



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110662532 A

(43)申请公布日 2020.01.07

(21)申请号 201880034533.8

(22)申请日 2018.04.02

(30)优先权数据

62/480,924 2017.04.03 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.11.25

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/025749 2018.04.02

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/187240 EN 2018.10.11

(71)申请人 加利福尼亚大学董事会

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 V·约翰 西村一郎 N·苏比阿

J·卡姆帕格纳 P·R·斯皮尔曼

M·P·阿拉姆

(74)专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司 11127

代理人 李栋修 庞东成

(51)Int.Cl.

A61K 9/127(2006.01)

A61K 47/24(2006.01)

A61K 47/28(2006.01)

A61K 31/05(2006.01)

A61K 31/352(2006.01)

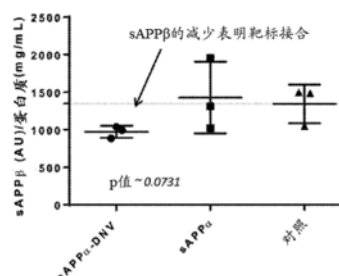
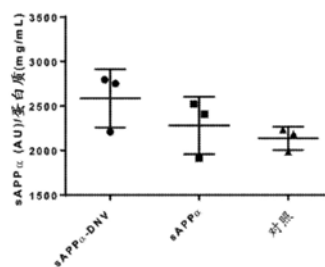
权利要求书6页 说明书41页 附图35页

(54)发明名称

用于跨血脑屏障、透粘膜和经皮药物递送的可变形的纳米级媒介物(DNVS)

(57)摘要

在各种实施方案中,提供了用于递送治疗剂的可变形的纳米级媒介物(DNV)。在某些实施方案中,所述DNV能够经皮递送并且可以另外跨越血脑屏障。



1. 一种可变形的纳米级药物递送媒介物,所述媒介物包含:
一种或多种形成囊泡的两亲性脂质;
胆固醇;以及
非离子型洗涤剂;
其中所述纳米级药物递送媒介物含有:
类黄酮(生物类黄酮)、异类黄酮、新类黄酮,或其前药;和/或
白藜芦醇或白藜芦醇类似物;和/或
醌氧化还原酶(NQO2)抑制剂;和/或
双膦酸盐;和/或
抗体;和/或
适体或miRNA。
2. 根据权利要求1所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述纳米级药物递送媒介物含有类黄酮(生物类黄酮)、异类黄酮、新类黄酮,或其前药。
3. 根据权利要求2所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述纳米级药物递送媒介物含有选自由以下组成的组的剂:橙皮苷、槲皮苷、芦丁、柑橘黄酮、木犀草素、芹菜素、柑橘黄酮、槲皮苷、山奈酚、杨梅素、漆黄素、高良姜精、异鼠李素、霍香黄酮醇、鼠李素、吡喃并黄酮醇、呋喃并黄酮醇、橙皮素、柚皮素、圣草酚、高圣草酚、花旗松素和二氢山奈酚,或其前药。
4. 根据权利要求2所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述纳米级药物递送媒介物含有高良姜精。
5. 根据权利要求2所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述纳米级药物递送媒介物含有高良姜精前体。
6. 根据权利要求2所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述纳米级药物递送媒介物含有芦丁。
7. 根据权利要求1-6中任一项所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述纳米级药物递送媒介物含有白藜芦醇或白藜芦醇类似物。
8. 根据权利要求7所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述纳米级药物递送媒介物含有白藜芦醇。
9. 根据权利要求7所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述纳米级药物递送媒介物含有白藜芦醇类似物。
10. 根据权利要求9所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述白藜芦醇类似物选自由以下组成的组:2,3',5',6-四羟基-反式-二苯乙烯、3,3',4,4'-四羟基-反式-二苯乙烯。
11. 根据权利要求9所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述白藜芦醇类似物选自由以下组成的组:图14中所示的所述白藜芦醇类似物。
12. 根据权利要求1-11中任一项所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述纳米级药物递送媒介物含有抗体。
13. 根据权利要求12所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述抗体是用于治疗神经退行性病症的抗体。
14. 根据权利要求17所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述神经退行性病症包括选

自由以下组成的组的病症:阿尔茨海默氏病(AD)、肌萎缩侧索硬化症(ALS)、脑瘫、痴呆/额颞叶痴呆(FTD)、亨廷顿氏病、轻度认知障碍(MCI)、帕金森氏病(PD)、原发性侧索硬化症(PLS)、局部缺血/中风、tau蛋白病、创伤性脑损伤(TBI),以及慢性创伤性脑病变(CTE)。

15. 根据权利要求12-14中任一项所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述抗体与选自由以下组成的组的蛋白质结合: β -淀粉样蛋白($A\beta$)、 α -突触核蛋白(α -syn)、tau、APP,以及TAR DNA结合蛋白43(TDP-43),或其片段。

16. 根据权利要求15所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述抗体与有毒的寡聚蛋白变体结合,但不与所述蛋白的单体、原纤维或非疾病相关形式结合。

17. 根据权利要求12-16中任一项所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述抗体是与 $A\beta$ 或其片段结合的抗体。

18. 根据权利要求12-17中任一项所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述抗体包括选自由以下组成的组的抗体:巴匹珠单抗(人源化3D6,)、索拉珠单抗(人源化m266)、Gantenerumab、Crenezumab(人源化IgG4)、BAN2401(人源化mAb158)、GSK933776(人源化IgG1)、AAB-003(Fc工程化的巴匹珠单抗)和SAR228810(人源化13C3)、BIIB037/BART(全人IgG1)。

19. 根据权利要求1-18中任一项所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述纳米级药物递送媒介物含有抑制性RNA(例如,miRNA)和/或适体。

20. 根据权利要求19所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述适体与选自由以下组成的组的蛋白质结合: β -淀粉样蛋白($A\beta$)、 α -突触核蛋白(α -syn)、tau、APP,以及TAR DNA结合蛋白43(TDP-43),或其片段。

21. 根据权利要求19所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述抑制性RNA抑制选自由以下组成的组的蛋白质的表达: β -淀粉样蛋白($A\beta$)、 α -突触核蛋白(α -syn)、tau、APP以及TAR DNA结合蛋白43(TDP-43),或其片段。

22. 根据权利要求1-21中任一项所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述纳米级药物递送媒介物含有醌氧化还原酶(NQO2)抑制剂。

23. 根据权利要求22所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述NQO2抑制剂选自由以下组成的组:NSC14229(奎纳克林)、NSC9858、NSC11232、NSC12547、NSC13000、NSC13484、NSC17602、NSC28487、NSC64924、NSC71795、NSC76750、NSC101984、NSC140268、NSC156529、NSC164017、NSC219733、NSC270904、NSC273829、NSC305831、NSC305836、NSC322087、NSC356821、NSC374718、NSC407356、NSC617933、NSC617939、NSC620318、NSC628440、NSC633239、NSC648424、NSC658835、NSC682454、白藜芦醇、白藜芦醇类似物,以及伊马替尼。

24. 根据权利要求1-23中任一项所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述纳米级药物递送媒介物含有双膦酸盐。

25. 根据权利要求24所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述纳米级药物递送媒介物含有双膦酸盐,所述双膦酸盐选自由以下组成的组:阿仑膦酸盐/胆钙化醇、依替膦酸盐、唑来膦酸(唑来膦酸盐)、伊班膦酸盐、利塞膦酸盐、阿仑膦酸盐、帕米膦酸盐、奈立膦酸盐、奥帕膦酸盐,以及替鲁膦酸盐。

26. 根据权利要求24所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述纳米级药物递送媒介物含有唑来膦酸(唑来膦酸盐)。

27. 根据权利要求1-26中任一项所述的纳米级药物递送媒介物, 其中所述形成囊泡的两亲性脂质包括磷脂。

28. 根据权利要求27所述的纳米级药物递送媒介物, 其中所述磷脂选自由以下组成的组: 1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱 (DPPC)、N-(2,3-二油酰氧基-1-丙基)-三甲基铵 (DOTAP), 以及1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺 (DOPE)。

29. 根据权利要求1-28中任一项所述的纳米级药物递送媒介物, 其中所述纳米级药物递送媒介物包含胶束。

30. 根据权利要求1-28中任一项所述的纳米级药物递送媒介物, 其中所述纳米级药物递送媒介物包含脂质体。

31. 根据权利要求1-30中任一项所述的纳米级药物递送媒介物, 其中所述药物递送媒介物包含至少两种磷脂。

32. 根据权利要求27-31中任一项所述的纳米级药物递送媒介物, 其中所述磷脂包括DPPC和第二磷脂。

33. 根据权利要求32所述的纳米级药物递送媒介物, 其中DPPC与所述第二磷脂的比率范围为2:1至1:2。

34. 根据权利要求32所述的纳米级药物递送媒介物, 其中DPPC与所述第二磷脂的比率为约1:1。

35. 根据权利要求27-34中任一项所述的纳米级药物递送媒介物, 其中总磷脂与胆固醇的比率范围为约12:2至约5:4或约5:3, 或约10:2至约6:2。

36. 根据权利要求35所述的纳米级药物递送媒介物, 其中磷脂与第二磷脂与胆固醇的比率为约4:4:2。

37. 根据权利要求35所述的纳米级药物递送媒介物, 其中磷脂与第二磷脂的比率为约5:3。

38. 根据权利要求1-37中任一项所述的纳米级药物递送媒介物, 其中脂质(包括胆固醇)与非离子型洗涤剂的w/w比率范围为约85:5至约85:25, 或约85:10至约85:20。

39. 根据权利要求38所述的纳米级药物递送媒介物, 其中脂质(包括胆固醇)与洗涤剂的w/w比率为约85:15。

40. 根据权利要求1-39中任一项所述的纳米级药物递送媒介物, 其中所述非离子型洗涤剂包括选自由以下组成的组的洗涤剂: Span 80、Tween 20、BRIJ® 76(硬脂基聚(10)氧基乙烯醚)、BRIJ® 78(硬脂基聚(20)氧基乙烯醚)、BRIJ® 96(油基聚(10)氧基乙烯醚), 以及BRIJ® 721(硬脂基聚(21)氧基乙烯醚)。

41. 根据权利要求40所述的纳米级药物递送媒介物, 其中所述药物递送媒介物包含按重量计约10%至约20%或约15%的Span 80。

42. 根据权利要求1-40中任一项所述的纳米级药物递送媒介物, 其中所述纳米级药物递送媒介物是中性的(不带电的)。

43. 根据权利要求42所述的纳米级药物递送媒介物, 其中所述磷脂包括DPPC和DOPE。

44. 根据权利要求1-30中任一项所述的纳米级药物递送媒介物, 其中所述纳米级药物递送媒介物是阳离子型的。

45. 根据权利要求44所述的纳米级药物递送媒介物, 其中所述磷脂包括DPPC和DOTAP。

46. 根据权利要求1-30中任一项所述的纳米级药物递送媒介物, 其中所述纳米级药物递送媒介物是阴离子型的。

47. 根据权利要求46所述的纳米级药物递送媒介物, 其中所述磷脂包括DPPC和DHP。

48. 根据权利要求1-47中任一项所述的纳米级药物递送媒介物, 其中所述媒介物(DNV)不是球形形状的。

49. 根据权利要求1-48中任一项所述的纳米级药物递送媒介物, 其中所述媒介物(DNV)是不规则形状的。

50. 根据权利要求1-49中任一项所述的纳米级药物递送媒介物, 其中所述媒介物(DNV)是稳定的并且在作为冻干粉储存至少1周、或至少2周、或至少3周、或至少4周、或至少2个月、或至少3个月、或至少4个月、或至少5个月、或至少6个月、或至少9个月、或至少12个月、或至少18个月、或至少24个月能够复原为功能性DNV。

51. 根据权利要求1-50中任一项所述的纳米级药物递送媒介物, 其中所述纳米级药物递送媒介物用聚合物功能化以延长血清半衰期。

52. 根据权利要求51所述的纳米级药物递送媒介物, 其中所述聚合物包括聚乙二醇和/或纤维素或改性纤维素。

53. 根据权利要求1-52中任一项所述的纳米级药物递送媒介物, 其中所述DNV的大小范围为从约50nm、或从约60nm、或从约70nm、或从约80nm、或从约90nm、或从约100nm, 至约10 μ m、或至约5 μ m、或至约1 μ m、或至约900nm、或至约800nm、或至约700nm、或至约600nm、或至约500nm、或至约400nm、或至约300nm的平均直径。

54. 根据权利要求1-52中任一项所述的纳米级药物递送媒介物, 其中所述DNV的大小范围为约50nm至约275nm的平均直径。

55. 根据权利要求1-52中任一项所述的纳米级药物递送媒介物, 其中所述DNV为约50nm的平均直径, 或约100nm的平均直径, 或约150nm的平均直径。

56. 根据权利要求1-55中任一项所述的纳米级药物递送媒介物, 其中所述纳米级药物递送媒介物附着至与细胞表面标记物结合的抗体或配体。

57. 根据权利要求56所述的纳米级药物递送媒介物, 其中所述细胞表面标记物是肿瘤细胞的标记物。

58. 根据权利要求57所述的纳米级药物递送媒介物, 其中所述细胞表面制造者包括表1中的标记物。

59. 根据权利要求1-55中任一项所述的纳米级药物递送媒介物, 其中所述纳米级药物递送媒介物附着至脑靶向分子和/或增强脑渗透性的分子。

60. 根据权利要求59所述的纳米级药物递送媒介物, 其中所述脑靶向分子和/或增强脑渗透性的分子选自由以下组成的组: 转铁蛋白、胰岛素、增强脑渗透性的小分子诸如苯并二氮䓬类、中性氨基酸转运蛋白配体, 以及葡萄糖转运蛋白配体。

61. 根据权利要求60所述的纳米级药物递送媒介物, 其中转铁蛋白附着至纳米级药物递送媒介物。

62. 根据权利要求60所述的纳米级药物递送媒介物, 其中叶酸附着至纳米级药物递送媒介物。

63. 一种药物制剂, 所述药物制剂包含根据权利要求1-62中任一项所述的纳米级药物

递送媒介物和药学上可接受的载体。

64. 根据权利要求63所述的制剂, 其中将所述制剂配混成用于通过选自以下组成的组的途径进行递送: 口服递送、等电渗递送、皮下递送、经皮递送、肠胃外递送、气溶胶施用、经由吸入施用、静脉内施用, 以及直肠施用。

65. 根据权利要求64所述的制剂, 其中将所述制剂配混成用于口服施用。

66. 根据权利要求64所述的制剂, 其中将所述制剂配混成用于经皮施用。

67. 根据权利要求66所述的制剂, 其中所述制剂被提供作为透皮贴剂。

68. 根据权利要求64所述的制剂, 其中将所述制剂配混成用于全身施用。

69. 根据权利要求63-68中任一项所述的制剂, 其中所述制剂是单位剂量制剂。

70. 一种治疗或预防神经退行性脑病症的方法, 所述方法包括:

向有需要的受试者施用有效量的根据权利要求1-28中任一项所述的负载的纳米级药物递送媒介物。

71. 根据权利要求70所述的方法, 其中所述神经退行性脑病症选自以下组成的组: 阿尔茨海默氏病 (AD)、肌萎缩侧索硬化症 (ALS)、脑瘫、痴呆/额颞叶痴呆 (FTD)、亨廷顿氏病、轻度认知障碍 (MCI)、帕金森氏病 (PD)、原发性侧索硬化症 (PLS)、局部缺血/中风、tau蛋白病、创伤性脑损伤 (TBI), 以及慢性创伤性脑病变 (CTE)。

72. 根据权利要求70-71中任一项所述的方法, 其中所述DSV含有淀粉样生成途径的抑制剂或将APP加工从淀粉样生成途径切换为非淀粉样生成途径的剂。

73. 根据权利要求70-72中任一项所述的方法, 其中所述方法预防或延迟阿尔茨海默氏病前病症和/或认知功能障碍的发作, 和/或改善阿尔茨海默氏病前病症和/或认知功能障碍的一种或多种症状, 和/或预防或延迟阿尔茨海默氏病前病症或认知功能障碍到阿尔茨海默氏病的进展, 和/或缓解阿尔茨海默氏病的一种或多种症状, 和/或逆转阿尔茨海默氏病, 和/或降低阿尔茨海默氏病的进展速率。

74. 一种将治疗剂递送至受试者的方法, 其中所述剂包括:

类黄酮 (生物类黄酮)、异类黄酮、新类黄酮, 或其前药; 和/或

白藜芦醇或白藜芦醇类似物; 和/或

醌氧化还原酶 (NQO2) 抑制剂; 和/或

双膦酸盐; 和/或

抗体;

和/或

适体或抑制性RNA (例如, miRNA);

所述方法包括向所述受试者施用根据权利要求1-62中任一项所述的纳米级药物递送媒介物, 其中所述纳米级递送媒介物含有所述治疗剂。

75. 根据权利要求74所述的方法, 其中所述受试者是人。

76. 根据权利要求74所述的方法, 其中所述受试者是非人哺乳动物。

77. 根据权利要求74-76中任一项所述的方法, 其中所述纳米级药物递送媒介物经由选自以下组成的组的途径递送: 口服递送、等电渗递送、皮下递送、经皮递送、肠胃外递送、气溶胶施用、经由吸入施用、静脉内施用, 以及直肠施用。

78. 根据权利要求74-76中任一项所述的方法, 其中所述纳米级药物递送媒介物跨血脑

屏障递送货物。

79. 根据权利要求78所述的方法, 其中所述纳米级药物递送媒介物经皮施加并且跨血脑屏障递送货物。

80. 根据权利要求74-76中任一项所述的方法, 其中所述纳米级药物递送媒介物将货物局部地递送至颅面骨和/或口腔骨。

81. 根据权利要求80所述的方法, 其中所述纳米级药物递送媒介物将货物递送至牙槽骨。

82. 根据权利要求74-76中任一项所述的方法, 其中所述纳米级药物递送媒介物将货物局部递送至局部、皮内或皮下部位。

83. 根据权利要求74-76中任一项所述的方法, 其中所述纳米级药物递送媒介物将货物递送至颅顶皮肤和/或下层骨。

84. 根据权利要求74-76中任一项所述的方法, 其中将所述纳米级药物递送媒介物施加至口腔粘膜。

用于跨血脑屏障、透粘膜和经皮药物递送的可变形的纳米级媒介物 (DNVS)

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2017年4月3日提交的USSN 62/480,924的权益和优先权,该专利出于所有目的以引用方式整体并入本文。

[0003] 对政府支持的声明

[0004] [不适用]

背景技术

[0005] 现代医学为我们提供了能够成功治疗各种疾病病理的新药物和相关递送系统。然而情况通常是药物仅在靶位点有效,而在全身循环中无效甚至有毒。因此,局部药物递送系统将有可能减少剂量并增加在其他方面有毒的药物的功效,并减少或消除副作用,从而导致增进的患者依从性和结局。

[0006] 有超过十九种经批准的经皮药物递送系统和几种实验性经皮药物递送系统,所述几种实验性经皮药物递送系统包括贴剂、微针、塑料聚合物和脂质纳米颗粒以及水凝胶基质(参见例如Prausnitz等人,(2008) Nat. Biotechnol., 26 (11):1261-268;Petelin等人,(1998) Int. J. Pharmaceut. 173 (1-2):193-202;Madhav等人,(2012) Exp. Opin. Drug Deliv., 9 (6):629-647;Patel等人,(2011) J. Control. Rel. 153 (2):106-116)。这些系统经常遭受运输、安全性和功效改善方面的故障。

发明内容

[0007] 在各种实施方案中,提供了可用于递送治疗剂的可变形的纳米级媒介物(DNV)。在某些实施方案中,DNV能够经皮递送并且可以另外跨越血脑屏障。

[0008] 本文设想的各种实施方案可包括但不限于以下中的一个或多个:

[0009] 实施方案1:一种可变形的纳米级药物递送媒介物,所述媒介物包含:

[0010] 一种或多种形成囊泡的两亲性脂质;

[0011] 胆固醇;以及

[0012] 非离子型洗涤剂;其中所述纳米级药物递送媒介物含有:

[0013] 类黄酮(生物类黄酮)、异类黄酮、新类黄酮,或其前药;和/或

[0014] 白藜芦醇或白藜芦醇类似物;和/或

[0015] 醌氧化还原酶(NQO2)抑制剂;和/或

[0016] 双膦酸盐;和/或

[0017] 抗体;和/或

[0018] 适体或miRNA。

[0019] 实施方案2:根据实施方案1所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述纳米级药物递送媒介物含有类黄酮(生物类黄酮)、异类黄酮、新类黄酮,或其前药。

[0020] 实施方案3:根据实施方案2所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述纳米级药物

递送媒介物含有选自以下组成的组的剂：橙皮苷、槲皮苷、芦丁、柑橘黄酮、木犀草素、芹菜素、柑橘黄酮、槲皮苷、山奈酚、杨梅素、漆黄素、高良姜精、异鼠李素、霍香黄酮醇、鼠李素素(rhamnazin)、吡喃并黄酮醇、呋喃并黄酮醇、橙皮素、柚皮素、圣草酚、高圣草酚、花旗松素和二氢山奈酚，或其前药。

[0021] 实施方案4：根据实施方案2所述的纳米级药物递送媒介物，其中所述纳米级药物递送媒介物含有高良姜精。

[0022] 实施方案5：根据实施方案2所述的纳米级药物递送媒介物，其中所述纳米级药物递送媒介物含有高良姜精前体(progalangin)。

[0023] 实施方案6：根据实施方案2所述的纳米级药物递送媒介物，其中所述纳米级药物递送媒介物含有芦丁。

[0024] 实施方案7：根据实施方案1-6中任一项所述的纳米级药物递送媒介物，其中所述纳米级药物递送媒介物含有白藜芦醇或白藜芦醇类似物。

[0025] 实施方案8：根据实施方案7所述的纳米级药物递送媒介物，其中所述纳米级药物递送媒介物含有白藜芦醇。

[0026] 实施方案9：根据实施方案7所述的纳米级药物递送媒介物，其中所述纳米级药物递送媒介物含有白藜芦醇类似物。

[0027] 实施方案10：根据实施方案9所述的纳米级药物递送媒介物，其中所述白藜芦醇类似物选自以下组成的组：2,3',5',6-四羟基-反式-二苯乙烯、3,3',4,4'-四羟基-反式-二苯乙烯。

[0028] 实施方案11：根据实施方案9所述的纳米级药物递送媒介物，其中所述白藜芦醇类似物选自以下组成的组：图14中所示的白藜芦醇类似物。

[0029] 实施方案12：根据实施方案1-11中任一项所述的纳米级药物递送媒介物，其中所述纳米级药物递送媒介物含有抗体。

[0030] 实施方案13：根据实施方案12所述的纳米级药物递送媒介物，其中所述抗体是可用于治疗神经退行性病症的抗体。

[0031] 实施方案14：根据实施方案17所述的纳米级药物递送媒介物，其中所述神经退行性病症包括选自以下组成的组的病症：阿尔茨海默氏病(AD)、肌萎缩侧索硬化症(ALS)、脑瘫、痴呆/额颞叶痴呆(FTD)、亨廷顿氏病、轻度认知障碍(MCI)、帕金森氏病(PD)、原发性侧索硬化症(PLS)、局部缺血/中风、tau蛋白病(taupathies)、创伤性脑损伤(TBI)，以及慢性创伤性脑病变(CTE)。

[0032] 实施方案15：根据实施方案12-14中任一项所述的纳米级药物递送媒介物，其中所述抗体与选自以下组成的组的蛋白质结合： β -淀粉样蛋白(A β)、 α -突触核蛋白(α -syn)、tau、APP，以及TAR DNA结合蛋白43(TDP-43)，或其片段。

[0033] 实施方案16：根据实施方案15所述的纳米级药物递送媒介物，其中所述抗体与有毒的寡聚蛋白变体结合，但不与所述蛋白的单体、原纤维或非疾病相关形式结合。

[0034] 实施方案17：根据实施方案12-16中任一项所述的纳米级药物递送媒介物，其中所述抗体是与A β 或其片段结合的抗体。

[0035] 实施方案18：根据实施方案12-17中任一项所述的纳米级药物递送媒介物，其中所述抗体包括选自以下组成的组的抗体：巴匹珠单抗(Bapineuzumab)(人源化3D6,)、索拉

珠单抗 (Solanezumab) (人源化m266)、Gantenerumab、Crenezumab (人源化IgG4)、BAN2401 (人源化mAb158)、GSK 933776 (人源化IgG1)、AAB-003 (Fc工程化的巴匹珠单抗) 和 SAR228810 (人源化13C3)、BIIB037/BART (全人IgG1)。

[0036] 实施方案19:根据实施方案1-18中任一项所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述纳米级药物递送媒介物含有抑制性RNA (例如,miRNA) 和/或适体。

[0037] 实施方案20:根据实施方案19所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述适体与选自由以下组成的组的蛋白质结合: β -淀粉样蛋白 ($A\beta$)、 α -突触核蛋白 (α -syn)、tau、APP,以及 TAR DNA结合蛋白43 (TDP-43),或其片段。

[0038] 实施方案21:根据实施方案19所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述抑制性RNA抑制选自由以下组成的组的蛋白质的表达: β -淀粉样蛋白 ($A\beta$)、 α -突触核蛋白 (α -syn)、tau、APP,以及 TAR DNA结合蛋白43 (TDP-43),或其片段。

[0039] 实施方案22:根据实施方案1-21中任一项所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述纳米级药物递送媒介物含有醌氧化还原酶 (NQO2) 抑制剂。

[0040] 实施方案23:根据实施方案22所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述NQO2抑制剂选自由以下组成的组: NSC14229 (奎纳克林)、NSC9858、NSC11232、NSC12547、NSC13000、NSC13484、NSC17602、NSC28487、NSC64924、NSC71795、NSC76750、NSC101984、NSC140268、NSC156529、NSC164017、NSC219733、NSC270904、NSC273829、NSC305831、NSC305836、NSC322087、NSC356821、NSC374718、NSC407356、NSC617933、NSC617939、NSC620318、NSC628440、NSC633239、NSC648424、NSC658835、NSC682454、白藜芦醇、白藜芦醇类似物,以及伊马替尼。

[0041] 实施方案24:根据实施方案1-23中任一项所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述纳米级药物递送媒介物含有双膦酸盐。

[0042] 实施方案25:根据实施方案24所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述纳米级药物递送媒介物含有双膦酸盐,所述双膦酸盐选自由以下组成的组:阿仑膦酸盐 (adendronate)/胆钙化醇、依替膦酸盐、唑来膦酸 (唑来膦酸盐 (zolendronate))、伊班膦酸盐、利塞膦酸盐、阿仑膦酸盐、帕米膦酸盐、奈立膦酸盐、奥帕膦酸盐,以及替鲁膦酸盐。

[0043] 实施方案26:根据实施方案24所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述纳米级药物递送媒介物含有唑来膦酸 (唑来膦酸盐)。

[0044] 实施方案27:根据实施方案1-26中任一项所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述形成囊泡的两亲性脂质包括磷脂。

[0045] 实施方案28:根据实施方案27所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述磷脂选自由以下组成的组:1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱 (DPPC)、N-(2,3-二油酰氧基-1-丙基)、三甲基铵 (DOTAP),以及1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺 (DOPE)。

[0046] 实施方案29:根据实施方案1-28中任一项所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述纳米级药物递送媒介物包含胶束。

[0047] 实施方案30:根据实施方案1-28中任一项所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述纳米级药物递送媒介物包含脂质体。

[0048] 实施方案31:根据实施方案1-30中任一项所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述药物递送媒介物包含至少两种磷脂。

[0049] 实施方案32:根据实施方案27-31中任一项所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述磷脂包括DPPC和第二磷脂。

[0050] 实施方案33:根据实施方案32所述的纳米级药物递送媒介物,其中DPPC与所述第二磷脂的比率范围为2:1至1:2。

[0051] 实施方案34:根据实施方案32所述的纳米级药物递送媒介物,其中DPPC与所述第二磷脂的比率为约1:1。

[0052] 实施方案35:根据实施方案27-34中任一项所述的纳米级药物递送媒介物,其中总磷脂与胆固醇的比率范围为约12:2至约5:4或约5:3,或约10:2至约6:2。

[0053] 实施方案36:根据实施方案35所述的纳米级药物递送媒介物,其中磷脂与第二磷脂与胆固醇的比率为约4:4:2。

[0054] 实施方案37:根据实施方案35所述的纳米级药物递送媒介物,其中磷脂与第二磷脂的比率为约5:3。

[0055] 实施方案38:根据实施方案1-37中任一项所述的纳米级药物递送媒介物,其中脂质(包括胆固醇)与非离子型洗涤剂的w/w比率范围为约85:5至约85:25,或约85:10至约85:20。

[0056] 实施方案39:根据实施方案38所述的纳米级药物递送媒介物,其中脂质(包括胆固醇)与洗涤剂的w/w比率为约85:15。

[0057] 实施方案40:根据实施方案1-39中任一项所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述非离子型洗涤剂包括选自以下组成的组的洗涤剂:Span 80、Tween 20、BRIJ® 76(硬脂基聚(10)氧基乙烯醚)、BRIJ® 78(硬脂基聚(20)氧基乙烯醚)、BRIJ® 96(油基聚(10)氧基乙烯醚),以及BRIJ® 721(硬脂基聚(21)氧基乙烯醚)。

[0058] 实施方案41:根据实施方案40所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述药物递送媒介物包含按重量计约10%至约20%或约15%的Span 80。

[0059] 实施方案42:根据实施方案1-40中任一项所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述纳米级药物递送媒介物是中性的(不带电的)。

[0060] 实施方案43:根据实施方案42所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述磷脂包括DPPC和DOPE。

[0061] 实施方案44:根据实施方案1-30中任一项所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述纳米级药物递送媒介物是阳离子型的。

[0062] 实施方案45:根据实施方案44所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述磷脂包括DPPC和DOTAP。

[0063] 实施方案46:根据实施方案1-30中任一项所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述纳米级药物递送媒介物是阴离子型的。

[0064] 实施方案47:根据实施方案46所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述磷脂包括DPPC和DHP。

[0065] 实施方案48:根据实施方案1-47中任一项所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述媒介物(DNV)不是球形形状的。

[0066] 实施方案49:根据实施方案1-48中任一项所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述媒介物(DNV)是不规则形状的。

[0067] 实施方案50:根据实施方案1-49中任一项所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述媒介物(DNV)是稳定的并且在作为冻干粉储存至少1周、或至少2周、或至少3周、或至少4周、或至少2个月、或至少3个月、或至少4个月、或至少5个月、或至少6个月、或至少9个月、或至少12个月、或至少18个月、或至少24个月后能够复原为功能性DNV。

[0068] 实施方案51:根据实施方案1-50中任一项所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述纳米级药物递送媒介物用聚合物功能化以延长血清半衰期。

[0069] 实施方案52:根据实施方案51所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述聚合物包括聚乙二醇和/或纤维素或改性纤维素。

[0070] 实施方案53:根据实施方案1-52中任一项所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述DNV的大小范围为从约50nm、或从约60nm、或从约70nm、或从约80nm、或从约90nm、或从约100nm,至约10 μ m、或至约5 μ m、或至约1 μ m、或至约900nm、或至约800nm、或至约700nm、或至约600nm、或至约500nm、或至约400nm、或至约300nm的平均直径。

[0071] 实施方案54:根据实施方案1-52中任一项所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述DNV的大小范围为约50nm至约275nm的平均直径。

[0072] 实施方案55:根据实施方案1-52中任一项所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述DNV为约50nm的平均直径,或约100nm的平均直径,或约150nm的平均直径。

[0073] 实施方案56:根据实施方案1-55中任一项所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述纳米级药物递送媒介物附着至与细胞表面标记物结合的抗体或配体。

[0074] 实施方案57:根据实施方案56所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述细胞表面标记物是肿瘤细胞的标记物。

[0075] 实施方案58:根据实施方案57所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述细胞表面制造者包括表1中的标记物。

[0076] 实施方案59:根据实施方案1-55中任一项所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述纳米级药物递送媒介物附着至脑靶向分子和/或增强脑渗透性的分子。

[0077] 实施方案60:根据实施方案59所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述脑靶向分子和/或增强脑渗透性的分子选自以下组成的组:转铁蛋白、胰岛素、增强脑渗透性的小分子诸如苯并二氮䓬类、中性氨基酸转运蛋白配体,以及葡萄糖转运蛋白配体。

[0078] 实施方案61:根据实施方案60所述的纳米级药物递送媒介物,其中转铁蛋白附着至纳米级药物递送媒介物。

[0079] 实施方案62:根据实施方案60所述的纳米级药物递送媒介物,其中叶酸附着至纳米级药物递送媒介物。

[0080] 实施方案63:一种药物制剂,所述药物制剂包含根据实施方案1-62中任一项所述的纳米级药物递送媒介物和药学上可接受的载体。

[0081] 实施方案64:根据实施方案63所述的制剂,其中将所述制剂配混成用于通过选自由以下组成的组的途径进行递送:口服递送、等电渗递送(isophoretic delivery)、皮下递送、经皮递送、肠胃外递送、气溶胶施用、经由吸入施用、静脉内施用,以及直肠施用。

[0082] 实施方案65:根据实施方案64所述的制剂,其中将所述制剂配混成用于口服施用。

[0083] 实施方案66:根据实施方案64所述的制剂,其中将所述制剂配混成用于经皮施用。

[0084] 实施方案67:根据实施方案66所述的制剂,其中所述制剂被提供作为透皮贴剂。

- [0085] 实施方案68:根据实施方案64所述的制剂,其中将所述制剂配混成用于全身施用。
- [0086] 实施方案69:根据实施方案63-68中任一项所述的制剂,其中所述制剂是单位剂量制剂。
- [0087] 实施方案70:一种治疗或预防神经退行性脑病症的方法,所述方法包括:
- [0088] 向有需要的受试者施用有效量的根据实施方案1-28中任一项所述的负载的纳米级药物递送媒介物。
- [0089] 实施方案71:根据实施方案70所述的方法,其中所述神经退行性脑病症选自自由以下组成的组:阿尔茨海默氏病(AD)、肌萎缩侧索硬化症(ALS)、脑瘫、痴呆/额颞叶痴呆(FTD)、亨廷顿氏病、轻度认知障碍(MCI)、帕金森氏病(PD)、原发性侧索硬化症(PLS)、局部缺血/中风、tau蛋白病、创伤性脑损伤(TBI),以及慢性创伤性脑病变(CTE)。
- [0090] 实施方案72:根据实施方案70-71中任一项所述的方法,其中所述DSV含有淀粉样生成途径的抑制剂或将APP加工从淀粉样生成途径切换为非淀粉样生成途径的剂。
- [0091] 实施方案73:根据实施方案70-72中任一项所述的方法,其中所述方法预防或延迟阿尔茨海默氏病前病症和/或认知功能障碍的发作,和/或改善阿尔茨海默氏病前病症和/或认知功能障碍的一种或多种症状,和/或预防或延迟阿尔茨海默氏病前病症或认知功能障碍到阿尔茨海默氏病的进展,和/或缓解阿尔茨海默氏病的一种或多种症状,和/或逆转阿尔茨海默氏病,和/或降低阿尔茨海默氏病的进展速率。
- [0092] 实施方案74:一种向受试者递送治疗剂的方法,其中所述剂包括:类黄酮(生物类黄酮)、异类黄酮、新类黄酮,或其前药;和/或白藜芦醇或白藜芦醇类似物;和/或醌氧化还原酶(NQO2)抑制剂;和/或双膦酸酯;和/或抗体;和/或适体或抑制性RNA(例如,miRNA);所述方法包括向所述受试者施用根据实施方案1-62中任一项所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述纳米级递送媒介物含有所述治疗剂。
- [0093] 实施方案75:根据实施方案74所述的方法,其中所述受试者是人。
- [0094] 实施方案76:根据实施方案74所述的方法,其中所述受试者是非人哺乳动物。
- [0095] 实施方案77:根据实施方案74-76中任一项所述的方法,其中所述纳米级药物递送媒介物经由选自自由以下组成的组的途径递送:口服递送、等电渗递送、皮下递送、经皮递送、肠胃外递送、气溶胶施用、经由吸入施用、静脉内施用,以及直肠施用。
- [0096] 实施方案78:根据实施方案74-76中任一项所述的方法,其中所述纳米级药物递送媒介物跨血脑屏障递送货物。
- [0097] 实施方案79:根据实施方案78所述的方法,其中所述纳米级药物递送媒介物经皮施加并且跨血脑屏障递送货物。
- [0098] 实施方案80:根据实施方案74-76中任一项所述的方法,其中所述纳米级药物递送媒介物将货物局部地递送至颅面骨和/或口腔骨。
- [0099] 实施方案81:根据实施方案80所述的方法,其中所述纳米级药物递送媒介物将货物递送至牙槽骨。
- [0100] 实施方案82:根据实施方案74-76中任一项所述的方法,其中所述纳米级药物递送媒介物将货物局部递送至局部、皮内或皮下部位。
- [0101] 实施方案83:根据实施方案74-76中任一项所述的方法,其中所述纳米级药物递送媒介物将货物递送至颅顶皮肤和/或下层骨。

[0102] 实施方案84:根据实施方案74-76中任一项所述的方法,其中将所述纳米级药物递送媒介物施加至口腔粘膜。

[0103] 实施方案85:一种可变形的纳米级药物递送媒介物,所述媒介物包含:

[0104] 一种或多种形成囊泡的两亲性脂质;

[0105] 胆固醇;以及

[0106] 非离子型洗涤剂。

[0107] 实施方案86:根据实施方案85所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述形成囊泡的两亲性脂质包括磷脂。

[0108] 实施方案87:根据实施方案86所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述磷脂选自由以下组成的组:1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱 (DPPC)、N-(2,3-二油酰氧基-1-丙基)、三甲基铵 (DOTAP),以及1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺 (DOPE)。

[0109] 实施方案88:根据实施方案85-87中任一项所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述纳米级药物递送媒介物包含胶束。

[0110] 实施方案89:根据实施方案85-87中任一项所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述纳米级药物递送媒介物包含脂质体。

[0111] 实施方案90:根据实施方案85-89中任一项所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述药物递送媒介物包含至少两种磷脂。

[0112] 实施方案91:根据实施方案86-90中任一项所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述磷脂包括DPPC和第二磷脂。

[0113] 实施方案92:根据实施方案91所述的纳米级药物递送媒介物,其中DPPC与所述第二磷脂的比率范围为2:1至1:2。

[0114] 实施方案93:根据实施方案91所述的纳米级药物递送媒介物,其中DPPC与所述第二磷脂的比率为约1:1。

[0115] 实施方案94:根据实施方案86-93中任一项所述的纳米级药物递送媒介物,其中总磷脂与胆固醇的比率范围为约12:2至约5:4或约5:3,或约10:2至约6:2。

[0116] 实施方案95:根据实施方案94所述的纳米级药物递送媒介物,其中磷脂与第二磷脂与胆固醇的比率为约4:4:2。

[0117] 实施方案96:根据实施方案94所述的纳米级药物递送媒介物,其中磷脂与第二磷脂的比率为约5:3。

[0118] 实施方案97:根据实施方案85-96中任一项所述的纳米级药物递送媒介物,其中脂质(包括胆固醇)与非离子型洗涤剂的w/w比率范围为约85:5至约85:25,或约85:10至约85:20。

[0119] 实施方案98:根据实施方案97所述的纳米级药物递送媒介物,其中脂质(包括胆固醇)与洗涤剂的w/w比率为约85:15。

[0120] 实施方案99:根据实施方案85-98中任一项所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述非离子型洗涤剂包括选自由以下组成的组的洗涤剂:Span 80、Tween 20、BRIJ® 76(硬脂基聚(10)氧基乙烯醚)、BRIJ® 78(硬脂基聚(20)氧基乙烯醚)、BRIJ® 96(油基聚(10)氧基乙烯醚),以及BRIJ® 721(硬脂基聚(21)氧基乙烯醚)。

[0121] 实施方案100:根据实施方案99所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述药物递送

媒介物包含按重量计约10%至约20%或约15%的Span 80。

[0122] 实施方案101:根据实施方案85-99中任一项所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述纳米级药物递送媒介物是中性的(不带电的)。

[0123] 实施方案102:根据实施方案101所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述磷脂包括DPPC和DOPE。

[0124] 实施方案103:根据实施方案85-89中任一项所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述纳米级药物递送媒介物是阳离子型的。

[0125] 实施方案104:根据实施方案103所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述磷脂包括DPPC和DOTAP。

[0126] 实施方案105:根据实施方案85-89中任一项所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述纳米级药物递送媒介物是阴离子型的。

[0127] 实施方案106:根据实施方案105所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述磷脂包括DPPC和DHP。

[0128] 实施方案107:根据实施方案85-106中任一项所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述媒介物(DNV)不是球形形状的。

[0129] 实施方案108:根据实施方案85-107中任一项所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述媒介物(DNV)是不规则形状的。

[0130] 实施方案109:根据实施方案85-108中任一项所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述媒介物(DNV)是稳定的并且在作为冻干粉储存至少1周、或至少2周、或至少3周、或至少4周、或至少2个月、或至少3个月、或至少4个月、或至少5个月、或至少6个月、或至少9个月、或至少12个月、或至少18个月、或至少24个月后能够复原为功能性DNV。

[0131] 实施方案110:根据实施方案85-109中任一项所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述纳米级药物递送媒介物用聚合物功能化以延长血清半衰期。

[0132] 实施方案111:根据实施方案110所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述聚合物包括聚乙二醇和/或纤维素或改性纤维素。

[0133] 实施方案112:根据实施方案85-111中任一项所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述DNV的大小范围为从约50nm、或从约60nm、或从约70nm、或从约80nm、或从约90nm、或从约100nm,至约10 μ m、或至约5 μ m、或至约1 μ m、或至约900nm、或至约800nm、或至约700nm、或至约600nm、或至约500nm、或至约400nm、或至约300nm的平均直径。

[0134] 实施方案113:根据实施方案85-111中任一项所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述DNV的大小范围为约50nm至约275nm的平均直径。

[0135] 实施方案114:根据实施方案85-111中任一项所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述DNV为约50nm的平均直径,或约100nm的平均直径,或约150nm的平均直径。

[0136] 实施方案115:根据实施方案85-114中任一项所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述纳米级药物递送媒介物附着至与细胞表面标记物结合的抗体或配体。

[0137] 实施方案116:根据实施方案115所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述细胞表面标记物是肿瘤细胞的标记物。

[0138] 实施方案117:根据实施方案116所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述细胞表面制造者包括表1中的标记物。

[0139] 实施方案118:根据实施方案85-114中任一项所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述纳米级药物递送媒介物附着至脑靶向分子和/或增强脑渗透性的分子。

[0140] 实施方案119:根据实施方案118所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述脑靶向分子和/或增强脑渗透性的分子选自由以下组成的组:转铁蛋白、胰岛素、增强脑渗透性的小分子诸如苯并二氮䓬类、中性氨基酸转运蛋白配体,以及葡萄糖转运蛋白配体。

[0141] 实施方案120:根据实施方案119所述的纳米级药物递送媒介物,其中转铁蛋白附着至纳米级药物递送媒介物。

[0142] 实施方案121:根据实施方案119所述的纳米级药物递送媒介物,其中叶酸附着至纳米级药物递送媒介物。

[0143] 实施方案122:根据实施方案85-121中任一项所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述DNV含有淀粉样生成途径的抑制剂或将APP加工从淀粉样生成途径切换为非淀粉样生成途径的剂。

[0144] 实施方案123:根据实施方案122所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述DNV含有选自由以下组成的组的剂:APP或sAPP α 、高良姜精、双硫仑和/或其类似物、厚朴酚和/或其类似物、托烷司琼和/或其类似物、硝甲西洋和/或其类似物、托品醇酯和/或其相关酯和/或其类似物、TrkA激酶抑制剂(例如,ADDN-1351)和/或其类似物、D2受体激动剂、 α 1-肾上腺素能受体拮抗剂,以及APP特异性BACE抑制剂,所述APP特异性BACE抑制剂包括但不限于高良姜精、高良姜精前药、芦丁、芦丁前药,以及其他类黄酮和类黄酮前药,以及乙内酰脲(例如,如在WO 2014127042 (PCT/PCT/US14/016100中所述),该专利为了其中所描述的乙内酰脲而以引用方式并入本文。

[0145] 实施方案124:根据实施方案122所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述DNV含有可溶性 β -NRG1(神经调节蛋白-1),可溶性 β -NRG1是NRG1(例如,rhNRG177-244)的BACE切割片段,其被证明为促认知的(pro-cognitive)并且参与脑中的ErbB4信号传导。

[0146] 实施方案125:根据实施方案85-124中任一项所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述纳米级药物递送媒介物含有类黄酮(生物类黄酮)、异类黄酮、新类黄酮,或其前药。

[0147] 实施方案126:根据实施方案125所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述纳米级药物递送媒介物含有选自由以下组成的组的剂:橙皮苷、槲皮苷、芦丁、柑橘黄酮、木犀草素、芹菜素、柑橘黄酮、槲皮苷、山奈酚、杨梅素、漆黄素、高良姜精、异鼠李素、霍香黄酮醇、鼠李素、吡喃并黄酮醇、呋喃并黄酮醇、橙皮素、柚皮素、圣草酚、高圣草酚、花旗松素和二氢山奈酚,或其前药。

[0148] 实施方案127:根据实施方案125所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述纳米级药物递送媒介物含有高良姜精。

[0149] 实施方案128:根据实施方案125所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述纳米级药物递送媒介物含有高良姜精前体。

[0150] 实施方案129:根据实施方案125所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述纳米级药物递送媒介物含有芦丁。

[0151] 实施方案130:根据实施方案85-129中任一项所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述纳米级药物递送媒介物含有白藜芦醇或白藜芦醇类似物。

[0152] 实施方案131:根据实施方案130所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述纳米级

药物递送媒介物含有白藜芦醇。

[0153] 实施方案132:根据实施方案130所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述纳米级药物递送媒介物含有白藜芦醇类似物。

[0154] 实施方案133:根据实施方案132所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述白藜芦醇类似物选自自由以下组成的组:2,3',5',6-四羟基-反式-二苯乙烯、3,3',4,4'-四羟基-反式-二苯乙烯。

[0155] 实施方案134:根据实施方案42所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述白藜芦醇类似物选自自由以下组成的组:图14中所示的白藜芦醇类似物。

[0156] 实施方案135:根据实施方案85-134中任一项所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述纳米级药物递送媒介物含有醌氧化还原酶(NQO2)抑制剂。

[0157] 实施方案136:根据实施方案85-121中任一项所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述纳米级药物递送媒介物含有双膦酸盐。

[0158] 实施方案137:根据实施方案136所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述纳米级药物递送媒介物含有双膦酸盐,所述双膦酸盐选自自由以下组成的组:阿仑膦酸盐/胆钙化醇、依替膦酸盐、唑来膦酸(唑来膦酸盐)、伊班膦酸盐、利塞膦酸盐、阿仑膦酸盐、帕米膦酸盐、奈立膦酸盐、奥帕膦酸盐,以及替鲁膦酸盐。

[0159] 实施方案138:根据实施方案136所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述纳米级药物递送媒介物含有唑来膦酸(唑来膦酸盐)。

[0160] 实施方案139:根据实施方案85-121中任一项所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述纳米级药物递送媒介物含有细胞毒性剂和/或细胞生长抑制剂。

[0161] 实施方案140:根据实施方案139所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述细胞毒性剂和/或细胞生长抑制剂选自自由以下组成的组:IDH1抑制剂、微管抑制剂、DNA破坏剂,以及聚合酶抑制剂。

[0162] 实施方案141:根据实施方案140所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述细胞毒性剂或细胞生长抑制剂包括微管蛋白抑制剂。

[0163] 实施方案142:根据实施方案141所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述细胞毒性剂或细胞生长抑制剂包括选自自由以下组成的组的药物:奥瑞斯他汀、尾海兔素-10、天然产物尾海兔素-10的合成衍生物,以及美登素或美登素衍生物。

[0164] 实施方案143:根据实施方案141所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述细胞毒性剂或细胞生长抑制剂包括选自自由以下组成的组的药物:单甲基奥瑞斯他汀F(MMAF)、奥瑞斯他汀E(AE)、单甲基奥瑞斯他汀E(MMAE)、vcMMAE,以及vcMMAF。

[0165] 实施方案144:根据实施方案141所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述细胞毒性剂或细胞生长抑制剂包括选自自由以下组成的组的美登素:美登素(DM1)、DM3和DM4。

[0166] 实施方案145:根据实施方案140所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述细胞毒性剂或细胞生长抑制剂包括DNA破坏剂。

[0167] 实施方案146:根据实施方案145所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述细胞毒性剂或细胞生长抑制剂包含选自自由以下组成的组的药物:卡里奇霉素、倍癌霉素,以及吡咯并苯并二氮草。

[0168] 实施方案147:根据实施方案146所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述细胞毒

性剂或细胞生长抑制剂包括卡里奇霉素或卡里奇霉类似物。

[0169] 实施方案148:根据实施方案146所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述细胞毒性剂或细胞生长抑制剂包括倍癌霉素。

[0170] 实施方案149:根据实施方案148所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述细胞毒性剂或细胞生长抑制剂包含选自由以下组成的组的倍癌霉素:倍癌霉素A、倍癌霉素B1、倍癌霉素B2、倍癌霉素C1、倍癌霉素C2、倍癌霉素D、倍癌霉素SA、环丙基苯并吡啶倍癌霉素(CC-1065)、辛坦霉素(Centanamycin)、雷查霉素、阿多来新、比折来新,以及卡折来新。

[0171] 实施方案150:根据实施方案146所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述细胞毒性剂或细胞生长抑制剂包含吡咯并苯并二氮革或吡咯并苯并二氮革二聚体。

[0172] 实施方案151:根据实施方案150所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述细胞毒性剂或细胞生长抑制剂包括选自由以下组成的组的药物:安曲霉素(及其二聚体)、甲基蒽霉素(及其二聚体)、茅屋霉素(及其二聚体)、普拉卡素(及其二聚体)、奇卡霉素(及其二聚体)、新蒽霉素A(及其二聚体)、新蒽霉素B(及其二聚体)、DC-81(及其二聚体)、西伯利亚霉素(及其二聚体)、泊罗霉素A(Porothramycin A)(及其二聚体)、泊罗霉素B(及其二聚体)、西巴霉素(及其二聚体)、赤霉素(Abbeymycin)(及其二聚体)、SG2000,以及SG2285。

[0173] 实施方案152:根据实施方案139所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述细胞毒性剂和/或细胞生长抑制剂包含选自由以下组成的组的药物:奥瑞斯他汀、尾海兔素、秋水仙碱、康普瑞汀,以及mTOR/PI3K抑制剂。

[0174] 实施方案153:根据实施方案139所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述细胞毒性剂和/或细胞生长抑制剂包括选自由以下组成的组的药物:氟脲嘧啶(5-FU)、卡培他滨、5-三氟甲基-2'-脱氧尿苷、甲氨蝶呤钠、雷替曲塞、培美曲塞、胞嘧啶阿拉伯糖苷、6-巯基嘌呤、硫唑嘌呤、6-硫鸟嘌呤(6-TG)、喷司他丁、磷酸氟达拉滨、克拉屈滨,氟尿苷(5-氟-2)、核糖核苷酸还原酶抑制剂(RNR)、环磷酰胺、环磷酰胺(neosar)、异环磷酰胺、噻替哌(thiotepa)、1,3-双(2-氯乙基)-1-亚硝基脲(BCNU)、甲基1, -(2-氯乙基)-3-环己基-1亚硝基脲(CCNU)、六甲嘧啶、白消安、盐酸丙卡巴肼、达卡巴嗪(DTIC)、苯丁酸氮芥、美法仑、顺铂、卡铂、奥沙利铂、苯达莫司汀、卡莫司汀、氮芥(chloromethine)、达卡巴嗪(DTIC)、福莫司汀、洛莫司汀、甘露舒凡、奈达铂、尼莫司汀、泼尼莫司汀、雷莫司汀、赛特铂、司莫司汀、链脲霉素、替莫唑胺、曲奥舒凡、三亚胺醌、三亚乙基蜜胺、噻替哌(thioTEPA)、四硝酸三铂、曲磷胺、乌拉莫司汀、阿霉素、枸橼酸柔红霉素、米托蒽醌、放线菌素D、依托泊苷、盐酸托泊替康、替尼泊苷(VM-26)、盐酸伊立替康(CPT-11)、喜树碱、贝洛替康、鲁比替康、长春新碱、硫酸长春碱、酒石酸长春瑞滨、硫酸长春地辛、紫杉醇、多西紫杉醇、纳米粒紫杉醇、abraxane、伊沙匹隆、拉洛他赛、奥他赛、替塞他赛、长春氟宁、视黄酸、视黄酸衍生物、阿霉素(doxirubicin)、长春花碱、长春新碱、环磷酰胺、异环磷酰胺、顺铂、5-氟尿嘧啶、喜树碱衍生物、干扰素、它莫西芬,以及紫杉醇。

[0175] 实施方案154:根据实施方案139所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述细胞毒性剂和/或细胞生长抑制剂包括细胞毒素。

[0176] 实施方案155:根据实施方案154所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述抗体附着至细胞毒素,所述细胞毒素选自由以下组成的组:白喉毒素、假单胞菌外毒素、蓖麻毒蛋白、相思豆毒素、皂草素,以及胸苷激酶。

[0177] 实施方案156:一种药物制剂,所述药物制剂包含根据实施方案85-155中任一项所述的纳米级药物递送媒介物和药学上可接受的载体。

[0178] 实施方案157:根据实施方案156所述的制剂,其中将所述制剂配混成用于通过选自由以下组成的组的途径进行递送:口服递送、等电渗递送、皮下递送、经皮递送、肠胃外递送、气溶胶施用、经由吸入施用、静脉内施用,以及直肠施用。

[0179] 实施方案158:根据实施方案157所述的制剂,其中将所述制剂配混成用于口服施用。

[0180] 实施方案159:根据实施方案157所述的制剂,其中将所述制剂配混成用于经皮施用。

[0181] 实施方案160:根据实施方案159所述的制剂,其中所述制剂被提供作为透皮贴剂。

[0182] 实施方案161:根据实施方案157所述的制剂,其中将所述制剂配混成用于全身施用。

[0183] 实施方案162:根据实施方案156-161中任一项所述的制剂,其中所述制剂是单位剂量制剂。

[0184] 实施方案163:一种治疗或预防神经退行性脑病症的方法,所述方法包括:

[0185] 向有需要的受试者施用有效量的根据实施方案122-135中任一项所述的负载的纳米级药物递送媒介物。

[0186] 实施方案164:根据实施方案163所述的方法,其中所述神经退行性脑病症选自由以下组成的组:帕金森氏病、亨廷顿氏病、阿尔茨海默氏病、轻度认知障碍、痴呆、缺血、中风、肌萎缩侧索硬化症(ALS)、原发性侧索硬化症(PLS),以及脑瘫。

[0187] 实施方案165:根据实施方案163-164中任一项所述的方法,其中所述DSV含有淀粉样生成途径的抑制剂或将APP加工从淀粉样生成途径切换为非淀粉样生成途径的剂。

[0188] 实施方案166:根据实施方案163-165中任一项所述的方法,其中所述方法预防或延迟阿尔茨海默氏病前病症和/或认知功能障碍的发作,和/或改善阿尔茨海默氏病前病症和/或认知功能障碍的一种或多种症状,和/或预防或延迟阿尔茨海默氏病前病症或认知功能障碍到阿尔茨海默氏病的进展,和/或缓解阿尔茨海默氏病的一种或多种症状,和/或逆转阿尔茨海默氏病,和/或降低阿尔茨海默氏病的进展速率。

[0189] 实施方案167:一种向受试者递送治疗剂和/或显像剂的方法,所述方法包括向所述受试者施用根据实施方案85-121中任一项所述的纳米级药物递送媒介物,其中所述纳米级递送媒介物含有所述治疗剂和/或显像剂。

[0190] 实施方案168:根据实施方案167所述的方法,其中所述纳米级递送媒介物是根据实施方案122-155中任一项所述的纳米级递送媒介物。

[0191] 实施方案169:根据实施方案167-168中任一项所述的方法,其中所述受试者是人。

[0192] 实施方案170:根据实施方案167-168中任一项所述的方法,其中所述受试者是非人哺乳动物。

[0193] 实施方案171:根据实施方案167-170中任一项所述的方法,其中所述纳米级药物递送媒介物经由选自由以下组成的组的途径递送:口服递送、等电渗递送、皮下递送、经皮递送、肠胃外递送、气溶胶施用、经由吸入施用、静脉内施用,以及直肠施用。

[0194] 实施方案172:根据实施方案167-170中任一项所述的方法,其中所述纳米级药物

递送媒介物跨血脑屏障递送货物。

[0195] 实施方案173:根据实施方案172所述的方法,其中所述纳米级药物递送媒介物经皮施加并且跨血脑屏障递送货物。

[0196] 实施方案174:根据实施方案167-170中任一项所述的方法,其中所述纳米级药物递送媒介物将货物局部地递送至颅面骨和/或口腔骨。

[0197] 实施方案175:根据实施方案174所述的方法,其中所述纳米级药物递送媒介物将货物递送至牙槽骨。

[0198] 实施方案176:根据实施方案167-170中任一项所述的方法,其中所述纳米级药物递送媒介物将货物局部递送至局部、皮内或皮下部位。

[0199] 实施方案177:根据实施方案167-170中任一项所述的方法,其中所述纳米级药物递送媒介物将货物递送至颅顶皮肤和/或下层骨。

[0200] 实施方案178:根据实施方案167-170中任一项所述的方法,其中将所述纳米级药物递送媒介物施加至口腔粘膜。

[0201] 实施方案179:一种制备根据实施方案85-117中任一项所述的可变形的纳米级药物递送媒介物的方法,所述方法包括:以受控的流率和压力在微通道中将DNV结构单元在有机相和水相中合并;以及收集含有DNV的所得样品。

[0202] 实施方案180:根据实施方案179所述的方法,其中将所述样品透析以产生透析样品。

[0203] 实施方案181:根据实施方案179-180中任一项所述的方法,其中将所述透析样品冻干成粉末。

[0204] 定义

[0205] 术语“受试者”、“个体”和“患者”可互换地指哺乳动物,优选是人或非人灵长类动物,还包括驯养的哺乳动物(例如,犬或猫)、实验室哺乳动物(例如,小鼠、大鼠、兔子、仓鼠、豚鼠)和农业哺乳动物(例如,马、牛、猪、绵羊)。在各种实施方案中,受试者可以是在医院、精神病护理设施中的医师或其他卫生工作者的照料下作为门诊患者或其他临床情况的人(例如,成年男性、成年女性、青春期男性、青春期女性、男孩、女孩)。在某些实施方案中,受试者可能不在医师或其他卫生工作者的照料或处方下。

[0206] 如本文所用的术语“制剂”或“药物制剂(drug formulation)”或“剂型”或“药物制剂(pharmaceutical formulation)”是指包含至少一种用于递送至受试者的治疗剂或药物的组合物。在某些实施方案中,剂型包含给定的“制剂”或“药物制剂”,并且可以以锭剂、丸剂、片剂、胶囊、栓剂、膜剂、条、液体、贴剂、薄膜、凝胶、喷雾或其他形式施用于患者。

[0207] 如本文所用,“抗体”是指由这样的一种或多种多肽组成的蛋白质,所述一种或多种多肽基本上由免疫球蛋白基因或免疫球蛋白基因片段编码。公认的免疫球蛋白基因包括 κ 、 λ 、 α 、 γ 、 δ 、 ϵ 和 μ 恒定区基因,以及无数免疫球蛋白可变区基因。轻链分类为 κ 或 λ 。重链被分类为 γ 、 μ 、 α 、 δ 或 ϵ ,这继而定义了免疫球蛋白类别,分别为IgG、IgM、IgA、IgD和IgE。

[0208] 已知典型的免疫球蛋白(抗体)结构单元包含四聚体。每个四聚体由两对相同的多肽链组成,每对具有一条“轻”链(约25kD)和一条“重”链(约50-70kD)。每条链的N末端限定了约100至110个或更多个氨基酸的可变区,所述可变区主要负责抗原识别。术语可变轻链(V_L)和可变重链(V_H)分别是指这些轻链和重链。

[0209] 抗体作为完整的免疫球蛋白存在,或作为通过用各种肽酶消化而产生的许多特征明确的片段存在。因此例如,胃蛋白酶消化铰链区中二硫键下方的抗体以产生 $F(ab)'_2$, $F(ab)'_2$ 是Fab的二聚体,Fab本身是通过二硫键与 V_H - C_H1 连接的轻链。 $F(ab)'_2$ 可以在温和的条件下还原以破坏铰链区中的二硫键,从而将 $(Fab')_2$ 二聚体转化为Fab'单体。Fab'单体本质上是具有铰链区的部分的Fab(关于其他抗体片段的更详细描述,请参见Fundamental Immunology,W.E.Paul编辑,Raven Press,N.Y.(1993))。尽管就完整抗体的消化而言定义了各种抗体片段,但是本领域技术人员应理解,可以化学地或通过利用重组DNA方法从头合成此类Fab'片段。因此,如本文所用,术语抗体还包括通过对完整抗体进行修饰而产生的或使用重组DNA方法从头合成的抗体片段。优选的抗体包括单链抗体(作为单条多肽链存在的抗体),更优选单链Fv抗体(sFv或scFv),其中可变重链和可变轻链(直接或通过肽接头)连接在一起以形成连续的多肽。单链Fv抗体是共价连接的 V_H - V_L 异二聚体,其可以从包含直接连接或通过肽编码接头连接的 V_H 编码序列和 V_L 编码序列的核酸表达。Huston等人,(1988) Proc.Nat.Acad.Sci.USA,85:5879-5883。虽然 V_H 和 V_L 彼此相连作为单一多肽链,但 V_H 和 V_L 结构域非共价地缔合。在丝状噬菌体表面表达的第一功能性抗体分子是单链Fv(scFv),然而,替代表达策略也已成功。例如,如果所述链中的一条(重链或轻链)与g3衣壳蛋白融合并且互补链作为可溶性分子输出到周质,则Fab分子可在噬菌体上展示。两条链可以在相同或不同的复制子上编码;重要的一点是,每个Fab分子中的两条抗体链都在翻译后装配,并且二聚体通过所述链中的一条链与例如g3p的连接而结合到噬菌体颗粒中(参见例如,美国专利号:5733743)。scFv抗体和许多其他结构将来自抗体V区的天然聚集但经化学分离的多肽轻和重链转换为这样的分子,所述分子折叠成三维结构,所述三维结构基本上类似于本领域技术人员已知的抗原结合位点的结构(参见例如,美国专利号5,091,513、5,132,405,以及4,956,778)。特别优选的抗体应包括已在噬菌体上展示的所有抗体(例如,scFv、Fv、Fab和二硫键连接的Fv(Reiter等人,(1995) Protein Eng.8:1323-1331))。

附图说明

[0210] 图1A示出了用于制造DNV的装置的一个实施方案。微流体通道示出在左上方。微流体反应器(右上方)与微流体反应器系统(底部)一起示出。图1B示出了制备包封亲水Zolodentrate的AF-ZOL DNV的微流体合成方案

[0211] 图2示出了可变形的纳米级媒介物的可视化。在新鲜切割的云母上制备负载有药物的可变形的纳米级媒介物(DNV),并通过原子力显微镜在流体中成像。相分析表明,常规脂质体(nDNV)具有球形形状,而DNV的形状变形(非球形)。

[0212] 图3A示出了常规脂质体,以及封装通过微流体方法产生的大小为约200nm的药物AF-ZOL的DNV的透射电子显微镜(TEM)图像。底部是微流体产生的DNV在作为冻干粉储存数周后的TEM图像。图3B示出了AF-ZOL DNV的共聚焦图像,表明DNV稳定性良好。

[0213] 图4示出了负载药物的DNV的群体特征。示出的是第一冻干后大小对比强度的曲线图。

[0214] 图5A至图5C示出AF-ZOL DNV穿透口腔粘膜屏障并局部递送有效负载。图5A示出了小鼠口腔粘膜上施加部位的图像。图5B示出了施加后48h切除的牙龈组织的LAS-3000图像。应注意位点(ii)表现出最小荧光,表明了所施加的负载DNV的高渗透性。图5C示出了施加部

位下方的牙槽骨的LAS-3000图像,表明DNV透过口腔粘膜并递送骨靶向荧光标签,而无全身性渗漏,如由未标记的股骨所指示。

[0215] 图6示出了负载有AF-ZOL的DNV的图像,所述图像为宏观视图。

[0216] 图7A至图7B示出,局部施加的DNV在皮肤层内局部递送有效负载。图7A是示出施加部位的图像;施加部位是在两耳之间头骨上方的剃光皮肤。图7B示出了在施加后48小时从小鼠切除的颅顶皮肤的LAS-3000荧光图像。

[0217] 图8基于颅顶骨的荧光强度示出了AF-ZOL在DNV中的显著经皮递送(相比于药物在传统的脂质体或媒介物中),证明了概念验证。

[0218] 图9A示出了用于制备含有高良姜精的DNV的微流体合成方案。图9B示出了疏水性药物高良姜精(一种具有低脑通透性的生物类黄酮)和高良姜精前体(PG-1)(一种高良姜精前药)的结构。

[0219] 图10A示出了微流体产生的Lipo-GAL DNV的DLS分析,显示出约150nm的大小。图10B示出了DNV和常规脂质体在回收后的大小和包封效率。图10C示出了Gal-DNV的示意图。

[0220] 图11A和图11B示出了转铁蛋白缀合的磷脂(Tf-DPPE)的合成。图11A示出了活性酯偶联。图11B示出了点击化学。如图11B所示,使用碳二亚胺化学品将DDPE缀合至小分子。使用点击化学将DDPE缀合至小分子。纯化后,将DDPE脑靶向分子衍生物缀合物冻干并储存在-20℃下,直到需要进行T-DNV合成。DDPE分子衍生物可用于微流体中以制备脑靶向DNV。该缀合物允许以药学上适用的等级制备T-DNV,以实现可扩展性和可再现性。X=酰胺或三唑。

[0221] 图12示出了T-DNV-Gal的微流体反应器合成(上部小图)并示出了DNV-Gal与T-DNV-Gal的示意性比较。

[0222] 图13A至图13C示出了DDPE-转铁蛋白缀合物的MALDI-TOF谱图(约3DDPE/转铁蛋白)(图13A);Tf-DDPE和转铁蛋白的SDS PAGE,所述SDS PAGE显示了DDPE-T和转铁蛋白的相似迁移(图13B);以及Tf-Lipo-Gal的代表性示意图(图13C)。

[0223] 图14示出了白藜芦醇((反式-3,4',5-三羟基二苯乙烯)和各种白藜芦醇(二苯乙烯)类似物。

[0224] 图15示出负载有铁的转铁蛋白(Tf)与细胞表面上的转铁蛋白受体结合。然后通过受体介导的内吞作用将所述负载有铁的转铁蛋白转运到细胞内。

[0225] 图16.在Caco-2细胞中进行渗透性测试。顶室含有填充了高良姜精或白藜芦醇的DNV。分析来自基底外侧室的样品以确定渗透系数。

[0226] 图17.顶部:随着时间推移的高良姜精渗透率($\mu\text{mol}/\text{sec}$)。底部:随着时间推移的白藜芦醇渗透率($\mu\text{mol}/\text{sec}$)。Gal:高良姜精;GD:高良姜精DNV;GTD:具有转铁蛋白的高良姜精DNV;Res:白藜芦醇;RD:白藜芦醇DNV;RTD:具有转铁蛋白的白藜芦醇DNV。

[0227] 图18.每种化合物的渗透系数(P_{app})。

[0228] 图19A示出了随施用后时间的变化,高良姜精和高良姜精前体的脑水平和血浆水平。图19B示出了高良姜精和高良姜精前体对A β_{40} 和A β_{42} 的影响。

[0229] 图20示出了一个制备DNV的实施方案中的反应器设置(顶部),并且示出了DNV与常规脂质体之间的某些差异(底部)。

[0230] 图21A和图21B示出了使用微流体反应器合成DNV。

[0231] 图22示出了DNV与常规脂质体的比较。

[0232] 图23示出了用转铁蛋白功能化的DNV的制造(顶部)和结构(底部)。

[0233] 图24示出了DNV、含有高良姜精的DNV(DNV-Gal)、用转铁蛋白功能化的空DNV(T-DNV),以及含有高良姜精且用转铁蛋白功能化的DNV(T-DNV-Gal)的图像。

[0234] 图25示出了顶室的配置,以评估致密细胞层的DNV渗透。

[0235] 图26示出了在CACO-2细胞渗透性模型中Gal、DNV-Gal和T-DNV-Gal的渗透性。

[0236] 图27示出了掺入sAPP α 的DSNV的体外功能测定的结果。sAPP β 和A β 1-42的减少表明靶标接合。

[0237] 图28示出了sAPP α -DNV的药代动力学(PK),说明了使用静脉内途径在小鼠中递送的概念的证据。

[0238] 图29示出了在体内使用sAPP α -DNV进行CNS递送。

[0239] 图30示出了在E4FAD小鼠中脑递送的sAPP α 的药效学效应。sAPP α 降低BACE切割的sAPP β 的水平。

[0240] 图31,小图A-E,示出了使用可变形的纳米级囊泡(DNVL)的经皮药物递送。小图A) DNV设计。小图B) 皮肤的横截面。小图C) 在DNV中配制荧光标记的双膦酸盐药物唑来膦酸盐。小图D) 将AF647-ZOL DNV粉末重悬并施加在小鼠颅顶皮肤上。小图E) 通过皮肤组织将AF647-AOL DNV递送至颅顶骨。

[0241] 图32,小图A和小图B,示出了通过经口腔黏膜药物递送进行口内施用。小图A) 将重悬的AF647-ZOL DNV粉末施加至腭粘膜组织。小图B) AF647-ZOL粘附至腭骨表面,表明经皮递送。

具体实施方式

[0242] 在各种实施方案中,提供了可用于递送治疗剂的可变形的纳米级媒介物(DNV)。在某些实施方案中,可变形的纳米级媒介物(DNV)是由磷脂组成的弹性纳米粒子,所述磷脂为诸如1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DPPC)、N-(2,3-二油酰氧基-1-丙基)三甲基铵(DOTAP),和/或1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)。在各种实施方案中,除了磷脂之外,DNV还含有能够充当膜调节剂的胆固醇和能够充当边缘活化剂的非离子型洗涤剂(示例性但非限制性的制剂使用Span 80(也称为山梨醇月桂酸酯,或去水山梨糖醇月桂酸酯)和/或吐温20(也称为聚乙二醇去水山梨糖醇月桂酸酯,或聚氧乙烯脱水山梨糖醇单月桂酸酯),所述非离子型洗涤剂赋予纳米颗粒的脂质双层可变形性。

[0243] 在各种实施方案中,本文所述的DNV能够跨越血脑屏障(BBB),并且能够用于递送货物(例如,如本文所述的一种或多种治疗剂)到脑/CNS。可以通过根据多种方式中的任何一种施用DNV来实现跨血脑屏障的此类递送,所述多种方式包括但不限于气溶胶施用(包括经鼻吸入、经口吸入等)、口服递送、等电渗透递送、皮下递送、经皮递送、肠胃外递送、静脉内施用、动脉内施用、贮库递送,以及直肠施用。

[0244] 在某些实施方案中,DNV以透皮贴剂形式提供,以用于将货物跨越血脑屏障(BBB)递送至中枢神经系统(CNS)。除了合成DNV本身的方法外,还提供了负载有靶向CNS的DNV的透皮贴剂,以用于将货物(药物、蛋白质、抗体、RNA或DNA)递送到脑。

[0245] 在某些实施方案中,DNV可作为贴剂、胶囊、液体(等)提供,以用于DNV的非CNS局部递送。在一些情况下,有效治疗需要非常局部的非CNS递送,以及避免DNV的全身分布。可以

合成具有增多的电荷以及因此受限的分布的DNV。

[0246] 在某些实施方案中,设想了靶向DNV。在CNS的内部和外部,都可能希望将货物(药物、蛋白质等)的递送限制为特定细胞类型,例如肿瘤细胞。因此,提供了这样的DNV,所述DNV在外部用与靶细胞特异性相互作用的配体装饰,所述配体例如是叶酸以靶向表达FA受体的细胞或运铁蛋白(Tf)以与BBB上的运铁蛋白受体相互作用。其他说明性靶标如下表1中所示。

[0247] DNV。

[0248] 在各种实施方案中,本文设想的DNV包含一种或多种形成囊泡的脂质,通常包括具有疏水性尾部基团和极性头部基团两者的两亲性脂质、胆固醇,以及洗涤剂。形成囊泡的脂质的特征是其以下能力:(a)在水中自发形成双层囊泡,如磷脂所例示,或(b)通过使疏水性部分与双层膜的内部疏水区域接触,以及使极性头部基团定向为朝向所述膜的外部极性表面,而稳定地结合到脂质双层中。在某些实施方案中,用于DNV的形成囊泡的脂质可包括具有上述特征中的一种的任何常规脂质。

[0249] 在某些实施方案中,该类型的形成囊泡的脂质是具有两个烃尾部或链(通常为酰基)和一极性头部基团的脂质。该类别中包括磷脂,诸如磷脂酰胆碱(PC)、磷脂酰乙醇胺(PE)、磷脂酸(PA)、磷脂酰甘油(PG),以及磷脂酰肌醇(PI),其中两个烃链的长度通常在约14-22个碳原子之间,并且具有不同程度的不饱和度。在某些实施方案中,合适的磷脂包括PE和PC。一种示例性的PC是氢化大豆磷脂酰胆碱(HSPC)。也可以使用单链脂质,诸如鞘磷脂(SM)等。在某些实施方案中,磷脂包括一种或多种磷脂,诸如1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱(DPPC)、N-(2,3-二油酰氧基-1-丙基)三甲基铵(DOTAP),和/或1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)。

[0250] 酰基链具有各种饱和度的上述脂质和磷脂可商购获得,或根据公开的方法制备。在某些实施方案中可以包括的其他脂质是鞘脂和糖脂。如本文所用的术语“鞘脂”包括具有两条烃链的脂质,所述两条烃链中的一条是鞘氨醇的烃链。术语“糖脂”是指还包含一个或多个糖残基的鞘脂。

[0251] 在各种实施方案中,DNV另外包括可以稳定化主要由磷脂组成的DNV的脂质。该组的示例性脂质是胆固醇,其水平为20摩尔%至45摩尔%。

[0252] 在各种实施方案中,DNV还可包含亲水性聚合物链的表面涂层。在某些实施方案中,可以通过在DNV组合物中包含用亲水聚合物链衍生化的一种或多种脂质(例如,磷脂)来将亲水聚合物包含在DNV中,可以使用的亲水聚合物链包括但不限于上述那些中的任一种,然而,在某些实施方案中,具有二酰基链的形成囊泡的脂质,例如磷脂,是优选的。一种说明性磷脂是磷脂酰乙醇胺(PE),其含有便于偶联至活化聚合物的反应性氨基基团,所述活化聚合物能够与靶向分子(诸如转铁蛋白、叶酸等)偶联。一种说明性PE为二硬脂酰基PE(DSPE)。另一个实例是用亲水聚合物链衍生化的非磷脂双链两亲脂质,诸如二酰基甘油或二烷基甘油。

[0253] 在某些实施方案中,用于DNV以延长血清半衰期和/或用于偶联抗体或配体的亲水性聚合物是聚乙二醇(PEG),在某些实施方案中为分子量在1,000-10,000道尔顿之间,或在1,000-5,000道尔顿之间,或优选地在2,000-5,000道尔顿之间的PEG链。PEG的甲氧基或乙氧基封端的类似物也是有用的亲水性聚合物,可以各种聚合物大小(例如,120-20,000道尔

顿)商购。

[0254] 其他可为合适的亲水性聚合物包括但不限于聚乳酸、聚乙醇酸、聚乙烯吡咯烷酮、聚甲基噁唑啉、聚乙基噁唑啉,聚羟丙基甲基丙烯酸酰胺、聚甲基丙烯酸酰胺、聚二甲基丙烯酸酰胺,以及衍生化的纤维素,诸如羟甲基纤维素或羟乙基纤维素。

[0255] 含有附着至磷脂的这些聚合物的脂质-聚合物缀合物的制备已描述于例如美国专利号5,395,619中。在某些实施方案中,通常,在脂质体形成过程中在脂质体形成组分中包含在约0.1-20摩尔%之间的聚合物衍生化的脂质。聚合物衍生化的脂质也是可商购的(例如,SUNBRITE(R),NOF Corporation,Japan.)。

[0256] 在各种实施方案中,亲水性聚合物链提供亲水链的表面涂层,所述亲水链的表面涂层足以延长在没有此类涂层的情况下DNV的血液循环时间。

[0257] 在一个说明性的非限制性实施方案中,脂质(包括胆固醇)和边缘活化剂以85:15w/w的比率存在。

[0258] 所使用的脂质组分的确切摩尔比和类型是基于DNV的预期施加确定的。例如,对于经口腔粘膜和经皮局部施用,在一个说明性但非限制性的实施方案中,使用5:3:2摩尔比(DPPC:胆固醇:DOTAP),其中该混合物含有按重量计15%的Span 80。

[0259] 将这些溶于有机溶剂(诸如异丙醇(IPA))中的组分经由单独输入到微流体反应器系统中而与水溶液(PBS或去离子水)混合,以在25℃至40℃范围的温度和1巴的压力下进行有效且连续的合成。微流体反应器通道提供高剪切应力和受控的混合,以及最小化的湍流,从而产生明确界定的DNV群体,并且消除了进行诸如超声或挤出等后处理以获得合适或均匀的大小的需要。从有机相过渡到水相时,所描述的组分根据它们在水性溶剂中的热力学稳定性而自动配置到DNV中。它们是无毒的,被制备为可重复性高、批次间差异小、可扩展、群体和分布非常均匀、具有可调的大小,并提供高度局部化的有效负载递送。我们的研究表明,该方法可以产生大小为50nm至微米范围的同质DNV群体。

[0260] 在某些实施方案中,DNV的大小范围为从约50nm、或从约60nm、或从约70nm、或从约80nm、或从约90nm、或从约100nm,至约10μm、或至约5μm、或至约1μm、或至约900nm、或至约800nm、或至约700nm、或至约600nm、或至约500nm、或至约400nm、或至约300nm的平均直径。在某些实施方案中,DNV的大小范围为约50nm至约275nm的平均直径。在某些实施方案中,DNV为约50nm的平均直径,或约100nm的平均直径,或约150nm的平均直径,或约200nm的平均直径或约250nm的平均直径。

[0261] 所得DNV大小可以主要通过调节水相和含脂质的有机相之间的流量比(FRR)来调节。我们的研究已表明,增加流量比直接减小了所得DNV大小,以及减小了大小可变性。对于经口腔粘膜和局部的施用,使用为100的FRR,以从上述组分获得大小以250nm为中心的DNV。应注意,取决于所用组分的特定类型,同一FRR可产生不同大小的DNV。

[0262] DNV可以经合成以封装各种类型的药物,所述各种类型的药物包括但不限于小分子,以及蛋白质、RNA和DNA。它们可以有效地封装亲水性和疏水性药物两者或其他货物。我们能够成功地合成尤其封装亲水性药物(诸如荧光素衍生物)的DNV、含有异硫氰酸荧光素(FITC)的DNV,和/或荧光标记的骨靶向药物或无标签的药物。在疏水性药物的情况下,我们主动地使用DNV来封装水溶性低的分子,所述水溶性低的分子为诸如但不限于高良姜精。在蛋白质的情况下,我们主动地使用DNV来封装蛋白质,所述蛋白质为诸如但不限于sAPPα和

BDNF;或者在核酸的情况下,我们主动地使用DNV来封装核酸,所述核酸为诸如但不限于影响脑中疾病靶标的miRNA。这些DNV经合成以通过血脑屏障递送(跨BBB递送)。给定药物的溶解度指示了其引入导微流体反应器内的相(有机相或水相),其中当药物和DNV组分处于同一(有机)相时,封装性最高。

[0263] DNV上的另一个重要的可调特征是电荷。DNV上的电荷将部分地确定从施加部位分散的程度。可以通过使用带电磷脂组分的不同组合来产生具有各种电荷浓度(ζ 电位)的DNV。我们已经合成了中性(DPPC、胆固醇、DOPE)、阳离子型(DPPC、胆固醇、DOTAP)和阴离子型(DPPC、胆固醇、DHP) DNV。可以通过调节DNV制备混合物中特定带电组分的浓度来调整电荷量。通过调节电荷,可以将DNV递送限制为局部递送或允许进行全身递送。

[0264] 除了大小、货物、可变形性和电荷外,还可以通过附加的聚乙二醇(PEG)或其他聚合物来延长DNV的半衰期。取决于治疗目标,添加PEG为可选择的。

[0265] 靶向DNV。

[0266] 除了货物、大小和可变形性外,DNV还可以合成为在外部上用靶向剂“装饰”,所述靶向剂为诸如但不限于转铁蛋白或叶酸,以允许分别靶向表达转铁蛋白(Tf)或叶酸受体的细胞。这些受体通常在BBB或肿瘤细胞上表达,因此带有这些靶向剂的DNV可以结合并跨越BBB,并且可以靶向这些细胞。可以通过在DNV表面上使用其他配体来特异性靶向其他细胞类型。

[0267] 通常,靶向剂可以与任何感兴趣的靶标缔合,所述感兴趣的靶标为诸如与器官、组织、细胞、细胞外基质或细胞内区域相关的靶标。在某些实施方案中,靶标可以与特定的疾病状态(诸如癌性病征)相关。在一些实施方案中,靶向剂可以对仅一种靶标(诸如受体)具有特异性。合适的靶标可包括但不限于核酸,诸如DNA、RNA,或其经修饰衍生物。合适的靶标还可包括但不限于蛋白质,诸如细胞外蛋白质、受体、细胞表面受体、肿瘤标记物、跨膜蛋白质、酶或抗体。合适的靶标可以包括碳水化合物,诸如可以例如存在于细胞表面上的单糖、二糖或多糖。

[0268] 在某些实施方案中,靶向剂可包括靶标配体(例如,含RGD的肽)、靶标配体的小分子模拟物(例如,肽模拟配体),或对特定靶标具有特异性的抗体或抗体片段。在一些实施方案中,靶向剂还可包括叶酸衍生物、B-12衍生物、整合素RGD肽、NGR衍生物、生长抑素衍生物,或与生长抑素受体结合的肽(诸如奥曲肽和奥曲肽酸(octreotate)),等。在某些实施方案中,靶向剂还可包括适体。适体可以经设计为与感兴趣的靶标缔合或结合。适体可以由例如DNA、RNA和/或肽组成,并且适体的某些方面是在本领域中众所周知的(参见例如, Klussman, S. 编辑, The Aptamer Handbook, Wiley-VCH (2006); Nissenbaum (2008) Trends in Biotech. 26 (8): 442-449; 等)。

[0269] 在某些实施方案中, DNV附着至与细胞表面标记物结合的配体或抗体。在某些实施方案中,标记物是肿瘤标记物,并且抗体/配体可用于将DNV引导/定位在癌细胞(例如,肿瘤部位)处。

[0270] 表1中提供了合适肿瘤标记物的说明性但非限制性的列表。这些和其他癌症标记物的抗体是本领域技术人员已知的,并且可以商业获得或容易地生产,例如使用噬菌体展示技术生产。

[0271] 表1. 说明性的癌症标记物和相关的参考文献,所有这些都是在鉴定参考的肿瘤

标记物的目的而以引用方式并入本文的。

[0272]

标记物	参考文献
5 α 还原酶	Délos 等人, (1998) <i>Int J Cancer</i> , 75:6 840-846
α -胎蛋白	Esteban 等人, (1996) <i>Tumour Biol.</i> , 17(5): 299-305
AM-1	Harada 等人, (1996) <i>Tohoku J Exp Med.</i> , 180(3): 273-288
APC	Dihlmann 等人, (1997) <i>Oncol Res.</i> , 9(3) 119-127
APRIL	Sordat 等人, (1998) <i>J Exp Med.</i> , 188(6): 1185-1190
BAGE	Böel 等人, (1995) <i>Immunity</i> , 2: 167-175.
β -连环蛋白	Hugh 等人, (1999) <i>Int J Cancer</i> , 82(4): 504-11
Bcl2	Koty 等人, (1999) <i>Lung Cancer</i> , 23(2): 115-127
bcr-abl (b3a2)	Verfaillie 等人, (1996) <i>Blood</i> , 87(11): 4770-4779
CA-125	Bast 等人, (1998) <i>Int J Biol Markers</i> , 13(4): 179-187
CASP-8/FLICE	Mandruzzato 等人, (1997) <i>J Exp Med.</i> , 186(5): 785-793。
组织蛋白酶	Thomssen 等人, (1995) <i>Clin Cancer Res.</i> , 1(7): 741-746
CD19	Scheuermann 等人, (1995) <i>Leuk Lymphoma</i> , 18(5-6): 385-397
CD20	Knox 等人, (1996) <i>Clin Cancer Res.</i> , 2(3): 457-470
CD21、CD23	Shubinsky 等人, (1997) <i>Leuk Lymphoma</i> , 25(5-6): 521-530
CD22、CD38	French 等人, (1995) <i>Br J Cancer</i> , 71(5): 986-994
CD33	Nakase 等人, (1996) <i>Am J Clin Pathol.</i> , 105(6): 761-768
CD35	Yamakawa 等人, <i>Cancer</i> , 73(11): 2808-2817
CD44	Naot 等人, (1997) <i>Adv Cancer Res.</i> , 71: 241-319
CD45	Buzzi 等人, (1992) <i>Cancer Res.</i> , 52(14): 4027-4035
CD46	Yamakawa 等人, (1994) <i>Cancer</i> , 73(11): 2808-2817
CD5	Stein 等人, (1991) <i>Clin Exp Immunol.</i> , 85(3): 418-423
CD52	Ginaldi 等人, (1998) <i>Leuk Res.</i> , 22(2): 185-191
CD55	Spendlove 等人, (1999) <i>Cancer Res.</i> , 59: 2282-2286.
CD59 (791Tgp72)	Jarvis 等人, (1997) <i>Int J Cancer</i> , 71(6): 1049-1055
CDC27	Wang 等人, (1999) <i>Science</i> , 284(5418): 1351-1354
CDK4	Wölfel 等人, (1995) <i>Science</i> , 269(5228): 1281-1284
CEA	Kass 等人, (1999) <i>Cancer Res.</i> , 59(3): 676-683
c-myc	Watson 等人, (1991) <i>Cancer Res.</i> , 51(15): 3996-4000
Cox-2	Tsujii 等人, (1998) <i>Cell</i> , 93: 705-716
DCC	Gotley 等人, (1996) <i>Oncogene</i> , 13(4): 787-795
DcR3	Pitti 等人, (1998) <i>Nature</i> , 396: 699-703
E6/E7	Steller 等人, (1996) <i>Cancer Res.</i> , 56(21): 5087-5091

[0273]

EGFR	Yang 等人, (1999) <i>Cancer Res.</i> , 59(6): 1236-1243。
EMBP	Shiina 等人, (1996) <i>Prostate</i> , 29(3): 169-176。
Ena78	Arenberg 等人, (1998) <i>J. Clin. Invest.</i> , 102: 465-472.
FGF8b 和 FGF8a	Dorkin 等人, (1999) <i>Oncogene</i> , 18(17): 2755-2761
FLK-1/KDR	Annie 和 Fong (1999) <i>Cancer Res.</i> , 59: 99-106
叶酸受体	Dixon 等人, (1992) <i>J Biol Chem.</i> , 267(33): 24140-72414
G250	Divgi 等人, (1998) <i>Clin Cancer Res.</i> , 4(11): 2729-2739
GAGE 家族	De Backer 等人, (1999) <i>Cancer Res.</i> , 59(13): 3157-3165
胃泌素 17	Watson 等人, (1995) <i>Int J Cancer</i> , 61(2): 233-240
胃泌素释放激素 (铃蟾肽)	Wang 等人, (1996) <i>Int J Cancer</i> , 68(4): 528-534
GD2/GD3/GM2	Wiesner 和 Sweeley (1995) <i>Int J Cancer</i> , 60(3): 294-299
GnRH	Bahk 等人, (1998) <i>Urol Res.</i> , 26(4): 259-264
GnTV	Hengstler 等人, (1998) <i>Recent Results Cancer Res.</i> , 154: 47-85
gp100/Pmel17	Wagner 等人, (1997) <i>Cancer Immunol Immunother.</i> , 44(4): 239-247
gp-100-in4	Kirkin 等人, (1998) <i>APMIS</i> , 106(7): 665-679
gp15	Maeurer 等人, (1996) <i>Melanoma Res.</i> , 6(1): 11-24
gp75/TRP-1	Lewis 等人, (1995) <i>Semin Cancer Biol.</i> , 6(6): 321-327
hCG	Hoermann 等人, (1992) <i>Cancer Res.</i> , 52(6): 1520-1524
乙酰肝素酶	Vlodavsky 等人, (1999) <i>Nat Med.</i> , 5(7): 793-802
Her2/neu	Lewis 等人, (1995) <i>Semin Cancer Biol.</i> , 6(6): 321-327
Her3	
HMTV	Kahl 等人, (1991) <i>Br J Cancer</i> , 63(4): 534-540
Hsp70	Jaattela 等人, (1998) <i>EMBO J.</i> , 17(21): 6124-6134
hTERT (端粒酶)	Vonderheide 等人, (1999) <i>Immunity</i> , 10: 673-679. 1999。
IGFR1	Ellis 等人, (1998) <i>Breast Cancer Res. Treat.</i> , 52: 175-184
IL-13R	Murata 等人, (1997) <i>Biochem Biophys Res Commun.</i> , 238(1): 90-94
iNOS	Klotz 等人, (1998) <i>Cancer</i> , 82(10): 1897-1903
Ki 67	Gerdes 等人, (1983) <i>Int J Cancer</i> , 31: 13-20
KIAA0205	Guéguen 等人, (1998) <i>J Immunol.</i> , 160(12): 6188-6194
K-ras、H-ras、N-ras	Abrams 等人, (1996) <i>Semin Oncol.</i> , 23(1): 118-134
KSA (CO17-1A)	Zhang 等人, (1998) <i>Clin Cancer Res.</i> , 4(2): 295-302
LDLR-FUT	Caruso 等人, (1998) <i>Oncol Rep.</i> , 5(4): 927-930
MAGE 家族 (MAGE1、MAGE3 等)	Marchand 等人, (1999) <i>Int J Cancer</i> , 80(2): 219-230

[0274]

乳腺珠蛋白	Watson 等人, (1999) <i>Cancer Res.</i> , 59: 13 3028-3031
MAP17	Kocher 等人, (1996) <i>Am J Pathol.</i> , 149(2): 493-500
草木犀浆-A/ MART-1	Lewis 和 Houghton (1995) <i>Semin Cancer Biol.</i> , 6(6): 321-327
间皮素	Chang 等人, (1996) <i>Proc. Natl. Acad. Sci., USA</i> , 93(1): 136-140
MIC A/B	Groh 等人, (1998) <i>Science</i> , 279: 1737-1740
MT-MMP, 诸 如 MMP2、 MMP3、 MMP7、 MMP9	Sato 和 Seiki (1996) <i>J Biochem (Tokyo)</i> , 119(2): 209-215
Mox1	Candia 等人, (1992) <i>Development</i> , 116(4): 1123-1136
粘蛋白, 诸如 MUC-1、 MUC-2、 MUC-3, 以 及 MUC-4	Lewis 和 Houghton (1995) <i>Semin Cancer Biol.</i> , 6(6): 321-327
MUM-1	Kirkin 等人, (1998) <i>APMIS</i> , 106(7): 665-679
NY-ESO-1	Jager 等人, (1998) <i>J. Exp. Med.</i> , 187: 265-270
骨粘连蛋白	Graham 等人, (1997) <i>Eur J Cancer</i> , 33(10): 1654-1660
p15	Yoshida 等人, (1995) <i>Cancer Res.</i> , 55(13): 2756-2760
P170/MDR1	Trock 等人, (1997) <i>J Natl Cancer Inst.</i> , 89(13): 917-931
p53	Roth 等人, (1996) <i>Proc. Natl. Acad. Sci., USA</i> , 93(10): 4781-4786.
p97/ 黑素转 铁蛋白	Furukawa 等人, (1989) <i>J Exp Med.</i> , 169(2): 585-590
PAI-1	Grøndahl-Hansen 等人, (1993) <i>Cancer Res.</i> , 53(11): 2513-2521
PDGF	Vassbotn 等人, (1993) <i>Mol Cell Biol.</i> , 13(7): 4066-4076
纤溶酶原 (uPA)	Naitoh 等人, (1995) <i>Jpn J Cancer Res.</i> , 86(1): 48-56
PRAME	Kirkin 等人, (1998) <i>APMIS</i> , 106(7): 665-679
Probasin	Matuo 等人, (1985) <i>Biochem Biophys Res Commun.</i> , 130(1): 293-300
Progenipointi n	-----
PSA	Sanda 等人, (1999) <i>Urology</i> , 53(2): 260-266。
PSM	Kawakami 等人, (1997) <i>Cancer Res.</i> , 57(12): 2321-2324
RAGE-1	Gaugler 等人, (1996) <i>Immunogenetics</i> , 44(5): 323-330
Rb	Dosaka-Akita 等人, (1997) <i>Cancer</i> , 79(7): 1329-1337
RCAS1	Sonoda 等人, (1996) <i>Cancer</i> , 77(8): 1501-1509.
SART-1	Kikuchi 等人, (1999) <i>Int J Cancer</i> , 81(3): 459-466
SSX 基因 家族	Gure 等人, (1997) <i>Int J Cancer</i> , 72(6): 965-971

[0275]

STAT3	Bromberg 等人, (1999) <i>Cell</i> , 98(3): 295-303
STn (粘蛋白缩合)	Sandmaier 等人, (1999) <i>J Immunother.</i> , 22(1): 54-66
TAG-72	Kuroki 等人, (1990) <i>Cancer Res.</i> , 50(16): 4872-4879
TGF- α	Imanishi 等人, (1989) <i>Br J Cancer</i> , 59(5): 761-765
TGF- β	Picon 等人, (1998) <i>Cancer Epidemiol Biomarkers Prev</i> , 7(6): 497-504
胸腺素 β 15	Bao 等人, (1996) <i>Nature Medicine</i> , 2(12), 1322-1328
IFN- α	Moradi 等人, (1993) <i>Cancer</i> , 72(8): 2433-2440
TPA	Maulard 等人, (1994) <i>Cancer</i> , 73(2): 394-398
TPI	Nishida 等人, (1984) <i>Cancer Res</i> 44(8): 3324-9
TRP-2	Parkhurst 等人, (1998) <i>Cancer Res.</i> , 58(21) 4895-4901
酪氨酸酶	Kirkin 等人, (1998) <i>APMIS</i> , 106(7): 665-679
VEGF	Hyodo 等人, (1998) <i>Eur J Cancer</i> , 34(13): 2041-2045
ZAG	Sanchez 等人, (1999) <i>Science</i> , 283(5409): 1914-1919
p16INK4	Quelle 等人, (1995) <i>Oncogene</i> , 1995 年 8 月 17 日; 11(4): 635-645
谷胱甘肽 S-转移酶	Hengstler (1998)等人, <i>Recent Results Cancer Res.</i> , 154: 47-85

[0276] 偶联含脂质构建体和靶向剂的方法是本领域技术人员众所周知的。实例包括但不限于通过使用例如双功能偶联剂和双功能芳基卤化物的传统化学反应进行生物素亲和素或链霉亲和素的使用(参见例如,美国专利号:US 4,885,172 A),所述双功能偶联剂为诸如戊二醛、二酰亚胺酯、芳族和脂族二异氰酸酯、二羧酸的双-对硝基苯基酯、芳族二磺酰氯,所述双功能芳基卤化物为诸如1,5-二氟-2,4-二硝基苯;p,p'-二氟m,m'-二硝基二苯砜、巯基反应性马来酰亚胺,等等。可应用于此类偶联的适当反应描述于Williams等人, *Methods in Immunology and Immunochemistry*, 第1卷, Academic Press, New York 1967 中。

[0277] 本文描述的DNV提供了许多优点,所述优点包括但不限于以下:

[0278] 1) DNV具有增强(i)穿过口腔粘膜,(ii)进入真皮层,以及(iii)经皮的局部药物递送的能力;

[0279] 2) DNV具有允许或增加小分子、蛋白质、RNA和/或抗体穿过血脑屏障到达脑的递送以用于CNS病症的潜能;

[0280] 3) DNV具有将货物专门运送到靶细胞类型,从而避免脱靶或副作用的潜能。

[0281] 血脑屏障(BBB)限制了可用于治疗神经系统病症诸如AD和PD的治疗分子。具有将各种分子(包括但不限于小分子、肽、蛋白质、抗体、适体、miRNA和小分子聚合物缀合物)在DNV中转运到脑的能力增加了可以评估和开发用于治疗这些破坏性病症的治疗剂的多样性。此外,DNV可以通过包括经皮途径在内的许多施用途径来促进递送,这可以增加在老年或患病患者群体中的给药简便性和依从性。另外,靶向DNV允许将治疗剂递送至仅某些细胞类型,从而限制了副作用。

[0282] 据信,现有脂质体技术中没有一种显示为有效地经皮,然后还跨越血脑屏障(BBB)

递送治疗剂。用于CNS病症的治疗剂受其跨越BBB的能力的限制。这导致排除了可以评估和开发用于CNS病症的许多可能的新型治疗剂。另外,患者依从性是成功治疗的障碍。本文所述的DNV具有使得能够在CNS病症如AD和PD的治疗中评估多种分子的潜力,从而增加了找到用于此类CNS病症的有效新治疗剂的成功率。

[0283] DNV使得能够递送更大类别的分子。现有技术大多限于小分子。DNV几乎没有毒性,并且在局部递送中不会破坏较深的活体组织。DNV不需要在皮肤上施加超声波、电力或化学增强剂。

[0284] 虽然有许多基于脂质体的方法主要通过全身途径来封装和递送药物,但是本文所述的DNV首次提供了使用脂质体技术产生DNV以通过经皮途径递送药物,从而实现最终脑递送的潜力。此外,本文所述的DNV可以使用流动化学设备在微反应器中产生的发现允许以高度质量控制、非常小且均一的直径以及潜在地大规模来制备靶向CNS的负载药物的弹性脂质体。

[0285] 负载的DNV。

[0286] 本文所述的DNV有效地将一种或多种治疗剂递送至许多靶标中的任何一种。此类剂可包括但不限于用于治疗或预防神经退行性脑病症的治疗剂、双膦酸盐、抗肿瘤剂(例如,细胞毒性药和/或细胞生长抑制药),或基本上是需要封装的任何其他剂。

[0287] 用于治疗或预防神经退行性病症的剂。

[0288] 在某些实施方案中,DNV有效地将治疗剂跨越血脑屏障转运,并有效地将一个或多个治疗部分递送至中枢神经系统(例如,至脑)。在某些实施方案中,此类剂可包括用于治疗或预防神经退行性脑病症的剂。此类神经退行性脑病症包括但不限于帕金森氏病、亨廷顿氏病、阿尔茨海默氏病、轻度认知障碍、痴呆、缺血、中风、肌萎缩侧索硬化症(ALS)、原发性侧索硬化(PLS)、脑瘫,等等。

[0289] 因此,在某些实施方案中,负载有此类剂的DNV可用于治疗和/或预防神经退行性疾病。例如,在某些实施方案中,负载有此类剂的DNV可用于预防或延迟阿尔茨海默氏病前病症和/或认知功能障碍的发作,和/或缓解阿尔茨海默氏病前病症和/或认知功能障碍的一种或多种症状,或预防或延迟阿尔茨海默氏病前病症或认知功能障碍到阿尔茨海默氏病的进展,或缓解阿尔茨海默氏病的一种或多种症状,和/或逆转阿尔茨海默氏病,和/或减轻阿尔茨海默氏病的进展速率。

[0290] 在某些实施方案中,DNV含有淀粉样生成途径的抑制剂或将APP加工从淀粉样生成途径切换为非淀粉样生成途径的剂。

[0291] 在某些实施方案中,用于治疗或预防神经退行性脑病症的剂包括但不限于淀粉样生成途径的抑制剂或将APP加工从淀粉样生成途径切换为非淀粉样生成途径的剂。在某些实施方案中,用于治疗或预防神经退行性脑病症的剂包括但不限于如在PCT/US2011/048472(WO 2012/024616)中所述的托烷司琼或其类似物、双硫仑或其类似物、厚朴酚或其类似物,和/或硝甲西洋或其类似物;和/或如在PCT/US2012/0051426(WO 2013/026021)中所述的TrkA激酶抑制剂(例如,ADDN-1351)和/或其类似物;和/或D2受体激动剂;和/或 $\alpha 1$ -肾上腺素能受体拮抗剂;和/或如在PCT/US2012/049223(WO 2013/019901)中所述的托品醇酯;和/或如在PCT/US2014/016100(WO 2014/127042)中所述的乙内酰脲;和/或如在PCT/US2015/045928(WO 2016/028910)中所述的阿拉丙酯酮类似物(例如,2-氨基-6-(4-氯苯

基)-5,5-二甲基-3-己酮和5-氨基-1-(4-氯苯基)-2,2-二甲基-3-己酮);异丙基阿拉丙酯类似物(例如,2-氨基-3-甲基丁酸2-(4-氯苯基)-1,1-二甲基酯、2,2-二苯基戊酸2-二乙基氨基乙基酯(双苯戊二氨酯)、2-氨基-3-甲基丁酸2-(4-氯苯基)-1,1-二甲基乙基酯(GEA 857)等);如在PCT/US2013/032481(WO 2013/142370)中所述的APP特异性BACE抑制剂(ASBI);和/或如下所述的生物类黄酮或其前药;和/或如下所述的白藜芦醇或白藜芦醇类似物。

[0292] 在某些实施方案中,用于治疗或预防神经退行性脑病症的剂包括ASBI,诸如高良姜精、芦丁、高良姜精前药,或芦丁前药。

[0293] 生物类黄酮和生物类黄酮前药。

[0294] 已证明某些类黄酮(例如,芦丁、高良姜精等)可以充当APP特异性BACE抑制剂并且据信有效治疗和/或预防各种神经退行性病症(参见例如,PCT/US2013/032481(WO 2013/142370)。另外,已知许多其他类黄酮具有神经保护效应。

[0295] 因此,在某些实施方案中,DNV负载有一种或多种类黄酮(生物类黄酮)、异类黄酮(例如,衍生自衍生自3-苯基铬-4-酮(3-苯基-1,4-苯并吡喃酮)结构),和/或新类黄酮(例如,衍生自3-苯基铬-4-酮(3-苯基-1,4-苯并吡喃酮)结构)。说明性的但非限制性的类黄酮包括但不限于橙皮苷(黄烷酮橙皮素的糖苷)、槲皮苷、芦丁(黄酮醇槲皮素的两种糖苷),以及黄酮柑橘黄酮。在某些实施方案中,类黄酮是类黄酮前药。在某些实施方案中,类黄酮包含高良姜精。在某些实施方案中,类黄酮包含芦丁。在某些实施方案中,类黄酮包含槲皮素。

[0296] 在某些实施方案中,DNV负载有黄酮。说明性的黄酮包括但不限于木犀草素、芹菜素、柑橘黄酮等。在某些实施方案中,DNV负载有一种或多种黄烷醇,诸如槲皮酮(auercetin)、山奈酚、杨梅素、漆黄素、高良姜精、异鼠李素、霍香黄酮醇、鼠李素、吡喃并黄酮醇、呋喃并黄酮醇,等等。在某些实施方案中,DNV负载有黄烷酮,诸如橙皮素、柚皮素、圣草酚、高圣草酚,等等。在某些实施方案中,DNV负载有黄烷酮醇,诸如花旗松素(或二氢槲皮素)、二氢山奈酚等。

[0297] 白藜芦醇及其类似物。

[0298] 在某些实施方案中,DNV负载有白藜芦醇和/或一种或多种白藜芦醇类似物。白藜芦醇类似物是本领域技术人员众所周知的。图14中示出了白藜芦醇类似物的示例性但非限制性实例。合成此类化合物的方法是本领域技术人员众所周知的。例如,由Ruan等人(2006) Chem.&Biodiv.,3:975-981描述了图14中的化合物4-7的合成方案,Liu等人(2008) Bioorg.Med.Chem.,16:10013-10021描述了图14中的化合物15a-15d的合成方案,Liu(2012) Steroids,77:419-423描述了图14中的化合物16-18的合成方案,Chen等人(2005) Chem.Pharmaceut.Bull.,53:1587-1590描述了图14中的化合物23的合成方案,Lu(2013) J.Med.Chem.,56:5843-5859提供了图14中化合物24和25的合成方案,并且其他说明的类似物的合成方案尤其可以在Ogas等人(2013) Ann.N.Y.Acad.Sci.1290:21-29中找到。Liu等人(2015) J.Med.Chem.,5:97-105也描述了类似物,

[0299] 醌氧化还原酶2(NQO2)的抑制剂

[0300] 在某些实施方案中,除白藜芦醇外,DNV还负载有NQO2抑制剂,诸如但不限于伊马替尼、褪黑激素9-氨基吡啶(Nolan等人,(2012) Mol.Cancer Ther.11(1):194-203)。合成此类化合物的方法是本领域技术人员众所周知的。在某些实施方案中,NQO2抑制剂包括选自

由以下组成的组的部分：NSC14229（奎纳克林）、NSC9858、NSC11232、NSC12547、NSC13000、NSC13484、NSC17602、NSC28487、NSC64924、NSC71795、NSC76750、NSC101984、NSC140268、NSC156529、NSC164017、NSC219733、NSC270904、NSC273829、NSC305831、NSC305836、NSC322087、NSC356821、NSC374718、NSC407356、NSC617933、NSC617939、NSC620318、NSC628440、NSC633239、NSC648424、NSC658835、NSC682454、白藜芦醇、白藜芦醇类似物，以及伊马替尼

[0301] 双膦酸盐。

[0302] 许多双膦酸盐（BP）已经通过IV输注施用，因为它们当口服施用时具有一些严重的不良副作用，所述严重的不良副作用包括例如肠上皮溃疡。对于需要每月去诊所进行一次IV输注的患者来说，这已经成为沉重的负担。

[0303] 本文所述的说明性实施方案之一为含有荧光缀合的双膦酸盐的DNV。事实证明，可变形的纳米级媒介物（DNV）有助于安全且有效的经皮施加以及经口腔粘膜施加。该观察结果立即表明，口服施用的DNV-BP可以通过穿过肠上皮内衬而安全地将BP转移到血液循环中，而没有目前的副作用。

[0304] 因此，在某些实施方案中，提供了负载有一种或多种双膦酸盐（bisphosphate）的DNV。示例性的双膦酸盐包括但不限于阿仑膦酸盐/胆钙化醇（例如，FOMAX® PLUS D）、依替膦酸盐（例如，DIDRONEL®）、唑来膦酸（唑来膦酸盐）（例如，ZOMETA®、RECLAST®、ACLASTA®）、伊班膦酸盐（例如，BONIVA®）、利塞膦酸盐（例如，ATELVIA®、ACTONEL®）、阿仑膦酸盐（例如，FOSAMAX®、BINOSTO®）、帕米膦酸盐（例如，AREDIA®）、奈立膦酸盐（例如，NERIXIA®）、奥帕膦酸盐、替鲁膦酸盐（例如，SKELID®）等。

[0305] 细胞毒性剂和/或细胞生长抑制剂。

[0306] 本文所述的DNV还有效地将一种或多种治疗剂递送至靶细胞，诸如癌细胞。因此，在某些实施方案中，本文所述的DNV含有细胞毒性剂和/或细胞生长抑制剂。说明性的细胞毒性剂和/或细胞生长抑制剂包括但不限于IDH1抑制剂、微管抑制剂、DNA破坏剂、聚合酶抑制剂等。在某些实施方案中，细胞毒性剂或细胞生长抑制剂包括微管蛋白抑制剂（例如，奥瑞斯他汀、尾海兔素-10、天然产物尾海兔素-10的合成衍生物、美登素或美登素衍生物等）。在某些实施方案中，细胞毒性剂或细胞生长抑制剂包括选自由以下组成的组的药物：单甲基奥瑞斯他汀F（MMAF）、奥瑞斯他汀E（AE）、单甲基奥瑞斯他汀E（MMAE）、vcMMAE，以及vcMMAF。在某些实施方案中，细胞毒性剂或细胞生长抑制剂包括选自由以下组成的组的美登素：美登素（DM1）、DM3和DM4。

[0307] 根据权利要求42所述的纳米级药物递送媒介物，其中所述细胞毒性剂或细胞生长抑制剂包含DNA破坏剂（例如，卡里奇霉素、卡里奇霉素类似物、倍癌霉素、倍癌霉素类似物、吡咯并苯并二氮䓬、吡咯并苯并二氮䓬类似物等）。在某些实施方案中，细胞毒性剂或细胞生长抑制剂包含选自由以下组成的组的倍癌霉素：倍癌霉素A、倍癌霉素B1、倍癌霉素B2、倍癌霉素C1、倍癌霉素C2、倍癌霉素D、倍癌霉素SA、环丙基苯并吡咯倍癌霉素（CC-1065）、辛坦霉素（Centanamycin）、雷查霉素、阿多来新、比折来新，以及卡折来新。

[0308] 在某些实施方案中，细胞毒性剂或细胞生长抑制剂包含吡咯并苯并二氮䓬或吡咯

并苯并二氮革二聚体(例如,安曲霉素(及其二聚体)、甲基氨苄霉素(及其二聚体)、茅屋霉素(及其二聚体)、普拉卡素(及其二聚体)、奇卡霉素(及其二聚体)、新苄霉素A(及其二聚体)、新苄霉素B(及其二聚体)、DC-81(及其二聚体)、西伯利亚霉素(及其二聚体)、泊罗霉素A(Porothramycin A)(及其二聚体)、泊罗霉素B(及其二聚体)、西巴霉素(及其二聚体)、赤霉素(Abbeymycin)(及其二聚体)、SG2000、SG2285,等)。

[0309] 在某些实施方案中,细胞毒性剂或细胞生长抑制剂包含选自以下组成的组的药物:奥瑞斯他汀、尾海兔素、秋水仙碱、康普瑞汀,以及mTOR/PI3K抑制剂。

[0310] 在某些实施方案中,细胞毒性剂或细胞生长抑制剂包括选自以下组成的组的药物:氟脲嘧啶(5-FU)、卡培他滨、5-三氟甲基-2'-脱氧尿苷、甲氨蝶呤钠、雷替曲塞、培美曲塞、胞嘧啶阿拉伯糖苷、6-巯基嘌呤、硫唑嘌呤、6-硫鸟嘌呤(6-TG)、喷司他丁、磷酸氟达拉滨、克拉屈滨、氟尿苷(5-氟-2)、核糖核苷酸还原酶抑制剂(RNR)、环磷酰胺、环磷酰胺(neosar)、异环磷酰胺、噻替哌(thiotepa)、1,3-双(2-氯乙基)-1-亚硝基脲(BCNU)、甲基1, -(2-氯乙基)-3-环己基-1-亚硝基脲(CCNU)、六甲嘧啶、白消安、盐酸丙卡巴肼、达卡巴嗪(DTIC)、苯丁酸氮芥、美法仑、顺铂、卡铂、奥沙利铂、苯达莫司汀、卡莫司汀、氮芥(chloromethine)、达卡巴嗪(DTIC)、福莫司汀、洛莫司汀、甘露舒凡、奈达铂、尼莫司汀、泼尼莫司汀、雷莫司汀、赛特铂、司莫司汀、链脲霉素、替莫唑胺、曲奥舒凡、三亚胺醌、三亚乙基蜜胺、噻替哌(thioTEPA)、四硝酸三铂、曲磷胺、乌拉莫司汀、阿霉素、枸橼酸柔红霉素、米托蒽醌、放线菌素D、依托泊苷、盐酸托泊替康、替尼泊苷(VM-26)、盐酸伊立替康(CPT-11)、喜树碱、贝洛替康、鲁比替康、长春新碱、硫酸长春碱、酒石酸长春瑞滨、硫酸长春地辛、紫杉醇、多西紫杉醇、纳米粒紫杉醇、abraxane、伊沙匹隆、拉洛他赛、奥他赛、替塞他赛、长春氟宁、视黄酸、视黄酸衍生物、阿霉素(doxirubicin)、长春花碱、长春新碱、环磷酰胺、异环磷酰胺、顺铂、5-氟尿嘧啶、喜树碱衍生物、干扰素、它莫西芬,以及紫杉醇。

[0311] 在某些实施方案中,细胞毒性剂或细胞生长抑制剂包括细胞毒素(例如,白喉毒素、假单胞菌外毒素、蓖麻毒素、相思豆毒素、皂草素、胸腺嘧啶激酶等)。

[0312] 可以封装在本文所述的DNV中的前述剂是说明性的,而非限制性的。使用其中提供的教导,DNV可以容易地用于封装许多其他剂。

[0313] 组合药物递送平台

[0314] 在某些实施方案中,两种或更多种药物可以封装在DNV中。药物中的一种可以是例如但不限于激酶抑制剂,诸如马塞替尼(masatinib)或其类似物,所述激酶抑制剂可以保护抗神经炎症,并且其他药物可以但不限于sAPP α 增强剂。

[0315] 药物制剂。

[0316] 在各种实施方案中,本文设想的药物制剂通常含有如本文所述的DNV(例如,含有一种或多种治疗剂)和药学上可接受的载体。术语“载体”通常是指用作药物制剂的稀释剂或媒介物的惰性物质。该术语还可以涵盖赋予组合物粘性品质的典型惰性物质。通常,生理上可接受的载体以液体形式存在。液体载体的实例包括但不限于生理盐水、磷酸盐缓冲液、普通缓冲盐水(135-150mM NaCl)、水、缓冲水、0.4%盐水、0.3%甘氨酸、0.3M蔗糖(以及其他碳水化合物)、糖蛋白,以提供增强的稳定性(例如,白蛋白、脂蛋白、球蛋白等)等。由于生理上可接受的载体是部分地按照所施用的特定组合物以及按照用于施用该组合物的特定方法而确定的,因此存在本发明的药物组合物的多种合适制剂(参见例如,Remington's

Pharmaceutical Sciences, Maak Publishing Company, Philadelphia, Pa., 第17版, (1985))。

[0317] 在各种实施方案中,可以通过常规的众所周知的灭菌技术来对药物制剂进行灭菌,或者可以在无菌条件下生产。可以将水溶液包装使用或在无菌条件下过滤并冻干,将冻干的制备物在施用前与无菌水溶液混合。在某些实施方案中,组合物可含有接近生理条件所需的药学上可接受的辅助物质,诸如pH调节和缓冲剂、张力调节剂、润湿剂等,例如乙酸钠、乳酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、去水山梨糖醇月桂酸酯和三乙醇胺油酸酯。还可以包含用于稳定化组合物的糖,诸如用于冻干组合物的稳定剂。

[0318] 适用于诸如通过关节内、静脉内、肌内、瘤内、皮内、腹膜内和皮下途径进行肠胃外施用的药物组合物可包括水性和非水性的等渗无菌注射溶液。在某些实施方案中,注射溶液可含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和使制剂与预期接受者的血液等渗的溶质,以及可包括悬浮剂、增溶剂、增稠剂、稳定剂和防腐剂的水性和非水性无菌悬浮液。注射溶液和悬浮液也可以从无菌粉末(诸如冻干的脂质体)制备。在某些实施方案中,组合物可以例如通过静脉内输注、腹膜内、膀胱内或鞘内施用。在各种实施方案中,还考虑肠胃外施用和静脉内施用。脂质体组合物的制剂可以单位剂量或多剂量密封容器(诸如安瓿和小瓶)呈现。

[0319] 在某些实施方案中,药物组合物被配制为作为气溶胶施用,例如用于经口和/或经鼻吸入。

[0320] 在某些实施方案中,药物组合物被配制用于局部递送、皮内递送、皮下递送和/或经皮递送。

[0321] 在某些实施方案中,药物组合物被配制用于施用至口腔粘膜、阴道粘膜,和/或直肠粘膜。

[0322] 在某些实施方案中,药物组合物为单位剂型。以此种形式,将组合物细分为含有适当量的活性组分(例如,DNV制剂)的单位剂量。单位剂型可以是包装的组合物,所述包装含有分立量的药物组合物。如果需要的话,则该组合物还可含有其他相容的治疗剂。

[0323] 在某些实施方案中,本文所述的DNV可以使用常规经皮药物递送系统(即,经皮“贴剂”)而递送穿过皮肤,其中活性剂(例如,DNV和/或其制剂)通常包含在层状结构中,所述层状结构用作要固定至皮肤的药物递送装置。在此类结构中,例如DNV和/或其制剂通常包含在上部背衬层下面的层或“贮库”中。应理解的是,术语“贮库”在本上下文是指最终可用于递送至皮肤表面的一定量的例如DNV和/或其制剂。因此,例如,“贮库”可以在贴剂的背衬层上的粘合剂中或在本领域技术人员已知的多种不同基质制剂中的任何一种中包含活性成分。贴剂可含有单一贮库,或可以含有多个贮库。

[0324] 在一个说明性实施方案中,贮库包含具有药学上可接受的接触粘合剂材料的聚合基质,所述聚合基质用于在药物递送过程中将系统固定至皮肤。合适的皮肤接触粘合剂材料的实例包括但不限于聚乙烯、聚硅氧烷、聚异丁烯、聚丙烯酸酯、聚氨酯等。替代地,例如DNV和/或DNV制剂贮库和皮肤接触粘合剂作为分离且不同的层存在,其中粘合剂在贮库下方,所述贮库在这种情况下可以是如上所述的聚合物基质,或者其可以是液体或水凝胶贮库,或可以采取某一其他形式。这些层压体中的背衬层充当装置的上表面,优选地充当“贴剂”的主要结构元件并为装置提供其柔性的大部分。为背衬层选择的材料优选是基本上不渗透活性剂(例如,DNV和/或其制剂)和存在的任何其他材料的。

[0325] 或者,可以采用其他药物递送系统。例如,脂质体、乳剂和微型乳剂/纳米乳剂是可用于保护和递送药物活性化合物的递送媒介物的众所周知实例。也可以采用某些有机溶剂诸如二甲基亚砜,尽管通常以更大的毒性为代价。

[0326] 实施例

[0327] 提供以下实施例是为了说明而不是限制要求保护的发明。

[0328] 实施例1

[0329] DNV的制备和表征。

[0330] 我们在此呈现了我们对一种此类技术的研究:可变形的纳米级媒介物(DNV)。在各种说明性实施方案中,药物递送媒介物由生物衍生的组分和用以赋予媒介物可变形性的多种专有成分组成。

[0331] 我们已经利用微流体反应器来高效且连续地合成这些DNV。它们无毒、易于制备、可扩展且可高度可重现,群体和分布非常均一、具有可控的大小,并提供高度局部化的有效负载递送。

[0332] 在各种实施方案中,本文所述的DNV提供高效的媒介物以将药物局部递送到颅面骨和/或口腔骨。如本文所述,在各种实施方案中,阳离子型DNV经合成以携带荧光标记的亲水性药物,并且无阻塞地施加于小鼠(n=4)的(i)剃光的头皮和(ii)口腔中的牙龈表面,以测试所述阳离子型DNV的渗透性和药物通量。从理论上讲,我们的结果表明,阳离子型DNV能够在口服施加的情况下到达其靶标牙槽骨并将其有效负载递送至其靶标牙槽骨,并在皮肤施加时递送至皮肤层,而不会发生任何全身性有效负载泄漏。

[0333] 材料

[0334] 微流体反应器系统(图1A),26 μ L-1000 μ L反应器芯片,如图1A所示进入芯片之前使用微型混合器。去离子水,PBS,异丙醇,氯仿,透析膜,冻干器,DNV结构单元,所述DNV结构单元包括膜部件、膜调节剂,以及可变形成分。Zetasizer (Malvern Z系列)、动态光散射器(Wyatt)。透射电子显微镜(JEOL)。微型挤出机和孔径为50nm的膜(Avanti Polar Lipids)。LAS-3000 (Fujifilm)

[0335] 原型DNV的制备:

[0336] 使用图1B所示的方案在微流体反应器中制备用于经皮递送AF647-唑来膦酸盐(AF-ZOL)、荧光双膦酸盐的DNV,所述方案为在室温和压力下使用如图1B所示的精确控制的流量比5来在有机相和水相中混合结构单元,在微通道中提供高速率的高剪切应力和受控的混合,从而减少湍流并最小化所得AF-ZOL DNV的大小和分散度。

[0337] 然后将收集的样品两次通过20K膜透析过夜。透析后,将样品冻干两次成粉末,以便通常在液氮(77K)中长期储存。可以将DNV重悬在适当的媒介物中10 μ L的最终体积中以经由直接移液器施加在麻醉的小鼠上而进行局部和牙龈施加,或者掺入凝胶中以施加到剃光的颅顶皮肤表面。该领域的预期最终临床用途可能是预充式注射器、拭子或凝胶贴剂的形式。

[0338] 表征:

[0339] 使用原子力显微镜(AFM)、透射电子显微镜和Malvern Zetasizer对DNV进行表征,以获得空DNV和有负载的DNV的电特性。

[0340] 大小-通过zetasizer (Malvern Z系列) 获得DNV的大小测量和分散度分析,并通过

动态光散射 (Wyatt) 进行证实。

[0341] ζ 电位-通过zetasizer测量 (Malvern Z系列) 获得悬浮液中DNV的 ζ 电位。

[0342] 捕获效率-通过超速离心 (100,000G达2h) 或透析进行DNV封装的药物与游离药物的分离。将上清液和重悬的DNV溶液均通过荧光分光光度法进行分析, 以提供对所捕获的药物和游离药物的比较。捕获效率 = (总药物-游离药物) * 100% 对于这些研究, 使用荧光素衍生物异硫氰酸荧光素 (FITC)。

[0343] 弹性-使用微型挤出机和孔径为50nm的膜对不同配置的媒介物的弹性进行定性比较。(Avanti极性脂质)。

[0344] 空DNV和负载的DNV的电特性在表2中示出。DNV的AFM成像示出在图2中并且DNV的TEM图像示出在图3A中, 并且储存和重悬后使用共聚焦显微镜的囊泡活力在图3B中显示没有来自囊泡的药物泄漏。使用微流体反应器制备DNV和常规脂质体, 并如上所述进行表征。

[0345] 表2. 溶液 (PBS) 中空DNV和负载的DNV的电特性。

[0346]	样品名称	ζ 电位 (mV)	迁移率 ($\mu\text{mcm/Vs}$)	电导率 (mS/cm)
	空阳离子型 DMV 编号 1	+19.1	1.261	17.8
	空阳离子型 DMV 编号 2	+19.3	1.273	18.5
	空阳离子型 DMV 编号 3	+20.0	1.319	19.0
	负载的阳离子型 DMV 编号 1	-12.9	-0.8529	17.8
	负载的阳离子型 DMV 编号 2	-13.1	-0.8644	18.6
	负载的阳离子型 DMV 编号 3	-12.8	-0.8471	19.0

[0347] 图4A示出了DNV的大小分布, 并且表3显示了DNV和常规脂质体的表征的汇总

[0348] 表3. 微流体产生的DNV和封装药物AF-ZOL的脂质体的特性。

[0349]

	纳米粒子类型	
特征	DNV	常规脂质体
大小(直径)	221±48 nm	106±39 nm
ζ 电位	+41.7±3.7 mV	+38.1±1.8 mV
捕获效率	39.6%	37.4%
DNV 在储存数周后作为冻干粉稳定。		

[0350] 实施例2

[0351] 体内研究: 在经口腔粘膜和经皮局部施加中的DNV施加和创新。

[0352] 在将DNV施加至口腔粘膜的牙龈表面和施加至颅顶皮肤的小鼠中的体内测试显示, DNV能够有效地穿透口腔粘膜屏障并将药物局部递送至下面的牙槽骨, 而不会发生全身性有效负载泄漏。在经皮局部施加的情况下, DNV在皮肤各层内递送有效负载, 而不会穿透并将药物递送到颅骨或全身。

[0353] 具体地, 在小鼠 (n=4) 中进行体内研究, 以测试DNV在以下两种施加部位处的性能 (i) 牙龈表面和 (ii) 颅顶皮肤 (每种施加部位n=2)。使用空DNV的阴性对照, 并与封装荧光骨靶向药物的DNV进行对比测试。在施加后48小时, 处死小鼠并分析组织和骨骼。

[0354] 该研究表明, DNV可变形性允许这些纳米媒介物 (纳米级囊泡) 挤压穿过明显小于其直径的孔, 同时保留其有效负载而不破裂。这使它们能够更深入地透过特别是阻塞性的

屏障(诸如口腔粘膜),并通过仅进入靶位点而不会发生全身性有效负载泄漏来避免潜在的并发症(参见例如,图4B、图5A至图5C、图6、图7A和图7B以及图8。

[0355] 讨论

[0356] 已经有效合成了大小为约200nm的高度同质的DNV群体,以便从微流体反应器以快速、受控和连续方式来封装荧光骨靶向亲水性药物。在此,合成了阳离子型DNV,但也可以使用相同的可变形性成分类似地合成阴离子型DNV和中性DNV,不同之处仅在于掺入了特定的带电组分。

[0357] 小鼠体内测试,特别是施加至口腔粘膜和颅顶皮肤表明,媒介物能够有效地穿透口腔粘膜屏障并将药物局部递送至下面的牙槽骨,而不会发生全身性有效负载泄漏。在局部施加的情况下,DNV在皮肤各层内递送有效负载,而不会穿透并将药物递送到颅骨或全身。

[0358] 这项研究表明,它们的可变形性允许这些纳米媒介物挤压穿过显著小于其直径的孔,同时保留其有效负载而不破裂。这使它们能够更深入地透过特别是阻塞性的屏障(诸如口腔粘膜),并通过进入靶位点而不会发生全身性有效负载泄漏来避免潜在的并发症。

[0359] DNV在皮肤中的阻抗可归因于施加时的DNV大小。尽管是均质的,但在第二次冻干后,群体的大小为约600nm。研究表明,大小200nm以上的纳米粒子似乎难以穿透到角质层(Singh等人,(2009) AAPS J. 11 (1):54-64;Holpuch等人,(2010) Pharm. Res. 27 (7):1224-1236;Šentjarc等人,(1999) J. Control. Rel. 59 (1):87-97)。用于确定DNV大小对皮肤渗透的影响的进一步实验目前正处于进展中。

[0360] 结论

[0361] 组织学分析允许确定皮肤、牙龈和骨骼中的积聚部位。鉴于它们的可生物降解性、相对可忽略的毒性、易于合成性以及大规模制造的潜力,这些DNV载体呈现为穿过口腔粘膜屏障以及局部至皮肤的新型局部递送系统,可能对许多牙科、药用化妆品或再生目的是有用的。

[0362] 实施例3

[0363] 用于跨血脑屏障递送的可变形的纳米级媒介物

[0364] 材料

[0365] 可变形的纳米级媒介物(DNV)结构单元购自Sigma Aldrich和Avanti Polar Lipids。包括2个泵、注射器、注射环、微反应器和芯片保持器的微流体系统购自Syrriis。磷酸盐缓冲盐水(PBS)、无水异丙醇(IPA)、氯仿和高良姜精(GAL)获自Sigma。透析膜、0.1 μ m和0.2 μ m的聚醚砜(PES)过滤器、冻干器、旋转蒸发器和离心管获自Thermo Fisher Scientific。动态光散射器来自Wyat,透射电子显微镜来自JEOL,原子力显微镜来自Bruker,并且质谱仪来自Advion。

[0366] 方法

[0367] 在各种实施方案中,DNV结构单元由脂质阴离子磷脂、胆固醇和非离子洗涤剂Span 80组成。所使用的确切脂质成分、洗涤剂和摩尔比是基于DNV的预期施加来确定的,如图9中示意性示出的。在说明性但非限制性的实施方案中,将1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DPPC)、胆固醇和磷酸二十六烷基酯(DHP)溶于氯仿中,并以4:4:2的摩尔比混合;然后将氯仿蒸发过夜或在旋转蒸发器中蒸发。将脂质混合物溶于IPA中以得到20mM的浓度。然后将

1.5% (脂质混合物的w/w)的Tween 20或Span 80加入到脂质混合物中并混合。将十毫摩尔的高良姜精 (GAL) 溶于IPA中,以4:1的摩尔比加入脂质/洗涤剂混合物中,之后滤过0.2 μ m PES过滤器。将PBS和蒸馏水 (dd) 使用0.1 μ m PES过滤器过滤。在泵中设置流量比为3-4 (PBS或dd水比IPA),并用IPA和PBS或蒸馏水洗涤系统。通常使用26 μ L微反应器,但也可以使用更大大小的反应器来优化大小和形态,可以用于合成DNV。一旦微流体系统已经被洗涤,将脂质/GAL/洗涤剂混合物负载在注射环中,然后在25-40 $^{\circ}$ C和1巴的压力下使用第二泵与水溶液 (PBS或dd水) 一起泵送通过微反应器,以产生GAL封装的DNV (Lipo-GAL)。在DNV合成后,通过透析和冻干或超速离心将所述DNV浓缩以产生DNV沉淀。然后如图10所示通过DLS和粒径分布来进行大小表征。使用超速离心或透析从溶液中去除了未掺入在脂质体中的GAL。

[0368] 表征

[0369] 通过Wyatt仪器中的动态光散射来测定Lipo-Gal DNV的大小 (图10)。通过透射电子显微镜和原子力显微镜来确认该测量。通过使用HPLC和质谱法计算游离GAL来计算捕获效率。

[0370] 讨论。

[0371] 可变形的纳米级媒介物是弹性纳米粒子,在某些实施方案中所述弹性纳米粒子由磷脂组成,所述磷脂为诸如1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱 (DPPC)、N-(2,3-二油酰氧基-1-丙基) 三甲基铵 (DOTAP)、1,2-二油基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺 (DOPE)。除磷脂外,DNV还含有两种关键成分:膜调节剂胆固醇和充当边缘活化剂的非离子型洗涤剂 (例如,Span 80、Tween 20等),从而为纳米粒子的脂质双层增加了可变形性。

[0372] 在一个说明性但非限制性的实施方案中,脂质 (包括胆固醇) 和边缘活化剂以85:15w/w的比率存在。

[0373] 所使用的脂质组分的确切摩尔比和类型是基于DNV的预期施加来确定的。例如,在经口腔粘膜和局部施加的一个说明性实施方案中,可以使用5:3:2的摩尔比 (DPPC:胆固醇:DOTAP),其中该混合物含有按重量计15%的Span 80。

[0374] 将这些溶于有机溶剂 (诸如异丙醇 (IPA)) 中的组分经由单独输入到微流体反应器系统中而与水溶液 (PBS或去离子水) 合并,以在25 $^{\circ}$ C-40 $^{\circ}$ C和1巴的压力下进行有效且连续的合成。微流体反应器通道提供高剪切应力和受控的混合,以及最小化的湍流,从而产生明确限定的DNV群体,并且消除了进行后处理诸如超声或挤出以获得合适大小的需要。从有机相过渡到水相时,所描述的组分根据它们在水性溶剂中的热力学稳定性而自动配置到DNV中。

[0375] DNV是无毒的,被制备为可重复性高、批次间差异小、可扩展、群体和分布非常均匀、具有可调的大小,并提供高度局部化的有效负载递送。我们的研究表明,这种方法可以产生50nm大小至微米范围大小的同质群体。所得DNV大小主要通过调节水相和含脂质的有机相之间的流量比 (FRR) 来调节。我们的研究已表明,增加流量比直接减小了所得DNV大小,以及减小了大小分散度。对于经口腔粘膜和局部的施加,使用为100的FRR,以从上述组分获得大小以250nm为中心的DNV。应注意,取决于所用组分的特定类型,相同FRR可产生不同大小的DNV。

[0376] DNV可以经合成以封装各种类型的药物,所述各种类型的药物包括例如小分子、蛋白质、RNA和DNA。它们可以有效地封装亲水性药物和疏水性药物,尽管对后者更为成功。在

我们的研究中,我们已经合成了它们以成功封装以下亲水性药物:荧光素衍生物、异硫氰酸荧光素 (FITC), 以及荧光标记的骨靶向药物。在疏水性药物的情况下,我们主动地使用DNV来封装高良姜精,以递送穿过血脑屏障。给定药物的溶解度指示了其引入导微流体反应器内的相(有机相或水相),其中当药物和DNV组分处于相同(有机)相时,封装性最高。

[0377] 另一种有趣的可调整特征是在DNV上含有的电荷:可以通过使用带电磷脂组分的不同组合来产生具有各种电荷浓度(ζ 电位)的DNV。我们已经合成了中性(DPPC、胆固醇、DOPE)、阳离子型(DPPC、胆固醇、DOTAP)和阴离子型(DPPC、胆固醇、DHP) DNV。可以通过调节DNV制备混合物中特定带电组分的浓度来调整电荷强度。

[0378] 用于体内使用的原型制备(经口腔粘膜和局部施加):

[0379] 将从微流体反应器中收集的DNV样品两次通过20K膜透析过夜,以从溶液中去除99.9%的游离药物。透析后,将样品冻干成粉末并重悬在10 μ L的最终体积,这适于经由直接移液器施加在麻醉的小鼠上而进行局部和牙龈施加。该领域中的预期最终临床用途可能是预充式注射器的形式。

[0380] 在经口腔粘膜和局部施加中的DNV施加与创新:小鼠体内测试,特别是施加至口腔粘膜的牙龈表面和颅顶皮肤表明,媒介物能够有效地穿透口腔粘膜屏障并将药物局部递送至下面的牙槽骨,而不会发生全身性有效负载泄漏。在局部施加的情况下,DNV在皮肤各层内递送有效负载,而不会穿透并将药物递送到颅骨或全身。

[0381] 这项研究表明,DNV的可变形性允许这些纳米媒介物挤压穿过显著小于其直径的孔,同时保留其有效负载而不破裂。这使它们能够更深入地透过特别是阻塞性的屏障(诸如口腔粘膜),并通过进入靶位点而不会发生全身性有效负载泄漏来避免潜在的并发症。

[0382] 材料(包括表征)

[0383] 微流体反应器系统,26 μ L反应器芯片,但是可以根据需要使用更大的大小来控制大小和形态,去离子水,PBS,异丙醇,氯仿,透析膜,冻干器,DNV结构单元,所述DNV结构单元包括膜部件、膜调节剂,以及可变形成分。Zetasizer (Malvern Z系列)、动态光散射器(Wyatt)。透射电子显微镜(JEOL)。原子力显微镜(Bruker)

[0384] 在我们的研究中,已在大小、 ζ 电位、捕获效率、定性弹性和形态方面对各种合成的DNV群体进行了表征。

[0385] 此外,这些DNV在水悬浮液中长时间保持稳定,甚至在两个月后保持活力,尽管可能由于融合事件而在群体同质性方面存在某种降低。

[0386] 使用Caco-2细胞系统测量DNV的血脑屏障渗透性的特征,并通过进行小鼠的药代动力学研究来进一步证实。

[0387] 实施例4

[0388] 使用DNV以生成能够穿透血脑屏障(BBB)的稳定的靶向CNS的脂质体

[0389] 可以如实施例3中所述在微流体反应器中通过在有机相中包含DDPE(18:1十二烷基PE,或1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-(十二烷基))缀合的转铁蛋白(Tf)蛋白质来制备Tf-Lipo-Gal DNV。如上所述使用超速离心进行DNV分离。

[0390] Tf-DDPE缀合物的合成

[0391] 通过在PBS中利用碳二亚胺化学品来将转铁蛋白缀合至DDPE (Muthu等人,2015)。通常,为了将转铁蛋白缀合至DDPE,以1:5:5 (DDPE:EDC.HCl:NHS)的摩尔比将N-羟基-琥珀

酰亚胺 (NHS) 和1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基) 碳二亚胺盐酸盐 (EDC.HCl) 加入到DDPE的PBS溶液 (pH 5.8) 中。具体地, 向DDPE (50mg, 0.05mmol) 在1.5mL PBS (pH 5.8) 中的搅拌溶液中加入EDC.HCl (49mg, 0.26mmol) 和NHS (30mg, 0.26mmol)。将反应混合物在25℃下搅拌5h, 之后在4℃下搅拌24h。将粗制混合物与1mL 2% (w/v) 转铁蛋白进一步混合, 并在4℃下搅拌8h。将反应混合物进一步分为两等份, 并用3mL透析盒 (截留MW: 20kDa) 针对蒸馏水 (ddH₂O) 透析48h-在最初2h后经常更换ddH₂O, 并且每12h后重复三次以去除过量的DDPE、NHS和EDC盐酸盐。将获得的溶液快速冷冻并冻干, 以高产率获得呈无色粉末的DDPE-转铁蛋白缀合物, 将所述DDPE-转铁蛋白缀合物在惰性气氛下于-20℃储存, 直到需要进行脂质体合成 (图12)。MALDI-TOF表征与SDS-PAGE和Tf-Lipo-Gal的代表性卡通图一起在图13中示出。MALDI质谱分析表明DDPE与转铁蛋白比为 (4:1)。

[0392] 脑渗透性小分子-DDPE缀合物的合成

[0393] 如图11B所示, 具有增强的脑渗透性的脑渗透性小分子模板 (诸如苯并二氮䓬类或使用转运蛋白 (诸如中性氨基酸转运蛋白 (LAT1) 或葡萄糖转运蛋白 (GluT1)) 的分子) 可通过图11A中所示的活性酯偶联或通过图11B中所示的点击化学锚定到DDPE上。将使用Cu (I) 催化的叠氮化物-炔烃环加成 (CuAAC) 或无Cu (I) 的叠氮化物点击化学反应来完成小分子与DDPE的共价偶联。

[0394] 实施例5

[0395] 使用DNV以生成能够穿透血脑屏障 (BBB) 的稳定的靶向CNS的脂质体, 诸如以治疗多形性成胶质细胞瘤 (GBM)。

[0396] DNV可用于递送潜在的治疗剂, 以治疗多形性成胶质细胞瘤 (GBM), GBM是所有癌症中最具侵袭性和致死性的。GBM对于常规治疗而言是难治的, 这部分是由于GBM细胞的侵袭性以及这些肿瘤与中枢神经系统 (CNS) 的整合。

[0397] 由于GBM可能来自低级神经胶质瘤并且这些中的大于70%具有异柠檬酸脱氢酶IDH1/2突变, 从而导致酶促活性的功能获得增加, 存在对IDH1抑制剂作为治疗剂的兴趣。我们正在DNV中封装市售的IDH1抑制剂 (诸如AGI-5198), 以测试在多种神经胶质瘤细胞系以及神经胶质瘤和GBM体内模型中的功效。

[0398] 此外, 最近的研究已经表明, 在>50%的人肿瘤中发现的突变肿瘤抑制因子p53产生了易聚集的肽, 从而导致功能丧失, 我们还封装了p53聚集的阻断剂。这些肽阻断剂在DNV中的递送将使得能够体内评估任何抗肿瘤效应。

[0399] 实施例6

[0400] 使用DNV跨BBB递送大生物分子以用于AD。

[0401] sAPP α 是来自APP α 加工的100Kd片段, 并且最近已经由Drug Discovery Lab显示为抑制 β 分泌酶BACE1。由于BACE抑制剂具有作为阿尔茨海默氏病 (AD) 治疗剂的潜力, 因此sAPP α 跨BBB的递送将使其能够被评估作为潜在的BACE抑制剂。我们正在生成DNV以稳定地封装重组产生的sAPP α , 并将评估其在AD小鼠模型中的功效。

[0402] 实施例7

[0403] 使用DNV将miRNA跨BBB递送至脑以用于AD。

[0404] DNV也可用于递送微型RNA (miRNA), 诸如miRNA-107 (miR-107), 以用于阿尔茨海默氏病 (AD) 治疗。miRNA是小干扰RNA (siRNA) 的内源表达形式, 其是非蛋白质编码RNA, 充当基

因表达的调节剂。已经证明,miR-107在AD早期在脑脊髓液(CSF)中减少,并且这种减少可能通过上调BACE表达和活性来加速疾病进展。因此,增加脑中miR-107的水平可能会潜在地使BACE表达和活性正常化、减少A β 肽的产生(与AD病理学有关),增加sAPP α ,并可能成为AD的潜在治疗方法。在我们的微流体反应器中制备的CNS靶向DNV中的miR-107递送提供了体内调节BACE的可能性。我们计划在AD小鼠中测试这些DNV的BBB渗透性和功效。类似地,可以经合成调节AD和其他CNS病症的疾病病理的其他miRNA并体内测试。

[0405] 实施例8

[0406] 使用DNV以通过经皮施加跨BBB递送药物到脑以用于帕金森氏病(PD)。

[0407] DNV可用于封装和经皮地递送PD药物普拉克索,以易化递送并增加依从性。普拉克索是一种具有良好水溶性的低分子量治疗剂,其刺激脑中的多巴胺受体。由于其具高极性亲水性(实验测得的log P为0.4),很难将游离药物跨角质层(皮肤外层)经皮递送。我们将普拉克索封装在DNV中,以测试这些DNV纳米粒子跨越角质层并允许将普拉克索经皮递送至脑的能力。

[0408] 实施例9

[0409] 使用DNV递送去乙酰化酶1(SirT1)增强剂来用于肌萎缩侧索硬化症(ALS)

[0410] DNV也可用于封装去乙酰化酶1(SirT1)增强剂以用于ALS治疗。在ALS小鼠模型中的体内研究表明,增加SirT1水平改善了ALS表型。增加SirT1水平的分子将被封装在DNV中,以用于经皮递送来治疗ALS,并将在ALS小鼠模型中进行测试。

[0411] 实施例10

[0412] 使用Caco-2细胞来测定在具有和不具有转铁蛋白的情况下含高良姜精和含白藜芦醇的可变形的纳米囊泡的渗透性

[0413] 实施例10的汇总

[0414] 治疗神经退行性病症(诸如阿尔茨海默氏病(AD))的常见挑战是渗透血脑屏障(BBB)和有效地将化合物递送到中枢神经系统。我们通过合成具有和不具有转铁蛋白的可变形的纳米囊泡(DNV)来解决问题,所述DNV封装通常无法穿透BBB的潜在治疗剂。两种此类化合物是高良姜精(参见图9B)和白藜芦醇(参见图14)。为了测试具有或不具有转铁蛋白的DNV跨BBB转运这些化合物的能力,我们使用Caco-2细胞来模拟有助于组成BBB的紧密连接。当将高良姜精和白藜芦醇包装在DNV中时,高良姜精和白藜芦醇都能更好地穿透Caco-2细胞,但是含有转铁蛋白的DNV和不含转铁蛋白的DNV之间没有区别。

[0415] 实施例10的背景

[0416] 在某些实施方案中,可变形的纳米囊泡(DNV)是含有表面活性剂Span 80的脂质体(图2)。我们使用微流体反应器来将化合物封装到这些DNV中。两种化合物是高良姜精(一种从姜根中分离出的生物类黄酮)和白藜芦醇(一种在红酒、花生和其他食品中发现的二苯乙烯)。这些化合物具有潜在的AD治疗特性,但是它们不能穿透BBB以显示它们的治疗效应。为了潜在地增强DNV穿透BBB的能力,我们还向它们中添加了转铁蛋白。在先前的研究中,内皮细胞通过受体介导的机制吸收与转铁蛋白偶联的脂质体,如图15中所看到的。此途径可以增强DNV与Caco-2细胞结合,然后穿过它们的紧密连接的能力。我们使用Caco-2细胞(上皮人结肠腺癌),所述Caco-2细胞形成与BBB中发现的紧密连接相似的紧密连接,以测试具有和不具有转铁蛋白的DNV穿透BBB的能力。

[0417] 方法。

[0418] 通过以下方式来形成DNV:在IPA中用高良姜精或白藜芦醇溶解DMPC、DCP和CH (2:2:1),以产生10mM的溶液。为了产生具有转铁蛋白的DNV,以脂质质量的0.1%加入转铁蛋白。然后将该溶液以500 μ L/min的流量注入微流体反应器中,同时以5mL/min的流量注入水。使Caco-2细胞生长三代,然后将它们作为单层在transwell插件上铺板,然后生长另外一个月。将具有和不具有转铁蛋白的高良姜精和转铁蛋白包装的DNV放置在每个transwell插件的顶室中,并从基底外侧室中去除一半体积,并每15分钟用HBSS替换(图16)。使用LC-MS测定这些样品中的每一样品的药物浓度,并使用以下公式来计算每种化合物的被动转运的渗透系数: $P_{app} = (dQ/dt) (1 / (A C_0))$,其中 dQ/dt 是随时间推移渗透膜的药物量(cm/s),A是过滤器的表面积(cm^2),并且 C_0 是供体室内的初始浓度($\mu mol/cm^3$)。

[0419] 结果。

[0420] 当将白藜芦醇和高良姜精包装在DNV中时,白藜芦醇和高良姜精能够更好地穿透Caco-2细胞,但具有和不具有转铁蛋白的DNV的穿透细胞的能力之间没有区别(图17)。具有转铁蛋白的白藜芦醇DNV(RTD)和不具有转铁蛋白的白藜芦醇DNV(RD)的渗透系数均高于游离白藜芦醇(图18)。具有转铁蛋白的高良姜精DNV(GTD)和不具有转铁蛋白的高良姜精DNV(GD)在15分钟的第一时间点之前达到平衡,如通过图17中的斜率基本上为零和图18中的低 P_{app} 所看到的。

[0421] 结论。

[0422] 这些数据表明DNV将穿过BBB有效地将正常不可渗透的化合物递送到CNS中。

[0423] 实施例11

[0424] GAL-DNV和T-DNV的封装和测试。

[0425] 高良姜精和高良姜精前体在小鼠中的药代动力学如图19A和图19B所示。如其中所示,在1h时观察到了 $C_{最大}$ 为约50ng/g的高良姜精低脑水平和低脑比血浆比率(1:10)(图19A)。观察到高良姜精降低AB40水平,但是对AB42水平没有影响(图19B)。高良姜精前体降低AB40和AB42水平(图19B)。

[0426] 建立了药代动力学后,确定发现可变形的纳米囊泡(DNV)可以更有效地将高良姜精靶向脑。另外,需要测试已知能增强脑渗透性的转铁蛋白是否可用,因此制备具有和不具有转铁蛋白的Gal-DNV。

[0427] 本文所述的基于磷脂的可变形的纳米囊泡(DNV)提供了许多优点,包括但不限于:

[0428] 形状灵活;

[0429] 封装各种类别的治疗剂;以及

[0430] 局部经皮递送,同时使全身暴露最小化(例如,参见图20)。

[0431] 如图21A和图21B所示,将微流体反应器用于本文所述的DNV合成。基于微流体反应器的DNV合成允许更改输入参数(诸如流速、摩尔比和流量比),并允许对关键DNV特性(例如大小、弹性和表面电荷)进行微调。

[0432] 如图21A所示,通过使用微流体反应器,总流量比(TFR)和流量比(FRR)可以经调节以微调DNV的大小。应注意,FRR与脂质体的大小成反比。

[0433] 图22示出了传统脂质体与DNV之间的某些组成差异,而图10A示出了经由DLS的DNV和常规脂质体的物理特性差异,并且图10B示出了DNV和常规脂质体的回收后大小和包封效

率。

[0434] 如上所述,决定制备用转铁蛋白功能化的DNV。转铁蛋白是一种血清糖蛋白(约80KDa),其与在脑、微血管内皮细胞(BMVEC)和脑神经胶质瘤细胞中高度表达的转运受体(TR)结合。转运可通过受体介导的内吞作用而跨越血脑屏障(参见例如,图15),并且含Tf的纳米粒子已用于将siRNA递送至癌症患者,并显示为以剂量依赖性方式将功能性siRNA递送至黑素瘤肿瘤。然而,必须适当调节亲和力,以允许来自血液的受体结合,跨BBB的转胞吞作用,并从受体释放到脑实质中。进行实验以确定转铁蛋白功能化的DNV是否可以改善治疗剂(例如,高良姜精)到脑的递送。

[0435] 为了制备转铁蛋白功能化的DNV,使用碳二亚胺化学法将DDPE与全转铁蛋白缀合(参见例如,图11中的反应方案)。使用微流体反应器来合成功能化的DNV(参见例如,图23)。使用透析去除多余的NHS、EDC和未缀合的DDPE。纯化后,将DDPE-T缀合物冻干,并储存在-20℃下,直到需要进行T-DNV合成。Tt在-20℃下保持稳定达几个月。

[0436] DNV、含有高良姜精的DNV、转铁蛋白功能化的DNV和转铁蛋白功能化的DNV的图像如图24所示。

[0437] 将DDPE-T缀合物在纯化和冻干后通过MALDI-TOF表征(参见例如,图13A),并且SDS-PAGE显示DDPE-T和转铁蛋白的迁移相似(图13B)。DNV的示意图如图13C所示。

[0438] 使用CACO-2细胞模型,使用GAL-DNV和GAL-T-DNV的细胞渗透性,所述CACO-2细胞模型模拟血脑屏障(参见例如,图25)。

[0439] 在21天的培养时段后,评估DNV穿过CaCO-2细胞模型的转运。测试制品的浓度为100μM,细胞接种密度为 2.5×10^5 ,并且TEER>350 Ω cm²。分析表明,在该模型中Gal-DNV和Gal-T-DNV具有相似的渗透性(参见例如,图26)。

[0440] 实施例12

[0441] 使用sAPPα-DNV的CNS递送

[0442] sAPPα是678个氨基酸的大蛋白质。如本文所述产生含有sAPPα的DNV(sAPPαDNV)。表4说明了sAPPα-DNV的表征。

[0443] 表4. sAPPα-DNV的表征。

[0444]	样品	平均 Z 平均值 (d.nm)	[] μM	封装效率
	sAPPα-DNV	165	3.1	43

[0445] 在CHO-7W细胞中测试sAPPα-DNV。使用αLISA检测试剂盒从培养基中测定sAPPβ和Aβ1-42。观察到sAPPβ和Aβ1-42的减少(参见例如,图27),表明DNV中所含的sAPPα在DNV合成后起作用并表现出靶标接合。

[0446] 向野生型小鼠静脉内给药20μg的sAPPα-DNV,并在1h和24h后安乐死,向脑灌注生理盐水,匀浆化并使用αLISA检测试剂盒评定脑匀浆中的sAPPα水平。1h后在脑匀浆中检测sAPPα(参见例如,图28)。

[0447] 向野生型小鼠皮下(Sub Q)或腹膜内(IP)给药20μg的sAPPα-DNV。给药1h和4h后,对小鼠实施安乐死,向脑灌注生理盐水,匀浆化,并使用αLISA检测试剂盒评定脑匀浆中的sAPPα水平。1h后在脑匀浆中检测sAPPα。结果表明,通过Sub Q途径可以在1h时检测到1.8nM的sAPPα并在4h时检测到1.85nM的sAPPα。通过IP途径,我们可以分别在1h和4h时检测到

1.7nM和1.8nM的sAPP α (参见例如,图29)。相比之下,通过IV途径可以在脑中检测到约12nM的sAPP α 。

[0448] 向E4FAD小鼠静脉内给药20 μ g的sAPP α -DNV或20 μ g的sAPP α 和空DNV (对照)。1h后对小鼠实施安乐死,向脑灌注生理盐水,匀浆化,并使用 α LISA检测试剂盒评定脑匀浆中sAPP α 和sAPP β 的水平。观察到sAPP β 减少的趋势(P为约0.0731) (参见例如,图30)。sAPP α 本身或媒介物均未引起sAPP β 水平降低。

[0449] 如上所述,在某些实施方案中,本文所述的可变形的纳米级囊泡 (DNV) 包含<200nm的脂质体,所述脂质体能够在保持其中的有效负载的同时变形。在各种实施方案中,它们由GRAS (通常被认为是安全的) 材料组成,并且能够封装各种分子,包括亲脂性和亲水性的小分子、DNA/RNA/siRNA和肽/蛋白质/适体,以及其组合。DNV的表面可以容易地修饰为包括不同的表面电荷、分子如PEG以延长循环半衰期,并且包括载体蛋白以用于靶向药物递送。DNV可以很容易地在微流体反应器中合成,这使我们能够控制它们的大小、 ζ 电位,并实现可扩展性和批次间可再现性。我们合成的DNV可以很容易地作为冻干粉储存,并且我们已经确定这种形式在储存中稳定至少六个月。

[0450] 如上所示,我们已经证明了使用大的神经营养因子可溶性淀粉样前体蛋白- α (sAPP α ,一种678个氨基酸的蛋白质) 的概念验证,并已显示,使用DNV-sAPP α ,实现了将约12nM的药理学相关剂量的sAPP α 递送至脑,从而导致靶标接合。

[0451] 因此,证明了DNV平台可以将大分子递送到CNS,尽管将认识到DNV可以经优化以递送特定部分。

[0452] 很难将药物递送到中枢神经系统 (CNS),特别是对于大生物分子而言。对于用于治疗阿尔茨海默氏病 (AD) 和其他神经退行性病症的抗体的递送尤其如此。抗脑肿瘤疗法也面临类似的障碍。因此,在某些实施方案中,本文所述的DNV平台可用于广泛应用于神经退行性病症的大生物分子的CNS递送,所述神经退行性病症为诸如AD、帕金森氏病 (PD)、肌萎缩侧索硬化症 (ALS)、创伤性脑损伤 (TBI)、中风、术后认知功能障碍 (POCD),以及脑肿瘤的免疫治疗。

[0453] 因此,在某些实施方案中,据信本文所述的DNV适于递送抗体。可以使用如本文所述的微流体反应器来封装抗体。Ab-DNV尤其可以通过静脉内注射 (i.v.) 和sub Q途径施用,以确定脑递送。在标记了抗体的情况下,可以通过脑匀浆和切片的荧光成像以及整个动物成像来确定脑中的抗体分布。

[0454] 可以使用本文所述的DNV递送至CNS的说明性抗体包括但不限于scFv、IgG、Fab、(Fab')₂,以及(scFv')₂。

[0455] 在某些实施方案中,本文所述的DNV中递送的抗体是被认为在神经退行性疾病 (例如,阿尔茨海默氏病 (AD)、肌萎缩侧索硬化症 (ALS)、脑瘫、痴呆/额颞叶痴呆 (FTD)、亨廷顿氏病、轻度认知障碍 (MCI)、帕金森氏病 (PD)、原发性侧索硬化症 (PLS)、局部缺血/中风、tau蛋白病、创伤性脑损伤 (TBI),慢性创伤性脑病变 (CTE等) 的治疗中具有功效的抗体。

[0456] 在某些实施方案中,抗体是与选定的与神经退行性病症相关的蛋白质 (例如 β -淀粉样蛋白 (A β)、 α -突触核蛋白 (α -syn)、tau、APP和TAR DNA结合蛋白43 (TDP-43),或其片段) 结合的抗体。在某些实施方案中,抗体与这些蛋白质的有毒寡聚体结合,但不与所述蛋白质的单体、原纤维或非疾病相关形式结合。

[0457] 说明性抗体包括但不限于与A β 或其片段和/或其前体结合的抗体。在某些实施方案中,抗体可以是选自由以下组成的组的抗体:巴匹珠单抗(人源化的3D6,Janssen/Pfizer)、索拉珠单抗(人源化的m266,Eli Lilly)、Gantenerumab(全人,Hoffmann-La Roche)、Crenezumab(人源化的IgG4,Genentech)、BAN2401(人源化的mAb158,Eisai Inc.)、GSK 933776(人源化的IgG1,GlaxoSmithKline)、AAB-003(Fc工程化的巴匹珠单抗,Janssen/Pfizer)、SAR228810(人源化的13C3,Sanofi)、BIIB037/BART(全人IgG1,Biogen Idec)。这些抗体的靶表位是本领域技术人员已知的,并且尤其在表中描述。

[0458] 表5. 与A β 结合的说明性抗体。

[0459]

化合物	表位	参考文献
巴匹珠单抗 (人源化的 3D6)	氨基末端	Salloway (2012) <i>Eur J Neurol.</i> 19: SC312; Sperling (2012) <i>Eur J Neurol.</i> 19: SC3012
索拉珠单抗 (人源化的 m266)	中央(氨基酸 16 至 24), 仅在可溶性淀粉样蛋白- β 上可及	Farlow 等人, (2012) <i>Alzheimers Dement.</i> 8: 261-271; Tayeb 等人, (2013) <i>Expert Opin. Biol. Ther.</i> 13: 1075-1084
Gantenerumab (全人)	淀粉样蛋白- β 的氨基末端和中央部分	Bohrmann 等人, (2012) <i>J. Alzheimers Dis.</i> 28: 49-69; Ostrowitzki 等人, (2012) <i>Arch. Neurol.</i> 69: 198-207
Crenezumab (人源化的 IgG4)	构象表位, 包括寡聚形式和原纤维形式	Adolfsson 等人, (2012) <i>J. Neurosci.</i> 32: 9677-9689; Garber (2012) <i>Nat. Biotechnol.</i> 30: 731-732
BAN2401 (人源化的 mAb158)	结合大型淀粉样蛋白- β 原纤维 (>100 kDa)	Moreth 等人, (2013) <i>Immun. Ageing.</i> 10: 18-10; Randomized, Double-blind, Placebo-controlled, Combined Single Ascending Dose and Multiple Ascending Dose Study (www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01230853?term=ban2401&rank=2)

[0460]

GSK 933776 (人源化的IgG1)	氨基末端	Moreth 等人, (2013) <i>Immun. Ageing</i> . 10: 18-10; A Clinical Study to Assess Single and Repeat Doses of a New Medication (GSK933776) in Patients With Alzheimer's Disease (www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00459550?term=GSK933776&rank=2)
AAB-003 (Fc 工程化的巴匹珠单抗)	氨基末端	Moreth 等人, (2013) <i>Immun. Ageing</i> . 10: 18-10; Study Evaluating The Safety Of AAB-003 (PF-05236812) In Subjects With Alzheimer's Disease (www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01193608?term=aab003&rank=1)
SAR228810 (人源化的13C3)	原纤维, 以及低分子量淀粉样蛋白- β	Moreth 等人, (2013) <i>Immun. Ageing</i> . 10: 18-10; Single and Repeated Dosing Study to Assess the Safety and the Concentration-time Profile of SAR228810 in Alzheimer's Patients (www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01485302?term=SAR228810&rank=1)
BIIB037/BART (全人 IgG1)	不溶性原纤维人淀粉样蛋白- β	Moreth 等人, (2013) <i>Immun. Ageing</i> . 10: 18-10; Single Ascending Dose Study of BIIB037 in Subjects With Alzheimer's Disease (www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01397539?term=BIIB037&rank=2)

[0461] 在某些实施方案中, 纳米级药物递送媒介物含有抑制性RNA (例如, miRNA) 和/或适体。在某些实施方案中, 适体是与选自由以下组成的组的蛋白质结合的DNA或蛋白质适体: β -淀粉样蛋白 ($A\beta$)、 α -突触核蛋白 (α -syn)、tau、APP, 以及TAR DNA结合蛋白43 (TDP-43), 或其片段。在某些实施方案中, 抑制性RNA抑制选自由以下组成的组的蛋白质的表达: β -淀粉样蛋白 ($A\beta$)、 α -突触核蛋白 (α -syn)、tau、APP, 以及TAR DNA结合蛋白43 (TDP-43), 或其片段。

[0462] 前述抗体、适体和抑制性RNA是说明性而非限制性的。使用本文提供的教导, DNV可以容易地用于递送许多不同的部分, 所述许多不同的部分包括但不限于抗体、蛋白质、核酸等。

[0463] 实施例13

[0464] 穿过口腔粘膜的经皮递送

[0465] 图31示出了使用本文所述的DNV来进行经皮药物递送。如图31, 小图A所示, 可变形的纳米级囊泡 (DNV) 经设计为具有表面活性剂的脂质外层, 以为柔性的并改变形态以穿过上皮细胞之间, 同时在DNV中携带有效负载。到达下层结缔组织后, DNV释放有效负载以进行局部治疗。C AF647-20L DNV。表皮由高度角化的外层和增殖且分化的角化细胞层组成 (图31, 小图B)。DNV可以穿过上皮紧密连接, 并允许药物递送到真皮。图31, 图C) 显示了用DNV和

不可变形的常规脂质体 (nDNV) 配制的荧光标记的双膦酸盐药物唑来膦酸盐 (AF647-20L)。共聚焦激光扫描显微镜展示了 DNV 和 nDNV 中的 AF647 信号。将冻干的 AF647-20L DNV 粉末重悬于医用级盐水溶液中, 并施加在小鼠颅顶皮肤上 (图 31, 小图 D)。我们已经证明 DNV 可以穿透小鼠皮肤的角化表皮。将 AF647-20L 施加于 DNV、nDNV 或水溶液后三天时, 收获小鼠颅顶试样并测量 AF647-20L 荧光信号。DNV 穿过皮肤组织将 AF647-20L 递送至下层颅顶骨 (图 31, 小图 E)。

[0466] 图 32 示出了通过经口腔粘膜药物递送进行的口内施用。这项研究经设计以评定 DNV 穿透小鼠上颌口腔粘膜并释放 AF647-20L 有效负载的功效, 所述 AF647-20L 有效负载随后在上颌骨上被吸收。

[0467] 将冻干的 AF647-20L DNV 粉末重悬于纯水 (MQW) 或聚乙二醇 (PEG) 溶液中。对于麻醉的小鼠, 仅将 AF647-20L DNV 溶液滴在腭粘膜组织上, 并用定制的护口器覆盖 1 小时 (图 32, 小图 A)。AF647-20L DNV 施加后三天时, 收获小鼠上颌骨, 并测量附着至腭骨表面的 AF647-20L。这项研究表明, 在 MQW 中重悬的 DNV 配方中的 AF647-20L 实现了用于经口腔粘膜的药物递送的显著功效 (参见图 32, 小图 B)

[0468] 应当理解, 本文描述的实例和实施方案仅用于说明性目的, 并且将向本领域技术人员建议根据本文描述的实例和实施方案的各种修改或改变, 并且所述各种修改或改变包括在本申请的精神和范围以及所附权利要求的范围内。本文引用的所有出版物、专利和专利申请出于所有目的以引用方式整体并入本文。

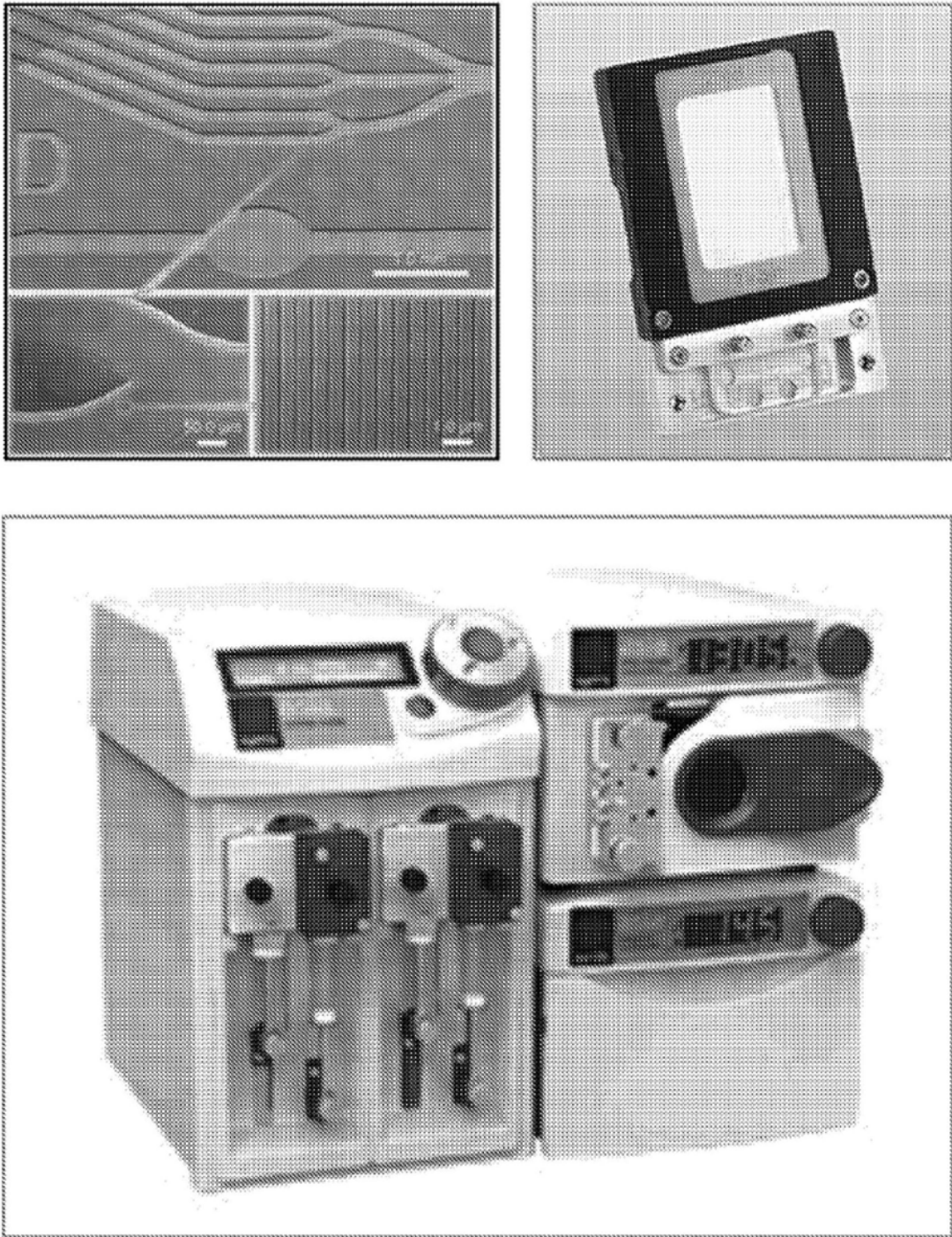


图1A

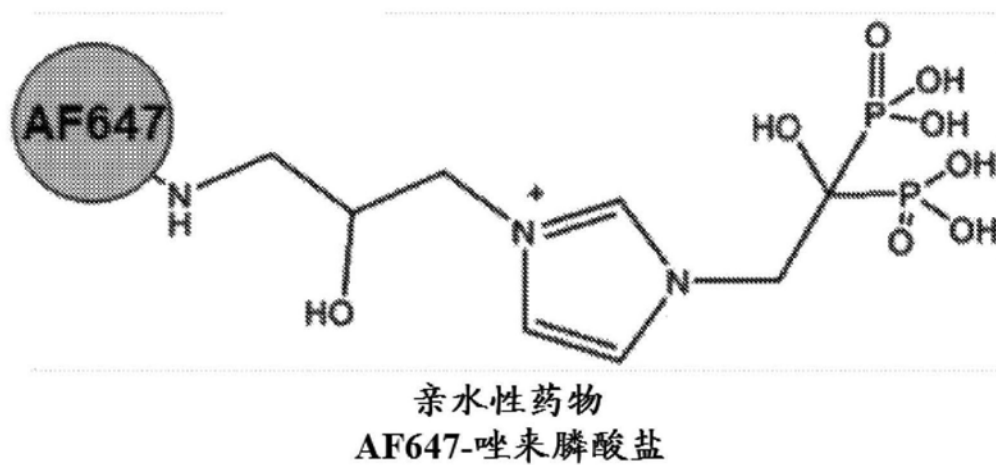
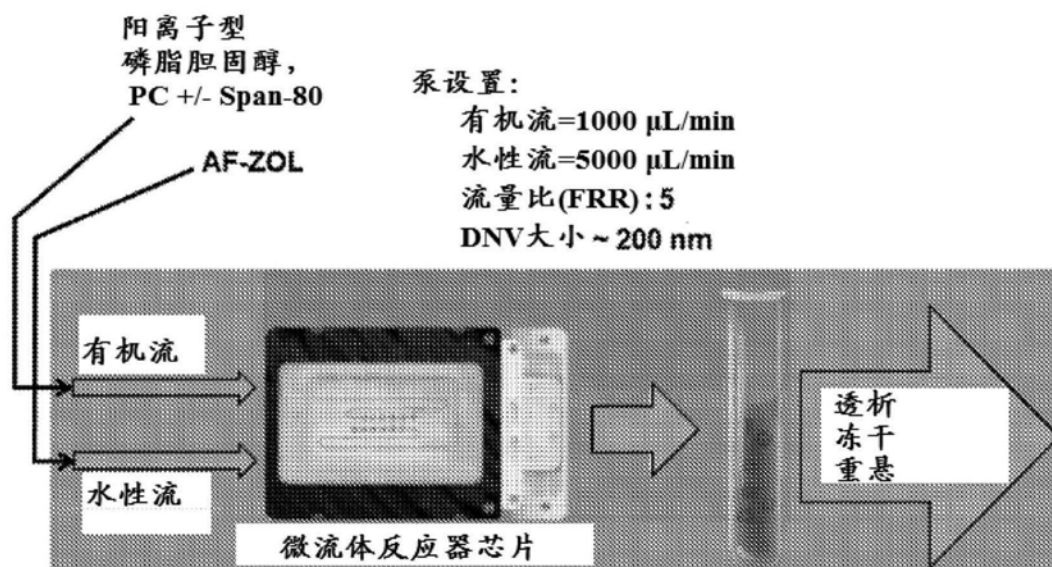


图1B

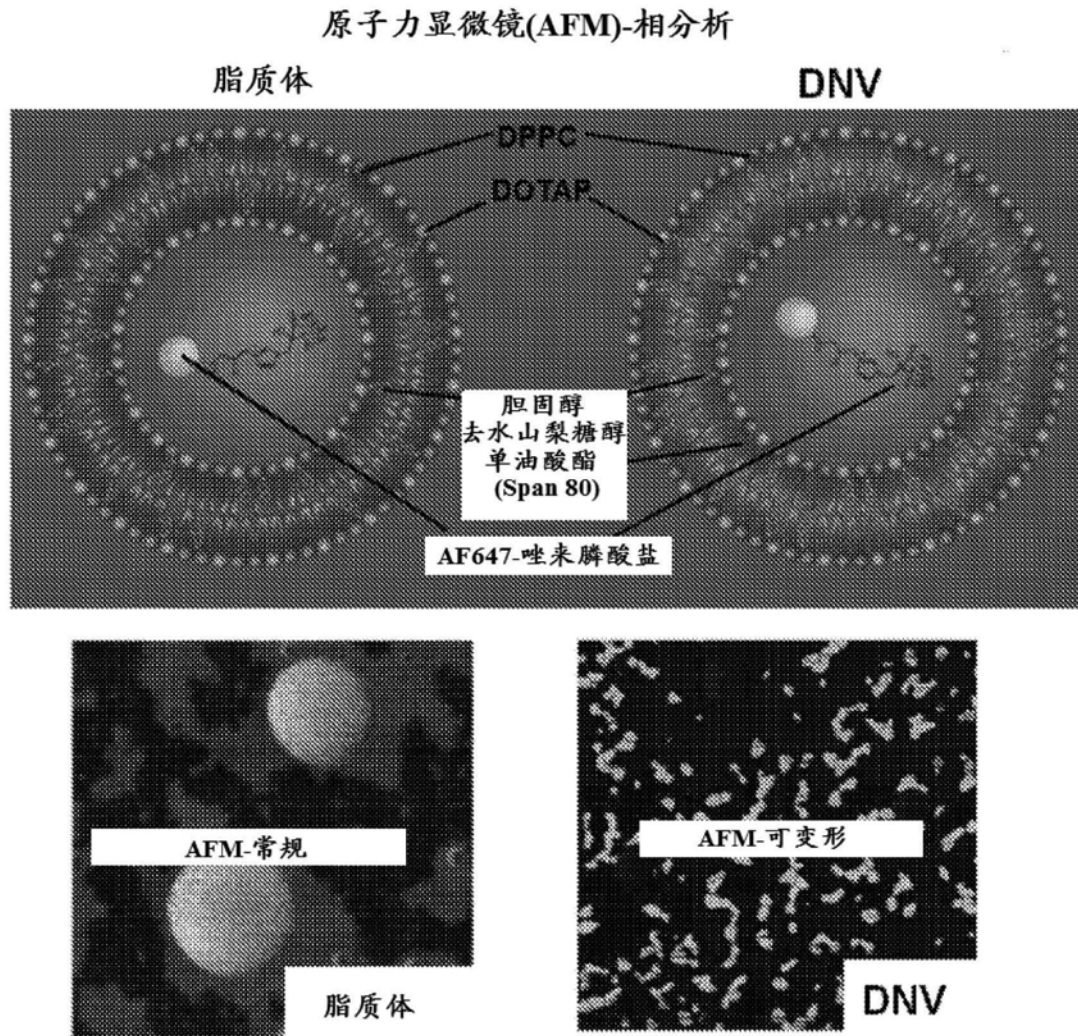
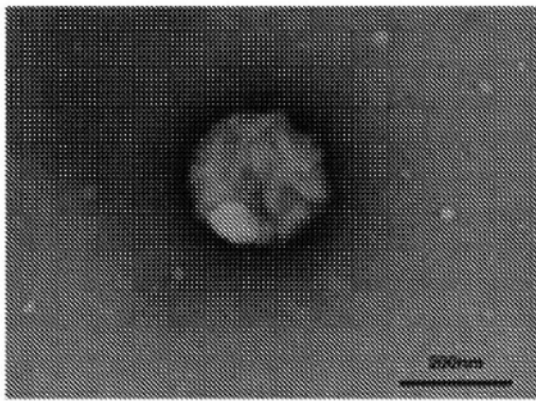
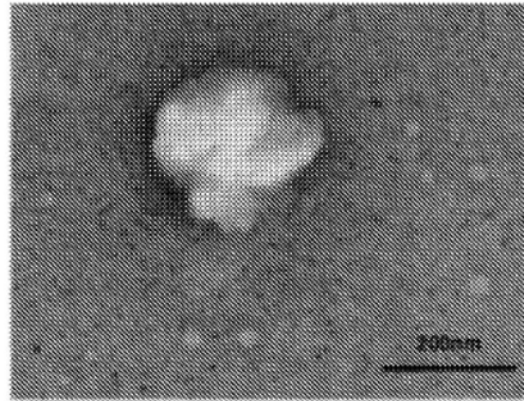


图2



负载有AF-ZOL的脂质体



负载有AF-ZOL的DNV

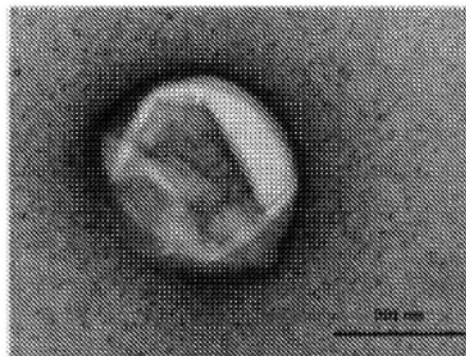
在储存数周后重悬的
冻干AF-ZOL DNV

图3A

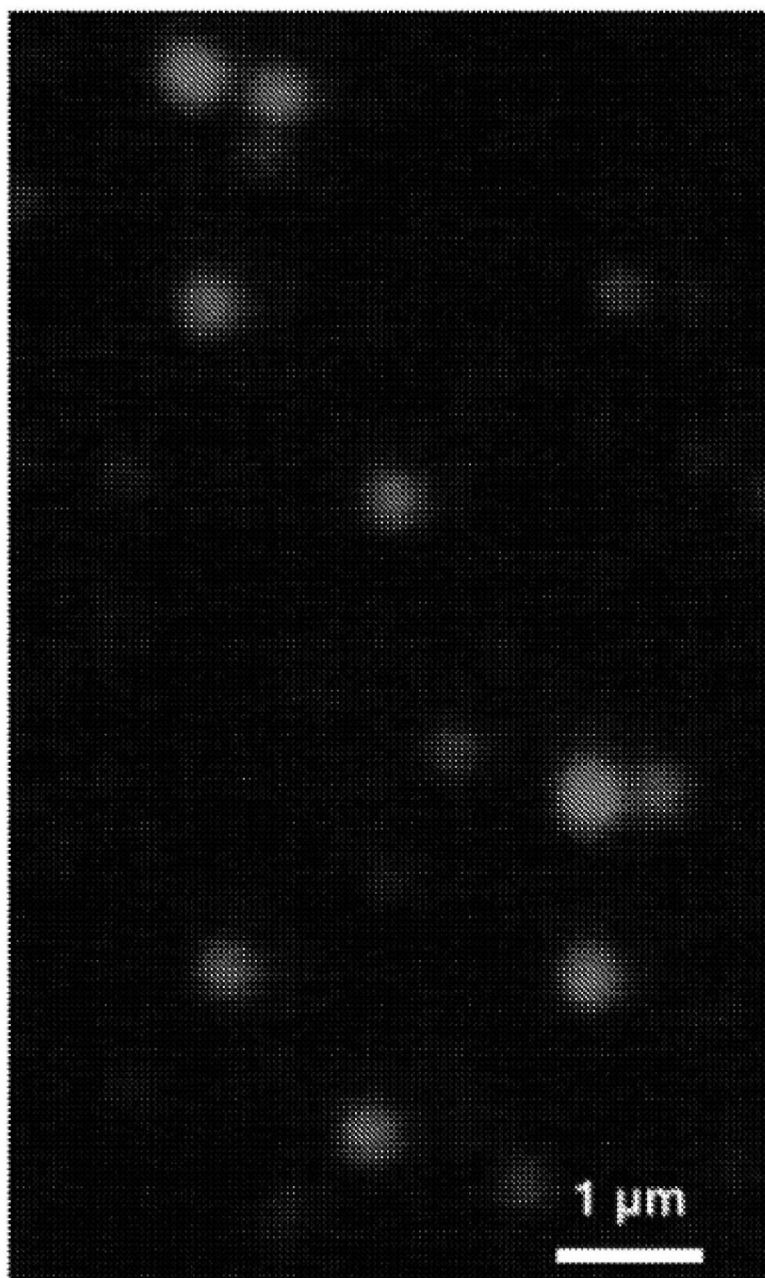


图3B

	大小(d.nm):	强度%:	标准偏差(d.nm):
Z平均值(d.nm): 231.0	峰1: 245.7	100.0	61.86
Pdi: 0.056	峰2: 0.000	0.0	0.000
截距: 0.943	峰3: 0.000	0.0	0.000
结果质量: 好			

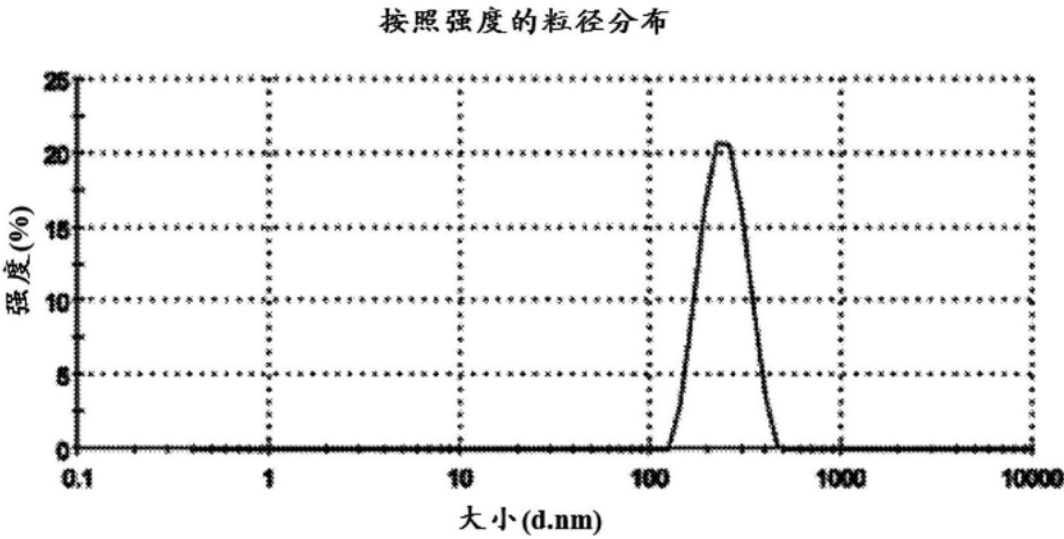


图4



图5A

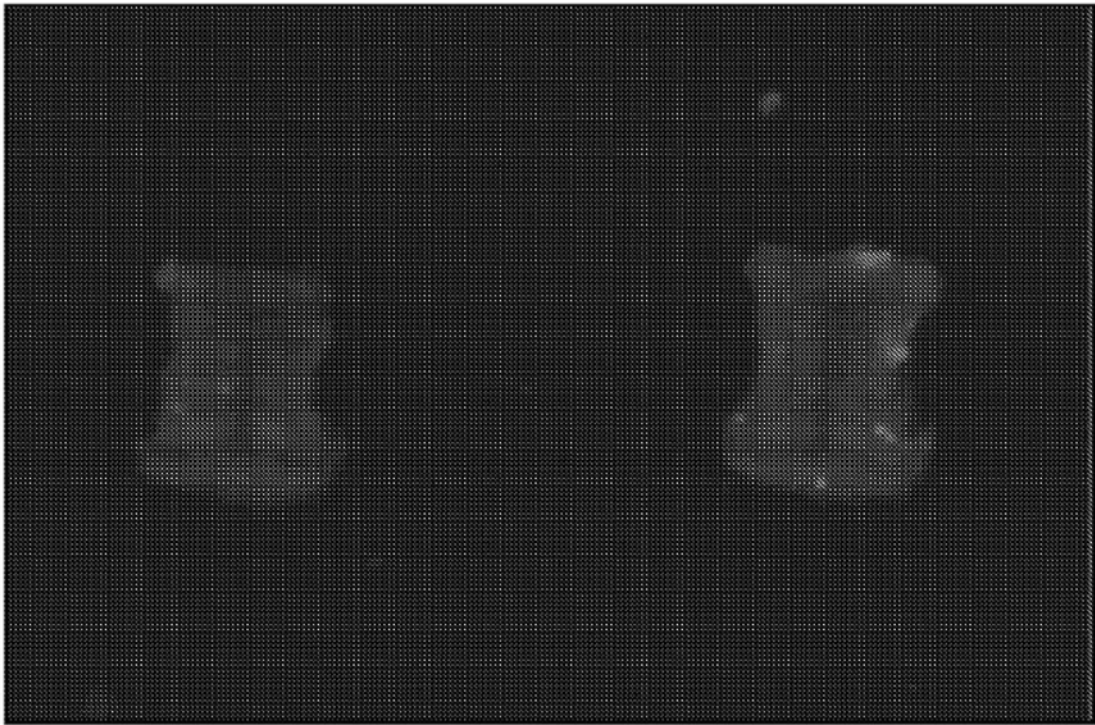


图5B

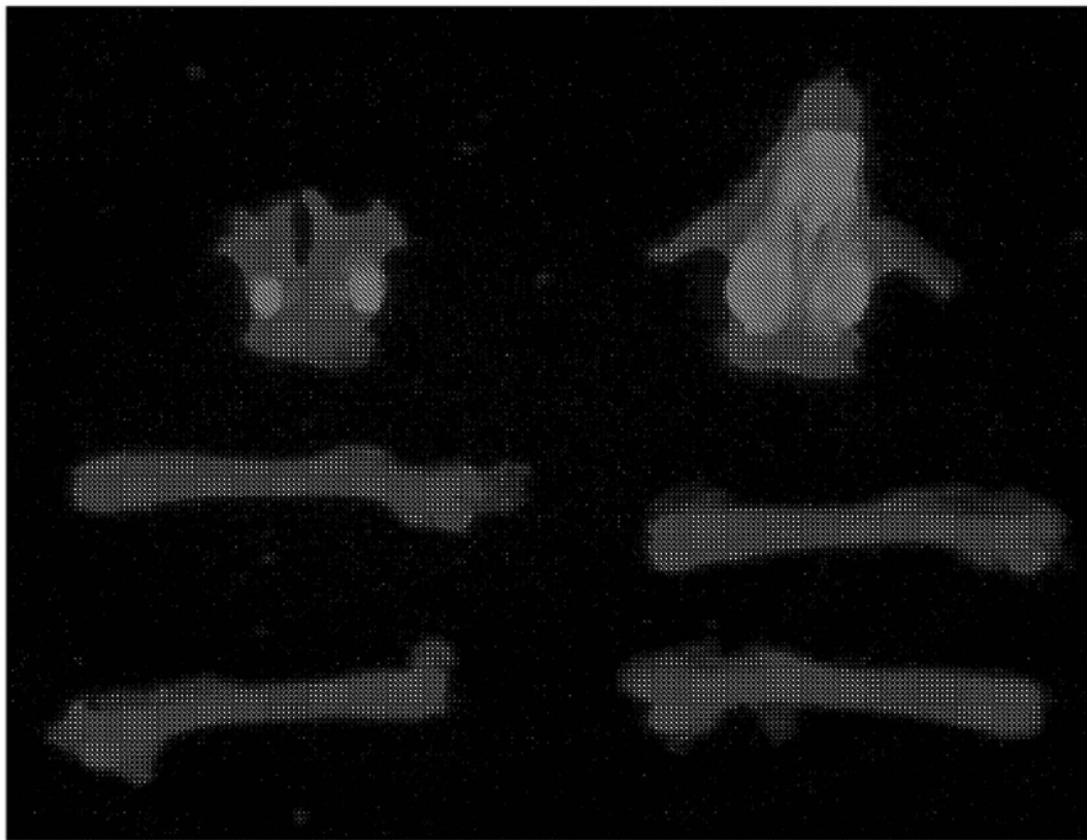


图5C

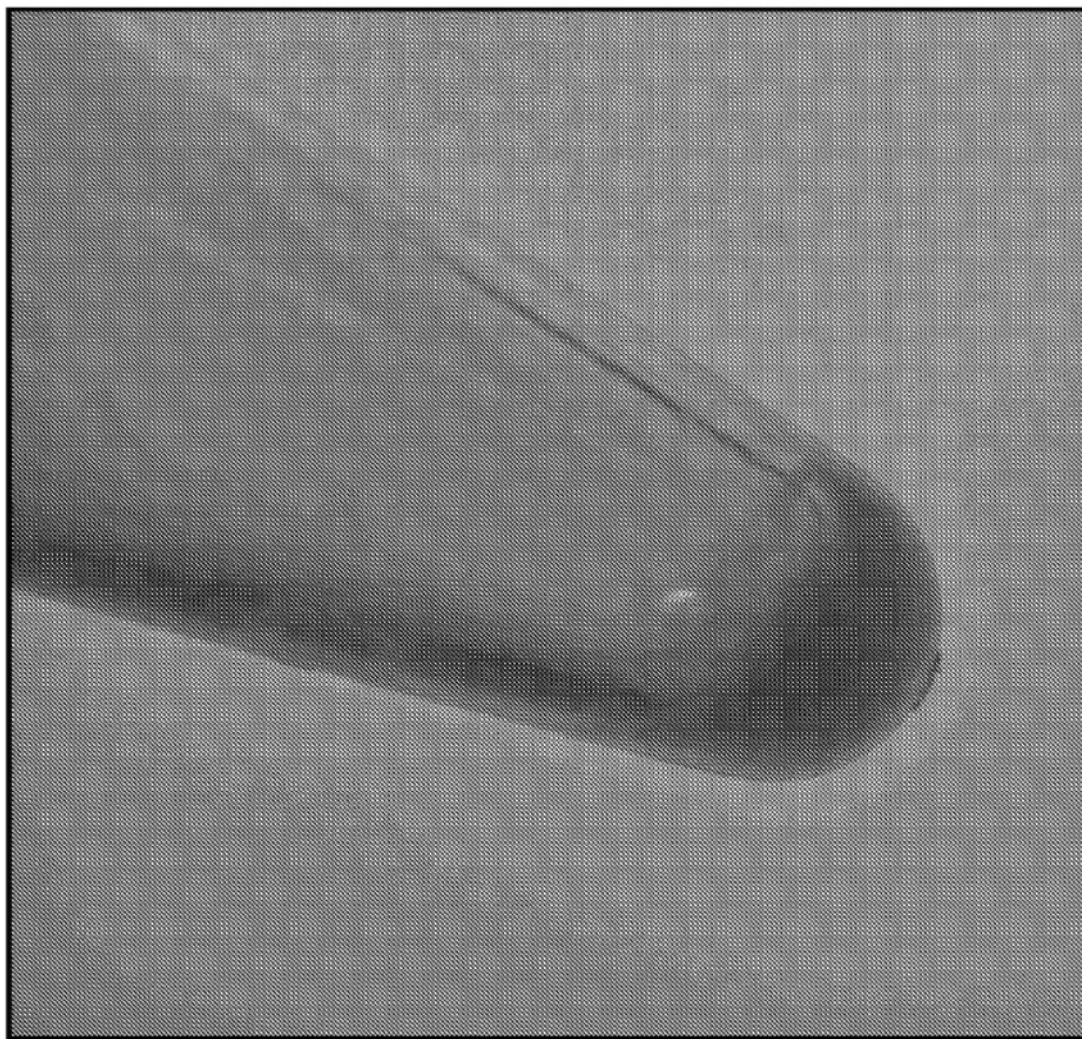


图6

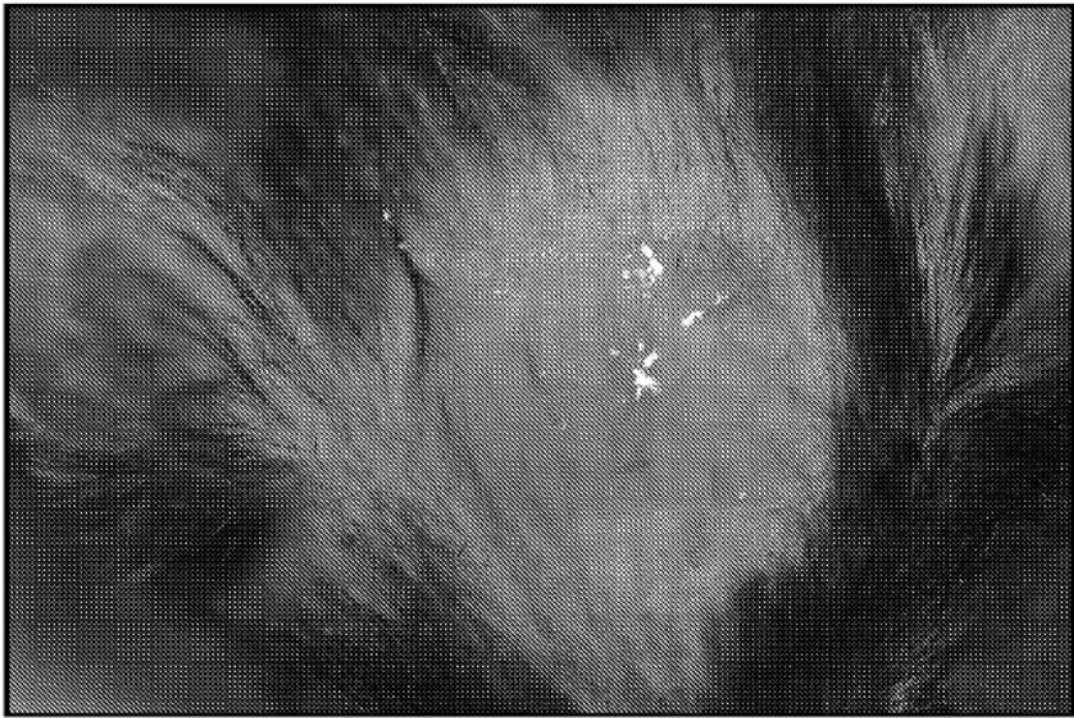


图7A

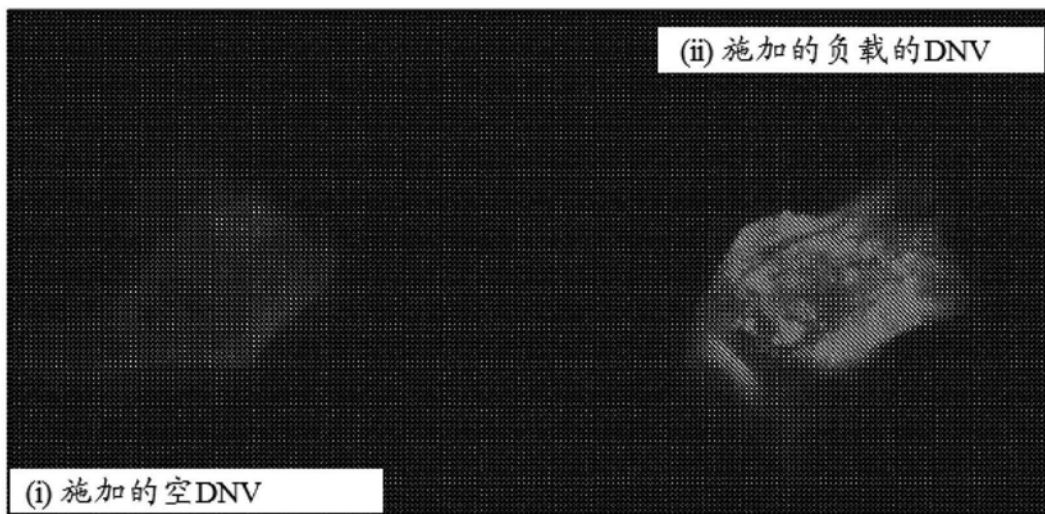


图7B

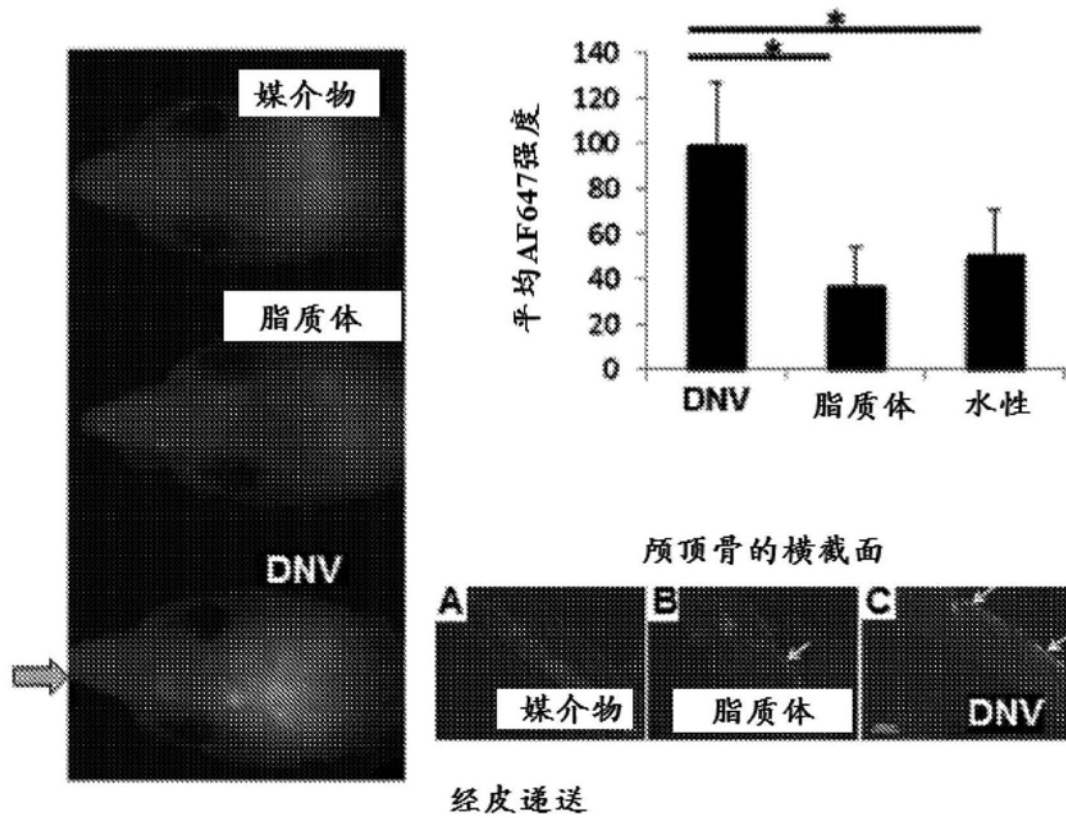


图8

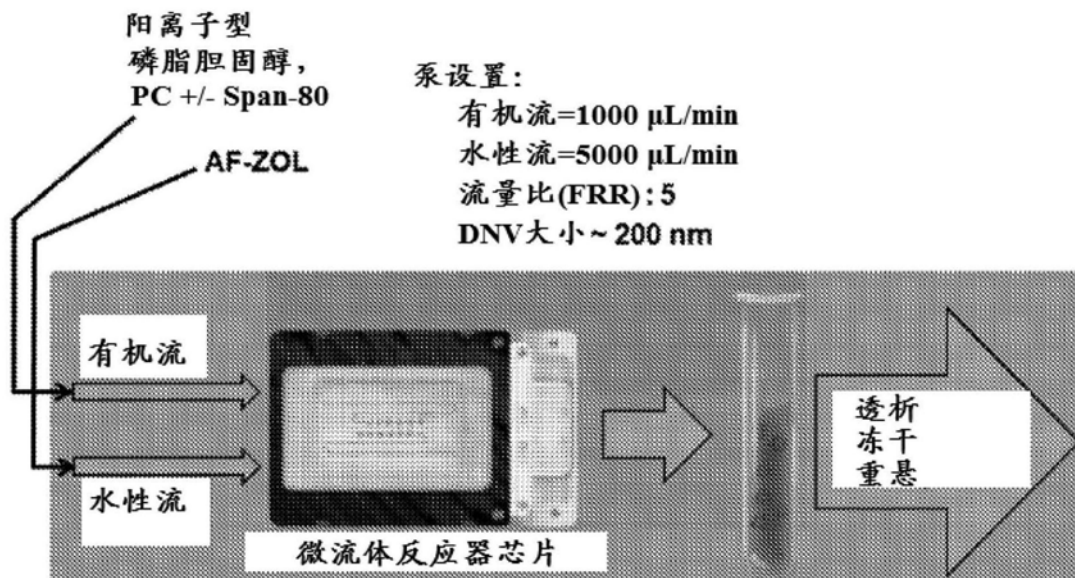


图9A

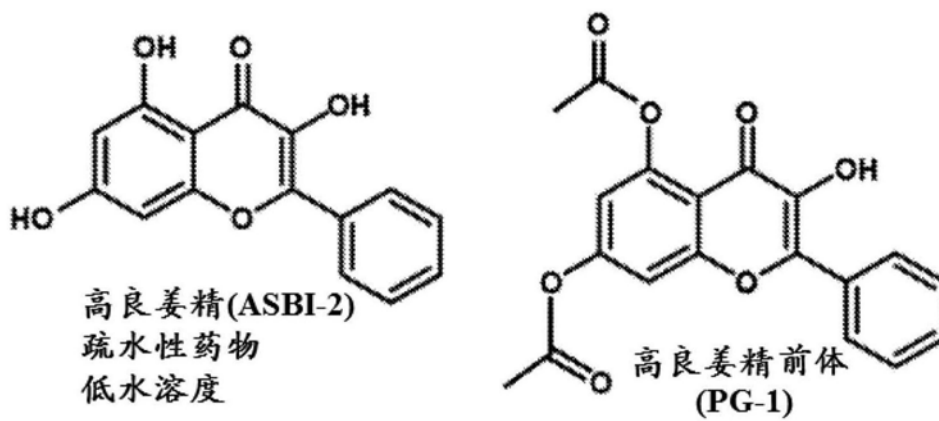
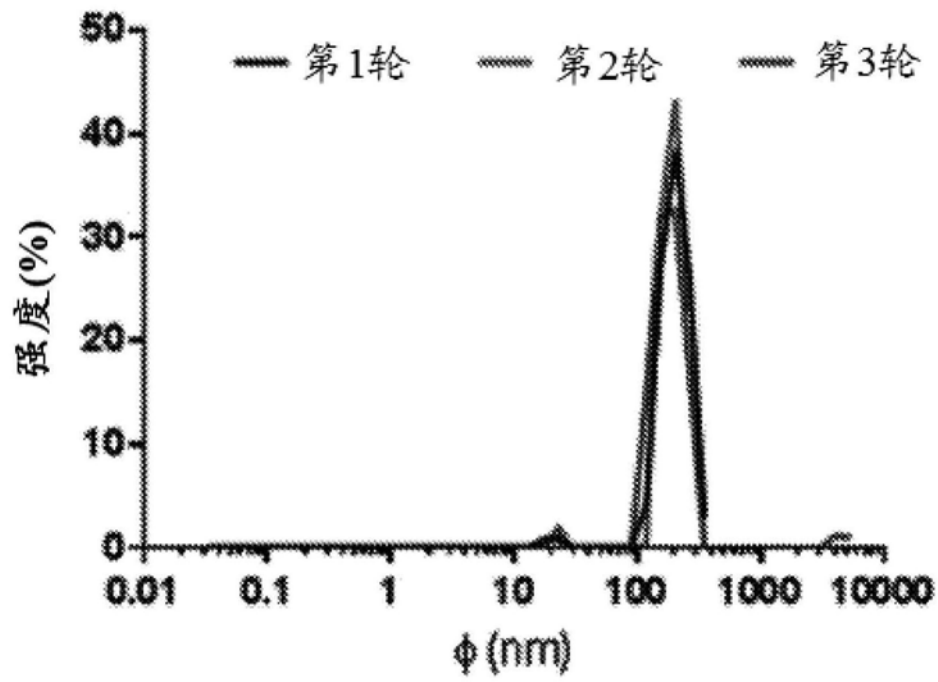


图9B

动态光散射(DLS)

脂质体



DNV

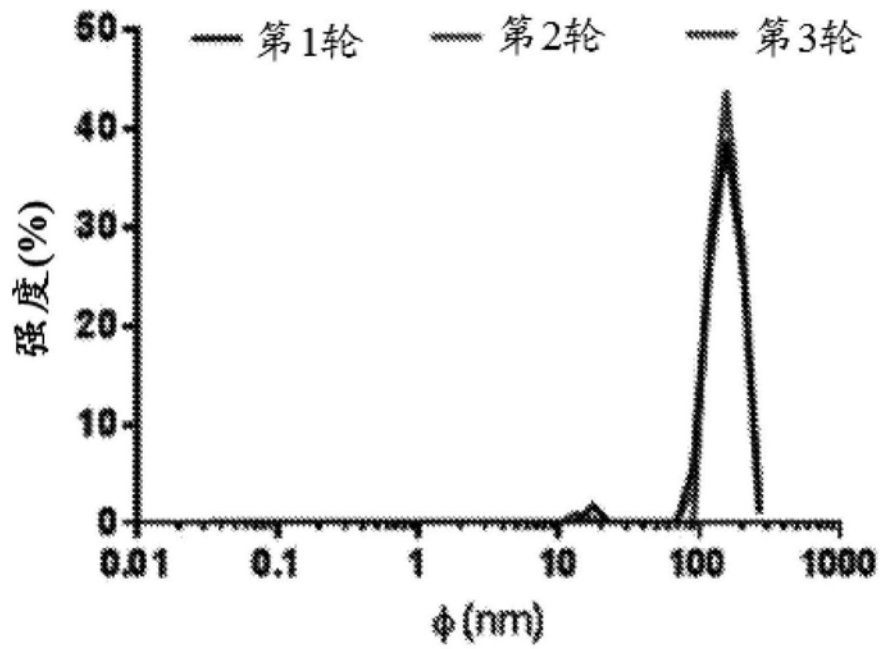


图10A

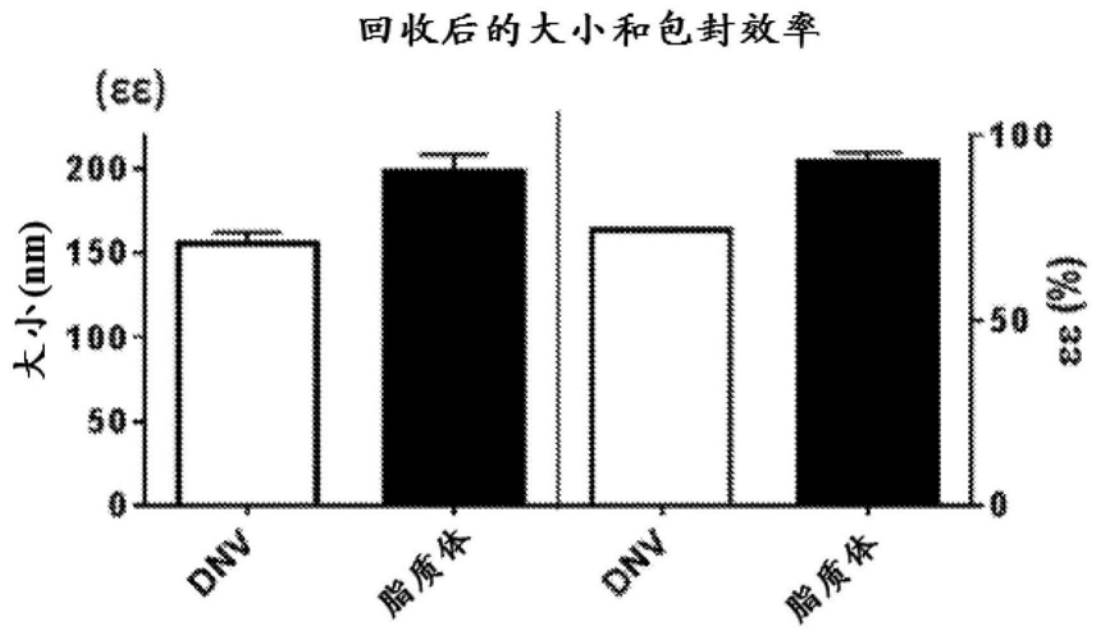


图10B

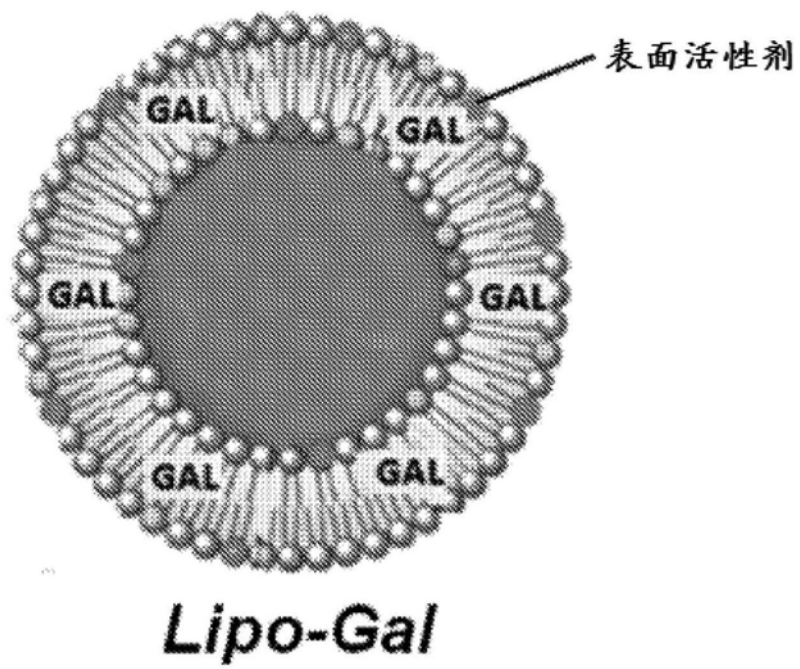


图10C

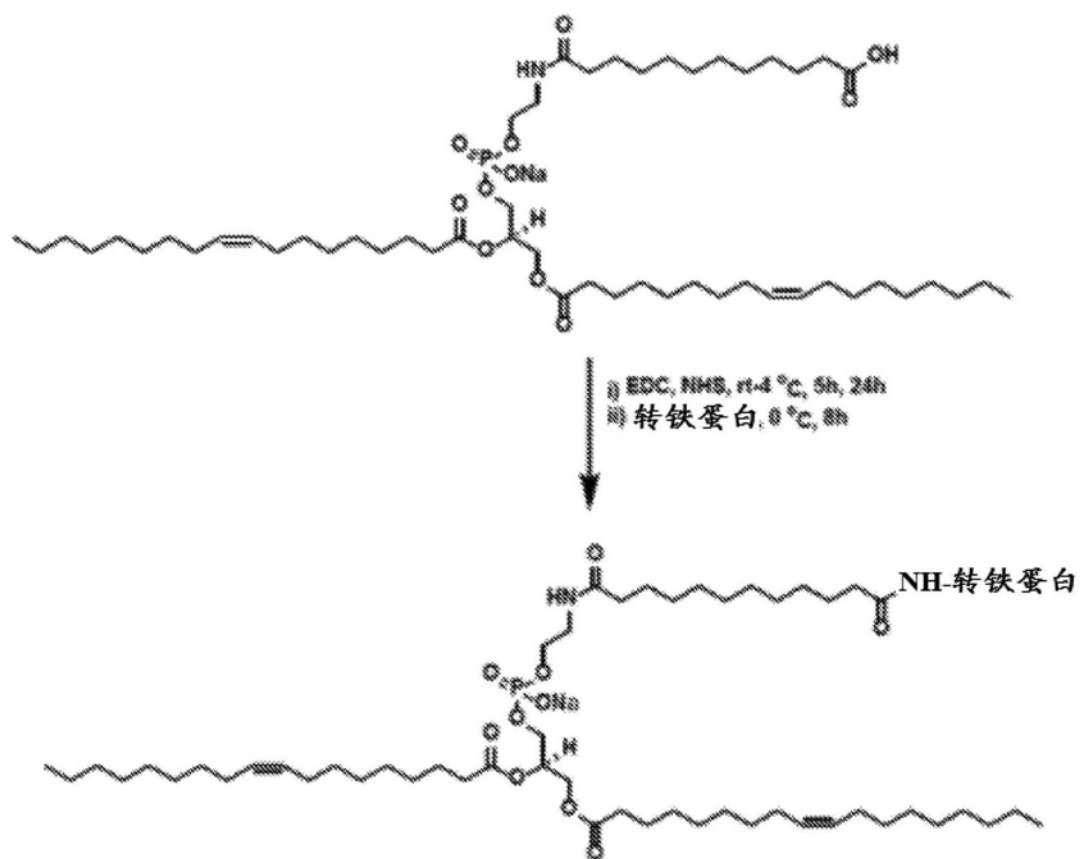


图11A

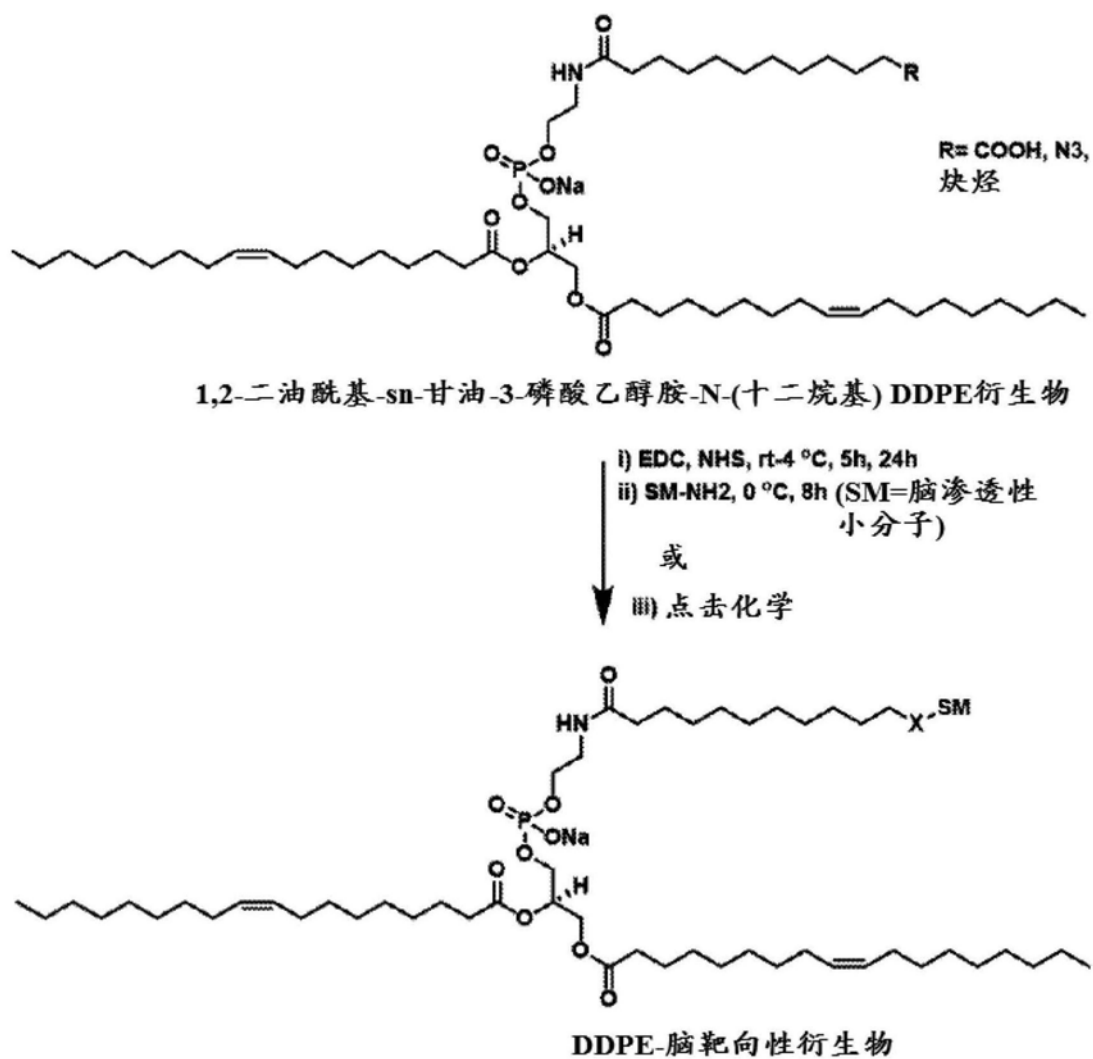


图11B

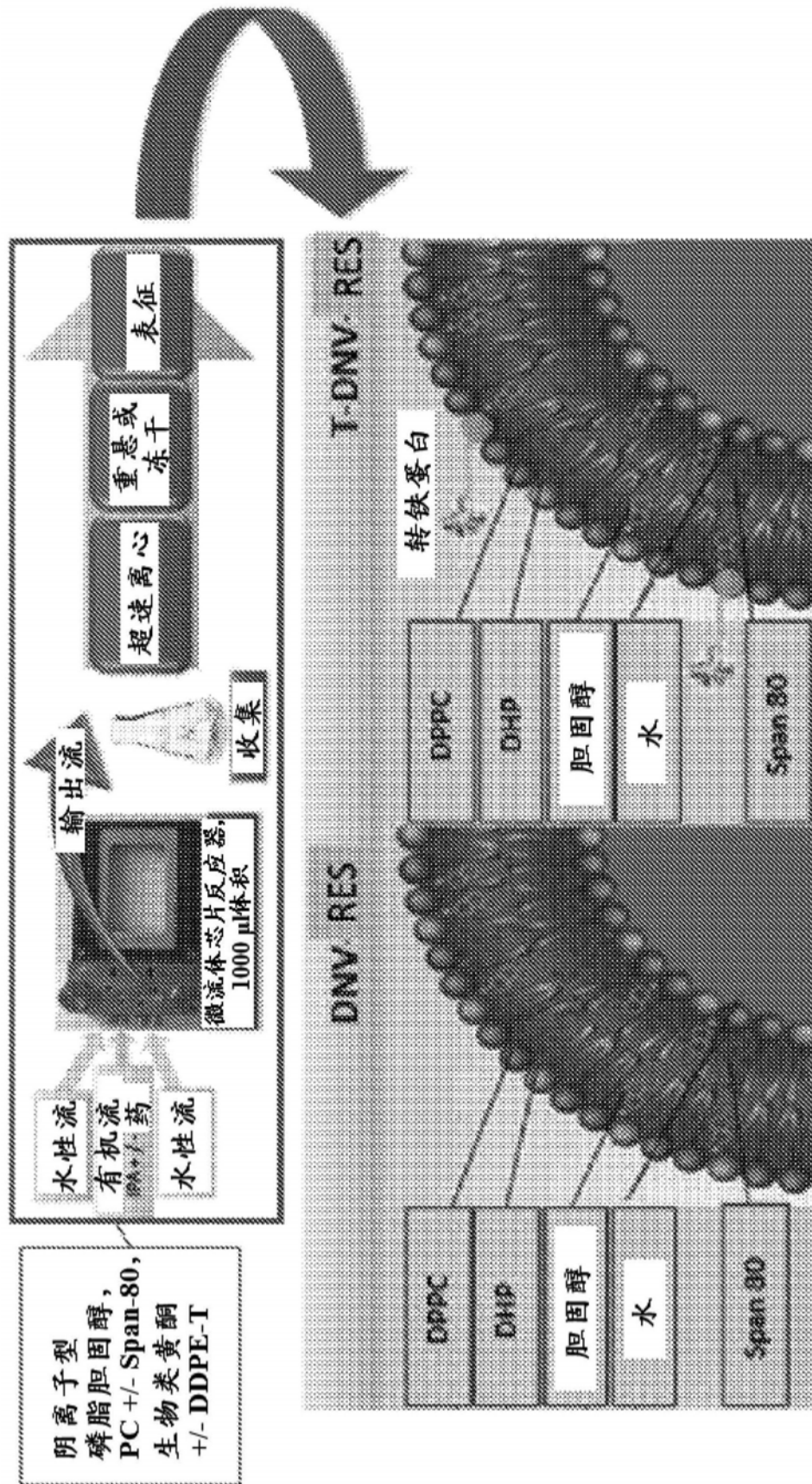


图12

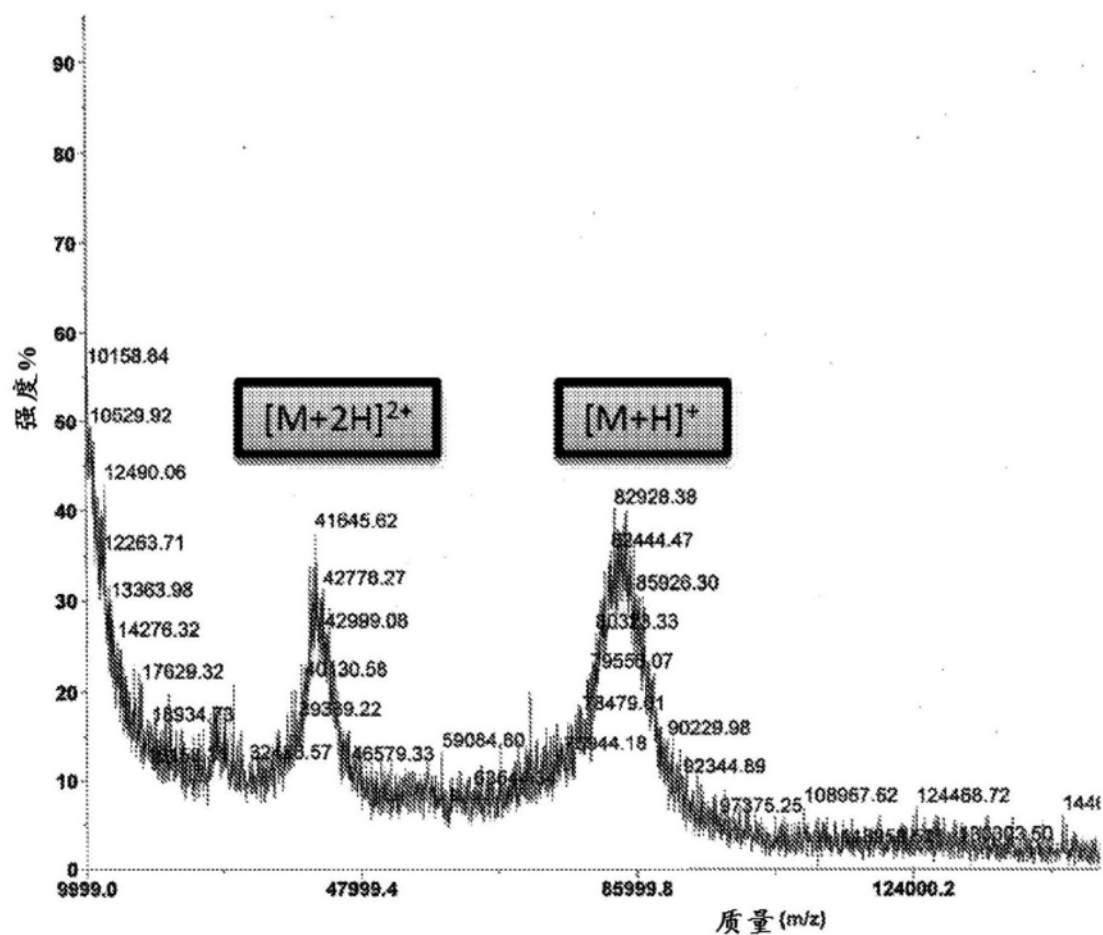


图13A

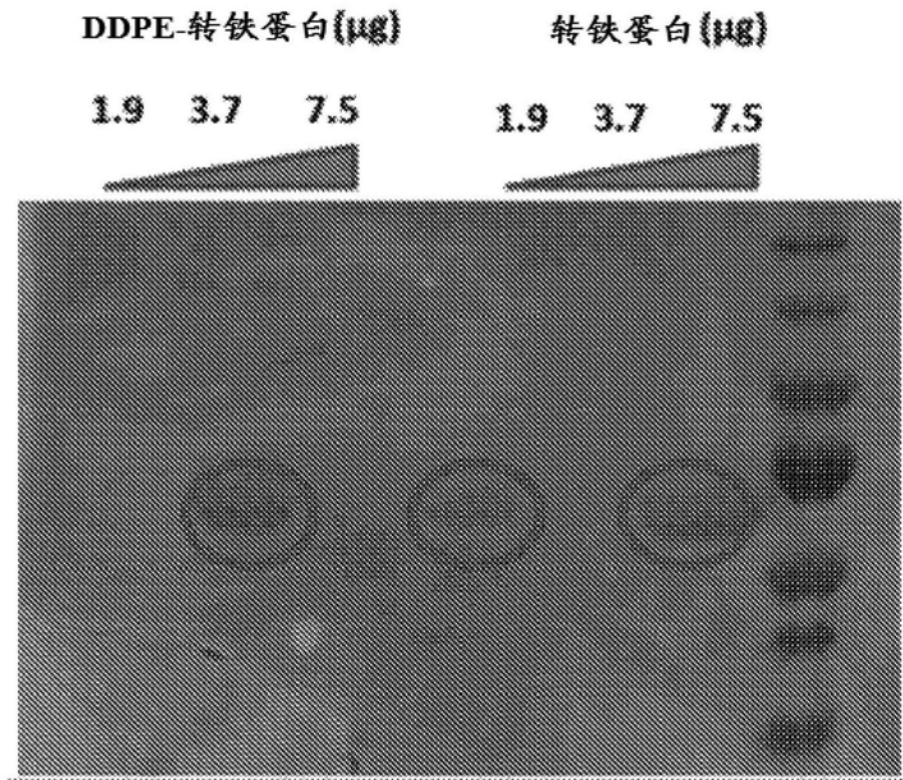


图13B

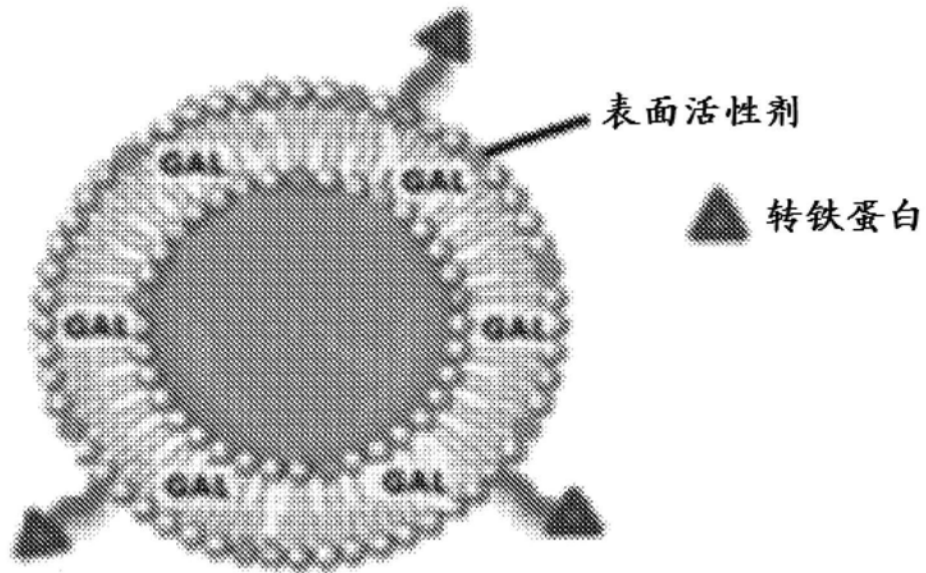


图13C

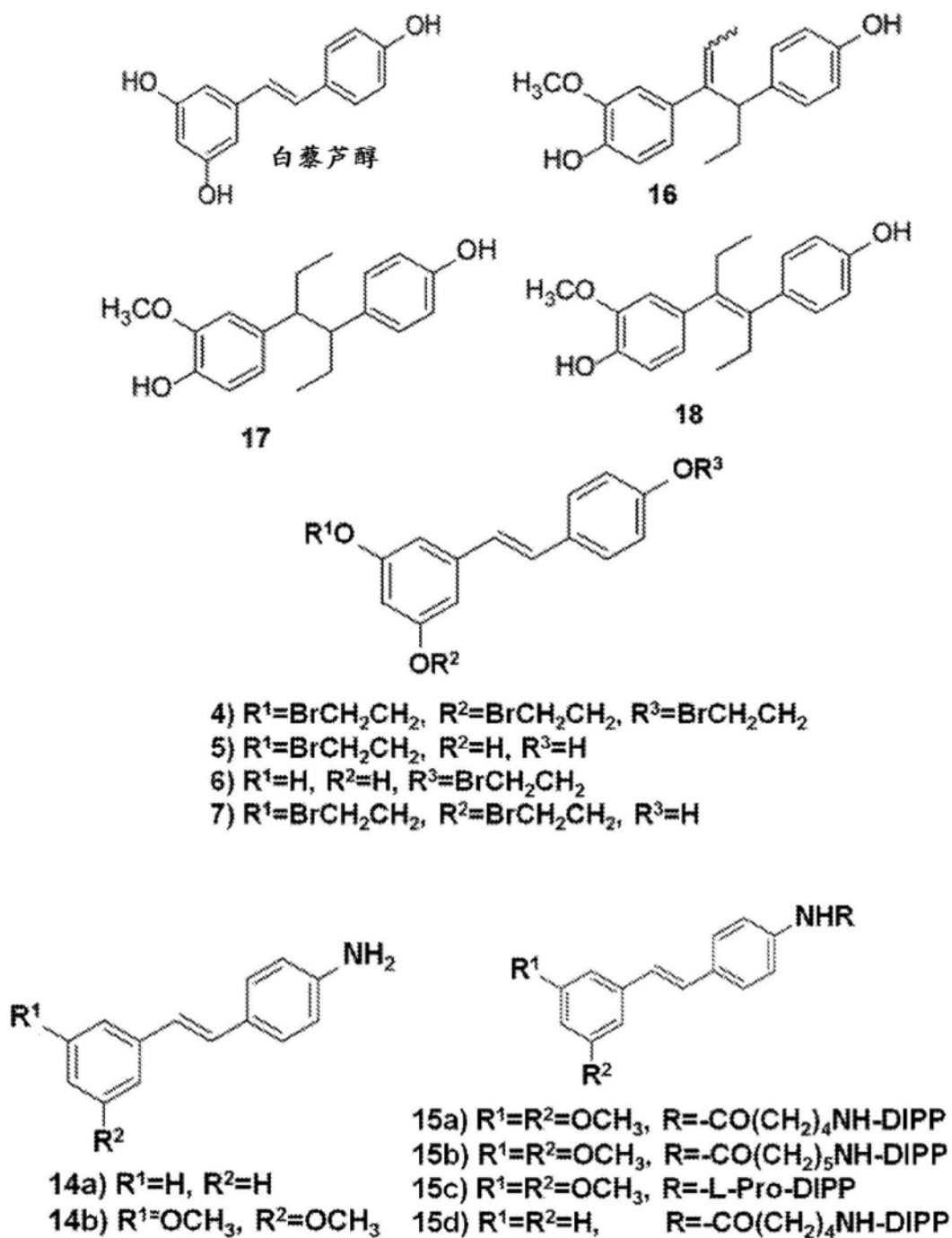


图14

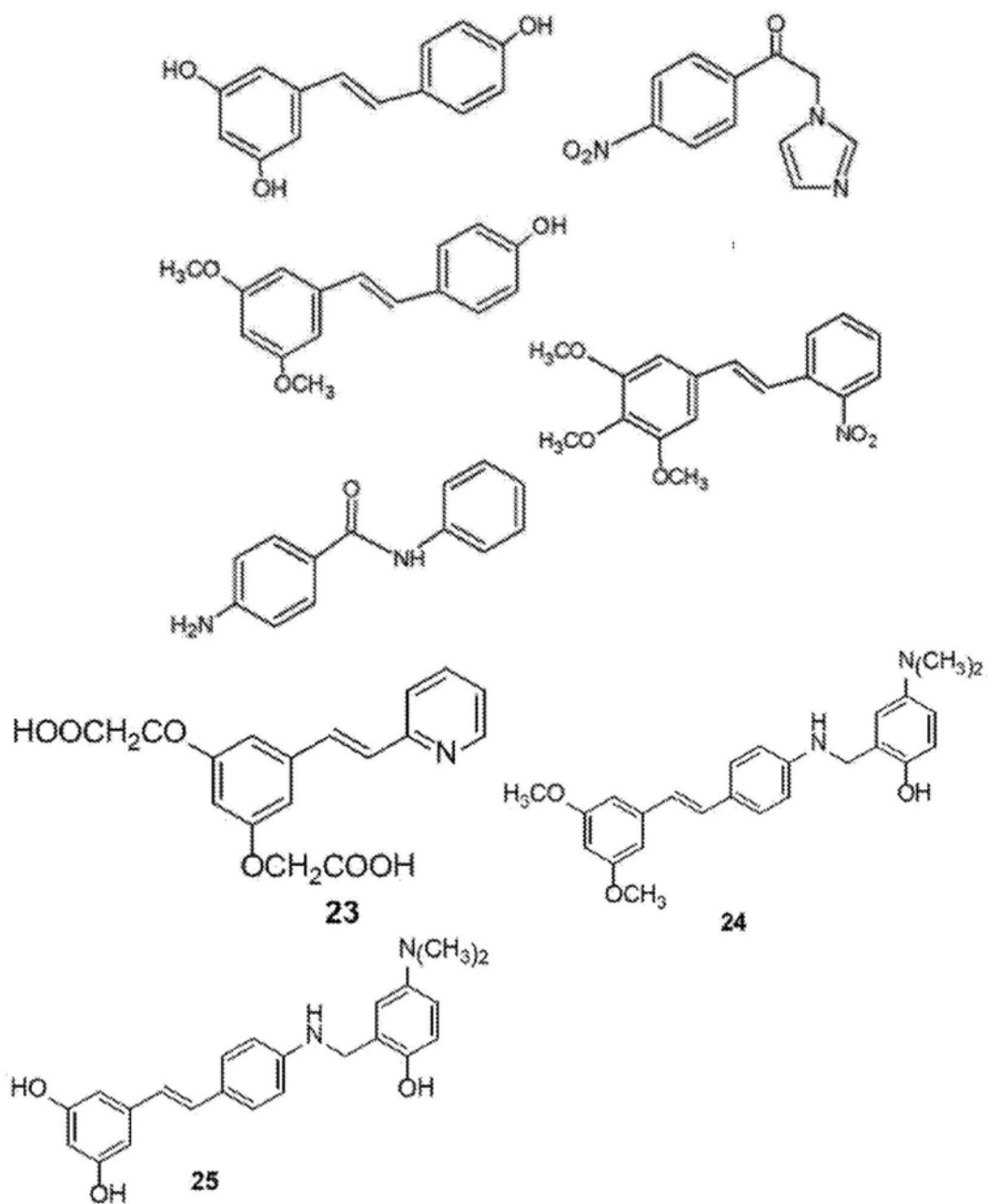


图14续

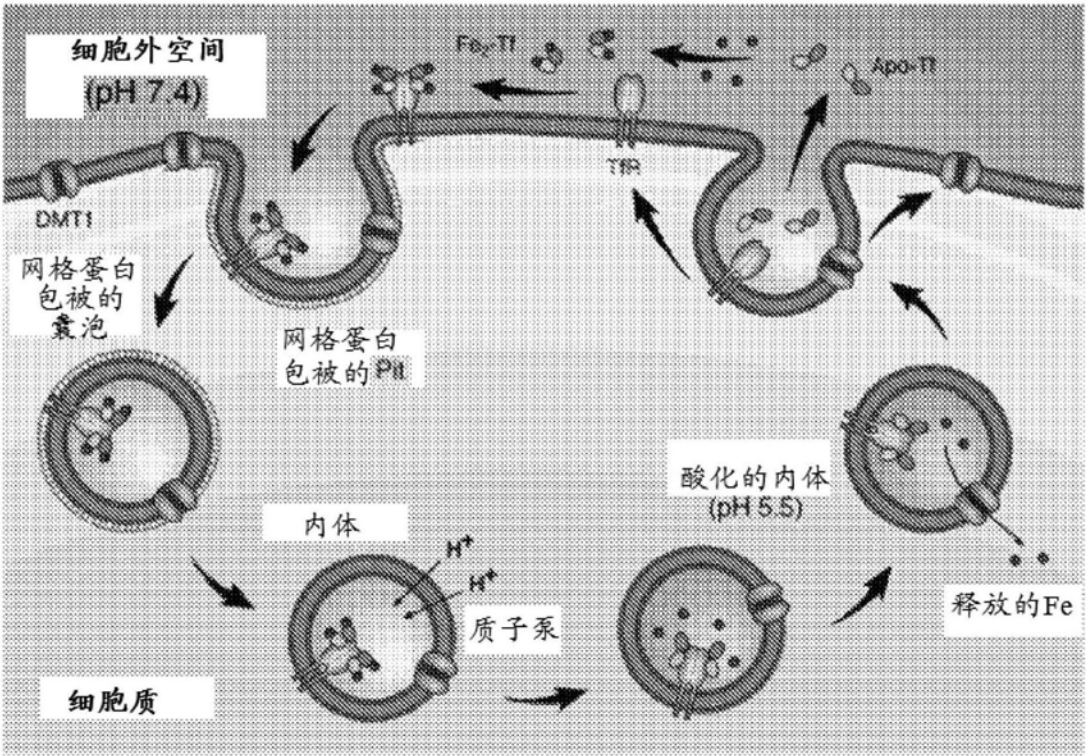


图15

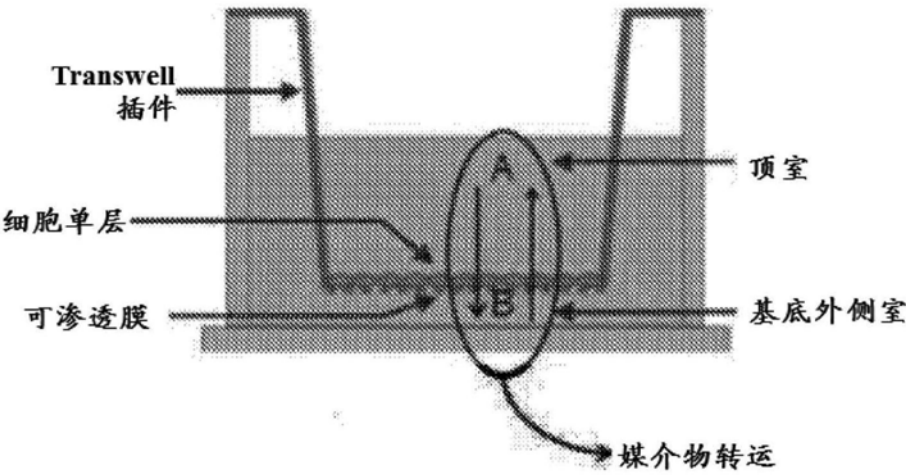


图16

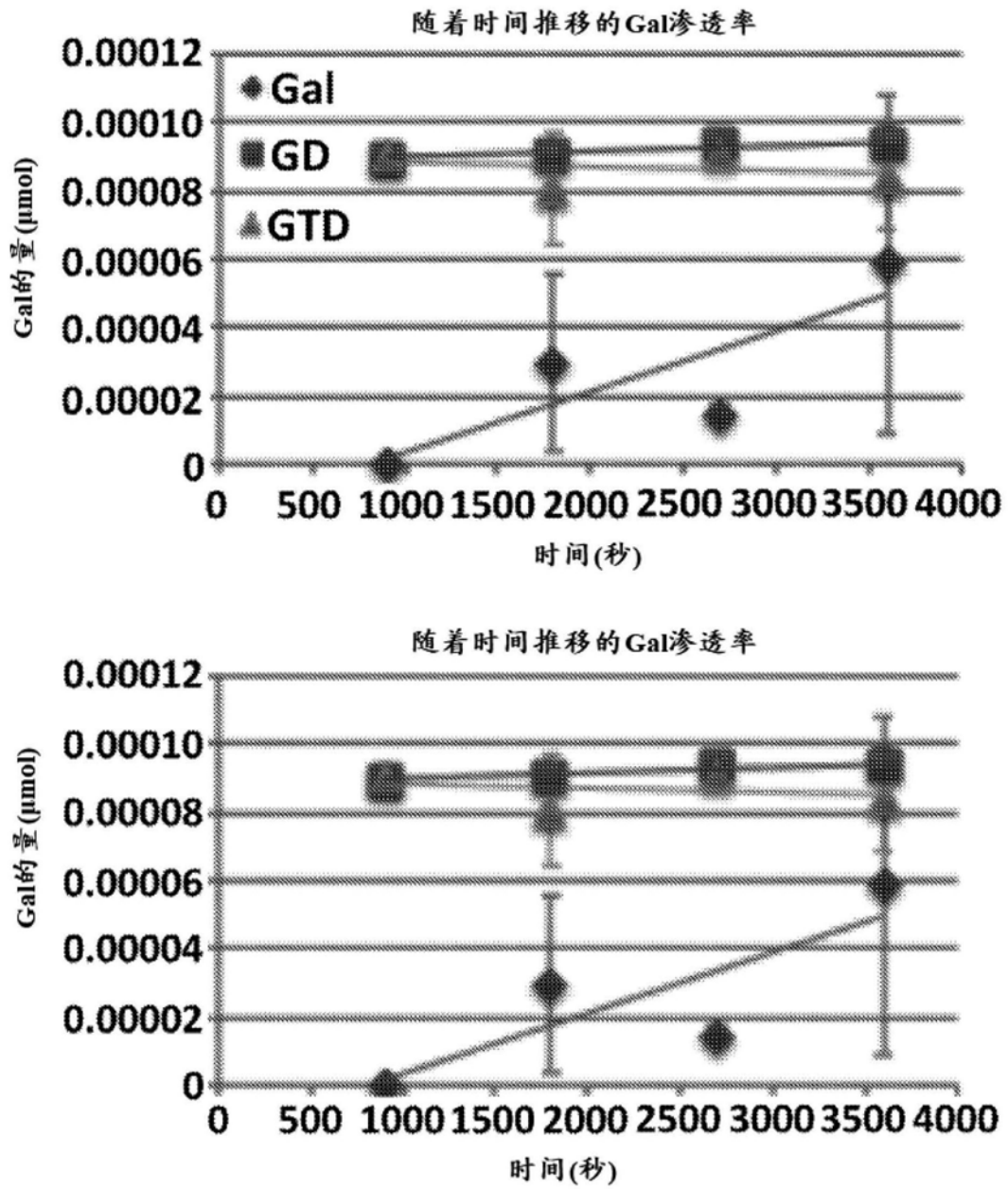


图17

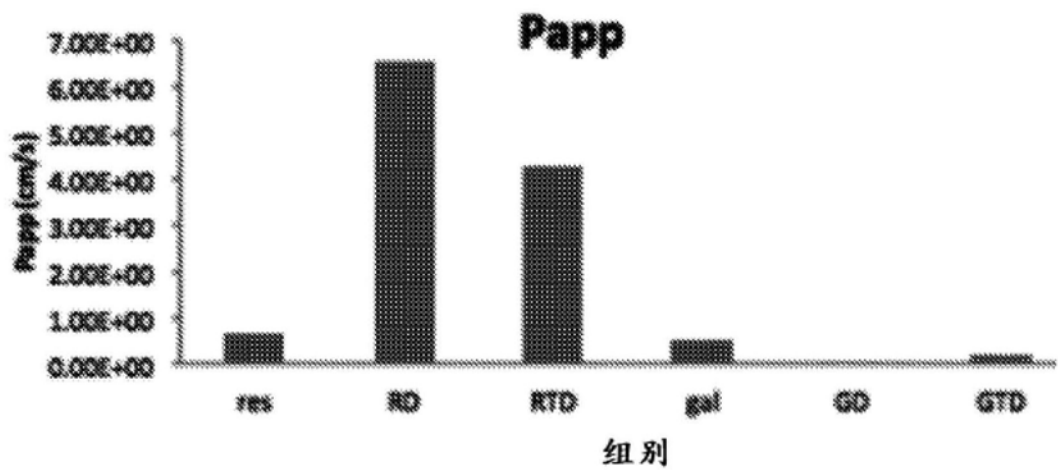


图18

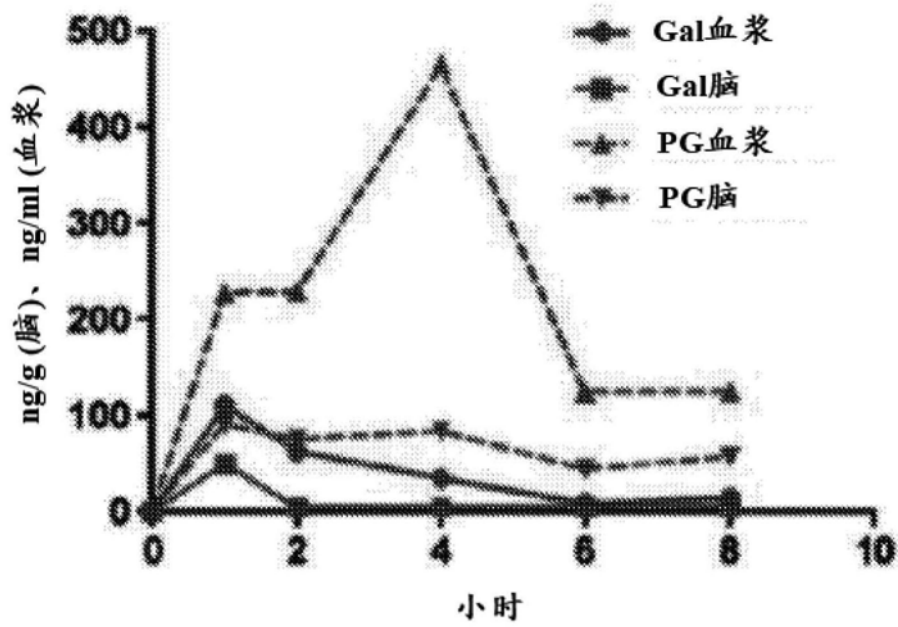


图19A

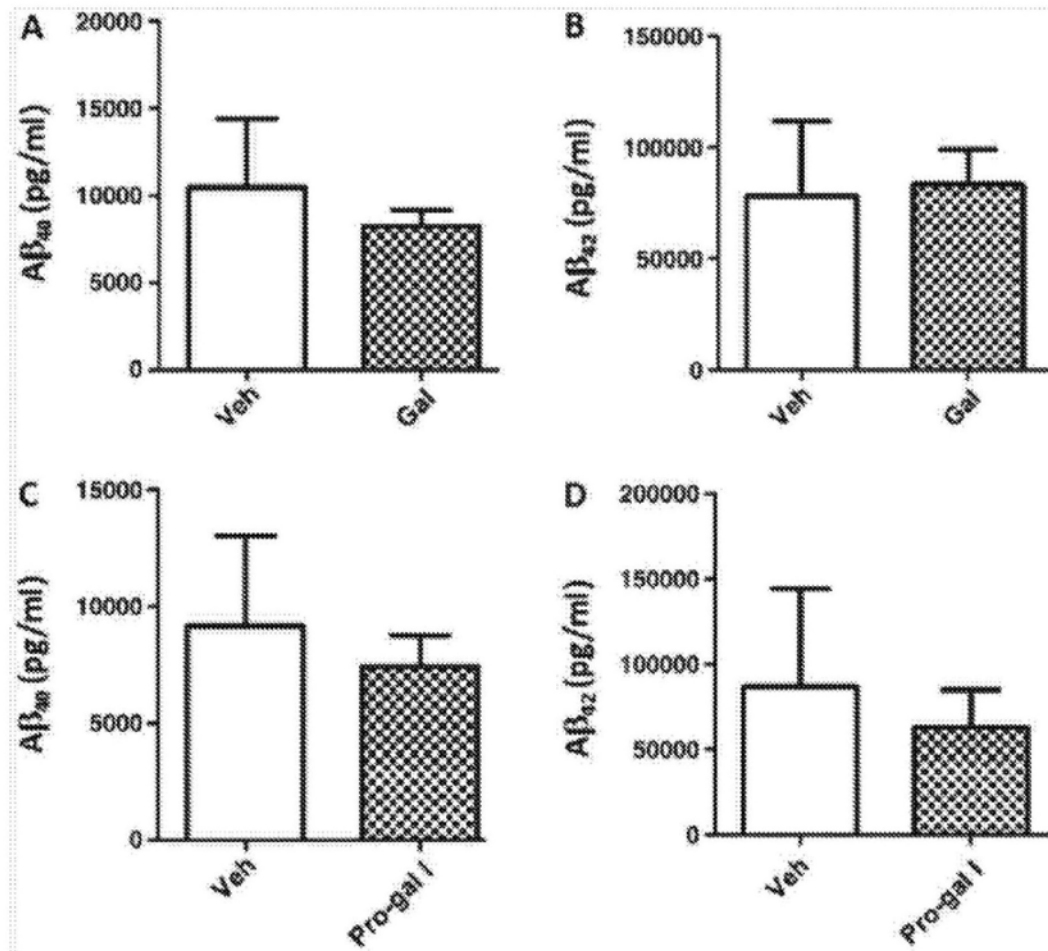


图19B

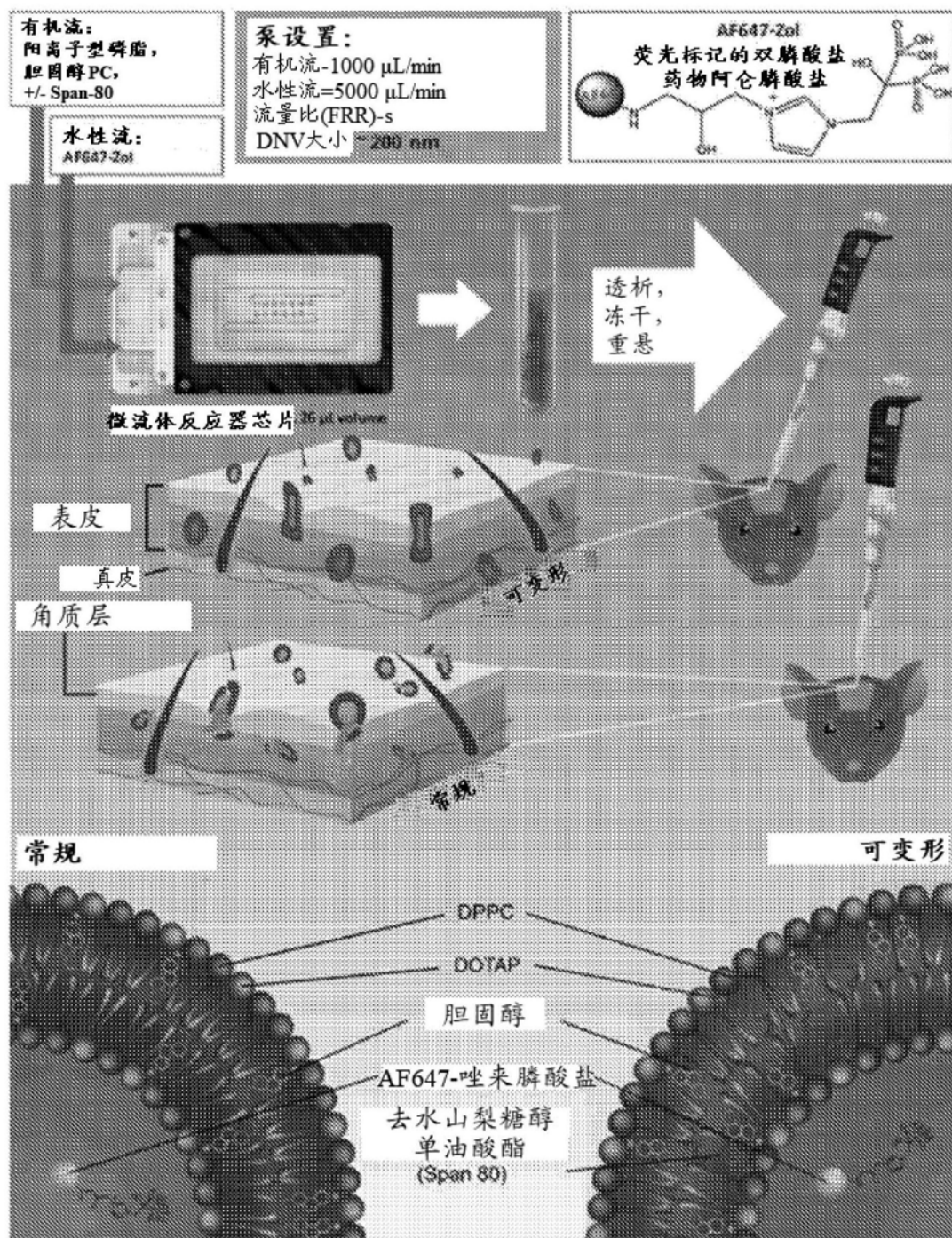


图20

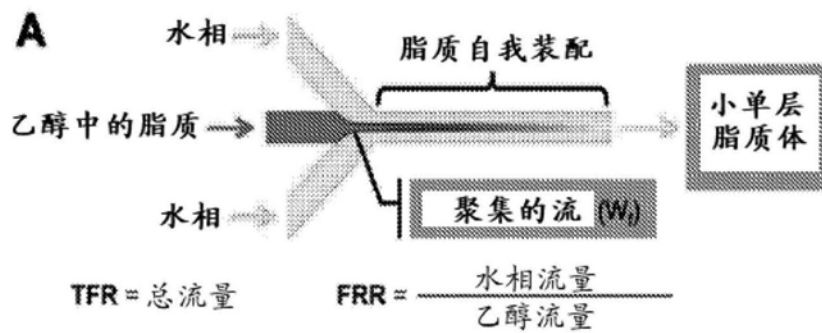


图21A

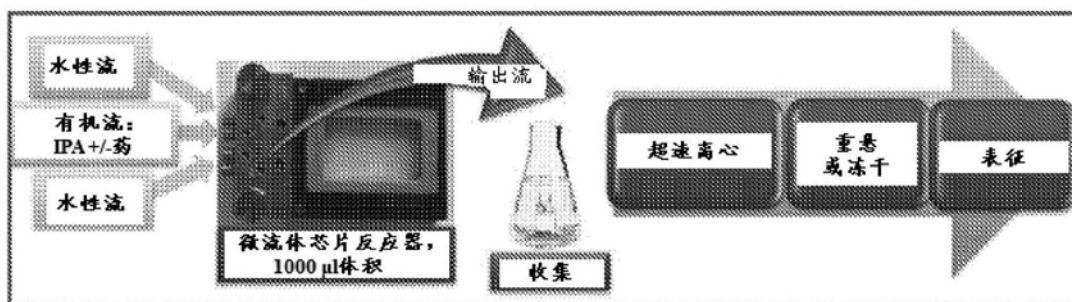


图21B

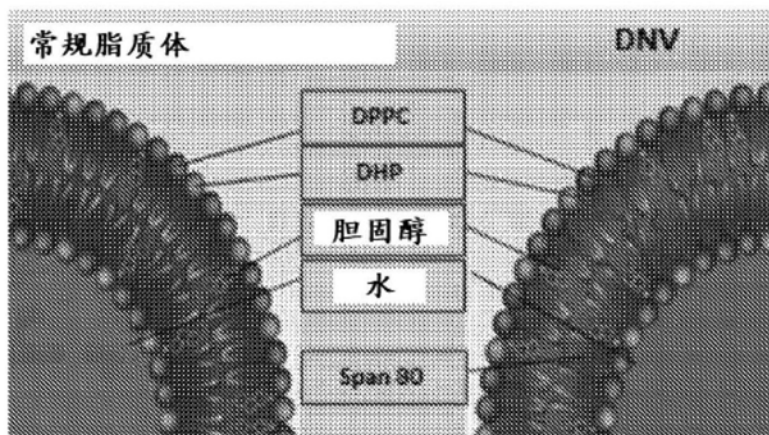


图22

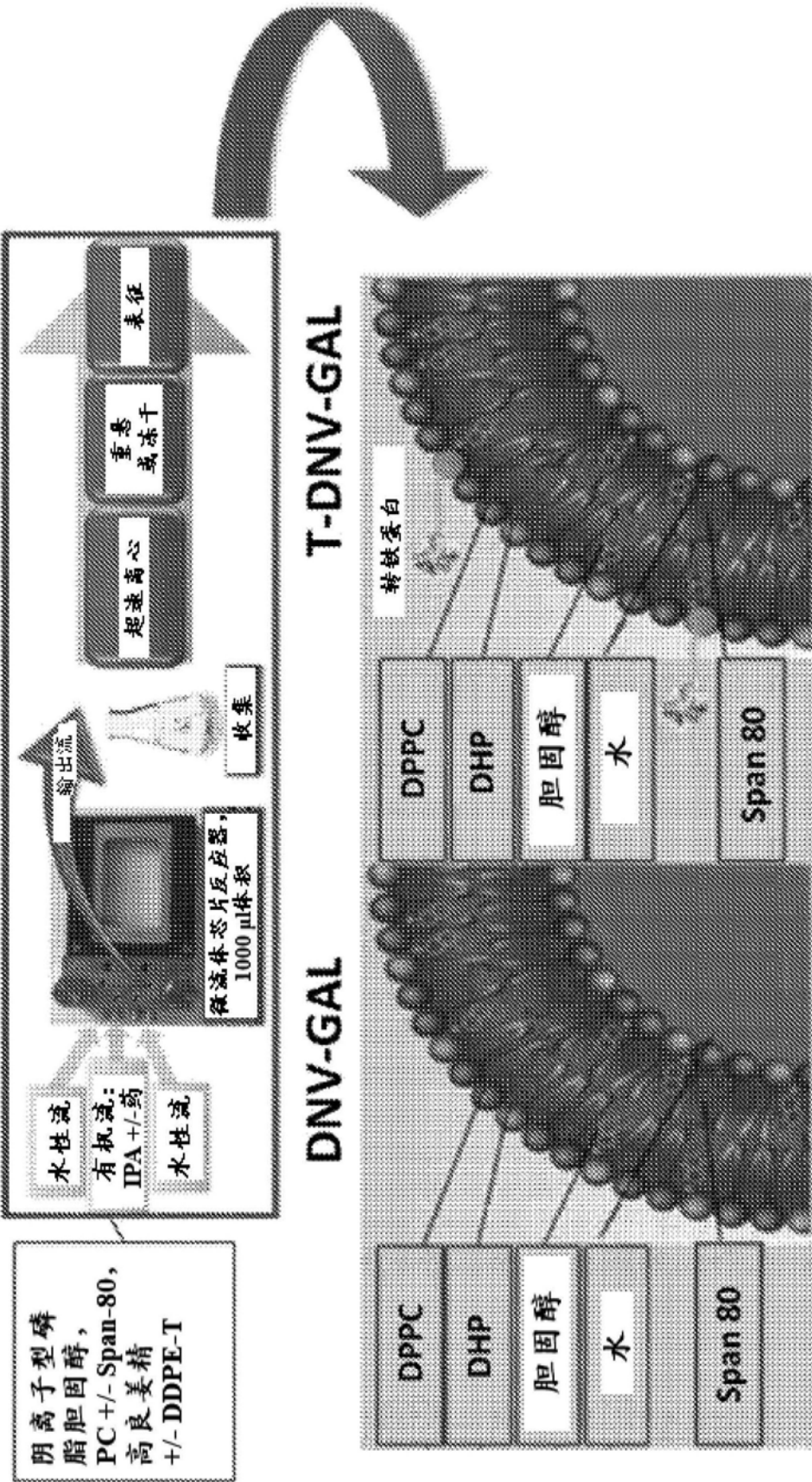


图23

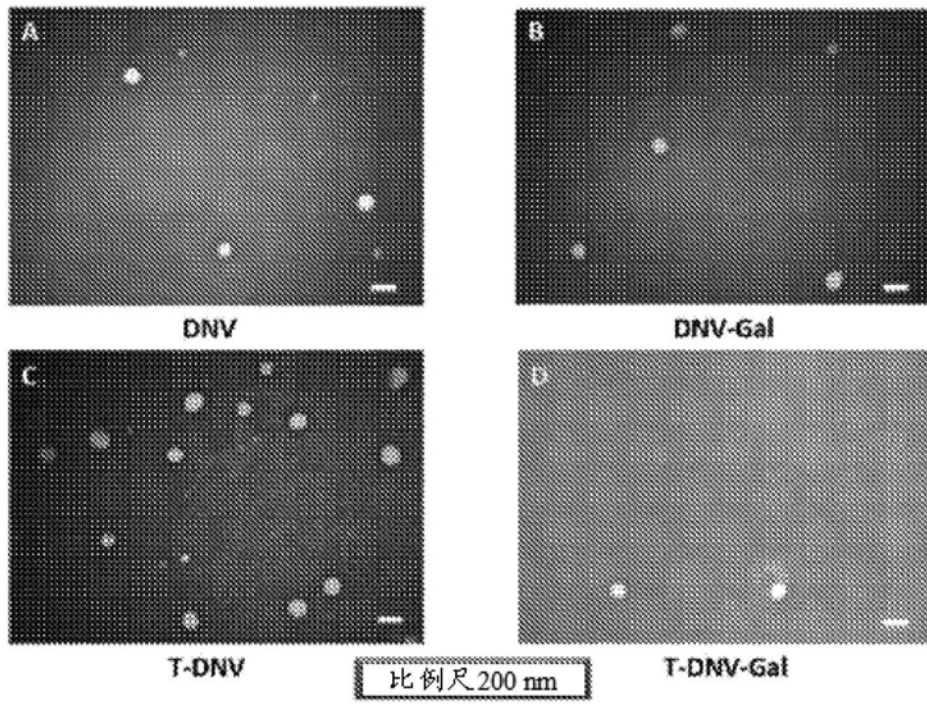


图24

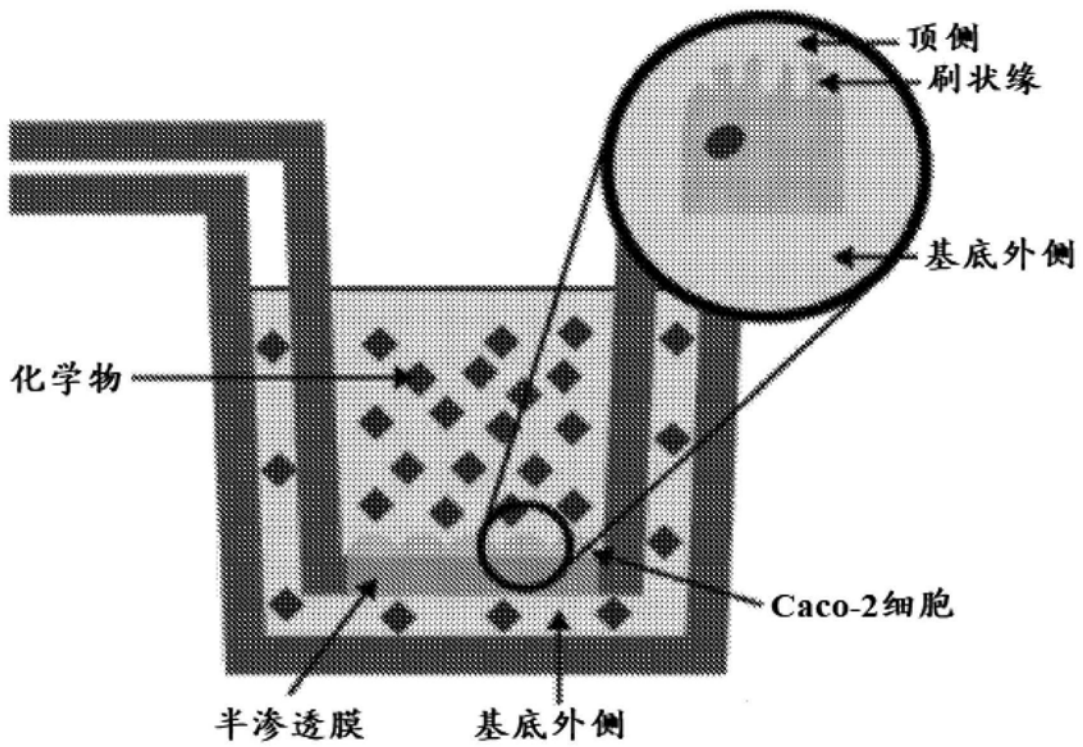


图25

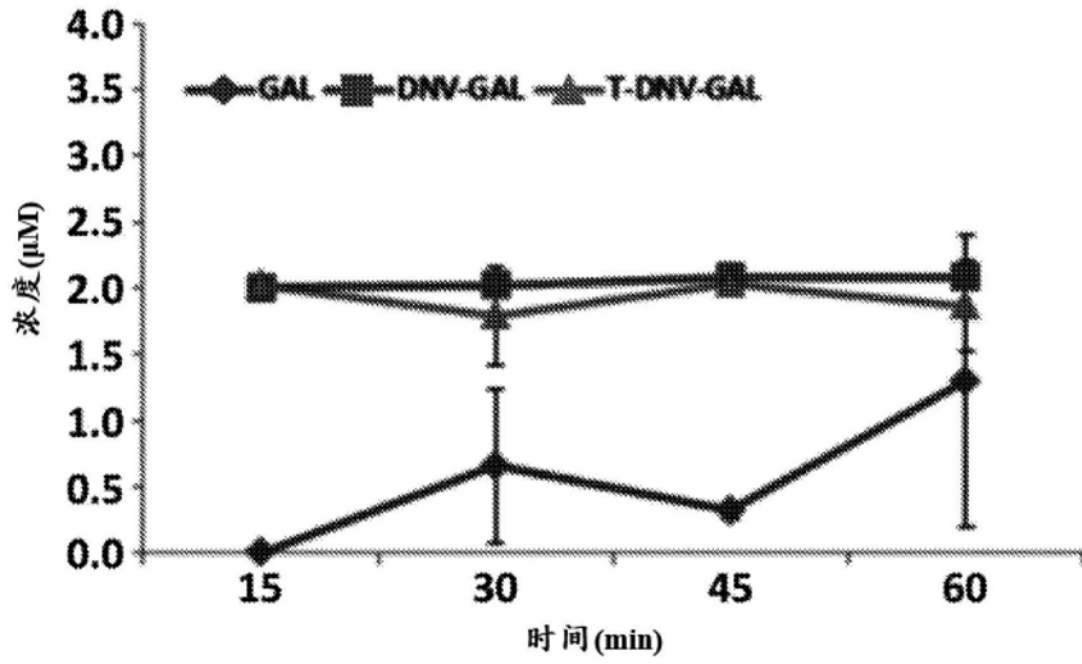


图26

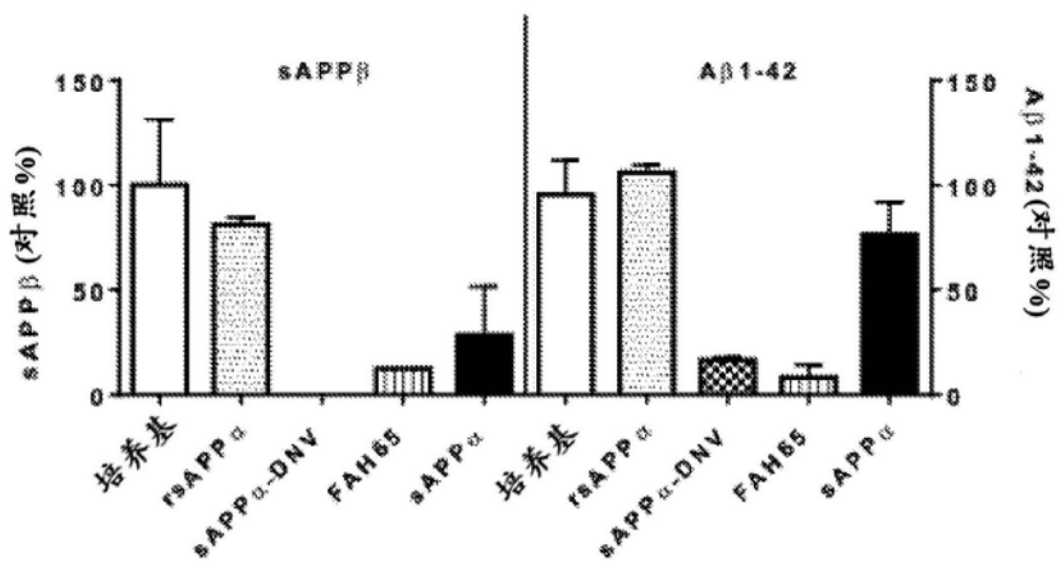


图27

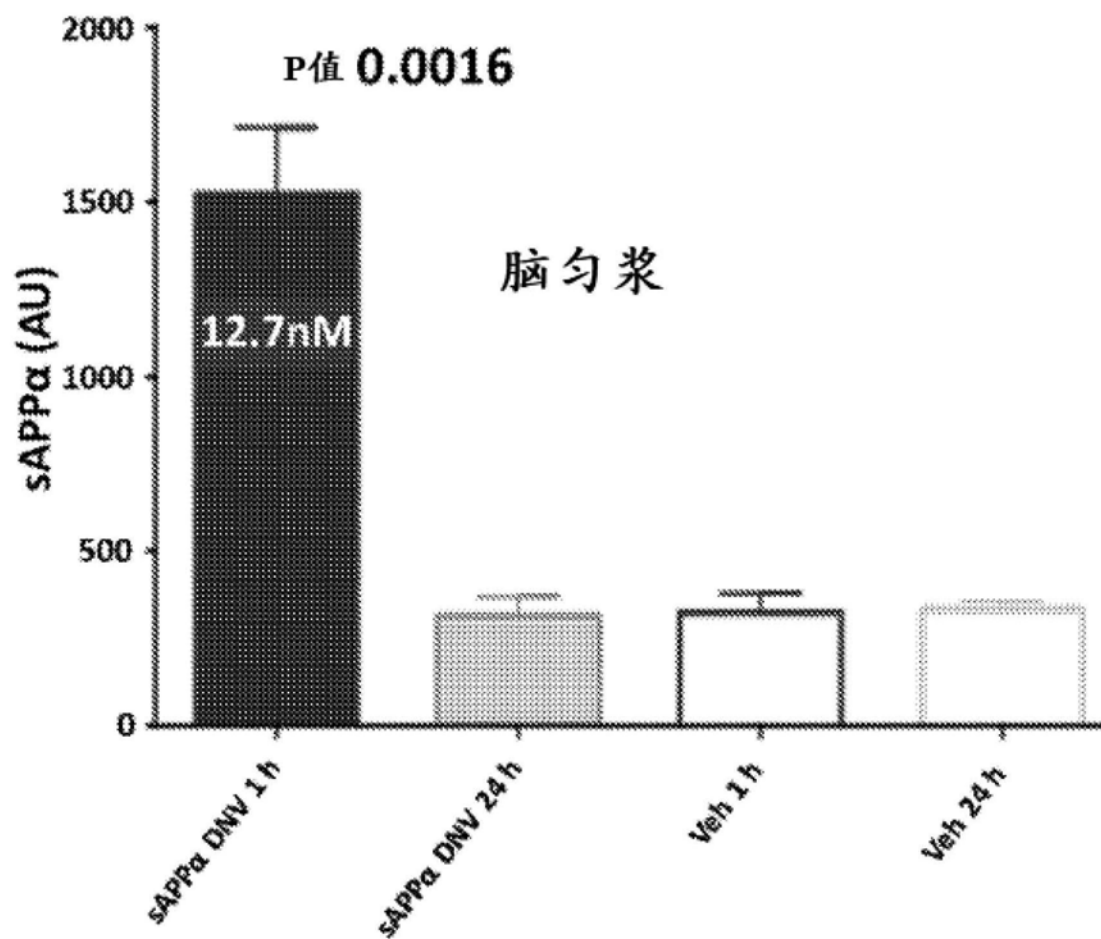


图28

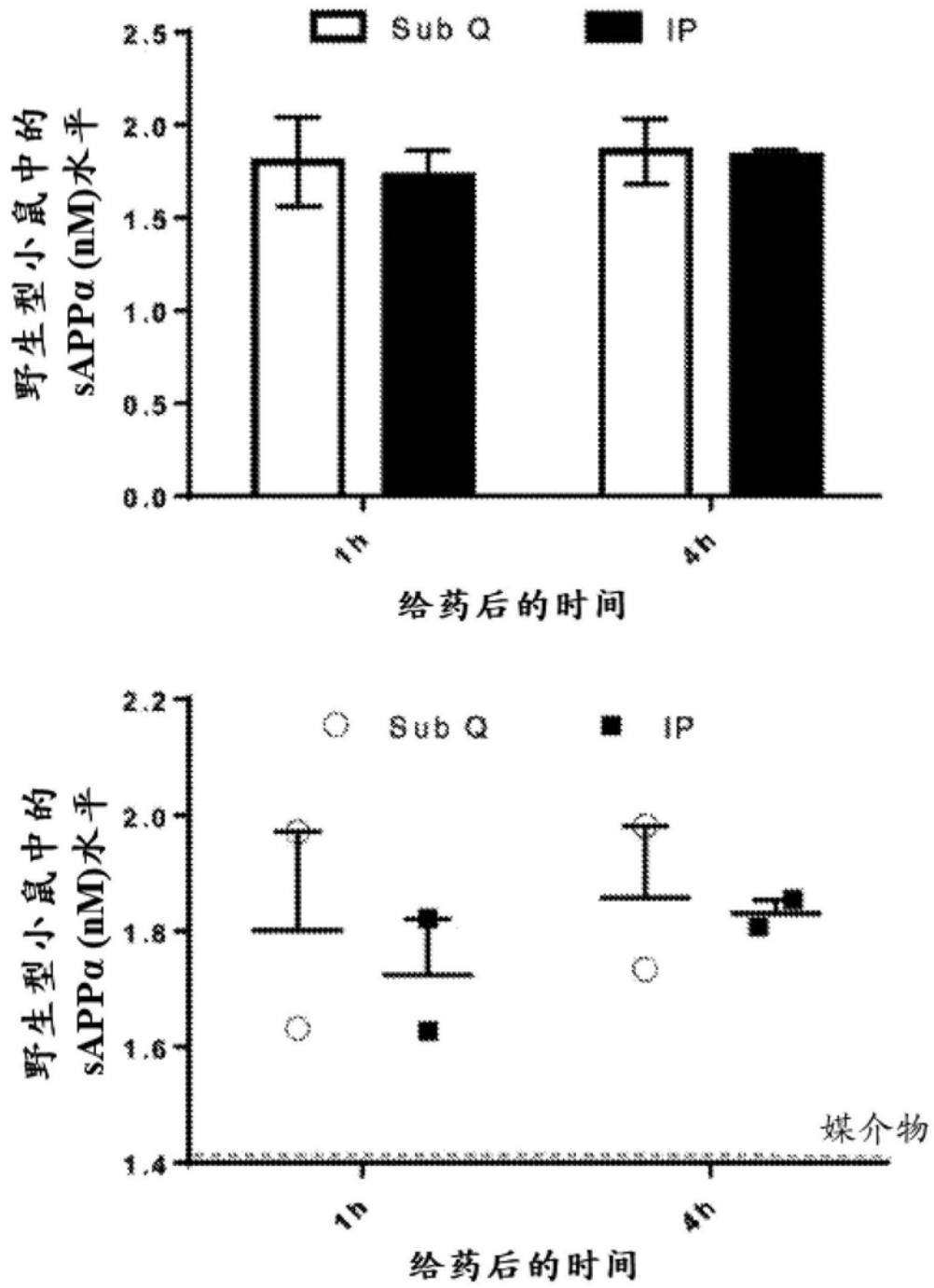


图29

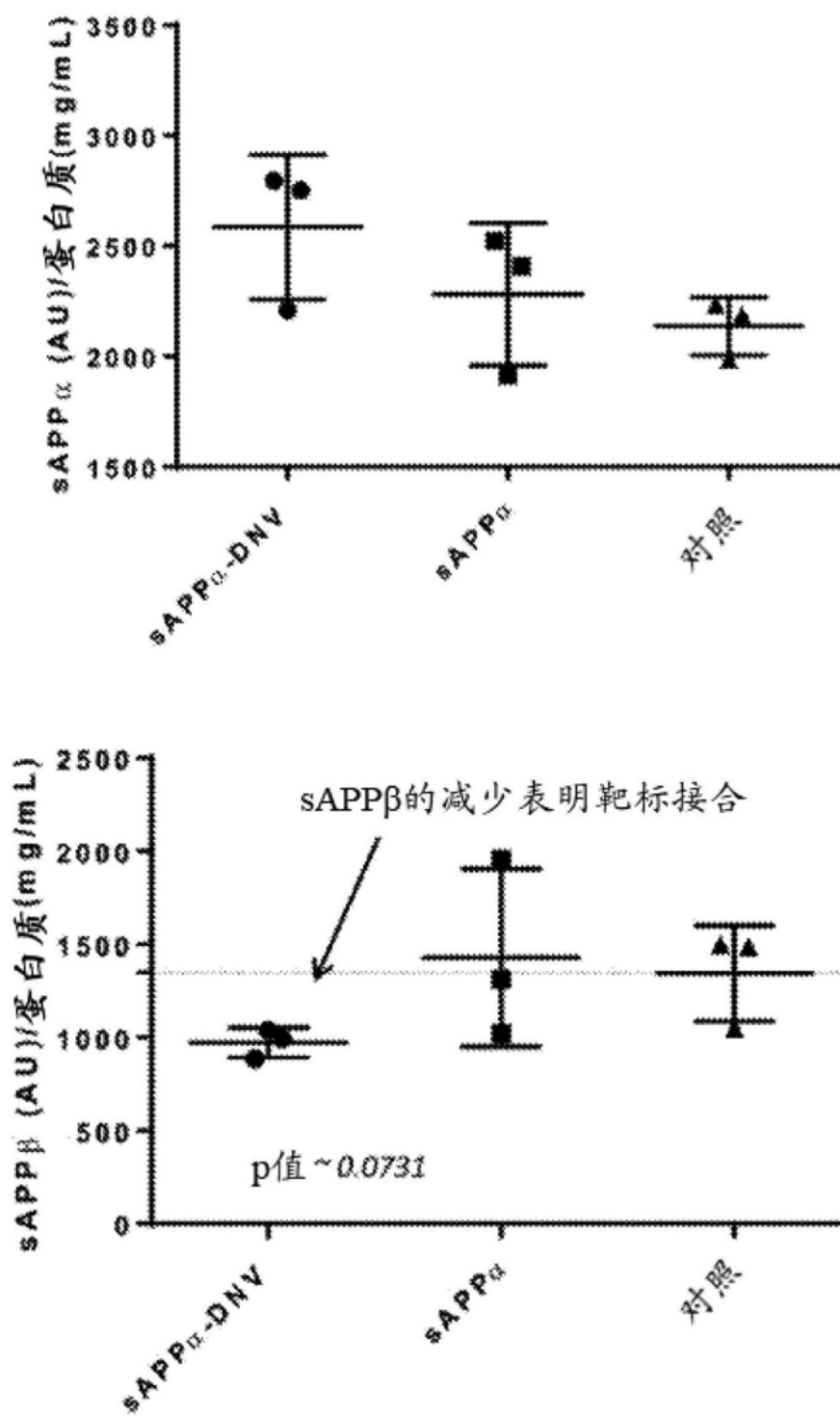


图30

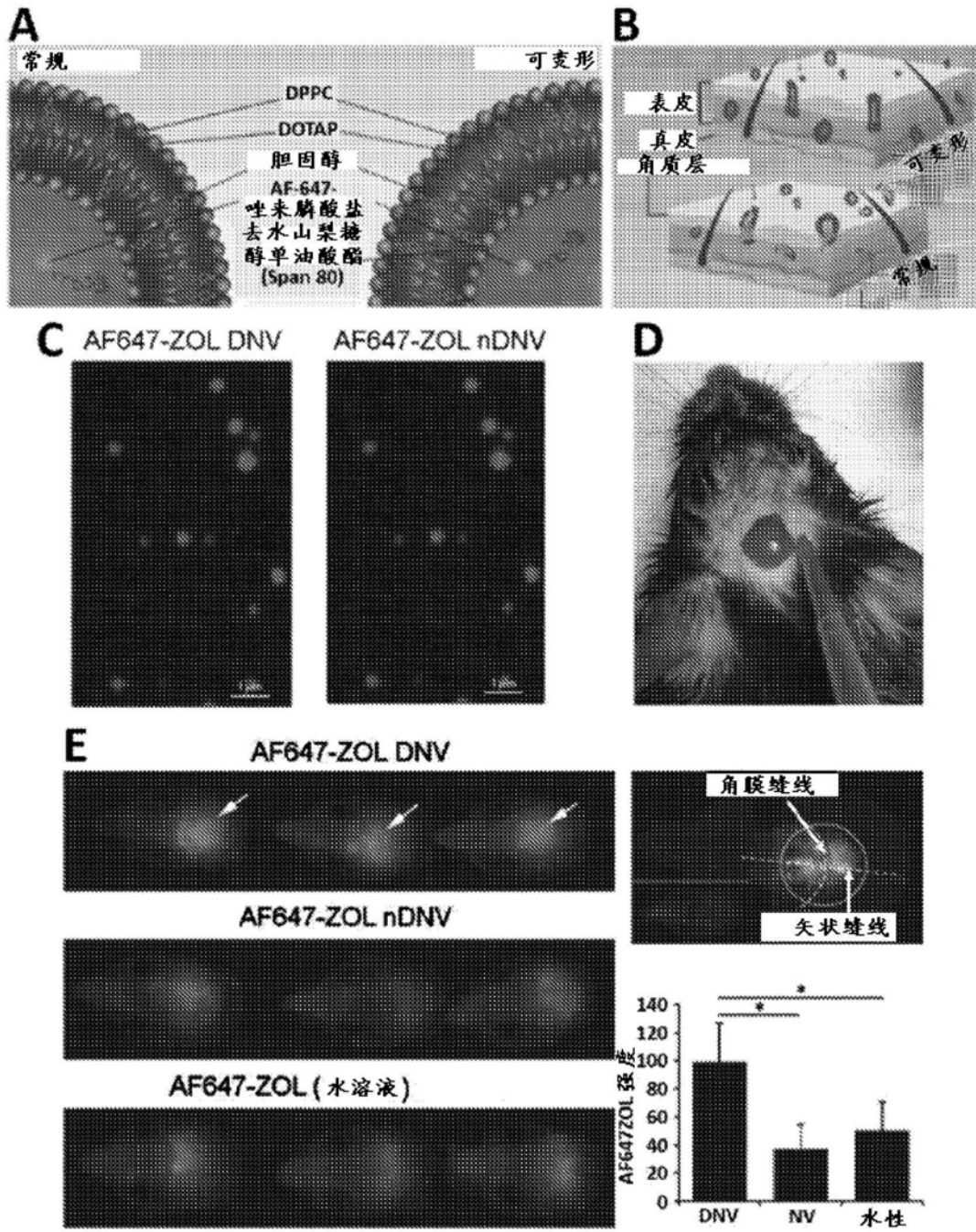


图31

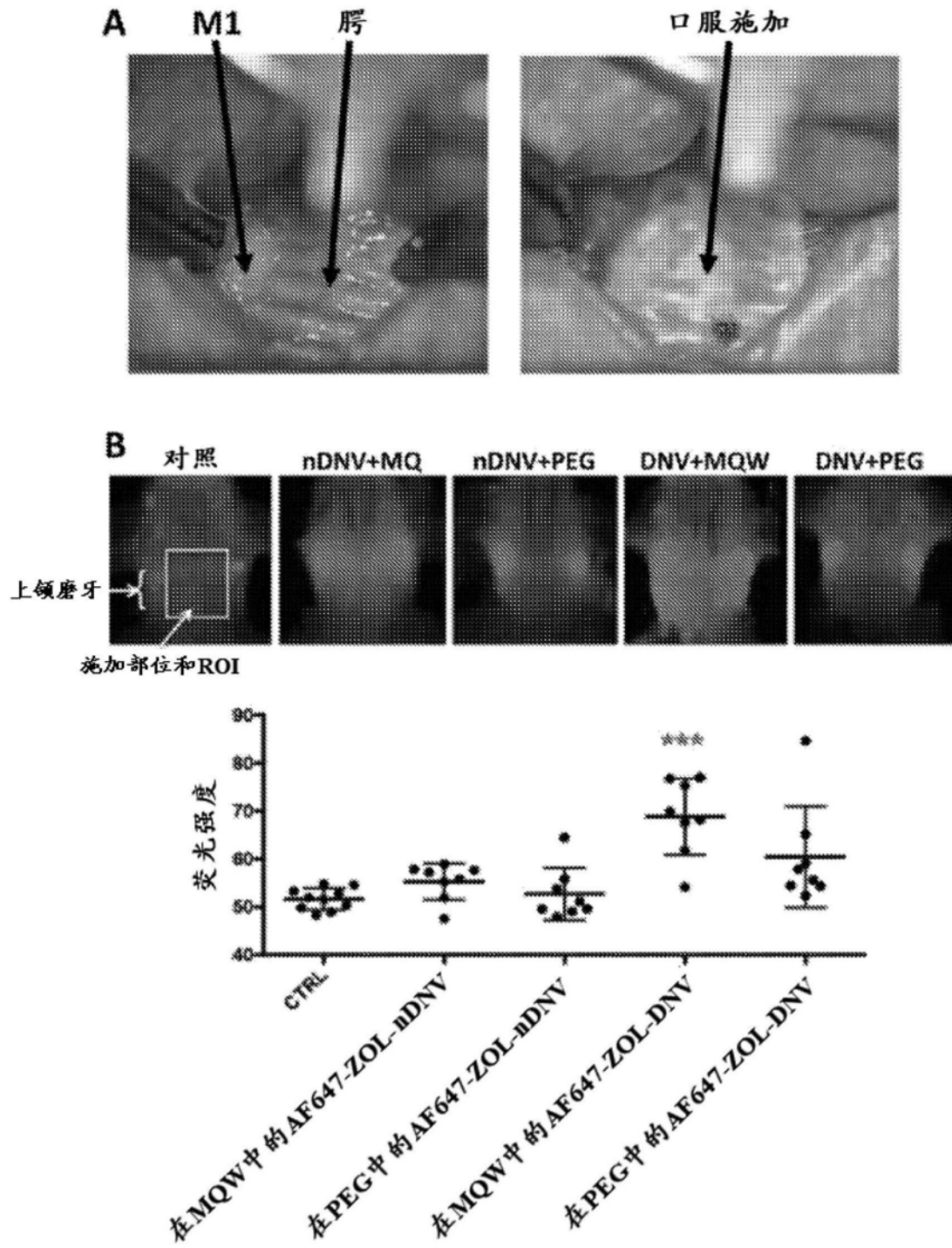


图32