



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103120795 A

(43) 申请公布日 2013.05.29

(21) 申请号 201210417502.5

A61K 9/14 (2006.01)

(22) 申请日 2012.10.26

A61K 31/12 (2006.01)

(66) 本国优先权数据

A61P 29/00 (2006.01)

201110332009.9 2011.10.27 CN

(71) 申请人 四川大学

地址 610065 四川省成都市武侯区一环路南  
一段 24 号

(72) 发明人 苟马玲 魏于全 赵霞 钱志勇

(74) 专利代理机构 成都虹桥专利事务所(普通  
合伙) 51124

代理人 梁鑫

(51) Int. Cl.

A61K 47/46 (2006.01)

A61K 47/34 (2006.01)

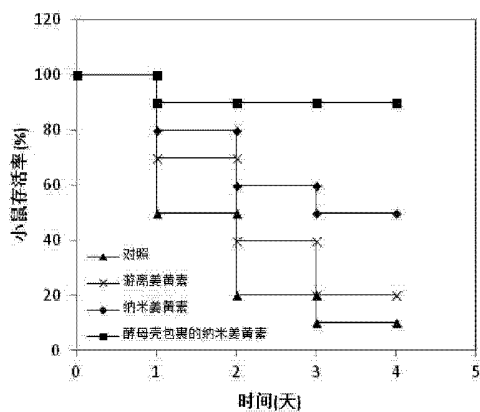
权利要求书1页 说明书4页 附图3页

(54) 发明名称

一种靶向巨噬细胞的制剂

(57) 摘要

本发明公开了一种靶向巨噬细胞的制剂,属于药物制剂领域。本发明所要解决的技术问题是克服现有的 CYW 药物传输时的缺陷。本发明解决技术问题的技术方案是提供一种新的靶向巨噬细胞的制剂。该靶向巨噬细胞的制剂是由囊状的酵母细胞壁内装载自组装的载药纳米粒得到。本发明还提供靶向巨噬细胞的制剂的制备方法,该方法是将共聚物和所述待装载的药物送入囊状的酵母细胞壁内部进行自组装形成载药纳米粒,以得到囊状的酵母细胞壁装载自组装的载药纳米粒的靶向巨噬细胞的制剂。本发明获得了可高度靶向巨噬细胞的口服制剂。克服了以前 CYW 装载药物的方法对这些疏水性药物的适应性较差,以及容易泄露等长期困扰本领域的技术问题,并能实现缓释功能。



1. 靶向巨噬细胞的制剂,是由囊状的酵母细胞壁内装载自组装的载药纳米粒得到,所述自组装的载药纳米粒是由共聚物装载药物自组装形成的纳米粒。

2. 根据权利要求1所述的靶向巨噬细胞的制剂,其特征在于所述共聚物为:聚乳酸/聚乙二醇共聚物、聚己内酯/聚乙二醇共聚物、PLGA/PEG等可降解、可自组装的两亲性聚合物。

3. 根据权利要求1所述的靶向巨噬细胞的制剂,其特征在于所述药物为:可作用于巨噬细胞发挥治疗效果的疏水性药物。

4. 根据权利要求3所述的靶向巨噬细胞的制剂,其特征在于:所述的可作用于巨噬细胞发挥治疗效果的疏水性药物为姜黄素、木犀草素、雷公藤甲素、他克莫司或利福平中的至少一种。

5. 根据权利要求1所述的靶向巨噬细胞的制剂,其特征在于所述囊状的酵母细胞壁为将酵母粉先通过NaOH碱溶液处理,然后采用HCl酸溶液处理,最后通过异丙醇和丙酮洗涤获得。

6. 制备靶向巨噬细胞的制剂的方法,是将共聚物和所述待装载的药物送入囊状的酵母细胞壁内部进行自组装形成载药纳米粒,以得到囊状的酵母细胞壁装载自组装的载药纳米粒的靶向巨噬细胞的制剂。

7. 根据权利要求6所述的制备靶向巨噬细胞的制剂的方法,其特征在于所述共聚物为:聚乳酸/聚乙二醇共聚物、聚己内酯/聚乙二醇共聚物或PLGA/PEG共聚物。

8. 根据权利要求7所述的制备靶向巨噬细胞的制剂的方法,其特征在于:所述的药物为疏水性药物为姜黄素、木犀草素、雷公藤甲素、他克莫司或利福平中的至少一种。

9. 根据权利要求6所述的制备靶向巨噬细胞的制剂的方法,其特征在于。

10. 根据权利要求7所述的制备靶向巨噬细胞的制剂的方法,其特征在于:所述共聚物为MPEG-PCL时,所述药物为姜黄素或香豆素时,将姜黄素或香豆素和MPEG-PCL溶解在DMSO中,加入干的囊状的酵母细胞壁,使酵母细胞壁充分溶胀,让姜黄素和MPEG-PCL的DMSO溶液进入酵母壳内部;然后将此体系加入到水中,充分反应后,离心弃上清,所得沉淀即为靶向巨噬细胞的制剂。

## 一种靶向巨噬细胞的制剂

### 技术领域

[0001] 本发明属于药物制剂领域,具体涉及一种靶向巨噬细胞的制剂。

### 背景技术

[0002] 很多疾病是由严重炎症反应引起,如风湿性关节炎、炎性肠病等,需要应用抗炎药物。巨噬细胞可在很多炎性疾病中促进致病性炎症反应,是很多抗炎药物的靶细胞。采用新型的药物传递系统将抗炎药物靶向到巨噬细胞,可提高抗炎药物的疗效并降低其毒副作用;这为抗炎药物的研发提供了新的思路。口服是最重要的给药途径之一,开发一种口服的可特异靶向巨噬细胞的抗炎药具有较强的科学意义和良好的临床应用前景。

[0003] 目前研发的抗炎药物多数为小分子药物,这些小分子药物又有很多是疏水性的。疏水性药物由于水溶性差严重影响了其成药性。纳米生物技术为提高活性物质的成药性提供了新的策略。科学家们采用纳米粒装载疏水性药物以解决其水溶性差的问题,成功获得了多种纳米药物制剂,部分已进入临床研究或上市(如:)。同时,科学家们还采用具有靶向性的纳米粒装载疏水性药物,将疏水药物靶向传递到靶器官、靶细胞或靶细胞器,以提高药物的效果,降低药物的毒副作用,为药物研发提供了新思路。通常设计靶向纳米药物的策略有:1)直接将药物连接在靶向配体上形成自组装的靶向纳米药物;2)采用具有靶向性的纳米粒装载药物;3)采用具有靶向性的微囊装载纳米药物。因此,我们可以采用不同的策略设计出具有靶向性的纳米药物。

[0004] 由于机体天然免疫的存在,巨噬细胞表面的病原识别受体可以识别微生物的结构和表面的分子,从而可对病原体进行特异性的识别和吞噬。酵母是一类重要的真菌,具有重要的药用和食用价值。酵母经口服后可以特异性的被肠道的M细胞摄取,进入淋巴道,然后高效率的被巨噬细胞吞噬。这个过程主要由于酵母的特殊结构和表面的分子可被M细胞、巨噬细胞等识别进而被特异性摄取。Ostroff GR采用化学的方法处理酵母,获得了主要成分由 $\beta$ -葡聚糖、甘露糖、壳多糖等多糖组成的囊状酵母细胞壁(CYW),发现其保留了一些酵母的特性(如粒度和表面分子),经口服后可被M细胞表面高表达的乳糖酶基鞘氨醇识别,特异性的被M细胞摄取并进入淋巴系统,然后被巨噬细胞表面高表达的CR3和Dectin-1识别,被巨噬细胞特异性摄取。因此,CYW可作为一种新型的安全、高效的靶向巨噬细胞的药物载体。

[0005] 目前CYW已被用于药物传输,这些药物基本都是采用CYW干粉与药物溶液混合,通过CYW的溶胀,药物被吸进CYW内部,然后采用一些技术阻止药物快速漏出CYW,最终实现CYW对药物的装载和缓释。Aouadi等人采用CYW装载基因,通过静电作用让RNA和PEI在CYW内部形成复合物,防止RNA从CYW内部快速漏出。Aouadi等人采用CYW装载蛋白,通过控制CYW的孔径来实现蛋白的缓释;Soto等人采用CYW传输小分子抗结核菌药,首先将药物吸入CYW,然后改变pH让药物发生沉淀,最后采用海藻酸钠或壳聚糖填充CYW,以防止药物的快速漏出,实现CYW对小分子药物的缓释。

[0006] 由于目前的很多药物是疏水性的,而以前的CYW装载药物的方法对这些疏水性药

物的适应性较差。本发明中,我们发明了一种 CYW 装载疏水性小分子药物的技术,将载药纳米粒装入 CYW 的内部自组装,实现 CYW 靶向传递疏水性小分子药药物,获得了新型的口服靶向巨噬细胞药物,为炎症及其引起的相关疾病的治疗提供了新选择。

## 发明内容

[0007] 本发明要解决的技术问题是克服现有的 CYW 药物传输时的缺陷。

[0008] 本发明解决上述技术问题的技术方案是提供一种新的靶向巨噬细胞的制剂。该靶向巨噬细胞的制剂是由囊状的酵母细胞壁内装载自组装的载药纳米粒得到。

[0009] 其中,上述自组装的载药纳米粒是由共聚物装载药物自组装形成的纳米粒。所述纳米粒一般为胶束。

[0010] 其中,上述靶向巨噬细胞的制剂中所述共聚物为可降解、可自组装的两亲性聚合物。比如为:聚乳酸/聚乙二醇共聚物、聚己内酯/聚乙二醇共聚物或 PLGA/PEG 共聚物。

[0011] 其中,上述靶向巨噬细胞的制剂中所述药物为:可作用于巨噬细胞发挥治疗效果的疏水性药物。

[0012] 其中,上述靶向巨噬细胞的制剂中所述可作用于巨噬细胞发挥治疗效果的疏水性药物为:姜黄素、木犀草素、雷公藤甲素、他克莫司或利福平中的至少一种。这些药物均为可作用于巨噬细胞发挥治疗效果的疏水性药物。

[0013] 其中,上述的靶向巨噬细胞的制剂中所述囊状的酵母细胞壁(CYW)为化学的方法处理酵母得到。主要由酵母细胞壁的多糖组成。

[0014] 其中,上述的囊状的酵母细胞壁为将酵母粉先通过 NaOH 碱溶液处理,然后采用 HCl 酸溶液处理,最后通过异丙醇和丙酮洗涤获得。

[0015] 其中,上述的靶向巨噬细胞的制剂中的载药纳米粒是在囊状的酵母细胞壁内部进行的自组装。

[0016] 其中,上述的靶向巨噬细胞的制剂是将共聚物和所述待装载的药物送入囊状的酵母细胞壁内部进行自组装形成载药纳米粒的得到。

[0017] 其中,上述靶向巨噬细胞的制剂中所述的共聚物为 MPEG-PCL,药物为姜黄素或香豆素。

[0018] 其中,上述的 MPEG-PCL 共聚物中 PEG 链段的分子量可为 1000-5000 道尔顿,pcl 链段的分子量可为 1000-10000 道尔顿。

[0019] 本发明还提供了一种制备靶向巨噬细胞的制剂的方法。该方法是将共聚物和所述待装载的药物送入囊状的酵母细胞壁内部进行自组装形成载药纳米粒,以得到囊状的酵母细胞壁装载自组装的载药纳米粒的靶向巨噬细胞的制剂。

[0020] 其中,上述方法中所述共聚物为可降解、可自组装为纳米粒的两亲性聚合物。比如为:聚乳酸/聚乙二醇共聚物、聚己内酯/聚乙二醇共聚物或 PLGA/PEG 共聚物。

[0021] 其中,上述方法中所述药物为可作用于巨噬细胞发挥治疗效果的疏水性药物。

[0022] 其中,上述方法中所述的可作用于巨噬细胞发挥治疗效果的疏水性药物为姜黄素、木犀草素、雷公藤甲素、他克莫司或利福平中的至少一种。这些药物均是可作用于巨噬细胞发挥治疗效果的疏水性药物。

[0023] 其中,上述方法中所述的囊状的酵母细胞壁为将酵母粉先通过 NaOH 碱溶液处理,

然后采用 HCl 酸溶液处理,最后通过异丙醇和丙酮洗涤获得。

[0024] 其中,上述方法中所述的共聚物为 MPEG-PCL 时,所述药物为姜黄素或香豆素时,将姜黄素或香豆素和 MPEG-PCL 溶解在 DMSO 中,加入干的囊状的酵母细胞壁,使酵母细胞壁充分溶胀,让姜黄素和 MPEG-PCL 的 DMSO 溶液进入酵母壳内部;然后将此体系加入到水中,充分反应后,离心弃上清,所得沉淀即为靶向巨噬细胞的制剂。

[0025] 本发明的有益效果在于:创造性提供了一种新型的纳米靶向药物制剂,及其的制备方法,获得了可高度靶向巨噬细胞的口服制剂。克服了以前 CYW 装载药物的方法对这些疏水性药物的适应性较差,以及容易泄露等长期困扰本领域的技术问题,并能实现缓释功能,具有很好的应用前景,为本领域带来了一种新的选择。

## 附图说明

[0026] 图 1 本发明酵母细胞壁包裹的纳米姜黄素的制备示意图。A)通过化学处理方法制备酵母细胞壁;B)纳米姜黄素的自组装示意图;C)酵母细胞壁包裹的纳米姜黄素的制备示意图。

[0027] 图 2 酵母包裹的纳米姜黄素的表征。A)光学照片;B)荧光照片;C)体外释放曲线。

[0028] 图 3 酵母包裹的纳米药物经口服后特异性进入淋巴道。A)通过伊文思蓝标记淋巴管(LV:淋巴管,BV:血管);B)伊文思蓝特异性进入淋巴管的显微照片;C)肠系膜组织的非特异性绿色荧光;D)吸收了伊文思蓝的淋巴管发出红色荧光;E)口服酵母包裹的纳米香豆素后的肠系膜的显微照片;F)酵母包裹的纳米香豆素经口服后特异性进入淋巴管发出绿色荧光。

[0029] 图 4 酵母靶向巨噬细胞。A)巨噬细胞可高效摄取 FITC 标记的酵母细胞壁;B)酵母细胞壁包裹纳米香豆素增强巨噬细胞对纳米香豆素的摄取。

[0030] 图 5. 酵母细胞壁包裹纳米姜黄素增强口服姜黄素的抗炎效果。

## 具体实施方式

[0031] 以下结合附图对本发明进行具体的说明。

[0032] 实施例一囊状酵母细胞壁包裹的纳米姜黄素的制备和功效试验

[0033] 一. 酵母壳包裹的纳米姜黄素的制备和表征

[0034] 本实施例制备的是酵母细胞壁包裹的纳米姜黄素,该制剂是将姜黄素 20:180 的 MPEG<sub>2000</sub>-PCL<sub>2000</sub> 溶于 DMSO 中,加入 200 重量份酵母细胞壁,使充分溶胀,将该体系加入水中,离心,弃上清,将沉淀清洗,将获得的产物冻干,在 4 度保存,即得。

[0035] 首先通过化学处理方法制备酵母壳(图 1A)。将每 100g 面包酵母粉溶解于 1 升 NaOH (1M) 溶液中,在 80 度水浴搅拌半小时,然后通过离心(3000rpm,10min)收集酵母沉淀,再用一升纯净水洗一遍;将获得的酵母在 PH 为 3~4 的 HCl 溶液处理 1 小时(反应温度为 55 度),通过离心收集酵母壳,用异丙醇洗 4 遍,再用丙酮洗两遍,最后将产品吹干,大约获得 9g 白色酵母壳,即囊状酵母细胞壁(CYW)。

[0036] 然后制备酵母壳包裹的纳米姜黄素(图 1B)。将 MPEG-PCL (聚乙二醇-聚己内酯共聚物,本实例使用的是 MPEG<sub>2000</sub>-PCL<sub>2000</sub>,下标表示相应链段的分子量)和姜黄素的 DMSO 溶液加入到水中,会形成自组装的载姜黄素的 MPEG-PCL 纳米胶束(图 1B)。首先将每 20mg 姜

黄素和每 180mgMPEG—PCL 溶解在 1mL 的 DMSO 中,加入到 200mg 上述制备干酵母壳,使酵母壳充分溶胀,让姜黄素和 MPEG—PCL 的 DMSO 溶液进入酵母壳内部;然后将这种酵母壳液体在搅拌的条件下加入到 10mL 水中,5 分钟后,在 8000rpm 的速度下离心 30s,弃上清,将沉淀用清水洗 5 遍,然后将获得的产物冻干,在 4 度保存。

[0037] 通过激光粒度仪器测试,获得的酵母壳包裹的纳米姜黄素的颗粒大小均匀,平均粒度为 3.6 微米。图 2A 和图 2B 所示,由于将纳米姜黄素载入了酵母壳,可以看到酵母壳发出绿色荧光。通过 HPLC 方法测定,该姜黄素制剂的载药量为 2%。如果图 2C 所示,酵母壳包裹的纳米姜黄素可以缓慢释放姜黄素,酵母壳包裹的游离姜黄素不能实现对姜黄素的缓慢释放。

[0038] 2. 酵母包裹的纳米药物经口服后特异性进入淋巴道

[0039] 文献报道局部注射伊文思蓝可特异性进入淋巴道而不进入血管,我们向 Balb/c 小鼠腹腔注射 0.5mL 的伊文思蓝溶液(5mg/mL),4 小时后,可以观察到伊文思蓝特异性进入了肠系膜淋巴管(图 3A)。在显微镜下,也可以直接观察到蓝颜色的伊文思蓝进入淋巴管(图 3B)。而在绿色荧光下,淋巴管不会发出特异的绿色荧光(图 3C)。而由于伊文思蓝可以发出红色荧光,所以可以看到肠系膜淋巴管发出红色荧光(图 3D)。选择有绿色荧光的香豆素作为模型药物,采用制备酵母细胞壁包裹的纳米姜黄素的方法制备酵母细胞壁包裹的纳米香豆素;经过口服酵母壳包裹的纳米香豆素 3 小时后,可以观察到肠系膜上的血管并没有发出绿色荧光,而淋巴管出现了特异性的绿色荧光(图 3E,图 3F)。证明,酵母壳包裹的纳米药物可以特异性的被吸收进入淋巴管。

[0040] 二. 酵母壳将包裹的纳米药物靶向到巨噬细胞的验证试验

[0041] 向小鼠腹腔注射 1mL 的肉汤培养,2 天后,用 10mL 不含血清的 DMEM 培养基注入腹腔,用手按压小鼠腹部 5 分钟,无菌条件下,用注射器吸出腹腔洗液,1500rpm 离心 10min,再用无血清 DMEM 培养基洗两遍,大约获得  $5 \times 10^6$  个巨噬细胞。然后用含 10% 血清 DMEM 培养基重悬细胞,以  $5 \times 10^5$  个细胞数每孔铺六孔板,大约半小时,大多数巨噬细胞都贴壁,洗去培养基和悬浮细胞,然后加入纳米香豆素和酵母壳包被的纳米香豆素,以 100:1(酵母:巨噬细胞)比例,大约 1 小时,荧光显微镜观察,然后收集细胞做流式检测。结果发现巨噬细胞摄取的酵母壳包裹的纳米香豆素远远多于纳米香豆素(图 4B)

[0042] 三. 酵母壳包裹的纳米姜黄素的抗炎效果试验

[0043] 以 10 只 Balb/c 小鼠为一组,分为对照组,游离姜黄素组,纳米姜黄素组,酵母壳包裹的纳米姜黄素组四组,口服 100mg/kg 的剂量给药,LPS 以 400ug/ 只的量注射 Balb/c 小鼠诱导致死,观察小鼠生存期。结果发现酵母包裹的纳米姜黄素可以有效提高小鼠的生存期,极为明显的明显高于其余三组(结果见图 5)。说明本发明酵母壳包裹的纳米姜黄素克服了以前 CYW 装载药物的方法对疏水性药物的适应性较差,以及容易泄露等长期困扰本领域的技术问题,并能实现缓释功能,效果出人意料,具有很好的应用前景。

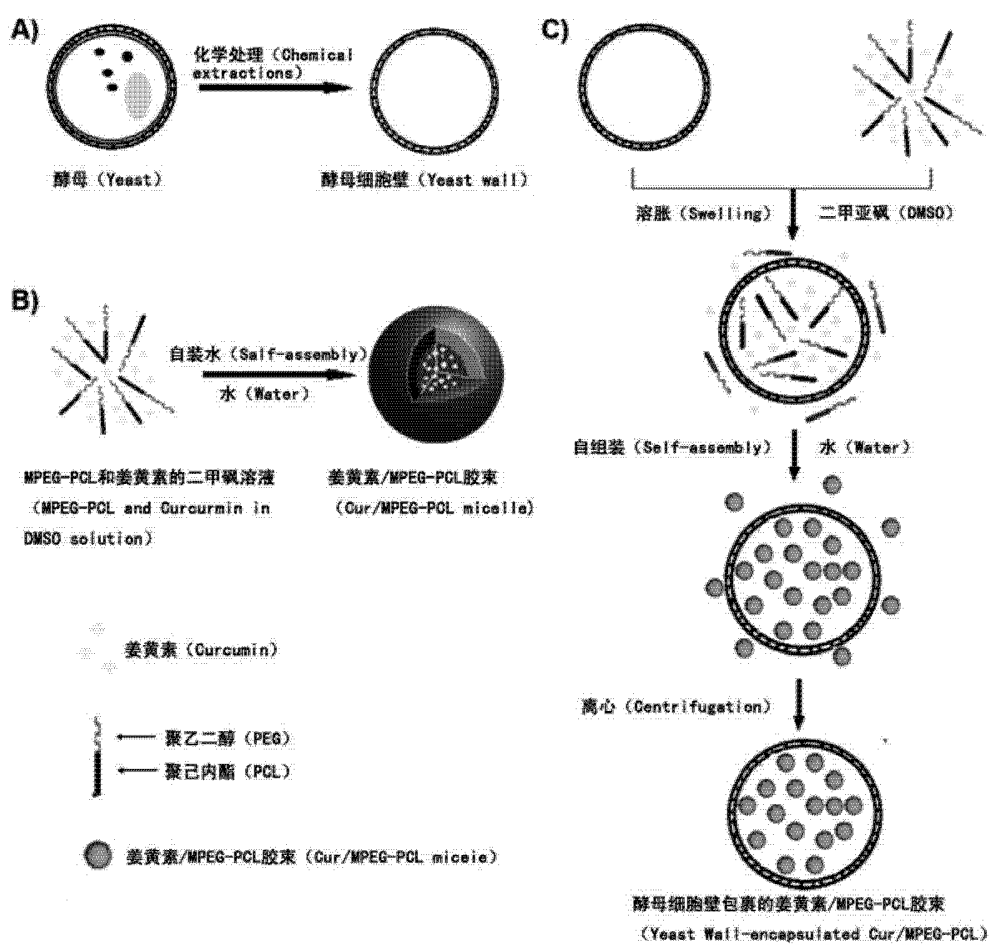


图 1

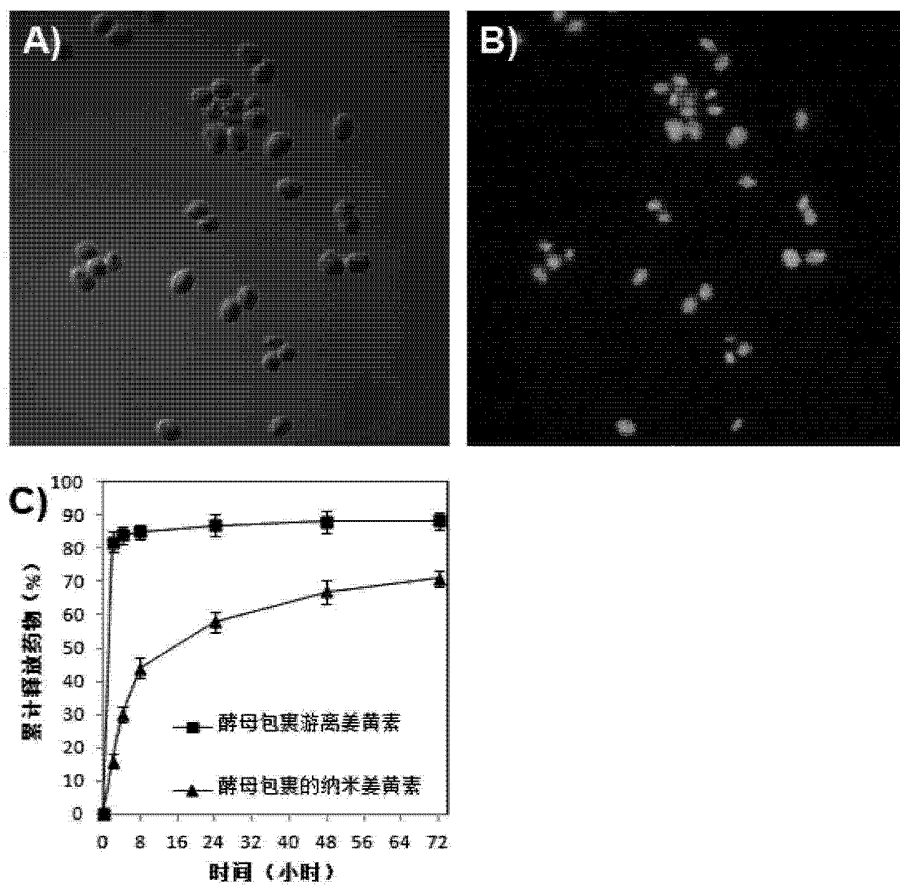


图 2

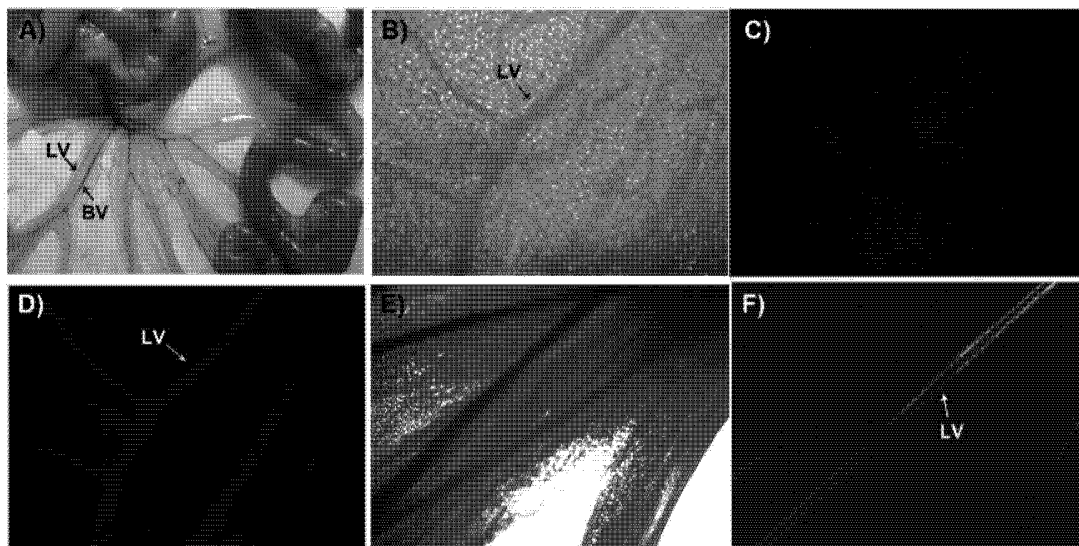


图 3



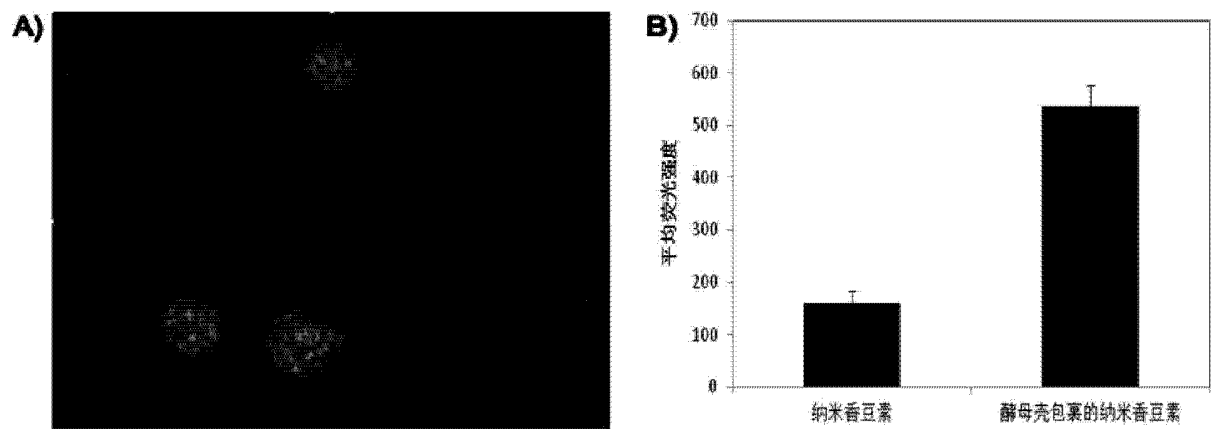


图 4

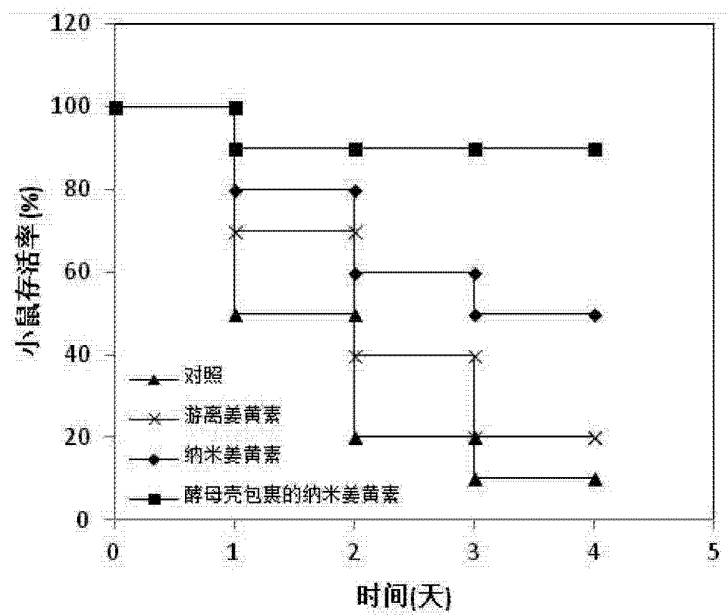


图 5