

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

A61K 31/715

A61K 9/14

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 98808439.2

[43]公开日 2000年9月27日

[11]公开号 CN 1268057A

[22]申请日 1998.7.1 [21]申请号 98808439.2

[30]优先权

[32]1997.7.3 [33]US [31]08/887,994

[86]国际申请 PCT/US98/13997 1998.7.1

[87]国际公布 WO99/01143 英 1999.1.14

[85]进入国家阶段日期 2000.2.23

[71]申请人 奥奎斯特公司

地址 美国加利福尼亚州

[72]发明人 R·C·斯皮洛 A·Y·汤普森

刘麟书

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 王景朝 温宏艳

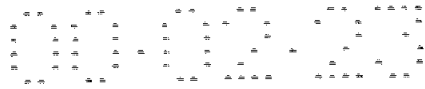
权利要求书2页 说明书9页 附图页数2页

[54]发明名称 交联的多糖药物载体

[57]摘要

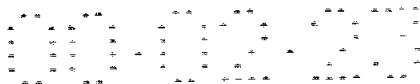
本发明提供用于输送治疗剂的载体及其制备方法。多糖与氧化剂反应来打开多糖上的糖环以形成醛基团。该醛基与第二多糖反应形成共价脎键,并且第一和第二多糖独立地选自透明质酸、葡聚糖、葡聚糖硫酸酯、硫酸软骨素、硫酸皮肤素、硫酸角质素、肝素、硫酸肝素和藻酸盐。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4



权 利 要 求 书

1. 一种输送治疗剂的可生物降解的载体，所述载体含有与第二多糖交联的第一多糖，其中所述第一和第二多糖均是选自透明质酸、葡聚糖、葡聚糖硫酸酯、硫酸软骨素、硫酸皮肤素、硫酸角质素、肝素、硫酸肝素和藻酸盐的衍生物；并且其中所述第一多糖和5 第二多糖通过所述第二多糖上的氨基和氧化所述第一多糖糖环形成的醛基之间的脰键相互共价交联。
2. 权利要求 1 的载体，其中所述第一多糖和第二多糖相同。
3. 权利要求 2 的载体，其中所述第一多糖和第二多糖均为透明质10 酸盐。
4. 权利要求 1 的载体，其中所述第一多糖和第二多糖不相同。
5. 权利要求 4 的载体，其中所述第一多糖为透明质酸盐而第二多糖为硫酸软骨素。
6. 权利要求 1 的载体，其中所述第一多糖含有经氧化糖环形成的15 游离醛基。
7. 一种治疗组合物，含有生物可降解的载体和治疗剂，所述载体含有与第二多糖交联的第一多糖，其中所述第一和第二多糖均是选自透明质酸、葡聚糖、葡聚糖硫酸酯、硫酸软骨素、硫酸皮肤素、硫酸角质素、肝素、硫酸肝素和藻酸盐的衍生物；并且其中所述第一多糖和第二20 多糖通过所述第二多糖上的氨基和氧化所述第一多糖糖环形成的醛基之间的脰键相互共价交联。
8. 权利要求 7 的组合物，其中所述治疗剂选自生长因子、细胞分裂素、激素和 DNA 构件。
9. 权利要求 8 的组合物，其中所述治疗剂是成骨剂。
- 25 10. 权利要求 1 的载体，为类似凝胶的形式。
11. 权利要求 1 的载体，为类似海绵的形式。
12. 一种制备输送治疗剂的生物可降解载体的方法，所述方法包括下列步骤：具有醛基的第一多糖衍生物与第二多糖在一定条件下反应，其中所述醛基与所述第二多糖共价交联而形成所述载体，并且所述第一30 和第二多糖独立地选自透明质酸、葡聚糖、葡聚糖硫酸酯、硫酸软骨素、硫酸皮肤素、硫酸角质素、肝素、硫酸肝素和藻酸盐。
13. 权利要求 12 的方法，其中所述方法进一步包括氧化所述第一



多糖形成第一多糖衍生物的步骤。

14. 权利要求 12 的方法，其中所述第一多糖与所述第二多糖相同。

15. 权利要求 14 的方法，其中所述第一多糖与所述第二多糖均为透明质酸盐。

5 16. 权利要求 15 的方法，其中所述第一多糖与所述第二多糖不同。

17. 权利要求 16 的方法，其中所述第一多糖为透明质酸盐而所述第二多糖为硫酸软骨素。

18. 权利要求 13 的方法，其中所述氧化第一多糖的步骤包括用高碘酸盐处理所述第一多糖。

10 19. 权利要求 12 的方法，其中所述第一多糖衍生物包含过量醛基，以便保留游离的醛基来随后继续与所述第二多糖交联。

20. 一种体内输送治疗剂的方法，包括将权利要求 7 的组合物给予所需输送部位的步骤。

15 21. 一种体内诱导骨生长的方法，包括将权利要求 9 的组合物给予所需骨生长部位的步骤。

22. 权利要求 8 的组合物，其中所述治疗剂与所述载体共价结合。

23. 权利要求 8 的组合物，其中所述治疗剂被包封在所述载体中。

24. 权利要求 22 或 23 的组合物，其中所述治疗剂包括成骨剂。

25. 权利要求 24 的组合物，其中所述治疗剂包括 bFGF。

20 26. 权利要求 12 的方法，进一步包括在与所述第二多糖反应之前第一多糖衍生物与治疗剂反应的步骤。

27. 权利要求 26 的方法，其中所述治疗剂选自生长因子、细胞分裂素、激素和 DNA 构件。

28. 权利要求 27 的方法，其中所述治疗剂包括生长因子。

25 29. 权利要求 28 的方法，其中所述生长因子包括 bFGF。

30. 一种体内输送治疗剂的方法，包括将权利要求 22 或 23 的组合物给予所需输送部位的步骤。

31. 权利要求 30 的方法，其中所述治疗剂包括 bFGF。

说明书

交联的多糖药物载体

本发明背景

5 本发明涉及用于输送治疗剂的生物可降解的载体，制备该载体的方法和使用该载体的方法。

临床上需要可生物降解的生物相容性治疗剂的载体，该载体可针对性地输送并控制输送治疗剂。

在各种各样的生物材料中使用多糖，如透明质酸(HA)和葡聚糖硫酸酯。透明质酸(HA)是一种天然产生的多糖，被用作制备眼药和矫形外科药物中的基料。单一 HA 的临床适应征受到其物理特性和天然 HA 分子残留时间短的限制。甲醛交联的 HA(Hylan)已经被用于关节炎病关节的粘性补充(Takigami 等人, 1993, 碳水聚合物(carbohydrate polymer)22: 153-160)。葡聚糖硫酸酯是一种葡聚糖的葡萄糖胺聚糖类的多离子衍生物，已显示可用作治疗高血脂的生物材料和药物。通过某些菌株来合成葡萄糖的亲水性聚合物葡聚糖，再酯化葡聚糖来产生其酯。

Berg 等人(美国专利 5510418, 出版于 1996 年 4 月 4 日)公开了葡萄糖胺聚糖，如 HA、硫酸软骨素、硫酸角质素、壳多糖和肝素，它们被化学结合到合成的亲水性聚合物(如用作可注射制剂或固体植入剂的聚乙二醇(PEG))上。Koji Kimata 等人(美国专利 5464942, 出版于 1995 年 11 月 7 日)公开了连接葡萄糖胺聚糖的磷脂及其作为转移瘤抑制剂的用途。Sakurai 等人(美国专利 5310881, 出版于 1994 年 5 月 10 日)公开了葡萄糖胺聚糖-改量的蛋白质。Balazs 等人(美国专利 5128326, 出版于 1992 年 7 月 7 日)公开了用二乙烯基砒交联的 hyaluronan。

本发明概述

25 本发明提供用于输送治疗剂的生物可降解的载体，制备该载体的方法和使用该载体的方法。本发明生物可降解的载体含有交联的第一和第二多糖，其中第一和第二多糖均是选自透明质酸、葡聚糖、葡聚糖硫酸酯、硫酸软骨素、硫酸皮肤素、硫酸角质素、肝素、硫酸肝素和藻酸盐的衍生物。第一多糖包含由氧化的糖环衍生的醛基。第二多糖是胺衍生物，并且第一和第二多糖通过形成胍键的基团共价交联。在本发明中，交联反应中不用外加的交联剂或离子结合剂。



制备生物可降解载体的方法包括下列步骤：氧化第一多糖而形成具有醛基的第一多糖衍生物，并且将第一多糖衍生物与第二多糖胺衍生物，在醛基与胺部位共价反应能形成交联载体的条件下反应。

5 本发明也提供使用该载体输送治疗剂的方法，是通过在需要治疗介入的部位给予该载体进行的。

可改变第一和第二多糖的比例来调节载体的物理和生物特性。例如，较高比例带醛基的多糖，对于将治疗剂固定到载体上是优选的。未反应但有活性的醛基存在为与治疗剂共价连接提供位置。

10 可制备各种物理形式的本发明载体。例如，可制成类似凝胶的形式用于注射或制成类似海绵的形式用于植入治疗介入所需部位。

本发明载体具有生物相容的优点，同时由于交联而保持延缓生物降解的速度；控制治疗剂的释放并且具有凝胶或海绵形式制剂的柔韧性以适应所需的治疗介入。

15 本文中的治疗剂意指任何生物活性剂，如蛋白质、多肽或氨基酸，包括生长因子、生长因子受体、细胞分裂素、激素、抗体或化学剂，例如显示有生物作用的生长因子和受体的非肽激素化学模拟物。

附图简述

图 1 描述包封在本发明载体中的晶体紫罗兰的释放情况。

图 2 描述固定在本发明载体中的 FITC-BSA 的释放情况。

20 优选实施方案的描述

本发明制备载体的方法包括下列步骤：打开第一多糖上的糖环，并将末端羟基用过碘酸钠或钾等作为选择性氧化剂氧化为醛。由这种方式产生的醛基的量可按化学计量来控制。这种方法通常可将大约 1% - 50% 的环打开。更优选地打开大约 1% - 10% 的重复糖单元而形成醛基。这些
25 醛基可与第二多糖胺衍生物在胺部位上形成共价交联。打开第一多糖上糖环的试剂，可以是任何选择性的氧化剂，该氧化剂能将末端羟基氧化为醛，它包括特异性的糖氧化酶。

在本发明中，第一和第二多糖均选自透明质酸、葡聚糖、葡聚糖硫酸酯、硫酸软骨素、硫酸皮肤素、硫酸角质素、肝素、硫酸肝素和藻酸盐。
30 在优选的实施方案中，第一和第二多糖均选自透明质酸和硫酸软骨素。本文中使用的术语“多糖”包括多糖本身及其盐，如钠、钾、镁、钙等盐。多糖原料的优选形式包括被批准用于人的那些。透明质酸盐的



原料可来自细菌发酵或从鸡冠分离出或可商购获得。

所述载体可包括相同的或不同的第一和第二多糖。在一个优选的实施方案中，第一和第二多糖均为透明质酸。在另一优选的实施方案中，一个多糖是 HA 而另一个为硫酸软骨素。多糖通常具有大约 1000-
5 10000000DA 的平均分子量。

本发明载体可被配制成几种物理形式，包括凝胶或海绵形式。当需要持续或缓慢释放输送治疗剂时，可通过与载体结合来固定治疗剂。通过使用过量的多糖多醛衍生物可制备载体凝胶、海绵或微粒制剂，这样载体具有未反应而同时仍有活性的醛，该醛基适于固定含游离胺的生物
10 活性治疗剂。蛋白质和许多生长因子是含游离胺的化合物。

需要实现短时间输送治疗剂时，治疗剂可被包裹在载体中。药物，生长因子、多肽、蛋白质和其它生物活性治疗剂，可通过将治疗剂与凝胶化前两种衍生物之一混合，或者凝胶化后药物溶液扩散到凝胶/海绵中被包裹在凝胶/海绵中。

治疗剂也可共价连接到载体上，例如通过亚胺键。在形成凝胶或海绵之前，载体上的某些醛基可与治疗剂上的胺基反应。

当需要制备通过注射器或导管进行关节输送的注射制剂时，可将载体制备成凝胶载体。另外，需要制备可植入的制剂时，载体可被配制成海绵状载体。本发明载体可通过在所需形状的模中冷冻干燥或空气干燥
20 制成任何形状。冷冻干燥的材料也可通过再水合该冷冻干燥材料来制成粘性凝胶。

可用于本发明治疗剂的实例不受特别的限制，并且包括来源于各种动物包括人、微生物和植物的蛋白质，以及通过化学合成和使用基因工程技术制备的那些。治疗剂包括（但不限于）生长因子，如 bFGF、aFGF、
25 EGF(表皮生长因子)、PDGF(血小板-衍生生长因子)、IGF(胰岛素类生长因子)、TGF- β 1-3，包括 TGF- β 超科(BMP's、GDF-5、ADMP-1 和 dpp)；细胞分裂素，如各种干扰素，包括 α -、 β -和 γ -干扰素，和白细胞介素-2和-3；激素，如胰岛素、生长激素释放因子和降钙素；非肽激素；抗生素；抗癌药和化学剂，如化学模拟的生长因子或生长因子受体，和 DNA
30 构件，包括 cDNA 构件和基因组构件。在优选的实施方案中，治疗剂包括以下因子，即蛋白质的或非蛋白质的，发现它们起骨、韧带、软骨或与骨或关节相关的其它组织生长的诱导或传导作用，例如 BMP 和 bFGF。



本发明也包括用于将自体的或异体的细胞包裹在载体中。自体细胞可以是那些供体中天然产生的，或者重组修饰成含有编码所需蛋白质产品的核酸的细胞。

5 本领域技术人员会理解，固定或包封在载体中的治疗剂的量将随所要达到的治疗目的而改变，但通常是在微微克到克的范围中。

本发明载体可通过植入、直接使用或注射给药，这取决于所要进行的治疗应用、物理特性和多糖衍生物的比例。

10 通过本领域普通技术人员已知的体外和体内试验，可显示治疗输送这些治疗剂的效力。在本发明中，优选的治疗剂是那些起骨、韧带、软骨或与骨或关节相关的其它组织生长的诱导或传导作用的因子。

体外和体内评价软骨诱导作用、软骨传导作用、骨诱导作用和骨传导作用的测定方法，对本领域普通技术人员来说是已知的。对于体外试验来说，将初期胎鼠颅盖细胞（按 Wong 和 Cohn 的方法通过一系列的胶原酶消化来获取 (PNAS USA 72:3167-3171, 1975)），或初期鼠髁的软骨
15 （Thyberg 和 Moskalewski (Cell Tissue Res. 204:77-94, 1979)），或兔关节的软骨细胞（通过 Blein-Sella O. 等人的方法获取的 (Methods Mol. Biol. , 43:169-175, 1995)）种进含有所需治疗剂的载体中，并在常规条件下培养 1-4 周。然后加工培养物并进行组织学评价。

20 含有所需治疗剂的本发明载体的软骨传导或软骨诱导能力，可通过其成功地承载原生鼠骨髓和基质细胞以及初期鼠或兔软骨细胞的粘附、迁移、增殖和分化来测定。骨髓和骨髓基质细胞是在全厚度缺损的次软骨骨髓中发现的软骨前体细胞源。骨髓可从 2-3 周龄同系繁殖的路易斯大鼠的长骨中收获，并且可直接加到载体中或在常规条件下培养 2 周。产生自这些培养物中的粘附基质细胞群被继代培养并冷冻备用。将 6 次
25 传代的细胞用于培养或接种在载体上，来试验软骨传导或软骨诱导能力。

视黄酸处理的软骨细胞代表较少成熟的软骨细胞，并且可用于试验基料承载软骨形成最后步骤的能力。细胞在载体上培养或接种前用视黄酸处理原生软骨细胞 (Dietz, U. 等人, 1993, J. Cell Biol. 52(1):
30 57-68)。

使用根据线粒体活力来测量细胞数目和生存力的 MTS 测定法检测细胞的粘附和增殖。在含有治疗剂的载体上培养基质细胞或软骨细胞 6-18

小时。在血清存在或不存在下进行粘合分析和 1-2 周的增殖评价。

5 为了进行细胞迁移试验，将含有治疗剂的载体涂敷或装在多孔的转移孔膜培养插入物上 (Corning)。基质细胞接种在转运孔上部室中的载体顶部，而化学吸引剂 (生长因子, PDGF) 置于底部室中。培养 12-18 小时后，通过 MTS 测定法定量测定经载体迁移到转移孔膜底层的细胞。从上部室移出载体并进行组织学加工来评价渗入度。

与成软骨和成骨相关的分化标记物分析从蛋白质和转录水平上来评价。可被分析的特异性标记物包括：1) II 型胶原和 IIA、IIB 异构体；2) Aggrecan 蛋白聚糖；3) IX、X 和 XI 型胶原；4) I 型胶原；5) 软骨基质蛋白质 (CMP)；6) Cart-1 转录因子；7) 粘连蛋白 (EDA、EDB 异构体)；10 8) Decorin 蛋白聚糖；9) 连接蛋白；10) NG-2 蛋白聚糖；11) 二聚糖蛋白聚糖；12) 碱性磷酸酯酶。分化可通过 Northern/PCR 分析、蛋白质印迹 (Western blotting) 或通过代谢细胞标记来测量。

15 为了进行 Northern/PCR 分析，通过常规方法从基质细胞或软骨细胞中分离 RNA。定时过程试验可用于测定最佳的培养期，根据细胞类型培养期范围为 1-6 周。通过 Northern 凝胶和具有特异性 cDNA 或 PCR 扩增探针的杂交技术来分析分离的 RNA。通过放射自显影的密度测量扫描和持家 (housekeeping) 基因信号 (G3PDH) 归一化来进行定量 Northern 分析。Northern 分析可用定量 PCR 分析来补充，后者使用由待分析基因的已公开 cDNA 序列产生的引物。

20 为了进行蛋白质印迹分析，通过常规技术从含有成骨或成软骨治疗剂的载体上培养的细胞中分离可溶性蛋白质溶胞产物 (Spiro R.C., 等人, 1991, J. Cell. Biol., 115:1463-1473)。细胞溶胞后，载体被提取到强变性剂 (8M 脲, GnHCL) 中取出并检查结合的或掺入的蛋白质。使用特异性多克隆或单克隆抗体通过标准蛋白质印迹技术分析蛋白质样品。

30 为了标记代谢细胞，用 $^{35}\text{SO}_4$ 、 ^{35}S -蛋氨酸或 $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -标记的氨基酸通过常规技术 (Spiro 等人, 同上) 来代谢性放射标记在含治疗剂的载体上培养的细胞。用对所研究蛋白质有特异性的抗体定量免疫沉淀可溶性蛋白和与基质有关的蛋白并通过 SDS-GAGE (Spiro 等人, 同上) 来分析。通过放射自显影的密度测量扫描进行结果定量并将信号针对细胞等同物或持家蛋白质如肌动蛋白归一化处理。

另外，在同系繁殖的大鼠软组织植入模型中，可试验含有成软骨剂的本发明载体承载体内成软骨分化的能力。将上文所述的大鼠骨髓或基质细胞以高密度接种在载体上，在含有 10% FBS 血清和抗体的 MEM 介质上培养过夜，然后转染到微孔扩散室中并腹膜内或皮下植入 8 周龄受试动物中。3 周后从各室中收获培养物并从组织学上评价软骨的形成。

使用远系繁殖大鼠的移植模型，评价含成软骨剂的载体保持体内软骨表型的能力。肋骨软骨的软骨细胞以高密度被接种在载体上，并在含有 1% 大鼠血清和抗生素的 Hams F-12 中培养过夜。然后将接种的载体植入由 8 周龄雄性 Sprague-Dawley 大鼠钝性解剖形成的后胫骨肌肉窝中。移植进行 14 天和 28 天，并且通过 aggrecan 和 II 型胶原染色从组织学上评价相容性、软骨生长和对分化表型的保持。

对于体内试验，可评价含有成骨剂的本发明载体承载骨愈合的能力，这种评价是在鼠颅骨缺损模型中由植入 6 周龄雄性 Sprague-Dawley 大鼠的顶骨中产生的 5mm × 3mm 缺口中进行的。通过放射自显影和组织学分析在第 28 天评价缺损情况。

骨修复体内模型是兔的全厚度关节骨缺损 (Amiel 等人, 1985, J. Bone Joint Surg. 67A:911)。在成年雄性新西兰白兔的内侧股骨骨节的中心形成大约直径为 3.7mm 并且厚度为 5mm 的缺损。然后将缺损用含有成骨剂的载体填充，或者不填充作为对照。在 6 和 12 周然后于 6 个月和一年从形态学和组织学上评价其缺损情况。

下列实施例用于举例说明而不打算以任何方式限定本发明。

实施例 I

制备透明质酸胺衍生物

通过在水溶性碳化二亚胺 (1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳化二亚胺盐酸盐 EDC) 存在下，透明质酸盐与乙二胺反应来将游离胺基团引入透明质酸盐 (HA) (Lifecore Biomedical 具有 1.3×10^6 的分子量)。需要过量极多的二胺化合物和 EDC (Aldrich)。

将 100ml PBS (10mM, pH7) 中的 HA 0.4g (约 1 mmole 重复单位) 和 6.7ml 的乙二胺 (100 mmole)，然后用 HCL 将溶液 pH 调节到 5.0。将 4.02g EDC (210 mmole) 加到该溶液中，并使反应在室温下进行 24 小时，用 4 升的去离子水透析 4 次，共 24 小时，由此在交联反应前除去所有未反应的乙二胺或 EDC，以便交联反应在没有利用外在的交联剂或离子结合剂下进行。

在这种条件下，糖链中 20% 的羧基转化为胺基。

实施例 II

制备多糖-多醛衍生物

用高碘酸钠作为氧化剂，通过氧化透明质酸盐来制备 HA/多醛 (HA-pAld)。将 HA 1g 溶于 80ml 去离子水中，并加入 20ml 0.5M 高碘酸钠。室温下避光反应 18 小时，加入甘油使未反应的高碘酸盐骤冷，并用大体积的去离子水渗析。渗析的 HA-pAld 溶液冷冻干燥，并在 4℃ 下避光储存所得白色粉末。在这种条件下，HA 中大约 5% 的重复单元被氧化。通过改变氧化条件，例如反应时间和氧化剂的量，来控制大分子链中活性醛的浓度。

通过上文相同的方法制备载有硫酸软骨素 (Sigma) 的活性醛 (CS-pALD)。

实施例 III

制备 HA-NH₂/HA-pAld 凝胶

将 0.2g HA-NH₂ 和 0.4g HA-pAld 分别溶于 50ml 去离子水中。两个溶液中均含有 100 微摩尔的活性基团。在室温和剧烈搅拌下混合两种溶液。20 分钟后形成凝胶。由此形成的凝胶于 0.1M HCl 到 0.1M NaOH pH 范围内在水中是稳定的。

实施例 IV

制备 HA-NH₂/HA-pAld 海绵

将实施例 III 中制备的 HA-NH₂/HA-pAld 凝胶在 -78℃ 温度下冷冻，然后在 -40℃、-20℃、-4℃ 和 18℃ 温度下分别真空干燥 4 小时、8 小时、20 小时和 1 小时。

实施例 V

制备 HA-NH₂/CS-pAld

除用 CS-pAld 代替 HA-pAld 外，按上文实施例 III 和 IV 公开的方法制备 HA-NH₂/CS-pAld 凝胶和海绵。

实施例 VI

制备包封有晶体紫罗兰的 HA-NH₂/HA-pAld 载体

将 2.0ml 晶体紫罗兰溶液 (1%, Sigma) 加到 23ml 含有 0.2g HA-NH₂ (游离胺含量 100 微摩尔) 中。在室温和剧烈搅拌下，将所得溶液与 25ml HA-pAld 溶液 (醛含量 100 微摩尔) 混合。20 分钟后形成凝胶。将由此形



成的凝胶与 500ml 去离子水在室温下培养，并在 1、2、4、6、8 和 18 小时的时间点取水样和换水。通过测量样品溶液在 590nm 处的 O.D. 来检测从凝胶释放的晶体紫罗兰。图 1 表示释放曲线。

实施例 VII

5 制备固定有治疗剂的 HA-NH₂/HA-pAld 载体

选择牛白蛋白-荧光素异硫氰酸盐 (FITC-BSA, Sigma) 作为治疗蛋白的模型。将 10mg 溶于 2ml 去离子水中的 FITC-BSA 加到 23ml 的 HA-pAld 溶液 (HA-pAld 含量 4g; 醛含量 100 微摩尔)。溶液在室温下培养 20 分钟，然后与 25ml HA-NH₂ 溶液 (HA-NH₂ 含量 0.2g; 游离胺含量 100 微摩尔) 混合，再在室温下培养 20 分钟。由此获得的凝胶于室温下在 500ml 去离子水中培养。在 1、2、4、6、8、24、48 小时时间点更换培养介质，然后是每两天换一次持续两周。通过在 495nm 处测量 O.D. 来测定培养介质中释放的 FITC-BSA。如图 2 所示，在头两个小时从载体中释放大约 12% 的 FITC-BSA; 此后未发现显著量的蛋白质，表明剩余的蛋白质共价固定在凝胶上。

实施例 VIII

将生长因子混合在基质中

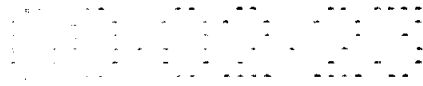
将碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor bFGF) 混合在 HA 凝胶中，通过加入到 HA(I) (实施例 1 中制备的) 溶液中，然后与 HA(II) (实施例 2 制备的) 混合，或者先将 bFGF 与 HA(II) 溶液在 4℃ 温度下培养过夜，再与 HA(I) 混合来进行。分别将这两种制剂记录为 HA(I/II) 和 HA(II/I)。与 HA(II) 培养使生长因子通过亚胺键共价连接到 HA 上。最终浓度为：在 1ml 不含 EDTA 的蔗糖缓冲液中有 1mg bFGF、2mg HA(I) 和 2mg HA(II)。放射性 ¹²⁵I- bFGF 用作制备释放动力学研究样品的示踪剂。含有 bFGF(1mg/ml) 的粘稠透明质酸盐溶液 (4%, W/V) 被用作对照。

为了进行体内大鼠头盖缺损测定，通过以每片海绵 30μg 比例将骨形成蛋白质 (BMP) 扩散在预先干燥的 HA 海绵 (5 × 4 × 3mm. L. W. H.) 中然后冷冻干燥，来制备混合在 HA 海绵中的生长因子。

实施例 IX

30 体外释放生长因子的研究

使用配置有 PET 膜的孔径为 0.4μm 的 6 孔规格的细胞培养插入物来



进行体外 bFGF 释放研究。选择含有蔗糖 (9%) 和 EDTA (1mM) 的柠檬酸钠缓冲液 (20mM, pH5) 和 DMEM 细胞培养介质作为释放介质。然后将 40mg 各样品 (实施例 VIII 中描述的 HA (I/II)、HA (II/I)、HA 海绵和对照物) 与 2.0ml 介质放置在孔中, 将另外 4ml 介质加到室外。所得培养板放置在轨道振摇平台上, 并在 37°C 温度下持续振摇。在所需时间点用液体闪烁计数器 (Beckman, LS6500) 记录室外释放介质的放射性, 并更新外室的释放介质。在 4 小时和 8 小时分别有大约 68% 和 90% 掺入的 bFGF 从 HA 粘稠溶液中释放到 DMEM 细胞培养介质中。在超过 1 天的时间中释放剩余的 bFGF。培养 4 小时、8 小时和 24 小时后, 包封在 HA (I/II) 中的 bFGF 分别释放大约 62、78 和 88%。在另外的两天中完全释放剩余的 bFGF。释放介质的类型似乎对 bFGF 的释放速率没有影响。对于 HA (II/I) 来说, 在培养 4 小时、1 天和 2 天后, 掺入的 bFGF 分别仅仅有 16、25 和 30% 从凝胶释放到蔗糖缓冲液中。剩余的 bFGF 释放 2 周多。选择 DMEM 细胞培养介质作为释放介质时, 相同的时间内从 HA (II/I) 中仅仅释放 13、15 和 17% 的 bFGF, 并且实验结束时, 培养两周后凝胶中仍剩余 20% 的 bFGF。

实施例 X

从骨膜下注射入大鼠的颅盖中

将 50 μ l 下文所述样品注射入 6 周龄雄性 Spague Dawley 大鼠的左顶骨的骨膜中。14 天后, 收获颅盖并进行组织学评价。下面给出顶骨厚度。

	顶骨厚度, μ m (平均值 \pm SD, n=6)
未治疗	259 \pm 30
HA 凝胶	276 \pm 94
HA (I/II) +1mg/ml bFGF	451 \pm 97
HA (II/I) +1mg/ml bFGF	523 \pm 81
缓冲液中的 1mg/ml bFGF	350 \pm 35
溶液 HA 中的 1mg/ml bFGF	281 \pm 30

说明书附图

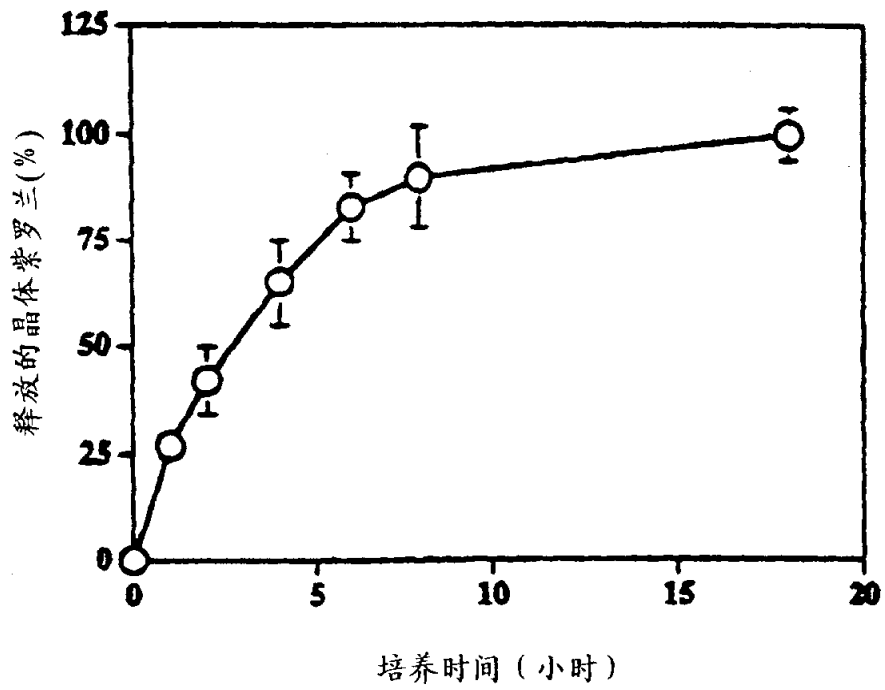


图 1 从 HA 凝胶中释放晶体紫罗兰

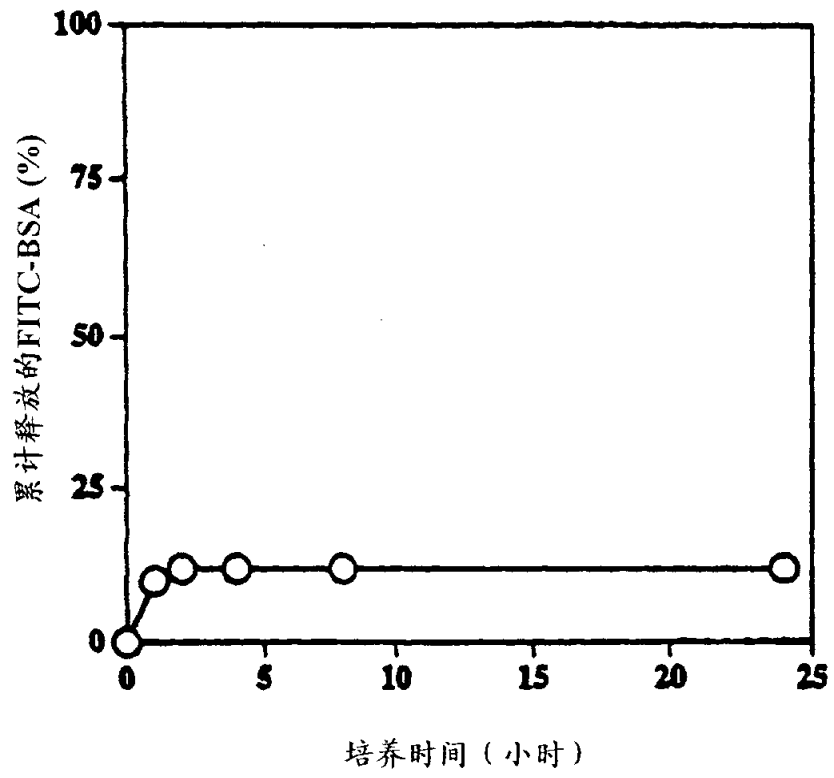


图 2 从 HA 凝胶中释放FITC-BSA