



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102448505 B

(45) 授权公告日 2015.04.15

(21) 申请号 201080022732.0

A61K 6/08(2006.01)

(22) 申请日 2010.05.24

A61L 27/54(2006.01)

A61L 31/16(2006.01)

(30) 优先权数据

61/181,884 2009.05.28 US

(56) 对比文件

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2011.11.24

CN 1871038 A, 2006.11.29, 说明书第2页第5-9、16-29行和第3页第2行-第4页第4行和图1-2.

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/SE2010/050560 2010.05.24

US 6746482 B2, 2004.06.08, 说明书第56、80段和表格7.

(87) PCT国际申请的公布数据

W02010/138062 EN 2010.12.02

WO 2008/105732 A1, 2008.09.04, 说明书实施例1~5.

(73) 专利权人 埃得生物公司

地址 瑞典林雪平市

WO 93/25246 A1, 1993.12.23, 说明书第5页第1段~第6页第1段, 第21页第3段, 第23页~第24页.

(72) 发明人 埃拉·卡特琳·维金

埃林·恩斯特伦 亨利克·阿龙松

奥斯卡·阿克塞尔松

WO 2007/128378 A1, 2007.11.15, 权利要求1~26和说明书第11页第1段, 第13页第2段和第17页第2段.

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

代理人 顾晋伟 彭鲲鹏

WO 2007/016524 A3, 2007.02.08, 权利要求1~33和说明书第55段.

审查员 唐敏健

(51) Int. Cl.

A61L 27/22(2006.01)

A61C 8/00(2006.01)

A61L 31/10(2006.01)

A61C 13/00(2006.01)

权利要求书2页 说明书10页

(54) 发明名称

多层蛋白质膜、制造方法以及使用该膜的药物递送装置和生物医学植入物

(57) 摘要

多层蛋白质膜的质量大于0.5 μg/cm²而且基本由蛋白质组成。药物递送装置包含其上可加载药物活性剂的多层蛋白质膜。生物医学植入物包含植入基底和至少部分所述植入基底表面上的多层蛋白质膜。制造质量大于0.5 μg/cm²的多层蛋白质膜的方法包括在约30℃至约95℃的温度下,将基底与蛋白质溶液接触,其中质量大于0.5 μg/cm²的多层蛋白质膜在所述基底上形成。

1. 通过以下方法产生的包含植入基底和至少部分所述植入基底表面上的多层蛋白质膜的生物学植入物,所述方法包括在蛋白质结合并聚集于基底表面的条件下将所述基底与蛋白质溶液相接触,其中

所述多层蛋白质膜的质量大于 $0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$,

所述多层蛋白质膜不含非治疗性连接实体,并且

所述蛋白质膜加载有药物活性剂。

2. 权利要求 1 的生物学植入物,其中所述蛋白质结合并聚集于基底表面的条件是 30°C 至 95°C 的温度。

3. 权利要求 1 的生物学植入物,其中所述方法还包括漂洗所获得的包含所述多层蛋白质膜的植入物。

4. 权利要求 1 的生物学植入物,其中实施 1 至 10 次接触步骤。

5. 权利要求 1 至 4 中任一项的生物学植入物,其中所述蛋白质包括非免疫原性蛋白质或人蛋白质。

6. 权利要求 1 至 4 中任一项的生物学植入物,其中所述蛋白质包括血液蛋白、腱蛋白或软骨蛋白,或者两种或更多种所述蛋白质的混合物。

7. 权利要求 1 至 4 中任一项的生物学植入物,其中所述蛋白质包括纤维蛋白原、白蛋白、纤连蛋白、玻连蛋白、球蛋白或胶原蛋白,或者两种或更多种所述蛋白质的混合物。

8. 权利要求 1 至 4 中任一项的生物学植入物,其中所述蛋白质包括纤维蛋白原。

9. 权利要求 1 至 4 中任一项的生物学植入物,其中所述植入基底由包括钛、钛合金、不锈钢、Co-Cr 合金、钽、陶瓷、聚合物或聚合物-金属复合材料的材料形成。

10. 权利要求 9 的生物学植入物,其中所述药物活性剂包括二磷酸类、骨形成蛋白、抗生素或他汀类,或者两种或更多种所述试剂的混合物。

11. 权利要求 10 的生物学植入物,其中所述药物活性剂包括二磷酸类。

12. 权利要求 11 的生物学植入物,其中所述二磷酸类包括唑来膦酸类、伊班膦酸类、利塞膦酸类、阿仑膦酸类、依替膦酸类、氯膦酸类、替鲁膦酸类或帕米膦酸类,或者两种或更多种所述二磷酸类的混合物。

13. 权利要求 1 至 3 中任一项的生物学植入物,其中通过在所述接触步骤中在所述蛋白质溶液中包含所述药物活性剂来将所述药物活性剂加载于所述膜上。

14. 权利要求 1 至 3 中任一项的生物学植入物,其中通过在膜形成后将所述植入基底与其上的所述膜在包含活性剂的溶液中孵育来将所述药物活性剂加载于所述膜上。

15. 权利要求 1 至 3 中任一项的生物学植入物,其中所述蛋白质膜具有至少 20nm 的厚度。

16. 生物学植入物的制造方法,所述生物学植入物包含植入基底和质量大于 $0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 并且不含非治疗性连接实体的多层蛋白质膜,所述方法包括在蛋白质结合并聚集于基底表面的条件下,将所述基底与体积至少对应于所期望蛋白质膜厚度的蛋白质溶液接触,其中药物活性剂加载于所述膜上。

17. 权利要求 16 的方法,其中所述蛋白质结合并聚集于基底表面的条件是 30°C 至 95°C 的温度。

18. 权利要求 16 至 17 中任一项的方法,其中通过在所述接触步骤中在所述蛋白质溶液

中包含所述药物活性剂来将所述药物活性剂加载于所述膜上。

19. 权利要求 16 至 17 中任一项的方法,其中通过将其上形成有所述多层蛋白质膜的所述基底在包含所述活性剂的溶液中孵育来将所述药物活性剂加载于所述膜上。

20. 权利要求 16 至 17 中任一项的方法,其还包括漂洗所获得的包含所述多层蛋白质膜的植入物。

21. 权利要求 16 至 17 中任一项的方法,其中所述基底由包括钛、钛合金、不锈钢、Co-Cr 合金、钽、陶瓷、聚合物或聚合物-金属复合材料的材料形成。

22. 权利要求 16 至 17 中任一项的方法,其中所述蛋白质包括非免疫原性蛋白质或人蛋白质。

23. 权利要求 22 的方法,其中所述蛋白质包括血液蛋白、腱蛋白或软骨蛋白,或者两种或更多种所述蛋白质的混合物。

24. 权利要求 22 的方法,其中所述蛋白质包括纤维蛋白原、白蛋白、纤连蛋白、玻连蛋白、球蛋白或胶原蛋白,或者两种或更多种所述蛋白质的混合物。

25. 权利要求 24 的方法,其中所述蛋白质包括纤维蛋白原。

26. 权利要求 16 的方法,其中所述药物活性剂包括二磷酸类、骨形成蛋白、抗生素或其他汀类,或者两种或更多种所述试剂的混合物。

27. 权利要求 26 的方法,其中所述药物活性剂包括二磷酸类。

多层蛋白质膜、制造方法以及使用该膜的药物递送装置和 生物医学植入物

发明领域

[0001] 本发明涉及多层蛋白质膜和制造多层蛋白质膜的方法。本发明还涉及包含加载了药物活性剂的多层蛋白质膜的药物递送装置和包含植入基底和至少部分植入基底表面上的多层蛋白质膜的生物医学植入物。

[0002] 发明背景

[0003] 对改进生物医学植入物和改进植入有机体（即身体）时生物医学植入物的生物相容性有持续需求。已知植入物表面的特性与植入后表面上的早期事件有很大相关性，而且这些早期事件对决定装置的相容性很重要。认为在引入有机体后的前几秒中，结合到植入物表面的蛋白质的组成、序列和其他特性将决定更长时间中的事件，而且最终影响植入物的生物相容性程度。而且，植入物的表面性质影响蛋白质与表面结合的状态，也影响随后与有机体的相互作用。

[0004] 通常，蛋白质在接触该蛋白质的表面形成单层。参见例如 *Biomaterials Science, An Introduction to Materials in Medicine*, 第二版, B. Ratner 等编, Elsevier Academic Press (2004), 245 页, 表 1。当用归零椭圆光度法 (null ellipsometry) 测量时, 单层的厚度通常为 2-4nm。根据 de Feijter 等, “Ellipsometry as a tool to study the adsorption of synthetic and biopolymers at the air-water interface”, *Biopolymers*, 17: 1759-1801 (1978), 单层厚度按照 $1\text{nm} = 0.12\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 转换为质量。因此, 平表面上的蛋白质单层通常小于 $0.5\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$, 而且通常在 $0.2-0.5\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 之间。椭圆光度法也常用于研究多层, 但如 Benesch 等 “The determination of thickness and surface mass density of mesothick immunoprecipitate layers by null ellipsometry and protein ¹²⁵iodine labeling”, *Journal of Colloid and Interface Science*, 249:84-90 (2002) 所述, 椭圆光度法在用于多层应用时不够精确。而且, 椭圆光度法仅可用于平面表面而不能用于具有非平面形貌的表面, 植入物通常是后一情况。因为这两个原因, 在本公开内容中使用每表面面积的蛋白质质量表征多层的尺寸。此外重要的是, 应注意宏观表面面积为 X 的装置可能有 10 或 100 倍 X 的微观表面面积或纳米表面面积, 因此由于形貌和结构, 装置上单层的质量可能看起来比平表面上单层的大得多。

[0005] 通常, 使用化学连接剂在表面上形成比单层更厚的蛋白质多层。如 Tengvall 等, “Preparation of multilayer plasma protein films on silicon by EDC/NHS coupling chemistry”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 28:261-272 (2003) 公开了乙基-二甲基-氨基丙基碳二亚胺 /N-羟基琥珀酰亚胺 (EDC/NHS) 化合物将纤维蛋白原、IgG、白蛋白等的单层彼此连接来形成多层膜的用途。还使用相互有特异性的不同蛋白质的多层 (如生物素和链亲合素或蛋白质和抗体) 建立更厚的膜。使用 EDC/NHS 建立的纤维蛋白原多层膜已与骨植入物结合用于药物递送, 还被施用至缝合线来维持软组织的完整性。参见例如 Aspenberg 等的美国专利公开 No. 2006/0002970 和 2006/0003917。Optovent AB 的 Skruvcoat 和 T-Coat 是使用这种膜 (称为 FibMat 膜) 的商品的实例。还用化学连接剂将

蛋白质膜或包被结合于表面（即植入物表面）并将构成该蛋白质膜的连续层连接在一起。化学物质（如戊二醛（GA））和硅烷偶联剂（如氨基丙基三乙氧基硅烷（APTES））已被用于该双重目的，并与用于多层膜形成的其他化学连接剂联合用于基底结合。

[0006] 然而用化学连接剂形成多层蛋白质膜和 / 或将多层蛋白质膜结合至基底有几个问题。首先，生产这种多层膜的过程是耗时的多步骤工序。例如使用化学连接剂生产纤维蛋白原多层包被平均可需要 70 个步骤、2 天时间，而更厚的层需要更多步骤和时间。该过程明显增加这种层在所需材料和生产时间两个方面的成本。其次，使用化学连接剂在植入时对有机体（即身体）引入额外的化学物，这增加了不相容的风险并需要进一步的管理审查和审批程序。实际上，Sigma Aldrich（戊二醛供应商）指出戊二醛是有毒和危害环境的，而通常认为 EDC 和 APTES 有腐蚀性。此外，由于化学连接剂可潜在地与膜加载的药物化学偶联，可能从监管机构的角度看产生了“新化学实体”，所以多层膜在药物递送中的用途可能受限。

[0007] 还尝试对蛋白质（如纤维蛋白原、溶菌酶和淀粉样蛋白）进行物理操作以形成细纤维（fibril）和纤维。例如，结合长蛋白质以形成带，继而形成细纤维，即缠绕的长蛋白质纤维。已研究细纤维以试图理解蛋白质与（生物）材料表面的相互作用。参见例如 Cacciafesta 等，“Human plasma fibrinogen adsorption on ultraflat titanium oxide surfaces studied with atomic force microscopy”，Langmuir, 16 :8167-8175(2000)。更特别地，纤维蛋白原的细纤维已用于生产 Au 纳米颗粒并在生物材料表面设计中用于刺激羟基磷灰石生长。然而，形成这种细纤维的过程可耗费较长时间和 / 或需要严格的反应条件如 2 左右的低 pH。

[0008] 因此，需要改进的多层蛋白质膜和 / 或制造该膜的方法。

[0009] 发明概述

[0010] 因此，本发明的一个目的是提供改进的多层蛋白质膜和制造其的方法。

[0011] 在一个实施方案中，本发明涉及质量大于 $0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 的多层蛋白质膜，其中所述膜基本由蛋白质组成。如以下更详细讨论的，术语“基本由……组成”在本发明多层膜的上下文中是指所述膜无需非治疗性连接实体（即对人体是外源的并且用于将蛋白质单层结合至基底和 / 或相互结合以形成多层膜和 / 或结合至药物活性剂的非治疗性化合物或材料）来形成而且不含非治疗性连接实体。

[0012] 在另一实施方案中，本发明涉及包含本发明的多层蛋白质膜和一种或多种加载于该膜上的药物活性剂的药物递送装置。

[0013] 在另一实施方案中，本发明涉及生物学植入物，其包含植入基底和至少部分该植入基底表面上的本发明多层蛋白质膜。可使用多种材料和多种外形的植入基底。

[0014] 本发明的另一实施方案涉及质量大于 $0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 的多层蛋白质膜的制造方法，其包括在于基底表面起始聚集过程的温度下，将基底与体积至少对应于所期望蛋白质膜厚度的蛋白质溶液接触，其中质量大于 $0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 的多层蛋白质膜在基底上形成。对不同蛋白质聚集温度不同，但通常可在 30°C 和 95°C 之间。

[0015] 本发明的膜、装置、生物学植入物和方法在这样的方面有利，即提供不含非治疗性化学物（对体内应用如体内植入是不期望的）的膜和 / 或提供制造简单并避免了常规技术中一个或多个耗时和 / 或费力处理的膜。参照以下详细描述本发明的其他优点和实施方案

案将更明显。

[0016] 发明详述

[0017] 一方面,本发明涉及质量大于 $0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 的多层蛋白质膜,其中所述膜基本由蛋白质组成。如以下更详细讨论的,术语“基本由……组成”在本发明多层膜的上下文中是指所述膜无需非治疗性连接实体(即对人体是外源的并且用于将蛋白质单层结合至基底和/或相互结合以形成多层膜和/或结合至药物活性剂的非治疗性化合物或材料)来形成而且不含非治疗性连接实体。因此,本发明的多层蛋白质膜不含连接实体,如常规使用的 EDC/NHS、APTES 和戊二醛连接剂材料。然而应理解,定义为基本由蛋白质组成的多层蛋白质膜可如以下详细讨论的包含一种或多种药物活性剂。对此应理解药物活性剂可加载于所述膜上。本公开内容中的词“加载于……上”也涵盖“加载于……内”。所述药物活性剂可通过吸附或吸收来加载于膜上,其中所述试剂不是多层膜结构的一部分,和/或这种药物活性剂可通过结合入多层膜来加载于多层膜上。在任一情况下,这种药物活性剂用于产生治疗效果,而不仅被用作连接实体。因此药物活性剂从多层膜扩散或递送或存留于多层中以催化方式起作用。

[0018] 在药物活性剂未结合入多层膜内的一个实施方案中,多层膜在整个膜厚度上构成是均质的,均质程度是其中不包含连接实体;因此,在膜形成的基底表面或贯穿膜到膜表面,膜构成中没有连接实体。

[0019] 在另一实施方案中,在基底表面提供本发明的多层蛋白质膜,一种或多种药物活性剂加载于该多层膜上,并且在第一层上提供第二层本发明多层蛋白质膜。

[0020] 在一个实施方案中,产品包含表面上有蛋白质膜的基底和任选的药物活性剂(两组分系统或更多),它们可一起销售但可分开包装。

[0021] 制造多层蛋白质膜的方法包括用体积至少对应于所期望层厚度的蛋白质,在蛋白质结合并聚集于表面的条件下孵育基底表面。在一个实施方案中,制造多层蛋白质膜并将药物活性剂加载于该膜上的方法包括湿化学技术(例如但不限于不同溶液中的孵育方法)或气溶胶技术(例如但不限于气溶胶喷雾)或所述技术的组合。

[0022] 本发明的多层蛋白质膜的厚度大于单层膜,优选用椭圆光度法测量大于 5nm 或质量大于 $0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。在一个具体的实施方案中,用质量测量的多层蛋白质膜的厚度为 $0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 至约 $50\text{g}/\text{cm}^2$,或厚度为约 $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 至约 $50\text{g}/\text{cm}^2$,或为约 $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 至约 $30 \mu\text{g}/\text{cm}^2$,或更特别地,约 $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 至约 $15 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。在另一实施方案中,多层蛋白质膜的厚度为约 $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 至约 $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$,或更特别地约 $1.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 至约 $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。在另一实施方案中,多层蛋白质膜的厚度为至少约 $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$,或更特别地,至少约 $1.2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 或至少约 $1.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。

[0023] 多层蛋白质膜可由任何合适的蛋白质形成,并且本领域普通技术人员应理解将根据所期望的蛋白质膜用途来选择蛋白质。在本文讨论的多种实施方案中,用蛋白质膜作为药物递送装置和/或作为生物医学植入物的表面包被。然而应理解根据本公开内容,本文所述的蛋白质膜也有显然的其他用途。

[0024] 在一个实施方案中,所述蛋白质包括非免疫原性的蛋白质或人蛋白质。例如人蛋白质在人蛋白质参考数据库(Human Protein Reference Database, <http://www.hprd.org>)中公开。在一个更具体的实施方案中,所述蛋白质包括人血液蛋白,实例包括但不限

于纤维蛋白原、白蛋白（例如血清白蛋白）、纤连蛋白、玻连蛋白、球蛋白（例如免疫球蛋白（IgA、IgD、IgE、IgG、IgM）或其两种或更多种的混合物；腱蛋白例如跟腱蛋白质；或软骨蛋白例如胶原蛋白；或两种或更多种所述蛋白质的混合物。在另一实施方案中，可以使用的蛋白质包括所述蛋白质的任何组合物，或更特别地，具有足以实际应用的纯度的任何纤维蛋白原组合物。可使用市售的纤维蛋白原产品，例如，Haemocomplettan®（CSLBehring），其含有由 900–1300mg 人纤维蛋白原、400–700mg 人血清白蛋白和 200–350mg NaCl 组成的总量为 1925–3010mg 的粉末。蛋白质可从组织中纯化或通过重组技术生产，例如在细胞（如哺乳动物细胞、细菌或噬菌体）中表达或在机器中合成。在一个具体的实施方案中，蛋白质包括人血液蛋白质，在一个更具体的实施方案中，蛋白质包括纤维蛋白原，更特别地人纤维蛋白原。在另一实施方案中，蛋白质包括纤维蛋白原，并且多层蛋白质膜的质量为约 $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 至约 $15 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ，或更具体地约 $1.2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 至约 $15 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ，或质量至少为 $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ，或更具体地至少 $1.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。在另一实施方案中，蛋白质的来源可是人血液，特别是患者自体的血液。在一个更具体的实施方案中，蛋白质包括人血浆和 / 或人血清，其可从患者自体血液或从不同的患者中纯化，或从库中纯化。应理解兽用多层膜可使用相应动物的蛋白质。

[0025] 多层蛋白质膜可用做药物递送装置，其中所递送的药物可以是蛋白质本身，例如通过膜的再吸收。在一个具体的实施方案中，药物是形成多层的蛋白质的整合部分或融合部分。例如，蛋白质可以是具有由酶学不稳定的氨基酸序列连接的结构部分和药物活性部分的融合蛋白质。因而随着蛋白质层在体内降解而递送药物。或者，将一种或多种药物活性剂加载于（例如通过吸附或吸收或结合）多层蛋白质膜上以在体内递送。

[0026] 多种药物活性剂的任一种可被加载于本发明的多层蛋白质膜上。在一些具体的实施方案中，药物活性剂包括骨活性（osteosactive）药物例如但不限于二磷酸类（bisphosphonate）或雷尼酸锶；生长因子例如但不限于骨形成蛋白（bone morphogenic protein, BMP）、成纤维细胞生长因子（FGF）、胰岛素样生长因子（IGF）、表皮生长因子（EGF）、转化生长因子（TGF）或血小板衍生生长因子（PDGF）；基底金属蛋白酶抑制剂（MMP-inh）；抗生素（包括抗微生物化合物，包括金属化合物例如含银或释放银的化合物）或他汀类（statin），或两种或更多种所述试剂的混合物。在另一些实施方案中，药物活性剂包括一种或多种四环素、化学修饰的四环素、合成的基底金属蛋白酶抑制剂包括异羟肟酸亚类中的那些、环氧合酶抑制剂包括环氧合酶 2 特异性抑制剂；核因子 κB 抑制剂；脂加氧酶抑制剂；皮质醇包括糖皮质激素；大环内酯类抗生素；羟甲基戊二酰辅酶 A 还原酶抑制剂（他汀类）；血管紧张素转化酶（ACE）抑制剂；血管紧张素 II 受体阻断剂（ARB）；抑肽酶；甲磺酸加贝酯；柳氮磺吡啶；肿瘤坏死因子 α 的抑制剂；和转化生长因子 β 抑制剂。

[0027] 在一个具体的实施方案中，药物活性剂包括二磷酸类。多种二磷酸类在本领域已知而且适用于加载本发明的多层蛋白质膜，其包括但不限于唑来膦酸类（zoledronic acid）、伊班膦酸类（ibandronate）、利塞膦酸类（risendronate）、阿仑膦酸类（alendronate）、依替膦酸类（etidronate）、氯膦酸类（chlodronate）、替鲁膦酸类（tiludronate）或帕米膦酸类（pamidronate），或者两种或更多种所述二磷酸类的混合物。

[0028] 在本发明的一个实施方案中，多层蛋白质膜在基底上形成。如上所述，基底可组成生物医学植入物，而且多层蛋白质膜用于改进植入装置的功能和 / 或递送药物至植入物的周围区域。生物医学植入物广泛用于如整形外科、牙科、耳科和其他骨和软组织环境，而且

包括但不限于整形外科植入物,缝线,心脏植入物包括导管、支架和瓣膜,人工血管,电子装置,深部脑刺激电极等。植入物可以为颗粒形式,例如金属或陶瓷颗粒,如骨水泥粉中所用那些。在整形外科和牙科植入物中,多层蛋白质可改进早期稳定性、植入物寿命/预后和/或功能性(例如牙科植入物的早期载入或植入物的简单去除,例如与羟基磷灰石(HA)包被的植入物相比)。在软组织植入物中,多层蛋白质膜可维持组织的完整性,即在如腱(例如跟腱)中防止组织碎裂以尽早愈合,或者在结肠吻合术中以防止潜在的致命渗漏。此外,植入物可以是仅适合于体内药物递送的惰性材料。例如,植入物可包含可渗透材料以用于药物的皮下缓慢释放。

[0029] 基底(例如生物医学植入物基底)可由适当的材料形成,所述材料包括但不限于金属如钛或钽,合金如钛合金、不锈钢和Co-Cr合金,或陶瓷,聚合物和聚合物-金属复合材料。

[0030] 多层蛋白质膜可以按照所期望的提供于全部或部分基底表面。如期望可在其上形成蛋白质膜前处理基底表面。例如,可使基底表面经受蚀刻、等离子蚀刻、涂底漆、喷砂、磨削等。所得表面可具有纳米结构化表面,例如具有槽、脊、突起、丝、针等。本发明不受基底表面形貌的限制。表面可是粗糙、多孔、光滑的等。在一个实施方案中,可在施加蛋白质膜前对光滑的植入物表面进行蚀刻或表面粗糙化。在一个实施方案中,通过在其上提供无机膜(例如羟基磷灰石膜)来在蛋白质膜形成之前使基底表面更具生物相容性。

[0031] 在多层蛋白质膜生产和/或药物活性剂加载过程中,聚集条件可通过不同的方法提供,尤其是通过加热蛋白质至至少起始聚集的温度,并将温度在该水平或其上保持足以使膜形成至所期望厚度的时间。例如但不限于,溶液可在加入基底前预加热,基底可在加入溶液前预加热,基底和溶液都可在加在一起前预热,和/或基底与溶液可混合并一起加热。在上述实例中的术语溶液是指蛋白质溶液和/或药物活性剂溶液。

[0032] 根据本发明的另一方面,质量大于 $0.5\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 的多层蛋白质膜的制造方法包括在蛋白质于基底表面起始聚集样状态的温度下,将基底与体积至少以对应于所期望蛋白质膜厚度的蛋白质溶液接触,其中质量大于 $0.5\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 的多层蛋白质膜在基底上形成。通常使用水溶液。在指定条件下在蛋白质溶液中孵育基底的这一步骤出人意料地导致多层蛋白质膜的形成。不受理论限制,认为蛋白质因溶液的条件而变粘,而且粘性蛋白质相互之间以及与表面之间以不能区分的过程结合和/或交联。因此显然的是,本方法对现有技术的费力并且耗时的方法提供显著改进。在一个具体的实施方案中,可在通过孵育过程施加膜之前用标准清洗程序来产生干净的植入物表面。干净的植入物在蛋白质溶液中孵育。

[0033] 通过控制孵育参数(如时间、温度、pH、离子强度、共溶剂和蛋白质组成)来如本文实施例所示生产期望厚度的膜。因此,孵育适于在于基底表面起始聚集过程的温度下,以至少相当于所期望蛋白质膜厚度的体积进行,或特别地在约 30°C 至约 95°C 的范围内进行,或更特别地,在约 30°C 至约 65°C 进行。温度范围的另一一些实例是约 40°C 至约 60°C (例如纤维蛋白原)、约 60°C 至约 80°C (例如白蛋白)和约 65°C 至约 85°C (例如免疫球蛋白)。通过添加合适的化合物,可在更低的温度(在液体水的温度范围内)完成膜形成。在一些具体的实施方案中,有利的是孵育时间可多至约72小时,或约片刻至约72小时,或约5秒至约90分钟,或约2分钟至约50分钟,或约5分钟至约30分钟,或5分钟至约15分钟。在一些更具体的实施方案中,采用这些时间以形成质量大于约 $1\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 的多层蛋白质膜。

[0034] 溶液中的蛋白质浓度可不同,通常更高的溶液浓度产生更厚的膜。然而,浓度不应过高而使溶液中的蛋白质不能溶解。在一个实施方案中,蛋白质溶液所包含蛋白质的量是约 0.1mg/ml 至约 300mg/ml,或更特别地约 1mg/ml 至约 100mg/ml,甚至更特别地约 1mg/ml 至约 10mg/ml。在另一实施方案中,蛋白质溶液所包含蛋白质的量是约 1mg/ml 至约 5mg/ml。蛋白质溶液可被缓冲,合适的缓冲液包括但不限于醋酸缓冲液、硼酸缓冲液、柠檬酸缓冲液或磷酸缓冲液。在一个更具体的实施方案中,蛋白质溶液用醋酸缓冲液缓冲。缓冲 pH 适当地在 pH4-7 的范围内,或更特别地在 pH5-6 的范围内。在一个实施方案中,蛋白质溶液的 pH 在蛋白质的等电点 (PI) 左右,在一个更具体的实施方案中,蛋白质溶液的 pH 稍低或高于(例如 0.1-0.5pH 单位)蛋白质 PI。在一个实施方案中,通常缓冲液浓度可在约 0.1mM 至约 100mM 的范围内,或约 1mM 至约 50mM,或更特别地约 5mM 至约 30mM。在另一些实施方案中,蛋白质溶液包含盐,例如但不限于 NaCl,在一个具体的实施方案中,盐浓度是约 0.1% 质量/体积至约 10% 质量/体积,或更特别地约 0.5% 质量/体积至约 2% 质量/体积。在一个实施方案中,蛋白质溶液具有生理盐度。

[0035] 优选地,在孵育前清洗基底表面以主要地去除有机物质。提及仅作为示例而不旨在限制的两种清洗的方法。在一个实施方案中,可在超声浴中用 70% 乙醇清洗基底 5 分钟,并在于水中进行 5 分钟超声前在 MilliQ® 水中彻底漂洗。最后在水中漂洗基底,并任选地在流动氮中干燥。或者,可在超声浴中用含有 2% 乙酸和 2% triton X 的溶液孵育基底 5 分钟。在水中彻底漂洗基底,并且在超声浴中用 70% 乙醇孵育,而后在水中彻底漂洗并在水中超声 5 分钟。最后在水中漂洗基底,并任选地在流动氮气中干燥。

[0036] 如所述在接触(孵育)步骤中,可容易地形成质量为 $1.2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ - $1.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 的蛋白质膜,相当于用椭圆光度法测量时的约 20-25nm。在一些具体的实施方案中,多层蛋白质膜的质量是至少 $1.2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 或至少 $1.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。可通过反复孵育植入基底(包含第一个步骤中形成的膜)来在蛋白质溶液中将接触过程重复所期望的次数。在一个实施方案中,实施 1-10 次孵育,而在一个更具体的实施方案中,实施 1-4 次孵育。任选地,可在第二次和/或随后的孵育步骤中使用新蛋白质溶液。可制备任何厚度的多层膜,而且由于多层是在多层之上形成的,多次孵育步骤所得的膜可被称为“多-多层膜 (multi-multilayer film)”。通常可通过实施所述过程 3 至 4 次而容易地形成 $3-10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 多层膜(或“多-多层膜”),任选地在每个接触步骤中使用新蛋白质溶液。该多-多层膜的厚度估计为约 100nm,尽管该厚度在椭圆光度法的测量范围外。

[0037] 当期望用药物活性剂加载多层蛋白质膜时,加载可在膜形成期间或在随后步骤中完成。在膜形成期间加载活性剂时,活性剂包括在接触步骤的蛋白质溶液内。如果在膜形成后将活性剂加载于膜上,则在包含活性剂的溶液中孵育其上有膜的基底,即植入基底(例如直接在膜形成后或在使用植入物前的任何时间点)。如以上详细描述,可通过吸附或吸收加载活性剂,其中试剂非共价地整合在蛋白质膜上并通过空间、疏水、氢键和/或静电力固定,或者试剂可结合至多层膜。

[0038] 适合用药物活性剂加载蛋白质膜的参数通常依据以下原则,但根据特定系统的具体特征可以适当进行一些变化。例如,可以在约 0°C 至约 95°C 的温度将具有蛋白质膜的基底与活性剂溶液接触至少约片刻的时间,更特别地约 1 分钟至约 72 小时。在一个更具体的实施方案中,接触时间是约 1 分钟至 60 分钟,或更特别地约 5 分钟至约 30 分钟。溶液中活

性剂的浓度取决于所期望的蛋白质膜中活性剂的浓度。在一个实施方案中,溶液的活性剂浓度为约 1ng/ml 至约 500mg/ml 的范围内,或约 0.1mg/ml 至约 100mg/ml,或约 0.1mg/ml 至约 10mg/ml,或更特别地,在约 0.1mg/ml 至约 5mg/ml 的范围内。活性剂溶液可被缓冲,例如考虑到膜蛋白质的 PI 以及活性剂和蛋白质各自的电荷,在 pH2-10 的范围内,或更特别地在 pH2-7 的范围内,更特别地 pH3-5 的范围,或 pH7-10 的范围。合适的缓冲液包括但不限于醋酸缓冲液、硼酸缓冲液、柠檬酸缓冲液或磷酸缓冲液。通常缓冲液浓度可在约 0.1mM 至约 20mM 的范围内,或更具体地约 0.5mM 至约 10mM。加载于蛋白质膜的活性剂的量取决于膜厚度和所述接触步骤的参数。

[0039] 可通过不同方法确定多层中蛋白质或活性剂的量,例如椭圆光度法、HPLC、质谱(例如 ICP-SFMS)、同位素标记或胺荧法。ICP-SFMS 是用于定量样品中不同元素和同位素的方法。如果不存在于其他组分中,磷检测可用于定量吸收入蛋白质膜的二磷酸类的量,硫可用于定量蛋白质。胺荧是可用于标记蛋白质以定量样品中蛋白质总量的荧光团。这是能测量小至纳克的小量蛋白质的简单方法。见 Sogawa 等, *Journal of Biochemistry*, 83(6) : 1783-1787(1978) 和 Udenfriend, *Science*, 178(4063) : 871-872(1972)。

[0040] 在本发明的一个实施方案中,蛋白质膜(有或没有药物活性剂)的制造方法可自动化。所述方法可包括具有受控参数(例如但不限于温度、浓度、pH、流动速度等)的流动系统以使同时生产数百或数千的包被基底成为可能。

[0041] 在蛋白质膜于基底表面上形成后(任选地于膜上加载活性剂),可在干燥和包装前将基底漂洗、浸蘸或不进行处理。可按照期望使用灭菌步骤。根据本发明的一个实施方案,为对包被部分进行质量控制,用同样方法包被参照装置并用于分析组分的量。

[0042] 在以下实施例中说明本发明的多种实施方案。

[0043] 一般实验程序:在以下实施例中, MilliQ® 水用于漂洗、稀释等,而且被称为水。实验室环境中的孵育的温度范围为约 16°C 至约 24°C,被称为室温。纤维蛋白原是去除纤溶酶原的纤维蛋白原 (Calbiochem, USA), 阿伦膦酸盐是三水合阿伦膦酸一钠 (LKT Laboratories, USA), ¹⁴C 标记的阿伦膦酸盐来自 Larodan Fine Chemicals, Sweden。纯钛盘片是 ASTM B265 Grade 2, 表面积为 0.85cm²。钛表面是有 2000 埃钛层的硅晶片,通过汽相沉积制备,在用椭圆光度法测量厚度的实施例中平行使用。

[0044] 实施例 1

[0045] 本实施例说明具有加载了二磷酸类药物阿仑膦酸类 (0.16 μg/cm²) 之多层纤维蛋白原膜的钛基底 (1.5 μg/cm²) 的制备。

[0046] 在含有 2% 乙酸和 2% triton X 的溶液中清洗纯钛盘片 5 分钟。在水中彻底漂洗基底,在超声浴中用 70% 乙醇孵育,然后在水中彻底漂洗并在水中超声 5 分钟。最后在水中漂洗基底并任选地在流动氮气中干燥。

[0047] 将所述盘片在溶于 10mM 醋酸缓冲液和 0.9% 质量/体积 NaCl 的 2mg/ml 纤维蛋白原溶液 (pH 5.5) 中孵育。在 50°C 加热块中孵育 10 分钟,然后将板在水中漂洗并在流动氮气中干燥。所得膜的质量用胺荧法测量是约 1.5 μg/cm²,用椭圆光度法测量约是 25nm。

[0048] 将具有纤维蛋白原多层膜的钛盘片在溶解于 2.5mM 醋酸缓冲液的 0.5mg/ml 阿仑膦酸类溶液 (pH 4) 中孵育。将瓶放置于摇台上并在室温孵育 60 分钟。然后在水中漂洗盘片并在流动氮气中干燥。通过使用 ¹⁴C 标记的阿仑膦酸类检测膜中有约 0.16 μg/cm² 的阿

仑膦酸类。

[0049] 实施例 2

[0050] 本实施例说明具有加载了二膦酸类药物唑来膦酸类 ($0.18 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) 之多层纤维蛋白原膜 ($1.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) 的钛基底的制备。

[0051] 纯钛盘片的清洗同实施例 1, 纤维蛋白原膜的制备同实施例 1。将纤维蛋白原包被的钛盘片在溶解于 2.5mM 醋酸缓冲液的 0.5mg/ml 唑来膦酸类 (LKT Laboratories, USA) 溶液 (pH 4) 中孵育。在室温倾斜孵育 60 分钟, 之后在水中漂洗表面并在流动氮气中干燥。用 ICP-SFMS 测量有约 $0.18 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 的唑来膦酸类被吸收。

[0052] 实施例 3

[0053] 本实施例说明具有两个加载了二膦酸类药物阿仑膦酸类 ($0.3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) 之多层纤维蛋白原膜 ($3.2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) 的钛基底的制备。

[0054] 纯钛盘片的清洗如实施例 1 所述, 第一个纤维蛋白原多层的制备同实施例 1。重复实施例 1 所述的多层形成过程, 如上所述漂洗和干燥表面。纤维蛋白原多 - 多层膜的总质量约为 $3.2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。

[0055] 按照实施例 1 所述方法用阿仑膦酸类加载具有多 - 多层膜的盘片, 通过使用 ^{14}C 标记的阿仑膦酸类检测, 约 $0.3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 阿仑膦酸类被吸收于膜中。

[0056] 实施例 4

[0057] 本实施例说明具有 $4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 的多层纤维蛋白原膜并加载 $0.44 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 阿仑膦酸类的不锈钢基底的制备。

[0058] 使用表面积为 0.85cm^2 的不锈钢 (SS) 盘片。盘片的清洗同实施例 1。纤维蛋白原多层的制备同实施例 1, 产生用胺荳法测量约为 $4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 的纤维蛋白原。与钛盘片相比 SS 盘片上纤维蛋白原的量更大是由于更大的表面粗糙度。

[0059] 按照实施例 1 所述方法用阿仑膦酸类加载纤维蛋白原包被的不锈钢盘片, 通过使用 ^{14}C 标记的阿仑膦酸类检测得到约 $0.44 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 阿仑膦酸类。

[0060] 实施例 5

[0061] 本实施例说明具有多层纤维蛋白原膜 ($1.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) 并用 5 分钟孵育步骤加载了阿仑膦酸类 ($0.16 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) 的钛基底的制备。

[0062] 除在水中漂洗后盘片不干燥外, 按照实施例 1 所述方法用多层纤维蛋白原膜制备钛盘片。之后, 在室温下将盘片在溶解于 2.5mM 醋酸缓冲液的 0.5mg/ml 阿仑膦酸类溶液 (pH 4) 中孵育 5 分钟。盘片在水中漂洗并在流动氮气中干燥。通过使用 ^{14}C 标记的阿仑膦酸类检测膜中约有 $0.16 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 的阿仑膦酸类。

[0063] 实施例 6

[0064] 本实施例说明具有在一个联合的纤维蛋白原和阿仑膦酸类孵育中制备的含阿仑膦酸类 ($0.12 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) 多层纤维蛋白原膜的钛基底的制备。

[0065] 钛盘片的清洗同实施例 1。将盘片在包含 2mg/ml 纤维蛋白原和 0.5mg/ml 阿仑膦酸类并溶解于 10mM 醋酸缓冲液和 0.9% 质量 / 体积 NaCl 的纤维蛋白原和阿仑膦酸类溶液 (pH4) 中孵育。在 50°C 加热块中孵育 10 分钟, 然后在水中漂洗表面并在流动氮气中干燥。通过使用 ^{14}C 标记的阿仑膦酸类检测到膜中约有 $0.12 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 阿仑膦酸类。

[0066] 实施例 7

- [0067] 本实施例说明具有在 55℃ 孵育温度下制备的多层纤维蛋白原膜的钛基底的制备。
- [0068] 钛表面的清洗同实施例 1。将表面在溶解于 10mM 醋酸缓冲液和 0.9% 质量 / 体积 NaCl 的 2mg/ml 纤维蛋白原溶液 (pH 5.5) 中孵育。在 50℃ 加热块中孵育 10 分钟, 然后在水中漂洗表面并在流动氮气中干燥。通过用椭圆光度法测量产生的膜厚度为约 26nm。
- [0069] 实施例 8
- [0070] 本实施例说明具有加载了更高浓度的阿仑膦酸类 ($2.3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) 之多层纤维蛋白原膜 ($1.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) 的钛基底的制备。
- [0071] 除在水中漂洗盘片后不干燥外, 钛盘片的清洗和纤维蛋白原多层膜的制备同实施例 1。之后, 在室温下将盘片在溶解于 2.5mM 醋酸缓冲液的 5mg/ml 阿仑膦酸类溶液 (pH 4) 中孵育 5 分钟。在水中漂洗盘片并在流动氮气中干燥。通过使用 ^{14}C 标记的阿仑膦酸类, 检测到膜中约有 $2.3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 阿仑膦酸类。
- [0072] 实施例 9
- [0073] 本实施例说明具有加载了二膦酸类药物阿仑膦酸类 ($0.29 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) 之多层人血清白蛋白 (HSA) 膜 (50nm) 的钛基底的制备。
- [0074] 纯钛盘片的清洗同实施例 1。将盘片在溶解于 10mM 醋酸缓冲液和 3.0% 质量 / 体积 NaCl 的 2mg/ml HSA (Sigma Aldrich, USA) 溶液 (pH 5.3) 中孵育。在 70℃ 加热块中孵育 10 分钟, 然后在水中漂洗盘片并在流动氮气中干燥。用椭圆光度法测量产生的膜厚度约为 50nm。
- [0075] 将具有多层白蛋白膜的钛盘片在溶解于 2.5mM 醋酸缓冲液的 0.5mg/ml 阿仑膦酸类溶液 (pH 4) 中孵育。在室温孵育盘片 10 分钟, 然后在水中漂洗盘片并在流动氮气中干燥。通过使用 ^{14}C 标记的阿仑膦酸类检测膜中约有 $0.29 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 阿仑膦酸类。
- [0076] 实施例 10
- [0077] 本实施例说明具有加载了二膦酸类药物阿仑膦酸类 ($0.29 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) 之多层免疫球蛋白 G (IgG) 膜 (40nm) 的钛基底的制备。
- [0078] 纯钛盘片的清洗同实施例 1。将盘片在溶解于 10mM 醋酸缓冲液和 1.2% 质量 / 体积 NaCl 的 2mg/ml IgG (Octapharma, Switzerland) 溶液 (pH 4.3) 中孵育。在 75℃ 加热块中孵育 10 分钟, 然后在水中漂洗表面并在流动氮气中干燥。用椭圆光度法测量产生的膜厚度约是 40nm。将具有多层 IgG 膜的钛盘片在溶解于 2.5mM 醋酸缓冲液的 0.5mg/ml 阿仑膦酸类溶液 (pH 4) 中孵育。在室温孵育盘片 10 分钟, 然后在水中漂洗盘片并在流动氮气中干燥。通过使用 ^{14}C 标记的阿仑膦酸类检测到膜中约有 $0.29 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 阿仑膦酸类。
- [0079] 实施例 11
- [0080] 本实施例说明具有加载了抗生素庆大霉素之多层纤维蛋白原膜 (26nm) 的钛基底的制备。
- [0081] 纯钛盘片的清洗同实施例 1。将盘片在溶解于 10mM 醋酸缓冲液和 0.9% 质量 / 体积 HCl 的 2mg/ml 纤维蛋白原溶液 (pH 5.3) 中孵育。在 50℃ 加热块中孵育 10 分钟, 然后在水中漂洗盘片并在流动氮气中干燥。用椭圆光度法测量产生的膜厚度约是 26nm。
- [0082] 在室温下将具有多层纤维蛋白原膜的钛盘片在溶解于水的 10mg/ml 庆大霉素 (Sigma Aldrich, USA) 溶液中孵育 60 分钟。之后使用具有 10^8 菌落形成单位 / ml 的金黄色葡萄球菌 (S. Aureus) (ATCC, USA) 的琼脂平板, 通过扩散敏感性测试 (diffusion

susceptibility test) 测量盘片的抗菌活性。在第一个 24 小时内, 盘片释放约 $40 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 至约 $80 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 的庆大霉素, 使用系列平板转移测试 (serial plate transfer test) 直到 48 小时也可检测到抑制区。

[0083] 实施例 12

[0084] 本实施例说明具有加载了二膦酸类药物阿仑膦酸类 ($0.19 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) 之多层 Haemocomplettan®膜 (27nm) 的钛基底的制备。

[0085] 纯钛盘片的清洗同实施例 1。将盘片在溶解于 10mM 醋酸缓冲液和 0.9% 质量 / 体积 NaCl 的 2mg/ml Haemocomplettan® (CSL Behring, USA) 溶液 (pH5.5) 中孵育。在 50°C 加热块中孵育 20 分钟, 然后在水中漂洗盘片但不在流动氮气中干燥。用椭圆光度法测量产生的膜厚度约是 27nm。

[0086] 将具有多层 Haemocomplettan®膜的钛盘片在溶解于 2.5mM 醋酸缓冲液的 0.5mg/ml 阿仑膦酸类溶液 (pH 4) 中孵育。将盘片在室温孵育 5 分钟, 然后将盘片水中浸蘸并在流动氮气中干燥。通过使用 ^{14}C 标记的阿仑膦酸类检测到膜中约有 $0.19 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 阿仑膦酸类。

[0087] 本文描述的具体实施例和实施方案实际上仅是示例, 而不旨在限制权利要求所限定的本发明。根据本说明书, 其他实施方案和实施例及其优势对本领域普通技术人员将是显而易见的, 并且在本发明权利要求范围内。