



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 111918644 A

(43) 申请公布日 2020. 11. 10

(21) 申请号 201880084655.8

申请人 加利福尼亚大学董事会

(22) 申请日 2018.11.16

(72) 发明人 萨米尔·米特拉戈特里

(30) 优先权数据

62/588,008 2017.11.17 US

62/681,856 2018.06.07 US

62/681,861 2018.06.07 US

62/681,866 2018.06.07 US

62/681,852 2018.06.07 US

阿姆利塔·班纳里 泰勒·布朗

凯莉·易卜生

克里斯蒂安·阿加泰莫

(74) 专利代理机构 北京信慧永光知识产权代理有限公司 11290

代理人 董世豪 张淑珍

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2020.06.29

(51) Int. Cl.

A61K 9/00 (2006.01)

A61K 31/14 (2006.01)

A61K 31/20 (2006.01)

A61K 38/39 (2006.01)

A61L 26/00 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/061532 2018.11.16

(87) PCT国际申请的公布数据

W02019/099837 EN 2019.05.23

(71) 申请人 哈佛大学校长及研究员协会

地址 美国马萨诸塞州

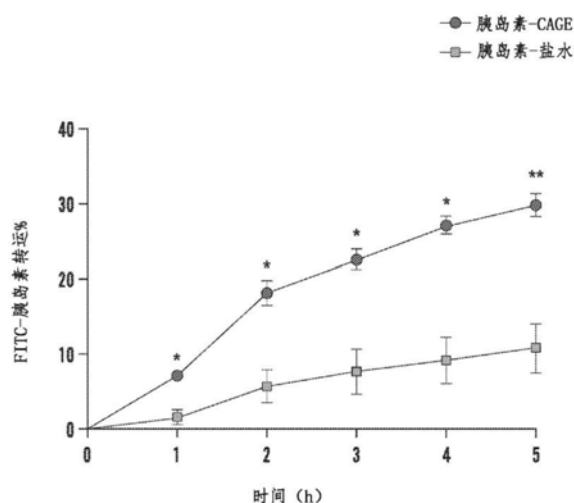
权利要求书7页 说明书84页 附图40页

(54) 发明名称

用于内部递送的离子液体

(57) 摘要

本文所述的技术针对例如用于口服或胃肠外给予的、包含CAGE和至少一种活性化合物的组合物。



1. 一种口服递送至少一种活性化合物的方法,所述方法包括口服给予与包含胆碱和香叶酸根(CAGE)的离子液体的组合物组合的所述活性化合物。

2. 一种递送至少一种活性化合物的方法,所述方法包括皮下、皮内或静脉内给予与CAGE组合的所述活性化合物。

3. 一种递送至少一种活性化合物的方法,所述方法包括向粘膜给予与CAGE组合的所述活性化合物。

4. 如权利要求3所述的方法,其中,所述粘膜为鼻粘膜、口腔粘膜或阴道粘膜。

5. 一种胃肠外递送至少一种活性化合物的方法,所述方法包括胃肠外给予与CAGE组合的所述活性化合物。

6. 如权利要求5所述的方法,其中,所述给予包括递送至肿瘤。

7. 一种在有需要的受试者中治疗疾病的方法,所述方法通过注射入受影响的组织中而向所述受试者给予与CAGE组合的活性化合物。

8. 如权利要求7所述的方法,其中,所述疾病为癌症、肥胖、增生或由组织生长引起的任何其它疾病。

9. 如权利要求1-8中任一项所述的方法,其中,CAGE的浓度为至少0.1%w/v。

10. 如权利要求1-9中任一项所述的方法,其中,所述CAGE包含比例为从约2:1至约1:10的胆碱:香叶酸或香叶酸根。

11. 如权利要求1-9中任一项所述的方法,其中,所述CAGE包含比例为从约1:1至约1:4的胆碱:香叶酸或香叶酸根。

12. 如权利要求1-9中任一项所述的方法,其中,所述CAGE包含比例为从约1:2至约1:4的胆碱:香叶酸或香叶酸根。

13. 如权利要求1-12中任一项所述的方法,其中,所述离子液体的阴离子包括香叶酸和/或香叶酸根。

14. 如权利要求1-13中任一项所述的方法,其中,将与CAGE组合的所述活性化合物给予一次。

15. 如权利要求1-14中任一项所述的方法,其中,将与CAGE组合的所述活性化合物以多剂量给予。

16. 如权利要求1-15中任一项所述的方法,其中,所述活性化合物包括核酸分子。

17. 如权利要求1-15中任一项所述的方法,其中,所述活性化合物包括小分子。

18. 如权利要求1-15中任一项所述的方法,其中,所述活性化合物包括多肽。

19. 如权利要求1-15中任一项所述的方法,其中,所述活性化合物包括抗体或抗体试剂。

20. 如权利要求1-19中任一项所述的方法,其中,所述活性化合物包括化疗化合物。

21. 如权利要求1-20中任一项所述的方法,其中,所述活性化合物包括胰岛素。

22. 如权利要求1-20中任一项所述的方法,其中,所述活性化合物包括GLP-1多肽或其模拟物或类似物。

23. 如权利要求21-22中任一项所述的方法,其中,所述活性化合物以1-20mg/kg的剂量提供。

24. 一种组合物,所述组合物包含与CAGE组合的活性化合物。

25. 如权利要求24所述的组合物,其中,CAGE的浓度为至少0.1%w/v或5%w/w。
26. 如权利要求24-25中任一项所述的组合物,其中,所述CAGE包含比例为从约2:1至约1:10的胆碱:香叶酸或香叶酸根。
27. 如权利要求24-26中任一项所述的组合物,其中,所述CAGE包含比例为从约1:1至约1:4的胆碱:香叶酸或香叶酸根。
28. 如权利要求24-27中任一项所述的组合物,其中,所述CAGE包含比例为从约1:2至约1:4的胆碱:香叶酸或香叶酸根。
29. 如权利要求24-28中任一项所述的组合物,其中,所述活性化合物包括核酸分子。
30. 如权利要求24-28中任一项所述的组合物,其中,所述活性化合物包括小分子。
31. 如权利要求24-28中任一项所述的组合物,其中,所述活性化合物包括多肽。
32. 如权利要求24-31中任一项所述的组合物,其中,所述活性化合物包括抗体或抗体试剂。
33. 如权利要求24-32中任一项所述的组合物,其中,所述活性化合物包括化疗化合物。
34. 如权利要求24-30中任一项所述的组合物,其中,所述活性化合物包括胰岛素。
35. 如权利要求24-31中任一项所述的组合物,其中,所述活性化合物包括GLP-1多肽或其模拟物或类似物。
36. 如权利要求34-35中任一项所述的组合物,其中,所述活性化合物以1-20mg/kg的剂量提供。
37. 如权利要求24-36中任一项所述的组合物,所述组合物进一步包含另外的药学上可接受的载体。
38. 如权利要求24-37中任一项所述的组合物,将所述组合物配制为口服、皮下或胃肠外制剂。
39. 如权利要求24-38中任一项所述的组合物,将所述组合物配制为用于向粘膜给予。
40. 如权利要求39所述的组合物,其中,所述粘膜为鼻粘膜、口腔粘膜或阴道粘膜。
41. 如权利要求38所述的组合物,其中,所述口服制剂为包含所述活性化合物和CAGE的组合的可降解的胶囊。
42. 如权利要求24-41中任一项所述的组合物,其中,与不存在CAGE时的活性相比,所述活性化合物的生物学活性得以改善或稳定。
43. 如权利要求1-42中任一项所述的方法或组合物,其中,所述活性化合物和CAGE的组合为混合物。
44. 如权利要求1-42中任一项所述的方法或组合物,其中,所述活性化合物和CAGE的组合包括包含所述活性化合物的纳米颗粒、以包含CAGE的组合物处于溶液或混悬液中的纳米颗粒。
45. 一种将核酸分子递送至细胞的方法,所述方法包括使所述细胞同与如下组合物组合的核酸分子接触,所述组合物包含胆碱和香叶酸根(CAGE)的离子液体。
46. 如权利要求45所述的方法,其中,所述细胞为受试者中的细胞,并且所述接触的步骤包括向所述受试者给予与如下组合物组合的所述核酸分子,所述组合物包含胆碱和香叶酸根(CAGE)的离子液体。
47. 如权利要求45-46中任一项所述的方法,其中,所述核酸分子包括载体、表达载体或

抑制性核酸分子。

48. 如权利要求45-47中任一项所述的方法, 其中, CAGE的浓度为至少0.1%w/v或5%w/w。

49. 如权利要求45-47中任一项所述的方法, 其中, 所述CAGE包含比例为从约2:1至约1:10的胆碱: 香叶酸或香叶酸根。

50. 如权利要求45-47中任一项所述的方法, 其中, 所述CAGE包含比例为从约1:1至约1:4的胆碱: 香叶酸或香叶酸根。

51. 如权利要求45-47中任一项所述的方法, 其中, 所述CAGE包含比例为从约1:2至约1:4的胆碱: 香叶酸或香叶酸根。

52. 如权利要求45-51中任一项所述的方法, 其中, 所述离子液体的阴离子包括香叶酸和/或香叶酸根。

53. 如权利要求45-52中任一项所述的方法, 其中, 所述核酸分子和CAGE的组合为混合物。

54. 如权利要求45-53中任一项所述的方法, 其中, 所述核酸分子和CAGE的组合包括包含所述核酸分子的纳米颗粒、以包含CAGE的组合物处于溶液或混悬液中的纳米颗粒。

55. 用于口服递送、递送至粘膜、胃肠外递送或治疗疾病的与包含胆碱和香叶酸根(CAGE)的离子液体的组合物组合的至少一种活性化合物。

56. 如权利要求55所述的组合, 其中, 所述粘膜为鼻粘膜、口腔粘膜或阴道粘膜。

57. 如权利要求55所述的组合, 其中, 所述胃肠外给予包括递送至肿瘤。

58. 如权利要求55所述的组合, 其中, 所述治疗包括将所述组合物注射至受影响的组织。

59. 如权利要求58所述的组合, 其中, 所述疾病为癌症、肥胖、增生或由组织生长引起的任何其它疾病。

60. 如权利要求55-59中任一项所述的组合, 其中, CAGE的浓度为至少0.1%w/v或5%w/w。

61. 如权利要求55-59中任一项所述的组合, 其中, 所述CAGE包含比例为从约2:1至约1:10的胆碱: 香叶酸或香叶酸根。

62. 如权利要求55-61中任一项所述的组合, 其中, 所述CAGE包含比例为从约1:1至约1:4的胆碱: 香叶酸或香叶酸根。

63. 如权利要求55-61中任一项所述的组合, 其中, 所述CAGE包含比例为从约1:2至约1:4的胆碱: 香叶酸或香叶酸根。

64. 如权利要求55-63中任一项所述的组合, 其中, 所述离子液体的阴离子包括香叶酸和/或香叶酸根。

65. 如权利要求55-64中任一项所述的组合, 其中, 将与CAGE组合的所述活性化合物给予一次。

66. 如权利要求55-64中任一项所述的组合, 其中, 将与CAGE组合的所述活性化合物以多剂量给予。

67. 如权利要求55-66中任一项所述的组合, 其中, 所述活性化合物包括核酸分子。

68. 如权利要求55-66中任一项所述的组合, 其中, 所述活性化合物包括小分子。

69. 如权利要求55-66中任一项所述的组合,其中,所述活性化合物包括多肽。
70. 如权利要求55-66中任一项所述的组合,其中,所述活性化合物包括抗体或抗体试剂。
71. 如权利要求55-66中任一项所述的组合,其中,所述活性化合物包括化疗化合物。
72. 如权利要求55-66中任一项所述的组合,其中,所述活性化合物包括胰岛素。
73. 如权利要求55-66中任一项所述的组合,其中,所述活性化合物包含GLP-1多肽或其模拟物或类似物。
74. 如权利要求73所述的组合,其中,所述活性化合物以1-20mg/kg的剂量提供。
75. 一种治疗肥胖症、防止体重增加或减轻受试者体重的方法,所述方法包括向受试者口服给予包含胆碱和香叶酸根(CAGE)的离子液体的组合物。
76. 如权利要求75所述的方法,其中,CAGE的浓度为至少0.1%w/v。
77. 如权利要求75-76中任一项所述的方法,其中,所述CAGE包含比例为从约2:1至约1:10的胆碱:香叶酸或香叶酸根。
78. 如权利要求75-77中任一项所述的方法,其中,所述CAGE包含比例为从约1:1至约1:4的胆碱:香叶酸或香叶酸根。
79. 如权利要求75-78中任一项所述的方法,其中,所述离子液体的阴离子包括香叶酸和/或香叶酸根。
80. 如权利要求75-79中任一项所述的方法,其中,所述组合物进一步包含活性化合物。
81. 如权利要求80所述的方法,其中,所述活性化合物在治疗肥胖症方面是治疗学上有效的。
82. 如权利要求80所述的方法,其中,所述活性化合物在治疗与肥胖症有关的疾病方面是治疗学上有效的。
83. 如权利要求80-82中任一项所述的方法,其中,所述活性化合物包括小分子。
84. 如权利要求80-82中任一项所述的方法,其中,所述活性化合物包括多肽。
85. 如权利要求80-82中任一项所述的方法,其中,所述活性化合物包括抗体或抗体试剂。
86. 一种用于治疗肥胖症、防止体重增加或减轻受试者体重的方法中的包含胆碱和香叶酸根的离子液体(CAGE)的组合物,其中,将所述组合物口服给予至所述受试者。
87. 如权利要求86所述的组合物,其中,CAGE的浓度为至少0.1%w/v。
88. 如权利要求86-87中任一项所述的组合物,其中,所述CAGE包含比例为从约2:1至约1:10的胆碱:香叶酸或香叶酸根。
89. 如权利要求86-87中任一项所述的组合物,其中,所述CAGE包含比例为从约1:1至约1:4的胆碱:香叶酸或香叶酸根。
90. 如权利要求86-89中任一项所述的组合物,其中,所述离子液体的阴离子包括香叶酸和/或香叶酸根。
91. 如权利要求86-90中任一项所述的组合物,其中,所述组合物进一步包含活性化合物。
92. 如权利要求91所述的组合物,其中,所述活性化合物在治疗肥胖症方面是治疗学上有效的。

93. 如权利要求91所述的组合物,其中,所述活性化合物在治疗与肥胖症有关的疾病方面是治疗学上有效的。

94. 如权利要求91-93中任一项所述的组合物,其中,所述活性化合物包括小分子。

95. 如权利要求91-93中任一项所述的组合物,其中,所述活性化合物包括多肽。

96. 如权利要求91-93中任一项所述的组合物,其中,所述活性化合物包括抗体或抗体试剂。

97. 一种递送至少一种活性化合物的方法,所述方法给予与包含盐的组合物组合的活性化合物,其中,所述盐以至少0.05M的浓度存在。

98. 如权利要求97所述的方法,其中,所述盐为离子液体。

99. 如权利要求98所述的方法,其中,所述离子液体为胆碱和香叶酸根 (CAGE)。

100. 如权利要求99所述的方法,其中,所述阳离子为胆碱。

101. 如权利要求99-100中任一项所述的方法,其中,所述阴离子为香叶酸或香叶酸根。

102. 如权利要求97-101中任一项所述的方法,其中,所述递送为口服的、皮下的、皮内的、静脉内的、胃肠外的或向粘膜的递送。

103. 如权利要求97-102中任一项所述的方法,其中,所述递送为口服的。

104. 如权利要求97-103中任一项所述的方法,其中,所述盐以至少0.05M、0.1M、0.5M、1M、1.5M、2M、2.5M、3M、3.5M、4M或更高的浓度存在。

105. 如权利要求97-104中任一项所述的方法,其中,所述盐以从约0.05M至约4M的浓度存在。

106. 如权利要求97-105中任一项所述的方法,其中,所述盐在给予后溶解。

107. 如权利要求97-105中任一项所述的方法,其中,所述盐为纯的或无水的液体。

108. 如权利要求97-105中任一项所述的方法,其中,所述盐为水性溶液。

109. 如权利要求97-108中任一项所述的方法,其中,所述给予为向受试者给予。

110. 如权利要求97-108中任一项所述的方法,其中,所述给予为接触细胞和/或组织。

111. 如权利要求97-110中任一项所述的方法,其中,所述活性化合物包括核酸分子、化疗化合物、小分子、肽和/或抗体或抗体试剂。

112. 如权利要求111所述的方法,其中,所述活性化合物为所述盐的组分。

113. 如权利要求111所述的方法,其中,所述活性化合物包括胰岛素或者GLP-1多肽或其模拟物或类似物。

114. 一种组合物,所述组合物包含:

a. 一种盐,其中,所述盐以至少0.05M的浓度存在;以及

b. 一种活性化合物。

115. 如权利要求114所述的组合物,其中,所述盐为离子液体。

116. 如权利要求115所述的组合物,其中,所述离子液体为胆碱和香叶酸根 (CAGE)。

117. 如权利要求116所述的组合物,其中,所述阳离子为胆碱。

118. 如权利要求116或117所述的组合物,其中,所述阴离子为香叶酸或香叶酸根。

119. 如权利要求114-118中任一项所述的组合物,其中,所述盐以至少0.05M、0.1M、0.5M、1M、1.5M、2M、2.5M、3M、3.5M、4M或更高的浓度存在。

120. 如权利要求114-119中任一项所述的组合物,其中,所述盐以从约0.05M至约4M的

浓度存在。

121. 如权利要求114-120中任一项所述的组合物,其中,所述盐为纯的或无水的液体。

122. 如权利要求114-120中任一项所述的组合物,其中,所述盐为水性溶液。

123. 如权利要求114-121中任一项所述的组合物,其中,所述活性化合物包括核酸分子、化疗化合物、小分子、肽和/或抗体或抗体试剂。

124. 如权利要求123所述的组合物,其中,所述活性化合物为所述盐的组分。

125. 如权利要求123所述的组合物,其中,所述活性化合物包括胰岛素或者GLP-1多肽或其模拟物或类似物。

126. 如权利要求114-125中任一项所述的组合物,所述组合物用于递送方法或治疗方法中。

127. 如权利要求97-126中任一项所述的方法或组合物,其中,与不存在盐时的活性相比,所述活性化合物的生物学活性得以改善或稳定。

128. 如权利要求97-127中任一项所述的方法或组合物,其中,所述活性化合物和所述盐的组合为混合物。

129. 如权利要求97-128中任一项所述的方法或组合物,其中,所述活性化合物和盐的组合包括包含所述活性化合物的纳米颗粒、以包含所述盐的组合物处于溶液或混悬液中的纳米颗粒。

130. 一种在有需要的受试者中治疗糖尿病、溃疡、癌症或纤维化的方法,所述方法包括向所述受试者给予如下组合物,所述组合物包含离子液体胆碱和香叶酸根(CAGE)且不包含另外的治疗活性剂。

131. 如权利要求130所述的方法,其中,所述给予是通过注射。

132. 如权利要求130所述的方法,其中,所述给予是口服的。

133. 如权利要求130-132中任一项所述的方法,其中,CAGE的浓度为至少0.1%w/v。

134. 如权利要求130-133中任一项所述的方法,其中,所述CAGE包含比例为从约2:1至约1:10的胆碱:香叶酸或香叶酸根。

135. 如权利要求130-133中任一项所述的方法,其中,所述CAGE包含比例为从约1:1至约1:4的胆碱:香叶酸或香叶酸根。

136. 如权利要求130-133中任一项所述的方法,其中,所述CAGE包含比例为从约1:2至约1:4的胆碱:香叶酸或香叶酸根。

137. 如权利要求130-136中任一项所述的方法,其中,所述离子液体的阴离子包括香叶酸和/或香叶酸根。

138. 一种组合物,所述组合物包含离子液体胆碱和香叶酸根(CAGE),并且不包含用于在有需要的受试者中治疗糖尿病、溃疡、癌症或纤维化的方法中的另外的治疗活性剂。

139. 如权利要求138所述的组合物,其中,所述给予是通过注射。

140. 如权利要求138所述的组合物,其中,所述给予是口服的。

141. 如权利要求138-140中任一项所述的组合物,其中,CAGE的浓度为至少0.1%w/v。

142. 如权利要求138-141中任一项所述的组合物,其中,所述CAGE包含比例为从约2:1至约1:10的胆碱:香叶酸或香叶酸根。

143. 如权利要求138-141中任一项所述的组合物,其中,所述CAGE包含比例为从约1:1

至约1:4的胆碱:香叶酸或香叶酸根。

144. 如权利要求138-141中任一项所述的组合物,其中,所述CAGE包含比例为从约1:2至约1:4的胆碱:香叶酸或香叶酸根。

145. 如权利要求138-144中任一项所述的组合物,其中,所述离子液体的阴离子包括香叶酸和/或香叶酸根。

用于内部递送的离子液体

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 根据35U.S.C.§119(e),本申请要求2017年11月17日递交的美国临时申请No.62/588,008、2018年6月7日递交的美国临时申请No.62/681,852、2018年6月7日递交的美国临时申请No.62/681,856、2018年6月7日递交的美国临时申请No.62/681,861、2018年6月7日提交的美国临时申请No.62/681,866的权益,以引用的方式将其内容整体并入本文。

技术领域

[0003] 本文所述的技术涉及用于稳定和递送活性化合物的离子液体,例如CAGE。

背景技术

[0004] 通过将化合物在溶剂中递送可改善许多活性化合物(例如药物活性化合物)的摄取。然而,这种方法通常不适合在体内使用,因为大多数此类溶剂表现出毒性副作用和/或对递送点起刺激物作用。这些毒性和刺激性作用严重到足以减缓活性化合物的性能或摄取的任何增加。

发明内容

[0005] 如本文所证明的,发明人已经发现特定的离子液体CAGE提供了改善的活性化合物摄取动力学,同时出人意料地不会引起有害的副作用。这种出乎意料的效果适用于通常容易受到载体溶剂引起的毒性和刺激的许多递送途径。由于已知CAGE具有抗菌特性,因此这种无毒副作用尤其令人惊讶。

[0006] 在任何实施方式的一个方面,本文描述了口服递送至少一种活性化合物的方法,该方法包括将所述活性化合物与包含胆碱和香叶酸根(geranate)(CAGE)的离子液体的组合物一起口服给予。在任何实施方式的一方面,本文描述了递送至少一种活性化合物的方法,该方法包括皮下、皮内或静脉内给予与CAGE组合的活性化合物。在任何实施方式的一个方面,本文描述了递送至少一种活性化合物的方法,该方法包括向粘膜给予与CAGE组合的活性化合物。

[0007] 在任何实施方式的一个方面,本文描述了至少一种活性化合物的胃肠外递送的方法,该方法包括将与CAGE组合的活性化合物胃肠外给予。在任何方面的一些实施方式中,给予包括递送至肿瘤。在任何实施方式的一个方面,本文描述了通过如下在有需要的受试者中治疗疾病的方法:通过注射入受影响的组织中而向受试者给予与CAGE组合的活性化合物。在任何方面的一些实施方式中,所述疾病为癌症、过度肥胖、肥胖、疣、增生或由不期望的组织生长引起的任何其它疾病。

[0008] 在任何实施方式的一个方面,本文描述了一种组合物,该组合物包含与CAGE组合的活性化合物。在任何方面的一些实施方式中,该组合物进一步包含额外的药学上可接受的载体。

[0009] 在任何方面的一些实施方式中,将组合物配制成口服制剂、皮下制剂或胃肠外制

剂。在任何方面的一些实施方式中,口服制剂为包含活性化合物和CAGE的组合的可降解胶囊。

[0010] 在任何方面的一些实施方式中,CAGE的浓度为至少0.1%w/v。在任何方面的一些实施方式中,CAGE包含比例为从约2:1至约1:10的胆碱:香叶酸或香叶酸根。在任何方面的一些实施方式中,CAGE包含比例为从约1:1至约1:4的胆碱:香叶酸或香叶酸根。在任何方面的一些实施方式中,CAGE包含比例为从约1:2至约1:4的胆碱:香叶酸或香叶酸根。在任何方面的一些实施方式中,离子液体的阴离子包括香叶酸和/或香叶酸根。

[0011] 在任何方面的一些实施方式中,将与CAGE组合的活性化合物给予一次。在任何方面的一些实施方式中,将与CAGE组合的活性化合物以多剂量给予。

[0012] 在任何方面的一些实施方式中,活性化合物包括核酸分子。在任何方面的一些实施方式中,活性化合物包括小分子。在任何方面的一些实施方式中,活性化合物包括多肽。在任何方面的一些实施方式中,活性化合物包括化疗化合物。在任何方面的一些实施方式中,活性化合物包括胰岛素。在任何方面的一些实施方式中,活性化合物包括抗体或抗体试剂。

[0013] 在任何方面的一些实施方式中,与不存在CAGE时的活性相比,活性化合物的生物学活性得以改善或稳定。

[0014] 在任何方面的一些实施方式中,活性化合物和CAGE的组合为混合物。在任何方面的一些实施方式中,活性化合物和CAGE的组合包括包含所述活性化合物的纳米颗粒、以包含CAGE的组合物处于溶液或混悬液中的纳米颗粒。

[0015] 如本文所证明的,发明人已经发现特定的离子液体CAGE减少了肠道中亲脂性分子的摄取。因此,CAGE可减少受试者的脂肪吸收,提供肥胖症的治疗或减轻体重/体重增加。

[0016] 在任何实施方式的一个方面,本文提供的是一种治疗肥胖症、防止体重增加或减轻受试者体重的方法,该方法包括向受试者口服给予包含胆碱和香叶酸根(CAGE)的离子液体的组合物。

[0017] 在任何方面的一些实施方式中,CAGE的浓度为至少0.1%w/v。在任何方面的一些实施方式中,CAGE包含比例为从约2:1至约1:10的胆碱:香叶酸或香叶酸根。在任何方面的一些实施方式中,CAGE包含比例为从约1:1至约1:4的胆碱:香叶酸或香叶酸根。在任何方面的一些实施方式中,离子液体的阴离子包括香叶酸和/或香叶酸根。

[0018] 在任何方面的一些实施方式中,该组合物进一步包含活性化合物。在任何方面的一些实施方式中,活性化合物在治疗肥胖症或与肥胖症有关的疾病方面是治疗学上有效的。在任何方面的一些实施方式中,活性化合物包括小分子、多肽、或抗体或抗体试剂。

[0019] 如本文所示的,在0.05M或更高的浓度下,盐(例如,离子液体或CAGE)显示出出乎意料的药物递送功效(例如,穿过细胞和/或细胞膜的能力)的增加。因此,本文描述了递送至少一种活性化合物的方法,该方法将活性化合物与包含盐的组合物组合给予,其中所述盐以至少0.05M的浓度存在。本文进一步描述了递送CAGE的方法,该方法以至少0.05M的浓度给予CAGE。在任何实施方式的一个方面,本文描述了包含盐和活性化合物的组合物,其中,所述盐以至少0.05M的浓度存在。

[0020] 在任何方面的一些实施方式中,盐为离子液体。在任何方面的一些实施方式中,离子液体为胆碱和香叶酸根(CAGE)。在任何方面的一些实施方式中,阳离子为胆碱。在任何方

面的一些实施方式中,阴离子为香叶酸或香叶酸根。

[0021] 在任何方面的一些实施方式中,递送为口服的、皮下的、皮内的、静脉内的、胃肠外的或向粘膜递送的。在任何方面的一些实施方式中,递送为口服的。

[0022] 在任何方面的一些实施方式中,盐以至少0.05M、0.1M、0.5M、1M、1.5M、2M、2.5M、3M、3.5M、4M或更高的浓度存在。在任何方面的一些实施方式中,盐以从约0.05M至约4M的浓度存在。

[0023] 在任何方面的一些实施方式中,盐在给予后溶解。在任何方面的一些实施方式中,盐为纯的或无水的液体。在任何方面的一些实施方式中,盐为水性溶液。

[0024] 在任何方面的一些实施方式中,给予为向受试者给予。在任何方面的一些实施方式中,给予为接触细胞和/或组织。

[0025] 在任何方面的一些实施方式中,活性化合物包括核酸分子、化疗化合物、小分子、肽和/或抗体或抗体试剂。在任何方面的一些实施方式中,活性化合物为盐的组分。在任何方面的一些实施方式中,活性化合物包括胰岛素。

[0026] 在任何方面的一些实施方式中,与不存在盐时的活性相比,活性化合物的生物学活性得以改善或稳定。在任何方面的一些实施方式中,活性化合物和盐的组合为混合物。在任何方面的一些实施方式中,活性化合物和盐的组合包括包含所述活性化合物的纳米颗粒、以包含盐的组合处于溶液或混悬液中的纳米颗粒。

[0027] 如本文所证明的,离子液体胆碱和香叶酸根 (CAGE) 被证明具有酶抑制剂活性,包括抑制胰岛素的降解。因此,本文提供的是与使用离子液体 (例如CAGE) 来治疗某些疾病有关的方法和组合物。在任何实施方式的一个方面,本文描述的是向有需要的受试者给予酶抑制疗法的方法,该方法包括向受试者给予包含离子液体胆碱和香叶酸根 (CAGE) 的组合物。在任何实施方式的一个方面,本文描述的是在有需要的受试者中治疗糖尿病、溃疡、癌症或纤维化的方法,该方法包括向受试者给予包含离子液体胆碱和香叶酸根 (CAGE) 的组合物。

[0028] 在任何方面的一些实施方式中,包含CAGE的组合物不包含另外的治疗活性剂。在任何方面的一些实施方式中,在向受试者给予包含CAGE的组合物的时间段内和/或在向受试者给予包含含有CAGE的组合物的治疗方案的时间段内,不向受试者给予用于该病症 (例如,糖尿病、溃疡、癌症或纤维化) 的另外的治疗活性剂。

[0029] 在任何方面的一些实施方式中,给予为通过注射的或口服的。

[0030] 在任何方面的一些实施方式中,CAGE的浓度为至少0.1%w/v。在任何方面的一些实施方式中,CAGE包含比例为从约2:1至约1:10的胆碱:香叶酸或香叶酸根。在任何方面的一些实施方式中,CAGE包含比例为从约1:1至约1:4的胆碱:香叶酸或香叶酸根。在任何方面的一些实施方式中,CAGE包含比例为从约1:2至约1:4的胆碱:香叶酸或香叶酸根。在任何方面的一些实施方式中,离子液体的阴离子包括香叶酸和/或香叶酸根。

附图说明

[0031] 图1显示了在CAGE存在时,FITC-胰岛素跨Caco-2单层转运的增强。数据表示为平均值±S.E. (n=6) (*p<0.01,**p<0.001)。

[0032] 图2A-图2B描述了覆盖有单层Caco-2细胞并用分散在盐水 (图2A) 和10mM CAGE (图

2B) 中的FITC-胰岛素孵育5小时的transwell膜的代表性共聚焦显微图像。图像以60×放大倍数拍摄。图像显示经DAPI标记的细胞核(蓝色)和FITC-胰岛素(绿色)的重叠。

[0033] 图3描述了用CAGE处理对Caco-2细胞的紧密连接完整性的影响。数据表示为平均值±S.E. (n=6); (*p<0.01; **p<0.001)。

[0034] 图4描述了在非糖尿病大鼠中空肠内给予时,胰岛素-CAGE降低血糖水平的功效。数据表示为平均值±S.E. (n=6)。与皮下给予2U/kg胰岛素相比,在从2h至3.5h和5h时,在经5U/kg胰岛素-CAGE治疗的大鼠的功效方面,注意到明显更高的功效(p<0.05)(由*表示)。

[0035] 图5描述了CAGE在增强胰岛素的口服生物利用度方面的功效。数据表示为平均值±S.E. (n=4)。

[0036] 图6描述了用于口服给予的放置在加长的9号胶囊中的CAGE的图片。

[0037] 图7描述了以胶囊口服给予的胰岛素-CAGE的体内功效。数据表示为平均值±S.E. (n=6)。与皮下给予的胰岛素相比,在各个时间点观察到CAGE-胰岛素的功效均明显更高(p<0.05)(以*表示)。

[0038] 图8A-图8E描述了小肠组织切片的苏木精和伊红染色的显微照片。(图8A)空肠内给予纯CAGE; (图8B)空肠内给予盐水; (图8C)口服给予纯CAGE; (图8D)口服给予胰岛素-盐水; (图8E)口服给予胰岛素-CAGE。比例尺:200μm。插图显示为粘膜表面,比例尺为50μm。

[0039] 图9描述了在不同的月数时从CAGE分离的胰岛素的圆二色谱。将胰岛素分散在CAGE中,并在RT(25℃)或4℃的冷藏下保存长达4个月。

[0040] 图10描述了在不同时间点从CAGE分离的胰岛素在降低非糖尿病大鼠的血糖水平方面的功效。在给予后1小时和2小时,注意到新鲜制备的胰岛素与在RT(25℃)下储存3个月的胰岛素-CAGE之间在生物活性方面的统计学上显著的差异(p<0.05)(表示为*)。所有数据均表示为平均值±S.E. (n=6)。

[0041] 图11左图显示了在CAGE中溶解的喜树碱(CPT)对4T1细胞的作用;右图显示了在CAGE中溶解的紫杉醇对4T1细胞的作用。两幅图均表明溶解在CAGE中的药物与溶解在DMSO中的药物同样有效。

[0042] 图12描述了皮下递送的来自CAGE的胰岛素(2U/kg)(蓝色)和对照(盐水中的2U/kg,橙色)以及单独的CAGE(绿色)的生物活性。与标准的胰岛素-盐水注射相比,CAGE中的胰岛素产生实质上更长持续时间的低血糖症。

[0043] 图13描述了在室温(RT)和4℃下储存在CAGE中的胰岛素的生物活性。甚至在室温下保存2个月也保持了生物活性。

[0044] 图14描述了CAGE对右旋糖酐在组织中的分散的影响。与盐水相比(最左边的子图),向制剂中添加CAGE增强了右旋糖酐在皮肤中的分散。在实施例2的表中对增强的幅度进行量化。纯CAGE使右旋糖酐的扩散增强了2.6倍至5.5倍。

[0045] 图15描述了在不同的月数时从CAGE分离出的胰岛素的圆二色谱。将胰岛素分散在CAGE中,并在室温(25℃)或4℃的冷藏下保存长达4个月。胰岛素的α-螺旋二级构象在CAGE中保留一长段时间。

[0046] 图16A-图16B显示了在非糖尿病大鼠中空肠内给予时,胰岛素-CAGE在降低血糖水平方面的功效。图16A描述了对禁食效应相关的血糖变化归一化后的各种制剂的功效。注射单独的盐水的动物被认为是禁食组,并且减去从盐水组获得的血糖后绘制数据。图16B描述

了与未将盐水血糖水平归一化的初始水平相比的血糖变化。所有数据均表示为平均值±标准误差(S.E.)(n=6)。与皮下给予的2U/kg胰岛素相比,注意到在研究的各个时间点的经5U/kg胰岛素-CAGE治疗的大鼠的疗效方面显著更高($p<0.05$)(由*表示)。

[0047] 图17描述了CAGE在增强胰岛素的口服生物利用度方面的功效。数据表示为平均值±S.E. (n=4)。

[0048] 图18A-图18B显示了以胶囊口服给予的胰岛素-CAGE的体内功效。图18A描述了对禁食效应相关的血糖变化归一化后的各种制剂的功效。给予空胶囊的动物被认为是禁食组,并且减去从空胶囊组获得的血糖变化后绘制数据。图18B描述了与未对空胶囊血糖水平进行归一化的初始水平相比的血糖变化。所有数据均表示为平均值±S.E. (n=6)。与皮下给予的胰岛素相比,观察到在各个时间点的CAGE-胰岛素的功效显著更高($p<0.05$)(以*表示)。

[0049] 图19描述了小肠组织切片的苏木精和伊红染色的显微照片。切片代表空肠内给予纯CAGE或盐水;口服给予纯CAGE、胰岛素-盐水或胰岛素-CAGE胶囊;以及在每天一次共7天将胰岛素、CAGE或胰岛素-CAGE胶囊重复给药之后。比例尺:200 μm 。插图 of 粘膜表面,比例尺为50 μm 。

[0050] 图20显示了在纯CAGE胶囊之后0.5小时继之以10U/kg胰岛素胶囊的连续给药时降低血糖的功效。在10U/kg胰岛素溶液以及CAGE和10U/kg胰岛素的连续的胶囊给药之间未观察到疗效方面的显著差异。数据表示为平均值±S.E. (n=6)。

[0051] 图21描述了通过CAGE降低粘液粘度。显示了无CAGE(0%)、1%w/v CAGE和5%w/v CAGE的模拟粘液在50.12 1/s的剪切速率下的以cP计的平均粘度值。数据表示为平均值±S.E. (n=3);(* $p<0.001$,CAGE治疗与无CAGE治疗进行比较)。

[0052] 图22描述了使用GFP-质粒的共聚焦图像。P3000TM试剂有助于将质粒与递送溶媒一起有效地递送至细胞核,有助于提高转染效率。P3000很可能是小分子,而不是脂质体。在完全更换培养基之前3天进行转染。

[0053] 图23描述了浓度依赖性:CAGE(1:2)+P3000%是指CAGE浓度。P3000(增强试剂)浓度在0.09%v/v保持恒定。在完全更换培养基之前3天进行转染。

[0054] 图24描述了CAGE组合物的作用:浓度为0.9%。当存在过量的香叶酸(1:2和1:4)时,出现最大的转染。P3000增强剂浓度在0.09%v/v保持恒定。在完全更换培养基之前,用IL+质粒在1天内进行转染。

[0055] 图25描述了使用GFP-质粒(对照)的共聚焦图像。在完全更换培养基之前3天进行转染。

[0056] 图26为室温下的纯CAGE-1:1(黑色实线)、CAGE-1:2(灰色实线)、CAGE-1:3(黑色虚线)、CAGE-1:4(灰色虚线)的广角X射线散射图。前峰的位置(低的q峰)对CAGE中的香叶酸摩尔比敏感,而相邻峰(高的q峰)的位置不敏感。

[0057] 图27A-图27D描述了显示室温下的在(图27A)CAGE-1:1、(图27B)CAGE-1:2、(图27C)CAGE-1:3、(图27D)CAGE-1:4中的水合诱导的纳米结构转变的广角X射线散射图。前峰(低的q峰)和相邻峰的位置和强度对CAGE中的水的量和香叶酸的摩尔比敏感。如从宽峰到尖峰的过渡所反映出的,在较高的香叶酸摩尔比下(如1:3和1:4),纳米结构变得有序。深黑色:纯CAGE;灰色实线:75%w/w CAGE;浅黑色:50%w/w CAGE;灰色/浅色虚线:25%w/w

CAGE;以及黑色/深色虚线:5%w/w CAGE。

[0058] 图28描述了在25℃和 $1s^{-1}$ 的剪切速率下,纯CAGE和50%水合的CAGE-1:2和CAGE-1:4的流变行为的代表性转变。加入50%水时,纯CAGE-1:2的粘度降低,而纯CAGE-1:4的粘度增加。深灰色:纯的;以及浅灰色:水合的。插图:粘性较低的CAGE-1:2 (50% H_2O ,w/w) 和凝胶样的CAGE-1:4 (50% H_2O ,w/w) 的照片。

[0059] 图29A描述了纯CAGE-1:4的牛顿特性(蓝色曲线)和50%水合的CAGE-1:4的非牛顿特性(红色曲线)的图。图29B描述了水合的50%水合的CAGE-1:4的剪切稀化行为的图。深灰色:纯CAGE-1:4;浅灰色:50%水合的CAGE-1:4。流变实验在25℃下进行。

[0060] 图30A-图30D描述了相对于显示出CMC的CAGE-1:1 (图30A)、CAGE-1:2 (图30B)、CAGE-1:3 (图30C)、CAGE-1:4 (图30D) 的浓度的芘发射的第一(I1)和第三(I3)振动带的比值的曲线图,其对应于急剧升降的斜率。CAGE-1:3和CAGE-1:4表现出两个CMC,很可能是由于两者自组装成两个不同的纳米结构。

[0061] 图31A-图31F描述了水中的DES纳米结构的冷冻-TEM显微照片。上部子图:(图31A) 5%w/w的CAGE-1:2的水包油微乳液;(图31B) 5%w/w的CAGE-1:3的水包油微乳液;(图31C) 5%w/w的CAGE-1:4的水包油微乳液;(图31D) 20%w/w的CAGE-1:2的胶束;(图31E) 20%的CAGE-1:3的囊泡;以及(图31F) CAGE1:4的囊泡。

[0062] 图32描述了在CAGE中给予的索马鲁肽的PK和PD的图。 $n=3$,平均值 \pm SEM。通过EIA试剂盒,T0时间点对索马鲁肽而言是阳性的,并且在虚线数据集中减去这些T0值。

[0063] 图33描述了在不同浓度的CAGE的存在下,荧光黄跨Caco-2单层转运的增强。数据表示为平均值 \pm S.E. ($n=4$) (* $p<0.05$,** $p<0.001$,*** $p<0.0001$;所有CAGE治疗与无CAGE治疗比较)。

[0064] 图34描述了各种浓度的CAGE对香豆素-6的被动胞吞转运的影响。数据表示为平均值 \pm S.E. ($n=4$);(* $p<0.05$; ** $p<0.0001$;无CAGE治疗与10mM CAGE治疗组比较)。

[0065] 图35描述了当用各种浓度的CAGE处理时的Caco-2细胞的活力。5小时后,将CAGE从培养基中移出并替换为新鲜的DMEM。在另外的19h(总共24h)之后,使用MTT测定法测量细胞活力。数据表示为平均值 \pm S.E. ($n=4$)。

[0066] 图36描述了覆盖有Caco-2细胞的层并用分散在各种浓度的CAGE或PPS中的FITC-胰岛素孵育5小时的transwell膜的代表性共聚焦显微照片。图像以40 \times 放大倍数拍摄。图像显示出经DAPI标记的细胞核(蓝色)、FITC-胰岛素(绿色)以及DAPI染色和FITC-胰岛素的叠加。

[0067] 图37显示了在CAGE的存在下,FITC-胰岛素跨Caco-2单层转运的增强。数据表示为平均值 \pm S.E. ($n=4$) (* $p<0.05$,** $p<0.001$;CAGE治疗与无CAGE治疗比较)。

[0068] 图38描述了在不同浓度的CAGE的存在下,FITC-右旋糖酐跨Caco-2单层转运的增强。数据表示为平均值 \pm S.E. ($n=4$) (* $p<0.01$,** $p<0.0001$;CAGE治疗与无CAGE治疗比较)。

[0069] 图39描述了当用各种浓度的CAGE或10mM癸酸钠处理时对Caco-2细胞中的紧密连接完整性的影响。数据表示为平均值 \pm S.E. ($n=4$);(* $p<0.05$; ** $p<0.0001$;所有CAGE治疗与无CAGE治疗比较)。

[0070] 图40描述了通过CAGE对抗胰蛋白酶消化而使胰岛素的稳定性增强。数据表示为平均值 \pm S.E. ($n=3$);(* $p<0.01$; ** $p<0.001$;胰岛素-PBS治疗与胰岛素-CAGE治疗比较)。

具体实施方式

[0071] 如本文所述,发明人已经证明离子液体CAGE (胆碱和香叶酸或香叶酸根) 不仅对口服和/或胃肠外使用而言是安全的,而且显著改善了CAGE溶液中所含的活性化合物的递送,对大多数溶剂而言通常未观察到副作用。实际上,作为一类存在普遍的毒性问题的物质的溶剂,因此“溶剂暴露”成为常用的医学术语,意在涵盖与一种或多种溶剂接触的危害。已经证明,通常溶剂暴露以及暴露至选择的个别溶剂形成多种病症的病因。有鉴于此,本文展示的CAGE的安全性特别令人惊讶和出乎意料,尤其是通过口服和胃肠外给予途径绕过了人体的许多自然防御。

[0072] 因此,在任何实施方式的一个方面,本文描述的是口服递送至少一种活性化合物的方法,该方法包括口服给予包含与离子液体胆碱和香叶酸根 (CAGE) 组合的活性化合物的组合物。

[0073] 口服给予可包括提供片剂 (包括但不限于刻痕或包衣片剂)、丸剂、囊片、胶囊、可咀嚼片剂、粉剂包、扁囊剂、锭剂、糯米纸囊剂、气雾剂或液体剂 (例如但不限于糖浆、酏剂,处于水性液体、非水性液体、水包油乳液或油包水乳液中的溶液或混悬液)。口服制剂可包括分散剂型,例如但不限于片剂 (包括但不限于刻痕或包衣片剂)、丸剂、囊片、胶囊、可咀嚼片剂、粉剂包、扁囊剂、锭剂、糯米纸囊剂、气雾剂或液体剂 (例如但不限于糖浆、酏剂,处于水性液体、非水性液体、水包油乳液或油包水乳液中的溶液或混悬液)。这样的组合物包含预定量的CAGE和至少一种活性化合物,并且可通过本领域技术人员公知的药学方法制备。通常参见Remington: The Science and Practice of Pharmacy,第21版,Lippincott, Williams和Wilkins, Philadelphia PA (2005)。

[0074] 在任何实施方式的一个方面,本文描述的是治疗糖尿病的方法,该方法包括口服给予与CAGE组合的胰岛素的口服制剂。在任何实施方式的一个方面,本文描述的是治疗糖尿病的方法,该方法包括口服给予与CAGE组合的GLP-1多肽或其模拟物/类似物的口服制剂。

[0075] 在本文中注意到,例如,在为了给予以允许活性化合物渗透到机体内部而必须穿透的细胞层的特征方面,口服和局部给予差异很大。在皮肤中,由所给予的组合物穿过的第一层为表皮,其由复层鳞状上皮和基底层组成。表皮具有至少5层,并且最常见的细胞类型是Merkel细胞、角化细胞、黑素细胞 (melanocytes) 和朗格汉斯细胞。值得注意的是,皮肤的最外表面包括25-30个细胞厚的死细胞层。在表皮之下是真皮,其包括结缔组织、血管和各种腺体。相比之下,对于口服给予,该组合物立即接触肠上皮,其为具有两层薄的下底层的单层单纯柱状上皮细胞。此外,肠上皮形成紧密的连接以提供不渗透性,而皮肤包含角蛋白以形成对生物体而言的外部屏障。因此,在不引起不当损害的情况下穿过这些组织中的每个的问题是明显不同的,并且在口服给予期间遇到的组织显然更容易受到刺激和毒性的影响。

[0076] 如本文其它地方所述,在口服给予期间,CAGE能够安全地携带活性化合物跨过所遇到的敏感膜。类似地,CAGE可安全地递送活性化合物跨过其它敏感的内部组织。

[0077] 如本文实施例中所述,CAGE既提供蛋白酶抑制剂又提供粘液溶解活性。因此,其特别适合作为递送至/跨过粘膜的溶媒。在任何实施方式的一个方面,本文描述的是递送至少一种活性化合物的方法,该方法包括将与CAGE组合的活性化合物给予至粘膜,例如鼻膜、口

腔膜或阴道膜。

[0078] CAGE还用于溶解药物,从而使得能够高浓度的注射。与传统的增溶载体(例如EtOH)相比,CAGE也在组织中以更大的速率扩散。在一些实施方式中,不希望受到理论的束缚,CAGE也可扩散到组织中,从而允许药物的局部沉淀。经沉淀的药物可形成贮库并显示出持续释放。

[0079] 在另一个实施方式中,即使在CAGE的局部扩散之后,药物也可继续在CAGE中保持可溶,并引起快速和增强的向循环中的递送。皮下递送通常需要多剂量或控释制剂。由于对时机本身的任何担心,并不必须执行这种方法,而这么做是为了确保在活性化合物降解之前已接收到全部剂量。推注给予通常是效率低的,因为活性化合物在全剂量可发挥作用之前会降解或代谢。由于CAGE稳定活性化合物的能力,因此这种方法是不必要的,即总的期望剂量可作为单次给予被递送而无需控释机制。

[0080] 因此,在任何实施方式的一个方面,本文描述的是通过皮下、皮内或静脉内给予来递送至少一种活性化合物的方法,该方法包括给予与CAGE组合的活性化合物。在任何方面的一些实施方式中,皮下、皮内或静脉内给予包括经由注射、导管或端口等给予。

[0081] 发明人进一步证明,在较高浓度下,CAGE提供了细胞毒性作用,其中超过50%的暴露至CAGE的细胞被杀死。这对于活性化合物本身被设计为具有细胞毒性或抑制细胞生长或者可通过抑制一种或多种细胞类型(例如癌症)的生长来治疗的疾病的应用来说特别有用。适合于细胞毒性的CAGE浓度可根据例如靶组织类型、所使用的CAGE的化学计量比、所给予的组合物的量和/或期望的效果的程度而变化。

[0082] 因此,在任何实施方式的一个方面,本文描述的是胃肠外递送至少一种活性化合物的方法,该方法包括将与CAGE组合的活性化合物胃肠外给予。在一些实施方式中,胃肠外给予包括递送至肿瘤,例如癌症肿瘤。

[0083] 在一些实施方式中,包含与本文所述的至少一种活性化合物组合的CAGE的组合物可为胃肠外剂型。由于胃肠外剂型的给予通常绕过患者对抗污染物的天然防御,因此胃肠外剂型优选为无菌的或能够在给予患者之前被灭菌。胃肠外剂型的实例包括但不限于准备好用于注射的溶液、准备好用于溶解或悬浮在药学上可接受的注射溶媒中的干燥产品、准备好用于注射的混悬液和乳剂。另外,可制备用于患者的给予的控释胃肠外剂型,包括但不限于DUROS®型剂型和剂量倾卸。

[0084] 可用于提供包含与如本文所公开的至少一种活性化合物组合的CAGE的组合物的胃肠外剂型的合适的溶媒是本领域技术人员公知的。实例包括但不限于无菌水、注射用水USP、盐水溶液、葡萄糖溶液、水性溶媒(例如但不限于氯化钠注射液、林格氏注射液、右旋糖注射液、右旋糖和氯化钠注射液以及乳酸盐林格氏注射液)、水混溶的溶媒(例如但不限于乙醇、聚乙二醇和丙二醇)、非水性溶媒(例如但不限于玉米油、棉籽油、花生油、芝麻油、油酸乙酯、肉豆蔻酸异丙酯和苯甲酸苄酯)。还可将改变或修改组分在本文所公开的组合物中的溶解度的化合物掺入本公开的胃肠外剂型中,包括常规胃肠外剂型和控释胃肠外剂型。

[0085] 常规剂型通常提供从制剂中快速或立即释放药物。根据药物的药理学和药代动力学,常规剂型的使用可引起患者血液和其它组织中的药物浓度的广泛波动。这些波动可影响许多参数,例如剂量频率、起效、功效持续时间、治疗性血液水平的维持、毒性、副作用等。尽管如上文所述,包含与至少一种活性化合物组合的CAGE的组合物可消除使用控释制剂的

某些理由,但在本文考虑之列的是在一些实施方式中所述方法和组合物可用于控释制剂中。例如,控释制剂可用于控制药物的起效、作用的持续时间、治疗窗口内的血浆水平和血液峰值水平。特别是,控释或缓释剂型或制剂可用于确保实现药物的最大功效,同时使潜在的副作用和安全问题最小化,这可由药物剂量不足(例如低于最低治疗水平)以及超过药物的毒性水平所致。在一些实施方式中,包含与至少一种活性化合物组合的CAGE的组合物可以以持续释放制剂的形式给予。

[0086] 控释药学产品的共同目标是改善其非控释对应物所实现的药物治疗。理想地,在医学治疗中使用最佳设计的控释制剂的特征在于,在最短的时间内使用最少的药物物质来治愈或控制病症。控释制剂的优点包括:1) 延长药物活性;2) 降低给药频率;3) 增加患者依从性;4) 使用总量较少的药物;5) 减少局部或全身性副作用;6) 最小化药物积累;7) 减少血液水平的波动;8) 治疗功效的改善;9) 减少药物活性的丧失或增强;以及10) 改善疾病或病症的控制速度。Kim,Cherng-ju,Controlled Release Dosage Form Design,2(Technomic Publishing,Lancaster,Pa.:2000)。

[0087] 大多数控释制剂被设计成起始释放一定量的药物(活性成分),迅速产生期望的治疗作用,并逐渐和连续释放其它量的药物以在延长的时间段内维持这一水平的治疗或预防作用。为了维持药物在体内的这种恒定水平,必须以一定的速率从剂型中释放药物,其将替代被代谢和从体内排出的药物的量。活性成分的控释可通过多种条件刺激,包括但不限于pH、离子强度、渗透压、温度、酶、水和其它生理条件或化合物。

[0088] 多种已知的控释或缓释剂型、制剂和装置可适于与本公开的盐和组合物一起使用。实例包括但不限于在美国专利No.3,845,770、No.3,916,899、No.3,536,809、No.3,598,123、No.4,008,719、No.5674,533、No.5,059,595、No.5,591,767、No.5,120,548;No.5,073,543、No.5,639,476、No.5,354,556、No.5,733,566和No.6,365,185B1中描述的那些,将其各自通过引用并入本文。这些剂型可用于提供一种或多种活性成分的缓慢释放或控制释放,例如使用羟丙基甲基纤维素、其它聚合物基质、凝胶、渗透膜、渗透系统(例如**OROS®**, Alza Corporation,Mountain View,Calif.美国)、或其组合以提供不同比例的期望的释放曲线。

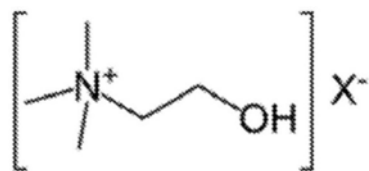
[0089] 在任何实施方式的一个方面,本文描述的是通过注射入受影响的组织中而向受试者给予与CAGE组合的活性化合物,从而治疗有需要的受试者的疾病的方法。在一些实施方式中,受影响的组织为包含病变细胞的组织。在一些实施方式中,受影响的组织为显示出疾病症状的组织。合适的受影响的组织的非限制性实例包括肿瘤组织、脂肪组织、疣、不期望的脂肪组织等。

[0090] 在任何方面的一些实施方式中,疾病为由组织生长引起的疾病,例如,不希望的、异常的或病理性的组织生长。由组织生长引起的疾病可为由组织生长的速率、组织生长的位置或组织生长的模式/结构引起的或以其为特征的任何疾病,其与健康受试者中的该组织类型的正常情况不同。这种疾病的非限制性实例为肿瘤、癌症、肥胖/肥胖症、疣和/或增生。

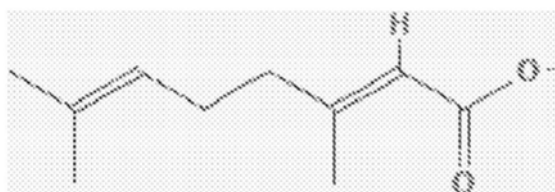
[0091] 如本文所使用的,术语“离子液体(ILs)”是指在室温下为液态的有机盐或有机盐的混合物。这类溶剂已被示出可用于多种领域,包括工业加工、催化、制药和电化学。离子液体包含至少一种阴离子组分和至少一种阳离子组分。离子液体可包含额外的氢键供体(即,

可提供-OH或-NH基团的任何分子),实例包括但不限于醇、脂肪酸和胺。至少一种阴离子组分和至少一种阳离子组分可以以任何摩尔比存在。示例性的摩尔比(阳离子:阴离子)包括但不限于1:1、1:2、2:1、1:3、3:1、2:3、3:2,以及这些比例之间的范围。对于离子液体的进一步讨论,参见例如Hough等,“The third evolution of ionic liquids:active pharmaceutical ingredients”,New Journal of Chemistry,31:1429 (2007)和Xu等,“Ionic Liquids:Ion Mobilities,Glass Temperatures,and Fragilities”,Journal of Physical Chemistry B,107 (25):6170-6178 (2003);将其各自通过引用以其整体并入本文。在任何方面的一些实施方式中,离子液体或溶剂在低于100℃下作为液体存在。在任何方面的一些实施方式中,离子液体或溶剂在室温下作为液体存在。

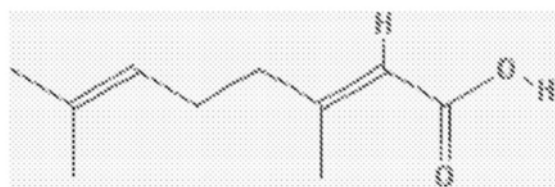
[0092] 在任何方面的一些实施方式中,本文所述的离子液体为CAGE(胆碱和香叶酸根)。CAGE为包含阳离子的胆碱(参见例如结构I)和阴离子的香叶酸根或香叶酸(参见例如结构II和III)的离子液体。CAGE的制备可为例如如国际专利公开W0 2015/066647中所述,将其整体内容通过引用并入本文,或如本文实施例中所述。



结构 I



结构 II



结构 III

[0094] 在任何方面的一些实施方式中,离子液体的阴离子包括香叶酸和/或香叶酸根。在任何方面的一些实施方式中,离子液体的阴离子包括香叶酸根。在任何方面的一些实施方式中,离子液体的阴离子包括香叶酸。

[0095] 在任何方面的一些实施方式中,CAGE的浓度为至少0.01%w/v。在任何方面的一些实施方式中,CAGE的浓度为至少0.05%w/v。在任何方面的一些实施方式中,CAGE的浓度为至少0.1%w/v。在任何方面的一些实施方式中,CAGE的浓度为至少0.2%w/v、至少0.3%w/v、至少0.4%w/v、至少0.5%w/v、至少1%w/v或更高。

[0096] 在任何方面的一些实施方式中,CAGE的浓度为从约0.01%w/v至约1%w/v。在任何方面的一些实施方式中,CAGE的浓度为从0.01%w/v至1%w/v。在任何方面的一些实施方式中,CAGE的浓度为从约0.05%w/v至约0.5%w/v。在任何方面的一些实施方式中,CAGE的浓度为从0.05%w/v至0.5%w/v。

[0097] 在任何方面的一些实施方式中,CAGE的浓度为至少25%w/w。在任何方面的一些实施方式中,CAGE在水中的浓度为至少25%w/w。在任何方面的一些实施方式中,CAGE在盐水或生理相容的缓冲液中的浓度为至少25%w/w。

[0098] 在任何方面的一些实施方式中,CAGE的浓度为从约5%w/w至约75%w/w。在任何方面的一些实施方式中,CAGE的浓度为从5%w/w至75%w/w。在任何方面的一些实施方式中,CAGE在水、盐水或生理相容的缓冲液中的浓度为从约5%w/w至约75%w/w。在任何方面的一些实施方式中,CAGE在水、盐水或生理相容的缓冲液中的浓度为从5%w/w至75%w/w。

[0099] 如本文所述的,可通过改变CAGE的浓度和比例来获得不同的结构。水合程度的增加破坏了天然分子和离子簇,引起纳米级重组,影响了极性和非极性结构域、原子的邻接以及分子内和分子间的相互作用。伴随着高的水合程度(>75% H_2O),取决于前体的摩尔比,DES的纳米结构自组装为囊泡、球形胶束和o/w微乳液。

[0100] 在任何方面的一些实施方式中,CAGE具有比例为约1:4的胆碱:香叶酸(或香叶酸根),并且浓度为约5%w/w,提供了微乳液。在任何方面的一些实施方式中,CAGE具有比例为约1:3至约1:4的胆碱:香叶酸(或香叶酸根),并且浓度为约20%w/w,提供了囊泡。在任何方面的一些实施方式中,CAGE具有比例为约1:2的胆碱:香叶酸(或香叶酸根),并且浓度为约20%w/w,提供了胶束。在任何方面的一些实施方式中,CAGE具有比例为约1:4的胆碱:香叶酸(或香叶酸根),并且浓度为约50%w/w,提供了溶胶-凝胶。

[0101] 在任何方面的一些实施方式中,CAGE为凝胶或剪切稀化牛顿凝胶。

[0102] 在任何方面的一些实施方式中,CAGE的浓度为至少25%w/w,并且胆碱:香叶酸(或香叶酸根)的比例为至少1:3。在任何方面的一些实施方式中,CAGE在水中的浓度为至少25%w/w,并且胆碱:香叶酸(或香叶酸根)的比例为至少1:3。在任何方面的一些实施方式中,CAGE的浓度为至少25%w/w,并且胆碱:香叶酸(或香叶酸根)的比例为1:3或1:4。在任何方面的一些实施方式中,CAGE在水中的浓度为至少25%w/w,并且胆碱:香叶酸(或香叶酸根)的比例为1:3或1:4。在任何方面的一些实施方式中,CAGE为凝胶或剪切稀化牛顿凝胶。

[0103] 在任何方面的一些实施方式中,CAGE以w/w或w/v计为100%。

[0104] 在任何方面的一些实施方式中,CAGE的胆碱:香叶酸(或香叶酸根)的比例为从约10:1至约1:10。在任何方面的一些实施方式中,CAGE的胆碱:香叶酸(或香叶酸根)的比例为从10:1至1:10。在任何方面的一些实施方式中,CAGE的胆碱:香叶酸(或香叶酸根)的比例为从约5:1至约1:5。在任何方面的一些实施方式中,CAGE的胆碱:香叶酸(或香叶酸根)的比例为从5:1至1:5。在任何方面的一些实施方式中,CAGE的胆碱:香叶酸(或香叶酸根)的比例为从约2:1至约1:4。在任何方面的一些实施方式中,CAGE的胆碱:香叶酸(或香叶酸根)的比例为从2:1至1:4。在任何方面的一些实施方式中,CAGE的胆碱:香叶酸(或香叶酸根)的比例为从约1:1至约1:4。在任何方面的一些实施方式中,CAGE的胆碱:香叶酸(或香叶酸根)的比例为从1:1至1:4。在任何方面的一些实施方式中,CAGE的胆碱:香叶酸(或香叶酸根)的比例为约1:1、1:2、1:3或1:4。除图11外(其利用了比例为1:1的CAGE),各图描述了用比例为1:2的CAGE收集的数据。不希望受到理论的束缚,具有较高比例的香叶酸和/或香叶酸根的组合表现出较大的疏水性和毒性,而具有较高比例的胆碱的组合表现出较大的亲水性且更加非活性的。在任何方面的一些实施方式中,具有较高比例的香叶酸和/或香叶酸根的组

合物表现出较大的疏水性,而具有较高比例的胆碱的组合物表现出较大的亲水性。

[0105] 在任何方面的一些实施方式中,例如,当一个或多个核酸分子与CAGE组合提供时,胆碱:香叶酸(或香叶酸根)的比例大于1:1,例如,大于1:2、从约1:2至约1:4或从1:2至1:4。

[0106] 在任何方面的一些实施方式中,组合物或制剂中的离子液体(例如CAGE)的浓度为约0.1mM至20mM。在任何方面的一些实施方式中,组合物或制剂中的离子液体(例如CAGE)的浓度为约0.5mM至20mM、0.5mM至18mM、0.5mM至16mM、0.5mM至14mM、0.5mM至12mM、0.5mM至10mM、0.5mM至8mM、1mM至20mM、1mM至18mM、1mM至16mM、1mM至14mM、1mM至12mM、1mM至10mM、1mM至8mM、2mM至20mM、2mM至18mM、2mM至16mM、2mM至14mM、2mM至12mM、2mM至10mM、2mM至8mM、4mM至20mM、4mM至18mM、4mM至16mM、4mM至14mM、4mM至12mM、4mM至10mM、4mM至8mM、6mM至20mM、6mM至18mM、6mM至14mM、6mM至12mM、6mM至10mM、6mM至8mM、8mM至20mM、8mM至18mM、8mM至16mM、8mM至14mM、8mM至12mM、8mM至10mM、10mM至20mM、10mM至18mM、10mM至16mM、10mM至14mM、10mM至12mM、12mM至20mM、12mM至18mM、12mM至16mM、12mM至14mM、14mM至20mM、14mM至18mM、14mM至16mM、16mM至20mM、16mM至18mM或18mM至20mM。在任何方面的一些实施方式中,组合物或制剂中的离子液体(例如CAGE)的浓度为约1mM、约2mM、约3mM、约4mM、约5mM、约6mM、约7mM、约8mM、约9mM、约10mM、约11mM、约12mM、约13mM、约14mM、约15mM、约16mM、约17mM、约18mM、约19mM或约20mM。

[0107] 如本文所使用的,“与...组合”是指两种以上的物质以任何分子或物理排列(例如,以掺和物、溶液、混合物、混悬液、乳液、胶体)存在于同一制剂中。该制剂可为均质或非均质的混合物。在任何方面的一些实施方式中,活性化合物与CAGE可通过上层结构(例如纳米颗粒、脂质体、载体、细胞或支架等)包含,所述上层结构为处于溶液、混合物、掺和物、混悬液等中的上层结构。

[0108] 如本文所使用的,“活性化合物”或“活性剂”为将对靶细胞或生物体产生作用的任何试剂。术语“化合物”和“试剂”是指通常不存在或不以被给予和/或提供至细胞、组织或受试者的水平存在的任何实体。试剂可选自包括如下的组:化学品,有机或无机小分子,信号分子,核酸序列,核酸类似物,蛋白质,肽,酶,适体,拟肽,肽衍生物,肽类似物,抗体,胞内抗体,生物大分子,从生物材料(例如细菌、植物、真菌或动物细胞或组织)制成的提取物,天然存在的或合成的组合物或其功能片段。在一些实施方式中,试剂为任何化学品、实体或部分,包括但不限于合成的和天然存在的非蛋白质实体。已知试剂可具有期望的活性和/或性质,或者可选自多种化合物的文库。预期用于本文所述的方法中的活性化合物的非限制性实例包括小分子、多肽、核酸、化学疗法/化疗化合物、抗体、抗体试剂、疫苗、GLP-1多肽或其模拟物/类似物和胰岛素。

[0109] 如本文所述的核酸分子可为载体、表达载体、抑制性核酸、适体、模板分子或盒(例如,用于基因编辑)或靶向分子(例如,用于CRISPR-Cas技术),或希望递送至细胞的任何其它核酸分子。核酸分子可为RNA、DNA或其合成形式或修饰形式。

[0110] 在任何实施方式的一个方面,本文描述的是将核酸分子递送至细胞的方法,该方法包括使细胞同与包含胆碱和香叶酸根(CAGE)的离子液体的组合物组合的核酸分子进行接触。在任何方面的一些实施方式中,所述细胞为受试者中的细胞,并且所述接触步骤包括向受试者给予与包含胆碱和香叶酸根(CAGE)的离子液体的组合物组合的核酸分子。在任何方面的一些实施方式中,细胞为体外的、体内的或离体的。在任何方面的一些实施方式中,

细胞为真核的。在任何方面的一些实施方式中,细胞为哺乳动物的。在任何方面的一些实施方式中,细胞为上皮细胞,例如肠上皮细胞。

[0111] 如本文所使用的,术语“小分子”是指化学试剂,可包括但不限于肽、拟肽、氨基酸、氨基酸类似物、多核苷酸、多核苷酸类似物、适体、核苷酸、核苷酸类似物、分子量小于约10,000克/摩尔的有机或无机化合物(即,包括杂有机化合物和有机金属化合物)、分子量小于约5,000克/摩尔的有机或无机化合物、分子量小于约1,000克/摩尔的有机或无机化合物、分子量小于约500克/摩尔的有机或无机化合物,以及此类化合物的盐、酯和其它药学上可接受的形式。

[0112] 在任何方面的一些实施方式中,活性化合物可为治疗性化合物或药物,例如对受试者中的至少一种病症的治疗而言治疗学上有效的试剂或化合物。治疗性化合物在多种情况下为本领域已知的,参见例如在万维网drugs.com上可用的数据库、或在万维网catalog.data.gov/dataset/drugsfda-databse上可用的经FDA批准的化合物的目录;通过引用将其各自整体并入本文。

[0113] 如本文所使用的,术语“化疗剂”是指在治疗以异常细胞生长为特征的疾病中具有治疗用途的任何化学试剂或生物试剂。这些疾病包括肿瘤、赘生物和癌症以及以增生性生长为特征的疾病。这些试剂可起到抑制癌症细胞持续增殖所依赖的细胞活性的作用。在所有实施方式的一些方面,化学治疗剂为细胞周期抑制剂或细胞分裂抑制剂。本发明的方法中可用的化疗剂的类别包括烷化剂/生物碱试剂、抗代谢物、激素或激素类似物、以及各种抗肿瘤药。这些试剂中的大多数对癌细胞具有直接或间接的毒性。在一个实施方式中,化疗剂为放射性分子。

[0114] 在任何方面的一些实施方式中,活性化合物为疏水分子,例如雌二醇、睾酮、咪喹莫特、皮质酮、紫杉醇、阿霉素、顺铂和/或喜树碱。在任何方面的一些实施方式中,活性化合物为疏水分子,例如雌二醇、睾酮、紫杉醇、阿霉素、顺铂和/或喜树碱。

[0115] 在任何实施方式的一个方面,本文描述的是一种组合物,其包含与CAGE组合的至少一种活性化合物。在一些实施方式中,药物组合物包含CAGE和本文所述的一种或多种活性化合物。在一些实施方式中,药物组合物基本上由CAGE和本文所述的一种或多种活性化合物组成。在一些实施方式中,药物组合物由CAGE和本文所述的一种或多种活性化合物组成。在一些实施方式中,药物组合物基本上由CAGE的水性溶液和本文所述的一种或多种活性化合物组成。在一些实施方式中,药物组合物由CAGE的水性溶液和本文所述的一种或多种活性化合物组成。

[0116] 在任何方面的一些实施方式中,本文所述的组合物(例如包含CAGE和活性化合物的组合物)可进一步包含药学上可接受的载体。如本文所使用的,术语“药学上可接受的”、“生理学上可耐受的”及其语法变体(当它们指的是组合物、载体、稀释剂和试剂时)可互换使用,并且表示该材料能够给予至哺乳动物或针对哺乳动物给予而不会产生不期望的生理作用(例如恶心、头晕、胃部不适等)。除非期望,否则药学上可接受的载体将不会促进针对与其混合的试剂的免疫应答的产生。包含溶解或分散于其中的活性成分的药物组合物的制备在本领域中为公知的,并且不必基于制剂而受到限制。通常,将这样的组合物制备成可注射的液体溶液或混悬液,然而,也可制备成适合于在使用前在液体中形成溶液或混悬液的固体形式。该制剂也可被乳化为脂质体组合物或作为脂质体组合物存在。可将活性成分与

药学上可接受的且与活性成分相容的赋形剂以适用于本文所述的治疗方法的量混合。合适的赋形剂包括例如水、盐水、右旋糖、甘油、乙醇等及其组合。另外,如果期望,该组合物可包含少量的辅助物质,例如提高活性成分的效力的湿润剂或乳化剂、pH缓冲剂等。本公开的治疗组合物可包括其中的组分的药学上可接受的盐。药学上可接受的盐包括与无机酸(如盐酸或磷酸)或有机酸(如乙酸、酒石酸、扁桃酸等)形成的酸加成盐(与多肽的游离氨基形成)。与游离羧基形成的盐也可衍生自无机碱(例如钠、钾、铵、钙或铁的氢氧化物)、以及有机碱(例如异丙胺、三甲胺、2-乙基氨基乙醇、组氨酸、普鲁卡因等)。生理学上可耐受的载体为本领域公知的。示例性的液体载体为无菌水性溶液,其除了活性成分和水外不包含任何物质,或者包含缓冲液(例如处于生理pH值的磷酸钠、生理盐水或两者,例如磷酸盐缓冲盐水)。更进一步,水性载体可包含多于一种的缓冲盐,以及诸如氯化钠和氯化钾的盐、右旋糖、聚乙二醇和其它溶质。除了水之外以及把水排除之外,液体组合物还可包含液相。这种额外的液相的实例为甘油、植物油(例如棉籽油)和水油乳剂。在本文所述的方法中有效地治疗特定紊乱或病症所使用的活性剂的量将取决于紊乱或病症的性质,并且可通过标准的临床技术确定。在该领域的标准的参考书Remington's Pharmaceutical Sciences, A. Osol中描述了合适的药物载体。例如,通过将1.5wt%的活性成分溶解在0.9%的氯化钠溶液中来制备适于注射给予的胃肠外组合物。

[0117] 在药物载体的上下文中,术语“载体”是指与治疗剂一起给予的稀释剂、佐剂、赋形剂或溶媒。此类药物载体可为无菌液体,例如水和油,包括石油、动物、植物或合成来源的油(例如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等)。当药物组合物静脉内给予时,水是优选的载体。盐水溶液以及右旋糖水性溶液和甘油水性溶液也可用作液体载体,特别是用于可注射溶液。合适的药物赋形剂包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、大米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石粉、氯化钠、脱脂奶粉、甘油、丙烯、乙二醇、水、乙醇等。如果期望,该组合物还可包含少量的湿润剂或乳化剂或pH缓冲剂。这些组合物可采取溶液剂、混悬剂、乳剂、片剂、丸剂、胶囊剂、散剂、缓释制剂等形式。该组合物可与传统的粘合剂和载体(例如甘油三酸酯)一起配制成栓剂。口服制剂可包括标准载体,例如药用级的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁等。在Remington's Pharmaceutical Sciences,第18版,Gennaro编(Mack Publishing Co.,1990)中描述了合适的药物载体的实例。制剂应适合于给予方式。

[0118] 药学上可接受的载体和稀释剂包括盐水、水性缓冲溶液、溶剂和/或分散介质。这种载体和稀释剂的使用是本领域公知的。可用作药学上可接受的载体的材料的一些非限制性实例包括:(1)糖,例如乳糖、葡萄糖和蔗糖;(2)淀粉,例如玉米淀粉和马铃薯淀粉;(3)纤维素及其衍生物,例如羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、乙基纤维素、微晶纤维素和醋酸纤维素;(4)黄蓍胶粉;(5)麦芽;(6)明胶;(7)润滑剂,如硬脂酸镁、十二烷基硫酸钠和滑石粉;(8)赋形剂,例如可可脂和栓剂蜡;(9)油,如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油;(10)二醇,例如丙二醇;(11)多元醇,例如甘油、山梨醇、甘露醇和聚乙二醇(PEG);(12)酯,例如油酸乙酯和月桂酸乙酯;(13)琼脂;(14)缓冲剂,例如氢氧化镁和氢氧化铝;(15)海藻酸;(16)无热原水;(17)等渗盐水;(18)林格氏溶液;(19)乙醇;(20)pH缓冲溶液;(21)聚酯、聚碳酸酯和/或聚酸酐;(22)填充剂,例如多肽和氨基酸;(23)血清成分,例如血清白蛋白、HDL和LDL;(22)C₂-C₁₂醇,例如乙醇;以及(23)药物制剂中使用的其它无毒相

容性物质。制剂中也可存在润湿剂、着色剂、脱模剂、包衣剂、甜味剂、调味剂、加香剂、防腐剂和抗氧化剂。诸如“赋形剂”、“载体”、“药学上可接受的载体”等的术语在本文中可互换使用。在一些实施方式中,载体抑制活性化合物的降解。术语“药学上可接受的载体”不包括组织培养基。

[0119] 在任何方面的一些实施方式中,可将本文所述的组合物(例如包含CAGE和活性化合物的组合物)配制成口服、皮下、静脉内、皮内或胃肠外制剂。在任何方面的一些实施方式中,口服制剂可为包含本文所述的组合物(例如,包含CAGE和活性化合物的组合物)的可降解的胶囊。

[0120] 在本文描述的任何方面的一些实施方式中,与不存在CAGE时的活性相比,活性化合物的生物学活性得以改善或稳定。在本文描述的任何方面的一些实施方式中,与不存在离子液体或溶剂的对照胰岛素相比,离子液体(例如,CAGE)或溶剂极大地增强了胰岛素渗透穿过皮肤。

[0121] 在任何实施方式的一个方面,本文描述的是使用导管将至少一种活性化合物给予至受试者的方法,其中,将该导管用CAGE包被。在任何实施方式的一个方面,本文描述的是通过将导管放置到体内来收集体液的方法,其中,将导管用CAGE包被。

[0122] 在一些实施方式中,本文所述的方法涉及用本文所述的组合物(例如包含CAGE和活性化合物的组合物)治疗患有或被诊断为患有病症的受试者。可由医师使用当前诊断糖尿病的方法来鉴别患有例如糖尿病的病症的受试者。表征这些病症并帮助诊断的糖尿病的症状和/或并发症在本领域中是公知的,并且包括但不限于体重减轻、愈合缓慢、多尿、多饮、多食性头痛、皮肤瘙痒和疲劳。可有助于诊断例如糖尿病的测试包括但不限于血液测试(例如,用于空腹血糖水平的血液测试)。糖尿病的家庭病史或暴露于糖尿病的危险因素(例如超重)也可帮助确定受试者是否可能患有糖尿病或帮助诊断糖尿病。

[0123] 本文所述的组合物和方法可给予至患有或诊断为患有本文所述的病症的受试者。在一些实施方式中,为了减轻本文所述病症的症状,本文所述的方法包括向受试者给予有效量的本文所述的组合物(例如,包含CAGE和活性化合物的组合物)。如本文所使用的,“减轻症状”是改善与病症相关的任何标记或症状。与等同的未处理对照相比,按任何标准技术测得的此减少量为至少5%、10%、20%、40%、50%、60%、80%、90%、95%、99%或更多。用于将本文所述的组合物给予至受试者的多种方式是本领域技术人员已知的。这样的方法可包括但不限于口服、胃肠外、静脉内、肌肉内、皮下、经皮、气道(气雾剂)、肺、皮肤、注射或瘤内给予。给予可为局部的或全身性的。

[0124] 如本文所使用的,术语“有效量”是指减轻疾病或紊乱的至少一种或多种症状所需的组合物的量,并且涉及足以提供期望效果的药物组合物的量。因此,术语“治疗上有效量”是指当给予至典型受试者时足以提供特定效果的组合物的量。在各种情况下,本文所使用的有效量还包括足以延迟疾病症状的进展、改变疾病症状的病程(例如但不限于减慢疾病症状的进展)或逆转疾病症状的量。因此,通常指明确切的“有效量”是不可行的。然而,对于任何给定的情况,可由本领域普通技术人员仅使用常规实验来确定适当的“有效量”。

[0125] 有效量、毒性和治疗功效可通过细胞培养或实验动物中的标准药理学程序来确定,例如,用于确定LD50(使50%的群体致死的剂量)和ED50(在50%的群体中治疗上有效的剂量)的药理学程序。剂量可根据所采用的剂型和所采用的给予途径而变化。毒性效果和治疗效

果之间的剂量比是治疗指数,并且可表示为LD50/ED50之比。显示出大的治疗指数的组合物和方法是优选的。最开始可从细胞培养测定中估计治疗学上有效的剂量。同样,可在动物模型中制定剂量,以达到如下循环血浆浓度范围,所述范围包括细胞培养或合适的动物模型中确定的IC50(即,达到症状的半数最大抑制的活性化合物的浓度)。血浆中的水平可例如通过高效液相色谱法来测量。可通过合适的生物测定法(例如包括血糖测定法)来监测任何特定剂量的作用。剂量可由医生确定,并根据需要进行调整以适合所观察到的治疗效果。

[0126] 如本文所使用的,“糖尿病(diabetes)”是指糖尿病(diabetes mellitus),其特征为胰腺的胰岛素分泌不足或不分泌的代谢疾病。除非本文另有指明,如全文所使用的,“糖尿病”包括1型、2型、3型和4型糖尿病。糖尿病的发病通常是由于遗传和环境原因的组合,导致异常高的血糖水平(高血糖症)。糖尿病的两种最常见形式归因于胰岛素产生减少(在1型中)、或机体对胰岛素的应答减弱(在2型和妊娠型中)。两者都会导致高血糖症,其在很大程度上造成糖尿病的急性体征:尿液产生过多、产生代偿性口渴和增高的流体摄入、视力模糊、无法解释的体重减轻、倦怠和能量代谢改变。糖尿病可引起许多并发症。如果疾病得不到适当控制,可能发生急性并发症(低血糖症、酮症酸中毒或非酮高渗性昏迷)。严重的长期并发症(即慢性副作用)包括心血管疾病(风险加倍)、慢性肾衰竭、视网膜损伤(可导致失明)、神经损伤(多种类型)和微血管损伤,其可导致阳痿和伤口愈合不良。伤口(尤其是脚的伤口)的不良愈合可导致坏疽,并且可能导致截肢。在一些实施方式中,糖尿病可为2型糖尿病。2型糖尿病(非胰岛素依赖型糖尿病(NIDDM)或成年糖尿病)是一种代谢性紊乱,其主要特征为胰岛素抵抗(机体对胰岛素的应答减弱)、相对的胰岛素缺乏和高血糖症。在一些实施方式中,受试者可为前驱糖尿病的,其可表征为例如具有升高的空腹血糖或升高的餐后血糖。

[0127] 已知胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 减少人的食物摄入和饥饿感,并且是来源于胰高血糖素原基因的转录产物的肠降血糖素,其有助于葡萄糖稳态。GLP-1模拟物目前被用于2型糖尿病的治疗中。最近的临床试验表明,这些治疗不仅改善了葡萄糖稳态,而且还成功地引起体重减轻。如本文所使用的,“GLP-1多肽”是指GLP-1的各种前体肽(pre-peptides)和前肽(pro-peptides)以及切割产物,例如,对于人:GLP-1 (1-37) (SEQ ID NO:2)、GLP-1 (7-36) (SEQ ID NO:3) 和GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO:4)。在一些实施方式中,GLP-1多肽可为GLP-1 (7-36) 和/或GLP-1 (7-37) 或来自除人以外物种的相关多肽。对于许多物种而言,本领域已知GLP-1多肽的序列,如人GLP-1 (NCBI基因ID:2641) 多肽(例如NCBI参考序列:NP_002045.1;SEQ ID NO:1) 和SEQ ID NO:2-SEQ ID NO:4。在一些实施方式中,GLP-1的前体肽或前肽可用于本文所述的方法或组合物中,例如,胰高血糖素前原蛋白(例如,SEQ ID NO:1)。还特别在考虑之列的是用于本文所述的方法和组合物中的本文所述的任何多肽的天然存在的等位基因或变体。

[0128] SEQ ID NO:1

1 mksiyfvagl fvmlvqgswq rslqgteeks rsfsasqadp lsdpdqmned krhsqgtfts
[0129] 61 dyskyldsrr aqdfvqwlmn tkrnrnniak rhdeferhae gtftsdvssy legqaakefi
121 awlvkgrgrg dfpeevaive elgrrhadgs fsdemntild nlaardfinw liqtkitdrk

[0130] SEQ ID NO:2

[0131] hdeferhae gtftsdvssy legqaakefi awlvkgrg

[0132] SEQ ID NO:3

[0133] hae gtftsdvssy legqaakefi awlvkgr

[0134] SEQ ID NO:4

[0135] hae gtftsdvssy legqaakefi awlvkgrg

[0136] 各种GLP-1模拟物是本领域已知的,并用于治疗糖尿病。GLP-1模拟物(或类似物)可包括exendin-4(与人GLP-1具有同源性的Heloderma蜥蜴多肽)及其衍生物、修饰为抗DPP-IV的GLP-1类似物或与例如用于延长半衰期的多种其它试剂缀合的人GLP-1多肽。GLP-1模拟物/类似物可包括例如艾塞那肽、利西拉来、杜拉鲁肽(dulaglutide)、索马鲁肽、阿必鲁肽、LY2189265、利拉鲁肽和taspoglutide。此类分子的实例以及对其制备和活性的进一步讨论可见于本领域中,例如Gupta.Indian J.Endocrinol Metab 17:413-421(2013); Garber.Diabetes Treatments 41:S279-S284(2018);美国专利公开US2009/0181912;以及国际专利公开W02011/080103,通过引用将其各自整体并入本文。

[0137] 如本文所使用的,术语“癌症”通常涉及一类疾病或病症,在其中异常细胞不受控地分裂并且可侵袭附近的组织。癌细胞还可通过血液和淋巴系统扩散到身体的其它部位。存在数种主要类型的癌症。癌是始于内衬于或覆盖内部器官的组织或皮肤中的癌症。肉瘤是一种始于骨骼、软骨、脂肪、肌肉、血管或其它结缔组织或支持性组织的癌症。白血病是始于血液形成组织(例如骨髓)且导致大量异常血细胞生成并进入血液的一种癌症。淋巴瘤和多发性骨髓瘤是始于免疫系统细胞的癌症。中枢神经系统癌症是始于大脑和脊髓组织的癌症。

[0138] 在任何方面的一些实施方式中,癌症是原发性癌症。在任何方面的一些实施方式中,癌症是恶性癌症。如本文所使用的,术语“恶性”是指在其中一组肿瘤细胞显示出不受控的生长(即,超出正常界限的分裂)、侵袭(即,侵入和破坏相邻组织)和/或转移(即,通过淋巴或血液扩散到身体的其它部位)中的一种或多种的癌症。如本文所使用的,术语“转移”是指癌症从身体的一部分扩散到另一部分。由扩散的细胞形成的肿瘤称为“转移性肿瘤”或“转移瘤”。转移性肿瘤包含与原始(原发性)肿瘤中的细胞相似的细胞。如本文所使用的,术语“良性”或“非恶性”是指可长大但不会扩散到身体其它部位的肿瘤。良性肿瘤是自限性的,并且通常不会侵袭或转移。

[0139] “癌细胞”或“肿瘤细胞”是指癌性生长物或组织的单个细胞。肿瘤通常是指由细胞的异常生长形成的肿胀或病变,其可为良性的、恶变前的或恶性的。大多数癌细胞形成肿瘤,但某些癌细胞例如白血病不一定形成肿瘤。对于形成肿瘤的那些癌细胞,术语癌症(细胞)和肿瘤(细胞)可互换使用。

[0140] 如本文所使用的,术语“赘生物”是指组织的任何新的和异常的生长(例如,异常的组织块),其生长超过并且与正常组织不协调。因此,赘生物可为良性赘生物、恶变前赘生物或恶性赘生物。

[0141] 患有癌症或肿瘤的受试者为在受试者体内存在客观上可测量的癌细胞的受试者。该定义包括恶性、活跃地增殖的癌症以及潜在的休眠肿瘤或微转移瘤。从其原始位置迁移并定植其它重要器官的癌症可最终通过受影响器官的功能退化而导致受试者死亡。

[0142] 癌症的实例包括但不限于癌、淋巴瘤、胚细胞瘤、肉瘤、白血病、基底细胞癌、胆道癌、膀胱癌、骨癌、脑和中枢神经系统癌症、乳腺癌、腹膜癌、宫颈癌、绒毛膜癌、结肠和直肠癌、结缔组织癌、消化系统癌症、子宫内膜癌、食管癌、眼癌、头颈癌、胃癌(包括胃肠癌)、胶

质母细胞瘤 (GBM)、肝癌、肝细胞瘤、上皮内赘生物、肾癌或肾脏癌、喉癌、白血病、肝癌、肺癌 (例如小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌和肺鳞癌)、淋巴瘤 (包括霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤)、黑色素瘤、骨髓瘤、成神经细胞瘤、口腔癌 (例如, 嘴唇、舌头、口和咽)、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、直肠癌、呼吸系统癌症、唾液腺癌、肉瘤、皮肤癌、鳞状细胞癌、胃癌、睾丸癌、甲状腺癌、子宫或子宫内膜癌、泌尿系统癌症、外阴癌、以及其它癌和肉瘤, 以及B细胞淋巴瘤 (包括低度/滤泡性非霍奇金淋巴瘤 (NHL)、小淋巴细胞 (SL) NHL、中度/滤泡性NHL、中度弥漫性NHL、高度免疫母细胞性NHL、高度淋巴瘤母细胞性NHL、高度小非核裂细胞NHL、大包块病变NHL、套细胞淋巴瘤、AIDS相关淋巴瘤和Waldenstrom巨球蛋白血症)、慢性淋巴细胞性白血病 (CLL)、急性成淋巴细胞性白血病 (ALL)、毛细胞白血病、慢性骨髓细胞性白血病和移植后的淋巴组织增生性紊乱 (PTLD), 以及与癥瘕病、水肿 (如脑肿瘤有关) 和Meigs综合征相关的异常血管增生。

[0143] “癌细胞”是体内、离体或组织培养物中的癌性的、癌前的或转化的细胞, 其具有自发的或经诱导的表型改变, 其不一定涉及新的遗传物质的摄取。尽管转化可产生自转化病毒感染和新基因组核酸的掺入或外源核酸的摄取, 但它也可自发或暴露至致癌物后产生, 从而使内源基因发生突变。转化/癌症与如下有关: 例如, 形态变化、细胞永生性、异常生长控制、病灶形成、锚着非依赖性、恶性、接触抑制和生长的密度限制的丧失、生长因子或血清非依赖性、肿瘤特异性标记、侵袭性或转移性、合适的动物宿主 (例如裸鼠) 中的肿瘤生长。

[0144] 在任何方面的一些实施方式中, 本文所述的组合物 (例如包含与至少一种活性化合物组合的CAGE的组合物) 作为单一疗法给予, 例如, 不向受试者给予针对该病症的另一种疗法。

[0145] 在任何方面的一些实施方式中, 本文所述的方法可进一步包括以本文所述的组合物 (例如包含与至少一种活性化合物组合的CAGE的组合物) 或者作为单独的制剂向受试者给予第二药剂和/或治疗, 例如将第二药剂和/或治疗作为组合疗法的一部分。例如, 用于治疗癌症的第二药剂和/或治疗的非限制性实例可包括放射疗法、外科手术、吉西他滨、顺铂、紫杉醇、卡铂、硼替佐米、AMG479、伏立诺他、利妥昔单抗、替莫唑胺、雷帕霉素、ABT-737、PI-103、烷化剂 (例如噻替哌 (thiotepa) 和 **CYTOXAN®** 环磷酰胺)、烷基磺酸酯 (例如白消安、英丙舒凡和哌泊舒凡 (piposulfan))、氮丙啶 (例如苯并多巴、卡波醌、美妥替哌 (meturedopa) 和uredopa)、乙撑亚胺和甲基蜜胺 (包括六甲蜜胺、三乙撑蜜胺、三乙撑磷酰胺、三乙撑硫代磷酰胺和三羟甲基蜜胺)、多聚乙酰 (特别是布拉它辛和布拉它辛酮 (bullatacinone))、喜树碱 (包括合成的类似物拓扑替康)、苔藓虫素、callystatin、CC-1065 (包括其阿多来新、卡折来新和比折来新合成类似物)、隐藻素 (尤其是隐藻素1和隐藻素8)、多拉司他汀、倍癌霉素 (包括合成类似物KW-2189和CB1-TM1)、艾榴塞洛素、水鬼蕉碱、sarcodictyin、海绵毒素 (spongistatin)、氮芥 (例如苯丁酸氮芥、萘氮芥、胆磷酰胺、雌氮芥、异环磷酰胺、二氯甲基二乙胺、氮氧芥盐酸盐、美法仑、新氮芥、苯芥胆甾醇 (phenesterine)、泼松龙苯芥、氯乙环磷酰胺、尿嘧啶氮芥)、亚硝基脲 (例如卡莫司汀、氯脲菌素、福莫司汀、洛莫司汀、尼莫司汀和雷莫司汀 (ranimustine))、抗生素 (例如烯二炔抗生素 (例如卡奇霉素、特别是卡奇霉素 γ 11 和卡奇霉素 ω 11 (参见例如, Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl., 33:183-186 (1994))、dynemicin (包括dynemicin A)、双膦酸盐 (例如氯膦酸盐)、埃斯培拉霉素 (esperamicin)、以及新制癌菌素发色团和相关的色素蛋白烯二

炔抗生素生色团)、aclacinomysins、放线菌素、安曲霉素(authramycin)、重氮丝氨酸、博来霉素、放线菌素C、carabycin、洋红霉素(caminomycin)、嗜癌素、色霉素(chromomycinis)、放线菌素D、柔红霉素、地托比星、6-重氮基-5-氧代-L-正亮氨酸、ADRIAMYCIN®阿霉素(包括吗啉代阿霉素、氰基吗啉代阿霉素、2-吡咯啉并阿霉素和去氧阿霉素)、表柔比星、依索比星、去甲氧基柔红霉素、麻西罗霉素、丝裂霉素(例如丝裂霉素C)、霉酚酸、诺加霉素、橄榄霉素、培洛霉素、泊非霉素(potfiromycin)、嘌呤霉素、三铁阿霉素(quelamycin)、罗多比星、链黑菌素、链脲佐菌素、杀结核菌素、乌苯美司、净司他丁、佐柔比星、抗代谢物(例如氨甲喋呤和5-氟尿嘧啶(5-FU))、叶酸类似物(例如二甲叶酸、氨甲蝶呤、蝶罗呤、曲美沙特)、嘌呤类似物(例如氟达拉滨、6-巯基嘌呤、硫咪嘌呤、硫鸟嘌呤)、嘧啶类似物(如安西他滨、阿扎胞苷、6-氮尿苷、卡莫氟、阿糖胞苷、二脱氧尿苷、去氧氟尿苷、依诺他滨、氟尿苷)、雄激素(例如卡普睾酮、丙酸甲雄烷酮、环硫雄醇、美雄烷、睾丸内酯)、抗肾上腺素(例如氨鲁米特、米托坦、曲洛司坦)、叶酸补充剂(例如亚叶酸)、乙酰葡醛内酯、醛磷酰胺糖苷、氨基乙酰丙酸、恩尿嘧啶、安吡啶、bestrabucil、比生群、依达曲沙(edatraxate)、地磷酰胺(defofamine)、地美可辛、地吡醌、elformithine、依利醋铵、埃博霉素、依托格鲁、硝酸镓、羟基脲、香菇多糖、氯尼达明(lonidainine)、美登木素(maytansinoids,例如美登素(maytansine)和安丝菌素)、米托胍脲、米托蒽醌、莫哌达醇(mopidanmol)、二胺硝吡啶(nitraerine)、喷司他丁、蛋氨酸芥、吡柔比星、洛索蒽醌、鬼臼酸、2-乙基胍、甲基苄胍、PSK®多糖复合物(JHS Natural Products, Eugene, Oreg.)、雷佐生、根霉素、西佐喃(sizofuran)、螺旋锗、细交链孢菌酮酸、三亚胺醌、2,2',2''-三氯三乙胺、单端孢霉烯(特别是T-2毒素、疣孢菌素A(verracurin A)、杆孢菌素A和蛇行菌素)、氨基甲酸酯、长春地辛、达卡巴嗪、甘露醇氮芥、二溴甘露醇、二溴卫矛醇、哌泊溴烷、gacytosine、阿糖胞苷("Ara-C")、环磷酰胺、噻替哌、紫杉烷类(例如TAXOL®紫杉醇(Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.)、ABRAXANE®Cremophor-free、紫杉醇的白蛋白工程化纳米颗粒制剂(American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Ill.)和TAXOTERE®doxetaxel(Rhone-Poulenc Rorer, Antony, 法国)、苯丁酸氮芥、GEMZAR®吉西他滨、6-硫代鸟嘌呤、巯基嘌呤、氨甲喋呤、铂类似物(例如顺铂、奥沙利铂和卡铂)、长春碱、铂、依托泊苷(VP-16)、异环磷酰胺、米托蒽醌、长春新碱、NAVELBINE.RTM. 长春瑞滨、盐酸米托蒽醌、替尼泊苷、依达曲沙、道诺霉素、氨基蝶呤、希罗达、伊班膦酸盐、伊立替康(Camptosar, CPT-11)(包括伊立替康与5-FU和甲酰四氢叶酸的治疗方案)、拓扑异构酶抑制剂RFS 2000、二氟甲基鸟氨酸(DMFO)、类视黄醇(例如视黄酸)、卡培他滨、考布他汀、甲酰四氢叶酸(LV)、奥沙利铂(包括奥沙利铂治疗方案(FOLFOX))、拉帕替尼(Tykerb.RTM.)、减少细胞增殖的PKC- α 、Raf、H-Ras、EGFR(例如厄洛替尼(Tarceva®))和VEGF-A的抑制剂,以及上述任一者的药学上可接受的盐、酸或衍生物。此外,治疗方法可进一步包括使用放射或放射疗法。此外,治疗方法可进一步包括使用手术治疗。

[0146] 在某些实施方式中,可向患者一次给予有效剂量的本文所述的组合物(例如包含与至少一种活性化合物组合的CAGE的组合物)。在某些实施方式中,可向患者重复给予有效剂量的本文所述的组合物(例如包含与至少一种活性化合物组合的CAGE的组合物)。对于全身性给予,可向受试者给予治疗量的本文所述的组合物(例如包含与至少一种活性化合物

组合的CAGE的组合),例如0.1mg/kg、0.5mg/kg、1.0mg/kg、2.0mg/kg、2.5mg/kg、5mg/kg、10mg/kg、15mg/kg、20mg/kg、25mg/kg、30mg/kg、40mg/kg、50mg/kg或更高。

[0147] 在一些实施方式中,活性化合物为胰岛素,并且胰岛素的浓度或剂量可为从约1U/kg至约20U/kg。在一些实施方式中,活性化合物为胰岛素,并且胰岛素的浓度或剂量可为从1U/kg至20U/kg。在一些实施方式中,活性化合物为胰岛素,并且胰岛素的浓度或剂量可小于20U/kg。在一些实施方式中,活性化合物为胰岛素,并且胰岛素的浓度或剂量可为从约2U/kg至约10U/kg。在一些实施方式中,活性化合物为胰岛素,并且胰岛素的浓度或剂量可为从2U/kg至10U/kg。在一些实施方式中,活性化合物为胰岛素,并且胰岛素的浓度或剂量可为从约2U/kg至约5U/kg。在一些实施方式中,活性化合物为胰岛素,并且胰岛素的浓度或剂量可为从2U/kg至5U/kg。在一些实施方式中,活性化合物为胰岛素,并且胰岛素的浓度或剂量可为从约5U/kg至约10U/kg。在一些实施方式中,活性化合物为胰岛素,并且胰岛素的浓度或剂量可为从5U/kg至10U/kg。在一些实施方式中,活性化合物为胰岛素,并且胰岛素的浓度或剂量可为2U/kg、5U/kg或10U/kg。

[0148] 在一些实施方式中,在初始治疗方案之后,能够以较低频率给予治疗。例如,每两周一次治疗三个月后,可每月重复一次治疗,持续六个月或一年或更长。根据本文所述的方法的治疗可将病症的标记或症状的水平降低至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%或至少90%或更多。

[0149] 如本文所述的组合物的剂量可由医师确定并根据需要进行调整以匹配所观察到的治疗效果。关于治疗的持续时间和频率,熟练的临床医生通常监测受试者以确定何时该治疗提供治疗益处,并确定是否增加或减少剂量、增高或降低给予频率、停止治疗、恢复治疗、或对治疗方案进行其它更改。给药时间表可从每周一次到每天一次变化,取决于许多临床因素,例如受试者对活性化合物的敏感性。期望的剂量或活化量可一次给予或分成亚剂量(例如2-4个亚剂量)给予,并在一段时间内(例如以一天中的适当间隔或其它合适的时间表)给予。在一些实施方式中,给予可为长期的,例如在数周或数个月的时间段内每天一次或多次给药和/或治疗。给药和/或治疗方案的实例为在1周、2周、3周、4周、1个月、2个月、3个月、4个月、5个月或6个月或更长的时间段内每天、每天两次、每天三次、或每天四次或更多次给予。本文所述的组合物(例如包含与至少一种活性化合物组合的CAGE的组合)可在一段时间内(例如在5分钟、10分钟、15分钟、20分钟或25分钟的时间段内)给予。

[0150] 根据本文描述的方法,本文描述的组合物的用于给予的剂量范围取决于例如活性化合物的形式、其效力以及本文所述的病症的症状、标记或指示物的期望减少的程度,例如症状或标记的期望的百分比减少。剂量不应太大而引起不良副作用。通常,剂量将随患者的年龄、状况和性别而变化,并且可由本领域技术人员确定。在任何并发症事件中,剂量也可由个别医生进行调整。

[0151] 所述的组合物在例如治疗本文所述的病症中、或用于诱导如本文所述的应答中的功效可由熟练的临床医生确定。然而,如本文所使用的术语,如果以有益的方式改变本文所述的病症的一种或多种症状或体征、其它临床可接受的症状得到改善或甚至变好、或在根据本文所述的方法的治疗后诱发例如至少10%的期望的应答,则治疗被视为“有效治疗”。例如,可通过测量根据本文所述的方法治疗的病症的标记、指示物、症状和/或发生率或合适的任何其它的可测量参数来评估功效。功效也可通过住院治疗或需要医学干预评估个体

不再恶化(即,疾病进展停止)来测量。测量这些指示物的方法是本领域技术人员已知的和/或在本文中描述的。治疗包括个体或动物(一些非限制性实例包括人或动物)中的疾病的任何治疗,并包括:(1)抑制疾病,例如预防症状(例如疼痛或炎症)的恶化;或(2)缓解疾病的严重程度,例如引起症状消退。如该术语在本文中所定义的,疾病治疗的有效量是指当向有需要的受试者给予时足以引起对该疾病的有效治疗的量。可通过评估病症或期望的应答的物理指标来确定药剂的功效。通过测量这些参数中的任何一个或参数的任何组合来监测给予和/或治疗的功效完全在本领域技术人员的能力范围内。可在本文所述病症(例如糖尿病或癌症的治疗)的动物模型中评估功效。当使用实验动物模型时,当观察到标记的统计学上显著的变化时,可证明治疗的功效。

[0152] 本文提供了体外和动物模型测定,其允许对给定剂量的本文所述的组合物(例如,包含与至少一种活性化合物组合的CAGE的组合物)进行评估。作为非限制性实例,可通过使用本文实施例中描述的小鼠模型来评估包含与胰岛素组合的CAGE的组合物给药的效果。

[0153] 肥胖症的发病率正在上升,并且众所周知的现有疗法(例如节食)具有低的长期成功率。减轻肥胖症或降低体重增加率的额外的治疗和策略对解决肥胖症本身以及因超重引起或加重的多种病症均具有关键的意义。如本文所述的,发明人已经证实离子液体CAGE(胆碱和香叶酸或香叶酸根)减少了肠中的疏水/亲脂性分子的摄取。因此,本文提供的是通过向有需要的受试者给予CAGE来治疗肥胖症和/或减轻体重/体重增长的方法。

[0154] 此外,CAGE能够安全地携带活性化合物穿过口服过程中遇到的敏感膜。因此,在任何方面的一些实施方式中,包含CAGE的组合物进一步包含活性化合物/试剂。因此,在任何方面的一些实施方式中,向受试者给予包含与活性化合物/试剂组合的CAGE的组合物。

[0155] 在任何方面的一些实施方式中,活性化合物在治疗肥胖症方面是治疗学上有效的。在任何方面的一些实施方式中,活性化合物在治疗与肥胖症有关的疾病方面是治疗学上有效的。在任何方面的一些实施方式中,活性化合物在治疗由肥胖症引起的疾病方面是治疗学上有效的。在任何方面的一些实施方式中,活性化合物在治疗引起肥胖症的疾病方面是治疗学上有效的。在任何方面的一些实施方式中,活性化合物在治疗代谢综合征方面是治疗学上有效的。

[0156] 在任何方面的一些实施方式中,活性化合物为疏水分子,例如雌二醇、睾酮、咪喹莫特、皮质酮、紫杉醇、阿霉素、顺铂和/或喜树碱。在任何方面的一些实施方式中,活性化合物是疏水分子,例如雌二醇、睾酮、皮质酮、紫杉醇、阿霉素、顺铂和/或喜树碱。

[0157] 在任何方面的一些实施方式中,所述组合物包含CAGE。在任何方面的一些实施方式中,所述组合物基本上由CAGE组成。在任何方面的一些实施方式中,所述组合物由CAGE组成。在任何方面的一些实施方式中,包含CAGE的组合物作为单一疗法给予,例如,不向受试者给予用于该病症的另一种疗法。

[0158] 在任何方面的一些实施方式中,所述组合物包含CAGE和至少一种活性化合物。在任何方面的一些实施方式中,所述组合物基本上由CAGE和至少一种活性化合物组成。在任何方面的一些实施方式中,组合物由CAGE和至少一种活性化合物组成。在任何方面的一些实施方式中,包含CAGE和至少一种活性化合物的组合物作为单一疗法给予,例如,不向受试者给予用于该病症的另一种疗法。

[0159] 在任何方面的一些实施方式中,可将包含CAGE和任选的活性化合物的组合物配制

为口服、皮下、静脉内、皮内或胃肠外制剂。在任何方面的一些实施方式中,口服制剂可为包括包含CAGE和任选的活性化合物的组合物的可降解的胶囊。

[0160] 在任何方面的一些实施方式中,给予包含CAGE的组合物的受试者为患有、被诊断为患有或需要治疗肥胖症、体重过重或预防体重增加的受试者。在一些实施方式中,受试者超重。本文描述的方法包括治疗肥胖症、减轻体重增加、预防体重增加、促进体重减轻等的方法。这些方法可例如促进代谢健康、出于美学原因而追求、和/或使患者准备好手术干预(不适于具有高的BMI或体重的患者)。在一些实施方式中,体重减轻可为医学上必需的和/或医学上指示的,例如,当受试者超重和/或肥胖时。在一些实施方式中,体重减轻可以是为了美容目的,例如,当受试者想要减肥时,无论体重减轻是否在医学上必要的和/或在医学上指示的。

[0161] 术语“肥胖症”是指体内脂肪过多。肥胖症可通过本领域技术人员接受和利用的任何度量来确定。当前,肥胖症的接受的度量是体重指数(BMI),其为相对于以米计的身高平方的以千克计的体重的度量。通常,对于超过20岁的成年人,BMI在大约18.5至24.9之间被认为是正常的,BMI在大约25.0至29.9之间被认为是超重,BMI在30.0或以上被认为是肥胖,而BMI在40或以上,被认为是病态肥胖。(参见例如,Gallagher等,(2000) Am J Clin Nutr 72:694-701)。这些BMI范围是基于体重对增加的疾病风险的影响。与高的BMI和肥胖症有关的一些常见病症包括心血管疾病、高血压(即高血压)、骨关节炎、癌症和糖尿病。尽管BMI与体脂相关,但BMI与实际体脂之间的关系随年龄和性别而有所不同。例如,对于相同的BMI,女性比男性更有可能具有更高的体脂百分比。此外,区分正常、超重和肥胖的BMI阈值可例如随年龄、性别、种族、健康状况和体型等因素而不同。在一些实施方式中,患有肥胖症的受试者可为在给予本文所述的治疗之前的体重指数为至少约25kg/m²的受试者。在一些实施方式中,患有肥胖症的受试者可为在给予本文所述的治疗之前的体重指数为至少约30kg/m²的受试者。

[0162] 在任何方面的一些实施方式中,给予包含CAGE的组合物的受试者为患有、被诊断为患有或需要治疗代谢紊乱或代谢综合征的受试者。术语“代谢紊乱”是指与受损或改变的葡萄糖调节或血糖控制有关或由受损或改变的葡萄糖调节或血糖控制加重的任何紊乱,例如胰岛素抵抗。此类紊乱包括但不限于肥胖症、脂肪组织过多、糖尿病、脂肪肝疾病、非酒精性脂肪肝疾病、代谢综合征、血脂异常、高血压、高血糖和心血管疾病。与代谢紊乱不同,“代谢综合征”是指如下医学紊乱的组合,当一起发生时,其会增加发展出心血管疾病和糖尿病的风险。例如,美国心脏协会和国际糖尿病基金会已经建立了许多代谢综合征的定义。仅举一个例子,WHO将代谢综合征定义为存在以下中的任何一种:糖尿病、葡萄糖耐量降低、空腹血糖受损或胰岛素抵抗;或存在以下中的两种:血压等于或大于140/90mmHg、血脂异常、向心性肥胖和微量白蛋白尿。在一些实施方式中,代谢紊乱可选自于由如下所组成的组:肥胖症、脂肪组织过多、糖尿病和心血管疾病。

[0163] 在一些实施方式中,本文描述的方法涉及用包含CAGE和活性化合物的组合物治疗患有或被诊断为患有病症的受试者。可由医师使用当前诊断糖尿病的方法来鉴别患有例如糖尿病的病症的受试者。表征这些病症并帮助诊断的糖尿病的症状和/或并发症在本领域中是公知的,并且包括但不限于体重减轻、愈合缓慢、多尿、多饮、多食性头痛、皮肤瘙痒和疲劳。例如,可有助于诊断糖尿病的测试包括但不限于血液测试(例如,用于空腹血糖水平

的血液测试)。糖尿病的家庭病史或暴露于糖尿病的危险因素(例如超重)也可帮助确定受试者是否可能患有糖尿病或帮助诊断糖尿病。

[0164] 在任何方面的一些实施方式中,根据本发明方法治疗的受试者为未患有或未诊断为患有糖尿病的受试者。在任何方面的一些实施方式中,根据本发明方法治疗的受试者为未给予胰岛素的受试者。在任何方面的一些实施方式中,包含CAGE的组合物不包含胰岛素。在任何方面的一些实施方式中,包含CAGE的组合物不包含另一种药物活性成分和/或在治疗糖尿病方面治疗学上有效的另一种药剂。

[0165] 许多活性化合物(例如药物活性化合物)的摄取可通过在溶剂中递送化合物来改善。然而,这种方法通常不适合在体内使用,因为大多数这样的溶剂表现出毒性副作用和/或对递送点而言是刺激性的。本文描述的是可提供低毒性和改善的递送动力学的方法和组合物。

[0166] 如本文所述,发明人已经发现,在50mM或更高时,盐显示出其穿过细胞/细胞膜的能力以及增加任何相关分子穿过细胞/细胞膜的能力的令人惊讶且显著的增高。因此,本文描述的是与高摩尔盐(例如大于0.05M的盐)的使用有关的药物递送方法。

[0167] 如本文所使用的,“盐”是指包含至少一种阳离子和至少一种阴离子,从而使该化合物为电中性的离子化合物。盐可包括无机的或有机的、多原子的或单原子的离子。盐可为碱金属盐。在任何方面的一些实施方式中,盐为离子液体。

[0168] 在任何方面的一些实施方式中,盐的浓度为至少0.01%w/v。在任何方面的一些实施方式中,盐的浓度为至少0.05%w/v。在任何方面的一些实施方式中,盐的浓度为至少0.1%w/v。在任何方面的一些实施方式中,盐的浓度为至少0.2%w/v、至少0.3%w/v、至少0.4%w/v、至少0.5%w/v、至少1%w/v或更高。

[0169] 在任何方面的一些实施方式中,盐的浓度为至少20mM。在任何方面的一些实施方式中,盐的浓度为至少约20mM。在任何方面的一些实施方式中,盐的浓度为至少25mM。在任何方面的一些实施方式中,盐的浓度为至少约25mM。在任何方面的一些实施方式中,盐的浓度为至少50mM。在任何方面的一些实施方式中,盐的浓度为至少约50mM。在任何方面的一些实施方式中,所述盐的浓度为至少100mM、500mM、1M、2M、3M或更高。在任何方面的一些实施方式中,盐的浓度为至少约100mM、500mM、1M、2M、3M或更高。

[0170] 在任何方面的一些实施方式中,盐的浓度为从约50mM至约4M。在任何方面的一些实施方式中,盐的浓度为从50mM至4M。在任何方面的一些实施方式中,盐的浓度为从约500mM至约4M。在任何方面的一些实施方式中,盐的浓度为从500mM至4M。在任何方面的一些实施方式中,盐的浓度为从约1M至约4M。在任何方面的一些实施方式中,盐的浓度为从1M至4M。在任何方面的一些实施方式中,所述盐的浓度为从约2M至约4M。在任何方面的一些实施方式中,盐的浓度为从2M至4M。

[0171] 在任何方面的一些实施方式中,例如,当与CAGE组合提供一个或多个核酸分子时,胆碱:香叶酸(或香叶酸根)的比例大于1:1,例如,大于1:2、从约1:2至约1:4或从1:2至1:4。

[0172] 在任何实施方式的一个方面,本文描述的是包含与盐(例如,浓度为0.05M或更高)组合的至少一种活性化合物的组合物。在一些实施方式中,药物组合物包含盐和本文所述的一种或多种活性化合物。在一些实施方式中,药物组合物基本上由盐和本文所述的一种或多种活性化合物组成。在一些实施方式中,药物组合物由盐和本文所述的一种或多种活

性化合物组成。在一些实施方式中,药物组合物基本上由本文所述的一种或多种活性化合物和盐的水性溶液组成。在一些实施方式中,药物组合物由本文所述的一种或多种活性化合物和盐的水性溶液组成。

[0173] 在一些实施方式中,盐为无水盐,例如未稀释或溶解在水中的离子液体。在一些实施方式中,盐作为水性溶液提供。

[0174] 在任何方面的一些实施方式中,包含盐(例如,浓度为0.05M或更高)和活性化合物的组合物可进一步包含药学上可接受的载体。

[0175] 在任何方面的一些实施方式中,可将包含盐(例如,浓度为0.05M或更高)和活性化合物的组合物配制成口服、皮下、静脉内、皮内或胃肠外制剂。在任何方面的一些实施方式中,口服制剂可为包括包含盐和活性化合物的组合物的可降解的胶囊。

[0176] 在另一实施方式中,即使在CAGE的局部扩散之后,药物也可继续保持溶于盐(例如CAGE)中,并引起向循环的快速和增强的递送。皮下递送通常需要多个剂量或控释制剂。由于对时间本身的任何担心,并不必须执行这种方法,但是加以执行以确保在活性化合物的降解之前接收到全部剂量。推注给予通常是无效的,因为活性化合物在全部剂量可发挥作用之前会降解或代谢。由于CAGE的稳定活性化合物的能力,因此这种方法是不必要的,即总的期望剂量可作为单次给予进行递送而无需控释机制。

[0177] 在任何实施方式的一个方面,本文描述的是通过注射入受影响的组织中而向受试者给予与盐组合的活性化合物,从而治疗有需要的受试者中的疾病的方法。在一些实施方式中,受影响的组织为包含病变细胞的组织。在一些实施方式中,受影响的组织为显示出疾病症状的组织。合适的受影响组织的非限制性实例包括肿瘤组织、脂肪组织(fat tissue)、脂肪组织(adipose tissue)、疣等。在任何方面的一些实施方式中,合适的受影响组织包括肿瘤组织、脂肪组织(fat tissue)、脂肪组织(adipose tissue)等。

[0178] 在任何方面的一些实施方式中,疾病为由组织生长引起的疾病,例如,不希望的、异常的或病理性的组织生长。由组织生长引起的疾病可为由组织生长的速率、组织生长的位置或组织生长的模式/结构引起的或以组织生长的速率、组织生长的位置或组织生长的模式/结构为特征的任何疾病,其与健康受试者中的该组织类型的正常情况不同。这种疾病的非限制性实例为肿瘤、癌症、肥胖/肥胖症、疣和/或增生。在任何方面的一些实施方式中,此类疾病为肿瘤、癌症、肥胖/肥胖症和/或增生。

[0179] 在本文描述的任何方面的一些实施方式中,与不存在浓度大于0.05M的盐的活性相比,活性化合物的生物学活性得以改善或稳定。在本文描述的任何方面的一些实施方式中,与不存在离子液体或溶剂的对照胰岛素相比,盐(例如,CAGE)或溶剂极大地增强了胰岛素渗透穿过皮肤。

[0180] 在任何实施方式的一个方面,本文描述的是使用导管至少将活性化合物给予至受试者的方法,其中,将导管用浓度大于0.05M的盐包被。在任何实施方式的一个方面,本文描述的是通过将导管放置到体内来收集体液的方法,其中,将导管用浓度大于0.05M的盐包被。

[0181] 在一些实施方式中,本文描述的方法涉及用包含浓度大于0.05M的盐和活性化合物的组合物对患有或被诊断为患有病症的受试者进行治疗。可由医师使用当前诊断糖尿病的方法来鉴别患有例如糖尿病的病症的受试者。表征这些病症并帮助诊断的糖尿病的症状

和/或并发症在本领域中是公知的,并且包括但不限于体重减轻、愈合缓慢、多尿、多饮、多食性头痛、皮肤瘙痒和疲劳。可有助于诊断例如糖尿病的测试包括但不限于血液测试(例如,用于空腹血糖水平的血液测试)。糖尿病的家庭病史或暴露于糖尿病的危险因素(例如超重)也可帮助确定受试者是否可能患有糖尿病或帮助诊断糖尿病。

[0182] 在任何方面的一些实施方式中,包含浓度大于0.05M的盐的组合物作为单一疗法给予,例如,不向受试者给予用于该病症的另一种疗法。在这样的实施方式中,盐或其组分可对所治疗的疾病具有治疗功效。

[0183] 在任何方面的一些实施方式中,将包含与本文所述的至少一种活性化合物组合的浓度大于0.05M的盐的组合物作为单一疗法给予,例如,不向受试者给予用于该病症的另一种疗法。

[0184] 在任何方面的一些实施方式中,本文所述的方法可进一步包括将第二药剂和/或治疗(例如,作为组合疗法的一部分)以组合物或作为单独的制剂给予至受试者,所述组合物包含与至少一种活性化合物组合的浓度大于0.05M的盐。

[0185] 在某些实施方式中,可向患者给予一次有效剂量的组合物,所述组合物包含与本文所述的至少一种活性化合物组合的浓度为0.05M或更高的盐。在某些实施方式中,可向患者重复给予有效剂量的组合物,所述组合物包含与至少一种活性化合物组合的浓度为0.05M或更高的盐。对于全身性给予,可向受试者给予治疗量(例如0.1mg/kg、0.5mg/kg、1.0mg/kg、2.0mg/kg、2.5mg/kg、5mg/kg、10mg/kg、15mg/kg、20mg/kg、25mg/kg、30mg/kg、40mg/kg、50mg/kg或更高)的组合物,所述组合物包含与至少一种活性化合物组合的浓度为0.05M或更高的盐。

[0186] 在一些实施方式中,活性化合物为胰岛素,并且胰岛素的浓度或剂量可为从约1U/kg至约20U/kg。在一些实施方式中,活性化合物为胰岛素,并且胰岛素的浓度或剂量可为从1U/kg至20U/kg。在一些实施方式中,活性化合物为胰岛素,并且胰岛素的浓度或剂量可小于20U/kg。在一些实施方式中,活性化合物为胰岛素,并且胰岛素的浓度或剂量可为从约2U/kg至约10U/kg。在一些实施方式中,活性化合物为胰岛素,并且胰岛素的浓度或剂量可为从2U/kg至10U/kg。在一些实施方式中,活性化合物为胰岛素,并且胰岛素的浓度或剂量可为从约2U/kg至约5U/kg。在一些实施方式中,活性化合物为胰岛素,并且胰岛素的浓度或剂量可为从2U/kg至5U/kg。在一些实施方式中,活性化合物为胰岛素,并且胰岛素的浓度或剂量可为从约5U/kg至约10U/kg。在一些实施方式中,活性化合物为胰岛素,并且胰岛素的浓度或剂量可为从5U/kg至10U/kg。在一些实施方式中,活性化合物为胰岛素,并且胰岛素的浓度或剂量可为2U/kg、5U/kg或10U/kg。

[0187] 酶抑制剂是许多病症(包括糖尿病)的治疗选项,其中例如胰岛素降解酶抑制剂、ACE抑制剂和 α -葡萄糖苷酶抑制剂都已被开发作为治疗方法。因此,安全、有效的酶抑制剂在许多病症的治疗中是令人感兴趣的。在任何实施方式的一个方面,本文描述的是在有需要的受试者中治疗糖尿病、溃疡、癌症或纤维化的方法,该方法包括向受试者给予包含离子液体胆碱和香叶酸根(CAGE)的组合物。在一些实施方式中,包含CAGE的组合物不包含其它治疗活性剂。

[0188] 离子液体CAGE(胆碱和香叶酸或香叶酸根)对于口服和/或胃肠外使用而言是安全的,但是对于大多数溶剂通常观察不到阴性副作用。实际上,作为一类存在普遍的毒性问题

的物质的溶剂,因此“溶剂暴露”是常用的医学术语,意在涵盖与一种或多种溶剂接触的危险。已经证明,通常溶剂暴露以及暴露至选择的个别溶剂形成多种病症的病因。有鉴于此,CAGE的安全性特别令人惊讶和出乎意料,特别是通过口服和非胃肠外给予途径,绕过了人体的许多自然防御。

[0189] 在任何实施方式的一个方面,本文描述的是包含CAGE的组合物。在一些实施方式中,组合物为包含CAGE的药物组合物。在一些实施方式中,药物组合物基本上由CAGE组成。在一些实施方式中,药物组合物由CAGE组成。在一些实施方式中,药物组合物基本上由CAGE的水性溶液组成。在一些实施方式中,药物组合物由CAGE的水性溶液组成。

[0190] 在任何方面的一些实施方式中,可将包含CAGE的组合物配制为口服、皮下、静脉内、皮内或胃肠外制剂。在任何方面的一些实施方式中,口服制剂可为包括包含CAGE的组合物的可降解的胶囊。在某些实施方式中,可向患者给予一次有效剂量的包含CAGE的组合物。在某些实施方式中,可向患者重复给予有效剂量的包含CAGE的组合物。

[0191] 在任何实施方式的一个方面,本文描述的是通过注射入受影响的组织中而向受试者给予CAGE来治疗有需要的受试者中的疾病的方法。在一些实施方式中,受影响的组织为包含病变细胞的组织。在一些实施方式中,受影响的组织为显示出疾病症状的组织。合适的受影响组织的非限制性实例包括肿瘤组织、脂肪组织、脂肪组织、疣等。在任何方面的一些实施方式中,受影响的组织包括肿瘤组织、脂肪组织、脂肪组织等。疾病可为例如癌症、纤维化或溃疡。

[0192] 通过减少瘢痕组织的积累而有利于细胞外基质,纤维化病症得益于细胞外基质的产生和/或维持。如本文所使用的,“纤维化”是指作为修复或反应过程而不是作为器官或组织的正常组成部分的纤维组织的形成。纤维化的特征在于任何特定组织中的超过正常沉积的胶原蛋白沉积和成纤维细胞积累。纤维化可作为炎症、刺激或愈合的结果而发生。需要治疗纤维化病症的受试者为患有或被诊断为患有纤维化病症或处于患有纤维化病症的风险的任何受试者。纤维化病症的非限制性实例包括但不限于肺纤维化、瘢痕、皮肤瘢痕、创伤、伤口、慢性伤口(例如在糖尿病患者中)、角膜缺损、角膜溃疡、角膜伤口、糖尿病性溃疡、溃疡、败血症、关节炎、特发性肺纤维化、囊性纤维化、肝硬化、心内膜心肌纤维化、纵隔纤维化、骨髓纤维化、腹膜后纤维化、进行性大块纤维化、肾源性系统性纤维化、克罗恩病、瘢痕疙瘩、硬皮病、系统性硬化、关节纤维化、粘连性关节囊炎、肺纤维化、肝纤维化、肾纤维化、心脏纤维化、血管纤维化、皮肤纤维化、眼纤维化、骨髓纤维化、哮喘、结节病、COPD、肺气肿、血吸虫病(nschistomasomiasis)、胆管炎、糖尿病肾病、狼疮性肾炎、血管成形术后动脉再狭窄、动脉粥样硬化、烧伤瘢痕、增生性瘢痕、肾源性纤维化皮肤病、白内障术后、增殖性玻璃体视网膜病变、Peyronie病、Duputren挛缩、皮炎以及移植物抗宿主病。

[0193] 如本文所使用的,“溃疡”是指体膜的破裂或破坏。在一些实施方式中,溃疡可由受影响的组织的炎症和/或坏死引起。溃疡可为皮肤溃疡(例如压力性溃疡、糖尿病性溃疡、溃疡性皮炎等)、角膜溃疡、口腔溃疡、消化性溃疡、静脉溃疡、应激性溃疡或溃疡性结肠炎。

[0194] 在任何方面的一些实施方式中,将包含CAGE的组合物作为单一疗法给予,例如,不向受试者给予用于该病症的另一种疗法。

[0195] 为了方便起见,在说明书、实施例和附加的权利要求书中使用的一些术语和短语的含义在如下提供。除非另有说明或从上下文中暗示得到,下列术语和短语包含下面所提

供的含义。提供这些定义以帮助描述特定的实施方式,而并不打算限制所要求保护的发明,因为本发明的范围仅通过权利要求书加以限定。除非另有定义,本文所使用的所有技术术语和科学术语具有与本发明所属技术领域中的普通技术人员通常理解的含义相同的含义。如果在本领域中的术语的使用与本文所提供的定义之间存在明显的差异,则以本说明书中提供的定义为准。

[0196] 为了方便起见,本文在说明书、实施例和附加的权利要求书中使用的一些术语汇集在此处。

[0197] 本文所使用的术语“减少”、“降低的”、“降低”或“抑制”都是指降低统计学上显著的量。在一些实施方式中,“下降”、“降低”、“减少”或“抑制”通常是指与参照水平(例如,缺少给定的治疗或药剂)相比减少至少10%,并且可以包括例如减少至少约10%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、或更多。如本文所使用的“降低”或“抑制”并未涵盖与参照水平相比的完全抑制或降低。“完全抑制”是与参照水平相比的100%的抑制。减少可以优选下降至在没有给定的紊乱的个体的正常范围内接受的水平。

[0198] 本文所使用的术语“增加的/增高的”、“增加/增高”、“增强”或“激活/活化”都是指增加统计学上显著的量。在一些实施方式中,术语“增加的/增高的”、“增加/增高”、“增强”或“激活/活化”可意味着与参照水平相比增加至少10%,例如增加至少约20%、或至少约30%、或至少约40%、或至少约50%、或至少约60%、或至少约70%、或至少约80%、或至少约90%或上至并包括100%的增加、或与参照水平相比的10%-100%之间的任意增加、或者至少约2倍、或至少约3倍、或至少约4倍、或至少约5倍或至少约10倍的增加、或与参照水平相比的2倍至10倍之间的任意增加或更多。在标记或症状的语境下,“增加/增高”是以此类水平的统计学上的显著增加/增高。

[0199] 如本文所使用的,“受试者”是指人或动物。通常动物是脊椎动物,例如灵长类动物、啮齿类动物、家养动物或狩猎动物。灵长类动物包括黑猩猩、食蟹猴、蜘蛛猴、以及猕猴例如恒河猴。啮齿类动物包括小鼠、大鼠、旱獭、雪貂、兔和仓鼠。家养动物和狩猎动物包括奶牛;马;猪;鹿;野牛;水牛;猫科动物,例如家猫;犬科动物,例如狗、狐狸、狼;鸟类,例如鸡、鹌鹑、鸵鸟;以及鱼类,例如鳟鱼、鲑鱼和鲑鱼。在一些实施方式中,受试者是哺乳动物,例如灵长类动物,例如人。术语“个体”、“患者”和“受试者”在本文中可互换使用。

[0200] 优选地,受试者是哺乳动物。所述哺乳动物可以是人、非人灵长类动物、小鼠、大鼠、狗、猫、马或奶牛,但不限于这些实例。除了人之外的哺乳动物可以有利地用作代表本发明所述的病症的动物模型的受试者。受试者可以是雄性或雌性。

[0201] 受试者可以是先前已被诊断或鉴别为患有或具有需要治疗的病症或者与该病症相关的一种或多种并发症的受试者,并且可选地已经接受对病症的治疗或对与该病症相关的一种或多种并发症的治疗。或者,受试者也可以是先前没有被诊断为具有病症或与该病症相关的一种或多种并发症的受试者。例如,受试者可以是显示出病症的一个或多个风险因素或者显示出与该病症相关的一种或多种并发症的一个或多个风险因素的受试者、或未显示风险因素的受试者。

[0202] “需要”治疗特定病症的“受试者”可以是具有下述病症的受试者:诊断为具有该病

症或诊断为具有发展出该病症的风险。

[0203] 如本文所使用的,术语“蛋白”和“多肽”在本文中互换使用,以指定一连串的氨基酸残基,所述氨基酸残基通过在相邻残基的 α -氨基基团和羧基基团之间的肽键相互连接。无论其大小或功能,术语“蛋白”和“多肽”是指氨基酸的聚合物,所述氨基酸包括经修饰的氨基酸(例如,磷酸化、糖化、糖基化等)和氨基酸类似物。“蛋白”和“多肽”通常用来指比较大的多肽,而术语“肽”通常用于指小的多肽,但是在本领域中这些术语的用法重叠。当指基因产物及其片段时,术语“蛋白”和“多肽”在本文中互换使用。因此,示例性的多肽或蛋白包括基因产物、天然存在的蛋白、同源物、直系同源物、旁系同源物、片段和上述物质的其它等同物、变型、片段和类似物。

[0204] 在本文所述的多种实施方式中,在进一步考虑之列的是涵盖所描述的任何具体多肽的变体(天然存在的或其它的)、等位基因、同源物、保守修饰变体和/或保守置换变体。对于氨基酸序列,本领域技术人员将认识到,当改变引起将氨基酸置换为化学上类似的氨基酸并保留了多肽的期望活性时,对经编码的序列中的单个氨基酸或少部分的氨基酸进行改变的核酸、肽、多肽或蛋白序列的个别置换、缺失或添加是“保守修饰变体”。此类保守修饰变体在与本公开相一致的多态变体、种间同源物和等位基因的基础之上另外存在,并且不排除与本公开相一致的多态变体、种间同源物和等位基因。

[0205] 给定的氨基酸可以被具有相似的理化特性的残基替代,例如,用一个脂肪族残基置换另一残基(例如用Ile、Val、Leu或Ala互相置换),或用一个极性残基置换另一残基(例如Lys和Arg之间;Glu和Asp之间;或Gln和Asn之间)。其它这样的保守置换(例如置换具有类似疏水性特征的整个区域)是公知的。能够以本文所述的任何一种测定对包含保守氨基酸置换的多肽进行测试,以确认保留了期望的活性(例如天然或参考多肽的活性和特异性)。

[0206] 氨基酸可以根据其侧链的性质方面的相似性进行分组(在A.L.Lehninger, in Biochemistry, 第二版, pp.73-75, Worth Publishers, New York (1975) 中): (1) 非极性的: Ala (A)、Val (V)、Leu (L)、Ile (I)、Pro (P)、Phe (F)、Trp (W)、Met (M); (2) 不带电的极性的: Gly (G)、Ser (S)、Thr (T)、Cys (C)、Tyr (Y)、Asn (N)、Gln (Q); (3) 酸性的: Asp (D)、Glu (E); (4) 碱性的: Lys (K)、Arg (R)、His (H)。或者,可基于共同的侧链特性将天然存在的残基分为如下的组: (1) 疏水的: 正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile; (2) 中性亲水的: Cys、Ser、Thr、Asn、Gln; (3) 酸性的: Asp、Glu; (4) 碱性的: His、Lys、Arg; (5) 残基影响链取向: Gly、Pro; (6) 芳香的: Trp、Tyr、Phe。非保守置换牵涉到用这些类别之一的一个成员更换另一类别。特定的保守置换包括例如: 将Ala置换为Gly或置换为Ser; 将Arg置换为Lys; 将Asn置换为Gln或置换为His; 将Asp置换为Glu; 将Cys置换为Ser; 将Gln置换为Asn; 将Glu置换为Asp; 将Gly置换为Ala或置换为Pro; 将His置换为Asn或置换为Gln; 将Ile置换为Leu或置换为Val; 将Leu置换为Ile或置换为Val; 将Lys置换为Arg、置换为Gln或置换为Glu; 将Met置换为Leu、置换为Tyr或置换为Ile; 将Phe置换为Met、置换为Leu或置换为Tyr; 将Ser置换为Thr; 将Thr置换为Ser; 将Trp置换为Tyr; 将Tyr置换为Trp; 和/或将Phe置换为Val、置换为Ile或置换为Leu。

[0207] 在一些实施方式中,本文所述的多肽(或编码这一多肽的核酸)可以是本文所述的氨基酸序列之一的功能片段。如本文所使用的,“功能片段”是根据本文下文所述的测定保留至少50%的野生型参考多肽的活性的肽的片段或节段。功能片段可包含本文公开的序列的保守置换。

[0208] 在一些实施方式中,本文所述的多肽可以是本文所述的序列的变体。在一些实施方式中,变体是保守修饰变体。保守置换变体可以通过例如天然核苷酸序列的突变获得。本文所指的“变体”是与天然多肽或参考多肽实质上同源的多肽,但是该多肽由于一个或多个缺失、插入或置换而具有与天然或参考多肽的氨基酸序列不同的氨基酸序列。编码变体多肽的DNA序列涵盖如下序列:当与天然DNA序列或参考DNA序列相比时,所述序列包含一个或多个核苷酸的添加、缺失或置换,但是编码保留活性的变体蛋白或其片段。多种基于PCR的位点特异性诱变方法在本领域中是已知的,并且可以被普通技术人员应用。

[0209] 变体氨基酸或DNA序列可与天然或参考序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或更多的一致性。天然序列和突变序列之间的同源性程度(一致性百分比)可以通过例如使用万维网上通常用于此目的的免费可用的计算机程序(例如具有默认设置的BLASTp或BLASTn)对两个序列进行比较来确定。

[0210] 在任何方面的一些实施方式中,变体可为与本文提供的参考序列之一具有至少90%、至少95%、至少98%或更高的序列同源性并且保留该参考序列的野生型活性(例如肠降血糖素活性)的多肽。在任何方面的一些实施方式中,变体可为与本文提供的天然存在的参考序列之一具有至少90%、至少95%、至少98%或更高的序列同源性并保留该参考序列的野生型活性(例如肠降血糖素活性)的多肽。在任何方面的一些实施方式中,变体可为与本文提供的参考序列之一具有至少90%、至少95%、至少98%或更高的序列同源性并且保留了该参考序列的野生型活性(例如肠降血糖素活性)的天然存在的多肽。

[0211] 天然氨基酸序列的改变可通过本领域技术人员已知的多种技术的任一种来完成。例如,可通过合成含有突变序列的寡核苷酸而在特定基因座引入突变,所述寡核苷酸侧接有允许与天然序列的片段连接的限制性位点。连接后,所得到的重构序列编码具有期望的氨基酸插入、置换或缺失的类似物。或者,可使用寡核苷酸指导的位点特异性的突变发生程序来提供具有特定密码子的改变的核苷酸序列,所述特定密码子根据所需的置换、缺失或插入而改变。进行这种改变的技术已很好地建立,并且包括例如通过Walder等(Gene 42: 133,1986);Bauer等(Gene 37:73,1985);Craik(BioTechniques,1985年1月,12-19);Smith等(Genetic Engineering:Principles and Methods,Plenum Press,1981)和美国专利Nos:4,518,584和4,737,462公开的那些技术,将其通过引用整体并入本文。通常,还可利用丝氨酸对不参与维持多肽的适当构象的任何半胱氨酸残基进行置换,以改进分子的氧化稳定性并防止异常交联。相反,可将半胱氨酸键添加至多肽,以改进多肽的稳定性或促进寡聚化。

[0212] 如本文所使用的,术语“抗体”是指免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫学活性部分,即包含免疫特异性地结合抗原的抗原结合位点的分子。该术语还指由两条免疫球蛋白重链和两条免疫球蛋白轻链组成的抗体以及包括全长抗体及其抗原结合部分在内的多种形式;包括例如免疫球蛋白分子、单克隆抗体、嵌合抗体、CDR移植抗体、人源化抗体、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、二硫键连接的Fv、scFv、单域抗体(dAb)、双价抗体、多特异性抗体、双重特异性抗体、抗独特型抗体、双特异性抗体、它们的功能活性表位结合部分和/或双功能杂交抗体。每条重链由所述重链的可变区(在本文缩写为HCVR或VH)和所述重链的恒定区组成。重链恒定区由三个结构域CH1、CH2和CH3组成。每条轻链由所述轻链的可变区(在本文

缩写为LCVR或VL)和所述轻链的恒定区组成。轻链恒定区由CL结构域组成。VH和VL区可以进一步分为被称为互补决定区(CDR)的高变区并散布有被称为框架区(FR)的保守区。因此,每个VH和VL区由三个CDR和四个FR组成,它们从N端到C端按以下顺序排布:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。该结构是本领域技术人员所公知的。

[0213] 如本文所使用的,术语“抗体试剂”是指多肽,所述多肽包含至少一个免疫球蛋白可变结构域或免疫球蛋白可变结构域序列,并特异性地结合给定的抗原。抗体试剂可包括抗体或含有抗体的抗原结合结构域的多肽。在一些实施方式中,抗体试剂可包括单克隆抗体或含有单克隆抗体的抗原结合结构域的多肽。例如,抗体可包含重(H)链可变区(本文中缩写为VH)和轻(L)链可变区(本文中缩写为VL)。在另一实例中,抗体包含两个重(H)链可变区和两个轻(L)链可变区。术语“抗体试剂”涵盖了抗体的抗原结合片段(例如单链抗体、Fab片段和sFab片段、F(ab')₂、Fd片段、Fv片段、scFv、和结构域抗体(dAb)片段以及完整抗体)。

[0214] 抗体和/或抗体试剂可包括免疫球蛋白分子、单克隆抗体、嵌合抗体、CDR移植抗体、人源化抗体、全长人抗体、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、二硫键连接的Fv、scFv、单域抗体、双价抗体、多特异性抗体、双重特异性抗体、抗独特型抗体、双特异性抗体、及它们的功能活性表位结合部分。

[0215] 如本文所使用的,术语“核酸”或“核酸序列”是指并入核糖核酸、脱氧核糖核酸或它们的类似物的单元的任何分子,优选聚合分子。核酸可以是单链或双链的。单链核酸可为变性的双链DNA的一条核酸链。或者,单链核酸可为并非衍生自任何双链DNA的单链核酸。在一个方面,核酸可以是DNA。在另一方面,核酸可以是RNA。合适的DNA可包括例如cDNA。合适的RNA可包括例如mRNA。

[0216] 如本文所使用的,“抑制性核酸”是指可抑制靶标(例如双链RNA(dsRNA)、抑制性RNA(iRNA)等)的表达的核酸分子。

[0217] 双链RNA分子(dsRNA)已显示出以称为RNA干扰(RNAi)的高度保守的调控机制阻断基因表达。本文所述的抑制性核酸可以包括具有长度为30个或更少的核苷酸(即,长度为15-30个核苷酸、长度通常为19-24个核苷酸)的区域的RNA链(反义链),该区域实质上与靶向的mRNA转录物的至少一部分互补。使用这些iRNA使得可以靶向降解mRNA转录物,引起靶标的表达和/或活性降低。

[0218] 如本文所使用的,术语“iRNA”是指含有RNA(或本文下文所述的经修饰的核酸)、并通过RNA诱导的沉默复合物(RISC)通路来介导RNA转录物的靶向切割的试剂。在任何方面的一些实施方式中,本文所述的iRNA引起靶标的表达和/或活性的抑制。在任何方面的一些实施方式中,与不存在iRNA的细胞中发现的靶mRNA水平相比,用抑制剂(例如iRNA)接触细胞造成细胞中的靶mRNA水平降低至少约5%、约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%、约95%、约99%、上至并包括100%。在任何方面的一些实施方式中,与不存在iRNA的受试者中发现的靶mRNA水平相比,向受试者给予抑制剂(例如iRNA)造成受试者中的靶mRNA水平降低至少约5%、约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%、约95%、约99%、上至并包括100%。

[0219] 在任何方面的一些实施方式中,iRNA可以是dsRNA。dsRNA包括两条RNA链,两条RNA链充分互补,以在使用dsRNA的情况下杂交形成双链结构。dsRNA的一条链(反义链)包括互补区域,该区域与靶序列实质上互补、且通常完全互补。靶序列可以衍生自在靶标的表达过

程中形成的mRNA的序列,即,其可以跨越一个或多个内含子边界。另一条链(正义链)包含互补于反义链的区域,从而使得在适当的条件下结合时,两条链杂交并形成双链结构。通常,双链结构的长度在15至30个碱基对之间,包括端值;长度更通常在18至25个碱基对之间,包括端值;长度更通常在19至24个碱基对之间,包括端值;并且长度最通常在19至21个碱基对之间,包括端值。类似地,与靶序列互补的区域的长度在15至30个碱基对之间,包括端值;长度更通常在18至25个碱基对之间,包括端值;长度更通常在19至24个碱基对之间,包括端值;并且长度最通常在19至21个碱基对之间,包括端值。在任何方面的一些实施方式中,dsRNA的长度在15至20个核苷酸之间,包括端值;并且在其它实施方式中,dsRNA的长度在25和30个核苷酸之间,包括端值。正如普通技术人员将认识到的,靶向用于切割的RNA的靶向区域最通常是较大的RNA分子(通常是mRNA分子)的一部分。相关地,mRNA靶标的“部分”是具有足以成为RNAi引导的切割(即,通过RISC通路切割)的底物的长度的mRNA靶标的连续序列。在一些情况下,具有短至9个碱基对的双链的dsRNA介导RNAi引导的RNA切割。最常见的靶标是至少15个核苷酸的长度、优选15-30个核苷酸的长度。

[0220] 抑制性核酸的类型的示例性实施方式可包括例如:siRNA、shRNA、miRNA和/或amiRNA,其为本领域公知的。

[0221] 在任何方面的一些实施方式中,对iRNA的RNA(例如dsRNA)进行化学修饰,以增强稳定性或其它有益的特性。可以通过本领域完善建立的方法修饰和/或合成本文所述的核酸,例如描述于“Current protocols in nucleic acid chemistry”,Beaucage,S.L.等(编),John Wiley&Sons,Inc.,New York,NY,USA中的方法,以引用的方式由此将其并入本文。修饰包括:例如(a)末端修饰,例如5'端修饰(磷酸化、缀合、反向连接等)、3'端修饰(缀合、DNA核苷酸、反向连接等);(b)碱基修饰,例如,用稳定碱基、不稳定碱基、或与扩大体系的伴侣碱基配对的碱基进行的置换;移除碱基(脱碱基核苷酸)或缀合碱基;(c)糖修饰(例如,在2'位或4'位)或糖置换;以及(d)骨架修饰,包括磷酸二酯连接的修饰或置换。用于本文所述的实施方式中的RNA化合物的具体实例包括但不限于含有经修饰的骨架或无天然核苷间连接的RNA。其中,具有经修饰的骨架的RNA包括在骨架中不具有磷原子的RNA。为了本申请文件的目的,并且如本领域有时所引用的,在其核苷间的骨架中不具有磷原子的经修饰的RNA也可以被认为是寡核苷酸。在任何方面的一些实施方式中,经修饰的RNA将会在其核苷间的骨架中具有磷原子。

[0222] 经修饰的RNA骨架可以包括例如:具有正常的3'-5'连接的boranophosphates、磷硫酰、手性磷硫酰、二硫代磷酸酯、磷酸三酯、氨基烷基磷酸三酯、甲基和其它烷基磷酸酯(包括3'-亚烷基磷酸酯和手性磷酸酯)、亚磷酸酯、氨基磷酸酯(包括3'-氨基磷酸氨基酯和氨基烷基氨基磷酸酯)、硫羰氨基磷酸酯(thionophosphoramidates)、硫羰烷基磷酸酯(thionoalkylphosphonates)和硫羰烷基磷酸三酯;它们的2'-5'连接的类似物;以及具有反极性的物质(其中,相邻的核苷单元对以3'-5'至5'-3'或2'-5'至5'-2'连接)。各种盐、混合盐和游离酸形式也包括在内。在其中不包含磷原子的经修饰的RNA骨架具有通过如下形成的骨架:短链烷基或环烷基核苷间连接、混合的杂原子和烷基或环烷基核苷间连接、或者一个或多个短链杂原子或杂环核苷间连接。这些骨架包括:具有吗啉代连接(部分上由核苷的糖部分形成)的骨架;硅氧烷骨架;硫化物骨架、亚砷骨架或砷骨架;formacetyl骨架和thioformacetyl骨架;methylene formacetyl骨架和methylene thioformacetyl骨架;含

烯烃骨架;氨基磺酸酯骨架;亚甲基亚氨基骨架和亚甲基胍基骨架;磺酸酯骨架和磺胺骨架;酰胺骨架;以及其它的具有混合的N、O、S和CH₂组成部分的骨架,以及具有杂原子骨架的寡核苷酸,并且特别是--CH₂--NH--CH₂--、--CH₂--N(CH₃)--O--CH₂--[称为亚甲基(甲基亚氨基)骨架或MMI骨架]、--CH₂--O--N(CH₃)--CH₂--、--CH₂--N(CH₃)--N(CH₃)--CH₂--和--N(CH₃)--CH₂--CH₂--[其中,天然磷酸二酯骨架表示为--O--P--O--CH₂--]。

[0223] 适于或考虑用于iRNA中的其它RNA模拟物中,核苷酸单元的糖和核苷间连接(即骨架)用新的基团所取代。碱基单元被保留用于与适当的核酸靶化合物杂交。一种此类寡聚化合物(已显示具有良好的杂交性质的RNA模拟物)被称为肽核酸(PNA)。在PNA化合物中,RNA的糖骨架被含酰胺骨架(特别是氨基乙基甘氨酸骨架)取代。核碱基保留并且直接或间接地结合至骨架的酰胺部分的氮杂氮原子。

[0224] iRNA的RNA也可以被修饰成包含一个或多个锁核酸(LNA)。锁核酸是具有经修饰的核糖部分的核苷酸,其中,所述核糖部分包含连接2'位和4'位碳原子的另外的桥。这一结构有效地将核糖“锁定”在3'-内向结构构象中。已经显示出,将锁核酸添加至siRNA增加了血清中的siRNA的稳定性,并降低了脱靶效应(Elmen, J.等, (2005) Nucleic Acids Research 33(1):439-447; Mook, OR.等, (2007) Mol Canc Ther 6(3):833-843; Grunweller, A.等, (2003) Nucleic Acids Research 31(12):3185-3193)。

[0225] 经修饰的RNA还可以包含一个或多个取代的糖部分。本文所述的iRNA(例如dsRNA)在2'位置可以包含如下中的一种:OH;F;O-烷基、S-烷基或N-烷基;O-烯基、S-烯基或N-烯基;O-炔基、S-炔基或N-炔基;或者O-烷基-O-烷基,其中,烷基、烯基和炔基可以是取代或未取代的C1-C10烷基或C2-C10烯基和C2-C10炔基。示例性的适当的修饰包括:O[(CH₂)_n]_mCH₃、O(CH₂)_nOCH₃、O(CH₂)_nNH₂、O(CH₂)_nCH₃、O(CH₂)_nONH₂和O(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂,其中,n和m为从1至约10。在任何方面的一些实施方式中,dsRNA在2'位置包含如下中的一种:C1-C10低级烷基;取代的低级烷基、烷芳基、芳烷基、O-烷芳基或O-芳烷基;SH、SCH₃、OCN、Cl、Br、CN、CF₃、OCF₃、SOCH₃、SO₂CH₃、ONO₂、NO₂、N₃、NH₂;杂环烷基、杂环烷芳基、氨基烷氨基、多烷基氨基、取代的甲硅烷基、RNA切割基团、报告子基团、嵌入剂、改善iRNA的药代动力学性质的基团、或改善iRNA的药效动力学性质的基团、以及具有类似性质的其它取代基。在任何方面的一些实施方式中,所述修饰包括2'-甲氧基乙氧基(2'-O--CH₂CH₂OCH₃,也称为2'-O-(2-甲氧基乙基)或2'-MOE)(Martin等, Helv. Chim. Acta, 1995, 78:486-504),即烷氧基-烷氧基基团。另一示例性的修饰是如下文的实施例所述的2'-二甲基氨基氧基乙氧基,即O(CH₂)₂ON(CH₃)₂基团,又称为2'-DMAOE;以及如下文的实施例所述的2'-二甲基氨基乙氧基乙氧基(在本领域也称为2'-O-二甲基氨基乙氧基乙基或2'-DMAEOE),即2'-O--CH₂--O--CH₂--N(CH₂)₂。

[0226] 其它修饰包括2'-甲氧基(2'-OCH₃)、2'-氨基丙氧基(2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂)和2'-氟(2'-F)。类似的修饰也可以在iRNA的RNA上的其它位置进行,特别是2'-5'连接的dsRNA中或3'末端核苷酸上的糖的3'位、以及5'末端核苷酸的5'位置。iRNA也可以具有糖模拟物,例如取代戊呋喃糖的环丁基部分。

[0227] 抑制性核酸还可包括核碱基(在本领域通常简称为“碱基”)修饰或置换。如本文所使用的,“未修饰的”或“天然的”核碱基包括:嘌呤碱基腺嘌呤(A)和鸟嘌呤(G);以及嘧啶碱基胸腺嘧啶(T)、胞嘧啶(C)和尿嘧啶(U)。经修饰的核碱基包括其它合成和天然的核碱基,

例如:5-甲基胞嘧啶(5-me-C);5-羟甲基胞嘧啶;黄嘌呤;次黄嘌呤;2-氨基腺嘌呤;腺嘌呤和鸟嘌呤的6-甲基衍生物和其它烷基衍生物;腺嘌呤和鸟嘌呤的2-丙基衍生物和其它烷基衍生物;2-硫尿嘧啶、2-硫胸腺嘧啶和2-硫胞嘧啶;5-卤素尿嘧啶和5-卤素胞嘧啶;5-丙炔基尿嘧啶和5-丙炔基胞嘧啶;6-偶氮尿嘧啶、6-偶氮胞嘧啶和6-偶氮胸腺嘧啶;5-尿嘧啶(假尿嘧啶);4-硫尿嘧啶;8-卤素、8-氨基、8-硫醇、8-硫代烷基、8-羟基和它的8-取代的腺嘌呤和鸟嘌呤;5-卤素(特别是5-溴)、5-三氟甲基和它的5-取代的尿嘧啶和胞嘧啶;7-甲基鸟嘌呤和7-甲基腺嘌呤;8-氮杂鸟嘌呤和8-氮杂腺嘌呤;7-脱氮鸟嘌呤和7-脱氮腺嘌呤以及3-脱氮鸟嘌呤和3-脱氮腺嘌呤。这些核碱基中的一些对于增高本发明中的特征性的抑制性核酸的结合亲和力是特别有用的。这些核碱基包括:5-取代的嘧啶;6-氮杂嘧啶;以及N-2、N-6和O-6取代的嘌呤,包括2-氨基丙基腺嘌呤、5-丙炔基尿嘧啶和5-丙炔基胞嘧啶。已显示出5-甲基胞嘧啶置换增高了核酸双链稳定性0.6-1.2°C (Sanghvi, Y.S., Crooke, S.T. 和 Lebleu, B. 编, dsRNA Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, 276-278页), 并且是示例性的碱基置换, 甚至更特别是与2'-O-甲氧乙基糖修饰组合时。

[0228] 上述的经修饰的核酸、骨架和核碱基的制备是本领域公知的。

[0229] 本发明中的特征性的抑制性核酸的另一修饰涉及将一个或多个配体、部分或缀合物在化学上连接至抑制性核酸, 所述配体、部分或缀合物增强了iRNA的细胞摄取、活性、细胞分布或药代动力学性质。此类部分包括但不限于: 脂质部分如胆固醇部分 (Letsinger等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86: 6553-6556); 胆酸 (Manoharan等, Biorg. Med. Chem. Lett., 1994, 4: 1053-1060); 硫醚, 例如bery1-S-三苯甲基硫醇 (Manoharan等, Ann. N.Y. Acad. Sci., 1992, 660: 306-309; Manoharan等, Biorg. Med. Chem. Lett., 1993, 3: 2765-2770); 硫代胆固醇 (Oberhauser等, Nucl. Acids Res., 1992, 20: 533-538); 脂肪链, 例如十二烷二醇或十一烷基残基 (Saison-Behmoaras等, EMBO J, 1991, 10: 1111-1118; Kabanov等, FEBS Lett., 1990, 259: 327-330; Svinarchuk等, Biochimie, 1993, 75: 49-54); 磷脂, 例如二-十六烷基-消旋-甘油或三乙基铵1,2-二-O-十六烷基-消旋-甘油-3-磷酸酯 (Manoharan等, Tetrahedron Lett., 1995, 36: 3651-3654; Shea等, Nucl. Acids Res., 1990, 18: 3777-3783); 聚胺或聚乙二醇链 (Manoharan等, Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14: 969-973), 或金刚烷乙酸 (Manoharan等, Tetrahedron Lett., 1995, 36: 3651-3654); 棕榈酰部分 (Mishra等, Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264: 229-237); 或十八胺或己基氨基-羧基氧基胆固醇部分 (Crooke等, J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277: 923-937)。

[0230] 如本文所使用的, 术语“载体”是指被设计用于递送至宿主细胞或用于在不同宿主细胞之间转移的核酸构建体。如本文所使用的, 载体可以是病毒的或非病毒的。术语“载体”涵盖了与合适的控制元件相关联时能够复制并且可将基因序列转移至细胞的任何遗传元件。载体可包括但不限于克隆载体、表达载体、重组载体、质粒、噬菌体、转座子、粘粒、染色体、病毒、病毒粒等。

[0231] 如本文所使用的, 术语“表达载体”是指对来自连接至载体上的转录调控序列的序列的RNA或多肽的表达进行指导的载体。所表达的序列通常但不必须对于细胞而言是异源的。表达载体可包含额外的元件, 例如表达载体可具有两种复制系统, 从而允许其保持在两种生物体中, 例如在人细胞中用于表达并在原核宿主中用于克隆和扩增。术语“表达”是指参与产生RNA和蛋白质以及适当分泌蛋白质的细胞过程, 包括(如果适用的话) 但不限于

例如转录、转录物加工、翻译和蛋白质折叠、修饰和加工。“表达产物”包括转录自基因的RNA以及通过转录自基因的mRNA的翻译而获得的多肽。术语“基因”意为当可操作地连接至合适的调控序列时,在体外或体内转录(DNA)成RNA的核酸序列。基因可包括或不包括编码区域之前和之后的区域,例如,5' 未翻译(5' UTR)或“前导”序列以及3' UTR或“尾随”序列、以及单独的编码区段(外显子)之间的间插序列(内含子)。

[0232] 如本文所使用的,术语“病毒载体”是指包含病毒来源的至少一种元件并且具有被包装到病毒载体颗粒中的能力的核酸载体构建体。病毒载体可包含编码本文所述的多肽的核酸,以代替非必需的病毒基因。可出于在体外或体内将任何核酸转移到细胞中的目的来使用载体和/或颗粒。许多形式的病毒载体是本领域已知的。

[0233] “重组载体”意为包含异源核酸序列或能够在体内表达的“转移基因”的载体。应当理解的是,在一些实施方式中,本文所述的载体可与其它合适的组合物和治疗组合。在一些实施方式中,载体是附加型的。合适的附加型载体的使用提供了将感兴趣的核苷酸在受试者中维持高拷贝数的染色体外DNA的手段,从而消除了染色体整合的潜在影响。

[0234] 如本文所使用的,术语“治疗/处理”或“减轻”是指治疗性处理,其中,目的是逆转、缓解、减轻、抑制、减缓或停止与疾病或紊乱(例如本文所述的病症或疾病)相关的病症的进展或严重程度。术语“治疗”包括降低或缓解病症、疾病或紊乱的至少一种不利影响或症状。如果一种或多种症状或临床标记减少,则治疗通常是“有效”的。或者,如果疾病的进展减弱或停止,则治疗是“有效”的。也就是说,“治疗”不仅包括症状或标记的改善,还包括与未进行治疗时所预期的情况相比症状的进展或恶化中止或至少减缓。有益或期望的临床结果(无论可测定或不可测定)包括但不限于:缓解一种或多种症状、减小疾病程度、稳定疾病状态(即,不恶化)、延迟或减缓疾病进展、减轻或减缓疾病状态、缓和(部分或全部)、和/或减少死亡率。术语“治疗”疾病还包括提供疾病的症状或副作用的舒解(包括姑息治疗)。

[0235] 如本文所使用的,术语“药物组合物”是指与药学上可接受的载体(例如在制药工业中常用的载体)组合的活性试剂。本文采用的短语“药学上可接受的”是指下述化合物、材料、组合物和/或剂型:在合理的医学判断范围内,适于与人类和动物的组织接触而无过度的毒性、刺激、过敏反应或其它问题或并发症,与合理的收益/风险比相匹配。在任何方面的一些实施方式中,药学上可接受的载体可为除水以外的载体。在任何方面的一些实施方式中,药学上可接受的载体可为乳膏、乳剂、凝胶、脂质体、纳米颗粒和/或软膏。在任何方面的一些实施方式中,药学上可接受的载体可为人工或工程化的载体,例如,活性成分不会被发现在其中天然存在的载体。

[0236] 如本文所使用的,术语“给予”是指通过一定的方法或途径向受试者中放置本文所公开的化合物,使得至少将试剂部分递送至期望部位。含有本文所公开的化合物的药物组合物可以通过任何适当的途径给予,从而在受试者中产生有效的治疗。

[0237] 术语“有效量”是指足以提供与病症相关的症状的至少一些减轻的组合物的量。在一个实施方式中,“有效量”是指将减轻患有该病症的受试者中的该病症的标记或症状的组合物的量。

[0238] 术语“统计学上显著”或“显著地”是指统计显著性,并且通常是指2个标准差(2SD)或更大的差异。

[0239] 除了的操作实施例或另有指示以外,本文所使用的表示成分的量或反应条件的

所有数字均应理解为在所有情况下均由术语“约”加以修饰。术语“约”在与百分比连接使用时可以表示 $\pm 1\%$ 。

[0240] 如本文所使用的,术语“包含”或“包括”用于指对于发明而言必不可少的组成、方法及其各自的成分,对于包含未指定的要素(无论是必要的要素或是非必要的要素)而言也是开放性的。如本文所使用的,术语“包含”意味着除了所存在的指定的要素之外,还可存在其它要素。“包含”的使用表明包含而非限制性的。

[0241] 术语“由…组成”是指本文所述的组合物、方法及其各自的成分,排除了在实施方式描述中未列举的任何要素。

[0242] 如本文所使用的,术语“基本上由…组成”是指对于给定的实施方式而言所需的要素。该术语允许存在不会实质上影响本发明的实施方式的基本和新颖的或功能性的特性的额外的要素。

[0243] 除非上下文另有明确指示,单数术语“一/该/所述(a/an/the)”包括复数的指示对象。类似地,除非上下文另有明确指示,词语“或”意在包括“和”。尽管与本文描述的相似或相当的方法和材料可用于本公开的实践或试验中,在下文中对合适的方法和材料进行了描述。缩写“例如(e.g.)”源自拉丁文的例如(exempli gratia),并且在本文中用于表示非限制性的实例。因此,缩写“e.g.”与术语“例如(for example)”同义。

[0244] 本文公开的本发明的替代性要素或实施方式的分组不应解释为限制。各组成员可单独地提及和请求保护或者以与该组的其它成员或本文可见的其它要素的任意组合提及和请求保护。出于方便和/或专利性的原因,组的一个或多个成员可被包含在组中或从组中删除。当任何此类包含或删除发生时,本文认为本申请文件包含经修饰的组,从而实现所附权利要求中使用的所有马库什组的书面描述。

[0245] 除非本文另有定义,否则与本申请结合使用的科学术语和技术术语应具有与本公开所属领域的普通技术人员通常理解的含义。应当理解的是,本发明不限于在本文中描述的特定的方法学、方案和试剂等,而是可由此进行变化。本文中使用的术语仅用于描述特定实施方式的目的,并不旨在对本公开的范围进行限制,而本公开的范围仅仅由权利要求来限定。免疫学和分子生物学中的常见术语的定义可见于:The Merck Manual of Diagnosis and Therapy,第19版,由Merck Sharp&Dohme Corp.出版,2011(ISBN 978-0-911910-19-3);Robert S.Porter等(编);The Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine,由Blackwell Science Ltd.出版,1999-2012(ISBN 9783527600908);以及Robert A.Meyers(编),Molecular Biology and Biotechnology:a Comprehensive Desk Reference,由VCH Publishers,Inc.出版,1995(ISBN 1-56081-569-8);Immunology by Werner Luttmann,由Elsevier出版,2006;Janeway's Immunobiology, Kenneth Murphy, Allan Mowat, Casey Weaver(编),Taylor&Francis Limited,2014(ISBN 0815345305,9780815345305);Lewin's Genes XI,由Jones&Bartlett Publishers出版,2014(ISBN-1449659055);Michael Richard Green and Joseph Sambrook,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第4版,Cold Spring Harbor Laboratory出版社,Cold Spring Harbor,N.Y.,USA(2012)(ISBN 1936113414);Davis等,Basic Methods in Molecular Biology,Elsevier Science Publishing Inc.,New York,USA(2012)(ISBN 044460149X);Laboratory Methods in Enzymology:DNA,Jon Lorsch(编),Elsevier,2013

(ISBN 0124199542);Current Protocols in Molecular Biology (CPMB),Frederick M.Ausubel (编),John Wiley and Sons,2014 (ISBN 047150338X,9780471503385);Current Protocols in Protein Science (CPPS),John E.Coligan (编),John Wiley and Sons, Inc.,2005;以及Current Protocols in Immunology (CPI) (John E.Coligan,ADA M Kruisbeek,David H Margulies,Ethan M Shevach,Warren Strobe, (编) John Wiley and Sons, Inc.,2003 (ISBN 0471142735,9780471142737);以引用的方式将它们的内容以其整体全部并入本文。

[0246] 本领域技术人员可以容易地辨别有用的化疗剂(例如参见Physicians' Cancer Chemotherapy Drug Manual 2014,Edward Chu,Vincent T.DeVita Jr.,Jones&Bartlett Learning;Principles of Cancer Therapy,Harrison's Principles of Internal Medicine中的第85章,第18版;Therapeutic Targeting of Cancer Cells:Era of Molecularly Targeted Agents and Cancer Pharmacology,Abeloff's Clinical Oncology中的第28至29章,2013Elsevier;以及Fischer D S (编):The Cancer Chemotherapy Handbook,第4版,St.Louis,Mosby-Year Book,2003)。

[0247] 本文在对本发明各个方面的描述中对其它术语进行定义。

[0248] 出于描述和公开的目的,将本申请全文中引用的所有专利和其它出版物(包括参考文献、发行的专利、公开的专利申请和同时待审的专利申请)以引用的方式明确地并入本文,例如,在此类出版物中描述的可与本文描述的技术关联使用的方法学。这些出版物仅由于它们的公开早于本申请的申请日而提供。在这一方面,不应当视作承认了本发明人没有权利借助于先前的发明或因为任何其它原因而将此类公开内容提前。所有关于这些文件的日期的声明或关于这些文件的内容的表述是基于申请人可获得的信息,并不构成关于这些文件的日期或内容的正确性的任何承认。

[0249] 对本公开的実施方式的描述并非旨在进行穷举或将本公开限制为所公开的明确的形式。尽管本文中出于说明性目的描述了本公开的具体实施方式和实施例,然而正如相关领域的技术人员将了解的,可在本公开的范围内进行各种等同修改。例如,当方法步骤或功能以给定的顺序存在时,替代的实施方式能够以不同的顺序执行功能、或可以实质上同时执行功能。本文所提供的本公开的教导可以施用至其它适当的程序或方法。本文所述的各种实施方式可以组合以提供进一步的实施方式。如果需要的话,可对本公开的方面进行修改,以采用上述参考文献和应用的组合、功能和构思,从而提供本公开的进一步的实施方式。此外,由于生物功能对等性的考虑,可以在种类或数量上对蛋白结构进行不影响生物或化学作用的一些改变。鉴于详细的描述,可以对本公开作出这些改变和其它改变。所有这些修饰都旨在包含于所附的权利要求的范围之内。

[0250] 可将任何上述实施方式的特定要素与其它实施方式中的要素组合或置换。此外,尽管在这些实施方式的上下文中已经描述了与本公开的一些实施方式相关的优点,然而其它实施方式也可以表现出此类优点,并且,并非所有的实施方式都必须表现出这样的优点才能落入本公开的范围之内。

[0251] 本文所描述的技术通过以下实施例进行进一步说明,而不应被解释为进行了进一步的限定。

[0252] 本文所述的技术的一些实施方式可以根据下列编号段落的任何一段进行定义:

- [0253] 1. 一种离子液体或溶剂,所述离子液体或溶剂包含具有有机阳离子和有机/无机阴离子的一组盐。
- [0254] 2. 如段落1所述的离子液体或溶剂,其中,有机阳离子和有机/无机阴离子分别为胆碱和香叶酸或香叶酸根。
- [0255] 3. 如段落1或2所述的离子液体或溶剂,其中,离子液体或溶剂在低于100℃下作为液体存在。
- [0256] 4. 如段落1、2或3所述的离子液体或溶剂,其中,所述离子液体或溶剂在室温下作为液体存在。
- [0257] 5. 如段落1-4中任一段所述的离子液体或溶剂,其中,与不存在离子液体或溶剂的对照胰岛素相比,所述离子液体或溶剂极大地增强了胰岛素渗透穿过皮肤。
- [0258] 6. 一种组合物,所述组合物包含如段落1-5中任一段所述的离子液体和胰岛素。
- [0259] 7. 如段落6所述的组合物,所述组合物进一步包含药学上可接受的载体。
- [0260] 8. 如段落6或7所述的组合物,其中,将所述组合物配制成口服制剂。
- [0261] 9. 一种组合物,所述组合物包含离子液体和胰岛素,所述离子液体包含胆碱和香叶酸根。
- [0262] 10. 如段落9所述的组合物,所述组合物进一步包含药学上可接受的载体。
- [0263] 11. 一种口服制剂,所述口服制剂包含离子液体、胰岛素和药学上可接受的载体,所述离子液体包含胆碱和香叶酸根。
- [0264] 12. 一种用于口服递送的胰岛素制剂,所述制剂包含段落1-5中任一段所述的离子液体。
- [0265] 13. 如段落12所述的用于口服递送的胰岛素制剂,所述制剂进一步包含药学上可接受的载体。
- [0266] 14. 一种用于口服递送治疗药物的方法,所述方法包括将段落1-5中任一段所述的离子液体与治疗药物混合并且将所述混合物口服给予至受试者。
- [0267] 15. 如段落14所述的方法,其中,所述混合物为口服制剂。
- [0268] 16. 一种治疗糖尿病的方法,所述方法包括口服给予包含胆碱和香叶酸根以及胰岛素和胰岛素的口服制剂,其中,所述胆碱和香叶酸根形成离子液体溶剂。
- [0269] 17. 如段落6-10中任一段所述的组合物、或段落11-13中任一段所述的制剂、或段落14-16中任一段所述的方法,其中,所述组合物或制剂中的离子液体浓度为约0.1mM至20mM。
- [0270] 18. 如段落6-10中任一段所述的组合物、或如段落11-13中任一段所述的制剂、或如段落14-16中任一段所述的方法,其中,所述组合物或制剂中的离子液体浓度为约0.5mM至20mM、0.5mM至18mM、0.5mM至16mM、0.5mM至14mM、0.5mM至12mM、0.5mM至10mM、0.5mM至8mM、1mM至20mM、1mM至18mM、1mM至16mM、1mM至14mM、1mM至12mM、1mM至10mM、1mM至8mM、2mM至20mM、2mM至18mM、2mM至16mM、2mM至14mM、2mM至12mM、2mM至10mM、2mM至8mM、4mM至20mM、4mM至18mM、4mM至16mM、4mM至14mM、4mM至12mM、4mM至10mM、4mM至8mM、6mM至20mM、6mM至18mM、6mM至14mM、6mM至12mM、6mM至10mM、6mM至8mM、8mM至20mM、8mM至18mM、8mM至16mM、8mM至14mM、8mM至12mM、8mM至10mM、10mM至20mM、10mM至18mM、10mM至16mM、10mM至14mM、10mM至12mM、12mM至20mM、12mM至18mM、12mM至16mM、12mM至14mM、14mM至20mM、14mM至18mM、14mM至

16mM、16mM至20mM、16mM至18mM或18mM至20mM。

[0271] 19.如段落17所述的组合物,其中,所述组合物中的离子液体浓度为约1mM、约2mM、约3mM、约4mM、约5mM、约6mM、约7mM、约8mM、约9mM、约10mM、约11mM、约12mM、约13mM、约14mM、约15mM、约16mM、约17mM、约18mM、约19mM或约20mM。

[0272] 本文所述的技术的一些实施方式可以根据下列编号段落的任何一段进行定义:

[0273] 1.一种口服递送至少一种活性化合物的方法,所述方法包括口服给予与包含胆碱和香叶酸根(CAGE)的离子液体的组合物组合的所述活性化合物。

[0274] 2.一种递送至少一种活性化合物的方法,所述方法包括皮下、皮内或静脉内给予与CAGE组合的所述活性化合物。

[0275] 3.一种递送至少一种活性化合物的方法,所述方法包括向粘膜给予与CAGE组合的所述活性化合物。

[0276] 4.如段落3所述的方法,其中,所述粘膜是鼻的、口腔的或阴道的。

[0277] 5.一种胃肠外递送至少一种活性化合物的方法,所述方法包括胃肠外给予与CAGE组合的所述活性化合物。

[0278] 6.如段落5所述的方法,其中,所述给予包括递送至肿瘤。

[0279] 7.一种在有需要的受试者中治疗疾病的方法,所述方法通过注射入受影响的组织中而向受试者给予与CAGE组合的活性化合物。

[0280] 8.如段落7所述的方法,其中,所述疾病是癌症、肥胖、疣、增生或由组织生长引起的任何其它疾病。

[0281] 9.如段落1-8中任一段所述的方法,其中,CAGE的浓度为至少0.1%w/v。

[0282] 10.如段落1-9中任一段所述的方法,其中,所述CAGE包含比例为从约2:1至约1:10的胆碱:香叶酸或香叶酸根。

[0283] 11.如段落1-9中任一段所述的方法,其中,所述CAGE包含比例为从约1:1至约1:4的胆碱:香叶酸或香叶酸根。

[0284] 12.如段落1-9中任一段所述的方法,其中,所述CAGE包含比例为从约1:2至约1:4的胆碱:香叶酸或香叶酸根。

[0285] 13.如段落1-12中任一段所述的方法,其中,离子液体的阴离子包括香叶酸和/或香叶酸根。

[0286] 14.如段落1-13中任一段所述的方法,其中,将与CAGE组合的所述活性化合物给予一次。

[0287] 15.如段落1-14中任一段所述的方法,其中,将与CAGE组合的所述活性化合物以多剂量给予。

[0288] 16.如段落1-15中任一段所述的方法,其中,所述活性化合物包括核酸分子。

[0289] 17.如段落1-15中任一段所述的方法,其中,所述活性化合物包括小分子。

[0290] 18.如段落1-15中任一段所述的方法,其中,所述活性化合物包括多肽。

[0291] 19.如段落1-15中任一段所述的方法,其中,所述活性化合物包括抗体或抗体试剂。

[0292] 20.如段落1-19中任一段所述的方法,其中,所述活性化合物包括化疗化合物。

[0293] 21.如段落1-20中任一段所述的方法,其中,所述活性化合物包括胰岛素。

- [0294] 22. 如段落21所述的方法, 其中, 以1-20mg/kg的剂量提供胰岛素。
- [0295] 23. 一种组合物, 所述组合物包含与CAGE组合的活性化合物。
- [0296] 24. 如段落23所述的组合物, 其中, CAGE的浓度为至少0.1%w/v。
- [0297] 25. 如段落23-24中任一段所述的组合物, 其中, 所述CAGE包含比例为从约2:1至约1:10的胆碱: 香叶酸或香叶酸根。
- [0298] 26. 如段落23-24中任一段所述的组合物, 其中, 所述CAGE包含比例为从约1:1至约1:4的胆碱: 香叶酸或香叶酸根。
- [0299] 27. 如段落23-24中任一段所述的组合物, 其中, 所述CAGE包含比例为从约1:2至约1:4的胆碱: 香叶酸或香叶酸根。
- [0300] 28. 如段落23-27中任一段所述的组合物, 其中, 所述活性化合物包含核酸分子。
- [0301] 29. 如段落23-27中任一段所述的组合物, 其中, 所述活性化合物包括小分子。
- [0302] 30. 如段落23-27中任一段所述的组合物, 其中, 所述活性化合物包含多肽。
- [0303] 31. 如段落23-27中任一段所述的组合物, 其中, 所述活性化合物包括抗体或抗体试剂。
- [0304] 32. 如段落23-31中任一段所述的组合物, 其中, 活性化合物包括化疗化合物。
- [0305] 33. 如段落23-32中任一段所述的组合物, 其中, 活性化合物包括胰岛素。
- [0306] 34. 如段落233所述的组合物, 其中, 以1-20mg/kg的剂量提供胰岛素。
- [0307] 35. 如段落23-34中任一段所述的组合物, 所述组合物进一步包含额外的药学上可接受的载体。
- [0308] 36. 如段落23-35中任一段所述的组合物, 将所述组合物配制为口服、皮下或胃肠外制剂。
- [0309] 37. 如段落23-36中任一段所述的组合物, 将所述组合物配制为用于向粘液膜给予。
- [0310] 38. 如段落37所述的组合物, 其中, 所述粘膜为鼻的、口腔的或阴道的。
- [0311] 39. 如段落36所述的组合物, 其中, 口服制剂为包含活性化合物和CAGE的组合的可降解的胶囊。
- [0312] 40. 如段落23-39中任一段所述的组合物, 其中, 与不存在CAGE时的活性相比, 该活性化合物的生物学活性得以改善或稳定。
- [0313] 41. 如段落1-40中任一段所述的方法或组合物, 其中, 活性化合物和CAGE的组合为混合物。
- [0314] 42. 如段落1-40中任一段所述的方法或组合物, 其中, 所述活性化合物和CAGE的组合包括包含所述活性化合物的纳米颗粒、以包含CAGE的组合物处于溶液或混悬液中的纳米颗粒。
- [0315] 43. 一种将核酸分子递送至细胞的方法, 所述方法包括使细胞同与如下组合物组合的核酸分子接触, 所述组合物包含胆碱和香叶酸根 (CAGE) 的离子液体。
- [0316] 44. 如段落43所述的方法, 其中, 所述细胞为受试者中的细胞, 并且所述接触步骤包括向受试者给予与如下组合物组合的核酸分子, 所述组合物包含胆碱和香叶酸根 (CAGE) 的离子液体。
- [0317] 45. 如段落43-44中任一段所述的方法, 其中, 所述核酸分子包含载体、表达载体或

抑制性核酸分子。

[0318] 46.如段落43-45中任一段所述的方法,其中,CAGE的浓度为至少0.1%w/v。

[0319] 47.如段落43-46中任一段所述的方法,其中,所述CAGE包括比例为从约2:1至约1:10的胆碱:香叶酸或香叶酸根。

[0320] 48.如段落43-46中任一段所述的方法,其中,所述CAGE包括比例为从约1:1至约1:4的胆碱:香叶酸或香叶酸根。

[0321] 49.如段落43-46中任一段所述的方法,其中,所述CAGE包括比例为从约1:2至约1:4的胆碱:香叶酸或香叶酸根。

[0322] 50.如段落43-49中任一段所述的方法,其中,所述离子液体的阴离子包括香叶酸和/或香叶酸根。

[0323] 51.如段落43-50中任一段的方法,其中,核酸分子和CAGE的组合为混合物。

[0324] 52.如段落43-50中任一段所述的方法,其中,所述核酸分子和CAGE的组合包括包含所述核酸分子的纳米颗粒、以包含CAGE的组合物处于溶液或混悬液中的纳米颗粒。

[0325] 53.用于口服递送、递送至粘膜、胃肠外递送或治疗疾病的与包含胆碱和香叶酸根(CAGE)的离子液体的组合物组合的至少一种活性化合物。

[0326] 54.如段落53所述的组合,其中,所述粘膜为鼻的、口腔的或阴道的。

[0327] 55.如段落53所述的组合,其中,胃肠外给予包括递送至肿瘤。

[0328] 56.如段落53所述的组合,其中,治疗包括将组合物注射到受影响的组织。

[0329] 57.如段落56所述的组合,其中,所述疾病为癌症、肥胖、疣、增生或由组织生长引起的任何其它疾病。

[0330] 58.如段落53-57中任一段所述的组合,其中,CAGE的浓度为至少0.1%w/v。

[0331] 59.如段落53-58中任一段所述的组合,其中,所述CAGE包含比例为从约2:1至约1:10的胆碱:香叶酸或香叶酸根。

[0332] 60.如段落53-59中任一段所述的组合,其中,所述CAGE包含比例为从约1:1至约1:4的胆碱:香叶酸或香叶酸根。

[0333] 61.如段落53-59中任一段所述的组合,其中,所述CAGE包含比例为从约1:2至约1:4的胆碱:香叶酸或香叶酸根。

[0334] 62.如段落53-61中任一段所述的组合,其中,离子液体的阴离子包含香叶酸和/或香叶酸根。

[0335] 63.如段落53-62中任一段所述的组合,其中,将与CAGE组合的活性化合物给予一次。

[0336] 64.如段落53-62中任一段所述的组合,其中,将与CAGE组合的活性化合物以多剂量给予。

[0337] 65.如段落53-64中任一段所述的组合,其中,所述活性化合物包括核酸分子。

[0338] 66.如段落53-65中任一段所述的组合,其中,活性化合物包括小分子。

[0339] 67.如段落53-65中任一段所述的组合,其中,所述活性化合物包括多肽。

[0340] 68.如段落53-65中任一段所述的组合,其中,所述活性化合物包括抗体或抗体试剂。

[0341] 69.如段落53-65中任一段所述的组合,其中,所述活性化合物包括化疗化合物。

[0342] 70. 如段落53-65中任一段所述的组合, 其中, 活性化合物包括胰岛素。

[0343] 71. 如段落70所述的组合, 其中, 以1-20mg/kg的剂量提供胰岛素。

[0344] 实施例

[0345] 实施例1: 胆碱-香叶酸根作为口服递送胰岛素的高效溶剂

[0346] 缩略词

[0347] AUC 曲线下面积

[0348] BSM 基础接种培养基

[0349] CAGE 胆碱和香叶酸根

[0350] CD 圆二色谱

[0351] CLSM 共聚焦激光扫描显微镜

[0352] DAPI 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚二盐酸盐

[0353] DMEM Dulbecco改良的eagle培养基

[0354] DMSO 二甲基亚砷

[0355] F 生物利用度

[0356] FBS 胎牛血清

[0357] FITC 异硫氰酸荧光素

[0358] GIT 胃肠道

[0359] IC₅₀ 半数最大抑制浓度

[0360] IJ 空肠内的

[0361] K_{el} 消除速率常数

[0362] MTT 3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四氮唑溴盐

[0363] PBS 磷酸盐缓冲盐水

[0364] P/S 青霉素和链霉素

[0365] RT 室温

[0366] SQ 皮下的

[0367] t^{1/2} 半衰期

[0368] TEER 跨上皮电阻

[0369] 随着全球糖尿病病例的增加以及对使用可注射胰岛素的血糖管理的患者依从性的缺乏, 迫切需要开发有效的口服胰岛素制剂。然而, 胃肠道对生物制品的口服递送展现了巨大的障碍。本文中, 我们报道了使用胆碱和香叶酸根 (CAGE) 离子液体的高效口服胰岛素制剂的开发。在体内, 胰岛素-CAGE在大鼠的空肠给予后显示出51%的出色的药代动力学生物利用度和66%的药效学生物利用度。与皮下注射胰岛素不同, 低的胰岛素剂量 (3-10U/kg) 引起血糖水平的显著下降, 其持续较长时间 (长达12h)。当使用口服灌胃将10U/kg胰岛素-CAGE以肠溶胶囊口服递送时, 观察到血糖持续降低高达45%。该制剂表现出高的生物相容性, 并且在室温下稳定2个月, 且在冷藏下稳定至少4个月。综上所述, 结果表明CAGE是有前途的口服给予的赋形剂, 应进一步探索用于口服递送胰岛素和目前作为注射剂销售的其它生物制品。

[0370] 由于易于给予、高的患者依从性和低的制造成本, 因此相比于注射, 优选药物给予的口服途径。然而, 由于对药物吸收而言的各种胃肠屏障, 其不适用于生物制品的递送。例

如,胰岛素为对于1型糖尿病管理必不可少的药物。其目前作为皮下注射给予,但由于其侵袭性而与患者依从性的缺乏有关。口服递送的胰岛素可显著提高患者的依从性,并且它严密地模拟了胰腺胰岛素的生理路径。口服/胰腺胰岛素通过门静脉转运至肝脏,在该处保留80%,并且其余的到达全身循环,与全身循环相比,在门静脉中产生高3倍的胰岛素浓度。当皮下注射胰岛素时,门静脉-外周胰岛素梯度被破坏,这是因为与门静脉(仅约20%)中的浓度相比,全身性胰岛素浓度更高,这破坏了肝的糖原存储和葡萄糖输出之间的精细平衡,常常导致高血糖,当用更高的胰岛素剂量治疗时,可导致低血糖症。

[0371] 对口服胰岛素产品的追求开始于几十年前。已经开发出数种策略来解决对生物制品的口服吸收而言的胃肠屏障,然而,没有制剂成功地消除所有的临床障碍,并且因此目前没有可商购的口服胰岛素产品。已完成或目前处于II期临床试验的产品包括带有改善口服胰岛素的吸收的添加剂的肠溶胶囊(Diabetology Ltd的Capsulin™和Oramed Ltd的ORMD-0801)、肝导向脂质体胰岛素(Diasome Pharmaceuticals Inc.的HDV-胰岛素)、聚乙二醇(PEG)缀合的胰岛素(Biocon Ltd.的IN-105)、Oshadi载体中的胰岛素-胰岛素原c-肽(Oshadi drug administration Ltd的Oshadli Icp)和使用胃肠渗透促进剂技术的长效胰岛素类似物片剂(Novo Nordisk的GIPET 1)。

[0372] 此外,许多产品需要多步骤的配制程序、蛋白质的化学修饰或各种添加剂,这些都有其自身的缺点。随着全球糖尿病流行的出现,存在开发安全、有效且易于升级的口服胰岛素产品的迫切感。

[0373] 我们已经开发了基于离子液体(IL)的胰岛素口服制剂,并确定了其安全性、功效和长期稳定性。离子液体由熔点低于100℃的有机/无机盐组成,并已广泛用于各种新的化学和制药技术中。对于当前的工作,我们使用了室温稳定的胆碱和香叶酸根(CAGE)深共熔溶剂,该溶剂早期在抗生素和胰岛素的透皮递送中表现出显著的功效。胰岛素通过一步法分散在CAGE中,并在体外和体内评估了其安全性和功效以及其储存稳定性。该研究表明胰岛素的口服生物利用度空前提高,具有出色的口服功效、生物相容性和长期稳定性。

[0374] FITC-胰岛素跨肠单层转运的确定。我们设计了使用10mM CAGE或盐水的5小时长的FITC-胰岛素跨Caco-2单层转运的实验。在该研究中,与胰岛素-盐水处理组相比,经胰岛素-CAGE处理的细胞从开始就表现出明显更高的转运(图1)。两组的FITC-胰岛素转运均随时间稳定增加,并且在整个研究中,与经胰岛素-盐水处理的细胞相比,经CAGE处理的单层细胞在所有时间点观察到的胰岛素转运至少高3倍。在研究结束后的5小时,FITC-胰岛素转运在经胰岛素-CAGE处理的细胞中占30%,同时对于经胰岛素-盐水处理的细胞而言为10%。

[0375] 在研究结束时,通过transwell膜的共聚焦成像证实了这些结果。图像清楚地显示出,与胰岛素-盐水相比,用胰岛素-CAGE孵育的细胞对FITC-胰岛素的摄取更高(图2A-图2B)。

[0376] 测量TEER以确定当用CAGE处理时的Caco-2细胞中的紧密连接完整性。在经胰岛素-盐水处理的细胞中,在最初的3小时内,TEER保持接近原始值的100%,并且到5小时的研究结束时,TEER仅下降了2.5%至 $98.5 \pm 2.64\%$ (图3)。然而,在经胰岛素-CAGE处理的细胞中,TEER在2小时和3小时时分别显著下降至 $88.35 \pm 0.86\%$ 和 $77.43 \pm 3.48\%$ 。超过3小时后,TEER开始升高,并在4h时达到初始值的 $82.94 \pm 2.64\%$,并最终在5h时达到 $91.3 \pm$

1.73%，这与经胰岛素-盐水处理的细胞无显著差异。由CAGE引起的TEER的这些变化表明CAGE暂时打开了肠道的紧密连接，并帮助胰岛素跨细胞转运。然而，除了短暂打开紧密连接之外，可能还有多种机制在起作用，以通过CAGE协助胰岛素跨这些细胞的转运，这还有待阐明。

[0377] 空肠内给予时的胰岛素-CAGE的体内功效。为了判定胰岛素-CAGE在降低血糖水平方面的功效，将3-5U/kg胰岛素与其对照一起分散在CAGE中，并空肠内给予至经麻醉的大鼠，然后每0.5小时监测血糖，持续共5h(图4)。在给予3U/kg胰岛素-CAGE的大鼠中，血糖从0.5小时开始稳定下降，直到2.5小时达到其初始值的55% ($55.37 \pm 5.64\%$)。超过这一时间点之后，到5小时的研究结束时，血糖下降得以稳定并达到初始值的53% ($53.12 \pm 3.16\%$)。用5U/kg胰岛素-CAGE治疗的组显示出在血糖水平方面的急剧下降，在1.5和2小时内以下降约65%告终(分别为 $36.73 \pm 4.46\%$ 和 $35.37 \pm 5.25\%$)。此后，通常在由于机体的葡萄糖稳态机制起效而经受血糖水平的快速下降的非糖尿病大鼠中观察到血糖水平升高。在5小时结束时，血糖水平约为初始水平的74% ($73.93 \pm 5.72\%$)。皮下注射2U/kg胰岛素的大鼠也显示出与空肠内给予5U/kg胰岛素-CAGE相似的血糖下降模式。然而，血糖下降的程度低于空肠内给予的5U/kg胰岛素-CAGE。在1小时内观察到51%的最大下降(初始水平的 $48.76 \pm 7.55\%$)，在5小时的研究结束后其迅速恢复到100% ($101.61 \pm 6.69\%$)。在较早的时间点，注意到皮下给予的胰岛素和5U/kg胰岛素-CAGE之间的疗效没有显著差异。但是，如图6清楚显示，CAGE直至研究结束显著维持了胰岛素的作用。对于3U/kg的胰岛素-CAGE空肠内给予，注意到了类似的胰岛素的持续生物活性。如在上述的组中所观察到的，其它制剂对照(例如纯CAGE、盐水或3U/kg胰岛素-盐水空肠内给予)并未引起血糖水平的快速下降。在所有这些对照组中，血糖在5小时内缓慢降低(很可能是由于持续禁食)至初始水平的约25%。

[0378] 通过在不同时间点测量血清胰岛素水平来确定胰岛素吸收和清除的药代动力学(图5)。在皮下注射2U/kg胰岛素和空肠内给予5U/kg胰岛素-CAGE后一小时内，胰岛素浓度迅速升高，随后下降并遵循相似的清除模式。另一方面，空肠内给予3U/kg胰岛素-盐水的血清胰岛素浓度几乎不增加。使用血清胰岛素浓度计算的药代动力学参数显示出，空肠内给予的胰岛素-CAGE的清除半衰期约为SQ胰岛素的两倍高(表1)。发现由此计算的5U/kg IJ胰岛素-CAGE的口服生物利用度为50.6%。

[0379] 表1:空肠内供给的胰岛素-CAGE和皮下给予的胰岛素溶液的药代动力学参数

	制剂	$K_{el} (h^{-1})$	$t^{1/2} (h)$	AUC _{总的} ($\mu IU \cdot h/ml$)	F%
[0380]	胰岛素 SQ	0.58	1.2	237.6	50.6
	胰岛素-CAGE	0.32	2.2	300.6	

[0381] 在我们的研究中，获得了51%的空肠生物利用度，这也是在其它口服胰岛素制剂中所见到的最高的之一。还应注意的是，胰岛素-CAGE的清除半衰期几乎比皮下注射的胰岛素高两倍，表明更持久的疗效。

[0382] 以胶囊口服递送的胰岛素-CAGE的体内功效。空肠内给予时的CAGE在增强胰岛素的口服生物利用度方面的明显功效，促使我们研究使用以胶囊口服递送的胰岛素-CAGE是否可达到类似的功效。为此，如图6所示，我们将10U/kg胰岛素-CAGE及其对照置于加长的9号胶囊中，并使用口服灌胃将它们给予至禁食过夜的大鼠。

[0383] 用10U/kg胰岛素-CAGE治疗的组在研究开始后1小时和2小时显示出血糖水平的快

速下降(分别为初始水平的 $68.58 \pm 2.12\%$ 和 $62.32 \pm 1.58\%$) (图7)。超过这一时间点之后,血糖在12小时内缓慢但稳定地下降至多达初始水平的约56% ($56.66 \pm 2.31\%$)。相比之下,皮下给予2U/kg胰岛素引起血糖水平在1小时内急剧下降50% ($51.43 \pm 5.25\%$),此后在4小时内其稳定上升至约88%。之后,血糖水平以类似于纯CAGE、空胶囊和胰岛素-盐水的制剂对照的模式下降。当口服给予这些对照时,观察到血糖水平随时间缓慢而稳定地下降(很可能是由于持续禁食),在12h时以约25%结束。值得注意的是,与皮下给予胰岛素不同并与空肠内给予一致,CAGE引起胰岛素从4小时开始直至在12小时研究结束为止的显著的持续作用。

[0384] 空肠内和口服给予CAGE后的肠的组织学分析。组织学检查显示出,在用CAGE或盐水治疗的大鼠中,小肠组织的形态没有显著差异(图8A-图8E)。空肠内给予后5小时或口服给予后12小时收集肠组织,并且显示出对小肠组织无显著的结构损伤。特别地,在所有的组织中都存在指状绒毛。结果清楚地表明了CAGE与肠的优异的生物相容性,从而证实了其对口服给予的适用性。

[0385] CAGE中的胰岛素的二级结构。胰岛素具有对于其受体结合并因此对于生物活性至关重要的固有的 α -螺旋构象。先前的研究表明,胰岛素在CAGE中在室温(RT, 25°C)下保存17小时后仍能保留其 α -螺旋构象[Banerjee等, AHM, 2017]。然而,当胰岛素在CAGE中分散较长时间后,是否保留构象尚不清楚。为此,我们将胰岛素-CAGE储存在RT下(远离阳光直射)或在 4°C 下冷藏,并在每个月使用CD对二级结构进行评价,持续4个月。结果显示在约207nm和222nm处存在双谷,这是CD图中的 α -螺旋的典型代表(图9)。新鲜胰岛素与在RT下储存长达3个月或在冷藏下储存长达4个月的胰岛素的形状或椭圆率程度没有差异。结果表明,CAGE有助于长时间保持胰岛素的稳定性,随后通过体内生物活性评估证实了这一点。要注意的是,一般而言,经冻干的常规胰岛素在室温下稳定至多3-4周,而在 4°C 下储存的胰岛素溶液仅稳定2-7天(参见例如在万维网prospecbio.com/Insulin_Human上可获取的文档)。

[0386] 通过体内生物活性确认胰岛素在CAGE中的稳定性。CD稳定性研究中获得的令人鼓舞的结果促使我们评估非糖尿病大鼠中的胰岛素的生物活性,以确认稳定性结果。为此,对禁食过夜的大鼠皮下注射1U/kg胰岛素(从CAGE中分离并重新悬浮在无菌盐水中),并监测血糖8小时(图10)。新鲜制备的胰岛素溶液(盐水中的胰岛素)在1小时内引起血糖水平下降50% ($50.73 \pm 2.47\%$),并在接下来的一个小时内保持不变($49.59 \pm 4.4\%$)。此后,血糖水平在5小时内升至原始水平的约92% ($92.05 \pm 4.8\%$),由于连续禁食而又缓慢下降至初始值的约30%。相比之下,从存储在温度和不同时间点的CAGE中分离的胰岛素遵循相似的模式,并且在注射后1小时和2小时显示出类似的血糖水平的下降,与新鲜胰岛素相比,下降百分比没有显著差异。然而,对于在RT下储存3个月的胰岛素,观察到显著减弱的功效。在该组中,注射胰岛素后1小时和2小时内,注意到血糖水平仅下降了38% (分别为 $61.57 \pm 2.38\%$ 和 $61.98 \pm 3.19\%$),表明在RT下储存2个月后,胰岛素丧失了其部分生物活性。然而,即使在储存4个月后,用CAGE储存在 4°C 的胰岛素也没有表现出生物活性的任何下降。这清楚地表明,CAGE是用于胰岛素的长期储存的极佳溶剂。需要进一步的研究来确定在 4°C 下CAGE中的胰岛素稳定的最大时间长度。

[0387] 讨论

[0388] 在过去的几十年中,糖尿病的发病率一直稳定增长,以至于现在被称为“世纪流行

病”(1)。据报道,每个国家的糖尿病病例都有所增加,低收入和中等收入国家增长最快且中东和北非地区的发病率最高(1-3)。根据世界卫生组织最近的报告,2012年,糖尿病导致全球150万人死亡,另外还有320万人因高血糖相关的共病而死亡(3)。在美国,据报告2015年有3030万人(约占人口的9.4%)患有这种疾病,并且每年诊断出150万新病例(4)。当前管理该疾病的建议包括单独的胰岛素治疗或与口服降糖药(如二甲双胍)组合的胰岛素治疗(5)。单独的胰岛素治疗的个体经常需要每天两次给予中效胰岛素或每天一次给予长效胰岛素(5)。胰岛素在门诊中不能用作口服丸剂,只能作为皮下注射给予。然而,尽管可注射的胰岛素在管理高血糖症和减轻神经病变、肾病和视网膜病的风险方面有效,但由于疼痛、干扰日常活动和尴尬而使其具有较低的患者依从性,导致多达60%的患者故意遗漏和长期血糖控制不良(6,7)。由于糖尿病相关的并发症,这会导致更高的血红蛋白A1C水平和增加的住院率(6)。为了绕过这个问题,MannKind公司开发了可吸入的速效胰岛素制剂**Afrezza®**,用于餐后血糖管理,但是相关的肺部风险(例如,肺癌和糖尿病性酮症酸中毒的发生率更高,肺功能下降以及患有慢性肺病的患者发展出急性支气管痉挛的风险更高)可能会阻止患者转变为采用吸入胰岛素治疗(8)。鉴于糖尿病的指数增长和严重性,必须开发出对患者具有吸引力并避免基于制剂的副作用的胰岛素疗法。

[0389] 口服递送享有高的患者依从性,但不适合递送大分子(例如蛋白质或肽类药物)。这是由于以下事实:口服递送的药物需要穿越可降解蛋白质/肽类药物的胃的酸性环境。通过将其封装在肠溶或其它保护性包衣系统中可避免这种情况。但是,当肽/蛋白质药物在肠中从其保护性包装中释放时,会进入肠的蛋白水解环境中,在该处其易于被驻留的酶裂解成较小的氨基酸单位。倘若一部分药物逃脱了蛋白水解,也几乎不可能将其作为完整的分子吸收通过肠粘液层和肠上皮细胞而进入血液循环。由于GI的转运时间不规律以及在肠中缺乏特定的胰岛素吸收机制,口服胰岛素的吸收进一步受到阻碍(9)。GI转运期间的胰岛素结构的任何变化都可导致显著的变性和生物学活性的丧失。因此,毫不奇怪,蛋白质和肽类药物具有小于1%的可忽略不计的口服生物利用度,与可注射制剂的药理活性明显不同,所述可注射制剂的100%的剂量可用于药理活性(10)。一些研究人员试图通过如下来解决胰岛素的低的口服生物利用度的长期问题:修饰胰岛素分子;将其封装在新的载体中;或者使用肠溶衣、吸收促进剂或蛋白水解抑制剂。一些实例包括使用基于PLGA(聚[乳酸-乙醇酸共聚物])的纳米颗粒用于口服胰岛素递送。Pan等使用负载于PLGA纳米颗粒中的10U/kg胰岛素获得10.3%的药理生物利用度,而Cui和同事使用分别放置于PLGA和PLGA-55纳米颗粒中的20U/kg胰岛素获得3.68%和6.27%的口服生物利用度(11,12)。Sarmiento等使用壳聚糖-右旋糖酐纳米颗粒来封装胰岛素,并在分别将50U/kg和100U/kg胰岛素放入颗粒中后观察到5.6%和3.4%的药理生物利用度(13)。对于50U/kg和100U/kg的胰岛素剂量,海藻酸盐/酯-壳聚糖纳米颗粒分别将胰岛素的口服生物利用度提高到6.8%和3.4%(14)。Zhang和同事将50U/kg胰岛素封装在固体脂质纳米颗粒(SLN)和经麦胚凝集素修饰的SLN中,并分别获得4.46%和6.08%的药理生物利用度(15)。同样,Ansari等报道,与口服给予胰岛素溶液相比,使用SLN的胰岛素的口服生物利用度提高了五倍(8.26% vs 1.7%)(16)。通过以可生物降解的聚氰基丙烯酸异丁酯纳米球口服递送75U/kg胰岛素,实现了高的胰岛素的口服生物利用度(37.6%)(17)。改善蛋白质的口服递送的其它策略涉及使用蛋白水解酶抑制剂(例如甘氨酸胆酸钠、抑肽酶、大豆胰蛋白酶抑制剂、杆菌肽和camostat mesilate),其显示

出有望改善口服递送的胰岛素的功效(18)。胰岛素的化学修饰(例如连接靶向配体(如转铁蛋白)或细胞穿透肽(如TAT肽))已显示出有助于胰岛素跨过肠上皮细胞的胞吞转运作用(19,20)。IN-105是通过将聚乙二醇(PEG)短链与胰岛素缀合而获得的胰岛素类似物,通过改善溶解性、抵抗蛋白水解降解和肠道吸收的稳定性,已显示出T2DM患者餐后血糖的口服剂量依赖性的降低(21,22)。吸收促进剂包括胆汁盐、表面活性剂、脂肪酸、钙离子螯合剂、某些聚合物(例如壳聚糖/硫酸化壳聚糖)和闭锁小带蛋白毒素,其可通过调节用于跨细胞吸收的肠上皮的细胞膜结构或调节用于细胞旁转运的紧密连接渗透性而工作(18)。

[0390] IL与有机阳离子和有机/无机阴离子构成一组盐,其通常在低于100℃下为液体,同时一些在室温下作为液体存在(23)。通过对不同的离子进行配对,可将IL调整为具有不同的理化特性(例如粘度、疏水性、溶解性和生物可降解性),以用于生物催化、酶促工艺、蛋白质稳定性、渗透促进剂和增溶剂等领域的广泛的制药应用中(23-29)。我们最近设计了基于胆碱-香叶酸根(CAGE)的IL,其极大地增强了胰岛素渗透穿过皮肤(27)。

[0391] 首先使用人肠Caco-2细胞系在体外测试口服递送的CAGE的生物相容性,所述人肠Caco-2细胞系已被广泛用作肠吸收和屏障的模型(30,31)。孵育12-48小时的IC₅₀值≥10mM,表明高浓度的CAGE对肠细胞没有细胞毒性,因此证明CAGE作为安全的口服药物递送剂的应用潜力。

[0392] 为了确定CAGE在胰岛素跨肠细胞转运中的功效,我们将胰岛素分散在10mM CAGE中,并将该制剂与Caco-2细胞一起孵育5小时。与盐水中的胰岛素相比,CAGE在整个研究期间将胰岛素转运显著提高了3-4倍。还注意到细胞中紧密连接完整性的临时但显著的下降,并且推测其有助于增强胰岛素跨细胞的转运。然而,用于增强胰岛素的胞吞转运作用的多种其它机制的相互作用也应考虑在内,并因此有待研究。重要的是要注意,CAGE仅引起紧密连接完整性的暂时下降,并且细胞会在5小时内几乎将其连接完整性恢复到基础水平,清楚地表明,与许多其它渗透促进剂不同,CAGE不会永久或长时间地危害肠道上皮结构,从而减轻由此产生的任何毒性。

[0393] 材料和方法

[0394] CAGE的制备。根据我们先前的研究[Zakrewsky PNAS 2014]合成了CAGE溶剂。简言之,在500mL圆底烧瓶中,将两当量的纯的香叶酸(20g,0.119mol,Sigma-Aldrich, St.Louis,MO)添加至一当量的胆碱碳酸氢盐(80wt%溶液,12.275g,0.059mol,Sigma-Aldrich, St.Louis,MO)中,所述香叶酸已在<-70℃的丙酮中重结晶至少5次以除去杂质。将混合物在40℃下搅拌直至CO₂释放停止,并通过在60℃下旋转蒸发2小时除去水,然后在真空烘箱中在60℃下干燥48小时。在25℃时的物理特性与先前的值显示出良好的吻合。NMR谱(使用500MHz Varian instrument,Palo Alto,CA收集)也与以前的制备方法良好的吻合:¹H NMR(DMSO-d₆), δ 5.60(s,2H),5.07(t,J=6.1,2H)3.86(t,J=6.6,2H),3.42(t,J=6.6,2H),3.12(s,9H),2.57(m,4H),2.01(m,4H),1.97(s,6H),1.73(s,2H),1.64(s,6H)和1.57(s,6H);¹³C NMR(DMSO-d₆), δ 170.1,150-1,131.5,124.1,122,67.6,55.5,53.6,53.5,32.8,25.9和17.9。

[0395] 在96孔板和transwell中的Caco-2单层培养物。将人上皮结肠直肠腺癌细胞(Caco-2,ATCC,Manassas,VA)以1,000个细胞/孔的密度接种在96孔板中,并在37℃、5%CO₂下,在补充有10%胎牛血清(FBS)和1%青霉素-链霉素(P/S)(ThermoFisher Scientific,

Waltham, MA) 的 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基 (DMEM) 中生长 21 天, 以使得能够完全分化并形成汇合的单层。在此期间, 第一周每两天更换一次细胞培养基, 第二和第三周每隔一天更换一次。

[0396] 对于 transwells 中的转运实验, 使用了 3 天快速 Caco-2 生长系统。将细胞置于补充有 MITO+ 血清增量剂 (extender) 的 **Corning®** 基础接种培养基 (BSM) 中, 并以 400,000 个细胞/ml 的密度接种在置于 24 孔板内的 **Millicell®** PCF 插入物上。根据制造商的建议, 将 500 μ l 的含培养基的细胞置于顶端侧, 而将 1000 μ l 无细胞的 BSM 置于基底侧。在 37°C、5% CO₂ 下孵育 24 小时后, 将培养基替换为相同体积的补充有 MITO+ 血清增量剂的肠上皮细胞分化培养基, 持续另外的 2-4 天。定期测量 TEER, 并且当 TEER 达到高于 200 ohms \cdot cm² 时 (表明细胞之间的足够的紧密连接完整性), 进行转运研究。

[0397] CAGE 的体外口服生物相容性评估。对于该研究, 使用在 96 孔板中生长的 Caco-2 细胞。用 DMEM 将 CAGE 稀释至浓度为 25 至 3.125 mM。制备了三组不同的 CAGE 稀释液 (3 个稀释液重复)。从每个孔中吸出培养基, 并将各稀释液 (每孔 100 μ L) 分配到 6 个孔中 (6 个细胞重复)。对照孔仅填充培养基。将细胞在 37°C、5% CO₂ 下孵育 12 小时、24 小时或 48 小时。在每个时间点, 从孔中吸出 CAGE-培养基混合物, 并使用 MTT (3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四氮唑溴盐) 测定来评估细胞活力。将 MTT 粉末 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) 与培养基混合至浓度为 0.5 mg/mL, 添加至每个孔 (100 μ L) 中, 并在 37°C、5% CO₂ 下孵育 4 小时。除去 MTT 溶液, 并向每个孔中加入 100 μ L 二甲基亚砷 (DMSO, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)。将培养板包裹在箔中并摇动 20 分钟, 然后使用酶标仪 (M220 Infinite Pro, Tecan Group Ltd, Morrisville, NY) 在 570 nm 处读取吸光度。使用未处理的细胞活力值对吸光度读数进行归一化。

[0398] FITC-胰岛素转运测定。在实验开始之前, 将 transwell 中现有的培养基在顶端侧 (200 μ l) 和基底侧 (600 μ l) 替换为不含酚红、FBS 和 P/S 的 DMEM, 并将细胞孵育 30 分钟。此后, 将顶端侧的培养基替换为 200 μ l 的 500 μ g/ml 的 FITC-胰岛素, 所述 FITC-胰岛素用或不用 10 mM 的 CAGE 制备并溶于不含酚红、FBS 和 P/S 的 DMEM 中。在顶端侧添加 FITC-胰岛素后, 立即从基底侧取出 100 μ l 试样, 并用等体积的新鲜 DMEM 代替。在 1 小时、2 小时、3 小时、4 小时和 5 小时对此重复。在研究过程中, 将 transwell 板置于处于以 100 rpm 旋转的摇床上的 37°C、5% CO₂ 的培养箱内, 并仅在上述时间段取出以移出试样。在 5 小时的研究结束后, 使用酶标仪 (Tecan, Infinite M1000, **Männedorf**, 瑞士) 在 495/520 nm 激发/发射波长下测量试样中的 FITC-胰岛素的浓度, 并绘制为 FITC-胰岛素的转运 % vs 时间的图。此外, 当从 transwells 中取出试样时, 在每个时间点测量 TEER, 并绘制为初始值的变化 % vs 时间的图。

[0399] 为了定性分析 Caco-2 细胞对 FITC-胰岛素的摄取, 在研究结束时, 将来自 FITC-胰岛素转运研究的 transwells 用 PBS 洗涤两次, 然后加入 100 μ l 的 4% 多聚甲醛并保持在 4°C 下过夜。第二天, 从孔中吸出多聚甲醛, 用 PBS 将膜洗涤两次, 并切割 transwell 膜。然后将这些膜轻轻地放在载玻片上, 并向其添加包含 4',6-二脒基-2-苯基吲哚二盐酸盐 (DAPI) 的封片剂 (Vectashield™ Hardset, Vector Laboratories, Burlingame, CA), 然后用玻片覆盖膜。使用 Olympus Fluoview 1000™ 光谱共聚焦仪以 60 倍放大率对膜进行共聚焦成像。

[0400] 空肠内给予时的胰岛素-CAGE 的功效和药代动力学参数的评估。在禁食过夜但可

自由饮水的成年非糖尿病雄性Wistar大鼠中,测定了空肠内给予的胰岛素-CAGE的功效。在研究开始之前,将大鼠麻醉,修剪腹毛,并使用70%乙醇和聚维酮碘使该区域做好手术准备。在腹部制作切口以暴露肠。定位空肠并用100 μ l分散在CAGE中的3U/kg或5U/kg胰岛素或100 μ l对照(盐水、纯CAGE和盐水中的3U/kg胰岛素)进行注射。除盐水仅在3只大鼠中进行测试外,每种制剂在6只大鼠中进行测试。此后,将肠段放回腹部,并缝合肌肉和皮肤。在研究开始时以及每0.5小时直至在5小时的研究结束时,使用商业化的血糖仪测定血糖。在整个研究过程中动物保持麻醉,在研究结束时对其进行安乐死,并移出注射部位周围的肠段以进行进一步的组织学检查来确定毒性(如果有的话)。为了比较功效,将单独组的3只大鼠皮下注射处于盐水中的2U/kg的胰岛素。将结果绘制为相对于 $t=0$ 的初始读数的血糖水平变化%vs时间的图。

[0401] 通过在0h、1h、2h、3h和5h时,以BD Vacutainer®红帽管从空肠内注射5U/kg胰岛素-CAGE、空肠内注射3U/kg胰岛素-盐水和皮下注射2U/kg胰岛素-盐水的大鼠中收集约250 μ L血液,评估通过CAGE递送的胰岛素的药代动力学。遵循标准方案以从全血中分离血清。简言之,将血样在RT下静置15-30分钟以允许形成血凝块,然后以2,000g离心10分钟。然后将澄清的上清液(血清)收集到干净的管中,在该程序的过程中保存在冰中,并随后在-20℃下保存,直至进一步分析胰岛素含量。为了评估血清样品中的胰岛素浓度,使用了人胰岛素ELISA试剂盒(ThermoFisher Scientific, Waltham, MA),并遵循制造商方案以确定每个时间点的胰岛素浓度。根据血清胰岛素浓度与时间的图计算出药代动力学参数,例如消除速率常数(K_{el})、消除半衰期($t^{1/2}$)、曲线下面积(AUC)和口服生物利用度(F)%。

[0402] 体内口服功效。为了确定通过口服途径给予的胰岛素-CAGE的功效,使用了能够容纳80 μ l CAGE的加长的9号胶囊(Torpac, Fairfield, NJ)。这些胶囊装有80 μ l的10U/kg胰岛素-CAGE、纯CAGE或留空。然后,将胶囊用溶于异丙醇中的12.5%w/v的Eudragit®L-100肠溶包衣3次,以防止胶囊在胃的酸性环境中降解,并提供经封装的CAGE的肠位点特异性递送。为了口服功效研究,将成年非糖尿病雄性Wistar大鼠禁食过夜,但可自由饮水。第二天,使用口服灌胃向大鼠给予该胶囊,然后皮下给予5mg/kg的胃复安HCl以促进胃排空。此后,使用商业化的血糖仪测量血糖,并随后每小时测量一次直至12小时。在整个研究期间大鼠禁食。还通过口服给予作为溶液的制剂(不在胶囊中)来测试在盐水中的10U/kg胰岛素的对照。另外,还评估了皮下注射2U/kg胰岛素-盐水的功效。对于10U/kg胰岛素-CAGE和纯CAGE,每种制剂使用一组6只大鼠,而将每组3只大鼠用来研究空胶囊、皮下给予10U/kg胰岛素溶液和2U/kg胰岛素-盐水的功效。将结果绘制为血糖水平的百分比变化vs时间。

[0403] 组织的组织学,将组织固定在10%缓冲的福尔马林中,在乙醇中脱水,并包埋在石蜡中。将肠组织的5 μ m切片脱蜡、复水并用苏木精和伊红染色。使用光学显微镜以10倍和40倍放大倍率(Olympus BX60™ Upright Compound Microscope)检查组织形态。

[0404] 评估CAGE中的胰岛素稳定性。将包含人胰岛素(100U, 3.5mg, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)的样品悬浮在2mL微量离心管中的1mL CAGE或PBS中,并在室温(25℃)或冷藏(4℃)下孵育。1个月后,以及此后大约每个月持续共4个月,将样品以10000 \times g离心10分钟,通过移液器除去CAGE,并用1mL磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤软的胰岛素团粒,并再次离心。除去PBS-CAGE,并重复洗涤/离心步骤,直到在离心过程中胰岛素不形成团粒。

[0405] 圆二色谱(CD)研究:为了收集指示蛋白质二级结构的远紫外线区域(190-250nm)

中的光谱,用装载有400 μ L样品的矩形石英池(路径长度为1mm,Starna Cells,1-Q-q, Atascadero,CA)施行了圆二色性分光光度法(Jasco J-1500,Easton,MD)。

[0406] 体内的生物学功效评估:通过将如此获得的胰岛素以1U/kg的剂量皮下注射到成年非糖尿病雄性Wistar大鼠中,评估了从CAGE分离的胰岛素的生物学活性。使用商业化的血糖仪监测血糖水平8小时,并与新鲜制备的胰岛素溶液进行比较。所有动物实验均根据加利福尼亚大学Santa Barbara分校动物护理委员会的指导原则以及国家研究委员会实验动物资源研究所的动物护理和使用指南进行。在注射胰岛素之前,将大鼠禁食过夜,但可自由饮水,并且在整个研究过程中都禁食,以消除因食用食物而引起的血糖波动。将结果绘制为相对于初始水平的血糖变化%vs时间的图。

[0407] 数据分析。将所有数据以平均值 \pm 标准误差(S.E.)表示。为了进行统计分析,使用了学生T检验。将 $p < 0.05$ 视为显著差异。所有实验均以至少三重复进行。

[0408] 参考文献

[0409] 1.Kharroubi AT&Darwish HM(2015)Diabetes mellitus:The epidemic of the century.World J Diabetes 6(6):850-867.

[0410] 2.Olokoba AB,Obateru OA&Olokoba LB(2012)Type 2diabetes mellitus:A review of current trends.Oman Med J 27(4):269-273.

[0411] 3.World Health Organization(2016)Global report on diabetes

[0412] 4.Centers for Disease Control(2017)National diabetes statistics report,2017.estimates of diabetes and its burden in the united states.National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion:1-20.

[0413] 5.McCulloch DK(2017)Patient education:Diabetes mellitus type 2: Insulin treatment(beyond the basics)2017(11/08)

[0414] 6.Peyrot M,Rubin RR,Kruger DF&Travis LB(2010)Correlates of insulin injection omission.Diabetes Care 33(2):240-245.

[0415] 7.Fonte P,Araujo F,Reis S&Sarmiento B(2013)Oral insulin delivery:How far are we?.J Diabetes Sci Technol 7(2):520-531.

[0416] 8.Oleck J,Kassam S&Goldman JD(2016)Commentary:Why was inhaled insulin a failure in the market?.Diabetes Spectr 29(3):180-184.

[0417] 9.Souares S,Costa A,Fonte P&Sarmiento B(2017)in Drug Delivery:An Integrated Clinical and Engineering Approach,eds Rosen Y,Gurman P&Elman N (Taylor and Francis,

[0418] 10.Shaji J&Patole V(2008)Protein and peptide drug deliver:Oral approaches.Indian J Pharm Sci 70(3):269-277.

[0419] 11.Cui FD,Tao AJ,Cun DM,Zhang LQ&Shi K(2007)Preparation of insulin loaded PLGA-Hp55 nanoparticles for oral delivery.J Pharm Sci 96(2):421-427.

[0420] 12.Pan Y,Xu H,Zhao HY,Wei G&Zheng JM(2002)Study on preparation and oral efficacy of insulin-loaded poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles.Yao Xue Xue Bao 37(5):374-377.

- [0421] 13.Sarmiento B,Ribeiro A,Veiga F,Ferreira D&Neufeld R(2007) Oral bioavailability of insulin contained in polysaccharide nanoparticles.Biomacromolecules 8(10):3054-3060.
- [0422] 14.Sarmiento B,et al(2007) Alginate/chitosan nanoparticles are effective for oral insulin delivery.Pharm Res 24(12):2198-2206.
- [0423] 15.Zhang N,et al(2006) Lectin-modified solid lipid nanoparticles as carriers for oral administration of insulin.Int J Pharm 327(1-2):153-159.
- [0424] 16.Ansari MJ,et al(2016) Enhanced oral bioavailability of insulin-loaded solid lipid nanoparticles: Pharmacokinetic bioavailability of insulin-loaded solid lipid nanoparticles in diabetic rats.Drug Deliv 23(6):1972-1979.
- [0425] 17.Radwan MA(2001) Enhancement of absorption of insulin-loaded polyisobutylcyanoacrylate nanospheres by sodium cholate after oral and subcutaneous administration in diabetic rats.Drug Dev Ind Pharm 27(9):981-989.
- [0426] 18.Wong CY,Martinez J&Dass CR(2016) Oral delivery of insulin for treatment of diabetes: Status quo, challenges and opportunities.J Pharm Pharmacol 68(9):1093-1108.
- [0427] 19.Shah D&Shen WC(1996) Transcellular delivery of an insulin-transferrin conjugate in enterocyte-like caco-2 cells.J Pharm Sci 85(12):1306-1311.
- [0428] 20.Liang JF&Yang VC(2005) Insulin-cell penetrating peptide hybrids with improved intestinal absorption efficiency.Biochem Biophys Res Commun 335(3):734-738.
- [0429] 21.Khedkar A,et al(2010) A dose range finding study of novel oral insulin(IN-105) under fed conditions in type 2 diabetes mellitus subjects.Diabetes Obes Metab 12(8):659-664.
- [0430] 22.Buckley ST,Hubalek F&Rahbek UL(2016) Chemically modified peptides and proteins -critical considerations for oral delivery.Tissue Barriers 4(2): e1156805.
- [0431] 23.Adawiyah N,Moniruzzaman M,Hawatulaila S&Goto M(2016) Ionic liquids as a potential tool for drug delivery systems.Medicinal Chemistry Communications 7:1881-1897.
- [0432] 24.Yang M,et al(2014) Using ionic liquids in whole-cell biocatalysis for the nucleoside acylation.Microb Cell Fact 13:143-014-0143-y.
- [0433] 25.Zakrewsky M,et al(2016) Choline and geranate deep eutectic solvent as a broad-spectrum antiseptic agent for preventive and therapeutic applications.Adv Healthc Mater 5(11):1282-1289.
- [0434] 26.Zakrewsky M,et al(2014) Ionic liquids as a class of materials for transdermal delivery and pathogen neutralization.Proc Natl Acad Sci U S A

111 (37) :13313-13318.

[0435] 27.Banerjee A,Ibsen K,Iwao Y,Zakrewsky M&Mitragotri S (2017) Transdermal protein delivery using choline and geranate (CAGE) deep eutectic solvent. *Adv Healthc Mater* 6(15):10.1002/adhm.201601411. Epub 2017 Mar 24.

[0436] 28.Sivapragasam M,Moniruzzaman M&Goto M (2016) Recent advances in exploiting ionic liquids for biomolecules: Solubility, stability and applications. *Biotechnol J* 11(8):1000-1013.

[0437] 29.Patel R,Kumari M&Khan AB (2014) Recent advances in the applications of ionic liquids in protein stability and activity: A review. *Appl Biochem Biotechnol* 172(8):3701-3720.

[0438] 30.Angelis ID&Turco L (2011) Caco-2 cells as a model for intestinal absorption. *Curr Protoc Toxicol* Chapter 20:Unit20.6.

[0439] 31.Sambuy Y, et al (2005) The caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: Influence of cell and culture-related factors on caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biol Toxicol* 21(1):1-26.

[0440] 实施例2用于递送至组织中的离子液体

[0441] 疏水性药物的增溶长期以来一直是药物递送中的主要障碍。许多小分子(包括化疗药物)本质上是高度疏水的,并需要复杂的用于增溶的策略。本发明描述了离子液体用于该目的用途。本公开的另一个目的是证明离子液体用于增强药物从注射部位向组织中的分散的用途。本公开的另一个目的是证明离子液体在递送到皮下或皮内空间后用于增强药物的生物利用度的用途。

[0442] 深共熔溶剂(DES)和离子液体(IL)可增强药物的递送,并用于破坏/中和形成生物膜的细菌。此外,与常规的化学渗透促进剂(如乙醇)相比,本文所述的组合物表现出对细胞而言更低的毒性,从而对组织减轻了许多化学促进剂所特有的组织刺激性。DES是由各种化合物组成的混合物,其冷冻温度总体上低于单个成分,而IL是由有机阳离子和有机/无机阴离子组成的盐,其在室温下呈液态形式且稳定。在本文提供的证明之前,尚未确定离子液体(包括CAGE)对疏水性药物以及用于胃肠外给予的生物制品进行增溶的能力,以及其用于增强药物分散和吸收的用途。

[0443] 方法

[0444] CAGE的制备。合成香叶酸胆碱深共晶。简而言之,在500mL圆底烧瓶中,将两当量的纯香叶酸(50.0g,0.297摩尔,Sigma Aldrich,St.Louis,MO)在-70℃下于丙酮中重结晶5次,并加入一当量的胆碱碳酸氢盐(80wt%溶液,30.7g,0.297摩尔,Sigma Aldrich,St.Louis,MO)。将混合物在室温搅拌直至停止释放CO₂。通过在60℃下旋转蒸发2小时除去残留的H₂O,并在60℃的真空烘箱中干燥96小时。25℃时的物理特性与已公开的值良好吻合,并如下:密度为0.989±0.001g/mL;以及电导率为0.0427±0.0005mS/cm。提供了NMR谱。NMR归属也与已公开的归属良好吻合,并包括如下:¹H NMR (DMSO-d₆), δ5.57 (s, 2H), 5.07 (t, J=6.1, 2H), 3.85 (t, J=6.6, 2H), 3.42 (t, J=6.6, 2H), 3.17 (s, 9H), 2.60 (m, 4H), 2.00 (m, 4H), 1.93 (s, 6H), 1.70 (s, 2H), 1.64 (s, 6H) 和 1.57 (s, 6H); ¹³C NMR (DMSO-d₆), δ170.3, 150.4, 131.5, 124.0, 121.7, 67.6, 55.6, 53.5, 40.4, 32.8, 25.8 和 17.8。

[0445] 物理表征。实施NMR谱以验证最终产物的特性。¹H和¹³C NMR谱在600-MHz Varian仪器上使用处于DMSO-d₆中的约50mM浓度的样品收集。相对于128次扫描平均出¹H谱,脉冲之间有2秒的弛豫延迟。相对于512次扫描平均出¹³C光谱,脉冲之间有2秒的弛豫延迟。使用1mL容量瓶和分析天平测量密度三次。用DS-71电导率仪(Horiba,Kyoto,日本)以用KCl标准溶液校准的流动型电导电极(Horiba,Kyoto,日本)测量电导率。在25℃下使用0.25mL样品对每个样品进行3次电导率测量。

[0446] 体内实验。在正常大鼠中评估了从CAGE递送胰岛素的功效。在实验当天之前,将动物禁食过夜,但可自由饮水。给予前将胰岛素悬浮在CAGE中。麻醉动物,并皮下注射胰岛素-CAGE。对于对照实验,注射单独的CAGE或注射胰岛素-盐水。使用商业化的血糖仪以不同的时间间隔测量来自尾静脉的血糖水平。

[0447] 体外细胞培养实验。使用钙黄绿素-AM细胞活力测定法(Life Technologies)确定了载药脂质体的体外抗癌功效。将4T1细胞以每孔11,000个细胞或每孔1,000个细胞的密度以100μL培养基的总体积接种在96孔细胞培养板中,并允许附着过夜。然后,用含有脂质体的新鲜培养基替换培养基,并分别与4T1细胞孵育48小时。与药物一起孵育后,将培养基吸出并在室温下用处于PBS中的1μM钙黄绿素-AM置换30分钟。使用490nm和520nm的激发和发射波长测量细胞内水解的钙黄绿素-AM的荧光强度。通过从未处理的细胞的荧光减去实验孔中的活细胞的荧光并相对于未处理的细胞进行归一化来计算细胞抑制分数。

[0448] CAGE对分子在组织中的扩散的影响。进行实验以确定CAGE是否可用于增强分子从注射的点开始在组织内的分布。这些实验使用皮肤作为模型组织来进行。为此,将1mg/ml经标记的(FITC或AntoniaRed)150kDa右旋糖酐悬浮在如下中:纯的1:1CAGE、50% CAGE(用盐水稀释)、10% CAGE(用盐水稀释)或盐水。将50μl的各样品皮内注射到5cm×5cm见方的猪皮肤的一侧。将具有相同的CAGE浓度的2个不同标记的样品注射入相同的四方块中。将样品在RT下孵育2小时(同时我们接受培训),然后成像。将样品在37℃下再孵育2小时,然后再次成像。2小时的样品具有不同的曝光(我们仍在优化系统)。4小时的样品全部在相同的曝光下拍摄。通过使用ImageJ™在该区域周围手动绘制形状来估计每个样品和时间点的荧光区域的大小。

[0449] 结果

[0450] 溶解度:测定了两种疏水性药物紫杉醇和喜树碱在CAGE中的溶解度。两种药物实际上都不溶于水,需要增溶策略或改变药物的化学性质。例如,紫杉醇在水中缺乏溶解性导致使用了目前用于临床的溶剂聚氧乙烯蓖麻油。然而,聚氧乙烯蓖麻油存在毒性问题。另一方面,由于缺乏溶剂,喜树碱未在临床上使用,临床上使用了替代的化学形式伊立替康。相对于替代物,CAGE溶解两种药物的能力提供了明显的优势。

[0451] 紫杉醇:200+/-48mg/ml

[0452] 喜树碱:54mg/ml

[0453] CAGE用来对疏水性药物增溶的这一能力可用于多种药物,例如,雌二醇、睾酮、咪喹莫特、皮质酮、紫杉醇、阿霉素、顺铂、喜树碱。这些疏水性药物目前需要包括诸如乙醇或DMSO的溶剂的复杂的策略,这些策略无法用于许多应用,尤其是用于基于注射的递送系统。或者,已开发出用于使药物在胶束中增溶的策略。尽管胶束的使用对增溶有用,但从“小分子”到胶体很大程度地改变了药物性质。这种转变显著改变了治疗结果。药物在CAGE中的增

溶可直接解决这一局限。CAGE可以以数种可能的方式使用。在一种方式中,可配制增溶的药物用于局部应用,例如口服或透皮应用。CAGE在此应用中的主要作用是将增溶的药物保持在制剂中,从而为药物扩散穿过屏障提供高的浓度梯度。在另一应用中,可将CAGE中的药物溶液皮内、皮下或静脉内注射。在此类制剂中,CAGE起到溶解药物的作用,从而使得能够进行高浓度的注射。在一个实施方式中,在注射时,CAGE可扩散到组织中,从而使药物局部沉淀。沉淀的药物可形成贮库并显示出持续释放。在另一个实施方式中,即使在CAGE的局部扩散后,药物也可继续保持在CAGE中的可溶性,并引起向循环的快速和增强的递送。

[0454] 溶解在CAGE中的化疗药物的体外功效:测试了溶于CAGE中的紫杉醇和喜树碱对4T1癌细胞的作用。使用溶解在DMSO中的相同药物的阳性对照。请注意,虽然DMSO是体外研究中使用的溶剂,但其不是临床上可接受的替代物。

[0455] 此处描述的实施方式可以以多种方式使用。在一种形式中,化疗药物溶解在CAGE中并直接递送至肿瘤中。溶解的化学治疗药物可扩散到肿瘤中,从而使得具有治疗作用。注意,CAGE本身在高浓度下也具有细胞毒性作用。在一个实施方式中,可将CAGE直接注射入肿瘤中以实现局部细胞毒性作用。此种治疗可用于治疗实体瘤,例如肝、胰腺或乳腺中的肿瘤。在一个实施方式中,可将CAGE直接注射到脂肪组织中以促进裂解。CAGE可通过溶解来直接裂解脂肪细胞,也可诱导足够的破坏来促进巨噬细胞/免疫细胞介导的清除。

[0456] 从CAGE递送胰岛素的体内功效:从CAGE递送的胰岛素具有高的生物活性。皮下注射处于CAGE中的胰岛素的单纯悬液。该制剂产生了实质性的低血糖症(图12),其优于盐水中的胰岛素溶液。

[0457] 图12中描述的实施方式可以以多种方式使用。在一种形式中,CAGE可用于增强生物制品向循环中的吸收。大的生物制品(例如抗体)在注射入皮下空间后具有有限的向全身循环中的吸收。添加CAGE可增强其生物利用度。在另一个实施方式中,CAGE可用于改变注射药物的药代动力学。例如,可通过添加CAGE使从皮下注射部位迅速吸收的胰岛素表现出持续的吸收作用(图12)。

[0458] 生物分子的稳定:评估了CAGE中的胰岛素的稳定性。将胰岛素悬浮在CAGE中,并置于室温或4℃下。一个月或两个月后,皮下注射胰岛素,并基于血糖应答评估其生物学活性(图13)。2个月后,在室温下储存的胰岛素-CAGE的生物学活性与天然胰岛素相当,因此证明了CAGE对生物分子稳定性的影响。

[0459] 通过CAGE稳定生物分子可用于防止疫苗的降解。疫苗通常以水性制剂配制,并且需要冷藏以保持活性。这种冷链需求使得很难将疫苗运送到世界偏远地区。CAGE可用于保持室温下的疫苗活性。

[0460] 组织内的增强的分散:所有的经AntoniaRed标记的右旋糖酐样品看起来在2小时和4小时的时间点之间适度扩散。除了纯的CAGE样品外,经FTIC标记的右旋糖酐样品看起来没有在2小时到4小时之间扩散(伴随面积增加约2倍)(例如参见图14)。

[0461] 该实施方式可以以多种方式使用。在一种形式中,可将CAGE用于注射后增强其自身向组织中的分布,以治疗局部疾病,例如肿瘤或疣。CAGE对局部组织的作用还可用于增强增溶药物(例如化疗药剂)的分布。

[0462] 如本文所使用的,术语“离子液体”是指在室温下呈液态的有机盐或有机盐的混合物。此类溶剂已示出可用于多种领域,包括工业加工、催化、制药和电化学。离子液体包含至

少一种阴离子组分和至少一种阳离子组分。任选地,IL包含额外的氢键供体(即,可提供-OH或-NH基团的任何分子),实例包括但不限于醇、脂肪酸和胺。在一些实施方式中,阳离子或阴离子组分也是药物。

[0463] IL的行为由离子相互作用主导,而深共熔溶剂(DES)表现来自氢键键合的强力的作用。涉及离子和中性物质的系统的分类非常复杂,这主要是由于当前定义的限制。在这方面,本文提供的用于组合物、离子液体和深共熔溶剂的定义和描述将控制术语,因为其可被本领域的其他人应用。

[0464] 至少一种阴离子组分和至少一种阳离子组分可以以任何摩尔比存在。示例性的摩尔比(阳离子:阴离子)包括但不限于1:1、1:2、2:1、1:3、3:1、2:3、3:2,以及在这些比例之间的范围。在一些实施方式中,IL为深共熔溶剂(DES)。DES是一种具有特殊性能的离子型溶剂,由形成共晶的混合物构成,所述共晶的熔点远低于任一种单独的组分。示例性的DES包括但不限于油酸胆碱、己酸胆碱、香叶酸胆碱、丙二酸胆碱(胆碱丙二酸二钠)和尿素胆碱。在其中,制剂是DES,而不是真正的离子液体,因为过量的羧酸根排除1:1的离子对。用于制备IL/DES的离子可包括除胆碱或香叶酸以外的分子。例如,胆碱的衍生物或类似物可用作阳离子。同时,香叶酸的类似物或衍生物也可用作阴离子。

[0465] 待递送的药物可包括小分子、肽、蛋白质、核酸、抗体或任何其它治疗活性分子。

[0466] 实施例3:用于口服胰岛素递送的离子液体

[0467] 随着全世界糖尿病病例的增加以及对使用可注射胰岛素的血糖管理的患者依从性的缺乏,迫切需要开发有效的口服胰岛素制剂。然而,胃肠道对生物制品的口服递送展现出强大的屏障。本文描述的是使用胆碱和香叶酸根(CAGE)离子液体的高效的口服胰岛素制剂的开发。CAGE显著增强了胰岛素的细胞旁转运,同时保护其免于酶促降解以及通过与粘液层相互作用引起其稀化。在体内,胰岛素-CAGE在大鼠的空肠给予后显示出优异的药代动力学和药效学结果。与皮下注射胰岛素不同,低的胰岛素剂量(3-10U/kg)引起血糖水平的显著下降,其持续较长时间(长达12h)。当使用口服灌胃将10U/kg胰岛素-CAGE以肠溶胶囊口服递送时,观察到血糖持续降低高达45%。该制剂表现出高的生物相容性,并且在室温下稳定2个月,且在冷藏下稳定至少4个月。综上所述,结果表明,CAGE是有前途的用于胰岛素和目前作为注射剂销售的其它生物制品的口服递送的口服递送溶媒。

[0468] 目前,胰岛素可作为注射制剂获得,但口服产品将享有更高的患者依从性,并且将显著改善全世界糖尿病患者的生活质量。然而,由于大分子的口服吸收的各种胃肠屏障,蛋白质(如胰岛素)的口服递送具有挑战性。本文描述的是安全且高度有效的基于离子液体的口服胰岛素制剂的开发,该制剂通过高效地绕过胃肠屏障而显著增强了口服胰岛素的吸收。此外,该制剂在室温和冷藏下显示出良好的稳定性。

[0469] 由于其易于给予、高的患者依从性和低的制造成本,因此相比于注射剂,优选药物给予的口服途径。然而,由于对药物吸收而言的各种胃肠屏障,其不适用于生物制品的递送。例如,胰岛素为对于1型糖尿病管理必不可少的药物。其目前作为皮下注射给予,但由于与注射有关的疼痛和针头恐惧症,而与患者依从性的缺乏相关(1)。口服递送的胰岛素可显著增强患者的依从性。此外,其严密地模拟了胰腺胰岛素的生理路径(2,3)。口服/胰腺胰岛素通过门静脉转运到肝脏,在该处保留80%,并且其余的到达全身循环,与全身循环相比,在门静脉中产生多达高3倍的胰岛素浓度(3)。当皮下注射胰岛素时,这一门静脉-外周胰岛

素梯度被破坏,这是因为与门静脉(仅约20%)中的浓度相比,全身性胰岛素浓度更高,其破坏了肝的糖原存储与葡萄糖输出之间的精细平衡。这常常导致高血糖症,当用更高的胰岛素剂量治疗时,可导致低血糖症(3,4)。

[0470] 对口服胰岛素产品的追求开始于几十年前。已经开发出数种策略来解决对生物制品的口服吸收而言的胃肠屏障,然而,没有制剂成功地消除所有的临床障碍,并且因此目前还没有可商购的口服胰岛素产品。已完成或目前处于II期临床试验的产品包括带有改善口服胰岛素的吸收的添加剂的肠溶胶囊(Diabetology Ltd的Capsulin™和Oramed Ltd的ORMD-0801)、肝导向脂质体胰岛素(Diasome Pharmaceuticals Inc.的HDV-胰岛素)、聚乙二醇(PEG)缀合的胰岛素(Biocon Ltd.的IN-105)、Oshadi载体中的胰岛素-胰岛素原c-肽(Oshadi drug administration Ltd的Oshadli Icp)和使用胃肠渗透促进剂技术的长效胰岛素类似物片剂(Novo Nordisk的GIPET 1)(5-7)。另外,许多产品需要多步骤的配制程序、蛋白质的化学修饰或各种添加剂,这些都有其自身的缺点。随着全球糖尿病流行的出现,存在开发安全、有效且易于升级的口服胰岛素产品的迫切感。

[0471] 本文描述的是基于离子液体(IL)的胰岛素口服制剂,并证明了其安全性、功效和长期稳定性。离子液体由熔点低于100℃的有机/无机盐组成(8-10)。本文中,使用了室温稳定的胆碱和香叶酸根(CAGE)深共熔溶剂(11,12)。胰岛素以一步法分散在CAGE中,并在体外和体内评估了其安全性和功效以及其储存稳定性。该研究表明胰岛素的口服生物利用度空前提高,具有出色的口服功效、生物相容性和长期稳定性。

[0472] 结果

[0473] 胰岛素在CAGE中长期稳定。胰岛素具有对于其受体相互作用并因此对于其生物活性至关重要的固有的 α -螺旋构象(13)。在用CAGE进行口服递送的功能测试之前,评估胰岛素在CAGE中是否长期稳定。将胰岛素-CAGE在室温(远离阳光直射)下或在4℃下冷藏保存,并使用圆二色谱(CD)在每个月对从CAGE中分离出的胰岛素的二级结构进行评价,持续4个月。结果显示在约207nm和222nm处存在双谷,这是CD图中的 α -螺旋的典型代表(图15)。新鲜制备的胰岛素溶液与分别在RT或4℃下于CAGE中储存长达3个月和4个月的胰岛素之间的形状或椭圆率程度没有差异。结果表明,CAGE长时间地保护胰岛素的二级结构。

[0474] 为了验证CD稳定性数据,在非糖尿病大鼠中评估了在不同时间从CAGE中分离出的胰岛素的生物活性。为此,对禁食过夜的大鼠皮下注射胰岛素(从CAGE中分离并重新悬浮在无菌盐水中),并监测血糖8小时。新鲜胰岛素与在RT下储存1-2个月或在4℃下储存1-4个月的胰岛素-CAGE之间在生物学活性方面未见显著差异(图10)。在RT下储存3个月的胰岛素观察到疗效减弱,而在4℃下用CAGE储存的胰岛素即使在储存4个月也没有显示出生物活性的任何下降。这清楚地表明,CAGE是用于长期储存胰岛素的出色的溶剂。

[0475] 在空肠内给予时,胰岛素-CAGE引起严重的低血糖并显示出示例性的药代动力学。为了评估胰岛素-CAGE在降低血糖水平方面的功效,将3-5U/kg胰岛素分散在CAGE中并空肠内给予至经麻醉的非糖尿病大鼠,然后每0.5小时监测血糖,持续共5小时(图16)。给予3U/kg胰岛素-CAGE的大鼠从0.5小时开始显示出血糖水平的稳定下降,直至在2.5小时内下降为其初始值的45%($55 \pm 6\%$)。超出这一时间点之后,血糖水平保持稳定,在5h时中以47%结束。用5U/kg胰岛素-CAGE治疗的组显示出血糖水平的急剧下降,在1.5小时和2小时内以约65%的下降告终(分别为 $37 \pm 5\%$ 和 $35 \pm 5\%$)。此后血糖增加,这是在非糖尿病大鼠中的

典型的体内稳态应答,即经受血糖水平的突然而迅速的下降。在5小时的结束时,血糖水平为初始水平的74%。皮下注射2U/kg胰岛素的大鼠也表现出相似的血糖下降模式,但与5U/kg胰岛素-CAGE相比,程度较小。在1小时内观察到51%的最大下降(初始水平的 $49 \pm 8\%$),在5小时的研究结束时迅速恢复到100% ($101 \pm 7\%$)。对照(例如纯的CAGE、盐水或3U/kg胰岛素-盐水空肠内给予)并未引起血糖的显著下降。在所有这些对照组中,血糖在5小时内缓慢下降(最有可能是由于持续的禁食)至初始水平的约25%。通过在不同时间点测量血清胰岛素水平来确定胰岛素吸收和消除的药代动力学(图17)。在SQ注射2U/kg胰岛素和空肠内(IJ)给予5U/kg胰岛素-CAGE后一小时内,胰岛素浓度迅速增加,并随后下降以遵循相似的消除模式。使用血清胰岛素浓度计算的药代动力学参数显示出,空肠内给予的胰岛素-CAGE的消除半衰期几乎比SQ胰岛素高两倍(表2)。发现由此计算的5U/kg IJ胰岛素-CAGE的口服生物利用度为51%。由功效图计算的制剂的药效学生物利用度为66%。相反,IJ给予的5U/kg胰岛素-盐水,并未表现出胰岛素水平随时间的增加。

[0476] 表2:空肠内供给的胰岛素-CAGE和皮下给予的胰岛素溶液的药代动力学参数

	制剂	$K_{el} (h^{-1})$	$t^{1/2} (h)$	AUC _{总的} ($\mu IU \cdot h/mL$)	F%
[0477]	胰岛素-CAGE IJ	0.32	2.2	300.6	51
	胰岛素 SQ	0.58	1.2	237.6	

[0478] *消除速率常数(K_{el});半衰期($t^{1/2}$);曲线下面积(AUC);生物利用度(F)

[0479] 以胶囊口服给予的胰岛素-CAGE显示出在降低血糖水平方面的显著功效。当空肠内给予时,CAGE在增强胰岛素的口服生物利用度方面的显著功效促使我们研究其使用胶囊的口服递送时的功效。为此,将10U/kg胰岛素-CAGE或其对照置于肠溶包衣的加长的9号胶囊中,并使用口服灌胃给予至非糖尿病大鼠。

[0480] 用10U/kg胰岛素-CAGE治疗的组在胶囊给予后2小时内显示出血糖水平快速下降38%(初始水平的 $62 \pm 2\%$)(图18)。超出这一时间点之后,血糖在10h时缓慢而稳定地下降大约45% ($55 \pm 3\%$)。相比之下,皮下给予2U/kg胰岛素导致血糖水平在1h内急剧下降49% ($51 \pm 5\%$),其稳定上升并随后在4小时最高达到初始值的88%。此后,血糖水平以类似于纯CAGE、空胶囊和胰岛素-盐水的制剂对照的模式下降。如之前用IJ给予观察到的,与SQ胰岛素不同,胶囊中的胰岛素-CAGE表现出显著的持续功效,直至研究结束。

[0481] 为了评估CAGE是否仅起到渗透促进剂的作用,我们给予了大鼠处于胶囊中的纯CAGE,随后在0.5小时的延迟后以处于胶囊中的10U/kg的胰岛素粉进行给予(图20)。在研究的最初数个小时,观察到胰岛素-CAGE共同给予与连续给予之间的疗效显著差异(比较图20和图18),而胰岛素溶液(无CAGE)与连续给药的胰岛素和CAGE之间在所有时间点都未观察到显著差异(图20)。该研究进一步表明,一起给予胰岛素和CAGE提供了显著的疗效。

[0482] CAGE在体内表现出良好的口服生物相容性。口服胶囊给药后12小时或每天一次重复给药7天后、空肠内给予后5小时收集的小肠样品的组织学检查显示出,CAGE与盐水治疗的动物/胰岛素治疗的动物之间的形态无显著差异(图19)。另外,未注意到小肠组织的显著的结构损伤。特别地,在所有的组织中都发现了指状绒毛。结果清楚地表明了CAGE与肠组织的出色的生物相容性,从而证实了该制剂对口服给予的适用性。

[0483] 讨论

[0484] 在过去的几十年中,糖尿病的发病率稳定增长,以至于现在被称为“世纪流行病”

(14)。据报道,每个国家的糖尿病病例都有所增加,低收入和中等收入国家增长最快且中东和北非地区的发病率最高(14-16)。根据世界卫生组织最近的报告,2012年,糖尿病导致全球150万人死亡,另外还有320万人由于高血糖相关的共病而死亡(16)。在美国,据报告2015年有3030万人(约占人口的9.4%)患有这种疾病,并且每年诊断出150万新病例(17)。当前管理该疾病的建议包括单独的胰岛素治疗或与口服降糖药(如二甲双胍)组合的胰岛素治疗(18)。单独的胰岛素治疗的个体经常需要一天两次给予中效胰岛素或一天一次给予长效胰岛素(18)。胰岛素在门诊中不能用作口服丸剂,只能作为皮下注射给予。然而,尽管可注射的胰岛素在管理高血糖症和减轻神经病变、肾病和视网膜病的风险方面有效,但由于疼痛、干扰日常活动和尴尬而使其具有较低的患者依从性,导致多达60%的患者故意遗漏和长期血糖控制不良(5,19)。由于糖尿病相关的并发症,这会导致更高的血红蛋白A1C水平和增加的住院率(19)。为了绕过这个问题,MannKind公司开发了可吸入的速效胰岛素制剂 **Afrezza®**,用于餐后血糖管理,但是其伴随着肺部风险,例如,肺癌和糖尿病性酮症酸中毒的发生率更高,肺功能下降以及患有慢性肺病的患者发展出急性支气管痉挛的风险更高(20)。鉴于糖尿病的迅速增长和严重程度,必须开发出对患者具有吸引力并避免基于制剂的副作用的胰岛素疗法。

[0485] 口服递送享有高的患者依从性,但是不适合生物制品的递送。这是由于以下事实:口服递送的药物需要穿越可降解蛋白质/肽类药物的胃的酸性环境。通过将其封装在肠溶或其它保护性包衣系统中可避免这种情况。然而,当肽/蛋白质药物在肠中从其保护性外壳释放时,其进入肠的蛋白水解环境中,在该处其易于被驻留的酶裂解成较小的氨基酸单位。倘若一部分药物逃脱了蛋白水解,其作为完整的分子通过肠粘液层和肠上皮细胞吸收进入全身循环是挑战性的。由于GI的转运时间不规律以及在肠中缺乏特定的胰岛素吸收机制,口服胰岛素的吸收进一步受到阻碍(21)。GI转运期间的胰岛素结构的变化可导致显著的变性和生物学活性的丧失。因此,毫不奇怪,蛋白质和肽类药物具有小于1%的可忽略不计的口服生物利用度,与可注射制剂的药理活性明显不同,所述可注射制剂的100%的剂量可用于药理活性(22)。一些研究人员试图通过如下来解决胰岛素的低的口服生物利用度的长期问题:修饰胰岛素分子;将其封装在新的载体中;或者使用肠溶衣、吸收促进剂或蛋白水解抑制剂。一些实例包括使用基于聚[乳酸-乙醇酸共聚物](PLGA)或壳聚糖的纳米颗粒用于口服胰岛素递送。Pan等使用负载于PLGA纳米颗粒中的10U/kg胰岛素获得了10.3%的药理生物利用度,以及使用处于壳聚糖纳米颗粒中的21U/kg胰岛素获得了15.3%的药理生物利用度,而Cui和同事使用分别置于PLGA和PLGA-55纳米颗粒中20U/kg胰岛素获得3.7%和6.3%的口服生物利用度(23-25)。Sarmiento及同事们使用壳聚糖-右旋糖酐纳米颗粒来封装胰岛素,并在分别将50U/kg和100U/kg胰岛素放入颗粒中后观察到5.6%和3.4%的药理生物利用度(26)。对于50U/kg和100U/kg的胰岛素剂量,海藻酸盐/酯-壳聚糖纳米颗粒分别将胰岛素的口服生物利用度提高到6.8%和3.4%(27)。Zhang和同事们将50U/kg胰岛素封装在固体脂质纳米颗粒(SLN)和经麦胚凝集素修饰的SLN中,并分别获得了4.5%和6.1%的药理生物利用度(28)。同样,Ansari等报道,与口服给予胰岛素溶液相比,使用SLN的胰岛素的口服生物利用度提高了五倍(8.3% vs 1.7%)(29)。通过以可生物降解的聚氰基丙烯酸异丁酯纳米球口服递送胰岛素,实现了高的胰岛素的口服生物利用度(37.6%),但使用的为75U/kg的高剂量(30)。改善蛋白质的口服递送的其它策略涉及使用蛋白水解酶抑制剂

(例如甘氨酸胆酸钠、抑肽酶、大豆胰蛋白酶抑制剂、杆菌肽和camostat mesilate) (31)。胰岛素的化学修饰(例如连接靶向配体(如转铁蛋白)或细胞穿透肽(如TAT肽))已显示出有助于胰岛素跨过肠上皮细胞的胞吞转运作用(32,33)。IN-105是通过将PEG短链与胰岛素缀合而获得的胰岛素类似物,通过改善溶解性、抵抗蛋白水解降解和肠道吸收的稳定性,已显示出2型糖尿病患者餐后血糖的口服剂量依赖性的降低(34,35)。吸收促进剂包括胆汁盐、表面活性剂、脂肪酸、钙离子螯合剂、某些聚合物(例如壳聚糖/硫酸化壳聚糖)和闭锁小带蛋白毒素,其可通过调节用于跨细胞吸收的肠上皮的细胞膜结构或调节用于细胞旁转运的紧密连接渗透性而工作(31)。

[0486] IL与有机阳离子和有机/无机阴离子构成一组盐,其通常在低于100℃下为液体(36)。胆碱和香叶酸两者均被美国食品药品监督管理局(FDA)认可为GRAS(通常被认为是安全的)成分。胆碱是卵磷脂的重要成分,存在于植物和动物体内,是多种生理功能所必需的,其口服致死剂量50% (LD₅₀) 为3,400mg/kg,而香叶酸(通常在食品中用作调味剂)在大鼠中具有3,700mg/kg的口服LD₅₀ (43,44)。此外,在对离子液体的毒性的全面综述中,发现胆碱在其它各种阳离子头基中的毒性最低(45)。在这项研究中,单次给予后的口服CAGE剂量为80mg (80μL),其中包含约27mg胆碱和53mg香叶酸。因此,给予了比单独成分的口服LD₅₀低得多的剂量。男性每天摄取的合适的胆碱量为550毫克,女性每天为425毫克(46)。另一方面,香叶酸是常见的食品添加剂,并见于豆蔻、柠檬草、橙叶和其它香精油中(47)。

[0487] 发现CAGE在1%w/v和5%w/v的浓度下显著降低了粘蛋白水凝胶的粘度(图21),这表明CAGE有助于体内的粘液渗透,这是口服摄取大分子的关键屏障。

[0488] 在体内,当空肠内给予或以胶囊给予时,CAGE在提高胰岛素的口服摄取方面显示出杰出的功效。空肠注射3U/kg胰岛素-CAGE引起血糖水平在5小时内下降47%,这与皮下注射2U/kg胰岛素观察到的下降相当。使用5U/kg胰岛素-CAGE在2小时内观察到血糖水平急剧下降65%,并且在剩余的研究期间,与皮下注射胰岛素相比,该水平仍显著更低。这是文献中发现的最低的口服胰岛素剂量之一,证明了这一明显的功效。在其它值得注意的工作中,Pan及其同事证明,当口服给予处于PLGA颗粒中的10U/kg胰岛素时,在4小时内血糖水平下降了52% (24)。Chalasani等使用负载有20U/kg胰岛素的维生素B12缀合的右旋糖酐纳米颗粒,获得了70%-75%的血糖下降和29.4%的口服生物利用度(51)。使用胆汁盐混合胶束在狗中空肠内给予10U/kg胰岛素时,表现出1.8%的绝对生物利用度(52)。在大鼠中空肠内放置负载有50U/kg胰岛素的矩形粘膜粘性贴片产生3.9%的相对生物利用度。在存在渗透促进剂药物二甲基棕榈酰丙磺酸铵(PPS)的情况下,相对生物利用度提高到7.7% (53)。Yin及其同事显示出,肠注射封装50U/kg胰岛素的三甲基壳聚糖-半胱氨酸缀合物纳米颗粒使大鼠中的血糖水平降低70% (54)。使用Labrasol™来提高胰岛素的口服吸收,Takada和小组观察到回肠内和结肠内给予的生物利用度分别为0.25%和0.2% (55)。胃内递送包含200IU/kg胰岛素的基于卵磷脂的微乳剂,在正常大鼠中产生0.148% (无抑肽酶) 和0.159% (具有抑肽酶) 的生物利用度(56)。

[0489] 本文中,注意到胰岛素的高的空肠生物利用度。还应注意的是,胰岛素-CAGE的消除半衰期几乎比皮下注射的胰岛素高两倍,表明其疗效更持久。为了验证迄今为止观察到的显著功效,将胰岛素-CAGE进一步封装在肠溶胶囊中,并口服给予至大鼠。肠溶衣可防止胶囊在胃的酸性环境中分解,仅在小肠的更加碱性的环境中才释放封装的物质(57)。因此,

使用肠溶技术绕过胃可防止胃酸降解生物制品。为了说明在肠中释放胰岛素-CAGE时的剂量稀释,使用比IJ递送中使用的剂量更高的胰岛素剂量(10U/kg)。再次,与皮下注射的胰岛素相比,胰岛素-CAGE产生了相似程度的血糖下降。然而,与SQ胰岛素不同,胰岛素-CAGE的有效性持续直至在12小时的研究结束,表明其适用于长效口服胰岛素制剂。给予纯CAGE后0.5小时,紧接着给予胰岛素,不会产生任何显著的降血糖功效(图20)。这表明胰岛素和CAGE的共同给予是实现显著的体内功效所必需的。

[0490] 除了高效之外,对于临床中的潜在应用,CAGE还显示出生物相容性和长期稳定性(图19)。对于体内安全性测定,分离出单剂量或每天一次重复剂量给予一周后的用纯CAGE或胰岛素-CAGE治疗的大鼠的小肠切片,发现在空肠内或口服给予后,在形态学水平上没有毒性,证明了体内CAGE的优异的口服耐受性。

[0491] 如同通过二级结构和体内生物活性评价所评估的,胰岛素-CAGE在RT下稳定2个月并且在4℃下至少稳定4个月(图15和图10)。出现胰岛素的物理化学降解主要归因于水解、聚集和分子间转化反应导致效力丧失(60)。离子液体可阻止蛋白质与水分子的相互作用,而质子离子液体被报道用于稳定数种氨基酸以及胰岛素的天然构象,并减轻其自身聚集倾向(59,61)。不希望受到理论的束缚,在本文考虑之列的是用纯CAGE储存胰岛素防止蛋白质与水的相互作用,减轻水解相互作用并稳定其 α -螺旋二级结构。鉴于胰岛素的单体形式为生物活性形式,CAGE中的胰岛素的增强口服生物活性也可能部分归因于胰岛素分子作为单体向肠细胞和全身循环的呈递。

[0492] 总的来说,本文描述的是具有巨大的临床应用潜力的高效口服胰岛素制剂的开发。胰岛素-CAGE能够容易地以一步法制备,并因此可轻松扩大规模以进行工业生产。该产品不需要修饰胰岛素结构或开发复杂的纳米结构,并因此可避免在 multi-step 制剂开发过程中的活性成分的丧失或针对经修饰的蛋白的免疫反应的生成。此外,其为简单而稳健的制剂,仅包含胰岛素和由GRAS成分制成的离子液体,从而消除了使用任何添加剂来增强功效的需求。该制剂在非常低的胰岛素剂量下在体内显示出深度的功效。通过以肠溶胶囊递送胰岛素-CAGE,我们避开了胰岛素的胃肠降解并增强了其肠道渗透性,从而克服了口服递送生物制品的屏障。此外,该制剂是生物相容的并且具有良好的长期稳定性。这项研究的结果可促进临床中口服胰岛素递送的实现。

[0493] 材料和方法

[0494] 材料。香叶酸、胆碱碳酸氢盐、二甲基亚砜(DMSO)、FITC-胰岛素、FITC-右旋糖酐、癸酸钠(纯度为98%)、粘蛋白和人胰岛素购自Sigma-Aldrich(St.Louis,MO,USA),同时,牛胰蛋白酶获得自MP Biomedicals(Santa Ana,CA,USA)。Caco-2人结直肠腺癌细胞购自美国典型培养物保藏中心(Manassas,VA,USA),同时,具有或不具有酚红、胎牛血清(FBS)、青霉素/链霉素(P/S)溶液的Dulbecco改良的eagle培养基(DMEM),Hank平衡盐溶液(HBSS)、Dulbecco磷酸盐缓冲盐水(DPBS)和0.25%的胰蛋白酶溶液购自ThermoFisher Scientific(Waltham,MA,USA)。包含基础接种培养基(BSM)、肠上皮细胞分化培养基(EDM)和MITO+血清增量剂的肠上皮生长培养基购自Corning(Corning,NY,USA)。Millicell®-PCF细胞培养插入物(孔径3.0 μ m,直径12mm)和TEER测量设备 Millicell®-ERS获得自Millipore Sigma(Burlington,MA,USA),而TEER测量电极获得自World Precision Instruments,Inc(Sarasota,FL,USA)。多聚甲醛(16%w/v)和盐酸胃复安购自Alfa Aesar(Ward Hill,MA,

USA),带有4',6-二脒基-2-苯基吡啶二盐酸盐(DAPI)的Vectashield Hardset™购自Vector Laboratories Inc.(Burlingame,CA,USA)。3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)细胞毒性试剂盒和人胰岛素ELISA试剂盒获得自ThermoFisher Scientific(Waltham,MA,USA)。重200g-300g的雄性Wistar大鼠购自Charles River Laboratories(Wilmington,MA,USA),并且血糖测量仪(Aimstrip plus)及其试纸条购自Fisher Scientific(Pittsburgh,PA,USA)。胶囊的口服灌胃和加长的9号胶囊获得自Torpac(Fairfield,MA,USA)。苏木精和伊红溶液购自Sigma Aldrich(St.Louis,MO,USA)。使用的所有其它试剂均为分析纯。

[0495] CAGE和胰岛素-CAGE的制备。根据我们先前的研究合成CAGE(38)。简而言之,在500mL圆底烧瓶中,将两当量的纯的香叶酸(20g,0.119mol)添加至一当量的胆碱碳酸氢盐(80wt%溶液,12.275g,0.059mol),所述香叶酸已在<-70℃的丙酮中重结晶至少5次以去除杂质。将混合物在40℃下搅拌直至停止释放CO₂,并通过在60℃下旋转蒸发2小时除去水,然后在真空烘箱中在60℃下干燥48小时。在25℃时的物理特性与先前的值显示出良好的吻合。NMR谱(使用500-MHz Varian instrument,Palo Alto,CA收集)也与以前的制备方法良好的吻合:¹H NMR(DMSO-d₆), δ 5.60(s,2H)、5.07(t,J=6.1,2H)、3.86(t,J=6.6,2H)、3.42(t,J=6.6,2H)、3.12(s,9H)、2.57(m,4H)、2.01(m,4H)、1.97(s,6H)、1.73(s,2H)、1.64(s,6H)和1.57(s,6H);¹³C NMR(DMSO-d₆), δ 170.1、150.1、131.5、124.1、122、67.6、55.5、53.6、53.5、32.8、25.9和17.9。通过将预定量的胰岛素粉末添加到特定体积的CAGE中,然后涡旋5分钟来制备胰岛素-CAGE。

[0496] 评估CAGE中的胰岛素稳定性。将包含人胰岛素(100U,3.5mg)的样品悬浮在处于2mL微量离心管中的1mL CAGE或磷酸盐缓冲盐水(PBS)中,并在室温(25℃)或冷藏(4℃)下孵育。1个月后,以及此后大约每个月共计4个月,将样品以10000×g离心10分钟,通过移液管除去CAGE,并用1mL PBS洗涤软的胰岛素团粒并再次离心。除去PBS-CAGE,并重复洗涤/离心步骤,直到在离心过程中胰岛素不形成团粒为止。使用CD和体内生物活性(在SI中描述)分析所收集的胰岛素的稳定性。为了收集指示蛋白二级结构的远紫外区域(190-250nm)中的光谱,使用装载有400μL样品的矩形石英池(光程为1mm,Starna cells,1-Q-q,Atascadero,CA)施行了CD分光光度法(Jasco J-1500,Easton,MD)。

[0497] 空肠内给予时的胰岛素-CAGE功效的测定和药代动力学参数的评价。在禁食过夜但可自由饮水的成年非糖尿病雄性Wistar大鼠中测定空肠内注射的胰岛素-CAGE的功效。常规进行抗糖尿病功效研究前的禁食(29,62,63)。其有助于避免作为进食的结果的血糖水平波动,其可因食物摄入量和时间而在动物之间变化。所有的动物实验均根据加利福尼亚大学Santa Barbara分校动物护理委员会的指导原则以及国家研究委员会实验动物资源研究所的动物护理和使用指南进行。在研究开始之前,将大鼠麻醉,修剪腹毛,并使用70%乙醇和聚维酮碘使该区域做好手术准备。在腹部制作切口以暴露肠。定位空肠并用100μL 3U/kg或5U/kg胰岛素-CAGE或100μL对照进行注射。肠暴露后(即紧接在注射前)采集时间零点的血糖。除盐水仅在3只大鼠中进行测试外,每种制剂在6只大鼠中进行测试。此后,将肠段放回腹部,并缝合肌肉和皮肤。在研究开始时和每0.5h直至在5小时的研究结束时,使用商业化的血糖仪测定血糖。通过在手术前将动物放在温度受控的加热垫上,然后在手术后再盖上毛巾,可防止麻醉期间动物体温的下降。在整个研究过程中动物保持麻醉,并在5h后安

乐死。在5小时的研究结束时,移出注射部位周围的肠段,以进行进一步的组织学检查来确定毒性(如果有的话)。为了比较功效,将单独的组的3只大鼠皮下注射处于盐水中的2U/kg胰岛素。将结果绘制为相对于初始读数的血糖水平变化%vs时间的图。另外,将盐水组视为禁食对照,并在减去盐水组的血糖水平后绘图。通过在0小时、1小时、2小时、3小时和5小时,以BD Vacutainer®红帽管(Becton, Dickinson and Company, Franklin Lanes, NJ, USA)分别从空肠内注射5U/kg胰岛素-CAGE、空肠内注射5U/kg胰岛素-盐水和皮下注射2U/kg胰岛素-盐水的大鼠中收集约250μL血液来评估胰岛素-CAGE的药代动力学。遵循标准方案以从全血中分离血清。简而言之,将血样在RT下静置15-30分钟以凝结,然后以2,000g离心10分钟。然后将澄清的上清液(血清)收集到干净的管中,在该程序的过程中保存在冰中,并随后在-20℃下保存,直至进一步分析胰岛素含量。为了评估血清样品中的胰岛素浓度,使用了人胰岛素ELISA,并按照制造商的方案以确定每个时间点的胰岛素浓度。根据血清胰岛素浓度与时间的图计算出药代动力学参数,例如消除速率常数(K_{el})、半衰期($t^{1/2}$)、曲线下面积(AUC)和生物利用度(F)%。使用从功效图获得的AUC计算药效学生物利用度。

[0498] 体内口服功效。为了确定通过口服途径给予的胰岛素-CAGE的功效,使用了加长的9号胶囊。这些胶囊装有80μL的10U/kg胰岛素-CAGE、纯CAGE或留空。此后,用溶于异丙醇中的12.5%w/v的Eudragit®L-100对胶囊进行肠溶包衣3次。为了口服功效研究,将成年非糖尿病雄性Wistar大鼠禁食过夜,但可自由饮水。第二天,使用口服灌胃向大鼠给予该胶囊,然后皮下给予5mg/kg的胃复安HCl以促进胃排空。此后,使用商业化的血糖仪测量血糖,并随后每小时测量一次直至12小时。在整个研究期间大鼠禁食。还通过口服给予作为溶液(无胶囊)的制剂来测试盐水中的10U/kg胰岛素的对照。另外,评估了皮下注射2U/kg胰岛素-盐水的功效。对于10U/kg胰岛素CAGE和纯CAGE,每种制剂使用一组6只大鼠,而将每组3只大鼠用来研究空胶囊、10U/kg胰岛素溶液和皮下给予的2U/kg胰岛素-盐水的功效。将结果绘制为血糖水平变化百分比vs时间的图。另外,将空胶囊组视为禁食对照,并在减去空胶囊组的血糖水平后绘图。在12小时的研究后,将大鼠安乐死,并收集小肠切片用于组织的组织学。

[0499] 重复剂量生物相容性。在非糖尿病大鼠中,每天一次重复给予纯CAGE胶囊、10U/kg胰岛素-CAGE胶囊和10U/kg胶囊中的胰岛素7天的时间段后,评估重复剂量给予时的CAGE的生物相容性。在第8天将所有动物安乐死,并收集其小肠组织切片用于组织的组织学。

[0500] 组织的组织学。将小肠组织固定在10%缓冲的福尔马林中,在乙醇中脱水,并包埋在石蜡中。将肠组织的5μm切片脱蜡、复水并用苏木精和伊红染色。使用光学显微镜以10倍和40倍放大倍率(Olympus BX60™ Upright Compound Microscope)检查组织形态。

[0501] 数据分析。所有数据均以平均值±标准误差(S.E.)表示。为了统计分析,使用学生T检验。在 $p < 0.05$ 时认为是显著差异。所有实验以至少三重重复进行。

[0502] 参考文献

[0503] 1.Fu AZ,Qiu Y&Radican L(2009) Impact of fear of insulin or fear of injection on treatment outcomes of patients with diabetes.Curr Med Res Opin 25(6):1413-1420.

[0504] 2.Matteucci E,et al(2015) Insulin administration:Present strategies and future directions for a noninvasive(possibly more physiological) delivery.Drug Des Devel Ther 9:3109-3118.

- [0505] 3.Arbit E&Kidron M(2017) Oral insulin delivery in a physiologic context:Review.J Diabetes Sci Technol 11(4):825-832.
- [0506] 4.Fonte P,et al Polymer-based nanoparticles for oral insulin delivery:Revisited approaches.Biotechnol Adv
- [0507] 5.Fonte P,Araujo F,Reis S&Sarmiento B(2013) Oral insulin delivery:How far are we?.J Diabetes Sci Technol 7(2):520-531.
- [0508] 6.Zijlstra E,Heinemann L&Plum-Morschel L(2014) Oral insulin reloaded:A structured approach.J Diabetes Sci Technol 8(3):458-465.
- [0509] 7.Aguirre TAS,et al(2016) Current status of selected oral peptide technologies in advanced preclinical development and in clinical trials.Advanced Drug Delivery Reviews 106(Part B):223-241.
- [0510] 8.Rogers RD&Seddon KR(2003) Chemistry.ionic liquids--solvents of the future?.Science 302(5646):792-793.
- [0511] 9.Shamshina JL,Barber PS&Rogers RD(2013) Ionic liquids in drug delivery.Expert Opin Drug Deliv 10(10):1367-1381.
- [0512] 10.Lei Z,Chen B,Koo YM&MacFarlane DR(2017) Introduction:Ionic liquids.Chem Rev 117(10):6633-6635.
- [0513] 11.Banerjee A,Ibsen K,Iwao Y,Zakrewsky M&Mitragotri S(2017) Transdermal protein delivery using choline and geranate(CAGE)deep eutectic solvent.Adv Healthc Mater 6(15):10.1002/adhm.201601411.Epub 2017 Mar 24.
- [0514] 12.Zakrewsky M,et al(2016) Choline and geranate deep eutectic solvent as a broad-spectrum antiseptic agent for preventive and therapeutic applications.Adv Healthc Mater 5(11):1282-1289.
- [0515] 13.Huang K,et al(2004) How insulin binds:The B-chain alpha-helix contacts the L1 beta-helix of the insulin receptor.J Mol Biol 341(2):529-550.
- [0516] 14.Kharroubi AT&Darwish HM(2015) Diabetes mellitus:The epidemic of the century.World J Diabetes 6(6):850-867.
- [0517] 15.Olokoba AB,Obateru OA&Olokoba LB(2012) Type 2 diabetes mellitus:A review of current trends.Oman Med J 27(4):269-273.
- [0518] 16.World Health Organization(2016) Global report on diabetes
- [0519] 17.Centers for Disease Control(2017) National diabetes statistics report,2017.estimates of diabetes and its burden in the united states.National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion:1-20.
- [0520] 18.McCulloch DK(2017) Patient education:Diabetes mellitus type 2: Insulin treatment(beyond the basics) 2017(11/08)
- [0521] 19.Peyrot M,Rubin RR,Kruger DF&Travis LB(2010) Correlates of insulin injection omission.Diabetes Care 33(2):240-245.
- [0522] 20.Oleck J,Kassam S&Goldman JD(2016) Commentary:Whywas inhaled insulin

a failure in the market?.Diabetes Spectr 29(3):180-184.

[0523] 21.Soares S,Costa A,Fonte P&Sarmiento B(2017) in Drug Delivery:An Integrated Clinical and Engineering Approach,eds Rosen Y,Gurman P&Elman N (Taylor and Francis,

[0524] 22.Shaji J&Patole V(2008)Protein and peptide drug delivery:Oral approaches.Indian J Pharm Sci 70(3):269-277.

[0525] 23.Cui FD,Tao AJ,Cun DM,ZhangLQ&Shi K(2007)Preparation of insulin loaded PLGA-Hp55 nanoparticles for oral delivery.J Pharm Sci 96(2):421-427.

[0526] 24.Pan Y,Xu H,Zhao HY,Wei G&Zheng JM(2002)Study on preparation and oral efficacy of insulin-loaded poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles.Yao Xue Xue Bao 37(5):374-377.

[0527] 25.Pan Y,et al(2002)Bioadhesive polysaccharide in protein delivery system:Chitosan nanoparticles improve the intestinal absorption of insulin in vivo.International Journal of Pharmaceutics 249(1):139-147.

[0528] 26.Sarmiento B,Ribeiro A,Veiga F,Ferreira D&Neufeld R(2007)Oral bioavailability of insulin contained in polysaccharide nanoparticles.Biomacromolecules 8(10):3054-3060.

[0529] 27.Sarmiento B,et al(2007)Alginate/chitosan nanoparticles are effective for oral insulin delivery.Pharm Res 24(12):2198-2206.

[0530] 28.Zhang N,et al(2006)Lectin-modified solid lipid nanoparticles as carriers for oral administration of insulin.Int J Pharm 327(1-2):153-159.

[0531] 29.Ansari MJ,et al(2016)Enhanced oral bioavailability of insulin-loaded solid lipid nanoparticles:Pharmacokinetic bioavailability of insulin-loaded solid lipid nanoparticles in diabetic rats Drug Deliv 23(6):1972-1979.

[0532] 30.Radwan MA(2001)Enhancement of absorption of insulin-loaded polyisobutylcyanoacrylate nanospheres by sodium cholate after oral and subcutaneous administration in diabetic rats. Drug Dev Ind Pharm 27(9):981-989.

[0533] 31.Wong CY,Martinez J&Dass CR(2016)Oral delivery of insulin for treatment of diabetes:Status quo,challenges and opportunities.J Pharm Pharmacol 68(9):1093-1108.

[0534] 32.Shah D&Shen WC(1996)Transcellular delivery of an insulin-transferrin conjugate in enterocyte-like caco-2 cells.J Pharm Sci 85(12):1306-1311.

[0535] 33.Liang JF&Yang VC(2005)Insulin-cell penetrating peptide hybrids with improved intestinal absorption efficiency.Biochem Biophys Res Commun 335(3):734-738.

[0536] 34.Khedkar A,et al(2010)A dose range finding study of novel oral insulin(IN-105)under fed conditions in type 2 diabetes mellitus

subjects. *Diabetes Obes Metab* 12(8):659-664.

[0537] 35. Buckley ST, Hubalek F & Rahbek UL (2016) Chemically modified peptides and proteins-critical considerations for oral delivery, *Tissue Barriers* 4(2): e1156805.

[0538] 36. Adawiyah N, Moniruzzaman M, Hawatulaila S & Goto M (2016) Ionic liquids as a potential tool for drug delivery systems. *Medicinal Chemistry Communications* 7:1881-1897.

[0539] 37. Yang M, et al (2014) Using ionic liquids in whole-cell biocatalysis for the nucleoside acylation. *Microb Cell Fact* 13:143-014-0143-y.

[0540] 38. Zakrewsky M, et al (2014) Ionic liquids as a class of materials for transdermal delivery and pathogen neutralization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(37):13313-13318.

[0541] 39. Sivapragasam M, Moniruzzaman M & Goto M (2016) Recent advances in exploiting ionic liquids for biomolecules: Solubility, stability and applications. *Biotechnol J* 11(8):1000-1013.

[0542] 40. Patel R, Kumari M & Khan AB (2014) Recent advances in the applications of ionic liquids in protein stability and activity: A review. *Appl Biochem Biotechnol* 172(8):3701-3720.

[0543] 41. Williams HD, et al (2014) Ionic liquids provide unique opportunities for oral drug delivery: Structure optimization and in vivo evidence of utility. *Chem Commun (Camb)* 50(14):1688-1690.

[0544] 42. Sahbaz Y, et al (2015) Transformation of poorly water-soluble drugs into lipophilic ionic liquids enhances oral drug exposure from lipid based formulations. *Mol Pharm* 12(6):1980-1991.

[0545] 43. Davis KL, Hollister LE, Vento AL & Simonton S (1978) Choline chloride in methylphenidate- and apomorphine-induced stereotypy. *Life Sciences* 22(24):2171-2177.

[0546] 44. Anonymous (1979) Geranic acid. *Food and Cosmetics Toxicology* 17 (Supplement):785-786.

[0547] 45. Amde M, Liu JF & Pang L (2015) Environmental application, fate, effects, and concerns of ionic liquids: A review. *Environ Sci Technol* 49(21):12611-12627.

[0548] 46. Zeisel SH & da Costa KA (2009) Choline: An essential nutrient for public health. *Nutr Rev* 67(11):615-623.

[0549] 47. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database
 3,7-dimethylocta-2,6-dienoic acid. CID=9989. PubChem Compound Database 2018 (04/08)

[0550] 48. Konsoula R & Barile FA (2005) Correlation of in vitro cytotoxicity with paracellular permeability in caco-2 cells. *Toxicol in Vitro* 19(5):675-

684.

[0551] 49.Krug SM,et al(2013)Sodium caprate as an enhancer of macromolecule permeation across tricellular tight junctions of intestinal cells.Biomaterials 34(1):275-282.

[0552] 50.Simovic S,Song Y,Nann T&Desai TA(2015)Intestinal absorption of fluorescently labeled nanoparticles.Nanomedicine 11(5):1169-1178.

[0553] 51.Chalasani KB,Russell-Jones GJ,Jain AK,Diwan PV&Jain SK(2007)Effective oral delivery of insulin in animal models using vitamin B12-coated dextran nanoparticles.J Controlled Release 122(2):141-150.

[0554] 52.Catharine Scott-Moncrief J,Shao Z&Mittra AK(1994)Enhancement of intestinal insulin absorption by bile Salt-Fatty acid mixed micelles in dogs.Journal of Pharmaceutical Sciences 83(10):1465-1469.

[0555] 53.Gupta V,et al(2016)Oral delivery of exenatide and insulin using mucoadhesive intestinal devices.Annala of Biomedical Engineering 44(6):1993-2007.

[0556] 54.Yin L,et al(2009)Drug permeability and mucoadhesion properties of thiolated trimethyl chitosan nanoparticles in oral insulin delivery.Biomaterials 30(29):5691-5700.

[0557] 55.Eaimtrakam S,et al(2002)Absorption enhancing effect of labrasol on the intestinal absorption of insulin in rats.J Drug Target 10(3):255-260.

[0558] 56,Cilek A,Celebi N,Tirnaksiz F&Tay A(2005)A lecithin-based microemulsion of rh-insulin with aprotinin for oral administration: Investigation of hypoglycemic effects in non-diabetic and STZ-induced diabetic rats.Int J Pharm 298(1):176-185.

[0559] 57.Thakral S,Thakral NK&Majumdar DK(2013)Eudragit:A technology evaluation.Expert Opin Drug Deliv10(1):131-149.

[0560] 58.Schroder C(2017)Proteins in ionic liquids:Current status of experiments and simulations.Top Curr Chem(Cham) 375(2):25-017-0110-2.Epub 2017Feb 7.

[0561] 59.Micaelo NM&Soares CM(2008)Protein structure and dynamics in ionic liquids.insights from molecular dynamics simulation studies.J Phys Chem B 112(9):2566-2572.

[0562] 60.Bränge J&Langkjoer L(1993)Insulin structure and stability.Pharm Biotechnol 5:315-350.

[0563] 61.A.Kumar PV(2013)Prevention of insulin self-aggregation by a protic ionic liquid.Royal Society of Chemistry Advances 3:362-367.

[0564] 62.Lee S,et al(2005)A new drug carrier,nalpa-deoxycholyl-L:-Lysyl-methylester,for enhancing insulin absorption in the intestine.Diabetologia 48(3):405-411.

[0565] 63.Lee JJ,et al(2003)Characterization of streptozotocin-induced diabetic rats and pharmacodynamics of insulin formulations.Biosci Biotechnol Biochem 67(11):2396-2401.

[0566] 实施例4:实施例3的补充材料

[0567] 结果

[0568] 从CAGE分离的胰岛素的生物活性在长期储存后得以保留。为了验证使用CD获得的胰岛素-CAGE的长期稳定性数据,评价了非糖尿病大鼠中在不同月数从CAGE分离的胰岛素的生物活性(图10)。新鲜制备的胰岛素溶液(盐水中的胰岛素)在1小时内使血糖水平下降约49% ($51 \pm 2\%$),并在接下来的一个小时内维持($50 \pm 4\%$)。此后,血糖水平在5小时内升高至92% ($92 \pm 5\%$),并由于连续禁食而再次缓慢降低至初始值的30%。相比之下,在不同温度 and 不同时间点从CAGE分离的胰岛素遵循相似的模式,并且在注射后1小时和2小时血糖水平下降,与新鲜胰岛素相比,下降百分比没有显著差异。然而,对于在室温(RT)下储存3个月的胰岛素,观察到显著降低的疗效。注射胰岛素后1小时和2小时,注意到该组中的血糖水平显著降低了38% (分别为 $62 \pm 2\%$ 和 $62 \pm 3\%$),表明在RT下储存2个月后,胰岛素丧失了其部分生物活性。然而,用CAGE在4℃下储存的胰岛素对于至少4个月的储存而言保留了其生物活性。

[0569] CAGE和胰岛素的共同给予对于显著的治疗功效是必需的。当纯CAGE和10U/kg胰岛素分隔开0.5小时给予时,血糖缓慢下降,与10U/kg胰岛素溶液相比,在任何时间点均未获得显著差异(图20)。在10小时的研究中,两组的血糖下降均为初始水平的约34% (连续给药和胰岛素溶液分别为 $66.3 \pm 4.9\%$ 和 $66.9 \pm 7.1\%$)。这表明,CAGE不会引起肠膜的任何长期透化,并且只有将胰岛素和CAGE作为胰岛素-CAGE混合物共同给予,才可能实现显著降低血糖的功效。

[0570] CAGE对Caco-2单层活力的影响。在体外研究了CAGE对Caco-2肠细胞的影响。首先使用MTT (3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四氮唑溴盐) 细胞增殖测定来确定细胞活力。将单层暴露于各种浓度的CAGE持续5小时,并将细胞活力值归一化至无CAGE处理对照(图21)。用10mM的CAGE未观察到对细胞增殖的不利影响,而使用25mM的CAGE获得了86%的高的细胞活力。用50mM的CAGE获得了69%的轻微降低的活力。

[0571] CAGE显著增强了胰岛素跨肠单层的转运。使用0mM、10mM、25mM和50mM的CAGE开展了异硫氰酸荧光素(FITC)-胰岛素跨Caco-2单层的5小时长的转运实验。在整个研究过程中,两组的FITC-胰岛素转运均随时间稳定增加(数据未显示)。

[0572] 在5小时的研究结束时,通过transwell膜的共聚焦图像证实了这些结果。图像清楚地显示出,与对照细胞相比,随着CAGE浓度的增加,Caco-2细胞对FITC-胰岛素的摄取更高(数据未显示)。

[0573] CAGE介导的跨肠细胞的药物转运主要是细胞旁的。分子跨肠上皮的转运可为细胞旁或跨细胞的。为了评价CAGE增强药物跨Caco-2单层转运的机制,在不同浓度CAGE的存在下,使用特定的转运标记物研究了细胞旁转运和被动跨细胞转运。为此,评估了4kDa的FITC-右旋糖酐(细胞旁转运的特定标记物)的转运(1)。

[0574] 在各个时间点,在25mM和50mM CAGE的存在下,具有类似于胰岛素的大小的4kDa的FITC-右旋糖酐的转运也显著增强(数据未显示)。然而,为证实CAGE是否改善了分子的细胞

旁转运,通过测量跨上皮电阻 (TEER) 并将其与已建立的渗透促进剂癸酸钠进行比较,评估了用不同浓度的CAGE处理的Caco-2细胞的紧密连接完整性(数据未显示)(2)。在对照细胞中,TEER在最初的3h内略微下降约10%,其后在5h内恢复到其初始值,并且直至在24小时的研究结束时未改变。然而,当用10mM的CAGE处理时,TEER在1小时内下降29%,并且在1小时和5小时显著不同于对照。发现该TEER下降是短暂的,并且细胞在24小时内完全恢复了其紧密连接完整性。

[0575] 尽管由癸酸钠引起的TEER下降与50mM的CAGE的下降类似,但是在24小时的研究结束时,该组中的紧密连接完整性进一步降低到初始水平的36%。由10mM-25mM的CAGE引起的TEER变化表明,在这些浓度下,CAGE暂时打开了肠道紧密连接,其有助于胰岛素跨细胞转运。随后还评价了由CAGE介导的其它的口服吸收增强机制,例如粘液渗透和针对酶促降解的稳定性。

[0576] CAGE引起粘液变稀。用模拟粘液 (SM) 孵育的CAGE导致粘度非常显著的下降(图21)。SM表现出与胃粘液所报道的相似的剪切稀化曲线(4),并且SM粘度曲线与健康人十二指肠胃粘液的文献值匹配良好(5)。例如,在46 1/s的剪切速率下,文献值为12.3cP,相比之下在50.121/s下测得的SM平均值是11.3cP。在整个测量的剪切范围内,添加1%和5% CAGE(分别为23mM和115mM)降低了粘度。粘度降低表明,CAGE有助于体内的粘液渗透,从而促进胰岛素向肠上皮的递送,同时保护其在腔、粘膜和上皮部位免受蛋白水解降解。

[0577] 方法

[0578] 处于CAGE中的胰岛素的长期稳定性的体内评估。通过将从CAGE分离的1U/kg胰岛素皮下注射至成年非糖尿病雄性Wistar大鼠中,在不同的月数评价于RT或4℃储存的胰岛素-CAGE的生物学活性。使用商业化的血糖仪监测血糖水平8小时,并将其与皮下注射的新鲜制备的1U/kg胰岛素溶液进行比较。在注射胰岛素之前,将大鼠禁食过夜,但可自由饮水,并且在整个研究过程中都禁食,以消除因食用食物而引起的血糖波动。将结果绘制为相对于初始水平的血糖变化%vs时间的图。

[0579] 胰岛素和CAGE的连续给药。将非糖尿病Wistar大鼠禁食过夜8小时,但可随意饮水。此后,向大鼠以肠溶胶囊口服给予纯CAGE,然后注射5mg/kg的胃复安以诱导胃排空。在这一时间点评价时间零时的血糖。约0.5小时后,将10U/kg胰岛素粉以肠溶胶囊给予至大鼠。持续禁食,自由饮水直至在12小时的研究结束时,并在各个时间点评价血糖。将结果绘制为相对于初始水平的血糖变化%vs时间的图。

[0580] 在96孔板和transwell中的Caco-2单层培养。对于transwell中的转运实验,使用了3天快速Caco-2生长系统。将细胞置于补充有MITO+血清增量剂的Corning®基础接种培养基(BSM)中,并以400,000个细胞/mL的密度接种在置于24孔板内的Millicell®PCF插入物上。根据制造商的建议,将500μL含培养基的细胞置于顶端侧,同时将1000μL无细胞的BSM置于基底侧。在37℃、5%CO₂下孵育24小时后,将培养基替换为相同体积的补充有MITO+血清增量剂的肠上皮细胞分化培养基,再持续2-4天。定期测量TEER,并且当TEER达到高于200ohms.cm²时(表明细胞之间的足够的紧密连接完整性),进行转运研究。

[0581] CAGE的Caco-2细胞活力评估。对于这项研究,使用在96孔板中生长的Caco-2细胞。用Dulbecco改良的eagle培养基(DMEM)将CAGE稀释至范围为10mM-50mM的浓度。制备了三套不同的CAGE稀释液(3个稀释重复)。从每个孔中吸出培养基,并将各稀释液(每孔100μL)分

配到6个孔中(6个细胞重复)。对照孔仅填充培养基。将细胞与不同浓度的CAGE在37℃、5% CO₂下孵育5h,然后用新鲜DMEM替换培养基。使细胞生长另外的19小时(总共24小时),并使用MTT测定法评估细胞活力。将MTT粉末与培养基混合至浓度为0.5mg/mL,添加到每个孔(100μL)中,并在37℃、5%CO₂下孵育4小时。此后,除去MTT溶液,并向每个孔中加入100μL二甲基亚砷(DMSO)。将培养板包裹在箔中并摇动20分钟,然后使用酶标仪(M220 Infinite Pro, Tecan Group Ltd, Morrisville, NY)在570nm处读取吸光度。使用未处理的细胞活力值对吸光度读数进行归一化。

[0582] 体外胰岛素转运测定。在开始实验之前,将transwell中现有的培养基在顶端侧(200μL)和基底侧(600μL)替换为不含酚红、胎牛血清(FBS)和青霉素/链霉素(P/S)的DMEM,并将细胞孵育30分钟。此后,将顶端侧的培养基替换为200μL的500μg/mL的FITC-胰岛素,所述FITC-胰岛素用或不用10mM、25mM或50mM的CAGE制备并溶于不含酚红、FBS和P/S的DMEM中。在顶端侧添加FITC-胰岛素后,立即从基底侧取出100μL试样,并用等体积的新鲜DMEM代替。在1小时、2小时、3小时、4小时和5小时对此重复。在研究过程中,将transwell板置于处于以100rpm旋转的摇床上的37℃、5%CO₂的培养箱内,并仅在上述时间段取出以移出试样。在5小时的研究结束后,使用酶标仪(Tecan, Infinite M1000, Männedorf, 瑞士)在495/520nm激发/发射波长下测量试样中的FITC-胰岛素的浓度,并绘制为FITC-胰岛素的转运% vs时间的图。此外,当从transwells中取出试样时,在每个时间点测量TEER,并绘制为基底侧小室浓度vs时间的图。

[0583] 为了定性分析Caco-2细胞摄取的FITC-胰岛素,在研究结束时,用HBSS将来自FITC-胰岛素转运研究的transwells洗涤两次,然后加入100μL的4%多聚甲醛并保持在4℃过夜。第二天,从孔中吸出多聚甲醛,将膜用PBS洗涤两次,并切下transwell膜并将其轻轻放在载玻片上。将含有(4',6-二脒基-2-苯基吲哚二盐酸盐)DAPI的封片剂添加到膜,并盖上盖玻片。使用Olympus Fluoview™1000光谱共聚焦仪以40倍放大倍率对膜进行共聚焦成像。

[0584] 在体外的FITC-右旋糖酐转运测定。在实验开始之前,将transwells中现有的培养基在顶端侧(200μL)和基底侧(600μL)替换为不含酚红、FBS和P/S的DMEM,并将细胞孵育30分钟。此后,将顶端侧的培养基替换为200μL的处于DMSO中的500μg/mL的4kDa的FITC-右旋糖酐(终浓度10%),所述FITC-右旋糖酐用或不用10mM、25mM和50mM的CAGE制备,并溶于不含酚红、FBS和P/S的DMEM中。在向顶端侧添加测试物后,立即从基底侧取出100μL试样,并用等体积的新鲜DMEM代替。在1小时、2小时、3小时、4小时和5小时对此重复。在研究过程中,将transwell板置于处于以100rpm旋转的摇床上的37℃、5%CO₂的培养箱内,并仅在每个时间点取出以移出试样。在5h的研究结束后,使用酶标仪(BioTek Synergy NEO HTS™酶标仪, Winooski, VT, USA)在485/530、495/520和468/568激发/发射波长处测量具有不同FITC-右旋糖酐浓度的试样中的荧光。制备每种测试物的校准溶液,并使用FITC-右旋糖酐的荧光读数进行分析,其用于绘制基底侧小室浓度vs时间的图。

[0585] CAGE和癸酸钠对TEER值的影响。在实验开始之前,将transwell中现有的培养基在顶端侧(200μL)和基底侧(600μL)替换为不含酚红、FBS和P/S的DMEM,并将细胞孵育至少30分钟。记录每个插入物的TEER值。此后,用200μL的10mM、25mM和50mM的CAGE或10mM癸酸钠代替顶端侧的培养基。在研究过程中,将transwell板置于处于以100rpm旋转的摇床上的37

℃、5%CO₂的培养箱中,并仅在1小时、2小时、3小时、4小时、5小时和24h取出以进行额外的TEER测量。将TEER绘制为相对于初始值的变化%vs时间的图。

[0586] CAGE与粘蛋白的相互作用。通过将2%干燥的猪粘蛋白与盐水混合并涡旋直至粘蛋白完全溶解来制作模拟粘液。将大约1%和5%的CAGE(分别为23mM和115mM)添加到SM,并使用具有直径为40mm的铝制2°锥形的AR-G2流变仪(TA Instruments, New Castle, DE, USA)在25℃下以1-100 1/s的剪切速率范围测量粘度。

[0587] 实施例5

[0588] GFP质粒转染方案

[0589] 在添加转染试剂之前一天,将Caco-2细胞以80%汇合度接种在96孔半区板或24孔组织培养物处理的板中。对于lipofectamine转染研究,在Opti-Mem培养基中制备Lipofectamine 3000试剂(终浓度为0.07%或0.13%)并混合。通过在具有P3000促进剂(终浓度为0.09%v/v)的Opti-Mem培养基中稀释GFP质粒(96孔半区板为50ng/孔,或24孔板为250ng/孔)分别制备质粒DNA的预混液。将质粒DNA的预混液以1:1的比例添加到经稀释的lipofectamine 3000试剂的管中。使混合物在室温下孵育20分钟,以使质粒掺入阳离子lipofectamine中。然后将DNA-脂质复合体混合物以终浓度0.07%或0.13%直接添加至处于完全细胞培养基中的细胞。96孔半区板的总体积为100μL,而24孔平板的总体积为500μL。孵育3天后除去转染混合物,用DPBS洗涤,并替换为完全DMEM细胞培养基。

[0590] 使用上述相同的方案,其中,用终浓度为0.13%、0.26%、0.5%、0.71%和0.9%的CAGE的不同变量(1:1、1:2、1:4、2:1)代替lipofectamine 3000。如果使用P3000促进剂,终浓度保持在相同的0.09%。1天或3天后除去转染混合物,用DPBS洗涤,并替换为完全DMEM细胞培养基。

[0591] 将共聚焦显微镜用于对GFP表达的存在进行成像(图22-图25)。该数据表明CAGE可将DNA递送到细胞中。

[0592] 实施例6:水合的CAGE中的纳米结构转变

[0593] 已发现离子液体(例如胆碱和香叶酸共晶(CAGE))的令人兴奋的生物医学应用,然而,对其在水合条件下的结构了解得很少。此处描述的是模型两亲性深共熔溶剂CAGE的纳米结构中的水合诱导和组分依赖性转变。广角X射线散射和冷冻透射电子显微镜证实了纳米尺寸的形态学转变。水合破坏了天然的分子和离子簇,重组了极性和非极性结构域、阳离子和阴离子的交替以及原子的邻接。在高的水合度(>75%H₂O)下,根据浓度和组成,纳米级簇自组装为囊泡、胶束或微乳液。这些纳米级的形态变化也引起宏观行为的变化。具体地,在较高的香叶酸摩尔比下,水合的CAGE经历了从牛顿溶剂到剪切稀化的非牛顿凝胶的转变。这些结果表明,可通过控制离子液体的水合度和各组分的摩尔比来调节离子液体的纳米结构,从而提供了针对特定应用定制这些材料的新方法。

[0594] 深共熔溶剂(DES)是一类特殊的离子液体,通过将Lewis或Brønsted-Lowry酸和碱以不同的摩尔比混合来配制¹⁻³。DES是通过配位或氢键网络(通过前体的化学性质和/或摩尔比调整)连接的非对称分子和离子簇的复杂组装体³⁻¹⁸。最终,DES的纳米结构取决于配位或氢键网络的完整性,并因此易受包括水的氢供体的影响⁵。氢键网络使这些溶剂具有吸湿性和保水性⁵,这是影响其物理化学特性的特征性行为。例如,所吸收的水降低了熔融温度¹⁹并破坏了原始DES的纳米结构⁵。顾名思义,IL的行为受离子相互作用的支配,而DES受到的

氢键的强力影响。CAGE符合IL的定义,因为其主要包含离子物质(胆碱和香叶酸根),并且熔点低于100℃。同时,CAGE不是经典的IL,因为其也含有中性香叶酸。涉及离子和中性物质的系统的分类很复杂,主要归因于当前定义的限制。因此,本文提供的组合物、离子液体和DES的定义和描述用于控制如何将术语应用于本领域的其它地方。

[0595] 之前用于解构这些相互作用的方法关注完全亲水的DES(例如原型氯化胆碱/尿素^{4,5,10,15,17,19,20})或完全疏水的类似物(例如衍生自长链脂肪酸盐和长链脂肪酸的类似物¹⁸)。两亲性深共熔溶剂和离子液体^{3,21}开辟了新的机会。

[0596] 本文描述的是水合诱导的和组分依赖性的CAGE的纳米结构重构的研究。

[0597] 使用广角X射线散射(WAXS)、荧光光谱法和冷冻透射电子显微镜,系统地探索了由于增加水合和改变前体的摩尔比而引起的纳米结构转变。水在化学和生化过程中的普遍性决定了选择水合作为用于对这些转变进行研究的模型触发物。本文描述的是纳米级形态和流变学中值得注意的水合诱导和组分依赖性的转变,其为CAGE开辟了新的应用。

[0598] 结果与讨论

[0599] 本文描述的是CAGE-x:y的简便合成路线;x和y分别为胆碱和香叶酸的摩尔当量。该合成涉及将亲水性胆碱碳酸氢盐与各种摩尔当量的疏水性香叶酸混合。改变香叶酸的浓度允许解构CAGE纳米结构中的氢键相互作用、范德华力和疏水性的作用。香叶酸中的羧酸官能团因其氢键键合特性而出名,而烯基尾部为疏水性的并参与范德华相互作用。另一方面,避免了CAGE变体具有高于香叶酸的胆碱的摩尔当量,因为这种设计将包含碳酸氢盐(一种可能干扰纳米结构的化学物质),从而阻碍这项研究的目标。总体而言,本文提供的策略使得方便地研究水合如何破坏CAGE中的分子和离子簇,从而在纳米水平诱导结构转变。

[0600] 使用纯CAGE的广角X射线散射图评估水合CAGE的纳米级组织(图26)。所有纯CAGE在 $q=0.22-0.28\text{\AA}^{-1}$ 和 $q=1.43\text{\AA}^{-1}$ 处均表现出两个突出的散射峰,其中低 q 峰对一般酸浓度敏感(图26)。衍生自离散的阳离子和阴离子的常规离子液体的X射线散射曲线通常特征在于三个峰,包括归因于极性和非极性结构域交替对称的低的 q “前峰”,可归因于交替的阳离子和阴离子的中等的 q “电荷”峰,以及由于相邻原子的分子间和分子内堆积而产生的高的 q “邻接”峰²⁶⁻³⁰。根据离子液体上的结构和官能团,前峰、电荷峰或两者可能会从散射图谱中缺失^{5,28,39,31,32}。分别将低 q 峰指定为 $0.22-0.28\text{\AA}^{-1}$,并将 1.43\AA^{-1} 处的高的 q 峰指定作为前峰和邻接峰。散射信号中缺少电荷峰,可能是由于电荷峰²⁸的子峰的峰和反峰的抵消,或者是因为缺少交替的离散阳离子和阴离子。

[0601] 根据布拉格定律: $d=2\pi/q$ 计算,随着香叶酸的摩尔当量从1增加到4,极性和非极性结构域之间的相关距离(d)从 27.3\AA 减小到 22.7\AA (图26)。这是反常的,因为期望增加香叶酸含量会增加极性和非极性域之间的距离。解释这种异常行为可能很复杂,但可根据范德华力对高浓度香叶酸的极性羧基头部上的非极性烯基尾部和氢键相互作用的增加来对其进行合理解释。不希望受到理论的束缚,有吸引力的分子间相互作用中的一个或两个可引起CAGE形貌(landscape)中的分子簇和离子簇的紧密堆积,从而减小 d 。考虑到先前报道 d 随着普通离子液体的非极性烃片段的增加而增加,特别是当该片段在Brønsted碱或阳离子上时,所观察到的相关性是奇特的^{26,29,30}。

[0602] 图27A-图27D描述了WAXS数据,其表明增加水合度降低了极性和非极性结构域之

间的相关距离。如前峰的消失所证明的,由于CAGE浓度降至25%w/w(换句话说,水合度为75%)时的交替的极性结构域和非极性结构域,所有CAGE变体失去了对称性(图27A-27D)。该数据暗示了从纯CAGE的原始分子和离子簇转变为水的液体结构,并且重要的是,在分子间和分子内水平,CAGE的纳米结构发生了重组。不希望受到理论的束缚,在考虑之列的是水合诱导的现象影响极性和非极性结构域以及原子的邻接,触发这种纳米结构的转变,如在前峰和邻接峰的强度和位置的变化中所反映的(图27A-图27D)。这些峰的强度和位置的同时移动是特有的,因为增加水合作用只降低了前峰的强度,而对前峰的位置或邻接峰的强度的影响可忽略不计^{5,32}。其他人报道了^{27,33}打破交替的极性和非极性结构域的方案会破坏对称性,并最终导致前峰的完全消失。在考虑之列的是水与香叶酸的羧基头部的强的氢键键合能力会压倒并破坏有吸引力的范德华力,在低的水合度(<50% H_2O ,w/w)下分离非极性烯基尾巴,从而增加d,并且出于热力学原因,在高的水合度(>75% H_2O ,w/w)下将原始的纳米结构重新排列为不同的形态,直到反映为前峰的对称性消失为止。

[0603] 随着疏水性香叶酸与亲水性胆碱的摩尔比从1增加到4,极性和非极性结构域之间的距离变得对水合作用的响应更加积极。例如,在从纯DES变为50% CAGE-水混合物时,CAGE-1:1、CAGE-1:2、CAGE-1:3和CAGE-1:4中的极性和非极性结构域之间的距离分别增加11%、37%、86%和88%。相反,对应于邻接峰的原子之间的分子内和分子间距离变得对水合作用的响应更加迟钝,如CAGE-1:1和CAGE-1:3所示,其分别降低了14%和5%。结果表明,向CAGE添加水会分离极性和非极性结构域,尤其是当疏水性组分与亲水性组分的摩尔比较高至如CAGE-1:4时,而当比例较低至如CAGE-1:1时会使结构域聚集。

[0604] CAGE-1:1和CAGE-1:2中的纳米结构转变定性地不同于CAGE-1:3和CAGE-1:4中的纳米结构转变,并因此突出了香叶酸对CAGE的纳米结构的强烈贡献。尽管纯的和与水合的CAGE-1:1和CAGE-1:2表现出宽的前峰并且缺乏电荷峰,水合的CAGE-1:3和CAGE-1:4特征在于尖锐的多重散射前峰和电荷峰(图27A-图27D,75%w/w和50%w/w)。在这些水合的CAGE-1:3和CAGE-1:4中,从宽峰到尖峰的转变表明交替的极性和非极性结构域重组为更好的有序的纳米结构,这可能是由于存在氢键水分子时的分子间力的更好的排列。这种重新排列可影响其它宏观特性,例如本研究中发现的粘度(图28)。50%水合的CAGE-1:1和CAGE-1:2的近零剪切粘度低于其纯的类似物,而50%水合的CAGE-1:3和CAGE-1:4的近零剪切粘度高于其纯的类似物(图28)。与其更低粘性的纯的类似物和50%水合的CAGE-1:2相比,目视检查50%水合的CAGE-1:4-水混合物表现出凝胶样的行为(图28)。通过CAGE-1:4示出的更高变体的溶胶-凝胶转变对药物输送提供了新的可能性。

[0605] 流变学数据表明,在长达24小时稳定的凝胶表现出非牛顿行为,这与亲本CAGE的牛顿性质形成对比(图29A)。当施加增加的剪切速率时,凝胶的粘度明显降低(图29B),这显然是由于互连的氢键网络的破裂。有趣的是,在去除剪切力后,粘度在有限的时间内恢复到正常,这显示出重建破裂的网状结构很快,并表明在所检查的剪切速率内的剪切稀化行为³⁴。

[0606] 所有CAGE在高的水合度(>75% H_2O ,w/w)下经历自组装(图30A-图30D)。基于这些CAGE变体的固有的两亲性,预期到伴随着增加的水合作用的自组装。含芘的DES-水混合物(>60% H_2O ,w/w)的稳态荧光光谱研究通过揭示出临界胶束浓度(CMC)而提供了自组装的概貌(图30A-图30D)。芘发射中的第一(I1)与第三(I3)振动带之比与浓度的图表的斜率的显

著变化对应于两亲物的CMC。典型地,该图表显示出S形曲线,其中急剧升降的斜率对应于两亲物自组装成具有疏水性核心的良好定义的纳米结构,在其中芘优先隔开。图30A-图30D示出了CMC,并且揭示了CAGE变体的自组装过程中的质量差异。具有较高的香叶酸含量(CAGE-1:3和CAGE-1:4)的组合物表现出最低的CMC(2.5% CAGE, w/w)。定性地,CAGE-1:1和CAGE-1:2中的自组装过程与CAGE-1:3和CAGE-1:4中的自组装过程不同。前一组特征在于在所研究的浓度范围内仅具有一个明显的斜坡,而后者则表现出两个斜坡,并因此具有两个CMC。多个斜坡归因于在水性介质中的CAGE的纳米结构的转变。

[0607] 为了证实该假设,使用冷冻透射电子显微镜来目测检查对应于不同的CMC的5%w/w和20%w/w浓度的CAGE-水混合物中的纳米结构的形态。5%w/w的CAGE-1:2-水混合物、CAGE-1:3-水混合物或CAGE-1:4-水混合物形成了水包油(o/w)微乳液(可能是富含香叶酸的油相分散在水性相中),然后其随着混合物中的CAGE的浓度增加到20%而转变为不同的形态(图31A-图31F)。显然,随着CAGE浓度从5%增加到20%,CAGE-1:2从特征性的o/w微乳液微形态³⁵转变为胶束中典型的纳米结构^{36,37},而CAGE-1:3和CAGE-1:4重构成囊泡(图31A-图31F)。

[0608] 纳米结构的转变是不寻常的,因为很少有离子液体表现出这种行为³⁸,这对于一些非离子表面活性剂/助表面活性剂的o/w乳液是常见的^{39,40}。在后一体系中,假设根据水浓度,o/w液滴的纳米结构转变为层状结构,其剥落成囊泡^{39,40}。

[0609] CAGE的纳米结构及其以浓度和组成依赖的方式进行的转变具有多个基本的和实际的意义。从根本上来说,这些研究为纳米级水平的CAGE的行为提供了新的见解。自组装对于材料科学中的许多性质至关重要,因为自组装驱动子组件重组为不同形态的纳米结构(例如薄片和囊泡)。在许多化学和生物化学领域中对两亲性CAGE的新兴探索产生了解由水(最普遍存在的氢供体)诱导的分子重组的需求。这种纳米结构的重组对于衍生自离散阳离子和阴离子的常规两亲性离子液体而言被很好地表征^{26,41-57},但对于新兴的两亲性CAGE而言尚不清楚。

[0610] 了解CAGE-水相互作用对于开发进一步的应用也很重要。尽管皮肤环境相当干燥,并且不太可能显著改变CAGE的水合水平,但肠道环境却是高度水合的,并迅速将CAGE暴露至高度水合。因此,了解水合对CAGE性质的影响对于理解这些应用中的药物转运以及开发其进一步的生物学应用很重要。

[0611] 讨论

[0612] 本文描述的是组分的摩尔比和水合程度对CAGE的纳米结构至关重要。例如,在5%w/w时,CAGE-1:4(95%水合)形成了o/w微乳液,而20%w/w(80%水合)则自组装为囊泡。20%w/w的CAGE-1:4或CAGE-1:3的囊泡纳米结构与20%w/w的CAGE-1:2的胶束纳米结构不同。数据表明,水合程度的增加破坏了天然分子和离子簇,导致纳米级重组,影响了极性和非极性结构域、原子的邻接以及分子内和分子间的相互作用。根据前体的摩尔比,伴随着高的水合程度(>75% H₂O),CAGE的纳米结构自组装为囊泡、球状胶束和o/w微乳液。在亲水组分与疏水组分的低的摩尔比的情况下(例如在CAGE-1:4中),由于氢键相互作用的影响增加,水的存在(例如50%水合)诱导了溶胶-凝胶转变。数据揭示了用于调节CAGE的纳米结构并针对特定应用对其进行定制的新参数。

[0613] 实验方法

[0614] 材料。胆碱碳酸氢盐 (80%, 处于H₂O中)、香叶酸 (85%, 工业级) 和芘 (99%, 荧光级) 获得自Sigma Aldrich。如前所述, 使用供应商提供的胆碱碳酸氢盐和芘, 并通过从冷的 (-70°C) 香叶酸-丙酮溶液 (70%, v/v) 中重结晶 (5×) 来纯化香叶酸。

[0615] CAGE的制备。使用先前描述的方案制备CAGE。简而言之, 将适当摩尔当量的胆碱碳酸氢盐和重结晶的香叶酸混合并在室温下搅拌直至停止放出CO₂。例如, 为了获得CAGE-1: 2, 将一摩尔当量的胆碱碳酸氢盐与两摩尔当量的香叶酸混合。首先通过在60°C旋转蒸发20分钟, 然后在40°C的真空烘箱中48小时以除去水 (反应副产物)。较长的干燥时间足以将纯CAGE变体的水含量降低到可忽略的量。通过将适量的双去离子水添加到CAGE中并涡旋30秒以获得一致的混合物来制备水合CAGE。

[0616] 广角X射线散射实验。将使用与钨交错抛物线多层光学器和Dectris Pilatus 300K检测器耦合的Rigaku 002微焦点X射线源的SAXSLAB仪器用于获取CAGE的WAXS数据。将含有不同百分比的水 (0%、25%、50% 和 75% H₂O, w/w) 的水合CAGE装载入1.5mm毛细管中, 用环氧树脂密封以防止水吸收或蒸发, 然后引入大的真空室中抽真空至0.08mbar。在实验使用的X射线波长为0.154nm, 并且山嵛酸银校准的样品到检测器的距离为109.1mm。所有WAXS实验均在室温下进行。用SAXSGUI v2.15.01软件处理后, 从样品的散射曲线中减去水填充的毛细管的贡献。

[0617] 流变实验。CAGE的流变特性在装备有平行的板几何形状 (直径: 50mm) 的TA ARES G2应变控制的流变仪上测量。在纯水合的CAGE (0%、25% 和 50% H₂O, w/w) 上进行了流动扫描和流动温度斜坡流变实验。将粘度数据相对于剪切速率和应力作图, 以获得CAGE的剪切稀化和牛顿行为。

[0618] 临界胶束浓度测定。用芘探针的荧光光谱在Horiba Fluorolog-3荧光计上进行, 用于确定水合CAGE的临界胶束浓度 (CMC)。将CAGE变体与适量的双蒸水混合, 以获得掺杂有芘 (浓度为 1×10^{-6} M) 的CAGE-H₂O混合物 (20.0%、10.0%、5.00%、2.50% 和 1.25% CAGE, w/w)。在荧光实验中, 芘在334nm处激发, 在340-550nm之间扫描发射, 并记录了在373nm处的第一个 (I1) 和在384nm处的第三个 (I3) 振动带。将对应于I1/I3相对于CAGE浓度的曲线斜率的最大变化的浓度作为CMC。

[0619] 冷冻透射电子显微镜成像。对于冷冻TEM成像, 我们在-80°C下在Holey Carbon网格上快速冷冻了乙烷中的水合CAGE变体 (80% 和 95% H₂O, w/w), 并使用JEOL 2100 TEM或FEI Tecnai Artica CryoTEM在液氮温度下对样品成像。

[0620] 参考文献

[0621] 1. Wagle, D.V., Zhao, H., and Baker, G.A. Deep eutectic solvents: sustainable media for nanoscale and functional materials. *Acc. Chem. Res.* 47, 2299-2308 (2014).

[0622] 2. Smith, E.L., Abbott, A.P., and Ryder, K.S. Deep eutectic solvents (DESs) and their applications. *Chem. Rev.* 114, 11060-11082 (2014).

[0623] 3. McDonald, S., Murphy, T., Imberti, S., Warr, G.G., and Atkin, R. Amphiphilically nanostructured deep eutectic solvents. *J. Phys. Chem. Lett.* 9, 3922-3927 (2018).

[0624] 4. Hammond, O.S., Bowron, D.T., and Edler, K.J. Liquid structure of the choline chloride-urea deep eutectic solvent (reline) from neutron diffraction

and atomistic modelling. *Green Chem.* 18, 2736–2744 (2016) .

[0625] 5. Hammond, O. S., Bowron, D. T., and Edler, K. J. The effect of water upon deep eutectic solvent nanostructure: An unusual transition from ionic mixture to aqueous solution. *Angew. Chem. Int. Ed.* 56, 9782–9785 (2017) .

[0626] 6. Hammond, O. S., Bowron, D. T., Jackson, A. J., Arnold, T., Sanchez-Fernandez, A., Tsapatsaris, N., Sakai, V. G., and Edler, K. J. Resilience of malic acid natural deep eutectic solvent nanostructure to solidification and hydration. *J. Phys. Chem. B* 121, 7473–7483 (2017) .

[0627] 7. Valvi, A., Dutta, J. and Tiwari, S. Temperature-dependent empirical parameters for polarity in choline chloride based deep eutectic solvents. *J. Phys. Chem. B* 121, 11356–11366 (2017) .

[0628] 8. Sanchez-Fernandez, A., Hammond, O. S., Jackson, A. J., Arnold, T., Douth, J., and Edler, K. J. Surfactant-solvent interaction effects on the micellization of cationic surfactants in a carboxylic acid-based deep eutectic solvent. *Langmuir* 33, 14304–14314 (2017) .

[0629] 9. Passos, H., Tavares, D. J. P., Ferreira, A. M., Freire, M. G., and Coutinho, J. A. P. Are aqueous biphasic systems composed of deep eutectic solvents ternary or quaternary systems? *ACS Sustainable Chem. Eng.* 4, 2881–2886 (2016) .

[0630] 10. Pal, M., Rai, R., Yadav, A., Khanna, R., Baker, G. A., and Pandey, S. Self-aggregation of sodium dodecyl sulfate within (choline chloride plus urea) deep eutectic solvent. *Langmuir* 30, 13191–13198 (2014) .

[0631] 11. Bryant, S. J., Atkin, R., and Warr, G. G. Effect of deep eutectic solvent nanostructure on phospholipid bilayer phases. *Langmuir* 33, 6878–6884 (2017) .

[0632] 12. Florindo, C., Oliveira, F. S., Rebelo, L. P. N., Fernandes, A. M., and Marrucho, I. M. Insights into the synthesis and properties of deep eutectic solvents based on cholinium chloride and carboxylic acids. *ACS Sustainable Chem. Eng.* 2, 2416–2425 (2014) .

[0633] 13. Stefanovic, R., Ludwig, M., Webber, G. B., Atkin, R., and Page, A. J. Nanostructure, hydrogen bonding and rheology in choline chloride deep eutectic solvents as a function of the hydrogen bond donor. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 19, 3297–3306 (2017) .

[0634] 14. Griffin, P. J., Cosby, I., Holt, A. P., Benson, R. S., and Sangoro, J. R. Charge transport and structural dynamics in carboxylic-acid-based deep eutectic mixtures. *J. Phys. Chem. B* 118, 9378–9385 (2014) .

[0635] 15. Rumyantsev, M., Rumyantsev, S., and Kalagaev, I. Y. Effect of water on the activation thermodynamics of deep eutectic solvents based on carboxybetaine and choline. *J. Phys. Chem. B* 122, 5951–5960 (2018) .

[0636] 16. Kaur, S., and Kashyap, H. K. Unusual temperature dependence of nanoscale structural organization in deep eutectic solvents. *J. Phys. Chem. B*

122,5242–5250 (2018) .

[0637] 17.Kaur,S.,Gupta,A.,and Kashyap,H.K.Nanoscale spatial heterogeneity in deep eutectic solvents.J.Phys.Chem.B 120,6712–6720 (2016) .

[0638] 18.Florindo,C.,Celia-Silva,L.G.,Martins,L.F.G.,Branco,L.C.,and Marucho,I.M.Supramolecular hydrogel based on a sodium deep eutectic solvent.Chem.Commun.54,7527–7530 (2018) .

[0639] 19.Meng,X.,Ballerat-Busserolles,K.,Husson,P.,and Andanson,J.-M.Impact of water on the melting temperature of urea plus choline chloride deep eutectic solvent.New J.Chem.40,4492–4499 (2016) .

[0640] 20.Sanchez-Fernandez,A.,Edler,K.J.,Arnold,T.,Heenan,R.K.,Porcar,L.,Terrill,N.J.Terry,A.E.,and Jackson,A.J.Micelle structure in a deep eutectic solvent:a small-angle scattering study.Phys.Chem.Chem.Phys.18,14063–14073 (2016) .

[0641] 21.Banerjee,A.,Ibsen,K.,Iwao,Y.,Zakrewsky,M.,and Mitragotri,S.Transdermal protein delivery using choline and geranate(CAGE) deep eutectic solvent.Adv.Healthc.Mater.6,1601411 (2017) .

[0642] 22.Banerjee,A.,Ibsen,K.N.,Brown,T.,Chen,R.,Agatemor,C.,and Mitragotri,S.Ionic liquids for oral insulin delivery.Proc.Natl Acad.Sci.USA 201722338 (2018) .

[0643] 23.Ibsen,K.N.,Banerjee,A.,Tanner,E.E.L.,Nangia,S.,and Mitragotri,S.Mechanism of antibacterial activity of choline-based ionic liquids(CAGE) .ACS Biomater.Sci.Eng.Article ASAP (2018) .

[0644] 24.Zakrewsky,M.,Banerjee,A.,Apte,S.,Kern,T.L.,Jones,M.R.,Del Sesto,R.E.,Koppisch,A.T.,Fox,D.I.,and Mitragotri,S.Choline and geranate deep eutectic solvent as a broad-spectrum antiseptic agent for preventive and therapeutic applications.Adv.Healthc.Mater.5,1282–1289 (2016) .

[0645] 25.Zakrewsky,M.,Lovejoy,K.S.,Kern,T.L.,Miller,T.E.,Le,V.,Nagy,A.,Goumas,A.M.,Iyer,R.S.,Del Sesto,R.E.,Koppisch,A.T.,Fox,D.J.,and Mitragotri,S.Ionic liquids as a class of materials for transdermal delivery and pathogen neutralization.Proc.Natl.Acad.Sci.USA.111,13313–13318 (2014) .

[0646] 26.Greaves,T.L.,Kennedy,D.F.,Mudie,S.T.,and Drummond,C.J.Diversity observed in the nanostructure of protic ionic liquids.J.Phys.Chem.B 114, 10022–10031 (2010) .

[0647] 27.Araque,J.C.,Hettige,J.J.,and Margulis,C.J.Modern room temperature ionic liquids,a simple guide to understanding their structure and how it may relate to dynamics.J.Phys.Chem.B 119,12727–12740 (2015) .

[0648] 28.Hettige,J.J.,Kashyap,H.K.,Annapureddy,H.V.,and Margulis,C.J.Anions,the reporters of structure in ionic liquids.J.Phys.Chem.Lett.4, 105–110 (2013) .

- [0649] 29. Rauber, D., Zhang, P., Huch, V., Kraus, T., and Hempehnann, R. Lamellar structures in fluorinated phosphonium ionic liquids: the roles of fluorination and chain length. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 19, 27251–27258 (2017).
- [0650] 30. Port, T., and Méléard, P. New insight into the nanostructure of ionic liquids: a small angle X-ray scattering (SAXS) study on liquid tri-alkyl-methyl-ammonium bis(trifluoromethanesulfonyl) amides and their mixtures. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 11, 5469–5475 (2009).
- [0651] 31. Shen, Y., Kennedy, D. F., Greaves, T. L., Weerawardena, A., Mulder, R. J., Kirby, N., Song, G., and Drummond, C. J. Protic ionic liquids with fluorous anions: physicochemical properties and self-assembly nanostructure. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 14, 7981–7992 (2012).
- [0652] 32. Greaves, T. L., Kennedy, D. F., Weerawardena, A., Tse, N. M. K., Kirby, N., and Drummond, C. J. Nanostructured protic ionic liquids retain nanoscale features in aqueous solution while precursor **Brønsted** acids and bases exhibit different behavior. *J. Phys. Chem. B* 115, 2055–2066 (2011).
- [0653] 33. Kashyap, H. K., Santos, C. S., Daly, R. P., Hettige, J. J., Murthy N. S., Shirota, H., Castner, E. W., and Margulis, C. J. How Does the Ionic Liquid Organizational Landscape Change when Nonpolar Cationic Alkyl Groups Are Replaced by Polar Isoelectronic Diethers? *J. Phys. Chem. B* 117, 1130–1135 (2013).
- [0654] 34. Maestro, A., Gonzalez, C., and Gutierrez, J. M. Shear thinning and thixotropy of HMHEC and HEC water solutions. *J. Rheol.* 46, 1445–1457 (2002).
- [0655] 35. Kuntsche, J., Horst, J. C., and Bunjes, H. Cryogenic transmission electron microscopy (cryo-TEM) for studying the morphology of colloidal drug delivery systems. *Int. J. Pharm.* 417, 120–137 (2011).
- [0656] 36. Ruthstein, S., Schmidt, J., Kesselman, E., Talmon, Y., and Goldfarb, D. Resolving intermediate solution structures during the formation of mesoporous SBA-15. *J. Am. Chem. Soc.* 128, 3366–3374 (2006).
- [0657] 37. Patchornik, G., Wachtel, E., Kesselman, E., Danino, D. Cryo-TEM structural analysis of conjugated nonionic engineering-micelles, *Soft Matter*, 10, 4922–4928 (2014).
- [0658] 38. Wang, H., Zhang, L., Wang, J., Li, Z., and Zhang, S. The first evidence for unilamellar vesicle formation of ionic liquids in aqueous solutions. *Chem. Commun.* 49, 5222–5224 (2013).
- [0659] 39. Lee, H. S., Morrison, E. D., Frethem, C. D., Zasadzinski, J. A., and McCormick, A. V. Cryogenic electron microscopy study of nanoemulsion formation from microemulsions. *Langmuir* 30, 10826–10833 (2014).
- [0660] 40. Fernandez, P., Andre, V., Rieger, J., and Kuhnle, A. Nano-emulsion formation by emulsion phase inversion. *Colloid Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 251, 53–58 (2004).

- [0661] 41.Celso,F.L.,Yoshida,Y.,Lombardo,R.,Jafta,C.,Gontrani,L.,Triolo,A.,Russina,O.Mesoscopic structural organization in fluorinated room temperature ionic liquids.C.R.Chimie in press(2018) .
- [0662] 42.Russina,O.,Celso,F.L.,Plechko, N.V.,and Triolo,A.Emerging evidences of mesoscopic-scale complexity in neat ionic liquids and their mixtures.J.Phys.Chem.Lett.8,1197-1204(2017) .
- [0663] 43.Russina,O.,Triolo,A.,Gontrani,L.,Caminiti,R.,Xiao,D.,Hines Jr, Bartsch,R.A.,Quitevis,E.L.,Plechko, N.,and Seddon,K.R.Morphology and intermolecular dynamics of 1-alkyl-3-methylimidazolium bis{(trifluoromethane)sulfonyl}amide ionic liquids:structural and dynamic evidence of nanoscale segregation.J.Phys.Condens.Matter 21,424121(2009) .
- [0664] 44.Russina,O.,Triolo,A.,Gontrani,L.,and Caminiti,R.Mesoscopic structural heterogeneities in room-temperature ionic liquids.J.Phys.Chem.Lett.3,27-33(2012) .
- [0665] 45.Triolo,A.,Russina,O.,Bleif,H.-J.,and Di Cola,E.Nanoscale segregation in room temperature ionic liquids.J.Phys.Chem.B 111,4641-4644(2007) .
- [0666] 46.Triolo,A.,Russina,O.,Fazio,B.,Triolo,R.,and Di Cola,E.Morphology of 1-alkyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate room temperature ionic liquids.Chem.Phys.Lett.457,362-365(2008) .
- [0667] 47.Triolo,A.,Russina,O.,Fazio,B.,Appetecchi,G.B.,Cerewska,M.,Passerini,S.Nanoscale organization in piperidinium-based room temperature ionic liquids.J.Chem.Phys.130,164521(2009) .
- [0668] 48.Annapureddy,H.V.R.,Kashyap,H.K.,De Biase,P.M.,and Margulis,C.J.What is the origin of the prepeak in the X-ray scattering of imidazolium-based room-temperature ionic liquids?J.Phys.Chem.B 114,16838-16846(2010) .
- [0669] 49.Li,H.,Endres,F.,and Atkin,R.Effect of alkyl chain length and anion species on the interfacial nanostructure of ionic liquids at the Au(111)-ionic liquid interface as a function of potential.Phys.Chem.Chem.Phys.15,14624-14633(2013) .
- [0670] 50.Atkin,R.,and Warr,G.G.The smallest amphiphiles:Nanostructure in protic room-temperature ionic liquids with short alkyl groups.J.Phys.Chem.B 112,4164-4166(2008) .
- [0671] 51.Hayes,R.,Warr,G.G.,and Atkin,R.At the interface:solvation and designing ionic liquids.Phys.Chem.Chem.Phys.12,1709-1723(2010) .
- [0672] 52.Jiang,H.J.,Atkin,R.,and Warr,G.G.Nanostructured Ionic Liquids and Their Solutions:Recent Advances and Emerging Challenges.Curr.Opin.Green Sustainable Chem.12,27-32(2018) .
- [0673] 53.Hayes,R.,Warr,G.G.,and Atkin,R.Structure and nanostructure in

ionic liquids. Chem. Rev. 115, 6357–6426 (2015).

[0674] 54. Agatemor, C., Ibsen, K. N., Tanner, E. E., and Mitragotri, S. Ionic liquids for addressing unmet needs in healthcare. Bioeng. Transl. Med. 3, 7–25 (2018).

[0675] 55. Hayes, R., Imberti, S., Warr, G. G., and Atkin, R. Amphiphilicity determines nanostructure in protic ionic liquids. Phys. Chem. Chem. Phys. 13, 3237–3247 (2011).

[0676] 56. Jungnickel, C., Luczak, J., Ranke, J., Fernández, J. F., Muller, and Thöming, J. Micelle formation of imidazolium ionic liquids in aqueous solution. Colloids Surf A Physicochem. Eng. Asp. 316, 278–284 (2008).

[0677] 57. Blesic, M., Marques, M. H., Plechkova, N. V., Seddon, K. R., Rebelo, L. P. N., and Lopes, A. Self-aggregation of ionic liquids: micelle formation in aqueous solution. Green Chemistry 9, 481–490 (2007).

[0678] 实施例7

[0679] 非糖尿病雄性Wistar大鼠中的索马鲁肽研究

[0680] 将总体积为250μL的0.12mg/kg (30nmol/kg) 的索马鲁肽SC注射入有意识的动物。4小时后, 测量BG。在0分钟、30分钟、60分钟、120分钟和240分钟时收集血清以测量索马鲁肽的浓度(图32)。

[0681] 在整个实验过程中, 在麻醉下, 通过腹部手术空肠内注射处于100μL总体积的CAGE中的1.2mg/kg (10×SC剂量) 的索马鲁肽。4小时后, 测量BG。在0分钟、30分钟、60分钟、120分钟和240分钟时收集血清以测量索马鲁肽的浓度(图32)。

[0682] 通过竞争性EIA测定血清索马鲁肽浓度 (ng/mL), 并且在空肠内给予CAGE后在血液中检测到显著的索马鲁肽。

[0683] 实施例8

[0684] 结果

[0685] 在体外研究了CAGE与Caco-2单层的相互作用。荧光黄的转运表现出了CAGE浓度依赖性的增强(图33)。

[0686] 此后评估了在CAGE的存在下香豆素-6 (被动转胞吞作用的荧光标记) 的跨细胞渗透性。出乎意料的是, 即使在低浓度下, CAGE也会降低香豆素-6的跨细胞摄取(图34)。

[0687] 结果

[0688] CAGE介导的跨肠细胞的药物转运主要是细胞旁的。分子跨肠上皮的转运可为细胞旁或跨细胞的。为了评价CAGE增强药物跨Caco-2单层转运的机制, 在不同浓度CAGE的存在下, 使用其特定的转运标记物研究了细胞旁和被动跨细胞转运。为此, 评估了荧光黄的转运。在10mM–50mM的CAGE存在下, 荧光黄的转运在所有时间点均得到显著增强(图33)。在最低的10mM的CAGE浓度下, 转运增强约2倍。

[0689] 与单独的标记物相比, 使用50mM的CAGE, 荧光黄的转运在各个时间点显著增强7–10倍。另一方面, 在25mM和50mM CAGE的存在下, 大小与胰岛素相似的4kDa的FITC-右旋糖酐的转运在各个时间点也分别显著增强2–6倍和6–13倍(图33)。

[0690] 在探索了细胞旁途径之后, 使用香豆素-6 (用于被动跨细胞转运的荧光标记) 评价在CAGE存在下分子跨越肠细胞的跨细胞转运。在10mM–50mM CAGE存在下, 香豆素-6的胞吞

转运作用在所有时间点均显著降低,表明CAGE并不会主要协助药物的被动胞吞转运作用(图34)。在CAGE存在下减轻了香豆素-6的胞吞作用,意味着减低的细胞膜扰动(如果有),并因此更好的CAGE与肠细胞的生物相容性。

[0691] 方法

[0692] 96孔板和transwell中的Caco-2单层培养。对于transwell中的转运实验,使用了3天快速Caco-2生长系统。将细胞置于补充有MITO+血清增量剂的Corning®基础接种培养基(BSM)中,并以400,000个细胞/mL的密度接种在置于24孔板内的Millicell®PCF插入物上。根据制造商的建议,将500μL含培养基的细胞置于顶端侧,同时将1000μL无细胞的BSM置于基底侧。在37℃、5%CO₂下孵育24小时后,将培养基替换为补充有MITO+血清增量剂的相同体积的肠上皮细胞分化培养基,持续另外的2-4天。

[0693] 在体外的荧光黄和香豆素-6转运测定。在实验开始之前,将transwell中的培养基在顶端侧(200μL)和基底侧(600μL)替换为不含酚红、FBS和P/S的DMEM,并将细胞孵育30分钟。此后,将顶端侧中的培养基替换为处于DMSO中的200μL的500μg/mL的荧光黄(LY)或5μg/mL的香豆素-6(终浓度为10%),其用或不用10mM、25mM和50mM的CAGE制备并溶于无酚红、FBS和P/S的DMEM中。在将测试物品添加到顶端侧后,立即从基底侧取出100μL试样并用等体积的新鲜DMEM代替。在1小时、2小时、3小时、4小时和5小时对此重复。在研究过程中,将transwell板置于处于以100rpm旋转的摇床上的37℃、5%CO₂的培养箱内,并仅在每个时间点取出以移出试样。在5小时的研究结束后,使用酶标仪(BioTek Synergy NEO HTS™酶标仪,Winooski,VT,USA)分别在485/530nm、495/520nm和468/568nm激发/发射波长处测定具有不同LY和香豆素-6浓度的试样中的荧光。制备每种测试物的校准溶液,并使用LY和香豆素-6的荧光读数进行分析,该荧光读数用于绘制基底侧小室浓度vs时间的图。

[0694] 材料。香叶酸、胆碱碳酸氢盐、二甲基亚砜(DMSO)、FITC-胰岛素、FITC-右旋糖酐、癸酸钠(纯度为98%)、粘蛋白、香豆素-6和人胰岛素购自Sigma-Aldrich(St.Louis,MO,USA),同时,牛胰蛋白酶获得自MP Biomedicals(Santa Ana,CA,USA)。Caco-2人结直肠腺癌细胞购自美国典型培养物保藏中心(Manassas,VA,USA),同时,具有或不具有酚红、胎牛血清(FBS)、青霉素/链霉素(P/S)溶液的Dulbecco改良的eagle培养基(DMEM)、Hank平衡盐溶液(HBSS)、Dulbecco磷酸盐缓冲盐水(DPBS)和0.25%的胰蛋白酶溶液购自ThermoFisher Scientific(Waltham,MA,USA)。包含基础接种培养基(BSM)、肠上皮细胞分化培养基(EDM)和MITO+血清增量剂的肠上皮生长培养基购自Corning(Corning,NY,USA)。Millicell®-PCF细胞培养插入物(孔径3.0μm,直径12mm)和TEER测量设备Millicell®-ERS获得自Millipore Sigma(Burlington,MA,USA),而TEER测量电极获得自World Precision Instruments,Inc(Sarasota,FL,USA)。多聚甲醛(16%w/v)和盐酸胃复安购自Alfa Aesar(Ward Hill,MA,USA),带有4',6-二脒基-2-苯基吡啶二盐酸盐(DAPI)的Vectashield Hardset™购自Vector laboratories Inc.(Burlingame,CA,USA)。3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)细胞毒性试剂盒和人胰岛素ELISA试剂盒获得自ThermoFisher Scientific(Waltham,MA,USA)。重200g-300g的雄性Wistar大鼠购自Charles River Laboratories(Wilmington,MA,USA),并且血糖测量仪(Aimstrip plus)及其试纸条购自Fisher Scientific(Pittsburgh,PA,USA)。胶囊的口服灌胃和加长的9号胶

囊获得自Torpac (Fairfield, MA, USA)。苏木精和伊红溶液购自Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)。荧光黄购自VWR (Radnor, PA, USA)。使用的所有其它试剂均为分析纯。

[0695] CAGE和胰岛素-CAGE的制备。根据我们先前的研究合成CAGE。简而言之,在500mL圆底烧瓶中,将两当量的纯的香叶酸(20g, 0.119mol)添加至一当量的胆碱碳酸氢盐(80wt%溶液, 12.275g, 0.059mol),所述香叶酸已在 -70°C 的丙酮中重结晶至少5次以去除杂质。将混合物在 40°C 下搅拌直至停止释放 CO_2 ,并通过在 60°C 下旋转蒸发2小时除去水,然后在真空烘箱中在 60°C 下干燥48小时。在 25°C 时的物理特性与先前的值显示出良好的吻合。NMR谱(使用500-MHz Varian instrument, Palo Alto, CA收集)也与以前的制备方法良好的吻合: ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$), δ 5.60 (s, 2H)、5.07 (t, $J=6.1$, 2H)、3.86 (t, $J=6.6$, 2H)、3.42 (t, $J=6.6$, 2H)、3.12 (s, 9H)、2.57 (m, 4H)、2.01 (m, 4H)、1.97 (s, 6H)、1.73 (s, 2H)、1.64 (s, 6H)和1.57 (s, 6H); ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$), δ 170.1、150.1、131.5、124.1、122.6、7.6、55.5、53.6、53.5、32.8、25.9和17.9。通过将预定量的胰岛素粉添加到特定体积的CAGE中,然后涡旋5分钟来制备胰岛素-CAGE。

[0696] 数据分析。所有数据均以平均值 \pm 标准误差(S.E.)表示。为了统计分析,使用学生T检验。在 $p<0.05$ 时认为是显著差异。所有实验以至少三重复进行。

[0697] 实施例9

[0698] CAGE对Caco-2细胞表现出浓度依赖性作用(图35)。CAGE还表现出浓度依赖性的胰岛素转运增强,其中对于50mM的CAGE而言增强 >10 倍(图36和图36)。增强机制可能由细胞旁途径介导。此外,4kDa的FITC-右旋糖酐(与胰岛素相当的大小)的转运也以浓度依赖的方式增加,增强达13倍(图38)。通过测定跨上皮电阻(TEER)来测量肠道紧密连接的完整性,从而证实了这一点。如前所述,当暴露于CAGE 5h时,观察到在TEER方面的浓度依赖性下降,后随着浓度依赖性恢复(图39)。用10mM的CAGE处理细胞在1小时和5小时导致TEER显著下降,而使用25mM和50mM CAGE处理会导致在所有时间点TEER显著下降(40%-50%),并在24小时内,TEER分别恢复到初始水平的90%和58%。供参考,还测量了暴露于公知的渗透促进剂药物癸酸钠后的TEER方面的下降。

[0699] 材料和方法

[0700] 材料。香叶酸、胆碱碳酸氢盐、二甲基亚砷(DMSO)、FITC-胰岛素、FITC-右旋糖酐、癸酸钠(纯度为98%)、粘蛋白和人胰岛素购自Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA),同时,牛胰蛋白酶获得自MP Biomedicals (Santa Ana, CA, USA)。Caco-2人结直肠腺癌细胞购自美国典型培养物保藏中心(Manassas, VA, USA),同时,具有或不具有酚红、胎牛血清(FBS)、青霉素/链霉素(P/S)溶液的Dulbecco改良的eagle培养基(DMEM)、Hank平衡盐溶液(HBSS)、Dulbecco磷酸盐缓冲盐水(DPBS)和0.25%的胰蛋白酶溶液购自ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA)。包含基础接种培养基(BSM)、肠上皮细胞分化培养基(EDM)和MITO+血清增量剂的肠上皮生长培养基购自Corning (Corning, NY, USA)。Millicell®-PCF细胞培养插入物(孔径 $3.0\mu\text{m}$,直径12mm)和TEER测量设备Millicell®-ERS获得自Millipore Sigma (Burlington, MA, USA),而TEER测量电极获得自World Precision Instruments, Inc (Sarasota, FL, USA)。多聚甲醛(16%w/v)和盐酸胃复安购自Alfa Aesar (Ward Hill, MA, USA),带有4',6-二脒基-2-苯基吡啶二盐酸盐(DAPI)的Vectashield Hardset™获得自Vector laboratories Inc. (Burlingame, CA, USA)。3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯

基四氮唑溴盐 (MTT) 细胞毒性试剂盒和人胰岛素ELISA试剂盒获得自ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA)。重200g-300g的雄性Wistar大鼠购自Charles River Laboratories (Wilmington, MA, USA), 并且血糖测量仪 (Aimstrip plus) 及其试纸条购自Fisher Scientific (Pittsburgh, PA, USA)。胶囊的口服灌胃和加长的9号胶囊获得自Torpac (Fairfield, MA, USA)。苏木精和伊红溶液购自Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)。使用的所有其它试剂均为分析纯。

[0701] CAGE和胰岛素-CAGE的制备。根据我们先前的研究合成CAGE (38)。简而言之, 在500mL圆底烧瓶中, 将两当量的纯的香叶酸 (20g, 0.119mol) 添加至一当量的胆碱碳酸氢盐 (80wt% 溶液, 12.275g, 0.059mol), 所述香叶酸已在 -70°C 的丙酮中重结晶至少5次以去除杂质。将混合物在 40°C 下搅拌直至停止释放 CO_2 , 并通过在 60°C 下旋转蒸发2小时除去水, 然后在真空烘箱中在 60°C 下干燥48小时。在 25°C 时的物理特性与先前的值显示出良好的吻合。NMR谱 (使用500-MHz Varian instrument, Palo Alto, CA收集) 也与以前的制备方法良好的吻合: ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$), δ 5.60 (s, 2H)、5.07 (t, $J=6.1$, 2H)、3.86 (t, $J=6.6$, 2H)、3.42 (t, $J=6.6$, 2H)、3.12 (s, 9H)、2.57 (m, 4H)、2.01 (m, 4H)、1.97 (s, 6H)、1.73 (s, 2H)、1.64 (s, 6H) 和1.57 (s, 6H); ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$), δ 170.1、150.1、131.5、124.1、122.6、67.6、55.5、53.6、53.5、32.8、25.9和17.9。通过将预定量的胰岛素粉添加到特定体积的CAGE中, 然后涡旋5分钟来制备胰岛素CAGE。

[0702] CAGE显著增强了胰岛素跨肠单层的转运。使用0mM、10mM、25mM和50mM的CAGE开展了异硫氰酸荧光素 (FITC)-胰岛素跨Caco-2单层的5小时长的转运实验。在整个研究过程中, 两组的FITC胰岛素转运均随时间稳定增加, 但与无CAGE对照细胞相比, 经50mM胰岛素CAGE处理的细胞从开始就表现出非常显著的更高的转运 (图36)。与未处理的细胞相比, 在用50mM的CAGE处理的单层中, 在所有时间点观察到的高 >10 倍的胰岛素转运。同时, 10mM和25mM CAGE将FITC-胰岛素的转运提高了1.5-2倍。

[0703] 在5h的研究结束时, 通过transwell膜的共聚焦图像证实了这些结果。图像清楚地显示出, 与对照细胞相比, 随着CAGE浓度的增加, Caco-2细胞对FITC胰岛素的摄取更高 (图36)。

[0704] CAGE介导的跨肠细胞的药物转运主要是细胞旁的。分子跨肠上皮的转运可为细胞旁或跨细胞的。为了评价CAGE增强药物跨Caco-2单层转运的机制, 在不同浓度CAGE存在下, 使用特定的转运标记物研究了细胞旁转运和被动跨细胞转运。为此, 评估了4kDa的FITC-右旋糖酐 (细胞旁转运的特定标记物) 的转运。

[0705] 在各个时间点, 在25mM和50mM的CAGE的存在下, 具有类似于胰岛素的大小的4kDa的FITC-右旋糖酐的转运也分别显著增强了2-6倍和6-13倍 (图38)。然而, 为证实CAGE是否改善了分子的细胞旁转运, 通过测量跨上皮电阻 (TEER) 并将其与已建立的渗透促进剂癸酸钠进行比较, 评估了用不同浓度的CAGE处理的Caco-2细胞的紧密连接完整性 (图39)。在对照细胞中, TEER在最初的3h内略微下降约10%, 此后在5h内恢复到其初始值, 并且直至在24小时的研究结束时未改变。然而, 当用10mM的CAGE处理时, TEER在1小时内下降29%, 并且在1小时和5小时显著不同于对照。发现该TEER下降是短暂的, 并且细胞在24小时内完全恢复了其紧密连接完整性。

[0706] 当用25mM (下降约40%) 和50mM的CAGE (下降约50%) 孵育时, 紧密连接完整性也显

著降低。然而,用25mM的CAGE观察到约为初始水平的90%的良好恢复。在50mM的CAGE中,TEER在24小时内略微恢复到初始水平的58%。另一方面,尽管由于癸酸钠引起的TEER下降与50mM的CAGE的下降相似,但是在24小时的研究结束时,该组中的紧密连接完整性进一步下降至初始水平的36%。由10mM-25mM的CAGE引起的TEER变化表明,在这些浓度下,CAGE暂时打开肠道紧密连接,帮助胰岛素跨细胞转运。随后还评价了CAGE介导的其它的口服吸收增强机制,例如粘液渗透和针对酶促降解的稳定性。

[0707] 在96孔板和transwell中的Caco-2单层培养。对于transwell中的转运实验,使用了3天快速Caco-2生长系统。将细胞置于补充有MITO+血清增量剂的Corning®基础接种培养基(BSM)中,并以400,000个细胞/mL的密度接种在置于24孔板内的Millicell®PCF插入物上。根据制造商的建议,将500μL含培养基的细胞置于顶端侧,同时将1000μL无细胞的BSM置于基底侧。在37℃、5%CO₂下孵育24小时后,将培养基替换为相同体积的补充有MITO+血清增量剂的肠上皮细胞分化培养基,再持续2-4天。定期测量TEER,并且当TEER达到高于200ohms·cm²时(表明细胞之间的足够的紧密连接完整性),进行转运研究。

[0708] 体外胰岛素转运测定。在开始实验之前,将transwell中现有的培养基在顶端侧(200μL)和基底侧(600μL)替换为不含酚红、胎牛血清(FBS)和青霉素/链霉素(P/S)的DMEM,并将细胞孵育30分钟。此后,将顶端侧的培养基替换为200μL的500μg/mL的FITC-胰岛素,所述FITC-胰岛素用或不用10mM、25mM或50mM的CAGE制备并溶于不含酚红、FBS和P/S的DMEM中。在顶端侧添加FITC-胰岛素后,立即从基底侧取出100μL试样,并用等体积的新鲜DMEM代替。在1小时、2小时、3小时、4小时和5小时对此重复。在研究过程中,将transwell板置于处于以100rpm旋转的摇床上的37℃、5%CO₂的培养箱内,并仅在上述时间段取出以移出试样。在5小时的研究结束后,使用酶标仪(Tecan, Infinite M1000, Männedorf, 瑞士)在495/520nm激发/发射波长下测量试样中的FITC-胰岛素的浓度,并绘制为FITC-胰岛素的转运% vs时间的图。此外,当从transwells中取出试样时,在每个时间点测量TEER,并绘制为基底侧小室浓度vs时间的图。

[0709] 为了定性分析Caco-2细胞对FITC-胰岛素的摄取,在研究结束时,将来自FITC-胰岛素转运研究的transwell用HBSS洗涤两次,然后加入100μL的4%多聚甲醛并保持在4℃下过夜。第二天,从孔中吸出多聚甲醛,将膜用PBS洗涤两次,并切下transwell膜并将其轻轻放在载玻片上。向膜中添加包含(4',6-二脒基-2-苯基吡啶二盐酸盐)DAPI的封片剂,并盖上盖玻片。使用Olympus Fluoview™1000光谱共聚焦仪以40倍的放大倍率对膜进行共聚焦成像。

[0710] 在体外的FITC-右旋糖酐转运测定。在实验开始之前,将transwell中的培养基在顶端侧(200μL)和基底侧(600μL)替换为不含酚红、FBS和P/S的DMEM,并将细胞孵育30分钟。此后,将顶端侧的培养基替换为200μL的处于DMSO中的500μg/mL的4kDa的FITC-右旋糖酐(终浓度10%),所述FITC-右旋糖酐用或不用10mM、25mM和50mM的CAGE制备,并溶于不含酚红、FBS和P/S的DMEM中。在将测试物添加到顶端侧后,立即从基底侧取出100μL试样,并用等体积的新鲜DMEM代替。在1小时、2小时、3小时、4小时和5小时对此重复。在研究过程中,将transwell板置于处于以100rpm旋转的摇床上的37℃、5%CO₂的培养箱内,并仅在每个时间点取出以移出试样。在5小时的研究结束后,使用酶标仪(BioTek Synergy NEO HTS™酶标

仪,Winooski,VT,USA) 分别在485/530nm、495/520nm和468/568nm激发/发射波长处测量具有不同FITC-右旋糖酐浓度的试样中的荧光。制备每种测试物的校准溶液,并使用FITC-右旋糖酐的荧光读数进行分析,其用于绘制基底侧小室浓度vs时间的图。

[0711] CAGE和癸酸钠对TEER值的影响。在实验开始之前,将transwell中现有的培养基在顶端侧(200 μ L)和基底侧(600 μ L)替换为不含酚红、FBS和P/S的DMEM,并将细胞孵育至少30分钟。记录每个插入物的TEER值。此后,将顶端侧的培养基替换为200 μ L的10mM、25mM和50mM的CAGE或10mM癸酸钠。在研究过程中,将transwell板置于处于以100rpm旋转的摇床上的37 $^{\circ}$ C、5%CO₂的培养箱中,并仅在1小时、2小时、3小时、4小时、5小时和24小时取出以进行额外的TEER测量。将TEER绘制为相对于初始值的变化%vs时间的图。

[0712] 实施例10

[0713] 与缓冲液对照相比,CAGE显著阻碍了胰岛素的胰蛋白酶消化(图40)。从1小时开始到24小时的研究结束时特别注意到这一点。在较早的时间段内针对酶促降解的保护对于允许完好胰岛素的最大程度口服吸收至关重要。

[0714] CAGE防止酶促降解,这可能是通过形成物理屏障并干预其蛋白水解活性来限制肠道酶对加载的胰岛素的接近。酶的活性也受到其周围环境的调节,并且分子动力学模拟研究显示出,IL可从酶的表面移除水至与极性有机溶剂(如乙腈)相同的程度。基于该信息和我们的机理研究,在本文考虑之列的是CAGE保护胰岛素免于酶促降解。

[0715] CAGE显著减弱了胰岛素的酶促降解。推测在体内用CAGE观察到的改善的胰岛素药代动力学/药效学可能是由于肠的蛋白水解环境中的CAGE中的改善的胰岛素的稳定性。为此,将CAGE中的胰岛素或缓冲液中的胰岛素与胰蛋白酶一起孵育24h,并在各个时间点确定溶液中余留的完好的胰岛素的百分比。结果表明,与缓冲液对照相比,CAGE从1小时开始非常显著地($p < 0.001$)阻止了胰岛素的蛋白水解降解(图40)。用CAGE孵育2小时后,胰岛素降解方面获得了29%的差异。在24小时的研究结束时,尽管缓冲液对照中的胰岛素几乎完全降解(只有 $5 \pm 0.4\%$ 完好),但CAGE中约有四分之一的胰岛素仍保持完好($24 \pm 0.2\%$)。该研究清楚地表明,CAGE为胰岛素提供了抵抗蛋白水解降解的显著稳定性,这可能在提高口服吸收后于肠道部位以及全身循环的药物的半衰期中发挥作用。

[0716] 材料和方法

[0717] 材料。香叶酸、胆碱碳酸氢盐、二甲基亚砜(DMSO)、FITC-胰岛素、FITC-右旋糖酐、癸酸钠(纯度为98%)、粘蛋白和人胰岛素购自Sigma-Aldrich(St.Louis,MO,USA),同时,牛胰蛋白酶获得自MP Biomedicals(Santa Ana,CA,USA)。Caco-2人结直肠腺癌细胞购自美国典型培养物保藏中心(Manassas,VA,USA),同时,具有或不具有酚红、胎牛血清(FBS)、青霉素/链霉素(P/S)溶液的Dulbecco改良的eagle培养基(DMEM)、Hank平衡盐溶液(HBSS)、Dulbecco磷酸盐缓冲盐水(DPBS)和0.25%的胰蛋白酶溶液购自ThermoFisher Scientific(Waltham,MA,USA)。包含基础接种培养基(BSM)、肠上皮细胞分化培养基(EDM)和MITO+血清增量剂的肠上皮生长培养基购自Corning(Corning,NY,USA)。Millicell®-PCF细胞培养插入物(孔径3.0 μ m,直径12mm)和TEER测量设备Millicell®-ERS获得自Millipore Sigma(Burlington,MA,USA),而TEER测量电极获得自World Precision Instruments,Inc(Sarasota,FL,USA)。多聚甲醛(16%w/v)和盐酸胃复安购自Alfa Aesar(Ward Hill,MA,USA),带有4',6-二脒基-2-苯基吡啶二盐酸盐(DAPI)的Vectashield Hardset™购自Vector

laboratories Inc. (Burlingame, CA, USA)。3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四氮唑溴盐 (MTT) 细胞毒性试剂盒和人胰岛素ELISA试剂盒获得自ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA)。重200g-300g的雄性Wistar大鼠购自Charles River Laboratories (Wilmington, MA, USA)，并且血糖测量仪 (Aimstrip plus) 及其试纸条购自Fisher Scientific (Pittsburgh, PA, USA)。胶囊的口服灌胃和加长的9号胶囊获得自Torpac (Fairfield, MA, USA)。苏木精和伊红溶液购自Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)。使用的所有其它试剂均为分析纯。

[0718] CAGE和胰岛素-CAGE的制备。根据我们先前的研究合成CAGE (38)。简而言之，在500mL圆底烧瓶中，将两当量的纯的香叶酸 (20g, 0.119mol) 添加至一当量的胆碱碳酸氢盐 (80wt% 溶液, 12.275g, 0.059mol)，所述香叶酸已在 -70°C 的丙酮中重结晶至少5次以去除杂质。将混合物在 40°C 下搅拌直至停止释放 CO_2 ，并通过在 60°C 下旋转蒸发2小时除去水，然后在真空烘箱中在 60°C 下干燥48小时。在 25°C 时的物理特性与先前的值显示出良好的吻合。NMR谱 (使用500-MHz Varian instrument, Palo Alto, CA 收集) 也与以前的制备良好的吻合： ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$)， δ 5.60 (s, 2H)、5.07 (t, $J=6.1$, 2H)、3.86 (t, $J=6.6$, 2H)、3.42 (t, $J=6.6$, 2H)、3.12 (s, 9H)、2.57 (m, 4H)、2.01 (m, 4H)、1.97 (s, 6H)、1.73 (s, 2H)、1.64 (s, 6H) 和 1.57 (s, 6H)； ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$)， δ 170.1、150.1、131.5、124.1、122.6、67.6、55.5、53.6、53.5、32.8、25.9和17.9。通过将预定量的胰岛素粉添加到特定体积的CAGE中，然后涡旋5分钟来制备胰岛素CAGE。

[0719] 数据分析。所有数据均以平均值 \pm 标准误差 (S.E.) 表示。为了统计分析，使用学生T检验。在 $p<0.05$ 时认为是显著差异。所有实验以至少三重复进行。

[0720] CAGE对胰岛素降解的作用。在 37°C 下于含有等摩尔浓度的人胰岛素和牛胰蛋白酶的溶液中，研究了CAGE对胰蛋白酶介导的胰岛素降解的影响。简而言之，将2mL的胰岛素的纯CAGE溶液或Dulbecco磷酸盐缓冲盐水 (DPBS) 溶液 (86 μM) 加入到3mL的胰蛋白酶的DPBS溶液 (57 μM) 中，涡旋并在 37°C 下孵育。紧接在涡旋之后 (时间=0小时； t_0) 以及以预定的时间间隔，将0.1mL胰岛素-胰蛋白酶混合物等分，并通过添加0.1mL冰冷的0.1%三氟乙酸/乙腈溶液 (69:31, v/v) 抑制酶活性。通过液相色谱-质谱 (LC-MS) 分析样品，以确定在不同时间的溶液中的完好胰岛素的量。使用由如下组成的Agilent 1290/6140超高效液相色谱/质谱仪进行分析：1290Infinity LCTM二元泵、恒温柱箱、1290Infinity自动进样器、Agilent 1290二极管阵列检测器和Agilent 6140四极MSD系统。为了分析，将3 μL 样品注射入保持在 25°C 下的Agilent 300SB-C18 2.1 \times 75mm、5 μm 中，并用由具有0.1%甲酸 (FA) 的去离子水 (A) 和含0.1%FA的乙腈 (B) 的梯度混合物组成的流动相洗脱。95-5% (0分钟)、0-100% (10分钟)、0-100% (15分钟)、95-5% (15.1分钟)、95-5% (18分钟) 的A:B的梯度用于每次运行。将质谱仪设置为以选定的离子监测模式收集 ($M+5\text{H}$) +5 和 ($M+6\text{H}$) +6 离子，并选取峰面积以量化样品中的剩余胰岛素。计算相对于 t_0 时的胰岛素的在各时间间隔时余留的胰岛素的百分比。所有实验均以三重复进行，并报告为平均值 \pm 标准偏差。

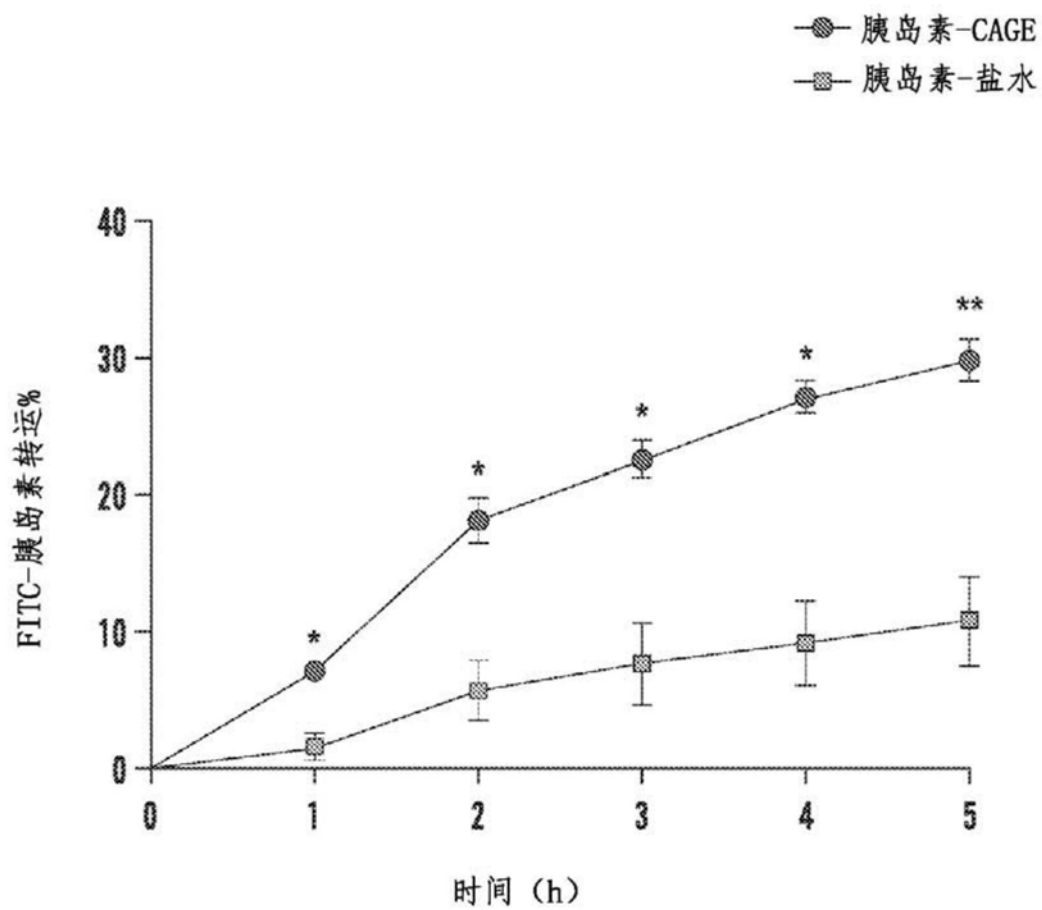


图1

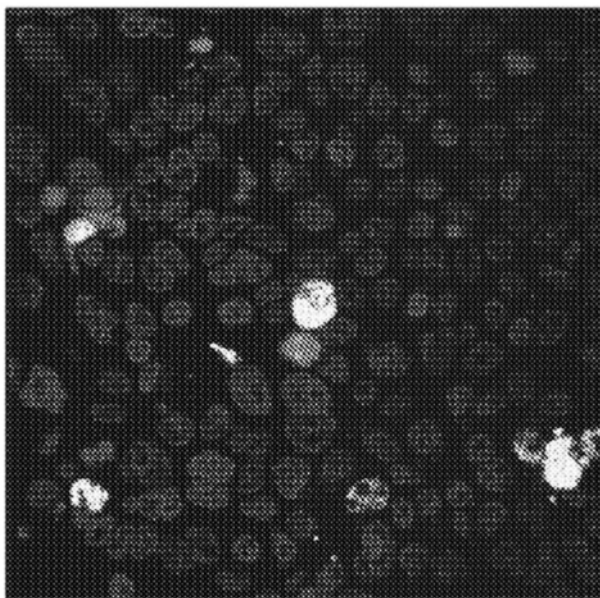


图2A

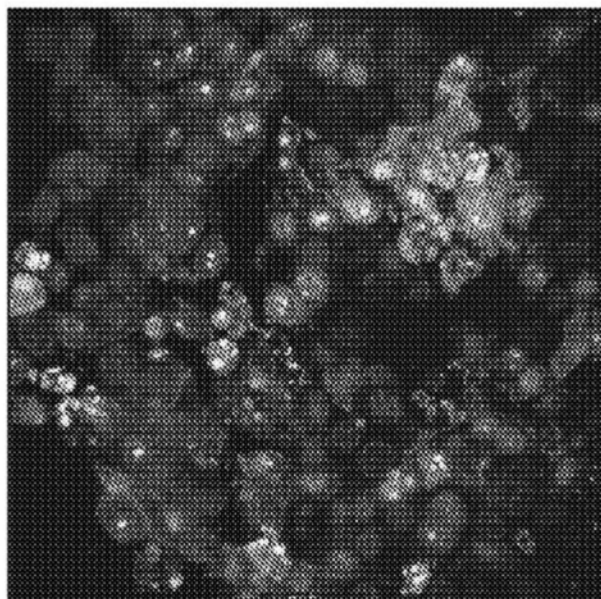


图2B

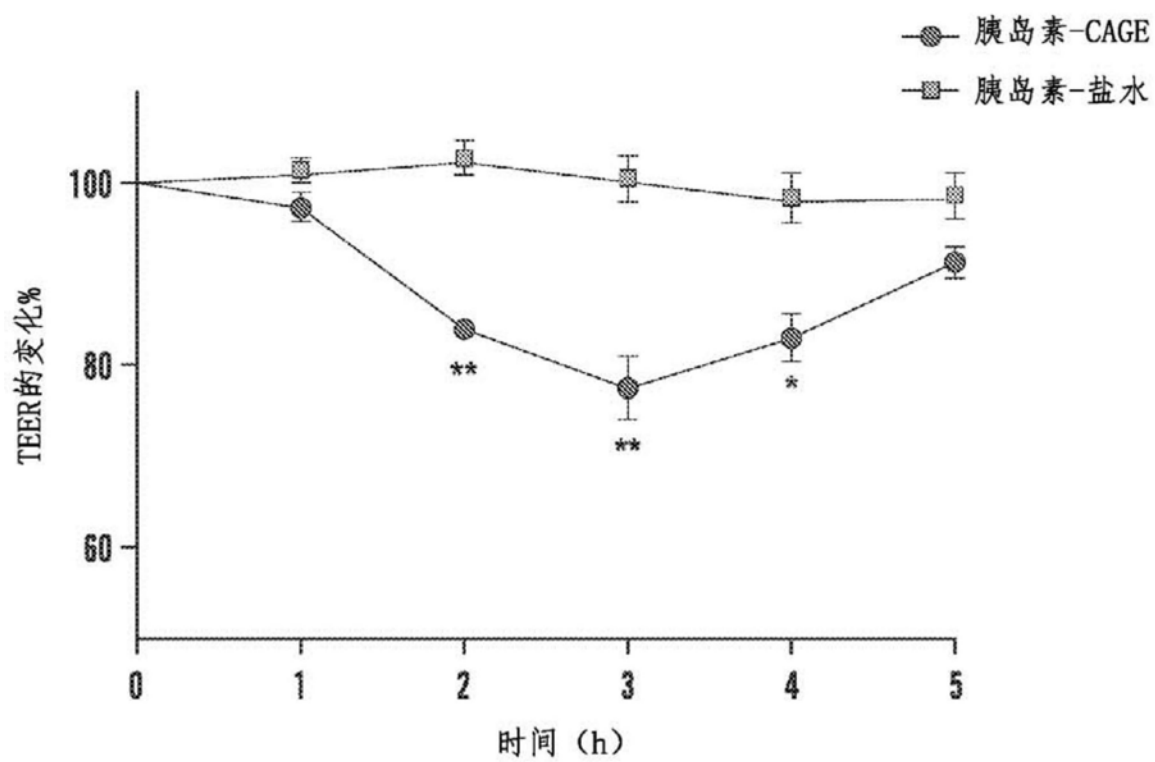


图3

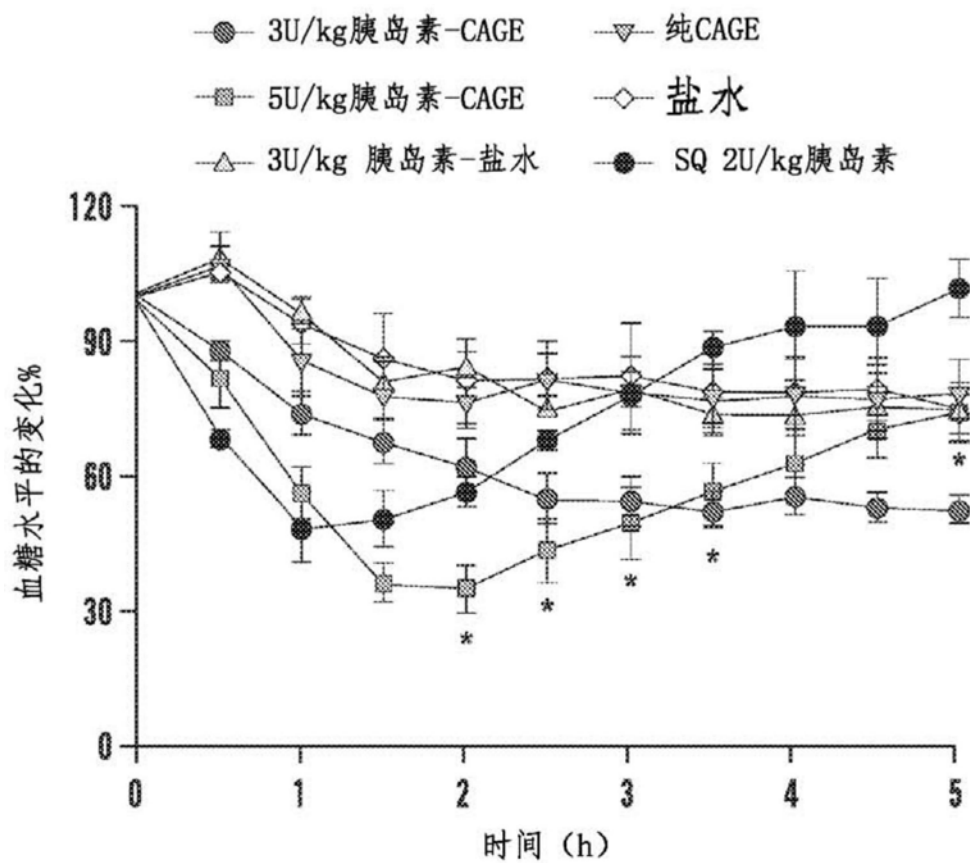


图4

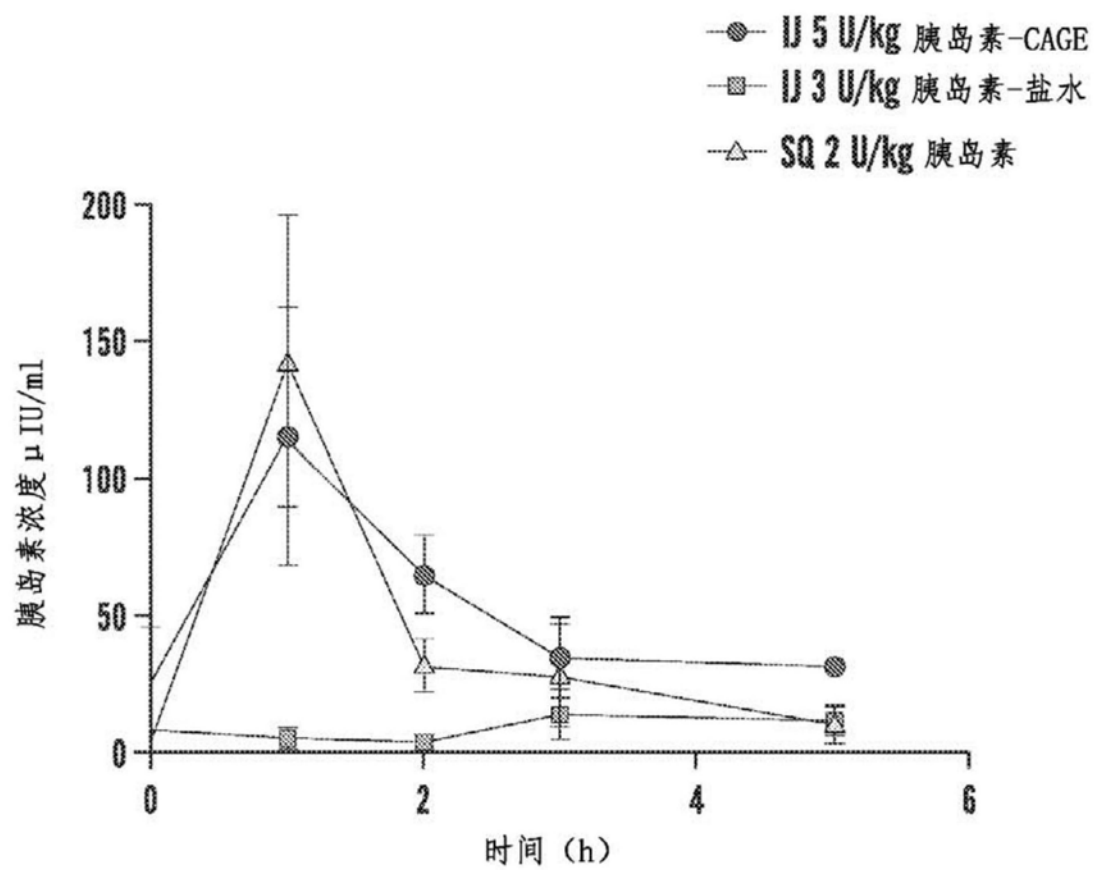


图5

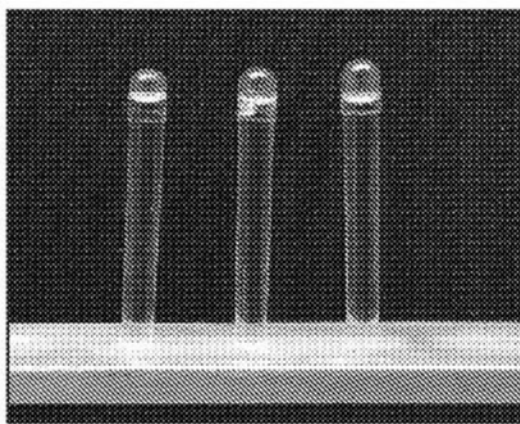


图6

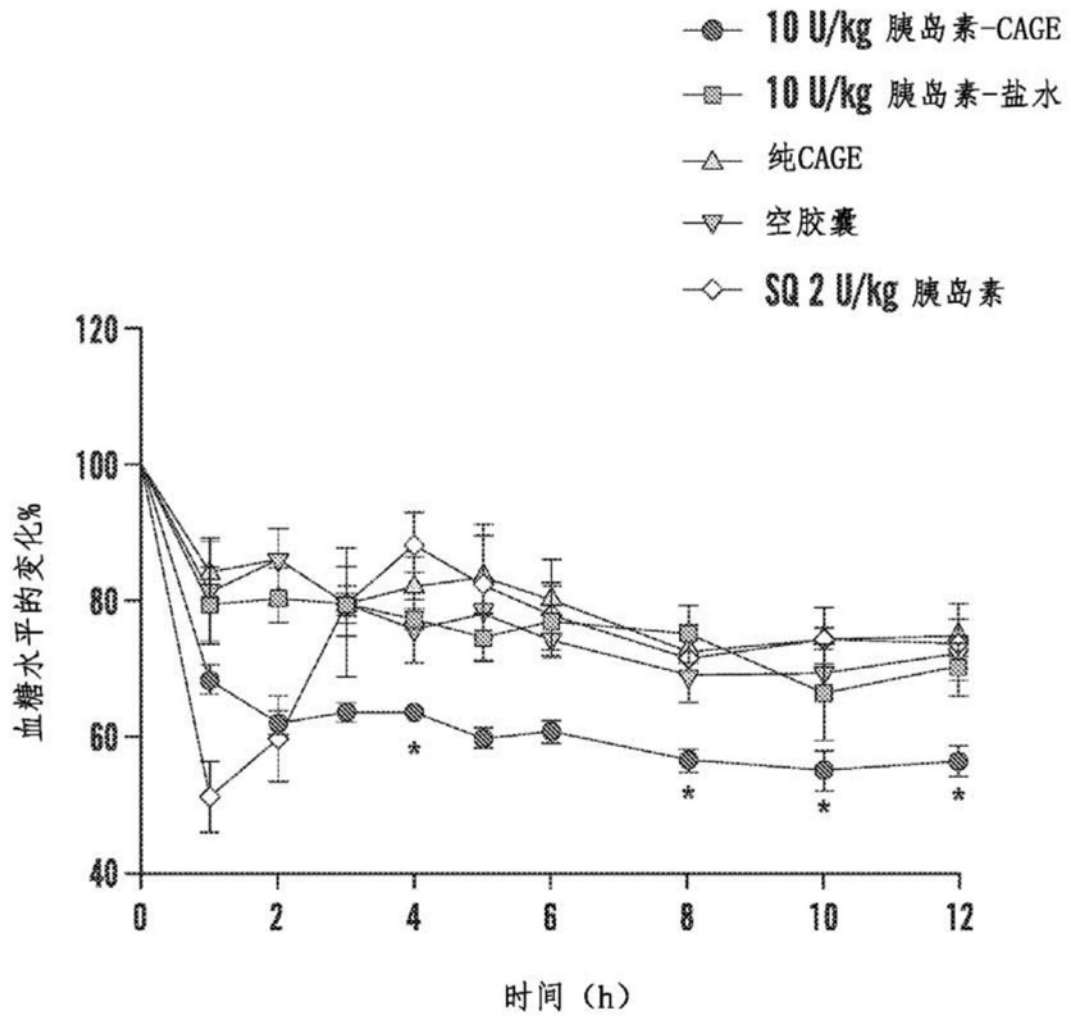


图7

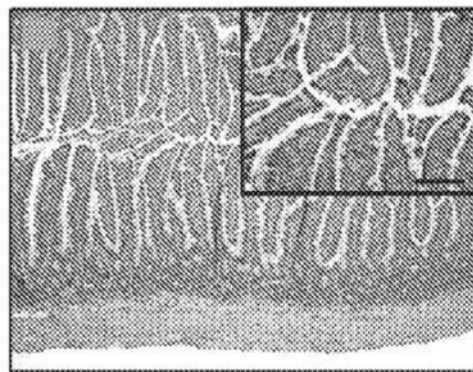


图8A

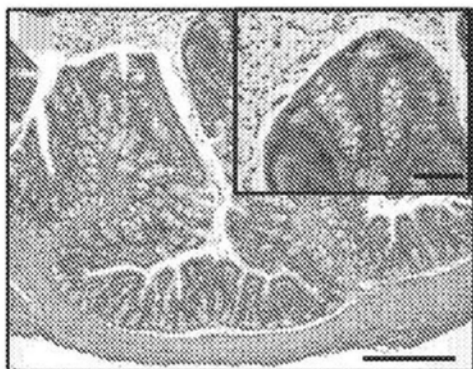


图8B

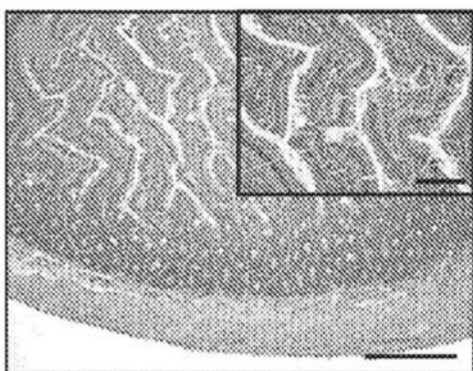


图8C

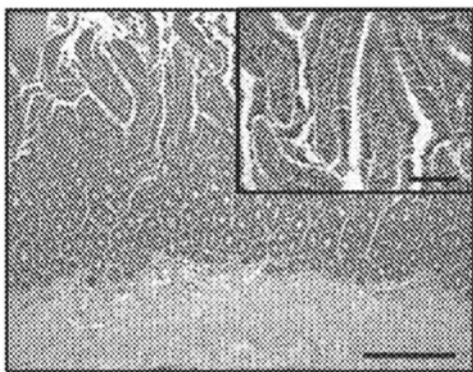


图8D

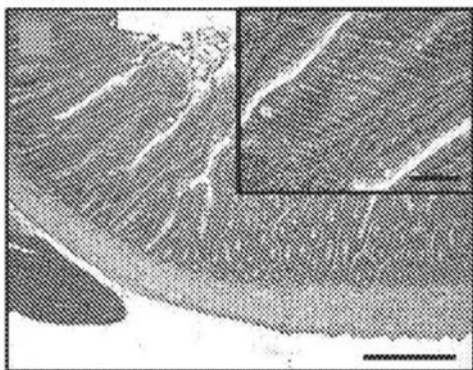


图8E

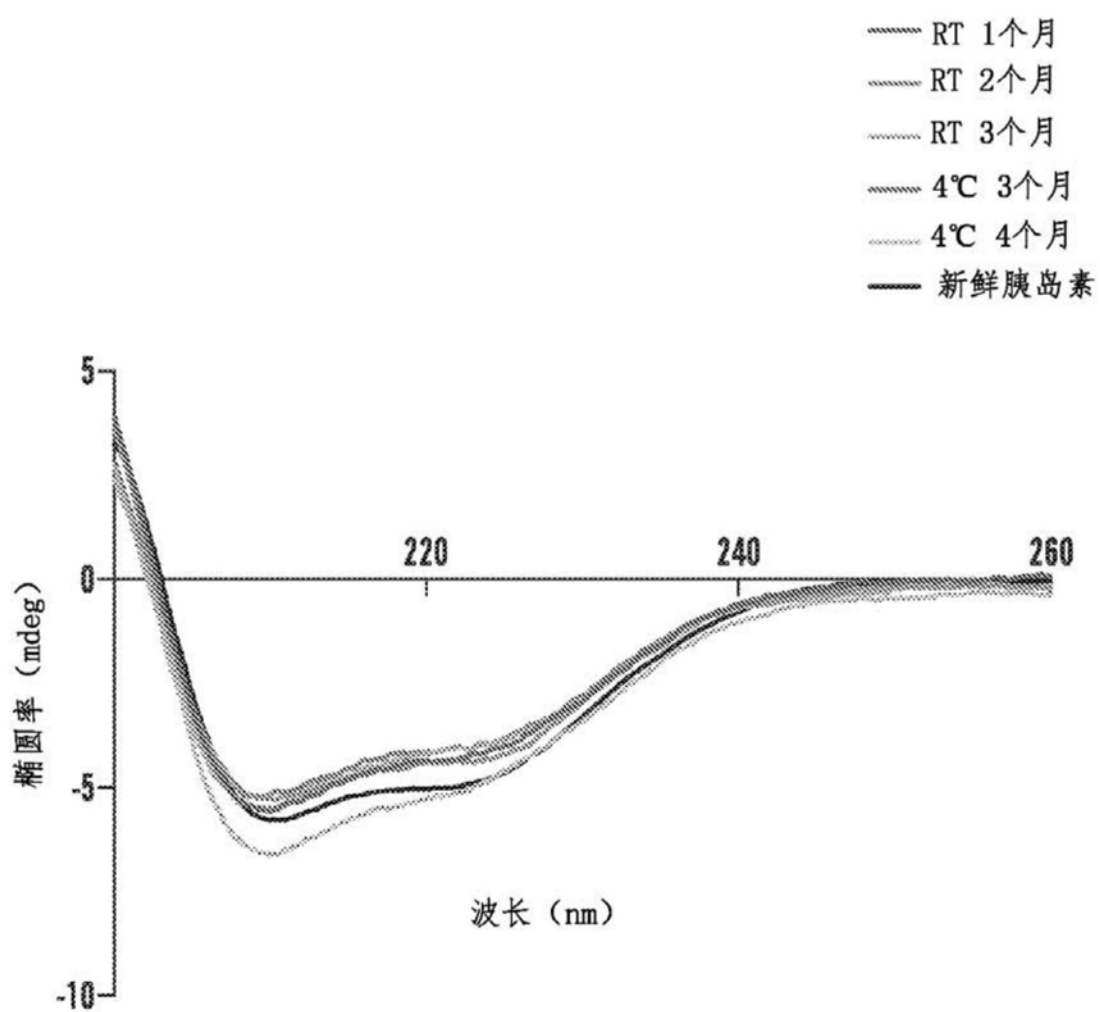


图9

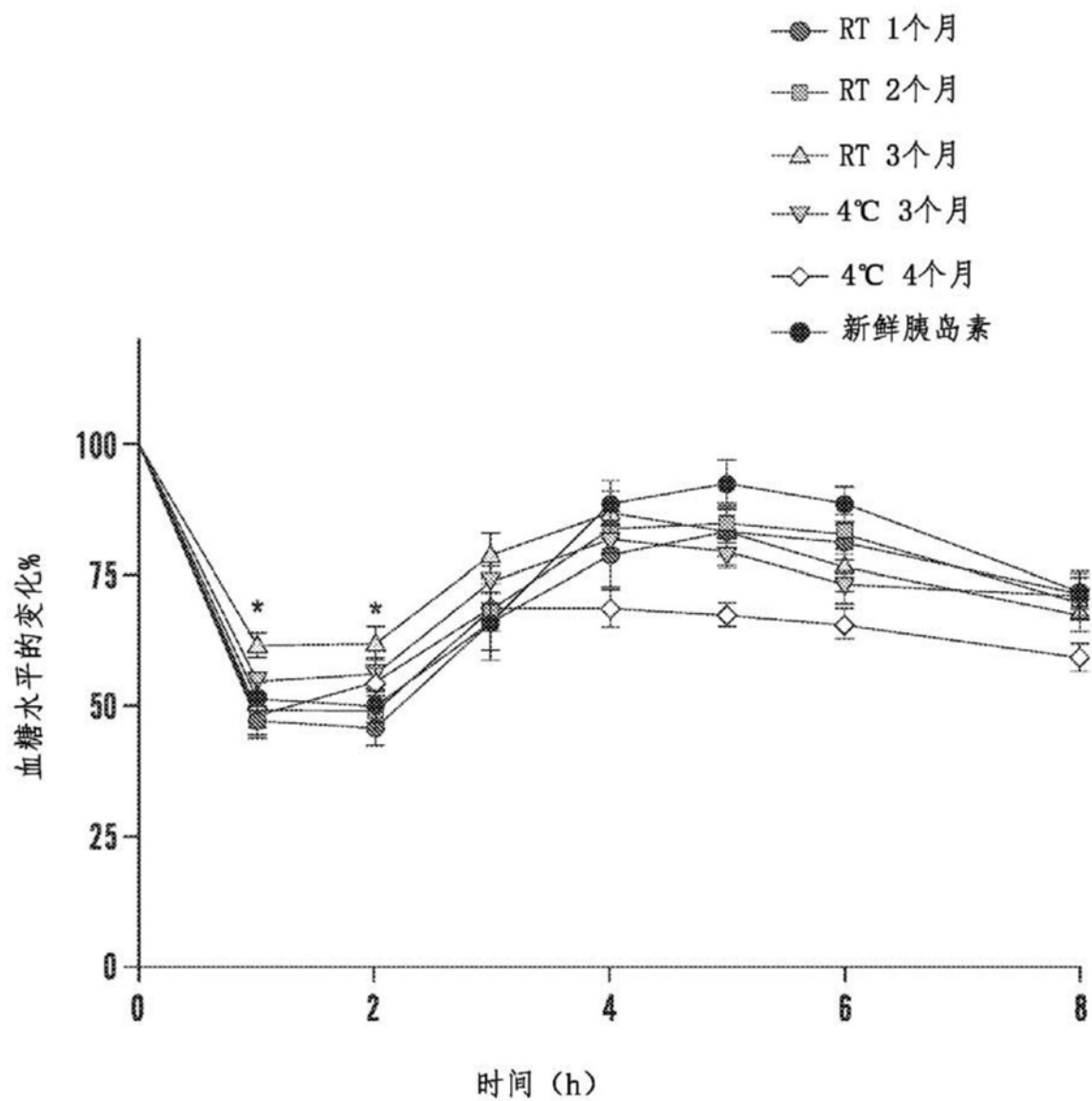


图10

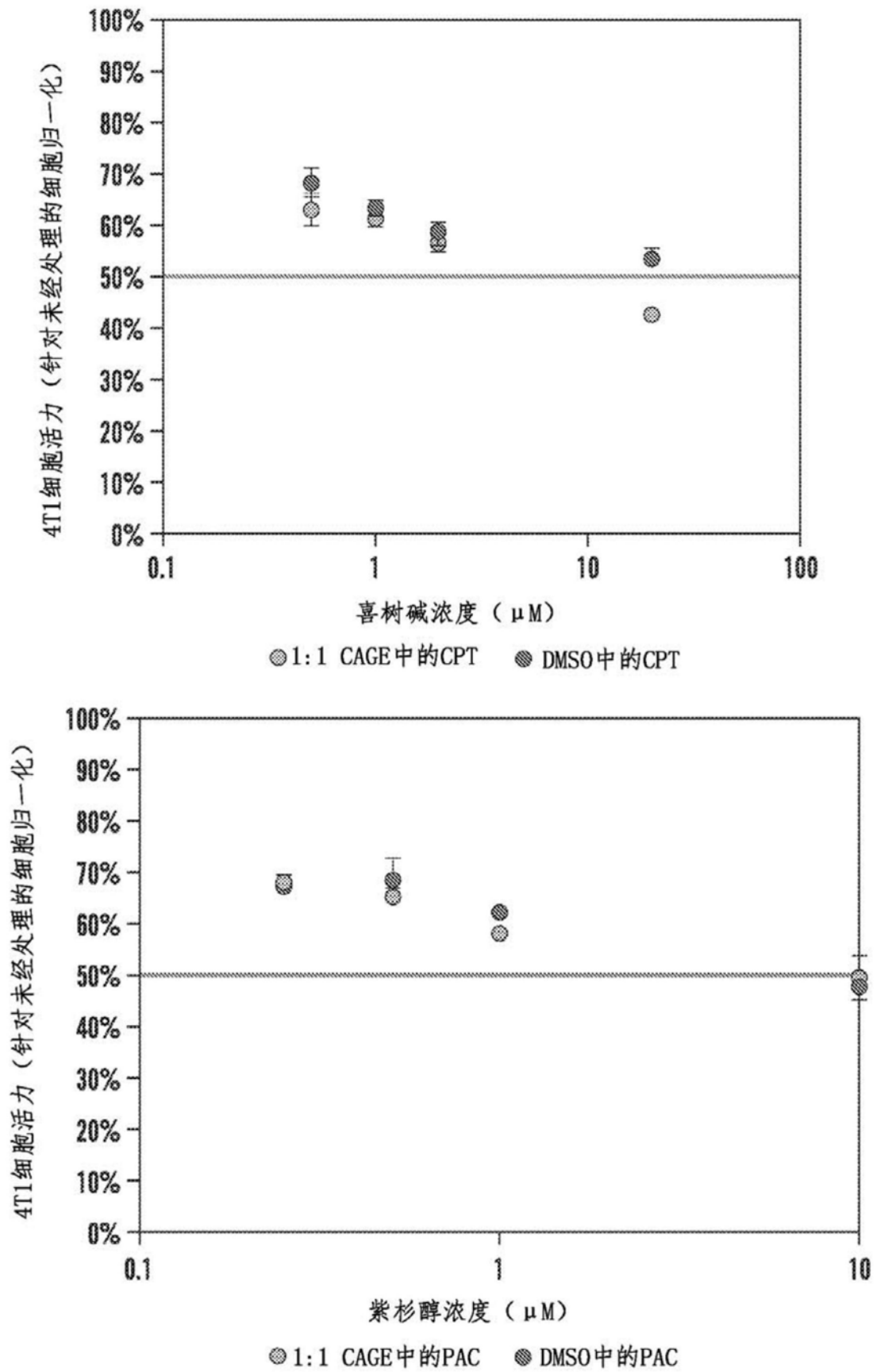


图11

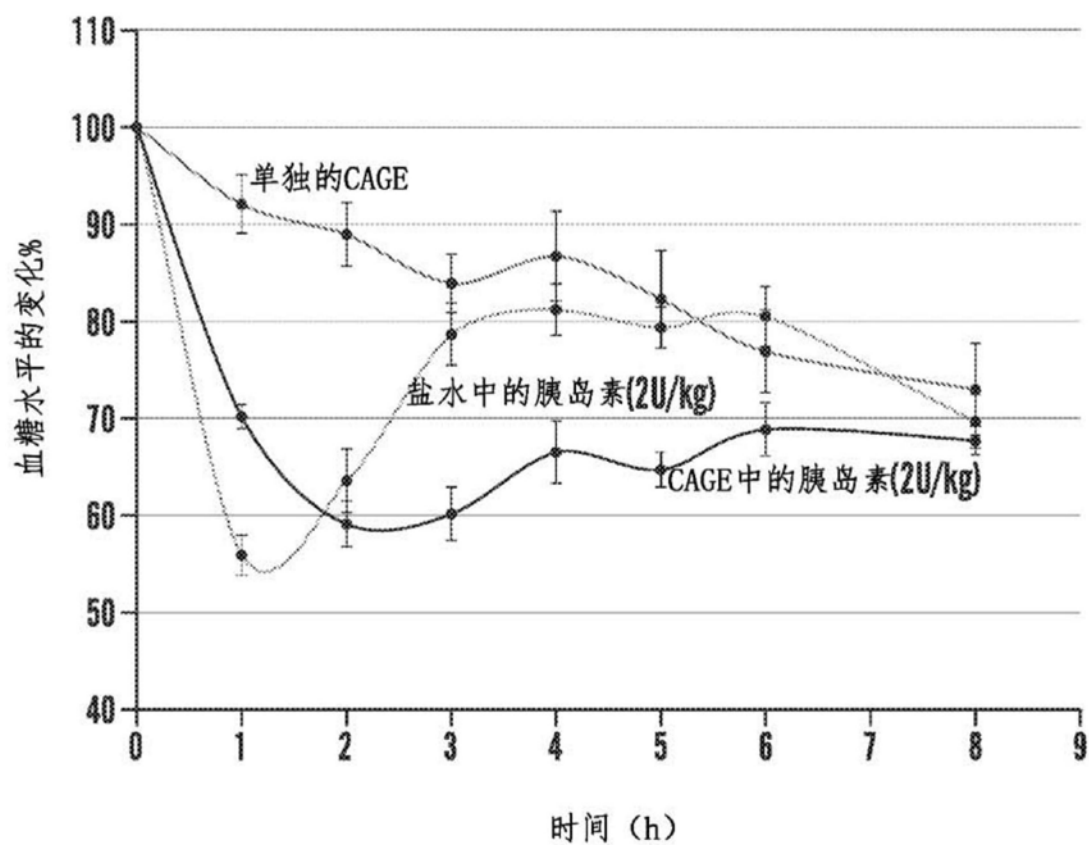


图12

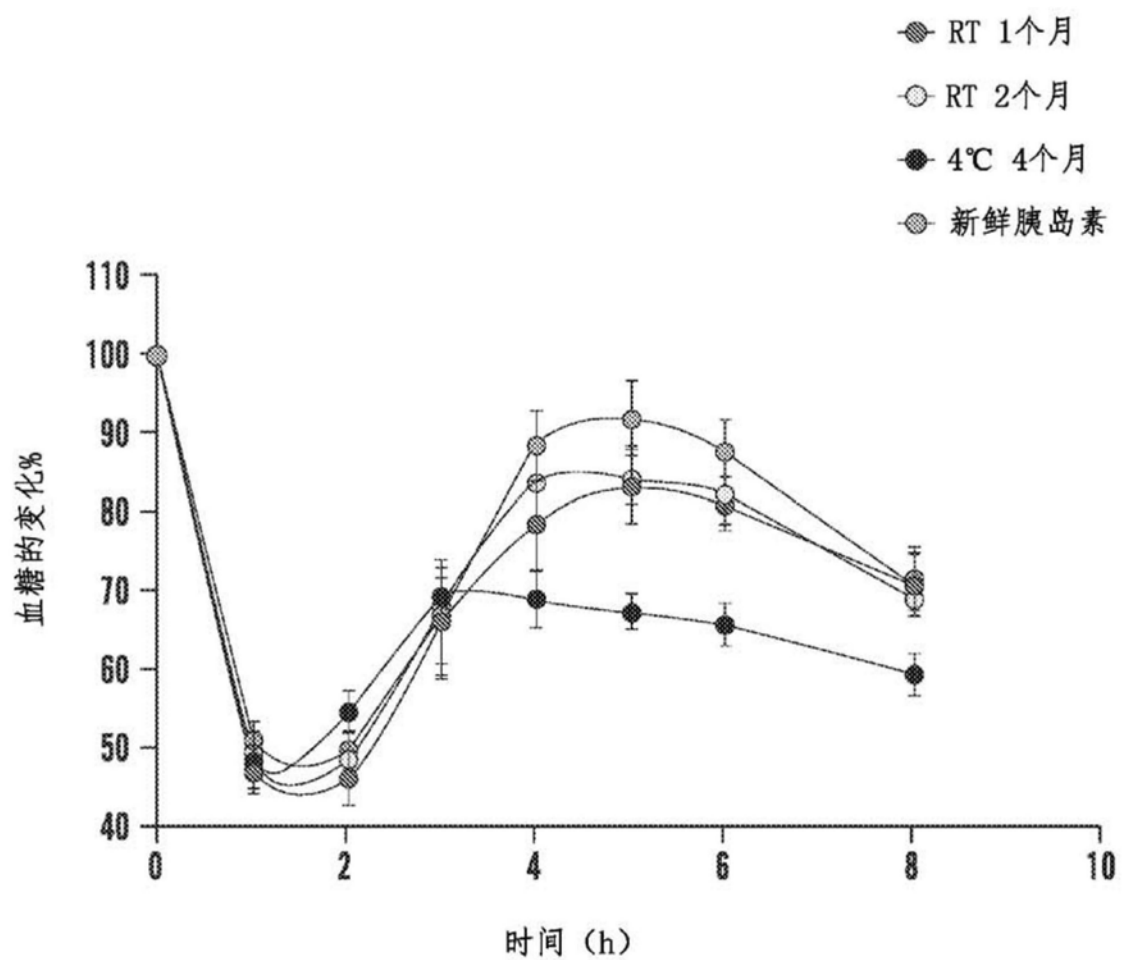


图13

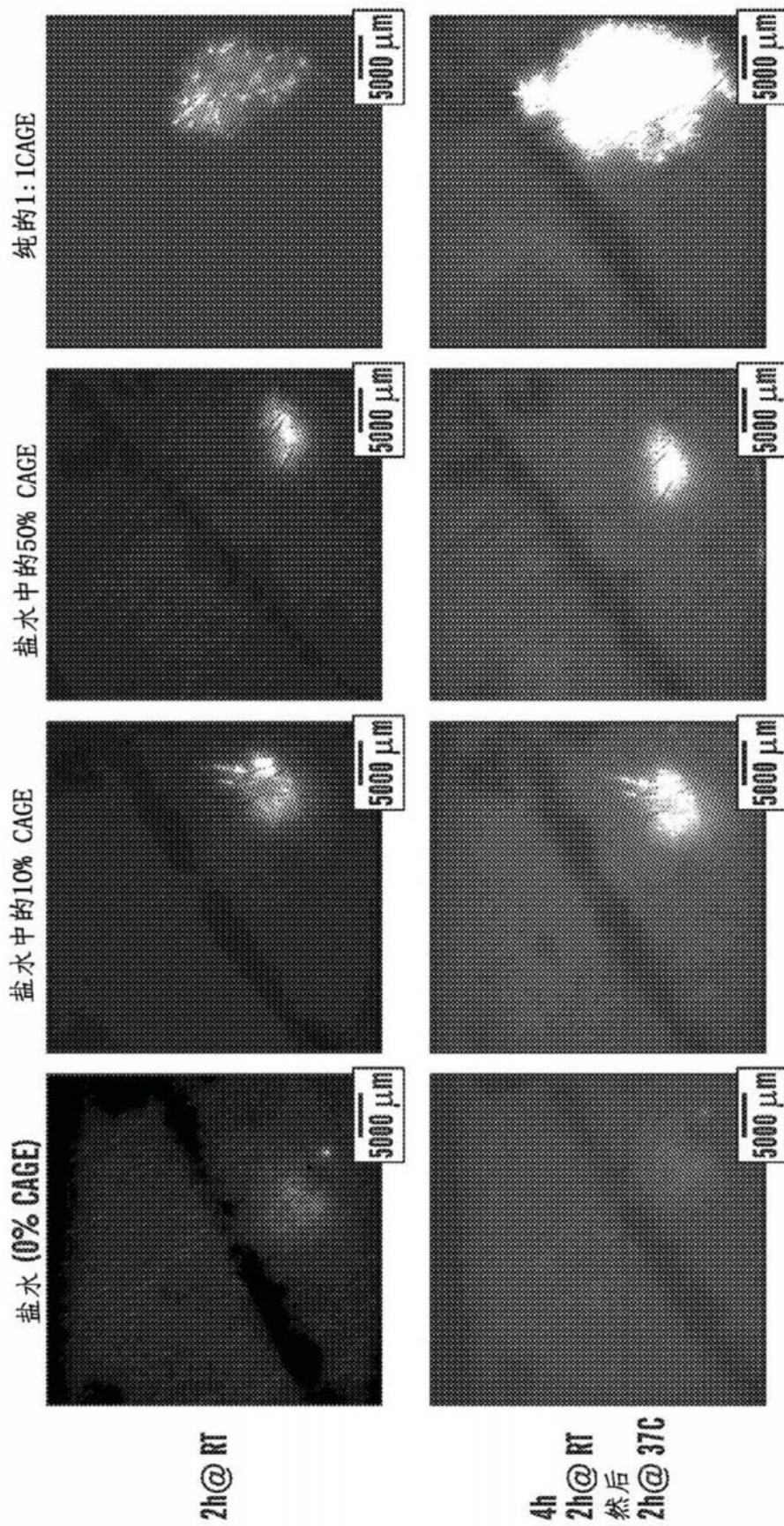


图14

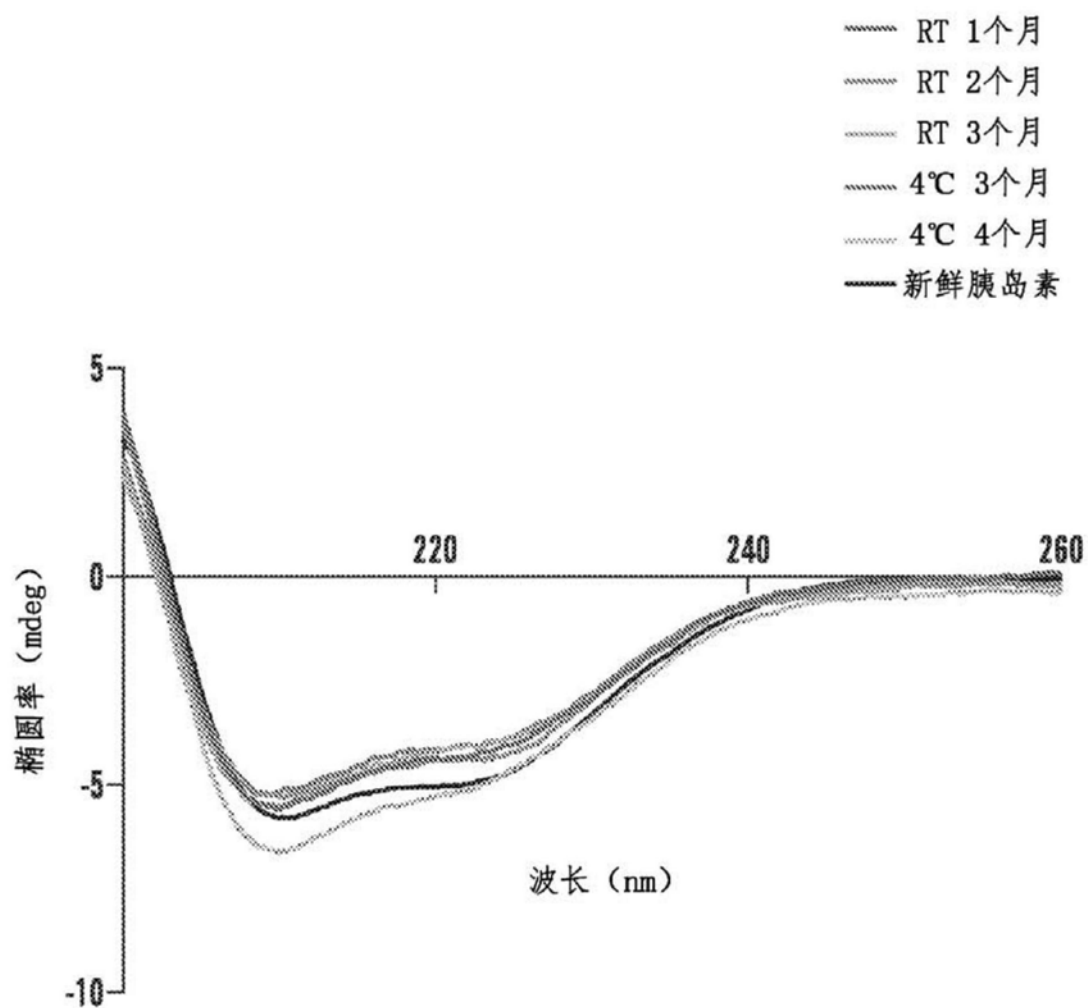


图15

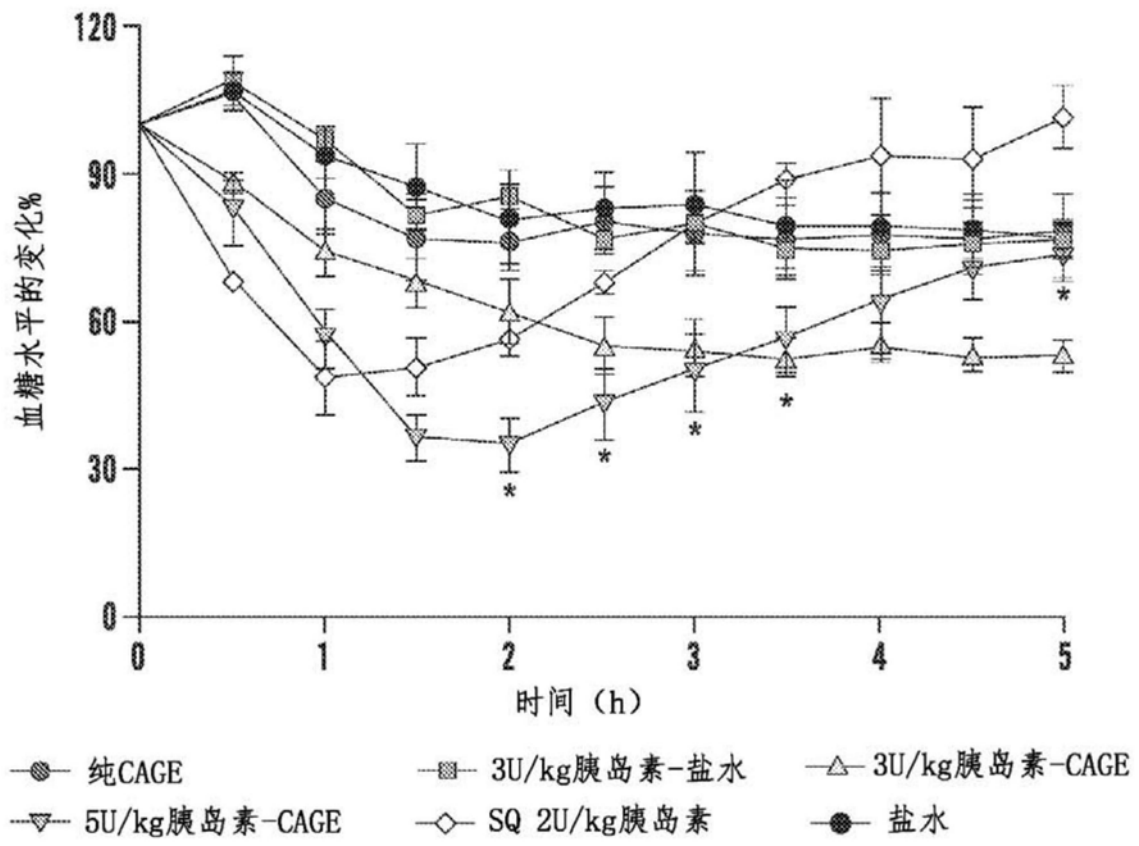


图16A

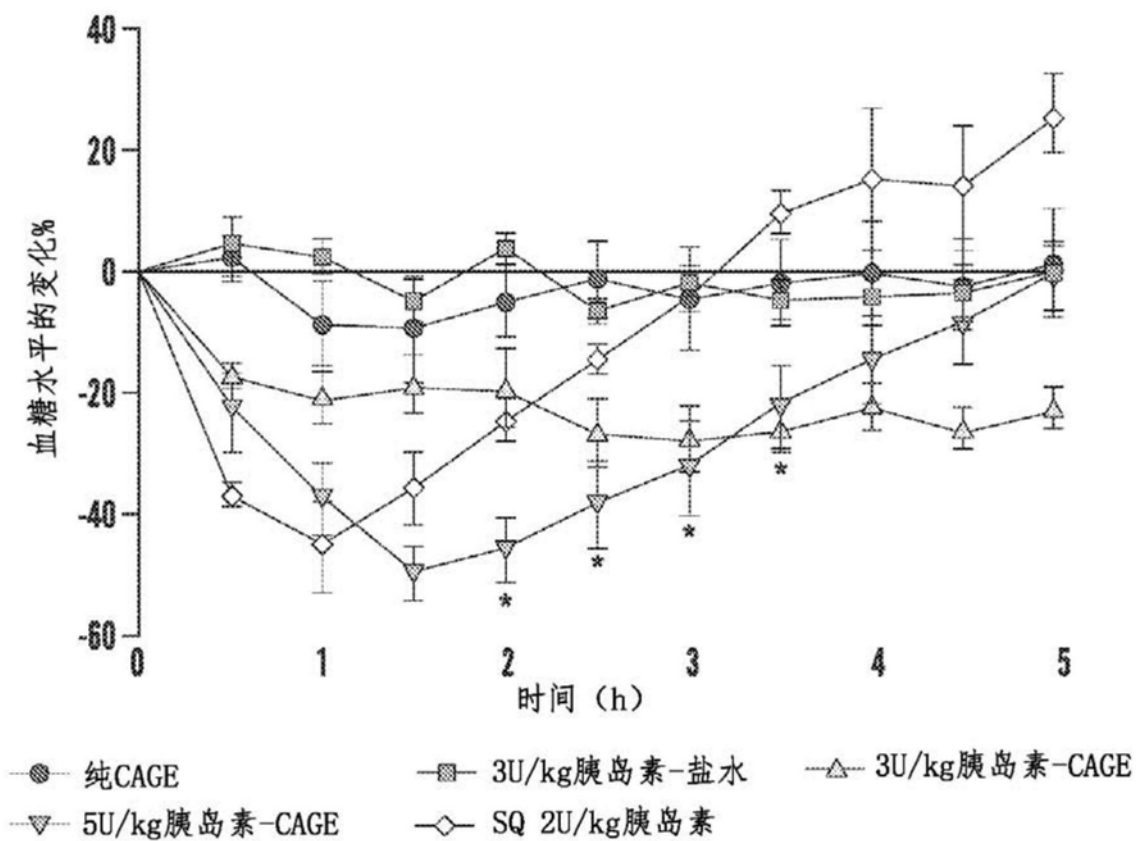


图16B

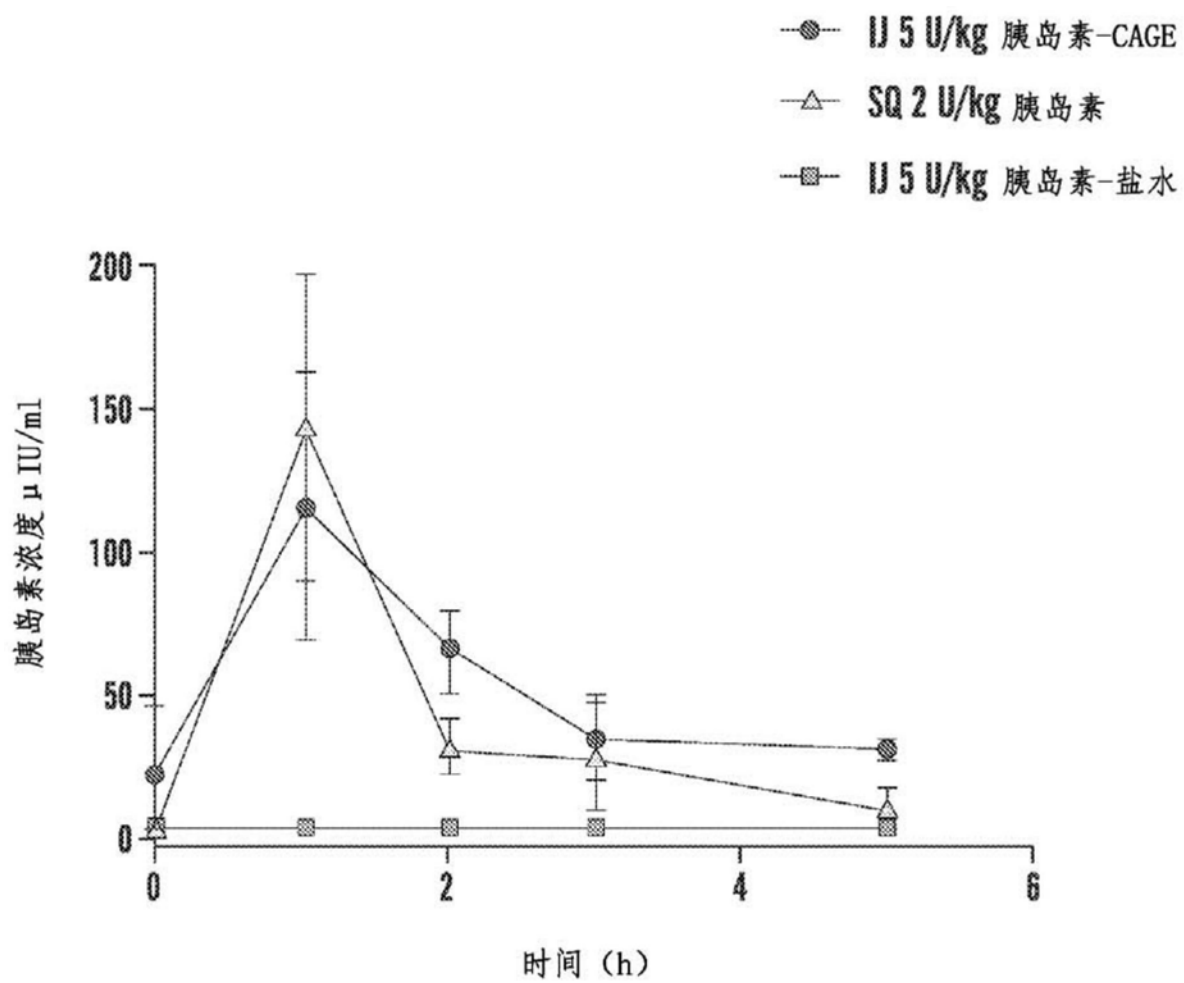


图17

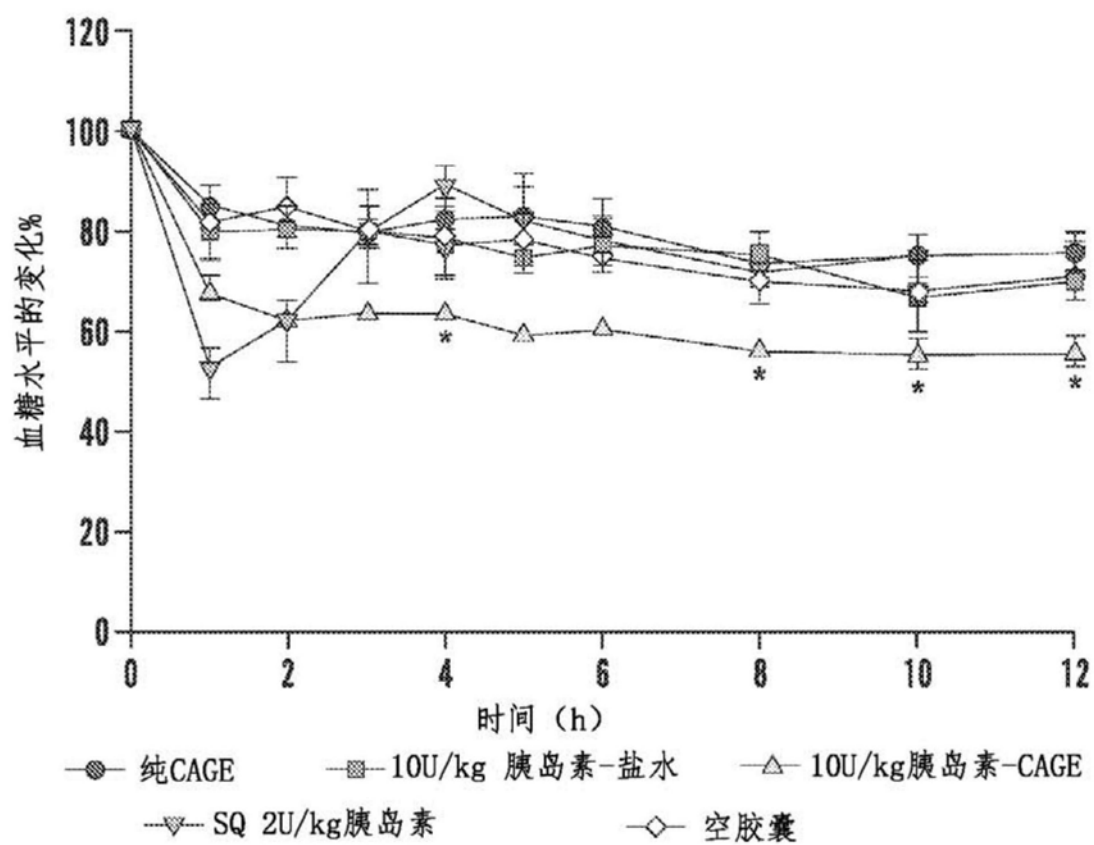


图18A

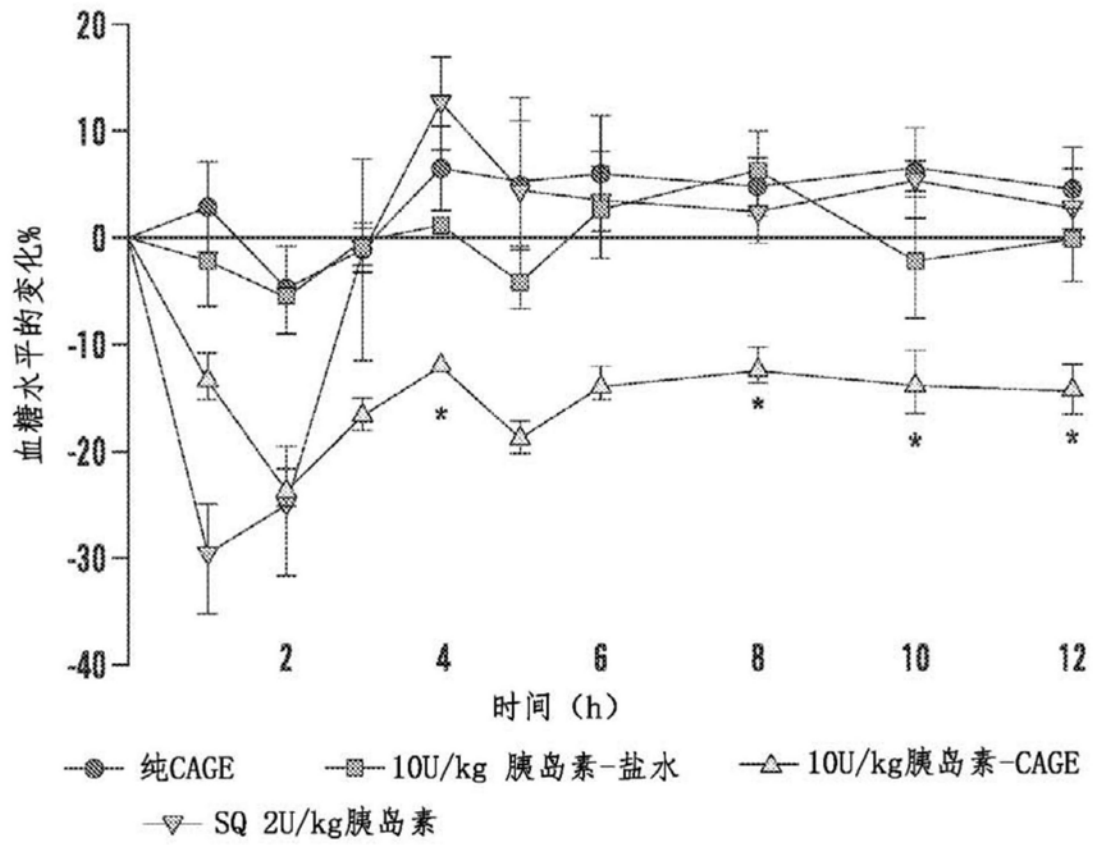


图18B

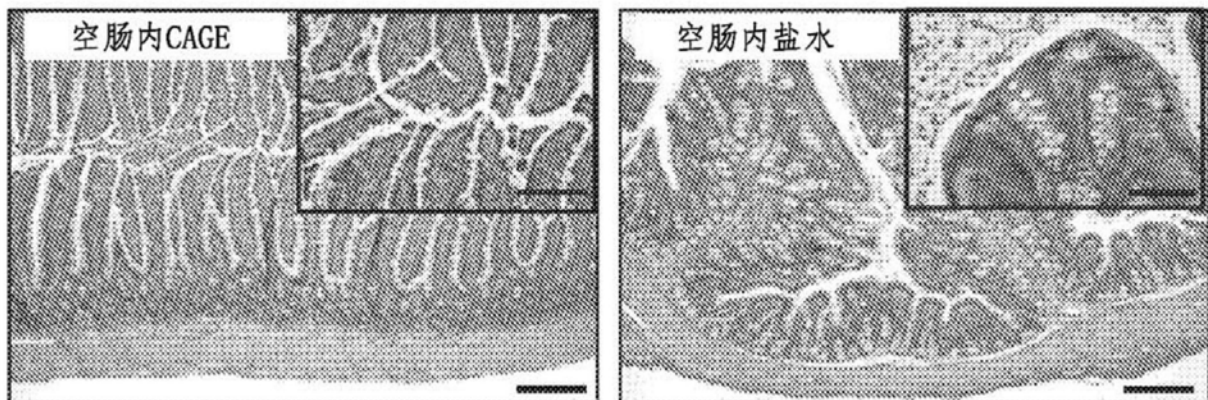


图19

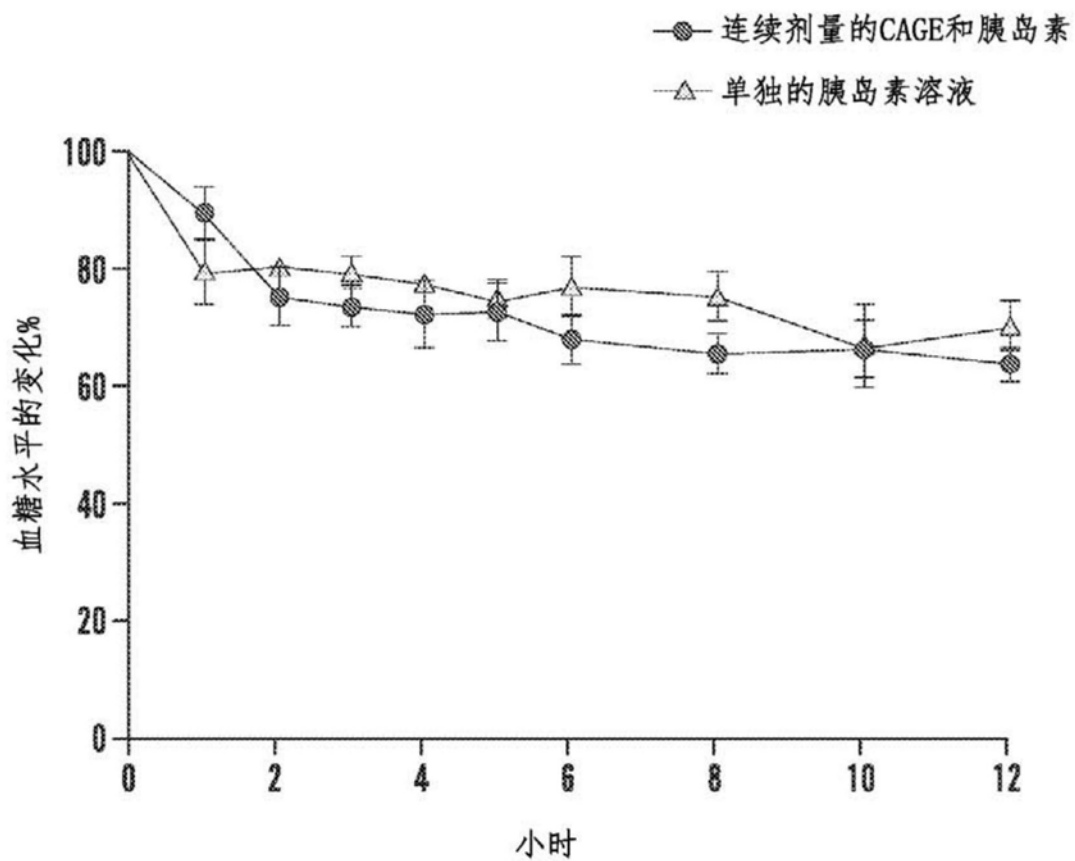


图20

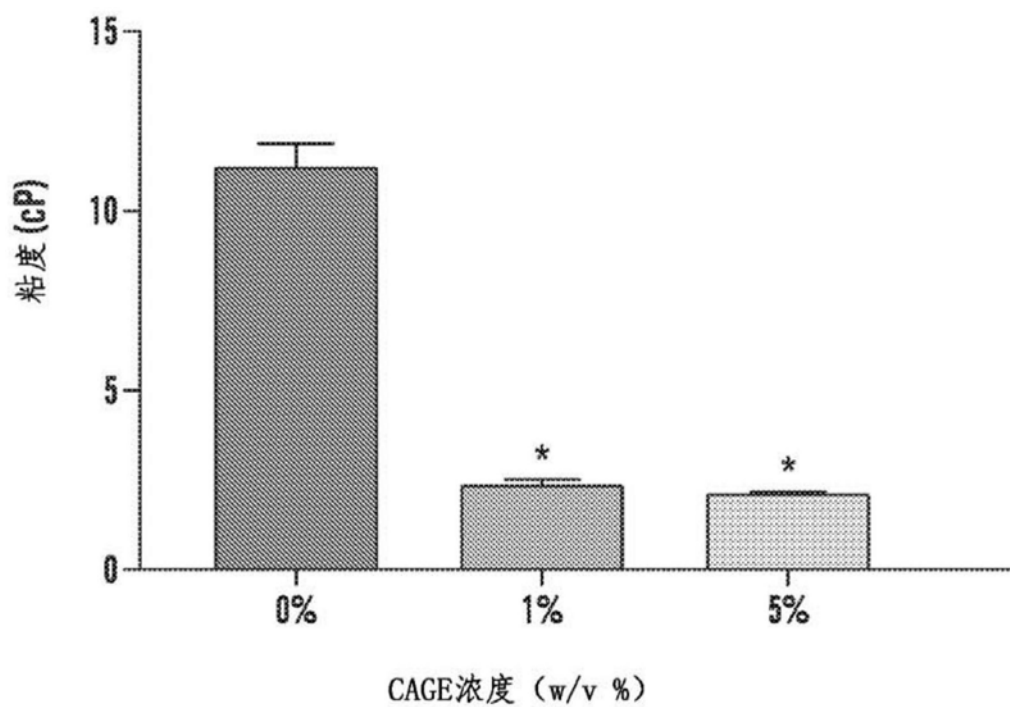


图21

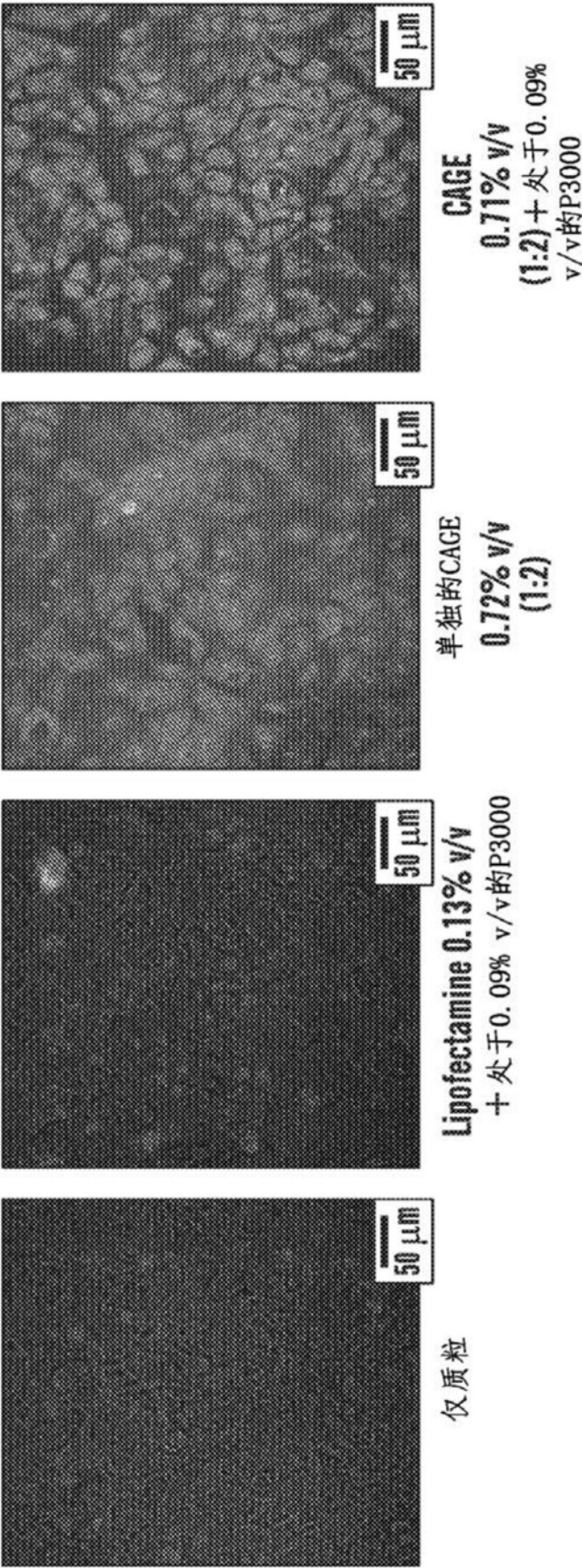


图22

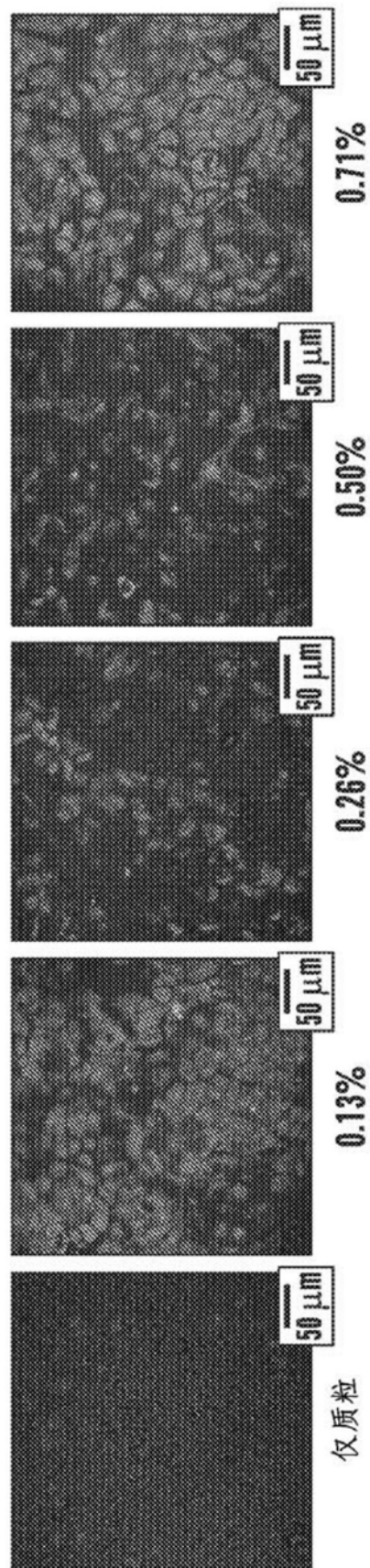


图23

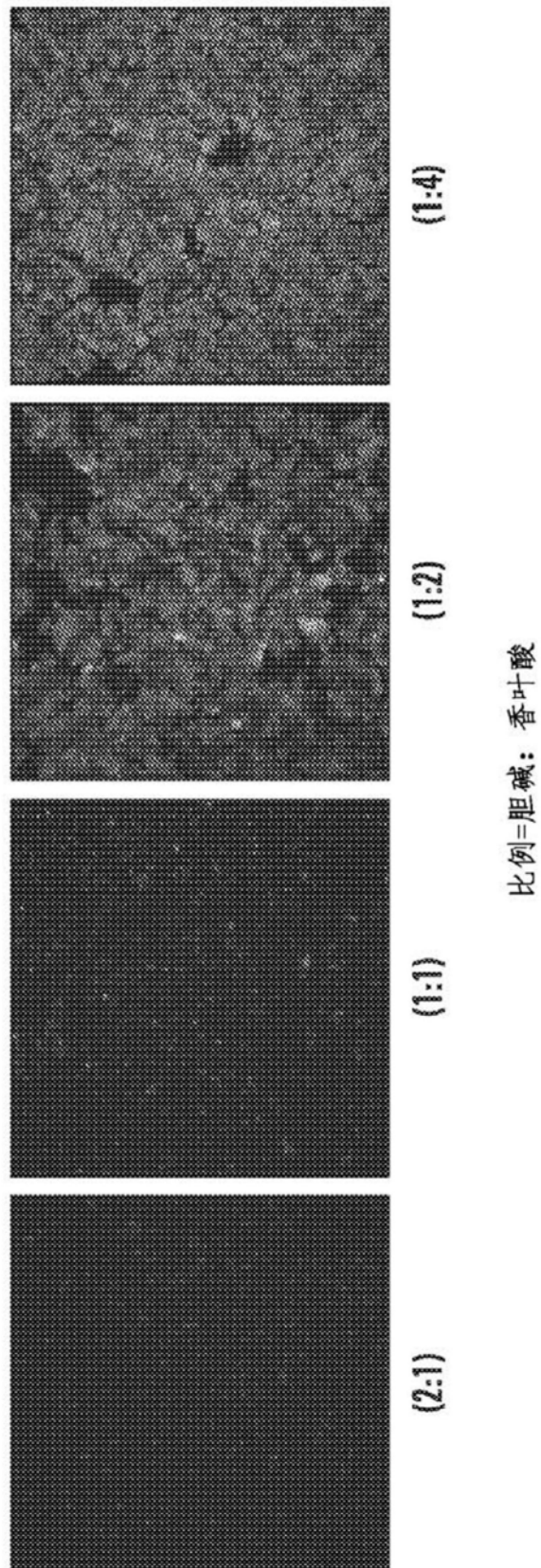


图24

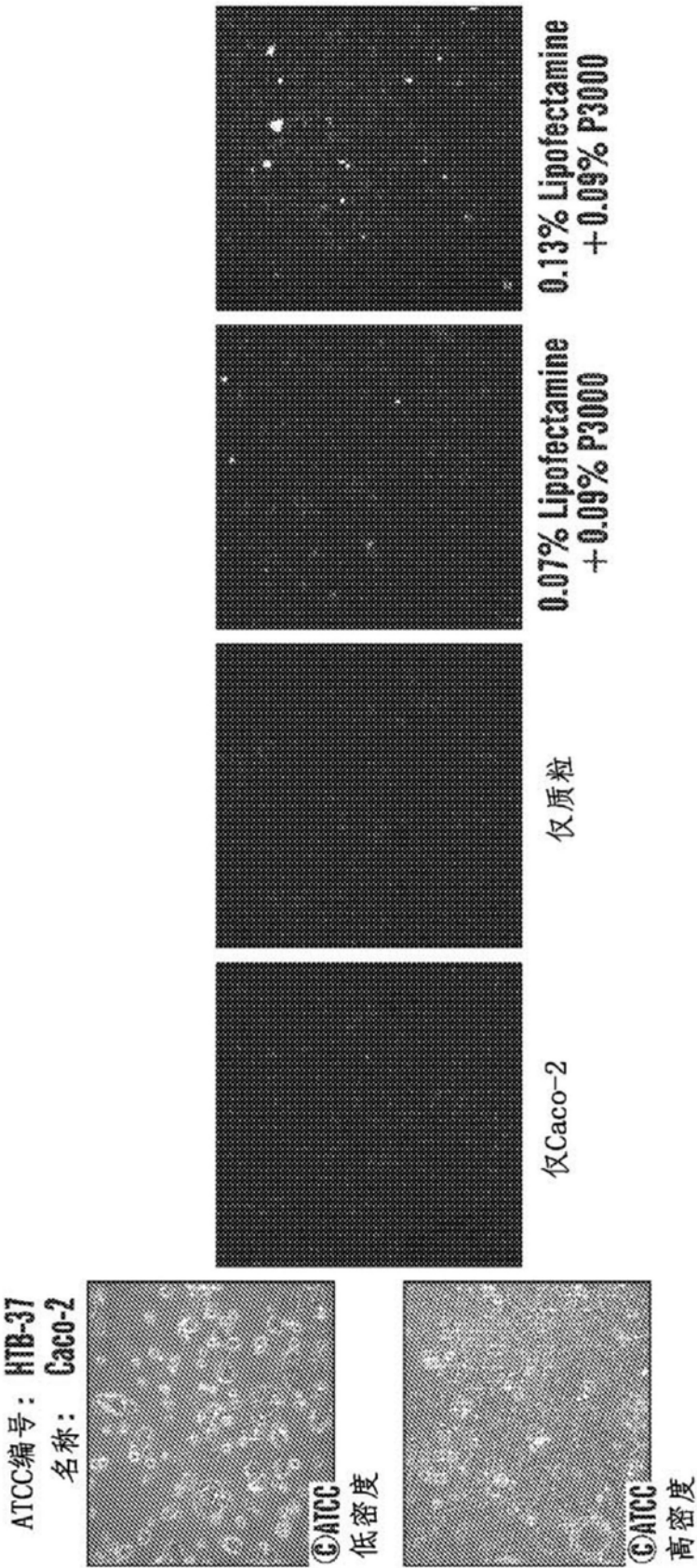


图25

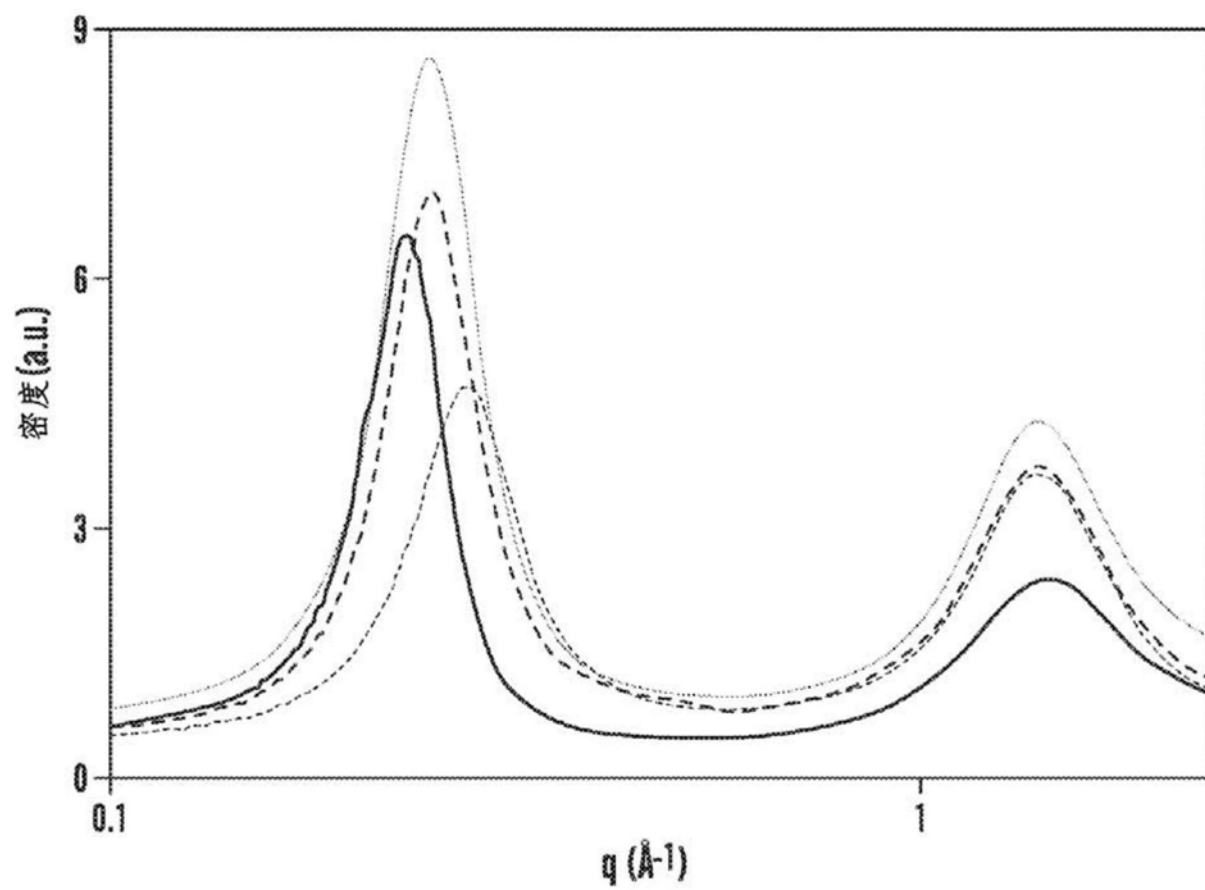


图26

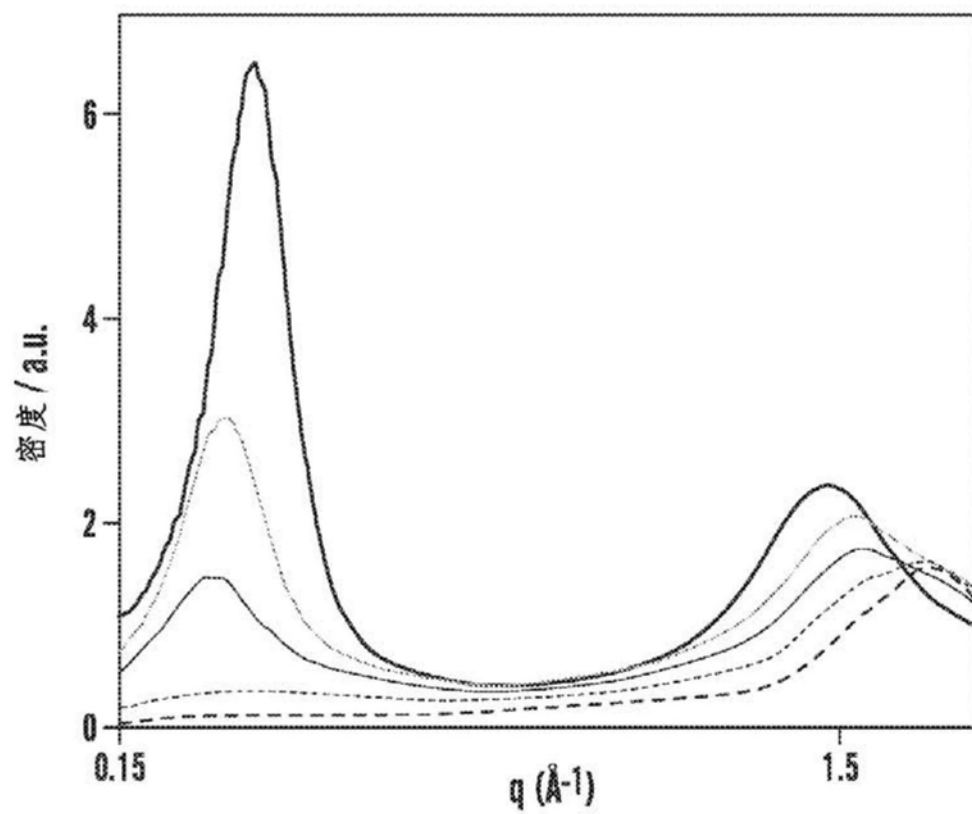


图27A

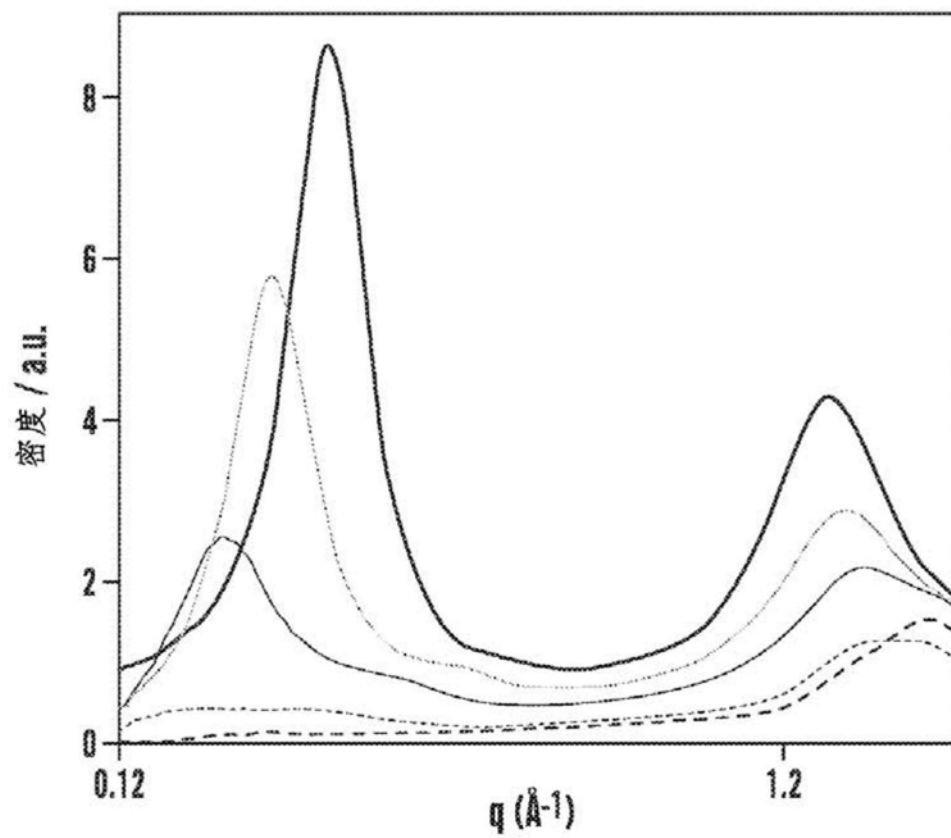


图27B

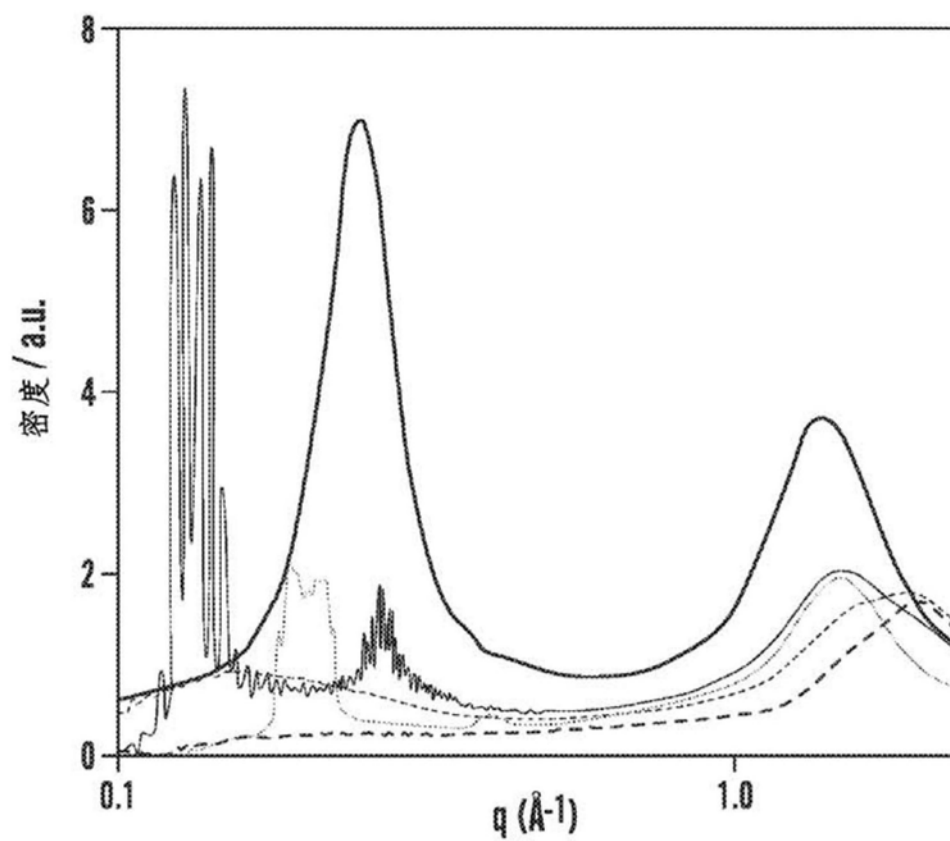


图27C

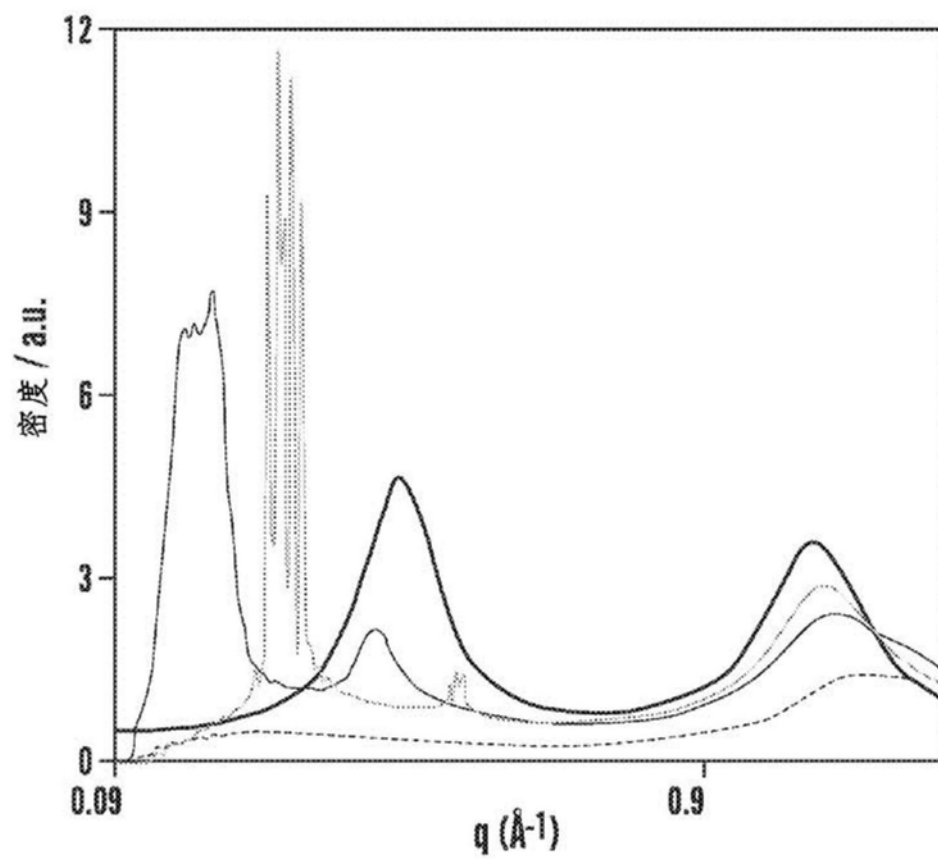


图27D

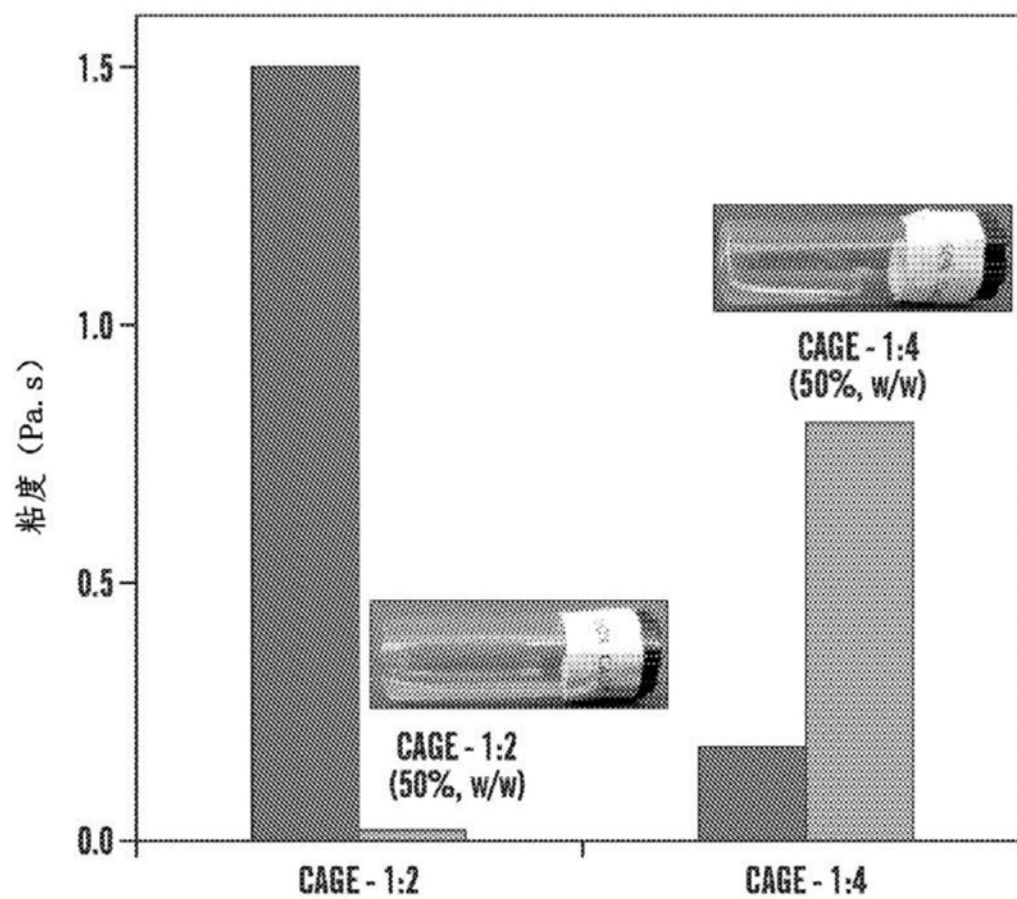


图28

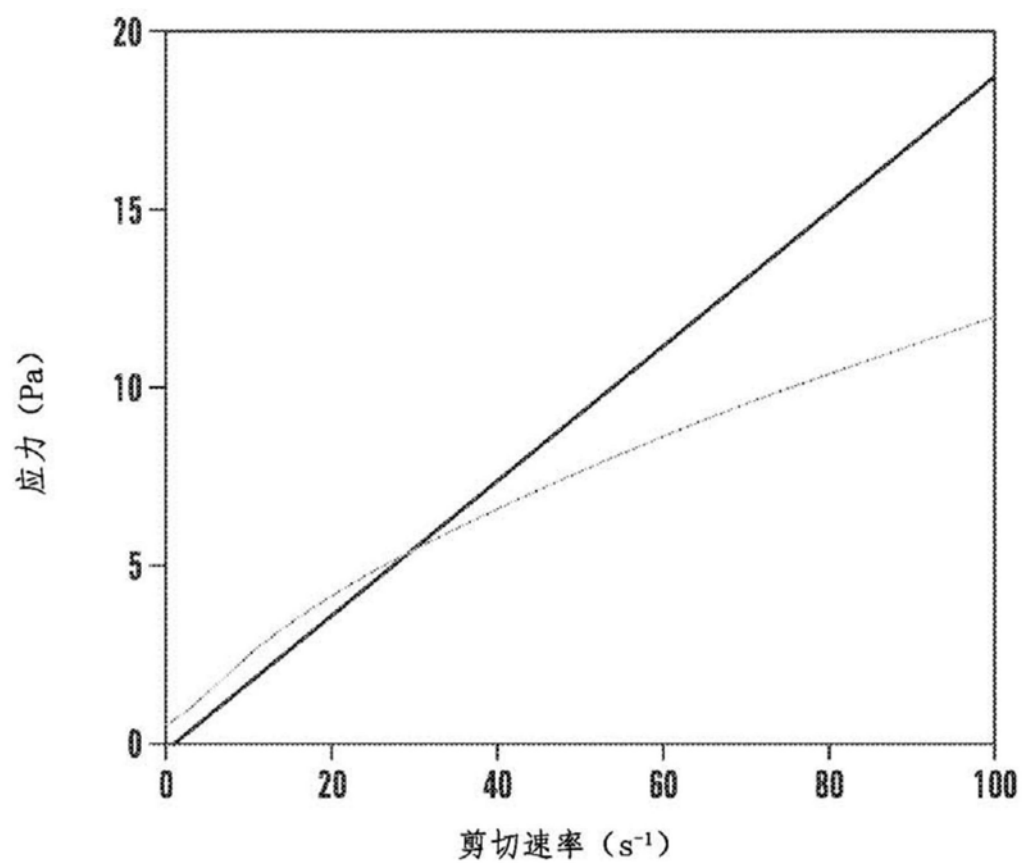


图29A

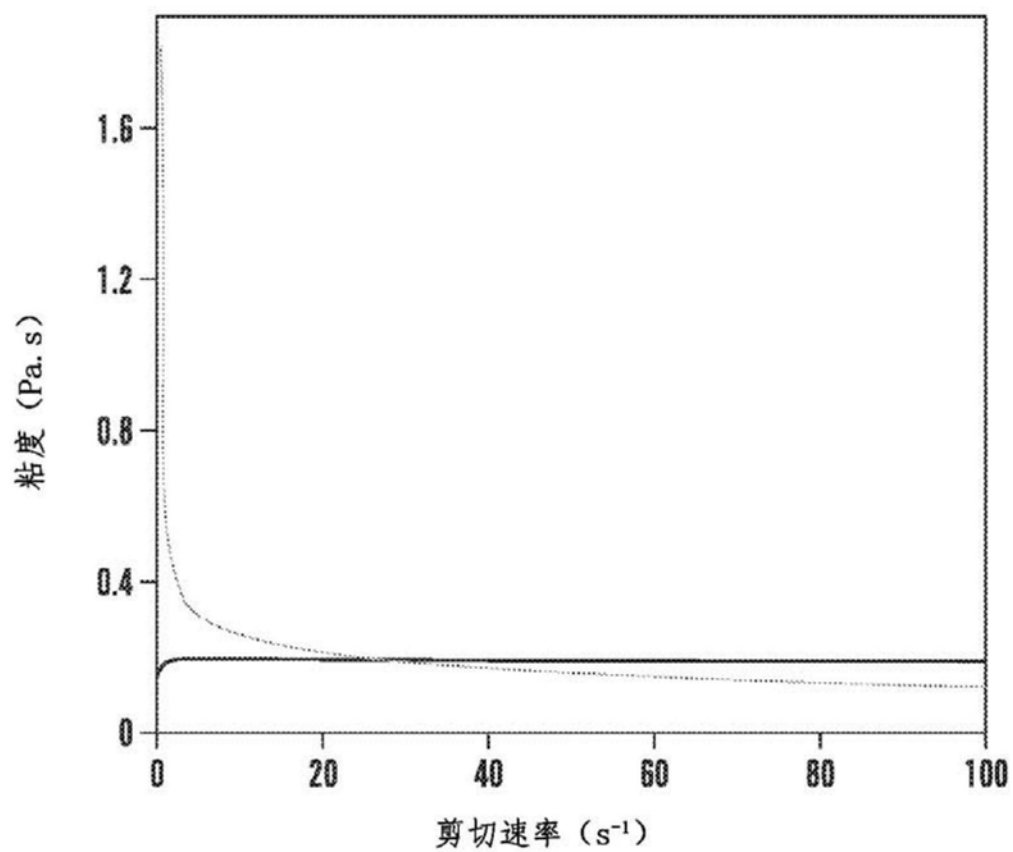


图29B

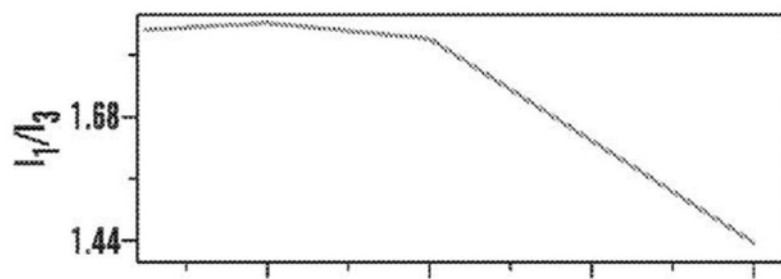


图30A

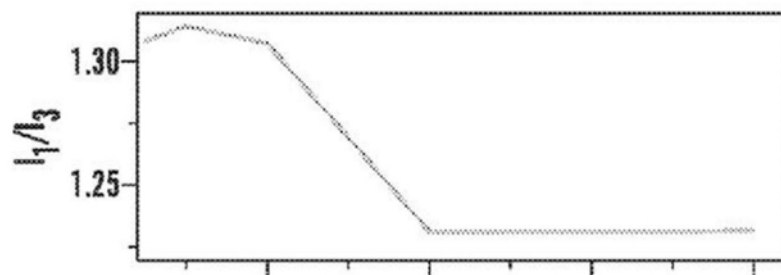


图30B

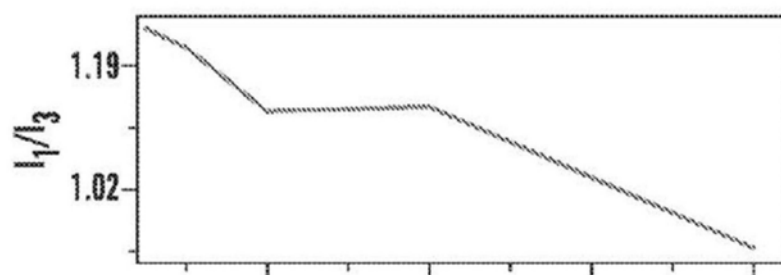


图30C

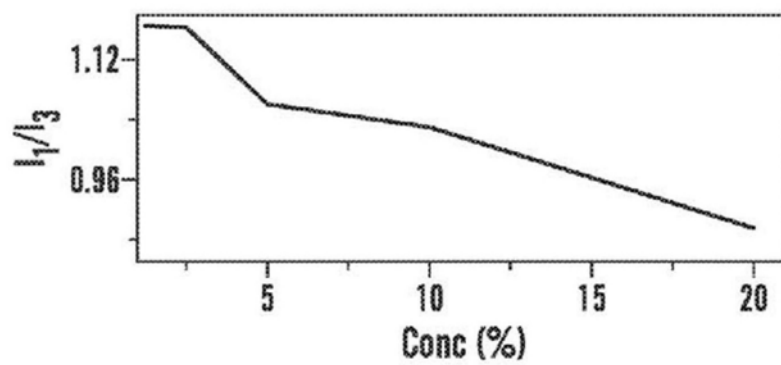


图30D

CAGE-1:2

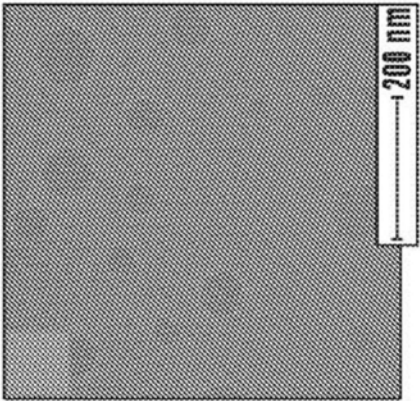


图 31A

CAGE-1:3

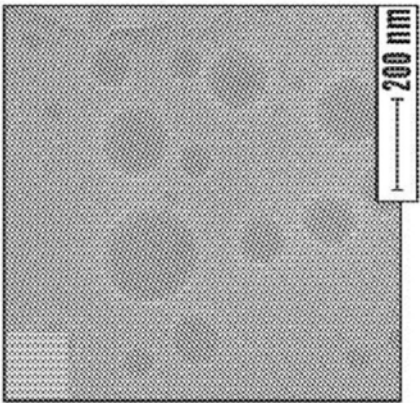


图 31B

CAGE-1:4

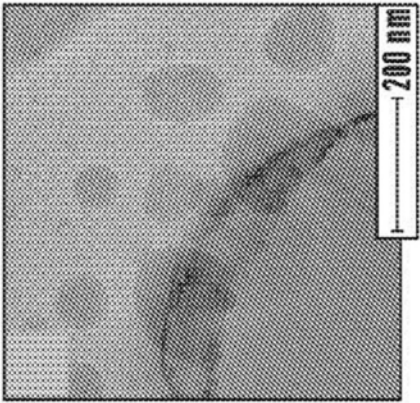


图 31C

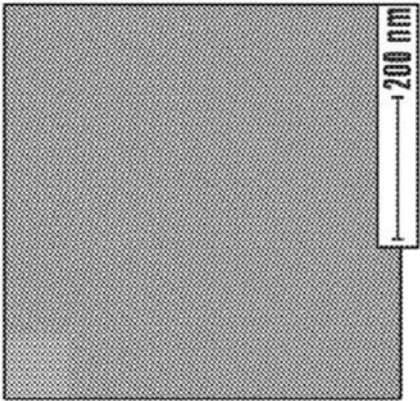


图 31D

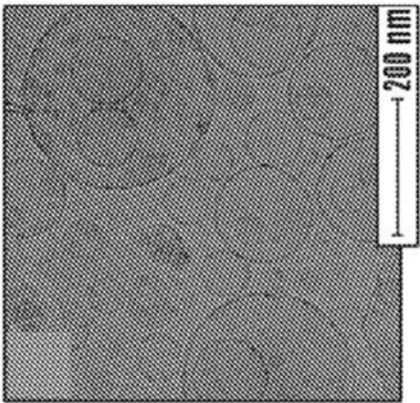


图 31E

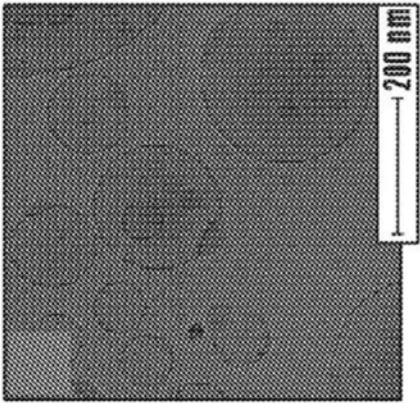


图 31F

5%, w/w,
DES-水混合物

20%, w/w,
DES-水混合物

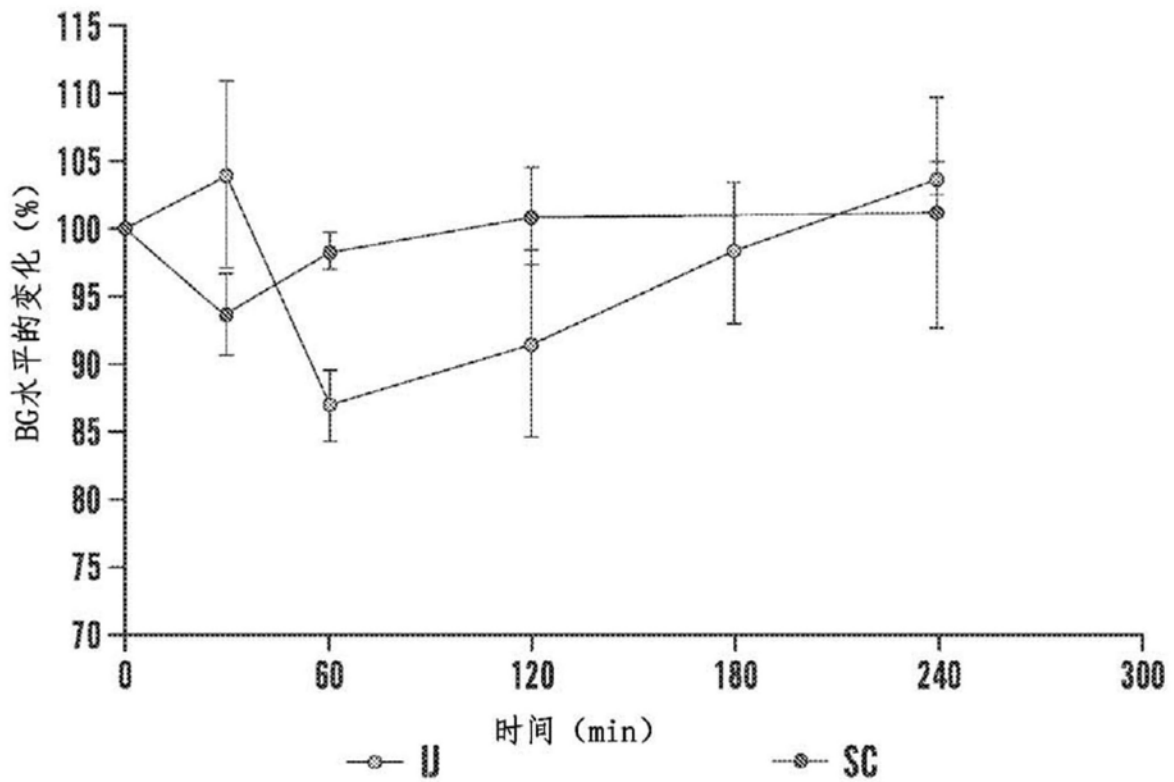
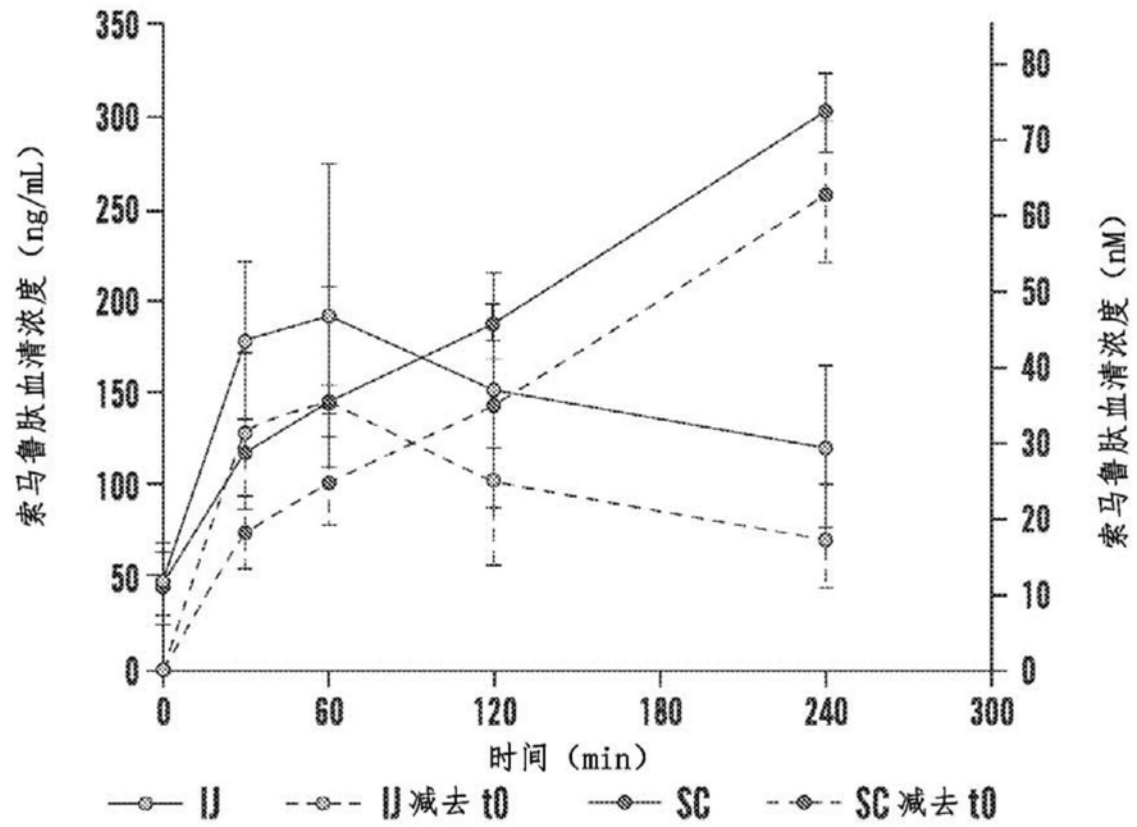


图32

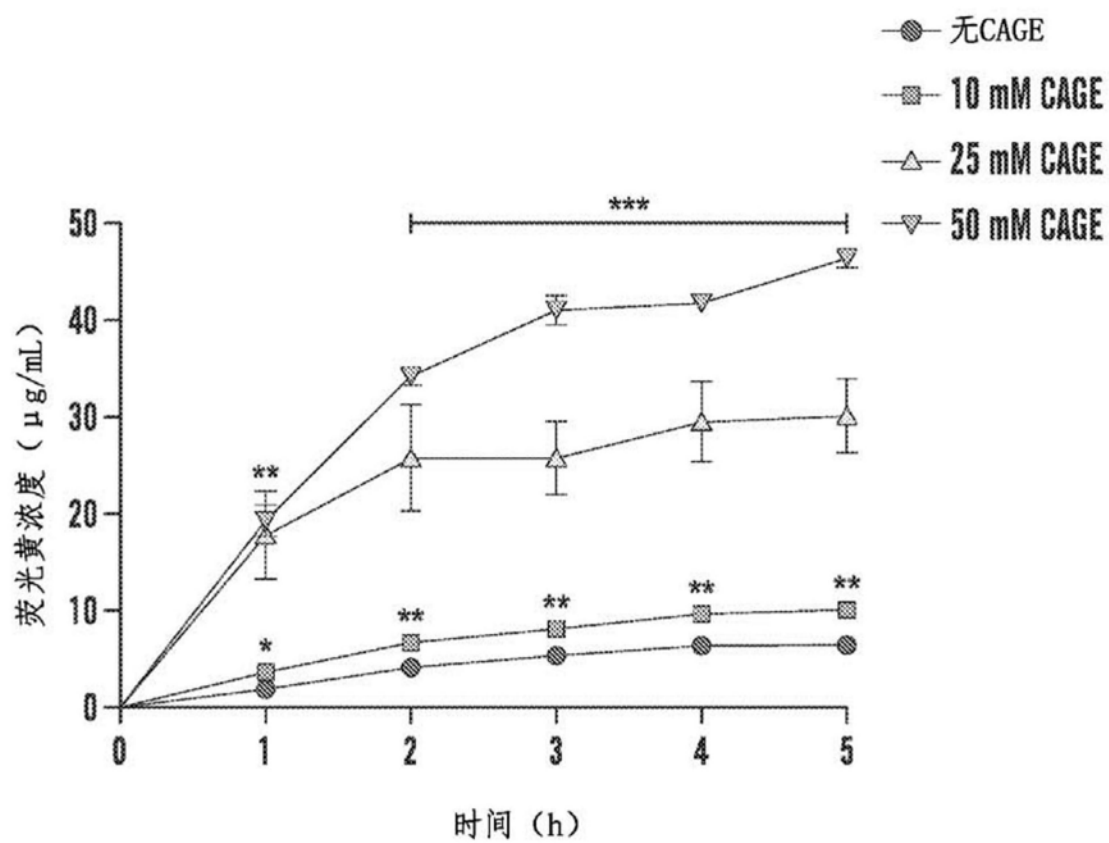


图33

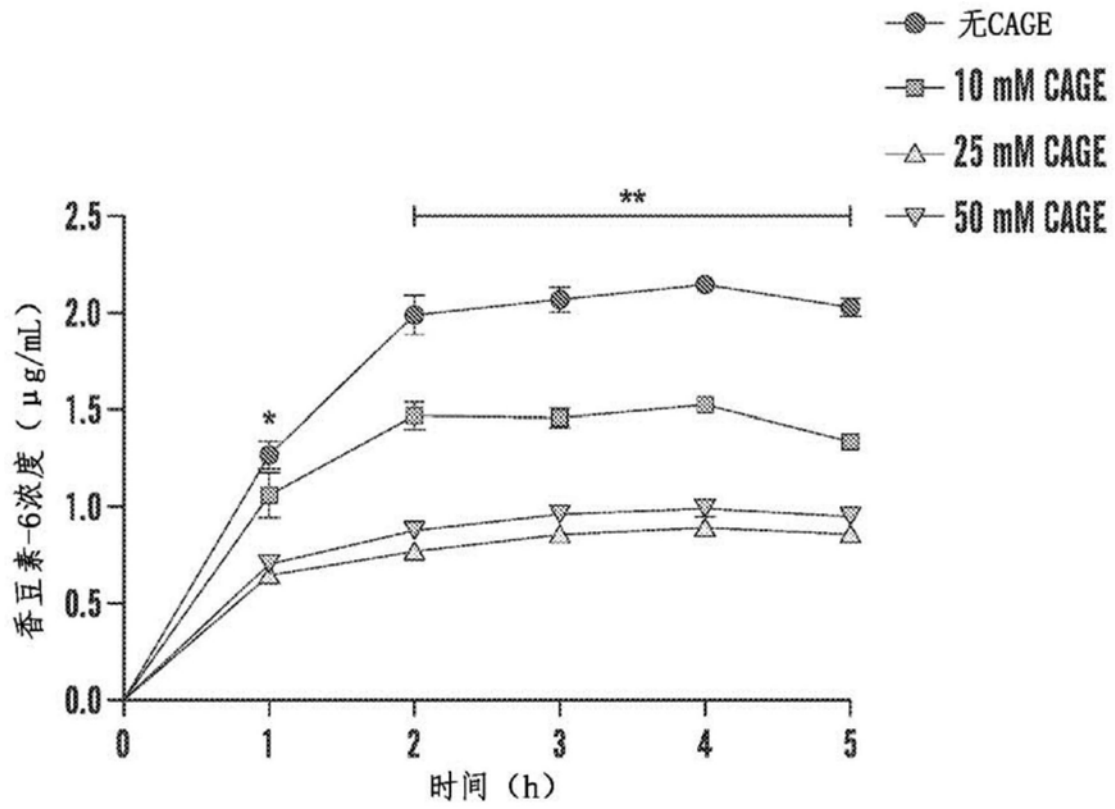


图34

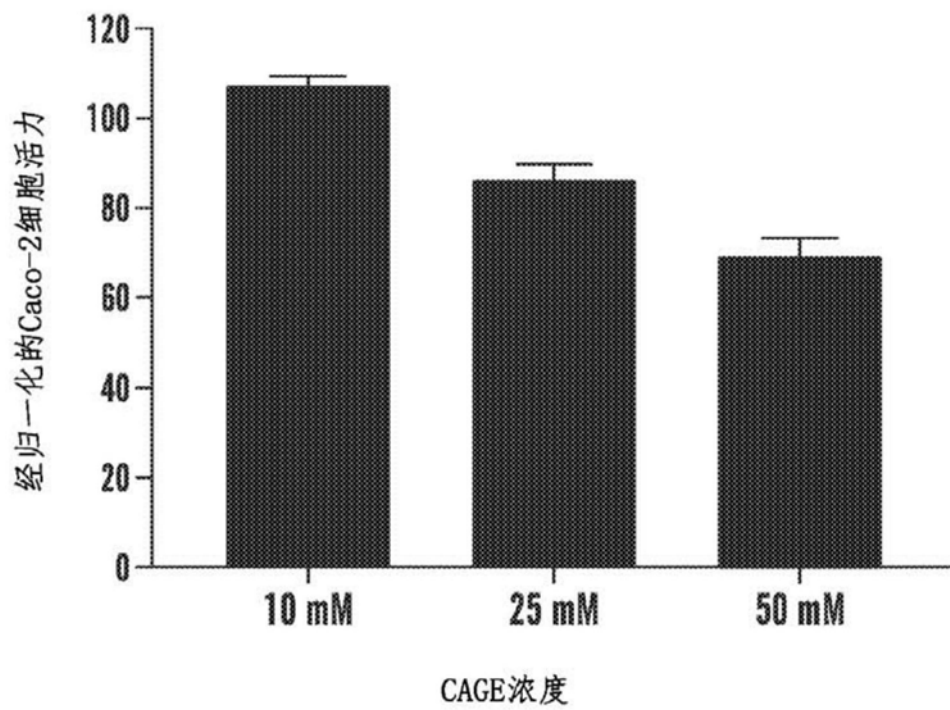


图35

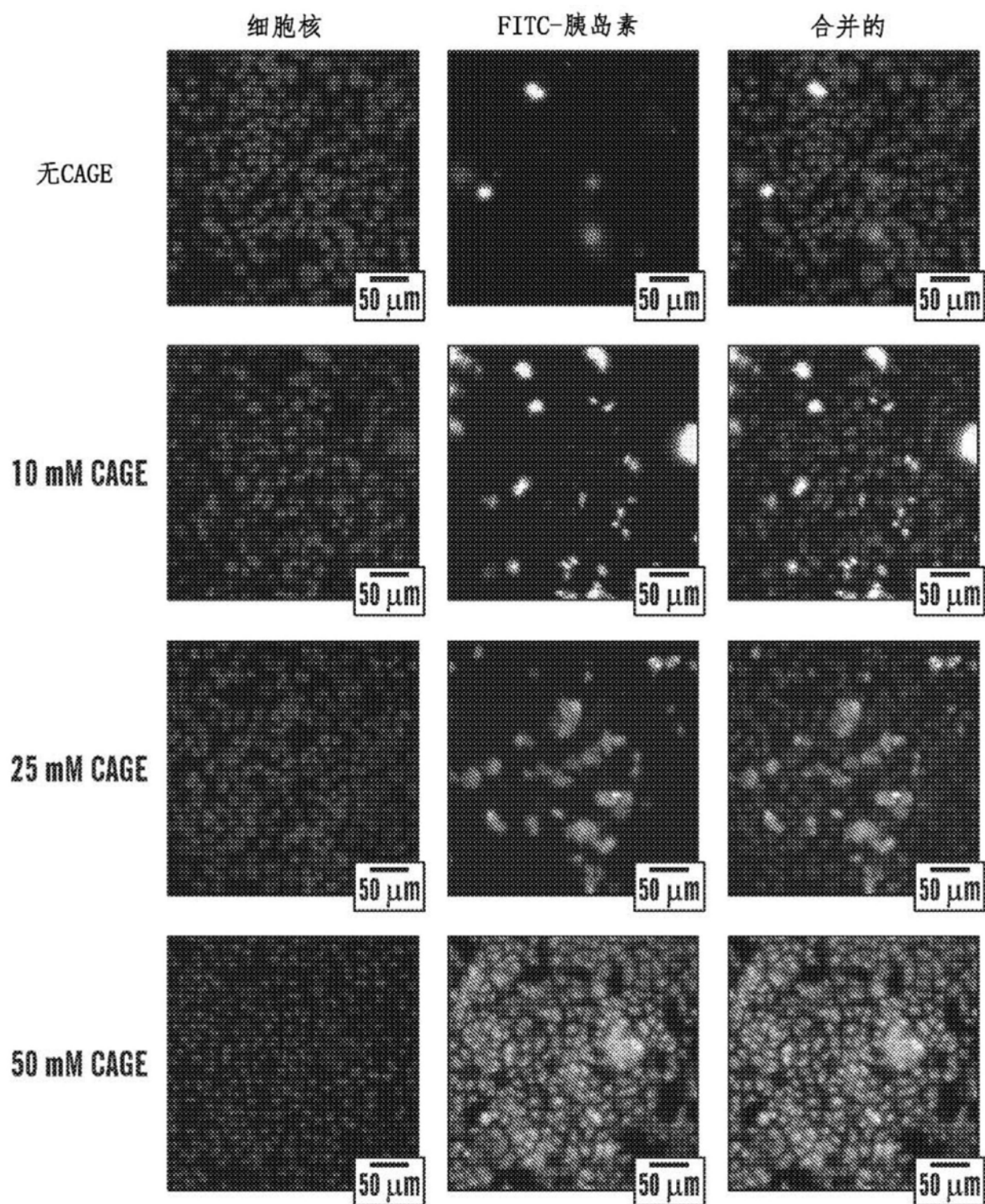


图36

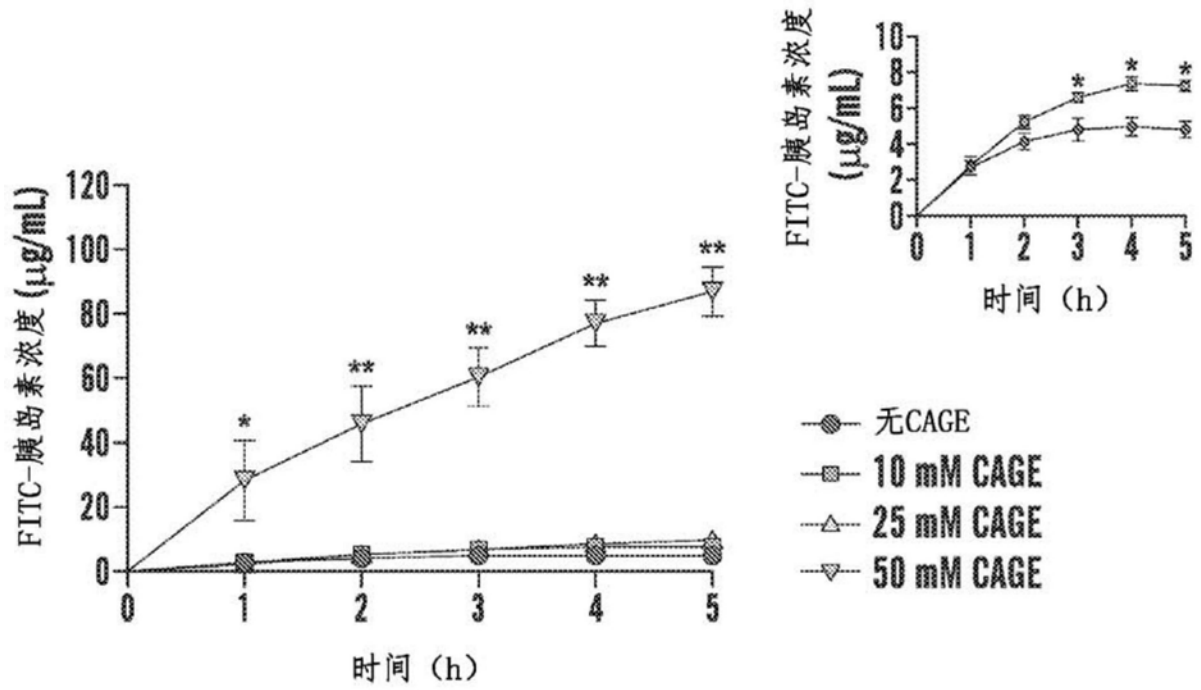


图37

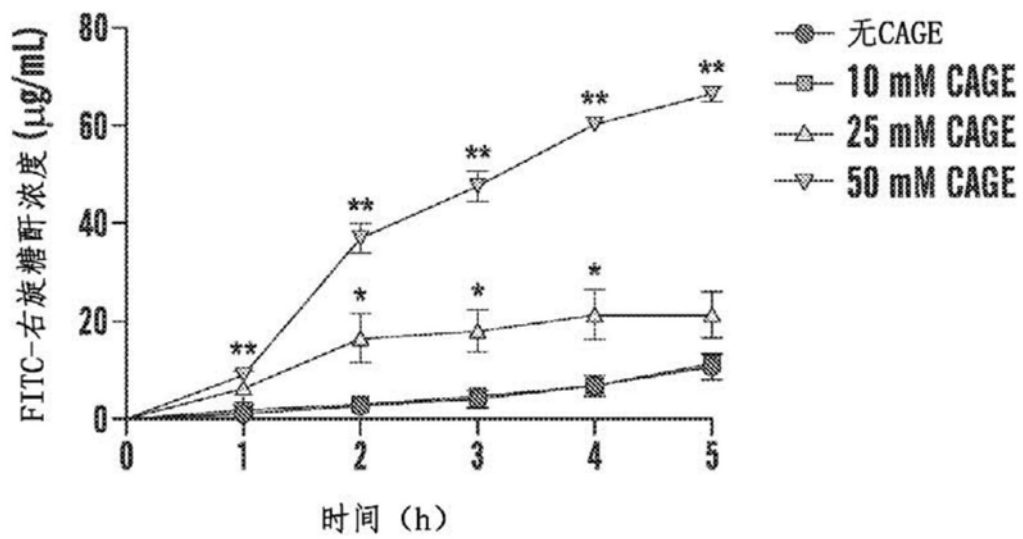


图38

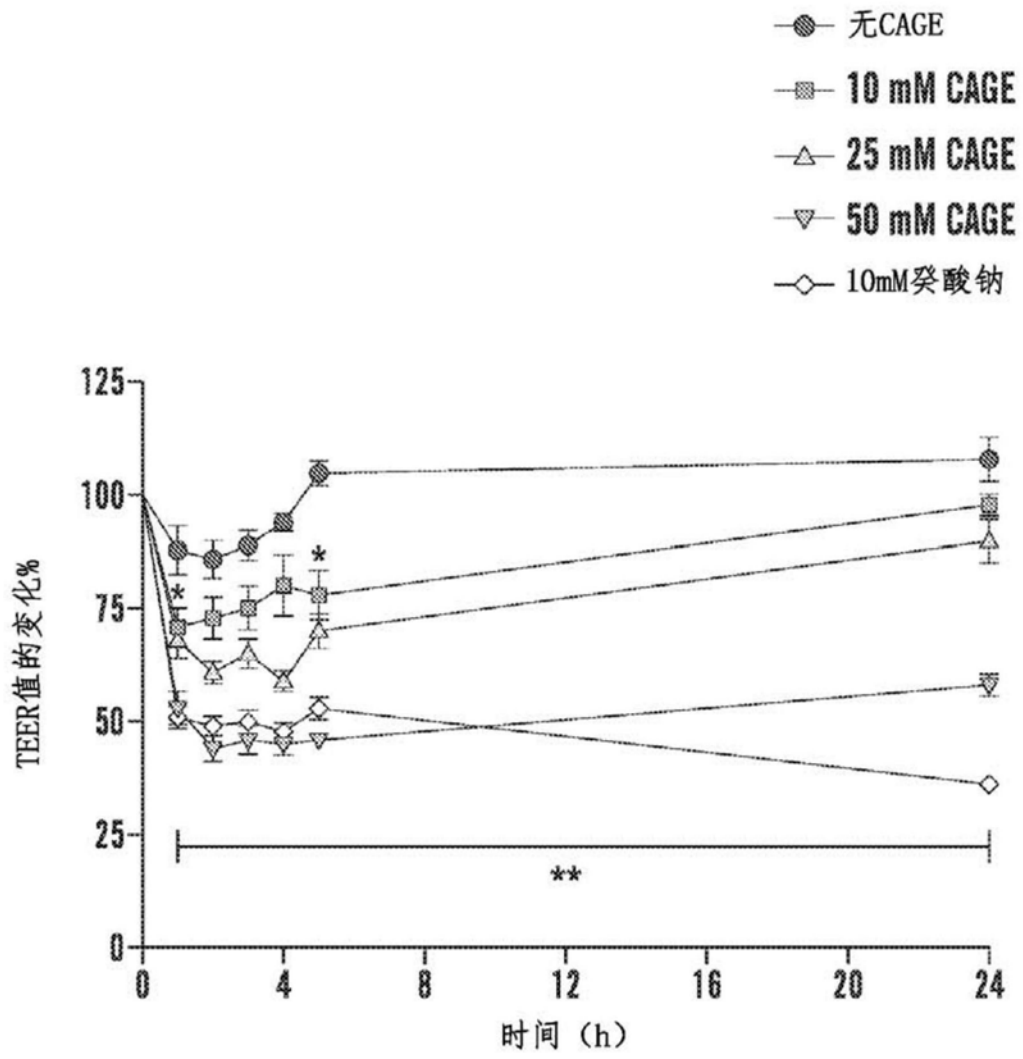


图39

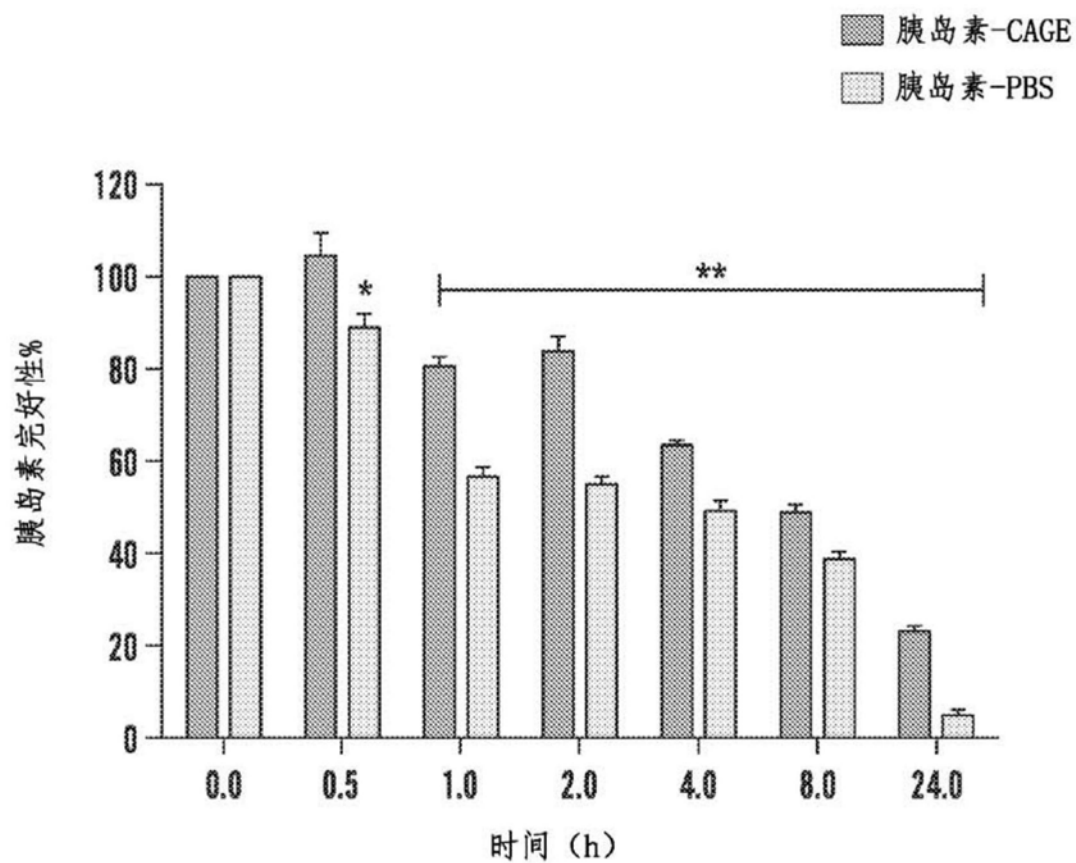


图40