[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl[7]
A61K 49/00
A61K 38/00

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01805792.6

[43] 公开日 2003 年 3 月 26 日

[11] 公开号 CN 1406140A

[22] 申请日 2001.2.28 [21] 申请号 01805792.6
[30] 优先权
[32] 2000. 2.28 [33] US [31] 60/185,282
[86] 国际申请 PCT/US01/06455 2001.2.28
[87] 国际公布 WO01/64164 英 2001.9.7
[85] 进入国家阶段日期 2002.8.28
[71] 申请人 吉倪塞思公司
地址 美国明尼苏达
[72] 发明人 G·M·安戈尔
[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所
代理人 程 泳

权利要求书 4 页 说明书 38 页 附图 7 页

[54] 发明名称 纳米胶囊包封系统与方法

[57] 摘要

本发明主要涉及纳米胶囊和制备这些纳米胶囊的方法。 本发明包括一种方法，包括形成表面活性剂微团，并将该表面活性剂微团分散于含有亲水性聚合物的水性组合物中，形成稳定的表面活性剂微团分散体。 该方法还包括机械形成稳定的表面活性剂微团分散体的小滴，沉淀亲水性聚合物，形成沉淀的纳米胶囊，温育该纳米胶囊以缩小其直径，过滤或离心该纳米胶囊。

ISSN1008-4274

1. 一种形成分散的微团的方法，该方法包括:

形成一种表面活性剂微团，其中该表面活性剂微团含有:

包被生物活性成分表面形成表面活性剂微团的一种表面活性剂，其中表面活性剂分子的 HLB 值小于约 6.0 单位；和

将表面活性剂微团分散到水性组合物中，其中该水性组合物含有亲水性聚合物，其中该亲水性聚合物包被生物活性成分表面，形成含有直径小于约 50 纳米的表面活性剂微团的分散体。

2. 权利要求 1 的方法，其中该表面活性剂分子是一种非离子型表面活性剂。

3. 权利要求 1 的方法，其进一步包括沉淀表面活性剂微团的亲水性聚合物，形成具有第一种直径的第一种纳米胶囊。

4. 权利要求 2 的方法，其中该成分与纳米胶囊的亲水性聚合物分开。

5. 权利要求 2 的方法，其进一步包括温育第一种纳米胶囊，形成具有第二种直径的第二种纳米胶囊，其中第二种直径小于第一种纳米胶囊的第一种直径。

6. 权利要求 5 的方法，其中温育第一种纳米胶囊包括将第一种纳米胶囊浸入含有一种溶质的水性组合物中。

7. 权利要求 1 的方法，其中该生物活性成分是一种亲水性成分。

8. 权利要求 1 的方法，其中该生物活性成分是一种多核苷酸或多肽。

9. 一种形成分散的表面活性剂微团的方法，该方法包括:

将表面活性剂分子分散到第一种亲水性组合物中，第一种亲水性组合物含有一种亲水性生物活性成分，其中表面活性剂分子的 HLB 值小于约 5.0 单位，该表面活性剂分子形成围绕亲水性生物活性成分的外壳，形成表面活性剂微团的分散体;

向表面活性剂微团分散体中加入一种生物相容性亲水性聚合物；其中该生物相容性亲水性聚合物可有效地稳定该分散体。

10. 权利要求 9 的方法，其中生物相容性亲水性聚合物形成围绕表面

活性剂微团的外壳。

11. 一种形成纳米胶囊的方法，该方法包括:

将表面活性剂分子分散到含有亲水性生物活性成分的第一种水性组合物中，其中表面活性剂分子的 HLB 值小于约 5.0 单位，该表面活性剂分子吸附于亲水性成分的表面上，形成表面活性剂微团;

向第一种水性组合物中加入生物相容性聚合物，形成含有多种稳定的表面活性剂微团的稳定的水性组合物；和

凝固稳定的表面活性剂微团，方法是将稳定的表面活性剂微团分散到含有一种溶质的第二种水性组合物中，持续可有效形成具有第一种直径的第一种纳米胶囊所需的时间。

12. 权利要求 11 的方法，其中表面活性剂分子的临界微团浓度低于约 200μm。

13. 权利要求 11 的方法，其进一步包括在将表面活性剂分子分散到第一种水性组合物中之前，将表面活性剂分子分散到生物相容性油中。

14. 权利要求 11 的方法，其中生物相容性聚合物可有效地形成围绕表面活性剂微团的外壳。

15. 权利要求 11 的方法，其中表面活性剂分子的浓度低于约 500 ppm。

16. 权利要求 11 的方法，其中分散稳定的表面活性剂微团包括将稳定的表面活性剂微团的小滴分散到第二种水性组合物中。

17. 权利要求 11 的方法，其中浓缩亲水性生物活性成分。

18. 一种生产纳米胶囊的方法，该方法包括:

浓缩第一种水性组合物中的生物活性成分，形成浓缩的生物活性成分;

将表面活性剂分子分散到第一种水性组合物中，其中表面活性剂分子的 HLB 值小于约 5.0 单位，表面活性剂分子吸附于浓缩的生物活性成分表面上，形成大量表面活性剂微团;

用生物相容性聚合物包被表面活性剂微团，形成大量稳定的表面活性剂微团;

将稳定的表面活性剂微团分散到含有一种溶质的第二种水性组合物中，形成具有第一种直径的纳米胶囊；和

其中生物活性成分不混合于纳米胶囊的生物相容性聚合物中。

19. 权利要求 18 的方法，其中生物相容性聚合物是一种离子渗透聚合物。

20. 权利要求 18 的方法，其进一步包括温育纳米胶囊，形成具有第二种直径的第二种纳米胶囊，其中第二种直径小于第一种直径。

21. 一种制备纳米胶囊的方法，该方法包括:

形成一种疏水性组合物，其中该疏水性组合物含有一种吸附于疏水性成分表面的表面活性剂分子，其中该表面活性剂分子的 HLB 值小于约 5.0 单位;

向该疏水性组合物中加入生物相容性聚合物，形成稳定的组合物，其中该生物相容性聚合物可有效地形成围绕表面活性剂分子的外壳；和

将稳定的组合物分散到水性组合物中，形成纳米胶囊。

22. 权利要求 21 的方法，其中生物相容性聚合物是一种亲水性组合物。

23. 权利要求 21 的方法，其中生物相容性聚合物能够离子渗透交换。

24. 权利要求 21 的方法，其中疏水性组合物进一步包含一种水溶性溶剂。

25. 权利要求 21 的方法，其进一步包括通过温育在含有一种溶质的水性组合物中的纳米胶囊，沉淀该纳米胶囊。

26. 权利要求 25 的方法，其中温育纳米胶囊可有效地缩小纳米胶囊的直径。

27. 权利要求 21 的方法，其中分散稳定的组合物包括:

机械形成稳定的组合物的大量小滴；和

将大量小滴分散到水性组合物中。

28. 权利要求 21 的方法，其中表面活性剂选自：2,4,7,9-四甲基-5-癸炔-4,7-二醇、含有乙炔二醇部分的分子和 2,4,7,9-四甲基-5-癸炔-4,7-二醇的混合物。

29. 权利要求 21 的方法，其中疏水性组合物不混合或包埋于生物相容性聚合物中。

30. 权利要求 21 的方法，其进一步包括过滤纳米胶囊。

31. 权利要求 22 的方法，其进一步包括离心纳米胶囊。

32. 权利要求 21 的方法，其进一步包括向固体剂型中加入纳米胶囊。

33. 权利要求 32 的方法，其中固体剂型选自：颗粒、片剂、丸剂、薄膜和包衣。

34. 一种转导遗传物质的方法，该方法包括：

对大量细胞应用通过权利要求 1 的方法制备的、含有一种多核苷酸的大量纳米胶囊；和

通过由细胞内的纳米胶囊核心释放多核苷酸，转导该细胞。

35. 一种转导遗传物质的方法，该方法包括：

对患者施用通过权利要求 1 的方法制备的、含有一种多核苷酸的大量纳米胶囊。

36. 权利要求 35 的方法，其中输送包括：经口、静脉内、皮下、腹膜内、鞘膜内、肌内、吸入、局部、经皮、栓剂、阴道栓、尿道内、门脉内、眼内、经鼓膜、肝内、动脉内、鞘内或其任一组合。

37. 权利要求 35 的方法，其中多核苷酸从纳米胶囊核心释放。

38. 利用权利要求 11 的方法制备的一种纳米胶囊。

39. 一种对细胞施用基因的方法，该方法包括：

对上皮细胞施用有效量的多个纳米胶囊，其中该纳米胶囊含有受一种启动子控制的基因。

40. 一种形成纳米胶囊基质的方法，该方法包括：

混合大量纳米胶囊、结合剂和赋形剂，形成纳米胶囊基质，其中该纳米胶囊基质能够释放纳米胶囊。

41. 权利要求 40 的方法，其进一步包括施用、成丸、压片或颗粒化纳米胶囊基质。

纳米胶囊包封系统与方法

相关申请的交叉引用

本申请对 Gretchen M. Unger 于 2000 年 2 月 28 日申请的题目为“纳米颗粒包封系统与方法”的申请系列号 60/185,282 要求优先权。

发明背景

本发明主要涉及大分子的控释输送系统领域，特别是用于核酸和基因治疗。更具体而言，本发明涉及直径小于约 50 纳米的纳米胶囊，其中生物活性成分位于纳米胶囊的核心，并涉及形成这些纳米胶囊的方法。

在过去几十年里，对纳米颗粒在生物活性剂输送中的应用的积极与大量的研究已经形成了大量制备纳米颗粒的方法。这些方法一般包括利用热、高压匀浆或高强度超声处理制备直径大于 100 纳米的纳米颗粒，或利用高含量的溶剂或油、细胞毒性化学试剂（如交联剂）、佐剂、催化剂或其任何组合制备直径小于 100 纳米的纳米颗粒。而且，由于许多变化因素，这些方法是有希望的。

例如，当在纳米颗粒的生产过程中使用有机溶剂时，有机溶剂可以变性生物活性剂，这可降低该生物活性剂的大部分（如果不是全部的话）效能。事实上，例如在对病人施用纳米颗粒后，生物活性剂的变性可以加强毒性反应。

另外，当利用有机溶剂制备纳米颗粒时，有机溶剂可以被降解，形成低 pH 环境，这可破坏生物活性剂的效能。因此，在制备纳米颗粒期间或之后有机溶剂一般可以变性生物活性剂。

因此，在纳米颗粒的生产过程中一般除去有机溶剂。然而，包括一种或多种有机溶剂去除技术通常增加形成纳米颗粒的成本和复杂性。

利用高压匀浆或高强度超声处理制备纳米颗粒一般导致生物活性剂混合（entangle）或包埋于纳米颗粒的聚合基质中。生物活性剂混合或包

埋于聚合基质中也可以变性生物活性剂，从而降低生物活性剂的效能。

生物活性剂混合或包埋于纳米颗粒的聚合基质中也可通过使生物活性剂在到达靶细胞之前未成熟释放，降低生物活性剂的效能。在施用纳米颗粒过程中，生物活性剂的未成熟释放一般促进细胞毒性或细胞死亡。

此外，到达靶细胞的纳米颗粒一般经过内体调节途径运送到靶细胞中，导致生物活性剂和纳米颗粒的溶酶体降解。因此，生物活性剂在靶细胞内也许没有功能活性，因为生物活性剂和纳米颗粒被降解。在此使用时，术语“功能活性”是指为了提供对靶细胞的治疗作用，生物活性剂在靶细胞内起作用的能力。

另外，高压匀浆或高强度超声处理技术一般需要复杂和昂贵的设备，这通常增加了制备纳米颗粒的成本。因此，迫切需要不用细胞毒性化学试剂（如有机溶剂）或不用复杂和昂贵的设备制备纳米颗粒。此外，也迫切需要制备生物活性剂未混合或包埋于纳米颗粒中的纳米颗粒，使细胞毒性反应降至最低。另外，也迫切需要研制可以输送到靶细胞内的纳米颗粒，在其中释放生物活性剂，实现生物活性剂的治疗输送。

发明概述

本发明主要涉及纳米胶囊及制备这些纳米胶囊的方法。本发明包括形成表面活性剂微团和将表面活性剂微团分散到含有亲水性聚合物的水性组合物中使表面活性剂微团稳定分散的方法。该方法进一步包括：机械形成稳定的表面活性剂微团分散体的小滴，沉淀亲水性聚合物形成沉淀纳米胶囊，温育纳米胶囊以缩小纳米胶囊的直径，过滤或离心该纳米胶囊。

附图简述

图 1 是本发明制备纳米胶囊的方法的图示。

图 1A 显示对不同分散条件下制备的纳米胶囊制剂的原子力显微镜检查。

图 1B 显示证明从释放溶液中定量回收小量 DNA 的实验结果。

图 1C 显示在不同分散条件下制备的纳米胶囊在 72 小时内的累积释放。

图 2 显示用 DNA 复合物、含 DNA 纳米胶囊处理或不处理的 HacaT 角质细胞培养物的相对胞饮活性。

图 3 显示来自大鼠成纤维细胞培养物的总蛋白的 Wstern blotting 结果。

图 4A 显示

图 4B 显示对来自图 4 实验的猪皮肤组织切片的免疫荧光显微镜检查。

图 5 显示纳米胶囊向固体剂型中的掺入。

图 6A 显示聚乙烯吡咯烷酮纳米胶囊摄取和绿色荧光蛋白（GFP）在 35mm 人皮肤成纤维细胞和无限增殖角质细胞培养物中的表达。

图 6B 显示 GFP 质粒 DNA 通过键生蛋白纳米胶囊的肿瘤靶向。

图 6C 显示键生蛋白包被的纳米胶囊和未用键生蛋白包被的纳米胶囊对鳞状细胞癌和人皮肤成纤维细胞（HDF）培养物的生长抑制作用。

图 7 显示用含有 20mer Fitc-标记 O-甲基 RNA 寡核苷酸的纳米胶囊处理的 HDF 培养物的摄取。

发明详述

本发明主要涉及直径小于约 50 纳米的纳米胶囊。本发明也涉及制备这些纳米胶囊的方法。根据本发明的方法，通过将生物活性成分分配到表面活性剂分子核心内，并在表面活性剂分子周围围绕生物相容聚合物外壳，形成纳米胶囊。

图 1 的 10 中概述了一种生产纳米胶囊的方法。在方法 10 中，生物活性成分 12 均匀分散到第一种水性组合物 14 中，形成亲水性组合物（未显示）。然后，表面活性剂组合物 16，其包含一种含有大量表面活性剂分子的表面活性剂成分（未显示），和任选的生物相容油成分 18，与亲水性组合物一起加入第一种分散装置 20 中。表面活性剂组合物 16 经历第一种分散装置 20 中的条件，引发了表面活性剂分子向生物活性成分 12 表

面上的至少部分吸附。

表面活性剂分子部分吸附于生物活性成分12的表面上起始了生物活性成分12向由第一种水性组合物14中的表面活性剂分子形成的外壳核心内的分配。表面活性剂分子向生物活性成分12表面上的吸附可以继续，直到生物活性成分12的全部表面都被表面活性剂分子覆盖，完成生物活性成分12向表面活性剂分子核心内的分配，形成表面活性剂微团22。

然后，向表面活性剂微团22中加入生物相容聚合物成分24，稳定位于第一种水性组合物14中的表面活性剂微团22。优选地，在稳定装置26中，生物相容聚合物成分24围绕着表面活性剂微团22，形成稳定的表面活性剂微团28。

待稳定后，将稳定的表面活性剂微团28从稳定装置26中转移到位于第二种分散装置32中的第二种水性组合物30中。优选地，第二种水性组合物30包含一种溶质（未显示），该溶剂能沉淀包被稳定的生物活性剂微团28的生物相容聚合物成分24。沉淀稳定的表面活性剂微团28的生物相容聚合物成分24后，形成分散的、任选地粉化的沉淀纳米胶囊36，下面称为纳米胶囊36。

已经发现，将表面活性剂组合物（其含有一种表面活性剂成分，亲水-亲脂-平衡（HLB）值小于约6.0单位）分散于含有生物活性成分的水性组合物中，形成围绕生物活性成分的表面活性剂微团。进一步发现，通过加入生物相容聚合物稳定表面活性剂微团包被表面活性剂微团，形成直径小于约50nm的纳米胶囊。

在此使用时，术语“纳米颗粒”是指一种具有矩阵型结构，大小小于约1000纳米的颗粒。当纳米颗粒包含生物活性成分时，该生物活性成分混合或包埋于纳米颗粒的矩阵型结构中。

术语“纳米球体”在此使用时是指一种具有固体球形结构，大小小于约1000纳米的颗粒。当纳米球体含有生物活性成分时，该生物活性成分吸附于纳米球体表面或包埋于纳米球体中。

类似地，术语“纳米核心”在此使用时是指一种含有小于1000纳米的固体核心的颗粒。当纳米核心中含有生物活性成分时，该生物活性成

分混合于纳米核心中。

在此使用时，术语“纳米胶囊”是指一种含有由外壳包围的空心，颗粒大小小于约1000纳米的颗粒。当纳米胶囊含有生物活性成分时，该生物活性成分位于由纳米胶囊的外壳围绕的核心中。术语“纳米胶囊”不是包括，一般不包括大小小于约1000纳米的颗粒，其中生物活性成分混合或包埋在纳米胶囊的基质中，或吸附于纳米胶囊的环绕的外壳上。

生物活性成分12可以以液体、蒸汽或颗粒形式包含于第一种水性组合物14中。选择的生物活性成分12的形式优选地使生物活性成分12:（1）在溶解或分散于第一种水性组合物14之前保持稳定，（2）均匀分散到第一种水性组合物14中，（3）任选地浓缩，缩小生物活性成分12的大小，（4）分配到表面活性剂微团22的核心中，（5）在纳米胶囊36的生物相容聚合物外壳24降解后释放，（6）在从纳米胶囊36释放后有功能活性。

生物活性成分12可以表征为“亲水的”或“疏水的”。在此使用时，术语“亲水的”或“亲水性”是指一种分子吸收水或与水形成一个或多个氢键的能力。也认为“亲水的”包括该分子能吸收水或与水形成一个或多个氢键的任何部分。在此使用时，术语“疏水的”和“疏水性”是指一种分子不能吸收水或不能与水形成一个或多个氢键的能力。也认为“疏水的”包括该分子不能吸收水或不能与水形成一个或多个氢键的任何部分。

当生物活性成分12是一种亲水性生物活性成分时，该亲水性生物活性成分可以直接加到第一种水性组合物14中。备选地，亲水性生物活性成分12也可以任选地溶解或分散于一种或多种溶剂（如水、非极性溶剂、极性溶剂或其任何组合）中。

在此使用时，术语“非极性溶剂”是指一种溶剂，它没有永久电偶极矩，因此不能与极性溶剂在分子内结合。另外，非极性溶剂可以表征为一种含有介电常数小于约20单位的分子的溶剂。类似地，术语“不混溶的”在此使用时是指两种或多种物质（如两种或多种液体、固体、蒸汽或其任何组合）不能与另一种物质形成分子内结合。在《Perry化学工

程师手册》(第六版)中可以见到非极性溶剂的一些不完全的例子，在此引用作为参考。

在此使用时，术语“极性溶剂”是指一种溶剂，它具有永久电偶极矩，因此能与另一种极性物质(如液体、固体、蒸汽或其任何组合)形成分子内结合。另外，非极性溶剂可以表征为一种含有介电常数大于约20单位的分子的溶剂。类似地，术语“可混溶的”在此使用时是指两种或多种物质彼此形成分子内结合的能力。在《Perry化学工程师手册》(第六版)中可以见到极性溶剂的一些不完全的例子，在此引用作为参考。

当生物活性成分12是一种疏水性生物活性成分时，该疏水性生物活性成分可以分散或溶解到一种能分散或溶解疏水分子的溶剂中，如上述水、非极性溶剂、极性溶剂或其任何组合。优选地，当生物活性成分12是一种疏水性生物活性成分12时，该疏水性生物活性成分12溶解或分散于水溶性溶剂中，如丙酮、乙腈、乙醇、二甲基乙酰胺(DMA)、四氢呋喃(THF)、二氧己环、二甲亚砜(DMSO)和二甲基甲酰胺(DMF)。在《Perry化学工程师手册》(第六版)中可以见到水溶性溶剂的其它合适的不完全例子，在此引用作为参考。

如上所述，在形成表面活性剂微团16之前生物活性成分12可任选地浓缩于第一种水性组合物14中。例如，当生物活性成分是一种多核苷酸时，可以利用DNA缩合剂浓缩该多核苷酸。在此使用时，“DNA缩合剂”是利于DNA浓缩或缩小的分子。

生物活性成分12的浓缩对于本发明并不重要，可以进行生物活性成分12的浓缩，以缩小生物活性成分12的大小。在分配到表面活性剂微团16的核心中之前，生物活性成分12的浓缩一般缩小生物活性成分12的大小。缩小生物活性成分12的大小可以使表面活性剂微团22中最大程度地掺入生物活性成分12，或者可以有助于纳米胶囊36总大小的缩小。提高可作为纳米胶囊36一部分的生物活性成分12的含量允许掺入含有大量单体(如大量碱基对或氨基酸)的大分子。Rolland, A.P.(1998) Crit. Rev. Therapeutic Drug. Carr. Syst. 15:143-198综述了缩合剂的一些不完全实例，在此引用作为参考。

生物活性成分 12 可进一步含有适合并且不干扰生物活性成分 12 的溶解或分散的其它成分。可以加入生物活性成分 12 中的其它成分的不完全实例包括 DNA 结合部分，是指以非共价方式与核酸相互作用的分子或其部分。DNA 结合部分可以包括但不限于：大沟和小沟结合剂、DNA 嵌入剂、聚阳离子、DNA 遮蔽成分、膜通透成分、亚细胞定位成分等。大沟和小沟结合剂在此使用时是指通过与双链 DNA 的大沟或小沟结合与 DNA 相互作用的分子。

类似地，术语“DNA 嵌入剂”在此使用时是指一种平面分子或分子的平面部分，它们通过插入核苷酸碱基对之间并与之平行嵌入 DNA 中。在此使用时，“聚阳离子”与 DNA 主链上的负电荷结合。DNA 结合部分可以通过“反应基团”与本发明的功能成分共价连接。该反应基团容易与功能成分上的亲核物质反应。反应基团（与其相应的反应性亲核物质）的不完全实例包括但不限于：N-羟基琥珀酰亚胺（例如胺）、马来酰亚胺和马来酰亚胺苯（例如巯基）、二硫吡啶（例如巯基）、酰肼（例如碳水化合物）和苯甲酰甲醛（例如精氨酸）。

术语“DNA 遮蔽成分”在此使用时是指一种分子，它在从纳米胶囊释放后能遮蔽全部或部分多核苷酸，通过抑制循环中存在的降解剂（如核酸酶）的攻击和/或干扰网状内皮系统的摄取，提高其循环半衰期。类似地，术语“膜通透成分”在此使用时是指帮助多核苷酸或包封的多核苷酸穿过膜的任何成分。因此“膜通透成分”部分包括电荷中和成分，通常是一种聚阳离子，它能中和多核苷酸上的大的负电荷，使多核苷酸能横穿过膜的疏水性内部。

许多电荷中和成分能作为膜通透剂。膜通透也可由两亲性分子引起。“膜通透剂”在此使用时是一种能帮助通常不通透的分子横穿过细胞膜并且进入细胞质的分子。膜通透剂可以是肽、胆汁盐、糖脂、磷脂或去污剂分子。膜渗透剂通常具有两亲性，使得一个部分是疏水性的，而另一部分是亲水性的，使它们能与膜相互作用。

术语“亚细胞定位成分”在此使用时是指一种能识别靶细胞中亚细胞成分的分子。识别的亚细胞成分包括核、核糖体、线粒体和叶绿体。

特别的亚细胞定位成分包括能帮助携带分子进入核中的“核定位成分”，已知包括核定位肽和氨基酸序列。

可包含治疗有效量的生物活性成分 12，用于转化多种细胞，如体外、体内或离体的细胞。在此使用时，“转化”是指在纳米胶囊暴露于大量细胞后大量细胞中生物活性成分的存在和/或功能活性。

此外，本领域技术人员应当认识到，生物活性成分 12 的含量可根据下列因素而不同：生物活性成分 12，温度、pH、摩尔渗透压浓度、任何溶质，第二种水性成分 30 中存在的任何其它成分或任选的溶剂，表面活性剂组合物 16，一种类型或一定含量的表面活性剂微团 22，生物相容性聚合物成分 24，稳定的表面活性剂微团 28 的任何希望的特性，纳米胶囊 36 的任何希望的特性，或其任何组合。

纳米胶囊 36 的生物活性成分 12 可以是单独的大分子，或在制备的两种或多种大分子的不同混合物中，随后结合形成生物活性成分 12。适于作为生物活性成分 12 一部分的亲水性大分子的不完全实例包括但不限于：多核苷酸、多肽、遗传物质、肽核酸、aptamer、碳水化合物、小染色体、分子聚合物、无机或有机性质的聚集物或结合物、基因、其它任何亲水性大分子或其组合。

可以作为生物活性成分 12 一部分的疏水性大分子的不完全实例包括但不限于：肾上腺素能剂、肾上腺皮质类固醇、肾上腺皮质抑制剂、醛甾酮拮抗剂和合成代谢剂；兴奋剂、麻醉剂、减食欲剂和抗痤疮剂；抗肾上腺素能剂、抗过敏剂、抗阿米巴剂、抗贫血剂和抗心绞痛剂；抗关节炎剂、抗哮喘剂、抗动脉粥样硬化剂、抗菌剂和抗胆碱能剂；抗凝剂、抗惊厥剂、抗抑郁剂、抗糖尿病剂和抗腹泻剂；抗利尿剂、抗呕剂、抗癫痫剂、抗纤溶剂和抗真菌剂；抗出血剂、消炎剂、抗微生物剂、偏头痛剂和抗缩瞳剂；抗霉菌剂、止恶心剂、抗肿瘤剂、antineutropenic 和抗寄生虫剂；抗增生剂、精神抑制剂、抗风湿剂、抗皮脂溢药和抗分泌剂；解痉剂、抗凝血剂、抗溃疡剂、抗病毒剂和食欲抑制剂；血糖调节剂、骨吸收抑制剂、支气管扩张剂、心血管剂和胆碱能剂；荧光剂、氧自由基清除剂、胃肠动力作用剂、糖皮质激素和毛发生长刺激剂；

止血剂、组胺 H2 受体拮抗剂；激素；降胆固醇药和降血糖药；降脂药、降血压剂和显像剂、免疫和激动剂；情绪调节剂、粘液溶解剂、散瞳剂或鼻减充血剂；神经肌肉阻断剂；神经保护剂、NMDA 拮抗剂、非激素固醇衍生物纤溶酶原激活物和血小板活化因子拮抗剂；血小板凝集抑制剂、psychotropic、放射活性剂、杀疥螨剂和致硬化剂；镇静剂、镇静-催眠剂、选择性腺苷 A1 拮抗剂、血清素拮抗剂和血清素抑制剂；血清素受体拮抗剂、类固醇、甲状腺激素和甲状腺抑制剂；thyromimetic、安定剂、肌萎缩侧索硬化、脑缺血、佩吉特病药；不稳定型心绞痛、血管收缩剂、血管扩张剂、创伤愈合剂和黄嘌呤氧化酶抑制剂；免疫剂、来自病原体（如病毒、细菌、真菌和寄生虫）的抗原，任选地为灭活完整生物的形式，肽、蛋白质、糖蛋白、碳水化合物或其组合，可在公开文献中发现的、属于上述种类并且批准用于人体的药理学或免疫学制剂的任何例子，其它任何疏水生物活性成分，或其任何组合。

在此使用时，术语“多肽”是指不受氨基酸数量限制的氨基酸的聚合物。也可以认为，术语“多肽”包括例如寡肽、肽或蛋白质。

在此使用时，术语“多核苷酸”是指多于 1 个核苷酸的单链、双链或多链形式的 RNA 或 DNA 序列。术语“多核苷酸”也包括含有 2'-脱氧-D-核糖或其修饰形式的聚脱氧核糖核苷酸，RNA 和其它任何类型的多核苷酸——是嘌呤或嘧啶碱的 N-糖苷、C-糖苷，或修饰的嘌呤或嘧啶碱或碱性核苷酸。多核苷酸可以编码启动区、操作子区、结构区、终止区、其组合或其它任何遗传相关物质。类似地，术语“遗传的”在此使用时是指能改变基因表达的任何物质。

本发明的方法中可以包括胶体、液体或蒸汽形式的第一种水性组合物 14。选择的第一种水性组合物 14 的形式优选地使第一种水性组合物 14：（1）在溶解或分散生物活性成分、表面活性剂组合物 16、表面活性剂微团 22 或任选地稳定剂表面活性剂微团 28 之前保持稳定，（2）均匀分散生物活性成分 12、表面活性剂组合物 16、表面活性剂微团 22 或任选地稳定剂表面活性剂 28，（3）作为水包油乳剂中的连续相，（4）不干扰或隐蔽生物活性成分 12 的功能活性，（5）不修饰或降解生物活性

成分 12、表面活性剂组合物 16、表面活性剂微团 22 或任选地稳定的表面活性剂微团 28。

第一种水性组合物 14 可以只含水，或者可以任选地含有既不干扰形成纳米胶囊 36 的方法又不掩盖生物活性成分 12 的功能活性的其它溶质或溶剂。此外，本领域技术人员将认识到，用于制备纳米胶囊 36 的一定量的第一种水性组合物 14 可能根据下列因素而不同：生物活性成分 12、表面活性剂组合物 16、温度、pH、摩尔渗透压浓度、任选的溶质或任选的溶剂、表面活性剂微团 22、生物相容的聚合物成分 24，和稳定的表面活性剂 28 或纳米胶囊 36 的希望的特性。

可以向第一种水性组合物 14 中加入生物活性成分 12，或者可以向生物活性成分 12 中加入第一种水性组合物 14。生物活性成分 12 和第一种水性组合物 14 的加入顺序对于本发明并不重要，当生物活性成分 12 溶解或分散于第一种水性组合物 14 中时形成的亲水性组合物（未显示）优选地在亲水性组合物中能保持均匀的溶液或分散体。

第一种水性组合物 14 可以是单独的成分，或在制备的两种或多种成分的不同混合物中，随后结合形成第一种水性组合物 14。第一种水性组合物 14 的不完全例子包括但不限于：上述水、非极性溶剂、极性溶剂或其任何组合。优选地，水是第一种水性组合物 14。

可以向生物活性成分 12、第一种水性组合物 14、亲水性组合物中加入液体、蒸汽或颗粒形式的表面活性剂组合物 16。选择的表面活性剂组合物 16 的形式优选地使表面活性剂组合物 16：（1）在加入生物活性成分 12、第一种水性组合物 14 或亲水性组合物之前保持稳定，（2）均匀分散于生物活性成分 12、第一种水性组合物 14 或亲水性组合物中，（3）形成微团结构，（4）吸附到生物活性成分 12、第一种水性组合物 14、亲水性组合物表面，（5）替换位于生物活性成分 12 表面的第一种水性组合物，（6）将生物活性成分 12 或亲水性组合物分配到微团结构核心中形成表面活性剂微团 22，（7）产生热力学驱动力，可有效地缩小生物活性成分 12、表面活性剂微团 22、稳定的表面活性剂 28 或纳米胶囊 36 的大小。

不希望被理论所束缚，可以认为，在加入第一种水性组合物 14 中时，表面活性剂组合物 16 的表面活性剂成分吸附于生物活性成分 12 的表面，以将疏水表面活性剂成分表面与第一种水性组合物 14 产生的热力学不宜环境的暴露减到最小。因此，表面活性剂成分吸附于生物活性成分表面，缩小表面活性剂成分可暴露于第一种水性组合物 14 的表面积。表面活性剂成分向生物活性成分 12 上的吸附被认为有利于生物活性成分 12 和/或表面活性剂微团 22 的缩小。

表面活性剂组合物 16 的表面活性剂成分可以是单独的表面活性剂，或者在制备的两种或多种表面活性剂的不同混合物中，随后结合形成表面活性剂组合物 16。HLB 值小于约 6.0 单位或者 CMC 值小于约 200μm 的合适的表面活性剂的不完全例子可见《皮肤学制剂》（Barry, B. Marcel Dekker (1983)）或《经皮吸收：药物、化妆品、机制、方法》第三版，Bronough, R.编写，1999 或《工业表面活性剂手册》（Ash, M.编写，Gower Pub. (1993)），在此引用作为参考。一个例子是，表面活性剂成分可以是 2,4,7,9-四甲基-5-癸炔-4,7-二醇（TM-二醇），2,4,7,9-四甲基-5-癸炔-4,7-二醇（TM-二醇）的混合物，含有一个或多个炔二醇基的分子，鲸蜡醇或其任何组合。

表面活性剂组合物 16 的任选的生物相容性油成分 18 可以以液体、蒸汽或颗粒的形式与表面活性剂成分结合。任选的生物相容性油成分 18 的形式优选地使任选的生物相容性油成分 18：（1）在加入表面活性剂组合物 16 中之前保持稳定，（2）均匀混合于表面活性剂组合物 16 中，（3）溶解或分散表面活性剂成分，（4）提高表面活性剂组合物 16 的疏水性，因此，在实施本发明时可以缩小生物活性成分 12、表面活性剂微团 22、稳定剂表面活性剂微团 28 或纳米胶囊 36 的大小。

优选地，表面活性剂组合物 16 中任选的生物相容性油成分 18 的浓度为约 10^{-7}%（重量）-约 10%（重量），这根据第一种水性组合物 14 中稳定的表面活性剂微团 28 的总体积。根据表面活性剂组合物 18 的总体积，任选的生物相容性油成分 18 的浓度高于约 10 个%（重量）可能是不希望的，因为这种较高的浓度提高了生物相容性油的相体积，因此

在此使用时，“表面活性剂”是指含有在热力学上倾向于被极性溶剂溶解的极性部分，和在热力学上倾向于被非极性溶剂溶解的烃部分的任何分子。术语“表面活性剂”也包括阴离子、阳离子或非离子型表面活性剂。在此使用时，术语“阴离子型表面活性剂”是指含有在水溶液中可电离形成阴离子的极性部分的表面活性剂。类似地，术语“阳离子型表面活性剂”是指含有在水溶液中可电离形成阳离子的阳离子极性部分的表面活性剂。同样，“非离子”表面活性剂是指含有在水溶液中不电离的极性部分的表面活性剂。

不希望被理论所束缚，通常认为表面活性剂是指一种分子，它能有效地缩小分散于第二种物质中的第一种物质之间的表面或界面张力，使得第一种物质溶解，第一种物质的任何分子基团分散。一般而言，在加入表面活性剂后第一种物质的流变动力学直径增加。但是，据认为表面活性剂组合物 16 能有效地缩小第一种水性组合物 14 中表面活性剂微团 22 的大小或直径，从而在实施本发明时缩小纳米胶囊 36 的大小。

表面活性剂组合物 16 可以只含有表面活性剂成分（未显示），或者可以任选地含有生物相容性油成分 18。表面活性剂成分可以用从小于约 1 单位到大于约 13 单位的 HLB 等级表征。

HLB 值小于约 6.0 单位的表面活性剂成分可能被描述为在水性组合物或基于水的组合物中分散较差或不分散。另外，HLB 值低于约 6.0 单位的表面活性剂成分可以表征为疏水或非离子型表面活性剂。HLB 值大于约 7.0 单位的表面活性剂成分可描述为，当分散于水性或基于水的组合物中时，该表面活性剂成分能形成乳状到半透明到澄清的分散体。

优选地，在实施本发明的方法时，表面活性剂组合物 16 的表面活性剂成分的 HLB 值小于约 6.0 单位。更加优选地，表面活性剂组合物 16 的表面活性剂成分的 HLB 值小于约 5.0 单位，以利于制备直径小于约 50mm 的纳米胶囊。

也可以按照临界微团浓度（CMC）值表征表面活性剂成分。优选地，表面活性剂组合物 16 的表面活性剂成分的 CMC 值小于约 300 微摩尔（μm）。更加优选地，表面活性剂成分的 CMC 值小于约 200μm。

可能在制备、分散和/或处理表面活性剂微团 22、稳定的表面活性剂微团 28 或纳米胶囊 36 时造成困难。表面活性剂组合物 16 中任选的生物相容性油成分的浓度低于约 10^{-7}%（重量）可能不是优选的，因为这样低的浓度不能有效地溶解表面活性剂成分，或者提高表面活性剂组合物 16 的疏水性，并且最终可能增加纳米胶囊 36 的直径。

表面活性剂组合物 16 的任选的生物相容性油成分 18 可以为单独的生物相容性油，或者可在制备的两种或多种生物相容性油的不同混合物中，然后结合形成任选的生物相容性油成分 18。可以作为生物相容性油成分 18 一部分的合适的生物相容性油的不完全例子可见:《皮肤学制剂》（Barry, B. Marcel Dekker (1983)）或《经皮吸收: 药物、化妆品、机制、方法》第三版，Bronough, R.编写，1999 或《工业表面活性剂手册》（Ash, M.编写，Gower Pub. (1993)），在此引用作为参考。优选地，食用或 USP 级油，如 DMSO、DMF、蓖麻油或其任意组合，用来实施本方法。

可含有一定量的表面活性剂组合物 16，使得在形成表面活性剂微团 22 时，能有效地形成微团结构，将生物活性成分 12、第一种水性组合物 14 或亲水性组合物分配到微团结构的核心中。更加优选地，可含有一定量的表面活性剂组合物 16，使得在实施本发明时，能有效地提供最大热力学驱动力，使生物活性成分 12、表面活性剂微团 22 的大小并最终使纳米胶囊 36 的大小降到最小。

此外，本领域技术人员应当认识到，表面活性剂组合物 16 的量可根据下列因素而不同: 生物活性成分 12、第一种水性组合物 14、表面活性剂成分与任选的生物相容性油 18 之比、表面活性剂微团 22、稳定的表面活性剂微团 28 或纳米胶囊 36 的希望的特性。例如，一种表面活性剂组合物，其含有与非极性生物相容性油（如蓖麻油）混合的 HLB 值约为 6.0 单位的表面活性剂成分，可以提供与含有与 DMSO 混合的约 4.0 单位表面活性剂成分的第二种表面活性剂组合物程度相同的热力学驱动力。

根据分散于第一种水性组合物 14 中的稳定的表面活性剂微团的总体积，表面活性剂组合物 16 的量可以高达约 0.5%（重量）。更加优选地，根据分散于第一种水性组合物 14 中的稳定的表面活性剂微团 28 的总体

积，表面活性剂组合物 16 的量低于约 0.25%（重量）。最优选地，根据分散于第一种水性组合物 14 中的稳定的表面活性剂微团 28 的总体积，表面活性剂组合物 16 的含量低于约 0.05%（重量）。一个不完全实例是，根据分散于第一种水性组合物 14 中的稳定的表面活性剂微团的总体积，可以向亲水性组合物总体积中加入浓度约为 500ppm 的表面活性剂组合物 16。

第一个分散装置 20 启动并促进形成基于生物活性成分 12、第一种水性组合物 14 和表面活性剂组合物 16 的微团结构。表面活性剂成分不断吸附于生物活性成分 12 或亲水性组合物表面上，直到所有表面活性剂分子覆盖、因而包围了微团结构核心中的生物活性成分 12 或亲水性组合物，形成表面活性剂微团 22。第一种水性组合物 14 中大量表面活性剂微团 22 的形成产生了表面活性剂微团 22 的分散体。

能够均匀混合或分散的任何常规分散装置 20 通常适用于产生根据本发明的表面活性剂微团的分散体。此外，本领域技术人员应当认识到，第一个分散装置 20 可根据纳米胶囊 36 的希望的特性而不同。例如，第一个分散装置 20 可包括任何装置，如超声或振荡装置（未显示）等，用于在亲水性组合物中分散生物活性成分 12，并且在加入表面活性剂组合物 16 后形成表面活性剂微团 22。但是，尽管第一个分散装置 20 可包括超声或振荡装置，但在实施本发明的方法时超声或振荡装置不是必需的。

在此使用时，“表面活性剂微团”可以表述为在生物活性成分 12 与表面活性剂组合物 16 间的界面处密集的表面活性剂分子的单分子屏障，使该屏障包封生物活性成分 12、第一种水性组合物 14 或亲水性组合物。也可以认为，术语“表面活性剂微团”包括部分或半表面活性剂微团，它们部分包封生物活性成分 12、第一种水性组合物 14 或亲水性组合物。

当生物活性成分 12 是一种亲水性生物活性成分时，表面活性剂分子的极性部分与亲水性生物活性成分的表面结合。当生物活性成分 12 是一种疏水性生物活性成分时，表面活性剂微团的烃部分与疏水性生物活性成分的表面结合。

表面活性剂微团的形成一般在确定的浓度（称为临界微团浓度）时

发生。如上所述，在实施本发明时，CMC 值小于约 200 微摩尔的表面活性剂成分是优选的。

在形成表面活性剂微团 22 的分散体后，将表面活性剂微团 22 的分散体转移到稳定装置 26 中，在其中加入生物相容性聚合物成分 24，来稳定表面活性剂微团 22 的分散体。此外，在不需要稳定装置 26 的第一个分散装置 20 中，也可以向表面活性剂微团 22 的分散体中加入生物相容性聚合物成分 24。

生物相容性聚合物成分 24 稳定表面活性剂微团 22 的分散体，在第一种水性组合物 14 中形成稳定的表面活性剂微团 28。因此，在加入生物相容性聚合物成分 24 后，在第一种水性组合物 14 中存在稳定的表面活性剂微团 28 的分散体。

在此使用时，术语“生物相容性的”是指一种物质，它能与生物系统相互作用，而不引起细胞毒性、不希望的蛋白质或核酸修饰或免疫应答的激活。

生物相容性聚合物成分 24 可以以液体、蒸汽或颗粒的形式加入表面活性剂微团 22 的分散体中。优选的生物相容性聚合物成分 24 的形成使生物相容性聚合物成分 24: （1）在加入表面活性剂微团 22 分散体前保持稳定，（2）均匀分散于表面活性剂微团 22 分散体中，（3）提高第一种水性组合物 14 的粘度，（4）在表面活性剂微团 22 与第一种水性组合物 14 的界面处形成界面层，（5）吸附于表面活性剂微团 22 的表面，（6）能够离子渗透交换，（7）在加入溶质后能够沉淀，（8）能够酶降解、表面和/或大量侵蚀，（9）不干扰或掩盖生物活性成分 12 的功能活性，（10）防止表面活性剂微团 22 分散体聚集和/或凝聚，（11）能够获得特殊的溶解型。

可含有一定量的生物相容性聚合物成分 24，以有效包被、因而稳定表面活性剂微团 22。此外，本领域技术人员应当认识到，根据生物活性成分 12、第一种水性组合物 14、表面活性剂组合物 16、温度、pH、摩尔渗透压浓度、存在任选的溶质或溶剂、表面活性剂微团 22、稳定的表面活性剂微团 28 任何希望的特性、纳米胶囊 36 或希望的溶解型，用来

稳定表面活性剂微团 22 的生物相容性聚合物成分 24 的含量可能不同。

尽管生物相容性聚合物成分 24 的浓度对于本发明不是关键的，但生物相容性聚合物成分 24 的浓度优选地基于生物活性成分和希望的溶解型。当生物相容性聚合物成分 24 的浓度太高时，纳米胶囊 36 的外壳可能不溶解。如果生物相容性聚合物成分 24 的浓度太低，纳米胶囊 36 的外壳可能快速溶解，从而提高细胞毒性。另外，生物相容性聚合物成分 24 的浓度太低也许不能产生有效的机械力来稳定表面活性剂微团 28。

生物相容性聚合物成分 24 浓度太高也是不希望的，因为太高的浓度可提高第一种水性组合物 14 的粘度，因而在制备、混合和/或转移稳定剂表面活性剂微团 28 时可造成困难。生物相容性聚合物成分 24 浓度太低不是优选的，因为较低的浓度可能无法提供需要的粘度来稳定表面活性剂微团，也不能有效地包被表面活性剂微团 22，来防止第一种水性组合物 14 中表面活性剂微团 22 的凝集。

生物相容性聚合物成分 24 可以作为单独的生物相容性聚合物，或者在制备的两种或多种生物相容性聚合物的不同混合物中，随后结合形成生物相容性聚合物成分 18。生物相容性聚合物的不完全例子包括：聚酰胺、聚碳酸酯、聚亚烷、聚亚烷基二醇、聚环氧烷、聚亚烷基对苯二酸、聚乙烯醇、聚乙烯醚、聚乙烯酯、聚卤乙烯、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙醇酸交酯、聚硅氧烷、聚氨基甲酸酯及其共聚物、烷基纤维素、羟烷基纤维素、纤维素醚、纤维素酯、硝基纤维素、丙烯酸和甲基丙烯酸酯的聚合物、甲基纤维素、乙基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羟丁基甲基纤维素、乙酸纤维素、丙酸纤维素、乙酸丁酸纤维素、乙酸邻苯二甲酸纤维素、羧乙基纤维素、三乙酸纤维素、硫酸纤维素钠盐、聚（甲基丙烯酸甲酯）、聚（甲基丙烯酸乙酯）、聚（甲基丙烯酸丁酯）、聚（甲基丙烯酸异丁酯）、聚（甲基丙烯酸己酯）、聚（甲基丙烯酸异癸酯）、聚（甲基丙烯酸月桂酯）、聚（甲基丙烯酸苯酯）、聚（丙烯酸甲酯）、聚（丙烯酸异丙酯）、聚（丙烯酸异丁酯）、聚（丙烯酸十八酯）、聚乙烯、聚丙烯、聚（乙二醇）、聚（环氧乙烷）、聚（对苯二甲酸乙二醇酯）、聚（乙烯醇）、聚（乙酸乙烯酯）、聚氯乙烯、聚

苯乙烯、聚乙烯吡咯烷酮、聚透明质酸、酪蛋白、明胶、明胶蛋白、聚酐、聚丙烯酸、藻酸盐、壳聚糖、聚（甲基丙烯酸甲酯）、聚（甲基丙烯酸乙酯）、聚（甲基丙烯酸丁酯）、聚（甲基丙烯酸异丁酯）、聚（甲基丙烯酸己酯）、聚（甲基丙烯酸异癸酯）、聚（甲基丙烯酸月桂酯）、聚（甲基丙烯酸苯酯）、聚（丙烯酸甲酯）、聚（丙烯酸酸异丙酯）、聚（丙烯酸酸异丁酯）、聚（丙烯酸酸异十八酯）及其组合。

另外，对于酶降解修饰，或适应于在应用光、超声能、辐射后改变，温度、pH、摩尔渗透压浓度、溶质或溶液浓度改变的生物相容性聚合物，也可以作为生物相容性聚合物成分 24 的一部分。优选地，生物相容性聚合物成分 24 是一种亲水性聚合物，它能基本上包被、优选地连续包被表面活性剂微团 22。更加优选地，亲水性生物相容性聚合物成分 24 能够离子渗透交换。

尽管本发明主要就亲水性生物相容性聚合物成分 24 进行了描述，但是应当理解，根据本发明，可以用其它任何生物相容性聚合物（如疏水性生物相容性聚合物）代替亲水性生物相容性聚合物，而仍具有本发明的优点。同样应当理解，根据本发明可包含任何生物相容性聚合物的任意组合，而仍具有本发明的优点。

适用于以生物相容性聚合物成分 24 稳定表面活性剂微团 22 的任何常规装置和技术通常可以用作根据本发明的稳定稳定装置 26。而且，在稳定过程中优选地不包括其它任何装置，如高压匀浆或强超声装置。

在稳定表面活性剂微团 22 后，可以将稳定的表面活性剂微团 28 转移到位于第二个分散装置 32 的第二种水性组合物 30 中。可通过机械形成稳定的表面活性剂微团 28 的小滴，转移稳定的表面活性剂微团 28，随后加入第二种水性组合物 30 中。

第二种水性组合物 30 可能只含有水，或者任选地可含有一种溶质，用于沉淀在稳定的表面活性剂微团 28 周围的生物相容性聚合物成分 24。可用来沉淀生物相容性聚合物 24 的溶质的不完全例子包括元素周期表中所列元素的离子。

优选地，第二种水性组合物 30 含有一种溶质，其含量可有效沉淀生

物相容性聚合物成分 24，并形成分散的、任选地粉化的本发明的纳米胶囊 36。在此使用时，术语“沉淀”是指围绕稳定的表面活性剂微团 28 的生物相容性聚合物成分 24 的凝固或硬化。也应当理解，术语“沉淀”也包括当生物相容性聚合物成分 24 暴露于溶质时可能发生的生物相容性聚合物 24 的任何结晶。

另外，能够调节纳米胶囊 36 效能的其它任何成分也可以作为第二种水性组合物的一部分，由此调节纳米胶囊 36 的功能活性。例如，第二种水性组合物可含有其它包被赋形剂，如细胞识别成分或不同的离子，如 Mn^{2+}、Mg^{2+}、Ca^{2+}、Al^{3+}、Be^{2+}、Li^{+}、Ba^{2+}、Gd^{3+}，或能够与生物相容性聚合物成分 24 相互作用的其它任何离子。

术语“细胞识别成分”在此使用时是指一种能识别靶细胞表面上的成分的分子。细胞识别成分可包括细胞表面抗原的抗体、细胞表面受体（如参与受体介导的胞吞的细胞表面受体）的配体、肽激素等。

已经发现，当稳定的表面活性剂微团 28 在含有用于沉淀生物相容性聚合物成分 24 的溶质的第二种水性组合物 30 中温育时，纳米胶囊 36 大小缩小。而且，在第二种水性组合物中温育稳定的表面活性剂微团 28 后，也观察到纳米胶囊 36 絮凝悬液的形成。

在此使用时，“絮凝的悬液”是指在网络样结构中结合的离散颗粒形成松散的凝聚，这通过生物活性成分的物理吸附，在化学作用过程中桥接（沉淀），或在较长距离的范德华引力强于较短距离的排斥力时发生。纳米胶囊 36 的絮凝悬液可能在网络样结构中包含不同含量的第一种水性组合物 14 或第二种水性组合物 30。另外，也可以轻轻拍打纳米胶囊的絮凝悬液分散纳米胶囊 36。

可通过特定孔口大小的喷嘴（未显示）或通过雾化装置（未显示）粉化，将稳定的表面活性剂微团 28 转移到第二种水性组合物 30 中。粉化或雾化稳定的表面活性剂微团 28 一般包括施加剪切力，这能够进一步分散稳定的表面活性剂微团 28。此外，在转移过程中施加剪切力也能有效地：（1）降低纳米胶囊 36 的大小，或（2）破碎在稳定装置 26 中形成的稳定的表面活性剂微团 28 之间的聚集或结合。例如，可以利用低于

约 100 psi 的喷嘴压力粉化稳定的表面活性剂微团 28。

根据可用来向第二种水性组合物中转移稳定的表面活性剂微团 28 的喷嘴孔口大小，纳米胶囊 36 的直径也可能不同。此外，也可以向含有沉淀生物相容性聚合物 24 的溶质的第二种水性组合物 30 中加入稳定的表面活性剂微团 28，形成纳米胶囊 36 的分散体，提供例如用于皮下施用纳米胶囊的分散体。

在沉淀和/或任选地温育第二种水性组合物 30 中的纳米胶囊 36 后，可以过滤、离心或干燥纳米胶囊 36，获得离散的纳米胶囊 36。可以冷冻或重建纳米胶囊 36 以备以后使用，或者可以通过如下的施用途径向靶细胞或组织输送：经口、静脉内、皮下、腹膜内、鞘膜内、肌内、吸入、局部、经皮、栓剂（直肠）、阴道栓（阴道）、尿道内、门脉内、肝内、动脉内、眼内、经鼓膜、intraumoral、鞘内或其任一组合。

直径小于约 50nm 的纳米胶囊 36 在向靶细胞输送生物活性成分中是有利的，这是由于以下几个原因：第一，直径小于约 50nm 的纳米胶囊 36 通过保护生物活性成分在向靶细胞运送过程中不降解提高了生物活性成分的输送。

第二，直径小于约 50nm 的纳米胶囊 36 促进有效的细胞摄取。靶细胞的有效细胞摄取一般在颗粒直径小于约 50nm 时发生，而在颗粒直径大于约 50nm 时不发生。

第三，认为靶细胞摄取纳米胶囊 36 是通过运输系统，如非内体途径，这防止纳米胶囊 36 的溶酶体降解。实际上可以认为，本发明的纳米胶囊 36 通过小窝蛋白（caveolin）调节途径有效地输出到细胞内，这避免了大多数（如果不是全部的话）一般可降解纳米胶囊 36 的内体调节途径。

第四，纳米胶囊 36 具有与生物活性成分分离的生物相容性聚合物外壳。实际上，生物活性成分不是混合于、包埋于或吸附于纳米胶囊 36 的生物相容性聚合物外壳上。当生物活性成分不是混合于、包埋于或吸附于生物相容性聚合物外壳上时，含有纳米胶囊 36 的细胞避免了凋亡或细胞死亡。

第五，在制备根据本发明的纳米胶囊 36 时，用生物相容性聚合物外

壳包围核心内的生物活性成分，可有利地避免纳米胶囊36的成熟前降解，或纳米胶囊体内运输过程中的细胞毒性反应。包围核心内的生物活性成分导致生物活性成分的线性释放速率，而在从纳米胶囊36释放过程中没有任何零裂解（zero burst）现象。

在没有任何零裂解现象的情况下，生物活性成分从纳米胶囊的线性释放率也是一个有利的特征，因为线性释放率允许合理地设计包被溶解型，以将细胞毒性减到最小。在此使用时，术语“溶解型”是指生物相容性聚合物外壳溶解或降解，从纳米胶囊核心释放生物活性成分的速率。

利用本发明的方法制备的纳米胶囊36的另一个优点是，即使需要也只需要加入少量有机溶剂形成纳米胶囊36。在本发明的方法中不使用大多数（如果不是全部的话）有机溶剂是有利的，因为在制备纳米胶囊36过程中有机溶剂可损伤生物活性成分12，破坏靶细胞，或者具有毒性。不使用大多数（如果不是全部的话）有机溶剂则不需要复杂的溶剂去除技术，如溶剂稀释、真空蒸发等，并且避免了制备纳米胶囊36过程中的任何相关成本或复杂方法策略。

本发明的纳米胶囊36还允许稳定地包封生物活性成分，特别是亲水性生物活性成分，如多核苷酸和多肽。“稳定包封”在此使用时是指保持包封的生物活性成分的结构。对于核酸，低分子量核酸裂解产物的产生基本上可以避免，这可通过电泳测定。纳米胶囊36也可用来包封任何生物活性成分，无论水溶性或电荷密度如何。

用途

纳米胶囊36可以与其它聚合结合剂、表面活性剂、填充剂和其它赋形剂结合，而使纳米胶囊36加入固体剂型中，如颗粒、片剂、丸剂、薄膜或包衣，用于提高生物活性成分12的输送。这样，设计溶解型、控制颗粒大小和细胞摄取保持于纳米胶囊水平上。这些用途包括但不限于：产生用于肺部输送的快速溶解的纳米胶囊丸，或用于装置介导的输送的纳米胶囊薄膜。

另一种用途是，通过聚合物选择和/或在纳米胶囊生物相容性聚合物

外壳或包被内含有细胞识别成分，可以为特殊细胞或组织摄取设计纳米胶囊 36。这些包被可用于向靶细胞特异地或增强地输送生物活性剂。这些用途包括但不限于：化疗剂或反义 DNA 的肿瘤靶向，向抗原递呈细胞输送抗原，向视网膜细胞经眼部施用核酶，经皮输送蛋白质抗体或经鼓膜施用肽核酸。

特性的确定和表征技术

在此使用多种分析技术。这些技术的解释如下：

图 1A：在新切开的云母上制备样品，分散、风干，利用配有 J 型扫描仪和环境开放（tapping）模式固定器的 Nanoscope II 多模式 AFM（数字仪器）成像。125μm 长的 IBMSC 型硅悬臂来自 IBM，共振频率为 250-450kHz。所有成像均为开放模式，图像为 512X512 像素，扫描频率为 1kHz。采集高度、振幅和相位图像。图像用 DI 软件处理，用 NIH Image SXM 分析。A：来自两相系统的制剂 Q，低 HLB 表面活性剂；B：来自两相系统的制剂 S，高 HLB 表面活性剂；C：来自一相系统的制剂 T，高 HLB 表面活性剂；D：来自两相系统的制剂 V，低 CMC 表面活性剂。

图 1B：纳米胶囊释放到异丁醇在磷酸缓冲液（PBS），pH7.2 中的 10%溶液中。样品一式两份。

图 1C：从含有表面活性剂的母样（Master batch）中等份采集标称 300ng 的 DNA 样品，过商品 miniprep 柱处理。洗脱液循环通过 Qiaquik 柱，收集 3 次（4，5）或 2 次（6，7），或者循环通过 Zymoclean 柱，收集两次（8，9）。利用商品共沉淀剂乙醇沉淀样品，在 Synergel 修饰的 1.5%琼脂糖凝胶上电泳，用 SybrGold 染料染色，用 Storm 860 数字化处理，与未修饰的但从相同母样中再沉淀的样品（10，11）比较。道 1-3：100、50 和 5ng ？_DNA。

图 2：根据网格蛋白（clathrin）（Chemicon）的免疫信号水平估计内吞活性。如文献所述（Transduction Laboratories），根据小窝蛋白-1 的免疫信号估计胞饮活性。利用抗 Lamp-1 的单克隆抗体（Transduction Laboratories）检测溶酶体活性。利用针对绵羊 IgG 的链霉亲和素-生物

素免疫复合物（Jackson Laboratories）检测纳米胶囊的定位。用绵羊 IgG 刺穿纳米胶囊的包被，以便能实施该检测策略。

图 3：70%铺满的无限增殖化 Rt-1 成纤维细胞培养物用含量逐渐提高的纳米胶囊制剂 K 处理 4 天，并用优化的脂质体制剂（剂量 50ng）短时处理（3 小时）。结果表示为细胞肌动蛋白综合强度的百分比，并与脂质体制剂比较。表达载体编号为 448：pEF/myc-his/GFP（Invitrogen）。

图 4A：在用盐水或 6μg 控释纳米胶囊处理 7 天后，骤冻照射的猪活检标本，然后在 RIPA 中匀浆。100μg 裂解样品在 SDS-PAGE 梯度凝胶上电泳，转移到硝酸纤维素膜上，利用化学荧光检测 β-半乳糖苷酶（121 kD）或 involucrin（~100 kD）。由于 100 kD 处凝胶缺陷的干扰，将结果标准化到转移后用考马斯蓝染色的凝胶上。Involucrin 是角质膜的一种成分，由上基部细胞产生，在照射的猪皮肤中能检测到，可用于未来的标准化目的。道 A：N，局部，活检 oc-2；B：N，局部，活检 oc-3；C：O，局部，活检 l-1；D：只有 PBS，活检 l-5；E：N，皮下注射，活检 l-6。

图 4B：利用针对一种加入的融合蛋白标记的单克隆抗体检测 β-半乳糖苷酶报道蛋白。A：N，局部，活检 oc-1，用抗-Xpress[a] 检测；B：与 A 的匹配图，检测抗 Von Willenbrand 因子（Sigma）；C：未处理的活检标本，用抗-Xpress[a]（Invitrogen）检测。

图 5：将纳米胶囊加入水性缝线包被中，缝线用于器官培养中的猪皮活检标本。用 Cy3 结合的链霉亲和素-生物素复合物检测纳米胶囊，掺入绵羊 IgG，利用兔抗 GFP 多克隆抗体（Abcom）以及 Fitc-结合的兔抗 IgG 多克隆抗体和 Alexa 488-结合的抗 Fitc 多克隆抗体（Molecular Probes），检测 GFP 转基因表达。包括不含一级抗体的对照，用于估计信号-背景水平。

图 6A：如前所述检测纳米胶囊，利用兔抗 GFP 多克隆抗体以及 Cy3 结合的抗兔 IgG 多克隆抗体（Jackson Laboratories）检测 GFP 转基因的表达。

图 6B：如图 5 所述检测 GFP 表达，细胞核用 10μg/ml 二苯甲酰胺复染。

图 6C：癌细胞和 HDF 细胞分别以 2000 和 6000 细胞/孔接种到 96 孔平板上过夜。如图所示向孔中加入顺铂制剂 18 小时，然后洗脱。72 小时后，通过商品 MTT 测定法（WST 测定，Boehringer Mannheim）估计细胞存活力。孔一式两份。

图 7：溶酶体的共定位用抗 Lamp-1 的单克隆抗体（Transduction Laboratories）检测。包括 O-甲基 RNA 的 AFM 图像，它是通过与 27 KD 聚乙烯亚胺纳米包封或复合配制而成的。

实施例

在下列实施例中更详细地描述了本发明，这些实施例只是旨在说明，因为本领域技术人员明白属于本发明范围内的许多修改和变化。

试剂：

A. 核酸缩合剂

聚（氮丙啶）（PEI）为 27 千道尔顿（kD）. PEI 以最佳条件使用（90% 电荷中和）。

聚赖氨酸（PLL）分子量为 70-150000。利用可从 Pierce Chemical (Rockford, IL)获得的碳二亚胺（carboxiimide）化学剂将 PLL 缩合物质与核信号定位肽（SV-40 T 抗原或 cys-gly-tyr-gly-pro-lys-lys-lys-arg-lys-val-gly-gly）结合。

核基质蛋白（NMP）的制备。利用 Gerner 等人，J. Cell. Biochem. 71(1998):363-374 所述的方法从大鼠成纤维细胞系和人角质细胞系中收集 NMP，该文献在此引用作为参考。蛋白质制品与所述核信号定位肽结合。

B. 表面活性剂

2,4,7,9-四甲基-5-癸炔-4,7-二醇（TM-二醇）：HLB=4-5，CMC 未测。

聚（氧-1,2-乙二醇）、a-（4-壬基酚）-w-羟基、Tergitol NP-40（NP40）：HLB=17.8，CMC 180μM，

聚氧乙烯 20 山梨聚糖单油酸酯（Tween 80）：HLB=10，CMC 920μM，

鲸蜡醇：HLB=4，CMC 未测。

C. 聚合物

透明质酸，细菌衍生的，100 万千道尔顿（MM kD），如美国专利 5,846,561（在此引用作为参考）所述与核定位信号肽结合。

透明质酸，来源于人脐带，约 4 MMkD，未结合。

聚烯吡酮（Povidone）（聚乙烯吡咯烷酮，PVP），分子量 10000kD，未生物结合。

聚烯吡酮（聚乙烯吡咯烷酮，PVP），分子量 40000kD，未生物结合。

聚烯吡酮（聚乙烯吡咯烷酮，PVP），分子量 36000kD，未生物结合。

腱生蛋白，220kD，未生物结合。

D. 表达载体

334: pcDNA/His/lacZ，产半乳糖苷酶，掺入 CMV 启动子，基于 pcDNA 3.1（Invitrogen），8.6 kb。

425: pEGFP-c/farn，为便于显微镜检用法呢基部分修饰的增强 GFP（绿色荧光蛋白）表达载体，CMV 启动子，4.6 kb。

423: pEGFP-c3/p57（Kpn/Sma）Clontech 增强 GFP（绿色荧光蛋白）表达载体，用来自细胞周期蛋白依赖的激酶的核定位标记修饰，以便于显微镜检，4.6 kb。

E. 细胞

CCRL 1764: 无限增殖化大鼠新生成纤维细胞系

HaCaT: 无限增殖化人角质细胞系

Ca9: 来自舌源鳞状细胞癌的人肿瘤细胞。

实施例 1A - 改变分散条件对亲水性纳米胶囊的影响

研究了适当的分散条件在下面一系列制剂中的重要性。这些制剂如下生产：i）利用水浴超声波仪在冰上预分散 25 μg DNA（425），ii）通过振荡，然后在冰上温育 20 分钟，缩合少量水中的 DNA，iii）加入表面活性剂，随后加入油，然后以 10 瓦探针超声处理 30 秒，iv）首先加入盐水，然后加入 1MM kD 透明质酸聚合物（1%）作为保护胶体，扩散稀释为 3 毫升（mL），v）通过 250 微米（μm）孔泵入 22mL PBS、10 毫摩尔（mM）

Ca^{2+}、200mM Li^{+}中，将乳液机制剪切为小滴，vi）颠倒温育过夜，vii）离心回收纳米颗粒，用于重悬浮和过滤除菌。缩合剂与 DNA 的重量比根据 90%电荷中和时的染料排除确定。在该实验中用 TM-二醇作为水不溶性表面活性剂，而用 Tergitol NP40 和 Tween 80 作为水溶性甚至更高水溶性的乳化剂/分散助剂。

为了防止在水性基质中形成微团，通过下列方法系统改变分散条件：i）选择水溶性表面活性剂（制剂 S、T、U 和 V），ii）除去分散相（制剂 T），iii）将表面活性剂加载量降低至微团形成所需的量以下。制剂 U 的特征在于使用水可混溶性油（硅油）。

物理表征这些制剂，测试其体外基因转移的功能性。定量结果总结于表 1A 中。

表 1A: 改变分散条件对亲水性纳米胶囊的影响

制剂	Q	R	S	T	U	W	V
实验变更:	surf > CMC	surf > CMC	surf > CMC	surf > CMC	surf > CMC	surf > CMC	surf > CMC
临界微团浓度（CMC）	~0	~0	360 ppm	360 ppm	360 ppm	1200 ppm	360 ppm
气溶胶前表面活性剂浓度（3ml 基础）	500 ppm	500 ppm	600 ppm	600 ppm	600 ppm	4000 ppm	90 ppm
HLB 值	4-5	4	17.8	17.8	17.8	10	17.8
相	水/可溶性油	水/可溶性油	水/可溶性油	水/可溶性油	水/可溶性油	水/可溶性油	水/可溶性油
制剂特征:							
核酸掺入（%）	86±8	67±1.4	50.3±12	39±1.7	32.8±6	37±1.41	57.6±16
低分子量 DNA 的出现 （%高于背景，纳米胶囊消化后电泳）	15.00	76	93.00	53.00	66	28	41.00
超螺旋保持（100 小时后，释放） （面积%，初始分布=76%超螺旋）	87%	65%	66%	59%	43%	65%	80%
颗粒大小（平均值±SE）	42±2	45±3	73±4	226±11	291±25	150±7	199±11
二级结构（s）	25% 100-200 nm	30% 500 nm	70% 300 nm	S<10%	S<10%	S>40%	S>80% 400 nm
絮凝状态	丝状絮凝	丝状絮凝	球形絮凝			酵母样凝集	凝集
备注				ppt. 雾化过程中		ppt. 雾化过程中	ppt. 雾化过程中
表现:							
转导 GFP 蛋白的产生 （像素单位，%对照脂质体制剂，100μg 总蛋白，第 11 天）	420	340	0	0	0	0	0

纳米胶囊的大小由开放模式 AFM 决定，图像示于图 1A 中。数据表明平均小于 50nm 的纳米胶囊大小仅用多相系统与低水溶性表面活性剂即可获得（表 1A: 制剂 Q、R 对 S、T、U、V 和 W）。此外，只有小于 50nm 的纳米胶囊导致在 CRL-1764 大鼠成纤维细胞中产生可检测的转基因（表 1A）。有效的分散也对应于减少的凝集和提高的 DNA 稳定性（如电泳分裂产物减少如证明的）。起始 DNA 部分松弛（根据电泳，76%为超螺旋）。以该值为基础，在 100 小时释放测试后仍然包封的 DNA 的超螺旋保持（rentention）在多相系统中是优秀的。

分散、粉化的亲水性纳米胶囊的释放图是线性的，显示没有零裂解，在 72 小时后导致约 60%释放（见图 1B）。用该系列中（Tween 80）的大多数水溶性表面活性剂制备的制剂 W 不能完全释放加载的 DNA。图 1C 说明，利用包括丁醇抽提 10%丁醇/盐水释放液体、在 miniprep 柱上分离以及在 260nm 激发下测量吸光度的方法，能精确地回收少量 DNA（在该情况下为 300 纳克 DNA）。通过在利用商品共沉淀助剂乙醇共沉淀后电泳回收的 DNA，证实了由紫外光谱法获得的结果。实验 1A 证明，多相系统在由微团溶液产生包被颗粒中的重要性确定了表面活性剂的要求，确认了体外测量释放分布图的方法。

实施例 1B - 过程参数对颗粒功能性的影响

为了研究调整过程参数对纳米胶囊输送 DNA 的功能性的影响，制备一系列制剂（设计在 3 天内释放），测量这些制剂在 5 天后在大鼠成纤维细胞培养物中输送核绿色荧光蛋白（GFP）报道转基因的转导效率。调节 DNA 分子的电荷中和、表面活性剂/油系统、表面活性剂相总体积、应用探针超声处理、粉化的绝对需要和接受水浴摩尔渗透（osmolality）。该实验的结果总结于表 1B 中:

表 1B: 过程参数对颗粒功能性的影响

纳米胶囊设计	制剂名称	缩合剂的电荷中和	表面活性剂	生物相容性油	油相体积（%，4.5 ml）	超声处理乳化	粉化直径（μm）	接受水浴摩尔渗透压浓度（mOs）
1	q.co.2	+	鲸蜡基 OH	蓖麻油/Etoh	4	+	250	220
2	q.co	--	鲸蜡基 OH	蓖麻油/Etoh	4	+	250	220
3	o.35	+	TM-二醇	DMSO	4	+	1.4	220
4	ea0.2	+	TM-二醇	DMSO	4	--	--	220
5	ea0.1	--	TM-二醇	DMSO	4	--	--	220
6	ea0.2	+	TM-二醇	DMSO	0.05	--	250	220
7	ed0a.12.di	+	TM-二醇	DMSO	0.05	--	250	0

纳米胶囊设计	制剂名称	纳米胶囊直径（nm）* n=20	包封产量（%，平均值±SE）	转导效率（5 天，大鼠成纤维细胞）
1	q.co.2	20±3，杆状	48.6±11	87±7%
2	q.co	12±0.7，不规则	48.6±2	71±28%
3	o.35	17±1.2，球形	82.3±7(4)	86±2%
4	ea0.2	24±2，s/r	32±10	72±2%
5	ea0.1	36±3，不规则	57±2	85±1%
6	ea0.2	39±3，r/e	39±5	96%
7	ed0a.12.di	39±3，椭圆	69±2	100%

* 纳米胶囊直径报告为利用数字图像分析获得的较小和较大颗粒轴的平均值，而纳米胶囊形态报告为不规则、杆状（r）、椭圆形（e）或球形（s）。

DNA 的水分散体与本发明方法的不可溶表面活性剂浓缩，产生平均直径小于 50 nm 的纳米胶囊。大量的成功操作方案可行，对包封产量有不同的影响。在鲸蜡醇/蓖麻油系统中，浓缩使颗粒的平均直径从 20 nm 变化为 12 nm（表 1B: F1 对 F2）。当使用 TM-二醇/DMSO 表面活性剂系统起始微团形成时（表 1B: F4 对 F5），缩合剂重量比的同样降低使颗粒大小从 24 nm 增加到 36 nm，而仍保持纳米胶囊输送转基因的功能性。这一发现说明表面活性剂的选择影响纳米胶囊的最终平均直径。

在纳米胶囊形式过程中去掉中等的能量输入（减少探针超声、粉化，但保留水浴超声处理），使功能性颗粒产量降低（表 1B: F3 对 F4）。这一发现说明，纳米胶囊的最佳产量不依赖于任何自发的微滴乳化过程。助溶剂相体积从 4%重量降到 500 ppm，而对颗粒功能性没有任何负面影响（表 1B: F4 对 F6）。这一发现说明，利用本发明的方法能制备基本上不含溶剂的纳米胶囊。最后，从接受水浴的粉化过程中去除盐，而对纳米胶囊功能性没有任何负面影响（表 1B: F6 对 F7）。

实施例 2-纳米胶囊大小对人角化细胞的纳米胶囊摄取的影响

在该实施例中研究了纳米胶囊大小对无限增殖化 HacaT 人类角质细胞培养物（HacaT's）中胞内交通的影响。对于这一系列制剂，用不同孔口直径的注射器剪切三种微团分散体。包被重量也从 1:1 DNA:聚合物（w/w）降为 1:40，以将溶解型从 5 天缩短为 3 天。在这些实验中，将纳米胶囊制剂与 DNA 和 PEI 的标准 polyplexes 和 lipoplexed 质粒 DNA 相比较。表 2 总结了实验设计与结果:

表 2: 颗粒大小对纳米胶囊的基因转移功能性的影响

制剂名称	颗粒大小（平均值，nm; 形态）	4 小时用小窝蛋白-1 共定位*	4 小时用网格蛋白共定位	10 小时用溶酶体共定位	转导效率（5 天，人角质细胞）
o.22 (64)	47±3，杆状	0	++	+	16±13
o.27 (57)	21±2，杆状	+	+	ND	81±8
o.35 (85)	17±1.2，球形	+++	0	0	78±9
Pei-pDNA	67±4，球形，不规则	0	+++	+++	40±15
Lipoplex pDNA	48±2, 200 nm 凝集	+	+	+++	41±27

关键词: 0 = 与未刺激的条件没有改变，+ 刺激的细胞数量增多大于 25%，++增多大于 50%，+++ 增多大于 75%。ND = 未测。

我们发现，与未刺激状态相比，纳米胶囊具有比标准制剂更高的细胞胞饮活性，较小的纳米胶囊使胞饮活性从网格蛋白包被的凹陷转移到小窝（表 2: 制剂 O 对 pei-dna 和 lipoplex pDNA）。进一步发现，纳米胶囊在加入 10 小时后避免了溶酶体的共定位，较小的纳米胶囊特别有效（见表 2: 制剂对 pei-dna 和 lipoplex pDNA）。这些结果在图 2 中进一步说明。通过与公开的对 HacaT 角质细胞的摄取研究相比较，进一步强调了这种提高。与初级角质细胞相比，在 HacaT 中裸 DNA 寡核苷酸的摄取（20μm）极少，显示在 2 小时时寡核苷酸在点状囊泡一致的溶酶体中积累。利用本发明方法的分散、粉化的亲水性纳米胶囊，证明在加入 10 小时后完全避开溶酶体。这些结果表明，本发明的方法的产物将具有提高的和延长的效能。

实施例 3 - 纳米颗粒输送对 DNA 和试剂诱导的细胞毒性的影响

为了测试由脂质体或 dendrimer 释放的可溶性外源 DNA 是否诱导凋亡，用加载/未加载的脂质体复合物、dendrimer 复合物、纳米颗粒和 1μg/ml 表鬼臼毒吡喃葡糖苷（etoposide）处理 Rt-1's，DNA 嵌入剂作为阳性对照。培养物用标准制剂处理 3 小时，在 30 小时后测定基因产物表达。培养物用纳米胶囊处理 4 天，以确保实验过程中全部 DNA 释放。对照中包括 1μg/ml 表鬼臼毒吡喃葡糖苷作为凋亡细胞死亡的阳性对照，在实验终止之前对培养物施用 DNA 嵌入剂过夜。其它对照包括标准 PEI-DNA 复合物，空纳米胶囊和含有空载体质粒 DNA 的纳米胶囊。对于本实验，如前所述用 35 号注射器产生亲水性纳米颗粒。

凋亡中较后的步骤之一是凋亡程序中核酸内切酶激活介导的 DNA 破碎。因此，通过用外源酶和取代核苷酸（TUNEL: tdt-介导的尿嘧啶核苷酸和标记）末端标记片段测定 DNA 破碎。结果表示为破碎指数，或显示 BRDU 末端标记的 DNA 的细胞占总培养物的百分数。培养物一式两份。实验设计和结果总结于表 3 中:

表 3：纳米胶囊包被重量对非特异试剂和质粒 DNA 相关细胞毒性的影响

制剂	k.35	ξ	O(omicron)	b.35	γ.35	Lipoplex GP	Lipoplex L+	polyplex
颗粒设计:								
DNA 缩合剂	变性的角质细胞核蛋白	100kD MW 聚赖氨酸	27 kD PEI	27 kD PEI	27 kD PEI	阳离子脂类	阳离子脂类	dendrimer
包被比（DNA/聚合物）	0.1	0.25	0.25	0.01	0.0025			
表现:								
剂量（标准制剂 30h，纳米胶囊 100h）	4.6	4.1	4	5	5	1μg 500 ng 0 ng	500 ng 250 ng 0 ng	2μg 1μg 0μg
细胞毒性（破碎指数，%）	ND	0.26±0.15	2±0.7	1.9±00.6	9±8	27±8 6±3 4±2.5	9.3±0.2 12.8±1.5 7.8±0.1	6.63±1.4 5.7±1.8 3.1±0.3
细胞毒性对照:								
（1μg 表鬼臼毒吡喃葡糖苷（8h），25±10%）								
（ Pei-DNA polyplexes(100h), 24±7%）								
（空载体纳米胶囊: 1.25±1.25%）			85±7					
（空载体纳米胶囊: 0.9±0.9%）	31±2	ND		32±3	24±4	17±2	死亡	死亡
转导效率（%细胞） （120h，剂量未列出）								
制剂特征:								
核酸掺入（%）	55±10	27±7	54±5	65±4	667±0.2	ND	ND	ND
累积释放（%，48h）	70	75±8	83±12	ND	ND	ND	ND	ND
颗粒大小（平均值±SE，nm）	26±2	22±2	20±1	35±2	57±5	48±2	ND	22.4±2
凝块（分散时）	少量	50% 80±6	200nm	300 nm	g.t.50% 300nm	300 nm		25% 300nm 难以融合

表 3B: 纳米包封的 pDNA 的剂量反应

制剂	剂量（100 小时）	GFP/肌动蛋白产量（密度比，%）
K.35	9μg	94.8
K.35	4.5μg	83.5
K.35	1.5μg	83.3
Lipoplex GP	0.5μg	94.9

我们发现，使用控释纳米胶囊使成纤维细胞培养物中凋亡细胞的比例减少了 3-100 倍。不含 DNA 的常规试剂显示 FI 比空纳米颗粒提高 4 倍，但在其它 DNA 存在下不含其它试剂又提高 50-100%。将包被重量从 1:40 降低到 1:400 使纳米胶囊平均直径从 20 nm 提高到 57 nm，并且导致在培养物中出现凋亡诱导区（表 3: F omicron 对 F upsilon 35）。将包被重量从 1:40 降低到中间的 1:100 降低了转导效率，但不增加颗粒大小和细胞毒性的出现。这些发现表明，纳米胶囊设计在保持纳米胶囊完整性中起作用，大小的影响和溶解型能有助于观察到的细胞毒性和功能性。我们的结论是，应用纳米胶囊制剂使剂量提高到有用的效率水平，但不诱发凋亡程序。

表 3B 说明了在成纤维细胞裂解物中测量的制剂 K.35 剂量反应的提高。在用剂量逐渐提高的纳米胶囊处理 4 天后，测量成纤维细胞裂解物中 GFP 的产生。9.5μg 剂量的纳米胶囊相当于脂质体制剂的产生，而未证明有任何细胞毒性。

实施例 4 – 纳米胶囊通过经皮和皮下途径通过角质化屏障上皮向猪组织输送大分子

研究了纳米胶囊向猪活检器官培养系统中的组织输送非病毒核酸的应用。在无菌条件下从服用镇静药的实验动物中收集 6mm 和 8mm 的圆形活检标本，在部分接触含 20%胎牛血清的培养基的网上培养。活检标本注射 90μl（6.3μg）或用 3×30μl 等份局部处理。在 7 天后骤冻活检标本，切片/匀浆进行 β-半乳糖苷酶产生测定。制剂信息和实验结果总结于表 4 中:

表 4：分散、粉化的纳米胶囊在穿过角质化屏障膜输送大分子中的功能性

制剂	N	O
实验更改（制剂 Q）	包被重量为 2.5× 聚合物分子量为 1×	包被重量为 2.5× 聚合物分子量为 4×
制剂特征: 核酸掺入（%） 累积释放（%，169 小时，2.5μg 样品） 消化后电泳样品中的低分子量 DNA 超螺旋保持(237 小时,释放,最初=69.7% sc/松弛的） 颗粒大小（平均 SE 主要标本） 颗粒描述 二级结构	 70.00 83 0 100% 18.2±0.2 nm 球形 20% 100nm flocs	 70.50 83.5±1.5 0 100% ND
表现: 转导蛋白质的产生 （像素单位,%阴性对照,100μg 总蛋白,标准化的副蛋白） 报道基因产物分布 （6.3μg 剂量，6 mm（N），8 mm（O）猪活检，1 周） 角质细胞（%细胞），n=2 视野/200 细胞，阴性对照：6% 内皮细胞（%vwf-+面积）乳突状和/或网状，n=2-4 视野，阴性对照：1.07±0.72% 真皮（%面积）；阴性对照：0.24±0.03,n=4/20×视野	 312±74（局部） 142（s.c.） 100% 73±20（乳突状）* 32±15（网状） 2.74±0.96 *	 191（局部） 100% 13.8±0.5(乳突状)* 8±2(网状)* 1.77±0.49 *

* = $p < 0.05$

照射的组织裂解物的 Western blotting 显示，用制剂 N 局部处理的双份活检标本中的 β-半乳糖苷酶比用盐水处理的同样培养的 6mm 活检标本提高 3 倍。在用制剂 O 纳米颗粒局部处理的 8mm 活检标本中测得只有 2 倍提高（见图 4B）。用较高分子量的 N 聚合物类似物产生制剂 O，提示颗粒形态学、剂量效应不同或与这种差异有关的两种制剂的原位释放图不同。为了确定纳米胶囊输送效能最初的细胞型特异性差异，在双标记实验中利用细胞特异性表位的抗体分析组织切片的 β-半乳糖苷酶表达（见图 4B）。对这些切片的数字图像分析表明，照射的角质细胞和内皮细胞在用 10 天释放制剂处理 7 天后容易在器官培养中转导。不含有细胞特异性标记就不可能特异地定量成纤维细胞，然而，在 N 活检真皮中测得表达区增加 11 倍（见图 4B）。有趣的是，对于制剂 N 和 O 局部处理的活检标本，转导血管的面积百分数在 100-300μm 深的附近区域减少约 50%（表 4: 乳突状对网状内皮细胞）。这些数据提示，纳米胶囊渗透表皮进入真皮。

实施例 5 – 本发明的纳米胶囊掺入固体剂型中，用于物理靶向的其它用途

通过在 1000μl 体积中振荡混合下列成分，将含有核 GFP 转基因或空载体的纳米胶囊掺入缝线包被中：i）50μg 含有质粒 DNA 的纳米胶囊，ii）200μg 牛粘蛋白，和 iii）75μg 蔗糖（60% w/w）。通过用缝线 5 次穿过穿孔的微量离心管，无菌包被缝线。通过在培养的猪皮肤活检标本中应用缝线，检测基因转移的包被功能性。活检标本在网上培养，使得活检标本底部接触细胞培养基。处理活检标本 7 天，然后骤冻，切片，进行免疫荧光显微镜检查，估计纳米胶囊的渗入和转基因输送。

利用抗绵羊 IgG 的链霉亲和素-生物素免疫复合物检测纳米胶囊的渗入。用绵羊 IgG 刺穿纳米胶囊包被，使这种检测策略能够进行。图 5A 显示毛细血管积累的整个猪皮组织中绵羊 IgG 信号的分布。在图 5A'中，在玻片处理过程中不使用一级抗体，以测定背景荧光水平。在该图中缝线可见。缝线可被确定为没有阳性核复染的光滑物。利用多克隆 GFP 抗

体证实 GFP 表达，消除了非特异性组织绿色荧光的影响。图 5B 利用 GFP 多克隆抗体显示整个缝线处理的真皮中 GFP 的表达。在 750 微米外可见缝线。图 5C 显示在用空载体包被处理的活检标本中没有 GFP 表达。本实施例证明，纳米胶囊可用于物理靶向的大分子输送。

实施例 6– 通过设计纳米胶囊包被，纳米胶囊在局部靶向中的用途

成纤维细胞靶向

如实施例 1 所述通过分散、粉化制备 GFP 纳米胶囊。聚乙烯吡咯烷酮（PVP，分子量 10 000）用作包被基质。使用 1:40 的包被重量比，产生 23±2 nm 的杆状纳米胶囊。对人皮肤成纤维细胞（HDF）和 HecaT 角质细胞培养物施用 1μg PVP 纳米胶囊 4 小时，然后固定，利用抗绵羊 IgG 的链霉亲和素-生物素免疫复合物检测纳米胶囊的摄入。用绵羊 IgG 刺穿纳米胶囊包被，使该检测策略能够实行。图 6 显示 PVP 纳米胶囊在 HDF's 中的阳性核定位，和 PVP 纳米胶囊在角质细胞中的阴性共定位（图 6: 6a 对 6b）。包括未处理的培养物的图用作对比（6a', 6b'）。培养物也用 5μg PVP 纳米胶囊处理 5 天，然后检测 GFP 转基因的产生。与摄取研究结果一致，只有成纤维细胞培养物显示产生 GFP 转基因（图 6: 6a"对 6b"）。

肿瘤靶向

如实施例 1 所述通过分散、粉化制备 GFP 纳米胶囊。腱生蛋白（TN，分子量 200 000）用作包被基质。使用 1:20 的包被重量比，产生 19±0.9 nm 的球形纳米胶囊。对在器官培养中保存的猪活检标本以连续小份局部施用 500ng TN 纳米胶囊。局部施用 3 分钟后，用培养基中漂洗活检标本，改变培养基防止除局部施用外的任何施用。

为了模拟上皮来源的肿瘤的坏死，12 小时前用 50 000 个人鳞状癌细胞接种活检标本。7 天后骤冻活检标本，切片，免疫检测 GFP 的产生。在图 6B 中，图“a”显示在肿瘤中心有强烈的 GFP 荧光，图“b”用抗 GFP 的多克隆抗体证实了这种 GFP 表达，图“c”利用细胞核的复染显示切片中的细胞定位，图“d”不用 GFP 抗体显示背景荧光水平。利用

抗角蛋白 10/1 的抗体（一种上皮标记物）通过阳性检测证实肿瘤的来源。图“b”与图“c”的对比表明，GFP 表达只限于肿瘤内的细胞。如实施例 5 已经证明的，整个组织中的表达也是可行的，并且能通过包被设计调节。本实施例证明，纳米胶囊输送能有效地靶向。

用于提高药物治疗效果的细胞特异性输送

如实施例 1 所述制备纳米胶囊包封顺铂——一种具有严重副作用的疏水性分子和常用的癌症化疗药。使用 1:100 的包被重量比，产生 29±3 nm 的不规则纳米胶囊。根据成纤维细胞相对于鳞状细胞癌培养物的细胞生长抑制的剂量反应改变，证明靶向效能。细胞接种于 96 孔平板上过夜，用含量逐渐提高的包封或未包封的药物处理 18 小时，然后在总共 72 小时生长时间的 48 小时后，利用 MTT 测定法估计细胞生长抑制。结果示于图 6C 中。数据表明，在应用未包封药物可杀死细胞的药物水平时，腱生蛋白纳米胶囊保护非靶细胞免于细胞死亡（零死亡）（图 6Aa：实心圆对空心圆）。对于癌培养，TN 纳米胶囊将抑制浓度（IC50）有效地降低了估计 300%，从 525μg/ml 到 160μg/ml。实施例 6 证明纳米胶囊可用于包被靶向的大分子输送。

实施例 7 – 纳米包封提高细胞摄取用作药物、营养剂、研究试剂或化妆品的其它制剂的用途

如实施例 1 所述制备含有 500 kD Fitc-标记葡聚糖、20mer Fitc-标记 mer O-甲基化 RNA 寡核苷酸和 16 mer 磷酸二酯 DNA 寡核苷酸的纳米胶囊。使用 1:40 的包被重量比，用 1 MM kD 寡核苷酸作为包被基质。利用 PEI 浓缩磷酸二酯 DNA 寡核苷酸，但在葡聚糖或 RNA 寡核苷酸制剂中不含 PEI。通过评价 35 mm 人皮肤成纤维细胞培养物中相对胞饮活性和细胞摄取的改变，检测纳米胶囊输送药物的功能性。纳米胶囊制剂与裸露制剂或复合制剂比较。定量结果总结于表 7 中。

表 6：纳米包封提高细胞摄取用作药物、营养剂、研究试剂或化妆品的其它制剂。在加入后 18 小时，常规配制的制剂中只有溶酶体是明显的。

			加入后 4.5 小时		加入后 18 小时	
生物活性成分	制剂	颗粒大小（平均值，SE，nm，形态）	细胞摄取活性的提高（高于基线的%细胞，小窝蛋白-1/网格蛋白） 剂量	核摄取效率（%细胞，成纤维细胞）	生物活性成分与溶酶体的共定位（%细胞，人成纤维细胞） 剂量	检测持续（%细胞，人成纤维细胞）
500 Kd fitc-葡聚糖	纳米胶囊	22±2，s/r	89/20 25μg	95±2	2±2 5μg	88±11
	裸露，Fitc-标记的	--	75/18 100μg	10	100±10 100μg	61±20
20 mer O-甲基化 RNA 寡核苷酸	纳米胶囊	13±0.7, r	78/90 2μg	74±5	0±0 5μg	80±6
	裸露，Fitc-标记的	--	--/73 5μg	14±7	--	--
	PEI/Fitc-标记的	236±26, r	--/-- --	--	100±0 5μg	94±10
16 mer PO DNA寡核苷酸	纳米胶囊	17±1, r	70/94 1μg	34±25	0±0 5μg	91±8
	FEI/Fitc-标记的	67±4, s/r	72%溶酶体 2μg	95±2	80±7 5μg	66
标称 n		20 个颗粒	70 个细胞	140 个细胞	50 个细胞	50 个细胞

* 假定 100%包封，估计包封的葡聚糖的剂量。

s = 球形

r = 杆状

表 7 显示，根据 AFM，所有纳米胶囊的平均直径小于 50nm。DNA 寡核苷酸的 PEI 复合物在 67nm 处测量，不带电荷的 RNA O-甲基寡核苷酸的 PEI 复合物在 236nm 处测量。如实施例 2 所述，应用角质细胞培养物和质粒 DNA，纳米胶囊刺激胞饮活性，网格蛋白和小窝蛋白-1 的信号水平升高证明了这一点。对于 500 kD 葡聚糖，通过纳米包封，胞饮活性向小窝有效转移（表 7，500 kD 葡聚糖）。在加入后 4.5 小时，核对包封葡聚糖和 RNA 的摄取高于裸露的葡聚糖和 RNA。对于 DNA 寡核苷酸的纳米胶囊，细胞摄取低于复合寡核苷酸，然而，到 4.5 小时时，大多数 DNA 寡核苷酸已经在溶酶体中非有效地螯合（表 7）。在加入后 18 小时，纳米胶囊显示从溶酶体中连续排除，而裸露的显示高水平的螯合。这些结果示于图 7A 和 7B 中。图“a”和“b”显示 18 小时培养物的 Fitc 检测。RNA 寡核苷酸的纳米胶囊只分布于核中（图 7B：a 对 a’）。在用复合 RNA 寡核苷酸处理的培养物中可见点状内涵物，与溶酶体的免疫学标记共定位（图 7A：a 对 a’）。包括来自 AFM 显微镜检的颗粒大小结果，证明包封后大小显著不同（图 7A，7B：b 对 b，b’）。也制备包封低分子量葡聚糖和不稳定 RNA 的制剂，其具有类似的摄取、纳米胶囊的大小和产量，证明包封不仅能提供靶向功能，而且有助于稳定对化学或酶降解敏感的分子。这些实施例证明纳米胶囊 36 可用于输送大量大分子。

尽管已经参照优选实施方案描述了本发明，但本领域技术人员应当认识到，可以在不背离本发明的精神和范围的情况下进行改变。

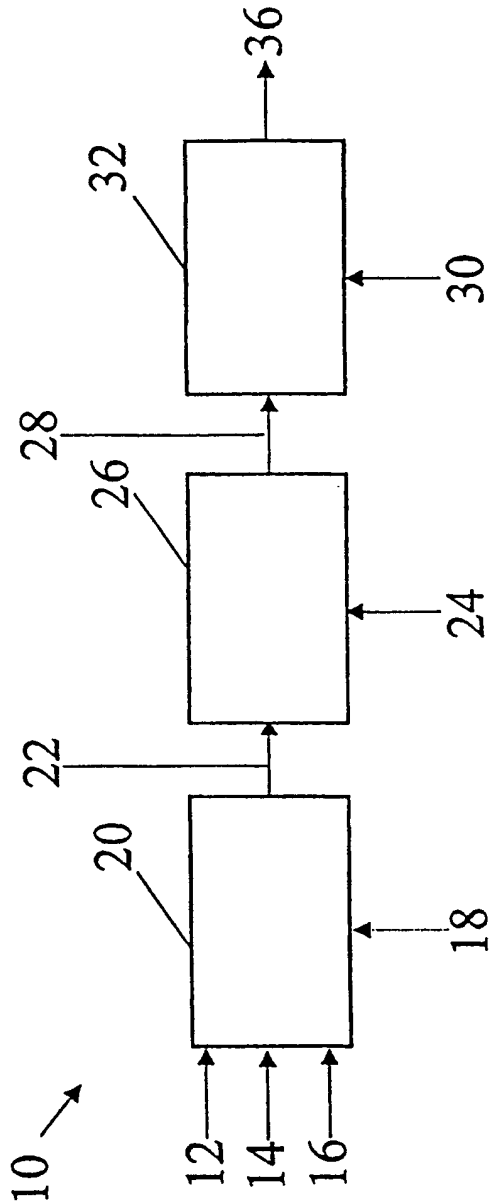


图1

在不同分散条件下制备的纳米胶囊

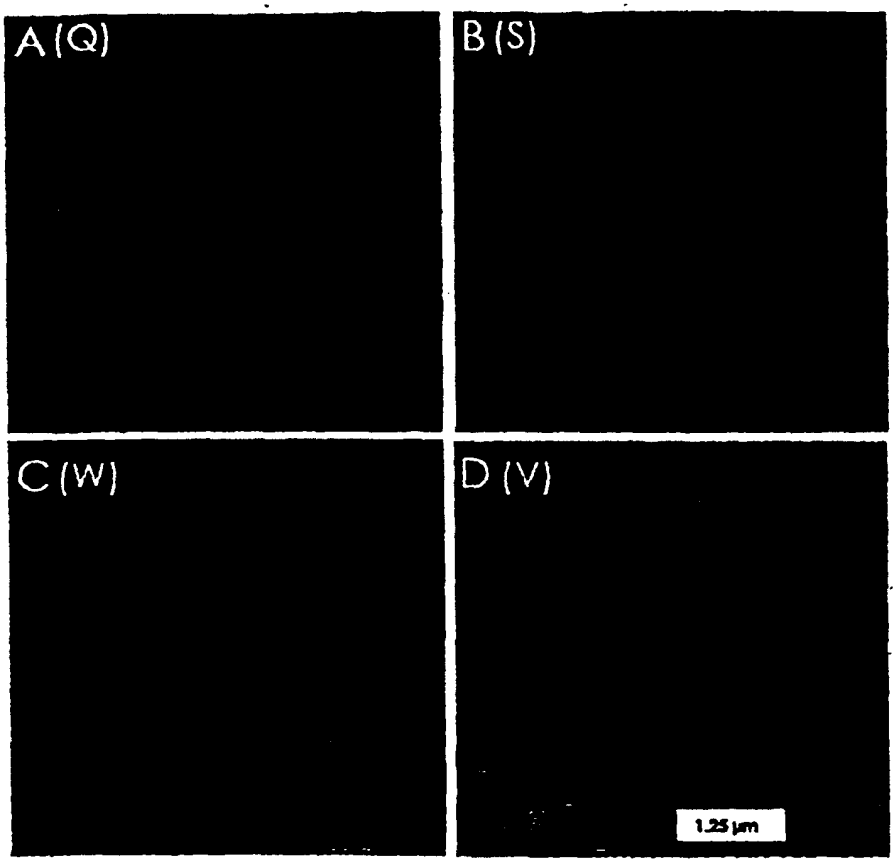


图1A

纳米胶囊制剂的累积释放研究

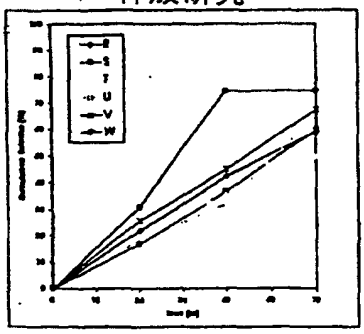


图1B

从受试溶液中定量回收的DNA

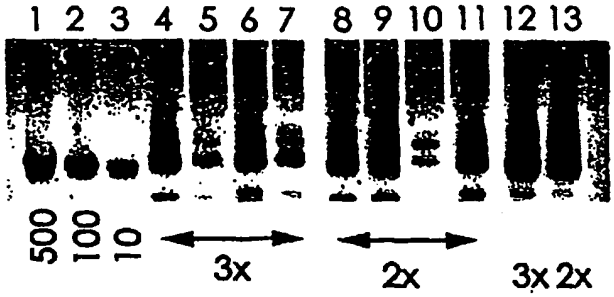


图1C

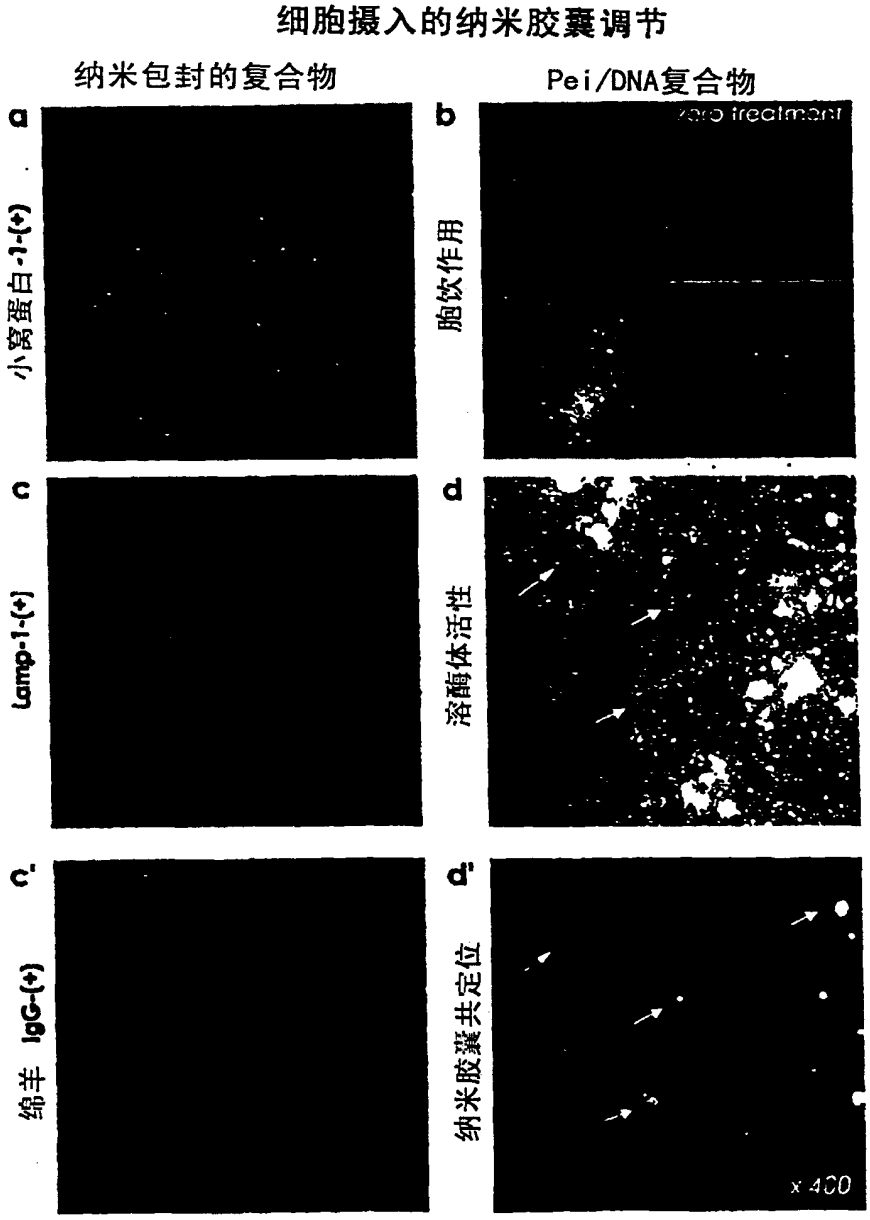

细胞摄入的纳米胶囊调节
纳米包封的复合物
Pei/DNA复合物
a
小窝蛋白-1-(+)
b
胞饮作用
c
Lamp-1-(+)
d
溶酶体活性
c'
绵羊 IgG-(+)
d'
纳米胶囊共定位
x 400

图2

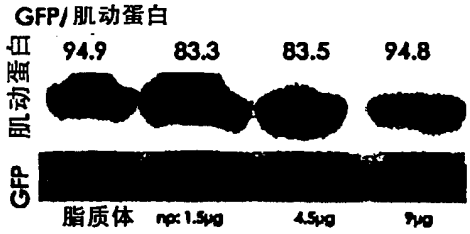


图3

在猪皮肤中纳米胶囊递送的转基因产生

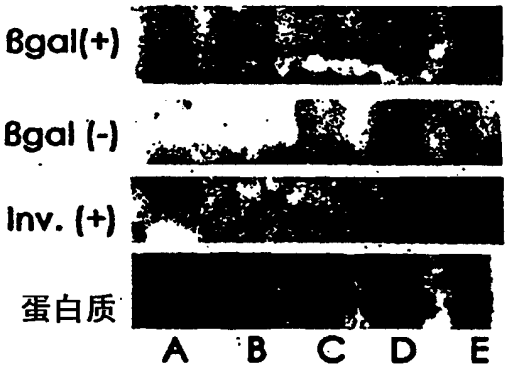
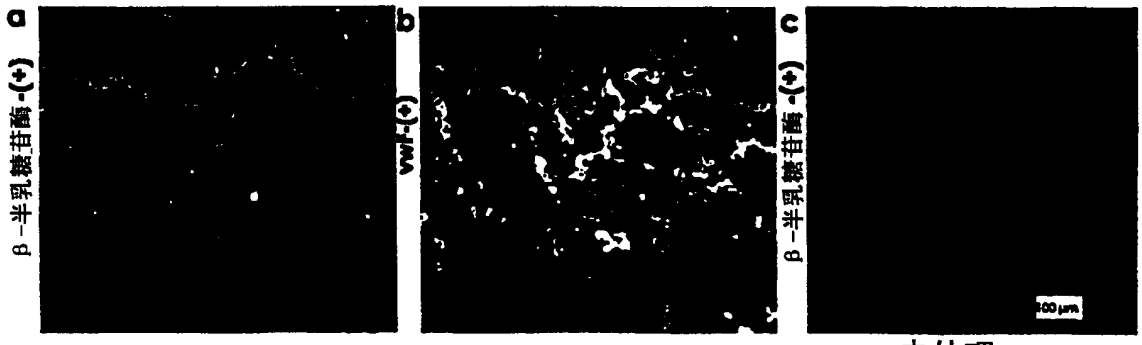


图4A

跨越角化组织屏障上皮的大分子递送



局部纳米包封的质粒DNA 未处理

图4B

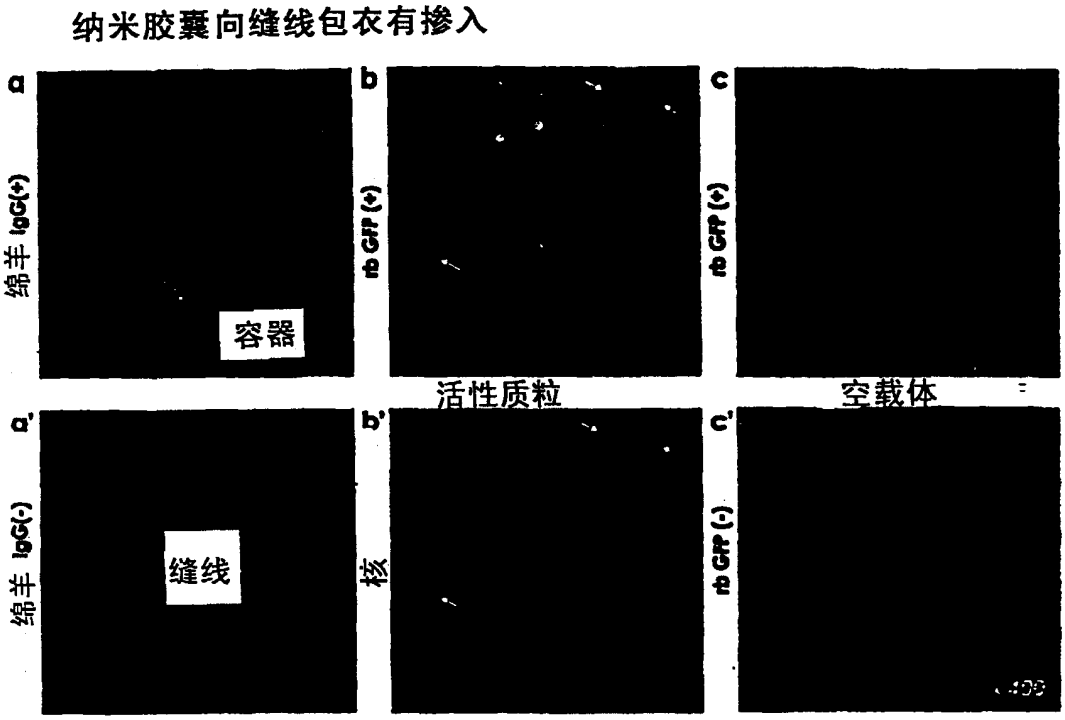

纳米胶囊向缝线包衣有掺入
a
b
c
绵羊 IgG(+)
rb GFP (+)
rb GFP (+)
容器
活性质粒
空载体
a'
b'
c'
绵羊 IgG(-)
rb GFP (-)
缝线
核

图5

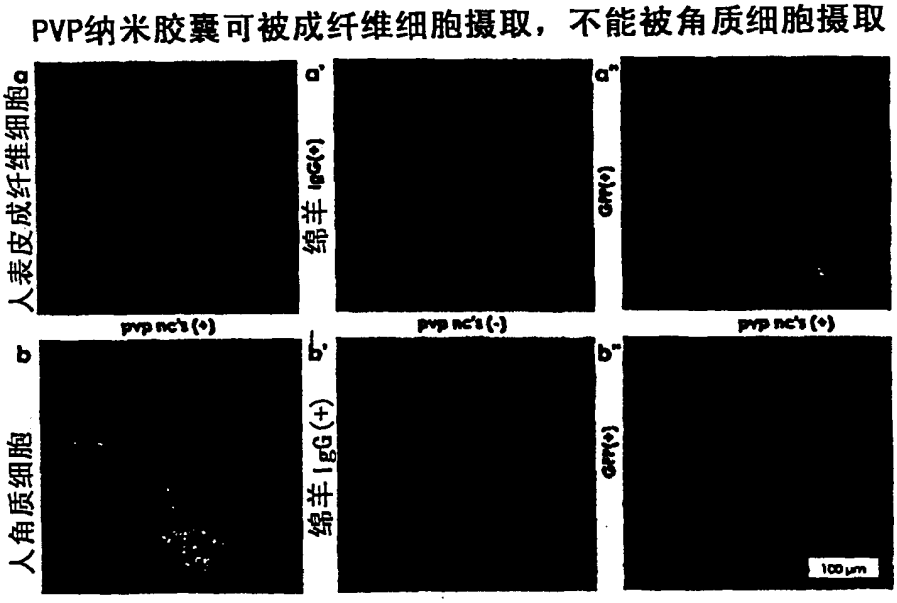

PVP纳米胶囊可被成纤维细胞摄取，不能被角质细胞摄取
人表皮成纤维细胞
人角质细胞
绵羊 IgG(+)
pvp nc's (+)
pvp nc's (-)
pvp nc's (+)
绵羊 IgG(+)
100 μm

图6A

设计用于靶向肿瘤的纳米胶囊

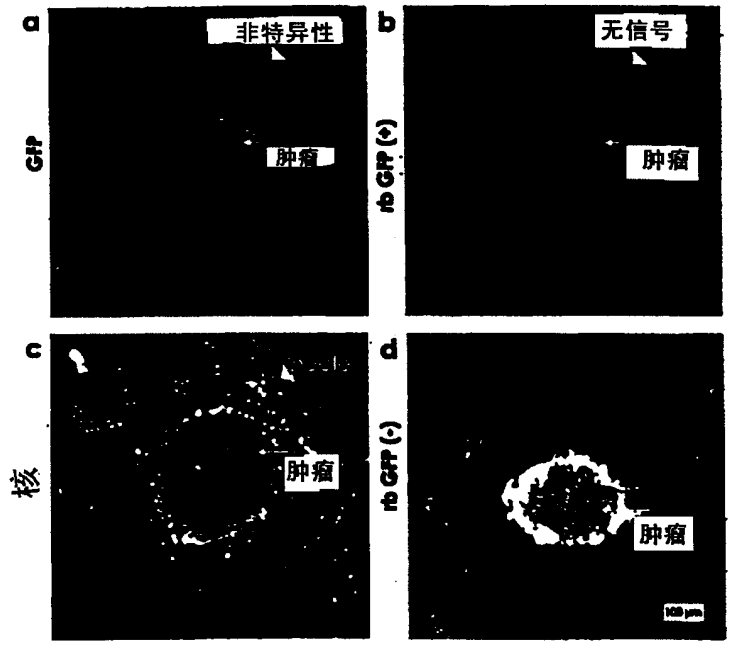


图6B

设计用于增加药物安全性的纳米胶囊包衣

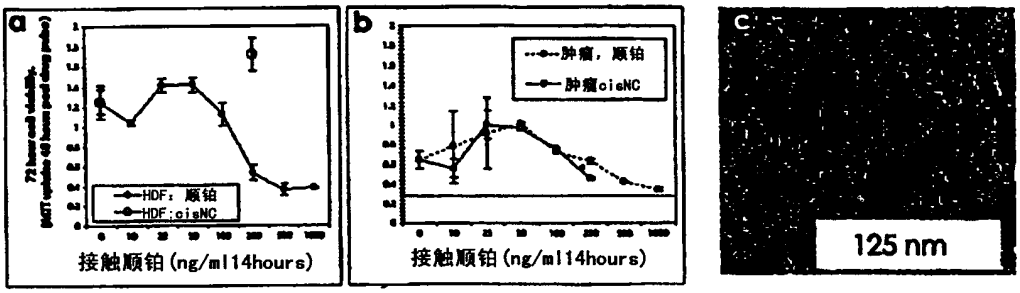


图6C

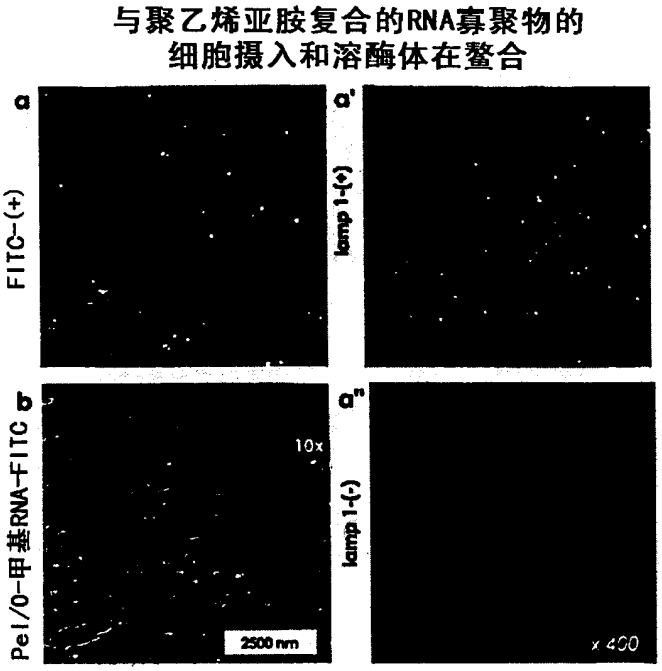

与聚乙烯亚胺复合的RNA寡聚物的
细胞摄入和溶酶体在螯合
a
a'
FITC-(+)
lamp 1-(+)
b
a"
Pei/O-甲基RNA-FITC
10x
lamp 1-(-)
2500 nm
x 400

图7A

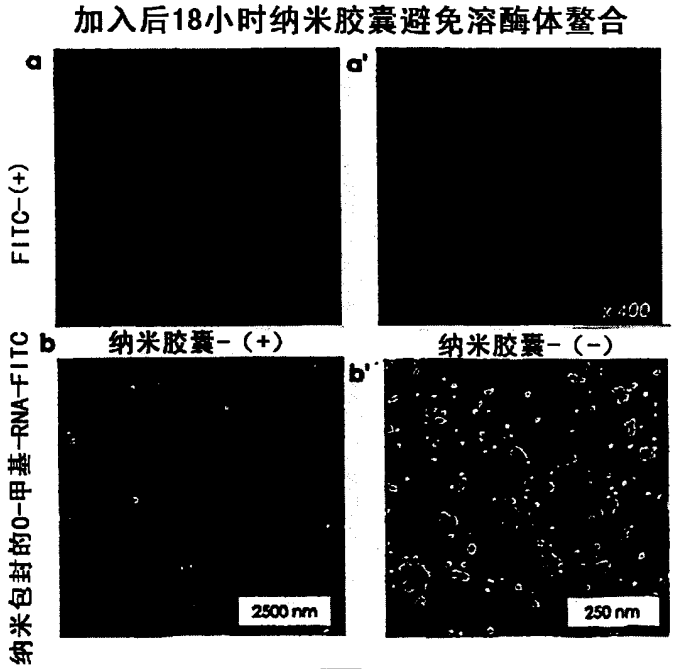

加入后18小时纳米胶囊避免溶酶体螯合
a
a'
FITC-(+)
x 400
b
纳米胶囊-（+）
纳米胶囊-（-）
b'
纳米包封的O-甲基-RNA-FITC
2500 nm
250 nm

图7B