



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106102719 A

(43)申请公布日 2016. 11. 09

(21)申请号 201580006784.1

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

(22)申请日 2015.02.03

代理人 郑斌 彭鲲鹏

(30)优先权数据

14153705.0 2014.02.03 EP

PCT/EP2014/064449 2014.07.07 EP

(51)Int.Cl.

A61K 9/10(2006.01)

A61K 9/14(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2016.08.01

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2015/052202 2015.02.03

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/114164 EN 2015.08.06

(71)申请人 阿普拉诺药品有限公司

地址 德国慕尼黑

(72)发明人 维尔纳·布兰德

权利要求书3页 说明书17页 附图11页

(54)发明名称

天然材料的纳米混悬剂及其制备方法

(57)摘要

本公开内容涉及用于制备至少一种天然材料的纳米混悬剂的方法,其中所述方法包括以下步骤:(a)提供至少一种颗粒尺寸(D_{go})小于320 μm 的天然材料;(b)将步骤(a)的所述至少一种天然材料分散在溶剂中;以及(c)将步骤(b)的分散体研磨至颗粒尺寸(D_{90})小于1000nm。所述纳米混悬剂可用于制备药物。

1. 一种用于制备包含至少一种天然材料的纳米混悬剂的方法, 其中所述方法包括以下步骤:

- a. 提供至少一种颗粒尺寸(D_{100})小于 $320\mu\text{m}$ 的天然材料;
- b. 将步骤a. 的所述至少一种天然材料分散在溶剂中;
- c. 将步骤b. 的分散体研磨至颗粒尺寸(D_{90})小于 1000nm ($D_{90} < 1000\text{nm}$)。

2. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述至少一种天然材料选自植物、蓝细菌、藻类和真菌, 和/或其中所述天然材料不包含人参和/或纤维素纤维。

3. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述至少一种天然材料是所述天然材料的一部分或全部, 优选所述天然材料的全部。

4. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述纳米混悬剂包含至少两种天然材料的混合物。

5. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中在步骤a. 之前在步骤a. 1中干燥所述天然材料, 优选冻干和/或热干燥。

6. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中步骤a. 中提供的所述天然材料的含水量 w 低于 15% ($w < 15\%$), 优选低于 12% ($w < 12\%$), 更优选低于 10% ($w < 10\%$), 并且最优选低于 8% ($w < 8\%$)。

7. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中在步骤a. 1中的所述干燥之前和/或之后预研磨所述天然材料, 优选地在刀式研磨机中预研磨, 并且任选地筛分至颗粒尺寸(D_{100})小于 $320\mu\text{m}$ 。

8. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述溶剂是水, 优选蒸馏水, 或者水和乙醇的混合物。

9. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述纳米混悬剂是水性纳米混悬剂或基于水和乙醇的混合物的纳米混悬剂。

10. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中基于用于所述纳米混悬剂的溶剂的总量, 在步骤b. 中使所述至少一种天然材料以 0.5% 至 20% (w/w), 优选 2% 至 10% (w/w), 进一步优选 2% 至 5% (w/w)或 5% 至 10% (w/w)的浓度分散。

11. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中分散步骤b. 或研磨步骤c. 包括添加稳定剂, 优选地其中所述分散步骤b. 包括添加磷脂和/或聚山梨酯。

12. 根据权利要求11所述的方法, 其中所述分散步骤b. 包括添加 0.5% 至 2% (w/w)的量的聚山梨酯, 和/或其中所述聚山梨酯选自聚山梨酯80和聚山梨酯20。

13. 根据权利要求11所述的方法, 其中基于所述天然材料的总量, 所述分散步骤b. 包括添加 50% 至 200% (w/w)的量的磷脂, 优选地其中所述磷脂包含高达 95% (按重量计)磷脂酰胆碱和/或 20% 至 30% (按重量计)的溶血磷脂酰胆碱。

14. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中步骤c. 的所述研磨在湿式搅拌器式球磨机中进行。

15. 根据权利要求14所述的方法, 其中研磨步骤c. 包括在磨球直径为 0.5 至 1.5mm 的湿式球磨机, 优选湿式搅拌器式球磨机中的第一研磨步骤c. 1, 和在磨球直径为 0.3 至 0.4mm 的湿式球磨机, 优选湿式搅拌器式球磨机中的第二研磨步骤c. 2, 以及在磨球直径为 0.05 至 0.2mm 的湿式球磨机, 优选湿式搅拌器式球磨机中的第三研磨步骤c. 2。

16. 根据权利要求14所述的方法, 其中研磨步骤c. 包括在磨球直径为0.4至0.5mm的湿式球磨机, 优选湿式搅拌器式球磨机中的第一研磨步骤c.1, 和在磨球直径为0.05至0.2mm的湿式球磨机, 优选湿式搅拌器式球磨机中的第二研磨步骤c.2。

17. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中研磨步骤c. 包括在颗粒尺寸 $D_{90} < 9\mu\text{m}$, 优选 $D_{90} < 3\mu\text{m}$, 更优选 $D_{90} < 800\text{nm}$ 并且最优选 $D_{90} < 300\text{nm}$ 时添加稳定剂, 优选地其中所述稳定剂是静电稳定剂和/或空间稳定剂。

18. 根据权利要求11或17所述的方法, 其中所述稳定剂选自磷脂; 聚山梨酯; 聚合物, 例如均聚物、嵌段和接枝共聚物(如羟丙基纤维素(HPC)、羟丙基甲基纤维素(HPMC)和聚乙烯吡咯烷酮(PVP)); 非离子三嵌段共聚物, 例如泊洛沙姆(例如, **Kolliphor**[®] P407或泊洛沙姆188); 共聚聚乙烯吡咯烷酮; **Labrasol**[®]; **Gelucire**[®]; 明胶; 卵磷脂(磷脂); 阿拉伯胶; 胆固醇; 黄耆胶; 聚氧乙烯烷基醚; 聚氧乙烯蓖麻油衍生物; 聚氧乙烯失水山梨醇脂肪酸酯; 失水山梨醇脂肪酸酯; 聚乙二醇; 聚氧乙烯硬脂酸酯; 甘油单酯和甘油二酯; 胶体二氧化硅; 十二烷基硫酸钠; 硅酸镁铝; 三乙醇胺; 硬脂酸; 硬脂酸钙; 单硬脂酸甘油酯; 十六十八醇; 西土马哥乳化蜡; 短链醇和中链醇; **Labrafil**[®]; **Purol-oleique**[®]; 丙烷-1,2,3-三醇; 聚乙烯醇和二辛基磺基琥珀酸钠(DOSS), 优选地其中所述稳定剂选自聚山梨酯80、聚山梨酯20、**Kolliphor**[®] P407和泊洛沙姆188。

19. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述方法包括在研磨步骤c. 完成之后添加丙烷-1,2,3-三醇(甘油)。

20. 根据权利要求19所述的方法, 其中基于所述溶剂的总体积, 所述稳定剂是30%至100%(v/v)的量, 优选40%(v/v)或50%(v/v)的量的甘油。

21. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中在研磨步骤c. 之后使所述纳米混悬剂进一步在胶体仪中经受胶体化步骤d., 优选地添加氧, 其中所述纳米混悬剂并非必须包含丙烷-1,2,3-三醇。

22. 根据权利要求21所述的方法, 其中所述纳米混悬剂的氧浓度为20至30mg/l。

23. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中在步骤c. 之后以及任选地在步骤d. 之前或之后过滤所述纳米混悬剂, 优选地用无菌过滤器过滤, 进一步优选地过滤至颗粒尺寸小于450nm并且更优选小于220nm。

24. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述纳米混悬剂另外包含选自以下的至少一种化合物: 矫味剂、防腐剂、表面活性剂和渗透增强剂。

25. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中如通过动态光散射或激光衍射分析仪所测量的, 步骤b. 的所述分散体被研磨至颗粒尺寸(D_{90})小于500nm($D_{90} < 500\text{nm}$), 优选小于300nm($D_{90} < 300\text{nm}$), 进一步优选小于250nm($D_{90} < 250\text{nm}$)并且最优选小于200nm($D_{90} < 200\text{nm}$)。

26. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中在进一步的步骤e. 中通过蒸发溶剂, 优选地在干燥室中蒸发溶剂来使所述纳米混悬剂的浓度增加至所述天然材料的浓度为基于所述纳米混悬剂之总体积的10%至40%(w/w), 优选10%至20%(w/w)。

27. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述至少一种天然材料以导致溶解度因子大于0.4、或大于0.5、或大于0.8、或大于1或者甚至大于1.1的浓度存在于所述纳米

混悬剂中。

28. 纳米混悬剂,其能够根据前述权利要求中任一项所述的方法获得。

29. 根据权利要求28所述的纳米混悬剂,其用于制备药物或补充剂,优选食物补充剂。

30. 根据权利要求28所述的纳米混悬剂,其用于制备用于经颊、表面或经口施用于动物,优选人的药物。

31. 根据权利要求28所述的纳米混悬剂,其用于制备用于肠胃外、鞘内、静脉内、经皮或经黏膜施用,优选经颊、表面或经口施用于动物,优选人的药物。

32. 根据权利要求28所述的纳米混悬剂,其用于治疗或预防癌症;炎性肠病(IBD);关节炎;人免疫缺陷病毒(HIV);其他病毒性疾病;皮肤病,例如神经性皮炎或银屑病;或自身免疫病,例如多发性硬化、血管炎、类风湿性关节炎或皮炎。

33. 根据权利要求28所述的纳米混悬剂用于制备药物的用途。

34. 根据权利要求28所述的纳米混悬剂用于制备用于治疗或预防以下疾病的药物的用途:癌症;炎性肠病(IBD);关节炎;人免疫缺陷病毒(HIV);其他病毒性疾病;皮肤病,例如神经性皮炎或银屑病;或自身免疫病,例如多发性硬化。

35. 用于治疗或预防以下疾病的方法,其包括向有此需要的患者施用有效量的根据权利要求28所述的纳米混悬剂:癌症;炎性肠病(IBD);关节炎;人免疫缺陷病毒(HIV);其他病毒性疾病;皮肤病,例如神经性皮炎或银屑病;或自身免疫病,例如多发性硬化。

天然材料的纳米混悬剂及其制备方法

背景技术

技术领域

[0001] 本申请涉及用于由天然材料制备纳米混悬剂的方法、包含至少一种天然材料的纳米混悬剂以及这样的纳米混悬剂用于制备药物的用途。

背景技术

[0002]

[0003] 天然材料(例如植物、蓝细菌、藻类或真菌)包含具有治疗疾病效力的活性剂。为了从天然材料中洗提这些活性剂,已知多种药物制备,包括水性或醇性渗滤或浸软、片剂或胶囊剂形式的干粉末提取物或者可注射剂量制剂。然而,这些施用类型伴随有很多缺点。很多成分在胃肠道内降解或者在肝中经历首过代谢。此外,部分群体经历吞咽丸剂的困难或者不能够耐受任何固体。再者,天然材料的许多活性剂具有差水溶性。因此,天然材料的许多活性剂的效力和治疗效果有限。

[0004] 美国专利No.5,858,410涉及通过高压均化制备的称为“纳米混悬剂”的药物制剂。在使用高压均化之前,曾通过珍珠研磨方法来制备纳米混悬剂,该方法与压力均化相比是耗时的方法。该技术是尤其美国专利No.5,271,944的主题。已使用许多其他方法来制备纳米混悬剂并且取得了不同程度的成功,所述方法包括低能搅拌器、涡轮式搅拌器、胶体磨、声谱显示仪、孔、介质研磨机、转子定子混合器和超声波仪(sonicator)。

[0005] 中国专利申请No.CN1 416 847 A涉及通过高压均化以20%至11,1%(w/w)的浓度制备的西洋参(Radix Panacis Quinquefolii)(美国花旗参(American ginseng))的纳米混悬剂制剂。

[0006] 欧洲专利公开No.EP2 226 171 A1涉及通过磨石型研磨机来粉碎木质材料(例如,花旗松(Douglas fir))以提供平均纤维直径为至高30nm的纤维素纤维及由其制成的对应纤维素纤维复合物。所述纤维的平均最小长度为50 μ m。

[0007] 然而,用于制备纳米混悬剂的现有技术方法缺乏由天然材料来制备具有大量天然材料(即,高浓度天然材料)的纳米混悬剂的方法。因此,仍然需要用于由天然材料制备纳米混悬剂的方法,所述纳米混悬剂可有利地用于治疗或预防疾病。

发明内容

[0008] 因此,本公开内容的一个目的是提供用于由天然材料的全部或部分来制备纳米混悬剂的方法,所述纳米混悬剂可用于制备药物。

[0009] 在第一方面,本公开内容提供了如权利要求1中公开的用于制备纳米混悬剂的方法。

[0010] 在另一个方面,本公开内容提供了可根据第一方面的方法获得的纳米混悬剂。

[0011] 在另一个方面,本公开内容提供了根据第一方面的纳米混悬剂,其用于制备用于

经颊、表面或经口施用于动物(优选人)的药物,或者用于制备用于肠胃外、鞘内、静脉内、经皮或经黏膜施用,优选经颊、表面或经口施用于动物(优选人)的药物。

[0012] 在另一个方面,本公开内容提供了根据第一方面的纳米混悬剂,其用于治疗或预防癌症、炎性肠病(inflammatory bowel disease,IBD)、关节炎、人免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus,HIV)、其他病毒性疾病、皮肤病(例如神经性皮炎或银屑病)或自身免疫病(例如多发性硬化)。

[0013] 在又一个方面,本公开内容提供了根据第一方面的纳米混悬剂用于制备药物的用途。

[0014] 在又一个方面,本公开内容提供了用于治疗或预防以下疾病的方法,其包括向有此需要的患者施用有效量的根据第一方面的纳米混悬剂:癌症、炎性肠病(IBD)、关节炎、人免疫缺陷病毒(HIV)、其他病毒性疾病、皮肤病(例如神经性皮炎或银屑病)或自身免疫病(例如多发性硬化)。

[0015] 附图简述

[0016] 图1示出了胶体仪(colloidator)的示意图;

[0017] 图2:示出了根据实施例1.1的橄榄叶(olive leave)纳米混悬剂在研磨所用比能下的颗粒尺寸(D_{90});

[0018] 图3示出了根据实施例1.3的橄榄叶的提取物和纳米混悬剂的干质量;

[0019] 图4:示出了根据实施例2.1的螺旋藻(spirulina)纳米混悬剂在研磨所用比能下的颗粒尺寸(D_{90});

[0020] 图5示出了根据实施例2.3的螺旋藻的提取物和纳米混悬剂的干质量;

[0021] 图6示出了根据实施例3.1(实线)和3.2(虚线)的姬松茸(agaricus subrufescens,ABM)纳米混悬剂在研磨所用比能下的颗粒尺寸(D_{90});

[0022] 图7示出了根据实施例3.1(实线)和3.3(虚线)的姬松茸(ABM)纳米混悬剂在研磨所用比能下的颗粒尺寸(D_{90});

[0023] 图8示出了根据实施例3.5的姬松茸(ABM)的提取物和纳米混悬剂的干质量;

[0024] 图9:示出了如实施例4.1中制备的姬松茸的纳米混悬剂和不同提取物相对于姬松茸粉末的 β 葡聚糖含量。

[0025] 图10:示出了基于如实施例5.1中制备的二氧化硅纳米混悬剂的物理稳定化的效果。

[0026] 图11:示出了基于如实施例3.1中制备的姬松茸纳米混悬剂的不经丙烷-1,2,3-三醇化学稳定化的效果。

[0027] 图12:示出了基于如实施例3.1中制备的姬松茸纳米混悬剂的经20%(v/v)丙烷-1,2,3-三醇化学稳定化的效果。

[0028] 图13:示出了基于如实施例3.1中制备的姬松茸纳米混悬剂的经50%(v/v)丙烷-1,2,3-三醇化学稳定化的效果。

[0029] 图14:示出了5%(w/w)姬松茸纳米混悬剂(如实施例3.1中制备的)和5%(w/w)姬松茸提取物(如实施例3.4中制备的)的 β -1,3/1,6-葡聚糖的微分重量分数(即,平均摩尔质量)。

[0030] 图15:示出了以下样品中dectin-1阳性单核细胞的相对量(以%计):未经刺激的

外周血单核细胞(PBMC)、经5%(w/w)姬松茸纳米混悬剂(如实施例3.1中制备的)和5%(w/w)姬松茸提取物(如实施例3.4中制备的)刺激的PBMC。

[0031] 图16:示出了由5%(w/w)姬松茸纳米混悬剂(如实施例3.1中制备的)和5%(w/w)提取物(如实施例3.4中制备的)引起的细胞因子TNF- α 的体外诱导的比较。

[0032] 图17:示出了由5%(w/w)姬松茸纳米混悬剂(如实施例3.1中制备的)和5%(w/w)提取物(如实施例3.4中制备的)引起的体外诱导中细胞因子IL-10的比较。

[0033] 图18:示出了由5%(w/w)姬松茸纳米混悬剂(如实施例3.1中制备的)和5%(w/w)提取物(如实施例3.4中制备的)引起的体外诱导中细胞因子IL-6的比较。

[0034] 图19:示出了5%(w/w)姬松茸纳米混悬剂(如实施例3.1中制备的)的颗粒分布。

[0035] 图20:示出了5%(w/w)姬松茸纳米混悬剂(如实施例12中制备的)的颗粒分布。

[0036] 图21:示出了由服用5%(w/w)姬松茸纳米混悬剂(如实施例12中制备的)引起的CD25激活T细胞CD3+CD25+体内诱导。

[0037] 图22:示出了由服用在胶囊剂中的姬松茸粉末引起的CD25激活T细胞CD3+CD25+体内诱导。

[0038] 发明详述

[0039] 本公开内容涉及用于制备包含至少一种天然材料的纳米混悬剂的方法,其中所述方法包括以下步骤:

[0040] a.提供至少一种颗粒尺寸(D_{100})小于320 μm 的天然材料;

[0041] b.将步骤a.的所述至少一种天然材料分散在溶剂中;

[0042] c.将步骤b.的分散体研磨至颗粒尺寸(D_{90})小于1000nm($D_{90}<1000\text{nm}$)。

[0043] 以下说明性地描述的本发明可适当地在缺少本文中未具体公开的任何要素、限制的情况下实施。

[0044] 将针对具体实施方案并参照某些附图对本发明进行描述,但是本发明不限于此而仅由权利要求书限定。除非另外指出,否则下文所述的术语一般应以其常见含义来理解。

[0045] 当在本说明书和权利要求书中使用术语“包含/包括”时,其不排除其他要素。出于本发明的目的,术语“由……组成”认为是术语“包含/包括”的一个优选实施方案。如果在下文中将组定义为包含至少一定数量的实施方案,则这还应理解为公开了一个组,其优选地仅由这些实施方案组成。

[0046] 除非另外明确指出,否则当在提及单数名词时使用没有数量词修饰的名词时,这包括该名词的复数形式。

[0047] 术语如“可获得的”或“可定义的”和“获得的”或“定义的”可互换使用。例如,这意味着,除非上下文另外明确指出,否则术语“获得的”不旨在表示例如实施方案必须通过例如按照术语“获得”的步骤顺序来获得,即使术语“获得的”或“定义的”总是包括这样的限制性理解作为一个优选实施方案。

[0048] 本文中使用的“纳米混悬剂”指纳米颗粒在溶剂(例如,如水、乙醇或其混合物)中的混悬剂。纳米混悬剂可另外包含稳定剂或其他化合物。纳米混悬剂包含悬浮在溶剂中的纳米颗粒形式的水溶性差的化合物。这样的纳米混悬剂用于提高在溶剂、脂质介质或二者中具有差溶解性的化合物的“溶解度”(或可分散性)。由于“溶解度为增加,达到差溶性化合物的较高血浆血液水平并且更快地达到所述化合物的最大血浆血液水平。术语“混悬剂”和

“分散体”当其指在溶剂中的固体颗粒时在本公开内容中可互换使用。

[0049] 本文中使用的“纳米颗粒”为颗粒尺寸小于1000nm的颗粒。在溶剂中的化合物纳米颗粒可以是原始颗粒或者由较小颗粒构成的团聚颗粒。在纳米混悬剂中的颗粒尺寸可用激光衍射分析仪(例如,Beckman CoulterLS 13320或Horiba LA-950)来测量。

[0050] 本公开内容中使用的术语天然材料的“溶解度”或“溶解度极限”涉及可溶解在溶剂中的天然材料的最大量。出于本公开内容的目的,可如下确定天然材料在特定溶剂中的溶解度:使用初始量的颗粒尺寸 $D_{90} < 320\mu\text{m}$ 之天然材料以5%或10%(w/w)的浓度来制备所述天然材料在溶剂(例如蒸馏水)中的混悬剂。对于所述混悬剂的制备,在30℃的温度下使天然材料悬浮在溶剂中60分钟。然后,将所得混悬剂以1500g离心30分钟,并且出于对照原因使沉淀物与上清液分离并称重。将上清液在60℃下干燥24小时,得到溶解在上清液中的天然材料(干基)并称重。使用以下公式来计算溶解度:

[0051] $\text{溶解度}(\%) = \text{上清液的质量(干基)} \times 100 / \text{初始天然材料粉末的质量(干基)}。$

[0052] 本公开内容中使用的术语“溶解度因子”涉及根据本公开内容之纳米混悬剂中的天然材料相对于所述天然材料在用于制备该纳米混悬剂之溶剂中的溶解度或溶解度极限的量。溶解度因子为将纳米混悬剂中存在的天然材料的量(以%(w/w)计)除以所述天然材料在所使用溶剂中的溶解度。换句话说,如果给出溶解度因子为1,则达到天然材料在所述溶剂中的溶解度极限。当溶解度因子小于1时,纳米混悬剂中天然材料的量小于溶解度极限,并且大于1的溶解度因子表示纳米混悬剂中存在超过可溶于所述溶剂中的天然材料的量,即,纳米混悬剂中天然材料的浓度高于其溶解度极限。

[0053] 本公开内容中使用的术语“纤维素纤维”涉及由具有数百至上万个 β -1,4-D-葡萄糖单元的线性链的多糖构成且纤维长度 $> 1\mu\text{m}$ 的植物纤维(尤其是木质纤维)。因此,纤维素纤维不是由几何形状为直径 $< 1\mu\text{m}$ 的球体或半轴长度 $< 1\mu\text{m}$ 的椭圆体的 β -1,3/1,6-葡聚糖构成。

[0054] 在一个优选实施方案中,所述至少一种天然材料选自植物(优选排除人参和/或纤维素纤维之外的植物)、蓝细菌、藻类和真菌。在另一个实施方案中,所述天然材料不包含人参和/或纤维素纤维。本文中使用的植物可包括种子植物亚门(spermatophytina),其可包括银杏纲(ginkopsida)(银杏(ginkgo))、买麻藤纲(gnetopsida)、松柏纲(coniferopsida)(例如针叶树)和被子植物(有花植物),被子植物可进一步包括例如以下亚纲:木兰亚纲(magnoliidae)、百合亚纲(liliidae)(例如菠萝)、金虎尾目(malpighiales)(例如圣约翰草(St. John's wort)、柳皮)、蔷薇亚纲(rosidae)(例如荨麻)、十字花目(brassicales)(例如番木瓜)、豆目(fabales)(例如黄芪)、唇形目(lamiales)(例如橄榄树和橄榄叶)、川续断目(dispsacales)(例如接骨木)。蓝细菌可包括例如螺旋藻。藻类可包括域红藻亚界(rhodobionta)(例如红藻、褐藻和硅藻)、绿藻类和灰绿藻亚界(glaucobionta)。真菌可包括acrasobionta、粘菌门(myxomycota)、异鞭藻亚界(heterokontobionta)和真菌门(mycobionta)(例如柱形真菌,如姬松茸)。

[0055] 在另一个优选实施方案中,所述天然材料是银杏、菠萝、圣约翰草、柳皮、荨麻、番木瓜、黄芪、橄榄叶、接骨木、螺旋藻、小球藻藻类、红藻、褐藻和硅藻、绿藻和灰绿藻亚界、姬松茸、乳香、红景天(rodiole rosea)、金鸡纳树皮(chincona bark)、吐根、兰草(boneset)、泻根木蓝属植物(bryony anil)、木蓝属植物根、姜黄(curcuma)、南非钩麻(devil's

claw)、猫爪草(cat's claw)、灰白岩蔷薇(cystus incanus)、亚麻籽、水飞蓟(sylibum marianum)(水飞蓟(holy thistle))、白屈菜(chelidoniummajus)(白屈菜(celandine))、kaplan-pelargonie、紫锥菊、葡萄籽。

[0056] 在另一个优选实施方案中,所述天然材料不包含人参和/或纤维素纤维。

[0057] 在另一个优选实施方案中,所述至少一种天然材料是所述天然材料的一部分或全部,优选所述天然材料的全部。本公开内容的方法可用于任何天然材料整体或其部分。作为一个实例,可使用植物的仅一部分,例如根、茎、叶、果实、花等,这取决于天然材料的类型。

[0058] 在另一个优选实施方案中,所述纳米混悬剂包含至少两种天然材料的混合物。同样地,所述纳米混悬剂可以是包含单一天然材料或一种以上天然材料(即,至少两种天然材料)的混合物的纳米混悬剂。所述纳米混悬剂同样地可以包含相同天然材料的不同部分,例如,根部分和花部分,和/或所述纳米混悬剂可包含不同类型的天然材料,例如,如不同的植物或者植物和蓝细菌。

[0059] 在另一个优选实施方案中,在步骤a.之前在步骤a.1中干燥用于制备纳米混悬剂的天然材料,优选冷冻干燥和/或热干燥。

[0060] 在另一个优选实施方案中,上文所公开方法之步骤a.中提供的用于制备纳米混悬剂的天然材料的含水量 w 低于15%($w < 15\%$),优选低于12%($w < 12\%$),更优选低于10%($w < 10\%$),并且最优选低于8%($w < 8\%$)。

[0061] 用于制备纳米混悬剂的天然材料的含水量优选具有低含水量。本公开内容中使用的术语“含水量”或“残留水分”指材料例如天然材料的含水量 w ,其通过使用以下公式由湿润或湿材料的质量 $m_{\text{湿}}$ 和无水干材料的质量 $m_{\text{干}}$ 以及具有残留水分之材料的质量 $m_{\text{残留}}$ 计算:残留水分含量[%] $w = (m_{\text{残留}} - m_{\text{干}}) / (m_{\text{湿}} - m_{\text{干}}) * 100\%$ 。

[0062] 这样的低含水量在制备纳米混悬剂时是有利的。另外,其可在使天然材料达到小于320 μm 的颗粒尺寸(D_{100})时有用。本领域中已知有不同的方法来降低天然材料的含水量,并且任意这些方法均可与本公开内容组合使用。作为一个实例,可将天然材料冻干(即,冷冻干燥)或热干燥。在干燥步骤之前根据天然材料的类型可有利地对天然材料进行清洗、去皮(peel)和/或去核。在下文中,给出了两种示例性的干燥方法。

[0063] 可用冻干器例如在如下四步方法中冻干天然材料:

[0064] .根据天然材料的尺寸和结构,用刀将天然材料切割成约1至2cm的较小片材;

[0065] .将1至2cm的片材放入刀式研磨机(例如来自Retsch GmbH, Germany的Grindomix[®] 200或300)中并用以下参数进行研磨:2000rpm10秒,随后5000rpm 10秒,并且最后10.000rpm 20秒;

[0066] .将所得浆在-18℃下冷冻4小时,进一步放入冻干器中并冻干直至产物温度为20℃。

[0067] 应该理解,上述冷冻干燥方法是示例性的,并且本领域技术人员可根据天然材料的类型对该方法作出修改。作为一个实例,蓝细菌可直接冷冻干燥而无需预先研磨或切割。类似地,也可根据需要调整在刀式研磨机中切割片材的参数。

[0068] 根据天然材料中化合物的热敏性,还可在例如36℃至45℃温度的空气或烘箱中干燥天然材料直至残留水分含量低至8%。

[0069] 在另一个优选实施方案中,在步骤a.1中的干燥之前和/或之后预研磨上文所公开

方法之步骤a. 中提供的用于制备纳米混悬剂的天然材料, 优选地在刀式研磨机中预研磨, 并任选地筛分至颗粒尺寸(D_{100})小于 $320\mu\text{m}$ 。天然材料的这种研磨可用天然材料原样进行, 即, 无需预先切割或干燥, 或者可如上所述将天然材料切割成片材和/或干燥。此外, 可对天然材料进行筛分以提供颗粒尺寸(D_{100})小于 $320\mu\text{m}$ 的天然材料粉末。

[0070] 用于预研磨和筛分经冷冻干燥之天然材料的一种示例性方法可如下:

[0071] 将经冷冻干燥进程的天然材料粉末放入刀式研磨机(例如来自Retsch GmbH, Germany的**Grindomix**[®] 200或300)中并用以下参数进行研磨: 2000rpm 10秒, 随后5000rpm 10秒, 并且最后10.000rpm 20秒;

[0072] 用筛孔尺寸为 $320\mu\text{m}$ 的筛子筛分来自刀式研磨机过程的进程天然材料粉末;

[0073] 将大于 $320\mu\text{m}$ 的天然材料颗粒再次放入刀式研磨机中进一步研磨并随后用 $320\mu\text{m}$ 筛子进行筛分。可丢弃第二或第三研磨步骤的残留物。

[0074] 类似地, 用于预研磨和筛分经热干燥天然材料的一种示例性方法可如下:

[0075] 用刀将经热干燥的天然材料切割成约1至2cm的较小片材;

[0076] 将1至2cm的片材放入刀式研磨机(例如来自Retsch GmbH, Germany的**Grindomix**[®] 200或300)中并用以下参数进行研磨: 2000rpm 10秒, 随后5000rpm 10秒, 并且最后10.000rpm 20秒;

[0077] 用筛孔尺寸为 $320\mu\text{m}$ 的筛子筛分来自刀式研磨机过程的进程天然材料粉末;

[0078] 将大于 $320\mu\text{m}$ 的天然材料颗粒再次放入刀式研磨机中进一步研磨并随后用 $320\mu\text{m}$ 筛子进行筛分。可丢弃第二或第三研磨步骤的残留物。

[0079] 根据本公开内容的方法, 在步骤b. 中将步骤a. 中提供的至少一种颗粒尺寸(D_{100})小于 $320\mu\text{m}$ 的天然材料分散在溶剂中。

[0080] 在另一个优选实施方案中, 所述溶剂是水, 优选蒸馏水, 或者水和乙醇的混合物。

[0081] 用作溶剂的水可以是任何种类的水, 例如正常水、纯化水、蒸馏水、双蒸水或三蒸水或者脱矿质水。类似地, 所使用的乙醇也可以是正常乙醇或者水和乙醇的混合物。因此, 所得纳米混悬剂可以是水性纳米混悬剂, 或者在乙醇中的纳米混悬剂, 或者基于水和乙醇的混合物、或任何其他溶剂或溶剂混合物的纳米混悬剂。本文中使用的术语“溶剂”指单一溶剂或溶剂混合物。优选地, 如果所述纳米混悬剂用作药物, 则所述溶剂是可药用溶剂。

[0082] 在另一个优选实施方案中, 所述纳米混悬剂是水性纳米混悬剂或者基于水和乙醇的混合物的纳米混悬剂。

[0083] 当在步骤b. 中将天然材料分散在溶剂中时, 基于所使用溶剂的总量, 天然材料的浓度优选为0.5%至20%(w/w), 优选2%至10%(w/w), 进一步优选2%至5%(w/w)或5%至10%(w/w)。在本申请的另一个优选实施方案中, 基于所使用溶剂的总量, 天然材料的浓度优选为0.5%至70%(w/w), 优选40%至70%(w/w), 或10%至40%(w/w)。天然材料以%(w/w)计的浓度是基于用于制备纳米混悬剂的溶剂的总量。作为一个实例, 1000g溶剂使用50g天然材料粉末, 制备5%(w/w)。在所述浓度范围内, 将混悬剂进一步研磨成纳米混悬剂变得容易。分散体可通过例如借助磁力搅拌器或任何其他旋转装置搅拌, 优选地以高达1000rpm的速度搅拌溶剂和天然材料来制备。

[0084] 因此, 在另一个优选实施方案中, 基于用于纳米混悬剂的溶剂的总量, 在步骤b. 中

将至少一种天然材料以0.5%至20%(w/w),优选2%至10%(w/w),进一步优选2%至5%(w/w)或5%至10%(w/w)的浓度分散。

[0085] 在一个特别优选的实施方案中,所述至少一种天然材料以导致溶解度因子大于0.4、或大于0.5、或大于0.8、或大于1或者甚至大于1.1的浓度存在于纳米混悬剂中。

[0086] 优选地,通过使用稳定剂来使纳米混悬剂稳定。这样的稳定剂可选自磷脂、聚山梨酯、丙烷-1,2,3-三醇(甘油)、静电或空间稳定剂和表面活性剂。可在步骤b.中或者在研磨步骤c.期间或者甚至在研磨步骤c.之后将这样的稳定剂添加到分散体中。一些稳定剂优选地优选在分散步骤b.中添加到纳米混悬剂中,例如磷脂、非离子表面活性剂和乳化剂,例如聚山梨酯。另一些稳定剂优选地在研磨步骤c.期间添加,如非离子三嵌段共聚物,例如泊洛沙姆。甚至另一些稳定剂优选地在研磨步骤c.之后添加,例如丙烷-1,2,3-三醇或二辛基磺基琥珀酸钠(DOSS)。如果在分散步骤b.中添加稳定剂,则基于天然材料的总量优选地添加50%高至200%(w/w)的量的稳定剂,特别是如果所述稳定剂是磷脂的话。如果所述稳定剂是非离子表面活性剂或乳化剂(如聚山梨酯),则基于溶剂的量优选地添加高达1.5%(w/w)的量。在步骤c.中的研磨期间,当已达到2 μ m高至10 μ m的特定颗粒尺寸(D₉₀)时,或者如果颗粒尺寸(D₉₀)在研磨步骤c.期间不进一步减小(例如,在1小时研磨时间期间不减小至少4%),或者如果颗粒尺寸(D₉₀)在研磨步骤c.期间在1小时研磨时间期间增大至少10%,则优选地添加如非离子三嵌段共聚物,例如泊洛沙姆的稳定剂。

[0087] 在一个优选实施方案中,所述稳定剂选自磷脂;聚山梨酯;聚合物,例如均聚物、嵌段和接枝共聚物(如羟丙基纤维素(HPC)、羟丙基甲基纤维素(HPMC)和聚乙烯吡咯烷酮(PVP));非离子三嵌段共聚物,例如泊洛沙姆(例如,**Kolliphor**[®]P407或泊洛沙姆188);共聚聚乙烯吡咯烷酮;**Labrasol**[®]; **Gelucire**[®];明胶;卵磷脂(磷脂);阿拉伯胶;胆固醇;黄蓍胶;聚氧乙烯烷基醚;聚氧乙烯蓖麻油衍生物;聚氧乙烯失水山梨醇脂肪酸酯;失水山梨醇脂肪酸酯;聚乙二醇;聚氧乙烯硬脂酸酯;甘油单酯和甘油二酯;胶体二氧化硅;十二烷基硫酸钠;硅酸镁铝;三乙醇胺;硬脂酸;硬脂酸钙;单硬脂酸甘油酯;十六十八醇(cetostearyl alcohol);西土马哥乳化蜡(cetomacrogol emulsifying wax);短链醇和中链醇;**Labrafil**[®]; **Purol-oleique**[®];丙烷-1,2,3-三醇、聚乙烯醇和二辛基磺基琥珀酸钠(DOSS)。聚山梨酯的优选实例是聚山梨酯80和聚山梨酯20。进一步优选地,所述稳定剂选自聚山梨酯80、聚山梨酯20、**Kolliphor**[®]P407和泊洛沙姆188。在一个特别优选的实施方案中,所述稳定剂是**Kolliphor**[®]P407或聚山梨酯80,例如**Tween**[®]80。在另一个优选实施方案中,分散步骤b.包括添加选自磷脂和聚山梨酯的稳定剂。

[0088] 在另一个优选实施方案中,基于用于纳米混悬剂的溶剂的总量,分散步骤b.包括添加0.5%至2%(w/w)的量的聚山梨酯,和/或其中所述聚山梨酯选自聚山梨酯80和聚山梨酯20。

[0089] 在另一个优选实施方案中,基于天然材料的量,分散步骤b.包括添加100%至200%(w/w)的量,优选130%至170%(w/w)的量的磷脂,优选地其中所述磷脂包含高达95%(按重量计)磷脂酰胆碱和20%至30%(按重量计)的溶血磷脂酰胆碱。优选地,所述磷脂包含20%至95%磷脂酰胆碱,优选20%至75%磷脂酰胆碱,和20%至30%溶血磷脂酰胆碱(例

如,Lipoid GmbH,Germany的Lipoid P100、P75、R LPC20)。基于天然材料的总量,还可优选地添加100%至300%(w/w),更优选50%至200%(w/w)的量的磷脂。

[0090] 当使用空间稳定剂作为稳定剂时,空间稳定剂吸附或附着到纳米颗粒的表面上并且提供克服范德华吸引力的大且致密的空间障碍,由此空间稳定剂降低聚集、团聚或者甚至颗粒融合。空间稳定剂优选是可药用的赋形剂并且可选自聚合物,例如均聚物、嵌段和接枝共聚物,如羟丙基纤维素(HPC)、羟丙基甲基纤维素(HPMC)和聚乙烯吡咯烷酮(PVP)。特别优选的空间稳定剂是非离子三嵌段共聚物**Kolliphor**[®]P407。**Kolliphor**[®]P407由以两条聚氧乙烯(聚(环氧乙烷))亲水链为侧翼的中心聚氧丙烯(聚(环氧丙烷))疏水链构成。可有利地在研磨步骤c.期间添加空间稳定剂。因此,优选地在研磨步骤c.期间,进一步优选地当颗粒的颗粒尺寸(D_{90})小于5 μm 时添加0.5%至2%(w/w)的量的空间稳定剂。

[0091] 用于本公开内容的方法的另一种优选稳定剂是甘油(丙烷-1,2,3-三醇)。所述甘油优选地在研磨步骤c.之后添加,进一步优选地以基于溶剂总体积的30%至100%(v/v)或40%至100%(v/v)的量,甚至更优选地40%(v/v)或50%(v/v)的量添加。

[0092] 除甘油之外或在其替代方案中,可使用作为静电稳定剂的二辛基磺基琥珀酸钠(DOSS),优选地以基于溶剂总量的0.5%至2%(w/w)的量使用,并且优选地在研磨步骤c.之后添加。

[0093] 在研磨步骤c.期间,将包含颗粒尺寸小于320 μm 的天然材料的分散体研磨至颗粒尺寸(D_{90})小于1000nm。这可在任何合适的磨机中实现。

[0094] 在一个优选实施方案中,所述研磨步骤c.在湿式球磨机,优选湿式搅拌器式球磨机中进行。

[0095] 在另一个优选实施方案中,所述研磨步骤c.包括在磨球直径为0.5至1.5mm的湿式球磨机,优选湿式搅拌器式球磨机中的第一研磨步骤c.1,和在磨球直径为0.3至0.4mm的湿式球磨机,优选湿式搅拌器式球磨机中的第二研磨步骤c.2,以及在磨球直径为0.05至0.2mm的湿式球磨机,优选湿式搅拌器式球磨机中的第三研磨步骤c.2。优选地,使用第二研磨步骤c.2直至达到约3至6 μm 的颗粒尺寸(D_{90}),并且使用第三研磨步骤c.3直至达到约80至500nm,优选80至300nm的颗粒尺寸(D_{90})。在天然材料粉末的起始颗粒尺寸(D_{100})小于320 μm 的另一个优选实施方案中,所述研磨步骤c.包括在磨球直径为0.4至0.5mm的湿式球磨机,优选湿式搅拌器式球磨机中的第一研磨步骤c.1,和在磨球直径为0.05至0.2mm的湿式球磨机,优选湿式搅拌器式球磨机中的第二研磨步骤c.2。优选地,使用第一研磨步骤c.1直至达到约2至6 μm 的颗粒尺寸(D_{90}),并且使用第二研磨步骤c.2直至达到约80至500nm,优选80至300nm的颗粒尺寸(D_{90})。还优选地,研磨机室内的温度为25 $^{\circ}\text{C}$ 至36 $^{\circ}\text{C}$,并且轮缘速度为10至14m/s,优选11至14m/s。

[0096] 因此,在一个优选实施方案中,如通过动态光散射或激光衍射分析仪所测量的,在步骤c.中将步骤b.的分散体研磨至颗粒尺寸(D_{90})小于500nm($D_{90} < 500\text{nm}$),优选小于300nm($D_{90} < 300\text{nm}$),进一步优选小于250nm($D_{90} < 250\text{nm}$)并且最优选小于200nm($D_{90} < 200\text{nm}$)。

[0097] 因此,如通过动态光散射或激光衍射分析仪所测量的,所得纳米混悬剂的颗粒尺寸(D_{90})可小于500nm($D_{90} < 500\text{nm}$),优选小于300nm($D_{90} < 300\text{nm}$),进一步优选小于250nm($D_{90} < 250\text{nm}$)且最优选小于200nm($D_{90} < 200\text{nm}$),并且颗粒尺寸大于40nm($D_{90} > 40\text{nm}$)。

[0098] 可进一步表征所得纳米混悬剂作为单模态混悬剂的最佳稳定化结果,其中所述单

模态的平均值小于300nm,优选小于200nm。这样的单模态混悬剂可通过过滤混悬剂获得。过滤器可使颗粒尺寸减小至小于450nm,优选小于300nm,进一步优选小于220nm的颗粒尺寸(D₉₀)。作为过滤器装置,可使用任何现有技术装置,例如Sartorius Stedim Biotech过滤器。如果将纳米混悬剂过滤至450nm,则这样的过滤使颗粒尺寸分布的标准偏差变得甚至更窄,这可有助于稳定化。在替代方案中,还可通过相应的加工方式来获得单模态混悬剂。如所列举的,实施例12的混悬剂是不经过滤的单模态混悬剂。

[0099] 在研磨步骤c.期间,向纳米混悬剂施加一定的比能。比能定义为湿式搅拌器式球磨机的净能量(总能量减去空转驱动功率)(以[kW]计)乘以研磨时间(以[h]计)除以纳米混悬剂的总量(以[t]计),所述总量为溶剂、天然材料粉末和所有稳定剂的量(以[t]计)。

[0100] 在如上文所公开使用稳定剂来化学稳定化的一个替代方案中,还可借助胶体仪(例如,来自Levigata GmbH, Germany的改良型Kamena)来物理稳定化纳米混悬剂,所述胶体仪也如图1所示。在这种方法中,通过转子(4)和支撑转子(5)的旋转将纳米混悬剂引导入容器(1)中在其上端经由挡板以几乎无湍流的方式进入到凹形圆柱体(3)中。在内部的凹形圆柱体(3)中,下降的纳米混悬剂流(7)撞击由凹形圆柱体下端出口处的转子(4,5)激发的向上旋转的反向纳米混悬剂流。在下降的纳米混悬剂流和对跖的旋转纳米混悬剂流碰撞时,纳米颗粒通过摩擦而静负载。这种静载荷或颗粒电荷可引起纳米颗粒分离,并因此引起物理稳定化。在此之后,纳米混悬剂在外部的双曲型圆柱体处以相反方向上升(6)。以此方式将纳米混悬剂设置成向上和向下对齐运动。在此产生的热能通过整合于容器(1)的双壁(2)中的水冷却器传导,其中将冷却介质供应到双壁(8a、8b、9a、9b)并从中引出。

[0101] 因此,在一个优选实施方案中,在研磨步骤c.之后使纳米混悬剂进一步在胶体仪中经受胶体化步骤d.,优选地添加氧。此外,这样的胶体化可替代稳定剂的使用,并且在另一个优选实施方案中,纳米混悬剂不包含任何稳定剂,特别是其不包含任何丙烷-1,2,3-三醇。

[0102] 如上文详细描述,本公开内容的纳米混悬剂可化学或物理稳定化。

[0103] 本公开内容的纳米混悬剂可另外含有氧(O₂)。对于本公开内容,如果水富含氧,则可将氧溶解在水中,例如物理或化学地溶解在水中,或者附着于任何纳米颗粒上。为了使纳米混悬剂富含额外量的氧,可使用上述胶体仪。在本公开内容的一种示例性方法中,在胶体化过程开始后约1分钟可添加氧,直至纳米混悬剂中包含20至30mg/L氧。通过这种方法,通过所谓的抽吸过程将氧添加到纳米混悬剂中,与其形成对比的是通过压力将氧插入在溶液中的压力方法。作为氧富集装置,可使用Levigata Ltd.的超胶体仪,但并非必须局限于此。

[0104] 在本公开内容的一个优选实施方案中,所述纳米混悬剂的氧浓度为约20至30mg/L。

[0105] 除至少一种天然材料和任选的氧之外,本公开内容的纳米混悬剂还可包含选自以下的至少一种化合物:矫味剂、防腐剂、表面活性剂和渗透增强剂,例如核黄素或抗坏血酸。

[0106] 可任选地在步骤c.之后并且任选地在步骤d.之前或之后在过滤步骤中过滤纳米混悬剂。通过这样的过滤,可根据需求进一步调节纳米混悬剂中纳米颗粒的尺寸。作为一个实例,可提及纳米混悬剂的无菌过滤。这样的无菌过滤器可使颗粒尺寸减小至小于450nm,优选小于220nm的颗粒尺寸(D₉₀)。作为过滤器装置,可使用任何现有技术装置,例如标准Milipore过滤器。如果将纳米混悬剂过滤至220nm,则这样的过滤使颗粒尺寸分布的标准偏

差变得甚至更窄,这可有助于稳定化。

[0107] 在本公开内容的一个优选实施方案中,在步骤c.之后并且任选地在步骤d.之前或之后过滤纳米混悬剂,优选地用无菌过滤器过滤,进一步优选地过滤至颗粒尺寸小于450nm,并且更优选小于220nm。

[0108] 在使用纳米混悬剂之前,可根据需要来调节纳米混悬剂的浓度。在一方面,可通过添加另外的溶剂来稀释纳米混悬剂。在另一方面,可在进一步的步骤e.中增加纳米混悬剂的浓度。浓度的增加可通过蒸发溶剂,优选地在干燥室中,进一步优选地在不超过40℃的温度下并且任选地在减压下蒸发溶剂来实现。然后,最终纳米混悬剂的天然材料浓度优选为基于该纳米混悬剂中存在的溶剂总量的10%至40%(w/w),优选10%至20%(w/w)。

[0109] 因此,在一个优选实施方案中,在进一步的步骤e.中通过蒸发溶剂,优选地在干燥室中蒸发溶剂来使纳米混悬剂的浓度增加至天然材料的浓度为基于该纳米混悬剂中存在的溶剂总量的10%至40%(w/w),优选10%至20%(w/w)。

[0110] 由上述制备方法推断并且由实验部分中的实施例支持,天然材料的纳米混悬剂与提取物的区别在于以下因素:

[0111] 活性组分的浓度

[0112] 由于纳米混悬剂包含天然材料在其天然组成中的全部或部分作为纳米颗粒而不仅仅是提取的部分(例如水溶性化合物),因此与提取物相比,在纳米混悬剂中亲水性化合物以及疏水性化合物的浓度更高。在提取物中,由于亲水性或疏水性化合物在各自溶剂中的溶解度,仅亲水性或疏水性化合物存在于溶液中。

[0113] 干质量的量

[0114] 由于纳米混悬剂的性质,干质量通常与在步骤b.中添加形成纳米混悬剂的化合物的量相同或几乎相同。与此相比,提取物的干质量常常小于加入到溶剂中的化合物的量,因为大多数化合物的溶解度远远小于100%。氧化

[0115] 由于纳米颗粒通常以有限的溶解度分散在纳米混悬剂中,因此化学反应的可能性不如基于溶液的制剂中那样显著。因此,纳米混悬剂的化学稳定性通常优于溶液。纳米混悬剂的氧化稳定性归因于类似于铝表面上的氧化层的机理。一旦纳米颗粒表面暴露于水和氧,其表面上就发生单层降解。这种单层可保护纳米颗粒的内部部分免受进一步降解,并且由此提高纳米混悬剂的氧化稳定性。

[0116] 化学稳定化

[0117] 与常规的微粒相比,纳米颗粒的独特纳米级结构提供了表面积与体积比的显著增加,这在体外和体内均引起显著不同的表现。尽管药物纳米晶体具有优点,但是其还存在多种缺点,包括制造复杂和稳定性问题。稳定性是确保药物产品的安全性和效力的关键方面之一。在静脉内施用的纳米混悬剂中,例如,形成较大的颗粒(>5 μ m)可导致毛细血管阻塞和栓塞,并且因此需要在储存期间严密监测药物颗粒尺寸和颗粒尺寸分布。本发明的纳米混悬剂不包含这样的较大颗粒。

[0118] 物理稳定化

[0119] 颗粒电荷是决定纳米混悬剂的物理稳定性的因素之一。颗粒带的相同电荷越高,颗粒之间的静电斥力越高,并且物理稳定性越高。通常,将颗粒电荷量化为所谓的 ζ 电势,其例如通过颗粒在电场中的电泳迁移率来测量。

[0120] 用于制备纳米混悬剂的上述方法产生纳米混悬剂。因此,本公开内容还涉及可根据本文所述的任一种方法获得的纳米混悬剂。

[0121] 此外,本公开内容的纳米混悬剂可用于制备药物或补充剂,例如食物补充剂。本公开内容的纳米混悬剂可有利地用于制备用于经颊、表面和/或经口施用于动物(优选人)的药物。

[0122] 天然材料的纳米混悬剂具备明显的优点,包括通过经黏膜途径施用的可能性。天然材料的纳米混悬剂每体积单位包含更高浓度的活性剂、包含更小的非水溶性活性剂颗粒,并且因此提供免疫调节性药物的新可能性,其中免疫调节性活性剂由免疫细胞摄取,这需要小颗粒尺寸的免疫调节性活性剂。

[0123] 对于口腔施用,由于物质经由口腔的摄取能力有限,因此药物应优选为液体并且以低剂量起效。此外,经由口腔施用的药物颗粒应在纳米范围内(例如,小于约300nm),否则通过口腔受到限制。由于本公开内容的纳米混悬剂可提供成具有小于300nm的颗粒尺寸 D_{90} ,因此所述纳米混悬剂可有利地用于口腔施用。

[0124] 在口腔中,公认有两条施用生物活性剂的途径。舌下递送通过内衬于口底部的黏膜来实现。由于高渗透性和丰富的血液供应,经由舌下途径的输送导致迅速起效,提供适于具有短递送期要求和不频繁给药方案的高度可渗透活性剂的递送途径。公认的第二条途径是经由颊黏膜。该区域涵盖面颊内衬的黏膜。该区域也具有丰富的血液供应、稳健并且在应激或损伤之后提供短的细胞恢复时间。尽管颊黏膜的渗透性比舌下区域低,但是光滑且相对固定黏膜的宽阔性提供用于生物活性剂的持续释放和控制释放递送的高度理想吸收途径。与其他经黏膜施用途径一样,两个主要的优点包括避免了肝首过代谢和在胃肠道中的系统前消除。

[0125] 此外,任何已知的渗透增强剂均可提高根据本公开内容的纳米混悬剂的通过。

[0126] 除经口施用以外,本公开内容的纳米混悬剂还可用于肠胃外、鞘内、静脉内、经皮或经黏膜施用于动物,优选人。因此,本公开内容的一个优选实施方案涉及纳米混悬剂在制备用于肠胃外、鞘内、静脉内、经皮或经黏膜施用,优选经颊、表面或经口施用于动物(优选人)的药物中的用途。

[0127] 本公开内容提供了天然材料的稳定纳米混悬剂、制备所述纳米混悬剂的方法以及所述纳米混悬剂的用途,其使得可增强生物活性剂向对象血流中的递送。在使这样的纳米混悬剂与身体,例如与口腔区域(包括颊黏膜)接触之后,化合物以足以引起期望生物应答的量吸收到血流中。因此,可通过正常或微流化的喷雾剂、气雾剂或液体来递送纳米混悬剂。递送可通过胃肠外、鞘内、静脉内、经皮、经黏膜以及任何或所有公认的药物递送方法来实现。

[0128] 与例如提取物相比,根据本文公开的方法制备的纳米混悬剂的最显著区别因素是:(i)天然材料的主要活性组分的平均摩尔质量—平均摩尔质量更低,生物利用度更高;(ii)天然材料的主要活性组分在人机体中被特定人受体识别的等级(所谓的病原体识别受体或toll样受体TLR;只有当TLR的检测等级高时,才可通过后续的信号级联反应引发提高的免疫刺激效应,以及(iii)天然材料的主要活性组分在人机体中产生的效果。对于天然材料姬松茸,这些区别因素提供于下文使用水不溶性 β -1,3/1,6-葡聚糖作为姬松茸的主要活性组分的实施例7至9中。

[0129] 本公开内容的纳米混悬剂可用于治疗或预防癌症;炎性肠病(IBM);关节炎;人免疫缺陷病毒(HIV);其他病毒性疾病;皮肤病,例如神经性皮炎或银屑病;或自身免疫疾病,例如多发性硬化、血管炎、类风湿性关节炎或皮炎。

[0130] 与例如由天然材料制备的提取物相比,本公开内容的纳米混悬剂有效地在较长时间内在血流中提供更高浓度的天然材料的活性剂。这尤其适用于这样的天然材料中包含的疏水性化合物。另外,与例如提取物相比,包含来自天然材料的免疫调节性化合物的纳米混悬剂以更广泛且更强烈的方式刺激免疫系统,因为其包含在纳米范围内的更具免疫刺激性的颗粒且量更高,所述颗粒更好地被相应的免疫亚群摄取或识别。

[0131] 实验部分

[0132] 在下文中,对本发明进行更详细的说明。然而,应理解,保护范围仅由所附权利要求书决定,而不局限于以下任何实施例。陈述以下实施例是为了帮助理解本发明,并且不应被解释为特别限制本文中描述且要求保护的发明。在本领域技术人员能力范围内的本发明的此类变化(包括现在已知或以后将开发的所有等同方案的替代)以及配方的变化或实验设计的变化均应认为落入并入本文的本发明范围内。

[0133] 实施例1:

[0134] 实施例1.1:橄榄叶纳米混悬剂的稳定剂

[0135] 将200g干橄榄叶粉末(颗粒尺寸 D_{90} : $<320\mu\text{m}$,残留水分 $<5\%$)添加到4000g双蒸水中,得到橄榄叶粉末在水中的 5% (w/w)分散体。颗粒尺寸 $D_{90}<320\mu\text{m}$ 的橄榄叶粉末的溶解度为 1.44% (w/w)。基于此,该纳米混悬剂的 5% (w/w)浓度是橄榄叶粉末的溶解度极限的3.5(溶解度因子)倍高。在湿式搅拌器式球磨机(X1型,Buehler AG,Switzerland)中将分散体研磨至颗粒尺寸(D_{90})小于400nm:使用尺寸为0.4至0.5mm的钨稳定氧化锆球直至颗粒尺寸(D_{90})为约380nm,然后使用尺寸为0.1mm的钨稳定氧化锆球直至达到272nm的最终颗粒尺寸(D_{90})。在颗粒尺寸(D_{90})为380nm时,添加14.5g(0.4% (w/w))**Tween**[®]80。这使颗粒尺寸减小到340nm。在颗粒尺寸(D_{90})为约340nm时再添加29g(0.7% (w/w))**Kolliphor**[®]P407使颗粒尺寸(D_{90})显著减小到272nm(参见图2)。用于研磨的比能[kWh/t]的量由图2可知。

[0136] 实施例1.2:橄榄叶的提取(比较)

[0137] 在22℃的温度下将相同量的橄榄粉末(200g,颗粒尺寸 D_{90} : $<320\mu\text{m}$) 在4000g双蒸水中提取2小时。

[0138] 实施例1.3:干质量比较

[0139] 如上制备的提取物(实施例1.2)和纳米混悬剂(实施例1.1)的干质量的量通过用 $0.45\mu\text{m}$ 过滤器(Millipore,纤维素酯膜)分别过滤提取物和纳米混悬剂来确定。将经过滤的固体干燥并确定经过滤颗粒的干质量。由图3还可知,纳米混悬剂的干质量的量为 4.5% (w/w),相比之下相同浓度橄榄叶粉末(5% (w/w))的提取物为 0.3% (w/w)。

[0140] 实施例2:

[0141] 实施例2.1:螺旋藻纳米混悬剂的稳定剂

[0142] 将300g螺旋藻粉末(10% (w/w),颗粒尺寸 D_{90} : $<150\mu\text{m}$,残留水分 $<5\%$)和60g**Kolliphor**[®]P407添加到3000g双蒸水中,得到螺旋藻在水中的分散体。颗粒尺寸 $D_{90}<150\mu\text{m}$ 的螺旋藻粉末的溶解度为 0.52% (w/w)。基于此,该纳米混悬剂的 10% (w/w)浓度是螺旋藻

粉末的溶解度极限的19.2(溶解度因子)倍高。如下在湿式搅拌器式球磨机(X1型,Buehler AG,Switzerland)中将分散体研磨至颗粒尺寸(D_{90})为约80nm:使用尺寸为0.4至0.5mm的钨稳定化氧化锆球直至颗粒尺寸(D_{90})为约120nm,然后使用尺寸为0.1mm的钨稳定化氧化锆球直至最终颗粒尺寸(D_{90})为80nm。用于研磨的比能[kWh/t]的量由图4可知。

[0143] 实施例2.2:螺旋藻的提取(比较)

[0144] 在22℃的温度下将相同量的螺旋藻粉末(300g,颗粒尺寸 D_{90} :<150 μ m)在3000g双蒸水中提取2小时。

[0145] 实施例2.3:于质量比较

[0146] 如上制备的提取物(实施例2.2)和纳米混悬剂(实施例2.1)的干质量的量通过用0.45 μ m过滤器(Millipore,纤维素酯膜)分别过滤提取物和纳米混悬剂来确定。将经过滤的固体干燥并确定经过滤颗粒的干质量。由图5还可知,纳米混悬剂的干质量的量为9.4%(w/w),相比之下相同浓度螺旋藻粉末(10%(w/w))的提取物为3.3%(w/w)。

[0147] 实施例3

[0148] 实施例3.1:具有5%P100、0.5%**Tween**[®]80和1%Kolliphor P407的姬松茸蘑菇纳米混悬剂的稳定剂

[0149] 将150g姬松茸粉末(颗粒尺寸 D_{90} :<320 μ m,残留水分<5%)、150g Lipoid P100(5%(w/w))和15g聚山梨酯**Tween**[®]80(0.5%(w/w))添加到3000g双蒸水中,得到姬松茸粉末在水中的5%(w/w)分散体。颗粒尺寸 D_{90} <320 μ m的姬松茸粉末的溶解度为3.2%(w/w)。基于此,该纳米混悬剂的5%(w/w)浓度是姬松茸粉末的溶解度极限的1.6(溶解度因子)倍高。在湿式搅拌器式球磨机(X1型,Buehler AG,Switzerland)中如下研磨分散体:使用尺寸为0.4至0.5mm的钨稳定化氧化锆球直至颗粒尺寸(D_{90})为约6.3 μ m,然后使用尺寸为0.1mm的钨稳定化氧化锆球直至达到240nm的最终颗粒尺寸(D_{90})。用于研磨的比能[kWh/t]的量由图6(实线)可知。在颗粒尺寸(D_{90})为约6.3 μ m时,添加30g(1%(w/w))**Kolliphor**[®]P407。该纳米混悬剂的最终颗粒尺寸(D_{90})为240nm(还参见图6-实线)。

[0150] 实施例3.2:具有10%P100、0.5%**Tween**[®]80和1%Kolliphor P407的姬松茸蘑菇纳米混悬剂的稳定剂

[0151] 将150g姬松茸粉末(颗粒尺寸 D_{90} :<320 μ m)、300g Lipoid P100(10%(w/w))和15g聚山梨酯**Tween**[®]80(0.5%(w/w))添加到3000g双蒸水中,得到姬松茸粉末在水中的5%(w/w)分散体。在湿式搅拌器式球磨机(X1型,Buehler AG,Switzerland)中如下研磨分散体:使用尺寸为0.4至0.5mm的钨稳定化氧化锆球直至颗粒尺寸(D_{90})为约6.3 μ m,然后使用尺寸为0.1mm的钨稳定化氧化锆球直至达到368nm的最终颗粒尺寸(D_{90})。用于研磨的比能[kWh/t]的量由图6(虚线)可知。在颗粒尺寸(D_{90})为约2.6 μ m时,添加30g(1%(w/w))**Kolliphor**[®]P407。该纳米混悬剂的最终颗粒尺寸(D_{90})为368nm(还参见图6-虚线)。

[0152] 实施例3.3:具有5%P100、0.75%**Tween**[®]80的姬松茸蘑菇纳米混悬剂的稳定剂

[0153] 将150g姬松茸粉末(颗粒尺寸 D_{90} :<320 μ m)、150g Lipoid P100(5%(w/w))和15g

聚山梨酯 **Tween**[®]80 (0.5% (w/w)) 添加到 3000g 双蒸水中, 得到姬松茸粉末在水中的 5% (w/w) 分散体。使用尺寸为 0.4 至 0.5mm 的钨稳定化氧化锆球在湿式搅拌器式球磨机 (X1 型, Buehler AG, Switzerland) 中研磨分散体。用于研磨的比能 [kWh/t] 的量由图 7 (实线) 可知。在 15170 kWh/t 的比能下, 纳米混悬剂的颗粒尺寸 (D_{90}) 减小到 343nm (还参见图 7-虚线)。在增加的比能下继续研磨之后, 颗粒尺寸突然增大, 这可能是由于可能由团聚引起的颗粒的高表面积。甚至再增加 7.5g 聚山梨酯 **Tween**[®]80 (得到总计 0.75% (w/w)) 也未显著减小颗粒尺寸。相比之下, 相同但另外具有 1% **Kolliphor**[®] P407 (上述实施例 3.2) 和 0.5% 聚山梨酯 **Tween**[®]80 的纳米混悬剂显示出颗粒尺寸的进一步减小并且还稳定 (参见图 7-实线)。

[0154] 实施例 3.4: 姬松茸蘑菇的提取 (比较)

[0155] 在 22℃ 的温度下将相同量的姬松茸粉末 (150g, 颗粒尺寸 D_{90} : < 320μm) 在 3000g 双蒸水中提取 2 小时。

[0156] 实施例 3.5: 干质量比较

[0157] 如上制备的提取物 (实施例 3.4) 和纳米混悬剂 (实施例 3.1) 的干质量的量通过用 0.45μm 过滤器 (Millipore, 纤维素酯膜) 分别过滤提取物和纳米混悬剂来确定。将经过滤的固体干燥并确定经过滤颗粒的干质量。由图 8 还可知, 该纳米混悬剂的干质量的量为 4.4% (w/w), 相比之下相同浓度姬松茸粉末 (5% (w/w)) 的提取物为 0% (w/w)。

[0158] 实施例 4:

[0159] 实施例 4.1: 活性组分的浓度

[0160] 姬松茸的主要活性剂是 β-1, 3/1, 6-葡聚糖, 并且因此可使用这种葡聚糖作为比较不同姬松茸提取物和姬松茸纳米混悬剂的浓度的参考物质。除实施例 3.1 的 5% (w/w) 纳米混悬剂和实施例 3.4 的 5% (w/w) 姬松茸提取物之外, 还以与实施例 3.4 类似的方式制备了另外的提取物。其他的提取物类型在图 9 中, 其中如图 9 中所示, 全部均以相同的参数 (150g 姬松茸粉末比 3000g 溶剂, 提取时间为 2 小时) 用不同溶剂 (双蒸水和 60% (v/v) 乙醇 (EtOH)) 和不同温度 (室温 22℃ 和 80℃) 制备而成。

[0161] 图 9 示出了不同姬松茸粉末提取物和实施例 3.1 的纳米混悬剂相对于用于制备该提取物和纳米混悬剂之纯姬松茸粉末的 β-1, 3/1, 6-葡聚糖含量的比较。在纳米混悬剂中, 掺入了 98% β-1, 3/1, 6-葡聚糖含量的粉末, 相比之下在室温下的乙醇提取物仅为 2%, 而在双蒸水中在 80℃ 下为高达 46%。这表明, 纳米混悬剂中几乎保留了来自粉末级分的所有 β-1, 3/1, 6-葡聚糖。

[0162] 实施例 5:

[0163] 实施例 5.1: 二氧化硅纳米混悬剂的稳定剂

[0164] 将 100g 二氧化硅粉末 (颗粒尺寸 D_{90} : < 25nm) 添加到 2000g 双蒸水中, 得到二氧化硅粉末在水中的 5% (w/w) 分散体。用上文详细描述的物理稳定化来稳定化二氧化硅纳米混悬剂。将通过激光衍射分析仪 Zetasizer (Malvern Instruments, UK) 测量的 ζ 电势作为评估物理稳定化效果的物理参数。因此, 在用胶体仪进行物理稳定化之前和之后测量 ζ 电势。由于在胶体仪中以 3000 分钟⁻¹进行物理稳定化 3 分钟, ζ 电势从 -0.84mV 降低至 -10.4mV。这与未经物理稳定化下的数值相比显著降低 (参见图 10)。

[0165] 实施例 6:

[0166] 在实施例6中,测试不同纳米混悬剂的长期稳定性。用分析型离心机(LUM GmbH的Lumifuge,Germany)进行加速稳定性测试以分级并量化纳米混悬剂的分层现象,如沉积、漂浮或固结。该测试用于确定纳米混悬剂的稳定性。如果纳米颗粒没有或仅有一些沉积、漂浮或固结,则认为该纳米混悬剂是长期稳定的。

[0167] 在加速稳定性测试中,将纳米混悬剂在离心机中以2000g(g =重力常数=9,81m/s²)加速。借助于Lumifuge,获得在整个样品长度上的空间和时间分辨消光谱。平行光(I_0)照亮整个样品池,并通过从上到下线性布置于整个样品的数千个具有微米级分辨率的传感器检测透射光 I 。通过 $\lg(I/I_0)$ 将透光率转化为消光度,并且可计算颗粒浓度。

[0168] 为了获得长期稳定的纳米混悬剂,可添加丙烷-1,2,3-三醇以增加纳米混悬剂的粘度并防止纳米混悬剂中的纳米颗粒沉积。以下实施例示出了添加丙烷-1,2,3-三醇的效果。

[0169] 实施例6.1:具有0%丙烷-1,2,3-三醇的姬松茸蘑菇纳米混悬剂的长期稳定剂

[0170] 取如实施例3.1中制备的纳米混悬剂并用磁力搅拌器搅拌约30分钟,不添加丙烷-1,2,3-三醇。然后,如上所述,用分析型离心机(LUM GmbH的Lumifuge,Germany)进行加速稳定性测试以分级并量化纳米混悬剂的分层现象,如沉积、漂浮或固结。

[0171] 图11示出了具有0%丙烷-1,2,3-三醇的纳米混悬剂的透光率曲线。可以看出,在第一次运转中较大的颗粒在2000g场下沉积(浅灰色线在40%和约25%透光率之间),然后在接下来的运转中更多的较大颗粒紧随其后,直至20分钟后在比色皿底部形成沉积物。透光率从开始时的44%下降到10%(沉积在比色皿底部),阐明了在2000g场下的沉积过程。这显示出纳米混悬剂的长期不稳定性。

[0172] 实施例6.2:具有20%丙烷-1,2,3-三醇的姬松茸蘑菇纳米混悬剂的长期稳定剂

[0173] 取500ml如实施例3.1中制备的纳米混悬剂并添加20%(v/v)丙烷-1,2,3-三醇。将所得混合物用磁力搅拌器搅拌约30分钟。然后,进行上述加速稳定性测试。

[0174] 图12示出了具有20%丙烷-1,2,3-三醇的纳米混悬剂的透光率曲线。可以看出,在第一次运转中在2000g场下沉积的较大颗粒(浅灰色线在50%和40%透光率之间)的量低得多,直至20分钟后在比色皿底部形成沉积物。透光率从开始时的58%下降到10%(沉积在比色皿底部),阐明了在2000g场下的沉积过程。这表明,通过添加20%(v/v)丙烷-1,2,3-三醇,可提高纳米混悬剂的稳定性。

[0175] 实施例6.3:具有50%丙烷-1,2,3-三醇的姬松茸蘑菇纳米混悬剂的长期稳定剂

[0176] 取500ml如实施例3.1中制备的纳米混悬剂并添加50%(v/v)丙烷-1,2,3-三醇。将所得混合物用磁力搅拌器搅拌约30分钟。然后,进行上述加速稳定性测试。

[0177] 图13示出了具有50%丙烷-1,2,3-三醇的纳米混悬剂的透光率曲线。可以看出,在2000g场下在20分钟期间没有沉积(浅灰色线在50%和约53%透光率之间)。在比色皿底部没有沉积物。这表明,通过添加50%(v/v)丙烷-1,2,3-三醇,纳米混悬剂的稳定性得到进一步提高。

[0178] 实施例7:浓度均为5%(w/w)的姬松茸蘑菇纳米混悬剂和提取物的 β -1,3/1,6-葡聚糖的平均摩尔质量

[0179] 图14示出了如实施例3.1中制备之姬松茸纳米混悬剂和如实施例3.4中制备之提取物的 β -1,3/1,6-葡聚糖的微分重量分数(即,平均摩尔质量)(纳米混悬剂1:检测器中20 μ

1注射体积;纳米混悬剂2:检测器中10 μ l注射体积,提取物:检测器中10 μ l注射体积)。用两个注射体积来测量姬松茸纳米混悬剂的摩尔质量以显示分析方法的可靠性,所述方法显示是稳定的。姬松茸纳米混悬剂的活性物质 β -1,3/1,6-葡聚糖的平均摩尔质量为15至16kDa,而提取物为135kDa。这表明,本文所述的由天然材料制备纳米混悬剂的方法显著减小主要活性物质 β -1,3/1,6-葡聚糖的摩尔质量。这导致在施用纳米混悬剂中存在的 β -1,3/1,6-葡聚糖的吸收更高。

[0180] 实施例8:浓度均为5%(w/w)的姬松茸蘑菇纳米混悬剂和提取物的 β -1,3/1,6-葡聚糖的检测

[0181] Dectin-1是免疫细胞上检测人体中 β -1,3/1,6-葡聚糖的主要受体。图15分别示出了以下样品中dectin-1阳性单核细胞的相对量(以%计):未经刺激的外周血单核细胞(PBMC)、经5%(w/w)姬松茸纳米混悬剂(如实施例3.1中制备的)和5%(w/w)姬松茸提取物(如实施例3.4中制备的)刺激的PBMC。相对于未经刺激的样品,当用5%(w/w)姬松茸纳米混悬剂刺激时PBMC的数量增加409%,相比之下在用5%(w/w)姬松茸提取物刺激时增加122%。

[0182] 实施例9:通过浓度均为5%(w/w)的姬松茸蘑菇纳米混悬剂和提取物的细胞因子TNF- α 诱导

[0183] TNF- α 是疾病发生中的主要细胞因子之一。图16示出了由姬松茸纳米混悬剂(如实施例3.1中制备的)和提取物(如实施例3.4中制备的)引起的细胞因子TNF- α 的体外诱导的比较。通过姬松茸纳米混悬剂的TNF- α 诱导与所述提取物相比高60倍。

[0184] 实施例10:通过浓度均为5%(w/w)的姬松茸蘑菇纳米混悬剂和提取物的细胞因子IL-10诱导

[0185] 图17示出了由姬松茸纳米混悬剂(如实施例3.1中制备的)和提取物(如实施例3.4中制备的)引起的体外诱导中作为主要促炎细胞因子之一的细胞因子IL-10的比较。通过姬松茸纳米混悬剂的IL-10诱导与所述提取物相比高26.5倍。

[0186] 实施例11:作为在人体中产生效果的通过浓度均为5%(w/w)之姬松茸蘑菇纳米混悬剂和提取物的细胞因子IL-6诱导

[0187] 图18示出了由姬松茸纳米混悬剂(如实施例3.1中制备的)和提取物(如实施例3.4中制备的)引起的体外诱导中作为主要促炎细胞因子之一的细胞因子IL-6的比较。通过姬松茸纳米混悬剂的IL-10诱导与所述提取物相比高6.7倍。

[0188] 实施例12:浓度为5%(w/w)且具有7.5%脂质的姬松茸蘑菇纳米混悬剂的颗粒分布的改善

[0189] 将150g姬松茸粉末(颗粒尺寸 D_{90} :<320 μ m)、225g Lipoid P100(7.5%(w/w))和15g聚山梨酯**Tween**[®]80(0.5%(w/w))添加到3000g双蒸水中,得到姬松茸粉末在水中的5%(w/w)分散体。在湿式搅拌器式球磨机(X1型,Buehler AG,Switzerland)中如下研磨分散体:使用尺寸为0.4至0.5mm的钨稳定化氧化锆球直至颗粒尺寸(D_{90})为约15 μ m,然后使用尺寸为0.1mm的钨稳定化氧化锆球直至达到375nm的最终颗粒尺寸(D_{100})。在颗粒尺寸(D_{90})为约4 μ m时,添加30g(1%(w/w))**Kolliphor**[®]P407。纳米混悬剂的最终颗粒尺寸(D_{10})为375nm。不必对所得纳米混悬剂进行过滤。

[0190] 通过与实施例3.1相比额外添加2.5%(w/w)Lipoid P100,实现两方面的主要改善。首先,与实施例3.1中10 μ m(参见图19)的颗粒尺寸(D₁₀₀)相比,实现375nm(参见图20)的最终颗粒尺寸(D₁₀₀)。其次,与实施例3.1中的双模态颗粒分布相比,获得单模态颗粒分布(分别参见图19和20)。为了使纳米混悬剂保持稳定,优选地具有单模态颗粒分布以避免或降低可能发生并且导致不稳定纳米混悬剂的奥斯特瓦尔德熟化(Ostwald ripening)。该差异还可由这两个实施例的更详细颗粒分布清楚可见。在实施例3.1中,D₁₀颗粒尺寸为0.108 μ m,D₅₀颗粒尺寸为0.159 μ m,D₉₀颗粒尺寸为0.240 μ m,以及D₁₀₀颗粒尺寸为10 μ m(参见图19)。与此相比,实施例12的详细颗粒分布为:D₁₀颗粒尺寸为0.065 μ m,D₅₀颗粒尺寸为0.104 μ m,D₉₀颗粒尺寸为0.178 μ m,以及D₁₀₀颗粒尺寸为0.375 μ m(参见图20)。

[0191] 实施例13:作为在人机体中产生效果的通过实施例12之姬松茸蘑菇纳米混悬剂的CD25激活T细胞诱导

[0192] CD25激活T细胞是认为诱导从T辅助细胞2(Th2)应答转变为T辅助细胞1(Th1)应答的一个重要T细胞亚群。Th1/Th2平衡向Th1应答转移导致免疫系统的病毒防御能力提高。在以下实施例中,与市场上可获得的姬松茸粉末进行比较,用根据实施例12的包含姬松茸之纳米混悬剂在人中测试CD25激活T细胞的增加。

[0193] 将如实施例12中制备的纳米混悬剂与丙烷-1,2,3-三醇(甘油)混合以产生包含40%甘油的混合物。通过泵喷雾致动器将此混合物以3.78ml/天的剂量施用于第一组的八个人。该剂量相当于105mg姬松茸(干固体含量)。在所述第一组中,CD25激活T细胞在开始之后在4周内增加33%(参见图21)。出于比较原因,使第二组的八个人以2520mg的日建议剂量接受在胶囊剂中的姬松茸粉末(颗粒尺寸为约220 μ m)。在所述第二组中,CD25激活T细胞在开始之后在4周内增加11.5%(参见图22)。

[0194] 由上述数据可以看出,与粉末相比,实施例12的纳米混悬剂导致CD25激活T细胞增加约3倍。换句话说,实施例12的纳米混悬剂的效力大约是常规粉末的3倍。甚至更令人惊讶的是,与粉末相比,剂量降低24倍。

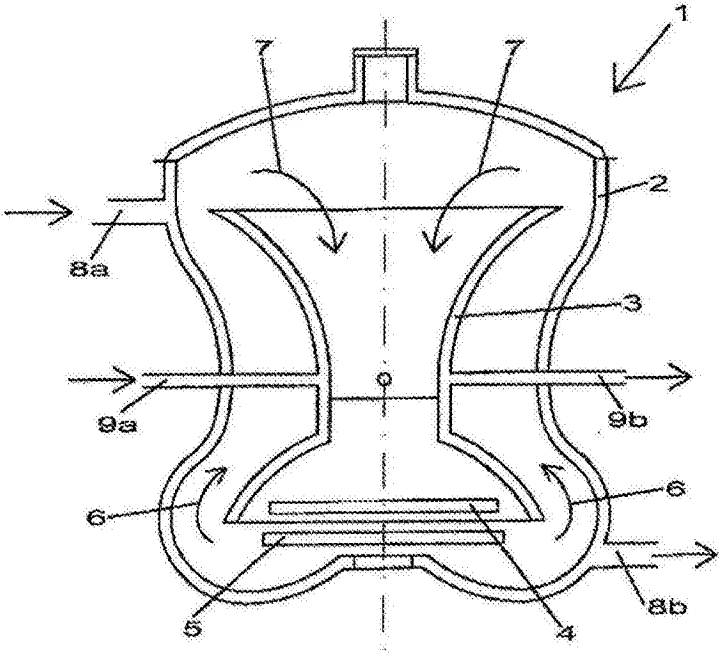


图1

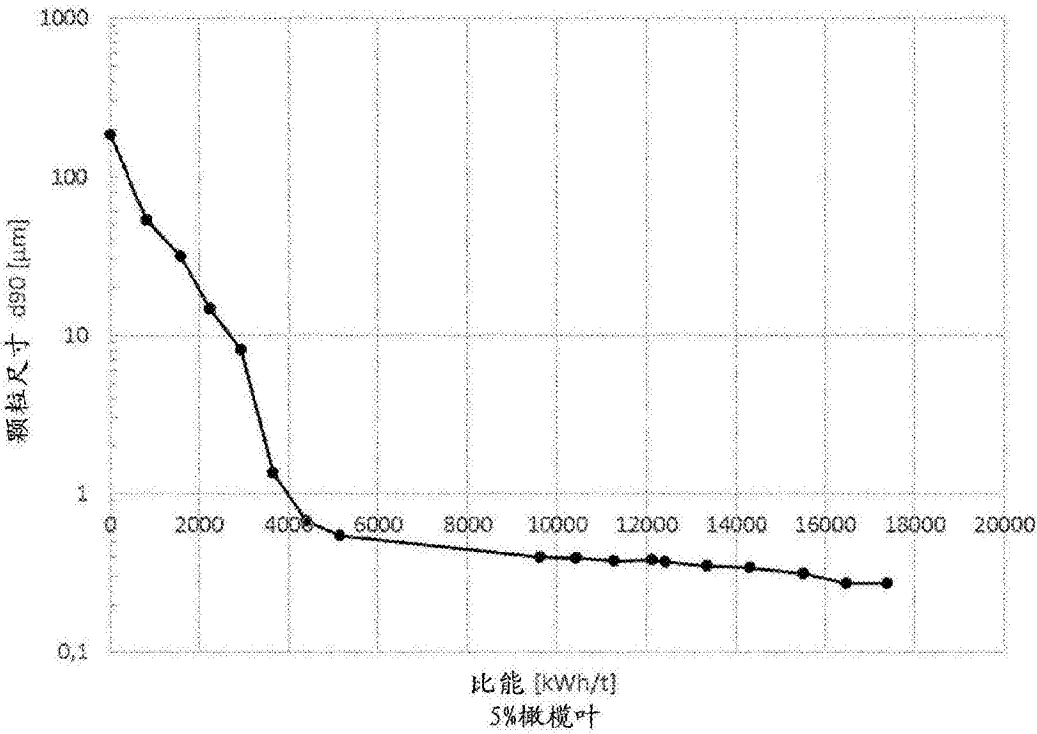


图2

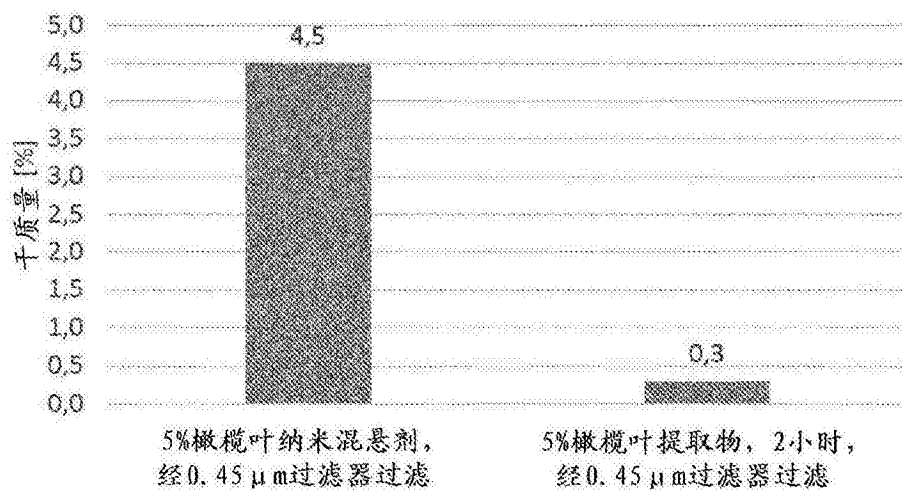


图3

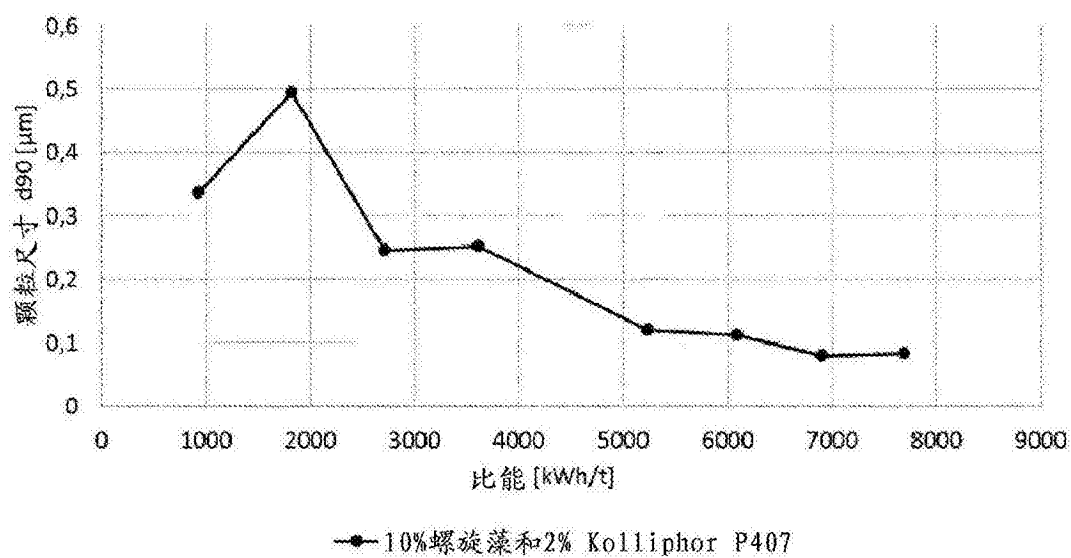


图4

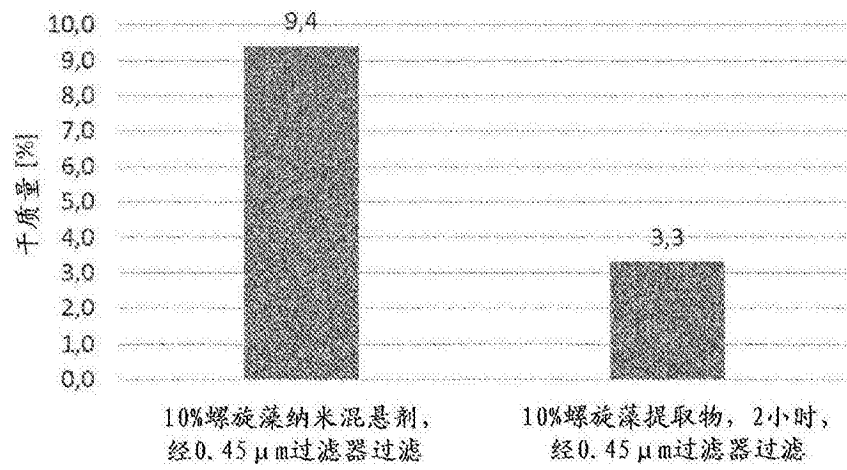


图5

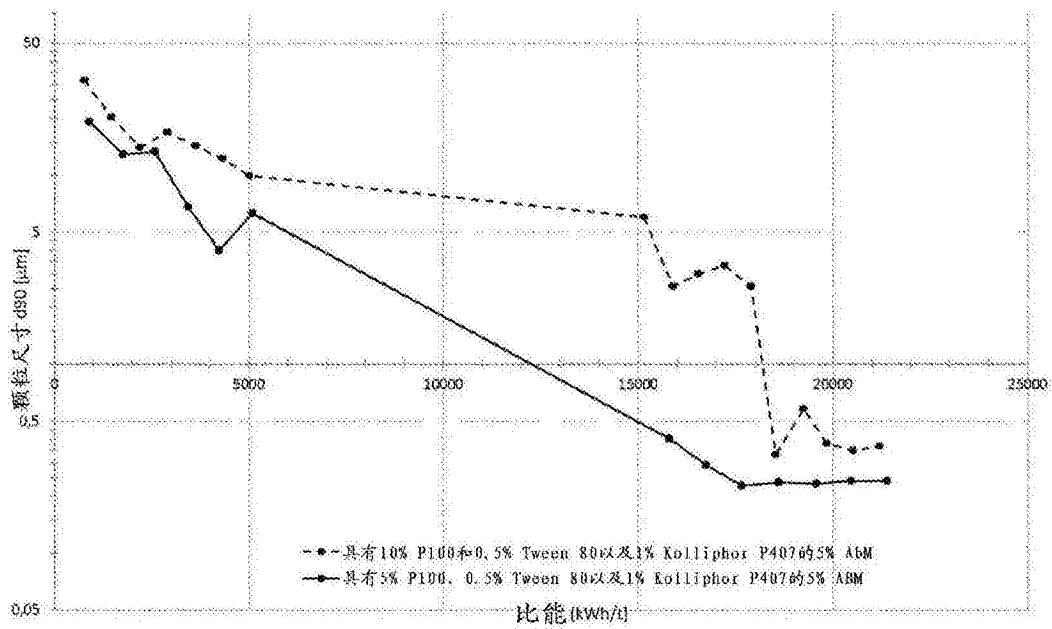


图6

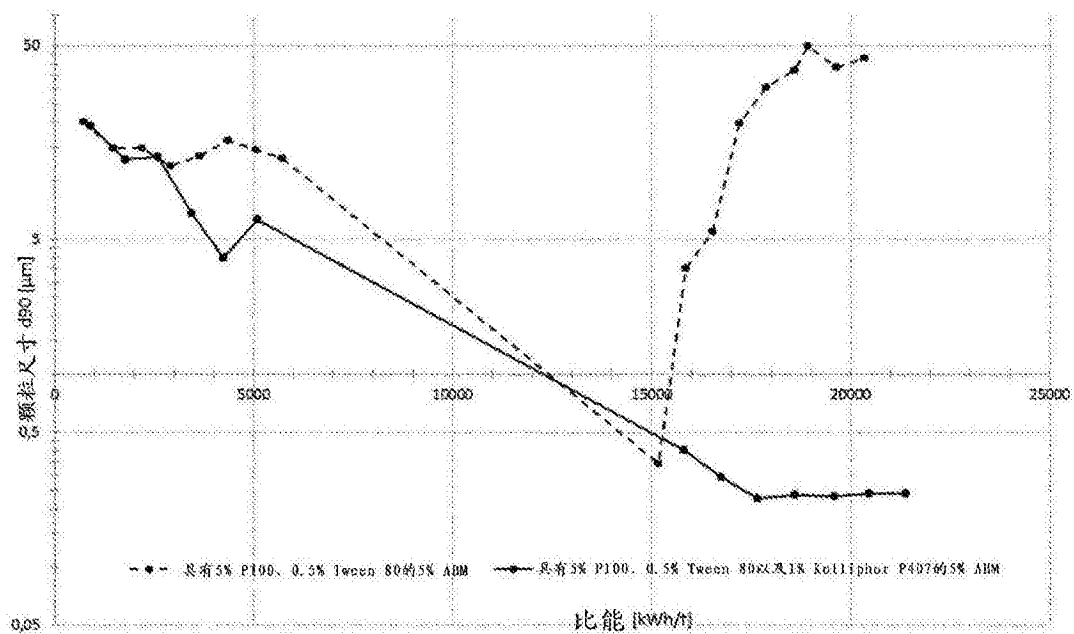


图7

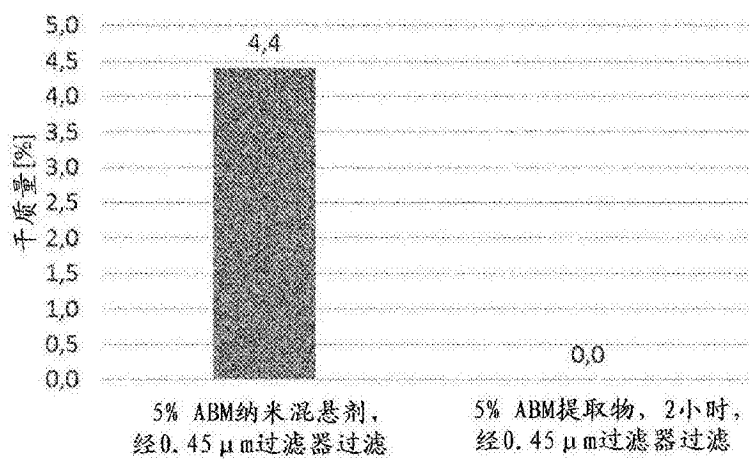


图8

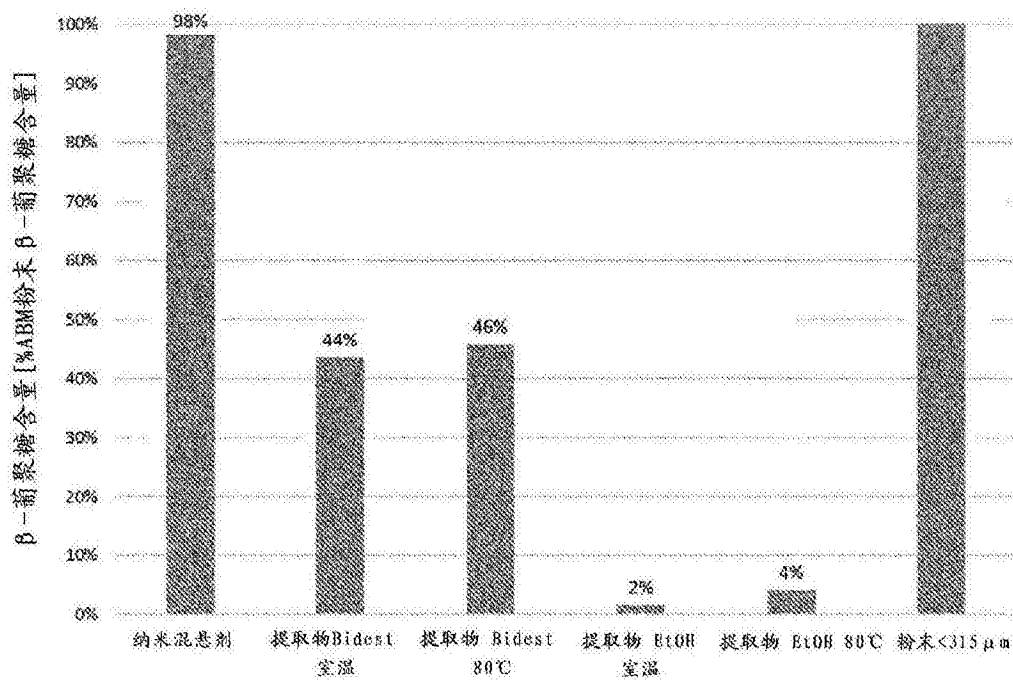


图9

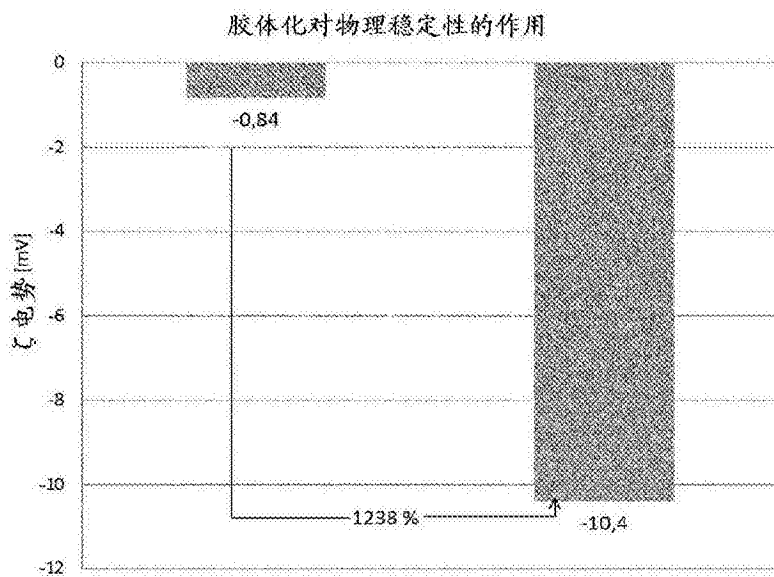


图10

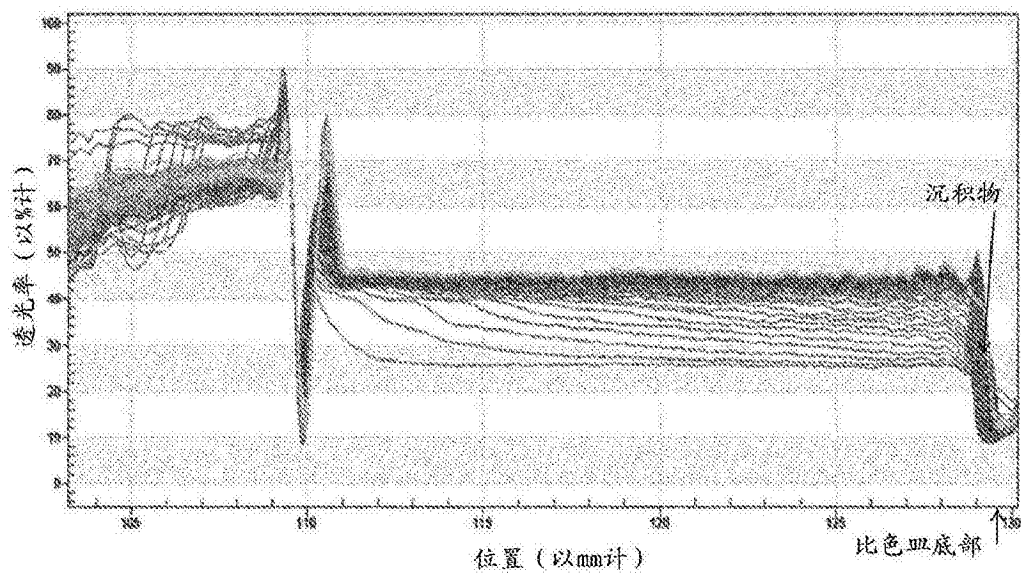


图11

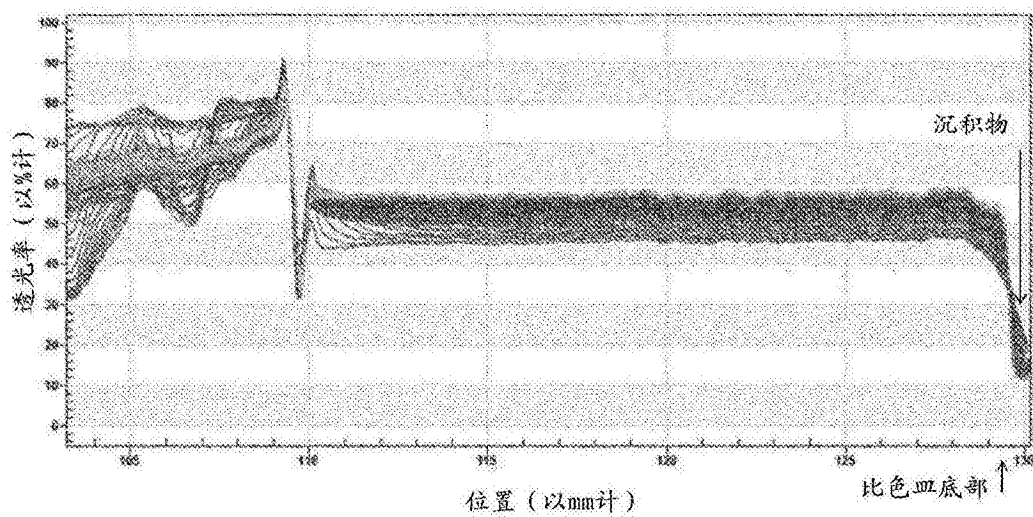


图12

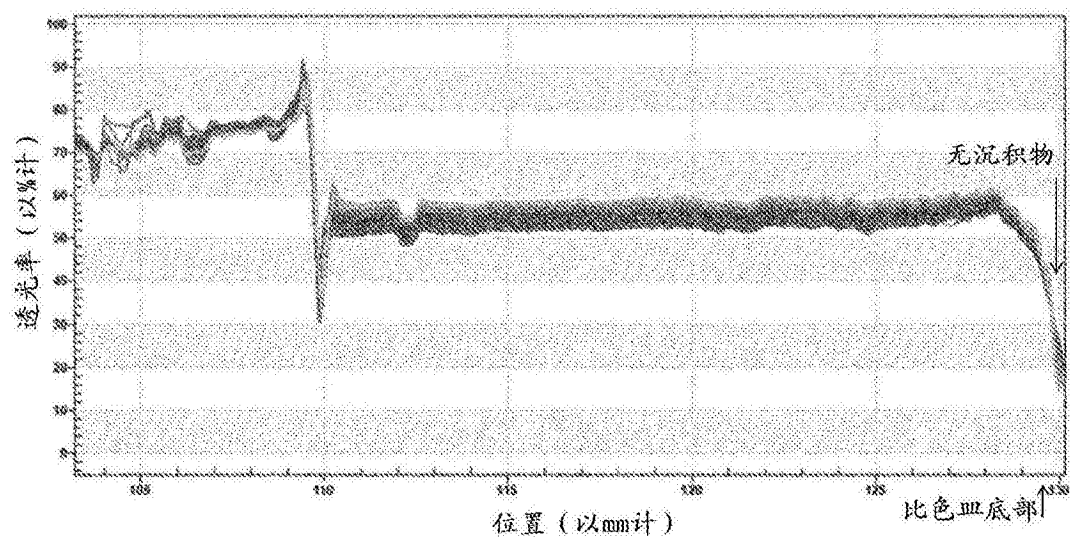


图13

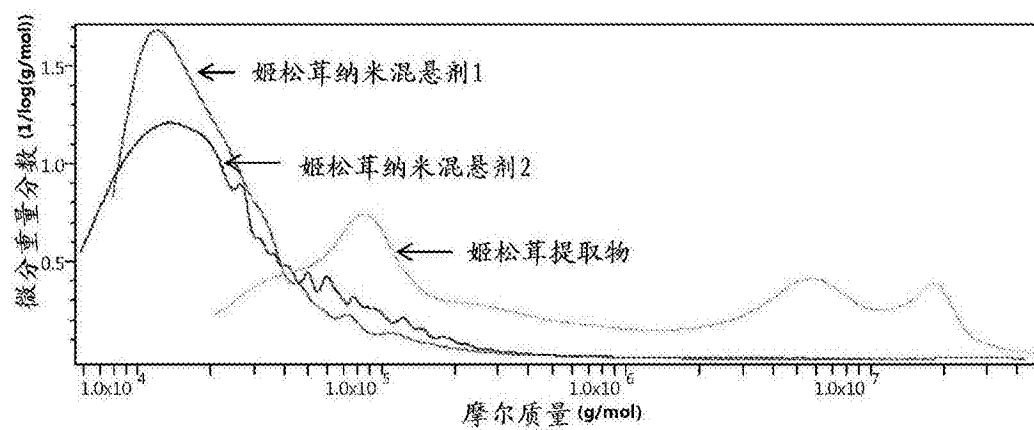


图14

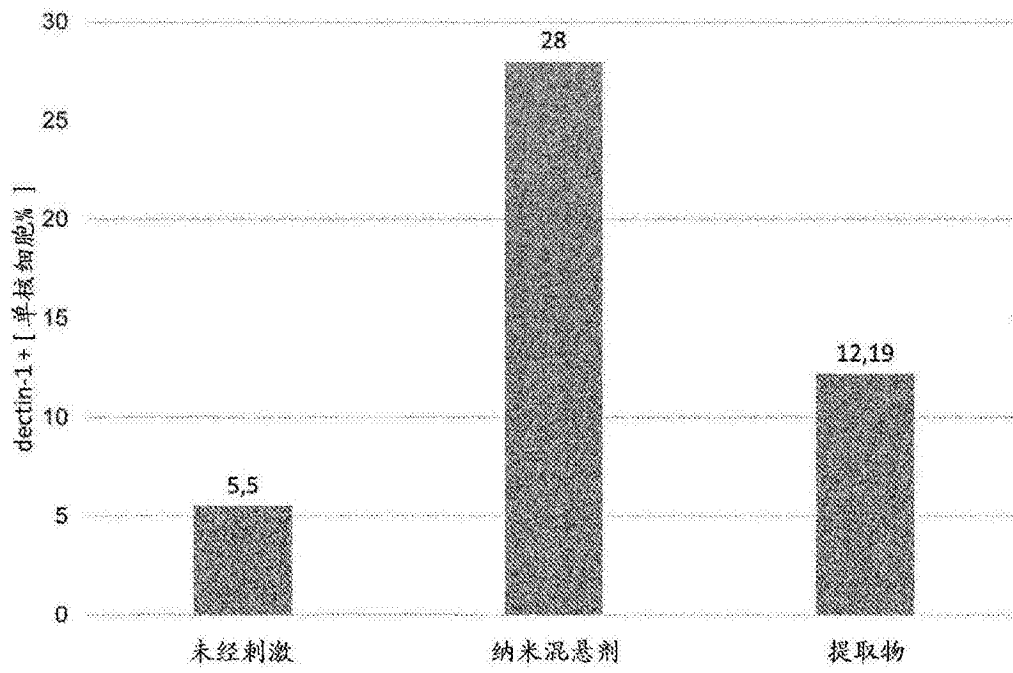


图15

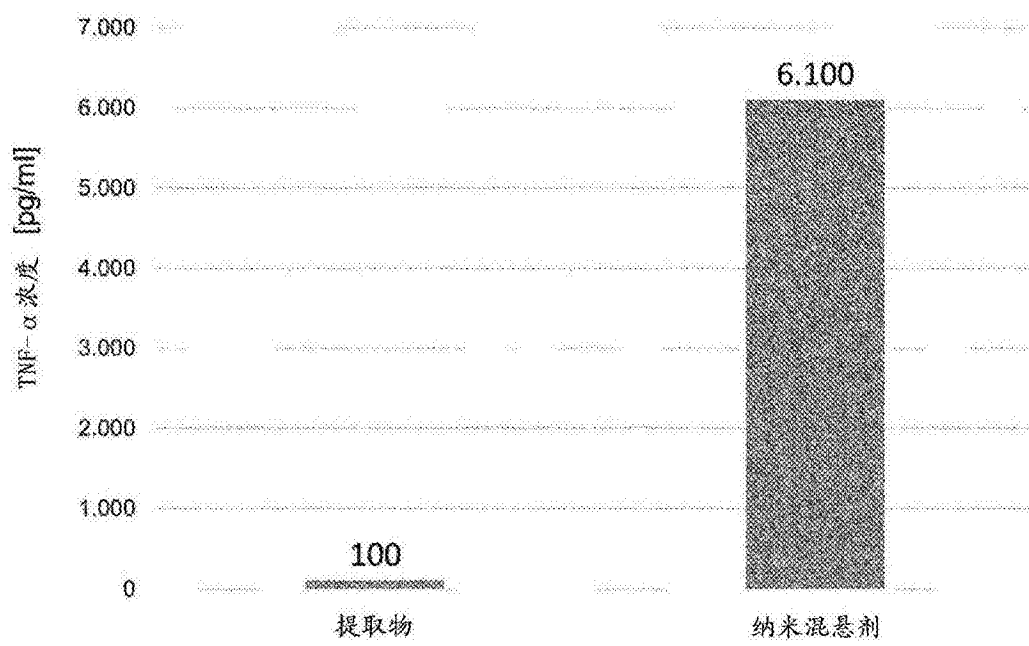


图16

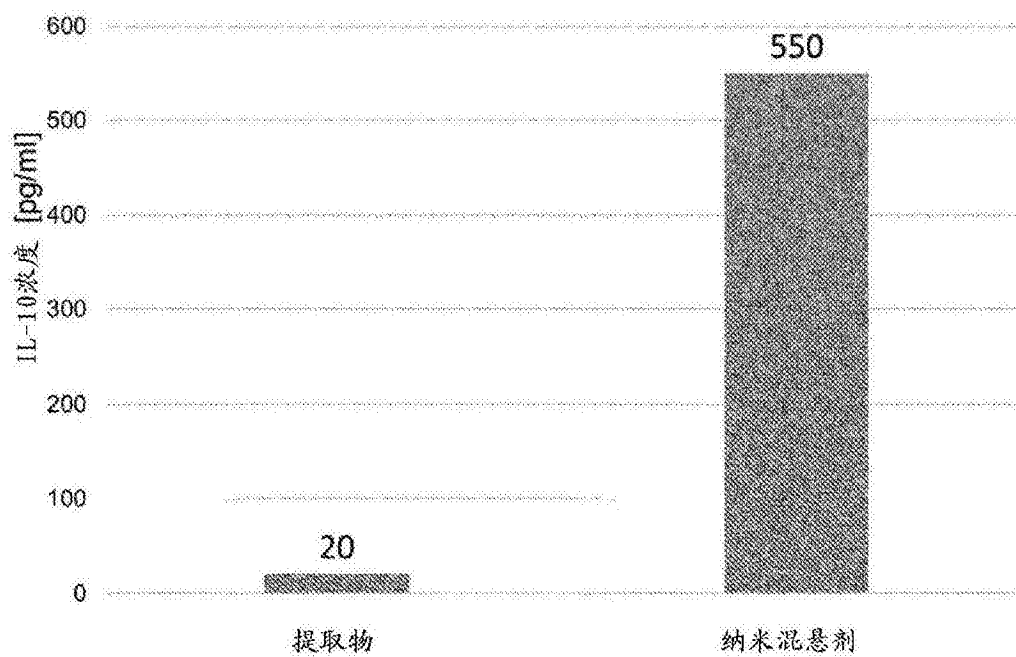


图17

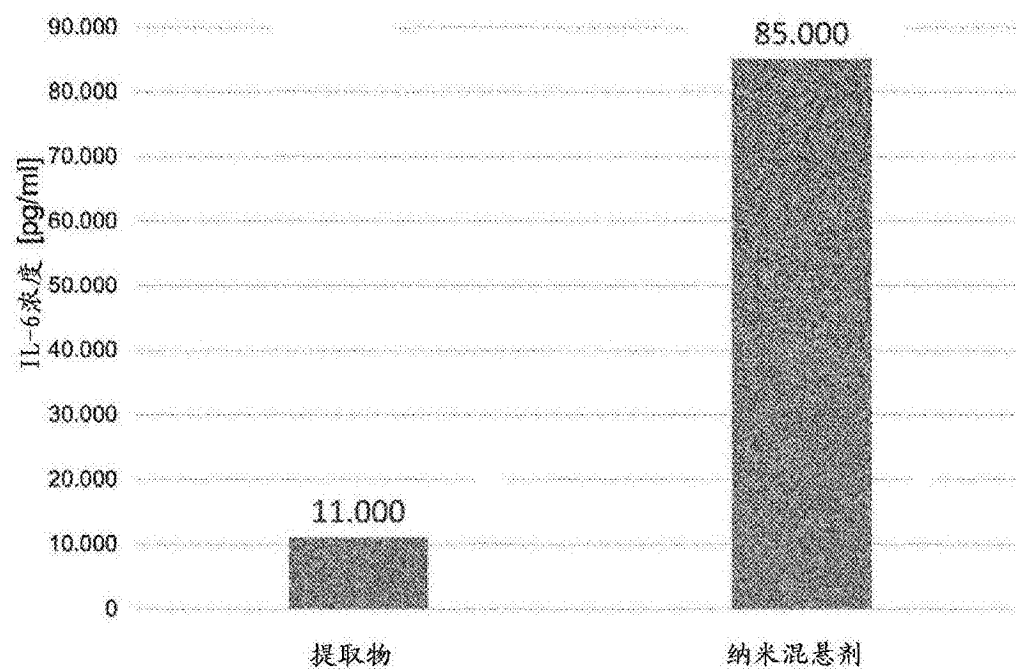


图18

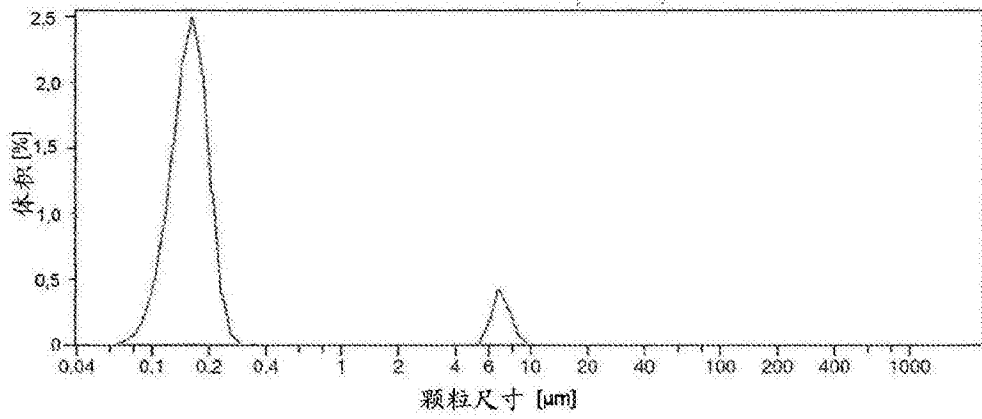


图19

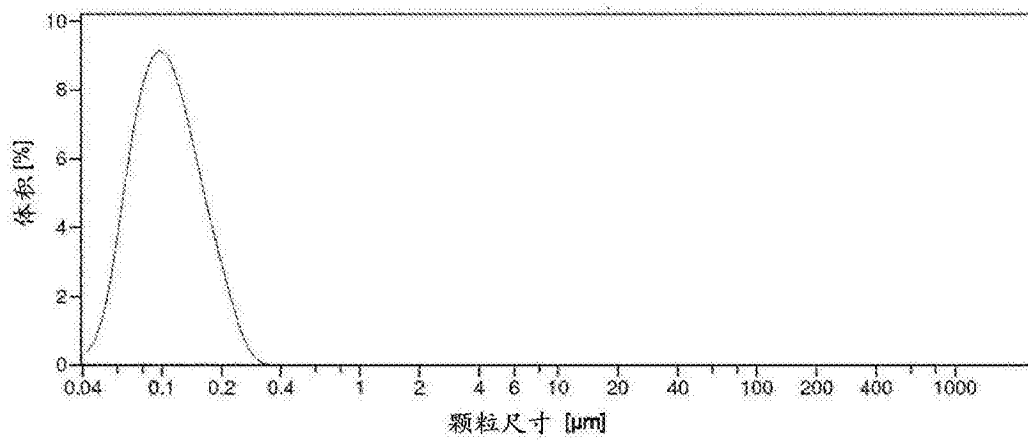


图20

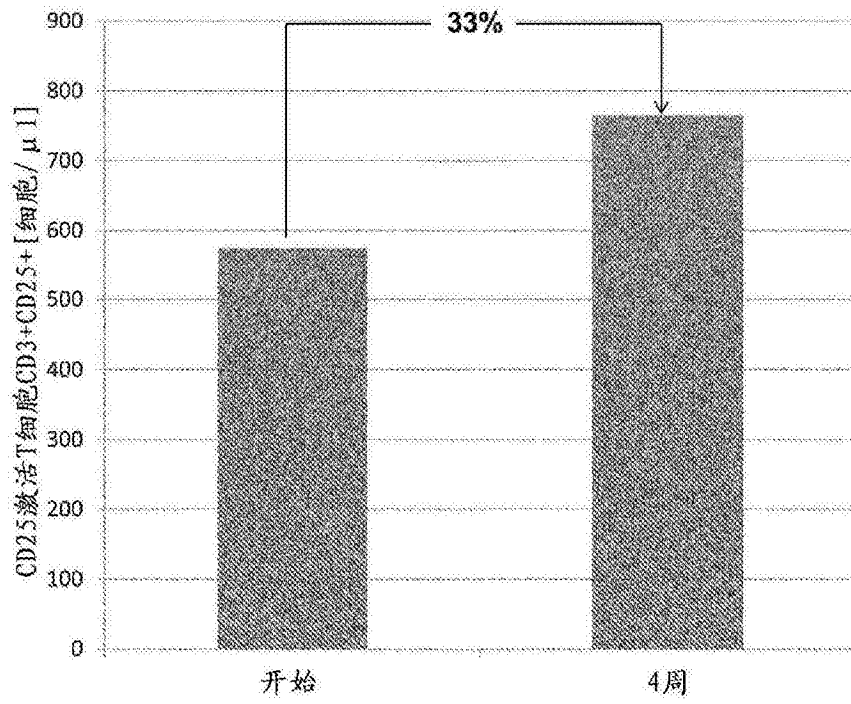


图21

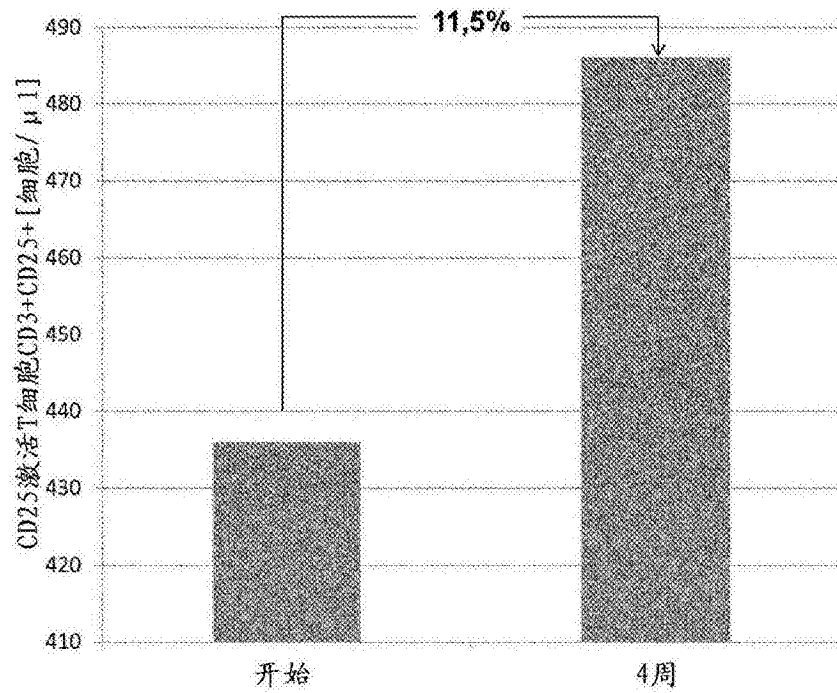


图22