

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02807315.0

[51] Int. Cl.

A61K 9/08 (2006.01)

A61K 47/36 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

A61K 9/22 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

[45] 授权公告日 2006 年 5 月 17 日

[11] 授权公告号 CN 1256080C

[22] 申请日 2002.2.27 [21] 申请号 02807315.0

[30] 优先权

[32] 2001.2.28 [33] US [31] 09/795,897

[86] 国际申请 PCT/US2002/005974 2002.2.27

[87] 国际公布 WO2002/067897 英 2002.9.6

[85] 进入国家阶段日期 2003.9.26

[71] 专利权人 凯瑞顿实验室有限公司

地址 美国德克萨斯州

[72] 发明人 倪亚炜 肯尼斯·M·亚茨

审查员 王 荟

[74] 专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司

代理人 丁香兰

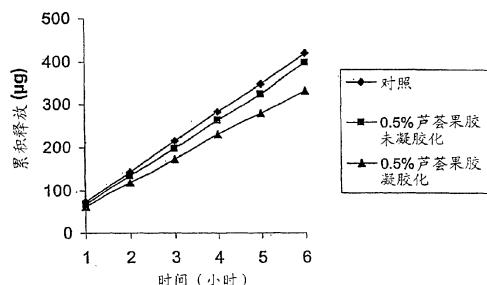
权利要求书 4 页 说明书 24 页 附图 2 页

[54] 发明名称

果胶凝胶的就地形成

[57] 摘要

本发明涉及果胶质的就地凝胶化。本发明还涉及向动物体输送和持续释放生理活性剂的就地凝胶化的组合物、其制备方法和使用方法。所述的果胶可从芦荟分离出来。



1. 一种在与动物组织或体液接触时形成凝胶以提供向动物体内持续释放生理活性剂的组合物，其中所述组合物为干燥状态，所述组合物含
5 有：

0.01 重量%-90 重量%的一种或多种生理活性剂；和

0.01 重量%-40 重量%的芦荟果胶，所述芦荟果胶的甲基化程度低于
30%，且其平均分子量大于 1×10^5 道尔顿。

2. 如权利要求 1 所述的组合物，其中所述组合物的形式为块状、片
10 状、**胶囊或粉状**。

3. 如权利要求 1 所述的组合物，其中所述组合物为粉状。

4. 如权利要求 1 所述的组合物，其中所述芦荟果胶的分子量大于 1×10^6 道尔顿，且其甲基化程度低于 10%。

5. 如权利要求 3 所述的组合物，其中所述芦荟果胶的分子量大于 1×10^6 道尔顿。
15

6. 如权利要求 5 所述的组合物，其中所述芦荟果胶的甲基化程度低
于 10%。

7. 如权利要求 1 所述的组合物，其中所述芦荟果胶的半乳糖醛酸含
量大于 90 重量%。

20 8. 如权利要求 1 所述的组合物，其中所述芦荟果胶含有 3-甲氧基-
鼠李糖。

9. 如权利要求 1 所述的组合物，其中还含有湿润剂或佐剂。

10. 如权利要求 1 所述的组合物，其还含有一价阳离子。

11. 如权利要求 1 所述的组合物，其还含有钠盐。

25 12. 如权利要求 1 所述的组合物，其还含有能生物降解的增稠剂。

13. 如权利要求 12 所述的组合物，其中所述增稠剂为羧甲基纤维素、
羟丙基纤维素、胶原质、白明胶、葡聚糖、透明质酸或藻酸盐。

14. 如权利要求 1 所述的组合物，其中所述生理活性剂包括治疗剂、
诊断剂、肽、核酸、活细胞、疫苗或蛋白质。

15. 如权利要求 1 所述的组合物，其中所述生理活性剂选自由抗菌物质、抗微生物剂、抗寄生虫剂、抗生素、抗组胺剂、解充血剂、抗代谢物、抗青光眼剂、抗癌剂、抗病毒剂、抗真菌剂、抗炎剂、抗糖尿病剂、麻醉剂、抗抑郁剂、止痛剂、抗凝剂、眼药、血管生长因子、免疫抑制剂和抗过敏剂组成的组。
5 抑制剂和抗过敏剂组成的组。

16. 如权利要求 3 所述的组合物，其中所述生理活性剂为肽或蛋白质。

17. 如权利要求 3 所述的组合物，其中所述生理活性剂为疫苗。

18. 如权利要求 1 所述的组合物，其中以所述组合物的总重量计，
10 所述芦荟果胶在从 0.1% 到 20% 的范围内。

19. 如权利要求 1 所述的组合物，其中以所述组合物的总重量计，
所述芦荟果胶在从 0.25% 到 2% 的范围内。

20. 如权利要求 1 所述的组合物，其中所述组合物含有粉状芦荟果
胶与粉状生理活性剂的混合物。

15 21. 如权利要求 1 所述的组合物，其中所述的动物组织或体液是动
物的眼睛、粘膜表面或伤口。

22. 如权利要求 1 所述的组合物，其中所述的动物组织或体液选自
由血液、血清、眼泪、肺津或鼻分泌物组成的组。

23. 如权利要求 3 所述的组合物，其中所述的动物组织或体液是动
20 物的鼻分泌物。

24. 一种在与动物组织或体液接触时形成凝胶以提供向动物体内持
续释放生理活性剂的组合物，其中所述组合物为溶液或分散液，所述溶
液或分散液含有

- i) 液态载体，
- 25 ii) 0.01 重量%-40 重量% 的芦荟果胶，所述芦荟果胶的甲基化程度
低于 30%，且其平均分子量大于 1×10^5 道尔顿，和
- iii) 0.01 重量%-90 重量% 的一种或多种生理活性剂，该生理活性剂
选自由核酸、抗菌物质、抗微生物剂、抗寄生虫剂、抗生素、抗组胺剂、
解充血剂、抗代谢物、抗青光眼剂、抗癌剂、抗病毒剂、抗真菌剂、抗

炎剂、抗糖尿病剂、麻醉剂、抗抑郁剂、止痛剂、抗凝剂、眼药、血管生长因子、免疫抑制剂和抗过敏剂组成的组。

25. 如权利要求 24 所述的组合物，其中所述芦荟果胶的甲基化程度低于 10%。

5 26. 如权利要求 24 所述的组合物，其中所述芦荟果胶的平均分子量大于 1×10^6 道尔顿。

27. 如权利要求 24 所述的组合物，其中所述芦荟果胶的甲基化程度低于 10%，且其平均分子量大于 1×10^6 道尔顿。

10 28. 如权利要求 24 所述的组合物，其中所述芦荟果胶的半乳糖醛酸含量大于 90 重量%。

29. 如权利要求 24 所述的组合物，其中所述芦荟果胶含有 3-甲氧基-鼠李糖。

30. 如权利要求 24 所述的组合物，其中还含有湿润剂或佐剂。

31. 如权利要求 24 所述的组合物，其中所述芦荟果胶占所述溶液或
15 分散液总重量的 0.1 到 20%。

32. 如权利要求 24 所述的组合物，其中所述芦荟果胶占所述溶液或分散液总重量的 0.25 到 2%。

33. 如权利要求 24 所述的组合物，其中所述芦荟果胶为所述溶液或分散液的 0.5% w/v。

20 34. 如权利要求 24 所述的组合物，其中所述芦荟果胶被酰胺化。

35. 如权利要求 24 所述的组合物，其还含有一价阳离子。

36. 如权利要求 35 所述的组合物，其中所述一价阳离子是钠。

37. 如权利要求 24 所述的组合物，其中所述溶液或分散液含有能生物降解的增稠剂。

25 38. 如权利要求 24 所述的组合物，其中所述溶液或分散液含有羧甲基纤维素、羟丙基纤维素、胶原质、白明胶、葡聚糖、透明质酸或藻酸盐。

39. 如权利要求 24 所述的组合物，其中所述载体包括水或盐水。

40. 如权利要求 24 所述的组合物，其中所述一种或多种生理活性剂

包括蛋白质。

41. 如权利要求 24 所述的组合物，其中所述生理活性剂包括治疗剂、诊断剂、肽、核酸、活细胞、疫苗或蛋白质。

5 42. 如权利要求 24 所述的组合物，其中所述生理活性剂为蛋白质。

43. 如权利要求 24 所述的组合物，其中所述生理活性剂为肽。

44. 如权利要求 24 所述的组合物，其中所述生理活性剂为疫苗。

45. 如权利要求 24 所述的组合物，其中所述生理活性剂为抗菌剂。

46. 如权利要求 24 所述的组合物，其中所述生理活性剂为磺胺嘧啶银。

10 47. 如权利要求 24 所述的组合物，其中所述凝胶将所述生理活性剂持续释放给组织或体液。

果胶凝胶的就地形成

5 技术领域

本发明涉及果胶质的就地凝胶化。具体而言，本发明涉及向动物体输送和持续释放生理活性剂的果胶的就地凝胶化。更具体而言，所述的果胶质来自芦荟 (*Aloe vera L.*) 植物。

10 背景技术

本文所用的缩略语释义：CMC，羧甲基纤维素；Da，道尔顿；DM，甲基化程度；Gal A，半乳糖醛酸；HEC，羟乙基纤维素；HM，高甲氧基；HPMC，羟丙基甲基纤维素；kDa，千道尔顿；LM，低甲氧基；PBS，磷酸盐缓冲的盐水；PEG-PLGA-PEG，聚乙二醇-聚(乳酸-共-乙二酸)-聚乙二醇；PEO-PLLA，聚环氧乙烷-聚 L-乳酸；PEO-PPO-PEO，聚环氧乙烷-聚环氧丙烷-聚环氧乙烷。

果胶是一类能生物降解的碳水化合物聚合物。果胶通常存在于植物的细胞壁中。植物的细胞壁分为三层，即胞间层、初生壁和次生壁。胞间壁的果胶含量最为丰富。关于果胶的化学和生物特性已经有很多报导 (Pilnik 和 Voragen, Advances in plant biochemistry and biotechnology (植物的生物化学和生物技术进展) 1, 219-270, 1992; Voragen 等, In Food polysaccharides and their applications (食用多糖及其应用), 287-339 页, Marcel Dekker, Inc., 纽约, 1995; Schols 和 Voragen, In Progress in Biotechnology 14. Pectins and pectinases (生物技术进展 14: 果胶与果胶酶), J. Visser 和 A.G.J. Voragen(编者), 3-20 页, Elsevier Science Publishers B.V., 阿姆斯特丹, 1996)。

果胶由 α -(1→4)连接的聚半乳糖醛酸骨架组成，该骨架上间有鼠李糖残基并被中性糖侧链及例如甲基和乙酰基等非糖成分改性。鼠李糖插入物及其他改性物的含量根据植物来源的不同而变化。Gal A 的含量通常

大于 70%，而鼠李糖的含量通常小于 2%。骨架中的鼠李糖残基与 Gal A 残基以 α -(1→2)连接。它们在骨架链上形成 T 形纽接，鼠李糖的含量增加时分子会更为柔顺。所述中性糖侧链连接在骨架中的鼠李糖残基的 O-3 或 O-4 位置上。鼠李糖残基倾向于在骨架上聚集成簇。因此，该具有侧链的区域被称为“毛状区”，而骨架的其余部分被称为“光滑区”。
5

甲基化发生在 Gal A 残基的羧基上。甲基化或甲酯化的程度(“DM”)是指被甲醇酯化的羧基(Gal A 残基)的百分数。根据 DM 的不同将果胶分为两类：DM 小于 50% 的低甲氧基(“LM”)果胶和 DM 大于 50% 的高甲氧基(“HM”)果胶。来自柑橘和苹果的商品果胶是天然的 HM 果胶。
10 LM 果胶一般通过化学脱酯化方法得到。商品 LM 果胶的 DM 一般为 20-50%。完全脱酯化的果胶被称为“果胶酸”或“聚半乳糖醛酸”。酸式的果胶酸是不溶性的，但盐式的果胶酸是可溶的。盐式的果胶酸通常为钠盐或钾盐。

果胶在 pH 约为 3-4 的范围内最稳定。pH 低于 3 时，甲氧基、乙酰基和中性糖侧链被脱去了。在中性和碱性条件下，甲酯基被皂化，并且聚半乳糖醛酸骨架通过甲基化的 Gal A 残基的非还原性末端上的糖苷键的 β -消除-裂解而断裂。果胶酸和 LM 果胶对于中性和碱性环境具有相对较高的耐受性，因为其仅有有限的甲酯基团数或根本没有甲酯基团。
15

现有的商品果胶主要来自柑橘和苹果。然而，除柑橘和苹果之外，
20 还可以从其他多种植物中分离得到果胶。研究发现，所有的蔬菜和水果都含有果胶。来自糖用甜菜、向日葵、土豆和柚子的果胶就是一些为人们所熟知的例子。

HM 果胶和 LM 果胶均可形成凝胶。然而，这些凝胶形成的机理完全不同(Voragen 等, In Food polysaccharides and their applications, 287-339 页, Marcel Dekker, Inc., 纽约, 1995)。HM 果胶在低的 pH 值下且在高浓度的共溶质(蔗糖)存在的条件下形成凝胶。LM 果胶在钙的存在下形成凝胶，因此，它是“钙反应性的”。通过一般所说的“蛋箱”结合区域的形成建立了钙-LM 果胶凝胶网络，在该“蛋箱”结合区域内， Ca^{++} 使两段聚半乳糖醛酸链交联起来。
25

HM 果胶通常不与钙离子反应，因此它不能形成钙凝胶。然而据报导，某些 HM 果胶对钙敏感而能够形成钙凝胶。此外，采用嵌段方式脱酯但其 DM 仍大于 50% 的方法，可使 HM 果胶能够与钙反应。参见 Christensen 等的美国专利 No.6,083,540。

5 钙-LM 果胶凝胶的形成受多个因素的影响，其中包括 DM、离子强度、pH 和分子量 (Garnier 等, Carbohydrate Research (碳水化合物研究) 240, 219-232, 1993; 256, 71-78, 1994)。DM 越低以及分子量越大，凝胶的形成越有效。此外，在 pH 约为 7.0 的中性条件下比在 pH 约为 3.5 的条件下更能有效地形成钙-LM 果胶凝胶。最后，加入一价反离子 (NaCl) 10 可促进凝胶化，也即，凝胶化时所需的钙较少。

果胶一般用于食品工业，美国食品及药物管理局 (FDA) 将果胶归类于“GRAS (一般认为是安全的)”。长期以来，果胶也被用作凝胶剂和止泄剂。近来在医疗器械和药物输送方面也采用果胶 (Thakur 等, Critical Reviews in Food Science & Nutrition (食品科学和营养评论) 37, 47-73, 15 1997)。在药物输送方面，多种试验配方中采用果胶通过口服将药物输送到结肠，因为果胶易于被肠内该区域的细菌分解。果胶可以不经凝胶化直接使用，也可在服用前预先形成果胶钙凝胶，从而将药剂包裹起来。参见 Ashford 等, J. Controlled Release (可控释放杂志) 26, 213-220, 1993; 30, 225-232, 1994; Munjeri 等, J. Controlled Release 46, 273-278, 1997; 20 Wakerly 等, J. Pharmacy & Pharmacology (药剂学和药理学杂志) 49, 622-625, 1997; International Journal of Pharmaceutics (国际制药学杂志) 153, 219-224, 1997; Miyazaki 等, International Journal of Pharmaceutics 204, 127-132, 2000。在本发明之前，还没有发现关于果胶就地凝胶化能力的研究。

25 美国专利 No.5,929,051 描述了从芦荟植物中分离得到的芦荟果胶，在此引用其全部内容供参考。这种果胶是天然的 LM 果胶，其能够形成钙凝胶。此外，芦荟果胶具有诸多独特的、特别是与凝胶化有关的化学性质，包括高的分子量 (大于 1×10^6 Da)、高的 Gal A 含量 (高达大于 90%) 以及低的 DM (小于 10%)。

目前商品果胶的大小通常为 $7\text{-}14 \times 10^4$ Da, Gal A 含量约为 75% (Voragen 等, In Food polysaccharides and their applications, 287-339 页, Marcel Dekker, Inc., 纽约, 1995)。这类果胶的鼠李糖含量小于 2%。商品 LM 果胶及其他天然 LM 果胶的 DM 大于 20%。DM 低于 10% 的芦荟果胶接近于果胶酸。此前还没有报导过具有如此低的 DM、如此高的分子量以及如此高的 Gal A 含量的果胶。芦荟果胶的研磨产物是灰白色粉末, 而时下的商品果胶和实验用果胶均为黄色到棕黑色的粉末。

近年来人们对药物输送这个课题进行了深入的研究, 目的是要实现持续(或缓慢)和/或受控的药物释放, 从而改善药效, 提高安全性和/或使患者更为舒服。通过抑制施用后的药物扩散和/或使聚合物基质逐步分解, 可以实现药剂的持续和/或受控释放。

就地凝胶化是指这样一种过程, 在某个部位施用组合物或制剂之后, 就在该给药部位形成凝胶。在人和动物的医药领域, 给药部位指各种注射部位、局部给药部位、手术部位以及药剂与组织或体液接触的其他部位。作为药剂输送剂, 就地形成的凝胶的优点在于, 就地形成的凝胶或聚合物网络可使药剂持续释放。同时, 它使得药物可以液体形式输送。

已有文献描述了能够就地凝胶化的聚合物, 这类聚合物包括泊洛沙姆 (Poloxamer)、普鲁尼克 (Pluronics) (Vadnere 等, Int. J. Pharm. (国际制药学杂志), 22, 207-218, 1984)、各种共聚物如 PEO-PLLA 和 PEG-PLGA-PEG (Jeong 等, Nature (自然) 388, 860-862, 1997; Jeong 等, J. Controlled Release (缓释杂志) 63, 155-163, 2000)、纤维素和乙酰邻苯二甲酸乳胶 (Cellcelose acetophthalate latex) (Gurny 等, J. Controlled Release, 353-361, 1985)、Gelrite (Rozier 等, Int. J. Pham. 57, 163-168, 1989), 卡波普 (Carbopol) 和基质胶 (Matrigel)。凝胶的形成由温度变化 (泊洛沙姆、普鲁尼克、PEO-PLLA 二嵌段共聚物、PEG-PLGA-PEG 三嵌段共聚物和基质胶)、pH 值改变 (纤维素和乙酰邻苯二甲酸乳胶和卡波普) 或与一价或二价离子 (Gelrite) 反应而引发。然而, 它们中的大多数需要高的聚合物浓度 (大于 20%) 来就地形成凝胶 (泊洛沙姆、PEO-PLLA 二嵌段共聚物、PEG-PLGA-PEG 三嵌段共聚物、纤维素和乙

酰邻苯二甲酸乳胶)。热凝胶聚合物(泊洛沙姆、普鲁尼克、PEO-PLLA 二嵌段共聚物、PEG-PLGA-PEG 三嵌段共聚物和基质胶)的缺点是在包装或贮存中的温度变化会使其在使用前发生凝胶化。不幸的是，这类聚合物中的某些不能被生物降解，例如泊洛沙姆，或者在施用前需要控制
5 温度(PEO-PLLA 二嵌段共聚物)，或者在配制过程中需要控制温度(普
鲁尼克和 Gelrite)。研究发现，当就地形成的凝胶配方中含有卡波普和普
鲁尼克的混合物时，用该凝胶配方输送眼药比由仅含有前述两者之一的
制剂更为有效。然而，所用的普鲁尼克为 14% (Lin 和 Sung, J. Controlled
10 Release 69, 379-388, 2000)。因此这类聚合物不太适合于人和动物的医
疗用途。此外，这类聚合物中的某些聚合物仅形成水凝胶，水凝胶是粘
性但仍能流动的溶液(例如泊洛沙姆和普鲁尼克)。

美国专利 No.5,958,443 公开了采用离子型多糖的就地凝胶化组合物，
所述组合物由药物、聚合物和能够形成凝胶的离子型多糖组成，所述能够
形成凝胶的离子型多糖由两种成分组成，即一种离子型多糖和一种能
15 够使所述离子型多糖交联的交联离子。凝胶的就地形成由交联离子引发。

因此，迫切需要更为简单和更为有效的就地形成的凝胶组合物，为了输送药物，所述组合物仅采用低的聚合物浓度。

发明内容

20 本发明的一个实施方式属于采用果胶质来提供用于人和动物的能生
物降解的就地形成的凝胶组合物。所述组合物在被施用到目的部位之后
由液体转变为凝胶。所述果胶质优选芦荟果胶。

本发明的一个目的是提供在人和动物体内受控或持续释放生理活性
剂的组合物。

25 本发明的另一目的是提供透明的聚合物溶液，所述聚合物溶液的浓
度超过一定范围时凝胶的透明度没有降低。所述组合物优选能够在低浓
度下就地形成凝胶。

本发明的再另一目的是提供透明的聚合物溶液，该溶液中加入了一
种增稠剂。所述组合物优选能够在低浓度下就地形成凝胶。

本发明进一步的目的是提供一种组合物，所述组合物一旦以液体形式被输送，就可在低浓度下就地形成凝胶。

本发明另外的目的是提供用来输送药物的组合物。在输送药物的情况下，在配方或所述组合物中加入例如治疗剂或诊断剂。这些药剂可以是小分子，也可以是例如蛋白质等大分子。所述组合物优选能够在低浓度下就地形成凝胶。

因此，本发明提供以下技术方案：

1. 一种在与动物组织或体液接触时形成凝胶以提供向动物体内持续释放生理活性剂的组合物，其中所述组合物为干燥状态，所述组合物含有：

10 0.01 重量%-90 重量%的一种或多种生理活性剂；和

0.01 重量%-40 重量%的芦荟果胶，所述芦荟果胶的甲基化程度低于30%，且其平均分子量大于 1×10^5 道尔顿。

2. 如技术方案 1 所述的组合物，其中所述组合物的形式为块状、片状、胶囊或粉状。

15 3. 如技术方案 1 所述的组合物，其中所述组合物为粉状。

4. 如技术方案 1 所述的组合物，其中所述芦荟果胶的分子量大于 1×10^6 道尔顿，且其甲基化程度低于 10%。

5. 如技术方案 3 所述的组合物，其中所述芦荟果胶的分子量大于 1×10^6 道尔顿。

20 6. 如技术方案 5 所述的组合物，其中所述芦荟果胶的甲基化程度低于 10%。

7. 如技术方案 1 所述的组合物，其中所述芦荟果胶的半乳糖醛酸含量大于 90 重量%。

25 8. 如技术方案 1 所述的组合物，其中所述芦荟果胶含有 3-甲氧基-鼠李糖。

9. 如技术方案 1 所述的组合物，其中还含有湿润剂或佐剂。

10. 如技术方案 1 所述的组合物，其还含有一价阳离子。

11. 如技术方案 1 所述的组合物，其还含有钠盐。

12. 如技术方案 1 所述的组合物，其还含有能生物降解的增稠剂。

30 13. 如技术方案 12 所述的组合物，其中所述增稠剂为羧甲基纤维素、羟丙基纤维素、胶原质、白明胶、葡聚糖、透明质酸或藻酸盐。

14. 如技术方案 1 所述的组合物，其中所述生理活性剂包括治疗剂、诊断剂、肽、核酸、活细胞、疫苗或蛋白质。

15. 如技术方案 1 所述的组合物，其中所述生理活性剂选自由抗菌物质、抗微生物剂、抗寄生虫剂、抗生素、抗组胺剂、解充血剂、抗代谢物、
5 抗青光眼剂、抗癌剂、抗病毒剂、抗真菌剂、抗炎剂、抗糖尿病剂、麻醉剂、抗抑郁剂、止痛剂、抗凝剂、眼药、血管生长因子、免疫抑制剂和抗过敏剂组成的组。

16. 如技术方案 3 所述的组合物，其中所述生理活性剂为肽或蛋白质。

17. 如技术方案 3 所述的组合物，其中所述生理活性剂为疫苗。

10 18. 如技术方案 1 所述的组合物，其中以所述组合物的总重量计，所述芦荟果胶在从 0.1% 到 20% 的范围内。

19. 如技术方案 1 所述的组合物，其中以所述组合物的总重量计，所述芦荟果胶在从 0.25% 到 2% 的范围内。

15 20. 如技术方案 1 所述的组合物，其中所述组合物含有粉状芦荟果胶与粉状生理活性剂的混合物。

21. 如技术方案 1 所述的组合物，其中所述的动物组织或体液是动物的眼睛、粘膜表面或伤口。

22. 如技术方案 1 所述的组合物，其中所述的动物组织或体液选自由血液、血清、眼泪、肺津或鼻分泌物组成的组。

20 23. 如技术方案 3 所述的组合物，其中所述的动物组织或体液是动物的鼻分泌物。

24. 一种在与动物组织或体液接触时形成凝胶以提供向动物体内持续释放生理活性剂的组合物，其中所述组合物为溶液或分散液，所述溶液或分散液含有

25 i) 液态载体，
ii) 0.01 重量%-40 重量% 的芦荟果胶，所述芦荟果胶的甲基化程度低于 30%，且其平均分子量大于 1×10^5 道尔顿，和

30 iii) 0.01 重量%-90 重量% 的一种或多种生理活性剂，该生理活性剂选自由核酸、抗菌物质、抗微生物剂、抗寄生虫剂、抗生素、抗组胺剂、解充血剂、抗代谢物、抗青光眼剂、抗癌剂、抗病毒剂、抗真菌剂、抗炎剂、抗糖尿病剂、麻醉剂、抗抑郁剂、止痛剂、抗凝剂、眼药、血管生长

因子、免疫抑制剂和抗过敏剂组成的组。

25. 如技术方案 24 所述的组合物，其中所述芦荟果胶的甲基化程度低于 10%。

26. 如技术方案 24 所述的组合物，其中所述芦荟果胶的平均分子量
5 大于 1×10^6 道尔顿。

27. 如技术方案 24 所述的组合物，其中所述芦荟果胶的甲基化程度低于 10%，且其平均分子量大于 1×10^6 道尔顿。

28. 如技术方案 24 所述的组合物，其中所述芦荟果胶的半乳糖醛酸含量大于 90 重量%。

10 29. 如技术方案 24 所述的组合物，其中所述芦荟果胶含有 3-甲氧基-鼠李糖。

30. 如技术方案 24 所述的组合物，其中还含有湿润剂或佐剂。

31. 如技术方案 24 所述的组合物，其中所述芦荟果胶占所述溶液或分散液总重量的 0.1 到 20%。

15 32. 如技术方案 24 所述的组合物，其中所述芦荟果胶占所述溶液或分散液总重量的 0.25 到 2%。

33. 如技术方案 24 所述的组合物，其中所述芦荟果胶为所述溶液或分散液的 0.5% w/v。

34. 如技术方案 24 所述的组合物，其中所述芦荟果胶被酰胺化。

20 35. 如技术方案 24 所述的组合物，其还含有一价阳离子。

36. 如技术方案 35 所述的组合物，其中所述一价阳离子是钠。

37. 如技术方案 24 所述的组合物，其中所述溶液或分散液含有能生物降解的增稠剂。

25 38. 如技术方案 24 所述的组合物，其中所述溶液或分散液含有羧甲基纤维素、羟丙基纤维素、胶原质、白明胶、葡聚糖、透明质酸或藻酸盐。

39. 如技术方案 24 所述的组合物，其中所述载体包括水或盐水。

40. 如技术方案 24 所述的组合物，其中所述一种或多种生理活性剂包括蛋白质。

30 41. 如技术方案 24 所述的组合物，其中所述生理活性剂包括治疗剂、诊断剂、肽、核酸、活细胞、疫苗或蛋白质。

42. 如技术方案 24 所述的组合物，其中所述生理活性剂为蛋白质。

43. 如技术方案 24 所述的组合物，其中所述生理活性剂为肽。
 44. 如技术方案 24 所述的组合物，其中所述生理活性剂为疫苗。
 45. 如技术方案 24 所述的组合物，其中所述生理活性剂为抗菌剂。
 46. 如技术方案 24 所述的组合物，其中所述生理活性剂为磺胺嘧啶
- 5 银。
47. 如技术方案 24 所述的组合物，其中所述凝胶将所述生理活性剂持续释放给组织或体液。

本发明实施方式的描述体现了本发明的上述和其他目的。以下的讨论阐述本发明的一些更为相关的特点。应当理解，这仅仅是对本发明的某些
10 更为显著的特点和用途的描述。因此，参考以下的具体实施方式可以更为完整地理解本发明。

为了更为完整地理解本发明的优选实施方式，请结合附图参见以下具体实施方式。附图中的相同标号指示相同要素。

15 附图说明

图 1 是 NaCl 与芦荟果胶的钙凝胶化的关系的柱状图。

图 2 显示了不同浓度的芦荟果胶与普通动物血清的就地凝胶化。

图 3A 显示了在 HEC 增稠剂存在的条件下芦荟果胶与普通动物血清的就地凝胶化。

20 图 3B 显示了在藻酸钠增稠剂存在的条件下芦荟果胶与普通动物血清的就地凝胶化。

图 4 显示了采用小分子有机化合物（坚牢绿）时芦荟的就地形成的凝胶所产生的缓释作用。

图 5 显示了一定面积内的 bFGF 处理与细胞数量的关系的柱状图。

25

具体实施方式

于是，本发明中所用的统称术语“果胶质”包括果胶、低甲氧基和高甲氧基果胶、脱酯果胶、果胶钙凝胶、芦荟果胶钠凝胶、果胶酸、果胶酸盐、果胶酯酸、果胶酯盐、原果胶和富含果胶的物质例如芦荟内的
30 凝胶细胞壁纤维中的一种、其多种物质的组合或其全部。如上所述，果

胶是植物中的或由植物制备得到的复合胶体碳水化合物衍生物的类别名称，果胶含有大量据认为以链状结合体存在的脱水半乳糖醛酸单元。羧基可被甲基部分酯化，也可被一种或多种碱部分或全部中和。于是，“脱酯”通常指从果胶分子上除去一个或多个甲酯基团。“果胶酸”是一个类别名称，它指主要含有胶体聚半乳糖醛酸且基本上不含甲酯基团的果胶质。完全脱酯的果胶即为果胶酸或聚半乳糖醛酸。“果胶酸盐”指果胶酸的普通盐或酸式盐。“果胶酯酸”指含有不可忽略不计的甲酯基团的胶体聚半乳糖醛酸。“果胶酯盐”指果胶酯酸的普通盐或酸式盐。“原果胶”指植物中的不溶于水的母果胶，通过控制水解可生成果胶、果胶酯酸等。
10 不溶于水的果胶可能与植物纤维素有关，例如芦荟内的凝胶或外皮细胞壁纤维。

芦荟果胶

芦荟叶由两部分组成，一是外部的绿色外皮，一是也被称为浆液的清澈的内部凝胶。从内部凝胶或外皮细胞壁纤维中提取芦荟果胶。已经发现，采用微碱性 pH 值的螯合剂是最有效的提取方法。芦荟果胶不同于此前所述的果胶。芦荟果胶的提纯制剂中鼠李糖的含量高达大于 4%，这个数值比例如柑橘、苹果、制糖甜菜和向日葵果胶的鼠李糖含量高出至少 2 倍。鼠李糖是果胶骨架中重要的糖，其含量影响分子的柔顺性。芦荟果胶还含有一种稀有的糖，即 3-甲氧基-鼠李糖，其他任何果胶均未描述过该糖。芦荟果胶是天然低甲氧基的，其 DM 通常小于 30%，还可低至小于 10%。芦荟果胶的 Gal A 含量大于 70%，还可高达大于 90%。当存在钙时，芦荟果胶能够形成凝胶。一价阳离子如钠、钾和锂可促进凝胶的形成。

可以根据以下一些特征将芦荟果胶与其他果胶区别开来：

- 25 1) 高的分子量 (大于 1×10^6 Da) 和高的特性粘数 (大于 550 ml/g);
- 2) 高的鼠李糖含量 (大于 4%);
- 3) 高的半乳糖醛酸含量 (大于 90%);
- 4) 含有 3-甲氧基-鼠李糖;
- 5) 是天然 LM 的，DM 低至小于 10%;

6) 能够形成钙凝胶;

7) 能够在低温 (4°C) 下形成基于一价阳离子的凝胶。

我们发现, 通过采用体内注射或在创伤表面局部涂敷的给药途径, 未凝胶化的果胶能够在给药部位就地形成凝胶。该就地形成的凝胶是牢固的且不会流动, 正如在体外形成的钙凝胶一样, 这种凝胶明显不同于粘性的但仍可流动的水凝胶。我们发现, 芦荟果胶就地形成的凝胶特别有效, 就地形成牢固的固体凝胶所需要的芦荟果胶浓度可低至 2.5 mg/ml, 也即 0.25%w/v, 如果加入增稠剂, 该浓度还可更低。

凝胶组合物可被制成等压或等渗的, 并可调节其 pH 值至哺乳动物的体液如眼泪的 pH 值。这类体液的 pH 值和渗透压分别为 7.4 和 29 mOsm/kg (毫渗透压摩尔/千克)。在例如相当于体液的 pH 值和渗透压的条件下, 有利于将药理活性剂输送到哺乳动物需要进行药物处理的部位。选择性地, 可以在消毒条件下施用本发明的药物组合物。

尽管不希望受到任何理论的约束, 但据信果胶的就地凝胶化主要受到体液中钙离子的介导。血液的钙浓度为 8.5-10.3 mEq/dl (毫当量/分升)。NaCl 也是体液的一种常见组分, 在 NaCl 存在的条件下, 果胶的钙凝胶得到了加强。血液中含有 134 mEq/L (毫当量/升) 的 NaCl。

在以下多种试剂存在的条件下也可以在皮下注射后就地形成凝胶, 所述试剂包括小分子有机化合物、蛋白质、核酸、活细胞及其他聚合物。这表明果胶能够通过胶囊或裹夹的形式输送多种药剂。当含有溶解性不良的化合物如磺胺嘧啶银时, 仍可就地形成凝胶。给药之后, 就地形成的果胶凝胶立即表现出明显的缓释效果。在体外和体内条件下采用小分子有机模型化合物 (坚固绿) 证实了这一点。此外, 当 bFGF 与就地形成的果胶凝胶一同给药时, 观察到该凝胶周围的细胞增殖有了明显的增加。

芦荟果胶在就地凝胶化方面比现有的商品果胶更为有效, 所述商品果胶包括 LM 果胶、聚半乳糖醛酸和酰胺化 LM 果胶。只有当商品聚半乳糖醛酸或 LM 果胶的浓度高于芦荟果胶的 10 倍时, 商品聚半乳糖醛酸或 LM 果胶才能够就地形成良好的凝胶。现有的商品 LM 果胶和聚半乳糖醛酸的 Gal A 含量较低 (约 75%), 其分子量较小 ($7-14 \times 10^4$ Da), 而

且其 DM 为 20-50%。还有其他一些聚合物能够形成钙凝胶。其中的一个例子是藻酸盐。然而，藻酸盐在测试浓度下不能就地形成真正意义上的凝胶。藻酸盐是一种多糖嵌段共聚物，其由古洛糖醛酸 (G) 和甘露糖醛酸(M)组成(Moe 等, In Food polysaccharides and their applications, 287-339 5 页, Marcel Dekker, Inc., 纽约, 1995)。藻酸盐中的这两种残基以 G-链段、M-链段或交替的 MG-链段存在。只有 G-链段与钙凝胶的形成有关。根据来源的不同，总的 G 含量有很大不同。G 含量最高约为 70%。此外，生理性液体中所含的 NaCl 阻碍了藻酸盐钙凝胶的形成。

已经发现，其他一些聚合物也能就地形成凝胶。然而，为了就地形成凝胶，它们大多需要高的聚合物浓度(大于 20%)(泊洛沙姆、PEO-PLLA 10 二嵌段共聚物、PEG-PLGA-PEG 三嵌段共聚物、纤维素和乙酰邻苯二甲酸乳胶)。这些聚合物中有些不能生物降解，例如泊洛沙姆，或者在施用前需要控制温度 (PEO-PLLA 二嵌段共聚物)，或者在配制过程中需要控制温度 (普鲁尼克和 Gelrite)。热凝胶聚合物 (泊洛沙姆、普鲁尼克、 15 PEO-PLLA 二嵌段共聚物、PEG-PLGA-PEG 三嵌段共聚物和基质胶) 的缺点是在包装或贮存中的温度变化会使其在施用前发生凝胶化。此外，这类聚合物中的一些仅形成水凝胶，水凝胶是粘性但仍能流动的溶液(例如泊洛沙姆和普鲁尼克)。另外，为了发生凝胶化，一些聚合物配方需要两种不同的聚合物或需要施加第二组分。

果胶，特别是芦荟果胶比这些聚合物或组合物有利，就地形成凝胶 20 所需要的聚合物浓度很低 (约 0.25%w/v)，如果加入增稠剂，该浓度还可更低。其制备过程无须调节温度或 pH 值，也无须加入第二组分来使其就地发生凝胶化。所得的凝胶是透明的，而且当果胶浓度超过一定浓度时不会使透明度降低，而 PEG-PLGA-PEG 三嵌段共聚物和普鲁尼克存在这 25 个问题。

生物技术的发展产生了越来越多的基于蛋白质的疗法。蛋白质本身不稳定。合适的配方和输送方法对于其在体内的功效非常关键 (Langer, Nature392, 5-10, 1998; Putney 和 Burke, Nature Biotechnology (自然生物技术) 16, 153-157, 1998)。就地形成的果胶凝胶特别适合于输送蛋白

质，因为果胶的凝胶化条件比较温和。许多蛋白质试剂也希望以缓释的方式局部给药，例如，伤口愈合的生长因子和用于治疗性的血管生长的血管生长因子。这也可通过就地形成果胶凝胶来实现。当采用就地形成的芦荟果胶凝胶输送 bFGF 时，观察到凝胶周围的细胞增殖有了显著的增加。

5 本文所用的术语“生理活性剂”指在动物体内能够表现出生理反应的试剂。所述生理活性剂包括例如药理活性物质；小分子如无机化合物、有机化合物及其盐；诊断试剂；治疗试剂；核酸；肽；聚合物；小蛋白质；大蛋白质；以及活细胞。药理活性物质包括引发免疫反应的物质，例如疫苗。治疗试剂的例子包括抗菌物质、抗微生物剂、抗寄生虫剂、
10 抗生素、抗组胺剂、解充血剂、抗代谢物、抗青光眼剂、抗癌剂、抗滤过性病原体剂、抗真菌剂、抗炎剂、抗糖尿病剂、麻醉剂、抗抑郁剂、止痛剂、抗凝剂、眼药、血管生长因子、免疫抑制剂和抗过敏剂。以最终的组合物或制剂的重量计，生理活性剂的含量可在从约 0.01% 到约大于 90% 的范围内变化。生理活性剂的用量依照其类型、形式和特性而变化。

15 以组合物的总重量计，果胶质可在约 0.01% 到约 40% 的范围内变化，优选从约 0.1% 到约 20%，更优选从约 0.25% 到约 2%。果胶质的用量依赖于生理活性剂的类型、形式和特性。选择性地也可采用载体或赋形剂。

20 本发明所用的载体包括任何药用载体，例如，水；盐水；缓冲的水溶液；乳状液，如油/水乳状液；佐剂；湿润剂；片剂；和胶囊。以最终的组合物或制剂的重量计，载体可在从约 0% 到约 90% 内变化。载体的用量依赖于生理活性剂以及所述组合物或制剂的给药方式。

25 代表性的缓冲剂包括碱金属或碱土金属的碳酸盐、氯化物、硫酸盐、磷酸盐、碳酸氢盐、柠檬酸盐、硼酸盐、乙酸盐和琥珀酸盐。代表性的防腐剂包括亚硫酸氢钠、硫代硫酸钠、抗坏血酸盐、苯扎氯铵、氯丁醇、乙基汞硫代水杨酸钠、硼酸苯汞、对羟基苯甲酸酯、苄醇和苯乙醇。

于是，本发明的一个实施方式提供了用来持续释放生理活性化合物的组合物，所述组合物含有果胶和生理活性化合物，且含有或不含药用增稠剂。优选地，给动物身体施用所述组合物后，所述组合物由液体变为凝胶，从而使生理活性化合物的释放得到延缓或控制。

可以在所述配方中加入能生物降解的增稠剂例如 CMC、HPMC、藻酸钠、胶原蛋白、白明胶和透明质酸。这类增稠剂的加入不但不影响如下所述的凝胶效果，而且提供了如下优点，即增加了凝胶基质强度，以及可在低的果胶浓度下就地形成凝胶。此外，也可使用对 pH 值、离子强度和温度变化有响应的聚合物，只要它们能够与果胶凝胶产生协同作用即可。此外，可以在存在或不存在增稠剂的条件下采用不同果胶的混合物。其他增稠剂包括卡波普、Gelrite、壳聚糖和木葡聚糖。以最终的组合物或制剂的质量计，所述增稠剂可在从约 0% 到约 90% 内变化。所用的能生物降解的增稠剂的量依赖于生理活性剂以及所述组合物或制剂的使用方式。

本发明的另一个实施方式提供了一种用作医用装置的组合物，所述组合物由果胶组成，且所述组合物中含有或不含药用增稠剂。

优选所述果胶质具有钙反应性。更优选所述果胶质是 LM 果胶或聚半乳糖醛酸。进而优选所述果胶质是芦荟果胶。

可以采用凝胶形成、粘度变化和电势测定等方法来测定钙反应活性。术语“凝胶形成”指由物理和化学条件变化而引起的溶液粘度的增加。所形成的凝胶可以是粘性液体、固体或介于液体与固体之间的任何状态。通过调节聚合物的浓度或其他因素可以得到不同状态的凝胶。对于一定的用途，某种特定状态的凝胶最为适用。

可以采用多种方法给动物施用含有一种或多种治疗剂或诊断剂的就地凝胶化的果胶组合物。例如，可以给眼睛、粘膜表面或伤口局部用药。也可以不经肠的方式给药，例如经皮下、肌肉或经腹膜内注射给药。还可将其注射到器官、关节腔或肿瘤内。

可以从多种植物来源提取果胶。除柑橘和苹果外，还可以从例如土豆、葡萄、制糖甜菜和向日葵籽获得果胶。可以对果胶进行改性。例如用氨处理果胶可以得到酰胺化的果胶。可以想象，类似于芦荟果胶的果胶可存在于不同种类的植物中，或者为了增强果胶就地凝胶化的能力，根据本文所公开的原则，可以一定方式对来自不同植物源的果胶进行加工、再处理和/或改性。此外，尽管 DM 小于 50% 的 LM 果胶因具有钙反

应活性而被本发明优选采用，但是，某些 HM 果胶也以已知对钙敏感且能够形成钙凝胶，因此它们也可用来就地凝胶化 (Tibbits 等, Carbohydrate research (碳水化合物研究) 310, 101-107, 1998)。此外，还可以采用嵌段形式的脱酯 HM 果胶，该种果胶的 DM 仍大于 50%，但通过嵌段形式的脱酯化反应已经被赋予了对钙的敏感性。参见 Christensen 等的美国专利 No.6,083,540。

因此本领域的技术人员应当理解，以上述公开的具体实施方式为基础，可以对其他用来实现与本发明相同目的的结构容易地进行修改或设计。本领域的技术人员应当认识到，这类等同的结构没有偏离所附权利要求的精神和范围。

实施例 1

芦荟果胶的就地凝胶化

芦荟果胶的提取

由芦荟叶的浆液或外皮制备细胞壁纤维，从该细胞壁纤维中提取芦荟果胶。提取果胶的基本方法已有报导。见 Voragen 等, In Food polysaccharides and their applications, 287-339 页, Marcel Dekker, Inc., 纽约, 1995, 另见美国专利 No.5,929,051, 本文在此特地引用其全文供参考。采用螯合剂如 EDTA 或在包括热水、热稀酸 (HCl, pH 1.5-3) 以及冷稀碱 (NaOH 和 Na₂CO₃; pH10) 等其他条件下提取芦荟果胶。

提取之后，通过粗滤和精滤除去残余的纤维。用乙醇沉淀果胶。用乙醇溶液进一步洗涤所述果胶沉淀，然后干燥。

由该方法得到的来自浆液或外皮细胞壁纤维的芦荟果胶的特征是：分子量大于 1×10^5 Da, DM 低 (小于 50%), Gal A 含量大于 80%。优选所述分子量大于 1×10^6 Da, DM 小于 10% 以及 Gal A 含量大于 90%。

采用基于 HPLC (高效液相色谱) 的尺寸排阻色谱法以支链淀粉为基准物测定分子量。通过选择还原法 (Maness 等, Analytical Biochemistry (分析生物化学) 185, 346-352, 1990) 和基于 HPLC 的方法 (Voragen 等, Food Hydrocolloids (食物水胶体), 1, 65-70, 1986) 测定 DM。采用间羟基联苯法 (Blumenkratz,N. 和 Asboe-Hansen,G. , Analytical

Biochemistry 54, 484-489, 1973) 测定 Gal A 含量。在此全文引用上述三篇文献供参考。

芦荟果胶的就地凝胶化

首先将芦荟果胶溶解于无菌的去离子水中，然后使之与等体积的 2
5 × 生理盐水 (0.3M NaCl) 混合。芦荟果胶不易溶于盐溶液。然而，果胶一旦溶于水中，它就能够与盐溶液混合，从而得到生理离子强度。以这种方式得到的生理盐水中的果胶溶液仍然是澄清的。室温下果胶溶液可自由流动，根据聚合物浓度的不同，该果胶溶液的 pH 值为 5.0-6.0。如无特别说明不调节温度和 pH 值。根据动物使用规程，在 Swiss Webster 小
10 鼠的下腹部皮下注射该制剂 (0.05 或 0.1 ml/部位)。注射后经过不同的时间杀死小鼠，检测凝胶的形成情况。

对于施用盐水的对照组，其注射部位的皮肤肿胀长时间不消退。用外科方法切开注射部位的皮肤，发现有一块球形或椭圆形凝胶。该凝胶是清澈透明，而且是稳固的。该凝胶很容易与周围的组织分离开来。用
15 外科方法将该凝胶连同皮肤切除下来，将其在福尔马林中固定，然后剖切，用 H&E 染色，在显微镜下观察。该凝胶仅被轻微染色，但是清晰可见，该凝胶被皮肤组织包裹。在大鼠中也观察到了相同的就地凝胶化。大鼠的注射部位的肿胀不如小鼠明显，因为大鼠的皮肤较厚且被毛皮覆盖。然而，当采用外科方法将注射部位切开时，观察到了同样的就地形成的凝胶。对于小鼠，可以在其下腹部皮下注射 1 毫升芦荟果胶溶液，
20 而相应地得到了明显较大的凝胶块。

凝胶的形成受果胶浓度的影响。果胶浓度约为 0.25% (w/v) 时，得到固体的坚固的凝胶，而在约 0.1% (w/v) 下没有观察到凝胶的形成。在 0.1 到 0.25 的浓度之间得到软凝胶。

25 当用稀氢氧化钠把芦荟果胶溶液的 pH 值调节至约为 7.2 时，就地形成了凝胶。

就地凝胶化的能力依赖于芦荟果胶的分子量。当采用分子量很小 (约 3×10^4 Da) 但其 DM 和 Gal A 含量相同的芦荟果胶时，在 0.5% (w/v) 下测试没有发现就地凝胶化。

通过腹膜和肌肉途径注射之后也就地形成了凝胶，但所形成的凝胶看上去不象皮下注射之后所形成的凝胶那样均一。

实施例 2

在伤口表面局部给药之后的就地凝胶化

5 将生理盐水中的芦荟果胶制剂（0.5%，w/v）直接涂敷到小鼠或大鼠皮肤上割伤的整个创面。采用生理盐水中含有 0.5%（w/v）CMC 的制剂和商品水凝胶创伤敷料作为对照。按照动物使用规程，采用活体冲击法形成创伤。4 小时后，杀死大鼠，用外科手术方法取下创面。在福尔马林中固定创面，然后切片，用 H&E 染色。采用芦荟果胶制剂在创面上明显
10 地形成了凝胶层，而采用 CMC 的制剂和商品水凝胶创伤敷料时则没有形成凝胶层。

实施例 3

由钙离子介导的果胶就地凝胶化

血液和泪液等体液中含有钙离子（8.5-10.3 mEq/dl 血液）。由于芦荟果胶形成钙凝胶，所以通过采用体外凝胶体系，用动物血清模拟凝胶的就地形成，从而检测钙在芦荟果胶的就地凝胶化中的作用。这种体外测试方法被称为凝胶正面迁移测试，其中，将动物血清置于玻璃管底部，将芦荟果胶溶液平铺在该血清的顶部（根据试验溶液与果胶溶液的密度关系，也可将果胶溶液置于管的底部）。在光源下观察时，由于果胶相中
15 形成的凝胶浑浊度增加，所以可将形成的凝胶与从果胶溶液区别开来。
20 而且，如果形成了凝胶，将管倾斜时界面不发生移动。

采用组织培养级的正常小牛血清。将 2 毫升血清置于玻璃管底部（0.8 × 11 cm），并将 1 毫升果胶溶液（0.5-0.75%，w/v）置于该血清顶部。在接触线或界面处立即形成了凝胶，经过一段时间，凝胶相或凝胶的前部
25 逐步向上伸入果胶溶液中。然而，如果首先用盐水透析血清，或向血清中加入 EDTA（二价阳离子的螯合剂）或 EGTA（钙离子的专用螯合剂），直至最终浓度为 10mM，这时没有观察到凝胶的形成。这表明钙是导致果胶的就地凝胶化的原因。

当采用经过肝素化的小鼠全血或从其中分离除去血浆时，也发生了

果胶的就地凝胶化。

实施例 4

果胶与其他体液的就地凝胶化

除了血清或血液之外，还有许多其他类型的体液，例如泪液。为了
5 测定果胶是否与其他体液也发生就地凝胶化，采用实施例 3 所述的凝胶
正面迁移测试法以及芦荟果胶（0.25%的盐水溶液）。

对腹膜液发生了凝胶化。在此情形下，所用的腹膜液是为了形成单
克隆抗体而注射了杂种细胞的小鼠的腹水。

对模拟的体液也发生了凝胶化。它们是：

10 1) 泪液(每 100 ml 含有 0.68 g NaCl、0.22 g NaHCO₃、0.008 g CaCl₂
•2H₂O 和 0.14 g KCl。参见 Stjernschantz 和 Asitin, in Edman, P. (编者),
“Biopharmaceutics of Ocular Drug Delivery (眼睛给药的生物制药学)”,
CRC Press, Boca Raton, 1-15 页, 1993。或者, 每 100 ml 含有 0.268 g 牛
血清白蛋白、0.268 g 溶解酵素、0.134 g 球蛋白、0.008 g CaCl₂•2H₂O、
15 0.650 g D-葡萄糖和 0.658 g NaCl。参见 Cohen 等, Journal of Controlled
Release 44, 201-208, 1997);

20 2) 肺津(每 100 ml 含有 0.01 g MgCl₂•6H₂O、0.61 g NaCl、0.03 g KCl、
0.027 g Na₂HPO₄•7H₂O、0.007 g Na₂SO₄、0.018 g CaCl₂•2H₂O、0.095 g
NaHC₂O₂•3H₂O、0.26 g NaHCO₃ 和 0.01 g Na₃H₅C₆O₇•2H₂O。参见 Fisher
25 和 Briant, Radiation Protection Dosimetry (放射保护的放射量测定), 53,
263-267, 1994); 和

25 3) 鼻分泌物(每 100 ml 含有 0.867 g NaCl、0.44g Na₂HPO₄、0.108 g
NaH₂PO₄、0.058 g CaCl₂•2H₂O 、0.31 g KCl 和 0.636 g 白蛋白。参见 Lorin
等, Journal of Laboratory Clinical Medicine (实验临床医学杂志), 2,
275-267, 1994)。

实施例 5

NaCl 促进果胶的钙凝胶化

血液和泪液等体液中含有钠离子 (135-146 mEq/L 血液)。在缓冲或
未经缓冲的生理盐水 (0.15 M NaCl) 或等渗溶液中制备局部或不经肠施

用的药理学制剂。已经发现 NaCl 可促进 LM 果胶的钙凝胶化。为了确定是否对于芦荟果胶也有相同的作用，采用了相同的凝胶正面迁移测试法。在 0.15 M NaCl 中制备芦荟果胶溶液 (0.5%, w/v)，将该溶液置于管的底部，再将 100 mM CaCl₂ 溶液 (0.05 ml) 置于所述果胶溶液的顶部。经过 5 一段时间，所形成的凝胶向下延伸到果胶溶液内。加入 CaCl₂ 18 小时后测定凝胶正面的迁移。结果显示，在 NaCl 存在下凝胶正面的迁移较快，即 NaCl 的存在促进了芦荟果胶的钙凝胶化 (图 1)。NaCl 的效果还与其剂量有关；在 0.15 M 的 NaCl 中比在 0.05 M 的 NaCl 中凝胶形成的速度快。

10 这些研究结果与此前关于其他 LM 果胶的研究结果一致 (Garnier 等, Carbohydrate Research 240, 219-232, 1993; 256, 71-81, 1994)。图 1 是 NaCl 与芦荟果胶的钙凝胶化的关系的柱状图。

实施例 6

在低的果胶浓度下果胶的就地凝胶化较快

15 采用上述的凝胶正面迁移测试法。将在盐水 (1 ml) 中不同浓度的芦荟果胶加到正常小牛血清 (2 ml) 上。室温下 18 小时后，测定所形成的凝胶的长度。不论果胶浓度如何，在接触相都能立即发生凝胶化。然而，不同的果胶浓度下在一段时间内凝胶长度的增长速度不同。我们发现，果胶浓度越低，凝胶化速度越快；在 0.05% (w/v) 下所形成的凝胶 20 长度比在 0.5% (w/v) 下的长度大将近 5 倍 (图 2)。在低浓度 (小于 0.2%，w/v) 下所形成的凝胶要松软的多，强烈的搅拌就可将其破坏。

当采用氯化钙溶液替代血清时，也观察到了同样的结果。这表明在较低的果胶浓度下果胶的钙凝胶化速度增加了。

实施例 7

25 其他聚合物或增稠剂的加入促进了果胶的就地凝胶化

采用上述的凝胶正面迁移测试法。将 HEC (0.45%, w/v)、CMC (0.45%, w/v) 或藻酸钠 (0.45%, w/v) 等聚合物与芦荟果胶 (0.05%, w/v) 混合。尽管藻酸钠能够在体外条件下与 CaCl₂ 溶液形成钙凝胶，但是藻酸钠不与血清就地形成凝胶。将 1 ml 的聚合物溶液加到 2 ml 的正常

小牛血清上。室温下 18 小时后，测定所形成的凝胶的长度。结果显示，其他聚合物的加入没有影响果胶就地凝胶化的速度（图 3A 和 3B）。当将所述聚合物与芦荟果胶以不同比例（0.4% 对 0.1%）混合时也观察到了同样的结果。

5 在体外的小鼠模型中，芦荟果胶（0.375%，w/v）和 CMC（0.375%，w/v）在盐水中的混合物在皮下注射后就地形成了凝胶。此外，增稠剂（0.4% 或 0.3%（w/v）的藻酸钠或 HEC）的加入使得有可能在低的芦荟果胶浓度（0.1% 或 0.2%，w/v）下就地形成较好的凝胶，此时就地形成凝胶要么是松软的，要么在单独使用芦荟果胶时没有就地形成凝胶（实施例 1）。

实施例 8

与其他果胶和藻酸盐的比较

实验中采用能够发生钙凝胶化的 LM 果胶。这类果胶包括来自柑橘的 DM 为 28% 的 LM 果胶；一种由苹果果胶制得的聚半乳糖醛酸（DM=0），
15 该两者均来自 Sigma Chemical Co.（西格玛化学公司）；和一种 DM 为 28-34% 的、DA（酰胺化度）为 16-22% 的酰胺化果胶。使用前将其溶解于去离子水，过滤并用乙醇沉析，然后干燥。

如实施例 1 所述，通过皮下途径在小鼠上进行就地凝胶化实验。每个试样为在两只小鼠上的四个部位进行注射。结果显示，皮下注射之后，
20 当它们的浓度均为 1.0 或 1.65%（w/v）时，均没有观察到凝胶的就地形成，而是仅观察到有斑点状的凝胶物质。然而，当在较高的浓度（3.0 或 3.3%，w/v）下进行试验时，采用聚半乳糖醛酸和酰胺化的 LM 果胶均得到了良好的凝胶。

类似地，实施例 1 中所述的低分子量的芦荟果胶在高浓度下（2.5%，
25 w/v）也发生了就地凝胶化。

还试验了 DM 为 64% 的 HM 柑橘果胶。其制备方法与 LM 果胶的制备方法相同。HM 果胶在 3%（w/v）的浓度下没有观察到凝胶的形成。
· 注射部位潮湿而且有水，没有观察到固体凝胶块。

还试验了藻酸盐，包括浓度为 0.5% 的 Keltone HVCR 和 G 含量高的

藻酸盐 Manugel DMB (G 含量, 60-70%)。皮下注射 4 小时后进行检测, 仅发现了斑点状的凝胶物质, 这表明大多数物质扩散掉了, 而没有发生凝胶化。在上述的体外凝胶化试验 (实施例 7) 中, 藻酸盐对于正常小牛血清也没有形成凝胶。综合这些结果表明, 在相同条件下, LM 果胶、聚半乳糖醛酸、酰胺化的 LM 果胶和藻酸盐比芦荟果胶就地凝胶化的效率低很多。

实施例 9

通过就地形成的果胶凝胶输送生理活性剂

对于采用就地形成的凝胶输送药物来说, 必须在药物或诊断剂存在下发生凝胶化。于是, 在生理盐水中使各种化合物或药剂与芦荟果胶混合, 使得最终的果胶浓度为 0.5 (w/v)。这些化合物或药剂为小分子有机化合物 (坚牢绿, 808 Da, 10 mg/ml)、小蛋白 (bFGF, 17 kDa, 10 μ g/ml)、中蛋白 (牛的血清白蛋白, 66 kDa, 10 mg/ml)、大蛋白 (牛的 I 型胶原蛋白, 2 mg/ml)、核酸 (Lamda DNA Hind III 片段, 200 μ g/ml)、聚碳酸酯 (CMC, 0.5%, w/v) 和 Raw 264.7 细胞 (小鼠的巨噬细胞系, 1×10^8 /ml)。给小鼠皮下注射上述混合物。注射后 4 小时检测凝胶的形成。结果显示, 与单独采用芦荟果胶进行对照, 在所测试的所有药剂存在下均形成了凝胶。所采用的药剂的浓度是测试的浓度, 而不是其可能的最大浓度。

此外, 通过凝胶正面迁移测试, 在以下物质存在下也发生了 0.5% (w/v) 的芦荟果胶溶液的就地凝胶化: 1) 0.1% (w/v) 的碘胺嘧啶银, 这是一种常用来处理伤口的溶解性不良的抗菌剂; 2) 0.5% (w/v) 的羟乙基纤维素 (HEC); 和 3) 0.5% (w/v) 的藻酸钠 (Keltone HVCR, Kelco)。如实施例 6 所述, 0.5% (w/v) 的 HEC 或藻酸钠的存在不影响就地凝胶化的效率。

于是, 采用如此多种不同的药剂均发生了就地凝胶化这一事实表明, 可以采用就地形成的果胶凝胶来输送多种药剂。

实施例 10

体外条件下小分子有机化合物从就地形成的果胶凝胶中的缓慢释放治疗剂和诊断剂的分子量变化有很大, 即从约 100 Da 到超过 10,000

Da。通常，化合物越小，越难达到缓释效果。此处选用小分子有机化合物作为试验模型。这是一种染料，即坚牢绿，其分子量为 808，其被广泛用于食品和制药工业。在盐水中将该染料与芦荟果胶 (0.5%，w/v) 混合，使得浓度为 1 mg/ml。仅将 1 mg/ml 的染料的盐水溶液作为对照。将 1 毫升的染料/果胶制剂或对照物置于装有 12 kDa 镐分的透析管（直径为 1 cm）中。然后将装有试样的透析管置于 30 ml 玻璃管中的 25 ml 正常小牛血清中。在加入了染料/芦荟果胶溶液的一支血清管中再加入 EDTA，直至最终浓度为 10 mM，以便阻止钙凝胶化的发生。在旋转振荡器上以 100 rpm 的转速摇晃装有试样的血清管。在不同的时间点取少量血清 (100 μl) 作为试样。通过在 620 nm 下测定 OD 来确定释放到血清中的染料的量。采用血清试样和已知量的坚牢绿来建立标准曲线。结果显示，在所测定的各个时间点上，从对照物和带有 EDTA 的染料/芦荟果胶（未形成凝胶）释放出的坚牢绿的量近似，而从不带 EDTA 的染料/芦荟果胶（形成凝胶）释放出的染料的量显著较低 ($p < 0.05$ ；斯式 t-检验) (图 4)。这表明芦荟果胶的存在及其凝胶化显著降低了化合物的释放速度。

实施例 11

皮下注射后小分子有机化合物从就地形成的果胶凝胶中的缓慢释放
为了测定上述观察到的缓释是否能在体内条件下实现，给小鼠皮下注射溶于生理盐水中的坚牢绿 (1 mg/ml) / 芦荟果胶 (0.5%，w/v)，或只注射溶于生理盐水中的坚牢绿。4 小时后检测注射部位 (每个试样两个部位)。我们发现在果胶存在的条件下就地形成了凝胶，该凝胶保持了染料，尽管颜色不如注射之前的初始制剂的强烈。相比之下，对照组的注射部位没有颜色，于是没有保持染料。因此，就地形成的果胶凝胶保持了染料，并且事实上延缓了体内条件下的释放。

实施例 12

通过就地形成的芦荟果胶凝胶局部给药

对于在围绕给药部位的组织上产生局部效果的生长因子而言，它们需要在基质中释放，以便使它们能够以缓慢或持续的方式被释放。它们在盐水或缓冲液中的释放效果不好。本实施例采用了生长因子 (bFGF)。

已知 bFGF（基本纤维原细胞生长因子，或 FGF-2）是一种已知的能够刺激纤维原细胞增殖和血管生长或血管形成的生长因子。在生理盐水中将其与芦荟果胶（0.5%，w/v）混合，使得浓度为 1-10 $\mu\text{g/ml}$ ，然后在小鼠下腹部的左侧或右侧皮下注射该混合物。其中一侧注射对照物（仅为果胶），另一侧注射含有 bFGF 的制剂。在第 5-10 天从两只小鼠上连皮摘取就地形成的凝胶，并将其在福尔马林中固定，切片后用 H&E 染色。在凝胶的两端选择两个相同的区域，这两个区域垂直地位于凝胶表面与皮肤肌肉层之间，且从凝胶的侧端水平向内 510 μm ，采用 NIH 的成像软件对每个凝胶的这两个选定区域进行计数。结果显示，用 bFGF 处理过的比对照物的细胞数高出 2 倍（图 5）。而且观察到 bFGF 浓度高（10 $\mu\text{g/ml}$ ）时凝胶周围的血管形成增加了。这表明 bFGF 从就地形成的凝胶中释放出来，并在周围的组织中发挥了其功能。

实施例 13

干燥的果胶组合物的就地凝胶化

在水中制备芦荟果胶和 CMC（分别为 0.75 重量%）的混合物，使 CMC 的浓度为 1.5%，分别在称量盘中将该混合物冻干。将干燥物切成圆片（直径约 1 cm，厚度约 3 mm），然后浸入装有 10 ml 正常小牛血清的有盖的培养皿中。芦荟果胶/CMC 圆片形成了一种清澈的凝胶，该凝胶在该试验结束后 4 天仍未发生变化，而仅含有 CMC 的圆片在同样条件下在几个小时内就被溶解或消失了。于是，该结果显示，干燥状态的果胶在浸入体液后也能形成凝胶。

实施例 14

就地形成的果胶凝胶在药物输送中的应用：配制方法

可以采用就地形成的果胶凝胶来提供一种生理上可接受的组合物，所述组合物含有治疗剂或诊断剂以及低浓度的凝胶聚合物（果胶），所述组合物具有与体液相同的 pH 值和渗透压，所述组合物在施用后可由液体转变为凝胶。

制备液体制剂的方法包括如下步骤：

1. 将果胶溶解于无菌的水中；

2. 制备缓冲的或非缓冲的盐水；
3. 混合两种溶液；
4. 将生理活性化合物加入到步骤 3 的制剂中。

作为替代方法，也可将生理活性剂加入混合之前的任一溶液中。除了水和缓冲或非缓冲的盐水或水溶液之外，还可以使用其他药用载体，其中包括乳状液如油/水乳状液、佐剂、各种类型的湿润剂、片剂和胶囊。

采用适当的缓冲剂如硼酸-硼酸钠、磷酸氢二钠-磷酸二氢钠、和 Tris-HCl 调节该制剂的 pH 值。用盐例如 NaCl、KCl 和 MgCl₂以及其他渗透压调节剂如山梨醇、蔗糖、甘油和甘露糖醇等将制剂的渗透压调节至接近于体液的渗透压。

可以加入药用增稠剂。增稠剂可以是 CMC、HPMC、HEC、藻酸盐、白明胶、葡聚糖、环糊精或透明质酸。

该制剂可以在室温或冷藏（4°C）条件下保存。如果该制剂含有约 0.15 M 的 NaCl，则当其在 4°C 贮存时会形成（钠）凝胶。施用前，可以将凝胶在室温下复原到溶液中。颗粒状的药物或治疗剂易于聚集成团，将颗粒状的或如磺胺嘧啶银等低水溶性的药物保存在凝胶基质中是有利的，因为凝胶可以阻止凝聚或沉淀的形成。

作为替代方法，也可以干燥的形式制备制剂。将果胶和生理活性剂在缓冲或非缓冲的水或盐水中的混合物冻干。作为替代方法，也可将果胶粉末与干燥的生理活性剂混合后压缩为所需的形状。干燥形式可以用作块状、片状、胶囊或粉状。

在制剂或组合物中，生理活性剂和果胶质的相对用量可以根据所需输送的特定药剂而变化。在液体配方中，药剂可在从约 0.01% 到约 50% (w/v) 的范围内，而果胶质可在从约 0.01% 到约 40% (w/v) 的范围内。在干燥的或悬浮的制剂中，药剂或果胶质均可在高达 90% (w/v) 以上。

尽管本文公开了优选的组合物或制剂以及方法，但是对于本领域的技术人员来说，根据上述教导很显然可以进行很多修改和变化。本领域的技术人员还应当认识到，这类修改和变化并不超出本发明所附的权利要求所描述的精神和范围。

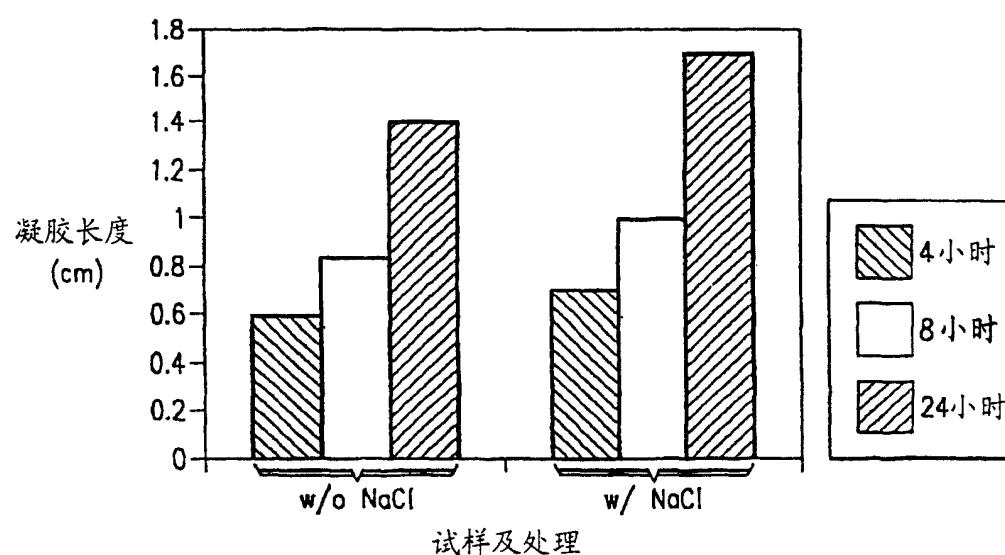


图 1

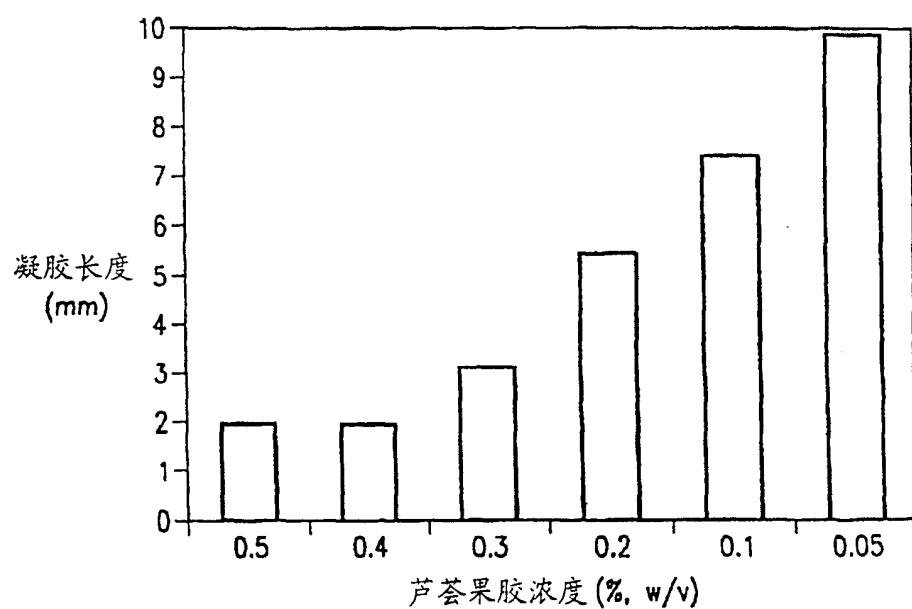


图 2

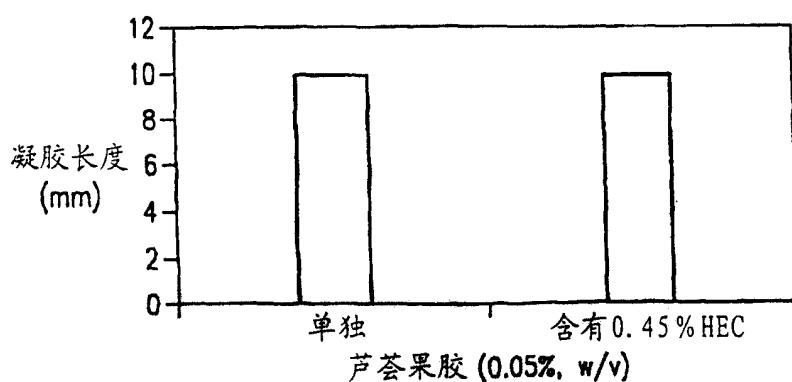


图 3A

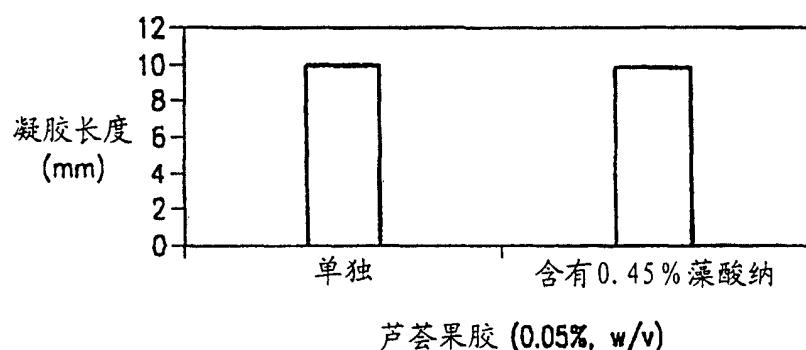


图 3B

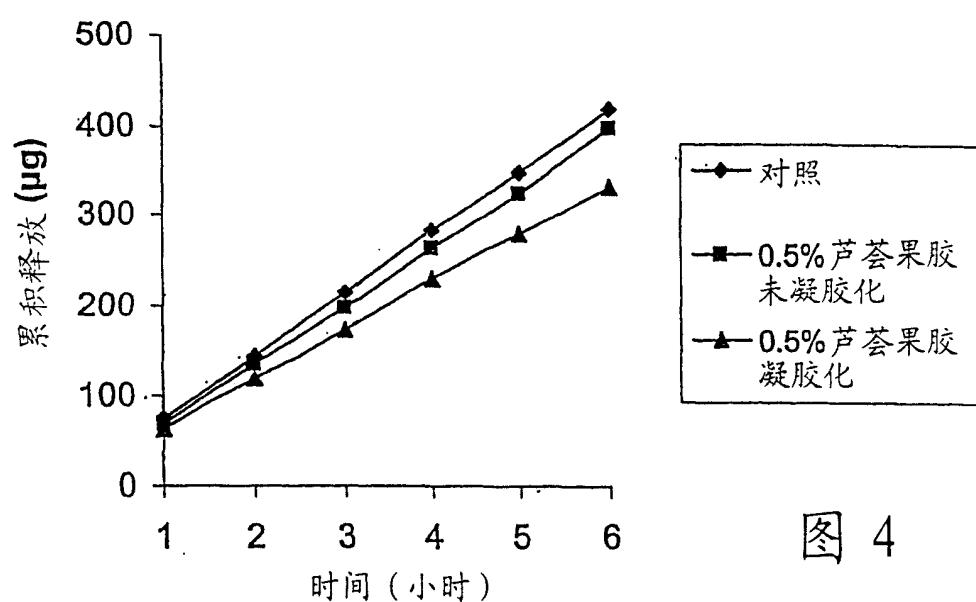


图 4

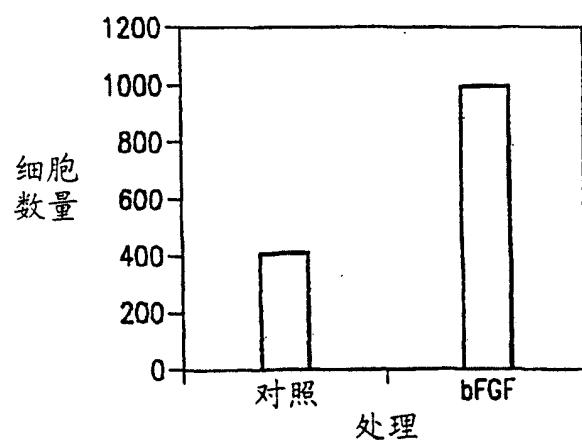


图 5