



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101583379 B

(45) 授权公告日 2013. 04. 03

(21) 申请号 200780037389. 5

(22) 申请日 2007. 10. 05

(30) 优先权数据

60/849, 684 2006. 10. 05 US

60/866, 516 2006. 11. 20 US

60/956, 760 2007. 08. 20 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2009. 04. 07

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2007/080536 2007. 10. 05

(87) PCT申请的公布数据

W02008/073558 EN 2008. 06. 19

(73) 专利权人 约翰斯霍普金斯大学

地址 美国马里兰州

(72) 发明人 阿纳尔班·迈特拉 乔治·费尔德曼

萨维塔·比史特

(74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限

责任公司 11219

代理人 杨青 樊卫民

(51) Int. Cl.

A61K 47/30 (2006. 01)

(56) 对比文件

US 6579519 B2, 2003. 06. 17, 说明书第 8 栏第实施例 1, 第 4 栏第 44-46 行, 第 64-67 行第 5 栏第 10-15 行, 第 22-30 行.

US 6579519 B2, 2003. 06. 17, 说明书第 8 栏第实施例 1, 第 4 栏第 44-46 行, 第 64-67 行第 5 栏第 10-15 行, 第 22-30 行.

陈伟. 聚乙二醇修饰的共聚物纳米粒研究进展. 《生物医学工程学杂志》. 2003, 第 20 卷 (第 1 期), 第 143 ~ 147 页.

审查员 涂海华

权利要求书 4 页 说明书 11 页 附图 13 页

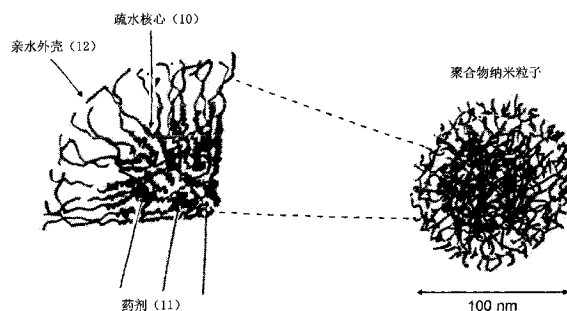
(54) 发明名称

使用优良聚合物纳米粒子的水溶性差药物的水可分散性口服, 肠胃外和局部制剂

(57) 摘要

具有疏水核心和亲水外壳的聚合物纳米粒子由: 1) 摩尔比约 50% 至约 90%, 优选 60% 的用于具体递送途径, 如口服或肠胃外的 N- 异丙基丙烯酰胺 (NIPAAm); 摩尔比约 10% 至约 30% 的水溶性乙烯基衍生物, 如乙烯基吡咯烷酮 (VP) 或醋酸乙烯酯 (VA), 或水不溶性乙烯基衍生物, 如甲基丙烯酸甲酯 (MMA) 或苯乙烯 (ST); 和摩尔比约 10% 至约 30% 的丙烯酸 (AA) 形成。所形成的纳米粒子可以任选地用 AA 中存在的反应性基团进行表面官能化, 包括 PEG 化, 或为诊断, 治疗和成像的目的结合分子部分, 如化学治疗剂, 造影剂, 抗体, 放射性核素, 配体和糖。聚合物纳米粒子优选分散在水性溶液中。聚合物纳米粒子在疏水核心中加入一种或多种药物或生物活性剂; 有时, 药物或生物活性剂可以通过反应性官能团结合至纳米粒子表面。聚合物纳米粒子能通过口服, 肠胃外或局部途径递送所述药物或生物活性剂。聚合物纳米

粒子使水溶性差的药物或生物活性剂, 或口服生物利用度差的药物或生物活性剂能够在水性溶液中配制, 从而使其能够方便地递送入体循环。



1. 制备具有高于人体体温 37℃ 的低临界溶解温度 (LCST) 的聚合物纳米粒子的方法, 包括以下步骤:

将 N- 异丙基丙烯酰胺 (NIPAAm), 丙烯酸 (AA) 和至少一种选自醋酸乙烯酯, 4- 乙烯基苯甲酸, 甲基丙烯酸甲酯, 甲基丙烯酸乙酯, N- 乙烯基吡咯烷酮, N- 乙烯基哌啶酮, N- 乙烯基己内酰胺, N- 乙烯基吡啶及苯乙烯的乙烯基单体溶解在水性流体中, 形成胶束, 其中所述 NIPAAm、所述 AA 和所述乙烯基单体的摩尔比为 50-70 : 10-30 : 30-10 ;

使所述胶束聚合 ;

从所述溶液中除去未反应的材料 ; 以及

向所述溶液中加入一种或多种生物活性剂, 并使所述一种或多种生物活性剂被包埋所述溶液中的聚合胶束内, 或被结合至所述溶液中的所述聚合胶束的表面。

2. 权利要求 1 的方法, 其中所述聚合步骤包括加入交联剂, 激活剂和引发剂中的一种或多种的步骤。

3. 权利要求 1 的方法, 其中所述聚合步骤包括向所述溶液中加入交联剂的步骤, 其中所述交联剂是 N, N' - 亚甲基双丙烯酰胺。

4. 权利要求 1 的方法, 其中所述聚合步骤包括加入为铵, 钾或钠的过二硫酸盐的引发剂。

5. 权利要求 1 的方法, 其中所述聚合步骤包括加入选自四甲基乙二胺 (TMED), 硫酸亚铁铵及其混合物的激活剂。

6. 权利要求 1 的方法, 其中所述聚合步骤在惰性气体存在下进行。

7. 权利要求 6 的方法, 其中所述惰性气体选自氩气和氮气。

8. 权利要求 1 的方法, 其中所述聚合步骤在 20℃ -80℃ 的温度范围内进行。

9. 权利要求 8 的方法, 其中所述温度在 30℃ -40℃ 的范围内。

10. 权利要求 1 的方法, 其中所述聚合物纳米粒子具有 50-100nm 的直径。

11. 权利要求 1 的方法, 其中所述一种或多种生物活性剂中至少有一种被包埋所述胶束内。

12. 权利要求 1 的方法, 其中所述一种或多种生物活性剂中至少有一种是药剂。

13. 权利要求 1 的方法, 其中至少一种水溶性差的生物活性剂选自抗肿瘤剂, 甾体化合物, 植物化学剂, 抗真菌剂, 抗病毒剂, 抗菌剂, 抗结核剂和抗炎剂。

14. 权利要求 1 的方法, 其中至少一种水溶性差的生物活性剂选自类黄酮和姜黄素类化合物。

15. 权利要求 1 的方法, 其中所述一种或多种生物活性剂中至少一种选自紫杉醇, 多西紫杉醇, 雷帕霉素, 多柔比星, 柔红霉素, 伊达比星, 表柔比星, 卡培他滨, 丝裂霉素 C, 安吡啶, 白消安, 维 A 酸, 依托泊苷, 苯丁酸氮芥, 氮芥, 美法仑, 吉西他滨, 5- 氟尿嘧啶 (5-FU), 苄基苯脲 (BPU) 化合物, 姜黄素类化合物, 环巴胺, 阿昔洛韦, 茚地那韦, 拉米夫定, 司他夫定, 奈韦拉平, 利托那韦, 更昔洛韦, 沙奎那韦, 洛匹那韦, 那非那韦, 伊曲康唑, 酮康唑, 咪康唑, 奥昔康唑, 舍他康唑, 两性霉素 B, 灰黄霉素, 环丙沙星, 莫西沙星, 氧氟沙星, 甲氧沙星, 培氟沙星, 诺氟沙星, 司帕沙星, 替马沙星, 左氧氟沙星, 洛美沙星, 西诺沙星, 氯唑西林, 苄青霉素, 甲氧苄青霉素, 红霉素, 利福平, 利福喷汀, 布洛芬, 吡罗昔康, 舒林酸。

16. 权利要求 15 的方法,其中姜黄素类化合物是姜黄素。

17. 权利要求 1 的方法,还包括在所述聚合步骤后通过用聚乙二醇 (PEG) 胺使所述聚合胶束中的 AA 官能化来对粒子进行表面修饰的任选步骤。

18. 权利要求 17 的方法,其中所述官能化步骤用交联剂通过所述聚合胶束上的 AA 的表面羧基与 PEG 或 PEG 衍生物的末端胺基间的化学结合来进行。

19. 权利要求 17 的方法,其中所述 PEG 具有 50D 至 8000D 的链长范围。

20. 权利要求 17 的方法,其中所述 PEG 胺衍生自甲氧基 PEG 胺。

21. 权利要求 17 的方法,其中所述 PEG 胺在聚乙二醇链的另一端含有官能团。

22. 权利要求 1 的方法,还包括通过使所述聚合胶束的羧基与被结合部分的胺基化学结合来对粒子进行表面修饰的任选步骤。

23. 权利要求 22 的方法,其中所述被结合部分与造影剂缔合。

24. 权利要求 23 的方法,其中所述造影剂是螯合金属复合物。

25. 权利要求 22 的方法,其中所述被结合部分是抗体。

26. 权利要求 22 的方法,其中所述被结合部分是细胞表面受体的配体。

27. 权利要求 26 的方法,其中所述细胞表面受体的配体是肽,糖或葡糖胺。

28. 权利要求 22 的方法,其中所述被结合部分是荧光团或染料或放射性核素。

29. 权利要求 23 的方法,其中所述被结合部分是掩味剂。

30. 权利要求 23 的方法,其中所述被结合部分是水溶性药剂。

31. 权利要求 30 的方法,其中水溶性药剂是吉西他滨。

32. 制备胶束组合物的方法,包括以下步骤:

将包括聚合的 N- 异丙基丙烯酰胺 (NIPAAm), 丙烯酸 (AA) 和选自醋酸乙烯酯, 4- 乙烯基苯甲酸, 甲基丙烯酸甲酯, 甲基丙烯酸乙酯, N- 乙烯基吡咯烷酮, N- 乙烯基哌啶酮, N- 乙烯基己内酰胺, N- 乙烯基咪唑及苯乙烯中的乙烯基单体的聚合胶束复溶在水性溶液中, 所述聚合胶束具有高于人体体温 37℃ 的低临界溶解温度 (LCST), 其中所述 NIPAAm、所述 AA 和所述乙烯基单体的摩尔比为 50-70 : 10-30 : 30-10。

33. 权利要求 32 的方法,还包括用链长为 50-8000D 的 PEG 胺,或用被结合部分,包括造影剂,抗体,细胞表面受体的配体,荧光团,染料,放射性核素,掩味剂或水不溶性药剂对所述聚合胶束在水性溶液中任选地进行表面官能化。

34. 权利要求 32 的方法,还包括向所述水性溶液中的所述聚合胶束中加入一种或多种生物活性剂,并使一种或多种生物活性剂被包埋在所述聚合胶束内。

35. 权利要求 32 的方法,还包括将所述溶液冷冻干燥,以得到具有被包埋生物活性剂的聚合胶束的可再分散干粉的步骤。

36. 包括以下单体的共聚物的可复溶聚合胶束,该可复溶聚合胶束具有高于人体体温 37℃ 的低临界溶解温度 (LCST) :

N- 异丙基丙烯酰胺 (NIPAAm),

丙烯酸,和

选自醋酸乙烯酯, 4- 乙烯基苯甲酸, 甲基丙烯酸甲酯, 甲基丙烯酸乙酯, N- 乙烯基吡咯烷酮, N- 乙烯基哌啶酮, N- 乙烯基己内酰胺, N- 乙烯基咪唑及苯乙烯中的乙烯基单体,

其中所述 NIPAAm、所述 AA 和所述乙烯基单体的摩尔比为 50-70 : 10-30 : 30-10。

37. 具有高于人体体温 37℃ 的低临界溶解温度 (LCST) 的纳米粒子的生物活性聚合组合物, 包括:

至少一种生物活性剂;

流体介质; 和

分散在所述流体介质中的多种聚合物纳米粒子, 所述聚合物纳米粒子包括以下单体的共聚物:

摩尔比范围为 50-70 的 N- 异丙基丙烯酰胺 (NIPAAm),

摩尔比范围为 10-30 的丙烯酸 (AA), 和

摩尔比范围为 10-30 的选自醋酸乙烯酯, 4- 乙烯基苯甲酸, 甲基丙烯酸甲酯, 甲基丙烯酸乙酯, N- 乙烯基吡咯烷酮, N- 乙烯基哌啶酮, N- 乙烯基己内酰胺, N- 乙烯基咪唑及苯乙烯中的乙烯基单体,

其中至少一种生物活性剂与所述聚合物纳米粒子缔合。

38. 权利要求 37 的生物活性聚合组合物, 其中所述生物活性剂水溶性差。

39. 权利要求 38 的生物活性聚合组合物, 其中所述水溶性差的生物活性剂在水中的溶解度小于 10 μ g/mL。

40. 权利要求 37 的生物活性聚合组合物, 其中所述生物活性剂溶于水, 并具有化学反应性官能团。

41. 权利要求 40 的生物活性聚合组合物, 其中所述水溶性生物活性剂通过化学结合与粒子表面相连。

42. 权利要求 37 的生物活性聚合组合物, 其中所述生物活性剂选自抗肿瘤剂, 甾体化合物, 植物化学剂, 抗真菌剂, 抗病毒剂, 抗菌剂, 抗结核剂和抗炎剂。

43. 权利要求 37 的生物活性聚合组合物, 其中所述生物活性剂选自类黄酮和姜黄素类化合物。

44. 权利要求 37 的生物活性聚合组合物, 其中所述至少一种生物活性剂选自紫杉醇, 多西紫杉醇, 雷帕霉素, 多柔比星, 柔红霉素, 伊达比星, 表柔比星, 卡培他滨, 丝裂霉素 C, 安吡啶, 白消安, 维 A 酸, 依托泊苷, 苯丁酸氮芥, 氮芥, 美法仑, 吉西他滨, 5- 氟尿嘧啶 (5-FU), 苄基苯脲 (BPU) 化合物, 姜黄素类化合物, 环巴胺, 阿昔洛韦, 茚地那韦, 拉米夫定, 司他夫定, 奈韦拉平, 利托那韦, 更昔洛韦, 沙奎那韦, 洛匹那韦, 那非那韦, 伊曲康唑, 酮康唑, 咪康唑, 奥昔康唑, 舍他康唑, 两性霉素 B, 灰黄霉素, 环丙沙星, 莫西沙星, 氧氟沙星, 甲氧沙星, 培氟沙星, 诺氟沙星, 司帕沙星, 替马沙星, 左氧氟沙星, 洛美沙星, 西诺沙星, 氯唑西林, 苄青霉素, 甲氧苄青霉素, 红霉素, 利福平, 利福喷汀, 布洛芬, 吲哚美辛, 酮洛芬, 萘普生, 奥沙普嗪, 吡罗昔康和舒林酸。

45. 权利要求 44 的生物活性聚合组合物, 其中姜黄素类化合物是姜黄素。

46. 权利要求 37 的生物活性聚合物, 其中所述多种聚合物纳米粒子包埋或结合一种以上的药剂。

47. 权利要求 46 的生物活性聚合组合物, 其中所述至少一种生物活性剂被包埋在所述聚合胶束内。

48. 权利要求 46 的生物活性聚合组合物, 其中所述至少一种生物活性剂被结合至所述聚合胶束的表面。

49. 权利要求 46 的生物活性聚合组合物,还包括至少一种与所述聚合物纳米粒子缔合的表面结合部分。

50. 权利要求 37 的生物活性聚合组合物,其是口服制剂的形式。

51. 权利要求 37 的生物活性聚合组合物,其是肠胃外和局部制剂的形式。

52. 用于制备聚合物纳米粒子组合物的方法,包括以下步骤:

向包括摩尔比范围为 50-70 的 NIPAAm,摩尔比范围为 10-30 的丙烯酸 (AA),和摩尔比范围为 10-30 的选自醋酸乙烯酯,4- 乙烯基苯甲酸,甲基丙烯酸甲酯,甲基丙烯酸乙酯, N- 乙烯基吡咯烷酮, N- 乙烯基哌啶酮, N- 乙烯基己内酰胺, N- 乙烯基咪唑及苯乙烯的乙烯基单体的聚合物纳米粒子中加入一种或多种药剂或生物活性剂,所述聚合物纳米粒子具有高于人体体温 37℃的低临界溶解温度 (LCST) ;以及

在所述加入步骤后回收聚合物纳米粒子。

53. 权利要求 52 的方法,还包括将所述聚合物纳米粒子表面官能化的步骤。

54. 权利要求 52 的方法,还包括将所述聚合物纳米粒子分散在水性溶液中的步骤。

55. 权利要求 1 的方法,还包括将所述溶液干燥的步骤,以得到具有被包埋生物活性剂的聚合胶束的可再分散干粉。

56. 权利要求 55 的方法,其中干燥是冷冻干燥。

57. 权利要求 1 的方法,其中所述一种或多种生物活性剂是姜黄素。

58. 权利要求 36 的可复溶聚合胶束,还包含姜黄素。

59. 权利要求 37 的生物活性聚合组合物,其中所述至少一种生物活性剂是姜黄素。

60. 权利要求 52 的方法,其中所述一种或多种生物活性剂是姜黄素。

使用优良聚合物纳米粒子的水溶性差药物的水可分散性口服, 肠胃外和局部制剂

发明领域

[0001] 本发明涉及用于药物, 包括水溶性差药物增溶或囊封的纳米粒子组合物。更具体地说, 本发明涉及具有“优良”特性, 如粘膜粘着性 (mucoadhesivity), 口服生物利用度和全身靶向多功能性 (multifunctionality for systemic targeting) 的组合物。

[0002] 发明背景

[0003] 在最近二十年里, 已有很多药物递送系统被开发用于疏水性和水溶性差的药物。这些系统都集中在克服药物的生物利用度差及随之引起的这些分子类型所固有的无效治疗。

[0004] 为解决上述与水溶性差药物的增溶有关的难题, 美国专利 No. 5, 645, 856 和 6, 096, 338 公开了制备疏水药物的载体的方法及基于该方法的药物组合物, 其中载体包括生物相容性油和用于使该油在该载体给药后在体内分散的药用表面活性剂组分。所用两亲型表面活性剂基本上不抑制油的体内脂解。这些类型的制剂可以用作许多疏水药物的载体系统, 与这些药物的已有制剂相比, 有时会导致生物利用度增加。然而, 这些制剂在体内不稳定, 药物有可能从乳剂中泄漏出来, 从而在机体内引起不必要的副作用。而且, 所用表面活性剂可能破坏生物膜, 从而导致细胞毒性。此外, 用这些乳剂系统不可能实现药物靶向。

[0005] 其它药物载体也已被使用, 如形成聚合胶束或超分子组装体的两亲型嵌段共聚物, 其中疏水部分形成核心, 亲水部分形成外壳。美国专利 5, 510, 103 描述了通过物理方法形成胶束, 并包埋疏水药物的具有亲水和疏水链段的嵌段共聚物。亲水链段优选为聚环氧乙烷, 疏水链段优选为聚 (L- 天冬氨酸 - ϵ - 苄酯), 同时优选药物为阿霉素 (Adriamycin)。

[0006] 近来, 聚合胶束被广泛用作肠胃外给药的药物递送载体。胶束药物递送载体有多个优点, 包括生物相容性, 核中的疏水药物的增溶, 促进药物载体在炎症部位的渗出的纳米大小粒径, 定位递送等。例如, 美国专利 No. 5, 955, 509 描述了聚 (乙烯基 -N- 杂环)-b- 聚 (环氧烷) 共聚物在含有药物制剂的胶束中的应用。这些共聚物对环境中的 pH 变化起反应, 并可用来在较低 pH 值条件下递送治疗性化合物。这些聚合胶束在生理 pH 下保持完整, 但暴露于 pH 较低的环境, 如在肿瘤组织中时将释放其内容物。

[0007] 文献中报道了许多形成胶束的具有非离子和 / 或带电荷疏水和亲水链段的两亲型共聚物。例如, 美国专利 No. 6, 322, 817 公开了由丙烯酸单体 N- 异丙基丙烯酰胺, N- 乙基吡咯烷酮和马来酸的 PEG 化单酯构成的交联聚合胶束的注射用制剂。据报道, 这些聚合物纳米粒子溶解了紫杉醇, 并通过肠胃外给药将该药物递送至肿瘤组织。然而, 据报道, 这些粒子仅适用于通过静脉内途径递送。而且, 报道的共聚物中作为组分之一的氰基丙烯酸烷基酯的使用可赋予该制剂毒性, 并不适合在体内应用。

[0008] 一个美国专利 No. 6, 555, 139 公开了疏水药物与糊精, β - 环糊精组合进行微流化或湿法微粉化 (wet-micronization) 的方法。该专利指出, 微流化方法促进了微溶性但高渗透性药物的平均粒度的减小, 并产生了光滑的胶乳样微混悬剂。可膨胀聚合物与不溶性亲水赋形剂的掺和物用该微混悬剂制粒产生的基质在紧压后均匀消蚀 24 小时。然而, 与

这些微流化系统有关的问题是,每一分子的药物都需要一分子的 β -环糊精,这导致大量的该化合物随药物一起给药进入机体内。而且,药物从 β -环糊精中泄漏,以及 β -环糊精-药物复合物的较差的生物利用度可能导致副作用。最后,高至直径 500nm 的粒度是限制其用于药物递送目的的原因。

[0009] 另一美国专利 No. 6, 579, 519 公开了由 N-异丙基丙烯酰胺,丙烯酸和 N-乙烯基吡咯烷酮构成的非 PEG 化 pH 敏感性和温度敏感性交联聚合胶束的制剂。这些粒子的应用非常有限,并仅可用于眼表局部递送的具体目的。这是因为这些粒子的 LCST (低临界溶解温度) 低于周围的体温,并且其在体内聚集成疏水团的缘故。因此,这些粒子不适用于体循环和靶向,包括口服递送。其它类似专利有美国专利 No. 6, 746, 635 和美国专利 No. 6, 824, 791。

[0010] 另一美国专利 No. 7, 094, 810 描述了由亲水链段和疏水链段组成的制剂,其中亲水链段由聚环氧乙烷制成,疏水链段由含有至少一个侧羧基的乙烯基单体构成。更具体地说,聚合物中包括的乙烯基单体是具有侧羧基的丙烯酸或甲基丙烯酸和丙烯酸丁酯(烷基酯),其中丁基链段可以是直链或支链。因此,疏水链段是不可离子化丙烯酸丁酯(烷基酯)与可离子化(烷基)丙烯酸的混合物,其控制了聚合物的疏水性。据报道,向粒子表面伸展的聚合物的可离子化羧基决定了对 pH 的敏感性。

[0011] 虽然这些聚合物大多数可以用于生物活性剂的注射或局部递送,但目前缺乏的是能依靠其纳米级粒度和粘膜粘着性应用于口服递送的多官能两亲型聚合物。这种“优良”纳米粒子的表面反应性官能团能通过 PEG 化,配体连接或荧光团标记为全身靶向的目的进行任选的修饰,因此可用于诊断学,治疗学和成像方面的同时的生物学应用。在这里,我们描述了这种可经口服生物利用的优良聚合物纳米粒子系统。

[0012] 发明概述

[0013] 本发明涉及含有一种或多种生物活性剂,如水溶性差的药物,尤其适用于口服递送,但也可用于其它应用,包括注射用或局部制剂的交联聚合物纳米粒子。

[0014] 本发明的另一个目的是提供制备聚合物纳米粒子的方法,所述纳米粒子可以最大程度地包埋单独或与其它生物活性剂组合的水溶性差的药物。聚合物纳米粒子优选包埋一种或多种药剂。优选聚合物纳米粒子具有小于或等于 50-100nm 的平均直径,并且直径超过 200nm 的粒子小于 5%。

[0015] 本发明的另一个目的是提供制备纳米粒子的方法,所述纳米粒子具有相互交联的聚合物链,以至可以控制囊封在这些纳米粒子内的被包埋药物的释放。

[0016] 本发明的另一个目的是提供制备纳米粒子的方法,所述纳米粒子中加入了单个药物或药物的组合物,任选地,纳米粒子外表面的不同链长(50-8000D)的聚乙二醇(PEG)链与所形成的纳米粒子表面上的反应性部分化学结合。PEG 链有助于全身给药后粒子在血液中循环相对长的时间。

[0017] 本发明的另一个目的是通过将药物,或其组合物化学结合在纳米粒子表面,然后纳米粒子起经口服途径吸收的介质的作用,以增加药物的生物利用度,使水溶性的但目前口服递送对其不是一种选择的药物的递送成为可能。

[0018] 本发明的另一个目的是为制成“优良”纳米粒子,在聚合过程中使用单独或组合的羧酸,胺或丙烯酸化合物的醛衍生物或类似的乙烯基衍生物作为单体,以赋予纳米粒子多官能化特性。

[0019] 本发明的另一个目的是提供制备聚合物纳米粒子的方法,所述纳米粒子中加入了分散在水性溶液中的水溶性差的药物或药物的组合物,其不含有不需要的和毒性的材料,如未反应的单体。

[0020] 本发明的另一个目的是提供制备聚合物纳米粒子的方法,所述纳米粒子中加入了水溶性差的药物或药物的组合物,其可以用于目的为将大量的药物靶向患病部位,而其它组织仅有微量药物的体内实验,这消除了现有技术的缺点。例如,本文所涵盖的聚合胶束复合物可以用靶向部分,如荧光团,染料,造影剂,抗原,抗体,氨基酸或糖,如葡糖胺或相关碳水化合物衍生物通过用与聚合胶束缔合的 PEG 链化学结合来进行官能化,这样便使得该复合物除所述口服制剂外,还可用于要求靶向递送至特定细胞或组织类型的医学,诊断学和成像方面的应用。

[0021] 本发明的另一个目的是通过将矫味剂化学结合至胶束表面来掩盖加入聚合胶束内的某些药剂的原味,以使制剂在经口摄取时更可口。

[0022] 本发明的另一个目的是提供使用根据本发明的方法制备的加入了水溶性差的药物或药物的组合物的聚合物纳米粒子治疗起因于不希望的病原性和解剖学病症的病症的方法。

[0023] 根据本发明,制备了包括优选平均直径小于 100nm 的粒径,包埋了至少一种单独或与一种或多种其它药物组合的水溶性差的疏水药物的聚合物纳米粒子的药用组合物。这些两亲型纳米粒子可以由交联聚合物制成,其主要包括下列三种特定摩尔比的作为单体加入的组分:(1) N-异丙基丙烯酰胺 (NIPAAm),加 (2) 水溶性乙烯基化合物,如醋酸乙烯酯 (VA) 或乙烯基吡咯烷酮 (VP),以使粒子外壳更亲水,或水不溶性乙烯基衍生物,如苯乙烯 (ST) 或甲基丙烯酸甲酯 (MMA),以使粒子核心更疏水,加 (3) 提供表面反应性官能团的丙烯酸 (AA)。纳米粒子表面可以任选地用 AA 提供的反应性官能团进行官能化,包括通过 PEG 化使在血液中的循环时间更长,或为治疗学,诊断学和成像方面的应用而加入其它可用于体内靶向组织的表面反应性基团。

附图说明

[0024] 图 1 图示了具有包括包埋药物 (11) 的聚合物的疏水部分的疏水核心 (10),形成向水性介质方向呈现的亲水外壳 (12) 的亲水部分的聚合物纳米粒子。纳米粒子的粒度小于 100nm,可以包含一种或多种药剂或其它生物活性剂的分子。

[0025] 图 2 图示了三个水溶性差药物的例子,其增溶能够通过包埋在本发明所实施的聚合物纳米粒子中来实现。如溶液的浊度和各药物的可见漂浮颗粒所证明的那样,游离紫杉醇 (A),游离雷帕霉素 (C) 和游离利福平 (E) 基本上不溶于水。相比之下,等量的纳米粒子囊封的紫杉醇 (B),纳米粒子囊封的雷帕霉素 (D) 和纳米粒子囊封的利福平 (F) 在水中形成了透明溶液。

[0026] 图 3 显示了低临界溶解温度 (LCST) 与纳米粒子中的组分的重量百分比,尤其是 NIPAAm 的摩尔比的函数关系。在图示的例子中,给出了三种各自具有不同摩尔比的 NIPAAm (NP),乙烯基吡咯烷酮 (VP) 和丙烯酸 (AA),包括聚合物纳米粒子的不同纳米粒子组合物。纳米粒子的平均粒度 (nm) 通过动态光散射和其它方法测量。NIPAAm 摩尔比为 90% 的组合物具有低于体温的 LCST,而 NIPAAm 摩尔比为 60% 的组合物具有高于体温的 LCST。

[0027] 图 4a 是平均直径为 50nm 或 50nm 以下 (100nm 比例尺在右下部图示) 的 NIPAAM/VP/AA 聚合物纳米粒子 (摩尔比为 60 : 20 : 20) 的透射电子显微 (TEM) 照片。图 4b 是平均直径为 50nm 或 50nm 以下 (500nm 比例尺在右下部图示) 的 NIPAAM/MMA/AA 聚合物纳米粒子 (摩尔比为 60 : 20 : 20) 的 TEM 照片。观察到了最低限度的多分散性。

[0028] 图 5a-c 图示了口服递送的空聚合物纳米粒子无可论证的体内毒性。使用了两种口服递送的空纳米粒子: 摩尔比为 60 : 20 : 20 的 NIPAAM/VP/AA (命名为 NVA622) 和摩尔比为 60 : 20 : 20 的 NIPAAM/MMA/AA (命名为 NMA622)。每组 4 只 CD1 野生型小鼠 (两只雄性, 两只雌性) 各自给药 500 μ L 水中的 500mg/kg 空 NVA622 或空 NMA622 纳米粒子, 每周连续给药 5 天, 共 2 周。在空纳米粒子给药期间和最后, 未见体重减轻, 行为异常或其它异常特征。在接受空 NVA622 或空 NMA622 纳米粒子的小鼠中未观察到明显 (宏观) 毒性。

[0029] 图 6 图示了用聚合物纳米粒子囊封紫杉醇 (纳米紫杉醇) 进行的体外细胞存活率 (3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基溴化四唑鎓或 MTT) 测定, 并与游离紫杉醇比较。在图示的例子中, 摩尔比为 60 : 20 : 20 的 NIPAAM/VP/AA 聚合物纳米粒子被用于紫杉醇囊封。三种人胰腺癌细胞系 (XPA-1, BxPC3 和 PANC-1) 与浓度渐增 (1, 10, 20, 50 和 100nm) 的游离紫杉醇 (黑色条) 或等量的纳米紫杉醇 (灰色条) 一起孵育 48 小时。在各条件下还包括作为对照的与将所述剂量的纳米紫杉醇囊封所需要的量等量的空聚合物纳米粒子 (白色条) 和与将所述剂量的游离紫杉醇溶解所需要的量等量的溶剂 (二甲基亚砜 [DMSO], 蓝色条)。在所有三种细胞系中, 纳米紫杉醇 (灰色条) 均显示了与游离紫杉醇 (黑色条) 相比相当的体外细胞毒性。因此, 药物的纳米囊封不会引起药物活性的降低。相反地, 如预期的那样, 空聚合物的处理未显示出任何与细胞的基线对照生长 (0nm 条件下) 相比显著的细胞毒性作用。所有测定重复进行三次, 误差条表示标准偏差。

[0030] 图 7 图示了为证明聚合物纳米粒子囊封的紫杉醇 (纳米紫杉醇) 与聚合物纳米粒子囊封的姜黄素 (纳米姜黄素) 的协同作用而进行的体外细胞存活率 (MTT) 测定。三种人胰腺癌细胞系 (XPA-1, BxPC3 和 PANC-1) 与浓度渐增 (1, 2, 4, 6, 8 和 10nm) 的游离紫杉醇 (黑色条) 或等量的纳米紫杉醇 (白色条) 一起孵育 48 小时。为了测试与姜黄素的协同治疗作用, 还将细胞与游离姜黄素 (15 μ M) + 游离紫杉醇 (灰色条), 或与等量的纳米姜黄素 (15 μ M) + 纳米紫杉醇 (蓝色条) 一起孵育。如图示的那样, 在紫杉醇的任何指定剂量下, 纳米紫杉醇和纳米姜黄素的组合均显示出比单独的游离紫杉醇或纳米紫杉醇增加的细胞毒性。值得注意的是, 尤其在两种细胞系 (XPA-1 和 Panc-1) 中以较低剂量使用时, 纳米紫杉醇与纳米姜黄素的组合也表现出比游离紫杉醇与游离姜黄素的组合更好的效力, 这可能归因于纳米囊封的化合物细胞内摄取的增加。在较高剂量时, 用游离或纳米囊封的药物联合治疗表现出相等的作用。

[0031] 图 8 图示了纳米粒子囊封的利福平和游离利福平对结核分枝杆菌 (MTB) 的杀菌作用。在该实验中, MTB 在没有任何处理, 纳米囊封的利福平, 游离利福平和空纳米粒子的条件下培养两周。在未处理管和空纳米粒子管中, MTB 生长旺盛, 后者与聚合物本身无毒性的事实一致。相比之下, 在纳米囊封利福平和游离利福平管中, MTB 的生长被完全抑制。

[0032] 图 9 图示了用与聚合物纳米粒子的丙烯酸 (AA) 表面反应性官能团结合的水溶性药物吉西他滨进行的体外细胞存活率 (MTT) 测定。与水溶性差的药物被囊封在纳米粒子内不同, 水溶性药物如吉西他滨可以结合在纳米粒子表面, 这使得该化合物可适合于口服递

送。人胰腺癌细胞系 BxPC3 与剂量渐增的游离吉西他滨（黑色条），纳米吉西他滨（白色条），空聚合物（灰色条）或 PBS 溶剂（花纹条）一起孵育。UT 表示未处理。96 小时时，游离吉西他滨和纳米吉西他滨显示出相等的活性。所有测定重复进行三次，取平均值和标准偏差绘图。

[0033] 图 10 图示了口服递送聚合物纳米粒子后雷帕霉素的血中水平。将雷帕霉素囊封在包括丙烯酸 (AA) 百分比渐增的共聚合组合物的纳米粒子中。纳米粒子或者以原样给药，或者在表面 PEG 化后给药。比较了：对照 A（混悬在水中的雷帕霉素）；包括比例为 60 : 30 : 10 的 NIPAAM : VP : AA 的雷帕霉素纳米粒子（命名为 NVA631）；包括比例为 60 : 20 : 20 的 NIPAAM : VP : AA 的雷帕霉素纳米粒子（命名为 NVA622）；包括比例为 60 : 10 : 30 的 NIPAAM : VP : AA 的雷帕霉素纳米粒子（命名为 NVA613）；和包括比例为 60 : 20 : 20 的 NIPAAM : MMA : AA 的雷帕霉素纳米粒子（命名为 NMA622）。相应的囊封了雷帕霉素的 PEG 化纳米粒子 (PEG-NVA-631, PEG-NVA-622, PEG-NVA-613 和 PEG-NMA-622) 用阴影条表示。雷帕霉素以分散在水中的游离药物的形式给药 (15mg/kg)，或者以各聚合物纳米粒子制剂中等剂量的纳米囊封雷帕霉素的形式给药。本研究中每组各包括六只野生型 C57/B6 小鼠。用口服递送后 2 小时获得的样品通过 HPLC 测定血中水平。两种各自含有摩尔比为 20% 的 AA 的纳米粒子 (NVA622 和 NMA622) 在口服递送后显示出了最高的血中雷帕霉素水平。

[0034] 图 11 图示了口服递送的纳米囊封雷帕霉素在小鼠体内 24 小时的药代动力学 (PK) 数据。本研究选择了 2 小时具有最高血中水平的两种聚合物纳米粒子制剂（图 10）：NVA622 和 NMA622，其分别含有摩尔比为 60 : 20 : 20 的 NIPAAM/VP/AA 和 NIPAAM/MMA/AA。本研究每组包括六只野生型 C57/B6 小鼠。在零时给予单剂量纳米囊封雷帕霉素（等于 15mg/kg 药物），在口服给药后 30 分钟，2, 4, 8 和 24 小时从面静脉通过静脉穿刺获取血液。通过 HPLC 测定小鼠血浆中的雷帕霉素水平。各纳米粒子制剂用平均值和标准偏差（误差条）对各时间点作图。NMA622 纳米粒子具有与 NVA622 纳米粒子相比更高的曲线下面积 (AUC)（平均 AUC 分别为 26,949 对 11,684）。

[0035] 图 12 图示了纳米粒子囊封雷帕霉素经口服途径给药后 2 小时在中央和外周静脉循环中的雷帕霉素水平。囊封了雷帕霉素的 NVA622 粒子经口服途径对三只小鼠给药（剂量为 15mg/kg），在 2 小时测定中央静脉和外周静脉（面静脉）循环中雷帕霉素的水平。所有三次独立的测量中，中央静脉循环中雷帕霉素的水平与外周静脉循环中雷帕霉素的水平平均相同，这与口服递送的纳米粒子囊封雷帕霉素在血液循环中等同全身分布相一致。

[0036] 发明详述

[0037] 本文描述了被包埋入聚合物纳米粒子的单独或与两种或两种以上药物组合的水溶性差药物的药用组合物。本文还描述了结合在聚合物纳米粒子表面的水溶性药物，如吉西他滨的药用组合物。纳米粒子成形后近似球形，优选平均直径为 50-100nm 或以下的粒度。纳米粒子可以描述为两亲型和交联聚合物的胶束聚集体的纳米粒度的粒子。

[0038] 在本发明中，聚合胶束的纳米粒子通过以下步骤制备：

[0039] (i) 将 NIPAAM 和 AA 溶解在水中，形成胶束，

[0040] (ii) 加入至少一种乙烯基衍生物，其可以是水溶性或水不溶性的，但都可以溶于所述胶束中，并且可以通过自由基聚合反应聚合，

[0041] (iii) 加入适量激活剂和引发剂,它们是例如,作为激活剂的四甲基乙二胺(TMED)和硫酸亚铁铵,以及作为激活剂的过二硫酸铵,

[0042] (iv) 向所述胶束溶液中加入交联剂,交联剂优选为 N,N'-亚甲基二丙烯酰胺,

[0043] (v) 使单体在惰性气体,如氮气存在下于 30℃-40℃ 的温度下聚合 24 小时,以近似完成反应,形成共聚物,

[0044] (vi) 通过透析 3 小时除去毒性单体和其它未反应的材料来纯化共聚合胶束的纳米粒子,

[0045] (vii) 任选地通过将不同链长(50-8000D)的 PEG 胺或其它被结合分子部分化学结合至纳米粒子表面的反应性官能团,对纳米粒子进行表面修饰,

[0046] (viii) 加入一种或多种待包埋入水性溶液中所形成的聚合物纳米粒子内的生物活性剂,或将空聚合物纳米粒子冷冻干燥成干粉待用,

[0047] (ix) 将空聚合物纳米粒子的干粉复溶于水性溶液中,加入一种或多种待包埋在所述聚合物纳米粒子内的生物活性剂,

[0048] (x) 将载药聚合物纳米粒子冷冻干燥成干粉,以及

[0049] (xi) 将载药聚合物纳米粒子复溶于水性溶液中,以用于口服,注射或局部递送。

[0050] 除 NIPAAm 和 AA 外,乙烯基单体选自水溶性乙烯基化合物,如醋酸乙烯酯,4-乙烯基苯甲酸,N-乙烯基吡咯烷酮(VP)和 N-乙烯基哌啶酮,而水不溶性两亲型乙烯基化合物包括甲基丙烯酸甲酯(MMA),甲基丙烯酸乙酯, N-乙烯基己内酰胺(N-vinylcaprolactum), N-乙烯基吡啶和苯乙烯。

[0051] 在一个实施方案中,纳米粒子通过反应混合物中的单体的聚合形成。组合物具有以下摩尔比:NIPAAm,约 50%至约 90%,优选 60%用于具体递送途径,如口服或肠胃外;乙烯基单体如水溶性 VP 或水不溶性 MMA,约 10%至约 30%;和 AA,约 10%至约 30%。将单体溶解在水中,向其中加入过二硫酸铵,TEMED 和硫酸亚铁铵。还加入 N,N'-亚甲基二丙烯酰胺,以使聚合物交联。优选在惰性气体(例如,氮气,氩气等)存在下,在优选 20℃-80℃,或更优选 30℃-40℃ 的温度范围内使混合物聚合,直至聚合反应完全。聚合反应的完全可以通过 HPLC 或乙烯基质子的 ¹H NMR 根据反应混合物中单体的耗尽来确定。溶液通过透析纯化例如 2-4 个小时,以除去任何毒性单体或其它未反应的物质。在实施例 1 中,为了可能通过改变聚合物中 AA 的比例来调节口服递送的纳米粒子在胃肠道中的粘膜粘着性,用 NIPAAm,VP 和 AA 按摩尔比 60:30:10,60:20:20 和 60:10:30 制备共聚物。在实施例 2 中,制备了类似的共聚合物纳米粒子,其中 VP 用 MMA 代替,并且在该具体实施例中,所用 NIPAAm, MMA 和 AA 的摩尔比为 60:20:20。如下文将要讨论的那样,所用单体的比例也影响纳米粒子在体温下的稳定性。

[0052] 图 1 图示了本发明的一个实施方案,其显示纳米粒子具有包括包埋了药物(标记为 11)的聚合物的疏水部分的疏水核心(标记为 10),而亲水部分形成了向水性介质方向呈现的亲水外壳(标记为 12)。亦如图 1 所示,聚合物纳米粒子的粒度优选小于 100nm,并且可以包含一种或多种药剂或其它生物活性剂的分子。

[0053] 由于共聚合物制剂中 NIPAAm 的存在,纳米粒子外壳在低临界溶解温度(LCST)下从亲水实体转变为疏水实体,如在图 3 中看到的那样,LCST 可以通过改变 NIPAAm 在所用单体中的比例来调节。为使这些纳米粒子适用于体循环,纳米粒子应具有高于人体体温(约

37℃) 的 LCST。为获得高 LCST 的纳米粒子,即, LCST 在 45-50℃ 的范围内,从而使全身递送药物和纳米粒子在体温下的稳定性成为可能,要求 NIPAAm 组分以 50-70% 的最佳摩尔比使用,其余两种单体构成 100% 的剩余部分。如上文所述,其它单体或官能性部分也可以包括在内,其不影响 LCST。

[0054] 本文所述纳米粒子可以以原样用于药物递送,或者任选地,纳米粒子的表面可以通过将 AA 提供的反应性表面基团 (COO-) 官能化来进行修饰,以连接不同长度 (50-8000D) 的 PEG 胺链,或化学结合靶向部分,如配体,抗体,放射性核素,荧光团和造影剂,或加入掩味剂如阿司帕坦。如在图 10 中看到的那样,PEG 胺链的加入不妨碍观察到的药物囊封的纳米粒子的口服生物利用度。在这里,四种独立的囊封了雷帕霉素的纳米粒子制剂 (NVA631, NVA622, NVA613 和 NMA622) 经口服途径对小鼠给药,两小时时体循环中的药物水平与囊封在相应的 PEG 化纳米粒子 (PEG-NVA613, PEG-NVA622, PEG-NVA613 和 PEG-NMA622) 内的雷帕霉素进行了比较。如看到的那样,口服递送未 PEG 化纳米粒子与 PEG 化纳米粒子后的血中雷帕霉素水平相当。本领域技术人员将意识到,PEG 化通过回避固有网状内皮系统 (RES) 使纳米粒子循环时间更长,本发明中体现的“RES 回避”纳米粒子工程化不妨碍其生物利用度。

[0055] 本文公开的聚合物纳米粒子优选最大可能程度地载有药物或其它生物活性剂。药物或生物活性剂可以是水溶性差或不溶于水,但易溶于有机溶剂中的有机化合物。药物或生物活性剂以干粉的形式,或者根据药物在溶剂中的溶解度而作为在氯仿,乙醇或醚中的溶液加入到聚合物溶液中,形成光学上澄清的溶液。这些药物的例子包括但不限于抗肿瘤剂,如紫杉醇,多西紫杉醇,雷帕霉素,多柔比星,柔红霉素,伊达比星,表柔比星,卡培他滨,丝裂霉素 C,安吡啶,白消安,维 A 酸,依托泊苷,苯丁酸氮芥,氮芥,美法仑和苄基苯脲 (BPU) 化合物;植物化学剂及其它天然化合物,如姜黄素,姜黄素类化合物和其它类黄酮;甾体化合物,如天然和合成甾体,以及甾体衍生物如环巴胺;抗病毒剂,如阿昔洛韦,茚地那韦,拉米夫定,司他夫定,奈韦拉平,利托那韦,更昔洛韦,沙奎那韦,洛匹那韦,那非那韦;抗真菌剂,如伊曲康唑,酮康唑,咪康唑,奥昔康唑,舍他康唑,两性霉素 B 和灰黄霉素;抗细菌剂,如喹诺酮,包括环丙沙星,氧氟沙星,莫西沙星,甲氧沙星,培氟沙星,诺氟沙星,司帕沙星,替马沙星,左氧氟沙星,洛美沙星,西诺沙星;抗细菌剂,如青霉素,包括氯唑西林,苄青霉素,甲氧苄青霉素;抗细菌剂,如氨基糖苷,包括红霉素和其它大环内酯;抗结核剂,如利福平和利福喷汀;以及抗炎剂,如布洛芬,吲哚美辛,酮洛芬,萘普生,奥沙普嗪,吡罗昔康,舒林酸。优选组合中载有的药物占聚合物的 1% 至 20% (重量比);然而,在一些应用中,载量可以非常高。

[0056] 一般而言,将一种或多种生物活性剂,如在水性介质中溶解性差的药物,但也包括其它产生生物效应的药剂溶解在适宜的溶剂,如乙醇或氯仿中,然后加入到纳米粒子溶液中。该加入步骤可以在纳米粒子形成之前或之后进行。药物或生物活性剂与纳米粒子溶液的结合导致药物或生物活性剂被包埋在纳米粒子的疏水核心 (内部) 内。含有被包埋药物或生物活性剂的纳米粒子如果需要可以冷冻干燥,或以其它方式制成粉末形式,待之后复溶于适宜的流体介质中,用于向人或哺乳动物给药。在随后讨论的实施例 5 中,结合图 10, 11 和 12,显示了被囊封在聚合物纳米粒子内的雷帕霉素的体内口服生物利用度。

[0057] 在本发明的另一个实施方案中,溶于水但因其它原因造成经口服途径生物利用度

低的药物可以通过纳米粒子中的反应性羧基与药物上的互补官能团,如胺或硫醇基间的共价结合连接至纳米粒子的表面。与纳米粒子的结合使这些药物变得可经口服生物利用。这些化合物的例子包括但不限于抗肿瘤剂,如吉西他滨。

[0058] 通过上述方法制备的含有至少一种药物或药物与生物活性剂的组合物的纳米粒子(例如,具有被包埋药物或结合在表面的药物,甚至两者的组合物的纳米粒子)可以用于起因于各种疾病,包括但不限于癌症,炎症,感染和神经退行性病变的病理学病症的治疗。

[0059] 现在参照以下非限制性实施例对本发明进行描述。

[0060] 实施例

[0061] 实施例 1. NIPAAm, VP(水溶性乙烯基衍生物)和 AA 的交联共聚合胶束的合成

[0062] NIPAAm 与 VP 和 AA 的共聚物通过自由基聚合合成。将水溶性单体 NIPAAm, VP 和 AA 分别以 60 : 30 : 10(NVA631), 60 : 20 : 20(NVA622) 和 60 : 10 : 30(NVA613) 的摩尔比溶解在水中。在 N₂ 气氛中用过硫酸铵 (APS) 作引发剂引发聚合反应。加入硫酸亚铁铵 (FAS), 以激活聚合反应, 并确保单体聚合完全, 获得好的收率。以 NVA631 为原型例子, 在典型的实验方案中, 使用了在 10ml 水中的 62.8mg 重结晶的 NIPAAm, 30.5 μ l 新蒸馏的 VP 和 6.61 μ l AA(新蒸馏)。为使聚合物链交联, 在单体的水性溶液中加入 30 μ l MBA(0.049g/ml)。通氮气 30 分钟, 除去溶解氧。然后加入 20 μ l FAS(0.5% w/v), 30 μ l APS 和 20 μ l TEMED, 以引发聚合反应。聚合在 30°C 于氮气气氛中进行 24 小时。聚合完全后, 将总的聚合物水性溶液用 spectrapore 膜透析袋(截留值 12kD)透析过夜。然后立即将透析过的溶液冷冻干燥, 得到待以后使用的易再分散于水性缓冲液中的干粉。聚合物纳米粒子的收率大于 90%。当用其它水溶性乙烯基衍生物, 如乙烯基醇 (VA) 代替 VP 时, 制备方法仍然相同, 并且共聚物特性不变。

[0063] 实施例 2. NIPAAm, MMA(水不溶性乙烯基衍生物)和 AA 的交联共聚合胶束的合成

[0064] NIPAAm 与 MMA 和 AA 的共聚物通过自由基聚合合成。将水溶性单体 NIPAAm 和 AA 溶解在水中, 水不溶性 MMA 溶解在 NIPAAm 和 AA 的胶束溶液中, NIPAAm : MMA : AA 的摩尔比分别为 60 : 30 : 10(NMA631), 60 : 20 : 20(NMA622) 和 60 : 10 : 30(NMA613)。在 N₂ 气氛中用过硫酸铵 (APS) 作引发剂引发聚合反应。加入硫酸亚铁铵 (FAS), 以激活聚合反应, 并确保单体聚合完全, 获得好的收率。以 NMA622 为原型例子, 在制备 NMA622 的典型实验方案中, 使用了在 10ml 水中的 66.6mg 重结晶 NIPAAm, 19.4 μ l 新蒸馏的 MMA 和 14 μ l AA(新蒸馏)。为使聚合物链交联, 在单体的水性溶液中加入 30 μ l MBA(0.049g/ml)。通氮气 30 分钟, 除去溶解氧。然后加入 20 μ l FAS(0.5% w/v), 30 μ l APS 和 20 μ l TEMED, 以引发聚合反应。聚合在 30°C 于氮气气氛中进行 24 小时。聚合完全后, 将总的聚合物水性溶液用 spectrapore 膜透析袋(截留值 12kD)透析过夜。然后立即将透析过的溶液冷冻干燥, 得到待以后使用的易再分散于水性缓冲液中的干粉。聚合物纳米粒子的收率大于 90%。当用其它水不溶性乙烯基衍生物, 如苯乙烯 (ST) 代替 MMA 时, 制备方法仍然相同, 并且共聚物特性不变。

[0065] 实施例 3. 用 5kD PEG 部分对 NIPAAm/VP/AA 共聚合胶束进行表面修饰

[0066] 用上文所述详细方案制备制剂 NVA631, NVA622 或 NVA613。被用于共聚合后与 AA 结合的例示性官能化 PEG 分子为甲氧基-聚乙二醇胺(甲氧基-PEG 胺; 分子量 5000D)。甲氧基-PEG 胺与共聚物中的丙烯酸的羧基的结合通过用 EDCI 作交联剂进行。简而言之, 将

100mg 共聚物冻干粉溶解在 10ml 磷酸盐缓冲液中。向其中加入 5mM 的 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)-碳二亚胺盐酸盐 (EDCI), 搅拌 30 分钟。之后, 向共聚物溶液中加入 5mg 甲氧基-PEG 胺, 室温搅拌过夜。第二天, 将溶液用 12kD 透析膜透析 2-4 小时, 以除去任何未结合的甲氧基-PEG 胺, 然后冷冻干燥。所得纳米粒子命名为 PEG-NVA631, PEG-NVA-622 和 PEG-NVA613。同样的 PEG 化可以对 NIPAAM/MMA/AA 制剂进行, 并分别命名为 PEG-NMA631, PEG-NMA622 和 PEG-NMA613。

[0067] 实施例 4. 将水溶性差的免疫调节和抗癌药物雷帕霉素囊封的聚合物纳米粒子的制备

[0068] 已知免疫调节和抗癌剂雷帕霉素在经口服途径给药时吸收差。为研究用本发明的纳米粒子递送雷帕霉素, 按下法将雷帕霉素加入 NVA631, NVA622, NVA613 和 NMA622 纳米粒子, 或各自的 PEG 化衍生物 (PEG-NVA631, PEG-NVA622, PEG-NVA613 和 PEG-NMA622) 中: 将 100mg 各纳米粒子的冻干粉分散在 10ml 蒸馏水中, 充分搅拌以重新形成胶束。将游离药物雷帕霉素溶解于氯仿 (10mg/ml), 然后在不断涡旋和温和超声下将药物的 CHCl_3 溶液缓慢加入到聚合物溶液中。雷帕霉素被直接装入胶束的疏水核心。载药胶束然后冷冻干燥成干粉待以后使用。高至每 100mg 胶束粉末 3mg 的雷帕霉素被包埋在各共聚合胶束 (NVA631, NVA622, NVA613 和 NMA622 及相应的 PEG 化衍生物) 中, 形成载药纳米粒子溶液, 因而得到了聚合物的 3% (重量比) 的总载量。

[0069] 该实施例显示了水溶性差的药物可以被容易且有效地装载入本发明的纳米粒子中。

[0070] 实施例 5. 囊封雷帕霉素的聚合物纳米粒子的体内口服给药

[0071] 雷帕霉素是水溶性差的药物, 其口服生物利用度低。这些实验的目的是确定与水性介质中的游离雷帕霉素相比, 在本发明体现的聚合物纳米粒子中进行的雷帕霉素的纳米囊封是否可以增强口服给药后的吸收。研究了 9 组独立的 C57B6 野生型小鼠 ($N = 6$ 只小鼠 / 组)。雷帕霉素以悬浮在水中的口服游离雷帕霉素 (15mg/kg 体重), 或以等量的被囊封在 NVA631, NVA622, NVA613 和 NMA622 纳米粒子, 或各自的表面修饰的 PEG 化衍生物内的雷帕霉素的形式向小鼠给药。所有剂量均通过经口灌胃 (oral lavage) 给予。口服给药后 2 小时, 取小鼠血, 通过高效液相色谱 (HPLC) 测定血液中的雷帕霉素浓度。本研究的结果见图 10。可以看到的是, 与水中的游离雷帕霉素基本上不可检出相比, 所有供试纳米粒子均成功地向血流中递送了高水平的雷帕霉素。我们把这些口服递送后的高系统水平归之于载体聚合物的纳米粒子的粒度 (直径约 50nm), 及其由于表面上来自聚合物的 AA 组分的游离 COO^- (羧基) 的存在而增强的胃肠道粘膜粘着性。此外, 两种纳米粒子制剂 NVA622 和 NM622 在 2 小时具有最高血中水平, 我们把这归结于聚合物组成中粘膜粘着剂 AA 的最佳摩尔比。本研究还证明了 AA 的部分 PEG 化 (如在 PEG-NVA631, PEG-NVA622, PEG-NVA613 和 PEG-NMA622 中表现的那样) 不妨碍纳米粒子的粘膜粘着倾向, 这可能是因为即使在 PEG 化后也仍有足量的粘着粘膜的游离 COO^- 基团存在。因此, 这些纳米粒子有时为体循环时间更长所需要的任选 PEG 化不妨碍口服生物利用度。图 11 中的实验证实了纳米粒子囊封的药物的口服摄取迅速而完全, 在口服给药后早至 30 分钟便观察到显著高的水平。最后, 图 12 中的实验证实了纳米粒子囊封药物口服递送后在循环中的全身均匀分布, 在中央和外周循环隔室中观察到了接近相同的雷帕霉素水平。因此, 本实施例证明了本发明中体现的聚合

物纳米粒子经口服途径向体循环有效地递送一种或多种被囊封的水溶性差药物的能力。

[0072] 实施例 6. 抗癌剂的纳米粒子制剂的体外生长试验, 以及用两种独立抗癌剂的纳米粒子制剂实现联合治疗的例子

[0073] 紫杉醇是水溶性差的抗癌剂, 可以用本文所述聚合物纳米粒子增溶后分散在水性介质中。在三种人胰腺癌细胞系 (XPA-1, BxPC3 和 PANC-1) 中用被囊封在 NVA631 粒子内的纳米紫杉醇进行体外细胞存活率 (MTT) 测定。本研究的结果见图 6。如看到的那样, 在任何指定紫杉醇剂量下, 纳米紫杉醇均显示出与游离药物相等的效力, 证实纳米囊封方法不降低母体化合物的活性。两种独立治疗剂 (纳米紫杉醇和纳米姜黄素) 的结果见图 7。如看到的那样, 在任何指定紫杉醇剂量下, 纳米紫杉醇与纳米姜黄素的组合均显示出比单独的游离紫杉醇或纳米紫杉醇增加的细胞毒性。值得注意的是, 尤其在两种细胞系 (XPA-1 和 Panc-1) 中以较低剂量使用时, 纳米紫杉醇与纳米姜黄素的组合也表现出比游离紫杉醇与游离姜黄素的组合更好的效力, 这可能归因于纳米囊封化合物细胞内摄取的增加。在较高剂量时, 用游离或纳米囊封药物联合治疗表现出相当的作用。

[0074] 实施例 7. 用掩味剂阿司帕坦对聚合物纳米粒子制剂进行表面修饰, 以及将抗真菌剂灰黄霉素囊封在表面修饰的纳米粒子中

[0075] 抗真菌剂灰黄霉素水溶性差, 口服生物利用度差, 并且具有可以影响患者依从性的苦味。在本实施例中, 我们证实了“优良”聚合物纳米粒子 (说明性例子是组合物 NMA622) 可用于用掩味剂进行表面修饰, 以及灰黄霉素在这种修饰的纳米粒子中的加入。通过搅拌将 10ml NMA 622 聚合物纳米粒子的分散体 (含 100mg 聚合物) 与 500 μ l 5mM 的 EDCI 混合至完全溶解。向澄清的分散体中加入 30mg 阿司帕坦固体。溶液过夜搅拌 15-20 小时。然后将澄清溶液用截留值为 12kD 的透析袋透析 4 小时, 每小时更换一次外部的水。向透析过的溶液中加入 2mg 固体灰黄霉素, 溶液超声 30 分钟, 使完全分散, 然后在搅拌下于 50-60 $^{\circ}$ C 温和加热, 得到澄清溶液。如果需要, 重复先超声然后在搅拌下温和加热的过程, 直至溶液澄清。将室温下纳米灰黄霉素的澄清溶液冷冻干燥成干粉, 待进一步使用。

[0076] 进一步研究了室温下灰黄霉素从表面结合阿司帕坦的聚合物纳米粒子中释放的动力学。通过涡旋将 10mg 载有灰黄霉素的表面修饰 NMA622 聚合物纳米粒子的冻干粉 (命名为“纳米灰黄霉素”) 溶解在 1ml 水中。然后, 向 1ml 水中加入 10 μ l 纳米灰黄霉素的澄清溶液, 在 292nm 处测定混合物的吸光度。每 2 小时后, 将最初的纳米灰黄霉素溶液以 2000rpm 的转速离心 10 分钟, 小心从水面上吸取离心液 10 μ l, 加到 1ml 水中。在 292nm 处测定吸光度。10 小时后, 将最初的纳米灰黄霉素溶液放置过夜, 在 24 小时如上文所述测定 292nm 处的吸光度。同样在 48 和 72 小时测定吸光度。按式 $(D_0 - D_t) / D_0 \times 100$ 计算释放率 (%), 其中 D_0 是零时的吸光度, D_t 是 t 小时时的吸光度。该计算假定基本上所有从纳米粒子中释放出来的灰黄霉素都在离心过程中沉淀了下来, 并且水中灰黄霉素的浓度基本上等于零。

[0077] 结果:

[0078]	时间	OD	释放率 (%)
[0079]	0 小时	0.093	0.0
[0080]	2 小时	0.085	8.6
[0081]	4 小时	0.076	18.3
[0082]	6 小时	0.072	23.0

[0083]	10 小时	0.061	34.4
[0084]	24 小时	0.053	43.0
[0085]	48 小时	0.048	48.4
[0086]	72 小时	0.018	80.6

[0087] 本实施例证实了另一种水溶性差药物抗真菌剂灰黄霉素在所述聚合物纳米粒子中的囊封,以及通过结合至纳米粒子表面的掩味剂改变被囊封药剂的原有味道的能力。本实施例还阐明了纳米粒子装载的药物在 72 小时内的良好释放动力学,包括无任何“突释”效应。

[0088] 实施例 8. 水溶性抗癌药物吉西他滨在聚合物纳米粒子表面的结合,以及用所述“纳米吉西他滨”制剂在人癌细胞系中进行体外细胞存活率测定

[0089] 吉西他滨是水溶性化合物,因此与上文讨论的被囊封在聚合物纳米粒子的疏水核心内的水溶性差药物不同。这里,我们将吉西他滨作为水溶性药物的一个说明性例子,描述了其与聚合物纳米粒子的亲水表面的化学结合。这种结合期望通过利用被用作载体的所述聚合物纳米粒子的口服可生物利用性使吉西他滨适合于口服递送。通过涡旋将 10mg NMA622 聚合物纳米粒子分散在 10ml 水中。向澄清溶液中加入 6.5mg EDCI,搅拌 10 分钟。之后,加入 10.2mg 吉西他滨粉末,同时继续搅拌。溶液再搅拌 15-20 小时。然后在水中将澄清溶液用 12kD 透析膜透析 3 小时。随后冷冻干燥成干粉,待进一步使用。为了证明与聚合物纳米粒子结合的吉西他滨保留了抗癌作用,如实施例 6 中所述用人胰腺癌细胞系 BxPC3 进行了细胞存活率 (MTT) 测定。图 9 证实了 96 小时时纳米吉西他滨具有与游离吉西他滨相当的效力。

[0090] 尽管对本发明以其优选实施方案的形式进行了描述,但本领域技术人员将认识到,本发明可以在进行在所附权利要求的精神和范围内的修改的条件下实施。

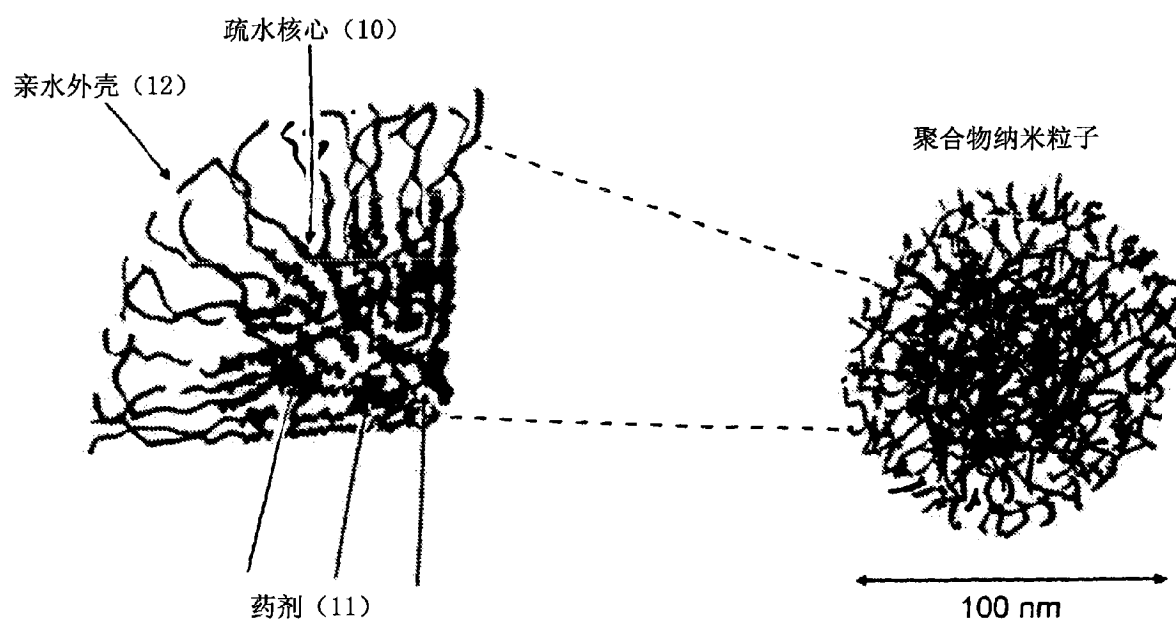


图 1

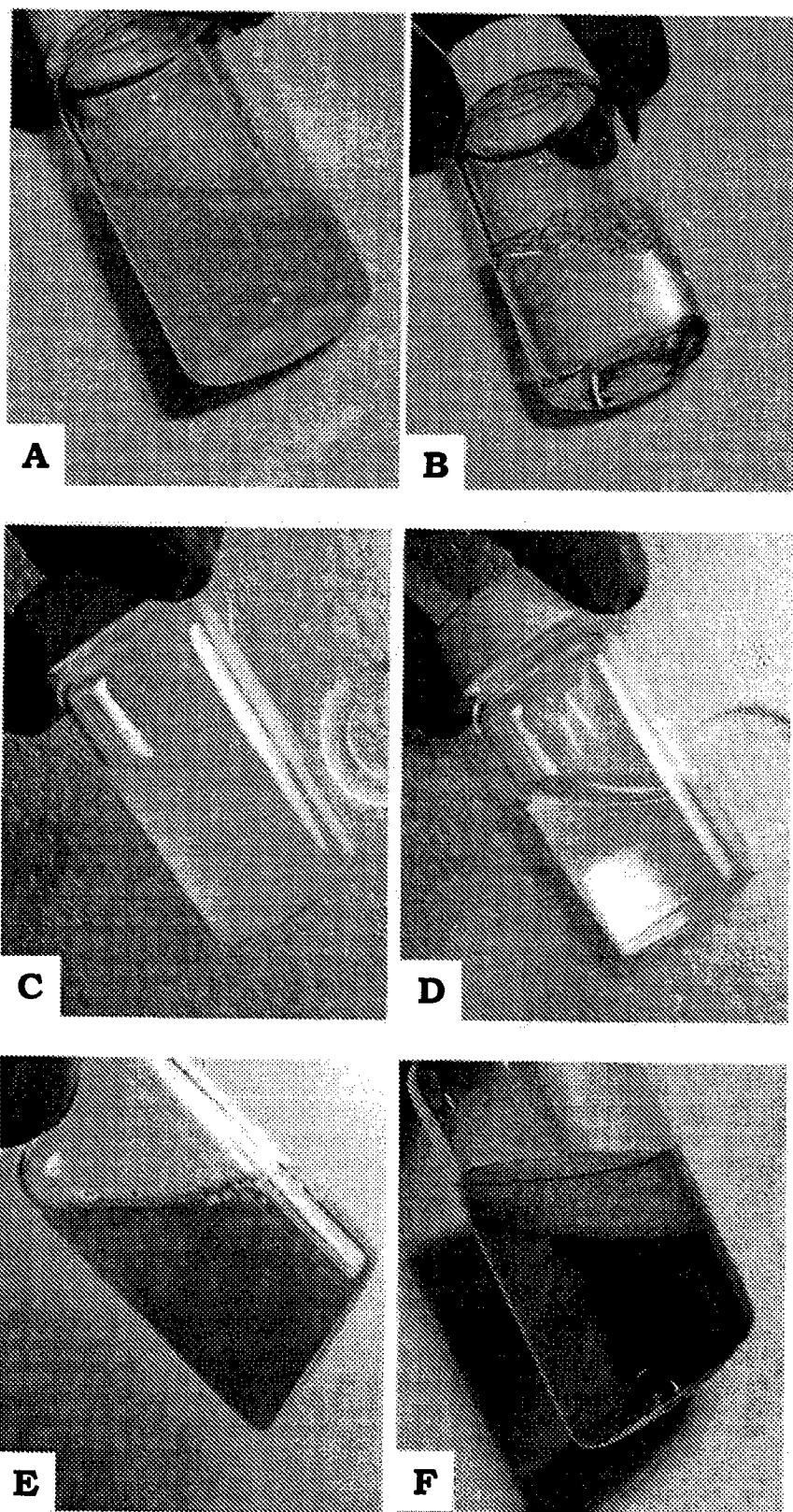


图 2

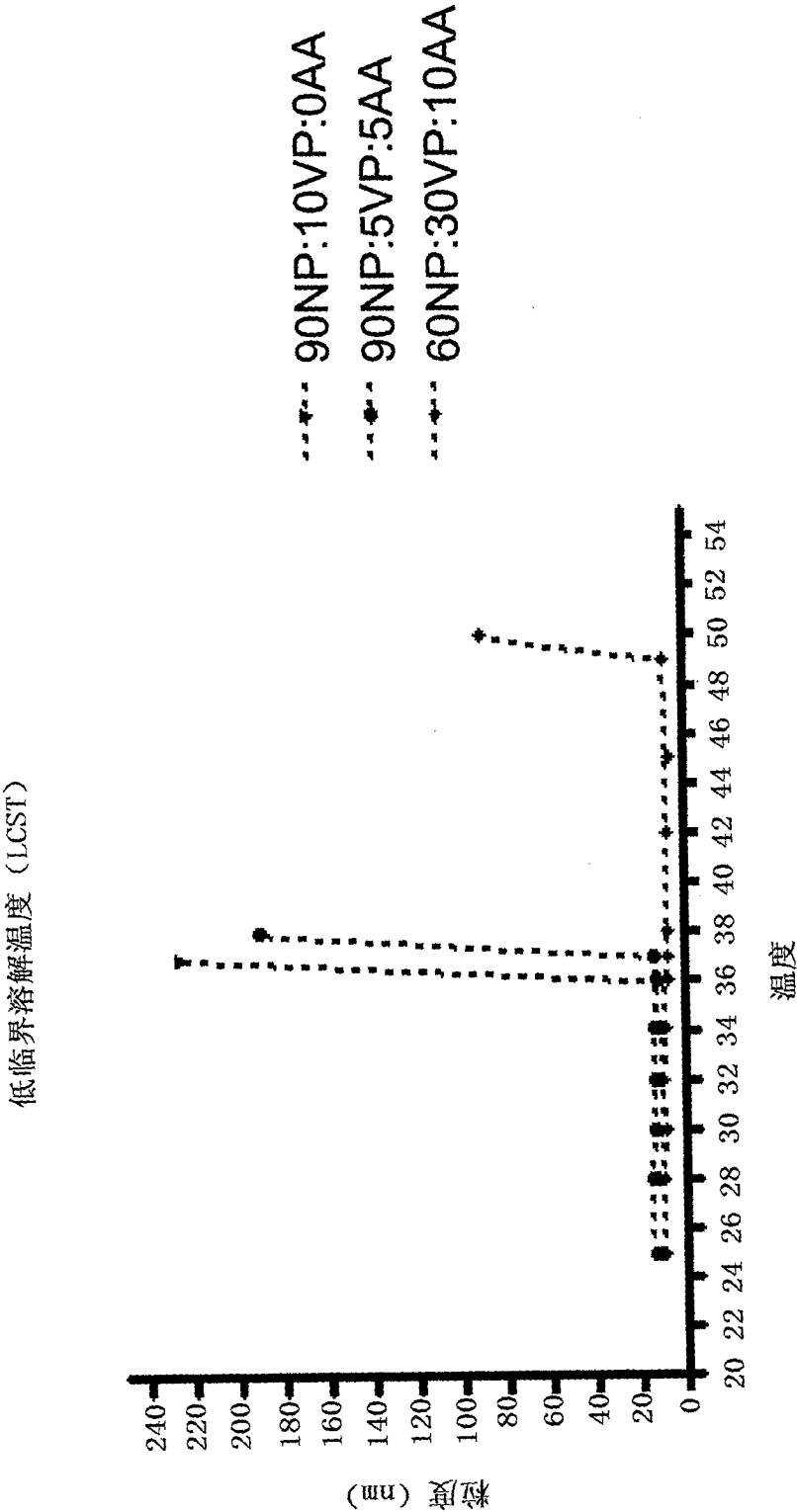


图 3

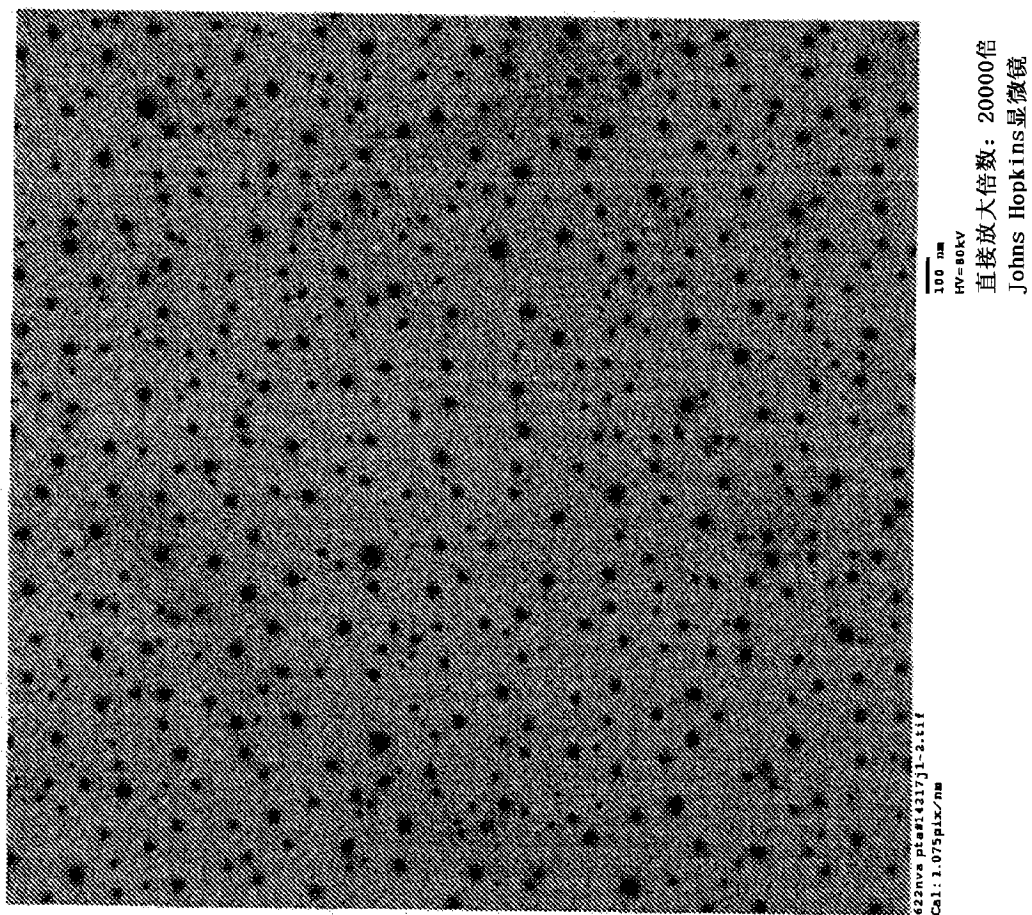


图4A

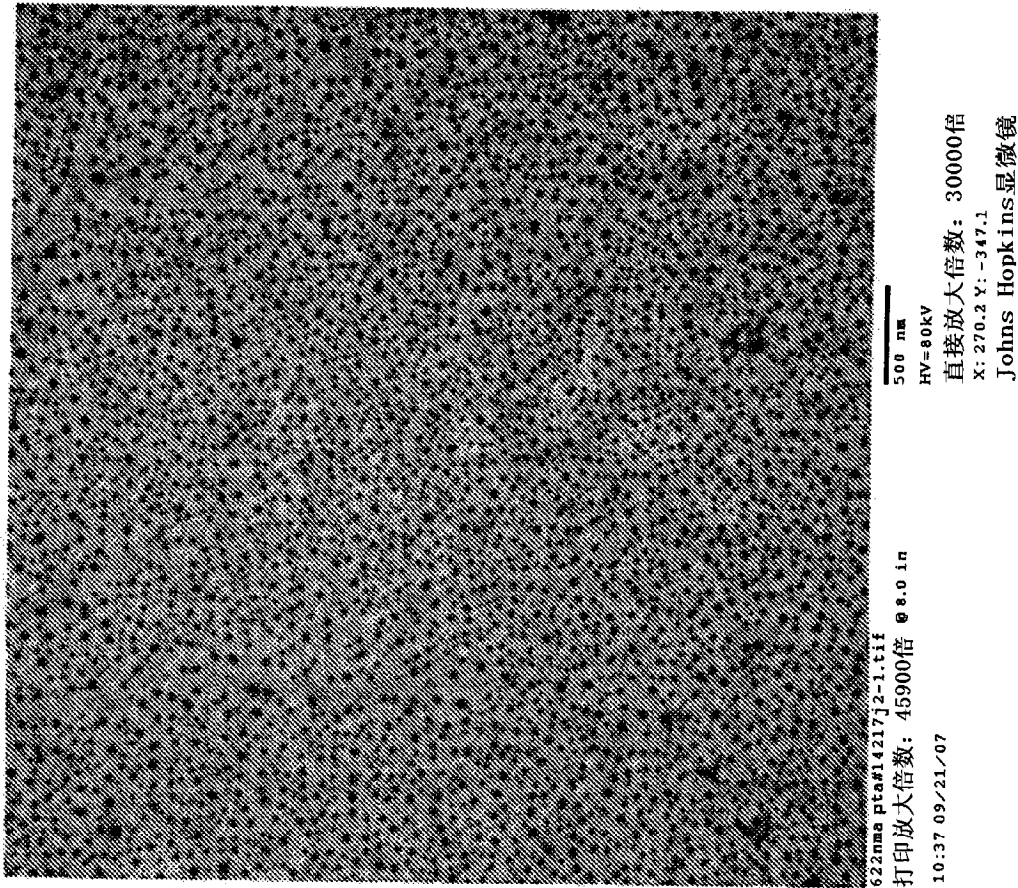


图4B

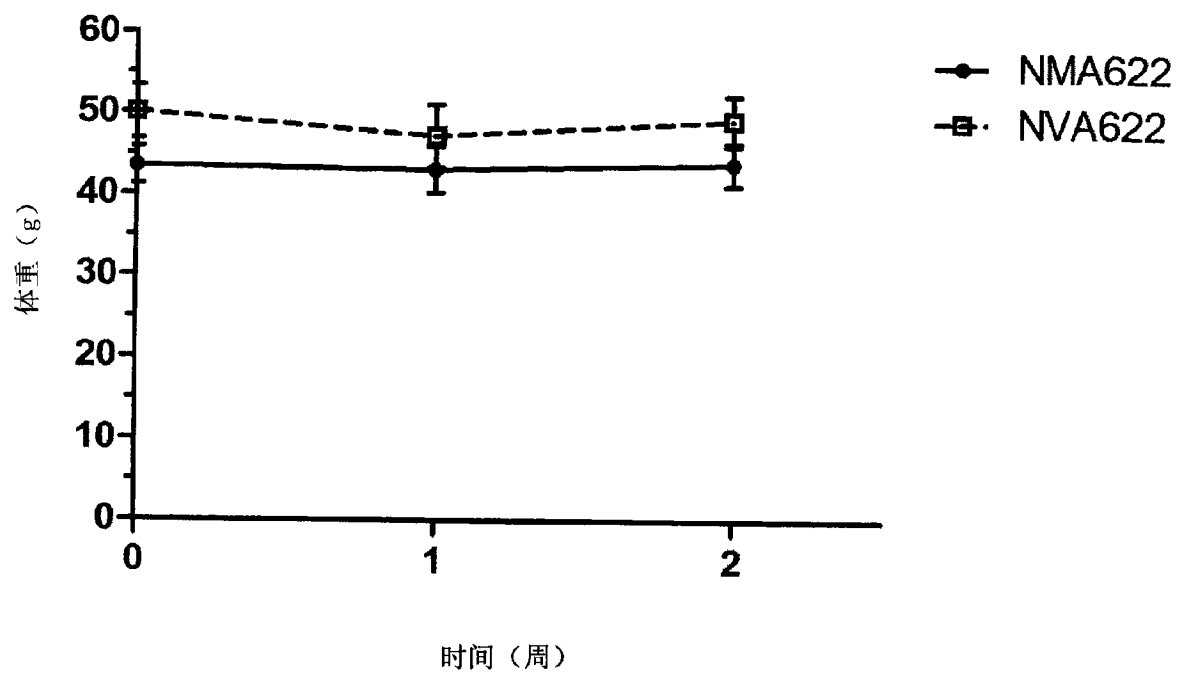


图 5

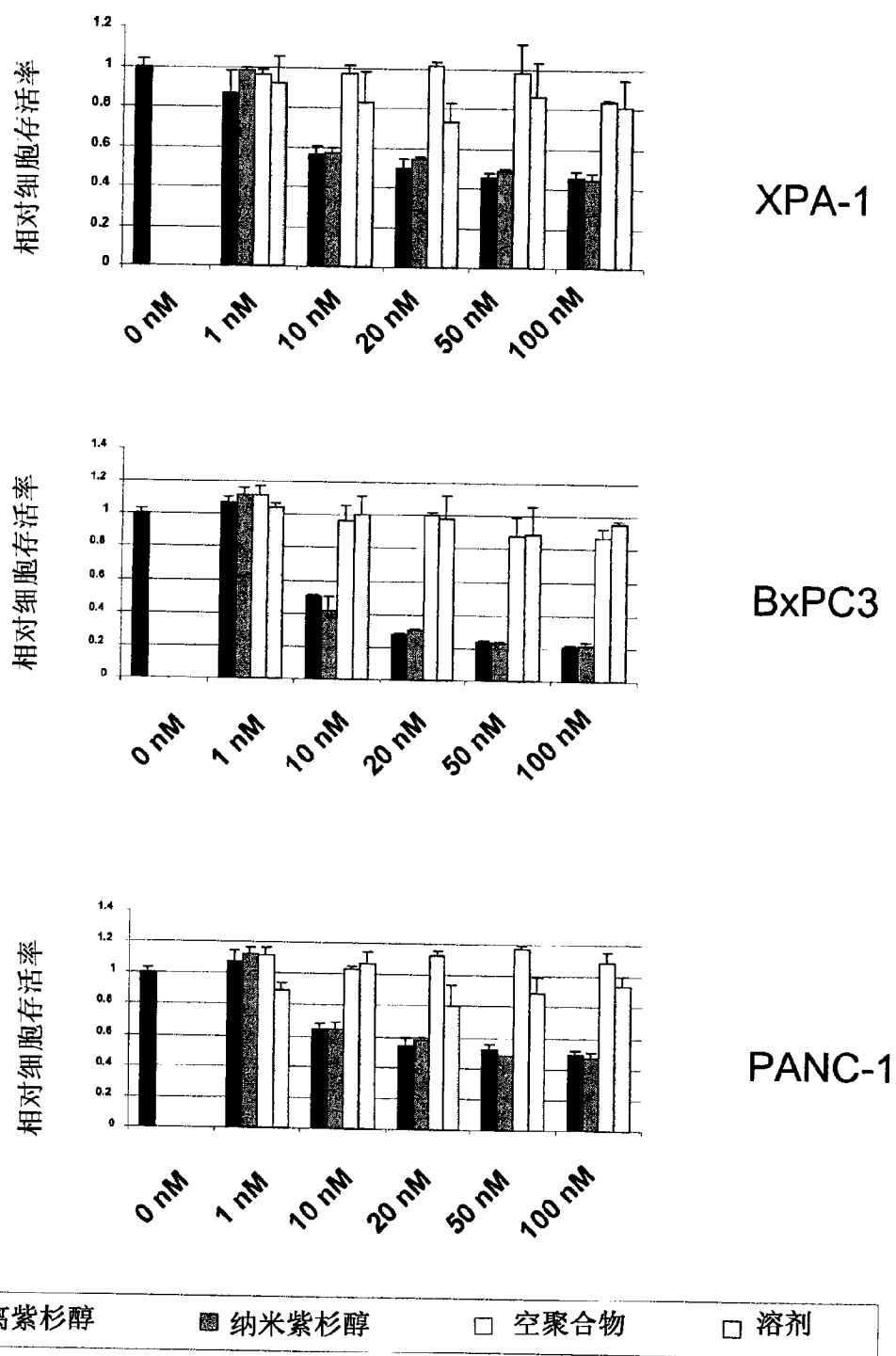


图 6

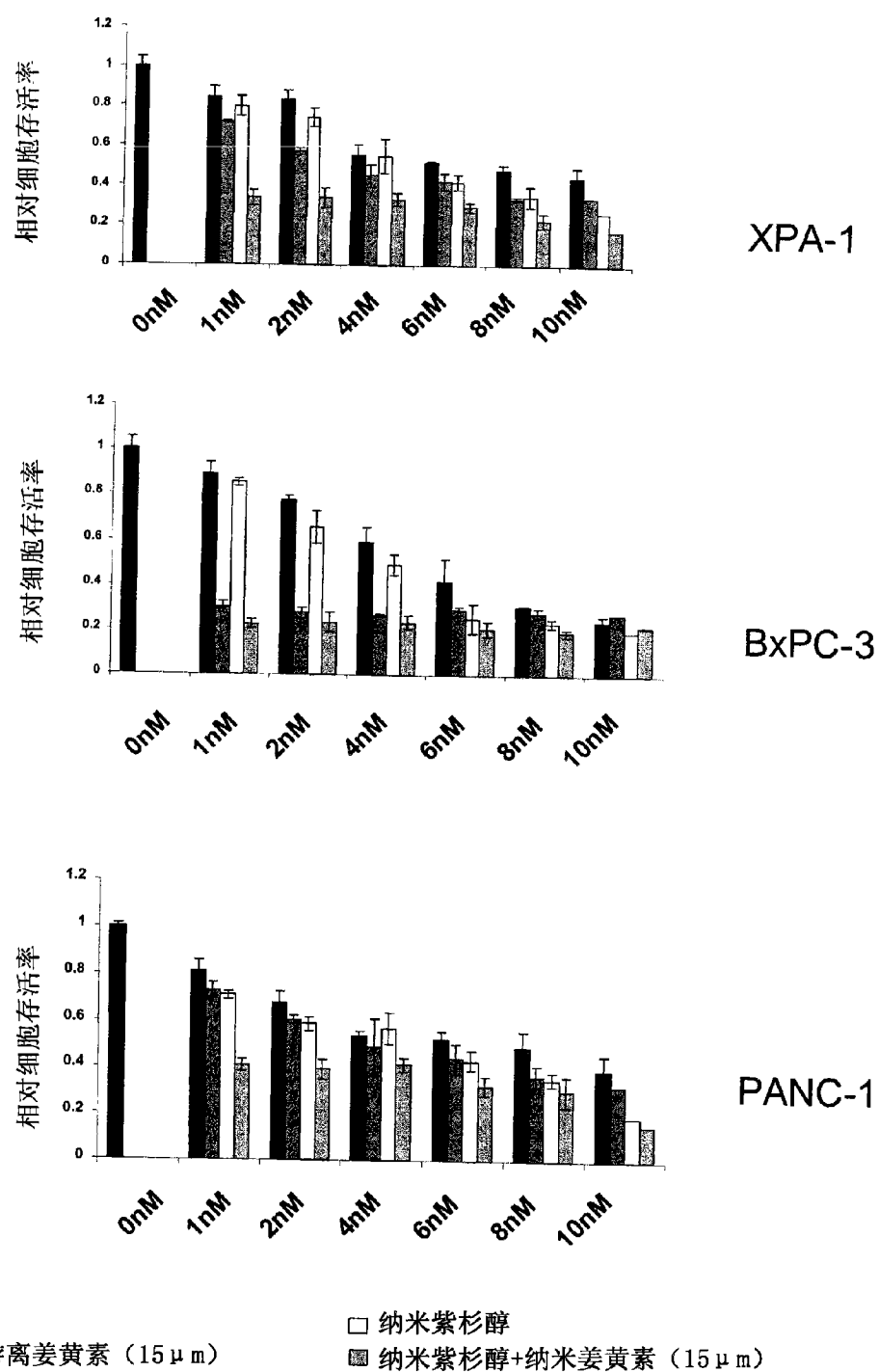


图 7

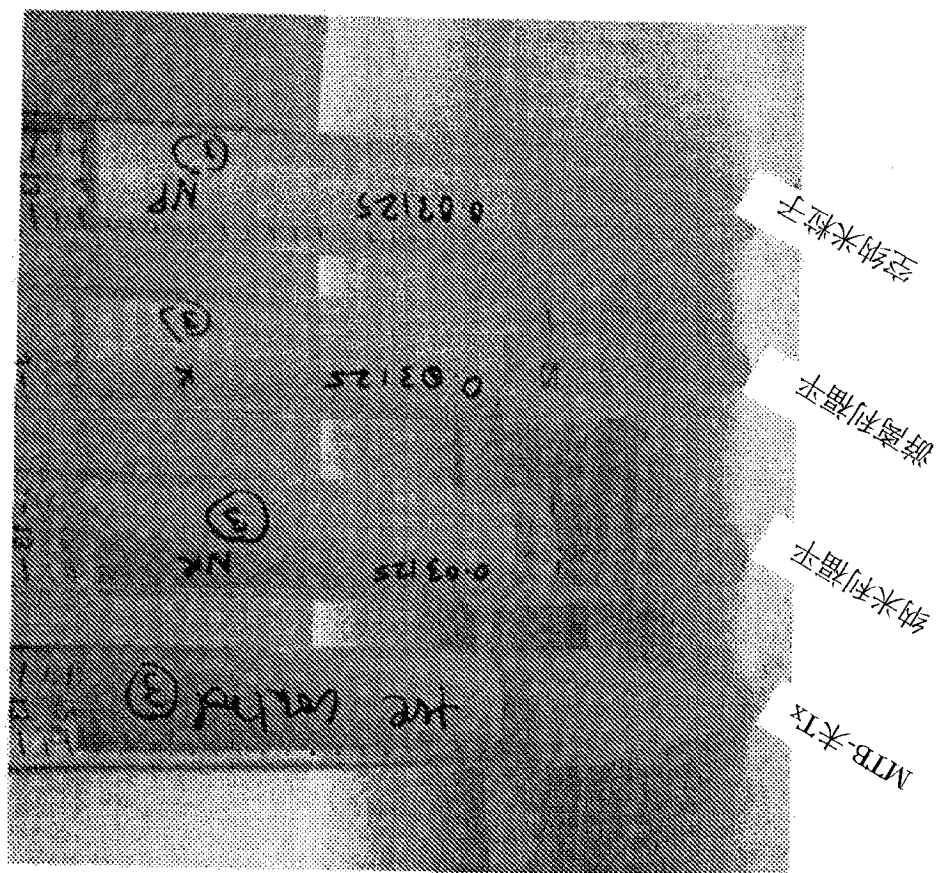


图8

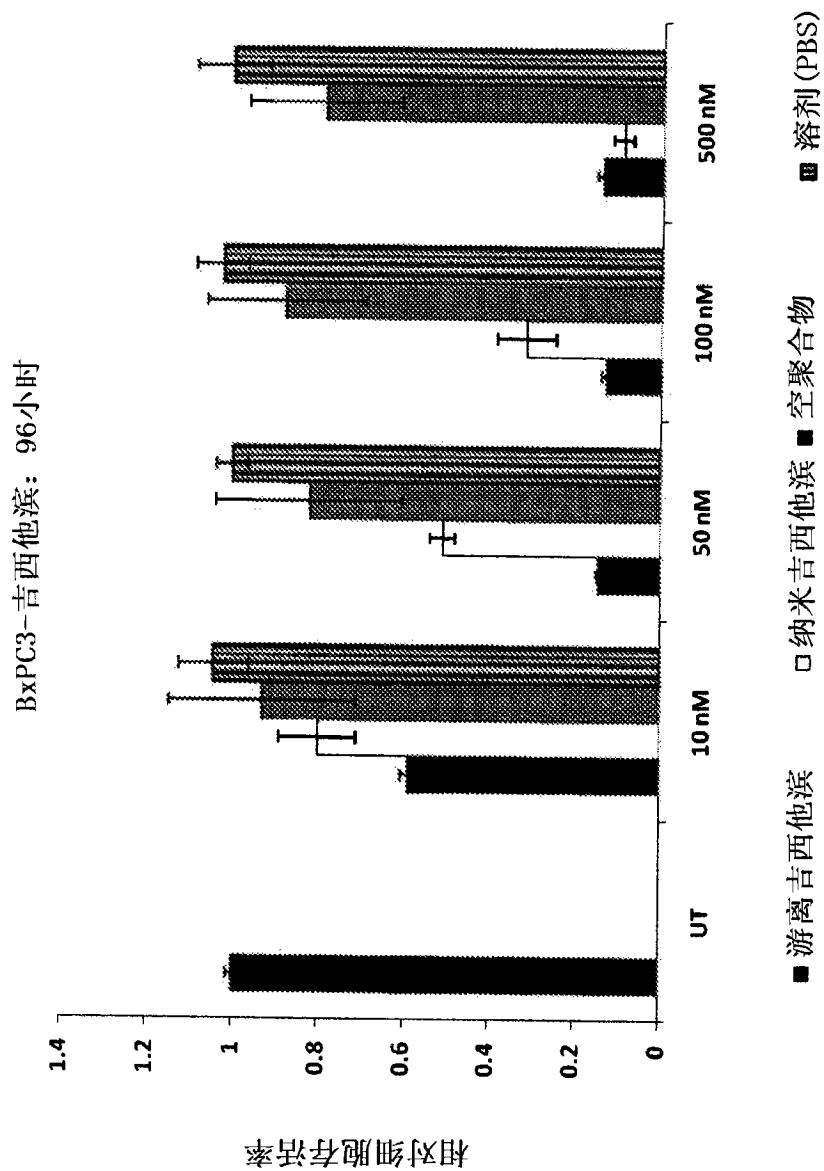


图9

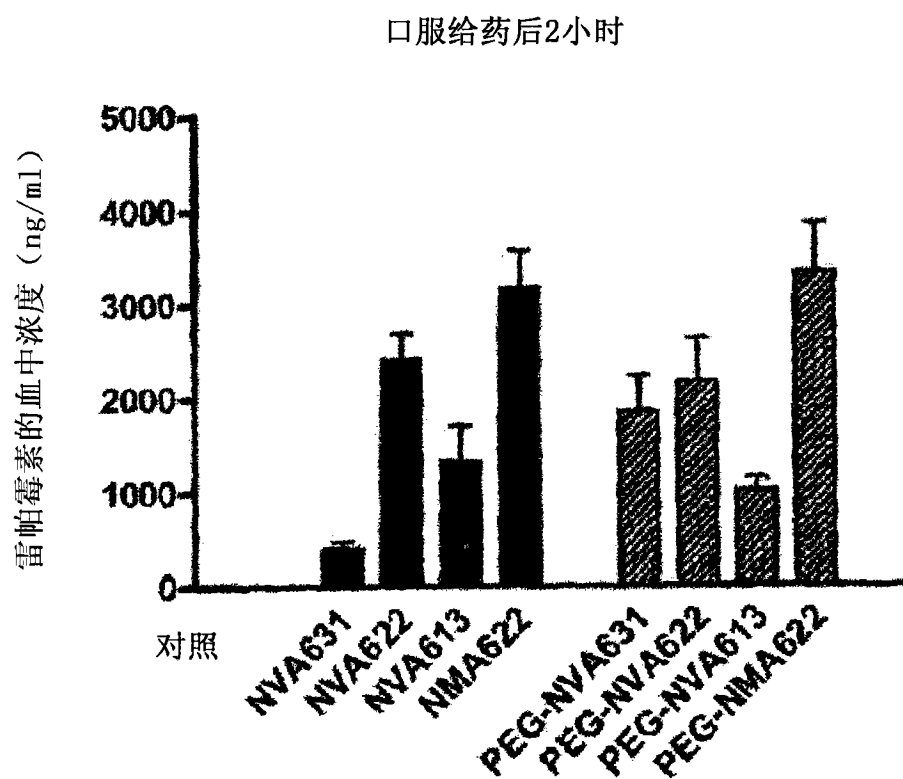


图 10

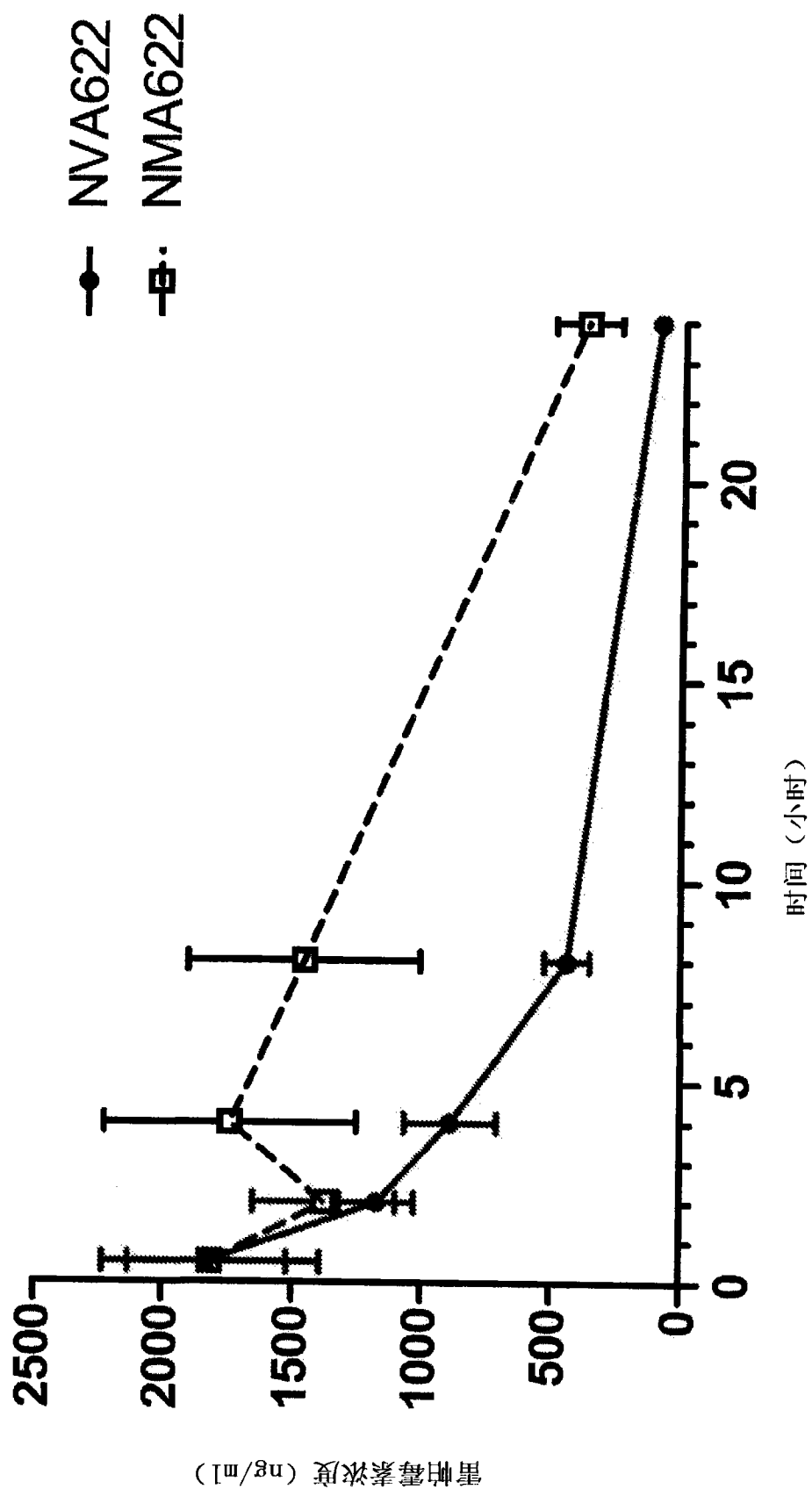


图11

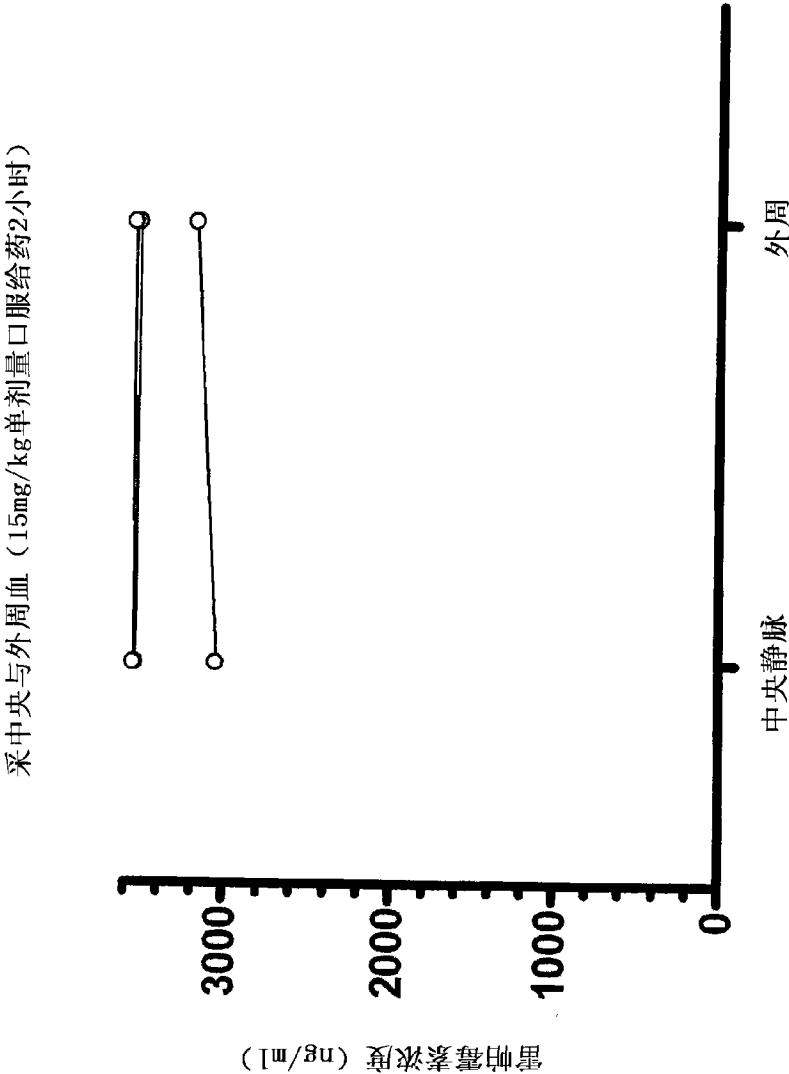


图12