

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

A61K 9/51

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 99803733.8

[43]公开日 2001 年 4 月 25 日

[11]公开号 CN 1292687A

[22]申请日 1999.3.6 [21]申请号 99803733.8
[30]优先权
[32]1998.3.13 [33]DE [31]19810965.2
[86]国际申请 PCT/EP99/01452 1999.3.6
[87]国际公布 WO99/47130 德 1999.9.23
[85]进入国家阶段日期 2000.9.6
[71]申请人 阿温提斯研究技术两合公司
地址 德国法兰克福
[72]发明人 J·马尼罗 J·费尔彼
P·博德克

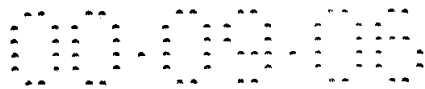
[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事
务所
代理人 黄泽雄

权利要求书 2 页 说明书 25 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 毫微颗粒、毫微颗粒的制备方法及其应用
[57]摘要

本发明涉及含有生物可相容、生物可降解聚电解质复合物和至少一种活性物质的毫微颗粒,所述复合物是由聚阳离子和聚阴离子组成。所述毫微颗粒是在其形成过程中用至少一种交联剂附加处理所述聚电解质复合物来制得。本发明还公开了一种用于制备上述毫微颗粒的方法,其中将附着或未附着形式的活性物质、至少一种酸性高分子物质的水溶液和至少一种碱性高分子物质的水溶液混合,随后聚电解质以毫微颗粒形式形成,或者,如果适宜,转化为毫微颗粒,该方法包括,用交联剂后继处理毫微颗粒聚电解质复合物。所述毫微颗粒适用于生物活性剂给药。其优点特别在于其高度稳定性和以可控方式释放活性物质,而不会产生猝释效应的性能。此外,鉴于其制备方法,本发明的毫微颗粒仅仅含有少量的残余有机溶剂。

ISSN 1008-4274

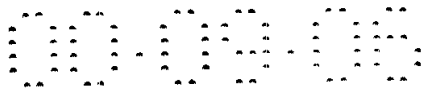


权 利 要 求 书

1. 含有生物可相容、生物可降解的聚电解质复合物和至少一种生物活性剂的毫微颗粒，所述聚电解质复合物是由至少一种聚阳离子和至少一种聚阴离子组成，所述毫微颗粒是在其形成过程中或之后用至少一种交联剂附加处理该聚电解质复合物来制得。
2. 如权利要求 1 所述的毫微颗粒，其中所述颗粒的平均粒度为 50 至 250nm。
3. 如至少一个上述权利要求所述的毫微颗粒，其中所述交联剂是乙二醛、TSTU 或 EDAP。
4. 如至少一个上述权利要求所述的毫微颗粒，其中所述聚阳离子是聚氨基葡萄糖。
5. 如至少一个上述权利要求所述的毫微颗粒，其中所述聚阴离子是木聚糖多硫酸酯。
6. 如至少一个上述权利要求所述的毫微颗粒，其中所述毫微颗粒是通过在复合物形成之前、形成期间或形成之后，用至少一种可以将毫微颗粒表面改性的试剂对聚电解质复合物的两种带电聚合物中的至少一种聚合物进行附加处理来得到。
7. 如权利要求 6 所述的毫微颗粒，其中所述表面改性物质含有载体。
8. 一种用于制备任一上述权利要求所述颗粒的方法，其中将附着或未附着形式的活性物质、至少一种聚阳离子的水溶液和至少一种聚阴离子的水溶液混合，随后聚电解质以毫微颗粒形式形成，或者，如果适

宜，转化为毫微颗粒，该方法包括，用一种交联剂处理毫微颗粒聚电解质复合物。

9. 如权利要求 1-8 任一项所述的颗粒或如权利要求 9 所述方法制得的颗粒作为口服给药形式的应用。



说明书

毫微颗粒、毫微颗粒的制备方法及其应用

本发明涉及毫微颗粒、毫微颗粒的制备方法以及毫微颗粒的应用。

在现代制药技术中，人们对那些其给药形式不但可以以温和方式施用而且影响药物的靶向模式、分布、生物利用度或吸收作用的制剂和活性药物组合物越来越感兴趣。

尤其是，现已发现粒度范围小于 $100\mu\text{m}$ 的颗粒体系，也称作微粒或毫微颗粒，是绝大多数不同类型药物向机体给药的理想给药形式。

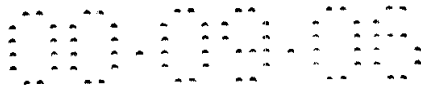
一篇描述上述毫微颗粒优越性的文献是 WO 96/20698。在这篇文献中，它特别举例说明了可以以不同途径将此类颗粒的表面改性以便提高例如保留时间。该文献还提及，例如所述颗粒可以用抗原提供以将包封在颗粒内部的药物以高度靶向方式释放在指定的作用靶位。然而，问题在于颗粒的延效作用相对受到限制，这归因于释放发生得极其快速。此外，所述颗粒的稳定性也较低。

另一篇现有技术公开的文献是 WO 96/05810。该文献涉及带正电的含聚氨基葡萄糖微粒。该颗粒在粘膜上的停留时间因颗粒部分交联而延长，由此使更多的颗粒被机体摄入。在此，问题在于所述颗粒是在乳液中制成。因此，颗粒中或颗粒上可能保留有溶剂残余物。尤其是在疏水性聚合物或生物活性剂如蛋白质上对疏水性溶剂的吸附可以引起这种问题。这些溶剂残余物是不可取的，特别是对于药物应用来说。

而且，通过正电 ζ 电势测定的颗粒正电荷不利于 WO 96/20698 所述的表面改性。

此外，所述微粒一般过大 ($1-100\mu\text{m}$) 以致不能被生物膜有效吸收。而且，较大的颗粒 ($>5\mu\text{m}$) 具有毒性作用，因其可以粘着在肺部的毛线血管内。

Biotech Australia 在美国专利 US 5449720 和 WO 92/17167 中公开了相似的体系，其中微粒的吸收得到显著提高。在这些体系中，应



- 由此只需要低剂量的药物，并且使有害副作用减小至最低限度；
- 所述毫微颗粒明显比常规颗粒更加稳定，同时没有损害它们的生物可降解性；
 - 由于粒度很小，本发明的颗粒特别易于吸收；
 - 所述毫微颗粒基本上不含有机溶剂残余物，因它们可以在水溶液中生成；
 - 通过交联可以改变聚电解质复合物的电荷，从而改变颗粒的亲水性。这可引起血浆蛋白质结合毫微颗粒的改变。此外，也可以影响颗粒在粘膜上的保留时间和颗粒在机体内的停留时间。
 - 其他可以附着在毫微颗粒表面上的物质通过交联键合在所述颗粒上。这些物质可以，例如通过作用于颗粒的主动转运来提高颗粒的吸收作用。由此，能够避免这些物质和聚电解质复合物的共价结合。这将提高生物利用度。
 - 另外，这种方案可以影响所述颗粒的溶胀性能和/或吸水作用。

为了本发明的目的，所述毫微颗粒是平均粒度为 10-1000nm，优选 10-500nm 和更优选 50-250nm 的颗粒，该颗粒具有生物可相容和生物可降解聚电解质复合物。

所述颗粒的形状可以是规则或不规则。

在此，术语“生物可相容”是指适用于制备聚电解质复合物的化合物在给药时是适宜的，也就是，例如不存在或仅仅具有可接受程度的毒性和/或极低的变应原效应。为了避免所述聚合物在机体内蓄积，它们应是生物可降解或可排除的。根据其用途，还优选所述聚合物是生物可相容聚合物。

所述聚电解质复合物可以通过将聚阴离子和聚阳离子如专利 EP 0454044 B1 所述方法混合制成。所得毫微颗粒的表面可以带有正电荷或负电荷(具有正电或负电 ζ 电势)或不带电荷，这取决于聚合离子的比例。

适合本发明目的聚阴离子是所有带负电荷的生物可降解或可排除的聚合物。特别是，多元酸可以特别带有荷电的膦酸根、磷酸根、磺

这些聚合物/共聚物的混合物也适用。优选聚氨基葡萄糖，因其极高的相容性是公认的。

所述聚阳离子的重均分子量优选为 1000 至 2,000,000 道尔顿，特别优选 40,000 至 600,000 道尔顿。其制备方法为所属技术领域普通技术人员公知。通常，可以从市场购得它们。

为了制备毫微颗粒，所用聚阳离子的浓度优选是 0.1 至 40g/l，特别优选 1 至 20g/l。

所述毫微颗粒可以进一步含有所属领域技术人员已知的生物可相容和/或生物可降解聚合物。例如但在不强加任何限制下，可以提及下列聚合物：

多糖类化合物如葡聚糖及其衍生物，聚氰基丙烯酸烷基酯，多元醇，聚亚甲基丙二酸酯，聚酯类如 PLGA(聚乳酸-聚羟基乙酸共聚物)和聚己内酯，聚醚类化合物如聚乙二醇，聚酞类化合物，聚丙烯酰胺类化合物，聚磷嗪(polyphosphazene)类化合物，生物可降解聚酰胺类化合物和聚氨酯类化合物。在此特别优选的是具有附加官能团的聚合物衍生物。在不强加任何限制下，这些官能团包括羟基、氨基、巯基、羧基、硫羧基、亚氨基、羰基、烷氧基羧基、羧酰氨基、膦酸根、硫酸根、磺酸根、磺基和环氧基团。

上述生物可降解聚合物也可以以共聚形式应用。这是指可用于制备上述生物可降解聚合物的不同单体的共聚物。在本发明的上下文中，这些聚合物/共聚物的混合物也适用。

这些聚合物可以改变毫微颗粒的稳定性。而且，所述聚合物可用作下文提及的表面改性剂，以使生物活性剂与所述毫微颗粒结合和/或稳定活性物质。

所述聚合物的重均分子量大于 1000 道尔顿，优选 30,000 至 2,000,000 道尔顿，特别优选 50,000 至 300,000 道尔顿。

为了制备毫微颗粒，所用生物可降解聚合物的浓度优选是 0 至 100g/l，特别优选 0-40g/l。

可以从文献中获知这些聚合物的制备方法和所述多元酸或多元碱的

制备方法。大部分此类聚合物也可以由市场购得。此外，如果需要，可以向毫微颗粒中混入其它添加剂。因此，可以掺入例如吸收促进剂，如磷脂类化合物。

生物活性剂是影响活体的性质或行为的物质。它们包括但不限于是治疗剂、诊断剂、化妆品和具有预防作用的物质。在此应该指出，在特定情况中，所述物质本身不具有活性。此处所述的诊断剂包括，例如造影剂，如氧气或稀有气体等。

特别令人感兴趣的生物活性剂是，例如，活性肽和蛋白质如胰岛素、干扰素、酶、生长激素、红细胞生成素、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、人生长激素、降钙素、促黄体素释放激素(LHRH)、凝血因子 VIII、组织纤溶酶原激活物(tPA)、脑磷脂类、胰高血糖素、促甲状腺素释放激素(TRH)、胸腺(细胞)生成素、胸腺五肽、胸腺卡汀和类似物及片段；

酶抑制剂，例如 HIV-蛋白酶抑制剂；

抗原和免疫原，例如流感病毒(壳)体或抗原的亚基；

神经节苷脂；

抗生素，例如： β -内酰胺类抗生素(青霉素、头孢菌素、单环内酰胺、碳青霉烯(carbapenemene)类等)、氨基糖甙类(例如链霉素)、四环素、氯霉素、大环内酯(例如红霉素)、林可霉素、磷霉素、褐霉酸、多粘菌素、万古霉素和替考拉宁；

局部麻醉剂；

避孕药；

镇痛剂，例如：催眠镇痛剂，特别是鸦片生物碱类、4-苯基哌啶类衍生物(哌替啶)、3,3-二苯基丙基胺类衍生物(美沙酮)、芬太尼衍生物、曲马朵、奈福泮；和非鸦片类镇痛剂、退热剂、消炎药，特别是水杨酸的衍生物(例如乙酰水杨酸)、苯胺的衍生物(例如对乙酰氨基酚)、邻氨基苯甲酸的衍生物(甲灭酸)、吡唑类衍生物(安乃近、安替比林、异丙安替比林)和(杂环)芳基乙酸和丙酸的衍生物(吲哚美辛、双氯芬酸、布洛芬、萘普生)、糖皮质(甾类)激素和保泰松类衍生物；

治风湿药，例如羟基保泰松；芳基乙酸和丙酸衍生物，特别是吲

咪美辛、双氯芬酸、布洛芬、酮洛芬；昔康(oxicam)类，例如吡罗昔康；金(I)制剂，D-青霉胺，氯喹和免疫抑制剂；

激素类和拮抗剂类，例如肽类激素，特别是促肾上腺皮质激素、后叶加压素、去氨加压素、甲状旁腺激素、促生长素抑制素、胰岛素；甾类激素，特别是孕甾酮、雌激素和雄性激素，前列腺素和肾上腺激素，如肾上腺素；

细胞(生长)抑制剂，例如烷化剂，特别是氮芥、环磷酰胺、异环磷酰胺、美法仑、苯丁酸氮芥、六甲密胺、噻替派、白消安、卡氮芥、iomustine、甲环亚硝脒、streptozocine 和达卡巴嗪；

抗代谢物，例如甲氨蝶呤、氟尿嘧啶、氟尿苷、阿糖胞苷、巯嘌呤、硫鸟嘌呤、戊制菌素；

生物碱类；

RNA, DNA, 例如核苷酸、低聚核苷酸、多核苷酸、基因或基因片段、质粒和/或载体以及它们的衍生物；它们特别适用于例如 HIV、类风湿关节炎、癌症、激素缺乏性疾病、高血压、动脉粥样硬化、肌肉疾病、病毒感染以及活性肽和蛋白质内源性合成不足；

毒素或疫苗，例如菌苗，如破伤风和霍乱毒素；和病毒疫苗，例如 AIDS 抗原或肝炎病毒组成；

碳水化合物，例如单糖或多糖、葡聚糖、琼脂、琼脂糖衍生物、蛋白多糖，如肝素、类肝素、硫酸皮肤素；

脂质类，例如磷脂、胆甾醇、甘油三酯和脂质蛋白等。

也可以应用这些生物活性剂的混合物。

本发明的毫微颗粒是特别适合于不稳定制剂的给药形式，因所述颗粒极其稳定，由此保护活性物质如蛋白质能够对抗如胃酸的分解作用。所以，活性物质可以在例如口服给药后以特定的靶向方式释放，使活性物质不会过早地释放在胃或肠内，被胃肠降解，而只在颗粒被摄入血液中后才释放出活性物质。

至少存在 4 种不同的使活性物质进入毫微颗粒内或位于毫微颗粒上的途径：

1. 在复合物沉淀过程中将存在于溶液中的活性物质或活性物质混合物包合(由溶液“捕获”)。
2. 在与最终的毫微颗粒接触时由溶液中吸附或吸收活性物质或活性物质混合物(在多孔颗粒或凝胶具有“海绵作用”的情况下)。
3. 沉淀出聚电解质复合物, 其中活性物质通过化学方式键合在复合物配偶体上。
4. 应用活性物质/活性物质的混合物作为聚电解质复合物形成配偶体的包埋作用。

为了制备所述毫微颗粒, 所用活性物质/活性物质混合物的浓度优选为 0.1 至 40g/l, 特别优选 1 至 20g/l。

按照本发明, 所述聚电解质复合物在形成之后用至少一种交联剂作附加处理。这些化合物连接起毫微颗粒的聚合物, 令它们变得更加稳定, 并且较缓慢地释放出毫微颗粒中所含有的药学活性物质。

这些交联剂包括但不限于:

醛类化合物和酮类化合物, 例如甲醛、乙二醛、戊二醛; 苯醌; 卤代三嗪衍生物, 如

2, 4, 6-三氯-1, 3, 5-三嗪,
2, 4-二氯-6-甲氧基-1, 3, 5-三嗪,
2, 4-二氯-6-甲氧基-1, 3, 5-三嗪,
2, 4-二氯-6-苯氧基-1, 3, 5-三嗪,
2-氯-4, 6-二甲氧基-1, 3, 5-三嗪,
2-氯-4, 6-二乙氧基-1, 3, 5-三嗪,
2-氯-4, 6-二苯氧基-1, 3, 5-三嗪;

磷盐类化合物, 例如

O-(1, 2-二氢-2-氧代-1-吡啶基)三吡咯烷基磷氯化物,
O-(1, 2-二氢-2-氧代-1-吡啶基)三吡咯烷基磷六氟磷酸盐,
O-(1, 2-二氢-2-氧代-1-吡啶基)三吡咯烷基磷高氯酸盐,
O-(1, 2-二氢-2-氧代-1-吡啶基)三吡咯烷基磷四氟硼酸盐,
O-(1, 2-二氢-2-氧代-1-吡啶基)三(二甲基氨基)磷氯化物,

0-(1,2-二氢-2-氧代-1-吡啶基)三(二甲基氨基)磷六氟磷酸盐,

0-(1,2-二氢-2-氧代-1-吡啶基)三(二甲基氨基)磷高氯酸盐,

0-(1,2-二氢-2-氧代-1-吡啶基)三(二甲基氨基)磷四氟硼酸盐,

0-(3,4-二氢-4-氧代-1,2,3-苯并三嗪-3-基)三吡咯烷基磷氯化物,

0-(3,4-二氢-4-氧代-1,2,3-苯并三嗪-3-基)三吡咯烷基磷六氟磷酸盐,

0-(3,4-二氢-4-氧代-1,2,3-苯并三嗪-3-基)三吡咯烷基磷高氯酸盐,

0-(3,4-二氢-4-氧代-1,2,3-苯并三嗪-3-基)三吡咯烷基磷四氟硼酸盐,

0-(3,4-二氢-4-氧代-1,2,3-苯并三嗪-3-基)三(二甲基氨基)磷氯化物,

0-(3,4-二氢-4-氧代-1,2,3-苯并三嗪-3-基)三(二甲基氨基)磷六氟磷酸盐,

0-(3,4-二氢-4-氧代-1,2,3-苯并三嗪-3-基)三(二甲基氨基)磷高氯酸盐,

0-(3,4-二氢-4-氧代-1,2,3-苯并三嗪-3-基)三(二甲基氨基)磷四氟硼酸盐,

0-(5-降冰片烯-2,3-二甲酰氨基)三吡咯烷基磷氯化物,

0-(5-降冰片烯-2,3-二甲酰氨基)三吡咯烷基磷六氟磷酸盐,

0-(5-降冰片烯-2,3-二甲酰氨基)三吡咯烷基磷高氯酸盐,

0-(5-降冰片烯-2,3-二甲酰氨基)三吡咯烷基磷四氟硼酸盐,

0-(5-降冰片烯-2,3-二甲酰氨基)三(二甲基氨基)磷氯化物,

0-(5-降冰片烯-2,3-二甲酰氨基)三(二甲基氨基)磷六氟磷酸盐,

0-(5-降冰片烯-2,3-二甲酰氨基)三(二甲基氨基)磷高氯酸盐,

0-(5-降冰片烯-2,3-二甲酰氨基)三(二甲基氨基)磷四氟硼酸盐,

0-(苯并三唑-1-基)三吡咯烷基磷氯化物,
 0-(苯并三唑-1-基)三吡咯烷基磷六氟磷酸盐,
 0-(苯并三唑-1-基)三吡咯烷基磷高氯酸盐,
 0-(苯并三唑-1-基)三吡咯烷基磷四氟硼酸盐,
 0-(苯并三唑-1-基)三(二甲基氨基)磷氯化物,
 0-(苯并三唑-1-基)三(二甲基氨基)磷六氟磷酸盐,
 0-(苯并三唑-1-基)三(二甲基氨基)磷高氯酸盐,
 0-(苯并三唑-1-基)三(二甲基氨基)磷四氟硼酸盐,
 0-(N-马来酰亚氨基)三吡咯烷基磷氯化物,
 0-(N-马来酰亚氨基)三吡咯烷基磷六氟磷酸盐,
 0-(N-马来酰亚氨基)三吡咯烷基磷高氯酸盐,
 0-(N-马来酰亚氨基)三吡咯烷基磷四氟硼酸盐,
 0-(N-马来酰亚氨基)三(二甲基氨基)磷氯化物,
 0-(N-马来酰亚氨基)三(二甲基氨基)磷六氟磷酸盐,
 0-(N-马来酰亚氨基)三(二甲基氨基)磷高氯酸盐,
 0-(N-马来酰亚氨基)三(二甲基氨基)磷四氟硼酸盐,
 0-(N-琥珀酰亚氨基)三吡咯烷基磷氯化物,
 0-(N-琥珀酰亚氨基)三吡咯烷基磷六氟磷酸盐,
 0-(N-琥珀酰亚氨基)三吡咯烷基磷高氯酸盐,
 0-(N-琥珀酰亚氨基)三吡咯烷基磷四氟硼酸盐,
 0-(N-琥珀酰亚氨基)三(二甲基氨基)磷氯化物,
 0-(N-琥珀酰亚氨基)三(二甲基氨基)磷六氟磷酸盐,
 0-(N-琥珀酰亚氨基)三(二甲基氨基)磷高氯酸盐,
 0-(N-琥珀酰亚氨基)三(二甲基氨基)磷四氟硼酸盐,
 0-(N-邻苯二甲酰亚氨基)三吡咯烷基磷氯化物,
 0-(N-邻苯二甲酰亚氨基)三吡咯烷基磷六氟磷酸盐,
 0-(N-邻苯二甲酰亚氨基)三吡咯烷基磷高氯酸盐,

O-(N-邻苯二甲酰亚氨基)三吡咯烷基磷四氟硼酸盐,
 O-(N-邻苯二甲酰亚氨基)三(二甲基氨基)磷氯化物,
 O-(N-邻苯二甲酰亚氨基)三(二甲基氨基)磷六氟磷酸盐,
 O-(N-邻苯二甲酰亚氨基)三(二甲基氨基)磷高氯酸盐,
 O-(N-邻苯二甲酰亚氨基)三(二甲基氨基)磷四氟硼酸盐,
 O-(N-全氢邻苯二甲酰亚氨基)三吡咯烷基磷六氟磷酸盐,
 O-(N-全氢邻苯二甲酰亚氨基)三吡咯烷基磷六氟磷酸盐,
 O-(N-全氢邻苯二甲酰亚氨基)三吡咯烷基磷高氯酸盐,
 O-(N-全氢邻苯二甲酰亚氨基)三吡咯烷基磷四氟硼酸盐,
 O-(N-全氢邻苯二甲酰亚氨基)三(二甲基氨基)磷氯化物,
 O-(N-全氢邻苯二甲酰亚氨基)三(二甲基氨基)磷六氟磷酸盐,
 O-(N-全氢邻苯二甲酰亚氨基)三(二甲基氨基)磷高氯酸盐,
 O-(N-全氢邻苯二甲酰亚氨基)三(二甲基氨基)磷四氟硼酸盐,
 三(二甲基氨基)氯磷六氟磷酸盐,
 三(二甲基氨基)溴磷六氟磷酸盐,
 三(二甲基氨基)氰基磷六氟磷酸盐,
 三(二甲基氨基)异氰硫基磷六氟磷酸盐,
 三(二甲基氨基)叠氮磷六氟磷酸盐,
 三(二甲基氨基)三氯甲基磷六氟磷酸盐,
 三(二甲基氨基)三氟甲基磷六氟磷酸盐,
 三(二甲基氨基)苯氧基磷六氟磷酸盐,
 三(二甲基氨基)-对-硝基苯氧基磷六氟磷酸盐,
 三吡咯烷基氯磷六氟磷酸盐,
 三吡咯烷基溴磷六氟磷酸盐,
 三吡咯烷基氰基磷六氟磷酸盐,
 三吡咯烷基异氰硫基磷六氟磷酸盐,
 三吡咯烷基叠氮磷六氟磷酸盐,
 三吡咯烷基三氯甲基磷六氟磷酸盐,
 三吡咯烷基三氟甲基磷六氟磷酸盐,

三吡咯烷基苯氧基磷六氟磷酸盐,

三吡咯烷基-对-硝基苯氧基磷六氟磷酸盐;

脲盐, 例如

1, 2-二氢-2-氧代-1-吡啶基氧基二亚环己基脲盐氯化物,

1, 2-二氢-2-氧代-1-吡啶基氧基二亚环己基脲盐六氟磷酸盐,

1, 2-二氢-2-氧代-1-吡啶基氧基二亚环己基脲盐高氯酸盐,

1, 2-二氢-2-氧代-1-吡啶基氧基二亚环己基脲盐四氟硼酸盐,

1, 2-二氢-2-氧代-1-吡啶基氧基二亚环戊基脲盐氯化物,

1, 2-二氢-2-氧代-1-吡啶基氧基二亚环戊基脲盐六氟磷酸盐,

1, 2-二氢-2-氧代-1-吡啶基氧基二亚环戊基脲盐高氯酸盐,

1, 2-二氢-2-氧代-1-吡啶基氧基二亚环戊基脲盐四氟硼酸盐,

1, 2-二氢-2-氧代-1-吡啶基氧基-N, N, N', N'-四甲基脲盐氯化物,

1, 2-二氢-2-氧代-1-吡啶基氧基-N, N, N', N'-四甲基脲盐六氟磷酸盐,

1, 2-二氢-2-氧代-1-吡啶基氧基-N, N, N', N'-四甲基脲盐高氯酸盐,

1, 2-二氢-2-氧代-1-吡啶基氧基-N, N, N', N'-四甲基脲盐四氟硼酸盐,

3, 4-二氢-4-氧代-1, 2, 3-苯并三嗪-3-基氧基二亚环己基脲盐氯化物,

3, 4-二氢-4-氧代-1, 2, 3-苯并三嗪-3-基氧基二亚环己基脲盐六氟磷酸盐,

3, 4-二氢-4-氧代-1, 2, 3-苯并三嗪-3-基氧基二亚环己基脲盐高氯酸盐,

3, 4-二氢-4-氧代-1, 2, 3-苯并三嗪-3-基氧基二亚环己基脲盐四氟硼酸盐,

3, 4-二氢-4-氧代-1, 2, 3-苯并三嗪-3-基氧基二亚环戊基脲盐氯化物

化物,

3,4-二氢-4-氧代-1,2,3-苯并三嗪-3-基氧基二亚环戊基脲六
氟磷酸盐,

3,4-二氢-4-氧代-1,2,3-苯并三嗪-3-基氧基二亚环戊基脲高
氯酸盐,

3,4-二氢-4-氧代-1,2,3-苯并三嗪-3-基氧基二亚环戊基脲四
氟硼酸盐,

3,4-二氢-4-氧代-1,2,3-苯并三嗪-3-基氧基-N,N,N',N'-四甲
基脲氯化物,

3,4-二氢-4-氧代-1,2,3-苯并三嗪-3-基氧基-N,N,N',N'-四甲
基脲六氟磷酸盐,

3,4-二氢-4-氧代-1,2,3-苯并三嗪-3-基氧基-N,N,N',N'-四甲
基脲高氯酸盐,

3,4-二氢-4-氧代-1,2,3-苯并三嗪-3-基氧基-N,N,N',N'-四甲
基脲四氟硼酸盐,

5-降冰片烯-2,3-二甲酰氨基氧基二亚环己基脲氯化物,

5-降冰片烯-2,3-二甲酰氨基氧基二亚环己基脲六氟磷酸盐,

5-降冰片烯-2,3-二甲酰氨基氧基二亚环己基脲高氯酸盐,

5-降冰片烯-2,3-二甲酰氨基氧基二亚环己基脲四氟硼酸盐,

5-降冰片烯-2,3-二甲酰氨基氧基二亚环戊基脲氯化物,

5-降冰片烯-2,3-二甲酰氨基氧基二亚环戊基脲六氟磷酸盐,

5-降冰片烯-2,3-二甲酰氨基氧基二亚环戊基脲高氯酸盐,

5-降冰片烯-2,3-二甲酰氨基氧基二亚环戊基脲四氟硼酸盐,

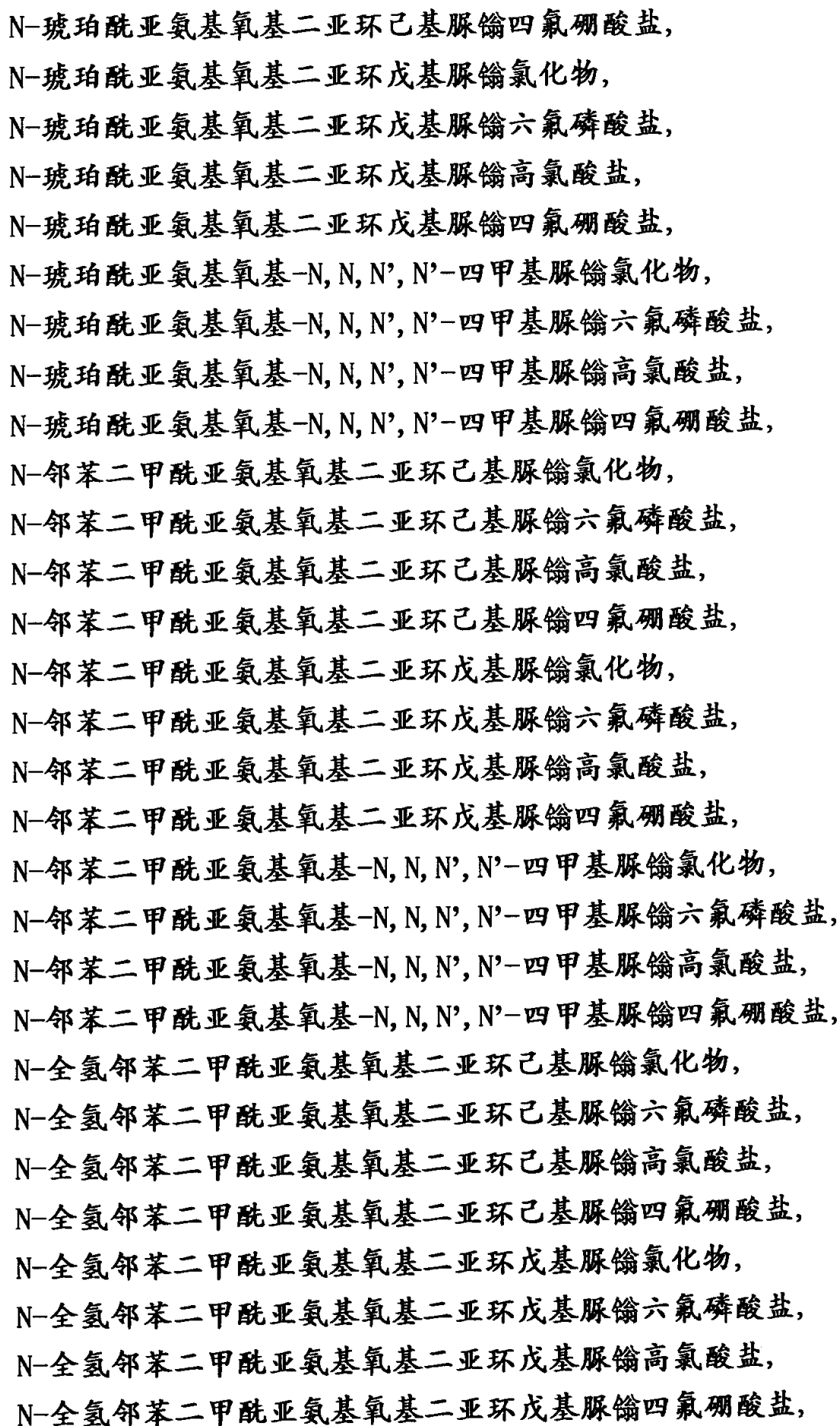
5-降冰片烯-2,3-二甲酰氨基氧基-N,N,N',N'-四甲基脲氯化
物,

5-降冰片烯-2,3-二甲酰氨基氧基-N,N,N',N'-四甲基脲六氟
磷酸盐,

5-降冰片烯-2,3-二甲酰氨基氧基-N,N,N',N'-四甲基脲高氯
酸盐,

5-降冰片烯-2,3-二甲酰氨基氧基-N,N,N',N'-四甲基脲鎓四氟

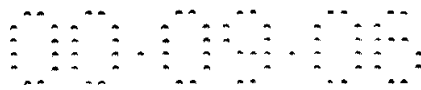
苯并三唑-1-基氧基二亚环己基脲脒氯化物,
 苯并三唑-1-基氧基二亚环己基脲脒六氟磷酸盐,
 苯并三唑-1-基氧基二亚环己基脲脒高氯酸盐,
 苯并三唑-1-基氧基二亚环己基脲脒四氟硼酸盐,
 苯并三唑-1-基氧基二亚环戊基脲脒氯化物,
 苯并三唑-1-基氧基二亚环戊基脲脒六氟磷酸盐,
 苯并三唑-1-基氧基二亚环戊基脲脒高氯酸盐,
 苯并三唑-1-基氧基二亚环戊基脲脒四氟硼酸盐,
 苯并三唑-1-基氧基-N,N,N',N'-四甲基脲脒氯化物,
 苯并三唑-1-基氧基-N,N,N',N'-四甲基脲脒六氟磷酸盐,
 苯并三唑-1-基氧基-N,N,N',N'-四甲基脲脒高氯酸盐,
 苯并三唑-1-基氧基-N,N,N',N'-四甲基脲脒四氟硼酸盐,
 N-马来酰亚氨基氧基二亚环己基脲脒氯化物,
 N-马来酰亚氨基氧基二亚环己基脲脒六氟磷酸盐,
 N-马来酰亚氨基氧基二亚环己基脲脒高氯酸盐,
 N-马来酰亚氨基氧基二亚环己基脲脒四氟硼酸盐,
 N-马来酰亚氨基氧基二亚环戊基脲脒氯化物,
 N-马来酰亚氨基氧基二亚环戊基脲脒六氟磷酸盐,
 N-马来酰亚氨基氧基二亚环戊基脲脒高氯酸盐,
 N-马来酰亚氨基氧基二亚环戊基脲脒四氟硼酸盐,
 N-马来酰亚氨基氧基-N,N,N',N'-四甲基脲脒氯化物,
 N-马来酰亚氨基氧基-N,N,N',N'-四甲基脲脒六氟磷酸盐,
 N-马来酰亚氨基氧基-N,N,N',N'-四甲基脲脒高氯酸盐,
 N-马来酰亚氨基氧基-N,N,N',N'-四甲基脲脒四氟硼酸盐,
 N-琥珀酰亚氨基氧基二亚环己基脲脒氯化物,
 N-琥珀酰亚氨基氧基二亚环己基脲脒六氟磷酸盐,
 N-琥珀酰亚氨基氧基二亚环己基脲脒高氯酸盐,



N-全氢邻苯二甲酰亚氨基氧基-N,N,N',N'-四甲基脲鎓氯化物,
 N-全氢邻苯二甲酰亚氨基氧基-N,N,N',N'-四甲基脲鎓六氟磷酸
 盐,
 N-全氢邻苯二甲酰亚氨基氧基-N,N,N',N'-四甲基脲鎓高氯酸
 盐,
 N-全氢邻苯二甲酰亚氨基氧基-N,N,N',N'-四甲基脲鎓四氟硼酸
 盐,

羟胺的衍生物, 例如

二(1,2-二氢-2-氧代-1-吡啶基)碳酸盐,
 二(3,4-二氢-4-氧代-1,2,3-苯并三嗪-3-基)碳酸盐,
 二(5-降冰片烯-2,3-二甲酰亚氨基)碳酸盐,
 二(苯并三唑-1-基)碳酸盐,
 二(N-马来酰亚氨基)碳酸盐,
 二(N-琥珀酰亚氨基)碳酸盐,
 二(N-邻苯二甲酰亚氨基)碳酸盐,
 二(N-全氢邻苯二甲酰亚氨基)碳酸盐,
 二(1,2-二氢-2-氧代-1-吡啶基)草酸盐,
 二(3,4-二氢-4-氧代-1,2,3-苯并三嗪-3-基)草酸盐,
 二(5-降冰片烯-2,3-二甲酰亚氨基)草酸盐,
 二(苯并三唑-1-基)草酸盐,
 二(N-马来酰亚氨基)草酸盐,
 二(N-琥珀酰亚氨基)草酸盐,
 二(N-邻苯二甲酰亚氨基)草酸盐,
 二(N-全氢邻苯二甲酰亚氨基)草酸盐,
 二(1,2-二氢-2-氧代-1-吡啶基)二碳酸盐(pyrocarbonate),
 二(3,4-二氢-4-氧代-1,2,3-苯并三嗪-3-基)二碳酸盐,
 二(5-降冰片烯-2,3-二甲酰亚氨基)二碳酸盐,
 二(苯并三唑-1-基)二碳酸盐,



二(N-马来酰亚氨基)二碳酸盐,
二(N-琥珀酰亚氨基)二碳酸盐,
二(N-邻苯二甲酰亚氨基)二碳酸盐,
二(N-全氢邻苯二甲酰亚氨基)二碳酸盐; 和

反应性碳酸衍生物, 例如碳二亚胺类化合物, 特别是 N-(3-二甲基氨基丙基)-N-乙基碳二亚胺。

优选使用可以形成酯基或酰胺基的试剂, 因所得酯基或酰胺基团特别易于生物降解。它们包括所有卤代三嗪类衍生物、所有磷盐、所有脲盐 and 反应性碳酸衍生物。此处特别优选 N-(3-二甲基氨基丙基)-N-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDAP)和 O-(N-琥珀酰亚氨基)-N,N,N',N'-四甲基脲四氯化硼酸盐(TSTU)。

交联程度受到聚电解质复合物和交联剂的浓度以及反应时间的影响。

反应时间特别取决于所选交联剂和聚电解质复合物的类型、反应性和浓度, 以及反应温度和溶液的 pH 值。在某些情况中, 它还受到催化剂的影响。在室温下, 反应时间优选为 1 分钟至 24 小时, 特别优选 5 至 120 分钟。

所述毫微颗粒的表面可以被改性。这种改性公开在上述专利申请 WO 96/20698, US5449720 和 WO 92/17167 中, 在此引入这些文献作为参考。

通过改性的方式, 可以改变所述毫微颗粒在靶向方式中的性质。由此, 例如, 可以产生抗血小板特性, 改善颗粒的经肠摄取, 或令物质附着在所述颗粒上, 使颗粒富集在严格指定的机体区域内。在此可以提及的一个实例是令抗癌细胞抗原附着在所述颗粒上, 使药物直接自活性物质饱和的缓释药物制剂中释放至癌细胞处。

这种改性是通过在复合物形成之前、形成期间或形成之后用表面改性剂对至少一种带电聚电解质复合物的聚合物进行附加处理来获得。所述表面改性试剂包括但不限于多种的合成聚合物、生物高分子、低分子量低聚物、天然物质和表面活性物质。

所述的可用于毫微颗粒表面改性的合成聚合物包括羧甲基纤维素、纤维素、醋酸纤维素、邻苯二甲酸纤维素、聚乙二醇(碳蜡)、聚乙烯醇(PVA)、邻苯二甲酸羟丙基甲基纤维素、羟丙基纤维素、羧甲基纤维素钠或钾、聚乙烯吡咯烷酮、聚苯乙烯和硅酸盐如皂土。

可用于所述毫微颗粒表面改性的生物聚合物特别包括：蛋白质和肽类，如明胶、酪蛋白、白蛋白、卵清蛋白、肌红蛋白、血红蛋白、单克隆和多克隆抗体，细胞因子，如生长因子、干扰素、淋巴因子、monokin、白介素和趋化因子；和多糖和果胶。

可用于所述毫微颗粒表面改性的天然物质特别包括：辅助因子，例如辅酶，如维生素类，特别是维生素 B12，和辅基，例如 Hem 基团；脂质，例如磷脂，如卵磷脂和胆甾醇；和前列腺素。

可用于所述毫微颗粒表面改性的表面活性剂包括：

- 非离子表面活性剂，特别是脱水山梨糖醇脂肪酸酯，具体如聚氧化乙烯脱水山梨糖醇脂肪酸酯，脂肪醇，例如鲸蜡醇或硬脂基醇，和聚醚磺酸酯；
- 阴离子表面活性剂，特别是十二烷基硫酸钠、脂肪酸(如棕榈酸、硬脂酸和油酸)、脂肪酸甘油酯(如甘油一硬脂酸酯)和脂肪酸的钠盐和钾盐(油酸钠、棕榈酸钠、硬脂酸钠等)、聚氧化硬脂酸酯、聚氧化乙烯月桂基醚、脱水山梨糖醇倍半油酸酯和三乙醇胺；和
- 阳离子表面活性剂，尤其是二(十二烷基)二甲基溴化铵、鲸蜡基三甲基溴化铵、苯扎氯铵、十六烷基三甲基氯化铵、二甲基十二烷基氨基丙烷、N-鲸蜡基-N-乙基吗啉鎓乙硫酸盐。

这些可用于所述毫微颗粒改性的试剂适宜含有能够主动转运(例如吸收)所述颗粒的试剂。此类试剂被称作载体。

所述载体特别包括：胆酸、粘附素、侵袭素、毒素如植物或细菌毒素、钴胺素、病毒血凝素、凝集素、转铁蛋白、核黄素和用于肠转运的肽类(用于肠蛋白转运的载体系统)。同样也可以应用这些物质的被各载体系统使用的衍生物。

适合用作载体的钴胺素包括，例如，与胃液的内因子(IF)、糖蛋

白结合的物质如维生素 B12 或类似物。由于这种结合作用，粘膜将肠道中的毫微颗粒主动吸收。所述类似物包括，例如但不限于，水钴胺素、腺苷钴胺素、甲基钴胺素、羟钴胺、氰钴胺、二苯脲和 5-甲氧基亚苺基氰基钴胺素，和上述化合物的去二甲基、一乙基酰胺和甲基酰胺衍生物。此外，这些类似物包括氯钴胺素、亚硫酸合氰钴胺素(sulfitocobalamine)、硝基钴胺素、硫氰酸合钴胺素、苯并咪唑氰钴胺素衍生物(如 5,6-二氯苯并咪唑、5-氰基苯并咪唑、三甲基苯并咪唑的衍生物)和腺苷氰基钴胺素[(Ade)CN-Cbl]、钴胺素内酯、钴胺素内酰胺以及生物素 B12 或其类似物的 N-酰苯胺、乙酰胺、一羧基和二羧基衍生物。其它的维生素 B12 类似物是钴原子被锌或镍取代所得的化合物。

在本发明的上下文中，这些表面改性剂也可以作为混合物应用，使不同性质的表面改性剂相结合，或由此获得协同作用。

为了制备所述毫微颗粒，所用表面改性剂的浓度优选是 0 至 200g/l，特别优选 0 至 20g/l。

可以将这些表面改性剂直接加入水溶液中。优选此类试剂通过共价或离子方式附着在至少一种亲水性聚合物、交联剂或其它的上述生物可相容和生物可降解聚合物和活性物质上，由此将它们尽可能紧密地和聚电解质复合物相连接。

为了这个目的，可以用其它物质活化所述表面改性剂。然而，也可以将所述亲水性聚合物、交联剂或上述其他生物可相容和生物可降解聚合物以及生物活性剂活化，随后令这些物质和表面改性剂相结合。所述活化剂包括，例如但不限于，二琥珀酰亚氨基辛二酸盐、二(磺基琥珀酰亚氨基)辛二酸盐、乙二醇二(琥珀酰亚氨基琥珀酸酯)、乙二醇二(磺基琥珀酰亚氨基琥珀酸酯)、对-氨基苯基乙酸、二硫双(琥珀酰亚氨基丙酸盐)、3,3'-二硫双(磺基琥珀酰亚氨基丙酸盐)、二琥珀酰亚氨基酒石酸盐、二磺基琥珀酰亚氨基酒石酸盐、二[2-(琥珀酰亚氨基氧基羧基氧基)亚乙基]砒、二[2-(磺基琥珀酰亚氨基氧基羧基氧基)亚甲基]砒、N,N'-二甲基己二酸二酰胺*2HCl、N,N'-二甲基庚二酸二

可以单独应用上述活化剂或使用它们的混合物。

这些公开在专利申请 WO 96/20698、US 5449720 和 WO 92/17167。

所述毫微颗粒适宜通过聚电解质复合作用制备。通过将聚阳离子的水溶液、聚阴离子的水溶液和至少一种生物活性剂以及, 如果适当, 其它能够附着在两种离子型聚合物中的一种聚合物上或以游离形式存在的物质(其它聚合物、辅剂等)相混合, 随后用交联剂处理, 可以获得所述毫微颗粒。

20

实施方案中，所属领域技术人员可以应用如等电点作为参照。可以通过溶液混合的步骤来控制粒度，例如在滴加的情况中通过至少两种溶液的稀释、搅拌速率、pH 值和用于滴加的喷嘴的直径以及滴加速率来控制粒度。然而，也可以通过超声来影响粒度。

在本发明所述制备方法的特别优选实施方案中，可以无需使用其它辅剂。但是，所述辅剂可以作为例如增溶剂，这取决于生物活性剂。对于应用交联剂的处理过程，辅剂则可能是必不可少的。

然而，根据所用的生物活性剂和聚合物，可以采用不同的乳化方法。例如，当将特别疏水的活性物质或其它疏水性聚合物引入毫微颗粒中时，乳化可能是必需的。这些乳化方法公开在 WO 96/05810 中。

例如，将一种亲水性聚合物溶解在水中。在剧烈搅拌下，将该溶液加至溶解有疏水性物质的非极性溶剂中。随后，例如，将第二种亲水性聚合物加至所得乳液中，形成聚电解质复合物。通过加入一种上述交联剂可以使这种复合物就地交联。优选用适当试剂如磺基琥珀酸二辛酯来稳定乳液。

也可以将非极性聚合物溶解在疏水溶剂中以将该聚合物引入聚电解质复合物。如果疏水性生物活性剂和非极性聚合物两者皆被引入聚电解质复合物中，可以对上述方法作略微改动以便形成多乳液（油包水包油乳液）。

所述颗粒也可以通过喷雾干燥获得。在此，将含有至少一种聚阴离子、至少一种聚阳离子和至少一种生物活性剂以及，如果适当，其它物质的适当溶液经过适宜喷嘴进行喷雾，由此形成所需粒度的颗粒。随后将这些颗粒干燥。

可以通过加入交联剂使所得颗粒就地交联，生成本发明的毫微颗粒。为了这个目的，例如加入一种上述交联剂并优选在室温下将混合物进一步搅拌 10 分钟至 24 小时，这取决于所需的交联程度和交联剂。颗粒反应的准确步骤取决于交联剂，所属领域技术人员可以以一些常规实验使其最佳化。

交联作用可以通过文献中已知的方法，例如 NMR、NIR 或排阻色谱

来测定。

但是，也可以稍后交联其中含有聚电解质复合物和至少一种生物活性剂的所得颗粒。为了这个目的，可以将这些颗粒引入适当的溶剂中，例如水或偶极非质子溶剂如 DMF(二甲基甲酰胺)或 DMSO(二甲基亚砷)中。随后向该溶液内加入一种上述交联剂，并且和所得聚电解质复合物反应，后者被进一步交联。这可以通过例如在室温下搅拌 10 分钟至 24 小时来完成。

随后可以分离出颗粒。该分离可以通过例如过滤或离心来完成。优选此后将所得颗粒用水洗涤和干燥，如冷冻干燥。

所得毫微颗粒可以通过照射来灭菌，这是所属领域技术人员熟知的。然而，也可以在灭菌条件下制备所述毫微颗粒。

所述颗粒可以通过任何所属领域技术人员已知的途径给药。其中特别包括但不限于口服给药的形式。但是，它们还可以通过，例如，非肠道给药，如静脉内、动脉内、肌肉内、皮下、鞘内或髓内注射。此外，所述毫微颗粒可以经鼻给药、经眼给药、直肠给药、阴道给药、经颊给药、口服给药、透皮给药和吸入给药。

下列实施例用于更详细地描述本发明。

实施例 1a:

室温下，将 18mg 胰岛素和 2mg FITC(异硫氰酸荧光素)标记的胰岛素在装有 12ml 蒸馏水(得自 Millipore 的水处理单位)的 50ml 锥形瓶中于电磁搅拌器(Ikamag RCT, 5 型)上搅拌 1 分钟。随后滴加 0.1N HCl 水溶液直至得到澄清的溶液和胰岛素全部溶解。

此后，将 20mg 已溶解在 4ml 蒸馏水中的木聚糖多硫酸酯(得自 Bene-Arneimittel)在搅拌下滴加至这种溶液内。在滴加过程中，混合物变混浊。随后缓慢滴加 0.1N NaOH 溶液直至溶液完全澄清为止。

在中速搅拌下将该溶液和 4mg 溶于 2ml 微孔处理水中的聚氨基葡萄糖(得自于 Fluka)溶液混合。至此溶液出现极轻微的混浊。

使用乙二醛(Riedel)进行交联。为了这个目的，加入 400 μ l 的浓

度为 2% 的乙二醛水溶液(相当于 8mg 的纯乙二醛)。在室温下将所得混悬液搅拌 10 分钟。

随后, 将该混悬液经 100KD 膜(Millipore 的 PLHK 膜)超滤(超滤池 Amicon 8050, 氮气压 0.2 巴, 纯度>99.9%), 随后用 5ml 水洗涤残余物。再将渗余物转移至 100ml 圆底烧瓶内, 冷冻(用异丙醇/干冰的混合物)和冷冻干燥过夜(LDC-1 型, Christ)。

现已发现, 在 30 分钟后只释放出 30.1% 的胰岛素。

对照实施例 1:

重复实施例 1。但是, 所得颗粒未经交联, 即所得混悬液没有与乙二醛混合, 而是直接如上文所述接受洗涤、超滤和干燥。

按照实施例 1 所述内容测试 FITC-胰岛素的释放。发现已有 59.4 % 的 FITC-胰岛素释放至溶液中。

实施例 1b:

反应是按照类似于实施例 1 所述过程进行: 在 50ml 锥形瓶中, 将 20mg 胰岛素和 12ml 蒸馏水一起搅拌 1 分钟, 滴加 0.1N HCl 溶液直至得到澄清溶液。搅拌下, 向该溶液中滴加 20mg 溶于 4ml 水中的木聚糖多硫酸酯, 随后加入 0.1N NaOH 溶液直至形成澄清溶液。在中速搅拌下, 向该溶液中加入 4mg 溶于 2ml 水中的聚氨基葡萄糖溶液。将 20mg 聚-(L-赖氨酸甲酯富马酰胺)(LMF)的水解产物(通过如专利 EP 0245840 B1 所述方法制备)溶解在 4ml 水中且滴加。为了交联, 这次在搅拌下首先加入 8 μ l N-乙基二异丙基胺(得自于 Fluka)且随后加入 13mg (N-琥珀酰亚氨基)-N,N,N',N'-四甲基脲鎓四氟硼酸盐(TSTU, 得自于 Fluka)以代替乙二醛, 将混合物在室温下 15 分钟。按照类似于实施例 1a 的方式进行处理和释放: 在本实施例的情况中, 胰岛素的释放量是通过由文献获知的 HPLC 法测定。在 PBS 缓冲液中 4 小时后, 只释放出 30 % 的胰岛素。在完全相同的条件下, 未交联的对照实施例显示出 4 小时后已释放出 73% 的胰岛素。

实施例 1c:

按照实施例 1b 所述过程再重复一次反应。这次用 16.4mg 0-(1H-苯并三唑-1-基)-N,N',N''-四甲基脲鎓六氟磷酸盐 (HBTU, 得自于 Fluka) 代替 TSTU 作为交联剂。4 小时后缓冲液中释放的胰岛素仅为 14 %。

实施例 2a: 白蛋白的包埋

室温下, 将 18mg 牛血清白蛋白 (BSA) 和 2mg BSA-FITC (得自于 Sigma) 在 4ml 蒸馏水中、于电磁搅拌器 (IKA-combimag RCT, 5 型) 上搅拌 1 分钟。搅拌下, 将 20mg 预先已溶解在 4ml 蒸馏水中的木聚糖多硫酸酯 (得自于 Bene-Arzneimittel) 滴加至上述溶液中。

在中速搅拌下, 向该溶液中加入 4mg 溶于 2ml 微孔处理水中的聚氨基葡萄糖 (得自于 Fluka) 溶液。此时溶液略微混浊。将溶解在 4ml 水中的 20mg LMF (赖氨酸甲酯富马酰胺水解产物) 滴加至整个溶液中。用 200 μ l 的浓度为 40% 的乙二醛水溶液 (Riedel) 进行交联。在室温下将该混合物搅拌 15 分钟。

通过超滤方式 (超滤池 Amicon 8050, 氮气压 1 巴)、经 300 KD 膜 (PLMK, 得自于 Millipore) 纯化该混悬液。用 30ml 水洗涤 3 次残余物, 得到 100ml 的渗透物。

将渗透物转移至 250ml 圆底烧瓶中, 冷冻且冷冻干燥过夜。

BSA-FITC 的释放是通过将 5mg 干燥颗粒悬浮在 10ml 磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 中且在 37 $^{\circ}$ C 的干燥箱中孵育来测定。4 小时后, 取出样本, 进行超滤 (滤膜 Millipore PLHK), 用分光光度计在 494nm 下测定 FITC 含量, 4 小时后, FITC-BSA 的释放量为 54%。

为了对比, 在相同条件下但不加入交联剂来制备颗粒。在这些颗粒中, FITC-BSA 的释放量为 80.5%。

实施例 2b

按照实施例 1 所述方法进行反应。为了交联, 这次在搅拌下首先

加入 8 μ l N-乙基二异丙基胺(得自于 Fluka)且随后加入 13mg (N-琥珀酰亚氨基)-N,N,N',N'-四甲基脲鎓四氟硼酸盐(TSTU, 得自于 Fluka), 它们替代了乙二醛, 将混合物在室温下搅拌 15 分钟。按照类似于实施例 2a 的方式进行处理和释放。在 PBS 缓冲液中 4 小时后, 业已释放出 67% 的 BSA。

实施例 2c

按照实施例 2b 所述再重复一次反应。这次用 16.4mg O-(1H-苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲鎓六氟磷酸盐(HBTU, 得自于 Fluka)代替 TSTU 作为交联剂。当使用这种交联剂时, 仅释放出 45% 的 BAS。

实施例 3a: 四环素的包埋

这次用 20mg 四环素(Sigma)代替模型药物 BSA 并且按照实施例 2a 操作。利用由文献中获知的方法, 通过 UV 分光光度计在 356nm 下测定四环素的释放。未经交联, 4 小时后释放出 70% 的四环素, 如果颗粒按照实施例 2a 所述方法用 200 μ l 的浓度为 40% 乙二醛溶液交联, 仅释放出 10% 的四环素。

实施例 3b:

用 13mg TSTU 和再一份 8 μ l 的 N-乙基二异丙基胺代替乙二醛作为交联剂。在这种情况下, 四环素的释放量仅仅为 34%。