

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號： 95117398

A61K 9/52 (2006.01)

※申請日期： 95.5.16

※IPC 分類：

A61K 9/70 (2006.01)

A61K 9/50 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

A61K 9/00 (2006.01)

一種由微囊胞聚集體所構成的支架及其製造方法/

A nanocapsule-assemble scaffold capable and manufacturing of the same

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文) ID : 46804706

國立交通大學/NATIONAL CHIAO TUNG UNIVERSITY

代表人：(中文/英文) 張俊彥/CHANG, CHUNYEN

住居所或營業所地址：(中文/英文)

新竹市大學路 1001 號

NO.1001 UNIVERSITY Road, Hsinchu CITY 300-10, Taiwan(R.O.C)

國籍：(中文/英文) 中華民國 R.O.C

三、發明人：(共 3 人)

姓名：(中文/英文)

ID :

1. 陳三元/CHEN, SAN-YUAN

E121067733

2. 劉澤英/LIU, TSE-YING

C120587912

3. 劉典謨/LIU, DEAN-MO

T120335912

國籍：(中文/英文)

1. 中華民國/ROC 2. 中華民國/ROC 3. 中華民國/ROC

四、聲明事項：

主張專利法第二十二條第二項第一款或第二款規定之事實，其事實發生日期為：

申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

主張專利法第三十條生物材料：

須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

不須寄存生物材料者：

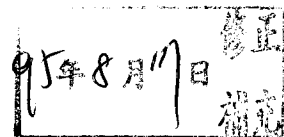
所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

五、中文發明摘要：

一種由微囊胞聚集體所構成的組織工程支架及其製造方法，藉由乳化製程或是微脂體製程來形成囊胞，並透過控制材料特性及乳化條件，配合支架成形製程，使微囊胞自我堆積聚集組裝形成緊密結構，並可做為組織或細胞貼附、成長及分化之基底，還可以透過微囊胞預先包覆組織或細胞貼附、成長及分化過程中所需的藥物分子，使之同時發揮基底結構及藥物儲槽的雙重角色，並透過微囊胞特性進一步控制藥物釋放速率，達到藥物程序式釋放、協同釋放與穩定釋放的功能，且不易破壞藥物活性，並應用在組織工程及細胞培養的生醫元件上。

六、英文發明摘要：

This invention discloses a method to produce novel scaffolding materials with a nanostructure capable of delivering drug in well-controllable manner, or preferably, in a near zero-order kinetic for drug release, for tissue engineering applications. The said scaffold has a solid macroporous network that is constructed by assembly of nano-and/or microcapsules, wherein said capsules comprised single or multiple core and solid polymeric shell. Said core contains biologically or therapeutically active agent that is able to release outward said shell to provide vital active ingredient(s) for the growth, differentiation, and proliferation of specific cells attached on the macroporous scaffold for the production of engineered tissues.



七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(3)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

- 3 固體外殼 solid shell
- 4 生物活性劑 Bioactive agent
- 5 液體或固體核 liquid or solid core

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

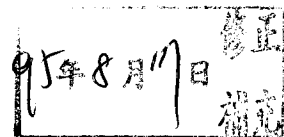
本發明涉及在組織工程中生醫相容可降解分子之微囊胞。更進一步的說，本發明係微囊胞聚集而成之多孔聚集體支架結構。

【先前技術】

組織工程包括開發能夠與生物組織特定地相互作用產生功能性組織等的新一代生物材料。然而利用天然或合成的高分子材料將固體或液體藥物包嵌而成的微囊胞則是用來包覆藥物的製法之一。因此大多數的藥物載體使用微囊胞通常具有延緩藥物釋放、提高藥物穩定性、掩蓋不良臭味、降低腸胃道副作用等的功能，應用這樣的微囊胞特性，在乳化製備的過程後再利用溶鹽法使之聚集而成的微囊胞聚集體，進一步應用於組織工程上，則為本發明最主要的目的。

【發明內容】

本發明為一種由微囊胞聚集體所構成的組織工程支架及其製程，微囊胞聚集體是藉由微囊胞自我組裝特性所形成的結構，目的在於做為組織或細胞貼附、成長及分化的基底並透過



七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(3)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

- 3 固體外殼 solid shell
- 4 生物活性劑 Bioactive agent
- 5 液體或固體核 liquid or solid core

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明涉及在組織工程中生醫相容可降解分子之微囊胞。更進一步的說，本發明係微囊胞聚集而成之多孔聚集體支架結構。

【先前技術】

組織工程包括開發能夠與生物組織特定地相互作用產生功能性組織等的新一代生物材料。然而利用天然或合成的高分子材料將固體或液體藥物包嵌而成的微囊胞則是用來包覆藥物的製法之一。因此大多數的藥物載體使用微囊胞通常具有延緩藥物釋放、提高藥物穩定性、掩蓋不良臭味、降低腸胃道副作用等的功能，應用這樣的微囊胞特性，在乳化製備的過程後再利用溶鹽法使之聚集而成的微囊胞聚集體，進一步應用於組織工程上，則為本發明最主要的目的。

【發明內容】

本發明為一種由微囊胞聚集體所構成的組織工程支架及其製程，微囊胞聚集體是藉由微囊胞自我組裝特性所形成的結構，目的在於做為組織或細胞貼附、成長及分化的基底並透過

微囊胞預先包覆組織或細胞貼附、成長及分化過程中所需的藥物分子，使微囊胞聚集體不但可以做為支撐主組織及細胞的基底結構，還可以發揮藥物釋放的雙重角色，以此製程可製作出具有高藥物包覆效率的支架並可以同時包覆多種藥物分子於不同微囊胞內，達到程序式釋放及多藥物協同釋放的功能，另外，基於微囊胞的特性，容易達到零階釋放（zero-order）穩定的釋放曲線，也不易破壞藥物活性，這些特性顯示透過簡單的過程可製備具穩定藥物釋放功能的組織工程支架，並可應用在組織及細胞培養的生醫元件上。

【實施方式】

本發明係經油性改質之幾丁聚醣（acylation chitosan）及水溶性的幾丁聚醣（carboxymethyl-hexanoyl chitosan；HNOCC）做為較佳實施例材料來說明由微囊胞聚集體所構成的組織工程支架。且可利用生醫相容可降解分子材料將固體、液體或膠體內容物包嵌而成的微囊胞，其生醫相容可降解分子材料可為一種或一種以上之天然、半合成或合成的分子材料。而天然的材料可為一種或一種以上之膠原蛋白、明膠、透明質酸（Hyaluronic Acid， HA）、阿拉伯膠、海藻膠鈉、褐藻膠或幾丁聚醣；半合成的分子材料其包含一種或一種以上之鄰苯二甲酸醋酸纖維素（CAP）、羧甲基纖維素（CMC-Na）或乙基纖維素（EC）；合成的分子材料其包含一種或一種以上之聚乙烯吡咯烷酮（PVP）、聚乙烯醇（PVA）、聚乳酸交酯、聚醯胺、聚乳酸-甘醇酸 Poly(Glycolide - co-Lactide)（PLGA）或 Poly(Glycolide)；其所可包嵌之固體、液體或膠體內容物，係可以溶解、嵌合、吸附或化學鍵結等多種形式與微囊胞進行包嵌。

微囊胞的製造

以二氯甲烷將 O-hexanoyl chitosan (混合重量比 10:1) 溶解以形成油相溶液，另外，以 3% 的醋酸溶液與 chitosan 的混合溶液(混合重量比 10:1) 做為第一水相溶液，並以 0.1M 之 NaOH 將第一水相溶液之 pH 值調整至 5.5-6 之間，本例以 BSA 做為蛋白質藥物之模藥 (Model drug)，第一水相溶液與模藥混合後形成 BSA 濃度為 0.5 mg/mL 之溶液(亦可以 basic fibroblast growth factor 做為模藥形成 1ug/mL 之水溶液)，再與油相溶液進行混合 (油相與第一水相溶液體積比為 30:1)，並以超音波均質機進行乳化 30 秒，可以得到 Water in Oil (W/O) 之乳化溶液，然後再將此乳化溶液置入第二水相溶液(酒精與 carboxymethyl hexanoyl chitosan solution 以重量比 3:1 所形成)內，將乳化溶液與第二水相溶液以體積比 5:1 進行雙乳化(Double emulsion) 可形成微囊胞懸浮液，這些微囊胞 (外徑 0.8-5 um) 懸浮於分散介質(carboxymethyl hexanoyl chitosan solution) 中，其中每個單一微囊胞外層(shell) 部份由厚度 0.2-0.4 um 的油溶性 O-hexanoyl chitosan 構成，核心(core) 部份由水溶性幾丁聚醣與模藥所構成。

微囊胞支架的製備

將上述之微囊胞懸浮液，與平均粒徑 300 um (微米) 的 PMMA (polymethylmethacrylate) microsphere 均勻混合，再以抽氣過濾法去除掉大部份的分散介質溶液，留下微囊胞與 PMMA microsphere 顆粒的混合體(圖一左)，在 50°C 條件下溫乾燥 8 小時後，在抽氣過濾裝置中以丙酮(acetone) 將 PMMA microsphere 以溶鹽法 (salt-leaching method) 除去，此時微囊胞與鹽顆粒的混合體只剩下微囊胞聚集體(由眾多微囊胞聚集

排列堆積所形成)所構成的立體多孔狀結構(圖一右及圖二),其孔洞大小由先前加入的 PMMA microsphere 直徑所定義(約 300 μm)。

然而利用不同製程所製造的微囊胞透過溶鹽法所形成的各式微囊胞聚集體(圖三-圖六與圖十),其所構成的多孔狀結構之巨觀孔洞大小是由上述之鹽顆粒尺寸所定義,而巨觀孔洞與孔洞之側壁則由微囊胞聚集體所構成,當二氯甲烷完全乾燥後,側壁厚度則由微囊胞的量及粒徑大小所決定,因為這些微囊胞在乳化的過程中因非常的靠近,而且二氯甲烷非常容易揮發因此會造成微囊胞的殼與微囊胞殼之間有部分融合現象,且發現此現象可提供相當的強度,構成連續狀組裝排列的微囊胞聚集體胞支撐力量,因此以本發明所示,每單一微囊胞粒徑約為 0.8 μm 到約 5 μm 之間,外部殼部分的厚度約為大約介於 0.2 μm 到約 0.4 μm 之間,以上兩者均可透過材料的選擇與乳化條件的控制;內部核心的部分則由包含模藥的水相材料所組成,若在乳化前將交聯劑加入水相材料,則可以形成包含模藥的水膠核心,而且無論是液態核心或水膠核心,均可以透過擴散或是降解的方式,漸漸將核心內的模藥釋放出來,而且透過微囊胞聚集體所形成支架的基底結構,可進一步做為細胞或組織貼附、分化及生長的基底。

另外本發明利用可以選擇對於模藥-BSA 溶解度很大的材料(HNOCC)來作核心所產生之組織工程用之微囊胞聚集體支架結構可以達到非常接近零階釋放的穩定藥物釋放效應、協同釋放效應與程序式釋放效應(圖七-圖八)。

零階釋放效應

將包覆 BSA 的 HNOCC/O-hexanoyl chitosan/chitosan 微囊胞聚集體，置於 pH=7.4 的釋放介質溶液中（本例採用 PBS，phosphate buffer solution）中，每隔固定間隔，取出 0.1cc 釋放介質溶液，與 2cc 的 BCA(Bicinchoninic acid)solution 混合後，以 UV-visible 分光光度計量測波長 562 nm 的吸光度，並以標準吸收度-濃度曲線換算釋放出的 BSA 量，以 M_t/M 對時間(t) 作圖可得圖七(其中 M_t 為任一時間所釋放出的 BSA 量，M 為時間無限長時所釋放出 BSA 量)。

程序式釋放效應

將一為 HNOCC/O-hexanoyl chitosan/chitosan microcapsule，一為 HNOCC/PLGA/chitosan microcapsule，兩種不同的微囊胞本釋放實驗是將上述包覆 BSA 的兩種微囊胞聚集體所構成的支架置於 pH=7.4 的釋放介質溶液中，每隔固定間隔，取出 0.1cc 釋放介質溶液與 2cc 的 BCA (Bicinchoninic acid) solution 混合後，以 UV-visible 分光光度計量測波長 562 nm 的吸光度，並以標準吸收度-濃度曲線換算釋放出的 BSA 量，以 M_t 對時間(t)作圖可得圖八(其中 M_t 為任一時間所釋放出的 BSA 量)。因為 BSA 在兩種 Shell 的材料中的擴散速率不同，因而呈現明顯的兩階段釋放曲線。

而且大為提高藥物的包覆率（80%），因此只要控制核心包覆藥物濃度及殼的厚度，對於藥物動力學可以得到很好的操控，相較於習知技術利用支架結構材料來將藥物包覆於孔壁內，因支架結構材料往往對藥物的溶解度不高，導致以往習知技術（圖九與圖十一）的藥物包覆效率受到相當的限制，而且不易透過製程對結構的操控而得到良好的釋放控制。

本發明另一實施例中以 size-exclusion HPLC 來測量 BSA

monomer content 以及利用 FT-IR 在 amine I group 區域來計算 BSA 的二級結構。如下表所示，釋放後的蛋白質在 monomer content 及 secondary structure 上與釋放前差異不大，顯示本發明具有保護藥物活性之特色，其原因為 model drug 是溶解於具相容性的核心材料中，在支架的製程中，可以避免習知技術中各種支架製程中來自溫度、有機溶劑、酸鹼值、離子及機械力量對藥物分子的侵擾而得以保持藥物活性。

Sample	Secondary structure (%)		Monomer content (%)
	α -Helix	B-Sheet	
在 pH 7.4 的溶液中的 BSA	$54 \pm 6^*$	$8 \pm 3^*$	95
從微囊胞中所釋放的 BSA	48 ± 4	11 ± 4	93

因此，本發明以一些較佳實施例揭露於上但其並非用以限定本發明僅侷限於上述相關材料與其乳化製程，如以電化學沈積或是以高分子電解質鍍層所形成的微囊胞或是微球體所構成的微囊胞聚集體支架均是在本發明的範疇內。且本發明亦不侷限於上述實施例所採用之溶鹽所製造的微囊胞聚集體支架，其他如發泡法或是真空乾燥法等支架製程，所製造的微囊胞聚集體支架亦在本發明範疇內。任何熟習此技術者，在不脫離本發明之精神和範圍內，均屬於本案發明保護之範疇。

【圖式簡單說明】

- 圖一、經由溶鹽法聚集而成之微囊胞支架結構。
- 圖二、習知技術之支架孔壁(左一，左二)與本發明微囊胞聚集體所構成的支架孔壁(右一)之比較微觀示意圖。
- 圖三、微囊胞聚集體支架結構。
- 圖四、多殼層的微囊胞聚集體支架結構。
- 圖五、實心微囊胞(microsphere)聚集體支架結構。
- 圖六、多種不同微囊胞所共同構成之微囊胞聚集體支架結構。
- 圖七、利用 HNOCC 來作核心所產生之組織工程用之微囊胞聚集體支架結構，達到 BSA 模藥零階釋放的穩定藥物釋放效應。
- 圖八、利用 HNOCC 來作核心所產生之組織工程用之微囊胞聚集體支架結構，達到兩種不同模藥兩階段程序式釋放的穩定藥物釋放效應。
- 圖九、習知技術例，一般具釋藥功能的支架內壁表面。
- 圖十、本發明微囊胞聚集體所構成的(具釋藥功能)支架內壁表面。
- 圖十一、習知技術例，具有程序式釋藥功能的支架。

【主要元件符號說明】

- | | | | |
|---|-----------------------------|----|---------------------|
| 1 | PMMA 微粒 PMMA microsphere | 10 | 外殼-2 shell-2 |
| 2 | 開孔 Open pore | 11 | 核-2 core-2 |
| 3 | 固體外殼 solid shell | 12 | 血管內皮生長因子 VEGF |
| 4 | 生物活性劑 Bioactive agent | 13 | 多孔混合體 porous matrix |
| 5 | 液體或固體核 liquid or solid core | 14 | 聚合物 polymer |
| 6 | 藥物-1 Drug-1 | 15 | 血小板衍生生長因子 PDGF |
| 7 | 藥物-2 Drug-2 | | |
| 8 | 藥物-3 Drug-3 | 16 | 孔 PORE |
| 9 | 外殼-1 shell-1 | | |

十、申請專利範圍：

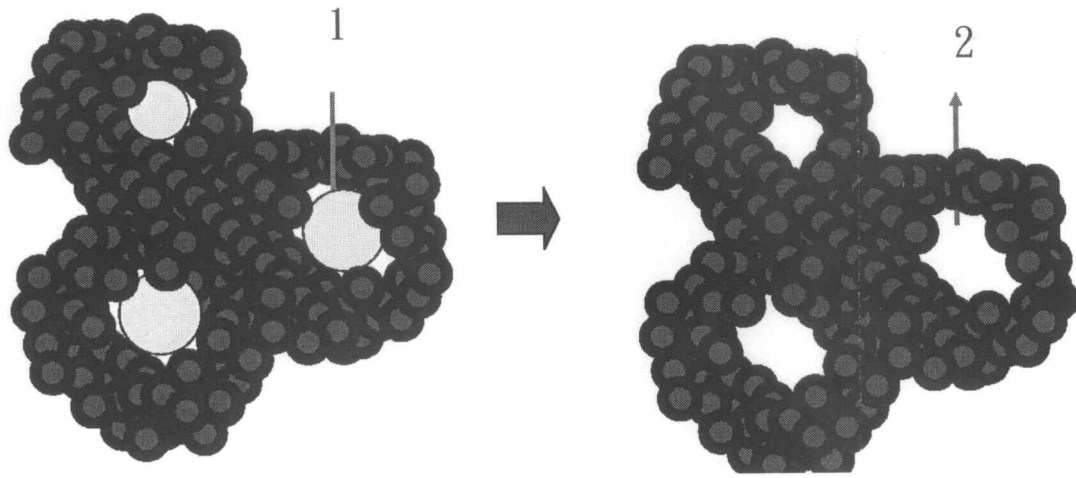
1. 一種微囊胞聚集體支架結構，將微囊胞經聚集溶合之後而成的多孔狀聚集體支架，包括至少一微囊胞聚集堆積後相連而成之支柱，該支柱任一側可進而相連而成一多孔狀連結通道；其多孔孔狀通道之平均直徑約為 20 微米到約 400 微米之間。
2. 如申請專利範圍第 1 項所述之微囊胞聚集體支架結構，其包括利用一種或一種以上之天然、半合成或合成分子材料將固體、液體或膠體內容物包嵌而成的微粒徑；且其微粒可以由單殼層或複數殼層所構成之結構。
3. 如申請專利範圍第 2 項所述之微囊胞聚集體支架結構，其天然的分子材料其包含一種或一種以上之膠原蛋白、明膠、透明質酸 (Hyaluronic Acid, HA)、阿拉伯膠、海藻膠鈉、褐藻膠或幾丁聚醣。
4. 如申請專利範圍第 2 項所述之微囊胞聚集體支架結構，其半合成的分子材料其包含一種或一種以上之鄰苯二甲酸醋酸纖維素 (CAP)、羧甲基纖維素 (CMC-Na) 或乙基纖維素 (EC)。
5. 如申請專利範圍第 2 項所述之微囊胞聚集體支架結構，其合成的分子材料其包含一種或一種以上之聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)、聚乙烯醇 (PVA)、聚乳酸交酯、聚醯胺、聚乳酸-甘醇酸 Poly(Glycolide-co-Lactide) (PLGA) 或 Poly(Glycolide)。
6. 如申請專利範圍第 2 項所述之微囊胞聚集體支架結構，其所可包嵌之固體、液體或膠體內容物，係可以溶解、嵌合、吸附或化學鍵結等多種形式與微囊胞進行包嵌。
7. 如申請專利範圍第 2 項所述之微囊胞聚集體支架結構，其可包嵌之內容物可包括各種不同之藥物或組合物。
8. 如申請專利範圍第 2 項所請之微囊胞聚集體支架結構，其可用於延緩內容物釋放，包括特定控制內容物釋放速率、程序式釋放

或多藥物協同釋放。

9. 如申請專利範圍第 1 項所請之微囊胞聚集體支架結構，其依據微囊胞所包嵌內容物的不同，可進一步作為細胞或組織貼附、細胞分化及生長的基底，使其用於延緩內容物釋放、提高內容物穩定性或對細胞產生特定專一標靶。
10. 如申請專利範圍第 1 項所請之微囊胞聚集體支架結構，其可藉由電化學沈積或是以高分子電解質鍍層等方式來製作。
11. 如申請專利範圍第 1 項所請之微囊胞聚集體支架結構，其可藉由自我組裝或是模鑄製程將複數微囊胞聚集而成。
12. 一種微囊胞聚集體支架結構之製備方法，其係將微囊胞聚集溶合形成懸浮液，並利用有機溶液將微囊胞聚合體間之鹽類洗淨而構成之多孔狀微囊胞聚集體支架。
13. 如申請專利範圍第 12 項所請之微囊胞聚集體支架結構之製備方法，其可藉由自我組裝或是模鑄製程將複數微囊胞聚集而成。

十一、圖式：

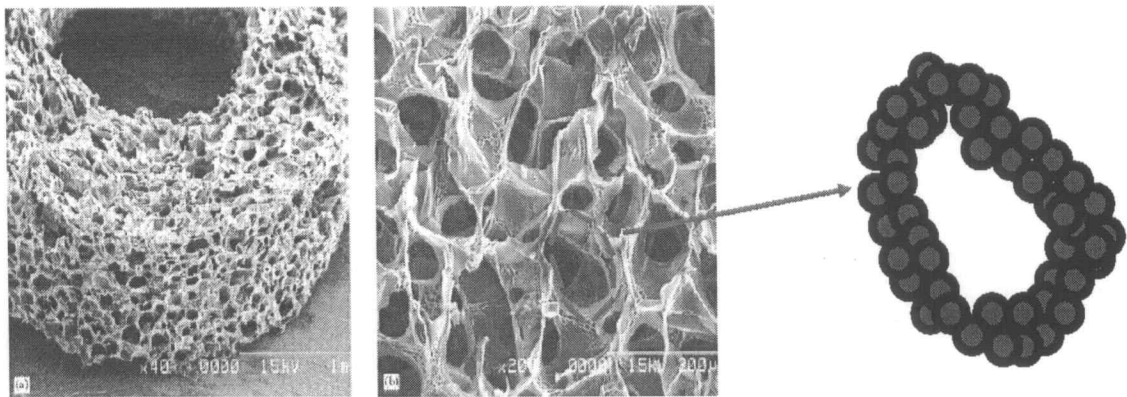
圖一、



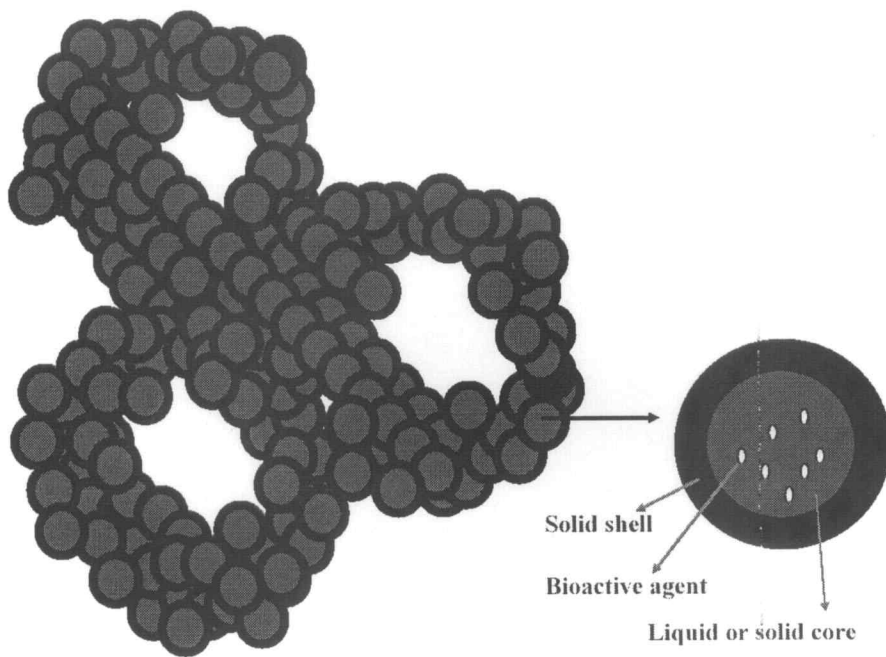
丙酮過濾前

丙酮過濾後

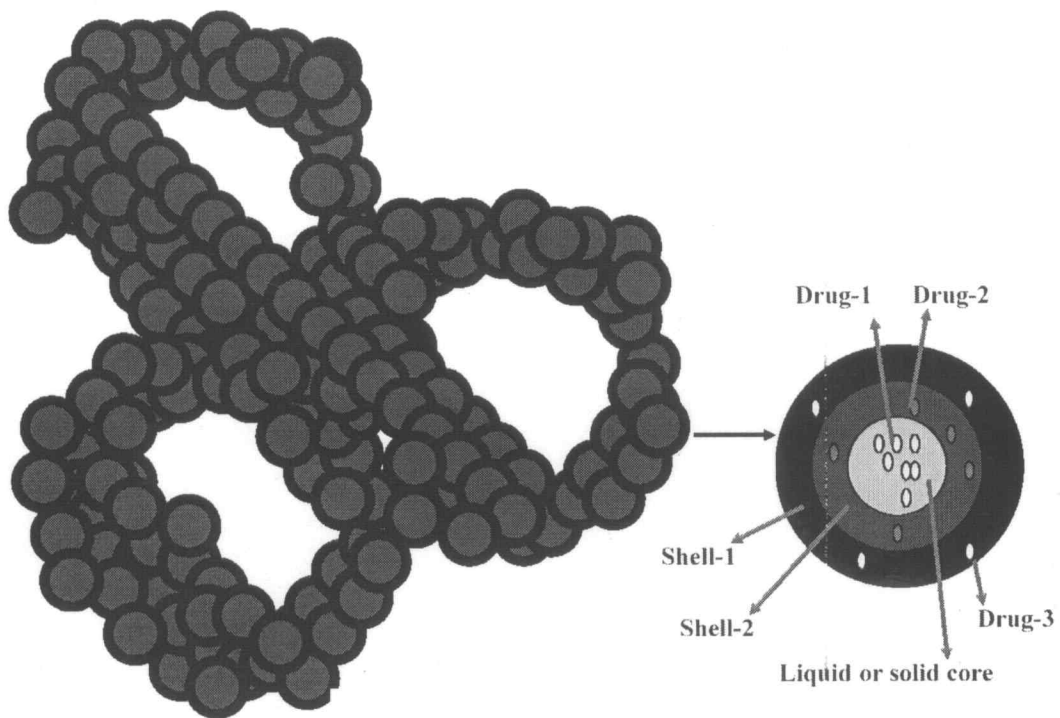
圖二、



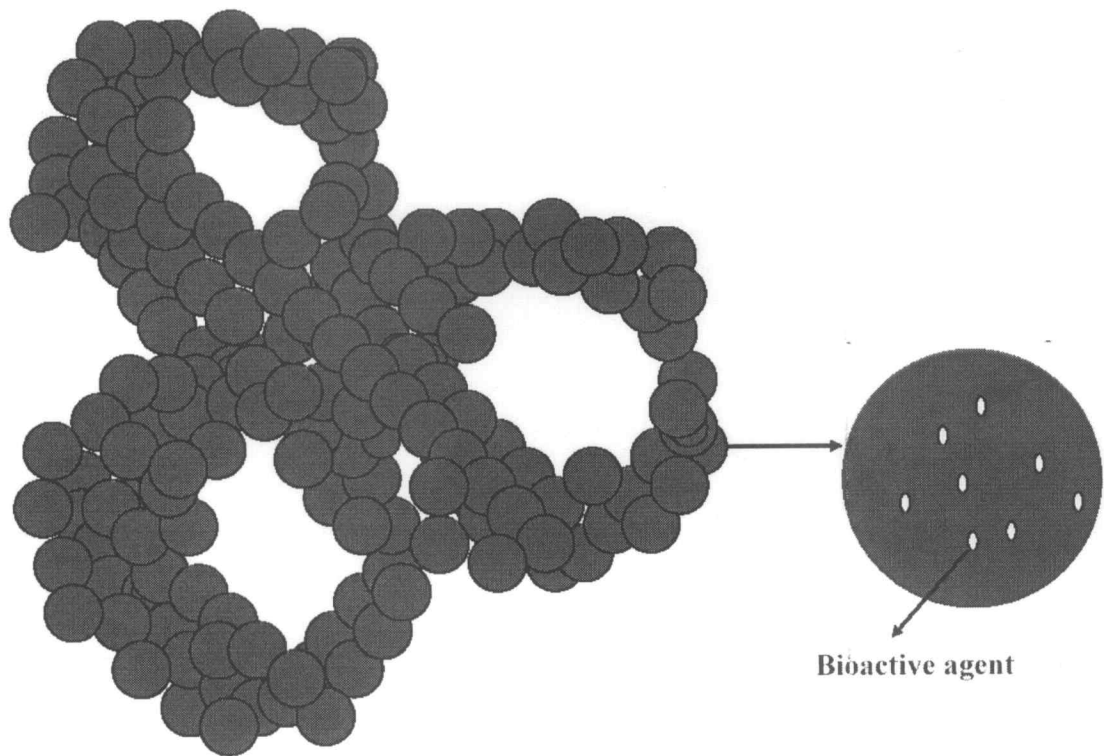
圖三、



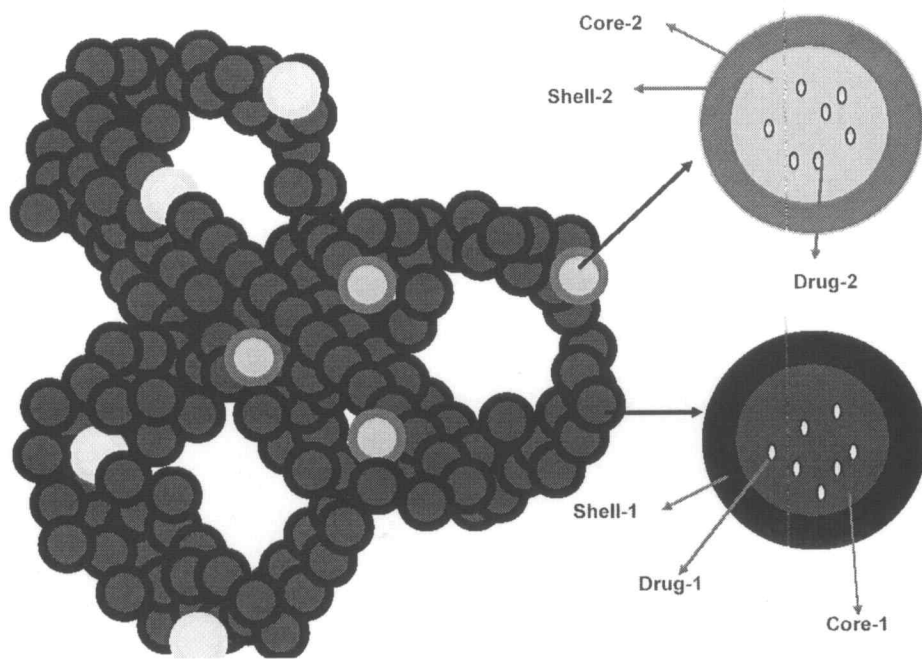
圖四、



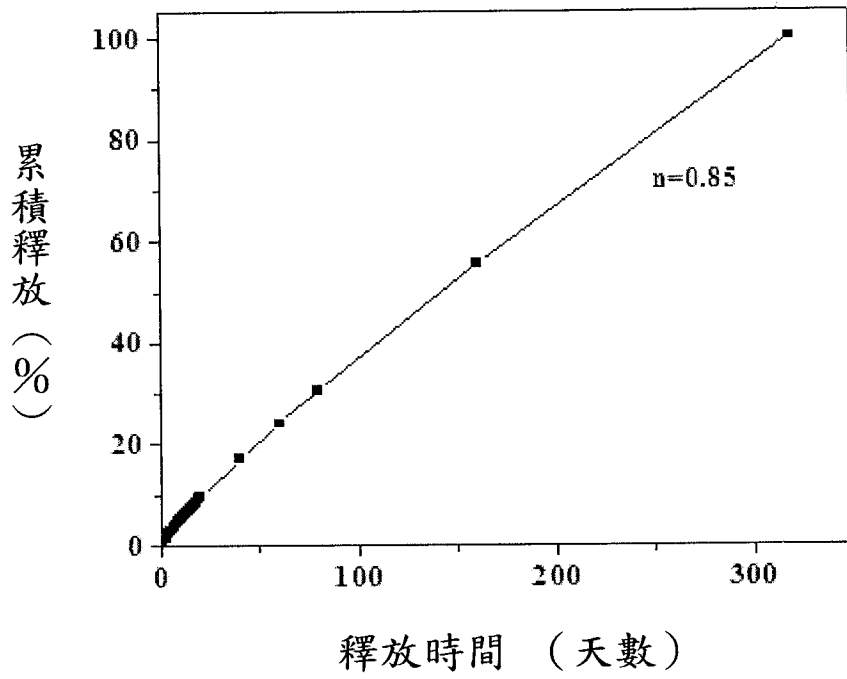
圖五、



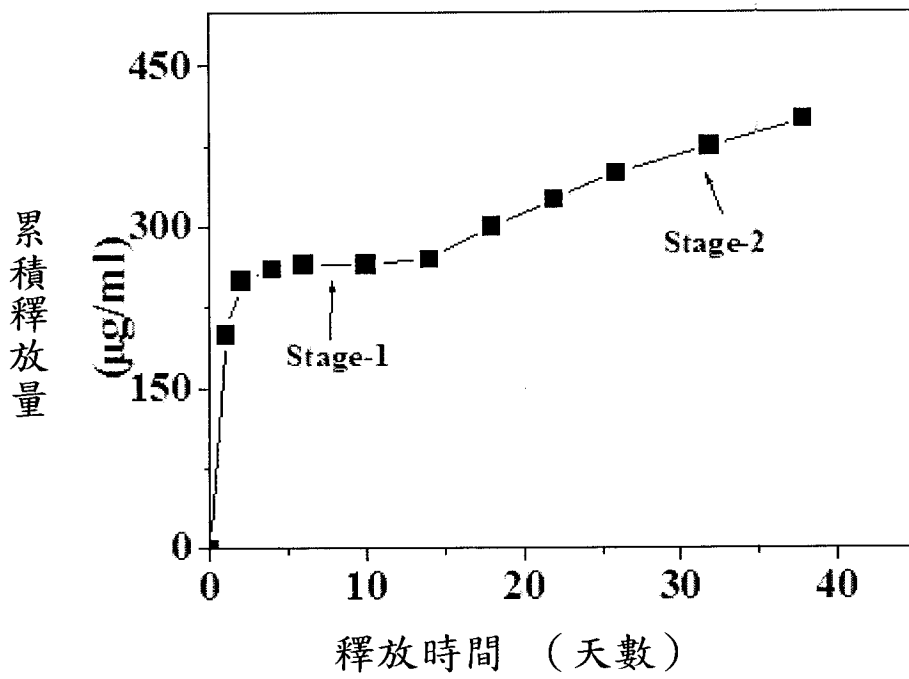
圖六、



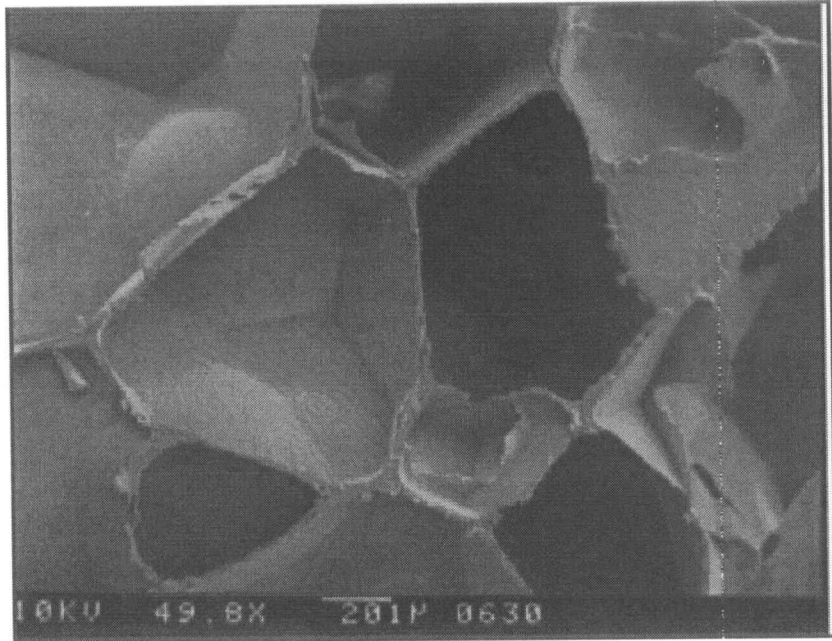
圖七、



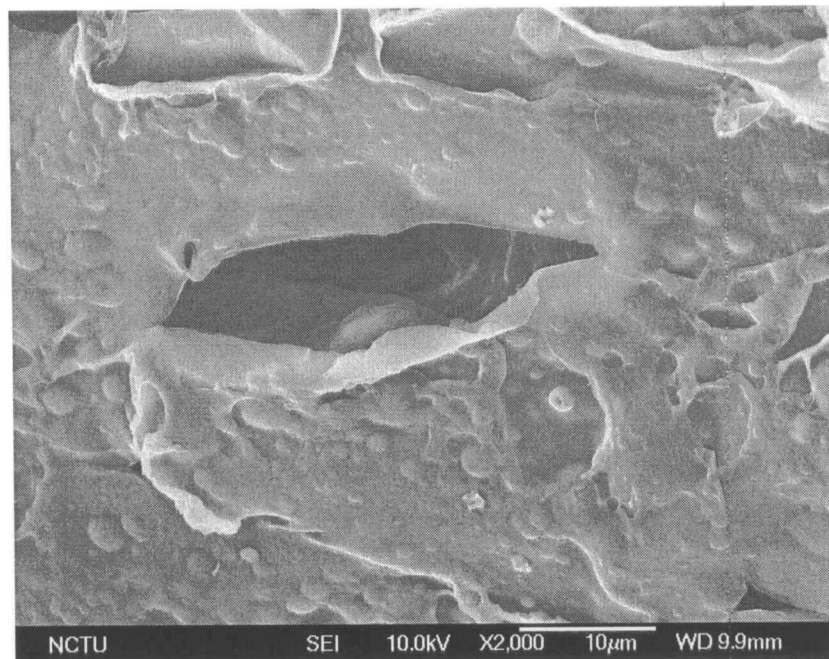
圖八、



圖九、



圖十、



圖十一、

