



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101384247 B

(45) 授权公告日 2013. 05. 22

(21) 申请号 200680034259. 1

(22) 申请日 2006. 07. 11

(30) 优先权数据

60/700, 224 2005. 07. 18 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2008. 03. 18

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2006/026918 2006. 07. 11

(87) PCT申请的公布数据

W02008/010788 EN 2008. 01. 24

(73) 专利权人 麻萨诸塞州洛厄尔大学

地址 美国麻萨诸塞州

(72) 发明人 R · 尼克洛西 T · 威尔逊

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

代理人 刘冬 韦欣华

(51) Int. Cl.

A61K 9/00(2006. 01)

B82B 1/00(2006. 01)

B82B 3/00(2006. 01)

(56) 对比文件

US 2004/0115159 A1, 2004. 06. 17, 摘要, 说明书第 7-11 段, 第 21 段.

US 2004/0115159 A1, 2004. 06. 17, 摘要, 说明书第 7-11 段, 第 21 段.

US 5851452 A, 1998. 12. 22, 说明书第 6 栏第 27-30 行.

US 2004/0048836 A1, 2004. 03. 11, 说明书第 63 段最后一段.

US 6274150 B1, 2001. 08. 14, 说明书第 1 栏第 28-30 行.

审查员 张晴

权利要求书2页 说明书30页 附图13页

(54) 发明名称

制备与使用纳米乳剂的组合物和方法

(57) 摘要

本发明公开了改进的纳米乳剂,所述纳米乳剂包含均匀的、离散程度非常小的纳米尺寸直径的颗粒。这种均匀性导致被掺入的化合物(即药物或营养制品)的生物利用度得到改进,表现在包括但不限于 T_{max} 降低、 C_{max} 增加和 AUC 增大等各种不同的药代动力学参数方面。制备这些均匀纳米乳剂的改进方法,应用了在工艺和力学上与用来生产纳米颗粒组合物的常规碾磨技术都不同的微流化法。此外,这种改进部分由于将基本可溶性化合物与加热的分散介质相混合的新步骤而产生。这不像现有的将不溶性化合物与未加热的分散介质相混合的纳米颗粒组合物方法。此外,观察到这些纳米乳剂是抗菌的,对温度和 pH 极端变化均具有稳定性。因此,预期这些纳米乳剂比现有纳米乳剂的存放期明显延长。

1. 一种方法,该方法包括:
 - a) 提供:
 - i) 一种预混合物,其组成组分包括:

液体分散介质,其选自油基介质和水性介质;

乳化剂,其选自甘油单脂肪酸酯、甘油二脂肪酸酯和聚山梨酯;

和

化合物,该化合物基本溶于所述液体分散介质;以及
 - ii) 一种装置,其在高压下能够产生足以产生 10nm 和 110nm 之间的纳米乳剂粒子的连续湍流;
 - b) 使用所述装置产生纳米乳剂粒子群;

使得所述预混合物进行单程微流化,由此形成均匀纳米乳剂,其中所述均匀纳米乳剂包含纳米粒子群,所述纳米乳剂的均匀性在于:

低于 3% 的纳米粒子的粒径分布在特定范围以外,所述特定范围为最小直径与最大直径之差不超过 600nm;并且

所述纳米粒子群的直径在 10nm 和 100nm 之间。
2. 权利要求 1 的方法,其中所述水性介质选自水、盐溶液、右旋糖和短链醇。
3. 权利要求 2 的方法,其中所述盐溶液是林格氏溶液。
4. 权利要求 1 的方法,其中所述油基介质选自得自植物源和海洋源的饱和及不饱和油、硅油和矿物油。
5. 权利要求 1 的方法,其中所述化合物选自脂质、植物甾醇、鳕鱼肝油、生育酚、叶黄素、玉米黄质和大豆蛋白。
6. 权利要求 5 的方法,其中所述脂质是卵磷脂。
7. 权利要求 1 的方法,其中所述化合物是药物。
8. 权利要求 1 的方法,其中所述化合物是营养剂。
9. 权利要求 1 的方法,其中所述化合物是药用化妆剂。
10. 权利要求 1 的方法,其中所述化合物是蛋白质。
11. 权利要求 1 的方法,其中所述连续湍流用微流化器实现。
12. 权利要求 1 的方法,其中所述最小直径与最大直径之差不超过 300nm。
13. 权利要求 1 的方法,其中所述最小直径与最大直径之差不超过 200nm。
14. 权利要求 1 的方法,其中所述最小直径与最大直径之差不超过 100nm。
15. 权利要求 1 的方法,其中所述最小直径为 10nm;所述最大直径为 110nm。
16. 权利要求 1 的方法,其中所述最小直径为 40nm;所述最大直径为 110nm。
17. 权利要求 1 的方法,其中所述最小直径为 50nm;所述最大直径为 150nm。
18. 权利要求 1 的方法,其中所述粒子群中 86% 粒子的平均直径为 54nm。
19. 权利要求 1 的方法,其中所述粒子群中 14% 粒子的平均直径为 16nm。
20. 权利要求 1 的方法,其中所述粒子群中 82% 粒子的平均直径为 64nm。
21. 权利要求 1 的方法,其中所述粒子群中 17% 粒子的平均直径为 19nm。
22. 权利要求 1 的方法,其中所述粒子群中 78% 粒子的平均直径为 88nm。
23. 权利要求 1 的方法,其中所述粒子群中 22% 粒子的平均直径为 27nm。

24. 权利要求 1 的方法,其中所述粒子群中 84%粒子的平均直径为 90nm。
25. 权利要求 1 的方法,其中所述粒子群中 16%粒子的平均直径为 23nm。
26. 权利要求 1 的方法,其中所述粒子群中 80%粒子的平均直径为 55nm。
27. 权利要求 1-26 任一项的方法,其还包括将所述纳米乳剂配制成经皮肤应用制剂的步骤。
28. 权利要求 1-26 任一项的方法,其还包括将所述纳米乳剂配制成乳膏剂的步骤。
29. 权利要求 1-26 任一项的方法,其还包括将所述纳米乳剂配制成霜剂的步骤。
30. 权利要求 1-26 任一项的方法,其还包括将所述纳米乳剂配制成凝胶剂的步骤。
31. 根据权利要求 1-30 任一项的方法制得的纳米乳剂在制备用于对所给予的治疗有效量的化合物无效的患者药物中的用途。

制备与使用纳米乳剂的组合物和方法

发明领域

[0001] 本发明涉及纳米乳剂领域。在一个实施方案中,纳米乳剂采用高剪切应力技术制备。在一个实施方案中,本发明提供均匀微流化纳米乳剂 (uniform microfluidized nanoemulsion)。在另一个实施方案中,均匀纳米乳剂包含化合物,例如药物、营养制品或药用化妆品。在一个实施方案中,当与常规纳米颗粒组合物和 / 或纳米乳剂相比时,均匀纳米乳剂包括改进的药代动力学参数。在一个实施方案中,本发明提供抗菌纳米乳剂的制备方法。

[0002] 发明背景

[0003] 微乳剂 / 纳米乳剂技术具有巨大的商业价值。仅就营养制品领域而言,全球贸易的市场价值估计为 2500 亿美元。因此,将脂溶性营养制品掺入饮料 (食品工业增长最快的部分) 以及低脂食品或脱脂食品中是十分有益的。

[0004] 所需要的纳米乳剂是 :i) 温度稳定性和 pH 稳定性得到改进 ;ii) 生物利用度得到改进 ;和 iii) 因微生物抗性所致存放期限得到改进。另外,纳米乳剂的制备应相对容易和便宜。

[0005] 发明概述

[0006] 本发明涉及纳米乳剂领域。在一个实施方案中,纳米乳剂采用高剪切应力技术制备。在一个实施方案中,本发明提供均匀微流化纳米乳剂。在另一个实施方案中,均匀纳米乳剂包含化合物,例如药物、营养制品或药用化妆品。在一个实施方案中,当与常规纳米颗粒组合物和 / 或纳米乳剂相比时,均匀纳米乳剂包括改进的药代动力学参数。在一个实施方案中,本发明提供抗菌纳米乳剂的制备方法。

[0007] 在一个实施方案中,本发明提供包含具有最大直径和最小直径的粒子群的纳米乳剂,其中所述最大直径和最小直径之差不超过 100nm。

[0008] 在一个实施方案中,本发明提供包含直径介于约 10 纳米和约 110 纳米之间的粒子群的纳米乳剂,其中所述纳米乳剂没有被直径大于 110 纳米的粒子污染。在一个实施方案中,粒子将化合物包封起来。在一个实施方案中,化合物为药物。在另一个实施方案中,化合物为营养制品。

[0009] 在一个实施方案中,本发明提供包含第一粒子群和第二粒子群的纳米乳剂,其中在所述第一粒子群中大部分粒子的直径介于约 10 纳米和约 20 纳米之间,其中在所述第二粒子群中大部分粒子的直径介于约 40 纳米和约 80 纳米之间,其中所述纳米乳剂没有被直径大于 110 纳米的粒子污染。在一个实施方案中,粒子将化合物包封起来。在一个实施方案中,化合物为药物。在一个实施方案中,化合物为营养制品。

[0010] 本发明提供一种包含直径介于约 50 纳米和约 150 纳米之间的粒子群的纳米乳剂,其中所述纳米乳剂没有被直径大于 160 纳米的粒子污染。在一个实施方案中,粒子将化合物包封起来。在一个实施方案中,化合物为药物。在一个实施方案中,化合物为营养制品。

[0011] 在一个实施方案中,本发明提供一种方法,该方法包括 :a) 提供 :i) 包含化合物和液体分散介质的预混合物,其中所述化合物在所述介质中的溶解度大于 30mg/ml ;和 ii) 能

够维持至少 25,000PSI 的微流化器 (microfluidizer) ;b) 采用将所述预混合物单程暴露于所述微流化器以形成直径范围约介于 10-110nm 之间的纳米乳粒子群。在一个实施方案中,分散介质选自水性介质和油基介质。在一个实施方案中,水性介质选自水、林格氏溶液、右旋糖和短链醇类。在一个实施方案中,油基介质选自但不限于得自植物源和海洋源的饱和及不饱和油、硅油、矿物油和植物衍生油 (plant-derived oil)。在一个实施方案中,化合物选自但不限于植物甾醇、鳕鱼肝油、生育酚、卵磷脂、叶黄素、玉米黄质和大豆蛋白。

[0012] 在一个实施方案中,本发明提供一种方法,该方法包括 :a) 提供 :i) 加热的分散介质 ;ii) 基本溶于所述介质的化合物 ;iii) 能够从所述介质制备均匀纳米乳剂的微流化器 ;b) 在至少 70℃ 的温度下将所述化合物加到所述介质中以形成预混合物 ;和 c) 在至少 25,000PSI 的压力下,使所述预混合物微流化以形成粒径范围介于 10-110nm 之间的纳米乳剂。在一个实施方案中,所述分散介质选自大豆油和水。在一个实施方案中,将所述分散介质加热到至少 65℃。在一个实施方案中,所述化合物可选自植物甾醇、鳕鱼肝油、生育酚、卵磷脂、叶黄素、玉米黄质、番茄红素、乳清蛋白和大豆蛋白。在一个实施方案中,纳米乳剂将化合物包封起来。在一个实施方案中,所述粒径的 86% 的平均直径为 54nm。在一个实施方案中,所述粒径的 14% 的平均直径为 16nm。在一个实施方案中,所述粒径的 82% 的平均直径为 64nm。在一个实施方案中,所述粒径的 17% 的平均直径为 19nm。在一个实施方案中,所述粒径的 78% 的平均直径为 88nm。在一个实施方案中,所述粒径的 22% 的平均直径为 27nm。在一个实施方案中,所述粒径的 84% 的平均直径为 90nm。在一个实施方案中,所述粒径的 16% 的平均直径为 23nm。在一个实施方案中,所述粒径的 80% 的平均直径为 55nm。

[0013] 在一个实施方案中,本发明提供一种方法,该方法包括 :a) 提供 :i) 包含化合物、第一抗氧化剂、第二抗氧化剂和水性分散介质的预混合物,其中所述化合物在所述介质中的溶解度大于 30mg/ml ;和 ii) 能够维持至少 25,000PSI 的微流化器 ;和 b) 采用将所述预混合物单程暴露于所述微流化器中以形成直径范围介于 40-110nm 之间的纳米乳粒子群。其中所述粒径在至少 4 个月内保持稳定。在一个实施方案中,该方法还包括将所述纳米乳粒子群用巴斯德灭菌法进行灭菌,其中所述粒径保持稳定。在一个实施方案中,该方法还包括将所述纳米乳粒子群冷冻,其中所述粒径保持稳定。

[0014] 在一个实施方案中,本发明提供一种方法,该方法包括 :a) 提供 :i) 包含第一抗氧化剂的稳定的水性分散介质 ;ii) 包含天然乳化剂的溶液 ;iii) 基本溶于所述包含第二抗氧化剂的介质的化合物 ;iv) 能够从所述介质制备均匀纳米乳剂的微流化器 ;b) 将所述化合物和所述溶液加到所述介质中,并加热到至少 50℃ 的温度以形成预混合物 ;和 c) 在至少 25,000PSI 的压力下,使所述预混合物微流化以形成粒径范围介于 40-110nm 之间的纳米乳剂,其中所述粒径在至少 4 个月内保持稳定。在一个实施方案中,纳米乳剂将化合物包封起来。在一个实施方案中,该方法还包括将所述纳米乳剂用巴斯德灭菌法进行灭菌,其中所述粒径保持稳定。在一个实施方案中,该方法还包括将所述纳米乳剂冷冻,其中所述粒径保持稳定。在一个实施方案中,所述溶液包含牛奶。在一个实施方案中,所述化合物包含 DHA 鱼油。在一个实施方案中,所述巴斯德灭菌法包括将所述纳米乳剂暴露在 75℃ 下 30 秒钟。在一个实施方案中,所述冷冻包括将所述纳米乳剂暴露在 -4℃ 下 24 小时。

[0015] 在一个实施方案中,本发明提供一种方法,该方法包括 :a) 提供 :i) 对所给予的治疗有效量的化合物不应受治疗者 ;ii) 包含包封有所述化合物的粒子群的纳米乳剂,其

中所述粒子的直径介于约 10nm 和约 110nm 之间,其中所述纳米乳剂没有被直径大于 110 纳米的粒子污染;b) 在所述化合物生物利用度得到改进且其中所述化合物是治疗有效的条件下,将所述纳米乳剂递送给所述患者。在一个实施方案中,改进的生物利用度包括选自以下的药代动力学参数: $T_{\max}$ 降低、 $C_{\max}$ 增加和 AUC 增大。在一个实施方案中,递药包括选自口服、经皮、静脉内、腹膜内、肌内和皮下的方法。在一个实施方案中,纳米乳剂包含植物甾醇。在一个实施方案中,纳米乳剂包含番茄红素。

[0016] 在一个实施方案中,本发明提供改进纳米乳剂生物利用度的方法,该方法包括提供均匀微流化纳米乳剂,并将该均匀纳米乳剂递送给受治疗者。在一个实施方案中,受治疗者(患者)包括哺乳动物。在一个实施方案中,纳米乳剂将化合物包封起来。在一个实施方案中,经口服给药递送纳米乳剂。在另一个实施方案中,通过包括但不限于经皮、静脉内、腹膜内、肌内或皮下的方法递送纳米乳剂。在一个实施方案中,所述改进的生物利用度包括选自以下的药代动力学参数: $T_{\max}$ 降低、 $C_{\max}$ 增加和 AUC 增大。在一个实施方案中,所述纳米乳剂配制成用于口服给药。在一个实施方案中,所述纳米乳剂包含植物甾醇。在一个实施方案中,所述纳米乳剂包含番茄红素。

[0017] 在一个实施方案中,本发明提供具有抗菌性能的纳米乳剂,其中所述纳米乳剂包含包封有所述化合物的粒子群,其中所述粒子的直径介于约 10 纳米和约 110 纳米之间,其中所述纳米乳剂没有被直径大于 110 纳米的粒子污染。在一个实施方案中,纳米乳剂抵抗细菌生长至少 3 个月。在一个实施方案中,抗菌性能包括剪切力引起的细胞裂解。在一个实施方案中,抗菌性能包括氧化环境。在一个实施方案中,纳米乳剂是无菌的。

[0018] 在一个实施方案中,本发明提供具有抗菌性能的统一微流化纳米乳剂。在一个实施方案中,所述纳米乳剂抵抗细菌生长至少 3 个月。在一个实施方案中,纳米乳剂包含直径分布介于 10-110nm 之间的粒子。在一个实施方案中,所述抗菌性能包括剪切力引起的细胞裂解。在一个实施方案中,纳米乳剂是无菌的。

[0019] 在一个实施方案中,本发明提供一种方法,该方法包括:a) 提供:i) 包含化合物和液体分散介质的预混合物;和 ii) 高压下能够产生连续湍流的装置;b) 使用所述装置产生直径均一的纳米乳粒子群。在一个实施方案中,分散介质选自水性介质和油基介质。在一个实施方案中,水性介质选自水、盐溶液、林格氏溶液、右旋糖和短链醇类。在一个实施方案中,油基介质选自得自植物源和海洋源的饱和及不饱和油、硅油和矿物油。在一个实施方案中,化合物选自植物甾醇、鳕鱼肝油、生育酚、卵磷脂、叶黄素、玉米黄质和大豆蛋白。

[0020] 定义

[0021] 一般地讲,本文所用术语按照本领域普通技术人员公认的定义进行解释。然而,下列术语则按照下面的定义进行解释。

[0022] 本文所用术语“微流化”、“使……微流化”或“微流化器”是指利用高压连续湍流的仪器或过程,包括但不限于微流化器或者其它可以用来生产均匀纳米乳剂的类似装置。例如微流化可以在 30 秒时间内(通常指单程暴露),由预混合物制备包含药物、营养制品或药用化妆品的均匀纳米乳剂。微流化器通常可在约 25,000PSI 的压力下操作以生产均匀纳米乳剂。

[0023] 本文所用术语“均匀纳米乳剂(uniform nanoemulsion)”是指粒径大小在任何规定范围内的任何乳剂,其中最大直径与最小直径之差不超过约 600nm,优选约 300nm,更

优选约 200nm,但是最优选约 100nm(即:例如,采用本文所提供的微流化法生产粒径范围约 10-110nm 的均匀纳米乳剂,并且本文是指均匀微流化纳米乳剂)。优选总粒径分布(即 100%)包括在粒径大小的规定范围内。本文还认为超出粒径大小规定范围 3% 以下的粒径分布仍为均匀纳米乳剂。

[0024] 本文所用术语“群(population)”是指纳米乳粒子按直径大小分布的任何混合物。例如,纳米乳粒子群的粒径范围可以介于约 10-110nm 之间。

[0025] 本文所用术语“纳米粒子(nanoparticle)”是指直径不大于 300 纳米(nm)的任何粒子(如美国国家科学基金会(National Science Foundation)定义),或者优选不大于 100nm(如美国国立卫生研究院(National Institutes of Health)定义)。最常规的技术生产平均粒径约 300 纳米(nm)以上的纳米颗粒组合物。

[0026] 本文所用术语“分散介质”是指任何油基液或水成液,其中药物、营养制品或药用化妆品加热时可以溶解。油基液可以包括但不限于得自植物源和海洋源的饱和及不饱和油,包括但不限于大豆、红花、橄榄、玉米、棉花籽、亚麻籽(linseed)、红花、棕榈、花生、亚麻仁(flaxseed)、向日葵、米糠、芝麻、油菜籽、可可脂等及其混合物;硅油和矿物油。或者,水性介质可包括但不限于水、盐溶液、短链醇类、5%右旋糖、林格氏溶液(乳酸化林格氏注射液、乳酸化林格氏溶液加 5%右旋糖注射液、酰化林格氏注射液(acylated Ringer's injection))、Normosol-M、Isolyte E 等等,以及具有高表面活化性能的合成和/或天然洗涤剂、脱氧胆酸盐、环糊精、离液序列高的盐、离子配对剂等等,及其混合物。

[0027] 本文所用术语“化合物”是指能在分散介质中基本溶解的任何药物、营养制品或药用化妆品(即:例如有机化学品、脂质、蛋白质、油、维生素、晶体、矿物质等等)。

[0028] 本文所用术语“基本溶解的”是指任何化合物溶于分散介质至浓度 30mg/ml 以上。优选加热分散介质时,化合物被溶解。

[0029] 本文所用术语“预混合物”是指其后用于生产纳米颗粒组合物或均匀微流化纳米乳剂的任何混合物。预混合物通常含有液体分散介质和化合物,任选含有乳化剂和/或抗氧化剂。

[0030] 本文所用术语“稳定的”是指任何纳米乳粒子群的直径在较长时期内(即:例如 1 天至 24 个月,优选 2 周至 12 个月,但更优选 2 个月至 5 个月)保持在约 10-110nm 范围内。例如,如果纳米乳粒子群经过长期保存、温度变化和/或 pH 变化,其直径仍保持在约 10-110nm 的范围内,则该纳米乳剂是稳定的。

[0031] 本文所用术语“抗菌”是指没有观测到细菌生长。

[0032] 本文所用术语“无菌”是指纳米乳剂中不含活的细菌细胞。

[0033] 本文所用术语“药学可接受的”是指在合理的医学判断范围内,适用于与人和动物组织接触而无过度毒性、刺激性、变态反应或其它问题或并发症,与合理的利益/风险比相对称的化合物、材料、组合物和/或剂型。

[0034] 本文所用术语“药学上可接受的盐”是指衍生物,其中通过制成母体化合物的酸式盐或碱式盐而对其进行改性。药学上可接受的盐的实例包括但不限于碱性残基(例如胺)的无机或有机酸的盐;酸性残基(例如羧酸)的碱金属盐或有机盐等等。药学上可接受的盐包括由例如无毒无机酸或有机酸所形成的母体化合物的常规无毒盐或季铵盐。例如,这些常规无毒盐包括由例如盐酸、氢溴酸、硫酸、氨基磺酸、磷酸、硝酸等无机酸所衍生的无

毒盐；以及用诸如以下的有机酸制备的盐：乙酸、丙酸、琥珀酸、乙醇酸、硬脂酸、乳酸、苹果酸、酒石酸、柠檬酸、抗坏血酸、双羟萘酸、马来酸、羟基马来酸、苯乙酸、谷氨酸、苯甲酸、水杨酸、磺胺酸、2- 乙酸基苯甲酸、富马酸、甲苯磺酸、甲磺酸、乙二磺酸、草酸、羟乙磺酸等。

[0035] 本文所用术语“治疗有效量”当涉及药物剂量时，是指向许多需要这种治疗的受治疗者给予或递送药物，提供规定药理反应的剂量。要强调的是，在特定情况下，给予特定受治疗者“治疗有效量”，在治疗本文所述疾病时并不总是有效的，即使这样的剂量仍被本领域技术人员视为“治疗有效量”。实际上，具体的受治疗者可能是对“治疗有效量”不应有的。例如不应受治疗者可能具有低的生物利用度，因此无法获得临床功效。还要理解的是，在特定情况下，药物剂量是以口服剂量计量的，或者是参照如血液中所测药物水平。

[0036] 本文所用术语“不应有的”是指在递送化合物后，受治疗者没有反应出如医务人员正常情况下所观察的预期临床功效。

[0037] 本文所用术语“递送”或“给予”是指向受治疗者提供药物或营养制品的任何途径，这些途径为医学界标准所认可。例如，本发明提供的递药或给药途径包括但不限于口服、经皮、静脉内、腹膜内、肌内或皮下。

[0038] 本文所用术语“受治疗者（患者）”是指本发明实施方案可以向其递药或给药的任何动物。例如，受治疗者（患者）可为人、狗、猫、牛、猪、马、小鼠、大鼠、沙鼠（gerbil）、仓鼠等。

[0039] 本文所用术语“包封”、“包封有”或“将……包封起来”是指任何化合物被保护性材料完全包裹起来。例如，化合物可以被在微流化过程形成的纳米乳粒子群包封起来。

[0040] 本文所用术语“营养制品（nutraceutical）”是指添加到食物源（即：例如强化食物或膳食补充剂）的任何化合物，除其基础营养价值外还提供保健或药疗益处。

[0041] 本文所用术语“药用化妆品（cosmeceutical）”是指添加到既具有化妆品性质又具有药物性质的制品中的任何化合物（即：例如过氧化苯甲酰或维生素 A）。药用化妆品一般用于外用以改善肤色或总的外观形象。药用化妆品可以用作组合物，包括但不限于乳膏剂、油制剂、泡沫制剂、喷雾剂、液体制剂等等。药用化妆品可以包括很多种类，例如但不限于类胡萝卜素、酚类化合物或水溶性抗氧化剂。

[0042] 附图简述

[0043] 图 1 是示例性数据，显示在制备 3 个月后微流化植物甾醇纳米乳粒子群的粒径分布。

[0044] 图 1A 是示例性数据，显示在制备 3 个月后微流化植物甾醇纳米乳的粒径分布。

[0045] 图 2 是示例性数据，显示在制备 4 个月后微流化鳕鱼肝油纳米乳粒子群的粒径分布。

[0046] 图 3 是示例性数据，显示在制备 5 个月后微流化生育酚纳米乳粒子群的粒径分布。

[0047] 图 4 是示例性数据，显示微流化叶黄素 / 玉米黄质纳米乳粒子群的粒径分布。

[0048] 图 5 是示例性数据，显示微流化大豆蛋白纳米乳粒子群的粒径分布。

[0049] 图 6 是示例性数据，显示微流化乳清蛋白纳米乳粒子群的粒径分布。

[0050] 图 7 是示例性数据，显示微流化橙汁 / 植物甾醇 / 叶黄素纳米乳粒子群的粒径分布。

[0051] 图 8 是示例性数据，显示制备 2 个月后微流化 DHA 鱼油 / 水纳米乳粒子群的粒径

分布。

[0052] 图 9 是示例性数据,显示制备 3 周后微流化 DHA 鱼油 / 牛奶纳米乳粒子群的粒径分布。

[0053] 图 10 是示例性数据,显示微流化 DHA 鱼油 / 牛奶 / 生育酚纳米乳粒子群的粒径分布。

[0054] 图 11 是示例性数据,显示用巴斯德灭菌法灭菌后微流化 DHA 鱼油 / 牛奶 / 生育酚纳米乳粒子群的粒径分布。

[0055] 图 12 是示例性数据,显示冻融工艺后微流化 DHA 鱼油 / 牛奶 / 生育酚纳米乳粒子群的粒径分布。

[0056] 图 13 是当饲喂富含番茄红素的饮食时,沙鼠血浆番茄红素水平的示例性数据。

[0057] 图 14 表示当饲喂富含微流化番茄红素纳米乳剂的饮食时沙鼠血浆番茄红素水平的示例性数据。

[0058] 图 15 表示在制备微流化植物甾醇纳米乳剂过程中所产生的抗菌性能的一个实施方案。

[0059] 图 16 是示例性数据,显示实施例 12 所使用的微流化植物甾醇纳米乳粒子群的粒径分布。

[0060] 图 17 是示例性数据,显示 4 周后微流化植物甾醇纳米乳剂饮食在降低高胆固醇血症仓鼠血浆 LDL-C 方面,比微粉化植物甾醇饮食或结晶植物甾醇饮食有效。

[0061] 图 18 表示比较以下预混合物胆固醇粒径分布的示例性数据:图 A:Tween[®] 80/ 水(按照‘118 专利);图 B:油 / 卵磷脂 / Tween[®] 80/ 水(由本发明的一个实施方案提供)。

[0062] 图 19 表示比较以下微流化胆固醇纳米乳剂粒径分布的示例性数据:图 A:Tween[®] 80/ 水(按照‘118 专利,采用重复多程微流化法(repeated microfluidization passes));图 B:油 / 卵磷脂 / Tween[®] 80/ 水(由本发明的一个实施方案提供,采用单程微流化法(single microfluidization pass))。

[0063] 图 20 表示比较以下微流化胆固醇纳米乳剂粒径分布的示例性数据:图 A:Tween[®] 80/ 水(按照‘118 专利,采用单程暴露);图 B:油 / 卵磷脂 / Tween[®] 80/ 水(由本发明的一个实施方案提供,采用单程暴露)。

[0064] 发明详述

[0065] 本发明涉及纳米乳剂领域。在一个实施方案中,纳米乳剂通过高剪切应力技术生产。在一个实施方案中,本发明提供均匀微流化纳米乳剂。在另一个实施方案中,均匀纳米乳剂包含化合物,例如药物、营养制品或药用化妆品。在一个实施方案中,当与常规纳米颗粒组合物和 / 或纳米乳剂相比时,均匀纳米乳剂包括改进的药代动力学参数。在一个实施方案中,本发明提供抗菌纳米乳剂的制备方法。

[0066] 纳米乳剂作为递送系统的用途总的来讲涉及药物。然而,纳米乳剂营养制品递送则几乎未引起关注。例如,一个纳米乳剂系统含有植物甾醇(Bruce 等,“Method for producing dispersible sterol and stanol compounds(可分散甾醇与甾烷醇化合物的生产方法)”,美国专利第 6,387,411 号(2002),通过引用结合到本文中)。然而该技术采用研

磨法生产纳米乳剂,因此粒径要比本文所提供的大至少 6 倍。虽然不一定了解发明的机制,但是我们认为这种直径的差异提供了稳定性和功效两方面的明显优势(见下文)。此外,‘411 专利没有公开掺入可吸收微量营养物。

[0067] 纳米乳剂作为递送系统的另一个用途涉及药用化妆品。药用化妆品可以包含例如类胡萝卜素类,包括但不限于 α -胡萝卜素、 β -胡萝卜素、 β -隐黄质、番茄红素、藏红花酸、墨角藻黄素、halocynthiaxanthin、角黄素、虾青素(astraxanthin)、叶黄素或玉米黄质;酚类化合物,包括但不限于槲皮素、芸香苷、杨梅树皮素、山柰酚、儿茶素、表没食子儿茶素、表儿茶素、白藜芦醇(reservatrol)、生育酚、阿魏酸盐(ferulate)、泛醌醇-10(ubiquinol-10)、大豆异黄酮类(例如染料木素(genestein))、大豆黄素、 α -硫辛酸、花色素苷类、鞣花单宁类、没食子酸或鞣花酸;或水溶性抗氧化剂,例如抗坏血酸、尿酸或胆红素。

[0068] 本发明涉及包含用于所有可吸收(即:例如脂溶性)营养物的口服递送载体的纳米粒子群或纳米乳剂,可吸收营养物包括但不限于脂肪酸、类胡萝卜素、生育酚、生育三烯酚和辅酶 Q。然而,递送方法并不限于口服,还包括但不限于经皮、静脉内、腹膜内、肌肉或皮下。在另一个实施方案中,类胡萝卜素包括但不限于叶黄素和玉米黄质。本发明还涉及用于所有不可吸收(即:例如脂溶性)植物甾醇化合物口服递送载体的纳米粒子群或纳米乳剂,植物甾醇化合物包括但不限于植物甾醇和植物甾烷醇(phytostanol)。在一个实施方案中,化合物被纳米粒子或纳米乳包封起来。在一个实施方案中,用常用乳化剂来制备纳米乳剂。在一个实施方案中,所述乳化剂包括但不限于磷脂、甘油单脂肪酸酯(fatty acid monoglyceride)、甘油二脂肪酸酯(fatty acid diglyceride)或聚山梨酯(polysorbate)。

[0069] 本发明还提供本发明的某些纳米乳剂实施方案,所述纳米乳剂的表面积与体积之比使得生物利用度比起本领域已知现有方法和组合物的有改进。

[0070] 本发明还提供本发明的某些纳米乳剂实施方案,所述纳米乳剂是抗微生物生长的。虽然不一定了解发明的机制,但是我们认为微流化工艺包括高剪切应力和/或产生氧化环境,从而破坏微生物的完整性和/或阻止微生物生长。

[0071] I. 纳米乳剂的制备方法

[0072] 有许多方法被用来制备纳米乳剂。具体地讲,这些方法提供的粒径变化大,需要有机溶剂和/或聚合物。如果考虑将这些已知纳米乳剂用于口服药物或营养物递送系统,则生物相容性和生理副作用的问题会变成大问题。

[0073] 在一个实施方案中,本发明提供纳米乳剂的制备方法,该方法包括高压连续湍流。在一个实施方案中,高压湍流包括微流化。在一个实施方案中,采用单程暴露(即:例如在 30 秒钟时间内)由预混合物制备均匀纳米乳剂。在一个实施方案中,均匀纳米乳剂包含最小直径与最大直径之差不超过约 100nm 的粒子群。在一个实施方案中,采用至少 25,000PSI 的压力来生产均匀纳米乳剂。在一个实施方案中,本发明提供无需有机溶剂或聚合物制备均匀微流化纳米乳剂的方法。在一个实施方案中,微流化纳米乳剂是由混悬液制备的。在另一个实施方案中,微流化纳米乳剂是由微乳剂制备的。

[0074] 在一个实施方案中,本发明提供使用基本溶于液体分散介质的化合物的均匀微流化纳米乳剂。在一个实施方案中,纳米乳剂将化合物包封起来。在一个实施方案中,化合物包括药物和/或营养制品。

[0075] 示例性的营养制品和膳食补充剂参见例如 Roberts 等, *Nutriceuticals :The Complete Encyclopedia of Supplements, Herbs, Vitamins, and Healing Foods*(营养制品 :补充剂、草药、维生素和食疗食物大百科全书)(美国营养协会 (American Nutriceutical Association), 2001), 该文献通过引用特别结合到本文中。膳食补充剂和营养制品还可参见 *Physicians' Desk Reference for Nutritional Supplements*, 第一版 (2001) 和 *The Physicians' Desk Reference for Herbal Medicines*, 第一版 (2001), 这两个文献都通过引用结合到本文中。营养制品或膳食补充剂, 亦称植物化学品或功能食品, 一般是一类膳食补充剂、维生素、矿物质、草药或对身体有医疗作用或生物作用的食疗食物当中的任一种。

[0076] 示例性的营养制品或膳食补充剂包括但不限于叶黄素、叶酸、脂肪酸 (例如 DHA 和 ARA)、水果提取物、蔬菜提取物、维生素和矿物质补充剂、磷脂酰丝氨酸、硫辛酸、褪黑素、葡糖胺 / 软骨素、芦荟、胶树脂 (Guggul)、氨基酸 (例如谷氨酰胺、精氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、苏氨酸、色氨酸和缬氨酸)、绿茶、番茄红素、全食品、食品添加剂、草药、植物性营养素 (phytonutrient)、抗氧化剂、水果的黄酮类组分、月见草油、亚麻仁、鱼油、海洋动物油和益生菌制剂。营养制品和膳食补充剂还包括一般被基因工程改造成具有所需性能的生物工程食品, 亦称“营养增补剂 (pharmafoods)”。

[0077] 具体地讲, 这些化合物包括但不限于天然存在的油、脂肪酸和蛋白质。在一个实施方案中, 天然存在的油包括鱼油 (即 : 例如鳕鱼肝油)。在一个实施方案中, 天然存在的脂肪酸包括 ω -3 (即 : 例如 DHA)。在一个实施方案中, 纳米乳剂几乎不含或者不含脂肪。在一个实施方案中, 天然存在的蛋白质包括大豆或乳清。

[0078] 在一个实施方案中, 本发明提供均匀微流化纳米乳剂的制备方法, 所述纳米乳剂包含直径范围介于 10-110nm 之间的粒子群。

[0079] A. 微流化器

[0080] 微流化是驱动单动增压泵 (single acting intensifier pump) 的独特工艺。增压泵增加液压至所选择的水平, 反过来, 液压又将压力施加到产物流。当增压泵运行其压力冲程时, 会驱使产物以恒压通过相互作用室。在相互作用室内有特殊设计的固定布局微通道, 通过微通道的产物流将加至高速, 产生高切力和冲击力, 在高速产物流自身撞击及撞击耐磨表面时, 产生均匀纳米乳。

[0081] 当增压泵完成其压力冲程时, 会逆转方向, 抽取新的大量产物。在进料行程结束时, 会再一次逆转方向, 驱使产物保持恒压, 从而重复该过程。

[0082] 当产物流流出相互作用室时, 会通过内置的调节产物至所需温度的热交换器。在这一点上, 产物可以通过系统再循环进一步加工, 或者可接到外部至下一加工步骤 (Cook 等, “Apparatus For Forming Emulsions (乳剂的生产设备)”, 美国专利第 4, 533, 254 号 (1985); 和 Cook 等, “Method Of Forming A Microemulsion (微乳剂的制备方法)”, 美国专利第 4, 908, 154 号 (1990), 这两项专利都通过引用结合到本文)。

[0083] B. 纳米颗粒组合物

[0084] 早期尝试应用微流化器来生产所需药物的纳米颗粒组合物, 因为该药物难溶解于液体分散介质。在一项公开的技术中, “难溶解”被定义为 10mg/ml 以下 (Bosch 等, “Process for preparing therapeutic compositions containing nanoparticles (含有纳米粒子的

治疗组合物的制备方法)”,美国专利第 5,510,118 号(1996)(通过引用结合到本文))。虽然优选考虑水不溶性化合物,但是油不溶性化合物也用微流化工艺进行处理。“118 专利”的微流化工艺被描述为“碾磨”作用,因此表明不溶性化合物粒子在生产纳米颗粒组合物过程中经历了物理崩解。此外,这一早期工艺需要较长的加工时间(即重复微乳化循环),从而促使微流化器发热。因此,这一早期技术需要 40℃ 以下的加工温度。这种技术导致平均纳米乳剂粒径约 300nm 便是一个问题。虽然‘118 专利指出,可以获得较小的粒径(即 100nm 以下),但是并未提供证明这种能力的数据。本文提供的示例性数据采用了 Bosch 等人的工艺,得到完整的粒径分布图。参见实施例 13。这些数据显示 Bosch 等人的技术无法生产本发明所提供的均匀纳米乳剂。

[0085] 其他人实施了‘118 的基础技术将各种不溶性化合物包封起来。实际上,这些后续的公开内容将纳米颗粒组合物定义为“由难溶解的治疗药或诊断药所组成的颗粒吸附到非交联表面稳定剂中,或者与非交联表面稳定剂缔合”(Cooper 等,“Nanoparticulate Sterol Formulations And Novel Sterol Combinations(纳米颗粒甾醇制剂与新的甾醇组合)”,美国专利申请公布号 2004/0033202 A1(2004),参见第一页第三段,(通过引用结合到本文))。同‘118 专利一样,Cooper 等人公开了用难溶于液体分散介质(即水、油、醇类、二醇类等)的化合物来制备纳米颗粒组合物。例如 Cooper 等人把“难溶于水”的药物定义为溶解度不超过约 30mg/ml。例如,本领域有人提出包含一种或多种甾醇类或甾烷醇类(即谷甾醇或植物甾醇类)的植物甾醇纳米颗粒组合物的粒径不超过 50nm。Cooper 等人没有使用微流化器,也没有提供任何数据显示提供均匀的粒径范围介于 10-110nm 之间的能力。Cooper 等人依赖较传统的碾磨工艺,无法产生范围介于 10-110nm 之间的均匀的粒径分布。

[0086] Cooper 等人应用本领域已知的碾磨机 DYNOMILL[®] KDL。这种设备现由美国 Glen Mills Inc. (Clifton, NJ) 销售,广告宣传中具有下列技术信息。DYNOMILL[®] 是一种通用卧式珠磨机,应用范围从油漆、涂料至制药以及用于蛋白质提取的细胞破碎。研究论文中曾报道研磨至平均直径为 320nm。DYNOMILL[®] 始终在湿润情况下工作,也就是说,待研磨的原料保持在任何合适液体的悬浮液中。置于外壳内的研磨室包括一系列沿转轴纵深等距离相间的搅拌器。研磨室的外壳用来控制待加工原料的温度。研磨室一端是固定的,悬臂穿过转轴突出出来。轴承端装有具有间隙公差的分隔器间隙,可以设为 20 微米。研磨室装有其容积约 80% 的珠粒(即 PolyMill[®] 500;研磨珠直径 500 μm)。根据具体的应用,可获得由玻璃、陶瓷、金属、碳化钨和其它材料制成的研磨珠。现将加工原料装入研磨室。当研磨室充满原料和研磨珠时,开动机器,搅拌器盘旋转,迫使研磨珠用飓风式压力反复冲击加工原料。这种具有数千次独立冲击力的作用,引起原料尺寸持续快速地减小。在同一珠磨机中,可以通过改变研磨室和间隙设置,进行批量加工和连续加工。

[0087] Cooper 等人最多局限于植物甾醇纳米颗粒组合物,其中 90% 的粒径为 187nm 以下。然而,未给出实际的粒径分布。在一个实施方案中,本发明提供 Cooper 等人所述技术,该技术不能产生范围介于 10-110nm 之间均匀的粒径分布。参见实施例 14。不像本发明的某些实施方案,Cooper 等人没有考虑包括加热过程的纳米颗粒组合物的制备方法。实际上,Cooper 等人提出讨论,得出的结论是用包括加热的工艺制备植物甾醇纳米颗粒组合物存在

很多问题,需要改进。本发明某些实施实施方案解决了这些问题。

[0088] 曾有人提出,不溶于所选液体分散介质的两种药物美洛昔康和托吡酯,作为应用 Cooper 等人的纳米颗粒组合物技术来改进临床给药的可能的备选技术 (Cooper 等,“Nanoparticulate meloxicam formulations(纳米颗粒美洛昔康剂型)”,美国专利申请公布号 2004/0229038(2004) 和 Gustow 等,“Nanoparticulate topiramate formulations(纳米颗粒托吡酯剂型)”,美国专利申请公布号 2004/0258758(2004))。这两项专利公布小册子都未包括证明生产粒径范围约 10-110nm 的均匀微流化纳米乳剂的示例性数据。

[0089] C. 纳米乳化 (nanoemulsification)

[0090] 主要是小粒子的均匀混合物(即:例如粒子群)的形成涉及被称为“乳化”的物理过程。在本领域中,乳剂在传统上被定义为“由分散于不混溶液体中的液体(含或不含乳化剂)、通常是由比胶体尺寸大的液滴组成的系统”(Medline Plus Online Medical Dictionary, MerriamWebster(2005))。因此,随着本领域开发出能够生产粒子直径越来越小的乳化剂,术语“微乳剂 (microemulsion)”和“纳米乳剂 (nanoemulsion)”变得广为人知。在概念上,微乳剂的直径比纳米乳剂的大 1000 倍。然而,粒径分布可能在不受控制的乳化过程中发生很大的变化,在纳米乳剂和微乳剂技术之间产生重叠。

[0091] 在一个实施方案中,本发明提供预混合物,该预混合物包含基本溶于(即:例如 30mg/ml 以上)液体分散介质(即:例如加热液体分散介质)和任选普通乳化剂(包括但不限于磷脂、甘油单脂肪酸酯、甘油二脂肪酸酯或聚山梨酯)。在一个实施方案中,通过将预混合物暴露于高压连续湍流以生产纳米乳剂,其中压力至少为 25,000PSI。在一个实施方案中,高压湍流包括微流化。在一个实施方案中,纳米乳剂包含将药物或营养制品包封起来的粒子。在一个实施方案中,纳米乳剂包含具有稳定粒子的均匀纳米乳剂。在一个实施方案中,微流化包括单程暴露(即:例如约 30 秒钟)。在一个实施方案中,均匀的植物甾醇微流化纳米乳剂具有改进的降低低密度脂蛋白胆固醇的功效。

[0092] 口服给药是向任何受治疗者提供药物和营养制品的常用方法。本发明提供的递送纳米乳剂的方法并不限于口服,还包括例如经皮、静脉内、腹膜内、肌肉或皮下给药途径。优选口服给药,因为该剂型(即液体制剂或混悬剂)的生产相对便宜,耐受性好。然而,该剂型成分在随后的胃肠吸收不如可预测的一样。对于获得进入受治疗者体内的药物和营养制品,剂型必须与消化系统相适应。因此,脂基递药系统以用作许多递药系统的载体而著称,然而,其功效可能取决于:i) 脂质组成(即:例如分子大小和电性);ii) 药物、营养制品或药用化妆品的化学结构(即分子大小和 pH 电离作用);和 iii) 受治疗者的总的健康状况。脂质一般分成生理不可吸收的或生理可吸收的。应当了解的是,胃肠吸收过程与化合物的溶解性质无关。本发明提供涉及均匀微流化纳米乳剂的组合物和方法,所述均匀微流化纳米乳剂包含可吸收或不可吸收的脂质从而改进其生物利用度。

[0093] 1. 不可吸收脂质

[0094] 口服给药后,植物甾醇、甾烷醇和三萜烯醇(即:例如谷维素)不被吸收或者难被吸收进入血流。在一个实施方案中,本发明提供包含不可吸收脂质和任选常用乳化剂的均匀纳米乳剂(即:例如微流化)的制备方法,所述脂质基本溶于液体分散介质,所述常用乳化剂例如磷脂、甘油单脂肪酸酯、甘油二脂肪酸酯或聚山梨酯用以配制改进的纳米乳剂。在一个实施方案中,纳米乳剂包含粒径范围介于 10-110nm 之间的粒子,从而改进口服给药。

[0095] 已知使用植物甾醇（例如 β -谷甾醇）能降低血液胆固醇水平，因为植物甾醇是不能吸收的。胃肠系统中存在的不吸收植物甾醇抑制胆固醇的正常代谢，随之降低血液胆固醇水平。具体地讲，给予 20g 结晶植物甾醇，可以降低血浆胆固醇水平大约 10% (Pollack 等, “Sitosterol (谷甾醇)”, *Monographs on Atherosclerosis*, 第 10 卷, O. J. Pollack 和 D. Kritchevsky 主编, Basel, New York, Karger (1981))。

[0096] 此外，不可吸收脂质由于无副作用，因此作为营养制品是有优势的。当使用传统药物系统性降低胆固醇干预（即：例如 HMG 辅酶 A 还原酶抑制剂或烟酸）时，通常观察到副作用。因为植物甾醇的副作用发生率非常低，所以可以开给大众，包括几乎不推荐系统性干预的儿童。已经知道，使用适量的植物甾醇可以降低血液胆固醇水平。本发明提供对递送植物甾醇或植物甾烷醇的目前已知方法的改进方法。

[0097] 第一种已知方法包括将植物甾醇溶于含有人造奶油的植物油中至植物甾醇的有效水平。当通过 i) 与脂肪酸（例如油酸酯或亚油酸酯）酯交换；ii) 在植物油中混匀；或者 iii) 氢化生产人造奶油，来增加游离甾烷醇或甾醇的脂肪溶解度时，血浆胆固醇可降低约 30%。为了吸取足够的植物甾醇，这一过程可引起脂肪消耗多达约 18 克 (Miettinen 等, “Use of a stanol fatty acid ester for reducing serum cholesterol level (甾烷醇脂肪酸酯在降低血清胆固醇水平中的用途)”, 美国专利第 5,502,045 号 (1996)；和 Wester 等, “Phytosterol compositions (植物甾醇组合物)”, 美国专利第 6,589,588 号 (2003)，这两个专利都通过引用结合到本文)。养胖头脑清醒的美国人，加上人造奶油的成本高，这对于降低血浆胆固醇的自然疗法 (naturopathic approach) 来说是不可接受的。该方法的缺点是超重或肥胖人士通常胆固醇水平已升高。医生当然已告诫这样的受治疗者避免额外的膳食脂肪。在一个实施方案中，本发明提供包含植物甾醇的饮料纳米乳剂的制备方法。例如，饮料纳米乳剂的制备方法可包括高压连续湍流。在一个实施方案中，高压连续湍流包括微流化。在另一个实施方案中，纳米乳剂饮料包含橙汁产品。

[0098] 第二种已知方法包括掺入微米大小的胶束（即直径数千纳米的微乳）的水分散植物甾醇（即：例如不溶于脂肪的甾烷醇）的口服递药，随后可以添加到饮料或食品中 (Ostlund, Jr., “Sitostanol formulation to reduce cholesterol absorption and method for preparing and use of same (降低胆固醇吸收的谷甾醇制剂及其制备方法与用途)”, 美国专利第 5,932,562 号 (1999) (通过引用结合到本文))。当将含有植物甾醇的微乳剂给入肠内时，胆固醇吸收降低约 37% (Ostlund, Jr., “Sitostanol formulation to reduce cholesterol absorption and method for preparing and use of same (降低胆固醇吸收的谷甾醇制剂及其制备方法与用途)”, 美国专利第 5,932,562 号 (1999)；和 Spillburg 等, “Fat-free food supplemented with soy stanol-lecithin powder reduce cholesterol absorption and LDL cholesterol (添加大豆甾烷醇-卵磷脂粉的脱脂食品降低胆固醇吸收及 LDL 胆固醇)”, *J Am Diet Assoc.* 103:577-581 (2003))。这种方法的缺点是这些微乳制品的粒径约数千纳米（即直径为微米），因此无法提供最佳功效。本发明提供纳米乳剂技术，该技术包括提供粒径介于 10-110nm 之间的特殊制剂和微流化工艺。在一个实施方案中，纳米粒子具有改进的 pH 和温度稳定性能，从而在整个胃肠系统中使粒子完整性保持稳定。

[0099] 第三种已知方法包括生产水可分散性甾醇制品的植物甾醇的口服递药。这些水可

分散性产品通常包括乳化剂,包括但不限于单甘油酯和聚山梨酯。已知这些水可分散性产品用粒径不超过 1000nm(平均= 358nm)的液体/液体分散体均化。然而,本发明提供微流化纳米乳剂技术(即:例如由连续湍流高压工艺所制得),该技术改进了这些水可分散性植物甾醇成为纳米乳剂粒径约 40-60nm 的乳化作用。

[0100] 同样地,通过将甾烷醇/甾醇与高级支链烃共熔,然后研磨所得产物来制备水可分散性甾醇/甾烷醇或甾醇/甾烷醇酯组合物的方法也是已知的(Bruce 等,“Method for producing dispersible sterol and stanol compounds(可分散甾醇和甾烷醇化合物的生产方法)”,美国专利第 6,387,411 号(2002)(通过引用结合到本文))。这种研磨方法通常产生的粒径范围介于 10-150 微米之间。产生水可分散甾醇制品的其它已知方法用的是在乳化剂中均化,乳化剂包括但不限于单甘油酯和聚山梨酯。据报道,这些均化方法生产的液体/液体分散体的粒径小于 1000nm(平均= 358nm)(Stevens 等,“Aqueous dispersible sterol product(水可分散性甾醇制品)”,美国专利第 6,623,780 号(2003)(通过引用结合到本文))。这种制品当添加到橙汁中时,可以降低 LDL 胆固醇约 12%(Devaraj 等,“Plant sterol-fortified orange juice effectively lowers cholesterol levels in mildly hypercholesterolemic healthy individuals(植物甾醇强化橙汁有效降低轻度高胆固醇血症健康个体的胆固醇水平)”,*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24:25-28(2004))。

[0101] 尽管不一定了解发明机制,但是我们认为,根据本发明制备的均匀微流化纳米乳剂获得高得多的表面积/体积之比(即:例如高达 6 倍),导致较高的稳定性。因此,我们进一步认为,任何掺入的药物、营养制品或药用化妆品提高了功效(即:例如植物甾醇降低血浆胆固醇)。我们进一步认为,本发明的一个实施方案提供的含有较小尺寸纳米粒子的植物甾醇,当与已知的微米尺寸胶束或者微乳相比时,改善了膳食胆固醇的正常胶束递送至消化道的破裂状况。例如,已知预制的含有植物甾烷醇的微米尺寸胶束在抑制胆固醇吸收时,其功效比结晶甾烷醇混悬液高达 3 倍(Ostund 等,“Sitostanol administered in lecithin micelles potently reduces cholesterol absorption in humans(给予谷甾醇的卵磷脂胶束有效降低人对胆固醇的吸收)”,*Am J Clin Nutr* 70:826-831(1999))。

[0102] 2. 可吸收脂质

[0103] 本发明还涉及纳米乳剂作为可吸收脂质的口服递药载体的用途,该可吸收脂质包括但不限于脂肪酸、类胡萝卜素、生育酚和其它脂溶性维生素、生育三烯酚和辅酶 Q。在一个实施方案中,本发明提供均匀微流化纳米乳剂的制备方法,所述均匀微流化纳米乳剂包括在液体分散介质中基本稳定的可吸收脂质和任选常用的乳化剂,常用的乳化剂例如磷脂、甘油单脂肪酸酯、甘油二脂肪酸酯或聚山梨酯以配制改进的纳米乳剂。在一个实施方案中,制备方法包括将预制混合物暴露于高压连续湍流的步骤。在一个实施方案中,压力为至少 25,000PSI。在一个实施方案中,纳米乳剂包含类胡萝卜素,包括但不限于叶黄素和玉米黄质。在一个实施方案中,纳米乳剂包含粒径范围为 10-110nm 的纳米粒子,从而改进生物利用度。在一个实施方案中,在口服、经皮、静脉内、腹膜内、肌肉或皮下递药后,纳米乳剂生物利用度得到改进。

[0104] 在一个实施方案中,本发明提供治疗或预防黄斑变性(即 65 岁以上人群致盲的主要原因)的方法,该方法提供包含至少一种类胡萝卜素的改进的纳米乳剂。在一个实施方案中,类胡萝卜素选自叶黄素或玉米黄质。

[0105] 在正常生理条件下,这些类型的化合物难被胃肠系统吸收。因此,预测脂质营养物的吸收变化不定,因此导致脂质生物利用度(即:例如所吸收剂量的百分比)也是十分变化不定。影响生物利用度的因素包括但不限于食品加工方法、食品基质(food matrix)和在天然存在的胶束(即:例如脂质胶束运送系统)中的生理溶解度。

[0106] 脂溶性营养物可以掺入到含有高脂的植物油中用于分散到脂肪基质(即:例如微米尺寸胶束)中。胶束使脂溶性营养物增溶,从而允许小肠吸收。例如,当植物甾醇以胶束递送时,胆固醇吸收抑制增强多达3倍(Ostlund等,“Sitostanol administered in lecithin micellespotently reduces cholesterol absorption in humans(给予谷甾醇的卵磷脂胶束有效降低人对胆固醇的吸收)”,Am J Clin Nutr 70:826-831(1999))。

[0107] 同样,当使类胡萝卜素在胶束中增溶时,观察到在细胞培养物中体外类胡萝卜素生物利用度提高(Xu等,“Solubilization andstabilization of carotenoids using micelles:delivery of lycopene to cells inculture(利用胶束使类胡萝卜素增溶和稳定:番茄红素递送到培养细胞内)”,Lipids 34:1031-1036(1999))。然而,使用胶束的缺点包括使用氯化有机溶剂,这是在食品工业中应当避免的做法。另一个体外实验证实,脂肪酸、维生素和 β -胡萝卜素等亲脂物质的纳米乳剂可被递送到细胞培养基(RPMI-1640)中并被TK-6细胞摄入(Zuelli等,“Deliveringlipophilic substances into cells using nanoemulsions (利用纳米乳剂将亲脂物质递送至细胞内)”,美国专利第6,558,941号(2003)(通过引用结合到本文))。

[0108] II. 均匀纳米乳剂的药代动力学特征

[0109] 在一个实施方案中,本发明提供用高压连续湍流法生产的纳米乳剂,该纳米乳剂当与本领域目前已知的常规纳米颗粒组合物和/或纳米乳剂相比较时,具有改进的药代动力学特征。已知纳米颗粒比微颗粒更有效地递送和/或释放药物(即:例如诺氟沙星(norflaxin))和/或蛋白质(即:例如血清白蛋白)(Jeon等,“Effect of solvent on the preparation ofsurfactant-free poly(DL-lactide-co-glycolide)nanoparticles andnorfloxacin release characteristics(溶剂对制备不含表面活性剂的聚DL-丙交酯-乙交酯共聚物纳米颗粒的影响及诺氟沙星的释放特征)”,Int J pharm 207:99-108(2000);和Panyam等,“Polymer degradation andin vitro release of a model protein from poly(DL-lactide-co-glycolide)nano-and microparticles(聚合物降解与聚DL-丙交酯-乙交酯共聚物纳米颗粒和微颗粒中模式蛋白的体外释放)”,J Control Release92:173-187(2003))。

[0110] 本发明的一个实施方案提供均匀微流化纳米乳剂,该均匀微流化纳米乳剂当与本领域目前已知的常规纳米颗粒组合物和/或纳米乳剂相比较时,具有改进的药代动力学特征。均匀微流化纳米乳剂的一个优势包括粒径范围窄(即:例如10-110nm)。目前已知的大多数常规纳米颗粒组合物和/或纳米乳剂的粒径分布较宽,抵销了较小尺寸颗粒改进的功效和生物利用度。

[0111] 本发明解决了纳米乳剂生产中遇到的粒径变化十分大的问题,提供了较均匀的小尺寸纳米乳剂(即:例如包含稳定颗粒的均匀纳米乳剂)。因此,这些不依赖于递送方式(包括但不限于口服、经皮、静脉内、腹膜内、肌内或皮下等)的均匀纳米乳剂,当与本领域目前已知的常规纳米颗粒组合物和/或纳米乳剂相比较时,具有改进的药代动力学特征。

[0112] A. 吸收相

[0113] 采用常规纳米颗粒组合物或纳米乳剂并不理想,这是由于起效延迟所致。相比之下,本发明提供的均匀微流化纳米乳剂显示出较快的治疗效果。

[0114] 市售的药物和营养制品为片剂、液体制剂、凝胶胶囊剂、胶囊剂等等,一般用于口服给药。这些组合物的峰值血浆浓度通常发生在给药后 2-4 小时。

[0115] 如果将本发明所提供的均匀微流化纳米乳剂制成口服剂型,则所掺入的化合物可获得少于约 2 小时的峰值血浆浓度,优选少于约 1 小时,更优选少于约 30 分钟,但是最优选介于 1-15 分钟之间。

[0116] B. 给药频率和给药剂量

[0117] 大多数药物和营养制品推荐的总日剂量按分剂给予。单日剂量可优选每天多次给药为本领域所知。例如,在部分性癫痫发作成人患者的研究中,日剂量为 200mg/ 天的效果不稳定,比 400mg/ 天的效果低。参见 Physicians' Desk Reference, 增刊 57, 第 2502 页 (2003)。

[0118] 相比之下,可以较低频率、较低剂量和以液体分散制剂、散剂、喷雾剂、固体再分散剂型、软膏剂、乳膏剂等剂型,给予本发明的某些均匀微流化纳米乳剂。用于本发明剂型类型的实例包括但不限于任何药物、营养制品或药用化妆品的液体分散剂型、凝胶剂、气雾剂(经肺和经鼻)、软膏剂、乳膏剂、固体剂型等等。可以使用较小的剂量,因为本发明实施方案的粒径较小,确保了较为充分的吸收。

[0119] 在一个实施方案中,本发明提供治疗有效量的均匀微流化纳米乳剂,其治疗有效量为常规药物、营养制品或药用化妆品制剂治疗有效量的 1/6、1/5、1/4、1/3 或 1/2。

[0120] C. 口服给药

[0121] 可以预期常规纳米颗粒或纳米乳剂组合物的液体剂型是体积相对较大、物质粘性较高,可能不太被受治疗者群体完全接收。而且,粘性溶液剂在胃肠外用药时可能有问题,因为这些溶液剂需要缓慢的注射器推力,并可能粘住管壁。此外,水溶性不佳的活性药物的常规制剂对于静脉内给药技术往往是不安全的,主要与水溶性高的物质结合使用。本发明所提供的实施方案通过利用基本溶于液体分散介质的药物、营养制品或药用化妆品,解决了这个问题。

[0122] 均匀微流化纳米乳剂实施方案的液体剂型提供了优于常规纳米颗粒或纳米乳剂的明显优势。在一个实施方案中,均匀微流化纳米乳剂包括粘度低。在另一个实施方案中,均匀纳米乳剂包括质地光滑。这些优势包括例如:i) 更好的受治疗者顺应性,因为剂型的感观较稀,易于使用和消化;ii) 便于分散,因为可以用杯子或注射器;iii) 配制浓度较高的药物、营养制品或药用化妆品的可能性,导致较低的剂量体积,因此受治疗者使用的体积较小;和 iv) 总体配制更容易(easier overall formulation concerns)。

[0123] 本发明所提供的均匀纳米乳剂的液体剂型较易于使用,这在考虑青少年受治疗者、临终疾病受治疗者和年长受治疗者时尤其重要。这些受治疗者群体不能很好地耐受需要相对较大剂量体积的粘性制剂或砂粒质制剂。液体口服剂型对于使用片剂有困难的受治疗者群体(例如婴儿和长者)是特别优选的。

[0124] 在每毫升浓度大致相同的情况下,本发明纳米颗粒托吡酯液体剂型的粘度与常规纳米颗粒组合物或纳米乳剂的液体口服剂型相比,优选小于约 1/200、小于约 1/175、小于

约 1/150、小于约 1/125、小于约 1/100、小于约 1/75、小于约 1/50 或小于约 1/25。

[0125] 在一个实施方案中,本发明提供不混浊的均匀微流化纳米乳剂。在一个实施方案中,混浊是指肉眼可以观察到的颗粒物质的性质,或者在使用时可以感觉到“砂粒质感”的性质。本发明实施方案所提供的纳米乳剂可以像水一样轻易地从容器中倒出或者抽出,而预期常规纳米颗粒或纳米乳剂组合物的液体剂型具有明显的较“粘滞”的特征。

[0126] D. 生物利用度提高

[0127] 在一个实施方案中,本发明提供相同剂量下,与给予现有的常规纳米颗粒组合物和纳米乳剂相比,生物利用度提高,剂量需求较小的均匀微流化纳米乳剂。

[0128] 任何药物、营养制品或药用化妆品如果在规定时间内以规定剂量给予时,都可能具有不利的副作用。因此,需要较低剂量然而却可以达到与用较大剂量所观察到的相同或更好的治疗效果。这种较低的剂量可以用本发明所提供的均匀微流化纳米乳剂来实现,因为比起常规纳米颗粒组合物和纳米乳剂,生物利用度较高,因此较低剂量的药物和营养制品很可能是获得所需治疗效果所需要的。

[0129] 例如,掺到常规纳米颗粒或纳米乳剂的药物、营养制品或药用化妆品的相对生物利用度可约为 85% (即与纯溶液相比)。在一个实施方案中,配制成口服药物、营养制品或药用化妆品剂型的均匀微流化纳米乳剂的相对生物利用度优选约大于 85%。在一个实施方案中,相对生物利用度大于约 90%,或大于约 95%,大于约 98%。

[0130] E. 药代动力学特征

[0131] 本发明还提供均匀微流化纳米乳剂的实施方案,该均匀微流化纳米乳剂掺有药物和 / 或营养制品,当给予哺乳动物受治疗者时,具有改进的药代动力学特征。在一个实施方案中,改进的特征是与常规纳米颗粒组合物和纳米乳剂相比较的。

[0132] 本发明改进的药代动力学 (pK) 特征可能具有几种不同类型的特性。在一个实施方案中,均匀微流化纳米乳剂改进的 pK 特征可以产生与常规纳米颗粒组合物或纳米乳剂相同的 pK 特征,但却是在较低剂量下产生的。在另一个实施方案中,与常规纳米颗粒组合物或纳米乳剂相比,改进的 pK 特征需要较低的给药频率。在一个实施方案中,比起常规纳米颗粒组合物和纳米乳剂,改进的 pK 特征显示活性起效较快和 / 或药物吸收量较大 (即生物利用度较高)。在另一个实施方案中,改进的 pK 特征允许更有效和 / 或较快地滴定到受治疗者的治疗性血浆水平。

[0133] 本发明提供具有改进药代动力学特征的均匀微流化纳米乳剂的一些实施方案,药代动力学特征用最大浓度时间 (T_{max})、最大浓度 (C_{max}) 和 / 或曲线下面积 (AUC) 特征来表示。

[0134] 在一个实施方案中,在给予相同剂量时,掺入均匀微流化纳米乳剂中的药物、营养制品或药用化妆品给药剂量的 T_{max} 小于常规纳米颗粒组合物和 / 或纳米乳剂的 T_{max} 。优选在给予相同剂量时,该 T_{max} 约小于常规纳米颗粒组合物和 / 或纳米乳剂的 T_{max} 的 99%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、25%、20%、15% 或 10%。

[0135] 在另一个实施方案中,在给予相同剂量时,掺入均匀微流化纳米乳剂中的药物、营养制品或药用化妆品给药剂量的 C_{max} 大于常规纳米颗粒组合物和 / 或纳米乳剂的 C_{max} 。优选在给予相同剂量时,该 C_{max} 约大于常规纳米颗粒组合物和 / 或纳米乳剂的 C_{max} 的 5%、10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、110%、120%、130%、140% 或 150%。

[0136] 在一个实施方案中,在给予相同剂量时,掺入均匀微流化纳米乳剂中的药物、营养制品或药用化妆品给药剂量的 AUC 大于常规纳米颗粒组合物和 / 或纳米乳剂的 AUC。优选在给予相同剂量时,该 AUC 约大于常规纳米颗粒组合物和 / 或纳米乳剂的 AUC 的 5%、10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、110%、120%、130%、140% 或 150%。

[0137] III. 无菌纳米乳剂

[0138] 本发明提供具有抗菌性能的纳米乳剂的制备方法。在一个实施方案中,该方法包括将预混合物暴露于高压连续湍流的步骤。在一个实施方案中,通过微流化制备抗菌纳米乳剂。在一个实施方案中,暴露包括约 30 秒钟。在另一个实施方案中,暴露包括至少 25,000PSI 的压力。在另一个实施方案中,抗菌纳米乳剂包含大豆蛋白。

[0139] 例如将大豆蛋白粉制品加到水中从而形成混悬液。然后,将第一等分混悬液加到第一容器(即:例如细胞培养 falcon 培养瓶)中,用作对照。将第二等分混悬液进行微流化(同上)以生产纳米乳剂。按实施例 5 将制品微流化。然后将微流化纳米乳剂加到第二容器中。将两个容器立即放入冰箱内,观察数天。对照混悬液结块并长出细菌。见图 15A 和图 15B。相比之下,含有大豆蛋白的微流化纳米乳剂没有结块,也没有长出细菌。见图 15C 和图 15D。

[0140] 尽管不一定了解发明的机制,但是我们认为微流化作用可以灭菌。我们进一步认为微流化剪切应力导致细菌细胞裂解,从而防止进一步的细菌生长。因此,我们认为本文所提供的微流化法能生产无微生物的组合物。

[0141] 在一个实施方案中,本发明提供具有用高压连续湍流法产生的氧化环境的纳米乳剂。在一个实施方案中,纳米乳剂包括均匀微流化纳米乳剂。在一个实施方案中,氧化环境防止细菌生长。在另一个实施方案中,氧化环境是杀菌的。在另一个实施方案中,氧化环境提供无菌纳米乳剂。

[0142] 纳米乳剂的氧化环境可由表面积与体积比增大所产生。在一个实施方案中,本发明还提供在抗氧化剂存在下避免通过微流化产生氧化环境的方法。在一个实施方案中,抗氧化剂减少微流化纳米乳剂中活性氧中间体(ROS)的存在。在另一个实施方案中,抗氧化剂被纳米颗粒包封起来用于随后释出给受治疗者。

[0143] 通过测定氧化环境的指示剂,可以定量测定任何纳米乳剂内的 ROS 荷载。丙二醛(MDA)是已知的氧化环境指示剂。

[0144] 表 1. 根据丙二醛形成所测定的纳米乳剂中的氧化应力

[0145]

制剂	样品 1	样品 2	样品 3	平均值
血浆 (未氧化对照)	4.0	2.8	3.3	3.4

血浆 +FeCl ₃ (氧化对照)	12.4	16.0	13.1	13.9
1.5g DHA 与 200ml 牛奶 (微流化)	44.0	42.6	45.8	44.1
1.75g DHA、1000mg Vit E 和 800mg Vit C 与 200ml 牛奶 (未微流化)	12.8	19.2	20.1	17.4
1.75g DHA、1000mg Vit E 和 800mg Vit C 与 200ml 牛奶 (微流化)	4.0	6.0	3.5	4.5
1.75g DHA 和 800mg Vit C 与 200ml 牛奶 (微流化)	17.5	17.8	20.8	18.7
1.75g DHA 和 1000mg Vit E 与 200ml 牛奶 (微流化)	9.8	16.7	11.4	12.6

[0146] 从上表 1 中可以发现,微流化纳米乳剂的制备方法提高 MDA 水平大约 13 倍。此外,维生素 C 和 / 或维生素 E 的存在防止了在微流化纳米乳剂中产生 MDA,从而使 MDA 回复到内稳态的血浆水平。

[0147] 实验

[0148] 以下实施例是本发明所提供的具体实施方案,并且不是限制性的。

[0149] 实施例 1 :植物甾醇微流化纳米乳剂的稳定制剂

[0150] 本实施例是微流化纳米乳剂的一个植物甾醇实施方案。分步过程如下:

[0151] 1. 加热 4g 大豆油

[0152] 2. 加入 5g 大豆卵磷脂,搅拌并加热至 90℃

[0153] 3. 加入 1g 植物甾醇,搅拌并加热 10 分钟

[0154] 4. 加入 250mg 聚山梨酯 80

[0155] 5. 加热 240ml 去离子水至 70℃

[0156] 6. 将步骤 4 的混合物加到步骤 5 的混合物中,连续搅拌并加热 30 分钟

[0157] 7. 将步骤 6 的混合物均化 2-4 分钟

[0158] 8. 在电热板上搅拌制剂 10 分钟

[0159] 9. 用 M-110EH 设备于 25,000PSI 进行一次微流化

[0160] 10. 用 Malvern Nano S 仪器进行粒径分析

[0161] 这些微流化植物甾醇纳米乳剂的平均粒径(即峰 1/峰 2)为 39nm。见图 1。植物甾醇微流化纳米乳剂的平均粒径数据见下表 2。

[0162] 表 2 :微流化植物甾醇纳米乳剂

[0163]

	直径 (nm)	强度 (%)	宽度 (nm)
峰 1	54.16	85.86	14.36
峰 2	15.55	14.14	2.521
峰 3	0	0	0

[0164] Z 平均 :38.91 ;PDI :0.228 ;截距 (intercept) :0.9764。

[0165] 三个月后,再次测量粒径。这种微流化植物甾醇纳米乳剂的平均粒径(即峰 1)为 64.4nm。见图 1A。三个月后植物甾醇纳米乳剂的平均粒径数据见下表 3。

[0166] 表 3 :保存 3 个月 :微流化植物甾醇纳米乳剂

[0167]

	直径 (nm)	强度 (%)	宽度 (nm)
峰 1	74.8	100	120.8
峰 2	0	0	0
峰 3	0	0	0

[0168] Z 平均 :64.4 ;PDI :0.196 ;截距 :0.969。

[0169] 实施例 2 :鳕鱼肝油微流化纳米乳剂的稳定剂

[0170] 本实施例是微流化纳米乳剂的一个鳕鱼肝油实施方案,其粒径稳定至少 4 个月。分步过程如下 :

[0171] 1. 加热 5g 大豆油 (65℃)

[0172] 2. 加入 5g 鳕鱼肝油,搅拌并加热至 80℃

[0173] 3. 加入 6g 聚山梨酯 80,搅拌并加热 20 分钟

[0174] 4. 加入 200ml 去离子水,搅拌并加热 30 分钟

[0175] 5. 用 M-110EH 设备于 25,000PSI 进行一次微流化

[0176] 6. 用 Malvern Nano S 仪器进行粒径分析

[0177] 这种鳕鱼肝油微流化纳米乳剂的平均粒径(即峰 1/ 峰 2)为 58nm。在进行微流化前,鳕鱼肝油混悬液的平均粒径为 2,842nm。这表示通过微流化器一次后,平均粒径减小 50 倍。微流化工艺后 4 个月,再次测定粒径,未观察到有变化。见图 2。4 个月微流化样品的平均粒径数据见表 4。

[0178] 表 4 :制备后 4 个月的微流化鳕鱼肝油纳米乳剂

[0179]

	直径 (nm)	强度 (%)	宽度 (nm)
峰 1	63.92	82.22	15.62
峰 2	18.51	17.78	2.771

峰 3	0	0	0
-----	---	---	---

[0180] Z 平均 :45.15 ;PDI :0.247 ;截距 :0.9707。

[0181] 实施例 3 :生育酚微流化纳米乳剂的稳定剂

[0182] 本实施例是微流化纳米乳剂的一个生育酚实施方案,粒径保持至少 5 个月,分步过程如下 :

[0183] 1. 加热 13.5g 大豆油

[0184] 2. 加入 2g 生育酚,搅拌并加热至 90℃

[0185] 3. 加热 2g 聚山梨酯 80 的 100ml 去离子水溶液,加热至 75℃

[0186] 4. 将步骤 3 的混合物加到步骤 2 的混合物中

[0187] 5. 加热 300ml 去离子水及 6g 聚山梨酯 80,加热直到 70℃

[0188] 6. 将步骤 4 的混合物加到步骤 5 的混合物中,继续搅拌和加热

[0189] 7. 将步骤 6 的混合物均化 2-4 分钟

[0190] 8. 在电热板上搅拌制剂 3-5 分钟

[0191] 9. 用 M-110EH 设备于 25,000PSI 进行一次微流化

[0192] 10. 用 Malvern Nano S 仪器进行粒径分析

[0193] 生育酚微流化纳米乳剂的平均粒径为 64nm。在进行微流化前,生育酚混悬液的平均粒径为 1,362nm。这表示通过微流化器一次后,平均粒径减小 21 倍。微流化工艺后 5 个月,再次测定粒径,未观察到有变化。见图 3。5 个月微流化样品的平均粒径数据见表 5。

[0194] 表 5 :制备后 5 个月的微流化生育酚纳米乳剂

[0195]

	直径 (nm)	强度 (%)	宽度 (nm)
峰 1	88.06	77.84	19.99
峰 2	26.46	22.16	3.651
峰 3	0	0	0

[0196] Z 平均 :58.07 ;PDI :0.234 ;截距 :0.9697。

[0197] 实施例 4 :叶黄素和玉米黄质微流化纳米乳剂的制剂

[0198] 本实施例是微流化纳米乳剂的一个叶黄素 / 玉米黄质实施方案。分步过程如下 :

[0199] 1. 加热 5g 大豆油

[0200] 2. 加入 2g 卵磷脂

[0201] 3. 加热并搅拌,10 分钟

[0202] 4. 加入 125mg 叶黄素和 125mg 玉米黄质

[0203] 5. 加热并搅拌,10 分钟

[0204] 6. 加热 240ml 去离子水,50℃

[0205] 7. 将热水加到混合物中

[0206] 8. 搅拌并加热,直到形成溶液

[0207] 9. 用 M-110EH 设备于 25,000PSI 进行一次微流化

[0208] 10. 用 Malvern Nano S 仪器进行粒径分析

[0209] 叶黄素和玉米黄质微流化纳米乳剂的平均粒径（即峰 1/ 峰 2）为 62nm。见图 4。该样品的平均粒径数据见表 6。

[0210] 表 6 :微流化叶黄素 / 玉米黄质纳米乳剂

[0211]

	直径 (nm)	强度 (%)	宽度 (nm)
峰 1	89.45	83.96	21.1
峰 2	22.81	16.04	2.968
峰 3	0	0	0

[0212] Z 平均 :62.26 ;PDI :0.245 ;截距 :0.976。

[0213] 实施例 5 :大豆蛋白微流化纳米乳剂的制剂

[0214] 本实施例是微流化纳米乳剂的一个大豆蛋白实施方案。分步过程如下：

[0215] 1. 加热 5g 大豆油

[0216] 2. 加入 5g 液体卵磷脂

[0217] 3. 搅拌并加热 10 分钟,70℃

[0218] 4. 加热 240ml 去离子水,65℃

[0219] 5. 将热水加到混合物中

[0220] 6. 加入 9g 大豆蛋白,搅拌并加热 10 分钟

[0221] 7. 加入 9g 大豆蛋白

[0222] 8. 搅拌并加热 20 分钟,70℃

[0223] 9. 均化 1 分钟

[0224] 10. 用 M-110EH 设备于 25,000PSI 进行 10 次微流化

[0225] 11. 用 Malvern Nano S 仪器进行粒径分析

[0226] Vanilla 大豆蛋白 (Central Soya 公司) 微流化纳米乳剂的平均粒径（即峰 1/ 峰 2）为 55nm。见图 5。样品的平均粒径数据见表 7。

[0227] 表 7 :微流化大豆蛋白纳米乳剂

[0228]

	直径 (nm)	强度 (%)	宽度 (nm)
峰 1	55.15	80.32	16.45
峰 2	290.8	19.68	82.82
峰 3	0	0	0

[0229] Z 平均 :54.97 ;PDI :0.283 ;截距 :0.9819。

[0230] 实施例 6 :乳清蛋白微流化纳米乳剂的制剂

[0231] 本实施例是微流化纳米乳剂的一个乳清蛋白实施方案。分步过程如下：

- [0232] 1. 加热 5g 大豆油
- [0233] 2. 加入 5g 大豆卵磷脂
- [0234] 3. 加入 250mg 聚山梨酯 80
- [0235] 4. 搅拌并加热 10 分钟, 70℃
- [0236] 5. 加热 240ml 去离子水, 65℃
- [0237] 6. 将热水加到混合物中
- [0238] 7. 加入 10g 乳清蛋白
- [0239] 8. 搅拌并加热 10 分钟
- [0240] 9. 均化 1 分钟
- [0241] 10. 用 M-110EH 设备于 25, 000PSI 进行一次微流化
- [0242] 11. 用 Malvern Nano S 仪器进行粒径分析
- [0243] 乳清蛋白微流化纳米乳剂的平均粒径 (即峰 1/ 峰 2) 为 108nm。见图 6。样品的平均粒径数据见表 8。
- [0244] 表 8 :微流化乳清蛋白纳米乳剂

[0245]

	直径 (nm)	强度 (%)	宽度 (nm)
峰 1	127. 7	91. 3	38. 09
峰 2	23. 72	6. 161	2. 764
峰 3	5027	2. 536	593

- [0246] Z 平均 :108. 2 ;PDI :0. 263 ;截距 :0. 948。
- [0247] 实施例 7 :橙汁、植物甾醇和叶黄素微流化纳米乳剂的制剂
- [0248] 本实施例是微流化纳米乳剂的一个橙汁 / 植物甾醇 / 叶黄素实施方案。分步过程如下 :
- [0249] 1. 加热大豆油, 80℃
- [0250] 2. 加入 1. 5g 植物甾醇
- [0251] 3. 搅拌并加热, 5 分钟
- [0252] 4. 加入 5g 聚山梨酯 80
- [0253] 5. 加入 70mg 叶黄素
- [0254] 6. 搅拌并加热, 10 分钟
- [0255] 7. 加入 240ml 橙汁 (Tropicana[®])
- [0256] 8. 搅拌并加热, 1 小时
- [0257] 9. 用 M-110EH 设备于 25, 000PSI 进行两次微流化
- [0258] 10. 用 Malvern Nano S 仪器进行粒径分析
- [0259] 橙汁 / 植物甾醇 / 叶黄素微流化纳米乳剂的平均粒径 (即峰 1/ 峰 2) 为 46nm。见图 7。样品的平均粒径数据见表 9。
- [0260] 表 9 :微流化橙汁 / 植物甾醇 / 叶黄素纳米乳剂

[0261]

	直径 (nm)	强度 (%)	宽度 (nm)
峰 1	61.55	81.57	15.32
峰 2	17.13	16.1	2.433
峰 3	5143	2.329	509.4

[0262] Z 平均 :46.41 ;PDI :0.322 ;截距 :0.9609。

[0263] 实施例 8 :DHA 鱼油 / 水微流化纳米乳剂的稳定剂

[0264] 本实施例是微流化纳米乳剂的一个 DHA 鱼油 / 水实施方案,粒径保持至少 2 个月。
分步过程如下 :

[0265] 1. 加热 6.4g DHA 鱼油

[0266] 2. 加入 6g 大豆卵磷脂

[0267] 3. 加入 250mg 聚山梨酯 80

[0268] 4. 加热 240ml 去离子水,75℃

[0269] 5. 将热水加到混合物中

[0270] 6. 搅拌并加热,20 分钟

[0271] 7. 均化 2 分钟

[0272] 8. 搅拌并加热,10 分钟

[0273] 9. 用 M-110EH 设备于 25,000PSI 进行一次微流化

[0274] 10. 用 Malvern Nano S 仪器进行粒径分析

[0275] DHA 鱼油 / 水微流化纳米乳剂的平均粒径 (即峰 1) 为 73nm。微流化工艺后 2 个月,再次测定粒径,未发现变化。见图 8。2 个月后微流化样品的平均粒径数据见表 10。

[0276] 表 10 :稳定的微流化 DHA 鱼油 / 水纳米乳剂

[0277]

	直径 (nm)	强度 (%)	宽度 (nm)
峰 1	81.73	100	20.38
峰 2	0	0	0
峰 3	0	0	0

[0278] Z 平均 :72.58 ;PDI :0.205 ;截距 :0.9636。

[0279] 实施例 9 :DHA 鱼油 / 牛奶微流化纳米乳剂的稳定剂

[0280] 本实施例是一个未添加任何乳化剂的 DHA 鱼油 / 牛奶实施方案,其粒径保持至少 3 周。分步过程如下 :

[0281] 1. 加热 1.5g DHA 鱼油,50℃

[0282] 2. 加热 200ml 全脂牛奶,50℃

[0283] 3. 将两者混合在一起

[0284] 4. 搅拌并加热, 10 分钟

[0285] 5. 用 M-110EH 设备于 25, 000PSI 进行一次微流化

[0286] 6. 用 Malvern Nano S 仪器进行粒径分析

[0287] DHA 鱼油 / 牛奶微流化纳米乳剂的平均粒径 (即峰 1) 为 93nm。该纳米乳剂制备时未添加任何乳化剂。微流化工艺后 3 周, 溶液中仍有鱼油, 再次测定粒径, 未发现有变化。见图 9。3 周后微流化样品的平均粒径数据见表 11。

[0288] 表 11 : 稳定的微流化 DHA 鱼油 / 牛奶纳米乳剂

[0289]

	直径 (nm)	强度 (%)	宽度 (nm)
峰 1	106.9	100	32.84
峰 2	0	0	0
峰 3	0	0	0

[0290] Z 平均 : 93.11 ; PDI : 0.178 ; 截距 : 0.9341。

[0291] 实施例 10 : 微流化纳米乳剂的温度稳定性

[0292] 本实施例证明暴露在热或冷后, 微流化纳米乳剂的稳定性。本实验所用制剂包含 DHA 鱼油 / 牛奶 / 生育酚。

[0293] 1. 将 1g 维生素 C 溶于 25ml 去离子水

[0294] 2. 将 200ml 全脂牛奶加到步骤 1 中

[0295] 3. 使用 1.7g DHA 鱼油, 并加入 800mg δ -生育酚

[0296] 4. 将步骤 1 和步骤 2 加到步骤 3 中

[0297] 5. 搅拌并加热 10 分钟, 50°C

[0298] 6. 用 M-110EH 设备于 25, 000PSI 进行一次微流化

[0299] 7. 用 Malvern Nano S 仪器进行粒径分析

[0300] DHA 鱼油 / 牛奶 / 生育酚微流化纳米乳剂的平均粒径 (即峰 1) 为 87nm。见图 10。该纳米乳剂制备时未添加任何乳化剂。最初纳米乳剂的平均粒径数据见表 12。

[0301] 表 12 : 微流化 DHA 鱼油 / 牛奶 / 生育酚最初的纳米乳剂

[0302]

	直径 (nm)	强度 (%)	宽度 (nm)
峰 1	91.84	97.86	23.95
峰 2	5179	2.144	485.1
峰 3	0	0	0

[0303] Z 平均 : 87.09 ; PDI : 0.216 ; 截距 : 0.9339。

[0304] 最初的微流化纳米乳剂用巴斯德灭菌法在 75°C 下灭菌 30 秒钟。24 小时后, 溶液中仍有鱼油, 与最初的纳米乳剂相比, 粒径保持稳定。见图 11。经巴斯德灭菌法灭菌 (简称

巴氏灭菌)的微流化纳米乳剂的平均粒径数据见表 13。

[0305] 表 13 :微流化 DHA 鱼油 / 牛奶 / 生育酚巴氏灭菌纳米乳剂

[0306]

	直径 (nm)	强度 (%)	宽度 (nm)
峰 1	108.3	82.49	28.06
峰 2	45.16	17.51	8.109
峰 3	0	0	0

[0307] Z 平均 :87.18 ;PDI :0.198 ;截距 :0.9281。

[0308] 在 -4℃下,对最初的微流化纳米乳剂进行 24 小时冻融测试。24 小时后,溶液中仍有鱼油,与最初的纳米乳剂相比,粒径保持稳定。见图 12。冻融微流化纳米乳剂的平均粒径数据见表 14。

[0309] 表 14 :微流化 DHA 鱼油 / 牛奶 / 生育酚冻融纳米乳剂

[0310]

	直径 (nm)	强度 (%)	宽度 (nm)
峰 1	99.7	100	39.07
峰 2	0	0	0

[0311] Z 平均 :87.58 ;PDI :0.198。

[0312] 实施例 11 :膳食番茄红素生物利用度的改进

[0313] 本实施例证实,当以均匀微流化纳米乳剂饲喂番茄红素时,相对于混入标准饮食配方的番茄红素,番茄红素的生物利用度得到改进。

[0314] 番茄红素微流化纳米乳剂的分步制备法如下 :

[0315] 1. 加热 5g 大豆油

[0316] 2. 加入 2g 卵磷脂

[0317] 3. 加热并搅拌,10 分钟

[0318] 4. 加入 125mg 番茄红素

[0319] 5. 加热并搅拌,10 分钟

[0320] 6. 加热 240ml 去离子水 (或葡萄汁) ;50℃

[0321] 7. 将加热的水 (或葡萄汁) 加到混合物中

[0322] 8. 搅拌并加热,直到形成溶液

[0323] 9. 用 M-110EH 设备于 25,000PSI 进行一次微流化

[0324] 10. 用 Malvern Nano S 仪器进行粒径分析

[0325] 番茄红素微流化纳米乳剂的平均粒径为 74nm。

[0326] 在沙鼠中的生物利用度

[0327] 将上述微流化纳米乳剂掺入基于颗粒饲料 (chow) 的饮食中,在 4 周内饲喂沙鼠。对照组饲喂番茄红素与富含油的基于颗粒饲料的饮食。4 周结束时,采集两组沙鼠的血液,

得到血浆,经 HPLC 测定血浆番茄红素水平。

[0328] 图 13 表明,对照沙鼠无可检测到的血浆番茄红素水平。然而饲喂包含微流化番茄红素纳米乳剂的沙鼠显示血浆番茄红素水平升高。见图 14。

[0329] 在人体中的生物利用度

[0330] 用葡萄汁代替水来制备微流化番茄红素纳米乳剂,在 4 天时间内,口服给予两个受治疗的人(125mg/份,每天两份)。这种给药提高血浆番茄红素水平大约 38% (数据未显示)。

[0331] 实施例 12 :微流化纳米乳剂的改进功效

[0332] 本实施例提供的数据表明,微流化纳米乳剂改进的功效超过常规纳米乳剂所观察到的功效。具体地讲,本实施例对 3 种植物甾醇制剂降低高胆固醇血症仓鼠血浆低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 水平的能力进行了比较。

[0333] 微流化混合的植物甾醇 (60%谷甾醇) 纳米乳剂的分步制备法如下:

[0334] 1. 加热 5g 大豆油

[0335] 2. 加入 5g 大豆卵磷脂,搅拌并加热 15 分钟

[0336] 3. 重复步骤 2

[0337] 4. 加入 15g 大豆油,搅拌并加热 10 分钟

[0338] 5. 加入 4g 植物甾醇,搅拌并加热 10 分钟

[0339] 6. 重复步骤 4 四次

[0340] 7. 加入 1g 聚山梨酯 80,搅拌并加热 10 分钟

[0341] 8. 加热 200ml MinuteMaid Heartwise® 橙汁 (75°C)

[0342] 9. 加热 1800ml MinuteMaid Heartwise® 橙汁 (70°C)

[0343] 10. 将步骤 8 加到步骤 7 中,搅拌并加热 20 分钟 (80°C)

[0344] 11. 加到步骤 10 中

[0345] 12. 加入 1g 聚山梨酯 80,搅拌并加热 20 分钟 (80°C)

[0346] 13. 均化 2-4 分钟

[0347] 14. 在电热板上搅拌匀浆 10 分钟

[0348] 15. 用 M-110EH 设备于 25,000PSI 进行一次微流化

[0349] 16. 用 Malvern Nano S 仪器进行粒径分析

[0350] 微流化植物甾醇纳米乳剂的平均粒径为 41.95nm。见图 16。

[0351] 将 40 只仓鼠分成 4 组,每组 10 只。第 1 组饲喂对照高胆固醇血饮食 (HCD);第 2 组饲喂结晶植物甾醇,30mg/天;第 3 组饲喂 MinuteMaid Heartwise® 微乳化植物甾醇 (Cargill 公司),20mg/天;第 4 组饲喂微流化植物甾醇纳米乳剂,10mg/天。4 周后,分析血样的血浆 LDL-C 水平。微流化植物甾醇纳米乳剂的功效是 MinuteMaidHeartwise® 微乳饮食的 2 倍,是结晶植物甾醇饮食的 3 倍。见图 17。

[0352] 数据表明,当与微米尺寸植物甾醇饮食或结晶植物甾醇饮食相比时,实施例 11 所述改进的生物利用度导致临床治疗得到改进。

[0353] 实施例 13 :胆固醇纳米乳剂 :不溶性分散介质与可溶性分散介质

[0354] 本实施例提供的数据证实,均匀微流化纳米乳剂组合物取决于化合物在液体分散介质中基本的溶解性。本实施例对美国专利第 5,510,118 号所述微流化技术与本发明所提供的的一个实施方案进行比较。选择可吸收脂质胆固醇为试验化合物。

[0355] I 组是 ‘118 预混合物,通过将胆固醇 (2g)、水 (100ml) 和 Tween[®] 80 (0.2g) 分散来制备,其中胆固醇不溶于 (即至少 30mg/ml 以下) 液体分散介质 (水)。之后,用 M-110EH 设备对这种胆固醇 / 水 / Tween[®] 80 溶液进行微流化。通过微流化器在 4,000-20,000PSI 范围内进行多程 (10-15 程) 微流化,但是因为产热超过 70℃ 时则结束 (比 ‘118 专利推荐的 30-40℃ 高得多)。微流化后,发现大部分的胆固醇沉淀出来。24 小时后, I 组纳米乳剂中仅含有 0.44g 胆固醇 (即占起始胆固醇重量的 22%)。

[0356] II 组是本发明的一个实施方案,通过将胆固醇 (2g) 分散于加热的大豆油 (10g)、大豆卵磷脂 (5g) 和 Tween[®] 80 (0.2g) 来制备,其中,胆固醇基本溶于 (即至少 30mg/ml 以上) 分散介质 (油)。之后,将这种胆固醇 / 油 / 卵磷脂 / Tween[®] 80 加到 100ml 热水中,用 M-110EH 设备,采用 30 秒钟单程,在 25,000PSI 下进行微流化。微流化后,胆固醇的沉淀不十分明显。24 小时后, II 组纳米乳剂含有 1.66g 胆固醇 (即占起始胆固醇重量的 83%)。

[0357] 数据显示, I 组和 II 组预混合物制品的粒径分布几乎相同。分别见图 18A 和图 18B。具体地讲,对于这两种制品,都观察到 700-1000nm 单峰范围内的平均粒径约 900nm。见表 15 和表 16。

[0358] 表 15 :胆固醇 / Tween[®] 80 / 水预混合物粒径 : I 组

[0359]

	直径 (nm)	强度 (%)	宽度 (nm)
峰 1	942.5	100	38.9

[0360] Z 平均 :1982 ;PDI :0.210 ;截距 :0.6797。

[0361] 表 16 :胆固醇 / 油 / 卵磷脂 / Tween[®] 80 / 水预混合物粒径 : II 组

[0362]

	直径 (nm)	强度 (%)	宽度 (nm)
峰 1	897.9	100	64.8

[0363] Z 平均 :1328 ;PDI :0.427 ;截距 :0.6989。

[0364] 然而,在微流化后, I 组和 II 组之间粒径分布的差异非常大。分别见图 19A 和图 19B。I 组显示两个非常不同和独特的峰。见表 17。然而, II 组则显示是一个均匀微流化纳米乳剂实施方案的单峰。见表 18。

[0365] 表 17 :微流化胆固醇 / Tween[®] 80 / 水纳米乳剂

[0366]

	直径 (nm)	强度 (%)	宽度 (nm)
峰 1	578.2	67.6	120.8
峰 2	96.7	32.3	14.9

[0367] Z 平均 :246.5 ;PDI :0.789 ;截距 :0.7687。

[0368] 表 18 :微流化胆固醇 / 油 / 卵磷脂 /Tween[®] 80/ 水纳米乳剂

[0369]

	直径 (nm)	强度 (%)	宽度 (nm)
峰 1	101.3	100	25.1

[0370] Z 平均 :86.8 ;PDI :0.240 ;截距 :0.9455。

[0371] 以上数据表明,本发明一些实施方案提供生产均匀微流化纳米乳剂的优于本领域方法的改进方法。具体地讲,目前清楚的是 Bosch 等人 (‘118 专利) 和 Cooper 等人多项专利 (申请公布号 ‘758、‘038 和 ‘202) 没有提供产生均匀粒径分布的微流化工艺。

[0372] 实施例 14 :纳米颗粒组合物与均匀微流化纳米乳剂

[0373] 本实施例介绍了表明碾磨的纳米颗粒组合物 (例如按 Cooper 等的美国专利申请公布号 2004/0033202 制备的纳米颗粒组合物) 不像本发明的一个实施方案所提供的均匀微流化纳米乳剂一样产生均匀粒径分布。选择可吸收植物甾醇为试验化合物。

[0374] I 组表示通过将 5% (重量 / 重量) 植物甾醇 / 水溶液与 1% (重量 / 重量) Tween[®] 80 分散制备成 ‘202 预混合物,其中植物甾醇不溶于 (即至少 30mg/ml 以下) 液体分散介质 (水)。之后在 10℃ 下,植物甾醇 / 水 / Tween[®] 80 溶液用 DYN0-Mill KDL (Willy A Bachofen AG, Machinefabrik, Basel, Switzerland) 碾磨 1.5-2 小时,采用 500 μm Polymill[®] 500 型的碾磨介质 (即研磨珠)。碾磨后,观察到大部分的植物甾醇沉淀出来。至少 24 小时后, I 组纳米颗粒制品含有起始植物甾醇重量的 1/2 以下。

[0375] II 组是本发明的一个实施方案,通过将 5% (重量 / 重量) 植物甾醇 / 加热的大豆油溶液、大豆卵磷脂与 1% (重量 / 重量) Tween[®] 80 分散来制备,其中植物甾醇基本溶于 (即至少 30mg/ml 以上) 液体分散介质 (油)。之后,将植物甾醇 / 油 / 卵磷脂 / Tween[®] 80 预混合物加到 100ml 热水中,用 M-100EH 设备,采用 30 秒钟单程,在 25,000PSI 下进行微流化。微流化后,植物甾醇的沉淀不十分明显。24 小时后, II 组纳米乳剂含有起始植物甾醇重量的 3/4 以上。

[0376] 数据显示, I 组和 II 组预混合物制品的粒径分布几乎相同。例如,对于这两个制品,都观察到 700-1000nm 单峰范围内的平均粒径约 900nm。见表 19 和表 20。

[0377] 表 19 :植物甾醇 / Tween[®] 80/ 水预混合物粒径 :I 组

[0378]

	直径 (nm)	强度 (%)	宽度 (nm)
峰 1	942.5	100	38.9

[0379] Z 平均 :1982 ;PDI :0.210 ;截距 :0.6797。

[0380] 表 20 :植物甾醇 / 油 / 卵磷脂 /Tween[®] 80/ 水预混合物粒径 :II 组

[0381]

	直径 (nm)	强度 (%)	宽度 (nm)
峰 1	897.9	100	64.8

[0382] Z 平均 :1328 ;PDI :0.427 ;截距 :0.6989。

[0383] 然而在加工后,预期 I 组和 II 组之间粒径分布的差异非常大。例如, I 组最可能显示至少 2 个非常不同和独特的峰。见表 21。然而, II 组则仅具有是一个均匀微流化纳米乳剂实施方案的单峰。见表 22。

[0384] 表 21 :微流化胆固醇 /Tween[®] 80/ 水纳米乳剂 :I 组

[0385]

	直径 (nm)	强度 (%)	宽度 (nm)
峰 1	578.2	67.6	120.8
峰 2	96.7	32.3	14.9

[0386] Z 平均 :246.5 ;PDI :0.789 ;截距 :0.7687。

[0387] 表 22 :微流化胆固醇 / 油 / 卵磷脂 /Tween[®] 80/ 水纳米乳剂 :II 组

[0388]

	直径 (nm)	强度 (%)	宽度 (nm)
峰 1	101.3	100	25.1

[0389] Z 平均 :86.8 ;PDI :0.240 ;截距 :0.9455。

[0390] 以上数据表明,该纳米颗粒组合物不能像本文提供的纳米乳剂的一些实施方案一样产生均匀的粒径分布。具体地讲,目前清楚的是 Cooper 等人的多项专利(申请公布号‘758、‘038 和 ‘202) 没有提供产生均匀粒径分布的碾磨工艺。

[0391] 实施例 15 :优于常规纳米颗粒组合物的改进的生物利用度

[0392] 本实施例将提供的数据显示,本发明提供的一个实施方案的均匀微流化纳米乳剂对比常规纳米颗粒组合物,具有改进的植物甾醇生物利用度和 / 或功效。

[0393] 通过用经口管饲法饲喂 30 只仓鼠 $1 \mu\text{Ci } ^3\text{H-}$ 胆固醇,绘制标准曲线。然后测定第 1 天、第 2 天、第 4 天和第 7 天的血浆胆固醇水平。这些数据用来计算 7 天时间内 $^3\text{H-}$ 胆固醇的生物利用度,用曲线下面积 (AUC) 表示。

[0394] 在血浆放射性水平回复到背景水平(即约 7.5 天胆固醇代谢半衰期)后,用下列

治疗组重复实验 (n = 10)。

[0395] I 组 :标准饮食与植物甾醇相混合。

[0396] II 组 :标准饮食与按实施例 1 制备的均匀微流化植物甾醇纳米乳剂相混合。

[0397] III 组 :标准饮食与按 Cooper 等人 ‘202 申请中所述常规研磨机技术制备的常规番茄红素纳米颗粒组合物相混合。

[0398] AUC 的测量值可确定每个制品降低 ^3H -胆固醇吸收进入血流的能力,它与每个制品的生物利用度和 / 或功效成比例。

[0399] 当以均匀微流化纳米乳剂给予时,可观察到植物甾醇的生物利用度和 / 或功效较高,因为 :i) 均匀微流化纳米乳剂的平均粒径比常规纳米颗粒组合物的小 (即 :例如 300nm 与 50nm) ;ii) 微流化产生比研磨或均化稳定的颗粒 ;和 iii) 不像研磨或均化所产生的颗粒,微流化产生抗 pH 颗粒 (即抗胃酸条件或小肠碱性条件)。

[0400] 实施例 16 :超过常规纳米颗粒组合物的改进功效

[0401] 本实施例提供的数据显示,本发明的一个实施方案提供的均匀微流化纳米乳剂在降低血浆胆固醇水平方面比起常规纳米颗粒组合物,具有改进的功效。

[0402] 这项研究历时 6 周。简单地讲,为了提高和稳定血浆胆固醇水平,在试验前 2 周,饲喂 70 只仓鼠液体型高胆固醇血饮食。随后,将仓鼠分成下述 7 个试验组 (n = 10)。每组维持液体型高胆固醇血饮食,并且另饲喂以下成分 4 周 :i) 纳米颗粒组合物 (即 :例如按 Cooper 等人的 ‘202 申请制备) ;ii) 本发明的一个实施方案提供的均匀微流化纳米乳剂。

[0403] I 组 :仅高胆固醇血饮食

[0404] II 组 :高胆固醇血饮食 +0.1% (重量 / 重量) 植物甾醇纳米颗粒组合物

[0405] III 组 :高胆固醇血饮食 +0.5% (重量 / 重量) 植物甾醇纳米颗粒组合物

[0406] IV 组 :高胆固醇血饮食 +1% (重量 / 重量) 植物甾醇纳米颗粒组合物

[0407] V 组 :高胆固醇血饮食 +0.1% (重量 / 重量) 植物甾醇均匀微流化纳米乳剂

[0408] VI 组 :高胆固醇血饮食 +0.5% (重量 / 重量) 植物甾醇均匀微流化纳米乳剂

[0409] VII 组 :高胆固醇血饮食 +1% (重量 / 重量) 植物甾醇均匀微流化纳米乳剂

[0410] 在第 0、2、3、4、5 和 6 周时采集血样,其中血浆胆固醇水平用本领域已知方法测定。

[0411] 观察到植物甾醇均匀微流化纳米乳剂降低血浆胆固醇水平的较高功效,因为 :i) 植物甾醇均匀微流化纳米乳剂的平均粒径比常规纳米颗粒组合物的小 (即 :例如 300nm 与 50nm) ;ii) 微流化产生比研磨或均化稳定的颗粒 ;和 iii) 不像研磨或均化所产生的颗粒,微流化产生抗 pH 颗粒 (即抗胃酸条件或小肠碱性条件)。

[0412] 实施例 17 :微流化单程比较

[0413] 本实施例提供的数据显示,在相同微流化技术下,当与本发明的一个实施方案相比时,Bosch 技术不产生均匀微流化纳米乳剂。

[0414] 按实施例 13 制备 I 组和 II 组预混合物。每个预混合物于 25,000PSI 下通过微流化器一次。I 组 (代表 Bosch 制剂) 显示,85% 颗粒的平均直径为 815nm。见图 20A。II 组 (代表本发明的一个实施方案) 显示,98% 颗粒的平均直径为 78nm。见图 20B。这表示平均直径相差 10 倍以上。重要的是,仅 15% 的 Bosch 颗粒在 100nm 的范围内,因此表明在这个较窄范围内,粒径分布相差 6 倍。

[0415] I 组与 II 组之间的平均粒径分布见下表 23 和下表 24。

[0416] 表 23 :微流化胆固醇 /Tween[®] 80/ 水纳米乳剂 :单程

[0417]

	直径 (nm)	强度 (%)	宽度 (nm)
峰 1	815.3	84.5	117.7
峰 2	101.8	15.54	10.54

[0418] Z 平均 :651.5 ;PDI :84.5 ;截距 :0.7487。

[0419] 表 24 :微流化胆固醇 / 油 / 卵磷脂 /Tween[®] 80/ 水纳米乳剂 :单程

[0420]

	直径 (nm)	强度 (%)	宽度 (nm)
峰 1	78.43	97.47	31.43
峰 2	19.63	2.535	2.928

[0421] Z 平均 :65.98 ;PDI :0.190 ;截距 :0.9210。

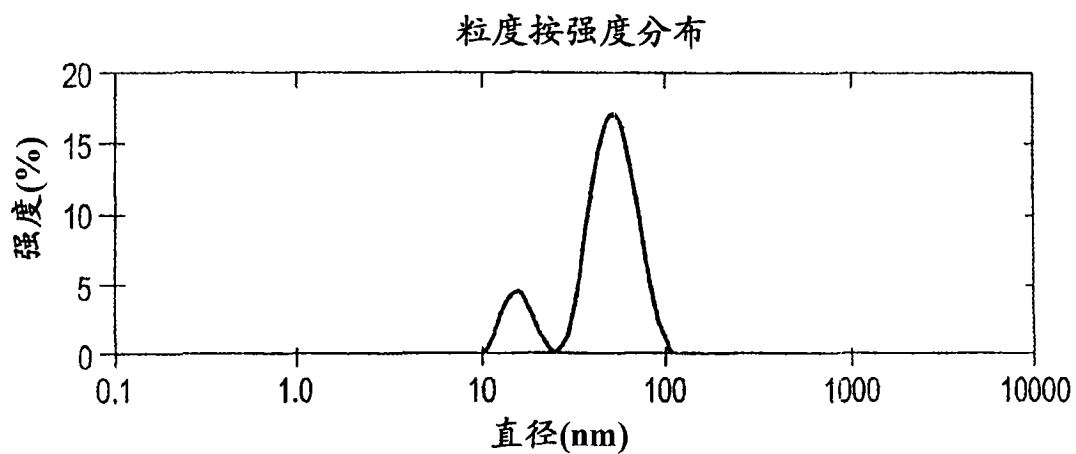


图 1

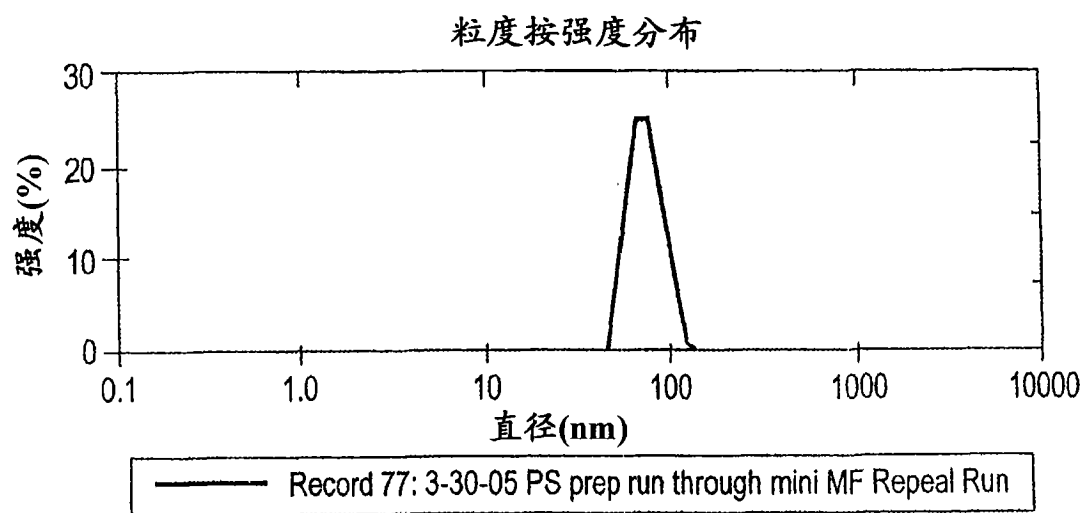


图 1A

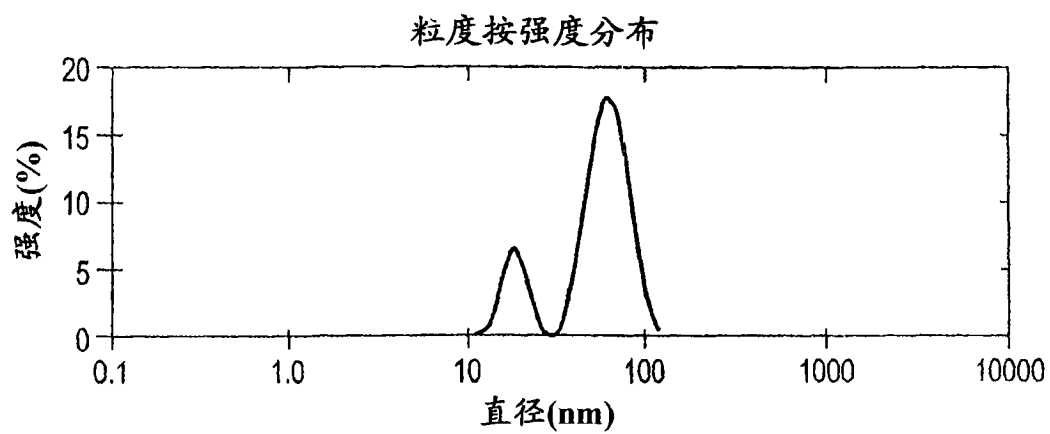


图 2

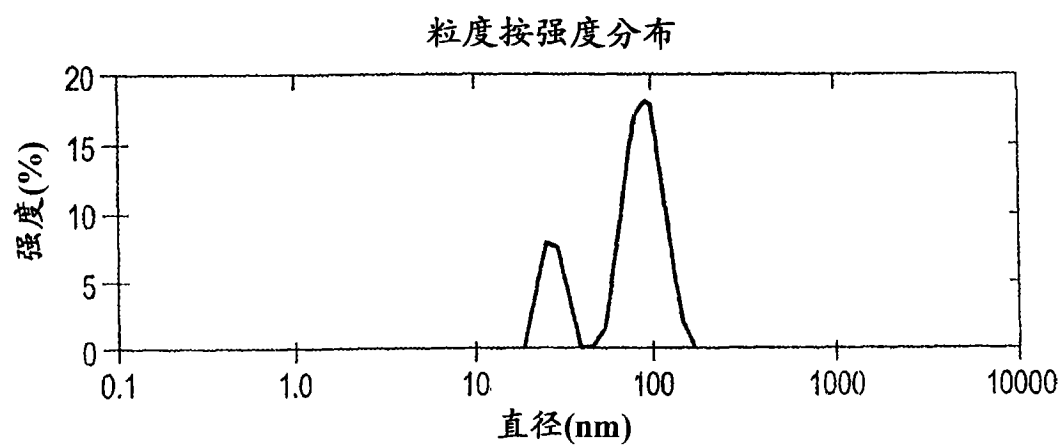


图 3

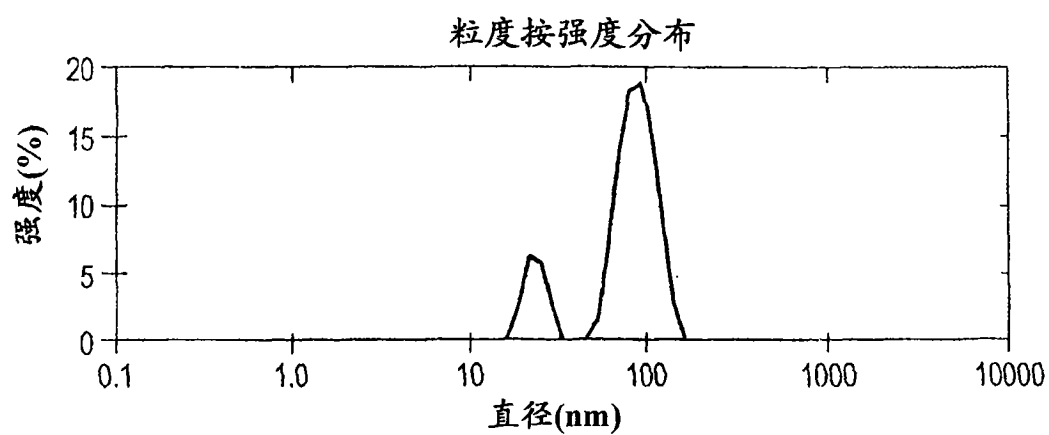


图 4

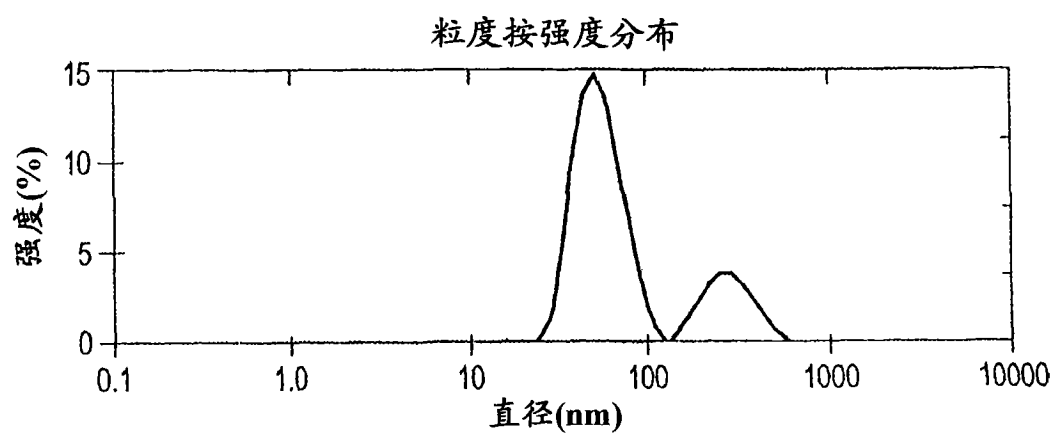


图 5

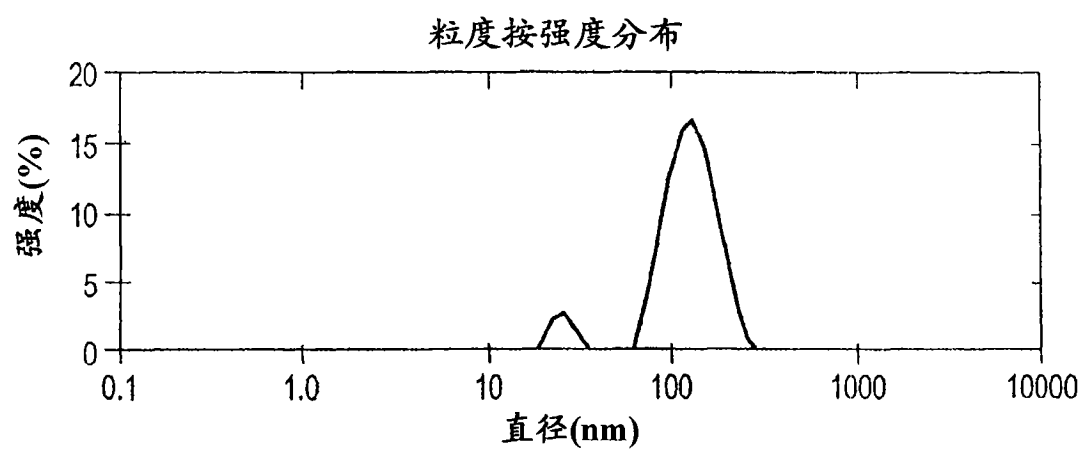


图 6

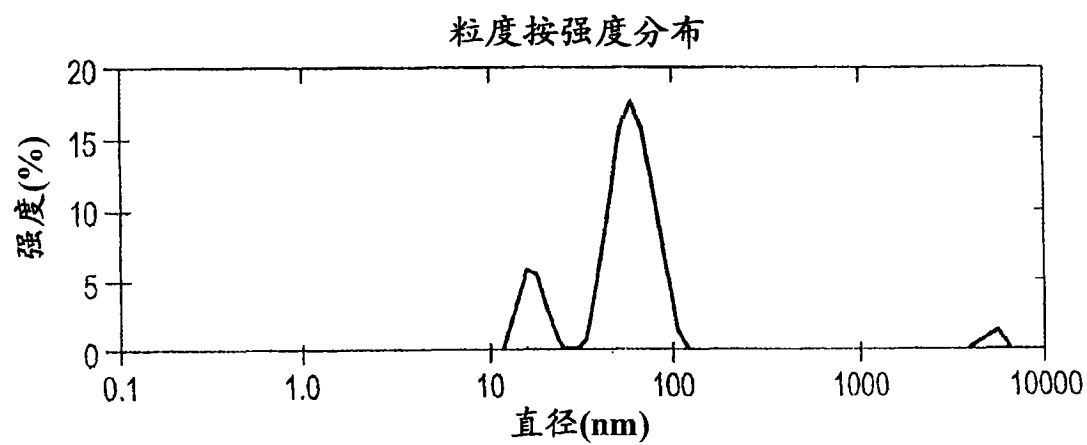


图 7

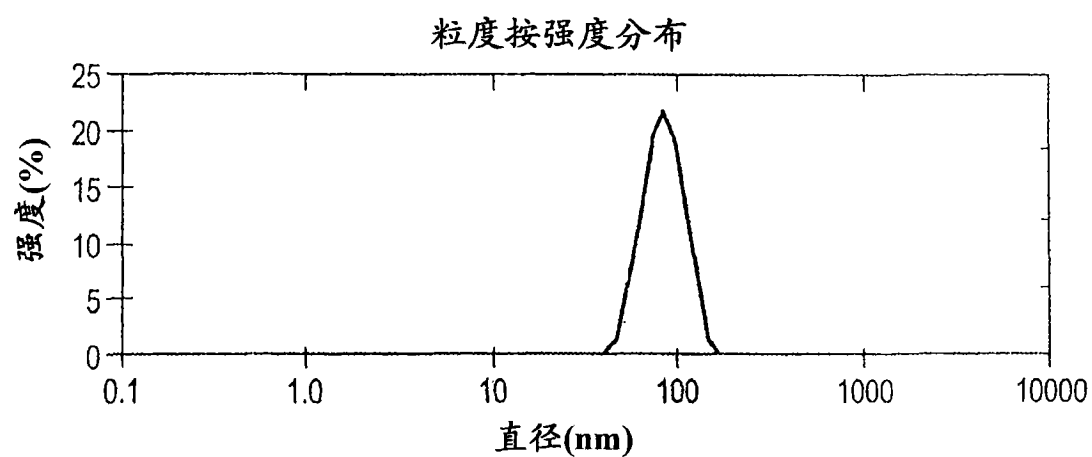


图 8

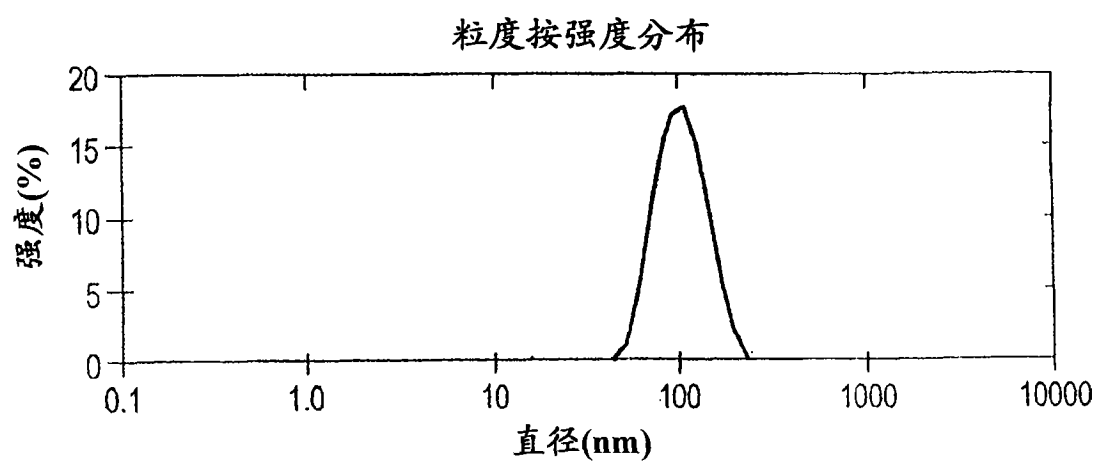


图 9

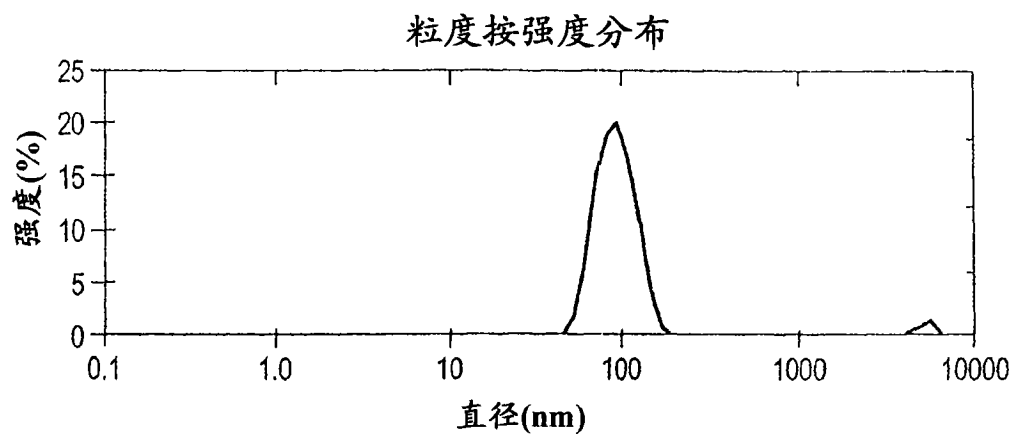
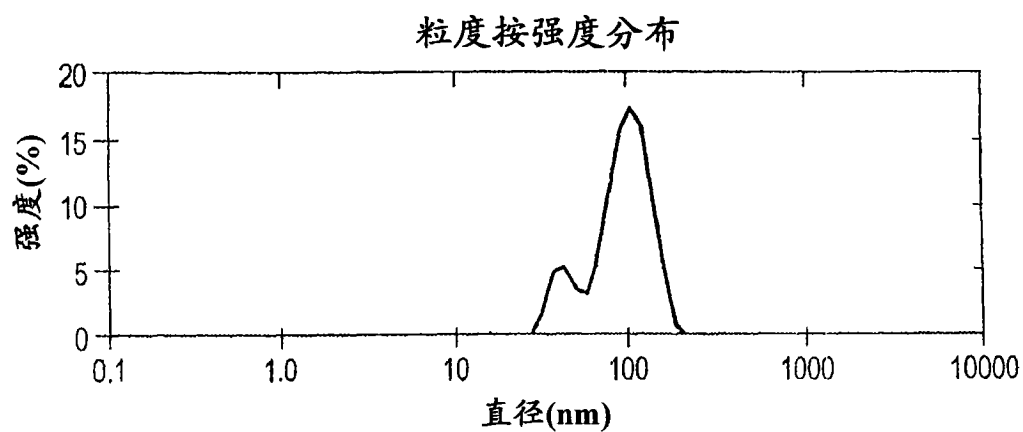
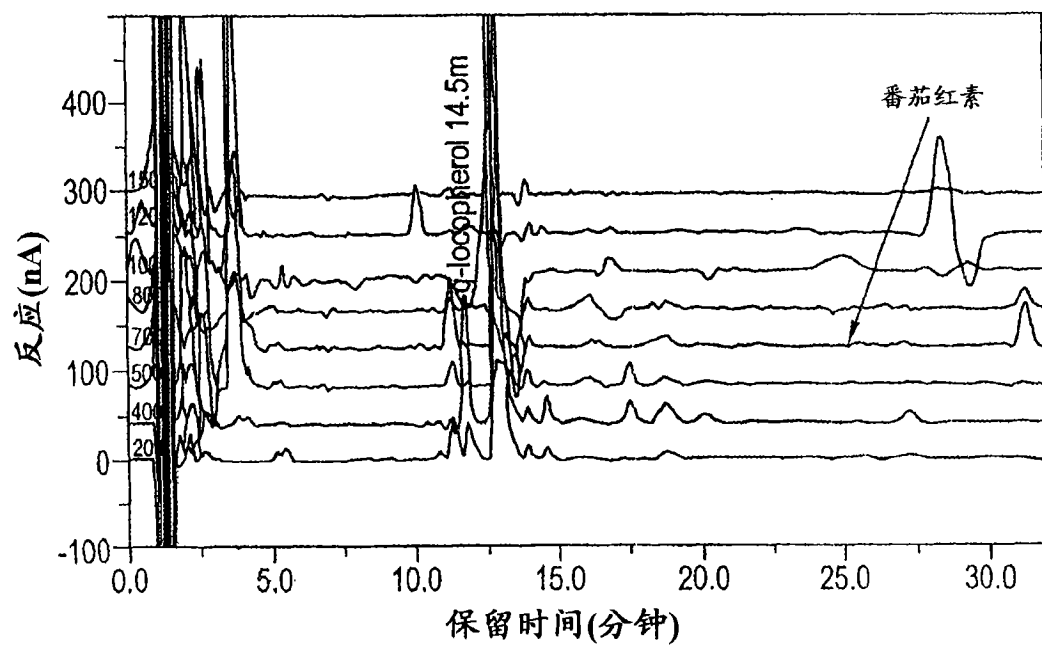
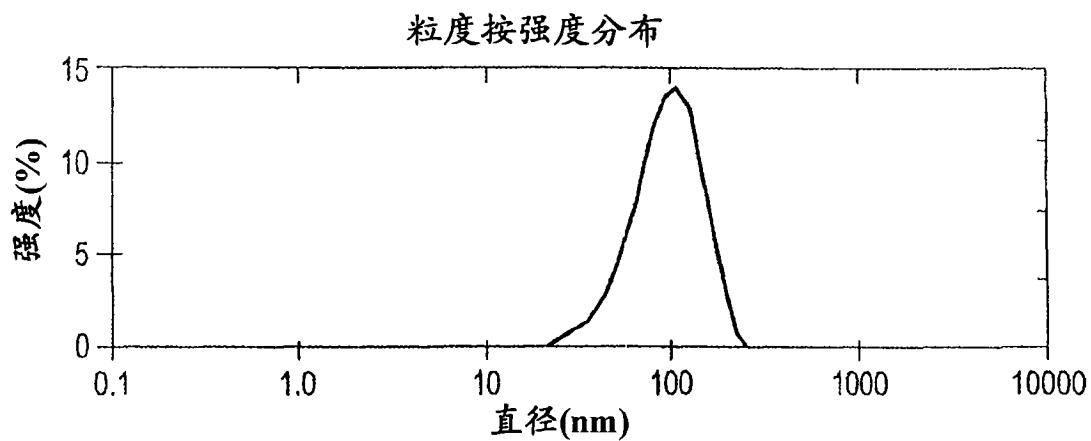


图 10



—— 记录 178: 6-07-05 制备 5 维生素 C 1000mg,
维生素 E 800mg 和 1.7g DHA 油, 加热到 75℃30 秒

图 11



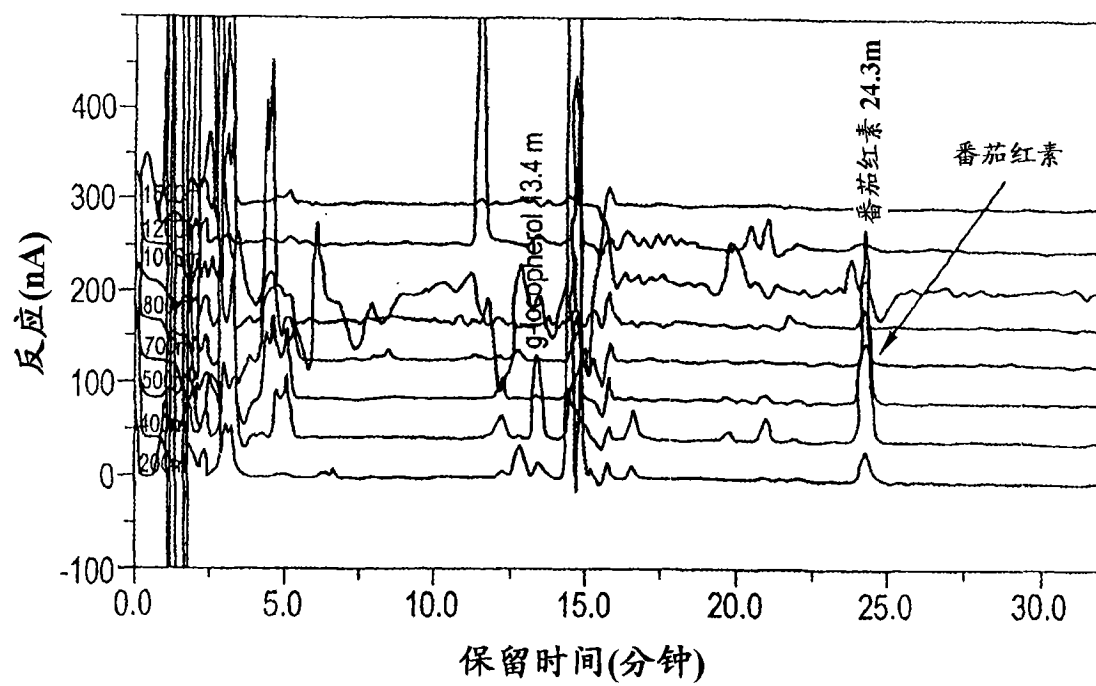
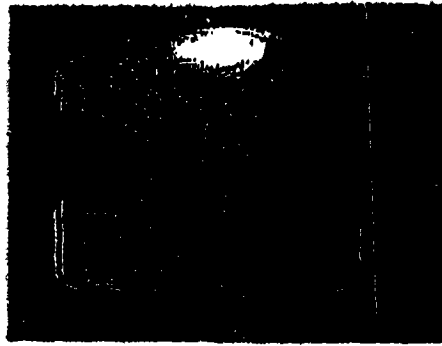
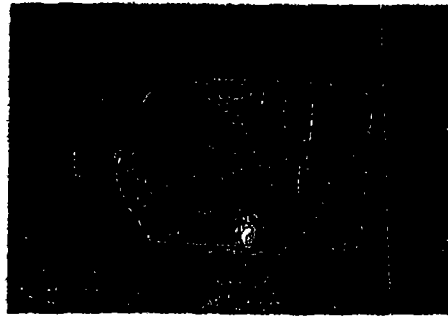


图 14

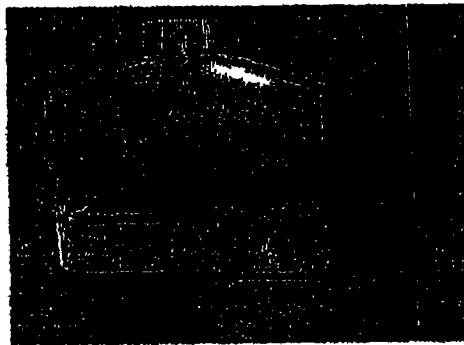
A



B



C



D

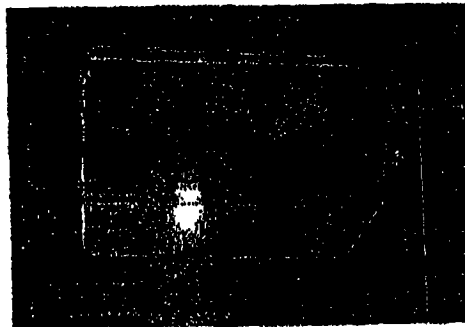


图 15

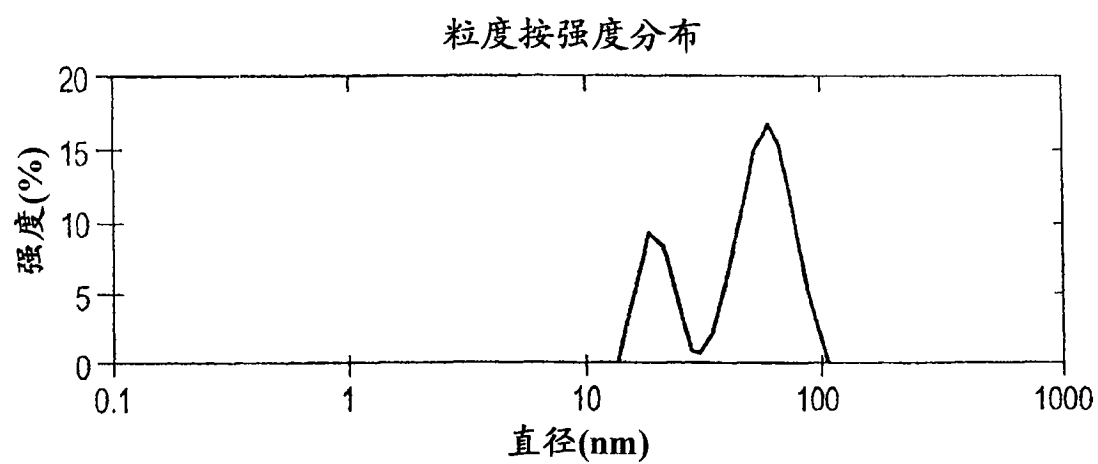


图 16

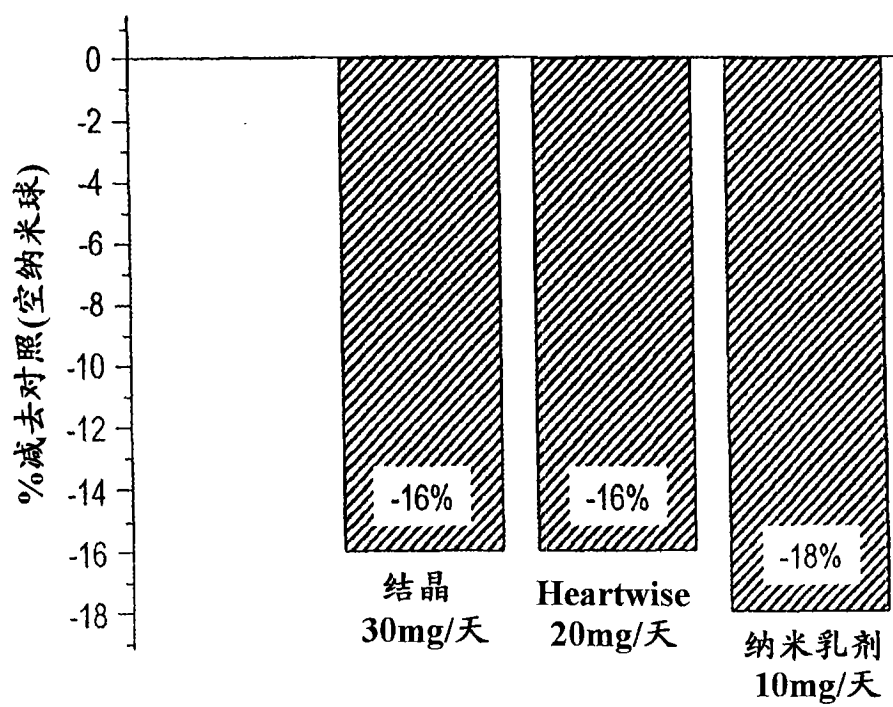


图 17

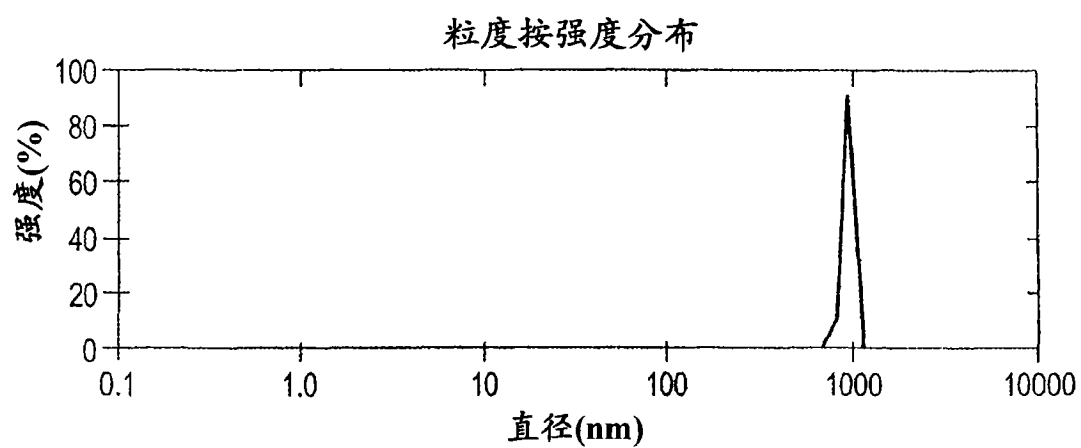


图 18A

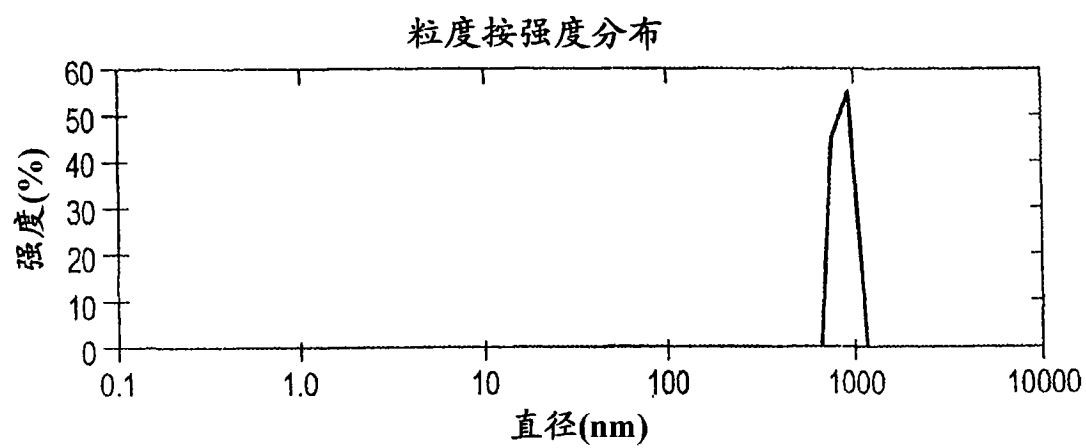


图 18B

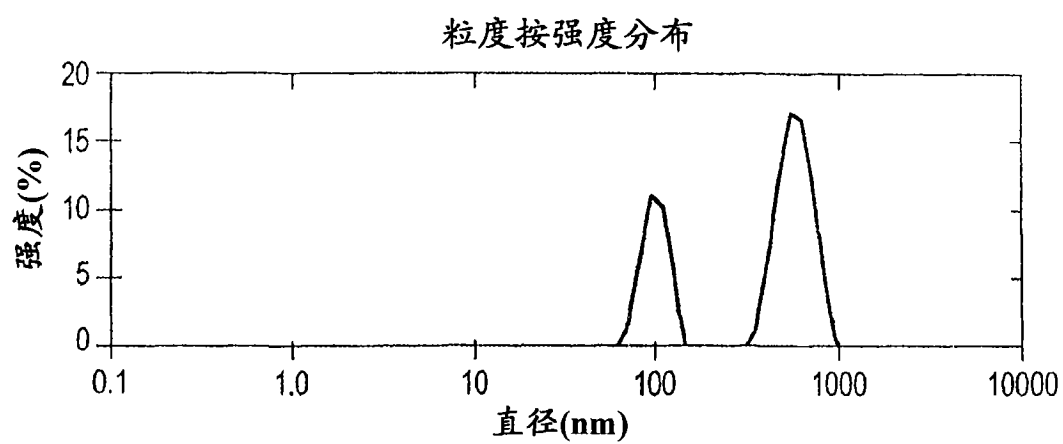


图 19A

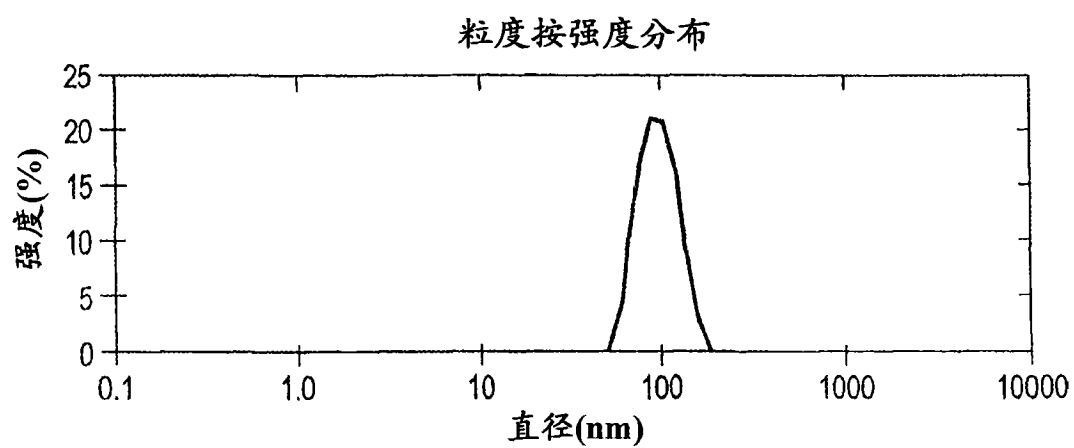


图 19B

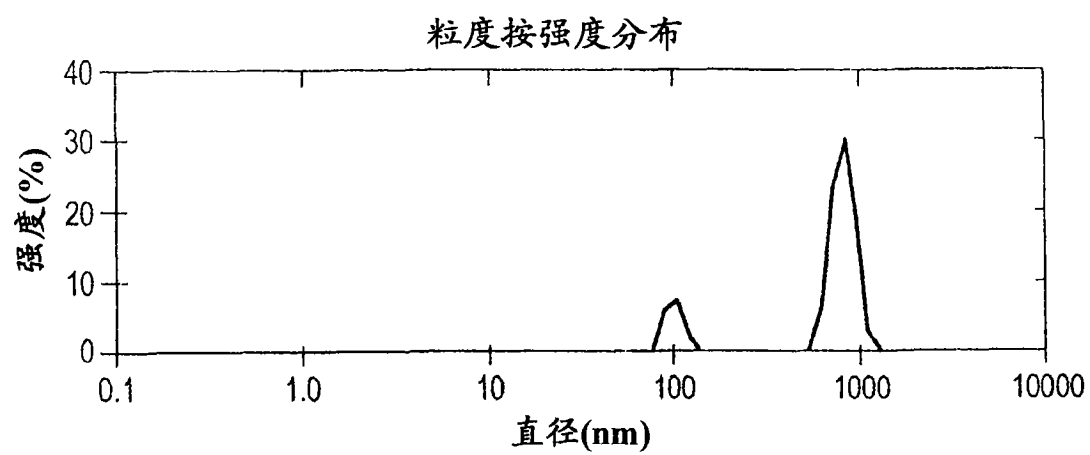


图 20A

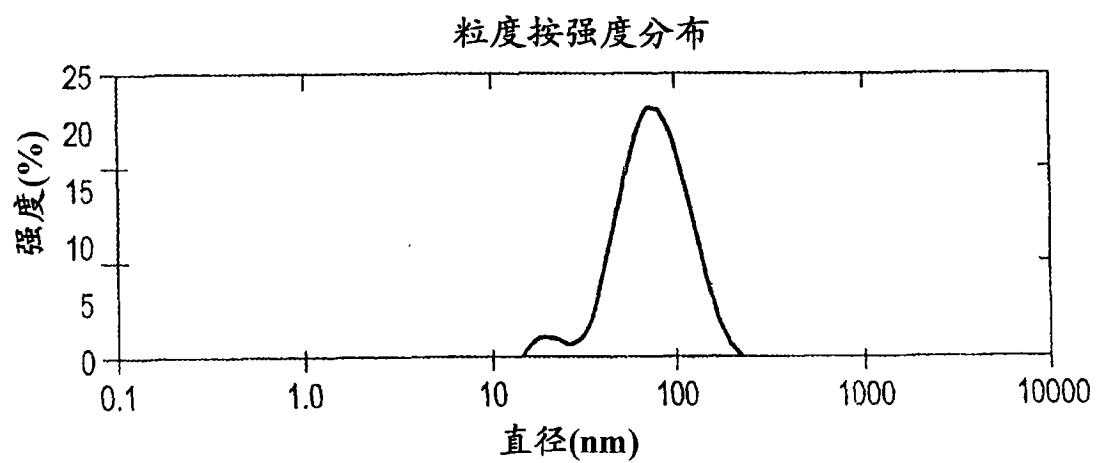


图 20B