

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102458640 A

(43) 申请公布日 2012. 05. 16

(21) 申请号 201080034273. 8

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2010. 06. 07

B01J 13/04 (2006. 01)

(30) 优先权数据

A01N 25/28 (2006. 01)

61/184, 559 2009. 06. 05 US

A61K 9/50 (2006. 01)

A61K 9/58 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

B01J 13/06 (2006. 01)

2012. 02. 02

C08J 3/09 (2006. 01)

(86) PCT申请的申请数据

PCT/SG2010/000215 2010. 06. 07

(87) PCT申请的公布数据

W02010/140987 EN 2010. 12. 09

(71) 申请人 新加坡南洋理工大学

地址 新加坡新加坡

(72) 发明人 吕世财 李伟立

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 徐国栋 林柏楠

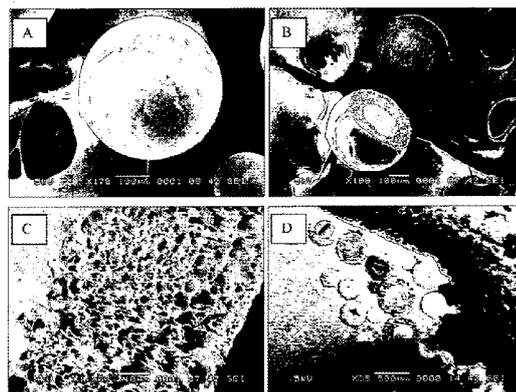
权利要求书 3 页 说明书 21 页 附图 22 页

(54) 发明名称

多相微粒和生产多相微粒的方法

(57) 摘要

本发明涉及一种生产多相微粒的方法。该方法包括将至少三种不同的聚合物溶于挥发性有机溶剂中以得到第一溶液。第一溶液包含至少两个浊点,其中第二浊点高于第一浊点。选择第一溶液的粘度和第一和第二浊点使得至少三种不同的聚合物在第一溶液中彼此不溶混。将第一溶液分散在包含表面活性剂的含水连续相中以得到乳液。将挥发性有机溶剂从乳液中蒸发。在蒸发以前乳液中至少三种不同聚合物一起的总浓度在第一浊点以下,或在第一浊点以上且第二浊点以下,或在第二浊点以上。本发明还涉及通过该方法制备的多相微粒和包含多相微粒的药物组合物。



白色条在图A和B中表示: 100 μm; 在图C中表示: 10 μm, 在图D中表示: 500 μm

1. 一种生产多相微粒的方法,其中所述方法包括:

将至少三种不同的聚合物溶于挥发性有机溶剂中以得到第一溶液,其中第一溶液包含至少两个浊点,其中第二浊点高于第一浊点,其中选择第一溶液的粘度以及第一浊点和第二浊点,使得当挥发性有机溶剂蒸发时所述至少三种不同的聚合物变得彼此不溶混;

将第一溶液分散在含水连续相中以得到乳液,其中含水连续相包含表面活性剂;和
将挥发性有机溶剂从乳液中蒸发;

其中在蒸发以前乳液中所述至少三种不同聚合物一起的总浓度在第一浊点以下,或在第一浊点以上且在第二浊点以下,或在第二浊点以上。

2. 根据权利要求1的方法,其进一步包括将待包封的目标物质加入第一溶液中。

3. 根据前述权利要求中任一项的方法,其中第一溶液中不同聚合物的数为3。

4. 根据权利要求3的方法,其中第一溶液中三种不同聚合物的总浓度小于具有最低浊点的聚合物的浊点或在具有最低浊点的聚合物的浊点与具有第二最低浊点的聚合物的浊点之间。

5. 根据权利要求4的方法,其中形成的微粒具有双层结构。

6. 根据权利要求4或5的方法,其中第一溶液中三种不同聚合物的总浓度为约2% (w/v) 至约10% (w/v)。

7. 根据权利要求3的方法,其中第一溶液中三种不同聚合物的总浓度大于第二浊点。

8. 根据权利要求7的方法,其中形成的微粒具有三层结构。

9. 根据权利要求1或2的方法,其中第一溶液中不同聚合物的数为4,且其中第一溶液因此包含三个浊点。

10. 根据权利要求9的方法,其中第一溶液中四种不同聚合物的总浓度大于第三浊点。

11. 根据权利要求10的方法,其中形成的微粒具有四层结构。

12. 根据前述权利要求中任一项的方法,其中在连续搅拌下将第一溶液分散在含水连续相中。

13. 根据权利要求12的方法,其中形成的微粒的尺寸通过提高搅拌速度而降低。

14. 根据权利要求12的方法,其中搅拌速度为约150-2000rpm。

15. 根据权利要求4-6中任一项的方法,其中挥发性有机溶剂与含水连续相之比为约0.1-0.005v/v(挥发性溶剂的体积/水的体积)。

16. 根据权利要求7-11中任一项的方法,其中选择挥发性有机相与含水连续相之比使得挥发性有机溶剂保持可溶于含水连续相中。

17. 根据权利要求4-6中任一项的方法,其中聚合物质量比为约1-3 : 2-3 : 1-2。

18. 根据前述权利要求中任一项的方法,其中所述至少三种聚合物各自的分子量彼此不同。

19. 根据前述权利要求中任一项的方法,其中表面活性剂为离子表面活性剂或非离子表面活性剂。

20. 根据前述权利要求中任一项的方法,其中离子表面活性剂选自十二烷基硫酸钠(SDS)、戊烷磺酸钠、脱氢胆酸、甘氨石胆酸乙酯、月桂基硫酸铵和其它烷基硫酸盐、月桂基聚氧乙烯醚硫酸钠、烷基苯磺酸盐、肥皂、脂肪酸盐、鲸蜡基三甲基溴化铵(CTAB)、十二烷基

乙基二甲基溴化铵 (D12EDMAB)、二-十二烷基溴化铵 (DMAB)、十六烷基氯化吡啶 (CPC)、聚乙氧基化牛脂胺 (POEA)、十六烷基三甲基对甲苯磺酸铵、苯扎氯铵 (BAC)、苯索氯铵 (BZT) 及其混合物。

21. 根据前述权利要求中任一项的方法,其中非离子表面活性剂选自聚乙烯醇、泊洛沙姆、烷基聚氧化乙烯、二甘醇单己基醚、聚氧化乙烯和聚氧化丙烯的共聚物、六甘醇单十六烷基醚、烷基多葡萄糖苷、毛地黄皂苷、乙二醇单癸基醚、椰油酰胺 MEA、椰油酰胺 DEA、椰油酰胺 TEA、脂肪醇及其混合物。

22. 根据前述权利要求中任一项的方法,其中挥发性有机溶剂具有小于 100°C 的沸点。

23. 根据权利要求 22 的方法,其中所述溶剂选自 DMF、DCM 和 THF。

24. 根据权利要求 2-23 中任一项的方法,其中目标物质选自药物、蛋白质如酶和抗体、肽、生长因子、有机分子、核酸、农药、染料和肥料。

25. 根据前述权利要求中任一项的方法,其中聚合物为可生物降解聚合物或生物相容性聚合物。

26. 根据权利要求 25 的方法,其中所述可生物降解聚合物选自聚酯、聚酐、聚原酸酯、聚磷腈、聚磷酸盐、聚磷酸酯、聚膦酸酯、聚二噁烷酮、聚羟基链烷酸酯、聚碳酸酯、聚烷基碳酸酯、聚原碳酸酯、聚酯酰胺、聚酰胺、聚胺、多肽、聚氨酯、聚醚酯。

27. 根据权利要求 25 的方法,其中所述可生物降解聚合物选自聚(α -羟基酸)如聚乳酸、聚乙醇酸及其共聚物和混合物如聚(L-丙交酯)(PLLA)、聚(D,L-丙交酯)(PLA);聚(乙交酯)(PGA)、聚(L-丙交酯-co-D,L-丙交酯)(PLLA/PLA)、聚(L-丙交酯-co-乙交酯)(PLLA/PGA)、聚(D,L-丙交酯-co-乙交酯)(PLA/PGA)、聚(乙交酯-co-三亚甲基碳酸酯)(PGA/PTMC)、聚(D,L-丙交酯-co-己内酯)(PLA/PCL)、聚(乙交酯-co-己内酯)(PGA/PCL);聚氧化乙烯(PEO);聚二噁烷酮(PDS);聚富马酸二羟丙酯;聚(谷氨酸乙酯-co-谷氨酸);聚(谷氨酸叔丁氧基-羰基甲酯);聚碳酸酯。

28. 根据权利要求 25 的方法,其中所述可生物降解聚合物选自聚内酯如聚(ϵ -己内酯)(PCL)及其共聚物如聚己内酯-co-丙烯酸丁酯;聚羟基丁酸酯(PHBT)和聚羟基丁酸酯的共聚物;聚(磷腈);聚(磷酸酯);多肽;聚(α -羟基酸/ α -氨基酸)、马来酸酐共聚物;聚磷腈;聚亚氨基碳酸酯;聚(二甲基-三亚甲基碳酸酯-co-三亚甲基碳酸酯);聚二噁烷酮、聚戊内酯、聚原酸酯、聚酐、聚氰基丙烯酸酯;酪氨酸衍生的聚碳酸酯或聚酯-酰胺;多糖如透明质酸。

29. 根据权利要求 25 的方法,其中所述生物相容性聚合物选自聚酰胺、聚碳酸酯、聚烯、聚亚烷基二醇、聚氧化烯、聚对苯二甲酸亚烷基酯、聚乙烯醇、聚乙烯醚、聚乙烯酯、聚乙烯基卤化物、聚乙烯基吡咯烷酮、聚乙交酯、聚硅氧烷、聚氨酯及其共聚物、烷基纤维素、羟烷基纤维素、纤维素醚、纤维素酯、硝基纤维素、丙烯酸酯和甲基丙烯酸酯的聚合物、甲基纤维素、乙基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羟丁基甲基纤维素、乙酸纤维素、丙酸纤维素、乙酸丁酸纤维素、乙酸邻苯二甲酸纤维素、羧乙基纤维素、三乙酸纤维素、硫酸纤维素钠盐、聚(甲基丙烯酸甲酯)、聚(甲基丙烯酸乙酯)、聚(甲基丙烯酸丁酯)、聚(甲基丙烯酸异丁酯)、聚(甲基丙烯酸己酯)、聚(甲基丙烯酸异癸酯)、聚(甲基丙烯酸月桂酯)、聚(甲基丙烯酸苯酯)、聚(丙烯酸甲酯)、聚(丙烯酸异丙酯)、聚(丙烯酸异丁酯)、聚(丙烯酸十八烷基酯)、聚乙烯、聚丙烯、聚(乙二醇)、聚(氧化乙烯)、聚(对苯二甲酸

乙二酯)、聚(乙烯醇)、聚(乙酸乙烯酯)如乙烯乙酸乙烯酯(EVA)、聚氯乙烯、聚苯乙烯、聚透明质酸、酪蛋白、明胶、谷蛋白、聚酞、聚丙烯酸、藻酸盐、壳聚糖、任何其共聚物,及其混合物。

30. 一种通过权利要求 1-29 中任一项中提及的方法得到的多相微粒。
31. 根据权利要求 30 的多相微粒,其用于在其中包封的目标物质的缓释。
32. 一种包含根据权利要求 30 的多相微粒的药物组合物。

多相微粒和生产多相微粒的方法

[0001] 相关申请交叉引用

[0002] 本申请要求 2009 年 6 月 05 日提交的美国临时申请 No. 61/184, 559 的优先权利益, 通过引用将其关于所有目的的内容全部结合到本文中。

发明领域

[0003] 本发明涉及聚合物化学领域, 特别是关于生产用于物质缓释的颗粒材料的聚合物化学领域。

[0004] 发明背景

[0005] 物质如药物、杀虫剂、肥料指示剂和其它活性化合物的可控给予可通过多种方法实现。在一类给予体系中, 形成聚合颗粒, 其中单一聚合物层结合待给予的活性化合物。当用于药物给予时, 这类给予体系可通过保护药物以防在达到人体内的释放点以前降解而实现可控药物释放。

[0006] 然而, 这类单层 (或单壁) 微粒具有限制, 例如对于提供恒定 (零级) 药物释放而言的无能和治疗试剂的延时或脉冲释放的缺乏。因此, 已开发了双层 (或双壁) 微粒以提供在控制药物释放动力和规律中的更多功能性。

[0007] 本发明的目的是提供可用于物质的给予和 / 或缓释的替代给予体系。

[0008] 发明概述

[0009] 在第一方面中, 本发明涉及一种生产多相微粒的方法。方法包括将至少三种不同的聚合物溶于挥发性有机溶剂中以得到第一溶液。第一溶液包含至少两个浊点, 其中第二浊点 (CP2) 高于第一浊点 (CP1)。选择第一溶液的粘度以及第一浊点 (CP1) 和第二浊点 (CP2) 使得当挥发性有机溶剂蒸发时所述至少三种不同的聚合物变得彼此不溶混。将第一溶液分散在包含表面活性剂的含水连续相中以得到乳液。将挥发性有机溶剂从乳液中蒸发。在蒸发以前乳液中所述至少三种不同聚合物一起的总浓度在第一浊点以下, 或在第一浊点以上且第二浊点以下, 或在第二浊点以上。

[0010] 在第二方面中, 本发明涉及通过本发明方法得到的多相微粒。

[0011] 在第三方面中, 本发明涉及包含通过本发明方法得到的多相微粒的药物组合物。

[0012] 附图简述

[0013] 当连同非限定性实施例和附图考虑时, 参考详述更好地理解本发明, 其中:

[0014] 图 1 显示三元相聚 (L- 乳酸) / 聚 (DL- 乳酸-co- 乙醇酸 / 聚 (己内酯) (PLLA/PLGA/PCL) 复合双壁 (DW) 微粒的扫描电子显微镜 (SEM) 显微照片。图 1A 为微粒的外部形态的显微照片。图 1B 为微粒的横截面视图的显微照片。图 1C 为微粒的内部形态的近视图的显微照片。图 1D 为嵌入聚丙烯酸树脂中的微粒的横截面视图的显微照片。

[0015] 图 2 为在用四氢呋喃 (THF) 溶解以后三元相 PLLA/PLGA/PCL 复合双壁微粒的 SEM 显微照片。图 2A 为显示微粒的横截面视图的显微照片。图 2B 为显示多孔壳的近视图的显微照片。

[0016] 图 3 显示借助 BTEM 由三元相 PLLA/PLGA/PCL 双壁复合微粒得到的纯组分拉曼光

谱评估和它们相关的得分图像。得分图像的轴为像素,并可通过各个像素乘以 $5\mu\text{m}$ 而与距离直接关联。

[0017] 图 4 显示三元相 PLLA/PLGA 双壁微球的 SEM 显微照片。图 4A 为显示微粒的横截面视图的显微照片。图 4B 为显示壳的近视图的显微照片。

[0018] 图 5 显示使用 (A) 2% (w/v)、(B) 4% (w/v)、(C) 6% (w/v) 和 (D) 10% (w/v) 的各种聚合物溶液浓度制备的三元相 PLLA/PLGA/PCL 微粒的 SEM 显微照片。

[0019] 图 6 显示使用 (A) 150rpm、(B) 300rpm、(C) 400rpm 和 (D) 500rpm 的各种搅拌速度制备的三元相 PLLA/PLGA/PCL 微粒的 SEM 显微照片。

[0020] 图 7 为在用 THF 溶解以后以 150rpm 的搅拌速度制备的三元相 PLLA/PLGA/PCL 微粒的 SEM 显微照片。

[0021] 图 8 显示使用 (A) 50mL (油 / 水 (o/w) : 0.1)、(B) 150mL (o/w : 0.03)、(C) 250mL (o/w : 0.02)、(D) 400mL (o/w : 0.0125) 和 (E) 600mL (o/w : 0.0083) 的不同体积的聚乙烯醇 (PVA) 水溶液制备的三元相 PLLA/PLGA/PCL 微粒的 SEM 显微照片。

[0022] 图 9 显示使用 (A) 2 : 3 : 1、(C) 1 : 3 : 1 和 (E) 3 : 2 : 2 的各种三元相 PLLA : PLGA : PCL 质量比制备的微粒的 SEM 显微照片。图 9B、9D 和 9F 为在用 THF 溶解以后的相应横截面视图。

[0023] 图 10A 为分别相应于最外壳、中间层和芯的三元相聚 (DL- 乳酸 -co- 乙醇酸 / 聚 (L- 乳酸) / 乙烯乙酸乙烯酯 (PLGA/PLLA/EVA) 的三壁 (TW) 微粒的 SEM 显微照片。图 10B 显示借助 BTEM 由三元相 PLGA/PLLA/EVA 三壁复合微粒得到的纯组分拉曼光谱评估和它们相关的得分图像。图 10C 为 PLGA/PLLA/EVA 三壁微粒的 SEM 显微照片,其中 PLGA 壳具有较大的厚度。图 10D 显示层倒置的三元相 PLLA/PLGA/EVA 微粒的 SEM 显微照片,其中最外壳、中间层和芯分别为 PLLA、PLGA 和 EVA。图 10E 显示借助 BTEM 由三元相 PLLA/PLGA/EVA 三壁复合微粒得到的纯组分拉曼光谱评估和它们相关的得分图像。

[0024] 图 11A 为四层聚 (DL- 乳酸 -co- 乙醇酸 / 聚 (L- 乳酸) / 聚苯乙烯 / 乙烯乙酸乙烯酯 (PLGA/PLLA/PS/EVA) 微粒的 SEM 显微照片。壳至芯构造 : PLGA、PLLA、PS、EVA。图 11B 显示借助 BTEM 由 PLGA/PLLA/PS/EVA 四层复合微粒得到的纯组分拉曼光谱评估和它们相关的得分图像。

[0025] 图 12A 为分别相应于最外壳、中间层和芯的三壁 PLGA/PLLA/EVA 微粒的 SEM 显微照片,其具有约 $15\mu\text{m}$ 的尺寸。图 12B 显示借助 BTEM 由 PLGA/PLLA/EVA 三壁复合微粒得到的纯组分拉曼光谱评估和它们相关的得分图像。

[0026] 图 13A 为三元相 PLLA/PLGA/PCL 双壁复合微粒的 SEM 显微照片。布洛芬 (Ibuprofen) (疏水性) 位于用 PCL 颗粒浸渍的 PLLA 壳中; 盐酸甲氧氯普胺 (metoclopramide HCl) (亲水性) 位于 PLGA 芯中。图 13B 显示借助 BTEM 由微粒得到的纯组分拉曼光谱评估和它们相关的得分图像。

[0027] 图 14A 为三元相 PLGA/PLLA/EVA 三壁复合微粒的 SEM 显微照片。最外壳、中间层和芯分别为 PLGA、PLLA 和 EVA 富集区。布洛芬 (Ibuprofen) (疏水性) 位于 EVA 芯中。图 14B 显示借助 BTEM 由微粒得到的纯组分拉曼光谱评估和它们相关的得分图像。图 14C 为三元相 PLGA/PLLA/EVA 三壁复合微粒的 SEM 显微照片。最外壳、中间层和芯分别为 PLGA、PLLA 和 EVA 富集区。盐酸甲氧氯普胺 (亲水性) 位于 PLGA 壳中。图 14D 显示借助 BTEM 由微粒

得到的纯组分拉曼光谱评估和它们相关的得分图像。

[0028] 图 15 为显示具有 A) 6 : 2 : 1、B) 3 : 2 : 1 和 C) 3 : 2 : 2 的质量比的三元相双壁 PLLA/PLGA/PCL 微粒的药物释放曲线 (drug release profile) 的图。壳和芯分别为用 PCL 颗粒浸渍的 PLLA 和 PLGA 富集区。盐酸甲氧氯普胺 (亲水性) 位于 PLGA 芯中。从图中可以看出微粒的药物释放曲线可通过改变聚合物质量比而控制。

[0029] 图 16 为显示三元相双壁 PLLA/PLGA/PCL 微粒的药物释放曲线的图。盐酸甲氧氯普胺和布洛芬分别位于 PLGA 芯和 PLLA/PCL 壳中。从图中可以看出布洛芬的释放在最初 10 天中实现,其后是盐酸甲氧氯普胺,以顺序方式提供由单一颗粒的多重药物释放。

[0030] 图 17 为显示 (A) 双层 PLLA (壳)/EVA (芯) 微粒、(B) 双层 PLGA (壳)/EVA (芯) 微粒、(C) 单层 EVA 微粒和 (D) 三层 PLGA (外壳)/PLLA (中间层)/EVA (芯) 微粒的药物释放曲线的图。从图中可以看出三层微粒实现更一致 (接近零级) 的释放率。

[0031] 图 18 为显示具有 (A) 10 : 2 : 1 和 (B) 10 : 5 : 1 的质量比的三层 PLGA/PLLA/EVA 微粒的药物释放曲线的图。布洛芬 (15 重量%) 位于 EVA 芯中。该图显示药物释放曲线可通过改变聚合物质量比 (即层厚度) 而控制。

[0032] 图 19 为显示三层微粒 (A) PLGA (在壳中的 MCA)/PLLA/EVA (芯) 和 (B) PLLA (壳)/PLGA (在中间层中的 MCA)/EVA (芯) 的药物释放曲线的图。该图显示药物释放曲线可通过层倒置而控制。

[0033] 图 20A 为显示溶液中总聚合物浓度为 16% w/v 的 PLGA/PLLA/PCL 溶液的照片。聚合物体系的第一浊点为 3.75% w/v,聚合物的第二浊点为 7% w/v。图 20A 显示在大于聚合物体系的第二浊点 7% w/v 的溶液中总聚合物浓度 16% w/v 下,当静置时 PLGA、PLLA 和 PCL 的三个液相分离并形成三个明显相。第一相分离在 3.75 重量% w/v 下发生,在该值下在溶液中 PLGA 与 PLLA/PCL 相分离。第二相分离在 7% w/v 下发生,在该值下 PLLA 和 PCL 相分离。图 20B 为显示浓度为 7.5% w/v 的 PLGA/PLLA/EVA 溶液的照片。聚合物体系的第一浊点为 4% w/v,聚合物体系的第二浊点为 5% w/v。图 20B 显示在大于聚合物体系的第二浊点 5% w/v 的浓度 7.5% w/v 下,当静置时 PLGA、PLLA 和 EVA 的三个液相分离并形成三个明显相。图 20C 为显示浓度为 13% w/v 的 PLGA/PLLA/PS/EVA 溶液的照片。聚合物体系的第一浊点为 4% w/v,聚合物体系的第二浊点为 5% w/v,聚合物体系的第三浊点 12% w/v。图 20C 显示在大于聚合物的第三浊点 12% w/v 的浓度 13% w/v 下,当静置时 PLGA、PLLA 和 PS 和 EVA 的四个液相分离并形成四个明显相。

[0034] 本发明详述

[0035] 本发明基于多相微粒可通过将至少三种不同类型的聚合物溶于挥发性有机溶剂中,随后将含有聚合物的溶剂分散在含水介质中,由此形成乳液而形成这一发现。选择至少三种不同类型的聚合物使得当它们溶于其中的挥发性有机溶剂蒸发时它们变得彼此不混溶。溶剂可通过蒸发而从乳液中除去。作为溶剂除去的结果的聚合物溶液浓度的变化导致当它们达到各自的浊点时,聚合物以顺序方式在不同的相中分离。因此,可形成包含在颗粒内不同聚合物类型的离散区的多相微粒。可调整微粒的构造,即不同聚合物类型的离散区的分布和尺寸以适于具体应用。例如,多相微粒可用于目标物质的给予和缓释。特别地,微粒的离散区可用于容纳在应用中可以以可控方式释放的目标物质。

[0036] 在第一方面中,本发明涉及一种生产多相微粒的方法。如本文所用术语“多相”指

具有至少三种聚合物组分的体系。因此,术语“多相微粒”指由至少三种聚合物组分形成的微米级颗粒,由此各个聚合物类型占据颗粒内的离散区。当聚合物组分的数为3时,多相微粒还可称为三元相微粒。三元相微粒可具有两层或三层。当聚合物组分的数为4时,多相微粒可称为四元相微粒。四元相微粒可具有2、3或4层。微粒中的各个层可由不同的聚合物类型形成。聚合物为通过较小化学单元重复而建立的大分子。聚合物的重复单元通常与单体,即形成聚合物的原料相等或几乎相等。聚合物的重复单元可经由共价键相互连接。在一些情况下,重复为线性的,例如在具有单一骨架而不具有支链的聚合物链的情况下。在一些情况下,链为支化或互连的以形成三维网络。

[0037] 聚合物可使用方法如缩聚和连锁聚合而形成。通常,在缩聚中,反应在两个分子之间进行以产生一个更大的分子,其中可能消除小分子如水。分子可包含官能团如硫醇基团、羧基、胺基团和卤化物基团,聚合反应通过所述基团进行。反应继续进行直至试剂中一种几乎全部用尽。一般而言,连锁聚合涉及掺入不饱和键如在两个碳原子之间的双或三化学键的分子连接在一起,且其可通过离子或自由基引发。自由基为具有一个不成对电子的反应性物质,其通常通过称为引发剂的相对不稳定的材料分解而形成。引发剂的实例包括但不限于卤素分子如氯和溴,和有机过氧化物如过氧化苯甲酰和过氧化甲乙酮。通常,自由基可打开单体的不饱和键,例如乙烯基单体的双键,并加入它中。所得分子保持为自由基并继续与体系中的其它单体反应,直至它与其它自由基反应,这消灭彼此的生长活性并形成聚合物链。

[0038] 用于本发明中的聚合物可以为天然或合成的。“天然聚合物”指可在自然中发现的聚合材料。天然聚合物的实例包括但不限于多糖、粘多糖和蛋白质。多糖为可水解成两种或更多种单糖分子的碳水化合物。它们可含有重复碳水化合物的骨架,即糖单元。多糖的实例包括但不限于藻酸盐、琼脂糖、壳聚糖、葡聚糖、淀粉和结冷胶。粘多糖为含有氨基糖作为组分的多糖。粘多糖的实例包括但不限于透明质酸、硫酸软骨素、硫酸皮肤素、硫酸角质素、硫酸葡聚糖、硫酸肝素、肝素、葡萄糖醛酸、艾杜糖醛酸、半乳糖、半乳糖胺和葡萄糖胺。蛋白质属于宽类别的多肽,指含有大于一个氨基酸(其包括天然和非天然氨基酸单体)的有机化合物分子。蛋白质的实例包括骨胶原、清蛋白、卵清蛋白、纤维蛋白、果胶和明胶。

[0039] 可用于形成微粒的合成聚合物的实例包括但不限于聚酯、聚酐、聚原酸酯、聚磷腈、拟聚氨基酸、聚酰胺、聚苯乙烯、乙烯乙酸乙烯酯、聚丁二烯、聚脲、(聚)丙烯酸酯、甲基丙烯酸酯、丙烯酸酯甲基丙烯酸酯共聚物、聚芳基砜(PAS)、聚氨酯、聚烷基氰基丙烯酸酯、聚磷腈或其共聚物和/或组合。其它实例包括聚乙烯、氟化聚乙烯、聚-4-甲基戊烯、聚丙烯腈、聚酰胺-酰亚胺、聚苯并噁唑、聚碳酸酯、聚氰基芳基醚、聚酯碳酸酯、聚醚、聚醚醚酮、聚醚酰亚胺、聚醚酮、聚醚酰亚胺、聚醚酮、聚醚砜、聚氟烯烃、聚酰亚胺、聚烯烃、聚噁二唑、聚苯醚、聚苯硫醚、聚丙烯、多硫化物、聚砜、聚四氟乙烯、聚硫醚、聚三唑、聚乙烯基、聚氟乙烯、聚硅氧烷、脲-甲醛或这些聚合物的共聚物或混合物,例如聚乙酸乙烯酯共聚物如乙烯乙酸乙烯酯(EVA)。

[0040] 可使用可生物降解和不可生物降解的聚合物。可生物降解的聚合物为经时间周期(例如在数天,或数月或数年内)在体内逐渐降解以产生生物相容性或无毒副产物的天然或合成聚合物。分解可例如借助水解而进行,可通过酶催化并可通过在细胞中使微粒暴露的条件辅助。

[0041] 可生物降解聚合物的实例包括但不限于乙交酯、丙交酯的聚合物和低聚物,聚乳酸,包括乳酸和乙醇酸的 α -羟基酸的聚酯,例如聚(α -羟基)酸,包括聚乙醇酸、聚(DL-乳酸-co-乙醇酸)(PLGA)、聚-L-乳酸(PLLA),和DL-丙交酯和乙交酯的三元共聚物;与聚酯共聚的 ϵ -己内酯和 ϵ -己内酯;聚内酯和聚己内酯,包括聚(己内酯)(PCL)、聚(ϵ -己内酯)、聚(8-戊内酯)和聚(γ -丁内酯);聚酐;聚原酸酯;其它羟基酸;聚二噁烷酮;和无毒或作为代谢物存在于体内的其它可生物降解聚合物。聚氨基酸的实例包括但不限于聚赖氨酸(PLL)、聚L-天冬氨酸、聚L-谷氨酸和苯乙烯-马来酸酐共聚物。聚乙二醇的衍生物的实例包括但不限于聚(乙二醇)-二-(乙基磷脂酰(乙二醇))(PEDGA)、聚(乙二醇)-co-酐、聚(乙二醇)co-丙交酯、聚(乙二醇)-co-乙交酯和聚(乙二醇)-co-原酸酯。丙烯酸酯聚合物的实例包括但不限于聚异丙基丙烯酸酯和聚丙烯酰胺。丙烯酸酯聚合物的实例包括但不限于二丙烯酸酯如聚乙二醇二丙烯酸酯(PEGDA)、低聚丙烯酸酯、甲基丙烯酸酯、二甲基丙烯酸酯、低聚甲基丙烯酸酯和PEG-低聚乙醇酰丙烯酸酯。羧基烷基纤维素的实例包括但不限于羧甲基纤维素和部分氧化的纤维素。

[0042] 聚合物可以为生物相容的。如本文所用,术语“生物相容”意指能与生物体系相互作用而不导致细胞毒性、不想要的蛋白质或核酸改性或不想要的免疫响应活化的材料。

[0043] 生物相容性聚合物的一些非详尽实例包括聚酰胺、聚碳酸酯、聚烯、聚亚烷基二醇、聚氧化烯、聚对苯二甲酸亚烷基酯、聚乙烯醇、聚乙烯醚、聚乙烯酯、聚乙烯基卤化物、聚乙烯基吡咯烷酮、聚乙交酯、聚硅氧烷、聚氨酯及其共聚物、烷基纤维素、羟烷基纤维素、纤维素醚、纤维素酯、硝基纤维素、丙烯酸和甲基丙烯酸酯的聚合物、甲基纤维素、乙基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羟丁基甲基纤维素、乙酸纤维素、丙酸纤维素、乙酸丁酸纤维素、乙酸邻苯二甲酸纤维素、羧乙基纤维素、三乙酸纤维素、硫酸纤维素钠盐、聚(甲基丙烯酸甲酯)、聚(甲基丙烯酸乙酯)、聚(甲基丙烯酸丁酯)、聚(甲基丙烯酸异丁酯)、聚(甲基丙烯酸己酯)、聚(甲基丙烯酸异癸酯)、聚(甲基丙烯酸月桂酯)、聚(甲基丙烯酸苯酯)、聚(丙烯酸甲酯)、聚(丙烯酸异丙酯)、聚(丙烯酸异丁酯)、聚(丙烯酸十八烷基酯)、聚乙烯、聚丙烯、聚(乙二醇)、聚氧化乙烯、聚(对苯二甲酸乙二酯)、聚乙烯醇、聚(乙酸乙烯酯)如乙烯乙酸乙烯酯(EVA)、聚氯乙烯、聚苯乙烯、聚透明质酸、酪蛋白、明胶、谷蛋白、聚酐、聚丙烯酸、藻酸盐、壳聚糖、任何其共聚物,及其混合物。

[0044] 用于根据本文所述方法生产多相微粒的该至少三种不同聚合物中一种可以与至少一种其它聚合物不溶混。如本文所用术语“不溶混”指不混合的物质,即物质不形成溶液。例如,有机溶剂如苯,和水,或烃如大豆油和水当混合时几乎完全不溶混并作为两层分离。该至少三种不同聚合物的溶混性可受因素如溶剂的类型和存在或不存在、溶剂中聚合物的总浓度和温度影响。根据本发明方法的至少三种不同聚合物可以在溶剂不存在下彼此不溶混。例如,当它们以固体形式混合,或当以熔融形式存在时,该至少三种不同聚合物可以彼此不溶混。

[0045] 一般而言,当溶液中至少三种不同聚合物的总浓度低时,至少三种不同聚合物彼此溶混并可形成均相溶液。然而,至少三种不同聚合物在溶剂的存在下可变得彼此不溶混。当至少三种不同聚合物的总浓度达到在溶剂中的特定浓度(例如由于溶剂的蒸发导致的浓度变化)时,一种聚合物变得与至少一种其它聚合物不溶混,且当达到该特定浓度时作为不同的相分离出。术语“相”指在液体体系中存在或可形成的均相液体部分。包含溶解

形式的具体聚合物的聚合物相可例如通过肉眼在视觉上清楚地区别于其它相。发生相形成的点称为浊点。

[0046] 术语聚合物溶液的“浊点”指在体系中一种聚合物变得与其它聚合物不溶混并形成分相时溶液中聚合物的总浓度。它可表示为挥发性有机溶剂中存在的聚合物的重量百分数除以挥发性有机溶剂的体积 (% w/v)。聚合物中浊点的数取决于存在的聚合物的数。使用两种聚合物的体系具有两种聚合物彼此不溶混时的一个浊点。使用三种聚合物的体系具有两个浊点。术语包含至少三种不同聚合物的挥发性有机溶剂的溶液的“第一浊点”指第一聚合物作为相从溶液中分离时溶液中聚合物的最低总浓度。在该第一浊点下,至少三种不同聚合物中一种与至少一种其它聚合物在体系中不溶混。术语包含至少三种不同聚合物的溶液的“第二浊点”指第二聚合物作为相从溶液中分离时溶液中聚合物的第二最低总浓度。在该第二浊点下,至少三种不同聚合物中第二种与至少一种其它聚合物在体系中不溶混。

[0047] 例如,当溶液中聚合物的总浓度例如通过从溶液中除去溶剂(例如通过蒸发)或通过将聚合物加入溶液中而提高时,可达到第一浊点,其中至少三种不同聚合物中一种与至少一种其它聚合物在溶剂中不溶混。与至少一种其它聚合物不溶混的聚合物从溶液中分离出以形成不同的相,而留下其它聚合物仍溶于溶剂中。当溶液中聚合物的总浓度进一步提高时,达到第二浊点,其中至少三种不同聚合物中第二聚合物与至少一种其它聚合物在溶剂中不溶混。第二聚合物可从溶液中分离出以形成不同的相。每次形成聚合物相时,测量恰形成的相中聚合物的浓度,因此给予我们定义浊点的聚合物浓度。

[0048] 作为使用彼此不溶混的聚合物的说明性实例,使用由三种不同类型的聚合物聚(L-乳酸)(PLLA)、聚(DL-乳酸-co-乙醇酸)(PLGA)和聚(己内酯)(PCL)构成的聚合物体系。所有三种聚合物彼此溶混并能以第一浊点以下的在溶液中的聚合物总浓度溶于有机溶剂如DCM中。PLGA在超过溶液中聚合物的特定总浓度,即第一浊点时与PLLA和PCL不溶混。因此,在将有机溶剂从聚合物溶液中除去的溶剂萃取方法中,PLGA与PLLA和PCL在溶液中不溶混,并在第一浊点下作为不同的相从溶液中分离出,留下仍溶于溶剂中的PLLA和PCL。当除去更多的溶剂时,溶液中的聚合物总浓度进一步提高,并达到第二浊点,其中PLLA与PCL在溶液中不溶混,且PLLA分离出以形成不同的相(还参见实施例9)。

[0049] 在另一实施方案中,使用由四种不同类型的聚合物PLLA、PLGA、聚苯乙烯(PS)和乙烯乙二醇(EVA)构成的聚合物体系。所有这四种聚合物彼此溶混并能以第一浊点以下的在溶液中的聚合物总浓度溶于有机溶剂如DCM中。在溶剂萃取方法中,溶液中聚合物的总浓度提高且EVA在第一浊点下作为不同的相从溶液中分离出。当除去更多的溶剂时,溶液中聚合物的总浓度进一步提高,且PLGA在第二浊点下从溶液中分离出。当溶液中聚合物的总浓度进一步提高时,达到第三浊点,且PS在第三浊点下与PLLA相分离(还参见实施例14)。

[0050] 回到本发明方法,方法包括将至少三种不同的聚合物溶于挥发性有机溶剂中以得到第一溶液。通过溶于溶剂中,至少三种不同的聚合物可形成均相溶液。因此,合适的溶剂为可溶解至少三种聚合物中每一种的溶剂。另外,合适的溶剂为挥发性且在水溶液中不溶混的溶剂。如本文所用术语“挥发性”指可在环境温度下容易蒸发的化合物。物质的挥发性的度量为在一个大气压下它的沸点。挥发性溶剂在一个大气压下可具有小于约100°C,例如约75°C或约50°C或约40°C或约30°C的沸点。可使用一类或多于一类溶剂。

[0051] 可用于本发明中的合适溶剂包括但不限于乙酸乙酯 (EAc)、丙酮、甲基乙基酮 (MEK)、四氢呋喃 (THF)、氯仿、戊烷、苯、苜醇、碳酸亚丙酯 (PC)、四氯化碳、二氯甲烷 (methylene chloride) (二氯甲烷 (dichloromethane) 或 DCM) 或乙腈。在一个实施方案中,二氯甲烷 (二氯甲烷或 DCM) 用作有机溶剂。

[0052] 可将至少三种不同的聚合物一起或以任何顺序单独地加入溶剂中。可进行搅动,例如通过搅拌或声波振荡以增强聚合物溶解在溶剂中的速率。可任选将热能应用于混合物以提高聚合物在溶剂中的溶解速率。

[0053] 可用于本发明方法中的聚合物的选择取决于所需应用。例如对于在生物医学领域中的应用,聚合物如 PCL、PGA、PLA 和 PLGA 因为它们生物相容性和生物降解性能而是重要的。特别地,PLGA 已被 FDA 认可用于人类治疗。当降解时,PLA 和 PLGA 链在体内分裂成单体酸,即乳酸和乙醇酸,其可通过克氏循环作为 CO_2 和在尿中作为水从有机体中排除。本领域技术人员能基于具体应用领域选择和确定合适的聚合物类型。

[0054] 本发明方法可进一步包括将待包封的目标物质加入第一溶液中。术语“目标物质”指意欲给予或释放的化合物。可将目标物质包封在多相微粒中,即该物质可存在于表面上,或包封在多相微粒内。可加入一种或多种不同类型的目标物质。取决于目标物质与聚合物之间相互作用的类型和强度,目标物质可位于微粒的不同区域或层中。目标物质与聚合物之间相互作用的类型在性质上可以为物理或化学的。在一些实施方案中,目标物质可经由物理键合,例如通过聚合物链上引发的疏水力、氢键结合、范德华相互作用、静电力或聚合物链纠缠中任一种使得目标物质陷入聚合物链中而载入不同的聚合物层中。在一些实施方案中,目标物质经由化学键合,例如通过共价键合、离子键合或亲合作用 (例如配体 / 受体相互作用、抗体 / 抗原相互作用等) 而载入不同的聚合物层中。因此,一种或多种目标物质可通过选择目标物质与至少三种不同聚合物各自之间合适类型的相互作用而载入和位于微粒的不同区域或层中,其可用于目标物质在应用中的可控释放。

[0055] 可包封的目标物质的实例包括但不限于药物、蛋白质如抗体和生长因子和核酸。术语“药物”指用于人类或动物疾病的治疗或预防或用于人类或动物生理状况或代谢状态的调节中的物质。药物的实例包括但不限于抗组胺剂如苯海拉明 (diphenhydramine) 和氯苯那敏 (chlorpheniramine), 和影响心血管、肾、肝和免疫系统的药物如抗高血压药、 β 受体阻断剂和降胆固醇剂;拟交感神经药物,例如儿茶酚胺如肾上腺素;非儿茶酚胺如苯肾上腺素和伪麻黄碱;抗感染剂,包括抗菌、抗病毒和抗真菌剂,例如氨基糖苷类如链霉素 (streptomycin)、庆大霉素 (gentamicin)、卡那霉素 (kanamycin);抗关节炎药如麻醉止痛药;抗炎剂如吲哚美辛 (indomethacin)、地塞米松 (dexamethasone) 和曲安奈德 (triamcinolone);抗肿瘤药如 5-氟尿嘧啶和甲氨蝶呤 (5-fluorouracil and methotrexate);镇定剂如安定 (diazepam);水不溶性、脂溶性疏水药物,例如类固醇如孕酮 (progesterone), 雌激素,包括避孕药如炔雌醇 (ethinyl estradiol) 和雄激素和它们的类似物,和脂溶性维生素如维生素 A、D、E 和 K, 和它们的类似物。

[0056] 可用作目标物质的蛋白质包括但不限于药物活性成分如激素、胰岛素、酶、抗体和生长因子。术语“生长因子”指影响细胞如成骨细胞、成纤维细胞、神经细胞、内皮细胞、上皮细胞、角化细胞、软骨细胞、肌细胞、来自韧带的细胞和来自髓核的细胞的功能的因子。术语“核酸”指任何可能构造如单链、双链或其组合的任何核酸。核酸例如包括 DNA 分子、RNA

分子、锁核酸分子 (LNA)、PNA 分子、使用核苷类似物或使用核酸化学产生的 DNA 或 RNA 的类似物、DNA-RNA 杂交分子和 tecto-RNA 分子。

[0057] 其它目标物质,例如包括其它药物物质如肥料、杀虫剂或农药、化学指示剂(如 pH 指示剂)或染料可包封在微粒中。作为说明性实例,可将药物如布洛芬(Ibuprofen)载入三层 PLGA/PLLA/EVA 微粒中。在制造过程期间,EVA 的疏水性长乙烯链与疏水性布洛芬(Ibuprofen)之间的强亲合力会驱使药物位于 EVA 芯中。

[0058] 将第一溶液分散在包含表面活性剂的含水连续相中以得到乳液。如本文所用,术语“乳液”指两种或更多种不溶混液体的分散体系。因此,一种液体在另一种中的乳化可导致两个不同的相形成,其中一种液体的小滴可分散,即分离和分布在另一种液体中的整个空间中。液体小滴称为分散相,而液体小滴分散于其中的另一种液体称为连续相。

[0059] 大多数乳液由水和油或脂肪作为不溶混相组成。取决于相的组成和比例,存在两种分布选择。如果水相如水“w”为连续相且油“o”为分散相,则结果是“O/W 乳液”,其基本特征由水相决定。如果油“o”为连续相且水“w”为分散相,则结果是“W/O 乳液”,其中基本特征由油决定。

[0060] 根据本公开内容,水包油包油(O1/O2/W)乳液可用于生产三元相双层微球。在该实施方案中,将三种聚合物以两个浊点之间的浓度溶于有机溶剂中,形成 O1/O2 乳液(第一乳液),其构成第一溶液。换言之,O1 相由一种聚合物在有机溶剂中形成,O2 相由两种聚合物在有机溶剂中形成,其中 O1 相为分散相且 O2 相为连续相。通过将第一溶液分散在含水连续相中,形成 O1/O2/W 乳液(第二乳液)。O1/O2/W 乳液的说明性实例为使用在 DCM 中的 PLGA(O1),在 DCM 中的 PLLA 和 PCL(O2)和已将 PVA 作为表面活性剂加入其中的水(W)形成的乳液。

[0061] 在另一实施方案中,水包油包油包油(O1/O2/O3/W)乳液可用于形成三层微粒。在该实施方案中,将三种聚合物以在第二浊点以上的总聚合物溶液浓度溶于有机溶剂中。所得聚合物溶液形成 O1/O2/O3 乳液,随后加入含水连续相中并乳化。O1/O2/O3/W 乳液的说明性实例为使用在 DCM 的 PLGA、PLLA 和 EVA(O1/O2/O3)和已将 PVA 作为表面活性剂加入其中的水(W)形成的乳液。

[0062] 如本文所述微粒形成的原理基于由于溶剂在大体积的外部水相中的部分萃取和挥发性溶剂的蒸发而引发溶于有机溶剂中的至少三种不同聚合物的相分离。因此,乳液中至少三种聚合物的第一聚合物的浓度可相对于乳液中至少三种聚合物的其它聚合物的浓度调整以使第一聚合物与乳液中的至少三种聚合物的其它聚合物不溶混。由于溶剂的部分萃取,至少三种聚合物可在乳滴内聚结,即分离成两个或更多个不溶混的液相。

[0063] 现在通过包含三种聚合物的聚合物溶液作为实例更详细地阐述本发明多相微粒的形成。在该实施方案中,当将挥发性有机溶剂从分散在水溶液中的乳滴中除去时,乳滴中聚合物的总浓度提高直至达到第一浊点。在该点下,含有具有最低浊点的聚合物和挥发性有机溶剂的小滴可相分离,即聚结,在乳滴中形成第一聚结滴(或第一聚结相)。当更多的溶剂从体系中除去时,聚合物溶液的浓度提高,且聚结滴的尺寸提高(这可由于聚结,即滴的并入而发生)。第二和第三聚合物在乳滴内保持溶混。当达到第二浊点(其在该三种聚合物体系中为最后浊点)时,第二聚合物(其为具有第二最低浊点的聚合物)和挥发性有机溶剂在乳滴内形成第二聚结滴(或第二聚结相)。第二聚合物可在第一聚结滴上形成层,

这降低第一聚合物层的表面能,因此降低体系的总能量。保留在乳滴中的第三聚合物然后可在第二聚合物上形成单独层,或可作为散布在第一和 / 或第二聚合物内的颗粒存在。单独的第三聚合物本身,即与含有第一和第二聚合物的微粒分开,不形成微粒,因为这样是热动力学上不利的。继续该方法直至除去残留溶剂,其后形成微粒。

[0064] 如本文所述,由三种不同类型的聚合物组成的溶液形成的微粒可具有包含芯、中间层和外层的三层结构,其中各层由不同的聚合物形成。作为选择,形成的微粒还可具有包含芯和外层的双层结构,其中各层由不同的聚合物形成,且第三聚合物的颗粒散布在第一和 / 或第二聚合物内。形成的微粒还可具有单层结构,其中第二和第三聚合物的颗粒散布在第一聚合物内。

[0065] 同样,由四种不同类型的聚合物组成的溶液形成的微粒可具有包含芯、第二层、第三层和外层的四层结构,其中各层由不同的聚合物形成。作为选择,形成的微粒还可具有包含芯、中间层和外层的三层结构,其中各层由不同的聚合物形成,且第四聚合物的颗粒散布在芯、中间层和 / 或外层内。形成的微粒还可具有双层结构,其中第一聚合物形成芯且第二聚合物形成第二层,且第三和第四聚合物的颗粒散布在第一和 / 或第二聚合物内。形成的微粒还可具有单层结构,其中第二、第三和第四聚合物的颗粒散布在第一聚合物内。

[0066] 因此,可形成包含在颗粒内不同聚合物类型的离散区的多相微粒。微粒的构造,即不同聚合物类型的离散区的分布和尺寸取决于聚合物相聚结的速率,并可通过参数如初始聚合物溶液的浓度、聚合物体系的沉淀速率和聚合物质量比控制。

[0067] 初始聚合物溶液的浓度指在蒸发以前乳液中至少三种聚合物一起的浓度。初始聚合物溶液的浓度可通过所用聚合物的总和除以溶剂的体积而计算(表示为% w/v)。它可影响乳化溶液中的聚合物是否可相分离形成多层微粒。为形成多相微粒,包含至少三种不同聚合物的初始聚合物溶液浓度可低于第一浊点,或可在第一浊点以上且在第二浊点以下,或可在聚合物溶液的第二浊点以上。

[0068] 例如,为形成三元相双层微粒,初始聚合物溶液浓度可低于第一浊点,或可在聚合物溶液的第一与第二浊点之间。例如,为形成三元相三层微粒,初始聚合物溶液浓度可在聚合物溶液的第二浊点以上。例如,为形成四元相四层微粒,初始聚合物溶液浓度为在聚合物溶液的第三浊点以上。

[0069] 初始聚合物浓度的选择取决于聚合物溶液的粘度和聚合物在溶液中的浊点。如本文所用术语“粘度”指流体的内摩擦。它是在剪切应力或拉伸应力变形下流体的阻力的度量并可使用粘度计测量。通常,具有低分子量的聚合物具有低粘度,因为聚合物链较短且具有相互纠缠的较低倾向。一般而言,当溶于溶剂中时,低分子量聚合物产生具有低粘度的聚合物溶液。不愿受理论束缚,认为在较高的聚合物浓度下,聚合物移动并与其各自的相聚结的能力由于聚合物溶液的粘度提高而降低。这可产生不具有明显层的微粒结构。因此,为实现多相微粒,可使用具有低粘度和低浊点的多重聚合物体系。聚合物溶液的低粘度可产生聚合物在溶液中更大的迁移率。同样,聚合物的低浊点可产生在低总聚合物浓度下,即当溶剂含量高时,在溶液中聚合物的相分离。因此,在聚合物溶液的低粘度和低浊点下,存在溶液中聚合物的更大迁移率且聚合物链可更容易地与它们各自的相聚结,由此形成多相微粒构造。

[0070] 应当理解包含不同类型聚合物的不同聚合物体系可产生各自的聚合物相聚结形

成多相微粒构造所需的不同粘度和浊点。因此,在一些实施方案中,多相微粒也可使用包含具有低粘度和高浊点的聚合物的多重聚合物体系得到,在一些实施方案中,多相微粒也可使用包含具有高粘度和低浊点的聚合物的多重聚合物体系得到。

[0071] 在一个说明性实施方案中,使用质量比为 3 : 2 : 1 的 PLLA、PLGA 和 PCL。当 DCM 用作说明性溶剂且所用初始聚合物溶液浓度为 2% w/v (其小于在 DCM 中 3.75% w/v 的第一浊点) 时,形成包含 PLGA 芯和 PLLA 壳的双层微粒。PCL 作为颗粒分散在 PLGA 芯和 PLLA 壳中,具有在 PLGA 芯中较高的 PCL 浓度。当所用聚合物溶液的初始浓度为 4% w/v 和 6% w/v (其为在 DCM 中 3.75% w/v 的第一浊点与 7% w/v 的第二浊点之间) 时,形成包含 PLGA 芯和 PLLA 壳的双层微粒。PCL 作为颗粒分散在 PLGA 芯和 PLLA 壳中,具有在 PLGA 芯中较高的 PCL 浓度。当所用初始聚合物溶液浓度为 10% w/v (其大于在 DCM 中 7% w/v 的第二浊点) 时,没有观察到明显的层形成。这可能是由于聚合物溶液的高粘度,其产生对于聚合物聚结形成明显聚合物层而言不足的时间和迁移率。

[0072] 初始聚合物溶液的浓度还可影响所形成的微粒的尺寸。一般而言,较高的初始聚合物溶液浓度导致较大尺寸微粒的形成。

[0073] 微粒的构造可通过控制聚合物体系的沉淀速率而影响。沉淀速率指将溶剂从乳液中除去的速率。通常,较低的沉淀速率,即较低的溶剂除去速率,产生多相微粒,因为对于聚合物聚结形成明显的聚合物层存在更大量的时间和迁移率。

[0074] 沉淀速率取决于初始聚合物溶液浓度、搅拌速度和油相与含水连续相之比。一般而言,较低的初始聚合物溶液浓度产生较低的沉淀速率,因为除去的溶剂量更大。不愿受理论束缚,认为较低的初始聚合物溶液浓度提供较长的时间期间和较大的迁移率(由于溶液的较低粘度)以使聚合物本身根据热动力平衡而重建,如通过溶剂萃取期间组分的界面能的变化而测定。

[0075] 一般而言,较低的搅拌速度产生较低的聚合物沉淀速率。如本文所用搅拌速度可具有约 150 至约 2000rpm,例如约 150 至约 1500rpm,或约 150 至约 500rpm 的范围。一般而言,低于 150rpm 的搅拌速度产生对于形成乳滴而言不足的剪切力。较高的搅拌速度可产生较小的微粒。超过 2000rpm 的搅拌速度可由于高沉淀速率而产生各自聚合物相的不足聚结。在一个实施方案中,2000rpm 的搅拌速率用于形成与在 400rpm 的搅拌速度下的具有约 300 μ m 的直径的三层多相微粒(还参见实施例 13)相比具有 15 μ m 的较小直径的三层多相微粒(还参见实施例 15)。

[0076] 挥发性有机溶剂与含水连续相之比(油/水比)指挥发性有机溶剂与水的体积比(表示为 v/v)。它可通过挥发性有机溶剂的体积除以水的体积而得到。一般而言,可控制聚合物体系中挥发性有机溶剂的量以影响溶剂蒸发所需的时间以及聚合物相在溶液中的迁移率,其又影响所形成的微粒的构造。为形成三元相双壁微粒,油/水比可以为约 0.1 至约 0.005v/v,例如约 0.1 至约 0.03v/v,或约 0.1 至约 0.0083v/v 或约 0.08 至约 0.03v/v,或约 0.07 至约 0.04v/v。对于三壁和四壁微粒,选择挥发性有机溶剂与水相之比使得挥发性有机溶剂保持可溶于含水连续相中。由于高沉淀速率,三壁和四壁结构动力学上陷入非平衡构造中,因为聚合物链不具有对于重建而言足够的时间和迁移率。

[0077] 聚合物质量比指不同类型的聚合物之间的质量比。一般而言,溶液中具有较高质量的聚合物相形成外壳,其卷入具有较低质量的聚合物相。如果所用聚合物的质量对于聚

合物而言是相同的,则形成较高体积的聚合物可形成壳。因此,对于芯-壳微粒,壳聚合物与芯聚合物的质量比可足够大以确保壳聚合物覆盖芯聚合物。微粒的各聚合物层的厚度可通过改变聚合物质量比而控制。通常,较高的聚合物质量产生微粒中较厚的聚合物层。因此,聚合物质量比可以具有任何合适的值,其取决于所需的微粒构造。在一个说明性实施方案中,使用对于 PLLA : PLGA : PCL 为 1-3 : 2-3 : 1-2 的聚合物质量比。

[0078] 不同的微粒构造如芯-壳倒置可通过改变聚合物质量比而实现,其又可取决于聚合物的浊点和沉淀速率。如本文所用术语“芯-壳倒置”指其中起初形成颗粒芯的聚合物自身重建以在起初形成壳但现在形成芯的聚合物之上形成壳的现象,即存在芯和壳材料倒置。

[0079] 例如,如果聚合物溶液在聚合物的浊点以上且在高沉淀速率下制备,则芯-壳倒置可通过聚合物质量比的变化而进行。不愿受理论束缚,认为当起初将包含溶于挥发性有机溶剂中的至少三种不同聚合物的第一溶液倒入含水连续相中时,在与周围含水环境或其它聚合物形成界面中不存在聚合物的优先分布。该聚合物的优先分布可由于聚合物上亲水或疏水性基团的存在而发生,由此聚合物上亲水性基团的存在可使聚合物移向外部水相,且其可导致聚合物形成微粒的壳。因此,当在聚合物浊点附近且在高沉淀速率下准备溶液中聚合物的总浓度时,聚合物陷入其非平衡构造中,因为存在不足的时间和聚合物在溶液中的迁移率(由于可导致高溶液粘度的聚合物溶液的高浓度)以实现它们的平衡状态。因此,通过控制聚合物质量比,初始壳材料可形成芯,且初始芯材料可形成壳(例如参见实施例 13)。

[0080] 可加入表面活性剂以稳定含微粒的乳液。因此表面活性剂充电稳定剂且可包括两性表面活性剂、阴离子表面活性剂、阳离子表面活性剂、非离子表面活性剂或其混合物中任一种。取决于所用聚合物,表面活性剂可影响所形成的微粒的尺寸。

[0081] 阴离子表面活性剂的加入可赋予微粒表面带负电荷。阴离子表面活性剂的实例包括但不限于十二烷基硫酸钠(SDS)、戊烷磺酸钠、脱氢胆酸、甘氨酸胆酸乙酯、月桂基硫酸铵和其它烷基硫酸盐、月桂基聚氧乙烯醚硫酸钠、烷基苯磺酸盐、肥皂、脂肪酸盐或其混合物。

[0082] 阳离子表面活性剂的加入可赋予微粒表面带正电荷。阳离子表面活性剂的实例包括但不限于鲸蜡基三甲基溴化铵(CTAB)、十二烷基乙基二甲基溴化铵(D12EDMAB)、二-十二烷基溴化铵(DMAB)、十六烷基氯化吡啶鎓(CPC)、聚乙氧基化牛脂胺(POEA)、十六烷基三甲基对甲苯磺酸铵、苯扎氯铵(BAC)、苯索氯铵(BZT)及其混合物。

[0083] 非离子表面活性剂的实例可包括但不限于泊洛沙姆(poloxamer)、烷基聚氧化乙烯、二甘醇单己基醚、聚乙烯醇(PVA)、聚氧化乙烯和聚氧化丙烯的共聚物、六甘醇单十六烷基醚、烷基多葡萄糖苷、毛地黄皂苷、乙二醇单癸基醚、椰油酰胺 MEA、椰油酰胺 DEA、椰油酰胺 TEA、脂肪醇或其混合物。在一个实例中,聚乙烯醇(PVA)用于稳定微球乳液。

[0084] 泊洛沙姆如 F127 为在伯羟基中终止的二官能嵌段共聚物表面活性剂。它们由通过两个聚氧乙烯(聚氧化乙烯)亲水链侧面相接的中心聚氧丙烯(聚氧化丙烯)疏水链组成。由于聚合物嵌段的长度可定制,存在许多具有稍微不同性能的不同泊洛沙姆。对于通称“泊洛沙姆”,这些共聚物通常以字母“P”(代表泊洛沙姆),其后三个阿拉伯数字命名,其中最初两个阿拉伯数字 $\times 100$ 得到聚氧丙烯芯的近似分子质量,最后一个阿拉伯数字 $\times 10$ 得到%聚氧乙烯含量(例如 P407 = 具有 4,000g/mol 的聚氧丙烯分子质量和 70%聚氧乙烯

含量的泊洛沙姆)。对于普卢兰尼 (Pluronic) 商品名, 这些聚合物的编码以定义其在室温下的物理形式的字母 (L = 液体, P = 糊, F = 薄片 (固体)) 开始, 其后是两个或三个阿拉伯数字, 第一个阿拉伯数字指聚氧丙烯芯的分子质量 (由 BASF 的普卢兰尼方格测定) 且最后一个数字 $\times 10$ 得到 % 聚氧乙烯含量 (例如 F127 = 具有 4,000g/mol 的聚氧丙烯分子质量和 70% 聚氧乙烯含量的普卢兰尼)。在一个实例中, 可使用泊洛沙姆 407 (P407) (= 普卢兰尼 F127) 或 F-188 或 L-63 或其混合物。

[0085] 两性表面活性剂的实例可包括但不限于十二烷基甜菜碱、2,3-二巯基丙烷磺酸钠一水合物、十二烷基二甲基氧化胺、椰油酰胺基丙基甜菜碱、3-[N, N-二甲基 (3-棕榈酰氨基丙基) 氨基]-丙烷磺酸盐、椰油两性甘氨酸及其混合物。

[0086] 回到本发明方法的最后步骤, 将该最终乳液在合适的温度下或在真空下混合以使有机溶剂蒸发。在溶剂蒸发以后, 可在储存以前将微粒离心并洗涤。

[0087] 在第二方面中, 本发明涉及一种通过本发明方法得到的多层微粒。对于包含目标物质的多层微粒, 多层微粒可在意欲使用的场所降解以释放目标物质。如本文所用术语“降解”指多层微粒分解成较小的分子。降解可在特定条件如温度、磨损、pH、离子强度、电压、电流作用、辐射和生物手段下进行。在一些实施方案中, 微粒的降解可经数秒至数天或数月的时间周期进行。微粒降解所需的时间周期可取决于几个参数, 例如微粒的组分如所用聚合物和目标物质的类型、微粒的尺寸、温度、pH 和湿度。

[0088] 在第三方面中, 本发明涉及一种包含通过本发明方法得到的多层微粒的药物组合物。在一些实施方案中, 可将组合物倒入或注入具有所需形状的模具中, 然后硬化以形成具有分散于其中的微粒的基体。聚合物可降解, 仅留下目标物质。因此, 目标物质如肥料或农药的缓释可随着聚合物的降解而实现。在一些实施方案中, 组合物适于给予动物或人类体内的一个点, 例如缺陷点。可将组合物直接注入患者的一个点如缺陷点中, 聚合物可在那里硬化成具有分散于其中的微粒的基体。聚合物可以为可生物降解的。因此, 目标物质如药物的缓释可随着聚合物的降解而实现。

[0089] 本文说明性描述的本发明可适当地在不存在非本文具体公开的任何一种或多种元素、一个或多个极限下实践。因此, 例如术语“包含”、“包括”、“含有”等应宽泛且无限定地理解。另外, 本文所用术语和表述作为说明而不是限定性的术语使用, 在这类术语和表述的使用中不意欲排除所示和所述特征的任何等效物或其部分, 而是认为在要求保护的本发明范围内的各种改进是可能的。因此, 应当理解尽管已通过优选实施方案和任选特征具体地公开了本发明, 但本领域技术人员可采取本文所公开的包含在其中的本发明的改进和变化, 并认为这类改进和改变在本发明范围内。

[0090] 本文已宽泛且一般地描述了本发明。属于一般公开内容的更窄物种和亚属分组也形成本发明的部分。这包括具有从种属中除去任何主题的附文或消极限制的本发明一般描述, 而不管本文中是否具体叙述了排除的材料。

[0091] 其它实施方案在以下权利要求书和非限定性实施例。另外, 如果根据马库什群组描述了本发明的特征或方面, 则本领域技术人员会认识到还因此根据马库什群组的任何单独成员或成员的子群描述本发明。

[0092] 实验部分

[0093] 实施例 1: 材料

[0094] 使用聚(L-乳酸)(PLLA,特性粘度/IV :2.38,Bio Invigor)、聚(DL-乳酸-co-乙醇酸 50 : 50)(PLGA, IV :1.18, Bio Invigor)、聚(己内酯)(PCL, Aldrich) 和聚乙烯醇(PVA, MW 30-70kDa, Sigma-Aldrich) 而不进一步提纯。用于该研究中的聚合物的性能列于表 1 中。高效液相色谱(HPLC) 级二氯甲烷(DCM) 和四氢呋喃(THF)(Tedia Company Inc.) 按收到的原样用作溶剂。

[0095] 表 1 :研究中所用的聚合物

	聚合物	特性粘度(dlg ⁻¹)	M _n (gmol ⁻¹)*
[0096]	PLLA	2.38	1.64×10 ⁵
	PLGA	1.18	5×10 ⁴
	PCL	-	10.7×10 ⁴

[0097] * 如通过凝胶渗透色谱法(GPC) 测定的数均分子量。

[0098] 实施例 2 :聚合物浊点测定

[0099] 为测定聚合物的浊点,即一种聚合物变得与其它两种聚合物不溶混时的聚合物溶液浓度,根据 3 : 2 : 1(PLLA : PLGA : PCL) 的质量比称重 0.3g 质量的三种聚合物。为制备 2% (w/v) 均相聚合物溶液,将 PLLA(0.15g)、PLGA(0.1g) 和 PCL(0.05g) 溶于 15mL DCM 中。然后将三元聚合物溶液转移至 20mL 量筒中并使其在室温下无干扰地位于通风橱中。当两个不同相由于图 20A 所示聚合物相分离而在溶液中变得明显时,通过读出量筒上的刻度而记录溶液的体积。当形成明显的淡黄色液相时检测 PLGA 的相分离。为测定各相中的聚合物,即 PLGA、PLLA 或 PCL,可通过傅里叶变换红外光谱(FTIR) 分析使用注射器提取的聚合物相。

[0100] 为进一步确定聚合物溶液是否在所有聚合物的浊点以上制备,将溶液以 3500rpm 离心 10 分钟。如果观察到三个明显层,则这意味着溶液中所有三种聚合物在浊点以上变得不溶混。这显示于图 20B 中,所述图为显示 7.5% w/v 的 PLGA/PLLA/EVA 溶液的照片。聚合物体系的浊点为 5% w/v。类似地,对于四种聚合物体系可观察到四个明显层,如图 20C 所示,该图为显示 13% w/v 的 PLGA/PLLA/PS/EVA 溶液的照片。聚合物体系的浊点为 12% w/v。

[0101] 实施例 3 :微粒的制造

[0102] PLLA/PLGA/PCL 复合微粒使用(O/W) 乳液溶剂蒸发方法制备。首先将三种聚合物溶于 DCM 中。将所得聚合物溶液加入 0.5% (w/v) 的 PVA 水溶液中并使用顶置式搅拌器(Calframo BDC1850-220) 乳化。DCM 的蒸发将产生 PLLA、PLGA 和 PCL 的相分离,并得到三元相复合微粒。最后,将微粒过滤,用去离子水洗涤,冻干并储存在干燥器中用于进一步试验。

[0103] 具有不同构造的微粒以相同方式通过改变起始三元聚合物溶液浓度、搅拌速度、油/水比和聚合物质量比而制备。表 2 汇总了在制造不同构造的三元相微粒的溶液蒸发方法中使用的工艺参数。制造参比三元相微粒(颗粒 R) 用于随后与其它微粒比较。

[0104] 表 2 :用于制造 PLLA/PLGA/PCL 复合微粒的参数

[0105]

[0106]

描述	聚合物溶液浓度(%w/v)	搅拌速度(rpm)	油/水比	聚合物质量比 PLLA/PLGA/PCL		
				0.15g	0.1g	0.05g
三元相参比微粒(R)	6	300	0.02	0.15g	0.1g	0.05g
				3:2:1		
起始聚合物溶液浓度的影响	2	300	0.02	0.15g	0.1g	0.05g
	4			3:2:1		
	6					
	10					
搅拌速度的影响	6	150	0.02	0.15g	0.1g	0.05g
		300		3:2:1		
		400				
		500				
油/水比的影响	6	300	0.1	0.15g	0.1g	0.05g
			0.03	3:2:1		
			0.02			
			0.0125			
			0.0083			
聚合物质量比的影响	6	300	0.02	0.1g	0.15g	0.05g
				2:3:1		
				0.05g	0.15g	0.05g
				1:3:1		
				0.15g	0.1g	0.1g
3:2:2						

[0107] 实施例 4:使用扫描电子显微镜 (SEM) 表征

[0108] 微粒的表面和内部形态使用扫描电子显微镜 (SEM) 分析。所用 SEM 为 JEOL JEM-6360A, 其在 5kV 的电压下操作。在分析以前, 首先将试样安装在金属立杆上并大约在中心线处用剃须刀片横截。然后使用喷涂溅射仪型号 SPI-Module 将试样用金涂覆。完全卷入结构的形成效率通过计算嵌入聚丙烯酸树脂中的微粒的百分数而量化, 其与在 SEM 下在视野中的微粒总数相比是双壁的。

[0109] 实施例 5:使用溶解方法的微粒构造或聚合物分布研究

[0110] 使用基于聚合物在 THF 中的溶解度差 (PLGA 和 PCL 可溶于 THF 中, 但 PLLA 不可溶) 的溶解方法测定三元聚合物微粒中的最终构造或聚合物分布。

[0111] 首先将横截复合颗粒不搅拌而浸入 THF 中 2 天以溶解 PLGA 和 PCL 内容物。然后收集横截颗粒用于 SEM 分析。

[0112] 实施例 6 :使用拉曼成像的微粒构造或聚合物分布研究

[0113] 使用拉曼成像作为由实施例 5 所述溶解方法得到的最终颗粒构造的确证。将已预先截断的复合微粒放在激光功率为至多约 20mW 的显微镜物镜下。然后拉曼逐点映射测量在 $300\ \mu\text{m} \times 200\ \mu\text{m}$ 的面积上以 $5\ \mu\text{m}$ 的步长在 x 和 y 方向上使用装配有近红外增强深耗 (deep-depleted) 热电 Peltier 冷却 CCD 阵列检测器 (576×384 像素) 和高级莱卡显微镜的拉曼显微镜 (InVia Reflex, Renishaw) 进行。将试样用 785nm 近红外二极管激光器照射并使用 50 倍物镜收集反向散射光。测量扫描使用静态 1800 凹槽每 mm 分散光栅在 $300\text{--}1900\text{cm}^{-1}$ 的光谱窗口中收集且各个光谱的收集时间为约 35 秒。包括由于宇宙射线导致的尖峰剔除的光谱预处理然后在使用目标带熵最小化 (BTEM) 运算法则进一步分析拉曼成像数据以前进行。开发 BTEM 运算法则以重建纯组分。当所有下面组分的所有归一化纯组分光谱重建时,这些信号的各个测量点的相对贡献通过使它们反向投射到设置的基线校准和归一化数据上而计算。然后产生各个下面组分 (即 PLLA、PLGA 和 PCL) 的空间分布或聚合物分布。

[0114] 实施例 7 :使用差示扫描量热法 (DSC) 的微粒构造或聚合物分布研究

[0115] 微粒的热分析使用差示扫描量热仪 (DSC) (DSC-Q10, TA Instruments) 进行。为避免氧化降解,将试样和参比盘用氮气以 $48\text{mL}/\text{min}$ 的恒定流率洗涤。将约 5mg 的各个试样以 $5^\circ\text{C}/\text{分钟}$ 的扫描速率由 -50°C 加热至 200°C 。

[0116] 实施例 8 :三元相参比微粒 (颗粒 R) 的制造

[0117] 制造一套参比三元相微粒 (R) 以与使用表 2 所列工艺参数得到的微粒比较。图 1 显示 R 的 SEM 显微照片。图 1A 为显示 R 颗粒的外部形态的显微照片。图 1B 为显示 R 颗粒的横截面的显微照片。图 1C 为显示 R 颗粒的内部形态的近视图的显微照片。图 1D 为显示嵌入聚丙烯酸树脂中的 R 颗粒的横截面的显微照片。

[0118] 微粒构造或聚合物分布可以以以下方式分类,即 a) 微粒的尺寸, b) 壳、芯和颗粒的相对尺寸和位置,和 c) 壳和 / 或芯中的颗粒分布。

[0119] 使用显微照片,发现 R 颗粒具有约 $300\text{--}400\ \mu\text{m}$ 的尺寸范围。如图 1A 所示,R 颗粒为具有光滑外表面的球形。如图 1B 所示观察到完全卷入结构。如图 1C 所示,发现微粒的壳与芯相比较不致密。图 1D 显示嵌入聚丙烯酸树脂内的微粒的横截面,其证实了微粒具有完全卷入结构的观察。评估该完全卷入结构的形成效率为约 100%。

[0120] 图 2 为显示在溶于 THF 中以后 R 颗粒的横截面视图的 SEM 显微照片。具有周围多孔壳的中空芯可从图 2A 中看出。由于 PLLA 不溶于 THF 中,且 PCL 和 PLGA 均可溶于 THF 中,因此,壳确定为 PLLA。图 2B 为多孔壳的近视图。发现孔的尺寸为约 $5\text{--}10\ \mu\text{m}$ 。

[0121] 使用拉曼成像进一步检验芯 - 壳构造。拉曼测量结果显示于图 3 中。结果证实溶解结果,即壳和芯分别为富 PLLA 和 PLGA 区域,且 PCL 分散在 PLLA 壳中。因此,参考图 2B,可认为 PCL 颗粒的尺寸为约 $5\text{--}10\ \mu\text{m}$,这与溶解结果一致。

[0122] 因此,如使用 SEM、溶解方法和拉曼成像所观察的,形成的 R 颗粒包含 PLGA 芯,其具有用 PCL 颗粒浸渍的 PLLA 壳。为阐述,制造 PLLA/PLGA 的复合材料。图 4 为显示 PLLA/PLGA 颗粒的 SEM 显微照片。在 PCL 的不存在下,由双壁双相 PLLA/PLGA 微球观察到致密的

PLLA 壳。

[0123] R 颗粒的 DSC 热谱显示两个玻璃化转变温度,其分别相应于 PLLA 和 PLGA 的玻璃化转变温度,和两个熔点,其分别相应于 PLLA 和 PCL 的熔解温度。由 DSC 热谱得到的纯聚合物和颗粒 R 的热性能显示于表 3 中。

[0124] 表 3:由 DSC 热谱得到的纯聚合物和复合微粒的热性能

[0125]

聚合物	玻璃化转变温度, T _g (°C)	熔解温度, T _m (°C)
PLGA	43	-
PLLA	74	180
PCL	-	60
PLLA/PLGA/PCL PLLA: 63 PLGA: 45 PLLA: 176 PCL: 52		

[0126] 来自 DSC 热谱的两个玻璃化转变温度和两个熔解温度的存在(其为初始聚合物的代表)意味着聚合物相分离并形成不溶混的共混物,由此产生观察到的三元相微粒。

[0127] 实施例 9:起始聚合物溶液浓度对颗粒构造的影响

[0128] 使用 PLLA/PLGA/PCL 的浊点测量,观察到 PLGA 开始与 PCL/PLLA 相分离时的 3.75% (w/v) 的第一浊点,和 PCL 和 PLLA 开始相分离时的 7% (w/v) 的第二浊点。因此,使用这些值,制备初始聚合物溶液浓度为 2% (w/v) (第一浊点以下)、4% (w/v)、6% (w/v) (第一与第二浊点之间) 和 10% (w/v) (在两个浊点以上)。

[0129] 图 5 为使用各个聚合物溶液浓度,即 (A) 2% (w/v)、(B) 4% (w/v)、(C) 6% (w/v) 和 (D) 10% (w/v) 制备的 PLLA/PLGA/PCL 微粒的 SEM 显微照片。

[0130] 如图 5A 所示,当初始聚合物溶液浓度为 2% (w/v) 时,观察到完全卷入构造,其中芯与壳相比显示出较不致密。芯的多孔形态表明对于 2% (w/v) 更多的 PCL 分散在 PLGA 芯中。当初始聚合物溶液浓度分别如图 5B 和 5C 所示提高至 4% (w/v) 和 6% (w/v) 时,微粒构造保持为双壁的,且其类似于参比 R 的。然而,在如图 5D 所示 10% (w/v) 的初始聚合物溶液下,没有观察到卷入结构。相反,观察到具有其相应相的聚合物的不完全聚结。还观察到聚合物溶液浓度的提高提高所形成的微粒的尺寸。

[0131] 因此,从所得结果可总结出为实现微粒的双壁构造,需要低初始聚合物溶液浓度。合适的初始聚合物溶液浓度可使用浊点测量确定。另外,对于较高的聚合物溶液浓度得到较大的微粒尺寸,这可能是由于由更浓的溶液导致的较大的乳滴。

[0132] 不愿受理论束缚,并使用参比 R 的聚合物体系作为实例,认为当将初始聚合物浓度为 6% (w/v) 的聚合物溶液倒入 PVA 水溶液中时,当达到 PLGA 与 PCL/PLLA 相分离时的 3.75% (w/v) 的浊点时,PLGA 相作为乳滴内含有 DCM 和聚合物(称为聚结相)的小滴分离。这些滴开始聚结,尺寸变得更大,同时 PLLA 和 PCL 在乳滴内仍溶混。

[0133] 当达到 7% (w/v) 的第二浊点时,PCL 和 PLLA 开始相分离。在溶剂蒸发期间,PLGA 聚结滴倾向于向内芯迁移。这是由于富含 DCM 的 PLGA 聚结滴由于 DCM 与 PLGA 之间较高的相互作用度而比 PLLA-DCM 相更疏水,如通过 PLGA 在 DCM 中较高的溶解度所示。另一方面,PLLA 聚结滴对周围水相具有更大的亲合力。显示出 PCL 作为颗粒存在于 PLLA 层中,这可能是以下的结果。首先 PCL 与较大 PLGA 聚结滴的混合可能是困难的,且如果给出它在分散

PLLA 相中的有限迁移率,则 PCL 还与 PLLA 一起迁移至乳滴的外部区域。其次,PLLA 的较快凝固还意味着降低用于 PCL 进一步聚结和迁移的时间。第三,PLLA 和 PCL 的高分子量(高粘度)和体系中较低的 PCL 含量(即 3PLLA : 1PCL 的质量比)还可妨碍 PCL 的聚结和迁移,导致嵌入 PLLA 相中的更小 PCL 颗粒。溶剂的进一步除去最终导致 PLLA 沉淀,形成壳并捕集内部的 PCL 颗粒,其中 PLGA 形成内芯。

[0134] 因此,认为在测定聚合物构造中的主要因素之一是聚合物在溶液中的链迁移率。

[0135] 将该概念应用于具有 2% (w/v) 的初始聚合物浓度的聚合物溶液,则乳滴内部的聚合物保持溶混直至随后 PLGA 在 3.75% (w/v) 的第一浊点下相分离。导致高粘度的 PLLA 和 PCL 的高分子量使得 PLGA 与 PCL/PLLA 相的相分离更困难。PLGA、PLLA 和 PCL 的表面张力分别为 37.7mJ/m^2 、 36.1mJ/m^2 和 37.5mJ/m^2 ,同时聚合物溶液的表面张力可由聚合物和溶剂的体积加权平均预测。当溶剂蒸发时,有效界面能和因此预测的热力学构造会改变。如使用 Good 和 Girifalco 方程(例如参见 Girifalco, L. A. ;Good, R. J. J. Phys. Chem. 1957, 61 904) 计算,PLGA 和 PCL 的表面张力与 PLLA 和 PCL 相比更加类似。因此,PLGA 与 PCL 之间存在较低的界面能。因此,当达到第二浊点时,小 PLGA 聚结滴的均相分散体以及 PLGA 与 PCL 之间的较低界面能增强 PLGA 与 PCL 聚结滴之间的相互作用和混合。这会导致更多 PCL 分散在 PLGA 芯中,如图 5A 所示。另外,较低的沉淀速率可促进聚合物向热力学平衡构造的热力学驱动构造,这可受 PLGA 与 PCL 聚结滴之间的界面能影响。

[0136] 作为另一实例,当起始聚合物溶液具有在两个浊点之间的 4% (w/v) 和 6% (w/v) 的浓度时,得到相同的微粒构造,即 PLGA 芯和具有散布 PCL 颗粒的 PLLA 壳。

[0137] 当聚合物浓度为 10% (w/v) 时,高聚合物浓度产生提高的粘度,这降低了容许聚合物移入并与它们相应的相聚结的时间。因此,如图 5D 所示没有观察到卷入结构。

[0138] 实施例 10 :搅拌速度对颗粒构造的影响

[0139] 图 6 为以 (A) 150rpm、(B) 300rpm、(C) 400rpm 和 (D) 500rpm 的搅拌速度制备的 PLLA/PLGA/PCL 微粒的 SEM 显微照片。观察到搅拌速度的变化不影响最终构造,即聚合物在微粒中的分布。如图所示,双壁结构保持在微粒中。观察到在 150rpm 的最低搅拌速度下,PLLA 壳中的 PCL 颗粒在尺寸方面最大,如图 6A 所示。这可能是由于在较低搅拌速率下聚合物沉淀速度降低,由此导致在进行 PLLA 凝固以前 PCL 聚结滴具有更多的时间在 PLLA 基体内聚结。使用 THF 溶解试验证实了该观察,其显示 PLLA 壳中较大的孔,如图 7 所示。

[0140] 还观察到搅拌速度的提高降低形成的微粒的尺寸。这可能是由于较高的搅拌速度通过强剪切力提供更细的乳滴,由此产生较小的粒度。

[0141] 实施例 11 :油 / 水比对颗粒构造的影响

[0142] 研究油 / 水比对微粒结构的影响。图 8 为以 (A) 0.1、(B) 0.03、(C) 0.02、(D) 0.0125 和 (E) 0.0083 的油 / 水比制备的 PLLA/PLGA/PCL 微粒的 SEM 显微照片。

[0143] 对于最低体积的 PVA 溶液(油 / 水比 = 0.1),PLGA 聚结相不是位于颗粒中心,而是观察到迁移远离中心,如图 8A 所示。另外,观察到当使用较低体积的 PVA 水溶液时,PLLA 壳中的 PCL 颗粒尺寸更大,如从图 8A 和 8B 中可以看出。然而,图 8C、8D 和 8E 显示出进一步提高 PVA 连续相的体积不会对微粒的双壁构造产生任何进一步影响。

[0144] 不愿受理论影响,认为聚合物在溶液中的链迁移率受聚合体系的初始油 / 水比影响,其又影响聚合物构造。例如,在溶剂除去方法中,DCM 必须首先扩散到水相中,然后在水

/空气界面上蒸发。(DCM的扩散由于浓度梯度而进行。)DCM仅微溶于水中,溶解度为约2% (v/v)。认为0.02的初始油/水比为临界点,该油/水比转化为5mL DCM/250mL PVA水溶液。临界点基于所用DCM的量(其又取决于聚合物溶液浓度和总聚合物质量)和DCM在水中的溶解度得到,且对于所用不同的溶剂为不同的。在大于该临界点的油/水比下,水含量相对低。这导致DCM缓慢扩散到水相中,由此导致聚合物的缓慢沉淀。这还适用于PCL聚结滴,当使用较低体积的PVA水溶液时,观察到所述聚结滴在尺寸上更大,因为它们具有更多的时间聚结。

[0145] 在溶剂除去方法的稍后阶段中,少量残余DCM不再使得PLGA聚结滴比PLLA更疏水。因此,当沉淀速率足够慢时,PLGA通过向外部水相迁移而表现出其较高的亲水性。这显示于图8A中,其中PLGA聚结相不是位于颗粒中性,而是观察到迁移远离中心。在超过0.02的临界油/水比下,水溶液的量似乎对颗粒的最终构造不具有任何影响。可能当含水体积太大时,DCM立刻扩散到水中。因此,溶剂萃取速率不受超过临界点的油/水比影响。

[0146] 实施例12:聚合物质量比对颗粒构造的影响

[0147] 图9为使用(A)2:3:1、(C)1:3:1和(E)1:3:1的PLLA:PLGA:PCL质量比制备的微球的SEM显微照片。图9B、9D和9F为在用THF溶解以后图9A、9C和9E的各自相应的横截面视图。

[0148] 从图中观察到起始溶液中聚合物的质量比的变化导致所得嵌入颗粒的尺寸和芯和壳结构的尺寸变化。例如,当在对于参比R颗粒使用3:2:1的PLLA:PLGA:PCL质量比的图1B,与使用2:3:1的PLLA:PLGA:PCL质量比的图9A之间比较时,观察到具有较大直径的芯和具有较小厚度的壳。以较低的PLLA/PLGA比,观察到具有较大直径的PLGA芯和具有较小厚度的PLLA壳。如在图9C中可以看出,当PLLA:PLGA:PCL质量比变为1:3:1时,内芯体积与外壳体积之比变得甚至更大,因为PLLA(壳):PLGA(芯)质量比变为1:3。使用1:3:1的PLLA:PLGA:PCL质量比的图9E和9F显示PCL的量的提高导致PLLA壳中较大PCL颗粒形成。

[0149] 该观察使用图9B、9D和9F中在用THF溶解以后双壁复合微粒的SEM显微照片证实,壳和芯组合物分别确定为PLLA和PLGA,且将壳用PCL颗粒浸渍。此外,对于所用不同的聚合物质量比,没有观察到芯-壳倒置。这是令人惊讶的,因为其它团体已报告了芯-壳倒置可通过改变聚合物比而得到(例如参见Leach K等人,Journal of Microencapsulation 1999,16,153-67, Tan EC等人,Journal of Colloid and Interface Science 2005,291,135-43,和Matsumoto A等人,Journal of Controlled Release 1997,48,19-27)。在其它团体进行的研究中,当起初将二元聚合物溶液倒入PVA水溶液中时,各聚合物相的表面张力由于类似的DCM含量而大约相同。因此,较高质量的聚合物通常形成卷入具有较低质量的聚合物相的外壳。当沉淀速率足够快以动力学捕集非平衡构造以进行芯-壳倒置时,发生该现象。因此,本发明的发明人认为芯-壳倒置仅当聚合物溶液在通过用良好控制的沉淀速率声波振荡而产生油包油乳液的浊点以上制备时发生。

[0150] 因此,如在实施例中所用以6% (w/v)的相当低的起始聚合物浓度,本发明人认为存在足够的时间以使聚合物相自身根据它们的界面能所示热动力平衡重建。因此,没有观察到芯-壳倒置。代替而言,微粒的壳和芯的尺寸因此可通过改变不同聚合物的质量比而精细地调整。

[0151] 实施例 13 :三层微粒的形成和它的层倒置形式

[0152] 表 4 汇总了用于形成 PLGA/PLLA/EVA 三壁微粒 (EVA 芯、PLLA 中间层和 PLGA 外层), 和它的层倒置形式, 即 PLLA/PLGA/EVA 三壁微粒 (EVA 芯、PLGA 中间层和 PLGA 外层) 的设置。

[0153] 表 4 :用于形成三壁 PLGA/PLLA/EVA 微粒的设置

[0154]

描述	聚合物溶液浓度 (%w/v)	搅拌速度 (rpm)	油/水比	聚合物质量比		
				PLLA	PLGA	EVA
PLGA/PLLA/EVA (壳至芯)微粒	7.5 (第二浊点为 5%w/v)	400	~0.013 (350mL PVA 溶液)	0.2g 4:	0.1g 2:	0.05g 1
PLLA/PLGA/EVA (壳至芯)微粒	7.5 (所有聚合物的浊点均为 5%w/v)	400	~0.013 (350mL PVA 溶液)	0.1g 2:	0.2g 4:	0.05g 1

[0155] 一般而言,微粒使用乳液溶剂蒸发方法制备。首先将三种聚合物溶于 DCM 中。其后,首先将所得聚合物溶液超声波处理 1 分钟,随后加入 PVA 水溶液 (0.5% (w/v)) 中并使用顶置式搅拌器 (Calframo BDC1850-220) 在室温 (25°C) 下乳化。DCM 的蒸发导致 PLLA、PLGA 和 EVA 的相分离并得到三壁微粒。将微粒过滤,用去离子水洗涤,冻干并储存在干燥器中。

[0156] 图 10A 为分别相应于最外壳、中间层和芯的三元相聚 (DL- 乳酸-co- 乙醇酸 / 聚 (L- 乳酸) / 乙烯乙酸乙烯酯 (PLGA/PLLA/EVA) 的三壁 (TW) 微球的 SEM 显微照片。图 10B 显示借助 BTEM 由三元相 PLGA/PLLA/EVA 三壁复合微粒得到的纯组分拉曼光谱评估和它们相关的得分图像。图 10C 为 PLGA/PLLA/EVA 的三壁微球的 SEM 显微照片,其中 PLGA 壳具有较大的厚度。图 10D 显示层倒置的三元相 PLLA/PLGA/EVA 微球的 SEM 显微照片,其中最外壳、中间层和芯分别为 PLLA、PLGA 和 EVA。图 10E 显示借助 BTEM 由三元相 PLLA/PLGA/EVA 三壁复合微粒得到的纯组分拉曼光谱评估和它们相关的得分图像。

[0157] 实施例 14 :四层微粒的形成

[0158] 表 5 汇总了用于形成 PLGA/PLLA/PS/EVA 四层微粒 (EVA 芯、PS 第二层、PLLA 第三层和 PLGA 外层) 的设置。

[0159] 表 5 :用于 PLGA/PLLA/PS/EVA 四层微粒的形成中的设置

[0160]

聚合物溶液浓度 [%w/v]	聚合物质量比			
13 (所有聚合物的浊点均为 12%w/v)	PLGA	PLLA	EVA	PS
	0.4g 10:	0.2g 5:	0.1g 2.5:	0.04g 1

[0161] 首先将聚合物溶于 DCM 中。其后将所得聚合物溶液超声波处理 1 分钟,随后以 0.013 的油 / 水比加入含有 PCA 表面活性剂 (0.5% (w/v)) 的水中,并在室温 (25°C) 下使

用顶置式搅拌器 (Calframo BDC1850-220) 以 400rpm 乳化。DCM 的蒸发导致聚合物的相分离, 得到多相复合微粒。最后, 将微粒离心, 用去离子水洗涤, 冻干并储存在干燥器中。

[0162] 图 11A 为四层聚 (DL- 乳酸-co- 乙醇酸 / 聚 (L- 乳酸) / 聚苯乙烯 / 乙烯乙酸乙酯 (PLGA/PLLA/PS/EVA) 微粒的 SEM 显微照片。壳至芯构造: PLGA、PLLA、PS、EVA。图 11B 显示借助 BTEM 由 PLGA/PLLA/PS/EVA 四层复合微粒得到的纯组分拉曼光谱评估和它们相关的得分图像。

[0163] 实施例 15: 较小直径三层微粒的形成

[0164] 具有约 $15\ \mu\text{m}$ 的较小直径的三元相三壁 PLGA/PLLA/EVA (芯 EVA、中间层 PLLA 和外层 PLGA) 使用 2000rpm 的较高搅拌速度和 2% w/v 的较高表面活性剂含量形成。其它工艺参数与在实施例 13 中用于 PLGA/PLLA/EVA 微粒的相同。由于由较强剪切力形成的较细乳滴, 形成较小的粒度。

[0165] 图 12A 为分别相应于最外壳、中间层和芯的三壁 PLGA/PLLA/EVA 微粒的 SEM 显微照片, 所述微粒具有约 $15\ \mu\text{m}$ 的尺寸。图 12B 显示借助 BTEM 由 PLGA/PLLA/EVA 三壁复合微粒得到的纯组分拉曼光谱评估和它们相关的得分图像。

[0166] 实施例 15: 目标物质在微粒中的定位

[0167] 为制造载有布洛芬的三层 PLGA/PLLA/EVA 微粒, 首先将布洛芬加入聚合物溶液中, 随后将所得溶液超声波处理 1 分钟以实现完全均化。然后在搅拌下将该溶液倒入 PVA 水溶液中。药物与聚合物之间的相互作用 (聚合物-药物相互作用) 是药物分布的主要驱动力。药物与聚合物之间的亲合力越高, 药物载入聚合物中的倾向越强。在制造过程期间, EVA 的疏水性长乙烯链与疏水性布洛芬之间的强亲合力驱使药物位于 EVA 芯中。该药物-聚合物亲合力容许不同的药物基于它们的亲水-疏水性质位于不同聚合物中, 因此产生药物的特定层定位。

[0168] 图 13A 为三元相 PLLA/PLGA/PCL 双壁复合微粒的 SEM 显微照片。布洛芬 (疏水性) 位于用 PCL 颗粒浸渍的 PLLA 壳中; 盐酸甲氧氯普胺 (亲水性) 位于 PLGA 芯中。图 13B 显示借助 BTEM 由该微粒得到的纯组分拉曼光谱评估和它们相关的得分图像。

[0169] 图 14A 为三元相 PLGA/PLLA/EVA 三壁复合微粒的 SEM 显微照片。最外壳、中间层和芯分别为 PLGA、PLLA 和 EVA 富集区。布洛芬 (疏水性) 位于 EVA 芯中。图 14B 显示借助 BTEM 由该微粒得到的纯组分拉曼光谱评估和它们相关的得分图像。图 14C 为三元相 PLGA/PLLA/EVA 三壁复合微粒的 SEM 显微照片。最外壳、中间层和芯分别为 PLGA、PLLA 和 EVA 富集区。盐酸甲氧氯普胺 (亲水性) 位于 PLGA 壳中。图 14D 显示借助 BTEM 由该微粒得到的纯组分拉曼光谱评估和它们相关的得分图像。

[0170] 图 15 为显示质量比为 A) 6 : 2 : 1、B) 3 : 2 : 1 和 C) 3 : 2 : 2 的三元相双壁 PLLA/PLGA/PCL 微粒的药物释放曲线的图。壳和芯分别为用 PCL 颗粒浸渍的 PLLA 和 PLGA 富集区。盐酸甲氧氯普胺 (亲水性) 位于 PLGA 芯中。从图中可以看出微粒的药物释放曲线可通过改变聚合物质量比控制。

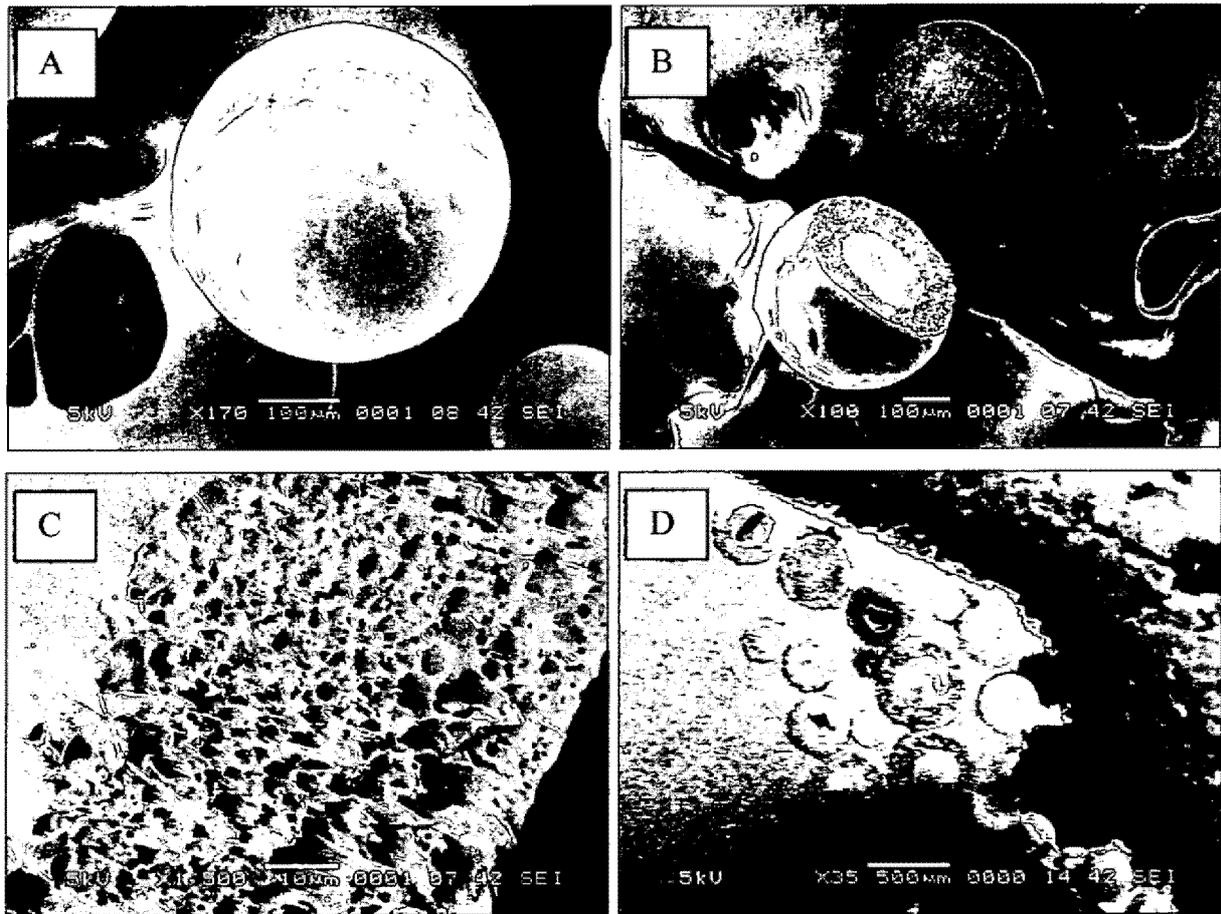
[0171] 图 16 为显示三元相双壁 PLLA/PLGA/PCL 微粒的药物释放曲线的图。盐酸甲氧氯普胺和布洛芬分别位于 PLGA 芯和 PLLA/PCL 壳中。从图中可以看出布洛芬的释放在最初 10 天内实现, 其后是盐酸甲氧氯普胺, 以顺序方式提供由单一颗粒的多重药物释放。

[0172] 图 17 为显示 (A) 双层 PLLA (壳) / EVA (芯) 微粒、(B) 双层 PLGA (壳) / EVA (芯)

微粒、(C) 单层 EVA 微粒和 (D) 三层 PLGA(外壳)/PLLA(中间层)/EVA(芯)微粒的药物释放曲线的图。从图中可以看出三层微粒实现更一致(接近零级)的释放率。

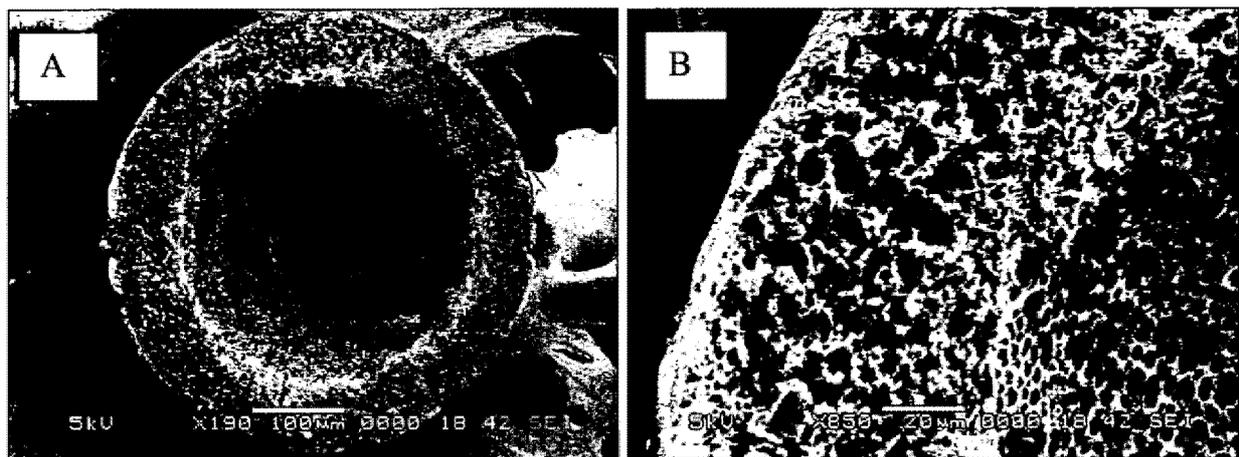
[0173] 图 18 为显示质量比为 (A) 10 : 2 : 1 和 (B) 10 : 5 : 1 的三层 PLGA/PLLA/EVA 微粒的药物释放曲线的图。布洛芬(15 重量%)位于 EVA 芯中。该图显示药物释放曲线可通过改变聚合物质量比(即层厚度)而控制。

[0174] 图 19 为显示三层微粒 (A) PLGA(壳中的 MCA)/PLLA/EVA(芯)和 (B) PLLA(壳)/PLGA(中间层中的 MCA)/EVA(芯)的药物释放曲线的图。该图显示药物释放曲线可通过层倒置而控制。



白色条在图1A和1B中表示: 100 μm ; 在图1C中表示: 10 μm , 在图1D中表示: 500 μm

图 1



白色条在图2A中表示: 100 μm ; 在图2B中表示: 20 μm

图 2

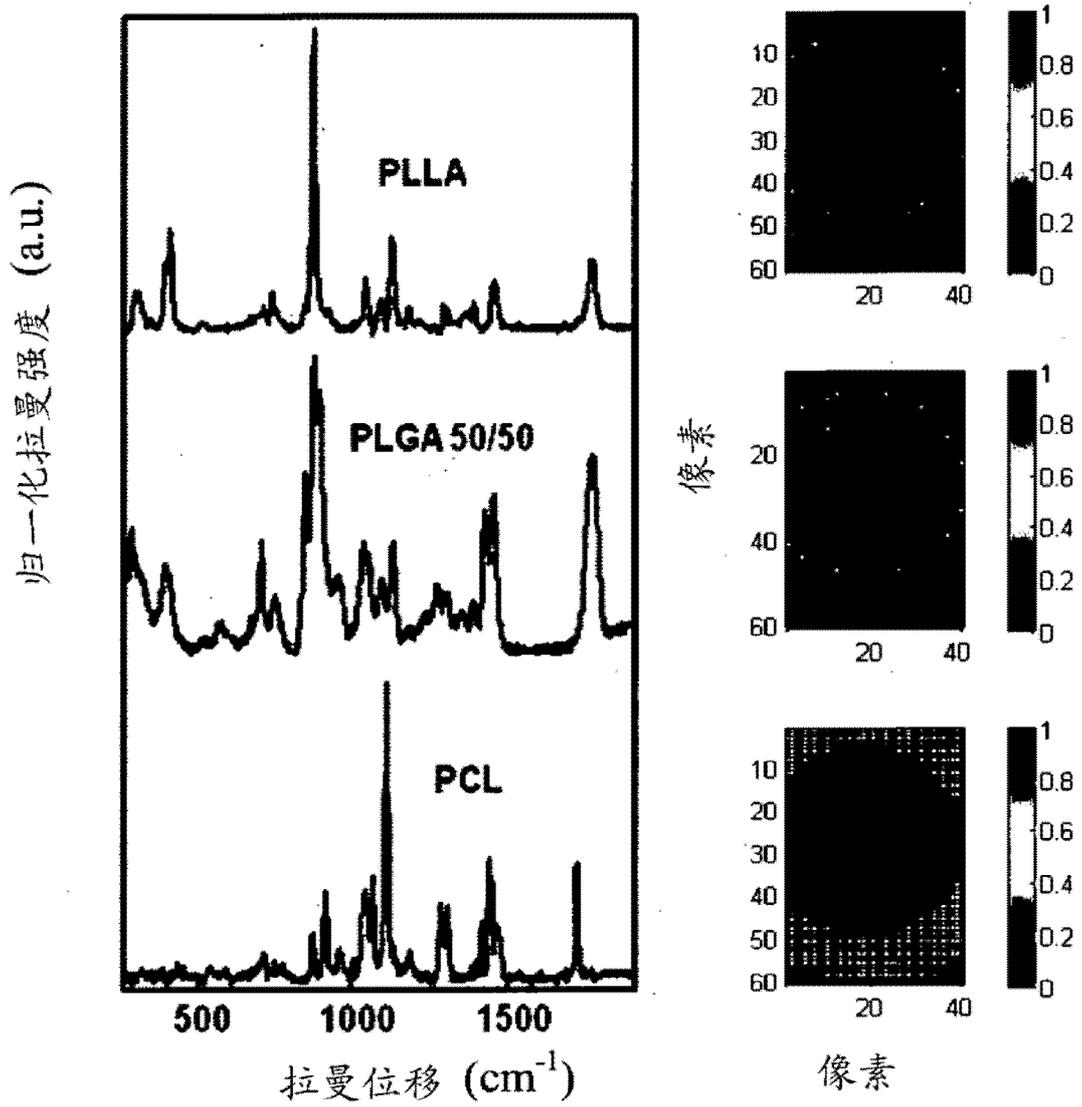
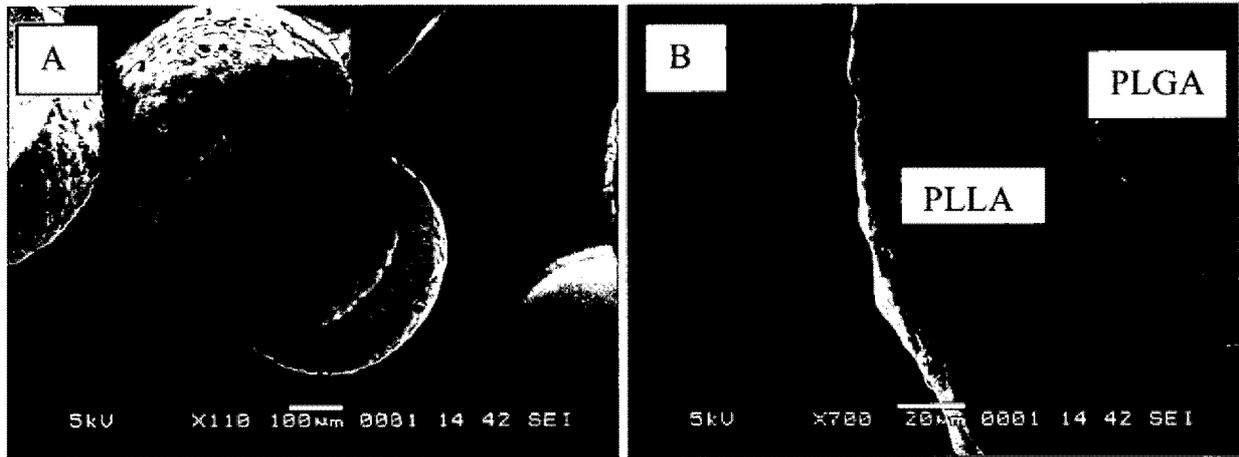
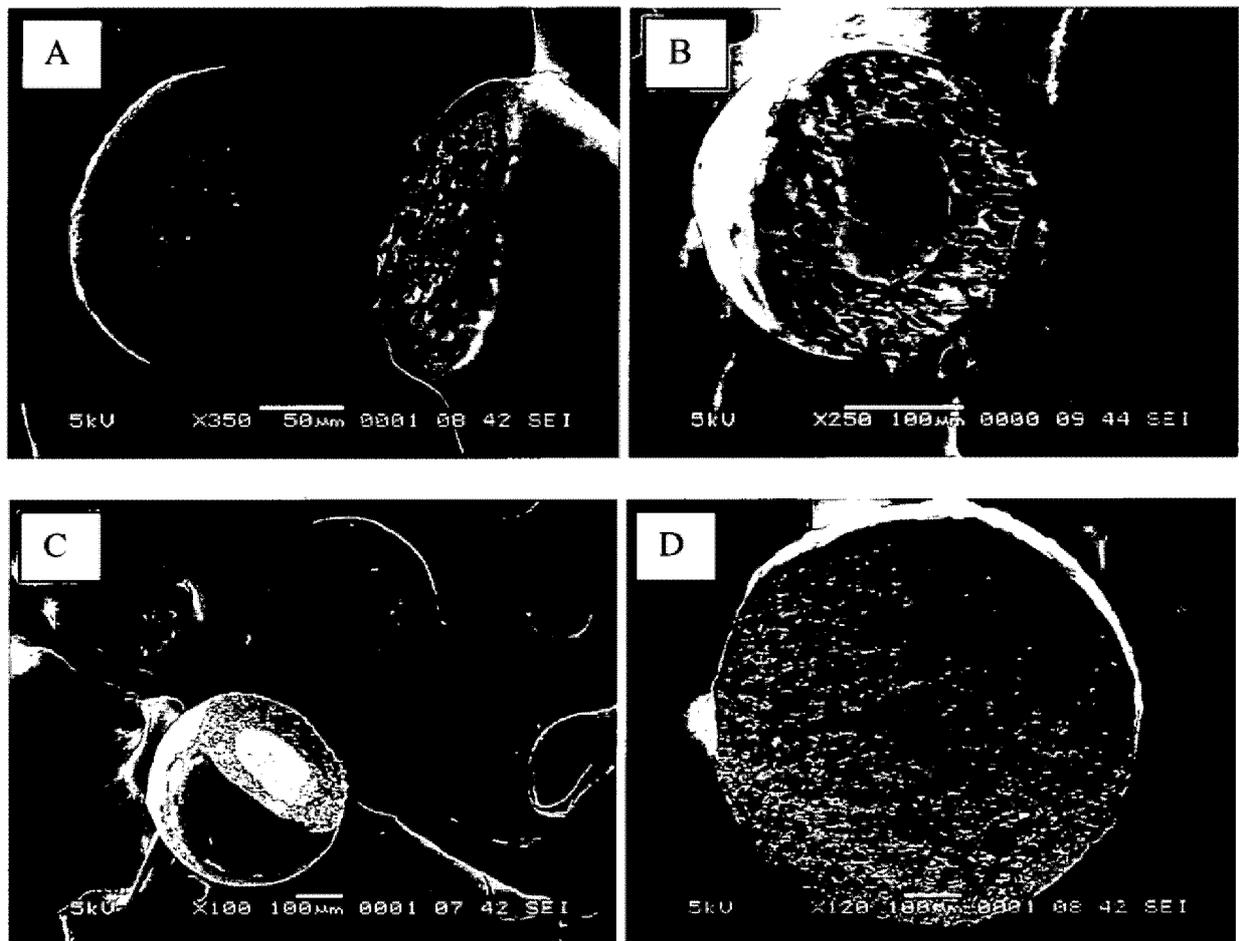


图 3



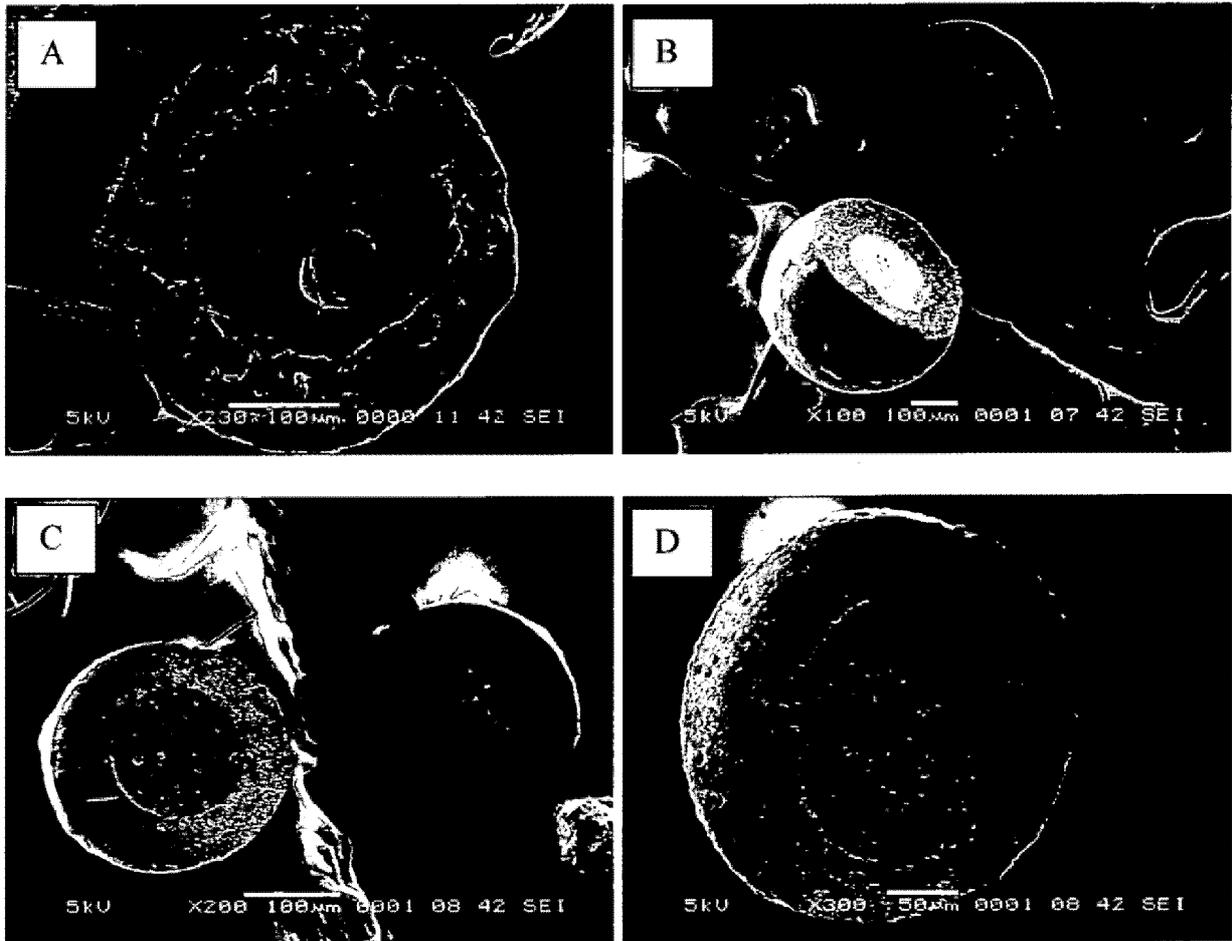
白色条在图4A中表示: 100 μm ; 在图4B中表示: 20 μm

图 4



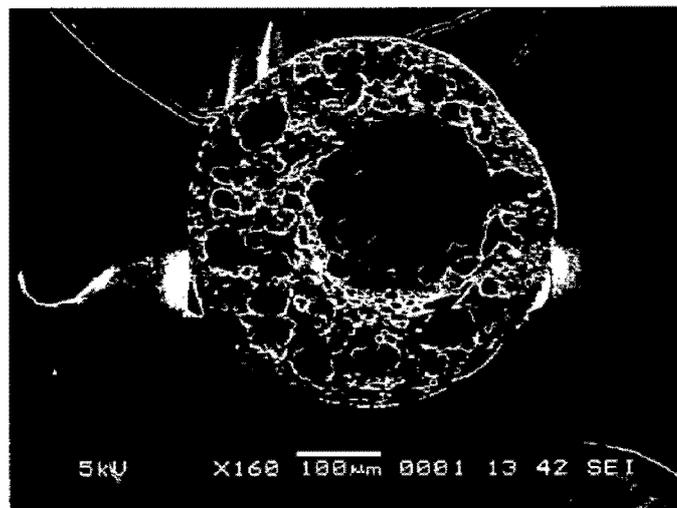
白色条在图5A中表示: 50 μm ; 在图5B、5C和5D中表示: 100 μm

图 5



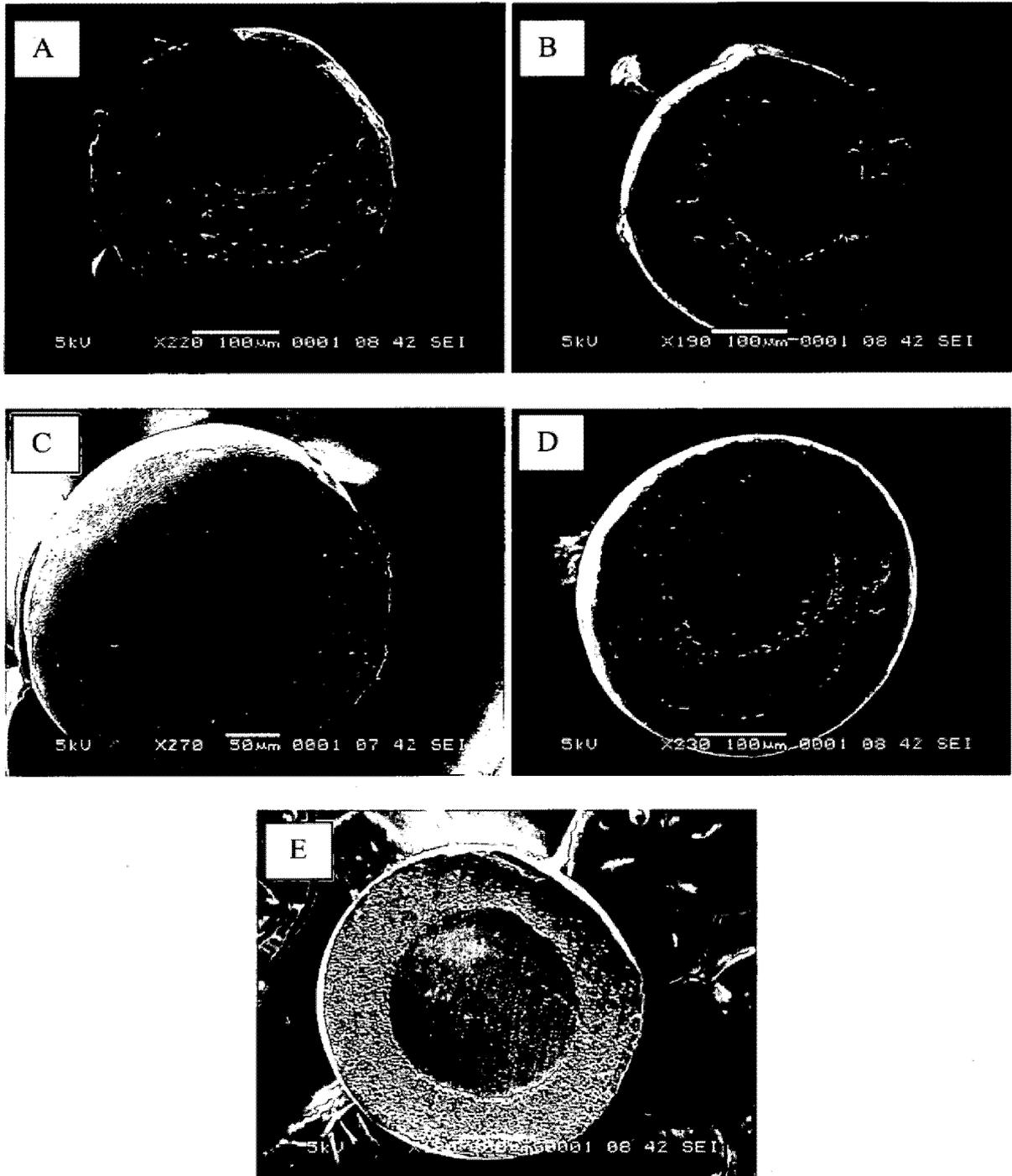
白色条在6A、6B和6C中表示: 100 μm ; 在6D中表示: 50 μm

图 6



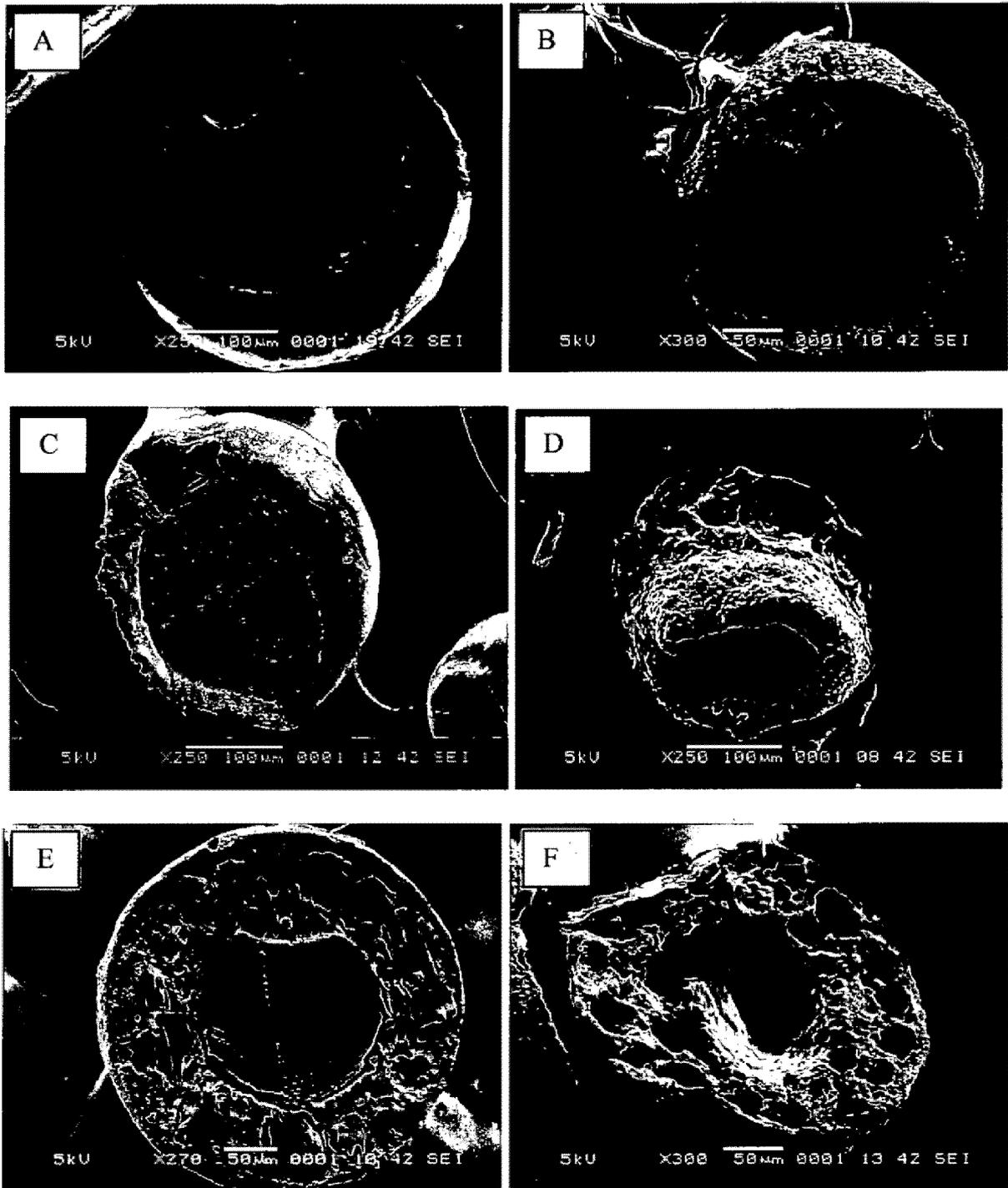
白色条在图7中表示: 100 μm

图 7



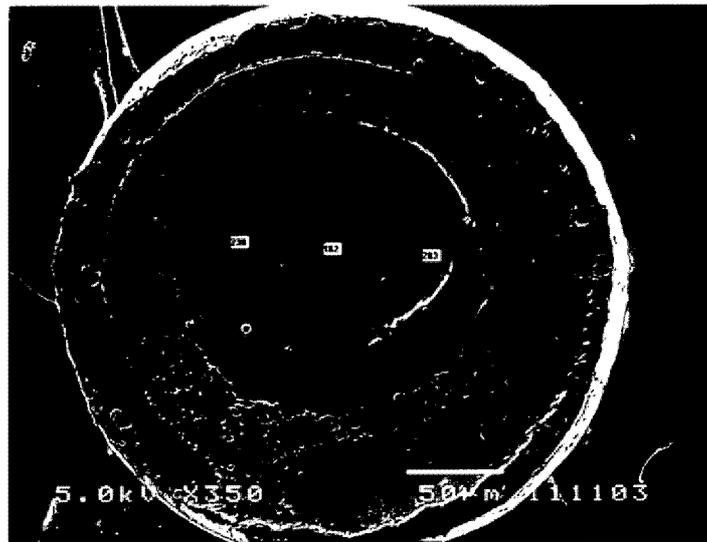
白色条在图8A、8B、8D和8E中表示: 100 µm; 在图8C中表示: 50 µm

图 8



白色条在图9A、9C和9D中表示：100 μm；在图9B、9E和9F中表示：50 μm

图 9



白色条在图10A中表示: 50 μm

图 10A

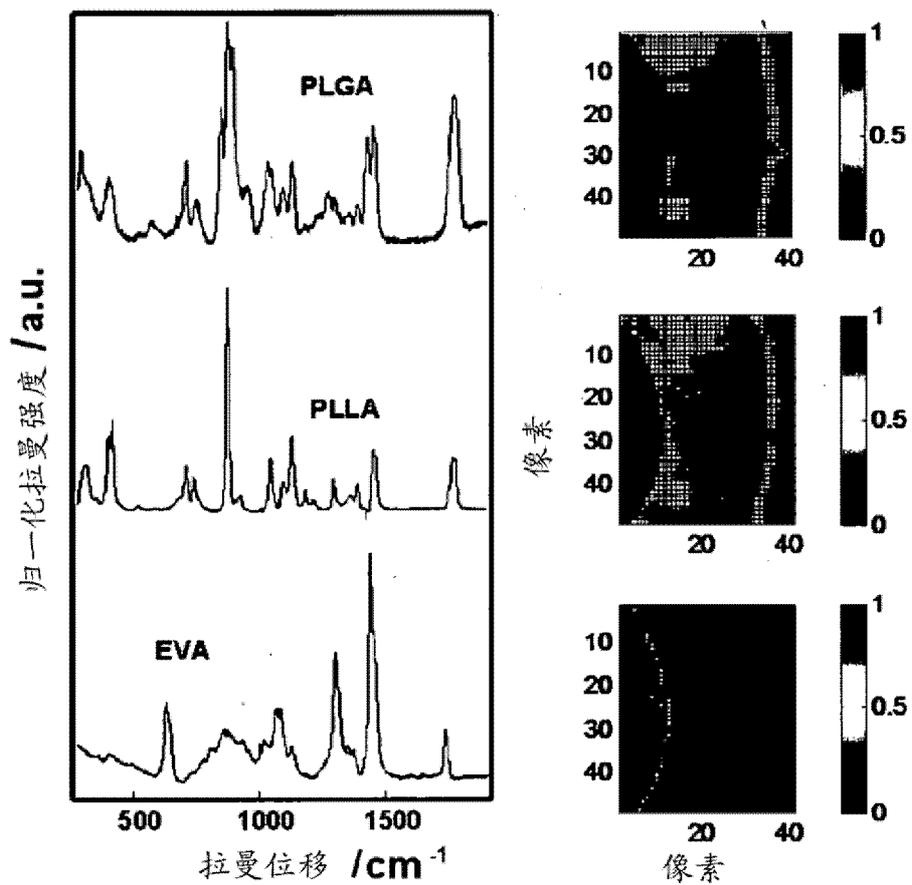
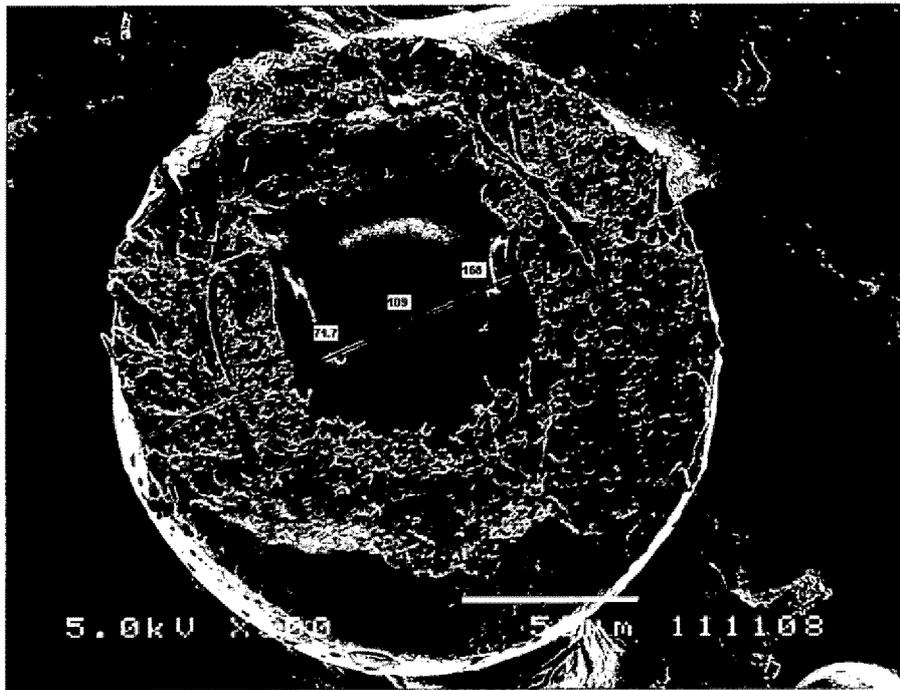


图 10B



白色条在图10C中表示: 50 μ m

图 10C



白色条在10D中表示: 100 μ m

图 10D

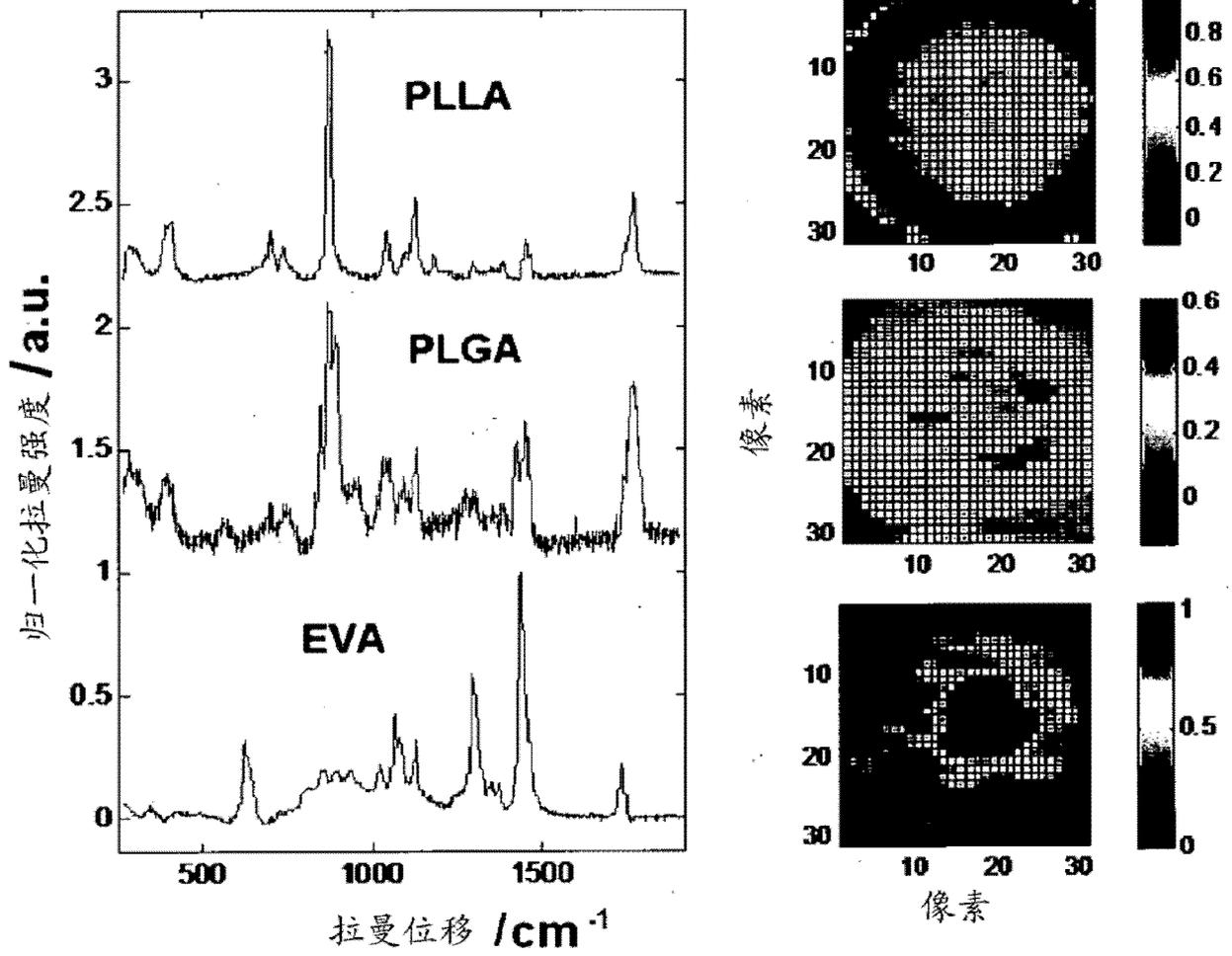
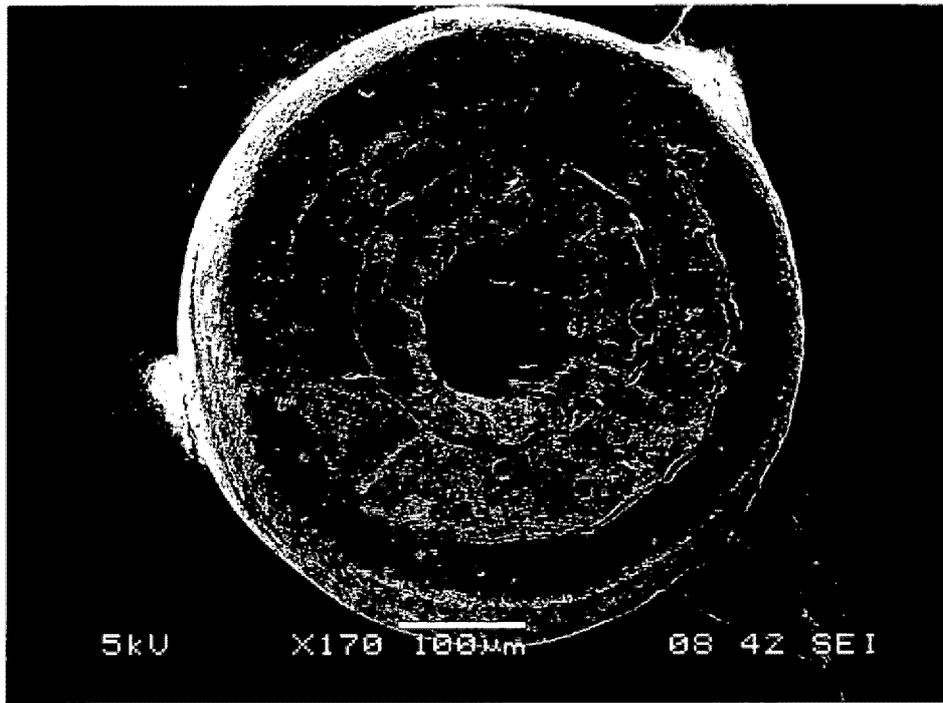


图 10E



白色条在图11A中表示: 100 µm

图 11A

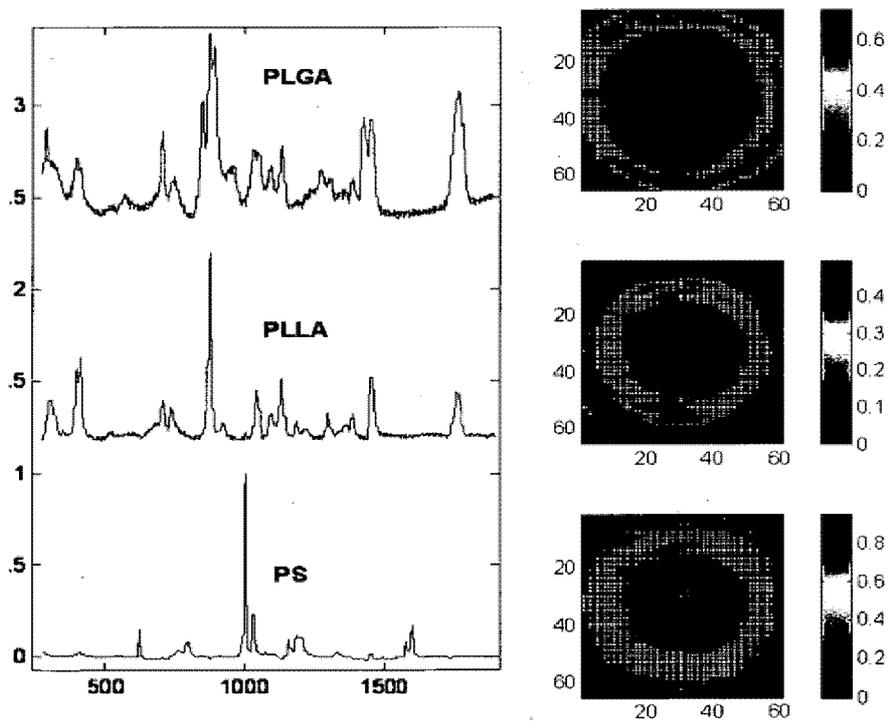


图 11B

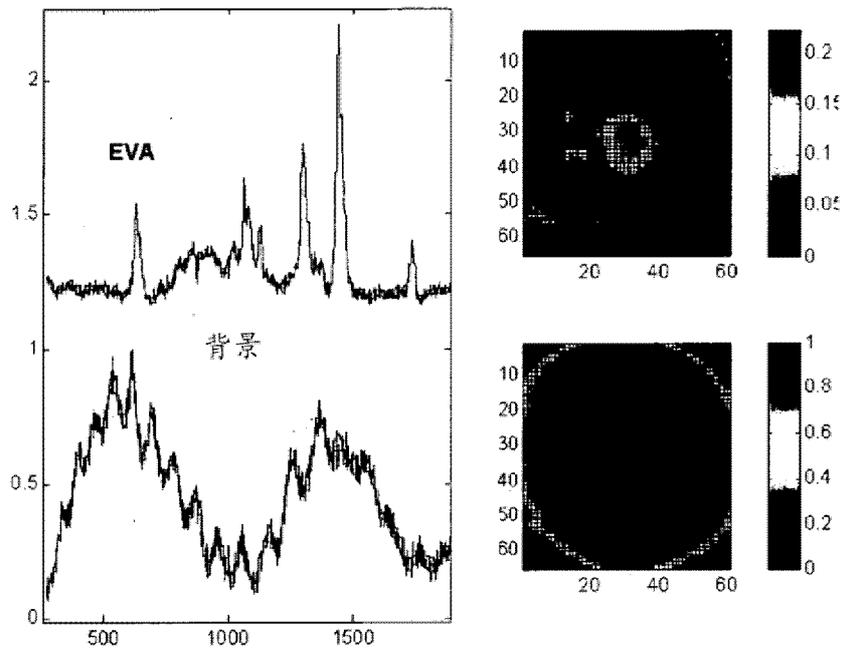


图 11B(续)



白色条在图12A中表示: 5 μm

图 12A

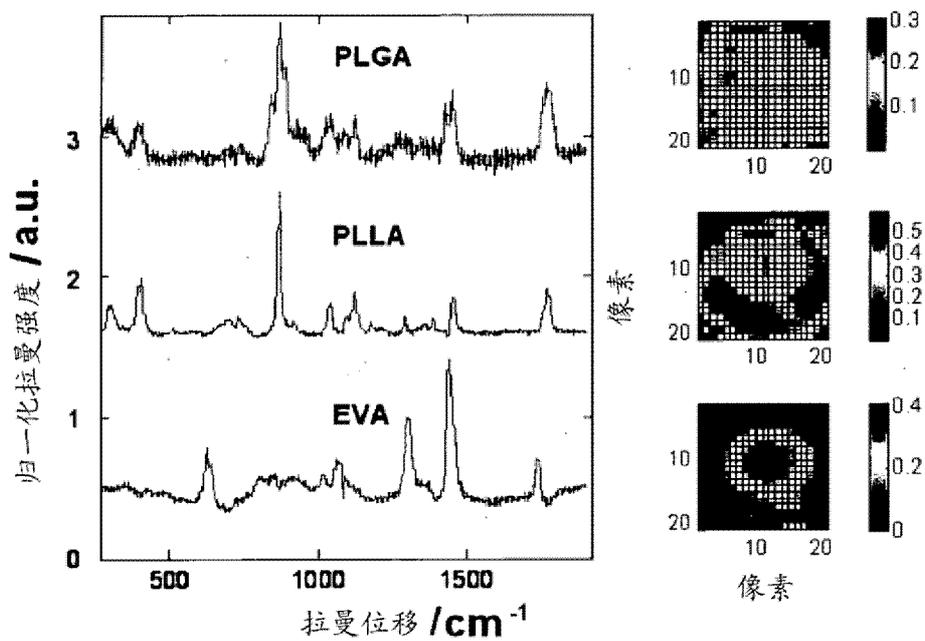
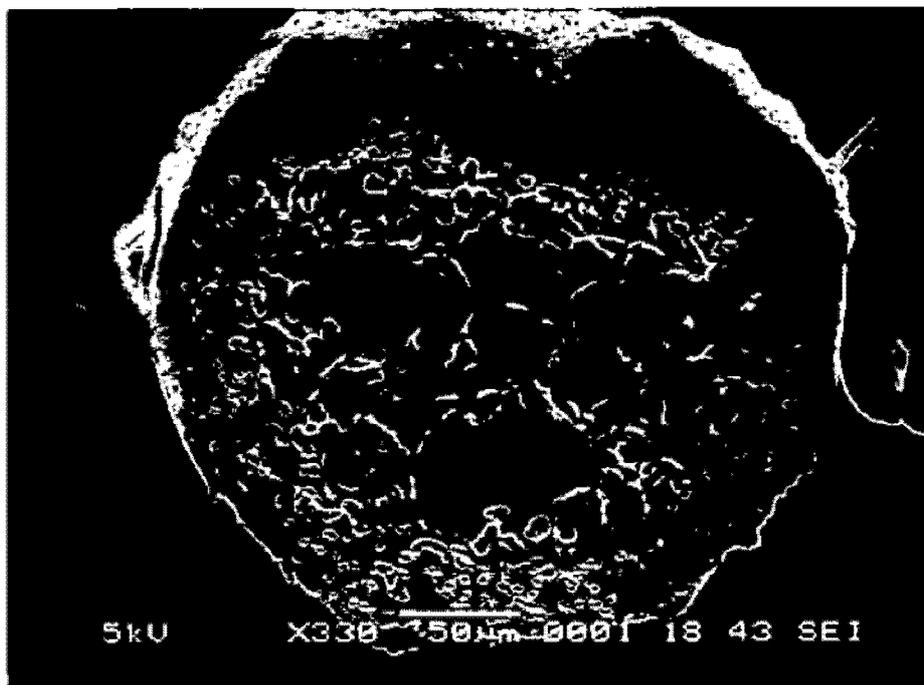


图 12B



白色条在图13A中表示: 50 µm

图 13A

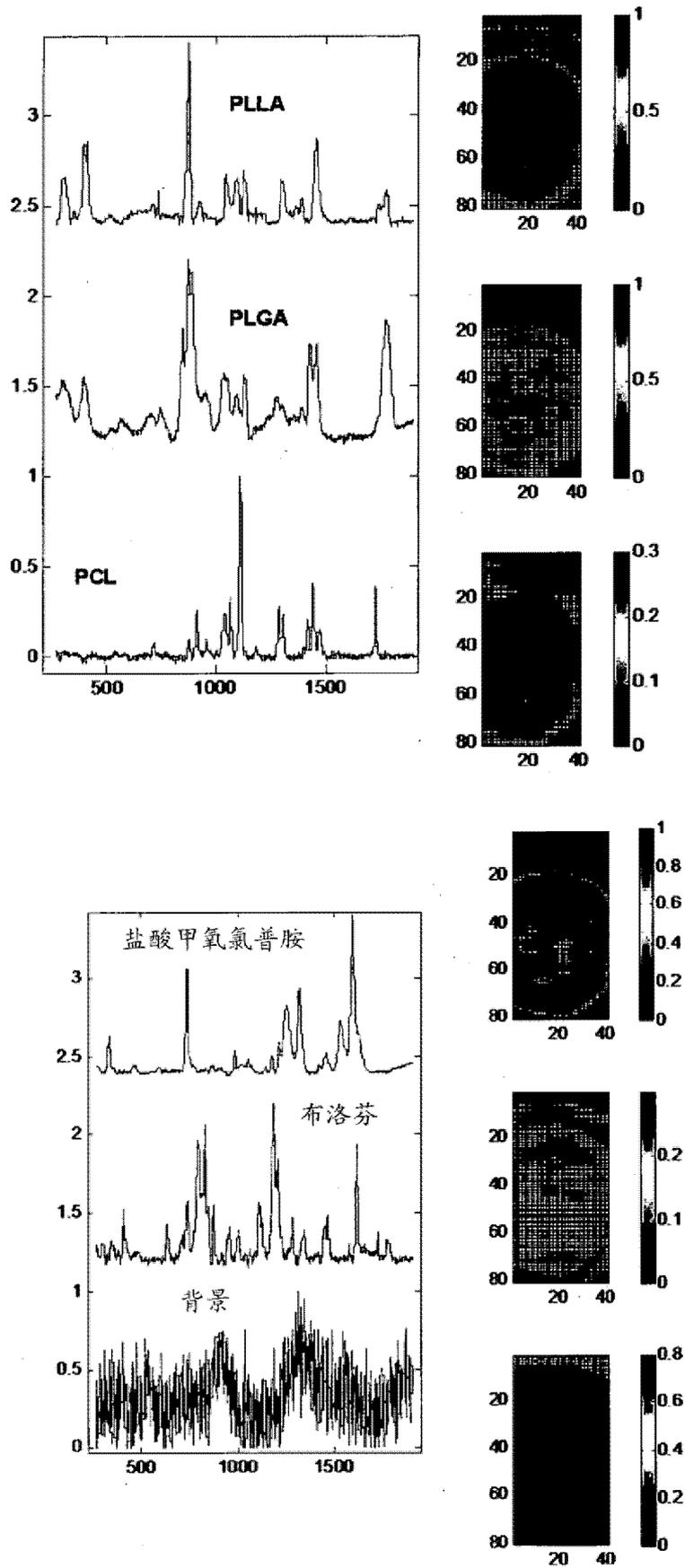
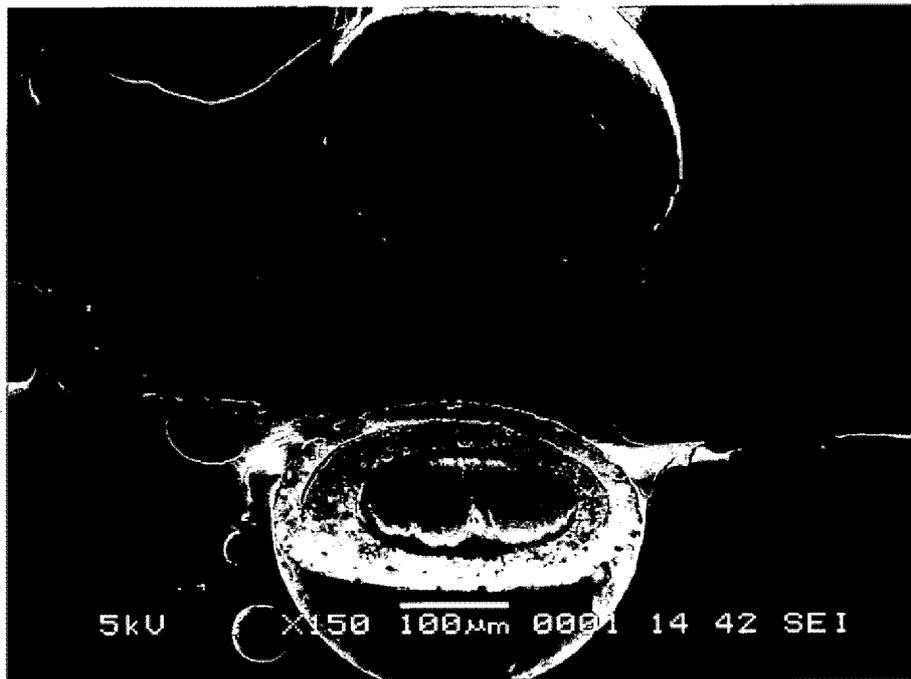


图 13B



白色条在图14A中表示: 100 μ m

图 14A

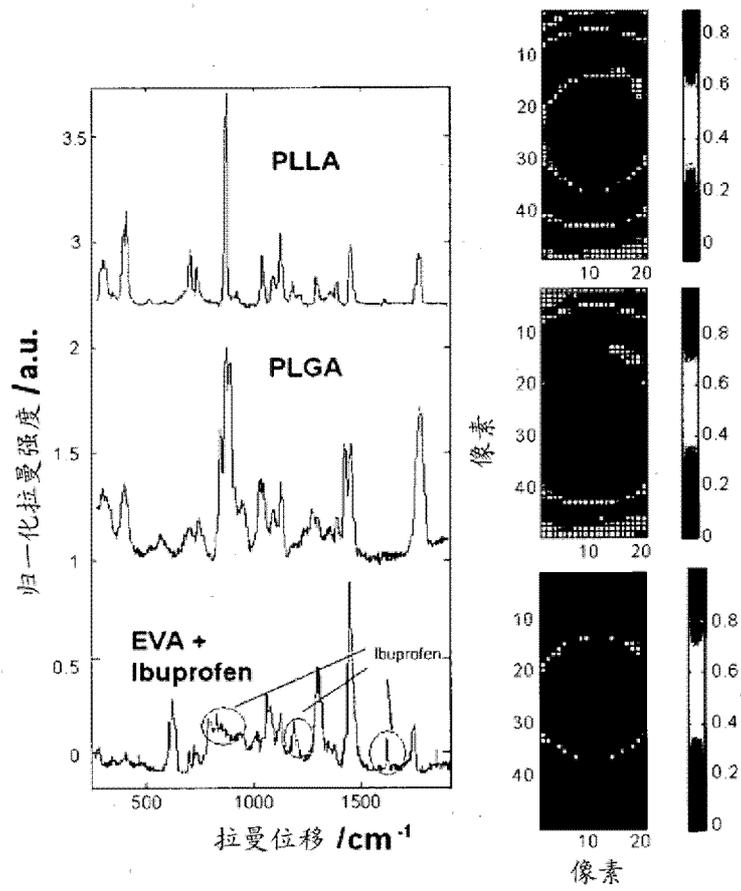
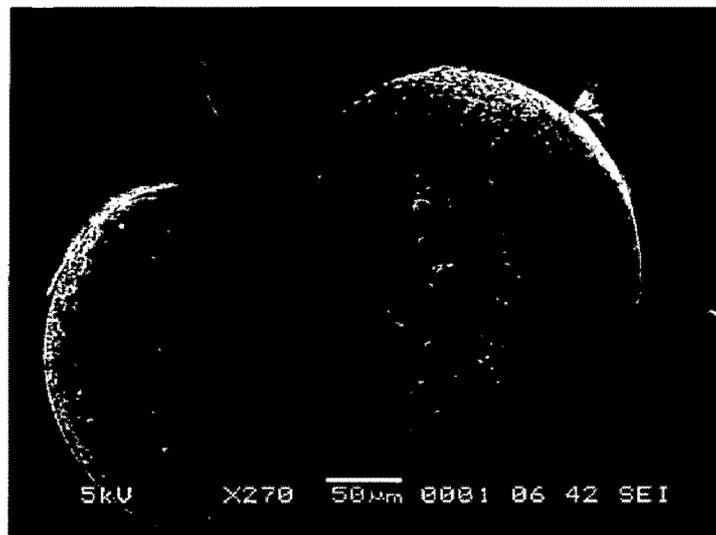


图 14B



白色条在图14C中表示: 50 μm

图 14C

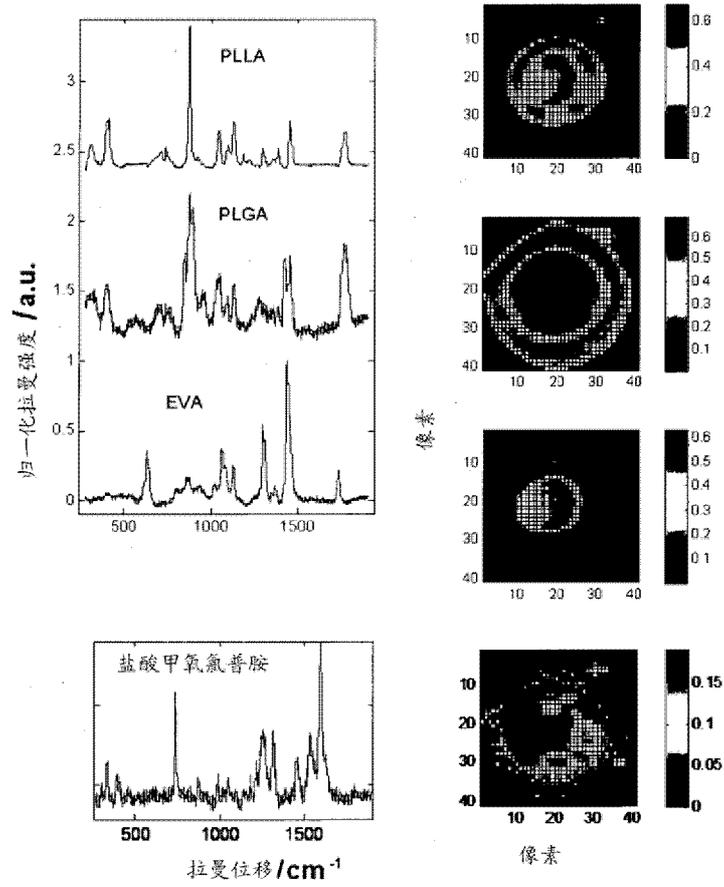


图 14D

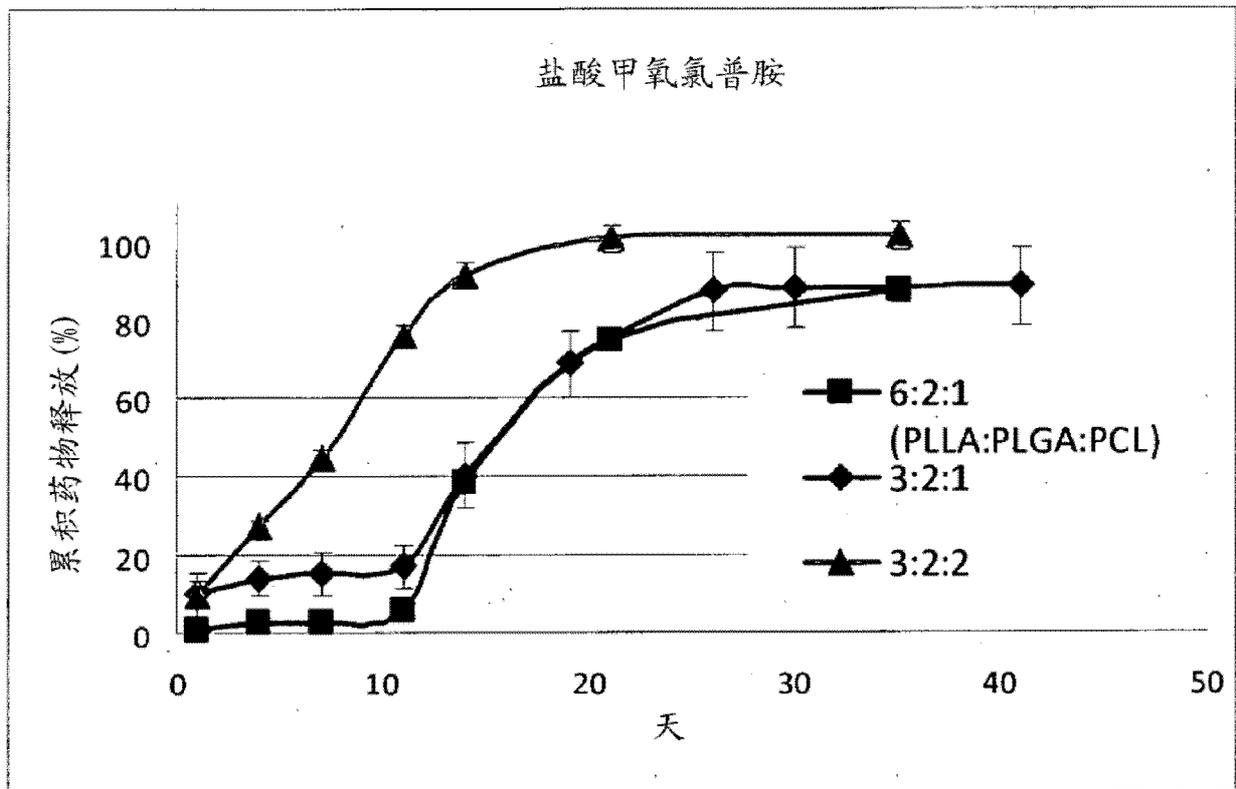


图 15

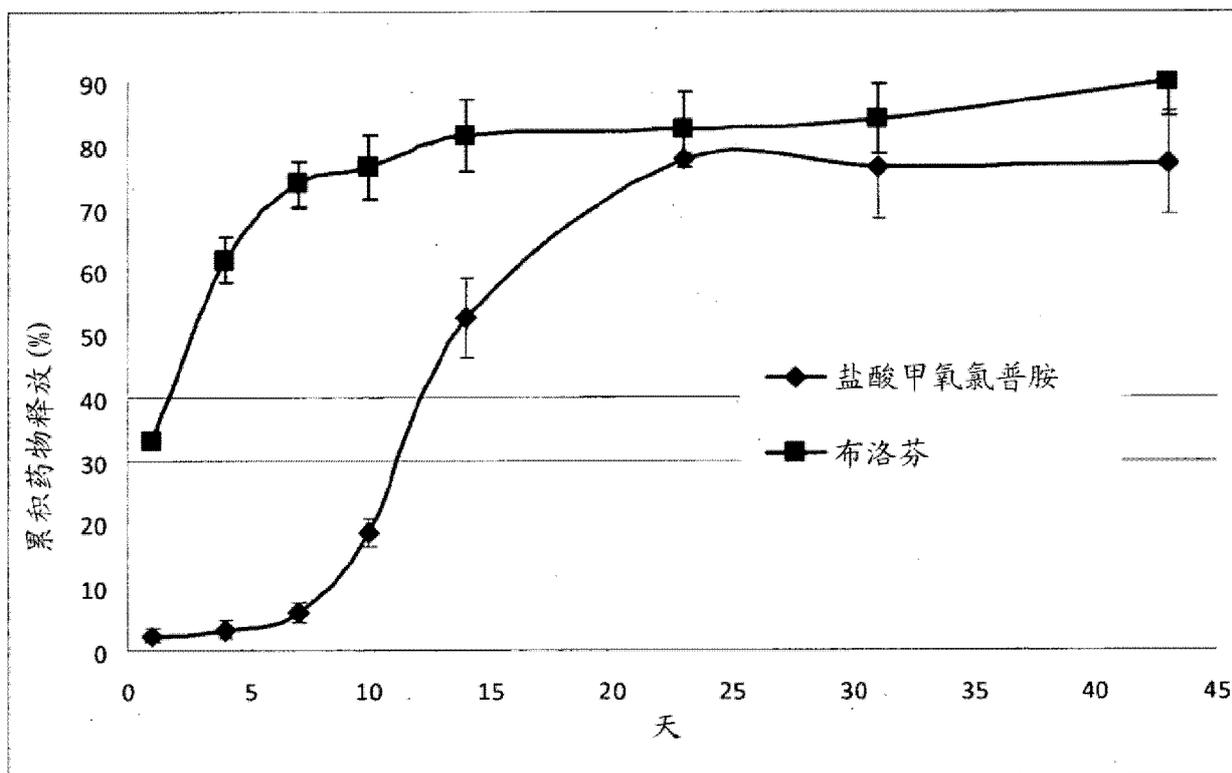


图 16

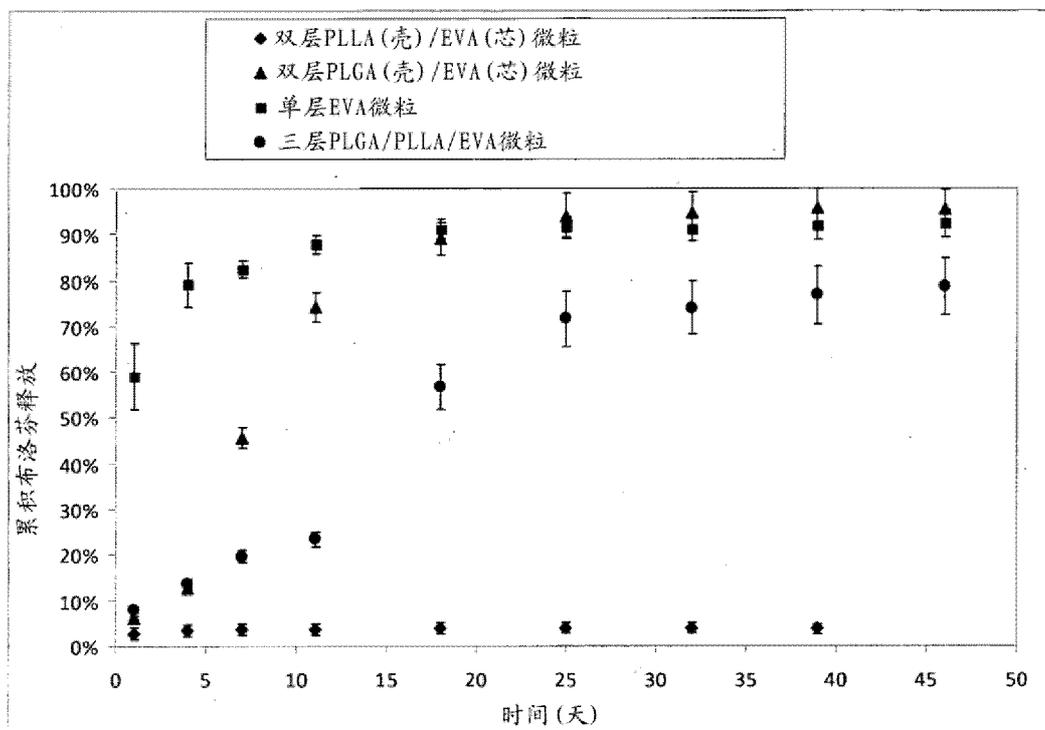


图 17

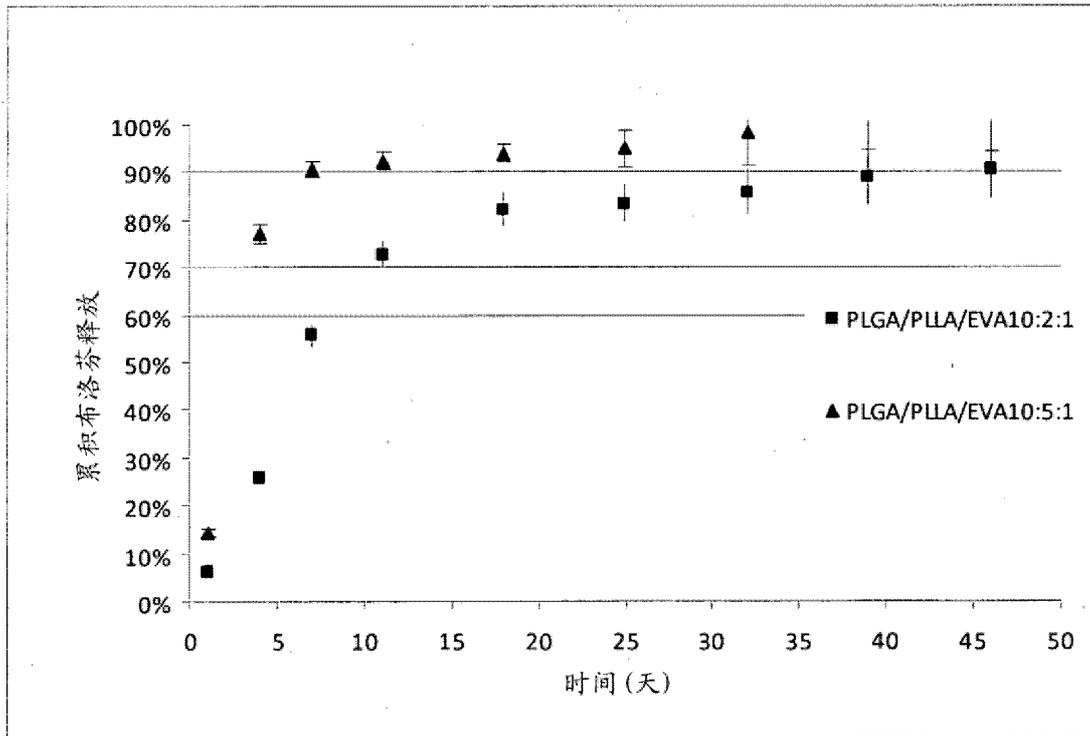


图 18

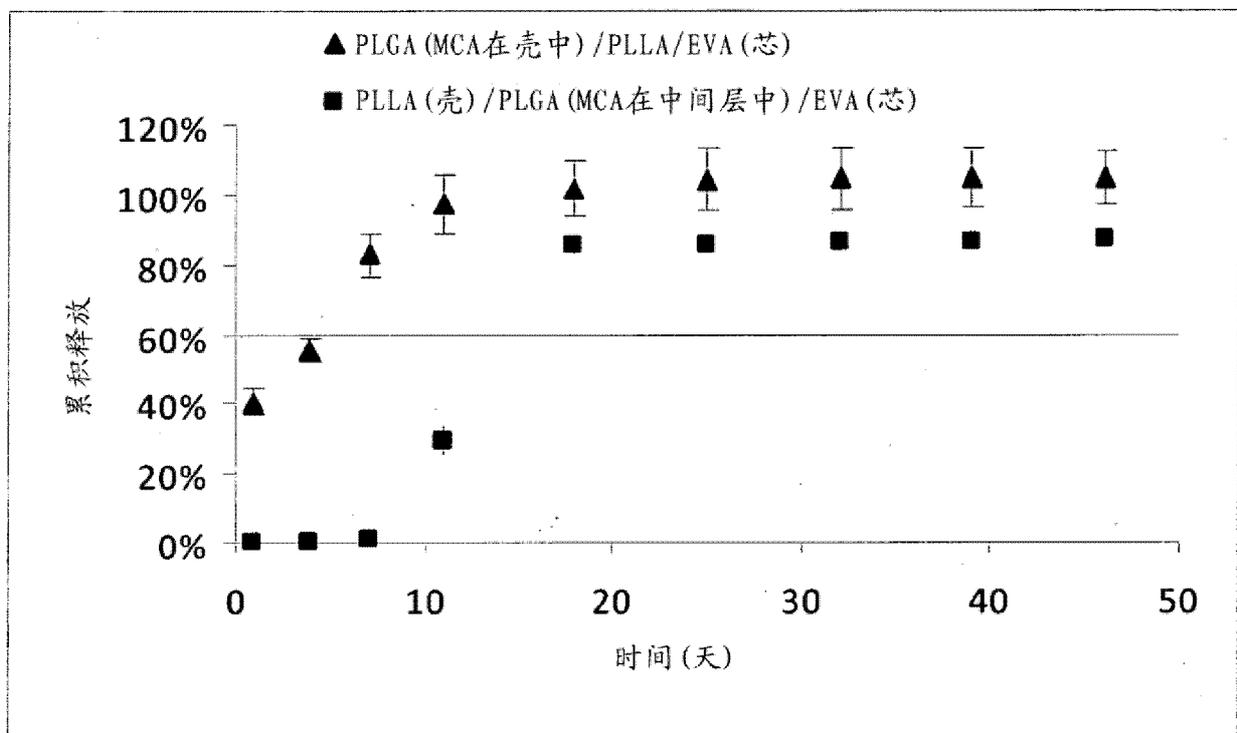


图 19

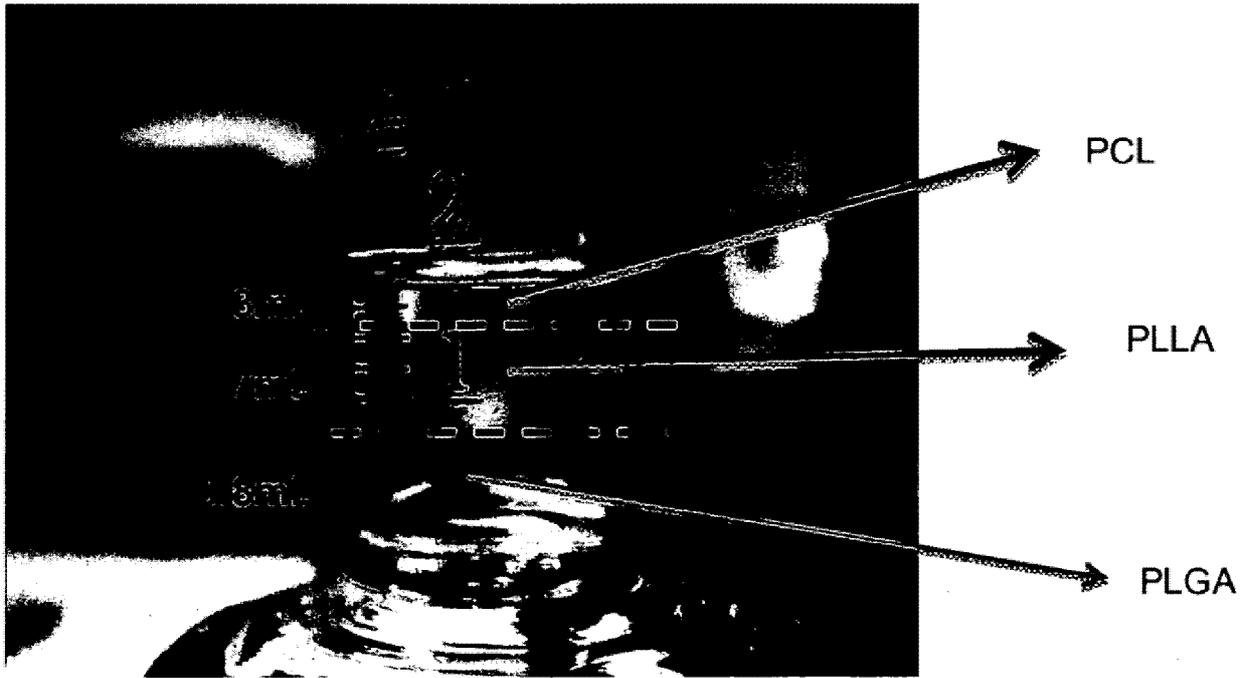


图 20A

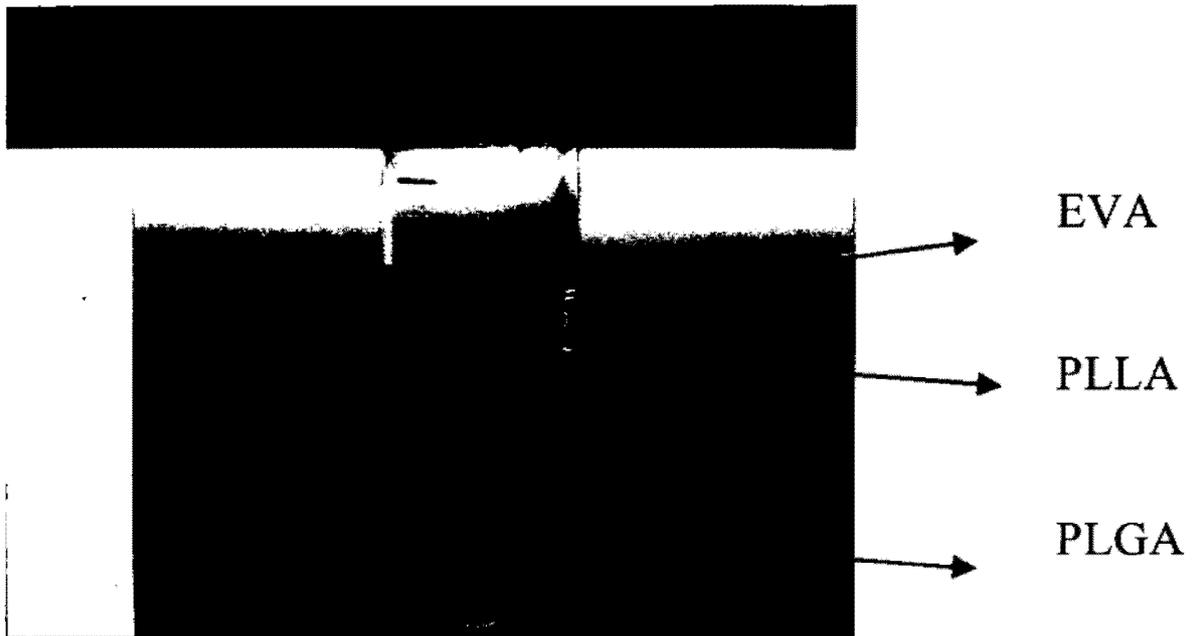


图 20B

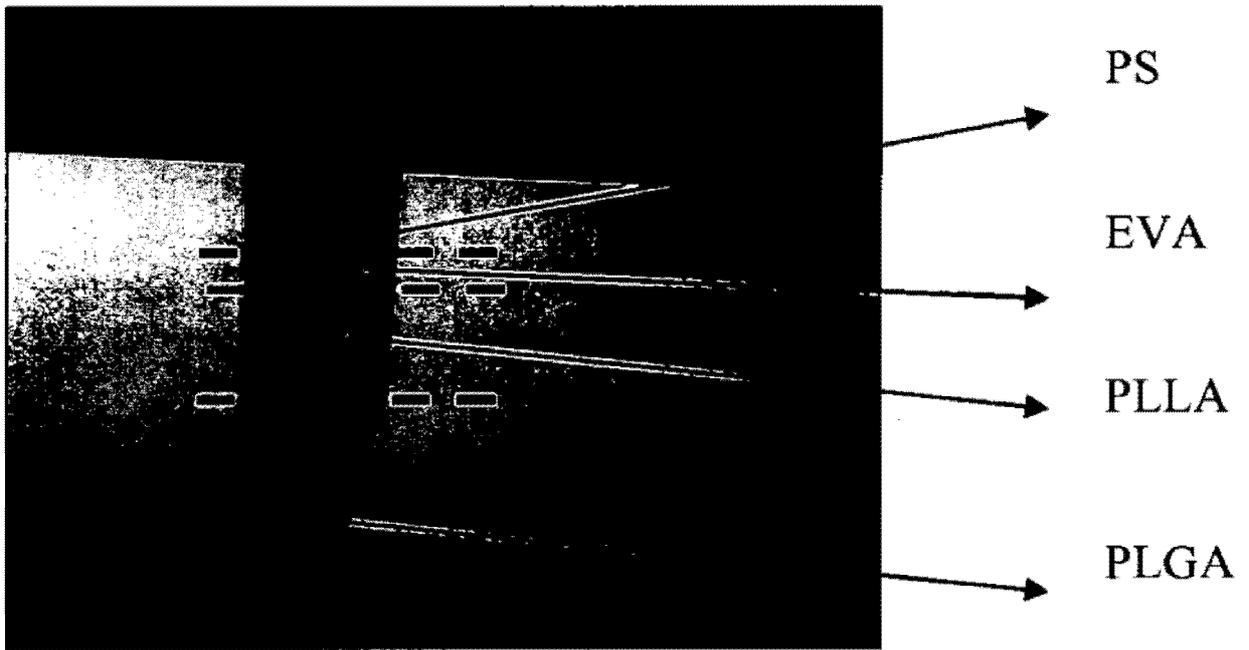


图 20C