



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114040753 A

(43) 申请公布日 2022.02.11

(21) 申请号 202080028418.7

(22) 申请日 2020.03.19

(30) 优先权数据

2019900910 2019.03.19 AU

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.10.13

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/AU2020/050260 2020.03.19

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/186304 EN 2020.09.24

(71) 申请人 澳大利亚仿生研究所

地址 澳大利亚维多利亚

申请人 墨尔本大学

(72) 发明人 A·维斯 马玉添 F·卡鲁索

M·布乔恩马尔姆

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所
有限公司 11038

代理人 谭玮

(51) Int.Cl.

A61K 9/16 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 31/00 (2006.01)

权利要求书2页 说明书33页 附图26页

(54) 发明名称

超粒子制剂

(57) 摘要

本发明涉及载有高水平有效负载并具有受控有效负载释放曲线的超粒子。特别是，公开了由介孔二氧化硅纳米颗粒制成并用藻酸电喷雾的超粒子，然后用生物可降解材料包覆或配制该藻酸。这些超粒子可用于各种治疗应用。

1. 一种包括超粒子的组合物,其中,所述超粒子包括至少1.5 μ g的有效负载并且用可生物降解的包衣包覆。

2. 一种组合物,其包括可生物降解的制剂和超粒子,所述超粒子包括至少1.5 μ g的有效负载,其中所述超粒子分散在可生物降解的制剂中。

3. 根据权利要求1或权利要求2所述的组合物,其中,所述超粒子包括至少2 μ g的有效负载。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的组合物,其中,所述超粒子包括1.5 μ g至10 μ g的有效负载。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的组合物,其中,所述超粒子包括具有至少60nm直径的孔。

6. 根据权利要求1至4中任一项所述的组合物,其中,所述超粒子包括具有至少50-100nm直径的孔。

7. 根据权利要求1至6中任一项所述的组合物,其中,所述超粒子具有无序的孔结构。

8. 根据权利要求1至7中任一项所述的组合物,其中,所述超粒子由具有双峰孔结构的纳米颗粒组成。

9. 根据权利要求8所述的组合物,其中,所述纳米颗粒双峰孔结构具有大于30nm的大孔直径。

10. 根据权利要求1至9中任一项所述的组合物,其中,所述可生物降解的制剂或包衣是凝胶或泡沫。

11. 根据权利要求1至10中任一项所述的组合物,其中,所述可生物降解的制剂或包衣包括蛋白性流体。

12. 根据权利要求11所述的组合物,其中,所述蛋白性流体包括血纤蛋白或其前体。

13. 根据权利要求12所述的组合物,其中,所述其前体是血纤蛋白原。

14. 根据权利要求13所述的组合物,其包括凝血酶。

15. 根据权利要求1至14中任一项所述的组合物,其中,所述有效负载是神经营养因子。

16. 根据权利要求15所述的组合物,其中,所述神经营养因子是神经营养蛋白。

17. 根据权利要求15所述的组合物,其中,所述超粒子包括至少两种有效负载,一种有效负载是神经营养因子。

18. 根据权利要求1至17中任一项所述的组合物,其包括至少两个、至少三个、至少四个、至少五个、至少六个、至少七个、至少八个、至少九个、至少10个超粒子。

19. 根据权利要求18所述的组合物,其包括具有不同有效负载的超粒子。

20. 根据权利要求1至18中任一项所述的组合物,其中,所述超粒子的特征在于持续的释放曲线。

21. 根据权利要求20所述的组合物,其中,所述超粒子的特征在于基本上线性的释放曲线。

22. 根据权利要求1至21中任一项所述的组合物,其中,所述超粒子作为一种固体浮现物分散在可生物降解的制剂中。

23. 根据权利要求1至22中任一项所述的组合物,其中,所述超粒子是用血纤蛋白或壳聚糖包覆的。

24. 根据权利要求1至23中任一项所述的组合物,其中,通过将包括纳米颗粒和藻酸或其多糖衍生物的组合物电喷雾到双阳离子水溶液中来制造所述超粒子。

25. 根据权利要求1至24中任一项所述的组合物,其包括藻酸 $[(C_6H_8O_6)_n]$ 或其多糖衍生物。

26. 根据权利要求25所述的组合物,其包括藻酸钠盐 $[Na(C_6H_8O_6)_n]$ 或其多糖衍生物。

27. 根据权利要求1至25任一项的组合物,其包括缓释系统。

28. 根据权利要求27所述的组合物,其中,所述缓释系统是水凝胶。

29. 根据权利要求27或权利要求28所述的组合物,其中,所述缓释系统包括藻酸盐水凝胶。

30. 根据权利要求29所述的组合物,其中,所述藻酸盐水凝胶是alg-CaCO₃水凝胶。

31. 根据权利要求27所述的组合物,其中,所述缓释系统包括钛-多酚凝胶或血纤蛋白胶。

32. 根据权利要求27至31中任一项所述的组合物,其中,所述超粒子是直接包覆的。

33. 根据权利要求1至32中任一项所述的组合物在制备用于治疗疾病或病症的药物中的用途。

34. 根据权利要求33所述的用途,其中,所述病症是听力损失。

35. 根据权利要求34所述的用途,其中,所述听力损失的特征在于感觉神经性听力损失(SNHL)、老年性耳聋或噪声诱发。

36. 一种当用于治疗疾病或病症时包括根据权利要求1至32中任一项所述的组合物的套件。

37. 根据权利要求36所述的套件,其中,所述病症是听力损失。

38. 根据权利要求37所述的套件,还包括耳蜗植入物。

超粒子制剂

技术领域

[0001] 本发明涉及载有高水平有效负载并具有受控有效负载释放曲线的超粒子。这些超粒子可用于各种治疗应用。

背景技术

[0002] 介孔二氧化硅是具有极高表面积的多孔材料,已广泛用于包封各种化合物和用于模板合成各种纳米结构材料。虽然这种类型的多孔材料在诸如药物递送的各种应用中都很受关注,但各种问题仍未解决。例如,高初始释放曲线或突释行为就是一个挑战。在一些情况下,可能需要控制释放和/或减少初始突释以实现诸如提高治疗药物递送的效率,减少给药频率和/或减少来自高水平治疗剂的初始释放的潜在副作用的结果。已经研究了各种方法来实现这些结果,包括修饰纳米载体的结构和通过共价键将药物与纳米载体偶联。

[0003] 希望提供具有极高表面面积的新的多孔材料,因为预期新材料可具有许多令人感兴趣的性质。

[0004] 因此,需要改进的超粒子。

发明内容

[0005] 对从超粒子上释放的有效负载进行时间控制的当前挑战是限制持续释放的有效负载的初始快速释放(即“突释”),导致更高的给药频率和降低的药物长期有效性。由于有效负载的生物利用度的快速增加,突释也可能引起受试对象的毒性问题。当超粒子装载有高水平有效负载时,毒性问题可能被放大。本发明人惊奇地发现,用可生物降解的包衣包覆超粒子可以显著降低有效负载从超粒子的初始突释,即使当它们负载有高水平有效负载时。因此,在第一方面,本发明涉及包括超粒子的组合物,其中超粒子包括至少1.5 μ g的有效负载并且用可生物降解的包衣包覆。在一个实例中,直接包覆超粒子。在另一个实例中,本发明涉及一种组合物,其包括可生物降解的制剂和超粒子,超粒子包括至少1.5 μ g有效负载,其中超粒子分散在可生物降解的制剂中。

[0006] 在一个实例中,超粒子包括至少2 μ g的有效负载。在另一个实例中,超粒子包括1.5 μ g至10 μ g的有效负载。在另一个实例中,超粒子包括直径至少为60nm的孔。在另一个实例中,超粒子包括直径至少50-100nm的孔。在另一个实例中,超粒子具有无序的孔结构。在另一个实例中,超粒子由具有双峰孔结构的纳米颗粒组成。在一个实例中,纳米颗粒双峰孔结构具有大于30nm的大孔径。

[0007] 在一个实例中,可生物降解的制剂或包衣是凝胶或泡沫。在另一个实例中,可生物降解的制剂或包衣包括蛋白流体。在另一个实例中,蛋白流体包括血纤蛋白或其前体。在一个实例中,其前体是血纤蛋白原。在一个实例中,包括前体的组合物可以进一步包括酶催化剂,其催化前体转化为可生物降解的包衣或其部分。因此,在一个实例中,本文公开的组合物可包括凝血酶。在一个实例中,本发明内容包括的组合物包括血纤蛋白原和凝血酶。

[0008] 在一个实例中,有效负载是神经营养因子。例如,神经营养因子可以是神经营养蛋

白。在一个实例中,神经营养蛋白是BDNF或NT-3。在一个实例中,神经营养蛋白是BDNF。在另一个实例中,神经营养蛋白是NT-3。在另一个实例中,超粒子包括至少两个有效负载,一个有效负载是神经营养因子。

[0009] 在另一个实例中,本文公开的组合物包括至少两个、至少三个、至少四个、至少五个、至少六个、至少七个、至少八个、至少九个、至少10个超粒子。在该实例中,超粒子可以负载不同的有效负载。

[0010] 在另一个实例中,本发明所包括的超粒子具有持续释放曲线。在另一个实例中,本发明所包括的超粒子具有基本上线性的释放曲线。在另一个实例中,本发明所包括的超粒子具有线性释放曲线。

[0011] 在另一个实例中,本发明所包括的超粒子作为固体浮现物分散在可生物降解的制剂中。在该实例中,可生物降解的制剂包覆超粒子。

[0012] 在另一个实例中,用血纤蛋白或壳聚糖包覆超粒子。

[0013] 本发明人还已经确定,根据本发明的包覆的超粒子可以与水凝胶系统组合以改善超粒子的手术递送的容易性和/或进一步控制药物释放动力学。因此,在一个实例中,本发明包括一种组合物,其包括本文公开的包覆的超粒子和水凝胶或缓释系统。在一个实例中,直接包覆超粒子。在一个实例中,缓释系统包括藻酸盐。在一个实例中,缓释系统包括藻酸盐水凝胶。例如,藻酸盐水凝胶可以是alg-CaCO₃水凝胶。在另一个实例中,缓释系统包括钛-多酚凝胶或血纤蛋白胶。

[0014] 在一个实例中,通过将包括纳米颗粒和藻酸或其多糖衍生物的组合物电喷雾到分散双阳离子水溶液中来制造超粒子。在一个实例中,藻酸是[(C₆H₈O₆)_n]或其多糖衍生物。在另一个实例中,藻酸钠盐[Na(C₆H₈O₆)_n]或其多糖衍生物。

[0015] 在另一个实例中,本发明涉及本文公开的超粒子或组合物在制备用于治疗疾病或病症的药物中的用途。在一个实例中,病症是听力损失。在一个实例中,听力损失的特征在于感觉神经性听力损失(SNHL)、老年性耳聋或噪声诱发。

[0016] 在另一个实例中,本发明涉及一种套件,套件包括本文公开的超粒子或组合物,当用于治疗本文公开的疾病或病症时。在一个实例中,病症是听力损失。在另一实例中,套件还包括耳蜗植入物。

[0017] 除非另外具体说明,否则本文中的任何实施例应被理解为比照适用于任何其他实施例。

[0018] 本发明不限于本文描述的特定实施例的范围,这些实施例仅用于示例性目的。如本文所述,功能等同的产品、组合物和方法显然在本发明的范围内。

[0019] 在整个说明书中,除非另有特别说明或上下文另有要求,引用单个步骤、物质组成、步骤组或物质组成组应被认为包括一个和多个(即一个或更多个)那些步骤、物质组成、步骤组或物质组成组。

[0020] 以下通过以下非限制性实施例并参考附图描述本发明。

附图说明

[0021] 图1制造MS-SPs的示例过程。

[0022] 图2根据不同pH值的MS-SPs的ζ电位。ζ电位测定在10mM乙酸钠缓冲液(pH4),10mM

磷酸盐缓冲液 (pH6), 10mM HEPES缓冲液 (pH8) 和10mM碳酸氢钠缓冲液 (pH10) 中进行。

[0023] 图3负载有FITC-溶菌酶 (绿色) 的MS-SPs的共聚焦显微镜图像。a, b) 不同放大倍数的MS-SPs。c) 在片段化的MS-SP内部负载FITC-溶菌酶。

[0024] 图4使用不同的FITC-溶菌酶负载浓度, 在3天 (72h) 孵育时间后的载药量。a) 相对于FITC-溶菌酶负载浓度, FITC-溶菌酶吸附到非多孔MS-SPs^{alg} (黑色圆圈)、小孔MS-SPs^{alg} (蓝色正方形) 和MS-SPs^{alg} (红色三角形) 中的量。b) 相对于FITC-溶菌酶负载浓度, FITC-溶菌酶吸附到非多孔MS-SPs (黑色圆圈)、小孔MS-SPs (蓝色正方形) 和MS-SPs (红色三角形) 中的量。c) MS-SPs^{alg}和d) MS-SPs中的FITC-溶菌酶负载效率。给出的数据是三次重复的平均值, 每次使用五个SPs, 误差条代表标准偏差。

[0025] 图5具有不同直径的MS-SPs的FITC-溶菌酶负载和释放行为。a) FITC-溶菌酶负载量, b) 体外FITC-溶菌酶释放曲线, c) 在每个单独的时间点释放的FITC-溶菌酶的值, d) 来自直径为200、550、650、1000 μm 的MS-SPs的体外FITC-溶菌酶释放标准曲线。

[0026] 图6人脑胶质母细胞瘤细胞 (U87MG细胞系) 与不同数量的MS-SPs孵育48小时的细胞活力。将添加到具有插入物的细胞中的乙醇制备为阴性 (细胞毒性) 对照, 未处理的细胞表示100%活力。给出的数据是四个样本的平均值, 误差条代表标准偏差。

[0027] 图7体外累积药物释放曲线。a) 体外FITC-溶菌酶 (0.2mg mL^{-1} , 载药3天) 从MS-SPs (红色圆圈) 和MS-SPs^{alg} (黑色三角形) 中释放。给出的数据是三次重复的平均值, 每次使用十个SPs, 误差条代表标准偏差。b) 体外FITC-溶菌酶 (1.0mg mL^{-1} , 载药3天) 从MS-SPs中释放。(b) 中的插入物是从第6天开始的体外FITC-溶菌酶释放曲线。c) 体外BDNF从MS-SPs中释放 (1.0mg mL^{-1} , 载药3天)。BDNF ELISA (Abcam) 用于测量BDNF浓度。

[0028] 图8对于MS-SPs^{alg}和MS-SPs (负载条件: 负载100 μL 的 0.2mg mL^{-1} 的FITC-溶菌酶, 负载时间3天), 在每个单独的时间点释放FITC-溶菌酶的值。给出的数据是三次重复的平均值, 每次使用十个超粒子, 误差条代表标准偏差。

[0029] 图9对于MS-SPs (负载条件: 负载100 μL 的 1.0mg mL^{-1} 的FITC-溶菌酶, 负载时间超过3天), 在每个单独的时间点释放FITC-溶菌酶的值。载药量为每超粒子 $6.49 \pm 0.48\mu\text{g}$ 。给出的数据是三次重复的平均值, 每次使用十个MS-SPs, 误差条代表标准偏差。

[0030] 图10体外BDNF药物研究中每个单独时间点的绝对值 (负载条件: 在3天中负载 1.0mg mL^{-1} BDNF)。给出的数据是三次重复的平均值, 每次使用一个MS-SP, 误差条代表标准偏差。

[0031] 图11 a) 用于测量来自MS-SPs的BDNF的MicroBCA测定。b) 在使用MS-SPs的每个单独时间点释放的BDNF值。载药量为每超粒子 $6.82\mu\text{g}$ 。给出的数据是三次重复的平均值, 误差条代表标准偏差。

[0032] 图12 a) MS-SPs (红色圆圈) 和MS-SPs^{alg} (黑色方块) 在PF127水凝胶系统中的体外FITC-溶菌酶释放曲线。B) 对于图 (a) (负载的100 μL 的 0.2mg mL^{-1} 的FITC-溶菌酶), 在每个单独的时间点释放FITC-溶菌酶的值。MS-SPs和MS-SPs^{alg}中的载药量分别为每粒超粒子 $1.89 \pm 0.08\mu\text{g}$ 和每粒超粒子 $1.93 \pm 0.03\mu\text{g}$ 。给出的数据是三次重复的平均值, 每次使用十个超粒子, 误差条代表标准偏差。

[0033] 图13 50%负载时 ($3.65\mu\text{g}/\text{SP}$) 的体外释放曲线

[0034] 图14在体外药物释放研究150天后MS-SPs的降解。a) 在37 $^{\circ}\text{C}$ 下, 在PBS (pH7.4) 中孵

育150天后,MS-SPs的SEM图像。b,c)在37℃下在PBS (pH7.4)中孵育150天之后MS-SPs的表面结构的SEM图像。

[0035] 图15显示了神经营养蛋白-3的量(负载的%)和以 μg 计的总量。植入受试对象内耳1周后,每个SP含有初始负载量的 $\sim 2\mu\text{g}$ 神经营养蛋白-3($\sim 40\%$)。

[0036] 图16 Si-SPs和 $^{\text{F}}$ Si-SPs的表征。(a) Si-SP的SEM图像。(b)显示Si-SP表面的高分辨SEM。(c) $^{\text{F}}$ Si-SP的SEM图像。(d)显示 $^{\text{F}}$ Si-SP表面的高分辨SEM。(e) $^{\text{F}}$ Si-SP的元素分布。(f) Si-和 $^{\text{F}}$ Si-SP的FTIR光谱。

[0037] 图17 CaCO_3 颗粒在(a)低放大倍数和(b)高放大倍数下的SEM图像。

[0038] 图18图2a和b中 $^{\text{F}}$ Si-SPs的体外FITC-溶菌酶释放曲线的体外药物释放标准曲线。

[0039] 图19 BDNF的体外释放标准曲线。

[0040] 图20在alg- CaCO_3 水凝胶中 $^{\text{F}}$ Si-SPs的体外FITC-溶菌酶释放曲线的体外药物释放标准曲线。

[0041] 图21用不同浓度血纤蛋白原和凝血酶包覆前Si-SPs中FITC-溶菌酶的载药量。

[0042] 图22在给定时间点,从包覆有不同浓度血纤蛋白原的血纤蛋白(含 1.72mg mL^{-1} 凝血酶的 2mg mL^{-1} 、 20mg mL^{-1} 和 40mg mL^{-1} 分别表示为 $^{2\text{F}1.72}\text{Si-SPs}$ 、 $^{20\text{F}1.72}\text{Si-SPs}$ 和 $^{40\text{F}1.72}\text{Si-SPs}$)的Si-SPs和 $^{\text{F}}$ Si-SPs释放的FITC-溶菌酶的百分比。给出的数据是一式三份的平均值,误差条表示标准偏差,每次使用10个SPs。

[0043] 图23从包覆有不同浓度凝血酶的血纤蛋白(含 20mg mL^{-1} 血纤蛋白原的 0.1mg mL^{-1} 、 0.5mg mL^{-1} 、 1.72mg mL^{-1} 和 5mg mL^{-1} 分别表示为 $^{20\text{F}0.1}\text{Si-SPs}$ 、 $^{20\text{F}0.5}\text{Si-SPs}$ 、 $^{20\text{F}1.72}\text{Si-SPs}$ 和 $^{20\text{F}5}\text{Si-SPs}$)的Si-SPs和 $^{\text{F}}$ Si-SPs释放的FITC-溶菌酶的百分比。给出的数据是一式三份的平均值,误差条表示标准偏差,每次使用10个SPs。

[0044] 图24体外累积释放曲线。(a).从包覆有不同浓度血纤蛋白原的血纤蛋白(凝血酶 1.72mg mL^{-1} 的 2mg mL^{-1} 、 20mg mL^{-1} 和 40mg mL^{-1} 分别表示为 $^{2\text{F}1.72}\text{Si-SPs}$ 、 $^{20\text{F}1.72}\text{Si-SPs}$ 和 $^{40\text{F}1.72}\text{Si-SPs}$)的Si-SPs和 $^{\text{F}}$ Si-SPs释放的FITC-溶菌酶。(b).从包覆有不同浓度凝血酶的血纤蛋白(血纤蛋白原 20mg mL^{-1} 的 0.1mg mL^{-1} 、 0.5mg mL^{-1} 、 1.72mg mL^{-1} 和 5mg mL^{-1} 分别表示为 $^{20\text{F}0.1}\text{Si-SPs}$ 、 $^{20\text{F}0.5}\text{Si-SPs}$ 、 $^{20\text{F}1.72}\text{Si-SPs}$ 和 $^{20\text{F}5}\text{Si-SPs}$)的Si-SPs和 $^{\text{F}}$ Si-SPs释放的FITC-溶菌酶。(c) BDNF和(d) NT-3从Si-SPs和 $^{\text{F}}$ Si-SPs的释放曲线。在(a-d)中给出的数据是一式三份的平均值,误差条表示标准偏差,各自测量(a)和(b)中从10个SP释放和(c)和(d)中从1个SP释放。

[0045] 图25如使用ELISA测量的,在给定的时间点从Si-SPs和 $^{\text{F}}$ Si-SPs释放的BDNF的百分比。给出的数据是一式三份的平均值,误差条表示标准偏差,每次使用1个SPs。

[0046] 图26如使用ELISA测量的,在给定的时间点从Si-SPs和 $^{\text{F}}$ Si-SPs释放的NT-3的百分比。给出的数据是一式三份的平均值,误差条表示标准偏差,每次使用1个SPs。

[0047] 图27于(a) 3d、(b) 2w、(c) 3w、(d) 6w、(e) 10w,在PBS (pH7.4) 37℃中降解后Si-SPs的SEM图像。(f)显示了在37℃下在PBS (pH7.4)中孵育10周之后Si-SPs的表面结构。通过比较图16b和(f),观察到剧烈变化。

[0048] 图28于(a) 3d、(b) 2w、(c) 3w、(d) 6w和(e) 10w,在PBS (pH7.4) 37℃中孵育后 $^{\text{F}}$ Si-SPs的SEM图像。(e)中的插入物显示了在37℃下在PBS (pH7.4)中孵育10周之后 $^{\text{F}}$ Si-SPs的表面结构。图16显示了孵育前 $^{\text{F}}$ Si-SPs的代表性图像,图27显示了降解的Si-SPs的图像。(f) ICP-

OES分析来定量在10周内从Si-SPs和^FSi-SPs释放的Si。使用20mg mL⁻¹血纤蛋白原和1.72mg mL⁻¹凝血酶制备^FSi-SPs。

[0049] 图29来自^FSi-SPs的血纤蛋白的体外累积降解百分比(20mg mL⁻¹血纤蛋白原和1.72mg mL⁻¹用于血纤蛋白包衣)。使用MicroBCA蛋白测定试剂盒测量血纤蛋白的量。

[0050] 图30在每个时间点测量的Si释放,作为超粒子中Si起始量的百分比。

[0051] 图31在暴露于含有2、5、10或15个^FSi-SPs降解产物的细胞培养基中48h后,在无菌条件下在细胞培养基中孵育达77天,人脑胶质母细胞瘤细胞的细胞活力。每个点代表一式三份孔的平均值,误差条表示标准偏差。使用未处理的细胞(即仅暴露于标准培养基的细胞)确定100%活力。

[0052] 图32在(a)低放大倍率和(b)高放大倍率下,冷冻干燥的alg-CaCO₃水凝胶(使用2wt%藻酸盐溶液和1.5mg CaCO₃颗粒合成)的横截面的SEM图像。(c).冻干alg-CaCO₃水凝胶表面结构的SEM图像。(d).在冻干的alg-CaCO₃水凝胶中的^FSi-SPs片段。(e).体外FITC-溶菌酶从alg-CaCO₃水凝胶中的Si-SPs、^FSi-SPs和^FSi-SPs中的释放百分比(^FSi-SPs通过使用20mg mL⁻¹血纤蛋白原和20mg mL⁻¹凝血酶作为血纤蛋白包衣来合成)。(f).alg-CaCO₃水凝胶在PBS(pH7.4)中于37℃降解42d。给出的数据是一式三份的平均值,误差条代表标准偏差。

[0053] 图33(a)的体外FITC-溶菌酶释放曲线。在用不同量的CaCO₃颗粒制备的alg-CaCO₃水凝胶中的Si-SPs:含2wt%的藻酸盐溶液的1mg、4.5mg或9mg分别表示为Si-SPs@²alg-¹CaCO₃水凝胶、Si-SPs@²alg-^{4.5}CaCO₃水凝胶和Si-SPs@²alg-⁹CaCO₃水凝胶。绿色线是在没有水凝胶的情况下的体外Si-SPs释放曲线。(b)在用不同浓度的藻酸盐溶液制备的alg-CaCO₃水凝胶中的Si-SPs:含1.5mg CaCO₃颗粒的1wt%、2wt%或3wt%分别表示为Si-SPs@¹alg-^{1.5}CaCO₃水凝胶、Si-SPs@²alg-^{1.5}CaCO₃水凝胶和Si-SPs@³alg-^{1.5}CaCO₃水凝胶。绿色线是在没有水凝胶的情况下的Si-SPs释放曲线。(c)在前42天内来自(a)的体外药物释放曲线,(d)在前42天内来自(b)的体外药物释放曲线。图c和d显示alg-CaCO₃水凝胶可以将FITC-溶菌酶从Si-SPs的突释延迟至28天。

[0054] 图34从^{Chi}Si-SPs(0.1wt%的壳聚糖和藻酸盐溶液以包覆Si-SPs。将Si-SPs包覆到1、2或3层壳聚糖和藻酸盐中)的体外FITC-溶菌酶释放曲线。

[0055] 图35从Si-SPs and ^{Chi}Si-SPs的体外BDNF释放曲线(0.1wt%的壳聚糖和藻酸盐溶液在2个循环包覆在Si-SPs上)。

[0056] 图36从Si-SPs and ^{Chi}Si-SPs的体外NT-3释放曲线(0.1wt%的壳聚糖和藻酸盐溶液在2个循环包覆在Si-SPs上)。

[0057] 图37从^{Chi}Si-SPs(1wt%的壳聚糖和藻酸盐溶液以包覆Si-SPs,壳聚糖和藻酸盐1个循环)的体外FITC-溶菌酶释放曲线。

具体实施方式

[0058] 一般技术和选择的定义

[0059] 除非另有明确定义,否则本文使用的所有技术和科学术语均应被视为具有与本领域(例如,生理学、临床研究、分子生物学、高表面积分子、电喷雾和生物化学)普通技术人员通常理解的含义。

[0060] 除非另有说明,本发明所用的技术是本领域技术人员熟知的标准方法。这些技术

在以下来源文献中都有描述和解释,例如,J.Perbal,《分子克隆实用指南》(A Practical Guide to Molecular Cloning),John Wiley and Sons(1984),Sambrook等人,《分子克隆:实验室手册》(Molecular Cloning:A Laboratory Manual),Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989),T.A.Brown(编),《基本分子生物学:一种实用方法》(Essential Molecular Biology:A Practical Approach),第1卷和第2卷,IRL Press(1991),D.M.Glover和B.D.Hames(编),以及F.M.Ausubel等人,(编),《最新分子生物学实验指南》(Current Protocols in Molecular Biology),Greene Pub.Associates and Wiley-Interscience(1988,包括目前为止的所有更新),Ed Harlow和David Lane(编)《抗体:实验室手册》(Antibodies:A Laboratory Manual),Cold Spring Harbor Laboratory,(1988),以及J.E.Coligan等人,(编)《最新免疫学实验指南》(Current Protocols in Immunology),John Wiley&Sons(包括目前为止的所有更新)。

[0061] 如本说明书和所附权利要求中所使用的单数形式的术语和单数形式“一(a)”、“一(an)”和“所述(the)”,例如,任选地包括复数指称对象,除非上下文另有明确说明。因此,例如,提及“超粒子”任选地包括多个超粒子。

[0062] 如本文所用,除非有相反的说明,否则术语“约”是指指定值的 $\pm 10\%$,更优选 $\pm 5\%$,更优选 $\pm 1\%$ 。

[0063] 术语“和/或”,例如“X和/或Y”应理解为意指“X和Y”或“X或Y”,并且应理解为提供对两种含义或任一含义的明确支持。

[0064] 在整个说明书中,词语“包括(comprise)”或诸如“包括(comprises)”或“包括(comprising)”的变化形式将被理解为意指包括所陈述的要素、整数或步骤,或要素、整数或步骤的组,但不排除任何其他要素、整数或步骤,或要素、整数或步骤的组。

[0065] 如本文所用,术语“治疗”是指设计用于在临床病理过程中改变所治疗的个体或细胞的自然过程的临床干预。示例性的所需治疗效果包括减少与所治疗病症有关的症状。在治疗听力损失的情况下,理想的治疗效果包括降低听力损失率和改善或减轻听力损失。例如,如果与病症相关的一个或多个症状减轻或消除,则个体“治疗”成功。

[0066] “治疗有效量”是指实现特定病症的可测量改善所需的至少最小量。治疗有效量还可以包括实现受试对象病症的可测量改善所需的至少最小量。治疗有效量可以一次或多次给药。治疗有效量可根据所治疗病症的严重程度以及所治疗患者的体重、年龄、种族背景、性别、健康和/或身体状况而变化。典型地,有效量将落在相对宽的范围内(例如,“剂量”范围),其可由执业医师通过常规试验和实验确定。治疗有效量可以在治疗期间以单一剂量或以重复一次或多次的剂量施用。

[0067] 有效负载

[0068] 根据本发明,超粒子可以包括各种有效负载。“有效负载”可以是用于治疗病症的任何药剂。试剂的实例包括生物制品如多核苷酸、抗体、单克隆抗体、抗体片段、抗体药物缀合物、蛋白、生物活性蛋白、融合蛋白、重组蛋白、肽、多肽、合成多肽、疫苗、治疗性血清、病毒、多核苷酸、细胞如干细胞或其部分以及小分子。

[0069] 示例性的病毒有效负载可包括适当修饰的逆转录病毒,腺病毒(AdV)、腺相关病毒(AAV)或重组形式如重组腺相关病毒(rAAV)及其衍生物如自补AAV(scAAV)和非重组整合AV。其它示例性的病毒治疗有效负载可包括单纯疱疹病毒(HSV)、慢病毒、牛痘和水泡性口

炎病毒 (VSV)。例如,病毒治疗有效负载可以包括AAV。各种AAV血清型是已知的,并且可以是合适的病毒有效负载。在一个实例中,AAV是血清型2。在另一个实例中,AAV是血清型1。在其它实例中,AAV是血清型3、4、7、8、9、10、11、12或13。

[0070] 在一个实例中,小分子是神经递质。术语“神经递质”在本发明的上下文中用于指通过化学突触将信号从一个细胞传递到另一个细胞的物质。通常,神经递质通过化学突触从一个神经元向靶细胞(例如另一个神经元、肌肉细胞或腺体细胞)传递信号。在另一个实例中,小分子是受体激动剂。术语“激动剂”在本发明的上下文中用于指当与受体结合时引发生理反应的物质。在另一个实例中,小分子是受体拮抗剂。术语“拮抗剂”在本发明的上下文中用于指干扰或抑制受体的生理作用的物质。

[0071] 示例性多核苷酸包括反义多核苷酸、双链DNA(dsDNA)或双链RNA(dsRNA)。在一个实例中,dsDNA或dsRNA是适体。在另一个实例中,dsRNA是siRNA、miRNA或shRNA。

[0072] 示例性抗体及其片段包括人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、单链抗体、双抗体、三抗体、四抗体或单结构域抗体。在一个实例中,抗体可以是双特异性的,抗体-药物缀合物或生物相似抗体。其它示例性多肽包括细胞因子、趋化因子、激素和凝血因子。在一个实例中,多肽是酶。示例性的酶包括蛋白酶、脂肪酶、天冬酰胺酶、liprotamases、组织纤溶酶原激活剂、胶原酶、谷氨酰胺酶、透明质酸酶、链激酶、尿酸酶、尿激酶或核酸酶,例如可编程核酸酶。在一个实例中,酶可以是DNA甲基转移酶。在一个实例中,酶可以是可编程的核酸酶,其被靶向以将遗传修饰引入基因或其调节区。例如,可编程核酸酶可以是RNA指导的工程化核酸酶(RGEN)。在一个实例中,RGEN来自古菌基因组或可以是其重组形式。在另一个实例中,RGEN可以来自细菌基因组或者是其重组形式。在另一个实例中,RGEN来自I型(CRISPR)-cas(CRISPR-相关)系统。在另一个实例中,RGEN来自II型(CRISPR)-cas(CRISPR-相关)系统。在另一个实例中,RGEN来自III型(CRISPR)-cas(CRISPR-相关)系统。在一个实例中,核酸酶是I类RGEN或II类RGEN。

[0073] 在另一个实例中,治疗有效负载是DNA甲基化抑制剂、组蛋白乙酰转移酶抑制剂或组蛋白脱乙酰酶抑制剂。

[0074] 在另一个实例中,治疗有效负载可以是在受试对象中刺激免疫应答的抗原。示例性抗原包括蛋白、肽、多糖或寡糖(游离的或与蛋白载体(carrier)缀合的)或其混合物。其它示例性抗原包括细胞或其部分或病毒颗粒或其部分。

[0075] 在一个实例中,治疗有效负载是抗肿瘤剂。

[0076] 其它示例性治疗有效负载包括内耳中膜受体的激动剂或拮抗剂。这样的治疗有效负载可以调节神经传递。在另一个实例中,治疗有效负载是可用于治疗一种或多种神经障碍,例如阿尔茨海默病,帕金森病,癫痫或多发性硬化的神经学药剂。

[0077] 在一个实例中,有效负载是“神经营养因子”。术语神经营养因子在本发明的上下文中用于指增强任何细胞包括来自听觉系统的细胞的生长或存活潜力的分子。例如,本发明内容包括的神经营养因子可以增强来自位于内耳、中耳或前庭系统中的听觉系统或其突触连接的细胞的生长或存活率。示例性细胞包括螺旋神经节神经元(SGN)、毛细胞、包括内耳和外耳毛细胞、耳蜗神经胶质细胞和施万细胞。示例性突触连接包括毛细胞、毛细胞和SGN或上述其它神经元之间的连接。其它实例包括罗森塔尔氏管(Rosenthal's canal)中的神经元细胞体或它们的突触连接,上中耳蜗区域中的神经元或突触连接和/或骨螺旋板中

的神经纤维。

[0078] 示例性神经营养因子可包括上述讨论的具有直接或间接增强来自听觉系统和/或其突触连接的细胞的存活率的已知治疗效果的试剂。

[0079] 在一个实例中,神经营养因子是神经营养蛋白。示例性神经营养肽包括脑衍生神经营养因子(BDNF)、神经生长因子、神经营养蛋白-3、神经营养蛋白-4、睫状神经营养因子(CNTF)家族成员如CNTF、白血病抑制因子(LIF)、白细胞介素-6(IL-6)、神经胶质成熟因子(GMF)、胰岛素生长因子-1(IGF-1)、神经调节蛋白1、神经调节蛋白2、神经调节蛋白3和神经调节蛋白4、血管内皮生长因子(VEGF)、神经胶质细胞衍生神经营养因子(GDNF)家族成员如GDNF、神经秩蛋白(NRTN)、artemin(ARTN)和人psp(PSPN)、肝配蛋白如A1、A2、A3、A4、A5、B1、B2和B3、胰岛素生长因子-1(IGF-1)和白细胞介素如IL-11。

[0080] 在一个实例中,神经营养因子选自脑源性神经营养因子(BDNF)、神经生长因子、神经营养蛋白-3、神经营养蛋白-4、睫状神经营养因子(CNTF)、神经胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)和IL-11组成的组。

[0081] 螺旋神经节神经元变性的一个原因是神经营养蛋白内源供应的丧失。因此,在一个实例中,神经营养因子是神经营养蛋白。术语“神经营养蛋白”在本发明的上下文中用于指诱导神经元和/或其突触连接存活、发育和/或功能的蛋白。示例性神经营养蛋白如上所述,包括BDNF、神经生长因子、神经营养蛋白-3和神经营养蛋白-4。因此,在一个实例中,超粒子包括BDNF。在另一个实例中,超粒子包括神经生长因子。在另一个实例中,超粒子包括神经营养蛋白-3。在另一个实例中,超粒子包括神经营养蛋白-4。在一个实例中,超粒子可以包括至少两种不同的神经营养蛋白。在其它实例中,超粒子可包括至少三种或四种不同的神经营养蛋白。

[0082] 通过施用包括多种不同治疗有效负载的超粒子可以提高治疗效果。因此,在一个实例中,超粒子可以包括至少两种、至少三种、至少四种、至少五种、至少六种、至少七种、至少八种、至少九种、至少10种不同的治疗有效负载。

[0083] 例如,超粒子可以包括至少两种不同的神经营养因子。在其它实例中,超粒子可包括至少三种、至少四种、至少五种不同的神经营养因子。在这些实施例中,考虑了神经营养因子如神经营养蛋白的各种组合。神经营养因子的示例性组合包括BDNF和神经生长因子, BDNF和神经营养蛋白-3、BDNF和神经营养蛋白-4、BDNF和CNTF、BDNF和GDNF、BDNF和IL-11、神经营养蛋白-3和神经营养蛋白-4、神经营养蛋白-3和CNTF、神经营养蛋白-3和CNTF、神经营养蛋白-3和GDNF、神经营养蛋白-3和IL-11、神经营养蛋白-4和CNTF、神经营养蛋白-4和GDNF、神经营养蛋白-4和IL-11、CNTF和GDNF、CNTF和IL-11、GDNF和IL-11、BDNF、神经营养蛋白-3和神经营养蛋白-4、BDNF、神经营养蛋白-3和CNTF、BDNF、神经营养蛋白-3和GDNF、BDNF、CNTF和GDNF、BDNF、CNTF和IL-11、神经营养蛋白-3、神经营养蛋白-4和CNTF、神经营养蛋白-3、神经营养蛋白-4和GDNF、神经营养蛋白-3、CNTF和GDNF、神经营养蛋白-3、神经营养蛋白-4和IL-11、神经营养蛋白-4、CNTF和GDNF、神经营养蛋白-4、CNTF和IL-11、BDNF、神经营养蛋白-3、神经营养蛋白-4和CNTF、BDNF、神经营养蛋白-3、神经营养蛋白-4和GDNF、BDNF、神经营养蛋白-3、CNTF和GDNF、BDNF、BDNF、神经营养蛋白-3、神经营养蛋白-4和IL-11、神经营养蛋白-3、神经营养蛋白-4、CNTF和GDNF、神经营养蛋白-3、神经营养蛋白-4、CNTF和IL-11。

[0084] 各种耳介入例如外科手术和听力装置的植入可导致副作用,例如中耳和内耳中的组织损伤、炎症和/或感染。抗这些副作用的生物学反应可以间接影响来自听觉系统的细胞和/或它们的突触连接的生长或存活潜力。因此,在一个实例中,神经营养因子有助于组织修复、减少炎症和/或减少感染。因此,其它示例性神经营养因子包括类固醇或抗氧化剂。其它示例性神经营养因子包括抗体或其它结合蛋白,例如抗原肌球蛋白受体激酶(TrK) B,抗TrK C或与p75神经营养蛋白受体相互作用的结合蛋白。例如,p75神经营养蛋白受体拮抗剂。在另一个实例中,神经营养因子包括核酸。例如,神经营养因子可包括基因治疗、沉默RNA如siRNA或miRNA、表达构建体如包括目的核酸的DNA质粒。在一个实例中,神经营养因子是包括编码视蛋白的核酸的表达构建体。

[0085] 神经营养因子的其它示例性组合包括类固醇、抗氧化剂、抗体或核酸和至少一种、至少两种、至少三种、至少四种、至少五种不同的神经营养因子。例如,超粒子可包括类固醇如地塞米松或泼尼松龙以及BDNF、神经生长因子、神经营养蛋白-3、神经营养蛋白-4和GDNF中的任何一种或多种。在另一个实例中,超粒子可包括表达载体(vector),表达载体(vector)包括视蛋白以及BDNF、神经生长因子、神经营养蛋白-3、神经营养蛋白-4和GDNF中的任何一种或多种。在另一个实例中,超粒子可包括抗体,例如抗原肌球蛋白受体激酶(TrK) B或抗TrK C以及BDNF、神经生长因子、神经营养蛋白-3、神经营养蛋白-4、GDNF和IL-11中的任何一种或多种。

[0086] 在一个实例中,超粒子可以包括至少两种、至少三种、至少四种、至少五种不同的治疗有效负载,其中至少一种治疗有效负载是神经营养因子。例如,超粒子可以包括至少三种不同的治疗有效负载,其中两种治疗有效负载是神经营养因子。在另一个实例中,超粒子可以包括至少四种不同的治疗有效负载,其中三种治疗有效负载是神经营养因子。在这些实施例中,治疗有效负载不需要增强来自听觉系统的细胞的生长或存活潜力,而是可以提供另一种治疗益处。例如,治疗有效负载可以在超粒子给药后抑制受试对象的免疫系统。在另一个实例中,超粒子可以包括降低来自听觉系统或其突触连接的细胞存活率和神经营养因子的有效负载。在实施例中,神经营养因子可以减轻由治疗有效负载引起的来自听觉系统或其突触连接的细胞存活率的减少。在一个实例中,超粒子包括抗肿瘤剂,包括顺铂或相关化合物、抗生素,包括氨基糖苷类(例如妥布霉素或相关化合物)、袪利尿剂例如呋塞米、抗代谢物例如甲氨蝶呤、水杨酸盐例如阿司匹林或放射性部分和神经营养因子。例如,超粒子可包括抗生素和BDNF、神经生长因子、神经营养蛋白-3、神经营养蛋白-4、GDNF和IL-11中的任何一种或多种。

[0087] 根据给药部位,有效负载可能需要从中耳扩散到内耳或前庭系统。这可以通过有效负载穿过圆窗或卵圆窗的扩散而发生。因此,在一个实例中,超粒子可以包括有助于有效负载穿过圆窗和卵圆窗扩散到内耳和/或前庭系统的分子。

[0088] 在一个实例中,有效负载具有大于7的等电点。在另一个实例中,有效负载具有大于8的等电点。在另一个实例中,有效负载具有大于9的等电点。在另一个实例中,有效负载具有大于10的等电点。在另一个实例中,有效负载的等电点在7至10之间。在另一个实例中,有效负载的等电点在7至9之间。在另一个实例中,有效负载的等电点在8至10之间。在另一个实例中,有效负载的等电点在9至10之间。

[0089] 在本发明内容的上下文中,包括有效负载的超粒子可称为负载超粒子。制备负载

超粒子的方法没有特别限制,只要所得超粒子可以负载至少1.5 μ g的有效负载。优选地,所得到的超粒子可以将有效负载递送到受试对象的耳朵。示例性的负载方法见Wang等人(2009) J. Mater. Chem. 19, 6451的综述,并且包括有效负载封装和捕获。在一个非限制性的实例中,可以通过使超粒子与有效负载物的水溶液接触,随后孵育一段时间来负载超粒子。有效负载溶液可以含有过量的待负载到超粒子上的有效负载,并且可以在室温下进行孵育。含有超粒子和有效负载的溶液的搅拌可用于增强有效负载的负载。

[0090] 本领域的技术人员将理解,有效负载的所需水平将可能受到有效负载本身和根据本发明内容处理的指示的影响。

[0091] 超粒子

[0092] 术语“超粒子”(“SP”)在本发明的上下文中用于指包括孔网络的附聚颗粒。孔网络为超粒子提供了用于承载有效负载的大的孔体积和表面积。大的孔体积和表面积是有利的,因为它可以增加由超粒子携带的有效负载量。在一个实例中,根据本发明的超粒子是团聚的纳米颗粒。

[0093] 在一个实例中,根据本发明的超粒子包括至少1.5 μ g的有效负载。在另一个实例中,超粒子包括至少2.0 μ g的有效负载。

[0094] 在另一个实例中,根据本发明的超粒子包括至少2.5 μ g的有效负载。在另一个实例中,超粒子包括至少2.6 μ g的有效负载。在另一个实例中,超粒子包括至少2.7 μ g的有效负载。在另一个实例中,超粒子包括至少2.8 μ g的有效负载。在另一个实例中,超粒子包括至少2.9 μ g的有效负载。在另一个实例中,超粒子包括至少3.0 μ g的有效负载。在另一个实例中,超粒子包括至少3.1 μ g的有效负载。在另一个实例中,超粒子包括至少3.2 μ g的有效负载。在另一个实例中,超粒子包括至少3.3 μ g的有效负载。在另一个实例中,超粒子包括至少3.4 μ g的有效负载。在另一个实例中,超粒子包括至少3.5 μ g的有效负载。在另一个实例中,超粒子包括至少3.6 μ g的有效负载。在另一个实例中,超粒子包括至少3.7 μ g的有效负载。在另一个实例中,超粒子包括至少3.8 μ g的有效负载。在另一个实例中,超粒子包括至少3.9 μ g的有效负载。在另一个实例中,超粒子包括至少4.0 μ g的有效负载。在另一个实例中,超粒子包括至少4.5 μ g的有效负载。在另一个实例中,超粒子包括至少5.0 μ g的有效负载。在另一个实例中,超粒子包括至少5.5 μ g的有效负载。在另一个实例中,超粒子包括至少6.0 μ g的有效负载。在另一个实例中,超粒子包括至少6.5 μ g的有效负载。在另一个实例中,超粒子包括至少7.0 μ g的有效负载。在另一个实例中,超粒子包括至少7.5 μ g的有效负载。在另一个实例中,超粒子包括至少8.0 μ g的有效负载。在另一个实例中,超粒子包括至少8.5 μ g的有效负载。在另一个实例中,超粒子包括至少9.0 μ g的有效负载。在另一个实例中,超粒子包括至少9.5 μ g的有效负载。在另一个实例中,超粒子包括至少10 μ g的有效负载。在另一个实例中,超粒子包括至少10.5 μ g的有效负载。在另一个实例中,超粒子包括至少11 μ g的有效负载。在另一个实例中,超粒子包括至少11.5 μ g的有效负载。在另一个实例中,超粒子包括至少12 μ g的有效负载。在另一个实例中,超粒子包括至少15 μ g的有效负载。在另一个实例中,超粒子包括至少20 μ g的有效负载。

[0095] 例如,超粒子可以包括至少6 μ g的有效负载。

[0096] 在另一个实例中,超粒子可以包括在约2.5至10 μ g之间的有效负载。在另一个实例中,超粒子可以包括在约3至10 μ g之间的有效负载。在另一个实例中,超粒子可以包括在约4

至10 μ g之间的有效负载。在另一个实例中,超粒子可以包括在约5至10 μ g之间的有效负载。在另一个实例中,超粒子可以包括在约6至10 μ g之间的有效负载。在另一个实例中,超粒子可以包括在约5至15 μ g之间的有效负载。在另一个实例中,超粒子可以包括在约5至20 μ g之间的有效负载。在另一个实例中,超粒子可以包括在约8至20 μ g之间的有效负载。在另一个实例中,超粒子可以包括在约8至15 μ g之间的有效负载。

[0097] 例如,超粒子可包括约6至8 μ g的有效负载。

[0098] 在一个实例中,根据本发明的超粒子包括至少1.5 μ g的神经营养因子。在另一个实例中,超粒子包括至少2.0 μ g的神经营养因子。

[0099] 在另一个实例中,超粒子包括至少2.5 μ g的神经营养因子。在另一个实例中,超粒子包括至少3.0 μ g的神经营养因子。在另一个实例中,超粒子包括至少3.5 μ g的神经营养因子。在另一个实例中,超粒子包括至少4.0 μ g的神经营养因子。在另一个实例中,超粒子包括至少5.0 μ g的神经营养因子。在另一个实例中,超粒子包括至少6.0 μ g的神经营养因子。在另一个实例中,超粒子包括至少7.0 μ g的神经营养因子。在另一个实例中,超粒子包括至少8.0 μ g的神经营养因子。在另一个实例中,超粒子包括至少9.0 μ g的神经营养因子。在另一个实例中,超粒子包括至少10 μ g的神经营养因子。在另一个实例中,超粒子包括至少10.5 μ g的神经营养因子。在另一个实例中,超粒子包括至少11 μ g的神经营养因子。在另一个实例中,超粒子包括至少11.5 μ g的神经营养因子。在另一个实例中,超粒子包括至少12 μ g的神经营养因子。在另一个实例中,超粒子包括至少15 μ g的神经营养因子。在另一个实例中,超粒子包括至少20 μ g的神经营养因子。

[0100] 例如,超粒子可以包括至少6 μ g的神经营养因子。在另一个实例中,超粒子可以包括在约2.5至10 μ g之间的神经营养因子。在另一个实例中,超粒子可以包括在约5至10 μ g之间的神经营养因子。在另一个实例中,超粒子可以包括在约6至10 μ g之间的神经营养因子。例如,超粒子可包括约6至8 μ g的神经营养因子。在另一个实例中,超粒子可以包括在约5至15 μ g之间的神经营养因子。在另一个实例中,超粒子可以包括在约5至20 μ g之间的神经营养因子。在另一个实例中,超粒子可以包括在约8至20 μ g之间的神经营养因子。在另一个实例中,超粒子可以包括在约8至15 μ g之间的神经营养因子。

[0101] 在一个实例中,根据本发明的超粒子包括至少1.5 μ g的神经营养蛋白。在另一个实例中,超粒子包括至少2.0 μ g的神经营养蛋白。

[0102] 在另一个实例中,超粒子包括至少2.5 μ g的神经营养蛋白。在另一个实例中,超粒子包括至少3.0 μ g的神经营养蛋白。在另一个实例中,超粒子包括至少3.5 μ g的神经营养蛋白。在另一个实例中,超粒子包括至少4.0 μ g的神经营养蛋白。在另一个实例中,超粒子包括至少5.0 μ g的神经营养蛋白。在另一个实例中,超粒子包括至少6.0 μ g的神经营养蛋白。在另一个实例中,超粒子包括至少7.0 μ g的神经营养蛋白。在另一个实例中,超粒子包括至少8.0 μ g的神经营养蛋白。在另一个实例中,超粒子包括至少9.0 μ g的神经营养蛋白。在另一个实例中,超粒子包括至少10 μ g的神经营养蛋白。在另一个实例中,超粒子包括至少10.5 μ g的神经营养蛋白。在另一个实例中,超粒子包括至少11 μ g的神经营养蛋白。在另一个实例中,超粒子包括至少11.5 μ g的神经营养蛋白。在另一个实例中,超粒子包括至少12 μ g的神经营养蛋白。在另一个实例中,超粒子包括至少15 μ g的神经营养蛋白。在另一个实例中,超粒子包括至少20 μ g的神经营养蛋白。

[0103] 例如,超粒子可以包括至少6 μ g的神经营养蛋白。

[0104] 在另一个实例中,超粒子可以包括在约2.5至10 μ g之间的神经营养蛋白。在另一个实例中,超粒子可以包括在约5至10 μ g之间的神经营养蛋白。在另一个实例中,超粒子可以包括在约6至10 μ g之间的神经营养蛋白。例如,超粒子可包括约6至8 μ g的神经营养蛋白。在另一个实例中,超粒子可以包括在约5至15 μ g之间的神经营养蛋白。在另一个实例中,超粒子可以包括在约5至20 μ g之间的神经营养蛋白。在另一个实例中,超粒子可以包括在约8至20 μ g之间的神经营养蛋白。在另一个实例中,超粒子可以包括在约8至15 μ g之间的神经营养蛋白。

[0105] 在一个实例中,根据本发明的超粒子包括至少1.5 μ g的有效负载,其中有效负载具有9至10的等电点。在另一个实例中,超粒子包括至少2.0 μ g的有效负载,其中有效负载具有9至10的等电点。

[0106] 在另一个实例中,超粒子包括至少2.5 μ g的有效负载,其中有效负载具有9至10的等电点。在另一个实例中,超粒子包括至少3.0 μ g的有效负载,其中有效负载具有9至10的等电点。在另一个实例中,超粒子包括至少3.5 μ g的有效负载,其中有效负载具有9至10的等电点。在另一个实例中,超粒子包括至少4.0 μ g的有效负载,其中有效负载具有9至10的等电点。在另一个实例中,超粒子包括至少5.0 μ g的有效负载,其中有效负载具有9至10的等电点。在另一个实例中,超粒子包括至少6.0 μ g的有效负载,其中有效负载具有9至10的等电点。在另一个实例中,超粒子包括至少7.0 μ g的有效负载,其中有效负载具有9至10的等电点。在另一个实例中,超粒子包括至少8.0 μ g的有效负载,其中有效负载具有9至10的等电点。在另一个实例中,超粒子包括至少9.0 μ g的有效负载,其中有效负载具有9至10的等电点。在另一个实例中,超粒子包括至少10 μ g的有效负载,其中有效负载具有9至10的等电点。在另一个实例中,超粒子包括至少10.5 μ g的有效负载,其中有效负载具有9至10的等电点。在另一个实例中,超粒子包括至少11 μ g的有效负载,其中有效负载具有9至10的等电点。在另一个实例中,超粒子包括至少11.5 μ g的有效负载,其中有效负载具有9至10的等电点。在另一个实例中,超粒子包括至少12 μ g的有效负载,其中有效负载具有9至10的等电点。在另一个实例中,超粒子包括至少15 μ g的有效负载,其中有效负载具有9至10的等电点。在另一个实例中,超粒子包括至少20 μ g的有效负载,其中有效负载具有9至10的等电点。

[0107] 例如,超粒子可以包括至少6 μ g的有效负载,其中有效负载具有9至10之间的等电点。

[0108] 在另一个实例中,超粒子可包括约2.5至10 μ g的有效负载,其中有效负载具有9至10之间的等电点。在另一个实例中,超粒子可包括约5至10 μ g的有效负载,其中有效负载具有9至10之间的等电点。在另一个实例中,超粒子可包括约6至10 μ g的有效负载,其中有效负载具有9至10之间的等电点。例如,超粒子可包括约6至8 μ g的有效负载,其中有效负载具有9至10之间的等电点。在另一个实例中,超粒子可包括约5至20 μ g的有效负载,其中有效负载具有9至10之间的等电点。在另一个实例中,超粒子可包括约5至15 μ g的有效负载,其中有效负载具有9至10之间的等电点。在另一个实例中,超粒子可包括约8至20 μ g的有效负载,其中有效负载具有9至10之间的等电点。在另一个实例中,超粒子可包括约8至15 μ g的有效负载,其中有效负载具有9至10之间的等电点。例如,有效负载可以是具有9至10之间的等电点的神经营养蛋白。

[0109] 在一个实例中,可以在藻酸盐水凝胶中提供具有上述有效负载的超粒子。例如,藻酸盐水凝胶可以是alg-CaCO₃水凝胶。

[0110] 本发明的超粒子可以负载有上述示例性的有效负载,并且可以具有选自以下讨论的实例的孔径。在一个实例中,超粒子是微孔的。在本发明的上下文中使用的术语“微孔”是指孔径小于约2nm的颗粒。例如,微孔超粒子可以具有约0.5nm至约2nm的孔径。在其它实例中,微孔超粒子具有约1nm到约2nm,约1.5nm到约2nm的孔径。在另一个实例中,超粒子是介孔的。术语“介孔”在本发明的上下文中用于指具有直径为约2nm至约50nm的孔的颗粒。例如,介孔超粒子可具有约2nm至约50nm的孔径。在其它实例中,介孔超粒子具有约2nm至约40nm,约2nm至约30nm的孔径。在另一个实例中,超粒子是大孔的。术语“大孔”在本发明的上下文中用于指孔径大于约50nm的颗粒。例如,大孔超粒子可以具有约50nm至约500nm的孔径。在其它实例中,大孔超粒子具有约50nm到约250nm,约50nm到约150nm,约50nm到约100nm的孔径。

[0111] 在一个实例中,超粒子由微孔纳米颗粒组成。在一个实例中,超粒子由孔径为约0.5nm至约2nm的纳米颗粒组成。在其它实例中,超粒子由孔径为约1nm至约2nm,约1.5nm至约2nm的纳米颗粒组成。在另一个实例中,超粒子由介孔纳米颗粒组成。在一个实例中,超粒子由孔径为约2nm至约50nm的纳米颗粒组成。在其它实例中,超粒子由孔径为约2nm至约40nm,约2nm至约30nm的纳米颗粒组成。在另一个实例中,超粒子由大孔纳米颗粒组成。在一个实例中,超粒子由孔径为约50nm至约95nm的纳米颗粒组成。在其它实例中,超粒子由孔径为约50nm至约85nm,约50nm至约75nm,约50nm至约65nm的纳米颗粒组成。

[0112] 在另一个实例中,超粒子由具有双峰孔结构的纳米颗粒组成。术语“双峰”在本发明的上下文中用于指包括多种孔径,通常为较小孔径和较大孔径的颗粒。例如,超粒子可包括具有介孔和大孔的纳米颗粒。在一个实例中,这种超粒子由具有2nm到95nm范围内的孔的纳米颗粒组成。在另一个实例中,超粒子由具有从10nm到95nm范围内的孔的双峰纳米颗粒组成。在另一个实例中,超粒子由具有从15nm到95nm范围内的孔的双峰纳米颗粒组成。

[0113] 在其它实例中,超粒子可包括1nm至200nm的孔径。在其它实例中,超粒子由具有约1nm到约5nm的较小孔径和约10nm到约50nm的较大孔径的双峰纳米颗粒组成。在另一个实例中,超粒子由具有约2nm至约4nm的较小孔径和约15nm至约40nm的较大孔径的双峰纳米颗粒组成。在另一个实例中,超粒子由具有约2nm至约3nm的较小孔径和约4nm至约40nm的较大孔径的双峰纳米颗粒组成。在其它实例中,超粒子由具有约10nm到约50nm的较小孔径和约70nm到约95nm的较大孔径的双峰纳米颗粒组成。在另一个实例中,超粒子由具有约15nm至约40nm的较小孔径和约80nm至约95nm的较大孔径的双峰纳米颗粒组成。

[0114] 在一个实例中,超粒子由微粒组成。在另一个实例中,超粒子由微孔微粒组成。在一个实例中,超粒子由孔径为约0.5nm至约2nm的微粒组成。在其它实例中,超粒子由孔径为约1nm至约2nm,约1.5nm至约2nm的微粒组成。在另一个实例中,超粒子由介孔微粒组成。在一个实例中,超粒子由孔径为约2nm至约50nm的微粒组成。在其它实例中,超粒子由孔径为约2nm至约40nm,约2nm至约30nm的微粒组成。在另一个实例中,超粒子由大孔微粒组成。在一个实例中,超粒子由孔径为约50nm至约500nm的微粒组成。在其它实施例中,超粒子由孔径为约50nm至约250nm,约50nm至约150nm,约50nm至约100nm的微粒组成。

[0115] 在另一个实例中,超粒子由具有双峰孔结构的微粒组成。例如,超粒子可以包括具

有介孔和大孔的微粒。在一个实例中,这样的超粒子由具有2nm到500nm的孔的微粒组成。在另一个实例中,超粒子由具有从10nm到250nm的孔的双峰微粒组成。在另一个实例中,超粒子由具有从15nm到150nm的孔的双峰微粒组成。

[0116] 在其它实例中,超粒子由具有约1nm到约5nm的较小孔径和约10nm到约50nm的较大孔径的双峰微粒组成。在另一个实例中,超粒子由具有约2nm至约4nm的较小孔径和约15nm至约70nm的较大孔径的双峰微粒组成。在另一个实例中,超粒子由具有约2nm至约3nm的较小孔径和约15nm至约65nm的较大孔径的双峰微粒组成。在其它实例中,超粒子由具有约10nm到约30nm的较小孔径和约15nm到约200nm的较大孔径的双峰微粒组成。在另一个实例中,超粒子由具有约15nm至约40nm的较小孔径和约15nm至约150nm的较大孔径的双峰微粒组成。在另一个实例中,超粒子由具有约20nm至约30nm的较小孔径和约100nm至约120nm的较大孔径的双峰微粒组成。

[0117] 在另一个实例中,超粒子负载有至少3 μ g的上述有效负载,并且由具有约2nm至约4nm的较小孔径和约15nm至约40nm的较大孔径的双峰纳米颗粒组成。在另一个实例中,超粒子负载有至少5 μ g的上述有效负载,并且由具有约2nm至约4nm的较小孔径和约15nm至约40nm的较大孔径的双峰纳米颗粒组成。

[0118] 在另一个实例中,超粒子负载有至少8 μ g的上述有效负载,并且由具有约2nm至约4nm的较小孔径和约15nm至约40nm的较大孔径的双峰纳米颗粒组成。在另一个实例中,超粒子负载有至少10 μ g的上述有效负载,并且由具有约2nm至约4nm的较小孔径和约15nm至约40nm的较大孔径的双峰纳米颗粒组成。在这些实施例中,可以在藻酸盐水凝胶中提供超粒子。例如,藻酸盐水凝胶可以是alg-CaCO₃水凝胶。

[0119] 在另一个实例中,超粒子由微粒和纳米颗粒组成。在实施例中,微粒和纳米颗粒可以具有上述提及的孔径。例如,超粒子可以由具有双峰孔结构的微粒和纳米颗粒组成。

[0120] 在一个实例中,超粒子可具有基本上均匀的孔径。在另一个实例中,超粒子包括可变孔径。在该实例中,孔径可以是可变的,但是落在特定的尺寸范围内。例如,超粒子可以主要是介孔的。在另一个实例中,超粒子可以主要是大孔的。在另一个实例中,超粒子由具有基本均匀孔径的纳米颗粒组成。在另一个实例中,超粒子由具有基本上均匀的小孔径和大孔径的双峰纳米颗粒组成。在另一个实例中,超粒子由具有基本均匀孔径的微粒组成。在另一个实例中,超粒子由具有基本上均匀的小孔径和大孔径的双峰微粒组成。

[0121] 在一个实例中,上述提及的超粒子可具有有序的孔结构。这些超粒子具有规则的、三维间隔的孔。在另一个实例中,以上提及的超粒子可以具有无序的孔结构。这些超粒子具有不规则的、三维间隔的孔。在另一个实例中,超粒子具有有序和无序孔结构的组合。

[0122] 本领域技术人员应当理解,可以通过例如透射电子显微术(TEM)、扫描电子显微术(SEM)和X射线计算机断层扫描来测量超粒子孔径。本领域技术人员可以通过测量其三维结构最宽点的宽度来确定具有上述示例孔径的超粒子。在一个实例中,最宽的点或孔可以位于超粒子的表面。

[0123] 本发明的超粒子的特征在于它们的微粒之间的距离。在一个实例中,颗粒之间的平均距离可以从大约80nm到大约400nm。在另一个实例中,胶体颗粒之间的平均距离为约90nm至约300nm,约100nm至

[0124] 在一个实例中,超粒子孔是连通的。例如,超粒子可以包括一系列互连的孔。在另

一个实例中,不连接超粒子的孔。在另一个实例中,超粒子具有连通孔和不连通孔的组合。

[0125] 本发明的超粒子的特征在于它们的孔体积。在一个实例中,超粒子孔体积的范围从约 0.5mLg^{-1} 至约 10mLg^{-1} 。在另一个实例中,超粒子具有约 0.8mLg^{-1} 至约 5mLg^{-1} 、约 1mLg^{-1} 至约 2.5mLg^{-1} 、约 1.5mLg^{-1} 至约 2mLg^{-1} 的孔体积。

[0126] 本发明的超粒子可具有中空芯或环形芯。在一个实例中,超粒子芯的内部体积是超粒子的总体积的至少约45%、至少约55%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%。生产中空芯超粒子的示例性方法包括酸芯工艺,例如US 4,468,498中描述的那些,和酯芯工艺,例如US 5,157,084和5,521,253中描述的那些。

[0127] 本发明的超粒子的特征在于其结构的表面积。在一个实例中,超粒子的表面积范围从大约 $500\text{m}^2\text{g}^{-1}$ 至约 $1500\text{m}^2\text{g}^{-1}$ 。在另一个实例中,超粒子具有介于约 $5500\text{m}^2\text{g}^{-1}$ 和约 $1250\text{m}^2\text{g}^{-1}$ 、约 $600\text{m}^2\text{g}^{-1}$ 和 $1000\text{m}^2\text{g}^{-1}$ 、约 $600\text{m}^2\text{g}^{-1}$ 和 $700\text{m}^2\text{g}^{-1}$ 之间的表面积。在一个实例中,超粒子的表面积约为 $600\text{m}^2\text{g}^{-1}$ 。在一个实例中,超粒子的表面积约为 $620\text{m}^2\text{g}^{-1}$ 。

[0128] 根据本发明公开内容的超粒子的特征在于特定的体外释放曲线。在一个实例中,超粒子释放有效负载至少50天。在一个实例中,超粒子释放有效负载至少100天。在一个实例中,超粒子释放有效负载至少150天。在一个实例中,包覆超粒子具有基本上线性的释放曲线。本领域技术人员可以使用各种方法测量超粒子的体外释放曲线。这些方法的实例在下面的实施例7中讨论。例如,本文公开的超粒子可以在诸如PBS的溶液中孵育之前用诸如FITC-溶菌酶的标记有效负载负载。可以使用荧光的间歇测量来确定随时间释放的有效负载水平(如, μg)。本领域技术人员将能够通过绘制随时间的有效负载释放图和拟合标准曲线来容易地识别突释和/或确定释放曲线是否基本上是线性的。在一个实例中,基本上线性的释放曲线具有线性标准曲线, $R^2 > 0.9$ 。在另一个实例中,基本上线性的释放曲线具有线性标准曲线, $R^2 > 0.92$ 。在另一个实例中,基本上线性的释放曲线具有线性标准曲线, $R^2 > 0.95$ 。在另一个实例中,基本上线性的释放曲线具有线性标准曲线, $R^2 > 0.97$ 。在另一个实例中,基本上线性的释放曲线具有线性标准曲线, $R^2 > 0.98$ 。在另一个实例中,基本上线性的释放曲线具有线性标准曲线, $R^2 > 0.99$ 。在另一个实例中,基本上线性的释放曲线具有线性标准曲线,其中 R^2 在0.9和0.99之间。在另一个实例中,基本上线性的释放曲线具有线性标准曲线,其中 R^2 在0.92和0.99之间。在另一个实例中,基本上线性的释放曲线具有线性标准曲线,其中 R^2 在0.95和0.99之间。

[0129] 在一个实例中,突释通过有效负载释放的显著增加以及随后的更持续的释放曲线来确定。突释的实例示于下图中。在一个实例中,突释的特征在于在前7天内大约30-75%的有效负载释放。在另一个实例中,突释的特征在于在前7天内大约30-70%的有效负载释放。在另一个实例中,突释的特征在于在前7天内大约35-65%的有效负载释放。在另一个实例中,突释的特征在于在前7天内大约40-60%的有效负载释放。当然,突释百分比将由有效负载的类型决定。例如,溶菌酶的突释可以表征为在前7天内大约55-75%的有效负载释放。在另一个实例中,BDNF的突释可以表征为在前7天内大约35-70%的有效负载释放。

[0130] 在一个实例中,本发明包括的持续释放曲线的特征在于在前7天内大约3-25%的有效负载释放。在另一个实例中,本发明包括的持续释放曲线的特征在于在前7天内大约5-25%的有效负载释放。

[0131] 在另一个实例中,本发明包括的持续释放曲线的特征在于在前7天内大约5-15%的有效负载释放。在另一个实例中,本发明包括的持续释放曲线的特征在于在前7天内大约5-10%的有效负载释放。在这些实例中,有效负载可以是神经营养蛋白。

[0132] 同样,持续释放百分比将由有效负载的类型决定。例如,溶菌酶的持续释放可以表征为在前7天内大约15-40%的有效负载释放。在另一个实例中,BDNF或NT3的持续释放可以表征为在前7天约5-10%的有效负载释放。

[0133] 在一个实例中,上述持续释放曲线也可以与基本线性的有效负载释放标准曲线相关。

[0134] 在一个实例中,观察到对于本发明所包括的超粒子有效负载的延迟释放。例如,可以基本上或完全抑制有效负载的释放,直到超粒子包衣充分生物降解。例如,从包覆的超粒子中释放有效负载可以在给药后最初几天基本上或完全被抑制。在一个实例中,有效负载从包覆的超粒子中的释放可以被基本上或完全抑制至少两天。在另一个实例中,有效负载从包覆的超粒子中的释放可以被基本上或完全抑制至少三天。在另一个实例中,有效负载从包覆的超粒子中的释放可以被基本上或完全抑制至少四天。在另一个实例中,有效负载从包覆的超粒子中的释放可以被基本上或完全抑制至少五天。在另一个实例中,有效负载从包覆的超粒子中的释放可以被基本上或完全抑制三至五天。

[0135] 在一个实例中,本发明的超粒子由直径为约1nm至100nm的纳米颗粒产生。在另一个实例中,超粒子由直径在约0.1 μ m和100 μ m之间的微粒产生。在另一个实例中,超粒子由纳米颗粒和微粒产生。

[0136] 形成本发明的超粒子的示例性颗粒包括有机颗粒、无机颗粒、金属颗粒或其组合。示例性的有机颗粒包括聚合物颗粒,例如聚乙醇酸(PGA)、聚乳酸(PLA)、聚(甲基丙烯酸)、聚(乙基丙烯酸)、聚丙烯酸(PAA)、聚(N-异丙基丙烯酰胺)、聚(N,N-二甲基丙烯酰胺)、聚酰胺、聚2-羟基丁酸酯(PHB)、明胶、聚己内酯(PCL)和聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)。示例性无机颗粒包括矿物填料,例如重质填料或高密度填料、颜料、粘土和其它合成颗粒。其它示例性无机颗粒包括致密矿物如重晶石、赤铁矿、氧化镁,无机氧化物包括二氧化钛、氧化钙、氧化锌、氧化镁、氧化铈、二氧化锆和二氧化硅。在一个实例中,材料是二氧化硅(例如二氧化硅)。因此,在一个实例中,超粒子可称为二氧化硅超粒子。示例性金属颗粒包括金、银和铜。在一个实例中,超粒子可以包括相同的微粒。例如,超粒子可以基本上由二氧化硅颗粒组成。在另一个实例中,超粒子可以包括不同的颗粒;例如二氧化硅和粘土颗粒。在其它实例中,超粒子可包括至少三个、至少四个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10种不同粒子。

[0137] 在一个实例中,超粒子包括聚合电解质或聚合电解质材料。这种超粒子的实例公开于W0 2006/037160中。在实施例中,聚合电解质可以是带正电荷的聚合电解质(或具有带正电荷的能力)或带负电荷的聚合电解质(或具有带负电荷的能力)或具有零净电荷。

[0138] 本发明的超粒子可具有各种形状。例如,超粒子可以具有球形。示例性的球形包括球体和卵形体。在另一个实例中,超粒子具有非球形形状。示例性的非球形形状包括哑铃形、半球形、圆盘形、四面体形、纤维形、球柱形和不规则形。在一个实例中,超粒子可以具有有序结构。例如,超粒子可以包括有序阵列。

[0139] 本发明的球形超粒子的特征在于它们的直径。例如,本发明的超粒子具有大于100

μm 的直径。例如,本发明的超粒子可以具有至少约150 μm 、约200 μm 、约250 μm 、约300 μm 、约350 μm 、约400 μm 、约450 μm 、约500 μm 、约550 μm 、约600 μm 、约650 μm 、约700 μm 、约750 μm 、约800 μm 、约850 μm 、约900 μm 、约950 μm 、约1000 μm 的直径。例如,超粒子可以具有约550 μm 的直径。这种超粒子的直径是有利的,因为它允许高载药量,同时便于通过套管进行内耳递送。在其他实例中,超粒子可以具有至少约150 μm 至约1000 μm 、约200 μm 至约900 μm 、约300 μm 至约800 μm 之间的直径。在另一个实例中,超粒子具有在约400 μm 和600 μm 之间的直径。在另一个实例中,超粒子具有在约450 μm 和550 μm 之间的直径。在另一个实例中,超粒子具有在约520 μm 和580 μm 之间的直径。在另一个实例中,超粒子具有在约460 μm 和540 μm 之间的直径。在另一个实例中,超粒子具有在约470 μm 和530 μm 之间的直径。在另一个实例中,超粒子具有在约480 μm 和520 μm 之间的直径。在另一个实例中,超粒子具有在约490 μm 和510 μm 之间的直径。在其它实例中,超粒子的特征在于其三维结构的最宽点的宽度。例如,超粒子可以具有与上述示例直径一致的宽度。

[0140] 在另一个实例中,通过添加官能部分来改性超粒子表面,以增强有效负载的负载。可以将任何数量的官能部分加入到超粒子的表面上,选择官能部分以补充所负载的有效负载。在一个实例中,将诸如3-氨基丙基三乙氧基硅烷(APTS)的部分接枝到二氧化硅超粒子的表面上。这引入了能够与有效负载上存在的任何羧基相互作用的胺官能团。在另一个实例中,将超粒子改性以承受总净电荷,这增强了有效负载的负载(Tan等人,Adv.Mater.(2012) 24,3362-3366)。例如,可以将超粒子的表面改性以承载总净正电荷,从而增强承载总净负电荷的有效负载的负载。在另一个实例中,将超粒子的表面改性以承载总净负电荷,使得承载总净正电荷的有效负载的负载增强。

[0141] 本发明的超粒子还可以包括交联的官能部分。例如,官能部分可以通过化学反应交联。在一个实例中,聚乙醇酸(PGA)分子通过PGA分子与胱胺的化学反应而交联(Tan等人,Adv.Mater.(2012) 24,3362-3366)。

[0142] 可生物降解包衣

[0143] 在某些实施方案中,可生物降解的包衣可用于减少或消除本文公开的超粒子的有效负载的初始突释。因此,在一个实例中,本发明包括包括本文所述的有效负载的超粒子,有效负载包覆有生物可降解包衣。

[0144] 术语“可生物降解的”在本发明的上下文中用于描述随时间分解的包衣,特别是在对受试对象给药后。在这种情况下,包衣的破裂与有效负载从超粒子释放到受试对象上同时发生。例如,本发明所包括的可生物降解的包衣在给药至受试对象的内耳后可以降解。在另一个实例中,本发明所包括的可生物降解的包衣在给药至受试对象的耳蜗后可以降解。

[0145] 术语“包衣”在本发明的上下文中用于指施加到表面或包封本文公开的超粒子及其有效负载的至少一层组合物。在一个实例中,至少部分超粒子被包覆。在另一个实例中,超粒子基本上被包覆。

[0146] 在一个实例中,将包衣施加或形成到本文公开的超粒子的表面上。术语“直接包衣”可用于描述当包衣直接施加或形成到它们的表面上时的这类超粒子。例如,直接包覆的超粒子可以在用催化剂处理之前包覆在前体物质中,以将包衣直接形成到超粒子的表面上。

[0147] 本发明所包括的包覆的超粒子的其它实例包括在诸如凝胶制剂或泡沫制剂的制

剂中提供的超粒子。在这些实例中,制剂是可生物降解的,并且例如可以包括可生物降解的凝胶或泡沫。例如,作为制剂中的固体浮现物提供的超粒子在本发明的上下文中被认为是包覆的。在实例中,超粒子可以分散在整个可生物降解的制剂中。

[0148] 本发明所包括的包衣没有特别限制,只要它们与超粒子有效负载相容(即不降解有效负载),对受试对象是生物学可接受的,并且减缓有效负载从本文公开的超粒子中的释放。因此,各种可生物降解的有机和无机聚合物可用作本发明上下文中的包衣,如美国专利 4,434,153 中描述的,其公开了各种纤维素材料,聚乙烯基聚合物等,它们在从最初给药后几分钟到给药后几小时的时间内溶解或生物降解并释放它们的内容物,这取决于包衣或封装材料及其厚度。其它示例性包衣材料包括天然和合成材料,例如 (a) 动物来源的结构蛋白和水胶体; (b) 植物来源的多糖和其它水胶体; 和 (c) 合成聚合物。这些基质材料中的一些适合于它们的天然形式,但其它基质材料,特别是水胶体,需要通过化学改性或物理改性如取向、辐射交联等来不溶解。示例性的第一类是:天然和修饰的胶原、肌肉蛋白、弹性蛋白、角蛋白、节肢弹性蛋白和血纤蛋白。示例性的多糖和植物水胶体为:褐藻胶、果胶、角叉菜胶、甲壳素(或壳聚糖)、肝素、硫酸软骨素、琼脂、瓜尔胶、刺槐豆胶、阿拉伯树胶、刺梧桐胶、黄耆胶、印度树胶、淀粉、氧化淀粉、淀粉磷酸酯、羧甲基淀粉、磺胺乙基淀粉、氨基乙基淀粉、淀粉酯如淀粉马来酸酯、琥珀酸酯、苯甲酸酯和乙酸酯、以及淀粉和明胶的混合物;纤维素及其衍生物,例如改性纤维素,例如通过用环氧乙烷处理棉得到的部分羟乙基化棉,或者通过用苛性碱和氯乙酸处理棉得到的部分羧甲基化棉。合成聚合物的实例包括聚(乙烯醇)、聚(环氧乙烷)、聚(丙烯酰胺)、聚(乙烯基吡咯烷酮)、聚(乙亚胺)、聚(乙烯基咪唑)、聚(磷酸酯)、合成多肽、聚乙烯基烷基醚;聚烷基醛,未交联的丙烯酸羟烷基酯和甲基丙烯酸酯的水溶性亲水聚合物、聚亚烷基碳酸酯、多酚包衣等。

[0149] 在一个实例中,生物可降解包衣包括胶原、明胶、琼脂糖、壳聚糖聚甘油磷酸盐水凝胶、聚乙二醇(PEG)水凝胶、聚乳酸(PLA)水凝胶、聚(乙烯醇)(PVA)水凝胶、藻酸盐水凝胶、二嵌段共聚肽水凝胶(DCH)中的一种或多种。

[0150] 在一个实例中,生物可降解包衣包括血纤蛋白或其衍生物。在另一个实例中,生物可降解包衣是血纤蛋白或其衍生物。在一个实例中,血纤蛋白由血纤蛋白原产生。血纤蛋白是一种天然材料,已报道用于若干生物医学应用。血纤蛋白凝胶由于其与许多组织结合的能力以及其在伤口愈合中的天然作用而被用作密封剂。本领域技术人员将理解,血纤蛋白可以通过导致血纤蛋白原聚合的蛋白酶凝血酶产生。在一个实例中,凝血酶具有至少800单位/mg的活性。在另一个实例中,凝血酶具有至少900单位/mg的活性。在另一个实例中,凝血酶具有至少1,000单位/mg的活性。在另一个实例中,凝血酶的活性为800至1200单位/mg。

[0151] 在一个实例中,血纤蛋白包衣可以用因子XIII和 Ca^{2+} 稳定。

[0152] 血纤蛋白衍生物的实例包括血纤蛋白单体、血纤蛋白二聚体、血纤蛋白聚合物或交联血纤蛋白聚合物。在另一个实例中,生物可降解包衣包括交联到血纤蛋白基质上的双结构域肽。

[0153] 在另一个实例中,可生物降解的包衣包括甲壳素或由甲壳素生产的产品如壳聚糖。在一个实例中,包衣是壳聚糖。在一个实例中,壳聚糖由甲壳素生产。例如,本领域技术人员可以理解,壳聚糖可以通过甲壳素的脱乙酰化来制备。在一个实例中,壳聚糖通过用碱性物质如氢氧化钠处理甲壳素来生产。

[0154] 在一个实例中,将包衣施加到本文公开的超粒子的表面上。在一个实例中,将至少一层包衣(或层)施加到超粒子的表面上。在另一个实例中,将至少两个、至少三个、至少4个或至少5层包衣(或层)施加到超粒子的表面上。因此,在一个实例中,本文公开的超粒子可包括至少2层包衣。在另一个实例中,本文公开的超粒子可包括至少3层包衣。在另一个实例中,本文公开的超粒子可包括2-5层包衣。在另一个实例中,本文公开的超粒子可以包括2或3层包衣。在其它实施例中,本发明所包括的组合物包括具有不同数量包衣的超粒子。例如,组合物中的一些超粒子可以包括一层包衣,而其它超粒子包括两层包衣。在一个实例中,组合物包括具有一层包衣的超粒子和具有两层包衣的超粒子。在其它实例中,组合物中的一部分超粒子被包覆,而其余的超粒子不被包覆。在这些实例中,超粒子可以负载相同的有效负载。例如,负载有BDNF并包覆有两层包衣的超粒子可以具有负载有BDNF并包覆有三层包衣的超粒子。在另一个实例中,用不同数量的包衣包覆的超粒子负载有不同的有效负载。例如,负载有BDNF并包覆有两层包衣的超粒子可以具有负载有NT-3并包覆有三层包衣的超粒子。

[0155] 在一个实例中,本文公开的超粒子具有约5%的超粒子直径的包衣厚度。在另一个实例中,包衣厚度小于超粒子直径的5%。在另一个实例中,包衣厚度小于超粒子直径的4%。在另一个实例中,包衣厚度小于超粒子直径的3%。在另一个实例中,包衣厚度小于超粒子直径的2%。在另一个实例中,包衣厚度小于超粒子直径的1%。在另一个实例中,包衣厚度小于超粒子直径的0.5%。在另一个实例中,包衣厚度小于超粒子直径的0.2%。在另一个实例中,包衣厚度为超粒子直径的0.2%至5%。

[0156] 在其它实施例中,本文公开的超粒子具有超粒子直径的约0.5%的包衣厚度。在另一个实例中,包衣厚度为约超粒子直径的0.15%。在另一个实例中,包衣厚度为约超粒子直径的0.1%。在另一个实例中,包衣厚度为超粒子直径的0.5%至0.1%。在另一个实例中,包衣厚度为超粒子直径的0.3%至0.1%。在另一个实例中,包衣厚度为超粒子直径的0.2%至0.1%。在这些实施例中,超粒子直径可以在450至550 μm 之间。在另一个实例中,超粒子的直径可以是500 μm 。在一个实例中,直接包覆的超粒子可以由它们的包衣厚度限定。

[0157] 各种方法适用于将包衣“施加”到超粒子的表面上,并且最合适的方法通常由所施加的包衣决定。在一个实例中,可以在包括本文公开的包衣材料的制剂中孵育超粒子。在血纤蛋白包覆的超粒子的上下文中,本文公开的超粒子可以与血纤蛋白原一起孵育,随后与凝血酶接触以促进血纤蛋白原转化成超粒子表面的血纤蛋白包衣。在一个实例中,可以重复该工艺以将多层包衣施加到超粒子的表面上。例如,本文公开的超粒子可以用至少两层、三层、四层、五层或更多层血纤蛋白包衣包覆,其中通过将超粒子与血纤蛋白原孵育,随后与凝血酶接触以促进血纤蛋白原转化为超粒子表面的血纤蛋白包衣来施加每层包衣。在另一个实例中,本文所公开的超粒子可以用至少两层、三层、四层、五层或更多层壳聚糖包衣包覆,其中通过将超粒子与壳聚糖一起孵育,随后在重复工艺之前的时间设定来施加每层包衣。

[0158] 在其它实例中,本文公开的超粒子可以用至少两层、三层、四层、五层或更多层生物可降解包衣包覆。在一个实例中,所有包衣是相同的。在另一个实例中,使用不同的生物可降解包衣。例如,可以用一层或多层血纤蛋白,然后一层或多层多层壳聚糖包覆超粒子,或者相反。

[0159] 如上文关于固体浮出物所提及的,在一个实例中,在作为本文所公开的包衣的制剂中提供超粒子。例如,可以在包括上述包衣的制剂中提供超粒子。在一个实例中,可以在制剂中提供超粒子,制剂包括以上提及的物质如血纤蛋白或壳聚糖。

[0160] 在另一个实例中,可以在包括血纤蛋白前体如血纤蛋白原和聚合催化剂的制剂中提供超粒子。血纤蛋白原聚合成血纤蛋白的工艺先前已被表征。简言之,蛋白酶在两个对称位点切割二聚血纤蛋白原分子。有几种可能的蛋白酶催化剂可以切割血纤蛋白原,包括凝血酶、肽酶和蛋白酶III,并且每一种都在不同的位点切割蛋白。一旦血纤蛋白原被裂解,就发生自聚合步骤,其中血纤蛋白原单体聚集在一起并形成非共价交联的聚合物凝胶。这种自组装的发生是因为结合位点在蛋白酶切割发生后暴露。一旦它们暴露,分子中心的这些结合位点可以与存在于肽链末端的血纤蛋白原链上的其它位点结合。以这种方式,形成聚合物网络。

[0161] 因此,在另一个实例中,可以在包括血纤蛋白原的制剂中提供超粒子。在实施例中,可以使血纤蛋白原与合适的蛋白酶如凝血酶(EC 3.4.21.5)接触,以促进血纤蛋白原在给药至受试对象之前转化成血纤蛋白。例如,可以在给药至受试对象之前将凝血酶加入到制剂中。

[0162] 如上,在上述参考材料中的包衣超粒子可以减缓有效负载从超粒子的突释。本发明人还发现水凝胶的存在甚至进一步降低了释放速率。因此,可以在水凝胶中提供本发明所包括的包覆的超粒子。在一个实例中,水凝胶是藻酸盐水凝胶。例如,藻酸盐水凝胶可以是alg-CaCO₃水凝胶。其它实例包括血纤蛋白胶(作为Tisseel;Baxter市售)和钛-多酚凝胶,例如Rahim等人,(2016) Angew.Chem.Int.Ed.55,13803所描述的)。

[0163] 在一个实例中,在水凝胶中提供根据本发明的超粒子也使得它们更容易处理。例如,水凝胶可以促进超粒子的容易植入和/或帮助将超粒子定位在靶标上(例如鼓膜、卵圆或圆窗或耳蜗)。在其它实例中,在水凝胶中提供超粒子还增强了穿过受试对象耳朵内的膜,如鼓膜、卵圆窗或圆窗的扩散。

[0164] 在另一个实例中,可以将包覆的超粒子掺入到缓释或靶向递送系统中。这样的缓释系统可以包括用于局部给药的泡沫、凝胶、滴剂和喷雾剂或用于注射或注射套管的储库。示例性的缓释系统包括聚合物基质、脂质体和微球体。聚合物基质包括基于储层的系统,其中超粒子被封闭在多孔聚合物包衣中(Yang和Pierstorff (2012) JALA.17,50-58)和其中超粒子被包埋在聚合物基质中的整体基质系统(Langer R (1990) Science.249,1527-1533)。脂质体可以是可生物降解的和两亲性药物递送系统,其可以使用磷脂和胆固醇配制。可以使用可生物降解和生物相容的聚合物配制微球。在另一个实例中,缓释系统可以是基于多糖的。例如,超粒子制剂可以包括阴离子多糖。在一个实例中,多糖可以是藻酸或其衍生物。例如,超粒子可以包括藻酸盐水凝胶。各种藻酸衍生物是本领域已知的。实例包括藻酸钠、藻酸钾和藻酸钙。其它实例包括藻酸钡和藻酸锶。在一个实例中,藻酸是藻酸钠。因此,在一个实例中,本发明包括含有上述提及的超粒子和藻酸钠的制剂。藻酸盐可以从各种来源获得(例如Sigma,FMC Health和Nutrition)。在另一个实例中,多糖是非支链多糖,例如糖胺聚糖。例如,多糖可以是透明质酸。

[0165] 制剂

[0166] 可以将超粒子配制成适于对受试对象给药的药物组合物。示例性的药物组合物可

以单独或与药学上可接受的载体(carrier)、稀释剂或赋形剂组合提供超粒子。在这些组合物中,以足以将治疗有效量的有效负载传递给受试对象的量提供超粒子。根据具体的给药途径,可以使用本领域已知的各种可接受的载体,例如在《雷明顿药物科学》Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack出版公司,N.J.USA,1991)中描述的。

[0167] 示例性的药物组合物还可以包括药学上可接受的无菌水性或非水性溶液、分散体、悬浮液或乳液,以及用于临用前重建成无菌可注射溶液或分散体的无菌粉末。合适的水性和非水性载体,稀释剂,溶剂或载体(vehicle)的实例包括水、乙醇、多元醇(如甘油、丙二醇、聚乙二醇等)及其合适的混合物、植物油和可注射的有机酯如油酸乙酯。例如,通过使用包衣材料如卵磷脂,通过在分散体的情况下保持所需的粒径,以及通过使用表面活性剂,可以保持适当的流动性。这样的组合物还可以含有佐剂,例如防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂或抗菌剂和抗真菌剂。

[0168] 在另一个实例中,可以将超粒子掺入到缓释或靶向递送系统中。例如,本发明人已经确定,为本文公开的超粒子提供藻酸盐水凝胶减缓了有效负载从超粒子的释放。这样的缓释系统可以包括用于局部给药的泡沫、凝胶、滴剂和喷雾剂或用于注射或注射套管的储库。在一个实例中,本文公开的直接包覆的超粒子以缓释系统提供。

[0169] 示例性的缓释系统包括聚合物基质、脂质体和微球体。聚合物基质包括基于储层的系统,其中超粒子被封闭在多孔聚合物包衣中(Yang和Pierstorff(2012)JALA.17,50-58)和其中超粒子被包埋在聚合物基质中的整体基质系统(Langer R(1990)Science.249,1527-1533)。脂质体可以是可生物降解的和两亲性药物递送系统,其可以使用磷脂和胆固醇配制。可以使用可生物降解和生物相容的聚合物配制微球。在另一个实例中,缓释系统可以是基于多糖的。例如,超粒子制剂可以包括阴离子多糖。在一个实例中,多糖可以是藻酸或其衍生物。例如,本文公开的包覆的超粒子可以分散在藻酸盐水凝胶中。各种藻酸衍生物是本领域已知的。实例包括藻酸钠、藻酸钾和藻酸钙。其它实例包括藻酸钡和藻酸锶。在一个实例中,藻酸是藻酸钠。因此,在一个实例中,本发明包括含有上述提及的超粒子和藻酸钠的制剂。藻酸盐可以从各种来源获得(例如Sigma,FMC Health和Nutrition)。在另一个实例中,多糖是非支链多糖,例如糖胺聚糖。例如,多糖可以是透明质酸。

[0170] 在一个实例中,包括上述缓释系统的制剂可以包括直接包覆和未包覆的超粒子。在实例中,超粒子可包括相同或不同的有效负载。该实例的优点是可以根据需要定制单个超粒子的释放曲线。

[0171] 在另一个实例中,在制剂中提供超粒子,其增强穿过受试对象耳内的膜如鼓膜、卵圆窗或圆窗的扩散。例如,超粒子制剂可以包括人工外淋巴。在另一个实例中,超粒子制剂使与圆窗膜的接触时间最大化。例如,相对于未包覆的超粒子,接触时间可以增加。

[0172] 在另一个实例中,将超粒子掺入或包埋在支架内,支架是受试对象不相容的并且降解成对受试对象无害的产物。这些支架容纳将要移植到受试对象中的超粒子。

[0173] 在本发明的实践中可以成功地使用各种不同的支架。示例性支架包括但不限于生物可降解支架。天然生物可降解支架包括胶原、纤连蛋白和层粘连蛋白支架。合适的支架包括聚乙醇酸支架或合成聚合物如聚酐、聚原酸酯和聚乳酸。

[0174] 治疗和给药

[0175] 本发明包括治疗疾病或病症的方法,包括施用本文定义的超粒子。因此,在一个实

例中,包括根据本发明的超粒子的组合物以有效治疗受试对象中的疾病或病症的量施用给受试对象。在一个实例中,疾病或病症是听力损失。术语“听力损失”在本发明的上下文中用于指受试对象检测或处理声音的能力的任何降低。因此,听力损失包括部分听力缺陷或完全不能听到。

[0176] 在一个实例中,听力损失的特征在于感觉神经性听力损失(SNHL)。在本发明的上下文中使用的SNHL是指由耳蜗内的精细感觉毛细胞的损伤,或它们与螺旋神经节神经元(SGN)的突触连接的丧失或耳蜗施万细胞的功能障碍引起的听力损失。在一个实例中,听力损失的特征为老年性耳聋。在另一个实例中,听力损失是噪声引起的。在另一个实例中,听力损失是疾病诱导的或遗传的。在另一个实例中,听力损失是由于暴露于耳毒素例如氨基糖苷类而引起的。

[0177] 在一个实施例中,受试对象是哺乳动物。在一个实施例中,受试对象是人。例如,受试对象可以是成人。在一个实例中,人类受试对象是儿童。其它示例性哺乳动物受试对象包括伴侣动物如狗或猫、或家畜动物如马或牛。术语例如“受试对象”、“患者”或“个体”是在上下文中可以在本发明中互换使用的术语。

[0178] 在一个实例中,腹膜内施用根据本发明的超粒子。本发明还包括通过耳将有效负载递送至受试对象的细胞、组织或器官的方法,该方法包括向受试对象的耳施用根据本发明的超粒子。在该实例中,该方法可以将有效负载从受试对象内耳、中耳和/或前庭系统递送到细胞。在另一个实例中,该方法将治疗有效负载递送到受试对象的神经细胞、神经组织或脑。

[0179] 在一个实例中,将组合物施用到鼓膜上。在实例中,可以配制组合物用于局部给药(例如滴剂、凝胶剂、泡沫剂、喷雾剂)。

[0180] 在另一个实例中,向“中耳”腔施用组合物。在本发明的上下文中,术语“中耳”用于指鼓膜和内耳之间的空间。因此,中耳在所有内耳组织的外部。例如,可通过鼓膜注射将组合物施用到中耳。在实例中,超粒子可以作为贮库型注射剂施用。在另一个实例中,治疗临床医生可以在鼓膜中产生开口,以便于组合物进入中耳。当向中耳施用组合物时,可将组合物施用到圆窗和/或卵圆窗上。

[0181] 在另一个实例中,将超粒子施用到内耳。例如,可以将超粒子施用到耳蜗。在一个实例中,可以将超粒子施用到耳蜗的基底转。进入耳蜗或内耳的其它结构的外科技术是本领域已知的。外科手术进入人耳蜗的示范技术在Clark GM等人,“改良多通道耳蜗植入的手术(Surgery for an improved multiple-channel cochlear implant)”,Ann Otol Rhinol Laryngol 93:204-7,1984,以及在Clark GM等人,“儿童多通道耳蜗植入的手术和安全考虑(Surgical and safety considerations of multichannel cochlear implants in children)”,Ear and Hearing Suppl.12:15S-24S,1991中描述。

[0182] 以上讨论了超粒子与耳介入的组合。在这些实例中,耳介入可与超粒子的给药同时发生。例如,耳蜗装置可以与超粒子同时植入。然而,增加螺旋神经节神经元的存活率可以改善耳蜗植入物的效用。因此,可能希望在已经施用了超粒子之后植入耳蜗装置。例如,耳蜗装置可以在施用超粒子后约一个月、约两个月、约三个月、约六个月植入。在这些实例中,耳蜗装置可施用至额外的超粒子。

[0183] 在一个实例中,将第一剂量的超粒子施用给受试对象的耳蜗,并且将至少第二剂

量的超粒子施用给受试对象的圆窗和/或卵圆窗。

[0184] 在一个实例中,将治疗有效量施用到受试对象的耳朵。在一个实例中,将多个超粒子施用到受试对象的耳朵。例如,可以将至少两个、至少三个、至少四个、至少5个、至少10个、至少20个超粒子施用到受试对象的耳朵。在另一个实例中,施用约1至10个超粒子。在其它实例中,将约两个至9个、约三个至8个、约四个至7个、约5至6个超粒子施用于受试对象的耳朵。在这些实例中,超粒子可包括相同的有效负载。或者,在另一个实例中,超粒子负载有不同的有效负载。例如,可以施用负载有神经营养因子的超粒子和负载有类固醇的超粒子。在另一个实例中,可以施用负载有神经营养因子的超粒子和负载有抗生素的超粒子。在另一个实例中,负载有神经营养因子的超粒子可与抗生素一起施用。

[0185] 组合物/套件

[0186] 根据本发明的超粒子可以在套件或包装中提供。例如,本文公开的组合物可以与治疗内耳疾病的书面说明书一起包装在合适的容器中。在一个实例中,组合物可以在单剂量容器中提供,例如滴耳器或预填充注射器。

[0187] 在一个实例中,套件包括用于治疗内耳疾病的方法中的根据本发明的超粒子。在另一实例中,套件包括用于治疗听力损失的方法中的根据本发明的超粒子。在一个实例中,听力损失是SNHL。在另一个实例中,听力损失是噪声引起的听力损失。在一个实例中,根据本发明的套件还包括助听器或植入物。因此,在一个实例中,套件可以包括超粒子和耳蜗植入物。

[0188] 制造

[0189] 根据本发明制造超粒子的实例如下,并且也在以下实施例部分中提供。在一个实例中,超粒子可以由包括纳米颗粒和藻酸或其多糖衍生物的组合物制造。以上提供了纳米颗粒的各种实例。在一个实例中,纳米颗粒具有双峰孔结构。可以使用各种方法生产纳米颗粒。Cui等人,2015,ACS Nano,9,1571-1580描述了一种这样的方法。

[0190] 在另一个实例中,通过电喷雾产生根据本发明的超粒子。电喷雾的实例在Jaworek A.,2007 Powder Technology 1,18-35中有综述。电喷雾的实例也在下面举例说明。在一个实例中,本发明包括一种制造超粒子的方法,该方法包括将包括纳米颗粒和藻酸或其多糖衍生物的组合物电喷雾到双阳离子水溶液中。

[0191] 本领域技术人员将理解,可以基于用于电喷雾的溶液的类型来优化电喷雾参数。例如,可以优化电压和流速以提供所需尺寸的超粒子。在一个实例中,流速为约6-10mL h⁻¹。在另一个实例中,流速为约7-9mL h⁻¹。在另一个实例中,流速为约8mL h⁻¹。在一个实例中,电压在大约10至25kV之间。在另一个实例中,电压在大约11至20kV之间。在另一个实例中,电压在大约12至14KV之间。在另一个实例中,电压约为13kV。

[0192] 在一个实例中,通过电喷雾纳米颗粒溶液产生超粒子。在一个实例中,溶液中纳米颗粒的浓度为约20mg/ml。在一个实例中,溶液中纳米颗粒的浓度为约30mg/ml。在一个实例中,溶液中纳米颗粒的浓度为约40mg/ml。在一个实例中,溶液中纳米颗粒的浓度为约50mg/ml。在一个实例中,溶液中纳米颗粒的浓度为约60mg/ml。

[0193] 在另一个实例中,通过电喷雾包括藻酸或其衍生物的纳米颗粒溶液产生超粒子。在一个实例中,纳米颗粒溶液由5mg mL⁻¹藻酸溶液制备。在一个实例中,纳米颗粒溶液由10mg mL⁻¹藻酸溶液制备。在一个实例中,纳米颗粒溶液由20mg mL⁻¹藻酸溶液制备。在一个

实例中,纳米颗粒溶液由30mg mL⁻¹藻酸溶液制备。在另一个实例中,由5mg mL⁻¹至30mg mL⁻¹藻酸溶液制备纳米颗粒溶液。在另一个实例中,由10mg mL⁻¹至30mg mL⁻¹藻酸溶液制备纳米颗粒溶液。在另一个实例中,由20mg mL⁻¹至30mg mL⁻¹藻酸溶液制备纳米颗粒溶液。

[0194] 在一个实例中,由5mg mL⁻¹藻酸水溶液制备纳米颗粒溶液。在一个实例中,由10mg mL⁻¹藻酸水溶液制备纳米颗粒溶液。在一个实例中,由20mg mL⁻¹藻酸水溶液制备纳米颗粒溶液。在一个实例中,由30mg mL⁻¹藻酸水溶液制备纳米颗粒溶液。在另一个实例中,纳米颗粒溶液由5mg mL⁻¹至30mg mL⁻¹藻酸溶液制备。在另一个实例中,纳米颗粒溶液由10mg mL⁻¹至30mg mL⁻¹藻酸溶液制备。在另一个实例中,纳米颗粒溶液由20mg mL⁻¹至30mg mL⁻¹藻酸溶液制备。

[0195] 在另一个实例中,通过电喷雾包括藻酸的纳米颗粒溶液产生超粒子。

[0196] 藻酸衍生物没有特别限制,只要它们在限定的温度下形成凝胶。在一个实例中,藻酸衍生物是多糖衍生物。藻酸衍生物包括各种藻酸盐形式。实例包括藻酸钠、藻酸钾和藻酸钙。其它实例包括藻酸钡和藻酸锶。在一个实例中,藻酸是藻酸钠。在另一个实例中,通过电喷雾包括藻酸的纳米颗粒溶液产生超粒子。

[0197] 根据所需的超粒子的尺寸和形状,不同粘度的藻酸盐可用于生产本发明的超粒子。例如,可以使用粘度为约20-300mPa*s的藻酸盐。在另一个实例中,藻酸盐的粘度为约20-200mPa*s。在一个实例中,藻酸盐的粘度为20mPa*s。在另一个实例中,藻酸盐的粘度为100mPa*s。在另一个实例中,藻酸盐的粘度为200mPa*s。

[0198] 在一个实例中,通过将包括纳米颗粒的组合物电喷雾到水溶液中来产生超粒子。在一个实例中,这是双阳离子水溶液。示例性双阳离子组分包括Ca²⁺和Ba²⁺。例如,水溶液可包括氯化钙。在另一个实例中,水溶液包括氯化钡。

[0199] 在一个实例中,通过电喷雾组合物产生超粒子,其中组合物中藻酸盐的浓度为5mg mL⁻¹至30mg mL⁻¹,组合物中纳米颗粒的浓度为20mg mL⁻¹至50mg mL⁻¹,电压为10kV至25kV。在另一个实例中,通过电喷雾组合物产生超粒子,其中组合物中藻酸盐的浓度为10mg mL⁻¹至30mg mL⁻¹,组合物中纳米颗粒的浓度为30mg mL⁻¹至50mg mL⁻¹,电压为11kV至21kV。在另一个实例中,通过电喷雾组合物产生超粒子,其中组合物中藻酸盐的浓度为20mg mL⁻¹至30mg mL⁻¹,组合物中纳米颗粒的浓度为35mg mL⁻¹至45mg mL⁻¹,电压为12kV至14kV。在这些实施例中,流速可以是8mL h⁻¹。

[0200] 在另一个实例中,通过电喷雾组合物产生超粒子,其中组合物中藻酸盐的浓度为30mg mL⁻¹,组合物中纳米颗粒的浓度为40mg mL⁻¹,电压为13kV,流速为8mL h⁻¹。

[0201] 在一个实例中,将使用本文所定义的方法制备的超粒子进行煅烧以除去藻酸或其衍生物。在一个实例中,煅烧在约500℃下进行。在另一个实例中,煅烧在约550℃下进行。在另一个实例中,煅烧在约600℃下进行。在另一个实例中,煅烧在约650℃下进行。在另一个实例中,煅烧在约700℃下进行。在一个实例中,煅烧进行约6至约30小时。在另一个实例中,煅烧进行约10小时。在另一个实例中,煅烧进行约20h。在另一个实例中,煅烧进行约30h。

[0202] 实施例

[0203] 实施例1——纳米颗粒制备

[0204] 使用基于Cui等人2015,ACS Nano,9,1571-1580中描述的那些方法生产的介孔二氧化硅纳米颗粒(MS-NP)。在搅拌下,将1.1g十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)完全溶解在50ml

的Milli-Q中。随后加入4.3g聚(丙烯酸)溶液(PAA, $M_w = 250\text{kDa}$, 35wt%水溶液), 在室温(25℃)下剧烈搅拌20min, 直到获得澄清溶液。然后在剧烈搅拌下向溶液中加入3.5ml氢氧化铵溶液(28-30%), 得到乳状悬浮液。然后在搅拌20min后加入4.46ml原硅酸四乙酯(TEOS)。将溶液再搅拌15min, 然后将混合物转移到Teflon密封的高压釜中, 高压釜在90℃下放置48h。

[0205] 合成的MS-NP用乙醇洗涤一次, 水洗两次, 乙醇洗两次, 最后在90℃下干燥。在550℃煅烧30h, 除去有机模板剂。

[0206] 实施例2——起始超粒子制造工艺-工艺A

[0207] 根据Wang等人(2010) Chem Mater. 22, 3829-3831制备介孔二氧化硅(MS)纳米颗粒。将MS纳米颗粒分散在Milli-Q水中, 颗粒浓度为5wt%, 并短暂超声处理以形成稳定的胶体悬浮液。然后将0.5-2.0μL等分试样的MS纳米颗粒分散体施加到用石蜡膜预覆盖的平坦表面上。在气流下干燥液滴, 以通过毛细管力作用驱动MS纳米颗粒组装成介孔二氧化硅超粒子(毛细管力MS-SPs)。毛细管力MS-SPs的大小由施加在液滴中的纳米颗粒分散体的体积控制。

[0208] 在毛细管力下, MS胶体自组装成致密结构以形成MS-SPs。然后从石蜡膜中取出毛细管力MS-SPs并转移到陶瓷容器中, 在923K下退火以增强毛细管力MS-SPs的机械稳定性。然后用有效负载负载毛细管力MS-SPs。每个颗粒负载约1.33μg蛋白。毛细管力MS-SPs显示出具有双峰孔结构(2-3nm和15-30nm), 并且毛细管力MS-SP内的大孔, 即密集填充的纳米颗粒之间的空间为100-200nm。

[0209] 实施例3——改进的制造工艺-工艺B

[0210] 将80mg的MS-NPs粉末加入到2ml藻酸钠溶液(水中30mg mL⁻¹)中。将所得溶液超声处理1小时, 直到MS-NPs在海藻酸钠盐溶液中均匀分布。

[0211] 为了形成大孔MS-SPs (^LMS-SPs), 将超声处理过的溶液加入到3mL塑料注射器中并置于注射泵中, 同时使用约8mL h⁻¹的流速将液体电喷雾到氯化钙溶液(1wt%在水中制备)浴中(电喷雾装置示于图1)。通过在管末端和氯化钙溶液之间施加电场来控制液滴大小。从氯化钙浴中收集藻酸盐珠MS-SPs (^LMS-SPs^{alg}) 并负载有效负载。与由工艺A生产的那些相比, 对于这些颗粒(^LMS-SPs)观察到显著增强的载药量负载性能: 每颗粒约7.8μg蛋白, 具有改善的机械稳定性。

[0212] 实施例4——改进的制造工艺-工艺C

[0213] 使用实施例3中描述的方法制备MS-SPs (^LMS-SPs^{alg})。在650℃下煅烧30h除去藻酸钠。该步骤除去所有有机组分, 仅留下介孔二氧化硅纳米颗粒(MS-SP)和微量钙和氯化钠。然后用有效负载负载MS-SPs。与由工艺A生产的那些相比, 对于这些颗粒观察到显著增强的载药量性能: 每颗粒约7.8μg蛋白。

[0214] 超粒子也由没有孔的纳米颗粒制成(无孔^NMS-SPs^{alg}; ^NMS-SPs^{alg})和孔径<2nm的纳米颗粒(小孔MS-SPs^{alg}; ^SMS-SPs^{alg})。当从这些超粒子除去藻酸盐时, 载药量性能显著降低(表1)。

[0215] 由工艺B和工艺C制备的MS-SP的最大载药量总结于表1中。

[0216] 表1: 工艺B和工艺C产生的MS-SP的负载

[0217]

颗粒类型	$q_{\max}$ (ug/颗粒)
无孔 ^N MS-SPs ^{alg}	$q_{\max} = 8.215$

无孔 ^N MS-SPs	$q_{\max} = 2.009$
小孔 ^S MS-SPs ^{alg}	$q_{\max} = 10.06$
小孔 ^S MS-SPs	$q_{\max} = 2.802$
大孔 ^L MS-SPs ^{alg}	$q_{\max} = 9.245$
大孔 ^L MS-SPs	$q_{\max} = 7.843$

[0218] 实施例5——超粒子释放特性

[0219] 溶菌酶

[0220] 通过将灭菌的SPs与100 μ L的FITC-溶菌酶溶液(0.2mg mL⁻¹在Milli-Q水中)一起孵育,制备负载FITC-溶菌酶的SPs用于体外释放研究。溶菌酶是模拟神经营养蛋白BDNF的良好模型蛋白(因为溶菌酶便宜且容易获得,而BDNF昂贵),因为它具有相似的物理化学性质(溶菌酶, $M_w = 14.3 \pm 0.5$ KDa, $R_h = 18.9 \pm 0.25$ Å和pI=11;BDNF, $M_w = 13$ KDa, $R_h = 24.0 \pm 3.2$ Å和pI=10)。

[0221] 图4a)和b)部分和图7a)部分显示了负载溶菌酶的MS-SPs的体外释放曲线。由工艺A和C制备的MS-SP的释放曲线是相似的。尽管工艺C产生的MS-SP负载了显著更高水平的标记溶菌酶。与由工艺A和C生成的MS-SP相比,由工艺B生成的MS-SP的有效负载释放显著减少。

[0222] ζ 电位

[0223] 然后用荧光素标记的溶菌酶(FITC-溶菌酶)负载MS-SPs。如图2所示,当pH值从4增加到10时,MS-SPs表现出从 ~ -7.6 mV到 ~ -33.9 mV的负 ζ 电位。因此,在静电驱动力的帮助下,可以将带正电荷的溶菌酶和BDNF负载到MS-SPs中。共焦显微镜图像(图3a,b)显示了负载到MS-SPs表面上的FITC-溶菌酶。然而,由于MS-SPs的尺寸相当大(直径为数百微米),所以标准激光扫描共焦显微术不适合于成像SPs的内部结构。然而,在用解剖刀使MS-SPs破裂时,可以对内部进行成像,并且发现在MS-SPs的多孔内部结构中也观察到FITC-溶菌酶(图3c)。

[0224] 附加负载能力评估

[0225] 然后在3天的孵育时间内,用不同负载浓度的FITC-溶菌酶研究不同类型SPs的负载能力(图4)。通常,随着FITC-溶菌酶浓度的增加,载药量增加。结果表明,含有^NMS-SPs^{alg}、^SMS-SPs^{alg}和^LMS-SPs^{alg}的藻酸盐比除去^NMS-SPs、^SMS-SPs和^LMS-SPs(在相当的浓度下)具有更高的负载能力。这可能是由于在中性pH值附近带正电荷的FITC-溶菌酶和带负电荷的藻酸盐之间增加的静电相互作用。另外,在低FITC-溶菌酶负载浓度(< 0.4 mg mL⁻¹),^LMS-SPs^{alg}具有与无孔MS-SPs^{alg}和^SMS-SPs^{alg}类似的药物负载能力,但是当浓度更高(> 0.4 mg mL⁻¹)时,与^NMS-SPs^{alg}和^SMS-SPs^{alg}相比,^LMS-SPs^{alg}中可以负载更多的FITC-溶菌酶。对于藻酸盐去除的MS-SPs,观察到类似的趋势:^LMS-SPs比^NMS-SPs和^SMS-SPs负载更多的FITC-溶菌酶。这些结果表明,大的多孔结构(在^LMS-SPs和^LMS-SPs^{alg}中)是改善载药量的关键因素,这可能是通过提供额外的表面和因此当外部颗粒表面和内部颗粒区域(在SP结构中)已经被药物完全饱和时的负载和容量。另外,负载能力还取决于MS-SPs的直径,其中较大的MS-SPs(1000 μ m)具有比较小的MS-SPs(200 μ m)更大的负载能力(图5)。

[0226] 实验确定FITC-溶菌酶在^NMS-SPs and ^SMS-SPs^{alg}中的最大负载量分别为每SP 3 μ g和每SP 2 μ g,其显著低于^LMS-SPs的每SP约15 μ g(FITC-溶菌酶浓度为1.5mg mL⁻¹,负载时间

为3天)。此外,实验确定FITC-溶菌酶在^NMS-SPs and ^SMS-SPs中的最大负载量分别为每SP 2 μg和每SP 1μg,其也显著低于^LMS-SPs的每SP约10μg (FITC-溶菌酶浓度为5.0mg mL⁻¹,负载时间为3天)。

[0227] 图4c和4d显示了六种不同SPs的载药量效率。随着FITC-溶菌酶的负载浓度增加,更多的FITC-溶菌酶可以被负载到SPs中。

[0228] BDNF

[0229] MS-SPs在用100μl的Milli-Q水清洗6次之前,先在100μl乙醇(80vol/vol%)中浸泡4小时进行灭菌。将MS-SPs置于Eppendorf管中,内含15μl的BDNF (Geneway, BDNF Human Protein, Cat.#10-663-45078) 溶液(1mg/ml的BDNF),在室温下孵育三天,偶尔手动摇晃。明显地,实现了约10μg BDNF的负载。

[0230] 实施例6——药代动力学

[0231] 进行体内研究以确定在植入4h、3天和7天后在植入耳中的超粒子递送的神经营养蛋白的药物有效负载和清除率。目的是测定随着时间的推移保留在耳蜗中的神经营养蛋白的量。

[0232] 将含有放射性标记的神经营养蛋白-3的1SP植入每个耳蜗。4小时(n=5)、3天(n=7)或7天(n=4)后收获耳蜗。测量全部耳蜗γ计数以确定神经营养蛋白-3随时间的清除率。神经营养蛋白-3的残留量(负载的%)和总量示于图15中。植入1周后,每个SP含有初始负载量的~2μg神经营养蛋白-3(~40%)。

[0233] 进行进一步的实验(n=2)以检查圆窗递送后神经营养蛋白-3的清除率。植入后3天——整个耳蜗测量再次用于测定神经营养蛋白-3从圆窗膜的清除率。与耳蜗内递送部位相比,使用圆窗观察到类似水平的清除率(47.4%的圆窗递送后残存的神经营养蛋白-3与耳蜗内递送的56%相比)。

[0234] 这些数据表明,即使治疗1周后仍可获得高水平的神经营养蛋白-3,也可实现神经营养蛋白-3的延长释放。

[0235] 实施例7——方法

[0236] 超粒子组装

[0237] 血纤蛋白包覆的二氧化硅超粒子(^FSi-SPs)由如上所述组装的Si-SPs制备。用100 μL的80% (v/v) 乙醇在室温(~22℃)下对Si-SPs进行4h灭菌。然后用无菌Milli-Q水洗涤Si-SPs六次。将50μL 20mg mL⁻¹血纤蛋白原溶于50mM Tris-Buffer生理盐水(TBS; 50mM Tris, 150mM NaCl, pH调节至7.2)中,加入至Si-SPs, 4℃孵育过夜(~16h)。第二天,抽吸上清液,将Si-SPs与50μL含1.72mg mL⁻¹凝血酶的50mM TBS、含40mM CaCl₂的TBS在室温(~22℃)下孵育1h。最后抽吸上清液,用Milli-Q水洗涤3次。

[0238] 血纤蛋白降解

[0239] 通过在37℃(每个样本10个^FSi-SPs)与100μL PBS (pH 7.4)孵育^FSi-SPs来评估^FSi-SPs的血纤蛋白降解情况。以特定的时间间隔(至多42天),收集95μL上清液并在-20℃储存用于进一步分析,然后用95μL新鲜PBS替换。使用基于制造商方案的MicroBCA蛋白测定试剂盒定量上清液中降解的血纤蛋白的浓度。血纤蛋白的降解百分比计算如下:

[0240] 剩余血纤蛋白百分比 (%) = $\frac{m_0 - m_n}{m_0} \times 100\%$

[0241] 其中 m_0 是SPs上血纤蛋白的原始量(总量), m_n 是在时间点n上清液中血纤蛋白的量。

[0242] 合成水凝胶系统的方法。

[0243] 为了制备 CaCO_3 颗粒,首先,将5g PSS(M_w 70kDa)完全溶解在500mL Milli-Q水中以形成 10mg mL^{-1} PSS溶液。然后,制备由1mL的1M Na_2CO_3 ,0.5mL的 10mg mL^{-1} PSS和3.5mL的Milli-Q水组成的“前体溶液”。在单独的烧瓶中,在剧烈搅拌下,将20mL的 10mg mL^{-1} PSS溶液加入到175mL的Milli-Q水中。搅拌1min后,加入5mL的1M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 溶液,同时剧烈搅拌2min。然后加入前体溶液(5mL)并将所得混合物剧烈搅拌1min,之后关闭搅拌器并将混合物静置3min,随后再剧烈搅拌1min。将合成的 CaCO_3 颗粒在80℃的烘箱中干燥过夜,并且使用研钵和研杵研磨以破碎干燥粉末中的任何大颗粒。然后将精细 CaCO_3 粉末用气流在723K下煅烧2h以除去任何有机材料。

[0244] 为了制备水凝胶,将在Milli-Q水中的1mL的 20mg mL^{-1} 藻酸盐溶液与15 μL 的 100mg mL^{-1} CaCO_3 颗粒(颗粒直径 $\sim 1.8\mu\text{m}$,见图17)混合。向其中加入53.4 μL 的 100mg mL^{-1} 的D-葡萄糖酸- δ -内酯(GDL),使 CaCO_3 颗粒与GDL的摩尔比为1:2,形成的水凝胶的pH值为中性。可以通过调节藻酸盐溶液的浓度和所用 CaCO_3 颗粒的量来调节水凝胶时间和水凝胶的性质。

[0245] 为了研究alg- CaCO_3 水凝胶的降解性,随时间监测水凝胶的质量(干重)。将PBS(500 μL , pH7.4)添加到水凝胶(500 μL 的 20mg mL^{-1} alg- CaCO_3 水凝胶)中并在37℃孵育。在不同时间点(0d、3d、1w、2w、3w、4w、6w),除去PBS,剩余的水凝胶样本用Milli-Q洗涤(5次),然后冷冻并在-20℃储存直至分析。在较长的时间点,用500 μL 新鲜PBS替换PBS,并返回到37℃培养箱直到下一个时间点。将所有剩余的样本冻干,并测量水凝胶的干重。重量损失百分比计算如下:

$$[0246] \quad \text{重量损失 (\%)} = \frac{m_0 - m_n}{m_0} \times 100\%$$

[0247] 其中 m_0 是在时间点0时水凝胶的总重量,而 m_n 是在时间点n时水凝胶的重量。

[0248] 使用Philips XL30场发射扫描电子显微镜(Philips,Netherlands)在5kV的操作电压下获取Si-SPs、 ^{29}Si -SPs和 CaCO_3 颗粒的扫描电子显微镜(SEM)图像。通过将SPs沉积到导电碳带上,随后溅射包衣以20nm的金对其包覆来制备SPs的SEM样本。通过Philips XL30场发射扫描电子显微镜(Philips,Netherlands)使用能量色散X射线光谱(EDX)获得 ^{29}Si -SP的SEM图像。为了制备alg- CaCO_3 水凝胶的SEM样本,首先使用上述方法合成水凝胶,然后冻干过夜。将冻干的样本直接置于导电碳带上,随后包覆金(通过溅射)用于成像。使用FTIR分光光度计(Bruker,Australia)测定Si-SPs和 ^{29}Si -SPs的傅立叶变换红外光谱(FTIR)光谱。

[0249] 体外释放研究

[0250] 在体外释放研究中,使用模型药物FITC-溶菌酶或神经营养蛋白(BDNF或NT-3)进行研究。灭菌后,用100 μL 的FITC-溶菌酶溶液(Milli-Q水中 1mg mL^{-1})孵育10个Si-SPs或10个 ^{29}Si -SPs。孵育3天后,吸出上清液。以规定的时间间隔(超过150天),收集95 μL 上清液(并在-20℃储存直到分析),用95 μL 新鲜PBS替换。使用Infinite M200酶标仪(Tecan, Switzerland)测量收集的样本的荧光,并使用FITC-溶菌酶标准曲线计算上清液中FITC-溶菌酶的浓度(图18)。从负载的 ^{29}Si -SPs释放的FITC-溶菌酶也根据血纤蛋白原浓度(凝血酶浓度为 1.72mg mL^{-1} 时,纤维蛋白原为 2mg mL^{-1} 、 20mg mL^{-1} 和 40mg mL^{-1} ,分别表示为 $^{29}\text{F1.72Si-SPs}$ 、 $^{20}\text{F1.72Si-SPs}$ 和 $^{40}\text{F1.72Si-SPs}$)和凝血酶浓度(血纤蛋白原浓度为 20mg mL^{-1} 时,凝血酶为

0.1mg mL⁻¹、0.5mg mL⁻¹、1.72mg mL⁻¹和5mg mL⁻¹,分别表示为^{20F0.1}Si-SPs、^{20F0.5}Si-SPs、^{20F1.72}Si-SPs和^{20F5}Si-SPs)评估。

[0251] 对于神经营养蛋白(BDNF或NT-3)负载,将4个无菌SPs(Si-SPs或^FSi-SPs)与30μLBDNF或NT-3溶液(Millli-Q水中1.0mg mL⁻¹)一起孵育。孵育3天后,除去上清液,将每个单独的SP置于新鲜的1.7mL微量离心管中(每管一个SP)。然后向每个管中加入100μL的PBS(pH7.4)并在37℃孵育。在规定的的时间点(超过40天),收集95μL上清液(并在-20℃储存直到分析),用新鲜95μL的PBS替换。在释放研究过程中的每个时间点重复取样方法。根据制造商的方案(例如图19),使用BDNF或NT-3标准曲线,使用BDNF或NT-3特异性酶联免疫吸附测定(ELISA),测定从Si-SPs和^FSi-SPs释放的BDNF或NT-3的量。

[0252] 如下测定来自包埋在水凝胶中的^FSi-SPs的FITC-溶菌酶释放。如上所述将藻酸盐溶液与CaCO₃颗粒混合。在凝胶化之前,向alg-CaCO₃混合物中加入10个^FSi-SPs(预负载FITC-溶菌酶3天)。为了诱导凝胶化,以与如上所述相同的浓度和体积加入GDL。~2min后,形成水凝胶。为了研究在PBS中的释放,加入100μL的PBS(pH7.4)并将样本在37℃孵育。在规定的的时间点(超过110天),收集95μL上清液(并在-20℃储存直到分析),用新鲜的PBS替换。用Infinite M200微孔板测定收集样本的荧光,用标准曲线测定相应的FITC-溶菌酶浓度(图20)。

[0253] 体外降解研究

[0254] 先用100μL的乙醇(80%v/v)在室温(~22℃)下对Si-SPs灭菌4h,然后用无菌Millli-Q水洗涤四次。随后,如上所述制备^FSi-SPs。通过在37℃下将Si-SPs或^FSi-SPs(每个样本有20个SPs)浸入1mL的10mM PBS(pH7.4)中来研究超粒子降解。在规定的的时间点(超过70天),收集1mL上清液,用新鲜1mL的PBS替换。使用电感耦合等离子体感热光发射光谱仪(ICP-OES)测量上清液中二氧化硅降解产物的存在。将氢氧化钠(8M,500μL)加入到每一收集的上清液的500μL中以溶解任何二氧化硅碎片。将样本在95℃孵育30min,接着超声处理30min。然后将样本在37℃孵育过夜。将1mL溶解的样本与4mL的Millli-Q水混合,从最初收集的上清液中得到十倍样本稀释。使用硅标准曲线通过ICP-OES测量每个样本中的硅量(对应于从SPs释放的硅)。除了这些测量之外,通过SEM成像观察在PBS中长期孵育后Si-SPs和^FSi-SPs的形态。

[0255] 体外细胞毒性研究

[0256] 首先用100μL的乙醇(80%v/v)在室温(~22℃)下将Si-SPs灭菌4h,然后用无菌Millli-Q水洗涤(3次),然后用细胞培养基洗涤(3次)。为了测定SPs降解产物的细胞毒性,将1mL细胞培养基(补充了10%胎牛血清的DMEM培养基,100单位mL⁻¹青霉素,100mg mL⁻¹链霉素)加入到越来越多的Si-SPs和^FSi-SPs中。以规定的时间间隔吸出所有细胞培养基(并储存在-20℃用于将来的细胞分析)并用新鲜细胞培养基替换。

[0257] 在湿润培养箱(37℃,5%CO₂)中,在补充有10%胎牛血清的DMEM中保持脑源性U87MG胶质母细胞瘤细胞。将U87MG细胞接种于96孔板中,每孔2×10⁴个细胞,加入100μL培养基培养过夜。随后,向每个孔中加入100μL样本(来自如上所述在细胞培养基中孵育并在不同时间点收集的Si-SPs和^FSi-SPs的降解产物)并孵育(37℃,5%CO₂)。孵育48h后,完全吸出细胞培养基,并向每个孔中加入100μL的XTT/PMS溶液以测量细胞活力。孵育4h后,使用Infinite M200酶标仪,在475nm波长和675nm参考波长下测量溶液的吸光度。通过从475nm

处的吸光度减去675nm处的吸光度来计算差异吸光度。通过在补充有10%胎牛血清的54mL的DMEM中混合在DPBS溶液中的135 μ L的2mM PMS与10.8mg XTT来制备XTT/PMS溶液。仅含有培养基(如,无细胞)的样本孔用作吸光度测量的背景对照。仅暴露于DMEM培养基的细胞称为未处理对照,用于使细胞毒性正常化。

[0258] 实施例8——血纤蛋白包覆的二氧化硅超粒子的合成

[0259] 通过凝胶介导的电喷雾组装合成的FITC-溶菌酶负载的Si-SPs具有高负载能力,可实现110天以上的药物缓释。然而,来自这些超粒子的约60%的FITC-溶菌酶在前3天中释放。血纤蛋白包覆的二氧化硅超粒子(^FSi-SPs)减缓这种突释。用血纤蛋白原,接着用酶凝血酶孵育Si-SPs,导致血纤蛋白原酶促转化为Si-SP表面上的血纤蛋白网。血纤蛋白是一种参与血液凝固过程的纤维状非球状蛋白。用扫描电子显微镜(SEM)检查血纤蛋白包覆后超粒子的表面超微结构。在低分辨率下,Si-SP和^FSi-SP之间在形态上几乎没有可观察到的差异,但是在高分辨率下,与Si-SP(图16b)相比,^FSi-SP(图16d)的表面形态清楚地显示用血纤蛋白包覆成功地覆盖了超粒子和孔表面结构。SEM-EDX元素图显示^FSi-SPs含有均匀分布在^FSi-SPs表面上的硅(Si)、氧(O)、钙(Ca)和氮(N)元素(图16),正如所预期的。Si-SPs的FTIR光谱证实了Si-O-Si键的存在,其中Si-O-Si的伸缩振动为1071 cm^{-1} ,O-Si-O的弯曲振动为793 cm^{-1} 和Si-O-Si的摇摆振动为455 cm^{-1} (图16f)表明Si-O-Si主要由二氧化硅组成。在962 cm^{-1} 处的峰可能进一步归因于Si-O-Ca振动模式,并且可能归因于使用以海藻酸钙作为支架的凝胶介导的电喷雾组装的Si-SPs合成程序。这些数据表明成功地制备了Si-SPs并且已经形成了血纤蛋白包衣。

[0260] 实施例9——体外药物释放

[0261] 将模型蛋白治疗剂(FITC-溶菌酶)预载到Si-SPs中,然后用血纤蛋白的致密层包覆,假设从^FSi-SPs中缓慢释放药物。为了测定FITC-溶菌酶从^FSi-SPs的释放曲线,将FITC-溶菌酶包覆的^FSi-SPs于37 $^{\circ}\text{C}$ 在PBS(pH7.4)中孵育,收集上清液用于分析不同时间点的蛋白含量。测试了^FSi-SPs合成的参数范围,包括使用不同浓度的血纤蛋白原(恒定凝血酶浓度(1.72 mg mL^{-1})时,纤维蛋白原为2 mg mL^{-1} 、20 mg mL^{-1} 和40 mg mL^{-1} ,分别表示为^{2F1.72}Si-SPs、^{20F1.72}Si-SPs和^{40F1.72}Si-SPs),和不同浓度的凝血酶(恒定血纤蛋白原浓度(20 mg mL^{-1})时,凝血酶为0.1 mg mL^{-1} 、0.5 mg mL^{-1} 、1.72 mg mL^{-1} 和5 mg mL^{-1} ,分别表示为^{20F0.1}Si-SPs、^{20F0.5}Si-SPs、^{20F1.72}Si-SPs和^{20F5}Si-SPs)制备的^FSi-SPs。将FITC-溶菌酶负载到Si-SPs中(室温孵育3天),导致平均负载量为每SP $\sim 7\mu\text{g}$ 。图21显示了在不同血纤蛋白原和凝血酶浓度下,在血纤蛋白包覆之前,所有单独管的Si-SPs的FITC-溶菌酶负载。在图22和23中示出了在每个时间点从SPs释放的FITC-溶菌酶的百分比。如图24a和24b所示,从Si-SPs和^FSi-SPs中检测到持续的FITC-溶菌酶释放超过110天。然而,用于^FSi-SPs的血纤蛋白包衣减慢了初始释放。对于未包覆的超粒子,在3天内观察到 $>60\%$ 的蛋白释放。与之相比,对于用2 mg mL^{-1} 血纤蛋白原和1.72 mg mL^{-1} 凝血酶包覆的超粒子,达到相同的释放量需要 >20 天,释放速率要慢得多。对于用更高浓度的血纤蛋白原(20 mg mL^{-1} 和40 mg mL^{-1})包覆的Si-SPs,达到 $>60\%$ 蛋白释放的时间进一步延长至28天(图24a)。应用不同浓度的凝血酶,从Si-SPs的FITC-溶菌酶释放也可以被减慢:未包覆颗粒3天后观察到60%的蛋白释放,而包覆颗粒需要 ~ 28 天,在不同浓度下没有多大差异(图24b)。

[0262] 在图24a和24b中,累积的药物释放量低于100%,这可能是由于在长时间内FITC的

光漂白,尽管不能排除在Si-SPs上存在牢固吸附的蛋白。然而,有明显的证据表明血纤蛋白包衣可以显著降低模型货物FITC-溶菌酶从Si-SPs的初始突释,提供更均匀分布的释放曲线。

[0263] 研究扩展到临床相关神经营养蛋白、BDNF和NT-3,以评估Si-SPs用于内耳神经营养蛋白递送的潜在应用。将BDNF或NT-3负载到Si-SPs(室温孵育3天)中,导致平均负载为 $7.3\mu\text{g SP}^{-1}$ 。用血纤蛋白包覆BDNF和NT-3包覆的Si-SPs是用 20mg mL^{-1} 血纤蛋白原和 1.72mg mL^{-1} 凝血酶进行的。选择这些参数是因为它们在FITC-溶菌酶研究中提供了最佳的突释减缓。图24c和d显示了在 37°C 下,在PBS(pH7.4)中,BDNF和NT-3从Si-SPs和 $^{\text{F}}$ Si-SPs的释放曲线。与从未包覆的Si-SPs释放相比,BDNF和NT-3从 $^{\text{F}}$ Si-SPs的释放似乎遵循接近线性的释放曲线。第21天,未包覆的Si-SPs释放出约60%的BDNF或NT-3,而 $^{\text{F}}$ Si-SPs释放出约10%的BDNF或NT-3,表明血纤蛋白包衣策略也减缓了神经营养蛋白的释放。在图25和26中示出了在每个时间点从Si-SPs和 $^{\text{F}}$ Si-SPs释放的BDNF和NT-3的百分比。增加的血纤蛋白凝胶化时间也与随时间的药物释放减少有关(与2h凝胶化时间[硬]相比,凝胶化时间[软]为10min)。

[0264] 实施例10——血纤蛋白胶包覆的二氧化硅超粒子的降解

[0265] 在体外降解研究中,通过将在PBS(pH7.4, 37°C)中孵育Si-SPs和 $^{\text{F}}$ Si-SPs进行研究。根据SEM分析,随着时间流逝,Si-SPs(图27)和 $^{\text{F}}$ Si-SPs(图28a)的尺寸逐渐减小,并且如从超粒子的形态所看到的,存在降解的明显证据,在孵育6周后其出现破裂和塌陷。在 37°C 下在PBS中孵育10周之后,当比较第3天的 $^{\text{F}}$ Si-SPs和第10周的 $^{\text{F}}$ Si-SPs时, $^{\text{F}}$ Si-SPs的直径减少了 $\sim 40\%$,并且超粒子形态的显著变化是明显的。在10周后 $^{\text{F}}$ Si-SPs表面的较高放大倍数成像显示出下面的二氧化硅微粒的外观,其也显示为碎片,证实了血纤蛋白包衣的降解性。这通过测量保留在 $^{\text{F}}$ Si-SPs上的血纤蛋白量来证实(图29),其显示在6周孵育后血纤蛋白几乎完全降解。在作为释放60%负载的FITC-溶菌酶所需时间的28天时,仅约5%的血纤蛋白保留在 $^{\text{F}}$ Si-SPs上,之后Si-SPs和 $^{\text{F}}$ Si-SPs之间的释放曲线变得相似。

[0266] 为了定量Si从超粒子的释放,使用在释放研究(图28f)的不同时间点(3天、7天、14天、21天、28天、42天和70天)收集的样本进行ICP-OES以测量Si浓度。在 37°C 下在PBS中孵育70天后,从Si-SPs和 $^{\text{F}}$ Si-SPs释放出约30%的Si。在第一周期间Si的降解对于 $^{\text{F}}$ Si-SPs比对于Si-SPs慢(图30)。14天后,Si-SPs和 $^{\text{F}}$ Si-SPs的降解速率遵循相同的曲线,这是预期的,因为仅有25%左右的血纤蛋白在14天后保留在 $^{\text{F}}$ Si-SPs上,因此大多数二氧化硅微粒直接暴露在PBS中(如,未包覆)。

[0267] 这些数据表明生物可降解包衣如血纤蛋白可用于促进治疗剂从Si-SPs中持续释放。

[0268] 实施例11——体外细胞毒性

[0269] 进行细胞毒性实验以测量长时间范围内从Si-SPs和 $^{\text{F}}$ Si-SPs释放的任何毒性组分。使用U87MG细胞检测 $^{\text{F}}$ Si-SPs的降解产物的体外细胞毒性。将在11周内收集的含有来自2、5、10或15 $^{\text{F}}$ Si-SPs的片段化Si和血纤蛋白包衣的上清液直接加入到细胞中,并在孵育2天后测量细胞的活力(图31)。结果显示,即使 $^{\text{F}}$ Si-SPs的数量从2增加到15,也没有由 $^{\text{F}}$ Si-SPs的降解产物引起的细胞毒性。对于Si-SPs观察到类似的结果。这支持了Si和血纤蛋白及其相应分解产物的生物相容性。

[0270] 实施例12——包封在Alg-CaCO₃水凝胶中的 $^{\text{F}}$ Si-SPs的体外药物释放

[0271] 研究通过藻酸盐和 Ca^{2+} 离子交联形成的水凝胶作为实现蛋白治疗剂从Si-SPs释放的额外控制的方法。藻酸盐是高度生物相容的天然多糖,其被广泛研究用于各种生物医学应用,并且已经显示出在长期植入后在内耳中是生物相容的。添加D-葡萄糖酸- δ -内酯(GDL,一种常见的食品添加剂)后释放钙离子的 CaCO_3 颗粒(直径约 $1.6\mu\text{m}$)被用来提供 Ca^{2+} 离子,使海藻酸盐交联成水凝胶。结合起来,这些组分形成了延迟/触发的水凝胶平台,由此可以以与液体形式的藻酸盐和 CaCO_3 颗粒的混合物施用药物负载的Si-SPs,接着加入GDL以将水凝胶固化到位。由于多孔 CaCO_3 颗粒的高表面积和与GDL相关的温和水解条件,凝胶化在加入GDL后 $\sim 2\text{min}$ 内发生。

[0272] 将FITC-溶菌酶负载的 $^{\text{F}}$ Si-SPs包封在alg- CaCO_3 水凝胶中,并测定FITC-溶菌酶在 37°C 的PBS (pH7.4)中孵育时的释放(图32e)。上面已经显示生物可降解的血纤蛋白包衣减缓了突释,图32e显示水凝胶的存在进一步降低了释放速率,其中在40天内释放了60%的FITC-溶菌酶。除了使用 $^{\text{F}}$ Si-SPs的这些结果之外,还使用不同量的 CaCO_3 颗粒和不同浓度的藻酸盐溶液研究了alg- CaCO_3 水凝胶中Si-SPs的体外释放曲线(图33)。对于不同的 CaCO_3 颗粒量和测试的藻酸盐浓度,没有观察到来自Si-SPs的FITC-溶菌酶释放曲线的大的差异。总之,这些结果表明alg- CaCO_3 水凝胶系统的触发凝胶化(在加入GDL时),系统可以包封药物负载的超粒子并具有强的释放曲线。示例性用途是作为一个简单的双组分“混合注射”系统,其中临床医生或外科医生可以将药物递送系统放置在预定位置,例如中耳或内耳。

[0273] 实施例13——壳聚糖包覆的超粒子

[0274] 如上所述,通过凝胶介导的电喷雾组装合成Si-SPs,并负载溶菌酶、BDNF或NT-3。然后用1、2或三层壳聚糖和藻酸盐(0.1wt%的壳聚糖和藻酸盐溶液)包覆负载的Si-SPs。然后随时间追踪体外药物释放(图34、35和36)。然后用一层1wt%的壳聚糖和藻酸盐溶液包覆负载溶菌酶的Si-SP,之后随时间追踪溶菌酶(图37)。

[0275] 本领域技术人员将理解,在不脱离如广泛描述的本发明的精神或范围的情况下,可以对如具体实施例中所示的本发明做出许多变化和/或修改。因此,本实施方案在所有方面都被认为是说明性的而非限制性的。

[0276] 本申请要求2019年3月19日提交的AU 2019900910的优先权,其公开内容通过引用并入本文。

[0277] 以上讨论的所有出版物以其整体并入本文。

[0278] 已经包括在本说明书中的对文献、法案、材料、设备、文章等的任何讨论仅出于提供本发明的上下文的目的。因为在本申请的每个权利要求的优先权日之前存在这些物质中的任一个或全部形成现有技术基础的一部分或者是与本发明相关的领域中的公知常识,所以不应认为这些物质中的任一个或全部形成现有技术基础的一部分或者是与本发明相关的领域中的公知常识。

[0279] 参考文献

[0280] Clark GM, 等人(1984)《耳、鼻、喉科学年报》(Ann Otol Rhinol Laryngol) 93: 204-207

[0281] Clark GM, 等人(1991)《耳与听力增刊》(Ear and Hearing Suppl.) 12:15S-24S

[0282] Cui等人(2015) ACS Nano 9:1571-1580

[0283] Jaworek (2007)《粉体技术》(Powder Technology) 176 (1), 18-35

- [0284] Langer R (1990)《科学》(Science) .249,1527-1533
- [0285] 《雷明顿药物科学》Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co.N.J.USA,1991)
- [0286] Tan等人 (2012)《先进材料》(Adv.Mater.) 24:3362-3366
- [0287] Wang等人 (2009)《材料化学杂志》(J.Mater.Chem.) 19:6451-6464
- [0288] Wang等人 (2010)《材料化学》(Chem Mater.) 22:3829-3831
- [0289] Yang和Pierstorff (2012) JALA.17,50-58

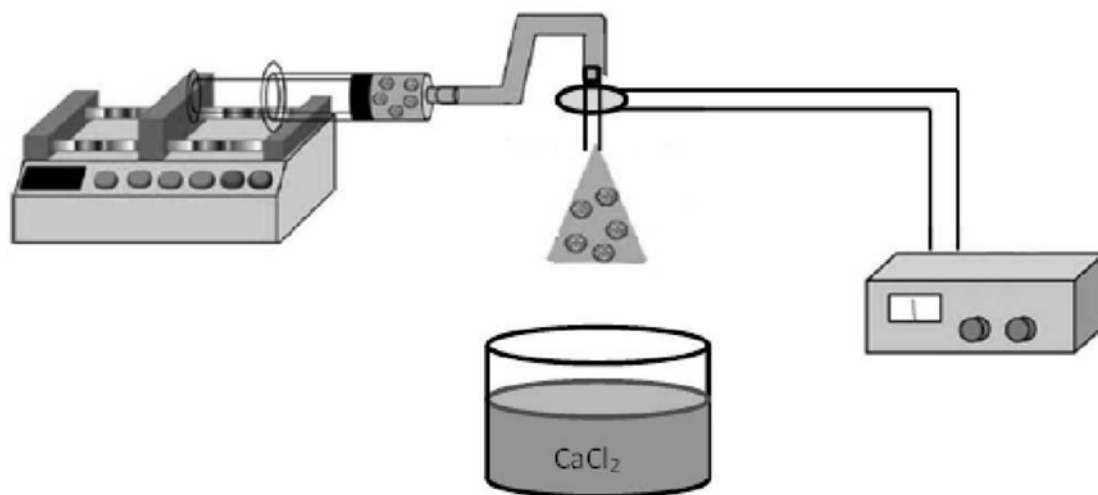


图1

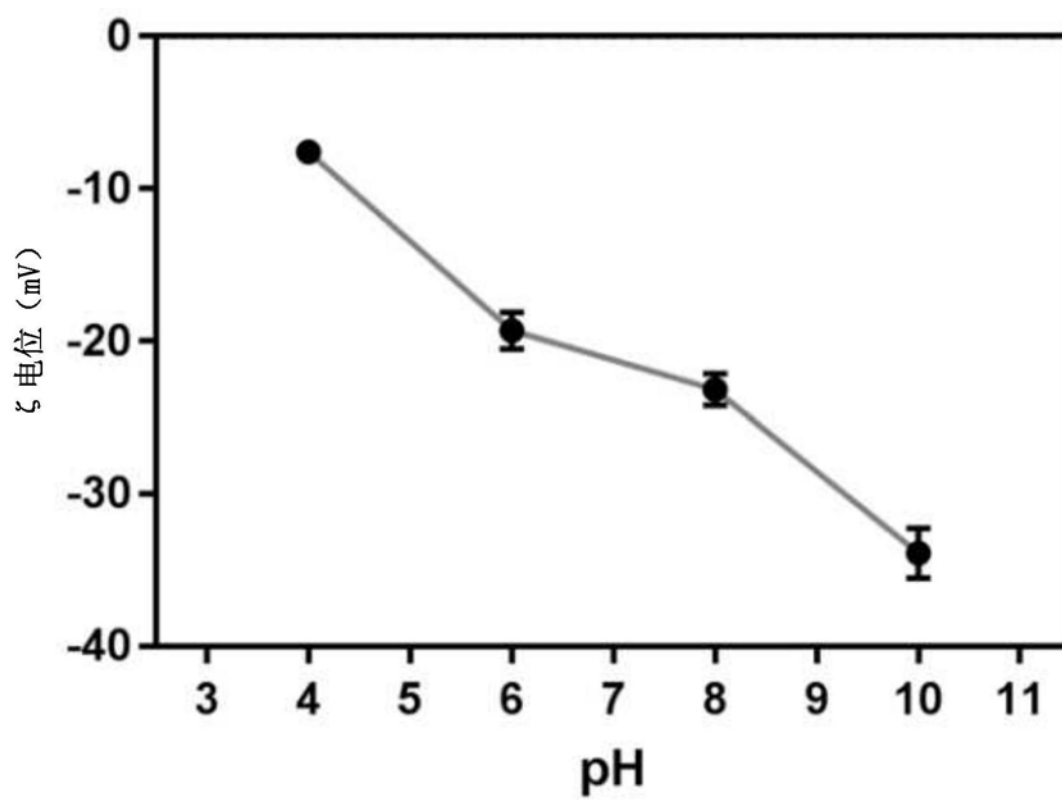


图2

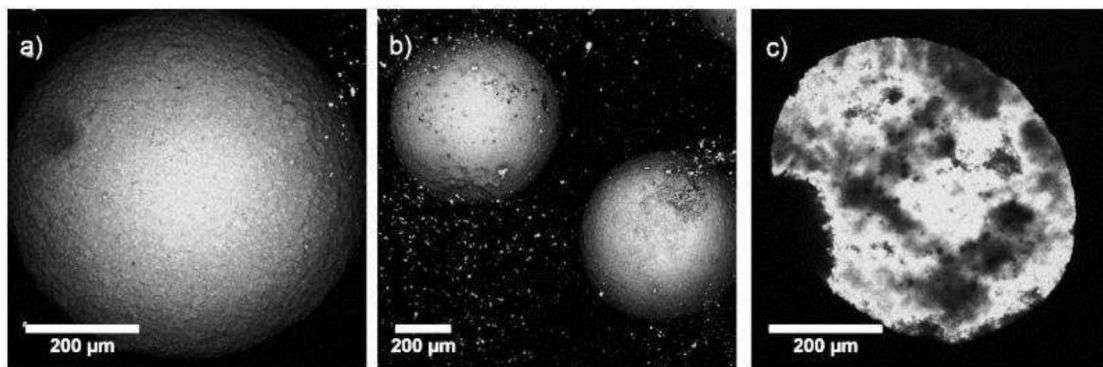


图3

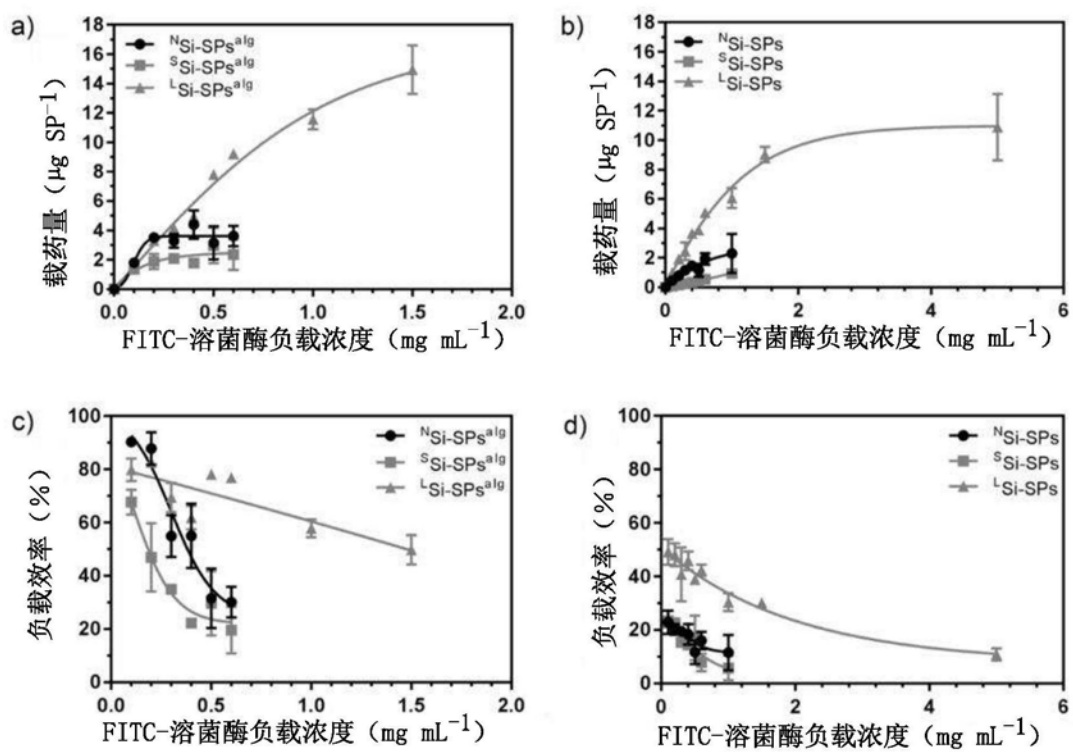


图4

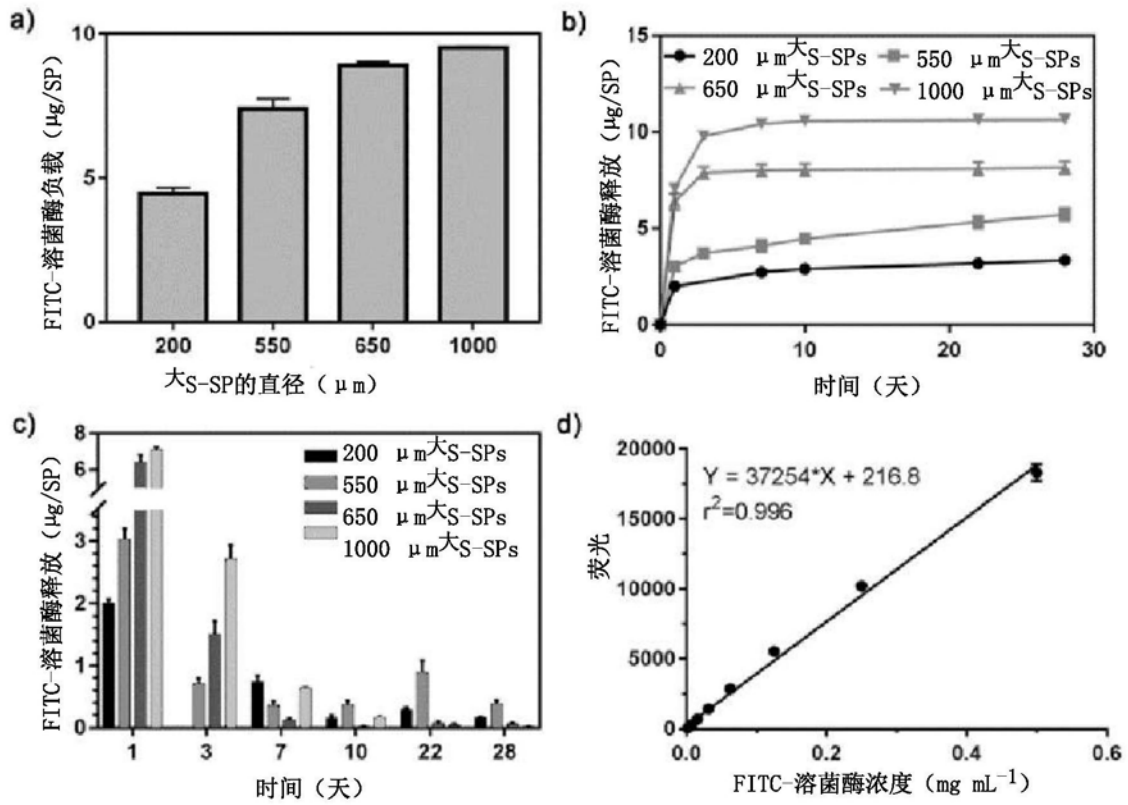


图5

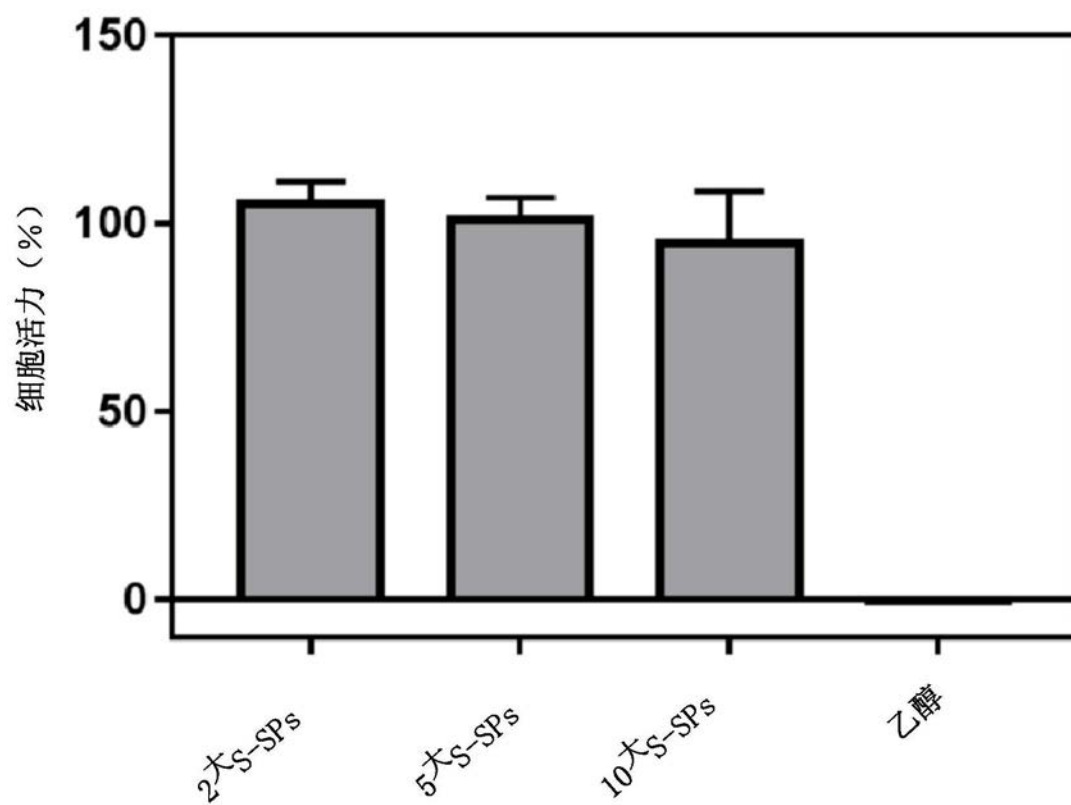


图6

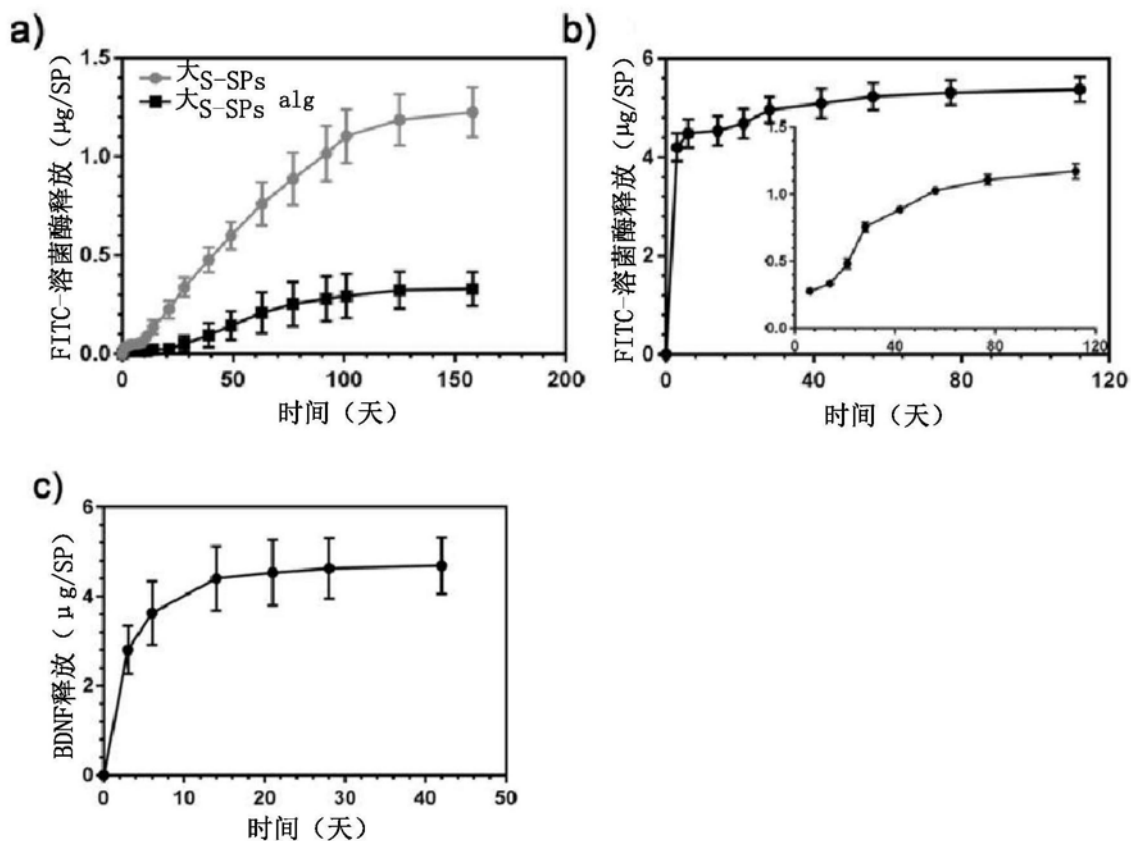


图7

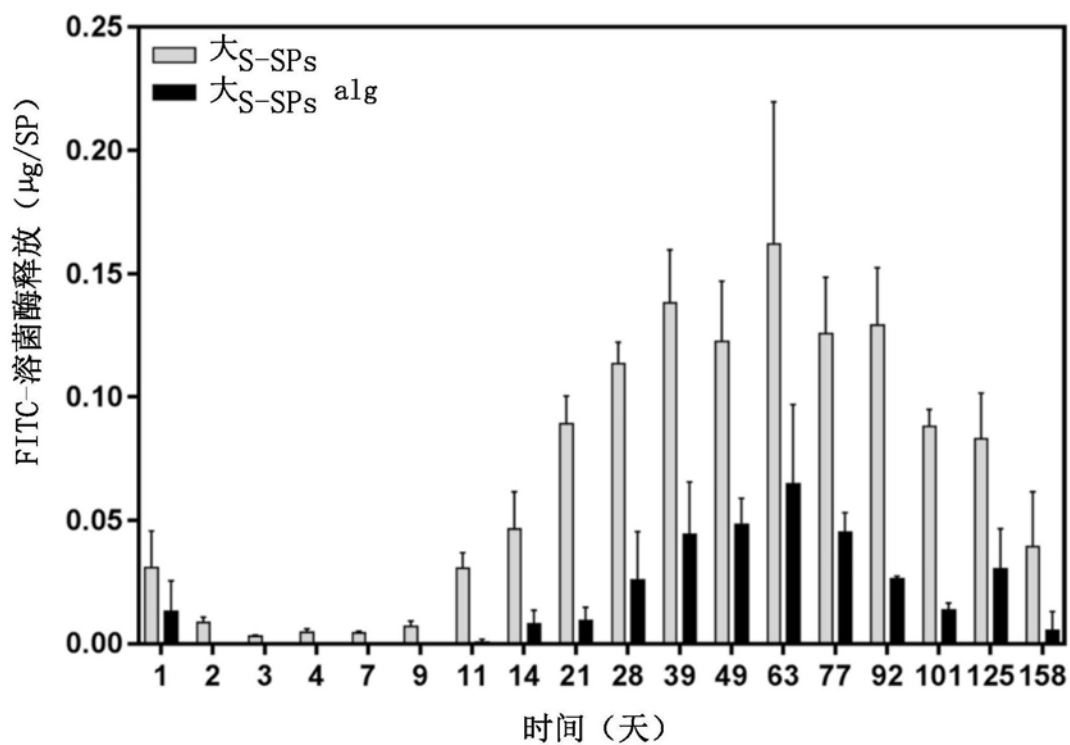


图8

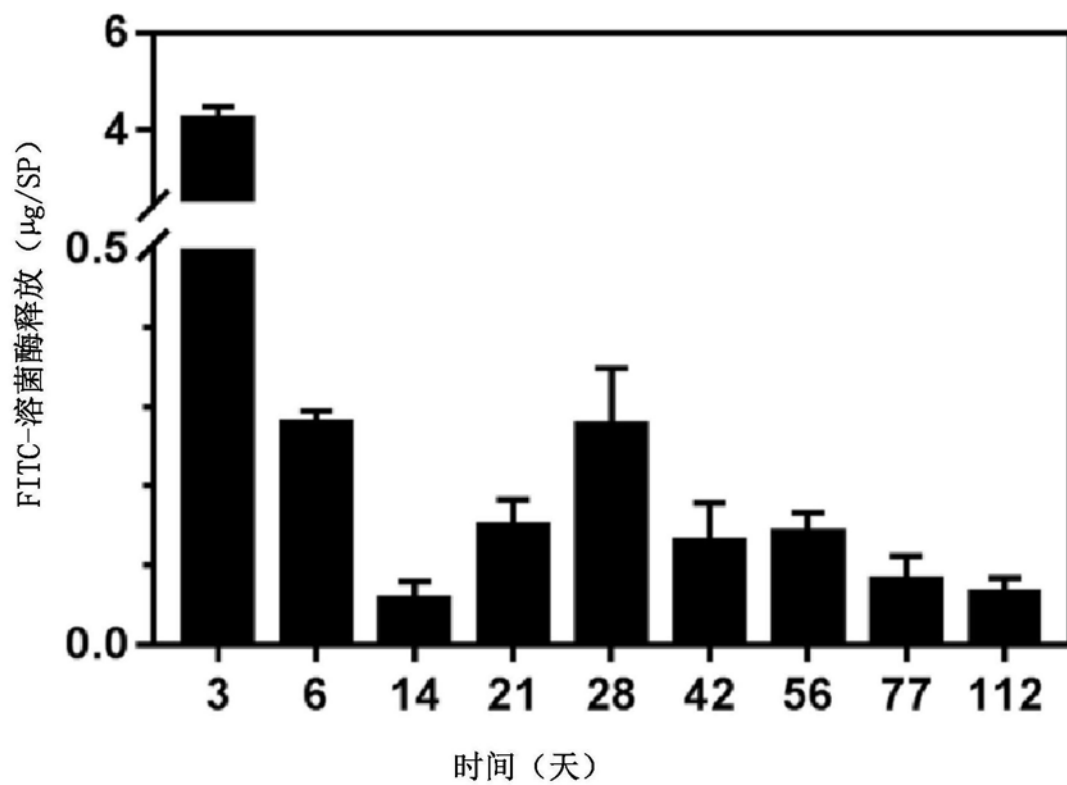


图9

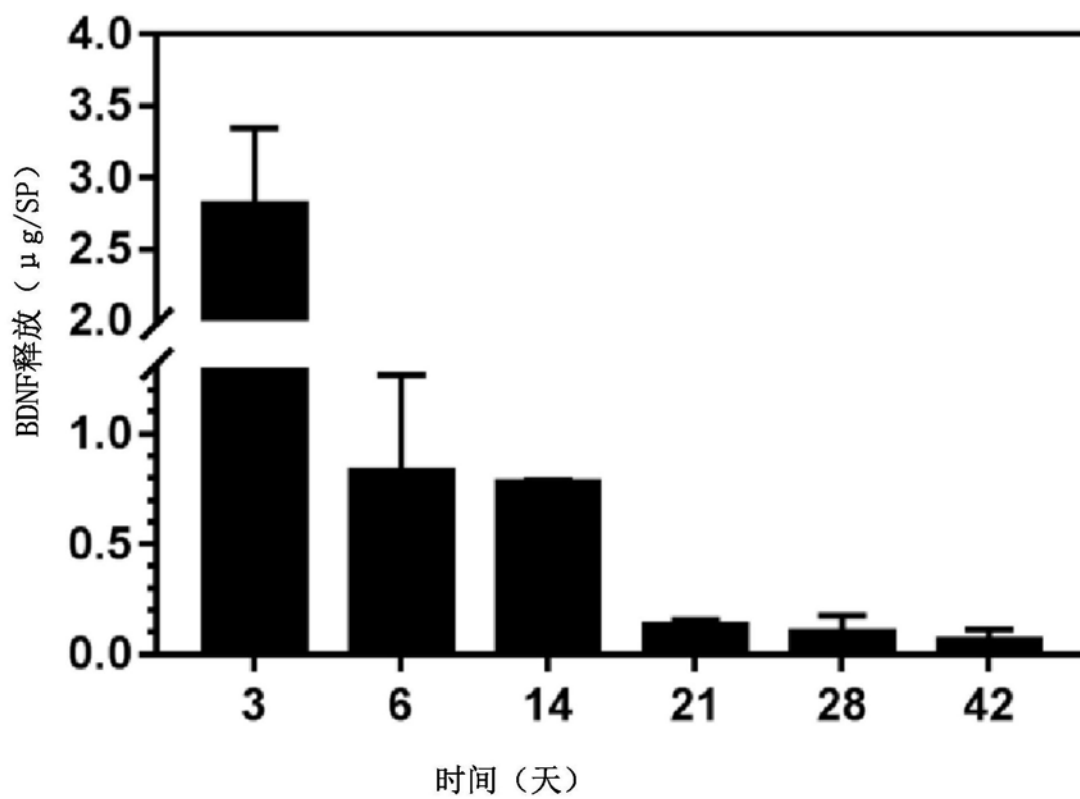


图10

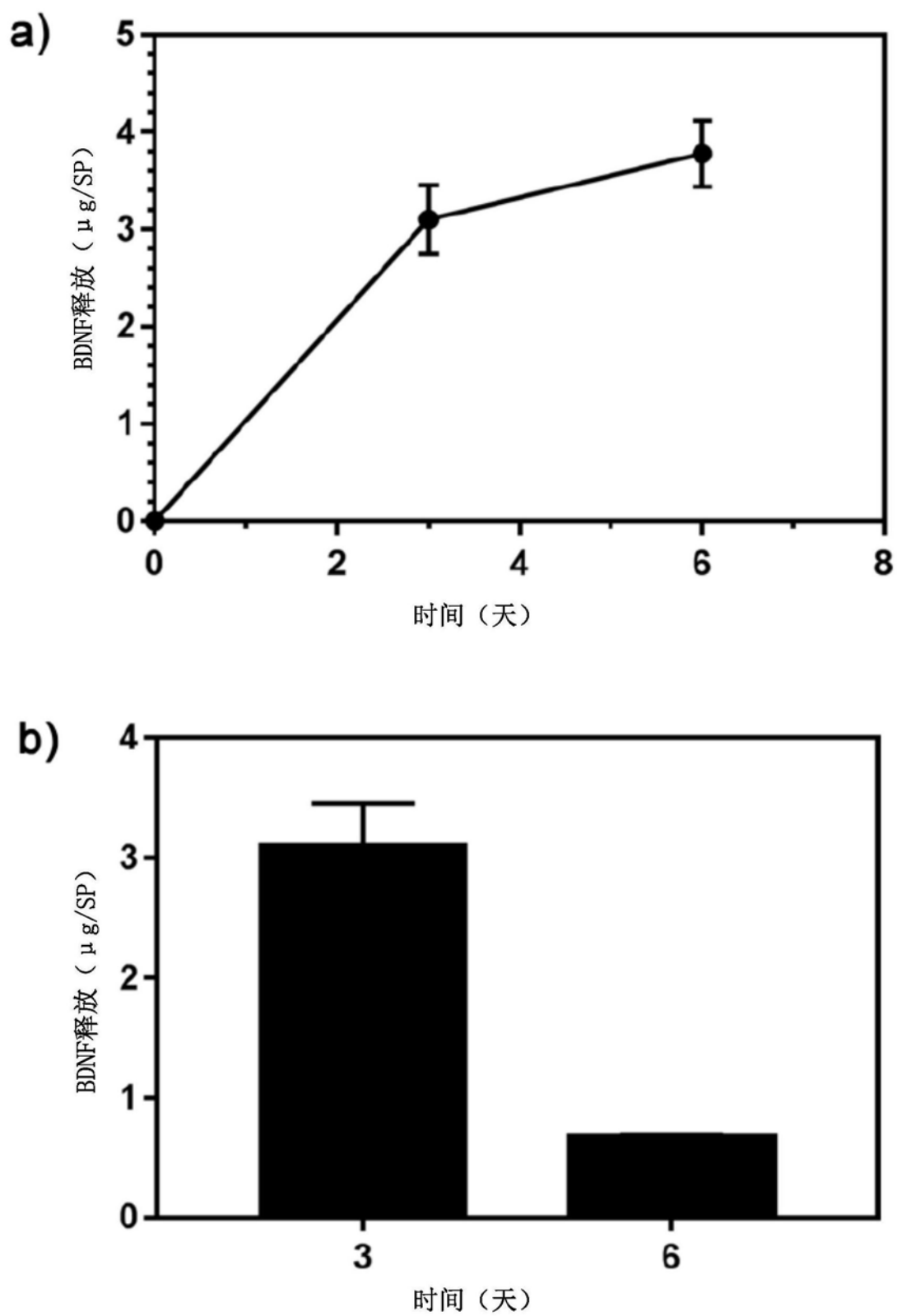


图11

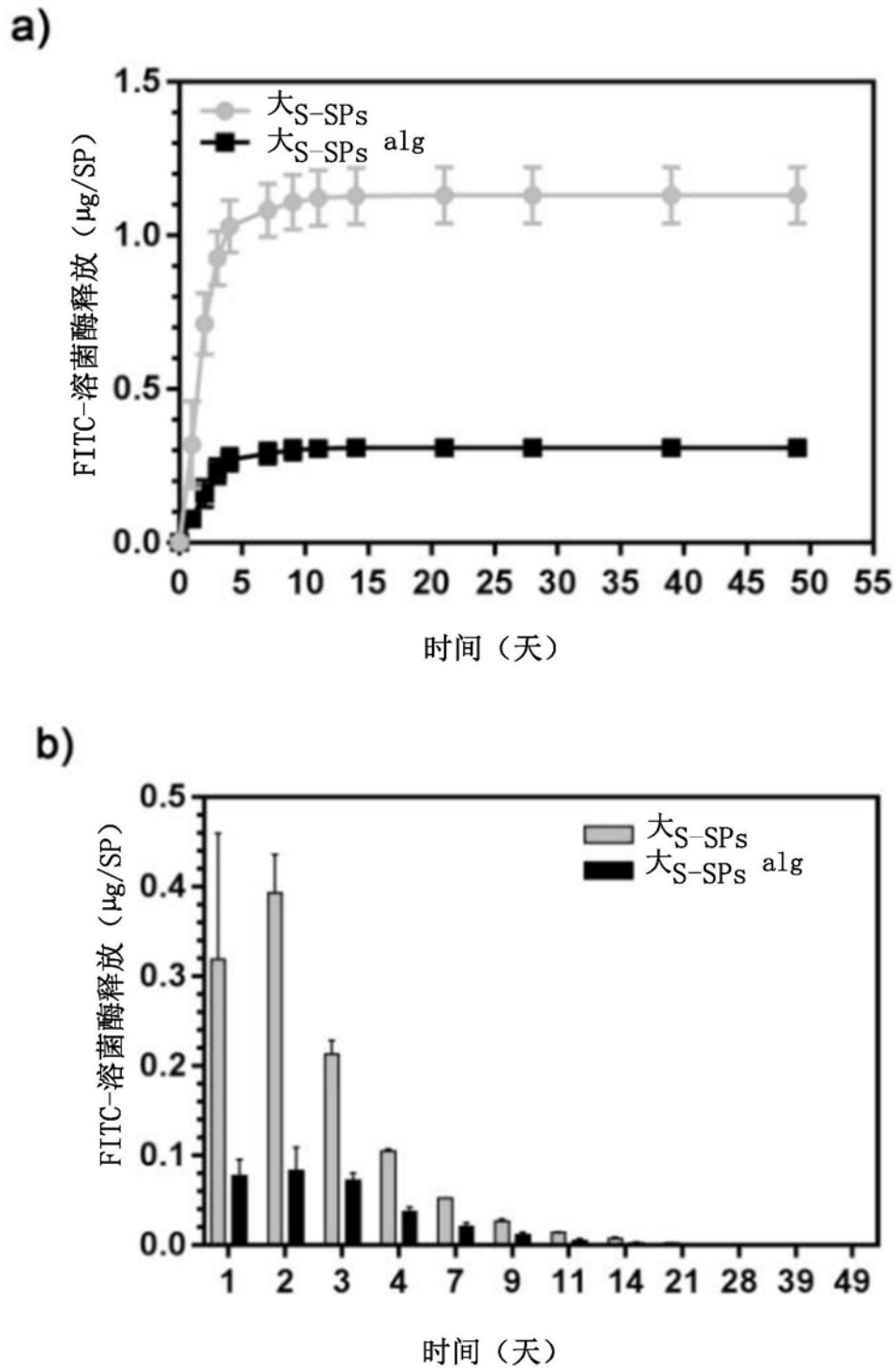


图12

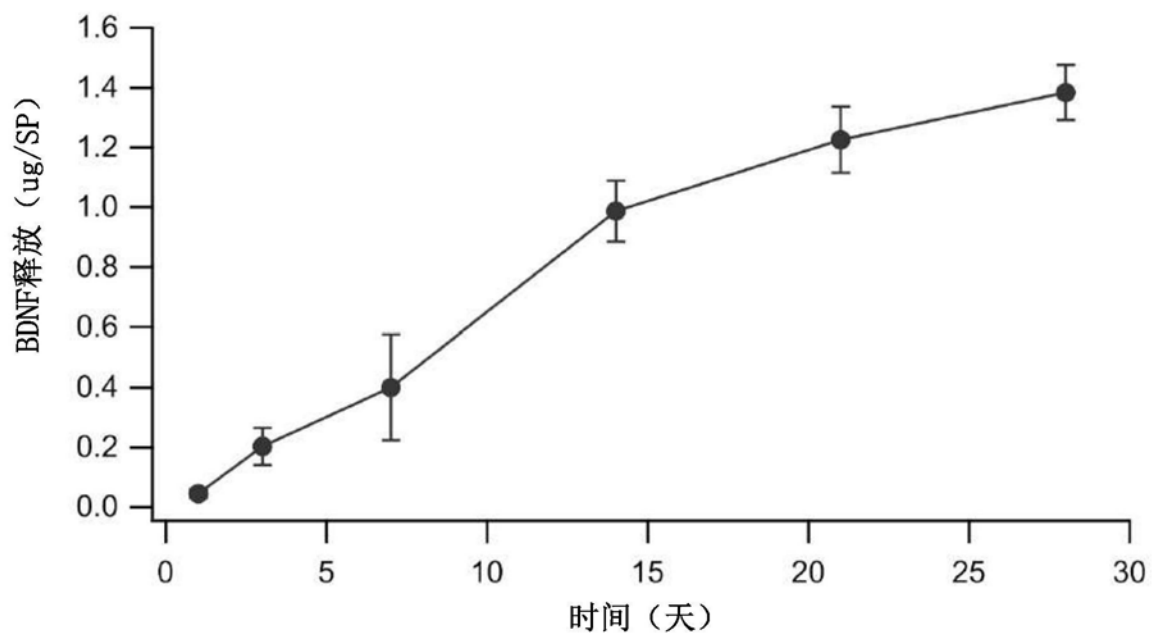


图13

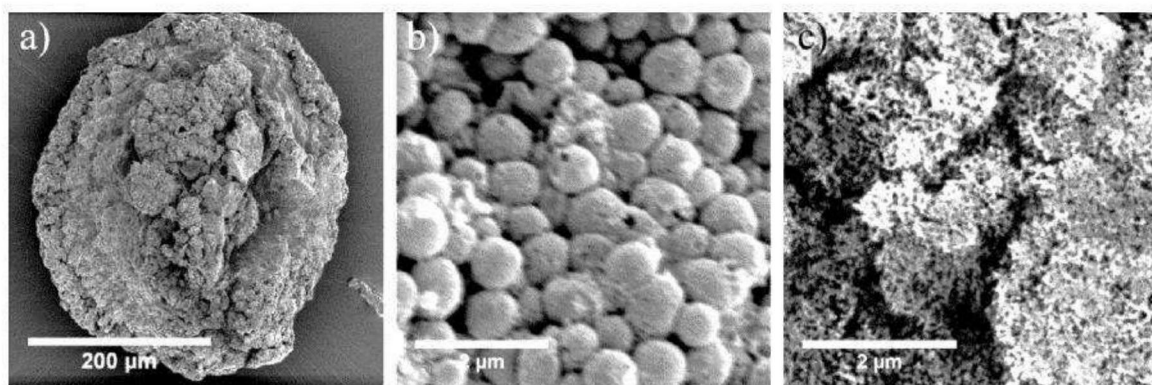


图14

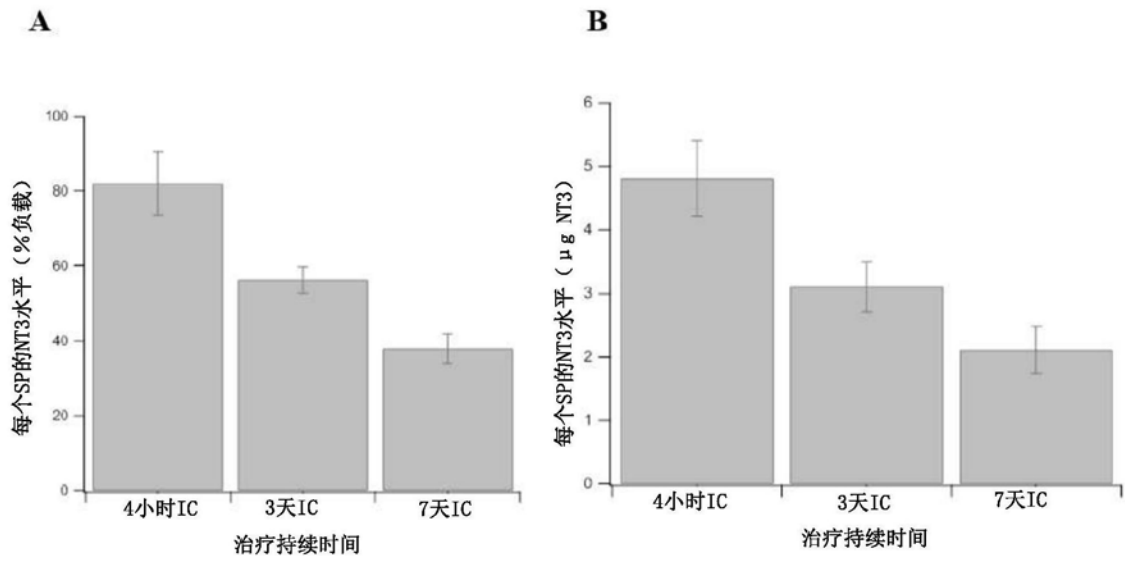


图15

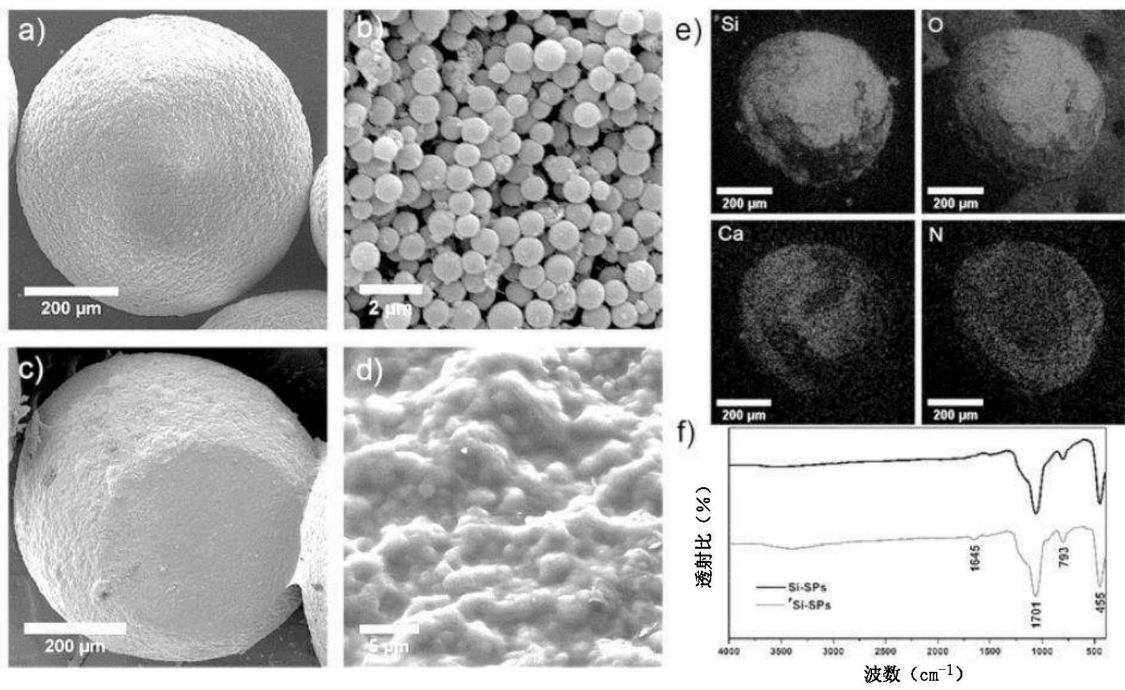


图16

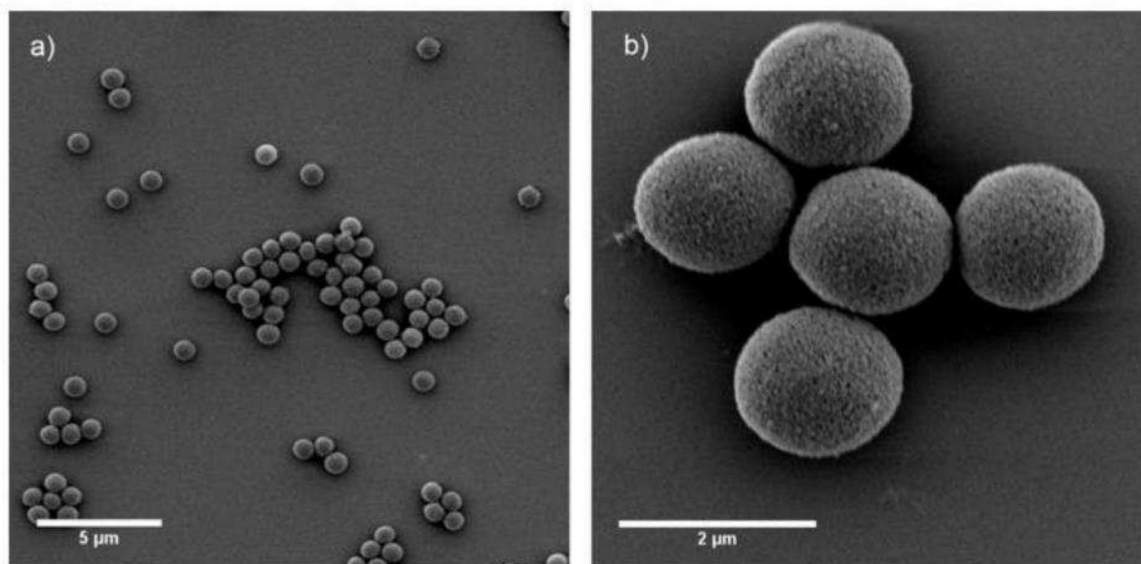


图17

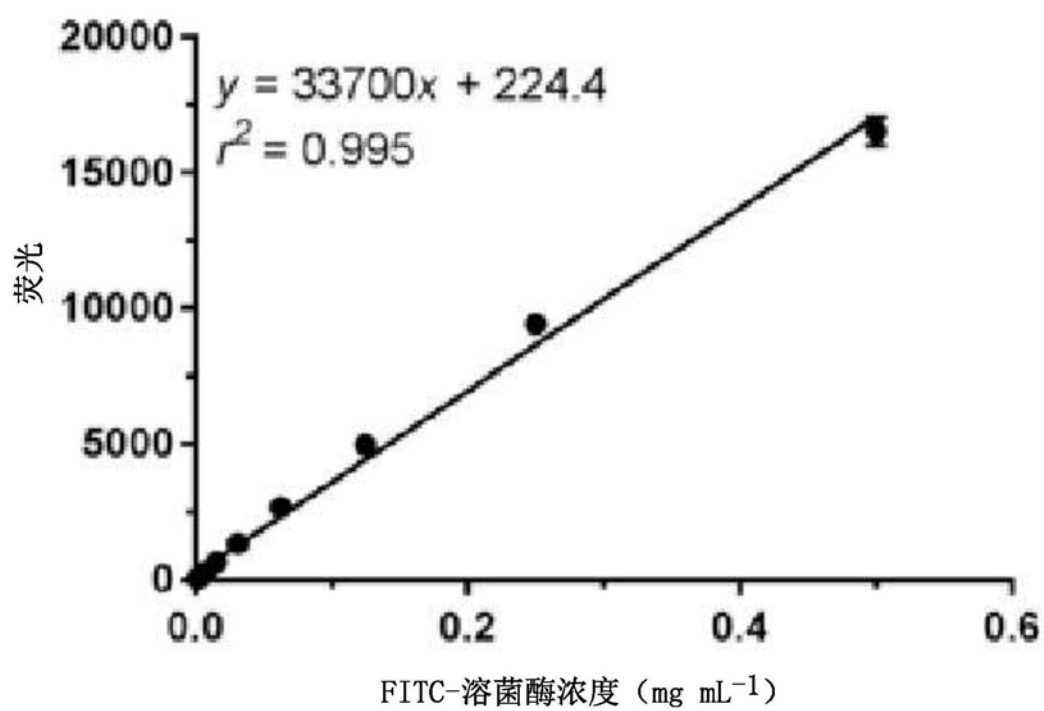


图18

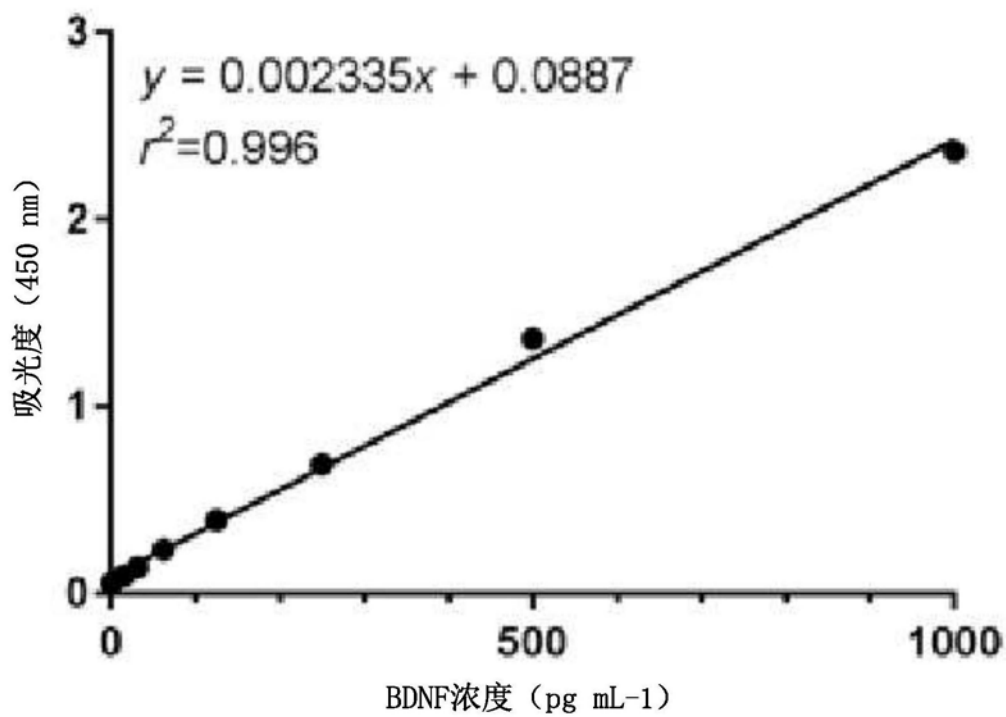


图19

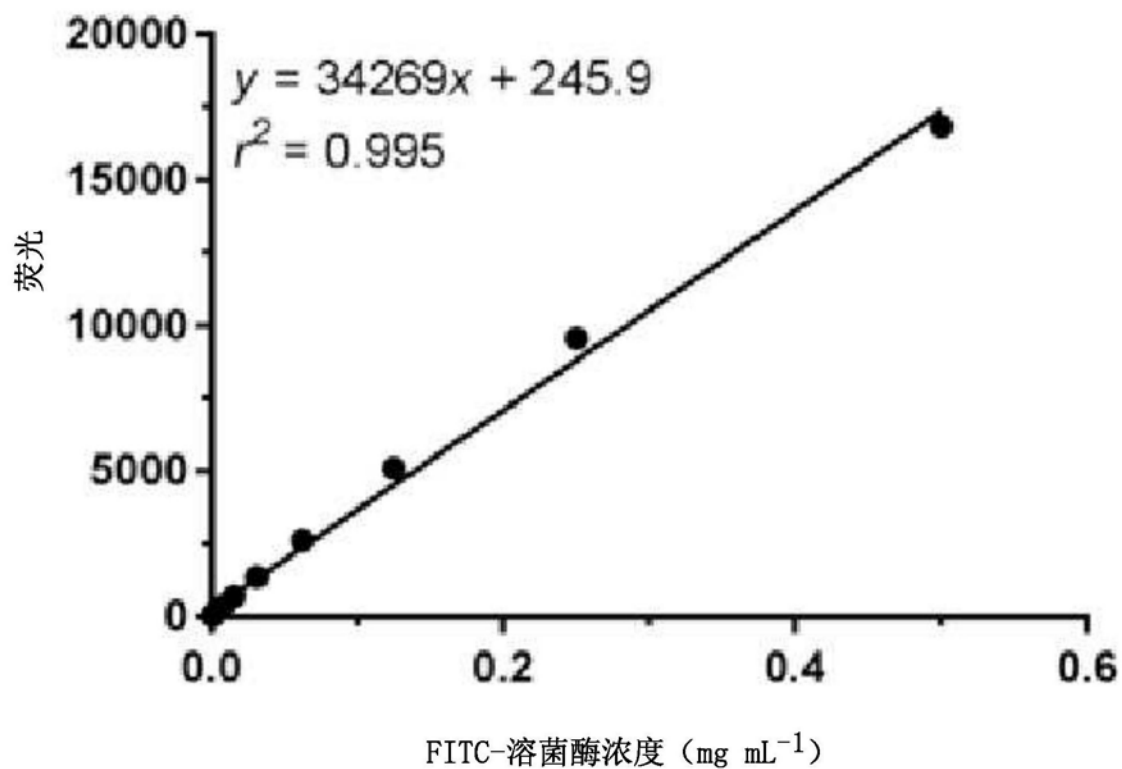


图20

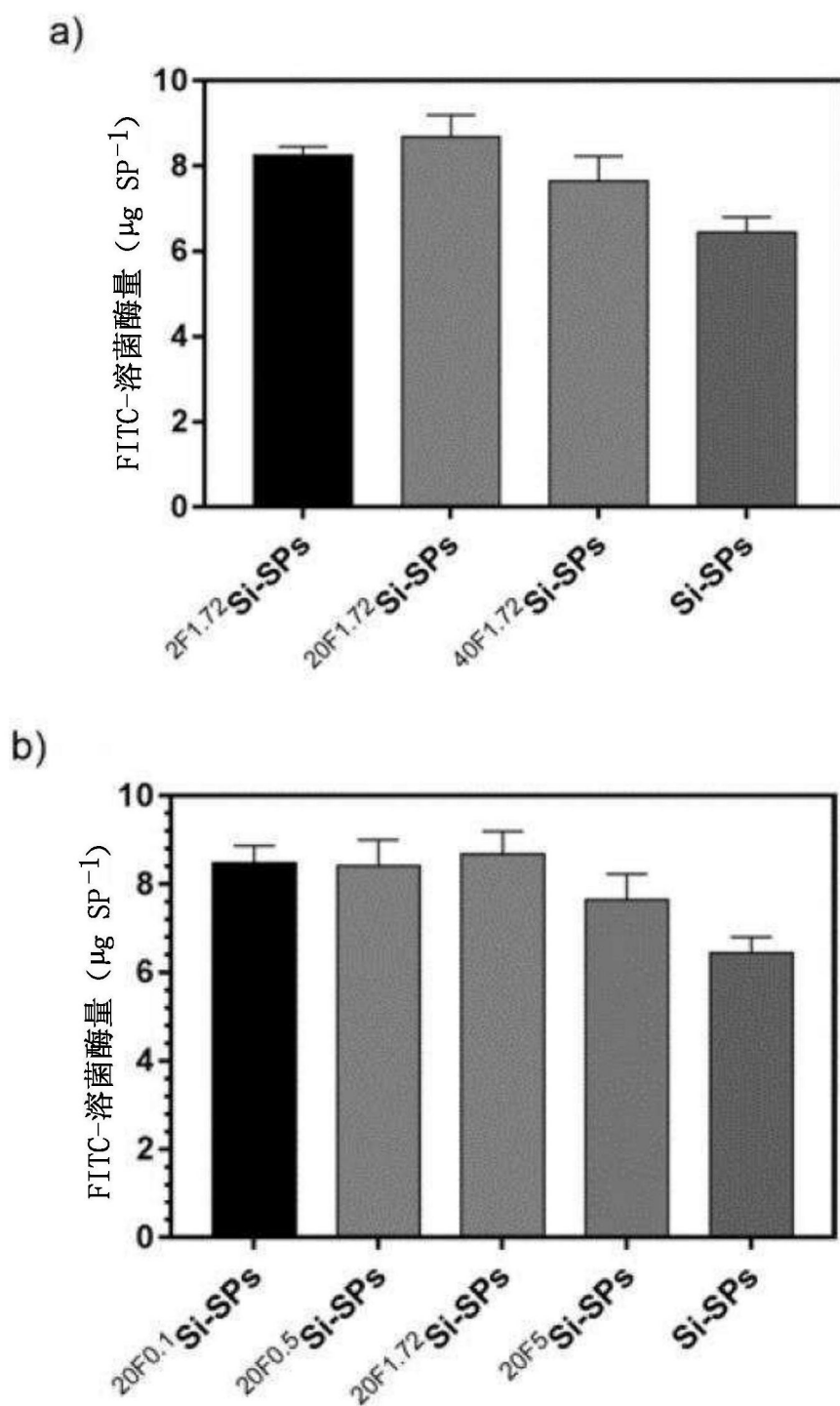


图21

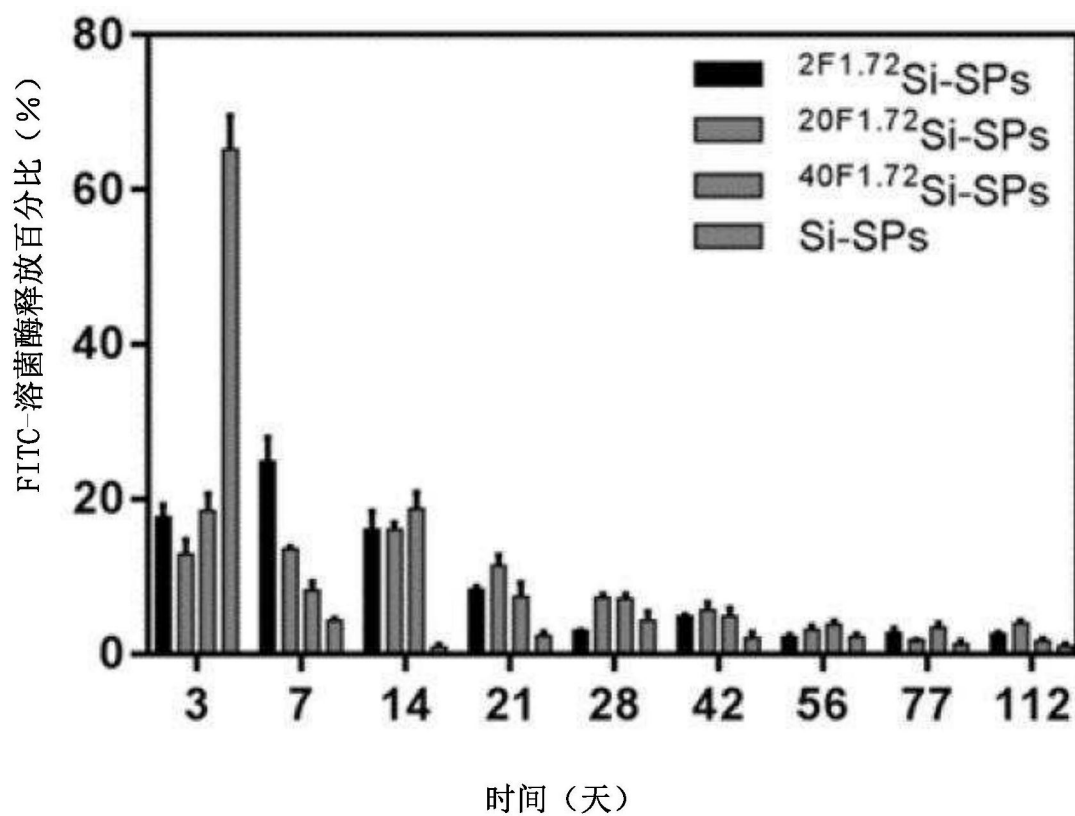


图22

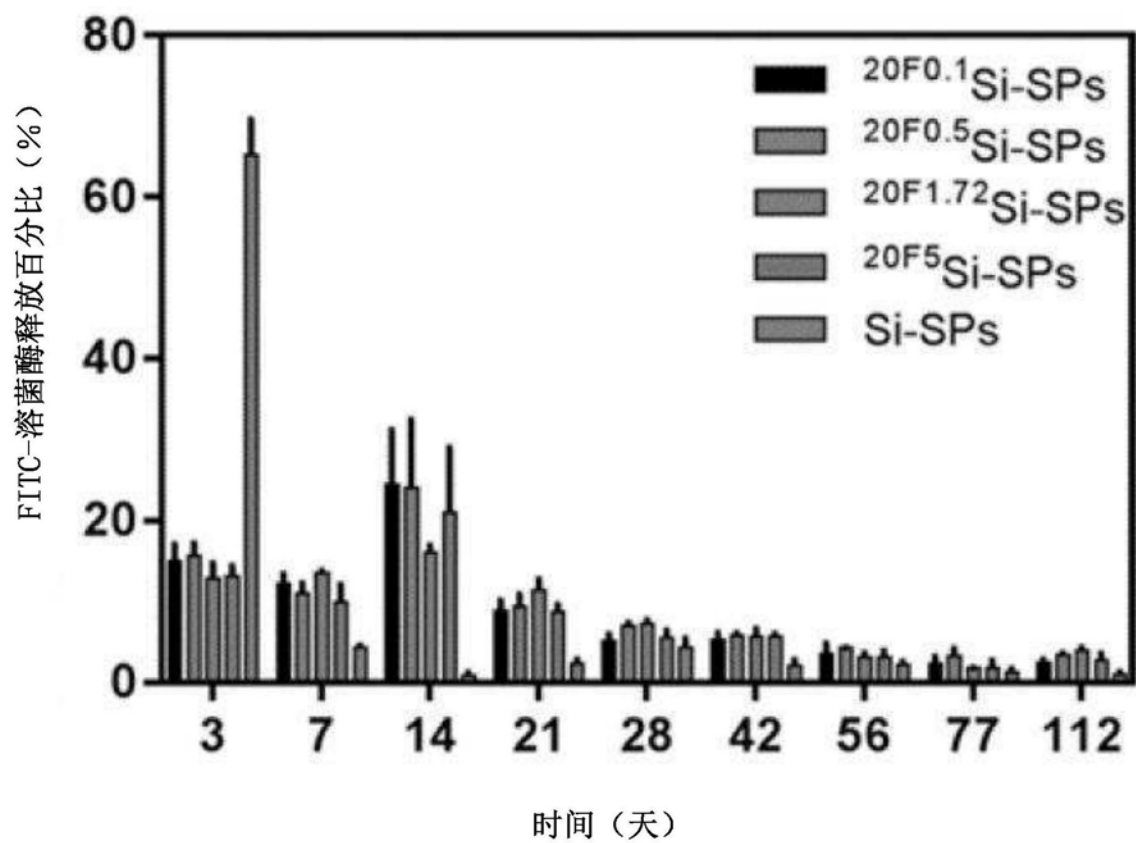


图23

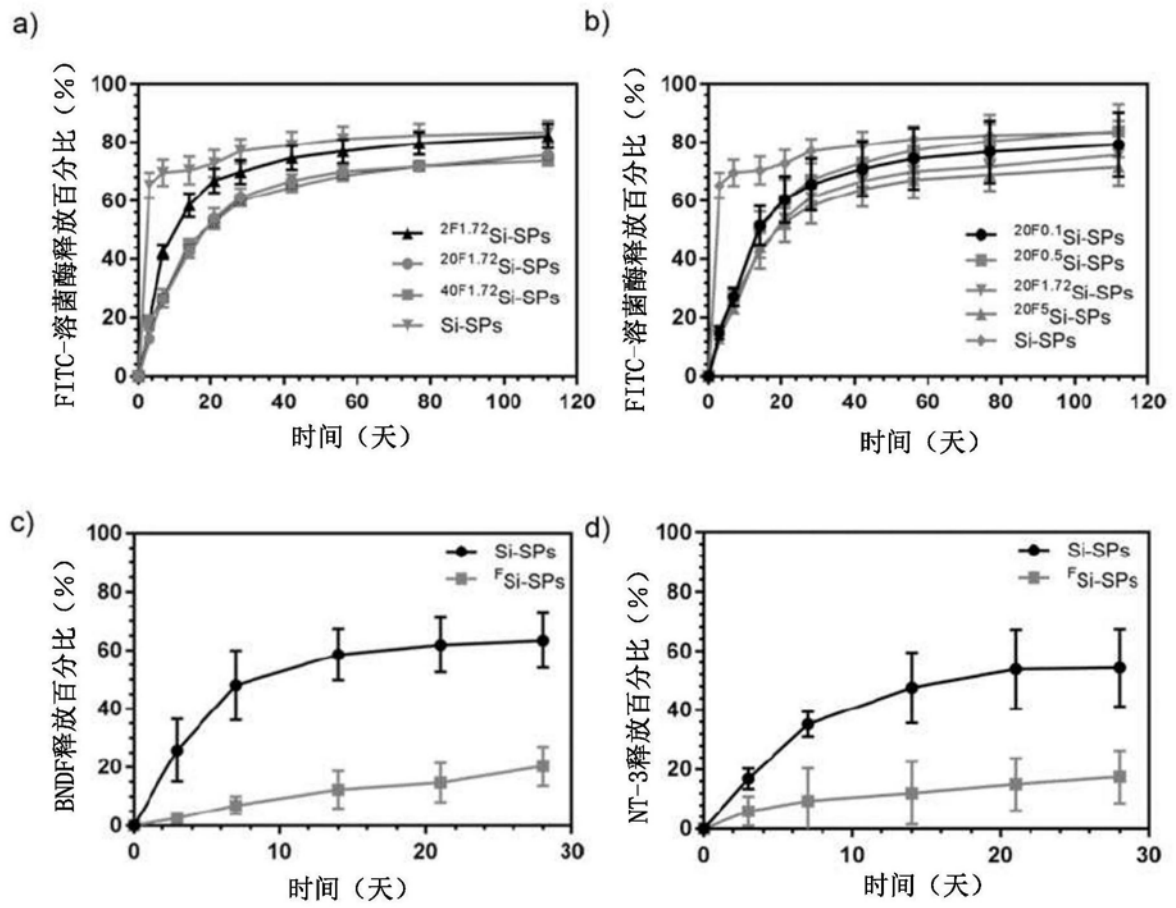


图24

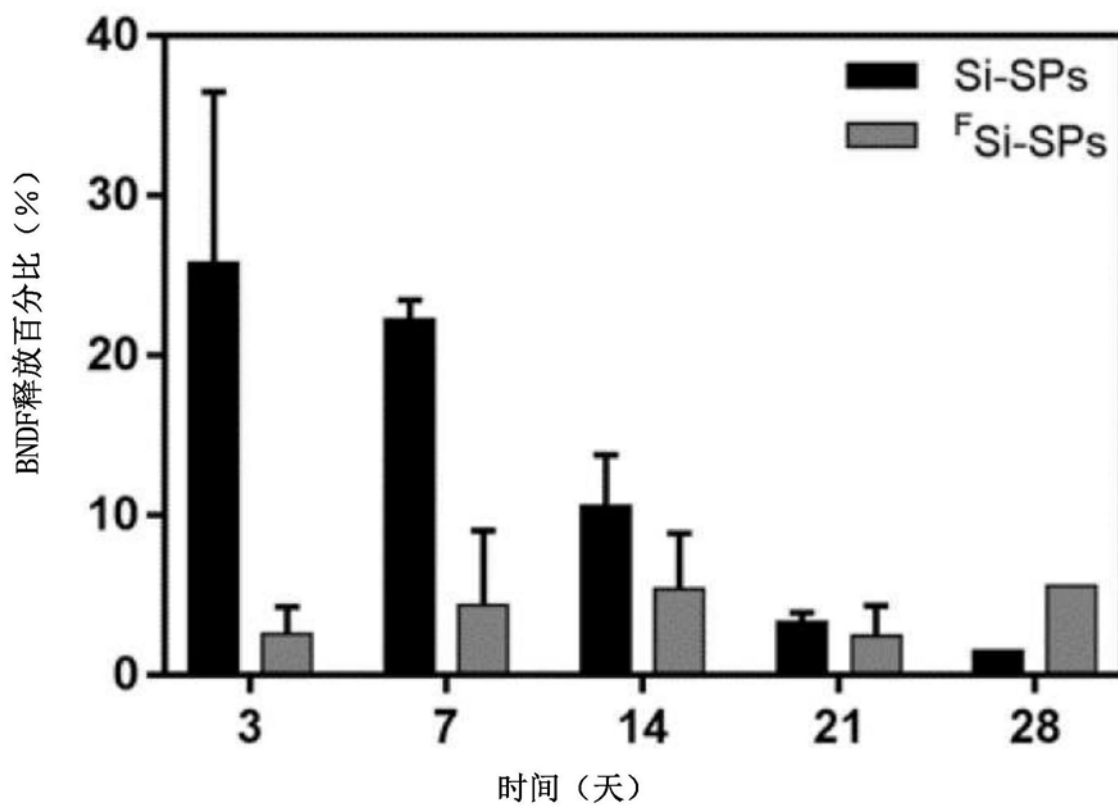


图25

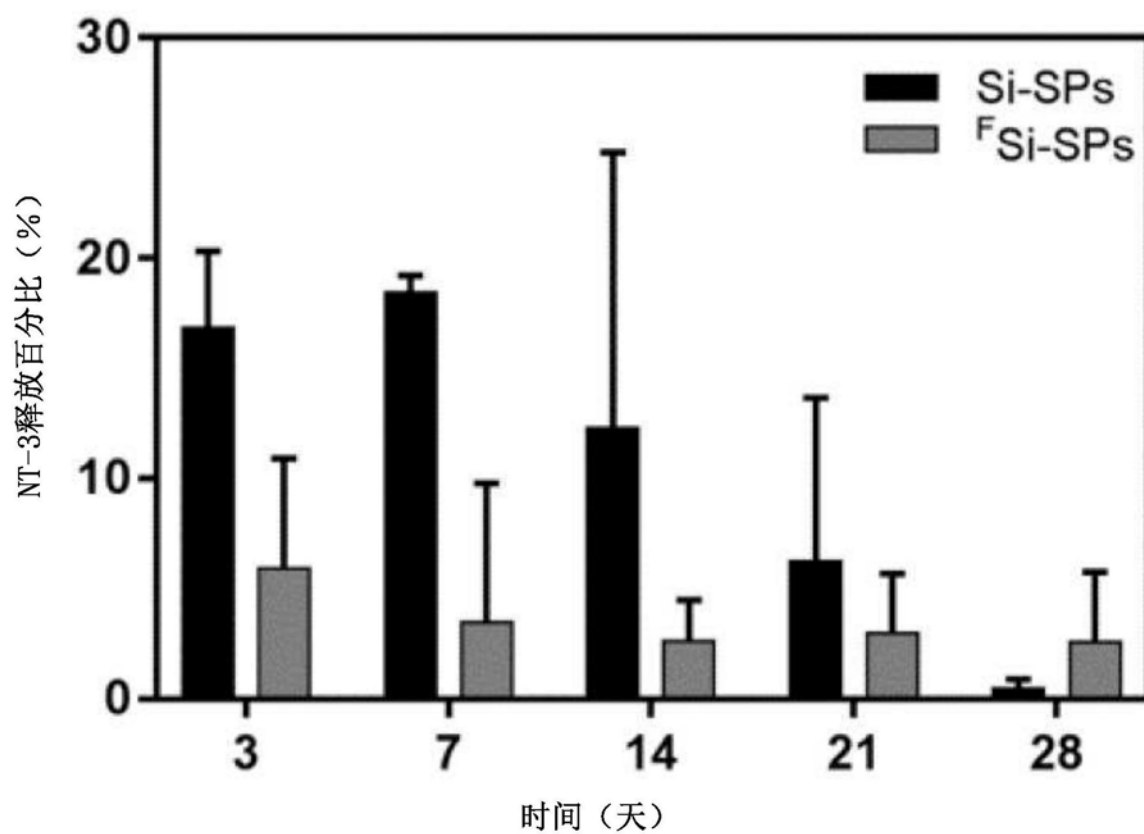


图26

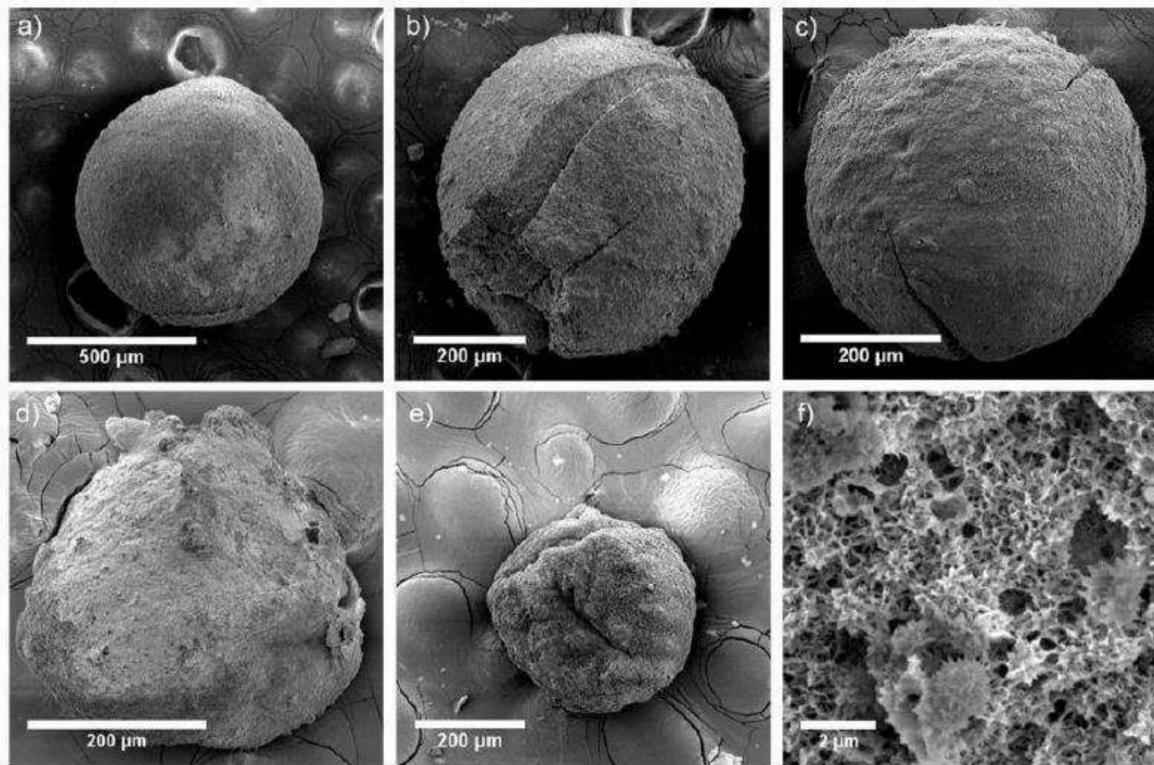


图27

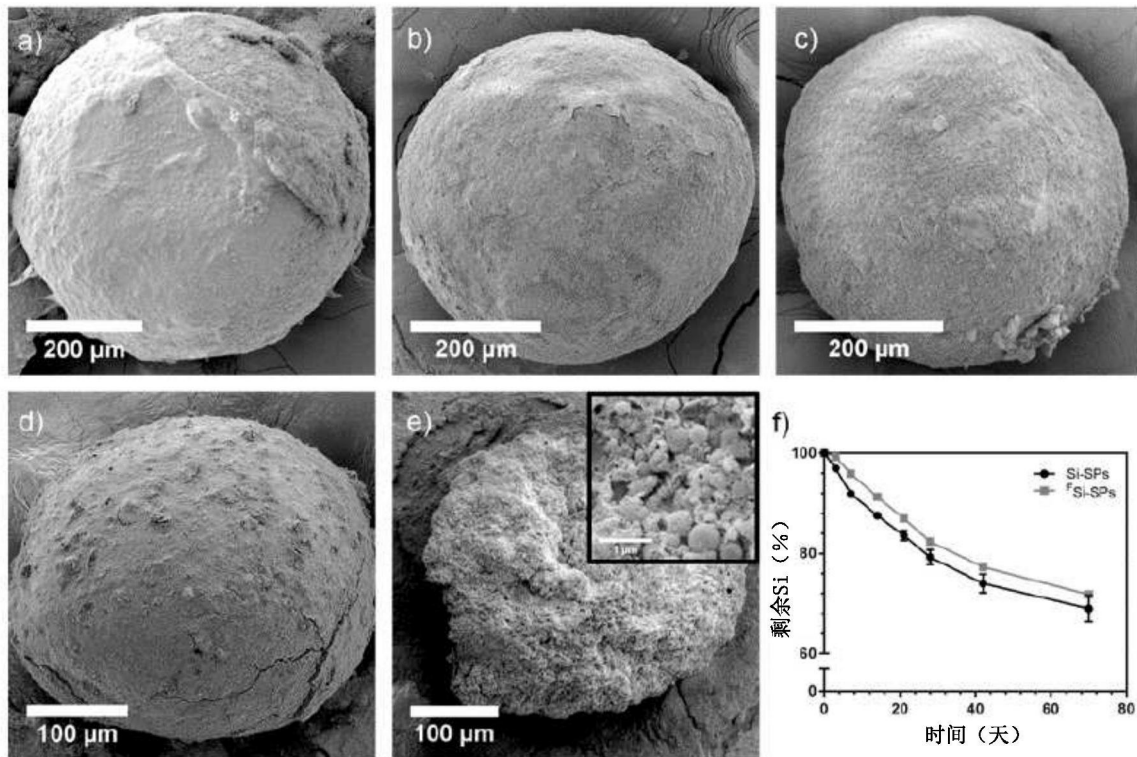


图28

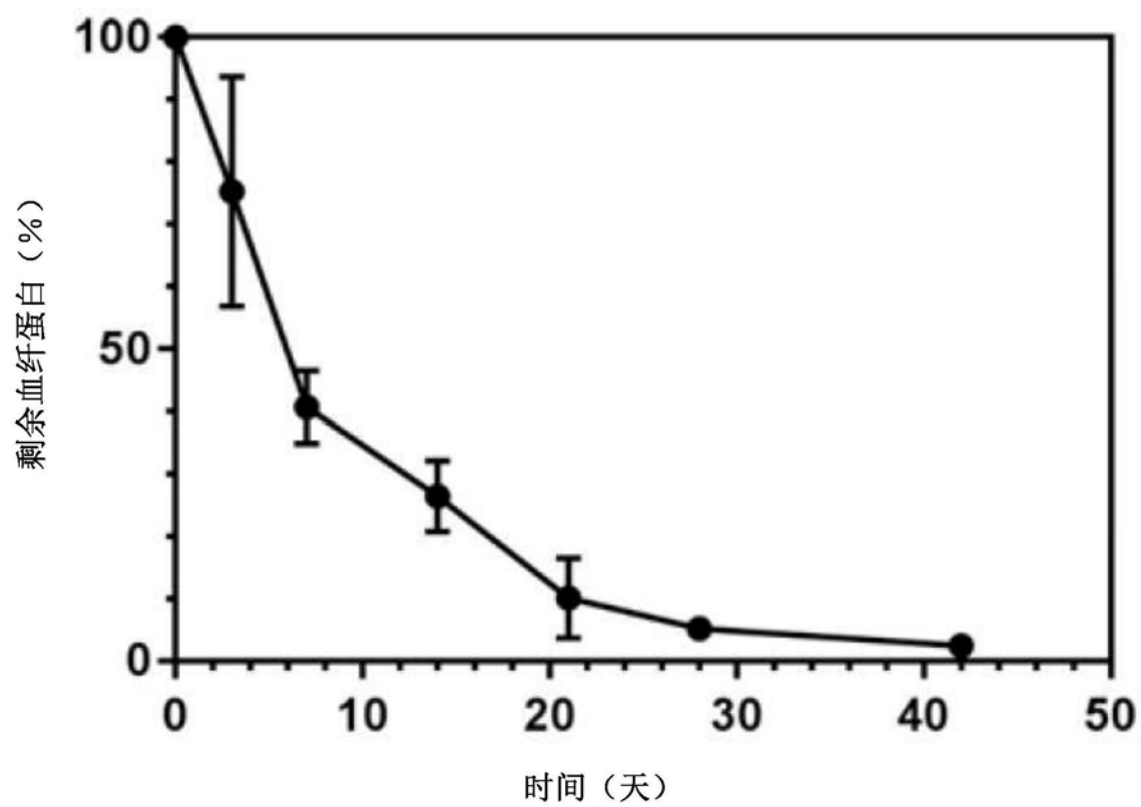


图29

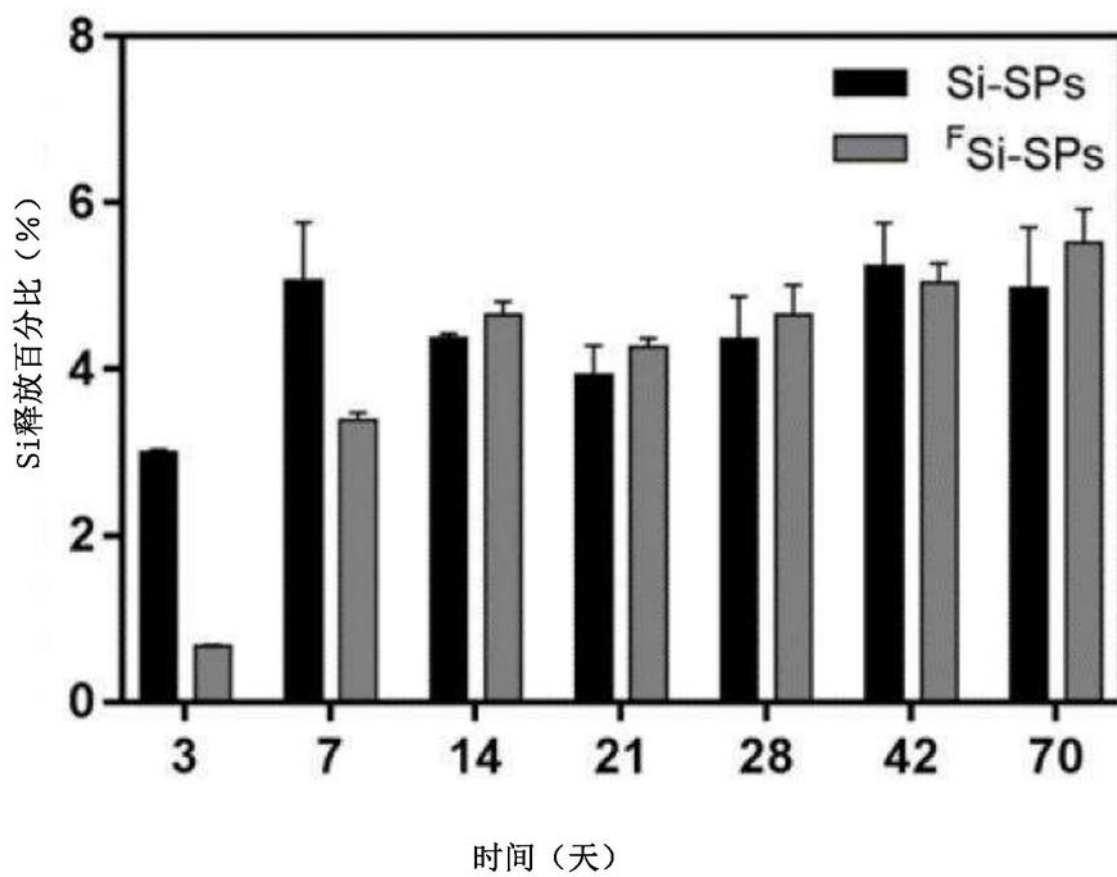


图30

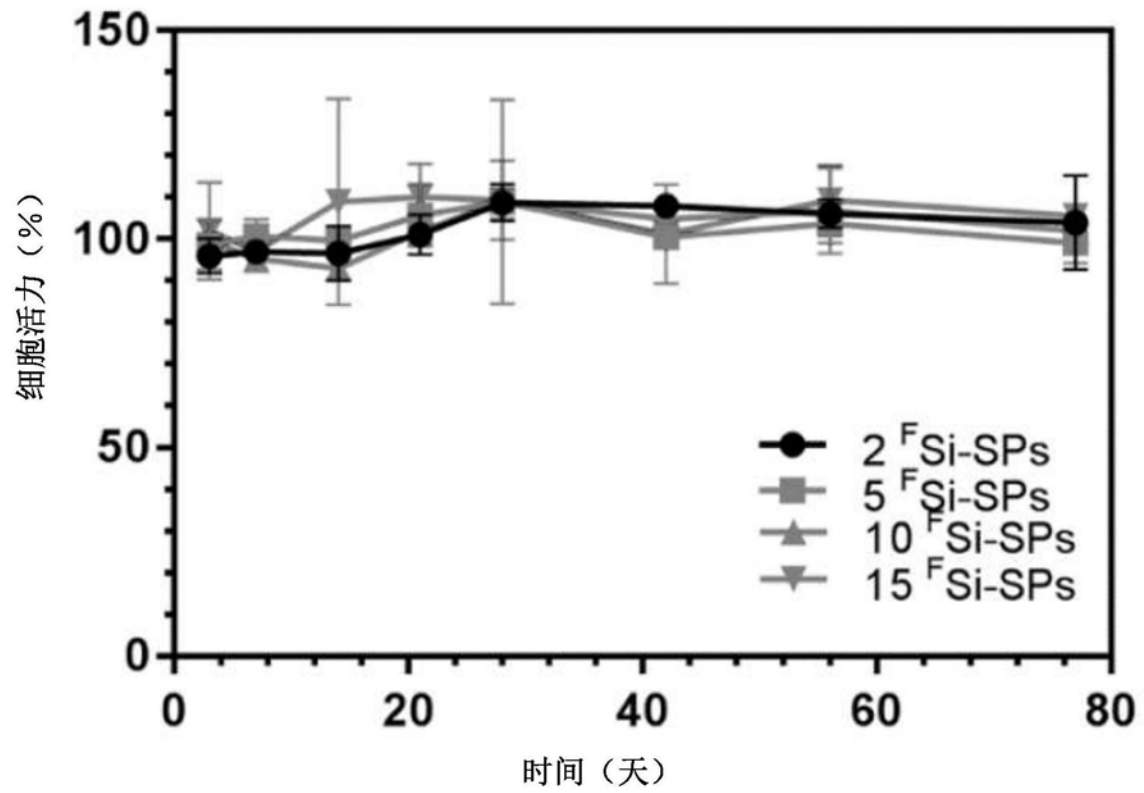


图31

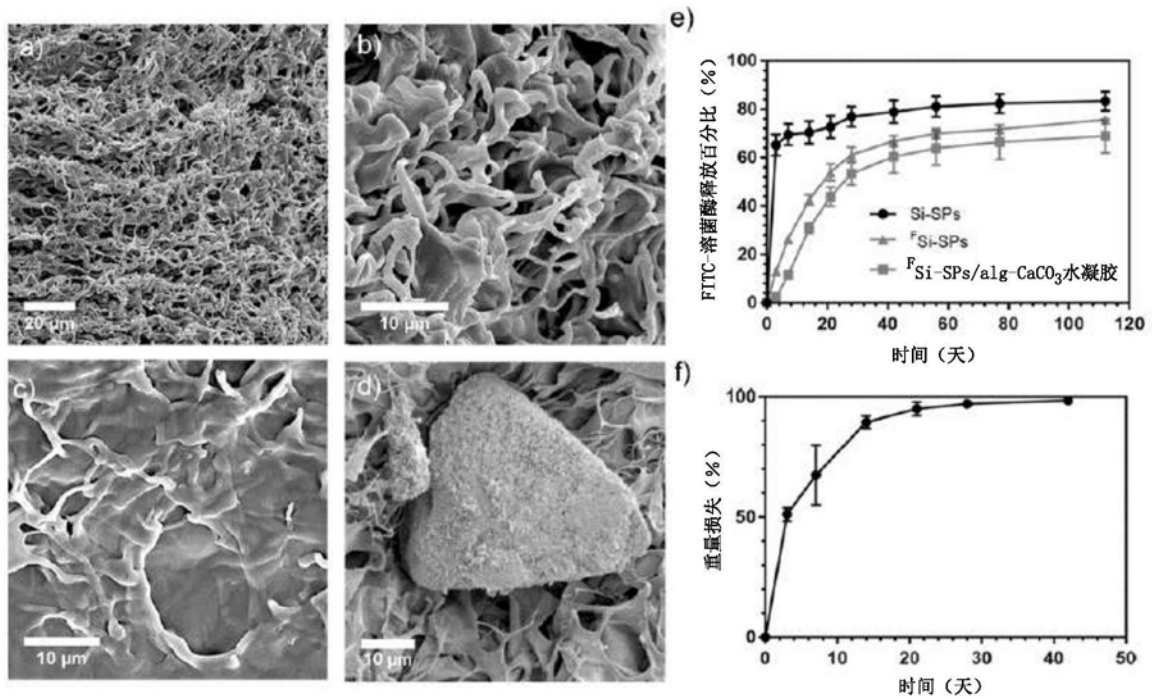


图32

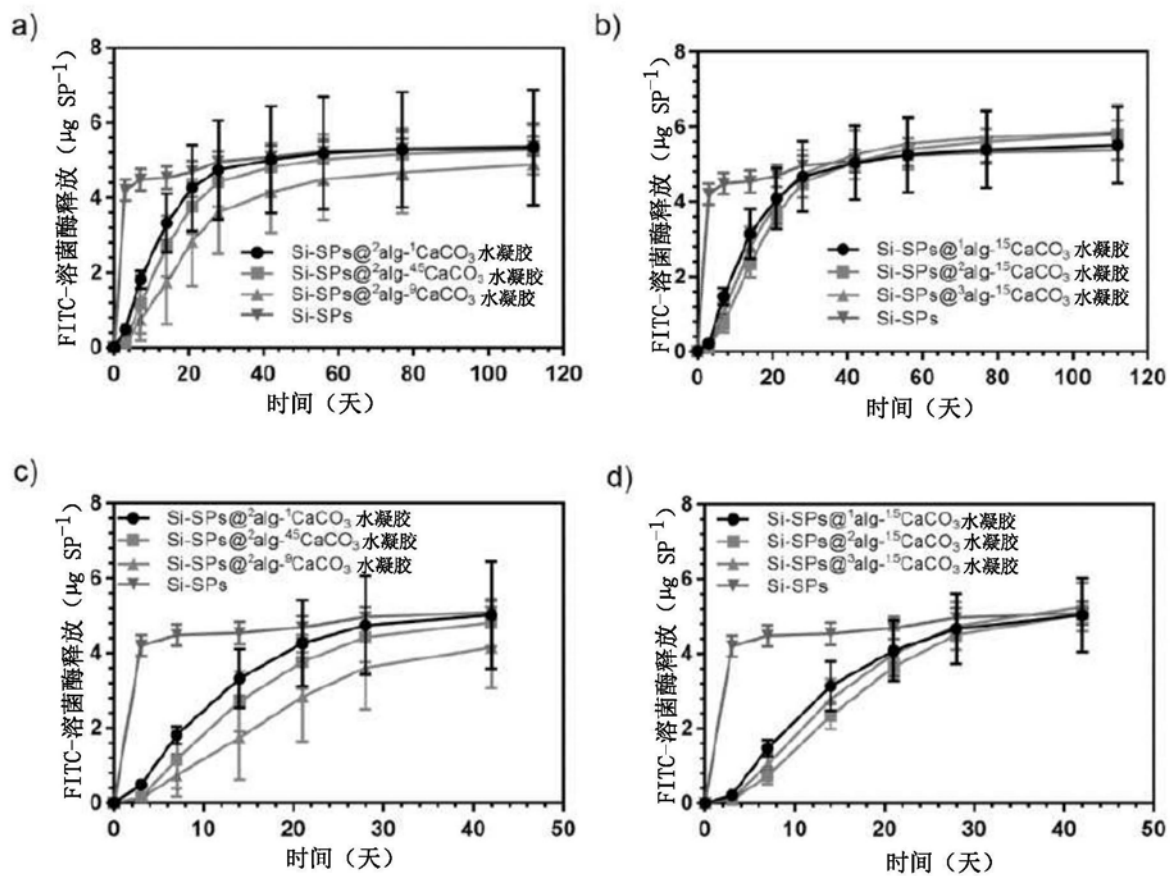


图33

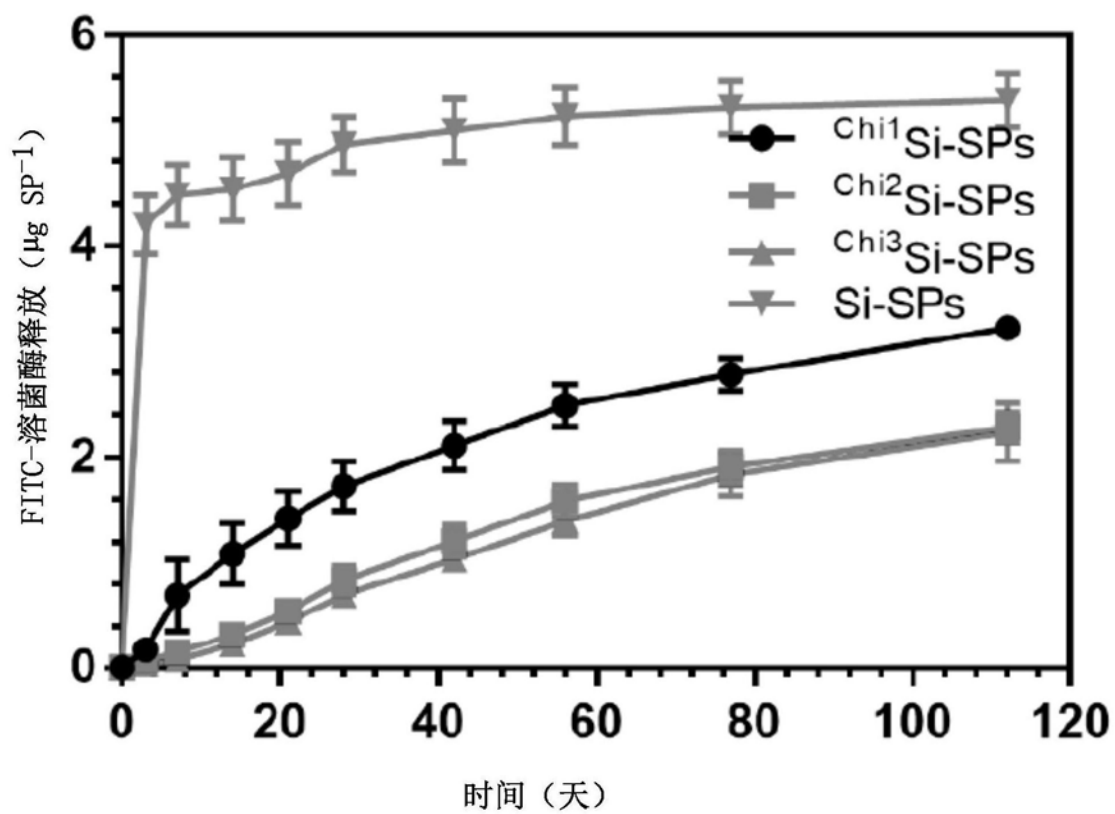


图34

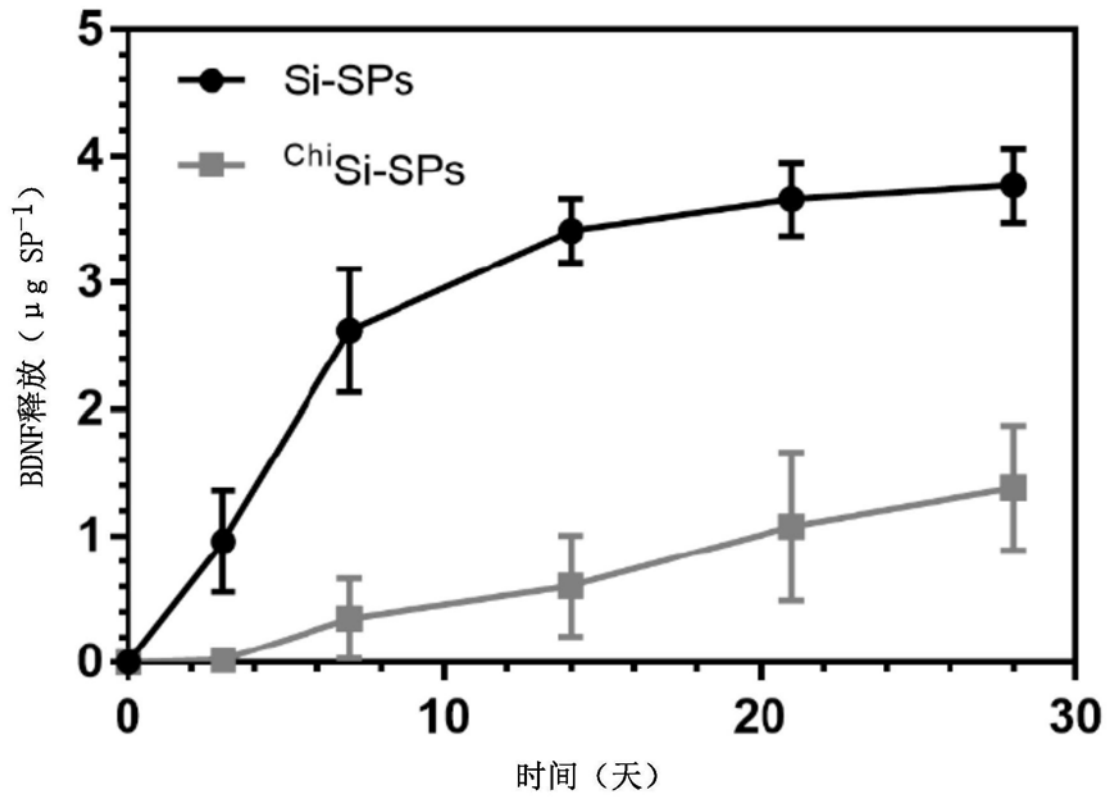


图35

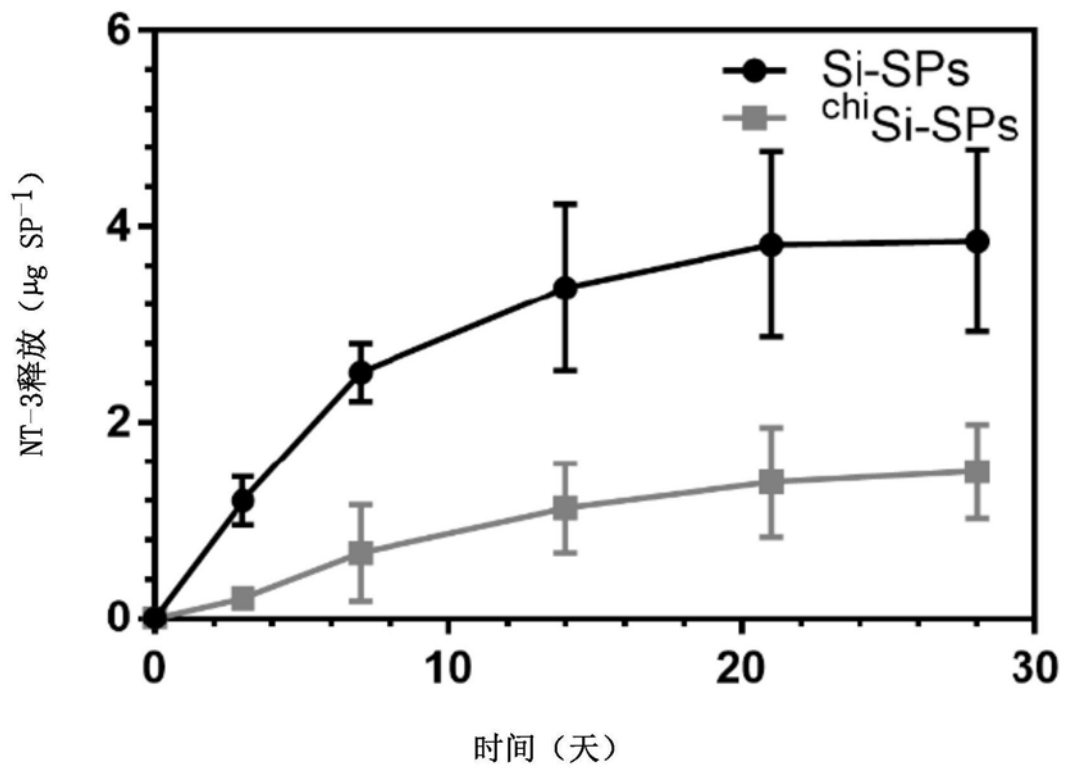


图36

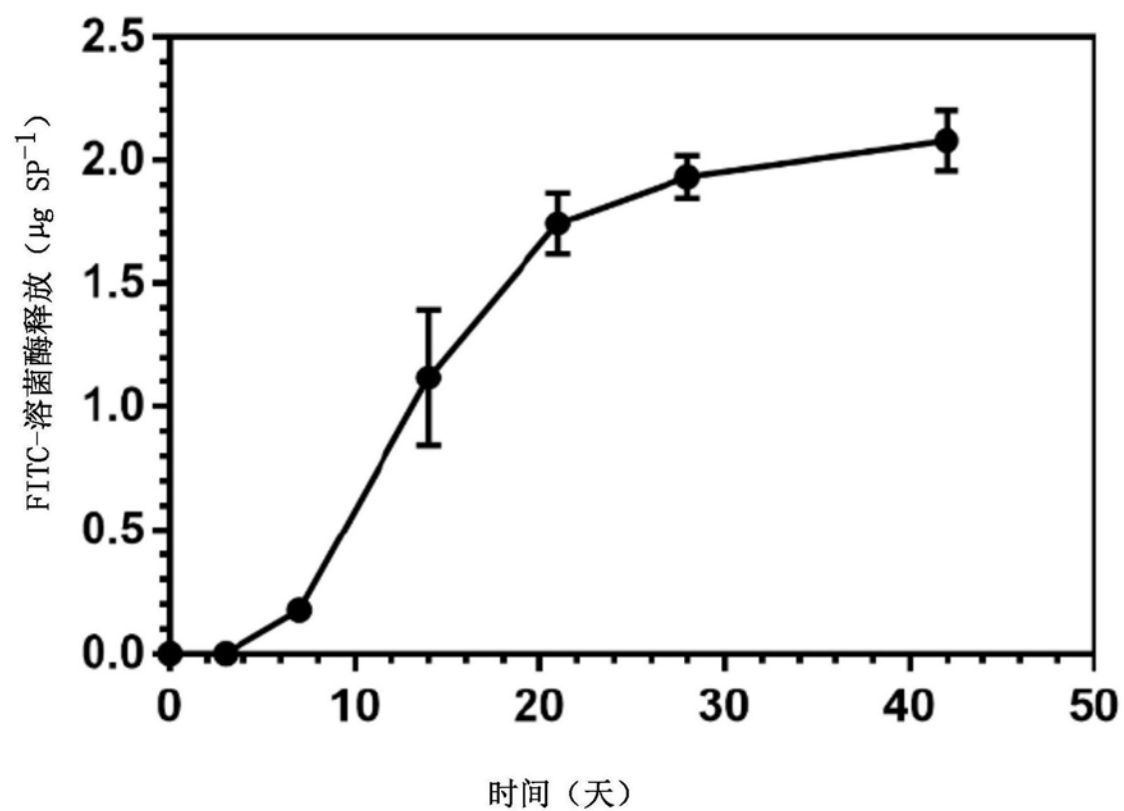


图37