



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102397535 A

(43) 申请公布日 2012.04.04

(21) 申请号 201010284783.2

A61P 3/10 (2006.01)

(22) 申请日 2010.09.15

(71) 申请人 中国科学院生物物理研究所
地址 100101 北京市朝阳区大屯路 15 号

(72) 发明人 梁伟 魏秀莉 于继兵

(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 王旭

(51) Int. Cl.

A61K 38/28 (2006.01)

A61K 47/34 (2006.01)

A61K 47/24 (2006.01)

A61K 9/16 (2006.01)

A61K 9/19 (2006.01)

A61K 9/10 (2006.01)

C07K 14/62 (2006.01)

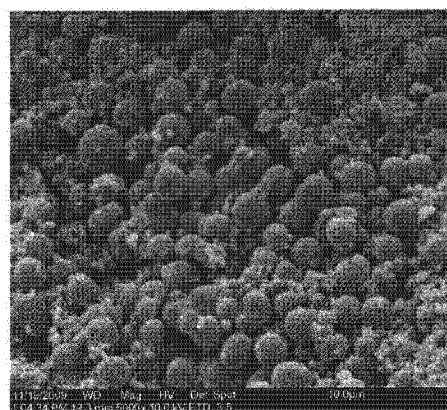
权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 2 页

(54) 发明名称

胰岛素结晶微球、其混悬剂、以及制备方法

(57) 摘要

本发明提供一种胰岛素结晶微球、其混悬剂以及制备方法。该胰岛素结晶微球采用液间成球结晶技术,利用胰岛素具有等电点性质制备。胰岛素结晶微球的平均粒径为 1-10 μm ,冷冻干燥后的胰岛素结晶微球混悬在 PEG、磷脂等保护剂中形成胰岛素结晶微球混悬剂。本申请所述胰岛素结晶微球的制备过程中不涉及任何高分子化学材料及有机溶剂,混悬剂中也未加入任何蛋白酶抑制剂或促吸收剂,且结晶微球的制备方法对胰岛素的生物活性无影响。大鼠服用此胰岛素结晶微球混悬剂 4h 后表现出较强的降血糖效果。可作为胰岛素的口服或其它非注射途径制剂。



1. 一种胰岛素结晶微球的制备方法,其特征在于包括如下步骤:
 - (1) 胰岛素加入盐溶液中,滴加冰醋酸并搅拌至胰岛素完全溶解,加入适量的聚乙二醇,搅拌溶解;胰岛素与聚乙二醇的重量比为 1 : 20-200;
 - (2) 调节步骤(1)中的溶液 pH 至 3.5-4.5,析出沉淀;
 - (3) 加热并搅拌步骤(2)中的溶液至沉淀完全溶解;
 - (4) 将溶液放置室温后调 pH 至 5.0-6.0,1-10℃下放置,再次析出沉淀;
 - (5) 离心、洗涤、分离沉淀,得胰岛素结晶微球。
2. 根据权利要求 1 所述的胰岛素结晶微球的制备方法,其特征在于还进一步包含如下步骤:
 - (6) 将所得胰岛素结晶微球混悬于聚乙二醇溶液中,冷冻干燥,得到胰岛素结晶微球的冻干粉形态。
3. 根据权利要求 1 所述的胰岛素结晶微球的制备方法,其特征在于步骤(1)所述的盐溶液为 NaCl 溶液。
4. 根据权利要求 1 所述的胰岛素结晶微球的制备方法,其特征在于步骤(1)所述的聚乙二醇为聚乙二醇 2000 或聚乙二醇 4000。
5. 根据权利要求 1 所述的胰岛素结晶微球的制备方法,其特征在于步骤(3)所述的加热步骤的温度为 55-65℃。
6. 根据权利要求 1 所述的胰岛素结晶微球的制备方法,其特征在于步骤(5)所述的洗涤过程为用 0.5% NaCl 洗涤 3 次,然后采用 0.5% 聚乙二醇 2000 溶液洗涤 3 次。
7. 根据权利要求 2 所述的胰岛素结晶微球的制备方法,其特征在于所述的聚乙二醇溶液为聚乙二醇 2000 或聚乙二醇 4000。
8. 一种胰岛素结晶微球,其特征在于所述胰岛素药物结晶微球由权利要求 1-7 任一项所述方法制备获得。
9. 一种胰岛素结晶微球混悬剂,其特征在于由权利要求 8 所述的胰岛素结晶微球与聚乙二醇、磷脂混悬组成,其中所述胰岛素结晶微球与聚乙二醇、磷脂的重量 / 体积比 (g/ml) 为 1 : 1-100,磷脂与聚乙二醇中的重量 / 体积比 (g/ml) 为 0.001-0.05 : 1。
10. 根据权利要求 9 所述的胰岛素结晶微球混悬剂,其特征在于所述聚乙二醇的分子量为 200-600。
11. 根据权利要求 9 所述的胰岛素结晶微球混悬剂,其特征在于所述磷脂为磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰肌醇或磷脂酰丝氨酸。
12. 根据权利要求 9 所述的胰岛素结晶微球混悬剂,其特征在于所述混悬剂中磷脂与聚乙二醇中的重量 / 体积比 (g/ml) 为 0.005-0.05 : 1。
13. 一种如权利要求 9-12 所述的胰岛素药物结晶微球混悬剂的制备方法,其特征在于将权利要求 8 所述胰岛素药物结晶微球混悬于含磷脂的 PEG 溶液中,得到胰岛素微球混悬剂。
14. 权利要求 8 所述的胰岛素药物结晶微球或权利要求 9-13 所述的胰岛素药物结晶微球混悬剂在制备口服降血糖药物中的应用。

胰岛素结晶微球、其混悬剂、以及制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于医药领域,涉及一种胰岛素结晶微球混悬剂及其制备方法。更具体而言,涉及一种采用液间成球结晶技术制备的胰岛素结晶微球混悬剂及其制备方法。

背景技术

[0002] 目前,糖尿病的发病率正在逐年增加,成为仅次于心血管疾病和癌症的第三大致死性疾病。胰岛素自 1922 年首次用于治疗糖尿病后,由于其独特的降血糖疗效,迄今为止是胰岛素依赖性糖尿病患者的首选药。胰岛素作为蛋白质与多肽药物,口服时易被胃肠道的蛋白水解酶降解,且分子量较大不易透过生物膜等因素,口服时的生物利用度很低,不能发挥应有的降血糖作用。目前,除了 Generex 公司的颊贴膜产品 OralIn-Lyn™ 已在印度与列厄瓜多尔上市外,其它所有的胰岛素制剂都通过注射给药。这不仅给患者带来很大的经济负担,影响了患者及其家属的生活质量,同时频繁长期注射用药还会产生诸多不良反应如:胰岛素浮肿、低血糖反应、肥大性脂肪营养不良及皮下脂肪萎缩等。

[0003] 目前有关胰岛素的非注射给药包括透皮给药、肺部吸入给药、鼻腔给药、口服及颊粘膜给药等。肺部吸入型胰岛素受到长期应用安全性和远期疗效的困扰,Exubera® 自动撤出市场在一定程度上对吸入型胰岛素的研制带来了阴影。胰岛素的口服给药途径可模拟生理性胰岛素分泌,重建生理状态下门静脉胰岛素浓度和外周循环胰岛素浓度近似 1 : 5 的比例,因此,口服输送系统是胰岛素最理想的非注射给药途径,避免了注射疼痛及不便,患者的依从性强。胰岛素口服输送系统要解决的关键问题是如何防止胰岛素在胃肠消化道内不被酶破坏的难题。目前报道的有关胰岛素口服输送系统的制备方法有以下几类:(1) 加入吸收促进剂:吸收促进剂包括蛋白酶抑制剂与渗透促进剂,常用的吸收促进剂包括胆酸盐、表面活性剂、杆菌肽与氨基酸衍生物等。但长期使用吸收促进剂可损伤胃肠道上皮,影响营养物质吸收,还可导致细菌毒素的进入,有可能引起全身感染及毒性反应;(2) 通过制剂技术保护胰岛素在胃肠道的稳定性以及促进其吸收:这些制剂技术包括将胰岛素包载于脂质体、固体微球/纳米粒、胶束、水凝胶、乳剂等。但上述制剂技术均存在一定的局限性:脂质体的稳定性差;制备纳米粒/微球时常使用到有机溶剂、高温/高压,这些不良条件有可能胰岛素丧失活性,并且有些聚合物材料在体内可引起炎症反应等;(3) 对胰岛素进行化学修饰或合成前体药物:采用脂肪酸对胰岛素进行化学修饰,可以强其亲脂性,提高其在肠道的吸收,但改变胰岛素的结构或合成前体药物非常复杂,如果结构修饰改变了其与受体结合位点的结合,可能影响其生物活性。

[0004] 综上所述,虽然有关胰岛素口服输送系统的研究报告、专利很多,但最终实现临床应用的却微乎其微,主要问题是口服给药剂量偏高,生物利用度较低,难于在临床上实际推广应用。在胰岛素口服输送系统的相关研究中,主要集中于如何克服胃肠道中的酶屏障及肠上皮屏障,增加肠上皮的通透性及打开紧密连接等,而忽略了胃肠道表面的粘液层对药物吸收的影响。人类的肠道粘液层由粘蛋白、水、电解质、脱落的上皮细胞、脂类、盐、酶、微生物及其产物组成,厚度达数百微米。磷脂使粘液层呈现疏水特性,粘蛋白与含水量决定了

粘液层的粘弹性质。含水量微小的变化可使粘液的流变性质产生非常显著的变化。粘液层中含有大量的酯酶、蛋白消化酶,是胰岛素被酶降解的主要场所。

[0005] 许多研究表明粘液层除了保护基底膜免受肠内容物中危险因素的伤害外,还是影响药物吸收的潜在屏障。对于口服输送系统而言,不管药物的理化性质如何,药物通过上皮吸收之前,首先必须通过粘液层。除中性小分子药物外,粘液层的厚度可显著影响大分子与带电荷分子药物进入基底组织的速率。例如,与当量厚度的水相比,粘液层可显著延迟氢离子的扩散。研究表明当粒子大于 60nm 时即无法穿粘液屏障,但研究发现 PEG 可防止大粒子(粒径 > 500nm) 附著于粘液层表面,粒子可快速穿越粘液层,而 PEG 未修饰的粒子则会吸附在粘液层表面并聚集成一团,无法进入粘液层中。

发明内容

[0006] 本发明的目的是在确保胰岛素口服输送系统有效性与安全性的双重条件下,制备一种新型胰岛素口服输送系统,即胰岛素药物结晶微球混悬剂。

[0007] 本发明提供了一种胰岛素药物结晶微球混悬剂及其制备方法,其中一定密度与尺寸的胰岛素药物结晶微球采用液间成球结晶技术制备。冻干所述胰岛素结晶微球获得胰岛素结晶微球冻干粉后,将其混悬在 PEG、磷脂等保护剂中即得胰岛素微球混悬剂。微球的制备不借助于任何聚合物与有机溶剂,从而保证了输送系统的安全性。PEG 与磷脂有利于药物微球迅速通过肠粘液层,避免被蛋白酶降解,增加与肠淋巴组织的接触,促进药物吸收。

[0008] 本发明所制备的胰岛素结晶微球混悬剂迅速通过肠粘液层的速度可以通过 PEG 的链长、磷脂的种类及改变 PEG 与磷脂之间的比例实现。

[0009] 本发明提供了一种胰岛素结晶微球的制备方法,其特征在于包括如下步骤:(1) 胰岛素加入盐溶液中,滴加冰醋酸并搅拌至胰岛素完全溶解,加入适量的聚乙二醇,搅拌溶解;胰岛素与聚乙二醇的重量比为 1 : 20-200;(2) 调节步骤(1)中的溶液 pH 至 3.5-4.5,析出沉淀;(3) 加热并搅拌步骤(2)中的溶液至沉淀完全溶解;(4) 将溶液放置室温后调 pH 至 5.0-6.0, 1-10℃(优选 4℃)下放置,再次析出沉淀;和(5) 离心、洗涤、分离沉淀,得胰岛素结晶微球。

[0010] 本发明的方法还进一步包含如下步骤:(6) 将所得胰岛素结晶微球混悬于聚乙二醇溶液中,冷冻干燥,得到胰岛素结晶微球的冻干粉形态。所述的聚乙二醇溶液为聚乙二醇 2000 或聚乙二醇 4000。

[0011] 在步骤(1)中,所述的盐溶液优选为 NaCl 溶液,所述的聚乙二醇为聚乙二醇 2000 或聚乙二醇 4000。

[0012] 在步骤(3)中,所述的加热步骤的温度为 55-65℃。

[0013] 在步骤(5)中,所述的洗涤过程为用 0.5% NaCl 洗涤 3 次,然后采用 0.5% 聚乙二醇 2000 溶液洗涤 3 次。

[0014] 本发明还涉及一种胰岛素结晶微球,所述胰岛素药物结晶微球由上述方法制备获得。

[0015] 本发明还涉及一种胰岛素结晶微球混悬剂,由上述的胰岛素结晶微球与聚乙二醇、磷脂混悬组成,其中所述胰岛素结晶微球与聚乙二醇、磷脂的重量/体积比(g/ml)为 1 : 1-100,磷脂与聚乙二醇中的重量/体积比(g/ml)为 0.001-0.05 : 1。

[0016] 在胰岛素结晶微球混悬剂中,所述聚乙二醇的分子量为 200-600,所述磷脂为磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰肌醇或磷脂酰丝氨酸。所述混悬剂中磷脂与聚乙二醇中的重量/体积比(g/ml)为 0.005-0.05 : 1。

[0017] 本发明还涉及胰岛素药物结晶微球混悬剂的制备方法,将上述胰岛素药物结晶微球混悬于含磷脂的 PEG 溶液中,得到胰岛素微球混悬剂。

[0018] 本发明还涉及上述的胰岛素药物结晶微球或上述的胰岛素药物结晶微球混悬剂在制备口服降血糖药物中的应用。

[0019] 本发明的药物结晶微球的大小为 10 μ m 以下,优选为或 5 μ m 以下。

[0020] 本发明的优点是:可以减少胰岛素在微晶化过程中因 pH 与温度变化导致的变性,活性丧失。冷冻干燥步骤对胰岛素的生物活性无影响。胰岛素药物结晶微球的口服给药剂量适当,正常大鼠口服给药剂量为 50IU/kg 时,降血糖百分率达 25%,具有广泛的临床应用前景,可以避免糖尿病患者长期注射给药产生的系列副作用。

[0021] 因此,本发明的胰岛素药物微球混悬剂可用于口服给药。

[0022] 结合实施方案对本发明的其他目的和优点做进一步详细的描述,使其更为清楚。

附图说明

[0023] 图 1 胰岛素结晶微球冻干粉的扫描电镜照片

[0024] 图 2 胰岛素结晶微球混悬剂的粒度分析仪测定图

[0025] 图 3 空腹麻醉正常大鼠十二指肠给药后的血糖水平变化图

[0026] 图 4 自由饮食清醒正常大鼠十二指肠给药后的血糖水平变化图

具体实施方式

[0027] 实施例 1

[0028] 0.5% NaCl 水溶液 20ml,加入 50mg 胰岛素,滴加冰醋酸搅拌溶解后加入 3g PEG 2000,搅拌溶解,用 1M 醋酸钠水溶液调 pH 至 3.9,磁力搅拌下加热至 65℃溶解,放置室温后用 1M 醋酸钠水溶液调 pH 至 5.6。置 4℃放置 12h,1000r/min (TDZ5-WS 多管架自动平衡离心机,rotor-2),离心 10min,所得沉淀用 0.5% NaCl 水溶液洗涤 3 次,然后采用 0.5% PEG2000 水溶液洗涤 3 次,将所得沉淀混悬在 1ml 0.5% PEG 2000 水溶液中,冷冻干燥得胰岛素的结晶微球。采用低温扫描电镜及基于固体颗粒的离心沉降和光透射原理的粒度仪测定胰岛素结晶微球的结构形态(图 1)及粒径分布(图 2)。采用 HPLC 测定微球中胰岛素的含量,依据动物试验的需要将胰岛素结晶微球通过研磨、混悬在含 2.0%大豆磷脂的 PEG 200 溶液中即得胰岛素微球混悬液。

[0029] 实施例 2

[0030] 0.8% NaCl 水溶液 40ml,加入 100mg 胰岛素,滴加冰醋酸搅拌溶解后加入 6g PEG 2000,搅拌溶解,用 1M 醋酸钠水溶液调 pH 至 4.2,磁力搅拌下加热至 60℃溶解,放置室温后用 1M 醋酸钠水溶液调 pH 至 5.5。置 4℃放置 16h,1000r/min (TDZ5-WS 多管架自动平衡离心机,rotor-2),离心 10min,所得沉淀用 0.8% NaCl 水溶液洗涤 3 次,然后采用 0.5% PEG2000 水溶液洗涤 3 次,将所得沉淀混悬在 1.5ml 0.5% PEG 2000 溶液中,冷冻干燥得胰岛素结晶微球(图 1,图 2)。采用 HPLC 测定微球中胰岛素的含量,依据动物试验的需要将胰岛素结

晶微球通过研磨、混悬在含 1.0%大豆磷脂的 PEG 400 溶液中即得胰岛素结晶微球混悬液。

[0031] 实施例 3

[0032] 0.9% NaCl 水溶液 20ml, 加入 50mg 胰岛素, 滴加冰醋酸搅拌溶解后加入 3g PEG 4000, 搅拌溶解, 用 2M 醋酸钠水溶液调 pH 至 4.1, 磁力搅拌下加热至 60℃溶解, 放置室温后用 2M 醋酸钠水溶液调 pH 至 5.7。置 4℃放置过夜, 1000r/min (TDZ5-WS 多管架自动平衡离心机, rotor-2), 离心 10min, 所得沉淀用 0.5% NaCl 水溶液洗涤 3 次, 然后采用 0.5% PEG4000 水溶液洗涤 3 次, 将所得沉淀混悬在 1ml 0.5% PEG 4000 水溶液中, 冷冻干燥得胰岛素的结晶微球 (图 1, 图 2)。采用 HPLC 测定微球中胰岛素的含量, 依据动物试验的需要将胰岛素结晶微球通过研磨、混悬在含 2.0%大豆磷脂的 PEG 200 溶液中即得胰岛素微球混悬液。

[0033] 实施例 4

[0034] 0.7% NaCl 水溶液 80ml, 加入 200mg 胰岛素, 滴加冰醋酸搅拌溶解后加入 9g PEG 2000, 搅拌溶解, 用 2M 醋酸钠水溶液调 pH 至 4.0, 磁力搅拌下加热至 60℃溶解, 放置室温后用 2M 醋酸钠水溶液调 pH 至 5.7。置 4℃放置过夜, 1000r/min (TDZ5-WS 多管架自动平衡离心机, rotor-2), 离心 10min, 所得沉淀用 pH 5.70.5% NaCl 水溶液洗涤 3 次, 然后采用 0.5% PEG 4000 水溶液洗涤 3 次, 将所得沉淀混悬在 2.5ml 0.5% PEG 4000 水溶液中, 冷冻干燥得胰岛素的结晶微球 (图 1, 图 2)。采用 HPLC 测定微球中胰岛素的含量, 依据动物试验的需要将胰岛素结晶微球通过研磨、混悬在含 1.0%大豆磷脂的 PEG 400 溶液中即得胰岛素微球混悬液。

[0035] 实施例 5

[0036] 0.5% NaCl 水溶液 50ml, 加入 100mg 胰岛素, 滴加冰醋酸搅拌溶解后加入 7g PEG 2000, 搅拌溶解, 用 1M 氢氧化钠水溶液调 pH 至 3.9, 磁力搅拌下加热至 58℃溶解, 放置室温后用 1M 氢氧化钠水溶液调 pH 至 5.6。置 4℃放置过夜, 1000r/min (TDZ5-WS 多管架自动平衡离心机, rotor-2), 离心 10min, 所得沉淀用 pH 5.60.5% NaCl 水溶液 3 次, 然后采用 0.5% PEG4000 水溶液洗涤 3 次, 将所得沉淀混悬在 2ml 0.5% PEG 4000 水溶液中, 冷冻干燥得胰岛素的结晶微球 (图 1, 图 2)。采用 HPLC 测定微球中胰岛素的含量, 依据动物试验的需要将胰岛素结晶微球通过研磨、混悬在含 1.0%大豆磷脂的 PEG 400 溶液中即得胰岛素微球混悬液。

[0037] 实施例 6

[0038] 健康雄性 SD 大鼠 15 只, 体重 180-200g, 随机分成 3 组, 第一组给予 0.5ml PBS 作为对照, 第二组给予胰岛素溶液 ($50\text{IU} \cdot \text{kg}^{-1}$), 第三组给予胰岛素药物微球混悬剂 ($50\text{IU} \cdot \text{kg}^{-1}$)。实验前禁食 16h, 可自由饮水。腹腔注射戊巴比妥钠麻醉大鼠, 将大鼠腹部朝上固定在平板上, 沿大鼠腹中线打开腹腔, 十二指肠给药, 具体操作如下: 在距幽门约 5cm 处注射给药。为了避免溶液外溢, 应尽量采用小号针头, 且顺着肠道方向向下注射给药。定时补充注射戊巴比妥钠, 保证大鼠在试验过程中一直处于麻醉状态。分别于 0、0.5、1、2、3、4、6、8、10h 大鼠尾静脉取血, 用血糖仪测定血糖值 (图 3)。由图可知, 三组在给药后 30min 时, 因手术刺激血糖均呈上升趋势, 随后下降。对照组与胰岛素溶液组的血糖变化趋势基本一致, 胰岛素药物微球混悬剂组的血糖水平明显低于对照组与胰岛素溶液组, 且血糖水平在 4-8h 内呈下降趋势, 8h 时血糖降至最低水平, 约为初始值的 30%左右, 随后血糖开始上升。结果表明, 麻醉空腹大鼠十二指肠给予胰岛素药物微球混悬剂后, 有明显的降血糖作

用。

[0039] 实施例 7

[0040] 健康雄性 SD 大鼠 15 只, 体重 180-200g, 随机分成 3 组, 第一组给予 0.5ml PBS 作为对照, 第二组给予胰岛素溶液 ($50\text{IU} \cdot \text{kg}^{-1}$), 第三组给予胰岛素药物微球混悬剂 ($50\text{IU} \cdot \text{kg}^{-1}$)。实验前自由饮食。腹腔注射戊巴比妥钠麻醉大鼠, 将大鼠腹部朝上固定在平板上, 沿大鼠腹中线打开腹腔, 十二指肠给药, 具体操作如下: 在距幽门约 5cm 处注射给药。为了避免溶液外溢, 应尽量采用小号针头, 且顺着肠道方向向下注射给药。随后将大鼠腹部进行手术缝合, 大鼠约于 1.5h 左右完全清醒, 分别于 3、4、6、8、10h 大鼠尾静脉取血, 用血糖仪测定血糖值 (图 4)。由图可知, 对照组与胰岛素溶液组的血糖变化趋势基本一致, 与给药前的血糖水平相比变化不大, 而胰岛素药物微球混悬剂组的血糖水平明显低于对照组与胰岛素溶液组, 4h 时血糖降至最低水平, 约为初始值的 25% 左右, 随后血糖开始上升。

[0041] 结果表明, 自由饮食清醒大鼠十二指肠给予胰岛素药物微球混悬剂后, 有明显的降血糖作用。从图 3 与图 4 中可以看出, 胰岛素微球混悬剂的降血糖效果与与实验动物的状态密切相关, 对空腹麻醉大鼠及自由饮食大鼠的降血糖作用存在明显差别。

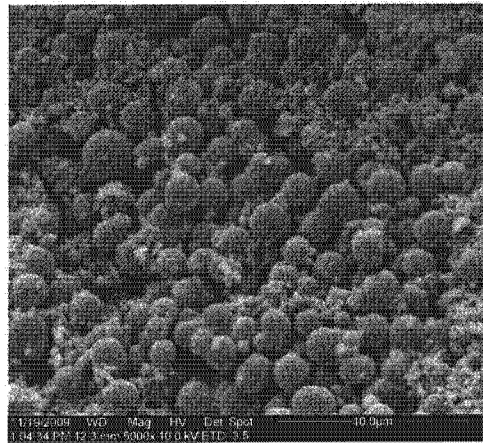


图 1

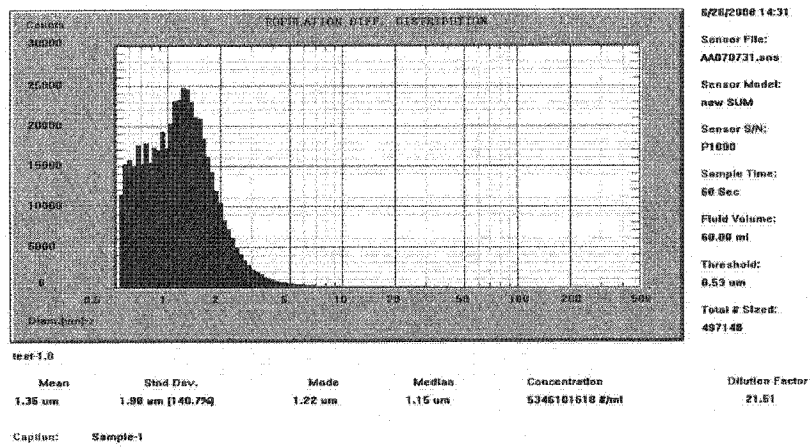


图 2

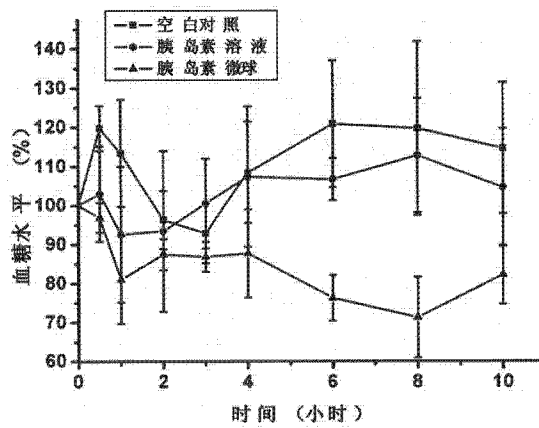


图 3

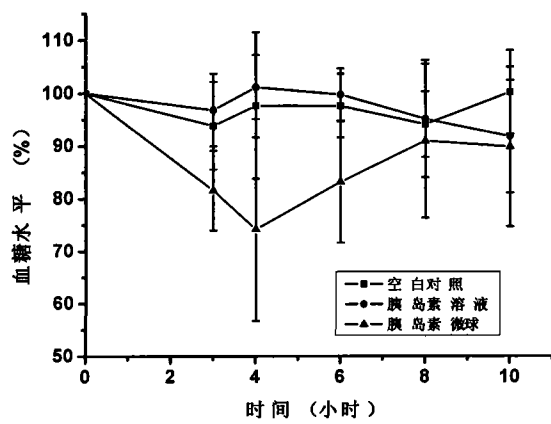


图 4