



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107072965 B

(45) 授权公告日 2021.05.11

(21) 申请号 201580060789.2

A61K 31/436 (2006.01)

(22) 申请日 2015.11.05

A61K 47/34 (2017.01)

A61P 37/06 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 107072965 A

(43) 申请公布日 2017.08.18

(30) 优先权数据

62/075,864 2014.11.05 US

62/075,866 2014.11.05 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2017.05.03

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2015/059350 2015.11.05

(87) PCT国际申请的公布数据

W02016/073799 EN 2016.05.12

(73) 专利权人 西莱克塔生物科技公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 康林·奥尼尔 阿伦·P·格里泽

大卫·H·阿尔特罗伊特

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司

11227

代理人 郑斌 吴朝

(51) Int. Cl.

A61K 9/51 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 103491957 A, 2014.01.01

CN 103179955 A, 2013.06.26

WO 2010/075072 A2, 2010.07.01

CN 102740834 A, 2012.10.17

CN 101291658 A, 2008.10.22

CN 102871966 A, 2013.01.16

CN 103501786 A, 2014.01.08

US 2010/209472 A1, 2010.08.19

WO 2010/005726 A2, 2010.01.14

Michal E. Matteucci et al. Design of

Potent Amorphous Drug Nanoparticles for Rapid Generation of Highly Supersaturated Media.《MOLECULAR PHARMACEUTICS》.2007,第4卷(第5期),第782-793页.

Kirk A. Overhoff et al. Effect of Stabilizer on the Maximum Degree and Extent of Supersaturation and Oral Absorption of Tacrolimus Made By Ultra-Rapid Freezing.《Pharmaceutical Research》.2007,第25卷(第1期),第167-175页.

审查员 孙妍妍

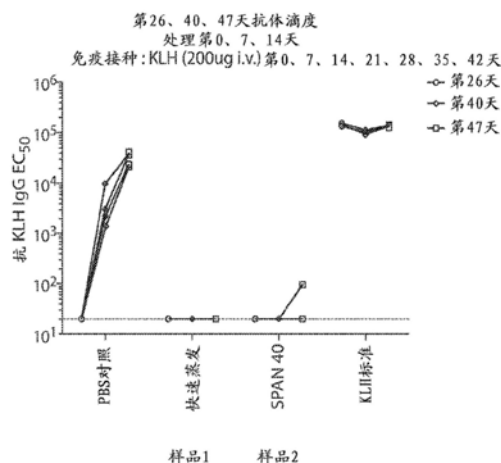
权利要求书3页 说明书36页 附图7页

(54) 发明名称

与具有处于稳定的超饱和状态之雷帕霉素的合成纳米颗粒相关的方法和组合物

(57) 摘要

公开了提供合成纳米载体的组合物和方法,所述合成纳米载体包含疏水性聚酯载体材料和稳定的超饱和量的雷帕霉素。在一些实施方案中,合成纳米载体还是最初可无菌过滤的。在另一些实施方案中,雷帕霉素在合成纳米载体组合物中以雷帕霉素/组合物中的疏水性聚酯载体材料小于50重量%的量存在。



1. 组合物,其包含:
包含疏水性聚酯载体材料和雷帕霉素的合成纳米载体;
其中所述雷帕霉素以稳定的超饱和量存在于所述合成纳米载体中,所述量为雷帕霉素/疏水性聚酯载体材料小于50重量%;
其中所述组合物最初是可通过0.22 μ m过滤器无菌过滤的;并且
其中所述合成纳米载体还包含HLB值小于或等于10的非离子表面活性剂,其中HLB值小于或等于10的非离子表面活性剂的量为:HLB值小于或等于10的非离子表面活性剂/疏水性聚酯载体材料重量为 ≥ 0.1 但 ≤ 15 重量%。
2. 权利要求1所述的组合物,其中所述雷帕霉素以小于45重量%的稳定的超饱和量存在。
3. 权利要求2所述的组合物,其中所述雷帕霉素以小于40重量%的稳定的超饱和量存在。
4. 权利要求3所述的组合物,其中所述雷帕霉素以小于35重量%的稳定的超饱和量存在。
5. 权利要求4所述的组合物,其中所述雷帕霉素以小于30重量%的稳定的超饱和量存在。
6. 权利要求3所述的组合物,其中所述雷帕霉素以小于25重量%的稳定的超饱和量存在。
7. 权利要求6所述的组合物,其中所述雷帕霉素以小于20重量%的稳定的超饱和量存在。
8. 权利要求7所述的组合物,其中所述雷帕霉素以小于15重量%的稳定的超饱和量存在。
9. 权利要求8所述的组合物,其中所述雷帕霉素以小于10重量%的稳定的超饱和量存在。
10. 权利要求1所述的组合物,其中所述雷帕霉素以大于7重量%的稳定的超饱和量存在。
11. 权利要求1所述的组合物,其中所述疏水性聚酯载体材料包含PLA、PLG、PLGA或聚己内酯。
12. 权利要求11所述的组合物,其中所述疏水性聚酯载体材料还包含PLA-PEG、PLGA-PEG或PCL-PEG。
13. 权利要求1所述的组合物,其中所述合成纳米载体中的疏水性聚酯载体材料的量为:疏水性聚酯载体材料/总固体为5-95重量%。
14. 权利要求13所述的组合物,其中所述合成纳米载体中的疏水性聚酯载体材料的量为:疏水性聚酯载体材料/总固体为60-95重量%。
15. 权利要求1所述的组合物,其中所述HLB值小于或等于10的非离子表面活性剂包含山梨聚糖酯、脂肪醇、脂肪酸酯、乙氧基化脂肪醇、泊洛沙姆或脂肪酸。
16. 权利要求15所述的组合物,其中所述HLB值小于或等于10的非离子表面活性剂包含SPAN 40、SPAN 20、油醇、硬脂醇、棕榈酸异丙酯、单硬脂酸甘油酯、BRIJ 52、BRIJ 93、Pluronic P-123、Pluronic L-31、棕榈酸、十二烷酸、三棕榈酸甘油酯或三亚油酸甘油酯。

17. 权利要求16所述的组合物,其中所述HLB值小于或等于10的非离子表面活性剂为SPAN 40。

18. 权利要求1所述的组合物,其中所述HLB值小于或等于10的非离子表面活性剂包封在所述合成纳米载体中、存在于所述合成纳米载体的表面上,或两者皆有。

19. 权利要求1所述的组合物,其中HLB值小于或等于10的非离子表面活性剂的量为:HLB值小于或等于10的非离子表面活性剂/疏水性聚酯载体材料重量为 ≥ 1 但 ≤ 13 重量%。

20. 权利要求19所述的组合物,其中HLB值小于或等于10的非离子表面活性剂的量为:HLB值小于或等于10的非离子表面活性剂/疏水性聚酯载体材料重量为 ≥ 1 但是 ≤ 9 重量%。

21. 权利要求1所述的组合物,其中使用动态光散射获得的所述合成纳米载体的粒度分布的平均值为直径大于120nm。

22. 权利要求21所述的组合物,其中所述直径大于150nm。

23. 权利要求22所述的组合物,其中所述直径大于200nm。

24. 权利要求23所述的组合物,其中所述直径大于250nm。

25. 权利要求21所述的组合物,其中所述直径小于300nm。

26. 权利要求21所述的组合物,其中所述直径小于250nm。

27. 权利要求25所述的组合物,其中所述直径小于200nm。

28. 权利要求1所述的组合物,其中所述雷帕霉素包封在所述合成纳米载体中。

29. 权利要求1所述的组合物,其中所述组合物还包含抗原。

30. 权利要求29所述的组合物,其中所述抗原与所述合成纳米载体混合在所述组合物中。

31. 权利要求1所述的组合物,其中所述组合物还包含可药用的载体。

32. 药盒,其包含:

前述权利要求中任一项所述的组合物。

33. 权利要求32所述的药盒,其中当所述组合物不包含抗原时,所述药盒还包含抗原。

34. 权利要求33所述的药盒,其中所述组合物和抗原包含在分开的容器中。

35. 权利要求33所述的药盒,其中所述组合物和抗原包含在同一容器中。

36. 权利要求32所述的药盒,其还包含使用说明书。

37. 权利要求1-31中任一项所述的组合物在制备用于在方法中使用的药物中的用途,所述方法包括向对象施用所述药物。

38. 权利要求37所述的用途,其中当所述组合物不包含抗原时,所述方法还包括向所述对象施用抗原。

39. 权利要求38所述的用途,其中所述抗原包含在不同的合成纳米载体中。

40. 权利要求38所述的用途,其中所述抗原不与任何合成纳米载体偶联。

41. 权利要求37所述的用途,其中所述施用是通过皮内、肌肉、静脉内、腹膜内或皮下施用。

42. 方法,其用于制备权利要求1所述的组合物,所述方法包括:

获得或提供所述疏水性聚酯载体材料,

获得或提供雷帕霉素,其量超过雷帕霉素的饱和极限,

将所述疏水性聚酯载体材料和雷帕霉素合并,

通过添加HLB值小于或等于10的非离子表面活性剂来使所述雷帕霉素稳定,其中HLB值小于或等于10的非离子表面活性剂的量为:HLB值小于或等于10的非离子表面活性剂/疏水性聚酯载体材料重量为 ≥ 0.1 但 ≤ 15 重量%,以及

过滤所得组合物,其中所述过滤包括通过 $0.22\mu\text{m}$ 过滤器过滤。

43. 权利要求42所述的方法,其中所述HLB值小于或等于10的非离子表面活性剂包含山梨聚糖酯、脂肪醇、脂肪酸酯、乙氧基化脂肪醇、泊洛沙姆或脂肪酸。

44. 权利要求43所述的方法,其中所述HLB值小于或等于10的非离子表面活性剂包含SPAN 40、SPAN 20、油醇、硬脂醇、棕榈酸异丙酯、单硬脂酸甘油酯、BRIJ 52、BRIJ 93、Pluronic P-123、Pluronic L-31、棕榈酸、十二烷酸、三棕榈酸甘油酯或三亚油酸甘油酯。

45. 权利要求44所述的方法,其中所述HLB值小于或等于10的非离子表面活性剂为SPAN 40。

46. 权利要求42-45中任一项所述的方法,其中HLB值小于或等于10的非离子表面活性剂的量为:HLB值小于或等于10的非离子表面活性剂/疏水性聚酯载体材料重量为 ≥ 1 但 ≤ 13 重量%。

47. 权利要求46所述的方法,其中HLB值小于或等于10的非离子表面活性剂的量为:HLB值小于或等于10的非离子表面活性剂/疏水性聚酯载体材料重量为 ≥ 1 但 ≤ 9 重量%。

48. 权利要求42所述的方法,其中在溶剂存在下,利用组合的疏水性聚酯载体材料和雷帕霉素的快速溶剂蒸发来使雷帕霉素稳定。

49. 权利要求42所述的方法,其中所述方法还包括确定所述疏水性聚酯载体材料中雷帕霉素的饱和极限。

50. 权利要求42所述的方法,其中雷帕霉素的量超过饱和极限大于1%。

51. 权利要求50所述的方法,其中雷帕霉素的量超过饱和极限至少5%。

52. 权利要求51所述的方法,其中雷帕霉素的量超过饱和极限至少10%。

53. 权利要求52所述的方法,其中雷帕霉素的量超过饱和极限至少15%。

54. 权利要求53所述的方法,其中雷帕霉素的量超过饱和极限至少20%。

55. 权利要求54所述的方法,其中雷帕霉素的量超过饱和极限至少25%。

56. 权利要求55所述的方法,其中雷帕霉素的量超过饱和极限至少30%。

57. 权利要求56所述的方法,其中雷帕霉素的量超过饱和极限至少35%。

58. 权利要求42所述的方法,其中所述疏水性聚酯载体材料包含PLA、PLG、PLGA或聚己内酯。

59. 权利要求58所述的方法,其中所述疏水性聚酯载体材料还包含PLA-PEG、PLGA-PEG或PCL-PEG。

60. 由权利要求42-45和48-59中任一项所述的方法制备的组合物。

与具有处于稳定的超饱和状态之雷帕霉素的合成纳米颗粒相关的方法和组合物

[0001] 相关申请

[0002] 本申请根据35U.S.C.§119要求2014年11月5日提交的美国临时申请62/075,864和2014年11月5日提交的62/075,866的权益,其全部内容通过引用并入本文。

技术领域

[0003] 本发明涉及合成纳米载体,其包含疏水性聚酯载体材料和稳定的超饱和量的雷帕霉素。优选地,这些合成纳米载体最初是可无菌过滤的,并且在一些实施方案中表现出体内效力。

[0004] 发明概述

[0005] 已经令人惊讶地发现,在合成纳米载体形成期间,制剂中雷帕霉素的相对于所述制剂中雷帕霉素的溶解度极限的浓度可以对所得合成纳米载体诱导免疫耐受性的能力具有显著影响。此外,这些雷帕霉素如何通过合成纳米载体分散可以影响所得合成纳米载体是否最初可无菌过滤。具体地,提供了在导致雷帕霉素浓度超过其在形成的纳米载体悬浮液中的溶解度的条件下产生的合成纳米载体的组合物和相关方法。这样的合成纳米载体可以提供更持久的免疫耐受性,并且最初可无菌过滤。

[0006] 在一个方面,提供了包含合成纳米载体的组合物,所述合成纳米载体包含疏水性聚酯载体材料和雷帕霉素,其中所述雷帕霉素以稳定的超饱和量存在于所述合成纳米载体中,所述量基于雷帕霉素的重量相对于疏水性聚酯载体材料的重量为小于50重量%

[0007] 在本文提供的任何一种组合物或方法的一个实施方案中,重量是在合成纳米载体配制期间组合的材料的配方重量。在本文提供的任何一种组合物或方法的一个实施方案中,重量是所得合成纳米载体组合物中材料的重量。

[0008] 在本文提供的任何一种组合物或方法的一个实施方案中,雷帕霉素以小于45重量%的稳定的超饱和量存在。在本文提供的任何一种组合物或方法的一个实施方案中,雷帕霉素以小于40重量%的稳定的超饱和量存在。在本文提供的任何一种组合物或方法的一个实施方案中,雷帕霉素以小于35重量%的稳定的超饱和量存在。在本文提供的任何一种组合物或方法的一个实施方案中,雷帕霉素以小于30重量%的稳定的超饱和量存在。在本文提供的任何一种组合物或方法的一个实施方案中,雷帕霉素以小于25重量%的稳定的超饱和量存在。在本文提供的任何一种组合物或方法的一个实施方案中,雷帕霉素以小于20重量%的稳定的超饱和量存在。在本文提供的任何一种组合物或方法的一个实施方案中,雷帕霉素以小于15重量%的稳定的超饱和量存在。在本文提供的任何一种组合物或方法的一个实施方案中,雷帕霉素以小于10重量%的稳定的超饱和量存在。在本文提供的任何一种组合物或方法的一个实施方案中,雷帕霉素以大于7重量%的稳定的超饱和量存在。

[0009] 在本文提供的任何一种组合物和方法的一个实施方案中,疏水性聚酯载体材料包含PLA、PLG、PLGA或聚己内酯。在本文提供的任何一种组合物和方法的一个实施方案中,疏水性聚酯载体材料还包含PLA-PEG、PLGA-PEG或PCL-PEG。

[0010] 在本文提供的任何一种组合物和方法的一个实施方案中,合成纳米载体中疏水性聚酯载体材料的量为:疏水性聚酯载体材料/总固体为5-95重量%。在本文提供的任何一种组合物和方法的一个实施方案中,合成纳米载体中的疏水性聚酯载体材料的量为:疏水性聚酯载体材料/总固体为60-95重量%。

[0011] 在本文提供的任何一种组合物和方法的一个实施方案中,合成纳米载体还包含HLB值小于或等于10的非离子表面活性剂。在本文提供的任何一种组合物和方法的一个实施方案中,HLB值小于或等于10的非离子表面活性剂包含山梨聚糖酯、脂肪醇、脂肪酸酯、乙氧基化脂肪醇、泊洛沙姆、脂肪酸、胆固醇、胆固醇衍生物或胆汁酸或盐。在本文提供的任何一种组合物和方法的一个实施方案中,HLB值小于或等于10的非离子表面活性剂包含SPAN 40、SPAN 20、油醇、硬脂醇、棕榈酸异丙酯、单硬脂酸甘油酯、BRIJ 52、BRIJ 93、Pluronic P-123、Pluronic L-31、棕榈酸、十二烷酸、三棕榈酸甘油酯或三亚油酸甘油酯。在本文提供的任何一种组合物和方法的一个实施方案中,HLB值小于或等于10的非离子表面活性剂为SPAN 40。

[0012] 在本文提供的任何一种组合物和方法的一个实施方案中,HLB值小于或等于10的非离子表面活性剂包封在合成纳米载体中,存在于合成纳米载体的表面上,或两者皆有。在本文提供的任何一种组合物和方法的一个实施方案中,HLB值小于或等于10的非离子表面活性剂的量为:HLB值小于或等于10的非离子表面活性剂/疏水性聚酯载体材料为 ≥ 0.1 但 ≤ 15 重量%。在本文提供的任何一种组合物和方法的一个实施方案中,HLB值小于或等于10的非离子表面活性剂的量为:HLB值小于或等于10的非离子表面活性剂/疏水性聚酯载体材料为 ≥ 1 但 ≤ 13 重量%。在本文提供的任何一种组合物和方法的一个实施方案中,HLB值小于或等于10的非离子表面活性剂的量为:HLB值小于或等于10的非离子表面活性剂/疏水性聚酯载体材料 ≥ 1 但 ≤ 9 重量%。

[0013] 在本文提供的任何一种组合物和方法的一个实施方案中,组合物最初可通过0.22 μm 过滤器无菌过滤。

[0014] 在本文提供的任何一种组合物和方法的一个实施方案中,使用动态光散射获得的合成纳米载体粒度分布的平均值为直径大于120nm。在本文提供的任何一种组合物和方法的一个实施方案中,直径大于150nm。在本文提供的任何一种组合物和方法的一个实施方案中,直径大于200nm。在本文提供的任何一种组合物和方法的一个实施方案中,直径大于250nm。在本文提供的任何组合物和方法的一个实施方案中,直径小于300nm。在本文提供的任何一种组合物和方法的一个实施方案中,直径小于250nm。在本文提供的任何一种组合物和方法的一个实施方案中,直径小于200nm。

[0015] 在本文提供的任何一种组合物和方法的一个实施方案中,雷帕霉素包封在合成纳米载体中。

[0016] 在本文提供的任何一种组合物和方法的一个实施方案中,组合物还包含抗原。在本文提供的任何一种组合物和方法的一个实施方案中,抗原与组合物中的合成纳米载体混合。

[0017] 在本文提供的任何一种组合物或方法的一个实施方案中,组合物还包含可药周的载体。

[0018] 在另一方面,提供了包含本文提供的任何一种组合物的药盒。在提供的任何一种

药盒的一个实施方案中,药盒用于本文提供的任何一种方法。在提供的任何一种药盒的一个实施方案中,当组合物不包含抗原时,药盒还包含抗原。在提供的任何一种药盒的一个实施方案中,组合物和抗原包含在分开的容器中。在提供的任何一种药盒的一个实施方案中,组合物和抗原包含在同一容器中。在提供的任何一种药盒的一个实施方案中,药盒还包含使用说明书。在提供的任何一种药盒的一个实施方案中,使用说明书包含对本文提供的任何一种方法的描述。

[0019] 在另一方面,提供了这样的方法,其包括向对象施用本文提供的任何一种组合物。在本文提供的任何一种方法的一个实施方案中,当组合物不包含抗原时,所述方法还包括向对象施用抗原。在本文提供的任何一种方法的一个实施方案中,抗原包含在不同的合成纳米载体中。在本文提供的任何一种方法的一个实施方案中,抗原不与任何合成纳米载体偶联。在本文提供的任何一种方法的一个实施方案中,施用是通过皮内、肌肉内、静脉内、腹膜内或皮下进行施用。

[0020] 另一方面,提供了用于制备合成纳米载体的方法,所述合成纳米载体包含疏水性聚酯载体材料和雷帕霉素,所述方法包括获得或提供疏水性聚酯载体材料,获得或提供超过雷帕霉素饱和极限的量的雷帕霉素,将所述疏水性聚酯载体材料和所述雷帕霉素组合,以及形成合成纳米载体,使得雷帕霉素处于稳定的超饱和量。

[0021] 另一方面,提供了用于制备合成纳米载体的方法,所述合成纳米载体包含疏水性聚酯载体材料和雷帕霉素,所述方法包括获得或提供疏水性聚酯载体材料,获得或提供超过雷帕霉素饱和极限的量的雷帕霉素,将所述疏水性聚酯载体材料和所述雷帕霉素组合,以及使所述雷帕霉素稳定。

[0022] 在任何一种制备方法的一个实施方案中,在HLB值小于或等于10的非离子表面活性剂的存在下形成合成纳米载体,或者通过添加HLB值小于或等于10的非离子表面活性剂使雷帕霉素稳定。

[0023] 在任何一种制备方法的一个实施方案中,在溶剂存在下,利用组合的疏水性聚酯载体材料和雷帕霉素的快速溶剂蒸发来形成合成纳米载体或使雷帕霉素稳定。

[0024] 在任何一种制备方法的一个实施方案中,利用固体熔融法和/或冷却注射成型来形成合成纳米载体或使雷帕霉素稳定。

[0025] 在任何一种制备方法的一个实施方案中,所述方法还包括确定疏水性聚酯载体材料中雷帕霉素的饱和极限。在任一种制备方法的一个实施方案中,使用本文提供的任何一种公式进行所述确定。

[0026] 在任何一种制备方法的一个实施方案中,所述方法还包括过滤所得组合物。在任一种制备方法的一个实施方案中,过滤包括通过0.22 μ m过滤器的过滤。

[0027] 在另一方面,提供了通过本文提供的任何一种制备方法制备的组合物。

[0028] 在本文提供的任何一种组合物或方法的一个实施方案中,雷帕霉素以超饱和量存在,所述量为疏水性聚酯载体材料中雷帕霉素的饱和极限以上至少1%。在本文提供的任何一种组合物或方法的一个实施方案中,雷帕霉素以超饱和量存在,所述量为疏水性聚酯载体材料中雷帕霉素的饱和极限以上至少5%。在本文提供的任何一种组合物或方法的一个实施方案中,雷帕霉素以超饱和量存在,所述量为疏水性聚酯载体材料中雷帕霉素的饱和极限以上至少10%。在本文提供的任何一种组合物或方法的一个实施方案中,雷帕霉素以

超饱和量存在,所述量为疏水性聚酯载体材料中雷帕霉素的饱和极限以上至少15%。在本文提供的任何一种组合物或方法的一个实施方案中,雷帕霉素以超饱和量存在,所述量为疏水性聚酯载体材料中雷帕霉素的饱和极限以上至少20%。在本文提供的任何一种组合物或方法的一个实施方案中,雷帕霉素以超饱和量存在,所述量为疏水性聚酯载体材料中雷帕霉素的饱和极限以上至少25%。在本文提供的任何一种组合物或方法的一个实施方案中,雷帕霉素以超饱和量存在,所述量为疏水性聚酯载体材料中雷帕霉素的饱和极限以上至少30%。

[0029] 在本文提供的任何一种组合物或方法的另一个实施方案中,雷帕霉素的量超过饱和和极限至少1%。在另一个实施方案中,雷帕霉素的量超过饱和和极限至少5%。在另一个实施方案中,雷帕霉素的量超过饱和和极限至少10%。在另一个实施方案中,雷帕霉素的量超过饱和和极限至少15%。在另一个实施方案中,雷帕霉素的量超过饱和和极限至少20%。在另一个实施方案中,雷帕霉素的量超过饱和和极限至少25%。在另一个实施方案中,雷帕霉素的量超过饱和和极限至少30%。

[0030] 在另一方面,提供了一些实施例中所提供的任何一个公式。本文提供的任何一种方法可以包括使用所提供的任何一种公式确定雷帕霉素的浓度的步骤。在本文提供的任何一种方法的一个实施方案中,所述公式用于确定疏水性聚酯载体材料中雷帕霉素的饱和和极限。

[0031] 在另一方面,提供了任何一个实施例的组合物。

[0032] 在另一方面,提供了制备本文提供的任何一种组合物(例如实施例的任何一种组合物)的方法。

[0033] 在另一方面,提供了制备本文提供的任何一种组合物或药盒的方法。在任何一种这些方法中的一个实施方案中,制备方法包括本文提供的任何一种方法的步骤。在任何一种这些方法中的另一个实施方案中,制备方法包括本文提供的任何一种方法(例如实施例中提供的任何一种方法)的步骤。

[0034] 在另一方面,提供了本文提供的任何一种组合物或药盒在制备用于在对象中促进免疫耐受性之药物中的用途。在本文提供的任何一种用途的另一个实施方案中,所述用途用于实现本文提供的任何一种方法。

[0035] 在另一方面,本文提供的任何一种组合物或药盒可用于本文提供的任何一种方法。

[0036] 在另一方面,提供了制造旨在促进免疫耐受性的药物的方法。在一个实施方案中,药物包含本文提供的任何一种组合物。

[0037] 附图简述

[0038] 图1示出了雷帕霉素损失和回收分析的结果,其例证了超饱和量的雷帕霉素的测定。

[0039] 图2示出了施用如本文所述的具有超饱和量雷帕霉素之合成纳米载体情况下的IgG水平。

[0040] 图3示出了施用如本文所述的具有超饱和量雷帕霉素之合成纳米载体情况下的IgG水平。

[0041] 图4示出了使用具有合成纳米载体之施用方案的抗体滴度,所述合成纳米载体是

利用本文所述的快速溶剂蒸发法和低HLB表面活性剂制备的。

[0042] 图5示出了多种容器中标准乳液的溶剂蒸发速率。50mL烧杯(样品1,菱形);125mm皿(样品4,正方形)。结果表明,在具有更大表面积的容器中,蒸发可以更快速。

[0043] 图6示出了共同施用纳米载体和KLH(keyhole limpet hemocyanin,匙孔血蓝蛋白)以及雷帕霉素(RAPA)诱导耐受性的能力的结果。在每次KLH攻击后分析小鼠的血清中针对KLH的抗体。

[0044] 图7示出了证明具有低HLB表面活性剂的纳米载体的持久抗体滴度降低的结果。缩写“tSIP”是指如所述的纳米载体。

[0045] 图8示出了证明在小鼠中相比于游离雷帕霉素+KLH,合成纳米载体+KLH之功效的结果。抗KLH EC₅₀:用合成纳米载体+KLH处理或未处理之小鼠的第35天和42天的抗体滴度(2或3次KLH单独攻击后)(符号表示几何平均值±95%CI)。缩写“NC”是指如所述的纳米载体。

[0046] 图9示出了实施例7的处理方案。缩写“NC”是指所述的纳米载体。

[0047] 图10示出了小鼠中的合成纳米载体+KLH抗原特异性。抗OVA EC₅₀:用合成纳米载体+KLH处理或未处理之小鼠的第65天的抗体滴度(条表示几何平均值±95%CI)。缩写“NC”是指如所述的纳米载体。

[0048] 发明详述

[0049] 在详细描述本发明之前,应当理解,本发明不限于特别示例的材料或工艺参数,因为其当然可以变化。还应当理解,本文使用的术语仅用于描述本发明的特定实施方案的目的,并不意在限制使用替代术语来描述本发明。

[0050] 本文引用的所有出版物、专利和专利申请,无论是上文还是下文,均通过引用整体并入本文以用于所有目的。

[0051] 如本说明书和所附权利要求中所使用的,未用数量词限定的名词包括复数指示物,除非另有明确规定。例如,提及“聚合物”包括两种或更多种这样的分子的混合物或不同分子量的单一聚合物种类的混合物,提及“合成纳米载体”包括两种或更多种这样的合成纳米载体的混合物或多种这样的合成纳米载体等。

[0052] 如本文所使用的,术语“包括”或其变化形式如“包含”或“含有”应解读为表明包括任何所列举的整体(例如特征、元件、特性、属性、方法/过程步骤或限制)或整体(例如特征、元件、特性、属性、方法/过程步骤或限制)的组,但不排除任何其他整体或整体的组。因此,如本文所使用的,术语“包括”是包含性的,并且不排除额外的未列举的整体或方法/过程步骤。

[0053] 在本文提供的任何一种组合物和方法的实施方案中,“包含”可以用“基本上由...组成”或“由...组成”代替。短语“基本上由...组成”本文中用于要求指定的整体或步骤以及不实质性影响要求保护之发明的特征或功能的那些。如本文所使用的,术语“由...组成”用于表示只存在列举的整体(例如特征、元件、特性、属性、方法/加工步骤或限制)或整体(例如特征、元件、特性、属性、方法/加工步骤或限制)的组。

[0054] A. 引言

[0055] 已经发现,具有超饱和雷帕霉素的合成纳米载体可以促进抗原特异性免疫耐受性,甚至持久的抗原特异性免疫耐受性。然而,在一些实施方案中,为了产生具有这样量的

合成纳米载体,需要雷帕霉素的稳定并入。在这样的实施方案中,没有稳定并入,则合成纳米载体可能表现出雷帕霉素损失,并且可能难以通过0.22 μ m过滤器无菌过滤。虽然不希望受任何特定理论的约束,但是通常,不能稳定地并入合成纳米载体中的雷帕霉素可形成聚集体,其可阻塞用于从合成纳米载体组合物中去除细菌的过滤器。这种去除对于产生具有期望细菌水平并因此产生更加无菌的组合物是重要的,这是用于体内施用的组合物的有益特征。因此,重要的是在合成纳米载体中超饱和量的雷帕霉素是稳定的,以便实现有益的体内效应并且最初可无菌过滤。

[0056] 令人惊奇的是,如一些实施例中所证实的,可以产生具有稳定的超饱和量雷帕霉素的合成纳米载体组合物,并且这种合成纳米载体可以在对象中提供持久的抗原特异性耐受性。产生这种合成纳米载体的方法包括使用低HLB表面活性剂,以及通过例如涉及快速溶剂蒸发的合成纳米载体的制备方法。许多实施例的结果表明,用这种方法生产的合成纳米载体可以产生具有超饱和量雷帕霉素的合成纳米载体,其最初可无菌过滤。在一些实施例中,这些合成纳米载体也已经表现为产生这样的合成纳米载体组合物,其能够在对象中表现出持久的抗原特异性耐受性。

[0057] 因此,本文提供了包含稳定的超饱和量雷帕霉素的合成纳米载体组合物的组合物和相关方法。优选地,此类合成纳米载体最初可无菌过滤。此外,在一些实施方案中,优选地,本文提供的合成纳米载体组合物不仅可以促进抗原特异性免疫耐受性,而且可以在相对于雷帕霉素不以稳定的超饱和量存在的合成纳米载体的增强水平下如此作用。

[0058] 现在将在下面更详细地描述本发明。

[0059] B. 定义

[0060] “施用”(“Administering”或“administration”或“administer”)是指以药理学有用的方式向对象提供材料。在一些实施方案,该术语旨在包括导致施用(causing to be administered)。“导致施用”意味着直接或间接地导致、督促、鼓励、协助、诱导或指导另一方施用所述材料。

[0061] “混合”是指将一种组分(如抗原)与另一种组分(如合成纳米载体)在组合物中混合。混合的组分是独立制备或获得的,并放置在一起。因此,除了一起放在组合物中时可能发生的可能的非共价相互作用之外,组分不彼此偶联。

[0062] 在用于向对象施用之组合物或剂量的情况下,“有效量”是指在对象中产生一种或更多种期望应答(例如产生抗原特异性致耐受性免疫应答)的组合物或剂量的量。在一些实施方案中,有效量是药效学有效量。因此,在一些实施方案中,有效量是产生本文提供的一种或更多种期望的治疗效果和/或免疫应答的本文提供的组合物或剂量的任何量。该量可用于体外或体内目的。对于体内目的,该量可以是临床医生认为可能对需要抗原特异性免疫耐受的对象具有临床益处的量。本文提供的任何一种组合物可以是有效量的。

[0063] 有效量可以涵盖降低不期望的免疫应答的水平,尽管在一些实施方案中,其涵盖完全阻止不期望的免疫应答。有效量还可以涵盖延迟不期望的免疫应答的发生。有效量也可以是产生期望治疗终点或期望治疗结果的量。在另一些实施方案中,有效量可以涉及增强期望应答(例如治疗终点或结果)的水平。有效量优选地导致对象对抗原的致耐受性免疫应答。可以通过常规方法来监测上述任何一项的实现。

[0064] 有效量当然取决于:进行治疗的特定对象;病症、疾病或障碍的严重程度;个体患

者参数,包括年龄、身体状况、体型和体重;治疗的持续时间;并存治疗(如果有的话)的性质;健康从业者的知识和专业知识内的具体施用途径等因素。这些因素是本领域普通技术人员所熟知的,并且可以仅仅通过常规实验来解决。通常优选使用最大剂量,即根据健康医学判断的最高安全剂量。然而,本领域普通技术人员将理解,由于医疗原因、心理原因或实际上任何其他原因,患者可能坚持使用较低剂量或可耐受剂量。

[0065] 通常,本发明组合中组分的剂量是指组分的量。或者,所述剂量可以基于提供期望量的合成纳米载体的数量来施用。

[0066] “抗原”是指B细胞抗原或T细胞抗原。“抗原类型”是指具有相同或基本上相同的抗原特征的分子。在一些实施方案中,抗原可以是蛋白质、多肽、肽、脂蛋白、糖脂、多核苷酸、多糖,或在细胞中包含或表达。在一些实施方案中,例如当抗原没有明确定义或表征时,抗原可以包含在细胞或组织制备物、细胞碎片、细胞外排体(cell exosome)、条件培养基等中。

[0067] “抗原特异性”是指由抗原或其部分的存在而产生的,或者产生特异性识别的或结合抗原的分子的任何免疫应答。例如,当免疫应答是抗原特异性抗体产生时,产生特异性结合抗原的抗体。又例如,在免疫应答是抗原特异性B细胞或CD4+T细胞增殖和/或活性的情况下,增殖和/或活性来自单独的或与MHC分子、B细胞等复合的抗原或其部分的识别。

[0068] 除非另有说明,否则本文使用的“平均值”是指算术平均值。

[0069] “确定”是指确定事实关系。确定可以以多种方式实现,包括但不限于进行实验或进行投射。在一些实施方案中,“确定”包括“导致确定”。“导致确定”意味着导致、督促、鼓励、协助、诱导或指导或与实体协作进行,以使实体确定事实关系;这包括直接或间接,明示或暗示。

[0070] “包封”是指将物质的至少一部分封装在合成纳米载体内。在一些实施方案中,物质完全封装在合成纳米载体内。在另一些实施方案中,包封的物质的全部或大部分不暴露于合成纳米载体外部的局部环境。在另一些实施方案中,不超过50%、40%、30%、20%、10%或5% (重量/重量) 暴露于局部环境。包封不同于吸附(absorption),后者是将大部分或全部物质放置在合成纳米载体的表面上,并使物质暴露于合成纳米载体外部的局部环境。在本文提供的任何一种组合物或方法的实施方案中,雷帕霉素和/或亲水-亲油平衡值(HLB)值小于或等于10的非离子表面活性剂包封在合成纳米载体中。

[0071] “疏水性聚酯载体材料”是指可以递送一种或更多种分子(例如,雷帕霉素和HLB值小于或等于10的非离子表面活性剂)、包含一种或更多种聚酯聚合物或其单元并具有疏水特性的任何可药用的载体。聚酯聚合物包括但不限于PLA、PLGA、PLG和聚己内酯。疏水性聚酯载体材料包括可以形成合成纳米载体或其一部分,并且可以包含或负载一种或更多种分子(例如,雷帕霉素和HLB值小于或等于10的非离子表面活性剂)的材料。一般,载体材料可以允许将一种或更多种分子(例如,雷帕霉素和HLB值小于或等于10的非离子表面活性剂)递送至靶位点或靶细胞,受控的释放所述一种或更多种分子,以及其他期望活性。“疏水性”是指基本上不参与与水的氢键键合的材料。这样的材料通常是非极性的、主要是非极性或电荷中性的。适合于本文所述组合物的载体材料可以基于其表现的某些水平的疏水性而被选择。因此,疏水性聚酯载体材料是整体疏水的那些,并且可以完全由疏水性聚酯或其单元组成。然而,在一些实施方案中,疏水性聚酯载体材料是整体疏水的,但包含与其他聚合物

或其单元组合的疏水性聚酯或其单元。这些其他聚合物或其单元可以具有疏水性但不一定如此。这样的载体材料可以包括一种或更多种其他聚合物或单元,条件是聚合物或其单元的基质被认为是疏水的。

[0072] “最初可无菌过滤”是指以前未过滤但可以通过过滤器(如0.22 μ m过滤器)过滤的合成纳米载体的组合物,所述过滤器的通过量为至少50克纳米载体/ m^2 滤膜表面积。在本文提供的任何一种组合物或方法的一些实施方案中,如下确定通过量:取9mL体积的合成纳米载体悬浮液并将其置于具有本文提供的任何一种过滤器的10mL注射器中。然后将合成纳米载体悬浮液推过过滤器,直至不再有悬浮材料通过过滤器。然后可以基于推动通过过滤器的材料和注射器中剩余的悬浮材料来计算通过量。在本文提供的任何一种组合物或方法的一些实施方案中,最初可无菌过滤组合物是非无菌的和/或不适于体内施用的(即,不是充分纯的,并且包含不太期望用于体内施用的可溶性组分)。在本文提供的任何一种组合物或方法的另一些实施方案中,最初可无菌过滤组合物包含已经制备但尚未进一步加工以生产临床级材料的合成纳米载体。在本文提供的任何一种组合物或方法的一些实施方案中,最初可无菌过滤组合物先前未过滤但可以通过过滤器(如0.22 μ m过滤器)过滤,其通过量为至少60、70、80、90、100、120、130、140、160、200、250、300、350、500、750、1000或1500克纳米载体/ m^2 滤膜表面积。所述0.22 μ m过滤器可以是任何具有0.22 μ m孔径的过滤器。这样的过滤器可以由多种材料制成,例如聚乙烯砵、聚偏氟乙烯、混合纤维素酯、无溶剂醋酸纤维素、再生纤维素、尼龙等。过滤器的具体实例包括Millipore SLGPM33R、Millipore SLGVM33RS、Millipore SLGSM33SS、Sartorius 16534、Sartorius 17764、Sartorius 17845等。

[0073] “合成纳米载体的最大尺寸”是指沿合成纳米载体的任何轴测量的纳米载体的最大尺寸。“合成纳米载体的最小尺寸”是指沿着合成纳米载体的任何轴测量的合成纳米载体的最小尺寸。例如,对于球状合成纳米载体,合成纳米载体的最大和最小尺寸将基本上相同,并且是其直径的大小。类似地,对于立方形合成纳米载体,合成纳米载体的最小尺寸将是其高度、宽度或长度中的最小尺寸,而合成纳米载体的最大尺寸将是其高度、宽度或长度中最大的尺寸。在一个实施方案中,基于样品中合成纳米载体的总数,样品中至少75%,优选至少80%,更优选至少90%的合成纳米载体的最小尺寸等于或大于100nm。在一个实施方案中,基于样品中合成纳米载体的总数,样品中至少75%,优选至少80%,更优选至少90%的合成纳米载体的最大尺寸等于或小于5 μ m。优选地,基于样品中合成纳米载体的总数,样品中至少75%,优选至少80%,更优选至少90%的合成纳米载体的最小尺寸大于110nm,更优选大于120nm,更优选大于130nm,更优选大于150nm。根据该实施方案,合成纳米载体的最大和最小尺寸的纵横比可以变化。例如,合成纳米载体的最大尺寸与最小尺寸的纵横比可以在以下范围变化:1:1至1,000,000:1,优选1:1至100,000:1,更优选1:1至10,000:1,更优选1:1至1000:1,甚至更优选1:1至100:1,然而更优选1:1至10:1。

[0074] 优选地,基于样品中合成纳米载体的总数,样品中至少75%,优选至少80%,更优选至少90%的合成纳米载体的最大尺寸等于或小于3 μ m,更优选等于或小于2 μ m,更优选等于或小于1 μ m,更优选等于或小于800nm,更优选等于或小于600nm,甚至更优选等于或小于500nm。在优选实施方案中,基于样品中合成纳米载体的总数,样品中至少75%,优选至少80%,更优选至少90%的合成纳米载体的最小尺寸等于或大于100nm,更优选等于或大于120nm,更优选等于或大于130nm,更优选等于或大于140nm,甚至更优选等于或大于150nm。

在一些实施方案中,可以通过将合成纳米载体悬浮在液体(通常为水性)介质中并使用动态光散射(dynamic light scattering,DLS)(例如使用Brookhaven ZetaPALS仪器)来获得对合成纳米载体尺寸(例如有效直径)的测量。例如,可以将合成纳米载体的悬浮液从水性缓冲液稀释到纯水中,以达到约0.01至0.5mg/mL的最终合成纳米载体悬浮液浓度。稀释的悬浮液可以在合适的比色皿中直接制备或转移到其中来进行DLS分析。然后可以将比色皿放置在DLS中,允许平衡至受控温度,然后扫描足够的时间以基于对介质的黏度和样品的折射指数的适当输入来获得稳定和可重复的分布。然后报告有效直径或分布的平均值。确定高纵横比或非球形合成纳米载体的有效尺寸可能需要放大技术(例如电子显微法),以获得更精确的测量。合成纳米载体的“尺寸”或“大小”或“直径”是指例如使用动态光散射获得的粒度分布的平均值。

[0075] 本文所用的“HLB值小于或等于10的非离子表面活性剂”或“低HLB表面活性剂”是指具有包含至少一个疏水尾部与亲水头部的结构或具有疏水基团或区域与亲水基团或区域的非离子两亲性分子。表面活性剂的尾部一般由烃链组成。表面活性剂可以基于亲水头部或基团或区域的电荷特性进行分类。如本文所用,“HLB”是指表面活性剂的亲水性-亲油性平衡或亲水-亲油平衡,并且是表面活性剂的亲水性质或亲油性质的量度。

[0076] 本文提供的任何一种表面活性剂的HLB可以使用Griffin法(Griffin's method)或Davie法(Davie's method)进行计算。例如,使用Griffin法,表面活性剂的HLB是表面活性剂的亲水部分的分子量除以整个表面活性剂的分子量乘以20的乘积。HLB值的范围为0至20,0对应于完全疏水(亲脂)分子,20对应于完全亲水(疏脂)分子。在一些实施方案中,本文提供的任何一种组合物或方法的表面活性剂的HLB为0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10(例如,由Griffin法或Davie法测定)。用于本文提供的任何一种组合物和方法的这样的表面活性剂的实例包括但不限于山梨聚糖酯,如SPAN 40、SPAN 20;脂肪醇,如油醇、硬脂醇;脂肪酸酯,如棕榈酸异丙酯、单硬脂酸甘油酯;乙氧基化脂肪醇,如BRIJ 52、BRIJ 93;泊洛沙姆,如Pluronic P-123、Pluronic L-31;脂肪酸,如棕榈酸、十二烷酸;三酸甘油酯,如三棕榈酸甘油酯、三亚油酸甘油酯;胆固醇;胆固醇衍生物,如胆固醇硫酸钠,胆固醇十二酸酯;以及胆汁盐或酸,如石胆酸、石胆酸钠。此类表面活性剂的其他实例包括山梨聚糖单硬脂酸酯(SPAN 60)、山梨聚糖三硬脂酸酯(SPAN 65)、山梨聚糖单油酸酯(SPAN 80)、山梨聚糖倍半油酸酯(SPAN 83)、山梨聚糖三油酸酯(SPAN 85)、山梨聚糖倍半油酸酯(Arlacel 83)、山梨聚糖二棕榈酸酯、脂肪酸的单和双甘油酯、聚氧乙烯山梨聚糖三油酸酯(Tween 85)、聚氧乙烯山梨聚糖六油酸酯(G 1086)、山梨聚糖单异硬脂酸酯(Montane 70)、聚氧乙烯醇、聚氧乙烯二醇烷基醚、聚氧乙烯(2)油基醚(BRIJ 93)、聚氧乙烯十六烷基醚(BRIJ 52)、聚乙二醇十二烷基醚(BRIJ L4);1-单十四酰基-外消旋-甘油;甘油单硬脂酸酯;甘油单棕榈酸酯;乙二胺四元四醇(ethylenediamine tetradkis tetrol)(Tetronic 90R4,Tetronic 701)、聚氧乙烯(5)壬基苯基醚(IGEPAL CA-520)、MERPOL A表面活性剂、MERPOL SE表面活性剂和聚(乙二醇)山梨糖醇六油酸酯。对于本领域普通技术人员而言,其他实例也是明显的。

[0077] “可药用的赋形剂”或“可药用的载体”是指与药物活性物质一起使用以配制组合物的药理学无活性材料。可药用的赋形剂包含本领域已知的多种材料,包括但不限于糖类(如葡萄糖、乳糖等),防腐剂如抗微生物剂、重建助剂、着色剂、盐水(如磷酸盐缓冲盐水)和缓冲剂。

[0078] “提供”是指个人执行的动作或一组动作，其提供用于实施本发明的所需事项或一组事项或方法。可以直接或间接采取动作或动作的组。

[0079] “快速溶剂蒸发”是指任何这样的溶剂蒸发步骤，当其用作合成纳米载体配制过程的一部分时，可以产生包含稳定的超饱和雷帕霉素的合成纳米载体。在本文提供的任何一种方法的一些实施方案中，这样的步骤是其中至少98%的溶剂(如二氯甲烷)在与本文提供的疏水性聚酯载体材料和雷帕霉素组合的45分钟内蒸发的步骤。在本文提供的任何一种方法的另一些实施方案中，这样的步骤是其中至少90%的溶剂在与本文提供的疏水性聚酯载体材料和雷帕霉素组合的30分钟内蒸发的步骤。在本文提供的任何一种方法的另一些实施方案中，这样的步骤是其中至少90%的溶剂在与本文提供的疏水性聚酯载体材料和雷帕霉素组合的15分钟内蒸发的步骤。本文在一些实施例提供了在形成合成纳米载体中的此类步骤和使用此类步骤之方法的实例。配制合成纳米载体(其可以包括一个或更多个溶剂蒸发步骤)的方法包括乳液法(例如双重乳液法(double emulsion process))、纳米沉淀、喷雾干燥、转子系统和超临界流体法(例如超临界CO₂)。又例如，所述方法可以是包括低温研磨(cryomilling)的方法。例如，可以将一定量的可导致超饱和的雷帕霉素量溶解在具有溶剂的大量聚合物中，并且蒸发溶剂。然后将所得材料磨碎以产生期望尺寸的合成纳米载体。其他方法也是本领域普通技术人员已知的。

[0080] 如本文所用的“饱和极限”是指预期溶剂不能溶解或吸收更多溶质的点。如果将超过饱和极限的额外溶质加入到溶剂中，则其可作为分离相(例如沉淀物)出现。在特定条件下，溶剂中溶质的饱和极限可以根据溶质的溶解度计算。在一些实施方案中，饱和极限可以指固相的饱和极限。例如，可以通过从两种或更多种组分的均匀混合物固化来形成固体，但高于一定材料比例(即，饱和极限)，在正常或平衡条件下形成分子均相的能力可以被超越。确定合成纳米载体的雷帕霉素饱和极限的实例可以在一些实施例中找到。当提及高于其饱和极限的雷帕霉素时，雷帕霉素(溶质)的量高于预期分散在疏水性聚酯载体材料或合成纳米载体组合物(溶剂)中的雷帕霉素的量。用于确定雷帕霉素的饱和极限的公式可以在下面的一些实施例中找到。

[0081] “溶剂”是指可以溶解溶质(例如本文提供的合成纳米载体的任何一种或更多种组分)的物质。在一些实施方案中，溶剂是可用于形成合成纳米载体的溶剂，例如在乳液法(例如，双重乳液法)中。此类溶剂的实例包括二氯甲烷、乙酸乙酯、氯仿和碳酸丙烯酯。实例还包括作为低水溶性有机溶剂和水混溶性溶剂(如丙酮、乙醇、二甲基亚砷、二甲基甲酰胺、甲酰胺等)之组合的溶剂混合物。本领域普通技术人员已知其他实例。

[0082] “对象”是指动物，包括温血哺乳动物，如人类和灵长类；鸟类；家养或农场动物，如猫、狗、绵羊、山羊、牛、马和猪；实验动物，如小鼠、大鼠和豚鼠；鱼；爬行类；动物园和野生动物；等等。

[0083] “超饱和”是指其中含有比在平衡条件下可溶解的更多的溶质(例如，雷帕霉素)的组合物(例如，合成纳米载体组合物)。换言之，具有超饱和浓度的组合物具有超过饱和浓度的浓度。在一些实施方案中，雷帕霉素可以高于其对于疏水性聚酯载体材料(例如，单独或与配制过程的水相中的溶剂组合)的饱和极限。可以通过本领域已知的任何方法将组合物中雷帕霉素的量确定为超饱和，例如通过测定组合物中分子的浓度并将所述浓度与预测的饱和浓度进行比较(例如参见一些实施例，其中可以使用方法、材料和数量等的细节来计算

雷帕霉素的超饱和水平)。

[0084] 用于确定雷帕霉素是否处于超饱和量的其他方法包括铸膜(film casting)、X射线散射和电子显微术。电子显微术的形式包括但不限于扫描电子显微术(scanning electron microscopy, SEM)、透射电子显微术(transmission electron microscopy, TEM)和低温透射电子显微术(cryo-TEM)。也可以在合成纳米载体形成期间用物理观察确定超饱和度,其中当挥发性有机溶剂几乎完全蒸发时,含有疏水性聚酯载体材料和雷帕霉素的混浊乳液将变得更透明,并且随着雷帕霉素浓缩成纳米载体制剂,溶液变得更浑浊。又例如,干燥的合成纳米载体材料可以分散在挥发性有机溶剂如丙酮、二氯甲烷、乙酸乙酯等中,使得所有的材料都可溶解形成透明溶液,并放置在载玻片上干燥。如果超饱和,则雷帕霉素与疏水性聚酯载体材料分离。可用于确定超饱和的另一种方法可以涉及通过在萃取随后用HPLC方法分析样品的一部分以量化存在的雷帕霉素的量。载体材料可以用质子NMR或其他正交方法如MALDI-MS等鉴定和/或一旦用HPLC鉴定即可定量。然后可以通过实验来确定疏水性聚酯载体材料中雷帕霉素的饱和极限。

[0085] 在一些实施方案中,本文提供的任何一种组合物可以包含超饱和量(例如超饱和浓度)的雷帕霉素。在一些实施方案中,组合物的超饱和程度为雷帕霉素超过组合物的饱和极限至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、25%、30%或更多。在本文提供的任何一种组合物的一些实施方案中,合成纳米载体中超饱和量的雷帕霉素为:雷帕霉素/疏水性聚酯载体材料为 ≥ 6 但 ≤ 50 重量%。在本文提供的任何一种组合物的其他一些实施方案中,这样的量为:雷帕霉素/疏水聚酯载体材料为 ≥ 6 但 ≤ 45 、 ≥ 6 但 ≤ 40 、 ≥ 6 但 ≤ 35 、 ≥ 6 但 ≤ 30 、 ≥ 6 但 ≤ 25 、 ≥ 6 但 ≤ 20 、 ≥ 6 但 ≤ 15 重量%。在本文提供的任何一种组合物的其他实施方案中,这样的量为:雷帕霉素/疏水聚酯载体材料为 ≥ 7 但 ≤ 45 、 ≥ 7 但 ≤ 40 、 ≥ 7 但 ≤ 35 、 ≥ 7 但 ≤ 30 、 ≥ 7 但 ≤ 25 、 ≥ 7 但 ≤ 20 、 ≥ 7 但 ≤ 15 重量%。在本文提供的任何一种组合物的另一些实施方案中,这样的量为:雷帕霉素/疏水性聚酯载体材料为 ≥ 8 但 ≤ 24 重量%。在本文提供的任何一种组合物的一些实施方案中,这样的量为:雷帕霉素/疏水聚酯载体材料为6、7、8、9、10、12、15、17、20、22、25、27、30、35、45或更多重量%。

[0086] 超饱和量的雷帕霉素优选是“稳定的”。在一些实施方案中,如果合成纳米载体在悬浮液中保留这样的量,则超饱和量的雷帕霉素在合成纳米载体中是稳定的。优选地,具有稳定的超饱和量雷帕霉素的合成纳米载体最初可无菌过滤,并且最初无菌过滤能力可以用作对合成纳米载体中超饱和量的雷帕霉素稳定性的测试。在一些实施方案中,当在体内施用,当合成纳米载体可用于有益的抗原特异性耐受性作用时,则认为合成纳米载体中超饱和量的雷帕霉素是稳定的。具有超饱和量雷帕霉素的合成纳米载体的实例可以在全部实施例中找到。有许多方法可以使合成纳米载体中的超饱和量的雷帕霉素稳定化。这样的方法包括在合成纳米载体的制备中使用HLB值小于或等于10的非离子表面活性剂、包括使用一个或更多个快速溶剂蒸发步骤的合成纳米载体形成方法,以及可以包括使用固体熔融和/或冷却注射成型的合成纳米载体形成方法。

[0087] “表面活性剂”是指可以降低两种液体之间或液体和固体之间的表面张力的化合物。表面活性剂可用作去垢剂、润湿剂、乳化剂、发泡剂和分散剂,并且可用于形成如本文所提供的合成纳米载体。在一些实施方案中,表面活性剂是HLB值小于或等于10的非离子表面活性剂。

[0088] “合成纳米载体”是指在自然界中没有发现,并且具有至少一个尺寸小于或等于5微米大小的离散物体。如本文所提供的,合成纳米载体包含疏水性聚酯载体材料。因此,合成纳米载体可以是但不限于包含疏水性聚酯纳米颗粒的合成纳米载体。合成纳米载体可以是多种不同的形状,包括但不限于球形、立方形、棱锥形、椭圆体形、圆柱体形、环形(toroidal)等。根据本发明的合成纳米载体包含一个或更多个表面。在实施方案中,合成纳米载体可具有大于1:1、1:1.2、1:1.5、1:2、1:3、1:5、1:7或大于1:10的纵横比。

[0089] 具有等于或小于约100nm,优选等于或小于100nm的最小尺寸的根据本发明的合成纳米载体不包含具有羟基(其激活补体)的表面,或者替代地包含基本上由不是羟基(其激活补体)的部分组成的表面。在优选的实施方案中,具有等于或小于约100nm,优选等于或小于100nm的最小尺寸的根据本发明的合成纳米载体不包含显著激活补体的表面,或者替代地包含基本上由基本不激活补体的部分所组成的表面。在一个更优选的实施方案中,具有等于或小于约100nm,优选等于或小于100nm的最小尺寸的根据本发明的合成纳米载体不包含激活补体的表面,或替代地包含基本上由不激活补体的部分组成的表面。

[0090] “总固体”是指包含在合成纳米载体的组合物或悬浮液中的所有组分的总重量。在本文提供的任何一种组合物或方法的一些实施方案中,总固体的量被确定为每mL悬浮液的总干纳米载体质量。这可以通过重量法来确定。

[0091] “重量%”是指一个重量与另一个重量的比乘以100。例如,重量%可以是一种组分的重量与另一种组分的重量的比乘以100或者一种组分的重量与超过一种组分的总重量的比乘以100。一般而言,将重量%测量为合成纳米载体群体的平均值或组合物或悬浮液中的合成纳米载体的平均值。

[0092] C. 组合物和相关方法

[0093] 本文提供了包含合成纳米载体的组合物和相关方法,所述合成纳米载体包含疏水性聚酯载体材料和稳定的超饱和量雷帕霉素。这样的组合物和相关方法可导致产生抗原特异性致耐受性作用。因此,所提供的组合物和相关方法可用于需要抗原特异性免疫耐受性的任何对象。如上所述,发现在合成纳米载体中递送超饱和量的雷帕霉素可提供更持久的抗原特异性免疫耐受性。然而,也已经发现超饱和量的雷帕霉素一般不稳定。在合成纳米载体中使雷帕霉素稳定可以有助于在形成过程中在合成纳米载体中保留适当的量,这些量已表现为有效。合成纳米载体中稳定的超饱和量雷帕霉素也导致产生这样的合成纳米载体组合物,其具有另外的最初可无菌过滤的有益效果。

[0094] 令人惊奇的是,已经发现在具有疏水性聚酯载体材料的合成纳米载体中,某些表面活性剂(亲水亲油平衡值(HLB)值小于或等于10的非离子表面活性剂)使雷帕霉素稳定,并且允许改善初始无菌过滤能力。如一些实施例所示,当将表面活性剂如SPAN 40并入到合成纳米载体制剂中时,在最初通过0.22 μ m过滤器时,发现包含雷帕霉素的合成纳米载体制剂的通过量增加。还如一些实施例中所示,许多这样的利用亲水亲油平衡(HLB)值小于或等于10的非离子表面活性剂配制的合成纳米载体也能够在对象中提供持久的抗原特异性耐受性。

[0095] 还已经发现在本文提供的合成纳米载体中HLB值小于或等于10的非离子表面活性剂的优化量。在本文提供的任何一种组合物或方法的一些实施方案中,合成纳米载体中HLB值小于或等于10的非离子表面活性剂的量为:HLB值小于或等于10的非离子表面活性剂/疏

水性聚酯载体材料为 ≥ 0.01 但 ≤ 20 重量%。在本文提供的任何一种组合物或方法的一些实施方案中,合成纳米载体中HLB值小于或等于10的非离子表面活性剂的量为:HLB值小于或等于10的非离子表面活性剂/疏水性聚酯载体材料为 ≥ 0.1 但 ≤ 15 、 ≥ 0.5 但 ≤ 13 、 ≥ 1 但 ≤ 9 或10重量%。在本文提供的任何一种组合物或方法的另一些实施方案中,合成纳米载体中HLB值小于或等于10的非离子表面活性剂的量为:HLB值小于或等于10的非离子表面活性剂/疏水性聚酯载体材料为 ≥ 0.01 但 ≤ 17 、 ≥ 0.01 但 ≤ 15 、 ≥ 0.01 但 ≤ 13 、 ≥ 0.01 但 ≤ 12 、 ≥ 0.01 但 ≤ 11 、 ≥ 0.01 但 ≤ 10 、 ≥ 0.01 但 ≤ 9 、 ≥ 0.01 但 ≤ 8 、 ≥ 0.01 但 ≤ 7 、 ≥ 0.01 但 ≤ 6 、 ≥ 0.01 但 ≤ 5 等重量%。仍在本文提供的任何一种组合物或方法的另一些实施方案中,合成纳米载体中HLB值小于或等于10的非离子表面活性剂的量为:HLB值小于或等于10的非离子表面活性剂/疏水性聚酯载体材料为 ≥ 0.1 但 ≤ 15 、 ≥ 0.1 但 ≤ 14 、 ≥ 0.1 但 ≤ 13 、 ≥ 0.1 但 ≤ 12 、 ≥ 0.1 但 ≤ 11 、 ≥ 0.1 但 ≤ 10 、 ≥ 0.1 但 ≤ 9 、 ≥ 0.1 但 ≤ 8 、 ≥ 0.1 但 ≤ 7 、 ≥ 0.1 但 ≤ 6 、 ≥ 0.1 但 ≤ 5 等重量%。仍在本文提供的任何一种组合物或方法的另一些实施方案中,合成纳米载体中HLB值小于或等于10的非离子表面活性剂的量为:HLB值小于或等于10的非离子表面活性剂/疏水性聚酯载体材料为 ≥ 0.5 但 ≤ 15 、 ≥ 0.5 但 ≤ 14 、 ≥ 0.5 但 ≤ 13 、 ≥ 0.5 但 ≤ 12 、 ≥ 0.5 但 ≤ 11 、 ≥ 0.5 但 ≤ 10 、 ≥ 0.5 但 ≤ 9 、 ≥ 0.5 但 ≤ 8 、 ≥ 0.5 但 ≤ 7 、 ≥ 0.5 但 ≤ 6 、 ≥ 0.5 但 ≤ 5 等重量%。仍在本文提供的任何一种组合物或方法的另一些实施方案中,合成纳米载体中HLB值小于或等于10的非离子表面活性剂的量为:HLB值小于或等于10的非离子表面活性剂/疏水性聚酯载体材料为 ≥ 1 但 ≤ 9 、 ≥ 1 但 ≤ 8 、 ≥ 1 但 ≤ 7 、 ≥ 1 但 ≤ 6 、 ≥ 1 但 ≤ 5 等重量%。仍在本文提供的任何一种组合物或方法的另一些实施方案中,合成纳米载体中HLB值小于或等于10的非离子表面活性剂的量为:HLB值小于或等于10的非离子表面活性剂/疏水性聚酯载体材料为 ≥ 5 但 ≤ 15 、 ≥ 5 但 ≤ 14 、 ≥ 5 但 ≤ 13 、 ≥ 5 但 ≤ 12 、 ≥ 5 但 ≤ 11 、 ≥ 5 但 ≤ 10 、 ≥ 5 但 ≤ 9 、 ≥ 5 但 ≤ 8 、 ≥ 5 但 ≤ 7 、 ≥ 5 但 ≤ 6 等重量%。在本文提供的任何一种组合物或方法的一些实施方案中,合成纳米载体中HLB值小于或等于10的非离子表面活性剂的量为:HLB值小于或等于10的非离子表面活性剂/疏水性聚酯载体材料为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20重量%。本文提供的任何HLB值可以使用Griffin法或Davie法来确定。

[0096] 同样,也已经发现,利用快速溶剂蒸发制备合成纳米载体的方法也可以产生包含稳定的超饱和量雷帕霉素的合成纳米载体。当这样的蒸发迅速发生时,雷帕霉素稳定地并入合成纳米载体中并且可以导致如本文所述的有益结果。例如,如一些实施例所表明,用这种方法生产的合成纳米载体最初可无菌过滤,并且当在体内施用获得有益的免疫效果。在一些实施例中提供了制备这样的合成纳米载体的具体方法。这样的方法的其他实例包括具有一个或更多个溶剂蒸发步骤的任何方法。可以包括一个或多个溶剂蒸发步骤的方法包括乳液法(例如双重乳液法)、纳米沉淀、喷雾干燥和超临界流体法。对于本领域的普通技术人员来说,其他方法也是明显的。

[0097] 此外,本文提供的合成纳米载体也可以使用包括固体熔融和冷却注射成型的方法制备。其他方法也是本领域技术人员已知的。

[0098] 如本文所提供的,合成纳米载体中雷帕霉素的量可以被优化和稳定,以使得当向对象施用合成纳米载体时,该量导致有效的结果(例如持久的抗原特异性耐受性)。在本文提供的任何一种组合物的一些实施方案中,包含稳定的超饱和量雷帕霉素的合成纳米载体包含 ≥ 6 但 ≤ 50 重量%的雷帕霉素/疏水性聚酯载体材料。在本文提供的任何一种组合物的

一些实施方案中,合成纳米载体包含 ≥ 6 但 ≤ 45 、 ≥ 6 但 ≤ 40 、 ≥ 6 但 ≤ 35 、 ≥ 6 但 ≤ 30 、 ≥ 6 但 ≤ 25 、 ≥ 6 但 ≤ 20 、 ≥ 6 但 ≤ 15 重量%的雷帕霉素/疏水性聚酯载体材料。在本文提供的任何一种组合物的另一些实施方案中,合成纳米载体包含 ≥ 7 但 ≤ 45 、 ≥ 7 但 ≤ 40 、 ≥ 7 但 ≤ 35 、 ≥ 7 但 ≤ 30 、 ≥ 7 但 ≤ 25 、 ≥ 7 但 ≤ 20 、 ≥ 7 但 ≤ 15 重量%的雷帕霉素/疏水性聚酯载体材料。在本文提供的任何一种组合物的另一些实施方案中,合成纳米载体包含 ≥ 8 但 ≤ 24 重量%的雷帕霉素/疏水性聚酯载体材料。在本文提供的任何一种组合物的一些实施方案中,合成纳米载体包含6、7、8、9、10、12、15、17、20、22、25、27、30、35、45或更多重量%的雷帕霉素/疏水性聚酯载体材料。

[0099] 此外,还确定了合成纳米载体组合物中疏水性聚酯载体材料的优化量。优选地,在本文提供的任何一种组合物的一些实施方案中,合成纳米载体组合物中的疏水性聚酯载体材料的量为:疏水性聚酯载体材料/总固体为5-95重量%。在本文提供的任何一种组合物的另一些实施方案中,合成纳米载体中的疏水性聚酯载体材料的量为:疏水性聚酯载体材料/总固体为10-95、15-90、20-90、25-90、30-80、30-70、30-60、30-50等重量%。在本文提供的任何一种组合物的另一些实施方案中,合成纳米载体中的疏水性聚酯载体材料的量为:疏水性聚酯载体材料/总固体为5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90或95重量%。

[0100] 对于本文提供的任何一种组合物,本文所列举的组分或材料的量可以使用本领域普通技术人员已知的方法或本文另有提供的方法来确定。例如,HLB值小于或等于10的非离子表面活性剂的量可以通过萃取然后通过HPLC方法定量来测量。疏水性聚酯载体材料的量可以使用HPLC来测定。在一些实施方案中,可以遵从使用质子NMR或其他正交方法(例如MALDI-MS等)来确定疏水性聚酯载体材料的身份,以确定这样的量。可以使用类似的方法来确定本文提供的任何一种组合物中的雷帕霉素的量。在一些实施方案中,使用HPLC确定雷帕霉素的量。用于确定组分或材料量的方法的另一些实例如本文其他地方(例如在一些实施例)所提供。对于本文提供的任何一种组合物或方法,组分或材料的量也可以基于纳米载体制剂的配方重量来确定。因此,在本文提供的任何一种组合物或方法的一些实施方案中,本文提供的任何一种组分的量是在配制合成纳米载体期间水相中组分的量。在本文提供的任何一种组合物或方法的一些实施方案中,任何一种组分的量均为所制备的和作为配制过程之结果的合成纳米载体组合物中的组分的量。

[0101] 本文提供的合成纳米载体材料包含疏水性聚酯载体材料。这样的材料包含聚酯,其可以包括含有乳酸和乙醇酸单元的共聚物,如聚(乳酸-共-乙醇酸)和聚(丙交酯-共-乙交酯),在本文中统称为“PLGA”;和包含乙醇酸单元的均聚物,在本文中称为“PGA”,以及包含乳酸单元的均聚物,如聚-L-乳酸、聚-D-乳酸、聚-D,L-乳酸、聚-L-丙交酯、聚-D-丙交酯和聚-D,L-丙交酯,在本文中统称为“PLA”。在一些实施方案中,示例性聚酯包括例如:聚羟基酸;PEG共聚物以及丙交酯和乙交酯的共聚物(例如PLA-PEG共聚物、PGA-PEG共聚物、PLGA-PEG共聚物及其衍生物)。在一些实施方案中,聚酯包括例如聚(己内酯)、聚(己内酯)-PEG共聚物、聚(L-丙交酯-共-L-赖氨酸)、聚(丝氨酸酯)、聚(4-羟基-L-脯氨酸酯)、聚[α -(4-氨基丁基)-L-乙醇酸]及其衍生物。

[0102] 在一些实施方案中,聚酯可以是PLGA。PLGA是乳酸和乙醇酸的生物相容性和生物可降解的共聚物,多种形式的PLGA通过乳酸:乙醇酸的比来表征。乳酸可以是L-乳酸、D-乳

酸或D,L-乳酸。PLGA的降解速率可以通过改变乳酸:乙醇酸比来调节。在一些实施方案中,根据本发明使用的PLGA通过以下乳酸:乙醇酸比表征:约85:15、约75:25、约60:40、约50:50、约40:60、约25:75或约15:85。

[0103] 本文提供的疏水性聚酯载体材料可以包含一种或更多种非聚酯疏水性聚合物或其单元和/或非疏水性的聚合物或其单元,条件是总体上疏水性聚酯载体材料是疏水性的并且含有一种或更多种聚酯或其单元。

[0104] 本文提供的疏水性聚酯载体材料可以包含一种或更多种作为非甲氧基封端的pluronic聚合物或其单元的聚合物。“非甲氧基封端的聚合物”是指具有至少一个以甲氧基以外的部分结束之末端的聚合物。在一些实施方案中,聚合物具有至少两个以甲氧基以外的部分结束的末端。在另一些实施方案中,聚合物不具有以甲氧基结束的末端。“非甲氧基封端的pluronic聚合物”是指除了两个末端均为甲氧基的线性pluronic聚合物之外的聚合物。

[0105] 在一些实施方案中,疏水性聚酯载体材料可以包含聚羟基链烷酸酯、聚酰胺、聚醚、聚烯烃、聚丙烯酸酯、聚碳酸酯、聚苯乙烯、硅酮、氟聚合物或其单元。可以包含在本文提供的疏水性聚酯载体材料中的聚合物的其他实例包括聚碳酸酯、聚酰胺或聚醚,或其单元。在另一些实施方案中,疏水性聚酯载体材料的聚合物可以包含聚(乙二醇)(PEG)、聚丙二醇或其单元。

[0106] 在一些实施方案中,优选地疏水性聚酯载体材料包含生物可降解的聚合物。因此,在这样的实施方案中,疏水性聚酯载体材料的聚合物可以包含聚醚、例如聚(乙二醇)或聚丙二醇或其单元。此外,聚合物可以包含聚醚和生物可降解聚合物的嵌段共聚物,使得聚合物是生物可降解的。在另一些实施方案中,聚合物不仅包含聚醚或其单元,例如聚(乙二醇)或聚丙二醇或其单元。

[0107] 适用于本发明的聚合物的其他实例包括但不限于聚乙烯、聚碳酸酯(例如聚(1,3-二噁烷-2酮))、聚酐(例如聚(癸二酸酐))、聚富马酸丙酯(polypropylfumerate)、聚酰胺(例如聚己内酰胺)、聚缩醛、聚醚、聚酯(例如聚丙交酯、聚乙交酯、聚丙交酯-共-乙交酯、聚己内酯、聚羟基酸(例如聚(β -羟基链烷酸酯)))、聚(原酸酯)、聚氰基丙烯酸酯、聚乙烯醇、聚氨酯、聚磷腈、聚丙烯酸酯、聚甲基丙烯酸酯、聚脲、聚苯乙烯和聚胺、聚赖氨酸、聚赖氨酸-PEG共聚物和聚(乙烯亚胺)、聚(乙烯亚胺)-PEG共聚物。

[0108] 可以包含在疏水性聚酯载体材料中的聚合物的其他实例包括丙烯酸聚合物,例如丙烯酸和甲基丙烯酸共聚物、甲基丙烯酸甲酯共聚物、甲基丙烯酸乙氧基乙酯、甲基丙烯酸氰乙酯、甲基丙烯酸氨基烷基酯共聚物、聚(丙烯酸)、聚(甲基丙烯酸)、甲基丙烯酸烷基酰胺共聚物、聚(甲基丙烯酸甲酯)、聚(甲基丙烯酸酐)、甲基丙烯酸甲酯、聚甲基丙烯酸酯、聚(甲基丙烯酸甲酯)共聚物、聚丙烯酰胺、甲基丙烯酸氨基烷基酯共聚物、甲基丙烯酸缩水甘油酯共聚物、聚氰基丙烯酸酯,或包含一种或更多种前述聚合物的组合。

[0109] 在一些实施方案中,合成纳米载体的聚合物缔合以形成聚合物基质。用于从其形成聚合物基质的多种聚合物和方法通常是已知的。在一些实施方案中,包含疏水性聚酯基质的合成纳米载体在合成纳米载体内产生疏水环境。

[0110] 在一些实施方案中,可以用一种或更多种部分和/或官能团修饰聚合物。根据本发明可以使用多种部分或官能团。在一些实施方案中,聚合物可以用聚乙二醇(PEG)、用碳酸

酯和/或用衍生自多糖的无环聚缩醛进行修饰(Papisov,2001,ACS Symposium Series,786:301)。某些实施方案可以使用Gref等的美国专利No.5543158或Von Andrian等的W0公开W02009/051837的一般性教导来实施。

[0111] 在一些实施方案中,聚合物可以用脂质或脂肪酸基团修饰。在一些实施方案中,脂肪酸基团可以是丁酸、己酸、辛酸、癸酸、月桂酸、豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、花生四烯酸、山萘酸或木蜡酸中的一种或更多种。在一些实施方案中,脂肪酸基团可以是棕榈油酸、油酸、反型异油酸、亚油酸、 α -亚油酸、 γ -亚油酸、花生四烯酸、鳕油酸(gadoleic)、花生四烯酸、二十碳五烯酸、二十二碳六烯酸或芥子酸中的一种或更多种。

[0112] 在一些实施方案中,优选地聚合物是生物可降解的。在一些实施方案中,根据本发明的聚合物包括由美国食品和药品管理局(FDA)在21C.F.R. §177.2600下批准用于人的聚合物。

[0113] 聚合物可以是天然的或非天然的(合成的)聚合物。聚合物可以是包含两种或更多种单体的均聚物或共聚物。就序列而言,共聚物可以是随机的、嵌段的或包含随机序列和嵌段序列的组合。通常,根据本发明的聚合物是有机聚合物。

[0114] 在一些实施方案中,聚合物可以是直链或支链聚合物。在一些实施方案中,聚合物可以是树枝状聚合物。在一些实施方案中,聚合物可以彼此充分交联。在一些实施方案中,聚合物可以基本上不交联。在一些实施方案中,聚合物可以根据本发明使用,而不经交联步骤。还应当理解,合成纳米载体可以包含任何前述和其他聚合物的嵌段共聚物、接枝共聚物、共混物、混合物和/或加合物。本领域技术人员将认识到,本文所列的聚合物表示可以根据本发明使用的聚合物的示例性但非全面的列表,只要聚合物满足期望的标准即可。

[0115] 这些和其他聚合物的性质及其制备方法是本领域熟知的(见例如美国专利6,123,727;5,804,178;5,770,417;5,736,372;5,716,404;6,095,148;5,837,752;5,902,599;5,696,175;5,514,378;5,512,600;5,399,665;5,019,379;5,010,167;4,806,621;4,638,045;和4,946,929;Wang等,2001,J. Am. Chem. Soc.,123:9480;Lim等,2001,J. Am. Chem. Soc.,123:2460;Langer,2000,Acc. Chem. Res.,33:94;Langer,1999,J. Control. Release,62:7;和Uhrich等人,1999,Chem. Rev.,99:3181)。更一般地,用于合成某些合适聚合物的多种方法描述在如下中:Concise Encyclopedia of Polymer Science and Polymeric Amines and Ammonium Salts,Goethals编,Pergamon Press,1980;Odian, John Wiley&Sons的Principles of Polymerization,第四版,2004;Contemporary Polymer Chemistry Allcock等,Prentice-Hall,1981;Deming等,1997,Nature,390:386;以及美国专利6,506,577、6,632,922、6,686,446和6,818,732。

[0116] 根据本发明可以使用多种合成纳米载体。在一些实施方案中,合成纳米载体是球体或球状。在一些实施方案中,合成纳米载体是平的或平板状。在一些实施方案中,合成纳米载体是立方体或立方形。在一些实施方案中,合成纳米载体是椭圆体或椭圆形。在一些实施方案中,合成纳米载体是圆柱体、锥体或棱锥形。

[0117] 在一些实施方案中,期望使用在大小或形状方面相对均匀的合成纳米载体群体,使得每个合成纳米载体具有相似的性质。例如,基于合成纳米载体的总数,至少80%、至少90%或至少95%的合成纳米载体可以具有落在合成纳米载体的平均直径或平均尺寸的5%、10%或20%以内的最小尺寸或最大尺寸。

[0118] 根据本发明的组合物可以包含与可药用的赋形剂组合的元素,如防腐剂、缓冲剂、盐水或磷酸盐缓冲盐水。组合物可以使用常规的药物制备和复合技术以获得有用的剂型。在一个实施方案中,将组合物(例如包含合成纳米载体的组合物)与防腐剂一起悬浮在无菌盐水溶液中以用于注射。

[0119] 在一些实施方案中,本文提供的合成纳米载体的任何组分可以是分离的。分离的是指元素与其天然环境分离,并且以足够的量存在以允许其识别或使用。这意味着例如元素可以通过色谱或电泳纯化。分离的元素可以但不一定是基本上纯的。因为分离的元素可以在药物制剂中与可药用的赋形剂混合,所以元素可以仅占制剂的小的重量百分比。尽管如此,元素是分离的,因为其已经与在生命系统中可能与其缔合的物质分离,即与其他脂质或蛋白质分离。本文提供的任何元素可以是分离的,并包括在组合物中或者以分离形式用于方法中。

[0120] D. 制备和使用组合物的方法及相关方法

[0121] 可以使用本领域已知的多种方法制备合成纳米载体。例如,合成纳米载体可以通过例如以下的方法形成:纳米沉淀、使用流体通道的流动聚焦、喷雾干燥、单和双重乳液溶剂蒸发、溶剂萃取、相分离、研磨(包括冷磨)、超临界流体(例如超临界二氧化碳)处理、微乳液加工、微米制备、纳米制备、牺牲层、简单和复合凝聚以及本领域普通技术人员公知的其他方法。作为替代或补充,已经描述了用于单分散半导体、导电、磁性、有机和其他纳米材料的水性和有机溶剂合成(Pellegrino等,2005,Small,1:48;Murray等,2000,Ann.Rev.Mat.Sci.,30:545;和Trindade等,2001,Chem.Mat.,13:3843)。在文献中已经描述了另外的方法(见例如Doubrow编,“Microcapsules and Nanoparticles in Medicine and Pharmacy,”CRC Press,Boca Raton,1992;Mathiowitz等,1987,J.Control.Release,5:13;Mathiowitz等,1987,Reactive Polymers,6:275;and Mathiowitz等,1988,J.Appl.Polymer Sci.,35:755;美国专利5578325和6007845;P.Paolicelli等,“Surface-modified PLGA-based Nanoparticles that can Efficiently Associate and Deliver Virus-like Particles”Nanomedicine.5(6):843-853(2010))。

[0122] 可以使用多种方法将多种材料包封在合成纳米载体中,包括但不限于:C.Astete等,“Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles”J.Biomater.Sci.Polymer Edn,第17卷,第3期,第247-289页(2006);K.Avgoustakis“Pegylated Poly(Lactide)and Poly(Lactide-Co-Glycolide)Nanoparticles: Preparation,Properties and Possible Applications in Drug Delivery”Current Drug Delivery 1:321-333(2004);C.Reis等,“Nanoencapsulation I.Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles”Nanomedicine 2:8-21(2006);P.Paolicelli等,“Surface-modified PLGA-based Nanoparticles that can Efficiently Associate and Deliver Virus-like Particles”Nanomedicine.5(6):843-853(2010)。可以使用适合于将材料包封在合成纳米载体中的其他方法,包括但不限于2003年10月14日授予Unger的美国专利6,632,671中公开的方法。

[0123] 在某些实施方案中,通过纳米沉淀工艺或喷雾干燥制备合成纳米载体。可以改变用于制备合成纳米载体的条件以产生期望尺寸或性质(例如,疏水性、亲水性、外部形态、“黏性”、形状等)的颗粒。制备合成纳米载体的方法和使用的条件(例如,溶剂、温度、浓度、

空气流速等)可以取决于待包括在合成纳米载体中的材料和/或载体基质的组成。

[0124] 如果通过任何上述方法制备的合成纳米载体具有在期望范围之外的尺寸范围,则可以例如使用筛来筛选这样的合成纳米载体的尺寸。

[0125] 在一些实施方案中,合成纳米载体可以与抗原或其他组合物通过在相同的载剂或递送系统中混合而组合。

[0126] 本文提供的组合物可以包含无机或有机缓冲剂(例如,磷酸、碳酸、乙酸或柠檬酸的钠盐或钾盐)和pH调节剂(例如,盐酸、氢氧化钠或氢氧化钾、柠檬酸盐或乙酸盐、氨基酸及其盐)、抗氧化剂(例如,抗坏血酸、 α -生育酚)、表面活性剂(例如,聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯80、聚氧乙烯9-10壬基酚、脱氧胆酸钠)、溶液和/或低温/冷冻稳定剂(例如,蔗糖、乳糖、甘露醇、海藻糖)、渗透调节剂(例如,盐或糖)、抗菌剂(例如,苯甲酸、苯酚、庆大霉素)、消泡剂(例如,聚二甲基硅氧烷(polydimethylsiloxane))、防腐剂(例如,硫柳汞,2-苯氧基乙醇、EDTA)聚合物稳定剂和黏度调节剂(例如,聚乙烯吡咯烷酮、泊洛沙姆488、羧甲基纤维素)和助溶剂(例如,甘油、聚乙二醇、乙醇)。

[0127] 根据本发明的组合物可以包含可药用的赋形剂。组合物可以使用常规的药物制备和复合技术以获得有用的剂型。适合于实施本发明的技术可以在以下中找到:Handbook of Industrial Mixing:Science and Practice,Edward L.Paul,Victor A.Atiemo-Obeng,和 Suzanne M.Kresta编,2004 John Wiley&Sons,Inc.;和Pharmaceutics:The Science of Dosage Form Design,第2版,M.E.Auten编,2001,Churchill Livingstone。在一个实施方案中,将组合物与防腐剂一起悬浮在无菌盐水溶液中以用于注射。

[0128] 应当理解,本发明的组合物可以以任何合适的方式制备,本发明决不限于可使用本文所述的方法制备的组合物。选择合适的制备方法可能需要注意所关联的特定元素的特性。

[0129] 在一些实施方案中,组合物在无菌条件下制备或在最初或最后灭菌。这可以确保所得组合物是无菌的和非感染性的,因此与非无菌组合物相比提高了安全性。这提供了有价值的安全措施,特别是当接受组合物的对象具有免疫缺陷、患有感染和/或易感染时。在一些实施方案中,组合物可以冻干并以悬浮液或冻干粉末的形式储存,这取决于用于延长期限而不损失活性的配制策略。

[0130] 根据本发明的施用可以通过各种途径,包括但不限于皮内、肌内、皮下、静脉内和腹膜内途径。本文所述的组合物可以制造和制备成使用常规方法施用。

[0131] 本发明的组合物可以以有效量施用,例如本文别处描述的有效量。剂型的剂量可以包含不同量的根据本发明的元素。存在于本发明剂型中的元素的量可以根据其性质、待实现的治疗益处和其他此类参数而不同。在一些实施方案中,可以进行剂量范围研究以确认剂型中所存在的最佳治疗量。在一些实施方案中,在向对象施用时,元素以产生期望效果和/或降低的免疫应答的有效量存在于剂型中。可以在对象中使用常规剂量范围研究和确定实现期望结果的量。本发明的剂型可以以多种频率施用。在一个实施方案中,本文提供的组合物的至少一次施用足以产生药理学相关应答。

[0132] 本公开的另一方面涉及药盒。在一些实施方案中,药盒包含本文提供的任何一种组合物。在所提供的任何一种药盒的一些实施方案中,药盒包含含有稳定的超饱和量雷帕霉素的合成纳米载体。在所提供的任何一种药盒的一些实施方案中,合成纳米载体最初也

可无菌过滤。在所提供的任何一种药盒的另一些实施方案中,药盒包含本文提供的任何一种量的疏水性聚酯载体材料和本文提供的任何一种量的雷帕霉素。在所提供的任何一种药盒的一些实施方案中,这种药盒还包含本文提供的任何一种量的亲水-亲油平衡 (HLB) 值小于或等于10的非离子表面活性剂。在所提供的任何一种药盒的一些实施方案中,药盒还包含抗原。在所提供的任何一种药盒的一些实施方案中,组合物或其元素可以包含在药盒中分开的容器中或同一容器中。在所提供的任何一种药盒的一些实施方案中,容器是小瓶或安瓿。在所提供的任何一种药盒的一些实施方案中,组合物或其元素包含在与容器分开的溶液中,使得可以在随后的时间将组合物或其元素加入到容器中。在所提供的任何一种药盒的一些实施方案中,组合物或其元素以冻干形式各自分开在容器中或在同一容器中,使得其可以在随后的时间重构。在所提供的任何一种药盒的一些实施方案中,药盒还包括用于重构、混合、施用等的说明书。在所提供的任何一种药盒的一些实施方案中,说明书包括本文所述方法的描述。说明书可以是任何合适的形式,例如印刷的插入物或标签。在本文提供的任何一种药盒的一些实施方案中,药盒还包含可以在体内将合成纳米载体递送至对象的一个或更多个注射器或其他装置。

实施例

[0133] 实施例1-具有超饱和雷帕霉素的合成纳米载体

[0134] 使用水包油乳液蒸发法合成含有聚合物PLGA (3:1丙交酯:乙交酯,比浓对数黏度0.39dL/g) 和PLA-PEG (5kDa PEG嵌段,比浓对数黏度0.36dL/g) 以及试剂雷帕霉素 (RAPA) 的纳米载体组合物。通过将聚合物和RAPA溶解在二氯甲烷中形成有机相。通过在含有表面活性剂聚乙烯醇 (PVA) 的水相中使有机相均化来形成乳液。然后将乳液与更大量的水性缓冲液合并并混合以使溶剂蒸发。改变不同组合物中的RAPA含量,使得当RAPA含量增加时,组合物越过系统的RAPA饱和极限。使用RAPA在水相和在分散的纳米载体相中的溶解度,计算组合物饱和极限下的RAPA含量。对于在水相中含有PVA作为主要溶质的组合物,发现RAPA在水相中的溶解度与PVA浓度成比例,使得RAPA在与溶解的PVA的质量比为1:125下可溶。对于含有所述PLGA和PLA-PEG作为纳米载体聚合物的组合物,发现RAPA在分散纳米载体相中的溶解度为7.2%wt/wt。以下公式可用于计算在组合物中饱和极限下的RAPA含量:

[0135]
$$\text{RAPA 含量} = V (0.008C_{\text{PVA}} + 0.072C_{\text{pol}})$$

[0136] 其中 C_{PVA} 是PVA的质量浓度, C_{pol} 是聚合物的组合质量浓度,V是蒸发结束时纳米载体悬浮液的体积。

[0137]

样品 ID	计算的 过饱和 (%)	RAPA 负载 (%)	直径 (nm)
1	-50	2.5	143
2	-25	3.8	146
3	1	4.9	147
4	23	4.9	130
5	48	8.1	160
6	73	9.8	189
7	98	12.4	203

[0138] 对于1、2和3,其一致的不能回收60%的RAPA,这表明水相和有机相之间的亚饱和平衡状态(regime)。对于含有较高量的RAPA的其余纳米载体,其一致的不能回收6.8mg RAPA。这种一致的绝对质量损失表明系统处于过饱和状态(即,在一个或多个相中是超饱和的)。

[0139] 实施例2-具有超饱和雷帕霉素的合成纳米载体消除或延迟抗体产生

[0140] 使用实施例1中所述的水包油乳液蒸发法合成包含聚合物PLGA(3:1丙交酯:乙交酯,比浓对数黏度0.39dL/g)和PLA-PEG(5kDa PEG嵌段,比浓对数黏度0.36dL/g)以及试剂RAPA的纳米载体组合物。改变不同组合物中的RAPA含量,使得当RAPA含量增加时,组合物越过系统的RAPA饱和极限。

[0141]

样品 ID	计算的 过饱和 (%)	RAPA 负载 (%)	直径 (nm)
1	-50	2.5	143
3	1	4.9	147
8	21	8.5	163
9	48	13.5	159

[0142] 为了评估组合物诱导免疫耐受性的能力,将小鼠用共同施用的纳米载体和匙孔血蓝蛋白(KLH)每周静脉内注射三次,然后每周仅用KLH进行攻击。然后在KLH攻击后分析小鼠血清中的KLH的抗体。在超饱和状态下制备的并且具有8%或更高的最终RAPA负载的组合物导致不存在针对KLH的抗体或所述抗体产生的延迟,其程度大于在饱和或低于饱和度下产生的并且具有5%或更低的最终RAPA负载的组合物。

[0143] 实施例3-具有超饱和量雷帕霉素的合成纳米载体

[0144] 使用实施例1中所述的水包油乳液蒸发法合成含有聚合物PLA(比浓对数黏度0.41dL/g)和PLA-PEG(5kDa PEG嵌段,比浓对数黏度0.50dL/g)以及试剂RAPA的纳米载体组

合物。改变不同组合物中的RAPA含量,使得当RAPA含量增加时,组合物越过系统的RAPA饱和极限。使用实施例1中所述的方法计算组合物饱和极限下的RAPA含量。对于含有所述PLA和PLA-PEG作为纳米载体聚合物的组合物,发现RAPA在分散的纳米载体相中的溶解度为8.4% wt/wt。以下公式可用于计算组合物饱和极限下的RAPA含量:

$$[0145] \quad \text{RAPA含量} = V(0.008c_{\text{PVA}} + 0.084c_{\text{pol}})$$

[0146] 其中 c_{PVA} 是PVA的质量浓度, c_{pol} 是聚合物的组合质量浓度, V 是蒸发结束时纳米载体悬浮液的体积。所有纳米载体批次在形成结束时通过0.22 μm 过滤器过滤。

样品ID	计算的过饱和 (%)	RAPA 负载 (%)	未洗涤的直径 (nm)	最终直径 (nm)	过滤器通过量 (g/m^2)
10	-10	5.4	145	149	>171
11	0	6.2	150	155	>180
12	10	6.1	151	154	>170
13	20	6.1	148	148	80
14	30	6.2	171	151	28
15	40	5.8	202	154	16

[0148] 尽管向纳米载体12-15中添加了增加量的RAPA,但纳米载体中的最终RAPA含量并未增加,而过滤器通过量降低。这表明组合物的RAPA过饱和,并且过量的RAPA在洗涤和/或过滤期间被除去。

[0149] 实施例4-具有超饱和量雷帕霉素的合成纳米载体以比具有饱和量雷帕霉素的合成纳米载体以更大的程度延迟抗体产生

[0150] 使用水包油乳液蒸发法合成含有聚合物PLA(比浓对数黏度0.41dL/g)和PLA-PEG(5kDa PEG嵌段,比浓对数黏度0.50dL/g)以及试剂RAPA的纳米载体组合物。改变不同组合物中的RAPA含量,使得一种组合物在系统的RAPA饱和极限下制成,并且一种组合物在33%过饱和下制成。在每种情况下,将一半材料通过0.22 μm 灭菌过滤器过滤,一半保留未过滤。

样品ID	计算的过饱和 (%)	RAPA 负载 (%)	未洗涤的直径 (nm)	最终直径 (nm)	过滤器通过量 (g/m^2)
16	0	6.8	126	133	N/A
17	0	5.6	126	131	>148
18	33	9.8	142	149	N/A
19	33	7.9	142	138	37

[0152] 为了评估组合物诱导免疫耐受性的能力,将小鼠用共同施用的纳米载体和KLH每周静脉内注射三次,然后每周仅用KLH进行攻击。然后在三次KLH攻击后分析小鼠血清中的

KLH抗体。在超饱和状态下制备的组合物比在饱和下产生的组合更大程度地延迟抗体产生。此外,无论组合物过滤或未过滤,重复攻击后滴度的延迟和降低都很明显。

[0153] 实施例5-更快速的溶剂蒸发和低HLB表面活性剂导致产生具有超饱和量雷帕霉素的也可最初无菌过滤的合成纳米载体

[0154] 材料和方法

[0155] 比浓对数黏度为0.41dL/g的PLA购自Evonik Industries AG (Rellinghauser Straße 1-11, Essen德国), 产品代码100DL 4A。约5,000Da的具有甲基醚封端PEG嵌段且整体比浓对数黏度为0.50DL/g的PLA-PEG-OMe嵌段共聚物购自Evonik Industries AG (Rellinghauser Straße 1-11, Essen德国), 产品代码100DL mPEG 5000 5CE。雷帕霉素购自Concord Biotech Limited, 1482-1486 Trasad Road, Dholka 382225, Ahmedabad印度。产品代码SIROLIMUS。**EMPROVE®**聚乙烯醇4-88 (PVA), USP (85-89%水解, 黏度3.4-4.6mPa·s) 购自EMD Chemicals Inc. (480 South Democrat Road Gibbstown, NJ 08027), 产品代码1.41350。Cellgro PBS 1X (PBS) 购自Corning Incorporated (One Riverfront Plaza Corning, NY 14831美国), 部件号21-040-CV。Dulbecco磷酸盐缓冲盐水1X (DPBS) 购自Lonza (Muenchensteinerstrasse 38, CH-4002 Basel, 瑞士), 产品代码17-512Q。山梨聚糖单棕榈酸酯购自Croda International (300-A Columbus Circle, Edison, NJ 08837), 产品代码SPAN 40。

[0156] 对于样品1, 如下制备溶液:

[0157] 溶液1: 通过将18.75mg/mL PLA、6.25mg/mL PLA-PEG-OMe和4.7mg/mL雷帕霉素溶解在二氯甲烷中来制备聚合物和雷帕霉素混合物。溶液2: 在100mM pH 8磷酸盐缓冲液中以50mg/mL制备PVA。

[0158] 通过将溶液1 (1.0mL) 和溶液2 (3.0mL) 在小玻璃压力管中合并来制备O/W乳液, 涡旋混合10秒, 然后使用Branson数字超声仪250将浸入冰水浴中的压力管以30%振幅超声处理1分钟。然后将乳液加入到含有DPBS (30mL) 的开口的500mL烧杯中。使用与上述相同的材料和方法制备第二O/W乳液, 然后添加到含有第一乳液和DPBS的同一容器中。然后将其在室温下搅拌2小时, 以使二氯甲烷蒸发并形成纳米载体。通过将纳米载体悬浮液转移到离心管中, 在75,600×g和4℃下离心50分钟, 除去上清液, 并将沉淀重新悬浮在含有0.25%w/v PVA的DPBS中来洗涤一部分纳米载体。重复洗涤步骤, 然后将沉淀重新悬浮在含有0.25%w/v PVA的DPBS中, 以获得基于聚合物的标称浓度为10mg/mL的纳米载体悬浮液。在不同的500mL烧杯中制备相同的制剂, 进行相同处理, 并在即将无菌过滤前与第一制剂合并。然后使用33mm直径的0.22μm PES膜注射器过滤器 (Millipore部件号SLGP033RB) 过滤纳米载体悬浮液。然后将过滤的纳米载体悬浮液保存在-20℃。

[0159] 对于样品2, 如下制备溶液:

[0160] 溶液1: 通过将75mg/mL PLA、25mg/mL PLA-PEG-OMe和16mg/mL雷帕霉素溶解在二氯甲烷中制备聚合物和雷帕霉素混合物。溶液2: 通过将Span 40以20mg/mL溶解在二氯甲烷中制备山梨聚糖单棕榈酸酯混合物。溶液3: 在100mM pH8磷酸盐缓冲液中以50mg/mL制备聚乙烯醇。溶液4: 使用0.20μm PTFE膜注射器过滤器 (VWR部件号28145-491) 过滤二氯甲烷。

[0161] 通过将溶液1 (0.5mL)、溶液2 (0.125mL) 和溶液4 (0.375mL) 和溶液3 (3.0mL) 在小玻璃压力管中合并制备O/W乳液, 涡旋混合10秒, 然后使用Branson数字超声仪250将浸入冰水

浴中的压力管以30%振幅超声处理1分钟。然后将乳液添加到含有DPBS (30mL) 的50mL烧杯中。使用与上述相同的材料和方法制备第二O/W乳液,然后添加到含有第一乳液和DPBS的相同烧杯中。然后以与样品1相同的方式处理纳米载体悬浮液。

[0162] 对于样品3,如下制备溶液:

[0163] 溶液1:通过将37.5mg/mL PLA、12.5mg/mL PLA-PEG-0me和8mg/mL雷帕霉素溶解在二氯甲烷中制备聚合物和雷帕霉素混合物。溶液2:在100mM pH 8磷酸盐缓冲液中以75mg/mL制备聚乙烯醇。

[0164] 通过将溶液1 (1mL) 和溶液2 (3.0mL) 在小玻璃压力管中合并来制备O/W乳液,涡旋混合10秒,然后使用Branson数字超声仪250将浸入冰水浴中的压力管以30%振幅超声处理1分钟。使用与上述样品1相同的方法形成O/W乳液。在通过超声处理乳化后,将乳液添加到含有DPBS (30mL) 的50mL烧杯中。使用与上述相同的材料和方法制备第二O/W乳液,然后添加到相同的溶剂蒸发容器中。将乳液搅拌2小时以使有机溶剂蒸发并形成纳米载体。然后通过将纳米载体悬浮液转移到离心管中并以75,600×g离心50分钟,除去上清液,并将沉淀重新悬浮在PBS中来洗涤一部分纳米载体。重复洗涤步骤,然后将沉淀物重新悬浮在PBS中,以获得基于聚合物的标称浓度为10mg/mL的纳米载体悬浮液。然后使用33mm直径的0.22μm PES膜注射器过滤器 (Millipore部件号SLGP033RB) 过滤纳米载体悬浮液。然后将过滤的纳米载体悬浮液保存在-20℃。

[0165] 通过动态光散射确定纳米载体尺寸。通过HPLC分析测定纳米载体中雷帕霉素的量。通过重量法测定每mL悬浮液的总干纳米载体质量。

[0166]

批号	SE 容器	低HLB 表面活性剂	容器的 表面积 (cm ²)	计算的 过滤器 通过量 (g NP/m ²)	雷帕霉素 负载 (%)	尺寸 (nm)	产率 (%)
1	500 mL 烧杯	无	64	>133	9.84	148	81
2	50 mL 烧杯	SPAN 40	14	>178	9.32	165	93
3	50 mL 烧杯	无	14	47	7.38	119	73

[0167] 在第0、7和14天用与200μL KLH (匙孔血蓝蛋白) (其以1mg/mL溶解在PBS中) 混合的纳米载体静脉内处理6周龄的C57BL/6雌性小鼠。在第21、28、35和42天,用200μg KLH加强小鼠。在第26、40和47天读取抗KLH IgG滴度。结果示出在图4中,并且证明包含稳定的超饱和雷帕霉素的合成纳米载体无论是用快速溶剂蒸发还是用低HLB表面活性剂制备,都显著降低体内抗原特异性抗体产生。

[0168]

组	批 ID	SE 容器	低HLB 表面活性剂	DLS 直径 (nm)	RAPA 负载 (%)	过滤能力 (g NP/m ²)
1	PBS	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
6	样品 1	500 mL 烧杯	无	148	9.8	>133
12	样品 2	50 mL 烧杯	SPAN 40	165	9.3	>178
全部	KLH, Sigma #H7017					

[0169] 实施例6-更快速的溶剂蒸发导致合成纳米载体提高的过滤能力

[0170] 材料和方法

[0171] 对于样品1、2和4,如下制备溶液:

[0172] 溶液1:通过将18.8mg/mL PLA、6.25mg/mL PLA-PEG-0me和4.7mg/mL雷帕霉素溶解在二氯甲烷中制备聚合物和雷帕霉素混合物。溶液2:在100mM pH 8磷酸盐缓冲液中以50mg/mL制备聚乙烯醇。

[0173] 与上述实施例5样品1类似的方式形成O/W乳液。超声处理之后,将乳液添加到含有DPBS (30mL) 的烧杯中。使用与上述相同的材料和方法制备第二O/W乳液,然后添加到含有第一乳液和DPBS的同一容器中。样品1使用50mL烧杯,样品2使用250mL烧杯,样品4使用125mm蒸发皿。对于每个批次,使用相同尺寸和类型的新溶剂蒸发容器重复双重单乳液,并在洗涤步骤之后与第一个合并。然后以与实施例5样品1相同的方式处理纳米载体悬浮液。

[0174] 通过动态光散射确定纳米载体尺寸。通过HPLC分析测定纳米载体中雷帕霉素的量。通过重量法测定每mL悬浮液的总干纳米载体质量。通过0.22μm的过滤器,将以g/m²计的纳米载体质量测量为过滤器通过量。另外,在加入制剂中的聚合物的标称浓度为10mg/mL时,该溶液可能仅通过一个具有4.5cm的过滤器表面积的33mm 0.22μm PES膜注射器过滤器。通过测量经过与制剂相同时间(2小时),从含有36mL SE缓冲液的相同溶剂蒸发容器中损失的水来计算从烧杯蒸发的溶剂的百分比。然后从制剂中测量的损失中减去水损失(g),以计算二氯甲烷有机溶剂的蒸发。

[0175]

批号	SE 容器	容器的 SA (cm ²)	计算的过滤器通过量 (g NP/m ²)	所需的无菌过滤器数量	雷帕霉素负载 (%)	尺寸 (nm)	产率 (%)
1	50 mL 烧杯	14	121	2	11.37	173	71
2	250 mL 烧杯	33	>146	1	11.66	156	72
4	125 mm 蒸发皿	123	>148	1	11.74	142	73

[0176] 实施例7-确定超饱和度的方法

[0177] 材料和方法

[0178] 比浓对数黏度为0.41dL/g的PLA购自Evonik Industries AG (Rellinghauser Straße 1-11, Essen德国), 产品代码100DL 4A。雷帕霉素购自Concord Biotech Limited, 1482-1486 Trasad Road, Dholka 382225, Ahmedabad印度。产品代码SIROLIMUS。

[0179] 如下制备溶液:

[0180] 溶液1:通过将PLA以100mg/mL溶解在二氯甲烷中来制备聚合物溶液。溶液2:通过将雷帕霉素以100mg/mL溶解在二氯甲烷溶解来制备雷帕霉素溶液。

[0181] 用70%异丙醇清洗玻璃显微镜载玻片,使其在化学通风橱的干净平坦表面上干燥。通过将100μL溶液1与100μL二氯甲烷在具有耐溶剂螺旋盖的玻璃小瓶中混合并通过涡旋混合来制备混合物1。使用与混合物1相同的方法,用100μL溶液1、33.3μL溶液2和66.7μL二氯甲烷制备混合物2。使用与混合物1相同的方法,用100μL溶液1、66.7μL溶液2和33.3μL二氯甲烷制备混合物3。接下来,将50μL的每种混合物施加到干净的玻璃载片上的分开的位置,并使其在通风橱中在室温下干燥过夜。拍摄每张干膜的数字图像,并使用图像分析软件进行分析。归一化的平均强度增加可以示出,膜在饱和点以上变得不透明。

[0182]

混合物	膜						背景				
	面积	平均强度	标准偏差	最小	最大	面积	平均强度	标准偏差	最小	最大	归一化的平均强度
1	45153	39.9	7.3	18	174	45588	38.6	6	18	123	1.3
2	43444	47.6	7.7	16	148	49698	40.5	5.7	19	95	7.1
3	63995	57.1	35.9	12	232	64441	23.4	4.4	8	85	33.7

[0183] 实施例8-低HLB表面活性剂SM提高RAPA负载和合成纳米载体过滤能力

[0184] 使用水包油乳液蒸发法,在添加或不添加低HLB表面活性剂山梨聚糖单棕榈酸酯(sorbitan monopalmitate, SM)的情况下合成包含聚合物PLA(比浓对数黏度(inherent viscosity)为0.41dL/g)和PLA-PEG(5kDa PEG嵌段,比浓对数黏度为0.50dL/g)以及疏水性药物雷帕霉素(RAPA)的纳米载体组合物。通过将聚合物和RAPA溶解在二氯甲烷中形成有机相。通过使用探针尖超声仪将含有表面活性剂PVA的水相中的有机相均化来形成乳液。然后将乳液与更大量的水性缓冲液合并并且混合以允许溶解和溶剂蒸发。将所得纳米载体洗涤并通过0.22μm过滤器过滤。所有组合物含有100mg聚合物。不同组合物的RAPA含量不同。

[0185]

样品 ID	添加到组合物中的RAPA (mg)	添加到组合物中的SM (mg)	未洗涤直径 (nm)	最终直径 (nm)	RAPA 负载 (%)	过滤器通过量 (g/m ²)
1	12.2	0	148	148	6.1	80
2	13.3	0	171	151	6.2	28
3	14.3	0	202	154	5.8	16
4	13.6	5	156	161	9.2	>174
5	17	5	168	170	11.8	>184
6	20.4	5	181	179	14.9	77

[0186] 对于不包含表面活性剂SM的组合物(样品1、2和3),随着RAPA的添加量的增加,观

察到将RAPA完全并入纳米载体组合物中的能力受限的几个迹象。在不存在SM的情况下,较高RAPA配制水平下过滤前后纳米载体尺寸之间增加的差异表明在洗涤和/或过滤过程期间存在被除去的较大颗粒(单个颗粒或聚集体)。堵塞前降低的过滤器通过量也表明了这一点。最后,向没有SM的纳米载体组合物中加入增加量的RAPA不会导致增加的RAPA负载(例如,样品1与样品3相比),表明额外的RAPA可与纳米载体本体分离,并在洗涤和/或过滤步骤中除去。

[0187] 相比之下,含有表面活性剂SM的组合物容易并入增加量的RAPA。纳米载体尺寸不受过滤的影响,并且增加添加到组合物中的RAPA的量导致纳米载体的RAPA负载增加。在最高负载水平(样品6)观察到过滤器通过量的一些降低,但这可能是由于固有地较大的纳米载体尺寸。总之,SM的并入有助于提高合成纳米载体组合物的RAPA负载和过滤能力。

[0188] 实施例9-SM和胆固醇增加RAPA负载和过滤能力

[0189] 使用如实施例8所述的材料和方法制备纳米载体组合物。制备含有聚合物和RAPA的纳米载体,其具有不同的RAPA负载水平。另外,也使用赋形剂——表面活性剂SM或胆固醇,以赋形剂:RAPA质量比为3.2:1来制备RAPA高度负载的纳米载体。

样品 ID	赋形剂	直径 (nm)	RAPA 负载 (%)	过滤器 通过量 (g/m ²)
[0190] 7	-	131	5.6	>148
8	-	138	7.9	37
9	SM	165	9.3	>178
10	胆固醇	166	14.3	>180

[0191] 在不存在赋形剂的情况下制备的纳米载体的样品(样品7和8)证明,超过表观纳米载体饱和点的RAPA负载的增加倾向于导致过滤器通过量的降低。添加SM或胆固醇导致产生更大的RAPA负载,同时保持稳定性(样品9和10)。

[0192] 为了评估组合物诱导免疫耐受的能力,用共同施用的纳米载体和KLH(匙孔血蓝蛋白)以相同的RAPA剂量对小鼠每周静脉内注射三次,然后每周仅用KLH进行攻击。然后在每次KLH攻击后,分析小鼠的血清中KLH的抗体(图6)。

[0193] 虽然接受RAPA纳米载体治疗的所有小鼠接受相同剂量的RAPA,但不同组对KLH显示不同程度的耐受性。接受具有最低负载的纳米载体组合物(样品7)的所有5只小鼠在第三次KLH攻击后(第40天)具有可定量滴度的抗KLH抗体。与仅接受PBS的小鼠相比,该组小鼠产生的抗KLH抗体滴度降低,但与其他纳米载体组相比表现出最小的耐受性。在不存在赋形剂(SM或胆固醇)(样品8)的情况下,增加纳米载体的RAPA负载显著改善耐受性,5只小鼠中仅有2只在3次KLH攻击后(第40天)表现出可定量滴度。含有胆固醇作为赋形剂的组合物(样品10)尽管纳米载体的RAPA负载量高,但导致五只小鼠中的四只在仅仅两次攻击之后(第33天)表现出显著的抗KLH抗体滴度。含有SM的纳米载体组合物(样品9)表现出制备中的高通量0.22μm过滤器通过量和优异的耐受性,其中五只小鼠中只有一只三次KLH攻击后(第40天)表现出可定量的抗KLH抗体滴度。该研究的结果表明,两种赋形剂(SM和胆固醇)都能够提高纳米载体的负载,与耐受性诱导性能和通过过滤通过量指示的加工有利性一致。低

HLB表面活性剂SM提供了提高纳米载体稳定性所需的特征,并表现出较高的性能。

[0194] 实施例10-低HLB表面活性剂对RAPA负载和过滤能力的影响

[0195] 材料和方法

[0196] 比浓对数黏度为0.41dL/g的PLA购自Lakeshore Biomaterials(756 Tom Martin Drive,Birmingham,AL 35211),产品代码100DL 4A。约5,000Da的具有甲基醚封端PEG嵌段且整体比浓对数黏度为0.50DL/g的PLA-PEG-OMe嵌段共聚物购自Lakeshore Biomaterials(756 Tom Martin Drive,Birmingham,AL 35211),产品代码100DL mPEG 5000 5CE。雷帕霉素购自Concord Biotech Limited(1482-1486 Trasad Road,Dholka 382225,Ahmedabad印度),产品代码SIROLIMUS。**EMPROVE®**聚乙烯醇4-88,USP(85-89%水解,黏度为3.4-4.6mPa·s)购自EMD Chemicals Inc.(480 South Democrat Road Gibbstown,NJ 08027),产品代码1.41350。Dulbecco磷酸盐缓冲盐水1X(DPBS)购自Lonza(Muenhensteinerstrasse 38,CH-4002 Basel,瑞士),产品代码17-512Q。山梨聚糖单棕榈酸酯购自Croda International(300-A Columbus Circle,Edison,NJ 08837),产品代码SPAN 40。聚山梨醇酯80购自(One North Broadway,Suite 912 White Plains,NY 10601),产品代码Polysorbate80(HX2),产品代码Polysorbate80(HX2)。山梨聚糖单月桂酸酯(SPAN 20)购自Alfa Aesar(26 Parkridge Rd Ward Hill,MA 01835),产品代码L12099。山梨聚糖硬脂酸酯(SPAN 60)购自Sigma-Aldrich(3050 Spruce St.St.Louis,MO 63103),产品代码S7010。山梨聚糖单油酸酯(SPAN 80)购自Tokyo Chemical Industry Co.,Ltd.(9211 North Harborgate Street Portland,OR 97203),产品代码S0060。辛基β-D-吡喃葡萄糖苷购自Sigma-Aldrich(3050 Spruce St.St.Louis,MO 63103),产品代码08001。油醇购自Alfa Aesar(26 Parkridge Rd Ward Hill,MA 01835),产品代码A18018。棕榈酸异丙酯购自Sigma-Aldrich(3050 Spruce St.St.Louis,MO 63103),产品代码W515604。聚乙二醇十六烷基醚(BRIJ 52)购自Sigma-Aldrich(3050 Spruce St.St.Louis,MO 63103),产品代码388831。聚乙二醇油醚(BRIJ 93)购自Sigma-Aldrich(3050 Spruce St.St.Louis,MO 63103),产品代码388866。聚(乙二醇)-嵌段-聚(丙二醇)-嵌段-聚(乙二醇)(Pluronic L-31)购自Sigma-Aldrich(3050 Spruce St.St.Louis,MO 63103),产品代码435406。聚(乙二醇)-嵌段-聚(丙二醇)-嵌段-聚(乙二醇)(Pluronic P-123)购自Sigma-Aldrich(3050 Spruce St.St.Louis,MO 63103),产品代码435465。棕榈酸购自Sigma-Aldrich(3050 Spruce St.St.Louis,MO 63103),产品代码P0500。DL-α-棕榈酸甘油酯购自Sigma-Aldrich(3050 Spruce St.St.Louis,MO 63103),产品代码M1640。三棕榈酸甘油酯购自Sigma-Aldrich(3050 Spruce St.St.Louis,MO 63103),产品代码T5888。

[0197] 对于样品11,如下制备溶液:

[0198] 溶液1:通过将75mg/mL PLA、25mg/mL PLA-PEG-OMe和16mg/mL雷帕霉素溶解在二氯甲烷中制备聚合物和雷帕霉素混合物。溶液2:通过将80mg/mL聚山梨酯80溶解在二氯甲烷中制备聚山梨醇酯80混合物。溶液3:在100mM pH8磷酸盐缓冲液中以50mg/mL制备聚乙烯醇。

[0199] 通过将溶液1(0.5mL)、溶液2(0.1mL)、二氯甲烷(0.4mL)和溶液3(3.0mL)在小玻璃压力管中合并,涡旋混合10秒,然后使用Branson数字超声仪250将浸入在冰浴中的压力管以30%振幅超声处理1分钟来制备O/W乳液。然后将乳液加入到含有DPBS(30mL)的50mL烧杯

中。使用与上述相同的材料和方法制备第二O/W乳液,然后加入到含有第一乳液和DPBS的同一容器中。然后将其在室温下搅拌2小时,以使二氯甲烷蒸发并形成纳米载体。通过将纳米载体悬浮液转移到离心管中并在75,600×g和4℃下离心50分钟,除去上清液,并将沉淀重新悬浮在含有0.25%w/v PVA的DPBS中来洗涤一部分纳米载体。重复洗涤步骤,然后将沉淀重新悬浮在含有0.25%w/v PVA的DPBS中,以获得基于聚合物的标称浓度为10mg/mL的纳米载体悬浮液。然后使用0.22μm PES膜注射器过滤器(Millipore部件号SLGP033RB)过滤纳米载体悬浮液。然后将过滤的纳米载体悬浮液保存在-20℃。

[0200] 对于样品12-25,如下制备溶液:

[0201] 溶液1:通过将75mg/mL PLA、25mg/mL PLA-PEG-0me和16mg/mL雷帕霉素溶解在二氯甲烷中制备聚合物和雷帕霉素混合物。溶液2:通过将5.0mg/mL HLB表面活性剂溶解在二氯甲烷中制备HLB混合物。HLB表面活性剂包括SPAN 20、SPAN 40、SPAN 60、SPAN 80、辛基β-D-吡喃葡萄糖苷、油酸、棕榈酸异丙酯、BRIJ 52、BRIJ 93、Pluronic L-31、Pluronic P-123、棕榈酸、DL-α-棕榈酸甘油酯和三棕榈酸甘油酯。溶液3:在100mM pH8磷酸盐缓冲液中以62.5mg/mL制备聚乙烯醇。

[0202] 通过将溶液1(0.5mL)、溶液2(0.5mL)和溶液3(3.0mL)在小玻璃压力管中合并,涡旋混合10秒,然后使用Branson数字超声仪250将浸入在冰浴中的压力管以30%振幅超声处理1分钟来制备O/W乳液。然后将乳液加入到含有DPBS(30mL)的50mL烧杯中。使用与上述相同的材料和方法制备第二O/W乳液,然后加入到含有第一乳液和DPBS的同一容器中。然后将其在室温下搅拌2小时,以使二氯甲烷蒸发并形成纳米载体。通过将纳米载体悬浮液转移到离心管中并在75,600×g和4℃下离心50分钟,除去上清液,并将沉淀重新悬浮在含有0.25%w/v PVA的DPBS中来洗涤一部分纳米载体。重复洗涤步骤,然后将沉淀重新悬浮在含有0.25%w/v PVA的DPBS中,以获得基于聚合物的标称浓度为10mg/mL的纳米载体悬浮液。然后使用0.22μm PES膜注射器过滤器(Millipore部件号SLGP033RB)过滤纳米载体悬浮液。然后将过滤的纳米载体悬浮液保存在-20℃。

[0203]

样品	有机相表面活性剂	表面活性剂的HLB	尺寸 (nm)	过滤	过滤器数量	计算的 g NP/m ²	产率 (%)	雷帕霉素负载 (%)
11	聚山梨醇酯 80	15	184	Millex 0.22 μm	>1	22	91	9.7
12	SPAN 20	8.6	148	Millex 0.22 μm	1	>144	71	11.2
13	SPAN 40	6.7	149	Millex 0.22 μm	1	>154	77	11.2
14	SPAN 60	4.7	151	Millex 0.22 μm	1	>154	77	11.0
15	SPAN 80	4.3	144	Millex 0.22 μm	1	>169	85	11.1
16	辛基 β-D-吡喃葡萄糖苷	12	127	Millex 0.22 μm	3	47	64	6.7
17	油醇	1.3	165	Millex 0.22 μm	1	>157	78	12.5
18	棕榈酸异丙酯	2.9	171	Millex 0.22 μm	1	>144	71	10.9
19	Brij 52	5	182	Millex 0.22 μm	1	>138	77	11.2
20	Brij 93	4	174	Millex 0.22 μm	1	>158	79	11.9
21	Pluronic L-31	1-7	169	Millex 0.22 μm	4	31	70	8.5
22	Pluronic P-123	7-9	162	Millex 0.22 μm	1	>145	72	10.7
23	棕榈酸	3.2	132	Millex 0.22 μm	1	>141	71	1.0
24	DL-α-棕榈酸甘油酯	7.2	153	Millex 0.22 μm	3	51	68	7.4
25	三棕榈酸甘油酯	4.3	168	Millex 0.22 μm	1	>146	73	10.0

[0204] 对于大部分低HLB表面活性剂,HLB是使用可公开获得的信息确定的。对于DL-α-棕榈酸甘油酯,使用下式计算HLB: $Mw=330.5g/mol$,亲水部分= $119.0g/mol$; $HLB=119.0/330.5 \times 100/5=7.2$ 。对于棕榈酸甘油酯,使用下式计算HLB: $Mw=807.3g/mol$,亲水部分= $173.0g/mol$; $HLB=173.0/807.3 \times 100/5=4.3$ 。对于棕榈酸异丙酯,使用下式计算HLB: $Mw=298.5g/mol$,亲水部分= $44.0g/mol$; $HLB=44.0/298.5 \times 100/5=2.9$ 。对于油醇,使用下式计算HLB: $Mw=268.5g/mol$,亲水部分= $17.0g/mol$; $HLB=17.0/268.5 \times 100/5=1.3$ 。此外,通过萃取后经由HPLC方法进行定量来测定低HLB表面活性剂的负载。

[0205] 在注入动物之前,将批量纳米载体悬浮液在室温水浴中解冻30分钟。用DPBS稀释纳米载体以达到278μg/mL雷帕霉素的期望浓度。在第0、7和14天对6周龄的C57BL/6雌性小鼠用与130μL 10x KLH(匙孔血蓝蛋白)混合的纳米载体(1.17mL)静脉内处理。在第21、28、35和42天,用200μg KLH对小鼠加强。在第40、47和61天读取抗KLH IgG滴度(通过ELISA测量)。结果表明,低HLB表面活性剂可以导致产生显著的雷帕霉素负载和合成纳米载体过滤能力。此外,如图7所示,所有具有低HLB表面活性剂的纳米载体导致抗体滴度降低至少40和47天。

[0206] 实施例11-低HLB表面活性剂对合成纳米载体过滤能力的影响

[0207] 材料和方法

[0208] 约5,000Da的具有甲基醚封端PEG嵌段且整体比浓对数黏度为0.50DL/g的PLA-

PEG-OMe嵌段共聚物购自Evonik Industries(Rellinghauser Straße 1-11 45128 Essen, 德国),产品代码100DL mPEG 5000 5CE。比浓对数黏度为0.41dL/g的PLA购自Evonik Industries(Rellinghauser Straße 1-11 45128 Essen德国),产品代码100DL 4A。雷帕霉素购自Concord Biotech Limited,1482-1486 Trasad Road,Dholka 382225,Ahmedabad印度,产品代码SIROLIMUS。山梨聚糖单棕榈酸酯购自Croda (315 Cherry Lane New Castle Delaware 19720),产品代码SPAN 40。二氯甲烷购自Spectrum(14422 S San Pedro Gardena CA,90248-2027)。部件号M1266。**EMPROVE®**聚乙烯醇4-88,USP(85-89%水解,黏度为3.4-4.6mPa·s)购自EMD Chemicals Inc.(480 South Democrat Road Gibbstown,NJ 08027),产品代码1.41350。Dulbecco磷酸盐缓冲盐水,1X,0.0095M(P04),不含钙和镁,购自BioWhittaker(8316 West Route 24 Mapleton,IL 61547),部件号#12001,产品代码Lonza DPBS。使用具有1/8”锥形尖端钛探针的Branson数字超声仪250进行乳化。

[0209] 如下制备溶液:

[0210] 溶液1:通过将50mg/mL PLA-PEG-OMe(100DL mPEG 5000 5CE)和150mg/mL PLA(100DL 4A)溶解在二氯甲烷中来制备聚合物混合物。溶液2:将雷帕霉素以160mg/mL溶解在二氯甲烷中。溶液5:将山梨聚糖单棕榈酸酯(SPAN 40)以50mg/mL溶解在二氯甲烷中。溶液6:使用0.2 μ m PTFE膜注射器过滤器(VWR部件号28145-491)进行无菌过滤的二氯甲烷。溶液7:通过将聚乙烯醇(**EMPROVE®**聚乙烯醇4-88)以75mg/mL溶解在100mM pH8磷酸盐缓冲液中来制备聚乙烯醇溶液。溶液8:通过将聚乙烯醇(**EMPROVE®**聚乙烯醇4-88)以2.5mg/mL溶解在Dulbecco磷酸盐缓冲盐水,1X,0.0095M(P04)(Lonza DPBS)中来制备聚乙烯醇和Dulbecco磷酸盐缓冲盐水,1X,0.0095M(P04)混合物。

[0211] 对于样品26,通过将溶液1(0.5mL)、溶液2(0.1mL)、溶液5(0.1mL)和溶液6(0.30mL)在小玻璃压力管中合并来制备O/W乳液。通过重复移液将溶液混合。接下来,添加溶液7(3.0mL),将制剂涡旋混合10秒。然后在压力管浸入在冰浴中的情况下将制剂以30%振幅超声处理1分钟。然后将乳液加入到含有Lonza DPBS(30mL)的开口的50mL烧杯中。然后将其在室温下搅拌2小时,以使二氯甲烷蒸发并形成纳米载体。通过将纳米载体悬浮液转移到离心管中,在75,600 $\times$ g和4 $^{\circ}$ C下离心50分钟,除去上清液,并将沉淀重新悬浮在溶液8中来洗涤一部分纳米载体。重复洗涤步骤,然后将沉淀重新悬浮在溶液8中,以获得基于聚合物的标称浓度为10mg/mL的纳米载体悬浮液。使用0.22 μ m PES膜注射器过滤器(Millex部件号SLGP033RS)过滤纳米载体制剂。测量纳米载体溶液过滤器通过量的质量。然后将过滤的纳米载体溶液储存在-20 $^{\circ}$ C。

[0212] 对于样品27,通过将溶液1(0.5mL)、溶液2(0.1mL)和溶液6(0.40mL)在小玻璃压力管中合并来制备O/W乳液。通过重复移液将溶液混合。接下来,加入溶液7(3.0mL),将制剂涡旋混合10秒。然后在压力管浸入在冰浴中的情况下将制剂以30%振幅超声处理1分钟。然后将乳液加入到含有Lonza DPBS(30mL)的开口的50mL烧杯中。然后将其在室温下搅拌2小时,以使二氯甲烷蒸发并形成纳米载体。通过将纳米载体悬浮液转移到离心管中,在75,600 $\times$ g和4 $^{\circ}$ C下离心50分钟,除去上清液,并将沉淀重新悬浮在溶液8中来洗涤一部分纳米载体。重复洗涤步骤,然后将沉淀重新悬浮在溶液8中,以获得基于聚合物的标称浓度为10mg/mL的纳米载体悬浮液。使用0.22 μ m PES膜注射器过滤器(Millex部件号SLGP033RS)过滤纳米载体制剂。测量纳米载体溶液过滤器通过量的质量。然后将过滤的纳米载体溶液储存在-20

℃。

[0213] 通过动态光散射确定纳米载体尺寸。通过HPLC分析测定纳米载体中的雷帕霉素的量。通过重量法测定每mL悬浮液的总干纳米载体质量。通过穿过第一过滤器的滤液量来评估过滤能力。

[0214] 数据显示,对于雷帕霉素,将SPAN 40并入合成纳米载体导致合成纳米载体组合物的过滤能力提高。

[0215]	纳米载体 ID	雷帕霉素	低 HLB 表面活性剂	有效直径 (nm)	雷帕霉素 含量 (% w/w)	纳米载体 产率 (%)	0.22μm 过滤器 通过量 (g/m ²)
	26	雷帕霉素	SPAN 40	179	17.19	80	98
	27	雷帕霉素	无	226	17.56	75	10

[0216] 实施例12-SPAN 40大大提高了包含聚酯聚合物的合成纳米载体的过滤能力

[0217] 材料和方法

[0218] 比浓对数黏度为0.41dL/g的PLA (100DL 4A) 购自Evonik Industries AG (Rellinghauser Straße 1-11, Essen德国), 产品代码100DL 4A。约5,000Da的具有甲基醚封端PEG嵌段且整体比浓对数黏度为0.50DL/g的PLA-PEG-OMe嵌段共聚物购自Evonik Industries AG (Rellinghauser Straße 1-11, Essen德国), 产品代码100DL mPEG 5000 5CE。雷帕霉素购自Concord Biotech Limited (1482-1486 Trasad Road, Dholka 382225, Ahmedabad印度), 产品代码SIROLIMUS。**EMPROVE®**聚乙烯醇4-88 (PVA), USP (85-89% 水解, 黏度为3.4-4.6mPa · s) 购自EMD Chemicals Inc. (480 South Democrat Road Gibbstown, NJ 08027), 产品代码1.41350。Duibecco磷酸盐缓冲盐水1X (DPBS) 购自Lonza (Muenchensteinerstrasse 38, CH-4002 Basel, 瑞士), 产品代码17-512Q。山梨聚糖单棕榈酸酯 (SPAN 40) 购自Croda International (300-A Columbus Circle, Edison, NJ 08837), 产品代码Span 40。PLGA (5050 DLG 2.5A), 具有约54重量%丙交酯和46重量%乙交酯, 比浓对数黏度为约0.24dL/g, 购自Evonik Industries AG (Rellinghauser Straße 1-11, Essen德国), 产品代码5050 DLG 2.5A。PLGA (7525 DLG 4A), 具有约73重量%丙交酯和27重量%乙交酯, 比浓对数黏度为约0.39dL/g, 购自Evonik Industries AG (Rellinghauser Straße 1-11, Essen德国), 产品代码7525 DLG 4A。聚己内酯 (PCL), 平均Mw 14,000Da, Mn为10,000Da, 购自Sigma-Aldrich (3050 Spruce St. St. Louis, MO 63103), 产品代码440752。

[0219] 对于样品1、3、5和7, 如下制备溶液:

[0220] 溶液1: 将50mg/mL PLA-PEG-OMe、10mg/mL Span 40和32mg/mL雷帕霉素溶解在二氯甲烷中。溶液2: 将100DL 4A以150mg/mL溶解在二氯甲烷中。溶液3: 将5050 DLG 2.5A以150mg/mL溶解在二氯甲烷中。溶液4: 将7525 DLG 4A以150mg/mL溶解在二氯甲烷中。溶液5: 将PCL以150mg/mL溶解在二氯甲烷中。溶液6: 在100mM pH 8磷酸盐缓冲液中以75mg/mL制备PVA。

[0221] 通过将溶液1 (0.5mL) 转移到厚壁玻璃压力管中制备O/W乳液。向其中第1批加入溶液2 (0.5mL), 第3批加入溶液3 (0.5mL), 第5批加入4 (0.5mL), 第7批加入溶液5 (0.5mL)。然后通过重复移液将两种溶液混合。接下来, 加入溶液6 (3.0mL), 将管涡旋混合10秒, 然后在压力管浸入在冰水浴中的情况下通过使用Branson数字超声仪250以30%振幅超声处理1分钟

来进行乳化。然后将乳液加入到含有DPBS (30mL) 的50mL烧杯中。然后将其在室温下搅拌2小时,以使二氯甲烷蒸发并形成纳米载体。通过将纳米载体悬浮液转移到离心管中并以75, 600×g离心50分钟,除去上清液,将沉淀重新悬浮在DPBS中来洗涤一部分纳米载体。重复洗涤步骤,然后将沉淀重新悬浮在DPBS中,以获得基于聚合物的标称浓度为10mg/mL的纳米载体悬浮液。然后使用0.22μm PES膜注射器过滤器 (Millipore部件号SLGP033RB) 过滤纳米载体悬浮液,并且如果需要,使用0.45μm PES膜注射器过滤器 (PALL部件号4614) 和/或1.2μm PES膜注射器过滤器 (PALL部件号4656) 来过滤。然后将过滤的纳米载体悬浮液储存在-20℃。

[0222] 通过动态光散射确定纳米载体尺寸。通过HPLC分析测定纳米载体中雷帕霉素的数量。通过将第一无菌0.22μm过滤器的流量的重量与产率进行比较,以确定在阻塞过滤器之前所通过的纳米载体的实际质量,或通过第一且唯一的过滤器的总量,从而来确定过滤能力。通过重量法测定每mL悬浮液的总干纳米载体质量。

[0223] 对于样品2、4、6和8,如下制备溶液:

[0224] 溶液1:通过将50mg/mL PLA-PEG-Ome和32mg/mL雷帕霉素溶解在二氯甲烷中来制备聚合物和雷帕霉素混合物。溶液2:将100DL 4A以150mg/mL溶解在二氯甲烷中。溶液3:将5050 DLG 2.5A以150mg/mL溶解在二氯甲烷中。溶液4:将7525 DLG 4A以150mg/mL溶解在二氯甲烷中。溶液5:将PCL以150mg/mL溶解在二氯甲烷中。溶液6:在100mM pH 8磷酸盐缓冲液中以75mg/mL制备PVA。

[0225] 通过将溶液1 (0.5mL) 转移到厚壁玻璃压力管中制备O/W乳液。向其中第2批加入溶液2 (0.5mL),第4批加入溶液3 (0.5mL),第6批加入4 (0.5mL),第8批加入溶液5 (0.5mL)。然后通过重复移液将两种溶液混合。PVA溶液的添加、洗涤、过滤和储存与上述相同。

[0226] 纳米尺寸的评估与上述相同。

[0227] 结果显示,在合成纳米载体中,包含SPAN 40的含有聚酯聚合物的合成纳米载体的过滤能力显著提高。

批号	核心聚合物	赋形剂	尺寸 (nm)	过滤器通过量 (g NP/m ²)	雷帕霉素负载 (%)	NP产率 (%)
1	100 DL 4A	SPAN 40	160	>148	12.65	75
2	100 DL 4A	无	197	17	10.88	71
3	5050 DLG 2.5A	SPAN 40	153	>139	13.09	70
4	5050 DLG 2.5A	无	188	59	13.40	64
5	7525 DLG 4A	SPAN 40	164	>158	11.81	78
6	7525 DLG 4A	无	196	28	11.64	73
7	聚己内酯	SPAN 40	164	112	10.62	75
8	聚己内酯	无	173	52	10.29	78

[0229] 实施例13-具有低HLB表面活性剂和显著的RAPA负载的合成纳米载体导致产生持久的抗原特异性耐受性

[0230] 材料和方法

[0231] 比浓对数黏度为0.41dL/g的PLA购自Lakeshore Biomaterials (756Tom Martin

Drive, Birmingham, AL 35211), 产品代码100DL 4A。约5,000Da的具有甲基醚封端PEG嵌段且整体比浓对数黏度为0.50DL/g的PLA-PEG-OMe嵌段共聚物购自Lakeshore Biomaterials (756 Tom Martin Drive, Birmingham, AL 35211), 产品代码100DL mPEG 5000 5CE。雷帕霉素购自Concord Biotech Limited (1482-1486 Trasad Road, Dholka 382225, Ahmedabad 印度), 产品代码SIROLIMUS。山梨聚糖单棕榈酸酯购自Sigma-Aldrich (3050 Spruce St., St. Louis, MO 63103), 产品代码388920。**EMPROVE®** 聚乙烯醇 (PVA) 4-88, USP (85-89% 水解, 黏度为3.4-4.6mPa·s) 购自EMD Chemicals Inc. (480 South Democrat Road Gibbstown, NJ 08027), 产品代码1.41350。Dulbecco磷酸盐缓冲盐水1X (DPBS) 购自Lonza (Muenchensteinerstrasse 38, CH-4002 Basel, 瑞士), 产品代码17-512Q。

[0232] 如下制备溶液:

[0233] 溶液1: 通过将37.5mg/mL PLA、12.5mg/mL PLA-PEG-OMe、8mg/mL雷帕霉素和2.5山梨聚糖单棕榈酸酯溶解在二氯甲烷中来制备聚合物、雷帕霉素和山梨聚糖单棕榈酸酯混合物。溶液2: 在100mM pH 8磷酸盐缓冲液中以50mg/mL制备聚乙烯醇。

[0234] 通过将溶液1 (1.0mL) 和溶液2 (3mL) 在小玻璃压力管中合并、涡旋混合10秒来制备O/W乳液。然后通过以30%振幅超声处理将制剂均化1分钟。然后将乳液加入到含有DPBS (30mL) 的开口烧杯中。使用与上述相同的材料和方法制备第二O/W乳液, 然后加入到含有第一乳液和DPBS的相同烧杯中。然后将合并的乳液在室温下搅拌2小时, 使二氯甲烷蒸发并形成纳米载体。通过将纳米载体悬浮液转移到离心管中, 在75,600×g和4℃下离心50分钟, 除去上清液, 并将沉淀重新悬浮在含有0.25%w/v PVA的DPBS中来洗涤一部分纳米载体。重复洗涤步骤, 然后将沉淀重新悬浮在含有0.25%w/v PVA的DPBS中, 以获得基于聚合物的标称浓度为10mg/mL的纳米载体悬浮液。然后使用0.22μm PES膜注射器过滤器 (Millipore部件号SLGP033RB) 过滤纳米载体悬浮液。然后将过滤的纳米载体悬浮液储存在-20℃。

[0235] 通过动态光散射确定纳米载体尺寸。通过HPLC分析测定纳米载体中雷帕霉素的量。通过重量法测定每mL悬浮液的总干纳米载体质量。

[0236]	有效直径 (nm)	雷帕霉素 含量 (% w/w)	纳米载体 浓度 (mg/mL)
	150	11.5	11.1

[0237] 评估合成纳米载体与游离雷帕霉素相比诱导针对模型抗原KLH的持久性免疫耐受性的能力。在第0、7和14天, 用PBS (组1)、单独或与KLH混合的50μg (~2mg/kg) 游离雷帕霉素 (分别为组2和组3), 或者单独 (组6) 或与KLH混合 (组7和8) 的包封在合成纳米载体中的50μg雷帕霉素向幼稚C57BL/6小鼠组 (每组n=10) 静脉内给药 (图8)。为了确定长期雷帕霉素施用的效果, 组4从第0天至第20天每周5次接受单独的游离雷帕霉素 (50μg/天) 或者每周一次与KLH组合施用 (组5)。随后在第21、28和35天用200μg KLH对所有组进行攻击。在第35和42天 (分别在2次和3次注射后) 收集血清, 并测定抗KLH抗体应答。如通过ELISA测定的, 将效力评估为抗KLH抗体滴度的EC50。图9示出了方案。

[0238] 在第35天和第42天, 分别为KLH的2和3次攻击注射后, 对照PBS处理的小鼠产生高

水平的抗KLH抗体。在不存在KLH的情况下,用游离雷帕霉素(每周或每日)处理的小鼠产生与PBS处理组相似水平的抗KLH抗体。仅用合成纳米载体或每日用游离雷帕霉素和KLH处理的小鼠与PBS对照组相比显示延迟的应答,但每次用KLH攻击时滴度均升高。这些结果表明,仅使用合成纳米载体处理不诱导长期免疫抑制,并且在KLH与每日的游离雷帕霉素共同施用的情况下,即使5倍的在合成纳米载体中施用之雷帕霉素的总每周剂量下,也不诱导持久的免疫耐受性。

[0239] 相比之下,即使在接受每周三次的处理后KLH攻击(总计6KLH注射)后,用含有显著量雷帕霉素的合成纳米载体+KLH(组7和8)处理的小鼠也几乎没有或没有可检测的抗KLH抗体,表明持久性免疫耐受。两批次的合成纳米载体效果类似。除了用合成纳米载体+KLH处理的那些组外,所有组在第42天出现了过敏反应。这些结果表明,通过用包含显著量雷帕霉素的合成纳米载体和KLH处理所诱导的针对KLH的耐受阻止了超敏反应的发生。

[0240] 为了评估对KLH的耐受性的抗原特异性,在第49和56天在后肢用OVA+CpG s.c. (35 μ g+20 μ g) 攻击所有动物。图10显示所有动物产生了针对OVA的类似水平的滴度,表明抗原与合成纳米载体的伴随施用可以产生免疫耐受性,并且合成纳米载体处理不诱导长期免疫抑制。这些结果表明纳米载体包封的(而不是游离的)雷帕霉素(当大量存在时)在与靶抗原伴随施用诱导持久和抗原特异性的免疫耐受。

[0241] 实施例14-SPAN 40提高雷帕霉素的过滤能力

[0242] 材料和方法

[0243] 比浓对数黏度为0.41dL/g的PLA购自Evonik Industries AG (Rellinghauser Straße 1-11, Essen德国), 产品代码100DL 4A。约5,000Da的具有甲基醚封端PEG嵌段且整体比浓对数黏度为0.50DL/g的PLA-PEG-OMe嵌段共聚物购自Evonik Industries AG (Rellinghauser Straße 1-11, Essen德国), 产品代码100DL mPEG 5000 5CE。雷帕霉素购自Concord Biotech Limited (1482-1486 Trasad Road, Dholka 382225, Ahmedabad印度), 产品代码SIROLIMUS。 **EMPROVE®** 聚乙烯醇4-88, USP (85-89% 水解, 黏度为3.4-4.6mPa·s) 购自EMD Chemicals Inc. (480 South Democrat Road Gibbstown, NJ 08027), 产品代码1.41350。Dulbecco 磷酸盐缓冲盐水1X (DPBS) 购自Lonza (Muenchensteinerstrasse 38, CH-4002 Basel, 瑞士), 产品代码17-512Q。山梨聚糖单棕榈酸酯购自Croda International (300-A Columbus Circle, Edison, NJ 08837), 产品代码SPAN 40。

[0244] 如下制备溶液。溶液1:通过溶解150mg/mL PLA和50mg/mL PLA-PEG-OMe制备聚合物和雷帕霉素混合物。溶液2:在二氯甲烷中以100mg/mL制备雷帕霉素溶液。溶液6:通过将SPAN 40以50mg/mL溶解在二氯甲烷中制备山梨糖醇单棕榈酸酯溶液。溶液7:在100mM pH 8 磷酸盐缓冲液中以75mg/mL制备聚乙烯醇。

[0245] 通过将溶液1 (0.5mL) 加入到厚壁压力管中制备O/W乳液。对于批次1, 将其与溶液6 (0.1mL) 和二氯甲烷 (0.28mL) 合并。然后将第1批与这些以及溶液2 (0.12mL) 合并。以类似的方式, 将批次2与二氯甲烷 (0.38mL) 合并, 然后将第2批与溶液2 (0.12mL) 合并。因此, 对于每个单独的批次, 有机相的总体积为1mL。通过重复移液将合并的有机相溶液混合。接下来, 加入溶液7 (3.0mL), 将压力管涡旋混合10秒, 然后使用Branson数字超声仪250将浸入冰水浴中的压力管以30%振幅超声处理1分钟。然后将乳液加入到含有DPBS (30mL) 的50mL烧杯中。

然后将其在室温下搅拌2小时,以使二氯甲烷快速蒸发以形成纳米载体。通过将纳米载体悬浮液转移到离心管中并且在75,600×g和4℃下离心50分钟,除去上清液,并将沉淀重新悬浮在含有0.25%w/v PVA的DPBS中来洗涤一部分纳米载体。重复洗涤步骤,然后将沉淀重新悬浮在含有0.25%w/v PVA的DPBS中,以获得基于聚合物的标称浓度为10mg/mL的纳米载体悬浮液。然后使用0.22μm PES膜注射器过滤器(Millipore部件号SLGP033RB)过滤纳米载体悬浮液。然后将过滤的纳米载体悬浮液保存在-20℃。

[0246] 结果表明,在合成纳米载体中并入SPAN 40增加了雷帕霉素的过滤能力。

[0247]

批号	雷帕霉素	低HBL表面活性剂	计算的过滤器通过量(g NP/m ²)	尺寸(nm)	产率(%)	雷帕霉素负载(%)
1	雷帕霉素	SPAN 40	>117	163	60	10.41
2	雷帕霉素	None	21	189	58	11.38

[0248] 实施例15-显示组分的量对雷帕霉素负荷和合成纳米载体过滤能力的影响材料和方法

[0249] 约5,000Da的具有甲基醚封端PEG嵌段且整体比浓对数黏度为0.50DL/g的PLA-PEG-OMe嵌段共聚物购自Evonik Industries(Rellinghauser Straße 1-11 45128 Essen, 德国),产品代码100DL mPEG 5000 5CE。比浓对数黏度为0.41dL/g的PLA购自Evonik Industries(Rellinghauser Straße 1-11 45128 Essen德国),产品代码100DL 4A。雷帕霉素购自Concord Biotech Limited,1482-1486 Trasad Road,Dholka 382225,Ahmedabad印度。产品代码SIROLIMUS。山梨聚糖单棕榈酸酯购自Croda(315 Cherry Lane New Castle Delaware 19720),产品代码SPAN40。二氯甲烷购自Spectrum(14422 S San Pedro Gardena CA,90248-2027)。部件号M1266。**EMPROVE®**聚乙烯醇4-88,(PVA),USP(85-89%水解,黏度为3.4-4.6mPa·s)购自EMD Chemicals Inc.(480 South Democrat Road Gibbstown, NJ 08027),产品代码1.41350。Dulbecco磷酸盐缓冲盐水(DPBS),1X,0.0095M(P04),不含钙和镁,购自BioWhittaker(8316 West Route 24 Mapleton,IL 61547),部件号#12001,产品代码Lonza DPBS。使用具有1/8”锥形尖端钛探针的Branson数字超声仪250进行乳化。

[0250] 如下制备溶液:

[0251] 聚合物溶液:通过以PLA-PEG比PLA的1:3的比率,将PLA-PEG-OMe(100DL mPEG 5000 5CE)和PLA(100DL 4A)以指定的mg/mL溶解在二氯甲烷中来制备聚合物混合物。雷帕霉素溶液:将雷帕霉素以指示的mg/mL溶解在二氯甲烷中。SPAN 40溶液:将山梨聚糖单棕榈酸酯(SPAN 40)以指示的mg/mL溶解在二氯甲烷中。CH₂Cl₂溶液:使用0.2μm PTFE膜注射器过滤器(VWR部件号28145-491)无菌过滤二氯甲烷(CH₂Cl₂)。PVA溶液:通过将聚乙烯醇(**EMPROVE®**聚乙烯醇4-88)以指定的mg/mL溶解在100mM pH 8的磷酸盐缓冲液中来制备聚乙烯醇溶液。DPBS PVA溶液:通过将聚乙烯醇(**EMPROVE®**聚乙烯醇4-88)以2.5mg/mL溶解在Dulbecco磷酸盐缓冲盐水,1X,0.0095M(P04)(Lonza DPBS)中来制备聚乙烯醇和Dulbecco磷酸盐缓冲盐水,1X,0.0095M(P04)混合物。

[0252] 通过将聚合物溶液、雷帕霉素溶液、SPAN 40溶液和/或CH₂Cl₂溶液在厚壁玻璃压力管中合并(总体积1-2mL)来制备O/W乳液。通过重复移液将溶液混合。接下来,加入PVA溶

液(3至6mL)(作为具有1mL有机相和3mL PVA水溶液的单一乳液,或作为依次制备的两个单一乳液)。将制剂涡旋混合十秒钟,然后在压力管浸入在冰浴中的情况下以30%振幅超声处理1分钟。然后将乳液加入到含有Lonza DPBS (30mL) 的开口的50mL烧杯中。然后将其在室温下搅拌2小时,以使二氯甲烷蒸发并形成纳米载体。通过将纳米载体悬浮液转移到离心管中并在75,600×g和4℃下离心50分钟,除去上清液,并将沉淀重新悬浮在DPBS PVA溶液中来洗涤一部分纳米载体。重复洗涤步骤,然后将沉淀重新悬浮在DPBS PVA溶液中,以获得基于聚合物的标称浓度为10mg/mL的纳米载体悬浮液。使用0.22μm PES膜注射器过滤器(Millex 部件号SLGP033RS) 过滤纳米载体制剂。测量纳米载体溶液过滤器通过量的质量。然后将过滤的纳米载体溶液储存在-20℃。

[0253] 过滤能力以所测量的通过一个33mm PES膜0.22μm注射器过滤器(来自Millipore, 部件号SLGP033RB) 之纳米载体的g/m²滤膜表面积给出。

[0254] 结果表明,许多合成纳米载体中的多种组分的量可导致产生具有预期体内有效量之雷帕霉素的初始可无菌过滤的合成纳米载体。

[0255]

批次 #	聚合物 (mg/mL)	SPAN 40 (mg/mL)	雷帕霉素 (mg/mL)	PVA (mg/mL)	尺寸 (nm)	过滤能力 (g NP/m ²)	产率	重量% HLB/雷帕霉素	重量% HLB/聚合物
1 ^a	50	0	8	62.5	135	52	70.7	0.00	0.00
2 ^a	50	0.1	8	62.5	135	26	68.6	1.23	0.20
3 ^a	50	0.25	8	62.5	148	27	70.9	3.03	0.50
4 ^a	50	0.5	8	62.5	166	146	73.2	5.88	0.99
5 ^a	50	1	8	62.5	147	151	75.7	11.11	1.96
6 ^a	50	1.5	8	62.5	161	146	72.2	15.79	2.91
7 ^a	50	2.5	8	62.5	149	176	85.0	23.81	4.76
8 ^a	50	2.5	8	50	182	209	103.5	23.81	4.76
9 ^a	50	2.5	8	75	132	155	76.7	23.81	4.76
10 ^a	50	3	8	62.5	143	140	69.4	27.27	5.66
11 ^a	62.5	3	8	62.5	151	205	80.9	27.27	4.58
12 ^a	37.5	3	8	62.5	139	203	60.9	27.27	7.41
13 ^a	50	4.5	8	62.5	149	149	73.6	36.00	8.26
14 ^a	50	5	6.66	50	148	193	94.4	42.88	9.09
15 ^a	50	5	8.33	50	176	176	86.2	37.48	9.09
16 ^a	50	10	8	50	173	38	66.1	55.56	16.67
17	100	10	11.32	75	153	178	88.2	46.90	9.09
18	100	10	14.16	75	160	200	98.9	41.39	9.09
19	100	10	17	75	177	182	101.0	37.04	9.09
20	100	7.5	24	75	188	125	70.4	23.81	6.98
21	75	11.25	30	75	197	17	82.5	27.27	13.04
22	100	15	32	75	201	17	108.1	31.91	13.04
23	100	15	40	75	217	9	82.6	27.27	13.04
24	100	15	40	75	193	14	116.5	27.27	13.04

[0256] ^a这些制剂以2mL有机相、6mL PVA溶液制备。

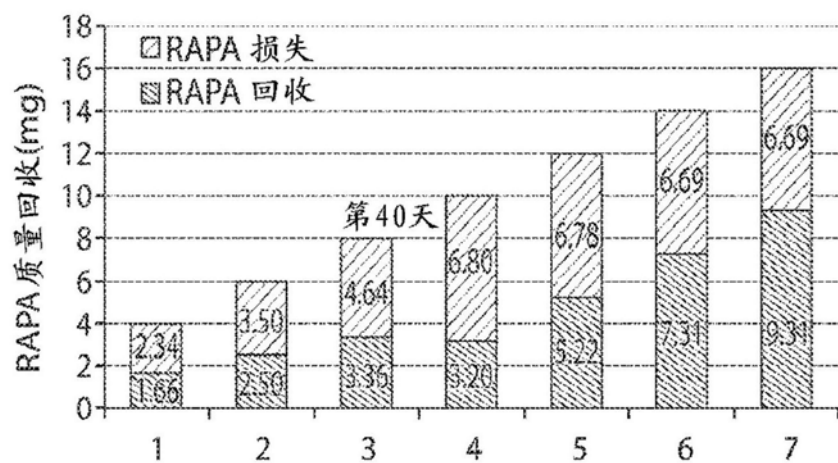


图1

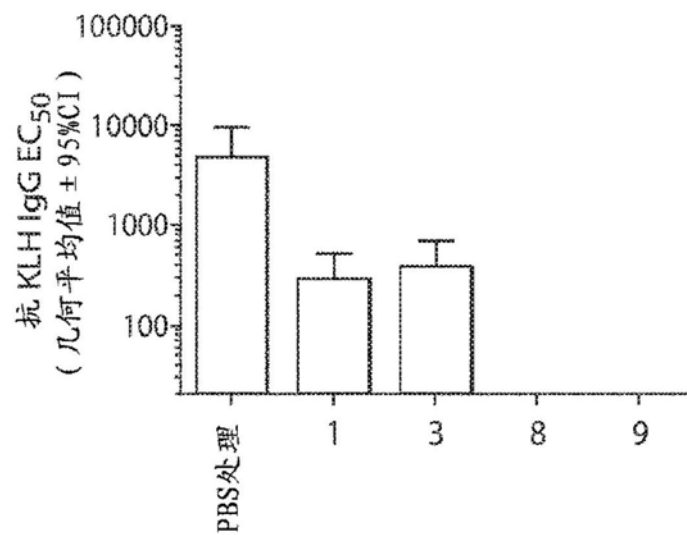


图2

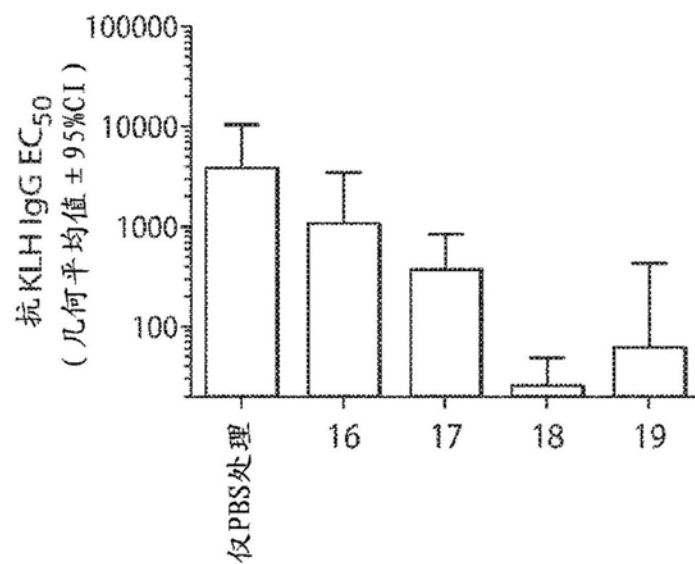


图3

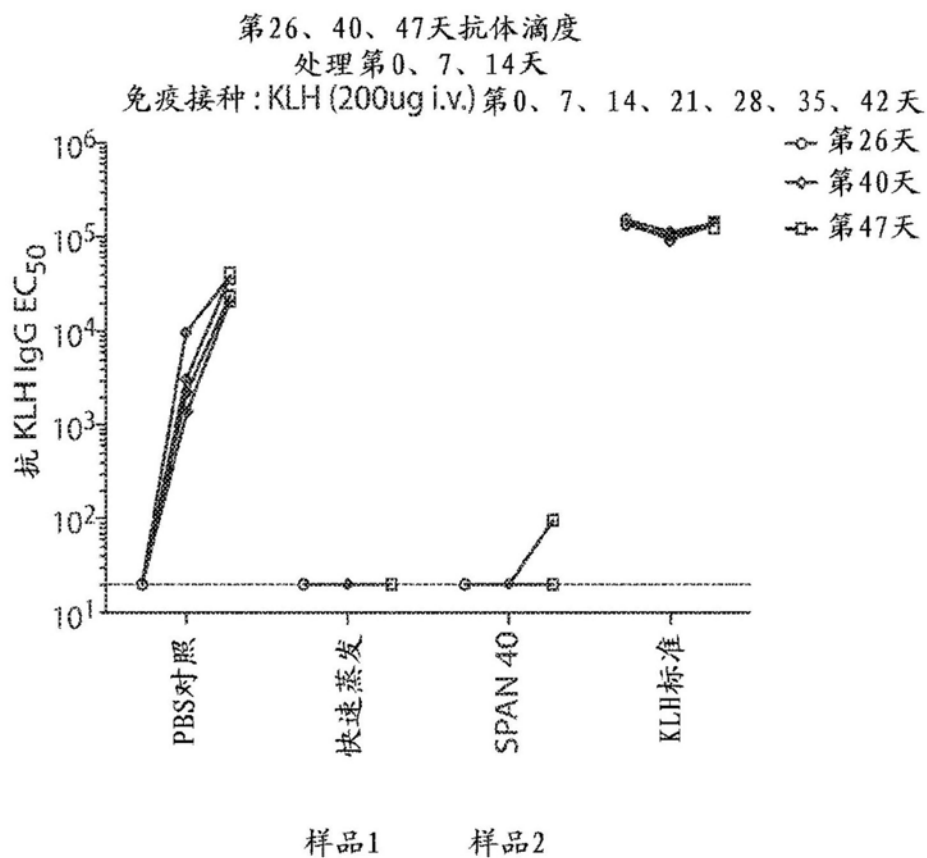


图4

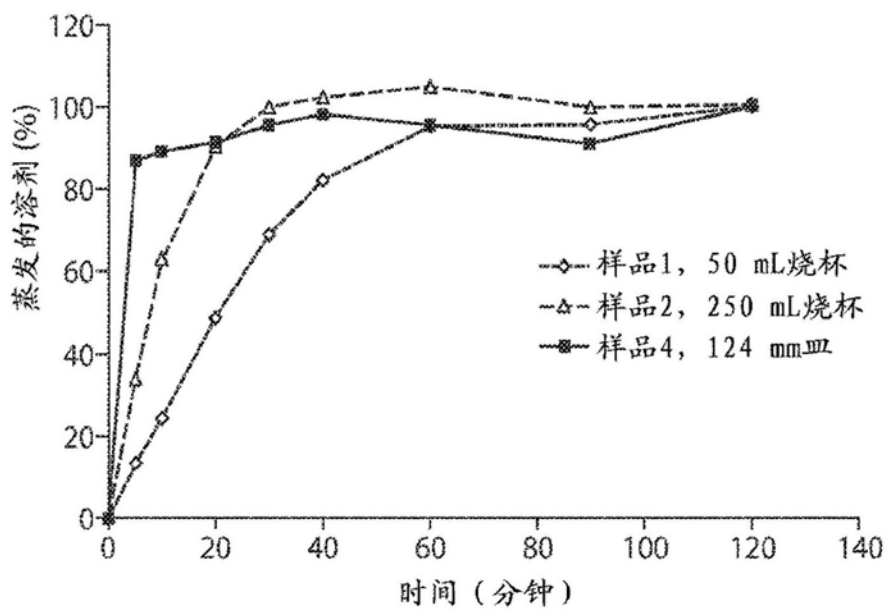


图5

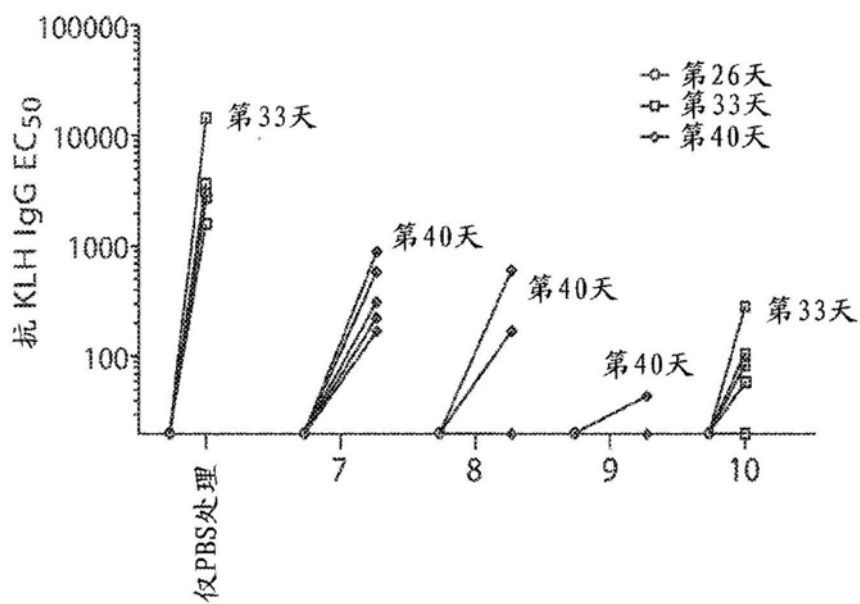


图6

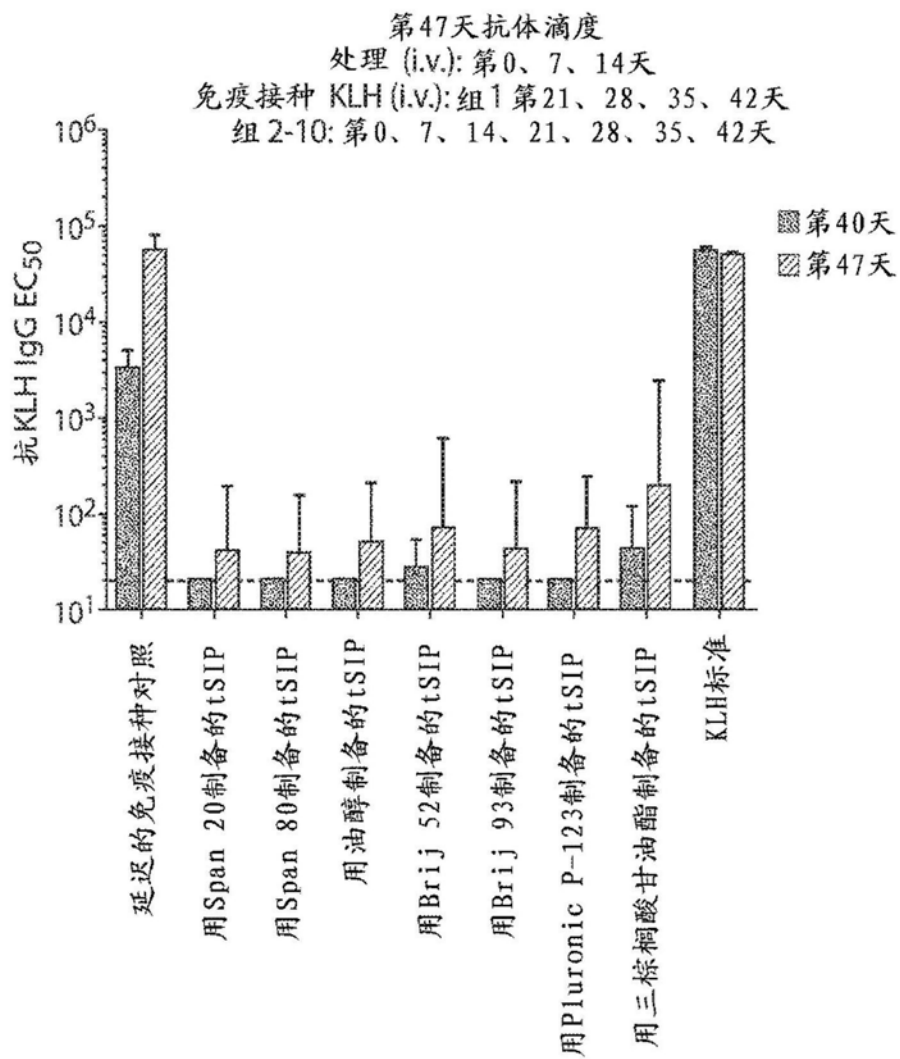


图7

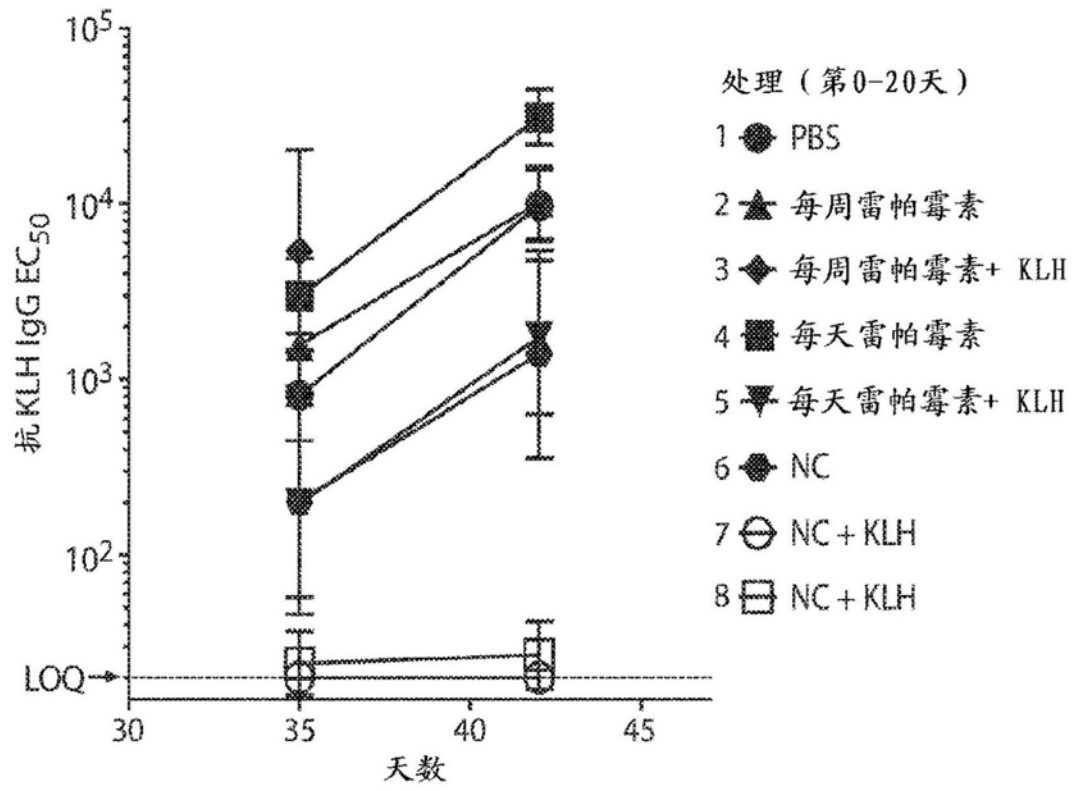


图8

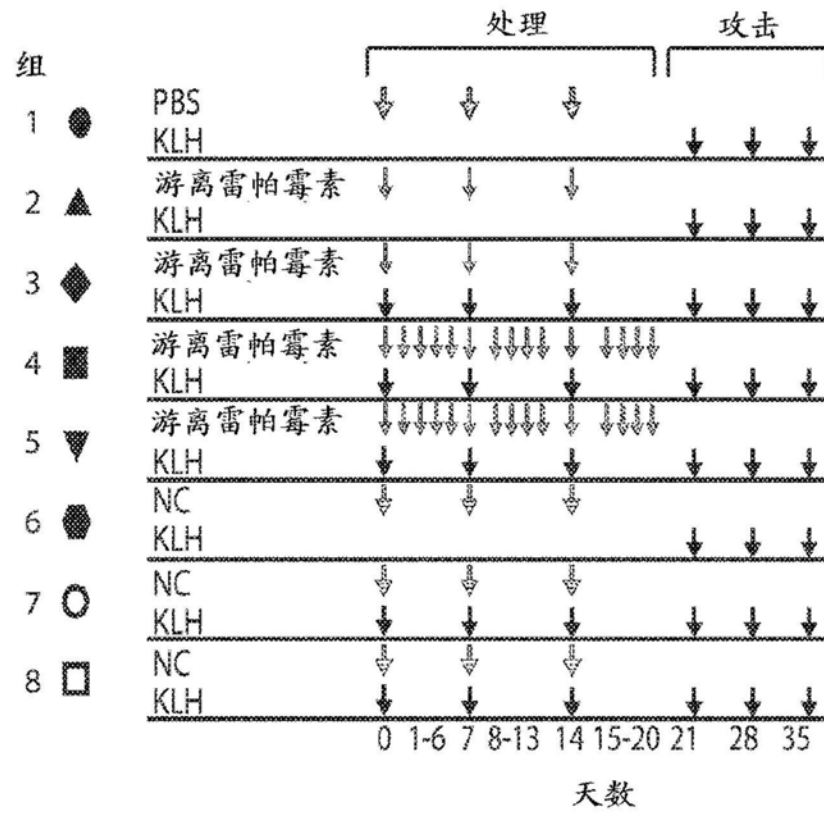


图9

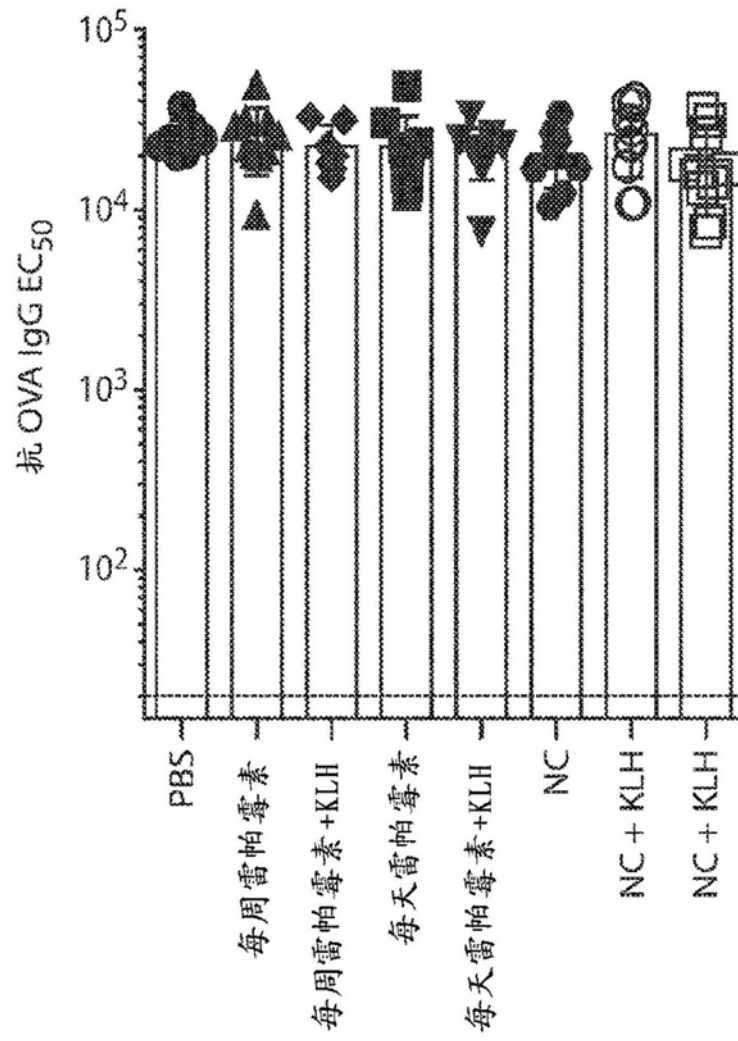


图10