

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680051564.1

[51] Int. Cl.

A61K 9/16 (2006.01)

A61K 9/51 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

A61K 49/04 (2006.01)

C08J 5/00 (2006.01)

[43] 公开日 2009 年 2 月 18 日

[11] 公开号 CN 101370479A

[22] 申请日 2006.12.14

[21] 申请号 200680051564.1

[30] 优先权

[32] 2005.12.16 [33] US [31] 60/751,172

[86] 国际申请 PCT/US2006/062118 2006.12.14

[87] 国际公布 WO2007/076295 英 2007.7.5

[85] 进入国家阶段日期 2008.7.22

[71] 申请人 堪萨斯州立大学

地址 美国堪萨斯州

[72] 发明人 C·J·伯克兰德 史联军

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 韦 东

权利要求书 6 页 说明书 27 页 附图 9 页

[54] 发明名称

用于递送治疗剂的纳米团簇

[57] 摘要

本发明描述了包含多种纳米颗粒的纳米团簇，所述纳米颗粒因环境因素而分散。还描述了预防、治疗或诊断对象疾病或病症的方法，该方法包括给予治疗有效量的包含本发明纳米团簇的组合物。

1. 一种包含多种纳米颗粒的纳米团簇。
2. 如权利要求 1 所述的纳米团簇,其特征在于,所述纳米颗粒因环境因素而分散。
3. 如权利要求 1 所述的纳米团簇,其特征在于,所述纳米团簇的大小约为 1-200 微米。
4. 如权利要求 1 所述的纳米团簇,其特征在于,所述纳米团簇的大小约为 1-100 微米。
5. 如权利要求 4 所述的纳米团簇,其特征在于,所述纳米团簇的大小约为 1-50 微米。
6. 如权利要求 5 所述的纳米团簇,其特征在于,所述纳米团簇的大小约为 1-40 微米。
7. 如权利要求 5 所述的纳米团簇,其特征在于,所述纳米团簇的大小约为 1-20 微米。
8. 如权利要求 1 所述的纳米团簇,其特征在于,所述纳米颗粒未包封。
9. 如权利要求 1 所述的纳米团簇,其特征在于,所述纳米颗粒未通过纳米颗粒上的官能团保持在一起。
10. 如权利要求 1 所述的纳米团簇,其特征在于,所述纳米颗粒不包含官能团。
11. 如权利要求 1 所述的纳米团簇,其特征在于,所述纳米颗粒并未共价结合在一起。
12. 如权利要求 1 所述的纳米团簇,其特征在于,所述纳米颗粒包含结合在其表面的活性成分。
13. 如权利要求 1 所述的纳米团簇,其特征在于,所述纳米颗粒是固体。
14. 如权利要求 13 所述的纳米团簇,其特征在于,所述纳米颗粒是空心的。
15. 如权利要求 1 所述的纳米团簇,其特征在于,所述纳米颗粒包含活性成分或聚合物或其混合物。
16. 如权利要求 15 所述的纳米团簇,其特征在于,所述纳米颗粒包含活性成分。
17. 如权利要求 16 所述的纳米团簇,其特征在于,所述活性成分是小分子、肽、蛋白质或核酸。
18. 如权利要求 15 所述的纳米团簇,其特征在于,所述纳米颗粒包含聚合物。

19. 如权利要求 18 所述的纳米团簇,其特征在于,所述聚合物是可生物降解的聚合物。

20. 如权利要求 19 所述的纳米团簇,其特征在于,所述可生物降解的聚合物是聚酯、聚原酸酯、聚磷酸酯、聚氨基酸或聚酐。

21. 如权利要求 1 所述的纳米团簇,其特征在于,所述纳米颗粒包封活性成分。

22. 如权利要求 1 所述的纳米团簇,所述纳米团簇还包含将多种纳米颗粒保持在一起或因环境因素而分散纳米颗粒的分散材料。

23. 如权利要求 22 的方法,其特征在于,所述分散材料将所述纳米颗粒保持在一起并因环境因素而分散所述纳米颗粒。

24. 如权利要求 22 的纳米团簇,其特征在于,所述分散材料包括水溶性聚合物、可生物降解的聚合物、聚电解质、金属、聚合物交联剂、小分子交联剂、pH 敏感材料、表面活性剂或温敏材料。

25. 如权利要求 22 所述的纳米团簇,其特征在于,所述分散材料涂覆在纳米颗粒的表面上。

26. 如权利要求 25 所述的纳米团簇,其特征在于,所述分散材料在纳米团簇形成之前涂覆在所述纳米颗粒的表面上。

27. 如权利要求 22 所述的纳米团簇,其特征在于,所述分散材料在纳米颗粒之间。

28. 如权利要求 22 所述的纳米团簇,其特征在于,所述分散材料偶联于纳米颗粒。

29. 如权利要求 28 所述的纳米团簇,其特征在于,所述分散材料共价或非共价偶联于纳米颗粒。

30. 如权利要求 2 所述的纳米团簇,其特征在于,所述环境因素是水、选定 pH、选定温度、选定酶的存在、选定化学品的存在、选定电磁波长范围的存在或振荡或剪切的存在。

31. 如权利要求 1 所述的纳米团簇,其特征在于,所述纳米团簇还包含活性成分。

32. 如权利要求 31 所述的纳米团簇,其特征在于,所述活性成分是小分子、蛋白质或核酸。

33. 如权利要求 31 所述的纳米团簇,其特征在于,所述活性成分包封在纳米颗粒中、掺入纳米颗粒材料中或偶联于纳米颗粒。

34. 如权利要求 31 所述的纳米团簇,其特征在于,所述活性成分捕获在纳米团簇中的纳米颗粒之间。

35. 如权利要求 31 所述的纳米团簇,其特征在于,所述活性成分没有偶联于、掺

入或包封在纳米颗粒内。

36. 如权利要求 1 所述的纳米团簇, 其特征在于, 所述纳米团簇包含约 1-99 重量%的纳米颗粒。

37. 如权利要求 1 所述的纳米团簇, 其特征在于, 所述纳米团簇包含约 10-75 重量%的纳米颗粒。

38. 如权利要求 1 所述的纳米团簇, 其特征在于, 所述纳米团簇包含约 15-50 重量%的纳米颗粒。

39. 如权利要求 1 所述的纳米团簇, 其特征在于, 所述纳米团簇包含约 20-25 重量%的纳米颗粒。

40. 如权利要求 1 所述的纳米团簇, 其特征在于, 所述纳米团簇包含约 1-50 重量%的分散材料。

41. 如权利要求 1 所述的纳米团簇, 其特征在于, 所述纳米团簇包含约 5-30 重量%的分散材料。

42. 如权利要求 1 所述的纳米团簇, 其特征在于, 所述纳米团簇包含约 10-20 重量%的分散材料。

43. 一种包含如权利要求 1 所述的纳米团簇的组合物。

44. 如权利要求 43 所述的组合物, 其特征在于, 所述组合物包含多种纳米团簇。

45. 如权利要求 43 所述的组合物, 其特征在于, 所述组合物还包含活性成分。

46. 如权利要求 43 所述的组合物, 其特征在于, 所述组合物被制成干粉、气雾剂、喷雾剂、片剂或液体制剂的形式。

47. 如权利要求 43 所述的组合物, 其特征在于, 所述组合物包含约 1-100 重量%的纳米团簇。

48. 如权利要求 43 所述的组合物, 其特征在于, 所述组合物配制在药学上可接受的载体中。

49. 一种预防或治疗对象疾病的方法, 所述方法包括给予需要该组合物的对象治疗有效量的包含如权利要求 1 所述纳米团簇的组合物。

50. 如权利要求 49 所述的方法, 其特征在于, 所述方法还包括确定对象是否需要预防或治疗。

51. 如权利要求 49 所述的方法, 其特征在于, 所述疾病是肺部疾病或病症。

52. 如权利要求 51 所述的方法, 其特征在于, 所述呼吸系统疾病是囊性纤维化病、结核病、严重急性呼吸道综合征、哮喘或肺炎。

53. 如权利要求 49 所述的方法, 其特征在于, 所述方法还包括给予用于治疗或预防该疾病的第二种疗法。

54. 如权利要求 49 所述的方法, 其特征在于, 所述组合物鼻腔给药。

55. 如权利要求 54 所述的方法, 其特征在于, 所述纳米团簇被递送至肺部细支气管或肺泡区域。

56. 如权利要求 49 所述的方法, 其特征在于, 所述分散材料接触水后分散所述颗粒。

57. 如权利要求 49 所述的方法, 其特征在于, 所述组合物静脉内给药。

58. 一种制备纳米团簇的方法, 所述方法包括:

(i) 获取分散材料;

(ii) 获取多种纳米颗粒; 和

(iii) 混合(i)和(ii),

将该混合物制成纳米团簇。

59. 如权利要求 58 所述的方法, 其特征在于, 获取多种纳米颗粒的过程包括:

(i) 获取纳米颗粒的水性悬浮液;

(ii) 将所述悬浮液乳化到非水相中;

(iii) 使所述水性悬浮液中的水吸收到非水相中;

(iv) 使所述纳米颗粒聚集到一起; 和

(v) 回收聚集的纳米颗粒。

60. 如权利要求 58 所述的方法, 其特征在于, 所述获取多种纳米颗粒的过程包括:

(i) 获取纳米颗粒的非水性悬浮液;

(ii) 将所述悬浮液乳化到水相中;

(iii) 使非水性悬浮液中的液体吸收到水相中;

(iv) 使所述纳米颗粒聚集到一起; 和

(v) 回收聚集的纳米颗粒。

61. 如权利要求 58 所述的方法, 其特征在于, 所述纳米团簇包含在组合物内。

62. 如权利要求 58 所述的方法, 其特征在于, 所述组合物被制成液体、喷雾剂、气雾剂或干粉的形式。

63. 如权利要求 58 所述的方法, 其特征在于, 在溶液中制备所述纳米团簇。

64. 如权利要求 63 所述的方法, 其特征在于, 不使用喷雾和冷冻干燥技术来制备所述纳米团簇。

65. 如权利要求 63 所述的方法, 其特征在于, 采用冷冻干燥或喷雾干燥技术从所述溶液中回收所述纳米团簇。

66. 一种制备纳米团簇的方法, 所述方法包括:

(i) 获取第一种纳米颗粒和第二种纳米颗粒; 和

(ii) 混合所述第一种和第二种纳米颗粒,

所述纳米颗粒自组装形成纳米团簇。

67. 如权利要求 66 所述的方法, 其特征在于, 所述第一种和第二种纳米颗粒是疏水的、亲水的或是亲水颗粒和疏水颗粒的混合物。

68. 如权利要求 66 所述的方法, 其特征在于, 所述第一种纳米颗粒带正电。

69. 如权利要求 68 所述的方法, 其特征在于, 所述第二种纳米颗粒带负电。

70. 如权利要求 66 所述的方法, 其特征在于, 所述第一种或第二种纳米颗粒带有静电电荷。

71. 如权利要求 66 所述的方法, 其特征在于, 所述自组装基于所述第一种和第二种纳米颗粒之间的静电相互作用。

72. 如权利要求 66 所述的方法, 其特征在于, 所述自组装基于所述第一种和第二种纳米颗粒之间的疏水或亲水相互作用。

73. 如权利要求 66 所述的方法, 其特征在于, 所述第一种和第二种纳米颗粒在溶液中自组装形成纳米团簇。

74. 如权利要求 66 所述的方法, 其特征在于, 所述方法还包括获取分散材料, 并将该分散材料与所述第一种和第二种纳米颗粒进行混合。

75. 如权利要求 66 所述的方法, 其特征在于, 所述纳米团簇在溶液中制备。

76. 如权利要求 75 所述的方法, 其特征在于, 不使用喷雾和冷冻干燥技术来制备所述纳米团簇。

77. 如权利要求 75 所述的方法, 其特征在于, 通过冷冻干燥或喷雾干燥技术从所述溶液中回收所述纳米团簇。

78. 一种将活性成分递送至需要的对象的方法, 所述方法包括:

(i) 获取包含如权利要求 1 所述的纳米团簇和活性成分的组合物; 和

(ii) 将该组合物给予所述对象。

79. 如权利要求 78 所述的方法, 其特征在于, 所述活性成分包封在纳米颗粒中、掺入纳米颗粒材料中或偶联于纳米颗粒。

80. 如权利要求 78 所述的纳米团簇, 其特征在于, 所述活性成分被捕获在纳米团

簇中的纳米颗粒之间。

81. 一种储存纳米颗粒的方法，所述方法包括使所述纳米颗粒形成如权利要求 1 所述的纳米团簇。

82. 如权利要求 81 所述的方法，其特征在于，所述纳米颗粒以液体、喷雾剂和气雾剂或干粉的形式储存。

83. 如权利要求 81 所述的方法，其特征在于，所述方法还包括使所述纳米团簇回复为纳米颗粒。

84. 如权利要求 83 所述的方法，其特征在于，所述使纳米团簇回复为纳米颗粒的步骤包括对所述纳米团簇施加环境因素。

85. 如权利要求 84 所述的方法，其特征在于，所述环境因素是水、选定 pH、选定温度、选定酶、选定化学品、选定电磁波长范围、振荡或剪切。

86. 如权利要求 81 所述的方法，其特征在于，所述纳米团簇包含将所述纳米颗粒保持在一起或因环境因素而分散所述纳米颗粒的分散材料。

87. 如权利要求 86 所述的方法，其特征在于，所述分散材料将所述纳米颗粒保持在一起并因境因素而分散所述纳米颗粒。

88. 如权利要求 86 所述的方法，其特征在于，所述分散材料包括水溶性聚合物、可生物降解的聚合物、聚电解质、金属、聚合物交联剂、小分子交联剂、pH 敏感材料或温敏材料。

用于递送治疗剂的纳米团簇

发明背景

本申请要求 2005 年 12 月 16 日提交的美国临时专利申请 60/751,172 的优先权，该申请的内容被纳入本文作为参考。

A. 发明领域

本发明一般涉及用于将活性成分转运至对象的递送载体。在某些方面，所述递送载体是可以在预防或治疗应用中使用的纳米团簇。

B. 发明背景

全球数以百万受到各种疾病或病症困扰的患者可以通过治疗剂或预防性试剂的有效递送来进行治疗。这些疾病或病症的例子包括肺部疾病、循环系统疾病、肌肉疾病、骨疾病、癌症等。

已使用纳米颗粒作为药物递送载体来治疗各种适应症(John 2003)。例如，已显示纳米颗粒能改善水溶性差的药物的溶解性并能提高细胞内和细胞旁的药物转运。此外，文献指出，聚阳离子聚合物与质粒 DNA 混合后形成纳米颗粒能有效递送质粒 DNA，从而提高基因表达(Kumar 2003)。对纳米颗粒介导的基因治疗的探索还能治疗遗传疾病如囊性纤维化病(Griesenbach 2004)。

大多数纳米颗粒制剂被设计成在细胞水平起效。这就需要确保纳米颗粒被有效递送到合适的靶细胞。然而，目前纳米颗粒治疗手段在到达靶细胞的能力方面有限。例如，目前两个研究小组正在研究微囊纳米颗粒作为肺部上皮细胞的纳米颗粒递送模式(Sham 2004, Grenha 2005)。这些努力因为通常不能控制微粒大小、分布以及难以递送大量治疗性纳米颗粒而受到限制。

发明概述

本发明通过提供有效的药物递送系统而克服了本领域的缺陷，所述系统可以(1)将纳米颗粒制成纳米团簇以便于操作、给药或靶向；和(2)维持纳米颗粒在靶部位的群

聚或分散。

在本发明的一方面，描述了一种包含多种纳米颗粒的纳米团簇。在某些非限制性方面，在靶部位维持纳米团簇(例如，纳米团簇不会分散成独立的纳米颗粒)。在其他方面，纳米颗粒因环境因素而分散。在某些非限制性的实施方式中，纳米团簇的大小约为 1-200 微米。在某些方面，纳米团簇的大小为 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190 或 200 微米。在其他方面、纳米团簇的大小可大于 200 微米(如 210、220、230、240、250、300、350、400、450、500、600、700 微米或更大)。本发明纳米团簇也可具有各种形状(例如，球形和非球形形状)。在某些实施方式中，纳米团簇可以是实心或空心的。本领域普通技术人员将理解，实心纳米团簇可以是无空隙的完全实心体，或者具有将纳米颗粒填塞到纳米团簇内时形成的一些空隙，例如孔或空心核。这些填塞空隙的大小非限制性地约为 1-1000 nm。在某些方面，填塞空隙的大小非限制性地约为 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000 纳米或更大。空心纳米团簇可具有空的空间或空穴。空穴的大小非限制性地约为 50 纳米到约 20 微米。空穴的大小例如可以是 50、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800...20 μ m 以及其中引出的任何范围。

在某些实施方式中，包含在纳米团簇内的纳米颗粒没有通过纳米颗粒上的官能团结合在一起(例如粘合或化学结合(例如共价键，非共价键，范德华力))。在某些方面，纳米颗粒相互间直接接触。在其他方面，纳米颗粒相互间不直接接触。在本发明的某些实施方式中，纳米颗粒未包封。在其他实施方式中，纳米颗粒不具有官能团。然而，在其他方面可以包含诸如羧基、巯基、羟基或氨基等官能团。可结合其他纳米颗粒，纳米颗粒表面活性成分或其他化合物的所有类型的官能团都适用于本发明。

在某些实施方式中，纳米团簇可包含活性成分。本发明内容中考虑可使用的活性成分的非限制性例子包括本领域普通技术人员已知的以及本说明书中描述的活性成分。例如，活性成分可包括药物以及专用试剂，如预防性试剂(例如疫苗)，诊断试剂(例如各种类型的示踪剂和成像增强剂)，治疗剂，例如小分子治疗剂(例如核酸、蛋白质、肽、多肽等)、药物、肽和放射性试剂，免疫调节剂、疫苗和病毒载体以及它们的组合。纳米颗粒可包括具体的实施方式，可呼吸的非医疗专用试剂如生理化学试剂，例如气

体解毒剂,生物物理调节剂,例如顺磁性试剂,发射剂,例如电磁波发射剂和成像增强剂。在某些实施方式中,活性成分可与纳米颗粒结合。例如,活性成分可缠结、嵌入、掺入、包封、结合于纳米颗粒表面(例如共价或非共价结合),或以其他方式与纳米颗粒结合。在某些优选的方面,活性成分是纳米颗粒。在其他方面,纳米颗粒可包含聚合物材料(包括例如可生物降解和非生物降解的聚合物)。可使用的聚合物材料的非限制性例子包括本领域普通技术人员已知以及本说明书中描述的物质。在某些实施方式中,纳米颗粒可包含聚合物与活性成分的混合物。

在其他非限制性实施方式中,纳米团簇或纳米颗粒或两者可包含至少一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种或更多种不同的活性成分。在优选实施方式中,纳米团簇或纳米颗粒包括:在其表面的第一种药物和包封在该纳米团簇或纳米颗粒内的第二种药物或者掺入纳米团簇或纳米颗粒材料的其他物质。认为纳米团簇可以受控的方式在给定的环境中或者在给定时间段后释放活性成分。例如,具有至少一种活性成分的纳米团簇可因环境因素或者在预定的时间段后释放。同样例如,含有至少两种不同活性成分的纳米团簇可因不同的环境因素或者在预定的时间段后释放。例如,活性成分 1 首先释放,然后再释放活性成分 2。在某些非限制性方面,第一种活性成分的释放可改善第二种活性成分的性能。

在其他具体的方面,本发明纳米团簇可包含分散材料,分散材料使多种纳米颗粒保持在一起和/或因环境因素而分散纳米颗粒。本发明可使用的分散材料包括本领域技术人员已知以及本说明书所述的材料。分散材料的非限制性例子包括液体敏感性材料(例如,水溶性物质(例如聚合物)、可生物降解的聚合物、聚电解质、金属、表面活性剂、聚合物交联剂、小分子交联剂、pH 敏感材料、压敏材料、酶敏感材料和温敏材料。本发明中使用的环境因素的非限制性例子包括液体(如水、血液、尿液、溶剂等)、选定 pH 范围、选定温度范围、电流、选定离子强度、压力、选定酶的存在、蛋白质、化学品、电磁波长范围(如可见光、UV 光、红外、紫外光、微波、X-射线和 γ -射线)或外力的存在(如振动、剪切、震摇等)。在某些方面,可在形成纳米团簇之前或之后将分散材料涂布到纳米颗粒的表面。在某些实施方式中,分散材料位于纳米颗粒之间或将纳米颗粒连接在一起(例如通过共价或非共价方式连接第一种纳米颗粒与第二种纳米颗粒)。分散材料可粘附或者共价或非共价偶联于纳米颗粒。

在本发明具体的实施方式中,纳米团簇可包含约 1-99 重量%或体积%的纳米颗粒或分散材料。纳米团簇也可完全由纳米颗粒构成(即 100%)。在优选实施方式中,纳米团簇包含约 10-90%、15-80%、20-70%、30-60%和约 40-50%的纳米颗粒或分散材料。

在某些实施方式中，纳米团簇包含至少 50% 的纳米颗粒或分散材料。

本发明另一个实施方式是包含本发明纳米团簇的组合物。在某些非限制性方面，该组合物包含多种(例如，至少 2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500 种或更多种)纳米团簇。组合物还可包含活性成分。如本说明书所述，可将组合物制成干粉、气雾剂、喷雾剂、片剂或液体制剂。本发明组合物可包含至少约 1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95% 或 100% 的本发明纳米团簇。在某些方面，本发明组合物可包含多种相同或类似的纳米团簇。在其他方面，本发明组合物可包含至少 2、3、4、5、6、7、8、9、10 种或更多种具有不同特征(例如附连不同活性成分，具有不同形状，空心或实心等)的纳米团簇。本发明组合物可配制在药学上可接受的载体中。

在另一实施方式中，提供了预防或治疗对象疾病或病症的方法，该方法包括给予需要的对象(例如，人、猪、马、牛、狗、猫、小鼠、大鼠、兔、或任何其他哺乳动物或非哺乳动物)治疗有效量的包含本发明纳米团簇的组合物。该方法还包括用于确定对象是否需要预防或治疗的方法。所述疾病或病症包括本领域技术人员已知以及本说明书所述的所有类型的疾病或病症。在某些优选的方面，所述疾病或病症可以是肺相关疾病或病症(例如，普通感冒、流感、囊性纤维化病、肺气肿、哮喘、结核病、严重的急性呼吸道综合征、肺炎、肺癌等)、循环系统疾病或病症、肌肉疾病或病症、骨疾病或病症、感染、癌症等。在某些实施方式中，该方法可包括给予用于治疗或预防该疾病的第二种治疗(如联合治疗)。在优选的实施方式中，本发明组合物经鼻腔给药。也考虑了本领域技术人员已知以及本说明书所述的其他给药方式。在具体的方面，组合物内的纳米团簇被递送至肺部深处(例如肺部细支气管或肺泡区域)。

在本发明某些优选的方面，本发明纳米团簇可用于递送疫苗或疫苗组分。例如，免疫系统细胞，尤其是巨噬细胞和树突细胞(dendrocyte)是免疫的靶点。这些“专业的”抗原递呈细胞(APC)可引发所需的 T-细胞对疫苗组分的应答。APC 一般能够吞噬 1-10 微米的颗粒。通过产生包含疫苗组分的该大小范围的纳米团簇或纳米颗粒，可使疫苗被动靶向递送至 APC。例如，美国专利 6,669,961 提供了该过程的非限制性解释。

本发明纳米团簇也可具有特定的质量密度。在某些优选的实施方式中，例如，质量密度大于、等于或小于 0.1 g/cm^3 。在具体实施方式中，本发明纳米团簇的质量密度约为 0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、 2.0 g/cm^3 或更

大。

还描述了制备纳米团簇的方法，该方法包括：(i)获取多种纳米颗粒；(ii)获得分散材料(需要时)；和(iii)将(i)和(ii)混合，将混合物制成纳米团簇。在某些方面，获取多种纳米颗粒的过程包括：(i)获取纳米颗粒的水性悬浮液；(ii)将该悬浮液乳化到非水相中；(iii)使水性悬浮液中的水吸收进入非水相；(iv)使纳米颗粒聚集到一起；和(v)回收聚集的纳米颗粒。在其他非限制性实施方式中，获取多种纳米颗粒的过程包括：(i)获取纳米颗粒的非水性悬浮液；(ii)将该悬浮液乳化到水相中；(iii)使非水性悬浮液中的液体吸收进入水相；(iv)使纳米颗粒聚集到一起；和(v)回收聚集的纳米颗粒。所述方法是非限制性的，本领域技术人员还明白其他方法(例如，乳剂/溶剂蒸发、提取、喷雾干燥、喷雾冻干、溶液中自组装等)。在某些方面，考虑不采用喷雾和/或冷冻干燥技术，在溶液中制备纳米团簇。还考虑采用本领域技术人员已知的冷冻干燥或喷雾干燥技术从溶液中回收纳米团簇。如本说明书所述，纳米团簇可包含在组合物内。在非限制性的实施方式中，组合物可制成液体、喷雾剂、气雾剂或干粉。

还描述了将活性成分递送至需要的对象的方法，该方法包括获取包含本发明纳米团簇和活性成分的组合物；和将该组合物给予对象。在非限制性的方面，活性成分被包封在纳米颗粒内、掺入纳米颗粒材料中、偶联于纳米颗粒、吸附或连接于纳米颗粒。

在本发明的又一个实施方式中，描述了制备纳米团簇的方法，该方法包括：(i)获取第一种纳米颗粒和第二种纳米颗粒；和(ii)将第一种和第二种纳米颗粒混合，所述纳米颗粒自组装形成纳米团簇。第一和第二种纳米颗粒，例如，可具有疏水性、亲水性或这两种性质。在其他方面，第一或第二种纳米颗粒可带有静电荷。例如，第一种纳米颗粒带正电，第二种纳米颗粒带负电，反之亦然。在具体的实施方式中，自组装可基于第一种和第二种纳米颗粒之间的静电相互作用。在其他非限制性的方面，自组装可基于第一种和第二种纳米颗粒之间的疏水或亲水相互作用。在某些实施方式中。第一种和第二种纳米颗粒可在溶液中自组装形成纳米团簇。在具体的方面，纳米团簇的制备无需采用喷雾和/或冷冻干燥技术；而是在溶液中形成纳米团簇。采用本领域技术人员已知的冷冻干燥或喷雾干燥可从溶液中回收纳米团簇。在其他方面，制备纳米团簇的方法可还包括获取分散材料以及将分散材料与第一和第二种纳米颗粒进行混合的步骤。

提供了储存纳米颗粒的方法，该方法包括使纳米颗粒形成纳米团簇。例如，纳米颗粒可以液体制剂、喷雾剂、气雾剂或干粉形式储存。储存纳米颗粒的方法还包括使纳米团簇恢复成纳米颗粒。在某些方面，使纳米团簇恢复成纳米颗粒的过程可包括：

对纳米团簇施加环境因素的影响。如上文及本说明书所述，环境因素非限制性的例子包括：水、选定 pH、选定温度、选定酶、选定化学品、选定电磁波长范围、振动或剪切。在某些具体的方面，纳米团簇可包含分散材料，分散材料使纳米颗粒保持在一起和/或因环境因素而分散纳米颗粒。分散材料非限制性的例子包括水溶性聚合物、可生物降解的聚合物、聚电解质、金属、聚合物交联剂、小分子交联剂、pH 敏感材料、表面活性剂或温敏材料。

认为本说明书所述的任何实施方式可参照本发明的任何方法或组合物实现，反之亦然。而且，本发明的组合物可用于实现本发明的方法。

权利要求书和/或说明书中使用的术语“抑制”、“降低”或“防止”或这些术语的任何变化形式包括任何可测量的降低或完全抑制以实现所需结果。

权利要求书和/或说明书中使用的术语“有效”表示足以实现理想、预期或指定的结果。

权利要求书和/或说明书中与术语“包含”联用的词“一”可表示“一种”，但也表示“一种或多种”，“至少一种”或“一种及一种以上”。

术语“约”或“大约”的定义接近本领域普通技术人员所理解的含义。在一个非限制性实施方式中，该术语限定在 10% 以内，优选 5%，更优选 1%，最优选 0.5% 以内。

权利要求书中的“或”用于表示“和/或”，除非明确指出二选一或者相互间排斥，但本文中支持该定义是指二选一及“和/或”。

权利要求书和/或说明书中使用的术语“包含”(以及任何其他形式)、“具有”(以及任何其他形式)、“包括”(以及任何其他形式)或“含有”(以及任何其他形式)是涵盖或开放式的，不排除额外的未提及的成分或方法步骤。

通过以下详细说明，本发明的其他目的，特征和优点将显而易见。然而，应理解，表示本发明具体实施方式的详细描述及实施例仅仅是示例性的。此外，通过以下详细描述，本领域技术人员将明白本发明精神和范围内的改变和改进形式。

附图简要说明

作为本说明书的一部分的附图进一步显示了本发明的某些方面。参考一幅或多幅附图，结合本文所述具体实施方式的详细描述，可更好地理解本发明。

图 1：治疗性纳米颗粒组织形成具有限定(可调)直径的纳米团簇。与环境因素相接触后，分散材料引发纳米颗粒的分散。

图 2: 电镜照片: (A)构成约 6 微米纳米团簇的~100 纳米二氧化硅颗粒; (B)~6 微米纳米团簇; (C)代表典型的纳米团簇分布。(C)中的比例尺代表 10 μm 。

图 3: 构建粒径分布宽或窄的纳米团簇(左上图和左下图)。调节所用构建条件和/或分散材料, 形成实心(右上图)或空心(右下图)团簇。

图 4: 聚苯乙烯纳米颗粒组成均一(约 75 微米)纳米团簇。

图 5: 电镜照片: (A)涂覆有分散材料(淡灰色光晕)的 225 纳米二氧化硅纳米颗粒和(B)涂覆有分散材料的二氧化硅纳米颗粒形成的 9 微米纳米团簇。

图 6: 经(A)480 nm 处的吸光度和(B)观测确定, 不同 pH 下涂覆有可水解聚合物的纳米颗粒组成的纳米团簇随时间的分散情况。分散体粒径分析表明, 纳米团簇释放多分散聚集体, 然后裂解形成单分散纳米颗粒。

图 7A、图 7B、图 7C: 通过增加纳米颗粒浓度制备的 PLGA 纳米团簇的几何大小分布(图 7A)和空气动力学大小分布(图 7B) (黑色=0.68 mg/ml, 红色=1.36 mg/ml, 绿色=2.16 mg/ml, 蓝色=2.72 mg/ml)。图 7C 是纳米团簇结构的扫描电镜照片。比例尺=5 μm 。

图 8A、图 8B、图 8C、图 8D、图 8E、图 8F: PLGA 纳米颗粒纳米团簇的激光扫描共聚焦显微照片。在纳米团簇结构内鉴定到 FITC-标记的涂有 PVAm 的纳米颗粒(图 8A 和图 8D)和罗丹明-标记的涂有 PEMA 的纳米颗粒(图 8B 和图 8E)。图 8C 和图 8F 的重叠照片揭示纳米团簇的扩散结构。比例尺=5 μm 。

图 9: 硝苯地平纳米颗粒群的扫描电镜(SEM)照片。

图 10: 硝苯地平纳米颗粒团簇的 SEM 照片。

图 11: 显示了包含 DOTAP/PLGA 纳米颗粒和卵清蛋白的纳米团簇的几何粒径。

图 12: 包含 DOTAP/PLGA 纳米颗粒和卵清蛋白的纳米团簇的 SEM 照片。

具体实施方式的描述

目前的药物递送治疗手段由于不能将活性成分有效递送至靶部位而效率低下。许多目前的药物递送系统到达特定靶部位的能力或效率有限。虽然纳米颗粒在药物递送中有一些优点(例如, 提高低溶解性 API 的溶出度, 改善细胞内和跨细胞转运等), 但是由于不能将纳米颗粒递送至药物作用部位而导致纳米颗粒的应用受到限制(例如, 干纳米颗粒太小而不能在肺中有效沉积, 可以绕过 APC 的侦测等)。此外, 工业规模下纳米颗粒常常难以掌控, 受控的聚集过程能够简化操作并使递送药物的纳米颗粒或纳米团簇容易重建和形成。

可采用本发明纳米团簇将活性成分递送至靶部位。可将所述纳米团簇和纳米颗粒的大小和分布设计成适合所需给药路径和/或特定疾病或病症治疗的形式。一方面,例如,纳米团簇提供了有效的药物递送系统,通过纳米团簇将纳米颗粒递送至靶部位。在某些方面,将纳米团簇保持在靶部位。在其他方面,纳米团簇在靶部位分散纳米颗粒。此外,可使纳米团簇具有合适的物理化学特性以将治疗性纳米颗粒或活性成分递送和受控释放至靶部位。

本发明的另一方面在于,无需使用本领域普通技术人员已知的标准喷雾干燥和/或冷冻干燥技术,在溶液中制备纳米团簇。

本发明的这些和其他方面将在以下内容中进一步详细描述。

A. 纳米团簇

在某些非限制性的方面,本发明纳米团簇可包含多种纳米颗粒,含或不含使多种纳米颗粒保持在一起的分散材料。也可使用分散材料,以便因环境因素而分散纳米颗粒。活性成分也可掺入纳米团簇中。在其他方面,纳米颗粒可以是活性成分。例如,图1显示了含有治疗性纳米颗粒和分散材料的纳米团簇。该递送系统具有以下优点:纳米团簇的大小适合递送(例如,肺、鼻腔、消化道中的M细胞、被抗原递呈细胞摄取等),同时具有纳米颗粒的优点,例如改善药物溶解度、生物利用度、跨越生物屏障运输、胞内递送等。如本说明书更详细所述,改变分散材料的性质能够开发环境响应型纳米颗粒递送系统和/或生物传感器。此外,团簇内纳米颗粒的特定排列能够单独控制活性成分的持续时间和浓度,在形成团簇之前独立形成各个纳米颗粒类型也有利于该概念。

本发明者由多种纳米颗粒材料成功制成纳米团簇,在水性溶液中控制团簇分散形成组成的纳米颗粒(参见实施例1-3)。在非限制性的方面,本发明者在去离子水中获得纳米颗粒的胶体悬浮液,然后乳化到辛醇中。然后,分散液滴中的水吸收到辛醇相中。随着从各个液滴去除水,纳米颗粒可压紧到一起直到形成纳米颗粒聚集体(图2)。在某些非限制性的实施方式中,根据液滴内纳米颗粒的浓度,液滴的大小可用作控制所得纳米团簇大小的模板。在其他方面,图2中团聚的纳米颗粒通过疏水、库仑和/或范德华力保持在一起,并可防止分散到水性介质中。

本发明纳米团簇的这些和其他方面在以下内容中进一步详细描述。

1. 纳米颗粒

纳米颗粒是一种大小为纳米级别的微观粒子。在优选实施方式中,本发明纳米颗

粒的大小约为 1-3000 纳米。在更具体的方面, 纳米颗粒的大小为 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300、2400、2500、2600、2700、2800、2900、3000 纳米或更大, 或其中引出的任意范围。

认为所有类型的材料和结构, 包括无机和有机材料都可用于本发明的纳米颗粒。这些材料和结构的非限制性例子包括活性成分(见说明书), 聚合物组装聚集体(polymersome)、脂质体和多聚体(polyplex)。其他非限制性的材料包括聚(原酸酯), 聚(酐), 聚(磷酸酯), 聚(膦腈)等。在优选的方面, 材料是可生物降解的聚合物聚(乳酸-乙醇酸共聚物)(PLGA)。PLGA 是一种经充分研究的药物递送聚合物, FDA 批准由于许多体内应用。其他非限制性的材料包括例如, 聚酯(如聚(乳酸)、聚(L-赖氨酸)、聚(乙醇酸)和聚(乳酸-乙醇酸共聚物))、聚(乳酸-赖氨酸共聚物)、聚(乳酸-接枝-赖氨酸)、聚酐(如聚(脂肪酸二聚体)、聚(延胡索酸)、聚(癸二酸)、聚(羧基苯氧基丙烷)、聚(羧基苯氧基己烷)、这些单体的共聚物等)、聚(酐-酰亚胺共聚物)、聚(酰胺)、聚(原酸酯)、聚(亚胺碳酸酯)、聚(氨基甲酸乙酯)、聚(有机膦腈)、聚磷酸酯)、聚(乙烯乙酸乙烯酯)和其他酰基取代的纤维素乙酸酯及其衍生物、聚(己内酯)、聚(碳酸酯)、聚(氨基酸)、聚(丙烯酸酯)、聚缩醛、聚(氰基丙烯酸酯)、聚(苯乙烯)、聚(氯化乙烯)、聚(氟化乙烯)、聚(乙烯基咪唑)、氯磺酰化聚烯烃、聚环氧乙烷、共聚物、聚苯乙烯以及它们的掺混物或共聚物。在某些优选的方面, 纳米颗粒包含羟丙基纤维素(HPC)、N-异丙基丙烯酰胺(NIPA)、聚乙二醇、聚乙烯醇(PVA)、聚氮丙啶、壳聚糖、壳多糖、硫酸右旋糖苷、肝素、硫酸软骨素、明胶等以及它们的衍生物、共聚物和混合物。制备纳米颗粒的非限制性方法参见美国专利公开 2003/0138490, 将其内容纳入本文作为参考。

在某些实施方式中, 纳米颗粒可与活性成分结合(例如, 缠结、嵌入、掺入、包封、结合于表面, 或以其他方式与纳米颗粒结合)。在某些优选的方面, 活性成分是纳米颗粒。在一优选但非限制性的方面, 活性成分是药物, 例如纯药物(如结晶或超临界流体处理的药物、包封药物(如聚合物)、表面结合药物(如吸附或结合于纳米颗粒表面的药物)、复合药物(如与用于形成纳米颗粒的材料结合的药物)。

在某些实施方式中, 本发明纳米颗粒不包含官能团。然而, 在其他方面, 纳米颗粒可包含官能团, 如羧基、巯基、羟基或氨基。考虑本发明可使用能够与其他纳米颗

粒、纳米颗粒表面活性成分或其他化合物结合的所有类型的官能团。例如，官能团可用于药物结合(共价或静电)。

2. 分散材料

在本发明的某些方面，分散材料具有多种功能。例如，它可使纳米颗粒通过分散材料相互间保持在一起(如，粘合或化学键(如，共价键、非共价键、范德华力)。在其他方面，分散材料可因环境因素而在靶部位分散纳米颗粒。例如当分散材料裂解、崩解或经历不再能够使纳米颗粒保持在一起的其他改变时可发生这种分散。

考虑适用于本发明的分散材料的非限制性例子包括：液体敏感性材料(如水溶性材料)如聚氧乙烯去水山梨糖醇脂肪酸酯、聚甘油脂肪酸酯、聚氧乙烯衍生物及其类似物、糖酯、糖醚、糖甘油酯(例如蔗糖、木糖醇和山梨糖醇)等、可生物降解的聚合物(参见纳米颗粒制备聚合物列表)、聚电解质如硫酸右旋糖苷、聚氮丙啶、壳聚糖、硫酸软骨素、肝素、硫酸肝素、聚(L-赖氨酸)等、金属(钙、锌等)、交联聚合物(聚甲基丙烯酸酯或具有该功能的类似衍生物、聚(谷氨酸)、聚(硫代磷酸酯)、聚(富马酸丙烯酯)-二丙烯酸酯等和/或具有合适的末端或侧链反应性基团的聚合物、小分子交联剂(二环氧化物、二酸、二胺等)如 2-亚甲基-1,3-二氧杂环庚烷(dioxepane)、戊二醛、二硫酸双琥珀酰亚胺丙酸酯、pH 敏感材料如聚(γ -谷氨酸)、酶敏感材料如聚(氨基酸)(肽、蛋白质等)如聚(N-取代的 α/β -天冬酰胺)、多糖、脂质、油等和温敏材料如(2-羟乙基甲基丙烯酸酯)、聚(N-异丙基丙烯酰胺)、聚(2-乙基丙烯酸-N-[4-(苯基偶氮)苯基]甲基丙烯酰胺共聚物)、丙烯酸或丙烯酰胺的聚合物及相关聚合物，包括这些聚合物的共聚物或掺混物，以及上文提及的纳米颗粒形成材料和表面活性剂(如非离子、阳离子、阴离子、隐阴离子(cryptoanionic)和两性离子表面活性剂(见 McCutcheon 的《乳化剂与去污剂》(2001); 美国专利 5,011,681; 4,421,769; 3,755,560, 6,117,915))。表面活性剂非限制性的例子包括甘油酯、丙二醇酯、聚乙二醇的脂肪酸酯、聚丙二醇的脂肪酸酯、山梨糖醇酯、去水山梨糖醇酸酐酯、羧酸共聚物、葡萄糖酯和醚、乙氧基化醚、乙氧基化醇、烷基磷酸酯、聚氧乙烯脂肪醚磷酸酯、脂肪酸酰胺、酰基乳酸酯、肥皂、TEA 硬脂酸酯、DEA 油基聚氧乙烯 3 醚磷酸酯、聚乙二醇 20 去水山梨糖醇单月桂酸酯(聚山梨酯 20)、聚乙二醇 5 大豆甾醇、硬脂基聚氧乙烯 2 醚、硬脂基聚氧乙烯 20 醚、硬脂基聚氧乙烯 21 醚、十六十八烷基聚氧乙烯 20 醚、PPG-2 甲基葡萄糖醚二硬脂酸酯、十六烷基聚氧乙烯 10 醚、十六烷基磷酸酯、十六烷基磷酸钾、二乙醇胺十六烷基磷酸酯、聚山梨酯 20、聚山梨酯 60、聚山梨酯 80、硬脂酸甘油酯、PEG-100 硬脂酸酯、四丁酚醛、

溴化十六烷基三甲铵(CTAB)、普流罗尼-68 以及它们的混合物。

导致分散材料不能再使纳米颗粒保持在一起的环境因素的非限制性例子包括液体(如水、血液、粘液、溶剂等)、选定 pH 范围、选定温度范围、电流、选定离子强度、压力、选定酶的存在、蛋白质、DNA、化学品、电磁波长范围(如可见光、UV 光、红外、紫外光、微波、X-射线和 γ -射线), 或外力的存在(如振荡、剪切、震荡等)。

3. 活性成分

在某些非限制性的方面, 本发明纳米团簇可包含活性成分。活性成分包括但不限于: 用于实现所需效果的任何组分、化合物或小分子。本发明所需效果的非限制性例子包括诊断和治疗效果。例如, 所需效果包括诊断、治愈、缓解、治疗或预防疾病或病症。活性成分也可影响患者身体局部或器官的结构或功能。

本发明可使用的活性成分包括但不限于: 核酸、蛋白质和肽、激素和类固醇、化疗剂、NSAID、疫苗组分、镇痛药、抗生素、抗抑郁药等。可使用的核酸的非限制性例子包括 DNA、cDNA、RNA、iRNA、siRNA、反义核酸、肽-核酸、寡核苷酸、或经修饰以改善稳定性的核酸(例如, 硫代磷酸酯、氨基磷酸酯或甲基磷酸酯)。

本发明可使用的蛋白质和肽包括但不限于: 人生长激素、牛生长激素、血管内皮生长因子、成纤维细胞生长因子、骨形态发生蛋白、肿瘤坏死因子、红细胞生成素、血小板生成素、组织纤溶酶原激活剂和衍生物、胰岛素、单克隆抗体(如抗-人表皮生长因子受体 2(贺赛汀)、抗-CD20(利妥昔单抗)、抗-CD18、抗-血管内皮生长因子、抗-IgE、抗-CD11a)及其衍生物、单链抗体片段、人脱氧核糖核酸酶 I(阿法链道酶(domase alfa)、普尔莫酶(Pulmozyme))、干扰素-1、粒细胞集落刺激因子、促黄体生成激素释放激素抑制剂肽、醋酸亮丙瑞林、内皮抑制素、血管抑制素、猪因子 VIII 凝血因子、干扰素 α -1、胰脂肪酶(胰脂酶)、卵清蛋白、硝苯地平、氯雷他定等。

可使用的激素和类固醇(如皮质类固醇)的非限制性例子包括醋酸炔诺酮、乙炔雌二醇、孕酮、雌激素、睾酮、氯泼尼松等。

可使用的化疗剂包括但不限于: 紫杉醇、长春碱、顺铂、卡铂、他莫昔芬等。

NSAID 的非限制性例子包括: 吡罗昔康、阿司匹林、双水杨酯(Amigesic)、二氟尼柳(Dolobid)、布洛芬(Motrin)、酮洛芬(Orudis)、萘丁美酮(Relafen)、吡罗昔康(Feldene)、萘普生(Aleve、Naprosyn)、双氯芬酸(Voltaren)、吲哚美辛(Indocin)、舒林酸(Clinoril)、托美丁(Tolectin)、依托度酸(Lodine)、酮咯酸(Toradol)、奥沙普秦(Daypro)或塞来考昔(Celebrex)。

可使用的疫苗组分包括但不限于：乙型肝炎、脊髓灰质炎、麻疹、腮腺炎、风疹、HIV、甲型肝炎(如贺福立适(Havrix))、结核病等的疫苗。

镇痛药的非限制性例子包括但不限于：阿司匹林、对乙酰氨基酚、布洛芬、萘普生钠等。

抗生素包括但不限于：阿莫西林、青霉素、磺胺药物、红霉素、链霉素、四环素、克拉霉素、妥布霉素、环丙沙星、特康唑、阿奇霉素等。

抗抑郁药包括但不限于：左洛复、氟西汀(百忧解)、帕罗西汀(Paxil)、西酞普兰、文拉法辛、马来酸氟伏沙明、盐酸丙咪嗪、锂、奈法唑酮等。

本发明可使用的其他活性成分包括但不限于：西地那非(伟哥(Viagra))、阿昔洛韦、更昔洛韦、非索非那定、塞来考昔(Celebrex)、罗非考昔、雄烯二酮、氯喹、盐酸苯海拉明、丁螺环酮、甲磺酸多沙唑嗪、氯雷他定、克劳尼滨(clonidine)、葡萄糖酸锌、醋酸锌、氢化可的松、华法林、硫酸茚地那韦、利多卡因、诺法生(novacaine)、雌二醇、醋酸炔诺酮、甲羟孕酮、右芬氟拉明、右安非他明、多西环素、沙利度胺、氟替卡松、磷酸氟达拉滨、依那西普、盐酸二甲双胍、透明质酸盐、盐酸四环素(tetracycline)、洛哌丁胺、伊波加因、氯硝西洋、氯胺酮、拉米夫定(3TC)、异维A酸、烟碱、甲氟喹、左氧氟沙星、阿托伐他汀(立普妥)、硝酸咪康唑(Monistat)、利托那韦、法莫替丁、辛伐他汀(Zocor)、盐酸西布曲明单氢化物、氧氟沙星、兰索拉唑、雷洛昔芬(Evista)、扎那米韦(Relenza)、磷酸奥塞米韦、4-苯基丁酸钠盐、氯丙嗪、奈韦拉平、齐多夫定或盐酸西替利嗪(Zyrtec)。

其他活性成分的非限制性例子可参见《医师案头参考 2000》(Physician's Desk Reference 2000)，第 54 版，ISBN：1563633302，AHFS 99 药物信息，美国卫生系统协会(Amer. Soc. of Health System)，ISBN：1879907917 和美国专利 5,019,400，将其内容纳入本文作为参考。

B. 纳米团簇制备变量基可调性

例如可以通过改变纳米颗粒类型或大小、分散性质、分散材料和加工条件来调节纳米团簇的目标大小、密度和/或可分散性。例如，图 3 和 4 显示了可采用各种加工条件来产生具有宽或窄粒径范围的纳米团簇，也可形成实心或空心的纳米团簇。控制乳液中或从喷嘴喷射的液滴大小有利于形成均一的纳米团簇。改变溶剂和提取相、温度、湿度等以及合适的纳米颗粒性质可控制纳米团簇的形态。例如，快速提取含纳米颗粒的溶液得到核/壳结构，而缓慢去除该相使纳米颗粒有时间从界面扩散和形成更致密的

纳米团簇结构。在另一实施例中，控制纳米颗粒的物理化学性质能提供促使纳米颗粒靠近或离开液滴界面的驱动力，分别形成核/壳结构或实心基质。此外，基于本发明者报道的精确粒径构造方法的改良形式(Berkland 2001, Berkland 2001, Berkland 2002, Berkland 2004)或类似技术，本发明者能够制备各种单分散纳米团簇(图 4)。

可采用许多技术来表征由各种纳米颗粒类型或大小、分散性质、分散材料和加工条件制备的纳米团簇。可采用这些技术机械确定加工参数如何影响颗粒物理化学性质。例如，纳米团簇干粉的空气动力学粒径可由 Aerosizer LD(得自药物递送研究中心, KU)测定，同时提供了关于干燥颗粒几何直径，大小分布，聚集和密度的支持性数据。可采用 Eric Munson 博士的实验室(Pharmaceutical Chemistry, KU)中的氦比重计(微粒学 AccuPyc 1330 氦气比重计)来更加准确地测定不同纳米团簇制剂的密度。例如，将纳米团簇粉末称量加入 1 cm³ 样品容器并称重。样品密度通过与第二空白腔室相比氦气置换的样品来测定。三种样品分别进行三复管测定，计算均值和标准差。通过扫描电镜(LEO 1550)探究颗粒外部和内部形态(通过冷冻破裂(Berkland 2004)观察内部形态)。

C. 药物组合物和给药途径

本发明的一个实施方式包括治疗、预防或诊断特定疾病或病症的方法，该方法包括：给予对象所述的纳米团簇。在许多情况下，单独给予或者包含在药物组合物中给予纳米团簇。通常，药物组合物的有效量限定为，足以缓解、减轻、最小化或限制疾病或病症的程度的量。更严格的定义是消除、根除或治愈疾病或病症的量。

1. 药物组合物

本发明药物组合物可包含本发明纳米团簇。短语“药物或药学上可接受的”包括但不限于给予对象(例如人)时不产生副作用、过敏反应或其他不良反应的分子实体和组合物。药物组合物的制备是本领域技术人员熟知的。《雷明登药物科学》(Remington's Pharmaceutical Sciences), 第 18 版，麦克印刷公司(Mack Printing Company), 1990。而且，对于动物(如人)给药，制剂优选符合无菌、无致热原性、一般安全性和纯度标准，如 FDA 生物标准所要求的那样。

“治疗有效量”是能在受者中有效产生有益效果的量。该量最初可通过温习公开文献，进行体外试验或者在健康试验动物中进行代谢研究来确定。临床环境中应用之前，宜在动物模型，优选待治疗的特定疾病广泛接受的动物模型中进行验证研究。某些实施方式中采用的优选动物模型是啮齿动物模型，因为其使用经济，尤其是因为所得结果已广泛接受用于预测临床值。

“药学上可接受的载体”包括任意和所有溶剂、分散体介质、涂层、表面活性剂、抗氧化剂、防腐剂(如抗菌剂、抗真菌剂)、等张剂、吸收延迟剂、盐、防腐剂、药物、药物稳定剂、凝胶、粘合剂、赋形剂、崩解剂、润滑剂、甜味剂、调味剂、染料、类似材料及其组合,如本领域普通技术人员所知(雷明登药物科学,1990)。

给予对象的本发明组合物的实际剂量可由身体和生理学因素确定,例如体重、疾病严重性、待治疗的疾病类型、过去或并行的治疗干预、患者特发症以及给药途径。在任意事件中,负责给药的人员将确定组合物中活性成分的浓度以及个体对象的适当剂量。

在某些非限制性实施方式中,药物组合物可包含例如至少约0.1%的活性成分或纳米团簇。在其它实施方式中,活性成分或纳米团簇占约2-75重量%或约25-60重量%,以及由其衍生的任意范围。在其他非限制性的实施例中,每次给药剂量也可约为约1微克/公斤/体重、约5微克/公斤/体重、约10微克/公斤/体重、约50微克/公斤/体重、约100微克/公斤/体重、约200微克/公斤/体重、约350微克/公斤/体重、约500微克/公斤/体重、约1毫克/公斤/体重、约5毫克/公斤/体重、约10毫克/公斤/体重、约50毫克/公斤/体重、约100毫克/公斤/体重、约200毫克/公斤/体重、约350毫克/公斤/体重、约500毫克/公斤/体重、至约1000毫克/公斤/体重或更高,以及由其衍生的任意范围。在由上述数字衍生的范围的非限制性例子中,基于上述数字,可给予约5-100毫克/公斤/体重,约5-500毫克/公斤/体重等。

组合物还可包含各种抗氧化剂以延迟一种或多种活性成分或纳米团簇的氧化。可通过防腐剂如各种抗菌剂和抗真菌剂来防止微生物的作用,这些防腐剂包括但不限于对羟基苯甲酸酯类(如,对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯)、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞或其组合。

本发明组合物可包含不同类型的载体,这取决于是以固体、液体或是气雾剂形式给药以及对于诸如注射等给药途径是否需要灭菌。

可将组合物配制成游离碱、中性或盐形式的组合物。药学上可接受的盐包括酸加成盐,例如与含有蛋白质的组合物的游离氨基基团形成的盐,或与无机酸(如盐酸或磷酸)或有机酸(如醋酸、草酸、酒石酸或或苦杏仁酸)形成的盐。与游离羧基形成的盐也可从无机碱(例如钠、钾、铵、钙或铁的氢氧化物)或有机碱(例如,异丙胺、三甲胺、组氨酸或普鲁卡因)衍生得到。

在组合物是液体形式的实施方式中,载体可以是溶剂或分散介质,包括但不限于水、乙醇、多元醇(如甘油、丙二醇、液体聚乙二醇等)、脂质(如甘油三酯、植物油、

脂质体)及其组合。例如通过使用涂层(例如卵磷脂);通过分散在载体(例如液体多元醇或脂质)中维持所需的粒径;通过使用表面活性剂(例如羟丙基纤维素);或上述方法的组合来维持适当的流动性。在许多情况下,优选包含等张剂,例如糖、氯化钠或其组合。

在其它实施方式中,可使用本发明的滴眼剂、鼻腔溶液或喷雾剂、气雾剂或吸入剂。通常将这些组合物设计成适合靶组织的类型。在非限制性的例子中,鼻腔溶液通常是水性溶液,它被设计成以液滴或喷雾的形式给予鼻腔。制备鼻腔溶液使其在许多方面都类似于鼻腔分泌物,从而维持正常的纤毛作用。因此,在优选实施方式中,水性鼻腔溶液通常是等张的或经稍许缓冲以维持 pH 约 5.5-6.5。此外,类似于眼用制剂中所用,需要时,制剂中还可包含抗微生物防腐剂、药物或合适的药物稳定剂。例如,已知各种市售鼻用制剂,该制剂包含药物如抗生素或抗组胺药。

在某些实施方式中,制备组合物用于口服给药。在这些实施方式中,固体组合物可包括例如溶液剂、混悬剂、乳剂、片剂、丸剂、胶囊(如、硬或软壳明胶胶囊)、缓释制剂、含服组合物、含片、酏剂、混悬剂、糖浆剂、纸囊剂或其组合。口服组合物可直接掺入饮食中。口服给药的优选载体包括惰性稀释剂、可同化的食用载体或其组合。在本发明的其他方面,可将口服组合物制备成糖浆剂或酏剂。糖浆剂或酏剂可包含例如,至少一种活性剂、甜味剂、防腐剂、调味剂、染料、防腐剂或其组合。

在某些实施方式中,口服组合物可包含一种或多种粘合剂、赋形剂、崩解剂、润滑剂、调味剂及其组合。在某些实施方式中,组合物可包含一种或多种以下成分:粘合剂,例如黄芪树胶、阿拉伯胶、玉米淀粉、明胶或其组合;赋形剂,例如磷酸二钙、甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁或其组合;崩解剂,例如玉米淀粉、马铃薯淀粉、藻酸或其组合;润滑剂,例如,硬脂酸镁;甜味剂,例如蔗糖、乳糖、糖精或其组合;调味剂,例如薄荷、冬青油、樱桃调味剂、橘味剂等;或上述物质的组合。如果剂型是胶囊,则除上述物质外,还可包含载体如液体载体。各种其他物质可以是涂层形式或用以改良该剂量单位的物理形式。例如,片剂、丸剂或胶囊可涂覆有虫胶、糖或两者。

无菌注射液的制备包括:将在合适溶剂中所需量的活性化合物与上文所列的各种其他成分混合,需要时进行过滤除菌。通常,分散体的制备包括:将各种无菌活性成分掺入包含基本分散介质和/或其他成分的无菌运载体中。对于无菌注射用溶液剂、混悬剂或乳剂的无菌粉末,优选的制备方法是真空干燥或冷冻干燥技术,从上述除菌过滤液体介质得到活性成分加任何其他所需成分的粉末。需要时液体介质应适当缓冲,

在用足量的盐水或葡萄糖注射之前，液体稀释剂首先应等张。也考虑了用于直接注射的高度浓缩组合物的制备，采用 DMSO 作为溶剂以产生极端快速渗透，将高浓度的活性剂递送至一小块区域内。

组合物应在制造和储存条件下稳定，保持对抗微生物(例如细菌或真菌)的污染作用。应理解，应该最大程度降低外毒素污染，达到安全水平，例如小于 0.5 纳克/毫克蛋白质。

在本发明的另一方面，本领域普通技术人员将理解，本发明组合物可包含任意数量的纳米颗粒、分散材料、活性成分和其他组分的组合。还应理解，这些成分的浓度可变化。例如，在一个非限制性的方面，本发明组合物可包含至少约 0.0001%-0.001%、0.001%-0.01%、0.01%-0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1.0%、1.1%、1.2%、1.3%、1.4%、1.5%、1.6%、1.7%、1.8%、1.9%、2.0%、2.1%、2.2%、2.3%、2.4%、2.5%、2.6%、2.7%、2.8%、2.9%、3.0%、3.1%、3.2%、3.3%、3.4%、3.5%、3.6%、3.7%、3.8%、3.9%、4.0%、4.1%、4.2%、4.3%、4.4%、4.5%、4.6%、4.7%、4.8%、4.9%、5.0%、5.1%、5.2%、5.3%、5.4%、5.5%、5.6%、5.7%、5.8%、5.9%、6.0%、6.1%、6.2%、6.3%、6.4%、6.5%、6.6%、6.7%、6.8%、6.9%、7.0%、7.1%、7.2%、7.3%、7.4%、7.5%、7.6%、7.7%、7.8%、7.9%、8.0%、8.1%、8.2%、8.3%、8.4%、8.5%、8.6%、8.7%、8.8%、8.9%、9.0%、9.1%、9.2%、9.3%、9.4%、9.5%、9.6%、9.7%、9.8%、9.9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或 99%或由其导出任何范围的至少一种纳米颗粒、分散材料、活性成分或本说明书和权利要求书中提及的其他组分。在非限制性的方面，百分比可由组合物总重量或总体积计算。本领域普通技术人员应理解，浓度可随着纳米颗粒、分散材料、活性成分或其他组分的加入、替代和/或削减而变化。

2. 给药途径

本发明可通过静脉内、皮内、动脉内、腹膜内、损伤内、颅内、关节内、前列腺内、胸膜内、气管内、鼻内、玻璃体内、阴道内、子宫内、直肠内、鞘内、局部、肿瘤内、肌内、腹膜内、皮下、结膜下、囊泡内、粘膜、心包内、脐带内、眼内、口服、部分、局部、吸入(如气雾剂吸入)、注射、输注、连续输注、局部直接灌注靶细胞、经导管、通过灌洗、乳霜形式、液体组合物(如脂质体)或通过其他方法或上述途径的任意组合来给药，如本领域普通技术人员所知(雷明登药物科学，1990)。

D. 联合治疗

为了增加本发明纳米团簇治疗的有效性,需要将这些纳米团簇与能有效治疗特定疾病或病症的其他疗法进行联合治疗。

本发明组合物可在其他药剂治疗之前或之后进行,间隔几分钟到几周。考虑了间隔约 12-24 小时内给予这两种治疗,更优选间隔约 6-12 小时这两种治疗。在一些情况下,需要显著延长治疗的时间,各次给药间的间隔为几天(2、3、4、5、6 或 7 天)、几周(1、2、3、4、5、6、7 或 8 周)或者甚至是几个月(1、2、3、4、5、6 个月或更久)。

可采用各种组合,包含纳米团簇的组合物为“A”,第二种药剂为“B”:

A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B

B/A/B/B B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A

B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A。

E. 纳米颗粒、分散材料、活性成分和其他组分的来源

本说明书和权利要求书中所述的纳米颗粒、分散材料、活性成分和其他组分可通过本领域普通技术人员已知的任何方法获得。在非限制性的实施方式中,例如,这些成分可通过获取纳米颗粒、分散材料、活性成分或其他组分源分离得到。此外,各成分可通过本领域普通技术人员已知的任何技术进行纯化。纯化技术的非限制性例子包括:聚丙烯酰胺凝胶电泳、过滤、离心、透析、高效液相色谱(HPLC)、凝胶色谱或分子筛色谱和亲和力色谱。在其他方面,化合物、药剂和活性成分可采用常规技术通过化学合成或通过重组方法获得。参见例如,Stewart 和 Young, (1984); Tamn 等, (1983); Merrifield, (1986); 以及 Barany 和 Merrifield (1979), Houghten (1985)。

F. 试剂盒

在本发明的其他实施方式中,提供了一种试剂盒。该试剂盒非限制性地装有本说明书和权利要求书中所述的纳米颗粒、分散材料、活性成分和其他组分。在优选实施方式中,试剂盒可装有含有纳米团簇的组合物。纳米团簇可包含例如多种纳米颗粒以及使纳米颗粒保持在一起和/或因环境因素分散纳米颗粒的分散材料。

试剂盒容器包括其中可装填组分的瓶、分配器、包装、间隔室或其他类型的容器。容器表面可包括标记。标记可以是文字、短语、缩写、图片或符号。

容器可分散预定量的组分(例如,本发明组合物)。组合物可分散在喷雾剂、气雾剂、或液体形式或半固体形式中。容器可具有喷雾、泵送或挤压机构。在某些方面,

试剂盒中可装有用于注射本发明组合物的注射器。

如果试剂盒中装有一种以上的组分(它们被包装在一起),则试剂盒通常还装有分别装填其他组分的第二、第三或其他容器。本发明试剂盒还可包括使各组分紧密密封用于出售的容器。该容器可装有注射或吹制塑料容器,其中包含有所需的瓶、分配器或包装。

试剂盒还可装有关于使用试剂盒组分以及使用试剂盒中未包含的任何其他组合物、化合物、药剂、活性成分或物体的指导说明。该指导说明可包括各种实施变量。该指导说明可包括如何应用、使用和维持该产品或组合物的解释。

实施例

包括下面的实施例是为了阐述本发明的某些非限制性方面。本领域技术人员应理解,以下实施例中所述的技术代表本发明者发现非常适用于实施本发明的技术。然而,根据本发明,本领域技术人员应理解,可在不背离本发明精神和范围的情况下对所述具体实施方式进行许多改变,而仍然获得相同或类似的结果。

实施例 1

响应型分散的纳米团簇

纳米团簇的形成: 本发明纳米团簇的制备过程包括: 将两个注射器泵(Harvard Apparatus 4400 和 Isco)连接于同轴喷嘴的内外接口,以便通过水性溶液和 1-辛醇(费氏科学公司(Fisher Scientific))中含液滴液体形式的纳米颗粒胶体悬浮液(见上述制剂)。两种不相混溶的液体以合适的流速注射,在辛醇相中产生含有纳米颗粒胶体悬浮液的单分散水性液滴。液体中的水溶解到 1-辛醇中导致纳米颗粒聚集形成球形结构之后,形成纳米团簇(图 4)。然后用乙醇洗涤纳米团簇以去除残留的 1-辛醇,冻干后备用。简单地将纳米颗粒悬浮液加入到辛醇相并搅拌以形成初始乳剂可实现类似的结果。

在一个非限制性的实施方式中,本发明者用聚(N-乙基甲酰胺)涂覆二氧化硅纳米颗粒,并用可水解的交联剂(2-二[2,2'-二(N-乙基甲酰胺基)乙氧基]丙烷)使该聚合物交联,以形成因 pH 降低而分散的纳米团簇(图 5)。采用该设置来测定因环境因素分散纳米团簇的能力。

由于聚合物的存在,团聚的纳米颗粒在外观上稍有不同,但大小分布与过去的实验相一致。纳米团簇根据时间和 pH 而分散进入水性溶液(图 6)。采用浊度分析来测定随时间推移的 480nm 光密度,溶液不透明表明,团簇相对分散形成组成性纳米颗粒。

也可随时间观测追踪纳米团簇的分散(图 6B)。借助激光光散射分析分散的纳米团簇溶液相的大小表明，释放了多分散的纳米颗粒聚集体。这种聚集体随时间进一步分散形成单个纳米颗粒(图 6C)。

实施例 2

自组装纳米团簇

纳米颗粒的形成：采用不同的聚电解质涂覆材料来控制表面电荷，通过改良的乳剂/溶剂提取方法来制备 PLGA 纳米颗粒(表 1)。使用聚乙烯胺(PVAm)作为阳离子涂覆材料，该材料由内部合成(参见实验)。根据前述方法的改良，通过水解该聚合物的酸酐形式来合成聚乙烯-*alt*-马来酸(PEMA)。所得聚电解质-涂覆的 PLGA 纳米颗粒具有优异的均一性和高表面电荷(表 1)。在合适的介质(水或有机溶剂)中，分别采用动态光散射和电导率测定(Brookhaven ZetaPALS)来分析各个纳米颗粒制剂的大小和 ζ 电位。研究证实，冻干和在 37℃, pH 7.4 孵育一周以上，纳米颗粒表面电荷保留(数据未显示)。对于该实验，涂有 PVAm 的纳米颗粒显著大于涂有 PEMA 的纳米颗粒；然而，粒度可容易地控制。纳米颗粒的制备也可采用报道技术，例如乳液聚合、乳剂溶剂提取、使它们反相乳化、沉淀、结晶、冻干、喷雾冻干、盐析等(Wittaya-Areekul 等，2002)。

表 1 (PLGA 纳米颗粒的性质)

PLGA 纳米颗粒	大小	ζ 电位
涂有 PVAm	498.5±8.4	+30.7±1.0
涂有 PEMA	262.7±11.3	-52.3±1.2

纳米团簇的形成：纳米团簇的制备包括：轻柔搅拌下将 3 毫升涂有 PVAm 的纳米颗粒缓慢加入到 10 毫升涂有 PEMA 的纳米颗粒中。带相反电荷的纳米颗粒的静电自组装诱导形成纳米团簇。增加混合的纳米颗粒的浓度导致团簇直径相应地增加(图 7)。使用 Coulter Multisizer III 测定水性溶液(Isoton)中的几何粒度分布。几何粒度分布相对较宽，标准偏差为平均几何直径的 60-70%。使用通过 Aerosizer LD 获得的飞行测量时间，从冻干的纳米团簇测定空气动力学粒度分布。纳米团簇空气动力学粒度分布比几何粒度分布要窄，表现为体积百分比增加(图 7B)和标准差降低(均值的 35-60%；表 2)。在几何粒度分布中检测到上升尾巴形式的涂有 PEMA 的游离纳米颗粒，但在空气动力学粒度分布中未检测到。此外，在扫描电镜照片中几乎没有观察到游离纳米颗粒(图 7C)，表明溶液中未与纳米团簇结合的纳米颗粒在冻干期间与纳米团簇结合。

表 2 (纳米团簇大小对 PLGA 纳米颗粒浓度的依赖性)

PLGA NP 浓度(mg/ml)	(-)*	(+)**	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)
	0.68	0.72	1.36	1.44	2.04	2.16	2.72	2.82
$d_{几何}(\mu m)$	7.4±5.1		8.7±5.6		9.4±5.6		13.7±8.3	
$d_{空气动力学}(\mu m)$	2.4±1.5		3.0±1.6		3.4±1.6		4.4±1.6	
$d_{几何}/d_{空气动力学}$	0.33±0.29		0.35±0.29		0.36±0.29		0.32±0.19	
ρ^1 计算值(g/cm ³)	0.11±0.09		0.12±0.08		0.13±0.08		0.10±0.04	
细颗粒分数	1.00		0.80		0.75		0.50	

* (-): 表面带负电荷的 PLGA 纳米颗粒(涂有 PEMA)

** (+): 表面带正电荷的 PLGA 纳米颗粒(涂有 PVAm)

1.由等式 1, 用 $d_{几何}=d_p$ 、 $\rho_{参考}=1\text{ g/cm}^3$ 、 $\gamma=1$ 计算的密度。

2.细颗粒分数的定义为 $d_{空气动力学}<5\text{ }\mu\text{m}$ 的干颗粒的分数。

纳米团簇的结构分析揭示低密度网状形态。扫描电镜图片显示冻干的纳米团簇具有大量孔隙 (图 7C)。根据等式 1(表 2), 由几何和空气动力学直径计算每种纳米团簇制剂的密度。虽然纳米团簇的大小随纳米颗粒浓度的增加而增加, 但每种制剂计算的密度基本上相同。纳米团簇密度计算值非常低(~0.15 g/cm³), 大多数制剂产生非常细的颗粒分数($d_{空气动力学}<5\text{ }\mu\text{m}$)。解释该密度计算值时, 应注意使用了水合几何直径、脱水空气动力学直径和假定的形状因子 $\gamma=1$ (即球形)。

使用激光扫描共聚焦显微术来获取对纳米团簇的结构和形成机制更深入的了解。用绿色荧光异氰酸酯(FITC)染料标记涂有 PVAm 的纳米颗粒, 用红色罗丹明染料标记涂有 PEMA 的纳米颗粒。两种纳米团簇颗粒的详细分析表明, 整个纳米团簇结构中同时存在涂有 PVAm 的(图 8A 和图 8D)和涂有 PEMA 的(图 8B 和图 8E)纳米颗粒。

实施例 3

硝苯地平 and 氯雷他定纳米颗粒的制备

下面包括了硝苯地平 and 氯雷他定纳米颗粒的各种非限制性制备实施例。

1020nm 硝苯地平纳米颗粒—将硝苯地平(50 毫克)溶解在 3 毫升二氯甲烷中。将硝苯地平溶液倒入 0.125%溴化十六烷基三甲铵(CTAB)溶液(30 毫升)中, 超声 60 秒。将颗粒悬浮液置于通风厨中 2 小时蒸发二氯甲烷。所得纳米颗粒的粒度为 1020nm, 多分散性 0.24。

660nm 硝苯地平纳米颗粒—将硝苯地平(50 毫克)溶解在 3 毫升二氯甲烷中。将硝苯地平溶液倒入 0.5%CTAB 溶液(30 毫升)中, 超声 60 秒。将颗粒悬浮液置于通风厨

中 2 小时蒸发二氯甲烷。所得纳米颗粒的粒度为 660nm, 多分散性 0.17。

480nm 硝苯地平纳米颗粒—将硝苯地平(50.2 毫克)溶解在 3 毫升乙醇中。将硝苯地平溶液倒入 0.5%CTAB 溶液(30 毫升)中, 超声 60 秒。将颗粒悬浮液置于通风厨中 2 小时蒸发乙醇。所得纳米颗粒的粒度为 480nm, 多分散性 0.12。

2373nm 硝苯地平纳米颗粒—将硝苯地平(30 毫克)溶解在 2 毫升乙醇中。将硝苯地平溶液倒入 0.3%普流罗尼 F-68 溶液(30 毫升)中, 15,000rpm 下匀浆化 60 秒。将颗粒悬浮液置于通风厨中 2 小时蒸发乙醇。所得纳米颗粒的粒度为 2373nm, 多分散性 0.09。

897nm 硝苯地平纳米颗粒—将硝苯地平(30 毫克)溶解在 2 毫升乙醇中。将硝苯地平溶液倒入 0.6%普流罗尼 F-68 溶液(30 毫升)中, 15,000rpm 下匀浆化 60 秒。将颗粒悬浮液置于通风厨中 2 小时蒸发乙醇。所得纳米颗粒的粒度为 897nm, 多分散性 0.07。

639nm 硝苯地平纳米颗粒—将硝苯地平(30 毫克)溶解在 2 毫升乙醇中。将硝苯地平溶液倒入 0.9%普流罗尼 F-68 溶液(30 毫升)中, 15,000rpm 下匀浆化 60 秒。将颗粒悬浮液置于通风厨中 2 小时蒸发乙醇。所得纳米颗粒的粒度为 639nm, 多分散性 0.005。

391nm 氯雷他定纳米颗粒—将氯雷他定(10 毫克)溶解在 1 毫升乙醇中。将氯雷他定溶液倒入 0.9%普流罗尼 F-68 溶液(10 毫升)中, 15,000rpm 下匀浆化 60 秒。将颗粒悬浮液置于通风厨中 2 小时蒸发乙醇。所得纳米颗粒的粒度为 391nm, 多分散性 0.005。

实施例 4

硝苯地平纳米团簇的制备

该实施例提供了本发明的非限制性实施方式, 其中纳米颗粒是纯硝苯地平(一种治疗高血压的钙通道阻断剂)。纳米颗粒涂覆有阳离子表面活性剂 (CTAB)。聚阴离子(藻酸钠)与 CTAB 偶联, 诱导纳米团簇的形成。

硝苯地平纳米颗粒的制备: 将硝苯地平(50 毫克)溶解于二氯甲烷(3 毫升)中。将该溶液完全倒入已知浓度的 CTAB 水溶液中(表 3)。将该溶液超声 60 秒。接着, 将该颗粒悬浮液置于通风厨中 2 小时以蒸发二氯甲烷。将悬浮液稀释至 1 毫克/毫升。图 9 是纳米团簇纳米颗粒群的扫描电镜(SEM)照片。

表 3 (团簇的几何粒度和空气动力学直径*)

CTAB 浓度(重量%)	V 硝苯地平/V 藻酸	几何粒度 (μm)	动态直径 (研磨之前) (μm)	动态直径 (研磨之后) (μm)
0.125	2:1	28.11 $\pm$ 8.33	3.313 $\pm$ 1.868	3.321 $\pm$ 1.763
	1:1	22.84 $\pm$ 11.64	3.814 $\pm$ 1.811	4.133 $\pm$ 1.829
	1:2	29.27 $\pm$ 11.47	4.219 $\pm$ 1.597	4.234 $\pm$ 1.836
	1:3	23.31 $\pm$ 13.4	3.397 $\pm$ 1.858	3.702 $\pm$ 1.844
0.25	2:1	27.24 $\pm$ 11.42	3.775 $\pm$ 1.804	3.467 $\pm$ 2.025
	1:1	29.49 $\pm$ 12.36	3.98 $\pm$ 1.868	4.135 $\pm$ 1.803
	1:2	23.36 $\pm$ 13.48	4.217 $\pm$ 1.874	4.312 $\pm$ 1.926
	1:3	23.82 $\pm$ 10.50	3.520 $\pm$ 1.989	4.006 $\pm$ 1.903
0.4	2:1	26.39 $\pm$ 12.76	3.819 $\pm$ 1.786	4.715 $\pm$ 1.397
	1:1	33.74 $\pm$ 13.85	4.156 $\pm$ 1.769	3.840 $\pm$ 1.942
	1:2	30.97 $\pm$ 14.31	3.793 $\pm$ 1.866	3.973 $\pm$ 1.876
	1:3	23.72 $\pm$ 15.70	/	/

*浓度：颗粒悬浮液：1毫克/毫升；藻酸(algenic acid)：1毫克/毫升

硝苯地平纳米团簇的制备：将藻酸水溶液(10 毫升，1 毫克/毫升)倒入硝苯地平纳米颗粒水性悬浮液(10 毫升，1 毫克/毫升)中，用匀浆器将混合液匀浆化(约 2000 rpm)2 分钟。冻干获得干硝苯地平纳米颗粒团簇。图 10 是硝苯地平纳米颗粒团簇的 SEM 图片。

实施例 5

含卵清蛋白的纳米团簇

该实施例提供了本发明的非限制性实施方式，其中，纳米颗粒是涂覆有阳离子脂质(DOTAP)的可生物降解的聚合物(PLGA)。卵清蛋白与涂覆的纳米颗粒表面偶联，诱导形成纳米团簇。

纳米颗粒的制备：采用改良的乳剂-溶剂蒸发技术制备 PLGA 纳米颗粒(Kazzaz 等，2000；Mainardes 等，2005，将这两份内容纳入本文作为参考)。使用脂质 1,2-二油酰基-3-三甲基铵-丙烷(DOTAP；AP 脂质有限公司(Avanti Polar Lipids, Inc.)；Alabaster, AL)作为涂覆材料来掺入阳离子表面电荷。将 3 毫升以 1.67%(w/v)溶解在丙酮/甲醇混合液(5/1)中的 PLGA (0.41 dL/g 特性粘度；Lactel；Pelham, AL)加入 25 毫升 DOTAP(50 μm)中，使用超声破膜仪(sonic dismembrator，费氏科学公司；匹兹堡，宾夕法尼亚州)以 50%功率在冰上超声 60 秒。对总共 6 批样品重复该过程。合并各批样品，在通风厨中以合适的速度搅拌过夜以蒸发溶剂。使用 Amicon Ultra-15 离心过滤机(密理伯公

司(Millipore); Billerica, 马塞诸塞州; F=863 g), 通过 KimWipe 滤器粗滤颗粒并用约 15 毫升蒸馏水、去离子水洗涤三次。将经洗涤的纳米颗粒在水浴中超声 15 分钟, 再次通过 KimWipe 过滤以去除所有大的聚集体。然后用 ζ 电位分析仪(布鲁克海纹仪器公司(Brookhaven Instruments); Holtsville, 纽约州)测定粒度和表面电荷(ζ)来表征所得颗粒: 纳米颗粒的平均粒径为 343.0±8.6 (nm), 多分散性 0.232±0.022, ζ 电位 36.44±0.56 (mV)。将纳米颗粒悬浮液稀释在 1 mM 硝酸钠溶液中测定表面电荷。

含卵清蛋白的纳米颗粒自发形成纳米团簇: 使用卵清蛋白作为模式蛋白。用磷酸盐缓冲盐水(PBS)制备包含约 0.4、1.5 和 2.5 毫克/毫升卵清蛋白的三种溶液, 用 UV 吸收光谱测定各溶液的准确浓度(表 4)。将 6 毫升 DOTAP 纳米颗粒和 1 毫升卵清蛋白溶液加入三支做好标记的 15 毫升离心管。在端对端试管旋转器上温和翻转样品, 40℃持续 45 分钟。用 Multisizer 3 库尔德计数器(贝克曼库尔德有限公司(Beckman Coulter, Inc.); Fullerton, 加利福尼亚州)测定其几何直径, 来分析所得纳米团簇。用 Labconco 台式冻干机(堪萨斯城, 密苏里州)冻干纳米团簇, 并进一步测定其空气动力学直径(Aerosizer; AP 仪器有限公司(Amherst Process Instruments Inc.))和形态(SEM)(表 5)。图 11 显示了含卵清蛋白的 DOTAP/PLGA 纳米颗粒的几何直径。

表 4(UV 吸收光谱测定的卵清蛋白溶液的浓度)

目标浓度(毫克/毫升)	实际浓度(毫克/毫升)
0.4	0.371 ± 0.001
1.5	1.374 ± 0.003
2.5	2.236 ± 0.040

表 5 (纳米团簇大小)

卵清蛋白目标浓度(毫克/毫升)	模式几何直径*(μm)	平均空气动力学直径(μm)
0.4	6.25	2.384±1.775
1.5	5.15	2.468±1.931
2.5	5.10	2.447±1.918

大小分布见图 11。

扫描电镜(SEM): 使用具有次级电子检测功能的 LEO 1550 场发射扫描电镜评价纳米团簇的大小和形态。将纳米团簇涂覆到平台上, 用金溅射后在 4000 和 10,000×放大时成像。图 12 包括含有 DOTAP/PLGA 纳米颗粒和卵清蛋白的纳米团簇的 SEM 图像。

实施例 6

干粉性能的体外评价

使用匹配接口和咽喉组件的多级液体冲击器(MSLI)(el-Araud 等, 1998)来评价从干粉吸入器给予的各种颗粒制剂的沉积性能。对于通过干粉吸入器(DPI)如 Spinhaler® 或 Rotahaler®的给药, 颗粒先被包封在大的两片式明胶胶囊中。将该胶囊置于 DPI 小室中, 然后刚好在呼吸活动之前扭曲以使胶囊分离或破裂。由于这些 DPI 没有使用推进剂或压缩气体, 所以患者的呼吸力或者在本发明中通过 MSLI 的体积流速可分散粉末。

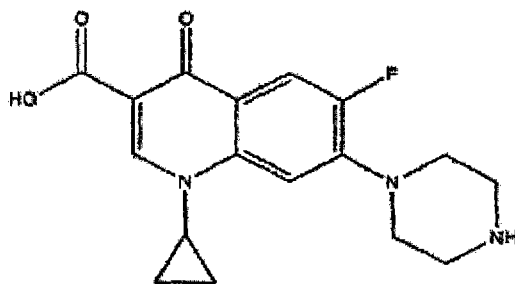
采用该实验设置, 可评价一些重要的性能参数, 包括颗粒制剂的可呼吸分数, 沉积在接口和咽喉组件上的质量以及在整个 MSLI 不同阶段上沉积的颗粒分数(通过拆除各部分并称重收集的颗粒质量来评价)。将在 MSLI 较低阶段(截止值为约 1-5 μm)高效率沉积的各批颗粒视作适合环丙沙星包封实验的“深入肺部”制剂。

实施例 7

鉴别能够包封、沉积和释放环丙沙星的纳米团簇制剂

可将纳米团簇配制成环丙沙星在约一周内受控释放。根据本说明书所述方法进行纳米团簇物理化学特性、药物分散和释放的全面分析。在一个实施方式中, 用包封在 PLGA 纳米颗粒中的纯环丙沙星或环丙沙星制备纳米团簇。

环丙沙星是一种广谱抗生素, 对革兰氏阴性菌尤其有效(Geller 2002, Geller 2003, Marier 2003), 其结构式如下:



纳米团簇分散性和环丙沙星释放动力学: 再次配制纳米团簇制剂以测定环丙沙星的受控释放, 小心维持相同的制造方法和设计用于深肺沉积的所得结构。环丙沙星(西格玛有限公司(Sigma, Inc.))可通过与聚合物相共溶来包封, 并部分地悬浮在聚合物相中或溶解在共溶剂中(如果在聚合物相中的溶解度低)。溶解研究确定环丙沙星的释放动力学。这些研究在生理学温度(37°C)、磷酸盐缓冲盐水中(pH 7.4)中进行。将约 10-20

毫克各个粒子制剂置于 2 毫升微量离心管中, 150 rpm 下震荡。释放样品的测定包括间歇性离心样品以分离纳米颗粒(15,000 rpm), 收集 1-1.5 毫升上清液, 用新鲜缓冲液更换上清液并重新悬浮样品。然后通过分光光度计在约 350nm 处测定各个时间点环丙沙星的浓度来分析上清液, 同时避免检测聚合物溶出物。一式三份地进行环丙沙星从各种纳米团簇制剂释放的实验, 并计算平均值和标准差。一式三份地将约 10 毫克各制剂溶解在二甲亚砜中并测定约 350nm 处的吸光度, 确定纳米团簇制剂中环丙沙星的初始载荷。不含环丙沙星的纳米团簇制剂的吸光度值用作空白对照。每单位质量聚合物中环丙沙星的计算量称为药物载荷。该数值除以加入实验的每单位质量聚合物中环丙沙星质量以计算药物包封效率。然后将环丙沙星随时间释放的总量除以药物载荷, 得到累积释放百分比。可制备类似的纳米团簇样品, 基于测定样品溶液在 480nm 处的浊度来测定分散动力学(见上文初步实验数据)。

再形成与受控释放的优化: 产生环丙沙星接近恒定释放约 1 周可包括纳米团簇的再形成。如果发生药物“突释”(快速初始释放)或需要增加释放持续时间, 则使用较高分子量 PLGA 或丙交酯含量较高的 PLGA, 因为这些聚合物相延迟降解。此外, 也可采用增加组成性纳米颗粒的粒径来降低环丙沙星的释放速率。可通过将纳米颗粒维持在小尺寸(如, <200 nm)以避免吞噬作用或肺上皮细胞的其他清除机制。

根据所述内容, 可实施本说明书中描述和要求权利的所有组合物和/或方法而无需进行过多实验。虽然以优选实施方式的形式描述了本发明组合物和方法, 但本领域技术人员应理解, 本文所述的组合物和/或方法以及方法各步骤或步骤顺序都可进行各种改变而不背离本发明的构思、精神和范围。更具体地说, 应理解某些化学和生理学上相关的试剂可代替本文所述试剂而实现相同或类似的结果。认为本领域技术人员明白的所有这些类似取代物或改进都在如所附权利要求书所限定的本发明构思、范围和概念内。

参考文献

下面的参考文献在一定程度上提供了本文所述内容的示例性过程或其他细节补充, 将其纳入本文作为参考。

美国专利公开第 2003/0138490 号

Adjei 和 Garren, Pharm. Res., 7(6):565-569, 1990

AHFS 99 药物信息(AHFS 99 Drug Information)

美国卫生系统协会(Amer. Soc. of Health System), ISBN: 1879907917

Barany 和 Merrifield, 刊于《肽》(The Peptides), Gross 和 Meienhofer (编), Academic Press, NY, 1-284, 1979.

Berkland 等, 刊于《用于控释药物递送的精确聚合物微粒》(Precision polymer microparticles for controlled-release drug delivery), ACS Symp Ser., 2002.

Berkland 等, J. Control Release, 73(1):59-74, 2001.

Berkland 等, J. Control Release, 82(1): 137-47, 2002.

Berkland 等, J. Control Release, 96(1):101-1111, 2004.

Berkland, 刊于《控制聚合物药物递送颗粒大小分布的方法, 化学工程》(Methods of controlling size distribution of polymeric drug delivery particles, Chemical Engineering), Urbana-Champaign, University of Illinois, 78, 2001.

Edwards 等, J. Appl. Physiol, 85(2):379-385, 1998.

Edwards 等, Science, 276:1868-1887, 1997.

El-Araud 等, J Pharm Pharmacol, 50(10):1081-5, 1998.

Geller 等, Chest, 122(1):219-226, 2002.

Geller 等, Chest, 123(1):28-36, 2003.

Grenha 等, Eur. J. Pharm. Sci, 25(4-5):427-437, 2005.

Griesenbach 等, Curr. Opin. Pulm. Med, 10(6): 542-546, 2004.

Houghten 等, Infect. Immun., 48(3):735-740., 1985.

John 等, Faseb. J., 17(15):2296-2298, 2003.

Johnson 等, Chest, 96(1):6-10, 1989.

Kazzaz 等, J Control Release, 67:347-56, 2000.

Kumar 等, Genet. Vaccines Ther., 1(1):3, 2003.

Mainardes 等, J Microencapsul, 22:13-24, 2005.

Marier 等, J. Antimicrob. Chemother., 52(2):247-252, 2003.

Merrifield, Science, 232(4748):341-347, 1986.

Newman 等, Eur. Respir. J., 16(1):178-183, 2000.

Newman, Curr. Opin. Pulm. Med., 9(1):S17-20, 2003.

《医师案头参考》(Physician's Desk Reference)第 54 版, 2000

Rasenack 和 Muller, Pharm. Dev. Technol, 9(1):1-13, 2004.

《雷明登药物科学》(Remington's Pharmaceutical Sciences), 第 18 版, Mack Printing

Company, 1289-1329, 1990.

Sham 等, Int. J. Pharm., 269(2):457-467, 2004.

Stewart 和 Young, 刊于《固相肽合成》(Solid Phase Peptide Synthesis), 第 2 版, Pierce Chemical Co., 1984.

Tarn 等, J. Am. Chem. Soc, 105:6442, 1983.

Wittaya-Areekul 等, J. Pharm. Sci, 91(4):1147-1155, 2002.

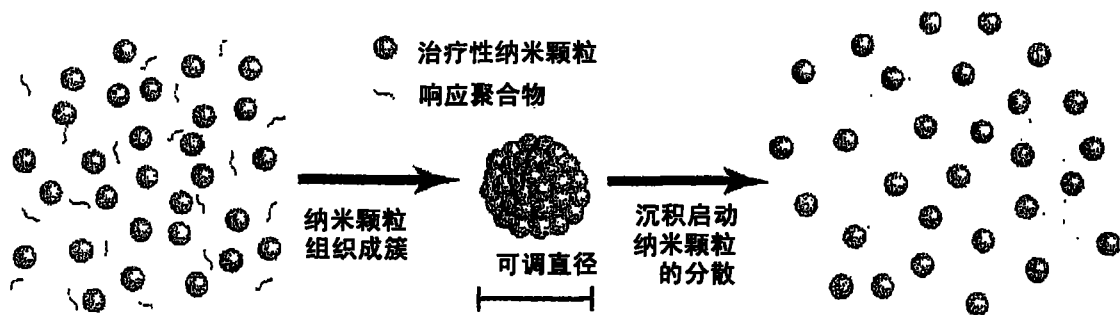


图 1

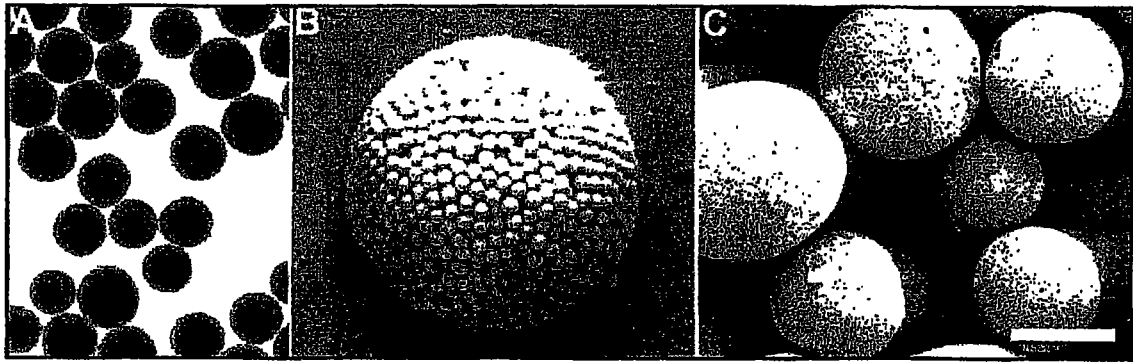


图 2

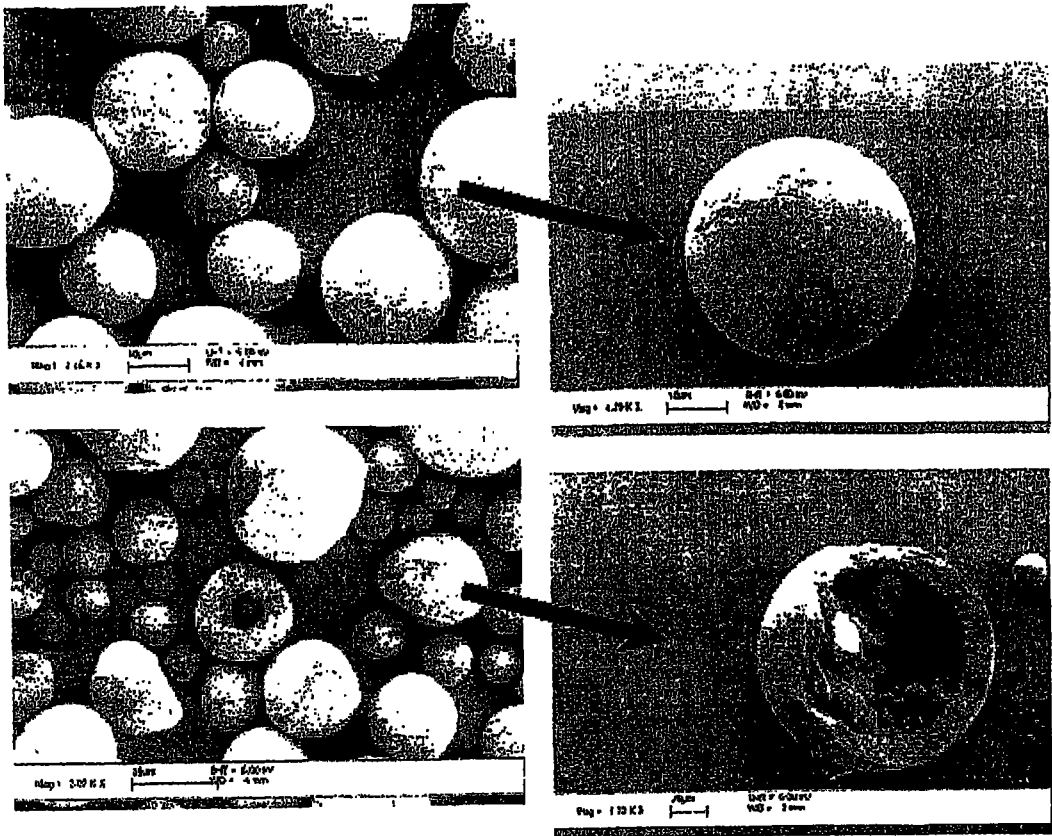


图 3

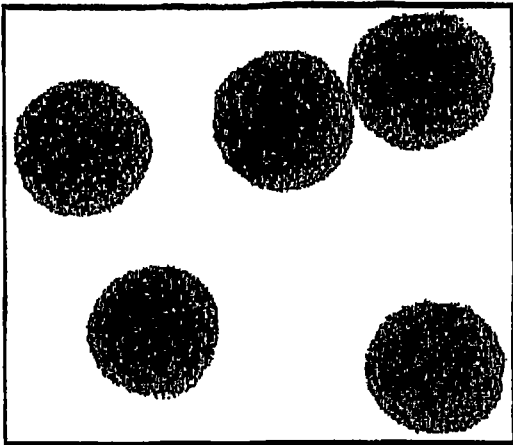


图 4

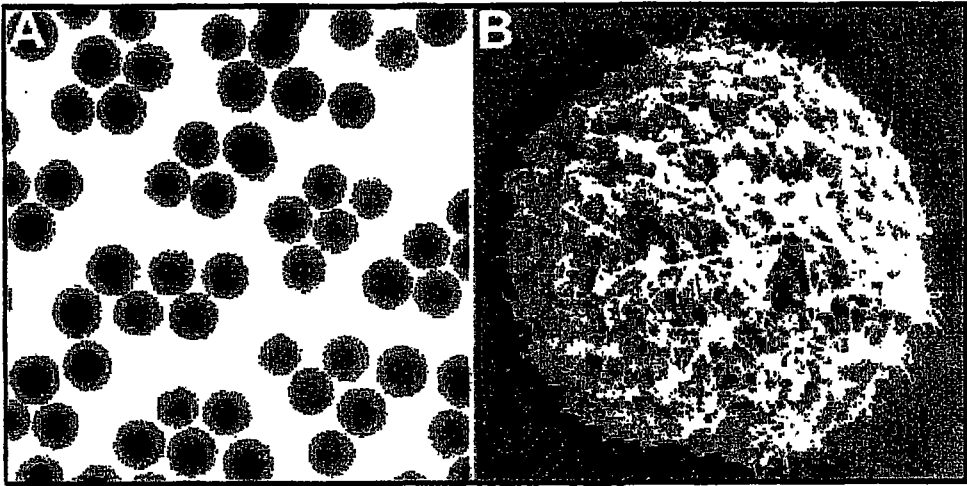


图 5

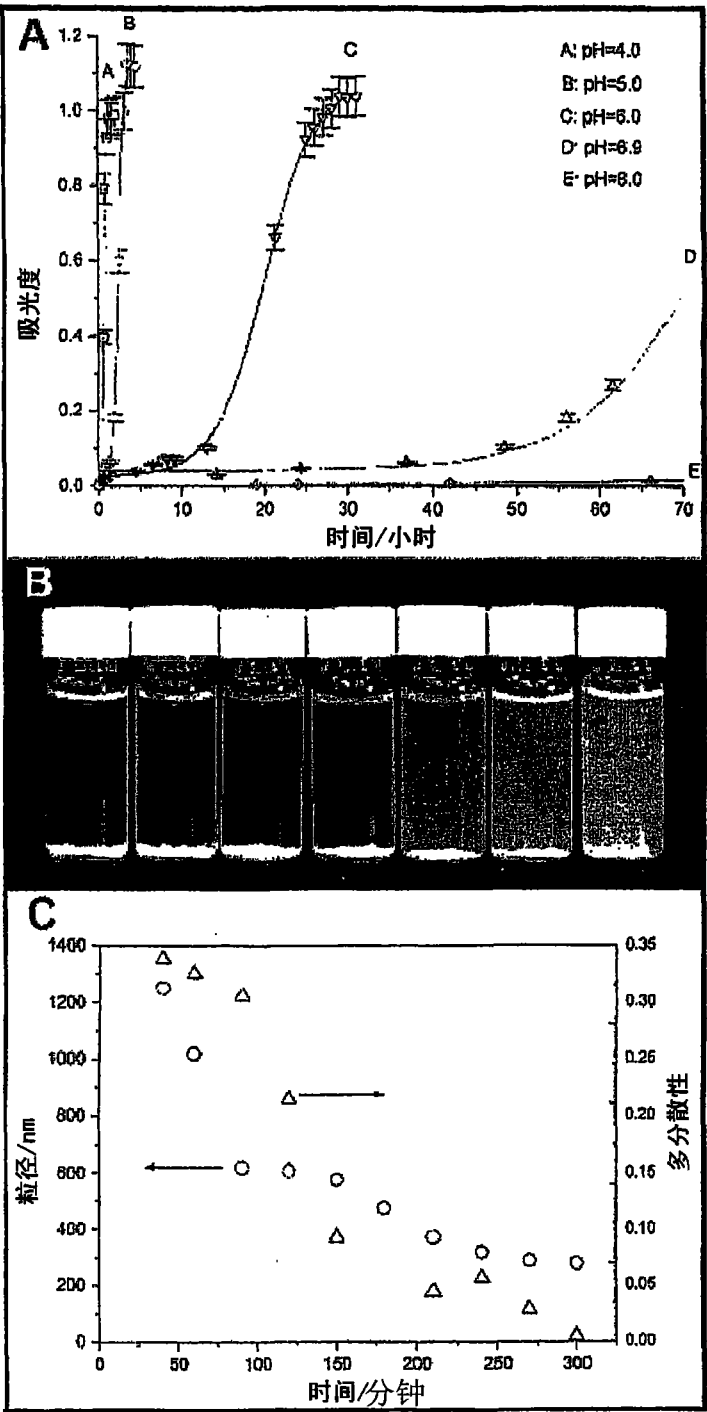


图 6

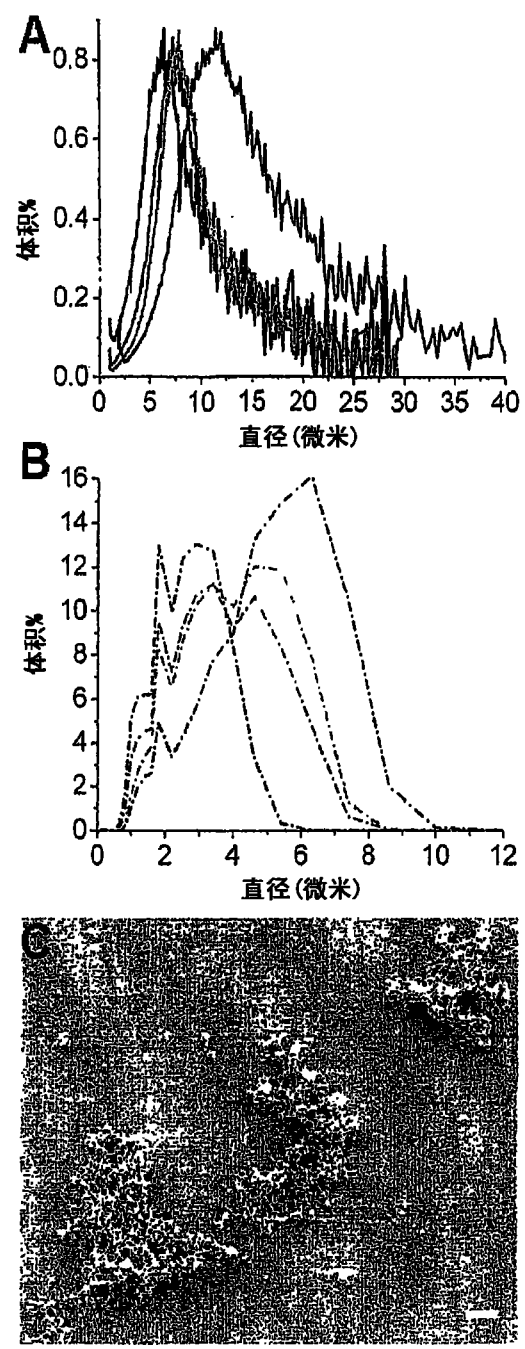


图 7

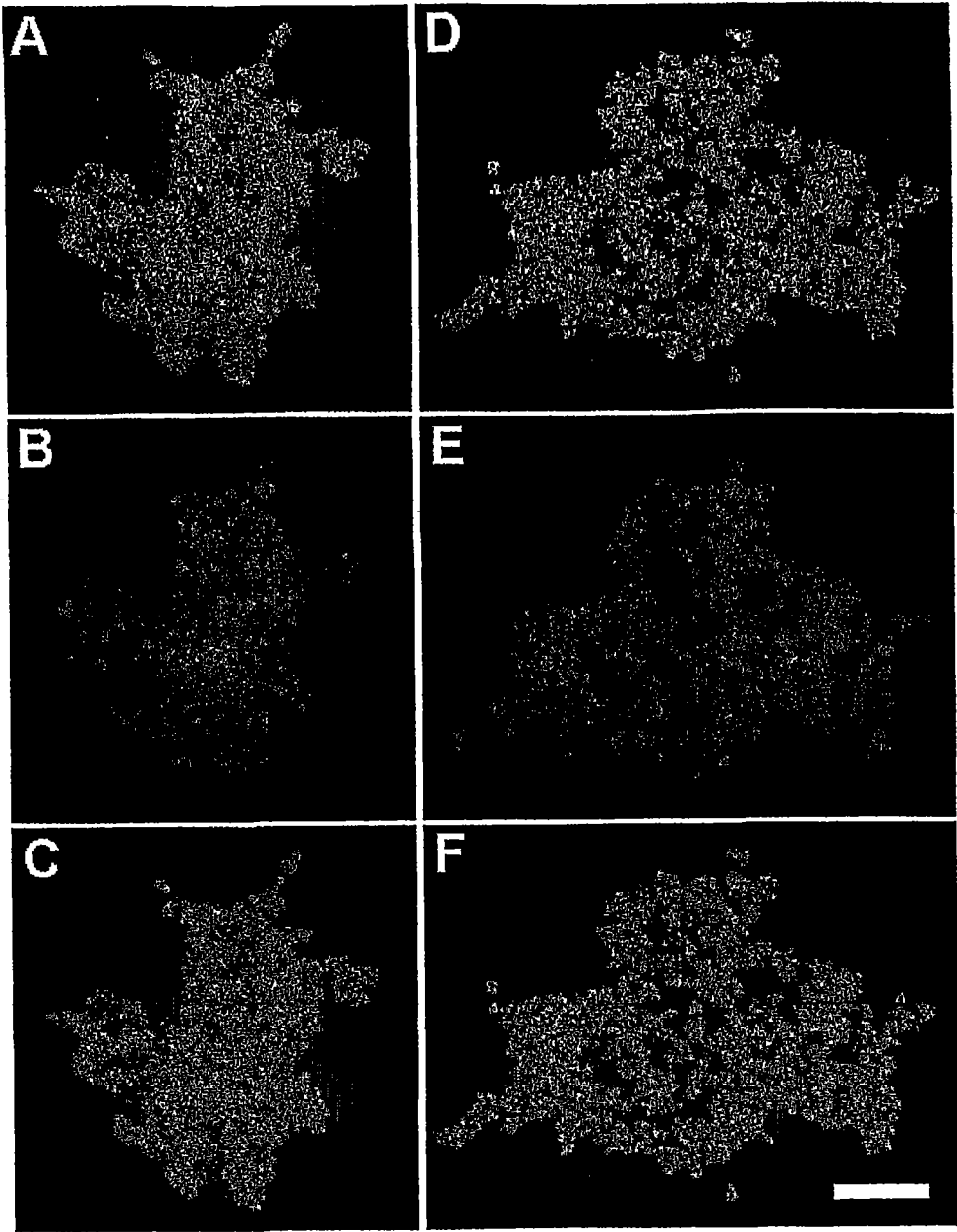


图 8

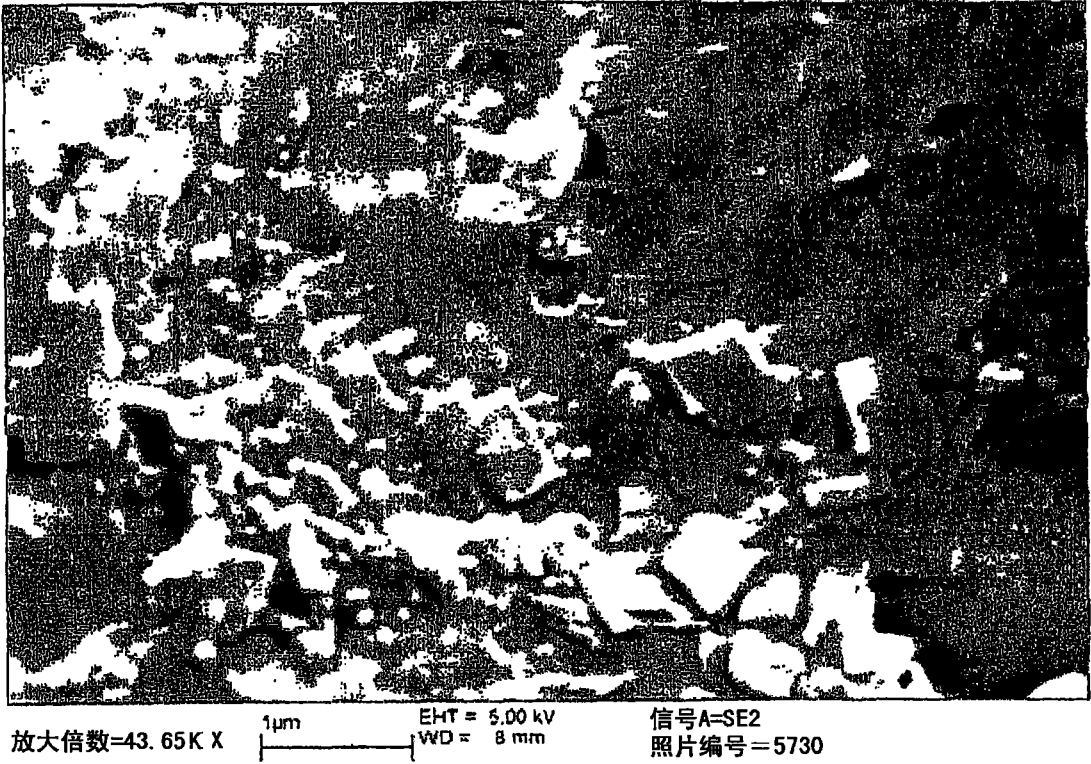


图 9

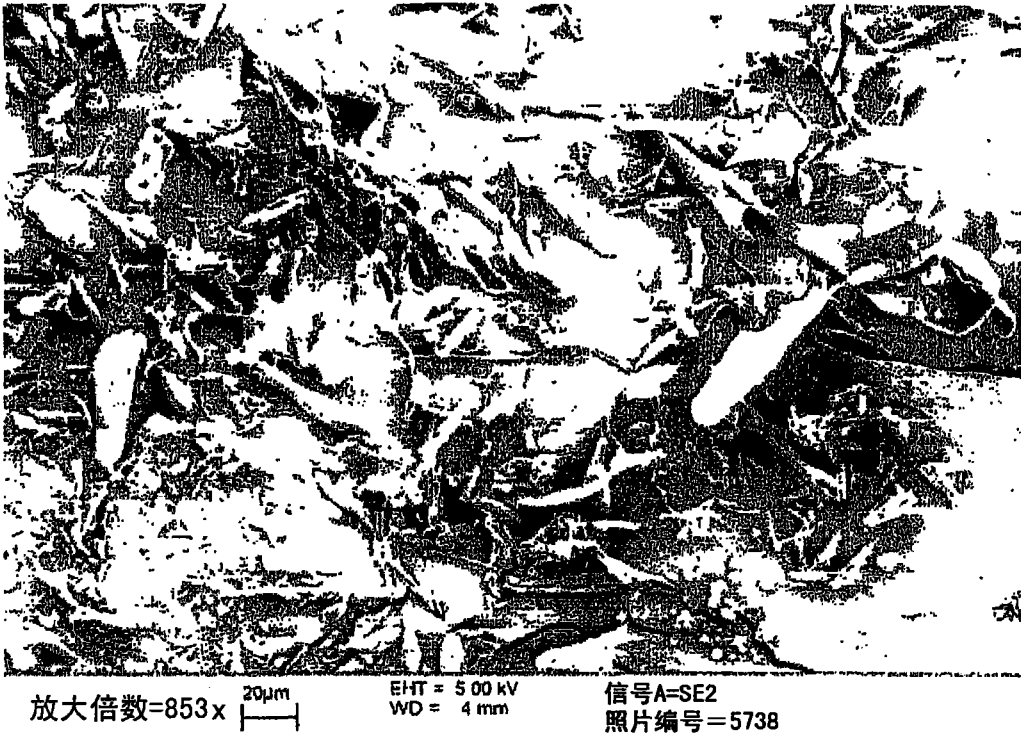


图 10

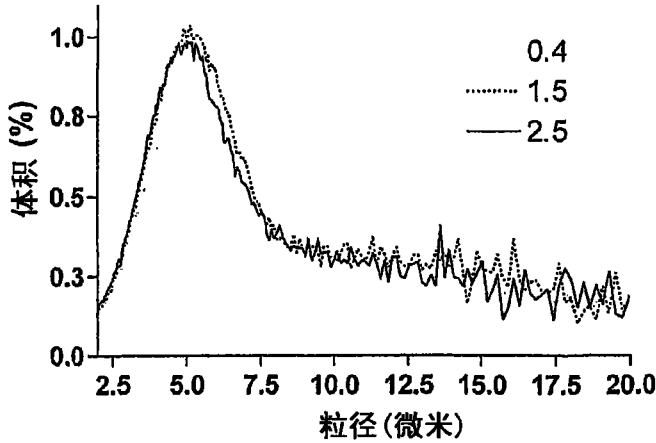


图 11

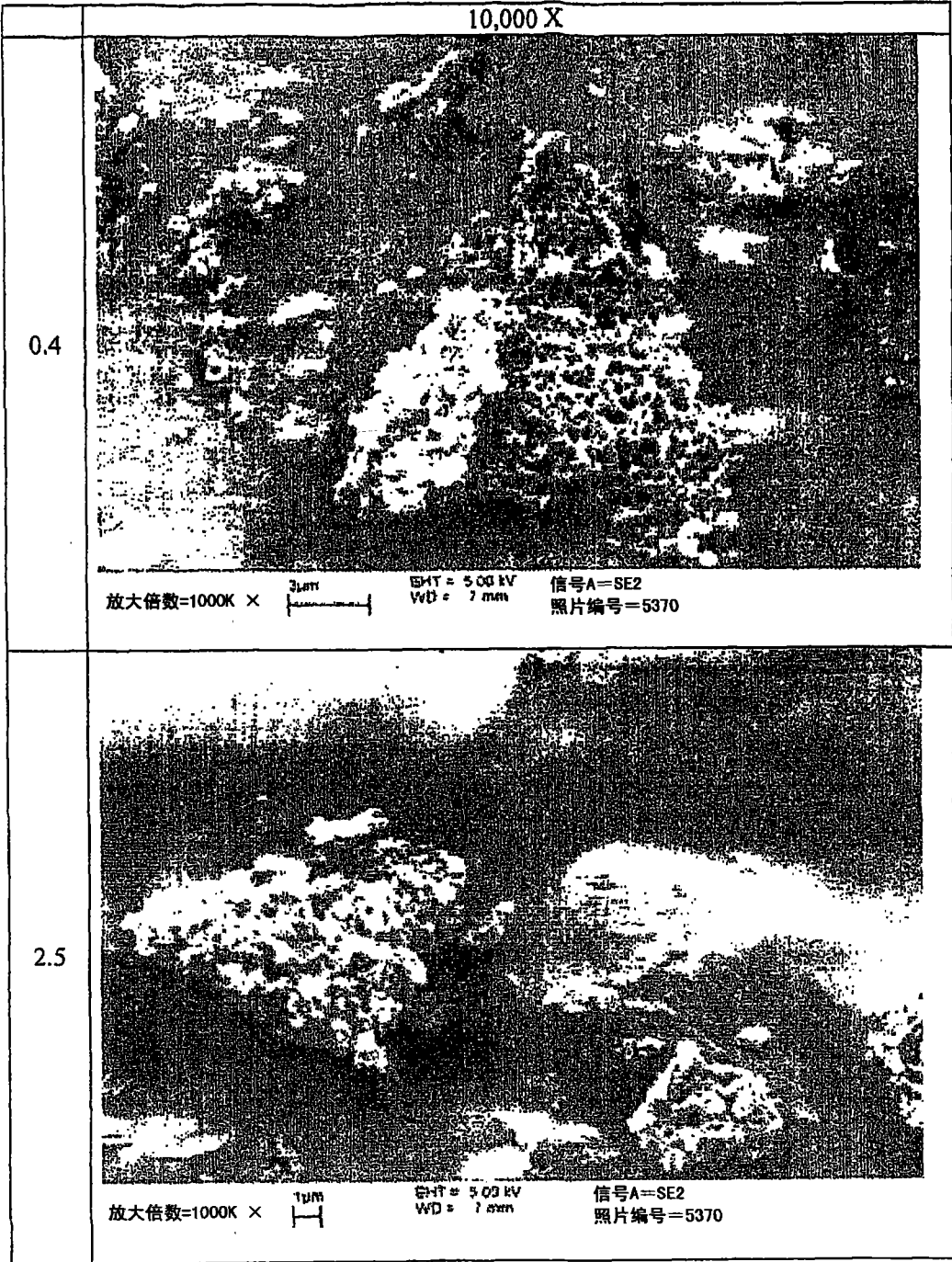


图 12