



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I686206 B

(45)公告日：中華民國 109 (2020) 年 03 月 01 日

(21)申請案號：104114899

(22)申請日：中華民國 104 (2015) 年 05 月 11 日

(51)Int. Cl. : A61K47/32 (2006.01)

A61K47/36 (2006.01)

C12N11/08 (2006.01)

(30)優先權：2014/05/09 英國

1408233.3

(71)申請人：新加坡商奧斯翠諾瓦新加坡新人有限公司 (新加坡) AUSTRIANOVA SINGAPORE
PTE LTD (SG)

新加坡

(72)發明人：陳偉仁 TAN, WEE JIN (SG)；鋼茲柏格 華特 H GUNZBURG, WALTER H.
(AT)；丹佐費德 約翰 DANGERFIELD, JOHN (GB)

(74)代理人：惲軼群；陳文郎

(56)參考文獻：

US 4407957

V. Stadlbauer1 et al, "Morphological and functional characterization of a pancreatic beta-cell line microencapsulated in sodium cellulose sulfate/poly(diallyldimethylammonium chloride)." 2018 年 12 月 26 日取自網址：http://impascience.eu/bioencapsulation/340_contribution_texts/2007-09-06_P2-20.pdf，
2007 年 9 月 6 日。

審查人員：詹季蓁

申請專利範圍項數：14 項 圖式數：5 共 35 頁

(54)名稱

多價陰離子性組成物之用途

(57)摘要

本文中揭示一種包含無毒多價陰離子性材料或其鹽之組成物用於解離一聚合膜的用途。另外，亦提出一種解離聚合膜之方法，該方法包含下列步驟：提供一聚合膜；及藉由對該聚合膜添加一包含無毒多價陰離子性材料之組成物來解離該聚合膜。

Disclosed herein is a use of a composition, comprising a non-toxic polyanionic material or a salt thereof to dissociate a polymeric membrane. In addition, a method of dissociating a polymeric membrane is also presented, the method comprising the steps of providing a polymeric membrane; and dissociating the polymeric membrane by adding a composition comprising a non-toxic polyanionic material to the polymeric membrane.

指定代表圖：

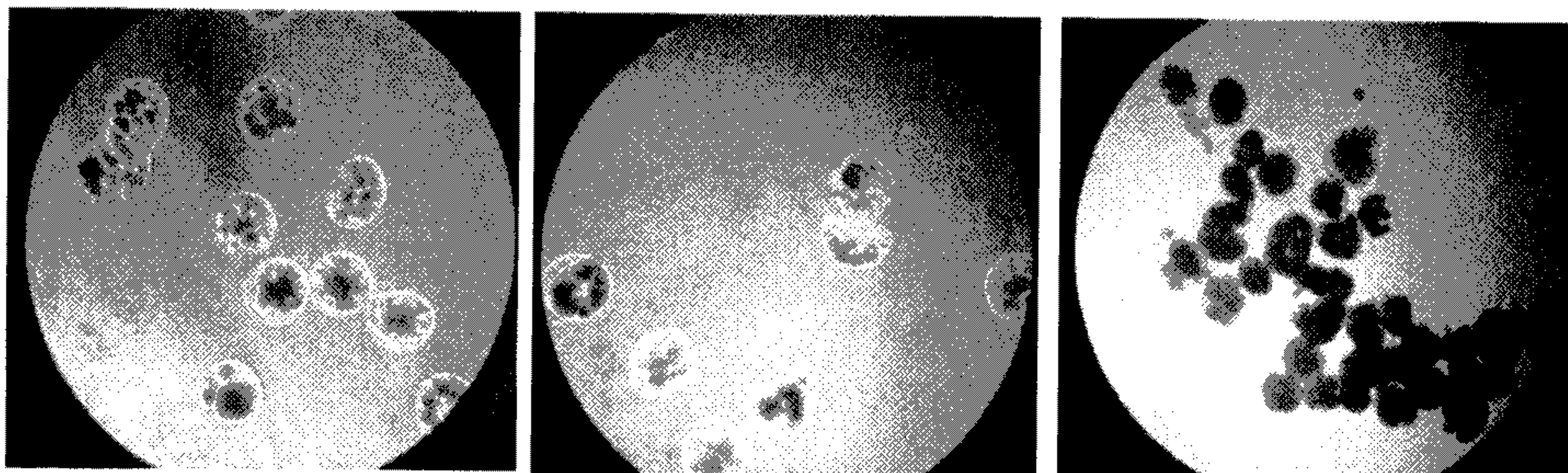


圖1

I686206

發明摘要

※ 申請案號：

※ 申請日：

※ I P C 分類：

【發明名稱】(中文/英文)

多價陰離子性組成物之用途

USE OF A POLYANIONIC COMPOSITION

【中文】

本文中揭示一種包含無毒多價陰離子性材料或其鹽之組成物用於解離一聚合膜的用途。另外，亦提出一種解離聚合膜之方法，該方法包含下列步驟：提供一聚合膜；及藉由對該聚合膜添加一包含無毒多價陰離子性材料之組成物來解離該聚合膜。

【英文】

Disclosed herein is a use of a composition, comprising a non-toxic polyanionic material or a salt thereof to dissociate a polymeric membrane. In addition, a method of dissociating a polymeric membrane is also presented, the method comprising the steps of providing a polymeric membrane; and dissociating the polymeric membrane by adding a composition comprising a non-toxic polyanionic material to the polymeric membrane.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（1）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

（無）

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

（無）

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

多價陰離子性組成物之用途

USE OF A POLYANIONIC COMPOSITION

【技術領域】

發明領域

[0001]本發明係關於一種多價陰離子性組成物用以解離一聚合膜之用途及一種進行該解離之方法。

【先前技術】

發明背景

[0002]在本說明書中對明顯先前已公開的文獻之列舉或討論應不必然被視為承認該文獻為目前技術發展水平之一部分或為一般通常常識。

[0003]囊封為在一內部基質周圍形成一連續塗層之過程。內部基質是完全地容納在膠囊壁內作為一經囊封之材料的核心。囊封必須區別於「固定」，該固定意指將材料截留在—基質內或遍及整個基質。與囊封相反，此為造成不定粒徑之隨機過程，其中一定百分比之經固定元素曝露在表面。在某些情況下，若將之植入體內，此可導致免疫原性。囊封有助於將核心材料與其環境分離，從而改善其穩定性、延長核心之存放期且在用於醫療用途之植入的情況下防止膠囊呈免疫原性。藉由在核心物質周圍之囊封劑所形成之結構係知曉為「壁」或「壁系統」。「壁系統」之特

性經設計以保護核心且可能在特定條件下釋放該核心，同時允許小分子穿過「壁」或「壁系統」。另外，「壁」或「壁系統」亦可以除膠囊以外之形式使用。舉例而言，壁可作為一障壁，其限制一或多種物質之運動同時允許小分子穿過「壁」或「壁系統」。壁可在特定條件下被移除，從而允許一或多種物質自由移動。

[0004]各種聚合物可用來產生用於囊封活細胞之膠囊。一些實例為海藻酸鹽、膠原蛋白、明膠、瓊脂糖、聚葡萄糖胺糖及硫酸纖維素(1)。最常用的材料為海藻酸鹽，其為天然陰離子性多醣，且係藉由D-甘露糖醛酸與L-古洛糖醛酸殘基經1-4醣苷鍵結線性地接合所製得。

硫酸纖維素微膠囊

[0005]對於海藻酸鹽之一替代性囊封技術涉及由帶相反電荷的多價離子形成聚電解質複合膠囊。尤其有效的聚電解質複合膠囊為一由纖維素硫酸鈉(NaCS或SCS)及聚[二烯丙基(二甲基)-氯化銨] (pDADMAC)所形成之膠囊。SCS/pDADMAC膠囊係藉由將多價陰離子性SCS之溶液滴入至多價陽離子性pDADMAC之溶液中來形成。有利地，諸如養分及廢物之小物質可容易地穿過SCS/pDADMAC膠囊孔，同時該等孔阻斷諸如細胞之大物質之離開/進入。SCS/pDADMAC膠囊亦與細胞生物相容，且當被植入體內時呈非免疫原性。另外，對於許多使用SCS/pDADMAC膠囊系統所囊封的細胞類型，已用文件證明細胞之長期生存期(亦即生存力)。再者，此等膠囊連同低溫防腐劑可在負

20°C、負80°C下或甚至在液氮之氣相中冷凍，而沒有對SCS/pDADMAC膠囊結構或其完整性造成任何損傷下經。此外，已使用SCS/pDADMAC膠囊所囊封的細胞在較長的時間段(高達至少5年)內顯示優異的細胞生存力。因此，針對經囊封之細胞的簡單儲存及運輸，SCS/pDADMAC膠囊提供一有用的技術。

[0006]SCS/pDADMAC膠囊已經最佳化且已成功地用於臨床中。舉例而言，SCS/pDADMAC膠囊已用於腫瘤治療之領域，其中經囊封之活細胞產生用以將化學治療劑輸送至腫瘤之治療性酶。患有不可切除胰臟癌之患者已在臨床試驗中以該方法來治療，且該治療顯示為安全且有效的(2-4)。亦已顯示的是，SCS/pDADMAC膠囊可在生理學上有效的劑量下在體內釋放多種不同種類之生物分子(5-8)。該等生物分子可穿過膠囊孔且包括治療性抗體、細胞激素及胰島素。大規模醫藥級(GMP)製造已使用SCS/pDADMAC膠囊技術來建立(9)。最近，該技術已顯示對於囊封敏感型細胞(例如幹細胞)以及對於製造幹細胞以供治療性應用是有用的(10，11)。另外，SCS/pDADMAC膠囊技術亦已顯示對於食品、動物飼料及醫藥營養品應用是有用的。舉例而言，SCS/pDADMAC膠囊技術可用於囊封益生菌且保護細菌免於胃酸損害。

[0007]總體而言，SCS/pDADMAC膠囊可描述為一種用以保護、分離、儲存及運輸一系列物質(包括任何種類之活細胞)的方法。使用真核細胞，用途主要在保健、生物技術、

獸醫學及研究中(10)。使用原核細胞，用途主要在益生菌、化妝品、耕種、農業及環境應用中。

[0008]除保護、分離、儲存及運輸細胞以外，對於一種若有需要可釋放儲存在其中的物質而不使該物質變性的囊封技術系統會是所欲的。對於一些在生物技術及生物醫學中之應用，具有釋放經囊封細胞之能力為不可或缺的，因為該等細胞需要為游離的(非囊封的)以供後續加工。因此，在實驗室中及/或體內使用細胞友好(cell-friendly)方法來解離或片斷化膠囊材料之概念將對囊封技術提供全新應用。因此，需要一種能夠以環境友好且細胞友好的方式解離膠囊材料之組成物。

【發明內容】

發明概要

[0009]在本發明之第一方面中，揭示一種包含無毒多價陰離子性材料或其鹽之組成物用於解離聚合膜之用途。在某些具體例中，無毒多價陰離子性物質為硫酸多醣、聚(苯乙烯磺酸鈉)或聚丙烯酸，或其等之鹽，其限制條件為硫酸多醣不為糖胺聚醣。

[0010]在本發明之具體例中，聚合膜係呈一囊封一物質之膠囊的形式或呈一阻斷一物質自由運動之障壁的形式。

[0011]在本發明之進一步具體例中，聚合膜可包含纖維素硫酸鈉及聚二烯丙基二甲基氯化銨(pDADMAC)。

[0012]在本發明之更進一步具體例中，無毒多價陰離子性材料可為硫酸多醣、聚(苯乙烯磺酸鈉)或聚丙烯酸或其等

之鹽，或者更特定言之，無毒多價陰離子性材料為硫酸多醣、聚(苯乙烯磺酸鈉)或聚丙烯酸或其等之鹽，其限制條件為硫酸多醣不為糖胺聚醣。舉例而言，多價陰離子性材料或其鹽可具有從4,000至20,000道爾頓之數目平均分子量[例如，從4,500至15,000 (諸如從5,000至10,000，例如5,000)之數目平均分子量]。

[0013]在本發明之具體例中，其中提及一物質，該物質可選自由以下各者組成之群中之一或多者：細胞、蛋白質、生物相容粒子及化合物。舉例而言，該物質為多個細胞。

[0014]在某些具體例中，多價陰離子性材料或其鹽為硫酸多醣，任擇地，其中硫酸多醣之各個醣單元含有從1至3個硫酸根基團。

[0015]在某些具體例中，硫酸多醣或其鹽為硫酸碳水化合物或其鹽、硫酸糖胺聚醣或其鹽，或其等之組合。在特定具體例中，硫酸多醣或其鹽為硫酸碳水化合物或其鹽，其限制條件為該硫酸碳水化合物不為硫酸糖胺聚醣。

[0016]舉例而言，硫酸碳水化合物為由以下各者組成之群中之一或多者：具有從4,000至20,000道爾頓之數目平均分子量的硫酸葡聚糖及硫酸纖維素，及其等之鹽(例如，硫酸碳水化合物為硫酸葡聚糖或其鹽，諸如硫酸葡聚糖鈉鹽)。

[0017]舉例而言，硫酸糖胺聚醣係選自由以下各者組成之群：肝素、硫酸乙醯肝素、硫酸軟骨素、硫酸皮膚素及其等之鹽。

[0018]在某些具體例中，該組成物為一包含硫酸葡聚糖之抗凝集劑。

[0019]在進一步的具體例中，該組成物可含有濃度為從 0.1 mg/mL 至 100 mg/mL (例如，濃度為從 1 mg/mL 至 20 mg/mL)之硫酸多醣。

[0020]在本發明之第二方面中，揭示一種解離一聚合膜之方法，該方法包含以下步驟：

(a) 提供一聚合膜；及

(b) 藉由對該聚合膜添加一包含無毒多價陰離子性材料之組成物來解離該聚合膜。

在某些具體例中，無毒多價陰離子性材料為硫酸多醣、聚(苯乙烯磺酸鈉)或聚丙烯酸或其等之鹽，其限制條件為硫酸多醣不為糖胺聚醣。

[0021]在本發明之具體例中，該聚合膜可呈一囊封一物質之膠囊的形式或呈一阻斷一物質自由運動之障壁的形式。

[0022]在進一步的具體例中，該聚合膜包含纖維素硫酸鈉及聚二烯丙基二甲基氯化銨(pDADMAC)。

[0023]在本發明之某些具體例中，當該聚合膜解離時，該物質可自膠囊或障壁被釋放。

[0024]在本發明之進一步具體例中，該物質可包含由以下各者組成之群中之一或多者：細胞、蛋白質、生物相容粒子及化合物。

[0025]在本發明之某些具體例中，該聚合膜在步驟(a)

中經置放於液體介質中。舉例而言，該包含無毒多價陰離子性材料之組成物被添加至該液體介質中以提供從0.01 mg/mL至30 mg/mL之無毒多價陰離子性材料濃度(例如，無毒多價陰離子性材料之濃度為從0.1 mg/mL至25 mg/mL，諸如從1 mg/mL至20 mg/mL)。

[0026]在本發明之進一步具體例中，細胞可被保持在一細胞釋放介質中歷時從1分鐘至16小時(例如從10分鐘至1.5小時，諸如從15分鐘至75分鐘)。

[0027]在本發明之第三方面中，揭示一種供解離聚合膜使用之多價陰離子性硫酸鹽組成物。在某些具體例中，無毒多價陰離子性材料為硫酸多醣、聚(苯乙烯磺酸鈉)或聚丙烯酸或其等之鹽，其限制條件為硫酸多醣不為糖胺聚醣。

[0028]在本發明之又進一步具體例中，本發明之第二及第三方面中之無毒多價陰離子性材料是如在本發明之第一方面中所描述。

[0029]本發明之進一步方面及具體例在以下條項中描述。

1. 一種包含無毒多價陰離子性材料或其鹽之組成物用於解離聚合膜的用途。
2. 如條項1之用途，其中該聚合膜係呈一囊封一物質之膠囊的形式或呈一阻斷一物質自由運動之障壁的形式。
3. 如條項1或2之用途，其中該聚合膜包含纖維素硫酸鈉及聚二烯丙基二甲基氯化銨(pDADMAC)。
4. 如前述條項中任一項之用途，其中該無毒多價陰離

子性材料爲硫酸多醣、聚(苯乙烯磺酸鈉)或聚丙烯酸或其等之鹽。

5. 如條項2至4中任一項之用途，其中該物質係選自由以下各者組成之群中之一或多者：細胞、蛋白質、生物相容粒子及化合物。

6. 如條項5之用途，其中該物質爲多個細胞。

7. 如前述條項中任一項之用途，其中該多價陰離子性材料或其鹽具有從4,000至20,000道爾頓之數目平均分子量。

8. 如條項7之用途，其中該多價陰離子性材料或其鹽具有從4,500至15,000之數目平均分子量。

9. 如條項8之用途，其中該多價陰離子性材料或其鹽具有從5,000至10,000之數目平均分子量。

10. 如條項9之用途，其中該多價陰離子性材料或其鹽具有5,000之數目平均分子量。

11. 如前述條項中任一項之用途，其中該多價陰離子性材料或其鹽爲硫酸多醣。

12. 如條項11之用途，其中該硫酸多醣之各個醣單元含有從1至3個硫酸根基團。

13. 如條項12之用途，其中該硫酸多醣或其鹽爲硫酸碳水化合物或其鹽、硫酸糖胺聚醣或其鹽，或者其等之組合。

14. 如條項13之用途，其中該硫酸碳水化合物爲由以下各者組成之群中之一或多者：具有從4,000至20,000道爾頓之數目平均分子量的硫酸葡聚糖及硫酸纖維素，及其等之

鹽。

15. 如條項14之用途，其中該硫酸碳水化合物為硫酸葡聚糖或其鹽。

16. 如條項15之用途，其中該硫酸葡聚糖為硫酸葡聚糖鈉鹽。

17. 如條項13之用途，其中該硫酸糖胺聚糖係選自由以下各者組成之群：肝素、硫酸乙醯肝素、硫酸軟骨素、硫酸皮膚素及其等之鹽。

18. 如條項1之用途，其中該組成物為一包含硫酸葡聚糖之抗凝集劑。

19. 如條項4至18中任一項之用途，其中該組成物含有濃度為從0.1 mg/mL至100 mg/mL之硫酸多醣。

20. 如條項19之用途，其中該組成物含有濃度為從1 mg/mL至20 mg/mL之硫酸多醣。

21. 一種解離一聚合膜之方法，該方法包含以下步驟：

(a) 提供一聚合膜；及

(b) 藉由對該聚合膜添加一包含無毒多價陰離子性材料之組成物來解離該聚合膜。

22. 如條項21之方法，其中該聚合膜係呈一囊封一物質之膠囊的形式或呈一阻斷一物質自由運動之障壁的形式。

23. 如條項21或條項22之方法，其中該聚合膜包含纖維素硫酸鈉及聚二烯丙基二甲基氯化銨(pDADMAC)。

24. 如條項22或條項23之方法，其中當該聚合膜解離時，該物質自該膠囊或障壁被釋放。

25. 如條項22至條項24中任一項之方法，其中該物質包含由以下各者組成之群中之一或多者：細胞、蛋白質、生物相容粒子及化合物。

26. 如條項21至25中任一項之方法，其中該聚合膜在步驟(a)中被置放於一液體介質中。

27. 如條項26之方法，其中該包含無毒多價陰離子性材料之組成物被添加至該液體介質中以提供從0.01 mg/mL至30 mg/mL之無毒多價陰離子性材料濃度。

28. 如條項27之方法，其中該無毒多價陰離子性材料之濃度為從0.1 mg/mL至25 mg/mL。

29. 如條項21至28中任一項之方法，其中該無毒多價陰離子性材料之濃度為從1 mg/mL至20 mg/mL。

30. 如條項25至29之方法，其中該等細胞被保持在一細胞釋放介質中歷時1分鐘至16小時。

31. 如條項30之方法，其中該等細胞被保持在該細胞釋放介質中歷時10分鐘至1.5小時。

32. 如條項31之方法，其中該等細胞被保持在該細胞釋放介質中歷時15分鐘至75分鐘。

33. 如條項21至32中任一項之方法，其中該無毒多價陰離子性材料為硫酸多醣、聚(苯乙烯磺酸鈉)或聚丙烯酸或其等之鹽。

34. 如條項21至33中任一項之方法，其中該多價陰離子性材料或其鹽具有從4,000至20,000道爾頓之數目平均分子量。

35. 如條項34之方法，其中該多價陰離子性材料或其鹽具有從4,500至15,000之數目平均分子量。

36. 如條項35之方法，其中該多價陰離子性物質或其鹽具有從5,000至10,000之數目平均分子量。

37. 如條項36之方法，其中該多價陰離子性物質或其鹽具有5,000之數目平均分子量。

38. 如條項21至37中任一項之方法，其中該多價陰離子性材料或其鹽為硫酸多醣。

39. 如條項38之方法，其中該硫酸多醣之各個醣單元含有從1至3個硫酸根基團。

40. 如條項33至39中任一項之方法，其中該硫酸多醣或其鹽為硫酸碳水化合物或其鹽、硫酸糖胺聚醣或其鹽，或其等之組合。

41. 如條項40之方法，其中該硫酸碳水化合物為由以下各者組成之群中之一或多者：具有從4,000至20,000道爾頓之數目平均分子量的硫酸葡聚糖與硫酸纖維素，及其等之鹽

42. 如條項41之方法，其中該硫酸碳水化合物為硫酸葡聚糖或其鹽。

43. 如條項42之方法，其中該硫酸葡聚糖為硫酸葡聚糖鈉鹽。

44. 如條項40之方法，其中該硫酸糖胺聚醣係選自由以下各者組成之群：肝素、硫酸乙醯肝素、硫酸軟骨素、硫酸皮膚素及其等之鹽。

45. 一種多價陰離子性硫酸鹽組成物，其供用於解離一聚合膜。

【圖式簡單說明】

[0030] 方面及具體例將參考以下圖式來描述，其中：

圖1為顯微影像(40倍放大率)，其說明硫酸葡聚糖儲備溶液(10倍稀釋度)隨時間推移對膠囊完整性之作用。左圖顯示在添加硫酸葡聚糖之前的膠囊，中間圖顯示緊接著在添加硫酸葡聚糖之後的膠囊，而右圖顯示在添加硫酸葡聚糖之後30分鐘的膠囊。

圖2為說明膠囊解離之顯微影像(150倍放大率)。

圖3說明當以具有不同濃度(亦即0 mg/mL至20 mg/mL)之硫酸葡聚糖溶液來培育時，隨時間推移所觀測(使用Prestoblue™)到之HEK 293細胞生存力。

圖4說明當以具有不同濃度(亦即0 mg/mL至50 mg/mL)之硫酸葡聚糖溶液來培育時，在15分鐘時所觀測(使用Prestoblue™)到之HEK 293細胞生存力。

圖5說明當以具有不同濃度(亦即0 mg/mL至50 mg/mL)之硫酸葡聚糖溶液來培育時，在15分鐘時所觀測(使用Prestoblue™)到之相對HEK 293細胞生存力(%)。

【實施方式】

[0031] 出人意料地，已發現一包含無毒多價陰離子性材料或其鹽之組成物可用於解離一聚合膜。

[0032] 該聚合膜之解離可使用包含以下步驟之方法來進行：

(a) 提供一聚合膜；及

(b) 藉由對該聚合膜添加一包含無毒多價陰離子性材料之組成物來解離聚合膜。

[0033]當在本文中使用时，「聚合膜」一詞係指包含兩種或兩種以上聚合物且呈複合物形式的材料。用以形成該複合物之適合的聚合物可包括一或多種含有硫酸根基團之多醣或含有硫酸根基團之多醣衍生物，組合以一或多種含有四級銨基團之聚合物。

[0034]含有硫酸根基團之多醣或含有硫酸根基團之多醣衍生物之實例包括，但不限於：硫酸纖維素、硫酸乙酸纖維素、硫酸羧甲基纖維素、硫酸葡聚糖、硫酸澱粉或其等之任何組合。當「聚合膜」包含含有硫酸根基團之多醣或含有硫酸根基團之多醣衍生物時，該等硫酸根基團可呈一鹽之形式。舉例而言，硫酸根基團可呈一鈉鹽之形式。

[0035]含有四級銨基團之聚合物之實例可包括，但不限於：聚二甲基二烯丙基銨或聚乙基苯甲基-三甲基銨。該四級銨基團可呈一鹽之形式。特定而言，四級銨基團可呈一氫鹽之形式。

[0036]舉例而言，聚合膜包含纖維素硫酸鈉(SCS)及聚二烯丙基二甲基氯化銨(pDADMAC)，其中纖維素硫酸鈉與聚二烯丙基二甲基氯化銨形成聚合複合物。在不希望受理論束縛的情況下，該等聚合複合物可經由含有硫酸根基團之多醣與含有四級銨基團之聚合物之間的靜電相互作用而形成。舉例而言，靜電相互作用可在纖維素硫酸鈉之帶負

電的陰離子性硫酸根基團與聚二烯丙基二甲基氯化銨之帶正電的陽離子基團之間發生。

[0037]如本文所描述之聚合膜可用於囊封一或多種物質，或形成一用以限制一或多種物質之運動的障壁。當在本文中使用時，「囊封(encapsulate)」、「經囊封」及「囊封(encapsulating)」等詞係指藉由聚合膜封閉一物質。此可藉由在該物質周圍形成一膠囊(其由聚合膜所製成)來完成。舉例而言，一包含纖維素硫酸鈉(SCS)與聚二烯丙基二甲基氯化銨(pDADMAC)聚合複合物之聚合膜可在細胞周圍形成一膠囊，因此將細胞囊封在SCS/pDADMAC膠囊內。

[0038]當在本文中討論時，「物質(substance)」一詞係指任何能夠藉由聚合膜囊封之材料或物料(matter)。此外，在聚合膜形成一障壁(當呈膠囊形式時)之狀況下，「物質」一詞係指任何能夠與另一物質分離而不穿過該障壁的材料或物料。如本文所用，「物質」之典型實例可選自由以下各者組成之群中之一或多者：細胞、蛋白質、生物相容粒子、化合物或其等之任何組合。特定而言，該物質可為細胞。細胞之實例可包括，但不限於：哺乳動物細胞、昆蟲細胞、植物細胞、細菌細胞、真菌細胞、原蟲細胞或其等之任何組合。此外，細胞可為活細胞或死細胞。

[0039]當聚合膜用於囊封一物質(亦即形成在該物質周圍形成一膠囊)時，聚合膜能夠阻斷經囊封之物質穿過膜壁且進入非經囊封之外部環境中。此外，當聚合膜用於形成一障壁以阻斷一或多種物質之運動時，聚合膜能夠阻斷該

一或多種物質穿過該障壁。

[0040] 當聚合膜形成一膠囊或一障壁(其能夠阻斷物質穿過膠囊壁或障壁)時，其亦可能夠允許水及其他溶劑、小化合物及生物分子(諸如細胞激素、抗體及胰島素)選擇性通過膠囊壁或障壁，此係歸因於該聚合膜包含孔。

[0041] 聚合膜之孔徑可為從20 nm至300 nm (例如20 nm至250 nm、從80 nm至225 nm、從100 nm至200 nm、從150 nm至175 nm、從80 nm至100 nm或從200 nm至300 nm)。其他可穿過此等孔之組分之實例包括，但不限於：藥物、遞送載體及治療性生物分子。更特定言之，治療性生物分子包括，但不限於：抗體、細胞激素及胰島素。

[0042] 當在本文中使用时，「多價陰離子性材料」一詞為聚合物，其重複單元包括至少一個陰離子性基團。陰離子性基團為一化學官能基，其可在生理pH下解離且其使得聚合物帶負電。陰離子性基團之實例包括，但不限於：羧酸根、硫酸根、硝酸根及磷酸根。應瞭解的是，多價陰離子性材料必須以某種方式不同於用於SCS/pDADMAC系統之SCS。舉例而言，該多價陰離子性材料之分子量可顯著低於如在SCS/pDADMAC系統所使用之SCS。舉例而言，SCS(或用於聚合膜之類似材料)之分子量可比用於破壞該膜之多價陰離子性材料之分子量大至少2倍(例如至少3倍、4倍、5倍、10倍、20倍)。

[0043] 多價陰離子性材料可為一或多種無機聚合物或其等之鹽，或者更特定言之，為一或多種有機聚合物或其

鹽。適合的有機聚合物之實例包括，但不限於：多醣、多肽、聚(苯乙烯磺酸鈉)或聚丙烯酸。多醣可包括硫酸多醣或其鹽，其中重複醣單元包括至少一個硫酸根基團。硫酸多醣之實例可選自由以下各者組成之群：硫酸糖胺聚醣或更佳為硫酸葡聚糖或其等之組合。硫酸糖胺聚醣之實例可選自由以下各者組成之群：肝素、硫酸乙醯肝素、硫酸軟骨素、硫酸皮膚素及其鹽。在某些具體例中，無毒多價陰離子性材料可為硫酸多醣、聚(苯乙烯磺酸鈉)或聚丙烯酸或其等之鹽，其限制條件為硫酸多醣不為糖胺聚醣。

[0044]在某些實例中，硫酸多醣可為硫酸葡聚糖或其鹽，或更特定言之為硫酸葡聚糖鈉鹽。

[0045]多價陰離子性材料或其鹽之平均分子量可為從4,000至20,000。特定而言，多價陰離子性材料(例如硫酸多醣)或其鹽之平均分子量可為從4,500至15,000、5,000至10,000、6,000至9,000或5,000。應瞭解的是，用於形成聚合物膜之含有硫酸根基團的多醣具有比用於破壞該膜之多價陰離子性材料之分子量大至少2倍(例如至少3倍、4倍、5倍、10倍、20倍)之分子量。

[0046]當多價陰離子性材料為硫酸多醣(例如，其限制條件為硫酸多醣不為糖胺聚醣)或其鹽時，硫酸多醣之各個醣單元(亦即重複單元)可包括從1至3個陰離子性基團。舉例而言，當硫酸多醣為硫酸葡聚糖時，硫酸葡聚糖可含有3個硫酸根基團。

[0047]多價陰離子性材料可為無毒材料。亦即，該材料

不會導致曝露於多價陰離子性材料之細胞在其延長曝露(例如10分鐘至24小時)於能夠解離聚合膜之多價陰離子性材料的濃度之後死亡。

[0048]一種包含多價陰離子性材料之組成物可用於解離一聚合膜。如本文中所論述，「解離(dissociate)」、「解離(dissociating)」、「解離(dissociation)」及「解離(dissociated)」等詞可用於描述使聚合膜解離或斷裂成較小碎片(亦即解離物)之過程。「解離」、「解離」、「解離」及「解離」等詞可與其他術語互換使用，該等術語諸如「片斷化(fragment)」、「片斷化(fragmentation)」、「溶解dissolve)」、「溶解(dissolution)」、「破壞(disrupt)」或「破壞(disruption)」，其等術語亦應理解為描述使聚合膜解離或斷裂成較小碎片之過程。

[0049]當聚合膜包含一聚合複合物時，該聚合物膜之解離可歸因於由多價陰離子性材料所造成之在聚合複合物中的靜電相互作用之破壞。舉例而言，在聚合膜包含纖維素硫酸鈉與聚二烯丙基二甲基氯化銨聚合複合物之狀況下，在纖維素硫酸鈉之帶負電的陰離子性硫酸根基團與聚二烯丙基二甲基氯化銨之帶正電的陽離子基團之間的靜電相互作用可經由競爭性多價陰離子性材料破壞。

[0050]當聚合膜囊封一或多種物質時，該聚合膜之解離將導致經囊封之物質釋放至一圍繞所形成之膠囊之介質中(亦即膠囊之外部環境)。舉例而言，當經囊封之物質為多個細胞且圍繞肝膠囊之環境為細胞培養基時，該等細胞在聚

合膜之解離之後被釋放至細胞培養基中。

[0051]另擇地，當聚合膜形成一限制一或多種物質運動之障壁時，該聚合膜之解離將移除該障壁且允許一或多種物質自由地移動而不受限制。

[0052]該包含多價陰離子性材料或其鹽之組成物可為溶液。舉例而言，該組成物可為一有機溶液，或更特定言之為水溶液。當該組成物為一溶液時，該組成物可進一步包含一溶劑、一生理緩衝溶液、一細胞培養基或其等之任何組合。

[0053]適合的溶劑之實例包括，但不限於：水、二甲亞砷、甘油、脫脂乳、鹽溶液、蔗糖溶液及海藻糖溶液。

[0054]生理緩衝溶液之實例包括，但不限於：磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)、Good's緩衝液、2-胺基-2-羥甲基-1,3-丙二醇(TRIS)緩衝液、磷酸鹽緩衝液、1,4-哌嗪二乙磺酸(PIPES)緩衝液、2-(*N*-嗎啉基)乙磺酸(MES)緩衝液、2-[(2-胺基-2-側氧基乙基)-(羧甲基)胺基]乙酸(ADA)緩衝液、2-(胺甲醯基甲胺基)乙磺酸(ACES)緩衝液、3-嗎啉基-2-羥丙基磺酸(MOPSO)緩衝液、3-嗎啉基丙烷-1-磺酸(MOPS)緩衝液、2-[[1,3-二羥基-2-(羥甲基)-2-丙基]胺基]乙烷磺酸(TES)緩衝液、3-(*N,N*-雙[2-羥乙基]胺基)-2-羥基丙磺酸(DIPSO)緩衝液、3-[[1,3-二羥基-2-(羥甲基)丙-2-基]胺基]-2-羥基-1-丙磺酸(TAPSO)緩衝液、3,3'-(1,4-哌嗪二基)雙(2-羥基-1-丙磺酸)(POPSO)緩衝液、3-[4-(2-羥乙基)哌嗪-1-基]丙-1-磺酸(HEPPS)緩衝液、*N*-(2-羥基-1,1-雙(羥甲基)乙基)(Tricine)

緩衝液、2-(雙(2-羥乙基)胺基)乙酸(Bicine)緩衝液及3-[[1,3-二羥基-2-(羥甲基)丙-2-基]胺基]丙-1-磺酸(TAPS)緩衝液。

[0055]細胞培養基之實例包括(但不限於) Luria-Bertani (LB) 肉汁培養基、Dulbecco 氏改質的 Eagle 培養基 (DMEM)、羅斯維公園紀念研究所培養基 (Roswell Park Memorial Institute medium, RPMI)、MRS培養基、胎牛血清 (FBS)、M199培養基、Ham氏培養基、F12培養基及 Williams 培養基。

[0056]該組成物可為一含有濃度為從0.1 mg/mL至100 mg/mL、更佳地從1 mg/mL至20 mg/mL之硫酸多醣的溶液。舉例而言，該組成物可為一水性硫酸葡聚糖鈉溶液，其中硫酸葡聚糖鈉之濃度為10 mg/mL。

[0057]另外，該包含多價陰離子性材料或其鹽之組成物可為一包含一或多種硫酸多醣之抗凝集劑。舉例而言，抗凝集劑可包含硫酸葡聚糖。當在本文中使用时，抗凝集劑一詞係指減少細胞凝集/聚集之試劑。

[0058]如本文中所討論的，聚合膜之解離可包括任何適合的方法，其包括：

- 提供一聚合膜；及
- 藉由對該聚合膜添加一包含無毒多價陰離子性材料之組成物來解離該聚合膜。

[0059]在某些實例中，聚合膜可置放於「介質」中。如本文所描述，「介質」係指任何適合的液體、凝膠或氣體，其能夠儲存聚合膜，而不損害該聚合膜之完整性或化學結

構。該聚合膜可在其被解離之前儲存在介質中。介質之實例包括，但不限於：細胞培養基、生理緩衝溶液、溶劑或其等之任何組合。典型的細胞培養基可包括，但不限於：Luria-Bertani (LB)肉汁培養基、Dulbecco氏改質的Eagle培養基(DMEM)、洛斯維公園紀念研究所培養基(RPMI)、MRS培養基、胎牛血清(FBS)、M199培養基、Ham氏培養基、F12培養基及Williams培養基。舉例而言，細胞培養基為補充有10%胎牛血清(FBS)之標準Dulbecco氏改質的Eagle培養基(DMEM)。

[0060]當該介質為一液體介質時，無毒多價陰離子性材料可被添加至該液體介質中以提供在液體介質中為從0.01 mg/mL至30 mg/mL之無毒多價陰離子性材料之濃度。特定而言，在液體介質中的無毒多價陰離子性材料之濃度可為從0.1 mg/mL至25 mg/mL、1 mg/mL至20 mg/mL，或5 mg/mL至10 mg/mL。舉例而言，當多價陰離子性材料為硫酸葡聚糖鈉鹽且該介質為一補充有10%胎牛血清(FBS)之標準Dulbecco氏改質的Eagle培養基(DMEM)時，在該補充有10%胎牛血清(FBS)之標準Dulbecco氏改質的Eagle培養基(DMEM)中的硫酸葡聚糖鈉鹽之濃度可為20 mg/mL。

[0061]當聚合膜用於囊封細胞時，該聚合膜可藉由添加一包含無毒多價陰離子性材料之組成物來解離，以將細胞釋放至介質中。將細胞釋放至介質中提供一「細胞釋放介質」。因此，如本文所描述，「細胞釋放介質」係指任何包含該聚合膜(經解離或未經解離)及無毒多價陰離子性材料

的介質。

[0062]細胞可被保持在該細胞釋放介質中歷時從1分鐘至24小時(例如16小時)、10分鐘至1.5小時，或從15分鐘至75分鐘。

[0063]因此，該包含無毒多價陰離子性材料之組成物可能能夠釋放經囊封之細胞而不對經釋放之細胞造成任何顯著損傷。此係藉由下文之細胞生存力研究來例示說明。經釋放之細胞(亦即未經囊封之細胞)可隨後用於進一步後續加工。

[0064]當前解離聚合膜之方法可用於，但不限於：大規模醫藥級製造、生物醫學應用、醫藥營養品應用、益生菌、化妝品應用、農業及環境應用。

實驗

材料及方法

硫酸葡聚糖儲備溶液之製備

[0065]將購自Sigma Aldrich (目錄編號#31404)之硫酸葡聚糖5000 MW添加至超純水中以提供具有100 mg/mL之濃度的硫酸葡聚糖儲備溶液。硫酸葡聚糖溶液經由0.2 μm 過濾器在無菌條件下過濾且保持為一無菌儲備溶液。作為替代方案，亦使用含有大約100 mg/mL的硫酸葡聚糖之Gibco抗凝集劑(ACA，目錄編號#0010057AE)。

細胞生存力及細胞培養基

[0066]細胞生存力係使用來自Lifetech之PrestobluTM(目錄編號A-13262)分析。在以下實驗期間所用的細胞為

HEK293細胞且用於細胞培養之培養基為補充有10%胎牛血清(FBS)之標準Dulbecco氏改質的Eagle培養基(DMEM)。

膠囊解離實驗

[0067]將具有或不具有經囊封的細胞之100個SCS/pDADMAC膠囊置放於6井多井培養皿內的補充有10% FBS之8 mL DMEM中。將硫酸葡聚糖儲備溶液或ACA (在20 mg/mL與1 mg/mL稀釋度之間)之等分試樣直接添加至含有SCS/pDADMAC膠囊之細胞培養基中，以提供一膠囊解離溶液。該膠囊解離溶液在CO₂培育箱中以恆定水平攪動在37°C下培育直至膠囊材料被解離，由此將經囊封之細胞釋放至細胞培養基中。解離膠囊所耗費之時間係藉由顯微法視覺追蹤且記錄(參見圖1及表1)。

[0068]使用相同條件將膠囊解離實驗重複若干次。所顯示的是，該等實驗可一致地且可靠地被複製。

細胞生存力實驗

[0069]將自100個經溶解之膠囊所釋放(使用上文對於膠囊解離實驗所描述之方法)的細胞球粒化且使其再懸浮於細胞培養基中。十分之一的懸浮液，等同於10個膠囊量之細胞(大致 1×10^5 個HEK293細胞)，隨後用於PrestobluTM細胞生存力分析。

[0070]將使用如上文描述之方法所獲得的懸浮細胞置放於在細胞培養基中之96-井微量培養盤內且以硫酸葡聚糖儲備溶液或ACA補充至一介於1 mg/mL與20 mg/mL之間的工作濃度。細胞在37°C下於CO₂培育箱中培育歷時1小時

及2小時且接著隨後使用Prestoblu[®]來分析細胞生存力。

結果

時間-依賴性膠囊解離研究

[0071] 進行膠囊解離之時間-依賴性研究。膠囊解離係使用在上文提供的膠囊解離實驗中所描述之方法來執行。時間-依賴性研究之結果參照圖1及圖2以及表1而被討論如下。

[0072] 圖1之顯微影像(40倍放大率)例示說明硫酸葡聚糖儲備溶液(10倍稀釋度，10 mg/mL)隨時間推移對膠囊完整性之作用。

[0073] 在圖1中，左圖顯示在添加硫酸葡聚糖之前的膠囊。中間圖顯示緊接著在添加硫酸葡聚糖儲備溶液之後，膠囊開始起皺且膠囊膜開始失去完整性。右圖例示說明在添加硫酸葡聚糖儲備溶液後30分鐘，膠囊已完全解離且細胞之凝塊保留。隨時間推移，該膠囊被觀測到解離成愈來愈小的碎片。

[0074] 圖2為例示說明一膠囊解離之顯微影像(150倍放大率)。該膠囊係使用在4 mg/mL下之硫酸葡聚糖儲備溶液而被解離，且其顯示在添加硫酸葡聚糖儲備溶液15分鐘內起皺且失去其膜完整性。可見到HEK293細胞之叢集自膠囊釋放至外部環境中(該影像之右上方角落)。

[0075] 表1例示說明膠囊在不同濃度之硫酸葡聚糖或ACA下完全解離所耗費之時間。膠囊係以具有不同濃度(10 mg/mL、5 mg/mL及1 mg/mL)之硫酸葡聚糖儲備溶液及具有

不同稀釋度(20倍、40倍及80倍稀釋度，分別具有5 mg/mL、2.5 mg/mL及1.25 mg/mL之硫酸葡聚糖濃度)之ACA溶液來培育。該等膠囊隨後藉由顯微法(40倍放大率)每15分鐘來觀測，且在當無膠囊材料可在顯微鏡下可見之時間下，判斷膠囊之完全解離已發生(例如，如圖1右圖中所示)。參考表1，對於膠囊之完全解離給予一個勾號，而對於少於膠囊之完全解離的任何情況給予一個叉號。

完全膠囊解離之時間(分鐘)	硫酸葡聚糖溶液(10 mg/mL)	硫酸葡聚糖溶液(5 mg/mL)	抗凝集劑溶液(20倍稀釋度，5 mg/mL)	抗凝集劑溶液(40倍稀釋度，2.5 mg/mL)	抗凝集劑溶液(80倍稀釋度，1.25 mg/mL)	硫酸葡聚糖溶液(1 mg/mL)
0	X	X	X	X	X	X
15	✓	X	X	X	X	X
30	✓	✓	✓	X	X	X
45	✓	✓	✓	✓	X	X
60	✓	✓	✓	✓	✓	X
75	✓	✓	✓	✓	✓	✓

[0076]如自表1可見，在硫酸葡聚糖濃度與膠囊完全解離所耗費的時間之間存在正相關。在硫酸葡聚糖溶液介於1 mg/mL與10 mg/mL之間的濃度下，完全膠囊解離可在15分鐘與75分鐘之間獲得。具有20倍稀釋度之ACA溶液完全解離膠囊所耗費的時間對應於具有5 mg/mL濃度之硫酸葡聚糖溶液完全解離膠囊所耗費的時間。此與ACA溶液在稀釋之前具有100 mg/mL之硫酸葡聚糖濃度相一致。

[0077]膠囊解離之程度視添加至膠囊之硫酸葡聚糖數量而定，同時解離速率受硫酸葡聚糖溶液之濃度、溫度及攪動影響。

[0078]在時間-依賴性研究期間自膠囊所釋放之細胞被

回收且可用於進一步加工。

細胞生存力分析

[0079]細胞生存力分析被進行以研究硫酸葡聚糖對該等細胞之生存力的作用。細胞生存力分析係使用對於上文細胞生存力實驗所描述之方法來進行，且結果可見例示說明於圖3中。

[0080]圖3例示說明在以具有不同濃度(亦即0 mg/mL至20 mg/mL)之硫酸葡聚糖溶液來培育細胞時，隨時間推移所觀測(使用Prestoblue™)到之HEK 293細胞生存力。

[0081]如由圖3所示，即使相對高的硫酸葡聚糖溶液濃度對於HEK293細胞之生存力具有極小作用。當以濃度為10 mg/mL之硫酸葡聚糖溶液來培育細胞歷時高達2小時之時，未觀測到細胞生存力之顯著下降。在20 mg/mL下觀測到細胞生存力輕微下降至77%，然而，在第1小時與第2小時之間生存力增加至88.1%，其表明細胞可快速恢復。

[0082]圖4及圖5例示說明在以不同濃度(亦即0 mg/mL至50 mg/mL)之硫酸葡聚糖溶液來培育細胞時，在15分鐘時所觀測(使用Prestoblue™)到之HEK 293細胞生存力。如由圖4及圖5所示，即使在較高硫酸葡聚糖濃度(50 mg/mL)下，細胞生存力仍未顯著降低。

參考文獻

[0083]

1. Bioencapsulation of Living Cells for Diverse Medical Applications. E-Book. Editors: Brandtner EM,

- Dangerfield JA. Bentham Science Publishers; 2013. 184 p.
2. Lohr M, Bago ZT, Bergmeister H, Ceijna M, Freund M, Gelbmann W, et al. Cell therapy using microencapsulated 293 cells transfected with a gene construct expressing CYP2B1, an ifosfamide converting enzyme, instilled intra-arterially in patients with advanced-stage pancreatic carcinoma: a phase I/II study. *J Mol Med.* 1999;77(4):393-8.
 3. Lohr M, Hoffmeyer A, Kroger J, Freund M, Hain J, Holle A, et al. Microencapsulated cell-mediated treatment of inoperable pancreatic carcinoma. *Lancet.* 2001;357(9268):1591-2.
 4. Lohr M, Kroger JC, Hoffmeyer A, Freund M, Hain J, Holle A, et al. Safety, feasibility and clinical benefit of localized chemotherapy using microencapsulated cells for inoperable pancreatic carcinoma in a phase I/II trial. *Cancer Therapy.* 2003;1:121-31.
 5. Hauser O, Prieschl-Grassauer E, Salmons B. Encapsulated, genetically modified cells producing in vivo therapeutics. *Current opinion in molecular therapeutics.* 2004;6(4):412-20. Epub 2004/10/08.
 6. Schaffellner S, Stadlbauer V, Stiegler P, Hauser O, Halwachs G, Lackner C, et al. Porcine islet cells microencapsulated in sodium cellulose sulfate.

- Transplantation proceedings. 2005;37(1):248-52. Epub 2005/04/06.
7. Stadlbauer V, Stiegler PB, Schaffellner S, Hauser O, Halwachs G, Iberer F, et al. Morphological and functional characterization of a pancreatic beta-cell line microencapsulated in sodium cellulose sulfate/poly(diallyldimethylammonium chloride). Xenotransplantation. 2006;13(4):337-44. Epub 2006/06/14.
 8. Pelegrin M, Marin M, Oates A, Noel D, Saller R, Salmons B, et al. Immunotherapy of a viral disease by in vivo production of therapeutic monoclonal antibodies. Human gene therapy. 2000;11(10):1407-15. Epub 2000/07/26.
 9. Salmons B, Hauser O, Gunzburg WH, Tabotta W. GMP production of an encapsulated cell therapy product: issues and considerations. BioProcessing. 2007;6(2):37-44.
 10. Dangerfield JA, Salmons B, Randolph C, Abastado J-P, Sinden J, Gunzburg WH, et al. The Diversity of Uses for Cellulose Sulfate Encapsulation. Chapter 3 in E-Book: Brandtner EM and Dangerfield, J.A., Eds.. Bioencapsulation of Living Cells for Diverse Medical Applications. Bentham Science Publishers; 2013. p. 70-92.
 11. Gunzburg WH, Salmons B. Stem cell therapies: on track

but suffer setback. Current opinion in molecular
therapeutics. 2009;11(4):360-3. Epub 2009/08/04.

【符號說明】

(無)

申請專利範圍

1. 一種包含無毒多價陰離子性材料或其鹽之組成物用於解離一聚合膜的用途，其中該無毒多價陰離子性材料為硫酸多醣或其鹽，其限制條件為該硫酸多醣不為糖胺聚醣。
2. 如請求項1之用途，其中該聚合膜係呈一囊封一物質之膠囊的形式或呈一阻斷一物質自由運動之障壁的形式。
3. 如請求項1之用途，其中該聚合膜包含纖維素硫酸鈉及聚二烯丙基二甲基氯化銨(pDADMAC)。
4. 如請求項2之用途，其中該物質係選自由以下各者組成之群中之一或多者：細胞、蛋白質、生物相容粒子及化合物。
5. 如請求項1之用途，其中該多價陰離子性材料或其鹽具有一從4,000至20,000道爾頓之數目平均分子量。
6. 如請求項1之用途，其中該硫酸多醣之各醣單元含有1至3個硫酸根基團。
7. 如請求項6之用途，其中該硫酸多醣為由以下各者組成之群中之一或多者：具有一從4,000至20,000道爾頓之數目平均分子量的硫酸葡聚糖與硫酸纖維素及其等之鹽。
8. 如請求項1之用途，其中該組成物為一包含硫酸葡聚糖之抗凝集劑。
9. 如請求項1之用途，其中該組成物含有濃度為0.1 mg/mL至100 mg/mL之硫酸多醣。

10. 一種解離一聚合膜之方法，該方法包含以下步驟：
 - (a) 提供一聚合膜；及
 - (b) 藉由對該聚合膜添加一包含無毒多價陰離子性材料之組成物來解離該聚合膜，
其中該無毒多價陰離子性材料為硫酸多醣或其鹽，其限制條件為該硫酸多醣不為糖胺聚醣。
11. 如請求項10之方法，其中該聚合膜在步驟(a)中被置放於液體介質中。
12. 如請求項10之方法，其中該聚合膜係呈一囊封多個細胞之膠囊的形式，其中將細胞保持在一細胞釋放介質中歷時從1分鐘至75分鐘。
13. 如請求項10之方法，其中該多價陰離子性材料或其鹽具有從4,000至20,000道爾頓之數目平均分子量。
14. 如請求項10之方法，其中：
 - (a) 該硫酸多醣之各個醣單元含有從1至3個硫酸根基團；及/或
 - (b) 該硫酸多醣為由以下各者組成之群中之一或多者：具有從4,000至20,000道爾頓之數目平均分子量的硫酸纖維素與硫酸葡聚糖及其等之鹽。

圖式

1/3

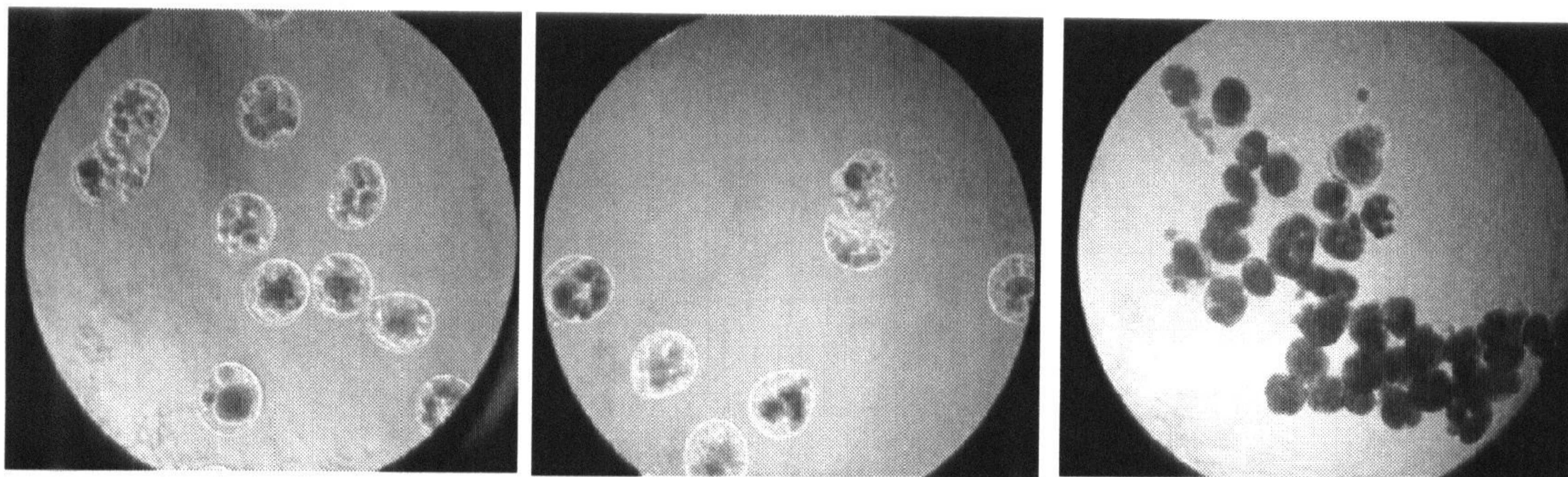


圖1

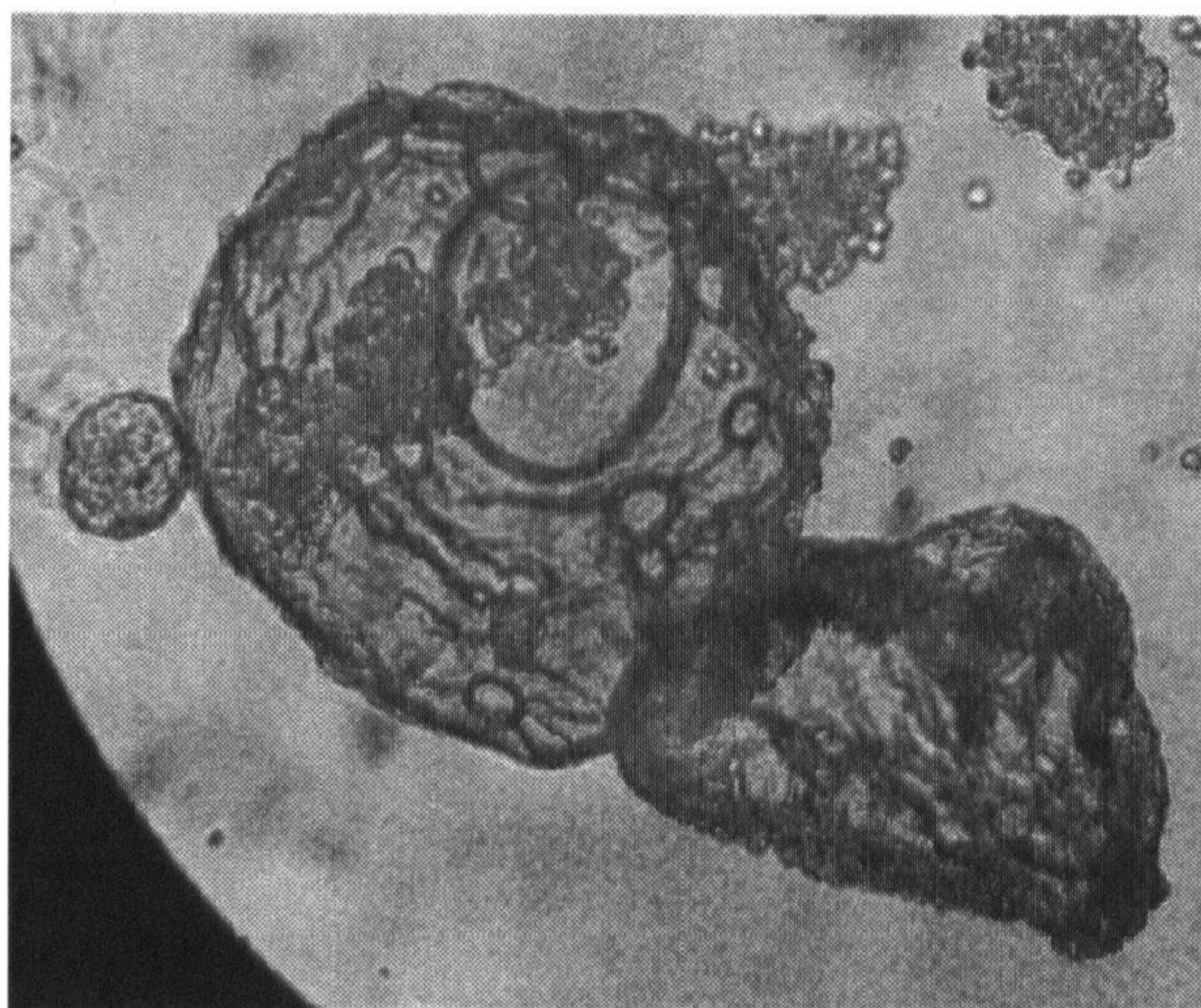


圖2

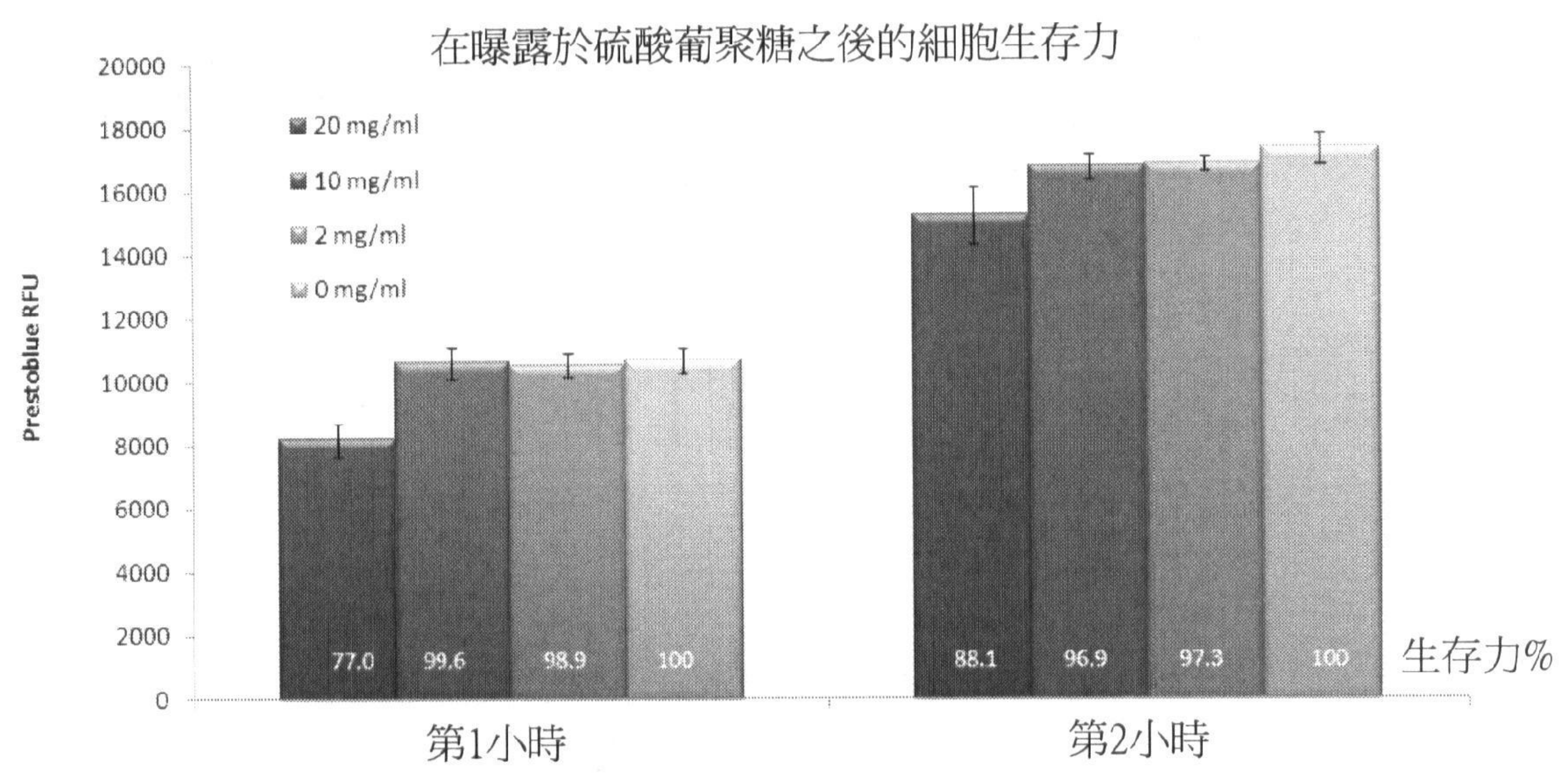


圖3

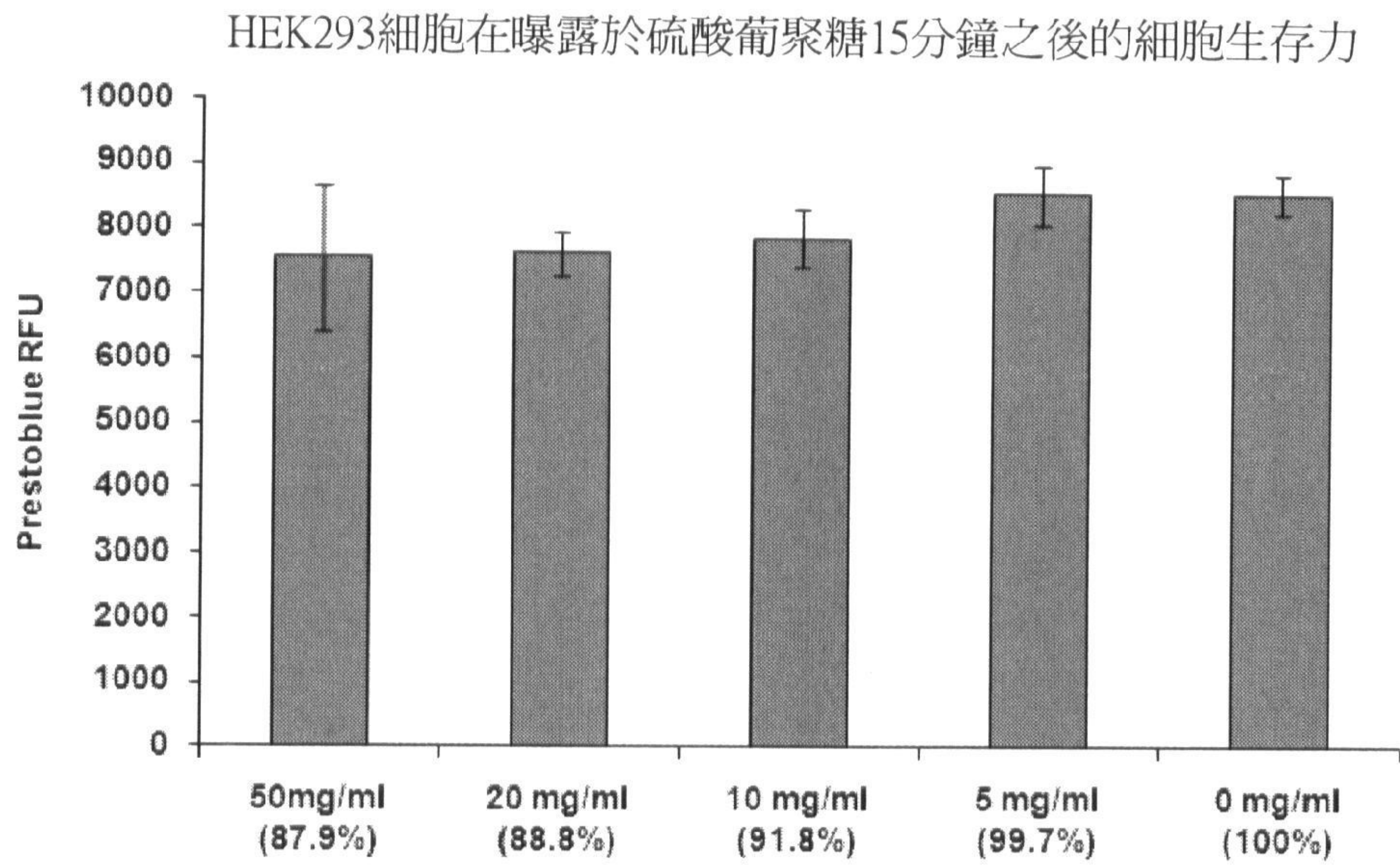


圖4

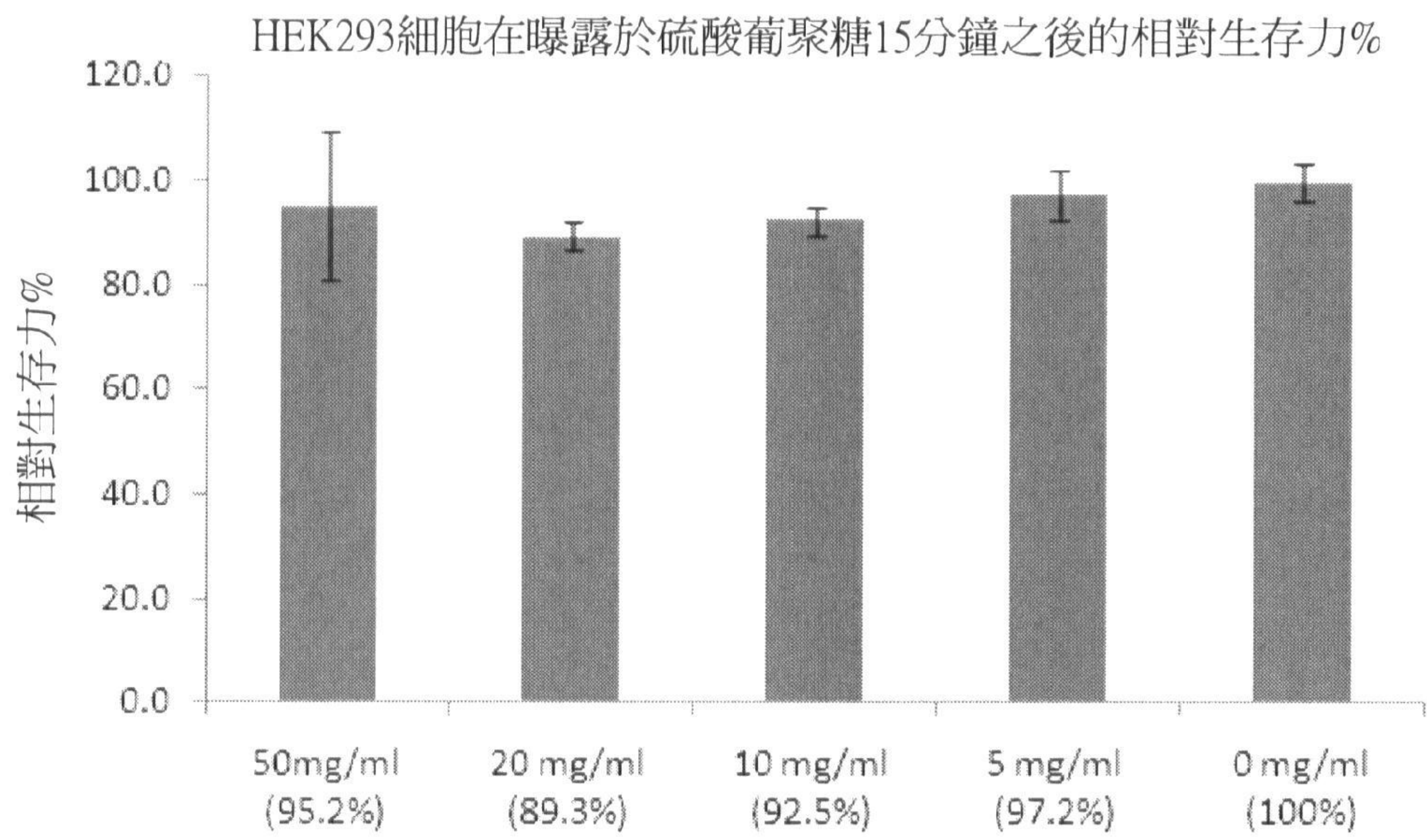


圖5