



(12) 发明专利



(10) 授权公告号 CN 112004524 B

(45) 授权公告日 2024. 09. 10

(21) 申请号 201980027345.7	(51) Int.Cl.
(22) 申请日 2019.02.26	A61K 9/00 (2006.01)
(65) 同一申请的已公布的文献号	A61K 38/13 (2006.01)
申请公布号 CN 112004524 A	A61K 9/06 (2006.01)
(43) 申请公布日 2020.11.27	A61K 47/34 (2017.01)
(30) 优先权数据	A61K 9/10 (2006.01)
62/635,088 2018.02.26 US	A61K 9/107 (2006.01)
(85) PCT国际申请进入国家阶段日	A61K 9/51 (2006.01)
2020.10.21	A61K 31/436 (2006.01)
(86) PCT国际申请的申请数据	A61K 31/573 (2006.01)
PCT/IL2019/050217 2019.02.26	A61P 27/00 (2006.01)
(87) PCT国际申请的公布数据	A61P 37/00 (2006.01)
W02019/162951 EN 2019.08.29	A61P 17/00 (2006.01)
(73) 专利权人 耶路撒冷希伯来大学伊森姆研究	(56) 对比文件
发展有限公司	CN 101014317 A,2007.08.08
地址 以色列耶路撒冷	US 2017065533 A1,2017.03.09
(72) 发明人 S·贝妮塔 T·纳萨尔	Sanyog Jain et al..Cyclosporin A
莱斯利·雷比伯 阿米特·巴迪希	loadied PLGA nanoparticle:preparation,
(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理	optimization, in0vitro characterization
有限公司 11262	and stability studies.《Current
专利代理师 高瑜 郑霞	Nanoscience》.2010,第6卷(第4期),422-431.
	审查员 张若曦
	权利要求书1页 说明书43页 附图10页

(54) 发明名称

药物递送系统

(57) 摘要

本发明涉及一种用于制造储存稳定且有效的药物递送系统的新颖平台。

1. 一种储存稳定且有效的等渗眼制剂,所述等渗眼制剂包含在液体载体中的粉末,所述粉末包含多个为纳米载体的PLGA纳米胶囊,所述PLGA纳米胶囊包含在至少一种油、甘油、至少一种表面活性剂和至少一种冷冻保护剂中的他克莫司,

其中所述至少一种油是蓖麻油,

其中所述PLGA具有50KDa至100KDa的平均分子量,且其中所述PLGA纳米胶囊具有在0.04%w/v-0.1%w/v的范围内的他克莫司含量。

2. 根据权利要求1所述的等渗眼制剂,其中所述液体载体是水基载体。

3. 根据权利要求1所述的等渗眼制剂,其中所述等渗眼制剂被配置用于注射或被配置为滴眼剂。

4. 根据权利要求1所述的等渗眼制剂,所述等渗眼制剂为用于治疗至少一种眼科疾病或紊乱的方法中的药物组合物。

5. 根据权利要求1所述的等渗眼制剂,所述等渗眼制剂呈滴眼剂的形式。

6. 根据权利要求1所述的等渗眼制剂,所述等渗眼制剂用于立即使用或在7天和28天之间的时间内使用。

7. 根据权利要求1所述的等渗眼制剂,所述等渗眼制剂呈水分散体的形式,用于在7天和28天之间的时间内使用。

8. 根据权利要求7所述的等渗眼制剂,保留在92%-100%的范围内的他克莫司的初始含量。

9. 根据权利要求1所述的等渗眼制剂,其中所述纳米载体为纳米球。

10. 根据权利要求1所述的等渗眼制剂,其中所述PLGA纳米胶囊具有在100nm和200nm之间的粒径。

11. 根据权利要求1-10中任一项所述的等渗眼制剂,还包含至少一种防腐剂。

12. 根据权利要求1所述的等渗眼制剂,其中所述至少一种冷冻保护剂为 β 环糊精。

13. 根据权利要求1所述的等渗眼制剂,其中所述至少一种表面活性剂选自吐温80、Lipoid E80、Solutol和PVA。

14. 根据权利要求1所述的等渗眼制剂,其中所述粉末呈由包含所述PLGA纳米胶囊的分散体通过冻干制备的干燥薄片的形式。

15. 一种试剂盒,所述试剂盒包含根据权利要求1-14中任一项所述的制剂和至少一种液体载体,及使用说明书。

16. 根据权利要求15所述的试剂盒,其中所述液体载体是水或水性溶液或无水即不含水的液体载体。

药物递送系统

技术领域

[0001] 本发明总体上提供了独特的递送系统、重构溶液及其用途。

[0002] 背景

[0003] 特应性皮炎 (AD) 的控制是一项治疗挑战,该治疗挑战包括最佳的皮肤护理、局部疗法和系统性治疗。局部皮质类固醇 (TCS) 由于其抗炎作用、免疫抑制作用和抗增生作用,是用于AD治疗的一线治疗剂。然而,它们具有许多与长期疗法相关的局部副作用和系统性副作用。与TCS相比,他克莫司 (Tacrolimus) 和吡美莫司 (pimecrolimus) 显示出更高的选择性、更高的效率和更好的短期安全性概况。然而,由于缺乏长期的安全性数据、广泛的未被临床试验认可的使用和皮肤癌和淋巴瘤的潜在风险,FDA的儿科顾问建议对这些剂进行“黑盒 (black box)”警告,限制其使用。

[0004] 环孢菌素A (CsA) 呈现出与他克莫司和吡美莫司类似的免疫调节性质。CsA在口服施用时在多种皮肤病的治疗方面显示出显著的效力。实际上,CsA疗法是严重AD的一线短期系统性疗法。事实上,CsA的长期系统性施用与严重的副作用相关,所述严重的副作用包括肾功能障碍、慢性肾毒性和高血压。

[0005] 不幸的是,由于CsA的大分子量和差的水溶性,CsA在局部应用后向皮肤层中的渗透受到限制。此外,由多种纳米载体介导的CsA向完整皮肤中的递送的前景几乎没有成功。

[0006] 参考文献

[0007] [1] Fessi H, Puisieux F, Devissaguet JP, Ammoury N, Benita S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. Int J Phar 1989;55:R1-R4。

[0008] [2] WO 2012/101638

[0009] [3] WO 2012/101639

[0010] 一般描述

[0011] 本文公开的技术的发明人已经开发了一种用于制造储存稳定且有效的药物递送系统的新颖平台,该药物递送系统可以被定制用于多种应用、定制成多种制剂,并且可以被定制成满足与药物递送相关的一个或更多个要求。

[0012] 该技术基于增强药物向皮肤中的渗透的纳米载体系统,所述纳米载体系统呈聚乳酸-乙醇酸共聚物 (PLGA) - 纳米球 (NS) 和纳米胶囊 (NC) 的形式。载体系统以冻干纳米颗粒 (NP) 提供,该冻干纳米颗粒可以被掺入无水局部制剂 (anhydrous topical formulation) 中,并且在多种皮肤层中提供改善的药物皮肤吸收和足够的皮肤-生物分布 (DBD) 概况,如离体例示的。

[0013] 根据确立已久的溶剂置换法 [1] 制备了多种含有活性物质诸如CsA的PLGA纳米载体,并且全部细节在下文的实验部分中呈现。

[0014] 因此,最一般而言,本发明提供了配制用于在液体载体中重构的冻干固体粉末制剂,该液体载体可以是用于本文公开的一些应用的水基载体 (特别是用于立即使用的那

些),或者可以是用于其他应用的无水载体(不含水的),诸如基于有机硅(silicone)的载体,特别是需要延长的储存期的那些。固体粉末可以可选择地按原样、以非液体形式或以配制形式使用。

[0015] 在第一方面中,本发明提供了包含多个PLGA纳米颗粒的粉末,每个纳米颗粒包含至少一种非亲水性材料(药物或活性物质),该粉末呈干燥薄片(dry flakes)的形式,通常可通过冻干获得。

[0016] 在一些实施方案中,干燥粉末还包含至少一种冷冻保护剂,该冷冻保护剂可以任选地选自环糊精、PVA、蔗糖、海藻糖、甘油、右旋糖、聚乙烯吡咯烷酮、甘露醇、木糖醇和其他冷冻保护剂。

[0017] 在一些实施方案中,冻干在至少一种冷冻保护剂的存在下进行,所述冷冻保护剂可以如上文选择。

[0018] 在另外的方面中,本发明提供了包含多个PLGA纳米颗粒的易重构粉末(ready-for-reconstitution powder),每个纳米颗粒包含至少一种非亲水性材料(药物或活性物质)。粉末可以是如所定义的干燥固体,然而,在一些条件下,并且取决于油或蜡状材料的含量,产品可以具有软膏(ointment)的稠度。

[0019] 本发明还提供了至少一种非亲水性药物的固体剂型,该剂型是包含多个PLGA纳米颗粒的干燥粉末,每个纳米颗粒包含至少一种非亲水性材料(药物或活性物质)。

[0020] 在一些实施方案中,根据本发明的干燥粉末或重构制剂包含不直接或间接导致在所述干燥粉末或重构制剂制造之后立即或制造起7天内的时段从包含至少一种非亲水性材料的纳米颗粒大量地(不超过纳米颗粒总量的15%-20%或10%-15%)浸出至少一种非亲水性材料的成分或载体或赋形剂。

[0021] 被包含在本发明的PLGA纳米颗粒中的“至少一种非亲水性材料”是水不溶性的药物或治疗活性剂,或性质上为疏水性或两亲性的药物或治疗活性剂。在一些实施方案中,所述至少一种非亲水性材料的特征在于大于1的LogP值,LogP值是化合物总亲脂性以及活性成分已经溶解的含水液相和有机液相之间的分配的估计值。

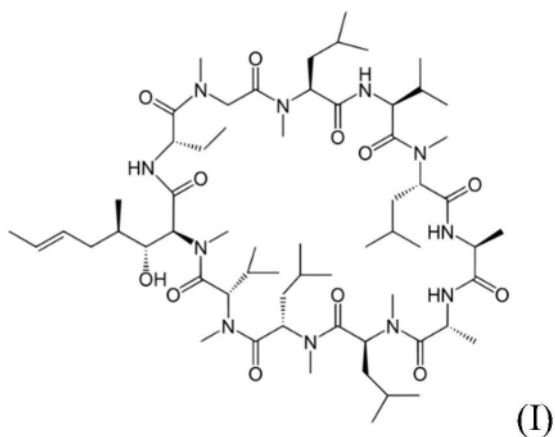
[0022] 在一些实施方案中,所述至少一种非亲水性材料选自环孢菌素A(Cys A)、他克莫司、吡美莫司、地塞米松棕榈酸酯(dexamethasone palmitate)、大麻属亲脂性提取的衍生物诸如四氢大麻酚(THC)和大麻二酚(CBD)(植物大麻素),或合成大麻素、扎鲁司特(zafirlukast)、非那雄胺(finasteride)、乙酸棕榈酸奥沙利铂(oxaliplatin palmitate acetate)(OPA)及其他。

[0023] 在一些实施方案中,非亲水性材料选自环孢菌素A(Cys A)、他克莫司和吡美莫司。在一些实施方案中,非亲水性材料是环孢菌素A(Cys A)或他克莫司或吡美莫司或CBD或THC或非那雄胺或乙酸棕榈酸奥沙利铂(OPA)。

[0024] 在一些实施方案中,非亲水性材料不是环孢菌素。

[0025] 在式(I)中示出的环孢菌素是一种免疫抑制剂大分子,其干扰T细胞的活性和生长,从而降低免疫系统的活性。如可以理解的,由于环孢菌素的相对大的尺寸,环孢菌素的局部递送在常规已知的递送系统中已经被证明是困难的。在本发明的上下文中,提及环孢菌素还包括环孢菌素家族(即环孢菌素A、环孢菌素B、环孢菌素C、环孢菌素D、环孢菌素E、环孢菌素F或环孢菌素G)的任何大环内酯,以及其任何药用盐、衍生物或类似物。

[0026]

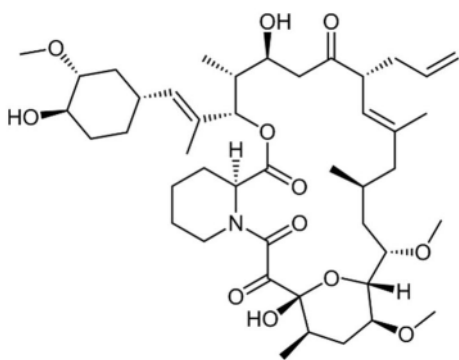


[0027] 根据一些实施方案,环孢菌素是环孢菌素A(CysA)。

[0028] 他克莫司和吡美莫司两者都因为它们在特应性皮炎的治疗中的局部抗炎性质而用于皮肤病学。这些非甾体药物下调免疫系统。他克莫司被制成0.03%和0.1%的软膏,而吡美莫司被分散成1%的乳膏(cream);两者都每天两次例行地在受影响区域施加,直到注意到临床改善。

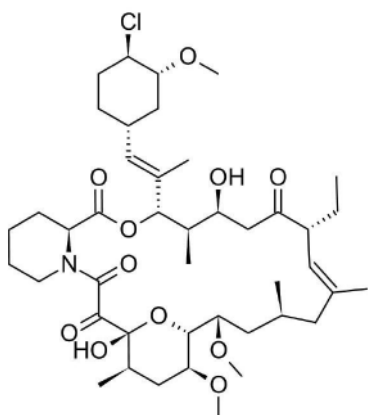
[0029] 在一些实施方案中,所述至少一种非亲水性剂是他克莫司。

[0030]



[0031] 在一些实施方案中,所述至少一种非亲水性剂是吡美莫司。

[0032]



[0033] 在一些实施方案中,纳米颗粒包含在约0.1wt%和10wt%之间的至少一种非亲水性材料,例如环孢菌素。

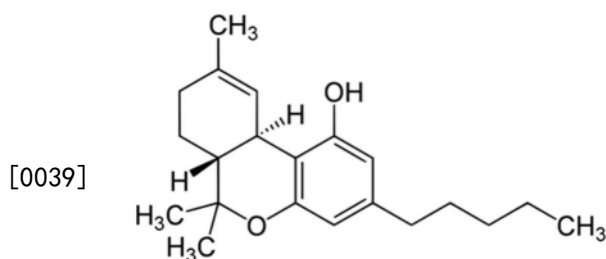
[0034] 根据本发明使用的大麻属亲脂性提取的衍生物是通过本领域已知的手段从大麻属植物获得的活性物质、组合物或其组合。提取的衍生物适用于纯化的以及粗制的干燥植物材料和提取物。存在用于产生浓缩大麻属衍生材料的多种方法,例如过滤、浸渍、浸提、渗滤、在多种溶剂中煎煮、索氏提取、微波和超声辅助提取以及其他方法。

[0035] 大麻属亲脂性植物提取物是从大麻属植物中获得的,最常见地从大麻 (*Cannabis Sativa*)、印度大麻 (*Cannabis Indica*) 或蒺藜大麻 (*Cannabis Ruderalis*) 的种获得的植物来源的材料或组合物的混合物。应理解,提取物的材料组成和其他性质可以变化,并且可以进一步定制以满足根据本发明的组合疗法的期望性质。

[0036] 由于大麻属植物提取物是通过例如直接从大麻属植物提取获得的,因此它可以包含若干种天然存在的化合物的组合,其中包括亲脂性衍生物,即两种主要的大麻素四氢大麻酚 (THC)、大麻二酚 (CBD),以及另外的大麻素,诸如 CBG (大麻萜酚 (cannabigerol))、CBC (大麻色原烯 (cannabichromene))、CBL (大麻环醇 (cannabicyclol))、CBV (次大麻酚 (cannabivarin))、THCV (四氢次大麻酚 (tetrahydrocannabivarin))、CBDV (次大麻二酚 (cannabidivarin))、CBCV (次大麻色酚 (cannabichromevarin))、CBGV (次大麻萜酚 (cannabigerovarin))、CBGM (大麻萜酚一甲基醚) 及其他中的一种或组合。

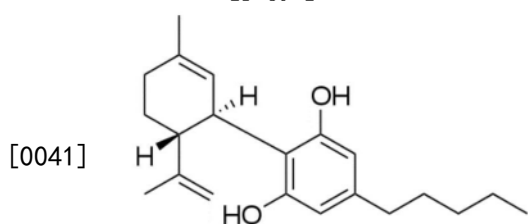
[0037] 虽然 THC 和 CBD 是主要的亲脂性衍生物,但提取级分的其他组分也在这样的亲脂性衍生物的范围。

[0038] 四氢大麻酚 (THC) 在本文中指一类精神活性大麻素,其特征在于对 CB1 受体和 CB2 受体的高亲和力。分子式为 $C_{21}H_{30}O_2$ 的 THC 具有约 314.46Da 的平均质量以及下文示出的结构。



THC

[0040] 大麻二酚 (CBD) 在本文中指一类对 CB1 受体和 CB2 受体具有低亲和力的非精神活性大麻素。具有式 $C_{21}H_{30}O_2$ 的 CBD 具有约 314.46Da 的平均质量以及下文示出的结构。



CBD

[0042] 本文的术语“THC”和“CBD”还包括这些分子的异构体、衍生物或前体,诸如(-)-反式- Δ^9 -四氢大麻酚 (Δ^9 -THC)、 Δ^8 -THC 和 Δ^9 -CBD,以及由它们相应的2-羧酸 (2-COOH) 衍生的 THC 和 CBD: THC-A 和 CBD-A。

[0043] “PLGA 纳米颗粒”是由聚乳酸 (PLA) 和聚乙醇酸 (PGA) 的共聚物制成的纳米颗粒,在一些实施方案中,共聚物选自嵌段共聚物、无规共聚物和接枝共聚物。在一些实施方案中,PLGA 共聚物是无规共聚物。在一些实施方案中,PLA 单体过量存在于 PLGA 中。在一些实施方案中,PLA 与 PGA 的摩尔比选自 95:5、90:10、85:15、80:20、75:25、70:30、65:35、60:40、55:45

和50:50。在其他实施方案中,PLA与PGA的摩尔比是50:50(1:1)。

[0044] PLGA可以具有任何分子量。在一些实施方案中,PLGA具有至少20KDa的平均分子量。在一些实施方案中,聚合物具有至少约50KDa的平均分子量。在一些其他实施方案中,聚合物具有在约20KDa和1,000KDa之间、在约20KDa和750KDa之间,或在约20KDa和500KDa之间的平均分子量。

[0045] 在一些实施方案中,聚合物具有不同于20KDa的平均分子量。

[0046] 在一些实施方案中,PLGA任选地具有至少约50KDa的平均分子量或被选择为不同于在2KDa和20KDa之间的平均分子量的平均分子量。

[0047] 取决于来自纳米颗粒的至少一种非亲水性材料的期望的释放速率和/或模式以及施用途,所述至少一种非亲水性材料可以被包含(包封)在纳米颗粒中,包埋在构成纳米颗粒的聚合物基质中和/或与纳米颗粒的表面(整个表面或其一部分)化学或物理地结合。对于一些应用,纳米颗粒可以呈核/壳(下文中也称为纳米胶囊或NC)的形式,具有聚合物壳和油性核,所述至少一种非亲水性活性物质溶解在油性核内。可选择地,纳米颗粒具有大体上均匀的组成,不以明显的核/壳结构为特征,非亲水性材料被包埋在其中;在这样的纳米颗粒(在本文中将被称为纳米球(NS))中,材料可以被包埋在聚合物基质中,例如,均匀地包埋在聚合物基质中,产生其中纳米颗粒内的材料的浓度在整个纳米颗粒的体积或质量上大体上均匀的纳米颗粒。在纳米球中,可能不需要油组分。

[0048] 在一些实施方案中,纳米颗粒呈纳米球或纳米胶囊的形式。在一些实施方案中,纳米颗粒呈纳米球的形式,该纳米球包含由PLGA聚合物制成的基质,并且非亲水性材料被包埋在该基质中。

[0049] 在一些实施方案中,纳米颗粒呈纳米胶囊的形式,该纳米胶囊包括由PLGA聚合物制成的壳,该壳包封溶解非亲水性材料的油(或油的组合或油性制剂)。油可以由任何油性有机溶剂或介质(单一材料或混合物)构成。在这样的实施方案中,油可以包含油酸、蓖麻油、辛酸、三丁酸甘油酯和中链或长链甘油三酯中的至少一种。

[0050] 在一些实施方案中,油制剂包含蓖麻油。在其他实施方案中,油制剂包含油酸。

[0051] 油可以呈油制剂的形式,该油制剂还可以包含多种添加剂,例如至少一种表面活性剂。表面活性剂可以选自油酰聚乙二醇-6甘油酯(Labrafil M1944CS)、聚山梨酯80(Tween®80)、聚乙二醇15羟基硬脂酸酯(Solutol HS15)、2-羟丙基-β-环糊精(Kleptose®HP)、磷脂(例如lipoid 80、phospholipon等)、泰洛沙泊(tyloxapol)、泊洛沙姆(poloxamer)及其任何混合物。

[0052] 在一些实施方案中,并且如本文上文所解释的,至少一种冷冻保护剂可以用于在冻干期间保护纳米颗粒的完整性。冷冻保护剂的非限制性实例包括PVA和环糊精诸如2-羟丙基-β-环糊精(Kleptose®HP)以及如本文所述的其他物质。

[0053] 如本文所述,作为药物或活性剂的非亲水性材料可以与所述纳米颗粒的表面结合,例如通过直接结合(化学的或物理的)、通过吸附到表面上,或经由接头部分,而不管所使用的纳米颗粒的类型如何(针对NS和NC两者)。可选择地,当纳米颗粒是纳米球时,活性剂可以被包埋在纳米颗粒中。当纳米颗粒呈纳米胶囊的形式时,活性剂可以被包含在纳米颗粒的核中。

[0054] 在一些实施方案中,在非亲水性材料溶解在被包含在纳米颗粒中(例如被包含在纳米胶囊的核中)的油中的情况下,非亲水性材料可以溶解在核中,包埋在聚合物壳中,或者与纳米胶囊的表面结合。当纳米颗粒是纳米球时,非亲水性材料可以被包埋在聚合物中。

[0055] 在一些实施方案中,纳米颗粒可以与至少两种不同的非亲水性材料结合,每种非亲水性材料以相同的方式或不同的方式与纳米颗粒结合。当有多种活性剂,例如至少两种非亲水性材料时,这些剂可以都是非亲水性材料,或者它们中的至少一种可以是非亲水性材料。非亲水性材料的组合允许靶向多个生物靶或增加对特定靶的亲合力。

[0056] 将与至少一种非亲水性材料一起呈现的另外的活性剂可以选自维生素、蛋白质、抗氧化剂、肽、多肽、脂质、碳水化合物、激素、抗体、单克隆抗体、治疗剂、抗生物剂、疫苗、预防剂、诊断剂、对比剂、核酸、营养剂、分子量小于约1,000Da或小于约500Da的小分子、电解质、药物、免疫剂、大分子、生物大分子、镇痛剂或抗炎剂;驱虫剂;抗心律失常剂;抗细菌剂;抗凝血剂;抗抑郁剂;抗糖尿病药;抗癫痫药;抗真菌剂;抗痛风剂;抗高血压剂;抗疟疾剂;抗偏头痛剂;抗毒蕈碱剂;抗神经可塑性剂或免疫抑制剂;抗原生动物剂;抗甲状腺剂;抗焦虑剂、镇静剂、催眠剂或精神安定剂; β 受体阻滞剂;心肌收缩剂;皮质类固醇;利尿剂;抗帕金森病剂;胃肠剂(gastro-intestinal agent);组胺H1受体拮抗剂;脂质调节剂;硝酸酯或抗心绞痛剂;营养剂;HIV蛋白酶抑制剂;阿片镇痛剂;辣椒素;性激素;细胞毒素剂;和兴奋剂,以及前文提及的物质的任何组合。

[0057] 此外,纳米颗粒可以与至少一种非活性剂结合。虽然,最一般而言,非活性剂不具有直接的治疗作用,但其可以改变纳米颗粒的一种或更多种性质。在一些实施方案中,非活性剂可以被选择以调节纳米颗粒的至少一种特性,诸如尺寸、极性、疏水性/亲水性、电荷、反应性、化学稳定性、清除和靶向性及其他中的一种或更多种。非活性剂尤其可以改善纳米颗粒的渗透性,改善纳米颗粒在液体悬浮液中的分散性,在冻干和/或重构期间稳定纳米颗粒等等。在一些实施方案中,所述至少一种非活性剂能够诱导、增强、抑制或减少至少一种非治疗性和/或非系统性作用。

[0058] 如本文所陈述的,本发明提供了包含多个PLGA纳米颗粒和非亲水性材料的冻干薄片状可分散干燥粉末。粉末是固体材料,可以呈无水的颗粒形式。如本文所使用的术语“干燥”指的是以下选择中的任何一种:将水干燥(dry of water)、不含水、缺乏水、大体上干燥(包含不超过1%-5%的水)、仅包含水合水、不是水或水性溶液。在一些实施方案中,水的量不超过7wt%。粉末可以是无水的,即相对于粉末的总重量,具有按重量计小于3%、或按重量计小于2%、或按重量计小于1%的水含量,和/或是不包含任何添加的水的组合物,即粉末中可能存在的水更特别地是结合水,诸如盐的结晶的水,或粉末生产中使用的原料所吸附的微量水。

[0059] 如本领域已知的,冻干指的是通过将制剂冷冻,然后降低周围压力,以允许冷冻的制剂直接从固相向气相挥发、蒸发或升华,留下所定义的干燥粉末,从而将制剂冷冻干燥。因此,本发明的干燥的冻干粉末是以干燥形式获得的粉末。在一些实施方案中,粉末可以通过其他方法而不是通过冻干在相同的干燥度获得,例如通过纳米喷雾(例如,利用Buchi, Flawill, Switzerland的纳米喷雾干燥器B-90)。因此,本发明还提供了不是通过冻干获得的干燥粉末。

[0060] 本发明的干燥粉末被提供为易重构的,呈可以通过将粉末添加到药学上可接受的

重构液体介质或载体中来再分散的形式。本发明的粉末的独特之处在于其通过将活性成分与纳米颗粒载体分离而得到的对分解的稳定性,并且还在于定制多种稳定且可以以多种方式施用和使用的重构液体制剂的能力。重构介质的实例包括水、注射用水、注射用抑菌水、氯化钠溶液(例如,0.9% (w/v) NaCl)、葡萄糖溶液(例如,5% 葡萄糖)、液体表面活性剂、pH 缓冲溶液(例如,磷酸盐缓冲溶液)、基于有机硅的溶液及其他。

[0061] 根据一些实施方案,重构介质是无水的基于有机硅的载体,其不含水或将水干燥,如本文所描述,并且因此长时间保持纳米颗粒完整。基于有机硅的载体不允许释放纳米颗粒的货物,直到纳米颗粒与水接触时,此时纳米颗粒的货物开始排放。这种排放可以在将硅基制剂施加到皮肤上并且纳米颗粒渗透到皮肤层中之后发生。

[0062] 基于有机硅的载体是液体、粘性液体或半固体载体,通常是包含硅构建单元的聚合物、低聚物或单体。在一些实施方案中,基于有机硅的载体是至少一种有机硅聚合物或是有机硅聚合物、低聚物和/或单体的至少一种制剂。在一些实施方案中,基于有机硅的载体包括环戊硅氧烷、环己硅氧烷(诸如ST-Cyclomethicone 56-USP-NF)、聚二甲基硅氧烷(诸如Q7-9120Silicone 350cst(聚二甲基硅氧烷)-USP-NF Elastomer 10)及其他。

[0063] 在一些实施方案中,基于有机硅的载体包括环戊硅氧烷和二甲聚硅氧烷交联聚合物。在一些实施方案中,基于有机硅的载体包括环戊硅氧烷和环己硅氧烷。

[0064] 在一些实施方案中,可以将易重构固体混合在半固体有机硅弹性体共混物中,该共混物包含以分别为80:15:3(w/w)的重量比的环己硅氧烷、环戊硅氧烷和聚二甲基硅氧烷聚合物。在一些实施方案中,将2%的包含至少一种非亲水性材料的冻干纳米颗粒分散在包含以分别为80:15:3(w/w)的重量比的环己硅氧烷、环戊硅氧烷和聚二甲基硅氧烷聚合物的制剂中,得到0.1%w/w的活性物质最终浓度。

[0065] 在一些实施方案中,这样的制剂还包含至少一种防腐剂,诸如苯甲酸和/或苯扎氯铵(benzalkonium chloride)。

[0066] 在一些实施方案中,重构介质是水基的。

[0067] 对于意在立即使用或在短时间(例如,在7天和28天之间)内使用的制剂,取决于如所推荐的活性成分,例如,对于对水敏感的活性成分诸如他克莫司和抗生素,制剂可以在水性或水基介质中形成,该介质包含本发明的粉末和至少一种如所定义的水基载体。例如,这样的制剂可以是眼制剂,例如滴眼剂或注射用制剂。在制剂意在长期使用或作为即用型制剂储存时,那么粉末可以在无水硅基液体载体中重构。

[0068] 本发明制剂的稳定性尤其取决于制剂的组成、所使用的特定活性成分、粉末重构的介质和储存条件。不希望被理论所束缚,一般来说,制剂的稳定性可以从两个不同的方向来观察和测试:

[0069] 1/冻干薄片状粉末中含有的活性成分随时间的稳定性,如本文下文提供的数据所指示的,例如对于油性核内的环孢菌素提供的数据所指示的。如所展示的,这样的制剂在蓖麻油核NC中是稳定的,但在油酸核NC中是不稳定的(表5和表8)。在37°C经6个月的随时间的稳定性测试指示,在油为油酸时有渗漏并且活性成分含量偏离初始值,而在蓖麻油中,活性成分在化学上是稳定的,并且展示渗漏没有增加。这意味着这些冻干粉末通常可以在室温储存持续至少约3年。

[0070] 2/分散在局部制剂中的NC的稳定性。在测试条件下,在三种不同温度经6个月,仅

当蓖麻油存在于NC中时,活性成分(例如CsA)保持稳定,并且不向局部制剂的外部相渗漏超过10%。

[0071] 因此,本发明还提供了皮肤(局部)制剂,其包含多个NC纳米颗粒,每个NC纳米颗粒在油性核中包含至少一种非亲水性材料,该核包含蓖麻油。

[0072] 就眼制剂或可注射制剂而言,干燥的薄片状NC的表现类似于配制用于局部应用的NC(下文表10和表17)。当分散制剂涉及眼制剂(他克莫司的干燥NC在无菌水性制剂中的分散体)时,取决于活性成分及其对水的敏感性,稳定性维持7天和28天之间的时间。

[0073] 例如,对于冻干重构,在1.45%甘油溶液中的NC重构稳定性(将60mg的冻干NC重新悬浮在350uL的含1.45%甘油的水中,以获得等渗制剂。在室温评估稳定性):

[0074]		初始	7天后	14天后	21天后
	尺寸(nm)	171.6	177.7	179.5	168.5
	PDI	0.13	0.127	0.118	0.153
	他克莫司含量(%)	0.57	0.57	0.56	0.51
	备注	无聚集体	无聚集体	无聚集体	聚集体

[0075] 在2.5%右旋糖溶液中的NC重构稳定性(将60mg的冻干NC重新悬浮在350uL的含2.5%右旋糖的水中,以获得等渗制剂。在室温评估稳定性):

	初始	7天后	14天后	21天后
尺寸(nm)	171.6	181	180.9	169.9
PDI	0.13	0.117	0.123	0.163
含量(%)	0.57	0.57	0.55	0.50
备注	无聚集体	无聚集体	无聚集体	聚集体

[0076] 如从上述结果可以看出的,活性物质,例如他克莫司,在室温在该水性制剂中保持稳定至少2周。

[0077] 因此,本发明还提供了稳定的水性制剂,该水性制剂包含本发明的粉末,用于在从制剂重构时起7天和28天之间的时间内使用。如上文所示,本发明还提供了稳定的无水制剂,例如稳定至少两周的无水制剂。

[0078] 载体的选择将部分地由与活性剂(当使用时)的相容性,以及由用于施用组合物的特定方法来确定。因此,粉末在液体载体中重构之后获得的药物组合物(或制剂)可以被配制用于口服、肠内、含服、鼻、局部、经上皮、直肠、阴道、气雾剂、经粘膜、表皮、透皮、真皮、眼部、肺部、皮下、皮内和/或肠胃外的施用。

[0079] 在一些实施方案中,制剂被配制用于或适于局部使用。如已知的,人类皮肤由许多层组成,这些层可以被分成三个主要的层组:角质层(Stratum corneum)(其位于皮肤的外表面)、表皮和真皮。虽然角质层是细胞外富含脂质的基质中角蛋白填充的细胞层(这实际上是药物递送到皮肤的主要屏障),但表皮和真皮层是活体组织。表皮没有血管,但真皮含

有可以引导治疗剂用于经上皮的系统性分布的毛细血管回路。尽管药物的透皮递送似乎是选择的途径,但只有有限数量的药物可以通过此途径被施用。不能够透皮递送更多种类的药物主要取决于对药物的低分子量(分子量不高于500Da的药物)、亲脂性和小剂量的要求。

[0080] 本发明的纳米颗粒明显克服了这些障碍。如上文所述,纳米颗粒能够容纳活性成分诸如环孢菌素和具有多种分子量和亲水性的其他活性剂。本发明的递送系统允许所述至少一种非亲水性剂运送穿过至少一层皮肤层,穿过角质层、表皮和真皮层。不希望被理论所束缚,递送系统运送治疗剂穿过角质层的能力取决于一系列事件,包括完整系统或离解的治疗剂和/或离解的纳米颗粒扩散穿过水化的角蛋白层并且进入更深皮肤层。

[0081] 局部制剂可以呈选自乳膏、软膏、无水乳剂、无水液体、无水凝胶、粉末、薄片或颗粒的形式。组合物可以被配制用于局部、经上皮、表皮、透皮和/或真皮施用途径。

[0082] 在一些实施方案中,制剂适于至少一种非亲水性剂的透皮施用。在这样的实施方案中,制剂可以被配制用于非亲水性剂穿过皮肤层并且特别是穿过角质层的局部递送。当期望非亲水性剂的系统性作用时,透皮施用可以被配置成将剂递送到受试者的循环系统中。

[0083] 通过配制基本上不含水或完全不含水的载体组合物,可以实现提高纳米颗粒在本发明制剂中的稳定性,例如用于局部应用。因此,不含水或无水的局部组合物可以被设计在硅基载体中。

[0084] 类似地,制剂组合物可以被配制用于至少一种非亲水性剂的眼部施用。在一些实施方案中,眼制剂可以被配制用于注射或滴眼剂。

[0085] 在设计用于口服施用、注射施用、滴注施用、以滴剂形式施用或需要形成纳米颗粒悬浮液的任何其他形式的施用的制剂中,溶液可以包括但不限于盐水、水或药学上可接受的有机介质。

[0086] 可以选择纳米颗粒的量或浓度,以及至少一种非亲水剂在纳米颗粒中的或本发明制剂整体中的相应的量或浓度,使得该量足以将所需有效量的非亲水性剂递送至受试者的目标器官或组织。所述至少一种非亲水性剂的“有效量”可以通过本领域已知的这些考虑因素来确定,使得不仅剂的量有效地达到期望的治疗作用,而且获得如所定义的稳定的递送系统。因此,尤其取决于所使用的特定剂、所采用的特定载体系统、待治疗疾病的类型和严重程度以及治疗方案,每种制剂可以被定制成包含预定量,该预定量不仅在制剂时有效,更重要的是在施用时有效。有效量通常在适当设计的临床试验(剂量范围研究)中确定并且本领域技术人员将了解如何适当地进行此类试验以便确定有效量。如众所周知的,有效量取决于多种因素,包括配体与受体的亲和力、其在体内的分布概况、多种药理学参数诸如在体内的半衰期、不期望的副作用(如果有的话)、诸如年龄和性别的因素以及其他。

[0087] 药物制剂可以包含不同类型或尺寸的具有不同或相同分散性质的纳米颗粒,利用不同或相同的分散材料,使得它们有助于一种或更多种靶向药物递送和受控释放形式,增强作用部位的药物生物利用度(也由于减少的清除),降低给药频率,以及使副作用最小化。充当递送系统的制剂和纳米颗粒能够以允许它们在至少约12小时内,或在一些实施方案中,至少约24小时内、至少约48小时内,或在其他实施方案中,在几天的时间内受控释放的速率递送所需的非亲水性活性物质。因此,递送系统可以被用于多种应用,诸如但不限于,药物递送、基因疗法、医学诊断、以及用于例如皮肤病症、癌症、病原体传播的疾病、激素相

关的疾病、与器官移植相关的反应副产物、和其他异常的细胞或组织生长的医学治疗剂。

[0088] 本发明还提供了获得冻干干燥粉末的方法,该粉末包含多个PLGA纳米颗粒,每个纳米颗粒包含至少一种非亲水性材料(药物),该方法包括将PLGA纳米颗粒的悬浮液冻干以提供干燥冻干粉末。

[0089] 在一些实施方案中,所述方法包括:

[0090] -获得包含至少一种疏水性材料(药物)的PLGA纳米颗粒的悬浮液;以及

[0091] -将所述悬浮液冻干以提供干燥冻干薄片状粉末。

[0092] 在一些实施方案中,包含至少一种非亲水性材料的PLGA纳米颗粒通过以下来获得:通过将PLGA溶解在至少一种溶剂(诸如丙酮)中来形成有机相,所述溶剂包含至少一种表面活性剂、至少一种油和至少一种非亲水性材料(诸如环孢菌素);将有机相引入到水相(水性介质或制剂)中,从而获得包含所述纳米载体的悬浮液。

[0093] 在一些实施方案中,悬浮液被浓缩,例如通过蒸发被浓缩,并且随后用至少一种冷冻保护剂处理(诸如用10%HP β CD溶液以1:1的体积比稀释)并冻干。

[0094] 如此冻干的固体具有不超过5%的水含量,并且可以被进一步用作易重构粉末。

[0095] 本发明还提供了试剂盒或商业包装,该试剂盒或商业包装包括干燥冻干粉末和至少一种液体载体;以及使用说明。在一些实施方案中,液体载体是水或水性溶液或者如本文所述的无水(不含水的)液体载体。

[0096] 如本文所展示的,根据本发明的制剂一般可以与不同的非亲水性药物实体一起使用。取决于所使用的非亲水性药物,制剂可用于不同疾病和状况的治疗或预防的方法。在一些实施方案中,药物制剂可以用于治疗通常可用本文具体列举的一种或更多种非亲水性材料治疗的状况或紊乱。在一些实施方案中,所述疾病或状况选自移植物抗宿主病、溃疡性结肠炎、类风湿性关节炎、银屑病、钱币状角膜炎(nummular keratitis)、干眼症、后葡萄膜炎、中间葡萄膜炎、特应性皮炎、木村病(Kimura disease)、坏疽性脓皮病、自身免疫性荨麻疹和系统性肥大细胞增多症。

[0097] 本公开内容的纳米颗粒和药物制剂可以对那些被物理屏障保护的组织特别有利。此类屏障可以是皮肤、血液屏障(例如,血-胸腺、血-脑、血-气、血-睾屏障等)、器官外膜及其他。在屏障是皮肤的情况下,可以通过本文描述的药物治疗的皮肤病症(当环孢菌素与其他活性物质组合时)包括,但不限于抗真菌紊乱或疾病、痤疮、银屑病、特应性皮炎、白癜风、瘢痕疙瘩、烧伤、疤痕、干燥病、鱼鳞癣、角化症、角皮病、皮炎、瘙痒、湿疹、疼痛、皮肤癌和胼胝。

[0098] 可以使用本发明的药物制剂以预防或治疗皮肤状况。在一些实施方案中,皮肤状况可以选自皮肤疾病,诸如皮炎、湿疹、接触性皮炎、过敏性接触性皮炎、刺激性接触性皮炎、特应性皮炎、婴儿湿疹、贝斯尼耶氏痒疹(Besnier's prurigo)、过敏性皮炎、屈部湿疹、播散性神经性皮炎、脂溢性(或皮脂溢性)皮炎、婴儿脂溢性皮炎、成人脂溢性皮炎、银屑病、神经性皮炎、疥疮、系统性皮炎、疱疹样皮炎、口周皮炎、盘状湿疹、钱币状皮炎(Nummul dermatitis)、主妇湿疹、汗疱疹(Pompholyx)、出汗障碍(dyshidrosis)、掌趾的顽拗性脓疱疹、Barber型或脓疱性银屑病、泛发性表皮脱落性皮炎、瘀滞性皮炎、静脉曲张性湿疹、出汗障碍性湿疹、慢性单纯性苔藓(局部划伤性皮炎;神经性皮炎)、扁平苔藓、真菌感染、擦烂性念珠菌病、头癣、白斑、panau、癣、脚癣、念珠菌病(moniliasis)、白色念珠菌病

(candidiasis); 皮肤真菌感染、水疱皮炎、慢性皮炎、棘细胞层水肿性皮炎、毒性皮炎 (dermatitis venenata)、Vidal 癣 (Vidal's lichen)、皮脂缺乏性湿疹性皮炎、自体敏感性湿疹、皮肤癌 (非黑素瘤)、真菌和微生物耐药性皮肤感染 (fungal and microbial resistant skin infections)、皮肤疼痛或其组合。

[0099] 在另外的实施方案中, 可以使用本发明的制剂以预防或治疗丘疹、寻常性痤疮、胎记、雀斑、纹身、疤痕、烧伤 (burns)、太阳灼伤 (sun burns)、皱纹、眉间纹、鱼尾纹、咖啡斑、良性皮肤肿瘤 (其在一个实施方案中是皮脂溢性角化症)、黑色丘疹性皮肤病、皮赘、皮脂腺增生、汗管瘤 (Syringomas)、黄斑瘤、或其组合; 良性皮肤增生、病毒疣、尿布念珠菌病、毛囊炎、疖、生疖、疖、皮肤的真菌感染、滴状色素减少症、脱发、脓疱病、黄褐斑、传染性软疣、红斑痤疮、疥疮、带状疱疹 (shingles)、丹毒、红癣、带状疱疹 (herpes zoster)、水痘带状疱疹病毒、水痘 (chicken pox)、皮肤癌 (诸如鳞状细胞癌、基底细胞癌、恶性黑素瘤)、癌前增生 (诸如先天性痣、光化性角化症)、荨麻疹 (urticaria)、荨麻疹 (hives)、白癜风、鱼鳞癣、黑棘皮病、大疱性类天疱疮、鸡眼和胼胝、头皮屑、干性皮肤、结节性红斑、Graves 皮肤病、过敏性紫癜、毛囊角化症、光泽苔癣、扁平苔癣、硬化性苔癣、肥大细胞增多症、传染性软疣、玫瑰糠疹、毛发红糠疹、PLEVA 或穆哈二氏病 (Mucha-Habermann Disease)、表皮溶解水疱症、脂溢性角化病、史蒂文斯-约翰逊综合征 (Stevens-Johnson Syndrome)、天疱疮、或其组合。

[0100] 在另外的实施方案中, 制剂可以用于预防或治疗与眼区相关的皮肤状况, 诸如汗管瘤、黄斑瘤、脓疱病、特应性皮炎、接触性皮炎或其组合; 与头皮、指甲相关的皮肤状况, 诸如由细菌、真菌、酵母和病毒引起的感染、甲沟炎或银屑病; 与嘴区相关的皮肤状况, 诸如口腔扁平苔癣、唇疱疹 (疱疹性龈口炎)、口腔白斑、口腔念珠菌病或其组合; 或其组合。

[0101] 根据一些实施方案, 药物组合物可以用于治疗或改善至少一种与脱发相关的症状。

[0102] 附图简述

[0103] 为了更好地理解本文公开的主题并且为了例示可以如何在实践中实施该主题, 现在将参考附图仅通过非限制性实例的方式描述实施方案, 在附图中:

[0104] 图1A-图1E提供了负载CsA的NC的表征。(A) 结晶CsA (i)、冻干CsA NC (ii) 和冻干空白NC (iii) 的XRD图。负载CsA的PLGA NC的透射电子显微术图像 (B-C, 比例尺=100nm)。冷冻断裂后掺入无水有机硅基质的冻干的负载CsA的NC (D, D(i)) 和冷冻保护剂 (E) 的Cryo-SEM 描绘。比例尺=1 μ m (D), 200nm (D(i)), 2 μ m (E)。

[0105] 图2A-图2C呈现了CsA NC的皮肤生物分布。通过Franz池中的渗透测定来确定的皮肤隔室中的 $[^3\text{H}]$ -CsA分布。(A) SC上层, (B) 下层SC和表皮, 以及 (C) 真皮, 在具有多种油组成的负载CsA的NC和相应的油对照孵育后6小时和24小时。值是平均值 $\pm$ SD。N=5。OL和LA分别意指油酸和Labrafil。

[0106] 图3A-图3D示出了通过Franz池中的渗透测定来确定的皮肤隔室中的 $[^3\text{H}]$ -CsA分布。(A) SC上层, (B) 下层SC和表皮, (C) 真皮, 以及 (D) 接受隔室, 在具有多种油组成的负载CsA的NC和相应的油对照孵育后6小时和24小时。值是平均值 $\pm$ SD。N=3。

[0107] 图4描绘了不同CsA制剂对小鼠的接触性超敏反应 (CHS) 的作用。在用1%噻唑酮攻击之前, 将单一处理 (20 μ g/cm²) 局部施加至小鼠剃毛过的腹部。在五天之后在右耳垂上进行耳反应诱发 (0.5%噻唑酮), 并且耳肿胀通过右耳和左耳之间的差异来呈现。值是平均值

±SD。N=5。*P<0.05。

[0108] 图5示出了由MasterSizer获得的NE的液滴尺寸分布。

[0109] 图6A-图6C提供了(A)NE-6、(B)NE-7、(C)NE-8的Cryo-TEM图片。

[0110] 图7A-图7B提供了在NE和油对照的孵育后24h角膜中保留的他克莫司的量/面积单位(A)和接受液中他克莫司的浓度(B)。值是基于三次重复的平均值±SD。*P<0.05,在NE和油对照之间。

[0111] 图8A-图8B是水重构后冻干前(A)和冻干后(B)的负载他克莫司的纳米胶囊的TEM图片。

[0112] 图9A-图9B描绘了在NC和油对照的孵育后24h角膜中保留的他克莫司的量/面积单位(A)和接受液中他克莫司的浓度(B)。值是基于六次重复的平均值±SD。*P<0.05,**P<0.01,在(A)中的NE和油对照之间,以及在(B)中的指示的处理之间。

[0113] 图10提供了冻干NC-2和NE的孵育后24h的接受液中他克莫司的浓度。值是基于三次重复的平均值±SD。*P<0.05,**P<0.01,在NE和冻干NC-2之间。

[0114] 图11提供了在处理施加后72h对离体培养的猪角膜进行的MTT生存力测定。对照代表未处理的角膜,阴性对照是Labrasol处理的角膜。值是基于三次重复的平均值±SD。

[0115] 图12示出了在72h期间培养的组织学离体猪角膜的上皮厚度测量。值是基于三次重复的平均值±SD。

[0116] 实施方案的详细描述

[0117] I. 实验

[0118] 1) 局部制剂中包含的活性物质和赋形剂

	材料	公司
	环孢菌素 A (CsA) USP	Teva Czech industries S.R.O. (Opava-Komarov, Czech Republic)
	PLGA 100 kDa (LA:GA 以 50:50 共混的聚-D,L-丙交酯-共-乙交酯), 未列出但以 Trelstar*销售(美国生产)	Lactel (Durect corporation, Birmingham, USA)
	油酸 USP 或蓖麻油 USP	分别为 Fisher chemical, USA 或 Lamotte, France
	Labrafil M 1944 CS (油酰聚乙二醇-6 甘油酯 EP), USP-NF	Gatefosse (Saint Priest cedex, France)
[0119]	Tween® 80 (聚山梨酯 80), USP	Ziv Chemical Ltd (Ashkelon, Israel)
	Solutol® HS 15 (聚乙二醇 15 羟基硬脂酸酯), USP	BASF (Ludwigshafen, Germany)
	Kleptose® HP ((2-羟丙基)-β-环糊精), USP-NF	Roquette (Lestrem cedex, France)
	ST-Cyclomethicone 56-USP-NF (环戊硅氧烷和环己硅氧烷)	Dow Corning (Seneffe, Belgium)
	Q7-9120 Silicone 350 cst (聚二甲基硅氧烷)-USP-NF	Dow Corning (Seneffe, Belgium)
	Elastomer 10 (环戊硅氧烷和二甲基聚硅氧烷交联聚合物), DMF	Dow Corning (Seneffe, Belgium)

[0120] *TRELSTAR DEPOT是无菌、可生物降解的冻干微粒制剂,以单剂量小瓶供应,含有双羟萘酸曲普瑞林(triptorelin pamoate) (3.75mg,按照肽基)、170mg聚-d,l-丙交酯-共-乙交酯、85mg甘露醇,USP、30mg羧甲基纤维素钠,USP、2mg聚山梨酯80,NF。重构后每月肌肉内注射一次。

[0121] 2) 空白NC和负载药物的NC的制备

[0122] 根据确立已久的溶剂置换法 (Fessi等人,1989) 制备了多种PLGA纳米载体。简言之,将聚合物聚乳酸-乙醇酸共聚物 (PLGA) 100K (乳酸:乙醇酸的50:50共混物) 以0.6%w/v的浓度溶解在丙酮中,该丙酮含有0.2%w/v Tween® 80和高达1%w/v的不同组成的不同油的共混物。将CsA以不同浓度添加到有机相中,将该有机相添加到含有0.1%w/v Solutol® HS 15的水相中,导致NC的形成。悬浮液以900rpm搅拌持续15min,并且然后通过减压蒸发来蒸发80%的初始水性介质进行浓缩。在ε2-6LSC中试冷冻干燥器 (Martin Christ,Germany) 中冻干之前,将分散在水性介质中的NC以1:1的体积比用10%HPβCD溶液稀释。最后,空白NC和CsA NC的半固体无水制剂由半固体有机硅弹性体共混物、环己硅氧烷(和)环戊硅氧烷、聚二甲基硅氧烷聚合物和冻干的空白NC或CsANC以分别为80:15:3:2的重量比组成。实际上,2%的冻干CsA NC被分散在药物制剂中,导致最终测试制剂中CsA的最终浓度为0.1%,w/w。

[0123] 此外,苯甲酸和/或苯扎氯铵也可以被掺入用于防腐目的。

[0124] 3) 单独的和在局部制剂中的CsA NC的物理化学评估方案

[0125] 浓缩在水性悬浮液 (PLGA浓度:15mg/mL) 中的NC的物理化学评估

[0126] 3.1) 粒度和 ζ 电位测量

[0127] 在25℃,使用Malvern的Zetasizer (Nano ZSP) 对NC的平均直径和 ζ 电位进行了表征。对于样品制备,将10 μ L的浓缩分散体稀释到990 μ L的HPLC水中。

[0128]	样品	
	材料	聚苯乙烯胶乳
	分散剂	水
	常规选项	尺寸: 马克-豪温克参数(使用分散剂粘度作为样品粘度) ζ : Smoluchowski 模型(使用分散剂粘度作为样品粘度)
	温度	25℃

[0129]	平衡时间(s): 120	
	池	一次性折叠毛细管池 DTS1070
	测量	
	尺寸: 173°背散射(NIBS 默认)	
	测量持续时间: 自动	
[0129]	测量数: 3	
	测量之间的延迟(秒): 0	
	ζ : 测量持续时间: 自动	
	最小运行: 10	
	最大运行: 100	
[0129]	测量数: 3	
	测量之间的延迟(秒): 0	

[0130] 3.2) CsA负载效率确定

[0131] 将10 μ L的浓缩分散体稀释到990 μ L乙腈 (HPLC级) 和CsA中。CsA的量通过如之后描述的HPLC进行定量 (稀释因子 $\times$ 100)。

[0132] 4) 冻干NC的物理化学评估

[0133] 4.1) 粒度和 ζ 电位测量

[0134] 在25℃,使用Malvern的Zetasizer (Nano ZSP) 对NC的平均直径和 ζ 电位进行了表征。对于样品制备,将约20mg的冻干NC溶解在1mL HPLC水中。然后将10 μ L的重构的冻干NC稀释到990 μ L HPLC水中。

[0135] 4.2) 水含量确定

[0136] 冻干NC中的水含量通过卡尔·费歇尔法 (Karl Fischer method) (KF) (Coulometer 831+KF Thermoprep (加热炉) 860; Metrohm) 来确定。加热炉被设定为150℃, 并且加热炉的气流被设定为80ml/min。该仪器通过加热炉标准 (Hydranal-水标准KF-加热炉, 140-160℃, Fluka, Sigma-aldrich) 进行校准, 并且在每次使用前测试一式三份空白, 以便设定位移。对于样品制备, 在小瓶中称重约20mg的冻干NC。

[0137] 4.3) 丙酮含量确定

[0138] 为了确定冻干NC中的微量丙酮, 我们利用了与GCMS仪器偶联的90℃预加热小瓶的死腔取样 (dead space sampling)。

[0139] 4.4) CsA含量确定

[0140] 将30mg的冻干NC溶解在1mL HPLC水中。然后, 将10μL的重构的冻干NC添加到490μL HPLC水中。还添加500μL乙腈。最后, 将250μL的制备的样品稀释到750μL乙腈中 (稀释因子×400)。CsA的量通过如之后描述的HPLC进行定量。

[0141] 4.5) 游离CsA的确定

[0142] 方案验证: 将约5mg的溶解在油酸: labrafil中的CsA溶液 (28% w/w) 添加到30mg的空白冻干NC中。如下文描述的, 通过三丁酸甘油酯完全提取CsA, 并且回收100%的CsA。

[0143] 冻干NC中的游离CsA: 通过用三丁酸甘油酯提取冻干NC来评估游离CsA。称重约15mg的冻干NC到4mL小瓶中, 并且然后添加2.5mL的三丁酸甘油酯。将溶液涡旋持续30s, 并且进一步离心 (14000rpm, 10min) (Mikro 200R, Hettich)。然后, 将100μL的上清液稀释到1900μL乙腈中, 将溶液涡旋并且然后离心 (14000rpm, 10min)。最后, 收集800μL的上清液并且通过HPLC进行评估 (稀释因子×50)。CsA水平代表冻干NC中未包封的CsA。

[0144] 4) 无水局部制剂

[0145] 制备了由80% Elastomer 10、16% ST-Cyclomethicone 56-NF和4% Q7-9120 Silicone 350cst组成的无水半固体基质。然后, 将2%冻干NC分散在基质中。当制备小规模时, 使用设定为1800rpm的头部搅拌器来搅拌混合物。对于高达1kg的大规模制备, 使用IKA® LR 1000基本型反应器 (100rpm, 在温度受控条件)。

[0146] 5) 无水半固体制剂的物理化学评估

[0147] 5.1) 粒度和ζ电位测量

[0148] 在25℃, 使用Malvern的Zetasizer (Nano ZSP) 对NC的平均直径和ζ电位进行了表征。对于样品制备, 将200mg的无水半固体制剂溶解在2mL HPLC水中。将样品涡旋并且进一步离心 (4000rpm, 10min)。然后, 收集1.2mL的上清液并且再次离心 (14000rpm, 10min)。最后, 收集1mL的所获得的上清液并且评估。

[0149] 5.2) CsA含量确定 (待修改)

[0150] 将200mg的无水半固体制剂溶解在4mL小瓶中的2mL DMSO中。将样品在37℃振摇30min, 并且然后离心 (4000rpm, 10min)。将1mL的上清液离心 (14000rpm, 10min)。最后, 将10μL的上清液稀释到990μL乙腈中 (稀释因子×200)。CsA的量通过如之后描述的HPLC进行定量。

[0151] 5.3) 游离CsA的确定

[0152] 方案验证: 将约1.5mg的溶解在油酸: labrafil中的CsA溶液 (28% w/w) 添加到500mg的有机硅基质中。如下文描述的, 通过三丁酸甘油酯提取CsA。回收至少80%的CsA。

[0153] 无水半固体制剂中的游离CsA:使用提取程序评估游离CsA。称重约500mg的无水半固体制剂到4mL小瓶中,并且然后添加2.5mL三丁酸甘油酯。将溶液涡旋并且进一步离心(14000rpm,10min)。然后,将100 μ L的上清液稀释到1900 μ L乙腈中,然后将溶液涡旋并且离心(14000rpm,10min)。最后,收集800 μ L的上清液并且通过HPLC进行评估(稀释因子 $\times$ 50)。

[0154] 6) 用于CsA定量的HPLC法

[0155] 将10 μ L的样品注入到由泵、自动进样器、柱烘箱和UV检测器组成的HPLC系统(Dionex ultimate 300,Thermo Fisher Scientific)中。使用5 μ m XTerra MS C8柱(3.9 $\times$ 150mm)(Waters corporation,Mildfold,Massachusetts,USA),在215nm的波长处获得CsA的鉴定。将柱恒温在60 $^{\circ}$ C。使用由乙腈:水(60:40v/v)的混合物组成的流动相实现CsA确定,该流动相得到6.6min的保留时间。通过在20mL闪烁管(scintillation vial)中称重2mg CsA并且添加10mL乙腈来制备CsA储备溶液(200 μ g/mL)。将储备液涡旋,并且在从1 μ g/mL至100 μ g/mL的范围内的浓度制备校准曲线。

[0156] 校准曲线制备

浓度 (μ g/mL)	CsA储备液 (μ L)	乙腈 (μ L)
0	0	1000
1	5	995
2.4	12	988
5	25	975
10	50	950
20	100	900
25	125	875
50	250	750
100	500	500

[0157] 校准曲线

[0158] 如等式(1)所描述确定冻干粉末中的CsA含量。

$$[0159] \quad \%CsA(w/w) = \frac{\text{药物量}}{\text{冻干粉末量}} \quad (1)。$$

[0160] 7) 形态学评估

[0161] 最后,使用两种技术进行形态学评估:透射电子显微镜(TEM)和低温扫描电子显微镜(Cryo-SEM)。在用磷钨酸负染色后使用透射电子显微术(TEM)(Philips Technai F20 100KV)并且通过低温扫描电子显微术(Cryo-SEM)(Ultra 55SEM,Zeiss,Germany)来进行形态学评估。在cryo-SEM方法中,将样品夹在两个平的铝薄片之间,200目TEM栅格用作它们之间的间隔件。然后将样品在HPM010高压冷冻机(Bal-Tec,Liechtenstein)中高压冷冻。将冷冻样品安装在固定器上,并且使用VCT 100真空冷冻转移装置(Bal-Tec)转移至BAF 60冷冻断裂装置(Bal-Tec)。在-120 $^{\circ}$ C的温度断裂之后,使用VCT 100将样品转移至SEM,并且使用次级背散射和镜内电子检测器在-120 $^{\circ}$ C的温度在1kV观察。在D8 Advance衍射仪(Bruker

AXS, Karlsruhe, Germany) 上进行X射线衍射 (XRD) 测量, 该衍射仪具有次级石墨单色仪、 2° 索拉狭缝和0.2mm接收狭缝。在室温, 使用CuK α 辐射($\lambda=1.5418 \text{ \AA}$)在以下测量条件下记录了 2° 至 $55^\circ 2\theta$ 范围内的XRD图: 管电压为40kV, 管电流为40mA, 步长为 $0.02^\circ 2\theta$ 的步进扫描模式, 并且计数时间为1s/步。结晶度的计算根据Wang等人 (Wang等人, 2006) 描述的方法进行。EVA3.0软件 (Bruker AXS) 用于所有计算。用于计算结晶度的等式如下: $DC=100\% \cdot Ac/(Ac+Aa)$, 其中DC是结晶度, Ac和Aa是X射线衍射图上的结晶面积和无定形面积。

[0163] 8) 猪组织处理

[0164] 经修整的猪耳皮肤, 约750 μm 厚, 购自Lahav动物研究所 (Kibbutz Lahav, Israel), 进行仔细清洗, 并且将所取皮的皮肤 (the dermatomed skin) 进行处理或在 -20°C 冷冻储存最长一个月直到使用。皮肤完整性通过使用VapoMeter装置 (Delfin Technologies, Finland) 测量经表皮水损失 (TEWL) (Heylings等人, 2001) 来确保。实验中仅使用了TEWL值 $\leq 15 \text{ g h}^{-1} \text{ m}^2$ 的皮肤样品 (Weiss-Angeli等人, 2010)。

[0165] 9) 离体DBD实验

[0166] 将切离的猪皮肤放置在Franz扩散池上, 接受隔室含有含10%乙醇的PBS (pH 7.4)。将在NC制剂和相应的对照中的不同剂量的放射性 (相当于937.5 μg 的CsA) 施加到安装的皮肤上。在不同的时间间隔, 确定在若干个皮肤隔室中的放射性标记的CsA的分布。首先, 通过连续洗涤收集皮肤表面上的剩余制剂, 并且与由D-SQUAME[®]皮肤取样盘 (CuDERM Corporation, Dallas, USA) 收集的第一胶带合并, 组成供给隔室。随后的10个胶带 (由五个连续的胶带剥离对组成) 被合并为上层SC。活性表皮, 也包括下层SC, 与真皮热分离 (在 56°C 的PBS中1min) (Touitou等人, 1998)。然后, 不同的分离的层用Solvable[®]化学地溶解。应该强调的是, 剩余的皮肤残余物也在Solvable[®]中被消化, 并且发现残余放射性可以忽略不计。还收集了接受液的等分试样。所有的放射性化合物都在Tri-CARB 2900TR β 计数器的Ultima-gold[®]闪烁液体中确定。

[0167] III结果和讨论

[0168] 1) 负载CsA的多种纳米载体的制备和表征

[0169] 为本研究制备了多种纳米颗粒制剂, 并且它们的物理特性被总结在表1中。多种纳米载体的平均直径在100nm至200nm之间变化, 具有相对窄的分布范围, 如通过所获得的低PDI值所反映的。含MCT的CsA NC的平均直径比CsA NS的平均直径高两倍, 而油核的变化对NC的粒度分布影响较小 (表1)。活性剂CsA的掺入 (无论有无油的存在) 都没有改变光滑且球形的PLGA基NP表面的带负电荷的性质。只有当NC中的油核由油酸: labrafil组成时, 高的药物包封效率 (92.15%回收率) 才导致冻干粉末中的药物含量为4.65% (w/w) (表1)。负载药物的NC在局部制剂中分散的主要问题是活性物质货物从纳米载体向局部制剂的外部相渗漏, 导致活性物质通过皮肤的运送效率显著受损。此外, PLGA的NC对水敏感, 并且在水性制剂中可能缓慢降解。因此, 它们需要被冷冻干燥, 并且掺入到适当的不含水的局部制剂中。如通过冷冻-断裂cryo-SEM描绘证实的, NC有效地分散在有机硅共混物中 [图1D-图1D(i)]。根据图1A中示出的X射线衍射 (XRD) 图, 可以注意到结晶CsA (i) 的典型峰从空白 (iii) 或负载CsA的NC (ii) 的衍射中缺失。这可能意味着, 当掺入到NC中时, CsA的物理状态是无定形的, 而不是结晶的。TEM图像证实了空白NC和负载药物的NC两者在水性介质中的球形形状和

均匀分布(图1B-图1C)。如图1D所示,冻干NC形成粗糙且不均匀的晶格,与不含NC的HP β CD的光滑表面形成对比(图1E)。仔细观察冷冻断裂冻干NC粉末揭示包埋在冷冻保护剂中的球形NC[图1D(i)]。合适的制剂的选择基于两个标准,包括包封效率和对冻干应力的耐受性。在五种制剂中,只有含有MCT和油酸:labrafil的CsA NC成功地通过了冻干应力,尽管由于与油酸相比更高的油浓度而更难获得良好的冻干的块状物。此外,选择油酸:labrafil制剂是因为高的包封效率,其含有理论药物量的92.15%。在冻干工艺之前和之后,在NC的形成工艺期间,这种油核组合显然在将CsA保留在NC的方面是最有效的(表1)。

[0170]

制剂	油 %,w/w	CsA ^a %,w/w	平均直径(nm)	DI ^b	ζ 电位	包封效率 (%) ^c	药物 含量 (%,w/w)
负载CsA的(油酸) NC	36	5.4	153.8 $\pm$ 1.8	0.15	-40.6	70.62	NAe
负载CsA的(油酸:labrafil) NC	13	5	162.0 $\pm$ 0.75	0.06	-36.0	92.15	4.65
负载CsA的(MCT) NC	36	5.4	192.8 $\pm$ 3.1	0.17	-35.2	78.73	4.25
负载CsA的(三丁酸甘油酯) NC	36	5.4	122.1 $\pm$ 2.7	0.17	-35.6	69.54	NAe
负载CsA的NS	0	4.8	106.7 $\pm$ 0.2	0.08	-34.5	54.0	NAe

表1.不同纳米载体制剂的组成和性质:^a初始药物浓度,^bPDI=多分散性指数,^c冻干前,^d冻干后,^eNA=数据不可得。

[0171] 2) 在离体模型中使用新鲜猪皮肤的CsA NC的皮肤生物分布

[0172] 图2中报告的结果呈现了在局部施加具有多种油组成的负载 ^3H -CsA的NC和相应的油对照,在Franz池中6小时和24小时的孵育期后,CsA在不同皮肤隔室中的离体皮肤分布。 ^3H -CsA在上层SC层中的分布在图2A中描绘,并且由五个连续胶带剥离的总和组成,每

个胶带剥离包括两个分离的连续胶带剥离提取(总计10个胶带剥离)。局部施加不同的CsA NC制剂后,6h后在SC上层中检测到升高的放射性CsA水平,约为初始施加剂量的15%。应注意,当施用相应的油对照时,在SC中记录了不超过初始剂量的1.5%的低水平的 $[^3\text{H}]$ -CsA(图2A)。还发现,在每个皮肤样品的活性表皮层中,从负载CsA的NC制剂计算的当量CsA浓度(母体药物以及可能的一些代谢物)明显高于相应的油制剂,如图2B所呈现的。值得注意的是,当在任何时间点在相应的油对照中施用 $[^3\text{H}]$ -CsA时,CsA几乎不渗透到活性表皮层。相比之下,当CsA被包封在NC中时,在施加后6小时和24小时观察到较高浓度的CsA。在每个时间点,每mg组织重量回收300ng和500ng之间的CsA。虽然在真皮隔室中观察到类似的模式(图2C),但CsA浓度(10ng-20ng/mg组织重量)低得多。应强调的是,对于所有被研究的隔室,在任何时间点都没有观察到多种NC制剂之间的统计学上显著的差异,无论油核组成如何。另一方面,在接受隔室液中,无论施加何种处理,在每个时间间隔, $[^3\text{H}]$ -CsA水平都低于初始放射性的1%(数据未示出)。

[0173] 当冻干并且将冻干粉末重构成NC水性分散体后,令人惊讶地注意到,在油酸:labrafil油核的情况下,在时间0时渗漏的CsA的量非常显著,大于10%,如也在表5中示出的,而令人惊讶的是,在以相同比例的蓖麻油:labrafil的情况下,渗漏明显小于10%,如再次在表5中示出的。

[0174] 在过去十年中,基于药物的纳米颗粒(NP)制剂因其在多种药物制剂中的使用而获得了相当大的关注。设计聚合物NP作为递送系统的主要目标是控制粒度和多分散性,最大化药物包封效率和药物负载,并且优化表面性质和药理学活性剂的释放,以在治疗上最佳的期望速率和剂量方案实现药物的部位特异性作用。

[0175] 为了避免任何将来的问题,对于优化过程,我们的目标是使用选定的油组成优化CsA包封效率,所选定的油组成是1:1的油酸:labrafil或蓖麻油:labrafil的比,连同PLGA(Lactel Ltd 100K E)或Purac Ltd的PLGA 17K。除了油(油酸相对蓖麻油)的性质之外,所有的实验条件都是相同的。

[0176] NP制剂是基于负载CsA的聚(乳酸-乙醇酸共聚物)纳米胶囊(PLGA-CsA)。

[0177] PLGA纳米胶囊如下制备:将聚合物聚乳酸-乙醇酸共聚物(PLGA) 100K(乳酸:乙醇酸的50:50共混物)以0.6%w/v的浓度溶解在丙酮中,该丙酮含有0.2%w/v Tween[®] 80和0.8%w/v的不同组成的不同油的共混物。将CsA以不同浓度添加到有机相中,然后将该有机相添加到含有0.1%w/v Solutol HS 15的水相中,导致纳米胶囊(NC)的形成。将悬浮液以900rpm搅拌持续15min,并且然后通过减压蒸发浓缩至初始水体积的20%(假设完全除去丙酮)。制剂的组成在表2中描绘。

[0178] 在ε2-6LSC中试冷冻干燥器(Martin Christ,Germany)中冻干之前,将分散在水性介质中的NC以1:1的体积比用10%HPβCD水性溶液稀释。

[0179]

实验室规模	量,mg
有机相	
环孢菌素A	150
蓖麻油	200
Labrafil	200
吐温80	100

PLGA (Lactel 100K E)	300
丙酮	50ml
水相	
Solutol	100
水	100ml
总体积	150ml

[0180] 表2.使用1:1的蓖麻油:labrafil的比的150ml的典型实验室批次的成分和相应量的列表。

[0181] 表3中描述了150ml批次的冻干工艺。

[0182]

部分	工艺阶段	时间 (h:min)	温度 (°C)	真空度(毫巴)
1	负载	00:00	20	-
2	冷冻	01:00	-35	-
3	冷冻	01:00	-35	-
4	升华	00:15	-35	1.03
5	升华	00:15	-20	1.03
6	升华	00:10	-10	0.94
7	升华	04:00	0	0.94
8	升华	05:00	20	0.94
9	二次干燥	05:00	20	0.001
	总时间	16.40		

[0183] 表3.实验室批次的冻干所选择的工艺参数的描述(总时间:~17小时)

[0184] 可以注意到,在油酸:labrafil的情况下,冻干工艺诱导了应力,这种应力损害了使用17K或100K分子量PLGA的NC的壁涂层完整性(表5)。

[0185] 表2中描述的且用蓖麻油:labrafil制备的典型批次的多种性质的不同的值在表4中描绘。

[0186]

NC 悬浮液	NC 直径(nm)	117.4 ± 12.9
	PDI (nm)	0.09 ± 0.01
	CsA 含量(% w/w)	14.3 ± 1.3
	基于初始含量的 CsA (%)	100.4 ± 9.0
分散体重构后的 NC 冻干粉末	NC 直径(nm)	200.2 ± 5.8
	PDI (nm)	0.12 ± 0.01
	CsA 含量(% w/w)	5 ± 0.1
	基于初始含量的 CsA (%)	100 ± 2
	水含量(%)	3.1 ± 0.9
	游离 CsA (%)	7.7 ± 0.9
	收率(%)	89.4 ± 0.7

[0187] 表4. 重构后的NC制剂悬浮液和冻干粉的结果

[0188] 可以注意到,多种物理化学性质不受冻干工艺的影响,并且冻干应力后CsA从NC中的渗漏仅为 7.7 ± 0.9 。

[0189] 重要的是应注意,最佳批次是由蓖麻油:labrafil共混物在适中地利用Lactel 100k E的情况下制备的NC所产生的,如表5所示。

[0190] 从表5中描绘的数据可以观察到,制剂中CsA的总浓度从5%增加到9%,w/w。

[0191] 粉末的冻干和粉末的重构后,由于Kleptose冷冻保护剂的存在,无论制剂的组成如何,NC的平均直径都增加约100nm,Kleptose冷冻保护剂包围每个NC并且保护其免受冻干工艺的影响。

[0192] PDI值低于0.15-0.2,指示NC群体具有良好的均匀性,特别是在冻干前,并且在冻干后和分散体重构后,均匀性主要在蓖麻油共混物中保持,并且更特别是在PLGA 100k的情况下。

[0193] 因此展示出,与油酸和表1中呈现的包括MCT在内的任何其他油相比,蓖麻油能够更好地保护NC免受冻干工艺的应力。

[0194] 最后,最有前景的制剂是lactel PLGA 100k,蓖麻油:labrafil,5%CsA。如果需要,7%的制剂可以作为备用。

[0195] 据我们所知,许多负载CsA的纳米载体的局部制剂尚未上市,这是因为制剂中纳米载体的有限的稳定性,以及随后活性物质货物从纳米载体向局部制剂的外部相的渗漏,导致活性物质通过皮肤的运送效率显著受损。此外,PLGA的NP对水敏感,并且在水性制剂中可能缓慢降解。因此,它们需要被冷冻干燥,并且掺入到不含水的局部制剂中。

[0196] 考虑到冻干工艺后获得的令人满意的结果,选择了油酸:labrafil-负载CsA的NC制剂(表1)。如通过冷冻-断裂cryo-SEM描绘证实的,NC有效地分散在有机硅共混物中[图1D-图1D(i)]。

[0197] 因此,本研究提出了分散在局部无水制剂中的CsANC的原始设计,该设计确保了CsA在NC中的短期稳定性,以及可能的与冻干NC粉末中观察到的同样明显的向基于有机硅的制剂中的最低限度渗漏。

[0198] 使用PLGANC对CsA的局部递送增强了其向活性皮肤层中的渗透,并且在SC层中回收了初始剂量的20% (图2)。虽然到达活性表皮和真皮的百分比低得多,但据我们了解,仍处于潜在治疗组织水平(图2)。此外,其他作者也报道了使用单油酸甘油酯作为渗透增强剂、胶束纳米载体或皮肤渗透肽的水乙醇溶液,高水平的CsA到达猪皮肤的深层。然而,据我们所知,这些递送系统还没有在任何效力研究中进行过评估。在这项研究中,在局部施加NC制剂后6小时和24小时,活形表皮和真皮中CsA的浓度分别为215ng/mg和260ng/mg;11ng/mg和21ng/mg。Furlanut等人报告,在银屑病人人类患者中,12小时谷值时高于100ng/ml的CsA浓度与良好的临床反应相关(Furlanut等人,1996)。表面上,阈值效应是缺乏相关性的似乎合理的解释。事实上,CsA似乎集中在皮肤中,其水平被估计接近血液中的峰值(Fisher等人,1988),并且比治疗有反应的斑块型银屑病人的谷值血样品的水平高约10倍(Ellis等人,1991)。我们可以合理地假设,1000ng/g的皮肤水平(相当于据报告对银屑病有活性的1ng/mg)足以抑制分配在皮肤中并且参与AD病理学的炎性细胞的激活。因此,如先前提及的,表皮和真皮中CsA的实际水平可以被认为是有效的。表皮和真皮中CsA的实际水平可以

被认为是有效的。此外,随着时间的推移,没能测量到在接受液中可检测到的穿过猪耳皮肤的放射性渗透,这表明非常低的放射性(如果有的话)可以穿过整个皮肤屏障。因此,可以预计局部施加后可能的CsA的明显系统性暴露不太可能出现。然而,这一假设需要在动物实验中得到证实,并且更有可能需要在临床药代动力学研究中得到证实。效力动物研究已经用油酸作为NC油核的一部分进行了报告,并且之前已经提交。然而,我们没有意识到冻干后CsA的明显渗漏。因此,用蓖麻油重复部分研究并且与油酸进行比较以确保与油酸NC所观察到的相同的效力是重要的。

[0199] 从图3中呈现的数据可以观察到,在基于油酸的NC或基于蓖麻油的NC之间,CsA在皮肤各层中的渗透概况没有差异,而相应的油溶液没有增强皮肤层的渗透(图3)。可以假设,基于油酸或蓖麻油核的CsANC的效力不应出现差异,但由于从NC中渗漏的CsA显著减少,甚至将增加渗透皮肤层的CsA量,并且引发非常需要的改善的药理学活性,因此甚至应预期有所改善。

[0200] 为了证实这些离体实验结果,决定还进行比较动物研究,以验证从该离体实验中得出的结论。

[0201]

			冻干前(水性分散体)					冻干和分散体重构后					
油组成	PLGA	CsA (%)	平均直径 (nm)	PDI值	CsA含量 (%w/w)	基于初始浓度观察到的CsA (%)	收率(%)	平均直径 (nm)	PDI	CsA含量 (%w/w)	基于初始浓度观察到的CsA (%)	游离CSA (%w/w)	
油酸 : labrafil	Purac 17k E	5	179.9 ± 23.7	0.11 ± 0.01	14.1 ± 1.3	98.8 ± 8.9	92.6 ± 2.9	286.3 ± 23.1	0.19 ± 0.07	5.5 ± 0.5	110 ± 10	16.8 ± 8.6	
		7	180.6 ± 19.3	0.11 ± 0.01	16.9 ± 0.7	89.6 ± 3.3	88.8 ± 1.9	296.5 ± 29.3	0.29 ± 0.11	6.2 ± 0.8	88.6 ± 11.4	20.1 ± 11.1	
		8	191.1	0.103	19.1	90.6	93.4	301	0.444	7.7	96.3	21	
		9	207.2 ± 27.2	0.10 ± 0.01	19.7 ± 3.4	85.3 ± 15.0	86.4 ± 5.9	294.1 ± 18.0	0.29 ± 0.06	8.23 ± 1.7	91.4 ± 18.9	14.9 ± 0.3	
	Lactel 100k E	5	165.7 ± 6.6	0.11 ± 0.01	13.7 ± 0.4	96.10 ± 2.9	91.2 ± 1.1	268.0 ± 16.8	0.16 ± 0.05	4.8 ± 0.4	96 ± 8	15.4 ± 3.9	
		7	169.8 ± 7.1	0.10 ± 0.01	18.6 ± 3.7	98.3 ± 19.2	90.4 ± 1.1	265.3 ± 18.1	0.20 ± 0.02	6.8 ± 0.3	97.1 ± 4.3	16.4 ± 2.3	
		8	162	0.121	19.8	94.2	90.3	240.3	0.205	7.77	97.1	12.44	
		9	172 ± 2.0	0.1 ± 0.02	22.1 ± 0.7	95.4 ± 2.9	91.0 ± 0.8	272.5 ± 21.5	0.18 ± 0.01	8.5 ± 1.2	94.4 ± 13.3	18.4 ± 6.0	
		5	154.5 ± 9.1	0.12 ± 0.02	13.7 ± 0.4	95.7 ± 3.1	88.1 ± 2.0	221.5 ± 40.4	0.18 ± 0.01	4.9 ± 0.13	98 ± 2.6	9.2 ± 5.3	
蓖麻油 : labrafil	Purac 17k E	7	155.7 ± 5.3	0.12 ± 0	17.3 ± 5.2	91.6 ± 2.8	89.8 ± 1.4	236.5 ± 27.3	0.18 ± 0.06	6.6 ± 0.6	94.3 ± 8.6	12 ± 6.1	
		8	153.8	0.134	18.8	89	89.3	244.6	0.152	7.9	98.8	16.6	
		9	160.4 ± 0.7	0.12 ± 0.02	21.7 ± 0.2	93.7 ± 0.6	88.5 ± 1.2	235.7 ± 20.5	0.14 ± 0.04	7.6 ± 1.5	84.4 ± 16.7	11.3 ± 3.4	
		5	117.4 ± 12.9	0.09 ± 0.01	14.3 ± 1.3	100.4 ± 9.0	89.4 ± 0.7	200.2 ± 5.8	0.12 ± 0.01	5 ± 0.1	100 ± 2	7.7 ± 0.9	
	Lactel 100k E	7	120.9 ± 16.3	0.1 ± 0.01	18.2 ± 1.3	96.2 ± 7.0	86.8 ± 3.2	209.2 ± 17.9	0.13 ± 0.02	6.9 ± 0.3	98.6 ± 4.3	7.96 ± 0.4	
		8	114.5	0.125	19.8	94.45	87.8	201.9	0.159	7.8	97.6	6.33	
		9	118.9 ± 5.8	0.09 ± 0	20.1 ± 1.4	90.3 ± 5.8	89 ± 1.1	199.9 ± 7.8	0.12 ± 0	7.8 ± 0.4	86.7 ± 4.4	9.2 ± 0.4	

表5.使用油酸:Labrafil和不同分子量的PLGA来增加CsA初始包封含量。每个批次为一式三份，除了8%作为单一批次进行。

[0202]

		0m	1m	3m	6m	9m
	制剂	16.6.16	16.7.16	16.9.16	16.12.16	16.3.17
外观	1 O:L 5% 100K	白色粉末	白色粉末	白色粉末	白色粉末	
	2 O:L 5% 17K	白色粉末	白色粉末	白色粉末	白色粉末	
	3 L:C 5% 100K	白色粉末	白色粉末	白色粉末	白色粉末	
	4 L:C 5% 17K	白色粉末	白色粉末	白色粉末	白色粉末	
	5 O:L 7% 17K	白色粉末	白色粉末	白色粉末	白色粉末	
	6 O:L 7% 100K	白色粉末	白色粉末	白色粉末	白色粉末	
	7 L:C 7% 17K	白色粉末	白色粉末	白色粉末	白色粉末	
	8 L:C 7% 100K	白色粉末	白色粉末	白色粉末	白色粉末	
尺寸/ PDI (nm)	1 O:L 5% 100K	278.4 ± 1.015 0.166 ± 0.024	279.9 ± 9.722 0.210 ± 0.026	265.6 ± 1.422 0.111 ± 0.018	261.3 ± 4.751 0.215 ± 0.040	
	2 O:L 5% 17K	283.3 ± 2.946 0.160 ± 0.017	295.8 ± 5.103 0.197 ± 0.028	273.1 ± 6.689 0.189 ± 0.008	283.2 ± 1.553 0.191 ± 0.015	
	3 L:C 5% 100K	198.5 ± 0.923 0.122 ± 0.048	201.4 ± 3.559 0.155 ± 0.033	203.1 ± 0.757 0.080 ± 0.033	199.9 ± 2.203 0.120 ± 0.028	
	4 L:C 5% 17K	208.1 ± 1.480 0.122 ± 0.029	210.7 ± 8.240 0.172 ± 0.038	210 ± 3.029 0.137 ± 0.019	204.4 ± 0.929 0.142 ± 0.045	
	5 O:L 7% 17K	263.7 ± 1.480 0.159 ± 0.022	265.6 ± 4.329 0.200 ± 0.025	250.7 ± 1.550 0.166 ± 0.007	321.2 ± 10.49 0.256 ± 0.065	
	6 O:L 7% 100K	269.1 ± 2.108 0.174 ± 0.046	256.3 ± 6.834 0.209 ± 0.047	260.9 ± 4.678 0.196 ± 0.049	270.8 ± 2.829 0.161 ± 0.025	
	7 L:C 7% 17K	225.4 ± 0.776 0.139 ± 0.029	226.1 ± 2.810 0.155 ± 0.031	222 ± 3.509 0.151 ± 0.013	219.8 ± 3.691 0.161 ± 0.013	
	8 L:C 7% 100K	212.1 ± 3.201 0.093 ± 0.023	215.6 ± 0.586 0.144 ± 0.030	210.2 ± 2.454 0.137 ± 0.031	211.5 ± 2.303 0.101 ± 0.026	
水含量%	1 O:L 5% 100K	3.7	4.0	3.0	1.9	
	2 O:L 5% 17K	3.6	4.2	3.2	1.2	
	3 L:C 5% 100K	2.8	4.1	3.0	0.1	
	4 L:C 5% 17K	3.0	3.9	3.2	1.9	
	5 O:L 7% 17K	2.9	4.2	3.4	3.8	
	6 O:L 7% 100K	2.5	3.5	3.0	2.0	
	7 L:C 7% 17K	3.0	4.2	3.5	0.5	
	8 L:C 7% 100K	2.7	3.5	3.0	2.3	
游离CsA%	1 O:L 5% 100K	11.7	11.2	12.7	12.9	
	2 O:L 5% 17K	15.6	16.0	16.2	17.7	
	3 L:C 5% 100K	4.5	5.5	5.4	5.8	
	4 L:C 5% 17K	6.2	6.9	7.0	7.8	
	5 O:L 7% 17K	12.4	12.8	13.3	12.5	
	6 O:L 7% 100K	14.0	13.5	13.7	20.6	
	7 L:C 7% 17K	7.8	8.0	9.4	1.8	
	8 L:C 7% 100K	6.6	7.6	6.5	16.2	

[0203]

CsA含量 (%,W/W)	1 O:L 5% 100K	4.5	4.7	5.3	4.8	
	2 O:L 5% 17K	4.7	4.9	5.4	5.0	
	3 L:C 5% 100K	4.5	4.8	5.0	4.7	
	4 L:C 5% 17K	4.8	4.4	5.0	4.6	
	5 O:L 7% 17K	5.8	6.3	6.7	6.2	
	6 O:L 7% 100K	5.1	6.4	7.0	6.5	
	7 L:C 7% 17K	6.3	7.6	7.0	6.5	
	8 L:C 7% 100K	6.3	6.2	7.1	6.5	

[0204] 表6. 在类似条件下制备的冻干NC在 $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 的长期储存稳定性的物理化学数据, 作为蓖麻油或油酸核的函数。

[0205]

		0m	1m	3m	6m	18m
	制剂	19.5.16	16.6.16	19.8.16	19.11.16	19.11.17
外观	1 O:L 5% 100K	白色粉末	白色粉末	白色粉末	白色粉末	
	2 O:L 5% 17K	白色粉末	白色粉末	白色粉末	白色粉末	
	3 L:C 5% 100K	白色粉末	白色粉末	白色粉末	白色粉末	
	4 L:C 5% 17K	白色粉末	白色粉末	白色粉末	白色粉末	
	5 O:L 7% 17K	白色粉末	白色粉末	白色粉末	白色粉末	
	6 O:L 7% 100K	白色粉末	白色粉末	白色粉末	白色粉末	
	7 L:C 7% 17K	白色粉末	白色粉末	白色粉末	白色粉末	
	8 L:C 7% 100K	白色粉末	白色粉末	白色粉末	白色粉末	
尺寸/ PDI (nm)	1 O:L 5% 100K	254.1 $\pm$ 5.880 0.113 $\pm$ 0.023	278.4 $\pm$ 1.015 0.166 $\pm$ 0.024	274.7 $\pm$ 2.250 0.150 $\pm$ 0.055	287.7 $\pm$ 6.854 0.152 $\pm$ 0.032	
	2 O:L 5% 17K	269.9 $\pm$ 2.858 0.144 $\pm$ 0.015	283.3 $\pm$ 2.946 0.160 $\pm$ 0.017	277.7 $\pm$ 3.729 0.171 $\pm$ 0.035	294.3 $\pm$ 4.359 0.178 $\pm$ 0.005	
	3 L:C 5% 100K	178.0 $\pm$ 0.8963 0.178 $\pm$ 0.036	198.5 $\pm$ 0.923 0.122 $\pm$ 0.048	272.3 $\pm$ 3.083 0.130 $\pm$ 0.075	213.5 $\pm$ 1.305 0.107 $\pm$ 0.031	
	4 L:C 5% 17K	178.3 $\pm$ 0.5508 0.173 $\pm$ 0.006	208.1 $\pm$ 1.480 0.122 $\pm$ 0.029	211.1 $\pm$ 1.069 0.152 $\pm$ 0.049	213.9 $\pm$ 2.352 0.103 $\pm$ 0.024	
	5 O:L 7% 17K	262.9 $\pm$ 6.465 0.216 $\pm$ 0.010	263.7 $\pm$ 1.480 0.159 $\pm$ 0.022	273.3 $\pm$ 7.778 0.194 $\pm$ 0.021	280.1 $\pm$ 5.424 0.181 $\pm$ 0.031	
	6 O:L 7% 100K	253.6 $\pm$ 9.260 0.224 $\pm$ 0.010	269.1 $\pm$ 2.108 0.174 $\pm$ 0.046	266.5 $\pm$ 1.300 0.222 $\pm$ 0.069	269.3 $\pm$ 1.637 0.093 $\pm$ 0.027	
	7 L:C 7% 17K	216.9 $\pm$ 2.325 0.291 $\pm$ 0.023	225.4 $\pm$ 0.776 0.139 $\pm$ 0.029	273.2 $\pm$ 7.580 0.185 $\pm$ 0.008	229.3 $\pm$ 2.203 0.136 $\pm$ 0.001	
	8 L:C 7% 100K	196.1 $\pm$ 2.838 0.115 $\pm$ 0.022	212.1 $\pm$ 3.201 0.093 $\pm$ 0.023	213.3 $\pm$ 5.320 0.116 $\pm$ 0.019	212.9 $\pm$ 2.150 0.106 $\pm$ 0.023	
水含量%	1 O:L 5% 100K	5.1	3.7	4.2	4.2	
	2 O:L 5% 17K	4.7	3.6	4.2	5.4	
	3 L:C 5% 100K	4.2	2.8	4.4	5.1	
	4 L:C 5% 17K	5.2	3.0	4.1	5.4	
	5 O:L 7% 17K	4.8	2.9	4.1	5.4	
	6 O:L 7% 100K	2.6	2.5	3.5	5.0	
	7 L:C 7% 17K	5.0	3.0	3.7	5.3	
	8 L:C 7% 100K	2.3	2.7	3.8	5.6	
游离CsA%	1 O:L 5% 100K	11.5	11.7	12.9	11.6	

[0206]

	2 O:L 5% 17K	10.7	15.6	17.8	13.7	
	3 L:C 5% 100K	5.4	4.5	7.08	5.3	
	4 L:C 5% 17K	5.4	6.2	5.45	6.9	
	5 O:L 7% 17K	12.2	12.4	10.7	18.7	
	6 O:L 7% 100K	14.9	14.0	10.2	18.5	
	7 L:C 7% 17K	7.7	7.8	10.7	10.7	
	8 L:C 7% 100K	8.2	6.6	9.2	8.9	
CsA含量 (%,W/W)	1 O:L 5% 100K	4.9	4.5	4.9	5.3	
	2 O:L 5% 17K	5.3	4.7	4.9	5.1	
	3 L:C 5% 100K	5.0	4.5	4.6	5.0	
	4 L:C 5% 17K	5.0	4.8	4.6	4.7	
	5 O:L 7% 17K	6.8	5.8	6.1	6.3	
	6 O:L 7% 100K	7.1	5.1	6.5	6.4	
	7 L:C 7% 17K	7.0	6.3	8.3	6.7	
	8 L:C 7% 100K	7.2	6.3	6.3	7.2	

[0207] 表7. 在类似条件下制备的冻干NC在 $25 \pm 3^\circ\text{C}$ 的长期储存稳定性的物理化学数据, 作为蓖麻油或油酸核的函数。

[0208]

		0m	2周	1m	3m	6m
	制剂	16.6.16	30.6.16	16.7.16	16.9.16	16.12.16
外观	1 O:L 5% 100K	白色粉末	白色粉末	白色粉末	白色粉末	白色粉末
	2 O:L 5% 17K	白色粉末	白色粉末	白色粉末	白色粉末	白色粉末
	3 L:C 5% 100K	白色粉末	白色粉末	白色粉末	白色粉末	白色粉末
	4 L:C 5% 17K	白色粉末	白色粉末	白色粉末	白色粉末	白色粉末
	5 O:L 7% 17K	白色粉末	白色粉末	白色粉末	白色粉末	白色粉末
	6 O:L 7% 100K	白色粉末	白色粉末	白色粉末	白色粉末	白色粉末
	7 L:C 7% 17K	白色粉末	白色粉末	白色粉末	白色粉末	白色粉末
	8 L:C 7% 100K	白色粉末	白色粉末	白色粉末	白色粉末	白色粉末
尺寸/ PDI (nm)	1 O:L 5% 100K	278.4 ± 1.015 0.166 ± 0.024	279.1 ± 11.41 0.191 ± 0.014	282.7 ± 3.970 0.207 ± 0.036	265.5 ± 0.6028 0.177 ± 0.028	269.4 ± 5.839 0.178 ± 0.016
	2 O:L 5% 17K	283.3 ± 2.946 0.160 ± 0.017	225.3 ± 46.83 0.117 ± 0.067	295.6 ± 5.217 0.214 ± 0.004	283.8 ± 0.300 0.163 ± 0.018	256.9 ± 7.425 0.144 ± 0.074
	3 L:C 5% 100K	198.5 ± 0.923 0.122 ± 0.048	202.2 ± 6.374 0.130 ± 0.05	203.5 ± 2.194 0.131 ± 0.022	198 ± 1.150 0.096 ± 0.030	141.2 ± 2.318 0.122 ± 0.016
	4 L:C 5% 17K	208.1 ± 1.480 0.122 ± 0.029	247.6 ± 32.6 0.168 ± 0.048	217.0 ± 3.899 0.148 ± 0.030	209.7 ± 0.6807 0.120 ± 0.021	213.8 ± 0.8386 0.113 ± 0.023
	5 O:L 7% 17K	263.7 ± 1.480 0.159 ± 0.022	263.6 ± 4.180 0.190 ± 0.037	268.4 ± 5.510 0.221 ± 0.027	255.4 ± 2.914 0.156 ± 0.010	286.0 ± 5.752 0.203 ± 0.021
	6 O:L 7% 100K	269.1 ± 2.108 0.174 ± 0.046	239.5 ± 25.44 0.122 ± 0.031	269.7 ± 4.917 0.245 ± 0.014	273.9 ± 3.625 0.158 ± 0.043	277.8 ± 2.721 0.219 ± 0.006
	7 L:C 7% 17K	225.4 ± 0.776 0.139 ± 0.029	215.2 ± 5.160 0.077 ± 0.059	231.7 ± 5.859 0.167 ± 0.031	225.2 ± 4.165 0.113 ± 0.013	231.7 ± 1.212 0.141 ± 0.026
	8 L:C 7% 100K	212.1 ± 3.201 0.093 ± 0.023	211.6 ± 2.778 0.067 ± 0.050	215.2 ± 6.214 0.157 ± 0.027	208.3 ± 2.879 0.100 ± 0.025	212.7 ± 1.682 0.101 ± 0.018
水含量%	1 O:L 5% 100K	3.75	3.0	3.6	1.5	2.1
	2 O:L 5% 17K	3.6	2.9	3.9	3.3	0.7
	3 L:C 5% 100K	2.8	2.8	3.6	2.9	1.6
	4 L:C 5% 17K	3.0	2.15	3.0	2.7	2.2
	5 O:L 7% 17K	2.9	2.0	3.0	3.3	ND
	6 O:L 7% 100K	2.5	2.1	2.8	2.4	ND
	7 L:C 7% 17K	3.0	2.3	3.0	2.5	ND
	8 L:C 7% 100K	2.7	2.0	3.0	2.3	ND
游离CsA%	1 O:L 5% 100K	11.7	12.6	11.6	12.6	11.4*
	2 O:L 5% 17K	15.6	15.5	19.6	15.7	9.2*
	3 L:C 5% 100K	4.5	4.0	4.8	5.7	5.3
	4 L:C 5% 17K	6.2	6.0	6.8	7.1	6.4
	5 O:L 7% 17K	12.4	12.8	17.6	13.4	17.6*
	6 O:L 7% 100K	14.0	13.0	18.2	15.0	18.7*
	7 L:C 7% 17K	7.8	7.0	10.8	9.7	12.5
	8 L:C 7% 100K	6.6	5.9	9.2	6.9	8.1
CsA含量 (%,W/W)	1 O:L 5% 100K	4.5	5.2	5.2	5.1	4.4*
	2 O:L 5% 17K	4.7	4.7	4.9	4.7	3.0*
	3 L:C 5% 100K	4.5	4.8	4.5	5.1	4.5
	4 L:C 5% 17K	4.8	4.3	5.1	5.1	4.6
	5 O:L 7% 17K	5.8	6.5	6.3	6.9	5.8*
	6 O:L 7% 100K	5.1	6.5	6.2	7.1	6.4*
	7 L:C 7% 17K	6.3	7.15	6.8	7.1	6.5
	8 L:C 7% 100K	6.3	6.8	6.3	6.9	6.3

[0209] 表8. 在类似条件下制备的冻干NC在37℃的长期储存稳定性的物理化学数据, 作为蓖麻油或油酸核的函数。

[0210] 接触性超敏反应 (CHS) 小鼠模型

[0211] 如下文描述进行CHS的诱导。在CHS致敏前4天, 对6-7周龄的BALB/c小鼠腹部进行仔细剃毛, 并且允许其休息恢复。在致敏当天, 将多种局部CsA制剂和Protopic®施加至剃毛过的皮肤 (20mg的Ca:La CsA NC或01:La CsA NC和空的NC半固体无水制剂, 均相当于20μg/cm² CsA)。局部处理后4小时, 为了引发CHS, 在剃毛过的腹部上用50μl含1%噁唑酮的丙酮/橄榄油 (A00) 4:1使小鼠致敏。五天后, 它们仅在右耳背部上用25μl含0.5%噁唑酮的A00进

行攻击。未处理左耳,并且通过千分尺(Myitutoyo,USA)测量肿胀反应,记录攻击后24小时、48小时、72小时、96小时和168小时左耳和右耳之间的差异。150 μ m的平均肿胀被认为是过敏反应。

[0212] 可以注意到,基于蓖麻油的CsA NC和基于油酸的NC一样有效。还可以观察到,在第2天(图4),基于蓖麻油的NC比基于油酸的CsA NC引发了显著改善的作用,证实了先前的推断。

[0213] 更重要的是,还观察到CsA NC的长期稳定性明显更倾向于蓖麻油而不是油酸,如表6-表8中呈现的结果所示。

[0214] 只有在蓖麻油核的情况下,多种参数才是稳定的,特别是在37 $^{\circ}$ C超过6个月时。

[0215] 这些结果清楚地指示,只有使用蓖麻油,才将有可能为市场设计产品,因为在37 $^{\circ}$ C时6个月的稳定性相当于商业产品3年的保质期,而这种稳定的产品不能用油酸获得,如表6-表8所示。

[0216] 眼递送

[0217] 背景

[0218] 人眼是复杂的器官,其由许多不同的细胞类型组成。药物的局部施用仍然是治疗眼疾病的优选途径,这主要是因为易于施加和患者依从性。然而,由于固有的解剖学和生理学障碍,局部施加的药物在眼中的吸收非常差,导致需要重复高剂量施用。首先,药物分子被稀释在角膜前泪膜上,总厚度约为10 μ m。这种泪液的外层的快速更新速率(1 μ l/min-3 μ l/min)连同眨眼反射,严重限制了药物在角膜前空间中的停留时间(<1min),并且从而限制了滴注的药物的眼生物利用度(<5%)。取决于不同眼病症的目标部位,药物需要被保留在角膜和/或结膜处,或者穿过这些屏障并且到达眼的内部结构。药物通过结膜的进入通常与系统性药物吸收有关,并且受到巩膜的高度阻碍。因此,角膜代表了靶标在内眼中的药物的主要进入途径。不幸的是,穿过角膜屏障对许多药物来说是一个关键的挑战。事实上,多层亲脂性角膜上皮高度组织化,存在大量的紧密连接和桥粒(desmosome),它们有效地排除外来分子和颗粒。此外,亲水性基质使得药物的运送非常困难。只有具有低分子量和适中亲脂特性的药物才能以适度的方式克服这些屏障。

[0219] 春季型角膜结膜炎(VKC)是一种主要发生在儿童的双侧慢性威胁视力且严重的炎性眼病。常见的发作年龄在10岁之前(4岁-7岁)。已经观察到男性占多数,特别是在20岁以下的患者中,男性:女性比为4:1-3:1。尽管春季型(vernal (spring))意味着疾病的季节性偏好,但它的病程通常在几乎全年发生,特别是在热带地区。VKC可以在世界各地出现,并且几乎所有大洲都已经报告。在约50%的患者中发现了特应性致敏。VKC病患者通常主要表现为眼症状,更主要的是瘙痒、溢液、流泪、眼刺激、眼发红以及不同程度的畏光。

[0220] VKC已被纳入最新的眼表超敏反应紊乱分类,被分类为IgE介导的和非IgE介导的眼过敏性疾病两者。尽管如此,但众所周知,并非所有VKC患者的皮肤过敏测试都呈阳性。结膜中Th2淋巴细胞数量的增加以及共刺激分子和细胞因子的表达的增加表明,T细胞在VKC3的发育中起到至关重要的作用。除了典型的Th2衍生细胞因子之外,Th1型细胞因子、促炎细胞因子、多种趋化因子、生长因子和酶在VKC患者中过表达。

[0221] 1.VKC治疗

[0222] 常用疗法包括局部抗组胺药和肥大细胞稳定剂。这些疗法很少是足够的,并且通

常需要局部皮质类固醇来治疗疾病的恶化和更严重的病例。皮质类固醇仍然是眼炎症的主要疗法,同时充当抗炎药物和免疫抑制药物两者。疗法的目标是防止眼损伤、结疤和最终视力丧失。虽然这些剂非常有效,但它们也并非没有相关风险。所有施用类型和手段的长期类固醇使用的眼副作用包括白内障形成、眼压升高和更易感染。为了克服局部类固醇可能引起的致盲并发症,更经常使用免疫调节药物诸如环孢菌素A和他克莫司。

[0223] 他克莫司即使在环孢菌素难治的VKC重症病例中也是有效的类固醇激发剂(steroid sparing agent)。

[0224] 2. 他克莫司的效力和限制

[0225] 他克莫司,也被称为FK506,是一种大环内酯,从含有细菌筑波链霉菌(*Streptomyces tsukubaensis*)的日本土壤样品的发酵液产生。这种药物与T淋巴细胞内的FK506结合蛋白结合,并且抑制钙调磷酸酶活性。钙调磷酸酶抑制抑制了激活的T细胞的核因子的去磷酸化及其向细胞核的转移,这导致抑制T淋巴细胞形成细胞因子。因此,T淋巴细胞的抑制可能导致炎性细胞因子的释放的抑制和减少对其他炎性细胞的刺激。他克莫司的免疫抑制作用不限于T淋巴细胞,还可以作用于B细胞、中性粒细胞和肥大细胞,这导致VKC症状和体征的改善。

[0226] 不同形式和浓度的他克莫司已在治疗眼前节炎性紊乱中被评估。大多数临床试验中研究的局部他克莫司制剂的主要浓度是0.1%。一些其他研究评估了较低浓度的他克莫司,包括0.005%、0.01%、0.02%和0.03%,并且表明局部滴眼剂是常规药物(包括局部类固醇)难治的VKC患者的安全且有效的治疗形式。然而,他克莫司难以渗透角膜上皮并且在角膜基质中积累,因为其差的水溶性和相对高的分子量。此外,这种药物还没有在世界范围内上市的眼制剂,这迫使VKC病患者使用用于治疗特应性皮炎的皮肤用他克莫司软膏。

[0227] 3. 用于治疗眼疾病的纳米载体

[0228] 开发能够在不需要频繁滴注的情况下以正确的剂量递送药物的有效局部剂型代表药物科学和技术的主要挑战。在过去的数十年中,已经表明尺寸<1000nm的特定纳米载体可以克服与眼相关的屏障。事实上,它们已经示出了与多种药物(包括高度亲脂性药物)结合的能力,减少了不稳定药物的降解,增加了相关药物在眼表面上的停留时间,并且改善了它们与角膜和结膜上皮的相互作用,并且因此提高了它们的生物利用度。纳米胶体系统包括脂质体、纳米颗粒和纳米乳剂。

[0229] 3.1. 聚合物纳米颗粒

[0230] 聚合物纳米颗粒(PN)是直径在从10nm至1000nm的范围内的胶体载体,并且包含多种可生物降解和不可生物降解的聚合物。PN可以被分类为纳米球(NS)或纳米胶囊(NC);NS是吸附或包埋药物的基质系统,而NC是储库型系统,在所述储库型系统中,周围的聚合物壁容纳其中分散药物的油核。

[0231] 这些系统已经作为局部眼递送系统进行了研究,并且显示出对眼表面的增强的粘附性以及其对药物的控制释放。因为这些PN可以掩蔽被包埋的药物的物理化学性质,所以它们可以改善药物的稳定性,并且因此提高药物的生物利用度。此外,这些胶体载体可以以液体形式施用,这有利于施用和患者依从性。

[0232] 纳米乳剂(NE)是通过使用表面活性剂稳定的两种不互溶液体的非均相分散体(水包油或油包水)。这些均匀系统都是低粘度流体,因此适合用于眼的局部施用。此外,表面活

性剂的存在增加了膜渗透性,从而增加了药物吸收。除此之外,NE还提供药物的持续释放,并且具有容纳亲水性药物和亲脂性药物两者的能力。鉴于纳米载体在局部眼递送方面的许多优势以及他克莫司在春季型角膜结膜炎中已经被证明的功效,我们的研究集中在开发。

[0233] 在本研究中,假设他克莫司包封在胶体递送系统(纳米胶囊和/或纳米乳剂)中将改善角膜药物滞留并且增加药物的眼渗透,在VKC中产生较高的治疗作用。

[0234] 总体目标是开发一种稳定的胶体眼制剂,该眼制剂中负载有他克莫司,以满足难治性VKC患者的世界范围内商业可得的治疗的需求。

[0235] 在这项研究中,我们专注于以下目标:

[0236] a-他克莫司纳米载体(NE/NC)的设计及其表征

[0237] b-制剂的稳定和对眼的生理条件的适应

[0238] c-纳米载体的猪角膜渗透的离体评估和选定纳米载体对切离的猪角膜的离体毒性评估。

[0239] 4.材料

[0240] 他克莫司(作为一水合物)由TEVA(Opava,Komárov,Czech Republic)慷慨捐赠;蓖麻油得自TAMAR industries(Rishon LeTsiyon,Israel),聚山梨酯80(**Tween**[®] 80)、聚氧乙烯-35蓖麻油(CremophorEL)、D(+)海藻糖、D-甘露醇、蔗糖、MTT(3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基溴化四唑)购自Sigma-Aldrich(Rehovot,Israel)。Lipoid E80得自Lipoid GmbH(Ludwigshafen,Germany),并且中链甘油三酯(MCT)由Société des Oleagineux(Bougival,France)慷慨提供。甘油得自Romical(Be'er-Sheva,Israel)。^[3H]-他克莫司、**Ultima-Gold**[®]液体闪烁混合液和**Solvable**[®]购自Perkin-Elmer(Boston,MA,USA)。PVA(Mowiol 4-88)得自Efal Chemical Industries(Netanya,Israel);PLGA 4.5K(MW:4.5KDa)、PLGA 7.5K(MW:7.5KDa)和PLGA 17K(MW:17KDa)得自Evonik Industries(Essen,Germany)。PLGA 50K(MW 50KDa)购自Lakeshore Biomaterials(Birmingham,AL,USA)并且PLGA 100K(MW 100KDa)购自**Lactel**[®](Durect Corp.,AL,USA)。聚乙二醇15羟基硬脂酸酯(**Solutol**[®]HS 15)由BASF(Ludwigshafen,Germany)慷慨捐赠。(2-羟丙基)- β -环糊精(HP β CD)来自Carbosynth(Compton,UK)。所有有机溶剂均为HPLC级,并且购自J.T Baker(Deventer,Holland)。所有组织培养产品均来自Biological Industries Ltd.(Beit Ha Emek,Israel)。

[0241] 5.方法

[0242] 5.1.纳米载体的制备

[0243] 5.1.1.空白NP和负载药物的NP的制备

[0244] 根据确立已久的溶剂置换法²⁰制备了多种PLGA纳米颗粒。简言之,将聚合物聚乳酸-乙醇酸共聚物(PLGA)(乳酸:乙醇酸的50:50共混物)以0.6%w/v的浓度溶解在丙酮中。对于NC制备,将MCT/蓖麻油和吐温80/Cremophor EL/Lipoid E80以不同的浓度和组合引入有机相,目的是制剂扫描。对于NS制备,没有油被混合到有机相中。将他克莫司以若干种浓度添加至有机相,最佳浓度为0.05%w/v和0.1%w/v。将有机相倒入含有0.2%-0.5%w/v的**Solutol**[®]HS 15或1.4%w/v PVA的水相中。有机相和水相之间的体积比为1:2v/v。将悬浮液以900rpm搅拌持续15min,并且然后通过减压蒸发除去所有丙酮。对于浓缩的制剂,也将水

蒸发,直到达到期望的最终体积。NP的纯化通过离心(4000rpm;5min;25℃)来进行。为了获得他克莫司的最佳制剂,制备了许多NP并且特别是NC制剂,使我们能够确定PLGA MW、活性成分浓度、油类型以及水相与有机相中不同表面活性剂的存在对NP的稳定性和性质的影响。

[0245] 5.1.2. 负载药物的NE的制备

[0246] 不同的纳米乳剂是在不添加聚合物PLGA的情况下,通过针对NC描述的相同工艺来制备的。用水进一步稀释这些制剂,以达到他克莫司浓度为0.05%w/v的目标。

[0247] 当制备放射性标记的NC/NE时,在添加至水相之前,将3 μ Ci的[³H]-他克莫司与0.05%w/v的他克莫司丙酮溶液混合。

[0248] 5.2. 纳米载体的物理化学表征

[0249] 5.2.1. 颗粒/液滴尺寸测量

[0250] 5.2.1.1. Zetasizer Nano ZS

[0251] 在25℃,通过Malvern的Zetasizer仪器(Nano系列,Nanos-ZS)测量多种NC和NE的平均直径。将10 μ L的每种制剂稀释到990 μ L HPLC用水中。

[0252] 5.2.1.2. Mastersizer

[0253] NE的液滴尺寸也通过使用Mastersizer 2000(Malvern Instruments,UK)来测量。每次测量使用约5mL的每种NE,分散在120mL的DDW中,并且在持续搅拌下($\sim$ 1,760rpm)测量。

[0254] 5.2.2. 形态学评估

[0255] 5.2.2.1. 透射电子显微术(TEM)成像

[0256] 使用JEM-1400plus 120kV(JEOL Ltd.)评估透射电子显微术(TEM)观察结果。通过将样品与乙酸铀酰(uranyl acetate)混合进行负染色来制备样本。

[0257] 5.2.2.2. 低温透射电子显微术(Cryo-TEM)成像

[0258] 对于低温透射电子显微术(Cryo-TEM)观察,将一滴NE/NP悬浮液放置在300目Cu栅格上支撑的碳涂覆多孔聚合物膜上(Ted Pella Ltd.),并且通过在液态乙烷中快速淬火至-170℃的方式,使用Vitrobot Mark-IV(FEI)来自动玻璃化样本。使用具有保持在-180℃的Gatan低温固定器的在120kV的Tecnai T12 G2 Spirit TEM(FEI)来研究样品。

[0259] 5.3NP的冻干

[0260] 一些冷冻保护剂以从1:20至1:1的范围内的不同质量比(PLGA:冷冻保护剂)进行测试。将一份冷冻保护剂水溶液添加到一份新鲜的NP悬浮液中,并且充分混合。然后通过 ϵ 2-6D冷冻干燥器(Christ)将制剂冻干持续17h。当需要时,将一定量的干燥粉末(相当于1mL NP的计算重量)分散在1mL的水中以重构初始分散体,并且重构通过粒度分布来表征。

[0261] 5.4. 等渗性调节和测量

[0262] 为了实现等渗性,将甘油添加至不同的制剂。对于NE和新鲜NP,需要2.25%w/v的甘油浓度,而对于冻干且重构的NP,2%w/v是足够的。渗透压(Osmolality)测量在3MO Plus微量渗透压计(Advanced Instruments Inc.,Massachusetts,USA)上进行。

[0263] 5.5. 他克莫司定量

[0264] 5.5.1. NE/新鲜NP的药物含量

[0265] NE中的他克莫司含量(以重量/体积计)通过HPLC来确定。将50 μ L的NE添加到950 μ L

的乙腈中,并且注入到配备有UV检测器的HPLC系统(Dionex ultimate 300,Thermo Fisher Scientific)中。使用5 μ m Phenomenex C18柱(4.6 $\times$ 150mm)(Torrance,California,USA),在60 $^{\circ}$ C 0.5mL/min的流速,并且乙腈:水的95:5v/v混合物作为流动相,在213nm的波长处检测他克莫司,保留时间为5.1min。

[0266] 5.5.2.冻干NP的药物负载

[0267] 将20mg的冻干NP在2.5mL的水中重构,并且再超声处理持续10min。然后将1mL的该分散体添加到9mL的乙腈中,并且在5分钟内涡旋。通过HPLC确定他克莫司在冻干NP中的负载效率。将1mL的后一种溶液注入到先前描述的HPLC系统中。如等式(1)所描述确定冻干粉末中的他克莫司负载量。

$$[0268] \quad \%Tac(w/w) = \frac{\text{药物量}}{\text{冻干粉末量}} \quad (1)$$

[0269] 5.6.他克莫司NP包封效率测定

[0270] 对于新鲜NP的包封效率(EE)确定,将1mL制剂置于1.5mL带帽聚丙烯管(Beckman Coulter)中,并且在4 $^{\circ}$ C以45000rpm超速离心持续75min(Optima MAX-XP超速离心机,TLA-45转子,Beckman Coulter)。分离上清液用于HPLC分析。通过将100 μ L的上清液溶解在900 μ L乙腈中来确定游离他克莫司的量。根据等式(2)计算EE。

$$[0271] \quad EE(\%) = \frac{\text{药物的初始量} - \text{药物的游离量}}{\text{药物的初始量}} * 100 \quad (2)$$

[0272] 对于冻干NP的包封效率确定,将8mg的冻干粉末在1mL的水中重构,并且在4 $^{\circ}$ C以40000rpm的速度超速离心持续40min。如先前针对新鲜NP所描述确定包封效率。

[0273] 5.7.负载他克莫司的纳米载体稳定性测定

[0274] 5.7.1.NE的稳定性评估

[0275] 将新鲜他克莫司NE分成1mL的样品,将该样品在4 $^{\circ}$ C、室温和37 $^{\circ}$ C保持密封,并且避光。在1周、2周、4周和8周,通过使用先前描述的相同的方案来采集样品用于液滴尺寸分布和药物含量,评估NE稳定性。

[0276] 5.7.2.NP的稳定性评估

[0277] 将他克莫司NP干燥粉末分成150mg的样品,将该样品在4 $^{\circ}$ C、室温和37 $^{\circ}$ C保持密封,并且避光。在1周、2周、4周、8周、12周和17周对粉末进行分析。在每个时间段结束时,从相关样品中取出粉末并且重新分散在水中。通过使用先前描述的方案的粒度分布和含量分析来评估悬浮液稳定性。

[0278] 5.8.离体角膜药物渗透实验

[0279] 猪眼得自Lahav动物研究所(Kibbutz Lahav,Israel)。摘除的眼在运输期间保持在冰上,并且在摘除的3小时内使用。将被约5mm的巩膜包围的角膜切开,并且放置在Franz扩散池(Permeagear Inc.,Hellertown,PA,USA)上,有效扩散面积为1.0cm²,并且接受隔室为8mL。将与10%乙醇混合的Dulbecco磷酸盐缓冲盐水(PBS)(pH=7.0)置于保持在35 $^{\circ}$ C并且持续搅拌的接受室中。将负载到NE/NP制剂中的³H-他克莫司和含有在蓖麻油中的³H-他克莫司的对照施加到安装的角膜上。在实验开始后24h,确定放射性标记的³H-他克莫司在若干个隔室中的分布。首先,通过用接受介质连续洗涤来收集角膜表面上的剩余制剂。然后在保持在60 $^{\circ}$ C的水浴中用Solvable[®]化学地溶解角膜,直到组织完全分解。最后,还收集了接

受液的等分试样。放射性标记的他克莫司在Tri-Carb 4910TR β 计数器(PerkinElmer, USA)中的Ultima-gold[®]闪烁液体中确定。

[0280] 5.9. 离体角膜毒性评估

[0281] 5.9.1. MTT生存力测定

[0282] 保持在先前描述的相同条件下的猪眼被用于生存力测定。在20mL聚维酮碘溶液中,将被约5mm的巩膜包围的角膜切开并且消毒5min。然后将角膜在PBS中洗涤,并且用10 μ L的不同浓度的NC处理,并且在37 $^{\circ}$ C在1.5mL DMEM中孵育持续72h。为了评估不同处理后角膜细胞生存力,进行了MTT生存力测定。首先将MTT粉末溶解在PBS中,以制备5mg/mL的储备溶液。将该溶液在PBS中进一步稀释至0.5mg/mL,并且向每个角膜添加500 μ L的稀释溶液,然后孵育1h。通过对每个角膜使用700 μ L异丙醇并且在室温振摇30min来进行染料提取。在最后一过程之后,提取100 μ L的提取物,并且在来自BioTek的Cytation 3成像读取器中以570nm的波长读取。

[0283] 5.9.2. 上皮厚度测量

[0284] 将根据先前描述的相同的方案处理和孵育的切开的角膜浸入多聚甲醛中持续12h,并且再转移到乙醇中,直到组织学切片。样品以4 μ m切割并且用苏木精和曙红染色。组织学图片由Olympus B201显微镜(光学放大倍数为 $\times 40$, Olympus America, Inc., MA, USA)拍摄。使用Image J软件,通过将测量的上皮面积除以其长度来获得上皮厚度。

[0285] 6. 结果

[0286] 6.1. 纳米乳剂(NE)

[0287] 6.1.1. 组成和表征

[0288] 通过改变表面活性剂和药物浓度制备了许多NE,筛选的目的是找到物理和化学上稳定的制剂,其具有呈现窄尺寸分布的亚微米液滴。表9中总结了所获得的NE的物理化学特性。只有在水相中含有作为表面活性剂的PVA和在有机相中含有蓖麻油的制剂是物理上稳定的(NE-5至NE-8)。选择NE-6至NE-8进行进一步评估。这些NE主要区别在于有机相表面活性剂吐温80的浓度,并且呈现出低的多分散性指数(PDI)和用Zetasizer Nano ZS测量的在176nm至201nm之间变化的平均液滴直径。

			有机相中的 表面活性剂		水相中的 表面活性剂				
制剂	他克莫司	油	吐温 80	Lipoid E80	Solutol	PVA	平均 直径	PDI	备注
	W/V % ^a	类型	W/V % ^a	W/V % ^a	W/V % ^a	W/V % ^a	(nm)		
[0289]	NE-1	蓖麻油	0.5	-	0.5	-	164.3	0.11	聚集体
		MCT							
	NE-2	蓖麻油	-	0.8	0.5	-	124.1	0.12	聚集体
		MCT							
	NE-3	蓖麻油	-	0.8	0.5	-	132.6	0.13	聚集体
	NE-4	蓖麻油	-	0.8	-	1.4	120.2	0.1	聚集体
		MCT							
	NE-5	蓖麻油	3.8	-	-	1.4	232.3	0.24	-
	NE-6	蓖麻油	1.4	-	-	1.4	201.2	0.15	-
	NE-7	蓖麻油	0.9	-	-	1.4	195.8	0.10	-
	NE-8	蓖麻油	0.4	-	-	1.4	176.7	0.11	-

[0290] 表9. 不同NE制剂的组成和性质。^a蒸发后的制剂中。

[0291] 由于常规的Zetasizer Nano ZS限于测量微米级颗粒,因此可通过激光衍射法使用Mastersizer 2000 (Malvern Instruments,UK) (覆盖0.02 μ m-2000 μ m的尺寸范围) 确认NE液滴的粒度分布。如通过仪器获得的图5中可以看出的,所选择的制剂 (NE-6至NE-8) 呈现出亚微米级的分布,这对于所有测试的NE都是类似的,证实了通过Zetasizer Nano ZS获得的结果。

[0292] 对所选择的NE进行形态学检查,以完成其物理化学表征。在所有制剂中都观察到球形NE液滴 (图6)。

[0293] 6.1.2. 离体角膜渗透实验

[0294] 图7中报告的结果呈现了在局部施加负载 [³H]-他克莫司的NE和油对照24h后,角膜中 [³H]-他克莫司的量/面积单位 (图7A) 及 [³H]-他克莫司在接受隔室中的浓度 (图7B)。将所有测试的NE稀释至获得0.05%的他克莫司浓度,并且调节至等渗。

[0295] 与油对照相比,负载于NE-8中的他克莫司明显更多地保留在角膜中 (p<0.05)。接受液中的药物浓度在NE-6、NE-7和NE-8中也比对照高4倍 (p<0.05),这突出表明当负载于纳米乳剂中时,他克莫司渗透通过角膜的显著增加。然而,在测试的NE之间,没有发现渗透差异 (p>0.05)。

[0296] 6.1.3. 稳定性评估

[0297] 当在4℃和室温储存8周之后,三种选定的NE显示出不变的物理化学特性和药物含量。然而,在37℃,在同样的时间段之后,他克莫司含量 (w/v) 比初始药物含量降低了至少20%,如表10中可以看出的。

		4℃			37℃			室温		
		尺寸(nm)	PDI	含量(%)	尺寸 (nm)	PDI	含量(%)	尺寸(nm)	PDI	含量(%)
[0298]	初始	201.2	0.15	0.06	201.2	0.15	0.06	201.2	0.15	0.06
	8周	200.3	0.11	0.04	200.3	0.11	0.04	201.1	0.14	0.05
	初始	195.8	0.1	0.05	195.8	0.1	0.05	195.8	0.1	0.05
	8周	195.3	0.12	0.05	194.8	0.09	0.04	195.1	0.1	0.05
	初始	176.7	0.11	0.05	176.7	0.11	0.05	176.7	0.11	0.05
	8周	180.3	0.11	0.05	178.7	0.11	0.04	177.1	0.11	0.05

[0299] 表10. 在不同储存温度8周之后的选定NE的稳定性结果。

[0300] 6.2. 纳米颗粒

[0301] 通过改变PLGA MW、油、表面活性剂、药物及其浓度, 以及制备纳米胶囊 (NC) 或纳米球 (NS), 制备了许多纳米颗粒的制剂。该筛选的目标在于找到具有呈现窄尺寸分布和高封装效率的颗粒的稳定制剂。

[0302] 6.2.1. 纳米球 (NS)

[0303] 在NS中配制他克莫司的所有尝试都不成功, 在几小时之后, 形成了聚集体 (表11)。溶解他克莫司的油显示对于配制药物和获得稳定产品是必要的。

[0304]

			有机相中的 表面活性剂		水相中的 表面活性剂	
	PLGA		吐温80	Lipoid E80	Solutol	
	W					
制剂	kDa	(W/V %) ^a	(W/V %) ^a	(W/V %) ^a	(W/V %) ^a	备注
NS-1	100	0.7	0.1	-	0.5	聚集体
NS-2	00	0.7	0.1	-	0.5	聚集体
NS-3	100	0.7	0.5	-	0.5	聚集体
NS-4	60	0.7	0.5	-	0.5	聚集体
NS-5	50	0.7	-	0.5	0.5	聚集体

[0305] 表11. 不同NS制剂的组成。^a蒸发后的制剂中

[0306] 6.2.2. 纳米胶囊 (NC)

[0307] 6.2.2.1. 组成和表征

[0308] 基于当以蓖麻油作为唯一的油类型配制时NE的物理稳定性, 我们用相同的组分配制了NC。制剂中的多种参数进行了变化, 诸如PLGA分子量以及在水相和有机相中使用的表面活性剂的浓度和类型 (表12)。

[0309]

制剂					有机相中的 表面活性剂			水相中的 表面活性剂	
	PLGA		他克莫司	蓖麻油	吐温80	Cremophor EL	Lipoid E80	Solutol	PVA
	W (kDa)	(W/V %) ^a	(W/V %) ^a	(W/V %) ^a	(W/V %) ^a	(W/V %) ^a	(W/V %) ^a	(W/V %) ^a	(W/V %) ^a
NC-1	50	0.6	0.05	1.05	-	0.25	-	-	1.4
NC-2	50	0.6	0.05	1.05	0.2	-	-	0.2	-
NC-3	50	0.6	0.05	1	0.4	-	-	0.2	-
NC-4	50	0.6	0.05	1	0.3	-	-	-	1.4
NC-5	50	0.6	0.1	1	0.2	-	-	0.2	-
NC-6	50	0.6	0.05	1.1	-	0.25	-	0.2	-
NC-7	50	0.6	0.05	1.1	-	0.5	-	0.2	-
NC-8	50	0.6	0.05	0.9	-	-	0.3	0.5	-
NC-9	50	0.6	0.07	0.9	-	-	0.3	0.5	-
NC-10	50	0.6	0.1	0.9	-	-	0.3	0.5	-
NC-11	50	0.6	0.1	1	-	-	0.3	0.2	-
NC-12	50	0.6	0.1	0.9	-	-	0.5	0.5	-
NC-13	50	0.6	0.1	1.2	-	-	0.3	0.5	-
NC-14	50	0.6	0.1	0.9	-	-	0.3	0.25	-
NC-15	4.5	0.6	0.1	0.9	-	-	0.3	0.5	-
NC-16	7.5	0.6	0.1	0.9	-	-	0.3	0.5	-
NC-17	17	0.6	0.1	0.9	-	-	0.3	0.5	-
NC-18	100	0.6	0.1	0.9	-	-	0.3	0.5	-
NC-19	100	0.6	0.1	1.2	-	-	0.3	0.5	-

[0310] 表12.不同NC制剂的组成。

[0311] 选择最稳定的制剂进行进一步表征(表13)。除了用PLGA 100KDa配制的NC-18之外,所有NC都用PLGA 50KDa配制。NC的尺寸从90nm至165nm不等,并且呈现低于或等于0.1的PDI,这突出了所形成的NC的均匀性。当改变不同的参数时,获得的包封效率(EE)差别不大,并且达到81%的最大值。

[0312]

制剂	平均直径 (nm)	PDI	EE (%)
NC-1	165.7	0.08	79
NC-2	165.1	0.1	79
NC-5	162.8	0.1	77
NC-6	155.9	0.08	81
NC-10	106.5	0.09	61
NC-18	90.8	0.08	73

[0313] 表13.选定NC制剂的性质。

[0314] 6.2.2.2.冻干

[0315] 由于PLGA NC在水性介质中的不稳定性,进行了冻干。完成了可变比例的冷冻保护剂的筛选,以便鉴定能够防止颗粒聚集的最有效的化合物。在测试的比例中考虑这些化合物在最终重构产品中的浓度以满足FDA要求。发现蔗糖和海藻糖不适于NC冻干,因为按照从1:1至1:20变化的PLGA:冷冻保护剂的比缺乏块状物。甘露醇给出块状物,然而,在重构之后,在从1:1至1:6的比观察到聚集体(表14)。

[0316]

冷冻保护剂	PLGA:冷冻保护剂的比	重构前	重构后	平均直径(nm)	PDI
蔗糖/海藻糖	1:1	无块状物	-	-	-
	1:2	无块状物	-	-	-
	1:5	无块状物	-	-	-
	1:10	无块状物	-	-	-
	1:15	无块状物	-	-	-
	1:20	无块状物	-	-	-
甘露醇	1:1	良好的块状物	聚集体	-	-
	1:2	良好的块状物	聚集体	-	-
	1:4	良好的块状物	聚集体	-	-
	1:6	良好的块状物	聚集体	-	-

[0317] 表14. 使用不同比例的多种冷冻保护剂的选定NC的外观、粒度和PDI值。

[0318] 对于选定的NC, β -环糊精是唯一的冷冻保护剂,其给出良好的块状物和在水中的快速再分散。关于加工之前和之后的尺寸相似性,以及相对低的PDI,对于NC-1制剂和NC-2制剂获得了最佳的冻干结果。对于两种NC,PLGA: β -环糊精的优选比为1:10(表15)。

[0319]

制剂	PLGA: β -环糊精的比	重构前	重构后	平均直径(nm)	PDI
NC-1	1:1	良好的块状物	大聚集体	-	-
	1:3	良好的块状物	大聚集体	-	-
	1:5	良好的块状物	大聚集体	-	-
	1:7	良好的块状物	良好	233.7	0.37
	1:8	良好的块状物	良好	225.9	0.25
	1:10	良好的块状物	良好	165.4	0.18
NC-2	1:1	良好的块状物	小颗粒	250.2	0.24
	1:3	良好的块状物	小颗粒	225.3	0.19
	1:6	良好的块状物	良好	200.4	0.19
	1:8	良好的块状物	良好	190.3	0.17
	1:10	良好的块状物	良好	170.2	0.15

[0320] 表15使用不同比例的 β -环糊精的NC-1和NC-2的外观、粒度和PDI值。

[0321] 因此,优选的制剂是NC-1和NC-2,不同之处在于在水相和有机相中使用的表面活性剂。NC-1含有Cremophor EL和PVA,而NC-2用吐温80和Solutol配制。如表16中可以看出的,在冻干工艺之后,这两种NC制剂保持了它们的约170nm的初始尺寸,具有低的PDI和70%的包封效率。

[0322]

制剂	NC-1	NC-2
冻干前		
尺寸(nm)	165.7	165.1
PDI	0.08	0.1
EE(%)	81	79
冻干后		
尺寸(nm)	165.4	170.2
PDI	0.18	0.15
EE(%)	70	71

[0323] 表16. 冻干之前和之后的优选NC性质

[0324] 形态学检查也通过TEM进行评估(图8)。所评估的两种制剂在冻干前呈现球形NC(图8A)。冻干和在水中的粉末重构不影响颗粒的物理形态,并且没有观察到聚集(图8B)。

[0325] 6.2.2.3. 离体角膜渗透实验

[0326] 为了评估他克莫司在负载于NC中时渗透角膜的潜力,进行了放射性标记的制剂的渗透实验。图9中报告的结果呈现了在局部施加负载 $[^3\text{H}]$ -他克莫司的NC和油对照24h后,角膜中 $[^3\text{H}]$ -他克莫司的量/面积单位(图9A)及 $[^3\text{H}]$ -他克莫司在接受隔室中的浓度(图9B)。在冻干并在水中重构以获得0.05%w/v的他克莫司浓度之前和之后测试两种NC制剂。[0327] 与油对照相比,所有NC处理在角膜中明显保留了更多的他克莫司(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)。接受液中的药物浓度获得了相同的结果,与对照相比明显更高(** $p < 0.01$)。此外,这些结果显示,与NC-1相比,在NC-2中负载时药物更好地渗透通过角膜(** $p < 0.01$),突出了制剂中使用的表面活性剂的重要性。冻干和水重构后的这些观察结果中没有观察到差异($p > 0.05$),表明这一过程并没有改变NC的性质。

[0328] 6.2.2.4. 稳定性评估

[0329] 当在不同温度储存一段时间时,两种选定的NC制剂显示出不同的稳定性概况。在8周之后,在37°C,NC-1的尺寸和PDI增加,并且初始药物含量(w/w)降低约20%(表17)。相反,在测试的储存时间期间,NC-2保留了其物理化学特性和初始药物含量(表18)。这些结果表明,制剂中表面活性剂的选择对于随着时间保持初始NC的性质也是至关重要的。

[0330]

	4°C			室温			37°C		
	尺寸(nm)	PDI	含量(%w/w)	尺寸(nm)	PDI	含量(%w/w)	尺寸(nm)	PDI	含量(%w/w)
初始	165.4	0.18	0.6	165.4	0.18	0.6	165.4	0.18	0.6
1周	165	0.19	0.6	164.1	0.18	0.6	167.2	0.19	0.6
2周	164	0.19	0.6	164.3	0.19	0.6	169.3	0.19	0.6
4周	170	0.20	0.6	161.7	0.22	0.6	173.2	0.23	0.6
8周	165.9	0.22	0.6	165.3	0.23	0.6	178.3	0.23	0.5

[0331] 表17. NC-1在不同储存温度随时间的稳定性结果

		4℃			室温			37℃		
		尺寸(nm)	PDI	含量 (%w/w)	尺寸(nm)	PDI	含量 (%w/w)	尺寸(nm)	PDI	含量 (%w/w)
[0332]	初始	170.2	0.15	0.5	170.2	0.15	0.5	170.2	0.15	0.5
	2周	169.1	0.11	0.5	170.1	0.14	0.5	169.3	0.13	0.5
	4周	169.9	0.11	0.5	170.8	0.12	0.5	170	0.12	0.5
	8周	169.2	0.12	0.5	172.2	0.13	0.5	171.7	0.14	0.5
	12周	167.6	0.12	0.5	172.7	0.12	0.5	173.3	0.13	0.5
	17周	178.7	0.13	0.5	171.6	0.13	0.5	178.3	0.13	0.5

[0333] 表18.NC-2在不同储存温度随时间的稳定性结果

[0334] 6.2.3NC相对于NE的离体角膜渗透的比较

[0335] 为了评估负载他克莫司的纳米载体中的一种相对于第二种纳米载体在角膜渗透方面的潜在优势,对所得的结果进行了比较。统计学分析表明,新鲜NC和冻干NC-1与NE相比,没有更多地渗透角膜($p>0.05$)。然而,如图10中可以看出的,相比不同的NE,冻干NC-2通过角膜递送更高的他克莫司的量($*p<0.05$, $**p<0.01$)。

[0336] 6.2.4. 离体毒性评估

[0337] 6.2.4.1.MTT生存力测定

[0338] 由于角膜渗透实验的成功及其随时间保留的稳定性,NC-2成为优选的制剂。为了评估其对角膜细胞的毒性,在离体猪角膜上测试了不同浓度的等渗重构NC-2,该离体猪角膜在器官培养中培养72h。如图11所示,随后进行的MTT测定表明,与对照的未处理角膜相比,在所评估的浓度,NC不影响组织的生存力($p>0.05$)。

[0339] 6.2.4.2. 上皮厚度测量

[0340] 为了评估由NC-2施加引起的角膜上皮的潜在损害,在72h孵育后对经处理的离体猪角膜进行组织学和H&E染色,随后进行上皮厚度测量。所获得的结果呈现出经NC-2处理的角膜和未经处理的对照之间的类似的上皮厚度($p>0.05$),表明经测试的NC的浓度不影响角膜形态学(图12)。

[0341] 7. 讨论

[0342] 靶向眼的免疫抑制剂药物递送系统的设计首先需要开发这样的纳米载体:其将包封免疫抑制剂,并且将具有有效渗透眼的高度选择性角膜屏障的潜力。

[0343] 在本研究中,免疫抑制剂他克莫司被包封在可生物降解的基于PLGA的纳米颗粒递送系统中,或者被负载于水包油纳米乳剂中。本研究中采用溶剂置换法(一种普遍且合适的亲脂性药物包封技术)来制备具有不同表面活性剂、PLGA MW、他克莫司和油浓度的NE、NS和NC。只有在水相中含有作为表面活性剂的PVA的NE制剂在物理上是稳定的,这可能是因为聚合物的乙酸酯基团将油滴吸附到疏水性表面上的能力,连同稳定链的强的溶剂化作用(水合作用),导致有效的空间位阻。此外,聚合物表面活性剂诸如PVA增加了水相的粘度,使纳米液滴保持悬浮。在有机相表面活性剂(吐温80)浓度上不同的选定的NE制剂呈现出所有期望的物理化学性质。事实上,纳米液滴呈现出从176nm至201nm变化的平均尺寸、低的多分散性指数(~ 0.1)和物理稳定性。在对他克莫司NE进行表征和优化之后,通过使用Franz扩散池来评估其角膜渗透(penetration)/渗透(permeation)概况。确定来自NE和油对照两者的

[³H]-他克莫司在不同隔室中的分布。结果揭示,[³H]-他克莫司穿过角膜的渗透比油对照多超过两倍(图7B)。

[0344] 这一发现是特别重要的,因为他克莫司由于其差的水溶性和相对高的分子量而难以渗透角膜上皮并且在角膜基质中积累,然而,当被负载于纳米乳剂中时,他克莫司更多地渗透到池接受液中,这表明药物渗透了构成复杂角膜组织的亲脂性部分和亲水性部分两者。

[0345] 这些结果对应于文献中先前报告的结果,表明纳米乳剂载体的使用可以改善药物通过角膜的渗透,这是由于角膜上皮吸收了胶体液滴。

[0346] 根据这些Franz池实验结果,还应该强调的是,当吐温80浓度从NE-6中的1.4%降低至NE-8中的0.4%时,角膜渗透没有显著减少,这表明可以使用最少量的这种表面活性剂,而不影响其充当渗透增强剂的潜力。

[0347] 在加速温度条件下对三种选定的NE(NE-6至NE-8)进行的物理-化学稳定性评估显示,尽管在所有测试的温度中,NE的物理稳定性由于液滴的类似的尺寸和PDI而保留,但在37℃,药物含量在8周后降低至初始他克莫司浓度的80%。这些发现表明,考虑到药物在油相和水相之间的分配,他克莫司可能由于水的存在而降解。

[0348] 因此,为了克服NE制剂在水性介质中的不稳定性,决定将所有精力集中在NP制剂的优化,该NP制剂也将在经历冻干和使用前重构。将高度亲脂性他克莫司包封到NS中的尝试没有成功。事实上,在几分钟之后,药物聚集。这种纳米载体的不稳定性可能有多种原因。首先,他克莫司对表面活性剂的亲和力可能高于对PLGA聚合物的亲和力,导致药物的胶束化而不是其包封。此外,他克莫司可能吸附到聚合物表面,导致当药物进入水相时,在平衡状态下药物聚集。

[0349] 此外,NS的小尺寸增加了Gibbs自由能,因此,颗粒趋向于自我聚集,以降低引发它们碰撞、药物释放及其结晶的表面能。因为将溶解药物的油组分,设计NC表现为是包封他克莫司的更好的解决方案。许多制剂的筛选是通过改变NC的组分及其浓度来实现的。选定的NC呈现出小于170nm的平均尺寸,低的PDI(≤ 0.1),以及从NC-10的61%到NC-6的81%变化的包封效率。因此,需要的下一步是对NC进行冻干,以便防止他克莫司和PLGA两者在水性环境中的降解。

[0350] 合适的冻干方法将具有三个需要的标准:占据与原始冷冻团块相同的体积的完整的块状物;重构的NC将具有均匀的悬浮液外观,而没有聚集体;以及最后,在水重构后,NC的初始物理化学性质应被保持。许多参数影响NC对冻干所施加的应力的耐受性,包括冷冻保护剂的类型和浓度。为了选择适当的冷冻保护剂,进行了不同浓度的许多冷冻保护剂的筛选。对于所有选定的NC,不同比例的蔗糖和海藻糖未给出不变的块状物。尽管在使用甘露醇作为冷冻保护剂之后获得了完整的块状物,但水重构并不均匀。然而,在以1:10的比的 β -环糊精的情况下,冻干是最佳的,对于六个选定的NC中的两个,既有不变的块状物、均匀的水重构,又没有物理化学特性的改变。NC-1和NC-2(区别在于水相和有机相中使用的表面活性剂)成为接下来的实验的优选制剂。形态学检查揭示了两种制剂在冻干之前和之后的高相似性,颗粒呈不变的球形形状,并且没有观察到聚集。将这两种制剂在Franz池上进一步测试,以评估它们在角膜滞留和渗透方面的潜力。确定来自NC-1、NC-2、它们各自的冻干粉末和油对照的[³H]-他克莫司在不同隔室中的分布。结果首先揭示了新鲜制剂和冻干制剂之

间在角膜滞留和渗透方面没有差异,表明这一过程没有改变NC的性质。第二,相比油对照,当在NC中时 $[^3\text{H}]$ -他克莫司在角膜中的滞留多超过两倍(图9A)。此外,相比油对照,接受液中的药物浓度高多达四倍(图9B)。第三,强调接受液中的 $[^3\text{H}]$ -他克莫司浓度在NC-1和NC-2之间的显著差异也是重要的。测试了区别在于组成它们的表面活性剂的这些制剂,以评估这些化合物对渗透增强的影响。有机相中含有吐温80并且水相中含有Solutol的NC-2比有机相中含有Cremophor EL并且水相中含有PVA的NC-1呈现出更好的角膜渗透。吐温80和Cremophor EL(均为聚氧乙烯化的非离子型表面活性剂)被假定与这些差异无关。相反,在水相中使用的PVA是具有不同作用机制的聚合物表面活性剂,如先前所述,其存在空间位阻。此外,在PLGA纳米颗粒的制剂中,PVA的疏水性部分在聚合物表面上形成网络,改变了颗粒的表面疏水性。此外,已报告,这种改变可以影响这些颗粒的细胞吸收,这是一种涉及眼渗透的机制。因此,用PVA配制的NC-1的渗透减少可能是由于当胶体药物递送系统局部施加至眼时发生角膜上皮吸收的减少。NE和NC的比较表明,两种纳米载体在实现药物渗透通过角膜方面都优于对照,但在新鲜NC和NE之间没有发现显著差异,如已经报告的。然而,冻干NC-2的角膜渗透明显优于NE。这一结果与先前公开的研究相矛盾,这些研究显示,胶体纳米载体的角膜渗透之间无差异,并且用 β -环糊精冻干颗粒减少了眼渗透。我们的结果可能是由于药物的更好的包封,导致未包埋的他克莫司和 β -环糊精之间较少的复合体形成,这通过纳米胶囊的吸收(当游离药物与冷冻保护剂复合时不会发生的过程)导致药物渗透增加。冻干的选定NC的稳定性评估显示,只有在NC-2中,初始药物含量在加速条件下随着时间的推移而保持不变。相反,在37°C在8周之后,NC-1他克莫司含量下降了17%,这可能是由于一些表面活性剂的作用可以加速药物降解。鉴于NC-2获得了更好的渗透和稳定性结果,NC-2成为未来实验的优选制剂。通过MTT实验和组织学测量两者来评估NC-2对角膜上皮的毒性。用水重构以获得不同药物浓度的冻干粉末被证明保留角膜细胞的生存力并且保持角膜上皮的完整性,这表明局部眼滴注该制剂对患者可以是安全的。

[0351] 8.地塞米松棕榈酸酯

[0352] 8.1在FDA批准的眼用油中的溶解性

[0353] 在矿物油、蓖麻油和MCT中评估了地塞米松棕榈酸酯的溶解性。

[0354]	浓度(mg/mL)	
	矿物油	1.3
	蓖麻油	33.6
	MCT	46.6

[0355] 表19:在多种油中评估的地塞米松

[0356] 由于在MCT油中获得了该药物的最高溶解度,因此选择该油进行制剂开发。

[0357] 8.2纳米载体开发

[0358] 为了选择最适合地塞米松棕榈酸酯的纳米载体,对纳米乳剂、纳米球和纳米胶囊进行了测试。最重要的参数是纳米颗粒的尺寸、PDI、包封效率和物理稳定性。第二个目标是获得高药物浓度和冻干可行性。

[0359]

成分(mg)	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14	D15	D16
DexP.	16.42	16.09	40.45	40.47	39.99	40	39.99	40.01	30.49	30.05	40.02	40.12	60	60.14	40.02	40.06
PLGA (0.15 g/dL-0.25 g/dL)	60.43	60.32	0	0	60.29	0	60.18	60.31	0	0	0	0	0	0	0	59.98
PLGA 17k Purac	0	0	0	0	0	60.39	0	0	0	0	60.14	0	60.34	60.02	60	0
吐温80	20.54	25.5	52.95	53.01	26.89	27.89	24.51	0	0	48.39	0	0	30.66	0	25	0
泰洛沙泊	0	0	0	0	0	0	0	17.49	0	0	11.44	16.14	0	12.46	0	14.46
蓖麻油	0	0	0	41.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MCT	0	25.96	45.1	0	52.35	50.27	100.1	51.03	0	0	0	50.45	50.35	50.03	49.54	49.86
丙酮(mL)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Solutol	20	20	20	20	20	20	20	20	0	20	20	20	20	20	0	0
Kolliphor RH 40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	50.2	50.2
水(mL)	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
最终体积(mL)	10	10	6	5	10	10	10	10	10	10	10	5	10	10	10	10.12
浓度(mg/mL)	1.684	1.911	7.611	8.968	N/A	4.23	N/A	4.31	3.05	3.005	4.1	8	6.35	6.15	4.26	4.1
EE(%)	58.6	82	N/A	N/A	N/A	91	N/A	98	N/A	N/A	N/A	N/A	92.5	96	84	92
新鲜制剂	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14	D15	D16
尺寸(nm)	99.49	121.1	108.4	113.9	149	127.2	167.9	156.4	144.8	66.78	111.8	153.4	140.2	151.9	126.2	140.9
PDI	0.093	0.078	0.102	0.084	0.103	0.069	0.103	0.102	0.055	0.08	0.083	0.078	0.058	0.062	0.067	0.082

[0360] 表20:纳米载体开发。

[0361] 8.3使用与PLGA成不同比例的羟丙基-β-环糊精进行冻干。

[0362] 如表21所示,空格意味着使用水进行的粉末重构不均匀。灰色格子代表用最低比例的冷冻保护剂获得的最佳物理参数。

[0363]

PLGA:HPBCD		D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D11	D12	D13	D14	D15	D16
1:2	尺寸			95.34*											
	PDI			0.123											
1:5	尺寸			140.6							333.9		333.9		
	PDI			0.133							0.418		0.418		
1:7	尺寸				293.2										
	PDI				0.244										
1:10	尺寸				251.2		159.1		172.6		184.6	191.1	180.8	139.8	142.4
	PDI				0.197		0.103		0.119		0.197	0.172	0.122	0.093	0.11
1:12	尺寸		138		208.2	217.3	150.7		172.2		176.1	177.7	172.7		
	PDI		0.092		0.139	0.233	0.091		0.103		0.175	0.111	0.093		
1:15	尺寸				180.8	194.4	147	214.8	168.8		169.1	172.8	171.8		
	PDI				0.106	0.158	0.049	0.226	0.099		0.116	0.136	0.083		

[0364] 表21:纳米乳剂的冻干。*这些冻干过程结果不可重现。

[0365] 8.4纳米球

[0366] 在几天之后,在纳米球中观察到聚集体(D11)。此外,冻干在所有测试的比例下都不起作用。因此,决定使用纳米乳剂和纳米胶囊继续。

[0367] 8.5纳米乳剂

[0368] 为了研究组分在纳米乳剂的物理稳定性中的重要性,将样品D9和D10配制成没有油和/或不同的表面活性剂。几天之后两者都呈现了相分离。

[0369] 样品D3、D4和D12获得成功,然而,D3以最低冷冻保护剂浓度冻干,但不可重现。然而,为了与冻干纳米胶囊进行比较,选择后者用于进一步研究。

[0370] 8.6纳米胶囊

[0371] D6、D8和D13至D16获得了最高的药物浓度和包封效率。以从1:10至1:15的PLGA:HPBCD的比进行的冻干也是成功的。

[0372] 8.7稳定性

[0373]

	初始	3周			6周		
	储存 温度 °C	4	25	40	4	25	40
D3							
尺寸	114.7	116.2	115.5	114.9	197.8	119	114.7
PdI	0.092	0.088	0.093	0.094	0.513	0.2	0.08
含量(%)	100	98	98	102	107	105	96

[0374] 表22:纳米乳剂的稳定性-未冻干

[0375] 如表22所示,在6周之后,液滴的尺寸和PDI发生了变化,尤其是在4°C和25°C的储存温度时,这意味着纳米乳剂不稳定。PDI值的显著升高清楚地指示液滴尺寸总体并非更加均匀,并且PDI的升高表明油滴的显著聚结,这增大了许多油滴的直径尺寸。该过程是不可逆转的。

[0376] 样品D6和D8是候选样品,因为两者在12周之后仅显示出细微的尺寸变化。

	初始	2周			4周			8周			12周		
	储存 温度°C	4	25	40	4	25	40	4	25	40	4	25	40
D6													
尺寸	153.9	155.3	153.4	156.9	160.2	155.8	161.4	160.1	160.8	172.3	165.7	161.9	177.1
PdI	0.058	0.053	0.068	0.082	0.057	0.069	0.078	0.085	0.113	0.094	0.079	0.077	0.085
含量(%)	5.34	100	99	99	98	97	99	96	97	96	96	92	93
水含量(%)	5.4	5.59	5.39	5.43	6.13	5.7	5.99	5.99	5.65	6.31	4.58	4.82	5.51

[0377]

	初始	2周			4周			8周			12周		
	储存 温度°C	4	25	40	4	25	40	4	25	40	4	25	40
D8													
尺寸	166.5	167.6	168.2	169.8	167.6	167	172.1	170.3	173.4	170.8	168	170.3	182.3
PdI	0.09	0.09	0.1	0.097	0.094	0.081	0.074	0.113	0.139	0.068	0.136	0.113	0.121
含量(%)	5.48	99	100	103	99	97	97	99	97	95	92	95	93
水含量(%)	5.4	5.9	5.44	5.48	5.39	5.54	5.69	5.58	5.55	6.14	4.30	4.37	4.43

[0378] 表23:纳米胶囊的稳定性-经冻干和重构。

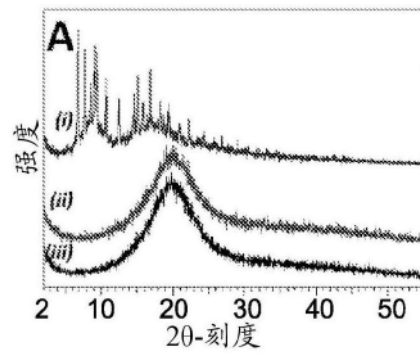


图1A

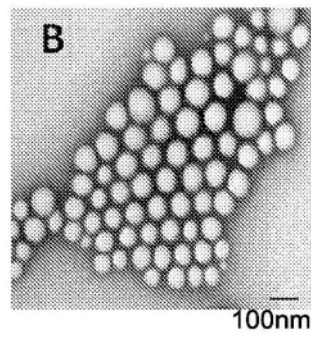


图1B

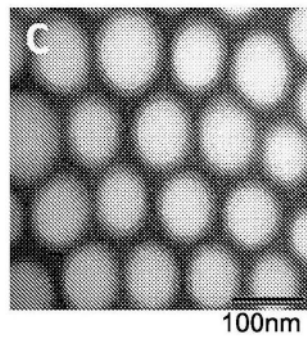


图1C

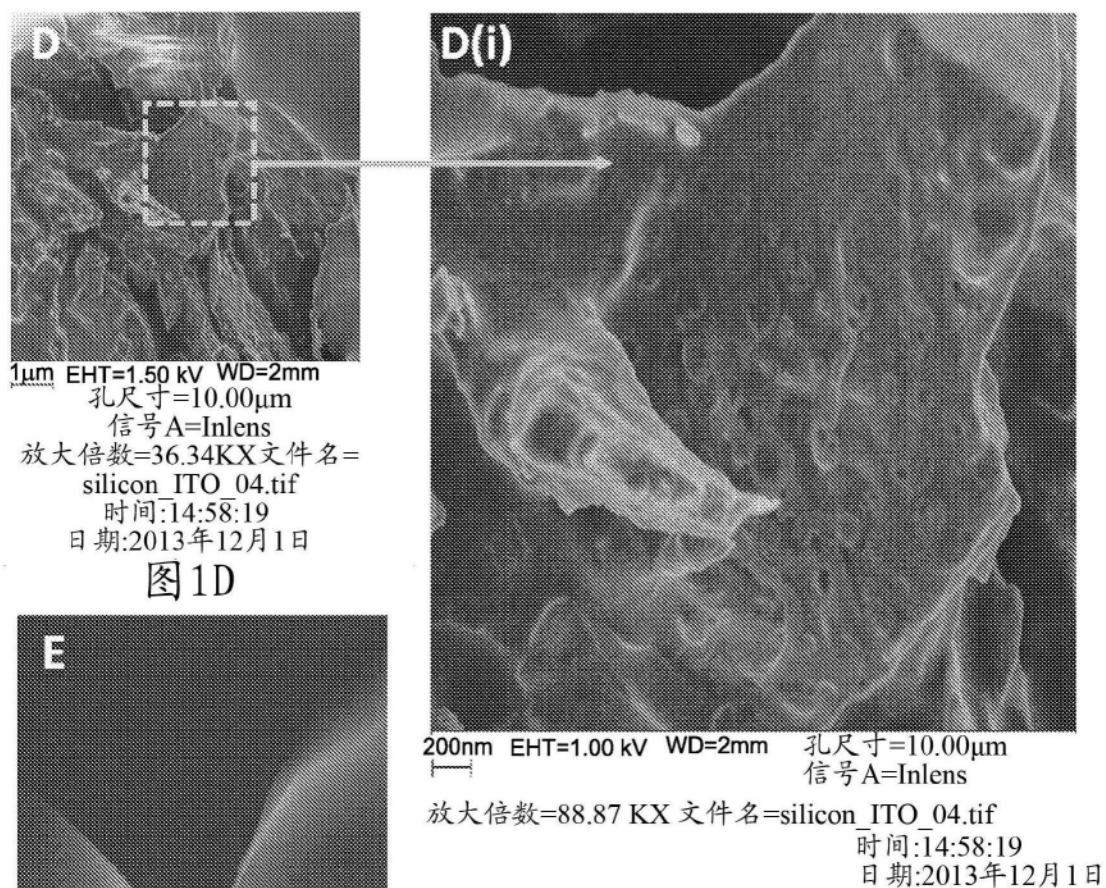


图1D

图1D (i)

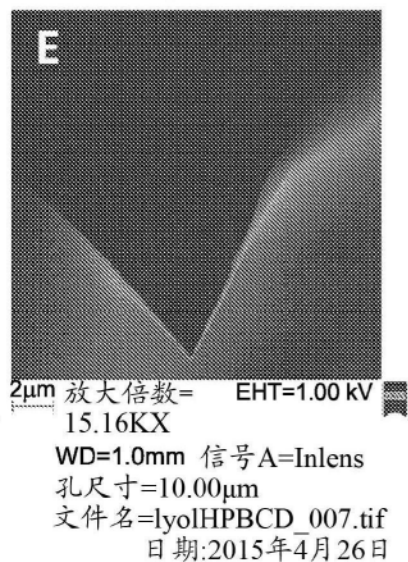


图1E

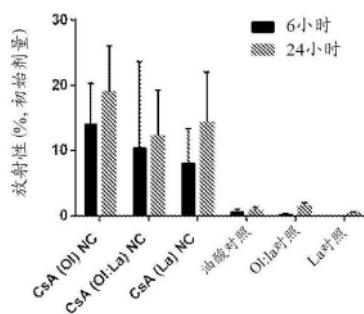


图2A

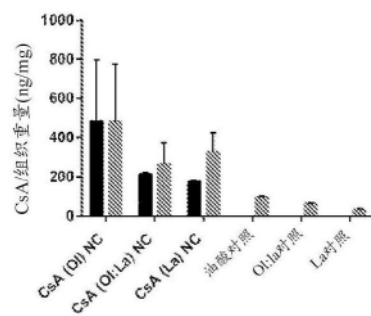


图2B

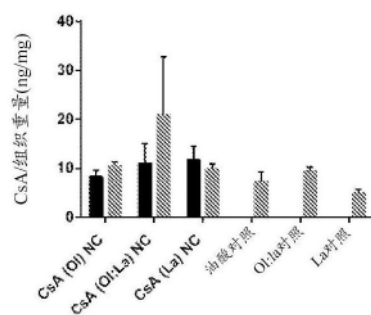


图2C

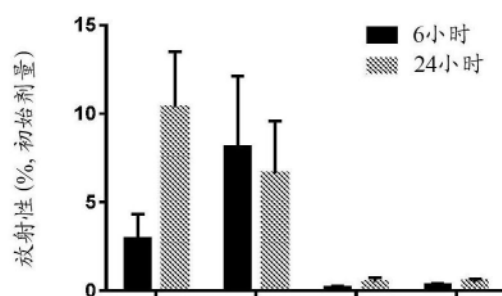


图3A

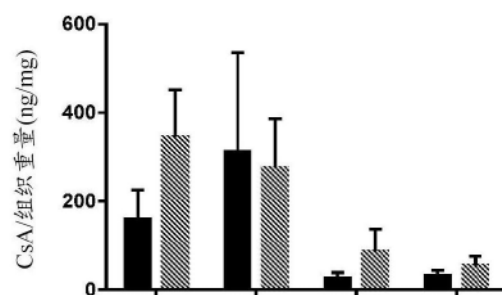


图3B

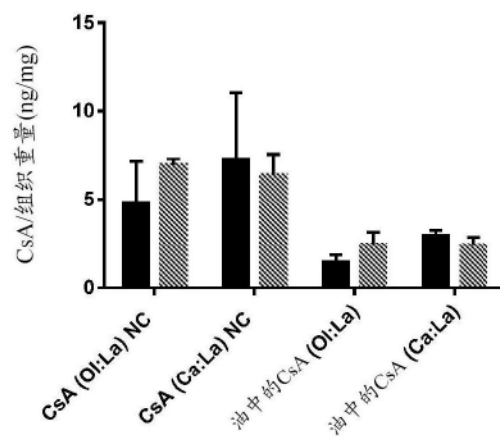


图3C

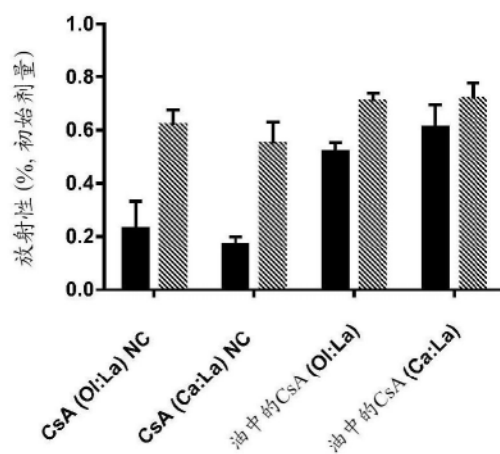


图3D

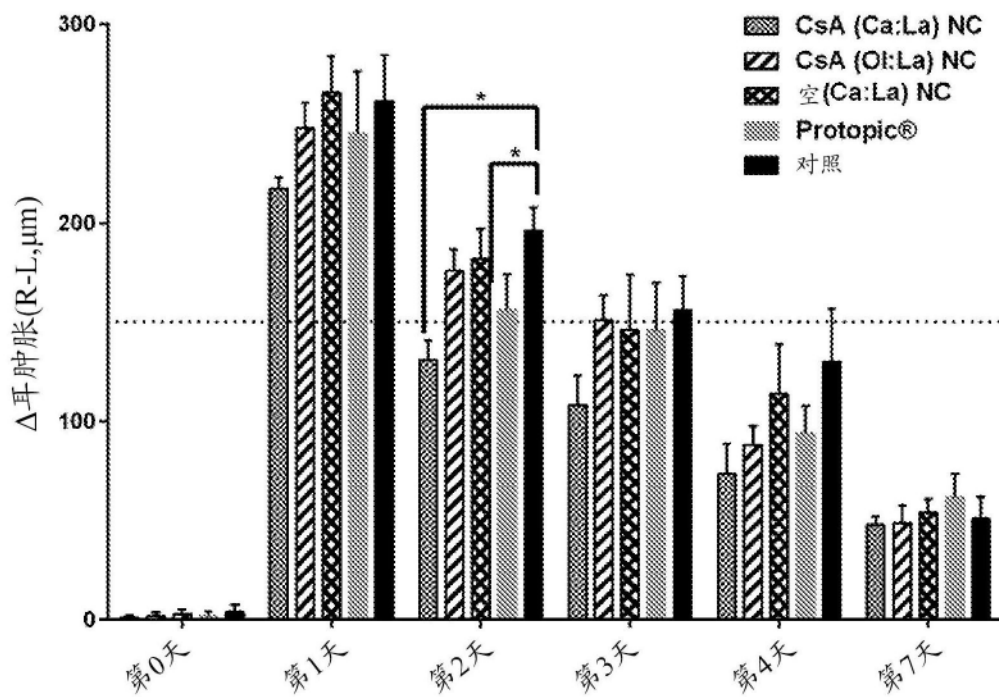


图4

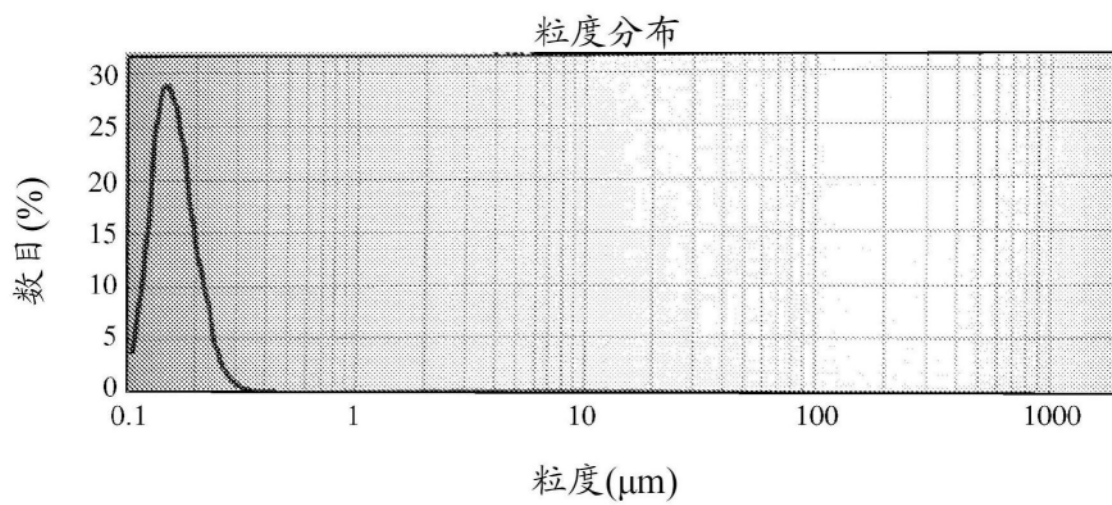


图5

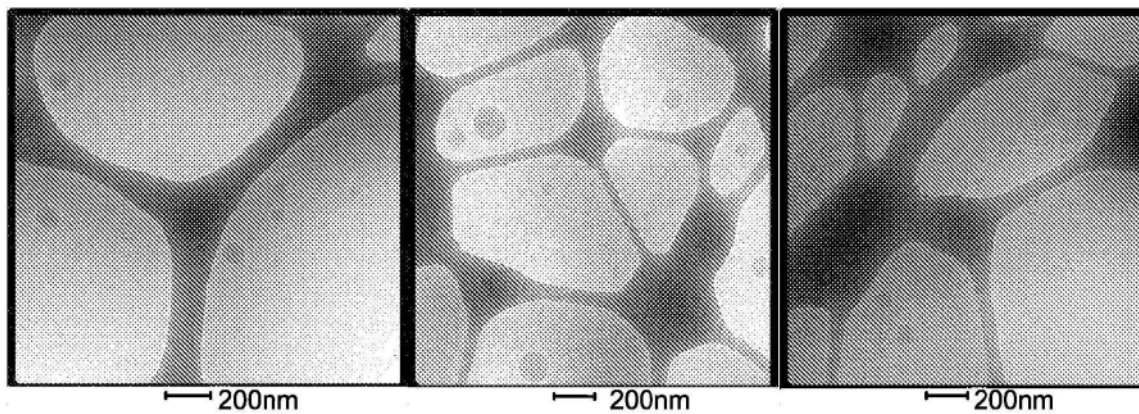


图 6A

图 6B

图 6C

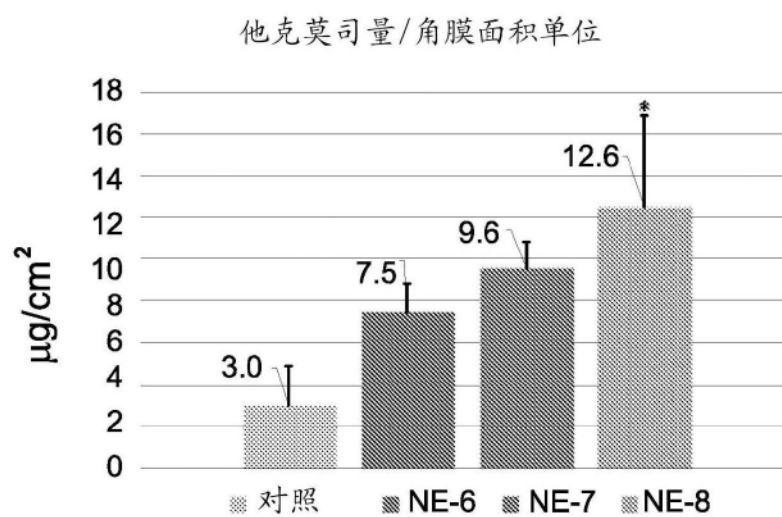


图7A

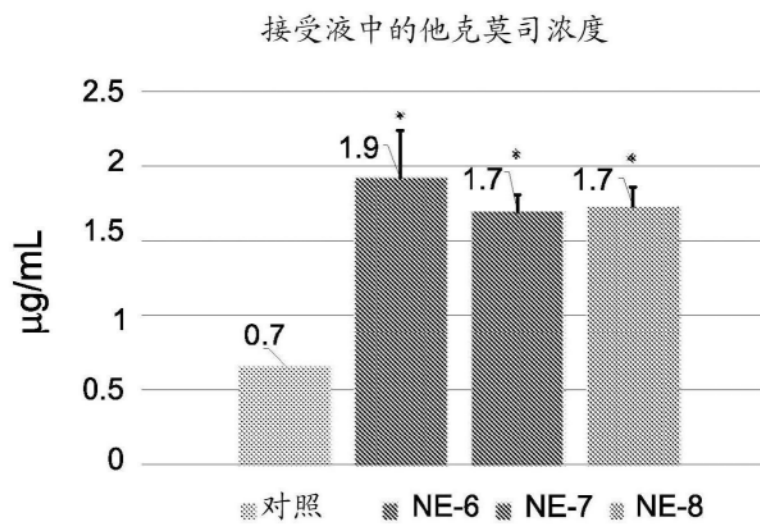
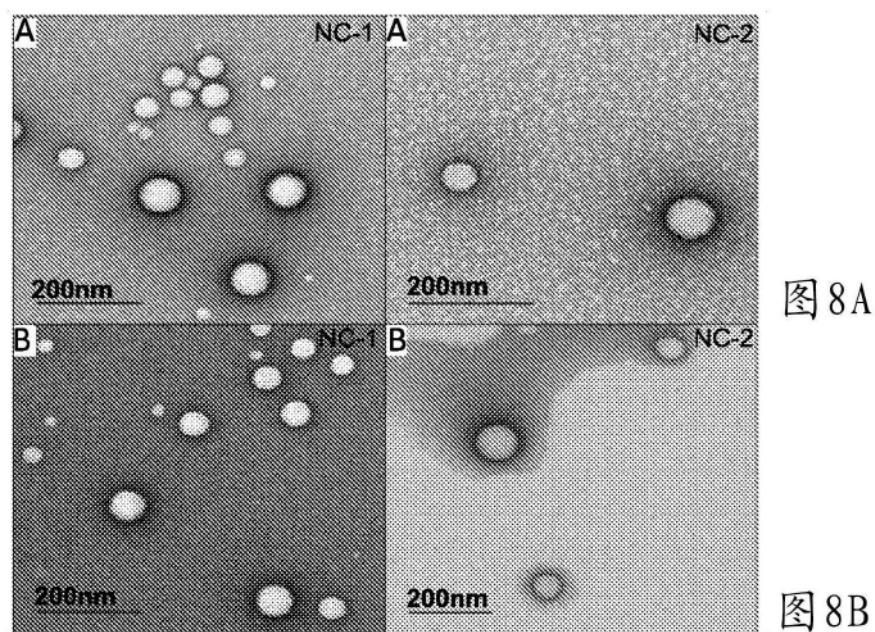


图7B



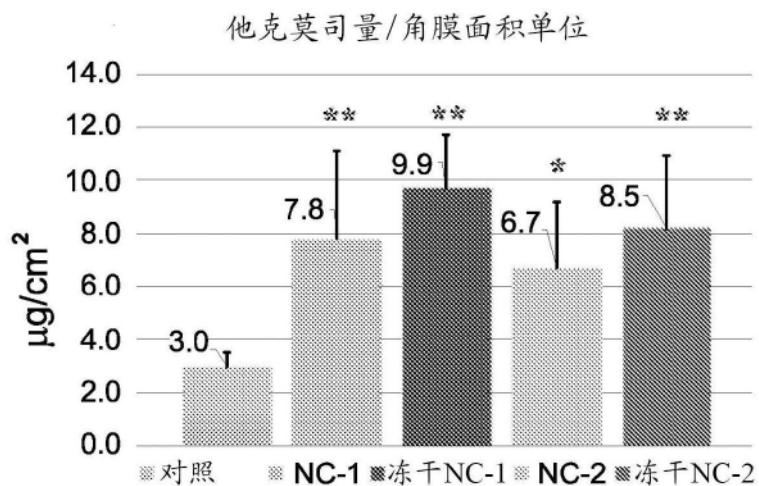


图9A

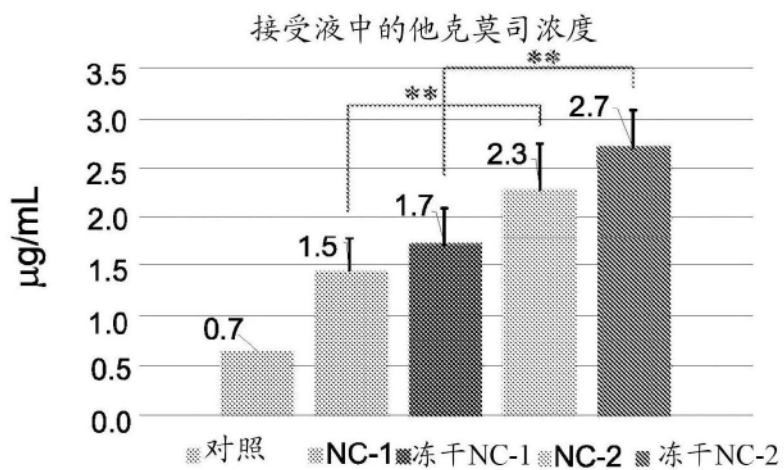


图9B

接受液中的他克莫司浓度

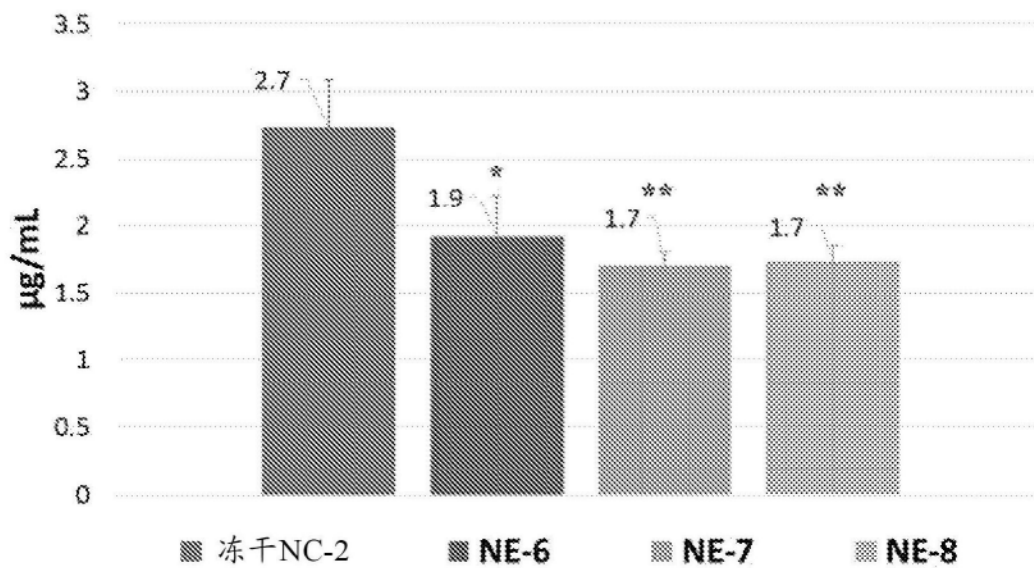


图10

MTT测定-72h

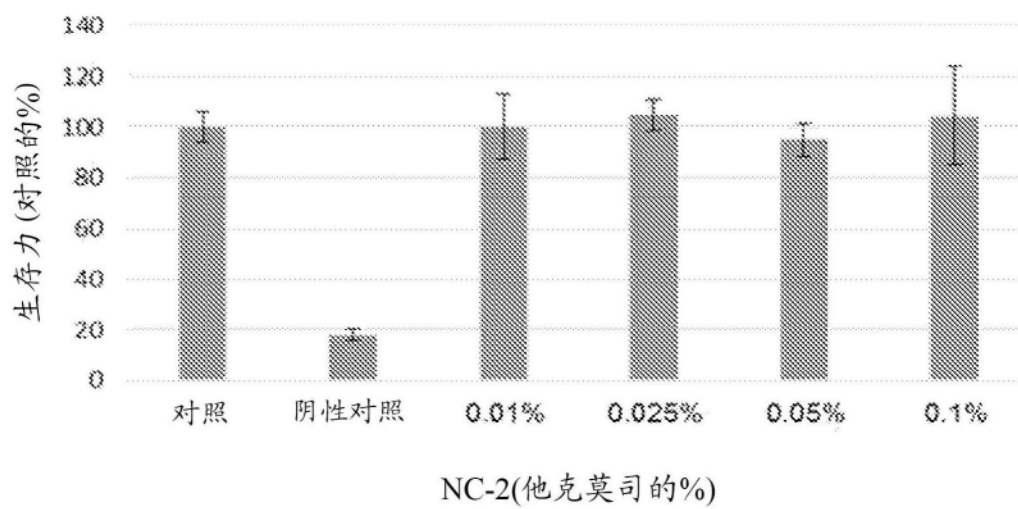


图11

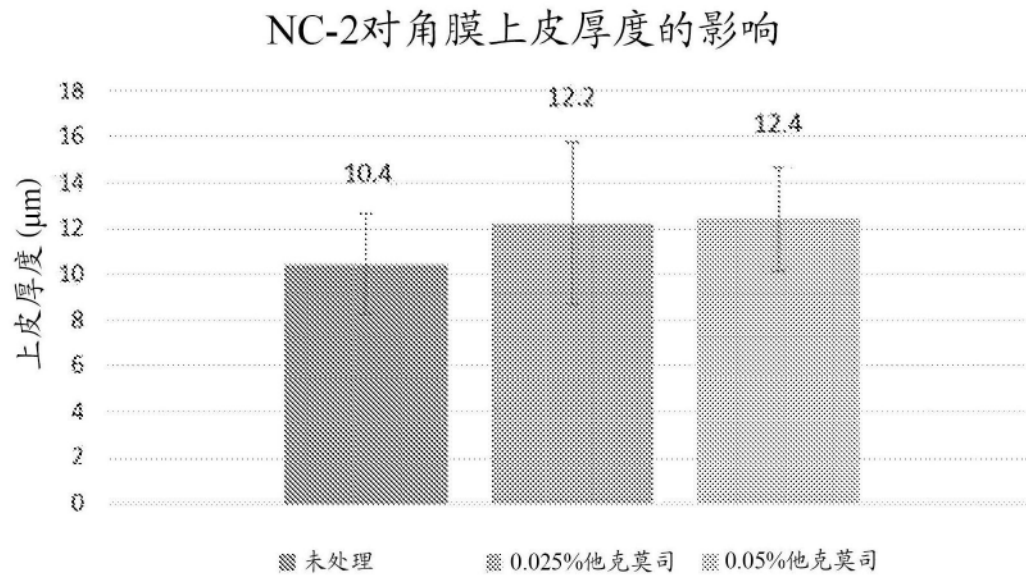


图12