



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110167624 B

(45) 授权公告日 2021.11.19

(21) 申请号 201780081305.1

(22) 申请日 2017.12.05

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110167624 A

(43) 申请公布日 2019.08.23

(30) 优先权数据
62/430,260 2016.12.05 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2019.06.28

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2017/064723 2017.12.05

(87) PCT国际申请的公布数据
W02018/106696 EN 2018.06.14

(73) 专利权人 北卡罗来纳州立大学
地址 美国北卡罗来纳州

(72) 发明人 顾震 J·王 叶彦奇

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所
有限公司 11038

代理人 姜煌

(51) Int.Cl.

A61M 37/00 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

A61K 47/54 (2017.01)

A61K 47/69 (2017.01)

A61K 38/28 (2006.01)

A61K 38/44 (2006.01)

A61K 31/728 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

(56) 对比文件

W0 2016172320 A1, 2016.10.27

US 2015030641 A1, 2015.01.29

W0 2009040548 A1, 2009.04.02

US 2016157764 A1, 2016.06.09

W0 2016172554 A1, 2016.10.27

CN 102281897 A, 2011.12.14

审查员 王俊玲

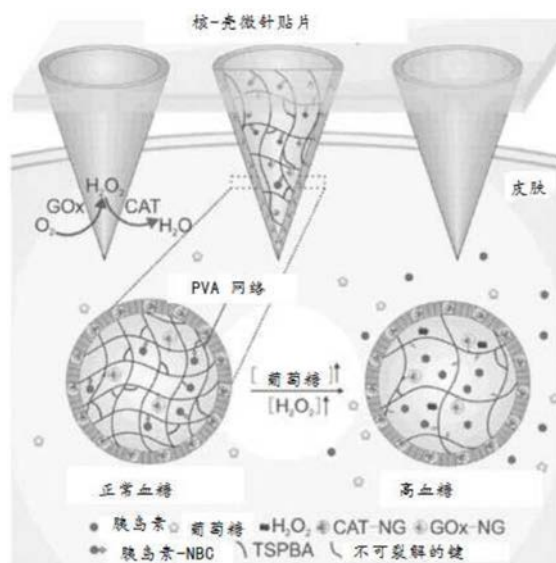
权利要求书1页 说明书22页 附图23页

(54) 发明名称

核-壳微针装置及其用途

(57) 摘要

本公开涉及用于治疗疾病(例如,糖尿病)的微针装置和方法,使用可降解交联凝胶进行治疗剂(例如,胰岛素)的自动调节递送。



1. 一种微针贴片, 包括:
多个微针, 所述多个微针各自具有基部端和尖端; 以及
基底, 所述微针的所述基部端连接至所述基底;
其中所述微针包括:
壳, 所述壳包含:
第一聚乙烯醇 (PVA) 聚合物, 所述第一聚乙烯醇聚合物与第一过氧化物敏感型接头交联; 和
过氧化物清除酶, 所述过氧化物清除酶包封在第一纳米凝胶内, 其中所述第一纳米凝胶嵌入在所述第一聚乙烯醇聚合物中;
以及
核, 所述核包含:
第二聚乙烯醇 (PVA) 聚合物, 所述第二聚乙烯醇聚合物与第二过氧化物敏感型接头交联;
葡萄糖响应剂, 所述葡萄糖响应剂包封在第二纳米凝胶内, 其中所述第二纳米凝胶嵌入在所述第二聚乙烯醇聚合物中; 和
治疗剂, 其中所述治疗剂通过第三过氧化物敏感型接头共价连接至所述第二聚乙烯醇聚合物。
2. 根据权利要求1所述的微针贴片, 其中所述第一过氧化物敏感型接头包括硼酸酯 (boronic ester)。
3. 根据权利要求1或权利要求2所述的微针贴片, 其中所述第一过氧化物敏感型接头为 N1-(4-二羟硼基苄基)-N3-(4-二羟硼基苯基)-N1,N1,N3,N3-四甲基丙烷-1,3-二胺鎓 (TSPBA)。
4. 根据权利要求1或权利要求2所述的微针贴片, 其中所述第二过氧化物敏感型接头包括硼酸酯。
5. 根据权利要求1或权利要求2所述的微针贴片, 其中所述第二过氧化物敏感型接头为 N1-(4-二羟硼基苄基)-N3-(4-二羟硼基苯基)-N1,N1,N3,N3-四甲基丙烷-1,3-二胺鎓 (TSPBA)。
6. 根据权利要求1或权利要求2所述的微针贴片, 其中所述第三过氧化物敏感型接头包括硼酸酯。
7. 根据权利要求1或权利要求2所述的微针贴片, 其中所述第三过氧化物敏感型接头为 4-硝基苄基-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧硼杂环戊烷-2-基)苄基碳酸酯 (NBC)。
8. 根据权利要求1或权利要求2所述的微针贴片, 其中所述葡萄糖响应剂包括葡萄糖氧化酶。
9. 根据权利要求1或权利要求2所述的微针贴片, 其中所述过氧化物清除酶为过氧化氢酶。
10. 根据权利要求1或权利要求2所述的微针贴片, 其中所述治疗剂为胰岛素。
11. 根据权利要求1或权利要求2所述的微针贴片, 其中所述微针进一步包含透明质酸 (HA)。

核-壳微针装置及其用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2016年12月5日提交的美国临时专利申请序列号 62/430,260的权益,该临时专利申请的公开内容以引用方式明确地并入本文。

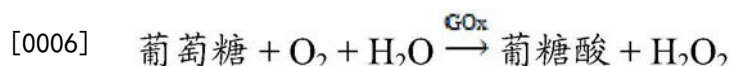
技术领域

[0003] 本公开涉及用于治疗疾病(例如,糖尿病)的微针装置和方法,使用可降解交联凝胶进行治疗剂(例如,胰岛素)的自动调节递送来。

背景技术

[0004] 糖尿病是一种慢性疾病,2016年影响全球4.22亿人,其特征内在于内源性产生的胰岛素缺乏和血糖水平(BGL)升高。不经适当的控制,长期 BGL升高可导致截肢、失明、肾衰竭和心血管疾病。为预防这些糖尿病并发症,1型和2型晚期糖尿病患者使用注射或输注的胰岛素通常无法实现血糖正常的目标。然而,当胰岛素水平超过所需水平时,开环外源性胰岛素注射或输注通常无法实现目标,并且带来额外的低血糖症风险;这些低血糖事件可能很严重,甚至可能致命。因此,迫切需要一种生物启发的“人工β细胞”系统,该系统能够响应于BGL升高而智能地“分泌”所需量的胰岛素,同时在正常血糖水平下维持基础胰岛素释放动力。

[0005] 为此,已经开发出基于闭环装置的系统,并且集成了经患者校准的连续葡萄糖监测传感器和外部胰岛素输注泵。然而,这种系统在算法准确度和传感器可靠性方面仍然面临挑战。因此,可响应于环境BGL升高而溶胀、降解或解离的化学工程制剂或装置作为一种替代解决方案引起越来越多的关注。这些系统通常采用三种不同材料及对应的作用机制中的一者,包括葡萄糖氧化酶(GOx)、苯基硼酸(PBA)和葡萄糖结合蛋白(GBP)。GOx催化D-葡萄糖氧化为D-葡萄糖酸内酯,D-葡萄糖酸内酯可水解成葡萄糖酸,并且在氧气存在下生成过氧化氢:



[0007] 因此,包埋GOx的酸度敏感型系统可响应于葡萄糖水平升高而产生局部酸性环境以触发胰岛素的释放。然而,快速切换体内生理pH以实现快速响应极具挑战性。基于局部氧水平的酶消耗开发出用于实现快速响应的缺氧敏感型制剂。然而,该制剂受到此系统中残留的过氧化氢的限制,引起了对长期生物相容性的担忧。此外,同时释放GOx与胰岛素可能引起全身毒性。将来应开发新一代智能胰岛素递送系统,优先考虑快速响应、制备和管理的简便性以及优异的生物相容性。

[0008] 本文所公开的组合物、装置、微针贴片和方法解决了这些及其他问题。

发明内容

[0009] 本文公开了一种用于自动调节血糖水平的生物启发的葡萄糖响应性治疗剂(例

如,胰岛素)递送系统。本文所公开的组合物和方法是改善1型和2型晚期糖尿病患者的健康和生活方式结果所需的。在一些实施例中,本文公开了一种无痛核-壳微针阵列贴片,该核-壳微针阵列贴片由可降解的交联凝胶组成,用于智能递送治疗剂,具有快速响应性和优异的生物相容性。当嵌入凝胶内部的葡萄糖特异性酶催化葡萄糖氧化的过程中所生成的 H_2O_2 触发时,这种基于凝胶的装置可部分解离并随后释放出治疗剂(例如,胰岛素)。重要的是, H_2O_2 响应性微针涂有嵌入式 H_2O_2 清除酶的薄层,从而模拟过氧化物酶体中酶的互补功能,以保护正常组织免受氧化应激引起损伤。利用化学诱导的1型糖尿病小鼠模型,表明这种具有生物响应性核和保护壳的智能胰岛素贴片可在正常范围内有效调控血糖水平,而长期副作用可忽略不计。

[0010] 在一些方面,本文公开了一种微针贴片,该微针贴片包括:

[0011] 多个微针,所述多个微针各自具有基部端和尖端;以及

[0012] 基底,微针的基部端连接至基底;

[0013] 其中微针包括:

[0014] 壳,该壳包含:

[0015] 第一聚乙烯醇(PVA)聚合物,该第一PVA聚合物与第一过氧化物敏感型接头交联;以及

[0016] 过氧化物清除酶,该过氧化物清除酶包封在第一纳米凝胶内,其中第一纳米凝胶嵌入在第一PVA聚合物中;

[0017] 以及

[0018] 核,该核包含:

[0019] 第二聚乙烯醇(PVA)聚合物,该第二PVA聚合物与第二过氧化物敏感型接头交联;

[0020] 葡萄糖响应剂,该葡萄糖响应剂包封在第二纳米凝胶内,其中第二纳米凝胶嵌入在第二PVA聚合物中;以及

[0021] 治疗剂,其中该治疗剂通过第三过氧化物敏感型接头共价连接到第二PVA聚合物。

[0022] 在一些实施例中,第一过氧化物敏感型接头包括硼酸酯。在一些实施例中,在暴露于过氧化物时,第一过氧化物敏感型接头从第一PVA聚合物分离。在一些实施例中,第一过氧化物敏感型接头为N1-(4-二羟硼基苄基)-N3-(4-二羟硼基苯基)-N1,N1,N3,N3-四甲基丙烷-1,3-二胺鎓(TSPBA)。

[0023] 在一些实施例中,第二过氧化物敏感型接头包括硼酸酯。在一些实施例中,在暴露于过氧化物时,第二过氧化物敏感型接头从第二PVA聚合物分离。在一些实施例中,第二过氧化物敏感型接头为N1-(4-二羟硼基苄基)-N3-(4-二羟硼基苯基)-N1,N1,N3,N3-四甲基丙烷-1,3-二胺鎓(TSPBA)。

[0024] 在一些实施例中,第三过氧化物敏感型接头包括硼酸酯。在一些实施例中,在暴露于过氧化物时,第三过氧化物敏感型接头从第二PVA聚合物分离。在一些实施例中,第三过氧化物敏感型接头为4-硝基苄基-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧硼杂环戊烷-2-基)苄基碳酸酯(NBC)。

[0025] 在一些实施例中,葡萄糖响应剂包括葡萄糖氧化酶。在一些实施例中,过氧化物清除酶为过氧化氢酶。在一些实施例中,治疗剂为胰岛素。在一些实施例中,微针进一步包含透明质酸(HA)。

- [0026] 在一些方面,本文公开了一种向受试者递送治疗剂的方法,该方法包括:
- [0027] 向受试者施用本文所公开的微针贴片;以及
- [0028] 在存在高血糖水平的葡萄糖时,从所述微针贴片释放出所述治疗剂。
- [0029] 在一些实施例中,受试者患有高血糖症。
- [0030] 在一些实施例中,在暴露于高血糖水平的葡萄糖时,葡萄糖响应剂产生过氧化物。在一些实施例中,该方法还包括在暴露于过氧化物时,使第一过氧化物敏感型接头从第一PVA聚合物分离。
- [0031] 在一些实施例中,该方法还包括在暴露于过氧化物时,使第三过氧化物敏感型接头从第二PVA聚合物分离。在一些实施例中,第三过氧化物敏感型接头从第二PVA聚合物的分离使治疗剂从微针贴片释放。
- [0032] 在一些实施例中,该方法还包括降低血糖水平。在一些实施例中,治疗剂包括胰岛素。在一些实施例中,该方法还包括在导致低血糖症之前终止释放治疗剂。
- [0033] 在附图和以下说明书中阐述了本发明的一个或多个实施例的细节。本发明的其他特征、目的和优点在说明书和附图以及权利要求中将显而易见。

附图说明

- [0034] 包含在本说明书中并构成其一部分的附图示出了下文所述的几个方面。
- [0035] 图1A-1C。使用 H_2O_2 响应性聚乙烯醇-N1-(4-二羟硼基苄基)-N3-(4-二羟硼基苄基)-N1,N1,N3,N3-四甲基丙烷-1,3-二胺鎓(PVA-TSPBA)凝胶的葡萄糖响应性胰岛素递送系统的示意图。图1A,由高血糖状态触发从PVA-TSPBA微针贴片释放出胰岛素,并且过氧化氢酶(CAT)嵌入的PVA-TSPBA壳大大减少了局部炎症。图1B,以4-硝基苄基-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧硼杂环戊烷-2-基)苄基碳酸酯(NBC)改性的胰岛素以及 H_2O_2 响应性释放的机制。图1C,PVA-TSPBA凝胶的制造以及 H_2O_2 响应性。
- [0036] 图2A-2F。从PVA-TSPBA凝胶中释放出体外葡萄糖响应性胰岛素。图2A,在pH为7.4和3.5的条件下,在包含10mM H_2O_2 的PBS中,从PVA-TSPBA中释放出胰岛素。图2B,在葡萄糖氧化酶(GOx)存在下,在PBS 7.4中,依赖于葡萄糖浓度的 H_2O_2 生成。将GOx直接加入溶液中,使其浓度达到0.2mg/mL。图2C,在GOx存在下,胰岛素从PBS 7.4中的凝胶中的依赖于葡萄糖浓度的释放。将GOx直接加入溶液中,使其浓度达到0.2mg/mL。将葡萄糖浓度设置为0、100mg/dL和400mg/dL。图2D,在包含GOx(0.2mg/mL)的PBS 7.4中,依赖于葡萄糖浓度的凝胶变化。图2E,自动调节胰岛素释放特征作为葡萄糖浓度的函数。图2F,脉冲胰岛素释放特征作为葡萄糖浓度的函数。
- [0037] 图3A-3G。PVA-TSPBA的微针(MN)阵列贴片的表征。图3A,具有透明质酸(HA)基料的负载有胰岛素的MN阵列的代表性荧光显微镜图像。将罗丹明B标记的胰岛素负载于微针顶部(红色)的PVA-TSPBA凝胶中,而HA基料(绿色,由FITC-胰岛素标记)主要位于底部。图3B,负载有胰岛素-FITC的MN阵列贴片的代表性荧光图像。比例尺,300 μm 。图3C,微针贴片的代表性扫描电镜图像。比例尺,300 μm 。图3D, MN的机械强度;图3E,负载有CAT的中空MN的底视图的代表性图像。这些图像使用共焦激光扫描显微镜获得,并且将z方向上的间隔设定为100 μm 。比例尺,300 μm 。图3F,使用冷冻切片得到的核-壳MN横截面的代表性图像:带有罗丹明B标记的CAT壳(红色),带有FITC标记的胰岛素(绿色)以及它们的叠加图。使用imageJ分

析得到壳的厚度为 $10\mu\text{m}$ 。图3G, GOx 或 GOx -纳米凝胶(GOx-NG)从PVA甲基丙烯酸酯凝胶时间依赖性释放。

[0038] 图4A-4H。MN阵列贴片用于1型糖尿病治疗的体内研究。图4A,用 MN阵列贴片治疗的小鼠(左图),切除MN阵列贴片插入的皮肤并用台盼蓝染色(右图)。比例尺, $600\mu\text{m}$ 。图4B,插入皮肤中的核-壳MN的代表性图像:嵌入带有罗丹明B标记的CAT的壳(红色)、由胰岛素-FITC标记的核(绿色)以及它们的叠加图。比例尺, $100\mu\text{m}$ 。图4C,用不同种类的微针阵列贴片治疗的1型糖尿病小鼠的血糖水平。图4D,在 MN-CAT或用胰岛素皮下注射对糖尿病小鼠治疗后1小时的体内葡萄糖耐受性试验。利用健康小鼠作为对照。图4E,基于120min内的曲线下面积(AUC)计算响应性,其中将基线设置为0min血糖读数。图4F,用MN阵列贴片或皮下注射胰岛素治疗的健康小鼠的血糖水平变化。在0min时进行治疗。图4G,低血糖症指数的定量分析,其确定为初始血糖读数和最低血糖读数之差除以达到最低点的时间。图4H,用多种MN阵列贴片治疗的糖尿病小鼠的血糖水平变化。MN-CAT的施用由蓝色箭头指示。每次在小鼠身上施用两个微针(第一次除外),由红色箭头指示最后两个微针被移除。学生t检验: $**P < 0.01$ 。数据点代表平均值 $\pm$ SD($n=5$)。误差条指示SD。

[0039] 图5A-5C。MN-CAT阵列用于糖尿病治疗的体内生物相容性研究。图 5A,小鼠经治疗的皮肤部位的代表性图像及其对应的H&E染色结果。用 MN-凝胶、MN-凝胶(G+I)、MN-凝胶(G+C+I)和MN-CAT对小鼠进行治疗。比例尺, 1mm 或 $300\mu\text{m}$,分别用于小鼠皮肤图像和H&E染色。图 5B,经MN治疗的表皮和皮肤厚度的统计分析。经MN-CAT治疗的表皮和皮肤与用MN-凝胶(G+I)治疗的表皮相比,表现出显著更少的肿胀($**P < 0.01$)。图5C,用MN-凝胶(G+I)、MN-凝胶(G+C+I)和MN-CAT治疗的皮肤的TUNEL测定(绿色)和Hoechst(蓝色)的免疫组织染色。比例尺, $150\mu\text{m}$ 。

[0040] 图6。葡萄糖氧化酶纳米凝胶(GOx-NG)生成 H_2O_2 以及用过氧化氢酶纳米凝胶(CAT-NG)消除的示意图。

[0041] 图7A-7B。在PBS中氧化之前和之后的TSPBA的 $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz,在 D_2O 中)。图7A)氧化前;图7B)在 $10\text{mM H}_2\text{O}_2$ 中氧化1h 后。

[0042] 图8。经纯化的胰岛素-NBC的MALDI-TOF质谱图。

[0043] 图9A-9B。使用具有25mm铝交叉影线平行板的TA Instruments AR-2000受控应力流变仪,在 25°C 下测得的胶凝之前和之后的PVA的动态流变学行为。所有实验均采用线性粘弹性方案,板之间的间隙为 $500\mu\text{m}$ 。图9A)PVA和PVA-TSPBA样本的弹性(G')和粘性(G'')模量的频谱,前者表现出溶液状特征,后者则表现出凝胶状行为。图9B)PVA-TSPBA样本的作为时间函数的 G' 和 G'' 的演变,表现出溶胶-凝胶转变。实验采用恒定频率 5rad/s 。在 10s^{-1} 的剪切速率下预剪切样本10s秒后开始测量。

[0044] 图10。天然胰岛素溶液以及从经过 400mg/dL 葡萄糖温育的凝胶中释放出的胰岛素的CD光谱。

[0045] 图11A-11B。CAT-NG的表征。图11A)利用动态激光散射测得的 CAT和CAT-NG的尺寸分布。图11B)CAT-NG的代表性TEM图像。

[0046] 图12A-12B。 GOx-NG 的表征。图12A)利用动态激光散射测得的 GOx 和 GOx-NG 的尺寸分布。图12B) GOx-NG 的代表性TEM图像。

[0047] 图13A-13B。负载有CAT的空心MN的代表性图像:侧视图(图 13A)和俯视图(图

13B)。在从微针的底部到顶部的方向上,b的间隔为 80 μ m。

[0048] 图14.胰岛素从负载于PVA甲基丙烯酸酯凝胶中的胰岛素-NBC中的 H_2O_2 依赖性释放。利用天然胰岛素作为对照。

[0049] 图15.在MN治疗后0min、5min和120min的皮肤穿刺痕迹。比例尺,0.5cm。

[0050] 图16.用MN-凝胶 (G+I) 治疗的1型糖尿病小鼠的血糖水平。

[0051] 图17.用包含或不含G0x的胰岛素-NBC负载的PVA-TSPBA凝胶治疗后,链脲佐菌素 (STZ) 诱导的糖尿病小鼠中的血糖水平。

[0052] 图18.在PBS中 (pH为7.4) 的葡萄糖溶液 (100mg/dL或400 mg/dL) 中存在不同比率的CAT下,通过G0x催化的葡萄糖氧化所得到的 H_2O_2 产生速率。将G0x的浓度设置为0.2mg/mL。

[0053] 图19.用MN-CAT、MN-凝胶 (I) 或MN-凝胶 (G+I) 治疗的小鼠中的血浆人胰岛素水平。

[0054] 图20.皮下注射凝胶- (G+I) 引起皮肤起泡。左图:凝胶接种部位;右图:接种后1小时观察到皮肤肿胀。比例尺,1cm。

具体实施方式

[0055] 本文公开了一种创新的核-壳微针 (MN) 阵列贴片,该MN阵列贴片由可降解的交联聚乙烯醇 (PVA) 凝胶组成,该交联PVA凝胶用于快速响应血糖水平 (BGL) 升高而自动调节治疗剂 (例如胰岛素) 的递送。如图1A所示,该装置的核组分包含葡萄糖氧化酶 (G0x),其生成 H_2O_2 以刺激治疗剂诸如胰岛素的释放,而壳组分中嵌有过氧化氢酶 (CAT),该过氧化氢酶作为一种活性过滤器,可清除过量的 H_2O_2 ,从而最大程度减小 H_2O_2 引起炎症的风险 (图6)。

[0056] 为实现 H_2O_2 响应性胰岛素释放,胰岛素用4-硝基苄基4- (4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧硼杂环戊烷-2-基) 苄基碳酸酯进行化学修饰 (称为胰岛素-NBC,图1B),随后锚定到水溶性PVA基体 [17]。值得注意的是,为了进一步促进游离胰岛素在聚合物基体中的运输并且提高响应速度,PVA也由 H_2O_2 不稳定的接头发生凝胶化:N1- (4-二羟硼基苄基)-N3- (4-二羟硼基苄基)-N1,N1,N3,N3-四甲基丙烷-1,3-二胺鎗 (TSPBA) (图1C)。当暴露于 G0x在高葡萄糖浓度下生成局部升高的 H_2O_2 水平时,胰岛素-NBC和 TSPBA均被氧化和水解 [18,19],导致游离胰岛素的快速释放 (图1A)。

[0057] 为限制G0x本身的潜在有害的释放 [16],将G0x封装在丙烯酸化纳米凝胶 (G0x-NG) 中以实现大尺寸 [8],并且在自由基聚合过程中与PVA甲基丙烯酸发生共价固定化,其形成部分不可裂解的PVA网络,以进一步防止G0x-NG泄漏,同时保持胰岛素易于释放。壳组分设计用于模拟过氧化物酶体中的互补功能 [20],其中形成过氧化氢酶纳米凝胶 (CAT-NG) [8],并且嵌入在覆盖PVA-TSPBA微针核的表面的交联PVA层的内部。

[0058] 总而言之,核和壳组分的设计能够:1) 用G0x充分催化以在核中执行葡萄糖-响应作用;以及2) 高效消除 H_2O_2 以减轻影响周围组织的炎症并减轻全身毒性。另外,用于将胰岛素负载到MN支架上的直接缀合方法提高了胰岛素负载过程的效率和容量。在无须经皮给药时,该生物反应性MN 贴片在毛细血管网中暴露于高间质液葡萄糖浓度时发生部分溶解 [9],从而释放出胰岛素,以通过局部毛细血管和淋巴网快速摄入,随后调控BGL [9]。

[0059] 描述了本发明的多个实施例。然而,应该理解,在不脱离本发明的精神和范围的情况下,可以进行各种修改。因此,其他实施例在以下权利要求的范围内。

[0060] 除非另有定义,否则本文使用的所有技术术语和科技术语都与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同。提供以下定义是为了充分理解本说明书中使用的术语。

[0061] 术语

[0062] 除非另有定义,否则本文使用的所有技术术语和科技术语都与本公开所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同。如本文所用的术语“包含”及其变体与术语“包括”、“含有”及其变体同义使用,并且为开放的非限制性术语。尽管本文已经使用术语“包含”、“包括”和“含有”来描述各种实施例,但是可使用术语“基本上由…组成”和“由…组成”来代替“包含”、“包括”和“含有”以提供更具体的实施例,并且也得到公开。

[0063] 本发明公开了用于制备本发明所公开的组合物、装置和贴剂的组分,以及在本文所公开的方法中使用的组合物、装置和贴剂本身。本文公开了这些及其他材料,并且应当理解,当本发明所公开这些材料的组合、子集、相互作用、基团等时,虽然可能未明确公开这些化合物的各种不同的单独和集体组合和排列的具体参考,但是其中每个在本文中均得到特别考虑和描述。例如,如果公开并且讨论了特定的组合物或装置并且讨论了可以进行的许多修改,除非指明是相反情况,否则具体考虑到每种组合和排列以及可能的修改。因此,如果公开了一类组分A、B和C以及一类组分 D、E和F以及组合的示例,或者例如公开了包含A-D的组合,那么即使未单独引用其中每一项,也认为公开了单独和集体设想的含义组合A-E、A-F、B-D、B-E、B-F、C-D、C-E和C-F。同样,还公开了这些组分的任何子集或组合。因此,例如,将认为公开了A-E、B-F和C-E的子组。该概念适用于本专利申请的所有方面,包括但不限于制备和使用本发明所公开的组合物、装置和贴片的方法中的步骤。因此,如果存在可以执行的各种附加步骤,则应当理解,这些附加步骤中的每个可用本发明所公开的方法的任何特定实施例或实施例的组合来执行。

[0064] 应当理解,本文所公开的组分、组合物、装置和贴片具有某些功能。本文公开了用于执行本发明所公开的功能的某些结构要求,并且应当理解,存在可执行与本发明所公开的结构相关的相同功能的各种结构,并且这些结构将最终实现相同的结果。

[0065] 除非另外明确指明,否则决不旨在将本文所述的任何方法解释为要求以特定顺序执行其步骤。因此,在方法权利要求实际上并未表述其步骤所遵循的顺序或者在权利要求书或说明书中没有特别指出该步骤将被限制为特定顺序的情况下时,则决非旨在在任何方面推断出某一顺序。这适用于任何可能的非表述的解释基础,包括:关于步骤或操作流程的排列的逻辑问题;源于语法组织或标点符号的普通含义;以及说明书中描述的实施例的数量或类型。

[0066] 如本说明书和权利要求书中所用,单数形式“一个”、“一种”和“所述”包括复数指代物,除非上下文另外明确规定。例如,术语“一个单元”包括多个单元,其中包括它们的混合物。

[0067] 如本文所用,术语“可”、“任选地”和“可任选地”可互换使用,并且意指包括发生疾病的情况以及不发生疾病的情况。因此,例如,制剂“可包含赋形剂”的陈述意在包括其中制剂包含赋形剂的情况以及制剂不包含赋形剂的情况。

[0068] 如本领域的普通技术人员所理解的,术语“约”和“大约”被定义为“接近”。在一个非限制性实施例中,术语被定义为在10%以内。在另一个非限制性实施例中,术语被定义为

在5%以内。在另一个非限制性实施例中,术语被定义为在1%以内。

[0069] 蛋白质的“活性”,包括与“生物活性”有关的那些,其中包括例如转录、翻译、细胞内易位、分泌、激酶磷酸化、蛋白酶切割和/或其他蛋白质的同嗜性和异嗜性结合。

[0070] 术语“给药”是指对受试者给药,包括口服、局部、静脉内、皮下、经皮、透皮、肌肉内、关节内、肠胃外、小动脉内、皮内、脑室内、颅内、腹膜内、病灶内、鼻内、直肠、阴道给药,通过吸入或通过植入型储存器。可使用透皮微针-阵列贴片进行给药。术语“肠胃外”包括皮下、静脉内、肌肉内、关节内、滑膜内、胸骨内、鞘内、肝内、病灶内和颅内注射或输注技术。

[0071] “生物相容的”通常是指材料及其任何代谢物或降解产物通常对接受者无毒并且不对受试者造成任何显著的副作用。

[0072] 如本文所用,术语“包含”旨在表示组合物和方法包括所述的元素,但是不排除其他元素。当用于定义组合物和方法时,“基本上由...组成”应指排除对组合具有任何重要意义的其他元素。因此,基本上由本文所定义的元素组成的组合物不排除来自分离和纯化方法的痕量污染物和药学上可接受的载体,诸如磷酸盐缓冲盐水、防腐剂等等。“由...组成”应指排除多于其他成分的痕量元素和用于施用本发明的组合物的实质性方法步骤。由这些过渡术语中的每个所定义的实施例都在本发明的范围内。

[0073] “对照”是在实验中用于比较目的的替代受试者或样本。对照可为“阳性对照”或“阴性对照”。

[0074] 如本文所用,“缀合”是指不可逆的结合相互作用。

[0075] 如本文所用,“接头”是指连接相邻分子的分子。一般来讲,除连接相邻分子或保持它们之间的一些最小距离或其他空间关系之外,接头无特定的生物活性。在一些情况下,可选择接头以影响或稳定相邻分子的某些特性,诸如分子的折叠、净电荷或疏水性。在一些实施例中,接头可在暴露于过氧化物诸如过氧化氢时脱离(例如,化学裂解)。在其他实施例中,接头在暴露于过氧化物诸如过氧化氢时可保持完整。

[0076] 术语“肽”、“蛋白质”和“多肽”可互换使用,是指包含两个或更多个氨基酸的天然或合成分子,所述氨基酸通过一个氨基酸的羧基与另一个氨基酸的 α -氨基连接。

[0077] 术语“载体”或“药学上可接受的载体”意指可用于制备通常安全且无毒的药物或治疗组合物的载体或赋形剂,并且包括兽医和/或人类药用或治疗用的药物可接受的载体。如本文所用,术语“载体”或“药学上可接受的载体”包括磷酸盐缓冲盐水溶液、水、乳液(诸如油/水或水/油乳液)和/或各种类型的润湿剂。如本文所用,术语“载体”包括任何赋形剂、稀释剂、填充剂、盐、缓冲液、稳定剂、增溶剂、脂质或本领域中熟知的用于药物制剂的其他材料,并且如下文所详述。

[0078] 如本文所用,术语“聚合物”是指相对高分子量的天然或合成有机化合物,其结构可由重复的小单元、单体(例如,聚乙烯、橡胶、纤维素)表示。合成聚合物通常由单体的加成或缩聚形成。如本文所用,术语“共聚物”是指由两种或更多种不同的重复单元(单体残基)形成的聚合物。以举例的方式并且非限制性地,共聚物可为交替共聚物、无规共聚物、嵌段共聚物或接枝共聚物。还可设想,在某些方面,嵌段共聚物的各种嵌段链段本身可包含共聚物。

[0079] 范围可在本文中被表示为从“约”一个特定值和/或至“约”另一个特定值。当表达此类范围时,另一个实施例包括从一个特定值和/或至另一个特定值。相似地,在利用前词

“约”将值表示为近似值时,应当理解,该特定值形成另一个实施例。还应当理解,每个范围的端点在相对于另一个端点和独立于另一个端点方面都是显著的。还应当理解,本文公开了许多值,并且每个值在本文中除值本身之外还被公开为“约”该特定值。例如,如果公开了值“10”,则还公开了“约10”。

[0080] 如本文所用,术语“治疗”、“治疗过程”、“治疗方法”及其语法变体包括部分或完全延迟、缓解、减轻或减小疾病或病症的一种或多种伴随症状的强度和/或缓解、减轻或阻止一种或多种疾病或病症的原因。根据本发明所述的治疗可防范性、预防性、姑息性或补救性地应用。预防性治疗是在发病前(例如,在出现明显的癌症迹象之前)、在早期发作期间(例如,在癌症的初始体征和症状之后)或在癌症的确定发展之后向受试者施用。预防性给药可在感染症状出现之前数天至数年发生。

[0081] 术语治疗剂的“有效量”意指无毒但足够量的有益剂以提供所需的效果。“有效的”有益剂的量将在不同受试者之间变化,取决于受试者的年龄和一般情况、特定的一种或多种有益剂等等。因此,并不总是能够指定确切的“有效量”。然而,任何受试者病例中的适当的“有效”量可由本领域的普通技术人员使用常规实验方法确定。此外,如本文所用并且除非另外特别说明,否则有益剂的“有效量”也可以指涵盖治疗有效量和预防有效量的量。

[0082] 实现治疗效果所需的药物的“有效量”可根据诸如受试者的年龄、性别和体重等因素而变化。可调整剂量方案以提供最佳治疗反应。例如,可每天施用若干分开的剂量,或者可按照治疗情况的紧急程度按比例减少剂量。

[0083] 如本文所用,治疗剂的“治疗有效量”是指有效实现所需的治疗效果的量,并且治疗剂的“预防有效量”是指有效预防不必要的生理条件的量。给定治疗剂的治疗有效量和预防有效量通常将根据诸如所治疗的疾病或病症的类型和严重程度以及受试者的年龄、性别和体重等因素而变化。

[0084] 术语“治疗有效量”还可指有效促进期望的治疗效果的治疗剂的量或治疗剂的递送速率(例如,随时间推移的量)。精确期望的治疗效果将根据待治疗的病症、受试者的耐受性、待施用的药物和/或药物制剂(例如,治疗剂(药物)的效力、制剂中的药物浓度等等),以及本领域中的普通技术人员所理解的各种其他因素而变化。

[0085] 如本文所用,术语“药学上可接受的”组分可指并非生物学上或以其他方式不可取的组分,即该组分可掺入本发明的药物制剂中并施用于如本文所述的受试者,而不引起任何显著的不良生物学效应或以有害的方式与包含该组分的制剂的任何其他组分相互作用。当术语“药学上可接受的”用于指称赋形剂时,通常暗示该组分符合所需的毒理学和生产测试标准,或者它包括在美国食品药品监督管理局所制定的非活性成分指南中。

[0086] 另外,如本文所用,术语“药理活性”(或仅“活性”),正如在“药理活性”衍生物或类似物中所用的那样,可指具有与母体化合物相同类型的药理活性并且程度大致相等的衍生物或类似物(例如,盐、酯、酰胺、缀合物、代谢物、异构体、片段等)。

[0087] 如本文所用,术语“受试者”可指生物诸如哺乳动物,包括但不限于人、牲畜、狗、猫及其他哺乳动物。治疗剂的给药可采用有效治疗的受试者的剂量和时间进行。在一些实施例中,受试者是人。

[0088] 微针装置(贴片)

[0089] 本文公开了一种用于递送治疗剂(例如,胰岛素)的创新的自动调节微针(MN)贴

片。

[0090] 在一些方面,本文公开了一种微针贴片,该微针贴片包括:

[0091] 多个微针,所述多个微针各自具有基部端和尖端;以及

[0092] 基底,微针的基部端连接至基底;

[0093] 其中微针包括:

[0094] 壳,该壳包含:

[0095] 第一聚乙烯醇(PVA)聚合物,该第一PVA聚合物与第一过氧化物敏感型接头交联;以及

[0096] 过氧化物清除酶,该过氧化物清除酶包封在第一纳米凝胶内,其中第一纳米凝胶嵌入在第一PVA聚合物中;

[0097] 以及

[0098] 核,该核包含:

[0099] 第二聚乙烯醇(PVA)聚合物,该第二PVA聚合物与第二过氧化物敏感型接头交联;

[0100] 葡萄糖响应剂,该葡萄糖响应剂包封在第二纳米凝胶内,其中第二纳米凝胶嵌入在第二PVA聚合物中;以及

[0101] 治疗剂,其中该治疗剂通过第三过氧化物敏感型接头共价连接到第二PVA聚合物。

[0102] 在一些实施例中,第一过氧化物敏感型接头包括硼酸酯。在一些实施例中,在暴露于过氧化物时,第一过氧化物敏感型接头从第一PVA聚合物分离。在一些实施例中,第一过氧化物敏感型接头为N1-(4-二羟硼基苄基)-N3-(4-二羟硼基苯基)-N1,N1,N3,N3-四甲基丙烷-1,3-二胺鎓(TSPBA)。

[0103] 在一些实施例中,第二过氧化物敏感型接头包括硼酸酯。在一些实施例中,在暴露于过氧化物时,第二过氧化物敏感型接头从第二PVA聚合物分离。在一些实施例中,第二过氧化物敏感型接头为N1-(4-二羟硼基苄基)-N3-(4-二羟硼基苯基)-N1,N1,N3,N3-四甲基丙烷-1,3-二胺鎓(TSPBA)。

[0104] 在一些实施例中,第三过氧化物敏感型接头包括硼酸酯。在一些实施例中,在暴露于过氧化物时,第三过氧化物敏感型接头从第二PVA聚合物分离。在一些实施例中,第三过氧化物敏感型接头为4-硝基苯基-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧硼杂环戊烷-2-基)苄基碳酸酯(NBC)。

[0105] 在一些实施例中,过氧化物敏感型接头包括4-硝基苯基-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧硼杂环戊烷-2-基)苄基碳酸酯(NBC)或N1-(4-二羟硼基苄基)-N3-(4-二羟硼基苯基)-N1,N1,N3,N3-四甲基丙烷-1,3-二胺鎓(TSPBA)。

[0106] 在一些实施例中,葡萄糖响应剂包括葡萄糖氧化酶。在一些实施例中,过氧化物清除酶为过氧化氢酶。在一些实施例中,葡萄糖响应剂包封在纳米凝胶内。在一些实施例中,葡萄糖响应剂共价连接到纳米凝胶。在一些实施例中,过氧化物清除酶包封在纳米凝胶内。在一些实施例中,过氧化物清除酶共价连接到纳米凝胶。在一些实施例中,微针涂覆有过氧化物清除酶。

[0107] 过氧化氢(H_2O_2)清除酶的示例包括但不限于过氧化氢酶、酚酸、3,4,5-三羟基苯甲酸(没食子酸)和1,2,3-三羟基苯(连苯三酚)。 H_2O_2 清除酶可通过本领域中已知的任何方法掺入微针中,包括将 H_2O_2 清除酶掺入纳米凝胶(例如,过氧化物酶体过氧化氢酶纳米凝胶)

中。

[0108] 在一些实施例中,第一纳米凝胶包含甲基丙烯酸酯纳米凝胶。在一些实施例中,第一纳米凝胶包含聚乙烯醇(PVA)甲基丙烯酸酯。

[0109] 在一些实施例中,第二纳米凝胶包含甲基丙烯酸酯纳米凝胶。在一些实施例中,第二纳米凝胶包含聚乙烯醇(PVA)甲基丙烯酸酯。

[0110] 在一些实施例中,本文所公开的纳米凝胶嵌入在交联的PVA聚合物中。在一些实施例中,本文所公开的纳米凝胶共价连接到交联的PVA聚合物。在一些实施例中,第一纳米凝胶嵌入在第一PVA聚合物中。在一些实施例中,第一纳米凝胶共价连接到第一PVA聚合物。在一些实施例中,第二纳米凝胶嵌入在第二PVA聚合物中。在一些实施例中,第二纳米凝胶共价连接到第二PVA聚合物。

[0111] 在一些实施例中,共价连接通过不可裂解的共价键实现。

[0112] 在一些实施例中,治疗剂为胰岛素。在一些实施例中,微针进一步包含透明质酸(HA)。

[0113] 在一些方面,本文公开了一种用于跨受试者的生物屏障运输材料的装置,该装置包括:

[0114] 多个微针,所述多个微针各自具有基部端和尖端;

[0115] 基底,微针的基部端连接或整合至基底;以及

[0116] 其中微针包括:

[0117] 壳,该壳包含:

[0118] 第一聚乙烯醇(PVA)聚合物,该第一PVA聚合物与第一过氧化物敏感型接头交联;以及

[0119] 过氧化物清除酶,该过氧化物清除酶包封在第一纳米凝胶内,其中第一纳米凝胶嵌入在第一PVA聚合物中;

[0120] 以及

[0121] 核,该核包含:

[0122] 第二聚乙烯醇(PVA)聚合物,该第二PVA聚合物与第二过氧化物敏感型接头交联;

[0123] 葡萄糖响应剂,该葡萄糖响应剂包封在第二纳米凝胶内,其中第二纳米凝胶嵌入在第二PVA聚合物中;以及

[0124] 治疗剂,其中该治疗剂通过第三过氧化物敏感型接头共价连接到第二PVA聚合物。

[0125] 在其他方面,本文还公开了用于跨生物屏障递送治疗剂(例如,胰岛素)的成套部件,该成套部件包括:

[0126] 多个微针,所述多个微针各自具有基部端和尖端;

[0127] 基底,微针的基部端连接或整合至基底;以及

[0128] 其中微针包括:

[0129] 壳,该壳包含:

[0130] 第一聚乙烯醇(PVA)聚合物,该第一PVA聚合物与第一过氧化物敏感型接头交联;以及

[0131] 过氧化物清除酶,该过氧化物清除酶包封在第一纳米凝胶内,其中第一纳米凝胶嵌入在第一PVA聚合物中;

[0132] 以及

[0133] 核,该核包含:

[0134] 第二聚乙烯醇 (PVA) 聚合物,该第二PVA聚合物与第二过氧化物敏感型接头交联;

[0135] 葡萄糖响应剂,该葡萄糖响应剂包封在第二纳米凝胶内,其中第二纳米凝胶嵌入在第二PVA聚合物中;以及

[0136] 治疗剂,其中该治疗剂通过第三过氧化物敏感型接头共价连接到第二PVA聚合物。

[0137] 除治疗剂诸如胰岛素之外,待递送给受试者的药剂也可为预防剂或诊断剂。例如,该药剂可选自由以下项构成的组:肽、蛋白质、碳水化合物、核酸分子、脂质、有机分子、生物活性无机分子以及它们的组合。例如,可配制使用本文所述的微针装置和方法进行递送的各种药物。如本文所用,术语“药物”或“药物制剂”在广义上指任何预防剂、治疗剂或诊断剂,或者可适于引入生物组织的其他物质,包括药物赋形剂以及用于纹身、化妆品的物质等等。药物可为具有生物活性的物质。药物制剂可包括各种形式,诸如液体溶液、凝胶、固体颗粒(例如,微粒、纳米颗粒)或它们的组合。药物可包含小分子、大分子(即高分子)或它们的组合。在代表性而非限制性的实施例,药物可选自免疫佐剂(例如,单磷酸脂质 A (MPLA)、铝盐(明矾)、CpG寡脱氧核苷酸(ODN))、氨基酸、疫苗、抗病毒剂、基因递送载体、白细胞介素抑制剂、免疫调节剂、神经营养因子、神经保护剂、抗肿瘤剂、化学治疗剂、多糖、抗凝血剂、抗生素、镇痛剂、麻醉剂、抗组胺剂、抗炎剂和病毒。药物可选自合适的蛋白质、肽和它们的片段,其可为天然存在的、合成的或重组制备的。

[0138] 组合物和/或药物制剂可进一步包括一种或多种药学上可接受的赋形剂,包括本领域中已知的pH调节剂、粘度调节剂、稀释剂等。

[0139] 在一个实施例中,微针包含透明质酸。除透明质酸之外,微针还可包含多种材料,其中包括金属、陶瓷、半导体、有机物、聚合物、复合物或它们的组合。典型的结构材料包括医药级不锈钢、金、钛、镍、铁、锡、铬、铜、钯、铂、这些金属或其他金属的合金、硅、二氧化硅和聚合物。代表性的生物可降解聚合物包括羟基酸(诸如乳酸和乙醇酸)的聚合物、聚交酯、聚乙交酯、聚交酯-共-乙交酯以及含有PEG的共聚物、聚酸酐、聚(邻)酯、聚氨酯、聚丁酸、聚戊酸和聚(丙交酯-共-己内酯)。

[0140] 微针应具有机械强度,以便在插入生物屏障时、在适当位置保留数天时以及在移除时保持完整。在一些实施例中,微针必须在足够长的时间内保持完整,至少使微针能够达到其预期目的(例如,递送治疗剂)。

[0141] 微针可具有直线轴或锥形轴。在一个实施例中,微针的直径在微针的基部端处最大,并且在基部的远侧端部缩小至一点。也可将微针制成具有包括直体(非锥形)部分和锥形部分的轴。针也可以根本不具有锥形端部,即它们可以只是具有钝头或平坦尖端的圆柱体。

[0142] 微针可取向成垂直于基底或与基底成一角度。在一个实施例中,微针取向成垂直于基底,使得可提供每单位面积基底更大的微针密度。微针的阵列可包括微针取向、高度或其他参数的混合。

[0143] 微针可形成为在垂直方向上具有圆形横截面的轴,或者该横截面可为非圆形的。例如,微针的横截面可为多边形(例如,星形、正方形、三角形)、椭圆形或另外的形状。横截面尺寸可介于约1 μ m和1000 μ m之间,使得基部可为约100-500 μ m,并且尖端可介于1 μ m和20 μ m

之间。在一个实施例中，微针在基部可为约300 μm ，并且在尖端为约5 μm 。

[0144] 微针的长度通常介于约10 μm 和1mm之间，优选地介于400 μm 和1mm之间。在一个实施例中，微针的长度(或高度)为约600 μm 。针对特定应用选择长度，同时考虑插入的部分和未插入的部分。微针的阵列可包括具有例如各种长度、外径、内径、横截面形状和微针之间间距的微针的混合。在一个实施例中，微针被布置成15 $\times$ 15阵列，尖端与尖端之间的间距为600 μm 。在一个实施例中，微针被布置成20 $\times$ 20阵列，尖端与尖端之间的间距为600 μm 。

[0145] 微针的壳可视为微针的外侧部分，该外侧部分与受试者接触。微针的核可视为位于朝向每个微针的中心的微针部分，并且由微针的壳部分隔开，而不接触受试者的皮肤。

[0146] 在一个实施例中，葡萄糖响应剂为葡萄糖氧化酶(GOx)。葡萄糖氧化酶将血糖转化为葡糖酸。这导致过氧化物(过氧化氢)的产生，并使pH值降低。

[0147] 治疗方法

[0148] 在一些方面，本文公开了一种向受试者递送治疗剂的方法，该方法包括：

[0149] 将微针贴片施用于对其有需要的受试者，其中微针贴片包括：

[0150] 多个微针，所述多个微针各自具有基部端和尖端；以及

[0151] 基底，微针的基部端连接至基底；

[0152] 其中微针包括：

[0153] 壳，该壳包含：

[0154] 第一聚乙烯醇(PVA)聚合物，该第一PVA聚合物与第一过氧化物敏感型接头交联；以及

[0155] 过氧化物清除酶，该过氧化物清除酶包封在第一纳米凝胶内，其中第一纳米凝胶嵌入在第一PVA聚合物中；

[0156] 以及

[0157] 核，该核包含：

[0158] 第二聚乙烯醇(PVA)聚合物，该第二PVA聚合物与第二过氧化物敏感型接头交联；

[0159] 葡萄糖响应剂，该葡萄糖响应剂包封在第二纳米凝胶内，其中第二纳米凝胶嵌入在第二PVA聚合物中；以及

[0160] 治疗剂，其中治疗剂通过第三过氧化物敏感型接头共价连接到第二PVA聚合物；

[0161] 以及

[0162] 在存在高血糖水平的葡萄糖时，从微针贴片释放出治疗剂。

[0163] 在一些方面，本文还公开了一种为受试者所需要的用于治疗其疾病的方法，该方法包括：

[0164] 向受试者提供微针贴片，其中微针贴片包括：

[0165] 多个微针，所述多个微针各自具有基部端和尖端；以及

[0166] 基底，微针的基部端连接至基底；

[0167] 其中微针包括：

[0168] 壳，该壳包含：

[0169] 第一聚乙烯醇(PVA)聚合物，该第一PVA聚合物与第一过氧化物敏感型接头交联；以及

[0170] 过氧化物清除酶，该过氧化物清除酶包封在第一纳米凝胶内，其中第一纳米凝胶

嵌入在第一PVA聚合物中；

[0171] 以及

[0172] 核,该核包含:

[0173] 第二聚乙烯醇(PVA)聚合物,该第二PVA聚合物与第二过氧化物敏感型接头交联;

[0174] 葡萄糖响应剂,该葡萄糖响应剂包封在第二纳米凝胶内,其中第二纳米凝胶嵌入在第二PVA聚合物中;以及

[0175] 治疗剂,其中该治疗剂通过第三过氧化物敏感型接头共价连接到第二PVA聚合物。

[0176] 在一些实施例中,该方法还包括在高血糖水平的葡萄糖存在下,从微针贴片释放出治疗剂。

[0177] 如本文所用,“高血糖水平的葡萄糖”是指导致临床高血糖症或存在导致临床高血糖症的风险的葡萄糖浓度。高血糖症、正常血糖和低血糖症的严格截断值可以在受试者之间变化,在具有不同形式或严重程度的糖尿病的受试者之间尤其如此。在一些实施例中,高血糖水平的葡萄糖包含大于100mg/dL的葡萄糖。在一些实施例中,高血糖水平的葡萄糖包含125 mg/dL或更大、150mg/dL或更大、175mg/dL或更大、或200mg/dL或更大的葡萄糖。相反,“血糖正常水平的葡萄糖”是指典型/正常的葡萄糖浓度,并且通常已知与血糖失衡的临床状况(或严重临床状况)不相关。在一些实施例中,血糖正常水平的葡萄糖包含约70mg/dL葡萄糖至少于200 mg/dL的葡萄糖。在一些实施例中,血糖正常水平的葡萄糖包含约70 mg/dL葡萄糖至约175mg/dL葡萄糖、约70mg/dL葡萄糖至约150mg/dL 葡萄糖、约70mg/dL葡萄糖至约125mg/dL葡萄糖、或约70mg/dL葡萄糖至约100mg/dL葡萄糖。“低血糖水平的葡萄糖”是指导致临床低血糖症或存在导致临床低血糖症的风险的葡萄糖浓度。在一些实施例中,低血糖水平的葡萄糖包含70mg/dL或更少的葡萄糖。在一些实施例中,低血糖水平的葡萄糖包含60mg/dL或更少、50mg/dL或更少、40mg/dL或更少、或30mg/dL或更少的葡萄糖。在一些实施例中,高血糖水平的葡萄糖包含200mg/dL或更多的葡萄糖,血糖正常水平的葡萄糖包含约70mg/dL 葡萄糖至少于200mg/dL的葡萄糖,并且低血糖水平的葡萄糖包含少于约 70mg/dL的葡萄糖。

[0178] 在一些实施例中,受试者患有高血糖症。在一些实施例中,受试者患有糖尿病或一些其他葡萄糖调节疾病。在一些实施例中,受试者患有糖尿病。在一些实施例中,受试者患有I型糖尿病。在一些实施例中,受试者患有II型糖尿病。

[0179] 在一些实施例中,在暴露于高血糖水平的葡萄糖时,葡萄糖响应剂产生过氧化物。在一些实施例中,该方法还包括在暴露于过氧化物时,使第一过氧化物敏感型接头从第一PVA聚合物分离。

[0180] 在一些实施例中,该方法还包括在暴露于过氧化物时,使第三过氧化物敏感型接头从第二PVA聚合物分离。在一些实施例中,第三过氧化物敏感型接头从第二PVA聚合物的分离使治疗剂从微针贴片释放。

[0181] 在一些实施例中,该方法还包括降低血糖水平。在一些实施例中,使血糖水平降低至不低于血糖正常水平。在一些实施例中,治疗剂包括胰岛素。在一些实施例中,该方法还包括在导致低血糖症之前终止释放治疗剂。

[0182] 在一些实施例中,疾病为糖尿病。在一些实施例中,疾病为I型糖尿病。在一些实施例中,疾病为II型糖尿病。

[0183] 在一些实施例中,第一过氧化物敏感型接头包括硼酸酯。在一些实施例中,在暴露于过氧化物时,第一过氧化物敏感型接头从第一PVA聚合物分离。在一些实施例中,第一过氧化物敏感型接头为N1-(4-二羟硼基苄基)-N3-(4-二羟硼基苄基)-N1,N1,N3,N3-四甲基丙烷-1,3-二胺鎓(TSPBA)。

[0184] 在一些实施例中,第二过氧化物敏感型接头包括硼酸酯。在一些实施例中,在暴露于过氧化物时,第二过氧化物敏感型接头从第二PVA聚合物分离。在一些实施例中,第二过氧化物敏感型接头为N1-(4-二羟硼基苄基)-N3-(4-二羟硼基苄基)-N1,N1,N3,N3-四甲基丙烷-1,3-二胺鎓(TSPBA)。

[0185] 在一些实施例中,第三过氧化物敏感型接头包括硼酸酯。在一些实施例中,在暴露于过氧化物时,第三过氧化物敏感型接头从第二PVA聚合物分离。在一些实施例中,第三过氧化物敏感型接头为4-硝基苄基-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧硼杂环戊烷-2-基)苄基碳酸酯(NBC)。

[0186] 在一些实施例中,葡萄糖响应剂包括葡萄糖氧化酶。在一些实施例中,过氧化物清除酶为过氧化氢酶。在一些实施例中,治疗剂为胰岛素。在一些实施例中,微针进一步包含透明质酸(HA)。

[0187] 在其他方面,本文还公开了一种为受试者所需要的用于治疗其疾病的方法,该方法包括:

[0188] 向受试者提供微针贴片,其中微针贴片包括:

[0189] 多个微针,所述多个微针各自具有基部端和尖端;以及

[0190] 基底,微针的基部端连接至基底;

[0191] 其中微针包括:

[0192] 壳,该壳包含:

[0193] 第一聚乙烯醇(PVA)聚合物,该第一PVA聚合物与第一过氧化物敏感型接头交联;以及

[0194] 过氧化物清除酶,该过氧化物清除酶包封在第一纳米凝胶内,其中第一纳米凝胶嵌入在第一PVA聚合物中;

[0195] 以及

[0196] 核,该核包含:

[0197] 第二聚乙烯醇(PVA)聚合物,该第二PVA聚合物与第二过氧化物敏感型接头交联;

[0198] 葡萄糖响应剂,该葡萄糖响应剂包封在第二纳米凝胶内,其中第二纳米凝胶嵌入在第二PVA聚合物中;以及

[0199] 治疗剂,其中治疗剂通过第三过氧化物敏感型接头共价连接到第二PVA聚合物;以及

[0200] 将微针插入生物屏障中,其中在高血糖水平的葡萄糖存在下,从微针贴片释放出治疗剂。

[0201] 另一方面,本文公开了一种为受试者所需要的用于治疗其高血糖症的方法,包括向受试者施用前述方面或实施例的微针贴片。在一些实施例中,高血糖症为糖尿病的症状之一。

[0202] 由于创新设计对高血糖状态的快速响应,核-壳贴片能够将血糖水平控制在正常

范围内。而且,与天然胰岛素相比,本发明所公开的微针贴片可避免产生低血糖症的风险。目前基于葡萄糖氧化酶(GOx)的葡萄糖响应性胰岛素递送系统主要利用由pH敏感型材料组成的基体,其响应速度极慢(因为在生理缓冲体系中难以有效降低pH水平),因此对临床转化仍然具有挑战性。在本公开中,基于基体的解离和胰岛素的分离,酶促方法产生的 H_2O_2 直接用作自动调节胰岛素释放的触发剂。在体外和体内研究中,这导致对葡萄糖水平变化的显著更快速且更敏锐的响应性。

[0203] 本文所公开的微针贴片也具有优异的生物相容性。在一些实施例中,微针贴片的基部和微针的基体分别由透明质酸(HA)和聚乙烯醇(PVA)制成,其具有高生物相容性,并且可进一步定制。由于具有优异的生物相容性和生物可降解性,HA和PVA已广泛应用于许多FDA批准的治疗制剂或医疗装置中。此外,先前应用的提高响应速度的缺氧反应系统导致长期使用 H_2O_2 引起严重炎症。在本公开中,通过表面涂覆的膜将葡萄糖氧化产生的过量 H_2O_2 限制在微针的空间内,这可以保护正常组织免受 H_2O_2 的损害。

[0204] 本文所公开的微针贴片也可方便地施用。交联凝胶与微针阵列贴片的整合提供了一种无痛的一次性给药模态。另外,胰岛素剂量和响应速度可根据个性化要求轻松调节。与具有植入式针/电极或其他针注射系统的胰岛素泵相比,该平台也方便得多。

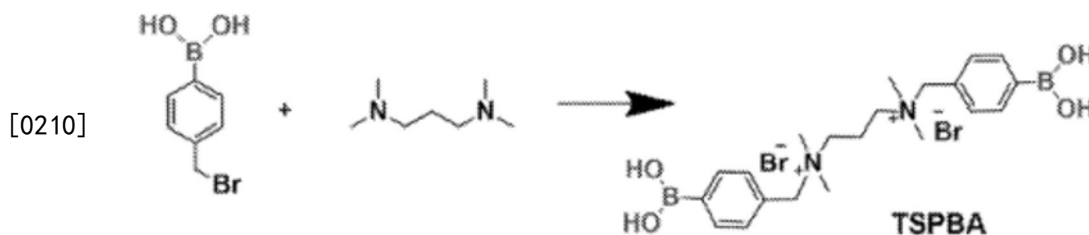
[0205] 实例

[0206] 以下实例用于示出根据本发明所公开的主题的组合物、装置、方法和结果。这些实例并非旨在包括本文所公开的主题的所有方面,而是示出代表性的方法和结果。这些实例并非旨在排除对本领域的技术人员显而易见的本发明的等同物和变型形式。

[0207] 实例1:用于自动调节胰岛素递送的核-壳微针凝胶。

[0208] 结果

[0209] TSPBA通过N1,N1,N3,N3-四甲基丙烷-1,3-二胺与过量4-(溴甲基)苯基硼酸的季铵化反应合成(方案1)。TSPBA上的季铵基团大大提高了其水溶性(约100mg/mL),这有利于PVA水溶液在不存在有机溶剂的情况下形成凝胶。在10mM H_2O_2 存在下氧化时,70%的TSPBA释放出对醌甲基化物(对羟基亚甲基苯酚),并且在2小时内转化为叔胺,如 1H -NMR分析结果所示(图7)。^[18]在由DMSO和10mM $NaHCO_3$ 水溶液组成的混合溶剂中存在略微过量的NBC的情况下,制备胰岛素-NBC。^[19]使用制备型高效液相色谱(HPLC)对产物进行纯化,^[13]并且利用MALDI-TOF质谱分析通过分子量确认该产物是由一个NBC修饰一个胰岛素的缀合物(图8)。重要的是,胰岛素-NBC在pH 7.4下具有比天然胰岛素高得多的水溶性(>100mg/mL),这对于制备具有高胰岛素负载容量的MN凝胶至关重要。胰岛素-NBC的苯基硼酸酯可在水溶液中水解;在二醇存在下促进该反应。^[19]然后,在PVA中,胰岛素-NBC可通过苯基硼酸与顺式-1,3-二醇之间的动力学酯键缀合至PVA链。^[21]向该反应溶液中加入TSPBA,导致在60s内,弹性(G')模量迅速上升并且在PVA链之间形成网络(图9)。^[22]TSPBA对PVA的凝胶化对于保持壳结构的完整性至关重要,该壳结构由水敏性材料组成,并且具体地防止其在制备核时溶解于水溶液中。



[0211] 方案1

[0212] 在pH 7.4的PBS中存在10mM H_2O_2 的情况下,对 H_2O_2 敏感型胰岛素的释放进行评估。通过以稳定的速率添加 H_2O_2 ,从形成的凝胶中释放出胰岛素,并且超过一半的胰岛素在两小时内释放出来(图2A)。尽管苯基硼酸与二醇形成的酯在酸性溶液中不稳定,[23]但是PVA与苯基硼酸形成的凝胶在酸性环境中是稳定的。[21]在pH 3.5时,凝胶表现出高稳定性,并且与pH 7.4相比,胰岛素释放速率相当慢。

[0213] 接下来,在PBS中存在GOx的情况下,在初始pH 7.4下,对3种不同葡萄糖浓度下的胰岛素释放速率进行评估,这3种浓度包括典型的高血糖水平(400mg/dL)、血糖正常水平(100mg/dL)和对照水平(0mg/dL)。使用荧光过氧化氢分析试剂盒测量 H_2O_2 生成速率。[24]在高血糖葡萄糖浓度 400mg/dL下,高效生成 H_2O_2 ,并且在30min内达到高达6mM(图 2B)。与高血糖溶液相比,在100mg/dL葡萄糖的血糖正常的溶液中, H_2O_2 生成速率则低得多。胰岛素释放对应于 H_2O_2 释放,使得与100 mg/dL的葡萄糖浓度相比,在400mg/dL的葡萄糖浓度下,胰岛素释放速率显著提高,而当凝胶在对照溶液中温育时,观察到可忽略不计的胰岛素释放(图 2C),与凝胶的形态变化一致(图2D)。

[0214] 此外,当测试溶液的葡萄糖浓度从正常血糖条件逐渐增加到高血糖条件时,胰岛素从PVA-TSPBA凝胶中的释放速率稳定提高,其中当葡萄糖浓度从100mg/dL增加至400mg/dL时,在2小时内实现最大15倍的胰岛素释放速率差异(图2E)。胰岛素在正常血糖条件下的有限释放是体内应用的重要安全特征。另外,通过在正常血糖和高血糖条件之间交替改变葡萄糖浓度,监测胰岛素的脉冲式动力学释放特性,并且当凝胶交替暴露于正常和高血糖水平时,实现了胰岛素的脉冲式释放特性(图2F)。总之,这些发现表明交联凝胶的解离仅发生在高血糖条件下,并且PVA-TSPBA 凝胶以取决于葡萄糖浓度的行为释放胰岛素。最后,天然胰岛素与从凝胶中释放出的胰岛素(1mg/mL)的远紫外圆二色(CD)光谱相似,表明释放的胰岛素保留 α -螺旋二级结构和生物活性(图10)。

[0215] 为制造核-壳MN凝胶,使用微成型方法将PVA-TSPBA凝胶整合到 MN阵列贴片中。[9]开发出一种“溶液-凝胶”方法,以方便地将交联凝胶负载到MN中并且形成核-壳结构。简而言之,制备、混合具有低粘度的 PVA、TSPBA和CAT-NG的稀释水溶液(图11),并且将其沉积到硅树脂模具中。将混合溶液在真空下静置30分钟,然后在500rpm下离心1小时,在模具上形成“壳”。将另一轮PVA、TSPBA和GOx-NG的稀释水溶液(图12)负载到模具中,并且重复该程序数次,直至得到负载有预定量的胰岛素的凝胶。在此过程中,将丙烯酸酯化的PVA和自由基引发剂加入到天然PVA水溶液中,以形成部分不可降解的网络。最后,浇铸透明质酸(HA)水溶液,并且在真空下干燥,以提供用于机械支撑的基部。[9] 将所得装置以 20×20 MN阵列布置在 10×10 mm²贴片上。针具有锥形形状,其基部直径为300 μ m,尖端直径为5 μ m,高度为600 μ m(图 3A)。用SEM和荧光显微镜确认MN的结构(图3B、图3C)。MN的机械强度确定为2N/针(图3D),其足以插入皮肤而不破裂。[25]为验证在 MN阵列上涂覆CAT层的可行性,制

备了由罗丹明B标记的、负载有 CAT-NG的PVA-TSPBA凝胶壳构建的中空MN阵列贴片。这些中空的MN在底视图、侧视图或俯视图中表现出完整的壳结构(图3E 和图 13)。此外,发现在制备核部分时,这种负载有CAT-NG的壳的完整性不受影响(图3F)。总而言之,这些结果证明了制备核-壳MN阵列的可行性,该核-壳MN阵列负载有胰岛素和GOx-NG,以及嵌有CAT-NG的壳。表明由甲基丙烯酸酯化的PVA形成的凝胶在GOx-NG上方选择性地释放胰岛素(图3G 和图14)。GOx-NG的释放可能由于其尺寸(约12 nm)远大于胰岛素和共价键而被阻止,从而降低了GOx的潜在局部和全身毒性。[16]

[0216] 在由链脲佐菌素(STZ)诱导的I型糖尿病小鼠模型中评估核-壳MN阵列贴片的体内性能。将小鼠分成六组:1)使用负载有GOx-NG和胰岛素-NBC的凝胶的带有CAT-NG壳的MN阵列贴片(MN-CAT)进行治疗;2)通过皮下注射人重组胰岛素进行治疗;3)使用负载有GOx-NG和胰岛素-NBC的凝胶的无壳MN阵列贴片(MN-凝胶(G+I))进行治疗;4)使用仅负载空白凝胶的微针阵列贴片(MN-凝胶)进行治疗;5)使用负载有胰岛素-NBC的凝胶的MN阵列贴片(MN-凝胶(I))进行治疗;6)利用负载有GOx和胰岛素以及CAT-NG的凝胶的MN阵列贴片(MN-凝胶(G+C+I))进行治疗。对于所有基于MN的胰岛素治疗,将胰岛素剂量设置为50 mg/kg。台盼蓝染色表明,MN成功渗透离体皮肤(图4A、图4B)。[26]此外,由MN引起的皮肤上的暂时微通道在治疗后两小时内迅速恢复(图 15,支持信息)。

[0217] 在给药后,检测随时间推移小鼠体内的BGL。在给药后30min,观察到经MN-凝胶(G+I)(图16)和MN-CAT(图4C)治疗的小鼠体内的BGL快速降低,然后BGL缓慢降至约100mg/dL,并且在大约200mg/dL下保持近6小时,比皮下注射胰岛素长得多(图4C)。这归因于在GOx存在下通过葡萄糖的氧化在局部快速生成 H_2O_2 ,以及凝胶对 H_2O_2 的高灵敏度。相比之下,对于用MN-凝胶(I)、MN-凝胶(G+C+I)和MN-凝胶治疗的小鼠,未观察到明显的BGL降低。这些结果与在皮下注射包含或不含GOx的PVA-TSPBA凝胶的糖尿病小鼠中观察到的结果一致(图 17)。总之,这些观察确认了 H_2O_2 在释放胰岛素中的重要作用以及PVA-TSPBA中的胰岛素在生理环境中的高稳定性。在体外,CAT可在正常血糖水平(100mg/dL)下有效分解 H_2O_2 (图18)。然而,MN-凝胶(G+C+I)降低BGL的能力受到明显限制(图4C),表明需要在壳层中分离CAT以在局部形成稳健水平的 H_2O_2 。另外,用MN-CAT和MN-凝胶(G+I)治疗的小鼠中的血浆人胰岛素水平显著高于用MN-凝胶(I)治疗的小鼠(图 19)。

[0218] 在MN或胰岛素给药后1小时,进一步进行腹膜内葡萄糖耐量试验(IPGTT)。在IPGTT之后,观察到BGL在所有组中达到峰值(图4D)。然而,仅健康小鼠和用MN-CAT治疗的小鼠能够在短时间内使血糖水平恢复到血糖正常水平,并且用MN-CAT治疗的小鼠对葡萄糖激发表现出显著更高的葡萄糖耐受性(图4E)。为评估与MN-CAT治疗相关的低血糖症的风险,对用MN阵列贴片治疗的健康小鼠的BGL进行观察。用胰岛素治疗的小鼠的BGL显著降低,而用MN-CAT治疗的小鼠的BGL仅略有降低,这与在正常血糖状态下从凝胶中缓慢释放胰岛素一致(图4F)。另外,MN-CAT治疗组表现出比胰岛素显著更低的低血糖症指数(图4G),表明MN-CAT在临床应用中是安全的。此外,执行长达40小时的连续MN给药,对MN的体内葡萄糖控制能力进行评估(图4H)。在此期间,BGL保持在100mg/dL至250mg/dL的窄范围内,并且至关重要,未记录到低血糖症。

[0219] 苯基硼酸与 H_2O_2 之间的反应减轻了生成的 H_2O_2 对周围组织的危害。然而,任何过量的未反应的 H_2O_2 仍然有可能有害。与用MN-凝胶(图 5A)治疗的皮肤相比,在用MN-凝胶(G+

I) 治疗的小鼠中,观察到明显的炎症。对于用直接皮下注射凝胶治疗的皮肤,观察到类似的现象(图 20)。形成鲜明对比的是,在用MN-CAT和MN-凝胶(G+C+I)治疗的小鼠的皮肤上几乎未观察到可见的炎症(图5A)。这些发现在苏木精和伊红(H&E)染色结果中得到确认。与用MN-凝胶治疗的皮肤相比,用MN-凝胶(G+I)治疗的皮肤样本表现出明显的中性粒细胞浸润,表明生成的 H_2O_2 引起病理生理反应和组织损伤。[27]然而,在用MN-凝胶(G+C+I)和MN-CAT治疗的小鼠的皮肤中,观察到中性粒细胞浸润大大减少。用CAT-MN和MN-凝胶(G+C+I)治疗的小鼠的表皮厚度和皮肤厚度与用空白MN治疗的皮肤的表皮厚度和皮肤厚度相当,但显著薄于用MN-凝胶(G+I)治疗的小鼠的表皮厚度和皮肤厚度(图5B)。[28]此外,用原位TUNEL分析染色的皮肤组织清晰地展示了用MN-凝胶(G+I)治疗的皮肤样本中的细胞凋亡,而在用负载或涂覆有CAT的MN治疗的皮肤组织中,则观察到可忽略不计的细胞死亡(图5C)。

[0220] 总而言之,本发明公开了一种用于葡萄糖响应性智能胰岛素递送的核-壳凝胶化MN阵列贴片。MN-凝胶通过“溶液-凝胶”法制得,该方法包括逐层沉积稀溶液。体外实验表明,在高血糖条件下,当GOx生成的 H_2O_2 触发时,这种交联凝胶可迅速释放胰岛素。局部升高的 H_2O_2 水平促进了胰岛素从凝胶基质中的分离以及基质本身的降解,这有助于产生有效的葡萄糖响应。体内实验表明,MN-CAT在调节BGL和维持正常血糖方面非常有效,同时避免了低血糖症的重大风险。重要的是,利用CAT涂层有望显著消除由生成的 H_2O_2 所引起的炎症。这种生物响应性核-壳MN阵列贴片为透皮药物递送提供了广泛的平台,其采用生理因子控制的方式并且具有增强的生物相容性。

[0221] 材料

[0222] 4-(溴甲基)苯基硼酸和4-(羟甲基)苯基硼酸购自Boron Molecular。N,N,N',N'-四甲基-1,3-丙二胺(TMPA)、4-硝基苯甲酰氯、三乙胺、PVA(89-98KDa,99%水解)购自Sigma-Aldrich。4-硝基苯基-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧硼杂环戊烷-2-基)苄基碳酸酯(NBC)根据文献[29]合成得到。TSPBA由TMPA与4-(溴甲基)苯基硼酸合成。PVA甲基丙烯酸酯由PVA与甲基丙烯酸酐的酯化反应合成。胰岛素-NBC由胰岛素与NBC在DMSO和 $NaHCO_3$ 水溶液的混合溶剂中合成。

[0223] 方法

[0224] TSPBA的合成。在DMF(40mL)中,将4-(溴甲基)苯基硼酸(1g, 4.6mmol)和N,N,N',N'-四甲基-1,3-丙二胺(0.2g, 1.5mmol)混合,并且在60℃下搅拌24h。将混合物倒入THF(100mL)中,过滤,并且利用THF(3×20mL)进行洗涤。在真空下干燥过夜后,获得纯TSPBA(0.6g, 收率70%)。 1H -NMR(300MHz, D_2O , δ): 7.677(d, 4H)、7.395(d, 4H)、4.409(s, 4H)、3.232(t, 4H)、2.936(s, 6H)、2.81(m, 2H)。

[0225] 胰岛素-NBC的合成。在搅拌下,将胰岛素(100mg)溶于0.1M $NaHCO_3$ 缓冲溶液(5mL, pH=8.5)中。将含有20mg NBC的5mL DMSO溶液加入上述溶液中。然后,在室温下对反应混合物搅拌过夜,随后调节pH以沉淀胰岛素-NBC。使用高效液相色谱(HPLC, Agilent)制备纯化产物。

[0226] PVA甲基丙烯酸酯的合成。将PVA(1g)和甲基丙烯酸酐(1g)溶于含有三乙胺(1g)的DMSO(20mL)中。在室温下,将溶液搅拌过夜。加入THF后,使PVA甲基丙烯酸酯发生沉淀,并洗涤三次。在真空下干燥上述产物。

[0227] 罗丹明B或FITC标记的胰岛素或CAT。将溶于DMSO (1mL) 中的罗丹明B异硫氰酸酯 (0.5mg) 加入溶于NaHCO₃ (10mM, 1mL) 中的胰岛素 (20mg) 中。将混合物搅拌过夜, 并相对于DI H₂O (3×2L) 进行渗析。将所得的溶液冻干, 获得罗丹明B标记的胰岛素。利用相同的方法获得其他荧光标记的蛋白质。荧光标记的胰岛素或CAT与未标记的胰岛素或CAT以相同的方式使用, 并且在荧光显微镜 (Olympus, IX71) 上拍摄荧光图像。

[0228] 胰岛素从PVA甲基丙烯酸酯凝胶中释放。将胰岛素或胰岛素-NBC溶于含有PVA甲基丙烯酸酯的H₂O中, 并加入光引发剂 (Irgacure 2959; 5%wt/vol)。将该溶液分配至三个管, 并在紫外光 (360nm) 下暴露30s以实现凝胶化。在30s凝胶化后, 另外加入1mL PBS和预定量的H₂O₂。以预定的时间间隔吸取溶液 (每管10μL) 并用考马斯蓝 (200μL) 进行染色。在Infinite 200PRO多模板读数仪 (TecanGroup Ltd.) 上检测595nm处的吸光度。利用标准曲线对胰岛素含量进行校准。

[0229] GOx-NG从PVA甲基丙烯酸酯凝胶中释放。将天然GOx或GOx-NG溶于含有PVA甲基丙烯酸酯的H₂O中, 并加入引发剂 (Irgacure 2959; 5%wt/vol)。将该溶液分配至三个管中的一个, 并在紫外光 (360nm) 下暴露30s。然后, 另外加入1mL PBS。以预定的时间间隔吸取溶液 (每管10μL) 并加入考马斯蓝 (200μL) 中。在Infinite 200PRO多模板读数仪 (TecanGroup Ltd.) 上检测595nm处的吸光度。利用标准曲线对GOx浓度进行校准。

[0230] 在GOx存在下葡萄糖溶液中的H₂O₂生成速率分析。根据制造商的方案 (Sigma-Aldrich), 使用荧光过氧化氢分析试剂盒测定H₂O₂浓度。将含有GOx (0.2mg/mL) 的葡萄糖溶液 (100mg/dL或400mg/dL) 在37℃下进行温育。吸取样本 (每管10μL), 以定时间隔稀释, 并检测荧光强度。

[0231] 负载有胰岛素-NBC的PVA-TSPBA凝胶的制备。通过将PVA和TSPBA混合在一起制备PVA-TSPBA凝胶。首先混合PVA (10wt%水溶液, 100μL) 和胰岛素-NBC (10wt%水溶液, 30μL), 然后加入TSPBA (10wt%水溶液, 30μL) 以制备坚韧的凝胶。在体外胰岛素释放实验过程中, 将该凝胶切片, 并且在不同条件下进行温育。

[0232] 胰岛素从PVA-TSPBA凝胶中的体外释放。将负载有胰岛素-NBC的PVA-TSPBA凝胶等分至含有1mL 10mM PBS (pH 7.4) 的离心管中。向溶液中加入各种量的葡萄糖 (最终浓度为0、100mg/dL或400mg/dL) 和GOx (0.2mg/mL)。以预定的时间间隔吸取溶液 (每管10μL), 用考马斯蓝 (200μL) 进行染色, 并在Infinite 200PRO多模板读数仪 (Tecan Group Ltd.) 上检测595nm处的吸光度。利用标准曲线对胰岛素浓度进行校准。

[0233] 微针阵列贴片的制造 (以MN-CAT作为示例)。本研究中的所有MN均使用购自Blueacre Technology Ltd的五个均匀的硅树脂模具进行制备。每个MN具有直径为300μm的圆形底部, 其在600μm的高度上逐渐变细至尖端半径约5μm。MN被布置成20×20阵列, 尖端与尖端之间的间距为600μm。首先, 制备PVA (3.5wt%水溶液, 450μL)、TSPBA (3.5wt%水溶液, 150μL) 和CAT-NG (1mg, 溶于400μL H₂O中) 的稀释水溶液, 并将其混合在一起。在沉积到硅树脂模具中后, 将溶液在真空减压条件下保持30分钟, 然后转移至Hettich Universal 32R离心机中, 并在500rpm下离心20分钟, 将凝胶溶液压到MN腔体中, 以在模具上形成膜。然后, 将PVA、甲基丙烯酸酯化的PVA-TSPBA、GOx-NG和光引发剂 (Irgacure 2959; 5%wt/vol) 的稀释水溶液装载到模具中, 并重复该程序数次, 直至负载预定量的胰岛素-NBC凝胶。最后, 将2mL HA (4wt%水溶液) 填充到由银胶带环绕的每个微型模具中, 并且在真空下干燥2天。在

干燥之后,将MN阵列小心地与硅树脂模具分离,并且MN 通过短时间UV照射(波长365nm)实现交联聚合。在FEI Verios 460L场发射扫描电镜上表征MN的形态。

[0234] 机械强度测试。通过在MTS 30G拉伸试验机上将不锈钢板压在微针上来测定具有应力-应变测量值的微针的机械强度。在载荷单元容量为 10.00N的情况下,微针尖端与板之间的初始测量值为2.00mm。将接近微针的板的速度设置为0.1mm/s。将微针的失效力记录为针开始弯曲时的力。

[0235] 体外皮肤渗透试验。为评估MN的体外皮肤渗透能力,将MN插入小鼠皮肤10min。用台盼蓝染色10min,然后利用光学显微镜(Leica EZ4D 立体显微镜)进行成像。

[0236] 通过功效分析计算样本量:G*功效3.1。实验不使用随机化方法。在实验和结果评估过程中,研究人员对分配知情。

[0237] 使用链脲佐菌素诱导的糖尿病小鼠进行体内研究。在链脲佐菌素诱导的成年糖尿病小鼠(雄性C57B6,8周龄;Jackson Laboratory)上,对用于治疗糖尿病的MN-阵列贴片和凝胶的体内功效进行评估。该动物研究方案得到北卡罗来纳州立大学机构动物管理和使用委员会以及北卡罗来纳大学教堂山分校的批准。使用Clarity GL2Plus血糖仪(Clarity Diagnostics)测量小鼠的尾静脉血样(约3μL)中的血浆葡萄糖。在给药之前,对小鼠葡萄糖水平监测两天。选择每组五只小鼠用MN或天然胰岛素进行治疗。监测每只小鼠的葡萄糖水平,直至其达到稳定。对于用负载有胰岛素-NBC 的凝胶、PVA(10wt%水溶液)、胰岛素-NBC(50μg,溶于H₂O中)和 GOx-NG(3μg,溶于5μL H₂O中)、TSPBA(10wt%水溶液)治疗的小鼠,连续皮下注射以原位形成凝胶。

[0238] 统计分析。利用非配对student's t检验确定治疗组和对照组之间血糖水平的差异。如果双尾P值小于0.05,则认为结果具有统计学意义。在所有分析中,统计方法保持一致。

[0239] 参考文献

[0240] [1] a) R. Mo, T. Jiang, J. Di, W. Tai, Z. Gu, Chem Soc Rev 2014, 43, 3595; b) O. Veiseh, B. C. Tang, K. A. Whitehead, D. G. Anderson, R. Langer, Nat Rev Drug Discov 2015, 14, 45.

[0241] [2] Y. Ohkubo, H. Kishikawa, E. Araki, T. Miyata, S. Isami, S. Motoyoshi, Y. Kojima, N. Furuyoshi, M. Shichiri, Diabetes Res Clin Pract 1995, 28, 103.

[0242] [3] D. R. Owens, B. Zinman, G. B. Bolli, Lancet 2001, 358, 739.

[0243] [4] E. Cengiz, J. L. Sherr, S. A. Weinzierl, W. V. Tamborlane, Expert Rev Med Devices 2011, 8, 449.

[0244] [5] B. W. Bequette, Diabetes Technol Ther 2005, 7, 28.

[0245] [6] a) K. M. Bratlie, R. L. York, M. A. Invernale, R. Langer, D. G. Anderson, Adv Healthc Mater 2012, 1, 267; b) C. R. Gordijo, K. Koulajian, A. J. Shuhendler, L. D. Bonifacio, H. Y. Huang, S. Chiang, G. A. Ozin, A. Giacca, X. Y. Wu, Adv Funct Mater 2011, 21, 73; c) C. M. Hassan, F. J. Doyle, N. A. Peppas, Macromolecules 1997, 30, 6166.

[0246] [7] Z. Gu, A. A. Aimetti, Q. Wang, T. T. Dang, Y. Zhang, O. Veiseh, H. Cheng, R. S. Langer, D. G. Anderson, ACS Nano 2013, 7, 4194.

[0247] [8] Z. Gu, T. T. Dang, M. Ma, B. C. Tang, H. Cheng, S. Jiang, Y. Dong, Y. Zhang,

D.G.Anderson,ACS Nano 2013,7,6758.

[0248] [9]J.Yu,Y.Zhang,Y.Ye,R.DiSanto,W.Sun,D.Ranson,F.S.Ligler, J.B.Buse, Z.Gu,Proc Natl Acad Sci U S A 2015,112,8260.

[0249] [10]W.Tai,R.Mo,J.Di,V.Subramanian,X.Gu,J.B.Buse,Z.Gu, Biomacromolecules 2014,15,3495.

[0250] [11]a)K.Podual,F.J.Doyle Iii,N.A.Peppas,J Control Release 2000, 67,9; b)K.Zhang,X.Y.Wu,J Control Release 2002,80,169;c)K.Podual,F.J. Doyle, N.A.Peppas,Polymer 2000,41,3975.

[0251] [12]a)Y.Dong,W.Wang,O.Veiseh,E.A.Appel,K.Xue,M.J. Webber,B.C.Tang,X.-W.Yang,G.C.Weir,R.Langer,D.G.Anderson, Langmuir 2016,32,8743;b)A.Matsumoto, T.Kurata,D.Shiino,K.Kataoka, Macromolecules 2004,37,1502;c)D.Shiino,Y.Murata, A.Kubo,Y.J.Kim,K. Kataoka,Y.Koyama,A.Kikuchi,M.Yokoyama,Y.Sakurai,T.Okano,J Control Release 1995, 37, 269;d)A.Matsumoto,R.Yoshida,K.Kataoka, Biomacromolecules 2004,5,1038;e)K.Kataoka,H.Miyazaki,M.Bunya,T. Okano, Y.Sakurai,J Am Chem Soc 1998,120,12694.

[0252] [13]D.H.Chou,M.J.Webber,B.C.Tang,A.B.Lin,L.S.Thapa,D. Deng, J.V.Truong,A.B.Cortinas,R.Langer,D.G.Anderson,Proc Natl Acad Sci U S A 2015, 112,2401.

[0253] [14]a)F.Liu,S.C.Song,D.Mix,M. **Baudyš**,S.W.Kim,Bioconjug Chem 1997,8, 664;b)S.Joel,K.B.Turner,S.Daunert,ACS Chem Biol 2014,9, 1595.

[0254] [15]G.Saravanakumar,J.Kim,W.J.Kim,Adv Sci 2016.

[0255] [16]W.A.Broom,C.E.Coulthard,M.R.Gurd,M.E.Sharpe,Br J Pharmacol Chemother 1946,1,225.

[0256] [17]S.Kitano,Y.Koyama,K.Kataoka,T.Okano,Y.Sakurai,J Control Release 1992,19,161.

[0257] [18]X.Liu,J.Xiang,D.Zhu,L.Jiang,Z.Zhou,J.Tang,X.Liu,Y. Huang,Y.Shen, Adv Mater 2016,28,1743.

[0258] [19]M.Wang,S.Sun,C.I.Neufeld,B.Perez-Ramirez,Q.Xu,Angew Chem Int Ed Engl 2014,53,13444.

[0259] [20]C.De Duve,P.Baudhuin,Physiol Rev 1966,46,323.

[0260] [21]M.Piest,X.L.Zhang,J.Trinidad,J.F.J.Engbersen,Soft Matter 2011,7, 11111.

[0261] [22]N.A.Burns,M.A.Naclerio,S.A.Khan,A.Shojaei,S.R. Raghavan,J Rheol 2014,58,1599.

[0262] [23]G.Springsteen,B.Wang,Tetrahedron 2002,58,5291.

[0263] [24]Y.Yamamoto,H.Koma,T.Yagami,NeuroToxicology 2015,49,86.

[0264] [25]a)O.Olatunji,D.B.Das,M.J.Garland,L.Belaid,R.F.Donnelly, Journal Of Pharmaceutical Sciences 2013,102,1209;b)S.P.Davis,B.J.Landis, Z.H.Adams, M.G.Allen,M.R.Prausnitz,J Biomech 2004,37,1155.

[0265] [26] I.C.Lee, J.-S.He, M.-T.Tsai, K.-C.Lin, J Mater Chem B 2015, 3, 276.

[0266] [27] Y.Liu, J.Du, M.Yan, M.Y.Lau, J.Hu, H.Han, O.O.Yang, S. Liang, W.Wei, H.Wang, J.Li, X.Zhu, L.Shi, W.Chen, C.Ji, Y.Lu, Nat Nano 2013, 8, 187.

[0267] [28] X.J.Jin, E.J.Kim, I.K.Oh, Y.K.Kim, C.H.Park, J.H.Chung, J Korean Med Sci 2010, 25, 930.

[0268] [29] J.L.Major Jourden, S.M.Cohen, Angew Chem Int Ed Engl 2010, 49, 6795.

[0269] 除非另有定义, 否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的技术人员通常理解的相同的含义。本文引用的出版物以及那些出版物所引用的材料以引用方式明确地并入本文。

[0270] 本领域的技术人员将认识到或者能够使用不超过常规的实验确定本文所述的本发明的具体实施例的许多等同物。此类等同物旨在被以下权利要求书所涵盖。

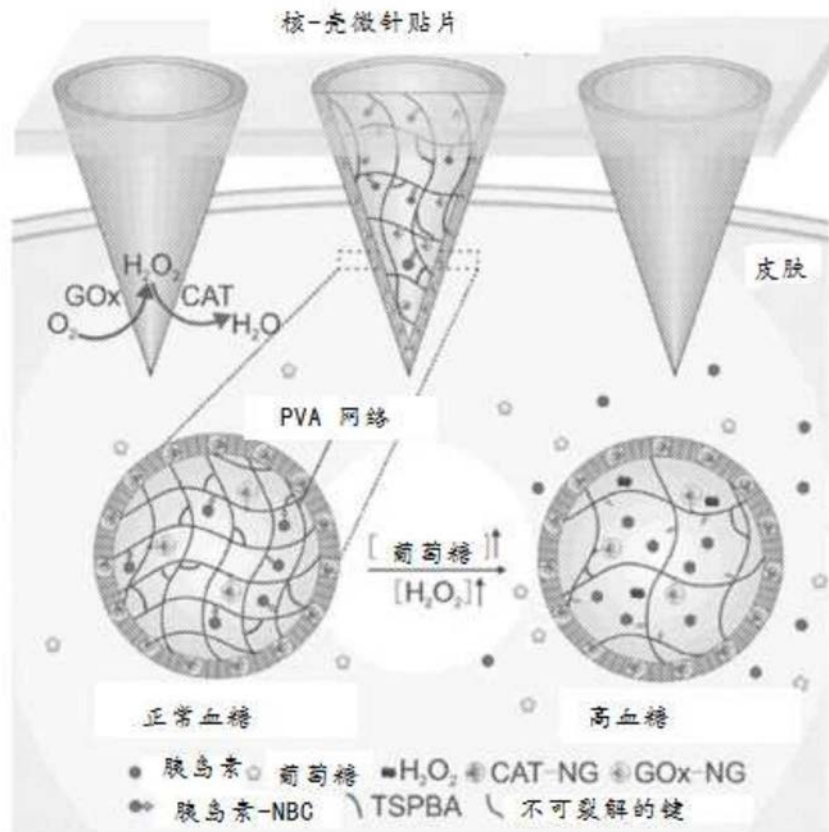


图1A

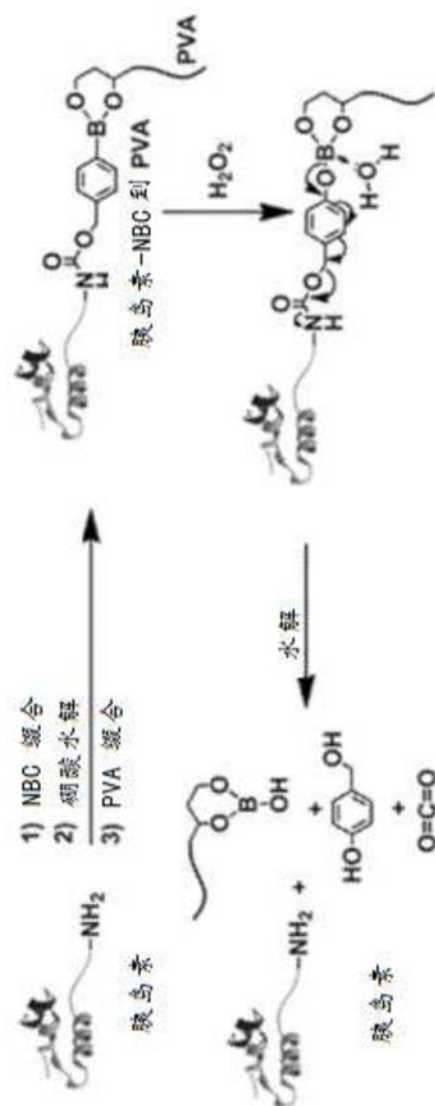


图1B

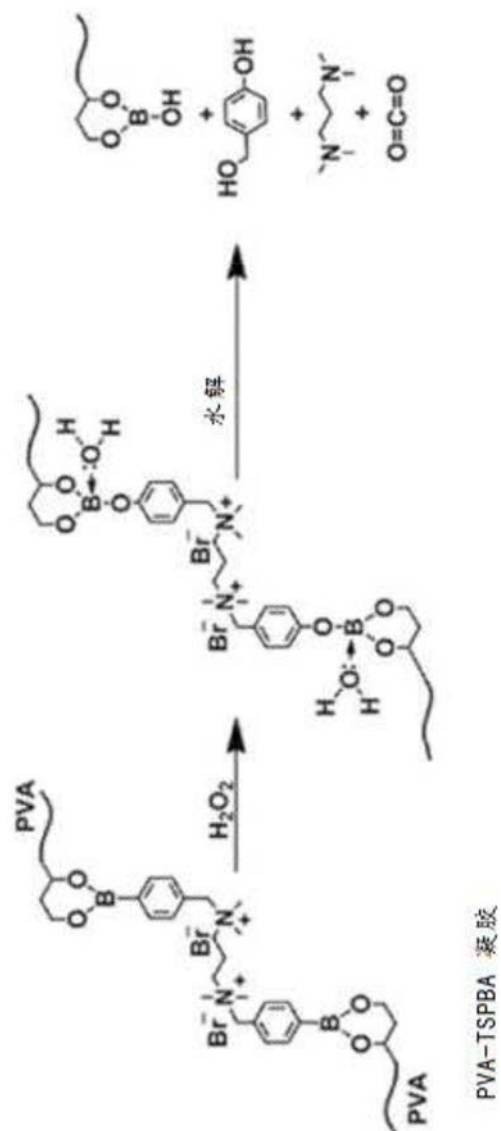


图1C

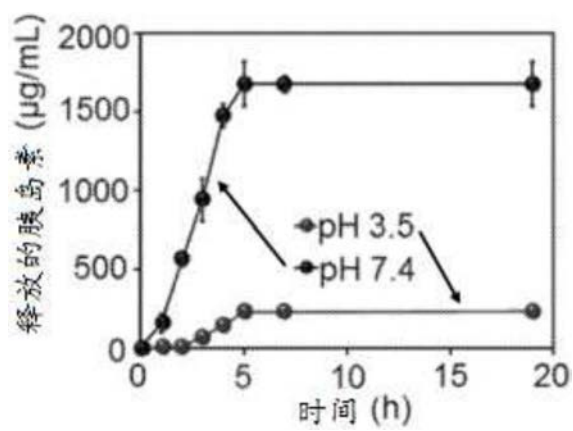


图2A

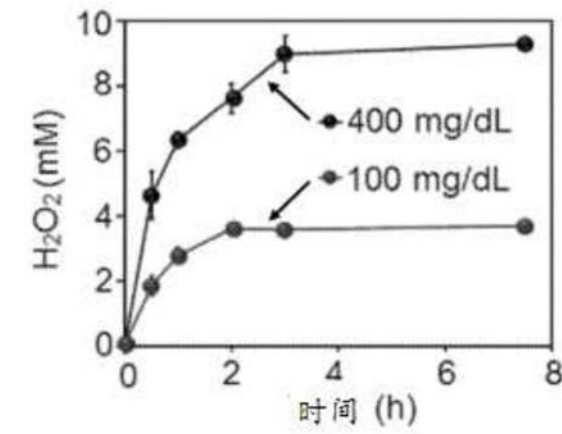


图2B

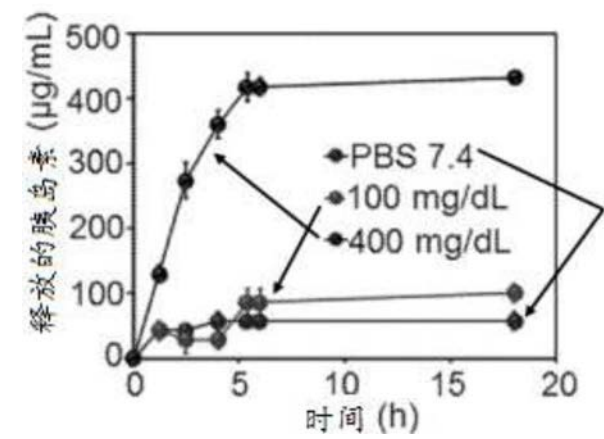


图2C

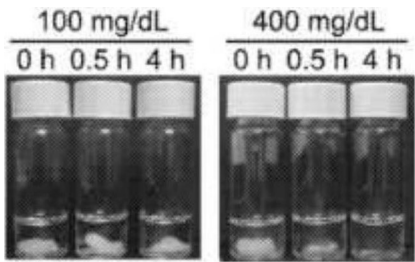


图2D

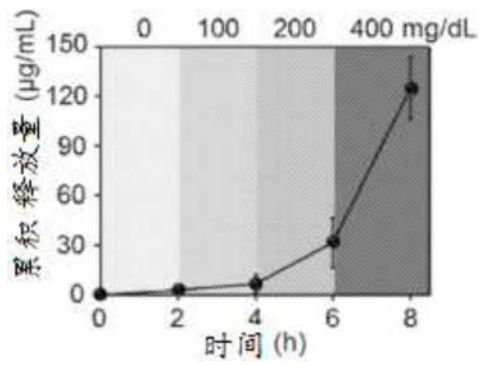


图2E

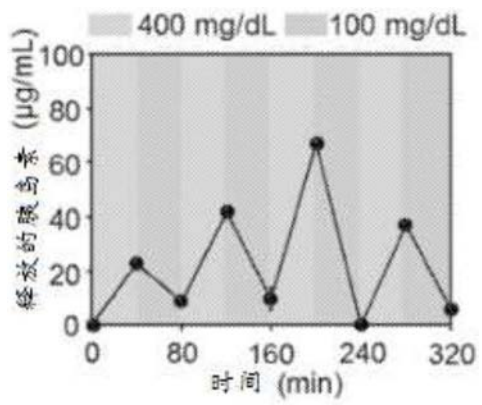


图2F

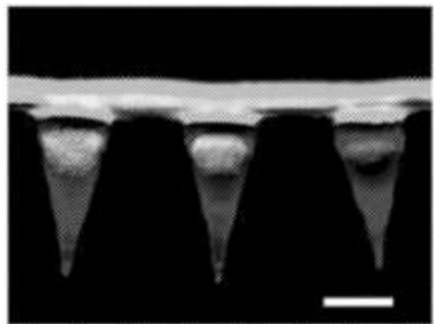


图3A

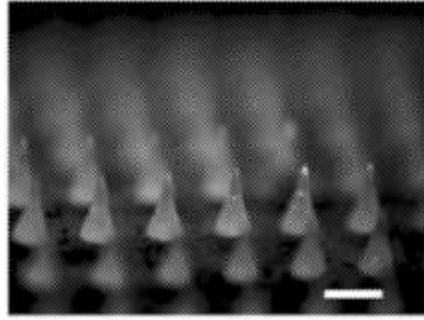


图3B

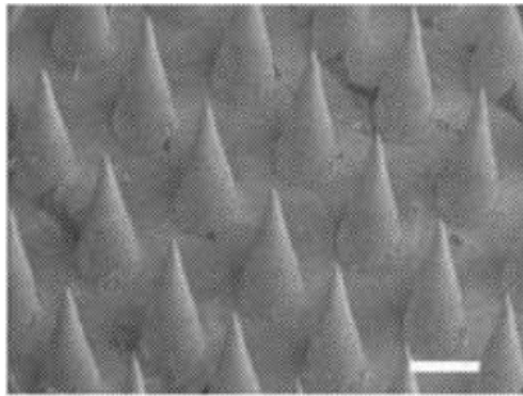


图3C

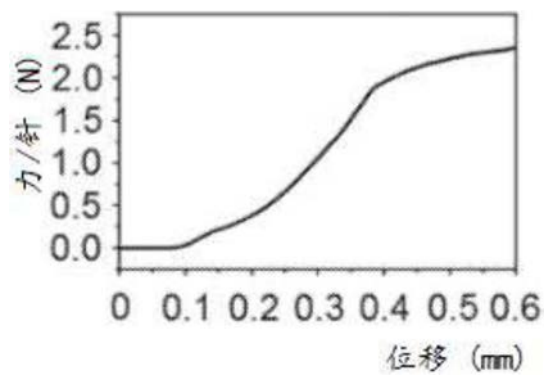


图3D

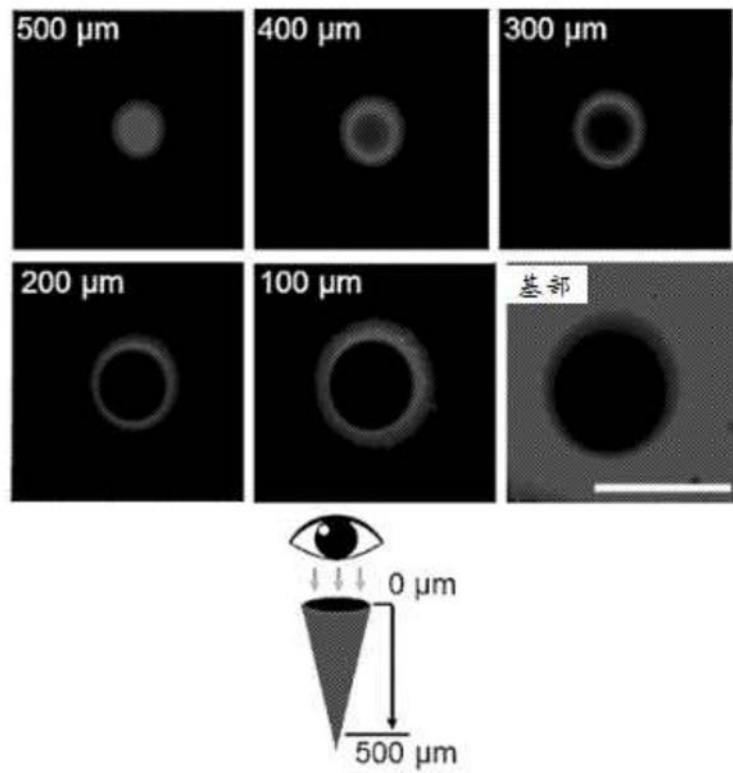


图3E

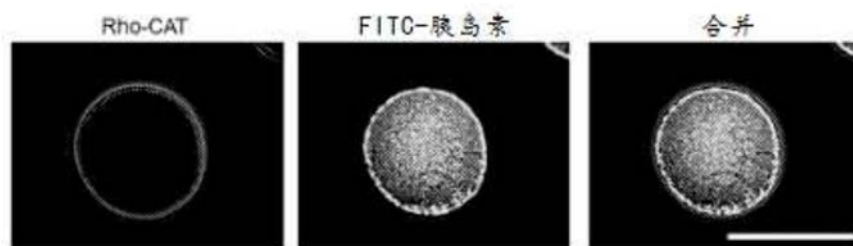


图3F

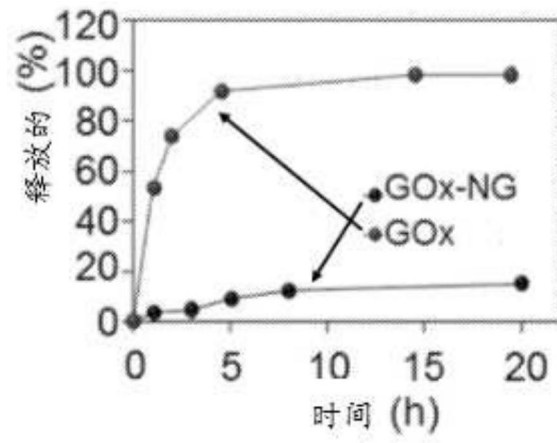


图3G

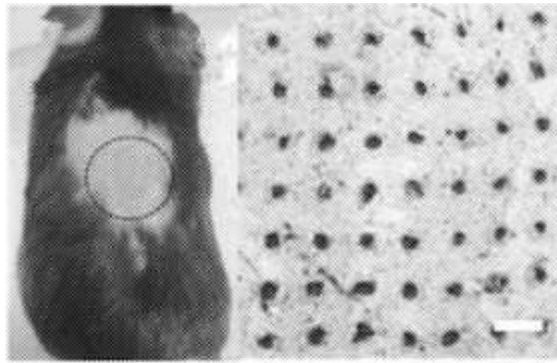


图4A

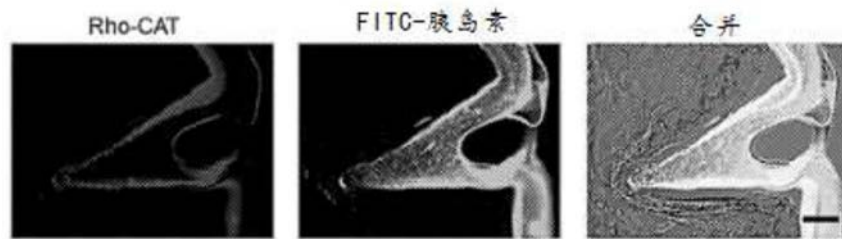


图4B

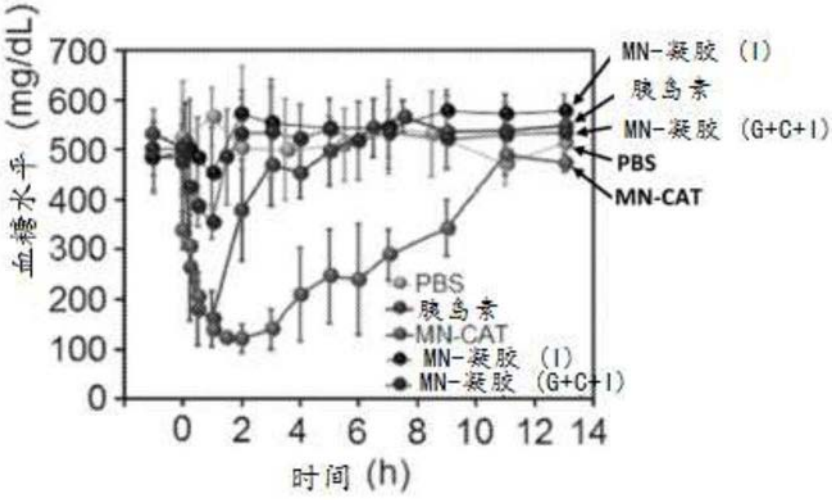


图4C

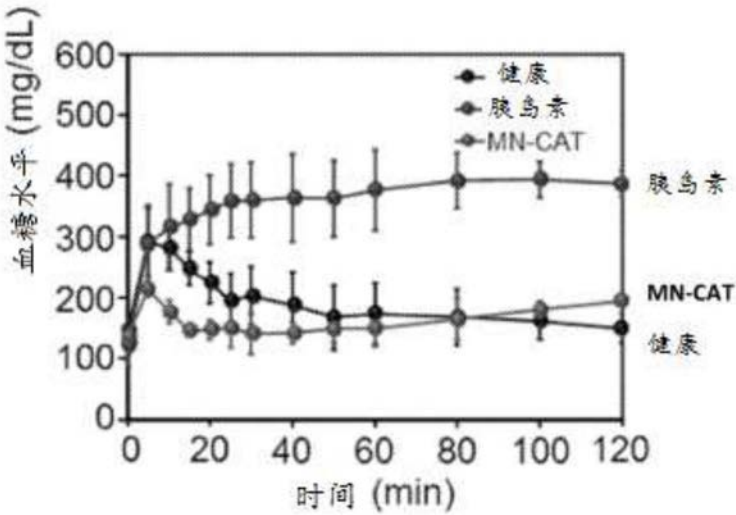


图4D

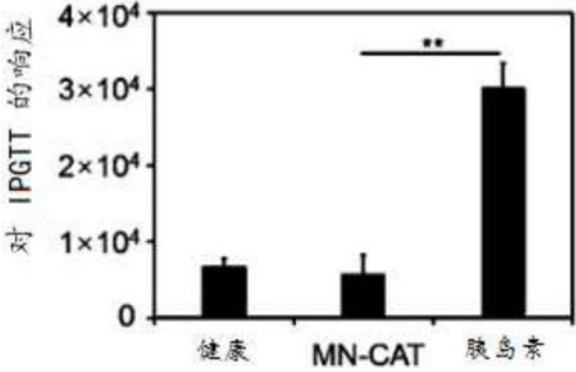


图4E

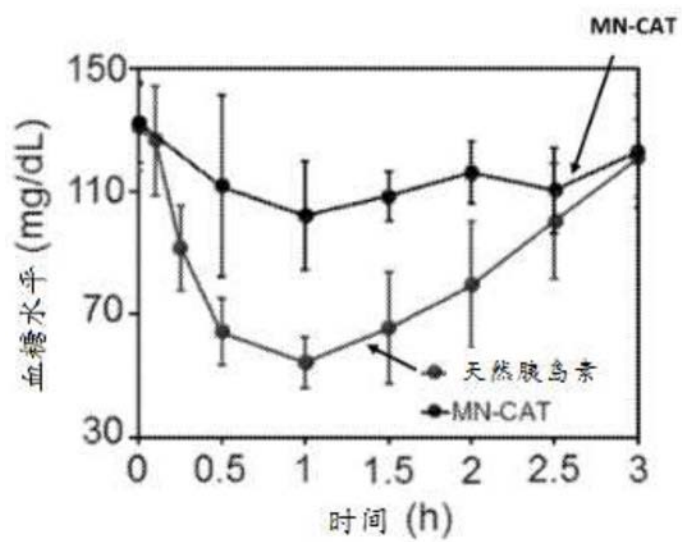


图4F

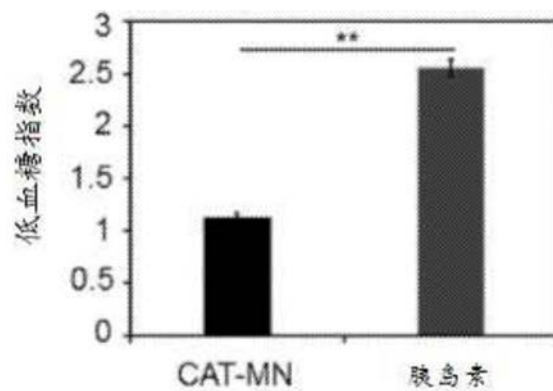


图4G

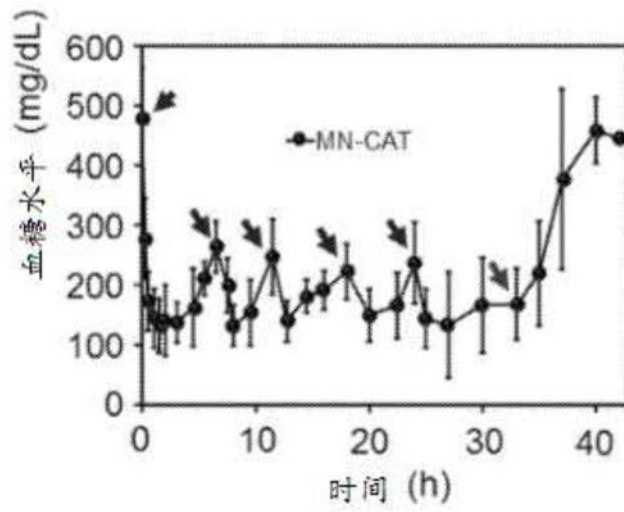


图4H

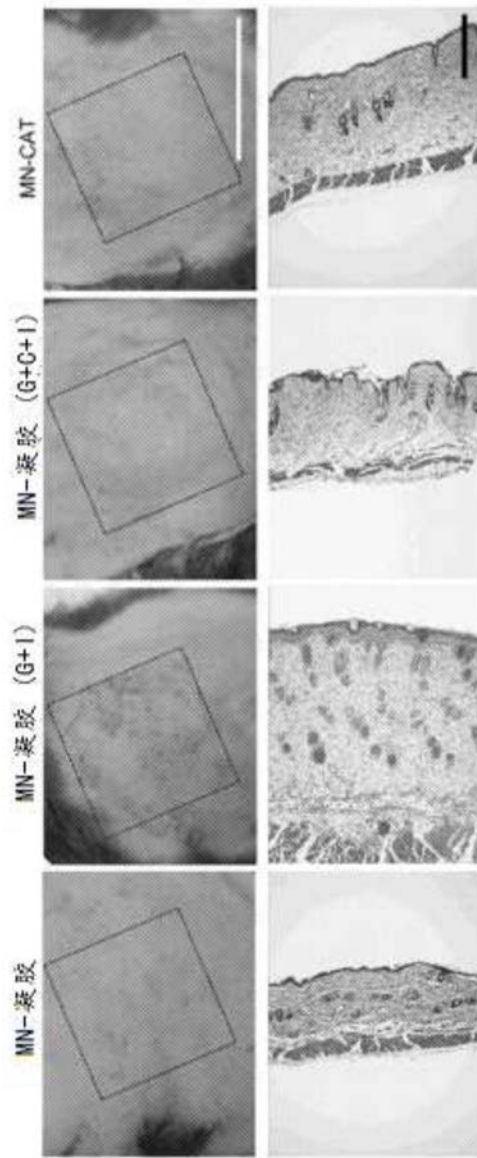


图5A

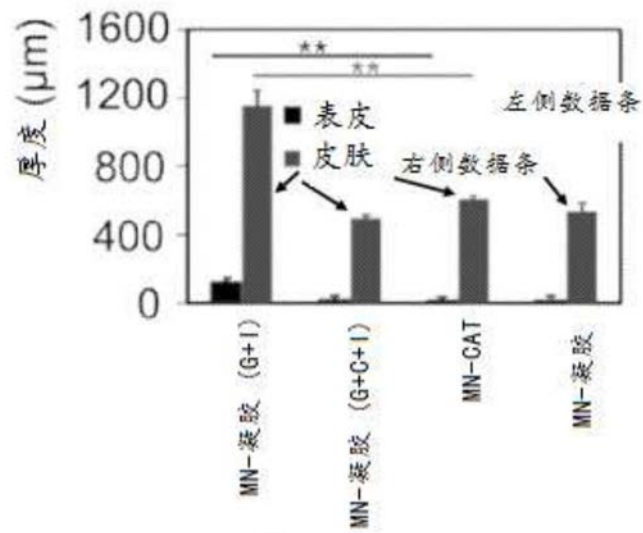


图5B

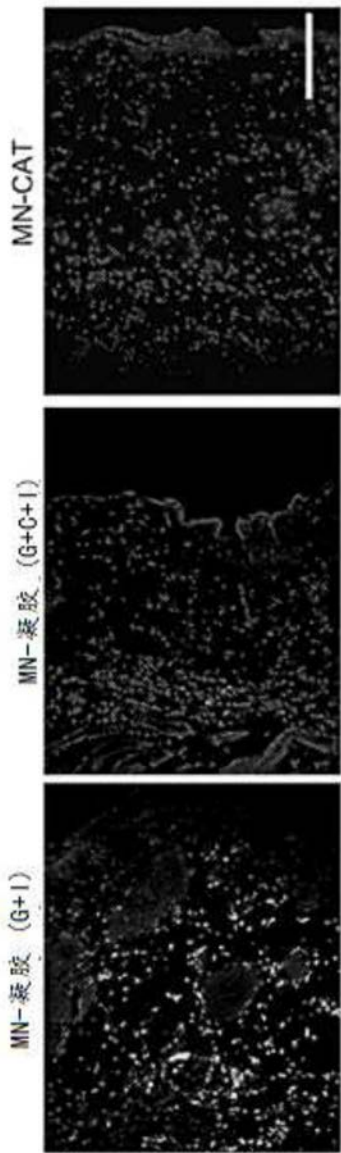


图5C

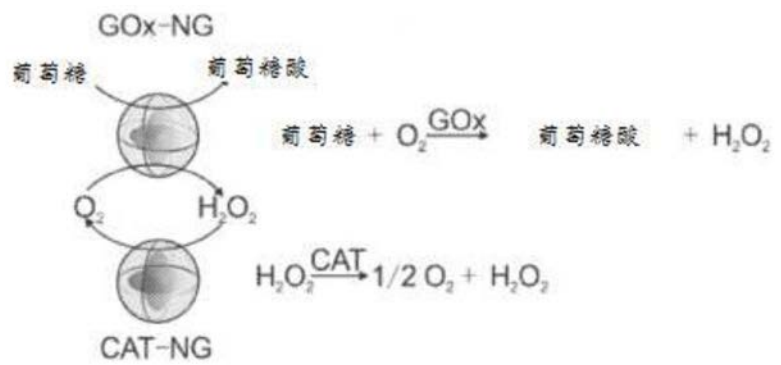


图6

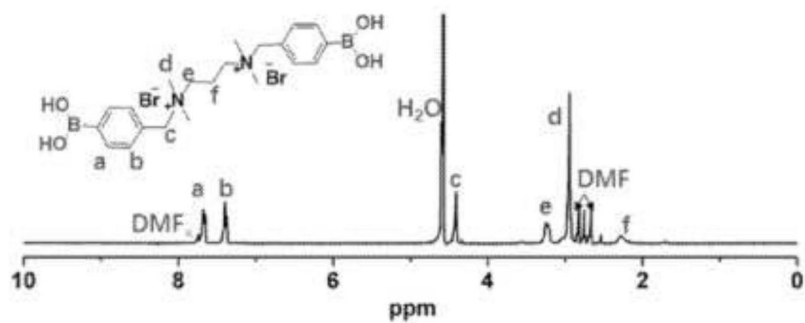


图7A

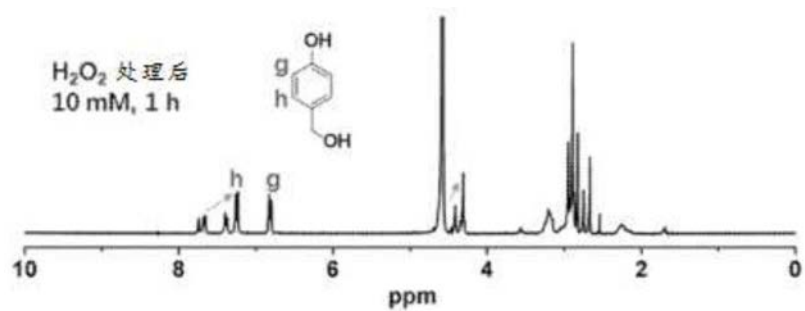


图7B

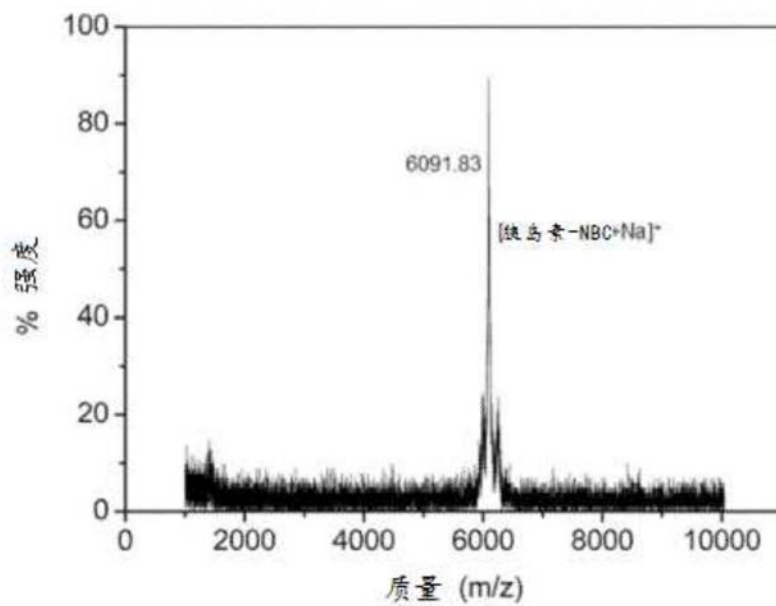


图8

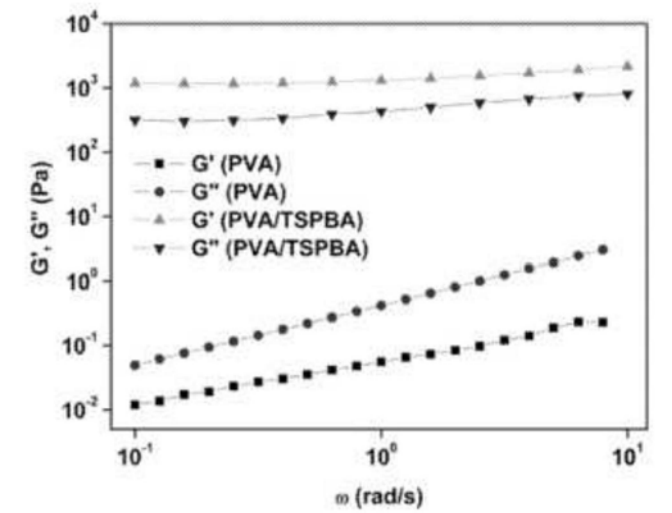


图9A

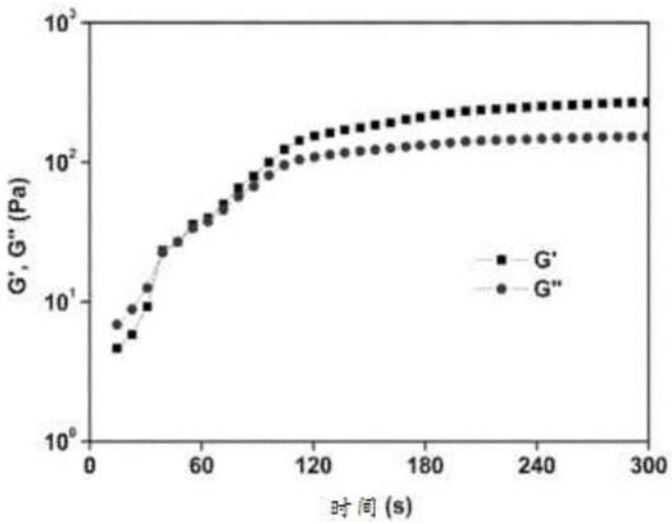


图9B

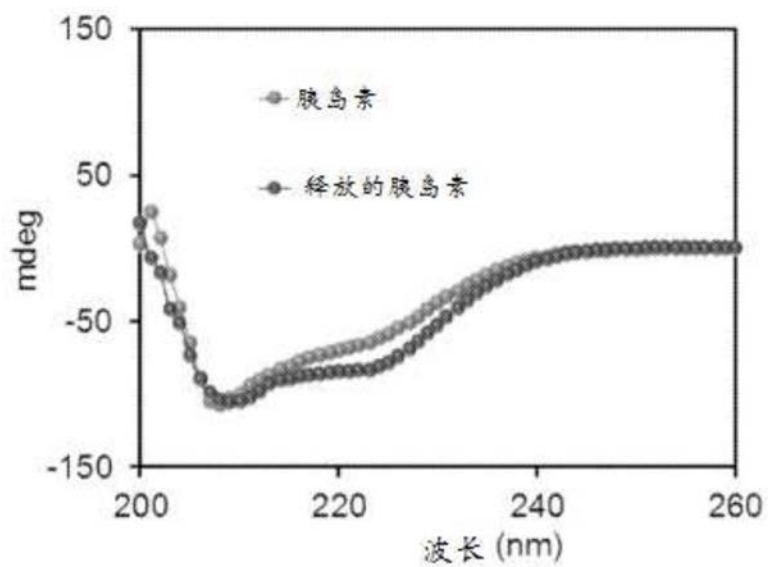


图10

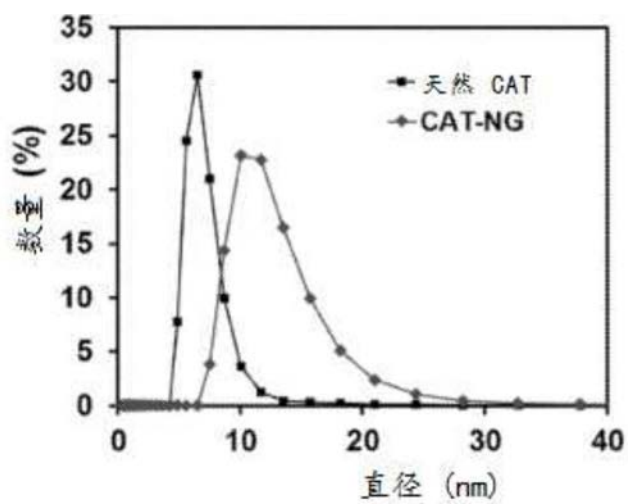


图11A

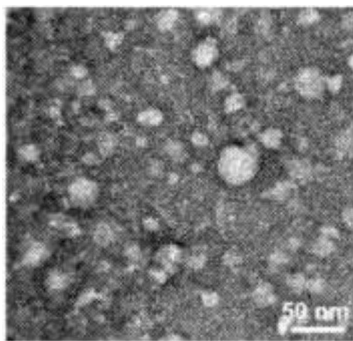


图11B

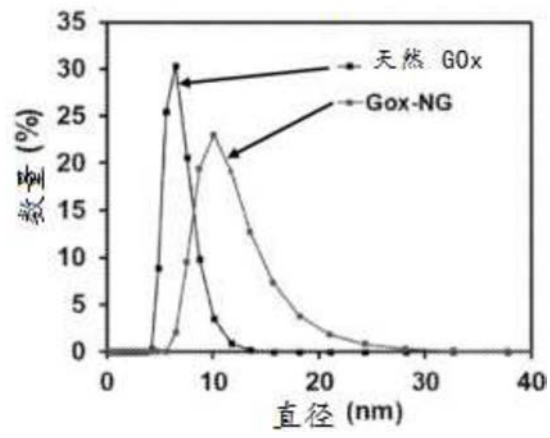


图12A

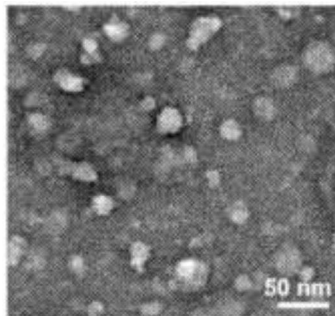


图12B



图13A



图13B

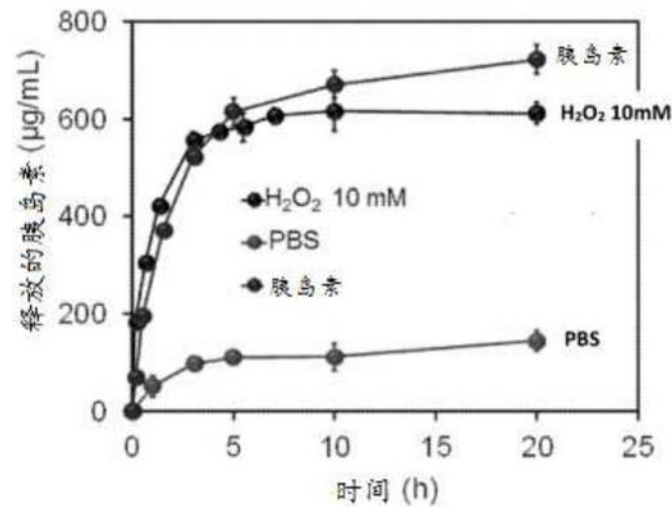


图14

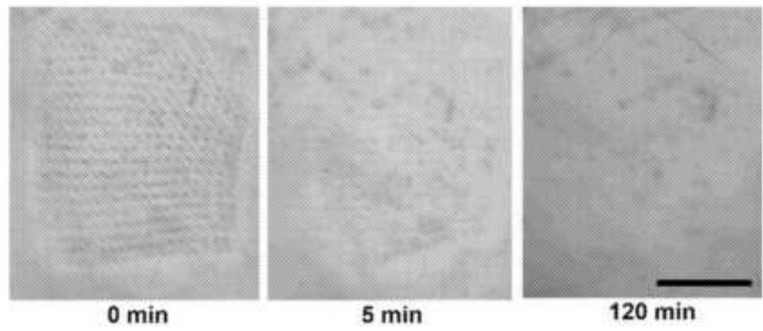


图15

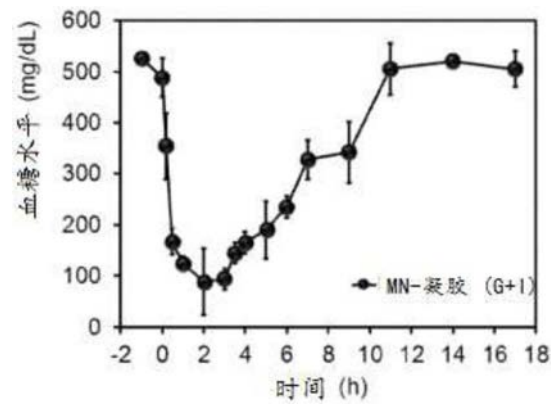


图16

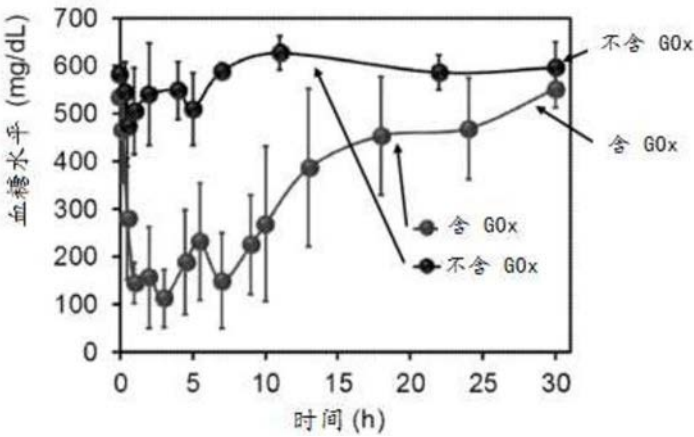


图17

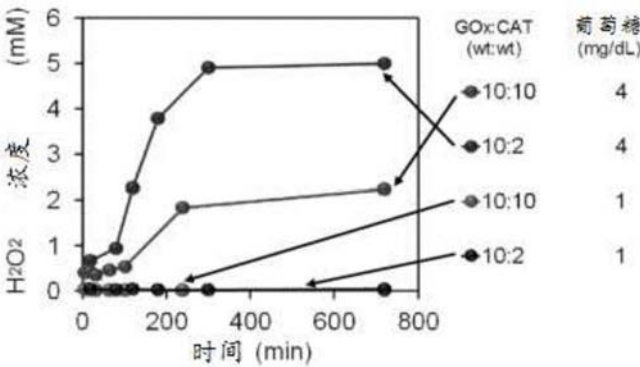


图18

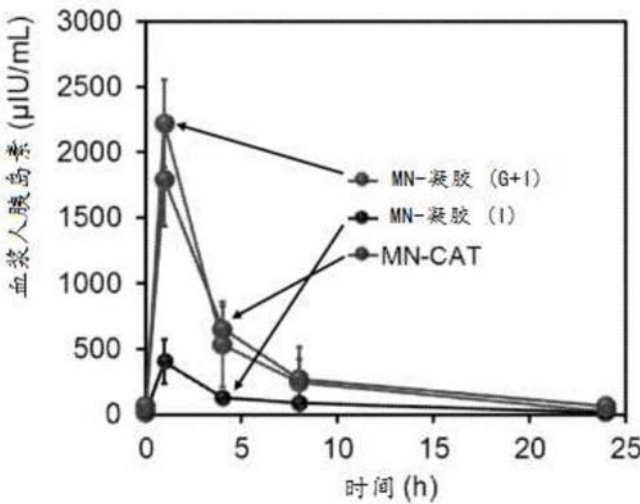


图19

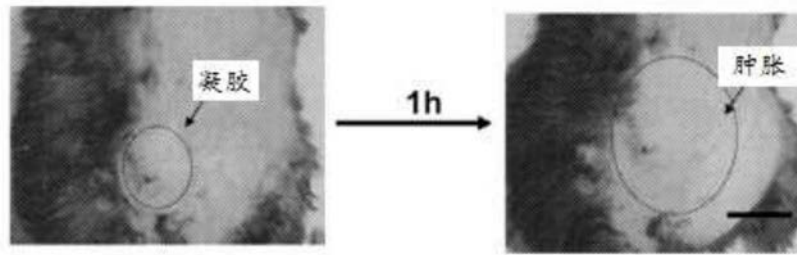


图20