



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104602712 A

(43) 申请公布日 2015. 05. 06

(21) 申请号 201380046358. 1

(22) 申请日 2013. 09. 06

(30) 优先权数据
61/697, 296 2012. 09. 06 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2015. 03. 05

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/SG2013/000389 2013. 09. 06

(87) PCT国际申请的公布数据
W02014/039012 EN 2014. 03. 13

(71) 申请人 南洋理工大学
地址 新加坡国新加坡市

(72) 发明人 S·文卡特拉曼 黄斯伶
莱昂纳德斯·克雷斯纳·维查亚

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任
公司 11021
代理人 吴胜周

(51) Int. Cl.
A61K 47/36(2006. 01)
A61K 31/728(2006. 01)

A61K 9/127(2006. 01)
A61K 31/765(2006. 01)
A61K 31/722(2006. 01)
A61K 31/5575(2006. 01)
A61K 31/505(2006. 01)
A61K 39/395(2006. 01)
A61K 31/7105(2006. 01)
A61K 31/711(2006. 01)
A61P 27/06(2006. 01)

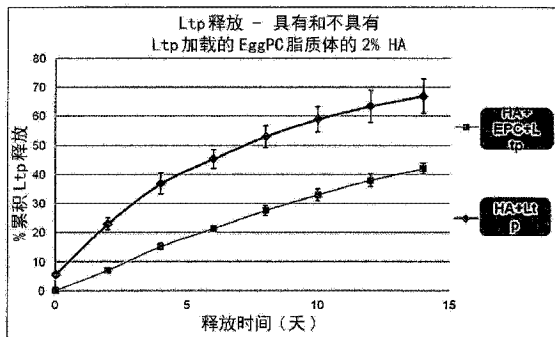
权利要求书2页 说明书13页 附图5页

(54) 发明名称

基于透明质酸的药物递送系统

(57) 摘要

本发明涉及包含加载有药物或蛋白质或核酸的囊泡的新型透明质酸 (HA) 水凝胶。所述新型 HA 水凝胶提供可用于多种临床和手术应用的持续释放制剂, 包括但不限于, 眼科学 (例如, 青光眼, 角膜, 眼部炎症, 玻璃体视网膜和医学视网膜疾病) 和皮肤病学病症。



1. 一种透明质酸 (HA) 水凝胶, 所述透明质酸水凝胶包含分散在其中的加载的囊泡, 其中所述加载的囊泡加载有一种或多种药物、一种或多种蛋白质或一种或多种核酸。

2. 根据权利要求 1 所述的 HA 水凝胶, 其中所述加载的囊泡选自胶束、脂质体和 / 或颗粒, 所述颗粒选自纳米颗粒和微粒。

3. 根据权利要求 1-2 所述的 HA 水凝胶, 其中所述胶束由两性自组装分子制成。

4. 根据权利要求 1-2 所述的 HA 水凝胶, 其中所述囊泡是脂质体。

5. 根据权利要求 1-4 所述的 HA 水凝胶, 其中所述自组装分子选自聚合物和表面活性剂, 优选嵌段聚合物, 更优选 Pluronic 嵌段共聚物。

6. 根据权利要求 1-5 所述的 HA 水凝胶, 其中所述颗粒选自脱乙酰壳聚糖纳米颗粒、脱乙酰壳聚糖微粒、聚(乳酸-共-乙醇酸)(PLGA) 纳米颗粒和聚(乳酸-共-乙醇酸)(PLGA) 微粒。

7. 根据权利要求 1-6 所述的 HA 水凝胶, 其中所述药物选自疏水或亲水药物, 优选地选自抗生素药物, 化学治疗药物, 用于治疗青光眼或高眼压的药物如拉坦前列素或 5-氟尿嘧啶 (5-FU), 所述蛋白质选自治疗性肽或蛋白质或单克隆抗体, 抗-VEGF 抗体如贝伐珠单抗和雷珠单抗, 所述核酸选自 siRNA 和质粒 DNA。

8. 根据权利要求 1-7 所述的 HA 水凝胶, 其中所述 HA 水凝胶是共价交联的水凝胶。

9. 根据权利要求 1-8 所述的 HA 水凝胶, 其中在所述 HA 水凝胶中,

a) 被官能化用于交联的官能化的 HA 通过交联剂相互连接 ; 或

其中

b) 所述官能化的 HA, 官能化基团是所述交联剂。

10. 根据权利要求 1-9 所述的 HA 水凝胶, 其中所述官能化的 HA 选自甲基丙烯酸酯-HA (HA-MA) 或己二酸二酰肼 HA (HA-ADH)。

11. 根据权利要求 1-10 所述的 HA 水凝胶, 其中所述交联剂是聚(乙二醇)二缩水甘油醚 (PEGDE)。

12. 根据权利要求 1-10 所述的 HA 水凝胶, 其中所述 HA 水凝胶选自 HA-MA 水凝胶, HA-ADH 水凝胶, 用 PEGDE 交联的 HA-ADH 水凝胶, 用 PEGDE 交联的 HA-MA 水凝胶。

13. 根据前述权利要求中任一项所述的 HA 水凝胶, 其中分散在所述 HA 水凝胶中的加载的囊泡的量是整个 HA 水凝胶的 1 重量% 至 40 重量%。

14. 根据权利要求 9a) 所述的 HA 水凝胶, 其中交联剂的摩尔数是有效官能化的 HA 的摩尔数的 2 至 10 倍。

15. 根据前述权利要求中任一项所述的 HA 水凝胶, 其中所述囊泡选自加载有 5-FU 的 PGLA 纳米颗粒, 加载有 5-FU 的 PGLA 微粒或加载有拉坦前列素的 EggPC 脂质体, 加载有 5-FU 的脱乙酰壳聚糖纳米颗粒, 加载有 5-FU 的脱乙酰壳聚糖微粒, 加载有紫杉醇的 PEG/PLA 胶束, 加载有多柔比星的脂质体, 加载有 siRNA 的脂质体, 加载有质粒 DNA 的脂质体。

16. 一种用于制备前述权利要求中任一项所述的 HA 水凝胶的方法, 所述方法包括 :

a) 提供具有官能部分的官能化的 HA, 其中所述官能部分用于交联 ;

b) 任选地在交联剂存在下, 使所述官能化的 HA 交联,

其中

所述交联在加载的囊泡存在下发生, 并且

其中

当不存在所述交联剂时,所述官能部分充当交联剂。

17. 根据权利要求 16 所述的方法,其中所述官能化的 HA 选自 HA-MA 或 HA-ADH。

18. 根据权利要求 16-17 所述的方法,其中所述交联剂选自 PEGDE。

19. 根据权利要求 16-18 所述的方法,其中所述加载的囊泡与所述官能化的 HA 混合以形成混合物,然后向所述混合物中加入所述交联剂。

20. 根据权利要求 19 所述的方法,其中所述官能化的 HA 是冷冻干燥的 HA-MA。

21. 根据权利要求 16-20 所述的方法,其中所述有效官能化的 HA 和所述交联剂以 1 : 1 至 1 : 20 的比率存在。

22. 根据权利要求 16-21 所述的方法,其中所述交联在 20°C 至 25°C 的温度发生。

23. 根据权利要求 16-22 所述的方法,其中所述交联是光交联。

24. 根据权利要求 23 所述的方法,其中所述光交联是 UV 光交联。

25. 一种通过权利要求 16-24 所述的任一种方法可获得的 HA 水凝胶,所述 HA 水凝胶包含分散在其中的加载的囊泡。

26. 一种如权利要求 1-15 和 25 所述的包含分散在其中的加载的囊泡的 HA 水凝胶,其用作药物。

27. 一种包含如权利要求 1-15 和 25-26 所述的 HA 水凝胶的药物制剂。

28. 根据权利要求 27 所述的药物制剂,其用于口服、局部、静脉内、皮下或肌肉内施用。

29. 根据权利要求 16-25 所述的方法,其中所述官能化的 HA 具有在 5 至 80% 范围的官能化程度。

基于透明质酸的药物递送系统

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 依据 35U.S.C. § 119(e), 本申请要求于 2012 年 9 月 6 日提交的名称为“Hyaluronic Acid-Based Drug Delivery Systems(基于透明质酸的药物递送系统)”的美国临时申请号 61/697, 296 的优先权权益, 将其整个公开内容通过引用以其整体结合在本文中用于所有的目的。

发明领域

[0003] 本发明涉及透明质酸 (HA) 水凝胶用于以可控的速率递送药物 (如小分子或蛋白质或肽或核酸) 用于多种临床和外科手术应用的用途, 所述临床或手术应用包括但不限于, 眼科学 (例如, 青光眼, 角膜, 眼部炎症, 玻璃体视网膜和医学视网膜疾病) 和皮肤病学病症。具体地, 本发明涉及 HA 水凝胶, 其包含分散在所述 HA 水凝胶中的加载的囊泡 (loaded vesicle), 其中所述囊泡加载有一种或多种药物, 一种或多种蛋白质, 或一种或多种核酸。所述药物或蛋白质或核酸以可控方式释放。另外, 本发明涉及用于制备包含加载有药物或蛋白质或核酸的囊泡的 HA 水凝胶的多种方式。本发明涉及用于制备包含分散在其中的加载的囊泡的 HA 水凝胶的方法。

[0004] 发明背景

[0005] 公知的是, 透明质酸 (HA), 作为一种天然存在的糖胺聚糖 (GAG), 在伤口愈合中起关键作用。HA 具有 100 至 10,000,000Da 的天然存在的分子大小范围。HA 参与组织的水体内稳态, 参与通过空间排阻现象调节其他物质的渗透性, 并且参与关节的润滑。HA 还特异性地结合细胞外基质中、细胞表面上和细胞胞质溶胶内的蛋白质, 由此在软骨基质稳定、细胞运动性、生长因子活动、形态发生以及胚胎发育和炎症中起作用。未改性的 HA 在药物递送和手术中具有多种重要的应用。例如, 其用作眼科药物递送的辅药。另外, HA 在粘性手术、粘度补充和伤口愈合领域具有重要的应用。HA 还是用于药物递送、组织改造和粘度补充的生物相容性和生物可降解聚合物的结构单元。

[0006] 水凝胶由交联的聚合物形成, 并且能够吸收大量的水而不被溶解。HA 水凝胶是物理或共价交联的 HA 凝胶。HA 分子通常被官能化, 以允许与交联剂反应。例如, 已经通过与诸如双环氧丁烷、乙二醇二缩水甘油醚 (EGDGE) 或聚乙二醇二缩水甘油醚 (PEGDE) 的分子交联而制备了交联的 HA 水凝胶。

[0007] HA 水凝胶已经用于一些应用, 包括药物递送应用。它们能够提供多种治疗剂的持续的、局部递送。由于 HA 水凝胶的生物相容性、低毒性、缺少免疫反应和生物可降解性, 已经研究了 HA 在水凝胶中作为构架材料的用途。

[0008] 尽管已经关于药物递送应用研究了 HA 水凝胶, 但是递送速率是难以控制的。如果将亲水药物结合在水凝胶中, 则结合是容易的 (可以加载大量), 但是释放也是快速的。另一方面, 由于溶解度原因, 难以将大量的疏水药物结合在所述水凝胶中。任何未溶解的药物将迁移到水凝胶表面并且爆发式释放 (在一天或两天内释放)。

[0009] 因此, 需要提供避免上文提及的缺点、允许疏水和亲水药物、蛋白质或核酸的有效

且局部化的可控的释放的另外的改善的药物 / 蛋白质 / 核酸持续不变的递送制剂。

[0010] 发明概述

[0011] 本发明通过提供新型和改善的可控释放的药物或蛋白质或核酸制剂及制备其的方法解决了此需要。

[0012] 在第一方面,本发明涉及透明质酸 (HA) 水凝胶,其包含分散在其中的加载的囊泡,其中所述囊泡加载有药物或蛋白质和肽或核酸 (“加载的囊泡”)。

[0013] 所述加载的囊泡选自胶束 (micelle)、脂质体和 / 或颗粒如微粒 (microparticle) 或纳米颗粒 (nanoparticle)。优选地,所述胶束由两性自组装分子制成。两性自组装分子优选地选自聚合物 (包括嵌段共聚物) 和表面活性剂。优选地,所述颗粒选自脱乙酰壳聚糖 (chitosan) 纳米颗粒或微粒以及聚 (乳酸 - 共 - 乙醇酸) (PLGA) 纳米颗粒或微粒。优选地,加载的囊泡的量是整个 HA 水凝胶系统 (包括加载的囊泡的 HA 水凝胶) 的 1 重量% 至 40 重量%。更优选地,整个 HA 水凝胶系统的 1-20 重量%。

[0014] 药物优选地选自疏水或亲水药物,更优选地其选自抗生素药物如环丙沙星,化学治疗药物如紫杉醇 (paclitaxel) 或多柔比星或 5- 氟尿嘧啶,用于治疗青光眼或高眼压的药物,如拉坦前列素,以及抗瘢痕药物,如 5- 氟尿嘧啶。

[0015] 蛋白质优选地选自单克隆抗体的组,如贝伐珠单抗 (Avastin) 和雷珠单抗 (Lucentis), 或类似的治疗性蛋白质。

[0016] 肽优选地是利钠肽 (natriuretic peptide), 包括 C- 型利钠肽 (C-NP), A- 型利钠肽 (A-NP), 嵌合型利钠肽 (CD-NP), 突变型心房利钠肽 (M-ANP)。

[0017] 核酸优选地选自 RNA、siRNA、DNA、cDNA 和质粒 DNA 的组。

[0018] 本发明所述的 HA 水凝胶优选是共价交联的 HA 水凝胶的 HA 水凝胶。形成水凝胶的 HA 部分 (骨架) 用要与交联剂连接的官能团官能化。所述交联剂是在 HA 水凝胶制备中适于充当交联剂的任意分子。交联在加载的囊泡存在下进行, 以提供本发明的 HA 水凝胶。官能团是与 HA 连接、优选共价连接的且能够与交联剂分子反应以交联官能化的 HA 并且用于 HA 凝胶的任意分子或部分或基团。备选地, 所述官能团是与 HA 连接、优选共价连接的且本身能够充当交联剂以形成 HA 水凝胶的任意分子或部分或基团。优选地, HA 用甲基丙烯酸或酸酐官能化以产生甲基丙烯酸酯-HA (HA-MA), HA 用己二酸二酰肼 (ADH) 官能化以产生 HA-ADH, 或者 HA 用乳酸官能化以产生 MeLAHA, 或用己内酯官能化以产生 MeCLHA。优选地, 交联剂分子是聚乙二醇二缩水甘油醚 (PEGDE)。在加载的囊泡存在下, HA-MA 用 PEGDE 的交联提供根据本发明的包含分散在其中的加载的囊泡的 HA 水凝胶。备选地, 在加载的囊泡存在下, HA-ADH 用 PEGDE 的交联提供根据本发明的包含分散在其中的加载的囊泡的 HA 水凝胶。

[0019] 备选地, 在官能化的 HA 中, 官能化基团是交联剂。优选地, 官能化的 HA 选自 HA-MA 和 HA-ADH。官能团 MA 可以充当交联剂而形成 HA-MA 水凝胶。官能团 ADH 可以充当交联剂而形成 HA-ADH 水凝胶。

[0020] 优选地, HA 水凝胶选自 HA-MA 水凝胶, HA-ADH 水凝胶, 用 PEGDE 交联的 HA-ADH 水凝胶, 用 PGDE 交联的 HA-MA 水凝胶。

[0021] 优选地, 被有效官能化的 HA 与交联剂的摩尔比 (其中交联剂不是官能团本身) 的范围为 1 : 20 至 1 : 1, 优选 1 : 10 至 1 : 2, 更优选 1 : 5 至 1 : 2。因此, 优选地, 加

入的交联剂的量是被有效官能化的 HA 的摩尔数的 2-10 倍。例如,对于如 HA-ADH 体系的体系,使用交联剂(其不是 ADH 本身)。例如,对于 HA-ADH,使用交联剂 PEGDE。通常,PEGDE 以是被有效官能化的 HA-ADH 的摩尔数的 2-10 倍的比率使用。例如,如果 HA-ADH 的官能化程度为 50% (即,整个 HA 分子的 50% 具有 ADH),那么可以加入该量的 2-10 倍的 PEGDE。

[0022] 在第二方面,本发明提供用于制备根据本发明的包含分散在其中的加载的囊泡的 HA 水凝胶的方法。

[0023] 所述方法包括:a) 提供具有适于与交联剂连接的官能团/部分的官能化的 HA,和 b) 任选地在交联剂存在下,交联所述官能化的 HA 部分,其中交联在加载的囊泡存在下发生,并且其中当不存在交联剂时,HA 上的官能团/部分充当交联剂。优选地,所述官能化的 HA 选自 HA-MA 或 HA-ADH。优选地,交联剂选自 PEGDE。优选地,当官能团充当交联剂时,所述官能团是 MA。

[0024] 按照本发明的方法,加载的囊泡与官能化的 HA 混合以形成混合物。然后,向所述混合物中加入交联剂,并且使之交联,从而提供包含分散在其中的加载的囊泡的 HA 水凝胶。备选地,将加载的囊泡与交联剂混合,并且随后加入官能化的 HA。

[0025] 在其中不需要交联剂的实施方案中,由于 HA 官能化部分的官能团/部分充当交联剂,所以使包含官能化的 HA 和加载的囊泡的混合物发生交联。可以向包含加载的囊泡的溶液中作为冷冻干燥的官能化的 HA 加入官能化的 HA。在包含加载的囊泡的溶液中,官能化的 HA 的浓度优选为 1% 至 20% (w/v),更优选为 2% 至 4% (w/v)。

[0026] 交联是一种化学反应或自由基聚合(交联),优选光交联。优选地,光交联是 UV 光交联,其任选地在光引发剂存在下发生。使用引发剂如 Irgacure 2959 来起始交联。引发剂的量是官能化的 HA 的 3 重量%至 15 重量%,优选是官能化的 HA 的 10 重量%。例如,当使用 HA-MA 来制备 HA-MA 水凝胶时,引发剂的量是 HA-MA 的 3 重量%至 15 重量%,优选是 HA-MA 的 10 重量%。

[0027] 在第三方面,本发明涉及利用本发明的任一种方法可获得的包含分散在其中的加载的囊泡的 HA 水凝胶。

[0028] 在第四方面,本发明涉及如上定义的包含分散在其中的加载的囊泡的 HA 水凝胶,其用作药物。

[0029] 在第五方面,本发明涉及一种药物制剂,其包含如上定义的包含分散在其中的加载的囊泡的 HA 水凝胶。所述药物制剂用于口服、局部、静脉内、皮下、眼内或肌肉内施用。

[0030] 附图描述

[0031] 当结合非限制性实施例和附图考虑时,参考详述将更好地理解本发明,在附图中:

[0032] 图 1 显示形成 PEG/PPG/PEG 嵌段共聚物的胶束和加载疏水药物的示意图。

[0033] 图 2 显示形成 PEG/PLA 嵌段共聚物的胶束和加载疏水药物的示意图。

[0034] 图 3a 是的磷脂结构(脂质体的构成单元)的图片。图 3b 显示脂质体的截面。其显示亲水药物可以加载在脂质体核心中,并且疏水药物可以停留在脂质体的双层中。

[0035] 图 4 是显示在 Egg 脂质体中加载有 Ltp 或没有加载 Ltp 的 HA 水凝胶中的%累积拉坦前列素(Ltp)释放的图表。

[0036] 图 5 是使用可光交联的 HA-MA 制备具有分散的加载的囊泡的 HA 水凝胶的方法的

方案。

[0037] 图 6 显示其中直接加载 Ltp (无囊泡) 的 HA-MA 水凝胶相对于根据本发明的 HA-MA 水凝胶 4% (即, 具有 Ltp 加载的脂质体) 在 15 天内的 % 累积药物释放。

[0038] 图 7 显示加载有 5-FU 的 PLGA 微粒的 SEM 图片, 其显示了粒度和球形。

[0039] 图 8 显示 HA 水凝胶中 5-FU 从批次 10、11 和 6 的 PLGA 微粒的释放分布曲线。

[0040] 图 9 显示 1) HA-MA+5FU 溶液、2) HA-MA+5-FU 凝胶和 3) HA-MA+PLGA/5FU 批次 6 微粒的 % 累积释放的比较。

[0041] 详述

[0042] 本发明的发明人已经发现, 在 HA 水凝胶中结合加载有疏水和 / 或亲水药物或蛋白质或核酸的囊泡提供这样的制剂, 其具有可控释放分布并且没有直接在水凝胶中结合亲水 / 疏水药物或蛋白质或核酸的缺点 (分别地, 快速释放和在一天或两天内爆发式释放)。

[0043] 有利地, 本发明的发明人已经发现, 当与其中药物或蛋白质或核酸直接加载在 HA 水凝胶中的系统相比较时, 和当与其中药物或蛋白质或核酸加载在囊泡中并且仅从所述囊泡释放的系统 (不存在 HA 水凝胶) 相比较时, 包含分散在其中的加载的囊泡的 HA 水凝胶提供具有改善的可控释放分布的系统。

[0044] 因此, 在一方面, 本发明涉及包含分散在其中的加载的囊泡的 HA 水凝胶, 其中所述囊泡加载有一种或多种药物、一种或多种蛋白质或一种或多种核酸。

[0045] “囊泡 (vesicle)” 在本文中定义为能够包含 (容纳, contain) 药物 / 蛋白质 / 肽 / 核酸并且能够在所需生理条件下将其释放的小袋 / 小泡。优选地, 根据本发明的囊泡选自脂质体或胶束或颗粒, 所述颗粒选自纳米颗粒和微粒。所述囊泡被制成使其加载有疏水或亲水药物、蛋白质、肽或核酸。优选地, 在加载的囊泡结合到 HA 水凝胶中之前制备所述加载的囊泡。

[0046] “胶束” 由自组装的两性分子制成。在超过一定浓度时, 自组装的两性分子自发地以特有的结构 (胶束) 存在。该浓度称为“临界胶束浓度” (CMC)。例如, 自组装的两性分子可以是聚合物和表面活性剂。实例包括表面活性剂, 如 (C₁₀-C₂₂烷基硫酸酯、C₁₀-C₂₂烷基甜菜碱、C₁₀-C₂₂烷基三甲基铵盐和 C₁₀-C₂₂烷基葡萄糖苷, 和聚合物, 优选嵌段共聚物, 如 PLGA (聚(丙交酯-共-乙交酯)) 与 PEG (聚乙二醇) 的共聚物、聚己内酯 (PCL) 与 PEG 的共聚物、聚乙二醇-聚乳酸的共聚物 (PEG/PLA)、聚乙二醇 (PEG) 与聚丙二醇 (PPG) (还称为聚乙烯和聚丙烯氧化物) 的共聚物。聚乙二醇 (PEG) 与聚丙二醇 (PPG) 的共聚物通常以商标 **Pluronic®** 出售。

[0047] 如所述, 自组装两性分子如 **Pluronic®** 的定义性能是称为“单聚体 (unimer)” 的分子在水溶液中自组装成胶束的能力。当分子浓度低于 CMC 时, 这些“单聚体” 在水中形成分子分散体。在高于 CMC 的浓度, 单聚体聚集, 通过称为“胶束化” 的过程形成胶束。例如, 在嵌段共聚物情况下, 胶束化的驱动力是疏水嵌段 (如 **Pluronic®** 中的 P0 嵌段) 的疏水相互作用。疏水嵌段自组装成由亲水嵌段 (如 **Pluronic®** 中的 E0 嵌段) 的亲水罩 (hydrophilic corona) 所覆盖的胶束的内核。例如, **Pluronic®** 胶束图像化为由 P0 核心和 E0 罩组成的球体 (图 1)。可以形成包括薄片 (lamelles) 或棒的另外的胶束形态。一般地, 取决于所用的

嵌段聚合物的类型,胶束具有不同的平均流体动力学直径。例如,取决于所用的 **Pluronic®** 类型,胶束可以具有在 20 至约 80nm 范围内的平均流体动力学直径。形成一个胶束的嵌段聚合物的数目称为“聚集数”。

[0048] 胶束的中心是疏水性的。如果在这样的聚合物中混合疏水药物或分子,则药物将会停留在疏水核心中,如图 1 所示。将疏水药物转移到胶束溶液的疏水核心(如 PO 核心)中的过程称为“增溶作用”。然后,通过药物递送机制发生药物的释放。

[0049] 聚乙二醇-聚乳酸(PEG/PLA)共聚物是在高于 CMC 的浓度在水溶液中形成胶束的另一个共聚物实例。(图 2)。本发明的发明人已经发现,PEG/PLA 共聚物能够形成结合疏水药物如紫杉醇的胶束。本发明的发明人已经发现,为了获得更大水平的释放控制,以及总体药物加载,可以将大量的这样的胶束结合到 HA 水凝胶中(~10-20 重量%),由此将药物释放的持续时间由数天延长至数月。

[0050] 在本发明的一个方面中,胶束由自组装的两性分子制成。自组装的两性分子可以选自表面活性剂,如 C_{10} - C_{22} 烷基硫酸酯、 C_{10} - C_{22} 烷基甜菜碱、 C_{10} - C_{22} 烷基三甲基铵盐和 C_{10} - C_{22} 糖苷,或聚合物,如嵌段共聚物。优选地,根据本发明的自组装两性分子是嵌段共聚物。优选地,自组装两性分子选自聚乙二醇(PEG)与聚丙二醇(PPG)的共聚物,如 **Pluronic®** 和 PEG/PLA;更优选地,**Pluronic®** 为 **Pluronic®** 127。

[0051] “脂质体”是由脂双层组成的囊泡。脂质体通常由富含磷脂酰胆碱的磷脂组成。(图 3)。亲水和疏水药物都可以加载在脂质体中。疏水药物结合在脂质囊泡的双层中,而亲水药物加载在脂质体的“核心”中(图 3)。例如,本发明的发明人已经将抗生素环丙沙星结合在脂质体核心中,环丙沙星是一种亲水药物,具有良好的加载和可控的释放。当这样加载的脂质体与 HA 水凝胶前体混合并交联时,获得进一步的释放控制。另外,本发明的发明人已经将疏水药物如拉坦前列素结合在脂质体双层中。在 HA 水凝胶交联之前,将加载的脂质体进一步结合在 HA 水凝胶前体中。使所述水凝胶前体形成 HA 水凝胶。将脂质体结合在 HA 水凝胶中进一步增加了药物的受控释放。

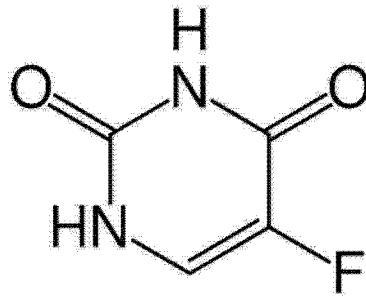
[0052] 在另一个实施方案中,疏水和亲水药物都可以加载到同一个脂质体中。疏水药物通过被动加载处于脂质体的双层部分中,而亲水药物通过主动加载处于脂质体的核心中。

[0053] 脂质体优选地选自 EPC(或 EggPC)脂质体,基于 1-棕榈酰-2-油酰基磷脂酰胆碱(POPC)的脂质体和基于 1,2-二肉豆蔻酰(d54)-sn-甘油酰-3-磷酸胆碱(DMPC)的脂质体。

[0054] 根据本发明的颗粒是尺寸(直径)在 5nm-50 μ m 范围内的非自组装颗粒。依据其尺寸(直径)范围,颗粒定义为纳米颗粒或微粒。一般地,纳米颗粒具有 5nm-250nm 的尺寸范围。微粒具有 > 250nm 到 50m 的尺寸范围。纳米颗粒和微粒通过形成药物(优选亲水药物)与阴离子或阳离子物质之间的复合物,然后形成纳米颗粒而制备。例如,用于制备纳米颗粒和微粒的阴离子物质例如是聚苯乙烯磺酸盐或聚丙烯酸,阳离子物质例如是脱乙酰壳聚糖。

[0055] 通过非限制性实例的方式:药物,如 5-氟尿嘧啶(5-FU)

[0056]



[0057] 将溶解在 NH_4OH 中,并且在高 pH 下以负离子存在,而在较低 pH 下以正离子存在。因此,在低 pH,这样的药物可以与阴离子物质(例如,聚苯乙烯磺酸盐或聚丙烯酸)复合,而形成相比于纯药物能够更有效地加载到水凝胶中的复合物。在较高的 pH,这些药物可以与阳离子(如脱乙酰壳聚糖)复合。

[0058] 由此,对于亲水药物,本发明还包括制备复合的药物,例如,利用脱乙酰壳聚糖。使用脱乙酰壳聚糖的复合之后是纳米颗粒或微粒形成。所形成的纳米颗粒或微粒混合到 HA 水凝胶前体(其被交联)。释放控制被优化。可以加载到脱乙酰壳聚糖纳米颗粒或微粒中的药物类型包括用作化学治疗和抗瘢痕剂的 5-氟尿嘧啶(5-FU)。核酸,如 siRNA;质粒 DNA 可以加载到纳米颗粒或微粒中。

[0059] 根据本发明的纳米颗粒或微粒还是聚(乳酸-共-乙醇酸)(PLGA)-纳米颗粒(NP)或 PLGA-微粒(PLGA-MP)。PLGA-NP 或 PLGA-MP 加载有药物或蛋白质或多肽或核酸。然后,经由 HA 水凝胶前体的聚合作用将加载的 PLGA-NP 或 PLGA-MP 包埋在 HA 水凝胶中。PLGA-NP 或 PLGA-MP 可以通过复乳剂溶剂蒸发(double emulsion solvent evaporation)而制备。复乳剂溶剂蒸发法例如公开在 Liao X, Wang J, Wang J, Zhang H: Preparation poly(lactide-co-glycolide) microsphere of bone sialoprotein(制备骨唾液蛋白的聚(丙交酯-共-乙交酯)微球体). Nano Biomed Eng 2010, 2:133 中。

[0060] 根据本发明的纳米颗粒具有的直径范围为 5nm 至 250nm,优选 40 至 100nm。根据本发明的微粒具有的直径范围为 $> 250\text{nm}$ 至 $50\ \mu\text{m}$ 。

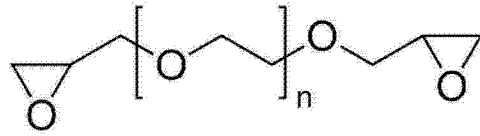
[0061] HA 是一种阴离子的、未硫酸化的糖胺聚糖。如本文定义的“HA 水凝胶”是交联的 HA 网络。交联优选是共价交联,即,HA 共价键合到交联剂分子上,以形成聚合物网络。HA 含有大量对水具有亲和性的亲水基团。由于经由交联剂在 HA 链之间形成的键所致,HA 水凝胶被防止溶解。由此,HA 或化学改性的 HA 可以经由聚合作用(交联)形成 HA 水凝胶。

[0062] HA 分子具有羧基基团、乙酰胺基基团和 OH 基团,其可以用适于交联的化学基团官能化。按照本发明,官能化的 HA 是“HA 水凝胶前体”。交联剂是另一种“HA 水凝胶前体”。当官能化的 HA 任选地在交联剂分子存在下交联时,其形成 HA 水凝胶。官能化的 HA 的实例是己二酸二酰肼 HA (HA-ADH),甲基丙烯酸酯化的 HA (HA-MA),硫醇化的(thiolated) HA (HA-SH)。可以合成 HA-ADH 并通过与甲基丙烯酸酐反应用于制备 HA-MA。通过与 Traut's 试剂(亚氨基硫烷(imminothiolane))反应,HA-ADH 可以用于制备硫醇化的 HA (HA-SH)。其他官能化的 HA 为 MeLAHA 和 MeCLHA。优选的官能化的 HA 是 HA-MA 和 HA-ADH。

[0063] “交联剂”或交联试剂/剂是含有两个以上能够化学连接到 HA 或官能化的 HA 的特定官能团的反应性末端的分子。可以用于制备根据本发明的 HA 水凝胶的交联剂的非限制性实例是:丁二醇二缩水甘油醚(buthylene glycol diglycidyl ether) (BDG),丁二醇

二缩水甘油醚 (butanediol diglycidyl ether) (BDDGE) 或聚 (乙二醇) 二缩水甘油醚 (PEGDE)。优选地, 交联剂是 PEGDE, 更优选地是下式的 PEGDE:

[0064]



[0065] 其中 $n = 1$ 至 50, 优选地, $n = 3-6$ 。

[0066] 官能化的 HA 可以在交联剂存在下交联。作为本发明这一实施方案的示例性实例, 在加载的囊泡存在下, HA-ADH 与 PEGDE 或 HA-MA 与 PEGDE 可以交联而产生本发明的 HA 水凝胶。由于官能团充当交联剂, 所以官能化的 HA 可以在加载的囊泡存在下和没有交联剂下交联。作为本发明这一实施方案的示例性实例, 在加载的囊泡存在下, HA-MA 可以交联, 优选地光交联, 产生具有加载的囊泡分散在其中的 HA 水凝胶 (HA-MA 水凝胶)。作为本发明这一实施方案的示例性实例的备选方案, 在加载的囊泡存在下, HA-ADH 可以化学交联, 产生具有加载的囊泡分散在其中的 HA 水凝胶 (HA-ADH 水凝胶)。

[0067] HA 水凝胶中的加载的囊泡的量可以为在整个 HA 水凝胶体系 (HA 水凝胶加加载的囊泡) 的 1 重量%至 60 重量%的范围内。优选地, 加载的囊泡的量为整个 HA 水凝胶体系的 2 重量%至 30 重量%, 更优选地, 为整个 HA 水凝胶体系的 4 重量%至 20 重量%。

[0068] HA 骨架上的官能化百分比 / 程度可以取决于官能化基团。典型地, 官能化的百分比为 5 至 80% (即, 5-80 的 HA 分子具有官能化 / 携带官能团)。优选地, HA-ADH 的官能化程度为 20 至 80%, 优选地, HA-MA 的官能化程度为 5% 至 20%, 更优选地为 10%; 优选地, HA-ADH 的官能化程度为 45% 至 50%。

[0069] 由此, 根据本发明的表述“官能化的 HA”或“HA-ADH”或“HA-MA”等是指包含官能化的和未官能化的 HA 的 HA 的组合物。官能化程度通过如上文公开的百分比表示。表述“有效官能化的 HA”是指有效携带官能团的“官能化的 HA”的部分。作为解释性的非限制性实例, 具有 50% 官能化程度的 HA-MA 意指这样的组合物, 其中一半 HA 分子被 MA 官能化, 而一半的 HA 分子未被官能化。50% 的 HA 分子有效地被 MA 官能化。作为另外的解释性的非限制性实例, 具有 60% 官能化程度的 HA-MA 意指这样的组合物, 其中 60% 的 HA 分子被 MA 官能化, 而 40% 的 HA 分子未被官能化, 即为 HA。60% 的 HA 分子“有效地”被 MA 官能化。

[0070] 在第二方面, 本发明涉及一种用于制备其中分散有加载的囊泡的 HA 水凝胶的方法。所述方法包括:

[0071] a) 提供具有官能部分的官能化的 HA, 其中所述官能部分用于交联;

[0072] b) 任选地在交联剂存在下, 交联所述官能化的 HA;

[0073] 其中

[0074] 所述交联在加载的囊泡存在下发生; 并且

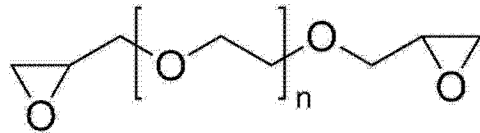
[0075] 其中

[0076] 当不存在交联剂时, 所述官能部分充当交联剂。

[0077] 官能化的 HA 是 HA 水凝胶前体。在本发明的方法中, 官能化的 HA 可以是适于制备 HA 水凝胶的任意官能化的 HA。官能化的 HA 例如为 HA-MA, HA-ADH, HA-SH, MeLAHA 和 MeCLHA。优选地, 官能化的 HA 选自 HA-ADH 和 HA-MA。

[0078] 交联剂分子是 HA 水凝胶前体。“交联剂”或“交联试剂”是含有两个以上能够化学连接到 HA 或官能化的 HA 的特定官能团的反应性末端的分子；可以用于制备根据本发明的 HA 水凝胶的交联剂的非限制性实例为：丁二醇二缩水甘油醚 (BDG)，丁二醇二缩水甘油醚 (BDDGE) 或聚(乙二醇)二缩水甘油醚 (PEGDE)。优选地，交联剂是 PEGDE，更优选地是下式的 PEGDE：

[0079]



[0080] 其中 $n = 50$ 至 400 ，其中 $n = 1$ 至 50 ，优选地， $n = 3-6$ 。

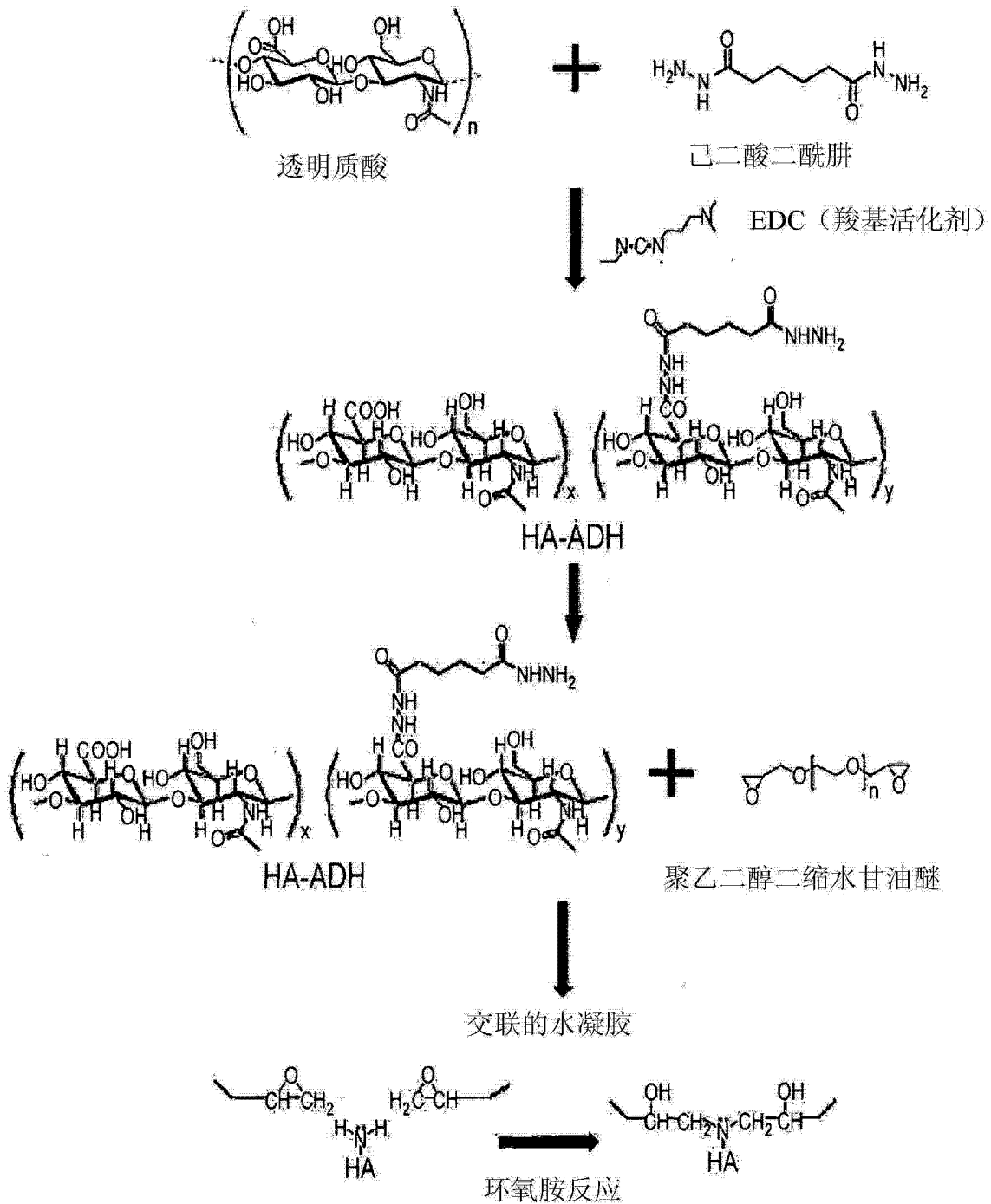
[0081] 包括如上文公开的胶束、脂质体以及选自纳米颗粒和微粒的颗粒并且加载有药物或蛋白质或肽或核酸的囊泡用在本发明的方法中以制备包含分散在其中的加载的囊泡的 HA 水凝胶。

[0082] 交联反应可以是化学交联，例如，经由缩合或加成反应，或自由基聚合，其中聚合（交联）包括通过一些引发剂源，如光、温度或氧化还原反应来形成自由基。优选地，自由基聚合（交联）经由光聚合（光交联）发生。典型地，UV 辐射用于光交联。典型地，当经由光交联形成 HA 水凝胶时，在含有 HA 水凝胶前体和加载的囊泡的溶液中存在光引发剂，如 Irgacure 2959。

[0083] 使用己二酸二酰肼 (ADH) 将 HA 的 OH 基团转化为醛，然后与乙烯二碳二亚胺 (EDC) 反应以在 HA 骨架 (HA-ADH) 中产生反应性官能团，可以用在本发明的方法中。然后，根据以下方案，通过在交联剂如 PEGDE 存在下交联，形成水凝胶：

[0084]

HA-ADH 水凝胶
合成路线



[0085] 凝胶前体（在此情形中，为 HA-ADH 和 PEGDE）可以与加载的囊泡（如上文公开的加载的脂质体 / 加载的胶束 / 加载的纳米颗粒）混合，然后交联。交联过程经由化学 - 或光 - 交联进行。交联过程在任意适当的温度下进行。优选地，其在环境温度下进行。优选地，其在 20°C 至 25°C 范围内的温度下进行。这一特征的优点在于囊泡中加载的蛋白质 / 核酸不变性。

[0086] 根据本发明的囊泡可以是脂质体、胶束（优选自组装两性分子的）或选自纳米颗

粒和微粒的颗粒,如上文公开的。

[0087] 加载的囊泡可以提供在溶液或混悬液中。溶剂可以依据囊泡进行选择。溶剂可以例如是水或乙醇。优选地,溶剂是水。

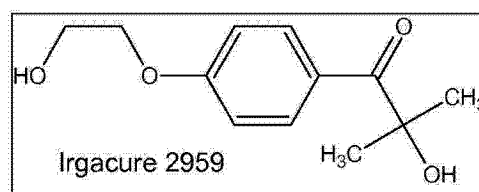
[0088] 按照本发明使用的 HA 是以适于形成水凝胶的形式的 HA。其可以称为 HA 水凝胶前体。由此,HA 水凝胶前体可以是官能化的 HA。在一方面,用于交联目的的官能化的任意 HA 可以用在本发明的方法中。优选地,HA-ADH、HA-MA、HA-SH 用于本发明的方法。可交联的官能化的 HA 可以作为冷冻干燥的官能化的 HA 或作为溶液加入到加载的囊泡的溶液 / 混悬液中。

[0089] 可以将适用于制备 HA 水凝胶的交联剂加入到含有加载的囊泡和官能化的 HA 的溶液 / 混悬液中。本发明的方法设想使用了适用于制备 HA 水凝胶的任何交联剂。优选的交联剂是 (BDG), 丁二醇二缩水甘油醚 (BDDGE) 或聚(乙二醇)二缩水甘油醚 (PEDGE)。更优选的交联剂是 PEGDE。

[0090] 当包含加载的囊泡的溶液 / 混悬液与 HA 水凝胶前体混合时,诱导交联反应。交联反应可以是化学交联反应,如缩合或加成反应,或自由基聚合(交联)。自由基聚合可以通过光(光交联)、温度或氧化还原反应引发,优选地,自由基聚合是光交联。优选地,光交联是 UV 交联反应。

[0091] 典型地,在 PEDGE 和 HA-ADH 存在下 HA 水凝胶的制备是化学交联反应。典型地,在存在 HA-MA 和没有另外的交联剂下 HA 水凝胶的制备是光交联反应。光交联可能需要光引发剂的存在。光引发剂可以在将其加入到加载的囊泡的溶液 / 混悬液之前与 HA-水凝胶前体混合。备选地,HA 水凝胶前体和光引发剂可以顺序地或同时加入到包含加载的囊泡的溶液中。然后,通过将包含加载的囊泡、HA 水凝胶前体和光引发剂的溶液 / 混悬液暴露于适当的照射而起始光交联反应。根据本发明的光引发剂优选是下式的 Irgacure 2959:

[0092]



[0093] 使用 HA-MA 的光交联 HA 水凝胶制备的示例性方案报告在图 5 中。

[0094] 施用方法

[0095] 依据施用方法,可以用适当的赋形剂相应地制备包含本发明的 HA 水凝胶的药物制剂。适当的药物制剂可以是片剂、胶囊、溶液如注射液、混悬剂、霜剂的形式。

[0096] 上文讨论的 HA 水凝胶制剂可以通过注射施用,更具体地通过皮下、皮内、眼内或肌肉内注射、口服或局部施用。在癌症治疗中,它们还可以局部递送(例如,脊髓内或肿瘤内)。本发明的 HA 水凝胶含有有效量的药物、蛋白质或肽或核酸、准确的剂量将随着患者因素而不同,所述患者因素如年龄、性别、总体状况等。本领域技术人员能够容易地考虑到这些因素并且利用它们来确定有效的治疗浓度,而无需过度实验。

[0097] 根据本发明的 HA 水凝胶可以有利地在原位制备。换言之,交联可以恰好在将所述水凝胶施加到关注部位之前发生。

[0098] 根据本发明的且如上文公开的透明质酸 (HA) 水凝胶以可控速率递送药物或蛋白

质或肽或核酸,用于多种临床和外科手术应用,包括但不限于,眼科(例如,青光眼,角膜,眼部炎症,玻璃体视网膜和医学视网膜疾病)和皮肤病学病症。

[0099] 定义

[0100] 如本文使用的,术语“C₁₀-C₂₂烷基”是指分别含有 10-22 个碳原子的饱和的、直链-或支链-烃基等。C₁₀-C₂₂烷基基团的实例包括,但不限于,C₁₀,C₁₂,如月桂基基团,C₁₄,C₁₆基团。

实施例

[0101] 实施例 1:制备拉坦前列素加载的脂质体;延长抗青光眼药物拉坦前列素(Ltp)的释放的持续时间

[0102] Ltp 是一种疏水药物。为了制备 Ltp 加载的 EPC 脂质体,在圆底烧瓶中将 0.5mM 浓度的 Ltp 和 10mm EPC 溶解在以 2:1(v/v) 比率的氯仿:甲醇的溶剂混合物中(药物与脂质比为 0.05)。手动混合该药物-脂质溶液,并且使用保持在 40°C 水浴上达 2 小时的旋转蒸发器从烧瓶中去溶剂。获得薄的、干燥的药物-脂质薄膜,并将该薄膜使用 PBS(pH7.4)缓冲液水合。通过在保持在 60°C 的水浴中手动摇动 10-15 分钟将所述薄膜完全水合,以形成多层囊泡(MLV)。通过安装在工作台顶部挤压机上的尺寸为 0.2 μm 和 0.08 μm 的聚碳酸酯滤器,将 MLV 混悬液挤压 15 次,以获得 Ltp 加载的 EPC 的大型多层囊泡(LUV)(尺寸~100nm)。

[0103] 实施例 2:制备甲基丙烯酸酯 HA(HA-MA)+Ltp 加载的 EPC 溶液

[0104] 取 20mg 或 40mg 冷冻干燥的 HA-MA 并直接溶解在 1ml Ltp 加载的 EPC 脂质体混悬液中,并且允许在室温搅拌过夜,以分别制备 2% (w/v) 或 4% HA-MA 溶液。

[0105] 实施例 3:制备己二酸二酰肼 HA(HA-ADH)+Ltp 加载的 EPC 溶液

[0106] 取 40mg 冷冻干燥的 HA-ADH 并直接溶解在 1ml Ltp 加载的 EPC 脂质体混悬液中,并且允许在室温搅拌过夜,以制备 4% (w/v) 的 HA-ADH 溶液。

[0107] 实施例 4:通过离子型胶凝(Ionotropic Gelation)制备脱乙酰壳聚糖/5-FU 纳米颗粒

[0108] 材料:脱乙酰壳聚糖 100kDa(US 样品),脱乙酰壳聚糖(Sigma:20-200cps),三聚磷酸钠(TPP),亲水药物(5-FU)

[0109] 装置:IKA 高架搅拌器,磁力搅拌器,Thermo 离心机,超离心机

[0110] 方案 I:

[0111] § 制备在 1% 乙酸中的 1mg/mL 脱乙酰壳聚糖-5FU(亲水药物)溶液,并且使用 0.22 μm 滤器过滤(100mL)

[0112] § 制备在超纯水中的浓度为 0.5mg/mL 的三苯基膦(TPP),并且使用 0.22 μm 滤器过滤(50mL)

[0113] § 通过加入 5M NaOH 将脱乙酰壳聚糖溶液的 pH 调节为 4.6 至 4.8

[0114] § 在使用 IKA 高架搅拌器以 1200rpm 搅拌下在 30 分钟内将 TPP 溶液逐滴加入到脱乙酰壳聚糖溶液中,并且继续搅拌 30 分钟

[0115] § 以 25000rpm 离心所述溶液,将沉淀物重新分散,并且使用 Malvern zeta 尺寸仪测量尺寸。

[0116] 观察结果：在按照上述方案制备的所有批次中，约 90% 的颗粒具有 50 至 140nm 的尺寸范围。

[0117] 实施例 5：具有和不具有 Ltp-EggPC 脂质体 - 化学交联的 HA 水凝胶

[0118] EggPC 是形成脂质体的脂质。使用文献中描述的标准方法将拉坦前列素 (Ltp) 加载到 eggPC 中。然后，将这些脂质体与 HA-ADH 和环氧交联剂 PEGDE 混合，并且允许静置过夜。然后定量拉坦前列素的释放。制备具有拉坦前列素加载（无脂质体）的 HA 水凝胶。然后，定量拉坦前列素的释放。

[0119] 测量从具有和不具有脂质体的 HA- 水凝胶的累积 Ltp 释放。结果报道在图 4 中。

[0120] 清楚地，与直接分散在水凝胶中的药物相比，拉坦前列素加载的脂质体更缓慢地释放药物。

[0121] 实施例 6：用于 5-FU 的结膜下 (sub-conjunctival) 可控释放的基于 PLGA 微粒的系统

[0122] 通过复乳剂技术制备加载有 5-FU 的 PLGA 微粒。然后将微粒冻干并且分散在 HA 前体溶液 (HA-MA) 中。Irgacure 用作引发剂。然后 UV 交联，得到其中分散有加载了 5-FU 的 PLGA 微粒的 HA 水凝胶。批次制剂公开在表 1 中：

[0123]

批次制剂	IV	PVA 的 pH	%收率	%加载	% EE
批次 11 - 400mg PLGA + 20mg 5Fu (40% PLGA)	0.4E	1.7	51.25	2.0	39.4
批次 10- 300mg PLGA + 20mg 5Fu (30% PLGA)	0.4E		41.67	3.5	52.2
批次 6 - 200mg PLGA + 20mg 5Fu (20% PLGA)	0.4		20	3.7	37

[0124] 图 7 报告了获得的微粒的 SEM 图像。

[0125] 图 8 显示三个批次在 15 天时间期内的释放分布。

[0126] 然后，将批次 6 的水凝胶与分散在 HA-MA 水凝胶中的 5-FU 的制剂 (5-FU 不含 / 无颗粒) 和分散在 HA-MA 溶液中的 5-FU 进行比较。可以清楚地看出，结合加载有 5-FU 的 PLGA 微粒延迟药物的释放。(图 9) 特别地，图 9 显示如果加载在溶液中 (无 X- 连接) 或从交联的凝胶中，5-FU 在几天内完全释放。

[0127] 实施例 7：可 UV 交联的水凝胶

[0128] 将疏水药物在交联之前结合到凝胶中，并且测量其释放分布。另外，还将含有相同的疏水药物的脂质体在交联之前结合到凝胶前体中，并且也定量由此产生的释放分布。特别地，拉坦前列素用作药物，并且 HA-MA 用作 HA 官能化部分。水凝胶是 4% (w/v) 的 HA-MA 水凝胶。数据显示在图 6 中。

[0129] 可以清楚看出,将脂质体结合在水凝胶中延迟了药物的释放,并且导致在 2 周内的几乎线性的(理想的)释放分布。这一原理可以应用于首先结合在脂质体/胶束中然后结合在水凝胶中的疏水药物。

[0130] 本文示例性描述的发明可以适当地在不存在本文没有具体公开的任何一个要素或多个要素、一种限制或多种限制下实施。因此,例如,术语“包含”、“包括”、“含有”等应被扩大地且没有限制地解读。另外,本文所用的术语和表达用作描述的术语,而没有限制,并且使用此类术语或表达并不意欲排除所示的或所述的特征的任何等价物或其部分,但是应该认识到,在所要求保护的发明范围内可能有多种改变。因此,应该理解,尽管已经通过示例性的实施方案和任选的特征具体公开了本发明,但本领域技术人员可以采用本文中公开的实施例的修改和改变,并且这样的修改和改变被认为在本发明的范围之内。

[0131] 本文已经宽泛地和概括性地描述了本发明。落入总体公开内容的每个更狭小的范围和子分组也形成本发明的一部分。这包括从概述中去除任何主题的附加条件或否定限制的本发明的一般描述,而不管本文中是否具体陈述所去除的内容。

[0132] 其他实施方案在所附权利要求之内。另外,在本发明的特征或负面依据马库什基团进行描述时,本领域技术人员应该认识到,本发明由此也关于马库什基团的任意个体成员或成员子组进行描述。

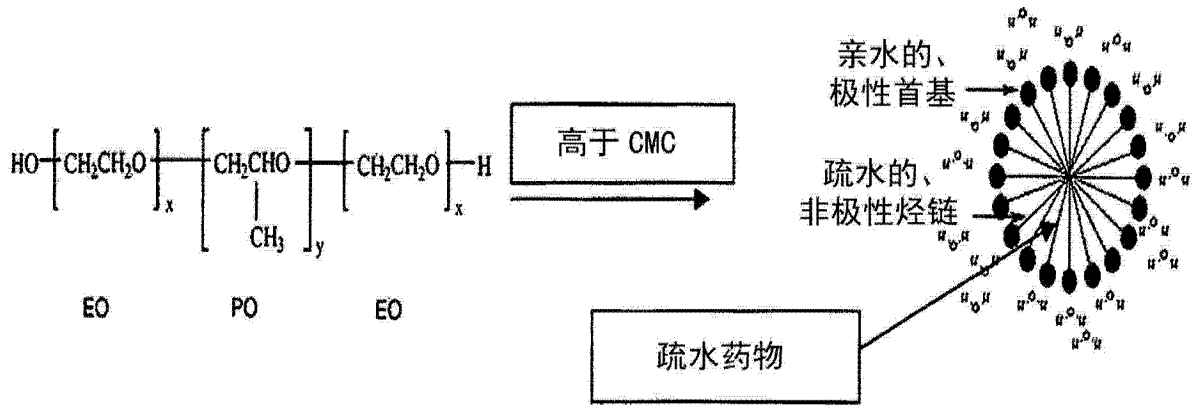


图 1

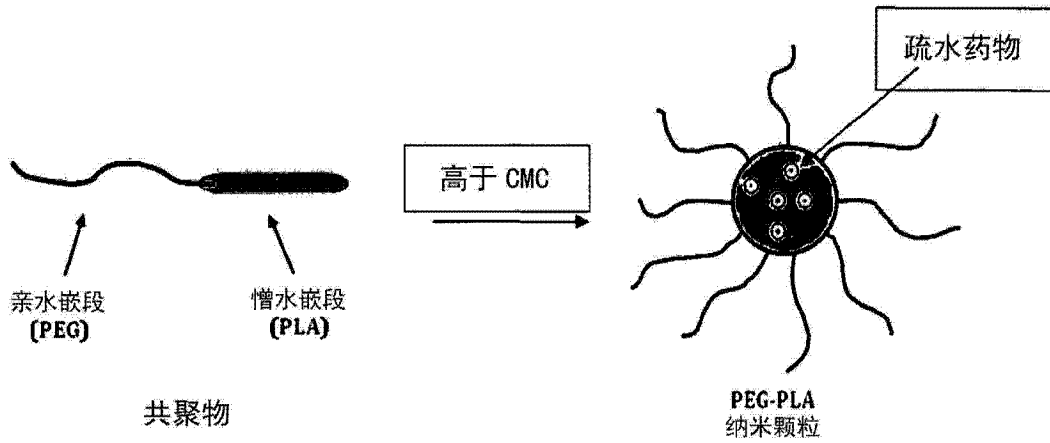
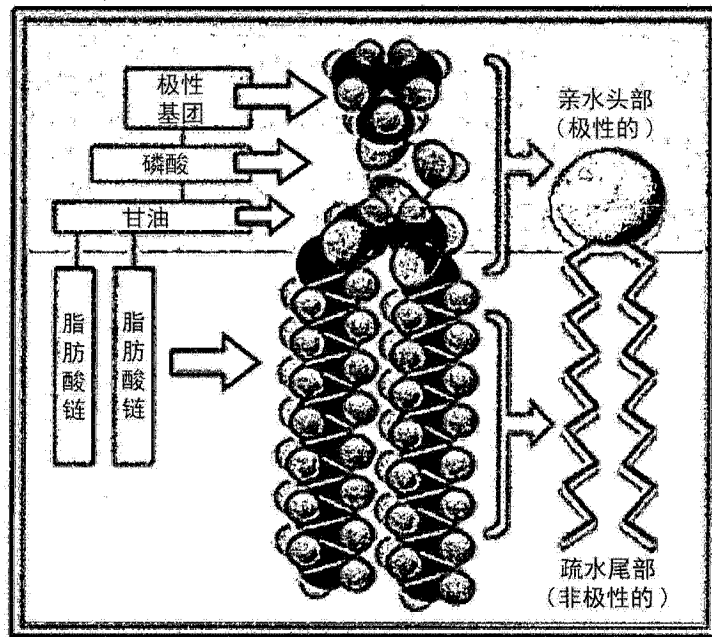


图 2



磷脂

图 3a

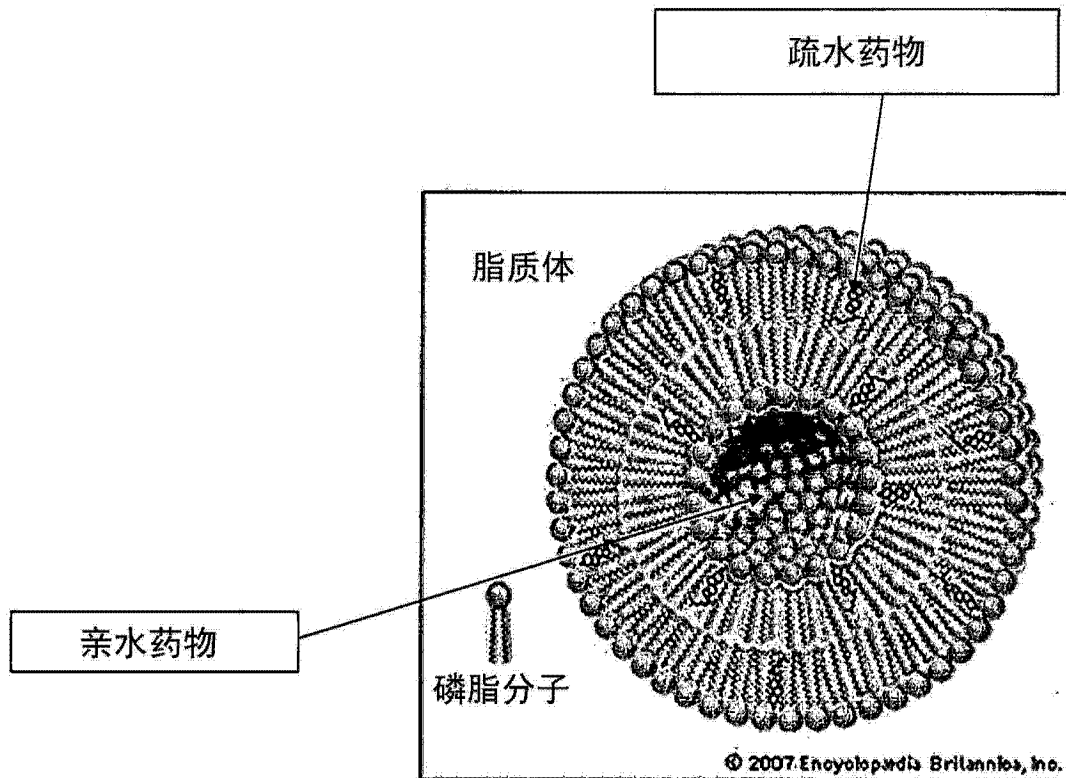


图 3b

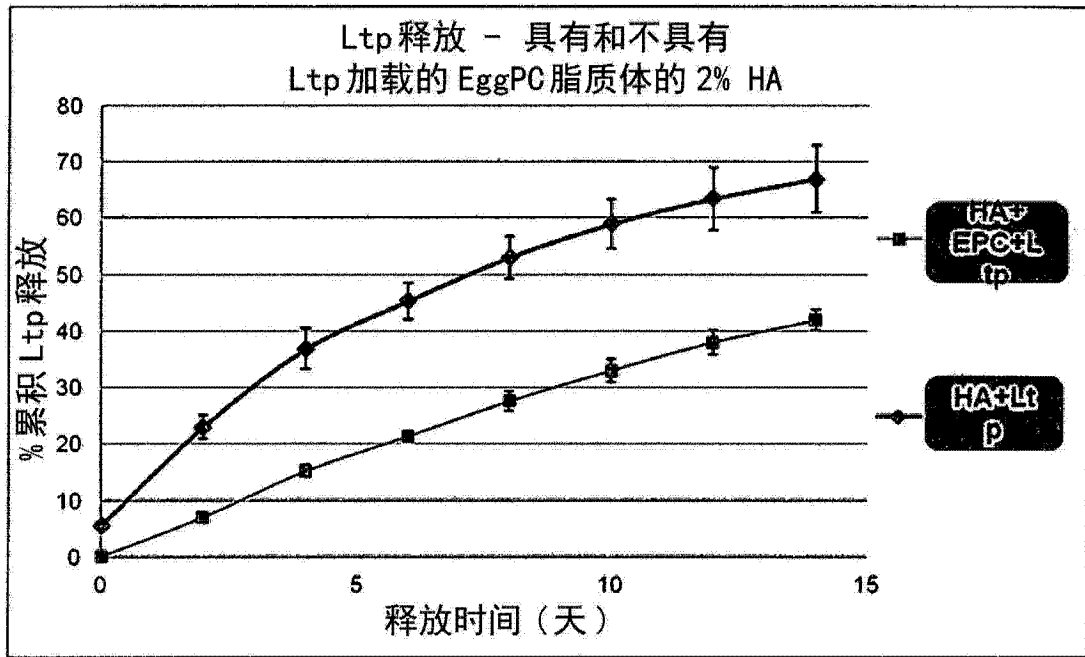


图 4

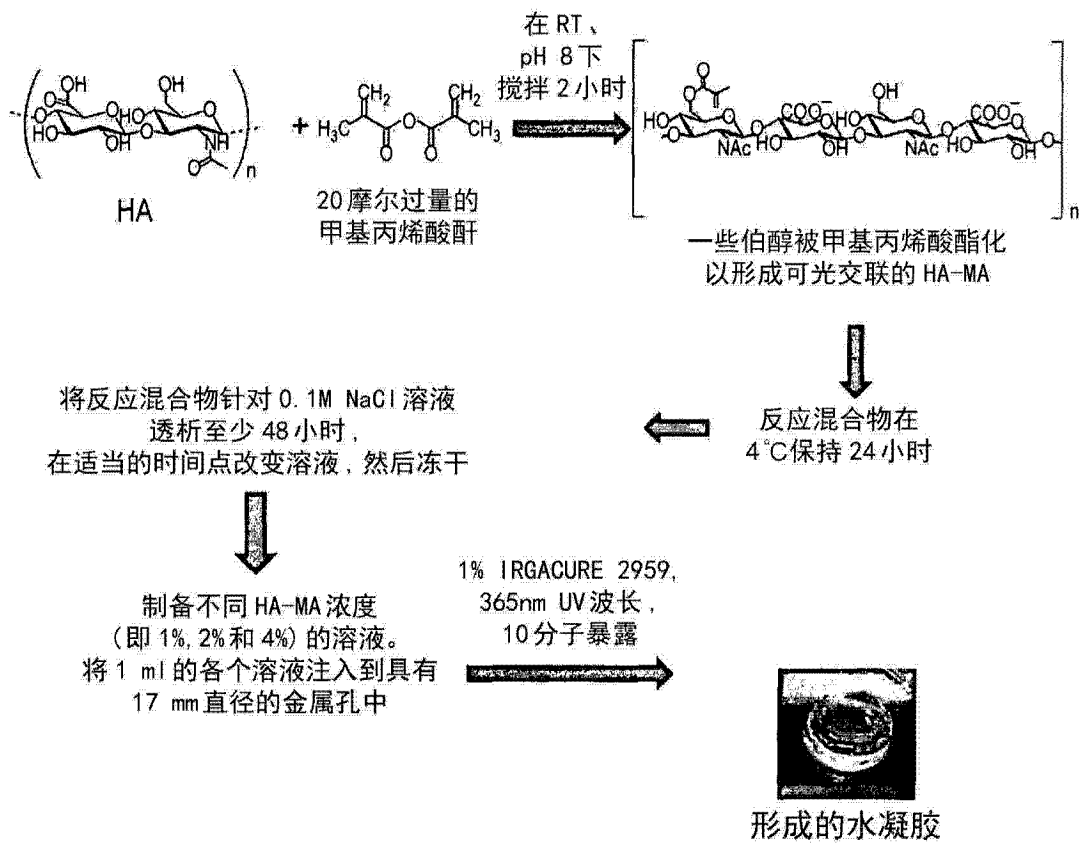


图 5

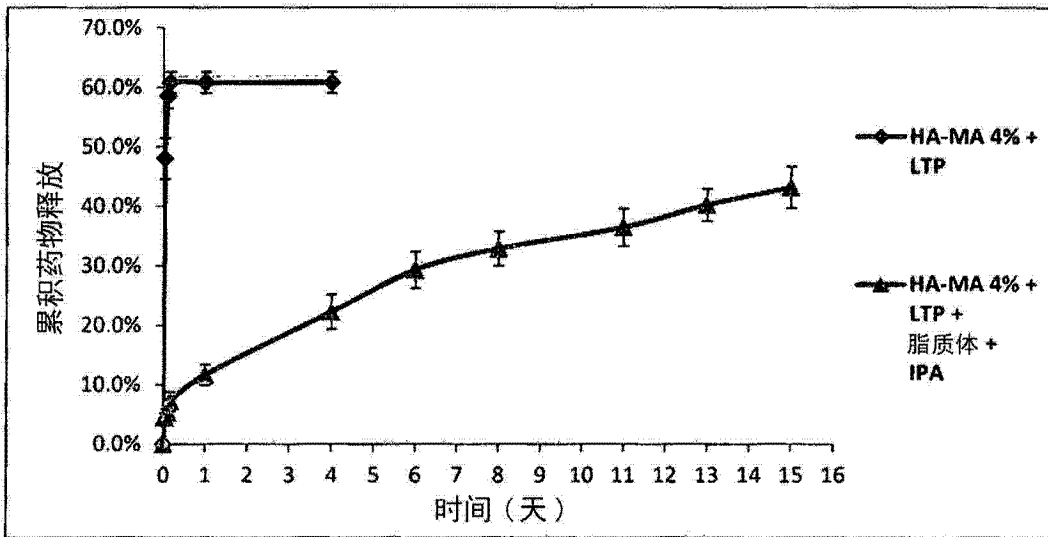


图 6

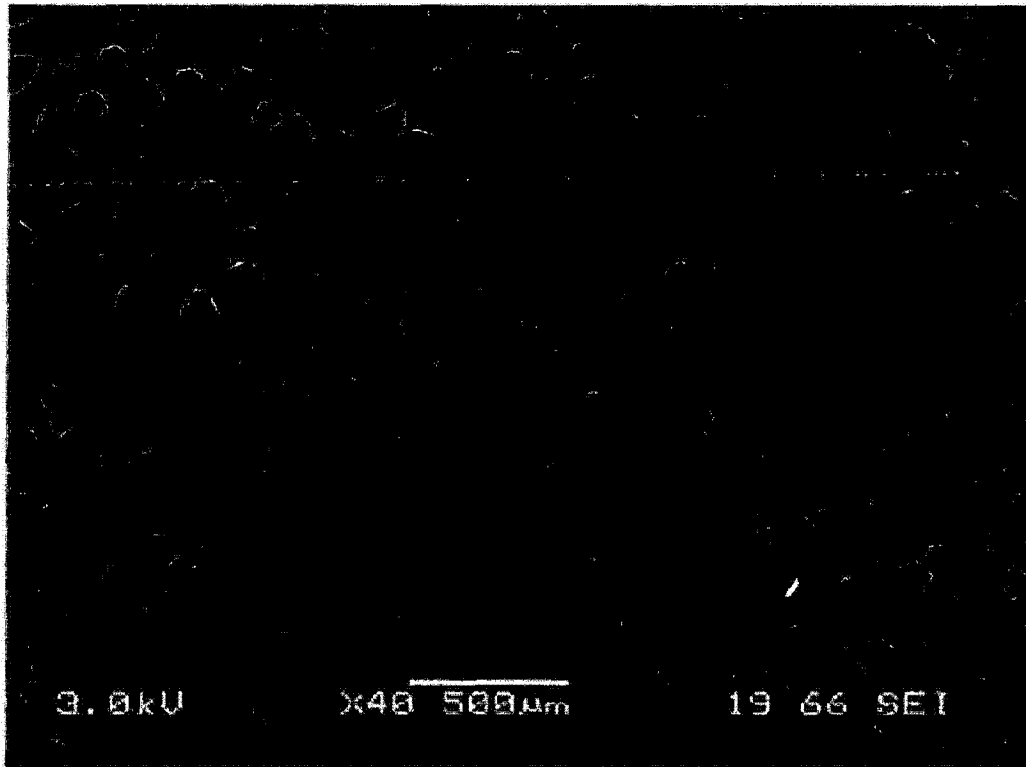


图 7

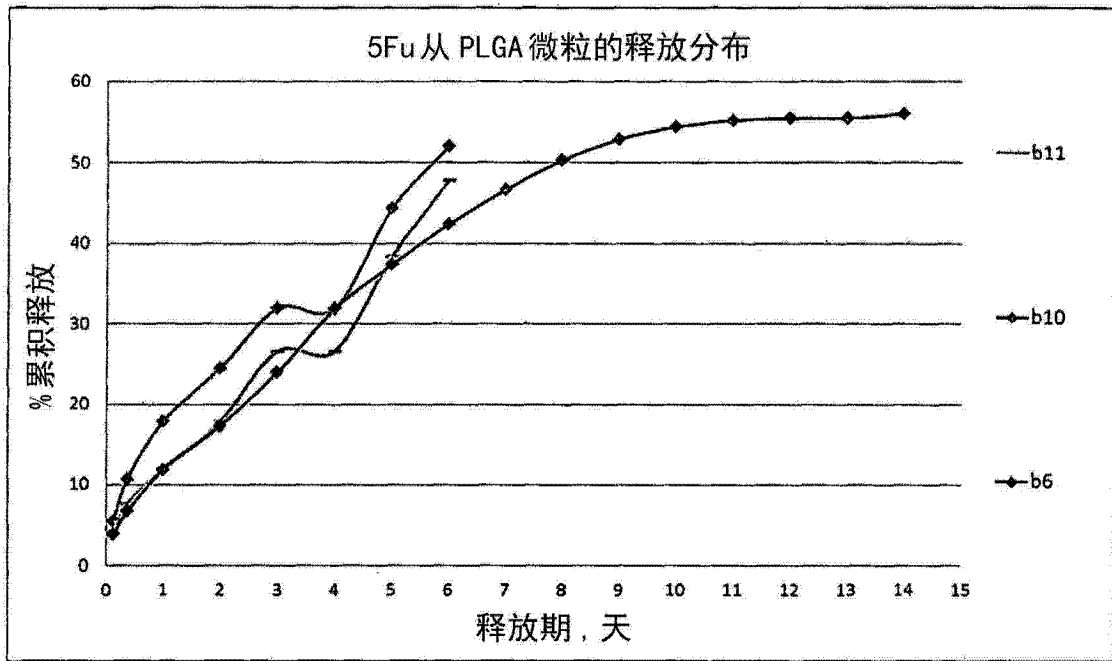


图 8

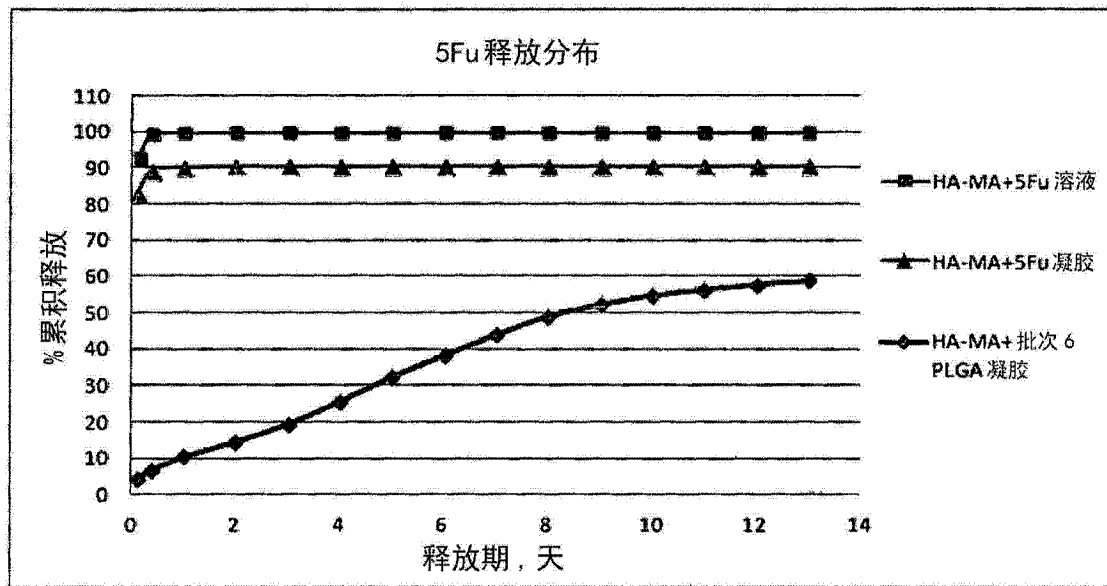


图 9