



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106102714 B

(45)授权公告日 2020.02.14

(21)申请号 201480072911.3

A61K 31/00(2006.01)

(22)申请日 2014.11.19

(56)对比文件

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 106102714 A

WO 2012066334 A1,2012.05.24,  
WO 2012094541 A2,2012.07.12,  
US 2009041833 A1,2009.02.12,  
US 2011064810 A1,2011.03.17,

(43)申请公布日 2016.11.09

Hui Lv等.Facile Fabrication of  
Monodisperse Polymer Hollow Spheres.

(30)优先权数据

1320413.6 2013.11.19 GB

《Langmuir》.2008,第24卷(第23期),第13736-  
13741页.

(85)PCT国际申请进入国家阶段日  
2016.07.11

James J. Kwan等.Inertial cavitation  
at the nanoscale.《Journal of the  
Acoustical Society of America》.2013,第133  
卷(第5期),第3315页.

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/GB2014/053416 2014.11.19

Jian Ye等.Fabrication,

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/075442 EN 2015.05.28

Characterization, and Optical Properties  
of Gold Nanobowl Submonolayer Structures.  
《Langmuir》.2009,第25卷(第1期),第1822-1827  
页.

(73)专利权人 奥克斯声能有限公司  
地址 英国牛津郡

Sarah J. Wagstaffe等.Sonosensitive  
Nanoparticles for Controlled Instigation  
of Cavitation and Drug Delivery by  
Ultrasound.《American Institute of  
Physics》.2012,第426-431页.

(72)发明人 詹姆斯·关 雷切尔·迈尔斯  
康斯坦丁-卡西奥斯·科西奥斯  
阿普尔瓦·沙

(74)专利代理机构 广州华进联合专利商标代理  
有限公司 44224

代理人 刘培培

审查员 屈小又

(51)Int.Cl.

A61K 9/00(2006.01)

A61K 51/00(2006.01)

权利要求书2页 说明书13页 附图9页

(54)发明名称

空化诱导的聚合物纳米颗粒

(57)摘要

在此公开的本发明涉及一种纳米颗粒,包  
括:具有腔的杯;和存在于所述腔中的气泡,其中  
所述气泡由所述杯部分包封。所述纳米杯的典型  
用途包括在同时暴露在超声下时引发惯性空化,  
和/或作为药物载体以响应超声激发而实现靶向  
给药。

CN 106102714 B

1. 一种药物组合物, 包含: 多个纳米颗粒, 和作为液体介质的药学可接受载体或稀释剂, 其中每个纳米颗粒包括:

具有腔的杯; 和

存在于所述腔中的气泡,

其中所述杯的尺寸为至少60nm且至多1000nm, 所述气泡由所述杯部分包封, 并且其中所述纳米颗粒包括具有单一腔的单一纳米杯。

2. 根据权利要求1所述的药物组合物, 其特征在于, 所述杯基本为部分球形。

3. 根据权利要求2所述的药物组合物, 其特征在于, 所述杯基本为半球形。

4. 根据前述任一项权利要求所述的药物组合物, 其特征在于, 所述杯具有基本均匀的壁厚度。

5. 根据权利要求4所述的药物组合物, 其特征在于, 所述杯的壁厚度为10-100nm。

6. 根据权利要求5所述的药物组合物, 其特征在于, 所述杯的壁厚度为30-70nm。

7. 根据权利要求1-3任一项所述的药物组合物, 其特征在于, 所述腔基本为部分球形。

8. 根据权利要求1-3任一项所述的药物组合物, 其特征在于, 所述腔的开口为50-900nm。

9. 根据权利要求8所述的药物组合物, 其特征在于, 所述腔的所述开口为50-400nm。

10. 根据权利要求9所述的药物组合物, 其特征在于, 所述杯的尺寸为60-500nm。

11. 根据权利要求1所述的药物组合物, 其特征在于, 所述杯和所述腔都基本为部分球形, 所述杯具有10-100nm的基本均匀的壁厚度, 且所述腔的开口的直径为50-900nm。

12. 根据权利要求11所述的药物组合物, 其特征在于, 所述腔的开口尺寸为50-400nm。

13. 根据权利要求1所述的药物组合物, 其特征在于, 所述杯包括聚合物。

14. 根据权利要求13所述的药物组合物, 其特征在于, 所述聚合物由两种或以上不同单体单位制成, 一种所述单体单位主要存在于所述杯的内表面, 另一种所述单体单位主要存在于所述杯的外表面。

15. 根据权利要求13或14所述的药物组合物, 其特征在于, 所述聚合物是甲基丙烯酸甲酯(MMA)和甲基丙烯酸2-羟乙酯(HEMA)的共聚物。

16. 根据权利要求13或14所述的药物组合物, 其特征在于, 所述聚合物是交联聚合物。

17. 根据权利要求15所述的药物组合物, 其特征在于, 所述聚合物可通过在自由基聚合反应中使用二乙烯基苯作为交联剂来获得。

18. 根据权利要求1所述的药物组合物, 其特征在于, 所述纳米颗粒包括一种或多种释放剂。

19. 根据权利要求18所述的药物组合物, 其特征在于, 所述杯内、所述杯的外表面上和/或所述杯的腔中存在释放剂。

20. 根据权利要求19所述的药物组合物, 其特征在于, 所述纳米颗粒在所述杯的所述腔中包括第一释放剂, 且在所述杯的外表面上包括第二释放剂。

21. 根据权利要求18-20中任一项所述的药物组合物, 其特征在于, 所述释放剂或所述每一种释放剂为药物。

22. 根据权利要求1-3任一项所述的药物组合物, 其特征在于, 所述药物组合物包括多分散指数不超过0.2的纳米颗粒。

23. 用于生产根据权利要求1-22中任一项所述的药物组合物的方法,包括:  
提供种子颗粒;  
部分涂覆所述种子颗粒,以提供具有腔的杯,其中所述杯的尺寸为至少60nm且至多1000nm;  
干燥所述杯;  
向所述杯提供气体,以在所述腔中产生气泡;和  
在液体介质中重悬浮所述纳米颗粒。
24. 根据权利要求23所述的方法,其特征在于,通过在空气中干燥所述杯来完成干燥所述杯和向所述杯提供气体的步骤。
25. 根据权利要求23或24所述的方法,其特征在于,所述种子颗粒通过在所述种子颗粒的存在下进行乳液聚合反应来涂覆,所述聚合反应使用一种或多种单体和/或预聚物及可选地使用交联剂来进行。
26. 根据权利要求25所述的方法,其特征在于,所述交联剂是二乙烯基苯。
27. 根据权利要求26所述的方法,其特征在于,所述聚合反应是自由基聚合反应。
28. 根据权利要求23或24所述的方法,其特征在于,所述种子颗粒的直径为100-600nm。
29. 根据权利要求23或24所述的方法,其特征在于,所述纳米颗粒包括一种或多种释放剂,且所述方法还包括:(a) 提供释放剂作为所述种子颗粒的涂层;和/或(b) 在聚合反应期间提供释放剂;和/或(c) 在所述杯的外表面上提供释放剂。
30. 根据权利要求29所述的方法,其特征在于,提供两种或多种不同释放剂。
31. 如权利要求1-22中任一项所述的药物组合物在制备用于治疗或诊断人或动物对象的药物中的应用。
32. 根据权利要求31所述的应用,其特征在于,所述药物是治疗肿瘤的药物。

## 空化诱导的聚合物纳米颗粒

### 技术领域

[0001] 本申请公开的发明涉及生物医学声学,尤其是惯性空化的纳米级引发剂及其在治疗和诊断方法中的用途。

### 背景技术

[0002] 已知的空化剂数量有限,包括封装在液体、蛋白质或聚合物涂层中的微米级气体(微泡)。微泡在外加声波(例如超声波)的负压循环期间扩张。若负压幅度对特定泡尺寸足够大,则泡在负压循环期间经历不稳定生长,随后在波的正压循环期间溃灭。在周围液体的惯性作用下几乎瞬间溃灭,产生机械冲击波,典型地关联有宽频声发射。该惯性空化过程已证实可用于各种生物医学和非生物医学应用。生物医学应用包括组织摧毁术、热切除、给药的靶定和增强、声溶栓和诊断超声成像。非生物医学应用包括声化学、声聚变、水疗和使用超声表征材料性质,例如如WO 2011/036475中的公开内容。

[0003] 在纯液体中实现惯性空化,需要能够克服液体抗张强度的极大压力振幅,典型地在GPa的数量级。将已有的空泡空间引入液体,将显著降低引发惯性空化所需的压力振幅(又称惯性空化阈值)。该阈值取决于超声激发频率、泡尺寸和周围液体性质(R. E. Apfel and C. K. Holland, "GAUGING THE LIKELIHOOD OF CAVITATION FROM SHORT-PULSE, LOW-DUTY CYCLE DIAGNOSTIC ULTRASOUND," *Ultrasound in Medicine and Biology*, vol. 17, pp. 179-185, 1991): 这意味着,在指定激发频率的指定液体中,空腔尺寸是惯性空化阈值的最重要的决定因素。

[0004] 自由气泡通常不用做空化核剂(cavitation nucleation agents),因其迅速消融。因此,表面活性稳定剂常用于提高泡寿命。因此,此前曾有数种试剂被提议用作可能的空化核,可以人为引入到介质中,以降低惯性空化阈值。最常用的试剂是以表面活性剂(例如脂类或蛋白质鞘)稳定化的微泡,通常是封装一种在周围介质中具有低溶解度的气体。能够在表面缝隙中截留或内含气体的固体颗粒也有记载用作潜在的空化核剂。

[0005] 微泡和固体颗粒通常均为数个微米尺寸。但是,许多应用中,要求微米级以下空化核或不具有显著浮性或沉积特性的核。例如,在液体中达到均匀空化,将需要可以长时间保持悬浮的试剂,而这在浮性微泡或下沉微粒中均不可能。在生物医学领域中,例如,血管通常直径不小于8微米,但管壁衬里的内皮细胞之间的紧密连接,在健康组织中小于100nm,在患病或癌症组织中为100-800nm。因此,微泡局限于血管,而不能渗出到血管周空间和随后的组织层。这在治疗应用尤其受限,例如在寻求治疗远离血管的组织的给药中。

[0006] 因此,提出了微米级空化剂来解决所述限制,包括纳米液滴(US20100178305, US20110177005)、聚合纳米气泡(WO 2013 055791)和捕捉表面纳米气泡的叠层珠结构,如见WO 2012/066334和Kwan et al., *Proceedings of Meetings on Acoustics*, vol. 19, 075031 (2013中的公开)。

[0007] 虽然可能控制所述已知纳米级空化剂的整体尺寸,所述试剂中所含的气穴尺寸可能因各种原因而难以预测和控制。纳米液滴设计为在环境压力降低(例如因超声波引起)时

汽化。由此一来,其实质为蒸汽泡,比气泡更难以溃灭。其还倾向于在注入后凝聚,由此非常易受温度波动影响,这意味着空化核的本质和尺寸既不可知,也不可控。聚合纳米气泡用完全包围纳米气泡的刚性薄壳来稳定化,惯性空化必须在其破裂之后才能发生,使得惯性空化阈值上升。叠层固体纳米颗粒难以可靠生产,而且虽然其整体颗粒尺寸可以调整,其气穴尺寸无法直接控制。

[0008] 因此,需要提供一种能够容易生产的纳米级空化引发剂,其中气穴尺寸能够根据需求改变并严格控制,得到显著降低的惯性空化阈值。

## 发明内容

[0009] 本发明提供了一种声学可调的纳米颗粒。该纳米颗粒包括部分包封在杯状环境中的气泡。该纳米颗粒能够通过稳定纳米级气泡,同时仍作为空化过程的一部分允许其扩张,从而使惯性空化阈值降低到临床相关水平,这些特征是简单将现有微气泡技术缩小到纳米级所不能达到的。此外,杯腔尺寸及由此纳米气泡尺寸可以得到准确控制,以产生调整为对唯一声学设定发生响应的纳米级空化引发剂。

[0010] 因此,本发明提供了一种纳米颗粒,包括:

[0011] 具有腔的杯;和

[0012] 存在于所述腔中的气泡,

[0013] 其中所述气泡由所述杯部分包封。

[0014] 典型地,所述纳米颗粒包括单一杯和相应地单一气泡。因此,该纳米颗粒典型地是单个纳米杯,而不是纳米杯阵列,或多个纳米杯的附聚物。具有单一杯的纳米颗粒提供了对腔尺寸的更高控制程度,且相应地提供了对实现的空化效果的更高控制程度。因此,在超声诱导空化时,单杯纳米颗粒提供的响应可预测度更高。在一个实施例中,该纳米颗粒是具有腔的杯的形式的纳米颗粒,其中腔内存在气泡,所述气泡被所述杯部分包封。

[0015] 本发明还提供了用于生产所述杯状纳米颗粒的方法,包括:

[0016] 提供种子颗粒;

[0017] 部分涂覆所述种子颗粒,典型为通过在所述种子颗粒的表面上进行聚合反应,以提供具有腔的杯;

[0018] 干燥所述杯;和

[0019] 向所述杯提供气体,以在所述腔中产生气泡,其中典型地通过在合适气体中(例如空气中)干燥所述杯来完成最后两步。

[0020] 该过程允许通过使用合适尺寸的种子颗粒,来准确控制气泡的尺寸,由此提供一种用于生产本发明的纳米颗粒的可靠而可重复的技术。

[0021] 在本发明的某些实施例中,所述纳米颗粒充当给药载体。该实施例允许靶定治疗剂,和,重要的是,响应刺激而触发治疗剂的“按需”释放。

[0022] 一项主要的挑战,是实现通过外部刺激触发治疗剂从纳米颗粒的释放。其尤其应用于向肿瘤的药物给药,由此,实现向脉管系统外的肿瘤区域的治疗相关浓度的给药,是疗效的关键。超声适合用作触发释放的外部刺激,因其可以容易地传播到从MHz范围的数十厘米到kHz范围的数米的距离。已有数种途径被提议用于超声触发药物释放。典型地,这些方法利用了增强渗透与滞留(EPR)效应,其中100-400nm之间的颗粒积聚在癌块上。因此,超声

触发的给药利用了足够小的纳米颗粒来积聚在对环境介质中的热和/或机械变化敏感的肿瘤中。例如,热敏脂质体将在高于42°C的温度下释放其有效载荷,但需要向患者递送大量能量。可选地,声敏脂质体在机械干扰的存在下由于惯性空化而释放药物。不幸的是,局限于脉管系统的空化核的移位,和位于肿瘤中的脂质体,限制了该给药方案的效用。替代地,纳米液滴被提议用作可在肿瘤中积聚的空化核。但是,由于液滴处于亚稳态热力学状态,这些颗粒本质上不稳定。最后,这些颗粒都对热波动高度敏感,导致提前位点(pre-site)汽化和凝聚。

[0023] 相应地,已有的方案未能提供所需的能够响应低能量超声激发而达成“按需”触发释放的纳米颗粒。但是,本发明通过提供经空化从纳米颗粒释放的药物,提供了所述触发释放。

[0024] 因此,本发明提供了本发明的纳米颗粒,其包括释放剂,其中该释放剂经空化从所述纳米颗粒分离。该释放剂典型为一种药物,例如治疗剂,或诊断材料。

[0025] 在一些实施例中,该释放剂提供为存在于所述腔中的药物层,典型地,例如,涂覆所述杯的内表面。在所述实施例中,该气泡充当“塞”,保护药物不会在暴露于水或血浆时立即释放,由此降低了在健康组织上的非特异性全身效应。当诱导气泡空化时,例如通过施加超声,所述腔可以被“去塞”,而药物可以得到释放。可选地,药物可以包含在所述杯的结构中,例如,在聚合物杯内,或涂覆在杯的外表面,以在暴露在超声下时更快释放治疗药物。因为可以局部诱导空化,例如,通过在药物的生理靶点区域施加超声,在这些实施例中,纳米颗粒可以用于靶向给药的方法中。

[0026] 本发明还提供了如本申请所述的纳米颗粒,供使用于人或动物对象的治疗或诊断方法,其中所述方法包括在对象中诱导空化,例如,将所述对象暴露在超声下。

[0027] 本发明还提供了人和动物对象的治疗或诊断方法,其中该方法包括用本申请所述的纳米颗粒给药并在对象中诱导空化,例如通过将所述对象暴露在超声下。

[0028] 本发明还提供了本申请所述的纳米颗粒在制备用于治疗或诊断人和动物对象的药物中的用途,其中所述治疗或诊断包括在对象中诱导空化,例如通过将所述对象暴露在超声下。

[0029] 本发明还提供了一种组合物,其包括多个如本申请所述的纳米颗粒且可选地包括载体或稀释剂,典型地为药学可接受载体或稀释剂,例如液体介质。在一些实施例中,所述组合物中的纳米颗粒基本为单分散。其多分散指数(PDI)可以是例如0.20或更低,例如0.19或更低,0.18或更低,0.17或更低,0.16或更低,或0.15或更低。该液体介质可以本质是水性的。

## 附图说明

[0030] 图1展示了根据本发明的典型纳米杯。

[0031] 图2是实施例1中制得的半球形纳米颗粒的透射电子显微镜照片(TEM)。其中插图是从TEM图像重建的半球形纳米颗粒3D模型。

[0032] 图3展示了实施例1中所用的种子颗粒和所制得的半球形纳米颗粒的尺寸分布。

[0033] 图4展示了具有在实施例1中制得的纳米颗粒群中测得的腔径的尺寸分布的半球形纳米颗粒的空腔几何结构。

[0034] 图5展示了数批具有不同颗粒和腔直径的本发明纳米颗粒的平均惯性空化阈值。

[0035] 图6展示了用于生产本发明所述的纳米杯的过程的示意图。

[0036] 图7a展示了本发明所述的小、中、大纳米杯的粒径,图7b展示了相同纳米杯的腔径,图7c和d展示了所述纳米杯的空化阈值。

[0037] 图8展示了本发明的纳米杯的空化效果,比较了组织模拟物中暴露在超声下的荧光药物模型的荧光图像,其中(a)单独流经组织模拟物;(b)连同SonoVue<sup>®</sup>微泡(平均直径5微米,购自Bracco)一同流经组织模拟物和(c)连同本发明荧光的纳米杯流经组织模拟物。图8d展示了本发明的纳米杯在较高振幅超声下的空化效应。

[0038] 图9展示了与未经干燥和重悬浮而因此不含气泡的纳米杯的相比,使用本发明所述的包含气泡的纳米杯实现的空化效应。

[0039] 图10展示了使用纳米杯来实现从空化敏感性脂质体的超声触发(在0.5 MHz和1.6 MHz下)药物释放。所实现的释放与使用微米级空化诱导剂(Sonovue, Bracco)所获得的释放相仿。

[0040] 图11证实,纳米杯在静脉内给药后稳定,允许使用传统诊断超声系统在肿瘤中引发空化和实时绘图。

## 具体实施方式

[0041] 纳米杯

[0042] 本申请所称的纳米颗粒是任何尺寸在1nm至1000nm之间的颗粒。纳米颗粒的尺寸典型是指纳米颗粒的平均直径(图1中的s)。该直径典型地由电镜来测定。当组合物中存在多个纳米杯时,典型地使用累积平均数作为纳米颗粒的尺寸。这可以使用动态光散射来测定。

[0043] 本申请所称的术语“部分球形”描述的是一种形成球形的一部分的形状。术语“部分球形”包括的形状例如是球冠、半球形,和从球体中纬线上方截去顶部的球形(即与球冠互补的球形部分)。基本部分球形包括形成球状体的一部分的形状和形成具有不规则部分(例如凹陷和突出)的球体或球状体的一部分的形状。

[0044] 本发明的纳米颗粒中,可以使用非部分球形的杯,且可以使用任何杯形,即具有能够部分包封气泡的腔的形状。纳米颗粒表面上的浅或小凹陷/瑕疵,例如深度小于约5nm、典型地小于约10nm或小于约20nm的,和/或开口小于约5nm、典型地小于约10nm或典型地小于约20nm的,通常不能包封气泡,因此不能看作本申请所称的腔。因此,具有单一腔的纳米颗粒的表面也可以包括所述小/浅瑕疵或凹陷。

[0045] 本申请所称的由所述杯部分包封的气泡典型地为这样的气泡:该气泡的一部分表面由所述杯包封(可选地通过所述杯和气泡之间存在的一层或多层),且一部分表面未由所述杯包封且可以暴露在含有该纳米颗粒的介质中,例如液体介质。

[0046] 本申请所称的腔的开口的尺寸,是在杯的边缘处(典型地是所述杯在气泡被包封部分和气泡未被包封部分之间形成边界的部分)所测量的腔最大维度(图1中的p)。在基本部分球形腔的情形中,该开口可以基本为圆形,且其尺寸测量为开口的直径。腔的开口的尺寸可以由透射电子显微镜法来测定。

[0047] 本申请所称的杯的壁厚度指的是从所述杯面向腔的表面上的一点,穿过所述杯,

到达所述杯的相对表面上的一点的最短距离(图1中的w)。杯的壁厚度可以由透射电子显微镜法来测定。

[0048] 本申请所称的所述杯的深度指的是从所述杯的边缘到所述杯的底部的最大距离(图1中的d)。所述杯的深度可以通过透射电子显微镜法来测定。

[0049] 在一些实施例中,杯内的厚度可以变化,或包含多个杯的组合物中的杯与杯之间的厚度可以变化,在此情况下可以测定平均值。在一些实施例中,杯内的厚度可以是均匀或基本均匀的,或包含多个杯的组合物中的杯与杯之间的厚度可以是均匀或基本均匀的。

[0050] 本申请所称的术语“基本均匀的厚度”指的是最大厚度大于最小厚度不超过25%的形状,例如大于最小厚度不超过20%,大于最小厚度不超过15%,大于最小厚度不超过10%或大于最小厚度不超过5%。

[0051] 本发明的纳米颗粒的典型尺寸为至少60nm或至少100nm且至多1000nm,例如至多500nm或至多300nm。例如,该纳米颗粒的尺寸可以是60-500nm或100-300nm。

[0052] 在将该纳米颗粒用于肿瘤治疗方法的实施例中,可能期望纳米颗粒具有特定尺寸,以通过增强渗透和滞留(EPR)作用提高在肿瘤组织中的累积。肿瘤组织可能包含具有异常形式和结构的新生血管,导致异常分子和流体运输动态。这可能导致约100-500nm例如100-300nm尺寸的纳米颗粒在肿瘤组织中的累积远大于在正常组织中的累积。因此,可能期望纳米颗粒的尺寸为100-500nm例如100-300nm,尤其是用于肿瘤治疗方法时。

[0053] 包含气泡的腔的期望尺寸和形状由将要使用的超声频率(典型范围为0.5 MHz至5.0 MHz)来确定,以最小化引发惯性空化所需的稀疏压力振幅。优选为小于5MPa的超声压力振幅,例如3MPa 或更小, 2.5MPa 或更小, 或 2MPa 或更小。在纳米杯的存在下,低至0.5MPa的超声压力振幅可能在高达2 MHz的频率下产生大量惯性空化。

[0054] 所述腔典型地为基本部分球形,例如基本半球形或半球形。所述腔的典型开口尺寸,对于基本部分球形腔即为开口处的直径,为50-900nm,例如至少50nm,100nm或至少200nm且不超过700nm,600nm,或不超过400nm。该腔可以,例如,为50-400nm或100-600nm。本领域技术人员能够选择合适的腔形状和尺寸来实现期望的超声参数,并基于在此公开的用于生产纳米颗粒的方法,产生具有期望的腔形状和尺寸的纳米颗粒。

[0055] 开口尺寸与纳米颗粒尺寸之比(图1中的p:s比率)典型为1:3至5:6,例如1:2至2:3。

[0056] 所述腔的典型深度为大于30nm,优选为大于50nm。例如,该腔的典型深度为60-500nm,例如80-400nm。

[0057] 具有较大尺寸(例如深度大于30nm,优选为大于50nm;和/或开口为50nm或以上)的腔的优点在于,能够引起较大的空化效应。

[0058] 所述杯的壁厚度(w)典型为10-100nm,例如30-70nm或约50nm。可以基于在此公开的用于生产纳米颗粒的方法,选择和准确控制所述杯的壁厚度。所述杯的壁厚度典型为基本均匀,无论是在单一纳米颗粒内还是在本发明的组合物的纳米颗粒之间。所述壁厚度典型为整体杯尺寸的固定比例。

[0059] 所述杯典型由聚合物材料形成,但还可以用任何可以形成纳米杯的固体材料形成。因此,所述杯典型地包括聚合物,优选地,其基本由聚合物组成。

[0060] 例如,该杯可以由能够在乳化聚合反应过程中形成的聚合物形成。合适的聚合物

包括聚甲基丙烯酸甲酯 (PMMA), 聚甲基丙烯酸2-羟乙酯 (pHEMA), 共聚物例如聚乳酸共乙醇酸 (PLGA), 聚苯乙烯和二乙烯基苯, 和甲基丙烯酸甲酯/甲基丙烯酸2-羟乙酯共聚物, 和pH或温度响应聚合物例如聚N-异丙基丙烯酰胺 (PNIPAM)。其他合适的聚合物包括, 但不限于, 分类为聚酞类的聚合物。

[0061] pH或温度响应聚合物例如PNIPAM可以用于增强包封在纳米杯内的药物的释放和/或在其标靶(如肿瘤)处的药物的摄取。pH响应聚合物在肿瘤治疗的环境中可以是优选的, 因为肿瘤中的pH可以低于健康组织(例如在远离血管的缺氧区域中)。温度响应聚合物可以优选与热疗或消融治疗联用, 例如高强聚焦超声 (HIFU)、微波、射频 (RF) 或激光。

[0062] 在一些实施例中, 所述杯由交联聚合物形成。所述聚合物的交联可以通过在聚合反应之前或期间, 将交联剂引入单体混合物中来达成。合适的交联剂包括二乙烯基苯 (DVB) 或乙烯基硅烷。交联还可以双硫键区域形式存在于聚合物中。双硫键区域形式可以使用硫醇化学途径引入。交联聚合物可用于给纳米颗粒提供刚性。对刚性的需求可以是, 例如, 为了降低或防止空化期间所述杯的破碎。交联度可以通过各种光谱法来测定, 例如拉曼光谱法或核磁共振光谱法, 或聚合物溶胀技术。

[0063] 聚合物杯可以包括两种或多种(例如2或3种)不同单体单元形成的聚合物。该聚合物可以通过单体混合物的共聚, 和/或提供一种或多种通过共聚反应或交联剂来连接的预聚物, 来产生。

[0064] 所述杯典型为生物相容的, 即能够在医学治疗或诊断方法中执行其期望功能, 而不会在治疗或诊断的受体或接收者中产生治疗上不可接受的局部或系统影响。

[0065] 气泡中所含的气体并无特别限制, 但典型为空气、氮气、氧气、全氟化碳例如全氟丙烷, 或其混合物。

[0066] 气泡的尺寸和形状可以与腔相同。例如, 若腔为半球形且开口直径为 $d$ , 则气泡可以是直径为 $d$ 的半球形。可选地, 气泡可以大于腔, 即其可以从杯的边缘突出。其从杯的边缘突出的距离可以是杯深度的10%或更多, 例如20%或更多、50%或更多或80%或更多或100%或更多。杯深度及气泡可突出的程度可以透射电子显微镜法测定。在一些实施例中, 所述腔是曲率半径为 $r$ 的部分球形或基本部分球形, 且气泡是半径为 $r$ 的球形。在该实施例的一个示例中, 所述腔为开口直径为 $d$ 的球形, 且气泡是半径为 $\frac{1}{2}d$ 的球形。

[0067] 本发明的纳米杯的特别优点在于, 可以控制所述腔的尺寸, 以提供可调整的空化引发剂。因此, 本发明的纳米杯典型地具有可预测和可重复的腔开口尺寸。因此, 所述具有可预测腔开口尺寸的纳米杯是可调整的纳米杯。

[0068] 纳米杯生产过程

[0069] 所述纳米杯的生产, 可以通过种子乳化聚合反应技术来形成杯, 可选地, 在该杯的腔内形成药物层, 并在气体存在下干燥该杯来引入气泡。

[0070] 所述腔的尺寸和形状, 可以通过选择所用的种子颗粒来进行选择和准确控制。因此, 所述种子乳化聚合反应技术典型地使用了尺寸和形状与期望的腔尺寸和形状互补的种子颗粒。例如, 可以使用球形种子颗粒来生产具有部分球形腔的杯。使用较大的种子颗粒可以形成较大的腔, 且类似地, 使用较小的种子颗粒可以产生较小的腔。所用的种子颗粒的典型尺寸为50-900nm, 例如至少50或至少100nm和至多600nm, 至多400nm或至多300nm。

[0071] 乳化聚合反应典型地通过在合适介质(例如水)中混合种子颗粒、单体和可选地交

联剂,混合以产生湍流状态并添加合适的引发剂,例如过硫酸钾。允许所述乳化聚合反应在合适温度下持续合适的时间长度。本领域技术人员能够为所用的具体反应混合物选择合适的温度和时间参数,不过,该聚合反应典型地在70-90℃下进行4-6小时,例如,在约80℃下进行约5小时。

[0072] 该聚合反应典型为自由基聚合反应过程。包覆到种子颗粒上的聚合物可以是与种子颗粒共聚的固体或液体聚合物。

[0073] 当从两种或以上单体单位形成所述杯时,可以在聚合反应初始向乳化聚合反应添加不同的单体,或可选地,可以在聚合反应过程进行期间提供一种或多种单体。可选地,一种或多种单体单位可以预聚合,且在聚合反应开始时或在聚合反应进行期间,向聚合反应混合物提供预聚物。典型地,一种或多种所述单体或预聚物可以对种子颗粒具有更高的亲和性。因此,聚合反应可以提供一种杯,其中一种单体单位主要形成在杯内表面上(即该单体对种子颗粒具有更高亲和性)而一种不同的单体单位主要在杯的外表面上。这可以提供在内外表面上具有不同表面性质的杯。

[0074] 在聚合物纳米杯的情形中,种子颗粒典型地保持与纳米杯内表面化学连接,种子颗粒材料典型地自身包含在杯内。在所有可用种子颗粒完全反应的情形中,将不存在需要去除的种子颗粒残余。大团聚体和小副产物通过离心和过滤来去除。纳米杯的最终形状、尺寸和成功形成的验证,可以通过透射电子显微镜(TEM)在网格平面的多个倾斜角度进行采集,其可重建为3D模型,如图2中的插入图所示。

[0075] 可以通过相对于反应混合物中存在的种子颗粒的量来选择单体混合物的量,控制所述杯的壁厚度。提高相对于种子颗粒数量的单体量,会增加所得杯的壁厚度,而降低相对于种子颗粒数量的单体量,会减少所得杯的壁厚度。此外,所述杯的壁厚度可以通过调整聚合反应进行的时长来进行调节,亦即,只要有足够的反应物,越长的反应时间会得到更厚的杯。

[0076] 乳化聚合反应进行后,可以洗涤产物,例如通过离心,以去除任何过量聚合物。典型地,在干燥前,将洗涤后的产物重新悬浮在合适介质中,例如水。

[0077] 所述产物可以用任何合适技术进行干燥,例如冷冻干燥或空气干燥。若冷冻干燥,则典型地不使用冷冻保护剂。优选为空气干燥,且可以例如在高温下或在干燥器中进行。空气干燥可以进行12-36小时的期间,例如24小时。在一个实施例中,可以在40-50℃下进行6-18小时的空气干燥,例如约12小时,然后在18-24℃下在干燥器中干燥约9小时。

[0078] 若在空气中干燥,则本发明的纳米颗粒中的气泡将为空气气泡。可以通过在期望气体中执行干燥步骤,来将替代气体应用于气泡。例如,干燥可以在空气下进行,而所得的具有空气气泡的纳米颗粒可以置于真空下来去除空气气泡,并与期望气体接触以引入新的期望气体气泡。在气体环境中干燥纳米杯,在所述杯的腔中提供了需要的气泡。在干燥之前,不存在气泡。

[0079] 干燥后的纳米杯可以重悬浮在液体介质中,如水溶液。合适的溶液包括稀释葡萄糖溶液,例如0.5-10%,优选为1-8%,例如约5%葡萄糖溶液。典型地,该溶液随后搅拌以最大化颗粒分散。干燥的纳米杯在重悬浮中保持其气泡。因此,经过气体环境中干燥并重悬浮的纳米杯,不同于直接在溶液中形成的纳米杯,原因在于,因有干燥步骤,气泡存在于所述腔中。

[0080] 纳米杯的重悬浮之后,优选地,过滤溶液以去除团聚材料。注射式过滤,例如1-5 $\mu$ m,典型为1.5-3 $\mu$ m,可用于去除细微颗粒。这将存在的颗粒限制为纳米尺寸小于过滤限度的纳米颗粒。可以使用先粗过滤然后注射式过滤的组合。

[0081] 当需要干燥形式的纳米杯时,例如为了便于运输,可以省略重悬浮和过滤步骤。典型地,干燥纳米杯在使用前重新悬浮,并根据所得尺寸分布,可选地过滤所得混悬物。

[0082] 图6示意性地展示了生产本发明所述的纳米杯的过程。图6a)展示了以球形颗粒诱导溶胀和变形的共聚物包覆的个体模板颗粒。所得纳米杯经过干燥和重悬浮以在腔内捕获气体。图6b)提供了对于纳米颗粒系统的惯性空化的假设机制的图示。初始,气泡在腔内稳定化。在足够的负压下,气泡可以延伸到腔的开口上,并最终脱离颗粒。为了发生惯性空化,已脱离的气泡必须不稳定生长,最终在周围介质的惯性下溃灭。

[0083] 纳米杯作为给药载体

[0084] 本发明的纳米颗粒可以通过例如,在所述腔内、所述杯内或所述杯的外表面上,包含释放剂(典型为药物)而用作给药载体。释放剂可以形成一层,典型为在所述杯的外表面上、杯内或杯的内表面上、所述腔内。在此,释放剂指的是在空化时从纳米颗粒释放的材料。典型地,释放剂为药物,亦即,治疗或诊断,例如药学或生物材料。典型地,释放剂是可用于人或动物对象的治疗或诊断的材料。此处的描述指的是存在于纳米颗粒中的药物或药物层。但是,应当理解,可用于在空化时释放的替代性材料,例如当用在非医学用途中时,也可以用作释放剂。因此,任何所述的药物或药物层,也可以构思为在适当时由替代性释放剂或释放剂层所取代。

[0085] 在所述腔或杯内存在药物层的实施例中,药物的性质并无特别限制,任何可用于治疗方法中的药物均可以使用。优选为亲水性药物。某些药物包括,但不限于,抗癌药物如阿霉素,紫杉醇,顺铂,吉西他滨,柔红霉素,和奥沙利铂(oxiloplatin);血栓溶解剂,如重组组织纤溶酶原激活物(rt-PA);抗炎剂,如乙酰水杨酸,布洛芬,双水杨酯;或抗生素剂如格尔德霉素或青霉素。当将药物包含在所述杯的外部时,典型地,该药物的选择在于,使其与所述杯结合的方式,可以避免在给药时溶解。因此,药物仅在空化时释放。

[0086] 所述纳米颗粒可以包括两种或多种不同药物。例如,一种药物可以设置于所述杯的腔内,而一种分开的不同药物设置于所述杯的外表面上。这两种药在释放时结合,例如在暴露于超声下时。因此,该纳米颗粒可用作提供组合疗法的方式,或提供仅在从纳米颗粒载体释放时(例如在暴露于超声下之后),在靶点位置混合的两种药物的同时释放。

[0087] 药物层的添加,可以在杯的形成前(例如在种子颗粒中)、杯的形成期间或杯的形成之后进行。加入药物层的时机,将导致其在纳米杯中的定位。例如,载药种子颗粒将把药物置于所述杯的腔内。在聚合反应期间添加药物,将把药物置于所述杯内。在杯形成后添加药物,将把药物置于所述杯的外表面上(亦即不朝向气泡的表面。)

[0088] 药物层的厚度取决于药物的量和位置。当将药物包含入所述杯自身内时,药物层的厚度将受到杯壁厚度的限制。在药物存在于腔内的情形中,药物层应当小于腔的厚度,由此允许至少部分被腔包封的气泡存在。可以通过调整聚合反应的时长和药物反应物的数量,来控制药物层的厚度。使用药物释放曲线来测量载药量。

[0089] 纳米杯的使用

[0090] 本发明的纳米颗粒可以单独用于任何需要惯性空化的情况中,例如组织摧毁术、

热切除、声化学、声聚变和废水处理。例如,其可以用于涉及使用惯性空化来引起局部组织切除和/或去除,以达到治疗结果的方法中。所述方法包括,例如,肿瘤的治疗和心脏病治疗中的心脏组织移除。

[0091] 可选地,本发明的纳米颗粒可以与其他试剂联用,例如药物或诊断剂(例如,MRI对比剂,例如Gd基MRI对比剂,或荧光镜检对比剂)。本发明的纳米颗粒可以用于将其他试剂递送到体内靶,其可通过将该纳米颗粒和其他试剂同时递送,或在纳米颗粒包含药物(例如杯腔中的药物层)的情形中,使用纳米颗粒自身作为药物配方的一部分。

[0092] 在使用了单独试剂的情形中,本发明的纳米颗粒可以在与单独试剂的单一组合物中给药,或作为单独组合物给药。当使用两种组合物时,可以同时或分开给药。优选为同时或基本同时给药。纳米颗粒和单独试剂给药之后的超声应用使得空化发生。这增强了试剂向细胞中的运输。以此方式使用空化来增强试剂向细胞中的运输的特别优点,在于超声可以在选定位置上应用,使得活性试剂仅在选定位置向细胞中的运输。

[0093] 在本发明的一个方面中,该单独试剂包封在声敏感脂质体中。所述声敏感脂质体可以在惯性空化的存在下释放试剂。因此,本发明的纳米颗粒可以与该脂质体同时给药,并施加超声以在期望位置引起空化,并相应地引起活性试剂在期望位置的释放。

[0094] 在本发明的一个可选方面中,如上所述,该活性试剂可以包含在纳米颗粒自身内。在此情形中,空化可以作用于令试剂从纳米颗粒释放,并帮助活性试剂运输到细胞内。

[0095] 当与其他试剂联用时,纳米颗粒还可以提供实时追踪和体内药物分布绘图,例如使用惯性空化的常规超声成像或被动声学绘图(WO 2010 052494)。

[0096] 用于达成空化的超声并无特定限制,且可以使用任何在0.5MHz至5.0MHz范围内的频率。该频率可以匹配调整后的纳米颗粒。这可以使得达成空化所需的超声压力较小。所用的超声压力振幅典型为小于5MPa,例如3MPa或更小。

[0097] 纳米杯组合物

[0098] 纳米颗粒可以提供为组合物,例如药物组合物。这可以是单独包括多个干燥形式(例如作为粉末)纳米颗粒的组合物,或包括纳米颗粒连同药学可接受载体或稀释剂的组合物。典型地,与载体或稀释剂共同提供的组合物提供为包含纳米颗粒混悬物的液体组合物。所述药物组合物典型地包含至多85 wt%的本发明纳米颗粒。更典型地,其包含至多50 wt%的本发明纳米颗粒。优选的药物组合物无菌无致热源。

[0099] 在使用之前,包含多个干燥形式纳米颗粒的组合物典型地重悬浮在合适液体中,例如水溶液中。

[0100] 包含多个纳米颗粒的组合物典型地包括基本均匀的纳米颗粒。这样的优点在于,对空化的控制较高,由此增进声学调谐。优选的纳米颗粒组合物的多分散指数为0.2。典型地,这由动态光散射测定。包含多个纳米颗粒的组合物的平均粒径在此定义为模态平均(即最大颗粒数目所显示的粒径)。本发明的一个优选方面中,该组合物中的至少50%纳米颗粒的粒径与平均值相差50nm以内。更优选地,所述纳米颗粒的至少60%、70%或80%的粒径与平均值相差50nm以内。更优选地,该组合物中的至少50%纳米颗粒的粒径与平均值相差20nm以内。更优选地,所述纳米颗粒的至少60%、70%或80%的粒径与平均值相差20nm以内。动态光散射可用于确定组合物中的粒径差异。

[0101] 包含多个纳米颗粒的组合物的平均腔径(腔的开口尺寸, $p$ )在此定义为模态平均

(即最大颗粒数目所显示的腔径)。本发明的一个优选方面中,该组合物中的至少50%纳米颗粒的腔径与平均值相差50nm以内。更优选地,所述纳米颗粒的至少60%、70%或80%的腔径与平均值相差50nm以内。更优选地,该组合物中的至少50%纳米颗粒的腔径与平均值相差20nm以内。更优选地,所述纳米颗粒的至少60%、70%或80%的腔径与平均值相差20nm以内。动态光散射可用于确定组合物中的腔径差异。

[0102] 本发明的纳米颗粒可以通过任何合适途径给药,取决于治疗方法的性质,例如口服(作为糖浆剂、片剂、胶囊、锭剂、控释制剂、速溶制剂等);外用(作为霜剂、膏剂、洗剂,喷雾剂或气雾剂等);通过注射(皮下,皮内,肌内,静脉内,肿瘤内等);经皮(例如,通过使用贴剂,凝胶或植入物)或通过吸入(以干粉,溶液,分散体等)。

[0103] 例如,固体口服形式中,除本发明的纳米颗粒以外,可以包含:稀释剂,例如乳糖,葡萄糖,蔗糖,纤维素,玉米淀粉或马铃薯淀粉;润滑剂,例如二氧化硅,滑石,硬脂酸,硬脂酸镁或硬脂酸钙,和/或聚乙二醇;结合剂,例如淀粉,阿拉伯树胶,明胶,甲基纤维素,羧甲基纤维素或聚乙烯吡咯烷酮;崩解剂,例如淀粉,藻酸,藻酸盐或淀粉羟乙酸钠;泡腾混合物;染料;甜味剂;润湿剂,例如卵磷脂,聚山梨醇酯,十二烷基硫酸盐;以及,在一般情况下,在药物制剂中使用的无毒且无药理学活性的物质。这样的药物制剂可以以已知的方式来制造,例如通过混合,制粒,压片,糖包衣或薄膜包衣方法。

[0104] 优选地,与载体或稀释剂共同提供的组合物为液体分散体。用于口服给药的液体分散体可以是糖浆剂、乳剂和混悬剂。优选为混悬剂。所述糖浆剂、乳剂和混悬剂可以包含,例如,蔗糖或蔗糖与甘油和/或甘露醇和/或山梨糖醇,作为载体。葡萄糖是优选的载体。例如,该纳米颗粒可以提供为葡萄糖溶液中的混悬剂,例如包含至多10wt%葡萄糖(例如约5wt%葡萄糖)的葡萄糖溶液。

[0105] 混悬剂和乳剂可以包含作为载体的例如天然树胶,琼脂,藻酸钠,果胶,甲基纤维素,羧甲基纤维素,或聚乙烯醇。除活性化合物以外,用于肌内注射的混悬剂或溶液还可以包含药学上可接受的载体,例如无菌水,橄榄油,油酸乙酯,二醇类(例如丙二醇),以及根据需要,适量盐酸利多卡因。

[0106] 用于注射或输注的溶液可以包含作为载体的例如无菌水,或优选地,其可以是无菌水性等渗盐水溶液的形式。

[0107] 作为治疗或诊断方法的一部分来给药的含药纳米颗粒的量,将取决于,例如,纳米颗粒中所存在的药物的品种和量。因此,本发明的含药纳米颗粒的剂量,典型地等于或小于单独给药时,纳米颗粒中存在的药物的剂量,即纳米颗粒中存在的药物的量将典型地等于或小于游离形式该药物的给药量。本发明的含药纳米颗粒剂量可以小于等量的游离药物,例如,以抵消本发明的试剂中如上所述的增强的药代动力学,例如95%或更少,85%或更少,80%或更少,75%或更少,70%或更少,65%或更少,60%或更少,55%或更少,或50%或更少。

[0108] 在本发明的纳米颗粒和另一试剂分开给药的实施例中,两种试剂可以在同一药物组合物中共同给药,或者在意图以相同或不同途径进行分开、同时、伴随或相继给药的不同组合物中共同给药。

[0109] 当单独使用时,纳米颗粒的给药量可以由本领域技术人员所确定的任何合适剂量。

## 实施例

[0110] 下文将通过如下非现实性实施例来对本发明进行举例说明。

### [0111] 实施例1

[0112] 具有球形杯的纳米颗粒,亦称为纳米杯(NCs),根据以下方案进行生产:

[0113] 取2mL10wt%的300nm聚苯乙烯(也称为胶乳)纳米颗粒,与34ml已过滤的去离子水混合。将所得混合物置于100ml圆底烧瓶中,并用氮气鼓泡30分钟。该圆底烧瓶装配有回流冷凝器,并置于80 °C水浴中。在搅拌下依次加入下列单体:851 $\mu$ l MMA,85 $\mu$ l HEMA,和533 $\mu$ l 80 v/v% DVB。取1.704ml的3.5 mg/ml过硫酸钾(KPS)溶液,用氮气脱气。加入KPS溶液。持续反应5小时之后,将反应混合物通过以15000rpm离心30分钟来洗涤三次。将所得的具有半球形杯的纳米颗粒悬浮在已过滤的去离子水中。所述纳米杯的TEM和尺寸分布如图2和3所示。

[0114] 将该NC分散体置于培养皿中并加热至~40 - 50 °C过夜。然后将培养皿置于干燥室中24小时。将所得的具有半球形杯和空气气泡的纳米颗粒分散在已过滤的去离子水中。

[0115] 图5展示了数批次具有不同颗粒直径和腔直径的本发明纳米颗粒的平均惯性空化阈值。通过将实施例1中的纳米杯暴露在200个独立HIFU脉冲(0.5 MHz 10循环正弦波)下,同时限制在0.2mm圆柱形管中获得结果。用15MHz传感器(也称为被动空化检测器)测量声发射。该接收信号被放大25倍,以降低RF噪声的影响,并使用12位DAQ卡进行数字记录。用2MHz的高通滤波器对信号进行数字滤波,以除去驱动频率的影响。将每个所得的电压轨迹转化至频域,用陷波滤波器滤除谐波,并检查宽频分量。如果为单个脉冲的宽频分量(测量为功率)比充满水的试管高三倍,则认为发生空化事件。因此,惯性空化的概率是每200次传输脉冲中惯性空化事件的百分比。

[0116] 对于一个完全均匀分布的系统,惯性空化曲线的概率应该是亥维赛德(Heaviside)函数(即,从0到100%的阶梯函数)。不过,从完美分布的偏差令概率曲线偏移,产生线性增加;群体内的不同腔体将具有不同的空化阈值。因此,个体腔惯性空化阈值可以通过将样品中的该尺寸群体与惯性空化概率进行比较来推断。

### [0117] 实施例2

[0118] 将根据实施例1所述方案生产的纳米杯干燥并重悬浮,以提供给如下的腔内气体组分:

[0119] 将纳米颗粒在水中的混悬物置于60°C的大培养皿中,空气干燥过夜。接下来,将干燥物悬浮在液体介质(如去离子水或5%葡萄糖)中,并剧烈搅拌至多8小时,以最大化颗粒分散。使用106 $\mu$ m和32 $\mu$ m的粗过滤组合来去除未分散的毫米级的附聚物。必要时使用2.7 $\mu$ m和1.6 $\mu$ m的注射式过滤(Whatman, GE Healthcare Life Sciences, UK)去除微附聚物。

### [0120] 实施例3

[0121] 根据实施例1的方案,生产了三种不同尺寸的纳米杯,并根据实施例2进行干燥和重悬浮。通过使用如下不同尺寸的聚苯乙烯种子纳米颗粒,得到不同尺寸:

[0122] 小纳米颗粒:100 nm聚苯乙烯种子;

[0123] 中纳米颗粒:300 nm聚苯乙烯种子;

[0124] 大纳米颗粒:460 nm聚苯乙烯种子。

[0125] 根据实施例1的方案生产的纳米杯的尺寸分布,由动态光散射测定。结果如图7a所

示,展示了通过使用不同尺寸的壳,可以产生具有小粒径分布和良好控制的粒径的纳米杯。

[0126] 图7b展示了以透射电子显微镜图像来测量的小、中、大纳米杯的腔径的尺寸分布。图7c和7d展示了小、中、大纳米杯的惯性空化阈值,其在0.5 MHz (c) 和 1.6 MHz (d) 下通过实验测定和数字预测。

[0127] 所示的实验测定的惯性空化阈值(空心圆圈)与通过改进的半球形腔Rayleigh-Plesset模型预测的惯性空化阈值(灰色十字)相互吻合。

[0128] 实施例4

[0129] 将1wt%琼脂糖组成的组织模拟物在1.6MHz中心频率和2.2 MPa(5%占空比)下暴露于超声中5分钟,同时使用实施例2的方法制备的荧光药物模型和荧光(9-蒎甲基丙烯酸酯)纳米杯连续流经通道。所用的荧光药物模型是四甲基罗丹明-40kDa葡聚糖。该组织模拟物在施加超声后相对于通道径向切片,且令药物模型的荧光图像可视化。图8c所示为药物在超声暴露后远离初始组织通道的移动。药物的运动由向纳米杯施加的超声引起的空化作用介导。

[0130] 图8a展示了省略了纳米杯的相应实施例,且图8b展示了用SonoVue 微泡(平均直径5微米,购自Bracco)替换本发明的纳米杯的相应实施例。图8d展示了使用荧光的本发明纳米杯暴露在4 MPa、1.5%占空比和1.6MHz中心频率的超声下的相应实施例。在图8中,白虚线表示HIFU聚焦的边缘,而(a)中的灰色虚线表示流容器的边缘。白色箭头标定超声的方向。在所有图像中,模型药物和荧光纳米杯在每幅图中以箭头标记。比例尺代表1毫米,并适用于所有的图像。

[0131] 实施例5

[0132] 为了比较(a)如本申请所述的包含气泡的纳米杯和(b)不含有气泡的纳米杯的性质,制备了两种纳米杯。按照实施例1的方案来制备纳米杯。部分纳米杯未经干燥。其他的则如实施例2所述进行干燥和重悬浮。

[0133] 图9a展示了经过干燥和重悬浮的300nm聚苯乙烯种子颗粒(空心正方形)、未经干燥和重悬浮的纳米杯(黑色三角形)和经过干燥和重悬浮的纳米杯(空心圆圈)以0.5 MHz中心频率暴露在超声下的惯性空化概率。

[0134] 图9b和c展示了大于(b)和小于(c)惯性空化阈值的纳米杯得到的空化功率。总功率已经分成宽频分量(表示惯性空化源产生的信号)和谐波分量(表示稳定空化源产生的信号)。

[0135] 实施例6

[0136] 在圆底烧瓶里的2氯仿:1甲醇中以65:25:3:7的比率混合DSPE,胆固醇, DSPC 和 DSPE-PEG (DSPE脂质体),以配置包封在空化敏感性脂质体内的荧光素,如S. Graham, R. Carlisle, J. Choi, M. Stevenson, A. Shah, R. Myers, K. Fisher, M.-B. Peregrino, L. Seymour, and C. C. Coussios, "Inertial cavitation to non-invasively trigger and monitor intratumoral release of drug from intravenously delivered liposomes," *Journal of Controlled Release*, vol. 178, pp. 101-107, 2014所述。

[0137] 在葡萄糖的单独存在下,将脂质体(平均直径140nm)暴露在0.5 MHz或1.6 MHz的超声下,未产生释放。在Sonovue® (SV)微泡(平均直径5微米,购自Bracco)的存在下,将脂

质体暴露在超声下,在所述两种频率下均得到几乎完全的释放。在纳米杯(NC)(平均直径300nm,如上述实施例1和2中所述产生)的存在下暴露脂质体,在0.5 MHz下得到与SV相同的释放,且在1.6 MHz下略低。结果如图10所示。

[0138] 这证明了使用与生物医学超声频率范围上的纳米脂质体尺寸相仿的空化诱导颗粒进行空化介导释放的可行性。与微泡不同,纳米杯能够穿过渗漏肿瘤脉管系统(内皮细胞间连接空隙100-800 nm)与脂质体一起成功地在肿瘤中积累。

[0139] 实施例7

[0140] Balb / c小鼠皮下植入CT-26鼠结肠癌细胞。以纳米杯(NCS)连续静脉注射给药。以超声诱导空化。图11a展示了体积为100-300 mm<sup>3</sup>的肿瘤(虚线轮廓)(通过被动声绘图(Passive Acoustic Mapping)重叠在常规B型图像上来绘制)。图11a的最上面一行展示了肿瘤中2MHz超声单脉冲之后的空化绘图,而第二行展示了整个肿瘤经多个超声脉冲的累加空化活动。图11b的图证实了每次注射后,肿瘤中空化水平的增加,暗示着NC在肿瘤内成功积累。

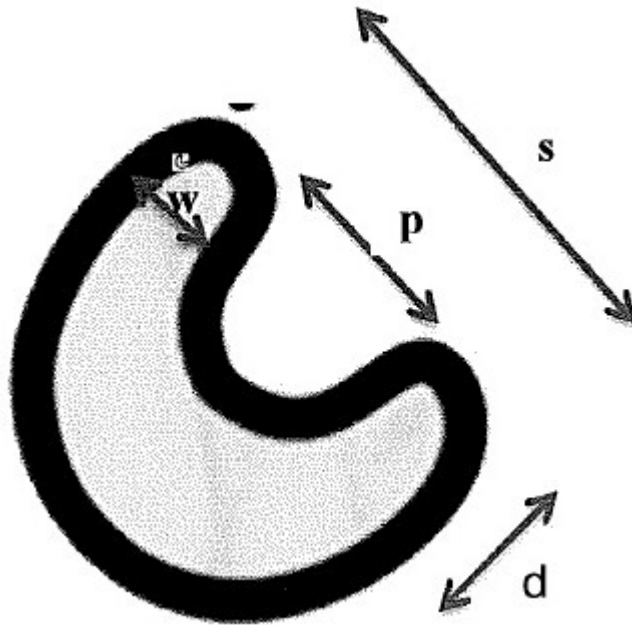


图1

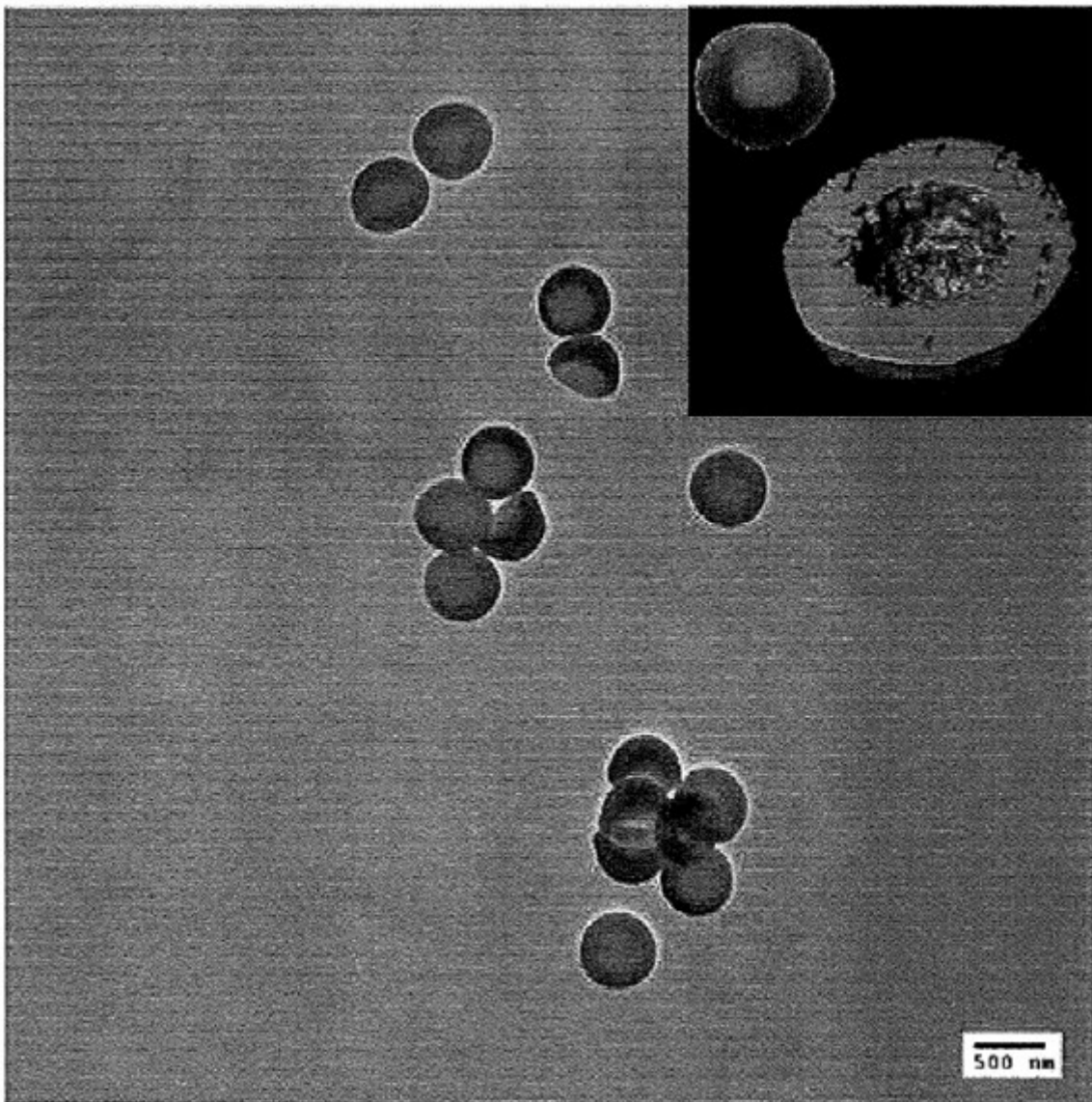


图2

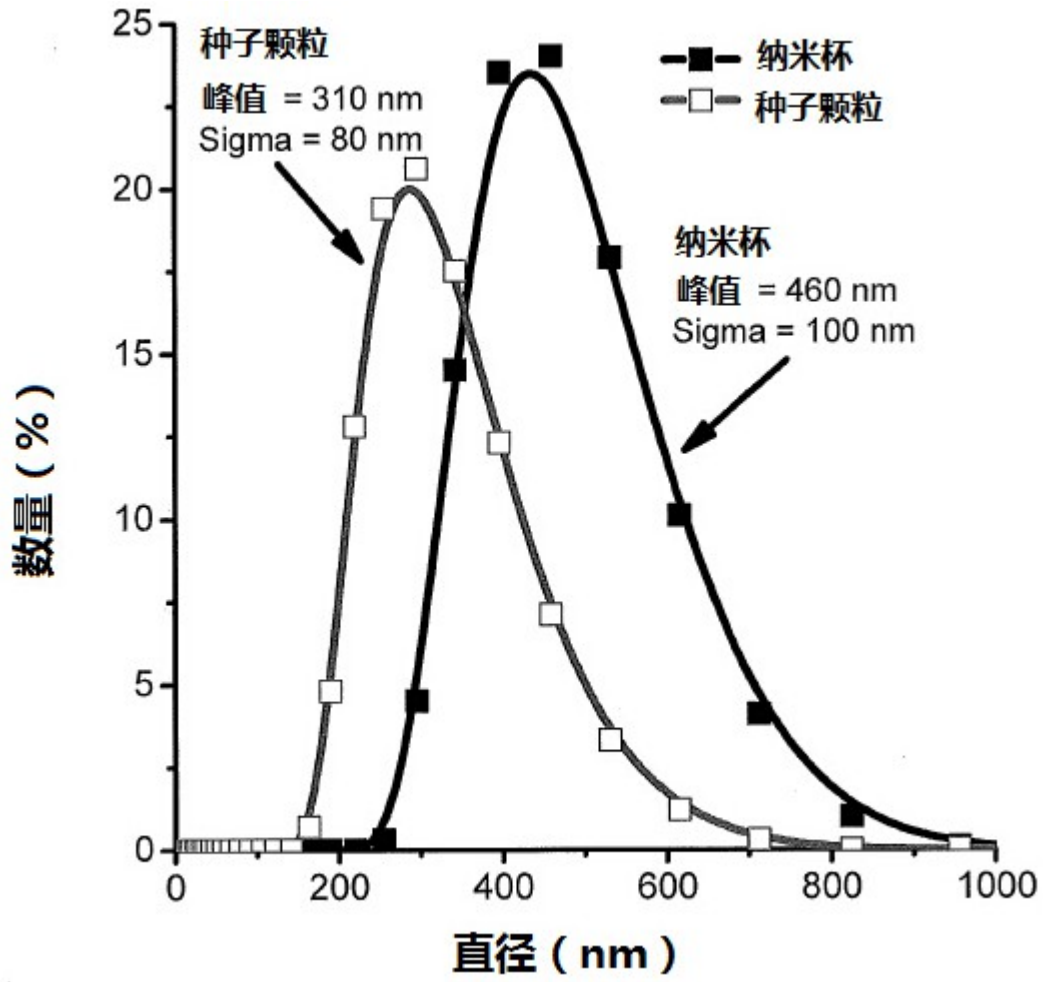


图3

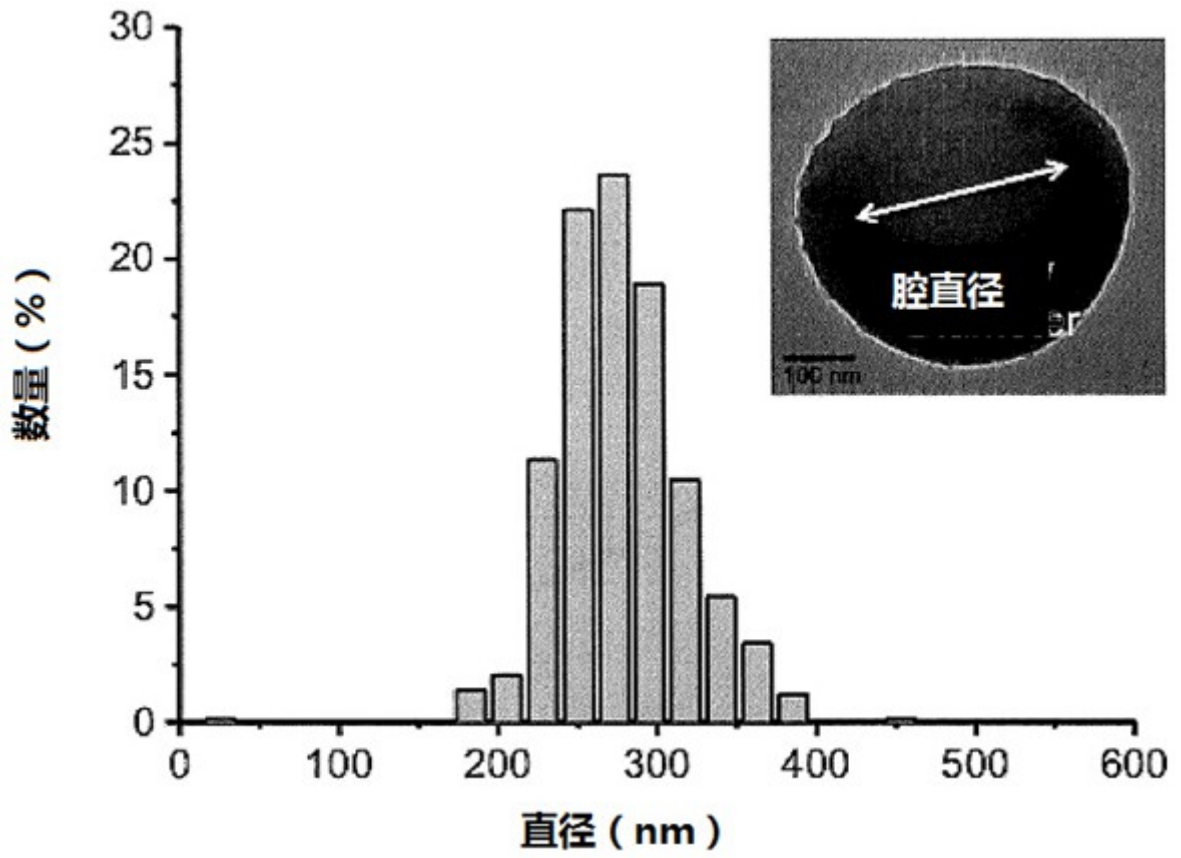


图4

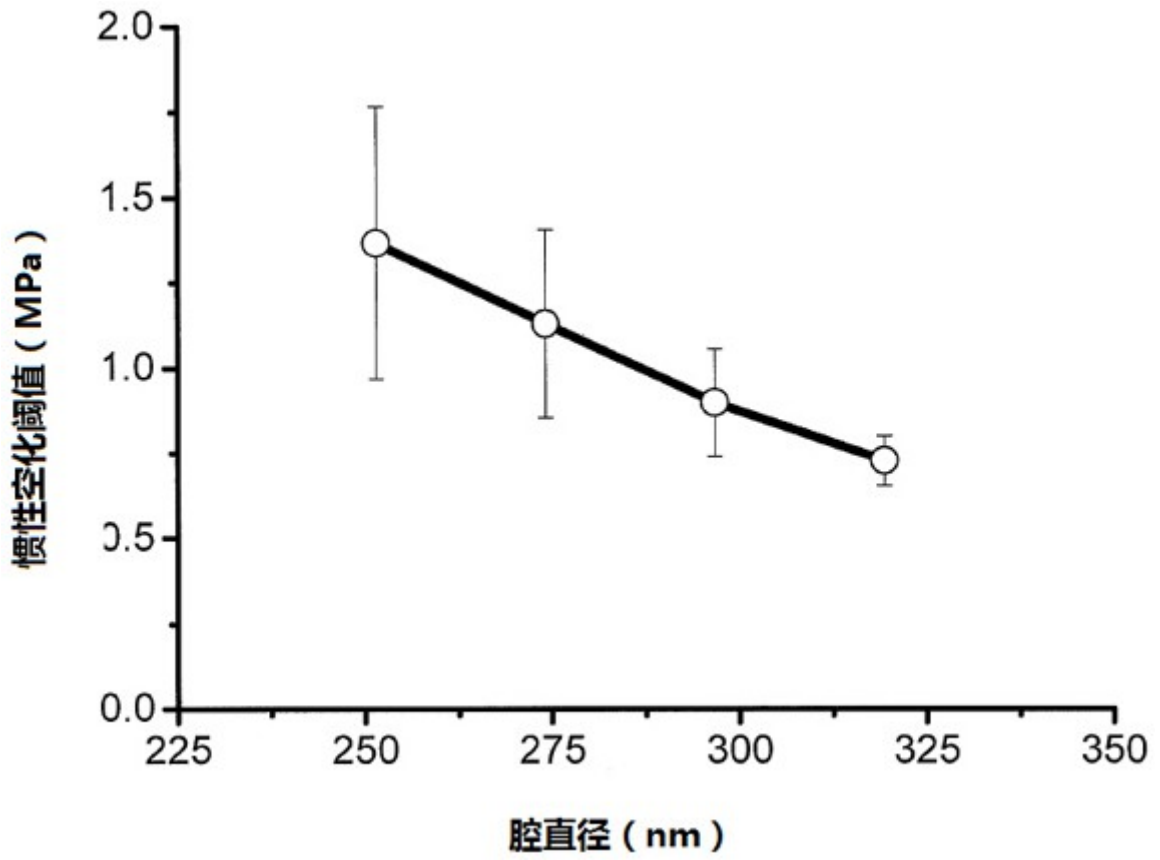


图5

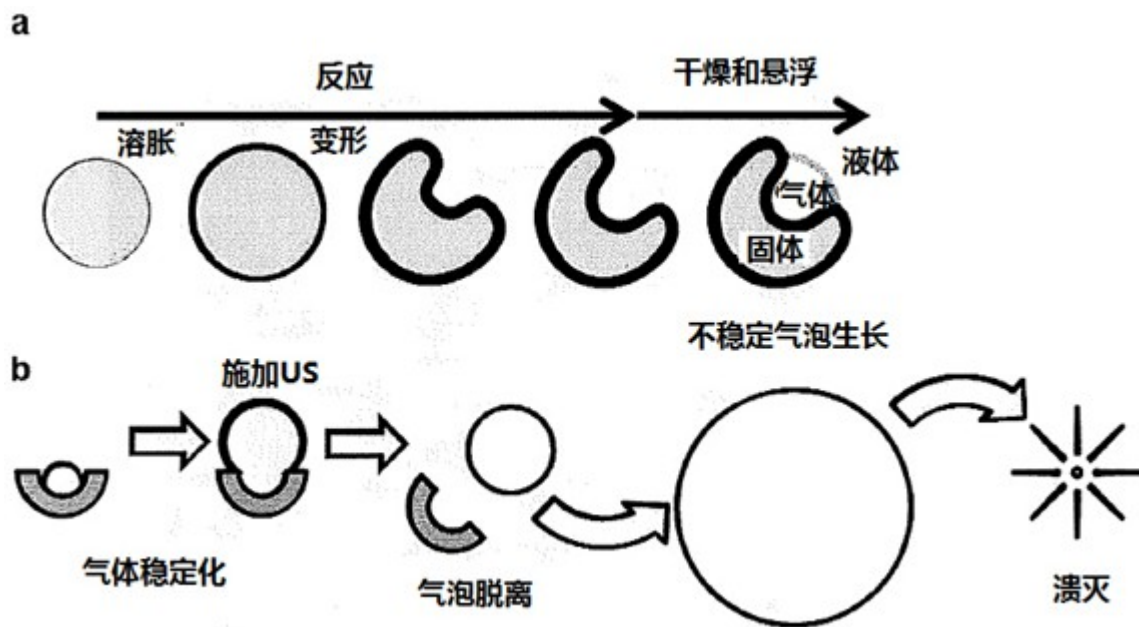


图6

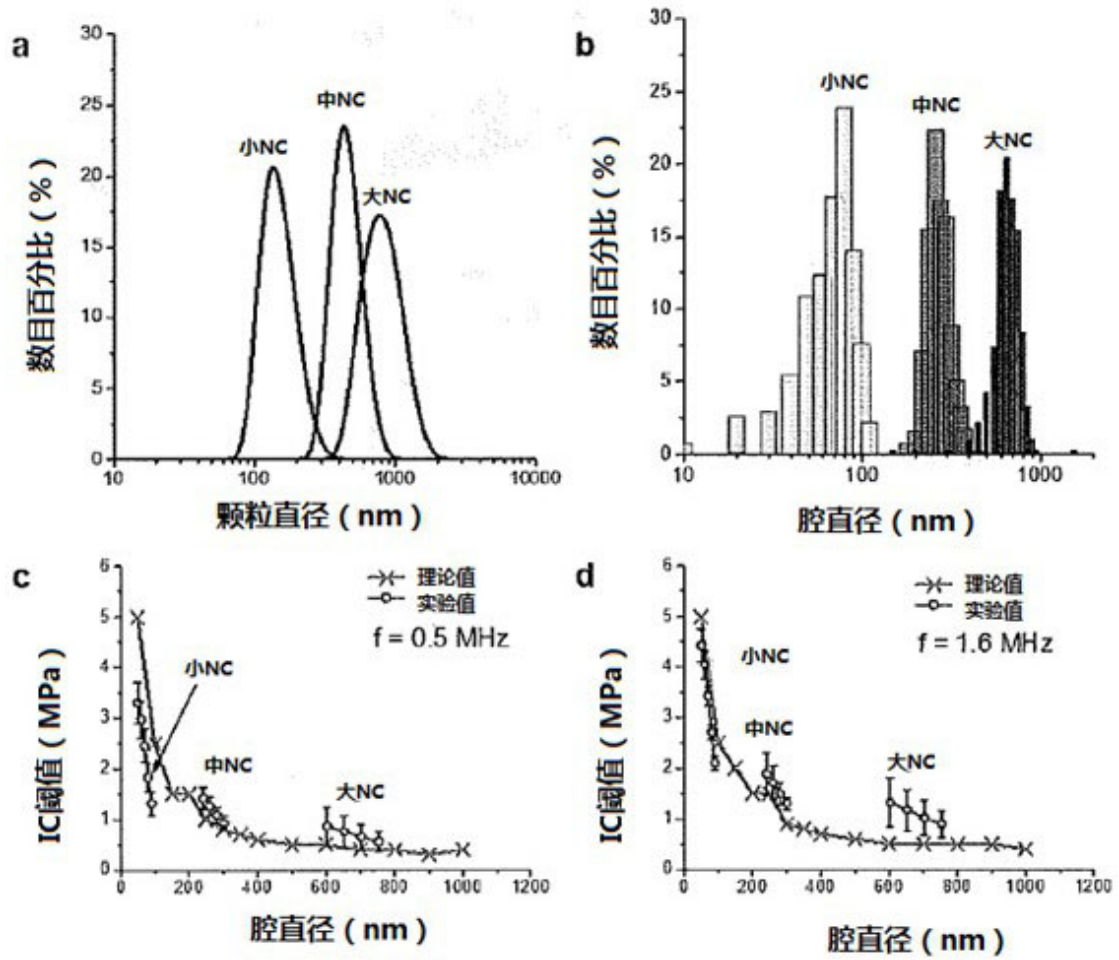


图7

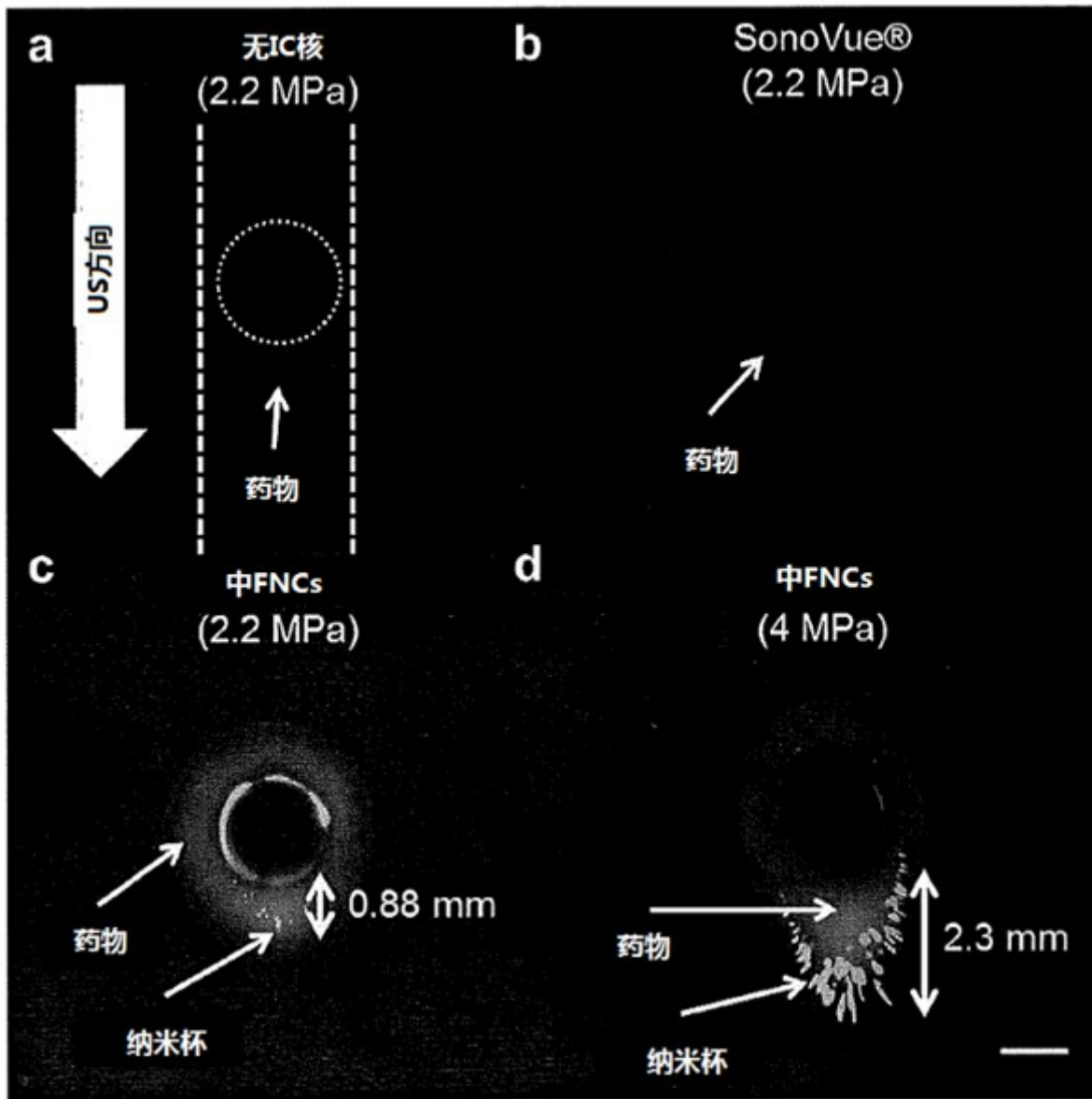


图8

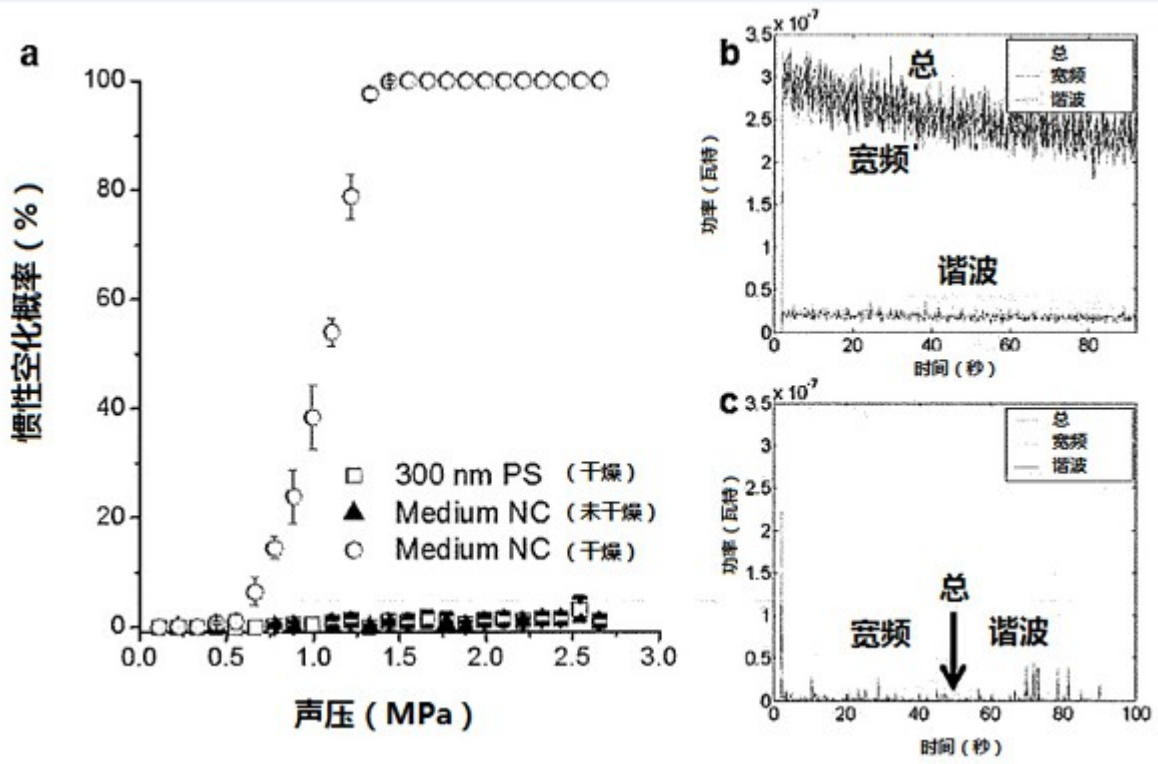


图9

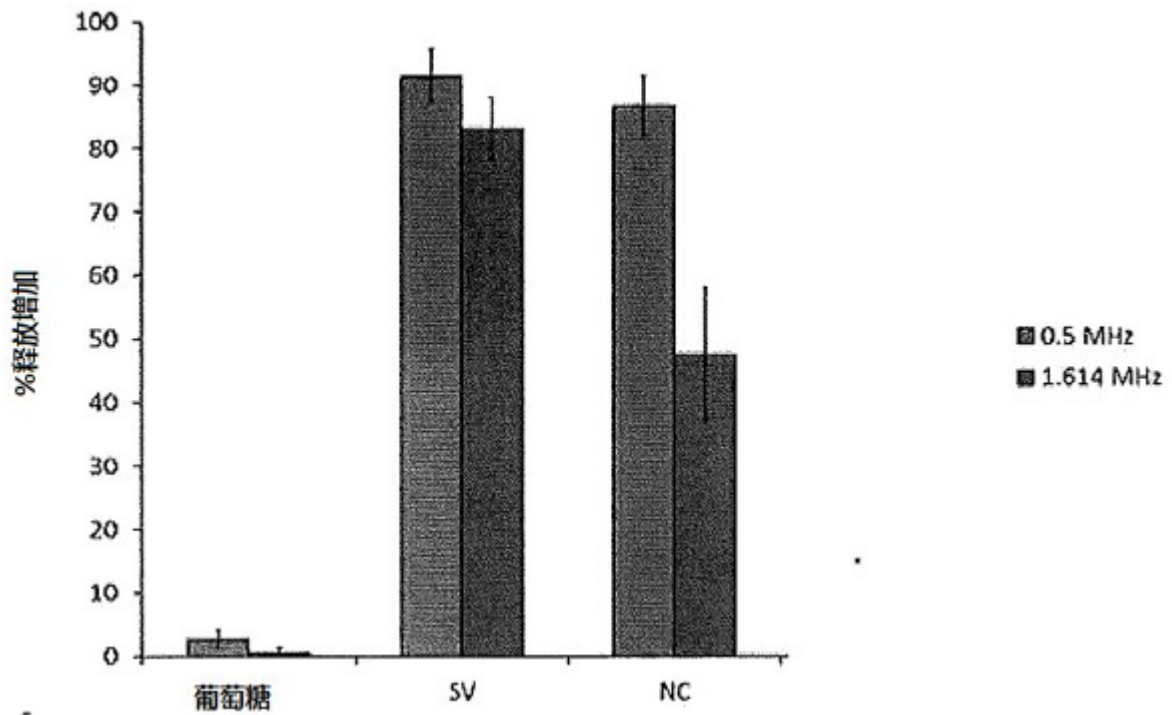


图10

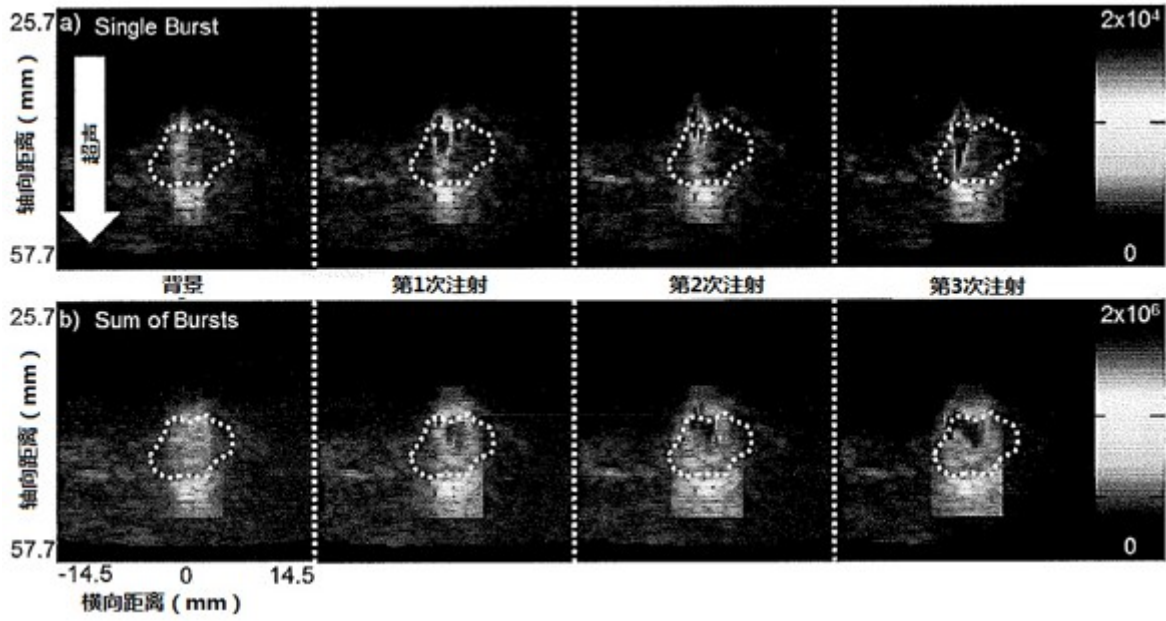


图11a

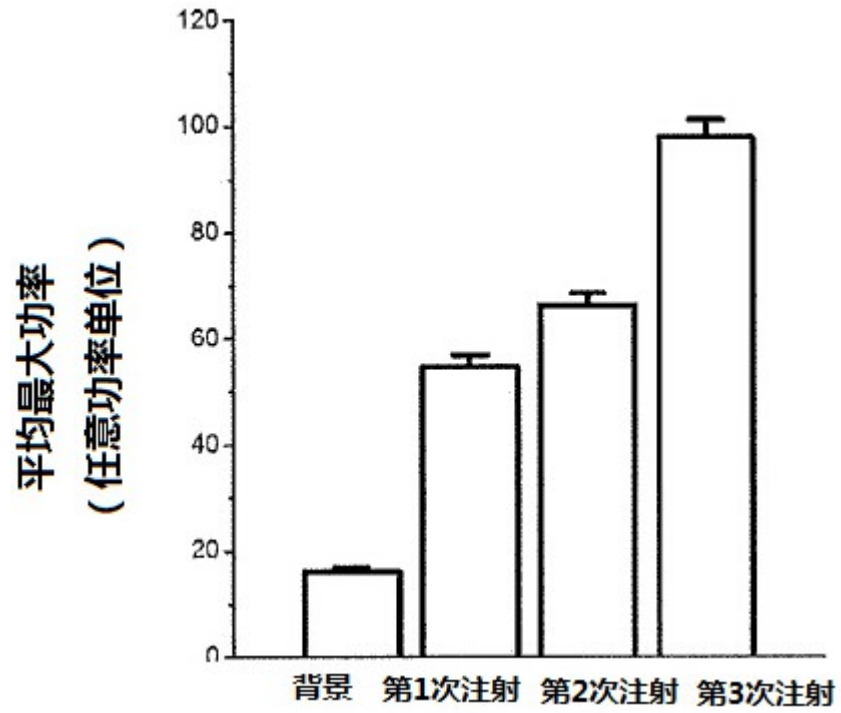


图11b