



(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 I856287 B

(45)公告日：中華民國 113 (2024) 年 09 月 21 日

(21)申請案號：111105058

(22)申請日：中華民國 111 (2022) 年 02 月 11 日

(51)Int. Cl. : C08J3/24 (2006.01) C08L1/00 (2006.01)
C08L5/00 (2006.01) C12N5/02 (2006.01)
C12N5/07 (2010.01)

(71)申請人：國立臺灣科技大學 (中華民國) NATIONAL TAIWAN UNIVERSITY OF SCIENCE
AND TECHNOLOGY (TW)

臺北市大安區基隆路四段 43 號

(72)發明人：蔡協致 TSAI, HSIEH-CHIH (TW)；林宣因 LIN, SHUIAN-YIN (TW)；楊銘乾
YANG, MING-CHIEN (TW)；黃俊強 HUANG, CHUN-CHIANG (TW)；林佑琰
LIN, YU-HSUAN (TW)

(74)代理人：李世章；秦建譜

(56)參考文獻：

CN 1423659A

CN 100341899C

CN 102743768B

CN 111315870A

審查人員：呂易理

申請專利範圍項數：15 項 圖式數：27 共 82 頁

(54)名稱

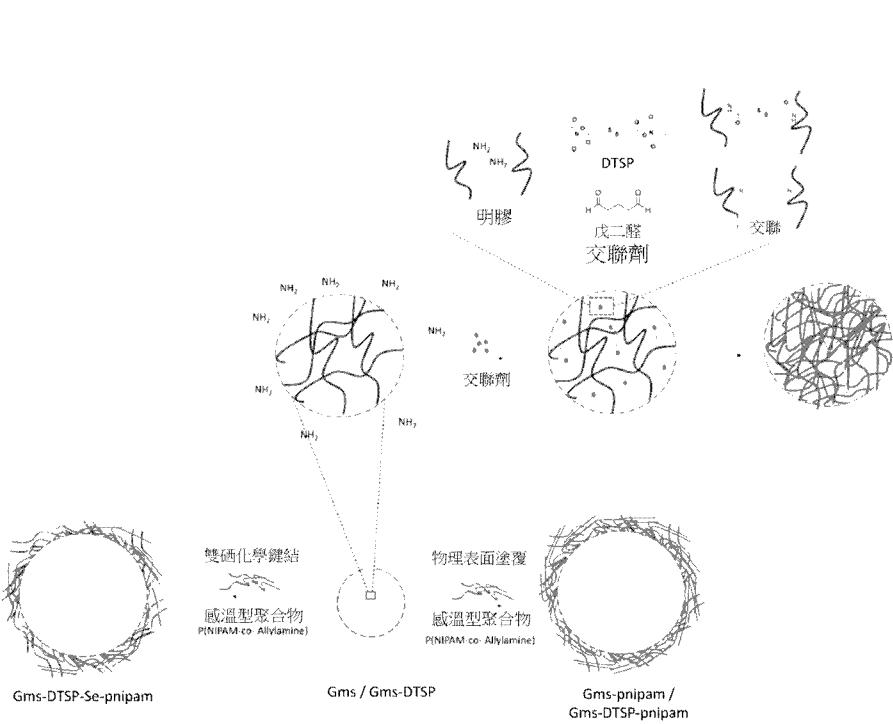
可溶解感溫型的微載體、其製備方法及其使用方法

(57)摘要

本揭露提供一種可溶解感溫型的微載體，包括溶解型聚合物以及感溫型聚合物包覆溶解型聚合物，溶解型聚合物以交聯劑將複數溶解型單體彼此鍵結。本揭露之可溶解還原型的微載體，有助於細胞的貼附，使用還原劑可易於細胞的脫附。

The present disclosure provides a soluble and thermosensitive microcarrier, including soluble polymer and a thermosensitive polymer covering the soluble polymer, wherein the soluble polymer is formed by a plurality of soluble monomers binding to each other with a crosslinking agent. The soluble and reducible microcarrier of present disclosure facilitates the attachment of cells, and the use of reducing agents can facilitate the detachment of cells.

指定代表圖：



第1圖



I856287

【發明摘要】

【中文發明名稱】可溶解感溫型的微載體、其製備方法及其使用方法

【英文發明名稱】 SOLUBLE AND THERMOSENSITIVE MICROCARRIER,
METHOD FOR MANUFACTURING AND METHOD OF USE THEREOF

【中文】

本揭露提供一種可溶解感溫型的微載體，包括溶解型聚合物以及感溫型聚合物包覆溶解型聚合物，溶解型聚合物以交聯劑將複數溶解型單體彼此鍵結。本揭露之可溶解還原型的微載體，有助於細胞的貼附，使用還原劑可易於細胞的脫附。

【英文】

The present disclosure provides a soluble and thermosensitive microcarrier, including soluble polymer and a thermosensitive polymer covering the soluble polymer, wherein the soluble polymer is formed by a plurality of soluble monomers binding to each other with a crosslinking agent. The soluble and reducible microcarrier of present disclosure facilitates the attachment of cells, and the use of reducing agents can facilitate the detachment of cells.

【指定代表圖】第(1)圖。

【代表圖之符號簡單說明】

無

【特徵化學式】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】可溶解感溫型的微載體、其製備方法及其使用方法

【英文發明名稱】 SOLUBLE AND THERMOSENSITIVE MICROCARRIER,
METHOD FOR MANUFACTURING AND METHOD OF USE THEREOF

【技術領域】

【0001】 本揭露是有關於一種微載體、其製備方法及其使用方法，特別是關於一種可溶解感溫型的微載體、其製備方法及其使用方法。

【先前技術】

【0002】 微載體被認為是實現高密度幹細胞擴增、並用於再生醫學的最佳技術。微載體的直徑通常為 100 微米 (μm) 至 400 微米，可提供高表面積以利細胞擴增。傳統的微載體設計以高細胞附著和增殖率為目標，然而，由於細胞回收率低，使得細胞製造過程變得艱難。由此可知，以微載體培養細胞時，在細胞收集步驟的技術上是具有挑戰性的。

【0003】 最近，康寧公司 (Corning[®]) 開發了一種可溶解的微載體，它與鈣離子交聯，表面塗有 Synthemax[®] II 基質。可溶解微載體的細胞收穫可以通過添加入乙二胺四乙酸 (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)、果膠酶 (pectinase) 和胰蛋白酶 (trypsin) 來達成。

【0004】 此外，使用非酶解法可避免細胞損壞及免疫型態改變。其中，溫度誘導脫附屬於非侵入性行為，將溫度敏感性材料表面接枝在培養皿上或是改質在微載體表面上。當溫度高於最低臨界溶液溫度(lower critical solution temperature, LCST)時，為疏水特性可吸附細胞；當調控溫度低於 LCST 時，會由疏水轉變成親水及無規則的捲曲現象，使細胞脫附。熱誘導已用於二維細胞培養，使用敏感性材料包括普朗尼克(pluronic)、甲基纖維素(MC)及 poly(N-isopropylacrylamide)(PNIPAM)。然而，這種脫附方法比酶脫附方法耗時或低效率。

【0005】 因此，基於上述缺點，現有技術實有待改善的必要。

【發明內容】

【0006】 本揭露之一實施方式提供了一種可溶解感溫型的微載體，包含溶解型聚合物，溶解型聚合物以交聯劑將複數溶解型單體彼此鍵結；以及感溫型聚合物包覆溶解型聚合物。

【0007】 在一些實施方式中，交聯劑包含零長度交聯劑與非零長度交聯劑。

【0008】 在一些實施方式中，零長度交聯劑包含碳二亞胺(carbodiimide, EDC)、N,N'-二環己基碳二亞胺(N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide DCC)、或其組合。

【0009】 在一些實施方式中，非零長度交聯劑包含甲醛 (formaldehyde)、戊二醛 (glutaraldehyde)、丙烯醯胺 (acrylamides)、異氰酸酯 (isocyanate)、梔子素 (genipin)、DTSP (3,3'-dithiodipropionic acid di (N-hydroxysuccinimide ester))、DSeDPA-NHS (3,3'-diselanediyldi-propanoic acid-N-hydroxysuccinimide)、BSSS (bis (sulfosuccinimidyl) suberate, BS3)、DSG (disuccinimidyl glutarate)、sulfo-EGS (ethylene glycolbis (sulfosuccinimidylsuccinate))、DSS (disuccinimidyl suberateS)、EGS (ethylene glycolbis (succinimidylsuccinate))、BS2G (bis (sulfosuccinimidyl) glutarate)、DTSSP (3,3'-dithiobis (sulfosuccinimidylpropionate))、DST (disuccinimidyl tartrate)、BSOCOES (bis (2-(succinimidooxycarbonyloxy) ethyl) sulfone)、DPDPB (1,4-di-(3'-(2'pyridylditio)-propionamido) butane)、sulfo DST (sulfodisuccinimidyl tartrate)、或 DSP (dithiobis (succinimidyl propionate))。

【0010】 在一些實施方式中，溶解型聚合物包含纖維素、膠原蛋白、明膠、海藻酸鈉、殼聚糖、玻尿酸、果酸或其組合。

【0011】 在一些實施方式中，感溫型聚合物包含聚(N-異丙基 丙 烯 醯 胺)(poly(N-isopropylacrylamide)，PNIPAM、PNIPA、PNIPAAm、NIPA、或 PNIPAA)、聚(N,N-二 乙 基 丙 烯 醯 胺)(poly(N,Ndiethylacrylamide)，PDEAM)、聚(N-乙 烯 基 己 內 醯 胺)(poly(N-vinylcaprolactam)，PVCL)、聚(2-異 丙 基 -2-惡 唑 啉)(poly(2-isopropyl-2-oxazoline)，PIOZ)、泊 咯 沙 姆(poloxamer)、或其組合。

【0012】 在一些實施方式中，感溫型聚合物更包含丙烯酸(acrylic acid，AAC)、丙烯胺(allylamine，ALA)、丙烯醯胺(acrylamide，AAm)、[2-(甲基 丙 烯 醯 基 氧 基)乙 基]二 甲 基 -(3-磺 酸 丙 基)氫 氧 化 鉍([2-(Methacryloyloxy)ethyl]dimethyl-(3-sulfo propyl)ammonium hydroxide，DMAPS)、甲基 丙 烯 酸 二 乙 氨 基 乙 酯(2-(Diethylamino)ethyl methacrylate，DEAEMA)、甲基 丙 烯 酸 羥 乙 酯(2-Hydroxyethyl methacrylate，HEMA)或其組合。

【0013】 在一些實施方式中，感溫型聚合物為聚(N-異丙基 丙 烯 醯 胺-co-丙 烯 胺)(P(NIPAM-co-ALA))或其組合。

【0014】 在一些實施方式中，丙烯胺佔該聚(N-異丙基 丙 烯 醯 胺-co-丙 烯 胺)的重量百分比為 1% 至 15%。

【0015】 在一些實施方式中，感溫型聚合物以該交聯劑鍵結

於該溶解型聚合物之外。

【0016】 在一些實施方式中，感溫型聚合物以物理性結合於該溶解型聚合物之外。

【0017】 本揭露之一實施方式另提供一種製備可溶解感溫型的微載體之方法，包含以下步驟：提供溶解型聚合物；將溶解型聚合物與交聯劑進行混合製程，當溶解型聚合物與交聯劑接觸時會進行交聯，獲得可溶解型的微載體；提供感溫型聚合物；以及混合可溶解型的微載體與感溫型聚合物，獲得可溶解感溫型的微載體。

【0018】 在一些實施方式中，溶解型聚合物包含纖維素、膠原蛋白、明膠、海藻酸鈉、殼聚醣、玻尿酸、果酸或其組合。

【0019】 在一些實施方式中，混合製程包含微流道、滴定、靜電紡絲、乳化交聯、薄膜乳化或其組合。

【0020】 在一些實施方式中，提供該感溫型聚合物的步驟，包含：以自由基聚合方法聚合溫度敏感高分子與親水性單體，獲得感溫型聚合物。

【0021】 在一些實施方式中，溫度敏感高分子包含聚(N-異丙基丙烯醯胺)(poly(N-isopropylacrylamide))、聚(N,N-二乙基丙烯醯胺)(poly(N,Ndiethylacrylamide)，PDEAAM)、聚(N-乙烯基己內醯胺)(poly(N-vinylcaprolactam)，PVCL)、聚(2-異丙基-2-惡唑啉)(poly(2-isopropyl-2-oxazoline)，PIOZ)、泊咯

沙姆 (poloxamer)、或其組合。

【0022】 在一些實施方式中，親水性單體包含丙烯酸 (acrylic acid, AAC)、丙烯胺 (allylamine, ALA)、丙烯醯胺 (acrylamide, AAm)、[2-(甲基丙烯醯基氧基)乙基]二甲基-(3-磺酸丙基)氫氧化銨 ([2-(Methacryloyloxy)ethyl]dimethyl-(3-sulfo propyl)ammonium hydroxide, DMAPS)、甲基丙烯酸二乙氨基乙酯 (2-(Diethylamino)ethyl methacrylate, DEAEMA)、甲基丙烯酸羥乙酯 (2-Hydroxyethyl methacrylate, HEMA) 或其組合。

【0023】 在一些實施方式中，方法更包含：提供還原型交聯劑；以及混合可溶解型的微載體、還原型交聯劑與感溫型聚合物，獲得可溶解感溫型的微載體，其中，感溫型聚合物以還原型交聯劑鍵結於溶解型聚合物之外。

【0024】 本揭露之一實施方式另提供一種如前述之可溶解感溫型的微載體的使用方法，當可溶解感溫型的微載體接觸還原劑、接觸較低臨界溶液溫度 (lower critical solution temperature, LCST)、先接觸還原劑再接觸較低臨界溶液溫度、或先接觸較低臨界溶液溫度再接觸還原劑時，則可溶解感溫型的微載體進行瓦解。

【0025】 在一些實施方式中，還原劑包含二硫蘇糖醇 (dithiothreitol, DTT)、 β -巯基乙醇 (β -mercaptoethanol)、穀胱甘肽 (Glutathione, GSH)、半胱胺酸 (cysteine)、2-巯基乙醇

β -mercaptoethanol (β -ME)、三(2-羧乙基)膦 Tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) 或其組合。

【圖式簡單說明】

【0026】 當結合附圖閱讀以下詳細描述時，本揭露的各種態樣將最易於理解。應注意的是，根據行業標準操作規程，各種特徵結構可能並非按比例繪製。事實上，為了論述之清晰性，可以任意地增大或減小各種特徵結構之尺寸。為讓本揭露之上述和其他目的、特徵、優點與實施例能更明顯易懂，所附圖式之說明如下：

第 1 圖繪示本揭露之一實施方式之微載體製備示意圖。

第 2 圖繪示本揭露之一實施方式之感溫型聚合物的 ^1H -NMR 光譜圖。

第 3 圖繪示本揭露之一實施方式之不同 ALA 比例之感溫型聚合物於不同溫度下之最低臨界的折線圖。

第 4 圖繪示本揭露之一實施方式之不同 ALA 比例之感溫型聚合物於不同溫度下之水接觸角的柱狀圖。

第 5 圖繪示本揭露之一實施方式之 DSeDPA 雙硒鍵交聯劑的 ^1H -NMR 光譜圖。

第 6 圖繪示本揭露之一實施方式之 DSeDPA-NHS 雙硒鍵交聯劑的 ^1H -NMR 光譜圖。

第 7 圖繪示本揭露之一實施方式之雙硒鍵交聯劑之拉

曼光譜圖。

第 8 圖繪示本揭露之一實施方式之雙硫鍵交聯劑之傅立葉轉換紅外線光譜 (Fourier-transform infrared spectroscopy, FT-IR) 光譜圖

第 9 圖繪示本揭露之一實施方式之多種可溶解型的微球之拉曼光譜圖。

第 10 圖繪示本揭露之一實施方式之多種可溶解還原型的微球之拉曼光譜圖。

第 11 圖繪示本揭露之一實施方式之交聯前後可溶解型的微球 (Gms) 之傅立葉轉換紅外線光譜圖。

第 12 圖繪示本揭露之一實施方式之多種可溶解型的微球之傅立葉轉換紅外線光譜圖。

第 13 圖繪示本揭露之一實施方式之多種可溶解還原型的微球之傅立葉轉換紅外線光譜圖。

第 14 a 圖至第 14 i 圖繪示本揭露之一實施方式之多種微球的掃描電子顯微鏡 (scanning electron microscope, SEM) 的影像圖；比例尺皆為 100 微米 (μm)，第 14 a、b、c、d、h、i 圖為 SEI 15.0 kV、150 倍、WD 11.4~12.2，第 14 d、e、f 圖為 SEI 5.0 kV 50 倍、WD 10.6~11.7。

第 15 圖繪示本揭露之一實施方式之不同交聯劑濃度之可溶解還原型微球 (Gms-DTSP) 膨潤後之粒徑折線圖。

第 16 圖繪示本揭露之一實施方式之不同微球膨潤後之膨脹率折線圖。

第 17 圖繪示本揭露之一實施方式之含 1% A L A 感溫型聚合物與犬類腎臟上皮細胞 (m a d i n - d a r b y c a n i n e k i d n e y c e l l , M D C K c e l l) 培養之細胞存活率柱狀圖 ;
n = 8 。

第 18 圖繪示本揭露之一實施方式之含 3% A L A 感溫型聚合物與犬類腎臟上皮細胞培養之細胞存活率柱狀圖 ;
n = 8 。

第 19 圖繪示本揭露之一實施方式之含 5% A L A 感溫型聚合物與犬類腎臟上皮細胞培養之細胞存活率柱狀圖 ;
n = 8 。

第 20 圖繪示本揭露之一實施方式之可溶解型與感溫型微球的細胞存活率柱狀圖。

第 21 圖繪示本揭露之一實施方式之可溶解還原型與感溫型微球的細胞存活率柱狀圖。

第 22 圖繪示本揭露之一實施方式之含不同比例 A L A 感溫型聚合物與犬類腎臟上皮細胞培養之螢光染色圖。

第 23 圖繪示本揭露之一實施方式之 M D C K 細胞於可溶解型與感溫型微球的之貼附率折線圖。

第 24 圖繪示本揭露之一實施方式之可溶解還原型與感溫型微球以 G S H 瓦解時的影像圖 ; 比例尺為 100 微米。

第 25 圖繪示本揭露之一實施方式之可溶解還原型與感溫型微球以 L - 半胱胺酸瓦解時的影像圖 ; 比例尺為 100 微米。

第 26 圖繪示本揭露之一實施方式之可溶解還原型與感

溫型微球以 D T T 瓦解時的影像圖；比例尺為 100 微米。

第 27 圖繪示本揭露之一實施方式之 M D C K 細胞於可溶解還原型與感溫型微球的之貼附率折線圖。

【實施方式】

【0027】 為使本揭露的敘述更加詳盡與完備，下文針對本揭露的實施態樣與具體實施例提出說明性的描述，但這並非實施或運用本揭露具體實施例的唯一形式。以下所揭露的各實施例，在有益的情形下可相互組合或取代，也可在一實施例中附加其他的實施例，而無須進一步的記載或說明。在以下描述中，將詳細敘述許多特定細節，以使讀者能夠充分理解以下的實施例。然而，亦可在無此等特定細節之情況下實踐本揭露之實施例。

【0028】 另外，空間相對用語，如「下」、「上」等，是用以方便描述一元件或特徵與其他元件或特徵在圖式中的相對關係。這些空間相對用語旨在包含除了圖式中所示之方位以外，裝置在使用或操作時的不同方位。裝置可被另外定位（例如旋轉 90 度或其他方位），而本文所使用的空間相對敘述亦可相對應地進行解釋。

【0029】 於本文中，除非內文中對於冠詞有所特別限定，否則『一』與『該』可泛指單一個或多個。將進一步理解的是，本文中所使用之『包含』、『包括』、『具有』及相似詞彙，指明其所記載的特徵、區域、整數、步驟、操作、元件與/或組件，但不排除其所述或額外的其一個或多個其

它特徵、區域、整數、步驟、操作、元件、組件，與/或其中之群組。

【0030】 在一些實施方式中，製備可溶解還原型的微載體或可溶解型的微載體，包括將溶解型聚合物與交聯劑進行混合製程，當溶解型聚合物與交聯劑接觸時會進行交聯，獲得可溶解還原型的微載體或可溶解型的微載體。在一實施方式中，微載體可呈現包括、但不限於近似圓球形的微球。在一些實施例中，微球在乾燥狀態下的粒徑介於 100-300 微米 (μm) 小球適用於貼壁細胞生長，例如，110 微米、120 微米、140 微米、200 微米、220 微米、250 微米、280 微米、或此等值之間的任何值。在一些實施例中，微載體浸泡在培養基中膨潤後球型變完整，粒徑介於 150-400 微米，例如 160 微米、170 微米、180 微米、190 微米、200 微米、250 微米、300 微米、310 微米、320 微米、330 微米、340 微米、350 微米、370 微米、或此等值之間的任何值。

【0031】 微載體表面的電荷和親水性質影響細胞貼附行為，帶正電化學基團，例如胺基 ($-\text{NH}_2$) 比起帶負電之羧酸基 ($-\text{COOH}$) 表面有更好的細胞附著力。另外表面略微親水，比起疏水性 (水接觸角 $> 90^\circ$) 和超疏水性 (水接觸角 $> 150^\circ$) 有更好的蛋白質吸附特性。

【0032】 在一實施方式中，溶解型聚合物包含纖維素、膠原蛋白、明膠、海藻酸鈉、殼聚醣、玻尿酸、果酸或其組合。在一實施方式中，明膠由 85% 至 92% 的蛋白質、礦物鹽和

水組成，從動物皮膚、骨骼和結締組織中細胞外基質膠原蛋白中提取的水溶性混合物，具有高度生物相容性與生物降解性且無毒的大分子，由 300-4000 個胺基酸組異質單鏈和多鏈多肽構成，製作方法通過酸性水解豬肉皮得到的 A 型明膠 (pH 3.8-6.0；等電點 6-8)；鹼性動物骨骼及皮膚水解的 B 型明膠 (pH 5.0-7.4；等電點 4.7-5.3)。明膠有獨特的胺基酸序列，由三個平行的左旋 α 鏈組成，每條鏈由重複的胺基酸序列 Gly-Xaa-Yaa (Gly:甘胺酸、Xaa:脯胺酸、Yaa:羥脯胺酸)，易溶於高溫水性溶劑中冷卻後形成凝膠，溫度在最高的臨界溶液溫度 (UCST) 30-35°C 時會發生溶膠-凝膠相轉變，屬於可逆的膠凝現象。在一實施方式中，膠原蛋白為存在眾多組織細胞外基質中的主要結構蛋白，富含精胺酸-甘胺酸-天冬胺酸 (RGD) 序列，促進細胞黏附和增殖生長。

【0033】 在一實施方式中，混合將油與表面活性劑形成混合液。在一實施方式中，油包括礦物油、硬酯酸、棉子油、油醇、白蠟油或其組合。在一實施方式中，表面活性劑包括山梨糖醇單油酸脂 80、羥基化羊毛脂、聚氧乙烯山梨醇蜂蠟衍生物、丙二醇脂肪酸酯、失水山梨醇單油酸酯、丙二醇單月桂酸酯、二乙二醇單油酸酯、聚氧乙烯油醇醚、聚氧乙烯山梨醇蜂蠟衍生物、二乙二醇脂肪酸酯、二乙二醇脂肪酸酯或其組合。在一實施方式中，親水親油平衡值 (hydrophilic-lipophilic balance, HLB) 為 0 表示完全親脂性分子，而值越大表示更加親水。在一些實施例

中，明膠油包水乳化系統依據 HLB 選擇恰當的界面活性劑，介於 3 至 5，例如 3.2、3.4、3.6、3.8、4.0、4.2、4.4、4.6、4.8、或此等值之間的任何值；其中，山梨糖醇單油酸脂 80 的 HLB 為 4.3 較親油，適合在油相中分散並避免水相中的液滴合併在一起，提高了乳化液的穩定性。

【0034】 在一實施方式中，接著，將溶解型聚合物與水加熱後配置成溶解型聚合物水溶液，接著將溶解型聚合物水溶液緩慢滴入混合液中，獲得油包水(W/O)乳液(油:水 v/v 從 10:1~4:1，包括，但不限於 9:1、8:1、7:1、6:1、5:1 或此等值之間的任何值)。此處油量不可太低，避免朔型效果不佳。在一實施方式中，溶解型聚合物與水加熱使複數溶解型聚合物或其單體呈現液態，加熱溫度包括，但不限於 30°C 至 90°C，例如 40°C、50°C、60°C、70°C、80°C、或此等值之間的任何值。

【0035】 在一實施方式中，接著，將油包水乳液降溫促使微球定型冷卻後，加入交聯劑並攪拌進行交聯反應，直到微球固化。本文中，「定型」是指穩定水在油中的型態。本文中，「固化」是指水珠的型態不再改變；乳化態材料進行微量表面與特性改質，依改質特性將材料朔行型態不再改變。在一實施方式中，此處所述之將油包水乳液降溫，其溫度小於前述加熱溫度。在一實施方式中，製備可溶解還原型的微載體中，交聯劑為還原型交聯劑，還原型交聯劑與溶解型聚合物的羥基、胺基、硫醇基、或羧酸基鍵結。在一些實施例中，還原型交聯劑包含，但不限於雙硫鍵交

聯劑、或雙硫鍵交聯劑。雙硫鍵交聯劑包含，但不限於 3,3'-二硫代二丙酸二(N-羥基丁二醯亞胺酯)(DTSP)、3,3'-二硫代雙(磺酸琥珀醯亞氨基丙酸酯)(DTSSP)、肼胺酸、或二巰基二琥珀醯亞胺醯胺丙酸(DSP)。雙硫鍵交聯劑包含，但不限於 DSeDPA-NHS (3,3'-二硫代二丙酸二(N-羥基丁二醯亞胺酯)；3,3'-Dithiodipropionic acid di(N-hydroxysuccinimide ester))、3,3'-二硫代二丙酸(3,3'-diselanediyldipropionic acid)、2,2'-二硫代二乙胺(2,2'-diselanediyldibis(ethan-1-amine))、2,2'-二硫代二乙醇(2,2'-diselanediyldibis(ethan-1-ol))或其組合。在另一實施方式中，製備可溶解的微載體中，交聯劑包含零長度交聯劑與非零長度交聯劑。所謂零長度交聯劑，在催化降解型聚合物交聯完成後會被去除；零長度交聯劑包含，但不限於碳二亞胺(EDC)、N,N'-二環己基碳二亞胺(DCC)、或其組合。非零長度的交聯劑最終會被併入聚合物網絡中，交聯劑與降解型聚合物反應，在降解型聚合物之間形成共價鍵，非零長度交聯劑包含，但不限於甲醛、戊二醛、丙烯醯胺、異氰酸酯、梔子素、DTSP、DSeDPA-NHS、BSSS、DSG、sulfo-EGS、DSS、EGS、BS2G、DTSSP、DST、BSOCOES、DPDPB、sulfo DST、或 DSP。

【0036】 在一實施方式中，接著，微球固化、交聯反應完後過濾去除油相並洗滌，將微球乾燥即得到可溶解還原型的

微球 (G m s - D T S P) 或可溶解型的微球 (G m s)。在一些實施例中，交聯反應完後以抽氣過濾裝置去除油相，再用丙酮/水溶液 (v / v, 5 : 1 ~ 1 : 1，例如 4 : 1、3 : 1 或 2 : 1) 洗滌數次，最後將微球冷凍乾燥。在一些實施例中，此處丙酮/水溶液比例可以是固定或是依序遞減，在高濃度丙酮/水溶液下可快速將油去除，但不可全丙酮清洗，會破壞微球表面或形態。

【0037】 在一實施方式中，溶解型聚合物與該還原型交聯劑的重量比為 1 : 0.08 至 1 : 0.8。

【0038】 在一實施方式中，溶解型聚合物與該還原型交聯劑的重量比為 1 : 0.32 至 1 : 0.8。

【0039】 在一些實施方式中，經由元素分析儀量測，乾燥後的可溶解還原型的微球 (G m s - D T S P) 中，明膠與 D T S P 的重量比為約 99 : 1 ~ 1.86 : 1，例如約 90 : 1 ~ 2 : 1、80 : 1 ~ 2 : 1、70 : 1 ~ 2 : 1、60 : 1 ~ 2 : 1、50 : 1 ~ 2 : 1、40 : 1 ~ 2 : 1、30 : 1 ~ 2 : 1、20 : 1 ~ 2 : 1、10 : 1 ~ 2 : 1、7 : 1 ~ 2 : 1、5.67 : 1 ~ 1.86 : 1、5 : 1 ~ 1.86 : 1、4 : 1 ~ 1.86 : 1、3 : 1 ~ 1.86 : 1、或者此等值中任意兩者之間的任何值。

【0040】 在一些實施方式中，製備感溫型聚合物包括：通過自由基聚合方法聚合溫度敏感高分子與親水性單體，獲得感溫型聚合物。在一實施方式中，溫度敏感高分子包含，但不限於聚 (N - 異丙基丙烯醯胺)、聚 (N, N - 二乙基丙烯醯胺) (poly (P D E A A M))、聚 (N - 乙基己內醯胺 (P V C L))、聚 (2 - 異丙基 - 2 - 惡唑啉) (P I O Z)、泊咯沙姆、或其組合。

在一實施方式中，親水性單體包含，但不限於丙烯酸(AAC)、丙烯胺(ALA)、丙烯醯胺(AAm)、[2-(甲基丙烯醯基氧基)乙基]二甲基-(3-磺酸丙基)氫氧化銨(DMAPS)、甲基丙烯酸二乙氨基乙酯(DEAEMA)、甲基丙烯酸羥乙酯(HEMA)或其組合。在一實施方式中，自由基聚合方法包括，但不限於穩定自由基聚合(SFRP)、原子轉移自由基聚合(ATRP)、或可逆加成-斷裂鏈轉移聚合(RAFT)。在一實施方式中，親水性單體包括，但不限於丙烯酸、丙烯胺、丙烯醯胺、[2-(甲基丙烯醯基氧基)乙基]二甲基-(3-磺酸丙基)氫氧化銨(DMAPS)、甲基丙烯酸二乙氨基乙酯(DEAEMA)、甲基丙烯酸羥乙酯(HEMA)或其組合。在一些實施例中，感溫型聚合物包含N-異丙基丙烯醯胺與丙烯胺，其中丙烯胺佔以感溫型聚合物的重量百分1%至5%，例如2%、3%、4%、或此等值之間的任何值。

【0041】 在一實施方式中，通過可逆加成斷裂鏈轉移聚合法將溫度敏感高分子、親水性單體、起始劑、鏈轉移劑溶於有機溶劑中，放置超音波震盪器溶解獲得混合物。將混合物加入反應瓶並通入氮氣吹掃後，接著加熱並持續攪拌進行聚合反應。反應瓶上方裝置冷凝管使系統維持回流，避免溫度過高反應物受熱揮發損失。當於反應瓶加熱後的混合物的黏度不再增稠之後，將反應瓶放入液態氮中以終止反應，獲得聚合溶液。在一些實施例中，加熱的溫度可在50°C至90°C，例如60°C、65°C、70°C、75°C、80°C、85°C、或此等值之間的任何值。在一些實施例中，反應時

間為 4 小時至 48 小時，例如 6 小時、8 小時、10 小時、15 小時、20 小時、25 小時、30 小時、35 小時、40 小時、45 小時、或此等值之間的任何值。在一些實施方式中，通常的鏈轉移劑包括硫醇、十二烷基硫醇 DDM、或者鹵代烷，比如四氯化碳。鏈轉移劑又被稱為改性劑和控制劑。

【0042】 在一實施方式中，將聚合溶液再沉澱於冷乙醚中以確保去除未反應的單體及鏈轉移劑。沉澱後得到固體並乾燥，以去除乙醚。接著使用透析膜進行純化步驟，將乾燥後的固體於水中透析純化獲得半成品，並將半成品去除水分，得到乾燥的感溫型聚合物，或稱溫敏性嵌段共聚物。

【0043】 在一些實施方式中，以物理方式製備可溶解還原感溫型的微球 (Gms-DTPS-pnipam) 或可溶解感溫型的微球 (Gms-pnipam)，包括：混合可溶解還原型的微載體與該感溫型聚合物，獲得該可溶解還原感溫型的微載體；或是，混合可溶解型的微載體與該感溫型聚合物，獲得該可溶解感溫型的微載體。在一實施方式中，配置感溫型聚合物水溶液後，加入可溶解還原型的微球 (Gms-DTSP) 或可溶解型的微球 (Gms) 於低溫下攪拌直到可溶解型的微球或可溶解還原型的微球表面上覆蓋感溫型聚合物。將改質完成後的微球洗滌以去除殘留的感溫型聚合物，接著再乾燥去除水分，獲得可溶解還原感溫型的微球 (Gms-DTPS-pnipam) 或可溶解感溫型的微球 (Gms-pnipam)。在一些實施例中，微球於 $0^{\circ}\text{C} \sim 15^{\circ}\text{C}$ 低溫下攪拌，例如 1°C 、 2°C 、 3°C 、 4°C 、 5°C 、 6°C 、

10°C、12°C、14°C、或此等值之間的任何值。在一些實施例中，將微球冷凍乾燥去除水分。在一實施方式中，以物理塗覆感溫型聚合物於微載體表面，是通過分子間作用力達成，例如范德瓦利(Van der Waals force)、次級鍵(secondary bond)包括但不限於氫鍵等。

【0044】 在一些實施方式中，製備雙硒鍵交聯劑包括：配置10毫莫爾(mmol)的硒(Se)粉末於3毫升水中並保持於氮氣環境中。在一些實施例中，將含硒的水注入三頸反應瓶並保持於氮氣中。隨後將20毫莫爾的硼氫化鈉(NaBH_4)於8毫升水中緩慢滴入到含硒的水中，並攪拌至無色使硒粉末完全溶解，獲得第一混合液。之後下等量10毫莫爾硒粉末到第一混合液中並加熱，直到呈現紅棕色獲得第二混合液。在一些實施例中，加熱溫度介於80°C至130°C，例如85°C、90°C、95°C、100°C、105°C、110°C、115°C、120°C、125°C、或此等值之間的任何值。接著，將20毫莫爾3-氯丙酸(3-chloropropionic acid)加入第二混合液於室溫氮氣環境下攪拌，獲得第三混合液。將第三混合液暴露於大氣中攪拌，接著過濾除去未反應物質，得到黃色上清液。將黃色上清液用1M鹽酸(HCl)將pH值調節至3.5，並用無水乙酸乙酯(ethyl acetate, EA)萃取兩次，得到上層有機層後再用水洗滌萃取並去除水份(例如，以無水硫酸美粉末吸收水分)並以乙酸乙酯後，得到DSeDPA。

【0045】 在一實施方式中，接著將1.2毫莫爾DSeDPA溶

於 5 毫升無水四氫呋喃中 (tetrahydrofuran, THF)，再滴入氮氣環境下的容器中，隨後再加入 2.88 毫莫爾 N-羥基琥珀醯亞胺 (N-hydroxysuccinimide, NHS) 攪拌獲得初始溶液。之後將 2.88 毫莫爾的二亞胺溶於 5 毫升無水四氫呋喃，滴加到低溫的初始溶液，以控制反應速度避免過快。在一些實施例中，低溫介於 0°C 至 20°C，例如 5°C、10°C、15°C、或此等值之間的任何值。接著，將含有四氫呋喃的初始溶液於室溫攪拌至完全反應後、再經過過濾雜質與去除四氫呋喃後，獲得 DSeDPA-NHS。DSeDPA-NHS 亦可於真空烘箱乾燥 24 小時後收集保存。

【0046】 在一些實施方式中，以化學法製備可溶解還原感溫型的微球 (Gms-DTSP-Se-pnipam) 或可溶解感溫型的微球 (Gms-Se-pnipam)，包括混合可溶解還原型的微載體、該還原型交聯劑與該感溫型聚合物，獲得該可溶解還原感溫型的微載體；或是，混合可溶解型的微載體、該還原型交聯劑與該感溫型聚合物，獲得該可溶解感溫型的微載體。在一實施方式中，配置感溫型聚合物水溶液後，加入 0.18 mM DSeDPA-NHS 及可溶解還原型的微球 (Gms-DTSP) 或可溶解型的微球 (Gms)，於低溫下攪拌直至可溶解還原型的微球的表面上覆蓋感溫型聚合物且化學鍵結完成。在一些實施例中，微球於 0°C 至 15°C 低溫下攪拌，例如 1°C、2°C、3°C、4°C、5°C、6°C、10°C、12°C、14°C、或此等值之間的任何值。鍵結完成後將微

球洗滌以去除殘留感溫型聚合物，接著再乾燥以去除多餘水分，即獲得可溶解還原感溫型的微球 (Gms-DTSP-Se-pnipam) 或可溶解感溫型的微球 (Gms-Se-pnipam)。

【0047】 在一些實施例中，以化學法製備可溶解還原感溫型的微球 (Gms-DTSP-Se-pnipam) 中，pnipam、Se、Gms 重量濃度百分比 (wt%) 對應為：pnipam 3~10%、Se 1~3%、Gms 87~96%。pnipam、Se、Gms 的重量分為 3~10：1~3：87~96，例如：pnipam 重量分為 3、4、5、6、7、8、9、10 或此等值之間的任何值；Se 重量分為 1、2、3 或此等值之間的任何值；Gms 的重量分為 87、88、89、90、91、92、93、94、95、96 或此等值之間的任何值。

【0048】 雖然下文中利用一系列的操作或步驟來說明在此揭露之方法，但是這些操作或步驟所示的順序不應被解釋為本揭露的限制。例如，某些操作或步驟可以按不同順序進行及/或與其它步驟同時進行。此外，並非必須執行所有繪示的操作、步驟及/或特徵才能實現本揭露的實施方式。此外，在此所述的每一個操作或步驟可以包含數個子步驟或動作。

【0049】 第 1 圖繪示本揭露之一實施方式之微載體製備示意圖。

【0050】 製備例 1 製備可溶解還原型的微球

【0051】 混合將礦物油與表面活性劑山梨糖醇單油酸脂 80

形成混合液。將明膠與水加熱後配置成 0.25 克 / 毫升 (g / mL) 的明膠水溶液 5 毫升，接著將明膠水溶液緩慢滴入混合液中，獲得油包水 (W / O) 乳液 (油 : 水 v / v, 7 : 1)。將油包水乳液迅速降溫促使微球定型冷卻，加入 0.1 克至 1 克的雙硫鍵交聯劑 DTSP 並攪拌進行交聯反應，直到微球固化 (此處 DTSP 約為 0.25 mM 至 1.2 mM)。交聯反應完後去除油相並洗滌，將微球乾燥，即得到可溶解還原型的微球 (Gms - DTSP)。

【0052】 經由元素分析儀量測，乾燥後的可溶解還原型的微球 (Gms - DTSP) 中，明膠與 DTSP 的重量比為約 99 : 1 ~ 65 : 35。

【0053】 製備例 2 製備可溶解型的微球

【0054】 混合將礦物油與表面活性劑山梨糖醇單油酸脂 80 形成混合液。將明膠與水加熱後配置成 0.25 克 / 毫升 (g / mL) 的明膠水溶液，接著將明膠水溶液緩慢滴入混合液中，獲得油包水 (W / O) 乳液 (油 : 水 v / v, 7 : 1)。將油包水乳液迅速降溫促使微球定型冷卻一段時間後，加入戊二醛並攪拌一段時間進行交聯反應，直到微球固化。交聯反應完後過濾去除油相並洗滌，將微球乾燥，即得到可溶解型的微球 (Gms)。

【0055】 製備例 3 製備感溫型聚合物

【0056】 通過可逆加成斷裂鏈轉移聚合法 (RAFT) 將 NIPAM、ALA、起始劑 (2,2'-azobis(2-methyl-propionitrile), AIBN)、

鏈轉移劑 (4-cyano-4-(phenylcarbonothioylthio) acid, CTA) 溶於 1,4-二噁烷 (1,4-Dioxane)，放置超音波震盪器溶解獲得混合物。將混合物慢慢加入反應瓶並通入氮氣吹掃後，接著加熱並持續攪拌進行聚合反應。反應瓶上方裝置冷凝管使系統維持回流，避免溫度過高反應物受熱揮發損失。當於反應瓶加熱後的混合物的黏度不再增稠之後，將反應瓶放入液態氮中以終止反應獲得聚合溶液，並將聚合溶液再沉澱於冷乙醚中以確保去除未反應的單體 (如 NIPAM、ALA) 及鏈轉移劑。沉澱後得到淺黃色固體並乾燥，以去除乙醚。接著使用透析膜 (截留分子量 (molecular weight cut off, MWCO) = 1000) 進行純化步驟，將乾燥後的淺黃色固體於水中透析純化獲得半成品，將半成品去除水分，得到乾燥的感溫型聚合物 P(NIPAM-co-Allylamine)，或稱溫敏性嵌段共聚物 (產率：約 90%)。

【0057】 製備例 4 製備可溶解還原感溫型的微球-物理法 (Gms-DTSP-pnipam)

【0058】 配置 3 wt% P(NIPAM-co-Allylamine) 乙醇水溶液後，加入由製備例 1 所製備的可溶解還原型的微球 (Gms-DTSP) 於低溫 0~5°C 下攪拌直到可溶解型的微球上覆蓋 P(NIPAM-co-Allylamine)。將改質完成後的微球洗滌以去除殘留 P(NIPAM-co-Allylamine)，接著再乾燥去除水分，獲得可溶解還原感溫型的微球 (Gms-DTPS-pnipam)。

【0059】 製備例 5 製備可溶解感溫型的微球 - 物理法 (Gms - pnipam)

【0060】 配置重量百分比 3% (wt%) P(NIPAM-co-Allylamine) 乙醇水溶液後，加入由製備例 2 所製備的可溶解型的微球 (Gms) 於低溫 $0\sim 5^{\circ}\text{C}$ 下攪拌直到可溶解型的微球上覆蓋 P(NIPAM-co-Allylamine) 且物理性鏈結完成。將改質完成後的微球洗滌以去除殘留 P(NIPAM-co-Allylamine)，接著再乾燥去除水分，獲得可溶解感溫型的微球 (Gms - pnipam)。

【0061】 製備例 6 雙硒鍵交聯劑的製備

【0062】 配置 10 毫莫爾 (mmol) 的硒 (Se) 粉末於 3 毫升水中並保持於氮氣環境中，隨後將 20 毫莫爾的硼氫化鈉 (NaBH_4) 於 8 毫升水中緩慢滴入到含硒的水中，並攪拌至無色使硒粉末完全溶解，獲得第一混合液。之後下等量 10 毫莫爾的硒粉末到第一混合液中並加熱，直到呈現紅棕色獲得第二混合液。將 20 毫莫爾的 3-氯丙酸加入第二混合液於室溫氮氣環境下攪拌，獲得第三混合液。將第三混合液暴露於大氣中攪拌，接著過濾除去未反應物質，得到黃色上清液。將黃色上清液用 1M 鹽酸將 pH 值調節至 3.5，並用無水乙酸乙酯萃取，得到上層有機層後再用水洗滌萃取兩次並去除水份及乙酸乙酯後，得到 DSeDPA (產率：85%)。

【0063】 將 1.2 毫莫爾 DSeDPA 溶於 5 毫升無水四氫呋喃中，再滴入氮氣環境下的容器中，隨後再加入 2.88 毫莫爾

N-羥基琥珀醯亞胺 (N-hydroxysuccinimide, NHS) 攪拌獲得初始溶液。之後將 2.88 毫莫爾的二亞胺溶於 5 毫升無水四氫呋喃，滴加到低溫的初始溶液，控制反應速度避免過快。將含有四氫呋喃的初始溶液於室溫攪拌至完全反應後、再經過過濾雜質與去除四氫呋喃後，獲得 DSeDPA-NHS。DSeDPA-NHS 亦可於真空烘箱乾燥 24 小時後收集保存。

【0064】 製備例 7 製備可溶解還原感溫型的微球-化學法 (Gms-DTSP-Se-pnipam)

【0065】 配置 3 wt% P(NIPAM-co-Allylamine) 乙醇水溶液後，加入 1 wt% DSeDPA-NHS 及製備例 1 的 96 wt% 可溶解還原型的微球 (Gms-DTSP)，於低溫下攪拌直至可溶解還原型的微球上覆蓋 P(NIPAM-co-Allylamine) 且化學鍵結完成。鍵結完成後將微球洗滌以去除殘留 P(NIPAM-co-Allylamine)，接著再乾燥以去除多餘水分，即獲得可溶解還原感溫型的微球 (Gms-DTSP-Se-pnipam)。

【0066】 實施例 1 感溫型聚合物的合成

【0067】 感溫型聚合物取自於製備例 3 以 ALA 單體與 NIPAM 聚合，使結構中具有正電性質的胺基，有利於細胞貼附應用。以下分為三組比例 1% ALA、3% ALA、5% ALA 實驗合成比例配方如下表 1，合成之聚合物經由 FT-IR 與 $^1\text{H-NMR}$ ，確認成功接枝並經由凝膠滲透層析法 (gel permeation chromatography, GPC) 量測分

子 量 。

表 1 、 P (N I P A M - c o - A l l y l a m i n e) 合 成 配 方

聚 合 物	配 比	N I P A M (m m o l)	A L A (m m o l)	C T A (m m o l)	A I B N (m m o l)
P (N I P A M - c o - A l a)	1 % A L A	2 9 . 6 9	0 . 3	0 . 0 2	0 . 0 1
	3 % A L A	2 9 . 0 7	0 . 9		
	5 % A L A	2 8 . 4 9	1 . 5		

【0068】 1 . 1 ¹ H - N M R 鑑 定 與 組 成 元 素

【0069】 首先確認 P (N I P A M - c o - A l l y l a m i n e) 聚 合 物 的 化 學 結 構 。 反 應 時 加 入 起 始 劑 A I B N ， 溫 度 到 達 7 0 ° C 時 ， 開 始 產 生 自 由 基 ， 促 使 單 體 雙 鍵 (C = C) 聚 合 反 應 。 利 用 核 磁 共 振 光 譜 儀 (N M R) 進 行 氫 譜 (¹ H - N M R) 分 析 鑑 定 分 子 結 構 (如 第 2 圖 所 示) ， 對 應 到 結 構 式 δ = 0 . 9 5 - 1 . 2 4 p p m (a , C H ₃ 來 自 N I P A M) ， δ = 1 . 3 4 - 1 . 7 5 p p m (b , C H ₂ 來 自 N I P A M 與 A l a) (h , C H ₂ 來 自 C T A) ， δ = 1 . 8 2 - 2 . 1 3 p p m (c , C H 來 自 N I P A M 與 A l a) (i , j , C H 來 自 C T A) ， δ = 2 . 6 6 p p m (d , C H ₂ 來 自 A l a) ， δ = 3 . 8 2 p p m (e , C H 來 自 N I P A M) ， δ = 7 . 3 2 - 7 . 7 9 p p m (f , C H 來 自 C T A) ， δ = 8 . 3 8 p p m (g , N H 來 自 N I P A M) 。 將 ¹ H - N M R 訊 號 積 分 推 算 出 接 枝 率 及 組 成 (如 下 表 2) 。

表 2、P(NIPAM-co-Allylamine)之組成比

聚 合 物	配 比 ^a	製 備 時 (m o l %)		於 產 物 中 (m o l %)	
		N I P A M	A L A	N I P A M	A L A
P (N I P A M - c o - A l a)	1 % A L A	9 9	1	9 9 . 8 2	0 . 1 4
	3 % A L A	9 7	3	9 9 . 7 5	0 . 2 4
	5 % A L A	9 5	5	9 9 . 6 8	0 . 3 1
^a X % A L A = (m o l e _{A L A} / m o l e _{N I P A M}) x 1 0 0 %					

【0070】 1 - 2 分子量量測鑑定

【0071】 使用凝膠滲透層析法鑑定合成之高分子分子量大小及分子量分佈。表 3 為 P(NIPAM-co-Allylamine) 感溫型聚合物經凝膠滲透層析法測量所得之分子量大小及分子量分佈。表 3 得知分子量分散度 (polydispersity index, PDI) 合成之聚合物都有狹窄分子量分佈，其值大多介於 1.2 - 1.3 之間，而 P(NIPAM-co-Allylamine) 的重量平均分子量 (Mw) 分別為 37666、42803、43056，證明單體經由 RAFT 成功聚合為共聚物。

表 3、P(NIPAM-co-Allylamine)之性質分析

配 比	M n * (g / m o l)	M w (g / m o l)	P D I
1 % A L A	2 9 7 3 9	3 7 6 6 6	1 . 2 6

3 % A L A	3 2 3 4 1	4 2 8 0 3	1 . 3 2
5 % A L A	3 3 9 5 9	4 3 0 5 6	1 . 2 6

* M n ： 數 均 分 子 量

【0072】 1 - 3 最低臨界溶液溫度 LCST 量測

【0073】 將單體 A L A 嵌 入 N I P A M 共 聚 物 中 後，因 靜 電 排 斥 力 增 加，P N I P A M 疏 水 力 影 響 L C S T。共 聚 物 之 L C S T 可 藉 由 紫 外 光 / 可 見 光 光 譜 儀 測 定，為 5 0 % 穿 透 率 下 對 應 之 溫 度：當 溫 度 上 升 共 聚 物 大 量 聚 集，從 溶 液 態 形 成 非 流 動 之 凝 膠 態，光 的 穿 透 值 相 對 降 低。第 3 圖 是 P N I P A M 及 1 % A L A、3 % A L A、5 % A L A 於 不 同 溫 度 下 之 穿 透 率，得 知 P N I P A M 的 L C S T 為 3 1.4 ° C；1 % A L A、3 % A L A、5 % A L A 的 L C S T 分 別 為 3 2.3 ° C、3 2.5 ° C、3 3.4 ° C，因 此 L C S T 隨 A L A 比 例 而 增 加。此 證 實 疏 水 單 體 的 加 入 共 聚 物 中 會 降 低 L C S T，反 之 親 水 單 體 會 增 加 L C S T，主 要 原 因 取 決 於 聚 合 物 尾 端 基 的 親 疏 水 性 質。

【0074】 1 - 4 水接觸角測試

【0075】 感溫型聚合物的水接觸角隨溫度而變化。水藉由自身表面張力在氣-液界面產生圓形水滴狀，透過影像圖根據 Y o u n g 公 式： $\gamma_{sv} = \gamma_{sl} + \gamma_{lv} \cos \theta$ 計 算 水 接 觸 角。請 參 閱 第 4 圖，以 市 售 P N I P A M 作 為 對 照 組，P N I P A M 在 室 溫 下 水 接 觸 角 為 $44.83 \pm 0.47^\circ$ ，嵌 入 A L A 後 1 % A L A、3 % A L A、5 % A L A 的 水 接 觸 角 為 $37.13 \pm 0.55^\circ$ 、 $32.65 \pm 0.28^\circ$ 、 $29.4 \pm 0.95^\circ$ 。當 溫 度 從 室 溫 上 升 至 4 0 ° C 時，P N I P A M、1 % A L A、3 % A L A、5 % A L A 的 水 接 觸 角 分

別為 $63.23 \pm 1.85^\circ$ 、 $64.91 \pm 0.89^\circ$ 、 $63.45 \pm 1.04^\circ$ 、 $53.83 \pm 1.17^\circ$ ，得知對照組 PNIPAM 低溫轉變成高溫時角度相差 18.4° ，嵌入 ALA 後 P(NIPAM-co-Allylamine) 相差 25° 以上，證實此共聚物有溫度反應特性。另外 ALA 為親水單體，在低溫時 5% ALA 水接觸角度較小，最為親水。隨共聚物 ALA 含量提升，接觸角逐漸下降。1% ALA、3% ALA 在高溫時較趨近於對照組 PNIPAM 疏水接觸角度，吻合略微親水(水接觸角 $< 90^\circ$) 有更好的蛋白質吸附特性，證實利於細胞吸附增殖。

【0076】 實施例 2 雙硒鍵交聯劑的合成

【0077】 合成雙硒鍵之其中一個目的，在於將 P(NIPAM-co-Allylamine) 聚合物以化學鍵結與微球結合形成熱響應(thermos-sensitive)微球，並與微球表面以物理性塗層溫感性高分子進行比較。雙硒鍵屬於氧化還原敏感性材料，易受到環境變化而斷裂，DSeDPA 兩端的羧酸基(-COOH)中的氧受 EDC 親核攻擊，形成高活性中間體(O-acylisourea)，隨後與 NHS 反應形成的第二個中間體(O-acylisourea)，在水中水解為 DSeDPA-NHS，並與胺基(-NH₂)快速反應產生穩定的醯胺鍵，此時與 P(NIPAM-co-Allylamine) 尾端胺基發生反應交聯成聚合物。

【0078】 2.1 ¹H-NMR 鑑定與組成元素

【0079】 結構之正確性用 ¹H-NMR 鑑定。DSeDPA 活化前(如第 5 圖所示)發現對應到結構式 $\delta = 2.69 \sim 2.72$

ppm (a) ; $\delta = 3.04 \sim 3.06$ ppm (b) , 兩點的結構式皆為 CH_2 , b 點旁邊是羧酸基 ($-\text{COOH}$) , 受到較大電負度拉扯位移至左方符合核磁共振中共振頻率變大訊號位於低場區 , 活化後 (如第 6 圖所示) DSeDPA-NHS 結構式 $\delta = 2.69 - 2.71$ ppm (a , CH_2 來自 DSeDPA) ; $\delta = 3.03 - 3.06$ ppm (b , CH_2 來自 DSeDPA) ; $\delta = 2.59$ ppm (c , CH 來自 NHS) , 從 c 點可證明在 NHS 活性基團上有四個 CH 訊號強度高於 a 及 b 點 , 以上 NMR 結果分析證明雙硒鍵交聯劑 DSeDPA-NHS 官能基成功合成無誤。

【0080】 2-2 拉曼光譜儀分析

【0081】 硒屬於空氣敏感之元素。第 7 圖為硒元素對稱結構的拉曼光譜譜圖。分析後 290 cm^{-1} 、 310 cm^{-1} 位置出現 Se-Se 雙硒鍵訊號 , 且 276 cm^{-1} 左右有明顯的 Se-C 官能基 , 因此證明經由 EDC 活化 , 提高羧酸的活性及反應效率 , 使 NHS 連接在羧酸基 ($-\text{COOH}$) , 成功合成之 DSeDPA-NHS , 由拉曼確認硒元素存在於結構中。

【0082】 2-3 傅立葉轉換紅外線光譜 (FT-IR) 分析

【0083】 使用 FT-IR 可以更準確觀察無機官能基結構。從第 8 圖之圖譜分析得知活化前 DSeDPA 羧酸基與 NHS 結合後 , 在 1688 cm^{-1} 屬於 C=O 官能基 ; 活化後因 NHS 結合受到拉扯 , 變動至 1776 cm^{-1} 峰值。另外 , 兩者其他官能基訊號 N-O 、 C-N 、 C-O 分子振動之光譜有明顯差異 , 代表反應成功。

【0084】 實施例 3 明膠微球鑑定

【0085】 明膠溶於熱水而不溶於冷水，但進行人體細胞培養需處於 37°C 環境，因此需將網絡交聯穩固，通過乳化反應加入交聯劑獲得微球。其中，以還原型交聯劑製備出的微球為可溶解還原型的微球 (Gms-DTSP，如製備例 1)、以非還原型交聯劑製備出的微球為可溶解型的微球 (Gms，如製備例 2)。接著再以物理塗覆或化學鍵結方式將感溫型聚合物結合於微球表面，分別獲得物理塗層的可溶解還原感溫型的微球 (Gms-DTPS-pnipam，如製備例 4) 與可溶解感溫型的微球 (Gms-pnipam，如製備例 5)、及化學鍵結的可溶解還原感溫型的微球 (Gms-DTSP-Se-pnipam，如製備例 7)。

【0086】 3.1 拉曼光譜儀分析

【0087】 利用拉曼儀器分析各組微球，依照使用交聯劑分為：

第一組：可溶解型的微球 (Gms，如製備例 2)、物理塗層的可溶解感溫型的微球 (Gms-pnipam，製備例 5)；

第二組：可溶解還原型的微球 (Gms-DTSP，如製備例 1)、化學鍵結的可溶解還原感溫型的微球 (Gms-DTSP-Se-pnipam，製備例 7)、物理塗層的可溶解還原感溫型的微球 (Gms-DTPS-pnipam，製備例 4)。

【0088】 由於明膠沒有固定結構式，但結構中有大量羥基和胺基，因此拉曼峰值無法指出實際改質後的結構，但還是能透過峰值位移觀察各微球差異。第 9 圖所示，為第一組

2000-2500 cm^{-1} 範圍內有兩根訊號，明膠經由戊二醛交聯後 (Gms)，能確認三個反應階段中的兩根峰值皆有左右位移。第 10 圖所示為第二組用 DTSP 交聯的微球。觀察出趨近 1400 cm^{-1} 位置，明膠由 DTSP 交聯後各組微球多出此訊號，推斷 DTSP 確實將明膠交聯穩固住成為微球。另外，2000-2500 cm^{-1} 範圍內的兩根訊號有些微的變動。

【0089】 3.2 傅立葉轉換紅外線光譜分析

【0090】 拉曼光譜儀與 FT-IR 呈現互補，且較適於檢測對稱鍵結。微球屬於非對稱性結構，使用 FT-IR 分析兩大組微球，相對有較強的紅外線吸收峰值。第 11 圖顯示明膠在未交聯前 amide I 在 1629 cm^{-1} 是受到 C=O 伸縮振動影響，在 1634 cm^{-1} 發生希夫鹼反應 (Schiff base) 的 C=N 伸縮振動，經交聯後 amide I 和未反應的醛基混合物的 C=O 伸縮所導致，確認明膠的胺基和戊二醛的羰基 (C=O) 之間形成之希夫鹼反應，證實了明膠與戊二醛交聯的成功。

【0091】 明膠中主要峰值有 1600-1700 cm^{-1} 的 amide I (C=O 鍵的拉伸)、1500-1590 cm^{-1} 的 amide II (NH 彎曲振動和 CN 伸縮振動) 和 1200 cm^{-1} 附近的 amide III (NH 彎曲振動和 CN 伸縮振動)，均在第 12 圖、第 13 圖觀察到特徵峰。特別是，使用 DTSP 交聯劑在 3500-3000 cm^{-1} 處觀察到 O-H 和 N-H 振動的峰，在 2940 cm^{-1} 處觀察到 -CH₃ 基團的對稱伸縮振動峰，而

D T S P 帶有 N H S 活性基團，與明膠網絡中胺基 ($-NH_2$) 反應後形成穩定的醯胺鍵。同時 N H S 結構被釋放，及在 1390 cm^{-1} 處並觀察到 $S=O$ 之特徵峰。

【0092】 3.3 掃描電子顯微鏡 (SEM) 分析

【0093】 使用 SEM 分析乾燥交聯固化之明膠微球的尺寸並觀察表面形貌。第 14 a 圖顯示未使用交聯劑得到之微球；第 14 b 圖顯示使用戊二醛交聯可溶解型的微球 (G m s)，形成團聚，無法過篩，粒徑範圍不均一；第 14 c 圖顯示可溶解感溫型的微球 (G m s - p n i p a m) 經由表面物理塗層後，微球具有分散性，顆粒明顯分散改善團聚現象，並同時觀察出表面有粉末狀態被感溫型聚合物包覆住；第 14 d 圖顯示使用 D T P S 交聯劑 0.25 mM (G m s - 0.25 mM D T S P)；第 14 e 圖顯示 D T P S 交聯劑 0.6 mM (G m s - 0.6 mM D T S P)；第 14 f 圖 (50 倍放大)、第 14 g 圖 (150 倍放大) 顯示 D T P S 交聯劑 1.2 mM (G m s - 1.2 mM D T S P)，得知隨交聯劑濃度增加，微球表面從平滑逐漸粗糙。接著觀察具有感溫型聚合物的微球：第 14 h 圖顯示使用物理塗層 (G m s - D T S P - p n i p a m)，發現微球使用物理塗層表面由原先的粗糙，被感溫型聚合物包覆後呈現平滑狀態；另一組第 14 i 圖顯示化學鍵結 (G m s - D T S P - S e - p n i p a m) 使用硒交聯劑將 P (N I P A M - c o - A l l y l a m i n e) 化學鍵結於明膠表面，有明顯變化之收縮孔洞。

【0094】 除了使用 SEM 外，同時使用能量分散式光譜儀 (energy - dispersive X - ray spectroscopy，EDS)

得知元素分析組成。使用戊二醛交聯之微球組成元素為 C、N、O 元素，使用雙硫鍵 DTSP 交聯劑得到 C、N、O、S 元素，用雙硒鍵交聯劑將 P(NIPAM-co-Allylamine) 化學鍵結於明膠得到 C、N、O、S、Se 元素，皆有交聯劑元素再次證實交聯成功。為了瞭解微球在乾燥狀態之尺寸，使用 Image J 分析粒徑大小，表 4 為各組明膠微球之平均粒徑。

表 4、各組明膠微球之平均粒徑

樣品	平均直徑 (μm)
(a) Gms	142.19 ± 107.68
(b) Gms-pnipam	123.08 ± 51.75
(c) Gms- 0.25 mM DTSP	222.31 ± 169.13
(d) Gms- 0.6 mM DTSP	226.37 ± 69.25
(e) Gms- 1.2 mM DTSP	251.13 ± 81.14
(f) Gms- DTSP-pnipam	208.56 ± 85.96
(g) Gms-DTSP-Se-pnipam	230.17 ± 71.36

【0095】 3.4 膨潤狀態粒徑分析

【0096】 微球粒徑定義範圍為 100-300 微米。首先使用篩網分離小於 100 微米的明膠微球，隨後浸入溫熱培養基保持 37°C 環境中持續 5 天，模擬真實細胞培養環境。然後使用光學顯微鏡觀察微球膨脹尺寸及穩定性。表 5 顯示 Gms 及 Gms-pnipam 粒徑分佈。Gms 乾燥時粒徑型態為團聚現象，不能初次過篩，有小顆的微球無法分離，尺寸分散較大；而 Gms-pnipam 表面塗層

P (N I P A M - c o - A l l y l a m i n e) 後，改善團聚現象能順利通過篩網，微球尺寸分佈區間較小。

表 5、明膠微球 (G m s)、(G m s - p n i p a m) 膨潤後之粒徑

樣品	時間 (小時)	平均直徑 (μm)
G m s	0.5	160.6 50.5
	24	172.8 $\pm$ 57.5
	48	146.1 $\pm$ 78.3
	72	188.8 $\pm$ 62.3
	96	167.4 $\pm$ 82.4
	120	121.7 $\pm$ 52.3
G m s - p n i p a m	0.5	305.4 $\pm$ 20.3
	24	307.4 $\pm$ 22.5
	48	306.9 $\pm$ 26.2
	72	307.4 $\pm$ 26.8
	96	305.6 $\pm$ 28.4
	120	308.2 $\pm$ 25.3

【0097】 另一組為以 0.25 mM、0.6 mM、1.2 mM DTSP 交聯之微球。第 15 圖與表 6 顯示，0.25 mM DTSP 微球在 0.5 小時觀察到尺度膨潤至 900 微米並逐漸上升，於 48 小時微球膨脹破裂，此組交聯劑不能穩定明膠網路，導致微球穩定性不佳。0.6 mM DTSP 觀察到 48 小時內尺寸在穩定範圍中，於 72 小時觀察微球尺寸下降，隨著時間緩慢溶化消失，而 1.2 mM DTSP 交聯微球在 120 小時內，尺度曲線平穩，粒徑範圍約 300 微米，證實交聯劑

濃度增加，得到網絡穩固尺寸之微球。明膠與 0.6 - 1.2 mM DTSP 的重量比為 1.25 : 0.4 ~ 1.25 : 1 (1 : 0.32 ~ 1 : 0.8)。

表 6、不同交聯劑濃度之可溶解還原型微球膨潤後之粒徑

樣品	時間 (小時)	平均直徑 (μm)
G m s D T S P 0.25 mM	0.5	901.04 ± 29.3
	24	921.28 ± 65.4
	48	75.92 ± 29.2
	72	-
	96	-
	120	-
G m s D T S P 0.6 mM	0.5	313.26 ± 44.7
	24	448.67 ± 83.4
	48	394.83 ± 83.7
	72	85.29 ± 80.2
	96	78.36 ± 41.4
	120	-
G m s D T S P 1.2 mM	0.5	341.30 ± 33.3
	24	252.76 ± 30.5
	48	250.02 ± 29.3
	72	319.82 ± 47.3
	96	297.14 ± 51.1
	120	301.75 ± 47.7

【0098】 表 7 是使用 G m s - 1.2 mM DTSP 與感溫型聚合

物 P (N I P A M - c o - A l l y l a m i n e) 結 合 後 形 成 之 G m s - D T S P - p n i p a m 及 G m s - D T S P - S e - p n i p a m 微 球 。 經 過 1 2 0 小 時 觀 察 ， 尺 寸 穩 定 變 化 ， 無 破 裂 及 溶 脹 現 象 ， 因 此 這 三 組 適 合 進 行 細 胞 培 育 實 驗 ， 證 實 成 功 合 成 還 原 感 溫 可 溶 解 型 明 膠 微 球 。

表 7 、 可 溶 解 還 原 型 與 感 溫 型 微 球 膨 潤 後 之 粒 徑

樣 品	時 間 (小 時)	平 均 直 徑 (μ m)
G m s - D T S P	0 . 5	3 4 1 . 3 0 ± 3 3 . 3
	2 4	2 5 2 . 7 6 ± 3 0 . 5
	4 8	2 5 0 . 0 2 ± 2 9 . 3
	7 2	3 1 9 . 8 2 ± 4 7 . 3
	9 6	2 9 7 . 1 4 ± 5 1 . 1
	1 2 0	3 0 1 . 7 5 ± 4 7 . 7
G m s - D T S P - p n i p a m	0 . 5	2 4 7 . 2 8 ± 3 4 . 9
	2 4	2 7 9 . 2 5 ± 3 7 . 9
	4 8	3 0 6 . 7 0 ± 3 7 . 3
	7 2	2 8 8 . 7 4 ± 3 7 . 1
	9 6	3 3 3 . 6 1 ± 4 1 . 4
	1 2 0	3 6 7 . 9 4 ± 4 5 . 1
G m s - D T S P - S e - p n i p a m	0 . 5	2 0 2 . 7 6 ± 3 2 . 3
	2 4	2 4 4 . 4 9 ± 3 2 . 5
	4 8	2 5 4 . 6 5 ± 3 4 . 3
	7 2	2 7 1 . 3 1 ± 3 0 . 2

	9 6	2 9 1 . 2 8 ± 3 0 . 1
	1 2 0	2 3 9 . 6 0 ± 4 7 . 7

【0099】 3.5 微球膨脹度測試

【0100】 將 10 毫克乾重微球 (W1) 放在 15 毫升離心管浸入 37°C 培養基中，在不同的時間點去除培養基，並使用拭鏡紙去除多餘液體，留下濕樣品秤量重量 (W3)，每組重複三次。微球膨脹率 (swelling ratio) 計算公式為：

Swelling ratio = (W3 - W2) / W1

含水率 (water content) 計算公式為：

Water content (%) = [1 - W1 / (W3 - W2)] × 100

W1: 乾燥樣品重量；W2: 乾樣品與離心管重量；W3: 濕樣品與離心管重量。

【0101】 比較微球膨潤度可用於評估聚合物微球 37°C 下吸水特性。實驗將乾燥之微球浸泡於培養基 24 小時後，秤量膨潤後之重量。第 16 圖是不同明膠微球膨脹性質，觀察出 0.6 mM 與 1.2 mM DTSP 濃度增加膨脹度隨之下降，0.25 mM DTSP 於 24 小時內膨脹率達 18.05，然於如前述表 6 所示於 48 小時候微球膨脹破裂，此組交聯劑不能穩定明膠網路。表面物理塗層感溫型聚合物膨脹度之增加，同時水含量提高。將 P(NIPAM-co-Allylamine) 摻入明膠微球中會顯著提升吸水能力，最明顯者為 GMS-DTSP-Se-pnipam 微球，溶脹率 12.62 ± 0.07，水含量 93.32 ± 0.97%。

表 8、不同微球膨潤後之膨脹率及含水率

樣 品	膨 脹 率 (w / w)	含 水 率 (%)
G m s	3 . 2 4 ± 0 . 0 5	6 7 . 1 4 ± 0 . 2 6
G m s - p n i p a m	4 . 5 9 ± 0 . 4 3	8 0 . 8 2 ± 1 . 2 7
G m s - 0 . 2 5 m M D T S P	1 8 . 0 5 ± 1 . 0 4	9 3 . 5 7 ± 1 . 8 8
G m s - 0 . 6 0 m M D T S P	8 . 0 8 ± 0 . 6 1	8 8 . 9 5 ± 0 . 7 6
G m s - 1 . 2 0 m M D T S P	6 . 9 4 ± 0 . 1 7	8 9 . 1 3 ± 2 . 7 1
G m s - D T S P - p n i p a m	7 . 2 9 ± 0 . 3 1	9 0 . 0 2 ± 0 . 5 7
G m s - D T S P - S e - p n i p a m	1 2 . 6 2 ± 0 . 0 7	9 3 . 3 2 ± 0 . 9 7

【0102】 3 . 6 溶解型微球瓦解行為

【0103】 雙硫鍵 (- S - S -) 通常為半胱胺酸側基之間兩個硫原子自然交聯形成，使用化學還原劑 D T T 活性游離半胱胺酸的烷基化來還原二硫鍵，使雙半胱胺酸斷裂成半胱胺酸，而雙硒鍵與雙硫鍵有類似氧化還原機制。雙硒鍵氧化響應性能力大於雙硫鍵，硒具有較大的原子半徑和較弱的電負性，其較低的鍵能可輕易被還原，使雙硒鍵斷裂，生成硒酸鹽的中間體 (R S e ⁻) 。

【0104】 本揭露將對氧化溶解型微球進行瓦解實驗。為了模擬細胞培養環境，將 G m s - D T S P 、 G m s - D T S P - p n i p a m 、 G m s - D T S P - S e - p n i p a m 浸泡於培養基中，並維持在 3 7 ° C 下，隨後加入 2 5 m M 還原劑 D T T ，觀察明膠聚合網絡瓦解的變化。表 9 顯示， G m s - D T S P - S e - p n i p a m 在 1 5 分鐘內就消失了，只剩下清澈溶液，其餘兩組於 3 0 分鐘內皆完全瓦解。

表 9 、還原型微球於 2 5 m M D T T 之瓦解行為

樣 品	瓦解時間 (分鐘)
G m s - D T S P	3 0
G m s - D T S P - p n i p a m	3 0
G m s - D T S P - S e - p n i p a m	1 5

【0105】 實施例 4 細胞存活率

【0106】 4.1 敏感性嵌段共聚物

【0107】 第 17 圖、第 18 圖、第 19 圖分別顯示 1 % A L A 、 3 % A L A 、 5 % A L A 感溫型聚合物與 M D C K 細胞共培養 24 小時，三種共聚物濃度在最高 1 0 0 0 μ g / m L 下細胞存活率分別為 9 7 . 4 % 、 9 6 . 5 % 、 9 6 . 3 % ，證實此感溫型聚合物具有與 M D C K 細胞 (生醫研究中作為標準的哺乳動物細胞系) 之良好生物相容性。由於細胞受到有毒物質刺激時會引起細胞型態改變導致細胞凋亡，而通過 M T T 試驗會與活細胞粒線體琥珀酸脫氫酶作用，還原反應下產生紫色結晶，並利用盤式分光光譜儀 5 7 0 n m ，透過吸光度的檢測得到定性活細胞數。

【0108】 4.2 明膠微球

【0109】 微球屬於載體，不能溶於培養基，其樣品形狀不均一。依照 I S O - 1 0 9 9 3 ，將微球以 0 . 1 g / m L 浸泡 3 7 ° C 培養基中持續 24 小時，萃取不同百分比浸泡微球過後的培養基與 M D C K 共培養 24 小時。第 20 圖顯示使用戊二醛交聯的可溶解型微球，在最高濃度 0 . 1 g / m L 下細胞存活率可達 8 2 % 。 G m s - p n i p a m 最高濃度下細胞存活率提升達 9 6 . 3 % 。由於表面物理塗層感溫型聚合物，故此感溫型

聚合物有良好生物相容性。第 21 圖顯示使用 DTSP 交聯的另一組可溶解還原型微球，三種類型微球也得到良好之生物相容性，皆能夠大於 90% 以上。在最高的濃度下細胞存活率也達到 94%，證實各組微球不具有毒殺細胞之能力，利於後續貼附培養實驗。

【0110】 實施例 5 細胞貼附脫附之測試

【0111】 5.1 感溫型聚合物細胞脫貼附測試

【0112】 細胞在 $P(NIPAM-co-Allylamine)$ 之吸脫附特性實驗中，將依照 1% ALA、3% ALA、5% ALA 分組，經旋轉塗佈於塑膠蓋玻片上，各與 0.5×10^6 cells/mL MDCK 共培養。光學顯微下觀察在 $37^{\circ}C$ 下，細胞貼滿於 $P(NIPAM-co-Allylamine)$ 膜上，以緊密鋪平簇狀形態生長，充分表現良好附著特性(圖未示)。當溫度降至 $4^{\circ}C$ ，共聚物膜表面上親水基團與細胞帶電基團相互作用，使細胞呈塊狀飄起，懸浮於 PBS 溶液中。另外使用空白塑膠蓋玻片(未經溫度敏感性嵌段共聚物塗層)作為對照組，將溫度調至低溫時，細胞形貌則未發生改變且未發生脫附，細胞仍黏附於蓋玻片上(圖未示)。

【0113】 經由溫度脫附下來的細胞，其活性使用活/死細胞成像試劑染色。活細胞可透過 Calcein-AM 鈣黃綠素輕易進入滲透於活細胞膜中，遭水解後鈣黃綠素存留在細胞內發出強烈綠色螢光，而死細胞受 BOBOTM-3 Iodide 穿過破損細胞膜對細胞核染色釋放出紅色螢光。第 22 圖顯示從螢光顯微鏡觀察由三組 $P(NIPAM-co-Allylamine)$ 膜

脫附下的細胞，其重疊影像中綠色螢光比例居多，證明溫度誘導脫附之細胞仍保持良好活性。

【0114】 使用溫度調控簡易的手法，將細胞從感溫響應性表面 $P(NIPAM-co-Allylamine)$ 脫附下來，細胞不遭受傷害，同時也避免使用傳統酶解法脫附造成的損傷疑慮。以工程醫學角度而言，細胞通過傳統酶解法切斷細胞間連結，收穫下來的細胞為獨立的單顆，無法再生連續的細胞片，而透過溫度敏感凝膠層能獲得細胞間連接完整的細胞片，屬於非侵入性脫附，匯合培養後的細胞需降低溫度成功地收穫為組織結構之細胞片，進而達到生醫組織再生修復目的。

【0115】 5.2 感溫型微球之溫度誘導脫附行為

【0116】 對於感溫型聚合物 $P(NIPAM-co-Allylamine)$ ，ALA 濃度會增加結構中胺基 ($-NH_2$)，使正電荷及親水性隨之上升。細胞培養方式，同上述 5.1 所述。對於 5% ALA 之共聚物，細胞在貼附時有較黏之培養表面。在低溫時細胞脫附，5% ALA 的脫附時間比其他兩組更長，顯示 ALA 含量較多有助於細胞黏附，但嵌入過多之 ALA 單體，會使共聚物過於親水而喪失感溫特性。因此在製備感溫型明膠微球時，經由以上細胞的吸脫附評估，最終選擇 5% ALA 共聚物進行明膠微球表面感溫修飾。

【0117】 為檢測 $P(NIPAM-co-Allylamine)$ 於微球上之溫度誘導細胞脫附能力，先測試 $Gms-pnipam$ 、 $Gms-DTSP-pnipam$ 的脫附行為。明膠微球藉由溫度誘

導細胞脫附，在低溫 4°C 下進行脫附 30 及 60 分鐘後，可以看出細胞只有些微掉落(圖未示)，證實此明膠微球使用溫度誘導進行細胞脫附有較差的效果，需要的時間較長。因此需使用傳統酶解及瓦解法，提升其細胞與載體脫附的效率。

【0118】 5.3 可溶解型微球細胞之脫貼附測試

【0119】 以螢光顯微鏡觀察，用 Hoechst 33342 觀察細胞有無黏附在微球表面進行生長。Hoechst 33342 可以穿透細胞膜發出藍色螢光，螢光顯微鏡觀察後證實藍色細胞貼附於五種微球上(包括 Gms、Gms-pnipam、Gms-DTSP、Gms-DTSP-pnipam、Gms-DTSP-Sepnipam，圖未示)，以便後續評估五款微球於吸附細胞之能力。

【0120】 為了評估微球細胞吸脫附測試，將 Gms、Gms-pnipam 膨潤後，每組以 $0.5 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ MDCK 細胞培養，在 1、3、5、7、24 小時用光學顯微鏡觀察 MDCK 於微球上貼附情況，計算細胞貼附率。結果顯示，1 小時就能觀察到細胞開始貼附微球邊緣上，但 Gms 因微球團聚，尺寸不均一，尺寸小顆的微球較難觀察出有無貼附細胞。而 Gms-pnipam 尺寸較均勻，能看出細胞均有明顯貼附上去，因此 Gms-pnipam 的細胞貼附效果優於改質前，故 pnipam 有利於細胞黏附(圖未示)。另外，結果亦顯示，胰蛋白酶解法完全進行細胞脫附實驗。將微球浸泡胰蛋白酶、 37°C 中 5 分鐘後觀察，Gms 表面有細

胞掉落，隨著時間增加，胰蛋白酶能斷開賴胺酸或精胺酸形成的肽鍵，細胞脫附效果隨胰蛋白酶消化作用而增加。10分鐘後以PBS清洗微球收回細胞，清洗過後的微球表面還是殘存很多的細胞，脫附效果不佳。另一組Gms-pnipam經5分鐘胰蛋白酶作用，可以看到細胞及感溫型聚合物同時切斷下來，10分鐘後看出細胞幾乎完全掉落於懸浮液中，由PBS清洗微球收回細胞後，微球表面趨近光滑平坦狀態，證實此感溫型聚合物有助於細胞脫附效果(圖未示)。

【0121】此外，將貼附細胞的Gms、Gms-pnipam，加入活/死染劑來辨識明膠微球表面上細胞死活程度。染活細胞的鈣黃綠素(Calcein-AM)會激發綠色螢光，而染死細胞的BOBO-3 Iodide激發紅色螢光。結果顯示細胞貼附於微球上有大量綠色螢光細胞與少數死細胞，而細胞在使用胰蛋白酶脫附時間太長會有破壞膜蛋白造成之損傷。另外，Gms-pnipam脫附下來的細胞呈綠色螢光，紅色細胞佔少數，而Gms則是脫附10分鐘後，細胞未能完全脫附，許多健康細胞仍然貼附於微球上。因此證明Gms具有吸附細胞之能力，但微球表面物理塗層感溫型聚合物後，可提升載體釋放細胞的脫附能力。

【0122】 5.4 可溶解型微球之細胞貼附率及脫附行為

【0123】第23圖顯示微球Gms、Gms-pnipam吸附細胞之能力。培育1小時後Gms-pnipam達到約40%細胞貼附率、Gms為23%細胞貼附率，而24小時後Gms、

Gms - pnipam 分別為 74 %、85 %。經表面感溫型聚合物塗層後，貼附率提升 11 %。接著評估明膠微球 Gms、Gms - pnipam 脫附特性，上節 5.3 已提到 Gms、Gms - pnipam 經胰蛋白酶消化相同時間，Gms 脫附效率小於 Gms - pnipam。收集脫附下來之細胞經清洗離心計算後，Gms、Gms - pnipam 所收穫細胞數分別為 192500 cell/mL、355750 cell/mL，經表面感溫型聚合物塗層後，其脫附比例提升 45.8 %。

【0124】 5.5 可溶解還原型微球之脫貼附測試

【0125】 本揭露於製作微球時使用氧化還原特性之雙硫鍵結構的交聯劑 DTSP，合成出 Gms - DTSP、Gms - DTSP - pnipam、Gms - DTSPSe - pnipam 培養兩天後用光學顯微鏡觀察 MDCK 細胞於微球上貼附的情況。

【0126】 Gms - DTSP - pnipam 還原型明膠微球使用三種 GSH、L - 半胱胺酸 (L - cysteine)、DTT 還原劑 (濃度皆為 25 mM) 進行瓦解行為之評估，觀察細胞脫附的情形。從第 24 圖可知，使用 GSH 還原劑 60 分鐘後微球均無脹破、溶解等變化；從第 25 圖可知，使用 L - 半胱胺酸還原劑經過 30 分鐘後微球腫大且細胞成團塊狀掉落，60 分鐘時微球完全溶解消失；從第 26 圖可知，使用 DTT 還原劑 5 分鐘就能觀察到微球腫大變形快速瓦解，於 30 分鐘時只剩下團狀細胞。在三種測試的還原劑中，DTT 含雙硫醇在切斷雙硫鍵表現出最佳的效果，比起 GSH 和 L - 半胱胺酸

有更高的氧化還原電位，GSH 和 L-半胱胺酸則為單硫醇需要其他含硫醇的分子催化才能加速提升雙硫鍵斷裂還原。

【0127】 Gms-DTSP、Gms-DTSP-pnipam 使用 DTT 還原劑需要 30 分鐘使微球降解消失，特別的是 Gms-DTSP 溶解型態屬於 DTT 將微球脹破，交聯網絡遭還原劑切斷使球體破裂細胞最終為單顆型態。表面塗層的 Gms-DTSP-pnipam 微球瓦解型態為 DTT 將細胞以團狀的方式脫離，推斷有外層感溫型聚合物塗層保護導致塗層與細胞先從外脫落，才能看到球體自身慢慢瓦解。最後的細胞呈團狀型態，於是將團聚之細胞與感溫型聚合物塗層一起脫落下來(圖未示)。

【0128】 另外，感溫型聚合物塗層於低溫下屬於親水性質，Gms-DTSP-pnipam 放置於低溫(如 4°C)於 5 分鐘逐漸崩解，於 10 分鐘細胞成為分散狀態。而 Gms-DTSP-Se-pnipam 瓦解時間最短(圖未示)。

【0129】 將貼附細胞的 Gms-DTSP、Gms-DTSP-pnipam、Gms-DTSP-Se-pnipam，加入活/死染劑來辨識明膠微球表面上細胞死活程度。結果顯示，細胞貼附於微球被大量綠色螢光細胞包附，瓦解後脫附下來的細胞被激發成綠色螢光(圖未示)，證明還原型明膠微球具有吸附細胞能力、且瓦解時細胞仍存活之能力。

【0130】 5.6 還原型明膠微球之細胞貼附率及脫附行為

【0131】 第 27 圖顯示可溶解還原型與感溫型微球

G m s - D T S P 、 G m s - D T S P - p n i p a m 、 G m s - D T S P - S e - p n i p a m 吸附細胞之能力。培養 1 小時後 G m s - D T S P 、 G m s - D T S P - p n i p a m 、 G m s - D T S P - S e - p n i p a m 的細胞貼附率分別為 40 %、39 %、29.5 %；8 小時後 G m s - D T S P 最先達到 88 %；24 小時後 G m s - D T S P 、 G m s - D T S P - p n i p a m 、 G m s - D T S P - S e - p n i p a m 細胞吸附率分別為 95 %、90 %、47 %。從實施例 3.3 的 SEM 觀察微球表面具有微小凹凸孔洞增加細胞貼附，其中 G m s - D T S P - p n i p a m 吸附細胞之能力優於 G m s - D T S P - S e - p n i p a m。

【0132】 5.7 收穫細胞之回養測試

【0133】 為了證明使用明膠微球收穫下來的細胞具有活性及後續的醫學應用之能力，將細胞從 G m s、G m s - p n i p a m、G m s - D T S P、G m s - D T S P - p n i p a m、G m s - D T S P - S e - p n i p a m 脫附後，收穫的細胞經由清洗離心後放入至培養皿進行回養。結果顯示，培養一天後觀察得知由 G m s、G m s - D T S P - S e - p n i p a m 培養的細胞，原始收回下來的細胞較少導致生長能力較慢，而其餘 G m s - p n i p a m、G m s - D T S P、G m s - D T S P - p n i p a m 皆呈現八分滿的狀態，細胞緊密鋪平簇狀形態生長，表現良好之細胞活性(圖未示)。因此，本揭露之微球脫附下來的細胞具有重複培養之能力。

【0134】 本揭露的可溶解還原型的微載體通過還原型交聯劑，有助於細胞的貼附，使用還原劑可易於細胞的脫附。

在一些實施方式中，使用還原劑 30 分內就能脫附細胞，且細胞脫附後均為活細胞，證明此方式並無毒性。

【0135】 本揭露的可溶解感溫型的微載體通過感溫型聚合物的包覆，培養溫度高於 LCST 時有助於細胞的貼附；通過溫度低於 LCST 時，有助於細胞的脫附。在一些實施方式中，浸泡在培養基中膨潤後球型變完整，粒徑穩定控制在 280 - 350 微米間，同時微球表面經感溫型聚合物保護，有助於微球在 37°C 之穩定性。在一些實施方式中，經由感溫型聚合物改質，細胞貼附率提升 11%，使用酶解法細胞脫附率提升 45.8%，有效提升微載體的貼附與脫附能力。

【0136】 雖然本揭露已以實施方式揭露如上，然其並非用以限定本揭露，任何熟習此技藝者，在不脫離本揭露之精神和範圍內，當可作各種之更動與潤飾，因此本揭露之保護範圍當視後附之申請專利範圍所界定者為準。

【符號說明】 無

【發明申請專利範圍】

【請求項1】一種可溶解感溫型的微載體，包含：

一溶解型聚合物，以一交聯劑將複數溶解型單體彼此鍵結，其中該交聯劑包含零長度交聯劑與非零長度交聯劑；以及

一感溫型聚合物，包覆該溶解型聚合物，其中該感溫型聚合物包含一溫度敏感高分子與一親水性單體聚合所形成；

其中，該溫度敏感高分子包含聚(N-異丙基丙烯醯胺)(poly(N-isopropylacrylamide)，PNIPAM、PNIPA、PNIPAAm、NIPA、或 PNIPAA)、聚(N,N-二乙基丙烯醯胺)(poly(N,Ndiethylacrylamide)，PDEAAM)、聚(N-乙 烯 基 己 內 醯 胺 (poly(N-vinylcaprolactam)，PVCL)、聚(2-異丙基-2-惡 唑 啉)(poly(2-isopropyl-2-oxazoline)，PIOZ)、泊咯沙姆(poloxamer)、或其組合；

其中，該親水性單體包含丙烯胺(allylamine，ALA)、丙烯醯胺(acrylamide，AAm)、[2-(甲基丙烯醯基氧基)乙 基]二 甲 基-(3-磺 酸 丙 基)氫 氧 化 鉍 ([2-(Methacryloyloxy)ethyl]dimethyl-(3-sulfopropyl)ammonium hydroxide，DMAPS)、甲基丙烯酸二乙氨基乙酯(2-(Diethylamino)ethyl methacrylate，DEAEMA)、甲基丙烯酸 羥 乙 酯 (2-Hydroxyethyl methacrylate，HEMA)或其組合。

【請求項2】 如請求項1所述之微載體，其中該零長度交聯劑包含碳二亞胺(carbodiimide，EDC)、N,N'-二環己基碳二亞胺(N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide，DCC)、或其組合。

【請求項3】 如請求項1所述之微載體，其中該非零長度交聯劑包含甲醛(formaldehyde)、戊二醛(glutaraldehyde)、丙烯醯胺(acrylamides)、異氰酸酯(isocyanate)、梔子素(genipin)、DTSP(3,3'-dithiodipropionic acid di(N-hydroxysuccinimide ester))、DSeDPA-NHS(3,3'-diselanediyldi-propanoic acid-N-hydroxysuccinimide)、BSSS(bis(sulfosuccinimidyl)suberate，BS3)、DSG(disuccinimidyl glutarate)、sulfo-EGS(ethylene glycolbis(sulfosuccinimidylsuccinate))、DSS(disuccinimidyl suberateS)、EGS(ethylene glycolbis(succinimidylsuccinate))、BS2G(bis(sulfosuccinimidyl)glutarate)、DTSSP(3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidylpropionate))、DST(disuccinimidyl tartrate)、BSOCOES(bis(2-(succinimidooxycarbonyloxy)ethyl)

sulfone)、DPDPB

(1,4-di-(3'-(2'pyridylthio)-propionamido)

butane)、sulfo DST (sulfordisuccinimidyl tartrate)、或 DSP (dithiobis (succinimidyl propionate))。

【請求項4】 如請求項1所述之微載體，其中該溶解型聚合物包含纖維素、膠原蛋白、明膠、海藻酸鈉、殼聚糖、玻尿酸、果酸或其組合。

【請求項5】 如請求項1所述之微載體，其中該感溫型聚合物為聚(N-異丙基丙烯醯胺-co-丙烯胺)(P(NIPAM-co-ALA))或其組合。

【請求項6】 如請求項5所述之微載體，其中該丙烯胺佔該聚(N-異丙基丙烯醯胺-co-丙烯胺)的重量百分比為1%至15%。

【請求項7】 如請求項1所述之微載體，其中該感溫型聚合物以該交聯劑鍵結於該溶解型聚合物之外。

【請求項8】 如請求項1所述之微載體，其中該感溫型聚合物以物理性結合於該溶解型聚合物之外。

【請求項9】 一種製備可溶解感溫型的微載體之方法，包含以下步驟：

提供一溶解型聚合物；

將該溶解型聚合物與一交聯劑進行一混合製程，當該溶解型聚合物與該交聯劑接觸時會進行交聯，獲得一可溶解型的微載體，其中該交聯劑包含零長度交聯劑與非零長度交聯劑；

提供一感溫型聚合物；以及

混合該可溶解型的微載體與該感溫型聚合物，獲得該可溶解感溫型的微載體，其中該感溫型聚合物包含一溫度敏感高分子與一親水性單體聚合所形成；

其中，該溫度敏感高分子包含聚(N-異丙基丙烯醯胺)、聚(N,N-二乙基丙烯醯胺)、聚(N-乙基己內醯胺、聚(2-異丙基-2-惡唑啉)、泊咯沙姆、或其組合；

其中，該親水性單體包含丙烯胺、丙烯醯胺、[2-(甲基丙烯醯基氧基)乙基]二甲基-(3-磺酸丙基)氫氧化銨、甲基丙烯酸二乙氨基乙酯、甲基丙烯酸羥乙酯、或其組合。

【請求項10】 如請求項9所述之方法，其中該溶解型聚合物包含纖維素、膠原蛋白、明膠、海藻酸鈉、殼聚醣、玻尿酸、果酸或其組合。

【請求項11】 如請求項9所述之方法，其中該混合製程包含微流道、滴定、靜電紡絲、乳化交聯、薄膜乳化或其組

合。

【請求項12】如請求項9所述之方法，其中該提供該感溫型聚合物的步驟，包含：

以自由基聚合方法聚合該溫度敏感高分子與該親水性單體，獲得該感溫型聚合物。

【請求項13】如請求項12所述之方法，更包含：

提供一還原型交聯劑；以及

混合該可溶解型的微載體、該還原型交聯劑與該感溫型聚合物，獲得該可溶解感溫型的微載體，

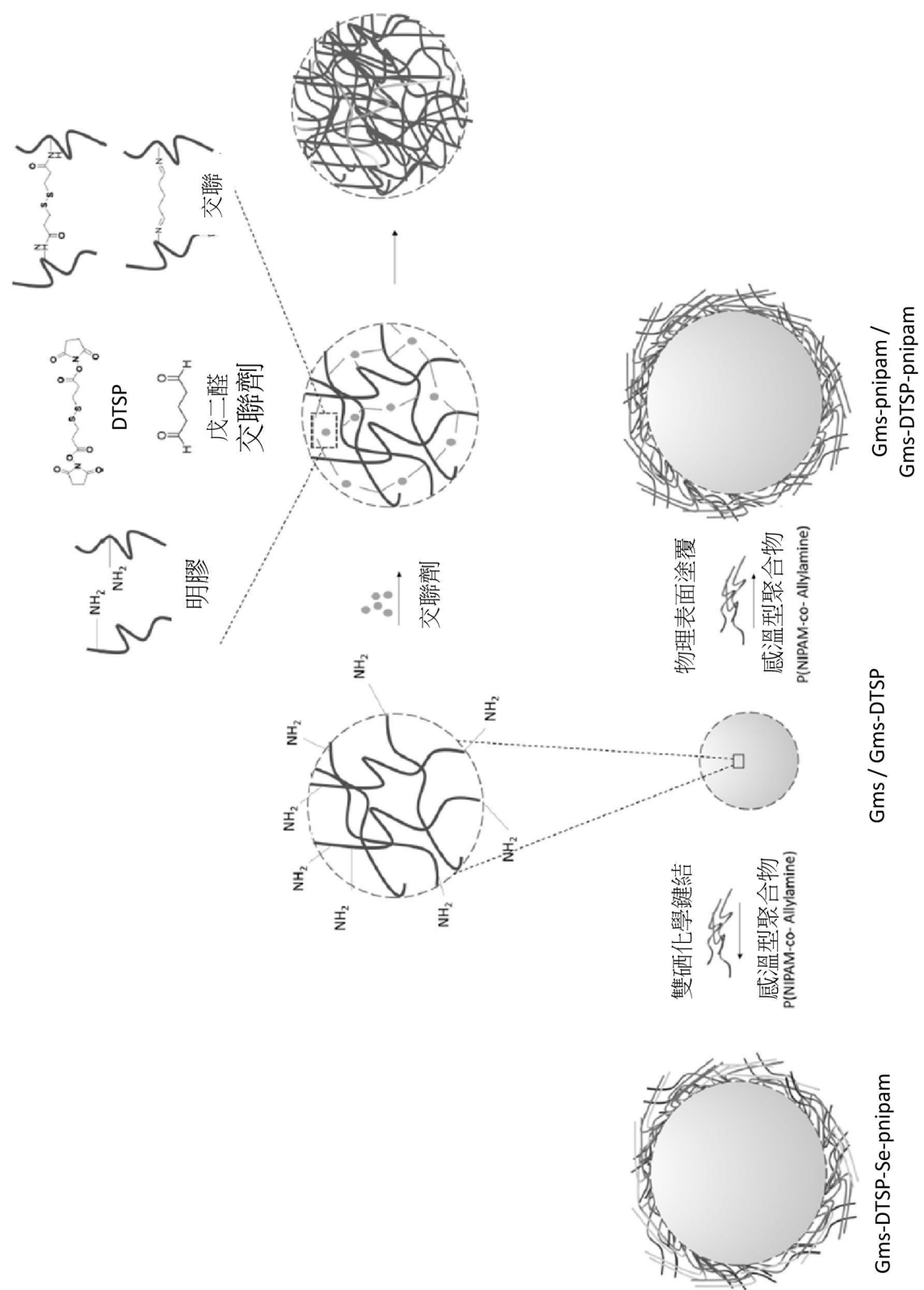
其中，該感溫型聚合物以該還原型交聯劑鍵結於該溶解型聚合物之外。

【請求項14】一種如請求項1所述之可溶解感溫型的微載體的使用方法，當該可溶解感溫型的微載體接觸一還原劑、接觸一較低臨界溶液溫度(lower critical solution temperature, LCST)、先接觸該還原劑再接觸該較低臨界溶液溫度、或先接觸較低臨界溶液溫度再接觸該還原劑時，則該可溶解感溫型的微載體進行瓦解。

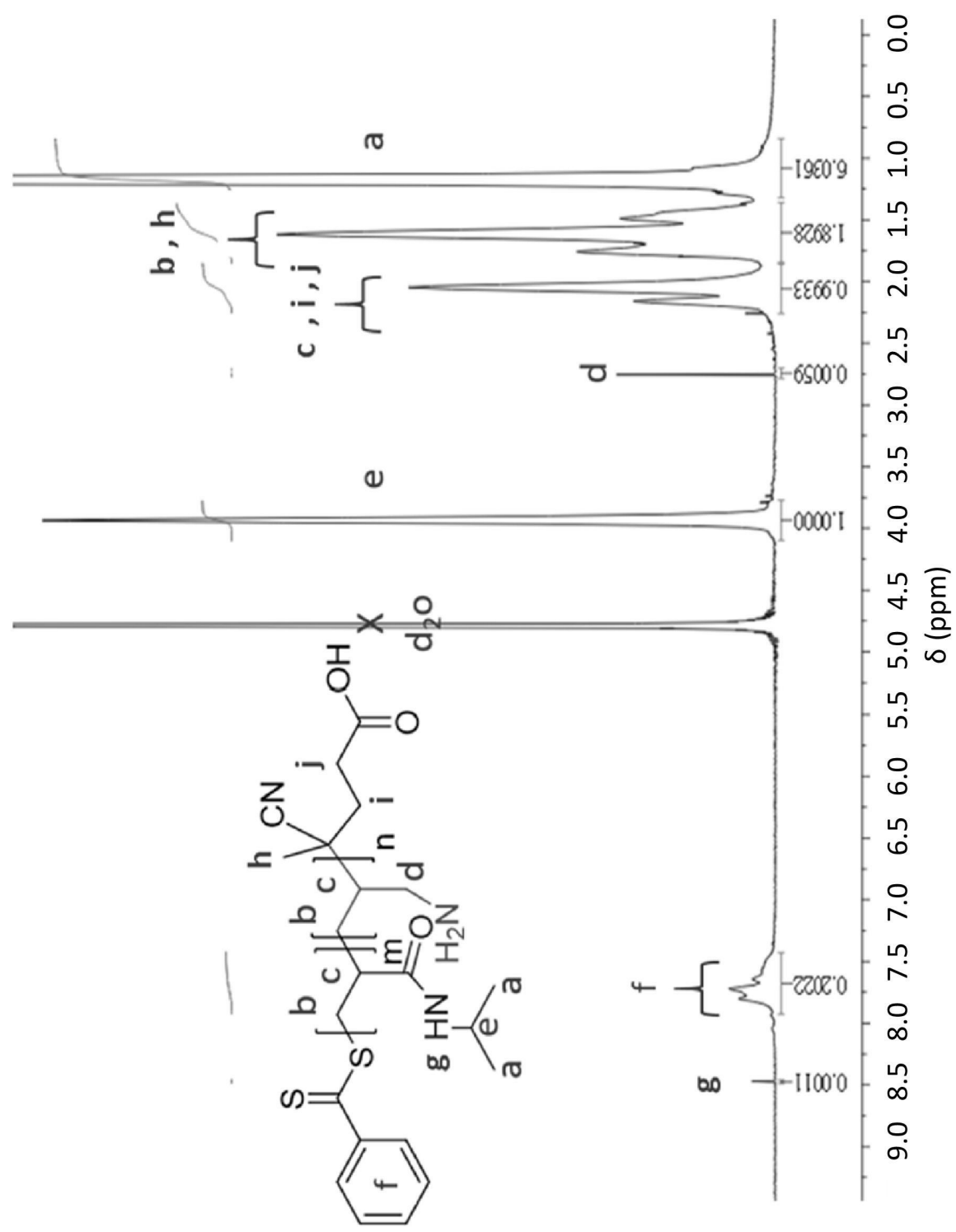
【請求項15】如請求項14所述之使用方法，其中該還原劑包含二硫蘇糖醇(dithiothreitol, DTT)、 β -巯基乙醇(β -mercaptoethanol)、穀胱甘肽(Glutathione，

G S H) 、 半 胱 胺 酸 (c y s t e i n e) 、 2 - 巯 基 乙 醇
 β - m e r c a p t o e t h a n o l (β - M E) 、 三 (2 - 羧 乙 基) 膦
T r i s (2 - c a r b o x y e t h y l) p h o s p h i n e (T C E P) 或 其 組
合 。

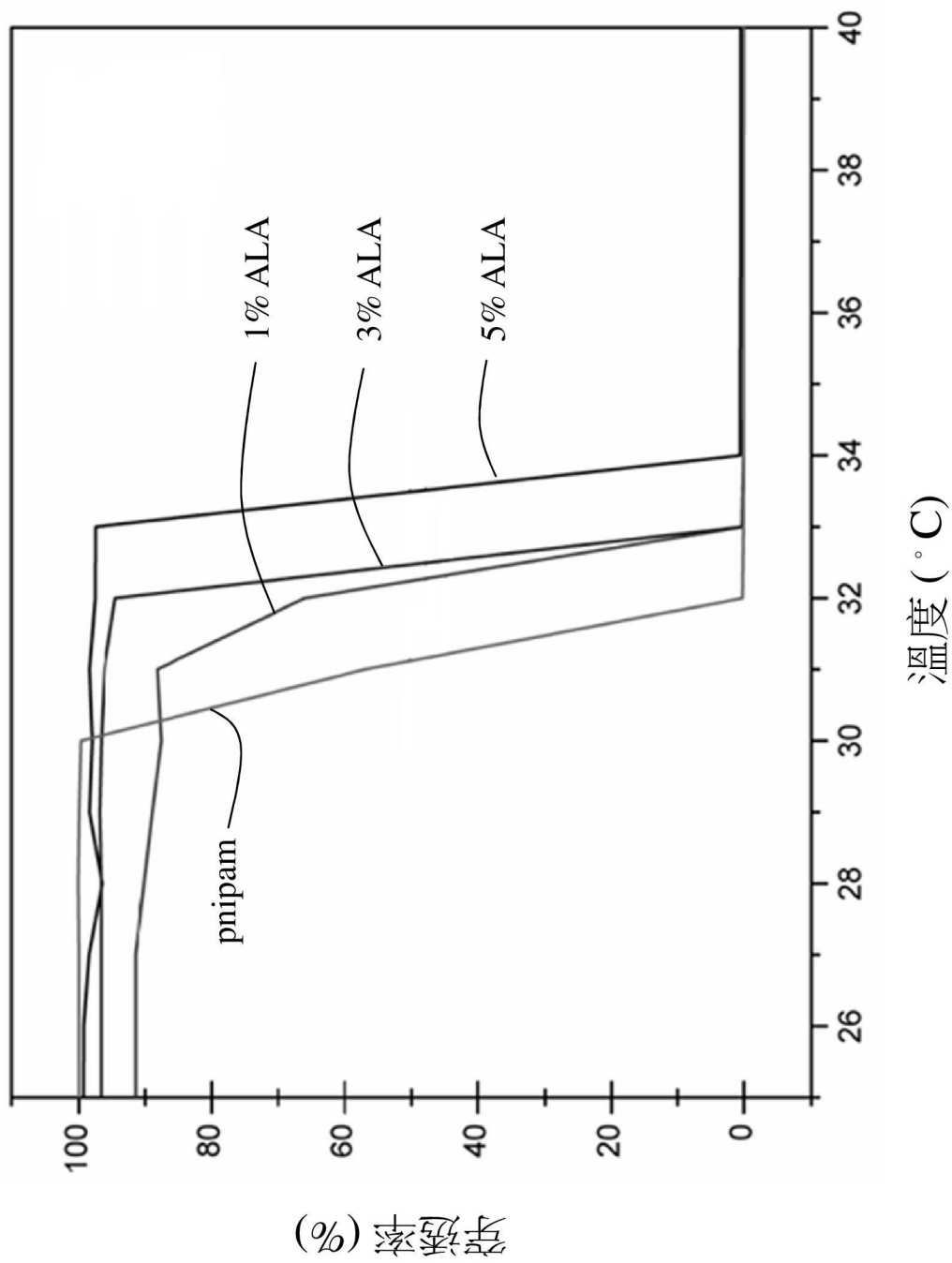
【發明圖式】



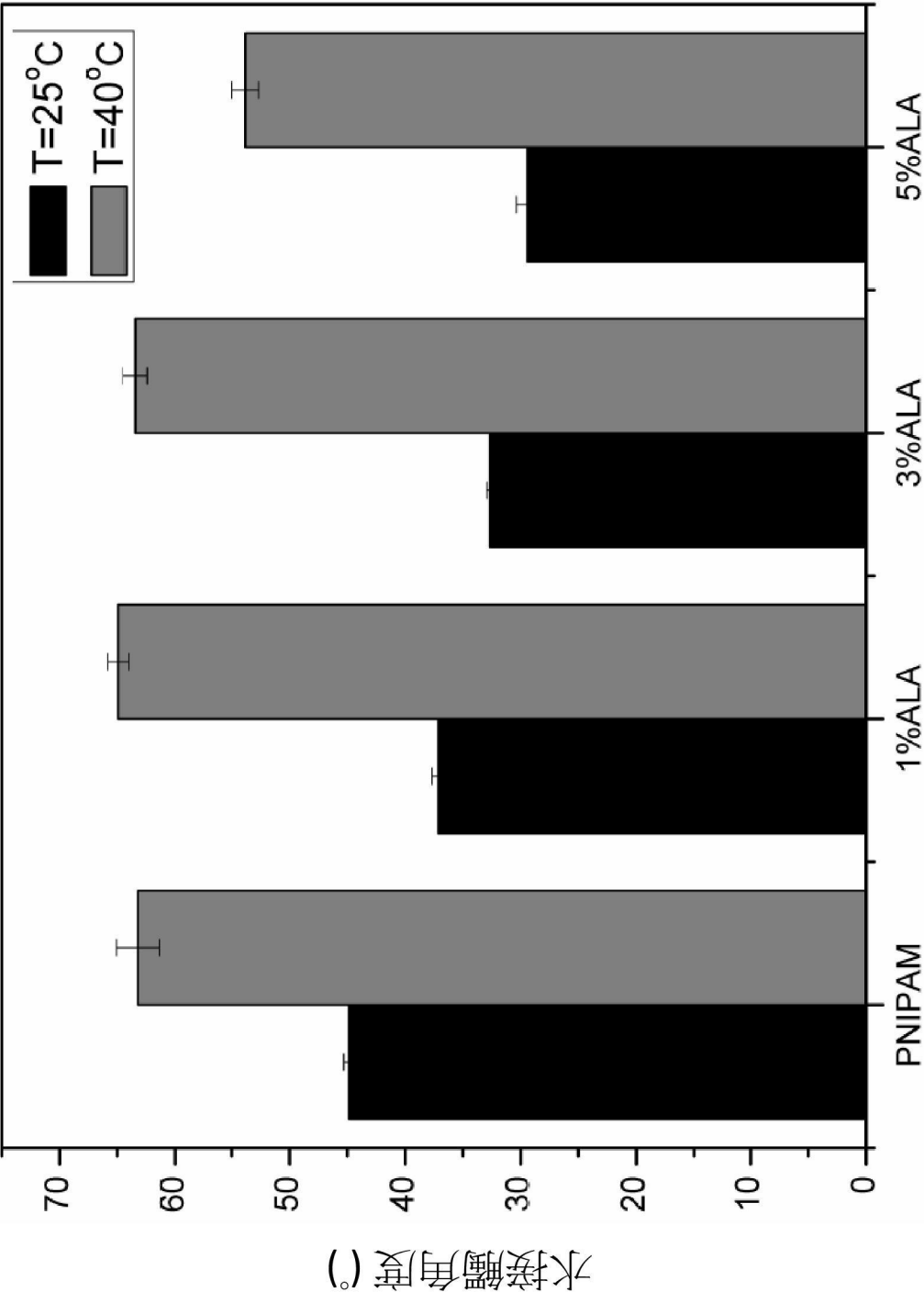
第1圖



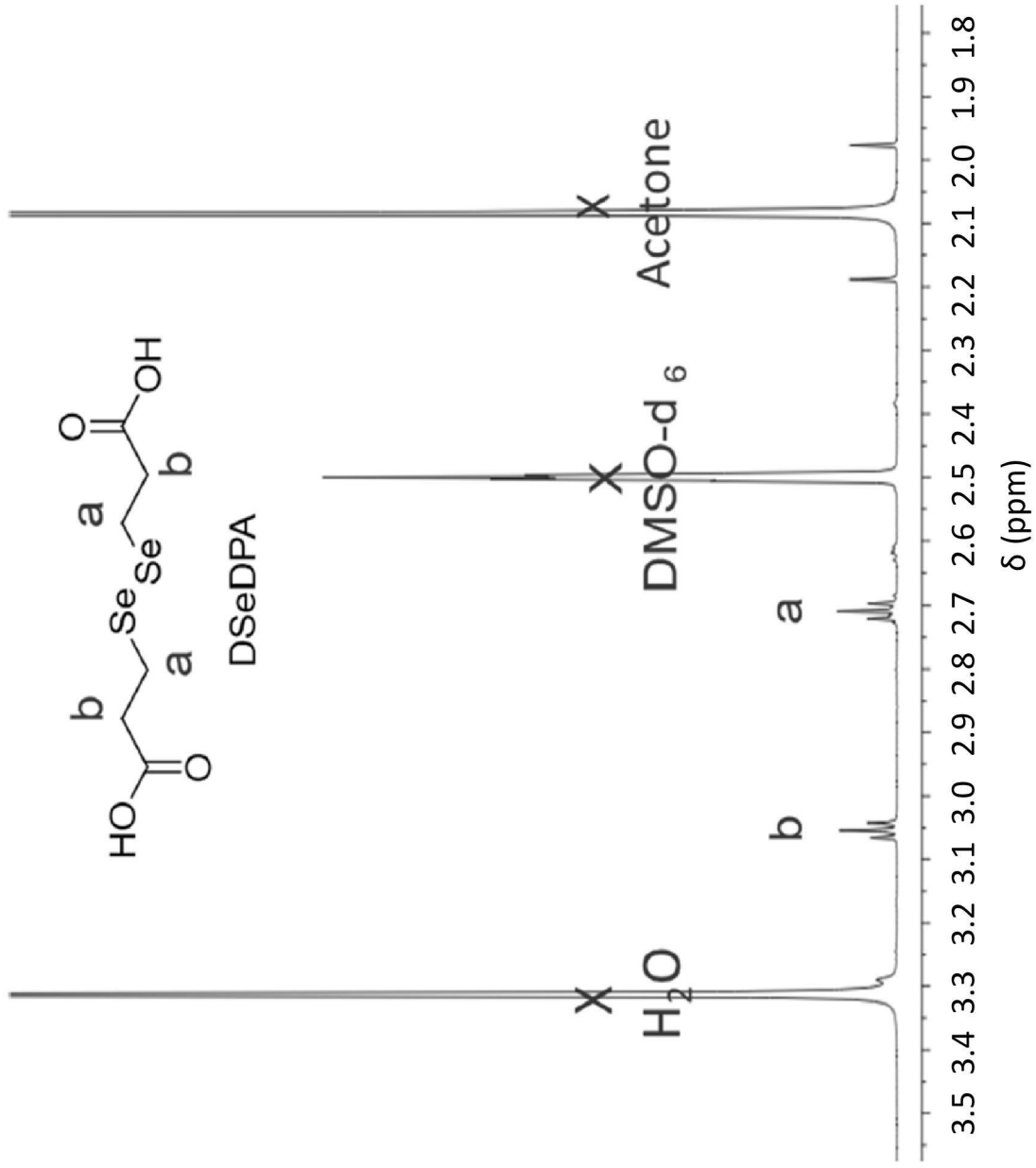
第2圖



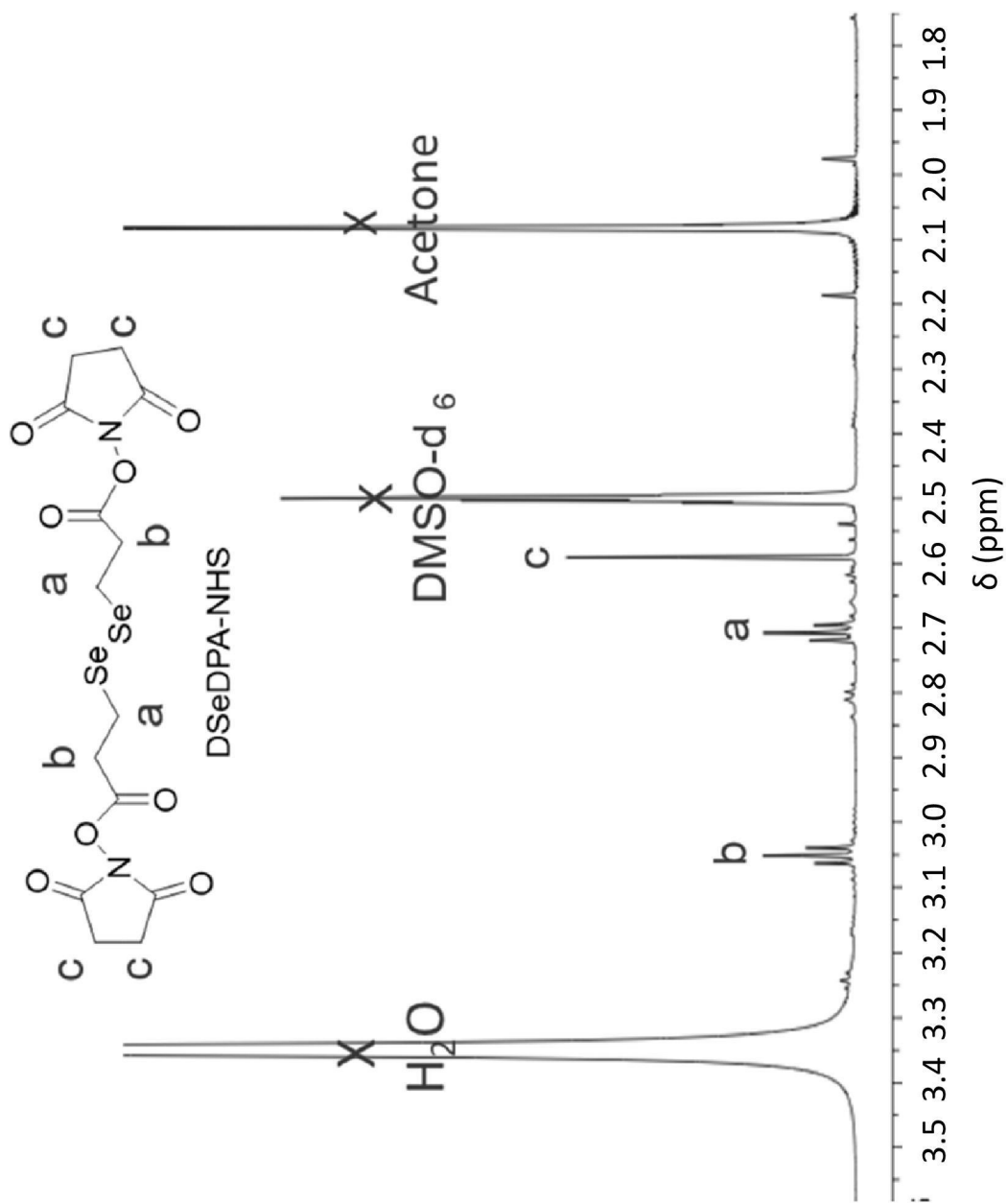
第3圖



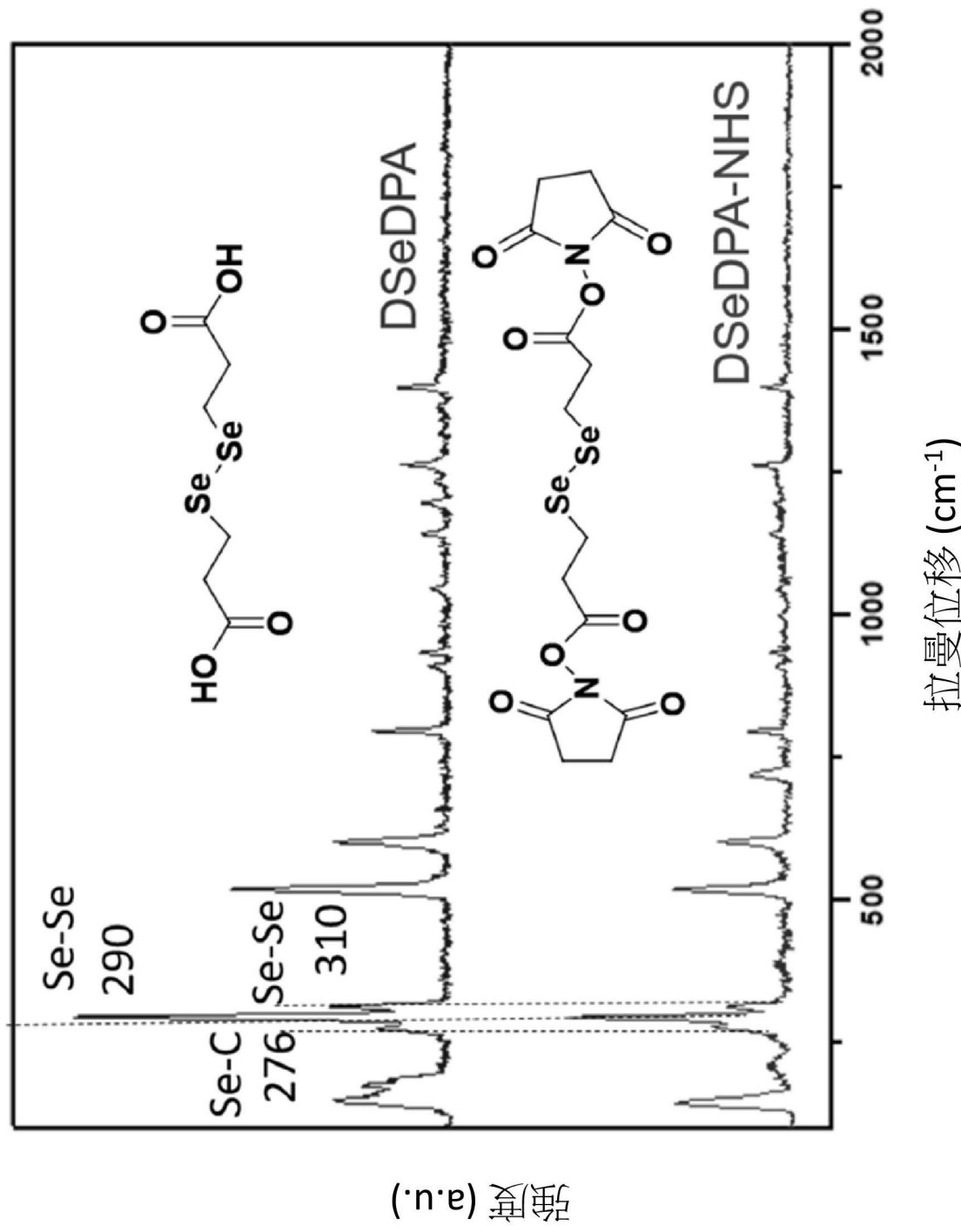
第4圖



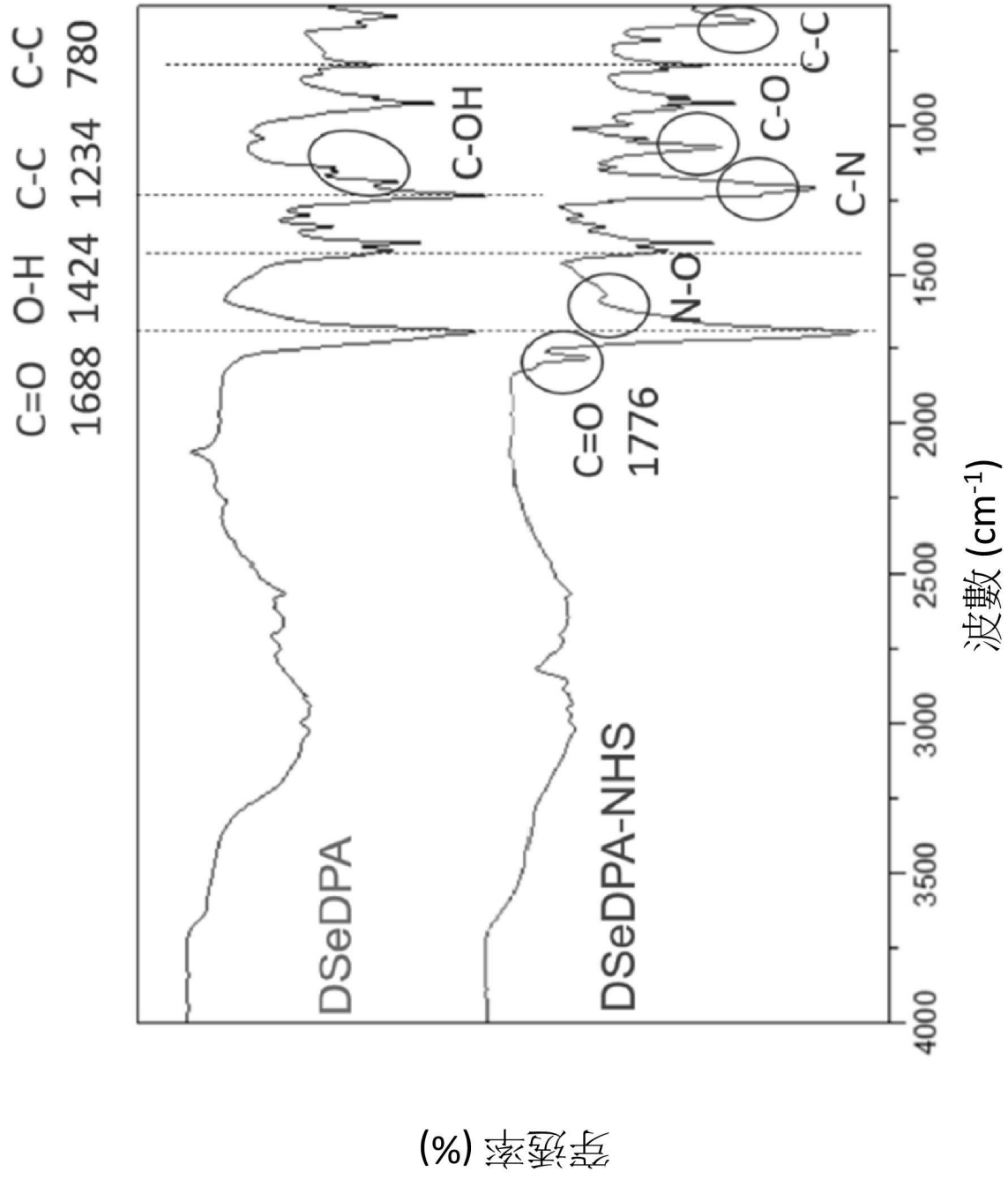
第5圖



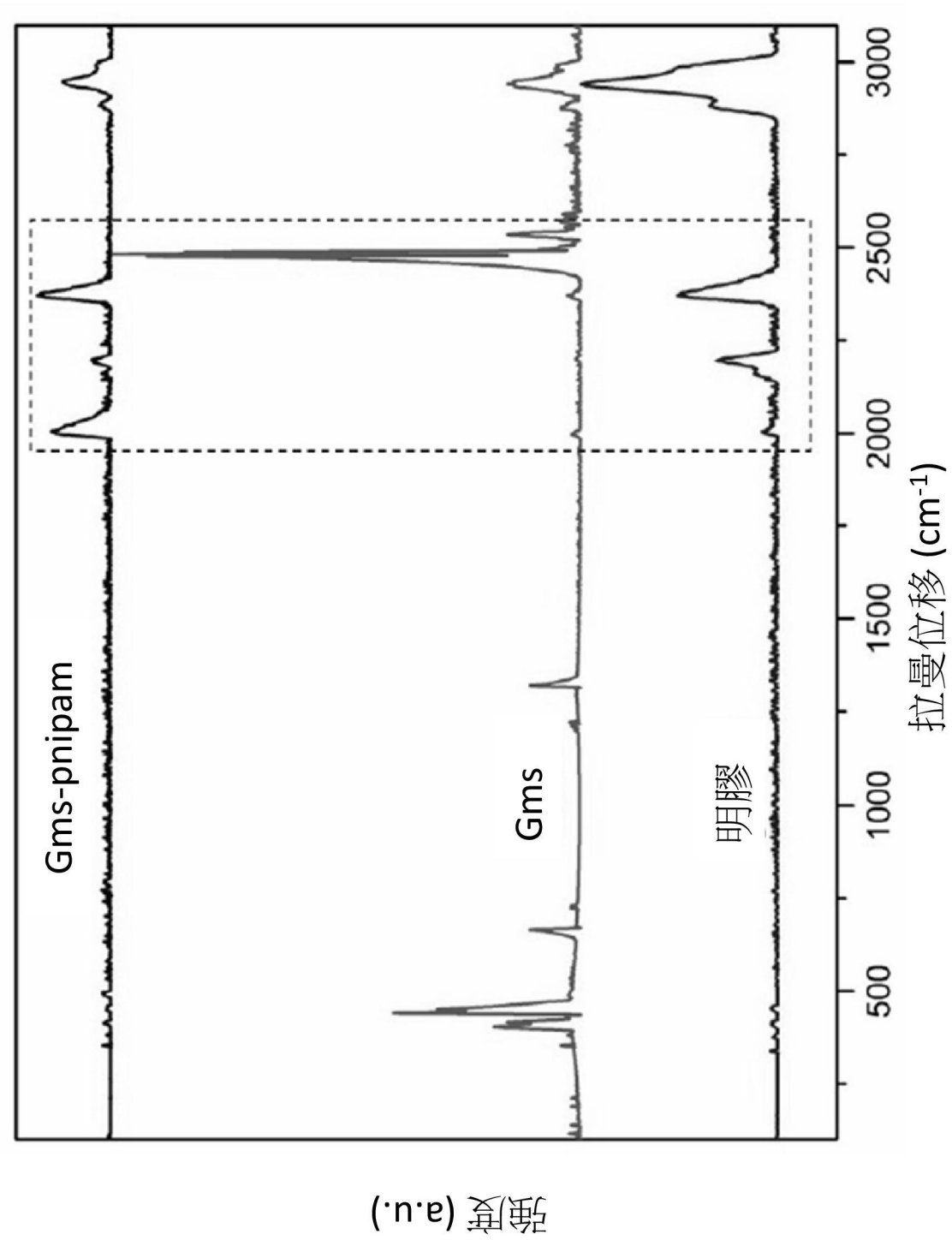
第6圖



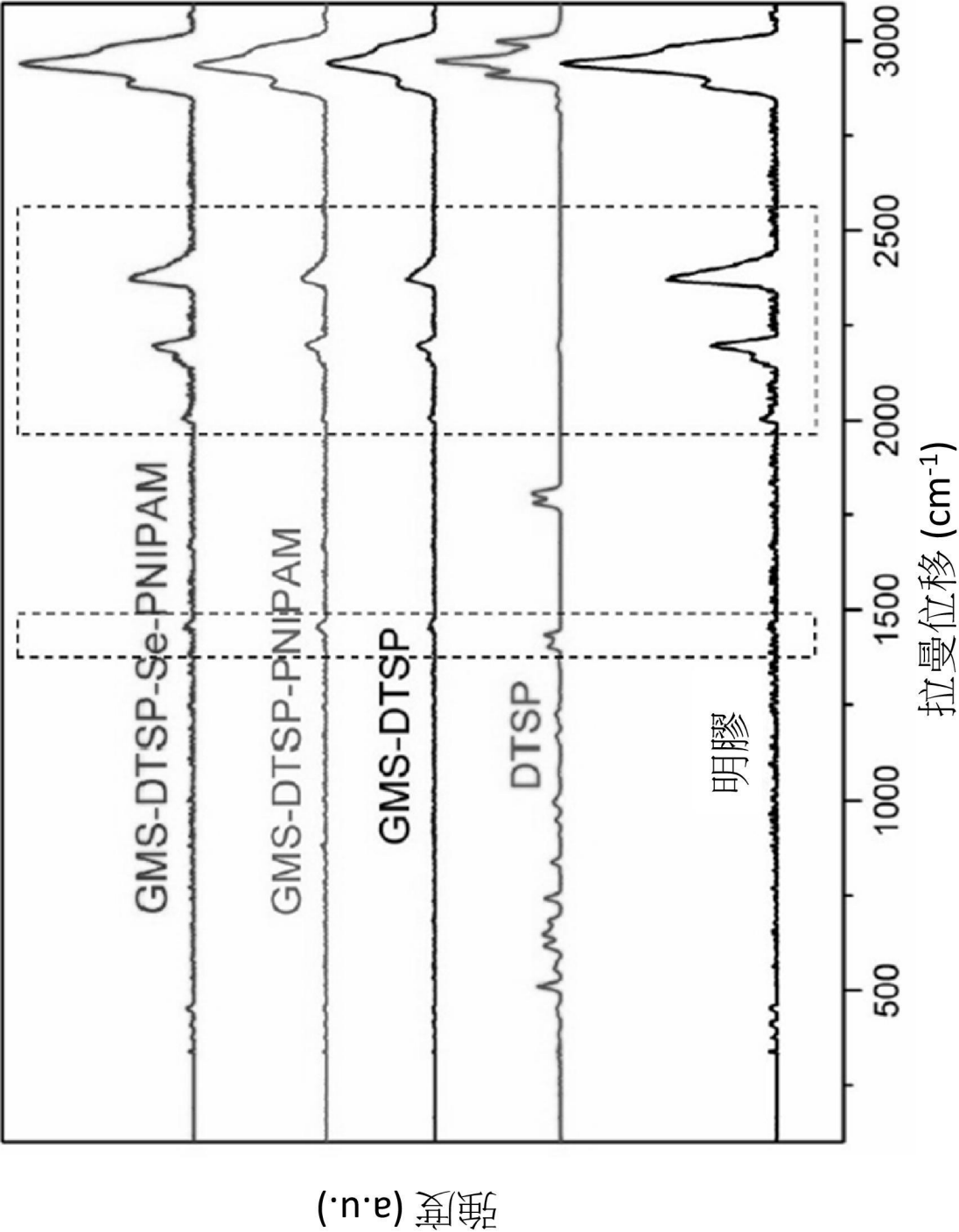
第7圖



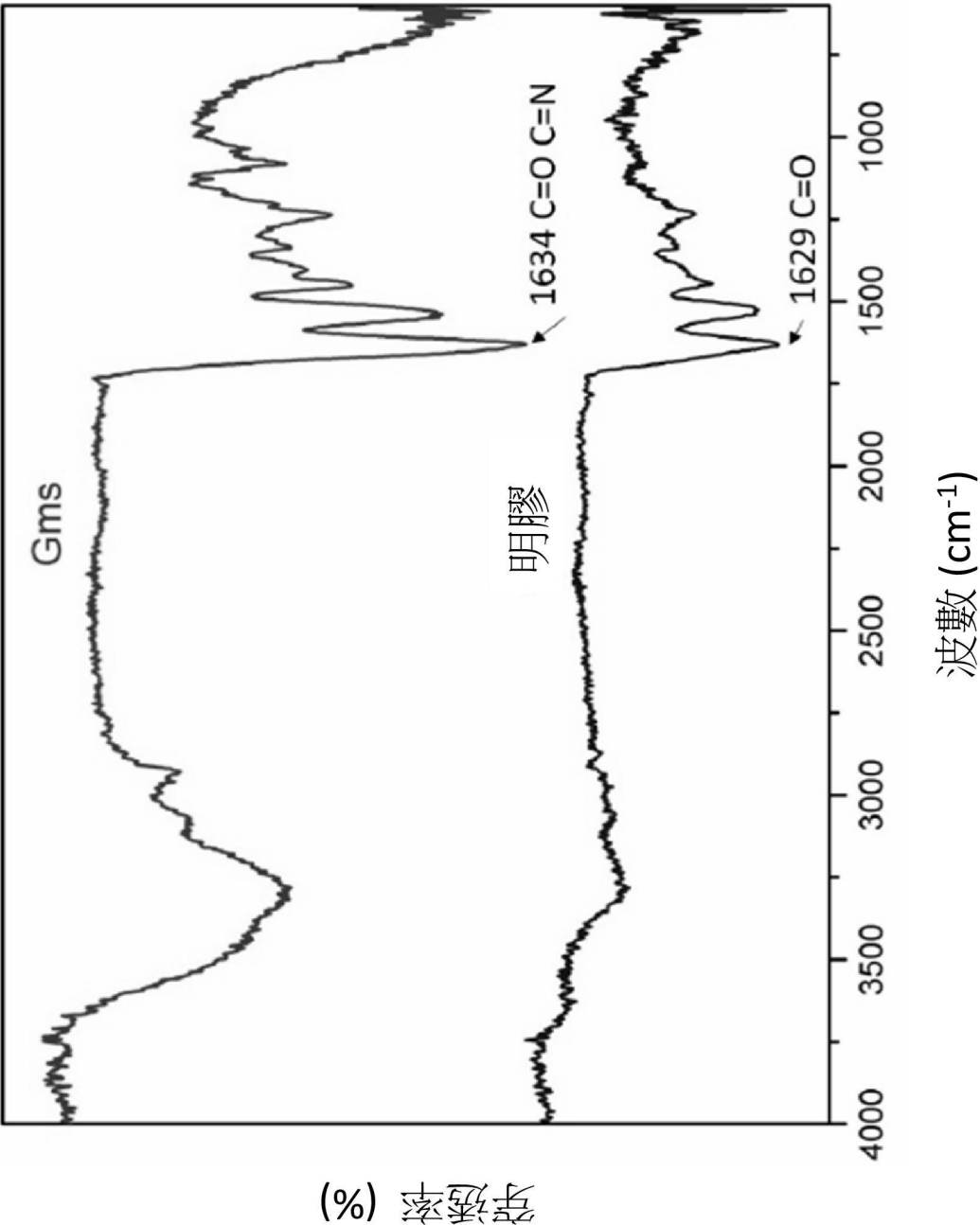
第8圖



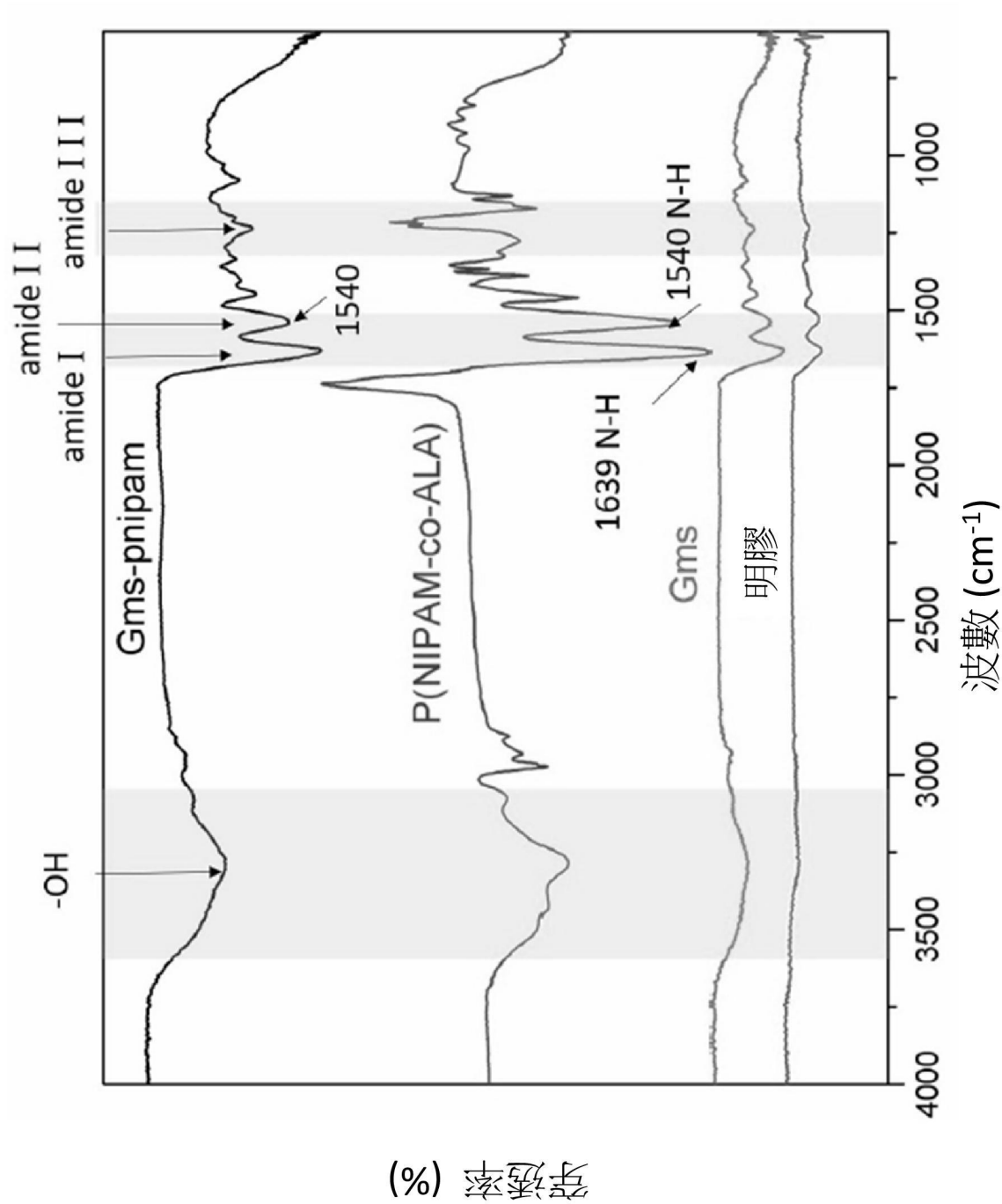
第9圖



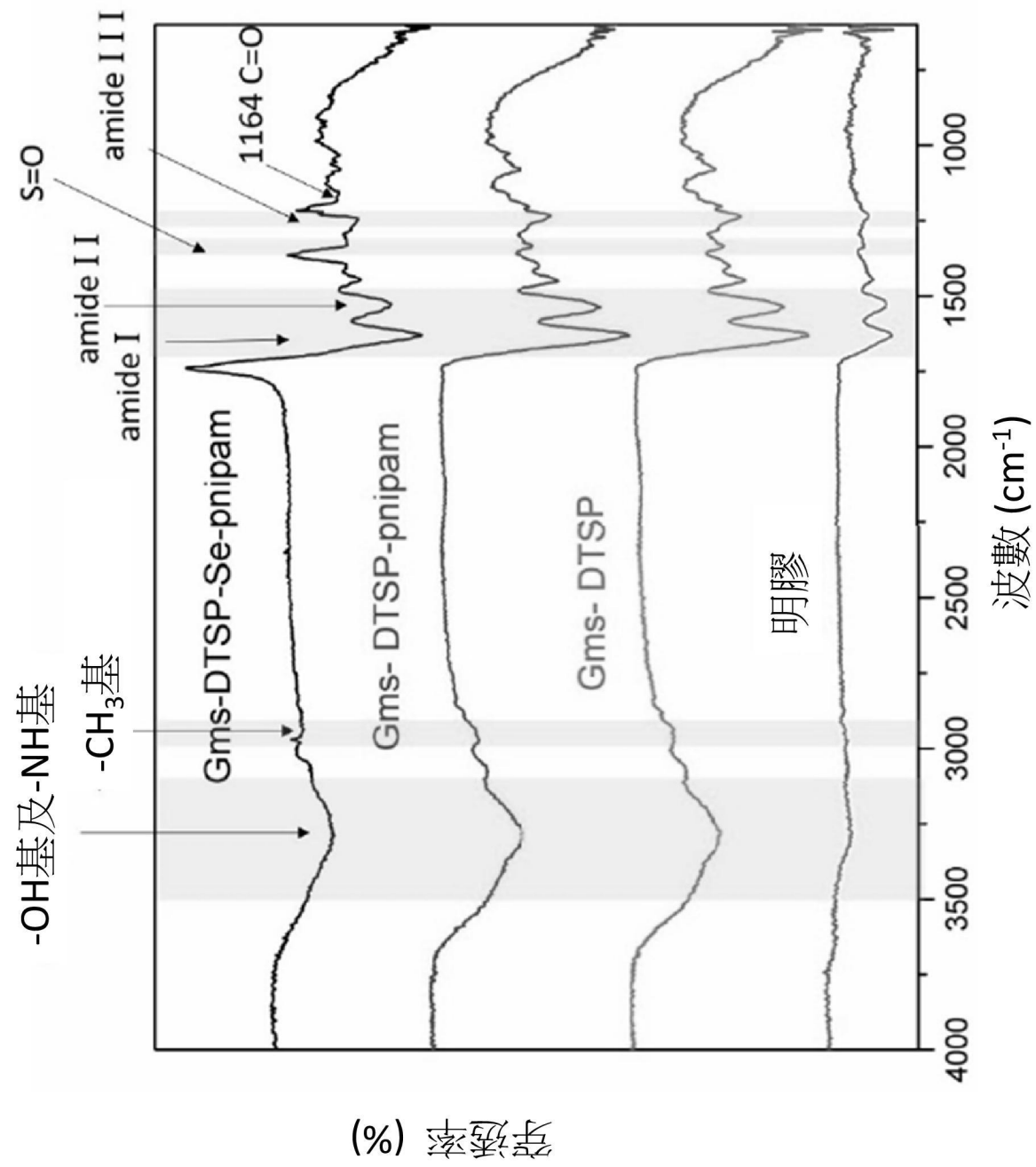
第10圖



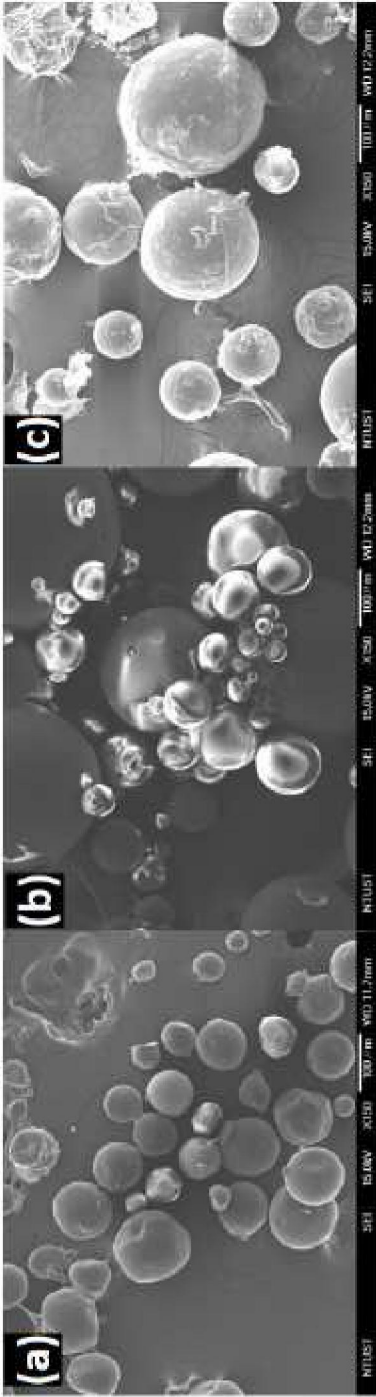
第11圖



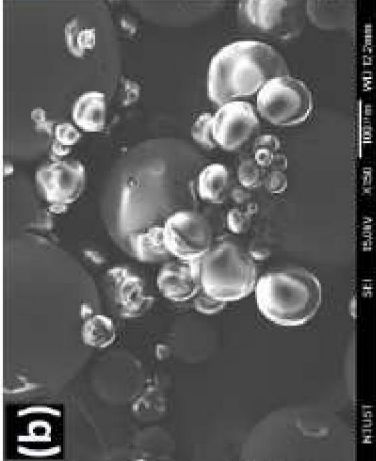
第12圖



第13圖



第14a圖



第14b圖



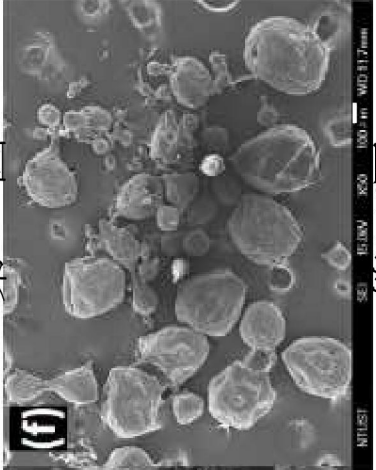
第14c圖



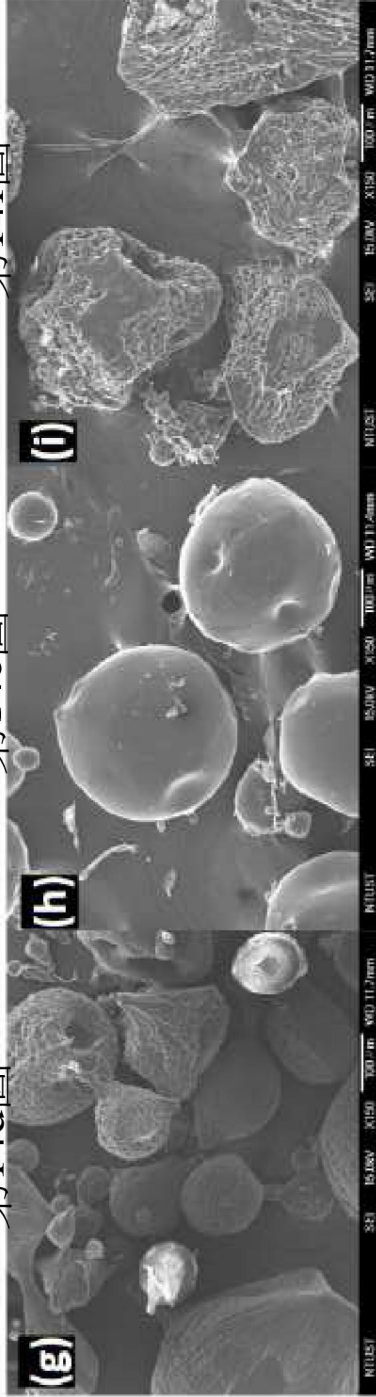
第14d圖



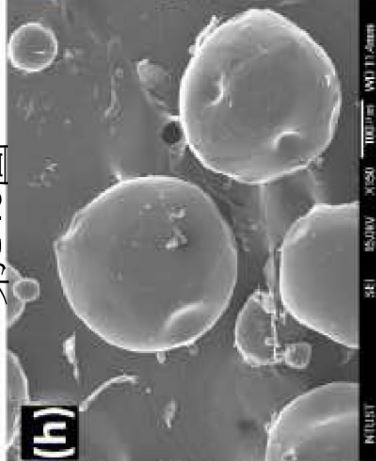
第14e圖



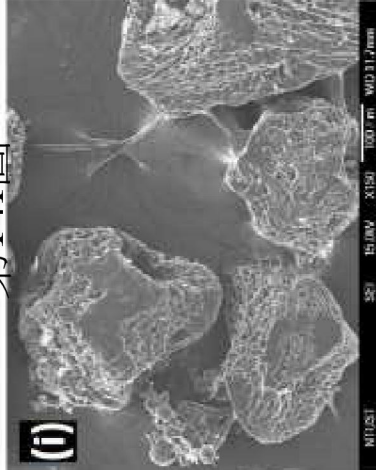
第14f圖



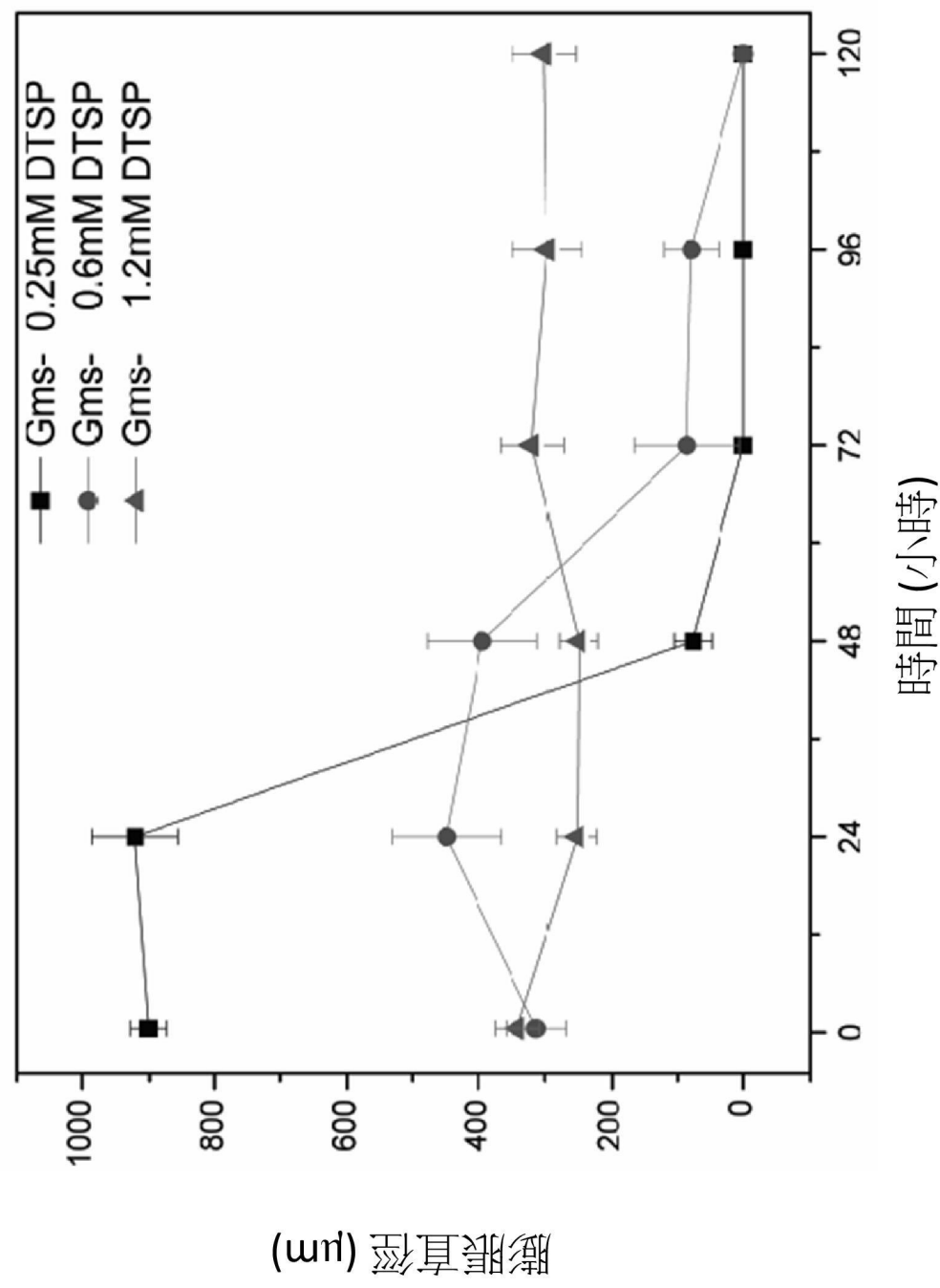
第14g圖



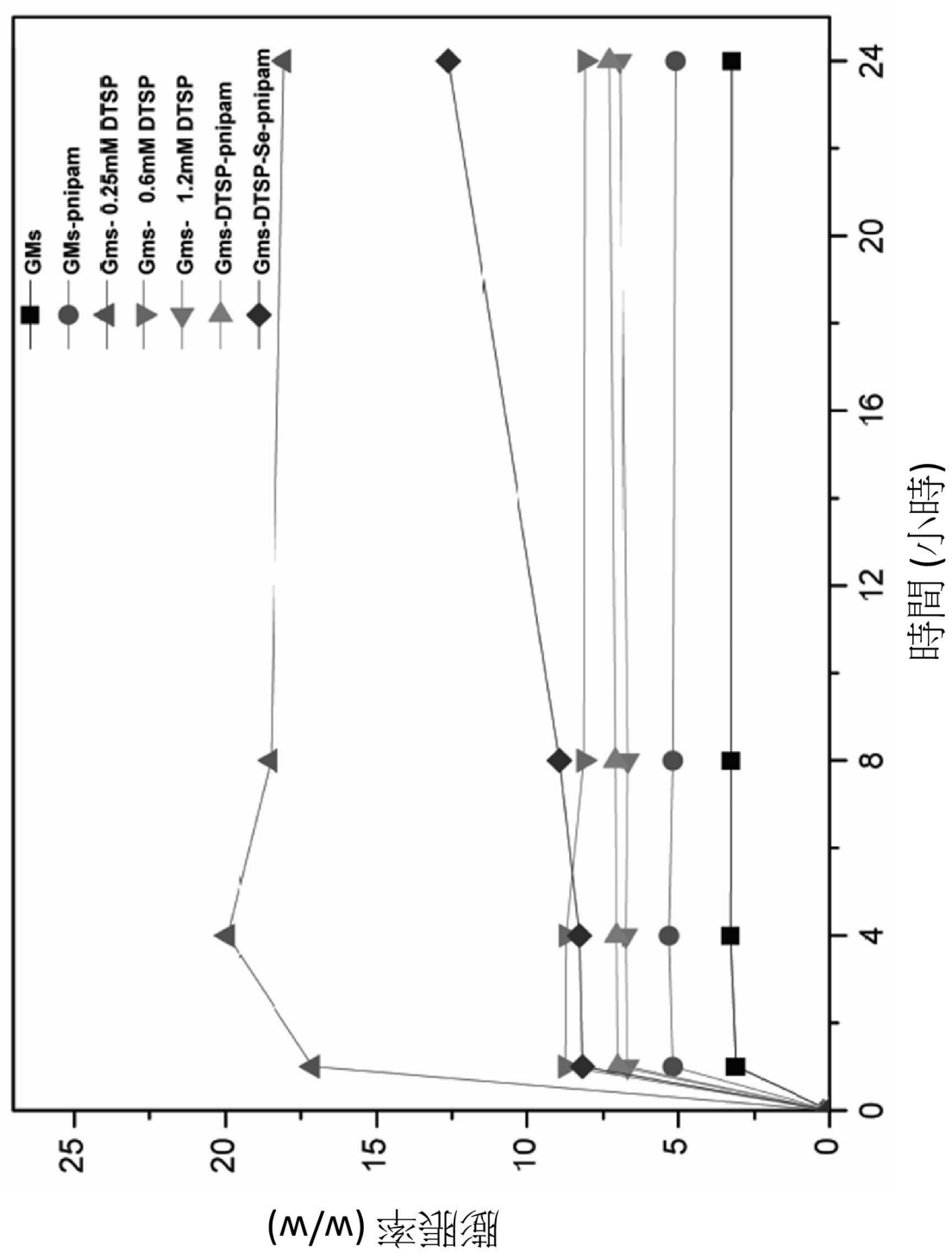
第14h圖



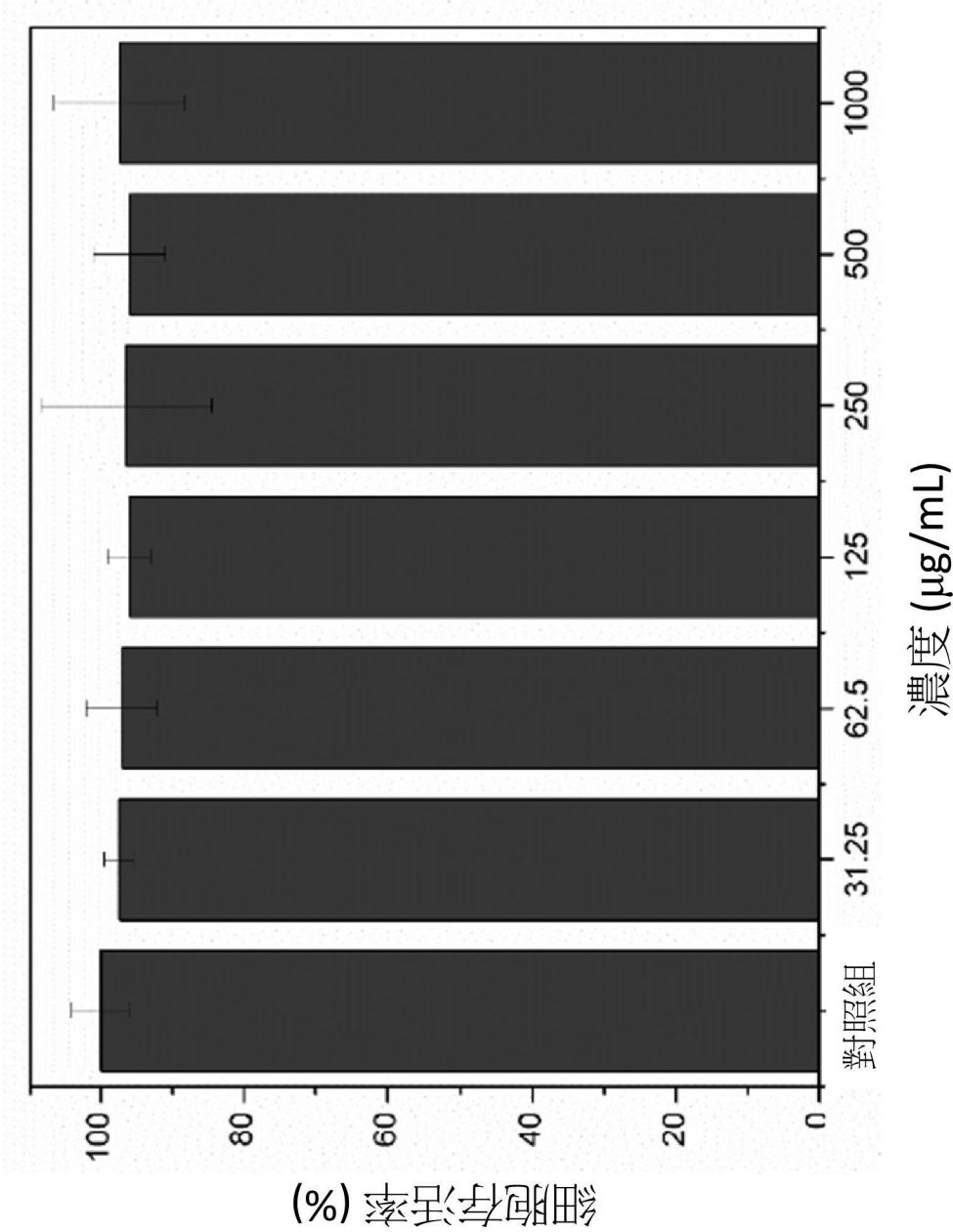
第14i圖



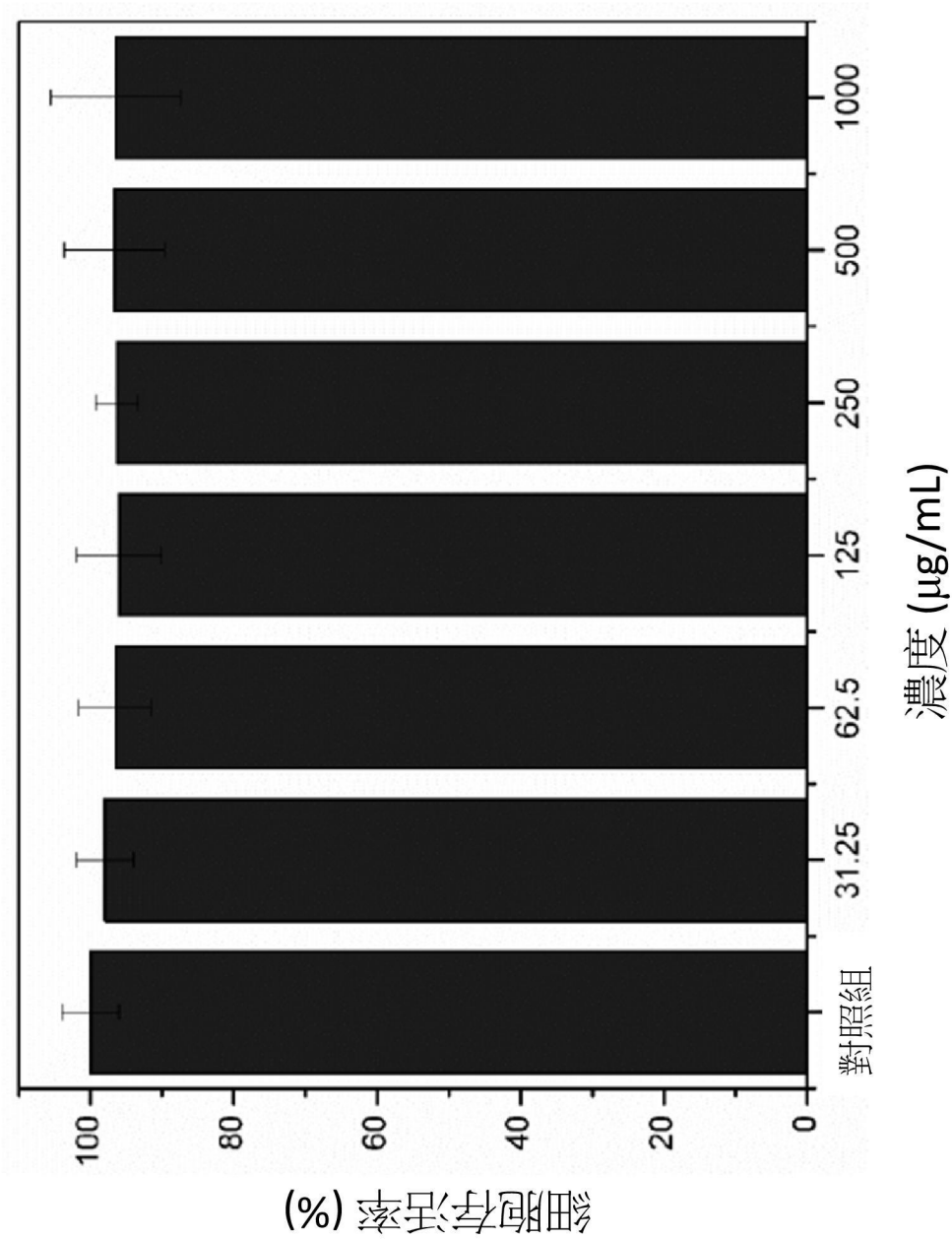
第15圖



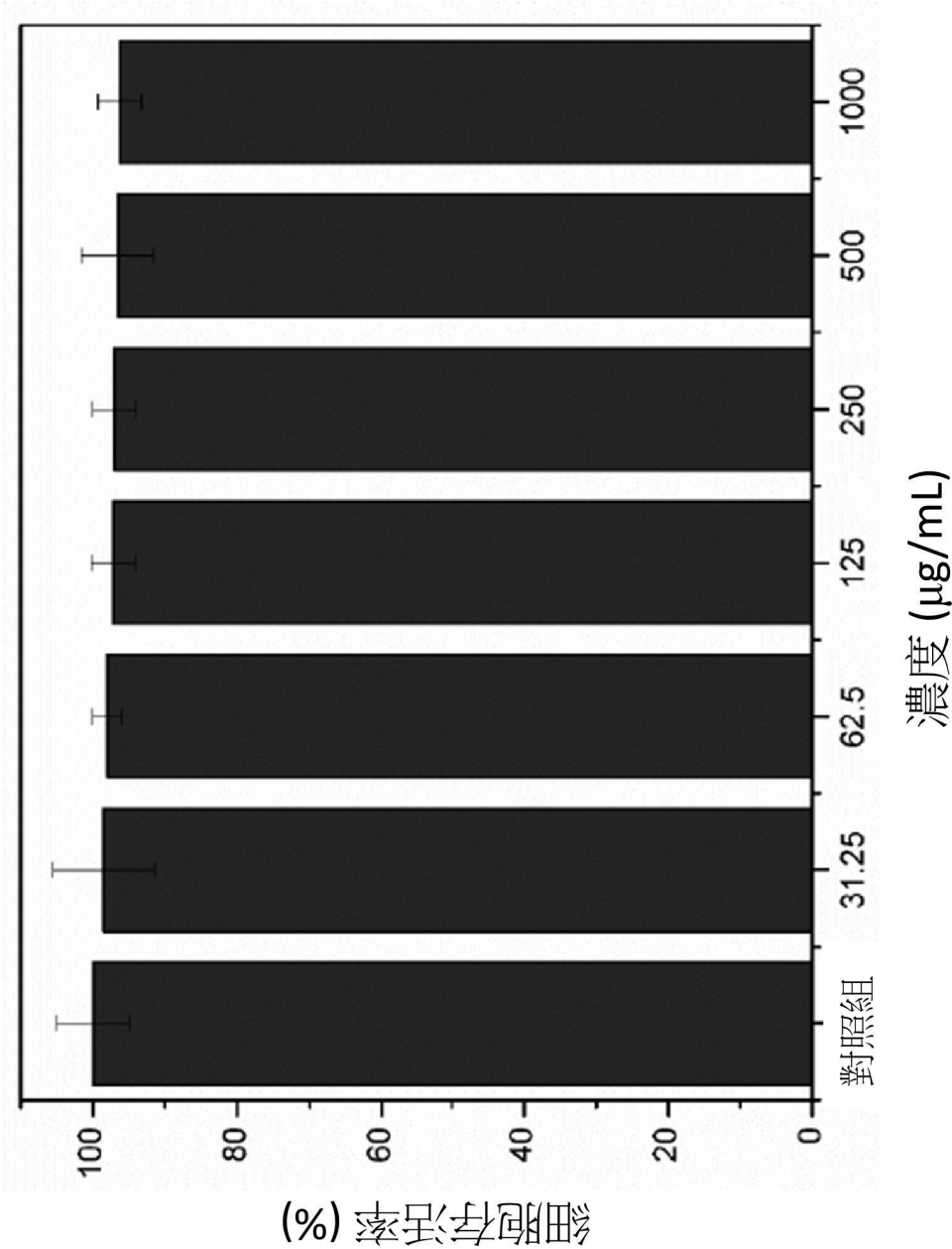
第16圖



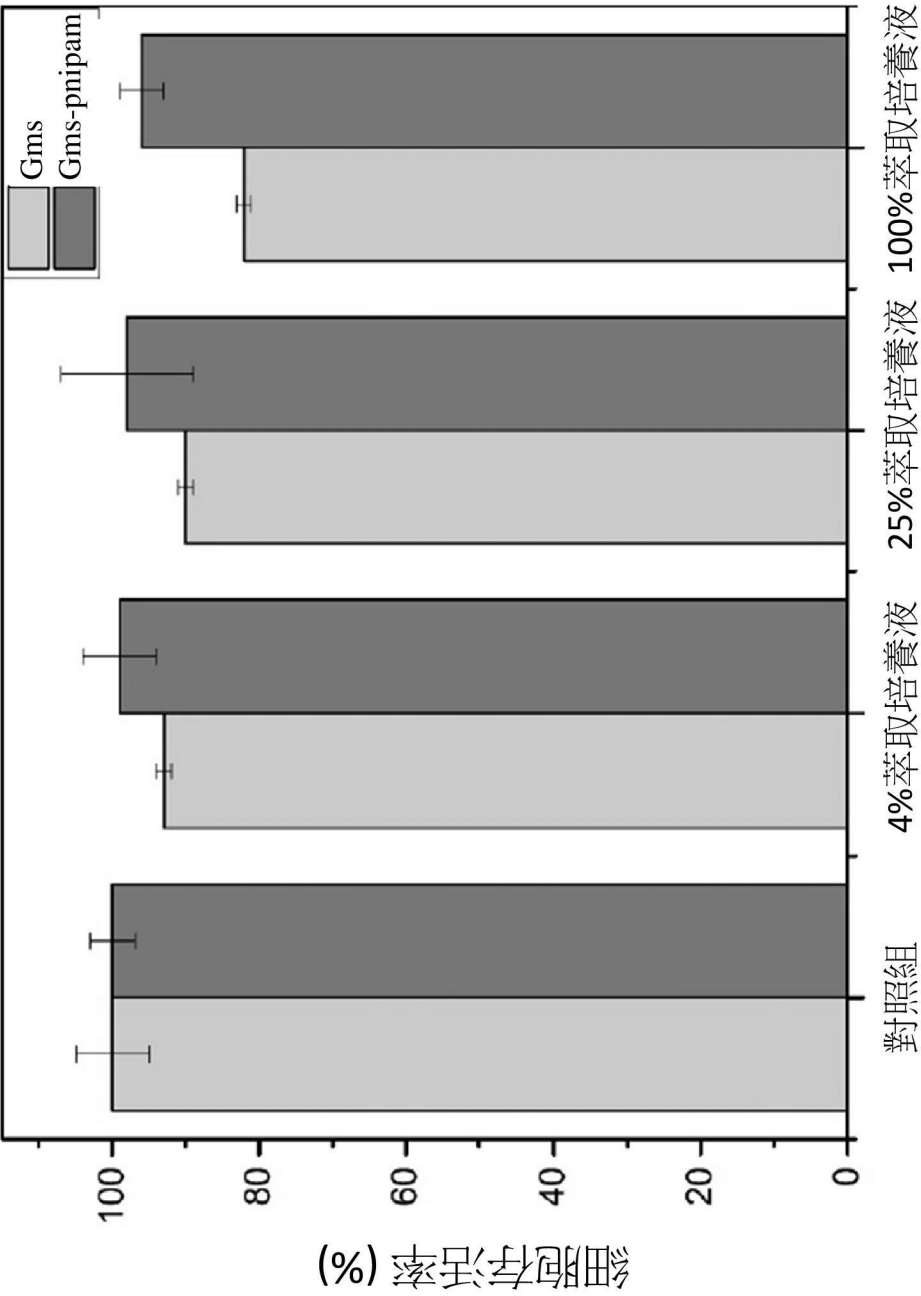
第17圖



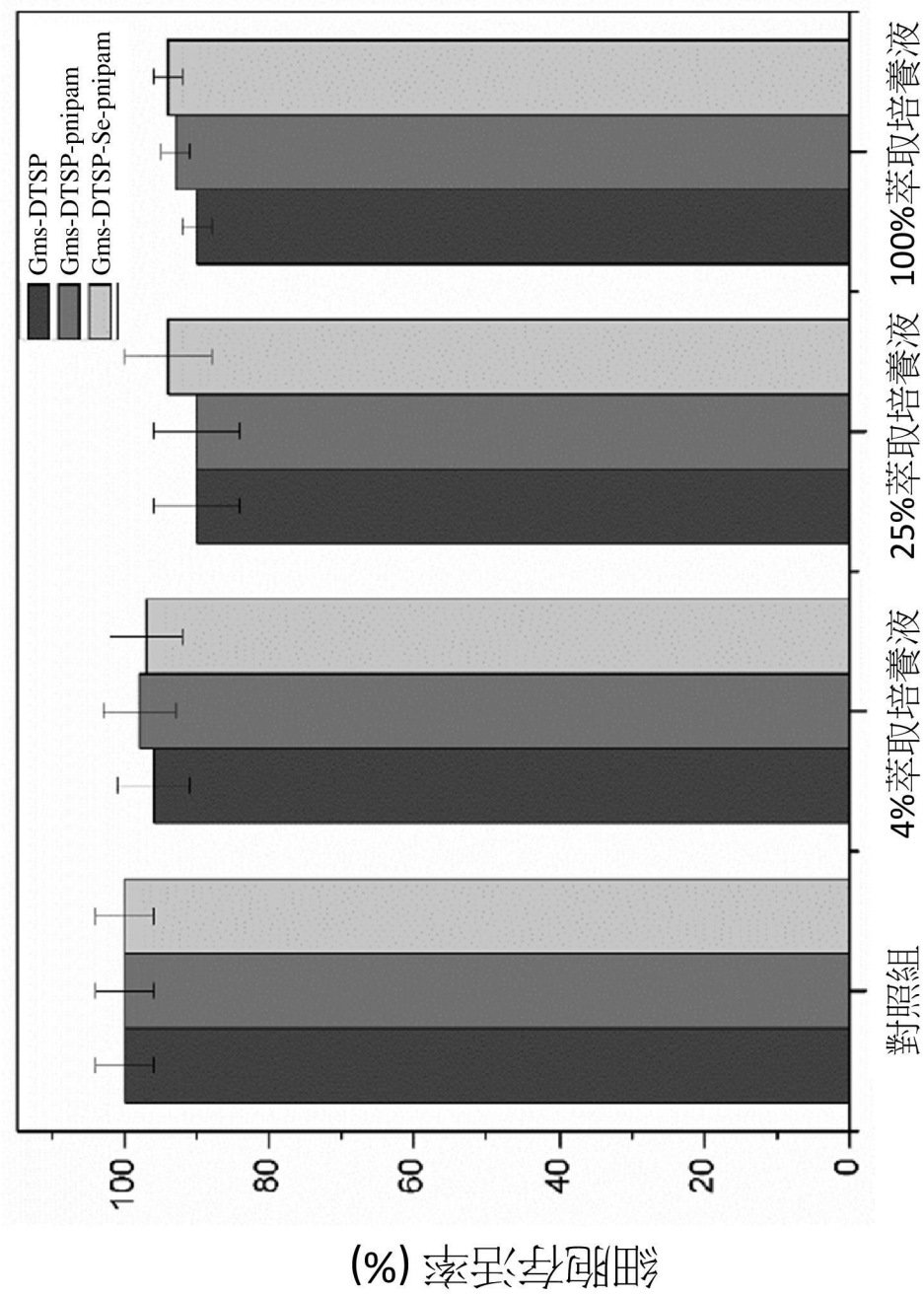
第18圖



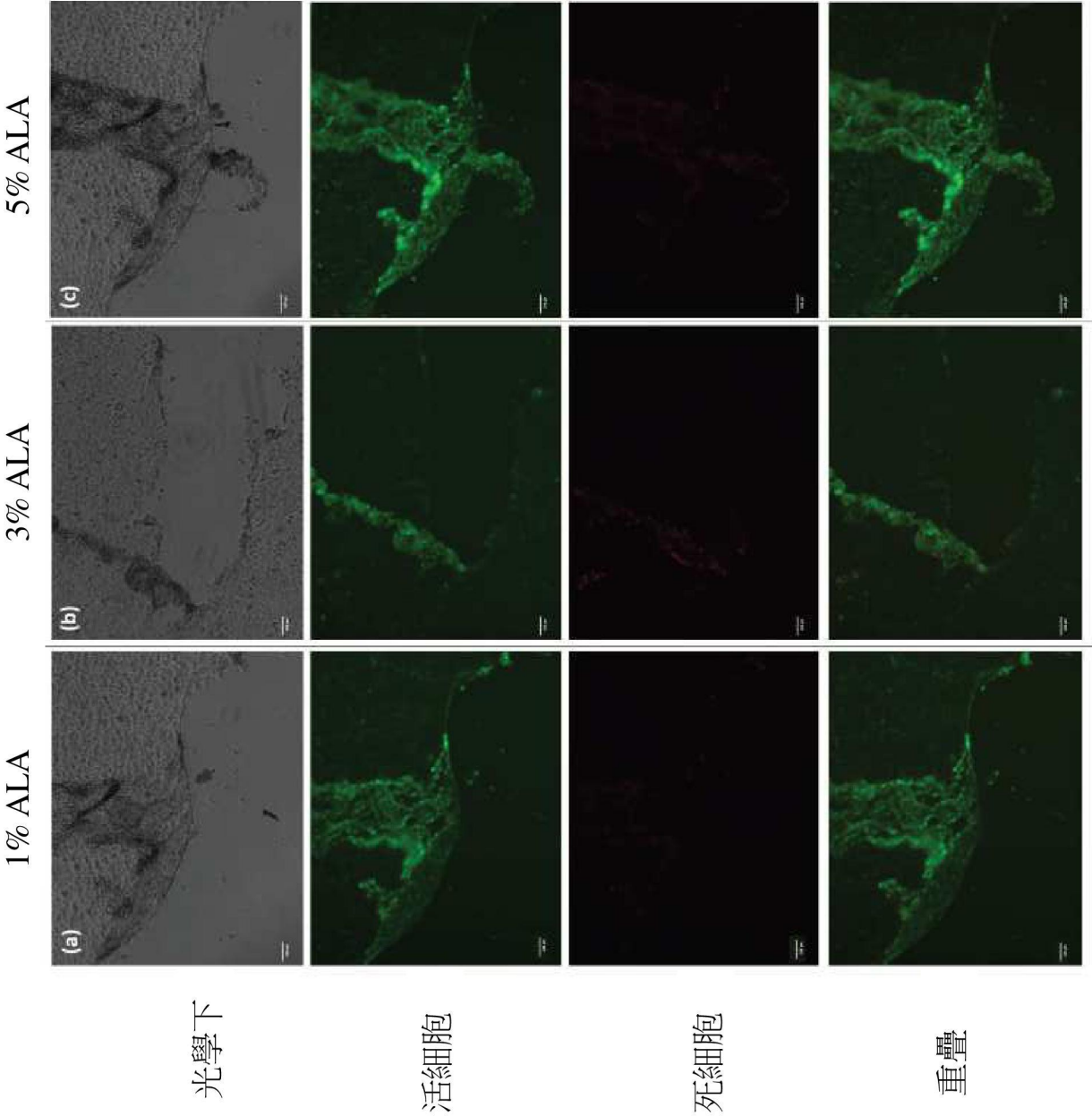
第19圖



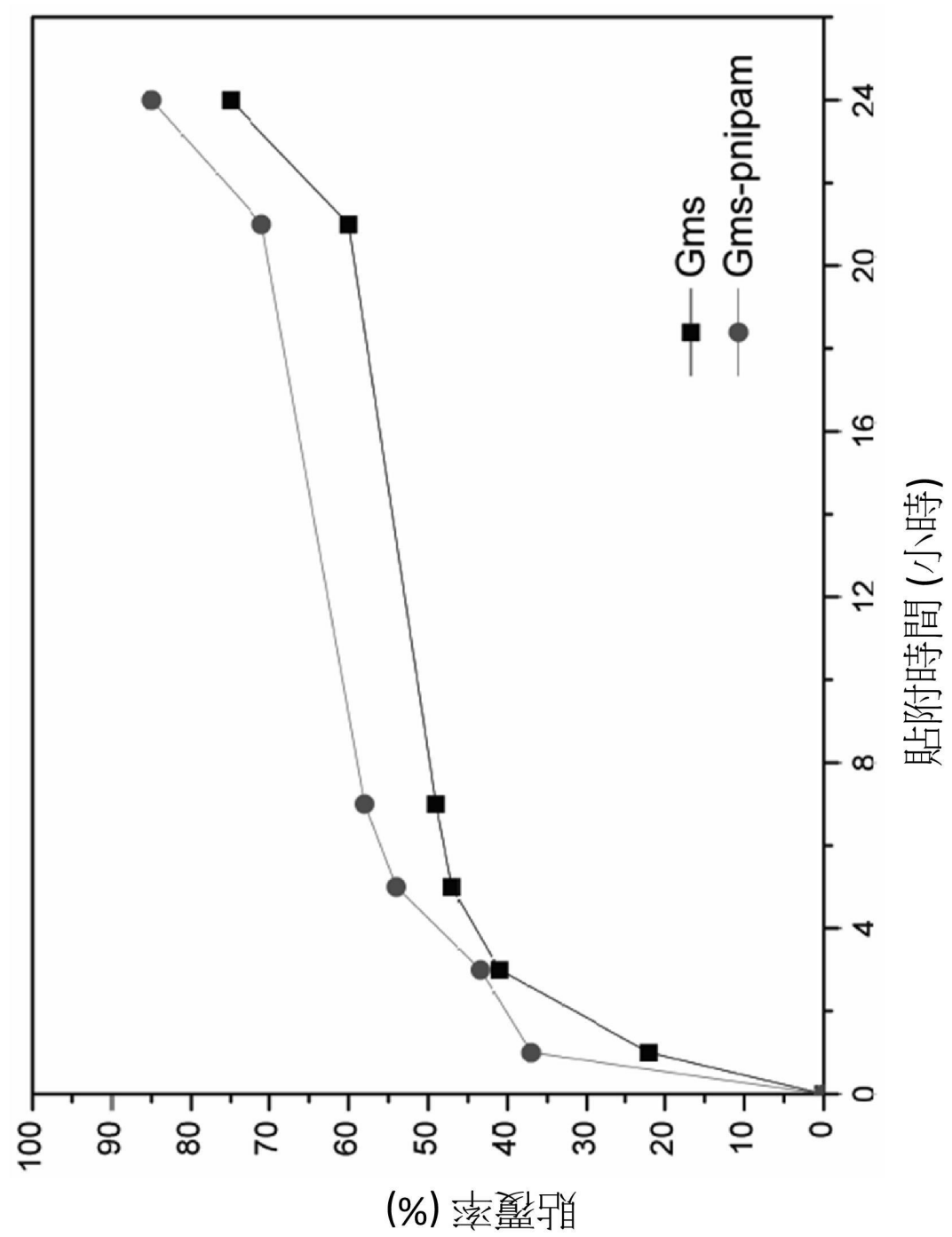
第20圖



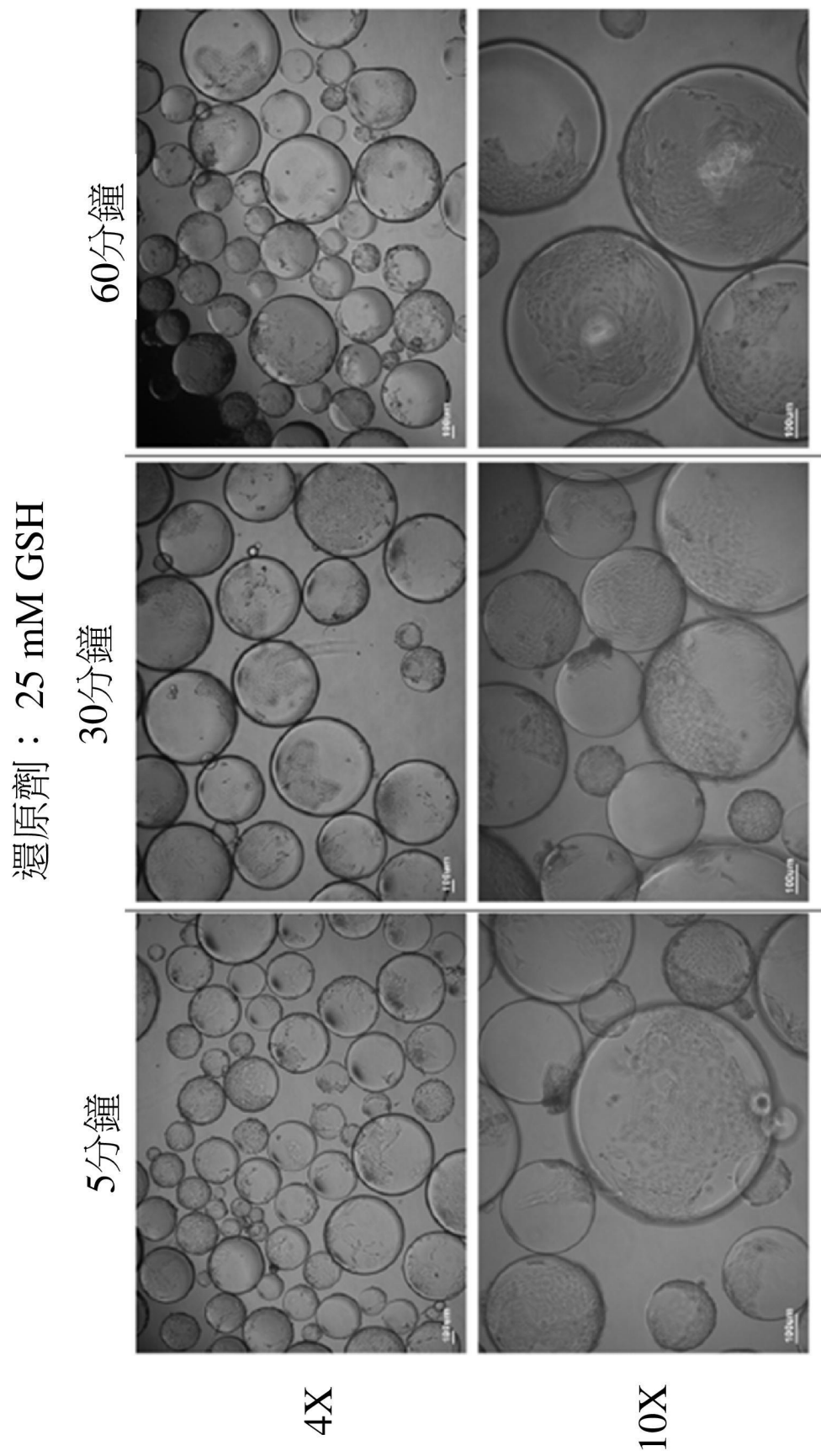
第21圖



第22圖



第23圖



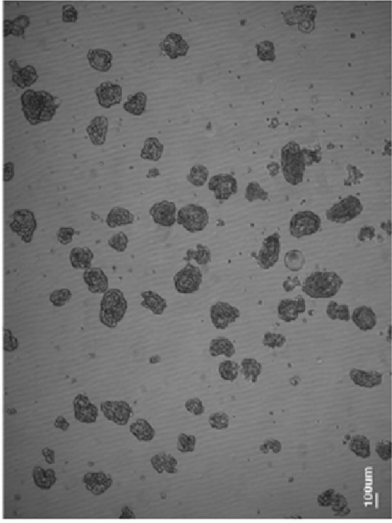
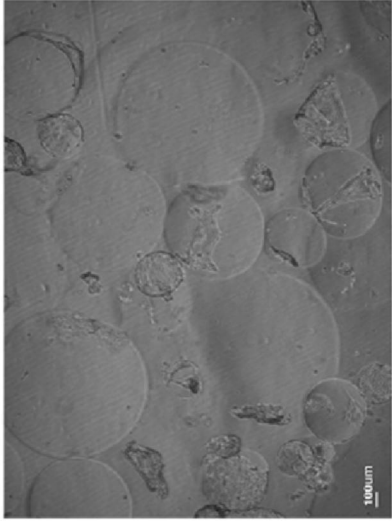
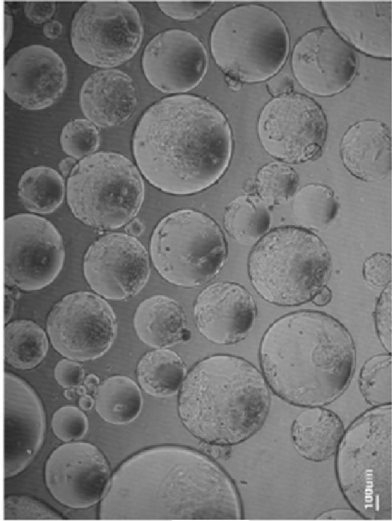
第24圖

還原劑：25 mM L-半胱胺酸

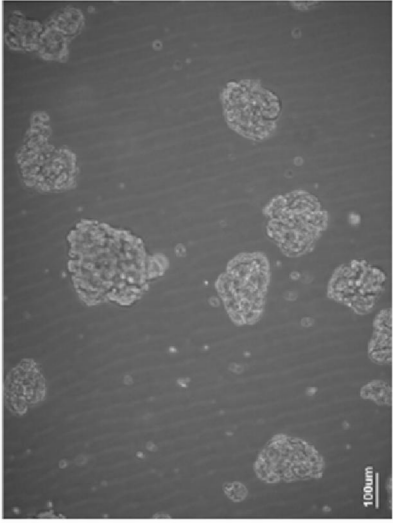
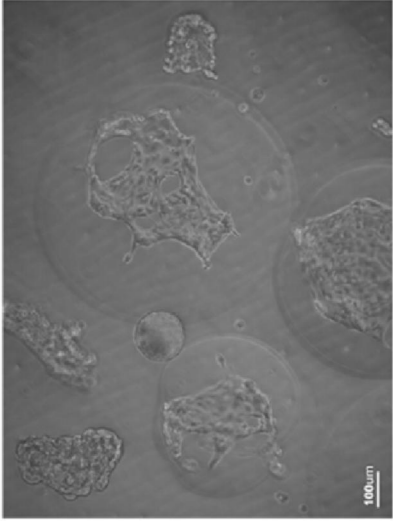
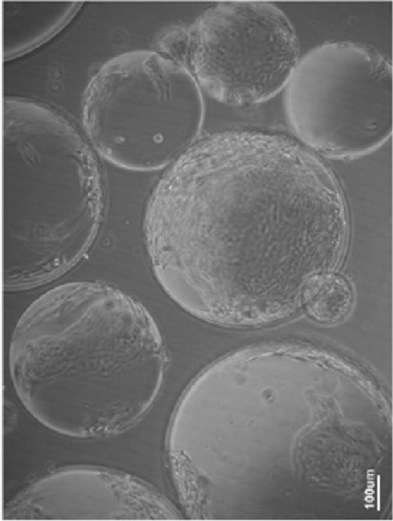
5分鐘

30分鐘

60分鐘



4X

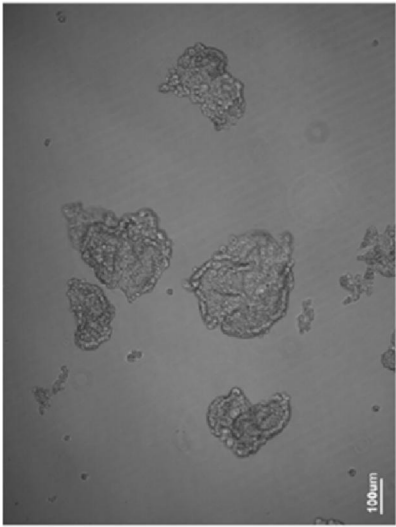
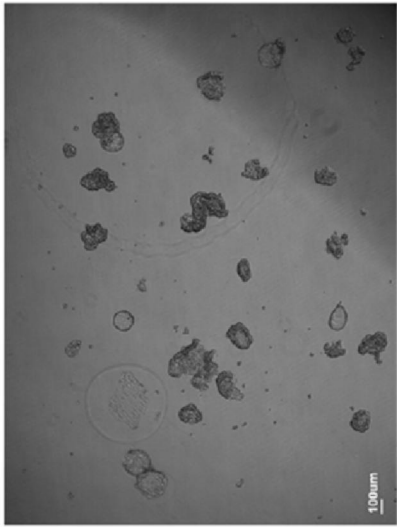


10X

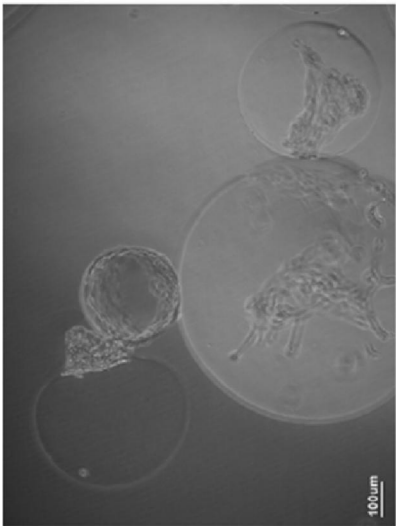
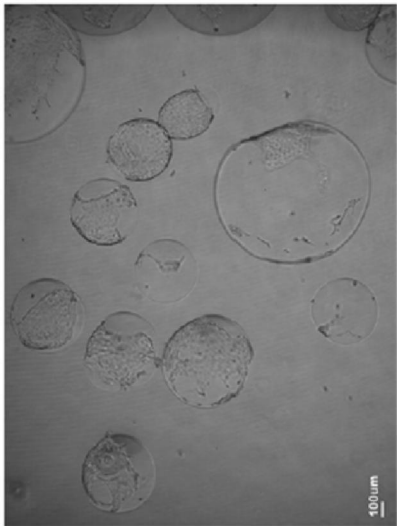
第25圖

還原劑：25 mM DTT

30分鐘



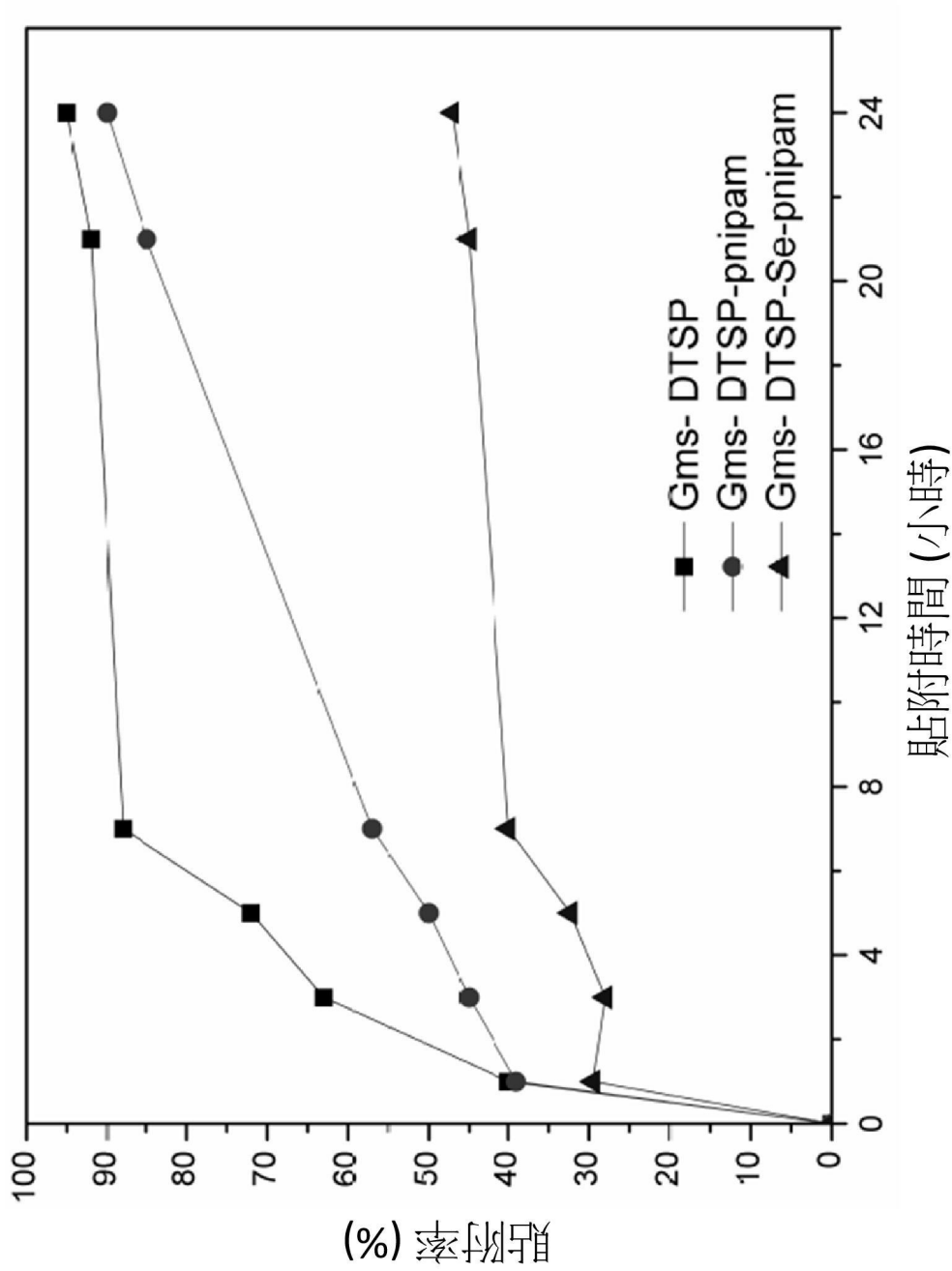
5分鐘



4X

10X

第26圖



第27圖