

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 9/127

A61K 38/28



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 98812660.5

[45] 授权公告日 2005 年 3 月 16 日

[11] 授权公告号 CN 1192766C

[22] 申请日 1998.10.23 [21] 申请号 98812660.5

[86] 国际申请 PCT/EP1998/006750 1998.10.23

[87] 国际公布 WO2000/024377 英 2000.5.4

[85] 进入国家阶段日期 2000.6.23

[71] 专利权人 伊迪亚股份公司

地址 德国慕尼黑

[72] 发明人 格雷戈尔·塞夫克

审查员 任 怡

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

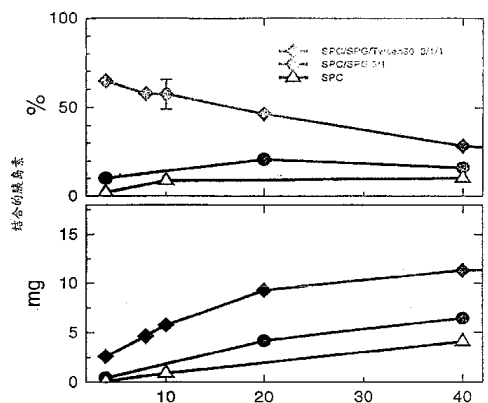
代理人 巫肖南

权利要求书 12 页 说明书 42 页 附图 12 页

[54] 发明名称 开发、测试和使用用于改进的有效负载和可控制性解缔/缔合速度的大分子和复合聚集体的缔合物的方法

[57] 摘要

本发明描述了适合开发、测试、制备和使用各种两亲性的、如果需要，修饰的大分子(例如多肽，蛋白质等等)或者其它链分子(例如合适的，部分疏水性的多核苷酸或多糖)与聚集体的复合体的原理和方法，所述聚集体包括极性和/或带电荷的两亲性物质的混合物并且形成可以自由被悬浮或支持的扩展表面。所描述的方法可以用来优化聚集体，在与发挥一定活性或有用的功能的链分子缔合后，该聚集体适合例如在药物释放、诊断或生物/催化领域体外或体内应用。作为具体实施例，描述了由负载(缔合)有胰岛素、干扰素、白细胞介素、神经生长因子、降钙素和免疫球蛋白等的脂质组成的小泡小滴的混合物。



1. 在合适的液体介质中具有两亲性性质的至少一种第一种物质和至少一种第二种物质，以及至少一种第三种物质的复合体，用于优化和控制所述的至少一种第三种物质与扩展的膜表面的缔合，所述扩展的膜表面由所述的至少一种第一种物质和至少一种第二种物质接触所述液体介质形成，其特征在于
- 在所述液体介质中所述的至少一种第一种物质和至少一种第二种物质具有不同的溶解性，
 - 在所述液体介质中，所述的至少一种第一种物质比所述的至少一种第二种物质溶解性较小，所述第一种物质选自脂质或脂质类似物质或它们的组合，并具有表面形成性质，
 - 在所述液体介质中，所述的至少一种第二种物质比所述的至少一种第一种物质溶解性大，所述第二种物质选自界面活性物质，表面活性剂，以及它们的混合物，并具有表面失稳定性质，
 - 所述的至少一种第三种物质选自链分子和大分子，并且其与由所述的至少一种第一种物质和至少一种第二种物质形成的扩展的膜表面的缔合，好于与由所述的至少一种第一种物质单独形成的扩展的膜表面的缔合，其中所述表面和所述至少一种第三种物质不具有相反的电荷。
2. 权利要求 1 的复合体，其特征在于由所述的至少一种第一种物质和至少一种第二种物质形成的扩展的膜表面，以及所述的至少一种第三种物质携带净电荷，所述扩展的膜表面的净电荷密度以及与所述扩展的膜表面缔合的所述至少一种第三种物质的分子的净电荷，具有相同的符号。
3. 权利要求 2 的复合体，其特征在于所述的扩展的膜表面，以及所述的至少一种第三种物质的分子都带正电荷或都带负电荷。
4. 权利要求 1-3 任一项的复合体，特征在于所述的至少一种两亲性物质能自身聚集形成扩展的膜表面，当所述至少一种第一种物质与其它复合体成分混合时，扩展的膜表面成为柔性更大的。
5. 权利要求 4 的复合体，其中所述其它复合体成分是所述至少一种第二种两亲性物质。
6. 权利要求 4 的复合体，其中所述第一种物质和所述第二种物质在该

介质中的溶解度差异至少 10 倍。

7. 权利要求 4 的复合体，其中所述第一种物质和所述第二种物质在该介质中的溶解度差异至少 100 倍。

8. 权利要求 1-3 任一项的复合体，特征在于其包括至少一种第一种物质能自身聚集形成扩展的膜表面的两亲性物质和至少一种第二种物质当加入到所述表面中时支持所述表面的增加的曲率的两亲性物质，所述增加曲率物质的浓度低于饱和浓度的 99%，或者低于高于该浓度就不能形成表面的浓度的 99%，无论哪个比较高。

9. 权利要求 4 的复合体，特征在于所述至少一种第二种溶解度更大或增加曲率物质的量至少是如权利要求 8 定义的相对浓度的 0.1%。

10. 权利要求 9 的复合体，其中常常是所述至少一种第二种溶解度更大或增加曲率物质的量至少是如权利要求 8 定义的相对浓度的 1-80%。

11. 权利要求 9 的复合体，其中所述至少一种第二种溶解度更大或增加曲率物质的量至少是如权利要求 8 定义的相对浓度的 10-60%。

12. 权利要求 9 的复合体，其中所述至少一种第二种溶解度更大或增加曲率物质的量至少是如权利要求 8 定义的相对浓度的 20-50%。

13. 权利要求 8 的复合体，特征在于表面具有相应于 15nm 和 5000nm 之间的平均半径的平均曲率，该平均曲率定义为表面所封闭的区域的平均半径的倒数。

14. 权利要求 13 的复合体，其中表面具有相应于在 30nm 和 1000nm 之间的平均半径的平均曲率。

15. 权利要求 13 的复合体，其中表面具有相应于在 40nm 和 300nm 之间的平均半径的平均曲率。

16. 权利要求 13 的复合体，其中表面具有相应于在 50nm 和 150nm 之间的平均半径的平均曲率。

17. 权利要求 8 的复合体，特征在于表面被固体支持。

18. 权利要求 17 的复合体，特征在于表面是被合适的曲率或大小的表面支持。

19. 权利要求 2 的复合体，特征在于表面相关的带电荷成分的相对浓度在所有形成表面的两亲性物质合起来的浓度的 5 和 100 相对摩尔%之间。

20. 权利要求 19 的复合体，其中特征在于表面相关的带电荷成分的相

对浓度在所有形成表面的两亲性物质合起来的浓度的在 10 和 80 相对摩尔% 之间。

21. 权利要求 19 的复合体, 其中特征在于表面相关的带电荷成分的相对浓度在所有形成表面的两亲性物质合起来的浓度的在 20 和 60 相对摩尔% 5 之间。

22. 权利要求 2 的复合体, 特征在于表面上平均电荷密度在 0.05Cbm^{-2} 和 0.5Cbm^{-2} 之间。

23. 权利要求 22 的复合体, 特征在于表面上平均电荷密度在 0.075Cbm^{-2} 和 0.4Cbm^{-2} 之间。

10 24. 权利要求 22 的复合体, 特征在于表面上平均电荷密度在 0.10Cbm^{-2} 和 0.35Cbm^{-2} 之间。

25. 权利要求 2 的复合体, 特征在于选择优选包括一价或低价离子的背景电解质的浓度和组成, 以使电荷-电荷相互作用对期望的缔合作用的正效应最大, 并相应于在 $I=0.001$ 和 $I=1$ 之间的离子强度。

15 26. 权利要求 25 的复合体, 其中离子强度在 $I=0.02$ 和 $I=0.5$ 之间。

27. 权利要求 25 的复合体, 其中离子强度在 $I=0.1$ 和 $I=0.3$ 之间。

28. 权利要求 1 的复合体, 特征在于在液体介质中溶解度较低的所述至少一种第一种物质是脂质或类脂质的物质, 而在液体介质中溶解度更大的所述至少一种第二种物质是一种表面活性剂, 或者与第三种缔合物质相 20 同。

29. 权利要求 28 的复合体, 其中所述至少一种第一种物质是体系中构成表面的和/或带电荷两亲性物质, 所述至少一种第二种物质是引起表面曲率、柔性或适用性增加的物质和/或是带电荷的物质。

30. 权利要求 1 的复合体, 特征在于其包括分散或悬浮于液体介质和被一层或几层至少两种类型或形式的自聚集两亲性物质的类膜包衣包围的 25 液体细微小滴形式的分子的重排, 所述至少两种物质在优选含水的液体介质中的溶解度的差异至少为 10 倍, 使得溶解度更大的物质的同型聚集体的平均直径或者两种物质的异型聚集体的平均直径小于溶解度较小的物质的同型聚集体的平均直径。

30 31. 权利要求 30 的复合体, 其中所述至少两种物质在优选含水的液体介质中的溶解度的差异至少为 100 倍。

32. 权利要求 1 的复合体, 其中能形成表面的所有两亲性物质的总含量占聚集体总干质量的 0.01%至 30 重量%。

33. 权利要求 32 的复合体, 其中所述含量是当复合体要被用来施用到人体或动物体表或体内时。

5 34. 权利要求 32 的复合体, 其中能形成表面的所有两亲性物质的总含量占聚集体总干质量在 0.1%至 15 重量%之间。

35. 权利要求 32 的复合体, 其中能形成表面的所有两亲性物质的总含量占聚集体总干质量在 1%和 10 重量%之间。

10 36. 权利要求 1 的复合体, 特征在于其含有至少一种生物相容的极性或非极性表面支持的脂质作为形成更扩展膜表面的所述至少一种第一物质。

37. 权利要求 36 的复合体, 其中由复合体形成的该表面具有双层结构。

15 38. 权利要求 36 的复合体, 其中所述至少一种第一扩展表面形成物质是来自生物源或相应的合成脂质的脂质或类脂类, 或者是这样的脂质的修饰物。

39. 权利要求 38 的复合体, 其中所述脂质是甘油酯, 甘油磷脂, 类异戊二烯脂, 神经鞘脂类, 甾族化合物, 硬脂酸精或甾醇, 含硫或含碳水化合物的脂质, 或者任何其它能形成双层的脂质。

20 40. 权利要求 39 的复合体, 其中任何其它能形成双层的脂质是半质子化的液体脂肪酸, 并且选自下面种类: 磷脂酰胆碱, 磷脂酰乙醇胺, 磷脂酰甘油, 磷脂酰肌醇, 磷脂酸, 磷脂酰丝氨酸, 神经鞘磷脂或鞘磷脂, 糖神经鞘脂类, 脑苷酯类, 脂酰基鞘氨醇己多糖苷, 硫脂类, 神经鞘缩醛磷脂, 神经节甾脂或其它糖脂或合成脂质, 包括但不限于二油酰基-, 二亚油酰基-, 二亚麻基-, 二亚麻酰基-, 二花生酰基-, 二月桂酰基-, 二肉豆蔻酰基-, 二棕榈酰基-, 二硬脂酰基, 或者相应的鞘氨醇衍生物, 或任何其它的糖脂或二酰基-, 二烯酰基-, 或二烷基-的脂质。

41. 权利要求 28 的复合体, 其中所述表面活性剂是非离子、两性离子、阴离子或阳离子表面活性剂。

30 42. 权利要求 41 的复合体, 其中所述表面活性剂是长链脂肪酸或醇, 烷基-三/二/甲基-铵盐, 烷基硫酸盐, 胆酸的一价盐, 脱氧胆酸盐, 甘氨酸胆酸盐, 甘氨酸脱氧胆酸盐, 牛磺脱氧胆酸盐或牛磺胆酸盐, 酰基-或链烷酰

基-二甲基氨基氧化物, 烷基-或链烷酰基-N-甲基葡糖酰胺, N-烷基-N, N-二甲基甘氨酸, 3-(酰基二甲基铵)-烷磺酸盐, N-酰基-磺基甜菜碱, 聚乙二醇-辛基苯基醚, 聚乙烯-酰基醚, 聚乙二醇-异酰基醚, 聚乙烯-酰基醚, 聚乙二醇-脱水山梨糖醇-酰基酯, 聚羟基乙烯-酰基醚, 或者相应的酯, 酰基-或链烷酰基-N-甲基葡糖酰胺, 烷基硫酸, 烷基硫酸盐, 脱氧胆酸钠, 甘氨酸脱氧胆酸钠, 油酸钠, 牛磺酸钠, 脂肪酸盐, 溶血磷脂, 油酰基-甘油磷脂酸, -磷酰基甘油, 或-磷酰基丝氨酸, 正-酰基-甘油磷脂酸, -磷酰基甘油, 或-磷酰基丝氨酸, 正-十四烷基-甘油磷脂酸, -磷酰基甘油, 或-磷酰基丝氨酸, 相应的棕榈油酰基, 反油酸酰基-, 11-十八碳烯酰基-溶血磷脂或者相应的短链磷脂, 还有表面活性多肽。

43. 权利要求 42 的复合体, 其中所述表面活性剂是十二烷基-二甲基-氨基氧化物, 九乙二醇-辛基苯基醚, 九乙烯-十二烷酰基醚, 八乙二醇-异十三烷酰基醚, 八乙烯十二烷酰基醚, 聚乙二醇-20-脱水山梨糖醇-单月桂酸酯, 或聚乙二醇-20-脱水山梨糖醇-单油酸酯, 聚羟基乙烯-月桂酰基、-肉豆蔻酰基、-十六烷基硬脂酰基或-油酰基醚, 或者相应的酯, 癸酰基-或十二烷酰基-N-甲基葡糖酰胺, 月桂基-或油酰基硫酸盐, 反油酸钠, 亚油酸钠, 月桂酸钠, 月桂酰基或油酰基-甘油磷脂酸, -磷酰基甘油, 或-磷酰基丝氨酸。

44. 权利要求 43 的复合体, 其中所述表面活性剂是 Tween20, Tween80, 聚羟基乙烯-8-硬脂酸酯、-月桂酸酯或-油酸酯类型, 或者聚乙氧基化的蓖麻油 40, 脱水山梨糖醇-单烷基酸酯。

45. 权利要求 44 的复合体, 其中所述表面活性剂是 Myrj 45, Cremophor EL, Arlacel 或 Span。

46. 权利要求 44 的复合体, 其中所述表面活性剂是脱水山梨糖醇-单月桂酸酯。

47. 权利要求 46 的复合体, 其中所述表面活性剂是 Arlacel20, Span20。

48. 权利要求 28 的复合体, 特征在于从复合体形成的表面含有相对浓度范围为 1-80 摩尔%的带电的膜成分。

49. 权利要求 48 的复合体, 其中从复合体形成的表面含有相对浓度范围为 10-60 摩尔%的带电的膜成分。

50. 权利要求 48 的复合体, 其中从复合体形成的表面含有相对浓度范

围为 30-50 摩尔%的带电的膜成分。

51. 权利要求 25 的复合体, 特征在于磷脂酰胆碱和/或磷脂酰甘油是支持表面的物质和溶血磷脂, 胆酸一价盐, 脱氧胆酸盐, 甘氨酸胆酸盐, 甘氨酸脱氧胆酸盐-或任何其它极性充分的甾醇衍生物, 月桂酸盐, 肉豆蔻酸盐, 5 棕榈酸盐, 油酸盐, 棕榈油酸盐, 反油酸盐或者一些其它脂肪酸和/或 Tween-、Myrj-或 Brij-型, 或者还有 Triton, 脂肪磺酸盐或-磺基甜菜碱, N-葡糖酰胺或-脱水山梨糖醇, 表面活性剂是较不能形成扩展表面的物质。

52. 权利要求 51 的复合体, 其中溶血磷脂为溶血磷脂酸或甲基磷脂酸, 溶血磷脂酰甘油, 或者溶血磷脂酰胆碱, 或者部分 N-甲基化了的溶血磷脂 10 酰乙醇胺, N-葡糖酰胺或-脱水山梨糖醇为 Arlacel 或 Span。

53. 权利要求 25 的复合体, 特征在于所述扩展表面所封闭的面积的平均半径是在 15nm 至 5000nm 之间。

54. 权利要求 53 的复合体, 其中所述平均半径在 30nm 至 1000nm 之间。

55. 权利要求 53 的复合体, 其中所述平均半径在 40nm 至 300nm 之间。

15 56. 权利要求 53 的复合体, 其中所述平均半径 50nm 至 150nm 之间。

57. 权利要求 1 的复合体, 特征在于与扩展表面缔合的第三种物质包括呈链分子形式的重复亚单元。

58. 权利要求 57 的复合体, 其中所述第三种物质包括低聚物或聚合物。

59. 权利要求 58 的复合体, 其中低聚物或聚合物具有平均分子量高于 20 800 道尔顿。

60. 权利要求 58 的复合体, 其中低聚物或聚合物具有平均分子量高于 1000 道尔顿。

61. 权利要求 58 的复合体, 其中低聚物或聚合物具有平均分子量高于 1500 道尔顿的物质。

25 62. 权利要求 57 的复合体, 特征在于第三种物质是生物源的。

63. 权利要求 62 的复合体, 其中第三种物质是生物活性的。

64. 权利要求 1 的复合体, 特征在于尤其通过将其自身插入膜和与该膜接触的液体介质之间, 而使第三种物质与类膜扩展表面缔合。

65. 权利要求 1 的复合体, 特征在于, 其中相应于第三种物质的链分子 30 子含量与吸附剂表面的质量相比在 0.001 和 50 相对百分数之间, 该特定比值可能随着所述链分子的摩尔质量的增加而减小。

66. 权利要求 65 的复合体, 其中相应于第三种物质的链分子含量与吸附剂表面的质量相比在 0.1 和 35 相对百分数之间。

67. 权利要求 65 的复合体, 其中相应于第三种物质的链分子含量与吸附剂表面的质量相比在 0.5 和 25 相对百分数之间。

5 68. 权利要求 65 的复合体, 其中相应于第三种物质的链分子含量与吸附剂表面的质量相比在 1 和 20 相对百分数之间。

69. 权利要求 57 的复合体, 其中链分子是蛋白质, 并且所述分子的至少一部分与表面缔合, 前提是这样的部分包括至少三个具有结合所述表面倾向的片段或官能团。

10 70. 权利要求 57 的复合体, 特征在于所述链分子属于天然形式的或者经过化学、生物化学或基因修饰后的多核苷酸类。

71. 权利要求 70 的复合体, 其中所述的多核苷酸类为 DNA 或 RNA。

15 72. 权利要求 57 的复合体, 特征在于所述链分子属于具有至少部分的与表面相互作用倾向的天然形式的或者一些化学, 生物化学或基因修饰后形式的多糖类。

73. 权利要求 57 的复合体, 其中链分子可以用作如下的药剂: 作为肾上腺类皮质激素抑制剂, β -抗肾上腺剂, 雄激素或抗雄激素, 抗寄生虫剂, 合成代谢剂, 麻醉剂或止痛剂, 兴奋剂, 抗变应性剂, 抗心律失常剂, 抗动脉硬化剂, 抗哮喘剂和/或支气管痉挛剂, 抗菌剂, 抗抑郁剂和/或抗精神病剂, 抗糖尿病剂, 解毒药, 止吐剂, 抗癫痫剂, 抗纤维蛋白溶解剂, 抗惊厥剂, 抗胆碱能剂, 酶, 辅酶或相应的抑制剂, 抗组胺休克剂, 抗高渗剂, 药物活性生物抑制剂, 抗低渗剂, 抗凝剂, 抗真菌剂, 抗肌无力剂, 抗帕金森病或老年性痴呆药物, 抗炎剂, 抗发烧剂, 抗风湿剂, 抗败血病剂, 呼吸回苏剂或呼吸刺激剂, 支气管松弛剂, 强心剂, 化疗剂, 冠状扩
20 展剂, 细胞生长抑制剂, 利尿剂, ganglium-阻断剂, 糖皮质激素, 抗-流感剂, 止血剂, 催眠剂, 免疫球蛋白或其片段或者任何其它免疫活性物质, 生物活性碳氢化合物, 生物活性碳氢化合物衍生物, 避孕药, 抗偏头痛剂, 盐皮质激素, 吗啡拮抗剂, 肌肉松弛剂, 麻醉剂, 神经治疗剂, 神经安定剂, 神经传递素或者其拮抗剂, 肽, 肽衍生物, 眼科药, 副-交感神经剂或
25 副交感神经阻滞药, 交感神经剂或交感神经阻滞药, 蛋白质, 蛋白质衍生物, 牛皮癣/神经性皮炎药, 扩瞳药, 神经刺激剂, 鼻科药, 任何催眠剂或
30

者其拮抗剂，镇静剂，解痉药，结核菌抑制剂，泌尿科药，血管收缩剂或血管舒张剂，病毒抑制剂或者任何愈合伤口的物质或者这些药剂的任何组合。

5 74. 权利要求 1 的复合体，其中所述第三种物质链分子或试剂是生长调节剂。

75. 权利要求 1 的复合体，其中所述第三种物质试剂具有免疫调节性质，包括抗体，细胞因子，淋巴因子，趋化因子和植物、细菌、病毒、病原体或者免疫原相应的活性部分，或者其部分或修饰物。

10 76. 权利要求 1 的复合体，其中所述第三种物质试剂是一种酶，辅酶或一些其它类型的生物催化剂。

77. 权利要求 1 的复合体，其中所述第三种物质试剂是识别分子，包括粘附素，抗体，连环蛋白，选择蛋白，陪伴蛋白，或者其部分。

78. 权利要求 1 的复合体，其中所述试剂是激素。

79. 权利要求 78 的复合体，其中所述激素是胰岛素。

15 80. 权利要求 1 的复合体，特征在于其含有 1-500I. U. 胰岛素/毫升。

81. 权利要求 80 的复合体，其中胰岛素为 20-400I. U. 胰岛素/毫升。

82. 权利要求 80 的复合体，其中胰岛素为 50-250I. U. 胰岛素/毫升。

83. 权利要求 79-82 的复合体，其中胰岛素是人重组体或人源化类型。

20 84. 权利要求 1 的复合体，特征在于其含有 0.01 毫克至 20 毫克白细胞介素/毫升，所述白细胞介素适合在人体或动物体内使用，包括 IL-2, IL-4, IL-8, IL-10, IL-12, 任选最后稀释后达到实际期望的药物浓度范围。

85. 权利要求 84 的复合体，其含有 0.1 至 15 毫克白细胞介素/毫升。

86. 权利要求 84 的复合体，其含有 1 至 10 毫克白细胞介素/毫升。

25 87. 权利要求 1 项的复合体，特征在于其含有多达 20 相对重量%干扰素，所述干扰素适合在人体或动物体内使用，包括但不限于 α -， β -， γ -IF，任选最后稀释后使药物浓度达到实际优选浓度范围。

88. 权利要求 87 的复合体，其含有 0.1 毫克至 15 毫克干扰素/毫升。

89. 权利要求 87 的复合体，其含有 1 至 10 毫克干扰素/毫升。

30 90. 权利要求 1 的复合体，特征在于，其含有多达 25 毫克神经生长因子/毫升悬浮液或者多达 25 相对重量%的神经生长因子作为药剂，并且任选

在使用前稀释。

91. 权利要求 90 的复合体, 其含有 0.1-15 相对重量%蛋白质。

92. 权利要求 90 的复合体, 其含有 1-10 相对重量%神经生长因子。

93. 权利要求 90-92 任一项的的复合体, 其中神经生长因子是人重组
5 神经生长因子。

94. 权利要求 1 的复合体, 特征在于, 该悬浮液含有多达 25 毫克免疫球蛋白/毫升悬浮液或者多达相对于总脂质的 25 重量%免疫球蛋白, 其中该试剂以完整抗体, 其部分, 或者其生物可接受的或活性修饰形式使用。

95. 权利要求 94 的复合体, 其中含有 0.1 相对重量%至 15 相对重量%
10 蛋白质。

96. 权利要求 94 的复合体, 其中含有 1 相对重量%至 10 相对重量%免疫球蛋白。

97. 制备活性剂形式的权利要求 1-96 任一项的复合体活性试剂的制
剂的方法, 特征在于下面步骤:

15 -选择所述至少一种第一种物质和所述至少一种第二种物质, 在合适的液体介质中它们的溶解度不同;

-这样至少当与所述介质接触而复合时, 它们形成扩展的膜表面;

20 -使得与只是由在液体介质中溶解度较小并且比单独所述至少一种第一种物质形成更加扩展的表面的所述至少一种第一种物质所形成的表面相比, 通过物质的复合而形成的扩展的膜表面吸引活性剂并且与活性剂缔合至较大程度。

98. 权利要求 97 的方法, 其中所述复合体活性试剂是生物、化妆和/或药学活性试剂。

99. 权利要求 97 的方法, 特征在于, 表面形成物质的复合体通过在试
25 剂分子存在下的过滤, 压力变化或者机械匀化, 振荡, 搅拌, 混合, 或者利用任何其它控制的机械破碎法来产生。

100. 权利要求 97 的方法, 其中使表面形成物质的选择的复合体吸附
30 到或者以一些其它的方式永久接触合适的的支持固体表面, 然后通过一次加入物质或同时加入几种物质而与液体介质接触, 从而后面的表面形成步骤的至少一步是在接着与固体支持的表面缔合的试剂存在下进行的。

101. 权利要求 97 的方法, 特征在于, 不管是悬浮于液体介质或固体

支持的，吸附表面或其前体首先通过下面的步骤制备，所述步骤可以包括依次混合表面形成分子，然后加入缔合分子并允许与所述表面缔合，任选通过搅拌，混合或温育协助进行，前提是这样的处理不破坏所进行的表面。

5 102. 权利要求 97-101 中任一的方法，特征在于试剂分子所缔合的表面相应于权利要求 1-37 任一项的表面。

103. 权利要求 97 的方法，特征在于液体介质悬浮液的特征相应于权利要求 1-47 任一项。

10 104. 权利要求 97 的制备用于各种药剂的非入侵式施用的制剂的方法，所述试剂可以是抗糖尿病试剂，生长因子，免疫调节剂，酶，识别分子，等等，或者肾上腺皮质抑制剂，肾上腺素抑制剂等等，其中能与所述试剂分子缔合的表面由至少一种两亲性物质，至少一种亲水性液体，至少一种界面活性物质或表面活性剂和至少一种药剂形成，在一些情况下，还有其它常规成分，其一起形成所述的制剂。

15 105. 权利要求 104 的方法，特征在于，至少一种界面活性物质或表面活性剂、至少一种两亲性物质、至少一种亲水性液体和试剂分开混合，任选将其溶解以形成溶液，然后将所得到的混合物或溶液相组合以接着优选通过机械能作用诱导与试剂分子缔合的实体的形成。

20 106. 权利要求 104 或 105 的方法，特征在于所述两亲性物质可以直接使用，或者溶解于生理相容性的极性液体中，该液体可以是水或者与水混溶，或者与极性溶液一起溶解于溶剂化介导的试剂中。

107. 权利要求 106 的方法，其中所述极性溶液包括至少一种界面活性物质或者一种表面活性剂。

25 108. 权利要求 106 的方法，特征在于通过向液相加入物质，反相蒸发，注射或透析，任选借助于机械压力，或者使用常规驱动压力过滤而诱导所述表面的形成。

109. 权利要求 108 的方法，其中机械压力为振荡，搅拌，振动，匀化，超声，剪切，冷冻和融化。

30 110. 权利要求 108 或 109 的方法，特征在于通过过滤诱导所述表面的形成，过滤材料具有 $0.01\mu\text{m}$ 和 $0.8\mu\text{m}$ 之间的孔径大小，借此可以串联或平行使用几种过滤器。

111. 权利要求 110 的方法，其中过滤材料具有 $0.02\mu\text{m}$ 和 $0.3\mu\text{m}$ 之间

的孔径大小。

112. 权利要求 110 的方法，其中过滤材料具有 0.05 μm 和 0.15 μm 之间的孔径大小。

5 113. 权利要求-104 的方法，特征在于制备所述试剂和载体，使在吸附表面形成后至少部分缔合。

114. 权利要求 104 的方法，特征在于仅在施用该制剂之前制备药剂分子所缔合的所述表面，如果方便，从合适的浓缩物或冻干物开始。

115. 权利要求 1 的复合体制备药物载体，药物贮库或者用于任何其它类型的药物或生物应用的用途。

10 116. 权利要求 2-96 任一项的复合体制备药物载体，药物贮库或者用于任何其它类型的药物或生物应用的用途。

117. 权利要求 1 的复合体在生物工程或基因操作中的用途。

118. 权利要求 2-96 任一项的复合体在生物工程或基因操作中的用途。

15 119. 权利要求 1 的复合体在用于生物处理或者诊断目的分离技术中的用途。

120. 权利要求 2-96 任一项的复合体在用于生物处理或者诊断目的分离技术中的用途。

20 121. 权利要求 1 的复合体稳定表面缔合分子的用途，所述分子是至少部分两亲性的物质，和/或在涉及表面缔合状态的这样的分子的催化方法中的用途。

122. 权利要求 2-96 任一项的复合体稳定表面缔合分子的用途，所述分子是至少部分两亲性的物质，和/或在涉及表面缔合状态的这样的分子的催化方法中的用途。

25 123. 权利要求 121 的用途，其中所述分子是链分子。

124. 权利要求 121 的用途，其中所述分子是蛋白质和它们的衍生物，多肽，多核苷酸或多糖。

30 125. 权利要求 1 的复合体影响所说的表面缔合分子和复合的可适用表面之间的缔合和解缔的动力学和/或可逆性的用途，其中较高表面电荷密度和/或较大表面柔软度和/或表面缺陷密度加速缔合，或者相应的降低减慢缔合速度，或者还诱导部分分子解缔。

126. 权利要求 2-96 任一项的复合体影响所说的表面缔合分子和复合的可适用表面之间的缔合和解缔的动力学和/或可逆性的用途，其中较高表面电荷密度和/或较大表面柔软度和/或表面缺陷密度加速缔合，或者相应的降低减慢缔合速度，或者还诱导部分分子解缔。

开发、测试和使用用于改进的有效负载
和可控制性解缔/缔合速度的大分子
5 和复合聚集体的缔合物的方法

本发明涉及当与液体介质接触时表现出两亲性性质并且能形成扩展表面、尤其是膜类表面的物质的复合体。更具体地说，本发明涉及分子水平上的其它两亲性物质与这类表面的缔合作用，从而这类其它两亲性表面缔
10 合的物质典型地是具有重复亚单元的较大分子，例如寡聚物和聚合物，并且经常是源于生物活性剂类。

本发明进一步涉及制备这类表面的方法和在这类较大分子和表面之间产生缔合物的方法以及这类表面和缔合物的各种用途。

两亲性链分子和相关的大分子，例如蛋白质吸附到任何类型的表面上，但是以不同的量相吸附，并且大多数情况下，以不同的构象吸附。本
15 发明描述了现有技术并且提供了一种新的优化和控制大分子与软的复合体表面缔合的理论基础。这对于将来的生物学、生物技术、药学、治疗和诊断应用应该是有价值的。

(大)分子吸附/结合到一种吸附剂表面(吸附剂/吸附物缔合作用)是多步
20 骤过程:

i) 第一步包括吸附物在吸附剂/溶液界面处的重分配，优选累积。该步骤一般快而且扩散速度可控制。

ii) 在第二步骤中，吸附物分子与软(膜)表面疏水性缔合。该过程包括几个阶段，例如部分分子结合和顺序重排，它们中至少一些经常是慢的。

有人提出(Cevc, G., Strohmaier, L., Berkholz, J., Blume, G.生物物理研究
(Stud.Biophys.) 1990, 138: 57ff)通过邻近界面减小大分子特异性结合到包埋在“软”脂质膜中的连接表面的配体上的可能性。这似乎是由于相同的非
25 库仑水合作用-依赖性力，其还防止相邻脂质膜彼此胶体破裂。总的产生的力随着脂质-溶液界面的亲水性和劲度的降低而降低(Cevc, G., Hauser, M.,
30 Kornyshev, A.A. Langmuir 1995, 11:3103-3110)。

以前还推测蛋白质非特异性吸附到脂质双层上的程度(Cevc, 等.,在所

引的书中, 1990)与对膜中蛋白质的疏水性结合位点的可得性成正比。发现在脂双层机械(例如通过超声)产生缺陷或者通过诱导脂质相过渡会增加膜结合蛋白质的量。

一般认为, 表面疏水程度越大, 两亲性大分子吸附程度就越大。例如, 5 K.Prime 和 G.M. Whitesides, (科学(Science), 1991, 252:1164-1167)证明了该“规则”或“原理”, 其使用自己设计的带有不同疏水性端基的单层的长链烷烃通过疏水性氨基酸结合来系统性改变蛋白质的吸附。迄今, “疏水性引力”因此被认为是蛋白质吸附中的主要力。

另一方面, 普遍接受浸在中性 pH 水溶液中的亲水性大分子例如蛋白质 10 和亲水性表面, 例如玻璃或蒙脱石粘土之间的净宏观相互作用被强的斥力控制。因此, 在可应用范德瓦耳斯、路易斯酸-碱和电子双层相互作用的宏观规模规则条件下, 亲水性蛋白质吸附到亲水性矿物表面上的作用通常是弱的(H.Quiquampoix 等, 蛋白质吸附到土壤矿物表面上的机理和结果, 界面蛋白质(PAI), 第 23 章, T.A.Horbett 和 J.L.Brash 编著, ACS 论文系列 602, 15 1995, 纽约: 321-333)。即使比它们吸附到疏水性表面更稀少, 但是一些亲水性蛋白质确实吸附到溶液中的玻璃上; 这样的蛋白质还可吸附到蒙脱石粘土表面上。为了解释这种重要的现象, 实验数据提示和支持通过结合到带(负)电荷亲水性蛋白质的多价抗衡离子(例如钙), 蛋白质能够结合浸在含水介质中的相等(例如负的)带电荷的亲水性矿物表面上。其它难以理解的电荷作用 20 涉及氢键的形成, 蛋白质成盐, 和抗衡离子的结合。例如, 有人提出“蛋白质分子中的结构重排, 吸着剂表面的脱水, 带电荷基团的重分配和蛋白质表面极性”都可能影响蛋白质吸附(Haynes, C.A.等, 胶体表面 B:生物界面, 2,1994:517-566)。与此相一致, 库仑相互作用尽管重要, 但是其一般不控制蛋白质对固体表面的吸附, 正如在蛋白质载有大量净负电荷条件下 α - 25 LA(α -乳清蛋白)对 PS(聚苯乙烯)强吸附的情况。另一项近期研究承认“迄今为止关于电荷对蛋白质吸附的作用的程度没有明确的一致意见”(蛋白质吸附的可逆性和机理, W. Norde 和 C.Haynes, 第 2 章(PAI), 在所引的书中:26-40)。

对于软表面, 例如膜, 目前流行的观点是至少蛋白质吸附中的第一步 30 是静电驱动和/或电荷控制的(参见例如: Deber, C.M.; Hughes, D.W.; Frasez, P.E.; Pawagi, A. B.; Moscarello, M. A., Arch. Biochem. Biophys. 1986, 245:455-

463; Zimmerman, R. M., Schmidt, C. F., Gaub, N. H. E. J. Colloid Int. Sci.1990, 139:268-280; Hernandez-Casedis, T.; Villalain, J.; Gomez-Fernandez, J.C. Mol. Cell. Biochem. 1993, 120:119-126)。先导的专家还得出结论: 静电力对于分泌型磷脂酶对各种脂质聚集体的结合是关键的(Scott, D.L.; Mandel, A.M.; 5 Sigler, P.B.; Honig, B. Biophys. J. 1994, 67:493-504)。

至今, 技术人员相信最终蛋白质吸附的主决定因素是疏水性引力, 而与在其吸附期间蛋白质构象变化引起的熵的增加结合的离子相互作用也起一些作用。

蛋白质一般强吸附到带相反电荷的表面上, 而不吸附到具有相同电荷的表面上。蛋白质吸附的 pH 依赖性反映该事实。电荷作用有时能被“潜伏” 10 因子所混淆, 例如小多价抗衡离子, 其能通过一般预期相互排斥的相同电荷桥接蛋白质和表面位点。

被吸附的蛋白质的最后构象很少与起始构象相同。这就是为什么蛋白质吸附的大多数模型引起可逆吸附状态向更紧密保持状态过渡, 其是表面上蛋白质的分子重构或松弛的结果所引起的。在吸附时大分子的重排经常 15 是灾难性的并以蛋白质变性而终结。从酶和抗体在吸附状态保持至少一些其生物活性和生物活性强烈依赖于天然结构的保持的事实, 能够得出结论: 被吸附的蛋白质构象的变化经常受时间和范围的限制。蛋白质折叠最强烈地受到疏水性相互作用的影响。两种现象, 即蛋白质结合和构象变化, 20 对某些两亲性物质例如表面活性剂和磷脂的存在敏感。相信蛋白质吸附通过加入这样的分子而减弱或逆反。

因此, 为了减少非特异性蛋白质吸附和损失, 蛋白质往往在蛋白质分离期间与表面活性剂混合。在一项特殊研究中, 蛋白质的吸附随着接枝的 Pluronic 表面活性剂的表面浓度增加而降低至可忽略水平。表面活性剂的单 25 体侧链中亚乙基-二醇(EG)单元的数目是 4, 9 和 24, 带有最小数目 EG 单元 (4)的单体对血液成分最具“惰性”(Analysis of the Prevention of Protein Adsorption by Steric Repulsion Theory, T.B. McPherson 等, 28 章, PAI, 在所引的书中: 395-404)。

增大界面厚度和亲水性, 从而降低下面的疏水位点的可得性的共价连接 30 到表面上的短聚合物表现出降低蛋白质结合改性的表面和在改性的表面变性的可能性。

在一个末端通常也包含一链的聚合物片段的表面活性剂趋向于对立或者甚至部分反转蛋白质对于各种表面的结合的事实与上述发现相一致。该现象可能涉及蛋白质的增溶作用或置换,这取决于表面活性剂-表面的相互作用和表面活性剂-蛋白质结合的相对强度;通常这两种因素都起一些作用。

5 在另一个实验中,向 pH7.0 水相以大约 10^{-4} wt%范围的浓度加入 Brij 型非离子表面活性剂(烷基聚氧乙烯醚)诱导蛋白质自空气/水界面的大量置换(T.Arnebrant 等,在所引的书中)。

曾充分研究过通过表面活性剂去除预吸附的蛋白质(固体表面处的蛋白质-表面活性剂相互作用, T.Arnebrant 等, 17 章, PAI, 在所引的书中:240-254)。鉴别出三种类型的相互作用:

10 i) 表面活性剂通过静电或疏水性相互作用与蛋白质中的特异性位点的结合,所述蛋白质是例如 α -乳球蛋白或血清白蛋白;

ii) 表面活性剂对蛋白质的协同性吸附,没有总体构象变化;

iii) 对蛋白质的协同性表面活性剂结合后的构象变化;

15 例如,蛋白质自甲基化(疏水性)二氧化硅表面去除对于不同的表面活性剂是相似的,表明蛋白质通过由于表面活性剂的较高表面活性的置换而被去除。可以得出结论,即表面活性剂的首基作用在亲水性表面处最显著而在疏水性表面处则相对不重要(固体表面处的蛋白质-表面活性剂相互作用, T.Arnebrant 等, 17 章, PAI,上文:240-254)。

20 对于其它脂质得出相同的结论。用 DPPC 脂质体悬浮液预处理则降低吸附在塑料表面上的血浆蛋白质的量;导管表面上胰岛素吸附有相同的趋势。

现在我们出人意料地发现两亲性物质,特别是大分子对包括脂质和表面活性剂的混合物的软表面的吸附比对不包含表面活性分子的脂质聚集体的吸附更有效。更具体地说,以磷脂和表面活性剂的混合物作为例子的形成稳定膜的分子-典型地但是不是必须的,呈脂质小泡形式(脂质体)-和至少一种强两亲性物质,即相对水溶性的双层失稳定成分(经常是表面活性剂)的掺合物,比纯的磷脂表面,特别是只是由磷脂组成或者还包括至少一

25 层稳定脂质类物质例如胆固醇的小泡或脂质体更趋向于结合两亲性物质例

30 如蛋白质。我们还发现对于这样的表面,所述表面的净电荷与吸附实体的净电荷具有相同符号,结合的两亲性大分子(蛋白质)的相对数量出人意料的

更高。这明显与公开的出版物相矛盾，所述出版物说明静电结合需要在相互作用实体上具有相反电荷以便是强烈的结合。

我们提出对于上述改进超分子(例如药物-载体)缔合的要求之一是吸附剂表面的一般适用性。这种吸附促进能力允许吸附大分子:

5 (i) 首先,由于局部吸引的电荷-电荷和其它相互作用而富集在吸附剂表面附近;

(ii) 其次,使对吸附剂表面的非静电相互作用/结合最优化。(后一过程典型地需要存在疏水性和 H-键结合位点,其通过表面柔性和/或适用性容易产生或制备)。

10 满足这些要求-并且允许它们的控制-(大分子)药物-载体复合体最适合实际应用。

我们进一步提出:蛋白质吸附到软(膜)表面中涉及的每一步在不同程度上取决于膜/溶液界面里/处的疏水结合位点的邻近和数目众多。大分子和结合表面之间的疏水缔合的动力学因此应该对可以接近的结合位点的数目敏感,而结合位点的数目又通过膜中表面活性成分的存在和膜的柔软度而增加。

15 吸附(大)分子的速度能针对多个结合位点构象调节也是重要的。例如,在不带电荷的柔韧(Transfersome®)膜的情况下,疏水相互作用是胰岛素-表面缔合的主要原因。根本的多步结合通常需要大量的系统重排,因此需要长吸附时间来完成。因此,形成 Transfersome®-胰岛素-复合物的最佳温育时间可以相对更长。

前面段落中提出的吸附方案与专业文献中描述的基本吸附情况相一致。虽然有一些不同甚至矛盾,但是这将我们的发现与迄今为止公开的公知知识明显区分开来。

25 出人意料地,根据本发明向表面加入带电荷的表面活性剂加速蛋白质结合到所述表面的过程并且提供控制大分子-膜缔合的程度和速度的方法。这与上述的被广泛接受的表面活性剂抑制蛋白质结合的教导相矛盾。另一方面,从这类表面至少部分消除表面活性剂加速大分子解吸并释放一些大分子的过程。这也与公知知识直接相背。

30 出人意料地,我们发现根据本发明的大分子对于软可变形表面特别是

相应膜的吸附比较小可变形的表面的吸附更强。因为相关文献提出软膜比其适用性更小的类型更加亲水和相互排斥，所以本发现与预期的直接相反。

因此，本发明的一个目的是具体确定大的，经常是大分子的两亲性分子，例如蛋白质，或者任何其它类型的合适的链分子，和复合体吸附剂表面之间的缔合最大化的条件。

本发明的另一个目的是确定控制大分子吸附到复合体表面的速度，或者从复合体表面解吸的相应速度的有利因素。

本发明的另一个目的是提供制备适合(生物)技术和药物应用的制剂的方法。

本发明的另一个目的是描述特别适用于所得到的制剂的实际应用的方式；包括但不限于得到的吸附物在诊断、分离技术和(生物)加工、生物工程、基因操作、试剂稳定化、浓缩或送递，例如在药学或兽药中的应用。

根据本发明的解决这些问题的技术方案定义在所附的独立权利要求中。

在从属权利要求中定义了提供具体优点的方便的技术方案。

定义

在本申请中使用的定义“缔合物”是两种或多种不同的分子的复合体，其中至少一种与一种或几种完全确定的表面形成聚集体，而不管复合体形成的原因但排除共价键合。不同种类分子之间的缔合作用可以以胶囊化(例如包裹到包括表面生成分子的小泡中)，插入(例如掺合到表面处和表面下的聚集体层中)或者吸附(到聚集体表面上)为基础；或者有可能是这些原理中的多种或两种的组合。

本申请中的术语“吸附物”，“吸附(大)分子”，“结合(大)分子”，“缔合(大)分子”等等可以互换使用来描述在选择的条件下不形成扩展表面的分子和上述含义“的吸附剂”或“结合表面”之间的缔合。

“载体”指聚集体，与其性质和产生的来源无关，其能与一种或多种用于实际目的的大分子缔合，例如对人或动物体施用或者送递。

“脂质”在本发明中的意义是具有与脂肪的特征类似的特征的任何物质。作为一种规则，该类型分子具有扩展的非极性区(链，X)和在大多数情况下，还具有一个水溶性极性亲水性基团，也称之为首基(Y)。对于这样的

物质有基本结构式 1:



其中 n 大于或等于 0. $n=0$ 的脂质称之为非极性脂质; $n \geq 1$ 的脂质是极性脂质。在本申请中, 所有的两亲性物质, 例如甘油酯, 甘油磷脂, 甘油磷基脂质, 甘油磷酰基脂质, 脑硫脂, 鞘脂类, 类异戊二烯脂质, 甾族化合物, 甘油硬脂酸酯类或甾醇类等等, 和所有的包含碳水化合物残基的脂质都简单称之为脂质。对于更明确的定义, 我们参见 PCT/EP91/01596。

在本申请中“界面活性”物质或“表面活性剂”指提高体系形成界面, 凸面或者其它明显曲面结构和多缺陷区的倾向的任何物质。除了普通的表面活性剂外, 辅助表面活性剂和更常规表面活性剂存在下促进脂质溶解性的其它分子全都落在该范畴内; 还有诱导或促进吸附剂(杂)聚集体中(至少部分疏水性)缺陷的形成的分子。表面活性剂的直接作用或者(部分)分子分层的间接催化, 或者还有表面活性剂诱导的相关分子上的构象变化常常是该作用的原因。因此, 除了常规表面活性剂外, 很多溶剂和不对称的并因此是两亲性的, 分子和聚合物, 例如很多低聚-和聚糖, 寡-和多肽, 寡-和多核苷酸和/或它们的衍生物属于上述范畴。PCT/EP91/01596 中公开了最普遍的标准表面活性剂、一些合适的溶剂(也称之为辅助表面活性剂)和很多其它相关的界面活性物质的相当广泛的目录, 在这里我们明确地引入该文献。工业表面活性剂手册; Michael Ash, Irene Ash, 编著., Gower 出版社, 1993 中公开了更完全的目录。

“链分子”或“大分子”是包含至少两种类型或状态的具有对于“吸附表面”不相同的亲力的基团的任何直链或支链的分子。对于本发明相应的改变(权利要求 2)或组合(权利要求 3)方面的其它具体要求是至少一种类型这样的基团必须在供体溶液中和/或在吸附表面处(部分地)带电荷。对于各个基团的表面亲和性差异常常是由于它们不同的两亲性, 即由于不同的亲水性/疏水性。不同的基团可以沿着链随机分布, 但是常常是几种物理相关的(例如几种亲水性或者多于一个的疏水性)基团位于一个链片段中。

本申请中“大分子”含义包括:

基本分子式是 $C_x(H_2O)_y$ 的糖类, 例如在糖, 淀粉, 纤维素等中(更完全的糖类的定义, 我们清楚地参见 PCT/EP91/01596), 为了本发明的目的, 常常需要衍生化来获得对于结合表面的附加亲和性。这可以例如通过使疏水

基团与目的是与(部分)疏水表面缔合的碳水化合物连接, 或者通过引入能够参与与更亲水性结合表面的其它非库仑(例如氢键)相互作用的这样的基团来实现。

寡或多核苷酸, 例如脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)的同型-或杂型链, 以及它们的化学, 生物, 或分子生物(遗传)修饰体(更详细的定义参见 PCT/EP91/01596 中给出的目录)。

包括 3-250 个, 经常是 4-100 个, 更经常 10-50 个相同或不同的氨基酸的寡肽或多肽, 其通过酰胺键自然偶联, 但是在模拟蛋白情况下可能取决于不同的聚合作用方案并且甚至可能部分或全部环化; 使用旋光纯化合物或外消旋化合物是可能的(对于更清楚和完全定义参见 PCT/EP91/01596)。

长多肽链, 不管它们的详细构象或准确的聚合度如何, 通常称之为蛋白质。如果不是全部, 则大多数情况下, 蛋白质十分有效地与表面缔合, 正如该项工作所提出的。因此我们避免引用这里的相关的物质, 且宁愿参照 PCT/EP91/01596 的部分目录以及迄今为止公开的专业文献。

只是为了说明的目的, 下面简要地总结了几个相关的类。

酶包括氧化还原酶(包括各种脱氢酶, (过)氧化物酶, (超氧化物)歧化酶等), 转移酶(例如酰基转移酶, 磷酸化酶和其它激酶), 转肽基酶(例如: 酯酶, 脂肪酶等等), 裂解酶类(包括脱羧基酶, 异构化酶等等), 各种蛋白酶, 辅酶等等。

来自 IgA, IgG, IgE, IgD, IgM 类的免疫球蛋白及所有的亚型, 它们的片段, 例如 Fab-或 Fab2-片段, 单链抗体或者其部分, 例如可变区或高变区, 天然形式或化学, 生物化学或遗传操作的, 都可以得益于本发明。这包括但不限于 IgG- γ 链, IgG-F(ab')₂ 片段, IgG-F(ab), IgG-Fc 片段, Ig- κ 链, Ig-s 轻链(例如 κ -和 λ -链), 并且还包括更小的免疫球蛋白片段, 例如任何这些物质或片段的可变区或高变区或修饰物。

除了抗体的免疫活性大分子(内毒素, 细胞因子, 淋巴因子和其它大的免疫调节剂或生物学信使)也属于异源链分子类。还有植物凝集素, 凝集素, 聚肌胞苷酸, 多胞苷酸(poli I:C), 红细胞生成素, “粒细胞巨噬细胞集落刺激因子”(GM-CSF), 白细胞介素 1-18, 干扰素(α , β 或 γ , 及其(生物)合成修饰物), 肿瘤坏死因子(TNF-s); 所有足够大的和两亲性组织和植物提取物, 它们的化学, 生物化学或生物学衍生物或置换物, 其部分等等。因此,

所有这样的分子可以与本申请中描述的复合体表面方便有效地缔合。

进一步的生物相关的例子包括影响局部或全部生长的物质，例如碱性成纤维细胞生长因子(BFGF)，内皮细胞生长因子(ECGF)，表皮生长因子(EGF)，成纤维细胞生长因子(FGF)，胰岛素，胰岛素样生长因子(例如 LGF I 和 LGF II)，神经生长因子(例如 β -NGF, NGF2, 5s, NGF 7s,等)，血小板衍生生长因子(PDGF)等等。

特别用于本发明目的的衍生化作用是(生物)化学，生物学或基因修饰或反应，通过所述修饰，吸附物适当时被几种，经常是多于3种的非极性(疏水)残基取代，所述残基例如具有1-24个碳原子的芳基，烷基-，链烯基-，烯酰基-，羟基烷基-，链烯基羟基-或羟基酰基-链，通过所述反应，提高吸附物和吸附剂之间产生的其它的非库仑相互作用的倾向。当大分子疏水化时，每条侧链有相对小数目(1-8，或者甚至更好地1-4)碳原子是有利的。相关的科学文献提供了关于链分子怎样为了不同的目的而被疏水化的广泛的信息。为了本发明目的，排除了其它公开物(参见例如 Torchilin, V.P.; Goldmacher, V.S.; Smirnov, V.N. Biochem.Biophys.Res.Comm. 1978, 85:983-990)中覆盖的强缔合吸附剂，这不仅是因为它们的现有技术性质，还因为它们可能导致可逆性较差的缔合。

本领域已知向由两亲性物质构成的膜中加入表面活性剂改善所述膜的适用性。此外，曾建议过该事实可以用来通过将试剂掺入到被相应的膜包围的微型小滴并且悬浮于合适的液体介质中改进试剂传输通过屏障中以其它方式封闭的孔。这更详细描述于我们早期申请 PCT/EP91/01596 和 PCT/EP96/04526 中。

选择一种方案以最优化所说的具有为了屏障孔穿透目的的高适用性膜的小泡，并且其一般与实现或者控制一方面链分子，和另一方面这样的膜之间的缔合的程度和速度的步骤不同。此外，当大分子与之缔合的所述表面是固载的时，包围所述小泡(从而小泡自身的不稳定性)这样的膜表面的三维适用性不必与例如缔合过程相关，因此不具有非固载膜的三维适用性特征。

为了实现和/或控制大分子与表面(这是本发明焦点所在)的缔合过程，可以应用两种主要作用，这已经在上文指明了。

第一种重要的现象是两亲性分子，即已经讨论过的大分子或者链分

子，与包括至少一种趋向于形成扩展表面的两亲性物质和至少一种在悬浮液体培养基中溶解度更大并且也趋向于比前者两亲性物质形成较少扩展表面的另一种物质的扩展表面更好地缔合。换句话说，在不存在前者溶解性更大、表面失稳定的第二种物质情况下，具有表面失稳定倾向的物质的存在使得表面-溶液界面对于吸附大分子与只是由溶解度较小的表面形成物质形成的相应表面相比相对更具有吸引力。在本说明书中，如果表面可允许两维协同表面刺激传播和/或展开，则其被视为扩展的。例如，小泡的表面通过支持表面波动或振动满足该标准要求；取决于膜的柔韧性，平均小泡直径在 20nm 和几百纳米之间是需要的。至少一个方向上没有达到该尺寸的(混合的)脂质胶束不满足这些要求；如果是这样，它们的表面不被认为是本发明意义上的扩展的。

第二种溶解度更大和表面失稳定物质一般是一种界面活性物质或表面活性剂。

第二种最近公开的作用是，与预期的相反，当表面是复合体并且包括至少两者两亲性物质，其中之一比另一种溶解度更大并且也趋向于去稳定通过溶解性较小的物质所形成的表面时，带电荷大分子或链分子更容易更好地与所述带相同电荷表面(即，两者都是负的或者两者都是正的)缔合。换句话说，尽管公知的是相同电荷相互排斥；但是当缔合物质和底物表面是负的时，或者当缔合过程中两个参与者具有净正电荷时，带电荷大分子或链分子可以与带相同电荷的表面更好地缔合，前提是表面复杂性允许必须的分子内和分子间重排。在现有技术的基础上，人们预见到在带负电荷大分子与带正电荷表面缔合情况下，即当通过静电吸引辅助下，缔合作用更容易更强，反之亦然。

前面段中所描述的两作用可以有利地组合，这一点具体定义在独立权利要求 3 中。

两亲性表面形成物质的选择可以通过一起形成大分子或链分子要结合的膜或表面并且最经常以悬浮于液体介质中的小泡形式存在的参与物质的不同的溶解性来确定。一般情况下，当参与分子之间的溶解性差异越大时，本发明作用越显著，即结合大分子的表面吸引力越高。更可溶膜成分应该比较小可溶性表面构成成分更可溶至少 10 倍，优选至少 100 倍。因此，当一种两亲性表面形成物质例如磷脂与第二种物质例如表面活性剂在合适的

液体介质例如水中结合时，使用在水中更溶解的表面活性剂比磷脂(以准确的量)作为第二种成分要有利得多。

另一方面，也可以以得到的表面曲率来确定选择。使用上述磷脂(作为基本表面形成物质)在水(用作液体介质)中与表面活性剂(作为表面失稳定的溶解性更大的第二种成分)混合，得到的小泡获得一些特征性表面曲率。(平均)曲率一般来说定义为考虑的表面所封闭的区域的平均半径的倒数。一般情况下，加入表面活性剂与不含有表面活性剂的磷脂质小泡的曲率相比将提高混合脂质小泡表面的曲率。如果存在表面活性剂的饱和浓度，其不破坏性平衡弯曲的表面稳定性，一般选择最佳表面活性剂浓度低于该饱和浓度的 99%；更经常地，在饱和浓度的 1 和 80 摩尔%之间，更优选地在 10 和 60 摩尔%之间，最优选在 20 和 50 摩尔%之间。

另一方面，如果各体系中饱和浓度达不到，由于加入表面活性剂后达到饱和之前表面分解的事实，使用的表面活性剂的量一般小于溶解浓度的 99%。同样，体系中表面活性剂的最佳浓度经常在限制吸附剂表面形成的浓度的 1%和 80%之间，更经常在 10%和 60%之间，并且优选在 20%和 50%之间，即高于扩展表面被小得多的溶解的混合脂质聚集体平均表面替代的浓度。

一种方便的、实际有用的物质的混合物可以以所述表面的平均曲率来确定。正如权利要求 7 所指出的，这些表面具有相应于 15nm 和 5000nm 之间，经常在 30nm 和 1000nm 之间，更经常 40nm 和 300nm 之间，最优选 50nm 和 150nm 之间的平均半径的平均曲率(定义为表面所封闭的区域的平均半径的倒数)。但是应该强调的是，吸附剂表面的曲率不必受吸附剂膜性能的控制。当使用固载表面并且根据本发明从选择的两亲性物质的混合物构建时，所述表面的平均曲率通常由支持固体表面曲率来确定。

此外，至少当使用相同电荷之间的缔合时，可能以表面相关的带电荷成分的相对浓度来表达本发明。这类表面相关的带电荷成分的相对浓度是所有表面形成两亲性物质一起形成的浓度的 5 和 100 摩尔%之间，更优选地在 10 和 80 摩尔%之间，最优选在 20 和 60 摩尔%之间。以净表面电荷密度表示，表面特征在于 0.05Cbm^{-2} (每平方米库仑)和 0.5Cbm^{-2} 之间的值，更好 0.075Cbm^{-2} 和 0.4Cbm^{-2} 之间，最好 0.10Cbm^{-2} 和 0.35Cbm^{-2} 之间。

优选选择背景电解质的浓度和组成，所述电解质优选包括低价离子，

以使电荷-电荷对期望的缔合作用的正作用最大。一般情况下，人们将本体离子强度保持在 $I=0.001$ 和 $I=1$ 之间，优选 $I=0.02$ 和 $I=0.5$ 之间，更优选 $I=0.1$ 和 $I=0.3$ 之间。

5 另一种本发明有用的定义集中在呈包围液体细微小滴的膜形式的吸附剂表面。这样的膜经常是双层样并且包括至少两种类型或形式的在用来悬浮小滴的液体介质(优选含水的)中的不溶性至少 10 倍，优选至少 100 倍差别的(自)聚集两亲性物质。在这样的情况下，对于形成膜的物质的选择可以通过要求溶解度较大物质的同型聚集体的平均直径或者包括两种物质的异型聚集体的直径小于只包含溶解度较小的物质的同型聚集体的平均直径来
10 确定。

系统中能形成表面的所有两亲性物质的总含量优选占总干质量的 0.01% 至 30 重量%，特别是在 0.1% 至 15 重量%之间，最优选在 1% 和 10 重量%之间，特别是在所述组合被用来产生主要为了药物目的而施用到人体或动物体中或体内的制剂的情况下。

15 表面构建或表面支持物质，即能形成扩展表面的物质可以有利地在生物相容极性或非极性脂质中选择，特别是当吸附剂表面要具有双层样结构时。具体地，主要表面形成物质可以是任何合适的生物源或相应的合成脂质中选出的脂质或类脂，或者是这样的脂质的修饰物，优选是甘油酯，甘油磷脂，类异戊二烯脂，神经鞘脂类，甾族化合物，硬脂酸精或甾醇，
20 含硫或含碳水化合物的脂质，或者任何其它能形成双层的脂质，特别是半质子化的液体脂肪酸，并且优选地选自下面种类：磷脂酰胆碱，磷脂酰乙醇胺，磷脂酰甘油，磷脂酰肌醇，磷脂酸，磷脂酰丝氨酸，神经鞘磷脂或或鞘磷脂，糖神经鞘脂类(例如脑苷酯类，脂酰基鞘氨醇己多糖苷，硫脂类，神经鞘缩醛磷脂)，神经节甾脂或其它糖脂或合成脂质，特别是二油酰基-，
25 二亚油酰基-，二亚麻基-，二亚麻酰基，二花生酰基-，二月桂酰基-，二肉豆蔻酰基-，二棕榈酰基-，二硬脂酰基，或者相应的鞘氨醇衍生物型，糖脂或二酰基-，二烯酰基-，或二烷基脂质。

其它表面失稳定和溶解度更大的物质有利地是表面活性剂，并且可以有利地属于非离子的，两性离子的，阴离子或阳离子去污剂；特别方便地
30 使用长链脂肪酸或醇，烷基-三/二/甲基-铵盐，烷基硫酸盐，胆酸的一价盐，脱氧胆酸盐，甘氨酸胆酸盐，甘氨酸脱氧胆酸盐，牛磺脱氧胆酸盐或牛磺胆酸

盐, 酰基-或链烷酰基-二甲基氨基氧化物, 特别是十二烷基-二甲基-氨基氧化物, 烷基-或链烷酰基-N-甲基葡糖酰胺, N-烷基-N, N-二甲基甘氨酸, 3-(酰基二甲基铵)-烷磺酸盐, N-酰基-磺基甜菜碱, 聚乙二醇-辛基苯基醚, 特别是九乙二醇-辛基苯基醚, 聚乙烯-酰基醚, 特别是九乙烯-十二烷酰基醚, 聚乙二醇-异酰基醚, 特别是八乙二醇-异十三烷酰基醚, 聚乙烯-酰基醚, 特别是八乙烯十二烷酰基醚, 聚乙二醇-脱水山梨糖醇-酰基酯, 例如聚乙二醇-20-脱水山梨糖醇-单月桂酸酯(Tween20)或聚乙二醇-20-脱水山梨糖醇-单油酸酯(Tween80), 聚羟基乙烯-酰基醚, 特别是聚羟基乙烯-月桂酰基、-肉豆蔻酰基、-十六烷基硬脂酰基或-油酰基醚, 例如聚羟基乙烯-4、6、8、10或12等-月桂酰基醚(例如Brij系列), 或者相应的酯, 例如聚羟基乙烯-8-硬脂酸酯(Myrij 45)、-月桂酸酯或-油酸酯类型, 或者聚乙氧基化的蓖麻油40(Cremophor EL), 脱水山梨糖醇-单烷基酸酯(例如Arlacel或Span), 特别是脱水山梨糖醇-单月桂酸酯(Arlacel20, Span20), 酰基-或链烷酰基-N-甲基葡糖酰胺, 特别是癸酰基-或十二烷酰基-N-甲基葡糖酰胺, 烷基硫酸盐, 例如月桂基-或油酰基硫酸盐, 脱氧胆酸钠, 甘氨酸脱氧胆酸钠, 油酸钠, 牛磺酸钠, 脂肪酸盐, 例如反油酸钠, 亚油酸钠, 月桂酸钠, 溶血磷脂, 例如正-亚十八烷基(=油酰基)-甘油磷脂酸, -磷酰基甘油, 或-磷酰基丝氨酸, 正-酰基-, 例如月桂酰基或油酰基-甘油磷脂酸, -磷酰基甘油, 或-磷酰基丝氨酸, 正-十四烷基-甘油磷脂酸, -磷酰基甘油, 或-磷酰基丝氨酸, 相应的棕榈油酰基, 反油酸酰基-, 11-十八碳烯酰基-溶血磷脂或者相应的短链磷脂, 还有表面活性多肽。

带电荷膜成分的浓度常常是以所有膜构建成分的量为基础的1-80摩尔%, 优选10-60摩尔%, 最优选30-50摩尔%的相对范围。

优选选择磷脂酰胆碱和/或磷脂酰甘油作为支持表面的物质和溶血磷脂, 例如溶血磷脂酸或甲基磷脂酸, 溶血磷脂酰甘油, 或者溶血磷脂酰胆碱, 或者部分N-甲基化了的溶血磷脂酰乙醇胺, 胆酸一价盐, 脱氧胆酸盐, 甘氨酸胆酸盐, 甘氨酸脱氧胆酸盐-或任何其它极性充分的甾醇衍生物, 月桂酸盐, 肉豆蔻酸盐, 棕榈酸盐, 油酸盐, 棕榈油酸盐, 反油酸盐或者一些其它脂肪酸和/或Tween-、Myrij-或Brij-型, 或者还有Triton, 脂肪磺酸盐或-磺基甜菜碱, N-葡糖酰胺或-脱水山梨糖醇(Arlacel或Span)表面活性剂被选作较不能形成扩展表面的物质。

有利的是，所述扩展表面所封闭的区域平均半径是15nm至5000nm之间，常常优选30nm至1000nm之间，更经常40nm至300nm之间，且最优选50nm至150nm之间。

一般情况下，与通过其它两种物质(以及根据需要，有第三，第四，第五物质等等情况)的复合形成的扩展表面缔合的第三种物质，可以包括具有重复亚单元的任何分子，特别是链分子形式。因此，这第三种物质可以是低聚物或聚合物。特别是，其可以是具有平均分子量高于800道尔顿，优选高于1000道尔顿，更经常高于1500道尔顿的两亲性大分子物质。一般情况下，这样的物质是生物源的，或者类似于生物物质，有利地具有生物活性，即是生物试剂。

第三种(类)物质优选特别是通过插入膜和液体介质之间的界面(或者多个界面)而与本发明膜样扩展表面缔合，所述这样的界面(或者多个界面)是所述膜的组成部分。

所述第三种物质(分子)的含量或相应的链分子的含量以吸附剂表面的质量为基础计，一般是在0.001和50重量%之间。经常情况下，使用相似相对单位，该含量在0.1和35重量%之间，更优选在0.5和25重量%之间，最优选在1和20重量%之间，经常发现该特定比例随着所述吸附(链)分子的摩尔量的增加而减小。

当吸附大分子或链分子是蛋白质或蛋白质的一部分时，通常发现这样的实体可以在本发明意义上与吸附表面缔合，前提是其至少包括三个具有结合吸附剂表面倾向的片段或官能团。

根据本发明趋向于缔合由所述两亲性物质形成的扩展表面的大分子或链分子可以属于至少具有与表面相互作用的部分倾向的天然形式的或者进行一些合适的化学，生物化学或基因修饰的多核苷酸类，例如DNA或RNA，或者多糖类。

与扩展表面缔合的链分子可以具有各种各样的生理功能和作用，例如作为肾上腺类皮质激素抑制剂， β -抗肾上腺剂，雄激素或抗雄激素，抗寄生虫剂，合成代谢剂，麻醉剂或止痛剂，兴奋剂，抗变应性剂，抗心律失常剂，抗动脉硬化剂，抗哮喘剂和/或支气管痉挛剂，抗菌剂，抗抑郁剂(antidepressivum)和/或抗精神病剂，抗糖尿病剂，解毒药，止吐剂，抗癫痫剂，抗纤维蛋白溶解剂，抗惊厥剂，抗胆碱能剂，酶，辅酶或相应的抑制

- 剂, 抗组胺体克剂, 抗高渗剂, 药物活性生物抑制剂, 抗低渗剂, 抗凝剂, 抗真菌剂, 抗肌无力剂, 抗帕金森病或老年性痴呆药物, 抗炎剂, 抗发烧剂, 抗风湿剂, 抗败血病剂, 呼吸回苏剂或呼吸刺激剂, 支气管松弛剂 (broncholyticum), 强心剂, 化疗剂, 冠状扩展肌, 细胞生长抑制剂, 利尿剂, ganglium-阻断剂, 糖皮质激素, 抗-流感剂, 止血剂, 催眠剂, 免疫球蛋白或其片段或者任何其它免疫活性物质, 生物活性碳氢化合物(衍生物), 避孕药, 抗偏头痛剂, 盐皮质激素, 吗啡拮抗剂, 肌肉松弛剂, 麻醉剂, 神经治疗剂, 神经安定剂, 神经递质或者一些其拮抗剂, 肽(衍生物), 眼科药, (副)-交感神经剂((para)-sympaticomimeticum)或(副)交感神经阻滞药, 蛋白质(衍生物), 牛皮癣/神经性皮炎药, 扩瞳药, 神经刺激剂, 鼻科药, 任何催眠剂或者其拮抗剂, 镇静剂, 解痉药, 结核菌抑制剂, 泌尿科药, 血管收缩剂或血管舒张剂, 病毒抑制剂或者任何愈合伤口的物质或者这些药剂的任何组合。

当第三种物质是生长调节剂时, 也可以有利地应用本发明。

- 有利的实施方案的其它实施例包括选自下面的第三种物质:免疫调节剂, 包括抗体, 细胞因子, 淋巴因子, 趋化因子和植物, 细菌, 病毒, 病原体或者免疫原相应的活性部分, 或者这些中任一的部分或修饰物, 酶, 辅酶或一些其它类型的生物催化剂; 识别分子, 包括特别是粘附素, 抗体, 连环蛋白, 选择蛋白, 陪伴蛋白, 或者其部分; 激素, 特别是胰岛素。

- 在胰岛素情况下, 本发明复合体优选包括作为活性物质的 1-500I.U.胰岛素/毫升, 特别是 20-400I.U.胰岛素/毫升, 最优选 50-250I.U.胰岛素/毫升。药物的优选形式是人重组胰岛素或人源化胰岛素。

- 本发明其它有利的用途包括应用各种细胞因子, 例如白细胞介素或干扰素等等, 所述白细胞介素适合在人体或动物体内使用, 包括 IL-2,IL-4,IL-8,IL-10,IL-12, 所述干扰素适合在人体或动物体内使用, 包括但不限于 α - β - γ -干扰素。

如果需要, 最后稀释达到实际期望的药物浓度范围后, 所述复合体包括 0.01 毫克至 20 毫克白细胞介素/毫升, 特别是 0.1 至 15 毫克白细胞介素/毫升, 最优选 1 至 10 毫克白细胞介素/毫升。

- 如果需要, 最后稀释使药物浓度达到实际优选浓度范围后, 所述复合体包括最多 20 相对重量%干扰素, 特别是 0.1 毫克至 15 毫克干扰素/毫升,

最优选 1 至 10 毫克干扰素/毫升。

在本发明另一个实施方案中，描述了给药与本发明表面缔合的作为第三种活性物质的神经生长因子(NGF)。这样的药剂的优选形式是人重组 NGF，施用的最佳浓度范围含有至多 25 毫克神经生长因子(NGF)/毫升悬浮液或者至多 25 相对重量%的 NGF 作为药剂，尤其是 0.1-15 相对重量%蛋白质，最优选 1-10 相对重量%NGF，并且如果需要，在使用前稀释。

可以使用用于免疫球蛋白(Ig)给药目的，呈完整抗体形式、部分抗体或者其一些其它生物可接受和活性修饰物形式的这里所报道的本发明技术。如果悬浮液含有至多 25 毫克免疫球蛋白(Ig)/毫升悬浮液或者至多相对于总脂质 25 重量%Ig，优选含有 0.1 相对重量%至 15 相对重量%蛋白质则是有利的，最优选含有 1 相对重量%至 10 相对重量%免疫球蛋白。

本发明公开了制备上述复合物，尤其是作为活性剂的制剂，特别是上面讨论的生物，化妆和/或药学活性试剂的制剂的方法，这样的方法包括选择至少两种在合适的液体介质中溶解度不同的两亲性物质，至少当与上述介质接触而复合时，所述物质能形成扩展表面，尤其是膜表面。对于这些方法的推荐的选择标准是使用通过将能够吸引活性剂并且支持与所述表面缔合的物质相组合所形成的一种扩展表面，前提是上述表面比只是由两种物质中其自身比另一种物质自身形成更加扩展的表面的一种物质形成的表面更吸引该活性剂，和/或选择至少两种其在合适的液体介质中溶解度不同的两亲性物质，前提是这样的物质至少在复合时与上述介质接触能够形成扩展表面，尤其是膜样表面，另一个前提是包括两种物质复合体的所述表面比只是由两种物质中其比另一种物质形成更加扩展的表面的一种物质形成的表面对于活性剂更具有引力且能够更好地结合活性剂，最后，但不是至少，在表面和试剂多带有净电荷情况下，表面和试剂两者平均都带负电荷或者两者都带正电荷。

制备本发明扩展表面的优选方法包括对于相应的物质混合物的机械操作，例如过滤，压力变化或者机械匀化，振荡，搅拌，混合，或者通过在要与该方法中形成的表面相缔合的试剂分子存在下任何其它控制的机械破碎方法。

优选的是，如果使表面形成物质的选择的复合物吸附到或者以一些其它的方式永久接触合适的固体支持表面，然后通过一次加入物质或同时加

入几种物质而与液体介质接触，从而后面的表面形成步骤的至少一步是在接着与固体支持的表面缔合的试剂存在下进行的。

不管是悬浮于液体介质或固体支持的，如果吸附表面或其前体首先通过下面的步骤制备则是有利的，所述步骤可以包括依次混合表面形成分子，然后加入缔合分子并允许与所述表面缔合，如果需要，通过搅拌，混合或温育协助进行，前提是这样的处理不破坏所进行的表面。

制备用于各种试剂的非入侵式施用的制剂是本发明优选的方法，尤其是通过人或动物或植物完整外皮产生能与包括至少一种两亲性物质、至少一种亲水性液体、至少一种界面活性或表面活性物质和至少一种试剂的复合体中的试剂分子相缔合的表面。这些成分一起形成适合非入侵式试剂施用的制剂，在合适和需要时，还可以加入其它常规的成分以实现最终制剂的所需性能和稳定性。

在操作该方法中，人们可以有利地分开混合选择的成分，如果需要，将成分(共同)溶解于溶液中，然后复合得到的混合物或溶液，最终诱导结合试剂的实体或表面的产生，正如所解释的，优选通过机械能作用。

适合本发明公开的目的的两亲性物质可以直接使用，或者溶解于生理相容性极性液体例如水中，或者与这样的溶剂混溶，或者与极性溶液一起溶解于溶合作用介导的试剂中，所述极性溶液优选至少包括一种界面活性物质或者一种表面活性剂。

诱导吸引试剂表面形成的一种优选的方法是通过向液相加入物质。可替换方法包括从反相蒸发，注射或透析，或者施与机械力，例如通过振荡，搅拌，振动，匀化，超声(即超声波照射)，剪切，冷冻和融化，或者在常规和适当的驱动压力下的过滤。当使用过滤时，可以有利地选择具有 $0.01\mu\text{m}$ 和 $0.8\mu\text{m}$ 之间，优选 $0.02\mu\text{m}$ 和 $0.3\mu\text{m}$ 之间，最优选 $0.05\mu\text{m}$ 和 $0.15\mu\text{m}$ 之间孔径大小的过滤材料。如果合适，为了实现期望的表面形成作用和使操作的容易程度和速度最大化，可以串联或平行使用几种过滤器。

如果使所述试剂和载体在吸附表面形成后至少部分缔合是有利的。

刚好在施用得到的实际目的的制剂之前形成试剂分子和结合表面之间的缔合是可能的。人们可以用合适的浓缩物或冻干物开始。

本发明公开了尤其为了药物递送，药物贮存，或者任何其它类型药物或生物应用目的的试剂载体的制备。因此，在屏障孔穿透情况下也可以使

用本发明；在这种情况下，如本领域所公知的那样，人们将有利地提供通过包围小滴的两亲性分子和与所述小滴表面相缔合的试剂分子所形成的呈膜形式的缔合表面，所述试剂分子由所述超变形小滴通过屏障物中的孔所携带，甚至当屏障孔平均直径比小滴或小泡的平均直径更小，甚至小得多时也是如此。但是需要一方面平衡最佳缔合性质和最好的膜适用性，另一方面，正如上文所已经解释的，这两者不必相同，并且更经常而不是实际上与仅仅由小泡膜对于孔通道的适用性确定最佳组合物性质不同。

本发明缔合物的其它用途包括生物工程应用，基因操作，以及用于生物处理或者诊断目的分离技术中的应用。这里，正如本发明其它用途中一样，包括酶方法和催化，使用根据本发明的固载的缔合表面而不是膜小泡形式是有用的。这使得本发明表面固定到固体载体上，然后对其进行方便的处理、接触、分离、浓缩等，例如目的是将与该类型表面缔合的催化活性大分子最大程度地固定到固体载体上。可能稳定表面缔合分子，尤其是链分子，其是至少部分两亲性的物质，例如(衍生物化的)蛋白质，多肽，多核苷酸或多糖和/或在涉及表面缔合状态的这样的分子的催化方法中。因此，为了制备例如用催化活性高亲和性或选择性或者活性大分子装填的柱子可以想到使用本发明的教导。这方面的一个实例是通过使合适的例如在溶液中的共同反应物通过包括具有非共价键连接从而包围固体载体的活性分子的固载表面的柱子而进行化学反应，当溶液通过固定化大分子时，在固体载体处发生与所述活性大分子的反应。在另一个详细描述的实施例中，至少一些分子与溶液分离的分子溶液通过装填有固载吸附剂表面的悬浮液的柱子或者与固载吸附剂表面的悬浮液，目的在于首先让靶分子与底物表面缔合，然后通过任何合适的方法分离液体和固体成分，包括但不限于离心，沉降，浮游(有或没有离心)电或磁吸附剂颗粒分离等等。

本发明的另一个用途涉及控制所述表面缔合分子和根据本发明通过复合合适的两亲性物质形成的复合的适用表面之间的缔合和解缔的动力学和/或可逆性，从而可以使用较高表面电荷密度和/或较大表面柔软性和/或较高表面缺陷密度来加速缔合。然后，可以利用相应的降低来减慢缔合速度，或者还引起部分或完全解缔。

制剂和贮存温度很少落在 0 °C 至 95 °C 范围之外。由于很多感兴趣的成分尤其是很多大分子的温度敏感性，温度优选低于 70 °C，更好低于 45 °C。

使用非水溶剂，可以使冷-或热-稳定剂在不同的温度范围内工作。实际应用一般在室温或生理温度下进行，但是在不同温度下使用是可能的并且可以对于具体制剂或应用期望不同的温度。在高温下保持吸附表面的适用性(柔性，电荷符合和/或电荷密度)是为此的一个可能的原因；在低温下保持试剂的活性形式提供另一个可能的实施例。

5 制剂特征合理地适用最敏感系统成分。在低温下贮存(例如在 4 °C)可以和使用惰性气体(例如氮气)一样有利。

公开 10 公开的制剂可以在应用的位点使用对于吸附剂或吸附物具有特异性的方法处理，这一点是更重要的(以磷脂为基础的吸附剂的例子参见：“脂质体”(Gregoriadis, G.编辑, CRC 出版社, Boca Raton, Fl., 第 1-3 卷, 1987); “作为药物载体的脂质体”, Gregoriadis, G.编辑, John Wiley & Sons, New York, 1988; “脂质体, 实际方法”, New, R., Oxford-Press, 1989)。制剂也能被稀释或浓缩(例如通过超离心或超滤)。

15 正当制剂使用之时或者在制剂使用之前，可以加入添加剂以改善得到的制剂的化学或生物稳定性，(大)分子缔合或其逆转，解缔/缔合动力学，给药方便，顺应性等等。

感兴趣的添加剂包括各种体系优化的溶剂(其浓度应该不超过保持或达到期望的体系特征定义的限制)，化学稳定剂(例如抗氧化剂和其它清除剂)，缓冲液等等，吸附促进剂，生物活性辅助分子(例如杀微生物剂，抗病毒剂)等等。

20 适合上面提到的目的的溶剂包括但不限于未取代的或取代的，例如卤化的，脂肪族的，脂环族的，芳香族的或芳香族-脂肪族的碳水化合物，例如苯，甲苯，亚甲基氯，二氯甲烷或氯仿，醇类，例如甲醇或乙醇，丙醇，乙二醇，丙二醇，甘油，erithritol，短链链烷酸酯(short-chain alkanecarbon acidesters)，例如乙酸烷基酯(acetic adic acidalkylesters)，例如二乙醚，二噁烷或四氢呋喃等等和它们的混合物。

也可以在制备之后或使用之前方便地调节吸附剂/吸附物混合物的 pH 值。这应该防止各个体系成分和/或缔合物的变质。还应该提高得到的混合物的生物活性或生理相容性。为了中和混合物用于体内或体外生物应用，经常使用生物相容酸或碱将 pH 值调至 3-12 之间，常常 5-9，最经常在 6-8 30 范围内，这取决于应用目的和部位。生理可接受酸是例如无机酸，例如盐

酸, 硫酸或磷酸, 和有机酸例如羧基脂肪酸例如乙酸的稀释的水溶液。生理可接受碱是例如稀释的氢氧化钠, 适当离子化的磷酸等等。

所有暗示或明确提到的脂质和表面活性剂是已知的。形成适合与大分子缔合的聚集体的脂质和磷脂综述在如“磷脂手册”(Cevc,G.,编著,Marcel Dekker, 纽约,1993), “脂肪酸及其甘油酯的化学和生物化学导论”(Gunstone,F.D., 编著)和其它参考书。商售表面活性剂综述在年刊“McCutcheon's, 乳化剂和去污剂”(Manufacturing Confectioner Publishing Co.)和其它相关参考书中给出(例如工业表面活性剂手册, M.Ash & I.Ash 编著,Gower,1993)。相关的活性物质汇编是例如德意志药典, 英国药物指南, 欧洲药典, 日本药典, 美国药典等等。相关的大分子描述于生产商目录, 相关的科学期刊和来自工业和科学的专业参考书。

本申请描述了缔合物的一些相关的性质, 用一些选择的多肽/蛋白质和磷脂/表面活性剂混合物来例证。一般结论的有效性不限于给出的选择, 而且得到的缔合物也不是仅适用于人和兽药领域。

下面的实施例应该是详细说明本发明而不是对本发明的限制。所有的温度是摄氏度, 载体大小以毫微米计, 比例和百分比以摩尔单位给出。另外, 除非另有说明, 使用标准 SI 单位。

实施例

进行下面的实验来测定复合体小泡上胰岛素的结合能力。使用不同组成的小泡组合物。变量包括不同的将净电荷带到小泡上/中的表面活性剂和脂质, 不同的脂质/去污剂比例, 不同的总脂质含量和各种胰岛素类型和浓度。

在第一系列实验中, 包括磷脂/生物表面活性剂混合物的复合体脂质小泡以不同蛋白质/脂质比例与胰岛素结合以发现结合最大值。使用常规的单一成分小泡(脂质体)作为对照。

实施例 1-27

超形变和柔性小泡(TransfersomesTM):

起始悬浮液

总脂质(TL)含量 10 重量%, 包括:

874.4 毫克来自大豆的磷脂酰胆碱

125.6 毫克胆酸钠

9 毫升磷酸盐缓冲液, pH7.1

最终悬浮液 A

TL 含量 5 重量%, 包括:

5

上述脂质和

每 100 毫克 TL 有 0.1, 0.5, 1, 2, 3, 4 毫克胰岛素。

为了实现期望的稀释度, 胰岛素贮存溶液(4 毫克/毫升 Actrapid™ Novo-Nordisk)与下面的缓冲液混合:

10

每 100mg 脂质的 胰岛素毫克数	缓冲液	胰岛素溶液 (4mg/ml Actrapid)
4	--	3mL
3	0.75mL	2.25mL
2	1.5mL	1.5mL
1	2.25mL	0.75mL
0.5	2.265mL	0.375mL
0.1	2,925mL	0.075mL

通过混合 2.5 毫升起始脂质悬浮液(10%TL)和 2.5 毫升合适的胰岛素稀释液来制备最终悬浮液 A。

15

最终悬浮液 B

TL 含量 5-2.5 重量%, 包括:

上述脂质和

每 100 毫克 TL 有 4, 5, 6.67, 10, 20, 40 和 80 毫克胰岛素。

为了实现不同的胰岛素/脂质比例, 使用下面的移液方案:

20

每 100mg 脂质的 胰岛素毫克数	实现的最终 TL (w-%)	起始悬浮液 (10%脂质)	缓冲液

4	5	3mL	--
5	4	2.4 mL	0.6 mL
6.67	3	1.8 mL	1.2 mL
10	2	1.2 mL	1.8 mL
20	1	0.6 mL	2.4 mL
40	0.5	0.3 mL	2.7 mL
80	0.25	0.15 mL	2.85 mL

通过混合 2.5 毫升 Actrapid HM(4 毫克/毫升胰岛素)和 2.5 毫升合适稀释的脂质悬浮液来制备最终悬浮液 B。

5 最终悬浮液 C

TL 含量 2.5 重量%至 0.125 重量%，包括：

上述脂质和

每 100 毫克 TL 有 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 80 和 160 毫克胰岛素。

10 为了得到引用的胰岛素/脂质比例，使用下面的移液方案：

每 100mg 脂质的 胰岛素毫克数	终 TL 浓度 (重量%)	起始脂质悬浮液， 稀释到 5 重量%脂 质	胰岛素溶液 (4mg/ml; Actrapid)	缓冲液 (ml)
4	2.5	2.5 mL	1.25 mL	1.25
5	2.5	2.5 mL	1.563 mL	0.938
6	2.5	2.5 mL	1.875 mL	0.625
7	2.5	2.5 mL	2.188 mL	0.313
8	2.5	2.5 mL	2.5 mL	--
9	2.2	2.222 mL	2.5 mL	0.278
10	2	2 mL	2.5 mL	0.5
15	1.3	1.333 mL	2.5 mL	1.167
20	1	1 mL	2.5 mL	1.5
30	0.67	0.667 mL	2.5 mL	1.833

40	0.5	0.5 mL	2.5 mL	2
50	0.4	0.4 mL	2.5 mL	2.1
80	0.25	0.25 mL	2.5 mL	2.25
160	0.125	0.125 mL	2.5 mL	2.375

对于实验系列 C，通过用缓冲液 1:1 体积/体积稀释悬浮液并如下所述重复过滤和冷冻-融化步骤而从 10% 贮备悬浮液来制备 5% 小泡悬浮液。

吸附剂/吸附物混合物的制备

- 5 通过标准方法制备缓冲液并且通过 0.2 微米无菌过滤器过滤。(为了将来使用，溶液在玻璃容器中保存。)脂质混合物悬浮于无菌玻璃容器中的缓冲液中，盖紧，在室温下在磁力搅拌器上搅拌 2 天。然后悬浮液顺序通过标定孔径分别为 400 毫微米、100 毫微米和 50 毫微米的蚀刻有轨迹的聚碳酸酯膜(Nucleopore 型)。每次进行 3 个通道，使用 0.6MPa 和 0.8MPa 之间的
- 10 驱动压力。得到的小泡悬浮液分别在 -70 °C 和 +50 °C 下冷冻和融化 5 次。为了得到期望的最终小泡大小，再将悬浮液在 0.7MPa 下通过 100 毫微米过滤器 4 次。作为最后步骤，通过具有 200 毫微米孔径的灭菌针筒式过滤器过滤灭菌高度不稳定的小泡。小泡在使用前在灭菌聚乙烯容器中在 4 °C 下保存。
- 15 每个胰岛素分子在中性 pH 范围中载有净负电荷，由于 $pI=5.4$ 以上带负电荷氨基酸相对带正电荷氨基酸过量。

- 使用商售胰岛素溶液(购自 Novo-Nordisk Actrapid™)用于很多包括该试验的缔合研究。因此，起始蛋白质溶液含有 4 毫克胰岛素/毫升和 3 毫克间甲酚/毫升。通过向吸附剂小泡的悬浮液加入适当量的这样的溶液，产生不
- 20 同标称的胰岛素/脂质比例。将得到的载体-胰岛素混合物小心充分地混合，并且根据实验，在室温下孵育至少 2 小时。

- 在实验系列 A 中，通过用 Actrapid 稀释原小泡悬浮液以获得最终脂质浓度为 50 毫克 TL/毫升和不同蛋白质/脂质比例来制备最终悬浮液。在实验系列 B 中，根据胰岛素/TL 比例，最终脂质浓度在 2.5 毫克/毫升和 40 毫克/
- 25 毫升之间变化。在实验系列 C 中，最终脂质浓度在 1.25 毫克/毫升至 25 毫克/毫升变化。为了比较，通过使用缓冲液代替脂质悬浮液来制备相同的稀释系列。

5 各用 4 毫升胰岛素/小泡混合物进行试验测试。2 小时后从含水面下相分离脂质小泡以测定有多少胰岛素(以任何方式)缔合了脂质小泡, 和还有多少没有结合保留在水面下相中。为了该目的, 使用了截留分子量是 100000 道尔顿的 CENTRISART I-超离心试管。对于每一个用 1 毫升含有悬浮液的胰岛素稀释的稀释液使用三个试管并且以 2000 g 离心 3 小时($T=10^{\circ}\text{C}$)。测定所得的光学澄清的上清液(假设只含有缓冲液、胰岛素和一些混合脂质(磷脂酰胆碱/胆酸盐)胶束)和溶解的去污剂的胰岛素浓度。弃除光学不澄清的上清液, 因为表明这样的上清液被通过 CENTRISART I 过滤器中的缺陷的脂质小泡所污染。将标准 HPLC 方法用于这里所报道的胰岛素测定。测定进行两次。

原稀释液作为阳性对照。在阴性对照中, 将非特异性的胰岛素对试验装置的吸附定量化。校正这样的非特异性结合后, 计算上清液中起始和最终胰岛素浓度之间的差异。假设“丢失”的胰岛素与小泡缔合, 并且以绝对值或相对值表示。

15 图 1 给出了上述实验的结果。其提示低于 6 毫克/100 毫克 TL 的胰岛素/脂质比例时, 加入的蛋白质的 80-90%与小泡缔合(结合)。在较高胰岛素/脂质比例时, 蛋白质-表面缔合的相对效率减小到对于 2/5(40 毫克/100 毫克)稀释度只有 5%结合。换句话说, 以高稀释度和以高蛋白质/脂质比例加入的每 40 毫克胰岛素中有 2 毫克趋向于(定量地)与 100 毫克高度不稳定小泡形式的脂质缔合。

20 延长孵育时间, 或者较小程度地, 提高加入的悬浮液浓度会改进这种情况(图 2 和 3)。

实施例 28-45:

25 标准小泡(脂质体), 起始悬浮液:

1 克来自大豆的磷脂酰胆碱

9 毫升磷酸盐缓冲液, pH7.1

最终悬浮液 A:

30 TL 含量 5 重量%, 包括

上述脂质和

每 100 毫克 TL 有 0.1, 0.5, 1, 2, 3, 4 毫克胰岛素
(0.1, 0.5, 1, 2, 3, 4 相对重量%)

最终悬浮液 B

5 TL 含量 5 重量%至 0.25 重量%,包括
上面给出的脂质和

每 100 毫克 TL 有 4, 5, 6.67, 10, 20, 40 和 80 毫克胰岛素

根据实施例 1-27 所述制备起始脂质悬浮液。但是, 为了获得足够小的脂质体的充分单分散的制剂, 必须另外通过 100 毫微米过滤器 6 次挤压。

10 发现与试验脂质体结合的胰岛素非常少, 只有 2%至 5%加入的药物与 4 毫克/毫升至 100 毫克/毫升稀释范围中的标准脂质小泡复合(没有图示给出数据)。

为了核查并通过实验排除悬浮稀释液对高度形变复合体小泡组成的影响, 进行下面的实验。

15

实施例 46-59:

起始悬浮液:

874.4 毫克来自大豆的磷脂酰胆碱

125.6 毫克胆酸钠(给定 10V-%TL 含量)

20 9 毫升磷酸盐缓冲液, pH7.1

最终悬浮液:

最终悬浮液的组成与实施例 1-27 的 B 系列和 C 系列中的相同, 包括递减的最终脂质浓度。

25 测定的胰岛素/脂质比例是:每 100 毫克 TL 有 4, 8, 10, 20, 40, 80, 160 毫克胰岛素。

30 小泡悬浮液的制备与实施例 1-27 对于所述胰岛素/脂质比例所描述的制备方法一致, 除了用含有 10mM 胆酸盐的 Actrapid 和/或含有 5-20mM 胆酸盐的缓冲液(用于对照或实验样品)进行稀释。进行实验使得所有样品中最终胆酸盐浓度是 5mM, 这接近于该去污剂的 CMC, 以防止胆酸盐在稀释后从小泡膜解缔。

为了防止胆酸盐从小泡洗出，不仅要保持原实际小泡组成，而且还要保持小泡表面的平均电荷密度。这些改进在结合中反映出来。

5 在该试验系列的实施例中，我们在移液过程中始终特别关心保持标称的胆酸盐浓度低于 5mM 程度，以防止错误的小泡溶解作用，这特别可能在低的总脂质浓度的范围内发生。

结果表明蛋白质/脂质重量比多达 10% 时，加入的胰岛素的 80% 至 90% 结合到脂质小泡表面(图 4)。这意味着吸附剂-吸附物缔合作用几乎是完美的而且蛋白质结合效率非常高。脂质缔合蛋白质的百分比随着蛋白质/脂质比例的增加而缓慢减小并且在 1.6 毫克胰岛素/1 毫克脂质时达到 7%。

10 载体缔合胰岛素的绝对量在大约 0.4 毫克胰岛素/1 毫克脂质时达到最大，其中发现加入的 40 毫克胰岛素中的 15.6 毫克已经与 100 毫克高度不稳定小泡形式的总脂质缔合。在每 1 毫克总脂质 0.2 毫克胰岛素相对比例时获得最好的产率，其中测得加入的 20 毫克中的 14 毫克已经与混合脂质小泡缔合。图 4 详细说明了这些数据。

15 如果向含有缓冲液或胰岛素溶液的混合脂质小泡悬浮液加入胆酸盐分子则获得相似结果。

实施例 60-71:

起始悬浮液(20%TL):

20 1099.7 毫克来自大豆的磷脂酰胆碱

900.3 毫克 Tween80

8 毫升磷酸盐缓冲液, pH7.4

最终悬浮液, 含有:

25 上面给出的脂质混合物

每 100 毫克 TL 有 2, 4, 8, 10, 20 和 40 毫克胰岛素。

基本上根据实施例 1-27 所描述制备小泡悬浮液，除了搅拌时间延长至 7 天。Actrapid™(Novo-Nordisk)是所有情况下吸附胰岛素源。

30 为了能使用 4 毫克/毫升的固定胰岛素浓度，制备具有变化的最终总脂质浓度在 8 毫克/毫升和 100 毫克/毫升之间的胰岛素/脂质比例。为了比较(关

于可能的稀释效果), 使用类似组成的小泡来制备不同胰岛素/脂质比例但是具有 10 毫克/毫升(1 重量%)固定最终总脂质浓度的小泡。选择蛋白质/小泡缔合作用时间是 3 小时。

5 用来从小泡结合蛋白质分离没有缔合胰岛素的离心时间是 6 小时(以 1000 g)。所有其它实验细节和第一试验系列(实施例 1-27)相同。

结论.与结合到包含非离子表面活性剂(Tween-80)的膜的胰岛素一般比结合带电荷(含有胆酸盐)的膜的量低的事实无关, 两种吸附剂体系的定性特征相同(参见实施例 1-27)。

10 以相对的胰岛素/脂质比例是 0.04 毫克胰岛素/1 毫克脂质与膜的缔合的胰岛素大约是 50%。相对浓度是 0.2 毫克胰岛素/1 毫克脂质时, 最大结合相当于总的加入的 20 毫克胰岛素中只有 5.2 毫克结合的蛋白。用 0.04 毫克胰岛素/1 毫克脂质获得该试验体系中的最佳结果, 即绝对最佳值。

实施例 72-76:

15 起始悬浮液(10%TL), 包括:

874.4 毫克来自大豆的磷脂酰胆碱

125.6 毫克胆酸钠

20 9 毫升磷酸盐缓冲液, pH7.1(-7.4;使用这些悬浮液, 使起始悬浮液的 pH 在 7.3-7.6 范围, 因为期望的 pH 是 7.3-7.4, 因此使用 pH7.1 的缓冲液进行下面用胆酸盐作为表面活性剂的试验系列)。

胰岛素溶液 A:

4 毫克/毫升, 8 毫克/毫升, 10 毫克/毫升, 20 毫克/毫升磷酸盐缓冲液, pH7.4

25 每毫升溶解的干胰岛素 30 微升盐酸(1M), 接着每 1 毫升溶液 30 微升 1M 氢氧化钠

胰岛素溶液 B:

4 毫克 Actrapid/毫升磷酸盐缓冲液, pH7.4

30

胰岛素-小泡混合物

5 重量%总脂质浓度

每1毫克总脂质 0.04, 0.08, 0.1 和 0.2 毫克干胰岛素
(4, 8, 10, 20 相对重量%).

- 5 根据实施例 1-27 所述, 使用相似膜组成制备小泡悬浮液。但是, 为了使用合理高的最终总脂质浓度获得高胰岛素/脂质比例, 将干胰岛素溶解至比在商售溶液中使用的浓度更高的浓度。

- 冻干的人重组胰岛素不容易溶解于 pH7.4 的磷酸盐缓冲液中。为了制备胰岛素溶液, 首先将类似于 Actrapid™ 的干燥冻干的人重组胰岛素“粉末”加入 2 毫升缓冲液中并且充分涡流。瞬时酸化作用后(通过加入 60 微升盐酸来实现), 酸化作用将胰岛素的溶解度充分增加以得到透明的溶液, 加入 60 微升氢氧化钠将 pH 调节回 7.4, 此时胰岛素是稳定的(作为六聚体)并且对降解/脱酰胺作用有抗性。通过直接将 8 毫克胰岛素溶解于 2 毫升 pH7.4 的缓冲液中制备另外的溶液。

- 15 小泡悬浮液(2 毫升)和胰岛素溶液-A(2 毫升)充分混合并且以上面给出的标称胰岛素/脂质比例孵育 12 小时。所有情况下最终总脂质浓度是 50 毫克/毫升。使用溶液 B 作为参照。实验的其它部分根据实施例 1-27 所述进行。

- 结论。干蛋白质粉末制备的溶液(至少暂时给出单体溶液)中的胰岛素结合与用实施例 1-27 中 Actrapid 中的胰岛素测定相当(图 5)。这提示可能大量胰岛素与 50 毫克/毫升浓度的脂质小泡悬浮液缔合。发现胰岛素结合最大值在蛋白质/脂质重量比例 1/5 左右, 其中大约 16 毫克加入的胰岛素与混合脂质膜缔合。

- 在相似的蛋白质浓度下, 用尤其是溶解的和商售胰岛素溶液测得相同的结果。

- 25 在下面的实验系列中, 比较胰岛素对不同带电荷的和不带电荷的, 液体, 混合脂质膜的吸附。

实施例 77-92:

常规小泡, SPC 脂质体, 中性(TL=10 重量%):

- 30 没有净电荷, 只包括两性离子磷脂

1 克来自大豆的磷脂酰胆碱

9 毫升磷酸盐缓冲液, pH7.4

常规小泡, 带电荷 SPC/SPG 脂质体(TL=10 重量%):

来自 25 摩尔%阴离子磷脂酰甘油的净负电荷

5 750 毫克来自大豆的磷脂酰胆碱

250 毫克来自大豆的磷脂酰甘油

9 毫升磷酸盐缓冲液, pH7.4

高度形变中性小泡(TL=10 重量%):

10 没有净电荷, 包括两性离子磷脂和非离子表面活性剂

550 毫克来自大豆的磷脂酰胆碱

450 毫克 Tween 80

9 毫升磷酸盐缓冲液, pH7.4

15 高形变带电荷小泡 A(TL=10 重量%):

净负电荷, 源自 25 摩尔%阴离子胆酸盐

874.4 毫克来自大豆的磷脂酰胆碱

125.6 毫克胆酸钠

9 毫升磷酸盐缓冲液, pH7.1

20

高度形变带电荷小泡 B(TL=10 重量%):

净负电荷, 源自 25 摩尔%(相对于 PC)阴离子磷脂酰甘油

284.3 毫克来自大豆的磷脂酰胆碱

94.8 毫克来自大豆的磷脂酰甘油

25 620.9 毫克 Tween80

9 毫升磷酸盐缓冲液, pH7.4

胰岛素-小泡混合物, 分别包括

每毫升最终悬浮液有 50, 25, 10, 5 毫克总脂质

30 每 1 毫克总脂质有 0.04, 0.08, 0.1 和 0.2 毫克胰岛素
(蛋白质的 4, 8, 10, 20 相对重量%)

根据上述制备所有的小泡。将包含 Tween 的小泡搅拌 7 天。将包含胆酸盐的小泡和脂质体搅拌 2 天。Actrapid100HM™(Novo-Nordisk)是胰岛素源。这引起最终蛋白质和得到的最终脂质浓度不同(分别是 50, 25, 10 和 5 毫克 TL/毫升)。但是使用 SPC-脂质体, 只研究了 4 相对重量%样品。

- 5 实验方案与实施例 1-27 所述相同。为了方便比较, 对于所有制剂孵育时间是 3 小时, 离心时间是 6 小时(以 500 g)。测得结果在图 6 中给出。

结果清楚地表明, 尽管其带有净负电荷, 但是其对于带负电荷表面结合最好。使得高小泡形变性的高膜柔性也是有利的。

- 10 对于高柔性带电荷膜的相对结合效率是 80-90%。因此, 对于所研究的两种类型的磷脂-表面混合物在 1/25 胰岛素/脂质重量比时, 观察到非常高度的蛋白质膜缔合作用。包括磷脂和非离子表面活性剂的不带电荷膜在可比较的胰岛素/脂质比例时表现出 50%相对结合。但是, 计算出加入的胰岛素中只有 2.5%(参见实施例 28-45)结合不带电荷的磷脂酰胆碱脂质体。通过蛋白质结合带电荷脂质体, 其以蛋白质/脂质重量比 1/25 与加入的胰岛素的
- 15 10-20%缔合, 超过最不好的结果。因此, 带电荷常规脂质双层介于不带电荷脂质体膜和更柔性但是中性(Transfersome™)膜之间。

- 20 这些发现提示净表面电荷(源自带电荷脂质或者其它带电荷膜缔合成分)应该与膜柔软度结合(其通过吸附剂中的去污剂和其它相关的分子的存在而促进)来使得表面-或载体-蛋白质缔合作用最大化。其原因是电荷将(部分)吸附分子“拉”向吸附剂。所述吸附剂当“软化”时, 允许蛋白质容易插入界面区。

实施例 93-95:

- 25 常规小泡, SPC 脂质体, 中性(TL=10 重量%):
没有净电荷, 只包括两性离子磷脂
1 克来自大豆的磷脂酰胆碱
9 毫升磷酸盐缓冲液, pH7.4

- 30 高度形变的带电荷小泡 A(TL=10 重量%):
净负电荷, 源自 25 摩尔%阴离子胆酸盐
874.4 毫克来自大豆的磷脂酰胆碱

125.6 毫克胆酸钠

9 毫升磷酸盐缓冲液, pH7.1

高度形变分带电荷小泡 B(TL=10 重量%):

5 净负电荷, 源自 25 摩尔%(相对于 PC)阴离子磷脂酰甘油

284.3 毫克来自大豆的磷脂酰胆碱

94.8 毫克来自大豆的磷脂酰甘油

620.9 毫克 Tween 80

9 毫升磷酸盐缓冲液, pH7.4

10

胰岛素-小泡混合物, 分别包括

每毫升最终悬浮液有 50, 25, 10, 5 毫克总脂质

每 1 毫克总脂质有 0.04, 0.08, 0.1 和 0.2 毫克胰岛素

(蛋白质的 4, 8, 10, 20 相对重量%)

15

制备.为了研究胰岛素对磷脂酰胆碱 Tween 80 混合膜的吸附作用的动力学, 我们进行了时间依赖性测定。根据相应的前面的实施例所述, 制备试验小泡。第一数据点在混合脂质悬浮液和蛋白质溶液后 2 小时采集。对于中性高不稳定膜, 选择的下一个时间点是 3 小时。在孵育 4 或 5 天后和 5 或 6 天后对于所有悬浮液进一步取样。

20

结论.对于胰岛素对于不带电荷 SPC/Tween 混合膜的吸附作用, 发现清楚的时间依赖性(对于一些代表性数据参见图 9)。当标称胰岛素/脂质重量比是 1/25 时, 在缔合过程的初期发现结合效率从 2 小时的 30%增加到 3 小时的 50%。t=4 天时, 结合增加到 64%, 但是该差别可以是不明显的, 因为 5 星期后结合只有 58%。

25

测得胰岛素对于简单的磷脂酰胆碱脂质体的结合只是在一定程度上从 3 小时后的 2.5%增加到 6 星期后的 5%。

如通过蛋白质与这样的膜的结合从 2 小时后的 64%增加到 6 星期后的 76%所表明的, 胰岛素对于带电荷的 SPC/SPG/Tween80 混合物的吸附比中性膜的情况快得多且强得多。与头几个小时缔合的数值相比的第二阶段增加的小程度表示更快的结合动力学。

30

对于带电荷 SPC/胆酸盐混合膜来说, 胰岛素结合的速度更大。用这样

的带电荷小泡进行实验揭示蛋白质对于混合脂质膜的吸附的没有时间依赖性。在 2 小时时，在实验误差内结合已经和孵育 5 星期后一样完全。这提示胰岛素对于带电荷的，柔性膜的结合比对于没有带电荷的膜快得多。通过推理，我们提出非普通的静电相互作用有可能影响蛋白质分子的解吸。

- 5 胰岛素与磷脂酰胆碱膜的非常弱和/或非常慢的缔合表明只是疏水性结合对于实现高有效载荷是不充分的。这可能是由于胰岛素分子发现脂质双层表面上合适的结合位置的有限能力。少的、不方便的吸附的蛋白质分子和下面的推测的吸附物之间的排斥力也是重要的。

10 实施例 96-100

具有不同电荷密度的超形变小泡的悬浮液(TL=10 重量%):

净负电荷，由于 25, 33, 50, 67, 75 摩尔%磷脂酰甘油； 137 毫克， 205 毫克， 274 毫克， 343 毫克， 411 毫克来自大豆的磷脂酰甘油

411 毫克， 343 毫克， 274 毫克， 205 毫克， 137 毫克来自大豆的磷

15 脂酰胆碱

452 毫克 Tween 80

9 毫升磷酸盐缓冲液, pH7.4

2 毫克胰岛素/毫升最终悬浮液

- 20 根据实施例 93-95 中的描述制备脂质小泡。如从图 4 中可以看到，提高膜中带电荷脂质的相对浓度增强小泡-胰岛素缔合，并且中等但是可接受地增大最终悬浮液的粘度。

根据实施例 93-95 制备的较高 SPG/SPC 摩尔比的脂质悬浮液更粘稠并且难以操作。然而，带电荷脂质成分的相对较高浓度的确提高小泡缔合的胰岛素的相对量。图 7 详细说明了这一点。

- 25 改变带电荷脂质含量影响非单调方式的蛋白质(胰岛素)的结合效率。首先，小泡缔合胰岛素的相对量增加。在 SPC/SPG 比例接近 50 时，观察到最大相对结合。这提示非常高的 SPG 含量不利于胰岛素的有效结合，可能是由于界面聚集作用和/或由于表面电荷对蛋白质吸附动力学的影响。(后者不应该太快以致不能允许大分子在表面上重排，从而导致最大填充密度)。

30

实施例 101-104:

以 1:1 与胰岛素混合的高柔性带电荷膜(TL=:10 重量%)

874.4 毫克来自大豆的磷脂酰胆碱

125.6 毫克胆酸钠

9 毫升磷酸盐缓冲液, pH7.1

5 起始溶液中 4 毫克胰岛素/毫升

使用不同的方法来制备小泡:除了实施例 1-27 描述的挤出和冷冻-解冻循环外, 还试验了简单得多的方案(其中悬浮液只是顺序挤出)。

10 发现蛋白质对于混合脂质膜的吸附的效率没有明显区别(图 8)。但是, 如“限制孔穿过测试”中评估的, 脂质小泡的形状适应性对于不同的批量不同:发现根据实施例 1-27 制备的小泡的形变性最高。

实施例 105-106:

具有各种添加剂的超柔性带电荷膜(最终组成)

15 437 毫克来自大豆的磷脂酰胆碱

63 毫克胆酸钠

1 毫升磷酸盐缓冲液, pH7.1

最终悬浮液中 2 毫克胰岛素/毫升

添加剂 A

20 间-甲酚 1.5 毫克/毫升(最终)

添加剂 B

苯甲醇 2.5 毫克/毫升(最终)

25 向含有胆酸钠的 Transfersomes™ 中加入助溶剂影响最终膜结合的胰岛素量。在间-甲酚存在下结合的相对效率是 60%, 在向试验悬浮液加入苯甲醇之后是 90%。

实施例 103-104 中使用的添加剂可以作为防腐剂。

实施例 107-110:

30 具有来自不同来源的不同胰岛素的类似膜

437 毫克来自大豆的磷脂酰胆碱

63 毫克胆酸钠

1 毫升磷酸盐缓冲液, pH7.1

2 毫克胰岛素/毫升

来自 Actrapid 100HM™(Novo-Nordisk)

5 源自干的人重组体(Novo-Nordisk)

源自干的猪的胰岛素(Sigma Chemical Industries)

来自 Lispro™, 一种胰岛素类似物(Pfizer Inc.)

发现不同蛋白质对于类似膜的吸附的效率没有明显差别。但是这不排除解吸/吸附的不同速度的可能性。

特别是如果干胰岛素溶解于酸性缓冲液中, 并且使其回到中性 pH 范围, 则该干胰岛素对于混合脂质膜的吸附效率和来自即用型 Actrapid™(Novo-Nordisk)溶液的胰岛素的效率是一样的。

15 实施例 111-118:

软的不带电荷的膜

起始悬浮液(10%TL):

1099.7 毫克来自大豆的磷脂酰胆碱

900.3 毫克 Tween 80

20 19 毫升磷酸盐缓冲液, pH7

最终悬浮液, 包括:

与上面所述的脂质混合物混合的 8.4 微克 IF,

如图 10 给出的, 使用 1.84 毫克 TL/毫升至 18.4 微克 TL/毫升来产生相对量增加的干扰素。

25 制剂含有具有增加摩尔比的蛋白质/脂质混合物并且基本上根据实施例 60-71 所述制备。根据实施例 1-27 所述进行试验, 有两点改变。第一涉及使用 Centrisart 分离试管(截留分子量 100k 道尔顿), 其在该试验系列中总是预先包被白蛋白(来自含有 40 毫克 BSA/毫升缓冲液的溶液)以将非特异性蛋白质吸附的量降低到低于 15%。与 BSA 孵育后, 试管用缓冲液洗涤两次并且

30 装入合适浓度的干扰素溶液(通过在相同的缓冲液中稀释贮存溶液来制备)。为了评估最终蛋白质浓度, 使用商售用于 IF 的 ELISA 免疫测试试剂

盒。为了计算小泡缔合的干扰素的量，使用和实施例 1-18 描述的相同的方法。两次或三次测得蛋白质结合的程度与来自上清液的“丢失的蛋白质”相同。

图 10 中给出了结果，给出了与胰岛素结合所述定性类似的图。

5

实施例 119-134:

高柔性带电荷膜

起始悬浮液

总脂质(TL)含量 10 重量%，包括:

10

874.4 毫克来自大豆的磷脂酰胆碱

125.6 毫克胆酸钠

9 毫升磷酸盐缓冲液, pH7.1

最终悬浮液

图 10 中给出的脂质/蛋白质混合物

15

(其它数据相当于实施例 111-118 中给出的那些)

图 10 中所详述的两组不同试验系列的结果(实心圆圈和方框)表明尽管蛋白质分子上有净负电荷，但是负的膜电荷对于干扰素结合到高度形变双层上的效率有期望的作用。

20

实施例 135-145:

起始悬浮液(10%TL):

软的不带电荷膜

SPC/Tw80

550 毫克来自大豆的磷脂酰胆碱

25

450 毫克 Tween 80

9 毫升磷酸盐缓冲液, pH6.5

软的带电荷膜

SPC/胆酸钠

874.4 毫克来自大豆的磷脂酰胆碱

30

125.6 毫克胆酸钠

9 毫升磷酸盐缓冲液, pH7.1

最终悬浮液包括:

上面给出比例的脂质和

10000 IU 的白细胞介素-2 (IL-2)

5 一起处理了给出的脂质混合物和蛋白质。然后测定缔合程度。基本上根据对于实施例 119-134 所述进行分离, 而使用 Renca-细胞生长的蛋白质依赖性刺激与标准曲线相比较, 体外测定 IL-2 的量。这得到了下面表中给出的数据(以 IU 给出绝对 IL-2 浓度和以%表示的相对蛋白质含量):

白细胞介素与超形变小泡缔合作用的效率对时间的函数

	第一天				第六天			
	SPC/胆酸钠		SPC/Tw80		SPC/胆酸钠		SPC/Tw80	
	IU	%	IU	%	IU	%	IU	%
起始	10000	69	10000	190	10000	154	10000	364
结合	8000	55	1000	19	5750	88	750	27
游离	6500	45	4250	81	750	12	2000	73
回收	14500	100	5250	100	6500	100	2750	100

10

起始值和最终值(总的回收蛋白)之间的偏差部分由于小泡/IL-2 分离期间蛋白质的损失和部分由于存在脂质而改变蛋白质活性。

发现白细胞介素和预先形成的具有不同表面电荷密度的高度形变脂质小泡的短期缔合对于电荷作用的敏感性比上面表中所建议的(没有给出数据)

15 小。

实施例 146-148:

常规中性小泡(起始悬浮液):

1 克来自大豆的磷脂酰胆碱

20 9mM 磷酸盐缓冲液, pH6.5

高度形变中性小泡(起始)

550 毫克来自大豆的磷脂酰胆碱

450 毫克 Tween 80

9 毫升磷酸盐缓冲液, pH6.5

高度形变的带电荷小泡(起始)

874.4 毫克来自大豆的磷脂酰胆碱

5 1% 5.6 毫克胆酸钠

9 毫升磷酸盐缓冲液, pH7.1

混合有降钙素(例如鲑鱼油)的小泡(最终悬浮液)

每毫升最终悬浮液有 100 毫克总脂质

10 每 100 毫克总脂质有 1 毫克蛋白质。

根据上述制备所有脂质悬浮液。向预先形成的小泡中加入蛋白质(掺杂少量 ^{125}I -标记的蛋白质标记, 在使用前不久纯化)并且孵育至少 24 小时; 或者向脂质加入蛋白质溶液并且在悬浮液制备期间通过微孔过滤器共挤出。

15 为了测定多肽结合膜的相对效率, 使用大小排阻凝胶色谱对蛋白质/小泡混合物进行层析, 接着检测放射性。这提供了含有分别与小泡缔合的和溶液中的放射性标记的蛋白质的两个峰。曲线下的面积分别是对于常规小泡是大约 30%和 70%, 对于中性软膜是 60-70%和 40-30%, 对于带电荷的高柔性膜是大于 80%和小于 20%。

20

实施例 149-152

高度形变中性小泡(起始)

550 毫克来自大豆的磷脂酰胆碱

450 毫克 Tween 80

25 9 毫升磷酸盐缓冲液, pH6.5

高度形变带电荷小泡(起始)

874.4 毫克来自大豆的磷脂酰胆碱

125.6 毫克胆酸钠

30 9 毫升磷酸盐缓冲液, pH7.1

混合有免疫球蛋白 G 的小泡(最终悬浮液)

每毫升最终悬浮液有 100 毫克总脂质

每 100 毫克总脂质有 0.5 毫克和 1 毫克蛋白质。

- 5 根据上述制备所有脂质悬浮液。通过加入到预先形成的小泡悬浮液中将免疫球蛋白(定向抗荧光素的单克隆 IgG)掺入到制剂中。将缔合的小泡与游离量的免疫球蛋白分离后,通过使用分离的、原始的和对照溶液中荧光猝灭来测定来自前者的相对影响。这提供了各部分中最终 IgG 浓度。

- 10 估计在带电荷高度形变的小泡情况下, IgG 载体膜缔合效率至少是 85%, 而对于中性软膜大约是低 10%。观察到的小的差别可能是由于 Ig 包含大的疏水性 Fc 区的事实, 所述 Fc 区即使在不存在膜软化的、产生缺陷成分的情况下也容易插入到脂质膜中。

实施例 153-154

- 15 高度形变带电荷小泡, C 型:

130.5 毫克来自大豆的磷脂酰胆碱

19.5 毫克胆酸钠盐

0.1 毫升乙醇

- 20 高度形变不带电荷的小泡, T 型:

75 毫克来自大豆的磷脂酰胆碱

75 毫克 Tween 80

0.1 毫升乙醇

- 25 胰岛素, 人重组体:

1.35 毫升 Actrapid™100 (Novo-Nordisk)

- 30 试验制剂. 每种脂质混合物溶解于乙醇中直到获得均匀的磷脂溶液(注意: 胆酸钠不能很好地溶解)。将混合物注入胰岛素溶液中并且充分混合。老化大约 12 小时后, 为了有利于进行, 得到的“粗小泡”悬浮液通过 0.2 毫微米过滤器(Sartorius, Gottingen)过滤几次, 得到好的样品均一性。最终膜

胰岛素浓度是 80 IU/毫升。

5 试验.男性健康志愿者 (75 公斤, 42 岁)在第一次葡萄糖浓度测定之前禁食 17 小时。暂时改变其血液中葡萄糖浓度后, 通过置于其臂中的软静脉导管每 10 分钟至 20 分钟输入 2 毫升至 4 毫升样品。最初试验期是 70 分钟, 其间平均血液葡萄糖浓度是 78.4, 施用 C 型 Transfersulin®悬浮液(45IU)并且均匀涂抹在另一只前臂内侧完整皮肤表面(以几种顺序)使得覆盖 56cm²的面积。施用试验悬浮液后 30 分钟, 皮肤表面出现可见干燥; 30 分钟后, 只有悬浮液的稀薄痕迹可见。

10 使用标准葡萄糖脱氢酶测试(Merck, Gluc-DH)来测定血糖浓度。每个样品含有三个独立的试样并且每一测试至少进行三次。这保证平均值的标准偏差很少超过 5 毫克/dL, 典型误差是 3 毫克/dL 级。

结论.上皮(epicutaneous)给药与 Transfersomes®(Transfersulin®)结合的胰岛素后, 血糖量正常的志愿受试者体内的血葡萄糖浓度的变化总是比通过皮下注射胰岛素溶液实现的血葡萄糖浓度的变化慢。

15 上表皮给药 Transfersulin®后血液中葡萄糖浓度的最大减少一般超过相应的皮下注射产生的血液中葡萄糖浓度的最大减少的 10%, 曲线下的面积至少是 20%, 使用公开的数据作为参考。对于 t 大于 3 小时悬浮液 C 情况下, 血液中血葡萄糖浓度的平均抑制是大约 18 毫克/dL。

20 悬浮液 T 的结果是大约比用悬浮液 C 测得的数据差 35%。加入磷脂酰甘油(相对于磷脂酰胆碱的 15 重量%)将 C-和 T-型制剂之间的差异减小到 25%(没有给出数据)。

25 但是, 即使使用迄今为止的最好的其它非入侵式胰岛素递送方法, 例如使用电离子透入法(Meyer, B.R., Katzeff, H. L., Eschbach, J. Trimmer, J., Zacharias, S.R., Rosen, S., Sibalis, D. Amer. J. Med. Sci. 1989, 297:3211-325)或者通过鼻喷入, 分别将少于 5%和少于 10%的胰岛素分子带入全身血液循环中。

实施例 155:

高度形变的带电荷小泡:

30 和实施例 72-76 一样的组合物

胰岛素，人重组体：

和实施例 72-76 一样的 Actrapid™(冻干物)(Novo-Nordisk)。

根据实施例 61-65 制备试验制剂。基本上根据上面实施例所述进行给药，但是禁食期持续更长并且取血样更早开始。因此，实验在没有监视禁食的 12 小时开始，进一步禁食 12 小时，在此期间不经任何处理来监测血液葡萄糖水平，监测期是 16 小时，在此期间受试者被禁食并且用上皮给药的 Transfersulin®处理。其它差别是施药面积只有 10cm²。

在给药胰岛素之前不定期取样。给药 Transfersulin®后，在头 4 小时中每 20 分钟取一次血样，此后每 30 分钟取一次。所有的样品用一种自身诊断装置 Accutrend(Boehringer-Mannheim, 德国)分析。在每个时间点读取 3-5 个读数。在图 12 中给出的结果相当于血葡萄糖浓度变化的平均值。虚线给出 95%置信限。

在第二“未处理”期中，平均血葡萄糖浓度是 83.2 毫克/dL。清楚地看出利用高可适用混合脂质小泡上皮给药后，在头几个小时内降低血葡萄糖浓度。葡萄糖动态曲线类似于前面试验系列中测得的结果，总的效果在一定程度上更强，可能是由于后者试验制剂中高得多的药物浓度。

实施例 156-158:

高度形变的带电荷小泡:

和实施例 153 一样的组合物

胰岛素，人重组体:

Actrapid™(Novo-Nordisk)，如图 12 中给出的批量。

在该试验系列中，通过使用相同批的 Transfersome®研究了胰岛素的批间变化的影响。根据前面实施例所述进行给药。单位面积的剂量和前面实施例中使用的相同。

在所有三个实验中平均血葡萄糖浓度大约相同。尽管如此，实验的结果在胰岛素批间非常不同。一批非常好而另一批根本没有作用；第三批产生中间结果。

胰岛素的小的批-批变化(其是已知的，但是通常没有报道，并且在非常大的吸附(载体)表面存在下特别显著)，看起来影响胰岛素-载体相互作用的效率和/或动力学。相信药物释放的变化的速度对于该现象特别敏感。因此

不仅在重要的生物试验前研究载体结合的脂质的量是重要的,而且测定药物释放的速度也是重要的。测定作为注射后制剂特征的受试动物例如小鼠或大鼠中葡萄糖动力学对于该目的是有用的。

5 施药具有相同批的 Transfersomes®但是不同批的胰岛素的三种不同批的 Transfersulin®后,血糖量正常的人志愿受试者体内葡萄糖动力学清楚地表明原药物特征中即使小的变化也对最终制剂的生物活性有相当强的影响(参见图 12)。

参考文献

- 10 Cevc, G., Strohmaier, L., Berkholtz, J., Blume, G. 生物物理研究(Stud. Biophys.) 1990, 138: 57ff
- Cevc, G., Hauser, M., Kornyshev, A.A. Langmuir 1995, 11: 3103-3110.
- Prime, K. 和 Whitesides, G.M. 科学(Science), 1991, 252: 1164-1167
- Deber, C. M.; Hughes, D. W.; Fraser, P. E.; Pawagi, A. B.; Moscarello, M.
- 15 A. Arch 生物化学生物物理(Biochem. Biophys.) 1986, 245: 455-463.
- Zimmerman, R. M., Schmidt, C. F., Gaub, N. H. E. J. Colloid Int. Sci. (胶体界面科学杂志)1990, 139: 268-280.
- Hernandez-Caselles, T.; Villalain, J.; Gomez-Fernandez, J. C.分子、细胞、生物化学(Mol. Cell. Biochem.) 1993, 120: 119-126.
- 20 Scott, D. L.; Mandel, A. M.; Sigler, P. B.; Honig, B.生物物理杂志(Biophys. J.) 1994, 67: 493-504.
- Norde, W., 高级胶体界面科学(Adv. Colloid Interface Sci.) 1986, 25: 267-340.
- Lee, C. -S.; Belfort, G.美国国家科学院院报(Proc. Natl. Acad. Sci.)1989,
- 25 86, 8392-8396.
- Haynes, C. A.; Norde, W.胶体和表面(Colloids and Surfaces)B 1994, 2, 517ff.
- Haynes, C. A.; Sliwinski, E.; Norde, W. 胶体界面科学杂志(J. Colloid Interface Sci.) 1994, 164, 394ff.
- 30 界面蛋白质, T.A. Horbett 和 J.L. Brash, 编辑, ACS 会议集锦(ACS Symposium Series)602, 1995, 纽约.

- Torchilin, V. P.; Goldmacher, V. S.; Smirnov, V. N. 生物化学生物物理研究通讯(Biochem. Biophys. Res. Comm.)1978, 85: 983-990.
- Meyer, B. R., Katzeff, H. L., Eschbach, J., Trimmer, J., Zacharias, S. R., Rosen, S., Sibalis, D. 美国药物科学杂志(Amer. J. Med. Sci.)1989, 297: 321-325.
- 5 其它信息文献
专利文献
- Pauly, H. C.; Koulbanis, C. 用于皮肤护理的含有氨基酸和肽和蛋白质的脂质体。 FR/Patent # 2627385/89.
- 10 Louhgrey, H. C.; Cullis, P. R.; Bally, M.B.; Choi, L.S.L.; Wong, K.F. 靶向脂质体和使用衍生化脂质用于脂质体 - 蛋白质偶联的方法。 PCT # 9100289/91.
- Hostetler, K.Y.; Felgner, P.L.; Felgner, J. 用于延长治疗用肽和蛋白质的生物利用度和保质期的脂质体。 PCT # 9104019/91
- 15 Matsuda, H.; Ueda, Y.; Yanmauchi, K.; Inui, J. 缓释蛋白质 - 脂质体复合体 JP # 0482839/92
- Kobayashi, N.; Ishida, S.; Kumazawa, E. 定量测定脂质体包被的生物活性蛋白质的方法 JP # 05302925/93
- Tagawa, T.; Hosokawa, S.; Nagaike, K. 含有结合了蛋白质的脂质体的药物。 EPT # 526700/93.
- 20 蛋白质 - 脂质体的相互作用
- Ledean, T.; Elhajji, Rebuffat, S.; Rajesvari, M.R.; Bodo, B. trichorinine a 3c 与膜模型的相互作用的荧光研究(Fluorescence studies of the interaction of trichorinine a 3c with model membranes.) Biochim. Biophys. Acta 1986, 858; 1-5.
- 25 Krishnaswamy, S. 凝血酶原酶复合体对于趋向复合体形成的蛋白质 - 蛋白质和蛋白质 - 膜相互作用的综合作用。 生物化学杂志(J. Biol. Chem.) 1990,265: 3708-3718.
- Liu, D.; Huang, L. 胰蛋白酶诱导的脂质小泡的裂解: 表面电荷和脂质成分的影晌。 生物化学年撰(Anal. Biochem.) 1992, 202: 1-5.
- 30

不同Transfersomes 上胰岛素的吸附作用

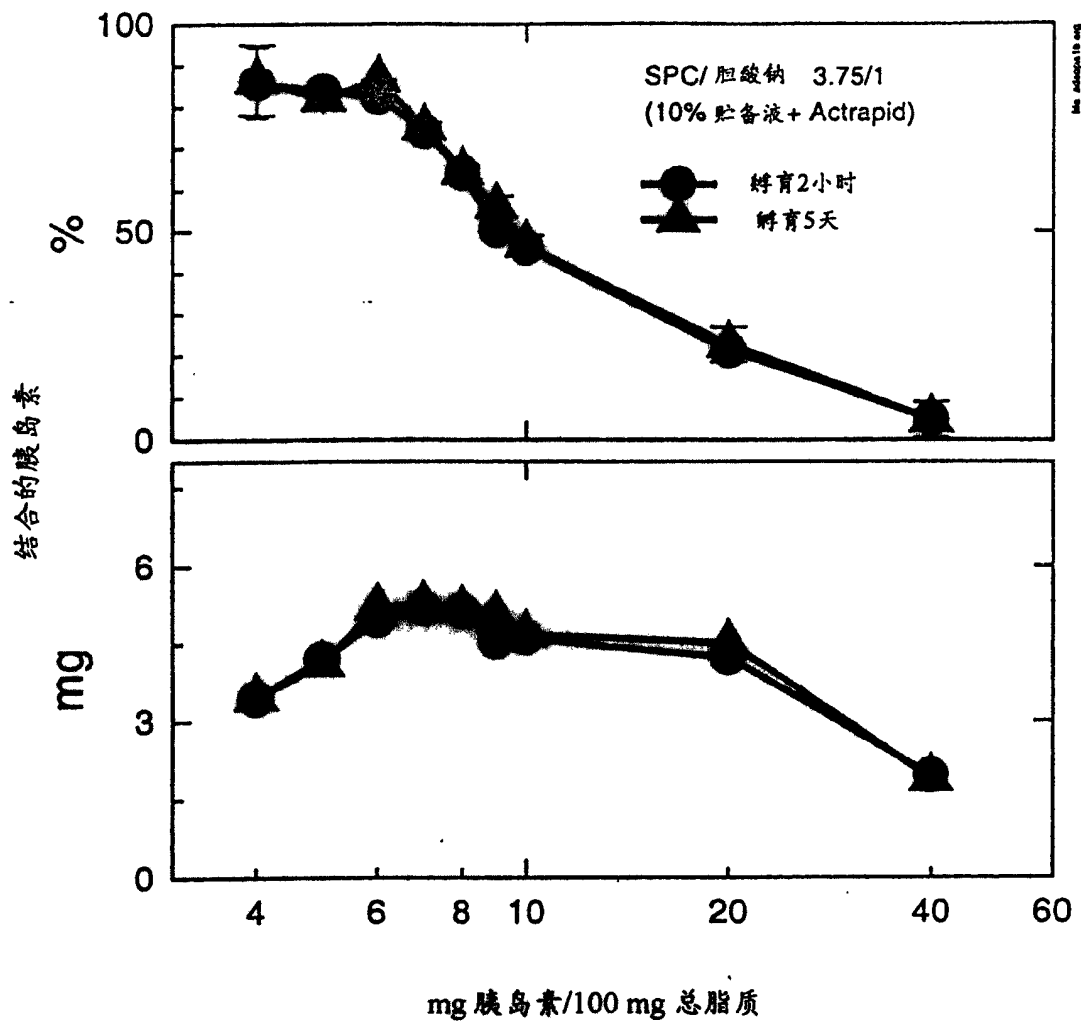


图 1

Transfersomes C上胰岛素的吸附作用

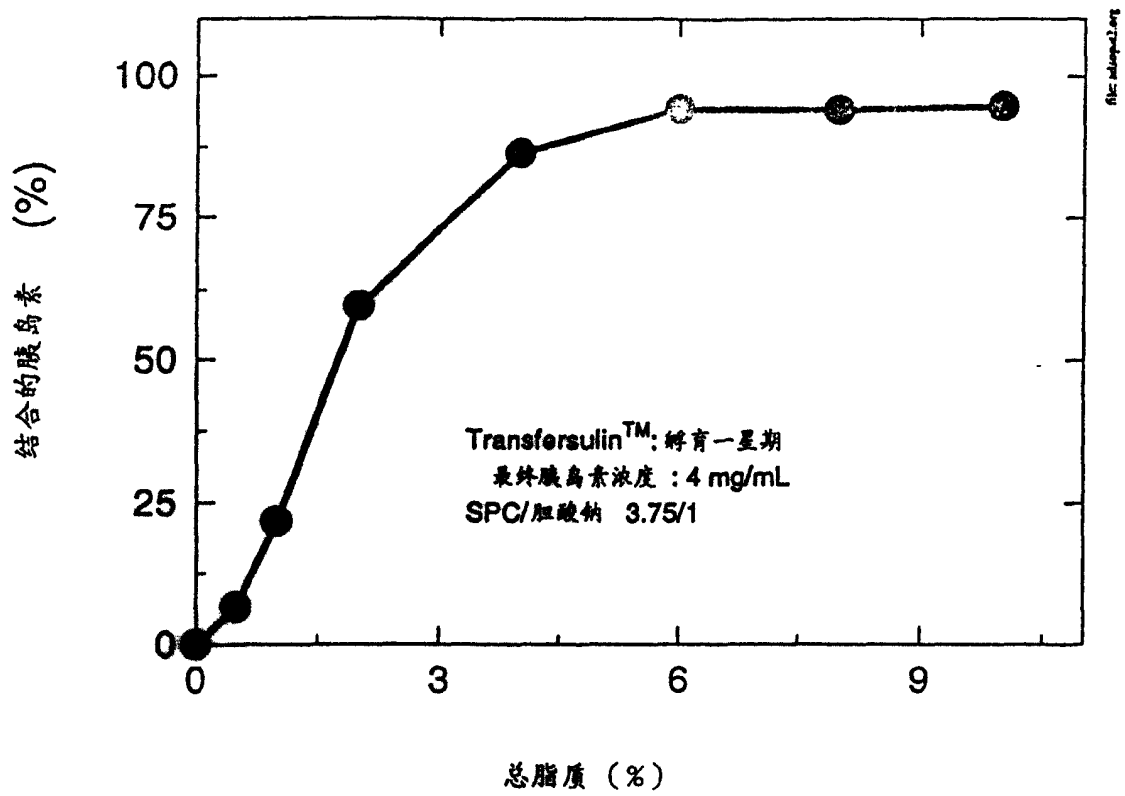


图 2

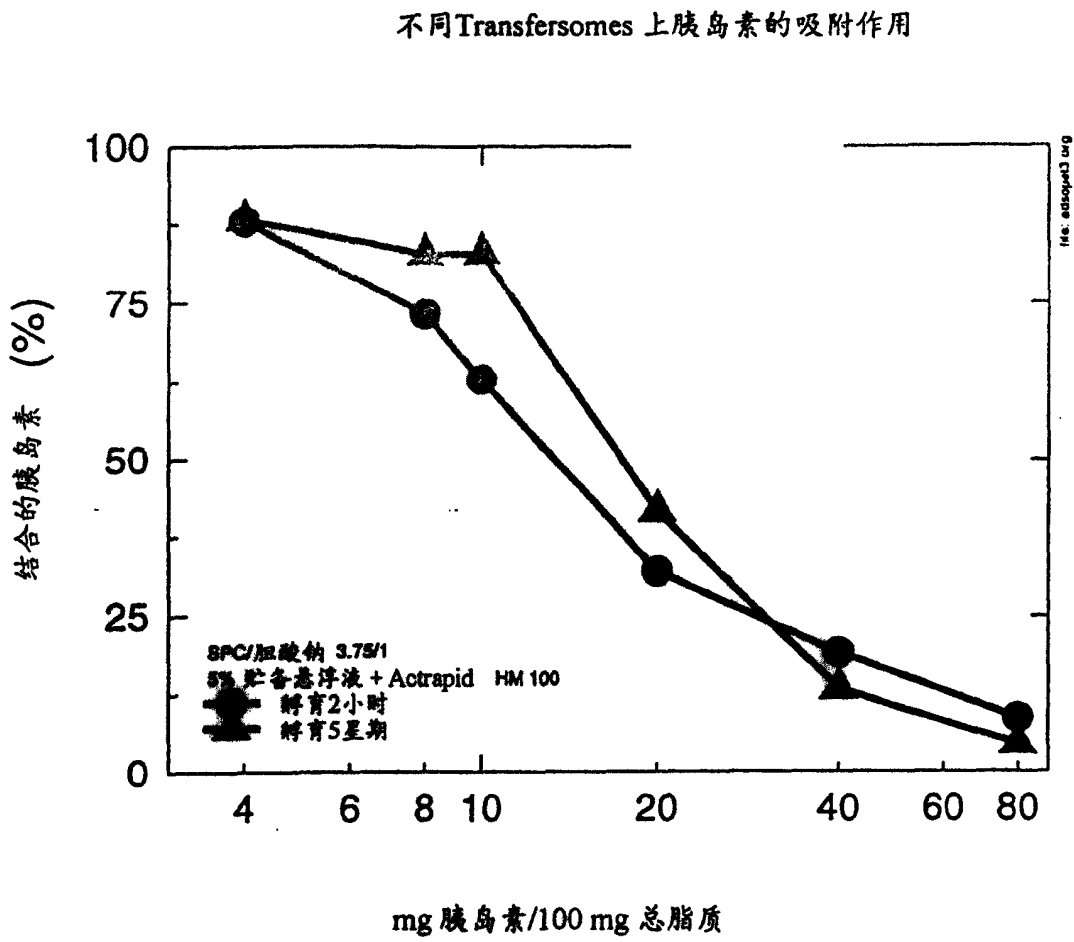


图 3

不同Transfersomes上胰岛素的吸附作用

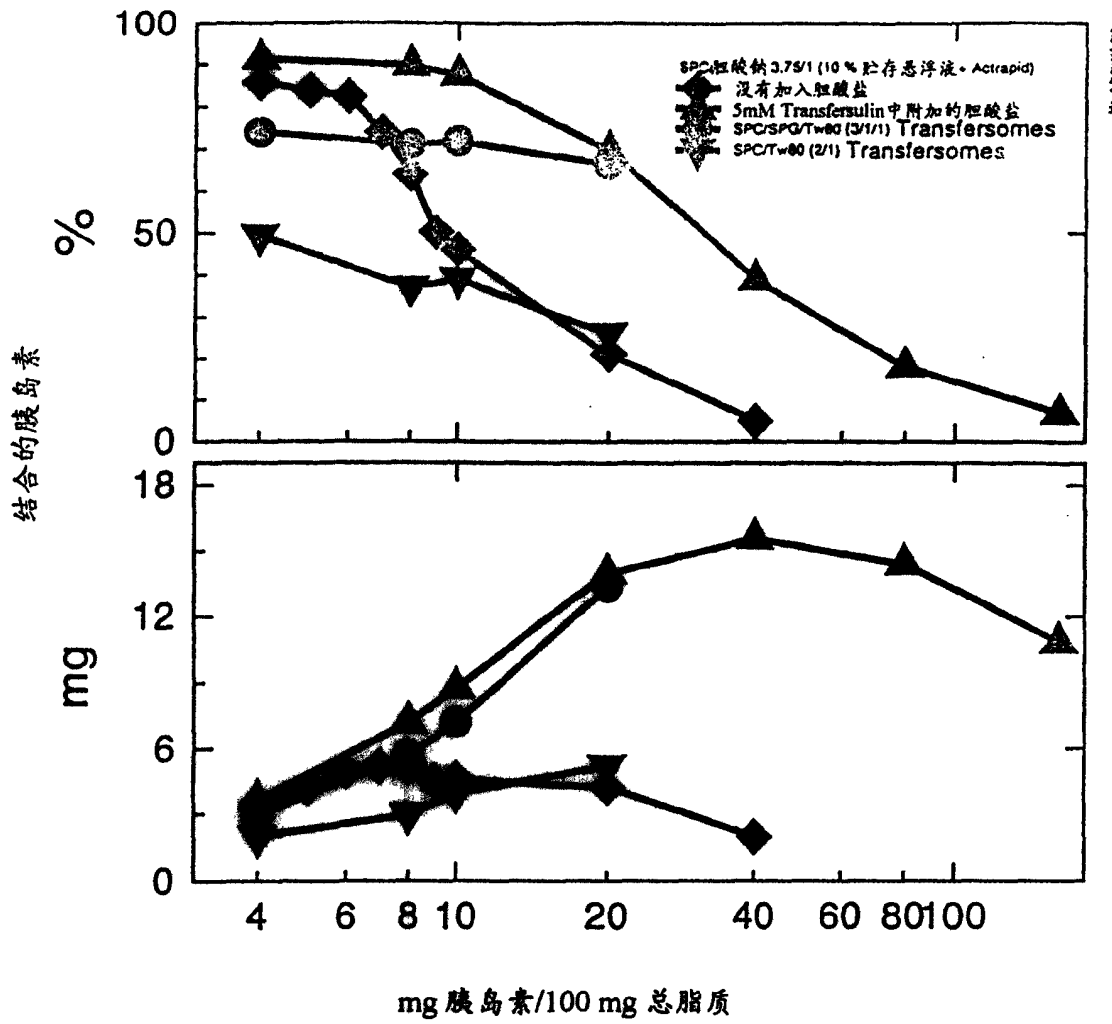


图 4

不同Transfersomes上胰岛素的吸附作用

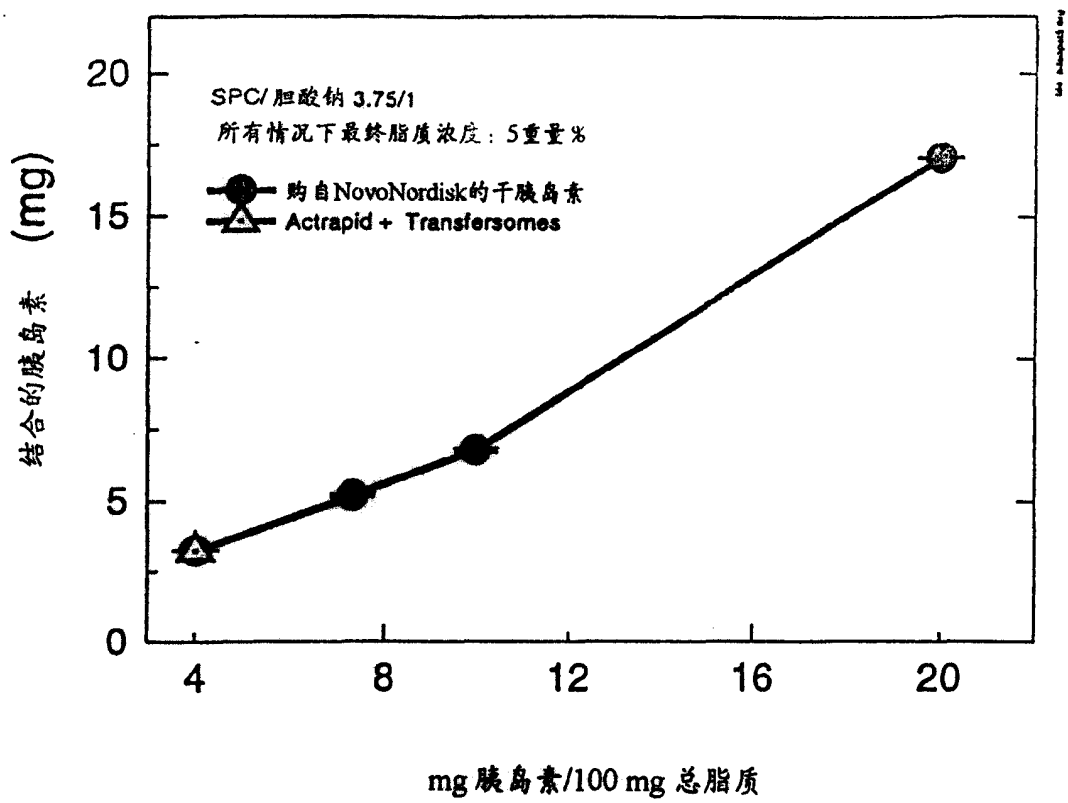


图 5

不同Transfersomes上胰岛素的吸附作用

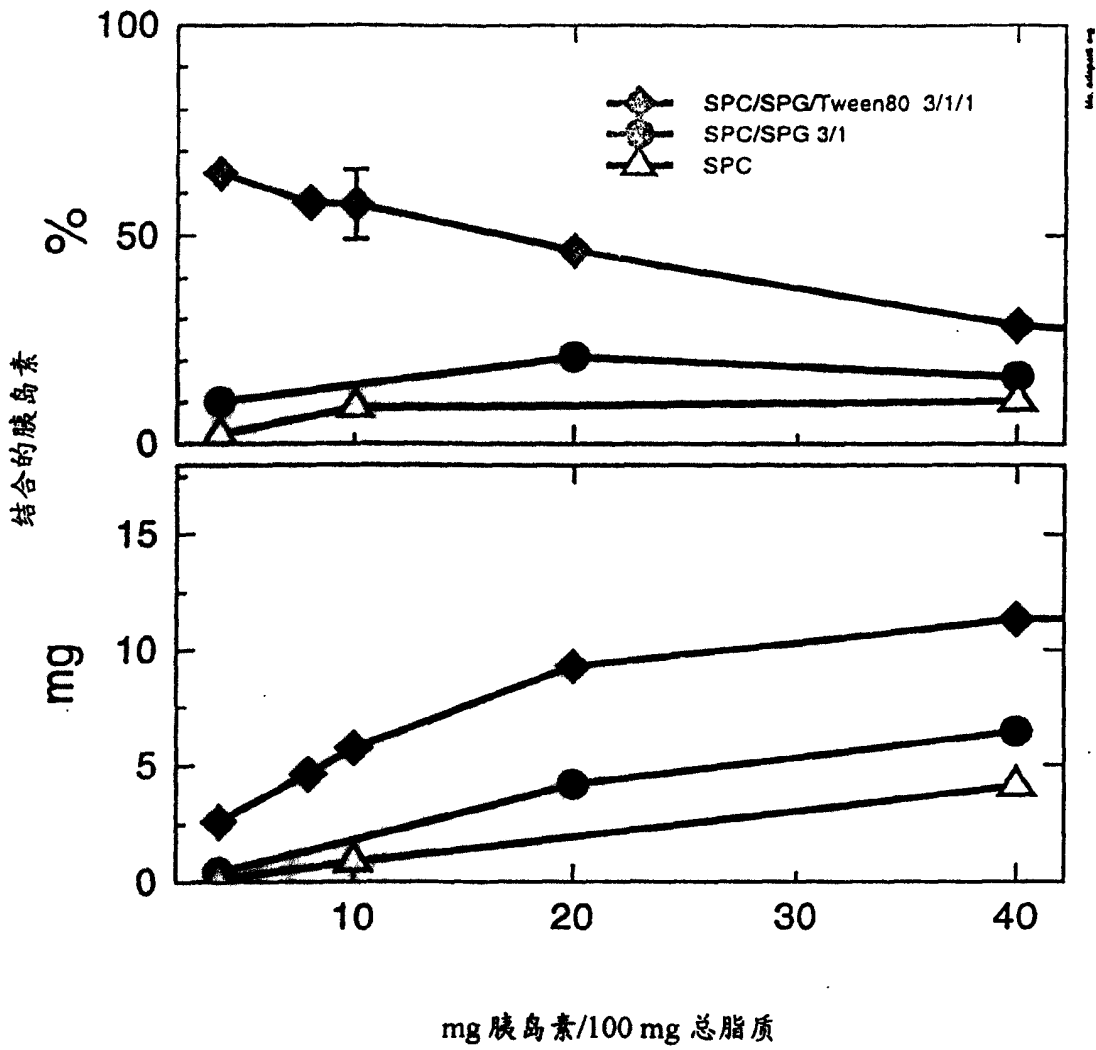


图 6

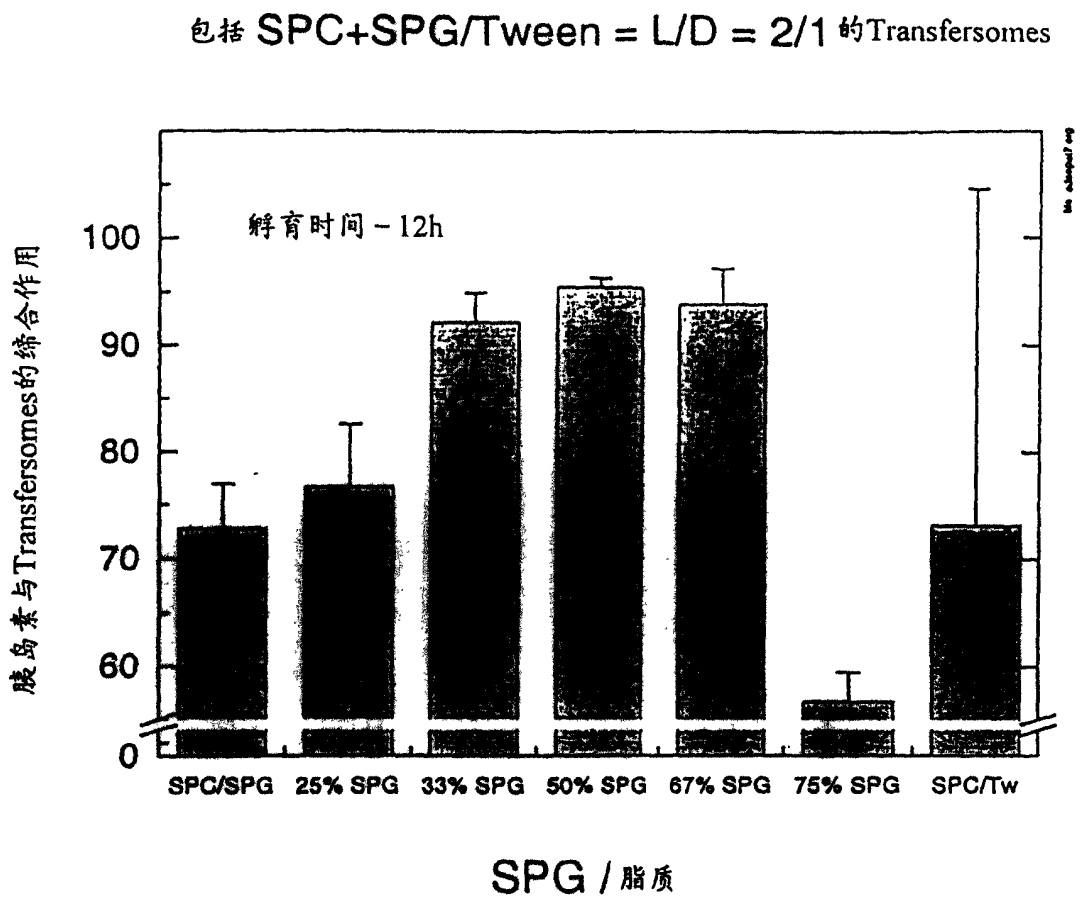


图 7

胰岛素与Transfersomes C的缔合作用

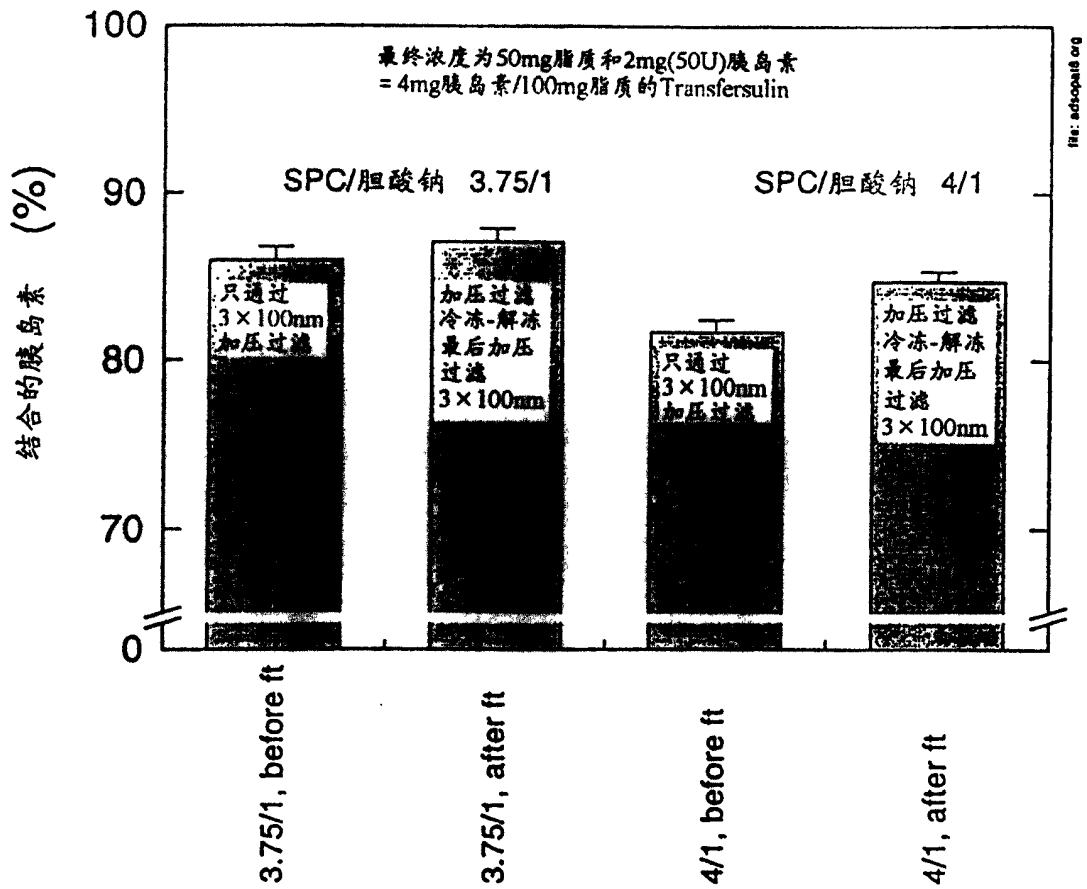
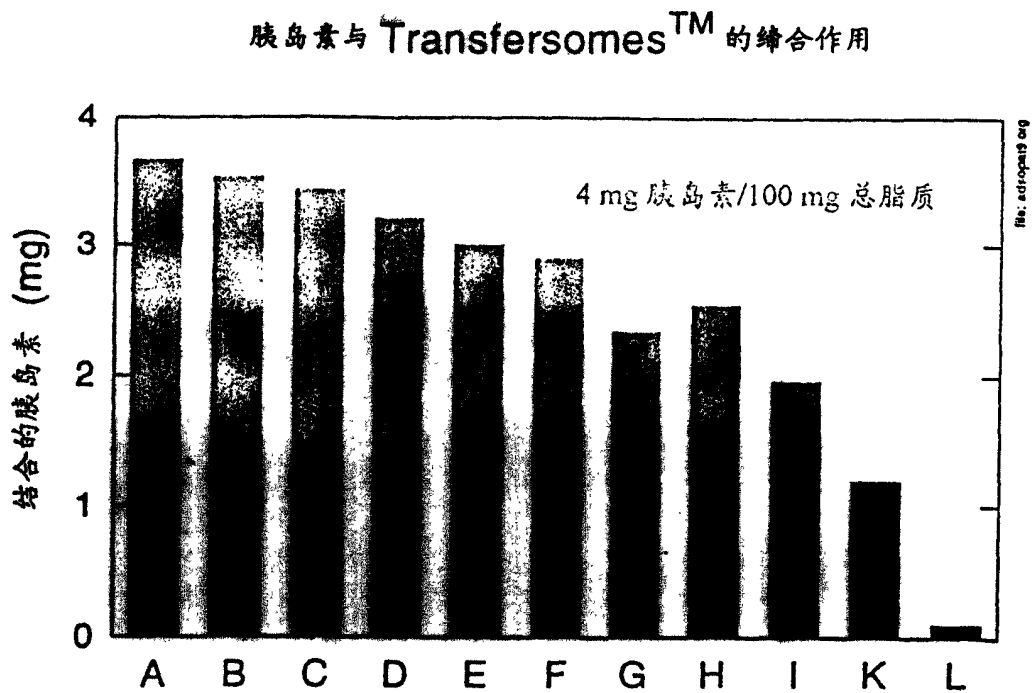


图 8



- A: SPC/ 胆酸盐缓冲液中的胆酸钠 + ActrapidTM
 B: SPC/ 胆酸钠, 5% + Actrapid
 C: SPC/ 胆酸钠, 10% + Actrapid
 D: SPC/SPG/Tween80 (3/1/1) + Actrapid
 E: SPC/ 胆酸钠 + 缓冲液中的冻干的人胰岛素
 F: SPC/ 胆酸钠 + Velasulin (猪胰岛素)
 G: SPC/Tween 80 (2/1) + Actrapid, 孵育5星期
 H: SPC/Tween 80 (2/1) + Actrapid, 孵育4天
 I: SPC/Tween 80 (2/1) + Actrapid, 孵育3小时
 K: SPC/Tween 80 (2/1) + Actrapid, 孵育2小时
 L: SPC (脂质体), 10% 贮存悬浮液

图 9

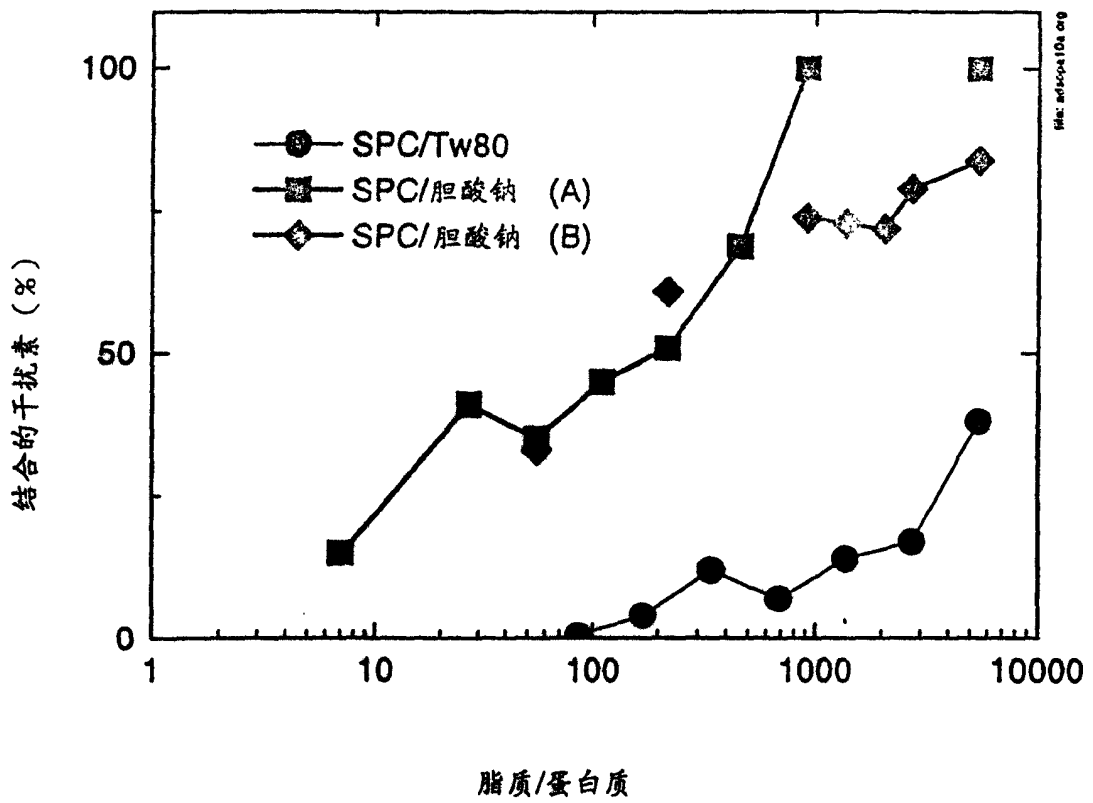


图 10

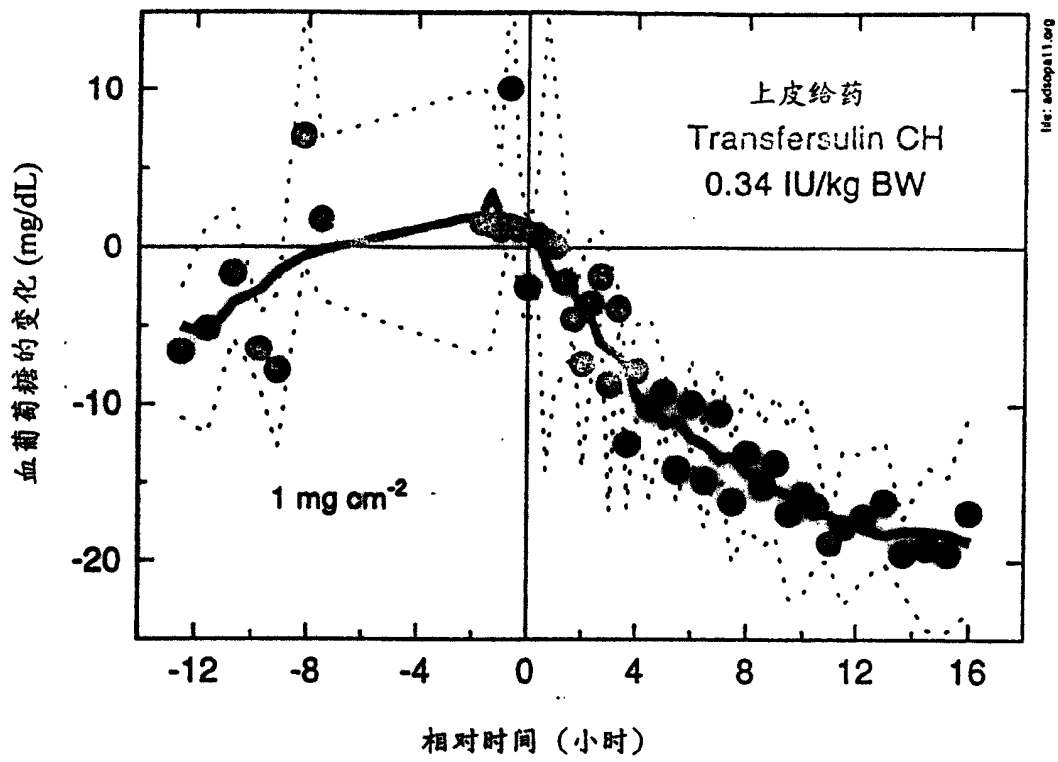


图 11

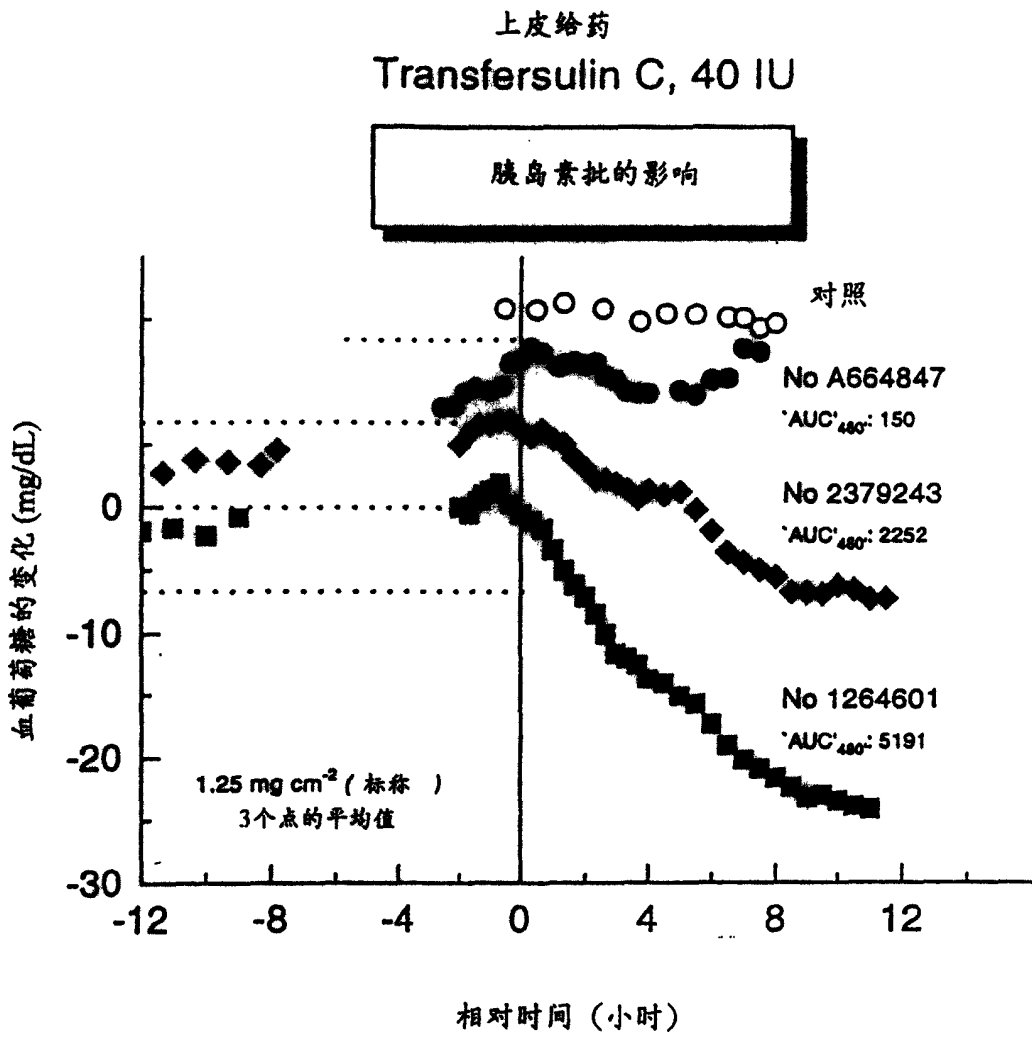


图 12