



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103596558 A

(43) 申请公布日 2014. 02. 19

(21) 申请号 201280012254. 4

马克仕·加西亚·富恩特斯

(22) 申请日 2012. 01. 09

(74) 专利代理机构 北京聿宏知识产权代理有限公司

(30) 优先权数据

公司 11372

P201130015 2011. 01. 10 ES

代理人 吴大建 刘华联

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(51) Int. Cl.

2013. 09. 09

A61K 9/51 (2006. 01)

(86) PCT国际申请的申请数据

A61K 47/34 (2006. 01)

PCT/ES2012/000008 2012. 01. 09

A61K 47/36 (2006. 01)

(87) PCT国际申请的公布数据

B82Y 5/00 (2006. 01)

W02012/095543 ES 2012. 07. 19

(71) 申请人 圣地亚哥德孔波斯特拉大学

地址 西班牙圣地亚哥德孔波斯特拉

(72) 发明人 玛丽亚·乔斯·阿朗索·费尔南德斯

德洛丽丝·托里斯·洛佩斯

古斯塔沃·里韦拉·罗德里格斯

费莉佩·安德烈斯·奥亚尔赞·安普

埃罗

乔凡娜·洛洛

特丽萨·贡萨洛·拉萨罗

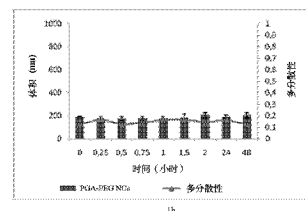
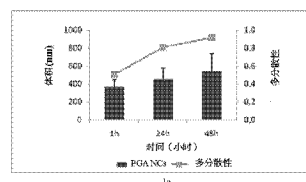
权利要求书2页 说明书37页 附图16页

(54) 发明名称

聚合物壳纳米微胶囊

(57) 摘要

本发明指的是一个管理活性成分的系统, 其活性成分包含油, 阳离子表面活性剂及所选择的聚合物, 包括聚谷氨酸 (PGA), 聚乙二醇-聚谷氨酸 (PGA-PEG), 透明质酸 (HA) 和聚天冬酰胺 (PAsn) 或它们的组合, 以及任选的活性成分, 其条件是当所述聚合物包含聚谷氨酸, 聚乙二醇-聚谷氨酸时, 活性成分不是一种膜海鞘素 (Didemmina) 或海洋缩酚酞 (Tamandarina)。聚谷氨酸的本发明还涉及获得纳米胶囊系统, 其药物成分和它们在医学上的运用的方法。



1. 一种施用活性成分的系统,其活性成分包含油、阳离子表面活性剂及所选择的聚合物,包括聚谷氨酸、聚乙二醇-聚谷氨酸、透明质酸和聚天冬酰胺或它们的组合,以及任选的活性成分,其条件是当所述聚合物包含聚谷氨酸、聚乙二醇-聚谷氨酸时,活性成分不是一种膜海鞘素或海洋缩酚酞。

2. 根据权利要求1所述的系统,其特征在于,所述阳离子型表面活性剂选自苯扎氯铵、苜蓿氯铵、西吡氯铵、十二烷基三甲基溴化铵、十四烷基三甲基溴化铵、十六烷基三甲基溴化铵和泊洛沙姆或它们的混合物。

3. 根据权利要求2所述的系统,其特征在于,所述阳离子表面活性剂是苯扎氯铵或十六烷基三甲基溴化铵。

4. 根据上述权利要求中任何一项所述的系统,其特征在于,所述油选自矿物油、角鲨烯油、香料油、硅氧烷油、精油、水不溶性维生素、硬脂酸异丙酯、硬脂酸丁酯、棕榈酸辛酯、棕榈酸十六酯、十三烷基山嵛酸酯、二异丙基己二酸酯、水杨酸辛酯、癸二酸二辛酯、邻氨基苯甲酸基、辛酸鲸蜡酯、肉豆蔻酸异丙酯、新戊二醇,二丙酮醇、Cerafilos[®]、油酸癸酯、C₁₂-C₁₅烷基、乳酸、乳酸十六烷基酯、乳酸月桂酯、新戊酸异硬脂、乳酸肉豆蔻酯、新戊基酮醇硬脂酸异鲸蜡硬脂酰硬脂酸酯、辛基十二烷基硬脂酰硬脂酸酯、烃油、异链烷烃、液体链烷烃、异十二烷、凡士林、坚果油、菜子油、辣椒油、椰子油、玉米油、棉子油、亚麻子油、油葡萄籽、芥子油、橄榄油、棕榈油、棕榈分提油、花生油、蓖麻油、松树种子油、罂粟籽油、南瓜籽油、油米糠、红花子油、茶油、松露油、植物油、杏油、霍霍巴油、澳洲坚果油、小麦胚芽油、杏仁油、大豆油、芝麻油、榛子油、葵花籽油、麻油、木油、石栗果油、鳄梨油、核桃油、鱼油、果油、五香粉油、杜松油、种子油、油杏仁籽油、茴香、芹菜种子油、香菜种子油、种子油、豆蔻、紫苏叶油、月桂叶油、肉桂叶油、油常见的鼠尾草叶、桉树叶油、柠檬叶油、茶树叶油、牛至油、广藿香叶油、薄荷叶油、松针油、迷迭香叶油、薄荷油、叶油、茶树叶油百里香油、茶叶加拿大花油、甘菊油、鼠尾草油、丁香油、油、天竺葵牛膝花油、茉莉油、薰衣草油、花油马乌卡、马郁兰花油、橙花油、玫瑰的花油、依兰花、皮油、桂皮油、桂皮油、油黄樟树皮、木油、樟木油、雪松油、花梨木油、檀香油、油姜木、妥尔油、蓖麻油、没药油、皮肤油、皮肤油贝加莫、柚子皮油、柠檬果皮油、酸橙皮油、橘皮油、陈皮油、根油、缬草油、油酸、亚油酸异硬脂醇、油醇、油酸乙酯、Miglyol[®]、Labrafil[®]、Labrafac[®]、Peceol[®] y Maisine[®] 或人工合成或半合成的衍生物,以及它们的组合。

5. 根据权利要求4所述的系统,其特征在于,所述油指的是 Miglyol[®]。

6. 根据上述权利要求中任何一项所述的系统,其特征在于,所述系统中还另外包括了油溶性表面活性剂。

7. 根据权利要求6所述的系统,其特征在于,所述油溶性表面活性剂是磷脂,选自卵磷脂、磷脂酰甘油、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、二磷脂、磷脂酸、磷脂酰胆碱和磷脂酰乙醇胺。

8. 根据权利要求7所述的系统,其特征在于,所述磷脂是卵磷脂。

9. 根据上述权利要求中任一项所述的系统,其特征在于,所述系统中还另外包括了水溶性表面活性剂。

10. 根据权利要求9所述的系统,其特征在于,所述水溶性表面活性剂选自泊洛沙姆和聚山梨醇酯。

11. 根据权利要求 10 所述的系统,其特征在于,所述泊洛沙姆为泊洛沙姆 188。
12. 根据上述权利要求中的任何一项所述的系统,其特征在于,所述活性成分选自肽、蛋白质、脂肪或亲脂性化合物、糖类化合物、核酸、核苷酸化合物或它们的组合。
13. 根据权利要求 12 所述的系统,其特征在于,所述活性成分为多西紫杉醇。
14. 根据权利要求 12 所述的系统,其特征在于,所述活性成分选自寡核苷酸、RNA 干扰、DNA 质粒或核苷酸。
15. 根据权利要求 14 所述的系统,其特征在于,所述活性成分是一种 DNA 的质粒。
16. 根据上述权利要求中任何一项所述的系统,其特征在于,它是冻干形式的。
17. 如权利要求 1 至 16 中任何一项所述的系统的制备步骤,包括:
制备的水溶液含有的聚合物选自聚谷氨酸、聚乙二醇-聚谷氨酸、透明质酸和聚天冬酰胺或它们的组合,以及任选一种水溶性表面活性剂;
 - a) 制备的水溶液含有选自聚谷氨酸、聚乙二醇-聚谷氨酸、透明质酸和聚天冬酰胺或由它们的组合组成的聚合物,以及任选的一种水溶性表面活性剂;
 - b) 制备包含油和阳离子性表面活性剂,和任选的油溶性表面活性剂的有机溶液;
 - c) 在搅拌下,混合步骤 a) 和 b) 中制备的溶液,便自发地获得了纳米胶囊;
 - d) 任选完全或部分蒸发在前一阶段获得的体积恒定的混合有机溶剂。
18. 根据权利要求 17 所述的制备步骤,其特征在于,所述制备步骤还包括添加一种活性成分,其条件是当所述聚合物包括聚谷氨酸或聚乙二醇-聚谷氨酸,其活性成分不是一种膜海鞘素或海洋缩酚酞。
19. 如权利要求 1 至 16 中任何一项所述的系统的制备步骤,包括涂覆纳米乳剂,纳米乳剂至少由一种油状物,阳离子表面活性剂,任选一种油溶性的表面活性剂和任选的包含一种水溶性的表面活性剂的油相,通过用聚谷氨酸、聚谷氨酸-聚乙二醇、透明质酸、聚天冬酰胺或它们的混合物的水溶液进行温育过程处理。
20. 根据权利要求 19 所述的制备步骤,其特征在于,所述制备步骤还包括添加活性成分,其条件是当所述聚合物包括聚谷氨酸或聚谷氨酸-聚乙二醇,其活性成分不是一种膜海鞘素或海洋缩酚酞。
21. 根据权利要求 17 至 20 中的任一项所述的制备步骤,其特征在于,所述制备步骤包括在冷冻保护剂的作用下,将所得到的系统进行冷冻干燥操作。
22. 根据权利要求 21 所述的制备步骤,其特征在于,所述制备步骤包括恢复冷冻干燥的系统。
23. 包含如权利要求 1 至 16 中任何一项所述的系统的药物组合物。
24. 根据权利要求 23 所述的药物组合物,其特征在于,所述药物组合物中所述的成分是用于局部、肠胃外或通过粘膜的施用。
25. 如权利要求 1 至 16 中任何一项所述的系统在制备药物中的应用。
26. 如权利要求 1 至 16 中任何一项所述的系统在制备用于治疗癌症的药物中的应用。

聚合物壳纳米微胶囊

技术领域

[0001] 本发明涉及一种含有纳米级纳米胶囊活性成分的施用系统,以及有相同药物和相同制备方法的药物组合物。

背景技术

[0002] 在纳米级的系统中掺入活性成分,帮助解决了这些分子制剂的限制,进一步增加了它们的治疗潜力。溶解度的改进、降解防范或活性成分更大的渗透,是活性分子的纳米胶囊所提供的一些优势。同时,这些系统跨越外部障碍和访问有机体内部的能力也众所周知,既取决于它们的大小也取决于它们的组合物。相对于较大的颗粒,小颗粒会增加给药的速率:纳米系统,直径小于 1 微米,以此为标准。

[0003] 聚谷氨酸 (PGA)

[0004] 聚谷氨酸 (PGA) 是一种可生物降解的聚合物,由带负电荷的谷氨酸组构成。由于它具有无毒性、非免疫原性和生物相容性等生物属性,该聚合物在新的释放药物配方的开发中,已被视作一个重要的生物材料 (Buescher&Margaritis, Crit RevBiotech2007)。

[0005] 聚谷氨酸的使用被广泛报道,例如,在癌症的治疗中,用于形成药物-聚合物复合物,在其形成过程中寻找一些中晚期的配方。抗癌药物聚谷氨酸紫杉醇 XYOTAX,是一种由聚-L-谷氨酸和抑制细胞生长的紫杉醇剂组成的药物配方,目前用在第 3 阶段的临床试验中。

[0006] 该聚合物也已被用在其他抗肿瘤药物的配方设计中,如阿霉素 (Shih et al., 2004)。

[0007] 此外,在 US2006246096 专利的申请文件中也曾报道过,用来形成药物释放系统的聚谷氨酸被用来作为遗传物质的制剂护壳。

[0008] 另一种由聚谷氨酸开发的释放系统是纳米粒子,如在 US2005238678 和 US6326511 专利文件中所述。

[0009] 另一方面,聚谷氨酸与聚乙二醇 (PEG) 形成共轭,目的是实现纳米系统的表面改性,为胶体系统提供更高的稳定性。这种与 PEG 的改性也最大限度地减少了蛋白质和网状内皮系统的细胞对纳米系统的认可,从而增加了其循环时间。

[0010] 聚谷氨酸和 PEG 联合的效果已经在 US2003170201 专利的申请中做了研究,评估由该聚合物形成的释放抑制细胞生长药物的复合物的潜力。

[0011] 透明质酸 (HA)

[0012] 透明质酸 (HA) 是一种天然存在的聚合物。更具体的说,它是一种葡萄糖胺聚糖,存在于结缔组织的细胞外基质,如皮下组织和软骨组织,也存在于眼玻璃体和关节腔的滑膜液中。这是一个能够与内源性受体 CD44 和 RHAMM 相互作用的聚合物,位于几乎所有生物体细胞的细胞表面,除了红细胞。透明质酸与这些受体的相互作用,可以调节某些生理过程,如细胞流动性和细胞的增殖。由于这些特性,透明质酸具有治疗用途,它在形态发生和胚胎发育、癌症和炎症过程中起着重要的作用。此外,由于所述性能,透明质酸可用来促进

上皮愈合。

[0013] 要证明这种生物的活性,在很多的研究中都做了描述,其中包括作为活性生物分子的透明质酸,例如 Sand et al. (Acta Ophthalmol. 67, 1989, 181-183) 所描述的,透明质酸应用在干燥性角结膜炎的治疗中, Nishida et al. (Exp. Eye Res. 53, 1991, 753-758) 描述的作为一个角膜的愈合标准, Blanco et al. (Clin. Exp. Rheumatol. 22 (3) 2004, 307-12) 描述的,将聚合物用于骨关节炎的治疗,等等。此外,透明质酸及其衍生物,根据不同形式的演示,作为一种活性分子成为无数专利文献的研究主题。在这一点上应该指出的是,在 W096/06622 专利的申请中,声称使用的透明质酸和衍生物,单独或与另一种治疗剂组合,用来调节这些组织和细胞群的细胞活性,在其表面上表现出透明质酸的受体,以此来治疗或防止炎症、纤维化和发生癌变。US6383478 专利保护一种由微粒、纳米粒子或薄膜构成的传送系统,其中加入透明质酸,作为活性分子尽可能促进血管的生成。

[0014] 此外,透明质酸也一直被用于众多的研究中,在该研究中建议用作生物材料-赋形剂,用于药物输送系统的发展。在这条线上,它是一种可生物降解的、生物相容性的聚合物,不具备免疫原性、粘膜粘附性和选择性亲和力,如 CD44 受体。至于选择使用透明质酸作为生物材料的赋形剂来获得纳米制剂,可以提及的原因包括以下内容:

[0015] - 在 US2007/0224277 专利的申请中,描述了由共价交联形成的透明质酸纳米颗粒的制备。

[0016] - 在 US2003/0166602A1 专利的申请中,公开了使用透明质酸修饰的脂质的各种剂型的制备,并且可容纳能抗癌的活性成分以及其它治疗剂或诊断剂。

[0017] - 在 W02004/112758A1 专利的申请中,描述了在含有透明质酸的纳米颗粒的水性介质中的制备,通过透明质酸离子间的相互作用、其他互补负荷的聚合物以及离子交联剂的存在而形成。

[0018] - Luo 和 Prestwich (Bioconjugate Chem. 10, 1999, 755-763) 综合透明质酸和紫杉醇抗癌生物剂之间的结合物,其细胞毒活性更高,在 CD44 过量的乳腺癌、肠癌和卵巢癌细胞系中比只用紫杉酚更具选择性。

[0019] - Yenice et al (Experimental Eye Research 2008, 87 (3), 162-7) 和 Barbault-foucher et al (Journal of Controlled Release 2002, 83, 365-375) 描述了透明质酸涂层的聚-ε-乙内酯纳米球,作为眼部给药系统。

[0020] 聚天冬酰胺 (PAsn)

[0021] 在文献中描述的 L-天冬酰胺是所有类型细胞的生长和发展所必需的一种氨基酸,直接参与蛋白质和 DNA 的合成,该氨基酸的主要来源是在饮食中。

[0022] L-天冬酰胺是目前在癌症的治疗中使用最多和效果最佳的策略之一,在市场上销售的制剂包括所需要的降解酶。在实施这种酶并将其沉积于肿瘤的周边时,如果降低氨基酸的浓度,导致氨基酸的缺失,细胞会阻止 DNA 和其他生存所必需的蛋白质的合成。这些制剂被称为 **Oncaspar[®]** 或 **Elspar[®]**, L-天冬酰胺则负责对这些酶降解。

[0023] 癌细胞在转移的晚期,尤其是对于白血病,对天冬酰胺有很高的认可性,因为其可以快速繁殖。癌细胞是无法有效地满足这种氨基酸的基本需求,这在许多情况下,导致这些细胞从氨基酸浓度较高的地方向肿瘤周边转移。

[0024] 上述认可性和必要性,最近已被用来作为治疗许多转移阶段的癌症的一种替代

品。我们已经对纳米系统做了大量的研究,如聚合物胶束或天冬酰胺的聚合衍生物涂层的脂质体。

[0025] 上述研究在基于聚氨基酸分子的纳米系统的发展中已经显示出巨大的潜力,而聚氨基酸分子是在天冬酰胺的基础上,如聚天冬酰胺(PAsn)或聚羟乙基天冬酰胺。另外,加上天冬酰胺的表面识别所赋予的特异性,基于该氨基酸的聚合物表现出与PEG类似的亲水性的特性和结构及物理化学特性,对正在进行中的药物半衰期做上述系统改善,以及在药代动力学和生物分布方面有显著的效果。

[0026] 在与聚天冬酰胺相关的研究中,Storm和合作伙伴(Metselaar, Bruin et al. 2003; Garcion, Lamprecht et al. 2006; Romberg, Kettenes-Van Den Bosch et al. 2006; Romberg, Metselaar et al. 2007; Romberg, Oussoren et al. 2007; Romberg, Oussoren et al. 2007; Romberg, Oussoren et al. 2007; Romberg, Flesch et al. 2008; Romberg, Hennink et al. 2008)评估了在脂质体上两种不同类型涂层的药代动力学,改变聚合物涂层;将PEG与聚羟乙基天冬酰胺进行比较,结果倾向于聚羟乙基天冬酰胺,因为后者呈现出更好的药代动力学和低剂量下更长的循环时间,并能够重复给药。

[0027] 根据上述资料,化合物的潜力是显而易见的,并能激起上述化合物-聚谷氨酸和聚乙二醇共聚物的兴趣,透明质酸和聚天冬酰胺—在新的给药系统的开发中作为生物材料-赋形剂。特别是,对于某些稳定的纳米系统的应用,它将适合用来封装和保护各种特性的分子,在所需的生物表面也呈现良好的吸附性和内化性。

发明内容

[0028] 本发明的发明者通过不同的实验程序,开发出了一种更容易获取的纳米囊系统,其中,所述的纳米胶囊包括聚合物、油和阳离子性表面活性剂。该纳米囊系统能够有效的融合脂溶性活性成分和亲水性成分。这些纳米胶囊的小体积(直径小于1微米)使其能够通过生物屏障,并由细胞内化。同时,聚合物壳的存在,除了赋予纳米胶囊更大的稳定性以外,根据每个特定壳的类型,能够提供各种有益的功能。

[0029] 因此,一方面来说,本发明涉及一种包含纳米胶囊的活性成分的施用系统,包括油、阳离子表面活性剂、以及从由聚谷氨酸(PGA)、聚谷氨酸-聚乙二醇(PGA-PEG)、透明质酸(HA)和聚天冬酰胺(PAsn)组成的群组中选取一种聚合物,任选一种表面活性剂溶于水中。

[0030] 条件是,当这样的纳米胶囊系统中包括聚谷氨酸或聚谷氨酸-聚乙二醇(PGA-PEG)时,所述活性成分则不是膜海鞘素(Didemna)或海洋缩酚酞(Tamandarina)。

[0031] 此外,纳米胶囊的发明,也可选用其它组分,如一种水溶性表面活性剂、一种油溶性表面活性剂,或两者兼而有之。

[0032] 另一方面,本发明涉及一个药物组合物,该组合物包括上述所定义的系统。

[0033] 同时,本发明还涉及到在药物的制备过程中所述系统的使用。在一个特定的实施例中,所述用途涉及癌症的治疗。

[0034] 进一步说,本发明涉及了一个用于获得上述定义系统的程序(以下在实施例中简称一个阶段的溶剂扩散过程),包括:

[0035] a) 制备一份水溶液,包括从聚谷氨酸(PGA)、聚谷氨酸-聚乙二醇(PGA-PEG)、透明

质酸 (HA) 和聚天冬酰胺 (PAsn) 组成的群组中选取一种聚合物, 任选一种表面活性剂溶于水;

[0036] b) 制备一份有机溶液, 包括油和阳离子性表面活性剂, 任选一种额外的表面活性剂溶于油中;

[0037] c) 将 a) 和 b) 步骤中制备的溶液搅拌混合, 将自发获得纳米胶囊;

[0038] d) 将前一步骤的混合有机溶剂全部或者部分进行蒸发, 直到得到恒定的体积。

[0039] 根据特定的实施方式, 脂溶性活性成分 (疏水性活性成分) 或两亲性活性成分, 通过将其添加到步骤 b) 中进行封装。亲水性质的活性成分可以添加到步骤 a) 中或在步骤 d) 之后通过一个孵化过程完成封装。

[0040] 从另一方面来说, 本发明涉及了一个用于获得上述定义系统的程序, 其中就包括一种纳米乳液涂层, 这种涂层至少由一种油、一种阳离子表面活性剂、并任选一种表面活性剂溶于油中、以及含有一种任选的水溶性表面活性剂的水相、从聚谷氨酸 (PGA)、聚谷氨酸-聚乙二醇 (PGA-PEG)、透明质酸 (HA) 和聚天冬酰胺 (PAsn) 组成的群组中选取一种聚合物或几种的组合物。

[0041] 在特定的实施例中, 上述过程还包括添加一种活性成分。如上述定义, 如果该聚合物是聚谷氨酸或聚谷氨酸-聚乙二醇 (PGA-PEG) 时, 所述活性成分则不是膜海鞘素 (Didemmina) 或海洋缩酚酞 (Tamandarina)。

[0042] 根据一个更具体的实例, 如果活性成分具有亲脂性, 所述活性成分将加入到纳米乳形成的过程中, 最好是溶解于乙醇中。

附图说明

[0043] 图 1: 聚谷氨酸 (1. a) 和聚谷氨酸-聚乙二醇 (1. b) 纳米胶囊在 37°C, 48 小时内粒径的演进和分散性。

[0044] 图 2: 经过各种浓度 (0.025-1% w/v 的海藻糖冷冻保护剂 (5% 和 10% w/v) 冷冻干燥后, 聚谷氨酸-聚乙二醇 (2. a) 和聚谷氨酸 (2. b) 纳米胶囊的粒径。

[0045] 图 3: 苯扎氯铵阳离子表面活性剂制备的透明质酸纳米胶囊的 TEM 图像。

[0046] 图 4: 从苯扎氯铵阳离子表面活性剂 (BKC) 和十六烷基三甲基溴化铵的阳离子表面活性剂 (CTAB) 制备的透明质酸纳米胶囊中获取的多西他赛 (DCX) 的释放曲线。

[0047] 图 5: 苯扎氯铵阳离子表面活性剂 (5. a) 和十六烷基三甲基溴化铵的阳离子表面活性剂 (5. b) 制备的透明质酸纳米胶囊的粒径演进。

[0048] 图 6: 经过各种浓度 (0.025-1% w/v) 的海藻糖冷冻保护剂 (5% 和 10% w/v) 冷冻干燥后, 苯扎氯铵阳离子表面活性剂制备的透明质酸纳米胶囊的粒径。

[0049] 图 7: 经过与白色透明质酸纳米胶囊 (NCs HA) 2 个小时 (7. a) 和 48 个小时 (7. b) 的接触, NCI-H460 癌症细胞系的成活能力。将多西他赛 (DCX) 融入溶液中, 制备成含有多西他赛的透明质酸的纳米胶囊, 形成各种抗肿瘤的浓度。在纳米囊的制备过程中使用的阳离子表面活性剂是十六烷基三甲基溴化铵。

[0050] 图 8: 苯扎氯铵阳离子表面活性剂 (8. a) 或十六烷基三甲基溴化铵的阳离子表面活性剂 (8. b) 制备的聚天冬酰胺纳米胶囊的 TEM 图像。

[0051] 图 9: 从十六烷基三甲基溴化铵的阳离子表面活性剂制备的聚天冬酰胺纳米胶囊

中获取的多西他赛 (DCX) 的释放曲线。

[0052] 图 10 :十六烷基三甲基溴化铵阳离子表面活性剂制备的聚天冬酰胺纳米胶囊,在 4℃ (10. a) 和 37℃ (10. b) 的储存过程中,粒径和 zeta 电位的演进,以及苯扎氯铵阳离子表面活性剂制备的聚天冬酰胺纳米胶囊,在 4℃ (10. c) 和 37℃ (10. d) 的储存过程中,粒径和 zeta 电位的演进。

[0053] 图 11 :经过与白色聚天冬酰胺纳米胶囊 (NCs PAsn) 2 个小时 (11. a) 和 48 个小时 (11. b) 的接触, NCI-H460 癌症细胞系的成活能力。将多西他赛 (DCX) 融入溶液中,制备成含有多西他赛的聚天冬酰胺纳米胶囊,形成各种抗肿瘤浓度。在纳米囊的制备过程中使用的阳离子表面活性剂是十六烷基三甲基溴化铵。

[0054] 图 12 :100 纳米的聚谷氨酸-聚乙二醇纳米胶囊给药后,在不同时间段内:(a) 6 小时, (b) 24 小时, (c) 48 小时,以 fotones/seg/cm²/sr 为单位的不同器官和组织的荧光强度 (皮下注射, 静脉注射)。

[0055] 图 13 :200 纳米的聚谷氨酸-聚乙二醇纳米胶囊给药后,在不同时间段内:(a) 6 小时, (b) 24 小时, (c) 48 小时,以 fotones/seg/cm²/sr 为单位的不同器官和组织的荧光强度 (皮下注射, 静脉注射)。

[0056] 图 14 :通过对瑞士白鼠进行静脉注射给药后,与 PAsn (▲), PGA (◆) 和 PGA-PEG (■) 纳米囊相关的等离子荧光裂解动力学。注射剂量百分比(与零时间的浓度相关的每个时间点的动物总重量毫克/公斤的 DID 浓度)以时间函数表示。纳米溶液 (●) 作为对照点。每个点代表一个组中注射剂量的平均百分比,公式为 $n=3 \pm D. E.$

[0057] 图 15 : (a) 在 PAsn (▲), PGA-PEG (■), 泰索帝® (-X-) 和生理盐水 (X) 制备的纳米胶囊对小白鼠给药后,随着时间的推移肿瘤的大小 (U87MG 皮下肿瘤神经胶质瘤); (b) 相对于初始体积,在注射各种制剂 18 和 21 天后小白鼠身上肿瘤。

[0058] 体积的增加。使用泰索帝® 和生理盐水的制剂进行控制。统计分析表明,与单纯的控制相比,使用纳米胶囊的制剂和泰索帝® 治疗后,18 天和 21 天后动物身上的肿瘤大小有明显差异 (* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ —F test ANOVA)。

[0059] 图 16 :与泰索帝® 给药和生理盐水控制相比较,施用添加多西紫杉醇的不同制剂的纳米胶囊 (PAsn (●), PGA-PEG (■), 泰索帝® (◆) 和生理盐水 (+)) 后,动物的 Kaplan-Meier 生存曲线图。

具体实施方式

[0060] 本发明是针对添加活性成分的纳米胶囊给药而进行设计和开发的,其中,所述系统中的纳米胶囊,直径小于 1 微米,其特征在于含有 (a) 一种从聚谷氨酸、聚谷氨酸-聚乙二醇、透明质酸、聚天冬酰胺或它们的组合物中选取的聚合物壳,以及 (b) 一个由油和阳离子性表面活性剂构成的核心。本发明的纳米胶囊最好包含至少一种活性成分,其条件是,如果该聚合物是聚谷氨酸或聚谷氨酸-聚乙二醇 (PGA-PEG) 时,所述活性成分则不是膜海鞘素 (Didemmina) 或海洋缩酚酞 (Tamandarina)。

[0061] 纳米胶囊:性质和大小

[0062] 与乳液系统相比,纳米囊系统的优点是用一种聚合物壳包裹住油性核心,可以赋

予其更高的稳定性并防止聚集,能够获取药物释放的曲线变化,更高的细胞内化以及与特定的细胞类型特异性的互动功能。

[0063] 相对于其它系统,如通常在有限载药条件下的脂质体或纳米粒子,纳米胶囊特别是亲脂性药物,由于其油性核心的存在,具有更大的载药可能性。纳米胶囊的另一大优势是能够结合不同性质的药物,如封装在胶囊核心的亲脂性药物,也可以是能够结合到所述囊壳的亲水性药物;同时,聚合物壳具备稳定性、保护性和特异性特点。

[0064] 相对于其他较大体积的系统(微粒、颗粒、薄膜、海绵等),本系统在其生物应用中也具有优势。事实上,我们知道,生物表面药物释放系统的相互作用非常受其大小限制。因此,纳米囊能够穿透黏膜并被细胞内化,作为药物运输系统,而微粒却不具有该功能。同样地,这些系统中的生物分布也受大小的限制。近年来,从世界上的纳米医学和药物输送纳米系统中获取的认知,已经在纳米级系统(例如,纳米粒子和纳米胶囊的直径小于1微米)和微系统(微粒和微胶囊)之间设置了一个明确定义。除了在细胞内化和克服复杂生物屏障方面功能的差异,在用于静脉注射抗癌药物的制剂中,纳米给药系统是必不可少的,以防止毛细血管的堵塞。同时,抵达肿瘤组织的纳米系统的可能性,与其大小及其表面的亲水性有严格的关系。

[0065] 本发明系统中的纳米胶囊的平均直径小于1微米,因此,对相应的纳米结构体系的定义是,基于尺寸小于1微米的聚合物的胶体系统,也就是说,1至999纳米之间的大小,优选在30至500纳米之间。纳米囊的大小主要是受化学成分和形成条件的影响,可以采用本领域技术人员已知的标准方法进行测量,并在下面实验部分描述。如果在制剂中改变囊壳化合物的比例,从所有纳米系统中获取的纳米胶囊的大小并不会发生明显的变化。

[0066] 同样重要的是,要注意纳米胶囊系统和“复合”系统之间的差异。人们所知的“复合”系统是由聚电解质或相反电荷的聚电解质和表面活性剂的相互作用而形成的纳米结构。而本发明的纳米胶囊系统则不同于聚谷氨酸-紫杉醇的复合物(US2003170201)或透明质酸复合物(Kim et al. J. Gene Med. (2009) 11:791),它作为一个油藏类型的纳米载体系统,在其核心部分可容纳大量的分子数,因为脂质(封装)具有较大或较小的亲和力,而起囊壳中可以加入具有亲和性(吸附性)的亲水性分子。这些功能能够保持纳米结构体的完整性和功能性,以及在生物体液的存在下提供更大的稳定性。

[0067] 成分

[0068] 聚谷氨酸(PGA)和聚谷氨酸-聚乙二醇(PGA-PEG)

[0069] 正如前面发明背景中提到的,在活性分子释放系统的设计中,聚谷氨酸和PEG的共轭组成了非常有趣的生物材料。

[0070] 在本文中所用的PGA包括PGA水溶性盐,如铵盐,以及PGA金属盐,如锂盐、钠盐、钾盐、镁盐等。此外,在一个实施例中,PGA从聚-D-谷氨酸、聚-L-谷氨酸、聚-D, L-谷氨酸、聚- α -谷氨酸、聚- α -D-谷氨酸、聚- α -L-谷氨酸、聚- α -D, L-谷氨酸、聚- γ -谷氨酸、聚- γ -D-谷氨酸、聚- γ -L-谷氨酸、聚- γ -D, L-谷氨酸以及它们的混合物中选取。在另一个实施方案中,PGA的优选方式是选择聚-L-谷氨酸,更优选的是聚-L-谷氨酸中的钠盐。还有在其他实施例中,优选聚- α -谷氨酸,更优选的是聚- α -谷氨酸中的钠盐。

[0071] 此外,本发明的纳米胶囊可以由PGA或PGA-PEG的水溶性衍生物组成,其中,PGA可以取代一个或多个可用的位置,例如,胺基团和/或羧酸,具有一个或多个合适的基团。PGA

和 PGA-PEG 的衍生物包括聚(烷基谷氨酰胺)衍生物和 PEG-聚(烷基谷氨酰胺)衍生物,如聚(N-2-(2'-羟基乙基)乙基-L-谷氨酰胺)(PEEG)、PEG-PEEG、聚(N-3-(羟基丙基)-L-谷氨酰胺)(PHPG)、PEG-PHPG、聚(N-2-(羟基乙基)-L-谷氨酰胺)(PHEG)、PEG-PHEG、聚(γ -苄基-L-谷氨酰胺)(pBG)、PEG-pBG、聚(γ -三氯乙烯-L-谷氨酸)(pTCEG)、PEG-pTCEG、聚(二甲基氨基乙基-L-谷氨酰胺)(pDMAEG)、PEG-pDMAEG、聚(吡啶基乙基-L-谷氨酰胺)(pPyAEG)、PEG-pPyAEG、聚(氨基乙基-L-谷氨酰胺)(pAEG)、PEG-pAEG、聚(组胺酶-L-谷氨酰胺)(pHisG)、PEG-pHisG、聚(胍基丁胺-L-谷氨酰胺)(pAgmG)和 PEG-pAgmG,以及它们的混合物(Hoste et al. J. Control. Release, 2000, 64, 53-61; Dekie J. Control. Release, 2000, 65, 187-202; Dubruel et al. Biomacromolecules, 2003, 4, 1168-1176)。在任何情况下,本领域的任何一位技术人员必须能够识别正在配制的 PGA 的变化,以便得到水溶性的衍生物。

[0072] 基于聚乙二醇的聚合物壳的存在,为纳米胶囊血浆提供了更大的稳定性,并增加了在体内的停留时间,更快速的为治疗目标给药。因此,与 PEG 链条的纳米材料的表面改性通过所谓的屏蔽系统(“隐形系统”)或长时间循环系统(“长循环系统”)(Park J. H. et al, 2008),能够减少单核吞噬细胞系统的获取。由于其长期在血液中存在,可以观察到这些系统能够更方便的为器官给药。此改性对抑制细胞生长的药物的运输和靶向性产生兴趣,其靶组织通常表现为乏血供和增加血管的通透性。

[0073] 聚乙二醇(PEG)其最常见的形式是(I)公式的聚合物:

[0074] $H-(O-CH_2-CH_2)_p-OH$

[0075] (I)

[0076] 其中 p 为整数,代表的 PEG 的聚合度。

[0077] 聚谷氨酸-聚乙二醇共轭的形成是采用一种改性聚乙二醇,其中一个或两个末端羟基均是改性的。可以用来获取 PGA-PEG 共轭改性的聚乙二醇包括公式(II)中提出的:

[0078] $X_1-(O-CH_2-CH_2)_p-X_2$

[0079] (II)

[0080] 其中:

[0081] X_1 是一种氢原子或一种羟基自由基的保护基团,用于锁定 OH 功能,看其随后的反应。羟基自由基的保护基团在本领域中是广为人知的;代表性的保护基团(包括要保护的氧气)是甲硅烷基醚,如三甲基甲硅烷基乙醚、三乙基甲硅烷基醚、叔丁基二甲基甲硅烷基醚、叔丁基二苯基甲硅烷基醚、三异丙基甲硅烷基醚、二甲基三甲硅烷基醚、三苯基甲硅烷基醚、二叔丁基二苯基甲硅烷基醚;烷基醚,如甲基醚、叔丁基醚、苄基醚、对甲氧基苄基醚、3', 4' -二甲氧基苄基醚、三苯甲基醚、烯丙醚;烷氧基,如甲氧基甲基醚、2-甲氧基乙氧基、苄氧基甲基醚、2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基甲基醚;四氢吡喃基醚及相关的醚;甲硫基甲基醚;酯,如乙酸酯、苯甲酸酯、新戊酸酯、甲氧基酯、氯乙酸酯、乙酰丙酸酯;碳酸盐,如苄基碳酸酯、对硝基苄基碳酸酯、叔丁基碳酸酯、碳酸酯、2, 2, 2-三氯乙基碳酸酯、2-(三甲基甲硅烷基)乙基碳酸烯丙基。羟基保护基的其它实例可以参考书籍,如 Greene 和 Wuts, John Wiley&Sons, Inc., Nueva York, 1999 “有机合成中的保护基团”。在一个优选的实施方案中,保护基团是烷基醚,优选是甲基醚。

[0082] X_2 是一个桥接组,用于锚定聚谷氨酸组和它们的衍生物组。另外, X_1 也可以作为

一个将其与其他的 PGA 或 PGA 衍生物锚定的桥接组。

[0083] 换句话说, PEG 是通过胺基团和 / 或羧酸与 PGA 及它的衍生物连接在一起的。

[0084] 聚合物的聚乙二醇化可以利用任何一种在本领域中允许使用的合适的方法进行(例如 Veronese et al. DDT, 2005, 10(21), 1451-1458; Nishiyama et al. Cancer Research 2003, 63, 8977-8983; Cabrera et al. J. Control. Release, 2005, 101, 223-232; US2003/0170201 中所描述)。

[0085] 这些聚合物可以选中多种不同的分子重量, 对于给定用途, 适合的分子重量由本领域技术人员可以很容易地确定。因此, 举个例子来说, 在 PGA 和 PGA-PEG 聚合物中 PEG 合适的分子重量大约在 1-100kDa 之间, 优选为约 5-80kDa 之间, 更优选为 10-50kDa 之间, 甚至更确切的说, 更优选为约 10kDa, 约 15kDa, 约 20kDa, 约 25kDa, 约 30kDa, 以及约 35kDa。

[0086] PEG 在 PGA-PEG 聚合物和水溶性衍生物中的分子重量可以在大约 1kDa-50kDa 之间, 优选为约 2kDa-40kDa 之间, 更优选为约 3kDa-30kDa 之间, 甚至更确切的说, 更优选为约 4kDa, 约 5kDa, 约 6kDa, 约 7kDa, 约 8kDa, 约 10kDa, 约 15kDa, 约 20kDa, 约 21kDa, 约 22kDa, 约 23kDa, 约 24kDa, 约 25kDa, 以及约 30kDa。

[0087] 另外, PGA-PEG 聚合物和它们的水溶性衍生物可供选择各种程度的聚乙二醇, 对于给定用途, 适合的聚乙二醇级由本领域技术人员可以很容易地确定。此聚乙二醇化的程度被定义为与 PEG 共同作用的 PGA 功能组的比例或 PGA 衍生物功能组的比例。因此, 适合 PGA-PEG 聚合物和其水溶性的衍生物的聚乙二醇级大约在 0.1%-10% 之间, 优选为约 0.2%-5% 之间, 更优选为约 0.5%-2% 之间, 甚至更确切的说, 更优选为约 0.5%, 约 0.6%, 约 0.7%, 约 0.8%, 约 0.9%, 约 1%, 约 1.1%, 约 1.2%, 约 1.3%, 约 1.4%, 约 1.5%, 约 1.6%, 约 1.7%, 约 1.8%, 约 1.9%, 以及约 2%。

[0088] 此外, PEG 在 PGA-PEG 聚合物和水溶性衍生物中的比例可以在大约 10% 和 90% (p/p) 之间, 相对于该聚合物的总重量, 优选为约 15% 和 80% 之间, 更优选为约 20% 和 70% 之间, 甚至更确切的说, 更优选为约 20%, 约 22%, 约 24%, 约 26%, 约 28%, 约 30%, 约 32%, 约 34%, 约 36%, 约 38%, 约 40%, 约 42%, 约 44%, 约 46%, 约 48%, 约 50%, 约 52%, 约 54%, 约 56%, 约 58%, 以及约 60%。

[0089] 透明质酸 (HA)

[0090] 纳米胶囊的表面上存在的透明质酸, 因其知名的粘附性能, 使它们能够牢固的粘附在粘膜表面。另一方面, 透明质酸有很大的潜力, 能够为细胞供给活跃的赋形药, 呈现快速增长和 CD44 受体的过度承受, 使其形成组织; 这种细胞活动的一个很明显例子是能够在各种类型的肿瘤细胞中明显的表现出来。

[0091] 本文中所用的 HA, 包括能够溶于 HA 液体中的可溶性盐类和 HA 水溶性衍生物。在一个特定的实施案例中, 透明质酸盐从钠盐、钾盐、镁盐、钙盐和锌盐的组合中选取。透明质酸盐的优选方式是钠。

[0092] 天冬酰胺 (PAsn)

[0093] 中性聚天冬酰胺在表面上的存在为纳米胶囊提供稳定性, 能够在身体器官内保存很长的寿命, 保护单核吞噬细胞系统和与特定靶细胞的特异性。

[0094] 纳米胶囊表面聚天冬酰胺的存在, 也为系统的癌细胞提供更大的特异性, 因为这些细胞需要更多的天冬酰胺, 来维持其发展。癌细胞无法自我满足这种氨基酸的需要, 与正

常细胞发生的情况相反。

[0095] 如本文所用, PAsn 包括 PAsn 水溶性盐和 PAsn 水溶性衍生物。

[0096] 纳米胶囊包括由油和阳离子表面活性剂组成的核心。

[0097] 油可以是挥发性的或非挥发性的, 在一个特定的实施例中, 从天然油、半合成和合成的药物或它们的组合中选定, 如动物油、植物油、碳氢油、硅氧烷。适合的油包括但不限于矿物油、角鲨烯油、调味油、硅氧烷油、精油、不溶于水的维生素、硬脂酸异丙酯、硬脂酸丁酯、棕榈酸辛酯、棕榈酸十六酯、十三烷基、十四烷基二十二烷酸、己二酸二异丙酯、癸二酸二辛酯、基邻氨基苯甲酸酯、辛酸鲸蜡酯、水杨酸辛酯、肉豆蔻酸异丙酯、新戊二醇酮醇、**Cerafilos[®]**、 C_{12} - C_{15} 烷基乳酸盐、乳酸十六烷基酯、乳酸月桂酯、乳酸肉豆蔻酯、异硬脂醇新戊酸酯、肉豆蔻酸根、异鲸蜡醇硬脂酸、辛基十二烷基硬脂酰硬脂酸酯、碳氢油、异构烷烃、流体石蜡、异十二烷、, 矿脂、坚果油、菜子油、辣椒油、椰子油、玉米油、棉籽油、亚麻籽油、葡萄籽油、芥子油、橄榄油、棕榈油、棕榈分提油、花生油、蓖麻油、松树种子油、罂粟籽油、, 南瓜籽油、米糠油、红花油、茶油、松露油、植物油、杏仁油、霍霍巴油、澳洲坚果、小麦胚芽油、扁桃油、大豆油、芝麻油、榛子油、葵花籽油、麻油、布瓦油、夏威夷果油、鳄梨油、核桃油、鱼油、浆果油、五香粉油、杜松油、种子油、杏仁籽油、茴香种子油、芹菜种子油、孜然油、肉豆蔻种子油、紫苏叶油、月桂叶油、肉桂叶油、普通鼠尾草叶油、桉树叶油、柠檬叶油、白千层叶油、牛至油、广藿香叶油、薄荷叶油、松针油、迷迭香叶油、留兰香油、茶树叶油、百里香叶油、加拿大茶叶油、花油、甘菊油、罗马鼠尾草油、丁香精油、天竺葵油、牛膝草花油、茉莉花油、薰衣草花油、马乌卡花油、马郁兰花油、橙花油、玫瑰花油、许依兰花油、树皮油、桂树皮油、擦树皮油、木油、樟木油、雪松油、帕洛玫瑰油、檀香油、姜油木油、妥尔油、蓖麻油、没药油、皮油、贝尔加莫果皮油、柚子皮油、柠檬果皮油、酸橙皮油、橙果皮油、陈皮油、根油、缬草油、油酸、亚油酸、油醇、异硬脂醇、油酸乙酯、**Miglyol[®]**、**Labrafil[®]**、**Labrafac[®]**、**Pecceol[®]**和 **Maisine[®]**, 合成或半合成衍生物以及它们的组合物。

[0098] 在一个更具体的实施例中, 油从花生油、棉花油、橄榄油、蓖麻油、大豆油、红花油、棕榈油; 维生素 E、肉豆蔻酸异丙酯德、角鲨烯、**Miglyol[®]**、**Labrafil[®]**、**Labrafac[®]**、**Pecceol[®]** 和 **Maisine[®]** 或它们的组合物中选定。油的首选形式是 **Miglyol[®]**。

[0099] 在本发明中, “阳离子表面活性剂”指的是拥有功能性构架和 / 或组织的组件, 能同时与制剂的亲脂性和亲水性部分相互作用, 对于阳离子功能性器官性官的存在, 这是最优选的相互作用。在特定实施例中, 阳离子表面活性剂是从油胺、硬脂胺、苯扎氯铵、苄索氯铵、氯化十六烷基吡啶鎓、十二烷基三甲基溴化铵、十六烷基三甲基溴化铵、和泊洛沙胺 (例如 **Tetronic[®]**) 或它们的混合物。阳离子表面活性剂优选溴化苯扎氯铵或十六烷基三甲基溴化铵。

[0100] 此外, 本发明的纳米胶囊可选包含一种油溶性表面活性剂、一种水溶性表面活性剂或两者都含有, 以促进系统的稳定, 允许纳米胶囊表面电荷的模块化, 并带来系统的稳定。

[0101] 在本发明中, “油溶性表面活性剂”或“水溶性表面活性剂”指的是拥有功能性构架和 / 或组织的成分, 能同时与制剂的亲脂性和亲水性部分相互作用, 相对于油溶性表面活

性剂的亲脂性部分或水溶性表面活性剂的亲水性部分,这是最优选的相互作用。

[0102] 对于这些可选的表面活性剂,根据其水溶性/油溶性的特性,本文中涉及的表面活性剂包括磷脂如卵磷脂、磷脂酰甘油、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、双磷脂酰甘油、磷脂酸、磷脂酰胆碱和磷脂酰乙醇胺;胆固醇;甘油单硬脂酸酯;聚氧乙烯聚丙烯共聚物(泊洛沙姆);聚乙二醇;聚丙二醇;鲸蜡醇;十六十八醇;硬脂醇;烷基芳基聚醚醇;脱水山梨糖醇的脂肪酸酯(如 Span[®] 和 Arlacel[®]);聚氧乙烯脂肪酸酯(如 Myrj[®]);聚氧乙烯脂肪酸酯(聚山梨醇酯),氧乙烯烷基醚(聚乙二醇醚);脂肪醇醚(如 Brij[®]),以及它们的混合物。

[0103] 根据一个优选的实施例,油溶性表面活性剂是选自卵磷脂、磷脂酰甘油、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、双磷脂酰甘油、磷脂酸、磷脂酰胆碱和磷脂酰乙醇胺中的一种磷脂,优选卵磷脂。

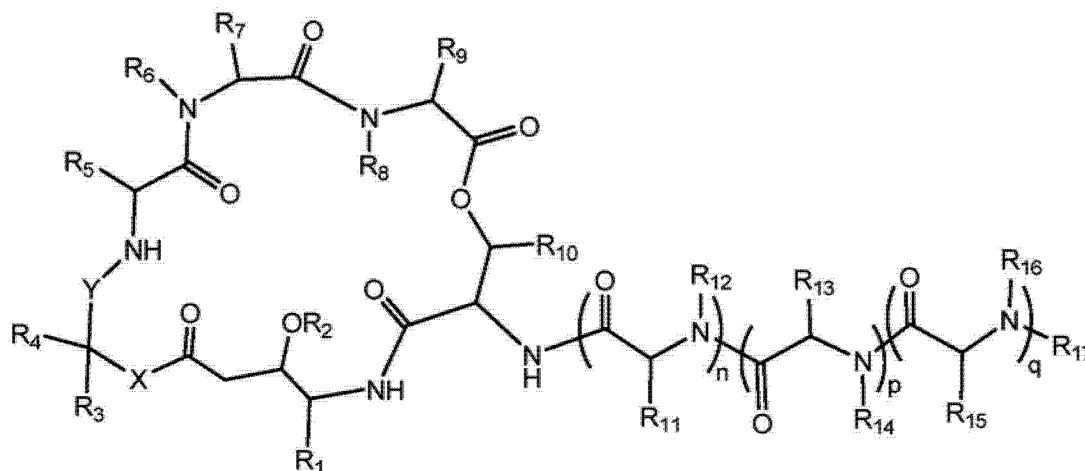
[0104] 在其他更好的实施例中,水溶性表面活性剂是聚氧乙烯亲水性衍生物,优选泊洛沙姆或聚山梨酯。在本发明中“泊洛沙姆”是指由一个聚氧丙烯中央疏水链连接到2个聚氧乙烯亲水链组成的非离子三嵌段共聚物。优选形式是泊洛沙姆 188。

[0105] 如上所定义,本发明的纳米胶囊还包含任选至少一种活性成分。“活性成分”术语是指用于处理、治疗、预防或诊断疾病或用于改善人类和动物的生理和心理健康的任何物质。活性成分可以是一种药物、维生素等。本发明的纳米胶囊系统对象是适用于掺入亲脂性或亲水性的活性成分。在一个优选的实施方案中,所述活性成分是多西他赛。

[0106] 掺入的活性成分的比例取决于要加入的每一种活性成分的具体情况,例如使用说明以及给药效率。

[0107] 纳米胶囊包含油、阳离子表面活性剂、一种 PGA 或 PGA-PEG 聚合物以及选自的一种 didemnin 或 tamandarina 的活性成分,这不在本专利申请范围内,而是 EP11382003.9 欧洲专利申请的涉及对象,主题为“纳米胶囊剂在药物组合物中的使用”,与本申请是同一天施行法律保护。didemnin 和 tamandarinas 是环缩酚酸肽,能够表现出多种生物活性,如抗肿瘤、免疫抑制和抗病毒。这类化合物的实例(不含本发明涉及的 PGA 或 PGA-PEG 纳米胶囊)属于下述通式:

[0108]



[0109] 其中 X 从 O 和 NH 中间选择;

[0110] Y 从 CO 和 -COCH(CH₃)CO- 中间选择;

[0111] n 和 p 从 0 和 1 中间独立的选择, q 从 0、1 和 2 中间选择;

[0112] R_1 、 R_3 、 R_5 、 R_9 、 R_{11} 和 R_{15} 单独从氢、取代或未取代的 C_1 - C_6 烷基、取代或未取代的 C_2 - C_6 链烯基以及取代或未取代的 C_2 - C_6 炔基中间选择;

[0113] R_2 从氢、 COR_a 、 $COOR_a$ 、取代或未取代的 C_1 - C_6 烷基、取代或未取代的 C_2 - C_6 链烯基以及取代或未取代的 C_2 - C_6 炔基中间选择;

[0114] R_4 、 R_8 、 R_{10} 、 R_{12} 和 R_{16} 单独从氢和取代或未取代的 C_1 - C_6 烷基中间选择;

[0115] R_7 和 R_{13} 单独从氢、取代或未取代的 C_1 - C_6 烷基、取代的或未取代的 C_2 - C_6 链烯基、取代或未取代的 C_2 - C_6 炔基中间选择; R_6 和 R_{14} 单独从氢和取代或未取代的 C_1 - C_6 烷基中间选择; 或 R_6 和 R_7 和 / 或 R_{13} 和 R_{14} , 连同它们所连接的相应的 N 原子和 C 原子, 可以形成取代或未取代的杂环基;

[0116] R_{17} 从氢、 COR_a 、 $COOR_a$ 、 $CONHR_b$ 、 $COSR_c$ 、 $(C=NR_b)OR_a$ 、 $(C=NR_b)NHR_b$ 、 $(C=NR_b)SR_c$ 、 $(C=S)OR_a$ 、 $(C=S)NHR_b$ 、 $(C=S)SR_c$ 、 SO_2R_c 、 SO_3R_c 、取代的或未取代的 C_1 - C_{12} 烷基、取代或未取代的 C_2 - C_{12} 链烯基和取代或未取代的 C_2 - C_{12} 炔基、取代或未取代的芳基, 以及取代或未取代的杂环基团中选择;

[0117] R_a 、 R_b 和 R_c 单独从氢、取代的或未取代的 C_1 - C_{12} 烷基、取代或未取代的 C_2 - C_{12} 链烯基和取代或未取代的 C_2 - C_{12} 炔基、取代或未取代的芳基, 以及取代或未取代的杂环基团中选择;

[0118] 或一种药学上可接受的盐, 前药或立体异构体

[0119] 特别是根据本发明, 如果纳米胶囊包含聚谷氨酸或聚谷氨酸-聚乙二醇 (PGA-PEG), 则活性成分不是缩肽。

[0120] 获取步骤

[0121] 获得纳米胶囊系统的步骤只需要通过简单的方法, 避免过于激烈的条件, 如高温直射。此外, 也没有必要进行任何的化学反应, 因为如上所述, 纳米胶囊系统的获取包括非共价相互作用。因此来保存掺入到系统中能够被降解的分子的完整性, 性能有所下降。为了在一定范围内形成所需大小的纳米胶囊, 形成包含油和阳离子性表面活性剂的油性核心, 通过不同类型的相互作用, 在其表面结合成聚合物涂层。因此, 它是一个溶剂的扩散过程中, 并以受控制的方式, 提供到系统的稳定性, 而不需要存在组件之间的共价链的创建。

[0122] 获取本发明系统的一个特定的步骤(在下面的实施例中称为溶剂扩散过程) 包括:

[0123] a) 制备一份包括从聚谷氨酸 (PGA)、聚谷氨酸-聚乙二醇 (PGA-PEG)、透明质酸 (HA) 和聚天冬酰胺 (PAsn) 或它们的组合物, 以及任选的水溶性表面活性剂组成的群组中选定聚合物的水溶液;

[0124] b) 制备一份包含油状物、阳离子表面活性剂, 以及任选的油溶性表面活性剂组成的有机溶液;

[0125] c) 搅拌混合从步骤 a) 和 b) 中得到的溶液, 自发获得的纳米胶囊;

[0126] d) 可选蒸发全部的或部分的从上述步骤中获取的混合物有机溶剂, 直到得到恒定的体积。

[0127] 在特定实施例中, 有机溶液 c) 的掺入可以在 15-25 秒之间的时间间隔内进行 250-500 微升之间体积的等分。

[0128] 本发明的系统可以通过另一种方法来制备(在后面实施例中称为溶剂扩散过程,分为两个阶段),包括通过聚合物水溶液的潜伏过程,涂抹纳米乳液的阳离子聚合物涂层。同时,纳米乳剂的形成可以通过超声波(在后面实施例中称为超声处理过程)或同质化(在后面实施例中称为同质化过程)促进。

[0129] 在一个特定的实施例中,潜伏过程包括用涂层聚合物水溶液混合阳离子纳米乳剂。

[0130] 上述阳离子纳米乳包括至少一种油、一种阳离子表面活性剂和一种水相。水相可以含有其它表面活性剂、盐和其它助剂。

[0131] 所述纳米乳的制备过程在现有技术中是已知的,并且可以包括一个扩散过程、超声处理和同质化过程(Prego et al. J. Nanosci. Nanotechnol. (2006)6:1; Tadros et al. Adv. Colloid Interface Sci. (2004)109:303)。

[0132] 获取阳离子纳米乳的另一个特别步骤(在下面的实施例中称为溶剂扩散过程)包括:

[0133] i) 制备一份包含油、阳离子表面活性剂和任选易溶于油的表面活性剂的有机溶液;

[0134] ii) 添加从步骤 i) 的水相溶液,任选包含一种水溶性的表面活性剂,经过搅拌形成阳离子纳米乳;

[0135] iii) 可选蒸发全部的或部分的混合物有机溶剂,直到得到恒定的体积。

[0136] 获取阳离子纳米乳的另一个特别步骤(在下面的实施例中称为超声处理)包括:

[0137] i) 制备一份包含油、阳离子表面活性剂和任选易溶于油的表面活性剂的有机溶液;

[0138] ii) 添加从步骤 i) 中得到的水相溶液,任选包含一种水溶性的表面活性剂并做超声处理;

[0139] iii) 用水稀释从步骤 ii) 中得到的乳液并混合;

[0140] iv) 可选蒸发全部的或部分的混合物有机溶剂,直到得到恒定的体积。

[0141] 获取阳离子纳米乳的另一个特别步骤(在下面的实施例中称为同质化过程)包括:

[0142] i) 制备一份包含油、阳离子表面活性剂和任选易溶于油的表面活性剂的有机溶液;

[0143] ii) 添加从步骤 i) 中得到的水相溶液,任选包含一种水溶性的表面活性剂并做同质化;

[0144] iii) 用水稀释从步骤 ii) 中得到的乳液并做同质化;iv) 可选蒸发全部的或部分的混合物有机溶剂,直到得到恒定的体

[0145] 积。

[0146] 根据上述步骤的特定实施例,如果活性成分是亲脂性或两亲性的,所述活性成分被添加到步骤 b) 或步骤 i) 的有机溶液中。根据其他的特定实施例,如果活性成分是亲水性的,所述活性成分被添加到步骤 a) 或步骤 ii) 的溶液中。所述亲水性活性成分以优选的方式添加溶解在水溶液中。另外,一旦形成纳米胶囊,也可以将亲水性活性成分通过其吸附性附加到步骤 d) 或经过潜伏过程后获取的纳米胶囊悬浮液中。

[0147] 纳米胶囊制剂以不同的比例混合一定量的包含聚合物水溶液包衣的阳离子

[0148] 纳米乳剂溶液制成,通过改变表面聚合物的比率。

[0149] 在一个具体的实施例中,PGA、PGA-PEG 和 HA 的掺入比例介于 0.05 - 12% p/p (聚合物涂层的重量 / 制剂的重量,干基)。所述涂层聚合物的水溶液中含有 1-60 毫克 / 毫升的所述聚合物。

[0150] 在另一个具体实施例中,PAsn 的掺入比例介于 2.5% -30% p/p 之间(聚合物涂层的重量 / 制剂的重量,干基)。所述涂层聚合物的水溶液中含有 1-60 毫克 / 毫升的所述聚合物。

[0151] 有机溶液中的溶剂优选极性溶剂的混合物,如乙醇和丙酮,也可包括非极性溶剂如二氯甲烷。在这种有机相中掺入油和阳离子表面活性剂,可选油溶性的表面活性剂。在一个特定的组合物中也采用了活性成分。

[0152] 经过以上描述的第一个步骤,获得本发明 PGA 或 PGA-PEG 纳米囊系统的一个特别的实施例包括:

[0153] a) 制备 20 毫升含 0.25%w/v 泊洛沙姆 188 的水溶液,其中溶解 0.1-25 毫克的聚谷氨酸或聚谷氨酸-聚乙二醇;

[0154] b) 制备一份用乙醇 / 丙酮卵磷脂溶液和阳离子表面活性剂组成的油相(苯扎氯铵或十六烷基三甲基溴化铵),并掺入 Miglyol[®] 812;

[0155] c) 搅拌混合从步骤 a) 和 b) 中得到的溶液,自发获得的纳米胶囊;

[0156] d) 可选蒸发从前一步骤获得的混合物有机溶剂,直到得到恒定的体积。经过以上描述的第一个步骤,获得本发明 PAsn 纳米囊系统的一个特别的实施例包括:

[0157] a) 制备 10 毫升体积的水溶液,其中溶解 0.5-25 毫克的聚天冬酰胺;

[0158] b) 制备一份用乙醇 / 丙酮卵磷脂溶液和阳离子表面活性剂组成的油相(苯扎氯铵或十六烷基三甲基溴化铵),并掺入 Miglyol[®] 812;

[0159] c) 搅拌混合从步骤 a) 和 b) 中得到的溶液,自发获得的纳米胶囊;

[0160] d) 可选蒸发从前一步骤获得的混合物有机溶剂,直到得到恒定的体积。经过以上描述的第一个步骤,获得本发明 HA 纳米囊系统的一个特别的实施例包括:

[0161] a) 制备 20 毫升含有 0.25% w/v 的泊洛沙姆 188 的水溶液,其中溶解 0.1-25 毫克的透明质酸;

[0162] b) 制备一份用乙醇 / 丙酮卵磷脂溶液和阳离子表面活性剂组成的油相(苯扎氯铵或十六烷基三甲基溴化铵),并掺入 Miglyol[®] 812;

[0163] c) 搅拌混合从步骤 a) 和 b) 中得到的溶液,自发获得的纳米胶囊;

[0164] d) 可选蒸发从前一步骤获得的混合物有机溶剂,直到得到恒定的体积。纳米胶囊系统的制备过程包括一个额外的冷冻干燥过程,以便使其在贮存期间保持原有的特色。对于系统的冻干,需要添加糖发挥冷冻保护效果。对其进行冷冻干燥所用的糖,例如,海藻糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、甘露糖醇、聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)。冻干形式的纳米胶囊可以储存很长一段时间,并很容易再生,如果情况允许的话,简单的添加适量的水。

[0165] 根据这一额外的步骤,本发明还涉及纳米胶囊系统,包括冻干形式的聚谷氨酸、聚谷氨酸-聚乙二醇,聚天冬酰胺或透明质酸胶囊壳。

[0166] 本文所述的纳米胶囊系统无论在悬浮状态还是以冻干的形式,均呈现足够的稳定

性。另一方面,稳定性的研究表明无论是给人的器官给药后还是给动物的器官给药后,均不会遭受快速的聚集或破坏的过程,但是能够保持其纳米胶囊的形状直到到达目标组织或细胞。

[0167] 与其他的药物给药系统和 / 或药物释放系统相比,本发明的纳米胶囊系统具有一定的优势,由于其以下独特的特性:

[0168] - 活性成分的封装 / 组合:该系统可包括一种或多种亲水性或亲脂性的活性成分或佐剂,以较纳米颗粒、微胶粒、复合物、纳米凝胶高的比例。

[0169] - 活性成分的释放:胶囊壳具有相同的释放速率,根据其应用和需要,允许活性成分的可控释。

[0170] - 生物体液中的稳定性:聚合物壳给予脂质核心极大的稳定性,针对其他微系统和纳米乳液系统,这就代表了它的一个优点。

[0171] - 生物表面某些特定的相互作用:聚合物壳给予脂质核心与粘膜表面相互作用的可能性,以及与上皮细胞和特定的细胞的相互作用的可能性。

[0172] 因此,本发明在一个特定的实施例涉及的是一个药物的组合,包括上面所述的纳米系统,以及任选地一种或多种药学上可接受的赋形剂。特别是,在本发明的纳米胶囊中的掺入活性成分源于系统,其特性与它的组成、性能和形态结构有关,使它们在治疗领域获得巨大的成功。在本发明系统中掺入的活性成分是那些根据治疗中制剂的应用,具有适当药物治疗特性的成分。在一个特定的实施例中,活性成分从肽、蛋白质、脂类或亲脂性化合物、糖类化合物、核酸化合物或如寡核苷酸的核苷酸、多核苷酸或以上提到的分子组合中选定。

[0173] 在一个优选的实施例中,亲脂性活性成分为多西他赛。

[0174] 在一个优选的实施例中,掺入的活性成分从寡核苷酸、ARN 干扰、ADN 质粒或多核苷酸,更优选的活性成分是一种 ADN 质粒。

[0175] 在另一个优选的实施例中,掺入的活性成分是疏水性、两亲性或亲水性的性质。优选两亲性或疏水性的活性成分添加到本发明制备的纳米胶囊方法步骤 b) 中。亲水性的活性成分优选加入到步骤 a) 中或通过潜伏过程添加到步骤 d) 之后。然而,本发明还考虑到其他的实施例,如在步骤 b) 中添加溶解在小体积水相的亲水性活性成分。与封装在纳米胶囊内的疏水性活性成分不同的是,亲水性活性成分可以通过其吸附作用附加到其表面上。

[0176] 如上述定义,如果本发明的纳米胶囊包含的聚合物是聚谷氨酸或聚谷氨酸-聚乙二醇 (PGA-PEG),则活性成分不会是膜海鞘素 (Didemmina) 或海洋缩酚酞 (Tamandarina)。

[0177] 所述药物组合可以以不同的方式给药,如通过粘膜给药、局部给药或胃肠道给药。

[0178] 相对于纳米胶囊系统的组成部分的总重量和干基,在系统中掺入的活性成分比例重量可高达约 50%。然后,适当的比例取决于在每一种情况下掺入的有效成分、要使用的指示以及给药效率。在特定实施例中,亲脂性活性成分的比例在重量上可高达约 10%,优选至多约 5%。

[0179] 如上所述,本文所述的纳米胶囊系统掺入一种以上的活性成分,可被溶解在同一溶液中,或分别溶解,这取决于要加入的分子的特性,防止任何相互作用的存在,无论是化学或物理的。

[0180] 如上文所定义,本发明涉及制备药物中所述系统的使用。在一个特定的实施例中,这种用法与癌症治疗有关。

[0181] 接下来,为了更好地理解本发明的特点和优势,将参考一系列案例以说明的形式完成上面的描述,但不意味着尽显于此。

[0182] 实施例

[0183] 下面显示了在整个实施例中所用缩略语的含义

[0184] PGA=聚-L-谷氨酸;在下列实施例中使用的PGA盐是分子量在15000和50000之间(SIGMA)的钠盐。

[0185] PGA-PEG16000Da=聚-L-谷氨酸-聚乙二醇;在下列实施例中使用的GA-PEG盐是分子量在16000Da的钠盐,特别是与6%的聚乙二醇化的百分比以及1000Da PEG链的尺寸(美国亚拉曼达聚合物)。

[0186] PGA-PEG22000Da=聚-L-谷氨酸-聚乙二醇;在下列实施例中使用的GA-PEG盐是分子量在22000Da的钠盐,特别是与93%的聚乙二醇化的百分比以及20000Da PEG链的尺寸(美国亚拉曼达聚合物)。

[0187] PGA-PEG35000Da=聚-L-谷氨酸-聚乙二醇;在下列实施例中使用的GA-PEG盐是分子量在35000Da的钠盐,特别是与60%的聚乙二醇化的百分比以及20000Da PEG链的尺寸(美国亚拉曼达聚合物)。

[0188] HA=透明质酸;在下列实施例中使用的HA是透明质酸钠,分子重量在20000-50000Da之间以及165000Da(法国Imquiaroma)。

[0189] PAsn=聚天冬酰胺;所使用的聚天冬酰胺优先的分子量为5000-15000Da之间,约5%的天门冬氨酸残基(SIGMA)。

[0190] BKC=苯扎氯铵(SIGMA)。

[0191] CTAB=十六烷基三甲基溴化铵(SIGMA)。

[0192] DCX=多西他赛(SIGMA)。

[0193] 纳米乳(NE)=为简单起见,这个术语用在包含卵磷脂, **MIGLYOL® 812** 和阳离子表面活性剂(苯扎氯铵或十六烷基三甲基溴化铵)的纳米系统的实施例中,阳离子表面活性剂可选泊洛沙姆188,它与纳米胶囊的唯一区别是在系统表面不存在聚合物涂层。

[0194] PGA 纳米乳(NCs)=为简单起见,这个术语用在纳米系统的实施例和图片中,其纳米胶囊包括卵磷脂、**MIGLYOL® 812**、苯扎氯、泊洛沙姆188和PGA。

[0195] PGA-PEG 纳米乳(NCs)=为简单起见,这个术语用在纳米系统的实施例和图片中,其纳米胶囊包括不同分子量的PGA-PEG共聚物 and 不同比例的聚乙二醇、卵磷脂、**MIGLYOL812**、苯扎氯铵、泊洛沙姆188。

[0196] HA 纳米胶囊(NCs)=为简单起见,这个术语用在纳米系统的实施例和图片中,其纳米胶囊包括卵磷脂、**MIGLYOL® 812**、阳离子表面活性(苯扎氯铵或十六烷基三甲基溴化铵)、泊洛沙姆188和HA。

[0197] PAsn 纳米胶囊(NCs)=为简单起见,这个术语用在纳米系统的实施例和图片中,其纳米胶囊包括聚天冬酰胺、卵磷脂、**MIGLYOL® 812**、阳离子表面活性(苯扎氯铵或十六烷基三甲基溴化铵)以及可选泊洛沙姆188。

[0198] 实施例1:根据聚合物的量,评估PGA纳米囊和PGA-PEG纳米囊的物理-化学热性

[0199] 实施例1.1:根据溶剂扩散过程,制备由油性芯组成的聚谷氨酸或聚谷氨酸-聚乙

二醇壳纳米微胶囊,分为两个阶段:

[0200] i) 制备一份由乙醇/丙酮(0.5:9 毫升)卵磷脂(30 毫克)的溶液以及苯扎氯铵阳离子表面活性剂(7 毫克)组成的油相,并在其中加入 125 微升的 Miglyol[®] 812;

[0201] ii) 在步骤 i) 中得到的溶液中加入约 2 毫升的含有 0.25% w/v 的泊洛沙姆 188 的水中,并用磁力搅拌 10 分钟;并由此自发获得阳离子纳米乳;

[0202] iii) 将有机溶剂蒸发至恒定的体积,以形成阳离子纳米乳;

[0203] iv) 通过与水溶液(1.5 毫升)的潜伏过程,涂抹从步骤 iii) 中得到的阳离子纳米乳,该水溶液由 0.1 至 25 毫克/毫升的聚谷氨酸或聚谷氨酸-聚乙二醇组成,以 4:1.5v/v 的比例(纳米乳:聚合物溶液),即刻会形成涂层,这与温度无关。

[0204] 制备完成后,测量平均直径、多分散性指数(PI)、以及其表面负荷(zeta 电位)。在表 1、2、3 和 4 中列出根据不同分子量的聚谷氨酸或聚谷氨酸-聚乙二醇,从步骤 iv) 中得到的参数值。

[0205] 表 1

[0206]

制剂	PGA 步骤 iv (mg)	尺寸 (nm)	PI	Zeta 电位 (mV)
NC PGA	100	X		
NC PGA	50	X		
NC PGA	25	X		
NC PGA	10	199 ± 7	0,1	-60 ± 1
NC PGA	5	196 ± 6	0,1	-54 ± 4
NC PGA	1	206 ± 6	0,1	-28 ± 3

[0207]

[0208] X= 不形成纳米胶囊

[0209] 表 2

[0210]

制剂	PGA-PEG 16000Da 步骤 iv (mg)	尺寸 (nm)	PI	Zeta 电位 (mV)
NC PGA-PEG 16000Da	100	X		
NC PGA-PEG 16000Da	50	X		
NC PGA-PEG 16000Da	25	198 ± 4	0.1	-60 ± 1
NC PGA-PEG 16000Da	10	194 ± 8	0.1	-55 ± 2
NC PGA-PEG 16000Da	5	219 ± 15	0.2	-56 ± 1
NC PGA-PEG 16000Da	1	252 ± 6	0.2	-28 ± 6

[0211] X= 不形成纳米胶囊

[0212] 表 3

[0213]

制剂	PGA-PEG 22000Da 步骤 iv (mg)	尺寸 (nm)	PI	Zeta 电位 (mV)
NC PGA-PEG 22000Da	100	227 ± 6	0.1	-6 ± 1
NC PGA-PEG 22000Da	50	223 ± 1	0.1	-1 ± 2
NC PGA-PEG 22000Da	25	225 ± 9	0.1	+2 ± 3
NC PGA-PEG 22000Da	10	224 ± 2	0.1	+11 ± 2
NC PGA-PEG 22000Da	5	222 ± 1	0.1	+15 ± 4
NC PGA-PEG 22000Da	1	211 ± 3	0.1	+26 ± 1

[0214] 表 4

[0215]

制剂	PGA-PEG 35000Da 步骤 iv (mg)	尺寸 (nm)	PI	Zeta 电位 (mV)
NC PGA-PEG 35000Da	100	201 ± 10	0.1	-41 ± 1
NC PGA-PEG 35000Da	50	200 ± 8	0.1	-45 ± 2
NC PGA-PEG 35000Da	25	210 ± 12	0.2	-29 ± 1
NC PGA-PEG 35000Da	10	204 ± 3	0.1	-29 ± 2
NC PGA-PEG 35000Da	5	207 ± 7	0.1	-30 ± 12
NC PGA-PEG 35000Da	1	263 ± 5	0.1	+2 ± 1

[0216]

[0217] 实施例 1.2 :根据溶剂的扩散过程,制备由油性芯组成的聚谷氨酸或聚谷氨酸-聚乙二醇壳纳米微胶囊,分为一个阶段:

[0218] a) 制备一份水溶液(20 毫升),在水溶液中稀释 0.5 至 25 毫克/毫升聚谷氨酸或聚谷氨酸-聚乙二醇,得到一份含有 0.25% w/v 的泊洛沙姆 188 的水溶液;

[0219] b) 制备一份由乙醇/丙酮(0.5:9 毫升)卵磷脂(30 毫克)的溶液以及苯扎氯铵阳离子表面活性剂(7 毫克)组成的油相,并在其中加入 125 微升的 Miglyol® 812;

[0220] c) 用磁力搅拌从步骤 a) 和 b) 中所得到的溶液,混合 10 分钟,然后自发获得的纳米胶囊;

[0221] d) 将有机溶剂蒸发至恒定的体积,以形成阳离子纳米乳;制备完成后,测量平均直径、多分散性指数、以及其表面负荷(zeta 电位)。在表 5、6、7 和 8 中列出根据聚谷氨酸或聚谷氨酸-聚乙二醇的量,从步骤 a) 的水溶液中得到的参数值。

[0222] 表 5

[0223]

制剂	PGA 步骤 a(mg)	尺寸 (nm)	PI	Zeta 电位 (mV)
NC PGA	100	170±14	0.1	-57±52
NC PGA	50	155±7	0.1	-57±3
NC PGA	25	178±5	0.0	-43±2
NC PGA	10	202±5	0.126	-45±1, 5
NC PGA	5	193±25	0.1	-48±1
NC PGA	1	217±3	0.1	-25±2

[0224] 表 6

[0225]

制剂	PGA-PEG 16000Da 步骤 a (mg)	尺寸 (nm)	PI	Zeta 电位 (mV)
NC PGA-PEG 16000Da	100	151±5	0.1	-64±1
NC PGA-PEG 16000Da	50	172±8	0.2	-67±3
NC PGA-PEG 16000Da	25	169±4	0.1	-60±1
NC PGA-PEG 16000Da	10	152±3	0.1	-49±1
NC PGA-PEG 16000Da	5	166±4	0.1	-42±3
NC PGA-PEG 16000Da	1	176±5	0.1	-36±2

[0226]

[0227] 表 7

[0228]

制剂	PGA-PEG 22000Da 步骤 a (mg)	尺寸 (nm)	PI	Zeta 电位 (mV)
NC PGA-PEG 22000Da	100	227±1	0.1	-0,5±1
NC PGA-PEG 22000Da	50	242±1	0.1	+3±4
NC PGA-PEG 22000Da	25	235±6	0.1	+13±2
NC PGA-PEG 22000Da	10	222±5	0.1	+16±2
NC PGA-PEG 22000Da	5	215±1	0.1	+25±1
NC PGA-PEG 22000Da	1	221±2	0.1	+21±5

[0229] 表 8

[0230]

制剂	PGA-PEG 35000Da 步骤 a (mg)	尺寸 (nm)	PI	Zeta 电 位 (mV)
NC PGA-PEG 35000Da	100	174 ± 4	0.1	-42 ± 3
NC PGA-PEG 35000Da	50	188 ± 6	0.1	-39 ± 3
NC PGA-PEG 35000Da	25	178 ± 5	0.1	-43 ± 1
NC PGA-PEG 35000Da	10	170 ± 2	0.1	-26 ± 2
NC PGA-PEG 35000Da	5	192 ± 2	0.1	-15 ± 1
NC PGA-PEG 35000Da	1	170 ± 4	0.1	-18 ± 2

[0231] 实施例 1.3 :根据超声处理步骤,制备由油性芯组成的聚谷氨酸或聚谷氨酸-聚乙二醇壳纳米微胶囊:

[0232] 制备一份由卵磷脂的溶液(30 毫克)和苯扎氯铵阳离子表面活性剂(7 毫克)组成的油相,在二氯甲烷溶液(1 毫升)中加入 125 微升的 Miglyol® 812;

[0233] i) 在步骤 i) 中得到的溶液中加入约 2 毫升的含有 0.25% w/v 的泊洛沙姆 188 的水中,并经过 1 分钟的超声处理;

[0234] ii) 稀释所得的乳液与水(以 1:10 的比例稀释);

[0235] iii) 将有机溶剂蒸发至恒定的体积,以形成阳离子纳米乳;

[0236] iv) 通过与水溶液(1.5 毫升)的潜伏过程,涂抹从步骤 iv) 中得到的阳离子纳米乳,该水溶液由 0.1 至 25 毫克/毫升的聚谷氨酸或聚谷氨酸-聚乙二醇组成,以 4:1.5 的比例(纳米乳:聚谷氨酸或聚谷氨酸-聚乙二醇的稀释),即刻会形成涂层,这与温度无关。

[0237] 制备完成后,测量平均直径、多分散性指数、以及其表面负荷(zeta 电位)。在表 9、10、11 和 12 中列出根据聚谷氨酸或聚谷氨酸-聚乙二醇的量,从步骤 v) 中得到的参数值。

[0238] 表 9

制剂	PGA 步骤 v (mg)	尺寸 (nm)	PI	Zeta 电位 (mV)
NC PGA	100	X		
NC PGA	50	X		
NC PGA	25	X		
NC PGA	10	195 ± 1	0.1	-62 ± 4
NC PGA	5	192 ± 2	0.1	-64 ± 1
NC PGA	1	194 ± 4	0.1	-27 ± 2

[0240] X= 不形成纳米胶囊

[0241] 表 10

[0242]

制剂	PGA-PEG 16000Da 步骤 v (mg)	尺寸 (nm)	PI	Zeta 电位 (mV)
NC PGA-PEG 16000Da	100	X		
NC PGA-PEG 16000Da	50	X		
NC PGA-PEG 16000Da	25	202 ± 25	0.2	-60 ± 2
NC PGA-PEG 16000Da	10	194 ± 5	0.1	-57 ± 3
NC PGA-PEG 16000Da	5	193 ± 4	0.1	-59 ± 2
NC PGA-PEG 16000Da	1	243 ± 15	0.1	-22 ± 7

[0243] X= 不形成纳米胶囊

[0244] 表 11

[0245]

制剂	PGA-PEG22000Da 步骤 v (mg)	尺寸 (nm)	PI	Zeta 电位 (mV)
NC PGA-PEG22000Da	100	195 ± 5	0.1	-6 ± 1
NC PGA-PEG22000Da	50	180 ± 12	0.1	-4 ± 1
NC PGA-PEG22000Da	25	175 ± 9	0.1	-1 ± 1
NC PGA-PEG22000Da	10	174 ± 11	0.1	+6 ± 1
NC PGA-PEG22000Da	5	172 ± 12	0.1	+10 ± 1
NC PGA-PEG22000Da	1	132 ± 10	0.3	+25 ± 1

[0246]

[0247] 表 12

[0248]

制剂	PGA-PEG 35000Da 步骤 v (mg)	尺寸 (nm)	PI	Zeta 电位 (mV)
NC PGA-PEG 35000Da	100	203 ± 10	0.1	-45 ± 1
NC PGA-PEG 35000Da	50	205 ± 1	0.1	-41 ± 1
NC PGA-PEG 35000Da	25	206 ± 3	0.1	-40 ± 1
NC PGA-PEG 35000Da	10	209 ± 4	0.2	-31 ± 4
NC PGA-PEG 35000Da	5	200 ± 15	0.1	-2,2 ±
NC PGA-PEG 35000Da	1	224 ± 3	0.1	+1 ± 1

[0249] 实施例 1.4 :根据同质化步骤,制备由油性芯组成的聚谷氨酸或聚谷氨酸-聚乙二醇壳纳米微胶囊:

[0250] 制备一份由卵磷脂的溶液(30 毫克)和苯扎氯铵阳离子表面活性剂(7 毫克)组成的油相,在二氯甲烷溶液(1 毫升)中加入 125 微升的 Miglyol® 812;

[0251] 在步骤 i) 中得到的溶液中加入约 2 毫升的含有 0.25% w/v 的泊洛沙姆 188 的水中,并以 16000 转的速度匀化 5 分钟,然后再 19000 转的速度匀化 5 分钟;

[0252] 稀释所得的乳液与水(以 1:10 的比例稀释),以 22000 转的速度匀化 3 分钟;

[0253] 将有机溶剂蒸发至恒定的体积,以形成纳米乳的阳离子;

[0254] 通过与水溶液(1.5 毫升)的潜伏过程,涂抹从步骤 iv) 中得到的纳米乳,该水溶液由 0.1 至 25 毫克/毫升的聚谷氨酸或聚谷氨酸-聚乙二醇组成,以 4:1.5 的比例(纳米乳:聚谷氨酸或聚谷氨酸-聚乙二醇的稀释),即刻会形成涂层,这与温度无关。

[0255] 制备完成后,测量平均直径、多分散性指数、以及其表面负荷(zeta 电位)。在表 13、14、15 和 16 中列出根据聚谷氨酸或聚谷氨酸-聚乙二醇的量,从步骤 v) 中得到的参数值。

[0256] 表 13

制剂	PGA 步骤 v (mg)	尺寸 (nm)	PI	Zeta 电位 (mV)
NC PGA	100	X		
NC PGA	50	X		
NC PGA	25	X		
NC PGA	10	187 ± 7	0.2	-65 ± 5
NC PGA	5	184 ± 10	0.2	-55 ± 1
NC PGA	1	234 ± 7	0.3	-22 ± 1

[0258] X= 不形成纳米胶囊

[0259] 表 14

[0260]

制剂	PGA-PEG 16000Da 步骤 v (mg)	尺寸 (nm)	PI	Zeta 电位 (mV)
NC PGA-PEG 16000Da	100	X		
NC PGA-PEG 16000Da	50	X		
NC PGA-PEG 16000Da	25	199 ± 17	0.2	-69 ± 1
NC PGA-PEG 16000Da	10	197 ± 7	0.1	-63 ± 1
NC PGA-PEG 16000Da	5	202 ± 15	0.2	-54 ± 1
NC PGA-PEG 16000Da	1	206 ± 8	0.5	-22 ± 1

[0261] X= 不形成纳米胶囊

[0262] 表 15

[0263]

制剂	PGA-PEG 22000Da 步骤.v (mg)	尺寸 (nm)	PI	Zeta 电位 (mV)
NC PGA-PEG 22000Da	100	201 ± 2	0.1	-8 ± 1
NC PGA-PEG 22000Da	50	199 ± 1	0.2	-2 ± 1
NC PGA-PEG 22000Da	25	202 ± 8	0.2	+4 ± 1
NC PGA-PEG 22000Da	10	210 ± 11	0.3	+14 ± 1
NC PGA-PEG 22000Da	5	195 ± 1	0.2	+17 ± 3
NC PGA-PEG 22000Da	1	201 ± 7	0.3	+35 ± 1

[0264] 表 16

[0265]

制剂	PGA-PEG 35000Da 步骤 v (mg)	尺寸 (nm)	PI	Zeta 电位 (mV)
NC PGA-PEG 35000Da	100	189 ± 14	0.2	-42 ± 2
NC PGA-PEG 35000Da	50	186 ± 7	0.2	-33 ± 7
NC PGA-PEG 35000Da	25	206 ± 20	0.2	-37 ± 1
NC PGA-PEG 35000Da	10	197 ± 17	0.2	-37 ± 1
NC PGA-PEG 35000Da	5	194 ± 1	0.2	-24 ± 2
NC PGA-PEG 35000Da	1	216 ± 20	0.2	+7 ± 1

[0266] 实施例 2: 评估在 35000Da 的聚谷氨酸或聚谷氨酸-聚乙二醇纳米胶囊中多西紫杉醇亲脂性药物的封装能力

[0267] 以纳米盐的形式制备 35000Da 的聚谷氨酸或聚谷氨酸-聚乙二醇纳米胶囊, 根据

前面描述的操作步骤,由卵磷脂、Miglyol® 812、苯扎氯铵(7 毫克)以及泊洛沙姆 188 组成一种油状的核心。并掺入亲脂性药物,我们考虑采用多西紫杉醇,一种几乎不溶于水的抗肿瘤剂。相对与先前所描述的实施例 1.1 的步骤的处理过程,做了一些修改,在乙醇中掺入一小分的活性成分原液(1-100 毫克 / 毫升)被引入到油相中。随后旋转蒸发系统直到得到一个恒定的体积,并与 35000Da 的聚谷氨酸或聚谷氨酸-聚乙二醇溶液一同潜伏,形成多西紫杉醇封装的纳米胶囊 / 35000Da 的聚谷氨酸或聚谷氨酸-聚乙二醇纳米胶囊,重量比高达 4%。

[0268] 在相关的时间内测量粒径的大小,随着时间的推移获得系统的演变信息。同时,还需要评估纳米胶囊稳定性的储存温度(37℃)的效果。图 1a 和图 1b 列出的结果显示了在贮存过程中 35000Da 的聚谷氨酸或聚谷氨酸-聚乙二醇的纳米胶囊的粒径为 5.8% μ m。

[0269] 一旦根据本发明的方法步骤制备好纳米胶囊,需确定封装效率(通过高分辨率液相色谱评估游离药物, $\lambda = 227\text{nm}$),得到一个封装效率 $\approx 60\%$ 。还需要测量平均粒径、多分散性指数、以及 zeta 电位这些参数值(见表 17)。

[0270] 表 17

[0271]

制剂	尺寸 (nm)	PI	Zeta 电位 (mV)
NC PGA	160 $\pm$ 4	0.1	-47 $\pm$ 2
NC PGA-PEG35000Da	180 $\pm$ 4	0.1	-20 $\pm$ 4

[0272] 实施例 3:评估贮存期间 35000Da 的聚谷氨酸或聚谷氨酸-聚乙二醇纳米胶囊制剂的粒径

[0273] 以纳米盐的形式制备 35000Da 的聚谷氨酸或聚谷氨酸-聚乙二醇纳米胶囊,根据前面描述的操作步骤,由卵磷脂、Miglyol® 812、苯扎氯铵(7 毫克)以及泊洛沙姆 188 组成一种油状的核心。在相关的时间内测量粒径的大小,随着时间的推移获得系统的演变信息。同时,还需要评估储存温度(37℃)对纳米胶囊稳定性的影响。图 1a 和图 1b 列出的结果显示了在贮存过程中 35000Da 的聚谷氨酸或聚谷氨酸-聚乙二醇的纳米胶囊的粒径为 5.8% μ m。

[0274] 实施例 4:评估冷冻干燥过程后冷冻保护剂海藻糖对聚谷氨酸或聚谷氨酸-聚乙二醇纳米胶囊粒径的影响

[0275] 以纳米盐的形式制备 35000Da 的聚谷氨酸或聚谷氨酸-聚乙二醇纳米胶囊,根据前面描述的操作步骤,由卵磷脂、Miglyol® 812、苯扎氯铵(7 毫克)以及泊洛沙姆 188 组成一种油状的核心。我们评估了在聚谷氨酸或聚谷氨酸-聚乙二醇纳米胶囊的冻干过程中,冷冻保护剂海藻糖含有的效果,以及后期经过两种浓度的海藻糖的再悬浮测试后粒径的恢复,5-10% w/v。同时,还需要评估纳米胶囊浓度(0.025-1%w/v)在冷冻干燥悬浮液中的影响。图 2a 和图 2b 列出的结果显示了在悬浮过后 35000Da 的聚谷氨酸或聚谷氨酸-聚乙二醇的纳米胶囊的粒径。

[0276] 实施例 5:根据聚合物的分子量,对 HA 及 HA-PEG 纳米胶囊的物理及化学特性所进行的评估。

[0277] 实施例 5.1 :根据两个阶段的溶剂扩散过程,制备由 HA 涂覆的一个油质核心组成的纳米胶囊:

[0278] i) 制备一个由卵磷脂(30 毫克)的乙醇/丙酮溶液(0.5:9 毫升)和苯扎氯铵阳离子表面活性剂(4 毫克)或十六烷基三甲基溴化铵(1.8 毫克)组成的油相,向其中加入 125 微升 Miglyol® 812;

[0279] ii) 将步骤 i)中得到的水溶液加入到 20 毫升 0.25% w/v 的泊洛沙姆 188,在磁力搅拌下保持 10 分钟,这样就自发地得到阳离子纳米乳剂;

[0280] iii) 该有机溶剂蒸发至体积不变;

[0281] iv) 通过温育过程,用 0.1-25 毫克的透明质酸钠组成的水溶液(1.5 毫升)涂覆步骤 iii)中获得的阳离子纳米乳剂,其中前后两者比为 4:1.5 (纳米乳剂:HA 溶液)不论温度高低,立即生成涂覆物。

[0282] 制备完成后,测量平均直径,多分散性指数及其表面电荷(电势 ζ),并且通过透射电子显微镜(图 3)给纳米胶囊照相。表 18 和 19 分别显示了在步骤 iv) HA 数量为 2-5 万 DA 的溶液中使用苯扎氯铵(表 18)或十六烷基三甲基溴化铵(表 19)所获得的参数数值。表 20 显示了在步骤 iv)中 HA 的数量为 16 万 DA 的溶液中使用苯扎氯铵所获得的参数数值。

[0283] 表 18

[0284]

化学式	HA 步骤 iv(mg)	体积 (nm)	PI	电势 ζ (mV)
NE	—	223 $\pm$ 10	0.1	27 $\pm$ 3
NCs HA	25	252 $\pm$ 19	0.1	-46 $\pm$ 2
NCs HA	12.5	235 $\pm$ 13	0.1	-45 $\pm$ 4
NCs HA	6.25	248 $\pm$ 10	0.2	-42 $\pm$ 2
NCs HA	0.5	249 $\pm$ 10	0.2	9 $\pm$ 2

[0285] 表 19

[0286]

化学式	HA 步骤 iv(mg)	体积 (nm)	PI	电势 ζ (mV)
NE	—	215 $\pm$ 7	0.1	35 $\pm$ 2
NCs HA	12.5	260 $\pm$ 20	0.2	-31 $\pm$ 3
NCs HA	6.25	238 $\pm$ 3	0.1	-37 $\pm$ 2
NCs HA	3.125	238 $\pm$ 2	0.1	-35 $\pm$ 2
NCs HA	0.1	231 $\pm$ 8	0.1	18 $\pm$ 2

[0287] 表 20

[0288]

化学式	HA 步骤 iv(mg)	体积 (nm)	PI	电势 ζ (mV)
NE	—	207 ± 5	0.1	27 ± 3
NCs HA	25	410 ± 70	0.5	-59 ± 6
NCs HA	12.5	294 ± 40	0.4	-62 ± 8
NCs HA	6.25	256 ± 11	0.5	-52 ± 8
NCs HA	1	271 ± 53	0.5	3 ± 1
NCs HA	0.5	235 ± 10	0.2	27 ± 3

[0289] 实施例 5.2 : 根据一个阶段的溶剂扩散过程, 制备由 HA 涂覆的一个油质核心组成的纳米胶囊 :

[0290] 制备透明质酸钠的水溶液 (20 毫升), 在其中溶解 0.5-25 毫克的 HA2-5 万 DA, 并加入 0.25% w/v 的泊洛沙姆 188 ;

[0291] a) 制备一个由卵磷脂 (30 毫克) 的乙醇 / 丙酮溶液 (0.5:9 毫升) 和苯扎氯铵阳离子表面活性剂 (4 毫克) 或十六烷基三甲基溴化铵 (1.8 毫克) 组成的油相, 向其中加入 125 微升 Miglyol[®] 812;

[0292] b) 混合步骤 a) 和 b) 所得溶液, 用磁力搅拌 10 分钟, 便自发地获得了纳米胶囊 ;

[0293] c) 该有机溶剂蒸发至体积不变 ;

[0294] 制备完成后, 测量平均直径, 多分散性指数及其表面电荷 (电势 ζ)。表 21 和 22 分别显示了在步骤 a) HA 溶液中使用苯扎氯铵 (表 21) 或十六烷基三甲基溴化铵 (表 22), 所获得的参数数值。

[0295] 表 21

[0296]

化学式	HA 步骤 a(mg)	体积 (nm)	PI	电势 ζ (mV)
NCs HA	25	186 ± 6	0.1	-47 ± 2
NCs HA	12.5	185 ± 4	0.1	-44 ± 2
NCs HA	0.5	251 ± 5	0.1	37 ± 1

[0297] 表 22

[0298]

化学式	HA 步骤 a(mg)	体积 (nm)	PI	电势 ζ (mV)
NCs HA	12.5	273 ± 12	0.2	-35 ± 2

NCs HA	6.25	170±6	0.1	-35±1
NCs HA	3.125	168±3	0.1	-35±2
NCs HA	0.1	228±17	0.1	33±3

[0299] 实施例 5.3:根据超声过程,制备由 HA 涂覆的一个油质核心组成的纳米胶囊:

[0300] 制备一个由卵磷脂(30 毫克)溶液和苯扎氯铵阳离子表面活性剂(4 毫克)组成的油相,在二氯甲烷(1 毫升)中加入 125 微升 Miglyol[®] 812;

[0301] 将步骤 i) 中获得的溶液加入 2 毫升 0.25%w/v 的泊洛沙姆 188 水溶液,超声处理 1 分钟;

[0302] i) 用水稀释所获得的乳剂(乳剂与水稀释比例:1:10);

[0303] ii) 该有机溶剂蒸发至体积不变,以便形成阳离子的纳米乳剂,及;

[0304] v) 通过温育过程,用 0.5-25 毫克的透明质酸钠组成的水溶液(1-5 毫升)涂覆步骤 iv) 中获得的阳离子纳米乳剂,其中前后两者比为 4:1.5v/v (纳米乳剂:HA 溶液)不论温度高低,立即生成涂覆物。

[0305] 制备完成后,测量平均直径,多分散性指数及其表面电荷(电势 ζ)。表 23 显示了根据步骤 v) HA 数量,所获得的参数值。

[0306] 表 23

[0307]

化学式	HA 步骤 v(mg)	体积 (nm)	PI	电势 ζ (mV)
NE	—	162±3	0.2	40±4
NCs HA	25	200±3	0.2	-43±6
NCs HA	12.5	179±5	0.1	-47±2
NCs HA	6.25	185±2	0.2	-43±2
NCs HA	0.5	177±1	0.2	14±2

[0308] 实施例 5.4:根据均质化过程,制备由 HA 涂覆的一个油质核心组成的纳米胶囊:

[0309] i) 制备一个由卵磷脂(30 毫克)溶液和苯扎氯铵阳离子表面活性剂(4 毫克)组成的油相,在二氯甲烷(1 毫升)中加入 125 微升 Miglyol[®] 812;

[0310] ii) 将步骤 i) 中获得的溶液加入 2 毫升 0.25%w/v 的泊洛沙姆 188 水溶液,在 16,000rpm 的转速下进行均质化 5 分钟,然后在 19,000rpm 的转速下再进行 5 分钟;

[0311] iii) 用水稀释所获得的乳剂(乳剂与水稀释比例:1:10);在 22,000rpm 的转速下进行均质化 3 分钟;

[0312] iv) 该有机溶剂蒸发至体积不变,以便形成阳离子的纳米乳剂,及;

[0313] v) 通过温育过程,用 0.5-25 毫克的透明质酸钠组成的水溶液(1.5 毫升)涂覆步骤 iv) 中获得的阳离子纳米乳剂,其中前后两者比为 4:1.5 (纳米乳剂:HA 溶液)不论温度

高低,立即生成涂覆物。

[0314] 制备完成后,测量平均直径,多分散性指数及其表面电荷(电势 ζ)。表 24 显示了根据步骤 v) HA 数量,所获得的参数值。

[0315] 表 24

[0316]

化学式	HA 步骤 v (mg)	体积 (nm)	PI	电势 ζ (mV)
NE	—	141 ± 9	0.3	49 ± 1
NCs HA	25	166 ± 18	0.2	-44 ± 2
NCs HA	12.5	143 ± 3	0.2	-42 ± 3
NCs HA	0.5	214 ± 5	0.3	37 ± 6

[0317]

[0318] 实施例 6 :HA 纳米胶囊中多西紫杉醇脂质体药物的包封率评估

[0319] 制备的 HA 纳米胶囊为钠盐及由卵磷脂, **Miglyol® 812**, 苯扎氯铵(4 毫克)或十六烷基三甲基溴化铵(1.8 毫克)阳离子表面活性剂和泊洛沙姆 188 组成的一个油质的核心。掺入亲脂性药物,从而采用几乎不溶于水的多西紫杉醇的抗肿瘤剂。制作的处理过程在先前所描述的例 5.1 的步骤中有所修改,因为乙醇(1-100 毫克/毫升)活性成分储备液的一小部分被掺入到油相中。随后旋转蒸发系统直至获得恒定的容量,并用 HA 溶液温育而形成了包封多西紫杉醇的纳米胶囊,多西紫杉醇/HA 纳米胶囊的重量比为 4%。

[0320] 根据本制作步骤所制备的纳米胶囊一旦完成,便确定包封率(高效液相色谱法, $\lambda = 227\text{nm}$ 测定游离药物)获得的包封率 $\approx 65\%$ 。同时也对微粒的平均直径,多分散性指数和电势 ζ 这些参数进行测量(表 25)。

[0321] 表 25

[0322]

化学式	体积 (nm)	PI	电势 ζ (mV)
NC BKC-HA	235 ± 13	0.1	-45 ± 4
NC BKC-HA/DCX	250 ± 20	0.1	-52 ± 11
NC CTAB-HA	267 ± 23	0.1	-31 ± 3
NC CTAB-HA/DCX	276 ± 1	0.1	-36 ± 1

[0323] 实施例 7 :HA 纳米胶囊的多西紫杉醇药物释放

[0324] 所制备的 HA 纳米胶囊按照例 6 中描述的程序包封亲脂性药物的多西紫杉醇。纳米胶囊在水中稀释,并在 37°C 下对其温育培养基进行水平摇动(100rpm)。在不同时间段取出温育培养基的样品,并且采用超速离心法对悬浮的纳米胶囊进行分离。最后,通过对游离药物的数量的测定,评估游离药物的馏分,在下方悬浮液体层中将其馏分与纳米胶囊结合

的药物馏分进行对比。多西紫杉醇的定量根据例 6 中所述来进行。在图 4 中显示了 HA 纳米胶囊的药物释放曲线。

[0325] 实施例 8 :在储存过程中 HA 纳米胶囊的制剂颗粒粒径大小评估

[0326] 制备的 HA 纳米胶囊为钠盐及由卵磷脂, Miglyol® 812, 苯扎氯铵(4 毫克)或十六烷基三甲基溴化铵(5.4 毫克)组成的一个油质的核心,根据之前所述步骤制备。在相应的时间内测量粒径大小,来获得系统评估随时间而演化的信息。同时还评估了储存温度(4 及 37°C)对纳米胶囊稳定性的影响。在图 5a 和 5b 中给出的结果分别显示了在储存期间,5.8% w/w 的苯扎氯铵及十六烷基三甲基溴化铵的 HA 纳米胶囊粒径大小的变化很小。

[0327] 实施例 9 :在冻干过程后,关于 HA 纳米胶囊粒径大小的冷冻保护剂海藻糖的效果评估

[0328] 制备的 HA 纳米胶囊为钠盐及由卵磷脂, Miglyol® 812, 苯扎氯铵(4 毫克)及泊洛沙姆 188 组成的一个油质的核心,根据之前所述步骤制备。对在 HA 纳米胶囊冻干过程中冷冻保护剂海藻糖的效果进行评估。在重新悬浮后,通过检定海藻糖的两种浓度 5 和 10% w/v,评估颗粒大小随后的恢复效果。同时也评估了处于冷冻干燥悬浮中的纳米胶囊的浓度(0.25, 0.5 和 1% w/v 的)的影响。图 6 中的结果显示了在重新悬浮后冻干的 HA 纳米胶囊的颗粒尺寸。

[0329] 实施例 10 :抑制 HA 纳米胶囊细胞增殖能力的研究

[0330] 为了评估包封多西紫杉醇分子来抑制肺癌 NCI-H460 细胞增殖的 HA 纳米胶囊的电势,根据例 6 中所述的方法,使用十六烷基三甲基溴化铵(1.8 毫克)制备了 HA 纳米胶囊。在图 7 中的结果显示了包封多西紫杉醇的纳米胶囊与自由分子相比抑制增殖的最大能力,当系统与癌细胞接触 2 及 48 小时。此外,还可以看到没有多西紫杉醇的系统依然安全。产生 50% 的人口死亡率的 IC₅₀ 浓度值是通过 Graphpad 棱镜 2.1 (Graphpad 软件)计算出来的。因此,多西紫杉醇溶液显示了 105 和 36nM 的 IC₅₀ 值,当分别与细胞接触 2 及 48 小时;包封多西紫杉醇的制剂的 HA 纳米胶囊表明在相同的温育时间内数值 ≈ 29 及 ≈ 13nM,并且多西紫杉醇的纳米胶囊能 3.6 倍和 2.8 倍更有效地抑制细胞增殖。

[0331] 实施例 11 :根据聚合物的分子量对 PAsn 纳米胶囊的物理及化学特性所进行的评估。

[0332] 实施例 11.1 :根据两个阶段的溶剂扩散过程,制备由 PAsn 涂覆的一个油质核心组成的纳米胶囊:

[0333] i) 制备一个由卵磷脂(30 毫克)的乙醇 / 丙酮溶液(0.5:9 毫升)和

[0334] 苯扎氯铵阳离子表面活性剂(4 毫克)或十六烷基三甲基溴化铵(1.8 毫克)组成的油相,向其中加入 0.125 毫升 Miglyol® 812;

[0335] ii) 将步骤 i)中得到的溶液加入 10 毫升的水,在磁力搅拌下保持 10 分钟,这样就自发地得到阳离子纳米乳剂;

[0336] iii) 该有机溶剂蒸发至体积不变;

[0337] iv) 通过温育过程,用不同量 PAsn 组成的水溶液(1 毫升)涂覆步骤 iii)中获得的阳离子纳米乳剂,其中前后两者比为 3.7:1 (纳米乳剂:PAsn 溶液)不论温度高低,立即生成涂覆物。

[0338] 制备完成后,测量平均直径,多分散性指数及其表面电荷(电势 ζ),并且通过透射电子显微镜(图 8)给纳米胶囊照相。表 26 和 27 分别显示了在步骤 iv) 的 PAsn 溶液中使用苯扎氯铵(4 毫克)(表 26)或十六烷基三甲基溴化铵(1.4 毫克)(表 27)所获得的参数数值。

[0339] 表 26

[0340]

化学式	PAsn 步骤 iv(mg)	体积 (nm)	IP	电势 ζ (mV)
NE	—	215 $\pm$ 7	0.1	34 $\pm$ 3
NCs PAsn	100	253 $\pm$ 16	0.2	-36 $\pm$ 9
NCs PAsn	50	250 $\pm$ 13	0.1	-36 $\pm$ 6
NCs PAsn	25	243 $\pm$ 19	0.1	-39 $\pm$ 2
NCs PAsn	10	235 $\pm$ 5	0.1	-33 $\pm$ 4
NCs PAsn	5	262 $\pm$ 3	0.1	-19 $\pm$ 2
NCs PAsn	1	370 $\pm$ 13	0.2	10 $\pm$ 2

[0341] 表 27

[0342]

化学式	PAsn 步骤 iv(mg)	体积 (nm)	IP	电势 ζ (mV)
NE	—	208 $\pm$ 10	0.1	40 $\pm$ 3
NCs PAsn	100	270 $\pm$ 5	0.2	-15 $\pm$ 9
NCs PAsn	50	263 $\pm$ 8	0.2	-20 $\pm$ 6
NCs PAsn	25	249 $\pm$ 19	0.2	-23 $\pm$ 2
NCs PAsn	10	214 $\pm$ 9	0.1	-24 $\pm$ 4
NCs PAsn	5	290 $\pm$ 3	0.2	-8 $\pm$ 2
NCs PAsn	1	339 $\pm$ 16	0.2	10 $\pm$ 2

[0343] 实施例 11.2 :根据一个阶段的溶剂扩散过程,制备由 PAsn 涂覆的一个油质核心组成的纳米胶囊:

[0344] a) 制备聚天冬酰胺水溶液(20 毫升),在其中溶解不同数量的聚氨基酸 5-200 毫克;

[0345] b) 制备一个由卵磷脂(30 毫克)的乙醇/丙酮溶液(0.5:9 毫升)和苯扎氯铵阳离

子表面活性剂(4 毫克)或十六烷基三甲基溴化铵(1.8 毫克)组成的油相,向其中加入 125 微升 Miglyol® 812;

[0346] c) 混合步骤 a) 和 b) 所得溶液,用磁力搅拌 10 分钟,便自发地获得了纳米胶囊;

[0347] d) 有机溶剂蒸发至体积不变。

[0348] 制备完成后,测量平均直径,多分散性指数及其表面电荷(电势 ζ)。表 28 和 29 分别显示了在步骤 iv) PAsn 溶液中使用苯扎氯铵(表 28)或十六烷基三甲基溴化铵(表 29)所获得的参数数值。

[0349] 表 28

[0350]

化学式	PAsn 步骤 a(mg)	体积 (nm)	IP	电势 ζ (mV)
NCs PAsn	10	—	—	—
NCs PAsn	50	323±16	0.2	-23±13
NCs PAsn	25	250±7	0.2	-20±6
NCs PAsn	10	215±9	0.1	-18±1
NCs PAsn	5	196±9	0.2	-6±1
NCs PAsn	1	356±6	0.2	13±5

[0351] 表 29

[0352]

化学式	PAsn 步骤 a(mg)	体积 (nm)	IP	电势 ζ (mV)
NCs PAsn	10	—	—	—
NCs PAsn	50	366±5	0.3	-22±6
NCs PAsn	25	260±4	0.2	-20±7
NCs PAsn	10	173.9±5	0.1	-24±3
NCs PAsn	5	140±3	0.2	-14±2
NCs PAsn	1	332±9	0.2	13±6

[0353] 实施例 11.3:根据超声过程,制备由 PAsn 涂覆的一个油质核心组成的纳米胶囊:

[0354] i) 制备一个由卵磷脂(30 毫克)和苯扎氯铵阳离子表面活性剂(4 毫克)或十六烷基三甲基溴化铵(1.8 毫克)组成的油相,在二氯甲烷中加入 200 微升 Miglyol® 812;

[0355] ii) 将步骤 i) 中得到的溶液加入 2 毫升的水,并在磁力搅拌下保持 30 秒;

[0356] iii) 用水稀释所获得的乳剂(乳剂与水稀释比例 1:10)；

[0357] iv) 该有机溶剂蒸发至体积不变,以便形成阳离子的纳米乳剂；

[0358] v) 通过温育过程,用不同数量的聚天冬酰胺组成的水溶液(1 毫升)涂覆步骤 iv) 中获得的阳离子纳米乳剂,其中前后两者比为 4:1 (纳米乳剂:PAsn 溶液)不论温度高低,立即生成涂覆物。

[0359] 制备完成后,测量平均直径,多分散性指数及其表面电荷(电势 ζ)。表 30 显示了所获得的数值。

[0360] 实施例 11.4:根据均质化过程,制备由聚天冬酰胺涂覆的一个油质核心组成的纳米胶囊；

[0361] i) 制备一个由卵磷脂(30 毫克)溶液和苯扎氯铵阳离子表面活性剂(4 毫克)或十六烷基三甲基溴化铵(1.8 毫克)组成的油相,在二氯甲烷(1 毫升)中加入 125 微升 Miglyol[®] 812；

[0362] ii) 将步骤 i) 中获得的溶液加入 2 毫升水,在 16,000rpm 的转速下进行均质化 5 分钟,然后在 19,000rpm 的转速下再进行 5 分钟；

[0363] iii) 用水稀释所获得的乳剂(乳剂与水稀释比例 1:10);在 22,000rpm 的转速下进行均质化 3 分钟；

[0364] iv) 该有机溶剂蒸发至体积不变,以便形成阳离子的纳米乳剂；

[0365] v) 通过温育过程,用不同数量的 PAsn 组成的水溶液(1 毫升)涂覆步骤 iv) 中获得的阳离子纳米乳剂,其中前后两者比为 4:1 (纳米乳剂:PAsn 溶液)不论温度高低,立即生成涂覆物。

[0366] 制备完成后,测量平均直径,多分散性指数及其表面电荷(电势 ζ)。表 30 显示了上述所获得的参数数值。

[0367] 表 30

[0368]

方法	TA	数量 TA (mg)	数量 PAsn	体积 (nm)	IP	电势 ζ (mV)
超声	CTAB	1.8	1 mg/mL	226 $\pm$ 5	0.1	-30 $\pm$ 4
超声	BKC	4	1 mg/mL	242 $\pm$ 3	0.2	-37 $\pm$ 5
均质化	CTAB	1.8	1 mg/mL	236 $\pm$ 2	0.1	-31 $\pm$ 1
均质化	BKC	4	1 mg/mL	254 $\pm$ 3	0.2	-34 $\pm$ 6

[0369]

[0370] 实施例 12: 聚天冬酰胺纳米胶囊中的多西紫杉醇脂质体药物的包封率的评估

[0371] 用由卵磷脂, Miglyol[®] 812, 苯扎氯铵阳离子表面活性剂(4 毫克)或十六烷基三甲基溴化铵(1.8 毫克)组成的油质核心来制备 PAsn 纳米胶囊。掺入亲脂性药物,从而采用几乎不溶于水的多西紫杉醇的抗肿瘤剂。制作的处理过程在先前所描述的例 11.1 的步骤

中稍有修改,因为乙醇(1-100 毫克/毫升)活性成分储备液的一小部分被掺入到油相中。随后旋转蒸发系统直至获得恒定的容量,并用 PAsn 溶液温育而形成了包封多西紫杉醇的纳米胶囊,多西紫杉醇/PAsn 纳米胶囊的重量比为 30%。

[0372] 根据本制作步骤所制备的纳米胶囊一旦完成,便确定包封率(高效液相色谱法, $\lambda = 227\text{nm}$ 测定游离药物)获得的包封率 $\approx 75\%$ 。同时也对微粒的平均直径,多分散性指数和电势 ζ 这些参数进行测量(表 31)。

[0373] 表 31

[0374]

化学式	体积 (nm)	PI	电势 ζ (mV)	% 联系
NC BKC-PAsn	254 ± 6	0.1	-33 ± 6	—
NC BKC-PAsn DCX	249 ± 7	0.1	-36 ± 11	75 ± 3
NC CTAB-PAsn	235 ± 7	0.1	-28 ± 3	—
NC CTAB-PAsn DCX	236 ± 12	0.1	-32 ± 8	76 ± 2

[0375] 实施例 13:聚天冬酰胺纳米胶囊的多西紫杉醇药物释放

[0376] 所制备的聚天冬酰胺纳米胶囊按照例 12 中描述的程序包封亲脂性药物的多西紫杉醇。纳米胶囊在水中稀释,并在 37°C 下对其温育培养基进行水平摇动 (100rpm)。在不同时间段取出温育培养基的样品,并且采用超速离心法对悬浮的纳米胶囊进行分离。最后,通过对游离药物的数量的测定,评估游离药物的馏分,在下方悬浮液体层中将其馏分与纳米胶囊结合的药物馏分进行对比。多西紫杉醇的定量根据例 12 中所述来进行。在图 9 中显示了聚天冬酰胺纳米胶囊的药物释放曲线。

[0377] 实施例 14:在储存过程中聚天冬酰胺纳米胶囊的制剂颗粒粒径大小评估

[0378] 制备的聚天冬酰胺纳米胶囊为由卵磷脂, Miglyol® 812, 苯扎氯铵(4 毫克)或十六烷基三甲基溴化铵(4 毫克)组成的一个油质的核心,根据之前所述步骤制备。在相当长一段时间内测量粒径大小,来获得系统评估随时间而演化的信息。同时还评估了储存温度(4 及 37°C)对纳米胶囊稳定性的影响。在图 10a 和 10b 中给出的结果分别显示了在储存期间,用苯扎氯铵及十六烷基三甲基溴化铵制备的聚天冬酰胺纳米胶囊粒径大小的变化很小。

[0379] 实施例 15:在冻干过程后,关于 PAsn 纳米胶囊粒径大小的冷冻保护剂葡萄糖及海藻糖的效果评估

[0380] 制备的聚天冬酰胺纳米胶囊为由卵磷脂, Miglyol® 812, 十六烷基三甲基溴化铵阳离子表面活性剂(1.8 毫克)组成的一个油质的核心,根据之前所述步骤制备。对在 PAsn 纳米胶囊冻干过程中冷冻保护剂海藻糖的效果进行评估。在重新悬浮后,通过检定海藻糖的两种浓度 5 和 10% w/v,评估颗粒大小随后的恢复效果。同时也评估了处于冷冻干燥悬浮中的纳米胶囊的浓度(0.25, 0.5 和 1% w/v)的影响。表 32 中的结果显示了在重新悬浮后冻干的 PAsn 纳米胶囊的颗粒尺寸。

[0381] 表 32

[0382]

[NC] %	[CRIO] %	体积	SD
葡萄糖			
0.125	0.25	342.7	8.856
0.125	1	293.5	7.862
0.25	0.5	302.6	8.271
0.5	0.5	322.9	6.795
0.5	1	314.8	7.808
海藻糖			
0.125	0.25	352.2	9.419
0.125	0.5	238.3	0.459
0.125	1	260.4	1.752
0.25	0.25	269.1	26.41
0.25	0.5	245.4	1.419
0.25	1	236.1	3.045
0.5	0.25	380.5	20.22
0.5	0.5	258	4.07
0.5	1	236.5	2.285

[0383]

[0384] 实施例 16 :抑制 PAsn 纳米胶囊细胞增殖能力的研究

[0385] 为了评估包封多西紫杉醇分子来抑制肺癌 NCI-H460 细胞增殖的 PAsn 纳米胶囊的电势,根据例 12 中所述的方法,使用十六烷基三甲基溴化铵(1.8 毫克)制备了 PAsn 纳米胶囊。在图 11 中的结果显示了包封多西紫杉醇的纳米胶囊与自由分子相比抑制增殖的最大能力,当系统与癌细胞接触 2 及 48 小时。此外,还可以看到没有多西紫杉醇的系统依然安全。产生 50%的人口死亡率的 IC50 浓度值是通过 Graphpad 棱镜 2.1 (Graphpad 软件)计算出来的。因此,多西紫杉醇溶液显示了 105 和 36nM 的 IC50 值,当分别与细胞接触 2 及 48 小时;包封多西紫杉醇的制剂的 PAsn 纳米胶囊表明在相同的温育时间内数值 ≈ 30 及 ≈ 13 nM,并且多西紫杉醇的纳米胶囊能 3.5 倍和 2.8 倍更有效地抑制细胞增殖。

[0386] 实施例 17 :聚谷氨酸-聚乙二醇纳米胶囊的生物分布的评价

[0387] 制备的纳米胶囊由聚乙二醇-聚谷氨酸(PGA-PEG)的覆盖层,(其覆盖层由聚乙二醇化的百分比为 60%和 PEG 链大小为 2 万 DA 的分子量为 35000DA 的钠盐构成),及一种由卵磷脂, Miglyol[®] 812 和平均粒径为 100nm 的十六烷基三甲基溴化铵构成的油质核心组成,根据一个阶段的溶剂扩散过程。此外,制备的纳米胶囊还由聚乙二醇-聚谷氨酸(PGA-PEG)的覆盖层,(其覆盖层由聚乙二醇化的百分比为 60%和 PEG 链大小为 2 万 DA 的分子量为

35000DA 的钠盐构成), 泊洛沙姆 188, 及一种由卵磷脂, Miglyol[®] 812 和平均粒径为 200nm 的苯扎氯铵构成的油质核心组成, 根据相同的过程。纳米胶囊的大小可调制, 通过适当修改成分的数量及在有机相中添加水相的方法, 以便达到这些尺寸。为了便于后续的可视化和量化, 将纳米胶囊用亲脂性的荧光标记物 DiD (1, 1'-二(十八烷基)-3, 3, 3', 3'-四甲基吡啶硫杂羰花青高氯酸盐) 标记。然后, 将这两种为 100 和 200nm 的纳米胶囊制剂进行分离, 并在水为 10% 的海藻糖溶液中稀释, 通过皮下(肩胛间区) 管道注射, 并且通过静脉(尾静脉) 注射到健康的 SCID 小鼠中, 以便评估其生物分布, 并且特别关注其在淋巴组织中的积累。注射体积为 100 微升, 100 和 200nm 的纳米胶囊浓度分别为 12 毫克 / 毫升, 13.6 毫克 / 毫升。在这两种情况下, DiD 的浓度为 11.7 微克 / 毫升。在不同器官中, 通过活体成像系统 (IVIS[®] 频谱, 卡尺生命科学), 在注射后的 6, 24 及 48 小时, 评估荧光强度。图 12 和图 13 分别显示了 100 和 200nm 的纳米胶囊的荧光分布情况。图 12a, 12b 和 12c 更具体地显示了在各种器官和组织中注射了 100nm 的聚谷氨酸-聚乙二醇纳米胶囊后, 荧光的级别(用光子 / seg/cm²/sr 来表示), 在经过不同时期后:(a) 6 小时, (b) 24 小时, (c) 48 小时, (皮下注射, 静脉内注射)。同样, 图 13a, 13b 和 13c 显示了在各种器官和组织中注射了 200nm 的聚谷氨酸-聚乙二醇纳米胶囊后, 荧光的级别(用光子 / seg/cm²/sr 来表示), 在经过不同时期后:(a) 6 小时, (b) 24 小时, (c) 48 小时, (皮下注射, 静脉内注射)。总体而言, 结果显示: 通过两种途径注射后, 荧光纳米胶囊在淋巴上的高积聚, 这种积聚当用于皮下注射时, 更为明显。事实上, 在皮下注射后, 可以在淋巴系统上看到一个清晰的赋形标记。这种在淋巴上的积聚与积聚在相应器官, 如肝脏和脾脏中的减少相关联。

[0388] 实施例 18: 在给小鼠静脉注射后, PAsn, PGA 和 PGA-PEG 的纳米胶囊的血浆消除速率的研究

[0389] 通过在例 1.1 和 11.1 中描述的在一个阶段的技术, 制备不同聚合物的纳米胶囊与不同的聚合物, 其聚合物包括 PAsn, PGA 或 PGA-PEG。在这些系统中, 配有荧光标记物 DiD (1, 1'-双十八烷基-3, 3, 3', 3'-四甲基吡啶硫杂羰花青高氯酸盐) (在 100 微克 / 毫升纳米胶囊中 DiD 的浓度), 在瑞士小鼠注射前(9-12 周, 20-22 克)。作为对照制剂, 使用了具有相同标记和相同浓度的带电阴离子纳米乳剂。同样, 进行一个对照实验来测定血浆中的残余荧光。从注射了 150 微升生理盐水的小鼠血液样本中进行实验。

[0390] 药制剂, 纳米胶囊, 荧光纳米乳剂, 生理盐水对照样品都是通过向小鼠尾部静脉注射 150 微升来完成的。在一定的时间间隔(30 分钟, 1 小时, 3 小时和 24 小时), 经心脏穿刺抽取血液样本, 一式三份。对 2000 克样品在真空采血管进行离心分离 10 分钟(SST II 前进, 5 毫升, Becton Dickinson 公司, 法国)。为了在零时刻确定荧光, 纳米胶囊和荧光纳米乳剂等分试样与适量血液混合, 以便在零时刻模拟在体内的浓度(血液重量中 150 微升的制剂相对应动物总重量的 7.5%, 即 1.89 克血液里约 150 微升)。最后, 将 150 毫升的上清液样品放置在 96 孔板上, 通过荧光检测软件, 使用荧光计测定荧光(赛默飞世尔科技, 法国)。荧光的测定在 644nm 的 DiD 激发波长和 664nm 的发射波长处完成。计算血液中的荧光浓度时, 需考虑到小鼠中血液总重量对应小鼠总重量的 7.5%。

[0391] 用荧光单位 (FU) 来表示荧光, 由下面的方程来计算:

[0392] (FU) 样品 - 血浆 (FU)

[0393] 图 14 显示了注射荧光剂量百分比(动物的总重量的 DiD 浓度在各时间相对于在零时刻的浓度,用毫克/千克表示),在不同时期对瑞士小鼠进行静脉注射后,荧光依然保持在血浆中。100%的荧光对应于在零时刻的荧光。因此,图 1 显示了注射药剂后在荧光的 PAsn, PGA 和 PGA-PEG 纳米胶囊的血浆中的消除动力情况。阴离子的纳米乳剂作为对照使用。每个点代表组中的注射剂量百分比的平均数 $n=3 \pm$ 标准偏差 (SD)。在图 14 中所示的结果表明在所评估的各种制剂的血浆消除速率存在着差异。观察到的荧光纳米胶囊制剂消除速率比与其对照的纳米乳剂的显著减少。这突出了的聚合物壳面延长在制剂血液中的停留时间。这在血液中增加的停留时间是至关重要,能防止系统不被希望的器官中的积累,同时,便于进入肿瘤组织。

[0394] 为了对纳米胶囊的血浆消除动力学进行更准确的比较,通过非房室模型的统计软件包来获取药代动力学参数,药动学 Kinetica5.11 (赛默飞世尔科技,法国)(表 1)分布或消除半衰期 ($t_{1/2}$) 通过下列公式来计算:

$$[0395] \quad t_{1/2} = \frac{\log(2)}{L_z}$$

[0396] L_z 指的是血浆浓度-时间曲线各相的线性相对应的斜率。 L_z 的测定通过线性回归,使用预定义的时间间隔(分别是分布半衰期 [0-1 小时] 和消除 $t_{1/2}$ [1-24 小时])来完成。

[0397] 为了确定曲线 (AUC) 及 (AUMC) 下的面积,在实验期间 (AUC [0-24 小时]) 使用梯形模型,无需使用数学外推法计算。在体内的平均停留时间 (MRT) 是 0-24 小时,根据公式计算:

$$[0398] \quad MRT[0-24h] = \frac{AUMC[0-24h]}{AUC[0-24h]}$$

[0399] 表 1 显示了相应的参数数值:分布的半衰期 (α 相) ($t_{1/2\alpha}$, 小时),从 0-1 小时计算,消除半衰期 (β 相) ($t_{1/2\beta}$, 小时),从 1-24 小时计算,平均滞留时间 (MRT, 小时),从 0 到 24 小时计算,血浆浓度/时间曲线下面积 (AUC, 小时),从 0 到 24 小时计算。这些参数所获得的结果显示了不同制剂的血浆消除动力学存在着差异。与在无聚合物涂层的纳米乳剂(对照制剂)中获得的参数相比,所有在纳米胶囊的制剂中得到参数有一个相当大的改进。这些结果的总体结论是所有在血浆中滞留时间较长的纳米胶囊的表现非常有利于将活性成分带到肿瘤部位。

[0400] 表 1:在静脉注射后,PGA, PGA-PEG, PAsn 纳米胶囊和作为对照使用的纳米乳剂的药代动力学参数。

[0401]	化学式	$t_{1/2\alpha}(h)$ (0-1h)	$t_{1/2\beta}(h)$ (1-24h)	MRT (h) (0-24h)	AUC (mg/ml*h) (0-24h)
	PGA 纳米胶囊	0.66	10.02	9.72	38.02
	PGA-PEG 纳米胶囊	0.74	16.08	17	50.65
	PAsn 纳米胶囊	0.58	12.64	12.75	34.83
	纳米乳剂	0.34	8.17	6.59	11.43

[0402] 实施例 19 : 静脉注射后在 U87MG 胶质瘤小鼠体内模型中所评估的多西紫杉醇的 PAsn 和 PGA-PEG 纳米胶囊的抗肿瘤效果研究

[0403] 为了评估抑制植入了 U87MG 肿瘤的小鼠体内模型中的肿瘤生长的多西紫杉醇的 PAsn 和 PGA-PEG 纳米胶囊的电势, 按照例 1.1 和 11.1 制备相应的纳米胶囊。此外, 这种疗效与商业制剂 Taxotere® 的疗效作比较。

[0404] 对于肿瘤的生长, 将动物(6 周大的 NMRI 裸鼠, 20-24 克)用异氟醚 / 氧气混合物麻醉, 然后在其右侧皮下注入 1×10^6 个 U87MG (ATCC, Manassas, VA) 细胞的 HBSS150 微升悬浮液。每 3 天用游标卡尺测量对肿瘤的生长进行评估。使用下列公式估算肿瘤体积 (V) :

[0405]

$$V = \left(\frac{\pi}{6}\right) \times (\text{宽})^2 \times (\text{长})$$

[0406] 当肿瘤达到 200 立方毫米时, 将小鼠分为 4 组, 分别给予不同的治疗 (PGA-PEG 纳米胶囊, PAsn 纳米胶囊, 对照纳米乳剂及商业制剂 Taxotere®)。在每次治疗中, 通过静脉注射的多西紫杉醇剂量为 2 毫克多西紫杉醇 / 千克动物体重。制剂注入量最大为 150 微升。给对照组注射同样体积的生理盐水。每周两次测量肿瘤大小, 为期 24 天。

[0407] 图 15a 显示了用载药纳米胶囊, Taxotere® 及生理盐水对照处理的动物肿瘤体积增加(每一时间段肿瘤大小与其初始大小之间的差异)的演变。结果首先表明了, 包封的多西紫杉醇保留它体内的抗肿瘤活性。此外, 纳米胶囊制剂和商业制剂一样有效, 两者都能有效减少肿瘤的生长速度。同时, 图 15b 显示了 18 日和 21 日后, 肿瘤体积相对于在零时刻大小的增加。可以看到在这两个时期, 治疗过和未治疗过(注射生理盐水)的动物肿瘤大小的差异是显著的。这一分析反映了所研发的纳米胶囊制剂的药效试验。

[0408] 图 16 显示了不同的时间周期后, 接受不同治疗所存活小鼠的百分比, 根据 Kaplan-Meier 法。结果表明: 注射了纳米胶囊制剂的小鼠存活比例(60-80%存活)高于注射 Taxotere® 的小鼠存活比例(30%存活)。纳米胶囊药物毒性的减少是由于治疗方法的较高选择性, 这一点是根据纳米胶囊在血浆中循环时间的延长来实现的。

[0409] 上述结果分析了在肿瘤植入后存活时间均值和中位数。表 2 显示了动物存活时间的范围(最长和最短时间的差异), 算术的均值和存活时间均值和中位数间的标准偏差

(SD)。此外,表 2 显示了存活增加率 (% IST),从平均值或中位数开始计算。例如,在平均值的情况下,按照下面方程来计算:

[0410]

$$\%IST = \frac{\text{均值}_T - \text{均值}_C}{\text{均值}_C} \times 100$$

[0411] 均值 T 代表了接受治疗的动物的平均存活时间,均值 C 代表了没有接受治疗(注射生理盐水)的动物的平均存活时间。

[0412] 该表还显示了每种制剂比对照组相比的参数“平均存活时间”差异的统计概率 (P) (P<0.05 被认为有统计学意义)。统计的差异通过 log-rank 检验(曼特尔-考克斯测试)来计算。接受治疗的动物的存活结果表明了纳米胶囊制剂相对于 Taxotere® 的优越性。

[0413] 表 2:用多西紫杉醇纳米胶囊治疗的动物的平均存活时间与注射 Taxotere® 及生理盐水所获得的相比较。

治疗方法	N	存活时间 (天)			存活时间增加率(%)		
		范围	中位数	均值 ± 标准偏 差(SD)	IST 中位数	IST 中位数	p-值 vs 生理盐水
[0414] PAsn 纳米胶囊	6	7-18	0	18.1 ± 2	0	61.6	0.066
PGA-PEG 纳米胶囊	6	14-21	0	18.7 ± 2	0	66.96	0.036
Taxotere®	6	7-21	21	16.8 ± 2	50	50	0.147
盐水	6	7-14	14	11.2 ± 2	-	-	

[0415] % IST 存活增加百分数,与对照组相比。

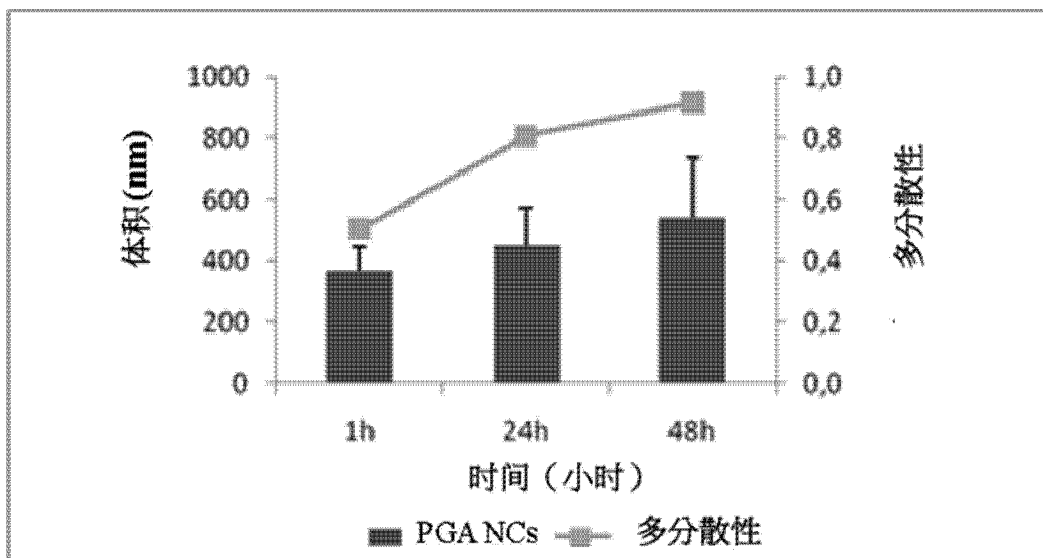


图 1a

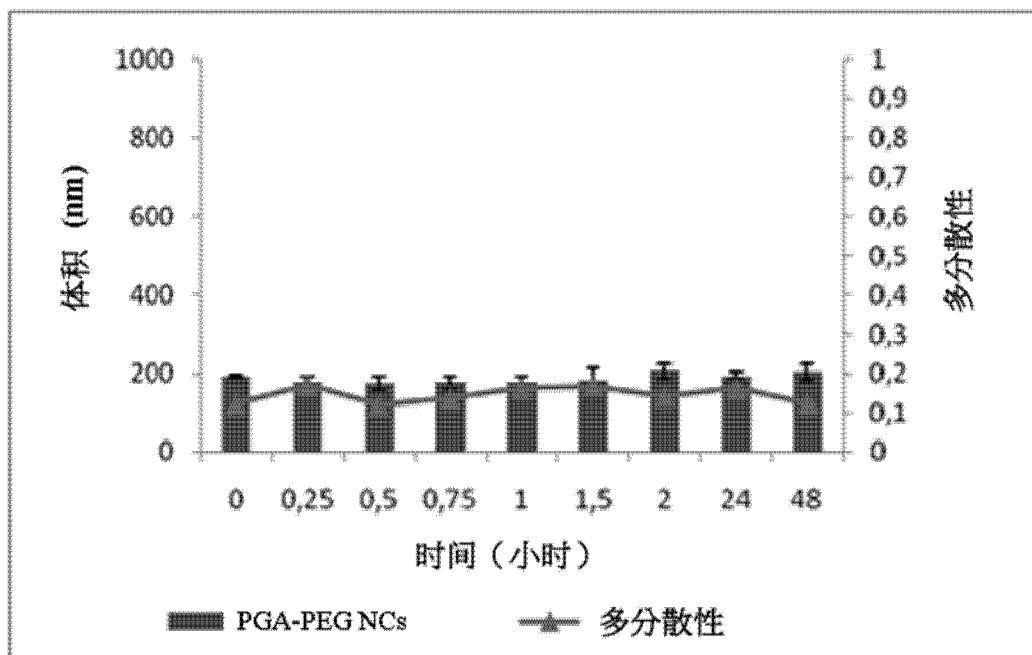


图 1b

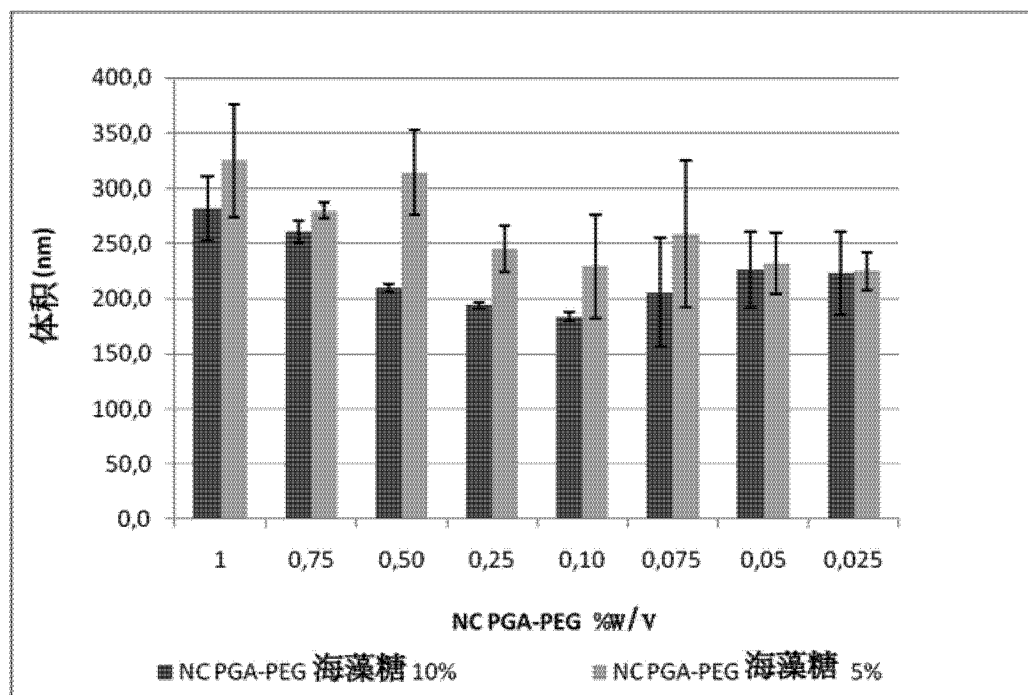


图 2a

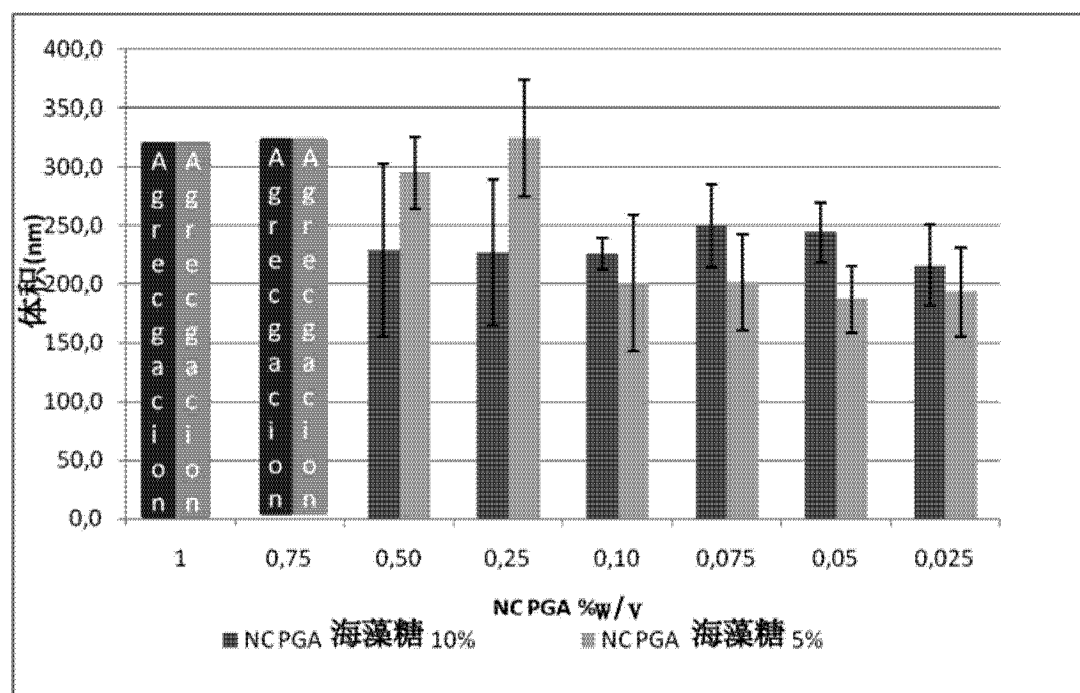


图 2b

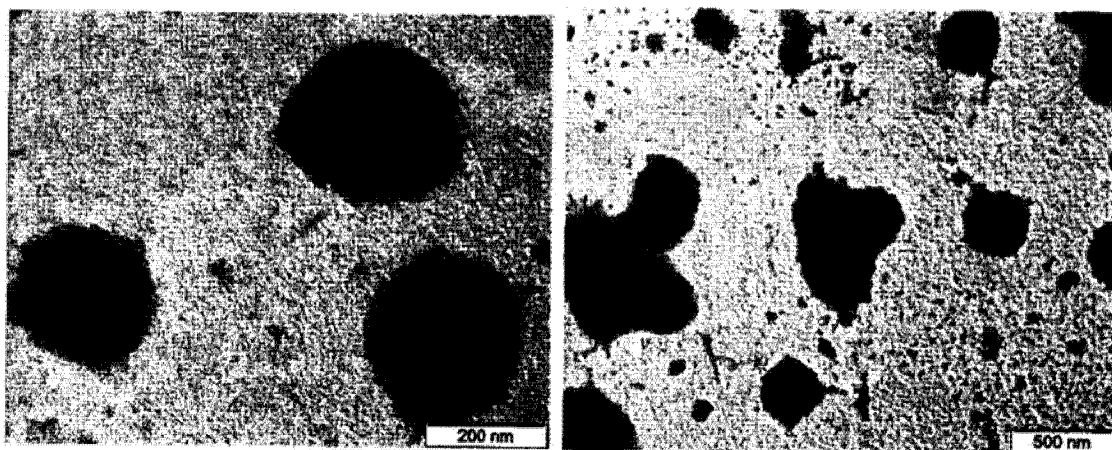


图 3

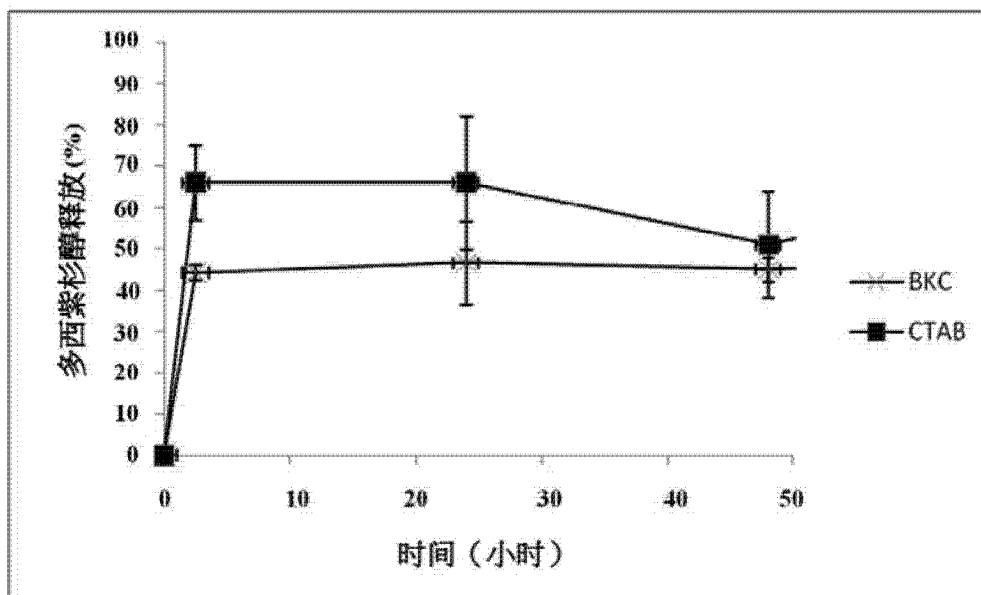


图 4

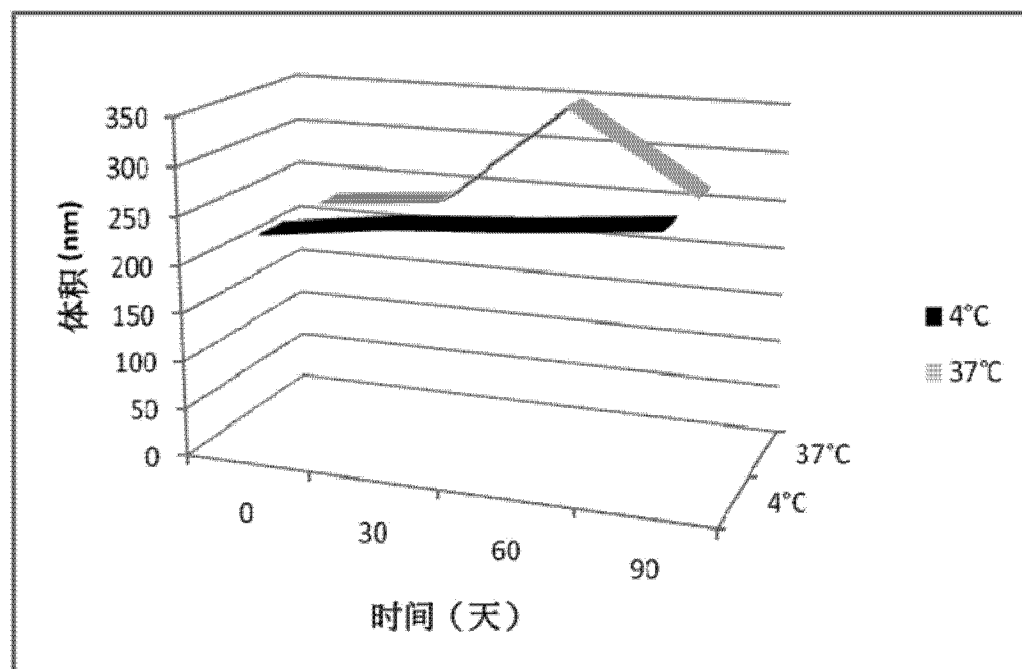


图 5a

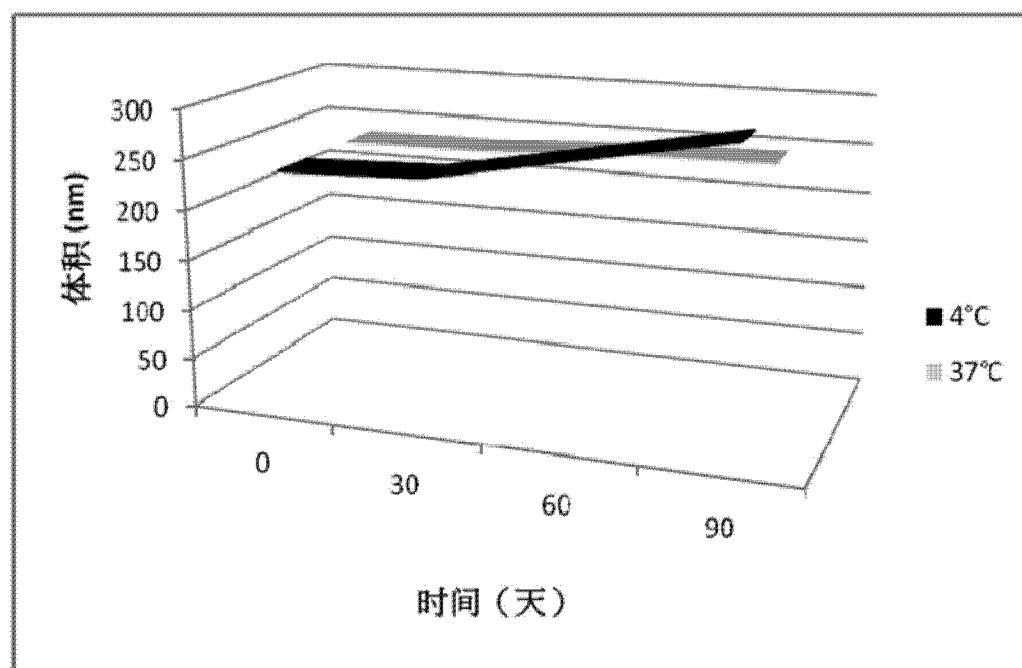


图 5b

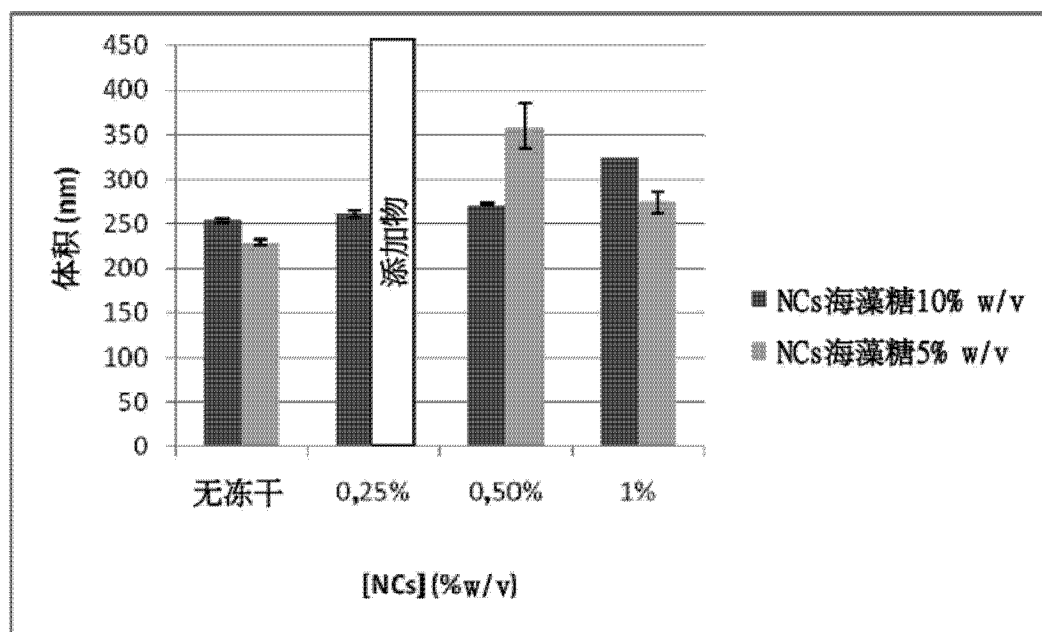


图 6

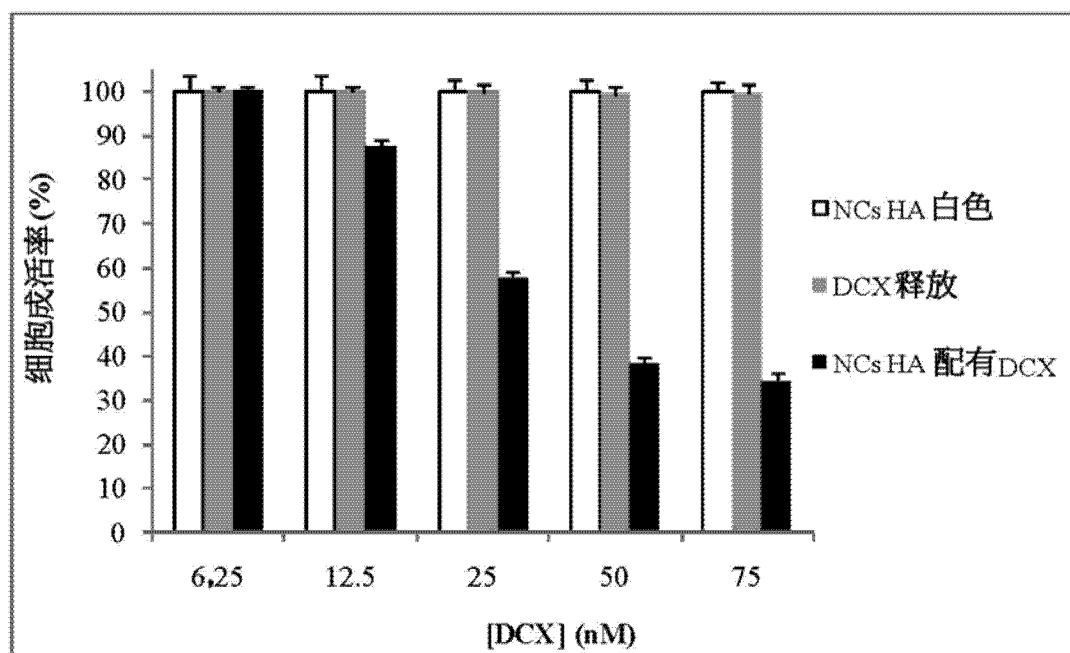


图 7a

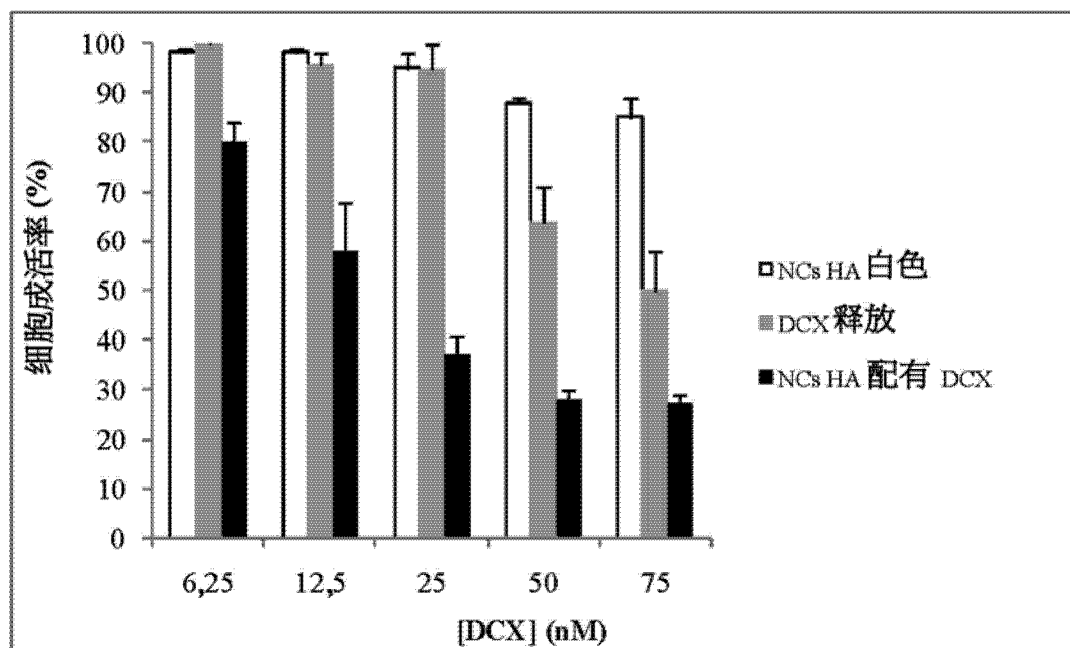


图 7b

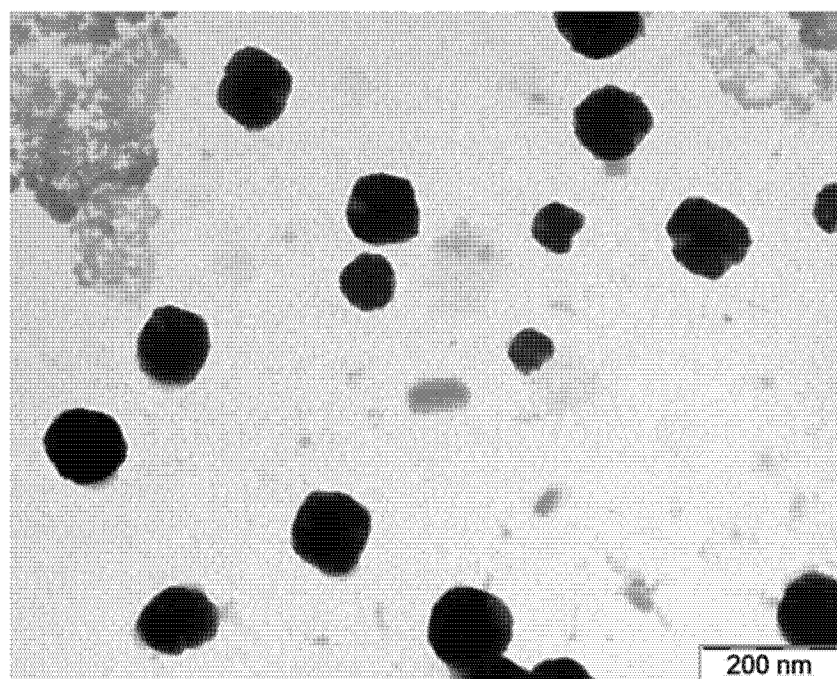


图 8a

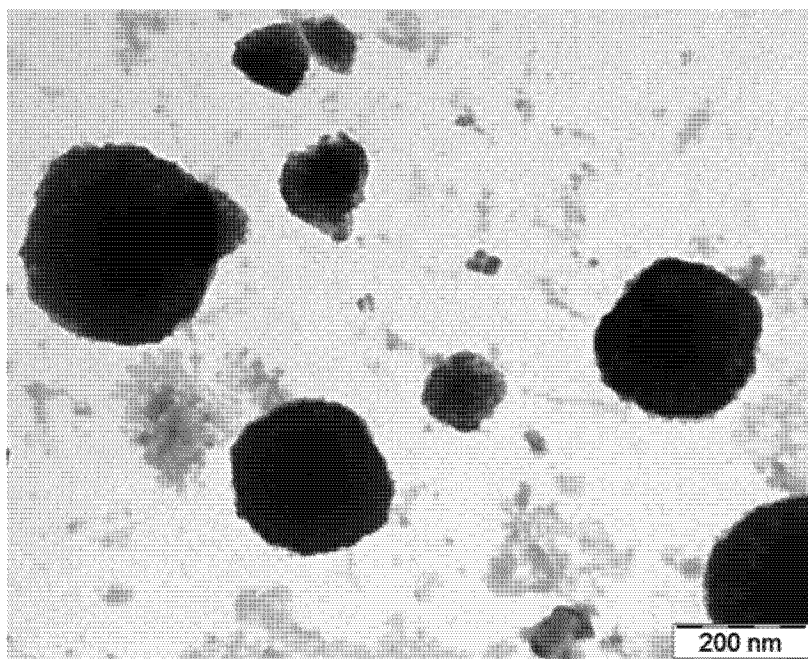


图 8b

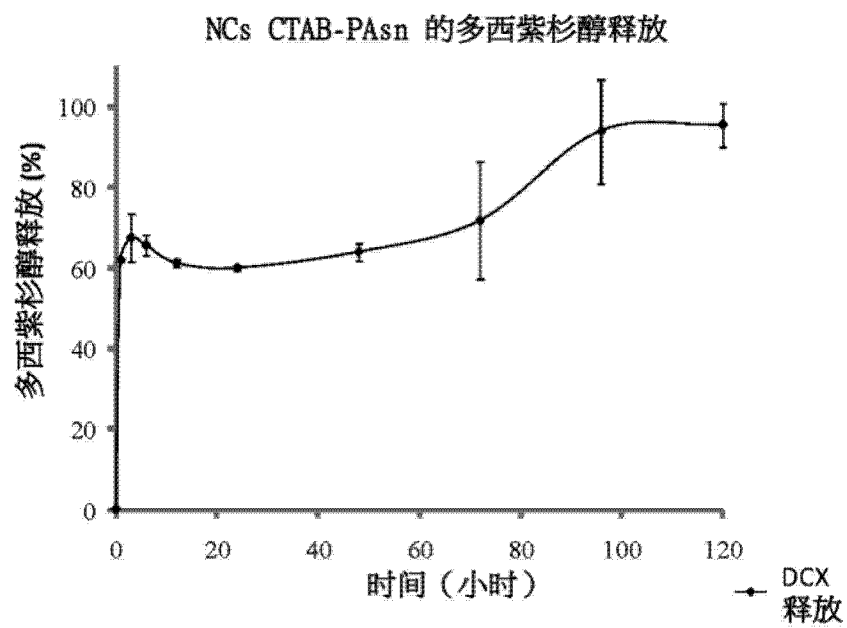


图 9

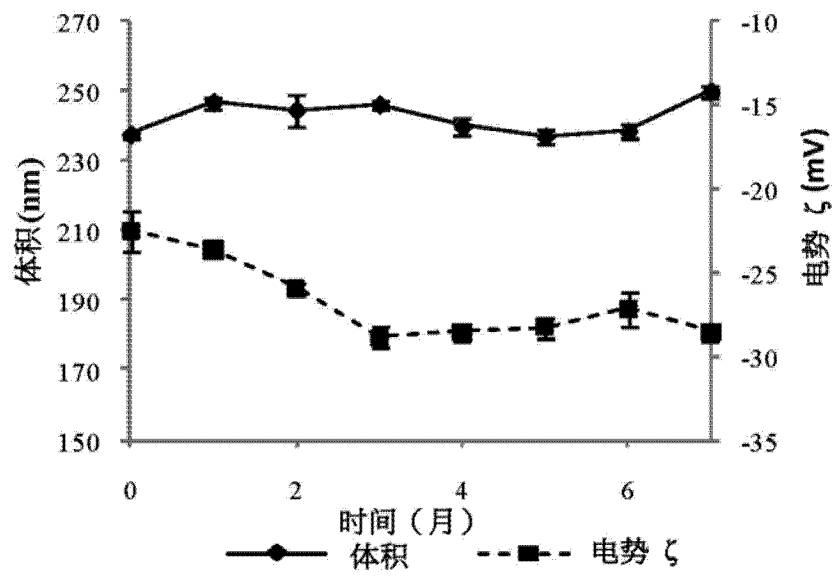


图 10a

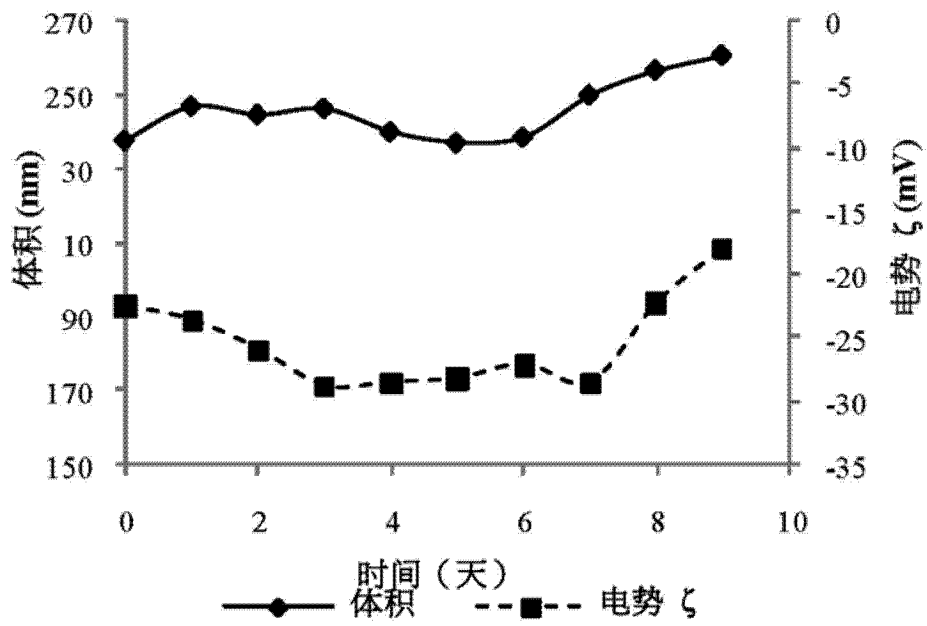


图 10b

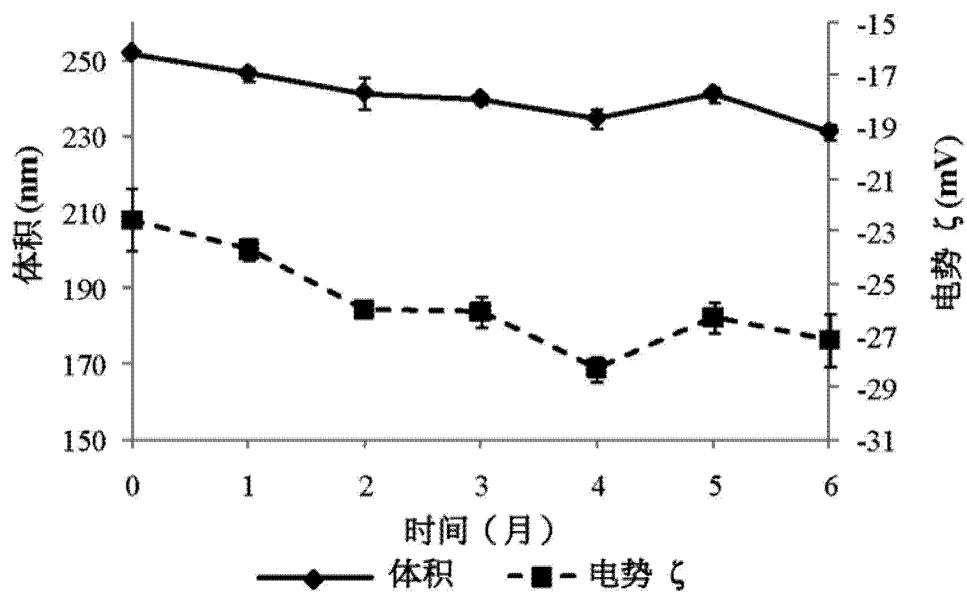


图 10c

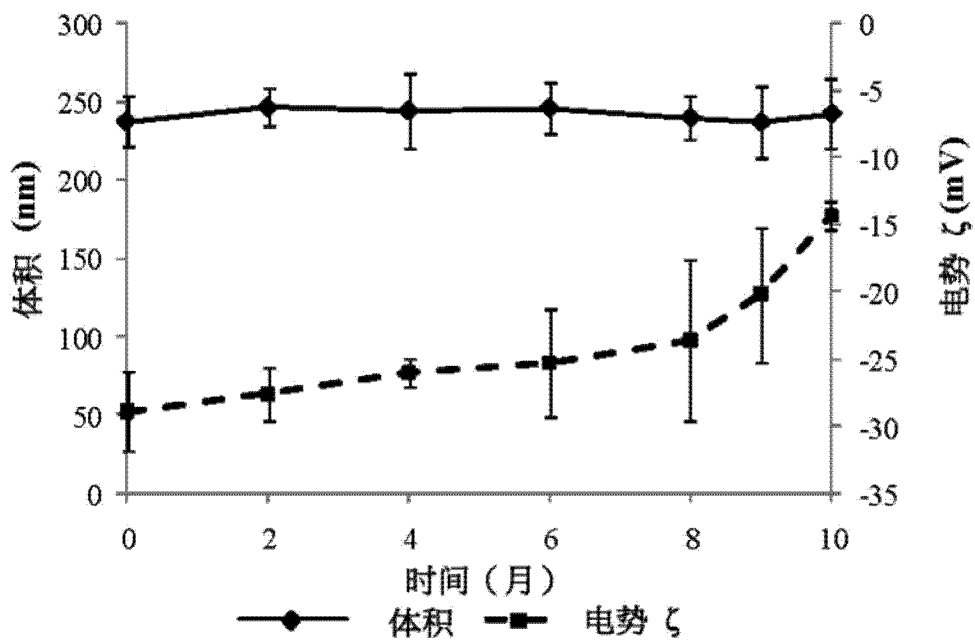


图 10d

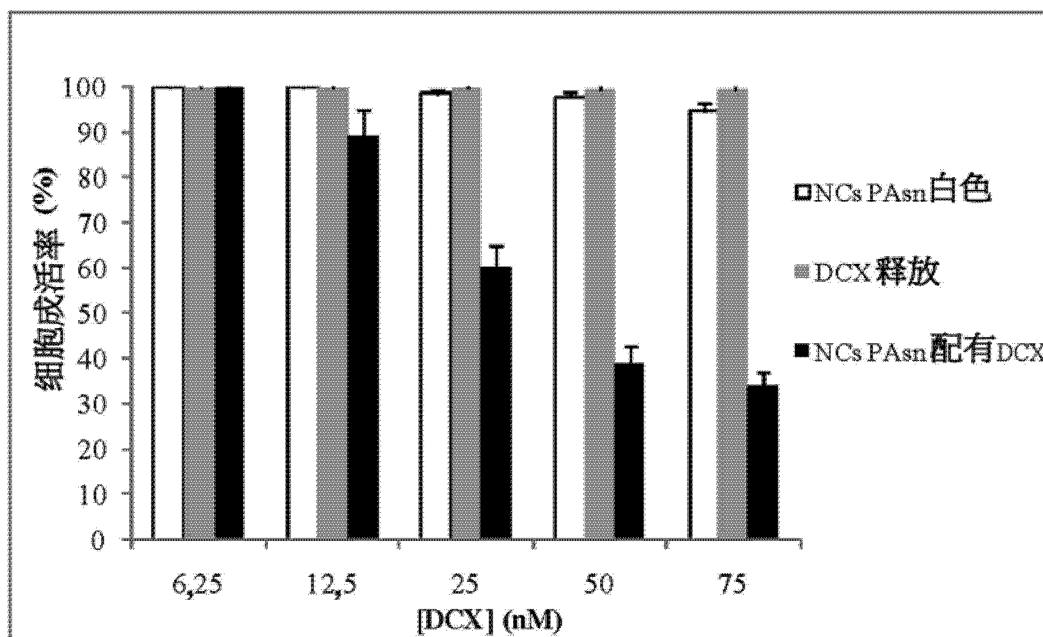


图 11a

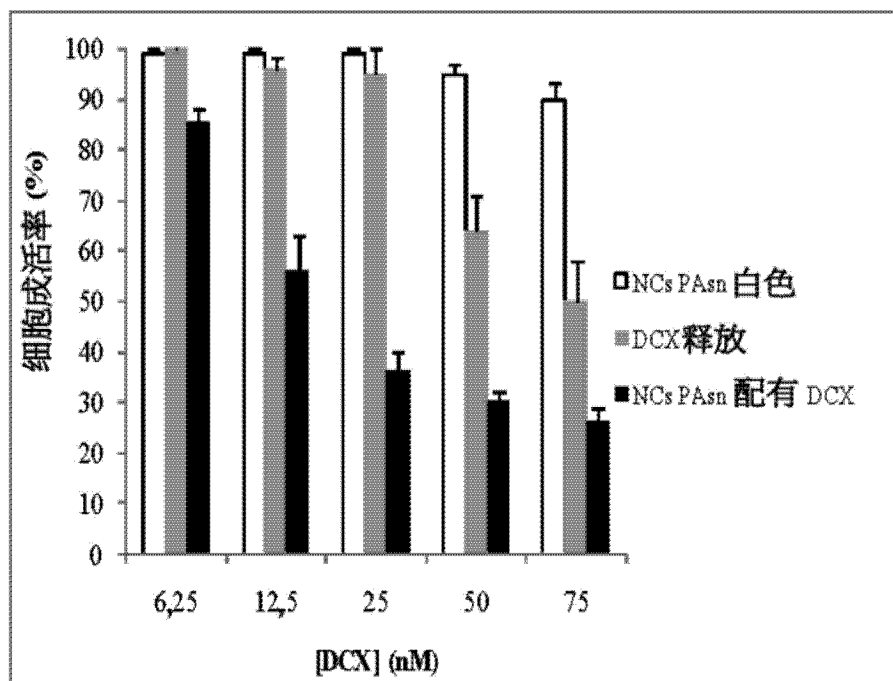


图 11b

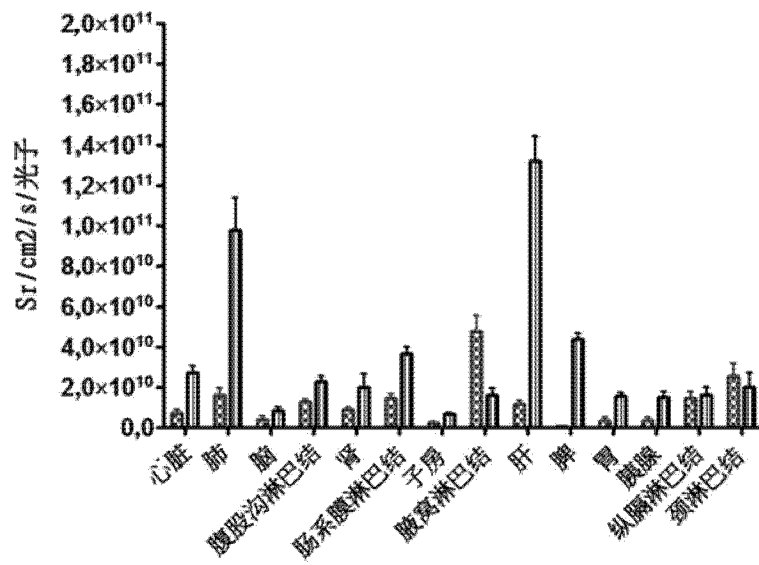


图 12a

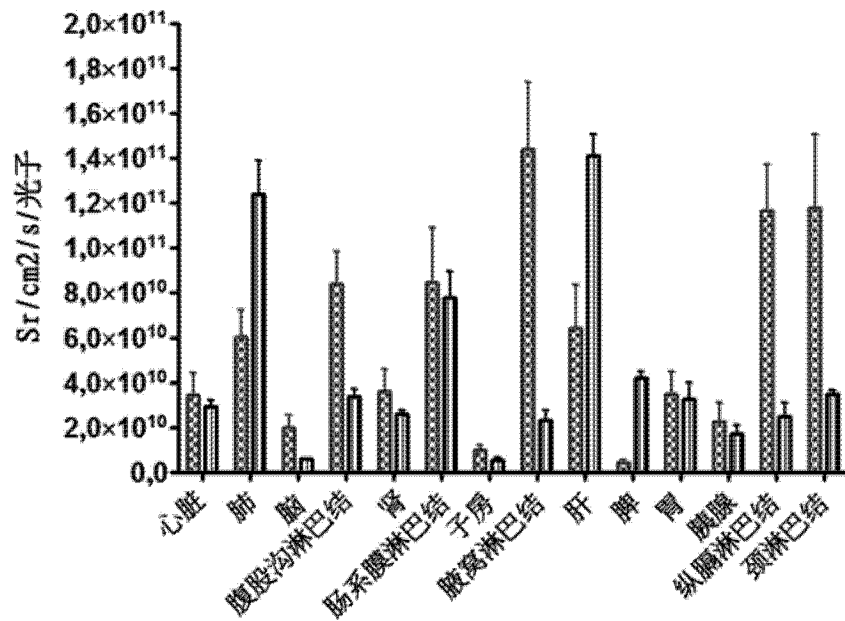


图 12b

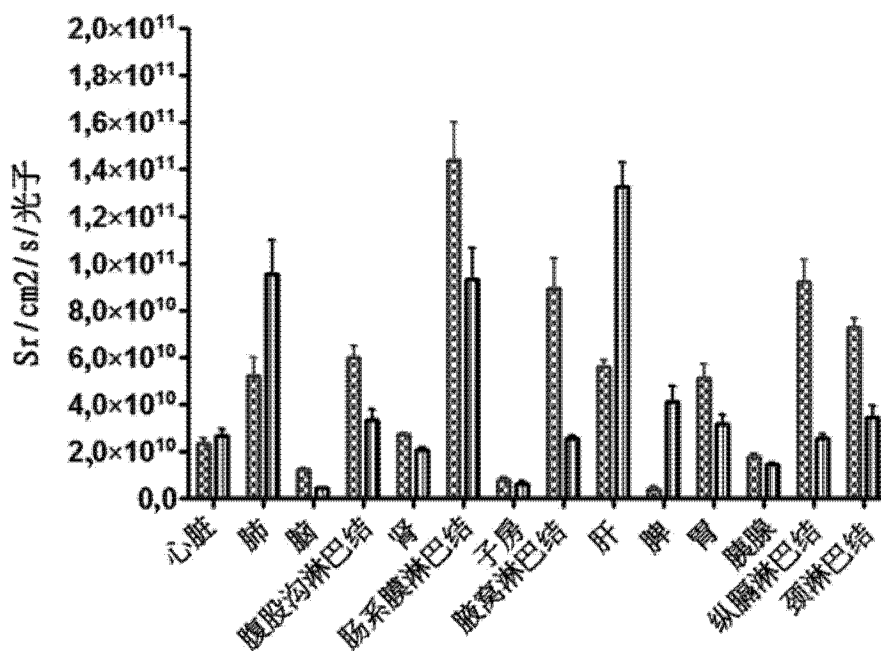


图 12c

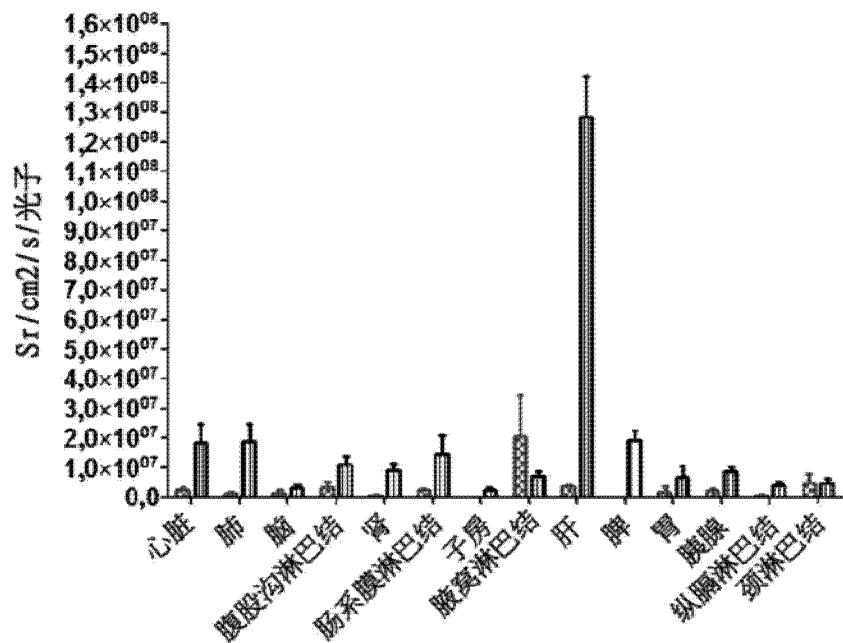


图 13a

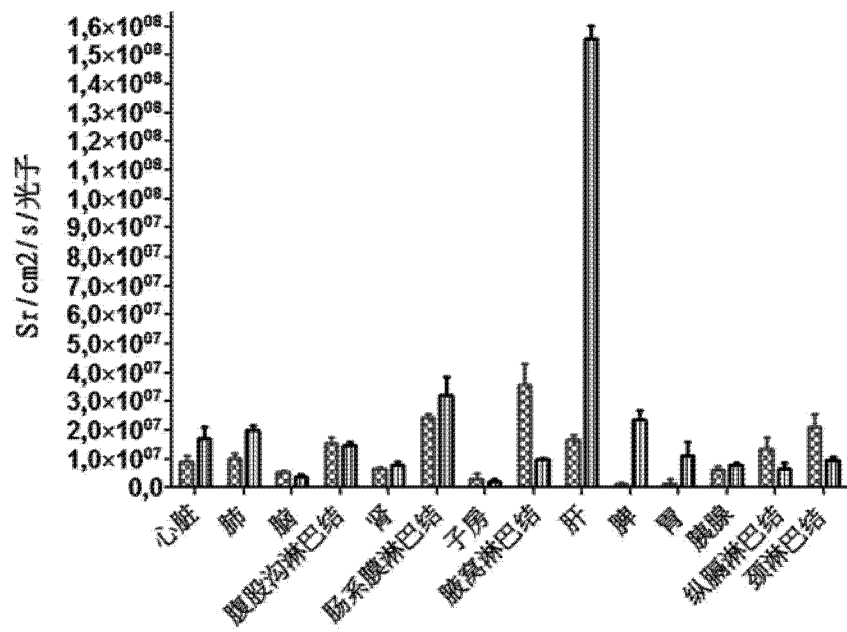


图 13b

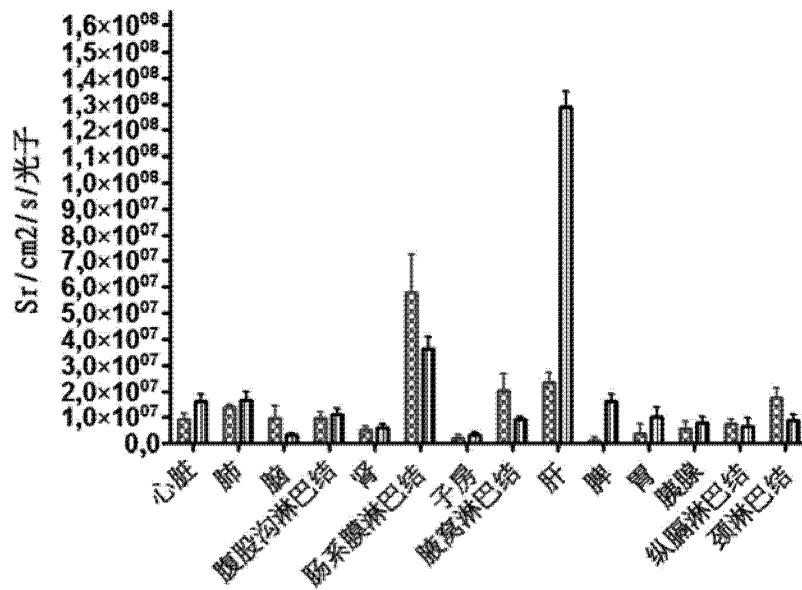


图 13c

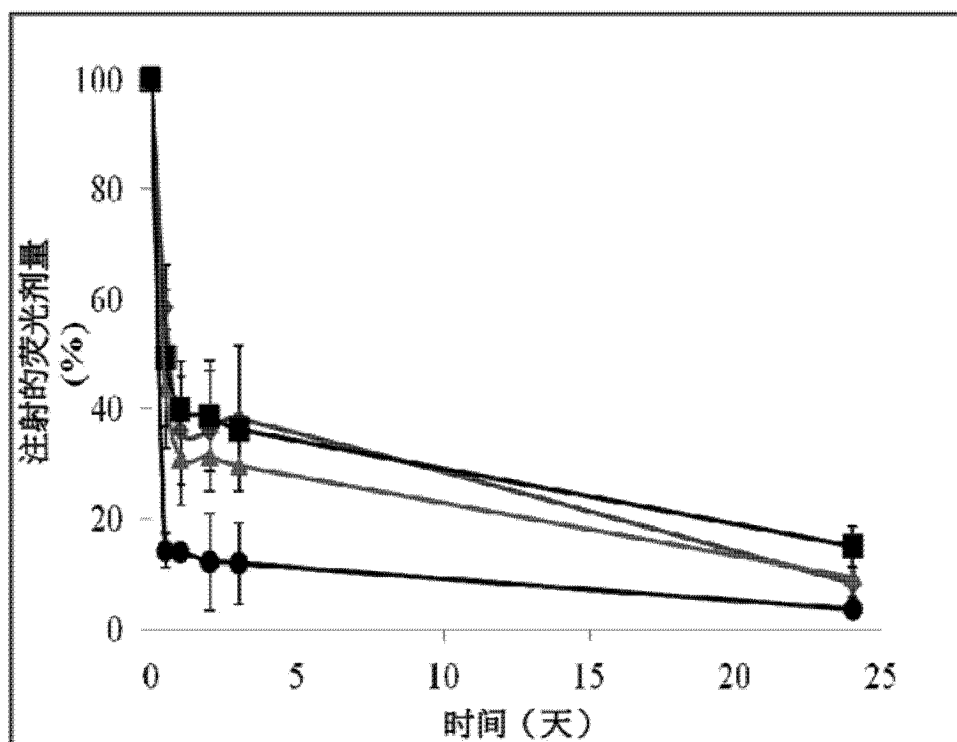


图 14

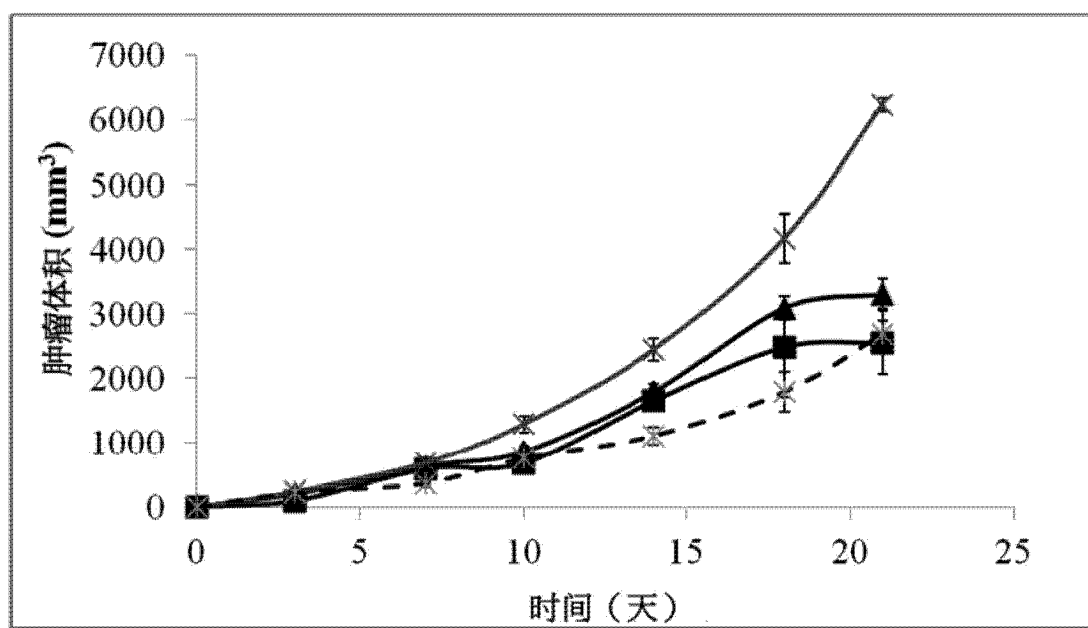


图 15a

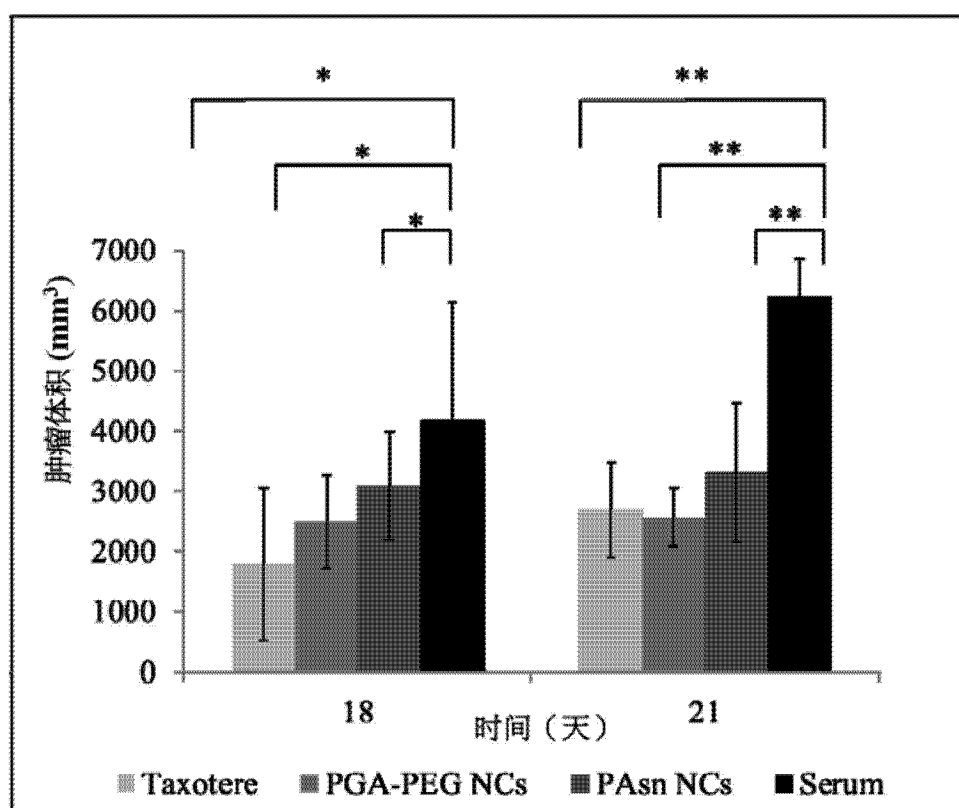


图 15b

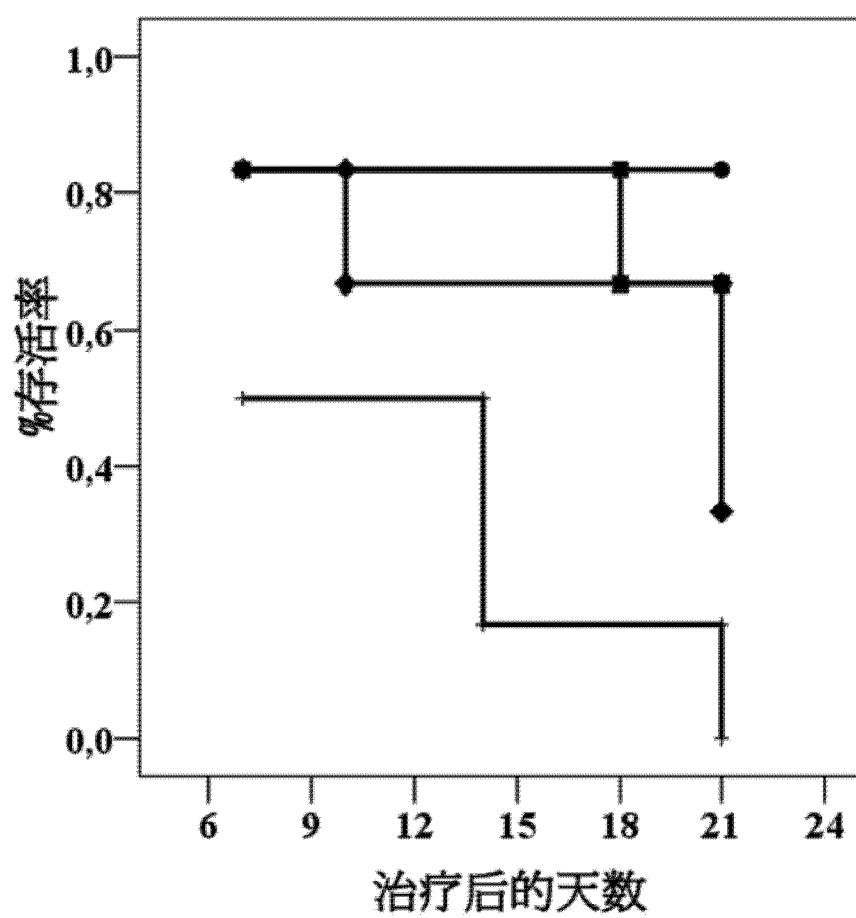


图 16