



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101360486 B

(45) 授权公告日 2012. 09. 05

(21) 申请号 200580044939. 7

A61K 45/00 (2006. 01)

(22) 申请日 2005. 12. 27

A61K 47/42 (2006. 01)

A61K 31/722 (2006. 01)

(30) 优先权数据

11/029, 082 2005. 01. 04 US

11/284, 734 2005. 11. 21 US

(56) 对比文件

CN 1379687 A, 2002. 11. 13, 说明书全文 .

(85) PCT申请进入国家阶段日

2007. 06. 26

审查员 谢京晶

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2005/047125 2005. 12. 27

(87) PCT申请的公布数据

W02006/073950 EN 2006. 07. 13

(73) 专利权人 那挪玛加医药有限公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 涂鸿生 宋信文

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

代理人 陶贻丰 郑霞

(51) Int. Cl.

A61K 38/00 (2006. 01)

A61K 9/50 (2006. 01)

A61K 38/28 (2006. 01)

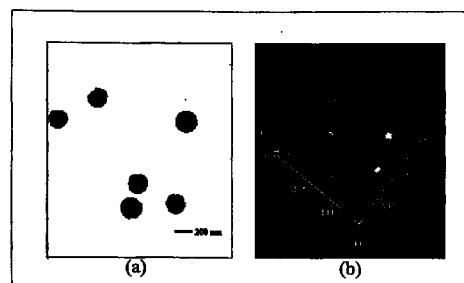
权利要求书 2 页 说明书 14 页 附图 6 页

(54) 发明名称

用于蛋白质药物递送的毫微粒

(57) 摘要

本发明公开了一种毫微粒,其由壳聚糖、聚 γ 谷氨酸以及至少一种生物活性剂组成,所述毫微粒以正表面电荷及其对于旁细胞药物递送增强渗透性进行表征。



1. 一种用于患者的毫微粒制剂,其特征在于促进肠内旁细胞输送,每个毫微粒包括为至少一种生物活性剂的第一组分、为聚 γ -谷氨酸的带负电荷的第二组分及为具有 80kDa 或更低分子量的低分子量壳聚糖的第三组分,其中所述第三组分占据所述毫微粒的表面。

2. 根据权利要求 1 所述的制剂,其中所述毫微粒中的所述壳聚糖与所述聚 γ -谷氨酸的重量比为 0.75 : 0.167 或更高。

3. 根据权利要求 1 所述的制剂,其中所述第一组分为胰岛素。

4. 根据权利要求 1 所述的制剂,其中所述第一组分为胰岛素和所述第二组分为聚 γ -谷氨酸,其中三种组分的重量比为 0.083 : 0.167 : 0.75。

5. 根据权利要求 1 所述的制剂,其中所述第一组分为胰岛素,其中胰岛素载荷能力至少为所述毫微粒的 8w/w%。

6. 根据权利要求 1 所述的制剂,其中所述第一组分为胰岛素,其中胰岛素载荷能力至少为所述毫微粒的 14w/w%。

7. 根据权利要求 1 所述的制剂,其中所述毫微粒的 ζ 电位在 15 和 40mV 之间。

8. 根据权利要求 1 所述的制剂,其中所述毫微粒的 ζ 电位在 25-40mV 之间。

9. 根据权利要求 1 所述的制剂,其中所述至少一种生物活性剂为蛋白质或肽。

10. 根据权利要求 1 所述的制剂,其中所述毫微粒进一步包囊于胶囊中。

11. 根据权利要求 10 所述的制剂,其中所述胶囊的表面包括甘油。

12. 根据权利要求 10 所述的制剂,其中所述胶囊的表面是亲水的。

13. 根据权利要求 1 所述的制剂,其中所述第三组分被交联。

14. 根据权利要求 1 所述的制剂,其中所述第三组分以低于 50% 的交联度进行交联。

15. 根据权利要求 1 所述的制剂,其中所述第三组分与交联剂进行交联,所述交联剂选自京尼平及其衍生物、立体异构体和其混合物。

16. 根据权利要求 1 所述的制剂,其中所述壳聚糖进一步与聚丙烯酸进行接枝。

17. 根据权利要求 1 所述的制剂,其中所述壳聚糖具有低于 40kDa 的分子量。

18. 根据权利要求 1 所述的制剂,其中所述毫微粒具有 100 和 300 纳米之间的平均粒度。

19. 根据权利要求 1 所述的制剂,其中所述毫微粒经由简单和温和的离子胶凝化法形成。

20. 根据权利要求 1 所述的制剂,其中所述毫微粒经由口服施用被递送至患者。

21. 根据权利要求 1 所述的制剂,其中所述毫微粒经由血管施用被递送至患者。

22. 根据权利要求 21 所述的制剂,其中所述至少一种生物活性剂是阿尔茨海默拮抗剂。

23. 根据权利要求 1 所述的制剂,其中所述壳聚糖与甲基、烷基、聚乙二醇 (PEG) 或肝素进行接枝。

24. 根据权利要求 1 所述的制剂,其中所述至少一种生物活性剂是选自由蛋白质、肽、核苷、核苷酸、抗病毒剂、抗肿瘤剂、抗生素和抗炎药组成的组。

25. 根据权利要求 1 所述的制剂,其中所述至少一种生物活性剂是选自由降钙素、环孢菌素、胰岛素、催产素、酪氨酸、脑啡肽、促甲状腺激素释放激素、卵泡刺激素、促黄体激素、加压素及加压素类似物、过氧化氢酶、超氧化物歧化酶、白细胞介素 II、干扰素、集落刺激因

子、肿瘤坏死因子和促黑色素细胞激素组成的组。

26. 根据权利要求 1 所述的制剂,其中所述至少一种生物活性剂是选自由促肾上腺皮质激素、催乳素、促黄体素释放素、生长激素、生长激素释放因子、生长激素抑制素、胰高血糖素、胃泌素、四肽胃泌素、五肽胃泌素、尿抑胃素、分泌素、降钙素、脑啡肽、内啡肽、血管紧张素、肾素、缓激肽、杆菌肽、多粘菌素、粘菌素、短杆菌酪肽、短杆菌肽及合成的类似物、单克隆抗体、以及可溶解的疫苗组成的组。

27. 根据权利要求 1 所述的制剂,其中所述至少一种生物活性剂是亲水性大分子。

28. 促进肠内旁细胞输送的毫微粒,其包括带正电荷的壳聚糖和带负电荷的聚 γ -谷氨酸,其中两种聚电解质之间的静电相互作用即刻导致长疏水片段的形成,由此生成高度中性化的络合物,所述络合物分隔成所述毫微粒,并且其中所述壳聚糖为具有 80kDa 或更低分子量的低分子量壳聚糖,所述毫微粒是通过将 pH7.4 的 γ -谷氨酸水溶液添加至 pH6.0 的壳聚糖水溶液中而获得的胶状的毫微粒。

29. 根据权利要求 28 所述的毫微粒,其中所述壳聚糖与所述聚 γ -谷氨酸的重量比为 0.75 : 0.167 或更高。

30. 根据权利要求 28 所述的毫微粒,其中所述毫微粒还包括至少一种生物活性剂。

31. 根据权利要求 28 所述的毫微粒,其中所述毫微粒的所述表面的特征为具有正表面电荷。

32. 根据权利要求 28 所述的毫微粒,其中所述毫微粒的 ζ 电位在 15 和 40mV 之间。

33. 根据权利要求 28 所述的毫微粒,其中所述毫微粒的 ζ 电位在 25-40mV 之间。

34. 根据权利要求 28 所述的毫微粒,其中所述毫微粒进一步包囊于胶囊中。

35. 根据权利要求 34 所述的毫微粒,其中所述胶囊的表面包括甘油。

36. 根据权利要求 28 所述的毫微粒,其中所述毫微粒与一种或多种赋形剂一起制成片剂。

37. 毫微粒在制备用于在动物受治疗者中促进肠内旁细胞输送至少一种生物活性剂的药物中的用途,其中每个毫微粒包括为所述至少一种生物活性剂的第一组分、为聚 γ -谷氨酸的带负电荷的第二组分及为具有 80kDa 或更低分子量的低分子量壳聚糖的第三组分,其中所述第三组分占据所述毫微粒的表面。

38. 根据权利要求 37 所述的用途,其中所述药物经由口服施用被施用至动物受治疗者中用于促进所述肠内旁细胞输送。

用于蛋白质药物递送的毫微粒

[0001] 相关申请的交叉参照

[0002] 本申请要求 2005 年 1 月 4 日提交的、题为“用于旁细胞药物递送的毫微粒”的美国专利申请序列号 11/029,082 的优先权,通过引用将其全部内容并入本文。

发明领域

[0003] 本发明涉及由壳聚糖 / 聚 γ 谷氨酸与蛋白质药物组成的毫微粒作为药物递送系统的医疗用途,所述药物递送系统具有增强的旁细胞药物递送能力。

[0004] 发明背景

[0005] 大量生产药用活性的肽与蛋白质是可行的 (Biomacromolecules 2004 ;5 : 1917-1925)。认为口服是对于患者最便利的药物施用方式。尽管如此,肠上皮却是亲水性药物如肽和蛋白质的主要屏障 (J. Control. Release 1996 ;39 :131-138)。这是因为亲水性药物不能通过脂质双层细胞膜轻易地扩散过细胞。已致力于改善亲水性药物的旁细胞输送 (paracellular transport) (J. Control. Release 1998 ;51 :35-46)。亲水性分子经由旁细胞途径 (paracellular pathway) 的输送受到紧密连接存在的极大限制,所述紧密连接位于临近的上皮细胞的向腔方位 (Annu. Rev. Nutr. 1995 ;15 :35-55)。这些紧密连接形成了限制亲水性分子旁细胞扩散的屏障。紧密连接的结构和功能以及其他的事物在 Ann. Rev. Physiol. 1998 ;60 :121-160 和在 Ballard TS 等人的、Annu. Rev. Nutr. 1995 ;15 :35-55 中描述。虽然紧密连接并没有形成严密的屏障,但在通过肠上皮从内腔至血流的扩散中却起到了关键作用,并且反之亦然。

[0006] 通过紧密连接在细胞间转运溶质称为旁细胞输送 (paracellular transport),所述紧密连接将细胞一起结合成像胃肠道上皮细胞一样的层。旁细胞输送是被动的。旁细胞输送依赖于由跨细胞输送产生的电化学梯度以及依赖于通过紧密连接的溶剂牵拉作用。紧密连接形成细胞间屏障,其隔离细胞层的顶端和基底外侧液体隔室。溶质通过紧密连接从顶端至基底外侧隔室的转运取决于紧密连接对该溶质的“严密性”。

[0007] 对作为药物递送载体的聚合毫微粒进行了广泛地研究 (Biomaterials 2002 ;23 : 3193-3201)。由于合成的、生物可降解的聚合物具有良好的生物相容性,因此更致力于研究由它们制成的毫微粒 (J. Drug Delivery 2000 ;7 :215-232 ;Eur. J. Pharm. Biopharm. 1995 ; 41 :19-25)。然而,因为这些毫微粒的疏水性能,使得它们不能成为亲水性药物的理想载体。已知有机溶剂可引起肽或蛋白质药物的降解,所述肽或蛋白质药物是不稳定的并且对它们的环境敏感 (J. Control. Release 2001 ;73 :279-291)。

[0008] 继口服药物递送后,蛋白质药物即将被胃中的低 pH 胃介质降解。蛋白质药物继口服施用后的吸收具有下述不利之处:高分子量、亲水性以及对酶失活的易感性。在肠上皮的蛋白质药物不能分配入疏水膜,因此只能经由旁细胞途径穿过上皮屏障。但是,紧密连接形成了限制亲水性分子旁细胞扩散的屏障。

[0009] 通常,通过碱性的脱乙酰作用由壳多糖获得壳聚糖 (CS)、阳离子的多糖 (J. Control. Release 2004 ;96 :285-300)。据文献报道,CS 是无毒的并且是软组织相容的

(Biomacromolecules 2004 ;5 :1917-1925 ;Biomacromolecules2004 ;5 :828-833)。此外,已知 CS 具有粘附至粘膜表面并暂时打开上皮细胞间紧密连接的特定特征 (Pharm. Res. 1994 ; 11 :1358-1361)。大部分可商购获得的 CS 具有相当大的分子量 (MW) 并且需要溶解于 pH 值约 4.0 或更低的乙酸溶液中,有时候这是不切实际的。

[0010] γ -PGA 是一种阴离子肽,是天然的化合物,其作为囊状物质或粘质通过芽胞杆菌属的成员产生 (Crit. Rev. Biotechnol. 2001 ;21 :219-232)。因为 γ -PGA 由天然形成的 L 谷氨酸通过酰胺键连接在一起组成,所以 γ -PGA 是独一无二的。据文献报道,这种天然形成的 γ -PGA 是水溶性的、生物可降解的和无毒的聚合物。通常通过使用溴化氢除去苯甲基保护基团由聚 (γ -苯甲基-L-谷氨酸酯) 来合成 α -PGA。

[0011] Thanou 等人报道了将壳聚糖及其衍生物作为肠内吸收促进剂 (Adv Drug Deliv Rev 2001 ;50 :S91-S101)。当壳聚糖在酸性 pH 质子化时,其能够增强肽药物经过粘膜上皮的旁细胞渗透性。发现壳聚糖或三甲基氯化壳聚糖与肽药物的联合施用与无壳聚糖组分的施用相比,潜在地提高了肽在动物中的生物利用度。

[0012] 发明概述

[0013] 本发明的某些方面涉及新型的毫微粒系统,其由亲水性的壳聚糖和聚 γ 谷氨酸水凝胶组成,所述亲水性的壳聚糖和聚 γ 谷氨酸水凝胶经由简单的离子胶凝化法制备。这种毫微粒技术在没有使用有害溶剂的温和条件下使用。而且,如果能够给出低 MW 的 CS 的话,就可在接近生理范围的 pH 值使用 CS 的聚阳离子特性以及优良的溶解度。在生理 pH 范围加载肽或蛋白质药物将能保持它们的生物活性。在此基础上,此处公开了一种用于制备本发明的毫微粒的低分子量 CS,其通过使用纤维素酶对商购获得的 CS 解聚获得。

[0014] 本发明的一个目的在于提供一种新型的用于旁细胞输送药物递送的毫微粒系统及其制备方法,所述方法使用简单和温和的离子胶凝化法,将聚 γ 谷氨酸 (γ -PGA) 溶液加入低分子量的壳聚糖 (低 MW CS) 溶液中。在一个实施方案中,在保持蛋白质和肽药物生物活性的 pH 具有适宜溶解度的、本发明的低 MW CS 的分子量约为 80kDa 或更低,优选约 40kDa。按规定,具有约 30-50kDa 分子量的壳聚糖粒子是肾惰性的。通过所制备的毫微粒的构成组分来控制它们的粒度和 ζ (zeta) 电位值。由 TEM (透射电子显微镜) 和 AFM (原子力显微镜) 检验获得的结果表明所制备的毫微粒的形态一般为球形。在 Caco-2 细胞单层中对所制备的毫微粒促进肠内旁细胞输送的评价进行了体外研究。在本发明的某些方面,提供了 CS 占据其表面的毫微粒,从而有效地降低 Caco-2 细胞单层的跨上皮细胞电阻 (TEER)。激光扫描共聚焦显微镜 (CLSM) 的观察结果证实 CS 占据其表面的毫微粒能够打开 Caco-2 细胞之间的紧密连接并允许经由旁细胞途径输送所述毫微粒,上述内容在 Sung 及其同伴的论文中得到证实 (Biomacromolecules 2005 ;6 :1104-1112)。

[0015] 本发明的某些方面涉及促进肠内或脑血旁细胞输送的方法,所述方法经设置用于在患者中递送至少一种生物活性剂,包括施用由 γ -PGA 和壳聚糖组成的毫微粒,其中施用毫微粒的步骤可经由口服施用或血管注射实现。在一个实施方案中,壳聚糖占据毫微粒的表面。在另一个实施方案中,毫微粒的表面使用正表面电荷进行表征。

[0016] 在另外的实施方案中,毫微粒的壳聚糖为低分子量的壳聚糖,其中低分子量的壳聚糖具有约为 80kDa 的分子量,优选具有低于约 50kDa 的分子量,且最优选约 40kDa 或更低。

[0017] 在另外的实施方案中,毫微粒的平均粒度在约 50 和 400 纳米之间,优选在约 100 和 300 纳米之间,且最优选在约 100 和 200 纳米之间。

[0018] 在某些实施方案中,将毫微粒加载至少一种治疗有效量的生物活性剂,其中所述生物活性剂选自蛋白质、肽、核苷、核苷酸、抗病毒剂、抗肿瘤剂、抗生素和抗炎药。此外,生物活性剂还可选自降钙素、环孢菌素、胰岛素、催产素、酪氨酸、脑啡肽、促甲状腺激素释放素(thyrotropin releasing hormone)、卵泡刺激素、促黄体激素、加压素及其类似物、过氧化氢酶、超氧化物歧化酶、白细胞介素 II、干扰素、集落刺激因子、肿瘤坏死因子和促黑色素细胞激素。在一个优选的实施方案中,生物活性剂为阿尔茨海默拮抗剂。

[0019] 本发明的某些方面涉及毫微粒的口服制剂,其可有效地促进肠内或脑血旁细胞输送,所述口服制剂包括 γ -PGA 和低分子量的壳聚糖,其中所述壳聚糖占据所述毫微粒的表面。本发明的某些方面涉及毫微粒的口服制剂,其可有效地促进肠内或脑血旁细胞输送,所述口服制剂包括在核芯中的阴性组分如 γ -PGA 或肝素以及低分子量的壳聚糖,其中所述壳聚糖占据所述毫微粒具有正电荷的表面。在另外的实施方案中,毫微粒包括至少一种生物活性剂,如胰岛素、胰岛素类似物、阿尔茨海默疾病拮抗剂、帕金森疾病拮抗剂或其他的蛋白质/肽。用于治疗阿尔茨海默疾病的生物活性剂可包括美金刚盐酸盐(麦氏大药厂的 Axura®)、多奈哌齐盐酸盐(日本卫材制药有限公司的 Aricept®)、利伐斯的明酒石酸盐(诺华公司的 Exelon®)、加兰他敏盐酸盐(强生公司的 Reminyl®)及他克林盐酸盐(美国派德药厂的 Cognex®)。胰岛素或胰岛素类似物产品的实例包括,但不限于 Humulin®(美国礼来公司)、Humalog®(美国礼来公司)及 Lantus®(安万特制药公司)。

[0020] 本发明的某些方面涉及毫微粒的口服制剂,其可有效地促进肠内或脑血旁细胞输送,所述口服制剂包括 γ -PGA 和低分子量的壳聚糖,其中使用交联剂或使用光线,如紫外线辐射对所述毫微粒进行交联。

[0021] 本发明的某些方面提供了一种毫微粒制剂,其特征为促进肠内或脑血旁细胞输送,每个毫微粒包括至少一种生物活性剂的第一组分、带负电荷的第二组分及为低分子量壳聚糖的第三组分,其中所述第三组分占据所述毫微粒的表面。在一个实施方案中,第二组分为 γ -PGA、肝素或藻酸盐。在另一个实施方案中,毫微粒制备溶液里的第一组分包含 0.075-0.091mg/ml 浓度范围的胰岛素,第二组分包含 0.150-0.184mg/ml 浓度范围的 γ -PGA,以及第三组分在 0.67-0.83mg/ml 的浓度范围。

[0022] 本发明的某些方面提供了一种毫微粒制剂,其特征为促进肠内或脑血旁细胞输送,每个毫微粒包括至少一种生物活性剂的第一组分、带负电荷的第二组分及为低分子量壳聚糖的第三组分,其中所述第三组分占据所述毫微粒的表面,其中至少一种生物活性剂为阿尔茨海默疾病拮抗剂或用于治疗阿尔茨海默疾病,所述生物活性剂选自美金刚盐酸盐、多奈哌齐盐酸盐、利伐斯的明酒石酸盐、加兰他敏盐酸盐及他克林盐酸盐。在另外的实施方案中,至少一种生物活性剂为胰岛素或胰岛素类似物。仍在另一个实施方案中,至少一种生物活性剂选自蛋白质、肽、核苷、核苷酸、抗病毒剂、抗肿瘤剂、抗生素和抗炎药。

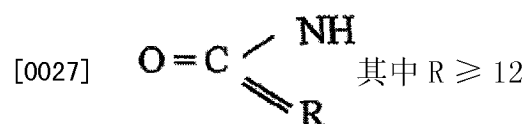
[0023] 本发明的某些方面提供了一种毫微粒制剂,其特征为促进肠内的旁细胞输送或脑血旁细胞输送,其中所述毫微粒还可包囊于胶囊锭(gelcapcapsule)、软胶囊等等。

[0024] 本发明的某些方面提供了一种毫微粒制剂,其特征为促进肠内或脑血旁细胞输送,每个毫微粒包括至少一种生物活性剂的第一组分、带负电荷的第二组分及为低分子量

壳聚糖的第三组分,其中所述第三组分占据所述毫微粒的表面,其中所述第三组分被交联。在一个实施方案中,交联度低于 50%。在另一个实施方案中,交联度范围在 1%和 20%之间。

[0025] 本发明的某些方面提供了一种毫微粒制剂,其特征为促进肠内或脑血旁细胞输送,每个毫微粒包括至少一种生物活性剂的第一组分、带负电荷的第二组分及为低分子量壳聚糖的第三组分,其中所述第三组分占据所述毫微粒的表面,其中使用交联剂对所述第三组分进行交联,所述交联剂选自京尼平 (genipin) 及其衍生物、类似物、立体异构体和混合物。在一个实施方案中,交联剂选自环氧化合物、二醛淀粉、戊二醛、甲醛、二甲亚胺、碳二亚胺、琥珀酰亚胺、二异氰酸酯、酰叠氮、无蛋白菌素、紫外线辐射、热交联 (dehydrothermal treatment)、三 (羟甲基) 磷化氢、抗坏血酸铜、葡萄糖赖氨酸 (glucose-lysine) 和光氧化剂。

[0026] 本发明的某些方面提供了一种毫微粒制剂,其特征为促进肠内或脑血旁细胞输送,其中低分子量的壳聚糖具有 80kDa 或更低的分子量。在一个实施方案中,低分子量的壳聚糖可与具有如下化学式的聚合物进一步接枝 (grafted) :



[0028] 本发明的某些方面提供了一种促进肠内或脑血旁细胞输送的方法,包括施用毫微粒制剂,其中每个毫微粒包括至少一种生物活性剂的第一组分、带负电荷的第二组分及为低分子量壳聚糖的第三组分,其中所述第三组分占据所述毫微粒的表面。在一个实施方案中,施用毫微粒制剂的步骤经由口服施用用于促进肠内旁细胞输送。在另一个实施方案中,施用毫微粒制剂的步骤经由血管施用或静脉脉管注射用于促进脑血旁细胞输送。

[0029] 附图简述

[0030] 当参考附图阅读以下的示例性实施方案的详细描述时,本发明的另外的目的和特征将变得更加显而易见并且还能更好地理解发明内容。

[0031] 图 1 显示 (a) 所制备的 CS- γ -PGA 毫微粒的 TEM 显微照片 (0.10% γ -PGA :0.20% CS) 以及 (b) 所制备的 CS- γ -PGA 毫微粒的 AFM 显微照片 (0.01% γ -PGA :0.01% CS)。

[0032] 图 2 显示所制备的 CS- γ -PGA 毫微粒对 Caco-2 细胞单层的 TEER 值的影响。

[0033] 图 3 显示胰岛素在壳聚糖与 γ -PGA 的毫微粒中的载荷能力及关联效应。

[0034] 图 4 显示胰岛素在作为参考的壳聚糖毫微粒中的载荷能力及关联效应。

[0035] 图 5 显示载有胰岛素的毫微粒的稳定性。

[0036] 图 6 显示胰岛素在体外于调节过 pH 的溶液中的代表性释放曲线。

[0037] 图 7 显示口服施用载有胰岛素的毫微粒后,胰岛素在糖尿病大鼠中的生物利用度。

[0038] 示例性实施方案的详细描述

[0039] 以下描述的、本发明的优选实施方案尤其涉及由壳聚糖 / 聚 γ 谷氨酸 / 胰岛素组成的毫微粒的制备,以及所述毫微粒通过打开上皮细胞之间的紧密连接以促进肠内或脑血旁细胞透过的渗透性。虽然所述描述阐述了各种实施方案的具体细节,但应理解的是,所述描述仅用于说明并且不应以任何方式解释为限制本发明。此外,以下描述的常规概念还可

包括本领域技术人员所作出的不同于本发明的申请及其改良。

[0040] γ -PGA 是天然形成的阴离子同质性聚酰胺,其由 L- 谷氨酸单元构成,所述 L- 谷氨酸单元经由 α 氨基与 γ 羧酸基团之间的酰胺键连接 (Crit. Rev. Biotechnol. 2001 ;21 : 219-232)。 γ -PGA 是某种芽孢杆菌的胞外聚合物,其在细胞内经由 TCA 循环生成并可自由地分泌入发酵液中。虽然 γ -PGA 可能与生产菌暴露于环境应激时存活率的提高有关,但是其确切的生物学作用并没有得到充分地认识。由于 γ -PGA 的水溶性、生物可降解性、可食用性以及对人类和环境的无毒性,所以在过去的几年里对 γ -PGA 在食品、化妆品、药物以及水处理中的一些应用进行了研究。

[0041] 实施例 1

[0042] 毫微粒制备的材料和方法

[0043] 具有约 85% 脱乙酰度的 CS ($MW \sim 2.8 \times 10^5$) 由 Challenge Bioproducts Co. (台中,台湾) 获得。乙酸、纤维素酶 (1.92 单位 /mg)、异硫氰酸荧光素 (FITC)、磷酸盐缓冲液 (PBS)、高碘酸、乙酸钠、甲醛、次硝酸铋和 Hanks 平衡盐溶液 (HBSS) 从 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) 购买。无水乙醇和酒石酸钾钠由 Merck (达姆施塔特,德国) 获得。非必需氨基酸 (NEAA) 溶液、胎牛血清 (FBS)、庆大霉素和胰蛋白酶-EDTA 由 Gibco (Grand Island, NY) 获得。Eagle's 最低必需培养基 (MEM) 从 Bio West (Nuaille, 法国) 购买。使用的其他化学物品和试剂全部为分析级。

[0044] 实施例 2

[0045] 通过酶水解的 CS 解聚作用

[0046] 根据 Qin 等人描述的方法使用酶 (纤维素酶) 对规则的 CS 进行处理得到具有某些改良的低 MW 的 CS (Food Chem. 2004 ;84 :107-115)。通过在 2% 的乙酸中溶解 CS 来制备 CS 溶液 (20g/l)。注意确保 CS 完全溶解。然后,将 CS 溶液置入容器中并使用 2N NaOH 水溶液调节至期望的 pH 5.0。随后将纤维素酶 (0.1g) 加入 CS 溶液 (100ml) 中并在 37°C 下持续搅拌 12 小时。之后,在 pH 7.0-7.2 使用 NaOH 水溶液使解聚的 CS 沉淀并使用去离子水将沉淀的 CS 洗涤三次。所得的低分子量 CS 在冷冻干燥机 (Eyela Co. Ltd, 东京,日本) 中冻干。

[0047] 通过凝胶渗透色谱 (GPC) 系统来测定解聚的 CS 的平均分子量,所述凝胶渗透色谱 (GPC) 系统配置有一套 PL 水凝胶- μ H 柱 (一根保护柱 (Guard) $8 \mu m$, $50 \times 7.5 mm$ 以及两根混合柱 $8 \mu m$, $300 \times 7.5 mm$, PL Laboratories, UK) 和屈光率 (RI) 检测器 (RI2000-F, SFD, 托兰斯, CA)。使用多糖标准品 (分子量范围 180-788,000, Polymer 实验室,英国) 建立标准曲线。流动相含有 0.01M NaH_2PO_4 和 0.5M $NaNO_3$ 并将 pH 调节至 2.0。流动相的流速为 1.0ml/min,并将柱子和 RI 检测器的传感器保持在 30°C。

[0048] 限制大部分商购获得的 CS 应用的因素是它们的高分子量以及由此在生理 pH 范围的高粘度和弱溶解度。低 MW 的 CS 克服了这些局限性并因此促成了 CS 在不同领域中的更广泛地应用。由于低 MW 的 CS 的弱抗原效应,提议将其作为胃肠外的药物载体使用 (Eur. J. Pharm. Biopharm. 2004 ;57 :101-105)。低 MW 的 CS 被用作为非病毒的基因递送系统并显示出良好的前景 (Int. J. Pharm. 1999 ;178 :231-243)。可使用一些水解酶来解聚 CS,所述水解酶的例子有溶菌酶、果胶酶、纤维素酶、菠萝蛋白酶、半纤维素酶、脂肪酶、木瓜蛋白酶等等 (Biochim. Biophys. Acta 1996 ;1291 :5-15 ;Biochem. Eng. J. 2001 ;7 :85-88 ;

Carbohydr. Res. 1992 ;237 :325-332)。在 Sung 及其同伴的论文中展示了标准 MW(也称为规则 MW)和低 MW CS 的 GPC 色谱(Biomacromolecules 2005 ;6 :1 104-1112)。已知纤维素酶催化 CS 中糖苷键的裂解(Food Chem. 2004 ;84 :107-115)。通过在 pH 7.0-7.2 使用 NaOH 水溶液使解聚的 CS 溶液沉淀来获得本研究中使用的低 MW CS。获得的低 MW CS 具有约为 50kDa 的 MW。在一个优选的实施方案中,低分子量的壳聚糖具有约为 40kDa 或更低的分子量。

[0049] 虽然 CS 在解聚前需溶解于 pH 约为 4.0 的乙酸溶液中,但是观察到所获得的低 MW CS 可轻易地溶解于 pH 6.0 的水溶液中。此外,发现低 MWCS 制备的毫微粒与它们使用高 MW(也称为标准 MW)CS(解聚前)制备的对照(counterparts)相比,具有较窄分布的、明显更小的粒度,这可归因于低 MW CS 的低粘度。作为一个实施例,0.10%的 γ -PGA 水溶液一经加入 0.20%的高 MW CS 溶液(粘度 $5.73 \pm 0.08\text{cp}$,由粘度计测量),所制备的毫微粒的平均粒度为 $878.3 \pm 28.4\text{nm}$,多分散指数 1.0,而将 0.10%的 γ -PGA 水溶液加入低 MW CS 溶液(粘度 $1.29 \pm 0.02\text{cp}$)形成的毫微粒的平均粒度为 $218.1 \pm 4.1\text{nm}$,多分散指数 0.3($n = 5$)。

[0050] 实施例 3

[0051] γ -PGA 的生产和纯化

[0052] 按照 Yoon 等人报道的方法(Biotechnol. Lett. 2000 ;22 :585-588)使用稍微改性的蕨样芽孢杆菌(ATCC 9945, Bioresources Collection and Research Center, Hsinchu, 台湾)生产 γ -PGA。高粘液型菌落(ATCC 9945a)选自 37℃下在琼脂平板的 E 培养基(E medium)(包含下述成分:L-谷氨酸,20.0g/l;柠檬酸,12.0g/l;甘油,80.0g/l; NH_4Cl , 7.0g/l; K_2HPO_4 ,0.5g/l; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,0.5g/l; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$,0.04g/l; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$,0.15g/l; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$,0.104g/l, pH 6.5)中培养几次的蕨样芽孢杆菌(ATCC 9945)。随后,将年轻的粘液型菌落转移至 10ml 的 E 培养基(E medium)并在 37℃下于 250rpm 的摇动培养箱中生长 24 小时。之后,将 500 μl 的培养肉汤与 50ml 的 E 培养基混合并转入装有 950ml E 培养基的 2.5 升发酵罐(KMJ-2B, Mituwa Co., 大阪,日本)。在 37℃培养细胞。通过自动补入 25% (v/v) NH_4OH 和 / 或 2M HCl 将 pH 控制在 6.5。最初通过补充空气和通过控制搅拌速度到 1000rpm 来将溶解的氧浓度控制在 40%的空气饱和度。

[0053] 40 小时后,通过在 4℃以 12,000xg 离心 20 分钟从培养肉汤中分离细胞。将含有 γ -PGA 的上清液倾入 4 倍体积的甲醇中并在轻微搅拌下放置过夜。通过在 4℃以 12,000xg 离心 40 分钟收集含有 γ -PGA 粗品的、生成的沉淀,然后将所述沉淀溶解于去离子水中,通过在 4℃以 24,000xg 离心 20 分钟除去不溶解的杂质。通过对蒸馏水透析(MWCO:100,000, Spectrum Laboratories, Inc., Laguna Hills, CA)12 小时除去 γ -PGA 水溶液的盐分,其中用水交换几次,且最终冻干获得 γ -PGA 纯品。

[0054] 实施例 4

[0055] CS- γ -PGA 毫微粒的制备

[0056] 在室温磁力搅拌下,使用吸量管(0.5-5ml, PLASTIBRAND®, BrandTechScientific Inc., 德国)将 γ -PGA 水溶液(pH 7.4, 2ml)加入不同浓度(0.01%、0.05%、0.10%、0.15%或 0.20%,以 w/v 计)的低 MW CS 水溶液(pH 6.0, 10ml)中,即可获得毫微粒。通过 38,000rpm 超速离心 1 小时收集毫微粒。丢弃上清液并将毫微

粒重新混悬于去离子水中用于进一步研究。使用 FT-IR 分析 CS- γ -PGA 毫微粒中低 MW CS 的氨基以及 γ -PGA 羧酸盐峰值的变化。

[0057] 按照所说明的,在室温磁力搅拌下, γ -PGA 水溶液 (pH 7.4) 一经加入低 MW CS 水溶液 (pH 6.0) 中,即可瞬时获得毫微粒。低 MW CS 和 CS- γ -PGA 毫微粒的 FT-IR 光谱在 Sung 及其同伴的论文中展示 (Biomacromolecules 2005 ;6 :1104-1112)。两种聚电解质 (γ -PGA 和 CS) 之间的静电作用即刻促使长疏水片段 (或具有高密度中性离子对的片段) 形成,且因此生成高度中性化的络合物,所述络合物分隔成胶状的毫微粒。

[0058] 实施例 5

[0059] CS- γ -PGA 毫微粒的特性

[0060] 通过 TEM (透射电子显微镜) 和 AFM (原子力显微镜) 对 CS- γ -PGA 毫微粒进行形态学考察。TEM 样品通过在涂布有碳的、400 目的铜载网上放置一滴毫微粒溶液来制备。沉积后约 2 分钟,用滤纸轻拍网格以除去表面的水并经由使用碱性的铋溶液进行阳性染色 (Microbiol. Immunol. 1986 ;30 :1207-1211)。AFM 样品通过在载玻片上掷一滴毫微粒溶液来制备,且随后于真空中干燥。使用粒度仪 (3000HS, Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK) 测量所制备的毫微粒的粒度分布和 ζ 电位。

[0061] 测定以不同浓度 γ -PGA 和 CS 制备的 CS- γ -PGA 毫微粒的粒度和 ζ 电位值并将结果示于表 1a 和 1b。发现所制备的毫微粒的粒度和 ζ 电位值主要是由加入透析液中 CS 周围浓度的溶液中 γ -PGA 的局部浓度的相对量决定。CS 浓度固定时,提高 γ -PGA 的浓度可使 γ -PGA 分子与更多的 CS 分子反应,并由此形成大尺寸的毫微粒 (表 1a, $p < 0.05$)。

[0062] 当 CS 分子的量超过局部 γ -PGA 分子的量时,一些过量的 CS 分子就会缠绕至 CS- γ -PGA 毫微粒的表面。因此,所得的毫微粒可显示出中性聚电解质复合核心结构,所述核心为确保胶体稳定性的、正电荷 CS 壳 (表 1b) 所环绕 (Langmuir. 2004 ;20 :7766-7778)。相反,当局部 γ -PGA 分子的量足以超过周围 CS 分子的量时,在所形成的毫微粒表面暴露有 γ -PGA,且由此产生负电荷的 ζ 电位。因此,可通过所制备的 CS- γ -PGA 毫微粒的构成组分来控制它们的粒度和 ζ 电位值。由 TEM 和 AFM 考察获得的结果显示所制备的毫微粒的形态为具有光滑表面的球形 (图 1a 和 1b)。本发明的某些方面涉及毫微粒,其平均粒度在约 50 和 400 纳米之间,优选在约 100 和 300 纳米之间,且最优选在约 100 和 200 纳米之间。毫微粒的形态在 2.5 和 6.6 之间的任何 pH 显示出具有光滑表面的球形。在一个实施方案中,本发明的毫微粒在约 2.5 或更低的 pH 的稳定性使得该毫微粒在暴露于胃中的酸性介质时能够保持完整。

[0063] 实施例 6

[0064] Caco-2 细胞培养物和 TEER 测量

[0065] 以每个插入片段 3×10^5 个细胞 (cells/insert) 的接种密度将 Caco-2 细胞接种于每板 6 孔的 Costar Transwell (Corning Costar Corp., 纽约) 中的、组织培养物处理过的聚碳酸酯滤膜片 (直径 24.5mm, 生长面积 4.7cm²)。将添加有 20% FBS、1% NEAA 和 40 μ g/ml 抗生素庆大霉素的 MEM (pH 7.4) 用作为培养介质,并加至供体和受体室。前 6 天每隔 48 小时更换介质且之后每隔 24 小时更换介质。培养物保持在 37°C 下的 95% 空气和 5% CO₂ 的气氛中,并在接种后第 18-21 天用于旁细胞输送实验 (TEER 值范围在 600-800 Ω cm²)。

[0066] 使用连接于一对筷子型电极的 Millicell[®] 电阻系统 (Millipore Corp., Bedford,

MA) 来监控 Caco-2 细胞单层的 TEER 值。为了启动输送实验,吸出供体室和受体室的培养介质并用预热的输送介质(添加 25mM 葡萄糖的 HBSS, pH 6.0) 将细胞漂洗两次。在 37℃ 下以输送介质平衡 30 分钟后,使用含有 0.5ml 受试毫微粒溶液(0.2mg/ml) 的 2ml 输送介质于 37℃ 孵育 2 小时。随后,小心除去毫微粒溶液并用 HBSS 将细胞洗涤三次,并且将毫微粒溶液替换为新鲜的培养物介质。测量另外 20 小时的 TEER 以研究受试毫微粒对 Caco-2 细胞单层作用的可逆性。

[0067] 细胞间的紧密连接是大分子旁细胞输送的主要屏障的一种(J. Control. Release 1996 ;39 :131-138 ;J. Control. Release 1998 ;51 :35-46)。经上皮的离子输送被预期为细胞之间严密性的优良标志,且在研究中经由测量 Caco-2 细胞单层的 TEER 来评价。据报道,TEER 的测量值可用于预知亲水性分子的旁细胞输送(Eur. J. Pharm. Biopharm. 2004 ;58 :225-235)。当紧密连接打开时,由于水和离子通道经过细胞旁路,所以 TEER 值降低。Caco-2 细胞单层已广泛地作为体外模型用于评价大分子的肠内旁细胞渗透性。

[0068] 所制备的 CS- γ -PGA 毫微粒对 Caco-2 细胞单层 TEER 值的影响在图 2 中展示。如图所示,所制备的具有正表面电荷的毫微粒(CS 占据表面,0.01% γ -PGA :0.05% CS、0.10% γ -PGA :0.2% CS 以及 0.20% γ -PGA :0.20% CS) 能够显著降低 Caco-2 细胞单层的 TEER 值($p < 0.05$)。在使用这些毫微粒孵育 2 小时后,Caco-2 细胞单层的 TEER 值与对照组(在输送介质中没有加入毫微粒)相比,可减少至它们初始值的约 50%。这表明 CS 占据表面的毫微粒可有效地打开 Caco-2 细胞之间的紧密连接,引起 TEER 值的降低。据报道,CS 氨基基团的正电荷与细胞表面和紧密连接上的负电荷的相互作用导致 F-肌动蛋白和紧密连接的蛋白质 ZO-1 的重新分布,其伴有增强的旁细胞渗透性(Drug Deliv. Rev. 2001 ;50 :S91-S101)。表明壳聚糖与紧密连接蛋白质 ZO-1 之间的相互作用导致壳聚糖至细胞骨架的迁移。

[0069] 表 1a

[0070] γ -PGA 和 CS 的浓度对所制备的 CS- γ -PGA 毫微粒粒度的影响

[0071]

平均粒度 (nm, n = 5)					
CS γ -PGA	0.01% ^{a)}	0.05%	0.10%	0.15%	0.20%
0.01% ^{b)}	79.0 $\pm$ 3.0	103.1 $\pm$ 4.6	96.7 $\pm$ 1.9	103.6 $\pm$ 1.9	140.5 $\pm$ 2.0
0.05%	157.4 $\pm$ 1.7	120.8 $\pm$ 3.9	144.5 $\pm$ 2.4	106.2 $\pm$ 3.8	165.4 $\pm$ 1.7
0.10%	202.2 $\pm$ 3.1	232.6 $\pm$ 1.2	161.0 $\pm$ 1.8	143.7 $\pm$ 2.7	218.1 $\pm$ 4.1
0.15%	277.7 $\pm$ 3.2	264.9 $\pm$ 2.1	188.6 $\pm$ 2.9	178.0 $\pm$ 2.2	301.1 $\pm$ 6.4
0.20%	284.1 $\pm$ 2.1	402.2 $\pm$ 4.0	▲	225.5 $\pm$ 3.1	365.5 $\pm$ 5.1

[0072] ^{a)}CS 的浓度(以 w/v 计)

[0073] ^{b)} γ -PGA 的浓度(以 w/v 计)

[0074] ▲观察到聚集物的沉淀

[0075] 表 1b

[0076] γ -PGA 和 CS 的浓度对所制备的 CS- γ -PGA 毫微粒 ζ 电位值的影响

[0077]

ζ 电位 (mV, n = 5)					
γ -PGA \ CS	0.01% ^{a)}	0.05%	0.10%	0.15%	0.20%
0.01% ^{b)}	15.4 ± 0.3	22.8 ± 0.5	19.8 ± 1.5	16.5 ± 1.4	17.2 ± 1.6
0.05%	-32.7 ± 0.7	23.7 ± 1.7	27.6 ± 0.7	20.3 ± 0.8	19.2 ± 0.6
0.10%	-33.1 ± 1.3	21.1 ± 1.6	20.3 ± 1.1	23.6 ± 0.9	24.7 ± 1.2
0.15%	-33.2 ± 2.1	-21.9 ± 2.0	19.2 ± 0.4	16.9 ± 1.7	19.8 ± 0.3
0.20%	-34.5 ± 0.5	-34.6 ± 0.3	▲	14.6 ± 0.7	16.3 ± 0.7

[0078] ^{a)} CS 的浓度 (以 w/v 计)[0079] ^{b)} γ -PGA 的浓度 (以 w/v 计)

[0080] ▲ 观察到聚集物的沉淀

[0081] 除去孵育的毫微粒后, 观察到 TEER 值渐增。这种现象表明 Caco-2 细胞单层的细胞间的紧密连接开始逐渐地恢复原状, 但是, TEER 值并没有恢复至它们的初始值 (图 2)。相反, 使用具有负表面电荷的毫微粒 (γ -PGA 占据表面, 0.10% γ -PGA : 0.01% CS 和 0.20% γ -PGA : 0.01% CS, 图 2) 孵育的 Caco-2 细胞单层的 TEER 值与对照组相比, 没有显示出显著性差异 ($p > 0.05$)。这表明 γ -PGA 对细胞间紧密连接的打开没有任何影响。

[0082] 实施例 7

[0083] fCS- γ -PGA 毫微粒的制备以及 CLSM 目测法

[0084] 制备用于共聚焦激光扫描显微镜 (CLSM) 研究的荧光 (FITC) 标记的 CS- γ -PGA (fCS- γ -PGA) 毫微粒。本发明的毫微粒显示出中性的聚电解质复合核心结构, 所述核心为正电荷的壳聚糖外壳所环绕。如文献所报道, 以 FITC 的异硫氰酸酯基团与 CS 的伯氨基之间的反应为基础, 合成 FITC 标记的低 MW CS (fCS) (Pharm. Res. 2003 ; 20 : 1812-1819)。简要地, 将 100mg FITC 的 150ml 脱水甲醇加至 100ml 的 1% 低 MW CS 的 0.1M 乙酸中。在避光的环境状态下反应 3 小时后, 通过使用 0.5M NaOH 增加 pH 值至约 8-9 使 fCS 沉淀。为了除去未结合的 FITC, 所述沉淀经受反复的洗涤和离心 (40,000×g 离心 10min) 循环直到在上清液中检测不到荧光。然后将溶解于 80ml 0.1M 乙酸中的 fCS 对 5 升蒸馏水避光透析 3 天, 同时每天换水。将生成物 fCS 在冰冻干燥器中冻干。按照实施例 4 中描述的步骤制备 fCS- γ -PGA 毫微粒。

[0085] 随后, 将含有 fCS- γ -PGA 毫微粒 (0.2mg/ml) 的输送介质引入 Caco-2 细胞的供体室, 所述含有 fCS- γ -PGA 毫微粒 (0.2mg/ml) 的输送介质在 transwell 上预培养 18-21 天。经由温度控制系统 (DH-35 Culture Dish Heater, Warner Instruments Inc., Hamden, CT) 将实验温度保持在 37°C。在孵育特定的时间间隔后, 吸出受试样品。然后在细胞于 3.7% 的多聚甲醛中固定前, 用预热的 PBS 溶液洗涤两次 (Pharm. Res. 2003 ; 20 : 1812-1819)。在倒置的 (inversed) CLSM (TCS SL, Leica, 德国) 下考察细胞。使用氩激光器观察荧光图像 (在 488nm 激发, 采集 510-540nm 的发射)。

[0086] 使用 CLSM 来显影荧光标记的 CS- γ -PGA (fCS- γ -PGA) 毫微粒经过 Caco-2 细胞单层的输送。这种非侵入的方法使得输送途径的光学部分和镜像经过 Caco-2 细胞单层, 而不破坏它们的结构 (J. Control. Release 1996 ;39 :131-138)。

[0087] 用毫微粒孵育 60 分钟后, 在细胞间隙观察到的荧光强度比在孵育 20 分钟后观察到的荧光强度更强并且在更深的层次显示。这些观察结果与发明人的 TEER 结果证实具有正表面电荷的毫微粒 (CS 占据表面) 能够打开 Caco-2 细胞之间的紧密连接, 并且允许所述毫微粒通过被动扩散经由旁细胞途径输送。更具体的数据可在 Sung 及其同伴的论文中找到 (Biomacromolecules 2005 ;6 :1104-1112)。

[0088] 实施例 8

[0089] 使用荧光标记的毫微粒的体内研究

[0090] 制备用于共聚焦激光扫描显微镜 (CLSM) 研究的荧光 (FITC) 标记的 CS- γ -PGA (fCS- γ -PGA) 毫微粒。给大鼠喂食 fCS- γ -PGA 毫微粒后, 在预先确定的时间将大鼠处死并分离出肠用于 CLSM 分析。通过 CLSM 清楚地观察到毫微粒的荧光图像, 其在适当的时间以及在不同的深度由大鼠的肠内表面渗透经过外表面, 所述肠包括十二指肠、空肠和回肠, 上述内容在实施例 12 中讨论。

[0091] 实施例 9

[0092] 毫微粒中的胰岛素载荷能力

[0093] 将荧光 (FITC)- 标记的 γ -PGA 加入壳聚糖溶液以制备荧光 (FITC)- 标记的、载有胰岛素的 CS- γ -PGA 毫微粒, 所述毫微粒用于采取共聚焦激光扫描显微镜 (CLSM) 评价的动物体内研究以及生物活性分析。通过使用离子胶凝化法制备载有胰岛素的 CS- γ -PGA 毫微粒, 所述方法将胰岛素 / γ -PGA 溶液加入 CS 溶液, 随后在容器中进行磁力搅拌。

[0094] 以壳聚糖 : γ -PGA 为 0.75mg/ml : 0.167mg/ml 的比例制备两种胰岛素浓度的毫微粒。所述毫微粒的粒度和 ζ 电位示于下表 2。

[0095] 表 2

[0096]

胰岛素浓度 (mg/ml) (n=5)	平均粒度 (nm)	多分散性指数 (PI)	ζ 电位 (mV)
0*	145.6 $\pm$ 1.9	0.14 $\pm$ 0.01	+32.11 $\pm$ 1.61
0.042	185.1 $\pm$ 5.6	0.31 $\pm$ 0.05	+29.91 $\pm$ 1.02
0.083	198.4 $\pm$ 6.2	0.30 $\pm$ 0.09	+27.83 $\pm$ 1.22

[0097] (*) 对照参考无胰岛素

[0098] 此外, 根据下式分析、计算胰岛素的关联效应和胰岛素的载荷能力, 并示于图 3 与图 4:

[0099]

$$\text{胰岛素关联效应 (AE\%)} = \left(\frac{\text{胰岛素总量} - \text{上清液中的胰岛素}}{\text{胰岛素总量}} \right) \times 100\%$$

[0100]

$$\text{载药量(LC)} = \left(\frac{\text{胰岛素总量} - \text{上清液中的胰岛素}}{\text{覆盖的粒子总量}} \right) \times 100\%$$

[0101] 图3显示壳聚糖与 γ -PGA 毫微粒中的胰岛素的载荷能力和关联效应,而图4显示仅有壳聚糖的、作为参考的毫微粒中胰岛素的载荷能力和关联效应(无 γ -PGA)。数据清楚地证实了对于核心中具有 γ -PGA 的毫微粒,胰岛素的载荷能力和关联效应明显地更高。通过使用离子胶凝化法获得 CS- γ -PGA 毫微粒的胰岛素 AE(40-55%) 和 LC(5.0-14.0%),所述方法将与 γ -PGA 溶液混合的胰岛素加入 CS 溶液,随后进行磁力搅拌用于分离毫微粒。本发明的某些方面涉及毫微粒的口服制剂,其有效地促进肠内或脑血旁细胞运输,所述毫微粒包括核心中的阴性组分(如 γ -PGA、肝素或藻酸盐)以及低分子量的壳聚糖,其中所述壳聚糖占据所述毫微粒的正电荷表面。藻酸盐是非生物可降解的,但是,按规定具有约 30-50kDa 分子量的藻酸盐粒子是肾惰性的。

[0102] Calceti 等人报道了口服的胰岛素-PEG 递送系统的体内评价(Eur JPharma Sci 2004;22:315-323)。胰岛素-PEG 被配制成由硫醇聚合物聚(丙烯酸)半胱氨酸构成的粘膜粘附片。治疗剂在 5 小时内从这些片剂中缓释释放。在体内,通过口服施用至糖尿病小鼠,发现血糖浓度随时间显著降低。此外,Krauland 等人报道了另一项在非糖尿病大鼠上进行的硫醇壳聚糖胰岛素片的口服胰岛素递送研究(J. Control. Release 2004,95:547-555)。递送的片剂利用共价连接于壳聚糖的 2- 硫醇亚胺形成壳聚糖-TBA(壳聚糖-4- 硫代丁基胺)结合物。将壳聚糖 TBA 胰岛素片剂口服施用于非糖尿病清醒状态的大鼠后,24 小时血糖浓度显著降低;证实了目前此处公开的毫微粒的胰岛素经过肠内吸收缓释释放的观察结果。在 Morcol 等人另外的报道中(Int. J. Pharm. 2004;277:91-97),一种包括磷酸钙 PEG 胰岛素酪蛋白粒子的口服递送系统在口服施用于糖尿病大鼠后显示出延长的降血糖效应。

[0103] Pan 等人公开了改善胰岛素体内肠吸收的壳聚糖毫微粒(Int J Pharma2002,249:139-147)与粒度为 250-400nm、多分散性指数小于 0.1、正电荷及稳定的胰岛素壳聚糖毫微粒。在施用胰岛素壳聚糖毫微粒后,发现低血糖延续并伴有提高的药理学生物利用度。Pan 等人的数据证实了发明人的观察结果,如图3和图4所示。但是,对于本发明核心中具有 γ -PGA 的壳聚糖胰岛素毫微粒,胰岛素的载荷能力和胰岛素的关联效应实际更高。

[0104] 实施例 10

[0105] 胰岛素毫微粒的稳定性

[0106] 图5显示本发明载有胰岛素的毫微粒的稳定性,所述载有胰岛素的毫微粒具有示例性的组合:CS 0.75mg/ml、 γ -PGA 0.167mg/ml 和胰岛素 0.083mg/ml。混悬于去离子水中的所制备的载有胰岛素的毫微粒在达 40 天的贮存期间是稳定的。首先(如图5所示),在毫微粒贮存溶液中的胰岛素浓度保持在约 9.5% 的恒定水平。在经过的约 40 天的期间,通过基本恒定在约 200nm 的粒度以及基本恒定在约 +28mV 的 ζ 电位进一步证实毫微粒的稳定性。预期将本发明含有胰岛素的毫微粒配制成软胶囊或胶囊锭构形时,应保持它们的生物稳定性,其中所述软胶囊或胶囊锭构形进一步隔绝环境对毫微粒的影响,如光照、热、空气状况等等。在一个实施方案中,胶囊锭的表面可进一步使用甘油处理或进行亲水性处理以使其更容易的吞咽。本发明的某些方面提供包括有效量胰岛素的胰岛素毫微粒制剂的丸锭或胶囊以治疗或处理糖尿病患者,其中含有胰岛素的毫微粒的稳定性至少为 40 天,优选超过 6 个月,且最优选超过两三年。通过“有效量的胰岛素”是指足量的胰岛素将以制剂存

在以当组合物以单一制剂形式施用于宿主时提供期望的治疗、预防或其他的生物效应。

[0107] 因此,为了方便和有效的口服施用,可将药物有效量的本发明的毫微粒与一种或多种赋形剂制成片剂,装入如凝胶胶囊的胶囊中以及混悬于液体溶液等等。可将毫微粒混悬于去离子水或类似物用于肠胃外施用。可通过常规的技术将毫微粒制成用于摄取的填充块 (packed mass)。例如,可使用已知的成囊工艺和材料将毫微粒包囊为“硬填充胶囊”或“软弹性胶囊”。包囊材料应高度溶解于胃液中以便胶囊咽下后粒子可快速地分散于胃中。每单位制剂,无论是胶囊或是片剂,应优选含有适宜粒度和数量的毫微粒,其提供了药有效量的毫微粒。一个例子是型号为 0 的明胶胶囊。

[0108] 实施例 11

[0109] 胰岛素的体外释放研究

[0110] 图 6 显示用于 pH 敏感性研究的毫微粒在调节过 pH 的溶液中的代表性蛋白质药物 (如胰岛素) 释放曲线,所述毫微粒中具有示例性的组合:CS 0.75mg/ml、 γ -PGA 0.167mg/ml 和胰岛素 0.083mg/ml。在一个实施方案中,该示例性组合可包括浓度范围 $\pm 10\%$ 的如下组分:CS 0.75mg/ml (浓度范围 0.67–0.83mg/ml)、 γ -PGA 0.167mg/ml (浓度范围 0.150–0.184mg/ml) 和胰岛素 0.083mg/ml (浓度范围 0.075–0.091mg/ml)。首先,在 37°C 及 100rpm 条件下于 DISTEK-2230A 容器中调节载有胰岛素的毫微粒溶液的 pH 至 2.5 以模拟胃部环境。在预先确定的特定时间间隔取样 ($n = 5$) 并通过 22,000rpm 离心 30 分钟获得无粒子的溶液,以便经由 HPLC 分析溶液中的游离或释放的胰岛素。直到样品溶液中的游离胰岛素浓度接近恒定的 26% 左右时 (示于图 6),调节 pH 至 6.6 以模拟肠的入口部分。在此特定时间间隔期间的胰岛素净释放约为 (从 26% 到 33%) 7%。换言之,在 pH 2.5 和 pH 6.6 区间,该毫微粒相当的稳定 (由溶液中可测量的最小胰岛素量证明)。

[0111] 为了进一步模拟肠的出口部分,调节含有胰岛素的毫微粒溶液至 pH 7.4。剩余的胰岛素 (约 67%) 从毫微粒释放。如上讨论,由于本发明的毫微粒外表面具有壳聚糖 (优先粘膜粘附于肠壁) 和正电荷 (促进旁细胞紧密连接输送),因此在旁细胞输送模型中,含有胰岛素的毫微粒比游离胰岛素更能有效地穿过肠壁。

[0112] 本发明的某些方面提供一种用于患者的毫微粒制剂,其特征在于促进肠内旁细胞输送或脑血旁细胞输送,每个毫微粒包括至少一种生物活性剂的第一组分、带负电荷的第二组分及为低分子量壳聚糖的第三组分,其中所述第一和第二组分处于中心核并且所述第三组分占据所述毫微粒的表面。在一个实施方案中,所述第二组分为 γ -PGA,其中壳聚糖与 γ -PGA 的重量比为 0.75 比 0.167 或更高。具有对 γ -PGA 过量的壳聚糖的制备溶液可获得在毫微粒表面有稳定正电荷的毫微粒。本发明的毫微粒的表面电荷 (ζ 电位) 在约 15 和 40mV 之间,优选在约 25–40mV 之间。

[0113] 通过举例说明,用于治疗糖尿病的毫微粒制剂包括第一组分胰岛素、第二组分 γ -PGA 及第三组分低分子量的壳聚糖,其中三种组分的重量比 (胰岛素 : γ -PGA : CS) 约为 0.083 : 0.167 : 0.75。如图 4 所示,CS : 胰岛素在制备溶液中的比例为 0.75 : 0.083 时或者 CS : 胰岛素的比例为 0.75 : 0.043 时,常规的壳聚糖胰岛素复合物的胰岛素浓度 (即胰岛素载荷能力) 或胰岛素载荷能力约为 $7.1 \pm 0.6w/w\%$ 或 $0.7 \pm 0.1w/w\%$ 。在本发明的某些实施方案中,胰岛素的载荷能力至少为毫微粒的 $8w/w\%$,优选至少为毫微粒的 $14w/w\%$ 。

[0114] 实施例 12

[0115] 加载胰岛素的、荧光标记的毫微粒的体内研究

[0116] 在体内研究中,给大鼠注射链唑霉素(STZ 75mg/kg 腹腔)的 0.01M 柠檬酸盐缓冲液(pH 4.3)以诱发糖尿病大鼠。使用商购获得的血糖仪分析来自大鼠尾部的血液中的血糖。在不禁食的情况下,正常雄性 Wistar 大鼠($n = 5$)的血糖浓度经测量为 $107.2 \pm 8.1\text{mg/dL}$,而糖尿病大鼠的血糖浓度为 $469.7 \pm 34.2\text{mg/dL}$ 。在动物研究中,糖尿病大鼠禁食 12 小时并经受下述四种不同的情况:(a) 口服施用去离子水(DI);(b) 以 30U/kg 口服施用胰岛素;(c) 以 30U/kg 口服施用载有胰岛素的毫微粒;以及(d) 以 5U/kg 皮下(SC)注射胰岛素作为阳性对照。在本研究中测量了来自大鼠尾部的经时血糖浓度。

[0117] 图 7 显示动物体内研究与时间相对的血糖变化(低血糖指标)($n = 5$)。对于口服施用去离子水和口服施用胰岛素的 8 个小时时间间隔的、作为基线值百分数的血糖变化看起来相对恒定在实验测量误差范围内。说明来自口服施用途径的所有胰岛素在大鼠胃中已基本分解。如所预期的,在此示例性研究中对于皮下途径注射胰岛素的大鼠,血液中的葡萄糖在很短的时间间隔内降低并在 3 小时后开始逐渐地趋于平缓。本研究最重要的观察结果来自口服途径施用载有胰岛素的毫微粒。在施用后约 2 小时血糖开始由基线值降低并于研究超过 8 小时处保持在较低的水平。表明目前载有胰岛素的毫微粒以缓释或延长的效应模式调节动物中的血糖水平。

[0118] 本发明的某些方面涉及一种由低 MW CS 和 γ -PGA 组成的新型毫微粒系统,所述毫微粒设定有占据其表面的 CS 以有效地打开紧密连接。所述毫微粒的表面特征为具有正表面电荷。在一个实施方案中,本发明的毫微粒使生物活性剂能够在肠内有效的递送,所述生物活性剂包括肽、多肽、蛋白质药物、其他的亲水性大分子等等。这样的多肽药物可以是能够口服施用于人类患者的任何天然或合成的多肽。示例性的药物包括,但不限于胰岛素;生长因子,比如表皮生长因子(EGF)、胰岛素样生长因子(IGF)、转化生长因子(TGF)、神经生长因子(NGF)、血小板源性生长因子(PDGF)、成骨蛋白(BMP)、成纤维细胞生长因子等等;生长激素抑制素;生长激素(somatotropin);生长激素(somatropin);人蛋氨酸生长素;降钙素;甲状旁腺素;集落刺激因子(CSF);凝血因子;肿瘤坏死因子;干扰素;白细胞介素;胃肠道的肽,比如血管活性肠肽(VIP)、胆汁细胞分裂素(CCK)、胃泌素、分泌素等等;红细胞生成素;生长激素和 GRF;抗利尿激素;奥曲肽;胰酶;歧化酶如过氧化物歧化酶;促甲状腺激素释放激素(TRH);促甲状腺素;黄体激素;LHRH;GHRH;组织纤溶酶原激活物;巨噬细胞活化剂;绒毛膜促性腺素;肝素;心钠素;血色素;逆转录病毒载体;松弛素;环孢菌素;催产素;疫苗;单克隆抗体等等;以及这些化合物的类似物和衍生物。本发明的生物活性剂可选自催产素、抗利尿激素、促肾上腺皮质激素、催乳素、促黄体素释放素或黄体激素释放素、生长激素、生长激素释放因子、生长激素抑制素、胰高血糖素、干扰素、胃泌素、四肽胃泌素、五肽胃泌素、尿抑胃素(urogastroine)、分泌素、降钙素、脑啡肽、内啡肽、血管紧张素、肾素、缓激肽、杆菌肽、多粘菌素、粘菌素、短杆菌酪肽、短杆菌肽及其合成的类似物,改性物和药理学活性的片段、单克隆抗体和可溶解的疫苗。在一个实施方案中,生物活性剂包括干细胞。

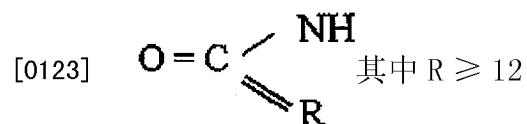
[0119] 在另一个实施方案中,本发明的毫微粒促进了生物活性剂经过脑血屏障和/或胃肠屏障的吸收。仍在另一个实施方案中,当生物活性剂和毫微粒以两组分系统口服施用或

基本同时施用,外层具有壳聚糖和表面正电荷的毫微粒在促进所施用的生物活性剂旁细胞药物(生物活性剂)输送中作为促进剂起作用。

[0120] 本发明的某些方面涉及一种促进生物活性剂肠内或脑血旁细胞输送的方法,设定并采用所述方法以在患者中递送至少一种生物活性剂,包括施用由 γ -PGA 和壳聚糖组成的毫微粒,其中所述毫微粒载有至少一种治疗有效量的或剂量的生物活性剂。本发明的毫微粒对于肽和蛋白质药物及其他的亲水性大分子是有效的肠内递送系统。在另外的实施方案中,生物活性剂选自蛋白质、肽、核苷、核苷酸、抗病毒剂、抗肿瘤剂、抗菌素和抗炎药物。在又一实施方案中,生物活性剂选自降钙素、环孢菌素、胰岛素、催产素、酪氨酸、脑啡肽、促甲状腺激素释放激素 (TRH)、促卵泡激素 (FSH)、黄体激素 (LH)、抗利尿激素和抗利尿激素类似物、过氧化氢酶、过氧化物歧化酶、白细胞介素-11 (IL2)、干扰素、集落刺激因子 (CSF)、肿瘤坏死因子 (TNF) 和促黑色素细胞激素。在又一实施方案中,生物活性剂为阿尔茨海默拮抗剂。

[0121] 在 2004 年 8 月 11 日提交的美国专利申请序列号 10/916,170 的同时待决申请中,公开了可与交联剂京尼平交联的生物材料,所述生物材料在生物组织内具有赖氨酸、羟基赖氨酸或精氨酸残基的自由氨基 (Biomaterials1999 ;20 :1759-72)。其还公开了可与交联剂交联的或使用光,如紫外线照射进行交联的可交联的生物材料,其中所述可交联的生物材料选自胶原、明胶、弹性蛋白、壳聚糖、NOCC(N、O、羧甲基壳聚糖)、血纤维蛋白胶、生物密封剂等等。此外,公开了选自下述物质的交联剂:京尼平及其衍生物、类似物(例如,貳元京尼平酸)、立体异构体和混合物。在一个实施方案中,交联剂还可选自环氧化合物、双醛淀粉、戊二醛、甲醛、二甲亚胺、碳二亚胺、琥珀酰亚胺、二异氰酸酯、酰基叠氮、无蛋白菌质、紫外线辐射、热交联、三(羟甲基)磷化氢、抗坏血酸铜、葡萄糖赖氨酸和光氧化剂等等。在一个实施方案中,由可交联的生物材料组成的毫微粒被交联,例如可高达所述生物材料的可交联组分的约 50% 或更高的交联度,优选约 1-20% 的交联度,以延缓所述生物材料的生物降解和/或使药物缓释释放。

[0122] 通过改性壳聚糖的结构来改变其荷电性能,比如将壳聚糖与下述基团或物质结合:甲基、烷基(例如乙基、丙基、丁基、异丁基等等)、聚乙二醇 (PEG) 或肝素。CS- γ -PGA 毫微粒的表面电荷密度(ζ 电位)可使其变得更加耐受 pH 或更加亲水。在一个实施方案中,壳聚糖与聚丙烯酸或具有下述化学式的聚合物接枝:



[0124] 作为说明,在配制 CS- γ -PGA 毫微粒中可使用三甲基氯化壳聚糖以保持所述毫微粒在低于 pH 2.5 的 pH,优选在如 1.0 一样低的 pH 的球体生物稳定性。本发明的某些方面提供与京尼平或其他交联剂交联的、加载药物且含有壳聚糖的生物材料,其作为生物相容性药物的载体用于提高在低于 pH 2.5 的 pH,优选在如 1.0 一样低的 pH 的生物稳定性。

[0125] 虽然已经参考本发明的某些实施方案的具体细节对本发明进行了描述,但是除了如所附权利要求所包括的范围或者达到所附权利要求所包括的范围之外,不预期将这样的细节看作为限制本发明的范围。根据上述发明内容可作出许多修改和变化。

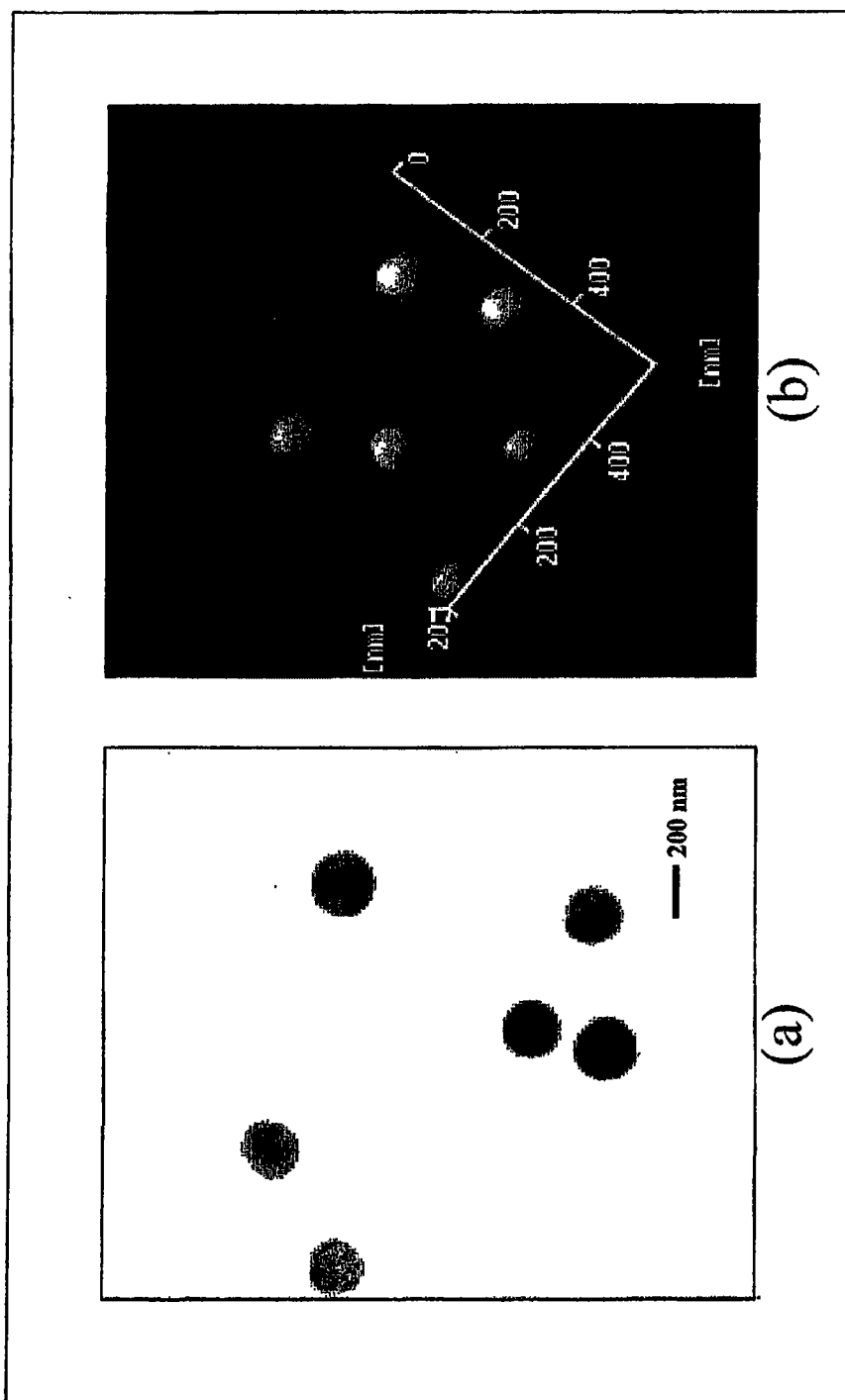


图1

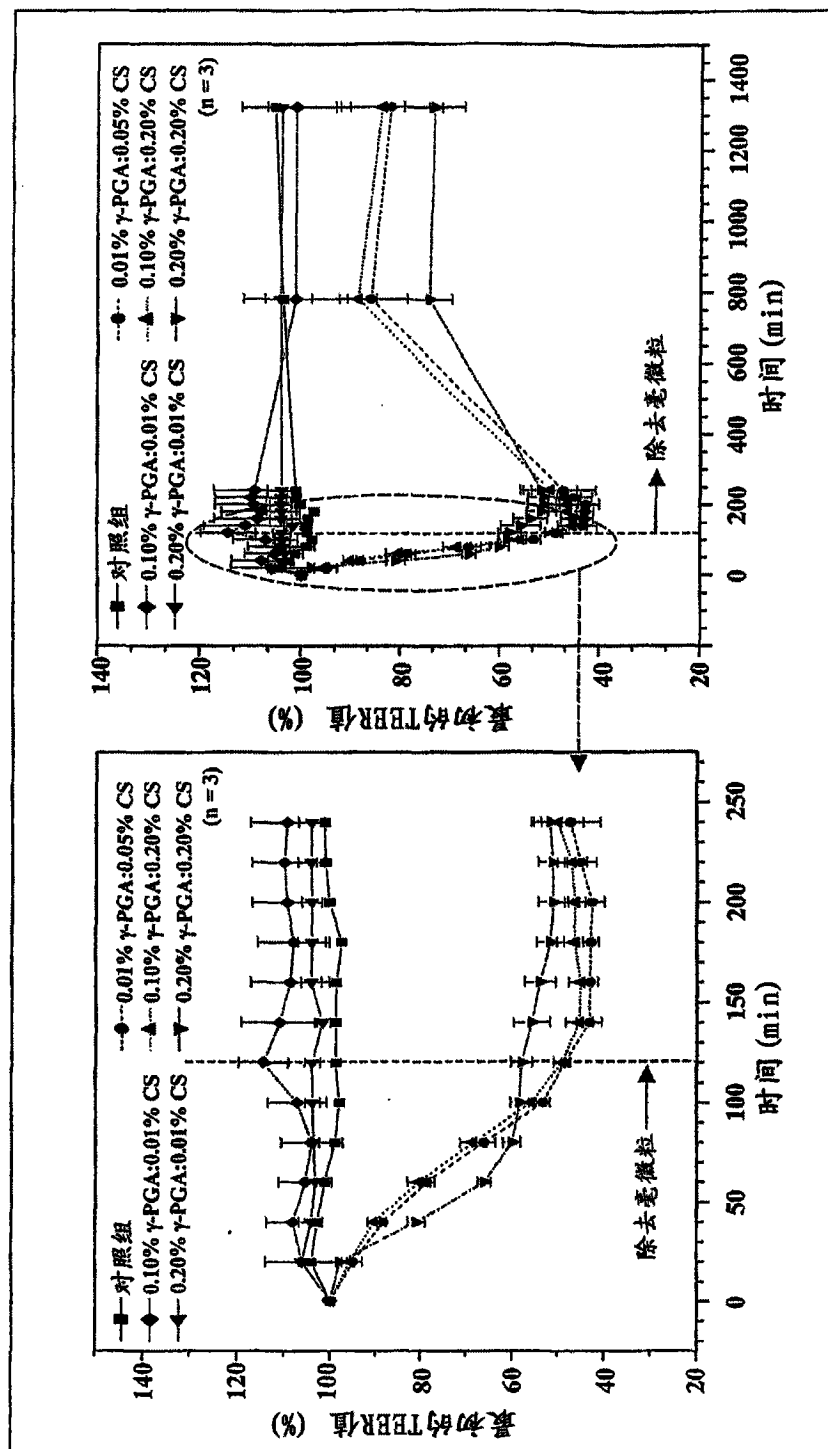


图2

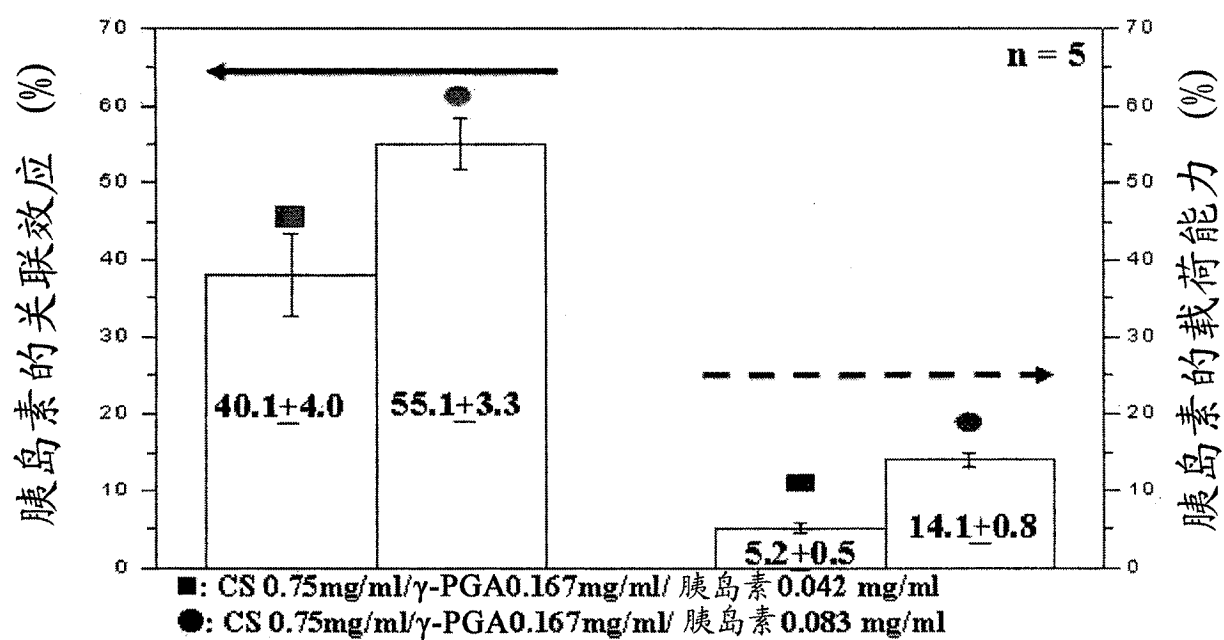


图 3

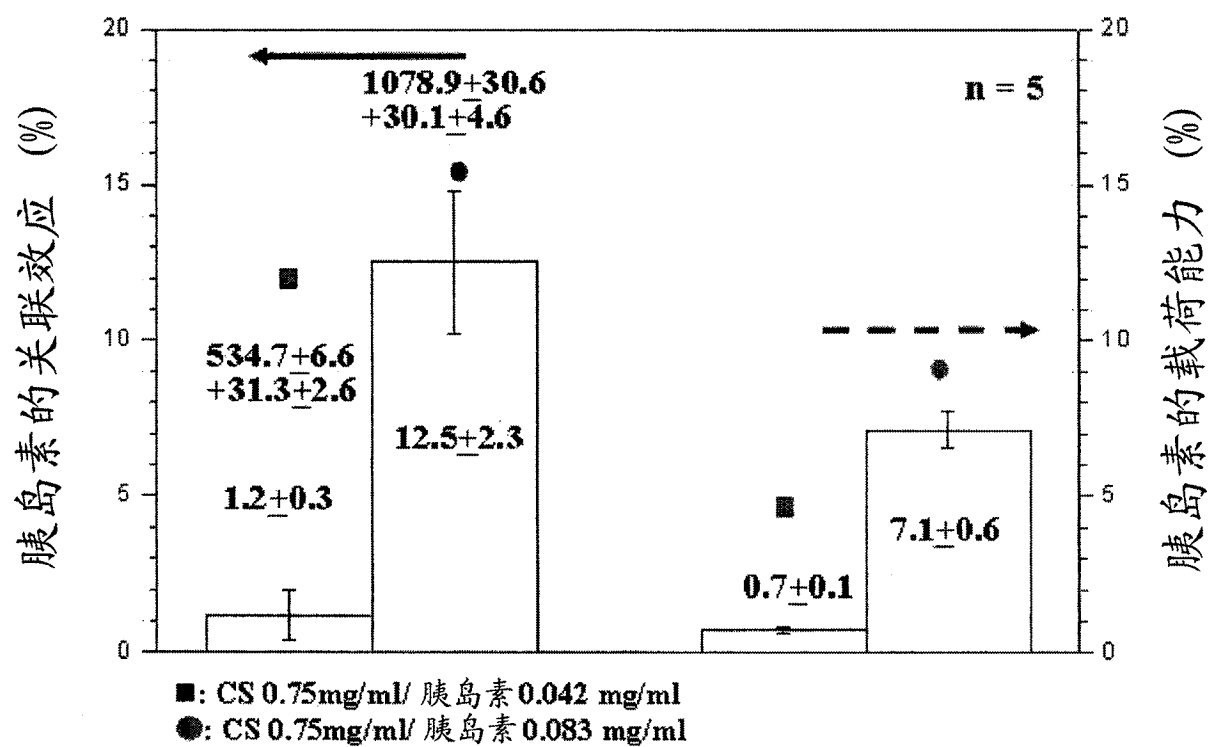


图 4

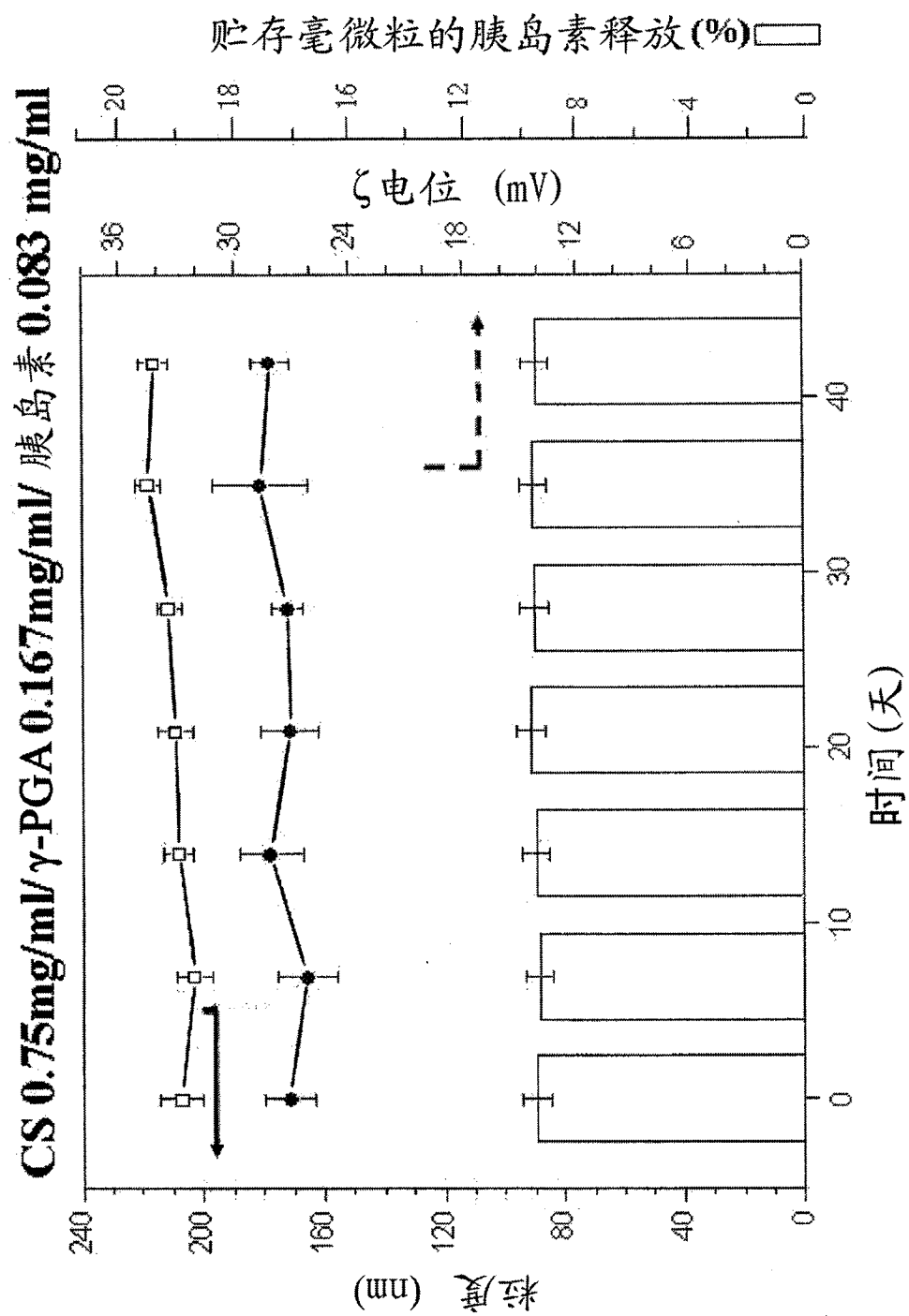


图 5

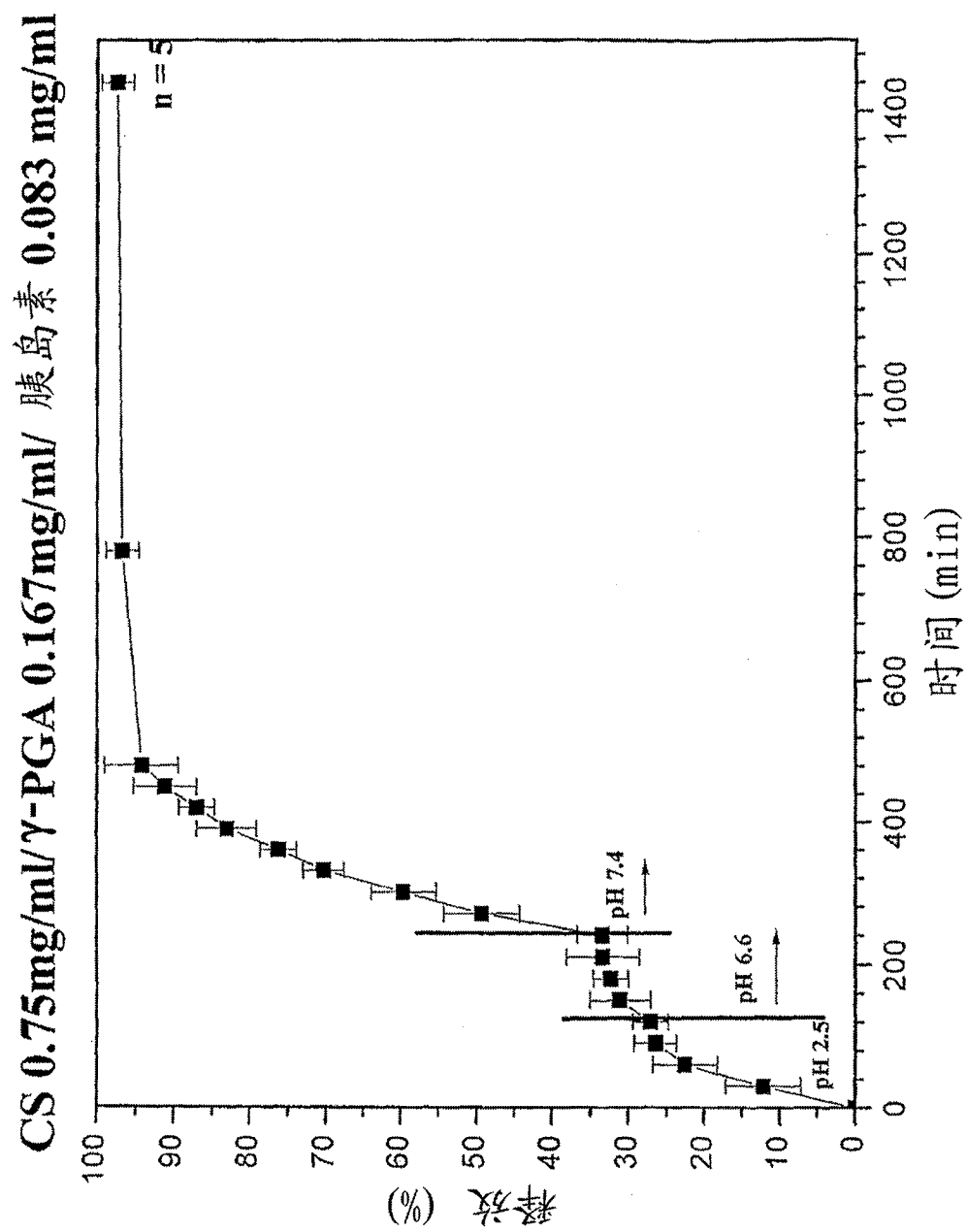


图 6

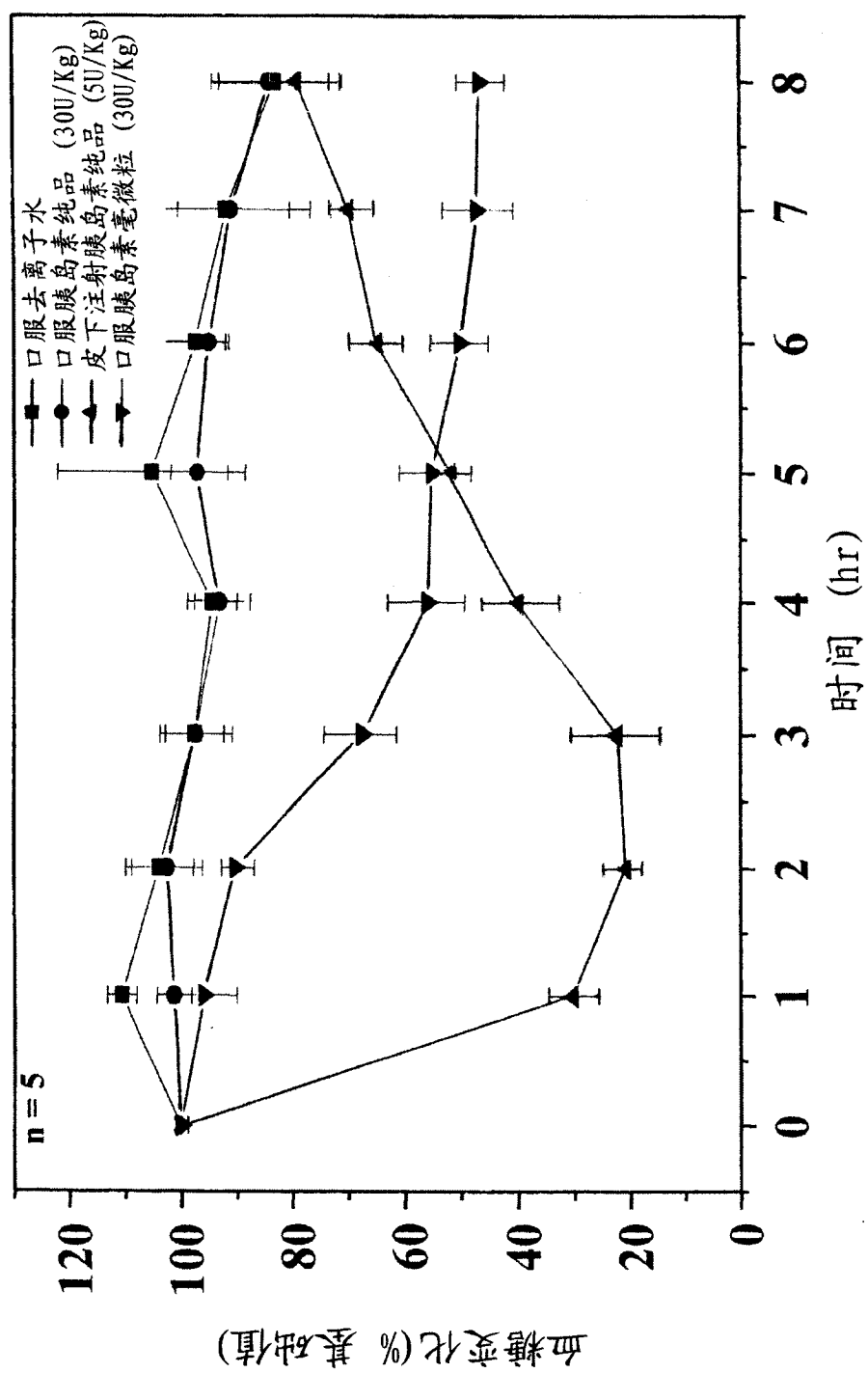


图7