(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 101742965 B
(45)授权公告日 2013.01.30

(21)申请号 200880024831.5
(22)申请日 2008.06.11
(30)优先权数据
60/934,070 2007.06.11 US
(85)PCT申请进入国家阶段日
2010.01.15
(86)PCT申请的申请数据
PCT/SE2008/050698 2008.06.11
(87)PCT申请的公布数据
WO2008/153493 EN 2008.12.18
(73)专利权人 吸入科学瑞典股份公司
地址 瑞典斯德哥尔摩
(72)发明人 珀·格德
(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所 11105
代理人 马高平
(51)Int.Cl.
A61B 5/08(2006.01)
G01N 33/15(2006.01)
(56)对比文件
US 4092845 ,1978.06.06,
WO 03/076927 A1,2003.09.18,
DE 2154594 ,1973.05.17,
EP 1308710 A2,2003.05.07,
US 2006/0288805 A1,2006.12.28,
审查员 张岩

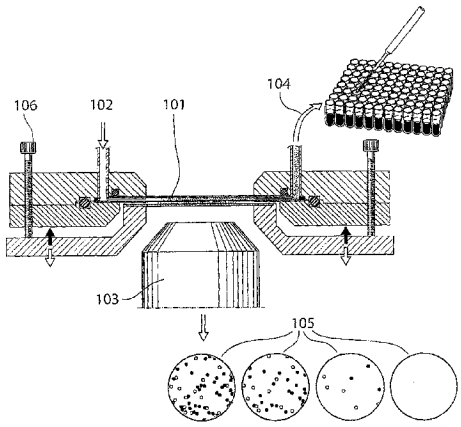
权利要求书 2 页 说明书 5 页 附图 2 页

(54)发明名称

用于研究粒子和肺部的相互作用的装置

(57)摘要

本发明涉及一种用于研究粒子在呼吸道的气血屏障中的溶解的配置和方法。一种用于仿真传递到呼吸道的气血屏障中粒子的相互作用的装置，该装置包括：灌注室(10)，用以接收并传递灌注液体流；半透膜(205)，其在一侧上覆盖有屏障层(204)，用以与粒子相互作用；及第一薄片组织(202)，该组织的一面分布有粒子。为仿真在灌注液体沿膜(205)流过灌注室(101)时粒子在气血屏障中的溶解，膜(205)布置为流体接触于灌注流体，而第一薄片组织(202)布置为接触膜(205)的屏障层(204)。沿该膜设置灌注流体流能够更为精确地仿真气血屏障的自然过程。



CN 101742965 B

1. 一种用于仿真传递到呼吸道的气血屏障的粒子 (203) 和肺部的相互作用的仿真装置，其包括 ：

灌注室 (101)，其用于接收并传递灌注流体流 ；

半透膜 (205)，其在一侧上覆盖有屏障层 (204)，用以与所述粒子相互作用 ；及

第一薄片组织 (202)，其具有分布有所述粒子的面，

其中，为仿真在灌注流体沿所述膜 (205) 流过灌注室 (101) 时所述粒子 (203) 在所述气血屏障中的溶解，所述膜 (205) 布置为流体地接触于所述灌注流体，并且所述第一薄片组织 (202) 布置为接触所述膜 (205) 的屏障层 (204)。

2. 根据权利要求 1 所述的仿真装置，其特征在于，所述灌注室 (101) 设置有用于建立与灌注室 (101) 流体连接的装置。

3. 根据权利要求 1 所述的仿真装置，其特征在于，所述室包括 ：

第二上薄片组织 (201)，

上部定距装置 (207)，用于将所述第二上薄片组织 (201) 附接在所述膜 (205) 上方，

下部定距装置 (208)，用于附接所述膜 (205)，并且允许所述粒子接触所述屏障层并用于接触所述第一薄片组织 (202)，并且

其中，所述上部定距装置 (207) 设置有分别用于传送进入灌注流体和流出灌注流体的通道 (301)。

4. 根据权利要求 3 所述的仿真装置，其特征在于，所述仿真装置的第一薄片组织 (202) 和第二上薄片组织 (201) 基本上平行。

5. 根据权利要求 3 或 4 所述的仿真装置，其特征在于，所述通道 (301) 布置为提供灌注流体基本上平行于所述膜 (205) 的流动。

6. 根据权利要求 1 所述的仿真装置，其特征在于，所述膜 (205) 由聚碳酸酯制成。

7. 根据权利要求 1 所述的仿真装置，其特征在于，所述膜 (205) 的微孔具有的直径在 0.01μm 到 1μm 的范围内。

8. 根据权利要求 1 所述的仿真装置，其特征在于，

所述第一薄片组织 (202) 布置为能够用光学检测器研究所述相互作用。

9. 根据权利要求 8 所述的仿真装置，其特征在于，

所述光学检测器记录所述第一薄片组织 (202) 的图像用于图像分析。

10. 根据权利要求 8 所述的仿真装置，其特征在于，

照明所述第一薄片组织 (202)，并且所述检测器测量光怎样受到所述粒子 (203) 的影响。

11. 根据权利要求 1 所述的仿真装置，其特征在于，

所述屏障层由多糖悬体制成。

12. 根据权利要求 1 所述的仿真装置，其特征在于，

所述屏障层包括分散的表面活性剂。

13. 根据权利要求 1 所述的仿真装置，其特征在于，所述粒子 (203) 从雾化剂型的流束分布于所述第一薄片组织 (202)。

14. 根据权利要求 13 所述的仿真装置，其特征在于，所述雾化剂型的流束包括尺寸在 0.3μm 到 10μm 的粒子，所述粒子包括至少一种药物活性成分。

15. 根据权利要求 1 所述的仿真装置，其特征在于，所述粒子 (203) 通过将所述第一薄片组织 (202) 暴露于包括所述粒子的环境而分布在所述第一薄片组织 (202) 上。

16. 一种用于研究粒子在呼吸道的气血屏障中的溶解的系统，其包括 ：

根据权利要求 3 中所述的仿真装置 ；

光学检测装置 ；

用于收集灌注流体的组分的装置 ；及

用于将根据权利要求 3 中所述的仿真装置固定至固定的结构的装置。

17. 根据权利要求 16 所述的系统，其特征在于，所述固定装置包括 ：

上部 (401)，其带有用于将灌注流引导入及引导出所述室 (10) 的连接管 (102) ；

中间部 (403)，其用于将所述膜 (205) 固定在所述上部定距装置 (207) 上 ；

下部 (400)，其用于将具有分布有粒子 (203) 的面的所述第一薄片组织 (202) 按压在所述膜 (205) 上。

18. 制备根据权利要求 1 至 15 的任一项所述的仿真装置的方法，该方法包括如下步骤 ：

提供用以接收并传递灌注流体流的灌注室，所述灌注室具有半透膜构成的壁 ；

用屏障层覆盖所述膜 ；

用所述屏障层接触并固定所述第一薄片组织，所述第一薄片组织使粒子分布于其接触面上，使得所述粒子的分布对原分布图样的干扰最小。

19. 一种使用权利要求 16-17 中的任一项所述的系统研究悬浮粒子与呼吸道的气血屏障之间的相互作用的方法，其包括如下步骤 ：

提供粒子的空气流束的取样 ；

提供根据权利要求 3 所述的仿真装置 ；

提供灌注流体流至所述灌注室 ；

检测所述屏障层与所述粒子的相互作用 ；和 / 或

收集并分析所述灌注流体的取样。

20. 根据权利要求 19 所述的方法，其特征在于，

用光学检测装置进行所述检测。

21. 根据权利要求 20 所述的方法，其特征在于，

所述光学检测装置记录所述第一薄片组织的图像，用于图像分析。

22. 根据权利要求 19 所述的方法，其特征在于，该方法包括对于粒子在所述第一薄片组织上的首次沉积的重量的确定。

23. 根据权利要求 12 所述的仿真装置，其特征在于，

所述分散的表面活性剂包括磷脂和 / 或蛋白质表面活性剂成分。

用于研究粒子和肺部的相互作用的装置

技术领域

[0001] 本发明针对涉及对悬浮粒子怎样与肺部相互作用的改进，该改进包括用于仿真干粉药物在肺部的溶解率的装置和方法。

背景技术

[0002] 对于干粉气雾剂，所吸入药物的效果的关键因素是溶解入肺液。缓慢的溶解能够被用作增加药物在肺部的持续时间的策略。但是，缓慢溶解又可能导致相当部分的所吸入粒子随黏膜纤毛升降而被重分配到消化道或者由肺泡巨噬细胞吞噬并且在它们的消化器官中被潜在地降解 (Lundborg，Falk et al. 1992)。测量可溶解粒子在肺部中的溶解非常困难。对于溶解更快的物质，必须采用间接方法，比如吸入给药后在循环系统中出现溶质。缓慢溶解的粒子，比如一些粒子放射性核，在从收集的肺部组织中回收粒子后进行定量分析。若干方法已经被提出用于仿真肺部中的固态粒子的溶解率。这些方法中的大部分意图用于具有低溶解性的不溶的核的源于环境因素的复杂粒子。实例如放射性粒子 (Kanapilly，Raabe et al. 1973)、矿物粒子或纤维 (Johnson1994)。但是，在最近，提出了过滤器法用以仿真药物在肺部中的溶解率 (Daves 和 Feddah，2003)。药物粒子沉积在玻璃纤维过滤器上，并且然后被置于过滤器盒中。在溢流构造中清洗该过滤器并重复分析单次通过的洗出液中溶解的药物。但就发现更为精确的、可靠的并且生理学上正确的模型来研究药物粒子的相互作用及在肺部组织中的溶解而言仍有改进的空间。

发明内容

[0003] 在本说明书中，术语“气血屏障”指空气与呼吸道的组织之间的界面。典型地，传导动脉的粘膜组织和肺部的小泡组织是气血屏障的实例。

[0004] 本发明的最通用的形式是用于研究粒子与肺液和肺部细胞的相互作用的装置。该装置包括：灌注室；半透膜；及具有分布有粒子的面的薄片组织。

[0005] 灌注室用以接收并传递灌注流体流。在一侧上覆盖有屏障层 (barrierlayer) 的半透膜布置成流体接触于灌注流体。装置还包括第一薄片组织，该薄片组织具有分布有粒子的面，并布置为接触于膜的屏障层。屏障能够构成用以类似于或仿真肺部上皮细胞的天然膜的或者物理化学屏障或生物屏障。在本配置中，物理化学屏障构成有多糖胶体以仿真气道黏液，并构成有磷脂散布以仿真上皮细胞的脂质膜。在另一个实例中，上皮细胞的生物屏障被添加到胶体层以能够研究屏障中的均衡活性传输机制。在一个方面中，屏障是与灌注流体等渗并用以接收粒子的胶体。在一个实施方式中，胶体可能包括磷脂散布。在另一个实施方式中，胶体包括另外配置有包括磷脂或适当的两性脂质的多个单层（比如十层）以仿真在肺部的黏液外膜层顶部的表面活性剂层。在另一个提供生物屏障的方面中，设置上皮细胞作为屏障层以能够在屏障中进行均匀的活性输送机构。

[0006] 灌注室包括用于建立灌注流体进入 / 流出灌注室的流体连接的装置，优选地，在室中设置定距环用于输送流体。灌注流体沿整个膜流过灌注室以仿真对于从肺部中的粒子

分离出的溶质的溶解和吸收。灌注流将接收通过屏障层和膜的溶解的和散布的制剂并且然后被输送离开用于随后的分析。

[0007] 与其中灌注流体趋于流过膜的方案相比，一个重要的特性在于灌注流趋于沿覆盖有粒子的膜流动。灌注流体沿膜的流动更精确地仿真气血屏障的自然过程。

[0008] 灌注室另外包括上薄片组织，即，盖体玻璃。灌注室优选地包括：第二上薄片组织；在一侧上附接到第二上薄片组织的第二上薄片组织及在另一侧上的所述膜；在一侧上附接到所述膜的下定距装置和在另一侧上的所述板。上定距装置优选地设置有用于输送流入和流出的灌注流体的通道。在一个优选实施方式中，所述室从上部观察基本上是圆形，而比如基本上矩形的另外的形式也能够想象得到。装置的膜优选地由具有微孔结构的多糖制成，微孔直径和微孔面积的部分能使扩散物快速通道而阻止流体通过膜的显著对流运动。在一个优选实施方式中，膜由于多糖制成并具有直径约为 0.01μm 到 1μm 的微孔。但是，能够选择其它的膜材料、微孔尺寸、及运行状态通过用于溶解的不同制剂来针对不同的大气粒子调节装置。

[0009] 优选地采用第一薄片组织以使能够用光学检测器研究溶解。屏障层或者是用以类似于或仿真肺部中的上皮细胞的天然膜的物理化学屏障或生物屏障。在一个方面中，屏障是胶体，该胶体与灌注流体等渗并被用以接收粒子。在一个实施方式中，胶体是多糖胶体，该胶体包括散布的磷脂。在另一个实施方式中，胶体包括散布的磷脂，该散布的磷脂另外设置有包括磷脂或适当的两性分子脂的多个单层（比如十层）的界面以仿真肺部的黏液外膜层顶部上的表面活性层。在另一个方面中，设置了生物屏障，在胶体层的膜上培植了单层上皮细胞以仿真活体肺部上皮细胞并设置用于研究屏障中的均匀活性输送机制的装置。大气粒子优选地从气雾剂型的流束而分布在板上。优选地，气雾粒子的尺寸在 0.3μm 到 10μm 的范围内，并包括至少一个药物活性组分。可选地，大气粒子通过板曝露于包括大气粒子的环境而分布在板上。灌注流体通常用以以类似于自然的血液流的方式与屏障层相互作用。更为具体地，灌注流应该是生理可接受的流体，其具有适应于胶体层的等渗性的等渗性并且如果使用包括活性细胞的屏障，其与细胞类型兼容。本领域技术人员能够发现许多可用于器官灌注的类血流体，这些类血流体能用于本发明的应用，并能另外通常容许肝素化全部血液作为可想像的灌注流体。在本发明的特别的实施方式中，灌注流体包括散布的两性分子脂质，比如磷脂和缓冲溶液，比如白蛋白缓冲溶液。

[0010] 在另一方面，本发明涉及用于研究粒子在肺部的溶解的配置，其包括：前述的装置；光学检测器装备；用于收集灌注流部分的装置和用于将所述装置固定到固定的结构的装置。优选地，固定装置包括：带有用于将灌注流体引导进入和离开室的连接管的上部；用于将膜固定在上定距装置的中部；及用于施压薄片组织的下部，其具有相对于膜的分布有大气粒子的面。

[0011] 在本发明的再一个方面中，涉及制备前述装置的方法，包括如下步骤：提供用以接收并传递灌注流体流的灌注室，该灌注室具有半透膜构成的壁；用胶体层覆盖半透膜膜；反转所述设备；使所述胶体层与所述第一薄片组织接触，大气粒子分布在其接触面上；将所述第一薄片组织固定到所述膜。可以通过使用楔形机构进行接触并固定，使膜以垂直运动而朝向固定的第一薄片组件位移以最小化对于粒子的初始分布图样的任何干扰。

[0012] 在再一个方面中，本发明涉及研究大气粒子之间的相互作用的方法，该方法包括

如下步骤：提供粒子的空气流束的取样；提供采用前述配置的前述装置。该方法另外包括：提供灌注流体流至所述灌注室，同时检测来自粒子的空气流束的制剂的溶解，收集并分析灌注流体的取样。能够采用光学检测器用于检测以记录粒子的溶解，可选地同时采用数字图像分析或任何类似技术进行。

[0013] 本发明有利地允许确定所期望的粒子制剂溶解率，这对于分析和评估通过呼吸系统给药的受试药具有显著的重要性。受试药在气血界面（即，呼吸系统的黏膜）中的行为因此能够通过分析结果得到的灌注液而被仔细地可视地 / 光学地、重量测定地和化学地分析。另外能够预期受试药在循环系统中出现的时间。因此，可以总结出，本发明提出了用于快速地分析通过呼吸系统给药的适当的固体药物及评估效果的形成的有力工具。

附图说明

[0014] 图 1 示出了根据本发明的配置的示意图。

[0015] 图 2 示出了灌注室的更详细的视图。

[0016] 图 3 示出了具有灌注通道的灌注室的视图。

[0017] 图 4 示出了固定装置的更为详细的视图。

具体实施方式

[0018] 图 1 示出了根据本发明的用于体外研究粒子 203 在肺部中的溶解的配置，该配置包括：灌注流室 101；计算机控制注射泵 102；及具有高解晰度摄像机的倒置显微镜 103，用于记录粒子 203 的图像 105。在流动室 101 的下游侧，灌注液被收集在计算机化部分的收集器 104 中。

[0019] 穿过该室的流动仿真了黏膜的生理学过程并且构建成交叉流动（图 2）。在实验中，黏膜建模被限定于两个平行的盖片 201 和 202 之间的 550μm 的空间。药物粒子 203 沉积在 12mm 的下盖片 202 的顶部。药物粒子 203 接触于仿真支气管黏膜的上皮细胞层的 50μm 的胶体层 204。胶体层位于仿真气道黏膜的基底膜的 10μm 多糖膜 205。在多糖膜 205 上方是 500μm 厚的灌注流室 101。灌注流室 101 的灌注流沿整个膜 205 从一侧流动到另一侧。灌注液在室中的驻留时间仅为数秒。这意图仿真血液在紧接在气道黏膜中的基底膜下的丰富的毛细血管袢中的短暂的通过时间 (Laitinen, Laitinen et al. 1989)。上定距装置 207 被用于将上盖片从膜 205 分离并形成灌注流室 101。另外，下定距装置 208 被用于将膜 205 从下盖片 202 分离。

[0020] 图 3 是定距装置 207 中采用的用于灌注液的灌注室 101 的水平视图，示出了入口和出品通道 301。灌注流室 101 的水平横截面具有基本上圆形的形式。

[0021] 灌注液组分在多糖膜 205 的另一侧上与胶体 204 等渗。例如，灌注液的基本组分是白蛋白缓冲剂，其中能够添加磷脂以增加向亲脂溶剂的萃取能力。

[0022] 灌注流体流动室 101 具有 12mm 的直径和 0.5mm 的厚度，这提供了 56μL 的容积。50μm 的胶体层 204 具有 5.7μL 并且多糖膜 205 的透过部是 1.1μL，总计提供了 63μL 的屏障容积。作为对比，非患病人群中的人体支气管上皮中的气血屏障的厚度从气管的 60μm 变化到细支气管的 5μm 到 8μm。由此，装置中的屏障厚度对应于气管上皮。黏膜的良好灌注部的总的厚度在上气道中具有估计为约 200μm(2001, Gerde & Scott)。装置的总计厚

度约为 510μm。

[0023] 为用装置制备样品，能够通过使用在《Inhalation Toxicology》2004,16,42-52 中由 P Gerde et al 所述的改进喷粉器使粒子 203 沉积在玻璃盖片 202 上。三个盖片在一起组合成三角形并将掩膜它们的 1mm 的周长以防止粒子沉积在未直接接触于胶体层的面上。修改的气溶胶保持室及三角形玻璃盖片保持器能够制成允许在一个气溶胶生成循环的时间均匀沉积在三个玻璃盖片上。

[0024] 当运行图 1 和图 2 所述的配置时，溶出度测量包括下面的主要步骤：

[0025] 1. 制备灌注液和胶体层 204。

[0026] 2. 气溶胶生成并沉积在玻璃盖片 202 上。

[0027] 3. 启动灌注流室 101 和胶体层 204。

[0028] 4. 在显微镜 103 下进行溶出度试验。

[0029] 5. 对显微镜检测的记录进行图像分析。

[0030] 6. 对洗出的灌注液进行化学分析。

[0031] 灌注液是基于带有混合于磷脂的白蛋白缓冲剂以增加向亲脂溶剂的析出能力。亲脂溶剂将进行彻底的超声处理以实现稳定的散布。在位于灌注器的悬浮体将保持悬浮直到被泵入灌注流室 101 时，这具有关键的重要性。磁搅拌器被布置在灌注室中以使亲脂溶剂在位于灌注室时保持悬浮。胶体 204 由多糖悬浮体制成 (1989,Gerde & Scholander)。将测试的有若干不同类型的屏障，细胞悬浮体。一个将要测试的细胞类型是 A549。

[0032] 用于覆盖盖片 203 的气溶胶用《Inhalation Toxicology》2004,16,42-52 中由 P Gerde et al 描述的系统生成以由气溶胶为各盖片产生近似 10μg 的涂层。盖片被一次三件地放置入专门的保持器。生成之后，气溶胶通过盖片保持器并且进入总的过滤器。将设计不带阀的新的保持室以最大化沉积在盖片上的加载的干粉的部分。采用当前的室，3mg 所加载的干粉中有大约 3×10μg 沉积在盖片上。

[0033] 在所准备的带有灌注室 101 的装置中，多糖膜 205 被伸展在适当的位置。在灌注流已经连接并且室 101 中的残留气泡被移除之后，施加胶体层 204。通过吸液或雾化器将胶体层 204 施加于散布的磷脂。通过对计算机存储的溶出过程的显微照片进行图像分析计算出溶出度曲线。初始的沉积在屏障 204 中的粒子体 203 的量在溶出试验之前通过重量的确定。

[0034] 图 4 示出了用于包括灌注流室 101 的装置的固定装置。图中仅示出用于入口流 402 的连接。但是，附图对于出口流也是有效的。固定装置包括：带有用于入口灌注流和出口灌注流的连接 402 的上屏障组件部 401；用于将膜 205 固定于上屏障组件部 401 的下屏障组件部 403。组件部 401 和组件部 403 设置有用于伸展膜 205 的伸展装置 405 和密封装置 405。

[0035] 一旦已经将料子盖片 202 置于它的安装到显微镜台的保持器 400，则启动自动控制程序来进行测量。显微镜的焦点被手动地调节并且然后控制程序获取粒子 205 的预接触图像。屏障组件 401、403 被下沉到粒子盖片 202 上，并且在接触之后马上记录初始的后沉积图像。然后记录第一组图像 105 以确定溶出率。依据这些初始图像的变化率，采用数据收集方案以给出溶出过程的足够良好的时间精度。

[0036] 使用反转显微镜 103 和高解析度的数字摄像机对溶出过程进行光学检测。带有沉

积的粒子 205 的粒子盖片 202 被置于安装到显微镜台的专用保持器 400 上。粒子 205 将被置于焦点并且带有胶体 204 的灌注室 101 将被置于粒子盖片 202 上方的引导柱上。在粒子 205 与胶体 204 接触之前记录若干图像。在接触之后，记录一系列快速图像 105 以确定溶出过程的速率。然后记录足够的常规图像 105 以确定整个溶出过程。全部图像 105 存储在计算机上并且强化对比以更容易地标出粒子 203。通过作为时间的函数计算与粒子相关的像素的消失而确定溶出。用不同的计算模型以将像素消失与粒子的溶出连接起来。

[0037] 还可以使用另外形式的光学检测。这样的方法能够基于用光源照明带有分布的粒子 203 的粒子盖片 202 并通过研究照明光的反射或折射来确定溶出率。

[0038] 在光学检测溶出率的同时，通过使用部分收集器 104 收集流出灌注流室 101 的单遍灌注液测量吸收率。取样间隔被调整为能够给出吸收过程的足够的精度。溶出曲线和吸收曲线将依据相同的时间轴进行描绘。另外粒子盖片能够易于进行重量测定分析以进一步研究与化学分析的相互关系并且由此能够获得粒子溶出过程和吸收过程的更为完全的图片。

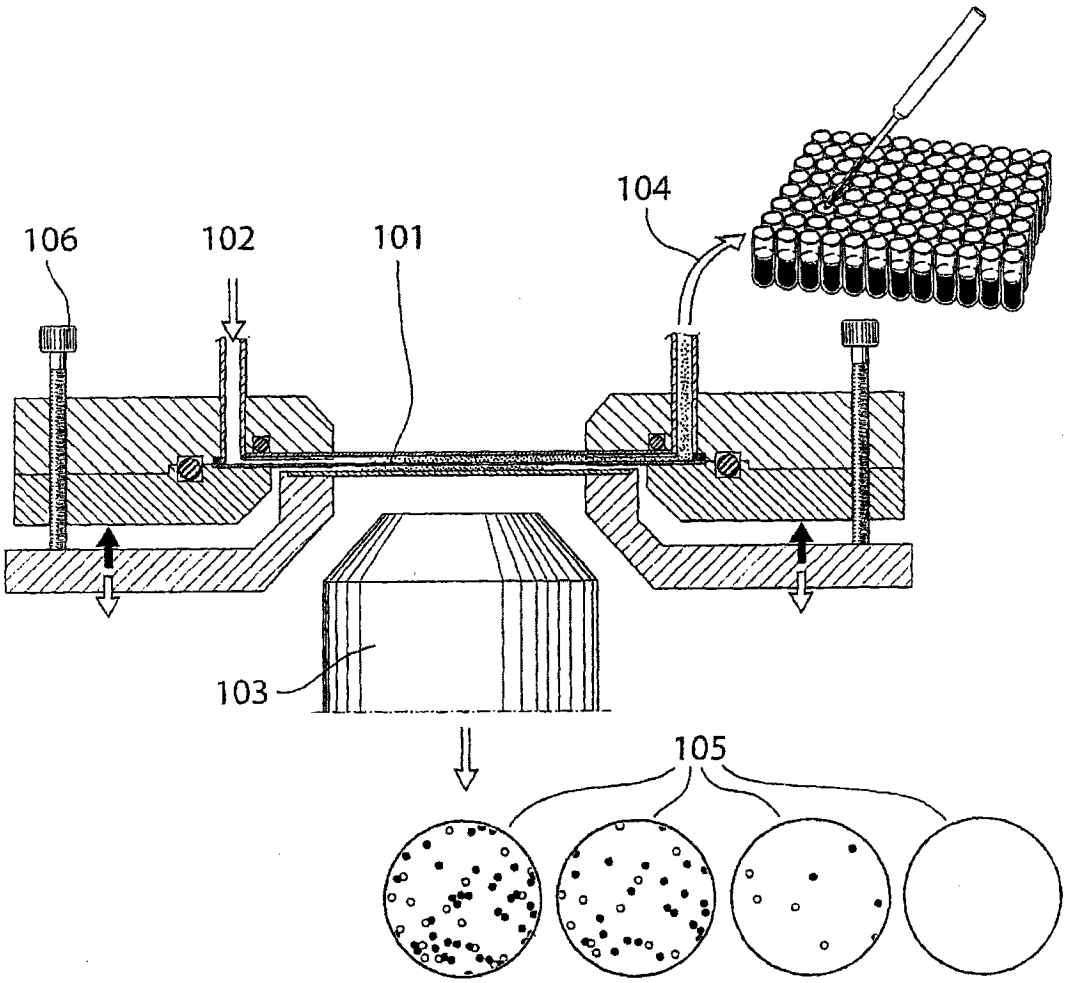


图 1

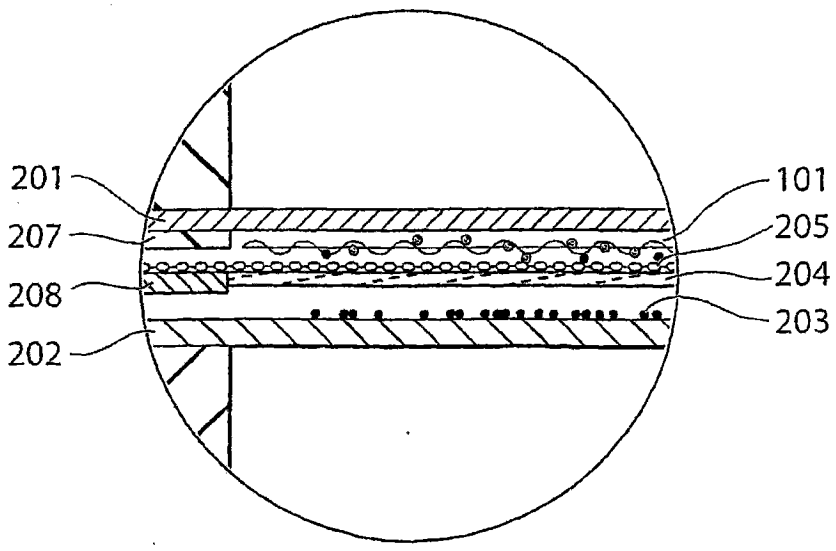


图 2

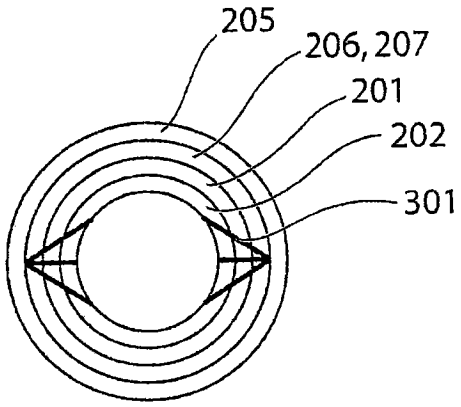

205
206, 207
201
202
301

图 3

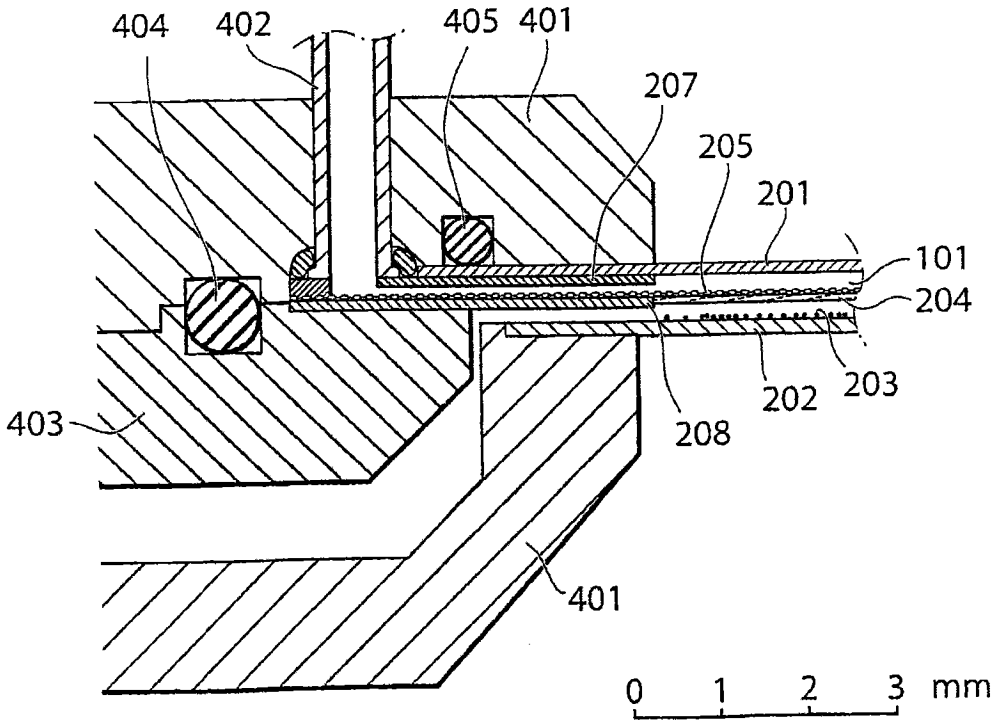

404
402
405
401
207
205
201
101
204
203
202
208
403
401
0 1 2 3 mm

图 4