

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580021379.3

[51] Int. Cl.

A61K 9/48 (2006.01)

A61K 9/14 (2006.01)

A61K 9/50 (2006.01)

A61K 9/51 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 6 月 27 日

[11] 公开号 CN 1988892A

[22] 申请日 2005.8.18

[21] 申请号 200580021379.3

[30] 优先权

[32] 2004.8.20 [33] DE [31] 102004041340.1

[86] 国际申请 PCT/EP2005/008954 2005.8.18

[87] 国际公布 WO2006/021367 德 2006.3.2

[85] 进入国家阶段日期 2006.12.26

[71] 申请人 格利达股份公司

地址 德国埃伯巴赫

[72] 发明人 M·阿勒斯 C·考斯特

K·茨维奥克 Z·兹雷斯

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商
标事务所

代理人 殷 骏

权利要求书 3 页 说明书 7 页 附图 4 页

[54] 发明名称

纳米粒子及其制备方法

[57] 摘要

提供可生物降解的纳米粒子，其保证一致的并且可定义的活性物质运输，同时提供一种制备该纳米粒子的适当方法，所述纳米粒子主要由水性明胶凝胶形成，其中，该纳米粒子的平均直径最大为 350nm，并且该纳米粒子的多分散性指数小于或等于 0.15，并且其中，使用明胶作为用于该制备方法的起始物质，分子量小于 65kDa 的明胶含量最大为 40 重量%，基于所有明胶计。

1. 主要由水性明胶凝胶形成的纳米粒子, 所述纳米粒子的平均直径最大为 350 nm, 并且纳米粒子的多分散性指数小于或等于 0.15。

2. 根据权利要求 1 的纳米粒子, 所述纳米粒子的多分散性指数小于或等于 0.1。

3. 根据权利要求 1 或 2 的纳米粒子, 所述纳米粒子的平均直径最大为 200 nm。

4. 根据权利要求 1~3 之一的纳米粒子, 所述纳米粒子的平均直径最大为 150 nm。

5. 根据权利要求 1~4 之一的纳米粒子, 所述纳米粒子直径的带宽最大为平均值以上 20 nm 和以下 20 nm。

6. 根据权利要求 1~5 之一的纳米粒子, 分子量小于 65 kDa 的明胶的含量最大为 40 重量%, 基于在纳米粒子中含有的所有明胶计。

7. 根据权利要求 1~5 之一的纳米粒子, 分子量小于 65 kDa 的明胶的含量最大为 30 重量%, 基于在纳米粒子中含有的所有明胶计。

8. 根据权利要求 1~5 之一的纳米粒子, 分子量小于 65 kDa 的明胶的含量最大为 20 重量%, 基于在纳米粒子中含有的所有明胶计。

9. 根据权利要求 1~8 之一的纳米粒子, 在纳米粒子中含有的明胶发生交联。

10. 根据权利要求 9 的纳米粒子, 所述明胶通过甲醛、二醛、异氰酸酯、二异氰酸酯、碳二亚胺或烷基二卤化物进行交联。

11. 根据权利要求 9 的纳米粒子, 所述明胶进行酶促交联。

12. 根据权利要求 11 的纳米粒子, 所述明胶通过转谷氨酰胺酶或漆酶进行交联。

13. 根据权利要求 1~12 之一的纳米粒子, 所述纳米粒子的水含量最大为 15 重量%。

14. 根据权利要求 1~13 之一的纳米粒子, 在所述纳米粒子的表面上结合药物活性物质。

15. 根据权利要求 14 的纳米粒子, 药物活性物质的结合是通过对纳米粒子的表面进行化学改性而引起的。

16. 根据权利要求 14 或 15 的纳米粒子, 所述药物活性物质吸附结合。

17. 根据权利要求 14 或 15 的纳米粒子, 所述药物活性物质共价键合。

18. 根据权利要求 14 或 15 的纳米粒子, 所述药物活性物质离子键合。

19. 根据权利要求 14~18 之一的纳米粒子, 所述药物活性物质通过间隔基结合。

20. 根据权利要求 1~19 之一的纳米粒子作为生物可降解的载体用于制备药物的用途。

21. 根据权利要求 20 的用途, 所述纳米粒子是细胞内递药系统的一部分, 尤其是作为核酸或肽的载体。

22. 根据权利要求 20 或 21 的用途, 所述药物是用于基因治疗的药物。

23. 一种制备主要由水性明胶凝胶形成的纳米粒子的方法, 包括以下步骤:

a) 制备明胶水溶液, 分子量小于 65 kDa 的明胶含量最大为 40 重量%, 基于所有明胶计;

b) 将明胶溶液的 pH 值调节到小于 7.0 的值;

c) 通过加入沉淀剂而使明胶沉淀; 和

d) 通过离心分离纳米粒子。

24. 根据权利要求 23 的方法, 在步骤 a) 中, 分子量小于 65 kDa 的明胶含量最大为 30 重量%, 基于所有明胶计。

25. 根据权利要求 23 的方法, 在步骤 a) 中, 分子量小于 65 kDa 的明胶含量最大为 20 重量%, 基于所有明胶计。

26. 根据权利要求 23~25 之一的方法, 在步骤 b) 中, 将 pH 值调节到小于或等于 3.0 的值。

27. 根据权利要求 26 的方法, 在步骤 b) 中, 将 pH 值调节到 1.5 ~ 3.0 的值。

28. 根据权利要求 23 ~ 27 之一的方法, 在步骤 c) 中, 所述沉淀剂是丙酮、醇或者两者的混合物, 任选在水溶液中。

29. 根据权利要求 23 ~ 28 之一的方法, 在步骤 c) 和 d) 之间进行步骤

c') 向该明胶溶液中加入交联剂。

30. 根据权利要求 29 的方法, 所述交联剂选自甲醛、二醛、异氰酸酯、二异氰酸酯、碳二亚胺或烷基二卤化物。

31. 根据权利要求 29 的方法, 所述交联剂是酶。

32. 根据权利要求 31 的方法, 所述交联剂是漆酶或转谷氨酰胺酶。

纳米粒子及其制备方法

本专利申请涉及纳米粒子、纳米粒子用于制备药物的用途以及纳米粒子的制备方法。

纳米粒子作为药物的载体体系自从 70 年代就是已知的。其能够将活性物质理想地运输到所希望的身体部位,在目的地才进行释放(所谓的递药系统)。同时有效保护尚未释放的活性物质免受身体代谢作用的影响。因此,通过活性物质分子占多数并且理想地到达其真正的作用位并使整个有机体较少负荷而可以使副作用最小化。

为了制备纳米粒子,文献中描述了大量合成性起始材料,例如聚丙烯酸酯、聚酰胺、聚苯乙烯和氰基丙烯酸酯。不过,这些大分子关键的缺点在于其差的或缺少的生物降解性。

作为天然的、在身体内可降解的载体材料,尤其公开了纤维结合素、多种不同多糖、清蛋白、胶原质和明胶。

已知纳米粒子的另一困难在于部分宽的尺寸分布,考虑到一致的释放和运输行为,这是有不利的。虽然通过麻烦的离心和其它分离方法可以将这些纳米粒子的尺寸分布窄化到一定范围,但这也不会带来满意的结果。

因此,本申请的任务在于提供可生物降解的纳米粒子,其保证一致的并且可定义的活性物质运输。同时所述任务还在于提供一种制备该纳米粒子的适当方法。

对于文端所述类型的纳米粒子,所述任务是如下实现的:纳米粒子主要由水性明胶凝胶形成,所述纳米粒子的平均直径最大为 350 nm,并且纳米粒子的多分散性指数小于或等于 0.15。

作为纳米粒子的起始材料,明胶具有一系列优点。其可以以确定的组成和纯度提供,并且具有相对小的抗原潜在性。此外,明胶可以肠胃外使用,尤其是作为血浆容量扩张剂。

此外，明胶的氨基酸侧链提供简便的可能性，可以化学改性纳米粒子的表面，使明胶交联，或者使活性物质分子共价结合到粒子上。

术语"水性明胶凝胶"在本申请意义上作如下理解，在纳米粒子中含有的明胶以水合形式，即作为水状胶体存在。由于所述纳米粒子在其制备和使用期间一直被水溶液包围，纳米粒子尺寸和多分散性的所有报告都是指该水合形式。用光子关联能谱法(PCS)的标准方法确定这些参数，以下对其进行详细描述。

表述"主要由...形成"在本发明中这样理解，所述纳米粒子有 95 重量%或更多，优选 97 重量%或更多，更优选 98 重量%或更多，最优选 99 重量%或更多由水性明胶凝胶组成。

多分散性指数是纳米粒子尺寸分布的尺度，理论值可以在 1 (最大散布)和 0 (所有粒子的尺寸相同)之间。本发明纳米粒子最大为 0.15 的低多分散性指数保证了理想并且可控制地运输活性物质以及在最理想的目的地释放该活性物质，尤其是通过体细胞吸收该纳米粒子时。

特别优选多分散性指数小于或等于 0.1 的纳米粒子。

纳米粒子的尺寸是其使用性的关键因素，可以根据使用领域而变化。多数情况下优选平均直径最大为 200 nm 的纳米粒子。

本发明另一实施方式涉及平均直径最大为 150 nm，优选 80~150 nm 的纳米粒子。这可以在利用所谓 EPR-作用(改善的渗透性和保持力)下进行使用。该作用能够针对地治疗肿瘤细胞，其对所述尺寸范围的纳米粒子比健康细胞具有更高的吸收率。

纳米粒子尺寸分布的另一参数是直径的带宽，其优选最大在平均值以上 20 nm 和以下 20 nm。同样可以通过 PCS 确定带宽。

本发明纳米粒子的性质还受所含明胶的分子量分布的影响。在该关系中重要的是低分子量明胶的含量，尤其是分子量小于 65 kDa 的明胶的含量，基于在纳米粒子含有的所有明胶计。该含量优选小于 40 重量%。特别有利的是小于 30 重量%，优选 20 重量%和更小的含量。

在现有技术中，与明胶相关所描述的大多纳米粒子，还含有其它结构聚合物(例如根据凝聚法制得的纳米粒子，如在 WO 01/47501 A1

中所述那样)。迄今由纯明胶制得的纳米粒子或者是不稳定的,或者不具有以上描述的、在粒子直径和尺寸分布方面对于选择性活性物质运输有利的参数。

在另一优选的实施方式中,在纳米粒子中含有的明胶发生交联。通过交联,根本上提高了纳米粒子的稳定性,此外,还可以通过所选的交联度而理想地调节纳米粒子的降解行为。这是有利的,因为不同的使用领域通常要求纳米粒子确定的降解时间。

交联时尤其有意义的是,分子量小于 65 kDa 的明胶的含量小于 20 重量%。

未交联的纳米粒子适于体外,尤其是诊断使用,其中,在明胶熔点以下例如在室温下进行处理。

相比之下,以上所述交联的纳米粒子尤其是适于治疗使用。

明胶可以进行化学交联,例如通过甲醛、二醛、异氰酸酯、二异氰酸酯、碳二亚胺或烷基二卤化物进行。

或者还可以进行酶促交联,例如通过转谷氨酰胺酶或漆酶进行。

在另一实施方式中,对本发明的纳米粒子进行干燥,优选干燥到水含量最大为 15 重量%。

本发明另一实施方式涉及在其表面上结合药物活性物质的纳米粒子。

在一种优选的实施方式中,在活性物质结合到纳米粒子的表面上之前进行化学改性,例如通过明胶的自由氨基或羧基进行反应而改性,从而形成带电的侧链或带有新化学官能团的侧链。

药物活性物质结合到纳米粒子或化学改性的纳米粒子上可以通过吸附力、通过共价键或通过离子键进行。例如纳米粒子(其表面通过相应的化学改性而带正电)上可离子性键合 DNA 或 RNA 片段。

在另一实施方式中,活性物质通过间隔臂结合到纳米粒子上。

以上所述的纳米粒子只要发生交联,根据本发明就可以用于制备药物。

特别有利的是,所述纳米粒子用于细胞内的递药系统,尤其是作

为核酸或肽的载体。

含有本发明纳米粒子的药物优选可以用于基因治疗中。

本发明还涉及一种制备开头所述领域的纳米粒子的方法。

针对基于本发明的任务的方法的本发明是如下实现的，使用明胶作为起始材料用于该制备方法，分子量小于 65 kDa 的明胶含量最大为 40 重量%，基于所有明胶计。

通过使用一种这样的明胶，可以以简单方式制得具有小多分散性和粒子直径带宽的纳米粒子，尤其是多分散性指数小于或等于 0.15 的本发明纳米粒子。

在本发明方法中，首先由一种这样的明胶制备水溶液，然后将其 pH 值调节到小于 7.0 的值。通过向该溶液中加入合适的沉淀剂，溶解的明胶以纳米粒子形式进行去溶剂化，然后通过简单的离心而从溶液中分离出来。不需要对该纳米粒子例如通过梯度离心进行分级，因为作为本发明制备方法的结果，该纳米粒子的多分散性已经在足够低的范围内。

在本发明方法范围内并不需要向该明胶水溶液中添加助剂，尤其是添加盐或表面活性物质如清洁剂。因此，本发明的纳米粒子优选基本上不含有所述添加剂。因此，本发明方法能够制备基本上仅由水性明胶凝胶形成的纳米粒子。

通过使用具有上述分子量分布的明胶，保证了形成较稳定的纳米粒子。低分子份额较高的明胶在该方法情况下导致增多地形成较大的团聚体或不稳定的粒子。

分子量小于 65 kDa 的明胶含量优选最大为 30 重量%，最优选最大为 20 重量%。

在一种优选的方法实施方式中，所调节的明胶溶液的 pH 值小于或等于 3.0，优选在 1.5~3.0 范围内。在该区间内，可以通过 pH 值部分地影响平均粒度，在此，较低的 pH 值倾向于导致较小的纳米粒子。

在另一优选的实施方式中，作为沉淀剂，使用丙酮、醇如乙醇或者这些沉淀剂相互之间或与水形成的混合物，在此优选丙酮作为沉淀

剂。

通过使用这种挥发性沉淀剂，尽可能避免了所述沉淀剂份额并入和/或保留在纳米粒子中，因此所述纳米粒子基本上仅由水性明胶凝胶形成。

为了制备交联的纳米粒子，在加入沉淀剂之后和离心之前，加入交联剂。在该实施方式中，分子量小于 65 kDa 的明胶含量优选为 20 重量%或更少，以便抵制交联时发生粒子的团聚。采用该方法可以制得非常一致的纳米粒子，其带宽最大为 ± 20 nm，并且其多分散性指数最大为 0.1。

以下在参考附图情况下通过实施例更详细地解释本发明。附图分别为：

图 1：两种明胶的凝胶渗透色谱（图 1A 或 1B），还给出了每种明胶的分子量分布；

图 2：本发明纳米粒子的电子显微镜照片；和

图 3：本发明制得的纳米粒子的尺寸分布。

分子量分布的测定

如上所述，通过明胶的分子量分布，可以影响由其制得的纳米粒子的性质。可以通过凝胶渗透色谱(GPC)确定分子量分布。

在带有以下组件的 HPLC-系统中进行确定：

HPLC-泵： Pharmacia 2249

UV-检测仪： LKW 2151

分离柱： TFK 400 SWXL，带有前柱(Fa. Tosoh Biosep GmbH)

移动相： 1 重量% SDS，100 mmol/l Na_2SO_4 ，
10 mmol/l NaH_2PO_4 / NaOH pH 5.3

制备 1 重量%的明胶水溶液，通过 30 分钟泡胀的明胶，然后在约 60°C 溶解而制备。通过 0.2 μl 一次性过滤器过滤后，30 μl 明胶溶液与 600 μl 移动相和 30 μl 0.01 重量%苯甲酸溶液混合。用 20 μl 该混合物在 0.5 ml/min 流率和 UV 检测下在 214 nm 下进行 GPC。

通过用具有已知分子量分布的标准明胶校准该体系，来对洗脱体

积和分子量进行归类。通过将色谱划分为确定的区域，并对 UV-检测仪-信号进行积分，可以计算出在每种分子量范围内的明胶含量。

在图 1 中示例性表示两种不同明胶的凝胶渗透色谱：

图 1A 表示 Bloom 值为 175 的市售猪皮明胶(明胶类型 A)的 GPC。由于分子量小于 65 kDa 的明胶含量较高，超过 45 重量%，所以这种明胶不适合用于制备纳米粒子的本发明方法，导致具有太高多分散性的粒子，或者导致所述粒子发生团聚。

图 1B 表示 Bloom 值为 310 的猪皮明胶的 GPC，分子量小于 65 kDa 的明胶含量约为 15 重量%。这种明胶非常良好适合于本发明的制备方法。

平均粒子直径和多分散性指数的确定

光子关联能谱能够确定纳米粒子的平均粒子直径、多分散性指数和粒子直径高于和低于平均值的带宽。

用 BI-200 SM Goniometer Version 2 (Brookhaven Instruments Corp., Holtsville, NY, USA) 进行测量。为此使用浓度为 10~50 $\mu\text{g/ml}$ 的纳米粒子在去矿物质水中的悬浮液。

实施例 1

该实施例描述由明胶形成的交联纳米粒子的制备，所述明胶的 GPC 表示在图 1B 中(分子量小于 65 kDa 的明胶含量约为 15 重量%)。

将 300 mg 所述明胶在 50℃ 下溶于水中。用盐酸调节 pH 值为 2.5 后，通过滴加 45 ml 丙酮而使该明胶去溶剂化。搅拌 10 分钟后，加入 40 μl 的 8% 戊二醛水溶液，然后再搅拌 30 min。通过在 10,000 g 离心 10 分钟，将所交联的纳米粒子从溶液中分离出来，并通过三次再分散于丙酮/水(30/70)中而进行纯化。在最后一次再分散后，在 50℃ 下蒸发掉丙酮。

这种简便的方法使得无需对本发明的纳米粒子进行额外的分离步骤，对于所述的纳米粒子，用以上所述的 PCS-方法查明，在多分散性指数约为 0.08 情况下的平均粒子直径约为 160 nm。纳米粒子的尺寸等级分布图示性表示在图 3 中。

对非交联的纳米粒子进行的对比实验显示，低分子量明胶在制得的纳米粒子中的含量很大程度上相应于在起始材料中的含量。

实施例 2

如实施例 1 所述制备交联的纳米粒子，在此，作为起始材料，使用 Bloom 值为 270 的猪皮明胶，分子量小于 65 kDa 的明胶含量约为 19 重量%。

对于根据本发明可直接得到的纳米粒子，用以上描述的 PCS-方法查明在多分散性指数约为 0.08 情况下的平均粒子直径约为 173 nm。其尺寸分布与根据实施例 1 制得的纳米粒子是可比较的。

图1A

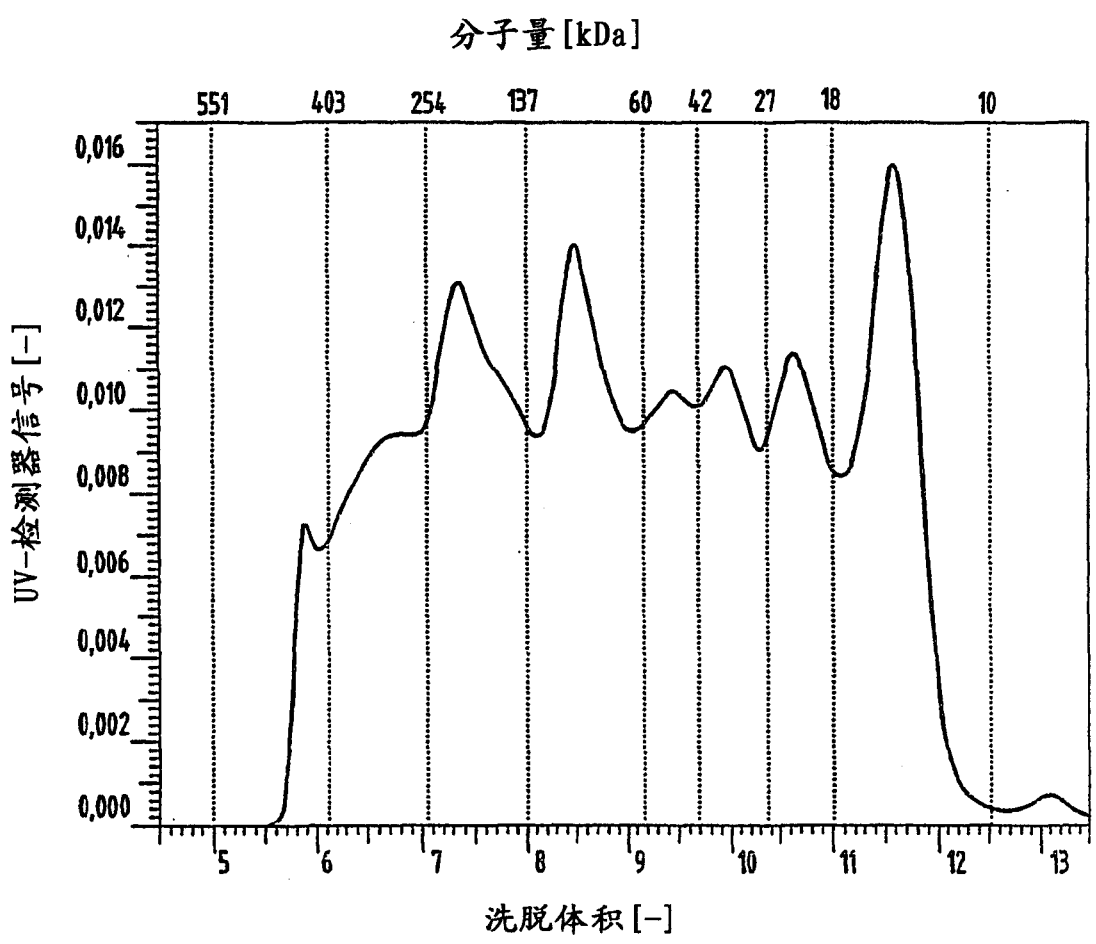


图 1B

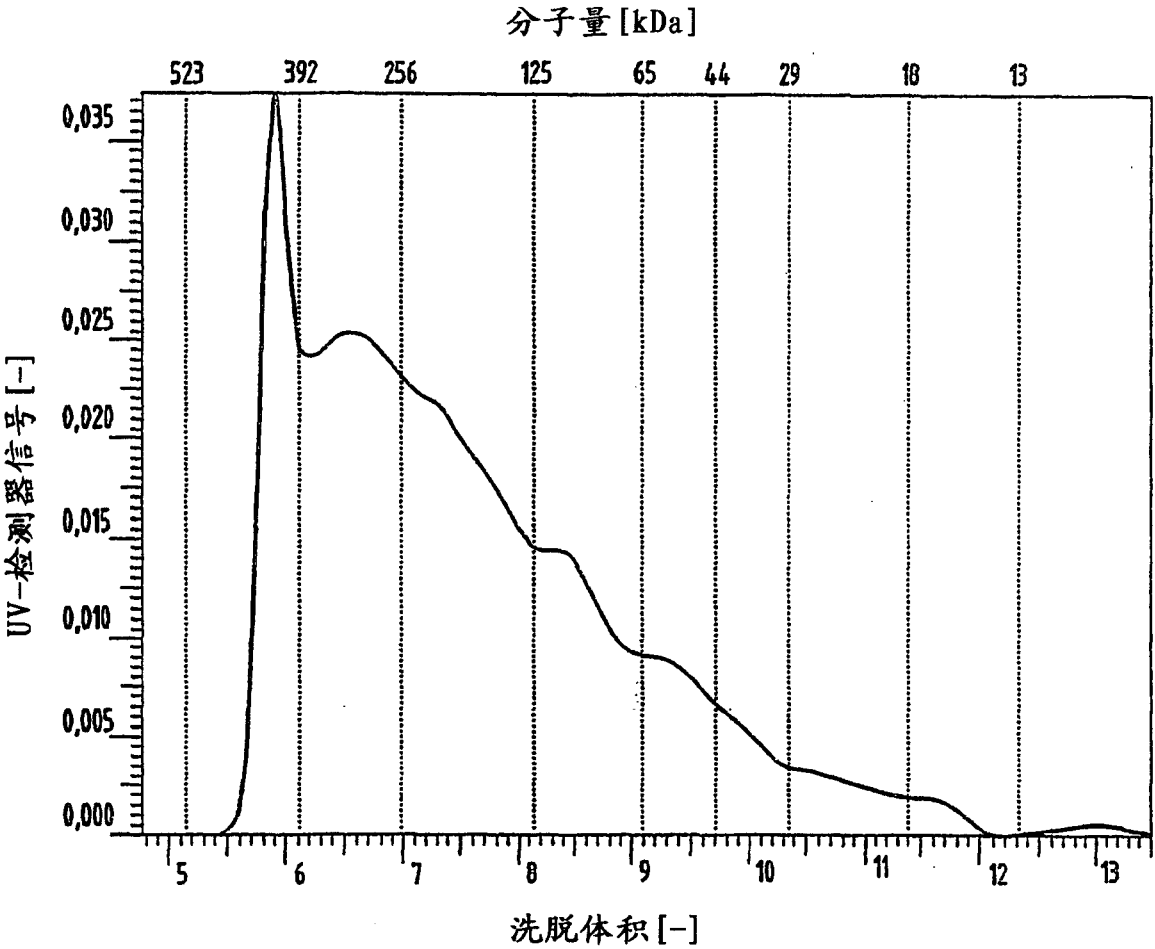


图2

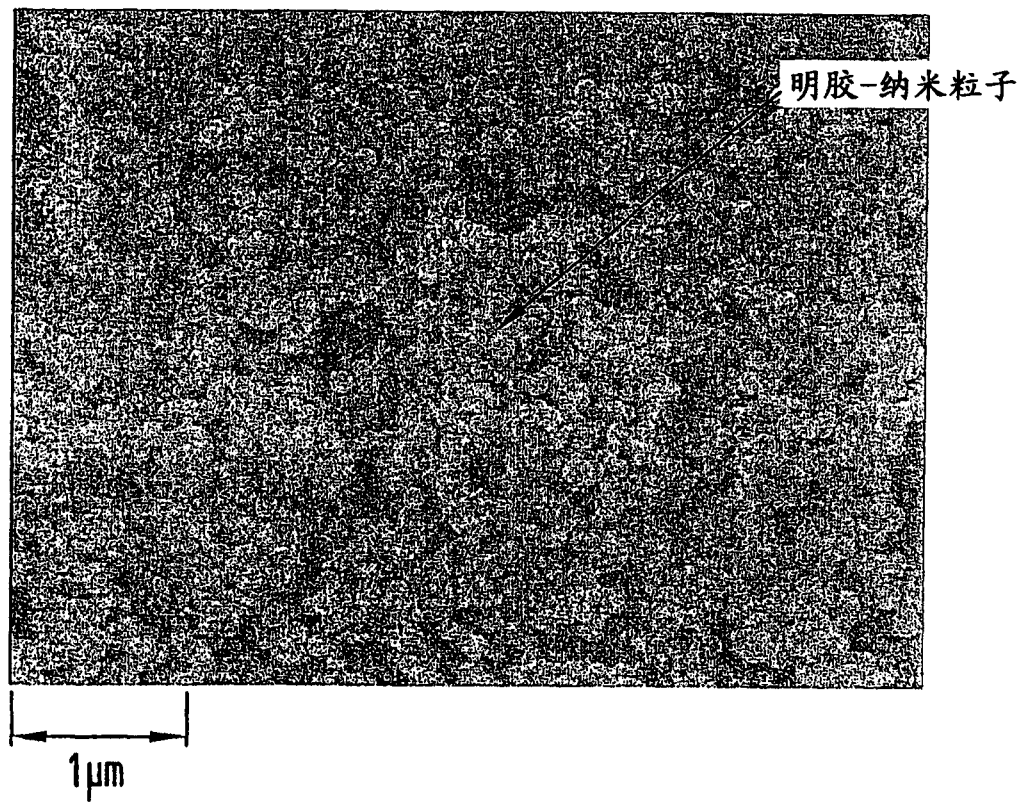


图3

