(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 102316855 A
(43)申请公布日 2012.01.11

(21)申请号 201080007270.5

(22)申请日 2010.02.01

(30)优先权数据
61/151,277 2009.02.10 US

(85)PCT申请进入国家阶段日
2011.08.10

(86)PCT申请的申请数据
PCT/US2010/022769 2010.02.01

(87)PCT申请的公布数据
WO2010/093528 EN 2010.08.19

(71)申请人 哈佛大学校长及研究员协会
地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 赵选贺 纳塔莉·D·许布施
戴维·J·穆尼 锁志刚

(74)专利代理机构 北京信慧永光知识产权代理有限责任公司 11290
代理人 张淑珍 梁兴龙

(51)Int.Cl.
A61K 9/22(2006.01)
A61K 47/34(2006.01)
A61K 47/06(2006.01)
A61K 41/00(2006.01)

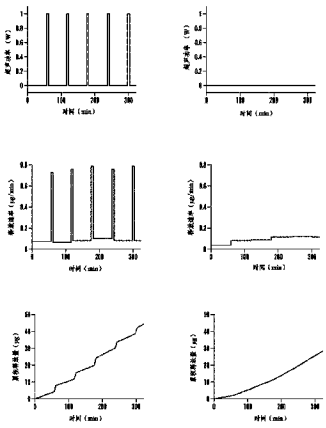
权利要求书 1 页 说明书 16 页 附图 7 页

(54)发明名称

基于需求并可逆的通过外部信号进行的药物释放

(57)摘要

本发明提供了一种根据需要从聚合物基质中释放药物而无需降解该基质的方法。在生理环境中,通过对自愈的聚合物基质进行超声,包封于基质中的高分子量和低分子量化合物都以受控速率输送,同时基质的完整性和刚度不受影响。



CN 102316855 A

1. 一种应答超声而基于需求释放生物活性物质的方法，该方法包括：提供生理上可接受的、包含生物活性物质的、自愈的聚合物基质；并通过超声诱发所述聚合物基质中的成穴作用以释放所述生物活性物质，其中所述自愈的聚合物基质是可逆交联的。

2. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述聚合物基质通过二价阳离子可逆交联，所述阳离子选自由 Ca^{2+}、Mg^{2+}、Ba^{2+} 和 Sr^{2+} 及它们的任意组合组成的组。

3. 如权利要求 1-2 任一项所述的方法，其中所述聚合物基质在生理条件下可逆交联。

4. 如权利要求 1-3 任一项所述的方法，其中所述聚合物基质包含海藻酸盐 / 酯或其衍生物。

5. 如权利要求 1-4 任一项所述的方法，其中所述生物活性物质在所述聚合物基质中扩散的平均自由程比相同的生物活性物质在水中扩散的平均自由程短。

6. 如权利要求 1-5 任一项所述的方法，其中所述生物活性物质与所述聚合物基质可逆结合。

7. 如权利要求 1-6 任一项所述的方法，其中所述生物活性物质与所述聚合物基质通过离子相互作用结合。

8. 如权利要求 1-6 任一项所述的方法，其中所述生物活性物质与所述聚合物基质通过可水解的键结合。

9. 如权利要求 1-6 任一项所述的方法，其中所述生物活性物质与所述聚合物基质通过可裂解的接头结合。

10. 如权利要求 1-9 任一项所述的方法，其中所述超声频率为约 20KHz 到约 1MHz。

11. 如权利要求 1-10 任一项所述的方法，其中所述超声强度为约 1 瓦到约 30 瓦。

12. 如权利要求 1-11 任一项所述的方法，其中所述聚合物基质的分子量为约 5,000 道尔顿到约 500,000 道尔顿。

13. 如权利要求 1-12 任一项所述的方法，其中所述释放的生物活性物质的生物活性与最初未包封在所述聚合物基质中的生物活性物质的生物活性相当。

14. 如权利要求 1-13 任一项所述的方法，其中在重复施加超声后，所述聚合物基质的物理完整性和 / 或机械刚度值为初始值的 24％、10％、5％、2％以内或更少。

15. 如权利要求 1-14 任一项所述的方法，其中所述聚合物基质是可生物降解的。

16. 如权利要求 1-15 任一项所述的方法，所述方法进一步包括将所述聚合物基质输送至到受试者的体内位置。

基于需求并可逆的通过外部信号进行的药物释放

[0001] 相关申请

[0002] 根据35U.S.C.§119(e)，本申请要求美国临时申请61/151,277(2009年2月10日提交）的优先权，将其内容以参照的形式整体引入本文中。

[0003] 政府支持

[0004] 本发明是在补助金号R37 DE013033的政府支持下作出的，所述补助金由美国国家卫生研究院授予。政府拥有本发明一定的权利。

技术领域

[0005] 本发明涉及应答外界刺激而在身体特定位置以可控方式进行的药物和生物制剂的受控释放。

背景技术

[0006] 在最近的几十年中，开发生物相容性的药物输送聚合物体系取得了较大进展。一般情况下，低分子量或高分子量的药物被包封入交联的聚合物基质中，由于聚合物中通常不可逆的物理或化学变化，药物随后在生理环境中释放。这些变化的实例包括水合作用和溶胀状态、崩解、进裂和降解(Langer 1990;Langer 1998;Uhrich 1999)。对于聚合物宏观性质永久且不可逆的变化或临时性的显著变化的需求是问题之所在。

[0007] 例如，通过各种相互作用，一些药物可能在包封时与聚合物基质结合并在交联化的聚合物基质降解时被释放(Bouhadir 2001)。然而，以这种方式释放的药物可能仍和从基质中释放的聚合物结合，并因此具有有限的生物活性。另外，由聚合物降解引起的pH和渗透压浓度(osmolality)的环境改变或降解产物可能会影响药物化合物的活性或结构完整性。另一个例子，药物释放聚合物基质可能被用作填充剂或伤口敷剂(Thornton2004)，在这种情况下，降解和物理性质的显著变化（例如，溶胀）都将限制他们的功能。

[0008] 近年来，为使药物基于需求并以受控速率从聚合物基质中释放，人们做出了许多努力。多数工作都集中在能在临床上非侵入式应用的刺激物的使用上（例如，磁场，Cheng 2006)。机械应力也被应用于含有药物的聚合物基质以刺激药物的输送(U.S.Pat No.6,748,954)。随着机械应力的应用释放速率随之增长，但是这种增长不能被精确控制。

[0009] 作为机械应力其中一种形式的低频率超声现已被应用于聚合物基质。超声能量通过产生成穴作用(cavitation)和运用机械应力来加速聚合物降解，使得药物释放(U.S.Pat No.4,657,543)。然而，由于超声引起的聚合物降解很难精确控制，药物的释放速率加快显示出如专利U.S.Pat No.4,657,543的图2所示的不规则模式。另外，聚合物的降解产物也可能引发上述的一些问题。

[0010] 因此，提供一种能基于需求和以受控速率可逆进行药物释放、且不会降解聚合物基质或降低其机械强度的聚合物基质是有利的。

发明内容

[0011] 一方面，本发明提供一种应答外部信号 (external cue) 而基于需求释放生物活性物质的方法，该方法包括：提供生理上可接受的、自愈的、包含生物活性物质的聚合物基质；并通过超声诱发聚合物基质的成穴作用以释放药物。

附图说明

[0012] 图 1A-1F 表示利用 1W 的超声每小时辐射 5min 从海藻酸盐 / 酯水凝胶中释放米托蒽醌的释放曲线。图 1A 和 1B 表示海藻酸盐 / 酯水凝胶的实验组 (图 1A) 和对照组 (图 1B) 中的超声功率曲线。图 1C 和 1D 表示相应的释放速率。图 1E 和 1F 表示相应的累积释放量。

[0013] 图 2 表示利用超声从海藻酸盐 / 酯水凝胶中释放的米托蒽醌的生物活性，所述生物活性通过该药物体外杀灭 MCF7 乳腺癌细胞的功效来进行测定。

[0014] 图 3A-3B 表示利用 1W 的超声每天辐射 15min 从海藻酸盐 / 酯水凝胶中释放质粒 DNA 的速率。图 3A 表示超声功率曲线。图 3B 表示质粒 DNA 的释放速率。

[0015] 图 4A-4B 表示在含有正常 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 浓度、含有 5 倍于正常 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 浓度和不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的 PBS 的介质中，超声辐射对水凝胶的作用。图 4A 表示不同的模量。图 4B 表示辐射后水凝胶的聚合物干重。

[0016] 图 5 表示米托蒽醌与海藻酸盐 / 酯聚合物骨架的糖残基形成离子络合物的示意图。

具体实施方式

[0017] 一方面，本发明提供一种应答外界信号而基于需求释放生物活性物质的方法，该方法包括：提供生理上可接受的、自愈的、包含生物活性物质的聚合物基质；并通过超声诱发所述聚合物基质的成穴作用以释放药物。其中，术语“基于需求 (on-demand)”表示操作人员控制生物活性物质从组合物中的释放。

[0018] 该方法可用于应答外部信号而基于需求在患者特定位置释放生物活性物质。这一过程通过向患者体内的位置提供生理上可接受的、自愈的、包含生物活性物质的聚合物基质，并通过超声诱发该聚合物基质的成穴作用释放药物而完成。

[0019] 本发明提供的药物输送方法利用可逆交联的聚合物基质，因此在应答超声而释放药物时，所述聚合物基质在生理环境中能够维持其完整性和刚度。超声冲击诱发所述聚合物基质成穴并对其施以机械压力。随着药物通过空穴释放，在生理离子条件下可逆的物理交联在空穴中重新形成。因此，在生理环境中这类聚合物是自愈的。

[0020] 本文使用的术语“自愈的 (self-healing)”是指当外部刺激终止后，所述聚合物基质实质上回到暴露于外部刺激之前的初始状态或情形的能力和 / 或抵抗形成保持相当长一段时间的宏观或可见的不规则和 / 或缺陷的能力。

[0021] 不言而喻的是，外部刺激可通过提供原本不存在的刺激、或抑制已经存在的刺激、或改变已经存在的刺激的量得以实施。

[0022] 本发明利用一类在生理条件和 / 或环境下自愈的聚合物。为了增加生物活性物质的释放，所述聚合物基质需要易受低频率超声影响，从而利用超声在其中产生成穴作用。另外，所述聚合物基质能使空穴重愈 (re-heal) 以维持其完整性和机械刚度。考虑到这些要

求，任何能可逆交联的聚合物材料都能被用作本发明的材料。

[0023] 所述聚合物基质材料可为自然来源或合成来源。所述基质可包括合成来源的材料或自然来源的材料（如，生物聚合物）或二者的混合物。在一些实施方式中，所述基质材料通过物理的和/或化学的相互作用而可逆交联。在一些实施方式中，所述基质是不可生物降解的。在一些实施方式中，所述基质是生物相容的。所述聚合物基质可利用本领域公知的、能被本领域技术人员容易地采用的方法制备。本文使用的术语“可逆交联”表示交联基质的交联可在应用外部信号时断裂，并在移除外部信号时重新形成。在一些实施方式中，所述基质在生理条件下可逆交联。

[0024] 基于包含可电离基团或可聚合双键的单体，合适的基质包括聚合物、共聚物和嵌段聚合物。典型的单体包括但不仅限于：丙烯酸、甲基丙烯酸甲酯、甲基丙烯酸、丙烯酸乙酯、乙烯基磺酸、苯乙烯、苯乙烯磺酸（例如，对苯乙烯磺酸）、马来酸、丁烯酸、乙烯基磷酸酯、乙烯基膦酸酯、乙烯、丙烯、苯乙烯、乙烯基甲醚、乙酸乙烯酯、乙烯醇、丙烯腈、丙烯酰胺、N-(C_1-C_6烷基）丙烯酰胺（例如N-异丙基丙烯酰胺、N-叔丁基丙烯酰胺）以及类似物。通过前述的任何单体的均聚或共聚得到聚合物基质。其它适合的聚合物基质材料可包括：海藻酸盐/酯、壳聚糖、胶原、明胶、透明质酸盐/酯、纤维蛋白、琼脂糖及它们的衍生物。所述基质可以是如上所述的共聚物，该共聚物中并入有作为共聚单体的配体，该配体连接、络合或物理包埋期望的生物活性物质。

[0025] 在一些实施方式中，所述基质包括选自由下列物质组成的组：聚酸酐、聚羟丁酸、聚原酸酯、聚硅氧烷、聚己酸内酯、聚（乳酸-乙醇酸）、聚乳酸、聚乙醇酸以及由这些聚合物的单体制备得到的共聚物。

[0026] 可用于本发明的合适的聚合物包括选自由下列聚合物组成的组中的一个或混合物，但不仅限于此：糖胺聚糖、丝、纤维蛋白、MATRIGEL®、聚乙二醇（PEG）、聚羟基甲基丙烯酸乙酯、聚乙烯醇、聚丙烯酰胺、聚（N-乙烯吡咯烷酮）、聚乙醇酸（PGA）、乳酸-乙醇酸共聚物（PLGA）、聚e-己内酯（PCL）、聚氧乙烯、聚富马酸丙二醇酯（PPF）、聚丙烯酸（PAA）、水解聚丙烯腈、聚甲基丙烯酸、聚乙烯胺、海藻酸、果胶酯酸、羧甲基纤维素、透明质酸、肝素、硫酸肝素、壳聚糖、羧甲基壳聚糖、几丁质（chitin）、支链淀粉（pullulan）、结冷胶（gellan）、黄原胶、胶原、明胶、羧甲基淀粉、羧甲基葡聚糖、硫酸软骨素、阳离子瓜尔胶、阳离子淀粉及它们的盐和酯。上列聚合物中非离子化交联的聚合物与离子化交联的聚合物混合使用。

[0027] 其它优选的聚合物包括：海藻酸的酯、果胶酯酸的酯或透明质酸的酯；和C2-C4的聚亚烷基乙二醇（例如，聚丙二醇）；以及包含1wt%-99wt%的海藻酸、果胶酯酸或透明质酸与99wt%-1wt%的聚丙烯酸、聚甲基丙烯酸或聚乙烯醇的混合物。优选的混合物包含海藻酸和聚乙烯醇。所述混合物的例子包括但不限于：聚乙烯醇（PVA）、海藻酸钠和海藻酸丙二醇酯。

[0028] 在一些实施方式中，所述聚合物基质是海藻酸盐/酯或海藻酸盐/酯的衍生物。在一些优选的实施方式中，所述聚合物基质是三维水凝胶形式的海藻酸/酯或海藻酸/酯衍生物。本文使用的术语“海藻酸盐/酯”表示海藻酸的任意数量的衍生物（例如，钙盐、钠盐或钾盐，或海藻酸丙二醇酯）。海藻酸盐/酯可通过生理环境中可用的二价离子如Ca^{2+}、Mg^{2+}、Ba^{2+}和Sr^{2+}进行可逆的交联。例如参见PCT/US97/16890，将其内容作为参考整体引入

本文。合适的海藻酸盐 / 酯聚合物的分子量范围为 5,000 道尔顿到 500,000 道尔顿。

[0029] 所述聚合物基质可被交联从而使其在水合或脱水时能采用物理上的稳定形式。通过掺入约 0.5wt% - 约 1.5wt%的交联剂至所述聚合物基质中可提供合适的交联化。也可通过掺入约 0.01mol% - 约 15mol%的交联化物质至所述聚合物基质中以提供交联化。

[0030] 合适的交联剂包括分子中有多个活性基团的化合物。所述分子交联剂可为 N, N' - 亚甲基双丙烯酰胺或二乙烯基苯 (DVB)、二甲基丙烯酸乙二醇酯、二乙烯酮、甲基丙烯酸乙烯酯和草酸二乙烯酯。利用离子、如金属离子的离子交联化也可能被采用。使用电磁波、如伽马射线的交联化也是可能的。所述交联化也可基于静电相互作用 (如离子相互作用)、氢键、疏水相互作用或 (微) 晶体形成。

[0031] 离子交联化的聚合物本质上可以是阴离子或阳离子，并且包括但不仅限于 :羧酸根、硫酸根、羟基和胺官能化的聚合物。用于交联化聚合物的交联离子可以是阴离子或者阳离子，这取决于聚合物是阴离子交联化的还是阳离子交联化的。合适的交联离子包括但不仅限于选自由下列阳离子组成的组的阳离子 :钙离子、镁离子、钡离子、锶离子、硼离子、铍离子、铝离子、铁离子、铜离子、钴离子、铅离子和银离子。阴离子可以选自但不仅限于由下列阴离子组成的组 :磷酸根离子、柠檬酸根离子、硼酸根离子、琥珀酸根离子、马来酸根离子、己二酸根离子和草酸根离子。更广泛地，阴离子来源于多元有机酸或无机酸。优选的交联阳离子是钙离子、铁离子和钡离子。最优选的交联阳离子为钙离子、镁离子和钡离子。最优选交联阴离子为磷酸根离子。交联化可通过将聚合物与含有溶解离子的雾滴 (nebulized droplet) 接触从而实现。本领域的一项常规技术将可为各种水凝胶选择合适的交联剂。例如，在有离子交联接头或二价阳离子如 Ca^{2+}、Ba^{2+}、Mg^{2+} 和 Sr^{2+} 存在时，实现胶原蛋白或海藻酸盐 / 酯的凝胶化。

[0032] 在一些实施方式中，所述聚合物基质通过二价阳离子可逆交联。可使所述聚合物基质可逆交联的二价阳离子浓度范围为约 0.001mM 到约 10mM。优选地，二价阳离子浓度范围为约 0.1mM 到约 5mM。在一些实施方式中，二价阳离子浓度范围为约 0.01mM 到约 10mM。在一些实施方式中，二价阳离子选自由下列阳离子组成的组 :Ca^{2+}、Ba^{2+}、Mg^{2+}、Sr^{2+} 及它们的组合。

[0033] 在一些实施方式中，在生理条件下所述聚合物基质能可逆交联。本文使用的术语“生理条件”表示生物体细胞外或细胞内存在的温度、pH、离子、离子强度、粘性和类似生化参数。在一些实施方式中，生理条件表示生物体的血清和 / 或血液中的条件。在一些实施方式中，生理条件表示生物体的细胞中的条件。

[0034] 从业者可以通过常规方法选择特定的体外条件去模拟生理条件。对于一般的指导，下述缓冲水溶液条件是可应用的 :10-250mM NaCl，5-50mM Tris HCl，pH 5-8，可任选添加二价阳离子和 / 或金属螯合剂和 / 或非离子型表面活性剂 (detergents) 和 / 或膜组分和 / 或消泡剂和 / 或闪烁体 (scintillants)。通常，模拟生理条件的体外条件包括 50-200mM NaCl 或 KCl，pH 6.5-8.5，20-45℃，和 0.001-10mM 二价阳离子 (如，Mg^{2+}、Ca^{2+}) ;优选地为约 150mM NaCl 或 KCl，pH 7.2-7.6，5mM 二价阳离子，并且通常包括 0.01-1.0%非特异性蛋白 (如，BSA)。通常可能存在非离子型表面活性剂 (吐温、NP-40、Triton X-100)，一般约为 0.001-2% (v/v)，通常为 0.05-0.2% (v/v)。

[0035] 所述聚合物基质可以是膨胀型凝胶或非膨胀型凝胶。膨胀型凝胶包括水凝胶和有

机凝胶。术语“水凝胶”表示交联的水不溶性的含水材料。对于生物医药用途而言，水凝胶具有许多理想的特性。例如，它们对组织无毒且对组织具有相容性，并且它们对水、离子和小分子具有高通透性。

[0036] 优选的水凝胶包括胶原和明胶、透明质酸盐 / 酯、纤维蛋白、海藻酸盐 / 酯、琼脂糖、壳多糖、聚丙烯酸、聚环氧乙烷、聚乙烯醇、聚磷腈和多肽。凝胶中的聚合物浓度范围为 0.1％ (w/w)-40％ (w/w)。优选地，凝胶中的聚合物浓度为 0.5-3％。

[0037] 在一些实施方式中，所述聚合物基质的弹性模量范围为 10^{-3}-10^{3}kPa。本文使用的术语“弹性模量”表示当对物体或物质施加力时，所述物体或物质发生弹性 (即，非永久地) 形变的趋势。通常，物体的弹性模量被定义为弹性形变区内的压力 - 应变曲线的斜率。通过具体指定压力和应变包括方向如何测量，可定义多种类型的弹性模量。杨氏模量 (E) 描述了拉伸弹性，或者说当沿某条轴施加反方向力时物体沿该轴发生形变的趋势 ；它被定义为拉伸应力与拉伸应变之间的比值。杨氏模量通常被简单地看作弹性模量。剪切模量或刚度模量 (G 或 μ) 描述了当施加反方向力时，物体发生剪切 (在恒定体积下的形状变化) 趋势 ；它被定义为剪切应力与剪切应变的比值。剪切模量是粘度推导 (derivation) 的一部分。体积模量 (K) 描述了体积弹性，或者说当物体在所有方向上均匀负载时其在所有方向上的形变趋势 ；它被定义为体积应力与体积应变的比值，是压缩率的倒数。体积模量是将杨氏模量扩展至三维。其他三个弹性模量分别为泊松比 (Poisson’s ratio)、拉梅第一参数 (Lamé’s first parameter) 和 P 波模量 (P-wave modulus)。

[0038] 在一些实施方式中，所述聚合物基质在重复 (如，1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、25、25、50、75、100 或更多次) 应用超声后，维持其物理完整性和机械刚度为初始值的 24％、10％、5％、2％或更低。本文使用的术语“物理完整性”表示所述聚合物基质的孔隙率、孔尺寸、孔连通性、比体积及其组合。

[0039] 本文使用的“生物活性物质 (bioactive agent)”或“生物活性材料”表示自然产生的生物材料，例如 ：纤连蛋白、玻连蛋白和层粘连蛋白等细胞外基质材料 ；细胞因子 ；和生长因子以及分化因子。“生物活性物质”也表示人工合成的对生物细胞、组织或器官具有生物效应的材料、分子或化合物。生物活性物质的分子量可以从很低 (例如，小分子，200-500 道尔顿) 到很高 (例如，质粒 DNA，～ 2,000,000 道尔顿) 进行变化。

[0040] 合适的生长因子和细胞因子包括但不仅限于 ：干细胞因子 (SCF)、粒细胞集落刺激因子 (G-CSF)、粒细胞 - 巨噬细胞刺激因子 (GM-CSF)、基质细胞衍生因子 -1、青灰因子、血管内皮细胞生长因子 (VEGF)、转化生长因子 β (TGF β)、血小板衍生生长因子 (PDGF)、血管生成素 (angiopoietin)(Ang)、表皮生长因子 (EGF)、碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF)、肝细胞核因子 (HNF)、神经生长因子 (NGF)、骨形态形成蛋白 (BMP)、成纤维细胞生长因子 (FGF)、肝细胞生长因子、胰岛素样生长因子 -1(IGF-1)、白介素 -3(IL-3)、白介素 -1 α (IL-1 α)、白介素 -1 β (IL-1 β)、白介素 -6(IL-6)、白介素 -7(IL-7)、白介素 -8(IL-8)、白介素 -11(IL-11) 和白介素 -13(IL-13)、集落刺激因子、血小板生成素、促红细胞生成素、Fit-3 配体、肿瘤坏死因子 α (TNF α)。其它例子见 ：Dijke 等人“Growth Factors for Wound Healing”，Bio/Technology，7 ：793-798(1989) ； 著 者 Mulder GD，Haberer PA，Jeter KF，Clinicians’Pocket Guide to Chronic Wound Repair，第 4 版，Springhouse，PA ：Springhouse Corporation，85，1998 ；Ziegler TR，Pierce GF，Herndon

D.N.,1997, International Symposium on Growth Factors and Wound Healing:Basic Science & Potential Clinical Applications(Boston,1995, Serono Symposia USA),出版方:Springer Verlag。

[0041] 在一些实施方式中,合适的生物活性物质包括但不仅限于治疗性物质。本文使用的术语“治疗性物质(therapeutic agent)”表示用于诊断、治疗或预防疾病的物质。本领域普通技术人员已知的有益于诊断、治疗或预防疾病的任何治疗性物质都被视作本发明范围内的治疗性物质。治疗性物质包括药学上的活性化合物、激素、生长因子、酶、DNA、质粒DNA、RNA、siRNA、病毒、蛋白、脂质、前炎性分子、抗体、抗生素、消炎药、反义核苷酸、转化核酸或它们的组合。任何治疗性物质都能组合,只要这种组合是生物相容性的。

[0042] 示范的治疗性物质包括但不仅限于:记载于Harrison's Principles of Internal Medicine,第13版,T.R.Harrison等著,McGraw-Hill N.Y.,NY;Physicians Desk Reference, 第50版,1997,Oradell New Jersey,Medical Economics Co.;Pharmcological Basis of Therapeutics,第8版,Goodman and Gilman,1990;United States Pharmcopeia,The National Formulary,USP XII NF XVII,1990;Goodman and Oilman's,The Pharmcological Basis of Therapeutics,现行版;和The Merck Index,现行版;将其内容整体引入本文作为参考。

[0043] 所述治疗性物质的例子包括但不仅限于:麻醉性止痛药;金盐(salts of gold);皮质类固醇;激素;抗疟疾药;吲哚衍生物;治疗关节炎的药物;抗生素,包括四环素、盘尼西林、链霉素和金霉素等;用于家畜和大牲畜的驱虫药和犬瘟热药物,例如吩噻嗪;基于硫的药物,如硫代异噁唑(sulfioxazole);抗肿瘤药;控制上瘾的药物,如控制酒瘾和控制烟瘾的药物;药物成瘾拮抗剂,如美沙酮;减肥药;甲状腺控制药物;镇痛药;控制受精的药物或避孕激素;安非他命;抗高血压药;消炎药;止咳药;镇静剂;神经肌肉松弛剂;抗癫痫药;抗抑郁药;抗心律失常药;血管扩张剂;降压利尿剂;抗糖尿病药;抗凝血剂;抗结核药;抗精神病药;激素和肽。不言而喻的是,上述列表并不完全,而是简单地表示可使用的治疗性物质的广泛多样化。在一些实施方式中,所述治疗性物质是米托蒽醌、蛋白(如,血管内皮细胞生长因子,VEGF)或质粒DNA。

[0044] 所述聚合物基质中的生物活性物质的量依赖于各种因素,包括例如:特定的物质;它应实现的功能;特定试剂的释放所需的时间段;给药量。通常,生物活性物质的剂量范围选自约0.001%(w/w)到95%(w/w),优选约5%(w/w)到75%(w/w),并且最优选约10%(w/w)到约60%(w/w)。

[0045] 在一些实施方式中,所述组合物包含细胞,如生物细胞。向组合物中并入细胞的一条途径是通过将干的或部分干的本发明组合物重新溶胀于含有待并入细胞的水溶液中。该水溶液含有约10^4到约10^8个细胞/ml。在一些实施方式中,所述水溶液含有约10^4到约10^6个细胞/ml。在一些实施方式中,所述水溶液含有约10^5个细胞/ml。在一个实施方式中,所述水溶液含有约5×10^5个细胞/ml。

[0046] 在一些实施方式中,所述组合物含有不止一种类型的细胞。这可通过在用于溶胀的水溶液中含有两种以上类型的细胞来完成。当掺入两种以上类型的细胞到组合物中时,所述水溶液中的细胞浓度范围为10^3到约10^9个细胞/ml。优选地,所述水溶液中的细胞浓度为10^6-10^8个细胞/ml。

[0047] 可用于并入组合物的细胞包括但不仅限于：干细胞（胚胎干细胞、间质干细胞、骨髓干细胞和造血干细胞）、软骨细胞祖细胞、胰腺祖细胞、成肌细胞、成纤维细胞、角质化细胞、神经细胞、神经胶质细胞、星形细胞、前脂肪细胞、脂肪细胞、血管内皮细胞、毛囊干细胞、内皮祖细胞、间质细胞、神经干细胞和平滑肌祖细胞。

[0048] 在一些实施方式中，所述细胞是遗传学修饰后的细胞。该细胞能经遗传学修饰从而能表达和分泌目标化合物，如生物活性物质、生长因子、分化因子、细胞因子及其类似物。用于表达和分泌目标化合物的遗传学修饰细胞的方法为本领域已知，并可被本领域技术人员容易地采用。

[0049] 也可使用已经重新编码成干细胞的分化细胞。例如，通过 Oct3/4、Sox2、c-Myc 和 Klf4 的转导，重新编码成胚胎干细胞的人表皮细胞 (Junying Yu 等，2007，Science 318：1917-1920；Takahashi K 等，2007，Cell 131：1-12)。

[0050] 可用于并入组合物的细胞可来自于任何源，如人、大鼠或小鼠。人类细胞包括但不仅限于：成人心肌细胞 (HCMa)、胎儿真皮纤维原细胞 (HDF-f)、人表皮角化细胞 (HEK)、人骨髓间质干细胞、人脐带间质干细胞、人毛囊内根鞘细胞、人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 和人脐静脉平滑肌细胞 (HUVSMC)、人内皮祖细胞、人成肌细胞、人毛细血管内皮细胞和人神经干细胞。

[0051] 示范的大鼠和小鼠细胞包括但不仅限于：RN-h（大鼠海马趾神经元细胞）、RN-c（大鼠皮层神经元细胞）、RA（大鼠星形细胞）、大鼠背根神经节细胞、大鼠神经祖细胞、小鼠胚胎干细胞 (mESC)、小鼠神经前体细胞、小鼠胰腺祖细胞、小鼠间质细胞和小鼠内胚层细胞。

[0052] 在一些实施方式中，组织培养细胞系可被用于本文所述组合物中。所述细胞系的例子包括但不仅限于：C166 细胞（小鼠 12 天胚胎的卵黄）、C6 胶质瘤细胞系、HL1（心肌细胞系）、AML12（非转化肝细胞）、HeLa 细胞（子宫颈癌细胞系）、中国仓鼠卵巢细胞 (CHO 细胞）。

[0053] 本领域的普通技术人员可定位、分离并扩增这些细胞。另外，细胞培养的基本原理和组织工程所需的定位、分离和扩增及制备细胞的方法见“Culture of Cells for Tissue Engineering”，编者：Gordana Vunjak-Novakovic，R. Ian Freshney，2006，John Wiley & Sons，Inc.，并见于“Cells for Tissue Engineering”，编者：Heath C.A.(Trends in Biotechnology，2000，18：17-19)，并且将其内容整体引入本文作为参考。

[0054] 所述生物活性物质可被简单地物理包埋于所述基质中，或者化学结合入所述基质中；或者被中间配体或接头络合、包入或物理固定化，所述中间配体或接头转而化学结合至所述基质。

[0055] 所述生物活性物质可以可逆地结合至所述聚合物基质，所以从所述聚合物基质中释放所述生物活性物质能够持续一段时间，并且释放速率通过超声以受控的方式增强。因为生物活性物质的释放并不涉及所述聚合物基质的降解，所以所述释放速率相对容易控制，并且释放物质的释放活性不受与交联的聚合物基质的降解产物的相互作用的影响。所述聚合物基质也可被修饰，以增强或调节它们与生物活性物质的可逆结合。参见例子 U.S.Pat No.7,186,413，其内容整体引入本文作为参考。

[0056] 所述生物活性物质通过接头能被共价连接至所述基质。根据不同的应用，所述接

头可以是可裂解的接头 (linker) 或不可裂解的接头。本文使用的“可裂解的接头”表示能在各种条件下裂解的接头。适合裂解的条件包括但不仅限于 :pH、UV 照射、酶活性、温度、水解作用、消除反应和取代反应、氧化还原反应和连接键的热力学性质。许多情况下,缀合或偶合相互作用的预期性质或期望的生物效应将决定接头基团的选择。在一些实施方式中,所述生物活性物质通过可裂解的接头连接至所述聚合物基质上。在一些实施方式中,可裂解的接头的体内半衰期为 1 小时、2 小时、3 小时、5 小时、8 小时、12 小时、24 小时、2 天、3 天、4 天、5 天、6 天、7 天、2 周、3 周、4 周、2 个月、3 个月、6 个月或 1 年或更长。

[0057] 在一些实施方式中,所述生物活性物质通过可水解的键与所述基质结合。术语“可水解的”表示在生理条件下可被水解或裂解的键。在一些实施方式中,可水解的键在受试者的血清或血液中的条件下被裂解。在一些实施方式中,可水解的键的体内半衰期为 1 小时、2 小时、3 小时、5 小时、8 小时、12 小时、24 小时、2 天、3 天、4 天、5 天、6 天、7 天、2 周、3 周、4 周、2 个月、3 个月、6 个月或 1 年或更长。

[0058] 在一些实施方式中,所述生物活性物质通过离子相互作用与所述聚合物基质可逆连接。

[0059] 将生物活性物质并入至基质中可通过多种途径完成。例如,在一种方法中,干的或不完全溶胀的基质可以在含有生物活性材料的合适的溶液中溶胀。而在另外一种方法中,基质通过在含有生物活性物质的介质中进行的交联反应而制备。生物活性物质也可在交联前或交联后通过多种次级相互作用被吸附至基质的表面,或通过可降解的或可水解的键共价偶合至基质的表面或主体。

[0060] 控制生物活性物质从聚合物基质中的释放的一个要求是所述生物活性物质不能很容易地通过分子扩散而从所述基质中释放,因此,所述生物活性物质在所述聚合物基质中的平均自由程 (mean-free path) 必须显著短于其在水中的平均自由程。相应地,在一些实施方式中,所述组合物中的细胞或生物活性物质的平均自由程要比它们在水中的平均自由程短。如果药物的分子尺寸足够的大 (如,质粒 DNA),以至于颗粒尺寸和聚合物基质中的孔隙尺寸大小相似,这个要求就将被满足,因此药物的释放将由外部刺激开启。然而,低分子量的生物活性物质的持续的和基于需求的释放可通过与聚合物基质的可逆结合而实现。例如,抗癌药物米托蒽醌可与海藻酸盐 / 酯聚合物骨架的糖残基上的羧酸根基团形成离子络合物 (图 5 和 Bouhadir 2001)。

[0061] 包封有生物活性物质的聚合物基质可通过本领域已知的任何合适的途径给药于受试者。这些途径包括但不仅限于口服途径或胃肠外途径,后者包括静脉内给药、肌内给药、皮下给药、经皮给药、气道给药 (气雾剂)、肺部给药、鼻内投药、直肠给药和局部给药 (包括口腔含化给药和舌下给药)。本文使用的术语“给药”表示通过方法或途径将包封有生物活性物质的基质放置入受试者体内,从而至少部分地将所述生物活性物质定位于期望的位点以产生期望的效果。

[0062] 示范的给药模式包括但不仅限于 :注射、输液 (infusion)、滴注 (instillation)、吸入或摄食。“注射”不受限制地包括 :静脉内注射和输液、肌内注射和输液、动脉内注射和输液、鞘内注射和输液、室内注射和输液、囊内注射和输液、眼内注射和输液、心内注射和输液、真皮内注射和输液、腹膜内注射和输液、经气管注射和输液、皮下注射和输液、表皮下注射和输液、关节内注射和输液、囊下注射和输液、蛛网膜下注射和输液、脊椎内注射和输液、

脑脊髓内注射和输液以及胸骨内注射和输液。

[0063] 包封有生物活性物质的聚合物基质可被输送至体内部位 (in vivo locus)。示范的体内部位包括但不仅限于伤口处、创伤处或病患处。包封有生物活性物质的基质可通过如植入或注射所述基质至受试者，而被输送至体内部位。所述包封有生物活性物质的聚合物基质可作为填充剂而加倍。

[0064] 一旦所述聚合物基质处于超声能量的影响之下，声波引起所述聚合物基质中的液体和固体的压缩和拉伸快速交替。所述挤缩和拉伸的交替进行引起成穴，增强了生物活性物质通过该成穴作用向所述基质外的对流 (convection)。除此之外，成穴气泡的破裂能在其周围产生明显的扰动，这能引起在所述聚合物基质上可逆结合的生物活性物质的脱附。随着生物活性物质通过成穴作用传送出基质，含有二价离子（如，Ca^{2+}、Mg^{2+}、Ba^{2+} 和 / 或 Sr^{2+}）的生理液体流入空穴内。这些二价离子重新交联空穴内的聚合物，并动态地重愈所述聚合物基质。通过这种方式，生物活性物质基于超声辐射以受控速率从所述聚合物基质中被释放，而不改变所述聚合物的完整性和机械强度。

[0065] 值得注意的是，超声已被广泛地用于引入成穴作用到皮肤和细胞膜中，并因此短暂并可逆地增强它对各种生物活性物质的通透性。当撤掉超声后，这些空穴将很快重愈。参见如 U.S.Pat.Nos. :4,767.402、6,002,961 和 4,780,212，其内容整体引入本文作为参考。所述聚合物基质体系通过模拟这些天然的自愈材料释放生物活性物质，具有不被局限于特定解剖部位的优点，并且能微调超声的频率和强度从而通过改变所述聚合物基质的物理性质（如，交联离子类型、聚合物对交联离子的亲和力）而引起释放。

[0066] 所述强度和频率的选择取决于所用的聚合物基质和基质所并入的生物活性物质。代表性的合适的超声频率位于约 1kHz 到约 1MHz 之间，同时强度范围为约 0.1 瓦特到约 30 瓦特。参见例如 U.S.Pat No.4,657,543，其内容整体引入本文作为参考。在一些实施方式中，超声频率从约 20kHz 到约 1MHz。优选地，超声频率约 20kHz。在一些实施方式中，超声强度从约 1mW 到约 5W。优选地，超声强度为约 1W。

[0067] 取决于环境，所述聚合物体系暴露于超声的时间可在很大的范围内变化。通常，合适的时间在几秒到几小时之间。参见例如 U.S.Pat No.4,657,543。值得注意的是，这些超声的功率水平低于被视为有害的水平 (Mitragotri 2005)。在一些实施方式中，聚合物暴露于超声的时间为约 1 分钟到约 5 分钟每小时。优选地，聚合物暴露于超声的时间为约 5 分钟 / 小时。所述暴露可以是在一个持续的时间段内或一个脉冲系统内，一小时内总暴露时间合计达到上述时间。在一个非限制实施例中，在给定的一小时的时间段内使用超声从约 1 分钟到约持续 15 分钟。在另一个非限制实施例中，在给定的一小时的时间段内超声使用时间较短，总计 1 分钟到 15 分钟。

[0068] 对受试者给药时，包封有生物活性物质的聚合物基质可与一种或多种药学上可接受的载体（添加剂）和 / 或稀释剂共同制剂。该药物组合物以固体形式或液体形式具体配制以进行给药，包括适应下述给药方式的形式 :(1) 口服给药，例如顿服药（水溶液剂或非水溶液剂或混悬剂）、锭剂、糖衣剂、胶囊、丸剂、片剂（如，以口腔吸收、舌下吸收和全身吸收为目标的片剂）、丸剂、散剂、颗粒剂、施用于舌头的膏剂 ;(2) 胃肠外给药，例如作为无菌溶液剂或混悬剂或是缓释剂型，经皮下注射、肌内注射、静脉内注射或硬膜外注射 ;(3) 局部施用，例如霜剂、软膏或控释贴片或皮肤用喷雾剂 ;(4) 阴道内或直肠内给药，例如阴道

栓剂、霜剂或泡沫剂；(5) 舌下给药；(6) 眼部给药；(7) 经皮给药；(8) 经粘膜给药；或 (9) 鼻部给药。

[0069] 待植入的基质可以额外包含一种或多种添加剂。所述添加剂可以是可解体的（可生物降解的）聚合物、甘露醇、淀粉糖、肌醇 (inosite)、山梨醇、葡萄糖、乳糖、蔗糖、氯化钠、氯化钙、氨基酸、氯化镁、柠檬酸、乙酸、羟基丁二酸、磷酸、葡萄糖醛酸、葡糖酸、聚山梨醇、乙酸钠、柠檬酸钠、磷酸钠、硬脂酸锌、硬脂酸铝、硬脂酸镁、碳酸钠、碳酸氢钠、氢氧化钠、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙二醇、羧甲基纤维素、甲基纤维素、淀粉或它们的混合物。

[0070] 植入物可制成圆形或长方形等，总表面积在约 0.01cm^2 到约 100cm^2 之间的情况下厚度为 0.1mm 到约 100mm。

[0071] 植入物可以是直径为约 0.5mm 到约 10mm、长度为约 0.5cm 到约 10cm 的圆柱体的形式。优选地，它的直径为约 1mm 到约 5mm，并且长度为约 1cm 到约 5cm。在一些情况下，植入物可以是球形的形式。

[0072] 当所述移植物是球形的形式时，它的直径范围为约 0.5mm 到约 50mm。在一些实施方式中，所述球形移植物的直径为约 5mm 到约 30mm。优选地，直径为约 10mm 到约 25mm。

[0073] 在一些实施方式中，植入物可包含自愈的聚合物的多种颗粒。所述颗粒的尺寸范围为约 10nm 到约 500μm。不希望通过理论加以束缚，包含多种颗粒的植入物可采用任何形状，并且不受限于上述的规则形状。例如，所述颗粒可以制成不规则的形状，即颗粒形状不具有已定义的几何形状。

[0074] 药物的控释

[0075] 对于固定在所述基质内的生物活性物质，在超声辐射下能实现可控的释放速率。当超声关闭后，由于所述基质的重愈使释放停止。因此，通过反复施加外部刺激，可使生物活性物质的释放以脉冲的方式实现。

[0076] 生物活性物质的这种基于需求脉冲式释放的能力在多种情况中都是有用的，包括免疫作用在内，其通常提供初次免疫，并随后提供独特的促升剂量 (booster doses)。对于可自然地扩散出所述基质的生物活性物质，在无外部刺激的情况下存在着基准 (baseline) 的释放速率。然而，超声辐射可以提高释放速率至基准值的很多倍。这种基准增强的释放曲线在许多情况下都可使用，包括短时增强止疼药的释放，以处理较剧烈的急性疼痛。此外，在缺乏免疫刺激分子时，确定剂量的过敏原从所述聚合物基质中的进行反复给药可用于诱发耐受性。在运用外部刺激使生物活性物质以脉冲的方式输送，以使输送的时机与特定的生物事件（如生物钟）相一致从而使生物活性物质的效果达到最大化（如，抗肿瘤剂）；上述方面也是有利的。

[0077] 在其它情况中，所述聚合物基质可被设计成持续释放一种生物活性物质和基于需求输送抗体或其它大分子，所述抗体或其它大分子能被用作远程激活“开 / 关”，，使得所述生物活性物质的活性在紧急临床状况下被增强或减弱（如，当治疗传染病时需要停用具有免疫抑制副作用的化疗生物活性物质），而无需移除生物活性物质的流出装置。相似地，系统可被设计成持续释放一种引发所期望的生物进程的生物活性物质，并在这一过程的合适阶段，基于需求触发第二种或第三种生物活性物质的释放。在组织工程和再生领域，有许多关于需要相继作用于形态发生素 (morephogens) 和生长因子的例子。例如，提供激活血管生成的第一生物活性物质（如，血管内皮细胞生长因子）的持续释放来治疗缺血性疾病，并

且一旦经第一分子的作用形成足够的密度就触发第二生物活性物质（如，血小板衍生生长因子）的释放，使新形成的血管成熟；以上方案是所期望的。

[0078] 需要了解的是，在相同的条件下，释放的生物活性物质的生物活性与未首先包封在聚合物基质中的生物活性物质的生物活性相当。在一些实施方式中，释放的生物活性物质的生物活性是未首先包封在聚合物基质中的生物活性物质的生物活性的至少 50％、60％、70％、80％、90％、95％或 100％。

[0079] 定义

[0080] 除非本文中另有说明，与本发明有关的科技术语具有被本领域普通技术人员所通常理解的含义。另外，除非上下文另有要求，单数术语涵盖复数术语，并且复数术语涵盖单数术语。

[0081] 本文使用的术语“包含 / 包括 (comprising or comprises)”表示对本发明必要的组合物、方法及其各自的组成部分，并且无论是否必要都仍然对未指定的要素保持开放。

[0082] 本文使用的术语“基本上由…组成”表示给定的实施方式所需的那些元素。该术语允许存在实质上不影响本发明实施方式的基础和新颖性或起作用的特征的额外成分。

[0083] 术语“由…组成”表示本文所述的组合物、方法及其各自的组成部分，排除没有在实施方式描述中详述的任何要素。

[0084] 除了在操作实施例中或另有指示的地方，本文所用的表示成分或反应条件的量的全部数值在所有例子中都应该被理解为被术语“约”修饰。与百分率相连使用的术语“约”可意味着 ±1％。另外，术语“约”可表示在某值的 ±1％以内。

[0085] 除非文中明确地另有所指，单数术语“一 (a/an)”和“该 / 所述 (the)”涵盖复数的所指物。相似地，除非文中明确地另有所指，单词“或 (or)”意在涵盖“和”。应进一步理解对核苷酸或多肽而言所有的碱基尺寸或氨基酸尺寸以及所有的分子量或分子质量值都是近似值，并且都是为描述而提供。

[0086] 尽管与本文描述的方法和材料相似或等同的方法和材料可被用于本文公开的实践或试验中，合适的方法和材料见下述。术语“包含 / 包括 (comprises)”意思是“含有 (includes)”。缩写“e.g.”源自拉丁文的例如 (exempli gratia)，并且用于此处表示非限制性的实例。因此，缩写“e.g.”与术语“例如 (for example)”同义。

[0087] 本文使用的术语“降低 (decrease)”、“减少 (reduced/reduction)”、“降低 (decrease)”或“抑制 (inhibit)”都意味着减少有统计学意义的量。然而，为避免疑义，“减少 (reducedreduction)”或“降低 (decrease)”或“抑制 (inhibit)”表示相对于参比水平降低至少 10％，例如降低至少约 20％、或至少约 30％、或至少约 40％、或至少约 50％、或至少约 60％、或至少约 70％、或至少约 80％、或至少约 90％、或上至并包括降低 100％（如，相对于参比水平的缺乏水平）、或相对于参比水平降低在 10％到 100％之间的任意量。

[0088] 本文使用的术语“增加 (increased/increase)”或“增强 (enhance)”或“激活 (activate)”通常都意味着增加有统计学意义的量；为避免疑义，术语“增加 (increased/increase)”或“增强 (enhance)”或“激活 (activate)”表示相对于参比水平增加至少 10％，例如增加至少约 20％、或至少约 30％、或至少约 40％、或至少约 50％、或至少约 60％、或至少约 70％、或至少约 80％、或至少约 90％、或上至并包括增加 100％、或相对于参比水平增加在 10％到 100％之间的任意量；或相对于参比水平至少约 2 倍、或至少约 3 倍、或至少约

4 倍、或至少约 5 倍、或至少约 10 倍的增加、或增加在 2 倍和 10 倍或之间的任意量、或是更大量的增加。

[0089] 术语“统计学显著 (statistically significant)”或“显著地 (significantly)”表示统计显著性，并且通常意味着参比水平以上或以下两个标准差。这个术语表示统计证明存在差异。它被定义为当无效假设实际上是真时作出否决该无效假设的决定的可能性。通常利用 p 值来作出决定。

[0090] 本文使用的，术语“药学上可接受的”表示在健全的医疗判断范围内适于与人类或动物的组织接触而无过度的毒性、刺激、过敏反应、或其他问题或并发症，具有合理的收益 / 风险比的化合物、材料、组合物和 / 或剂型。

[0091] 本文使用的术语“药学上可接受的载体”表示药学上可接受的材料、组合物或辅料，参与将目标化合物从身体的一个器官或部分搬运或转运到身体的另一器官或部分；例如，液体或固体的填充剂、稀释剂、赋形剂、制造助剂 (如，润滑剂、滑石、硬脂酸镁、硬脂酸钙或硬脂酸锌或硬脂酸)、或溶剂包封材料。从与制剂中其他成分相容和不能对患者有害的意义上来说，每种载体必须是“可接受的”。一些可作为药学上可接受载体的材料的例子包括：(1) 糖类，如乳糖、葡萄糖和蔗糖；(2) 淀粉类，如玉米淀粉和土豆淀粉；(3) 纤维素及其衍生物，如羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、乙基纤维素、微晶纤维素和醋酸纤维素；(4) 西黄蓍胶粉；(5) 麦芽；(6) 明胶；(7) 润滑剂，如硬脂酸镁、十二烷基硫酸钠和滑石；(8) 赋形剂，如可可脂和栓蜡；(9) 油类，如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油；(10) 二醇类，如丙烯二醇；(11) 多元醇类，如甘油、山梨醇、甘露醇和聚乙二醇 (PEG)；(12) 酯类，如油酸乙酯和月桂酸乙酯；(13) 琼脂；(14) 缓冲剂，如氢氧化镁和氢氧化铝；(15) 海藻酸；(16) 无热原水；(17) 等渗盐水；(18) 林格氏溶液；(19) 乙醇；(20)pH 缓冲液；(21) 聚酯类、聚碳酸酯类和 / 或聚酸酐类；(22) 填充剂，如多肽和氨基酸；(23) 血清组分，如血清白蛋白、高密度脂蛋白和低密度脂蛋白；(24)C_2-C_{12} 醇类，如乙醇；和 (25) 其它可用在药物制剂里的无毒相容性物质。湿润剂、着色剂、隔离剂 (release agent)、涂层剂、甜味剂、增香剂、芳香剂、防腐剂和抗氧化剂也可出现在制剂中。本文使用的术语如“赋形剂 (excipient)”、“载体 (carrier)”、“药学上可接受的载体 (pharmaceutically acceptable carrier)”或类似的术语都可相互替换使用。

[0092] 本文使用的术语“聚合物”意图包括寡聚物和多聚物，即包含有两个以上单体单元的化合物，该化合物可为均聚物或共聚物。术语“均聚物”表示将单一种类单体单元合并的聚合物。术语“共聚物”表示在相同的聚合物链上，由两种以上化学上不同的单体单元构造的聚合物。“嵌段共聚物”是将两种以上不同的均聚物或共聚物的两个以上片段合并的聚合物。

[0093] 本文使用的术语“溶胀剂”表示至少影响溶胀度的化合物或物质。通常，溶胀剂是水溶液或有机溶剂，然而溶胀剂也可以是气体。在一些实施方式中，溶胀剂是水或生理溶液，例如，磷酸盐缓冲盐水或生长介质。

[0094] 本文使用的术语“接头”表示连接化合物的两部分的有机基团。接头通常包括：直连键；或原子，如氧或硫；单元，如 SS、NH、C(O)、C(O)NH、SO、SO_2、SO_2NH；或原子链，如取代或非取代的烷基，其中一个或多个亚甲基可被 O、S、S(O)、SO_2、NH、NH_2、C(O) 中断或终止。

[0095] 疾病或紊乱的“治疗 (treament)”、“预防 (prevention)”或“改善

(amelioration)”表示推迟或预防这种疾病或紊乱的发作，逆转、减轻、改善、抑制、减缓或停止与这种疾病或紊乱相关的病症的发展或严重度的发展、加重或恶化。在一个实施方式中，疾病或紊乱的症状减轻至少 5％、至少 10％、至少 20％、至少 30％、至少 40％或至少 50％。

[0096] 本文使用的术语“受试者”表示人或动物。通常，该动物为脊椎动物，如灵长类动物、啮齿动物、家畜或狩猎动物。灵长类动物包括黑猩猩、食蟹猴 (cynomologous monkey)、蜘蛛猴和猕猴（如恒河猴）。啮齿动物包括小鼠、大鼠、旱獭 (woodchucks)、雪貂、兔子和仓鼠。家畜和狩猎动物包括牛、马、猪、鹿、野牛、水牛、猫科物种（如，家猫）、犬科物种（如，狗、狐狸、狼）、鸟类物种（如，鸡、鸸鹋、鸵鸟）和鱼类（如，鳟鱼、鲶鱼和鲑鱼）。患者和受试者包括前面所述的任何子集，如除了一个或多个组或物种（如人类、灵长类动物或啮齿动物）的上述所有。在特定的实施方式中，受试者是哺乳动物，如灵长类动物，如人类。本文使用的术语“患者 (patient)”和“受试者 (subject)”可相互替换使用。

[0097] 优选地，受试者为哺乳动物。所述哺乳动物可以是人、非人灵长类动物、小鼠、大鼠、狗、猫、马或牛，但不仅限于这些例子。除人以外的哺乳动物用作代表 HIF 或低氧 (hypoxia) 相关病理的动物模型的受试者是有利的。除此之外，本文所述的方法可被用来治疗家畜和 / 或宠物。受试者可以是雌性或雄性。受试者可是下述动物 ：先前被诊断患有或被认为正在遭受或患有 HIF 或低氧相关病理、一种或多种与 HIF 或低氧相关病理相关的并发症 ；任选的但不必已经对这种 HIF 或低氧相关病症进行治疗。

[0098] 为了描述和公开的目的，所有的专利和其它已确定的出版物在此明确地引入本文作为参考，例如，所述出版物中描述的方法学的使用可能与本发明相关。这些出版物仅因为它们的公开早于本发明的申请日而提供。这方面的任何内容不应视为承认发明者没有权利借助于先前的发明或因为任何其它原因而将公开的内容提前。所有关于这些文件的日期的声明或这些文件的内容的表述是基于申请者可得的信息，并且不构成任何关于这些文件的日期或这些文件的内容的正确性的承认。

[0099] 对于没有指出的范围，本领域普通技术人员将会理解的是，本文描述和阐明的各种实施方式中的任何一个都能被进一步修改，以将本文公开的任何其它实施方式中的特征并入。

[0100] 本发明可被下述任何编号的段落详细说明 ：

[0101] 1. 一种应答超声而基于需求释放生物活性物质的方法，该方法包括 ：提供含有生物活性物质的、生理上可接受的、自愈的聚合物基质 ；和通过超声诱发聚合物基质中的成穴作用以释放生物活性物质，其中自愈的聚合物基质是可逆交联的。

[0102] 2. 如段落 1 所述的方法，其中所述聚合物基质通过二价阳离子可逆交联，所述二价阳离子选自由下列离子组成的组 ：Ca^{2+}、Mg^{2+}、Ba^{2+}、Sr^{2+} 及其任意组合。

[0103] 3. 如段落 1 和段落 2 任一段落所述的方法，其中所述聚合物基质在生理条件下可逆交联。

[0104] 4. 如段落 1- 段落 3 任一段落所述的方法，其中所述聚合物包括海藻酸盐 / 酯或其衍生物。

[0105] 5. 如段落 1- 段落 4 任一段落所述的方法，其中所述生物活性物质在所述聚合物基质中扩散的平均自由程比相同的生物活性物质在水中扩散的平均自由程短。

[0106] 6. 如段落 1- 段落 5 任一段落所述的方法，其中所述生物活性物质可逆地结合到所述聚合物基质。

[0107] 7. 如段落 1- 段落 6 任一段落所述的方法，其中所述生物活性物质通过离子相互作用结合到所述聚合物基质。

[0108] 8. 如段落 1- 段落 6 任一段落所述的方法，其中所述生物活性物质通过可水解的键结合至所述聚合物基质。

[0109] 9. 如段落 1- 段落 6 任一段落所述的方法，其中所述生物活性物质通过可裂解的接头结合至所述聚合物基质。

[0110] 10. 如段落 1- 段落 9 任一段落所述的方法，其中超声的频率为约 20KHz 到约 1MHz。

[0111] 11. 如段落 1- 段落 10 任一段落所述的方法，其中超声的强度为约 1 瓦特到约 30 瓦特。

[0112] 12. 如段落 1- 段落 11 任一段落所述的方法，其中所述聚合物基质的分子量为约 5,000 道尔顿到约 500,000 道尔顿。

[0113] 13. 如段落 1- 段落 12 任一段落所述的方法，其中释放的生物活性物质的生物活性与最初未包封在所述聚合物基质中的生物活性物质的生物活性相当。

[0114] 14. 如段落 1- 段落 13 任一段落所述的方法，其中在重复施加超声后，所述聚合物基质的物理完整性和 / 或机械刚度值为它们的初始值的 24%、10%、5%、2% 以内或更少。

[0115] 15. 如段落 1- 段落 14 任一段落所述的方法，其中所述聚合物基质是可生物降解的。

[0116] 16. 根据段落 1- 段落 15 任一段落所述的方法，该方法进一步包括将所述聚合物基质输送到受试者的体内部位。

[0117] 下列实施例阐明了本发明的一些实施方式和一些方面。很明显地，对本领域技术人员来说，各种修改、增加、替换等都能在不改变本发明的精神或范围的情况下实现，并且这些修改和变化都包含在下述权利要求限定的本发明的范围之内。不管怎样，本发明并不局限于下述实施例。

[0118] 实施例

[0119] 实施例 1 ：包封的米托蒽醌的体外释放

[0120] 通过将海藻酸盐 / 酯水溶液与 $CaSO_4$ 的浆液混合，制备包含 0.825mg/ml 的米托蒽醌的海藻酸盐 / 酯水凝胶，得到终浓度为 50mM Ca^{2+} 和 2% 海藻酸盐 / 酯 (w/w) 的聚合物。将凝胶在两个玻片间浇注成型，并切成直径约 10mm、厚度为 2mm 的圆盘。随后，将所得水凝胶在商购的达尔伯克氏改良伊格尔氏培养基 (DMEM) 中过夜溶胀。然后，将得到的水凝胶圆盘放置于含有 5ml DMEM 的 15ml 塑料管中。一组样品水凝胶接受频率为 20KHz、强度为 1 瓦特、每小时超声 5 分钟的低频率超声。另一组包含对照水凝胶，制备过程相似，但不接受任何刺激。图 1A 和 1B 显示了作用于两组水凝胶的超声的功率曲线。从图 1C 中可看到，超声刺激使米托蒽醌的释放速率提高了～ 10 倍，并且提高后的释放速率均在同一个水平上。这表明米托蒽醌的释放是基于需求并可控的。从图 1D 和 1E 的对比中可看到，仅仅每小时超声 5 分钟增加累计释放量达～ 70%。此外，基质中的药物释放的控制几乎是数字式的，并且当移除超声后米托蒽醌的释放速率立即衰退到可以忽略不计的水平。

[0121] 实施例 2 ：包封的米托蒽醌从水凝胶中超声释放后的生物活性

[0122] 实施例 1 中释放的米托蒽醌的生物活性通过在米托蒽醌溶液中培养 MCF7 乳腺癌细胞进行研究，在培养 24 小时后测定细胞的存活率。浓度范围为 0.1μg/ml 到 20μg/ml 的新鲜的米托蒽醌溶液（未和聚合物混合）也被用于培养相同数量的 MCF7 乳腺癌细胞。从图 2 可看到，超声释放的米托蒽醌减少的细胞存活率与等同浓度的新鲜米托蒽醌溶液相当。因此，超声诱导的药物输送能够维持所释放药物的生物活性。

[0123] 实施例 3：包封的质粒 DNA 的体外释放

[0124] 将每 1ml 凝胶包含 0.1mg 质粒 DNA 的海藻酸盐 / 酯水凝胶按实施例 1 的描述制备。在 DMEM 中溶胀后，水凝胶圆盘接受频率为 20KHz、强度为 1 瓦特、每天超声 15 分钟的低频率超声。图 3A 显示了作用于水凝胶的超声功率曲线。图 3B 显示了超声使释放速率从几乎为 0 增加至有限值，并且接受超声的释放速率在三天的时间内都相似。这再次表明质粒 DNA 的释放是基于需求并可控的。

[0125] 实施例 4：各种环境中于超声作用下的聚合物基质的性质

[0126] 按实施例 1 制备海藻酸盐 / 酯水凝胶并在 DMEM 中溶胀，随后将其置于装有 5ml 常规的 DMEM（含有 200mg/L 的 $CaCl_2$ 和 100mg/L 的 $MgSO_4$）、改良的 DMEM（含有 1000mg/L $CaCl_2$ 和 500mg/L 的 $MgSO_4$）或 PBS（不含有 Ca^{2+} 和 Mg^{2+}）的塑料管中。将频率为 20KHz、强度为 1 瓦特、每小时超声 10 分钟的低频率超声施加至不同溶液中的水凝胶圆盘。在每次超声辐射后测定水凝胶圆盘的弹性模量。随后，水凝胶被冻干以测定其干重。

[0127] 图 4A 显示出在 PBS 中的水凝胶圆盘经四次超声辐射后测定的弹性模量降低～ 80％。在另一方面，在改良的 DMEM 中的凝胶圆盘经一次超声辐射后测定的弹性模量增加～ 80％，并经进一步超声辐射后维持在同一水平。在常规的 DMEM 中的凝胶圆盘在超声辐射下的弹性模量几乎保持不变。图 4B 显示出在 PBS 中的水凝胶圆盘经四次超声辐射后重量减少～ 30％，但是在常规的 DMEM 中的水凝胶几乎维持恒重。在常规的 DMEM 中的水凝胶被发现在超声辐射后仍完好无缺，但是 PBS 中经辐射的水凝胶圆盘严重损坏并在其内产生空穴（数据未示出）。

[0128] 生理环境中的 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的浓度接近常规的 DMEM 中的浓度。上述结果显示，生理环境中的 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 足以重愈低频率超声引发的空穴，因此在进行重复超声时维持凝胶的物理完整性和机械模量。

[0129] 参考文献

[0130] 1.Bouhadir, K.H.(2001). “Hydrogels for combination delivery of antineoplastic agents.”Biomaterials 22(19):2625-2633.

[0131] 2.Cheng T.J.(2006). “Magnetically responsive polymeric microparticles for oral delivery of protein drugs.”Pharm Res 23(3):557-64.

[0132] 3.Mitragotri S(2005). “Healing sound:the use of ultrasound in drug delivery and other therapeutic applications.”Nat Rev Drug Disc 4(3):255-60.

[0133] 4.Langer, R.(1990). “New Methods of Drug Delivery”Science 249(4976):1527-1533.

[0134] 5.Langer, R.(1998). “Drug delivery and targeting.”Nature 392(6679):5-10.

[0135] 6.Lee, K.Y.(2001). “Hydrogels for tissue engineering.”Chemical

Reviews101(7) :1869-1879.

[0136] 7.Richardson, T.P.(2001). “Polymeric system for dual growth factor delivery.”Nature Biotechnology 19(11) :1029-1034.

[0137] 8.Thornton AJ.(2004). “Shape retaining injectable hydrogels for minimally invasive bulking.”J Urol.127(2) :763-8.

[0138] 9.Uhrich, K.E.(1999). “Polymeric systems for controlled drug release.”Chemical Reviews 99(11) :3181-3198.

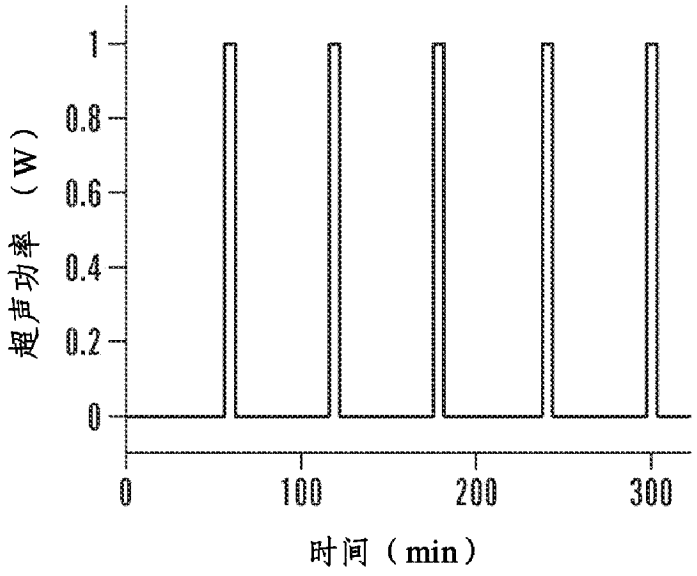

超声功率（W）
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0
100
200
300
时间（min）

图 1A

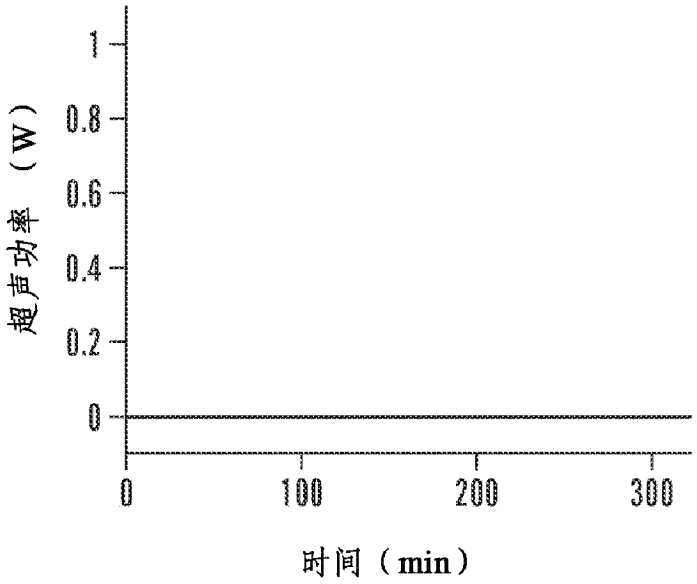

超声功率（W）
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0
100
200
300
时间（min）

图 1B

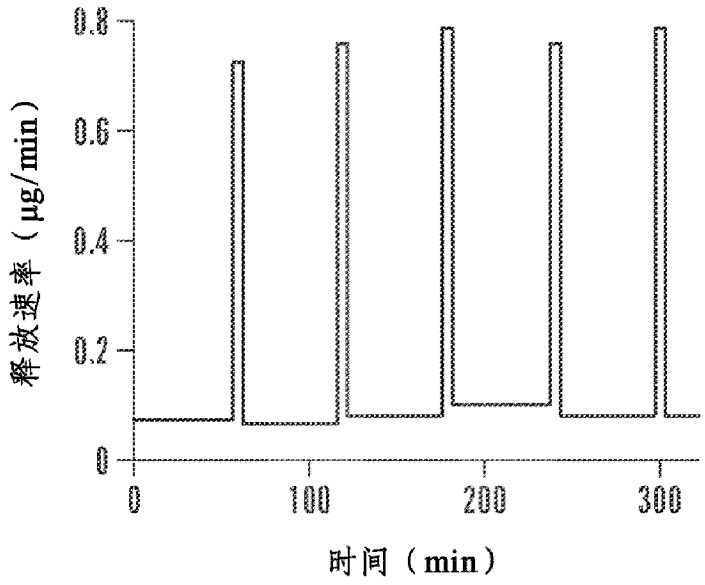

0.8
0.6
0.4
0.2
0
释放速率（μg/min）
0
100
200
300
时间（min）

图 1C

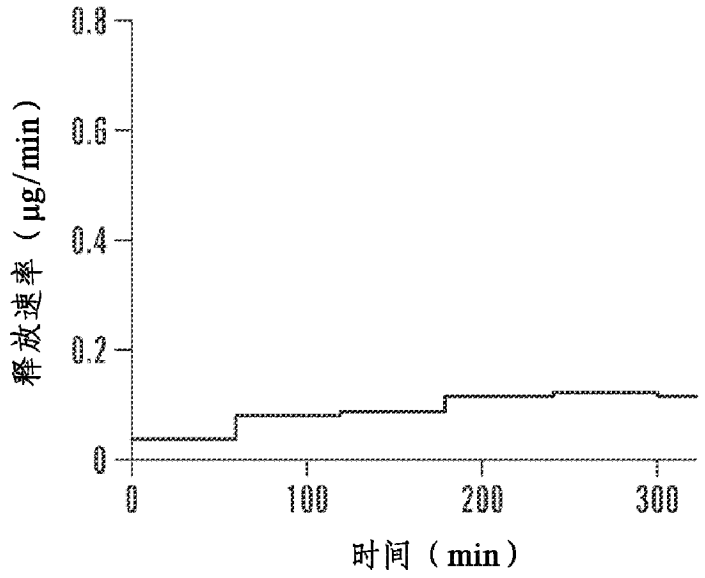

0.8
0.6
0.4
0.2
0
释放速率（μg/min）
0
100
200
300
时间（min）

图 1D

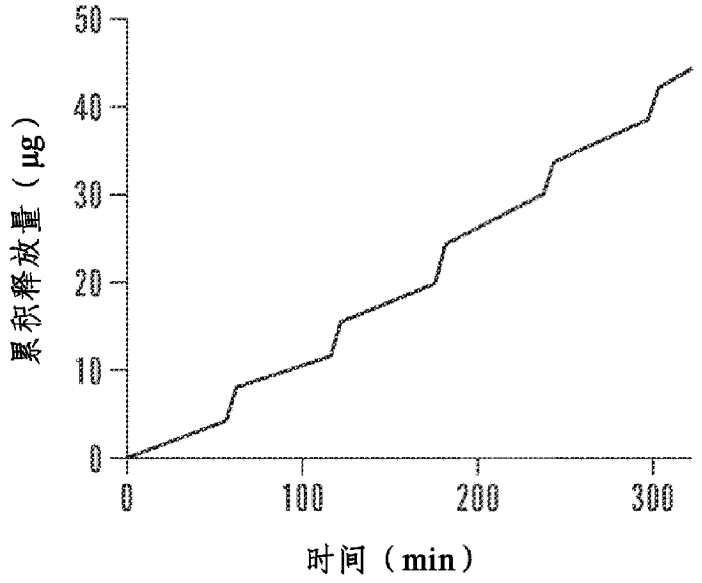

累积释放量（μg）
50
40
30
20
10
0
0
100
200
300
时间（min）

图 1E

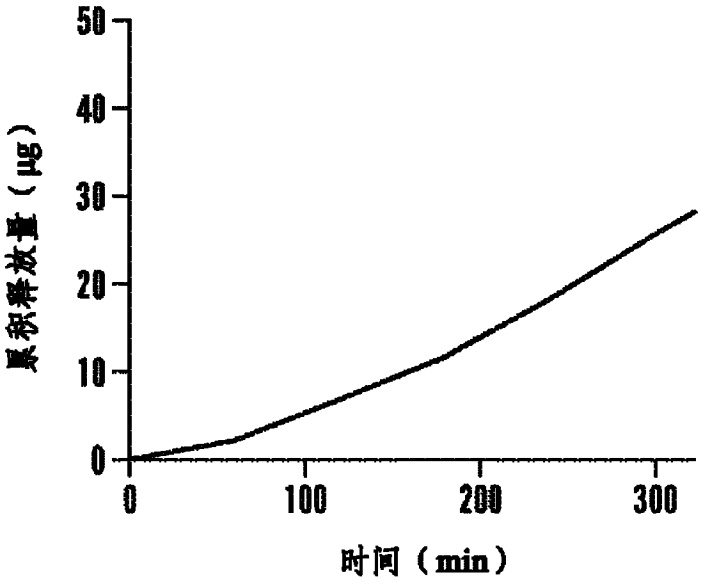

累积释放量（μg）
50
40
30
20
10
0
0
100
200
300
时间（min）

图 1F

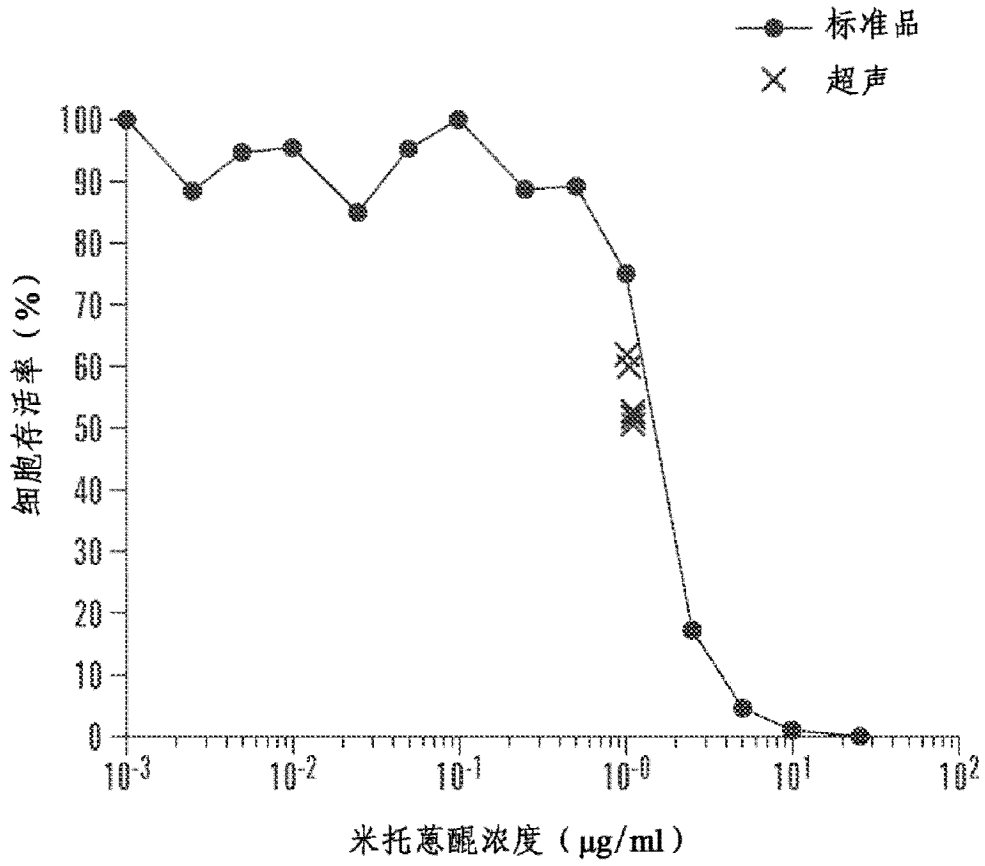

标准品
超声
细胞存活率（%）
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
10^{-3}
10^{-2}
10^{-1}
10^{-0}
10^{1}
10^{2}
米托蒽醌浓度（μg/ml）

图 2

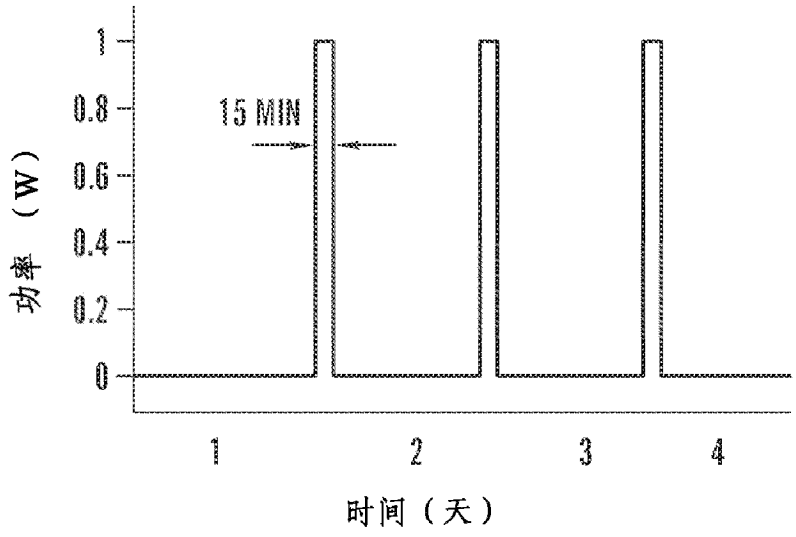

功率（W）
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
15 MIN
1
2
3
4
时间（天）

图 3A

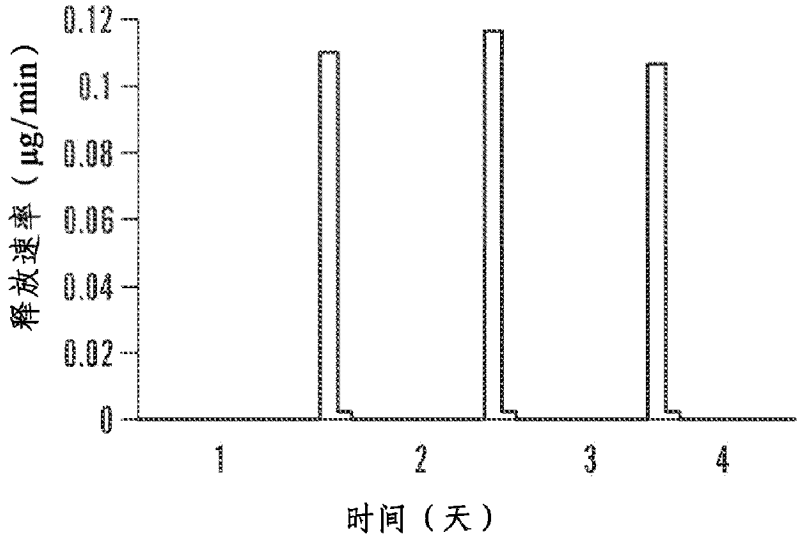

0.12
0.1
0.08
0.06
0.04
0.02
0
释放速率（μg/min）
1
2
3
4
时间（天）

图 3B

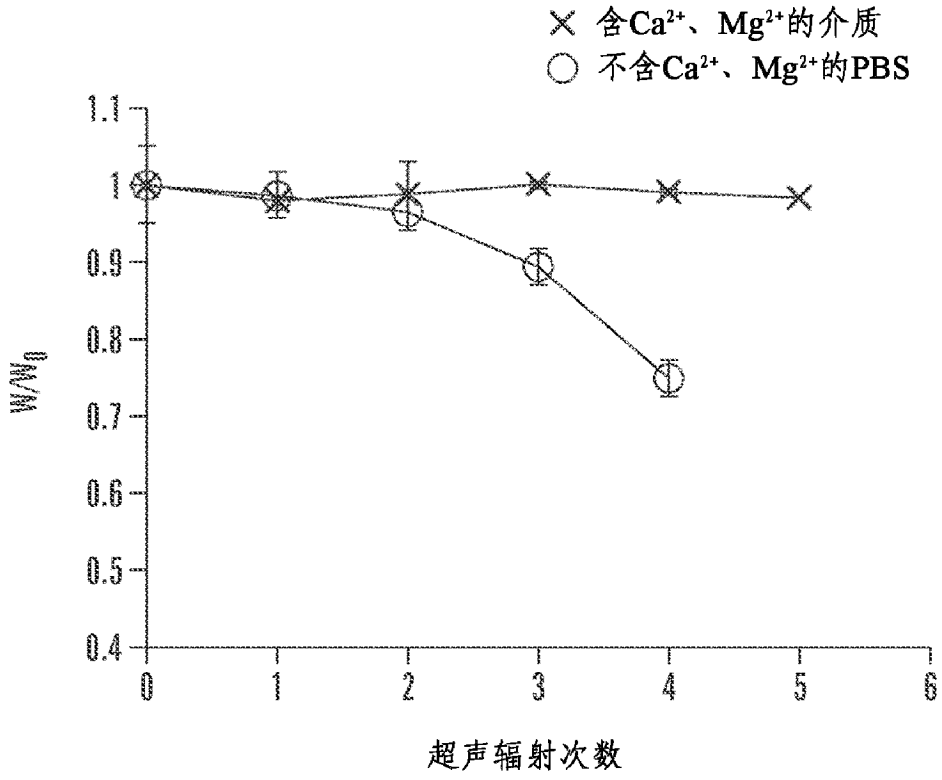

含Ca2+、Mg2+的介质
不含Ca2+、Mg2+的PBS
1.1
1
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
W/W0
0
1
2
3
4
5
6
超声辐射次数

图 4A

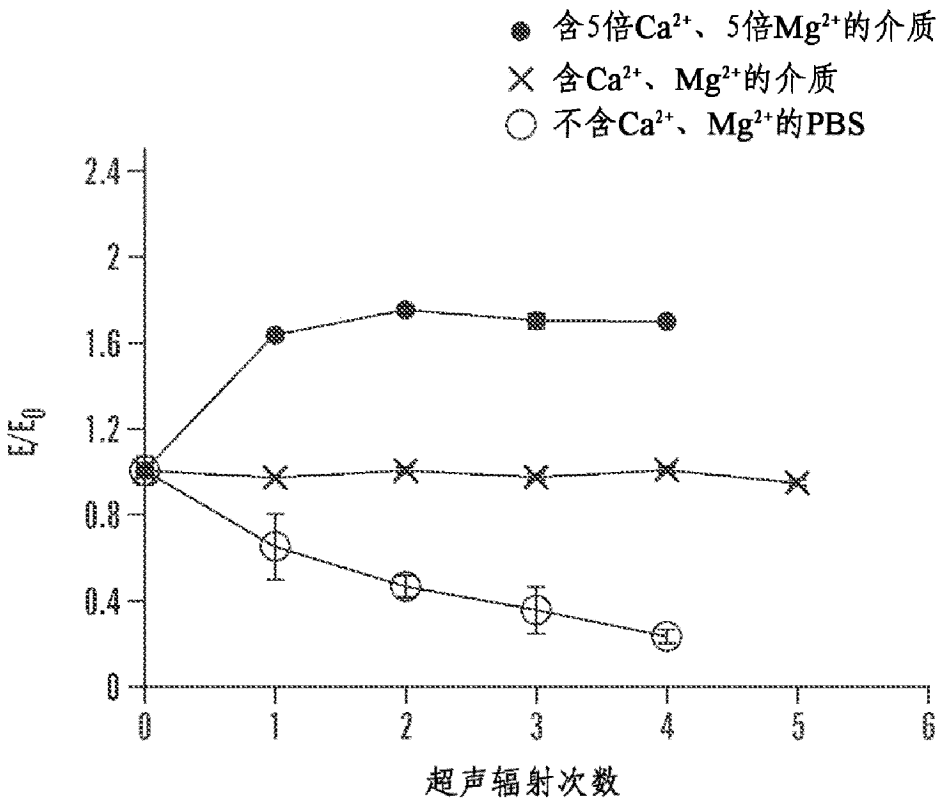

含5倍Ca2+、5倍Mg2+的介质
含Ca2+、Mg2+的介质
不含Ca2+、Mg2+的PBS
F/F0
2.4
2
1.6
1.2
0.8
0.4
0
0
1
2
3
4
5
6
超声辐射次数

图 4B

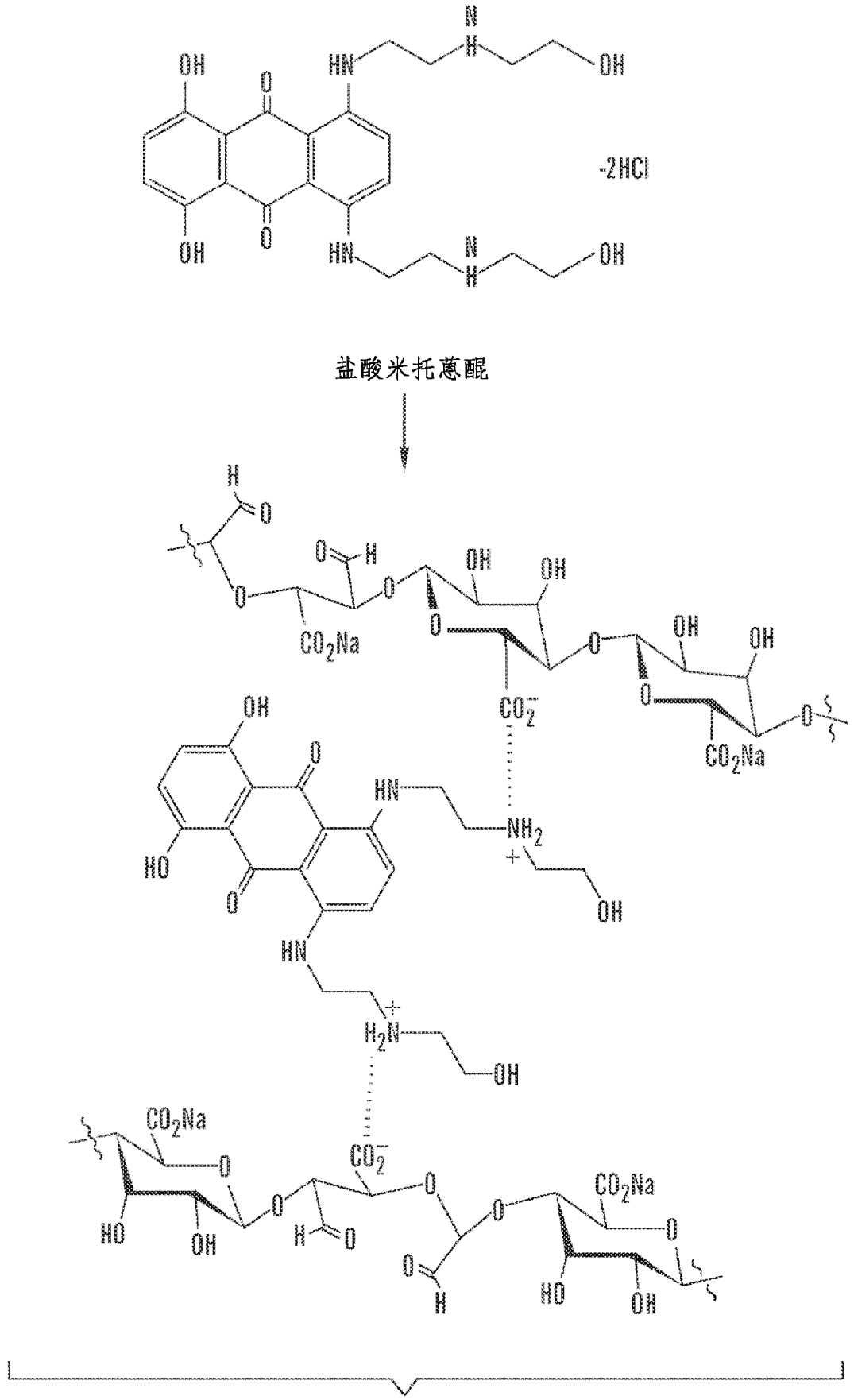


图 5