物质的溶液的混合物成层:胰岛素瘤球状体(1000个球状体)、4臂PEG-NH-DBCO(2.5mg)、4臂-PEG-[NH-(PEG)₄-DBCO]₃-FITC(10k,2.5微升,1%的去离子水溶液)和PEO(1百万分子量,50微升,1%的盐水溶液)(第1层)。将管密闭并在4℃下以1000rpm离心3分钟。

[0147] 将涂覆的球状体沉降在底部,并小心地除去上清液,随后添加2ml盐水。将管涡旋以将床分散在液体中并再次以1000rpm离心3分钟。除去上清液并用2ml新鲜盐水替换,然后涡旋以分散床。洗涤程序重复4次。最后,将洗涤过的涂覆的球状体置于孔中用于荧光显微研究。荧光显微图像显示,胰岛素瘤细胞球状体被均匀涂覆,图13。

[0148] 实施例28:在作为顶层悬浮介质的PEO(1百万分子量)1%溶液中用点击反应性聚合物共形涂覆大鼠胰岛

[0149] 向2ml离心管中加入200微升含4臂PEG-叠氮化物(10k分子量,10mg)的10%蔗糖溶液(第2层,底层)。在其之上使含有以下物质的溶液的混合物成层:胰岛(100个胰岛)、4臂PEG-NH-DBCO(2.5mg)、4臂-PEG-[NH-(PEG)₄-DBCO]₃-FITC(10k,2.5微升,1%的去离子水溶液)和PEO(1百万分子量,50微升,1%的盐水溶液)(第1层,顶层)。将管密闭并在4℃下以1000rpm离心3分钟。

[0150] 将涂覆的胰岛沉降在底部,并小心地除去上清液,随后添加2ml新鲜盐水。将管涡旋以将床分散在液体中并再次以1000rpm离心3分钟。除去上清液并用2ml新鲜盐水替换,然后涡旋以分散床。洗涤程序重复4次。最后,将洗涤过的涂覆的胰岛置于孔中用于荧光显微研究。荧光显微图像显示,如所示的胰岛被涂覆,图14。

[0151] 实施例29:在作为顶层中的悬浮介质的PEO溶液中用点击反应性MPC聚合物共形涂覆ARPE-19细胞球状体。

[0152] 向2ml离心管中加入200微升含叠氮化物改性的MPC聚合物(10mg)的10%蔗糖溶液作为第2层(底层)。在其之上使含有以下物质的溶液的混合物成层:ARPE-19球状体(50个球状体)、DBCO改性的MPC聚合物(2.5mg)、FITC标记的DBCO改性的MPC聚合物(0.025mg)和PEO(1百万分子量,50微升,1%的盐水溶液)(第1层)。将管密闭并以1000rpm离心3分钟。将涂覆的球状体沉降在底部,并小心地除去上清液,随后添加2ml盐水。将管涡旋以将床分散在液体中并再次以1000rpm离心3分钟。除去上清液并用2ml新鲜PBS替换,然后涡旋以分散床。洗涤程序重复3次。最后,将洗涤过的涂覆的球状体置于孔中并在37℃下在DMEM培养基中培养用于共聚焦显微研究。共聚焦显微图像显示,ARPE-19细胞球状体被均匀涂覆,并随着时间的推移与涂覆的聚合物逐渐融合,图19-图21。

[0153] 实施例30:在作为两个层中的悬浮介质的PEO溶液中用点击反应性MPC聚合物共形涂覆ARPE-19细胞球状体

[0154] 向2ml离心管中加入200微升含叠氮化物改性的MPC聚合物(10mg)和PEO(1百万分

子量,2mg)的10%蔗糖溶液作为第2层(底层)。在其之上使含有以下物质的溶液的混合物成层:ARPE-19球状体(50个球状体)、DBCO改性的MPC聚合物(2.5mg)、FITC标记的DBCO改性的MPC聚合物(0.025mg)和PEO(1百万分子量,50微升,1%的盐水溶液)(第1层)。将管密闭并以1000rpm离心3分钟。将涂覆的球状体沉降在底部,并小心地除去上清液,随后添加2ml盐水。将管涡旋以将床分散在液体中并再次以1000rpm离心3分钟。除去上清液并用2ml新鲜PBS替换,然后涡旋以分散床。洗涤程序重复3次。最后,将洗涤过的涂覆的球状体置于孔中并在37℃下在DMEM培养基中培养用于共聚焦显微研究。共聚焦显微图像显示,ARPE-19细胞球状体被均匀涂覆,是稳定的且在2个月后未融合,图22-图28。

[0155] 实施例31:在两个层中使用悬浮介质并通过连续添加顶层的方法用点击反应性聚合物共形涂覆ARPE-19细胞球状体

[0156] 将10微升含有DBCO改性的MPC聚合物(0.5mg)、FITC标记的DBCO改性的MPC聚合物(0.05mg)和PEO(1百万分子量,0.1mg)的悬浮200个ARPE-19球状体的盐水溶液引入移液管尖端,并装配在微管中,该微管在底部填充有200微升含叠氮化物改性的MPC聚合物(10mg)和PEO(1百万分子量,2mg)的10%蔗糖溶液。将微管使用台式离心机以1000rpm离心3分钟。将涂覆的球状体沉降在底部,并小心地除去上清液,随后添加2ml盐水。将管涡旋以将床分散在液体中并再次以1000rpm离心3分钟。除去上清液并用2ml新鲜PBS替换,然后涡旋以分散床。洗涤程序重复3次。最后,将洗涤过的涂覆的球状体置于孔中并在37℃下在DMEM培养基中培养用于共聚焦显微研究。共聚焦显微图像显示,ARPE-19细胞球状体被均匀涂覆,并以高收益率获得,图29。

[0157] 实施例32:在两个层中使用悬浮介质并通过连续添加顶层的方法用点击反应性MPC聚合物共形涂覆大鼠胰岛

[0158] 将50个胰岛(5微升体积)悬浮于含有DBCO改性的MPC聚合物(0.25mg)、FITC标记的DBCO改性的MPC聚合物(0.025mg)和PEO(1百万分子量,0.05mg)的盐水溶液中,引入移液管尖端,并装配在微管中,该微管在底部填充有100微升含叠氮化物改性的MPC聚合物(5mg)和PEO(1百万分子量,1mg)的10%蔗糖溶液。将微管使用台式离心机以1000rpm离心3分钟。将涂覆的胰岛沉降在底部,并小心地除去上清液,随后添加2mL盐水。将管涡旋以将床分散在液体中并再次以1000rpm离心3分钟。除去上清液并用2mL新鲜PBS替换,然后涡旋以分散床。洗涤程序重复3次。最后,将洗涤过的涂覆的胰岛置于孔中并在37℃下在RPMI培养基中培养用于共聚焦显微研究。共聚焦显微图像显示,胰岛被均匀涂覆,并且涂覆的聚合物稳定存在长达26天,图30-图33。

[0159] 实施例33:与裸胰岛素瘤细胞球状体相比较的,对实施例27的涂覆的胰岛素瘤细胞球状体的胰岛素分泌研究

[0160] 将涂覆的胰岛素瘤球状体和裸胰岛素瘤球状体(各自100个球状体)在37℃下置于含有1mL的1毫摩尔葡萄糖Krebs缓冲液(Sigma)的孔中保持1小时以进行平衡和预孵育。然后在37℃下在低葡萄糖(3毫摩尔,1mL)、高葡萄糖(10毫摩尔,1mL)和低葡萄糖(3毫摩尔,1mL)Krebs缓冲液中连续孵育2小时。在于低葡萄糖缓冲液中孵育结束时,收集100微升上清液用于测定。对于高葡萄糖缓冲液,在每个时间点(10、30、60、90、120分钟)收集30微升上清液用于测定,并且对于低葡萄糖缓冲液再次收集100微升上清液用于测定。通过ELISA测定收集的样品。对于涂覆的球状体和裸球状体都证实了对葡萄糖的胰岛素分泌响应性,并且

在高葡萄糖缓冲液中涂覆的球状体的胰岛素分泌与裸球状体相当。参见图15。在高葡萄糖缓冲液中未观察到涂覆的球状体出现胰岛素分泌延迟并且这是相对于裸球状体而言的,但发现这优于微胶囊化(钡/藻酸盐)制剂。数据绘制在图16中。

[0161] 实施例34:与裸胰岛相比较,使用实施例28的涂覆的大鼠胰岛的胰岛素分泌研究

[0162] 将涂覆的大鼠胰岛和裸胰岛(各自20个胰岛)在37°C下置于含有1mL的1毫摩尔葡萄糖Krebs缓冲液的孔中保持1小时以进行平衡和预孵育。然后在37°C下在低葡萄糖(2mM, 1mL)、高葡萄糖(20mM, 1mL)和低葡萄糖(2mM, 1mL) Krebs缓冲液中连续孵育2小时。在于低葡萄糖缓冲液中孵育结束时,收集100微升上清液用于测定。对于高葡萄糖缓冲液,在每个时间点(10、30、60、90、120分钟)收集30微升上清液用于测定,并且对于低葡萄糖缓冲液再次收集100微升上清液用于测定。通过ELISA测定收集的样品。对于涂覆的球状体和裸球状体都证实了对葡萄糖的胰岛素分泌响应性,并且在高葡萄糖缓冲液中涂覆的胰岛的胰岛素分泌与裸胰岛相当,图17。在高葡萄糖缓冲液中未观察到涂覆的球状体出现胰岛素分泌延迟并且这是相对于裸球状体而言的,但发现这优于微胶囊化(钡/藻酸盐)制剂。数据绘制在图18中。

[0163] 实施例35:实施例32的通过连续添加方法涂覆的胰岛以及裸大鼠胰岛的显微检查和活/死活力测定。

[0164] 将胰岛用Dulbecco磷酸盐缓冲盐水(DPBS)简单冲洗,并在由4 μ m钙黄绿素AM和8 μ m乙锭同型二聚体-1(EthD-1)组成的DPBS中孵育30min。在共聚焦显微镜上评估胰岛的活力。涂覆的球状体以及裸球状体初始具有几乎所有的活细胞。在于培养基中老化时,裸胰岛在第29天由于彼此聚集而引起中央细胞坏死,而涂覆的胰岛由于涂覆的聚合物的作用避免了聚集而仍然存活,图34-图37

[0165] 实施例36:与裸胰岛相比较,对实施例32的通过连续添加方法涂覆的大鼠胰岛的胰岛素分泌研究

[0166] 将涂覆的大鼠胰岛和裸胰岛(各自20个胰岛)在37°C下置于含有1mL的1mM葡萄糖Krebs缓冲液的孔中保持1小时以进行平衡和预孵育。然后在37°C下在低葡萄糖(2mM, 1mL)、高葡萄糖(20mM, 1mL)和低葡萄糖(2mM, 1mL) Krebs缓冲液中连续孵育2小时。在于每种葡萄糖缓冲液中孵育结束时,收集100 μ L上清液用于测定。通过ELISA测定收集的样品。发现在体外培养中,直至第17天裸胰岛和涂覆的胰岛的胰岛素分泌功能都是一致的,然而在第23天裸胰岛的功能显著降低,而涂覆的胰岛仍维持其功能,图38、图39。

[0167] 应当理解,对于描述本申请中的一些参数的所有数值边界,诸如“约”、“至少”、“小于”和“多于”,该描述也必然包括由所述值界定的任何范围。因此,例如描述“至少1、2、3、4或5”还尤其描述了范围1-2、1-3、1-4、1-5、2-3、2-4、2-5、3-4、3-5和4-5等。

[0168] 对于本文引用的所有专利、申请或其他参考文献,诸如非专利文献和参考序列信息,应当理解为出于所有目的以及所叙述的命题将它们以引用方式整体并入。如果以引用方式并入的文件与本申请之间存在任何冲突,则将以本申请为准。

[0169] 本申请中使用的标题只是为了方便,并不影响本申请的解释。

[0170] 本发明提供的每个方面的优选特征适用于本发明的所有其他方面,加以必要的变更,并且不受限制地由从属权利要求例示,并且还包括本发明的具体实施方案和方面(包括工作实施例)的各个特征(例如元素,包括数值范围和示例性实施方案)的组合和排列。例

如,在不脱离本发明的情况下,工作实施例中例示的具体实验参数可以适用于要求保护的本发明的零碎实施方案。例如,对于所公开的材料,尽管可能没有明确地公开所具体提到的这些化合物的每一种不同的个体和集合的组合和排列,但是本文具体地考虑和描述了每一个。因此,如果公开了一类元素A、B和C以及一类元素D、E和F并公开了元素A-D的组合的示例,则即使没有单独叙述每个组合,也单独地和集体地考虑了每个组合。因此,在该示例中,具体考虑了组合A-E、A-F、B-D、B-E、B-F、C-D、C-E和C-F中的每一个,并且应当被视为公开了A、B和C;D、E和F;和示例组合A-D。同样地,也明确考虑并公开这些的任何子集或组合。因此,例如,具体考虑了A-E、B-F和C-E的子组,并且应当被视为公开了A、B和C;D、E和F;和示例组合A-D。该概念适用于本申请的所有方面,包括物质组合物的元素以及制备或使用这些组合物的方法的步骤。

[0171] 如本领域普通技术人员根据说明书的教导所认识到的,本发明的前述方面可以以任何组合或排列的方式要求保护,达到它们对于现有技术是新颖的且非显而易见的程度—因此在本领域普通技术人员已知的一个或多个参考文献中描述元素的程度上,它们可以尤其通过特征或特征组合的否定附带条件或免责声明而从要求保护的发明中排除。

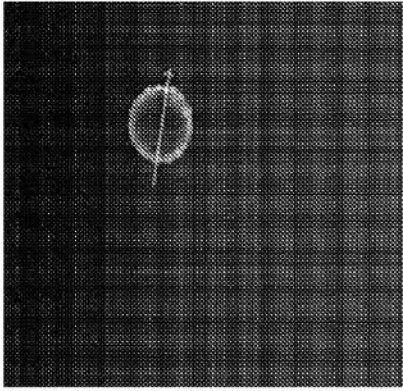


图 1

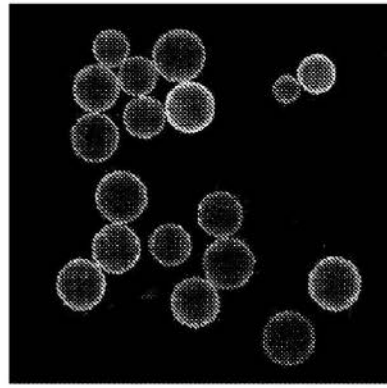


图 2

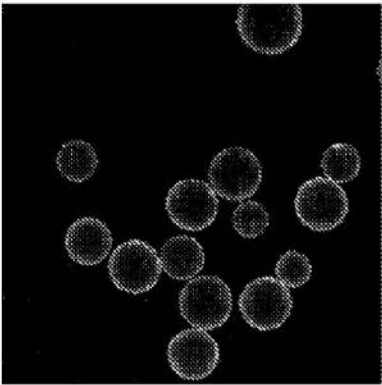


图 3

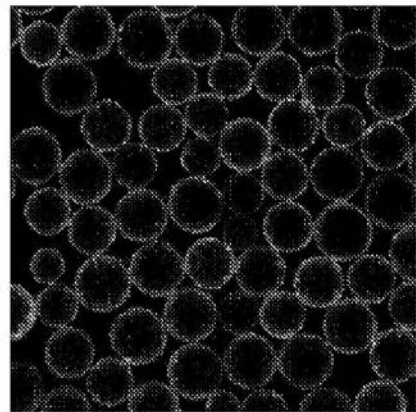


图 4

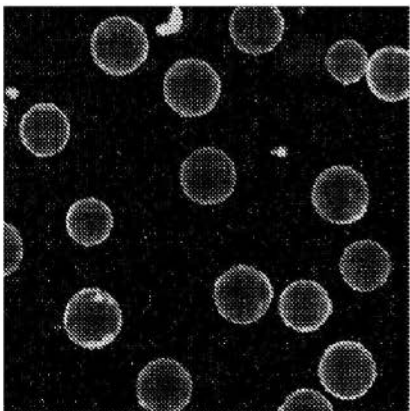


图 5

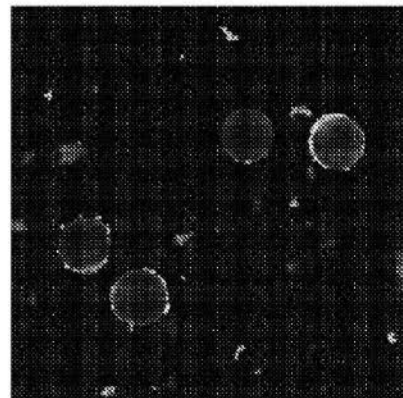


图 6

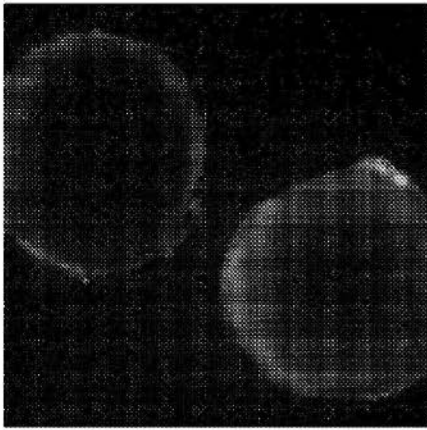


图 7

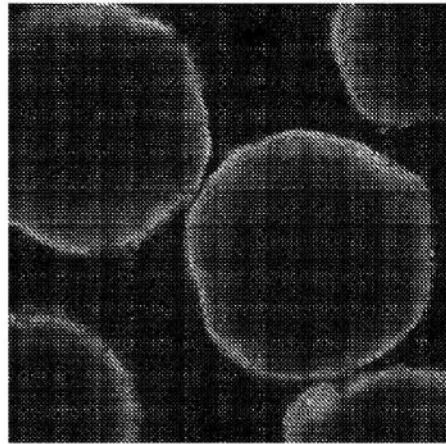


图 8

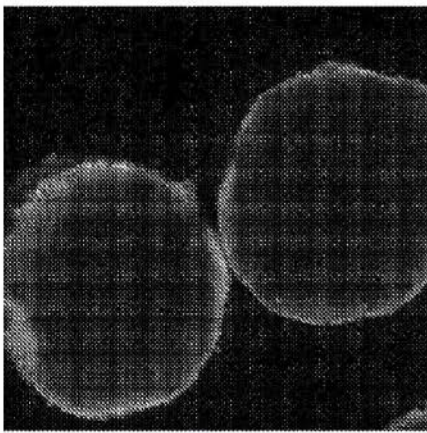


图 9

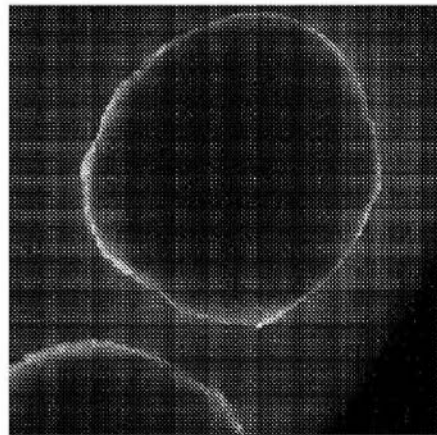


图 10

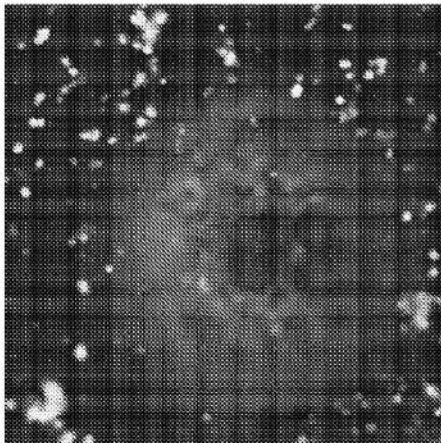


图 11

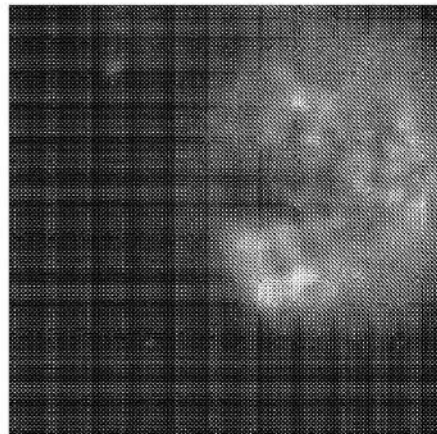


图 12

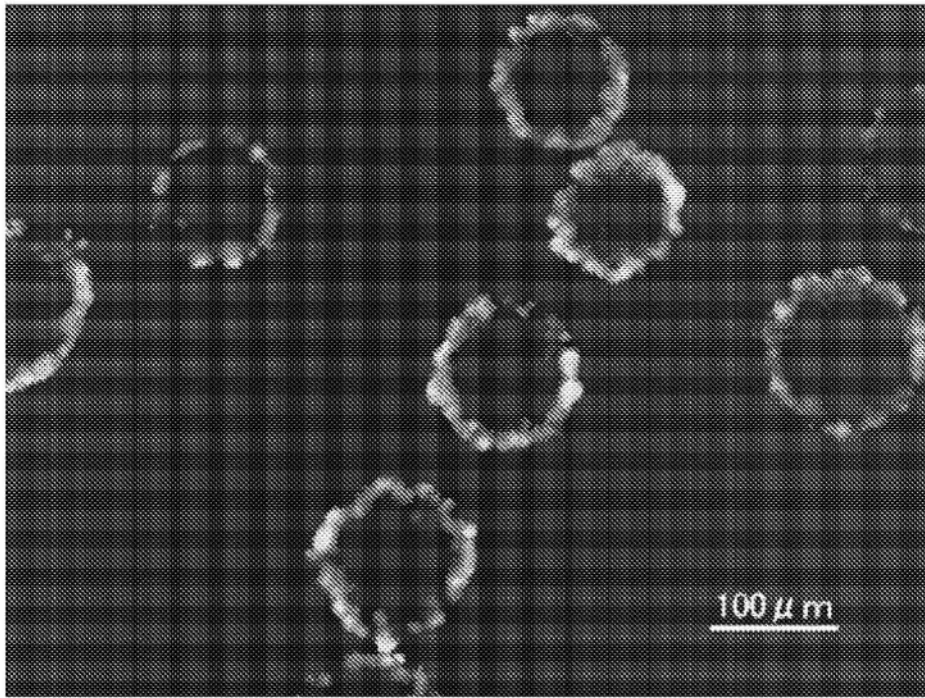


图 13

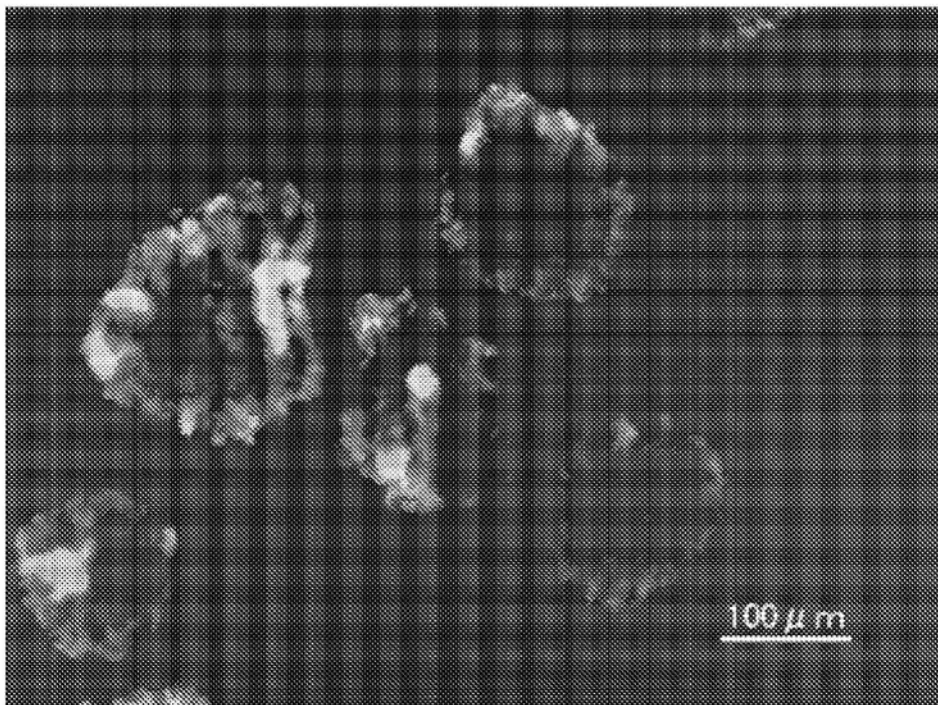


图 14

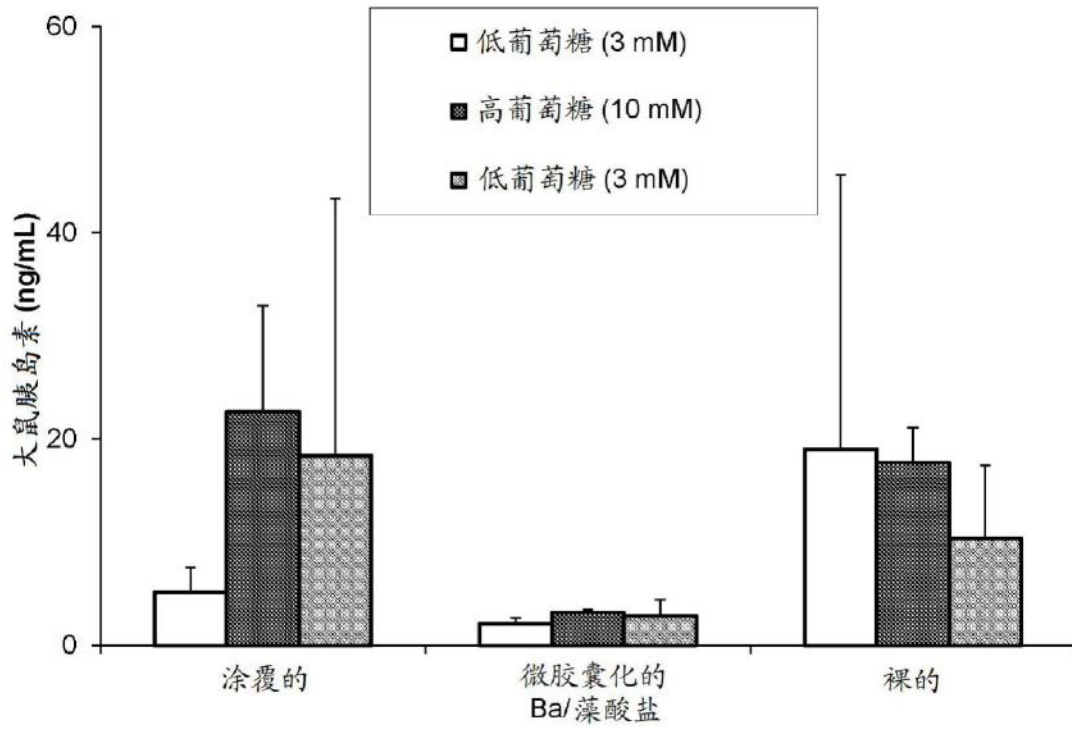


图15

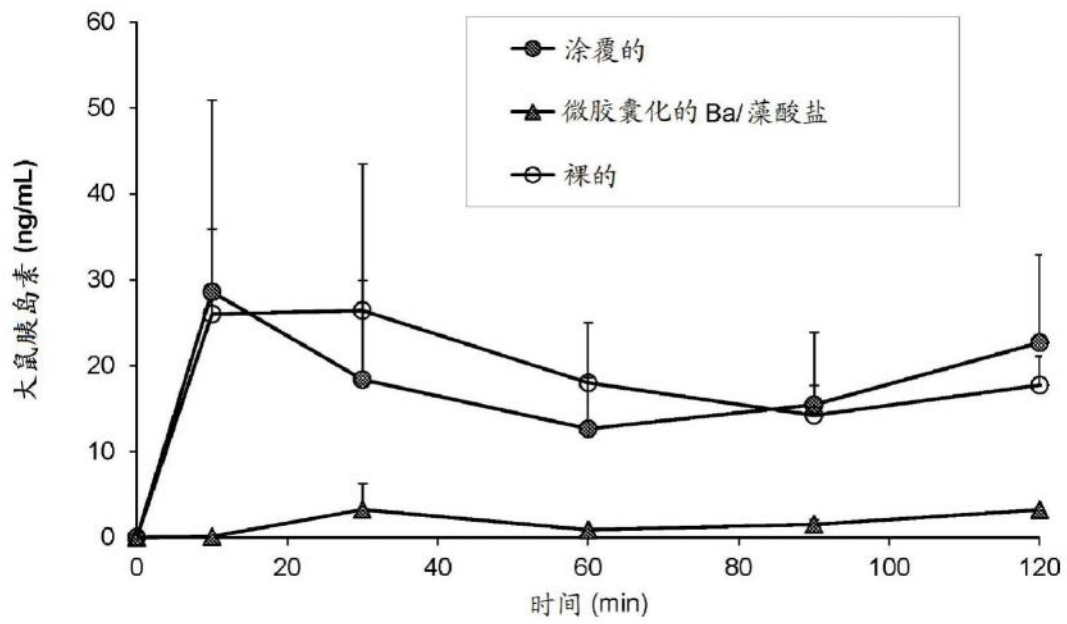


图16

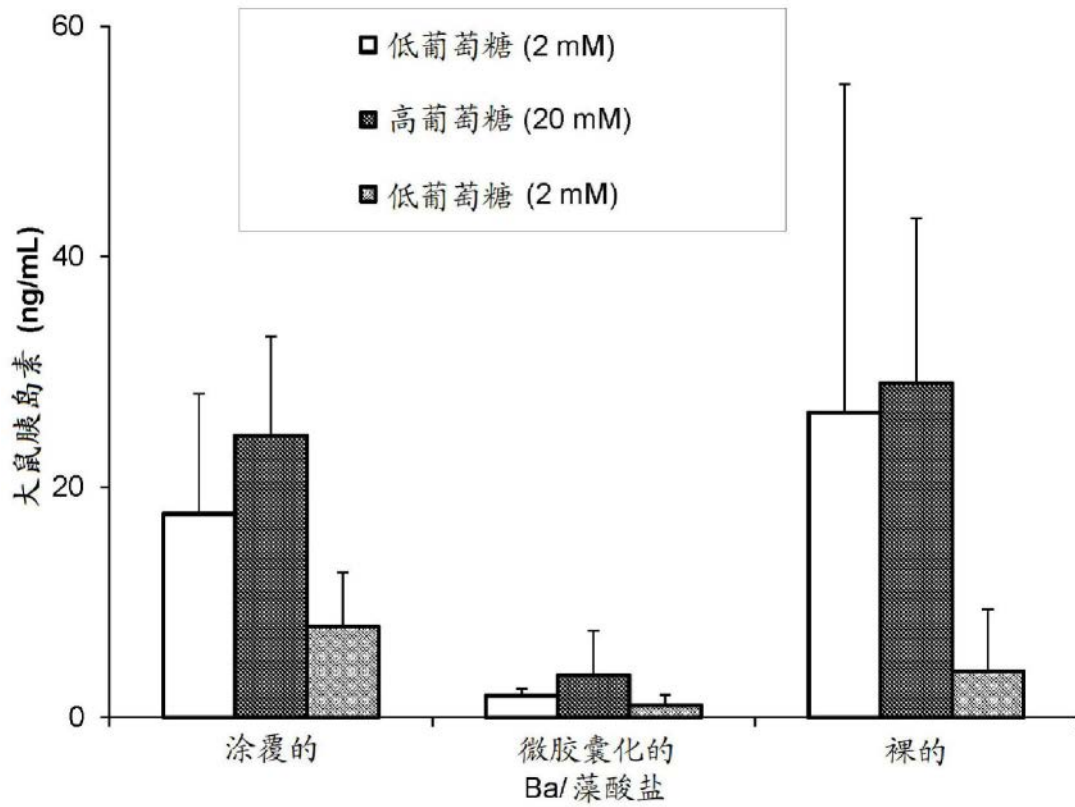


图17

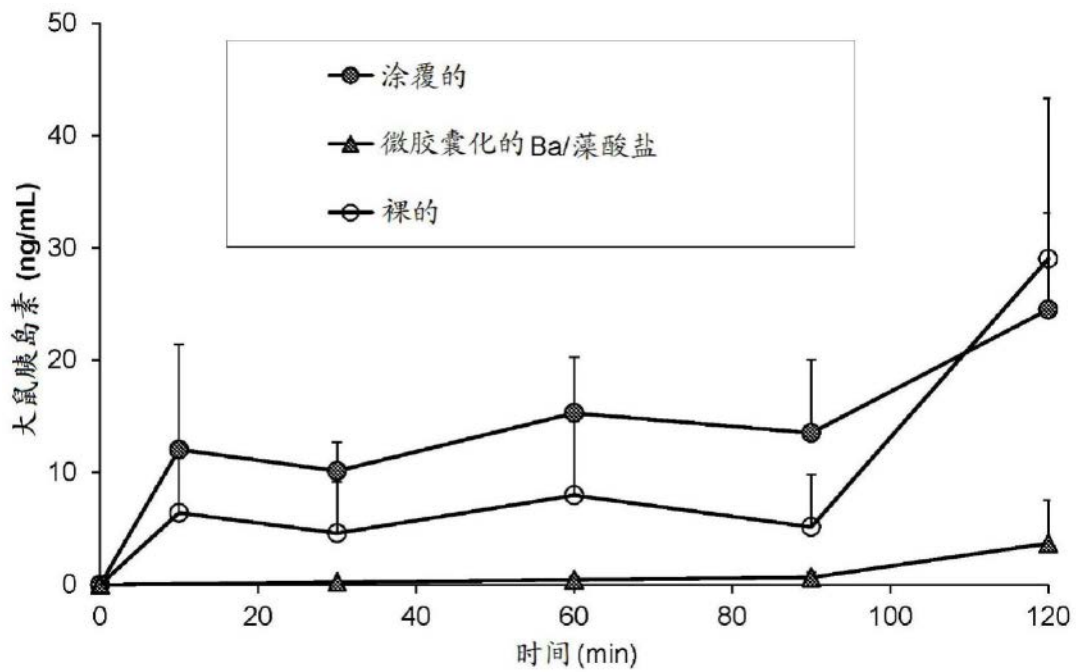


图18

第**1**天

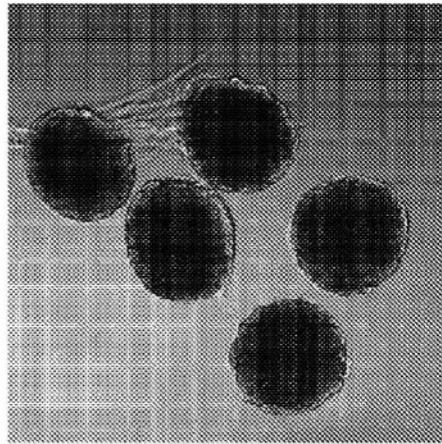


图 19

第**3**天

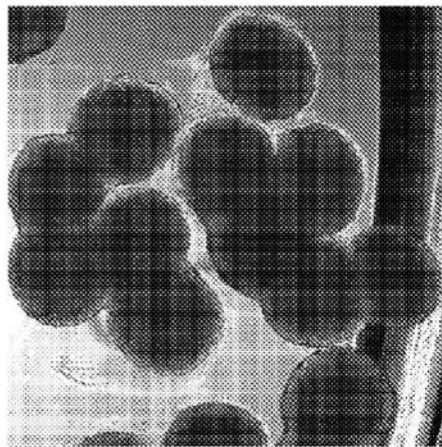


图 20

第**11**天

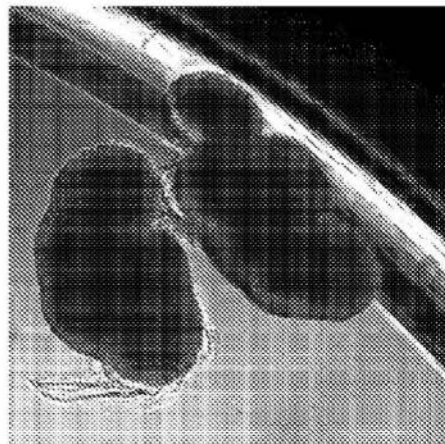


图 21

第1天

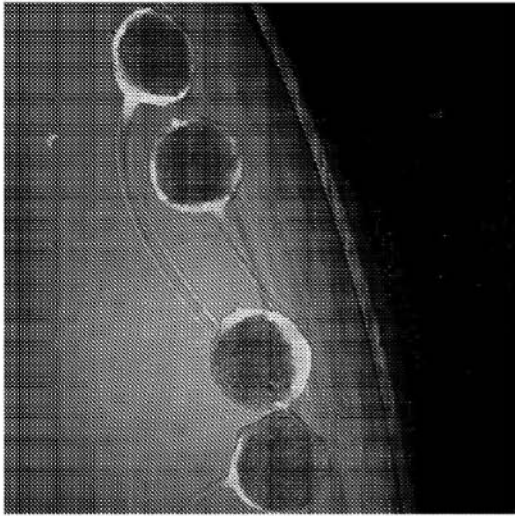


图 22

第8天

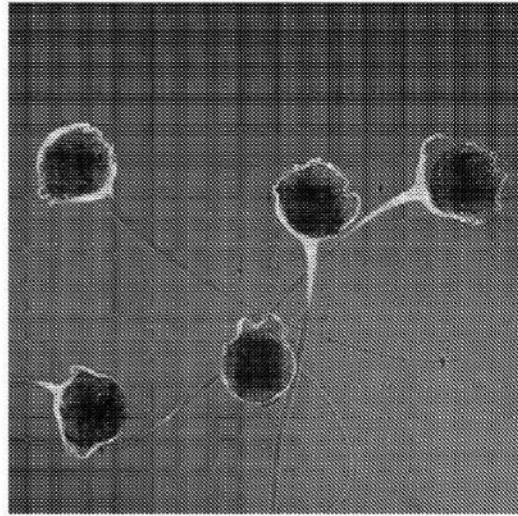


图 23

第18天

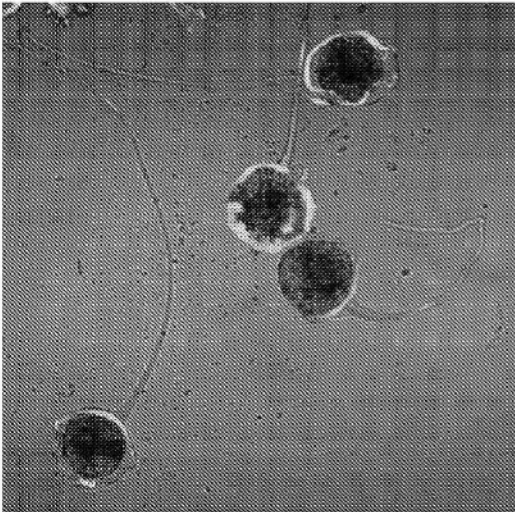


图 24

第25天

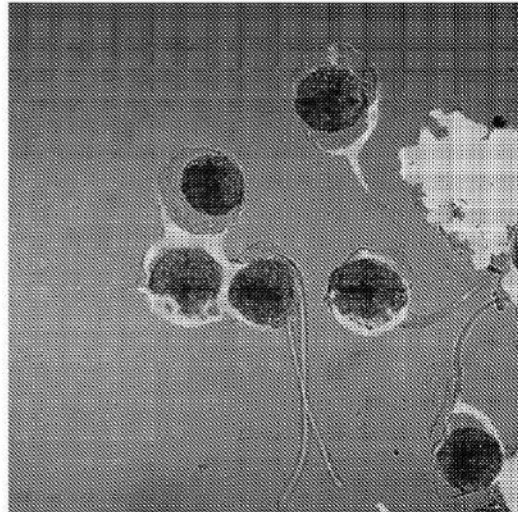


图 25

第**38**天

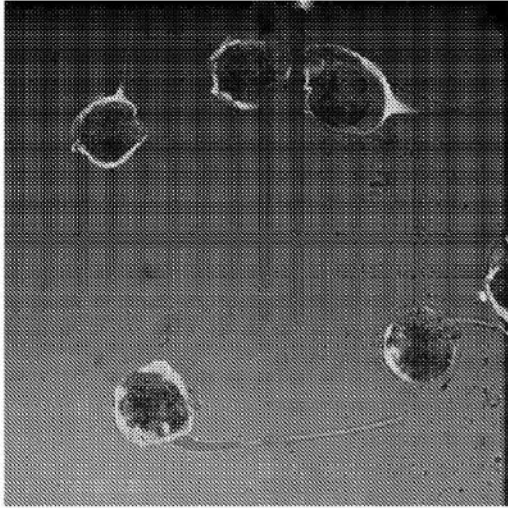


图 26

第**49**天

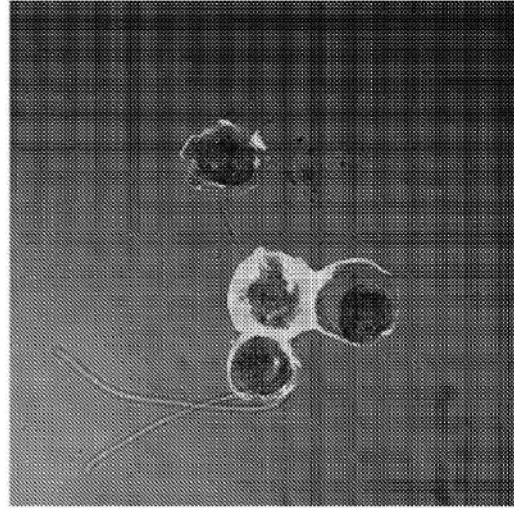


图 27

第**67**天

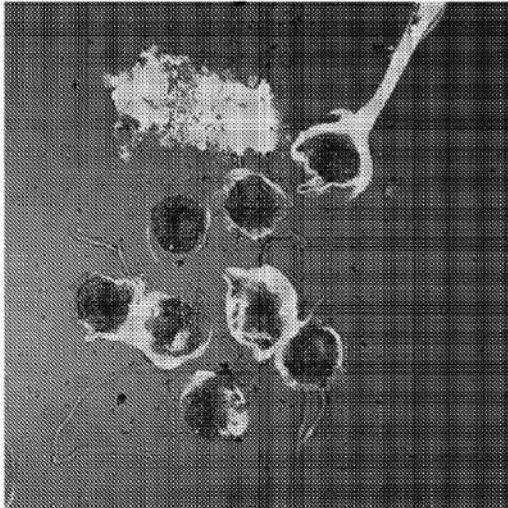


图 28

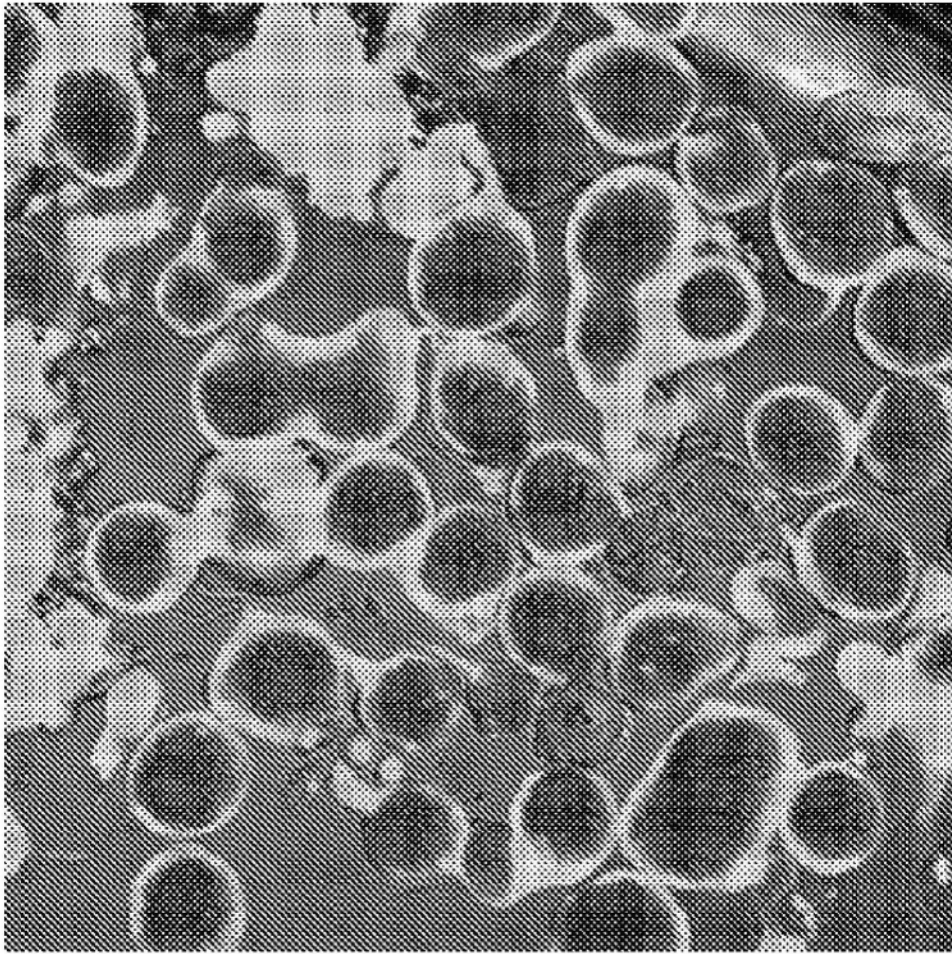


图29

第1天

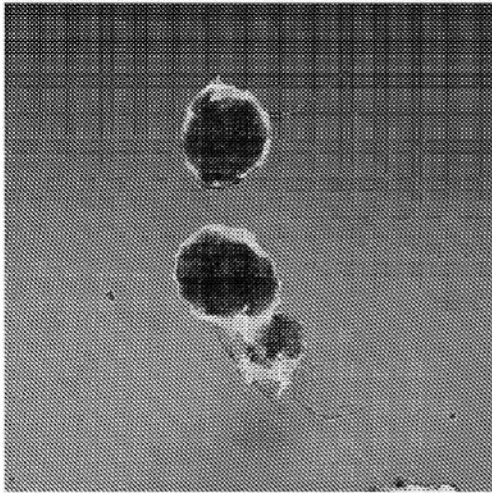


图 30

第8天

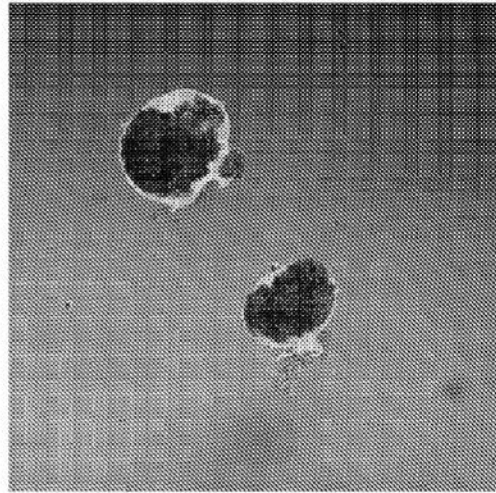


图 31

第18天

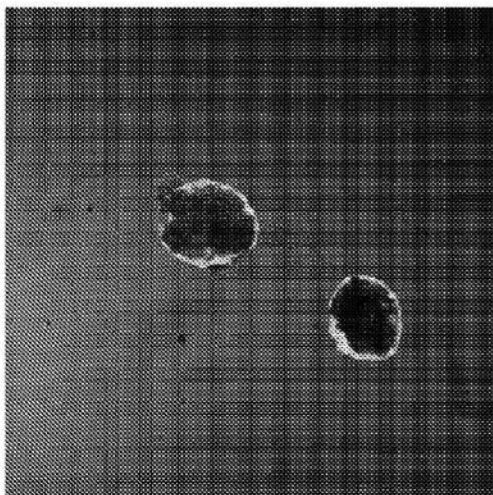


图 32

第26天

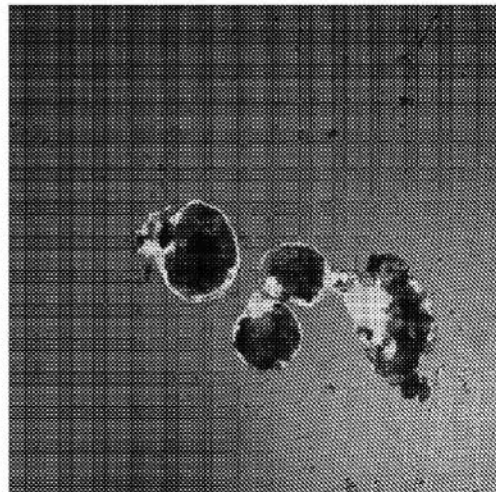


图 33

第 1 天, 裸的

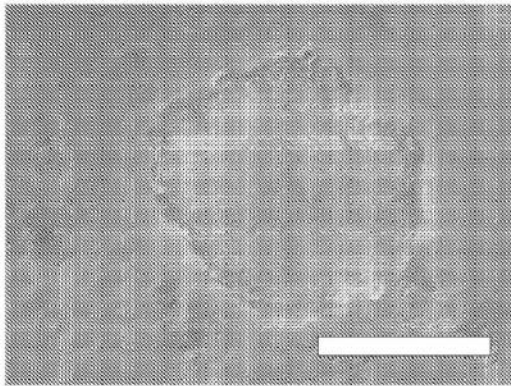


图 34

第 1 天, 涂覆的

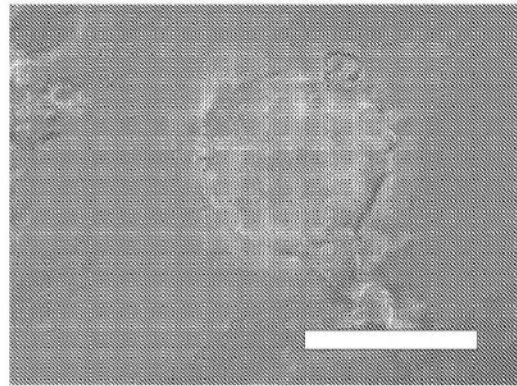


图 35

第 29 天, 裸的

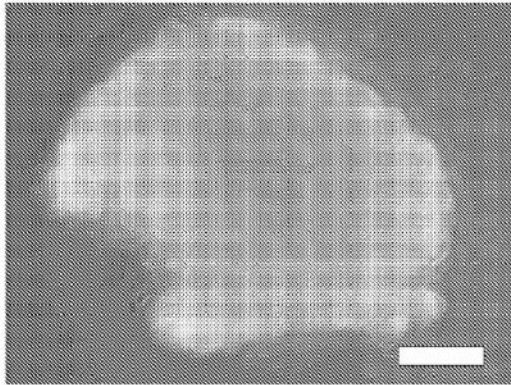


图 36

第 29 天, 涂覆的

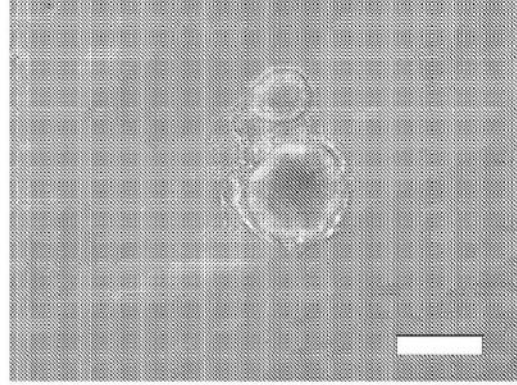


图 37

比例尺: 100 μm

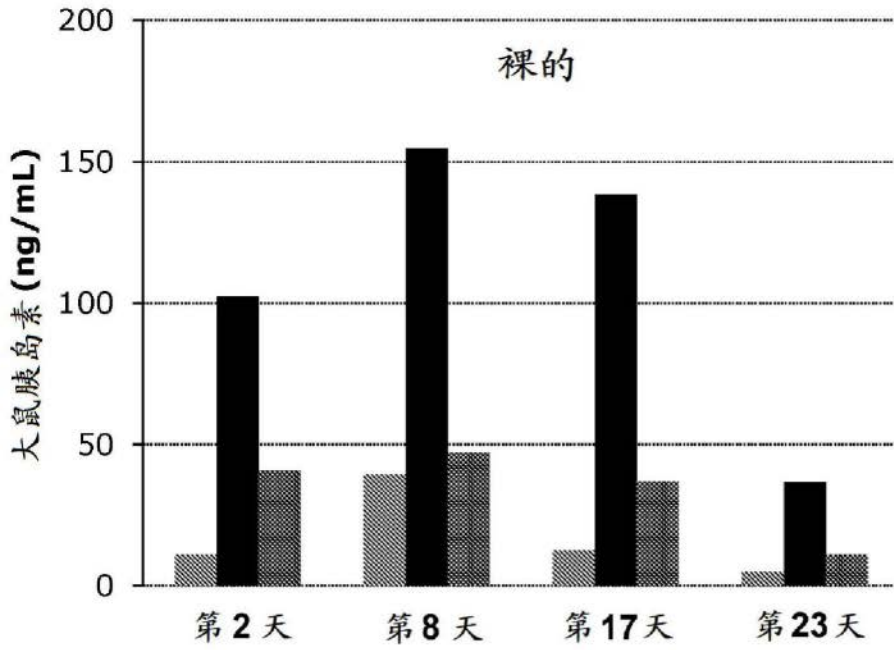


图 38

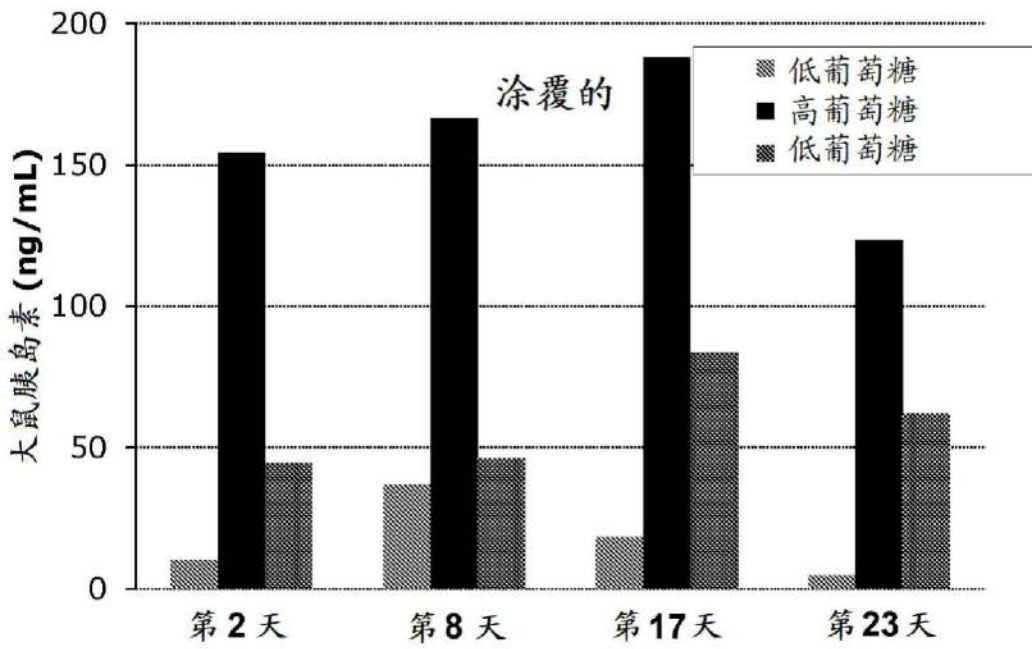
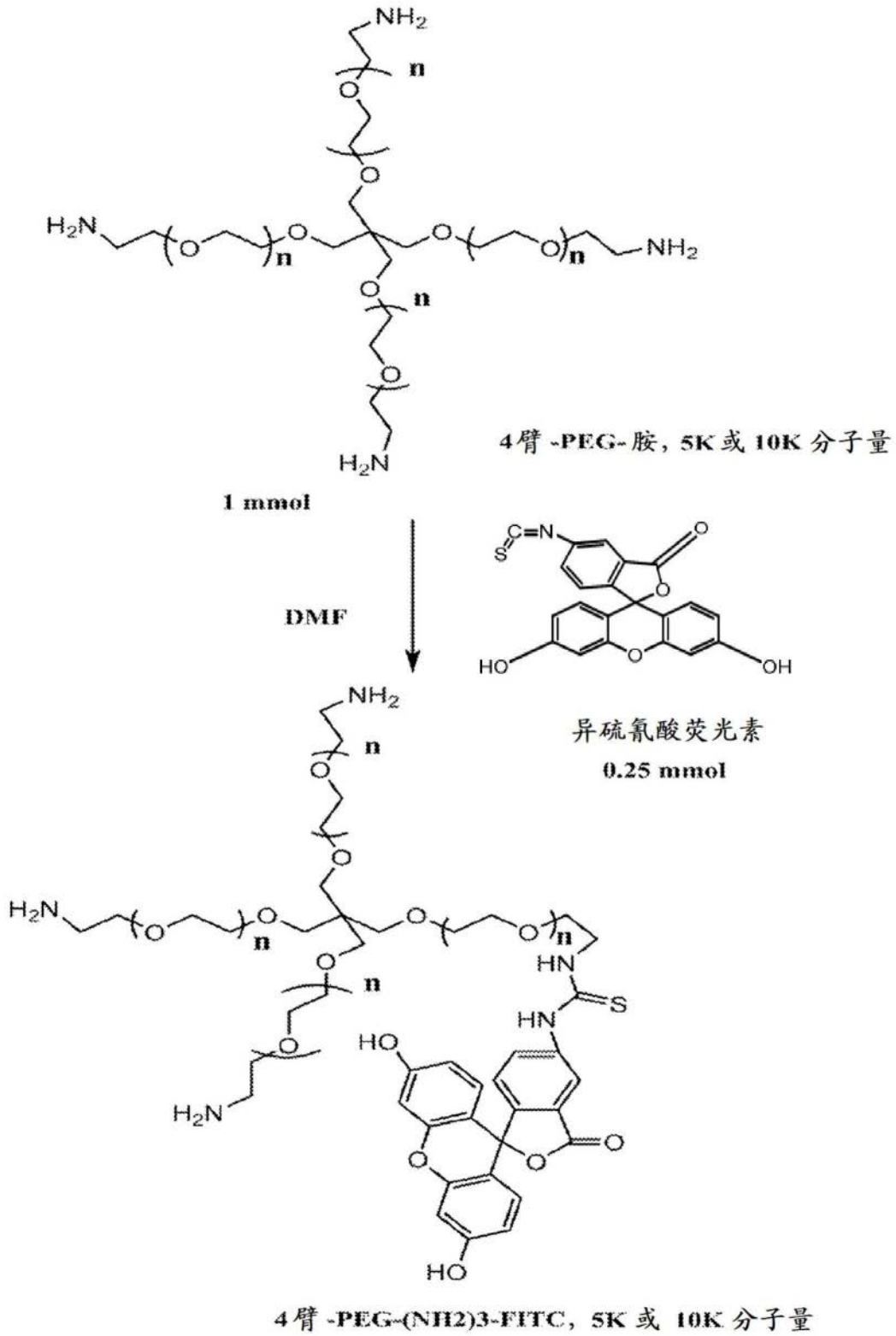


图 39



方案 1: 荧光素标记的 4 臂 PEG-NH₂ 的合成

图40: 方案1

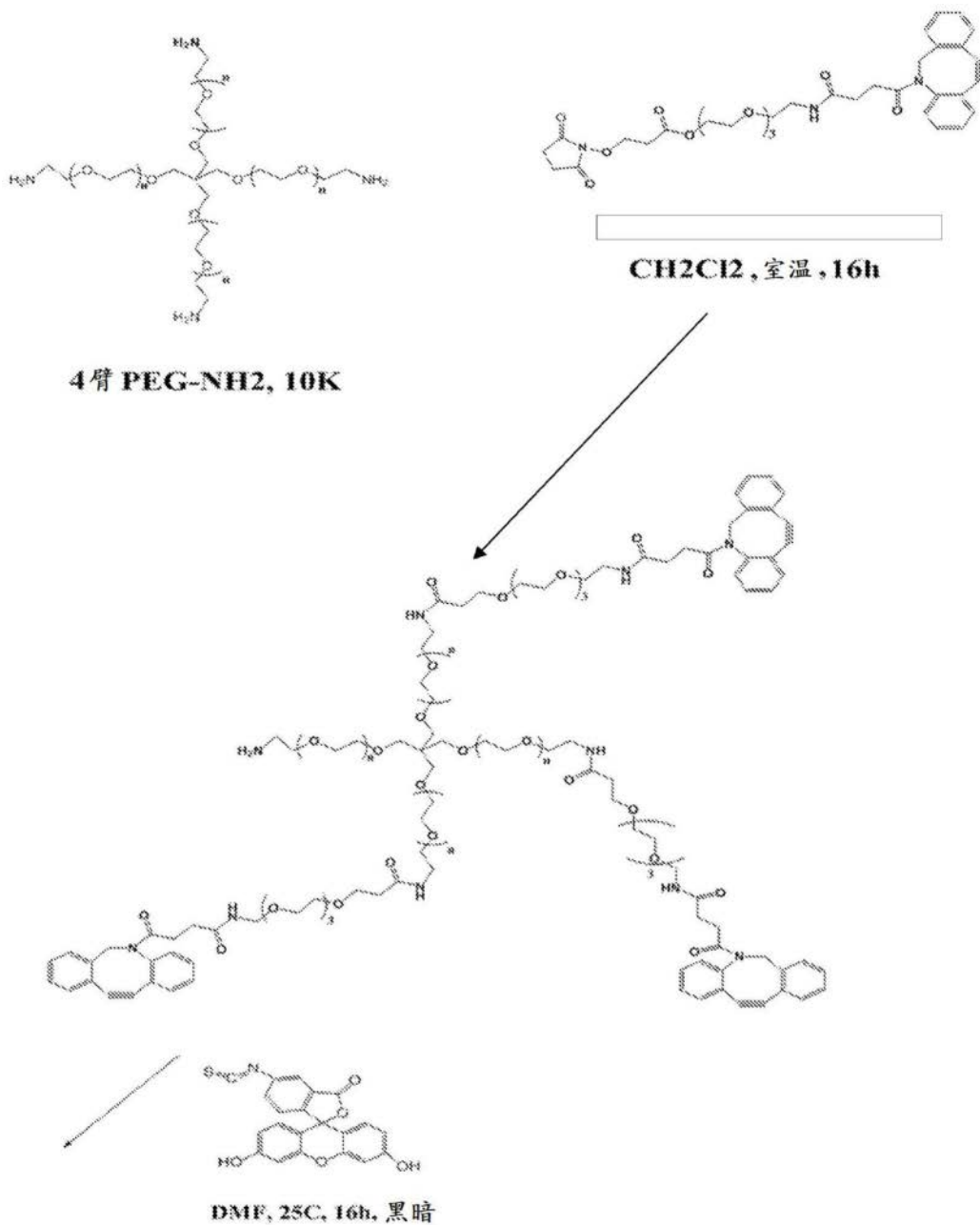
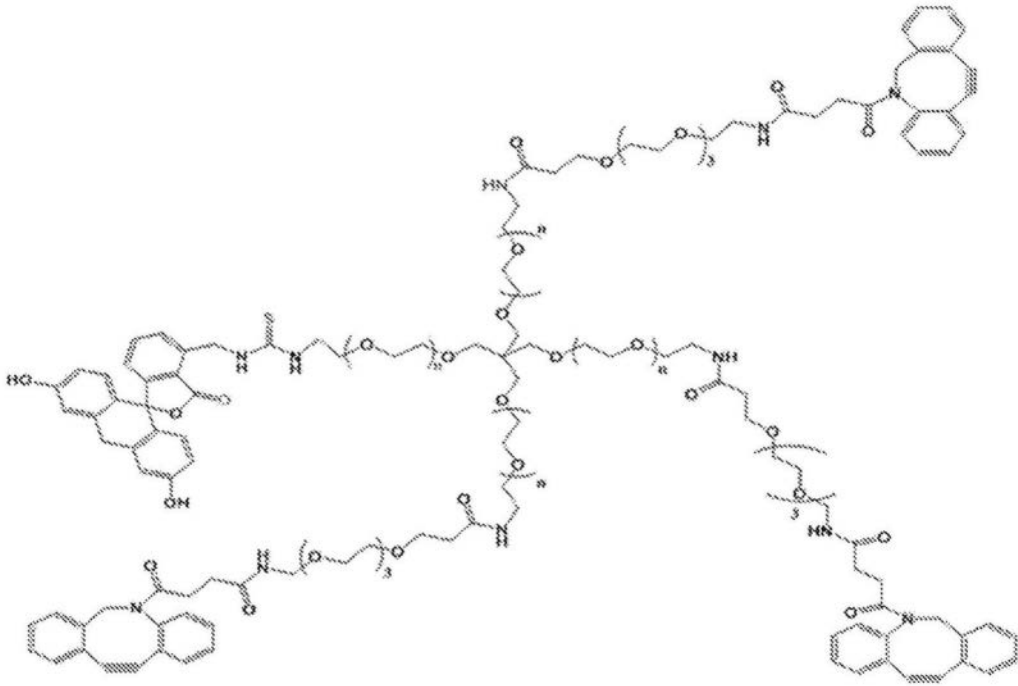


图41:方案2



方案 2: 40 臂-PEG- $\{NHCO-(PEG)_4-DBCO\}_3-FITC$ 的合成

图41续:方案2

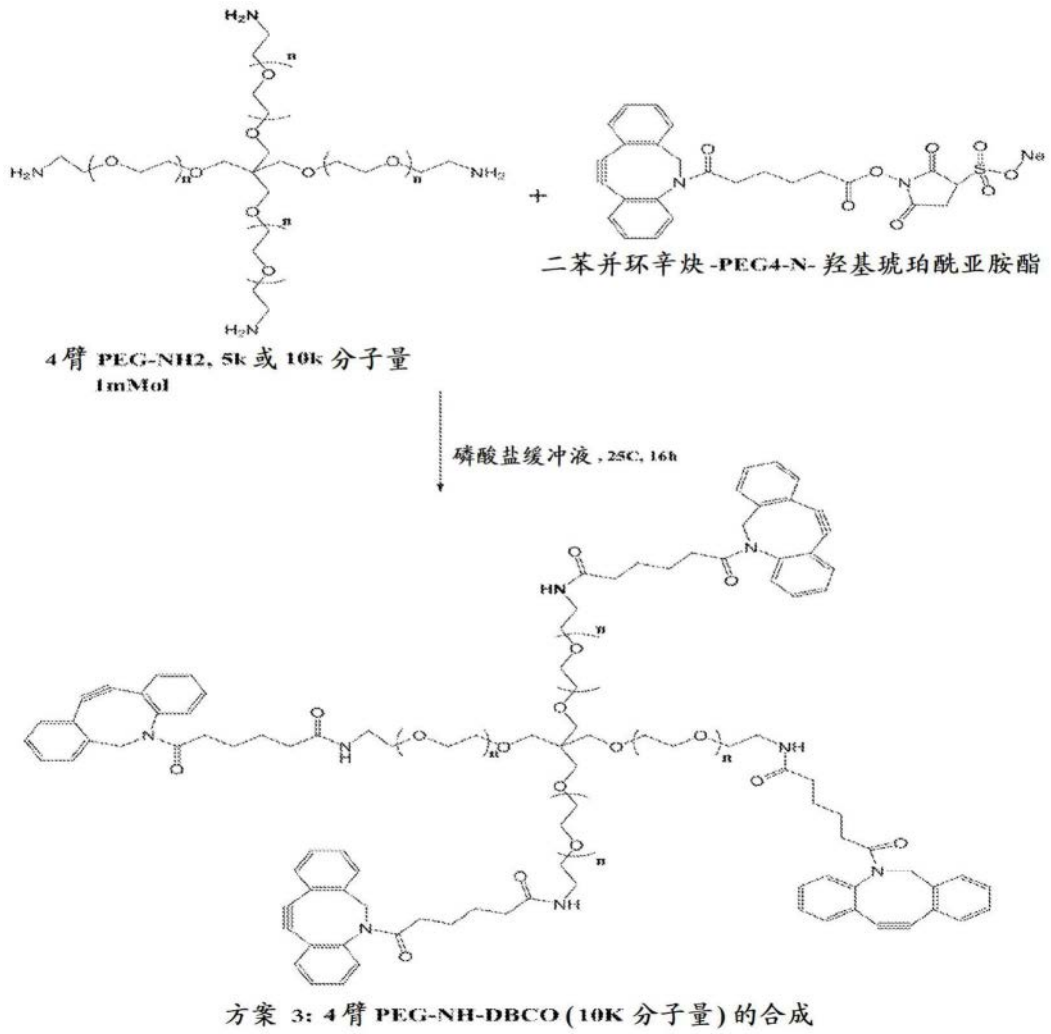


图42:方案3

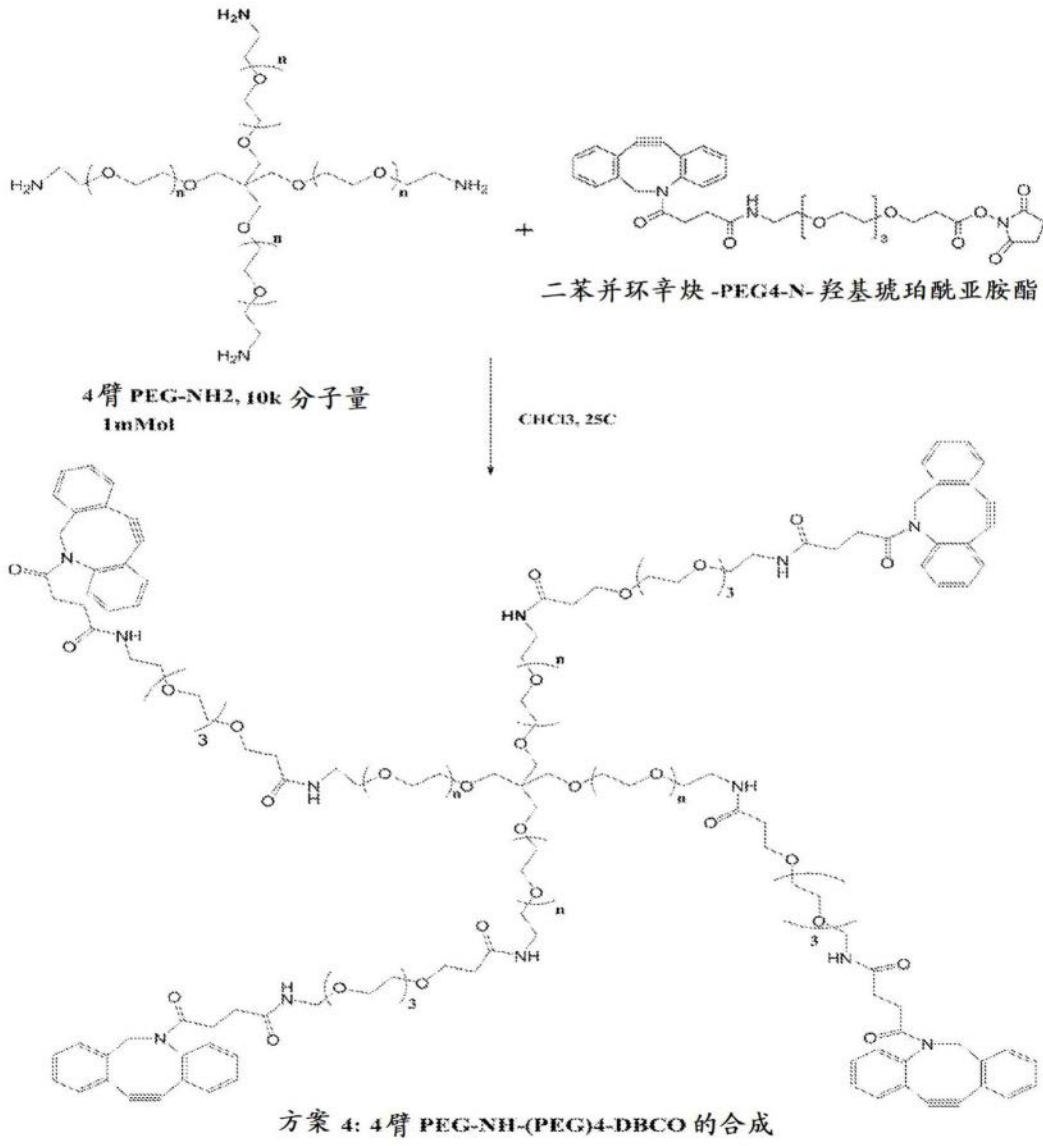


图43:方案4

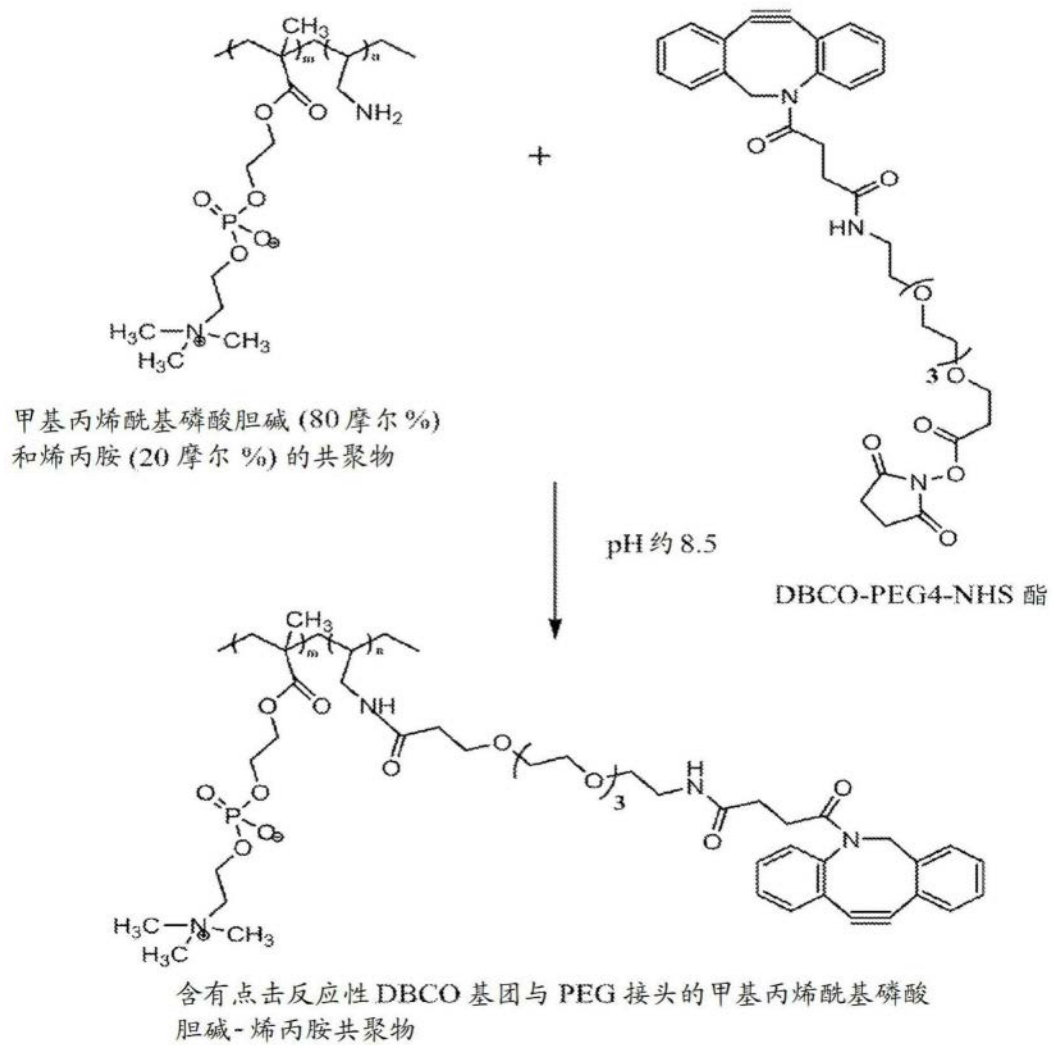


图44方案5

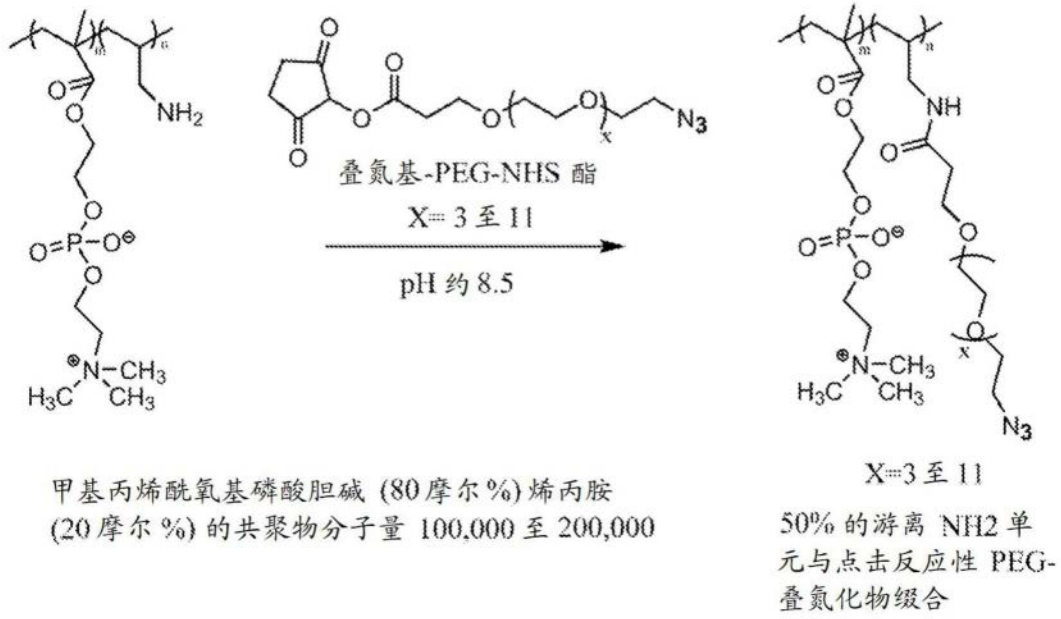


图45:方案6

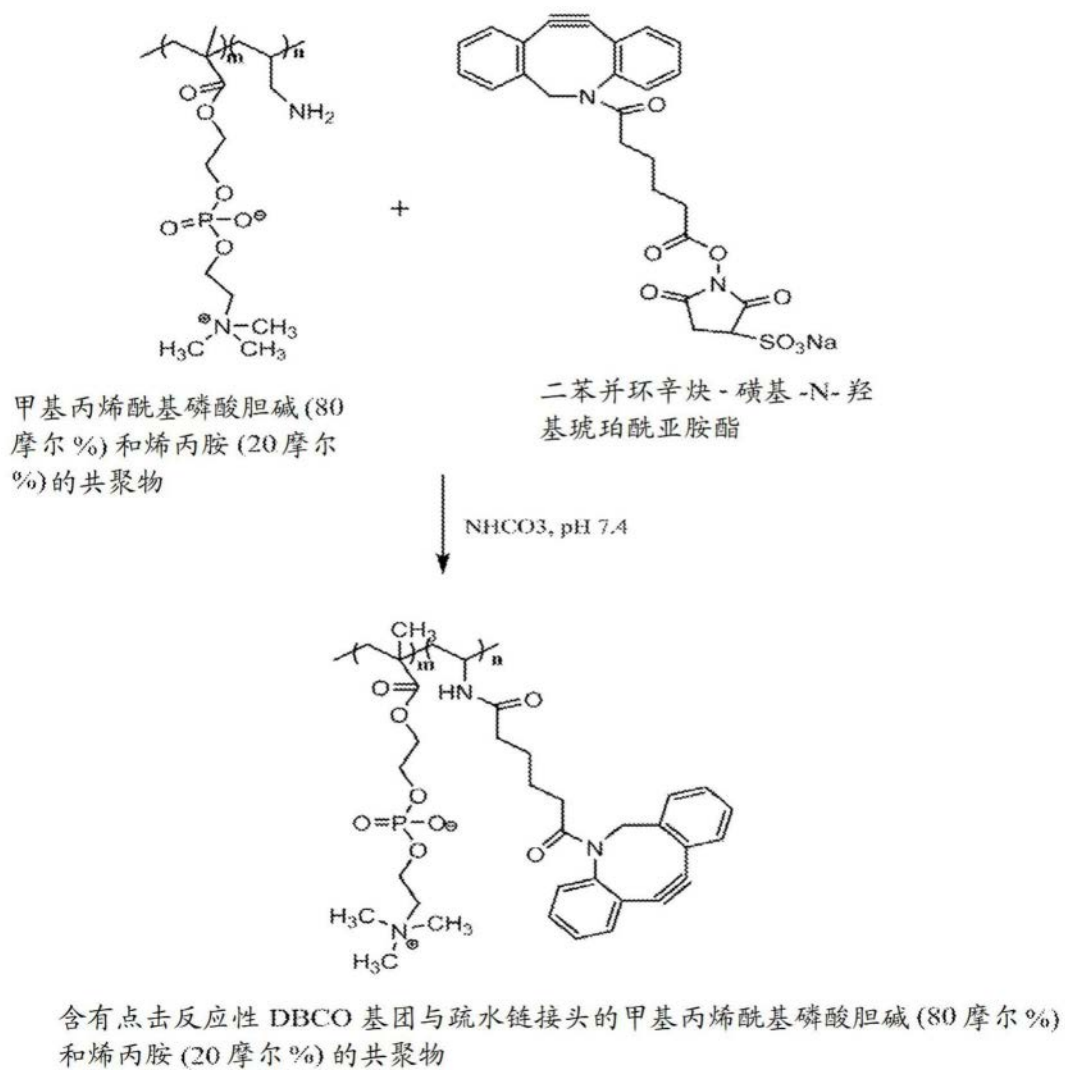


图46:方案7

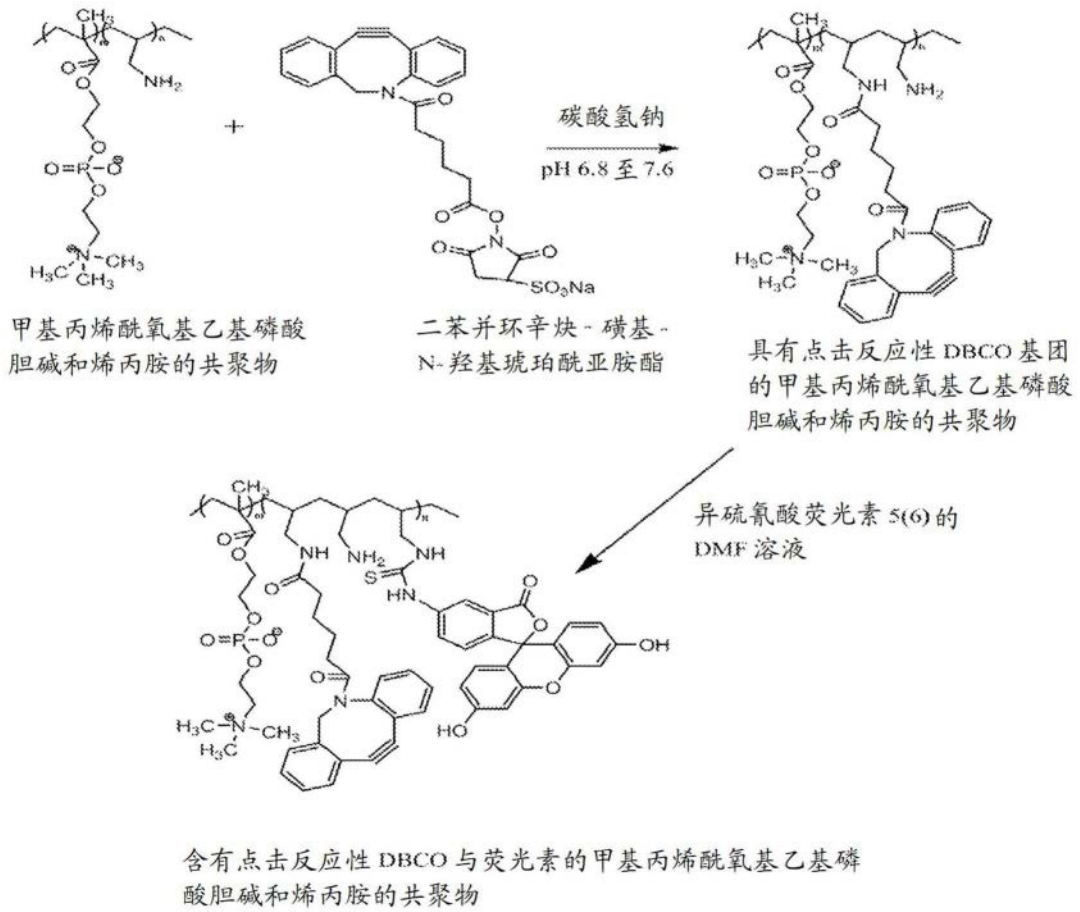


图47方案8

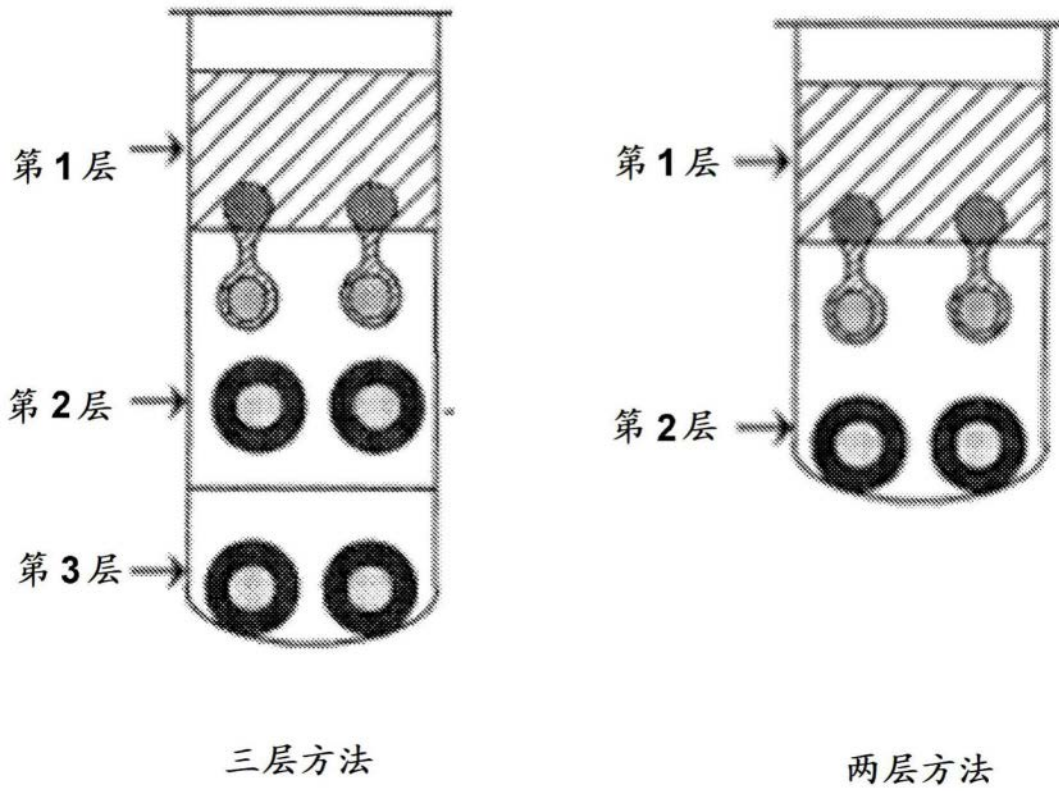


图48:方案9

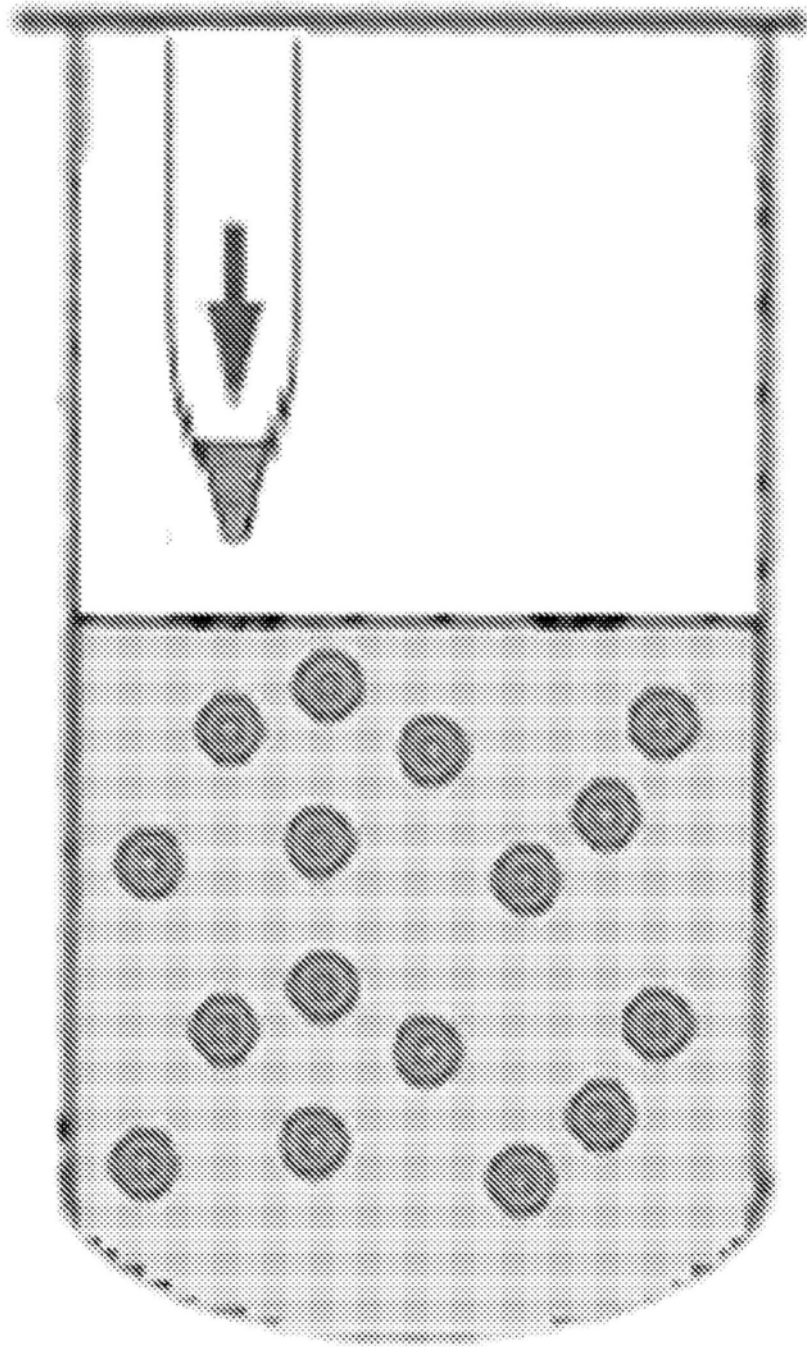


图49:方案10;连续添加方法图