



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201628654 A

(43)公開日：中華民國 105 (2016) 年 08 月 16 日

(21)申請案號：104139005

(22)申請日：中華民國 104 (2015) 年 11 月 24 日

(51)Int. Cl.：

A61K45/06 (2006.01)

A61K47/02 (2006.01)

B82Y5/00 (2011.01)

(30)優先權：2014/11/25

歐洲專利局

14306874.0

(71)申請人：奈諾生技公司 (法國) NANOBIOITIX (FR)

法國

(72)發明人：傑曼 馬修 GERMAIN, MATTHIEU (FR)；梅爾 瑪莉 艾迪斯 MEYRE, MARIE-EDITH (FR)；波提爾 安妮斯 (FR)；拉維 洛倫特 LEVY, LAURENT (FR)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：18 項 圖式數：3 共 37 頁

(54)名稱

結合至少二種相異奈米粒子與醫藥化合物之醫藥組合物、其製備及其用途

PHARMACEUTICAL COMPOSITION COMBINING AT LEAST TWO DISTINCT NANOPARTICLES AND A PHARMACEUTICAL COMPOUND, PREPARATION AND USES THEREOF

(57)摘要

本發明係關於包括(i)至少兩種相異生物相容奈米粒子及(ii)至少一種所關注化合物(通常至少一種醫藥化合物)之組合之醫藥組合物，該醫藥組合物欲投與需要該至少一種所關注化合物之個體，其中該至少兩種相異生物相容奈米粒子加強該(等)所關注化合物之效率。該至少兩種生物相容奈米粒子可依序或同時投與該個體，但通常係以介於超過約 5 分鐘與約 72 小時之間之間隔，與該至少一種所關注化合物分開投與，較佳在投與該至少一種所關注化合物之前投與該個體。該至少兩種生物相容奈米粒子之最長尺寸通常介於約 4nm 與約 500nm 之間。第一生物相容奈米粒子之絕對表面電荷值為至少 $|10\text{mV}|$ ，且第二生物相容奈米粒子或任何其他生物相容奈米粒子之絕對表面電荷值與該第一生物相容奈米粒子之絕對表面電荷值之差異為至少 10mV。

The present invention relates to a pharmaceutical composition comprising the combination of (i) at least two distinct biocompatible nanoparticles and (ii) at least one compound of interest, typically at least one pharmaceutical compound, to be administered to a subject in need of such at least one compound of interest, wherein the at least two distinct biocompatible nanoparticles potentiate the compound(s) of interest efficiency. The at least two biocompatible nanoparticles can be administered sequentially or simultaneously to the subject but are to be administered separately, typically with an interval of between more than about 5 minutes and about 72 hours, from the at least one compound of interest, preferably before the administration of the at least one compound of interest, to said subject. The longest dimension of the at least two biocompatible nanoparticles is typically between about 4 nm and about 500 nm. The absolute surface charge value of a first biocompatible nanoparticle is of at least $|10\text{ mV}|$ and the absolute surface charge value of the second biocompatible nanoparticle, or of any additional biocompatible nanoparticle, has a difference of at least 10 mV with the absolute surface charge value of the first biocompatible nanoparticle.

指定代表圖：

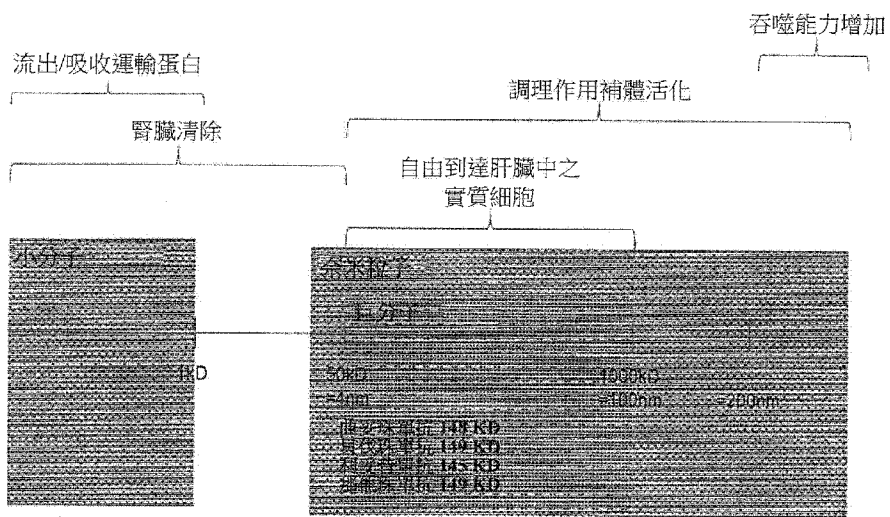


圖 1

發明摘要

※ 申請案號：104139005

※ 申請日：104.11.24

※IPC 分類：

A61K 45/06.47/62 (2006.01)
B82Y 5/00 (2011.01)

【發明名稱】

結合至少二種相異奈米粒子與醫藥化合物之醫藥組合物、其製備及其用途

PHARMACEUTICAL COMPOSITION COMBINING AT LEAST
TWO DISTINCT NANOPARTICLES AND A PHARMACEUTICAL
COMPOUND, PREPARATION AND USES THEREOF

【中文】

本發明係關於包括(i)至少兩種相異生物相容奈米粒子及(ii)至少一種所關注化合物(通常至少一種醫藥化合物)之組合之醫藥組合物，該醫藥組合物欲投與需要該至少一種所關注化合物之個體，其中該至少兩種相異生物相容奈米粒子加強該(等)所關注化合物之效率。該至少兩種生物相容奈米粒子可依序或同時投與該個體，但通常係以介於超過約5分鐘與約72小時之間之間隔，與該至少一種所關注化合物分開投與，較佳在投與該至少一種所關注化合物之前投與該個體。該至少兩種生物相容奈米粒子之最長尺寸通常介於約4 nm與約500 nm之間。第一生物相容奈米粒子之絕對表面電荷值為至少 $|10 \text{ mV}|$ ，且第二生物相容奈米粒子或任何其他生物相容奈米粒子之絕對表面電荷值與該第一生物相容奈米粒子之絕對表面電荷值之差異為至少10 mV。

【英文】

The present invention relates to a pharmaceutical composition comprising the combination of (i) at least two distinct biocompatible nanoparticles and (ii) at least one compound of interest, typically at least one pharmaceutical compound, to be administered to a subject in need of such at least one compound of interest, wherein the at least two distinct biocompatible nanoparticles potentiate the compound(s) of interest efficiency. The at least two biocompatible nanoparticles can be administered sequentially or simultaneously to the subject but are to be administered separately, typically with an interval of between more than about 5 minutes and about 72 hours, from the at least one compound of interest, preferably before the administration of the at least one compound of interest, to said subject. The longest dimension of the at least two biocompatible nanoparticles is typically between about 4 nm and about 500 nm. The absolute surface charge value of a first biocompatible nanoparticle is of at least $|10 \text{ mV}|$ and the absolute surface charge value of the second biocompatible nanoparticle, or of any additional biocompatible nanoparticle, has a difference of at least 10 mV with the absolute surface charge value of the first biocompatible nanoparticle.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（1）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】

結合至少二種相異奈米粒子與醫藥化合物之醫藥組合物、其製備及其用途

PHARMACEUTICAL COMPOSITION COMBINING AT LEAST TWO DISTINCT NANOPARTICLES AND A PHARMACEUTICAL COMPOUND, PREPARATION AND USES THEREOF

【技術領域】

本發明係關於包括(i)至少兩種相異生物相容奈米粒子及(ii)至少一種所關注化合物(通常至少一種醫藥化合物)之組合之醫藥組合物，其欲投與需要該至少一種所關注化合物之個體，其中該至少兩種相異生物相容奈米粒子加強所關注化合物之效率。

至少兩種生物相容奈米粒子可依序或同時投與該個體，但欲通常以介於超過約5分鐘與約72小時之間之間隔，與該至少一種所關注化合物分開、較佳在投與該至少一種所關注化合物之前投與該個體。

該至少兩種生物相容奈米粒子之最長尺寸通常介於約4 nm與約500 nm之間。第一生物相容奈米粒子之絕對表面電荷值為至少10 mV ($|10 \text{ mV}|$)，且第二生物相容奈米粒子或任何其他生物相容奈米粒子之絕對表面電荷值與該第一生物相容奈米粒子之絕對表面電荷值之差異為至少10 mV。

當與以標準醫藥劑量投與之該至少一種化合物誘導之醫藥效益及毒性相比時，將至少兩種相異生物相容奈米粒子及至少一種所關注化合物一起組合(通常依序)投與個體在該個體中在該至少一種所關注化合物之減小毒性下維持其醫藥(即治療性、預防性或診斷性)效益，

或在等效或減小毒性下增加其醫藥效益。

本發明醫藥組合物通常容許在對個體之等效毒性(較佳減小毒性)下維持相同醫藥效益的同時，或在對個體之等效或減小毒性下增加醫藥效益的同時，所投與化合物之醫藥劑量與該至少一種所關注化合物之標準醫藥劑量相比減少至少10%。

【先前技術】

為確保安全性及功效，需要將治療化合物在需要其之個體中以最佳速率選擇性地遞送至其靶位點。

藥物動力學(pK)係藥理學之分枝，其致力於確定外部投與活生物體之物質之命運。此確定涉及在足夠長時間段期間、較佳直至化合物消除為止，在所有主要組織中量測化合物濃度之步驟。有效描述化合物在活體內之行為需要藥物動力學，該行為包含其在生物體中吸收及分佈之機制以及其化學變化。血液中之pK特徵可使用多種程式擬合以獲得定量描述身體如何處置化合物之關鍵pK參數。重要參數包含最大濃度(C_{max})、半衰期($t_{1/2}$)、清除率、曲線下面積(AUC)及平均滯留時間(MRT)，即化合物在生物體中停留之平均時間。當觀測到化合物調配物之血液循環延長時，其經常與 $t_{1/2}$ 增加、清除率降低、AUC增加及MRT增加相關。pK數據通常用於決定最佳劑量及劑量方案，以供維持期望之血液濃度以在最小副作用下改良治療效率。另外，如熟習此項技術者所熟知，在大部分情形中，通常對於游離藥物，化合物之血液濃度與其功效及毒性二者相關聯。

治療以及預防化合物之物理-化學性質對其在體內之藥物動力學及代謝命運具有重要影響。因此，當設計此化合物時，適當物理-化學性質之選擇係關鍵的。然而，由於該化合物並非始終由生物體自身內源性提供且經常自外部投與，因此必須最佳化其生物分佈特徵以符合且較佳最佳化其期望之藥理學作用。

已研究若干方法以最佳化化合物至其靶位點之遞送。一種策略係設計具有隱形性質之治療化合物以延長其血液半衰期且因此增強其至靶位點之積聚。一種有利方法係將聚乙二醇(PEG)共價附接至治療化合物，已證明其可延長循環化合物之活體內半衰期($t_{1/2}$)，該活體內半衰期增加之程度部分隨化合物之性質及塗層之性質而變。同樣，已研發藥物載劑(例如脂質體、乳液或微膠粒)以藉由調節藥物在個體體內之生物分佈特徵來增強該等藥物之治療功效。

然而，治療化合物之生物分佈缺乏選擇性仍係問題。迄今為止，不良藥物動力學及高毒性係治療化合物研發失敗之重要原因。

舉例而言，在癌症治療之情況中，故意抑制身體之基本功能以殺死癌細胞會在正常細胞中產生毒性，且臨床醫師必須依賴在腫瘤與正常組織間之劑量-反應及治療化合物分佈之差異來發現可能之治療窗。應注意，由於在肝臟中藥物誘導之細胞損傷之直接及間接機制，肝毒性仍係自醫藥研發及臨床應用停藥之主要原因。

建議用於奈米顆粒化合物(例如藥物載劑)之方法[*Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 11(1) : 31-59 1994*]係預注射誘餌載劑以減小、飽和或甚至去活化網狀內皮系統(RES)之吞噬能力。損害或封鎖亦可與調理素分子之血漿含量降低相關。已顯示，在投與測試粒子之前，靜脈內投與某些試劑(例如脂肪酸之烷基酯、硫酸葡聚糖、稀土元素之鹽(例如 $GdCl_3$)、藥物載劑、空或囊封氯膦酸鹽)可誘導庫弗氏(kupffer)細胞吸收之中等至顯著降低。

例如，作者在「*Biomimetic amplification of nanoparticle homing to tumors*」[*PNAS 2007*]中報導RES在清除其奈米粒子「CREKA-SPIO」中之作用。最初實驗顯示，靜脈內(IV)注射之「CREKA-SPIO」奈米粒子在MDA-MB-435乳癌異種移植物中未有效地積聚。與此相比，在RES組織中觀察到高濃度粒子。藉由利用脂質體氯膦酸鹽

消耗肝臟中之RES巨噬細胞，發現其粒子之半衰期延長5倍。然而，氯膦酸鹽試劑誘導來自肝臟及脾臟之巨噬細胞之細胞凋亡，且此被視為總體有害的，此乃因巨噬細胞消耗增加與免疫阻抑及感染相關之風險。在第二個實驗中，作者測試包被有螯合Ni (II)作為潛在誘餌粒子之脂質體，假定氧化鐵及Ni (II)將吸引類似之血漿調理素，且因此Ni-脂質體可消耗全身循環中之該等類似調理素。實際上，在注射CREKA-SPIO奈米粒子之前5分鐘或48小時投與之靜脈內(IV)注射之Ni-脂質體使奈米粒子之血液半衰期可增加5倍。然而，觀測到高毒性，其在腫瘤小鼠中引起死亡。亦測試普通脂質體來代替Ni-脂質體。然而，與該等Ni-脂質體相比，儘管普通脂質體之毒性減小，但有效性顯著較低。實際上，血液半衰期僅增加約2倍。

WO2005086639係關於通常在超音波或X-射線暴露之情況中，或在磁振成像(MRI)之情況中以及在治療之情況中，將期望試劑選擇性投與個體中之靶位點之方法。所述方法之目的係藉由並行投與無活性誘餌載劑，在減少具體投與之試劑總劑量的同時改良或維持所關注試劑之效率。

所述發明利用基於概率之方法。將非靶向無活性試劑(「無活性載劑」)與展現類似物理特點之所關注靶向試劑(存在於「活性組合物」中)共投與(即「實質上同時地」)，以幫助所關注靶向試劑避開RES系統，由此使得可改良所關注試劑在期望位點處之吸收。此方法減少患者對所關注試劑之暴露，且因此減少該所關注試劑之每劑量成本。活性組合物與無活性誘餌載劑之投與彼此間隔在5分鐘內，較佳間隔在2分鐘內，或間隔甚至更短時間。此方法依賴於顯著過量之非靶向「載劑」或「誘餌」媒劑之存在，且依賴於當在靶向至期望位置處之媒劑存在下供應時，此過量誘餌載劑將與所關注靶向試劑競爭被網狀內皮系統吸收之概率。RES所捕獲粒子之半衰期係劑量依賴性

的，即粒子之循環半衰期隨劑量增加而增加。人們認為與較高劑量相關之較慢清除率有利於維持總試劑之高濃度，使得可降低欲投與之所關注試劑之劑量。換言之，根據WO2005086639之作者，由於總試劑之總體較高劑量而延長之半衰期應有益於靶向試劑。此方法涉及之要求係，無論活性試劑與無活性試劑之各別組成如何，二者關於其在RES中之清除率特徵之表現類似。

在此方法中，要求無活性試劑與活性試劑之準並行注射，以增加存在於血液中之試劑之總量，且因此延長其血液半衰期。此策略明確依賴基於概率之方法，其必然需要活性試劑與靶向試劑結合，以藉由賦予該活性試劑相對於無活性試劑之優勢來達成其在靶位點上之成功積聚。另外，由於準並行注射，可端視活性組合物之既定用途需要特別設計無活性載劑。

WO2005/063305係關於包括充氣微泡(通常具有至少0.5 μm 之大小)及與該微泡相結合之組份(具有約低於100 nm之大小)之組裝。所得組裝欲用作診斷性及/或治療性活性調配物中之醫藥活性組份。該兩種組份，即充氣微泡及微泡結合組份通常同時投與以供增強超音波對比成像視場中之成像，包含靶向超音波成像、超音波介導之藥物遞送及其他成像技術。

如自先前技術顯而易見且儘管長期醫學需要，由於其不可接受之毒性或其不利之藥物動力學參數而無法有效用於患者中之化合物(包含治療、預防以及診斷化合物)之改良仍係問題。

【圖式簡單說明】

圖1：端視治療化合物之大小(最長尺寸)自血液循環去除該等化合物之可能途徑之示意圖。

圖2：包括(i)實例2之至少兩種生物相容奈米粒子及(ii) Dox-NP®之醫藥組合物在MDA-MB-231-lucD3H2LN異種移植物中之治療時間

表之示意性表示。

圖3：L-麩胺酸N-(3-羧基-1-側氧基丙基)-1,5-雙十六烷基酯(SA-脂質)之化學式。

【實施方式】

本發明現在容許最佳化所關注化合物(本文中亦簡稱為「化合物」)或所關注化合物之組合之效率，無論其在治療、預防或診斷情況中之既定用途為何。本文所述組合物係(i)至少兩種相異生物相容奈米粒子及(ii)至少一種所關注化合物(通常為至少一種醫藥化合物，即治療、預防或診斷化合物)之組合，其最佳化至少一種所關注化合物之藥物動力學參數，且因此現在使得可能研發原本由於(例如)其不可接受之毒性而不可研發之治療化合物。通常，不使用生物相容奈米粒子作為(例如)醫藥化合物，即作為治療、預防或診斷化合物。

本發明之典型組合物(本文中通常稱為「醫藥組合物」)係包括(i)至少兩種相異生物相容奈米粒子及(ii)至少一種化合物(「所關注化合物」)之組合之組合物，其中至少兩種生物相容奈米粒子中每一者之最長或最大尺寸通常介於約4 nm與約500 nm之間，第一生物相容奈米粒子(本文中亦稱為「第一」生物相容奈米粒子)之絕對表面電荷值為至少10 mV ($|10 \text{ mV}|$)，且第二生物相容奈米粒子(本文中亦稱為「第二」生物相容奈米粒子)或任一其他生物相容奈米粒子之絕對表面電荷值與該第一生物相容奈米粒子之絕對表面電荷值之差異為至少10 mV。

當與一值(例如奈米粒子之大小或時間間隔)相關時，術語「約」及「左右」指示，所指示值之熟習此項技術者會識別為小變化之變化實質上不影響與其相關之標的物之性質且該標的物仍在本發明之精神中。

本發明之較佳目的係包括(i)至少兩種相異生物相容奈米粒子及

(ii)至少一種醫藥化合物之組合之醫藥組合物，其中至少兩種生物相容奈米粒子中每一者之最長或最大尺寸介於約4 nm與約500 nm之間，第一生物相容奈米粒子之絕對表面電荷值為至少10 mV ($|10 \text{ mV}|$)且第二生物相容奈米粒子或任一其他生物相容奈米粒子之絕對表面電荷值與第一生物相容奈米粒子之絕對表面電荷值之差異為至少10 mV，該組合物係用於在需要至少一種醫藥化合物之個體中與該至少一種醫藥化合物至該個體之投與分開投與至少兩種相異生物相容奈米粒子，間隔通常介於超過5分鐘與約72小時之間，且其中不使用生物相容奈米粒子作為例如醫藥化合物。

當與標準醫藥劑量之該至少一種化合物誘導之醫藥效益及毒性相比時，藉助本發明組合物將至少兩種相異生物相容奈米粒子及至少一種所關注化合物組合投與個體時，通常可在至少一種化合物對個體之減小毒性下容許(維持)其相同醫藥(即治療性、預防性或診斷性)效益，或在至少一種化合物對個體之等效或減小毒性(較佳減小毒性)下增加其醫藥效益。

本發明醫藥組合物通常容許(i)在對個體之等效毒性、較佳減小毒性下維持相同醫藥效益的同時，或(ii)在對個體之等效或減小毒性下增加醫藥效益的同時，所投與至少一種醫藥(即治療性、預防性或診斷性)化合物劑量可以比該化合物之標準醫藥劑量減少至少10%、較佳至少15%。

由於粒子形狀可影響其「生物相容性」，因此具有完全均一形狀之粒子在本文中較佳。出於藥物動力學原因，因此基本上球形/圓形或卵形形狀之奈米粒子較佳。此形狀亦有利於奈米粒子與細胞之相互作用或細胞對奈米粒子之吸收。球形/圓形形狀尤佳。

在本發明精神中，術語「奈米粒子」係指產物，尤其合成產物，其大小在奈米範圍內，通常介於約1 nm與約500 nm之間、較佳介

於約4 nm與約500 nm之間、介於約4 nm與約400 nm之間、約30 nm與約300 nm之間、約20 nm與約300 nm之間、約10 nm與約300 nm之間，例如介於約4 nm與約100 nm之間，例如介於約10 nm、15 nm或20 nm與約100 nm之間，或介於約100 nm與約500 nm之間，通常介於約100 nm與約300 nm之間。

術語「奈米粒子之大小」、「奈米粒子之最大大小」及「奈米粒子之最長大小」在本文中通常係指當形狀為球形/圓形或卵形時「奈米粒子之最長或最大尺寸」或「奈米粒子之直徑」。可使用透射電子顯微鏡(TEM)或低溫-TEM來量測奈米粒子之大小。亦可使用動態光散射(DLS)來量測溶液中奈米粒子之水動力學直徑。亦可相繼使用此兩種方法來比較藉由DLS量測之奈米粒子之水動力學直徑與藉由TEM或低溫-TEM量測之該奈米粒子之大小，以確認該大小。較佳方法係DLS (參考國際標準ISO22412粒子大小分析-動態光散射，國際標準化組織(ISO) 2008)。

為了可用於本發明情況中，「第一」生物相容奈米粒子之絕對靜電表面電荷(本文中亦稱為「電荷」或「表面電荷」)欲為至少、較佳高於 $|10 \text{ mV}|$ (絕對值)，且「第二」生物相容奈米粒子或任一其他生物相容奈米粒子之表面電荷值必須與「第一」生物相容奈米粒子之絕對表面電荷值具有至少10 mV之差異。奈米粒子之表面電荷通常係藉由 ζ 電勢量測在介於0.2 g/L與10 g/L之間之奈米粒子濃度下，在介於6與8之間之pH下，在水性介質中，且通常在水性介質中介於0.001 M與0.2 M之間(例如0.01 M或0.15 M)之電解質濃度下測定。

通常，本發明之「第一」生物相容奈米粒子之靜電表面電荷為至少 $|10 \text{ mV}|$ ，即低於-10 mV或高於+10 mV，例如低於介於-12 mV或-15 mV與-20 mV之間或高於介於+12 mV或+15 mV與+20 mV之間，通常低於-15 mV或高於+15 mV。「第二」生物相容奈米粒子或任

一其他生物相容奈米粒子與第一生物相容奈米粒子之絕對表面電荷值之(正或負)差異為至少10 mV。

較佳地，本發明之「第一」生物相容奈米粒子之絕對電子錶面電荷值(「絕對表面電荷值」)大於10 mV，該電荷甚至更佳為負電荷。

至少兩種相異生物相容奈米粒子之組合性質(大小及表面電荷)容許至少兩種相異奈米粒子之短血液循環。因此，藉由依序投與本發明之至少兩種相異生物相容奈米粒子及所關注化合物，達成至少兩種相異生物相容奈米粒子及所關注化合物之不共循環或共循環受限。因此，當與標準醫藥劑量之該至少一種化合物誘導之醫藥效益及毒性相比時，至少兩種相異生物相容奈米粒子之組合性質(大小及表面電荷)允許在至少一種化合物對個體之減小毒性下容許(維持)其相同醫藥(即治療性、預防性或診斷性)效益的同時，或換言之在至少一種化合物對個體之等效或減小毒性(較佳減小毒性)下增加其醫藥效益的同時，安全使用所關注化合物。

可用於本發明情況中之至少兩種生物相容奈米粒子可皆為有機或無機粒子。可進一步使用有機及無機奈米粒子之混合物作為至少兩種生物相容粒子。

在為有機粒子時，存於本發明醫藥組合物中之奈米粒子可為基於脂質之奈米粒子(甘油脂質、磷脂、固醇脂質等)，例如固體-液體奈米粒子；基於蛋白質之奈米粒子，本文中亦稱為「蛋白質奈米粒子」(例如白蛋白)；基於聚合物之奈米粒子(「聚合奈米粒子」)；基於共聚物之奈米粒子(「共聚奈米粒子」)；基於碳之奈米粒子；類病毒奈米粒子(例如病毒載體)或其混合物。

有機奈米粒子可另外為奈米球(普通奈米粒子)或奈米囊(中空奈米粒子)，例如脂質體、凝膠、水凝膠、微膠粒、樹枝狀聚合物等。

亦可使用本文所述有機奈米粒子之混合物。

聚合物或共聚物可具有天然或合成來源。

可在本發明情況中用於製備有機奈米粒子之合成(人造)及天然聚合物或共聚物之實例可選自聚乳酸(PLA)、聚(丙交酯-共-羥乙酸)(PLGA)、聚乙二醇(PEG)、羥乙酸乳酸聚酯(polyglactin)、聚乳酸(Polylactide)、聚氧乙烯脂肪酸酯、聚丙二醇、聚山梨醇酯、聚乙醇醇、聚丙稀醯胺、聚甲基丙烯酸甲酯、聚氰基丙烯酸烷基酯、聚乳酸酯-共-羥乙酸酯、聚(醯胺-胺)、聚(伸乙基亞胺)、海藻酸鹽、纖維素及纖維素衍生物聚合物、膠原、玻尿酸、聚麩胺酸(PGA)、肌動蛋白、多糖及明膠。

在為無機離子時且在其最長尺寸通常低於約10 nm，例如低於約8 nm、低於約7 nm，通常包括於約7 nm與約4 nm之間，例如低於約6 nm、低於約5 nm或低於約4 nm時，奈米粒子可由任何無機材料製成。無機材料可例如包括門捷列夫週期表(Mendeleev's periodic table)第3、4、5、6週期之金屬元素，包含鑰系元素。在奈米粒子之最長尺寸通常低於約10 nm時，奈米粒子可以較大結構組裝。以較大結構組裝奈米粒子通常可藉由奈米粒子與生物相容聚合物、蛋白質等之間之相互作用來觸發。較大結構亦可藉由將奈米粒子捕集於載劑(通常普通載劑，例如明膠結構(本文中亦稱為「明膠奈米粒子」)，或中空載劑，例如脂質體)中來獲得。在活體內投與後，彼等較大結構可進一步釋放奈米粒子。

在為無機離子時且在該奈米粒子之最長尺寸通常為至少10 nm、通常介於10 nm與500 nm之間時，奈米粒子可包括以下中之至少一者或存於以下之中：(i)一或多種選自例如Mg、Ca、Ba及Sr之二價金屬元素，(ii)一或多種選自例如Fe及Al之三價金屬元素，及(iii)一或多種包括Si之四價金屬元素。

在特定實施例中，奈米粒子之無機材料選自(i)一或多種選自例如Mg、Ca、Ba及Sr之二價金屬元素，(ii)一或多種選自例如Fe及Al之三價金屬元素及(iii)一或多種包括Si之四價金屬元素。

在另一特定實施例中，奈米粒子之無機材料選自碳酸鈣(CaCO_3)、碳酸鎂(MgCO_3)、氫氧化鎂(Mg(OH)_2)、氫氧化鐵(Fe(OH)_2)、氧(氫氧)化鐵(FeOOH)、氧化鐵(Fe_3O_4 或 Fe_2O_3)、氧化鋁(Al_2O_3)、氫氧化鋁(Al(OH)_3)、氧(氫氧)化鋁(AlOOH)及氧化矽(SiO_2)。

用於本文所述組合物中之奈米粒子係生物相容的，即與活組織相容。當其組合物需要時，奈米粒子因此經生物相容材料塗佈以變成可用的。在本發明之特定實施例中，本文所提及奈米粒子因此塗佈生物相容性塗層。

生物相容材料可係容許與生物靶相互作用之試劑。

在奈米粒子之表面上形成正電荷之試劑可(例如)選自胺基丙基三乙氧基矽烷或聚離胺酸。在奈米粒子表面上形成負電荷之試劑可(例如)選自磷酸鹽(例如聚磷酸鹽、偏磷酸鹽、焦磷酸鹽等)、羧酸鹽(例如檸檬酸鹽或二羧酸、尤其琥珀酸)或硫酸鹽。

在特定實施例中，只要「第一」奈米粒子之絕對電荷為至少10 mV ($|10 \text{ mV}|$)且第二生物相容奈米粒子或任一其他生物相容奈米粒子之絕對表面電荷值與第一生物相容奈米粒子之絕對表面電荷值之差異為至少10 mV，至少兩種相異奈米粒子即可經選自顯示立體基團之試劑之生物相容材料塗佈。此基團可選自(例如)聚乙二醇(PEG)；聚氧化乙烯；聚乙醇醇；聚丙烯酸酯；聚丙烯酸醯胺(聚(N-異丙基丙烯酸醯胺))；聚脲；生物聚合物；多糖(例如聚葡萄糖、木聚糖及纖維素)；膠原；兩性離子化合物(例如聚磺基甜菜鹼)等。

生物相容塗層可進一步包括標記劑，其通常為容許使用標準成

像設備使顏色可視化之試劑。

在與在任何粒子不存在下標準醫藥(通常治療性)劑量之該至少一種所關注化合物誘導之醫藥效益及毒性相比時，通常在該至少兩種奈米粒子(同時或分開)較佳以介於超過5分鐘與約72小時之間之間隔與至少一種所關注化合物分開投與需要該至少一種所關注化合物之個體時，至少兩種相異生物相容奈米粒子與至少一種所關注化合物一起之組合投與在對個體之減小毒性下維持所關注化合物之醫藥效益(即治療性、預防性或診斷性效益，通常治療效益)，或在對個體之等效或減小毒性下增加化合物之醫藥效益。

在特定實施例中，至少兩種相異生物相容奈米粒子與至少一種所關注化合物之組合投與容許在化合物對個體之等效毒性或減小毒性(較佳減小毒性)下維持相同治療效益的同時，或在化合物對個體之等效或減小毒性下增加治療效益的同時，通常在需要至少一種所關注化合物之個體中在該所關注化合物之前或之後(較佳之前)以介於超過5分鐘與約72小時之間之間隔與該至少一種所關注化合物分開投與時，所投與化合物之治療劑量與該化合物之標準治療劑量相比減少至少10%、較佳至少15%。

在特定實施例中，奈米粒子係與若干種所關注化合物、通常兩種所關注化合物一起投與。

奈米粒子通常較佳在其投與需要所關注化合物之個體後1小時及6週(例如4週)內、在1小時及1個月內(例如介於1小時與3週之間，或介於1小時與2週之間，或介於1小時與1週之間)自其所投與之個體清除。

構成奈米粒子(包含其生物相容塗層(若存在))之材料對確定奈米粒子之生物持久性係重要的。可將奈米粒子視為生物可降解(在例如由生物可降解聚合物、例如PLGA或PLA構成時)、可溶解(例如氧化

鐵)或生物不可降解且不可溶的。生物可降解且可溶之奈米粒子促進自個體快速清除奈米粒子。

根據本教示，可使用不同分子或試劑作為與如上文所述至少兩種相異生物相容奈米粒子組合投與之至少一種所關注化合物，通常作為至少一種所關注醫藥化合物。此化合物可係如先前解釋之治療、預防或診斷化合物。其可係有機化合物或無機化合物。

可用作所關注化合物之有機化合物之實例可選自生物化合物、抗體、寡核苷酸、合成肽、小分子靶向治療劑、溶瘤病毒、細胞毒性化合物及其任何相應前藥或衍生物等。

在特定實施例中，用於本發明情況中之所關注化合物係較佳選自以下之有機化合物：生物化合物、小分子分子靶向治療劑、溶瘤病毒及細胞毒性化合物。在另一特定實施例中，所關注化合物選自抗體、寡核苷酸及合成肽。

生物化合物係(例如)抗體、抗體藥物偶聯物、較佳單株抗體(「mAb」)，例如英利昔單抗(infliximab)、阿達木單抗(adalimumab)、貝伐珠單抗(bevacizumab)、利妥昔單抗(rituximab)、曲妥珠單抗(trastuzumab)、蘭尼單抗(ranibizumab)、西妥昔單抗(cetuximab)、帕那提目單抗(panatimumab)；蛋白質或重組蛋白質，例如恩博(enbrel) (依那西普(etanercept))或干擾素 β -1a；肽或重組肽，例如甘精胰島素或betaseron；疫苗，例如prevnar 13或gardasil；生物類似物，例如epogin；酶或重組酶，例如replagal或creon；等。

寡核苷酸係(例如)反義寡核苷酸、適配體，例如米泊美生鈉(mipomersen sodium)或番瀉苷(pursennid)等。

合成或人造肽係(例如)乙酸格拉替雷(glatiramer acetate)或乙酸柳培林(leuprolide acetate)。

溶瘤病毒係選擇性感染並損傷癌性組織但對正常組織無害之治

療可用病毒。溶瘤病毒(例如)選自腺病毒(例如Onyx-015)、柯薩奇病毒(coxsackie virus, 例如Catavak)、單純皰疹病毒(例如塔裡莫拉維克病毒(talimogene laherparepvec))、麻疹病毒(例如MV-CEA)、新城雞瘟病毒、小病毒、脊髓灰白質炎病毒、裡奧病毒(reovirus)、塞尼卡穀病毒、反轉錄病毒、牛痘、水皰性口炎病毒。

小分子靶向治療劑通常抑制惡性細胞內之突變、過表現或其他關鍵蛋白質(癌症治療情況中之潛在靶)上之酶結構域。一些治療劑包含彼等靶向細胞分裂(例如極光激酶抑制劑或週期蛋白依賴性激酶抑制劑)以及其他生物機制(例如蛋白質轉換及染色質修飾(例如組織蛋白去乙醯酶抑制劑))者。小分子靶向治療劑係(例如)伊馬替尼(imatinib)、雷帕黴素(rapamycin)、吉非替尼(gefitinib)、厄洛替尼(erlotinib)、索拉非尼(sorafenib)、舒尼替尼(sunitinib)、尼羅替尼(nilotinib)、達沙替尼(dasatinib)、拉帕替尼(lapatinib)、硼替佐米(bortezomib)、阿托伐他汀(atorvastatin)等。

細胞毒性化合物係(例如) DNA修飾劑, 例如蒽環(例如多柔比星(doxorubicine)、道諾黴素(daunorubicine)等)、烷化劑(例如美法侖(melphalan)或替莫唑胺(temozolomide))以及極精確地干擾確定生理機制(例如微管聚合)(例如紫杉醇)或代謝產物合成(例如胺甲喋呤(methotrexate))之藥物。可活化之細胞毒性化合物通常用於光動力療法之情況中(例如光卟啉(photofrin)), 且欲藉由外部來源(例如雷射源)活化以產生其治療效應。其他典型細胞毒性化合物通常選自如本文所述或如熟練腫瘤科醫生已知之化學治療劑。

前藥(例如卡培他濱(capecitabine)或伊立替康(irinotecan))在活體內以其活性形式代謝以產生其預期治療效應。

可用作至少一種所關注化合物之無機化合物之實例可選自過渡金屬配位錯合物、放射醫藥化合物、奈米粒子等。

過渡金屬配位錯合物提供優於較常見有機藥物之潛在優勢，包含寬範圍之配位數及幾何學、可採用之氧化還原態、配體取代之熱力學及動力學之「可調性」以及寬廣之結構多樣性。基於金屬之物質與細胞分子靶相互作用，影響生物化學功能，結果破壞惡性細胞。過渡金屬配位錯合物通常係作用於DNA結構之細胞毒性劑(例如，鉑配位錯合物：順鉑、卡鉑、奧沙利鉑(oxaloplatin)，或釕或金配位錯合物)。

放射醫藥化合物發射用於診斷目的或以便選擇性破壞惡性細胞之輻射。典型放射醫藥可含有(例如)銥-89、鉈-201、鎬-99、釷-83等。

奈米粒子通常可選自金屬氧化物奈米粒子(例如參見WO2009/147214及WO2007/118884)、金屬奈米粒子(例如金、鉑或銀奈米粒子)、金屬硫化物奈米粒子(例如 Bi_2S_3)及其任何混合物(例如經氧化鈣材料塗佈之金奈米粒子)。奈米粒子係(例如)可經由外部來源(例如電磁輻射源、超音波源或磁源等)活化之奈米粒子。

與如上文所述生物相容奈米粒子組合投與(通常如本文所述依序投與)之至少一種所關注化合物可根據熟習此項技術者已知之方式囊封於載劑中或接枝(或結合)至此載劑。典型載劑係(例如)脂質體(例如DOXIL或使用熱敏脂質之ThermoDox)、微膠粒、聚合(或「聚合物」)載劑、水凝膠、凝膠、共聚載劑、蛋白質載劑、無機載劑。

本發明醫藥組合物(藉由所關注化合物及至少兩種相異奈米粒子之組合來定義)可用於許多領域中，尤其用於人類或獸醫醫學中。此組合物通常用於動物、較佳哺乳動物(例如在獸醫醫學之情況中)、甚至更佳人類之個體中，不論其年齡或性別。

本發明醫藥組合物可用於心血管疾病、中樞神經系統(CNS)疾病、胃腸疾病、遺傳病症、血液病症、激素病症、免疫、傳染病、代

謝病症、肌肉骨骼病症、腫瘤、呼吸疾病、毒理學等中。在較佳實施例中，該醫藥組合物用於心血管疾病、CNS疾病、腫瘤、傳染病及代謝病症中。

在本發明情況下，一方面之至少兩種相異生物相容奈米粒子及另一方面之化合物(「所關注化合物」)有利地在需要該(等)化合物之個體中分開投與，通常間隔介於超過5分鐘與約72小時之間，通常介於超過5分鐘與約24小時之間，較佳介於超過5分鐘或30分鐘與約12小時之間，以最佳化化合物之醫藥功效。

在本發明中，在至少兩種相異奈米粒子及化合物(「所關注化合物」)有利地如先前所解釋通常以介於超過5分鐘與約72小時之間之間隔在需要該(等)化合物之個體中分開投與時，「第一」生物相容奈米粒子之絕對表面電荷值有利地為至少10 mV ($|10 \text{ mV}|$)，且「第二」生物相容奈米粒子或任何其他生物相容奈米粒子與「第一」生物相容奈米粒子之絕對表面電荷值之差異為至少10 mV。

在本發明之特定實施例中，在至少兩種相異奈米粒子及化合物(「所關注化合物」)在需要該化合物之個體中以介於超過5分鐘與約24小時之間之間隔分開投與時，奈米粒子較佳在化合物之前投與，「第一」生物相容奈米粒子之絕對表面電荷值有利地為至少15 mV ($|15 \text{ mV}|$)。

本文亦闡述治療患有例如彼等本文所提及之疾病之個體之方法，其中該方法包括向該個體投與本發明醫藥組合物，通常投與如本文所述之至少兩種相異生物相容奈米粒子及至少一種所關注化合物。至少兩種奈米粒子或至少一種所關注化合物中之任一者可首先投與個體，只要一方面之至少兩種生物相容奈米粒子及另一方面之至少一種化合物彼此間隔介於超過5分鐘與約72小時之間投與即可。投與該至少兩種奈米粒子或至少一種所關注化合物中之任一者可係每一者之單

一投與，每一者之重複投與，例如每一者之若干次連續投與。至少兩種相異生物相容奈米粒子可投與一次且至少一種所關注化合物可投與一次以上，且反之亦然。

在特定實施例中，至少在包括至少一種所關注化合物之若干次投與之方案開始時，即至少在第一次投與該至少一種所關注化合物時及在其投與之前或之後投與至少兩種相異生物相容奈米粒子。

在另一特定實施例中，在包括至少一種所關注化合物之若干次投與之方案開始時不投與至少兩種相異生物相容奈米粒子，且在該至少一種所關注化合物之第二次或第三次投與之前且在其投與之前或之後不投與至少兩種相異生物相容奈米粒子。

在此等最後兩個實施例之情況中，至少兩種相異生物相容奈米粒子亦可在至少一種所關注化合物之部分或全部後續投與期間與該至少一種所關注化合物一起(如先前所解釋在之前或之後)投與。

在特定實施例中，本發明之至少兩種相異奈米粒子係在將至少一種所關注化合物投與該個體之前(通常在投與該至少一種所關注化合物之前介於超過5分鐘與約72小時之間)投與該個體。

本發明醫藥組合物之至少兩種相異生物相容奈米粒子可藉由任一途徑投與，例如皮下、真皮內、經口途徑、經鼻途徑(吸入)、靜脈內(IV)、動脈內及/或腹膜內。較佳投與途徑係靜脈內途徑。本發明醫藥組合物之至少兩種相異生物相容奈米粒子可藉由不同途徑同時或分開投與。

本發明醫藥組合物之所關注化合物可藉由不同途徑投與，例如皮下、靜脈內(IV)、真皮內、動脈內、氣道(吸入)、腹膜內、肌內及/或經口途徑(口服)。

以下實例說明本發明，而不限其範圍。

實例

實例1：作為「第一」及/或「第二」生物相容奈米粒子之脂質體之合成。

使用脂質膜再水化方法製備脂質體。

絕對表面電荷值為至少10 mV ($|10 \text{ mV}|$)之「第一」及/或「第二」生物相容奈米粒子之合成：

a)將脂質溶解於氯仿中。最後在氮氣流下使氯仿蒸發。在pH 7.4下用20 mM HEPES及140 mM NaCl再水化脂質膜係在60℃下實施，以使得脂質濃度係25 mM。

使用以下脂質組成來製備帶電荷脂質體：DPPC (二棕櫚醯磷脂醯膽鹼) 62% mol；HSPC (氫化大豆磷脂醯膽鹼) 20% mol；CHOL (膽固醇) 16% mol；POPS (1-棕櫚醯基-2-油醯基磷脂醯絲胺酸) 1% mol；DSPE-PEG (二硬脂醯磷脂醯乙醇胺-[甲氧基(聚乙二醇)-2000]) 1% mol。

b)然後藉由將樣本接連投入液氮及調控在60℃下之水浴中實施6次冷凍-解凍循環。

c)使用熱桶擠壓機(LIPEX™擠壓機，Northern Lipids)在控制溫度及壓力下來校準脂質體之大小。在所有情形中，在60℃下實施擠壓。首先，在5巴壓力下穿過聚醚砜(PES) 0.45μm孔徑膜實施5次通過，然後在10巴下穿過PES 0.22μm孔徑膜實施12次通過，且最後在15巴下穿過0.1μm聚二氟亞乙烯(PVDF)膜實施12次通過。

使用Zetasizer NanoZS (Malvern instrument)及90°角之633 nm HeNe雷射藉由動態光散射(DLS)來測定所製備原樣之脂質體之大小分佈。在pH 7.4下在20 mM HEPES及140 mM NaCl中將脂質體懸浮液稀釋100倍。脂質體大小(即水動力學直徑)等於約145 nm (按強度分佈)，分子量分佈指數(PDI)等於約0.1。

如熟習此項技術者可理解，由於所選擇脂質組成而獲得期望表

面電荷，且其值係使用Zetasizer NanoZS (Malvern instrument)藉由 ζ 電勢量測來確認。

將脂質體在1 mM氯化鈉溶液中稀釋100倍且將所得懸浮液之pH調整至pH 7.4。在pH 7.4及1 mM NaCl下脂質體表面電荷等於約-25 mV。

「第二」及/或「第一」生物相容奈米粒子之合成：

a)將脂質溶解於氯仿中。最後在氮氣流下使氯仿蒸發以在派熱司玻璃(Pyrex)管壁上形成脂質膜。在pH 7.4下用25 mM HEPES及150 mM NaCl再水化脂質膜係在60°C下實施，以使得脂質濃度係50 mM。

使用以下脂質組成：DPPC (二棕櫚醯磷脂醯膽鹼) 57% mol；HSPC (氫化大豆磷脂醯膽鹼) 21% mol；CHOL (膽固醇) 16% mol；POPS (1-棕櫚醯基-2-油醯基磷脂醯絲胺酸) 5% mol；DSPE-PEG (二硬脂醯磷脂醯乙醇胺-[甲氧基(聚乙二醇)-2000]) 1% mol。

b)然後藉由將樣本接連投入液氮及調控在60°C下之水浴中實施6次冷凍-解凍循環。

c) 然後用探針在230W功率下在30s期間對脂質體溶液進行超音波處理。

d)使用熱桶擠壓機(LIPEXTM擠壓機，Northern Lipids)在控制溫度及壓力下來校準脂質體之大小。在60°C下實施擠壓。首先，在10巴壓力下穿過0.1 μ m孔徑聚二氟亞乙烯(PVDF)膜施加10次通過，然後在15巴壓力下穿過0.08 μ m孔徑聚碳酸酯(PC)膜施加10次通過，且最後在20巴壓力下穿過0.05 μ m孔徑PC膜施加10次通過。

e) 然後在具有聚乙烯砜(PES)膜及300 KDa截止值之Vivaspin濃縮器上藉由膜超濾將脂質體溶液濃縮兩次。

使用Zetasizer NanoZS (Malvern instrument)及173°角之633 nm HeNe雷射藉由動態光散射(DLS)來測定所製備原樣之脂質體之大小分

佈。在pH 7.4下在25 mM HEPES及150 mM NaCl中將脂質體溶液稀釋200倍。脂質體大小(即水動力學直徑)等於約70 nm (按強度分佈)，分子量分佈指數(PdI)等於約0.1。

脂質體之表面電荷係使用Zetasizer NanoZS (Malvern instrument)藉由 ζ 電勢量測來確定。將脂質體溶液在1 mM氯化鈉溶液中稀釋200倍且將溶液之pH調整至pH 7。在pH 7及1mM NaCl下，脂質體表面電荷等於約-40 mV。

實例2：作為「第一」及/或「第二」生物相容奈米粒子之脂質體之合成。

使用脂質膜再水化方法製備脂質體。

- 絕對表面電荷值為至少10 mV ($|10 \text{ mV}|$)之「第一」及/或「第二」生物相容奈米粒子之合成：

a)將脂質溶解於氯仿中。最後在氮氣流下使氯仿蒸發以在派熱司玻璃管壁上形成脂質膜。在pH 7.4下用25 mM HEPES及150 mM NaCl再水化脂質膜係在60°C下實施，以使得脂質濃度係50 mM。

使用以下脂質組成：HSPC (氫化大豆磷脂醯膽鹼) 59% mol；CHOL (膽固醇) 38% mol；DSPE-PEG (二硬脂醯磷脂醯乙醇胺-[甲氧基(聚乙二醇)-2000]) 3% mol。

b)然後藉由將樣本接連投入液氮及調控在60°C下之水浴中實施6次冷凍-解凍循環。

c)然後用探針在230W功率下在30s期間對脂質體溶液進行超音波處理。

d)使用熱桶擠壓機(LIPEXTM擠壓機，Northern Lipids)在控制溫度及壓力下來校準脂質體之大小。擠壓係在60°C下實施。在15巴壓力下穿過0.1 μm 孔徑聚二氟亞乙烯(PVDF)膜施加10次通過，然後在20巴壓力下穿過0.08 μm 孔徑聚碳酸酯(PC)膜施加18次通過。

e)然後在具有聚乙烯磺(PES)膜及300 KDa截止值之Vivaspin濃縮器上藉由膜超濾將脂質體溶液濃縮兩次。

使用Zetasizer NanoZS (Malvern instrument)及173°角之633 nm HeNe雷射藉由DLS來測定所製備原樣之脂質體之大小分佈。在pH 7.4下在25 mM HEPES及150 mM NaCl中將脂質體溶液稀釋200倍。脂質體大小(即水動力學直徑)等於約90 nm (按強度分佈)，分子量分佈指數(PdI)等於約0.1。

脂質體之表面電荷係使用Zetasizer NanoZS (Malvern instrument)藉由 ζ 電勢量測來確定。將脂質體溶液在1 mM氯化鈉溶液中稀釋200倍且將溶液之pH調整至pH 7。在pH 7及1mM NaCl下，脂質體表面電荷等於約-25 mV。

藉由比色檢定來量測脂質體溶液之最終脂質濃度：磷脂酶D切割磷脂醯膽鹼分子，由此釋放膽鹼基團，其將藉由與發色受質反應來形成藍色色素。發現脂質濃度為100 mM。

- 「第二」及/或「第一」生物相容奈米粒子之合成：

a)將脂質溶解於氯仿中。最後在氮氣流下使氯仿蒸發以在派熱司玻璃管壁上形成脂質膜。在pH 7.4下用25 mM HEPES及150 mM NaCl再水化脂質膜係在60°C下實施，以使得脂質濃度係50 mM。

使用以下脂質組成：DPPC (二棕櫚醯磷脂醯膽鹼) 57% mol；HSPC (氫化大豆磷脂醯膽鹼) 21% mol；CHOL (膽固醇) 16% mol；POPS (1-棕櫚醯基-2-油醯基磷脂醯絲胺酸) 5% mol；DSPE-PEG (二硬脂醯磷脂醯乙醇胺-[甲氧基(聚乙二醇)-2000]) 1% mol。

b)然後藉由將樣本接連投入液氮及調控在60°C下之水浴中實施6次冷凍-解凍循環。

c)使用熱桶擠壓機(LIPEX™擠壓機，Northern Lipids)在控制溫度及壓力下來校準脂質體之大小。在60°C下實施擠壓。首先，在5巴壓

力下穿過聚醚砜(PES) 0.45 μ m孔徑膜實施5次通過，然後在10巴下穿過PES 0.22 μ m孔徑膜實施12次通過，且最後在15巴下穿過0.1 μ m聚二氟亞乙烯(PVDF)膜實施12次通過。

d) 然後在具有聚乙烯砜(PES)膜及300 KDa截止值之Vivaspin濃縮器上藉由膜超濾將脂質體溶液濃縮兩次。

使用Zetasizer NanoZS (Malvern instrument)及173°角之633 nm HeNe雷射藉由動態光散射(DLS)來測定所製備原樣之脂質體之大小分佈。在pH 7.4下在25 mM HEPES及150 mM NaCl中將脂質體溶液稀釋200倍。脂質體大小(即水動力學直徑)等於約145 nm (按強度分佈)，分子量分佈指數(PdI)等於約0.1。

脂質體之表面電荷係使用Zetasizer NanoZS (Malvern instrument)藉由 ζ 電勢量測來確定。將脂質體溶液在1 mM氯化鈉溶液中稀釋200倍且將溶液之pH調整至pH 7。在pH 7及1mM NaCl下，脂質體表面電荷等於約-40 mV。

藉由比色檢定來量測脂質體溶液之最終脂質濃度：磷脂酶D切割磷酯醯膽鹼分子，由此釋放膽鹼基團，其將藉由與發色受質反應來形成藍色色素。發現脂質濃度為100 mM。

實例3：評估包括實例2之至少兩種生物相容奈米粒子懸浮液及Dox-NP®之醫藥組合物在MDA-MB-231-lucD3H2LN異種移植物中之功效及毒性之方法(參照圖2)

以以下方式在帶有MDA-MB-231-lucD3H2LN異種移植腫瘤之裸小鼠中投與包括(i)實例2之至少兩種相異「第一」及「第二」生物相容奈米粒子及(ii)作為所關注治療化合物之Dox-NP® (脂質體囊封多柔比星)之醫藥組合物：

a)藉由靜脈內注射(IV)經由側尾靜脈投與Dox-NP®及實例2之生物相容奈米粒子。

Dox-NP® (Avanti Polar lipids，在pH 6.5-6.8下，在具有10% w/v 蔗糖之10 mM組胺酸緩衝劑中，2 mg/ml多柔比星HCl之脂質體調配物)未經額外稀釋即以所需體積注射，以獲得3 mg/kg之注射多柔比星。

來自實例2之生物相容奈米粒子懸浮液未經任何額外稀釋即使用。

b)如圖2中所圖解說明來處理4組小鼠：

- 組1：5%無菌葡萄糖(對照(媒劑)組)。

在第1天、第7天及第14天向小鼠靜脈內(IV)注射5%無菌葡萄糖溶液。

- 組2：來自實例2之「第一」及「第二」生物相容奈米粒子(對照組)。

在第1天、第7天及第14天向小鼠靜脈內(IV)注射來自實例2之「第一」及「第二」生物相容奈米粒子(10 ml/kg)。每次(天)，第一生物相容奈米粒子之注射係在注射第二生物相容奈米粒子之前4小時實施。

- 組3：Dox-NP® (3 mg/kg多柔比星)(治療組)。

在第1天、第7天及第14天向小鼠靜脈內(IV)注射Dox-NP® (3 mg/kg多柔比星)。

- 組4：醫藥組合物，即(i)來自實例2之至少兩種相異(「第一」及「第二」)生物相容奈米粒子及(ii) Dox-NP® (3 mg/kg多柔比星)之組合(治療組)。

在第1天、第7天及第14天向小鼠靜脈內(IV)注射來自實例2之生物相容奈米粒子(10 ml/kg)及Dox-NP® (3 mg/kg多柔比星)。每次(每天)，來自實例2之「第一」及「第二」生物相容奈米粒子之同時注射係在注射Dox-NP® (3 mg/kg多柔比星)之前4小時實施。

- 組5：醫藥組合物，即(i)來自實例2之至少兩種相異生物相容奈米粒子及(ii) Dox-NP® (3 mg/kg多柔比星)之組合(治療組)。

在第1天、第7天及第14天向小鼠靜脈內(IV)注射來自實例2之生物相容奈米粒子(10 ml/kg)及Dox-NP® (3 mg/kg多柔比星)。每次(每天)，來自實例2之「第一」及「第二」生物相容奈米粒子之注射分別係在注射Dox-NP® (3 mg/kg多柔比星)之前4小時及1小時實施。

c)在投與醫藥組合物後評價任何毒性臨床體徵；且

d)腫瘤體積係使用下式利用數位卡尺自二維腫瘤體積量測來量測：

$$\text{腫瘤體積 (mm}^3\text{)} = \frac{\text{長度 (mm)} \times (\text{寬度})^2 \text{ (mm}^2\text{)}}{2}$$

實例4：作為「第一」或「第二」生物相容奈米粒子之脂質體之合成使用脂質膜再水化方法製備脂質體：

a)將脂質溶解於氯仿中。最後在氮氣流下使氯仿蒸發以在派熱司玻璃管壁上形成脂質膜。在pH 7.4下用25 mM HEPES及150 mM NaCl再水化脂質膜係在60°C下實施，以使得脂質濃度係50 mM。

使用以下脂質組成來製備帶電荷脂質體：DPPC (二棕櫚醯磷脂醯膽鹼) 58% mol；HSPC (氫化大豆磷脂醯膽鹼) 21% mol；CHOL (膽固醇) 16% mol；POPS (1-棕櫚醯基-2-油醯基磷脂醯絲胺酸) 5% mol。

b)然後藉由將樣本接連投入液氮及調控在60°C下之水浴中實施6次冷凍-解凍循環。每3次冷凍-解凍循環及在即將擠壓之前在30 s期間對脂質體溶液實施超音處理。

c)使用熱桶擠壓機(LIPEX™擠壓機，Northern Lipids)在控制溫度及壓力下來校準脂質體之大小。擠壓係在60°C下實施。在10巴壓力下穿過0.1 μm孔徑聚二氟亞乙烯(PVDF)膜施加10次通過。

使用Zetasizer NanoZS (Malvern instrument)及173°角之633 nm

HeNe雷射藉由動態光散射(DLS)來測定所製備原樣之脂質體之大小分佈。在pH 7.4下在25 mM HEPES及150 mM NaCl中將脂質體溶液稀釋200倍。脂質體大小(即水動力學直徑)等於約170 nm (按強度分佈)，分子量分佈指數(PdI)等於約0.2。

如熟習此項技術者可理解，由於所選擇脂質組成而獲得期望表面電荷，且其值係使用Zetasizer NanoZS (Malvern instrument)藉由 ζ 電勢量測來確認。將脂質體在1mM氯化鈉溶液中稀釋200倍且將溶液之pH調整至pH 7。在pH 7及1mM NaCl下，脂質體表面電荷等於約-40 mV。

脂質體溶液之最終脂質濃度係藉由比色檢定(巴列特方法)來量測。該方法基於藉助酸消化磷脂之總磷測定。釋放之無機磷酸鹽與鉬酸鉍反應，錯合物產生強藍色。脂質濃度等於約50 mM。

實例5：作為「第一」或「第二」生物相容奈米粒子之脂質體之合成
使用脂質膜再水化方法製備脂質體：

a)將脂質溶解於氯仿中。最後在氮氣流下使氯仿蒸發以在派熱司玻璃管壁上形成脂質膜。在pH 7.4下用25 mM HEPES及150 mM NaCl再水化脂質膜係在60°C下實施，以使得脂質濃度係50 mM。

使用以下脂質組成來製備帶電荷脂質體：DPPC (二棕櫚醯磷脂醯膽鹼) 45.15% mol；CHOL (膽固醇) 45.15% mol；DSPE-PEG (二硬脂醯磷脂醯乙醇胺-[甲氧基(聚乙二醇)-2000]) 0.60% mol；L-麩胺酸N-(3-羧基-1-側氧基丙基)-1,5-雙十六烷基酯(SA-脂質) 9.10% mol。SA-脂質在脂質體表面上帶來COOH基團。

b)然後藉由將樣本接連投入液氮及調控在60°C下之水浴中實施6次冷凍-解凍循環。

c)使用熱桶擠壓機(LIPEX™擠壓機，Northern Lipids)在控制溫度及壓力下來校準脂質體之大小。擠壓係在60°C下實施。在3巴壓力下

穿過0.45 μm 孔徑聚二氟亞乙烯(PVDF)膜施加7次通過，且在10巴壓力下穿過0.22 μm 孔徑聚二氟亞乙烯(PVDF)膜施加10次通過。使用Zetasizer NanoZS (Malvern instrument)及173°角之633 nm HeNe雷射藉由動態光散射(DLS)來測定所製備原樣之脂質體之大小分佈。在pH 7.4下在25 mM HEPES及150 mM NaCl中將脂質體溶液稀釋200倍。脂質體大小(即水動力學直徑)等於約230 nm (按強度分佈)，分子量分佈指數(PdI)等於約0.2。

如熟習此項技術者可理解，由於所選擇脂質組成而獲得期望表面電荷，且其值係使用Zetasizer NanoZS (Malvern instrument)藉由 ζ 電勢量測來確認。將脂質體溶液在1 mM氯化鈉溶液中稀釋200倍且將溶液之pH調整至pH 7。在pH 7及1mM NaCl下，脂質體表面電荷等於約-60 mV。

脂質體溶液之最終脂質濃度係藉由比色檢定(巴列特方法)來量測。該方法基於藉助酸消化磷脂之總磷測定。釋放之無機磷酸鹽與鉬酸鉍反應且錯合物產生強藍色。脂質濃度等於約50 mM。

實例6：作為「第一」或「第二」生物相容奈米粒子之脂質體之合成
使用脂質膜再水化方法製備脂質體：

a)將脂質溶解於氯仿中。最後在氮氣流下使氯仿蒸發以在派熱司玻璃管壁上形成脂質膜。在pH 7.4下用25 mM HEPES及150 mM NaCl再水化脂質膜係在60°C下實施且脂質濃度係50 mM。使用以下脂質組成來製備電荷脂質體：DSPC (1,2-二硬脂醯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼) 60% mol、CHOL (膽固醇) 35% mol；及琥珀醯PE (1,2-二油醯基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-琥珀醯基) 5% mol。

b)然後藉由將樣本接連投入液氮及調控在60°C下之水浴中實施6次冷凍-解凍循環。每3次冷凍-解凍循環及在即將擠壓之前，在30 s期間對脂質體溶液實施超音處理。

c)使用熱桶擠壓機(LIPEX™擠壓機，Northern Lipids)在控制溫度及壓力下來校準脂質體之大小。擠壓係在60℃下實施。在12巴壓力下穿過0.22 μm 孔徑聚二氟亞乙烯(PVDF)膜施加12次通過。

d)將對胺基苯基- α -D-吡喃甘露糖苷(MAN)偶聯至琥珀醯PE脂質體：使用碳二亞胺偶合用甘露糖衍生之配體對胺基苯基- α -D-吡喃甘露糖苷(MAN)修飾琥珀醯PE脂質體表面，以研發甘露糖偶聯脂質體。MAN藉由其胺基共價偶合至存在於預形成琥珀醯PE脂質體表面上之琥珀醯PE之羧酸基團。簡言之，向預形成之琥珀醯PE脂質體溶液中添加EDC (1-乙基-3-[3-二甲基胺基丙基]碳二亞胺鹽酸鹽) (琥珀醯PE/EDC莫耳比率為1:10)及N-羥基琥珀醯亞胺(NHS) (NHS/EDC莫耳比率為1:2.5)。然後將懸浮液之pH用1M NaOH調整至6且在室溫下將所得懸浮液攪拌15分鐘。隨後，將溶液之pH用1M NaOH調整至7且將MAN水溶液添加至溶液中(琥珀醯PE/MAN莫耳比率為1:2)。使用1M NaOH將pH再調整至7且在室溫下將懸浮液再攪拌2小時。使用50 KDa纖維素膜藉由3個具有稀釋因子($\times 500$ ； $\times 500$ ； $\times 500$)之透析步驟去除過量未結合MAN、EDC及NHS分子。

應注意，由於透析時可能之稀釋，可在具有聚乙烯砜(PES)膜及300 KDa截止值之Vivaspin濃縮器上使用膜超濾藉由離心(通常使用Sigma 3-15K離心機，5℃；1,200 rpm)來濃縮脂質體溶液。

使用Zetasizer NanoZS (Malvern instrument)及173°角之633 nm HeNe雷射藉由動態光散射(DLS)來測定所製備原樣之脂質體之大小分佈。在pH 7.4下在25 mM HEPES及150 mM NaCl中將脂質體溶液稀釋200倍。脂質體大小(即水動力學直徑)係約230 nm (按強度分佈)，分子量分佈指數(PDI)為約0.2。

如熟習此項技術者可理解，由於所選擇脂質組成而獲得期望表面電荷，且其值係使用Zetasizer NanoZS (Malvern instrument)藉由 ζ 電

勢量測來確認。將脂質體溶液在1mM氯化鈉溶液中且在pH 7下稀釋200倍。在pH 7及1 mM NaCl下，脂質體表面電荷係約-70 mV。

脂質體溶液之最終脂質濃度係藉由比色檢定(巴列特方法)來量測。該方法基於藉助酸消化磷脂之總磷測定。釋放之無機磷酸鹽與鉬酸鉍反應且錯合物產生強藍色。脂質濃度等於約50 mM。

【符號說明】

無

申請專利範圍

1. 一種包括(i)至少兩種相異生物相容奈米粒子及(ii)至少一種醫藥化合物之組合之醫藥組合物，其中該至少兩種生物相容奈米粒子中每一者之最長尺寸介於約4 nm與約500 nm之間，第一生物相容奈米粒子之絕對表面電荷值為至少 $|10 \text{ mV}|$ 且第二生物相容奈米粒子或任一其他生物相容奈米粒子之絕對表面電荷值與該第一生物相容奈米粒子之絕對表面電荷值之差異為至少10 mV，該醫藥組合物用於有此需要之個體中之治療性、預防性或診斷性方法中，該治療性、預防性或診斷性方法包括將該至少一種醫藥化合物投與該個體之步驟及投與該至少兩種相異生物相容奈米粒子之不同步驟，該至少兩種相異生物相容奈米粒子係在該至少一種醫藥化合物之前或之後通常介於超過5分鐘與約72小時之間，與該至少一種醫藥化合物分開投與該個體，且其中該生物相容奈米粒子不用作例如醫藥化合物。
2. 如請求項1之醫藥組合物，其中該至少兩種相異生物相容奈米粒子係在另一不同步驟中分開投與，或同時投與該需要該醫藥化合物之個體。
3. 如請求項1或2之醫藥組合物，其中該第一奈米粒子之絕對表面電荷值大於 $|10 \text{ mV}|$ ，該電荷為負電荷。
4. 如請求項1或2之醫藥組合物，其中該至少兩種相異奈米粒子係有機奈米粒子。
5. 如請求項4之醫藥組合物，其中該至少兩種相異奈米粒子選自基於脂質之奈米粒子、基於蛋白質之奈米粒子、基於聚合物之奈米粒子、基於共聚物之奈米粒子、基於碳之奈米粒子、類病毒奈米粒子及其任何混合物。

6. 如請求項1或2之醫藥組合物，其中該至少兩種相異奈米粒子係無機奈米粒子且該等奈米粒子中每一者之最長尺寸低於約7 nm。
7. 如請求項1或2之醫藥組合物，其中該至少兩種奈米粒子係無機奈米粒子，該等奈米粒子中每一者之最長尺寸為至少10 nm，且該等奈米粒子中每一者之無機材料選自(i)一或多種選自例如Mg、Ca、Ba及Sr之二價金屬元素，(ii)一或多種選自例如Fe及Al之三價金屬元素，及(iii)一或多種包括Si之四價金屬元素。
8. 如請求項7之醫藥組合物，其中該無機材料選自碳酸鈣(CaCO_3)、碳酸鎂(MgCO_3)、氫氧化鎂($\text{Mg}(\text{OH})_2$)、氫氧化鐵($\text{Fe}(\text{OH})_2$)、氧(氫氧)化鐵(FeOOH)、氧化鐵(Fe_3O_4 或 Fe_2O_3)、氧化鋁(Al_3O_4)、氫氧化鋁($\text{Al}(\text{OH})_3$)、氧(氫氧)化鋁(AlOOH)及氧化矽(SiO_2)。
9. 如請求項1或2之醫藥組合物，其中該醫藥組合物包括有機及無機奈米粒子二者。
10. 如請求項1或2之醫藥組合物，其中該至少兩種生物相容奈米粒子係分開或同時投與需要該至少一種醫藥化合物之個體，且係在該醫藥化合物之前介於超過5分鐘與約72小時之間投與。
11. 如請求項1或2之醫藥組合物，其中該至少兩種奈米粒子中每一者進一步塗佈生物相容性塗層。
12. 如請求項1或2之醫藥組合物，其中當與標準治療劑量之該至少一種醫藥化合物誘導之治療效益及毒性相比時，該至少兩種生物相容奈米粒子及該至少一種醫藥化合物之組合投藥在對該個體之減小毒性下，仍可維持該至少一種醫藥化合物之治療效益，或在對該個體之等效或減小毒性下，可增加該至少一種醫藥化合物之治療效益。
13. 如請求項1或2之醫藥組合物，其中該至少兩種生物相容奈米粒

子與該至少一種醫藥化合物之該組合投藥容許在對該個體之等效毒性或減小毒性下維持相同治療效益的同時，或在對該個體之等效或減小毒性下增加治療效益的同時，所投與至少一種醫藥化合物之治療劑量可以比該至少一種醫藥化合物之標準治療劑量減少至少10%。

14. 如請求項1或2之醫藥組合物，其中該至少兩種奈米粒子在其投與需要如請求項1中所提及之該至少一種醫藥化合物之個體後1小時至6週內自該接受投與之個體中清除。
15. 如請求項1或2之醫藥組合物，其中該至少一種醫藥化合物係較佳選自生物化合物、小分子靶向治療劑、溶瘤病毒及細胞毒性化合物之有機化合物。
16. 如請求項15之醫藥組合物，其中該至少一種醫藥化合物選自抗體、寡核苷酸及合成肽。
17. 如請求項1或2之醫藥組合物，其中該至少一種醫藥化合物係選自金屬奈米粒子、金屬氧化物奈米粒子、金屬硫化物奈米粒子及其任何混合物之無機化合物。
18. 如請求項1或2之醫藥組合物，其中該至少一種醫藥化合物囊封於載劑中或結合至該載劑。

圖式

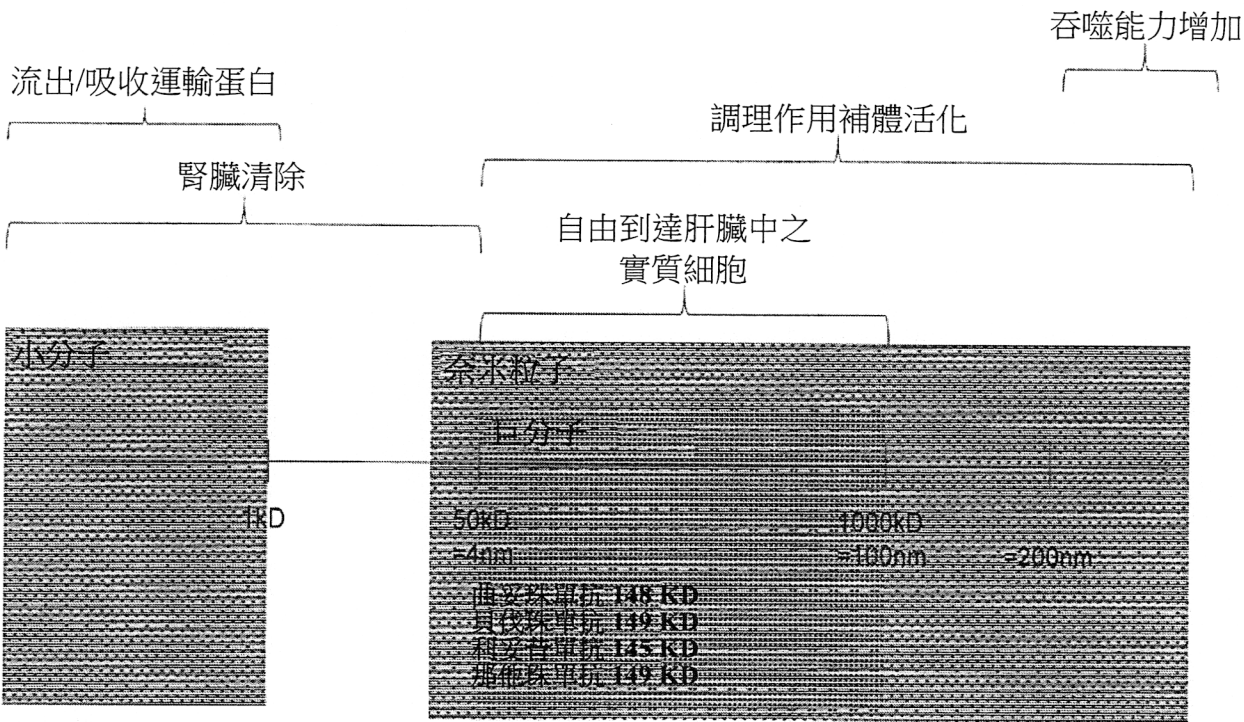


圖 1

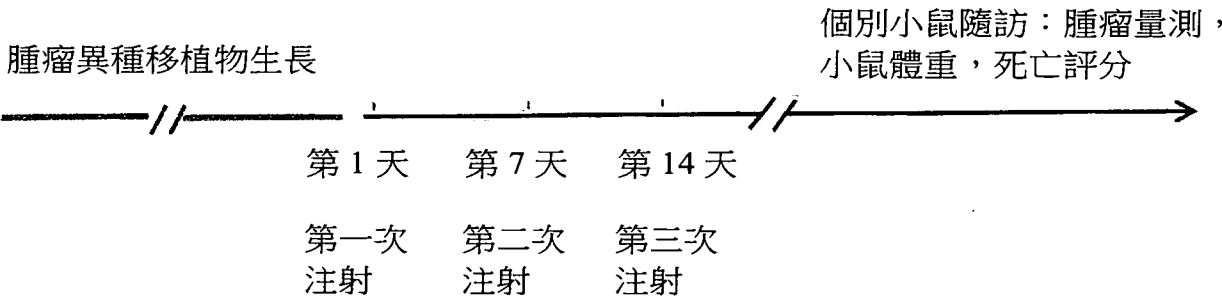


圖 2

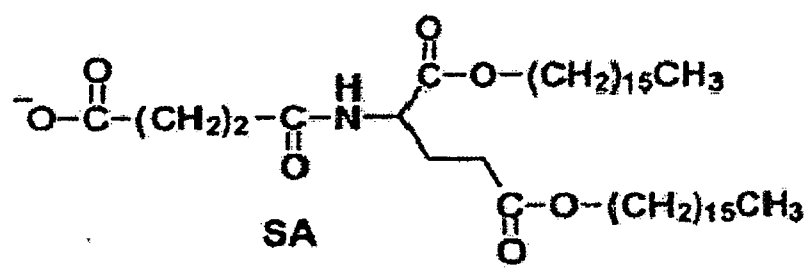


圖 3