



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02808639.2

[43] 公开日 2004 年 6 月 9 日

[11] 公开号 CN 1503664A

[22] 申请日 2002.3.26 [21] 申请号 02808639.2

[30] 优先权

[32] 2001.4.2 [33] FR [31] 01/04512

[86] 国际申请 PCT/FR2002/001045 2002.3.26

[87] 国际公布 WO02/078677 法 2002.10.10

[85] 进入国家阶段日期 2003.10.21

[71] 申请人 弗拉梅技术公司

地址 法国维尼希尤克斯

[72] 发明人 G·苏拉 M·布赖森

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 李华英

权利要求书 6 页 说明书 25 页 附图 3 页

[54] 发明名称 以两亲共聚物为基础的纳米粒子的
胶体悬液

[57] 摘要

本发明涉及一种在生理介质中稳定的释放活性成分如胰岛素的纳米粒子的含水悬液。所得粒子以三嵌段共聚物：聚乙二醇/亲水聚氨基酸/疏水聚氨基酸为基础。所述三嵌段共聚物粒子可以与活性成分结合，不会使其变性，并且能够在体内控制和长时间释放所述活性成分，由此能够非常长时间地释放该活性成分。本发明还涉及由其获得释放粒子的粉状固体以及所述粉状固体和以三嵌段共聚物为基础释放粒子的所述悬液的制备。本发明还涉及由所述填充有活性成分的释放粒子获得的药用特定产品。

1、一种亚微米粒子的胶体悬液，它尤其可用于向量化活性成分，这些粒子被个体化超分子排列，特征在于这些粒子：

· 以至少一种包括以下的两亲共聚物为基础：

✓ 至少一种聚亚烷基二醇 (PAG)型，优选聚乙二醇 (PEG) 的亲水聚合物嵌段；和

✓ 至少一种线性两亲共聚氨基酸 (PAA)，含有 α -肽链；和

· 能够在胶体悬液中以不溶解的形式与至少一种活性成分结合，并以持续和/或延迟方式释放所述活性成分，特别是在体内。

2、如权利要求 1 所述所述的悬液，特征在于构成这些粒子的两亲共聚氨基酸 (PAA(s)) 的氨基酸是至少两种类型：

· 第一种类型，包括至少一种亲水氨基酸 (IAA)，优选选自以下：

➢ 具有一个或多个可离子化链的氨基酸，它至少部分被离子化，优选是 Glu 和/或 Asp 及其盐和/或 Lys；

➢ 及其混合物；

· 第二种类型，包括至少一种疏水氨基酸 (OAA)，优选选自以下：

➢ 天然的中性氨基酸，有益地是以下小组：Leu、Ile、Val、Ala、Pro、Phe 及其混合物；

➢ 微量或合成的中性氨基酸，有益地是以下小组：正亮氨酸、正缬氨酸及其混合物；

➢ 极性氨基酸的衍生物，有益地是以下小组：谷氨酸甲酯、谷氨酸乙酯、天冬氨酸苄酯、N-乙酰基赖氨酸及其混合物；和

➢ 其混合物。

3、如权利要求 1 或 2 所述的悬液，特征在于构成这些粒子的两亲共聚氨基酸包括至少一种整体上亲水的嵌段和至少一种整体上疏水的嵌段。

4、如权利要求 1-3 任一项所述的悬液，特征在于构成这些粒子的两亲共聚氨基酸(PAA(s))具有“无规”结构。

5、如权利要求 1-3 任一项所述的悬液，特征在于构成这些粒子的两亲共聚氨基酸(PAA(s))具有“嵌段”结构。

6、如权利要求 5 所述的悬液，特征在于该“嵌段”两亲 PAA 有益地包括：

- 至少一个整体上是亲水的嵌段，主要由 IAA 氨基酸组成，并具有大于或等于 5 个 IAA 单体的绝对长度，优选大于或等于 200 个 IAA 单体，甚至更优选为 10-50 个 IAA 单体之间，和

- 至少一个整体上是疏水的嵌段，主要由 OAA 氨基酸组成，绝对长度大于或等于 5 个 OAA 单体，优选大于或等于 10 个 OAA 单体，更优选为 10-50 个 OAA 单体之间。

7、如权利要求 1-6 任一项所述的悬液，特征在于该亲水 PAG-优选 PEG-有益地为绝对长度大于或等于 5 个单体，优选为 5-120 个单体，甚至更优选为 5-50 个单体之间的嵌段形式。

8、如权利要求 1-3 和 5-7 任一项所述的悬液，特征在于这些粒子由“线性三嵌段”共聚物 PEG/IAA/OAA 的链组成，优选相应于下式：

(贴原文第 35 页的结构式)

其中：

→ R₁ = H、直链或支链 C₁-C₂₀ 烷基(取代或未取代的)、芳基，优选苄基(取代或未取代的)；

→ R₂ = NH、CO-NH、CS-NH、R₈-(CH₂)_t-R₉, 其中 R₈ 和 R₉ 独立地选自 OCO、OCONH、NHCO、NHCONH、CONH、COO、NH、CO; t = 1-6, [NHCH(R₁)CO-]_x;

→ R₃ = 沿该链的相同或不同自由基, 选自定义为可离子化亲水氨基酸(天然或合成衍生物)的基团, 即优选, 基团 (CH₂)_pC₆H₄OM、(CH₂)_pCO₂M、(CH₂)_pN(H_cR_{1d})₃X, 其中 p≥1, 优选 = 1 或 2; a 和 b 的值在 0-3 之间, 并且 a+b = 3; X 优选是氯离子、溴离子、硫酸根离子、硝酸根离子、磷酸氢根离子、乙酸根离子或乳酸根离子;

→ R₄ = 沿该链的相同或不同自由基, 选自 H 和 Me;

→ R₅ = 沿该链的相同或不同自由基, 选自定义为疏水氨基酸(天然或合成衍生物)的基团, 即优选基团 H、R₁、(CH₂)_qC₆H₅、(CH₂)_qC₆H₄OR₁、(CH₂)_qOR₁、(CH₂)_qCO₂R₁、(CH₂)_qCON(R₁)₂, 其中 q ≥ 1, 优选 = 1 或 2;

→ R₆ = R₄;

→ R₇ = H、R₁ 定义如上的 R₁CO、直链或支链 C₁-C₂₀ 烷基(取代或未取代的)、芳基, 优选苄基(取代或未取代的)、C₁-C₆ 羟基烷基、H、-(CH₂)_wOH、-(CH₂)_wCO₂M、-(CH₂)_w(CHR₁)_zOH、-(CH₂)_wNH₂、-(CH₂)_yC₆H₄OH、(CH₂)_yCO-N(R₁)₂; R₁₀ = H、Me、(CH₂)_vOH, 其中 w、z 和 v ≥ 1 并且 M = 金属或阳离子, 典型地是碱金属如 Na、Li、或 K、或 NH₄、R₁NH₃;

→ m > 1; n > 3; y ≥ 0.

9、如权利要求 1-8 任一项所述的悬液, 特征在于向量化粒子(纳米粒子)具有 10-500 nm, 优选 10-200 nm 的平均大小。

10、如权利要求 1-9 任一项所述的悬液, 特征在于向量化粒子(纳米粒子)包括至少一种活性成分。

11、如权利要求 1-10 任一项所述的悬液, 特征在于它是含水的

且稳定的。

12、一种粉状固体，特征在于它是由权利要求 1-11 任一项所述的悬液获得的。

13、一种由权利要求 1-3 和 5-11 任一项所述的悬液获得的粉状固体的制备方法，特征在于：

1) 将包括至少一种亚烷基二醇单体的至少一个 PAG 嵌段与包括至少一种亲水氨基酸 IAA 单体的至少一个亲水 PAA 嵌段反应，并与包括至少一种疏水氨基酸 OAA 单体的至少一个疏水 PAA 嵌段反应，这种 PAG 嵌段和这些嵌段各自包括至少一个反应性官能团，以便获得 PAG/聚 IAA/聚 OAA 嵌段”两亲共聚物；

2) 将步骤 1 中获得的 PAG/聚 IAA/聚 OAA 嵌段两亲共聚物转移到对两亲共聚物的疏水部分而言非溶剂的介质-优选水中，这样使得自发形成 PA 向量化粒子；

3) 任选，将该反应介质透析以纯化该结构化粒子的含水悬液；

4) 任选，将来自步骤 3 的悬液浓缩；

5) 任选，将至少一种活性成分活性成分与步骤 2、3 或 4 的粒子混合；

6) 除去该液体介质，收集包括携带或未携带粒子的粉状固体。

14、如权利要求 1-11 任一项所述的悬液的制备方法，特征在于将如权利要求 12 所述的粉状固体和/或通过如权利要求 13 所述的方法获得的粉状固体与对两亲共聚物的疏水部分为非溶剂的含水介质接触。

15、如权利要求 1-11 任一项所述的悬液的制备方法，特征在于它包括步骤 1、2、3、4 和任选的如权利要求 13 所述方法的步骤 5。

16、如权利要求 10 所述的悬液的制备方法，特征在于通过将含有所述亲水活性成分的液相与粒子的胶体悬液接触来将活性成分与这些粒子结合。

17、如权利要求 11 所述的悬液的制备方法，特征在于通过将所述活性成分以固体形式与粒子的胶体悬液接触来将活性成分与这些粒子结合。

18、如权利要求 1-11 任一项所述的悬液的制备方法，特征在于将如权利要求 12 所述的粉状固体和/或通过如权利要求 13 所述的方法获得的粉状固体与含有活性成分的液相接触。

19、如权利要求 1-11 任一项所述的悬液的制备方法，特征在于将如权利要求 12 所述的粉状固体和/或通过如权利要求 13 所述的方法获得的粉状固体与固态活性成分接触，并且将该固体混合物分散到液相，优选水溶液中。

20、一种产品，是如权利要求 13 所述的方法的中间体，特征在于它由为粒子前体的 PAG/聚 IAA/聚 OAA “嵌段”型，优选 PEG/聚 Glu 或 Asp/聚 ONAA 的两亲 PAA 共聚物组成。

21、如权利要求 1-11 任一项所述和/或通过如权利要求 13 所述的方法获得的悬液和/或如权利要求 12 所述的粉状固体，包括至少一种优选选自以下的活性成分：

- 疫苗，单独或与至少一种抗原结合；
- 蛋白质和/或肽，其中最优先选择的是：血红蛋白、细胞色素、白蛋白、干扰素、抗原、抗体、红细胞生成素、胰岛素、生长激素、因子 VIII 和 IX、白介素或其混合物，和造血干细胞刺激因子；
- 多糖，特别选择肝素；

- 核酸，优选 RNA 和/或 DNA 低聚核苷酸；
- 属于不同抗癌化学治疗类型的非肽-蛋白质分子，特别是蒽环霉素和紫杉烷类；
- 及其混合物。

22、一种药用、营养、植物保护或化妆品专用产品，特征在于它包括如权利要求 1-11 任一项所述和/或通过如权利要求 13 所述的方法获得的悬液和/或如权利要求 12 所述的粉状固体。

以两亲共聚物为基础的
纳米粒子的胶体悬液

本发明的领域是向量化纳米粒子的领域，它可用于活性成分的给药。这些活性成分优选是经口或鼻、阴道、眼、皮下、静脉内、肌内、真皮内、腹膜内、大脑内等路径给予动物或人体的药用产品或营养素。根据化学性质，本发明首要关注的活性成分是亲水的，例如蛋白质、糖蛋白、肽、多糖、脂多糖或多核苷酸。

本发明更具体地是涉及以聚氨基酸嵌段和例如聚亚烷基二醇(PAG)，优选聚乙二醇(PEG)的类型的亲水聚合物为基础的向量化纳米粒子的胶体悬液。

本发明既涉及纳米粒子本身，也涉及活性成分向量体系，它是由带有活性成分的纳米粒子组成的。

本发明还涉及含有这些纳米粒子的粉状固体。

本发明还涉及带有活性成分的粒子的所述胶体悬液的制备方法。

活性成分与纳米粒子结合特别是涉及改进它们的作用时间和/或它们运输到治疗位置的时间和/或增加所述活性成分的生物利用率。已经提出了许多结合技术。这些技术首先涉及使活性成分运输到其治疗作用位置，与此同时防止其遭受身体的攻击(水解、酶消化，等等)，其次，控制活性成分向其作用位置的释放，以便保持身体可以获得所需水平的量。运输和体内停留的变化所涉及的活性成分例如是蛋白质，但是也可以是完全不同的产品，合成或天然源的有机分子。

M. J. Humphrey 的评论(Delivery system for peptide Drugs, 由 S. Davis 和 L. Illum 编辑, 纽约 Plenum 出版社 1986)呈现了涉及提高活性成分的生物利用率的问题以及向量化和控制释放的体系的益处。

实际上, 两种主要类型的向量化和控制释放活性成分的体系加以区别, 其特征在于活性成分和纳米粒子的结合模式, 即:

- 经吸附结合, 如附图 1 所述, 和
- 经包封(或者经涂布)结合, 如附图 2 所述。

通过自发吸附的活性成分与纳米粒子结合是本发明涉及的体系。通常, 就活性成分而言, 自发吸附技术比经包封结合的技术受到的攻击小, 其中经常使用溶剂和/或表面活性剂, 并且还使用易于使活性成分, 特别是蛋白质性质的活性成分(保护其天然二级结构)变性的加工步骤(乳化、蒸发、蒸馏), 其中天然二级结构构成了大部分的常规目标活性成分。在经吸附结合的情况下, 通过解吸进行释放。

除了相对于纳米粒子的活性成分的结合/释放模式外, 纳米粒子的构成材料必须具有特定的工作性质。最后, 希望获得的纳米粒子的规格特别苛刻, 并且特别是包括以下规格。

1. 对纳米粒子所需的第一个规格是:
 - 首先, 纳米粒子容易与活性成分结合形成纳米粒子-活性成分体系, 这样活性成分在体内能够持续释放并持续作用(例如, 当活性成分 = 胰岛素时作用时间是至少 24 小时), 和
 - 其次, 这些纳米粒子(可以带有也可以未带有活性成分)形成稳定的含水悬液(例如至少几个月), 不需借助有机溶剂和/或表面活性剂; 即, 纳米粒子保持在悬液中, 不絮凝。
2. 纳米粒子应由生物相容的(共)聚合物组成, 它可以被除去(通过排泄)和/或快速生物降解成对身体无毒的产物。

3. 还希望纳米粒子具有足够小的尺寸，以便能够以液体悬液经受过滤器(孔径小于或等于 $0.2 \mu\text{m}$)的灭菌过滤。

4. 对该纳米粒子和纳米粒子-活性成分体系而言希望能够经过不使活性成分变性的方法获得。

5. 纳米粒子应有益地能够控制活性成分的释放速度。

6. 另一重要的规格是纳米粒子-活性成分体系能够构成优异的可注射的药用产品。这种提高的经注射-例如静脉内或肌内给药能力-“可注射性”的特征在于：

(i) 减少了注射体积(就给定的治疗剂量而言)，

(ii) 粘度低。

当治疗剂量的活性成分与最小量的纳米粒子结合时这两个性能都满足。换句话说，纳米粒子必需有高荷载的活性成分。

7. 在可注射的制品中纳米粒子的固有成本必需低，并且在这种情况下，纳米粒子还应带有高的活性成分。在最后分析时，小的尺寸和高的荷载是纳米粒子所需的主要规格。

8. 构成纳米粒子的聚合物不诱导免疫反应也是有益的。

9. 最后，纳米粒子在体内的寿命不低于活性成分所需的释放时间是有益的。

如下所述，现有技术中(a)与(g)的提议，尝试，不能满足所有这些规格。

(a) 专利 US-A-5 286 495 涉及使用带相反电荷的材料，即：藻酸盐(带负电)和聚赖氨酸(带正电)，通过蒸发水相中的蛋白质的包封方法。该加工方法能够生产大于 $35 \mu\text{m}$ 的粒子。

(b) 而且，通常使用乳化技术制备带有活性成分的微粒。例如，专利申请 WO 91/06286、WO 91/06287 和 WO 89/08449 公开了这种乳化技术，其中使用有机溶剂溶解聚合物，例如聚乳酸型的。然而，发现这些溶剂可以使特别是肽或多肽活性成分变性。

(c) 已知为类蛋白质的生物相容性纳米粒子也为已知，它早在

1970 由 X. Fox 和 K. Dose 描述于 “Molecular Evolution and the origin of Life”，由 Marcel Dekker 公司出版(1977)。因此，专利申请 WO 88/01213 提出了一种以合成多肽的混合物为基础的体系，其溶解度取决于 pH。为了获得所述发明的基质微粒，它们溶解多肽的混合物，然后随着 pH 改变，它们使得类蛋白质粒子沉淀。当在有活性成分的情况下发生沉淀时，该活性成分包封在粒子中。

(d) 作为剩余物，专利 US 4 351 337 也提到，涉及与本发明原有的活性成分向量化不同的领域。所述专利公开了固定并位于体内相当特定的位置的固体植入物。这些植入物是极微小的($160 \mu\text{m}$ ，长度等于 $2000 \mu\text{m}$)的中空管或胶囊，由共聚(氨基酸)的共聚物-例如聚(谷氨酸-亮氨酸)或聚(谷氨酸苄酯-亮氨酸)组成，它是将氨基酸 N-羧酐(NCA)单体共聚合获得的。通过从聚合物和活性成分的混合物中蒸发溶剂的技术进行包含活性成分。专利 US 4 450 150 属于上面研究的专利 US 4 351 337 的同族专利，并且基本上具有相同的主题。成分 PAA 是聚(谷氨酸-谷氨酸乙酯)。

(e) 专利申请 PCT/FR WO 97/02810 公开了一种控制释放活性成分的组合物，包括许多可生物降解的聚合物层状粒子，它至少部分结晶(乳酸聚合物)，并且活性成分吸附在所述粒子上。在这种情况下，通过解吸释放活性成分。

(f) 专利申请 PCT WO 96/29991 的主题是可用于向量化活性成分如胰岛素的聚氨基酸粒子。这些粒子大小在 $10\text{--}500 \text{ nm}$ 之间。

WO 96/29991 的这些粒子通过将 PAA 与水溶液接触自发形成。PAA 包括一由中性和疏水氨基酸单体 OAA(聚亮氨酸)形成的疏水嵌段和由可离子化且亲水单体 IAA(聚谷氨酸)形成的亲水嵌段。

(g) EP 0 583 955 公开了能够物理捕获疏水活性成分的聚合物胶束。这些胶束由嵌段共聚物组成，所述嵌段共聚物包括由聚乙二醇(PEG)组成的亲水嵌段和由聚氨基酸组成的疏水嵌段，例如：PEG/聚 ONAA (ONAA = 疏水中性氨基酸)。

该 ONAA 可以是：Leu、Val、Phe、Bz-O-Glu 或 Bz-O-Asp，优选

最后一个氨基酸。捕获在这些 PEG/聚 ONAA 胶束中的疏水活性成分活性成分例如是：阿霉素、吲哚美辛、红必霉素、甲氨蝶呤、丝裂霉素。

在该专利申请中，呈现的唯一实例是以 PEG/聚 Glu-O-Bz 为基础的胶束。现在，已知这些 Glu-O-Bz 酯不稳定，在含水介质中水解。此外，这些产物的酶水解形成潜在毒性的非天然苯衍生物。而且，在所述文献中没有记载该离子物是由 PEG/聚 ONAA 嵌段共聚物组成的，其核芯是由疏水中性聚氨基酸形成的并包括以 PEG 为基础的亲水外毛，这些离子能够与亲水活性成分结合并在体内释放它们。

而且已知，PEGs 不能生物降解，甚至能够防止纳米粒子的酶降解，因此削弱了纳米粒子的体内生物降解性，这是本发明上下文所需的主要特征之一。

因此从上面的内容得出，上述的现有技术的提议不完全满足上述的规格，尤其是规格 1（释放的持续时间和体内作用以及纳米粒子在含水悬液中的稳定性），2（生物降解性），4（不变性生产），5（控制释放速度）和 8（没有免疫反应）。

根据这种情况，本发明的主要目的之一是能够提供新的纳米粒子（吸附/解吸型），它自发形成，不需要借助表面活性剂或有机溶剂；稳定的纳米粒子含水悬液，它适用于向量化活性成分（特别是诸如胰岛素的蛋白质），并且与现有技术中已知以及上面呈现(a-g，参见上面)的向量化体系相比，首先能够显著增加活性成分的释放和在体内作用的时间。

本发明的另一主要目的是以胶体含水悬液形式提供新的纳米粒子，它稳定(特别是相对水解)或者为粉状并以聚亚烷基二醇 (PAG)/聚(氨基酸) (PAA) 嵌段共聚物为基础，这些新的纳米粒子必需最佳地

满足上面所列规格中的规格 1-9。

本发明的另一主要目的是对专利申请 EP 0 583 955 中公开的粒子的改进。

本发明的另一主要目的是提供一种纳米粒子悬液，它尽管有一 PEG 外壳，然而易于生物降解。

本发明的另一主要目的是提供一种新的纳米粒子悬液，其特征在于完全被控制，特别是在活性成分的携带量和控制活性成分释放动力学方面。

本发明的另一主要目的是提供稳定的药用纳米粒子悬液，它可以给予人或动物，例如经口或非肠道路径。

本发明的另一主要目的是提供一种含水胶体悬液或一种粉状固体，包括活性成分的向量化粒子，它满足上述规格，并且由合适且适用于给予人或动物，例如口服的呈现形式组成。

本发明的另一主要目的是提出一种 PAAs 粒子(干燥或者液体悬液)的制备方法，该 PAAs 粒子尤其可用作活性成分(特别是诸如胰岛素的蛋白质)的载体，所述方法能够更简单地进行，不使活性成分变性，并且能够精细地控制所得粒子的平均粒径。

本发明的另一主要目的是上述粒子以含水悬液或固体形式用于制备药用产品(例如疫苗)的用途，特别是可以给药，尤其是经口、鼻、阴道、眼、皮下、静脉内、肌内、真皮内、腹膜内或大脑内给药这些药用产品中的亲水活性成分，特别是蛋白质、糖蛋白、肽、多糖、脂多糖、低聚核苷酸和多核苷酸。

本发明的另一目的是提供一种药用产品，这种类型包括一持续释放活性成分的体系，容易生产且经济，并且也能够生物相容，能够保证非常高水平的活性成分生物利用率。

本发明的另一主要目的是提供一种疫苗向量化体系，它本身和与一种或多种抗原混合不致免疫。

这些目的(尤其是)是通过涉及以下的本发明实现的：首先是一种纳米粒子的胶体悬液，它尤其可用于向量化活性成分，这些粒子被个体化超分子排列。该悬液的特定特性是所述粒子：

- 以至少一种包括以下的两亲共聚物为基础：
 - ✓ 至少一种聚亚烷基二醇 (PAG)型，优选聚乙二醇 (PEG) 的亲水聚合物嵌段；和
 - ✓ 至少一种线性两亲共聚氨基酸 (PAA)，含有 α -肽链；和
- 能够在胶体悬液中以不溶解的形式与至少一种活性成分结合，并以持续和/或延迟方式释放所述活性成分，特别是在体内。

这些新型向量化粒子纳米粒子，以稳定胶体含水悬液或粉状固体形式的本发明基础之一涉及新的选择一种两亲 PAG/PAA 共聚物，例如一种[亲水聚合物/亲水聚氨基酸/疏水聚氨基酸]嵌段三聚物，

能够生产纳米大小(10–500 nm)的粒子，它形成在涉及水解和絮凝方面都稳定，没有表面活性剂和/或溶剂，并且能够通过吸附与活性成分结合并通过解吸释放这些 Aps 的水性胶体悬液。在本发明的情况下，当胶体粒子和活性成分在含水介质中接触时吸附自然并自发地发生。吸附取决于载体(纳米粒子)的性质和活性成分可以利用的载体量。

本发明的主要益处之一是获得一种纳米粒子-活性成分体系，与已知体系相比，特别是与专利申请 WO 96/29991 中所述并包括聚

(Glu)/聚 Leu 纳米粒子的体系相比，显著增加了在体内的作用时间（例如当活性成分 = 胰岛素时为 10 小时）。

而且，纳米粒子部分由亲水聚氨基酸组成的事实在提供了能够易于通过酶水解降解纳米粒子的益处，这便于从体内将其除去。

优选，包含这些粒子的两亲共聚氨基酸(PAA)的氨基酸是至少两种类型：

- 第一种类型，包括至少一种亲水氨基酸(IAA)；
- 第二种类型，包括至少一种疏水氨基酸(OAA)。

事实上，包含粒子的这些两亲共聚氨基酸(PAA)有益地包括至少一种整体上亲水的嵌段和至少一种整体上疏水的嵌段。

根据本发明，两亲共聚物的结构以及 IAA 和 OAA 氨基酸的性质经过选择以便：

- 聚合物链以小粒子(纳米粒子)形状自发构成，
- 这些粒子在水中和在生理介质中形成稳定的胶体悬液，
- 纳米粒子在含水介质中(没有有机溶剂和/或表面活性剂)通过不使活性成分变性的自发机理与蛋白质或其它活性成分结合，
- 纳米粒子在生理条件下，更具体地说在体内，以适用作药物的药动学和药效图谱从活性成分-纳米粒子结合复合物中释放活性成分；该释放动力学取决于为纳米粒子的前体的 PAG/PAA (=聚 IAA/聚 OAA)的性质。

因此，通过改变共聚物的特定嵌段结构，结合并释放活性成分的现象可以动力且定量地控制。

疏水部分聚 OAA 参与聚合物链的聚集，它在形成的纳米粒子的中

心。

根据本发明的一个优选模式：

· 亲水氨基酸(IAA)选自以下：

➢ 具有一个或多个可离子化链的氨基酸，它至少部分被离子化，优选是 Glu 和/或 Asp 及其盐和/或 Lys；它们是天然的或非天然的

➢ 及其混合物；

· 并且疏水氨基酸(OAA)选自以下：

➢ 天然的中性氨基酸，有益地是以下小组：Leu、Ile、Val、Ala、Pro、Phe 及其混合物；

➢ 微量或合成的中性氨基酸，有益地是以下小组：正亮氨酸、正缬氨酸及其混合物；

➢ 极性氨基酸的衍生物，有益地是以下小组：谷氨酸甲酯、谷氨酸乙酯、天冬氨酸苄酯、N-乙酰基赖氨酸及其混合物；和

➢ 其混合物。

根据本发明的一个优选实施方式，包含微粒的构成两亲共聚物的两亲共聚氨基酸(PAA)具有一“嵌段”结构。

根据一种变体，这些两亲共聚氨基酸(PAA)可以具有“无规”结构，条件是它仍然包括至少一个整体上为亲水的嵌段和至少一个整体上为疏水的嵌段，这样赋予了它两亲性。

优选的“嵌段”两亲 PAA 有益地包括：

· 至少一个整体上是亲水的嵌段，主要由 IAA 氨基酸组成，并具有大于或等于 5 个 IAA 单体的绝对长度，优选大于或等于 200 个 IAA 单体，甚至更优选为 10-50 个 IAA 单体之间，和

· 至少一个整体上是疏水的嵌段，主要由 OAA 氨基酸组成，绝

对长度大于或等于 5 个 OAA 单体，优选大于或等于 10 个 OAA 单体，更优选为 10-50 个 OAA 单体之间。

至于亲水 PAG-优选 PEG-它有益地是嵌段的形式，绝对长度大于或等于 5 个单体，优选在 5-120 个单体之间，甚至更优选在 5-50 个单体之间。应注意，该 PAG (例如 PEG) 嵌段可以是均聚物或共聚物，特别优选均聚物。

甚至更优选，申请人庆幸的是作为纳米粒子的构成材料，已选择一特定类的嵌段三聚物：亲水聚合物/亲水聚氨基酸/疏水聚氨基酸，它们是两亲的并且带电。这种两亲性使其能够获得新的且出人意料的性能，特别是上述的那些。因此，本发明的纳米粒子在没有任何表面活性剂和任何有机溶剂的情况下并在生理 pH 值下形成稳定的含水悬液。而且，根据三嵌段结构的选择，包括在 PAG 部分和疏水部分之间以氨基酸为基础的亲水嵌段，这些纳米粒子在体内易于通过酶水解反应降解。这是本发明优选实施方式的三聚物体系的关键点之一。

此外，该纳米粒子-活性成分组合自发形成并且首先能够在体内长时间释放并因此作用(例如，就例如胰岛素的蛋白质而言为 30 小时或更长)。因此，活性成分在体内的作用时间长，足够显著增加治疗范围并由此改善患者舒适度。

根据本发明的一个具体工作实例，粒子由“线性三嵌段”两亲共聚物 PEG/IAA/OAA 的链组成，优选相应于下式：

(贴原文第 14 页的结构式)

其中：

→ R₁ = H、直链或支链 C₁-C₂₀ 烷基(取代或未取代的)、芳基，优

选苄基(取代或未取代的);

→ R₂ = NH、CO-NH、CS-NH、R₈-(CH₂)_t-R₉, 其中 R₈ 和 R₉ 独立地选自 OCO、OCONH、NHCO、NHCONH、CONH、COO、NH、CO; t = 1-6, [NHCH(R₁)CO-]_x;

→ R₃ = 沿该链的相同或不同自由基, 选自定义为可离子化亲水氨基酸(天然或合成衍生物)的基团, 即优选, 基团 (CH₂)_pC₆H₄OM、(CH₂)_pCO₂M、(CH₂)_pN(H_cR_{1d})₃X, 其中 p≥1, 优选 = 1 或 2; a 和 b 的值在 0-3 之间, 并且 a+b = 3; X 优选是氯离子、溴离子、硫酸根离子、硝酸根离子、磷酸氢根离子、乙酸根离子或乳酸根离子;

→ R₄ = 沿该链的相同或不同自由基, 选自 H 和 Me;

→ R₅ = 沿该链的相同或不同自由基, 选自定义为疏水氨基酸(天然或合成衍生物)的基团, 即优选基团 H、R₁、(CH₂)_qC₆H₅、(CH₂)_qC₆H₄OR₁、(CH₂)_qOR₁、(CH₂)_qCO₂R₁、(CH₂)_qCON(R₁)₂, 其中 q ≥ 1, 优选 = 1 或 2;

→ R₆ = R₄;

→ R₇ = H、R₁ 定义如上的 R₁CO、直链或支链 C₁-C₂₀ 烷基(取代或未取代的)、芳基, 优选苄基(取代或未取代的)、C₁-C₆ 羟基烷基、H、-(CH₂)_wOH、-(CH₂)_wCO₂M、-(CH₂)_w(CHR₁)_zOH、-(CH₂)_wNH₂、-(CH₂)_yC₆H₄OH、(CH₂)_yCO-N(R₁)₂; R₁₀ = H、Me、(CH₂)_vOH, 其中 w、z 和 v ≥ 1 并且 M = 金属或阳离子, 典型地是碱金属如 Na、Li、或 K、或 NH₄、R_{1a}NH_b;

→ m > 1; n > 3; y ≥ 0; a+b = 4.

根据本发明, 在构成纳米粒子的共聚物中具有亲水聚氨基酸(聚 IAA)嵌段是特别有益的排列, 这是因为它提高了纳米粒子的生物降解性。该聚 IAA 嵌段优选排在亲水聚合物嵌段和疏水聚氨基酸(聚 OAA)嵌段之间。

本发明的纳米粒子粒子具有 10-500 nm, 优选 10-200 nm 的平均

大小。为了本发明的目的，术语“平均大小”和“平均粒径”意思是平均水力直径。

本发明的优点之一是能够非常好地控制这些物质的平均粒径及其粒径分布。聚合物链的自缔合的控制，因此纳米粒子大小的控制，是通过聚氨基酸组合物进行的，而且，就相同组合物而言，经过选择嵌段结构及其生产方法进行控制。以这种方式，粒径极小，为几个纳米到几十个纳米的数量级。

本发明的悬液含水并且是稳定的。

本发明不仅涉及上面定义的裸露粒子的悬液，而且涉及包括至少一种活性成分活性成分的粒子悬液。

这些粒子，可以与活性成分结合也可以不与活性成分结合，在含水液体中有益地为分散形式，但是也可以为从上述 PV 悬液中获得的粉状固体形式。

因此本发明除了涉及纳米粒子的含水胶体悬液之外，还涉及包含纳米粒子并由本发明的悬液获得的粉状固体。

应注意，疏水基团在聚合物链上的分布性质可以通过所选择的合成路径控制。在这一点上，有许多反应方案可以产生被选作用于获得本发明的纳米粒子的原料的聚合物。

根据本发明，选择制备纳米粒子悬液的一个特定方式。

因此，本发明的另一主要目的涉及以胶体悬液形式和粉状固体形式制备所选粒子(如上所述)。考虑的制备方法主要由以下组成：

- * 合成 PAG/聚 IAA/聚 OAA 共聚物(为纳米粒子的前体)，将它们转变成结构化纳米粒子粒子；
- * 任选，将由此生产的粒子纯化；
- * 任选，将这些粒子分离，优选通过浓缩、冷冻干燥、过滤或干燥。

更具体地说，该方法首先是一种制备由结构化纳米粒子形成的上述粉状固体的方法，该粒子尤其可用于向量化活性成分，这些粒子被个体化超分子排列：

- 以至少一种两亲共聚物为基础，包括：
 - ✓ 至少一种线性聚氨基酸(PAA)疏水嵌段，含有 α -肽链，制备该PAA 嵌段的疏水氨基酸 OAA 彼此相同或不同；
 - ✓ 至少一种线性聚氨基酸(PAA)亲水嵌段，含有 α -肽链，制备该PAA 嵌段的疏水氨基酸 IAA 彼此相同或不同；
 - ✓ 至少一种聚亚烷基二醇 (PAG)型，优选聚乙二醇 (PEG) 的亲水聚合物嵌段；
- 能够在胶体悬液中以不溶解的形式与至少一种活性成分结合，并以持续和/或延迟方式释放该活性成分，特别是在体内。

本方法特征在于：

- 1) 将至少一个 PAG 嵌段(包括至少一种亚烷基二醇单体)与至少一个亲水 PAA 嵌段(包括至少一种亲水氨基酸 IAA 单体)反应，并与至少一个疏水 PAA 嵌段(包括至少一种疏水氨基酸 OAA 单体)反应，这种 PAG 嵌段和这些嵌段各自包括至少一个反应性官能团，以便获得 PAG/聚 IAA/聚 OAA 嵌段”两亲共聚物；
- 2) 将步骤 1 中获得的 PAG/聚 IAA/聚 OAA 嵌段两亲共聚物转移到对两亲共聚物的疏水部分而言非溶剂的介质-优选水中，这样使得自发形成向量化粒子(纳米粒子)；

- 3) 任选，将该反应介质透析以纯化该结构化粒子的含水悬液；
- 4) 任选，将来自步骤 3 的悬液浓缩；
- 5) 任选，将至少一种活性成分活性成分与步骤 2、3 或 4 的粒子混合；
- 6) 除去该液体介质，收集包括携带或未携带粒子的粉状固体。

为了本发明的目的，术语“非溶剂”意思是讨论的两亲共聚物的部分例如在讨论的非溶剂介质中 25°C 下的溶解度小于 1 g/l.

在步骤 2 结束时，液体介质不形成均匀溶液，但是分离成分散相(纳米粒子)和没有“嵌段”两亲共聚物的相。

步骤 1 的 PAG 嵌段和聚 OAA 和聚 IAA 中的反应性官能团可以是胺或羧酸官能团。可以想到，在形成 PAG-聚 IAA 和/或 PAG-聚 OAA 和/或聚 IAA-聚 OAA 链接之前、期间或之后，进行聚合反应获得 PAG 嵌段和/或聚 IAA 亲水嵌段和/或聚 OAA 疏水嵌段。

所有这些变化都在本领域技术人员的能力范围内。

优选，在步骤 1 中：

1. 1) 在有下列物质的情况下进行由至少两种不同类型的 N-羧基氨基酸 (NCA) 酰形成的单体(首先 NCA-pIAA (“pIAA”是指 IAA 前体)，其次 NCA-OAA)的共聚合反应：

-至少一种极性溶剂，优选选自：N-甲基吡咯烷酮(NMP)、二甲基甲酰胺(DMF)、二甲亚砜(DMSO)、二甲基乙酰胺(DMAc)、吡咯烷酮；特别优选 NMP；和

-任选至少一种助溶剂，选自非质子溶剂(优选 1,4-二噁烷)和/或质子溶剂(优选吡咯烷酮)和/或水和/或醇，特别优选甲醇；

-进行水解，优选酸水解，将粒子的 PAA 前体共聚物的 pIAA 重复

单元转变成 IAA 重复单元，为此将酸性水相加入到上述有机介质中；

1. 2) 使用至少一种聚亚烷基二醇(优选 PEG 或 PPG)的 PAG 聚合物嵌段或者通过聚合亚烷基二醇单体(优选乙二醇或丙二醇)制备；该 PAG 嵌段用优选选自以下的反应基团官能化(有益地仅在其一端)：胺类(特别是伯胺或仲胺)、醇或硫醇、活化羧酸(通过与二环己基碳二亚胺、羧基二咪唑或本领域技术人员已知的任何其它试剂的在先反应)；

1. 3) 在聚合反应之前、期间或之后，将步骤 2 的官能化 PAG 加入到聚合亲水聚 IAA 和疏水聚 OAA 嵌段用的介质中。

该方法的步骤 1. 1 是受到聚合 N-羧基- α -氨基酸(NCA)酐用的已知技术的启发，例如文章“Biopolymers, 15, 1869 (1976)”和 H. R. Kricheldorf 的书籍“ α -amino acid-N-carboxy-anhydride and related heterocycles” Springer Verlag (1987) 中所述的。

根据一种变体，在步骤 1. 1 期间，所得聚(OAA)-聚(IAA)共聚物经沉淀-优选在水中-并且收集该沉淀物。该变体相当于制备粒子的间歇模式，其中以形成稳定的中间产物的沉淀物形式分离聚(OAA)-聚(IAA)共聚物。该沉淀物例如可以经过过滤、洗涤和干燥。

甚至更优选，该 NCA-pIAA 是 O-烷基化谷氨酸或天冬氨酸的 NCA，例如 NCA-Glu-O-Me、NCA-Glu-O-Et 或 NCA-Glu-O-Bz (Me = 甲基-Et = 乙基)。

而且，粒子的制备通常可以例如通过将疏水部分的非溶剂加入到溶于溶剂中的两亲共聚物的溶液中，有益地在合成该三聚物之后。将该三聚物的溶液加入到疏水部分的非溶剂中构成该方法的一个变体。该操作优选在于降低疏水部分的溶解度，以便它聚集，这样做以便形成纳米粒子。本领域技术人员能够发现降低聚合物的疏水部分的溶解

度的其它方式，例如通过改变温度、溶剂和非溶剂的性质、或者通过结合不同技术。

例如，在制备胶体悬液期间，将步骤 1 的 PAG-聚(IAA)-聚(OAA)两亲共聚物放置在含水介质中，其中至少一部分 PAG 易溶并且至少一部分 OAA 不易溶。该 PAG-聚 IAA-聚 OAA 共聚物以纳米粒子的形式存在于该含水介质中。

另一种制备本发明纳米粒子悬液的方法在于将上面作为产品的并通过获得它的方法获得的所述粉状固体与含水介质，特别是与水，即对两亲共聚物的疏水部分而言为非溶剂，接触。

因此，这些纳米粒子可以在水中在没有任何溶剂或表面活性剂的情况下获得。

优选在聚合反应之前和/或在聚合反应开始时加入官能化 PAG 嵌段，它优选在正常大气压下在 20–120°C 的温度下进行。

有益地，步骤 1.2 的 PAGs 是可商购获得的产品(例如 PEG)，或者以本身已知的方式通过聚合环氧乙烷获得。

其它参数，例如聚合物浓度、反应混合物的温度、亲水聚合物的加入方式、使用减压、反应时间等，根据所需效果调整，并且对本领域技术人员而言是公知的。

上面在呈现这些粒子的上下文中给出的聚合物的特性的描述，可以全部转移到与本方法有关的本说明书中。因此，按照本发明的方法，重复氨基酸的性质和数量、以及操作条件，可以经过选择，以便获得不同类型的具有上述特性的聚合物。

为了将一种或多种活性成分与这些粒子结合(步骤 3)，按照本发明可以进行几种方法。这些方法的非限制性实例列于下面。

按照第一种方法，通过将含有活性成分的液相(含水或不含水)与粒子的胶体悬液接触将活性成分与这些粒子结合。

按照第二种方法，通过将固态的活性成分与粒子的胶体悬液接触将该活性成分与这些粒子结合。固态活性成分可以是例如冷冻干燥物、沉淀物、粉末等的形式。

根据第三种方法，将上面作为产品的并通过其生产特性所述的粉状固体(PAA)与含有活性成分的液相(含水或不含水)接触。

按照第四种方法，将上面作为产品并通过其生产特性所述的粉状固体与固态活性成分接触。然后将该固体混合物分散到液相，优选水溶液中。

在所有这些方法中，所用的活性成分可以是纯或预配的形式。

纳米粒子的制备有益地是通过纯化步骤进行的，它包括本领域技术人员已知的工艺。在该任选的纯化步骤之后，获得纳米粒子的胶体悬液，它可以直接使用，或者可以想到通过本身已知的任何适宜物理方式分离或收集，例如：通过过滤、通过浓缩、通过超滤、通过密度梯度分离、通过离心、通过沉淀、任选通过加入盐、或者通过冷冻干燥。

根据任选步骤 5，通过任何合适的物理分离处理将杂质(盐)和溶剂除去，例如通过渗滤(渗析)(步骤 4)、过滤、pH 改变、色谱或蒸

馏。这些方法可以除去不想要的盐或溶剂。

为了浓缩(步骤 6)或者为了将所得结构化粒子与其液体悬液介质分离(步骤 7)，任选除去水相，例如通过蒸馏、通过干燥(例如在一炉中)、通过冷冻干燥或者任何其它合适物理方式：超滤、离心。步骤 7 之后，回收粉状白色固体。

基于纳米大小的粒子，悬液可以通过灭菌过滤器过滤，这样可以获得无菌可注射的药用液体，容易且便宜。凭借本发明，能够控制粒子的大小并且获得 25-100 nm 的水力直径(Dh)值是一个重要益处。

本发明还涉及上述方法的新的中间产物，特征在于它们由为粒子前体的 PAG-聚 IAA-聚 OAA 共聚物组成。

根据其另一方面，本发明涉及上面定义的和/或通过上面呈现的方法获得的一种悬液和/或一种粉状固体，该悬液和该固体包括至少一种优选选自以下的活性成分：

- 疫苗，单独或与至少一种抗原结合；
- 蛋白质和/或肽，其中最优先选择的是：血红蛋白、细胞色素、白蛋白、干扰素、抗原、抗体、红细胞生成素、胰岛素、生长激素、因子 VIII 和 IX、白介素或其混合物，和造血干细胞刺激因子；
- 多糖，特别选择肝素；
- 核酸，优先 RNA 和/或 DNA 低聚核苷酸；
- 属于不同抗癌化学治疗类型的非肽-蛋白质分子，特别是蒽环霉素和紫杉烷类；
- 及其混合物。

最后，本发明涉及一种药用、营养、植物保护或化妆品专用产品，特征在于它包括如上面定义的带有活性成分的悬液和/或粉状固

体。

按照其另一目的，本发明还涉及这些带有活性成分的纳米粒子(以悬液或固态)用于生产例如控制释放活性成分的体系的类型的药用产品。

它们例如可以是可以优选经口、鼻、阴道、眼、皮下、静脉内、肌内、真皮内、腹膜内或大脑内路径给药的药用产品。

可以想到的化妆品应用是例如包括本发明的与纳米粒子结合的活性成分的组合物，它们可以透皮使用。

下面涉及通过胰岛素形成的亲水活性成分的实施例将使本发明能够在各种产品/方法/应用方面更清楚地理解。这些实施例描述了任选携带有活性成分的聚氨基酸粒子的制备，并且类似地它们具有这些粒子的结构特征和性能。

附图简述

图 1-吸附活性成分类型的向量化粒子的方案。

图 2-包封活性成分类型的向量化粒子的方案。

图 3-注射带有比例为 0.6 IU/kg 的胰岛素的纳米粒子制剂(实施例 5)之后作为时间 t(小时)的函数的血糖 G 的变化(%基础的平均值)。

图 4-通过透射电子显微镜的纳米粒子的照片(实施例 2)。

图 5-注射带有比例为 0.6 IU/kg 的胰岛素的纳米粒子制剂(实施例 6)之后，在狗中作为时间 t(小时)的函数的血糖 G(%基础的平均值)和平均血胰岛素 I (MU/l) 的变化。

图 6-注射带有比例为 0.6 IU/kg 的胰岛素的纳米粒子制剂(实施

例 9)之后，在狗中作为时间 t (小时)的函数的血糖 G (%基础的平均值)和平均胰岛素 I (MU/1)的变化。

实施例

实施例 1：聚(亮氨酸)12-嵌段聚(谷氨酸酯)35-(聚乙二醇)113 的制备

用于将 NCA 聚合成嵌段或无规结构的聚合物的技术对本领域技术人员为已知并且详述于 H. R. Kricheldorf 的书籍 “ α -Amino Acid-N-Carboxy Anhydrides and Related Heterocycles”， Springer Verlag (1987)。以下合成详细说明了其中一种合成。

40℃下将 4.96 g 氨基乙基-PEG (分子量 5000; 聚合度(DP) 113) 溶解在 120 ml NMP 中。向其中加入 1.4ml MeOH，接着一次加入 6.4 g NCA-GluOMe。半小时之后，加入 1.8 g NCA-Leu，并使反应持续 2 小时。接下来，向反应介质中加入稀盐酸，在 80℃下将所得混合物加热 24 小时。50℃下，介质用 6N 氢氧化钠中和。将该中间体相对水透析，以除去溶解度小的残余物(溶剂、盐)。将该纯化溶液冷冻干燥得到一白色粉末。80%产率。

实施例 2：聚(亮氨酸)12-嵌段聚(谷氨酸酯)18-(聚乙二醇)17 的制备

40℃下将 2.01 g 氨基乙基-PEG (分子量 750; DP 17) 溶解在 45 ml NMP 中。向其中加入 1.5ml MeOH，接着一次加入 9 g NCA-GluOMe。半小时之后，加入 5 g NCA-Leu，并使反应持续 2 小时。接下来，向反应介质中加入稀盐酸，在 80℃下将所得混合物加热 24 小时。50℃下，介质用 6N 氢氧化钠中和。将该中间体相对水透析，以除去溶解度小的残余物(溶剂、盐)。将该纯化溶液冷冻干燥得到一白

色粉末。80%产率。

实施例 3：通过光扫描 (LS) 和透射式电子显微镜 (TEM) 证实纳米粒子

将 10 mg 实施例 1 或 2 中获得的共聚物悬浮在 10 ml 水或盐水溶液中。然后将该溶液加入到 Coulter 粒度分析仪 (或激光衍射仪) 中。测定的不同产品的粒径分析结果呈现在下表 1。

表 1-纳米粒子粒径测定

实施例	聚合物	粒径 (nm)
1	PEG ₁₁₃ -(GLU) ₃₅ -(LEU) ₁₂	80
2	PEG ₁₇ -(GLU) ₁₈ -(LEU) ₁₂	41

在本实施例中通过将实施例 2 的两亲共聚物悬浮于水中制备的向量化粒子纳米粒子也用透射式电子显微镜拍照(附图 4)。

实施例 4：这些纳米粒子与蛋白质(胰岛素)结合的试验

用 pH 7.4 的等渗磷酸盐缓冲液为原料，制备滴定度为 1.4 mg/ml 的人胰岛素溶液，相当于 40 UI/ml。将实施例 1 或 2 的 10 mg 两亲共聚物分散到 1 ml 该胰岛素溶液中。室温下培养 15 小时之后，通过离心 (60000 × g, 1 小时) 和超滤 (过滤阈值 300000 D) 将结合有向量化粒子纳米粒子的胰岛素和自由胰岛素分离。通过高效液相色谱或者通过 ELISA 测定滤液中回收的自由胰岛素并通过之差推断结合胰岛素的量。

下表 2 收集了对不同纳米粒子进行的结合度测定的结果。结合度表示结合的胰岛素相对胰岛素滴定度为 1.4mg/ml 且纳米粒子为 10 mg/ml 的制品中所用胰岛素的百分比。将该值转变为携带度，它表示能够与 100 mg 纳米粒子结合的胰岛素的最大量(mg)。

表 2-0.14 mg 胰岛素/mg 纳米粒子混合物的胰岛素结合度的测定

实施例	聚合物	最大携带度 mg/100mg PV
1	PEG ₁₁₃ -(GLU) ₃₅ -(LEU) ₁₂	10
2	PEG ₁₇ -9 (GLU) ₁₈ -(LEU) ₁₂	19

实施例 5：在健康禁食狗的情况下携带有胰岛素的纳米粒子的药动学和药效

将实施例 4 中制备的携带有胰岛素的纳米粒子悬液注射到两只因全胰切除术而患糖尿病并且从前一天晚上开始禁食的狗中。在早上 11 点以 0.5 IU/kg 胰岛素/kg 活动物体重的剂量经胸皮下给药该制品。给药体积是 0.18–0.24 ml。在时间 -4、-2、0、1、2、4、6、8、12、16、20、24、28、32、36、40、44 和 48 小时，在真空下通过颈静脉穿刺收集 1 ml 血液注于含肝素钠试管中。临时使用 30 ml 全血测定血糖。然后将该管离心并倾析，血浆于 -20°C 下贮藏用于胰岛素测定。下图 3 给出的结果显示大的低血糖效果（两只动物都具有），注射之后持续至少高达 24 小时。

表 3-在有本发明纳米粒子的情况下测定胰岛素作用时间(低血糖效果)

实施例	聚合物	血糖回到基础水平的时间(小时)	
	可溶性胰岛素(没有纳米粒子)	1	
1	PEG ₁₁₃ -(GLU) ₃₅ -(LEU) ₁₂	-	
2	PEG ₁₇ -(GLU) ₁₈ -(LEU) ₁₂	≥30	图 3

该实施例证实根据本发明在有纳米粒子的情况下胰岛素不变性。

而且，该实施例可以证实与未配制的胰岛素相比，胰岛素作用时间增加超过 30 小时，因此可以利用该纳米粒子作为控制释放胰岛素的延迟体系。还显示了如何能通过适当选择疏水基团控制作用时间。

对比实施例 6：聚(亮氨酸)₄₀-嵌段-(聚乙二醇)₁₁₃聚合物的制备

聚(Leu)₄₀-PEG 的合成：60°C 下将 10 g NCA-Leu 溶解在 150 ml

NMP 中。将 2 g 氨基乙基-PEG (M_w 5000) 的 50 ml NMP 的该 5 ml 溶液一次性加入到该单体中。2 小时之后，将该反应介质倒入 1L 水中。将形成的沉淀物过滤掉，洗涤并干燥。产率 > 95%。

将沉淀物溶解在 100ml 三氟乙酸中，接着在 1 小时内向其中加入 40 ml 水。然后用氢氧化钠将该悬液中和，相对水透析以除去由此形成的盐，冷冻干燥获得一固体产品。

对比实施例 7：在健康禁食狗中结合有胰岛素的纳米粒子的药动学和药效

配制实施例 6 的纳米粒子，然后按照实施例 5 中给出的方案注射到动物内。下图 5 给出的结果显示低血糖效果(两只动物都具有)，这样在注射之后持续高达 20 小时。

实施例 8：制剂稳定性比较

按照实施例 7 配制实施例 6 的纳米粒子、PEG-Leu₂₅。在 +4°C 下静置 1 个月之后，该制剂形成一沉淀物，它在 35°C 下不溶解，显示该纳米粒子制剂不稳定。

按照实施例 7 配制实施例 1 的纳米粒子 (聚(亮氨酸)₁₂-嵌段-聚(谷氨酸酯)₃₅-聚(乙二醇)-)₁₁₃。在 +4°C 下静置 1 个月之后，该制剂保持透明，不形成沉淀物，显示该纳米粒子制剂稳定，因此 PEG-聚 IAA-聚 OAA 三嵌段共聚物比 PEG-聚 OAA 二嵌段共聚物好。

对比实施例 9：聚(亮氨酸)₁₂-嵌段-(谷氨酸钠)₃₅聚合物的制备及其药效分析

在以下改动下按照实施例 1 制备该聚合物， M_w = 5000 且 DP = 113 的氨基乙基-PEG 替换为等摩尔量的氨水。将该纳米粒子分离，按照上面的实施例(实施例 2 和 5)以 50mg 纳米粒子/100UI 胰岛素的比例配制和注射。下图 6 给出的结果显示低血糖效果(两个动物都具有)，并且在注射之后持续高达 20 小时。

注释:

表 4: 普通胰岛素、现有技术中结合有向量化体系的胰岛素(对比实施例 6 和 8)和结合有本发明向量化粒子的胰岛素(实施例 2)的体内作用时间的对比

实施例	聚合物	血糖回到基础水平的时间(小时)	
	可溶性胰岛素(没有 PV)	1	
2	PEG ₁₇ -(GLU) ₁₈ -(LEU) ₁₂	≥30	图 3
对比实施例 6	PEG ₁₁₃ -LEU ₄₀	20	图 5
对比实施例 8	(GLU) ₃₅ -(LEU) ₁₂	20	图 6

由该表显示，本发明的体系(实施例 2)的体内作用时间(大于 30 小时)显然比现有技术的体系(WO 96/29991): 实施例 6 和 8 的长(20 小时)。

图 1

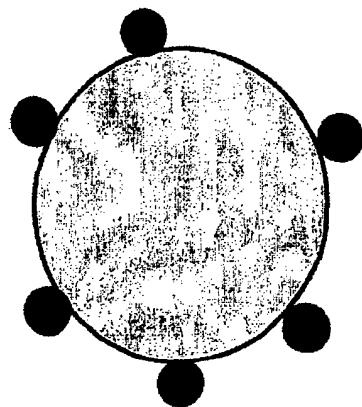


图 2

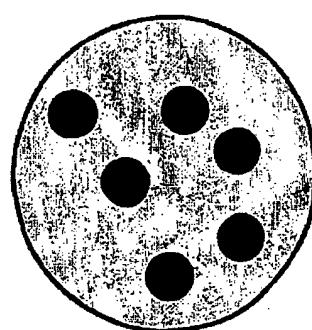


图 3

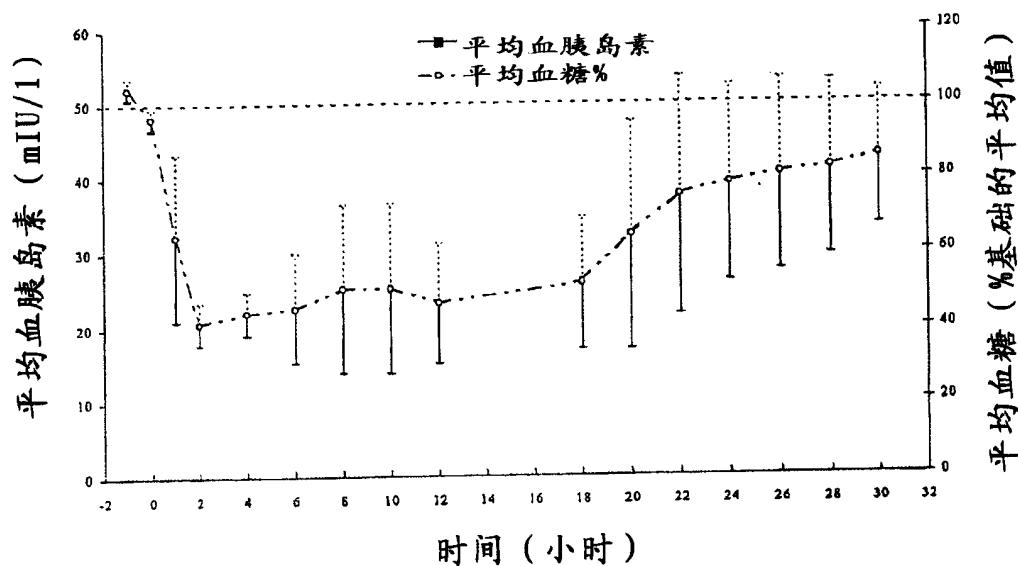


图 4

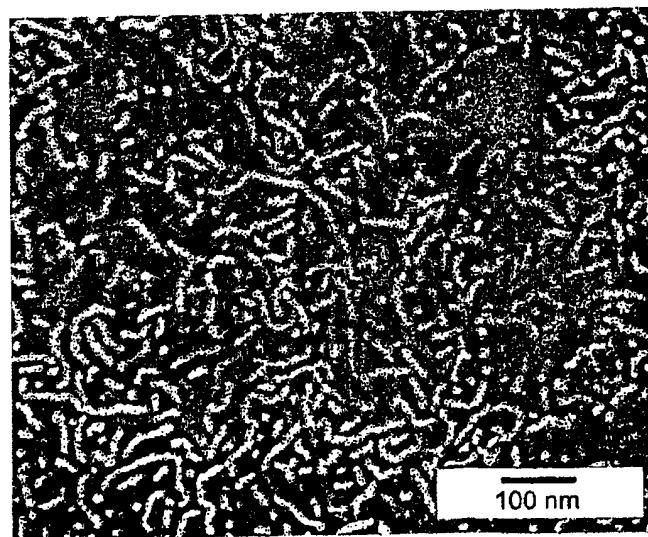


图 5

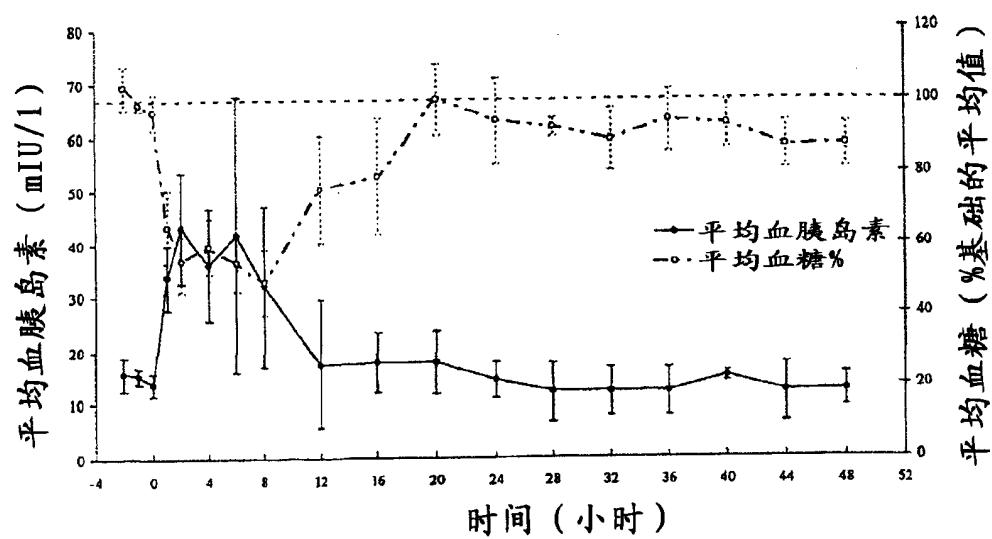


图 6

