

一种聚己内酯微球预分散组合物及其制备的聚己内酯注射用凝胶

技术领域

本发明涉及医疗美容或医用制剂技术领域，具体涉及一种聚己内酯微球预分散组合物及其制备的聚己内酯注射用凝胶。

背景技术

聚己内酯(Polycaprolactone, PCL)最早于上个世纪 30 年代被合成，是由 ϵ -己内酯(ϵ -CL)开环聚合所得的线性脂肪族聚酯。它是一种疏水性的半结晶型高分子，在室温下是橡胶态，其热稳定性较好，分解温度比其它聚酯要高得多。PCL 降解后的产物为 CO_2 和 H_2O ，对人体无毒，由于其特定的物理化学和机械性能、粘弹性和易于成型导致生产出具有各种形状和持续时间的基于 PCL 的产品，具体取决于其生物降解动力学，PCL 在生物医学领域已经被安全使用 70 多年，最新的应用多将其制备为微球用作体内植入材料的医美填充剂，刺激胶原蛋白的生成。基于 PCL 的胶原蛋白刺激剂由悬浮在羧甲基纤维素凝胶载体中的 PCL 微球组成，注射时可提供即时和持续的丰盈效果；嵌入产生的胶原纤维的 PCL 微球的形态、生物相容性都有助于创建独特的 3D 支架，以实现持续的效果。

随着医美市场需求的不断增长，PCL 有了更加广阔的市场前景。其主要是通过将其 PCL 制备成微球，以凝胶的形式应用范围为额部、鼻唇沟、面中部、鼻部、下颌以及手部，有效时间最长可达 24 个月，其安全性和有效性已经在多个临床试验中得到印证。PCL 注射用微球通常直径可以在 25-50 μm 之间，这样大小的微球正好可以避免巨噬细胞的吞噬而留在人体组织中，不仅大小而且形状已被证明对组织反应有很大影响，形状、圆形或不规则决定反应的程度，PCL 微球是规则的、具有光滑表面的球形，这些特征是已知可以最大限度地减少炎症反应的最佳特征，如果形成的球体更光滑，越有利于皮下注射，光滑度高的微球在刺激皱纹下面的成纤维细胞逐一包裹的同时，能够减少肉芽瘤发生、减少异物反应的发生，注射微球通常是将制备得到的具有光滑表面的 30% 体积比的 PCL 微球均匀悬浮至 70% 的 CMC 凝胶中。

在制备具有光滑表面的 PCL 微球上，现有技术已经公开了多种制备光滑 PCL 微球

的方法，例如 CN104001209B 公开了将得到的微球过滤、洗涤并干燥，然后分散到 CMC 凝胶中，制备过程为了避免 PCL 溶液在搅拌的水性介质中的凝固，所采用的条件包括在较长的时间内加入 PCL 的 DCM 溶液和较长的 DCM 蒸发时间使得分散的 PCL 粒子硬化，该文献还考察了 Hunter 法（US2003/0157187A 中的实施例 14）、Erneta 和 Wu 法（EP1872803A1 中实施例）等，并总结了 DCM 以及水中表面活性剂、表面活性剂的粘度、搅拌速率等对粒子形状及粒子表面光滑度的影响。CN109998997B 公开了采用膜乳化法制备的微球经过滤、洗涤、干燥后的微球平均直径为 50 μ m，且外观形态呈表面光滑、形态良好。然而，要想将制备得到的干燥微球分散至凝胶中并保持凝胶中的表面光滑性，需要对微球的分散工艺及凝胶继续研究，PCL 微球在混入 CMC 凝胶前，由于表面会吸附部分空气，混匀过程中存在液体与气体开始争夺微球表面的问题，致使微球表面气泡难去除；此外，由于 CMC 凝胶具有高粘性，致使混匀过程中 PCL 微球不易分散且易于形成气泡，因而需要一种新的手段解决混匀过程中的上述问题。而且，研究发现 PCL 微球的水解与水对微球的渗透有关，当水渗入微球时会发生整体降解过程，导致整个聚合物基质中的酯键从内部逐渐水解，因此，需要对微球的分散工艺及凝胶基础进一步研究，在促进制备得到的 PCL 微球在凝胶中仍具有光滑的表面，且能够进一步降低 PCL 的水解。

发明内容

为克服现有技术的不足，本发明提供了一种聚己内酯（PCL）微球预分散组合物以及采用这一组合物制备的含有高浓度聚己内酯的注射用凝胶。发明人通过研究意外发现 PCL 微球干燥后混匀或再分散环节是影响注射用 PCL 微球分散度、气泡形成、光滑度的关键，此外，发明人还意外地发现，相对于现有技术中常用的 PCL 微球分散介质-纯化水、蒸馏水、生理盐水等，本发明所选择的分散介质和凝胶基质能够有效降低 PCL 的降解，微球的光滑球形的维持有助于降低微球的降解速度。

在本发明第一方面，提供一种聚己内酯微球预分散组合物，其包含聚己内酯微球和磷酸盐缓冲液。

具体地，所述磷酸盐缓冲液包含磷酸氢二盐和/或磷酸二氢盐；更具体地，所述磷酸盐缓冲液包含磷酸氢二盐和磷酸二氢盐。

具体地，所述磷酸氢二盐选自：磷酸氢二钠、磷酸氢二钾、磷酸氢二铵中的一种或多种。

具体地，所述磷酸二氢盐选自：磷酸二氢钠、磷酸二氢钾或磷酸二氢铵中的一种或多种。

在本发明的一些实施例中，所述磷酸氢二盐为磷酸氢二钠，所述磷酸二氢盐为磷酸二氢钠。

在本发明另一些实施例中，所述磷酸氢二盐为磷酸氢二钠，所述磷酸二氢盐为磷酸二氢钾。

在本发明另一些实施例中，所述磷酸氢二盐为磷酸氢二钾，所述磷酸二氢盐为磷酸二氢钾。

在本发明另一些实施例中，所述磷酸氢二盐为磷酸氢二钾，所述磷酸二氢盐为磷酸二氢钠。

具体地，所述磷酸盐缓冲液还可以包括 pH 调节剂，例如盐酸、氢氧化钠、氢氧化钾等中的一种或多种。

具体地，所述磷酸盐缓冲液的 pH 为 6.0-8.0（例如 6.0、6.2、6.4、6.5、6.6、6.8、7.0、7.2、7.4、7.5、7.6、7.8、8.0），特别是 6.5-8.0，优选 7.0-7.5。

具体地，所述磷酸盐缓冲液还可以包括渗透压调节剂，例如氯化钾、氯化钠、甘油等中的一种或多种。

具体地，所述磷酸盐缓冲液的渗透压为 300-700mOsm/kg（例如 300、350、400、450、500、550、600mOsm/kg），特别是 500-650mOsm/kg，优选 550-650mOsm/kg。

在本发明的一些优选实施例中，所述磷酸盐缓冲液包含磷酸氢二钠和磷酸二氢钠，其 pH 为 6.0-8.0（特别是 6.5-7.5，例如 7.2），渗透压为 500-650mOsm/kg；更具体地，所述磷酸盐缓冲液由磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、氯化钠和水组成。

在本发明的一些优选实施例中，所述磷酸盐缓冲液包含磷酸氢二钠和磷酸二氢钾，其 pH 为 6.0-8.0（特别是 6.5-7.5，例如 7.2），渗透压为 300-700mOsm/kg（特别是 600mOsm/kg）；具体地，所述磷酸盐缓冲液由磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、氯化钾和水组成；更具体地，该磷酸盐缓冲液可以由磷酸氢二钠（ Na_2HPO_4 ）、磷酸二氢钾（ KH_2PO_4 ）和氯化钾水溶液复配而成。

在本发明的一些优选实施例中，所述磷酸盐缓冲液包含磷酸氢二钾和磷酸二氢钾，其 pH 为 6.0-8.0（特别是 6.5-7.5，例如 7.2），渗透压为 500-650mOsm/kg；更具体地，所述磷酸盐缓冲液由磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、氯化钾和水组成。

具体地，所述 PCL 微球的平均粒径范围为 25-60 μm （例如 25、30、35、40、45、

50、55、60 μ m)。

具体地，所述 PCL 微球中粒径为 25-50 μ m 的微球占比 $\geq$ 65%。

具体地，所述 PCL 微球的重均分子量为 8k-8 万 Da (例如 1 万 Da、2 万 Da、3 万 Da、4 万 Da、4.5 万 Da、6 万 Da、8 万 Da)，特别是 1-6 万 Da。

具体地，所述聚己内酯微球预分散组合物中，所述 PCL 微球的含量可以为 10-50wt% (例如 10wt%、15wt%、20wt%、25wt%、30wt%、35wt%、40wt%、45wt%、50wt%)。

具体地，所述 PCL 微球可以通过如下方法制备：

(1) 水相配制：利用含有成膜剂、表面活性剂、增稠剂的一种或者多种的溶液混合作为水相；

(2) 油相配制：将干燥的 PCL 溶解在有机溶剂中；

(3) 制备微球；

(4) 乳液中有机溶剂挥发，微球固化过滤、清洗、收集、干燥。

具体地，所述成膜剂包括但不限于：聚乙烯醇、聚丙烯醇、明胶、阿拉伯胶、右旋糖酐硫酸脂、透明质酸、果胶、卡拉胶等。

具体地，所述表面活性剂包括但不限于吐温、司盘、十二烷基硫酸钠、十二烷基苯磺酸钠等。

具体地，所述增稠剂包括但不限于：明胶、淀粉、卡拉胶、海藻酸钠、壳聚糖、果糖、羧甲基纤维素钠、高取代羟丙基纤维素、低取代羟丙基纤维素、微晶纤维素、羟丙基甲基纤维素、羟乙基纤维素等。

具体地，所述的有机溶剂选自：苯甲醇、二氯甲烷、氯仿、氯乙烷、二氯乙烷、三氯乙烷、乙酸乙酯、甲酸乙酯、乙醚、环己烷或其混合溶剂。

具体地，步骤 (3) 中所述制备微球可以采用膜乳化法、喷雾干燥法等现有技术中已知的方法，例如，膜乳化法制备微球：采用 800-10000mpa 压力，优选 800-3500mpa；更优选 1000-2000mpa 将油相挤压过膜管，膜孔 5-100 μ m，挤入连续的水相中，水相流速 50-10000ml/min；制备得到的微球的 D50 可以从 1 至 100 μ m 不等；跨度 $\text{span} \leq 2.0$ ；密度、组成、形态均匀；外观为球形，表面光滑。

在本发明的一些实施例中，所述 PCL 微球通过如下方法制备：配制水相，将聚己内酯用二氯甲烷配制成油相，将水相与油连续相进行乳化后，真空干燥，获得聚己内酯微球；所述水相中包括聚乙烯醇、羧甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、吐温 80、明胶、羟丙基纤维素淀粉、十二烷基硫酸钠中的一种或多种。

具体地，所述 PCL 微球可以是无菌的。

在本发明第二方面，提供一种聚己内酯微球预分散组合物的制备方法，其包括将干燥的聚己内酯微球（均匀）分散至分散液中的步骤，其中所述分散液为磷酸盐缓冲液。聚己内酯微球的分散液通常为纯化水、蒸馏水、生理盐水等，发明人经研究发现采用磷酸盐缓冲液作为分散液有助于维持聚己内酯微球的最佳分散性、减少气泡的产生。

具体地，所述聚己内酯微球和磷酸盐缓冲液具有本发明第一方面所述定义。

在本发明第三方面，提供一种聚己内酯注射用凝胶，其由包含将第一方面所述的预分散组合物和凝胶基质混合步骤的方法制备得到，所述凝胶基质包含羧甲基纤维素（钠）（即羧甲基纤维素或羧甲基纤维素钠）和分散液。

具体地，所述聚己内酯注射用凝胶由包含将第一方面所述的预分散组合物加入凝胶基质中并混合的方法制备得到。

具体地，所述凝胶基质的分散液选自：水（例如蒸馏水、纯化水、注射用水）、生理盐水、磷酸盐缓冲液。

在本发明的一个优选实施例中，所述凝胶基质的分散液为磷酸盐缓冲液，特别是本发明第一方面所述磷酸盐缓冲液。

具体地，聚己内酯注射用凝胶中高含量的聚己内酯微球是指聚己内酯微球的含量高于 20%，优选地，高于 25%，更优选地，高于 30%。

具体地，所述聚己内酯注射用凝胶中，聚己内酯微球的含量为 28-38wt%（例如 28%、30%、32%、33%、34%、36%、38%），特别是 30-36%。

具体地，所述聚己内酯注射用凝胶中，羧甲基纤维素（钠）含量为 1-5wt%（例如 2wt%、2.3wt%、2.6wt%、2.9wt%、3wt%、4wt%）。

具体地，所述聚己内酯注射用凝胶还可以包含 pH 调节剂，例如盐酸、氢氧化钠、氢氧化钾等中的一种或多种。

具体地，所述聚己内酯注射用凝胶的 pH 为 6.0-8.0（例如 6.0、6.2、6.4、6.5、6.6、6.8、7.0、7.2、7.4、7.5、7.6、7.8、8.0），特别是 6.5-8.0，优选 7.0-7.5。

具体地，所述聚己内酯注射用凝胶还可以包含渗透压调节剂，例如氯化钾、氯化钠、甘油等中的一种或多种。

具体地，所述聚己内酯注射用凝胶的渗透压为 300-600mOsm/kg（例如 300、350、400、450、500、550、600mOsm/kg），特别是 500-650mOsm/kg，优选 550-650mOsm/kg。

具体地，所述聚己内酯注射用凝胶还可以包含麻醉剂，例如，利多卡因、丁卡因等。

具体地，所述聚己内酯注射用凝胶还可以包含润滑剂，例如，甘油。

具体地，所述聚己内酯注射用凝胶还可以包含抗菌剂，用于提高抗菌效果，使所述聚己内酯注射用凝胶在使用、存储和运输过程中抗菌效果更好。

具体地，所述聚己内酯注射用凝胶还可以包含抗炎剂，用于减少机体的炎症反应。

具体地，所述聚己内酯注射用凝胶还可以包含抗氧化剂，用于提高的抗氧化性。

在本发明四方面，提供一种聚己内酯注射用凝胶的制备方法，其包括如下步骤：

- (1) 将聚己内酯微球（均匀）分散至分散液 I，得到聚己内酯预分散组合物；
- (2) 将羧甲基纤维素（钠）分散于分散液 II 中，得到凝胶基质；
- (3) 将所述聚己内酯预分散组合物加入凝胶基质中，混合（均匀）。

具体地，所述分散液 I 为磷酸盐缓冲液，如本发明第一方面所述。

具体地，所述分散液 II 选自：水（例如蒸馏水、纯化水、注射用水）、生理盐水、磷酸盐缓冲液，特别是本发明第一方面所述磷酸盐缓冲液。

具体地，所述分散液 I 与分散液 II 可以是相同的磷酸盐缓冲液，例如，在本发明的一些优选实施例中，所述磷酸盐缓冲液包含磷酸氢二钠和磷酸二氢钠，其 pH 为 6.0-8.0（特别是 6.5-7.5，例如 7.2），渗透压为 500-650mOsm/kg；更具体地，所述磷酸盐缓冲液由磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、氯化钠和水组成；在本发明另一些优选实施例中，所述磷酸盐缓冲液包含磷酸氢二钠和磷酸二氢钾，其 pH 为 6.0-8.0（特别是 6.5-7.5，例如 7.2），渗透压为 300-700mOsm/kg（特别是 600mOsm/kg）；具体地，所述磷酸盐缓冲液由磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、氯化钾和水组成；在本发明另一些优选实施例中，所述磷酸盐缓冲液包含磷酸氢二钾和磷酸二氢钾，其 pH 为 6.0-8.0（特别是 6.5-7.5，例如 7.2），渗透压为 500-650mOsm/kg；更具体地，所述磷酸盐缓冲液由磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、氯化钾和水组成。

具体地，步骤（1）还可以包括调节 pH 的步骤。

具体地，步骤（1）还可以包括调节渗透压的步骤。

具体地，步骤（1）还可以包括灭菌步骤。

具体地，步骤（2）还可以包括调节 pH 的步骤。

具体地，步骤（2）还可以包括调节渗透压的步骤。

具体地，步骤（2）还可以包括灭菌步骤。

具体地，步骤（3）中所述混合方式为搅拌，搅拌速度可以为 800-1200r/min（例如 1000r/min），搅拌时间可以为 1-10 分钟（例如 5 分钟）。

具体地，步骤（3）还包括除气泡步骤，例如通过真空搅拌脱泡机进行搅拌除气泡处理。

在本发明第五方面，提供第一方面所述的聚己内酯预分散组合物在制备聚己内酯注射用凝胶、植入物、药物载体中的应用。

在本发明的一个实施方式中，所述植入物为美容用植入物，例如皮下植入物（例如植入额部、鼻唇沟、面中部、鼻部、下颌、手部等以减少皱纹、褶皱、疤痕、老化等）；在本发明的一些实施例中，所述植入物为皮肤填充剂。

在本发明另一个实施方式中，所述植入物为疾病治疗用植入物，例如支架。

本发明所述的聚己内酯微球预分散组合物具有如下有益效果：

PCL 微球能够继续保持完整的球形、表面光滑、分散性好，降解速度降低，混合过程中可减少气泡，有利于保证产品质量的稳定，减少因微球在体内注射后分散不均匀导致的结节和肉芽肿的发生几率。利用其制备的聚己内酯注射用凝胶应用价值更佳。

附图说明

图 1 所示为未分散的干燥聚己内酯微球的显微照片。

图 2 所示为经蒸馏水分散后聚己内酯微球的显微照片。

图 3 所示为经蒸馏水分散后聚己内酯微球的电镜照片。

图 4 所示为经 0.9%生理盐水分散后聚己内酯微球的显微照片。

图 5 所示为经 0.9%生理盐水分散后聚己内酯微球的电镜照片。

图 6 所示为经钠系的等渗磷酸盐缓冲液 3-2 分散后聚己内酯微球的显微照片。

图 7 所示为经钠系的等渗磷酸盐缓冲液 3-2 分散后聚己内酯微球的电镜照片。

图 8 所示为经钾系 1 的等渗磷酸盐缓冲液 3-5 分散后聚己内酯微球的显微照片。

图 9 所示为经钾系 1 的等渗磷酸盐缓冲液 3-5 分散后聚己内酯微球的电镜照片。

图 10 所示为经钾系 2 的等渗磷酸盐缓冲液 3-8 分散后聚己内酯微球的显微照片。

图 11 所示为经钾系 2 的等渗磷酸盐缓冲液 3-8 分散后聚己内酯微球的电镜照片。

图 12 所示为经钠系的渗透压为 600mOsm/kg 的缓冲液（4-1-6）分散后聚己内酯微球的显微照片。

图 13 所示为经钾系 1 的渗透压为 600mOsm/kg 的缓冲液（4-2-6）分散后聚己内酯微球的显微照片。

图 14 所示为经钾系 2 的渗透压为 600mOsm/kg 的缓冲液（4-3-6）分散后聚己内酯

微球的显微照片。

图 15 所示为经钾系 1 的渗透压为 600mOsm/kg 的缓冲液 (4-2-6) 分散后聚己内酯微球的电镜照片。

图 16 所示为实施例 11 的含有聚己内酯微球的注射用凝胶的外观照片。

图 17 所示为实施例 11 的含有聚己内酯微球的注射用凝胶的显微照片。

图 18 所示为实施例 12 的含有聚己内酯微球的注射用凝胶的 1000r/min 搅拌后的外观照片。

图 19 所示为实施例 12 的含有聚己内酯微球的注射用凝胶的 2200r/min 搅拌后的外观照片。

图 20 所示为实施例 12 的含有聚己内酯微球的注射用凝胶的 2200r/min 搅拌后的显微照片。

图 21 所示为实施例 13 的含有聚己内酯微球的注射用凝胶的 1000r/min 搅拌后的外观照片。

图 22 所示为实施例 13 的含有聚己内酯微球的注射用凝胶的 2200r/min 搅拌后的外观照片。

具体实施方式

除非另有定义，本发明中所使用的所有科学和技术术语具有与本发明涉及技术领域的技术人员通常理解的相同的含义。

本文所引用的各种出版物、专利和公开的专利说明书，其公开内容通过引用整体并入本文。

下面将结合本发明实施例，对本发明的技术方案进行清楚、完整地描述，显然，所描述的实施例仅是本发明一部分实施例，而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例，本领域普通技术人员在没有作出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例，都属于本发明保护的范围。

以下实施例中所采用的一些检测方法具体操作如下：

干燥微球的形貌和粒径的检测

取适量干燥后的微球，剪取 0.5cm 左右导电胶带，粘贴到样品盘上，刮取少量粉末粘到导电胶带上，用洗耳球吹去导电胶带上多余的浮粉，喷金，把样品台放入仪器中进行观察，使用热场发射扫描电子镜显微镜（如：日本电子 JEOL- JSM-7001F）拍摄电镜照片。

取少量干燥后的微球用分散液分散，高速搅拌或超声 10min，待微球分散完全，滴加至石英皿，Zeta 粒径仪测定微球粒径分布。

分散后的微球形貌和粒径的检测

取少量干燥后的微球用分散液分散，高速搅拌或超声 10min，通过显微镜（XP-550C 偏光显微镜）观察微球分散及气泡形成情况。

取少量干燥后的微球用分散液分散，高速搅拌或超声 10min，待微球分散完全，滴加至石英皿，Zeta 粒径仪测定微球粒径分布。

分散液中微球降解的检测

分别称重(W_0)6 份相同质量的 PCL 微球后，分别将其浸泡在蒸馏水分散液中，放入 37℃ 摇床中，摇速 60r/min。每周更换分散液，以 8 周为一个降解期，测定 48 周。在每一个降解期结束，取出样品，用蒸馏水彻底冲洗，真空冷冻干燥至恒重(W_t)。计算降解率 = $(W_0 - W_t)/W_0 \times 100\%$ 。

凝胶中微球降解的检测

分别称重(W_0)6 份相同质量的 PCL 微球后，分别将其混合到蒸馏水作为分散液并制备相应的羧甲基纤维素（或羧甲基纤维素钠）凝胶；放入 37℃ 摇床中，摇速 60r/min。以 8 周为一个降解期，测定 48 周。在每一个降解期结束，取出 1 个样品，通过离心收集微球并用蒸馏水彻底冲洗，真空冷冻干燥至恒重(W_t)，从而获得 PCL 微球由该分散液制备的凝胶中的降解率 $(W_0 - W_t)/W_0 \times 100\%$ 。

对于 0.9%生理盐水、PBS 作为分散液制备的羧甲基纤维素（或羧甲基纤维素钠）凝胶中的降解率的测量同上述蒸馏水作为分散液的制备及测量过程。

一、干燥聚己内酯微球的制备：

实施例 1

将 10 至 20 克的 Mw 为 8k Da 的 PCL 溶解在二氯甲烷（DCM，10-20w/w%）中，将该溶液分散在含有 0.1%至 5%MC 的 1000ml 水中，通过溶剂萃取方法，搅拌（1000rpm），将所得到的微球过滤、洗涤并干燥。获得平均直径为 40 μ m 的微粒，PCL 微球中粒径为 25-50 μ m 的微球占比 68.6%，Span1.18，收率约为 67%。

实施例 2

称取 53.9g Mw 为 1 万 Da 的 PCL 溶解在二氯甲烷中（DCM，粘度 700cp），通过膜乳化法，压力 800mpa，将油相溶液分散到高速剪切含（1%）聚乙烯醇、（0.1%）吐温 80 水溶液

和(2.2%)羧甲基纤维素钠水溶液中,将所得微球过滤、洗涤、干燥。微球平均直径约50 μ m, PCL微球中粒径为25-50 μ m的微球占比70.4%, Span 1.19, 收率约为70%。

实施例3

称取54.9g Mw为4万Da的PCL溶解在二氯甲烷中(DCM, 粘度800cp), 通过高速均质乳化法, 将油相溶液分散到高速剪切含(1%)聚乙烯醇、(0.5%)明胶水溶液和(3.7%)羧甲基纤维素钠水溶液中, 将所得微球过滤、洗涤、干燥。微球平均直径约55 μ m, PCL微球中粒径为25-50 μ m的微球占比65.6%, Span 1.19, 收率约为65%。

实施例4

称取54.9g Mw为6万Da的PCL溶解在二氯甲烷中(DCM, 粘度800cp), 通过膜乳化法, 压力800mpa, 将油相溶液分散到高速剪切含(1%)聚乙烯醇、(2.2%)羟丙基纤维素水溶液中, 将所得微球过滤、洗涤、干燥。微球平均直径约60 μ m, PCL微球中粒径为25-50 μ m的微球占比66.2%, Span 1.19, 收率约为55%。

实施例5

称取53.9g Mw为8万Da的PCL溶解在二氯甲烷中(DCM, 粘度700cp), 通过膜乳化法, 压力800mpa, 将油相溶液分散到高速剪切含(1%)聚乙烯醇、(0.1%)十二烷基硫酸钠溶液和(2.2%)羧甲基纤维素钠水溶液中, 将所得微球过滤、洗涤、干燥。微球平均直径约50 μ m, PCL微球中粒径为25-50 μ m的微球占比73.3%, Span 1.19, 收率约为70%。

二、干燥聚己内酯微球的分散:

以下各实施例中均使用实施例2中方法制得的PCL微球考察了不同分散液对制得的PCL微球分散度、气泡含量、光滑度的影响。未经分散的微球显微照片(XP-550C偏光显微镜10x)如图1所示, 微球有团聚现象。

实施例6: 分散液1(蒸馏水)

将制得的微球分散至蒸馏水中, 显微镜及电镜下观察PCL的表面光滑度、球形完整性、分散情况。PCL微球的显微照片(XP-550C偏光显微镜10x)及电镜照片分别如图2和图3所示。

如图2所示, 微球在蒸馏水中并没有得到很好地分散。

如图3所示, 微球表面光滑度降低、球形完整性受损。

实施例7: 分散液2(0.9%生理盐水)

将制得的微球分散至0.9%生理盐水中, 显微镜及电镜下观察PCL的表面光滑度、球形完整度、分散情况。PCL微球的显微照片(XP-550C偏光显微镜20x)及电镜照片

分别如图 4 和图 5 所示。

如图 4 所示，相比蒸馏水，微球在生理盐水中的分散度提升，且由图 5 的电镜可见，微球表面光滑度受损度减小，球形完整性提升。

实施例 8：分散液 3：（不同 pH 值的等渗磷酸盐缓冲液）

1、制备钠系的等渗磷酸盐缓冲液：

磷酸氢二钠：0.1M 磷酸氢二钠 (Na_2HPO_4)，4℃ 储存；

磷酸二氢钠：0.1M 磷酸二氢钠 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)。

根据下表配制所需 pH 的溶液：

表 1 分散液配方

分散液编号	$\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{ml}$	$\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{ml}$	pH	维持等渗加 NaCl 的量(g)
3-1	50	50	6	0.17
3-2	80	20	7.2	0.054
3-3	90	10	8	0.015

将制得的微球分散至上述分散液 3-1 至 3-3 中，显微镜及电镜下观察 PCL 的表面光滑度（光滑+++++；基本光滑++++；少许凹凸+++；较多凹凸++；大量凹凸+）、球形完整度（球形+++++；基本球形++++；1~2 个椭球顶点+++；2-4 个椭球顶点++；5 个以上椭球顶点+）、分散情况（无聚集+++++；基本无聚集++++；少许聚集+++；较多 3 个微球以上聚集++；大量 3 个微球以上聚集+）。观察结果如下表所示，分散液 3-2 中 PCL 微球的显微照片（XP-550C 偏光显微镜 10x）及电镜照片分别如图 6 和 7 所示。

表 2 分散液的考察结果

分散液编号	表面光滑度	球形的完整性	分散情况
3-1	+++	+++	+++
3-2	+++	+++	+++
3-3	+++	+++	+++

由图 6-7（对应分散液 3-2）及上表可知，微球在钠系的等渗磷酸盐缓冲液中的分散度进一步提升，且由电镜照片可见，微球表面光滑度受损度减小，球形完整性提升。

2、制备钾系 1 的等渗磷酸盐缓冲液：

磷酸氢二钠：0.1M 磷酸氢二钠 (Na_2HPO_4)，4℃ 储存；

磷酸二氢钾：0.1M 磷酸二氢钾（KH₂PO₄），4℃储存。

根据下表配制所需 pH 的溶液：

表 3 分散液配方

分散液编号	Na ₂ HPO ₄ /ml	KH ₂ PO ₄ /ml	pH	维持等渗加 KCl 的量(g)
3-4	40	60	6	0.252
3-5	70	30	7.2	0.111
3-6	95	5	8	0

将制得的微球分散至上述分散液 3-4 至 3-6 中，显微镜及电镜下观察 PCL 的表面光滑度、球形完整度、分散情况。观察结果如下表所示，分散液 3-5 中 PCL 微球的显微照片（XP-550C 偏光显微镜 10x）及电镜照片分别如图 8 和 9 所示。

表 4 分散液的考察结果

分散液编号	微球的分散性	微球的完整性	微球的球形度
3-4	+++	+++	+++
3-5	++++	++++	++++
3-6	+++	+++	+++

由图 8-9（对应分散液 3-5）及上表可知，微球在钾系 1 的等渗磷酸盐缓冲液中的分散度进一步提升，且由电镜照片可见，微球表面光滑度受损度很小，球形完整性较高。

3、制备钾系 2 的等渗磷酸盐缓冲液：

磷酸氢二钾（二价）：0.1M 磷酸氢二钾（K₂HPO₄），4℃储存；

磷酸二氢钾：0.1M 磷酸二氢钾（KH₂PO₄），4℃储存。

根据下表配制所需 pH 的溶液：

表 5 分散液配方

分散液编号	K ₂ HPO ₄ /ml	KH ₂ PO ₄ /ml	pH	维持等渗加 KCl 的量(g)
3-7	40	60	6	0.252
3-8	70	30	7.2	0.112
3-9	95	5	8	0

将制得的微球分散至上述分散液 3-7 至 3-9 中，显微镜及电镜下观察 PCL 的表面光滑度、球形完整度、分散情况。观察结果如下表所示，分散液 3-8 中 PCL 微球的显微照片（XP-550C 偏光显微镜 10x）及电镜照片分别如图 10 和 11 所示。

表 6 分散液的考察结果

分散液编号	微球的分散性	微球的完整性	微球的球形度
3-7	+++	+++	+++
3-8	+++	+++	+++
3-9	+++	+++	+++

由图 10-11（对应分散液 3-8）及上表可知，微球在钾系 2 的等渗磷酸盐缓冲液与钠系分散液相类似，均具有较好的分散度，且由电镜照片可见，微球表面光滑度受损度很小，球形完整性较高。

实施例 9：分散液 4（不同渗透性的磷酸盐缓冲液）

1、根据钠系的等渗磷酸盐缓冲液制备不同渗透性的缓冲液(pH7.2，100ml)

参照实施例 8 表 2 分散液 3-2，通过调节 NaCl 的添加量调节渗透压，得到分散液 4-1-1 至 4-1-8。

将制得的微球分散至上述分散液 4-1-1 至 4-1-8 中，显微镜及电镜下观察 PCL 的表面光滑度、球形完整度、分散情况。观察结果如下表所示。

表 7 分散液的考察结果

分散液编号	调节渗透压加 NaCl 的量(g)	渗透压 mOsm/kg	微球的分散性	微球的完整性	微球的球形度
4-1-1	0.054	300	+++	+++	+++
4-1-2	0.200	350	+++	+++	+++
4-1-3	0.347	400	+++	+++	+++
4-1-4	0.493	450	+++	+++	+++
4-1-5	0.640	500	+++	+++	+++
4-1-6	0.933	600	++++	++++	++++
4-1-7	1.080	650	++++	+++	+++
4-1-8	1.226	700	+++	+++	+++

2、根据钾系 1 的等渗磷酸盐缓冲液制备不同渗透性的缓冲液(pH7.2，100ml)

参照实施例 8 表 3 分散液 3-5，通过调节 KCl 的添加量调节渗透压，得到分散液 4-2-1 至 4-2-8。

将制得的微球分散至上述分散液 4-2-1 至 4-2-8 中，显微镜及电镜下观察 PCL 的表面光滑度、球形完整度、分散情况。观察结果如下表所示。

表 8 分散液的考察结果

分散液编号	调节渗透压加 KCl 的量(g)	渗透压 mOsm/kg	微球的分散性	微球的完整性	微球的球形度
4-2-1	0.111	300	++++	++++	++++
4-2-2	0.299	350	++++	++++	++++
4-2-3	0.487	400	++++	++++	++++
4-2-4	0.675	450	++++	++++	++++
4-2-5	0.863	500	++++	++++	++++
4-2-6	1.239	600	+++++	+++++	+++++
4-2-7	1.427	650	++++	++++	++++
4-2-8	1.614	700	+++	+++	+++

3、根据钾系 2 的等渗磷酸盐缓冲液制备不同渗透性的缓冲液(pH7.2，100ml)

参照实施例 8 表 5 分散液 3-8，通过调节 KCl 的添加量调节渗透压，得到分散液 4-3-1 至 4-3-8。

将制得的微球分散至上述分散液 4-3-1 至 4-3-8 中，显微镜(XP-550C 偏光显微镜 10x)及电镜下观察 PCL 的表面光滑度、球形完整度、分散情况。观察结果如下表所示。

表 9 分散液的考察结果

分散液编号	调节渗透压加 KCl 的量(g)	渗透压 mOsm/kg	微球的分散性	微球的完整性	微球的球形度
4-3-1	0.112	300	+++	+++	+++
4-3-2	0.300	350	+++	+++	+++
4-3-3	0.488	400	+++	+++	+++
4-3-4	0.676	450	+++	+++	+++
4-3-5	0.864	500	+++	+++	+++
4-3-6	1.239	600	++++	++++	++++
4-3-7	1.428	650	++++	+++	+++

4-3-8	1.615	700	+++	+++	+++
-------	-------	-----	-----	-----	-----

由图 12-14（分别对应分散液 4-1-6、4-2-6、4-3-6）及上表可知，相比钠系、钾系 2 及钾系 1 其他渗透压的分散液，微球在钾系 1 渗透压为 600 的缓冲液分散后，分散度良好，微球表面光滑度受损度极小，球形完整性未见有效改变。

实施例 10：分散液对微球降解的影响

称重 18 份 750mg (W_0) 的 PCL 微球(PCL 重均分子量 4 万)后，分别将 6 份浸泡在 10mL 蒸馏水、10mL 0.9%生理盐水、10mL PBS(实施例 9 中所述分散液 4-2-6)溶液中，放入 37℃摇床中，摇速 60r/min。每周更换溶液，以 8 周为一个降解期，测定 48 周。在每一个降解期结束，取出样品，用蒸馏水彻底冲洗，真空冷冻干燥至恒重(W_t)。降解率 $= (W_0 - W_t) / W_0 \times 100\%$ 。

表 10 降解率考察结果

降解期（周）	重量			降解率		
	蒸馏水	0.9%生理盐水	PBS	蒸馏水	0.9%生理盐水	PBS
0	750	750	750	0.00%	0.00%	0.00%
8	727.5	731.25	740.625	3.00%	2.50%	1.25%
16	708.75	718.125	731.25	5.50%	4.25%	2.50%
24	678.75	684.375	703.125	9.50%	8.75%	6.25%
32	485.625	500.625	590.625	35.25%	33.25%	21.25%
40	438.75	453.75	543.75	41.50%	39.50%	27.50%
48	397.5	420	515.625	47.00%	44.00%	31.25%

由上表可知，以 PBS(实施例 9 中所述分散液 4-2-6)作为分散液预分散的 PCL 的降解速率低于生理盐水，且明显低于蒸馏水。由此可见，PBS 作为分散液能够有效降低 PCL 的降解，而且微球的光滑球形的维持有助于降低微球的降解速度。

三、聚己内酯微球凝胶的制备

实施例 11：

制备聚己内酯微球注射用凝胶，具体步骤如下：

(1) 将 CMC 与去离子水搅拌，混合均匀，得 CMC 混悬液；将氢氧化钠溶液加入 CMC 混悬液中，均匀混合；然后加入盐酸调节 pH 值至中性，得 CMC-Na 凝胶，量取 33g CMC-Na 凝胶；

(2) 配制磷酸缓冲液实施例 9 中所述分散液 4-2-6;

(3) 将 33g 灭菌后的 PCL 微球分散至 33g 分散液中, 分散液为 pH 值约为 7 的磷酸盐缓冲液, 搅拌转速为 500r/min, 形成均匀的预分散组合物;

(4) 将预分散组合物加入到 CMC-Na 凝胶中 (CMC-Na 在终产品中的含量为 2.6wt.%), 加入占产品 1wt.%的甘油, 使用玻璃棒或细刮刀进行初步搅拌 5min;

(5) 准备好初步混合好的样品, 使用真空搅拌脱泡机进行搅拌除气泡处理, 时长 6min, 转速为 1000r/min。使得终产物中 PCL 的用量为 33wt.%。

实施例 12: (对比产品 1): 不制备预分散组合物, 将 PCL 微球直接加入 CMC-Na 凝胶中

制备聚己内酯微球注射用凝胶, 具体步骤如下:

(1) 将 2.6g CMC-Na 粉末溶解于 63.4g 实施例 11 制备的磷酸盐缓冲液中, 形成凝胶;

(2) 将 33g 灭菌后的 PCL 微球加入 CMC-Na 凝胶中 (CMC-Na 在最终产品中的含量为 2.6wt.%), 加入产品 1wt.%的甘油, 使用玻璃棒或细刮刀进行初步搅拌 5min;

(3) 准备好初步混合好的样品, 使用真空搅拌脱泡机进行搅拌除气泡处理, 时长 6min, 转速为 1000r/min。使得终产物中 PCL 的用量 33wt.%, 后续将转速提高到 2200r/min 处理 10min。

实施例 13: (对比产品 2): 不制备预分散组合物, 将 PCL 微球、CMC-Na 粉末、磷酸盐缓冲液和甘油直接混合

制备聚己内酯微球注射用凝胶, 具体步骤如下:

(1) 将 33g PCL 微球, 以及 63.4g 实施例 11 方法制备的磷酸盐缓冲液, 1g 甘油, 搅拌转速 500r/min, 形成均匀的悬浮液;

(2) 将 2.6g CMC-Na 粉末置于容器中, 向容器中加入 PCL 微球、磷酸盐缓冲液、1g 甘油构成的悬浮液, CMC-Na 在产品中的含量为 2.6wt.%, 使用玻璃棒或细刮刀进行初步搅拌 5min;

(3) 准备好初步混合好的样品, 使用真空搅拌脱泡机进行搅拌除气泡处理, 时长 5min, 转速为 1000r/min。使得终产物中 PCL 的用量 33wt.%, 后续将转速提高到 2200r/min 处理 10min。

实施例 14: 无微球凝胶产品和直接将 PCL 微球直接加入 CMC-Na 凝胶中的产品的比较

将 2.6g CMC-Na 粉末溶解于 96.4g 实施例 11 制备的磷酸盐缓冲液中，加入 1wt%的甘油，形成凝胶（CMC-Na 在凝胶中的含量为 2.6wt.%）。

对上述无微球凝胶和实施例 12 中制备的含微球的 CMC-Na 凝胶的理化性质进行比较，结果如下表所示。

表 11 剪切粘度对比结果

样品	粘均分子量	剪切粘度/ mPa·s	
	CMC-Na	无微球 CMC-Na 凝胶	含 PCL 微球 CMC-Na 凝胶
	80-120 万	53060	88946

通过上表可以看出，将 PCL 微球加入 CMC-Na 凝胶后，形成的聚己内酯注射用凝胶的剪切粘度明显升高，此时凝胶更加粘稠，混合均匀较为困难。现有技术中针对高粘度流体的混合方法一般采用如上描述的高速剪切搅拌器混合，或者采用高粘度均质机等其他混合方法，但在此过程中 CMC 凝胶会包裹气泡，并对体系带来额外的热量，造成注射用凝胶中微球的萎缩变形影响注射效果。因此，实施例 11 中采用了向 CMC 凝胶中加入 PCL 微球预分散组合物的方式以降低微球与 CMC-Na 凝胶混合时的粘度，减少气泡提升混合效率。

实施例 15：实施例 11-13 中凝胶产品的气泡和微球分散性比较

将实施例 11 制备得到的产品与实施例 12-13 制备的对比产品 1-2 中气泡（无气泡-；零星气泡+；少量气泡++；较多气泡+++；大量气泡++++；全是气泡+++++）和微球分散性比较，结果如下表所示。

表 12 实施例 11-13 中凝胶产品的气泡和微球分散性结果

	实施例 11		对比产品 1		对比产品 2	
	磷酸缓冲液		不采用预分散直接加 PCL		直接加入 CMC-Na	
	气泡	分散	气泡	分散	气泡	分散
评价	-	++++	+++	++	++++	+
图片	图 16-17		图 18-20		图 21-22	

通过显微镜照片（显微镜 BM2000 10x）图 16 可以看到，相较于对比产品，采用预分散组合物后，凝胶产品中的气泡大幅减少，通过显微照片（XP-550C 偏光显微镜 10x）图 17 可以看出采用 1000r/min 的混合转速 5min 可以得到 PCL 微球均匀分布的凝胶产品；而对比产品还需要增加转速和时间继续搅拌。

未采用预分散步骤时,对比产品 1 和 2 中均在搅拌时产生了大量明显的气泡(图 18、21 中黑色较大的中间发白的球体即为气泡),尤其是对比产品 2 中将 PCL 微球、CMC-Na 粉末、磷酸盐缓冲液和甘油直接混合时,气泡数量众多。而且 CMC-Na 因为混合不充分产生大量白色斑块,采用 1000r/min 转速 5min 搅拌是不充分的,将 CMC 团聚的块进一步混合得到均一的凝胶状注射液比较困难。

从对比产品 1 的图 20 (XP-550C 偏光显微镜 10x) 可以看到,凝胶中含有大量气泡且部分微球团聚,其分散效果与采用去离子水作为分散液的相近,均有一定的聚集分散不开的情况。

尝试采用更高转速、更长搅拌时间继续处理凝胶。对比产品 1 中将转速提高到 2200r/min 处理 10min 后,即如图 19 所示,凝胶较之前均匀度有所提升,透明度提高,大气泡分散为小气泡,但是数量仍然较多。对比产品 2 中提高转速同样处理后,大量气泡仍然存在,虽然团聚、结块略有所减少,但是凝胶整体分散仍然不均匀,且劣于实施例 12 中再处理后的样品。

实施例 16: 凝胶基质对微球降解的影响

称重 6 份 750mg (W₀) 的 PCL 微球(PCL 重均分子量为 4 万 Da)后,分别将其混合到由蒸馏水中,进而混合至羧甲基纤维素钠凝胶中;放入 37℃ 摇床中,摇速 60r/min。以 8 周为一个降解期,测定 48 周。在每一个降解期结束,取出 1 个样品,通过离心收集微球并用蒸馏水彻底冲洗,真空冷冻干燥至恒重(Wt),从而获得 PCL 微球在蒸馏水作为分散液制备的凝胶中的降解率。

对于 0.9%生理盐水、钾系 1 的经 KCl 调节渗透压后的 PBS(实施例 9 中所述分散液 4-2-6)作为分散液制备的羧甲基纤维素钠凝胶中的降解率同上述蒸馏水作为分散液的制备及测量过程。

表 14 降解率考察结果

降解期 (周)	重量			降解率		
	蒸馏水	0.9%生理盐水	PBS	蒸馏水	0.9%生理盐水	PBS
CMC-Na 凝胶所采用的分散液						
0	750	750	750	0.00%	0.00%	0.00%
8	731.4	735.9	745.95	2.48%	1.88%	0.54%
16	712.65	722.775	736.575	4.98%	3.63%	1.79%
24	682.65	689.025	708.45	8.98%	8.13%	5.54%

32	489.525	505.275	595.95	34.73%	32.63%	20.54%
40	442.65	458.4	549.075	40.98%	38.88%	26.79%
48	401.4	424.65	520.95	46.48%	43.38%	30.54%

由上表可知，PBS（实施例 9 中所述分散液 4-2-6）作为分散液及其制备的凝胶中的 PCL 的降解速率低于生理盐水，且明显低于蒸馏水。由此可见，PBS 作为分散液能够有效降低 PCL 的降解，微球的光滑球形的维持有助于降低微球的降解速度。

以上研究表明，以磷酸盐缓冲液作为分散液，尤其磷酸氢二钠、磷酸二氢钾制得的缓冲液作为分散液，pH 为 6.0-8.0，渗透压为 300-650mOsm/kg 能够很好地维持 PCL 微球表面光滑球形的形态，减少或避免气泡的产生，进一步地以 CMC-Na 为凝胶基质，用 KCl 作为渗透压调节剂，渗透压为 300-650mOsm/kg，能够很好地维持 PCL 微球表面光滑球形的形态，而且能够有效降低 PCL 微球的降解。

以上所述仅是本专利的优选实施方式，应当指出，对于本技术领域的普通技术人员来说，在不脱离本专利技术原理的前提下，还可以做出若干改进和替换，这些改进和替换也应视为本专利的保护范围。

权 利 要 求 书

1、一种聚己内酯微球预分散组合物，其包含聚己内酯微球和分散液 I；其中，所述分散液 I 包括磷酸盐缓冲液，所述磷酸盐缓冲液包含磷酸氢二盐和/或磷酸二氢盐，所述分散液 I 的 pH 为 7.0-7.5，渗透压为 550-650mOsm/kg；

所述聚己内酯微球预分散组合物由干燥的聚己内酯微球均匀分散至分散液 I 中制得。

2、如权利要求 1 所述的聚己内酯微球预分散组合物，其特征在于，所述磷酸氢二盐选自磷酸氢二钠、磷酸氢二钾或磷酸氢二铵中的一种或任意几种，所述磷酸二氢盐选自磷酸二氢钠、磷酸二氢钾或磷酸二氢铵中的一种或任意几种。

3、如权利要求 2 所述的聚己内酯微球预分散组合物，其特征在于，所述分散液 I 还包含 pH 调节剂。

4、如权利要求 3 所述的聚己内酯微球预分散组合物，其特征在于，所述 pH 调节剂选自盐酸、氢氧化钠、氢氧化钾中的一种或任意几种。

5、如权利要求 4 所述的聚己内酯微球预分散组合物，其特征在于，所述分散液 I 还包含渗透压调节剂。

6、如权利要求 5 所述的聚己内酯微球预分散组合物，其特征在于，所述渗透压调节剂选自氯化钾、氯化钠、甘油中的一种或多种。

7、如权利要求 6 所述的聚己内酯微球预分散组合物，所述磷酸氢二盐为磷酸氢二钠；所述磷酸二氢盐为磷酸二氢钾；所述渗透压替换为 300-650mOsm/kg；所述渗透压调节剂为氯化钾。

8、如权利要求 1-7 中任一项所述的聚己内酯微球预分散组合物，其特征在于，所述聚己内酯微球的平均粒径范围为 25-60 μ m，所述聚己内酯微球中粒径为 25-50 μ m 的微球占比 $\geq$ 65%；所述聚己内酯微球的重均分子量为 8k-8 万 Da。

9、一种聚己内酯注射用凝胶，其包含权利要求 1-8 中任一项所述的聚己内酯微球预分散组合物和凝胶基质，所述凝胶基质包含分散液 II，以及羧甲基纤维素或羧甲基纤维素钠；

所述凝胶基质的分散液 II 选自：水、生理盐水或磷酸盐缓冲液；

所述聚己内酯注射用凝胶的 pH 为 7.0-7.5，渗透压为 550-650mOsm/kg。

10、如权利要求 9 所述的聚己内酯注射用凝胶，其特征在于，所述聚己内酯注射用凝胶中，聚己内酯微球的含量为 28-38wt%；羧甲基纤维素或羧甲基纤维素钠含量为

1-5wt%。

11、一种如权利要求 9 或 10 中所述的聚己内酯注射用凝胶的制备方法，其包括如下步骤：

- (1) 将聚己内酯微球分散至分散液 I，得到聚己内酯预分散组合物；
- (2) 将羧甲基纤维素或羧甲基纤维素钠分散于分散液 II 中，得到凝胶基质；
- (3) 将步骤 (1) 所述聚己内酯预分散组合物加入步骤 (2) 所述凝胶基质中，混合。

12、权利要求 1-8 中任一项所述的聚己内酯微球预分散组合物在制备聚己内酯注射用凝胶、植入物、药物载体中的应用。