



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105142620 B

(45)授权公告日 2018.09.28

(21)申请号 201480023441.1

(22)申请日 2014.02.25

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105142620 A

(43)申请公布日 2015.12.09

(30)优先权数据

61/768,929 2013.02.25 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2015.10.23

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/018211 2014.02.25

(87)PCT国际申请的公布数据

W02014/130994 EN 2014.08.28

(73)专利权人 罗切斯特大学

地址 美国纽约

(72)发明人 丘·库 丹尼尔·贝努瓦

马利斯·I·克莱因

梅甘·L·法尔塞塔 伍德

(74)专利代理机构 北京康信知识产权代理有限公司 11240

代理人 沈敬亭 李海霞

(51)Int.Cl.

A61K 9/70(2006.01)

A61L 15/46(2006.01)

C08F 218/00(2006.01)

(56)对比文件

CN 101189020 A,2008.05.28,

CN 101189020 A,2008.05.28,

US 2010/0021391 A1,2010.01.28,

US 2010/0021391 A1,2010.01.28,

CN 102516417 A,2012.06.27,

US 2011/0171123 A1,2011.07.14,

Corbin Clawson etc..“Synthesis and

Characterization of Lipid-Polymer Hybrid Nanoparticles with pH-Triggered PEG Shedding”.《Langmuir》.2011,第27卷(第17期), introduction部分.

审查员 卢少楠

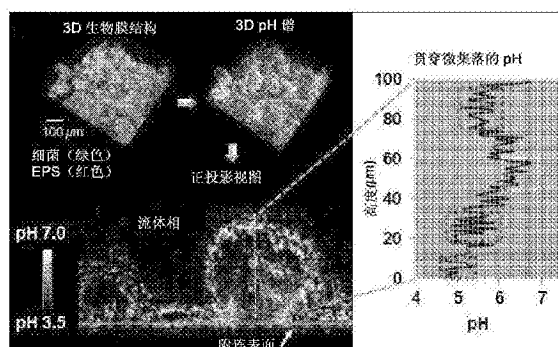
权利要求书2页 说明书54页 附图20页

(54)发明名称

用于受控释放抗生物膜剂的纳米颗粒

(57)摘要

本发明涉及治疗和/或预防生物膜和生物膜相关疾病的组合物和方法。本发明包括纳米颗粒载体(NPC)和位于其中的至少一种治疗剂。所述NPC结合在生物膜内并结合至有生物膜形成和积累风险的表面,同时当引发释放时,提供所述治疗剂的局部、持续、提高和受控的递送。在一个实施方式中,所述NPC包含pH响应性成分,从而使得当最需要时,当局部环境决定应准确递送所述治疗剂时,能够提供所述治疗剂的特异性递送。



1. 一种用于防止生物膜形成、防止生物膜积累和破坏生物膜的组合物,所述组合物由具有壳和核的至少一种纳米颗粒载体组成,其中所述至少一种纳米颗粒载体包括聚合物和治疗有效量的至少一种治疗剂,其中所述聚合物由聚(甲基丙烯酸二甲氨基乙酯)-b-聚(甲基丙烯酸二甲氨基乙酯-共-丙基丙烯酸-共-甲基丙烯酸丁酯)组成,且其中所述至少一种治疗剂包括选自由法呢醇、芹菜素、氟化物、氯己啶及其衍生物组成的组中的至少一种试剂。

2. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述组合物包含pH响应性成分,从而当所述纳米颗粒载体处于局部酸性pH环境时,所述纳米颗粒载体分解,借此释放所述至少一种治疗剂。

3. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述至少一种治疗剂通过可降解链连接至所述核。

4. 根据权利要求3所述的组合物,其中所述可降解链包含1-30个乳酸重复。

5. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述纳米颗粒载体结合到由液体、泡沫、糊剂、凝胶、胶浆、膜、可溶基质、片剂、胶囊和锭剂构成的组中的至少一种中。

6. 包含至少一种纳米颗粒载体和位于所述至少一种纳米颗粒载体内的至少一种治疗剂的组合物在制备用于治疗生物膜的药物中的应用,所述治疗包括向具有生物膜的表面施用所述组合物,其中所述至少一种纳米颗粒载体选择性结合至所述表面并且选择性地引发以释放所述至少一种治疗剂,借此当从所述至少一种纳米颗粒载体释放所述至少一种治疗剂时,提供所述治疗剂的局部递送,其中所述至少一种纳米颗粒载体包括聚合物和治疗有效量的至少一种治疗剂,其中所述聚合物由聚(甲基丙烯酸二甲氨基乙酯)-b-聚(甲基丙烯酸二甲氨基乙酯-共-丙基丙烯酸-共-甲基丙烯酸丁酯)组成,且其中所述至少一种治疗剂包括选自由法呢醇、芹菜素、氟化物、氯己啶及其衍生物组成的组中的至少一种试剂。

7. 根据权利要求6所述的应用,其中所述至少一种纳米颗粒载体包括将所述至少一种治疗剂连接至所述纳米颗粒载体的一部分的可降解链,其中所述至少一种治疗剂的释放速率取决于所述可降解链的长度。

8. 根据权利要求6所述的应用,其中所述表面位于受试者中。

9. 根据权利要求8所述的应用,其中所述受试者患有生物膜介导的病症。

10. 根据权利要求9所述的应用,其中所述病症选自由牙斑、龋齿、齿龈炎、尿路感染、导管感染、中耳感染和植入生物材料感染组成的组。

11. 根据权利要求8所述的应用,其中所述表面位于所述受试者的薄膜中。

12. 根据权利要求8所述的应用,其中所述受试者是哺乳动物。

13. 根据权利要求12所述的应用,其中所述哺乳动物选自由灵长类、牛、猪、马、绵羊、猫和狗组成的组。

14. 根据权利要求12所述的应用,其中所述哺乳动物是人。

15. 包含至少一种纳米颗粒载体和位于所述至少一种纳米颗粒载体内的至少一种治疗剂的组合物在制备用于治疗受试者中口腔疾病的药物中的应用,所述治疗包括向所述受试者的薄膜施用所述组合物,其中所述至少一种纳米颗粒载体选择性结合至表面并且选择性地引发以释放所述至少一种治疗剂,借此当从所述至少一种纳米颗粒载体释放所述至少一种治疗剂时,提供所述至少一种治疗剂的局部递送,其中所述至少一种纳米颗粒载体包括聚合物和治疗有效量的至少一种治疗剂,其中所述聚合物由聚(甲基丙烯酸二甲氨基乙

酯)-b-聚(甲基丙烯酸二甲氨基乙酯-共-丙基丙烯酸-共-甲基丙烯酸丁酯)组成,且其中所述至少一种治疗剂包括选自由法呢醇、芹菜素、氟化物、氯己啶及其衍生物组成的组中的至少一种试剂。

16. 根据权利要求15所述的应用,其中所述至少一种纳米颗粒载体包括将所述至少一种治疗剂连接至所述至少一种纳米颗粒载体的一部分的可降解链。

17. 根据权利要求15所述的应用,其中所述口腔疾病选自牙斑、龋齿、齿龈炎、牙周炎、义齿性口炎和口腔念珠菌病组成的组。

18. 根据权利要求15所述的应用,其中所述受试者是哺乳动物。

19. 根据权利要求18所述的应用,其中所述哺乳动物选自由灵长类、牛、猪、马、绵羊、猫和狗组成的组。

20. 根据权利要求18所述的应用,其中所述哺乳动物是人。

21. 包含至少一种纳米颗粒载体和位于所述至少一种纳米颗粒载体内的至少一种治疗剂的组合物在制备用于预防受试者中口腔疾病的药物中的应用,所述预防包括向所述受试者的薄膜施用所述组合物,其中所述至少一种纳米颗粒载体选择性结合至所述薄膜并且选择性地引发以释放所述至少一种治疗剂,借此当从所述至少一种纳米颗粒载体释放所述至少一种治疗剂时,提供所述至少一种治疗剂的局部递送,其中所述至少一种纳米颗粒载体包括聚合物和治疗有效量的至少一种治疗剂,其中所述聚合物由聚(甲基丙烯酸二甲氨基乙酯)-b-聚(甲基丙烯酸二甲氨基乙酯-共-丙基丙烯酸-共-甲基丙烯酸丁酯)组成,且其中所述至少一种治疗剂包括选自由法呢醇、芹菜素、氟化物、氯己啶及其衍生物组成的组中的至少一种试剂。

22. 根据权利要求21所述的应用,其中所述至少一种纳米颗粒载体包括将所述至少一种治疗剂连接至所述至少一种纳米颗粒载体的一部分的可降解链。

23. 根据权利要求21所述的应用,其中所述口腔疾病选自牙斑、龋齿、齿龈炎、牙周炎、义齿性口炎和口腔念珠菌病组成的组。

24. 根据权利要求21所述的应用,其中所述受试者是哺乳动物。

25. 根据权利要求24所述的应用,其中所述哺乳动物选自由灵长类、牛、猪、马、绵羊、猫和狗组成的组。

26. 根据权利要求24所述的应用,其中所述哺乳动物是人。

用于受控释放抗生物膜剂的纳米颗粒

[0001] 相关申请的引用

[0002] 本申请要求2013年2月25日提交的美国临时申请No.61/768929的优先权,该申请的内容以其全部内容作为参考并入本文。

背景技术

[0003] 人类中多种感染性疾病是由毒性生物膜所引起的,包括在口腔中发生的那些(例如,龋齿和牙周病)。例如,在全世界范围,儿童和成人同样地受龋齿疾病困扰,并且它是导致缺席工作和学习的主要急救就诊原因。仅在美国,治疗该疾病破坏的费用就超过\$400亿/年(Dye等人,2007,Vital Health Stat,1:1-92)。

[0004] 由于(1)通过标准治疗方案(通过短暂暴露的局部应用)外部引入的试剂缺少保留,(2)快速清除和(3)生物膜组装体的复杂性,发展治疗口腔中生物膜相关疾病的新型治疗方法是困难的。局部试剂必须保留或具有长期效果,而不会显示出广谱杀生物活性以防止破坏复杂的口腔(共生)菌群。同时,试剂不应与唾液蛋白形成复合物,这将导致从口腔中快速清除。

[0005] 生龋生物膜的组装是依赖于细菌源EPS富集基质的发展的动态过程(Bowen等人,2011,Caries Res,45(1):69-86)。在复杂的口腔微生物组中,变形链球菌(*Streptococcus mutans*)并不总是最大量的生物。然而,当蔗糖可用时,它可以快速安排生龋生物膜的形成。变形链球菌(*S.mutans*)源葡萄糖基转移酶(Gtf)存在于薄膜(唾液薄膜,pellicle)中和细菌表面上,从而原位产生EPS。在表面上形成的EPS促进微生物在牙齿上的局部积累,同时形成保护包埋细菌的扩散限制性聚合物基质。同时,发酵蔗糖及其它糖,从而在整个生物膜上和附连表面上产生酸性微环境(小生境)(Xiao等人,2012,PLoS Pathog,8(4):e1002623)。这些低pH小生境有利于EPS产生,同时生龋菌群在生物膜内繁殖,确保生物膜增大和牙釉质的局部酸溶解。因此,可以通过工程设计纳米颗粒从而在主动发生生物膜形成的位点携带现有和预期试剂。

[0006] 当前用于控制/调节毒性生物膜形成的方法是有限的。由于(1)通过标准治疗方案(通过短暂暴露的局部应用)外部引入的试剂缺少保留,(2)从口腔快速清除和(3)生物膜组装体的复杂性,发展用于口腔的新型治疗方法是困难的。局部试剂必须保留或具有长期效果,而不会显示出广谱杀生物活性以防止破坏复杂的口腔(共生)菌群。氯己啶是抑制唾液中变形链球菌(*mutans streptococci*)水平的广谱杀菌剂,但是对生物膜远远不够有效并且不适合每天预防性和治疗性使用。氟化物是龋齿预防的主要方法,其为龋齿提供了不完全的保护,并且可能不足以解决疾病传染性方面的问题(Ten Cate,2012,J Dent Res,91(9):813-815)。最近,已表明芹菜素(apigenin)和法呢醇有效破坏生龋生物膜的发展(Koo等人,2005,J Dent Res,84(11):1016-1020;Falsetta等人,2012,Antimicrob Agents Chemother,56(12):6201-6211)。芹菜素抑制EPS原位合成,而法呢醇是破坏变形链球菌(*S.mutans*)在低pH值的耐酸性的膜靶向试剂,其均不具有杀菌效果(Koo等人,2005,J Dent Res,84(11):1016-1020)。然而,这些试剂水溶性差并且不能在口腔中最佳地保留足

够的时间以发挥完全的体内治疗潜能 (Koo等人, 2005, J Dent Res, 84(11):1016-1020)。

[0007] 因此, 在本领域中, 需要提供活性剂有效保留, 同时在生物膜发展和积累位点提供生物活性物质的持续、局部递送的组合物和方法。本发明满足了这种尚未满足的需要。

发明内容

[0008] 本发明包括用于防止生物膜形成、防止生物膜积累和破坏生物膜的组合物。所述组合物包含至少一种具有壳和核的纳米颗粒载体 (NPC), 其中所述核包含治疗有效量的至少一种治疗剂。

[0009] 在一个实施方式中, NPC包含甲基丙烯酸二甲氨基乙酯 (DMAEMA)、聚丙烯酸 (PAA)、甲基丙烯酸丁酯 (BMA) 中的至少一种。在一个实施方式中, NPC包含聚(甲基丙烯酸二甲氨基乙酯)-b-聚(甲基丙烯酸二甲氨基乙酯-共-丙基丙烯酸-共-甲基丙烯酸丁酯) (pDMAEMA-b-p (DMAEMA-共-PAA-共-BMA))。

[0010] 在一个实施方式中, 所述组合物包含pH响应性成分, 从而当NPC处于局部酸性pH环境时, NPC分解, 借此释放至少一种治疗剂。

[0011] 在一个实施方式中, 所述NPC结合至生物膜。在一个实施方式中, 所述组合物结合至具有生物膜形成和积累风险的多个表面。

[0012] 在一个实施方式中, 所述至少一种治疗剂包括至少一种试剂, 其选自法呢醇、芹菜素、氟化物、氯己啶及其衍生物。

[0013] 在一个实施方式中, 所述至少一种治疗剂通过可降解链 (可降解束缚, degradable tether) 连接至核。在一个实施方式中, 可降解链的长度控制治疗剂的释放速率。

[0014] 在一个实施方式中, 将NPC掺入到由液体、泡沫、糊剂、凝胶、胶浆 (树胶, gum)、膜、可溶基质 (dissolvable substrate)、片剂、胶囊和锭剂构成的组中的至少一种中。

[0015] 本发明包括治疗生物膜的方法。所述方法包括向具有生物膜的表面施用 (给予, administer) 组合物, 所述组合物包含至少一种NPC和位于所述至少一种NPC内的至少一种治疗剂, 其中至少一种NPC选择性结合至所述表面并选择性地引发 (触发, trigger) 以释放至少一种治疗剂, 借此当从所述至少一种NPC释放所述至少一种治疗剂时, 提供所述治疗剂的局部递送。

[0016] 在一个实施方式中, 所述至少一种NPC包括甲基丙烯酸二甲氨基乙酯 (DMAEMA)、丙基丙烯酸 (PAA)、甲基丙烯酸丁酯 (BMA) 中的至少一种。在一个实施方式中, 所述至少一种NPC包含聚(甲基丙烯酸二甲氨基乙酯)-b-聚(甲基丙烯酸二甲氨基乙酯-共-丙基丙烯酸-共-甲基丙烯酸丁酯) (pDMAEMA-b-p (DMAEMA-共-PAA-共-BMA))。

[0017] 在一个实施方式中, 基于表面微环境的特征来引发至少一种NPC进行分解 (disassemble), 借此释放至少一种治疗剂。在一个实施方式中, 当至少一种NPC处于局部酸性pH环境中时, 引发至少一种NPC分解。

[0018] 在一个实施方式中, 所述至少一种治疗剂包括至少一种试剂, 其选自法呢醇、芹菜素、氟化物、氯己啶及其衍生物。

[0019] 在一个实施方式中, 至少一种NPC包括将至少一种治疗剂连接至NPC的一部分上的可降解链, 其中至少一种治疗剂的释放速率取决于可降解链的长度。

[0020] 在一个实施方式中,所述表面位于受试者中。在一个实施方式中,受试者患有生物膜介导的病症(biofilm mediated condition)。在一个实施方式中,所述病症选自牙斑(dental plaques)、龋齿(dental caries)、齿龈炎、牙周炎、尿路感染、导管感染(catheter infection)、中耳感染和植入生物材料感染(infections of implanted biomaterials)。在一个实施方式中,所述表面位于受试者的薄膜(唾液薄膜, pellicle)中。在一个实施方式中,所述受试者是哺乳动物。在一个实施方式中,所述哺乳动物选自人、灵长类、牛、猪、马、绵羊、猫和狗。

[0021] 本发明包括治疗受试者中口腔疾病的方法。所述方法包括向受试者的薄膜施用组合物,所述组合物包含至少一种NPC和位于至少一种NPC内的至少一种治疗剂,其中至少一种NPC选择性结合至所述表面并选择性地引发以释放至少一种治疗剂,借此当从所述至少一种NPC释放所述试剂时,提供至少一种治疗剂的局部递送。

[0022] 在一个实施方式中,所述至少一种NPC包括甲基丙烯酸二甲氨基乙酯(DMAEMA)、丙基丙烯酸(PAA)、甲基丙烯酸丁酯(BMA)中的至少一种。在一个实施方式中,所述至少一种NPC包含聚(甲基丙烯酸二甲氨基乙酯)-b-聚(甲基丙烯酸二甲氨基乙酯-共-丙基丙烯酸-共-甲基丙烯酸丁酯)(pDMAEMA-b-p(DMAEMA-共-PAA-共-BMA))。

[0023] 在一个实施方式中,基于表面微环境的特征来引发至少一种NPC进行分解,借此释放至少一种治疗剂。在一个实施方式中,当至少一种NPC 处于局部酸性pH环境中时,引发至少一种NPC分解。

[0024] 在一个实施方式中,所述至少一种治疗剂包括至少一种试剂,其选自法呢醇、芹菜素、氟化物和氯己啶。

[0025] 在一个实施方式中,至少一种NPC包括将至少一种治疗剂连接至至少一种NPC的一部分的可降解链。

[0026] 在一个实施方式中,口腔疾病选自牙斑、龋齿、齿龈炎、牙周炎、义齿性口炎(denture stomatitis)和口腔念珠菌病(oral candidiasis)。在一个实施方式中,所述受试者是哺乳动物。在一个实施方式中,所述哺乳动物选自人、灵长类、牛、猪、马、绵羊、猫和狗。

[0027] 本发明包括预防受试者中口腔疾病的方法。所述方法包括向受试者的薄膜施用组合物,所述组合物包含至少一种NPC和位于至少一种NPC内的至少一种治疗剂,其中至少一种NPC选择性结合至所述薄膜并选择性地引发以释放至少一种治疗剂,借此当从所述至少一种NPC释放所述试剂时,提供至少一种治疗剂的局部递送。

[0028] 在一个实施方式中,所述至少一种NPC包括甲基丙烯酸二甲氨基乙酯(DMAEMA)、丙基丙烯酸(PAA)、甲基丙烯酸丁酯(BMA)中的至少一种。在一个实施方式中,所述至少一种NPC包含聚(甲基丙烯酸二甲氨基乙酯)-b-聚(甲基丙烯酸二甲氨基乙酯-共-丙基丙烯酸-共-甲基丙烯酸丁酯)(pDMAEMA-b-p(DMAEMA-共-PAA-共-BMA))。

[0029] 在一个实施方式中,基于表面微环境的特征来引发至少一种NPC进行分解,借此释放至少一种治疗剂。在一个实施方式中,当至少一种NPC 处于局部酸性pH环境中时,引发至少一种NPC分解。

[0030] 在一个实施方式中,所述至少一种治疗剂包括至少一种试剂,其选自法呢醇、芹菜素、氟化物和氯己啶。

[0031] 在一个实施方式中,至少一种NPC包括将至少一种治疗剂连接至至少一种NPC的一部分的可降解键。

[0032] 在一个实施方式中,口腔疾病选自牙斑、龋齿、齿龈炎、牙周炎、义齿性口炎和口腔念珠菌病。在一个实施方式中,所述受试者是哺乳动物。在一个实施方式中,所述哺乳动物选自人、灵长类、牛、猪、马、绵羊、猫和狗。

附图说明

[0033] 当结合附图阅读时,将更好地理解本发明优选实施方式的下列详细说明。出于说明本发明的目的,在附图中显示了本发明优选的实施方式。然而,应理解本发明不限于附图中所示实施方式的精确布置和手段。

[0034] 图1是显示生龋生物膜内酸性小生境(niches)的图像。暗区域表示低pH区域(虚线框),而白色或亮区域指示接近中性pH的区域。因此,生物膜微环境是强酸性的。

[0035] 图2,包括图2A和图2B,是显示pH响应性NPC的组成、结构和功能的一组图像。图2A显示NPC组成:聚(甲基丙烯酸二甲氨基乙酯)-b-聚(甲基丙烯酸二甲氨基乙酯-共-丙基丙烯酸-共-甲基丙烯酸丁酯)(pDMAEMA-b-p(DMAEMA-共-PAA-共-BMA))。图2B显示NPC的pH依赖性结构。在生理学pH下,外部成分(黑色)质子化,并设计对薄膜具有高亲合力。内部成分(蓝色)设计在生理学pH是几乎电中性的,但通过包含BMA是疏水性的。在较低的pH环境,内部成分更加质子化,从而将NPC分解并从纳米颗粒核释放(一种或多种)药物。

[0036] 图3,包含图3A至图3C,是显示NPC有效结合至唾液薄膜和EPS-基质的一组图像。图3A显示NPC结合至薄膜。图3B显示NPC结合至通过表面吸附的GtfB原位形成的EPS。图3C显示将NPC引入至生物膜基质。在SHA圆盘表面上形成的22h大的变形链球菌(*S.mutans*)生物膜的代表性图像。

[0037] 图4是显示表明法呢醇随时间和作为pH函数从NPC控制释放的实验结果的图。显示了具有6个可降解键的一个可降解链长度的释放比率,误差线为标准偏差(n=5)。

[0038] 图5是显示通过NPC的药物原位持续和控制释放的建议模型的图示。

[0039] 图6,包括图6A和图6B,是显示评价NPC递送的试剂的效果的试验设计的一组示例性时间线(timeline)。图6A显示了研究对初始生物膜组装和对生物膜的进一步积累的作用的试验设计。图6B显示了研究对预形成的生物膜的去组装或防止累积的作用的试验设计。

[0040] 图7,包括图7A至图7D,显示了NPC的结构和功能,以及在实验中使用的聚合物的性质。图7A:显示了二嵌段共聚物的化学性质和自组装。如所说明的,通过2步RAFT聚合反应合成了阳离子和pH响应性的约20kDa的二嵌段共聚物(其中第1和第2嵌段分子量相等并且PDI为1.1),并通过超声在水溶液中自组装成胶束基NPC。图7B:用于分离结合至牙齿表面所需的物理化学特性的对照聚合物的结构。图7C:在结合实验中使用的所有聚合物和胶束基纳米颗粒的表征。 M_n 为数均分子量, PDI是分子量多分散指数, DP是聚合度,尺寸PDI是胶束直径的多分散性,并且 ζ 是胶束的 ζ -电位。NA=不适用(无胶束结构),并且ND=未检出。图7D: pH响应性NPC用于预防和/或治疗生物膜的建议作用方式。

[0041] 图8,包括图8A至图8G,显示了实验结果,实验结果表明了对模拟牙齿表面的结合的特征。图8A:对聚合物结合至模拟牙齿表面的表征。结合实验在1 μ M进行。误差线代表SEM(n=3),星号表示p<0.01的显著性差异。图8B:85 μ M时,聚合物结合的共聚焦图像(比例尺

(scale bars), 20 μ m)。图8C:聚合物覆盖的表面积百分比。与具有p(DMAEMA)冠(corona)的纳米颗粒和单独的p(DMAEMA)相比,具有PEG冠的纳米颗粒吸附的程度要低得多。图8D:在提高的聚合物浓度下NPC的平衡结合谱。实线和虚线代表对吸附数据的郎格缪尔拟合(Langmuir fit)。图8E:作为pH的函数,NPC和p(DMAEMA)对羟基磷灰石(HA)结合的倍数提高。p(DMAEMA)和NPC对HA的结合是相似的,然而在两者条件改变时,吸附随pH降低而提高($R^2>0$),如通过双尾学生t检验所评价的($p<0.01$)。图8F:在一定范围的pH值下,作为 ζ 电位的函数,NPC结合的倍数提高。通过改变NPC溶液的pH来改变结合和 ζ 电位,如图所示。实线表示皮尔逊相关性,外部和内部虚线表示95%置信度时皮尔逊相关性的置信区间。图8G:定义结合能力($b_{\max}$)和亲和力(K_a)的郎格缪尔拟合参数。根据图8D中提供的数据计算郎格缪尔参数($R^2>0.98$)。

[0042] 图9,包括图9A至图9E,显示了研究药物加载、pH-引发的释放和加载法呢醇的NPC的抗菌活性的实验结果。图9A:显示加载后NPC尺寸增加的透射电子显微镜(TEM)图像;对照(未加载,i)和以17.5wt%加载(ii)。图9B:pH 7.2和4.5时的法呢醇释放谱,包括法呢醇释放速率(插图)。实线和虚线显示了对一级药物释放的拟合($R^2>0.98$)以及通过拟合的一阶导数(first derivative)确定的释放速率(插图)。图9C:根据一级释放的拟合确定的释放动力学参数。pH 4.5时的初始释放速率(图9B. 插图, r_0)、释放速率常数(k_{obs})和释放半衰期($t_{1/2}$)表明pH 4.5时比pH 7.2时的释放快2倍。图9D:pH 7.2时,加载的NPC的抗菌活性。图9E:用加载的NPC处理后,低pH(4.5)对细菌存活的影响。暴露于加载的NPC 1h后,观察到细菌存活力 $\sim 3\log$ 的减少。在pH 7.2,将细菌从生长培养基转移到PBS后,观察到随时间延长,对细菌存活无进一步的影响,而在pH 4.5,在处理组和对照组中显示存活力随时间减少。误差线代表标准误差,对于释放实验($n=3$),对于抗菌活性实验($n=4$)。星号表示 $p<0.01$ 时的显著性差异,如通过双向方差分析(two-way ANOVA),然后通过Tukey检验进行多重比较所确定的。

[0043] 图10,包括图10A至图10C,显示了实验结果,这些实验结果表明通过NPC递送的法呢醇的抗生物膜作用。图10A:用于模拟每天2-3次治疗的临床相关方案的治疗方案。与对照相比,在用加载了法呢醇的NPC(18.5wt%)处理的生物膜中实现了单位干重菌落形成单位数目减少50%(图10B)和在剪切应力下生物膜除去提高2倍(图10C)。误差线代表标准误差,并且星号表示显著性差异,如通过双向方差分析,随后通过Tukey检验进行多重比较所评价的($n=4, p<0.01$)。

[0044] 图11显示了实验结果,这些实验结果表明了NPC的临界胶束浓度(CMC)。将一定范围的NPC浓度与PRODAN[®]一起培育,并将疏水相/亲水相中的荧光发射比相对于log(胶束浓度)作图。将CMC确定为发射比开始随聚合物浓度而增加时的浓度。误差线代表测量的标准误差($n=3$)。

[0045] 图12显示了确认gsHA形成的实验结果。用于结合实验的sHA表面上的葡聚糖组装体的共聚焦图像(比例尺,20 μ m)。如其它处所描述的,通过在存在AlexaFluor[®]647标记的右旋糖酐的情况下(Ex/Em : 647nm/668nm),通过将sHA珠用纯化的葡糖基转移酶B(GtfB)和蔗糖一起培育而形成gsHA表面。

[0046] 图13,包括图13A至图13B,显示了研究NPC加载一定范围的药物浓度的实验结果。通过法呢醇乳液的浊度($n=2$)测量并通过HPLC确认($n=1$)的NPC的加载容量(图13A)和加

载效率(图13B)。

[0047] 图14显示了实验结果,这些实验结果表明随着pH升高,NPC表面电荷减少。在一定范围的pH(3.4-10.5)下,在PBS中,通过DLS测量了NPC的 ζ 电位。误差线代表标准偏差($n=5$)。实线表示皮尔逊相关性,外部和内部虚线表示95%置信度时皮尔逊相关性的置信区间。

[0048] 图15显示了实验结果,这些实验结果表明一旦加载,观察到NPC尺寸增加。以一定范围的药物浓度(0.2-1.5mg/ml)加载后,通过动态光散射(DLS)检验NPC尺寸。对两个独立的聚合物批次进行测量,实验重复三次($n=2$)。

具体实施方式

[0049] 本发明一般地涉及抑制生物膜形成的组合物和方法。在一个实施方式中,本发明用于治疗 and/或预防生物膜和由生物膜所引起的感染性疾病。在一个实施方式中,本发明对于治疗 and/或预防受试者口中的生物膜是有用的。因此,本发明对于多种口腔疾病的治疗 and/或预防是有用的,其包括(但不限于)龋齿、牙龈炎、牙周病和生物膜相关的粘膜感染,包括(例如)义齿性口炎(denture stomatitis)和口腔念珠菌病。本发明不局限于医学背景中生物膜的治疗或预防,而且还涵盖了环境、商业和工业背景中生物膜的处理或防止。

[0050] 在一个实施方式中,本发明提供了抑制生物膜形成的组合物。在一个实施方式中,所述组合物抑制生物膜的进一步积累。在一个实施方式中,所述组合物促进已有生物膜的破坏或分解。在一个实施方式中,促进已有生物膜的破坏或分解使机械生物膜破坏更容易。在一个实施方式中,所述组合物减弱已有的生物膜,从而使机械生物膜破坏更容易。在一个实施方式中,所述组合物抑制生物膜的形成和进一步积累。

[0051] 在一个实施方式中,所述组合物包含纳米颗粒载体(NPC)和至少一种治疗剂。NPC能够结合至生物膜和结合至有生物膜形成和积累风险的位点,借此提供至少一种治疗剂的持续药物递送。因此,NPC在生物膜形成位点提供靶向药物递送。

[0052] 本发明部分基于以下发现:NPC能够密切结合至至少3种临床相关位点:1)薄膜(唾液薄膜, pellicle),覆盖牙齿和粘膜表面的唾液膜,2)在薄膜上形成的胞外多糖(EPS),其提高了细菌附着和有害细菌(例如,变形链球菌(*S.mutans*))的局部积累和3)生物膜内的EPS富集基质。因此,NPC起到(治疗剂)归航装置(归巢装置, homing device)的作用,其附着在生物膜形成和积累的“危险”位点和生物膜内。

[0053] 因此,NPC有助于局部保留治疗剂,并且当引发用于治疗剂释放时,直接在生物膜起始和积累位点上提供治疗剂的受控的、提高的并且持续的药物递送,借此来防止生物膜形成。此外,NPC还携带治疗剂并将治疗剂保留在生物膜内,借此抑制进一步的生物膜积累并促进已有生物膜的破坏。因此,NPC提供了可以抑制生物膜的初始组装和进一步积累两者并促进已有生物膜的破坏和分解的靶标药物递送。

[0054] 在一个实施方式中,所述至少一种治疗剂包括抗生物膜剂(抗生物膜试剂, anti-biofilm agent)。所述治疗剂包括任何天然存在的、合成的、无机的、有机的肽、酶、核酸小分子等,其在治疗和/或预防生物膜中具有至少一些活性。在某些实施方式中,所述治疗剂包括芹菜素、法呢醇、它们的衍生物及其组合。在另一个实施方式中,所述至少一种治疗剂包括抗菌剂,其包括(但不限于)氯己啶。在另一个实施方式中,所述至少一种治疗剂包括氟化物。本文表明NPC中可以加载治疗有效量的抗生物膜治疗剂。NPC还保证了加载的治疗剂

的可控释放。

[0055] 在一个实施方式中,NPC保留所述至少一种治疗剂,直至将其引发以释放所述至少一种治疗剂。这使得只有在最需要它的时候和最需要它的位置处释放所述至少一种治疗剂,借此避免浪费试剂。

[0056] 在一个实施方式中,所述NPC是pH激活的,其中以依赖于局部环境 pH的速率释放所述至少一种治疗剂。在某些实施方式中,当NPC处于pH 偏离正常生理学pH范围的局部环境内时释放所述治疗剂。例如,在一个实施方式中,仅当局部pH变为酸性时释放治疗剂。例如,在某些实施方式中,在非病理(还称为生理学)状况下存在的中性pH不释放或最低限度释放试剂,但是准确地当需要释放时,在酸性pH释放速率提高。因此,当不需要它们时,不会浪费试剂或没有过度暴露试剂的风险。

[0057] 本发明还提供了治疗和/或预防生物膜和与生物膜形成有关的疾病的方法。在一个实施方式中,所述方法包括向受试者施用有效量的组合物,所述组合物包含NPC和至少一种治疗剂。

[0058] 在一个实施方式中,本发明所述的方法通过减少受试者薄膜覆盖的牙齿上生龋生物膜的量或预防生龋生物膜的形成来治疗和/或预防龋齿。所述方法在生物膜内和向生物膜形成和积累的危险位点提供有效、持续和局部的治疗剂递送。

[0059] 定义

[0060] 除非另外定义,本文所使用的所有技术和科学名词的含义与本发明所属领域中技术人员通常理解的含义相同。尽管可以在本发明的实践或测试中使用与本文所述的那些类似或等价的任何方法和材料,但是描述了优选的方法和材料。

[0061] 如本文所使用的,下列术语中的每一个具有在本部分中与之相关的含义。

[0062] 在本文中,使用冠词“一个”和“一种”表示一个或多于一个(即,至少一个)语法上的制品对象。举例来说,“一个元素”表示一个元素或多于一个元素。

[0063] 如本文所使用的,当表示可测量的值,如量、瞬间持续时间等时,“约”表示涵盖了指定值的 $\pm 20\%$ 或 $\pm 10\%$,更优选地 $\pm 5\%$,甚至更优选地 $\pm 1\%$,并且还更优选地 $\pm 0.1\%$ 的改变,这是因为这些变化适合实施所公开的方法。

[0064] 如本文所使用的术语“生物膜”是指显示出多室特性的任何三维、基质包裹的微生物群落。因此,如本文所使用的,术语生物膜包括表面相关的生物膜和悬浮生物膜,如絮凝物(flocs)和颗粒。生物膜可以包括单一微生物物种或者可以是混合物种复合物,并且可以包括细菌以及真菌、藻类、原生动物或其它微生物。

[0065] 如本文所使用的,“疾病”是其中动物不能维持体内平衡(稳态)并且其中如果疾病不能得到改善,那么动物的健康持续变差的动物健康状况。

[0066] 如本文所使用的,在动物中“病症”是其中动物能够维持体内平衡,但是其中动物的健康状况不如没有病症时的好的健康状况。保持不治疗时,病症并不必然导致动物健康状况的进一步降低。

[0067] 如本文对于本发明所述的组合物所使用的,“生物活性的”是指相比于未治疗的哺乳动物,所述组合物在哺乳动物中引起可以监控和鉴别的生物反应。

[0068] 如本文所使用的,术语“治疗”表示改善疾病或病症的影响,或者延缓、终止或逆转疾病或病症的发展。该词语涵盖了减轻疾病或病症症状的严重程度和/或降低疾病或病症

症状的频率。

[0069] 如本文所使用的,术语“防止”或“预防”表示如果未发生,则无病症或疾病发展,或者如果已有病症或疾病发展,则病症或疾病不进一步发展。还被考虑在内的是预防与病症或疾病有关的一些或全部症状的能力。疾病和病症在本文中是可互换使用的。

[0070] 如本文所使用的,术语“医学干预”是指改善受试者的疾病或病症的影响,或者延缓、终止或逆转受试者的疾病或病症所需的一组一个或多个医学程序或处理。根据所讨论的疾病或病症,医学干预可以包括或不包括手术程序。可以由专业医学人员完全或部分进行医学干预,或者如果能够,可以在专业医学人员的指导下或者根据专业医学人员提供的文献或规程由受试者本人完全或部分进行医学干预。

[0071] 如本文所使用的,术语“有效量”或“治疗有效量”或“药物有效量”的组合物可互换地用于表示足以向施用所述组合物的受试者提供有益效果的组合物的量。如本文所使用的,术语“治疗”表示降低患者或受试者所经受的症状的频率或者施用组合物以减轻所经受的症状的严重程度。本领域的技术人员可以通过使用常规实验方法确定任何单个病例中适当的治疗量。

[0072] 如本文所使用的,术语“特异性结合”或“特异性地结合”是指第一分子(例如,抗体)优选地结合至第二分子(例如,特定抗原表位),但未必仅结合至第二分子。

[0073] 如本文所使用的,“预防性”或“防止性”治疗是出于降低发展与疾病或病症有关的病理的风险的目的,施用于未显示出疾病或病症的病征或仅显示出疾病或病症的早期病征的受试者的治疗。

[0074] 如本文所使用的,“治疗性”治疗是出于减轻或消除病症的目的,施用于显示出疾病或病症的病理的病征的受试者的治疗。

[0075] 如本文所使用的,所述术语“薄膜”或“牙薄膜”是指在牙齿表面釉质上形成的薄蛋白质薄膜。在某些情况下,口腔内不同种的细菌可以在薄膜上形成生物膜,在一些情况下,所述生物膜会导致龋齿及其它口腔疾病。

[0076] 如本文所使用,术语“药物可用的(药学上可接受的)”是指材料(如载体或稀释剂),其不破坏化合物的生物活性或性质,并且是相对无毒的,即所述材料可以施用至个体而不引起不期望的生物作用或不以有害的方式与包含它的组合物的任何组分相互作用。

[0077] 如本文所使用的,术语“药物可用的载体”是指药物可用的材料、组合物或载体,如液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂、溶剂或包封材料,其参与在受试者中携带或输送本发明的化合物或将本发明的化合物携带或输送至受试者,从而使其可以发挥它的预定功能。通常,将这些化合物从身体的一种器官或一部分携带或输送至身体的另一器官或一部分。在与制剂的另一种成分相容的意义上,每种载体必须是“可用的(可接受的)”并且对患者是无害的。可以用作药物可用的载体的材料的一些实例包括:糖,如乳糖、葡萄糖和蔗糖;淀粉,如玉米淀粉和马铃薯淀粉;纤维素及其衍生物,如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和乙酸纤维素;粉末状黄蓍胶;麦芽;明胶;滑石;赋形剂,如可可脂和栓剂蜡(suppository waxes);油剂,如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和豆油;二醇类,如丙二醇;多元醇,如丙三醇、山梨糖醇、甘露醇和聚乙二醇;酯类,如油酸乙酯和月桂酸乙酯;琼脂;缓冲剂,如氢氧化镁和氢氧化铝;海藻酸;无热原水;等渗盐水;林格氏溶液;乙醇;磷酸盐缓冲液;和药物制剂中使用的其它无毒的相容物质。如本文所使用,“药物可用的载体”还

包括与所述化合物的活性相容并且对受试者是生理学可用的任何和所有的涂层、抗菌剂、抗真菌剂以及吸收延迟剂等。还可将补充活性化合物加入所述组合物中。

[0078] 如本文所使用的,语言“药物可用的盐”是指由药物可用的无毒酸制备的施用化合物的盐,所述酸包括无机酸、有机酸、溶剂化物、水合物及其包合物(cathrates)。

[0079] 如本文所使用的,术语“聚合物”是指由通常通过共价化学键连接的重复结构单元组成的分子。术语“聚合物”还表示包括术语共聚物和低聚物。在一个实施方式中,聚合物包含主链(即定义聚合物中心链的化学连接性,其包括多个聚合物单体单元中的化学键)和侧链(即延伸出主链的化学连接性)。

[0080] 如本文所使用的,术语“受试者”是指可以具有生物膜相关病症或者具有发展生物膜相关病症风险,但是可能具有或可能不具有生物膜相关病症或者发展生物膜相关病症风险的人或另一种哺乳动物(例如,灵长类、狗、猫、山羊、马、猪、小鼠、大鼠、兔等)。在本发明的多个实施方式中,所述受试者是人。在这些实施方式中,通常将所述受试者称为“个体”或“患者”。术语“个体”和“患者”不表示特定的年龄。

[0081] 范围:在本发明公开中,本发明的多个方面可以以范围形式存在。应理解以范围形式进行说明仅是为了方便和简洁,并不应将其视作对本发明范围刻板的限制。因此,范围的说明应认为具有具体公开的所有可能的子范围以及该范围内的单个数值。例如,范围的说明(如1至6)应认为具有具体公开的子范围,如1至3、1至4、1至5、2至4、2至6、3至6等,以及该范围内的单个数值,例如,1、2、2.7、3、4、5、5.3和6。不考虑范围的宽度,这都是适用的。

[0082] 描述

[0083] 本发明提供了抑制生物膜形成的组合物和方法。在某些实施方式中,本发明用于治疗/或预防生物膜和由生物膜所引起的感染性疾病。已知生物膜参与全身多种感染。其中涉及生物膜并因此本发明对其治疗有用的病症包括(但不限于)牙斑、龋齿、牙龈炎、尿路感染、导管感染、中耳感染和植入生物材料(例如,人造关节、人工瓣膜等)感染。

[0084] 本发明不局限于体内或医学背景中生物膜的治疗或预防。在本领域中已知生物膜可以在多种表面上形成,其可以引起多种有害问题。例如,在厨房或浴室表面中生物膜形成可以引起许多卫生问题。另外,在海洋工程系统或船舶上生物膜形成可以导致腐蚀和生物污染。因此,本发明涵盖了可以在环境、商业、工业或其它背景中发生的生物膜的治疗或预防。

[0085] 在一个实施方式中,本发明提供了抑制生物膜形成的组合物。在一个实施方式中,所述组合物抑制生物膜的积累。在一个实施方式中,所述组合物促进已有生物膜的破坏或分解。在一个实施方式中,所述组合物包含至少一种纳米颗粒载体(NPC)和加载到至少一种NPC中的至少一种治疗剂。在一个实施方式中,NPC提供了至少一种治疗剂的局部和持续药物递送。本发明部分基于以下意外的发现:由聚合物基阳离子胶束组成的NPC结合至与生物膜形成和发展有关的所有表面,包括薄膜、沿薄膜形成的胞外多糖(exopolysaccharides)(EPS)(有危险的靶标表面),并且结合至生物膜内EPS富集基质(靶标生物膜微环境)。因此,NPC特异性靶向有生物膜形成(唾液覆盖表面,例如薄膜)和积累(EPS覆盖表面)危险的区域,以及生物膜(基质)内的区域(基质)。还发现NPC能够加载治疗有效量的治疗剂,并因此可以用于将临床相关剂量的治疗剂有效递送至需要的区域。另外,由于NPC仍结合至这些区域,因此NPC通过将治疗剂保留在那些位点来起到归航装置

(homing device)的作用,从而使得能够进行持续、受控和局部的药物递送,这是常规疗法中非常缺乏的特征。由于在口腔内这些临床相关位点缺少对药物的保留,因此基于局部施用的常规治疗方法通常是有缺陷的。由于在应用后,治疗剂在治疗位点良好保留,因此本发明的组合物克服了该限制。

[0086] 在一个实施方式中,NPC保留所述至少一种治疗剂,直至将其引发以释放所述至少一种治疗剂。这使得只有在最需要它的时候和最需要它的位置处释放所述至少一种治疗剂,借此避免浪费试剂。例如,可以通过微环境中的多种因素来引发NPC以释放至少一种治疗剂,所述多种因素包括(但不限于)温度、pH、生物分子识别等。

[0087] 在一个实施方式中,所述NPC是pH激活的,其中以依赖于局部环境 pH的速率释放所述至少一种治疗剂。在某些实施方式中,当NPC处于pH 偏离正常生理学pH范围的局部环境内时释放所述治疗剂。例如,在一个实施方式中,当局部pH为酸性时释放治疗剂。本发明部分基于在NPC内包含pH响应性成分。照此,基于局部环境的pH,本发明所述组合物提供了治疗剂的可控释放,借此使得治疗剂在其最需要时确切可用。例如,在某些条件下,生物膜内酸性生境的发展是导致口腔疾病(如龋齿)所必需的,这是因为:1) 该生境有利于导致龋齿和产酸生物的生长,2) 该生境引起进一步的生物膜积累,和3) 局部酸性导致牙齿的酸溶解。在(非患病情况中的)生理学pH下,NPC内的试剂最低限度释放。因此,在这些病理学状况下,如果局部环境变为酸性并且当局部环境变为酸性时,当最需要它们时,NPC特异地释放包埋治疗剂是有利的。在某些实施方式中,酸性局部环境中的特异性释放是有益的,这是因为治疗剂在这些条件下最具有活性。例如,在低pH,法呢醇对细菌的影响提高,并且在酸性pH,氟化物使牙齿再矿化以及影响细菌生长的能力显著提高。在一个实施方式中,pH依赖性药物递送速率取决于具体的NPC组成。照此,本发明涵盖了多种NPC组成,调节所述NPC组成以用于在特定pH下的特定释放速率。例如,在一个实施方式中,本发明的NPC包含至少一种可降解链和/或至少一种可降解键,其中所述可降解链和键的具体数目决定了NPC的 pH依赖性释放速率。

[0088] 由于NPC保持结合至有生物膜形成风险的区域,因此NPC通过保留生物活性试剂,当引发时使得能够在生物膜起始的位点直接进行持续、控制和局部药物递送而用作归航装置。NPC还携带生物活性剂并将生物活性剂保留在生物膜内,借此抑制进一步的生物膜积累并促进已有生物膜的破坏或去组装。此外,根据局部环境的pH,NPC提供了治疗剂的可控释放。

[0089] 在一个实施方式中,NPC包含至少一种治疗剂。本发明不限于任何特定的治疗剂,而是涵盖可以包埋在所述NPC内的任何适合的治疗剂。示例性治疗剂包括(但不限于)抗病毒剂、抗菌剂、抗生物膜剂、化疗剂、抗炎剂、防腐剂、麻醉剂、止痛剂、药物试剂、小分子、肽、核酸等。在一个实施方式中,所述治疗剂包括抗生物膜剂,其包括(但不限于)芹菜素及其衍生物;黄酮类(类黄酮),包括黄酮、黄酮醇、黄烷酮醇、二氢黄酮及其衍生物;法呢醇及其衍生物;萜类化合物,包括萜烯、萜品醇、二萜酸、二萜、三萜及其衍生物;生物膜降解酶,包括非水溶性葡聚糖酶(变异酶、变聚糖酶,mutanase)、葡聚糖酶和淀粉转葡萄糖苷酶(淀粉葡萄糖苷酶,amylglucosidase)-葡萄糖氧化酶;和EPS-合成酶抑制剂,包括玫瑰红(孟加拉红,Rose Bengal)、过硼酸盐、偏高碘酸盐(meta-periodate)、山梨糖醇、木糖醇、1-脱氧野尻霉素(1-deoxynojirimycin)、黄酮类、多酚、原花青素、丹宁和香豆素。

[0090] 在另一个实施方式中,所述至少一种治疗剂包括抗菌剂,其包括(但不限于)氯己啶及其衍生物,二双胍(bisbiguanides)类抑制剂成员、聚维酮碘、过氧化氢、多西环素、米诺环素、克林霉素、多西环素、甲硝唑、精油提取物(薄荷醇、麝香草酚、桉树脑、水杨酸甲酯、金属盐(锌、铜、锡离子)、苯酚(三氯生)、所有季铵化合物(氯化十六烷吡啶)、表面活性剂(月桂基硫酸钠、地莫匹醇)、所有天然分子(苯酚、酚酸、苯醌、生物碱、凝集素、肽、多肽、吡啶衍生物、flustramine衍生物、carolacton、卤化呋喃酮、乳清群海绵定(oroidin)类似物、agelasine、ageloxime D)。

[0091] 在另一个实施方式中,所述至少一种治疗剂包括氟化物。可以作为其制剂中的任一种包含氟化物,所述氟化物包括(但不限于)氟化钠、单氟磷酸盐及其衍生物和氟化亚锡。

[0092] 在一个实施方式中,所述组合物包含多种不同的NPC,其中所述不同的NPC中的每一个包含不同的治疗剂。例如,在一个实施方式中,所述组合物包含含有抗生物膜剂的第一NPC,和含有氟化物的第二NPC。在另一个实施方式中,所述组合物包含含有抗生物膜剂的第一NPC,含有广谱抗生素的第二NPC和含有氟化物的第三NPC。可以将不同的NPC中的每一个配置用于不同的药物递送特性,借此使得不同的治疗剂能够根据具体病症或治疗的需要在不同时间递送。

[0093] 在某些实施方式中,本发明所述的组合物是溶液、泡沫、糊剂、凝胶、胶浆(粘胶、树胶,gum)、可溶基质、片剂、锭剂等,可以向它们引入本发明的NPC。例如,所述组合物可以是允许将其应用到具有生物膜或具有发展生物膜风险的表面上的任何形式。在牙齿应用中,所述组合物可以是允许将其应用至受试者的薄膜或牙齿的任何形式。

[0094] 本发明还提供了治疗和/或预防生物膜和与生物膜形成有关的疾病的方法。在一个实施方式中,所述方法包括向受试者施用有效量的组合物,所述组合物包含NPC和至少一种治疗剂。如本文其它处所讨论的,本发明所述的组合物在生物膜基质内,在生物膜形成位点,在生物膜积累位点和/或在有生物膜形成和/或积累风险的位点特异地提供了至少一种治疗剂的局部持续递送。由于本发明所述的组合物结合至生物膜和有生物膜形成和积累风险的位点,本发明所述的方法不需要频繁应用所述组合物。因此,在一个实施方式中,所述方法包括单次应用有效量的包含NPC和至少一种治疗剂的组合物。

[0095] 在一个实施方式中,本发明包括通过减少沿受试者牙齿薄膜的生龋生物膜的量,预防所述生物膜的形成或预防所述生物膜的积累来治疗和预防龋齿的方法。所述方法在生物膜内,向生物膜形成和/或积累位点或向有生物膜形成和/或积累风险的位点提供治疗剂的有效、持续和局部递送。在一个实施方式中,所述方法提供了治疗剂从NPC中pH依赖性的释放。生龋生物膜的形成包括生物膜内酸性小生境的发展。因此,在一个实施方式中,所述方法包括如果局部环境变为酸性并且当局部环境变为酸性时,确切地当最需要治疗剂时,从NPC特异性递送治疗剂。

[0096] 在一个实施方式中,通过本发明所述的方法递送的治疗剂包括芹菜素、法呢醇、氯己啶、氟化物及其组合。然而,所述方法不限于任何具体的试剂。例如,本发明方法允许包含使用常规方式不能递送的某些治疗剂。在某些实施方式中,所述(一种或多种)治疗剂包埋或包封在NPC内。本文表明NPC显示出加载治疗有效量的治疗剂的能力。治疗剂的局部和有条件的释放使得所述方法能够包括苛刻治疗剂的递送,如果不在特定位点和条件下递送,则所述治疗剂将对受试者是有害的。例如,广谱抗生素对口腔的常规应用可以对受试者是

有害的,这是因为抗生素将破坏口腔内的所有细菌种,而实际上其中一些细菌种对受试者的健康是有益的。然而,当引发时,如通过本发明所述的方法实现的,局部和递送的递送使得能够递送相同试剂,这是因为仅靶向与病理(例如,生物膜、龋齿等)有关的细菌种,而不伤害位于口腔其它处的有益菌种。

[0097] 组合物

[0098] 本发明提供了包含纳米颗粒载体(NPC)的组合物,当引发时,所述组合物提供持续并且提高的局部药物递送。所述NPC是与靶标表面相互作用的聚合物基胶束组装体。如本文其它处所讨论的,本发明的NPC在生物膜内结合并且结合至有生物膜形成和积累风险的区域。在一个实施方式中,所述NPC是pH响应性的,在此包埋的治疗剂以依赖于局部pH的速率递送。在优选的实施方式中,所述NPC包含甲基丙烯酸二甲氨基乙酯(DMAEMA)、丙基丙烯酸(PAA)、甲基丙烯酸丁酯(BMA)或其共聚物。在美国专利申请公开No.US2011/0123636中描述了NPC的示例性组合物,该专利申请作为参考并入本文。

[0099] 在一个实施方式中,所述组合物包含含有至少一种治疗剂的NPC。例如,在一个实施方式中,所述NPC包含至少一种抗生物膜剂。

[0100] 在一个实施方式中,所述至少一种治疗剂在NPC内通过键和/或链结合。在一个实施方式中,当引发时,所述链是可降解的,其使得能够从NPC中将治疗剂释放至靶标组织。链的长度和个数决定治疗剂的释放速率,如Benoit等人,2007,Adv Funct Mater,17(13):2085-2093和Benoit等人,2006,Biomaterials,27(36):6102-6110中所述,以上每篇文献作为参考并入本文。

[0101] 在一个实施方式中,所述组合物包含多种不同的NPC,其中每个不同的NPC包含不同的治疗剂,借此使得能够局部和受控递送多种治疗剂。

[0102] NPC结构

[0103] 在本文一些实施方式中提供了包含多种嵌段共聚物的NPC。在某些实施方式中,所述NPC包含核和壳。

[0104] 在具体的实施方式中,本文所述的嵌段共聚物的核嵌段是pH依赖性疏水物。在某些实施方式中,壳嵌段是亲水的。在具体的实施方式中,壳嵌段在约中性pH是亲水的。

[0105] 在一些实施方式中,嵌段共聚物包含(i)多种疏水性单体残基,(ii)具有可带电物质的多种阴离子单体残基,所述可带电物质在生理学pH是阴离子,并且在酸性pH是基本中性的或不带电的和(iii)任选地多种阳离子单体残基。在这些实施方式的一些中,在生理学pH下嵌段共聚物中阴离子:阳离子物质的比值在约4:1至约1:4的范围内。在这些实施方式的一些中,嵌段共聚物的疏水性嵌段中阴离子与阳离子物质的比值的改变使得能够改变本文所述的NPC的活性。在这些实施方式的一些中,在生理学pH下本文所述的嵌段共聚物的疏水性嵌段中阴离子:阳离子物质的比值在约1:2至约3:1或约1:1至约2:1的范围内。

[0106] 在某些实施方式中,本文所提供的NPC中存在的嵌段共聚物包含核部分(例如,核嵌段),所述核部分包含多种疏水基团。在更具体的实施方式中,所述核部分(例如,核嵌段)包含多种疏水基团和多种第一可带电物质或基团。在更具体的实施方式中,这些第一可带电物质或基团为带负电荷的和/或为可充电为带负电荷的物质或基团(例如,在约中性pH,或约7.4的pH)。在一些具体的实施方式中,所述核部分(例如,核嵌段)包含多种疏水基团,多种第一可带电物质或基团和多种第二可带电物质或基团。在更具体的实施方式中,所述

第一可带电物质或基团为带负电荷的和/或可充电为带负电荷的物质或基团,并且所述第二可带电物质或基团为带正电荷的和/或可充电为带正电荷的物质或基团(例如,在约中性pH或约7.4的pH)。

[0107] 在某些实施方式中,NPC的壳和/或本文所述的嵌段共聚物的壳嵌段还包含可带电物质或基团。在一些实施方式中,本文所提供的NPC中存在的一种或多种嵌段共聚物具有包含多种可带阳离子电荷的物质或基团的壳部分。基于NPC周围媒介中电解质的浓度(例如,基于pH),这些可带阳离子电荷的物质处于带阳离子电荷或处于非带电状态。

[0108] 在某些实施方式中,本文所提供的NPC在约5的pH下具有净阳离子电荷。在一些实施方式中,本文所提供的NPC在约中性pH下具有净中性电荷。在某些实施方式中,本文所述的NPC在约中性pH(例如,在约7.4的pH)具有净阳离子电荷。在一些实施方式中,本文所述的NPC在约5的pH比约7的pH具有更多的净阳离子电荷。在其它或替代实施方式中,本文所提供的NPC具有在约5的pH比约7的pH更多的标称电荷(或电荷绝对值)。

[0109] 在某些实施方式中,本文提供了NPC,其中在约6及更高、约6.5及更高、约7及更高、约6至约14或更大;约6至约10或更大;约6至约9.5或更大;约6至约9或更大;约6至约8.5或更大;约6至约8或更大;约6.5至约14或更大;约6.5至约10或更大;约6.5至约9.5或更大;约6.5至约9或更大;约6.5至约8.5或更大;约7至约14或更大;约7至约10或更大;约7至约9.5或更大;约7至约9或更大;约7至约8.5或更大;约6.2至约7.5或更大;6.2至7.5;或约7.2至约7.4的pH范围内,NPC的形式为胶束、类胶束(pseudo-micelle)或胶束样结构。在某些实施方式中,在约7或更低的pH;约6.8或更低的pH;约6.5或更低的pH;约6.2或更低的pH;约6或更低的pH;约5.8或更低的pH;约5.7或更低的pH,本文所提供的NPC胶束、类胶束或胶束样结构基本或至少部分破坏或解离。在具体的实施方式中,在约6.2至7.5的pH范围内,NPC的形式是胶束。应理解如本文所使用的,NPC在至少所述的pH内具有形式并且还可以在所述pH范围外的pH具有所述形式。

[0110] 在某些实施方式中,本文所述的“嵌段共聚物”包含核部分和壳部分。如本文所讨论的,所述核部分任选地为或包含核嵌段并且所述壳部分任选地包含或为壳嵌段。在一些实施方式中,这些嵌段中的至少一种为梯度聚合物嵌段。在其它实施方式中,本文所使用的嵌段共聚物任选地被梯度聚合物(即NPC中使用的聚合物是具有核部分和壳部分的梯度聚合物)取代。

[0111] 在某些实施方式中,本发明所述的NPC包含二嵌段共聚物。例如,在一个实施方式中,所述NPC包含二嵌段聚合物,其包含 $p(\text{DMAEMA})-b-p(\text{DMAEMA}-\text{共}-\text{BMA}-\text{共}-\text{PAA})$ 。在一个实施方式中,所述壳嵌段包含 $p(\text{DMAEMA})$ 。在一个实施方式中,所述核嵌段包含 $p(\text{DMAEMA}-\text{共}-\text{BMA}-\text{共}-\text{PAA})$ 共聚物。在某些实施方式中,所述NPC为纳米颗粒。在具体的实施方式中,所述NPC为胶束。在其它实施方式中,所述NPC为尺寸约10nm至约200nm,约10nm至约100nm或约30-80nm的纳米颗粒或胶束。可以通过以下方法以任何方式确定颗粒尺寸,其包括(但不限于)凝胶渗透色谱法(GPC)、动态光散射(DLS)、电子显微镜技术(例如,TEM)及其它方法。

[0112] 在某些实施方式中,所述壳和/或壳嵌段为亲水的和/或带电的(例如,非带电的、阳离子的、多聚阳离子的、阴离子的、多聚阴离子的或两性离子的)。在某些实施方式中,所述壳和/或壳嵌段为亲水的和中性的(非带电的)。在具体的实施方式中,所述壳和/或壳嵌段包含净正电荷。在具体的实施方式中,所述壳和/或壳嵌段包含净负电荷。在具体的实施

方式中,所述壳和/或壳嵌段包含净中性电荷。在一些实施方式中,所述核和/或核嵌段是疏水性的和/或包含疏水基团、部分、单体单元、物质等。在具体的实施方式中,所述疏水核和/或核嵌段包含多种疏水基团、部分、单体单元、物质等和多种可带电物质或单体单元。在更具体的实施方式中,所述多种可充电单体单元或物质包含多种阴离子可充电单体单元或物质。在更具体的实施方式中,所述多种可充电单体单元或物质包含多种阳离子可充电单体单元或物质。在更具体的实施方式中,所述多种可充电单体单元或物质包含多种阳离子和多种阴离子可充电单体单元或物质。在一些实施方式中,嵌段共聚物分别具有(1)形成NPC壳的亲水、带电嵌段(例如,阴离子或多聚阴离子;或者阳离子或多聚阳离子;或者两性离子;或者非带电),(2)疏水性嵌段和(3)多种可带阴离子电荷的物质。在一些实施方式中,所述多种可带阴离子电荷的物质存在于疏水性嵌段中。在某些实施方式中,疏水核和/或核嵌段任选地包含可以包含或不包含疏水基团、可带电基团或它们的组合的间隔单体单元。在一些实施方式中,形成或存在于NPC核的聚合物嵌段(例如,共聚物的一种或多种核嵌段)是可带电的(例如,在生理学pH含有阳离子和/或阴离子物质)。在一些情况下,本文提供的NPC(例如,胶束)是由自结合的多种嵌段共聚物形成的。在某些情况下,自结合是通过嵌段共聚物的疏水性嵌段的相互作用发生的并且通过NPC核中存在的疏水性嵌段的疏水性相互作用稳定所得NPC(例如,胶束)。

[0113] 在一些实施方式中,本文提供的NPC(例如,胶束)在哺乳动物组织(例如,血清、血浆、唾液、软组织等)中保留至少2小时、至少4小时、至少6小时、至少8小时、至少12小时或至少24小时的活性(例如,NPC递送治疗剂的活性)。

[0114] 在多个实施方式中,在本文所述的NPC(例如,胶束)中使用的嵌段共聚物对本文所提供的NPC(例如,胶束)的某些方面或功能性具有影响或对其加以选择以具有影响,所述方面或功能性包括(但不限于):(1) NPC的生物物理学性质,如(通过非限制性实例)溶解度、水溶性、稳定性、水媒介中的稳定性、亲水性、亲油性(亲脂性)、疏水性等;(2) 辅助NPC制剂成为可施用形式或其它目的;(3) NPC靶向特定或所选类型细胞或生物结构的能力(例如,通过携带靶向部分);和/或(4) 提高NPC生物相容性的能力。在一些实施方式中,本文所提供的NPC的特征在于以下中的一种或多种:(1) NPC是通过嵌段共聚物的自发自结合形成的,从而一旦从水可混溶的溶剂(如(但不限于)乙醇)向水溶剂(例如,磷酸盐缓冲盐水,pH 7.4)稀释,则会形成组织化组装体(例如,胶束);(2) NPC对稀释稳定(例如,下至聚合物浓度为100 μ g/ml、50 μ g/ml、10 μ g/ml、5 μ g/ml或1 μ g/ml,其构成临界稳定浓度或临界胶束浓度(CMC));(3) NPC对周围介质的高离子强度稳定(例如,0.5M NaCl);和/或(4) 随着有机溶剂浓度提高,NPC的不稳定性提高,这些有机溶剂包括(但不限于)二甲基甲酰胺(DMF)、二甲亚砜(DMS)和二噁烷。在一些实施方式中,本文所提供的NPC的特征在于具有至少两种上述性质。在一些实施方式中,本文所提供的NPC的特征在于具有至少三种上述性质。在一些实施方式中,本文所提供的NPC的特征在于具有全部上述性质。

[0115] 在某些实施方式中,本文所提供的NPC的特征进一步或替代地在于其它标准:(1) 降低或提高单个嵌段的分子量和它们的相对长度比以控制所形成的NPC的尺寸及其相对稳定性和(2) 改变形成壳的聚合物阳离子嵌段的尺寸以提供有效的复合物形成和/或阴离子治疗剂的电荷中和。

[0116] 此外,在某些实施方式中,本文所提供的NPC将小的疏水性分子,如疏水性小分子

化合物(例如,疏水性小分子药物)选择性吸收至NPC 的疏水核。在某些实施方式中,本文所提供的NPC包含通过接头和/或链结合至NPC的一种或多种成分的治疗剂。

[0117] 嵌段共聚物

[0118] 在具体的实施方式中,本文所提供的嵌段共聚物的核嵌段包含多种第一可带电基团、物质或单体单元,和多种第二可带电物质、基团或单体单元。在某些情况下,所述第一可带电基团、物质或单体单元是带负电荷的或可带电为负电的物质、基团或单体单元。在一些情况下,所述第二可带电基团、物质或单体单元是带正电荷的或可带电为阳离子物质、基团或单体单元。在某些实施方式中,随着包含本文所述的NPC的水媒介的pH的降低,嵌段共聚物的核嵌段和NPC核更加质子化,从而导致NPC的形状和/或尺寸的破坏。

[0119] 在某些实施方式中,本文所提供的NPC包含多种膜去稳定嵌段共聚物,其以pH依赖方式使内体膜(endosomal membrane)去稳定。在多个实施方式中,当在NPC中组装和/或当独立于NPC形式存在时(例如,当胶束组装体解离和/或去稳定时),膜去稳定嵌段共聚物使膜去稳定。在一些实施方式中,在生理学pH或接近生理学pH时,构成NPC的聚合物是最低限度地膜去稳定的,但是一旦暴露于降低的pH,所述聚合物是膜去稳定的。在某些情况下,这种向膜去稳定状态的过渡是通过向所述聚合物引入的弱酸性残基的质子化发生的,这种质子化导致聚合物疏水性升高。在某些情况下,聚合物疏水性升高导致NPC构象变化,从而使NPC膜去稳定(例如,导致膜不稳定)。在一些实施方式中,本文所提供的NPC的膜去稳定的机制不依赖聚阳离子(如PEI或其它聚阳离子)的纯粹质子-海绵膜去稳定机制(purely proton-sponge membrane destabilizing mechanism)。在一些实施方式中,一起作用的两种膜破坏机制:(a) 聚阳离子(如DMAEMA)和(b)疏水化聚阴离子(如丙基丙烯酸)的组合对由聚合物提供的膜去稳定化的效力具有累加(加合,additive)或协同作用。

[0120] 在一些实施方式中,聚合物嵌段任选地选自(通过非限制实例)多核苷酸、寡核苷酸、聚乙二醇、亲水性嵌段、疏水性嵌段、带电荷嵌段等。

[0121] 在某些实施方式中,本文所述的NPC包含嵌段共聚物,其中所述嵌段共聚物是非肽和/或非脂质的。在一些实施方式中,形成NPC的嵌段共聚物的主链是非肽和/或非脂质的。在某些实施方式中,核嵌段的主链是非肽的和/或非脂质的。在一些实施方式中,壳嵌段是非肽的和/或非脂质的。如本文中所使用的,脂质是在广义上被定义为疏水性或两亲性分子的化合物大组,所述分子完全或部分来源于两种不同类型的生物化学亚单元:酮脂酰(ketoacyl)和异戊二烯基,例如,脂肪酸、甘油脂质、磷酸甘油脂质(glycerophospholipid)、鞘脂、糖脂、多聚乙酰(聚酮,polyketide)、固醇脂(sterol lipid)和孕烯醇酮脂(prenol lipid)。

[0122] 在一些实施方式中,本文提供了包含多个含有核部分(例如,核嵌段)和壳部分(例如,壳嵌段)的嵌段共聚物的NPC,其中核部分(例如,核嵌段)的数均分子量与壳部分(例如,壳嵌段)的数均分子量之比以任何合适的比值存在。在具体的实施方式中,在嵌段共聚物中,核部分(例如,核嵌段)的数均分子量与壳部分(例如,壳嵌段)的数均分子量之比以约1:10至约5:1、约1:1至约5:1、约5:4至约5:1、约1:2至约2:1、约2:1、约1.5:1、约1.1:1、约1.2:1、约1.3:1、约1.4:1、约1.6:1、约1.7:1、约1.8:1、约1.9:1或约2.1:1的比例存在。在一些实施方式中,在嵌段共聚物中,核部分(例如,核嵌段)的数均分子量与壳部分(例如,壳嵌段)的数均分子量之比以约2(或更大)比1;约1.5(或更大)比1;约1.1(或更大)比1;约

1.2 (或更大) 比1; 约1.3 (或更大) 比1; 约1.4 (或更大) 比1; 约1.6 (或更大) 比1; 约1.7 (或更大) 比1; 约1.8 (或更大) 比1; 约1.9 (或更大) 比1; 或约2.1 (或更大) 比1的比值存在。在具体的实施方式中, 核嵌段的数均分子量与壳嵌段的数均分子量之比为约2:1。

[0123] 在具体的实施方式中, 本文所提供的NPC包含至少一种类型的具有亲水性节段和疏水性节段的聚合物 (例如, 嵌段共聚物和/或单嵌段聚合物, 包括单嵌段共聚物)。在某些实施方式中, 亲水性节段是亲水性嵌段并且疏水性节段是疏水性嵌段。在一些实施方式中, 这些聚合物是非肽的。在其他实施方式中, 亲水性节段和疏水性节段是单嵌段梯度共聚物的不同区域。在不同的情况下, “聚合物节段” 是具有给定物理性质 (例如, 本文所述的嵌段的物理性质, 例如, 疏水性、亲水性、荷电率 (chargeability) 等) 的聚合物部分或包含一个或多个具有相似物理性质 (例如, 疏水性、亲水性、荷电率等) 的嵌段的聚合物部分。

[0124] 在某些实施方式中, 本文所述的NPC的一个或多个或全部聚合物分别具有 (1) 形成NPC的壳的至少一部分的任选地带电荷的亲水性节段 (例如, 壳嵌段); 和 (2) 形成NPC疏水核的至少一部分的基本上疏水性节段 (例如, 核嵌段), 所述NPC通过形成核的聚合物节段的疏水性相互作用来稳定。在一些实施方式中, 所述亲水性节段是中性的或不带电荷的。在一些实施方式中, 所述亲水性节段是带电荷的和阳离子的或聚阳离子的。在一些实施方式中, 所述亲水性节段是带电荷的和阴离子的或聚阴离子的。在一些实施方式中, 所述亲水性节段是带电荷的两性离子的。在一些情况下, 亲水性节段可以起至少3个作用: (1) 形成NPC的壳, (2) 提高NPC的水分散性, 和 (3) 连接至 (例如, 结合) 一个或多个治疗靶标。在一些实施方式中, 嵌段共聚物的核嵌段和/或NPC核还包含可带电荷的或带电荷的物质 (例如, 在生理pH下为阴离子性和/或阳离子性的物质/单体单元) 并且是膜去稳定的 (例如, 以pH依赖性的方式使膜去稳定)。在一些实施方式中, NPC的基本上疏水性嵌段 (例如, 核嵌段) 和/或核包含一个或多个可带电荷物质 (例如, 单体单元、部分、基团等)。在更具体的实施方式中, NPC的基本上疏水性嵌段和/或核包含多个阳离子物质和多个阴离子物质。在更具体的实施方式中, 嵌段共聚物的核嵌段和/或NPC核包含基本上相似数目的阳离子和阴离子物质 (即, 疏水性嵌段和/或核基本上是净中性的)。

[0125] 在某些实施方式中, 本文所提供的NPC包含含有第一和第二可带电物质的疏水性核嵌段。在一些实施方式中, 第一可带电物质是如本文所述的并且第二可带电物质是当质子化时可带电荷成为阳离子物质。在具体的实施方式中, 第一可带电物质在酸性pH (例如, 内体 (核内体、内涵体, endosomal) pH、低于约6.5的pH、低于约6.0的pH、低于约5.8的pH、低于约5.7的pH等) 下不带电荷。在具体的实施方式中, 第二可带电物质的pKa为约6至约10、约6.5至约9、约6.5至约8、约6.5至约7.5或任意其它适合的pKa。在某些实施方式中, 第一可带电物质中的至少一种和第二可带电物质中的至少一种存在于单个单体单元上。在一些实施方式中, 第一可带电物质存在于第一可带电单体单元上并且第二可带电物质存在于第二可带电单体单元上。在某些实施方式中, 第一可带电物质在去质子化后可带电荷成为阴离子物质, 第二可带电物质在质子化后可带电荷成为阳离子物质, 并且阴离子物质与阳离子物质之比在约中性pH下为约1:10至约10:1、约1:6至约6:1、约1:4至约4:1、约1:2至约2:1、约1:2至3:2之间, 或为约1:1。在一些实施方式中, 第一可带电单体单元与第二可带电单体单元之比为约1:10至约10:1、约1:6至约6:1、约1:4至约4:1、约1:2至约2:1、约1:2至3:2或为约1:1。

[0126] 如本文所使用的,术语“共聚物”表示作为两个或更多个不同单体聚合的结果的聚合物。本文所述的NPC的“单嵌段聚合物”或“亚单元聚合物 (subunit polymer)”是单个聚合步骤的合成产物。术语单嵌段聚合物包括共聚物(即超过一种类型的单体的聚合产物)和均聚物(即单个类型的单体的聚合产物)。“嵌段”共聚物是指包含结构单元或单体单元(在本文中可互换使用)的一个或多个亚组合的结构。这些结构单元或单体单元包含聚合单体的残基。在一些实施方式中,本文所述的嵌段共聚物包含非脂质结构单元或单体单元。在一些实施方式中,所述嵌段共聚物为二嵌段共聚物。二嵌段共聚物包含两个嵌段;这种聚合物的图示概括如下所示: $[A_a B_b C_c \dots]_m - [X_x Y_y Z_z \dots]_n$, 其中每个字母表示结构单元或单体单元,并且其中每个结构单元的下标表示该特定嵌段中该单元的摩尔分数,三个点表示每个嵌段中可以存在更多(也可以更少)个结构单元,并且m和n表示二嵌段共聚物中每个嵌段的分子量。如图示所显示的,在一些情况下,对每个嵌段分别控制每个结构单元的数量和性质。图示并不意味着且不应视为推断各嵌段中结构单元的数目或不同类型的结构单元的数目之间何种情况下的任何关系。该图示也不意味着描述特定嵌段内结构单元的任何特定数目或排列。在每个嵌段中,除非另外明确说明,否则结构单元可以以纯粹无规 (purely random)、交替无规 (alternating random)、规整交替 (regular alternating)、规整嵌段 (regular block) 或无规嵌段 (random block) 结构形式排列。例如,纯粹无规结构可以具有非限制形式: $x-x-y-z-x-y-y-z-y-z-z-z-\dots$ 。非限制性的示例性交替无规结构可以具有非限制形式: $x-y-x-z-y-x-y-z-y-x-z-\dots$, 并且示例性规整交替结构可以具有非限制形式: $x-y-z-x-y-z-x-y-z-\dots$ 。示例性的规整嵌段结构可以具有以下非限制结构: $\dots x-x-x-y-y-y-z-z-z-x-x-x-\dots$, 并且示例性的无规嵌段结构可以具有非限制性结构: $\dots x-x-x-z-z-x-x-y-y-y-y-z-z-z-x-x-z-z-z-\dots$ 。在梯度聚合物中,一个或多个单体单元的含量以梯度方式从聚合物的 α 端增加或减少至 ω 端。在上述一般实例中,无一是一个结构单元或嵌段的具体并列或嵌段中结构单元的数量或嵌段的数量,也不应将它们视为以任意方式具有或限制形成本发明胶束组装体的嵌段共聚物的实际结构。在某些实施方式中,本文提供了本文所述的任何亚单元聚合物或亚单元聚合物的组合物,而不考虑这些聚合物是否组装成胶束组装体。

[0127] 如本文中所使用的,包括结构单元的括号并非意指且并非视为意指结构单元本身形成嵌段。也就是说,方括号内的结构单元可以以任意方式与嵌段内的其它结构单元组合,即纯粹无规、交替无规、规整交替、规整嵌段或无规嵌段结构。本文所述的嵌段共聚物是任选地交替、梯度或无规嵌段共聚物。在一些实施方式中,嵌段共聚物是树枝状、星型或接枝共聚物。

[0128] 在某些实施方式中,本文所提供的NPC的嵌段共聚物包含烯属不饱和单体。术语“烯属不饱和单体”在本文中定义为具有至少一个碳双键或三键的化合物。烯属不饱和单体的非限制性实例是:(烷基)丙烯酸烷基酯、甲基丙烯酸酯、丙烯酸酯、烷基丙烯酰胺、甲基丙烯酰胺、丙烯酰胺、苯乙烯、烯丙基胺、烯丙基铵、二烯丙基胺、二烯丙基铵、N-乙烯基甲酰胺、乙烯醚、乙烯磺酸酯、丙烯酸、硫代甜菜碱 (sulfobetaine)、羧基甜菜碱、磷甜菜碱 (phosphobetaine) 或马来酸酐。

[0129] 在多个实施方式中,使用了适合于提供本文所述的NPC的聚合物的任何单体。在一些实施方式中,适合用于制备本文所提供的NPC的聚合物的单体包括(通过非限制性实例)

以下单体中的一种或多种：甲基丙烯酸甲酯、丙烯酸乙酯、甲基丙烯酸丙酯（全部异构体）、甲基丙烯酸丁酯（全部异构体）、甲基丙烯酸2-乙基己酯、甲基丙烯酸异冰片酯、甲基丙烯酸、甲基丙烯酸苄酯、甲基丙烯酸苯酯、甲基丙烯腈、 α -甲基苯乙烯、丙烯酸甲酯、丙烯酸乙酯、丙烯酸丙酯（全部异构体）、丙烯酸丁酯（全部异构体）、丙烯酸2-乙基己酯、丙烯酸异冰片酯（isobornyl acrylate）、丙烯酸、丙烯酸苄酯、丙烯酸苯基酯、丙烯腈、苯乙烯、选自如下的丙烯酸酯类和苯乙烯类：甲基丙烯酸缩水甘油酯、甲基丙烯酸2-羟基乙酯、甲基丙烯酸羟丙酯（全部异构体）、甲基丙烯酸羟丁酯（全部异构体）、甲基丙烯酸N,N-二甲氨基乙酯、甲基丙烯酸N,N-二乙基氨基乙酯、甲基丙烯酸三乙二醇酯、甲基丙烯酸寡乙二醇酯、衣康酸酐、衣康酸、丙烯酸缩水甘油酯、丙烯酸2-羟乙酯、丙烯酸羟丙酯（全部异构体）、丙烯酸羟丁酯（全部异构体）、丙烯酸N,N-二甲氨基乙酯、丙烯酸N,N-二乙氨基乙酯、丙烯酸三乙二醇酯、甲基丙烯酰胺、N-甲基丙烯酰胺、N,N-二甲基丙烯酰胺、N-叔丁基甲基丙烯酰胺、N-正丁基甲基丙烯酰胺、N-羟甲基丙烯酰胺（N-methylolacrylamide）、N-羟乙基丙烯酰胺（N-ethylolacrylamide）、乙烯基苯甲酸（全部异构体）、二乙氨基苯乙烯（全部异构体）、 α -甲基乙烯基苯甲酸（全部异构体）、二乙氨基 α -甲基苯乙烯（全部异构体）、对乙烯基苯磺酸、对乙烯基苯磺酸钠盐、甲基丙烯酸三甲氧基甲硅烷基丙酯、甲基丙烯酸三乙氧基甲硅烷基丙酯、甲基丙烯酸三丁氧基甲硅烷基丙酯、甲基丙烯酸二甲氧基甲基甲硅烷基丙酯、甲基丙烯酸二乙氧基甲基甲硅烷基丙酯、甲基丙烯酸二丁氧基甲基甲硅烷基丙酯、甲基丙烯酸二异丙氧基甲基甲硅烷基丙酯、甲基丙烯酸二甲氧基甲硅烷基丙酯、甲基丙烯酸二乙氧基甲硅烷基丙酯、甲基丙烯酸二丁氧基甲硅烷基丙酯、甲基丙烯酸二异丙氧基甲硅烷基丙酯、丙烯酸三甲氧基甲硅烷基丙酯、丙烯酸三乙氧基甲硅烷基丙酯、丙烯酸三丁氧基甲硅烷基丙酯、丙烯酸二甲氧基甲基甲硅烷基丙酯、丙烯酸二乙氧基甲基甲硅烷基丙酯、丙烯酸二丁氧基甲基甲硅烷基丙酯、丙烯酸二异丙氧基甲基甲硅烷基丙酯、丙烯酸二甲氧基甲硅烷基丙酯、丙烯酸二乙氧基甲硅烷基丙酯、丙烯酸二丁氧基甲硅烷基丙酯、丙烯酸二异丙氧基甲硅烷基丙酯、乙酸乙烯酯、丁酸乙烯酯、苯甲酸乙烯酯、乙烯基氯、乙烯基氟、乙烯基溴、马来酸酐、N-芳基马来酰亚胺、N-苯基马来酰亚胺、N-烷基马来酰亚胺、N-丁基马来酰亚胺、N-乙烯基吡咯烷酮、N-乙烯基吡啶、丁二烯、异戊二烯、氯丁二烯、乙烯、丙烯、1,5-己二烯类、1,4-己二烯类、1,3-丁二烯类、1,4-戊二烯类、乙烯醇、乙烯基胺、N-烷基乙烯基胺、烯丙基胺、N-烷基烯丙基胺、二烯丙基胺、N-烷基二烯丙基胺、亚烷基亚胺、丙烯酸类、烷基丙烯酸酯类、丙烯酰胺类、甲基丙烯酸类、甲基丙烯酸烷基酯类、甲基丙烯酰胺类、N-烷基丙烯酰胺类、N-烷基甲基丙烯酰胺类、N-异丙基丙烯酰胺、乙烯基萘、乙烯基吡啶、乙基乙烯基苯、氨基苯乙烯、乙烯基吡啶、乙烯基咪唑、乙烯基联苯、乙烯基茴香醚、乙烯基咪唑基、乙烯基吡啶基、乙烯基聚乙二醇、二甲氨基甲基苯乙烯、三甲基铵乙基甲基丙烯酸酯、三甲基铵乙基丙烯酸酯、二甲氨基丙基丙烯酰胺、三甲基铵乙基丙烯酸酯、三甲基铵乙基甲基丙烯酸酯、三甲基铵丙基丙烯酰胺、丙烯酸十二烷基酯、丙烯酸十八酯或甲基丙烯酸十八酯单体或其组合。

[0130] 在一些实施方式中，任选地使用这些单体的官能化形式。如本文所使用的，官能化单体是包含掩蔽或未掩蔽的官能团（例如，在聚合后可以连接其它部分的基团）的单体。这类基团的非限制性实例是伯氨基、羧基、硫醇基（巯基，thiols）、羟基、叠氨基和氰基。几个适合的掩蔽基团是可用的（参见，例如，T.W.Greene&P.G.M.Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis (第2版) J.Wiley&Sons, 1991. P.J.Kocienski, Protecting Groups,

Georg Thieme Verlag,1994)。

[0131] 以任何适合的方式制备本文所述的聚合物。用于产生本文所提供的聚合物的适合的合成方法包括(通过非限制性实例)阳离子、阴离子和自由基聚合。在一些情况下,当使用阳离子方法时,用催化剂处理单体以引发聚合。任选地,使用一种或多种单体来形成共聚物。在一些实施方式中,这种催化剂是引发剂,包括(例如)质子酸(布朗斯台德酸)或路易斯酸,在使用路易斯酸的情况下,还任选地使用一些促进剂,例如,水或醇。在一些实施方式中,催化剂是(通过非限制性实例)碘化氢、高氯酸、硫酸、磷酸、氟化氢、氯磺酸、甲磺酸、三氟甲磺酸、三氯化铝、烷基氯化铝、三氟化硼复合物、四氯化锡、五氯化锑、氯化锌、四氯化钛、五氯化磷、三氯氧磷(氧氯化磷,phosphorus oxychloride)或氯氧化铬。在某些实施方式中,聚合物合成纯净地或在任何适合的溶剂中进行。适合的溶剂包括(但不限于)戊烷、己烷、二氯甲烷、氯仿或二甲基甲酰胺(DMF)。在某些实施方式中,在任何适合的反应温度下,包括(例如)约-50℃至约100℃或约0℃至约70℃的温度下进行聚合物合成。

[0132] 在某些实施方式中,通过自由基聚合制备聚合物。当使用自由基聚合方法时,提供(i)单体、(ii)任选地共聚单体和(iii)任选的自由基来源以引发自由基聚合过程。在一些实施方式中,自由基的来源是任选的,因为一些单体可以在高温下加热时自引发。在某些情况下,在形成聚合混合物后,对混合物进行聚合条件。聚合条件是如本文所讨论的引起至少一种单体形成至少一种聚合物的那些条件。任选地将这些条件改变为任何适合的水平,并(通过非限制性实例)包括温度、压力、气氛、聚合混合物中使用的起始组分的比例和反应时间。以任何适合的方式进行聚合,其包括(例如)在溶液、分散体、混悬液、乳液中或本体(bulk)进行。

[0133] 在一些实施方式中,引发剂存在于反应混合物中。如果在本文所述的聚合方法中是有用的,则任选地使用任何适合的引发剂。这些引发剂(通过非限制性实例)包括一种或多种烷基过氧化物、取代的烷基过氧化物、芳基过氧化物、取代的芳基过氧化物、酰基过氧化物、烷基氢过氧化物、取代的烷基氢过氧化物、芳基氢过氧化物、取代的芳基氢过氧化物、杂烷基过氧化物、取代的杂烷基过氧化物、杂烷基氢过氧化物、取代的杂烷基氢过氧化物、杂芳基过氧化物、取代的杂芳基过氧化物、杂芳基氢过氧化物、取代的杂芳基氢过氧化物、烷基过酸酯、取代的烷基过酸酯、芳基过酸酯、取代的芳基过酸酯或偶氮化合物。在具体的实施方式中,过氧化苯甲酰(BPO)和/或AIBN用作引发剂。

[0134] 在一些实施方式中,聚合过程以活泼形式(living mode)按照任何适合的方式进行,如(但不限于)原子转移自由基聚合(ATRP)、一氧化二氮(硝基氧,nitroxide)-介导的活泼自由基聚合(NMP)、开环聚合(ROP)、简并性转移(degenerative transfer,DT)或可逆加成-断裂链转移(RAFT)。使用常规和/或活泼/受控聚合方法,可以生产多种聚合物结构,如(但不限于)嵌段、接枝、星形和梯度共聚物,其中单体单元在整个链上以统计学方式或以梯度方式分布,或以嵌段序列(block sequence)或侧链接枝形式均聚化。在其他实施方式中,通过大分子设计,经黄原酸酯类(MADIX)的可逆加成-断裂链转移合成聚合物(Direct Synthesis of Double Hydrophilic Statistical Di-and Triblock Copolymers Comprised of Acrylamide and Acrylic Acid Units via the MADIX Process”,Daniel Taton等人,Macromolecular Rapid Communications,22,No.18,1497-1503(2001))。

[0135] 在某些实施方式中,可逆加成-断裂链转移或RAFT用于合成本发明的乙烯型骨架

聚合物。RAFT是一种活泼聚合过程。RAFT包含自由基简并性链转移过程。在一些实施方式中,用于制备本文所述的聚合物的RAFT 方法使用了硫羰基硫基化合物,如(无限制地)二硫酯类、二硫氨基甲酸酯类、三硫代碳酸酯类和黄原酸酯类(xanthate),以通过可逆链转移机制介导聚合。在某些情况下,聚合物自由基与任何上述化合物的C=S基团的反应导致形成稳定的自由基中间体。典型地,这些稳定的自由基中间体不发生标准自由基聚合的典型终止反应,而是再引入能够再引发或增殖单体的自由基,从而在该过程中重新形成C=S键。大多数情况下,这种加成到 C=S键上,然后使随后的自由基断裂的循环持续至全部单体耗尽或反应淬灭。通常,低浓度的活性自由基在任何特定时间均限制正常终止反应。

[0136] 在一些实施方式中,在本文所提供的NPC中使用的聚合物具有低多分散性指数(PDI)或链长上的差异。可以以任何适合的方式测定多分散性指数(PDI),例如,通过将聚合物链的重均分子量除以其数均分子量来测量。数均分子量是各链分子量的总和除以链数目。重均分子量与分子量的平方除以具有该分子量的分子的数目成正比。由于重均分子量始终大于数均分子量,所以多分散性始终大于或等于1。当数值越来越接近相同时,即当多分散性趋近于值1时,聚合物变得更加接近单分散,其中每条链具有完全相同数目的结构单元。趋近于1的多分散性值可以使用活泼自由基聚合得到。确定多分散性的方法在本领域中是熟知的,如(但不限于)尺寸排阻色谱法、动态光散射、基质辅助激光解吸/电离色谱法和电喷雾质量色谱法。在一些实施方式中,本文所提供的胶束组装体(例如,胶束)的嵌段共聚物(例如,膜去稳定化嵌段共聚物)具有小于2.0、或小于1.8、或小于1.6、或小于1.5、或小于1.4、或小于1.3或小于1.2的多分散性指数(PDI)。

[0137] 本文所述的聚合过程任选地在任何适合的溶剂或其混合物中发生。适合的溶剂包括水、醇(例如,甲醇、乙醇、正丙醇、异丙醇、丁醇)、四氢呋喃(THF)、二甲基亚砷(DMSO)、二甲基甲酰胺(DMF)、丙酮、乙腈、六甲基磷酰胺、乙酸、甲酸、己烷、环己烷、苯、甲苯、二噁烷、二氯甲烷、醚(例如,乙醚(二乙醚,diethyl ether))、氯仿和乙酸乙酯。在一个方面,溶剂包括水和水与水可混溶的有机溶剂(例如,DMF)的混合物。

[0138] 在某些实施方式中,以任何适合的方式制备本文所使用的聚(DMAEMA)和其它聚合物实体(例如,BMA、DMAEMA和PAA的共聚物或共聚物嵌段)。在一个实施方式中,通过在RAFT CTA、ECT和自由基引发剂存在的情况下聚合DMAEMA来制备聚(DMAEMA)。在一些实施方式中,将嵌段聚(DMAEMA)大CTA(poly(DMAEMA) macroCTA)用于制备一系列二嵌段共聚物,其中第二嵌段包含BMA、DMAEMA和PAA。在其它具体的实施方式中,反转二嵌段聚合物上嵌段的方向(取向),以使在自组装后,聚合物的 ω 端暴露在NPC的亲水性节段上。在多个实施方式中,这以任何适合的方式实现,包括许多合成方法来实现。例如,在一些实施方式中,本文所述的嵌段共聚物的合成始于形成 PAA/BMA/DMAEMA核的疏水性嵌段的制备,然后在第二合成步骤中通过将所得的PAA/BMA/DMAEMA大CTA(大分子CTA,macroCTA)经历第二RAFT聚合步骤来加入形成壳的亲水性带电荷嵌段。替代方法包括将PAA/BMA/DMAEMA大CTA还原以形成硫醇基末端,然后将预形成的亲水性带电荷聚合物共价连接至所形成的硫醇基。这种合成方法提供了在暴露于NPC表面的聚合物链的 ω -端上引入反应基团的方法,从而提供了对NPC进行化学共轭的替代方法。

[0139] 在一些实施方式中,通过由单独的聚合方法制备的几种聚合物嵌段的化学共轭来合成嵌段共聚物。

[0140] 在一些情况下,嵌段共聚物包含具有反应基团的单体,所述反应基团可以通过本领域中已知的化学方法,例如,“点击”化学(“click”chemistry)(例如,“点击”反应,参见Wu,P.;Fokin,V.V.Catalytic Azide-Alkyne Cycloaddition:Reactivity and Applications.Aldrichim.Acta,2007,40,7-17)用于聚合后额外官能性的引入。

[0141] 在美国专利申请公开No.US2011/0123636中描述了在本发明中有用的示例性嵌段聚合物,以上专利作为参考并入本文。

[0142] 核

[0143] 在本文的某些实施方式中提供的本文所述的NPC核包含多种pH依赖性疏水物。在某些实施方式中,本文所述的NPC核通过疏水性相互作用至少部分、基本上或大部分结合在一起。

[0144] 在一些实施方式中,本文所述的NPC核包含多种第一可带电物质。在具体的实施方式中,所述第一可带电物质为带电荷的或者可带电为阴离子物质。应理解所述核内没有、有一些或全部的第一可带电物质是带电荷的。

[0145] 在某些实施方式中,本文所述的聚合物的核嵌段包含多种第一可带电物质和多种第二可带电物质。在一些情况下,所述第一可带电物质是带电荷的或者可带电为阴离子物质;并且所述第二可带电物质是带电荷的或者可带电为阳离子物质。在一些实施方式中,本文所述的NPC的核包含多种第一可带电物质;多种第二可带电物质;和多种疏水性物质。

[0146] 在某些实施方式中,当所述核包含多种可带阴离子电荷的物质和多种可带阳离子电荷的物质时,多种可带阴离子电荷的物质的数目与多种可带阳离子电荷的物质的数目的比值为约1:10至约10:1,约1:8至约8:1,约1:6至约6:1,约1:4至约4:1,约1:2至约2:1,约3:2至约2:3或为约1:1。在一些实施方式中,所述核包含带阴离子电荷的多种可带阴离子电荷的物质和带阳离子电荷的多种可带阳离子电荷的物质,其中所述核中存在的带阴离子电荷的物质的数目与带阳离子电荷的物质的数目的比值为约1:10至约10:1,约1:8至约8:1,约1:6至约6:1,约1:4至约4:1,约1:2至约2:1,约3:2至约2:3或为约1:1。

[0147] 在一些实施方式中,在中性pH(例如,在约7.4的pH),多种可带阴离子电荷的物质的数目与多种可带阳离子电荷的物质的数目的比值为约1:10至约10:1,约1:8至约8:1,约1:6至约6:1,约1:4至约4:1,约1:2至约2:1,约2:3至约3:2,约1:1.1至约1.1:1或为约1:1。在一些实施方式中,所述核包含带阴离子电荷的多种可带阴离子电荷的物质和带阳离子电荷的多种可带阳离子电荷的物质,其中在约中性pH(例如,在约7.4的pH),所述核中存在的带阴离子电荷的物质的数目与带阳离子电荷的物质的数目的比值为约1:10至约10:1,约1:8至约8:1,约1:6至约6:1,约1:4至约4:1,约1:2至约2:1,约2:3至约3:2,约1:1.1至约1.1:1或为约1:1。在具体的实施方式中,在约中性pH,所述核中存在的带正电荷的物质与所述核中存在的带负电荷的物质的比值为约1:4至约4:1。在更具体的实施方式中,在约中性pH,所述核中存在的带正电荷的物质与所述核中存在的带负电荷的物质的比值为约1:2至约2:1。在具体的实施方式中,在约中性pH,所述核中存在的带正电荷的物质与所述核中存在的带负电荷的物质的比值为约1:1.1至约1.1:1。

[0148] 在具体的实施方式中,所述第一可带电物质为布朗斯台德酸(Bronsted acid)。在某些情况下,如本文所使用的,可带电物质包括其中添加或去除质子(例如,以pH依赖的方式)分别提供了阳离子或阴离子物质、基团或单体单元的物质。

[0149] 在一些实施方式中,所述核中存在的第一可带电物质为在约中性pH(例如,在约7.4的pH),至少50%,至少60%,至少70%,至少80%,至少85%或至少95%带负电荷的物质。在具体的实施方式中,这些第一可带电物质在约中性pH通过丧失 H^+ 而带电荷为阴离子物质。在其它或替代实施方式中,所述核中存在的第一可带电物质为在轻微酸性pH(例如,约6.5或更低;约6.2或更低;约6或更低;约5.9或更低;约5.8或更低的pH;或者约内体pH),至少20%,至少30%,至少40%,至少50%,至少60%,至少70%,至少80%,至少85%或至少95%中性或不带电的物质。

[0150] 在一些实施方式中,通过非限制性实例,所述第一可带电物质是羧酸、酸酐、磺酰胺、磺酸、亚磺酸(sulfinic acid)、硫酸、磷酸、次膦酸(phosphinic acid)、硼酸、亚磷酸等。

[0151] 在一些实施方式中,所述核中存在的第二可带电物质为在约中性pH(例如,在约7.4的pH),至少20%,至少30%,至少40%,至少50%,至少60%,至少70%,至少80%,至少85%或至少95%带正电荷的物质。在具体的实施方式中,这些第二可带电物质通过添加 H^+ 而带电为阳离子物质。在其它或替代实施方式中,所述核中存在的第二可带电物质为在轻微酸性pH(例如,约6.5或更低;约6.2或更低;约6或更低;约5.9或更低;约5.8或更低的pH;或者约内体pH),至少20%,至少30%,至少40%,至少50%,至少60%,至少70%,至少80%,至少85%或至少95%带正电荷的物质。

[0152] 壳

[0153] 在一些实施方式中,本文所述的NPC的壳是亲水性的。在具体的实施方式中,本文所述的NPC的壳包含多种可带电物质。在具体的实施方式中,所述可带电物质为带电荷的或者可带电为阳离子物质。在其它具体的实施方式中,所述可带电物质为带电荷的或者可带电为阴离子物质。在其它实施方式中,NPC的壳为亲水的和不带电荷的(例如,基本上不带电荷的)。应理解这些壳嵌段包括其中可带电物质无一、一些或全部是带电荷的物质。

[0154] 在具体的实施方式中,本文所述的NPC壳在约中性pH(例如,在约7.4的pH)是多聚阳离子的。在一些实施方式中,NPC壳中的可带电物质是在约中性pH(例如,在约7.4的pH)至少20%,至少30%,至少40%,至少50%,至少60%,至少70%,至少80%,至少85%或至少95%带正电荷的物质、基团或单体单元。在具体的实施方式中,NPC壳中的这些可带电物质通过添加 H^+ 带电为阳离子物质(例如,布朗斯台德碱)。在其它或替代实施方式中,本文所述的NPC壳中的可带电物质是在轻微酸性pH(例如,约6.5或更低;约6.2或更低;约6或更低;约5.9或更低;约5.8或更低的pH;或者约内体pH)至少20%,至少30%,至少40%,至少50%,至少60%,至少70%,至少80%,至少85%或至少95%带正电荷的物质。

[0155] 在一些实施方式中,本文所述的NPC壳是在或接近生理学pH(例如,循环人血浆的pH)是阳离子的。在一些实施方式中,壳嵌段是多聚阳离子的。在一些实施方式中,所述壳包含一种或多种治疗剂,其中所述治疗剂是多聚阴离子的。在一些实施方式中,多种治疗剂包含总计x个阴离子,并且本文所述的NPC的多聚阳离子壳包含约0.6x、约0.7x、约0.8x、约0.9x、约1.0x、约1.1x个阳离子或更多。

[0156] 在一些实施方式中,本文所述的NPC壳是亲水性的并且是不带电荷的。在本文中有用的亲水的不带电荷的物质(通过非限制性实例)包括聚乙二醇(PEG)、聚环氧乙烷(PEO)等。

[0157] 在某些实施方式中,本文所述的NPC壳包含多种不同的亲水性物质(例如,至少一种不带电荷的亲水性物质和至少一种带电荷的亲水性物质)。

[0158] 颗粒尺寸

[0159] 在某些实施方式中,本文所提供的NPC是具有任何适合的尺寸的纳米颗粒。通过调节核部分、壳部分、其它部分的聚合度或它们的组合来调节纳米颗粒的尺寸以满足具体需要。在具体的实施方式中,本文所提供的 NPC的平均水力学直径(平均流体力学直径, average hydrodynamic diameter)为约10nm至约200nm。在更具体的实施方式中,本文所提供的NPC的平均水力学直径在水媒介(介质, medium)中为约1nm至约 500nm,约5nm至约250nm,约10nm至约200nm,约10nm至约100nm,约20nm至约100nm,约30nm至约80nm等。在更具体的实施方式中,本文所提供的NPC的平均水力学直径在具有约中性pH(例如,约7.4的 pH)的水媒介中为约1nm至约500nm,约5nm至约250nm,约10nm至约200nm,约10nm至约100nm,约20nm至约100nm,约30nm至约80nm 等。在一些实施方式中,本文所提供的NPC的平均水力学直径在人血清中为约1nm至约500nm,约5nm至约250nm,约10nm至约200nm,约 10nm至约100nm,约20nm至约100nm,约30nm至约80nm等。在一些实施方式中,本文所提供的NPC的平均水力学直径在人唾液中为约1nm 至约500nm,约5nm至约250nm,约10nm至约200nm,约10nm至约100nm,约20nm至约100nm,约30nm至约80nm等。

[0160] 组装体

[0161] 在一些实施方式中,本文所提供的NPC是自组装的。在某些实施方式中,NPC在水媒介中是自组装的或者能够自组装。在一些实施方式中, NPC是在具有约中性pH(例如,具有约7.4的pH)的水媒介中自组装的或者能够自组装。在一些实施方式中,用具有约中性pH(例如,具有约 7.4的pH)的水媒介稀释嵌段共聚物的有机溶液后,NPC是自组装的或者能够自组装。在一些实施方式中,NPC在人血清中是自组装的或者能够自组装。在一些实施方式中,NPC在人唾液中是自组装的或者能够自组装。在一些实施方式中,本文所提供的NPC是自组装的。

[0162] 在具体的实施方式中,本文所提供的NPC在约6至约9,约6至约8,约6.5至约9,约6.5至约8,约6.5至约7.5,约7至约9或约7至约8 内的至少一个pH值下的水媒介中自组装。应理解如本文所使用的,胶束组装体至少在本文所述的pH下自组装,但是还可以在所述pH范围外的一个或多个pH值自组装。

[0163] 在一些实施方式中,本文所提供的NPC在任何适合的浓度自组装。在某些实施方式中,本文所提供的NPC在约2 μ g/ml,约5 μ g/ml,约8 μ g/ml,约10 μ g/ml,约20 μ g/ml,约25 μ g/ml,约30 μ g/ml,约40 μ g/ml,约50 μ g/ml,约60 μ g/ml,约70 μ g/ml,约80 μ g/ml,约90 μ g/ml,约100 μ g/ml或更大自组装(例如,具有临界组装体浓度(CAC)或NPC形成的最小浓度)。在某些实施方式中,本文所提供的NPC在约1 μ g/mL至约100 μ g/mL之间的至少一个浓度自组装。

[0164] 在一些实施方式中,通过本文所述的聚合物的自发自组装制备本文所提供的NPC。在某些实施方式中,在(a)将聚合物在水可混溶的有机溶剂中的溶液稀释至水媒介中;或者(b)直接在水溶液中溶解后,本文所述的聚合物组装成本文所提供的NPC。在一些实施方式中,在没有治疗剂的情况下,本文所述的聚合物组装成本文所提供的NPC。

[0165] 在一些实施方式中,NPC对在水溶液中稀释稳定。在具体的实施方式中,NPC对在生理学pH(包括人血液或唾液的pH)的稀释稳定,其临界稳定性浓度(例如,临界胶束浓度

(CMC)) 为约50至约100 $\mu\text{g/mL}$, 或约10至约50 $\mu\text{g/mL}$, 小于10 $\mu\text{g/mL}$, 小于5 $\mu\text{g/mL}$, 或小于2 $\mu\text{g/mL}$ 。如本文所使用的, “NPC的去稳定”是指形成NPC的聚合链至少部分解聚, 结构改变(例如, 尺寸扩大和/或形状改变), 和/或可以形成无定形超分子结构(例如, 非胶束超分子结构)。术语临界稳定性浓度(CSC)、临界胶束浓度(CMC)和临界组装体浓度(CAC)在本文中是可互换使用的。

[0166] 稳定性

[0167] 在一些实施方式中, 本文所提供的NPC在水媒介(介质, medium) 中是稳定的。在某些实施方式中, 本文所提供的NPC在水媒介中, 在所选pH, 例如, 约生理学pH(例如, 人血液或唾液的pH) 是稳定的。在具体的实施方式中, 本文所提供的NPC在约中性pH(例如, 在约7.4的pH) 在水媒介中是稳定的。在某些实施方式中, 本文所提供的NPC在哺乳动物血清、哺乳动物血浆和/或哺乳动物唾液中是稳定的。应理解NPC 的稳定性不限于所指明的pH, 而是它在包括(至少)所指明的pH的pH 值是稳定的。在具体的实施方式中, 本文所述的NPC在酸性pH比在约中性pH具有显著较低的稳定性。在更具体的实施方式中, 本文所述的NPC 在约5.8的pH比在约7.4的pH具有显著较低的稳定性。

[0168] 在具体的实施方式中, NPC在约10 $\mu\text{g/mL}$ 或更大的浓度(例如, 在约中性pH) 是稳定的。在一些实施方式中, NPC在约100 $\mu\text{g/mL}$ 或更大的浓度(例如, 在约中性pH) 是稳定的。

[0169] 屏蔽亲水性节段/嵌段

[0170] 在某些实施方式中, 本文所述的NPC包含一种或多种屏蔽剂。在一些实施方式中, 多核苷酸载体嵌段/节段包含PEG取代的单体单元(例如, PEG是侧链并且不包含多核苷酸载体嵌段的主链)。在一些情况下, 在本文所述的胶束组装体中使用的一种或多种聚合物(例如, 嵌段共聚物) 包含分子量约1000至约30000的聚乙二醇(PEG) 链或嵌段。在一些实施方式中, PEG结合至聚合物末端基团, 或结合至在本文所提供的NPC的聚合物中存在的一个或多个可修饰侧基。在一些实施方式中, PEG残基结合至本文所提供的NPC的聚合物(例如, 嵌段共聚物) 的亲水性节段或嵌段(例如, 壳嵌段) 内的可修饰基团。在某些实施方式中, 包含具有2-20 环氧乙烷单位的PEG残基的单体共聚以形成用于形成本文所提供的NPC 的聚合物的亲水性部分。

[0171] 在一些情况下, 屏蔽剂提高了治疗剂抵抗酶促消化的稳定性。在一些情况下, 屏蔽剂降低了本文所述的NPC的毒性。在一些实施方式中, 屏蔽剂包含多种中性亲水性单体残基。在一些情况下, 屏蔽聚合物通过聚合物的末端基团共价结合至膜去稳定嵌段共聚物。在一些实施方式中, 屏蔽剂是连接到聚合物的一个或多个单体残基的共价偶联的侧基部分。在一些实施方式中, 本文所述的NPC中的多个单体残基包含通过官能团共价偶联至聚乙二醇低聚物或聚合物的侧基(侧垂, pendant) 屏蔽物质(例如, 聚乙二醇(PEG) 低聚物(例如, 具有20个或更低的重复单元) 或者聚合物(例如, 具有大于20个重复单元))。在一些情况下, 嵌段共聚物包含共价连接至共聚物的膜去稳定嵌段的 α 末端或 ω 末端的聚乙二醇(PEG) 低聚物或聚合物。

[0172] 可降解链

[0173] 在某些实施方式中, 本文所述的NPC包含将一个或多个治疗剂连接至一个或多个NPC聚合物的一个或多个键和/或链。在某些实施方式中, 所述键和/或链是可降解的, 从而当NPC的形状或结构破坏时, 它们降解。在具体的实施方式中, 所述键和/或链是可降解的,

从而当NPC的形状或结构由于局部pH而被破坏时,它们降解。例如,在一个实施方式中,当NPC的形状或结构由于酸性环境而被破坏时,所述键和/或链降解。所述键和/或链的降解将治疗剂从NPC释放到靶组织中。在某些实施方式中,降解速率,以及借此药剂的释放速率取决于链的结构和长度以及局部环境的pH。

[0174] 在一个实施方式中,所述键和/或链包含乳酸(LA)。一旦暴露于环境(即当NPC分解时),LA是水解可降解的。在一个实施方式中,NPC链包含1-30个LA重复。在另一个实施方式中,所述链包含1-10个LA重复。所述链不限于包括LA的组合物,而是涵盖了任何水解可降解单元,其包括(但不限于)聚(丙交酯-共-乙交酯)(poly(lactide-co-glycolide), PLG)。在一个实施方式中,治疗剂的释放速率受可降解链内LA重复个数的控制。例如,在某些实施方式中,随着重复个数的增加,释放速率提高。在其它实施方式中,随着重复个数的减少,释放速率提高。在Benoit等人, 2007, *Adv Funct Mater*, 17(13):2085-2093和Benoit等人, 2006, *Biomaterials*, 27(36):6102-6110中描述了可降解链的进一步说明,以上每篇文献作为参考并入本文。

[0175] 治疗剂

[0176] 在本文的某些实施方式中提供了包含至少一种研究试剂(research reagent)、至少一种诊断试剂、至少一种治疗剂或它们的组合的NPC。在一些实施方式中,这些治疗剂存在于NPC壳中、NPC核中、NPC表面上或它们的组合。

[0177] 在多个实施方式中,研究试剂、诊断试剂和/或治疗剂以任何适合的方式附接至NPC或其嵌段共聚物。在具体的实施方式中,附接是通过共价键、非共价相互作用、静态相互作用、疏水性相互作用等或它们的组合实现的。在一些实施方式中,研究试剂、诊断试剂和/或治疗剂附接至嵌段共聚物的壳嵌段。在某些实施方式中,研究试剂、诊断试剂或治疗剂形成嵌段共聚物的壳嵌段。在一些实施方式中,研究试剂、诊断试剂或治疗剂处于NPC的壳中。在一些实施方式中,研究试剂、诊断试剂和/或治疗剂附接至嵌段共聚物的核嵌段。在某些实施方式中,研究试剂、诊断试剂或治疗剂形成嵌段共聚物的核嵌段。在一些实施方式中,研究试剂、诊断试剂或治疗剂处于NPC核中。

[0178] 在一些实施方式中,本文提供了包含位于NPC壳中的第一治疗剂和位于NPC核中的第二治疗剂的NPC。

[0179] 在某些实施方式中,本文提供了包含至少1-5、5-250、5-1000、250-1000、至少2、至少5、至少10、至少20或至少50个治疗剂的NPC。在一些实施方式中,本文提供了包含多种本文所述的NPC的组合物,其中所述NPC平均包含至少1-5、5-250、5-1000、250-1000、至少2、至少5、至少10、至少20或至少50个治疗剂。

[0180] 在一些实施方式中,治疗剂、诊断试剂等(通过非限制性实例)选自至少一种核苷酸(例如,多核苷酸)、至少一种碳水化合物或至少一种氨基酸(例如,肽)。在具体的实施方式中,所述治疗剂为多核苷酸、寡核苷酸、基因表达调节剂、敲低剂(knockdown agent)、siRNA、RNAi试剂、dicer酶底物、miRNA、shRNA、反义寡核苷酸或适体。在其它具体的实施方式中,治疗剂是aiRNA(Asymmetric RNA duplexes mediate RNA interference in mammalian cells. Xiangao Sun, Harry A Rogoff, Chiang J Li *Nature Biotechnology* 26, 1379-1382 (2008))。在某些实施方式中,治疗剂是蛋白质、肽、显性阴性蛋白(dominant-negative protein)、酶、抗体或抗体片段。在一些实施方式中,治疗剂是碳水化合物或小分

子。

[0181] 在某些实施方式中,将多个嵌段共聚物中的一个或多个附接至治疗剂。在一些实施方式中,将多个嵌段共聚物中的一个或多个附接至第一治疗剂,并且其中将多个嵌段共聚物中的一个或多个附接至第二治疗剂。

[0182] 在一些实施方式中,通过任何适合的化学结合技术将治疗剂化学结合至NPC和/或至NPC的一个或多个聚合物。将治疗剂任选地结合至聚合物的末端,或结合至聚合物的侧链(pendant side chain)。在一些实施方式中,通过试剂与已形成的包含多个聚合物(例如,嵌段共聚物)的NPC结合形成了含有治疗剂的NPC。在其它实施方式中,通过试剂与聚合物结合,随后以任何适合的方式(例如,通过所得结合物自组装到包含所述试剂的NPC中)形成NPC形成含有治疗剂的NPC。在多个实施方式中,这种NPC还任选地包含与结合至所述试剂的那些类似、相同或不同的未结合的聚合物(例如,嵌段共聚物)。本文所述的NPC的聚合物和治疗剂之间的共价键任选地为不可切割的或可切割的。在某些实施方式中,将一种或多种试剂的前体附接至NPC或NPC的聚合物单元。在一些实施方式中,通过可切割的键附接一种或多种试剂。在某些实施方式中,本文所述的NPC中使用的可切割的键(通过非限制性实例)包括二硫键(例如,在细胞质的还原环境中解离的二硫键)。在一些实施方式中,NPC(包括其组分)与治疗剂之间的共价结合是通过任何适合的化学结合方法实现,所述方法包括(但不限于)胺-羧基连接基团、胺-硫氢基连接基团、胺-碳水化合物连接基团(amine-carbohydrate linkers)、胺-羟基连接基团、胺-胺连接基团、羧基-硫氢基连接基团、羧基-碳水化合物连接基团、羧基-羟基连接基团、羧基-羧基连接基团、硫氢基-碳水化合物连接基团、硫氢基-羟基连接基团、硫氢基-硫氢基连接基团、碳水化合物-羟基连接基团、碳水化合物-碳水化合物连接基团和羟基-羟基连接基团。在一些实施方式中,还使用pH敏感型键和连接基团(包括(但不限于)脘和乙缩醛键合)来进行结合。任选地还使用了任何其它适合的结合方法,例如,多种结合化学法是可用的(参见,例如,Bioconjugation, Aslam and Dent主编, Macmillan, 1998及其中的章节)。

[0183] 在一些实施方式中,本文所述的任何NPC还包含未附接至治疗剂的其它聚合物。在一些实施方式中,所述其它聚合物是稀释的聚合物或靶标部分载体聚合物。在某些实施方式中,本文所提供的任何NPC还包含附接至至少一个第二治疗剂(例如,第二治疗剂)的其它聚合物。在某些实施方式中,所述至少一个第二治疗剂(例如,第二治疗剂)不同于所述至少一个第一治疗剂(例如,第一治疗剂)。在一些实施方式中,胶束组装体中存在的所有聚合物的核部分(例如,核嵌段)是类似的或相同的。在某些实施方式中,胶束组装体中的一种或多种不同的聚合物包含类似或相同的核部分(例如,核嵌段),但是包含不同的非核部分(例如,壳嵌段)。

[0184] 本文所述的NPC包含可递送至靶标组织的任何适合的治疗剂,从而对靶标组织或对受试者具有影响。示例性治疗剂包括(但不限于)抗生素、抗病毒剂、抗微生物剂、抗感染剂、抗真菌剂、抗生物膜剂、激素、抗体、小分子、维生素、矿物质、多肽、酶、核酸、化疗剂、抗炎剂、免疫调节剂、麻醉剂、止痛剂等。

[0185] 在某些实施方式中,本文所述的NPC包含至少一种抗生物膜剂。本文描述NPC意外结合至生物膜和有形成生物膜风险的区域所有相关的表面。照此,在某些实施方式中,将本文所述的NPC归航(归巢, home)至生物膜和有生物膜形成和/或积累风险的区域内的位

点,并且当引发释放时,在这些位点局部释放抗生物膜剂。抗生物膜剂包括(但不限于)芹菜素及其衍生物;黄酮类,包括黄酮、黄酮醇、黄烷酮醇、二氢黄酮及其衍生物;法呢醇及其衍生物;萜类化合物,包括萜烯、萜品醇、二萜酸、二萜、三萜及其衍生物;生物膜降解酶,包括非水溶性葡聚糖酶、葡聚糖酶和淀粉转葡萄糖苷酶-葡萄糖氧化酶;和EPS-合成酶抑制剂,包括玫瑰红(孟加拉玫瑰红,Rose Bengal)、过硼酸盐、偏高碘酸盐、山梨糖醇、木糖醇、1-脱氧野尻霉素(1-deoxynojirimycin)、黄酮类、多酚、原花青素、丹宁和香豆素。

[0186] 在某些实施方式中,本文所述的NPC包含至少一种抗菌剂。在一个实施方式中,所述抗菌剂是广谱抗菌剂。适合的抗菌剂包括(但不限于) 氯己啶及其衍生物,二双胍(bisbiguanides)类抑制剂成员、聚维酮碘、过氧化氢、多西环素、米诺环素、克林霉素、多西环素、甲硝唑、精油提取物(薄荷醇、麝香草酚、桉树脑、水杨酸甲酯、金属盐(锌、铜、锡离子)、苯酚(三氯生)、所有季铵化合物(氯化十六烷吡啶)、表面活性剂(月桂基硫酸钠、地莫匹醇)、所有天然分子(苯酚、酚酸、苯醌、生物碱、凝集素、肽、多肽、吡啶衍生物、flustramine衍生物、carolacton、卤化呋喃酮、乳清群海绵定(oroïdin)类似物、agelasine、ageloxime D)。

[0187] 在另一个实施方式中,本文所述的NPC包括氟化物。可以作为其制剂中的任一种包含氟化物,所述氟化物包括(但不限于)氟化钠、单氟磷酸盐及其衍生物和氟化亚锡。

[0188] 在某些实施方式中,本发明所述的NPC包含治疗有效量的至少一种治疗剂。例如,在一个实施方式中,NPC核中加载了治疗有效量的至少一种治疗剂。治疗剂的相对量或浓度可以取决于NPC的尺寸、治疗剂的类型、待治疗或预防的病症等。在一个实施方式中,治疗剂以大于约0wt%,或大于约5wt%,或大于约10wt%,或大于约15wt%,或大于约20wt%,或大于约30wt%,或大于约50wt%,或大于约75wt%存在。例如,本文表明本发明的NPC可以加载比其最小有效浓度大得多的治疗剂的量或浓度。因此,本发明的组合物能够在NPC内保留治疗有效量的治疗剂。

[0189] 在某些实施方式中,所述组合物包含多种不同的NPC,每种NPC携带不同的治疗剂,借此提供组合法(联合疗法)。例如,在一个实施方式中,所述组合物包含含有抗生物膜剂的第一NPC,和含有氟化物的第二 NPC。在另一个实施方式中,所述组合物包含含有抗生物膜剂的第一NPC,含有广谱抗生素的第二NPC和含有氟化物的第三NPC。每种治疗剂具有不同但互补的作用机制,所有作用机制均针对病理的治疗;抗生物膜剂将预防生物膜形成,抗菌剂将杀死有害细菌,并且氟化物将重建矿物质。在一个实施方式中,将不同的NPC以不同的比例混合以实现最大的治疗效果。在一个实施方式中,可以将不同的NPC中的每一种配置用于不同的药物递送特性,借此使得不同的治疗剂能够根据具体病症或治疗的需要在不同时间递送。

[0190] 药物组合物和制剂

[0191] 本发明还涵盖了本发明的药物组合物或其盐用于实践本发明所述方法的应用。这种药物组合物可以包括处于适合于向受试者施用的形式的本发明的至少一种化合物、试剂、NPC或NPC结合物,或者所述药物组合物可以包含本发明的至少一种化合物、试剂、NPC或NPC结合物或其盐,和一种或多种药物可用的载体、一种或多种其它成分或这些成分的一些组合。本发明的化合物、试剂、NPC或NPC结合物可以以生理学可用的盐的形式(如与生理学可用的阳离子或阴离子结合,如本领域中熟知的)存在于药物组合物中。

[0192] 在一个实施方式中,可以施用用于实践本发明所述方法的药物组合物以递送1ng/kg/天至100mg/kg/天之间的剂量。在另一个实施方式中,可以施用用于实践本发明的药物组合物以递送1ng/kg/天至500mg/kg/天之间的剂量。

[0193] 本发明的药物组合物中活性成分、药物可用的载体和任何其它成分的相对量将根据待治疗受试者的特性(identity)、身材和病症并且还根据组合物施用途而改变。举例来说,所述组合物可以包含0.1%至100% (w/w) 之间的活性成分。

[0194] 可以适当地开发在本发明所述的方法中有用的药物组合物以用于口服、直肠、阴道、肠胃外、局部、肺、鼻内、口腔、眼部施用途或另一种施用途。在本发明所述的方法内有用的组合物可以直接施用于哺乳动物的皮肤或任何其它组织。其它所考虑的制剂包括脂质体制剂、含有活性成分的重新包封的红细胞(resealed erythrocyte)和基于免疫学的制剂。施用途对于熟练的技术人员将是显而易见的,并且将取决于多种因素,包括待治疗疾病的类型和严重性、待治疗的兽医或人受试者的类型和年龄等。

[0195] 可以通过任何已知的或此后在药学领域中开发的方法制备本文所述的药物组合物的制剂。一般说来,这些制备方法包括以下步骤:使活性成分与载体或一种或多种其它辅助成分结合,然后,如有必要或需要,将产物成型或包装成所需的单剂量或多剂量单位。

[0196] 如本文所使用的,“单位剂量”是包含预定量的活性成分的药物组合物的单个的量(离散的量,discrete amount)。活性成分的量通常等于将施用于受试者的活性成分的剂量或该剂量的适当分数,如(例如)该剂量的二分之一或三分之一。单位剂量形式可以是单个日剂量或多个日剂量之一(例如,每天约1至4次或更多次)。当使用多个日剂量时,对于每个剂量,单位剂量形式可以是相同或不同的。

[0197] 尽管对本文所提供的药物组合物的描述主要涉及在伦理上适合于向人施用的药物组合物,但本领域技术人员应理解这些组合物通常还适合于向所有种类的动物施用。对适合于向人施用的药物组合物进行改变以使所述组合物适合于向多种动物施用是易于理解的,并且兽医药理学的普通技术人员可以仅通过常规实验(如果需要)来设计和实施这种改变。考虑对其施用本发明的药物组合物的受试者包括(但不限于)人及其它灵长类、哺乳动物,包括商品化相关哺乳动物,如牛、猪、马、绵羊、猫和狗。

[0198] 在一个实施方式中,使用一种或多种药物可用的赋形剂或载体配制本发明所述的组合物。在一个实施方式中,本发明所述的药物组合物包含治疗有效量的本发明的化合物、试剂、NPC或NPC结合物和药物可用的载体。有用的药物可用的载体包括(但不限于)甘油、水、盐水、乙醇及其它药物可用的盐溶液,如磷酸盐和有机酸盐。在Remington's Pharmaceutical Sciences(1991,Mack Publication Co.,New Jersey)中描述了这些及其它药物可用的载体的实例。

[0199] 所述载体可以是溶剂或分散介质,其含有(例如)水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)、它们适合的混合物和植物油。可以(例如)通过使用涂层(如卵磷脂),在分散体的情况下通过保持所需粒度以及通过使用表面活性剂来保持合适的流动性。可以通过多种抗菌(antibacterial)和抗真菌剂(例如,对羟基苯甲酸酯类、氯代丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞(thimerosal)等)防止微生物的作用。在多数情况下,优选在所述组合物中包括等渗剂,例如,糖、氯化钠或多元醇,如甘露糖醇和山梨糖醇。可注射组合物的延长吸收可以通过在所述组合物中包括使吸收延迟的试剂(例如,单硬脂酸铝或明胶)来实现。

在一个实施方式中,所述药物可用的载体不是单独的DMSO。

[0200] 可以与常规赋形剂(即本领域已知的适合于口服、阴道、肠胃外、鼻部、静脉内、皮下、肠内或任何其它适合的施用形式的药物可用的有机或无机载体物质)混合使用制剂。药物制剂可以灭菌,并且如果需要,可以与助剂,例如,润滑剂、防腐剂、稳定剂、润湿剂、乳化剂、影响渗透压缓冲的盐、着色剂、调味剂和/或芳香物等混合。需要时,它们还可以与其它活性剂,例如,其它止痛剂混合。

[0201] 如本文所使用的,“其它成分”包括(但不限于)以下中的一种或多种:赋形剂;表面活性剂;分散剂;惰性稀释剂;成粒和崩解剂(*granulating and disintegrating agents*);粘结剂;润滑剂;甜味剂;调味剂;着色剂;防腐剂;生理学可降解的组分(*compositions*),如明胶;水性媒介和溶剂;油性媒介和溶剂;助悬剂;分散或润湿剂;乳化剂,镇痛剂(缓和剂, *demulcent*);缓冲剂;盐;增稠剂;填充剂;乳化剂;抗氧化剂;抗生素;抗真菌剂;稳定剂;和药物可用的聚合物或疏水性材料。可以包含在本发明所述的药物组合物中的其它“其它成分”是本领域已知的,并且在(例如) Genaro主编(1985, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co., Easton, PA)中有所描述,该文献作为参考并入本文。

[0202] 本发明所述的组合物可以包含按所述组合物总重量计约0.005%至2.0%的防腐剂。对于暴露于环境中的污染物来说,所述防腐剂用于防止腐败。根据本发明有用的防腐剂的实例包括(但不限于)选自以下的那些:苯甲醇、山梨酸、对羟基苯甲酸酯类(*parabens*)、咪唑烷基脲(*imidurea*)及其组合。特别优选的防腐剂是约0.5%至2.0%的苯甲醇和0.05%至0.5%的山梨酸的组合。

[0203] 所述组合物优选地包含抗氧化剂和抑制化合物降解的螯合剂。对于一些化合物,优选的抗氧化剂是按组合物总重量计约0.01wt%至0.3wt%的优选范围内的BHT、BHA、 α -生育酚和抗坏血酸,并且更优选地,0.03wt%至0.1wt%的范围内的BHT。优选地,螯合剂以按组合物总重量计0.01wt%至0.5wt%的量存在。特别优选的螯合剂包括按组合物总重量计约0.01wt%至0.20wt%的重量范围内,并且更优选地,按重量计0.02wt%至0.10wt%的范围内的乙二胺四乙酸盐(*edetate salts*) (例如,乙二胺四乙酸二钠)和柠檬酸。螯合剂对螯合所述组合物中对制剂寿命可能有害的金属离子有用。尽管对于一些化合物,BHT和乙二胺四乙酸二钠分别是特别优选的抗氧化剂和螯合剂,但是如本领域技术人员所知的,其它适合的和等同的抗氧化剂和螯合剂可以代替。

[0204] 可以使用常规方法制备液体混悬液以实现活性成分在水性或油性媒介中的混悬。水性媒介包括(例如)水和等渗盐水。油性媒介包括(例如)杏仁油、油脂、乙醇、植物油,如花生油、橄榄油、芝麻油或椰子油、分馏植物油(*fractionated vegetable oil*),和矿物油,如液体石蜡。液体混悬液还可以包含一种或多种其它成分,其包括(但不限于)助悬剂、分散或润湿剂、乳化剂、镇痛剂、防腐剂、缓冲剂、盐、调味剂、着色剂和甜味剂。油性混悬液还可以包含增稠剂。已知的助悬剂包括(但不限于)山梨糖醇糖浆(*sorbitol syrup*)、氢化可食用脂肪、海藻酸钠、聚乙烯吡咯烷酮、黄芪胶、阿拉伯树胶和纤维素衍生物,如羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素。已知的分散或润湿剂包括(但不限于)天然存在的磷脂,如卵磷脂、环氧烷与脂肪酸、与长链脂肪醇、与来源于脂肪酸和己糖醇的偏酯或者与来源于脂肪酸和己糖醇酐的偏酯的缩合产物(例如,分别为聚氧乙烯硬脂酸酯、十七乙烯氧基鲸蜡醇(十七乙烯氧基十六醇, *heptadecaethyleneoxycetanol*)、聚氧乙烯单油酸山梨糖

醇酯和聚氧乙烯单油酸脱水山梨糖醇酯)。已知的乳化剂包括(但不限于)卵磷脂和阿拉伯胶。已知的防腐剂包括(但不限于)对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯或对羟基苯甲酸正丙酯、抗坏血酸和山梨酸。已知的甜味剂包括(例如)甘油、丙二醇、山梨糖醇、蔗糖和糖精。已知用于油性混悬液的增稠剂包括(例如)蜂蜡、固体石蜡(hard paraffin)和鲸蜡醇。

[0205] 可以通过与液体混悬液基本相同的方式在水性或油性溶剂中制备活性成分的液体溶液,其主要差别在于活性成分是溶解的,而不是在溶剂中悬浮的。如本文所使用的,“油性”液体是包含含碳液体分子并且显示出低于水的极性的液体。本发明所述的药物组合物的液体溶液可以包含对于液体混悬液所述的每种成分,应理解助悬剂不必需辅助活性成分在溶剂中的溶解。水性溶剂包括(例如)水和等渗盐水。油性溶剂包括(例如)杏仁油、油酯、乙醇、植物油,如花生油、橄榄油、芝麻油或椰子油、分馏植物油,和矿物油,如液体石蜡。

[0206] 可以使用已知方法制备本发明的药物制剂的粉末和颗粒制剂。可以将这些制剂直接施用于受试者,或者将其用于(例如)形成片剂、填充胶囊或通过向其中添加水性或油性媒介制备水性或油性混悬液或溶液。这些制剂中的每一种还可以包含分散或润湿剂、助悬剂和防腐剂中的一种或多种。这些制剂中还可以包含其它赋形剂,如填充剂和甜味剂、调味剂或着色剂。

[0207] 还可以以水包油乳剂或油包水乳剂形式制备、包装或销售本发明的药物组合物。油相可以是植物油,如橄榄油或花生油、矿物油,如液体石蜡或者这些的组合。这些组合物还可以包含一种或多种乳化剂,如天然存在的胶,如阿拉伯胶或黄芪胶、天然存在的磷脂,如大豆磷脂或卵磷脂(lecithin phosphatide)、来源于脂肪酸和己糖醇酐的组合的酯或偏酯,如单油酸脱水山梨糖醇酯,和这些偏酯与环氧乙烷的缩合产物,如聚氧乙烯单油酸脱水山梨糖醇酯。这些乳剂还可以含有其它成分,其包括(例如)甜味或调味剂。

[0208] 用于用化学组合物浸渗或涂覆材料的方法在本领域中是已知的,并且包括(但不限于)使用或不使用后续干燥,将化学组合物沉积或结合在表面上的方法,在材料合成期间将化学组合物引入到材料结构中的方法(即,如使用生理学可降解材料),和将水性或油性溶液或混悬液吸附到吸附性材料中的方法。

[0209] 在某些实施方式中,将本发明所述的组合物引入到适合于沿受试者牙齿局部应用的药物组合物。例如,在一个实施方式中,将本文所述的NPC引入到糊剂(即牙膏)、漱口水、凝胶、口香糖、可溶解条、贴片、泡沫等中。在另一个实施方式中,将本文所述的NPC引入到用于修复的牙科材料中,如树脂和/或复合材料。在另一个实施方式中,将本文所述的NPC引入到用于蛀牙预防的牙科材料中,如牙科清漆(dental varnish)和牙科密封剂(dental sealant)。

[0210] 在某些实施方式中,将本发明所述的组合物涂覆到可植入材料上以防止在可植入材料上形成和/或积累生物膜。例如,在一个实施方式中,将本文所述的NPC涂覆到植入物上,所述植入物包括(但不限于)矫形植入物(例如,板、螺钉、人造关节等)、组织工程基底、起搏器、心脏泵、胰岛素泵、呼吸管、中心线导管(central line catheters)和留置导管。

[0211] 适合的组合物和剂量形式包括(例如)片剂、胶囊、囊片剂、丸剂、胶丸(软胶囊、软明胶胶囊,gel-caps)、锭剂、分散剂、混悬液、溶液、糖浆、颗粒剂、球剂(beads)、透皮贴片、凝胶剂、粉剂、小粒、乳浆剂(magmas)、锭剂、乳膏剂、糊剂、硬膏剂(plaster)、洗剂、圆盘(disks)、栓剂、用于鼻部或口服施用的液体喷雾、用于吸入的干粉或气雾制剂、用于膀胱内

施用的组合物和制剂等。应理解在本发明中有用的制剂和组合物不限于本文所述的具体制剂和组合物。

[0212] 口服施用

[0213] 对于口服应用,片剂、锭剂(糖衣丸, dragees)、液体、滴剂、栓剂或胶囊、囊片和凝胶胶囊(gelcaps)是特别适合的。适合于口服施用的其它制剂包括(但不限于)粉末状或颗粒状制剂、水性或油性混悬液、水性或油性溶液、糊剂、凝胶、牙膏、漱口水、糖衣(包衣, coating)、口腔冲洗剂、口香糖、清漆(varnishes)、密封剂(sealants)、口腔和牙齿“溶解条(dissolving strips)”,或乳液。可以根据本领域已知的任何方法制备旨在口服使用的组合物并且这些组合物可以包含选自适于生产片剂的惰性、无毒药学赋形剂的一种或多种试剂。这些赋形剂包括(例如)惰性稀释剂,如乳糖;成粒和崩解剂,如玉米淀粉;粘结剂,如淀粉;和润滑剂,如硬脂酸镁。

[0214] 片剂可以是非包衣的或它们可以使用已知的方法包衣以实现在受试者胃肠道中的延迟崩解,从而提供活性成分的持续释放和吸收。举例来说,材料(如单硬脂酸甘油酯或二硬脂酸甘油酯)可以用于包衣片剂。进一步举例来说,可以使用美国专利号4256108; 4160452;和4265874中所述的方法包衣片剂以形成渗透控制释放片剂。片剂还可以包含甜味剂、调味剂、着色剂、防腐剂或这些的一些组合,以提供药学上美观和适口的制剂。

[0215] 可以使用生理学可降解的组分(如明胶)制备包含活性成分的硬胶囊。这类硬胶囊包含活性成分,并且还可以包含其它成分,其包括(例如)惰性固体稀释剂,如碳酸钙、磷酸钙或高岭土。

[0216] 可以使用生理学可降解的组分(如明胶)制备包含活性成分的软明胶胶囊。这类软胶囊包含活性成分,其可以与水或油性介质,如花生油、液体石蜡或橄榄油混合。

[0217] 对于口服施用,本发明的组合物可以处于片剂或胶囊形式,所述片剂或胶囊是通过传统方式用药物可用的赋形剂,如粘结剂;填充剂;润滑剂;崩解剂;或湿润剂制备的。如果需要,可以使用适合的方法和包衣材料包衣片剂,如得自Colorcon, West Point, Pa.的OPADRY™薄膜包衣系统(例如,OPADRY™OY型、OYC型、Organic Enteric OY-P型、Aqueous Enteric OY-A型、OY-PM型和OPADRY™White, 32K18400)。

[0218] 用于口服施用的液体制剂可以处于溶液、糖浆或混悬液的形式。液体制剂可以通过传统方式用药物可用的添加剂制备,所述添加剂如助悬剂(例如,山梨糖醇糖浆、甲基纤维素或氢化食用脂肪);乳化剂(例如,卵磷脂或阿拉伯胶);非水性媒介(例如,杏仁油、油性酯或乙醇);和防腐剂(例如,对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯或山梨酸)。可以以液体形式或以旨在在使用前用水或另一种适合的媒介复原(重构, reconstitution)的干燥产品的形式制备、包装和销售适合于口服施用的本发明的药物组合物的液体制剂。

[0219] 可以(例如)通过任选地与一种或多种其它成分压制或模制活性成分来制备包含活性成分的片剂。可以通过在适合的装置中任选地与一种或多种粘结剂、润滑剂、赋形剂、表面活性剂和分散剂混合来压制自由流动形式的活性成分(如粉末或颗粒制剂)来制备压制片剂。可以通过在适合的装置中模制活性成分、可药用载体和至少足够湿润混合物的液体的混合物来制备模制片剂。在片剂生产中使用的药物可用的赋形剂包括(但不限于)惰性稀释剂、成粒和崩解剂、粘结剂和润滑剂。已知的分散剂包括(但不限于)马铃薯淀粉和淀粉乙醇酸钠。已知的表面活性剂包括(但不限于)月桂基硫酸钠。已知的稀释剂包括(但不

限于) 碳酸钙、碳酸钠、乳糖、微晶纤维素、磷酸钙、磷酸氢钙和磷酸钠。已知的成粒和崩解剂包括(但不限于) 玉米淀粉和海藻酸。已知的粘结剂包括(但不限于) 明胶、阿拉伯胶、预胶凝玉米淀粉、聚乙烯吡咯烷酮和羟丙基甲基纤维素。已知的润滑剂包括(但不限于) 硬脂酸镁、硬脂酸、二氧化硅和滑石。

[0220] 在药学领域中,成粒技术对于改变活性成分的起始粉末或其它颗粒材料是熟知的。粉末通常与粘结剂材料混合成更大的永久自由流动性团块 (agglomerate) 或颗粒,其被称为“成粒”。例如,使用溶剂的“湿”成粒法 (湿法造粒) 一般的特征在于粉末与粘结剂材料结合,并用水或有机溶剂在导致形成湿颗粒状物质的条件下湿润,随后溶剂必须从所述颗粒状物质中蒸发。

[0221] 熔融成粒通常包括使用在室温下为固体或半固体(即具有相对低的软化点或熔点范围)的材料在基本上不添加水或其它液体溶剂的情况下促进粉末状或其它材料成粒。当加热至熔点范围的温度时,低熔点固体液化以用作粘结剂或成粒媒介。液化固体本身分散在与其接触的粉末状材料表面上,并且当冷却时,形成其中初始材料结合在一起的固体颗粒物质。然后,可以将所得的熔融颗粒提供至压片机或将其包封以用于制备口服剂量形式。通过形成固体分散体或固溶体,熔融成粒改善了活性物质(即药物) 的溶解速度和生物利用率。

[0222] 美国专利No.5169645公开了流动性改善的直接可压缩含蜡颗粒剂。当蜡在熔融物中与某些流动性改善添加剂混合,随后将混合物冷却并成粒时,获得了该颗粒剂。在某些实施方式中,仅蜡本身在(一种或多种)蜡和添加剂的熔融组合中熔化,并且在其它情况下,蜡和添加剂两者都将熔化。

[0223] 本发明还包括多层片剂,其包含提供用于本发明的一种或多种化合物的延迟释放的层,和提供用于疾病治疗的药物的立即释放的其它层。使用蜡/pH敏感的聚合物混合物,可以获得其中包夹活性成分的胃不溶性组合物,从而确保了其延迟释放。

[0224] 溶解条通常包括普鲁兰糖并且可以用有效量的本文所述的NPC浸渗。溶解条在口腔内随时间溶解,从而将组合物应用于口腔内的表面。因此, NPC从普鲁兰糖材料中释放,并借此应用于相关治疗位点。

[0225] 口香糖可以是任何口香糖组合物,如本领域中已知的常规组合物。一般说来,这些组合物包括口香糖基质,其中可以添加风味剂、甜味剂、着色剂及其它本领域中已知的成分。口香糖基质通常是天然或合成弹性体,如橡胶、糖胶树胶(chicle)、夹竹桃科胶(莱开欧胶,lechi caspi)、节路顿胶(jelutong)、聚异丁烯、异丁烯-异戊二烯共聚物、苯乙烯-丁二烯共聚物或本领域中已知的其它适合的口香糖基质。在某些实施方式中,将本文所述的NPC引入到适合的口香糖组合物内,从而在受试者咀嚼口香糖时将NPC释放到口腔中。

[0226] 肠胃外施用

[0227] 如本文所使用,药物组合物的“肠胃外施用”包括其特征在于物理破坏受试者组织并通过所述组织中的裂口(breach)施用药物组合物的任何施用途径。因此,肠胃外施用包括(但不限于)通过注射组合物、通过外科切口应用组合物、通过穿透组织的非外科创伤应用组合物等的药物组合物的施用。具体地,考虑肠胃外施用包括(但不限于)皮下、腹膜内、肌内、胸骨内注射和肾透析输注技术。

[0228] 适合于肠胃外施用的药物组合物制剂包含与可药用载体(如无菌水或无菌生理盐

水)结合的活性成分。可以以适合于弹丸施用或连续施用的形式制备、包装或销售这些制剂。可以以单位剂量形式,如以包含防腐剂的安瓿或多剂量容器的形式制备、包装或销售可注射制剂。用于肠胃外施用的制剂包括(但不限于)混悬液、溶液、油性或水性媒介中的乳液、糊剂和可植入持续释放的或生物可降解的制剂。这些制剂还可以包含一种或多种其它成分,其包括(但不限于)助悬剂、稳定剂或分散剂。在肠胃外施用制剂的一个实施方式中,以干燥形式(即粉末或颗粒)提供活性成分以用于在肠胃外施用复原的组合物之前用适合的媒介(例如,无菌无热原水)复原(重构、复配, reconstitution)。

[0229] 可以以无菌可注射水性或油性混悬液或溶液形式制备、包装或销售药物组合物。可以根据已知技术配制这种混悬液或溶液,并且除活性成分外,所述混悬液或溶液可以包含其它成分,如本文所述的分散剂、湿润剂或助悬剂。例如,可以使用无毒的肠胃外可用的稀释剂或溶剂,如水或1,3-丁二醇制备这类无菌可注射制剂。其它可用的稀释剂和溶剂包括(但不限于)林格氏溶液、等渗氯化钠溶液和不挥发油,如合成单或双甘油酯。有用的其它肠胃外可施用制剂包括包含处于微晶形式、脂质体制剂中或作为生物可降解聚合物体系组分的活性成分的那些。用于持续释放或植入的组合物可以包含药物可用的聚合物或疏水性材料,如乳液、离子交换树脂、微溶聚合物或微溶盐。

[0230] 局部施用

[0231] 药物局部施用的障碍是皮肤的角质层。角质层是高抗性层,其由蛋白质、胆固醇、鞘脂类、游离脂肪酸和多种其它脂类组成,并且包括角质化的和活的细胞。限制化合物通过角质层的渗透速度(通量)的因素之一是可以加载或施加到皮肤表面上的活性物质的量。单位皮肤面积应用的活性物质的量越大,则皮肤表面和皮肤下层之间的浓度梯度越大,并且进而活性物质通过皮肤的扩散力越大。因此,在所有其它因素相同的情况下,相比于具有较低浓度的制剂,包含较大浓度的活性物质的制剂更可能导致活性物质渗透通过皮肤,并且通过的更多,并且以更恒定的速度通过。

[0232] 适合于局部施用的制剂包括(但不限于)液体或半液体制剂,如搽剂(liniments)、洗液、水包油或油包水乳液,如乳膏剂、软膏剂或糊剂和溶液或混悬液。局部可施用的制剂可以(例如)包含约1%至约10%(w/w)的活性成分,尽管活性成分的浓度可以高至活性成分在溶剂中的溶解度极限。用于局部施用的制剂还可以包含本文所述的一种或多种其它成分。

[0233] 可以使用渗透促进剂。这些材料提高药物穿过皮肤的渗透速度。本领域中典型的促进剂(enhancer)包括乙醇、单月桂酸甘油酯、PGML(聚乙二醇单月桂酸酯)、二甲亚砜等。其它促进剂包括油酸、油醇、乙氧基二甘醇、月桂氮酮(laurocapram)、烷羧酸、二甲亚砜、极性脂或N-甲基-2-吡咯烷酮。

[0234] 用于本发明一些组合物的局部递送的一种可用媒介可以包含脂质体。脂质体的组成和它们的使用在本领域中是已知的(例如,参见美国专利 No.6323219)。

[0235] 在替代性实施方式中,局部活性药物组合物可以任选地与其它成分结合,如佐剂、抗氧化剂、螯合剂、表面活性剂、起泡剂、湿润剂、乳化剂、增粘剂(viscosifier)、缓冲剂、防腐剂等。在另一个实施方式中,渗入或渗透促进剂包括在组合物中并且相对于缺少渗透促进剂的组合物,有效改善了活性成分经皮渗透至和通过角质层。多种渗透促进剂是本领域技术人员已知的,其包括油酸、油醇、乙氧基二甘醇、月桂氮酮、烷羧酸、二甲亚砜、极性脂

(极性脂质)或N-甲基-2-吡咯烷酮。在另一方面中,所述组合物还可以包含水溶助剂(hydrotropic agent),其用于提高角质层结构的无序性(disorder),并因此允许提高穿过角质层的输送。多种水溶助剂是本领域技术人员已知的,如异丙醇、丙二醇或二甲苯磺酸钠。

[0236] 局部活性药物组合物应以影响所需改变的有效量施用。如本文所使用的,“有效量”应指足以覆盖期望改变的皮肤表面区域的量。活性化合物应以按组合物的重量(weight volume)计约0.0001%至约15%的量存在。更优选地,它应以组合物的约0.0005%至约5%的量存在;最优选地,它应以组合物的约0.001%至约1%的量存在。这些化合物可以是合成的或天然来源的。

[0237] 直肠施用

[0238] 可以以适合于直肠施用的制剂制备、包装或销售本发明的药物组合物。这种组合物可以处于(例如)栓剂、保留灌肠制剂(retention enema preparation)以及用于直肠或结肠灌洗的溶液的形式。

[0239] 可以通过将活性成分与无刺激的药物可用的赋形剂混合(结合、合并, combine)来制备栓剂制剂,所述赋形剂在常规室温(即,约20℃)是固体的并且在受试者的直肠温度(即在健康人中为约37℃)是液体的。适合的药物可用的赋形剂包括(但不限于)可可脂、聚乙二醇和多种甘油酯。栓剂制剂还可以包括多种其它成分,其包括(但不限于)抗氧化剂和防腐剂。

[0240] 可以通过将活性成分与药物可用的液体载体混合来制备保留灌肠制剂或用于直肠或结肠灌洗的溶液。如本领域所熟知的,可以使用适应于受试者直肠解剖结构的递送装置施用灌肠制剂,并且可以将其包装在所述设备中。灌肠制剂还可以包括多种其它成分,其包括(但不限于)抗氧化剂和防腐剂。

[0241] 阴道施用

[0242] 可以以适合于阴道施用的制剂制备、包装或销售本发明的药物组合物。对于本发明所述的化合物的阴道或阴道周施用,剂量形式可以包括阴道栓剂、乳膏剂、软膏剂、液体制剂、阴道环(pessary)、填塞物、凝胶剂、糊剂、泡沫剂或喷雾剂。用于阴道或阴道周递送的栓剂、溶液、乳膏剂、软膏剂、液体制剂、阴道环、填塞物、凝胶剂、糊剂、泡沫剂或喷雾剂包含治疗有效量的所选活性剂和适合于阴道或阴道周药物施用的一种或多种常规无毒载体。可以使用如Remington:The Science and Practice of Pharmacy(如上)中所公开的常规方法制备本发明的阴道或阴道周形式(还参见如美国专利No.6515198;6500822;6417186;6416779;6376500;6355641;6258819;6172062;和6086909中采用的药物制剂)。可以制备阴道或阴道周剂量单位以快速或在几个小时的一段时间内崩解。完全崩解的时间段可以在约10分钟至约6小时的范围内,例如,小于约3小时。

[0243] 用于用化学组合物浸渗或涂覆材料的方法在本领域中是已知的,并且包括(但不限于)使用或不使用后续干燥,将化学组合物沉积或结合在表面上的方法,在材料(即,如使用生理学可降解材料)合成期间将化学组合物引入到材料结构中的方法,和将水性或油性溶液或混悬液吸附到吸附性材料中的方法。

[0244] 可以通过将活性成分与药物可用的液体载体混合来制备灌洗(冲洗, douche)制剂或用于阴道灌洗的溶液。如本领域所熟知的,可以使用适应于受试者阴道解剖结构的递

送装置施用灌洗制剂,并且可以将其包装在所述递送装置中。

[0245] 灌洗制剂还可以包含多种其它成分,其包括(但不限于)抗氧化剂、抗生素、抗真菌剂和防腐剂。

[0246] 口腔施用

[0247] 可以以适合于口腔施用的制剂制备、包装或销售本发明的药物组合物。这些制剂可以(例如)处于使用常规方法制备的片剂或锭剂形式,并且可以是(例如)0.1至20% (w/w)的活性成分,剩下的是包含口服可溶解或可降解的组合物和任选地本文所述的一种或多种其它成分。交替地,适合于口腔施用的制剂可以包含粉剂或含有活性成分的气雾化(aerosolized)或雾化(atomized)溶液或混悬液。当分散时,这些粉剂,气雾化或气雾化制剂优选地具有约0.1至约200纳米范围内的平均颗粒或微滴尺寸,并且还可以包含一种或多种本文所述的其它成分。本文所述的制剂的实例是非穷举的并且应理解本发明包括本文未描述的这些及其它制剂的其它改变,并且这些是本领域技术人员已知的。

[0248] 其它施用形式

[0249] 本发明的其它剂量形式包括如美国专利No.6340475、6488962、6451808、5972389、5582837和5007790中所述的剂量形式。本发明的其它剂量形式还包括如美国专利申请No.20030147952、20030104062、20030104053、20030044466、20030039688和20020051820中所述的剂量形式。本发明的其它剂量形式还包括如PCT申请No.WO 03/35041、WO 03/35040、WO 03/35029、WO 03/35177、WO 03/35039、WO 02/96404、WO 02/32416、WO 01/97783、WO 01/56544、WO 01/32217、WO 98/55107、WO 98/11879、WO 97/47285、WO 93/18755和WO 90/11757中所述的剂量形式。

[0250] 治疗方法

[0251] 本发明提供了治疗和/或预防生物膜和生物膜相关感染的方法,其包括施用有效量的组合物,所述组合物包含含有至少一种治疗剂的NPC。如本文所述,本文所述的NPC结合至生物膜内的位点,并且结合至有生物膜形成和积累风险的区域。照此,本文所述的NPC用作归航组合物,从而在需要治疗剂时,提供治疗剂在靶标位点的持续和局部递送。在某些实施方式中,本文所述的NPC是pH响应性的,其中治疗剂的释放受局部pH的影响。例如,在某些条件下,生物膜内酸性生境的发展是导致口腔疾病(如龋齿)所必需的,这是因为:1)该生境有利于导致龋齿和产酸生物的生长,2)该生境引起进一步的生物膜积累,和3)局部酸性导致牙齿的酸溶解。因此,在某些实施方式中,本发明所述的NPC包含特异地酸性条件下引起NPC胶束去组装(disassembly)的pH响应性成分。当需要试剂时,这使得试剂能够特异地低pH条件下递送,同时在生理学pH不提供或提供最少的递送。

[0252] 本发明所述的方法可以用于治疗和/或预防任何类型的生物膜或生物膜相关感染。例如,本文表明本发明所述的组合物的施用抑制生物膜的形成,抑制生物膜的进一步积累,促进已有生物膜的破坏或去组装,并且削弱已有的生物膜,借此使得更易于机械破坏生物膜。

[0253] 其中涉及生物膜的示例性病症以及因此其中本发明方法可以用于治疗和/或预防的病症包括口腔疾病,其包括(但不限于)牙斑、龋齿、齿龈炎、牙周病和生物膜相关粘膜感染,包括(例如)义齿性口炎和口腔念珠菌病。在某些实施方式中,本发明方法可以用于治疗和/或预防示例性疾病或病症,其包括(但不限于)尿路感染、导管感染、中耳感染、创口和植

入生物材料(例如,人造关节、人工瓣膜等)感染。

[0254] 在具体的实施方式中,本发明所述的方法治疗和/或预防龋齿。龋齿是通过在薄膜上形成的生龋生物膜产生的。如在本文其它地方所述的,本文所述的NPC结合至薄膜以及薄膜上形成的生物膜。基于局部治疗的传统龋齿治疗方法的缺陷在于由于唾液和摄食的快速清除,活性剂在口腔中不能保留足够的持续时间以发挥其完全的治疗潜力。

[0255] 本文所述的NPC在薄膜或生物膜上保留,借此使得能够持续和控制递送,以防止在“风险”表面形成生物膜并防止进一步的生物膜积累。此外,局部递送使得能够使用在传统方法中不适用的广谱活性剂。将在常规递送方法中发生的整个口腔对广谱试剂的暴露将无差别地消除细菌和微生物物种,其包括对口腔健康无害或有益的那些。然而,包封的治疗剂以及控制和局部递送使得能够使用这些强力的试剂,而没有将整个口腔暴露于其作用的风险。

[0256] 本发明不限于治疗和/或预防活体中的生物膜,而是涵盖了治疗和/或预防体外表面上生物膜的方法。例如,生物膜可以在潮湿环境中的表面上形成,包括浴室、厨房和某些工业环境。在某些实施方式中,在方法中使用本文所述的组合物以治疗和/或预防住宅、商业和工业环境中沿表面的生物膜形成或积累。所述方法包括向表面施用有效量的包含抗生物膜剂的NPC。在某些实施方式中,在方法中使用本文所述的组合物以治疗和/或预防植物、树木、水果、蔬菜和农作物上生物膜的形成。所述方法包括向具有生物膜或具有形成生物膜风险的植物、树木、水果、蔬菜或农作物上施用有效量的包含抗生物膜剂的NPC。

[0257] 在某些实施方式中,本发明所述的方法包括向包含生物膜的表面施用有效量的包含NPC和包封治疗剂的组合物,并且机械除去所述生物膜。例如,本文描述本发明所述的组合物可以削弱生物膜结构或支架,这然后使得更易于机械除去所述生物膜。例如,在某些实施方式中,所述方法包括向包含生物膜的薄膜施用本发明所述的组合物,并且使用(例如)牙刷或其它工具机械除去所述生物膜。

[0258] 施用/剂量施用

[0259] 施用方案可以影响有效量的构成。可以在疾病诊断之前或之后,向受试者施用治疗制剂。另外,可以每天或顺序施用一些划分剂量和交错剂量,或者可以连续输注剂量,或者可以是弹丸注射剂量。另外,可以根据治疗或预防情况的紧急需要的指示,按比例增加或减少治疗制剂的剂量。

[0260] 本发明任何组合物的施用途径包括口服、鼻部、直肠、肠胃外、舌下、经皮、经粘膜(例如,舌下、舌、(经)口腔、(经)尿道、阴道(例如,经阴道和阴道周)、鼻(内)和(经)直肠)、膀胱内、肺内、十二指肠内、胃内、鞘内、皮下、肌内、皮内、动脉内、静脉内、支气管内、吸入和局部施用。

[0261] 可以使用已知程序,以对疾病的预防或治疗有效的剂量和时间段进行对受试者(优选地,哺乳动物,更优选地,人)的本发明的组合物的施用。可以根据以下因素改变实现治疗效果所必需的治疗化合物的有效量,如所使用的特定化合物的活性;施用时间;化合物外排速率;治疗持续时间;与所述化合物结合使用的其它药物、化合物或材料;待治疗受试者的疾病或病症状况、年龄、性别、体重、病症(条件,condition)、一般健康状况和先前病史,以及医学领域中熟知的类似因素。可以调节剂量方案以提供最佳的治疗反应。例如,可以每天施用一些划分剂量(divided doses),或者可以如治疗情况紧急需要所指示的,按比

例降低剂量。本发明的治疗化合物的有效量范围的非限制性实例为约1至5000mg/kg体重/天。本领域的技术人员将能够研究相关因素并做出与治疗化合物的有效量有关的决定而无需过多实验。

[0262] 可以向受试者以频繁至每天几次的频率施用化合物,或者可以不太频繁地施用,如每天一次、每周一次、每两周一次、每月一次或甚至更不频繁,如每几个月一次或甚至每年一次或更少。应理解在非限制性实例中,可以每天、每隔一天、每2天、每3天、每4天或每5天施用每天剂量施用的化合物的量。例如,通过每隔一天施用,可以在周一开始5mg每天的剂量,并在周三施用第一次后续5mg每天的剂量,在周五施用第二次后续 5mg每天的剂量,等等。剂量的频率对于熟练的技术人员将是显而易见的,并且将取决于多种因素,如(但不限于)待治疗疾病的类型和严重性、动物的类型和年龄等。

[0263] 可以改变本发明所述药物组合中活性成分的实际剂量水平,从而对特定受试者、组合和施用形式获得实现所需治疗反应有效的活性成分的量,而不会对受试者有毒。

[0264] 具有本领域常规技术的医生,例如,医师、牙科医生或兽医可以容易地确定并开具所需的药物组合的有效量。例如,医师或兽医可以以低于实现所需治疗效果所需的水平开始在药物组合中使用的本发明所述的化合物的剂量,并逐渐提高剂量直至实现所需效果。

[0265] 在具体的实施方式中,将化合物配制成剂量单位形式是尤其有利的,以便于施用和剂量均匀性。如本文所使用的剂量单位形式是指适用于待治疗受试者的单一剂量的物理上离散的单元;每个单元含有与所需药物媒介相关联的经计算产生所需治疗效果的预定量的治疗化合物。本发明剂量单位形式由(a)治疗化合物的独有特性和待实现的具体治疗效果,以及(b)制备/配置这种治疗化合物用于受试者中疾病的治疗的领域中固有的限制所决定,并且直接取决于它们。

[0266] 在一个实施方式中,将本发明所述的组合物以每天1至5次或更大的范围内的剂量施用于受试者。在另一个实施方式中,将本发明所述的组合物以以下剂量范围施用于受试者,所述剂量范围包括(但不限于)每天一次、每两天一次、每三天一次至每周一次和每两周一次。对于本领域技术人员显而易见的是对于不同受试者,本发明所述组合物的多种组合的施用频率将是不同的,这取决于多种因素,其包括(但不限于)年龄、待治疗的疾病或病症、性别、整体健康状况及其它因素。因此,本发明不应视为仅限于任何特定剂量方案,并且要施用给任何受试者的精确剂量和组合物将由主治医生考虑受试者有关的所有其它因素来决定。

[0267] 用于施用的本发明的化合物可以在约1mg至约10000mg,约20mg至约9500mg,约40mg至约9000mg,约75mg至约8500mg,约150mg至约7500mg,约200mg至约7000mg,约3050mg至约6000mg,约500mg 至约5000mg,约750mg至约4000mg,约1mg至约3000mg,约10mg至约2500mg,约20mg至约2000mg,约25mg至约1500mg,约50mg至约 1000mg,约75mg至约900mg,约100mg至约800mg,约250mg至约750mg,约300mg至约600mg,约400mg至约500mg的范围内以及它们之间的任何和全部整体或部分增量。

[0268] 在一些实施方式中,本发明化合物的剂量为约1mg至约2500mg。在一些实施方式中,在本文所述的组合物中使用的本发明的化合物的剂量小于约10000mg,或小于约8000mg,或小于约6000mg,或小于约5000mg,或小于约3000mg,或小于约2000mg,或小于约

1000mg,或小于约500mg,或小于约200mg,或小于约50mg。类似地,在一些实施方式中,如本文所述的第二化合物(即,用于治疗如本发明所述组合物所治疗的相同或另一种疾病的药物)的剂量小于约1000mg,或小于约800mg,或小于约600mg,或小于约500mg,或小于约400mg,或小于约300mg,或小于约200mg,或小于约100mg,或小于约50mg,或小于约40mg,或小于约30mg,或小于约25mg,或小于约20mg,或小于约15mg,或小于约10mg,或小于约5mg,或小于约2mg,或小于约1mg,或小于约0.5mg及其任何和全部的整体或部分增量。

[0269] 在一个实施方式中,本发明涉及包装的药物组合物,其包括具有单独的或与第二药剂结合的治疗有效量的本发明的化合物或结合物的容器;和使用所述化合物或结合物治疗、预防或减轻受试者中一种或多种疾病症状的说明。

[0270] 术语“容器”包括用于容纳所述药物组合物的任何容器(receptacle)。例如,在一个实施方式中,所述容器为含有所述药物组合物的包装。在其它实施方式中,所述容器不是含有所述药物组合物的包装(即,所述容器是含有包装的药物组合物或未包装的药物组合物的容器,如箱或小瓶)以及所述药物组合物的使用说明。此外,包装技术在本领域中是熟知的。应理解所述药物组合物的使用说明可以包含在含有所述药物组合物的包装上,并且照此所述说明与包装产品形成了提高的功能关系。然而,应理解说明(说明书)可以包含有关化合物发挥其预定功能的能力的信息,例如,治疗或预防受试者中的疾病或向受试者递送图像或诊断试剂。

[0271] 在一个实施方式中,由受试者将所述组合物施用至其体内位点。在另一个实施方式中,由专业保健人员(例如,医师、牙科医生、牙科卫生员、兽医等)施用组合物。例如,在一个实施方式中,牙科医生将本文所述的NPC直接应用于受试者的牙齿。在一个实施方式中,牙科医生将本文所述的NPC应用于有生物膜形成和积累风险的位点。在另一个实施方式中,牙科医生将本文所述的NPC应用于已主动发展生物膜的位点。

[0272] 控制释放制剂和药物递送系统

[0273] 本发明涵盖了当引发治疗剂进行释放时,用于治疗剂控制释放的组合物和系统。例如,如在本文其它地方所述的,本发明所述的NPC在需要至少一种治疗剂的时间和位置释放至少一种治疗剂。可以通过治疗或预防位点的微环境内的多种因素来完成释放的引发,其包括(但不限于)温度、pH、特定分子或生物分子的存在或活性等。

[0274] 在某些情况下,可以使用常规技术,使用(例如)配备有pH敏感域或蛋白酶可切割片段的蛋白质来制备本发明的药物组合物的控制或持续释放制剂。在一些情况下,可以使用(例如)羟丙基甲基纤维素、其它聚合物基质、凝胶剂、渗透膜、渗透系统、多层涂层、微粒、脂质体或微球体或其组合,将要使用的剂量形式作为其中一种或多种活性成分的缓慢释放或控制释放而提供,以提供不同比例的所需释放分布谱。可以容易地选择包括本文所述的那些在内的本领域那些技术人员已知的适合的控制释放制剂以用于和本发明的药物组合物一起使用。因此,本发明涵盖了适合于口服的单一单位剂量形式,如适合于控制释放的片剂、胶囊、胶丸(软胶囊、软明胶胶囊,gel-caps)、锭剂和囊片剂。

[0275] 大部分控制释放药物产品具有共同的目标:改善药物治疗以优于其不控制释放的对应物。理想地,在医学治疗中优化设计的控制释放制剂的使用的特征在于在最短的时间内使用最少的药物物质来治愈或控制病症。控制释放制剂的优势包括延长的药物活性、降低的剂量频率和提高的受试者顺应性。另外,控制释放制剂可以用于影响作用或其它特征

的发生时间,如药物的血液水平,并因此可以影响副作用的发生。

[0276] 大部分控制释放制剂设计在开始时释放快速产生所需治疗效果的药物量,并逐渐和不断地释放在延长的一段时间内维持这种治疗效果水平的其它药物量。在某些实施方式中,本文所述的NPC的控制释放制剂使得能够在最需要试剂时,精确释放治疗剂。在另一个实施方式中,本文所述的NPC的控制释放制剂使得能够在治疗剂最有活性的情况下,精确释放治疗剂。为了在体内维持药物的这种恒定水平,必须以将替代代谢掉和从体内排出的药物量的速率从所述剂量形式中释放药物。

[0277] 可以通过多种诱导剂刺激活性成分的控制释放,例如,pH、温度、酶、水或其它生理条件或化合物。在本发明的背景中,术语“控制释放组分”在本文中定义为有利于活性成分控制释放的一种或多种化合物,其包括(但不限于)聚合物、聚合物基质、凝胶剂、渗透膜、脂质体或微球体或其组合。

[0278] 在某些实施方式中,本发明所述的制剂可以是(但不限于)短期、快速补偿(rapid-offset)以及控制(例如,持续释放)释放、迟延释放和脉动释放制剂。

[0279] 以其常规意义使用术语持续释放以表示用于在延长的一段时间内逐渐释放药物并且可以(尽管不必需)导致在延长的一段时间内基本恒定的血液药物水平的药物制剂。所述一段时间可以长至一个月或更长,并且应为比以丸剂形式施用的相同量的试剂更长的释放。

[0280] 对于持续释放,可以将化合物与向所述化合物提供持续释放性质的适合的聚合物或疏水物质一起配制。照此,可以(例如)通过注射以微粒形式或通过植入以薄片(wafer)或圆盘形式施用用于本发明所述方法的化合物。

[0281] 在本发明优选的实施方式中,使用持续释放制剂,将本发明所述的化合物单独施用于受试者,或与另一种药物试剂结合施用。

[0282] 以其常规意义在本文中使用术语迟延释放以表示用于在药物施用后的一定延迟之后开始药物释放并且可以(尽管不必需)包括从约10分钟长至约12小时的延迟的药物制剂。

[0283] 以其常规意义在本文中使用术语脉动释放(pulsatile release)以表示在药物施用后以生产脉动药物血浆谱的方式提供药物释放的药物制剂。

[0284] 以其常规意义使用术语立即释放以表示在药物施用后立即提供药物释放的药物制剂。

[0285] 如本文所使用的,短期是指在药物施用后,长达并包括约8小时、约7小时、约6小时、约5小时、约4小时、约3小时、约2小时、约1小时、约40分钟、约20分钟或约10分钟的任何时间段及其任何或全部的整体或部分增量。

[0286] 如本文所使用的,快速补偿是指在药物施用后,长达并包括约8小时、约7小时、约6小时、约5小时、约4小时、约3小时、约2小时、约1小时、约40分钟、约20分钟或约10分钟的任何时间段及其任何和全部的整体或部分增量。

[0287] 最多使用常规实验法,本领域技术人员将认识或能够确定本文所述的具体程序、实施方式、权利要求和实施例的大量等价物。认为这些等价物在本发明的范围内并且由所附权利要求所涵盖。例如,应理解使用本领域认可的替代选择和最多使用常规试验方法,反应条件的改变是在本发明申请的范围内,其包括(但不限于)反应时间、反应大小/体积和实

验试剂,如溶剂、催化剂、压力、气氛条件,例如,氮气氛和还原/氧化剂。

[0288] 应理解本文无论在任何地方提供值和范围,这些值和范围所涵盖的所有值和范围旨在涵盖在本发明的范围内。此外,本发明申请还考虑了这些范围内的所有值,以及值范围的上限或下限。

[0289] 实验实施例

[0290] 通过参考以下实验实施例,进一步详细描述了本发明。这些实施例仅以说明的目的提供,并且除非另外说明,否则不意欲进行限制。因此,本发明决不应视为受限于以下实施例,而应视为由于本文所提供的教导内容,涵盖了显而易见的任何和全部变化。

[0291] 无需进一步描述,据信使用以上说明以及以下说明性实施例,本领域的技术人员可以制备和使用本发明所述的化合物并实践所主张的方法。因此,以下工作实施例具体指出了本发明优选的实施方式,并且不应将其视为以任何方式限制本发明公开的其它内容。

[0292] 实施例1:通过pH-激活的纳米颗粒载体的抗生物膜剂的控制释放。

[0293] 可以将对环境刺激物主动起反应的纳米材料和纳米级(纳米尺度)系统用作新型药物递送系统。本文描述了保留和局部递送抗生物膜剂的令人激动的方法。该方法使用结合至薄膜(有生物膜形成风险的位点)和富含EPS的基质(生物膜内)两者上的通用纳米颗粒载体(NPC)。该非细胞毒性和非杀菌性聚合物基纳米载体还含有pH响应性成分,其有利于治疗剂在酸性环境内的控制释放。可以将两种已证明的抗生物膜剂(法呢醇和芹菜素)化学连接至NPC,并可以在低pH值从NPC中释放。法呢醇是在酸性pH有效的膜靶向抗菌剂,而芹菜素是EPS合成抑制剂。然而,任一种药物都不是在口腔中最佳保留的。本文描述pH激活的纳米颗粒提高了局部化并提供了独特抗生物膜剂的原位控制和持续释放,在此形成活性生物膜组装体,借此提高药物对龋齿体内发生的药效。本文所述的实验使用通过临床相关短暂暴露治疗方案建立的混合种生龋生物膜模型,比较了本发明的药物递送方法(相对于无NPC递送的药剂)对生物膜控制的有效性,另外,设计实验以检验NPC递送的药剂在防止龋齿疾病体内发生方面是否更有效(相对于无NPC递送的药剂)。将本发明的NPC基药物递送方法与当前龋齿预防(氟化物)和抗微生物剂疗法(氯己啶)的“黄金标准”相比较。本文所提供的数据表明了NPC将治疗剂递送至特定局部环境的潜能。该数据表明了使用NPC基疗法控制口腔生物膜的能力,同时由于生物膜与大部分感染性疾病有关,因此还具有口腔以外的相关性。

[0294] 现将描述在实验中使用的材料和方法。

[0295] 材料和方法

[0296] 使用体外混合种生龋生物膜和啮齿类龋齿模型两者,相对于无NPC递送的试剂评价了NPC药物递送方法的有效性。在存在唾液的情况下,需要有效性与延长的生物活性(短暂局部暴露后)的组合以提高体内效力的可能性。因此,使用了基于与NPC连接的试剂的每日局部施用的临床相关治疗方案。

[0297] 体外

[0298] 检验了在存在唾液的情况下,NPC递送的试剂是否(1)可以破坏初始生物膜组装体,(2)防止生物膜的进一步积累,和(3)促进预形成的生物膜的去组装(分解、解体,disassembly)或防止预形成的生物膜的进一步组装(累积)。

[0299] 治疗的准备

[0300] 对于以下治疗/实验组,使用了NPC连接的试剂和游离试剂(未连接至NPC):1) NPC-

芹菜素、2) NPC-法呢醇、3) NPC-芹菜素+法呢醇、4) 仅NPC (NPC-对照)、5) 芹菜素、6) 法呢醇、7) 芹菜素+法呢醇和8) 载体对照。如先前所进行的,将这些试剂每天应用两次,1分钟 (Koo等人,2005,J Dent Res,84(11):1016-1020;Falsetta等人,2012,Antimicrob Agents Chemother,56(12):6201-6211)。对于药物递送的优化,系统改变 NPC接头以使得能够调节药物释放速率、浓度和药物释放的耐久性以提供最大治疗效果。改变药物掺入的量和可降解链的长度/化学性质以提高芹菜素和法呢醇的递送/有效性。

[0301] 生物膜形成

[0302] 使用已建立的模拟与生龋生物膜发展有关的生态学和生物化学变化动态的体外模型,在SHA圆盘上产生了混合种生物膜 (Klein等人,2012, PLoS One,7(9):e45795;Xiao等人,2012,PLoS Pathol,8(4):e1002623)。使用变形链球菌 (*S.mutans*) UA159 (已证明的生龋病原体)、内氏放线菌 (*Actinomyces naeslundii*) ATCC 12104和口腔链球菌 (*Streptococcus oralis*) ATCC 35037 (早期定殖菌)。图6显示了试验设计,包括代表生物膜发展的不同阶段的生物膜去除的时间点 (Xiao等人,2012,PLoS Pathol, 8(4):e1002623)。检验以下生物膜属性:1) 生物量、2) 结构组织和3) 基因表达。

[0303] 生物量和3D生物膜结构

[0304] 使用如先前详细描述的组合聚焦荧光成像法和生物化学法的组合分析生物膜的生物量和3D空间组织 (Koo等人,2005,J Dent Res, 84(11):1016-1020;Xiao等人,2012,PLoS Pathol,8(4):e1002623)。简要地,用Alexa Fluor 647标记EPS,用Syto9标记细菌细胞 (Xiao等人,2012,PLoS Pathol,8(4):e1002623)。使用具有定制激光和物镜的Olympus FV1000双光子显微镜采集图像,并使用AMIRA (用于3D重构) 和 COMSTAT-DUOSTAT (生物膜生物量、EPS和比值的定量) 分析。使用标准生物化学和培养法确定干重、蛋白/EPS含量和活细胞 (菌落形成单位: CFU/干重或CFU/蛋白) (Koo等人,2005,J Dent Res,84(11):1016-1020)。

[0305] 基因表达

[0306] 实施RT-qPCR监控变形链球菌 (*S.mutans*) 中已知直接受芹菜素和法呢醇影响的基因gtfBCD (EPS合成) 和atpD (酸性耐受) 基因的表达 (Falsetta,2012,Antimicrob Agents Chemother,56(12):6201-6211)。使用对生物膜优化的规程,从每个处理的生物膜提取RNA并纯化 (Klein等人, 2012,PLoS One,7(9):e45795;Xiao等人,2012,PLoS Pathol,8(4):e1002623)。按照标准程序,使用基因特异引物合成并扩增cDNA (Klein 等人,2012,PLoS One,7(9):e45795;Xiao等人,2012,PLoS Pathol,8(4): e1002623)。还使用RNA印迹和RNAseq测定来补充基因表达测定。

[0307] 体内

[0308] 动物研究

[0309] 使用啮齿类牙齿龋齿模型评价有效的NPC递送试剂。简要地,使用变形链球菌 (*S.mutans*) UA159通过口腔感染雌性Sprague-Dawley SPF 大鼠 (Koo等人,2005,J Dent Res,84(11):1016-1020)。将大鼠随机置于实验组。组包括最有效的NPC递送试剂和NPC对照。另外,作为阳性对照 (以及它们的载体对照) 包含临床已证明的抗龋剂 (氟化物;作为NaF, 250ppm) 和广谱杀菌剂 (氯己定;0.12%v/v)。通过向动物饲喂Diet 2000 (含有56%的蔗糖) 并提供5% (w/v) 的蔗糖水进行无限制饮水5周来引起生龋菌斑-生物膜形成。使用

驼毛刷 (camel brush), 每天应用两次局部治疗 (包括周末)。实验期后, 通过CO₂窒息处死动物。

[0310] 菌斑的生物化学评价

[0311] 无菌解剖下颚, 除去菌斑并使用培养 (MSB琼脂和血液琼脂) 和基于PCR的方法分析 (1) 变形链球菌 (*S.mutans*) 和总可培养菌群数, 和 (2) EPS含量。

[0312] 龋齿评价

[0313] 根据Keyes系统的Larson改良方法, 对牙齿进行龋齿评分。

[0314] 统计分析

[0315] 使用JMP 8.0版 (SAS Institute Inc.) 并且显著性水平设置为0.05, 分析体外数据 (得自成像、生物化学和基因表达分析) 和体内数据 (龋齿得分和微生物计数)。

[0316] 现将描述实验结果。

[0317] 在存在唾液的情况下, NPC结合至薄膜和EPS-基质。

[0318] 基于它们的化学组成和官能性选择纳米颗粒-载体 (NPC)。它们由与特定表面静电相互作用并且包含pH响应性成分的聚合物基阳离子胶束组成。在酸性pH, NPC对递送多种药物是非常有效的 (Benoit等人, 2010, *Mol Pharm*, 7 (2): 442-455), 并且对人细胞无毒并且是非杀菌的。图2显示了 NPC的整体结构 (包括pH响应性和药物递送成分), 以及pH-引发的NPC药物释放的总体性原理。NPC包含聚 (甲基丙烯酸二甲氨基乙酯)-b-聚 (甲基丙烯酸二甲氨基乙酯-共-丙基丙烯酸-共-甲基丙烯酸丁酯) (pDMAEMA-b-p (DMAEMA-共-PAA-共-BMA)) (图2A)。图2B显示 NPC的pH依赖性结构。在生理学pH, 外部成分 (元素, element) (黑色) 质子化, 并设计对薄膜具有高亲合力。内部成分 (蓝色) 设计在生理学pH 是几乎电中性的, 但通过包含BMA是疏水性的。在较低的pH环境, 内部成分更加质子化, 从而将NPC分解并从纳米颗粒核释放药物。

[0319] 最初, 在存在唾液的情况下测试所选NPC是否结合至薄膜涂覆的羟基磷灰石 (HA) 珠表面。在与薄膜涂覆的HA珠培育前, 将NPC与唾液混合。NPC暴露 (1至60分钟) 后, 将所述珠在磷酸盐缓冲液中彻底清洗以除去任何结合的材料, 并通过共聚焦成像分析。

[0320] 数据显示甚至在存在唾液的情况下NPC紧密地并且均匀地结合至薄膜 (图3A)。由于甚至在通过使所述混合物涡旋来剧烈清洗所述珠后NPC 仍保持结合, 因此结合似乎是紧密的。NPC在薄膜上的保留是高度相关的, 这是因为: 1) 生物膜在薄膜涂覆的表面 (危险位点) 上形成, 和2) 在局部、短暂应用后, 大部分现用的治疗剂在口腔中是不保留的。然后, 测试 NPC是否结合至在薄膜涂覆的HA表面上形成的EPS和/或结合至富含 EPS的生物膜基质。将固定在薄膜涂覆的HA上的变形链球菌 (*S.mutans*) GtfB与蔗糖一起培育以原位形成EPS。然后, 检验在存在唾液的情况下 NPC是否将结合至在薄膜涂覆的HA上形成的EPS (蓝色标记) (如上所述)。NPC的确有效结合至表面形成的EPS, 如图3B中清楚所示。该观测结构还在临床上是很重要的, 这是因为表面上的EPS用作致病生物的结合位点, 如变形链球菌 (*Streptococcus mutans*, 已证明的生龋生物), 并用于促进表面上有害细菌的积累。无结合基序的NPC (参见图2A中的结构) 不粘附于薄膜或EPS。因此, 纳米载体缺乏非特异性结合。

[0321] 随后, 评价了NPC结合至生物膜基质的能力。在它们发展期间, 将生物膜暴露于NPC。在NPC处理后, 清洗生物膜以除去任何未结合的材料。3D生物膜重构显示NPC (红色) 在整个生物膜上彻底分布并与EPS 富集基质结合 (图3C)。这显示在生物膜内保留了NPC。此

外,NPC对变形链球菌(*S.mutans*)缺乏任何抗菌活性。

[0322] 随时间并且作为pH降低的函数,抗生物膜剂可以化学连接并从NPC释放。

[0323] 如先前所进行的,已合成了包含药物可释放链的NPC(Benoit等人,2006,Biomaterials,27(36):6102-6110)。与其未改变的对对应物相比,释放的药物在结构或活性上不具有任何差异。这些共聚物包括法呢醇-、芹菜素-或法呢醇-和芹菜素-可释放链两者。

[0324] 如图4所示,对于一个可降解链长度,从聚合物持续递送法呢醇长达6天;通过链连接的药物浓度控制整体剂量,而通过环境pH(低pH导致更快释放)和可降解链的化学性质和长度控制释放速率(Benoit等人,2006,Biomaterials,27(36):6102-6110)。与单独的NPC剂量相比,由于多价链连接,初始试验条件从NPC中递送10-20×摩尔浓度的法呢醇(高达100μM;其大大高于最小抑菌浓度)。可以在通常在贴附(附连)表面上和在生龋生物膜内达到的低pH值(pH 4-5)进一步对法呢醇和芹菜素随时间的最大释放来优化药物-递送系统。同时,它可以扭曲,从而在生理学中性pH最低限度地释放试剂。

[0325] 总体而言,本文所提供的数据显示了可以作为理想抗生物膜剂载体的高度创新和可行的技术(参见图5)。它引入了当局部pH变为酸性时(准确地,当试剂可以最有效时)有利于持续和控制药物释放的“归航装置”。与未连接至NPC的试剂相比,NPC-递送的药物对破坏生物膜组装体和积累最有效。不希望受任何具体理论的束缚,NPC-递送的药物有可能引起去组装。此外,NPC-递送可以提高对混合种生物膜内变形链球菌(*S.mutans*)病原性基因的抑制。

[0326] 体内龋齿模型

[0327] NPC-递送试剂对破坏体内生龋生物膜形成和蛀洞发生更有效(相对于无NPC递送的试剂)。此外,对于降低细菌定殖(生物膜形成)以及龋齿病变的发病率和严重性来说,NPC传送的试剂与氟化物和氯己啶相当(或者可能更优)。对于临床环境中治疗剂的局部递送来说,数据支持pH激活的NPC的有效性和有用性。

[0328] 本文提供的数据提供了发展该技术的基础。在其它实施方式中,将氟化物引入递送系统,从而使得能够同时原位释放抗生物膜和抗龋齿试剂。另外,在其它实施方式中,将其它药物(如抗炎剂和麻醉剂)连接至NPC以用于通常存在于经历活性炎症过程(例如,牙周炎)的酸性环境内的局部递送。显然,本发明的技术可以用于防止/治疗其它人类疾病或甚至由生物膜所引起的工业问题。NPC化学的低成本和灵活性使得能够发展多种产品以向消费者提供益处。预期可以将NPC-连接的试剂包含在产品中以用于日常口腔健康维护(例如,漱口水/牙膏)或诊疗室治疗(例如,用于局部应用的凝胶剂、清漆或修补材料)。

[0329] 实施例2:在牙科应用中用于抗生物膜剂的靶向控制释放的pH-激活的纳米颗粒

[0330] 实施本发明所提供的实验以研究包含聚(2-二甲基氨基)甲基丙烯酸乙酯、甲基丙烯酸丁酯(BMA)和2-丙基丙烯酸(PAA)(pDMAEMA-b-p(DMAEMA-共-BMA-共-PAA))的二嵌段共聚物的活性和这类聚合物靶向牙齿表面以及保留和递送抗生物膜药物法呢醇的能力。合成了阳离子NPC以及一些对照聚合物和胶束并分析它们通过静电相互作用靶向牙齿表面的能力。还分析了这些NPC加载法呢醇以及对与生物膜微环境相符的低pH响应的能力,以提高载体结合并通过胶束核破坏引发法呢醇释放。最后,检验了NPC介导的法呢醇递送的抗菌和抗生物膜效力。

[0331] 本文显示二嵌段自组装成~21nm带正电荷的纳米颗粒,并且由于阳离子纳米颗粒冠(其显示出~15.9mV的 ζ 电位)与带负电荷的牙齿表面的静电相互作用,其对~215L*mmol⁻¹的模拟牙齿表面显示出吸附亲合力。此外,由于它们的疏水核,这些NPC加载了高达~27wt%的法呢醇。由于纳米颗粒在模拟牙齿生物膜的酸性pH微环境显示出导致核不稳定的pH 响应性行为,因此法呢醇以pH依赖性方式释放,其在pH 4.5和7.2时的释放 $t_{1/2}$ 分别为7.3和14.7h。最后,评价了纳米颗粒的抗菌和抗生物膜活性。用加载法呢醇的纳米颗粒处理后,变形链球菌(*S. mutans*)的存活力降低了3log。另外,在使用临床相关纳米颗粒治疗方案后,观察到变形链球菌(*S. mutans*)生物膜菌落形成单位减少50%。因此,通过靶向和局部药物递送,以及由于和牙齿生物膜微环境相符的低pH所造成的快速、引发的释放提高药物效率,NPC对递送抗生物膜药物具有极大潜能。

[0332] 现将描述在这些实验中使用的材料和方法。

[0333] 材料

[0334] 除非另作说明,否则通过Sigma-Aldrich提供化学试剂和材料。如先前所述,合成了乙基磺酰基硫代羰基磺酰基戊酸(ethylsulfanylthiocarbonyl sulfanylpentanoic acid, ECT)和丙基丙烯酸(PAA)(Benoit等人,2011, *Biomacromolecules*, 12(7):2708-14; Murthy等人,1999, *J Control Release*, 61(1):137-43)。从甲醇重结晶2,2-偶氮二异丁腈(AIBN)。在使用之前,对甲基丙烯酸二甲氨基乙酯(DMAEMA)和甲基丙烯酸丁酯(BMA)进行蒸馏,并用碱性氧化铝过滤聚(乙二醇)单甲基醚甲基丙烯酸酯以除去抑制剂。

[0335] 聚合物合成

[0336] 通过对聚合物分子量和多分散指数(M_w/M_n , $PDI < 1.3$)提供精确控制的可逆加成断裂链转移(RAFT)聚合反应合成聚合物。具体地,合成了以下聚合物:p(DMAEMA)-b-p(DMAEMA-共-BMA-共-PAA)、p(DMAEMA)、p(DMAEMA)-p(BMA)和p(PEGMA)-b-p(DMAEMA-共-BMA-共-PAA)。在存在单体的情况下,以2,2-偶氮二异丁腈(AIBN)作为引发剂并且以ECT作为链转移剂(CTA)进行RAFT聚合反应。以下详细描述了每个聚合物的具体反应条件。

[0337] 聚(甲基丙烯酸二甲氨基乙酯), p(DMAEMA)的合成。

[0338] 将3克(3g)二甲基甲酰胺(DMF)(40wt%的单体)和2g蒸馏的DMAEMA引入至反应容器。初始单体与CTA的比值($[M]_0:[CTA]_0$)使得用作对照的p(DMAEMA)的 M_n 为16.0kDa,用作合成具有p(DMAEMA-共-BMA-共-PAA)的嵌段共聚物的大CTA的p(DMAEMA)的为9.1kDa,并且用于合成具有p(BMA)的嵌段共聚物的为22.8kDa(图7C)。CTA与引发剂的比值($[CTA]_0:[I]_0$)为10:1。在转移至60℃油浴用于聚合反应($t=6h$)之前,使用真空线技术(Schlenk line)用氮气吹扫反应40min。通过在30:70的二乙醚:戊烷中沉淀并离心分离所得聚合物(p(DMAEMA))。将p(DMAEMA)聚合物在丙酮中再溶解并在戊烷中沉淀,重复三次,并真空干燥过夜。

[0339] 聚(聚(乙二醇)单甲基醚甲基丙烯酸酯), p(PEGMA), 大CTA的合成

[0340] 将2克(2g)去抑制的(dehibited)聚(乙二醇)单甲基醚甲基丙烯酸酯(360g/摩尔)与3g DMF和CTA合并,其初始单体与CTA的比值($[M]_0:[CTA]_0$)为150。用氮气吹扫溶液40分钟,并在60℃反应6小时。CTA与引发剂的比值($[CTA]_0:[I]_0$)为10:1。通过在30:70的二乙醚:戊烷中沉淀并离心分离所得p(PEGMA)大CTA。将p(PEGMA)聚合物在丙酮中再溶解并随后在戊烷中沉淀,重复三次,并真空干燥过夜。

[0341] p (DMAEMA) -b-p (DMAEMA-共-BMA-共-PAA) 嵌段共聚物的合成。

[0342] 使用9.1kDa p (DMAEMA) 大CTA (大分子CTA) 合成了二嵌段共聚物p (DMAEMA) -b-p (DMAEMA-共-BMA-共-PAA)。将所需化学计量的量的DMAEMA、PAA和BMA (分别为25:25:50%) 加入至溶于DMF中的 p (DMAEMA) 大CTA中 (25wt%的单体, $[M]_0:[CTA]_0=250:1$)。CTA与引发剂的比值 ($[CTA]_0:[I]_0$) 为10:1, 并以AIBN作为引发剂。加入AIBN 后, 用氮气吹扫溶液40分钟, 并使其在60℃反应24hr。通过在30:70的二乙醚/戊烷中沉淀并离心来分离所得的二嵌段共聚物。然后, 将聚合物在丙酮中再溶解并在戊烷中沉淀, 重复三次, 并真空干燥过夜。

[0343] p (PEGMA) -b-p (DMAEMA-共-BMA-共-PAA) 嵌段共聚物的合成

[0344] 使用18.7kDa p (PEGMA) 大CTA合成了二嵌段共聚物 p (PEGMA) -b-p (DMAEMA-共-BMA-共-PAA)。将所需化学计量的量的 DMAEMA、PAA和BMA (分别为25:25:50%) 加入至溶于DMF中的 p (PEGMA) 大CTA中 (25wt%的单体) ($[M]_0:[CTA]_0, 250:1$)。CTA与引发剂的比值 ($[CTA]_0:[I]_0$) 为10:1, 并以AIBN作为引发剂。加入AIBN 后, 用氮气吹扫溶液40分钟, 并使其在60℃反应24hr。通过在30:70的二乙醚/戊烷中沉淀并离心来分离所得的二嵌段共聚物。然后, 将聚合物在丙酮中再溶解并在戊烷中沉淀, 重复三次, 并真空干燥过夜。

[0345] p (DMAEMA) -b-p (BMA) 嵌段共聚物的合成

[0346] 使用22.8kDa p (DMAEMA) 大CTA合成了二嵌段共聚物 p (DMAEMA) -b-p (BMA)。将所需化学计量的量的BMA加入至溶于DMF 中的p (DMAEMA) 大CTA中 (25wt%的单体) ($[M]_0:[CTA]_0, 250:1$)。CTA 与引发剂的比值 ($[CTA]_0:[I]_0$) 为10:1, 并以AIBN作为引发剂。加入AIBN 后, 用氮气吹扫溶液40分钟, 并使其在60℃反应24hr。通过在30:70的二乙醚/戊烷中沉淀并离心来分离所得的二嵌段共聚物。然后, 将聚合物在丙酮中再溶解并在戊烷中沉淀, 重复三次, 并真空干燥过夜。

[0347] 聚合物标记

[0348] 通过将0.25wt%的聚合物与 2×10^{-4} wt%的Texas Red®在三乙胺 (TEA) 和二甲基甲酰胺 (DMF) 溶液 (1% v/v) 中培育, 用Texas Red®磺酰氯 (Thermo Scientific, US) 标记所有聚合物。使用3500kDa MWC0膜 (Spectra/Por, Spectrum Labs, Rancho Dominguez, CA), 通过对蒸馏、去离子水 (ddH₂O) 透析纯化标记的聚合物。每天更换两次透析水, 持续5天, 并通过冷冻干燥收集聚合物。

[0349] 聚合物的表征

[0350] 分子量确定和聚合物组成的确认

[0351] 通过凝胶渗透色谱法 (GPC, 1200系列 (Shimadzu Technologies, Santa Clara, CA), 其配备有miniDAWN TREOS、多角度光散射 (MALS) 仪 (Wyatt Technologies, Santa Barbara, CA) 和折光率检测器 (Shimadzu Technologies, Santa Clara, CA); 柱: 预柱 (guard), TSK Gel Super H-H; 凝胶分离, TSK Gel HM-N, Tosoh 生物科学, Montgomeryville, PA) 确定所有聚合物的绝对分子量和多分散性 (M_w/M_n , PDI)。在60℃, 将含有0.05M LiBr的HPLC 级DMF用作流动相, 流速0.35mL/min。使用对p (DMAEMA) 报道的 dn/dc 值 (0.06ml/g) (Gallow等人, 2012, Polymer (Guildf), 53 (5):1131-7; Kryuchkov等人, 2011, Macromolecules, 44 (13):5209-17; Vesterinen等人, 2011, eXPRESS Polym Lett, 5 (9):754-65) 和对PEG报道的 dn/dc 值 (0.13ml/g) (Liu等人, 2012, Langmuir, 28 (8):3831-9) 确定绝对分子量。如前所述, 通过¹H NMR光谱 (Bruker Avance 400) 分析包含pH响应性嵌

段((p(DMAEMA-共-BMA-共-PAA))的嵌段共聚物以确认第二嵌段组分(Convertine等人, 2009, J Control Release, 133(3):221-9)。

[0352] NPC的形成和表征

[0353] 使用Zetasizer(Malvern Instruments, UK)测量 p(DMAEMA)-b-p(DMAEMA-共-BMA-共-PAA)、p(PEGMA)-b-p(DMAEMA-共-BMA-共-PAA)和p(DMAEMA)-b-p(BMA)的纳米颗粒的尺寸、多分散性指数(PDI)和 ζ 电位。对于尺寸测量,在0.2mg/ml和2.7mg/ml进行测量。除p(DMAEMA)-b-p(DMAEMA-共-BMA-共-PAA)外(其 ζ 电位在一定范围的pH(3.4-10.5)测量),在0.2mg/ml和pH 7.2 测量 ζ 电位,以将颗粒表面电荷与牙齿表面的结合相关联。

[0354] NPC的临界胶束浓度(CMC)

[0355] 使用**PRODAN®**(Molecular Probes, Eugene, Oregon)荧光发射的溶致变色迁移(solvatochromic shift),近似估计由p(DMAEMA)-b-p(DMAEMA-共-BMA-共-PAA)组成的胶束基NPC的CMC(Adhikary等人, 2009, J Phys Chem B, 113(35):11999-2004; Rodriguez等人, 2010, J Biomed Opt, 13(1):014025)。快速地,将溶于甲醇的**PRODAN®**等分至黑色96孔板中。干燥过夜后,加入一定浓度范围(0-2mg/ml)的胶束溶液并培育过夜以实现 5.45×10^{-4} mg/ml的最终**PRODAN®**浓度。在对应于**PRODAN®**在疏水相和亲水相中的发射的两个波长(E_x/E_{m1} : 360nm/436nm和 E_x/E_{m2} : 360nm/518nm)测量**PRODAN®**的发射。将发射比(疏水相/亲水相, E_{m1}/E_{m2})相对于log(胶束浓度)作图,并将发射比随聚合物浓度开始增加时的浓度确定为CMC(图11)。

[0356] 聚合物在牙齿模拟表面上的吸附

[0357] 模拟牙齿表面的制备

[0358] 将模拟牙齿表面的三种材料用于评价聚合物的吸附:未涂覆的羟基磷灰石(HA)、唾液涂覆的羟基磷灰石(sHA)和作为生龋生物膜基质重要成分的葡聚糖涂覆的羟基磷灰石(gsHA)。用缓冲液(50mM KCl, 1mM KPO_4 , 1mM $CaCl_2$, 1mM $MgCl_2$, 0.1mM PMSF和0.02% NaN_3 , 在dd- H_2O 中, pH 6.5)清洗羟基磷灰石(CHT™, BioRad)珠两次。将清洗的HA珠与人唾液培育以获得唾液涂覆的羟基磷灰石(sHA)。如其它处所描述的,通过在存在Alexa**Fluor®**647标记的右旋糖酐的情况下(E_x/E_m : 647nm/668nm)(Life Technologies),将sHA珠与纯化的葡糖基转移酶B(GtfB)和蔗糖一起培育以用于在sHA表面上形成葡聚糖,从而产生gsHA表面(Schilling等人, 1992, Infect Immun, 60(1):284-95)。通过共聚焦激光扫描显微术(FV10000lympus, USA)确认葡聚糖层的形成(图12)(Klein 等人, 2009, Appl Environ Microbiol, 75(3):837-41)。

[0359] 聚合物结合的评价

[0360] 通过在37℃,将1 μ M Texas**Red®**-标记的聚合物与牙齿表面培育1小时进行聚合物对牙齿表面吸附的定量测定,测定重复三次。如通过Infinite N200PRO酶标仪(微板读取器)(Tecan, Switzerland)所测量的,基于吸附前后Texas**Red®**信号(E_x/E_m : 550nm/617nm)的差异分析吸附聚合物的量。通过在37℃与85 μ M聚合物溶液培育1小时的HA、sHA和gsHA表面的共聚焦激光扫描显微术图像确认结果。使用ImageJ软件(v.1.47)对共聚焦图像分析聚合物的表面积覆盖度。简言之,将图像转化为8比特,并将内置阈值("Moments")用于使图像标准化。在每个标准化图像上选择5个独立区域进行分析。在一定范围的pH(3.4-10.5),还对NPC和p(DMAEMA)对羟基磷灰石(HA)的结合进行定量以检验p(DMAEMA)叔胺残基的质

子化如何影响吸附。

[0361] 吸附平衡曲线

[0362] 在0-15 μ M的浓度进一步分析NPC对HA、sHA和gsHA的吸附,并通过GraphPad Prism软件(v.6.03)将郎格缪尔平衡曲线对吸附平衡数据进行拟合。通过拟合,计算吸附的NPC对多种牙齿表面的模拟物的吸附亲和力常数(K_a [L*mmol $^{-1}$])和最大吸附量(X_{max} [mmole/m 2])。将NPC吸附相对于羟基磷灰石珠的表面积表示,所述表面积是根据厂家所提供的珠的平均半径和密度(分别为80nm和0.63g/ml)计算的。

[0363] 抗生物膜剂法呢醇的加载和从聚合物胶束中的释放

[0364] 药物加载

[0365] 通过类似于Tang等人(Tang等人,2003,Biomacromolecules, 4(6):1636-45)的超声处理,将法呢醇加载到胶束上。简要地,通过在ddH $_2$ O中,以40%的功率,使用超声波均质机(Sonic Raptor 250,Omn International, Kennesaw,GA)进行超声处理来制备一定浓度范围(0.2-1.5mg/ml)的法呢醇乳液。然后,在玻璃闪烁管中,将乳液与2.7mg/ml的p(DMAEMA)-b-p(DMAEMA-共-BMA-共-PAA)胶束混合。将这些溶液放置在超声波仪浴(50HT,VWR)中5分钟。基于校正曲线,法呢醇乳液在700nm(作为浊度的量度)的吸收变化与药物加载量相关联。根据加载的法呢醇的量,计算加载能力($100*(W_{t\text{加载}}/W_{t\text{胶束}})$)和效率($100*(W_{t\text{加载}}/W_{t0})$)。其中 $W_{t\text{加载}}$ 是加载的药物的量, $W_{t\text{胶束}}$ 是胶束的量,并且 W_{t0} 是乳液中法呢醇的初始量。为了确认这种计算加载能力和效率的方法,使用了高压液相色谱法(HPLC)。简要地,用3kDa离心过滤器单元(Amicon Ultra 0.5ml,Millipore,USA)浓缩加载了法呢醇的NPC,并且通过离心,用PBS另外清洗两次。使用C18柱(Kromasil Eternity,4.6mm $\times$ 50mm,Supelco,Bellefonte,PA),以0.5ml/min的流速,以20分钟内10%至90%的MeOH:H $_2$ O梯度,并通过UV吸收检测(210nm),通过HPLC(Shimadzu Technologies,Santa Clara,CA)测量保留物中法呢醇的量以确定加载能力。由于基于双尾Kolmogorov-Simonov检验,发现两数据组是统计学等价的($p<0.01$),因此HPLC分析与用于药物加载分析的简化方法一致(图13)。

[0366] 使用透射电子显微术检验法呢醇加载前后的纳米颗粒尺寸。简要地,以0wt%、18.4wt%和27wt%的加载能力将法呢醇加载至胶束,将所述胶束转移至碳涂覆的镍网上,并在存在2%(w/v)磷钨酸作为造影剂的情况下干燥2-5分钟。使用连接到11兆像素Erlangshen数字照相机系统(Gatan,Pleasanton,CA)的Hitachi 7650透射电子显微镜(Hitachi,Schaumburg,IL),以200000 $\times$ 的放大倍数采集游离(空,free)和加载的NPC的图像。

[0367] 药物释放

[0368] 使用透析定量从加载胶束释放的法呢醇。简要地,在PBS中,以先前鉴别的最佳加载效率(17.5wt%)进行法呢醇加载。将加载药物的胶束放置在pH 4.5或pH 7.2的PBS中,在37 $^{\circ}$ C通过6-8kDa透析膜(Spectra/Por, Spectrum Labs,Rancho Dominguez,CA)透析,并每天更换媒介。如先前详细说明的,通过HPLC在第0、1、2、3、4和7天定量法呢醇。在任何时间点,游离法呢醇的浓度均不高于其估计的溶解度极限1.7mg/L(US EPA;Estimation Program Interface(EPI)Suite V.3.12)。使用GraphPad Prism $^{\circledR}$ 软件(v.6.03),假设为一級释放动力学,进行释放数据的拟合。根据拟合,通过一级释放方程(释放%= $100*(1-e^{-k_{obs}t})$)计算释放速率常数 k_r 和释放半衰期 $t_{1/2}$ 。其中释放%是时间t时药物释放的%,而

k_{obs} 是所观察到的药物释放动力学常数,其根据以下关系式转化为释放半衰期: $t_{1/2} = \ln(2) / k_{obs}$ 。一旦确定拟合参数,计算拟合方程(释放速率 = $d(\text{释放}\%) / dt = 100 * k_{obs} * e^{-k_{obs} * t}$)的一阶导数以评价法呢醇随时间的释放速率。

[0369] 抗微生物活性和抗生物膜活性以及纳米颗粒介导的法呢醇释放

[0370] 将变形链球菌(*Streptococcus mutans*) UA159(ATCC 700610;血清型c,作为模式生龋生物)用于评价纳米颗粒介导的法呢醇释放对细胞存活力和生物膜形成的影响。在含有1% (w/v) 葡萄糖(37℃;5%CO₂)的超滤(10kDa膜)的胰蛋白胨-酵母提取物肉汤(UFTYE, pH 7.0)中,使变形链球菌(*S.mutans*) UA159细胞生长至指数生长中期(mid-exponential phase),并通过离心(5500×g,10min,4℃)收获细胞。然后,用0.89%NaCl 清洗细胞三次,并通过离心(5500×g,10min,4℃)收集。使用Branson Sonifier 450(以20W,4次10秒脉冲+5秒间隔;Branson Ultrasonics Co., Conn.,USA)对细胞悬液超声以获得单细胞混悬液,如通过光学显微术验证的。将细胞制剂的光密度(600nm)调节至 0.5 ± 0.05 ,其对应于 1.5×10^9 个变形链球菌(*S.mutans*) 菌落形成单位/ml(CFU/ml)。

[0371] 将细胞悬液(每个1mL)离心,用1mL 1×PBS, pH 7.0[NPC-对照(1.47mg/ml NPC)、NPC-法呢醇(1.47mg/ml NPC,加载了0.3mg/ml法呢醇)或PBS对照(1×PBS, pH 7.0)]中的处理溶液使细胞颗粒再悬浮。在37℃,将细胞在振荡器上边处理边培育1h。培育后,将0.1ml 每种混悬液的等份稀释10倍,并将0.1ml在血液琼脂板上铺板。用1×PBS, pH 7.0 清洗剩余0.9ml的每种细胞悬液三次以除去剩余的聚合物药物。第三次清洗时,制备0.45ml的2个等份并离心。用0.45mL 1×PBS, pH 7.0将每种条件的一个细胞颗粒再悬浮,并将0.1ml的混悬液逐次稀释和铺板。用0.45mL 1×PBS, pH 4.0将每种条件的另一个细胞颗粒再悬浮。将两种混悬液培育2和4h以分析pH对NPC处理的影响。在每个时间点,将每种混悬液等份稀释10倍,并在血液琼脂板上铺板。在使用(关于CFU计数器信息(info regarding CFU counter))对CFU计数前,将板培育48h(37℃, 5%CO₂)。

[0372] 使用5种处理溶液处理生物膜:空NPC(1.47mg/ml NPC,在1×PBS, pH 7.0中)、NPC-法呢醇(1.47mg/ml NPC,加载0.3mg/ml法呢醇,在1×PBS 中, pH 7.0)、游离的法呢醇(0.3mg/ml法呢醇,在1×PBS中, pH 7.0, 15%乙醇(EtOH));游离法呢醇的载体对照(1×PBS, pH 7.0, 15%EtOH) 和PBS(1×PBS, pH 7.0)。将15% (v/v) 的乙醇用作媒介物以溶解游离的法呢醇,其在水媒介中在有效浓度下是不溶的并且先前显示对变形链球菌(*S.mutans*)生物膜发展无影响(Koo等人,2003,J Antimicrob Chemother, 52(5):782-9)。如其它处详细说明的,在唾液涂覆的羟基磷灰石(sHA)表面(直径12.7mm,厚度1mm, Clarkson Chromatography Products Inc., South Williamsport, PA)上形成了变形链球菌(*S.mutans*) UA159的生物膜(Koo 等人,2010,J Bacteriol, 192(12):3024-32)。使用定制支架将HA圆盘垂直放置,并在37℃和5%CO₂下,在具有1%蔗糖的UFTYE (pH 7.0)中生长。用上述溶液预处理圆盘10min,用无菌盐水清洗两次,并转移回培养基。在唾液薄膜形成(sHA)后立即进行第一处理,然后将处理过的圆盘转移到含有变形链球菌(*S.mutans*) (10^5 CFU/ml)的培养基中。使生物膜在圆盘上形成,无中断,6小时,在此时间点应用第二处理。第二天,每6小时处理生物膜,总计处理3次,并更换2次培养基。48小时后,评价单位生物膜干重的菌落形成单位(CFU)的量。简要地,除去生物膜并均质化,然后铺板至血液琼脂板,并在37℃, 5%CO₂培育后,如前所述对CFU计数(Koo等人,2003,J Antimicrob Chemother, 52(5):

782-9)。

[0373] 统计分析

[0374] 在 p -值 $P<0.01$ 时,通过双向方差分析(Two-Way ANOVA),然后通过Tukey检验进行多重比较评价组间显著性。作为另外一种选择,在 p -值 $p<0.01$,通过双尾 t 检验评价与无相关性相比($r^2=0$),显示结合相对于 pH 和 ζ 电位的趋势的皮尔逊相关性的显著性($r^2>0$)。通过对所有拟合调节的 $R^2>0.98$,并且在 p -值 $P<0.05$,对其余进行D'Agostino&Pearson omnibus (K2) 正态检验来评价对一级释放动力学和朗格缪尔吸附平衡拟合的良好性。

[0375] 现将描述实验结果。

[0376] 聚合物结构和功能

[0377] 通过RAFT聚合反应形成了在该工作中使用的所有聚合物,其提供了对聚合物分子量和多分散指数(M_w/M_n , $PDI<1.3$)的精确控制。图7A- 图7C中详细显示了形成胶束基纳米颗粒载体(NPC)的 pH 响应性 p (DMAEMA)- b - p (DMAEMA-共-BMA-共-PAA)和用作吸附对照以模拟牙齿表面的聚合物的结构、组成和物理性质。以相等的第一比第二嵌段比,在两步RAFT聚合反应中合成了 p (DMAEMA)- b - p (DMAEMA-共-BMA-共-PAA)二嵌段(图7A)。首先,合成带正电荷的9.5kDa p (DMAEMA)嵌段($PDI=1.3$)(图7A至图7C)。从该 p (DMAEMA)大CTA(大分子CTA, macroCTA),加入 pH 响应性 p (DMAEMA-共-BMA-共-PAA)的第二嵌段(Benoit等人,2011, Biomacromolecules, 12(7):2708-14; Convertine等人, 2009, J Control Release, 133(3):221-9), (图7A),从而NPC聚合物的整体分子量为17.8kDa ($PDI=1.1$)(图7C)。类似地合成了形成胶束基纳米颗粒的对照二嵌段(图7B)。合成了 p (PEGMA)- b - p (DMAEMA-共-BMA-共-PAA)聚合物(C2),其第一嵌段和整体 M_n 分别为18.7kDa ($PDI=1.08$)和29.0kDa ($PDI=1.09$)(图7C),并且合成了 p (DMAEMA)- b - p (BMA)聚合物(C3),其冠为22.8kDa ($PDI=1.08$),整体 M_n 为37kDa ($PDI=1.01$)(图7C)。

[0378] p (DMAEMA)- b - p (DMAEMA-共-BMA-共-PAA)二嵌段自组装成 $\sim 21nm$ 的具有低临界胶束浓度(CMC)(0.008mg/ml,图11)的单分散胶束($PDI=0.2$)。所测量的胶束基纳米颗粒载体(NPC)的CMC与对具有类似聚合物组成的二嵌段所报道的值(0.002mg/ml)相当(Convertine等人,2010, Biomacromolecules, 11(11):2904-11)。由于叔胺残基($pK_a\sim 7.5$),在生理学 pH ,50%的 p (DMAEMA)质子化(Van de Wetering等人,1999, Bioconjug Chem, 10(4):589-97; van de Wetering等人,1998, Macromolecules, 31(23):8063-8)。NPC冠由于 p (DMAEMA)与水媒介的相互作用而组装,其导致NPC产生正 ζ 电位($\xi=+15.9mV$)(图7C),而由于 p (DMAEMA-共-BMA-共-PAA)嵌段的BMA残基中的疏水性相互作用NPC核组装(Benoit等人,2011, Biomacromolecules, 12(7):2708-14; Convertine等人, 2009, J Control Release, 133(3):221-9; Manganiello等人,2012, Biomaterials, 33(7):2301-9; Convertine等人,2010, Biomacromolecules, 11(11):2904-11)。

[0379] 使用包括 p (DMAEMA)(C1)和 p (PEGMA)- b - p (DMAEMA-共-BMA-共-PAA)(C2)和 p (DMAEMA)- b - p (BMA)(C3)的二嵌段在内的对照聚合物来显示 p (DMAEMA)冠和纳米颗粒结构在与牙齿表面结合中的作用(图7B)。因此,使用具有中性或正 ζ 电位的纳米颗粒(图7C)。例如,具有 p (PEGMA)冠和 pH 响应性核(C2)的21nm(直径 $PDI=0.37$)纳米颗粒具有轻微的负 ζ 电位($\xi=-1.6mV$)(图7C)。作为另外一种选择,具有 p (DMAEMA)冠和缺少 pH 响应性PAA和DMAEMA残基的 p (BMA)核(C3)的38nm胶束(直径 $PDI=0.21$)具有与NPC类似的 ζ 电位($\xi=+17.2mV$)。

) (图7C)。当在pH 7.2下p(DMAEMA)胺残基质子化时, 16.0kDa p(DMAEMA) (PDI=1.01) 用作电荷介导结合的阳性对照, 并且当在pH 10.5下胺残基为去质子化时, 用作阴性对照。单独的p(DMAEMA) 不形成纳米颗粒, 因此p(DMAEMA) 的直径、PDI和 ζ 电位是不可测量的。

[0380] 纳米颗粒对不同牙齿表面模拟物的吸附

[0381] 对表面的吸附取决于一些因素; 整体电荷、带电残基密度、分子量、三级分子构象 (tertiary molecular conformation)、pH和离子强度 (Gorbunoff 等人, 1984, Anal Biochem, 136 (2): 440-5; Bhat等人, 2004, Macromol Rapid Commun, 25 (1): 270-4; Sakai等人, 2007, J Colloid Interface Sci, 314 (2): 381-8)。因此, 使用三种模拟牙齿表面来评价聚合物结合 (图8): 模拟牙矿质和牙釉质的未涂覆的羟基磷灰石 (HA), 模拟牙齿薄膜的唾液涂覆的羟基磷灰石 (sHA) (Weerkamp等人, 1988, J Dent Res, 67 (12): 1483-7; Koo等人, 2002, Antimicrob Agents Chemother, 46 (5): 1302-9; Lendenmann等人, 2000, Adv Dent Res, 14 (1): 22-8; Ambatipudi等人, 2010, J Proteome Res, 9 (12): 6605-14; Koo等人, 2000, Caries Res, 34 (5): 418-26), 以及唾液薄膜和葡聚糖涂覆的羟基磷灰石 (gsHA), 其模拟了生物膜形成期间EPS分泌的初期 (Koo等人, 2010, J Bacteriol, 192 (12): 3024-32; Ambatipudi等人, 2010, J Proteome Res, 9 (12): 6605-14; Rozen等人, 2001, FEMS Microbiol Lett, 195 (2): 205-10)。

[0382] 如图8A所示, 在pH 7.2, 67%、60%和44%的NPC分别结合至HA、sHA和gsHA, 相比之下70%、76%和79%的p(DMAEMA) 结合 (图8A)。该数据表明由于在生理学pH, p(DMAEMA) 冠的叔胺残基50%质子化 (Van de Wetering等人, 1999, Bioconjug Chem, 10 (4): 589-97; van de Wetering等人, 1998, Macromolecules, 31 (23): 8063-8), 因此它们导致与牙齿模拟表面的结合。尽管不希望受任何具体理论的束缚, 但是与质子化的p(DMAEMA) (pH 7.2时) 相比, NPC与sHA和gsHA结合的减少可能与通过添加唾液 (sHA) 和葡聚糖 (gsHA) 的HA表面的遮蔽有关。尽管这些额外的表面成分对p(DMAEMA) 的结合无影响, 这可能是由于替代的相互作用所造成的, 如H-键合或p(DMAEMA) 与薄膜蛋白或带负电荷的葡聚糖的组装。与pH 7.2时的p(DMAEMA) 相比, 去质子化的p(DMAEMA) (pH 10.5时) 不结合至HA (0.5%) 并且与sHA (25.9%) 和gsHA (36.2%) 的结合更不显著 (图8A)。去质子化的p(DMAEMA) (pH 10.5时) 与sHA和gsHA 的结合还支持其它结合机制 (例如, H-键合、疏水性相互作用, 或者与薄膜蛋白或葡聚糖的组装)。

[0383] 然后, 将NPC结合与类似地形成纳米颗粒 (C2和C3) 的聚合物相比较 (图8A、图7B和图7C)。这些包括由p(DMAEMA)-b-p(BMA) 和 (p(PEGMA)-b-(DMAEMA-共-BMA-PAA)) 的嵌段共聚物形成的纳米颗粒 (图7B-图7C)。使用p(DMAEMA)-p(BMA) 确认p(DMAEMA) 冠和非pH 响应性纳米颗粒核在结合中的作用。对于所有牙齿模拟表面, p(DMAEMA)-b-p(BMA) 聚合物类似地结合至NPC (HA (58%)、sHA (56%)、gsHA (49%)) (图8A)。相对于具有p(PEGMA) 冠和pH响应性 p(DMAEMA-共-BMA-共-PAA) 核的聚合物, 评价NPC的吸附以确认具有中性、亲水性冠 (不同于p(DMAEMA)) 的纳米颗粒将不会结合。p(PEGMA)-b-p(DMAEMA-共-BMA-共-PAA) 纳米颗粒结合至牙齿模拟表面, 尽管以NPC约一半的水平 (25%、32%、25%) (图8A)。

[0384] 通过共聚焦成像确认聚合物与模拟牙齿表面的结合 (图8B)。与定量数据类似, 共聚焦图像显示在sHA和gsHA表面上, NPC、p(DMAEMA)-b-p(BMA) 和p(DMAEMA) 的结合大于具有p(PEGMA) 冠的纳米颗粒的结合。类似地, 观察到以下sHA和gsHA的聚合物覆盖%: p

(PEGMA)-b-p(DMAEMA-共-BMA-共-PAA)为21%和19%,相比之下,p(DMAEMA)为90%和87%,p(DMAEMA)-b-p(BMA)为94%和92%并且NPC为91%和89%,如图8C所示。

[0385] 由于它们显示出最大的吸附并具有固有pH响应性行为(Benoit等人,2011,Biomacromolecules,12(7):2708-14;Convertine等人,2009,J Control Release,133(3):221-9),因此使用由p(DMAEMA)-b-p(DMAEMA-共-BMA-共-PAA)组成的胶束基纳米颗粒载体(NPC)进行了更精密的吸附实验(图8D)。根据对吸附数据的朗格缪尔拟合(图8G),NPC在牙齿表面上的平均最大结合能力($X_{\max}$)为 $\sim 21\text{mol}/\text{m}^2$,吸附亲和力常数(K_a)为 $\sim 215\text{L}\cdot\text{mmol}^{-1}$ 。在多种牙齿表面之间,这些值不具有统计学差异。发现该吸附亲合力比一些二膦酸酯对羟基磷灰石的亲合力高几个数量级,而吸附能力与二膦酸酯对羟基磷灰石的相当(Claessens等人,2000,Langmuir,16(3):1360-7;Al-Kattan等人,2010,Adv Eng Mater,12(7):B224-B233;Pascaud等人,2012,Biomed Mater,7(5):054108;Leu等人,2006,Bone,38(5):628-36;Sato等人,1991,J Clin Invest,88(6):2095-105),这表示NPC可以更快吸附,但最大量类似。具体地,已知对羟基磷灰石具有特别高亲合力的二膦酸酯的 K_a 在 $1-13.8\text{L}\cdot\text{mmol}^{-1}$ 的范围内(Claessens等人,2000,Langmuir,16(3):1360-7;Al-Kattan等人,2010,Adv Eng Mater,12(7):B224-B233;Pascaud等人,2012,Biomed Mater,7(5):054108;Leu等人,2006,Bone,38(5):628-36;Sato等人,1991,J Clin Invest,88(6):2095-105),但是比NPC的亲合力弱 $\sim 20\sim 60$ 倍($\sim 221\sim 229\text{L}\cdot\text{mmol}^{-1}$ 的亲合力)。然而,其它资料来源报道了对一些二膦酸酯更高($\sim 720-3470\text{L}\cdot\text{mmol}^{-1}$)的亲合力,这可能是由于不同或间接的测量方法所造成的(Nancollas等人,2006,Bone,38(5):617-27;Henneman等人,2008,J Biomed Mater Res A,85(4):993-1000)。二膦酸酯的最大吸附能力($X_{\max}$)为 $2.17-2.31\text{mol}/\text{m}^2$ (Claessens等人,2000,Langmuir,16(3):1360-7;Al-Kattan等人,2010,Adv Eng Mater,12(7):B224-B233;Pascaud等人,2012,Biomed Mater,7(5):054108),与NPC对牙齿表面的最大吸附类似($19.5-23.4\text{mol}/\text{m}^2$)。另外,NPC对HA,sHA和gSHA的亲合力($K_a=\sim 215\text{L}\cdot\text{mmol}^{-1}$, $X_{\max}=\sim 21\text{mol}/\text{m}^2$) (图8G)大于用胺丁羟磷酸酯(阿仑唑奈、胺丁羟磷酸盐,alendronate)、二膦酸酯官能化的几种类型的纳米颗粒。胺丁羟磷酸酯-官能化的Au NP显示出高于未官能化的Au NP的 K_a ($\sim 4.5\mu\text{mol}$ 胺丁羟磷酸酯/ m^2),然而Au NP的 K_a 仅为本文所述的NPC的 $\sim 25\%$ (Ross等人,2011,J Biomed Mater Res A,99(1):58-66)。类似地,胺丁羟磷酸酯-官能化的纳米颗粒以较低的能力结合至HA(Chen等人,2009,Antimicrob Agents Chemother,53(11):4898-902)。尽管不希望受任何具体理论的束缚,但是NPC改善的结合可能是由于与官能化的纳米颗粒相比,NPC冠高密度的带电胺所造成的(Gorbunoff等人,1984,Anal Biochem,136(2):440-5)。

[0386] 还在酸性pH检验p(DMAEMA)结合。与生理条件相比,由于胺残基质子化提高,因此在酸性pH,p(DMAEMA)与HA的结合更强(图8E)。因此,DMAEMA适合在导致局部酸性pH的病理条件下将药物靶向带负电荷的牙齿表面(Xiao等人,2012,PLoS Pathog,8(4):e1002623)。与p(DMAEMA)类似,在低pH,NPC与HA的结合升高(图8E)。然而,当在pH 10.5(p(DMAEMA)的胺去质子化的条件)进行结合时,与pH 7.2所观察到的结合相比 $\sim 70\%$ 的NPC结合至HA,而在该碱性pH,0%的p(DMAEMA)结合(图8E),这与图8A中所提供的数据类似。这表明其它因素可以影响NPC与牙齿表面的结合。这些因素可以包括纳米颗粒的尺寸与形状或纳米颗粒表面上胺残基的密度(Gorbunoff等人,1984,Anal Biochem,136(2):440-5),其可能导致与

牙齿表面不同的相互作用。因此,实施了结合作为纳米颗粒 ζ 电位的函数的其它分析(图8F)。NPC结合与 ζ 电位相关,通过改变纳米颗粒溶液的pH改变 ζ 电位(图14)。观察到 NPC结合与 ζ 电位之间存在显著正相关(图8F)。尽管不希望受任何具体理论的束缚,但是在酸性pH, NPC更大的结合和更高的 ζ 电位(图8E- 图8F)可能是由于p(DMAEMA)的胺的质子化提高所造成的,这有助于 NPC与HA的带负电荷的基团的相互作用(Gorbunoff等人,1984,Anal Biochem,136(2):440-5)。

[0387] 药物加载和pH引发的法呢醇释放

[0388] p(DMAEMA)-b-p(DMAEMA-共-BMA-共-PAA) NPC以高达27%wt加载了法呢醇(图13A),这比其最小抑菌浓度(MIC)高 $\sim 26\%$ (Jabra-Rizk 等人,2006,Antimicrob Agents Chemother,50(4):1463-9;Koo等人,2002, Antimicrob Agents Chemother,46(5):1302-9)。纳米颗粒内法呢醇的浓度比在没有载体的情况下其估计的溶解度极限($\sim 1.7 \times 10^{-3} \text{mg/ml}$)高 ~ 440 倍。一旦以27.0wt%加载,NPC的尺寸从20.5nm提高至60.3nm,而在整个加载浓度范围内,加载效率高于 $\sim 90\%$ (图13B)。对于未加载的对照以及以 18.4wt%和27.0wt%加载了法呢醇的NPC,通过透射电子显微镜术(TEM) 确认了NPC的球形形状和尺寸增大(图9A)。对由聚(乳酸-共-乙醇酸)-b-聚(乙二醇)(PLGA-b-PEG)和聚苯乙烯-b-聚(乙二醇)(PS-b-PEG)(Zhu,2013, Biomaterials,34(38):10238-48)和p(DMAEMA)-p(BMA)(Benoit,2010,Mol Pharm,7(2):442-55)所形成的二嵌段胶束,报道了由于药物加载所造成的对尺寸的类似影响。根据法呢醇和NPC的比容计算了NPC直径的增加,如果以18.5wt%加载时为 $\sim 16.8 \text{nm}$,这类似于以18.5wt%加载时纳米颗粒尺寸 $\sim 16.5 \text{nm}$ 的测量的提高。另外,对具有类似p(DMAEMA)冠但 p(DMAEMA-共-BMA-共-PAA)核大2倍的纳米颗粒报道了较大的直径(45nm)(Convertine等人,2010,Biomacromolecules,11(11):2904-11)。因此,尽管不希望受任何特定理论的束缚,但是纳米颗粒尺寸的增加可能是由于法呢醇与NPC核的疏水性残基的组装和疏水性相互作用所造成的,这有效提高了整体纳米颗粒核体积。

[0389] 作为pH的函数,评价了法呢醇从NPC的释放(图9B)。在pH 4.5 时,法呢醇释放比pH 7.2时快2倍,这是通过一级动力学常数定量的($k_{\text{pH}=4.5}=0.0941/\text{hr}$, $k_{\text{pH}=7.2}=0.0471/\text{hr}$)。另外,对法呢醇释放的半衰期定量并发现对于pH 4.5和pH 7.2时的释放,分别为 $t_{1/2}=7.3 \text{hr}$ 和 $t_{1/2}=14.7 \text{hr}$ 。酸性pH时更快的释放可能是由于NPC核所报道的pH响应性行为所造成的(Benoit等人,2011,Biomacromolecules,12(7):2708-14;Convertine等人,2009,J Control Release,133(3):221-9;Wang and Rempel,2013,J Polym Sci Part A Polym Chem,51(20):4440-50;Fan等人,2012,Biomacromolecules,13(12):4126-37;Manganiello等人,2012,Biomaterials,33(7):2301-9)。具体地,在低pH,与pH 7.2时50%的质子化相比,DMAEMA残基($\text{pK}_a=7.2$)充分质子化。因此,核的整体电荷导致静电斥力,这使纳米颗粒核不稳定并引发法呢醇释放(Benoit等人,2011,Biomacromolecules,12(7):2708-14; Convertine等人,2009,J Control Release,133(3):221-9)。在具有甲基丙烯酸二乙氨基乙酯(DEAEMA)叔胺核的纳米颗粒中,观察到了类似的低pH 作用(Wang and Rempel,2013,J Polym Sci Part A Polym Chem,51(20):4440-50;Fan等人,2012,Biomacromolecules,13(12):4126-37; Manganiello等人,2012,Biomaterials,33(7):2301-9)。

[0390] 对法呢醇随时间的释放速率建模,并在图9B(插图)中显示了所得的预测。pH 4.5

时的初始释放速率为 $\sim 8\%$ 每小时,相比之下pH 7.2时为 $\sim 4\%$ 每小时。因此,pH 4.5时,在 $\sim 1/2$ 小时后,纳米颗粒将释放相当于1MIC 的药物量,相比之下pH 7.2时为 ~ 1 小时后(图9B插图)。另外,pH 4.5 时,法呢醇的释放速率随时间降低,而pH 7.2时,释放速率是相对稳定的。此外, ~ 12 小时后,释放速率达到平衡。然而,pH 4.5时,几乎所有药物 (75%) 释放,而pH 7.2时,完全释放需要 ~ 30 小时。因此,在与生物膜微环境一致的低pH,法呢醇快速释放。

[0391] 加载的NPC的抗菌和抗生物膜作用

[0392] 通过将加载药物的NPC与变形链球菌 (*S.mutants*) 培育1小时来评价加载药物的NPC的抗菌活性(图9D-图9E)。处理后,清洗细菌并转移至pH 7.2或pH 4.5之一的PBS,以评价加载药物的NPC的长期作用(图 9D-图9E)。与未加载的纳米颗粒和PBS对照相比,暴露于加载药物的NPC 后,变形链球菌 (*S.mutants*) 的存活力降低 $\sim 3\log$ (参见图9D-图9E中的 t_0)。然而,在清洗细菌并转移至pH 7.2后2和4小时观察CFU计数不再降低(图9D)。尽管不希望受任何特定理论束缚,但是法呢醇短期作用的缺少可以归因于暴露于加载的NPC 1小时后,并且在处理后,除去NPC 溶液并清洗细菌细胞,细菌存活力显著降低 $\sim 3\log$ 。相比之下,将细胞转移至pH 4.5后,CFU减少速率是随时间稳定的(图9E),这表示低pH损害变形链球菌 (*S.mutants*) 的存活力,从而可能导致在用法呢醇处理后,对低pH培养的敏感性提高。

[0393] 使用临床相关治疗方案,对变形链球菌 (*S.mutants*) 基生物膜评价法呢醇的抗生物膜活性,如图10A所示。游离法呢醇 (15%EtOH) 或NPC- 法呢醇处理溶液 (0.27mg/ml) 中法呢醇的量比其MIC ($< \sim 0.028\text{mg/ml}$) 高 $\sim 10\times - \sim 20\times$,并且比其在水媒介中的溶解度极限 ($1.7\times 10^{-3}\text{mg/ml}$) 高 $\sim 440\times$ 倍。对NPC-法呢醇处理样品观察到单位生物膜干重CFU $\sim 50\%$ 的显著减少(图10B)。相反,相对于PBS,使用等剂量游离法呢醇,或空NPC 对照或法呢醇载体对照 (15%EtOH) 的处理显示对CFU无影响(图10B)。由于在风险表面上和生物膜内保留并且以极高的法呢醇浓度保留,同时由于变形链球菌 (*S.mutans*) 生物膜内pH变为酸性而通过NPC局部最优释放(图7C),因此有可能观察到NPC-法呢醇的抗生物膜作用。游离法呢醇不能防止生物膜形成,而NPC递送的法呢醇足以显著减少细菌的存活(图9D-图9E)并防止生物膜形成(图10B)。这表明与生物膜微环境的低pH所引发的法呢醇从NPC的局部释放一起,结合至生物膜和/或牙齿表面的NPC或与细菌膜的NPC结合/相互作用介导所述作用。例如,NPC对生物膜表面细菌的附着将导致法呢醇有效浓度的原位提高,因而导致更显著的治疗效果(Koo等人,2003,*J Antimicrob Chemother*,52(5):782-9; Jabra-Rizk等人,2006,*Antimicrob Agents Chemother*,50(4):1463-9;Kaneko 等人,2011,*J Antibiot(Tokyo)*,64(8):547-9)。另外,已知阳离子纳米颗粒与生物膜相互作用(Benoit等人,2010,*Mol Pharm*,7(2):442-55;Benoit等人,2011,*Biomacromolecules*,12(7):2708-14;Convertine等人,2009,*J Control Release*,133(3):221-9),其可以导致法呢醇引入细菌膜并损害膜的完整性(Koo等人,2003,*J Antimicrob Chemother*,52(5):782-9;Jabra-Rizk等人,2006,*Antimicrob Agents Chemother*,50(4):1463-9),或者细菌细胞内的药物释放和某些代谢途径的抑制(Kaneko等人,2011,*J Antibiot(Tokyo)*,64(8):547-9)。

[0394] 进行实验,其中使用定制装置(custom-built device),对处理的生物膜进行直接应用于生物膜表面的恒定剪切力(0至 1.785N/m^2 的范围)。应用剪切应力后,测量保留在表面上的生物膜干重(生物质)的量。观察到与游离法呢醇或空NPC相比,剪切应力后,加载了

法呢醇的NPC显示出较大的生物膜去除(图10C)。

[0395] p(DMAEMA)-b-p(DMAEMA-共-BMA-共-PAA) NPC强烈吸附至牙齿表面,其亲和力比二磷酸酯对羟基磷灰石的亲合力高~20倍(Al-Kattan 等人,2010,Adv Eng Mater,12(7):B224-B233)。纳米颗粒的亲合力可能是由于与牙齿表面和生物膜的整体负电荷相互作用的外部p(DMAEMA)冠的带正电荷的胺残基所造成的,如对单独的p(DMAEMA)和 p(DMAEMA)-b-p(BMA) 纳米颗粒观察到了NPC的类似吸附行为。可以加载具有极低水溶性的法呢醇,并以比其对常见口腔细菌(如变形链球菌(*S. mutans*))的最小抑菌浓度大~26.7倍的浓度从纳米颗粒中释放(Koo等人,2002,Antimicrob Agents Chemother,46(5):1302-9)。快速pH响应性法呢醇释放表明纳米颗粒递送对于与牙齿疗法和病理性牙齿生物膜的低pH 微环境一致的相对短的治疗窗可能是有益的。另外,显示了加载的NPC 优良的抗生物膜活性。因此,NPC 具有较大的递送抗生物膜药物的潜能,从而由于对生龋生物膜的局部、快速和引发的释放而提高它们的效率。

[0396] 本文引用的各个以及每一个专利、专利申请和专利公开的公开内容以其全部内容作为参考并入本文。尽管已参考具体实施方式公开了本发明,但显而易见的是本领域技术人员在不背离本发明的真实精神和范围的情况下可以设计本发明的其它实施方式和变化。所附权利要求旨在视为包含所有这些实施方式和等价变化。

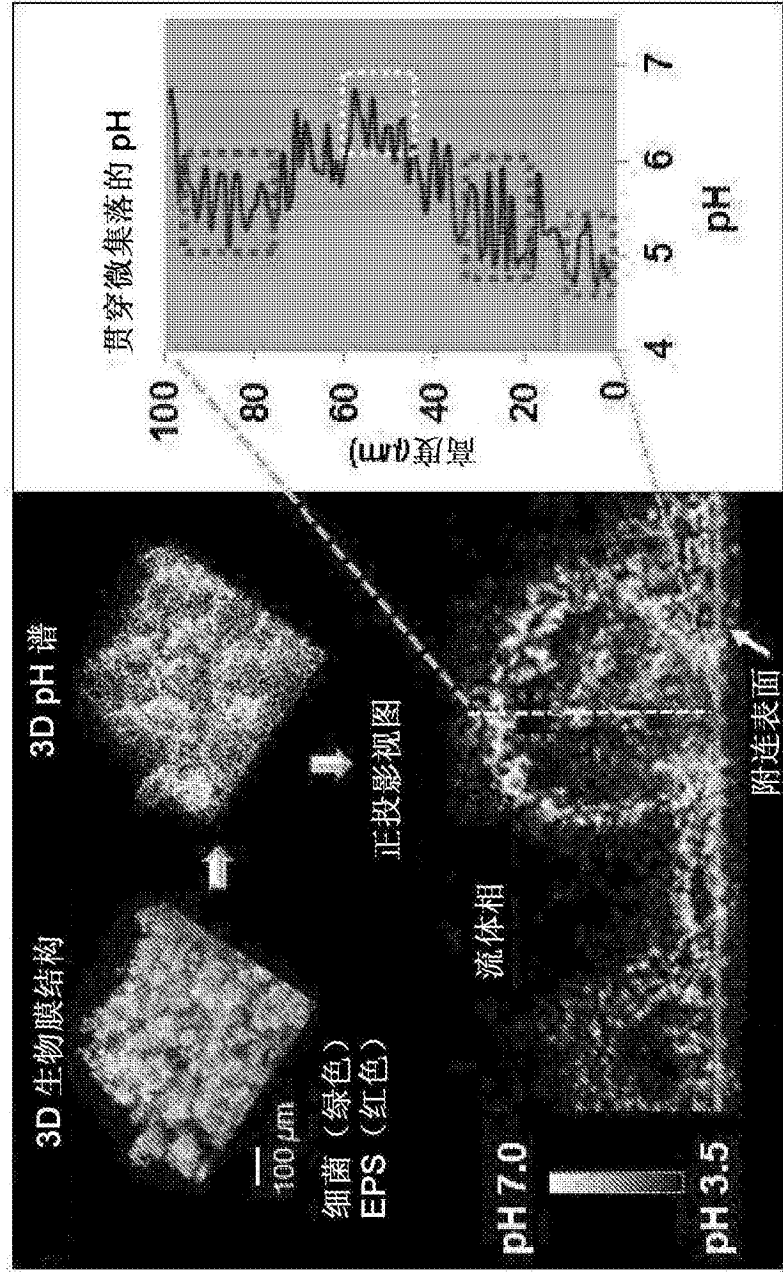


图1

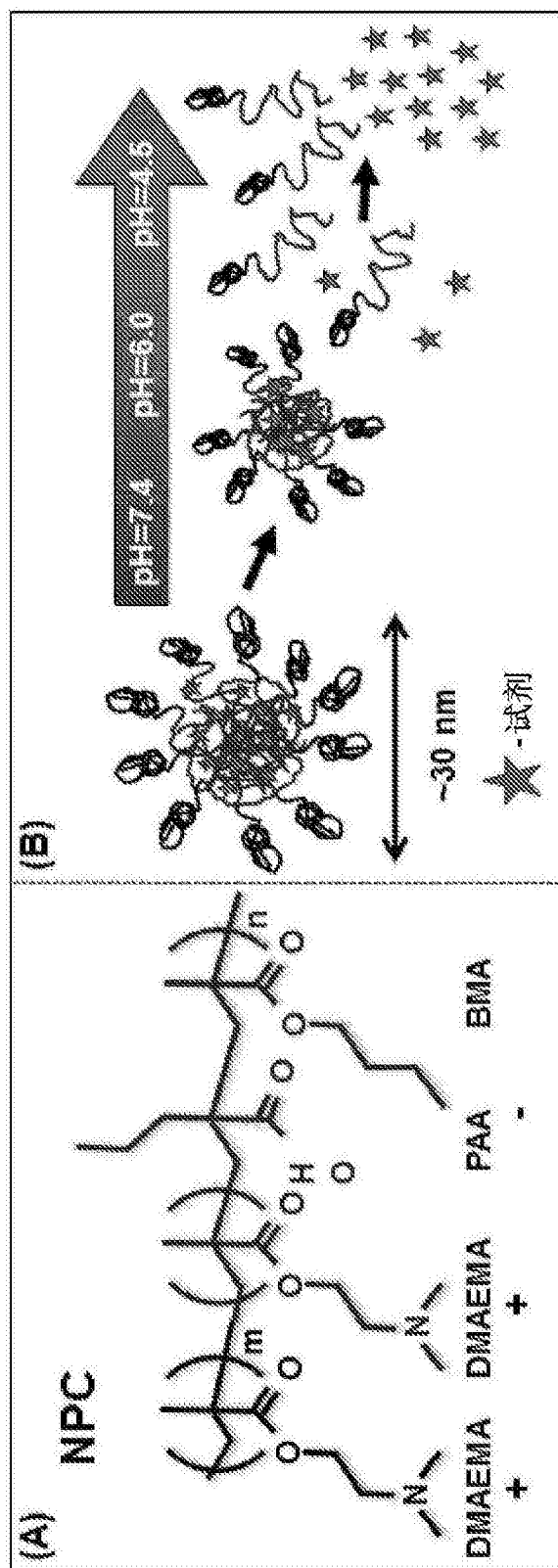


图2

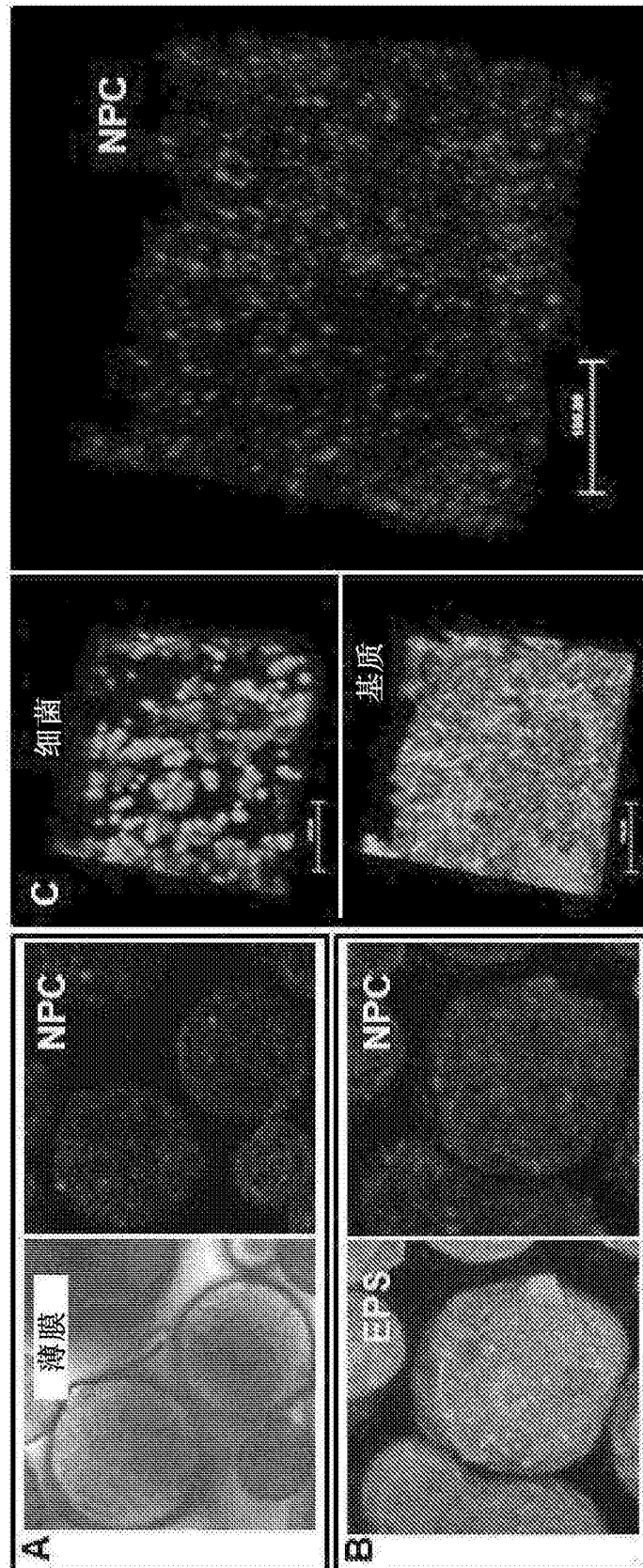


图3

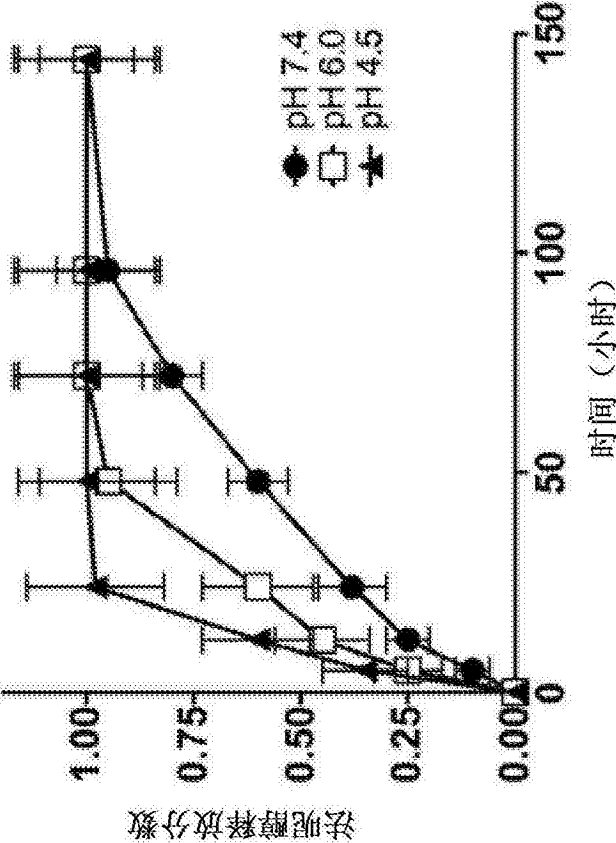


图4

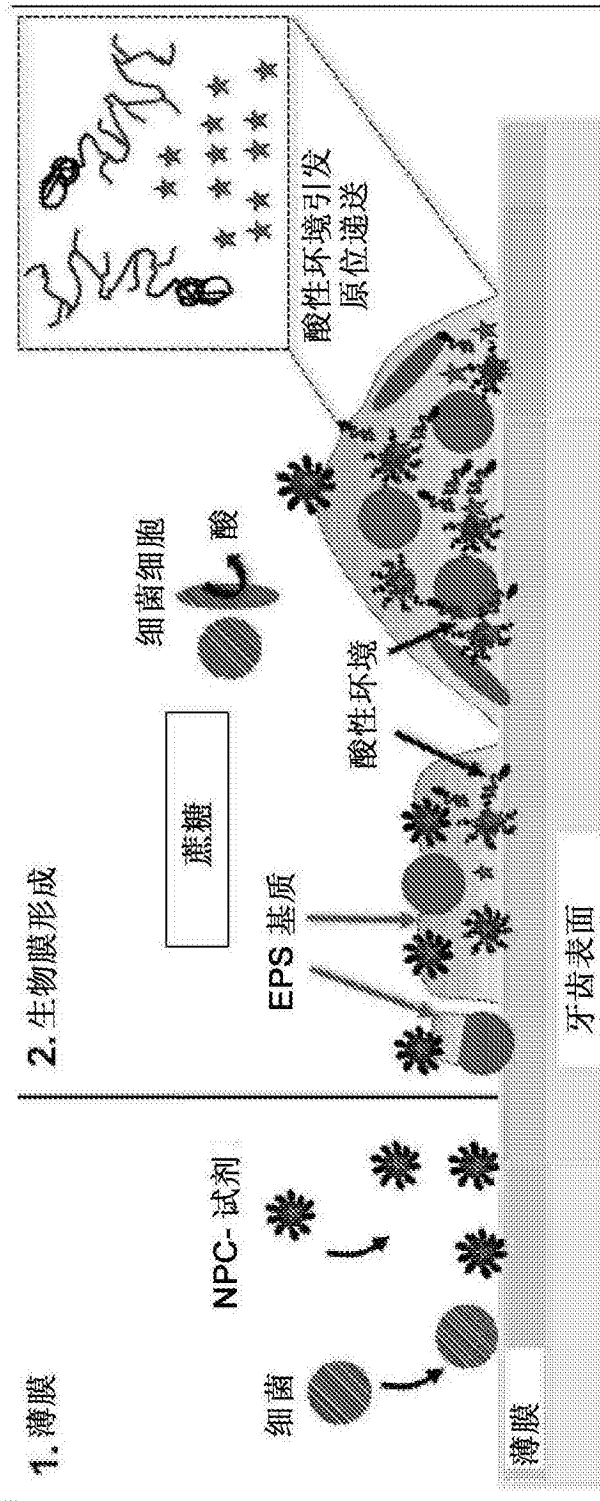


图5

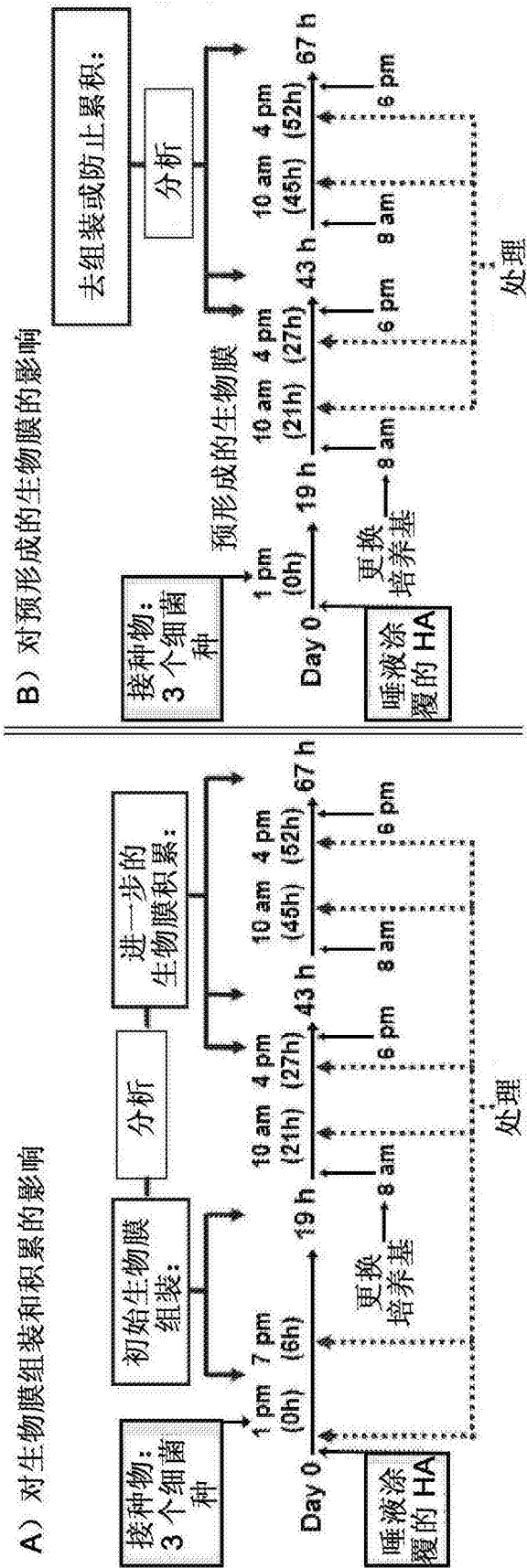


图6

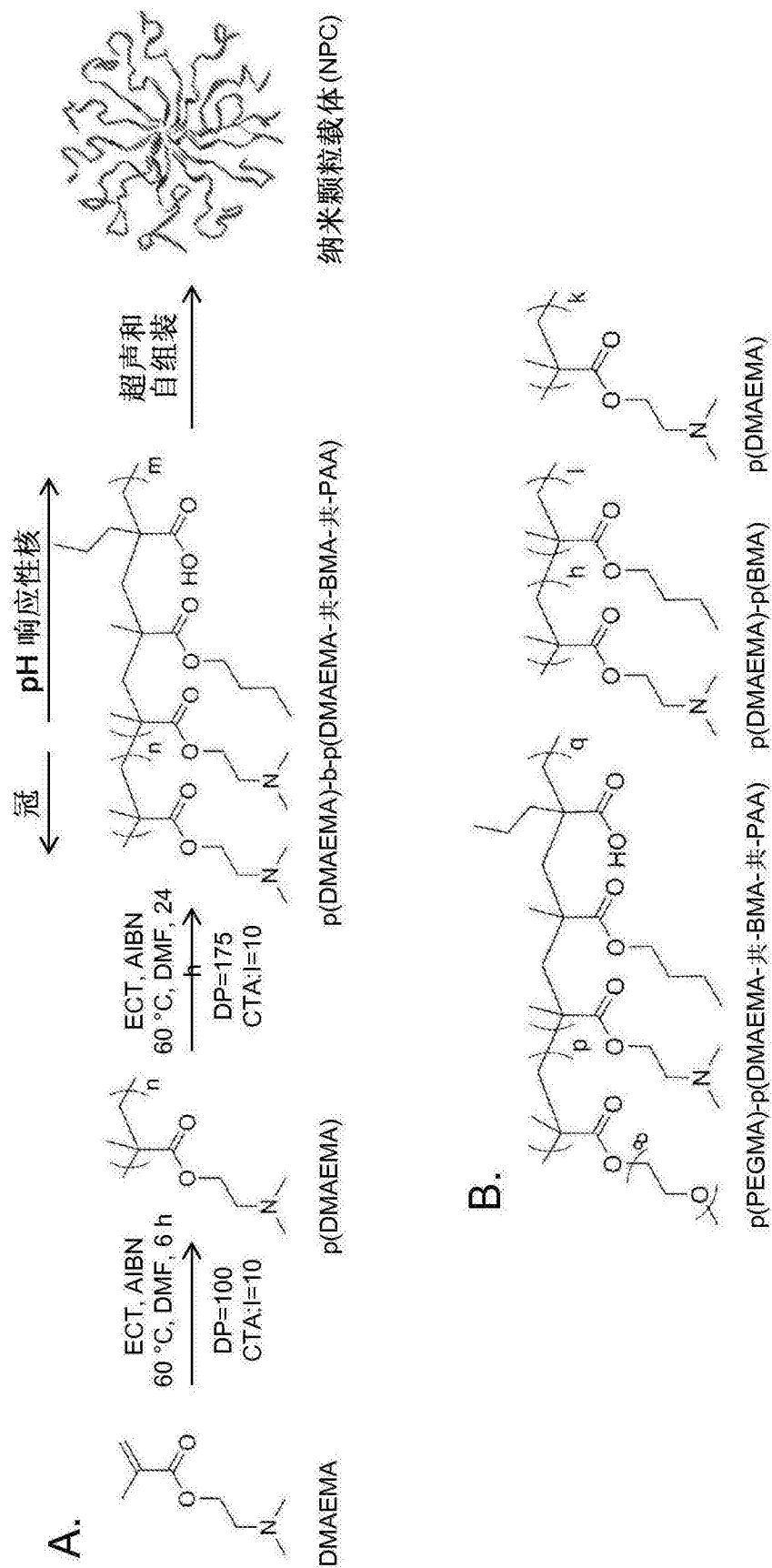


图7A-7B

C.

聚合物											胶束
冠嵌段				核嵌段				二嵌段共聚物			
缩写	组成	Mn	PDI	DP	组成	Mn	PDI	DP	尺寸 (d.nm)	尺寸PDI	ζ (mV)
NPC	p(DMAEMA)	9.3 kDa	1.3	100	p(DMAEMA-共-BMA-共-PAA)	21.9 kDa	1.1	175	21±0.4	0.2±0.09	+15.9±1.3
C1	p(DMAEMA)	16.0 kDa	1.01	100	NA	NA	NA	NA	ND (可溶)	ND	ND
C2	p(PEGMA)	18.7 kDa	1.08	100	p(DMAEMA-共-BMA-共-PAA)	29.0 kDa	1.09	250	21±0.9	0.37±0.05	-1.6±0.7
C3	p(DMAEMA)	22.8 kDa	1.08	150	p(BMA)	37.0 kDa	1.01	250	38±2.8	0.21±0.02	+17.2±1.7

图7C

D.

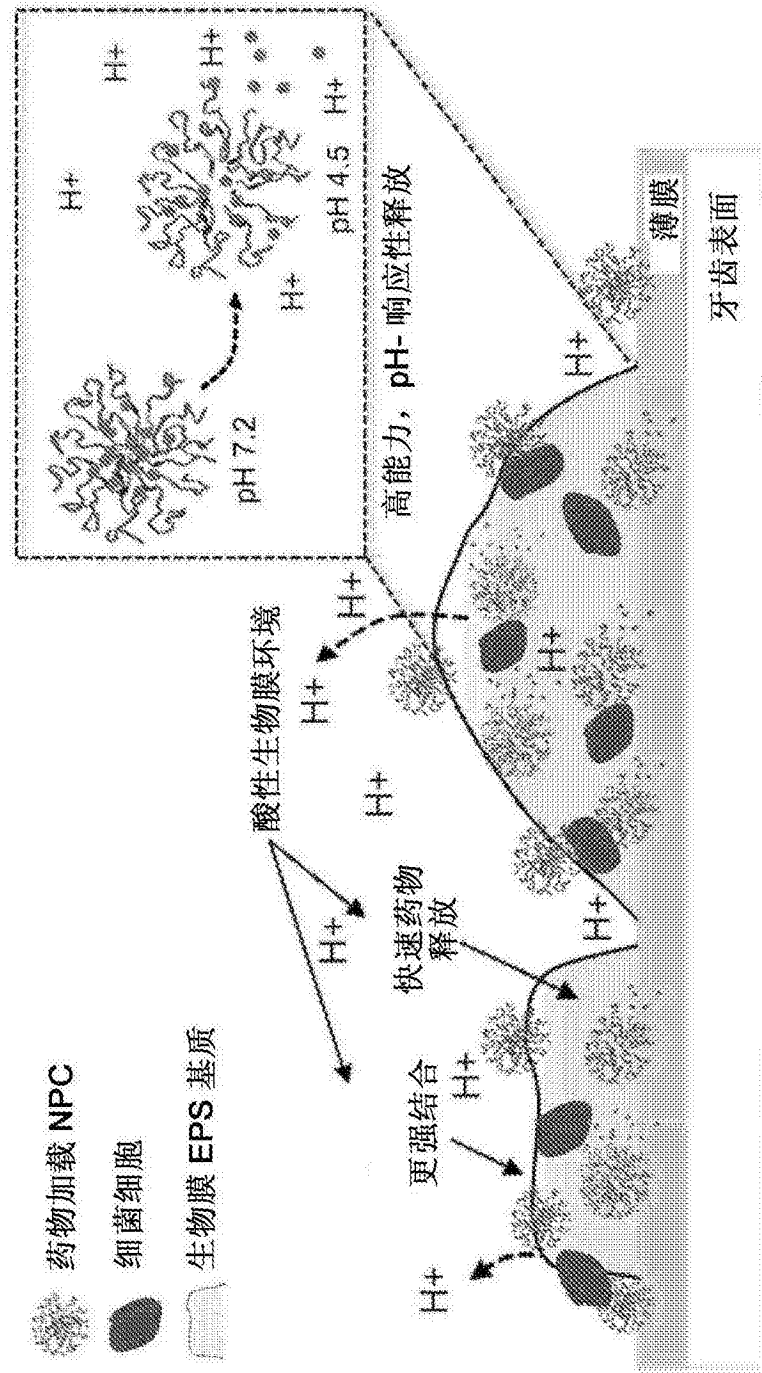
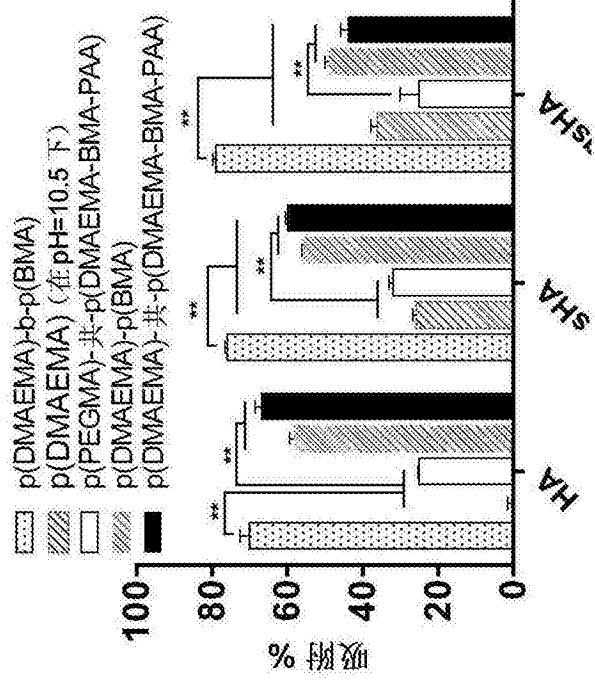


图7D

A.



B.

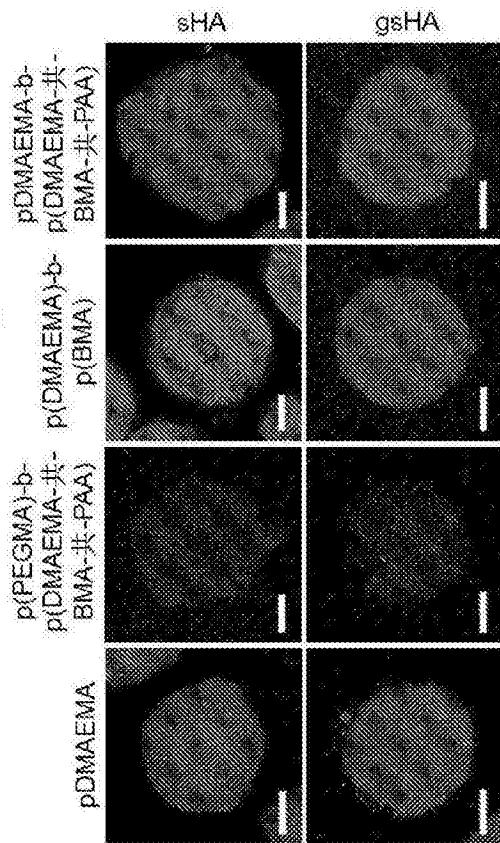


图8A-8B

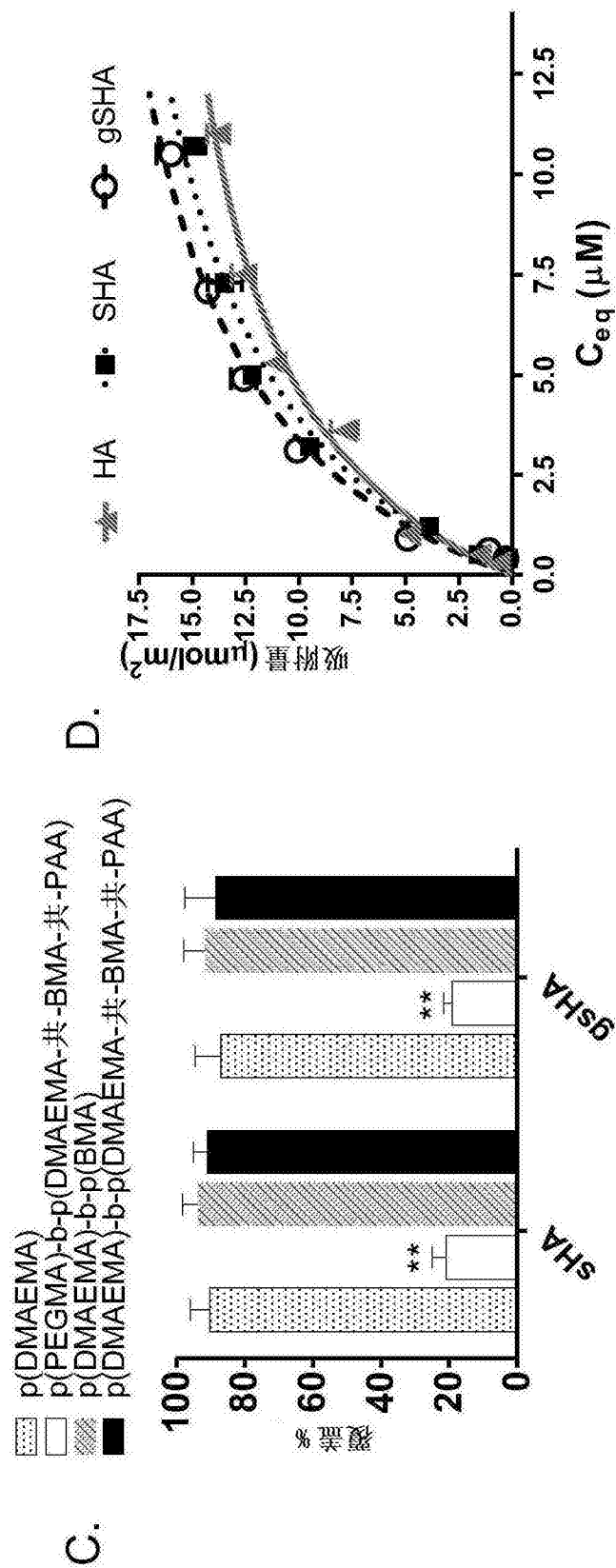


图8C-8D

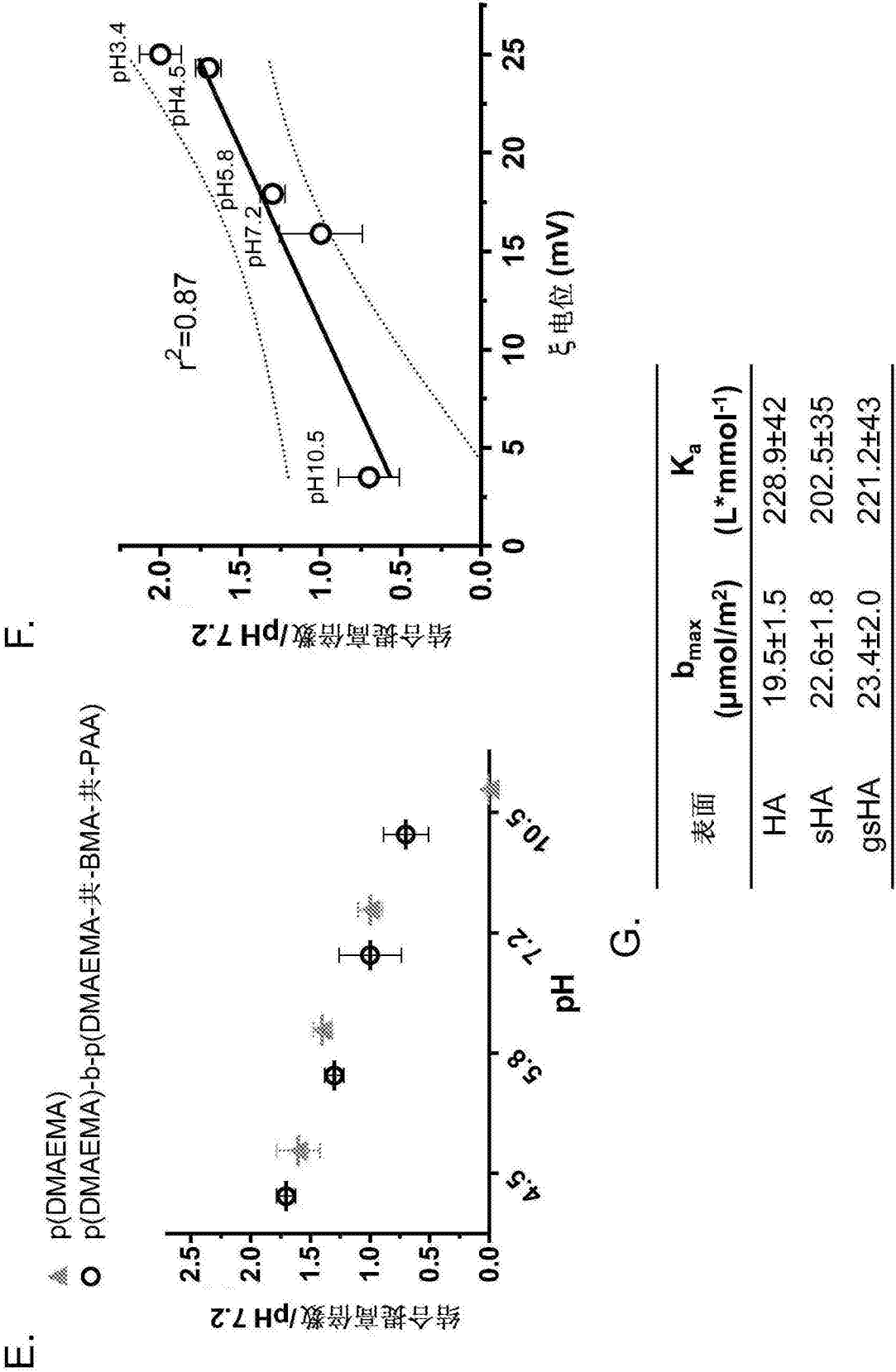
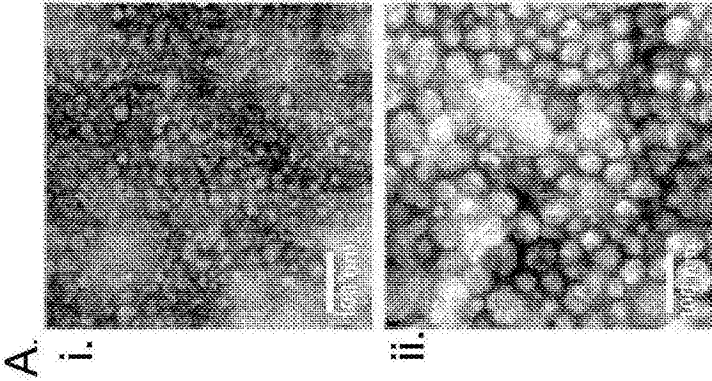
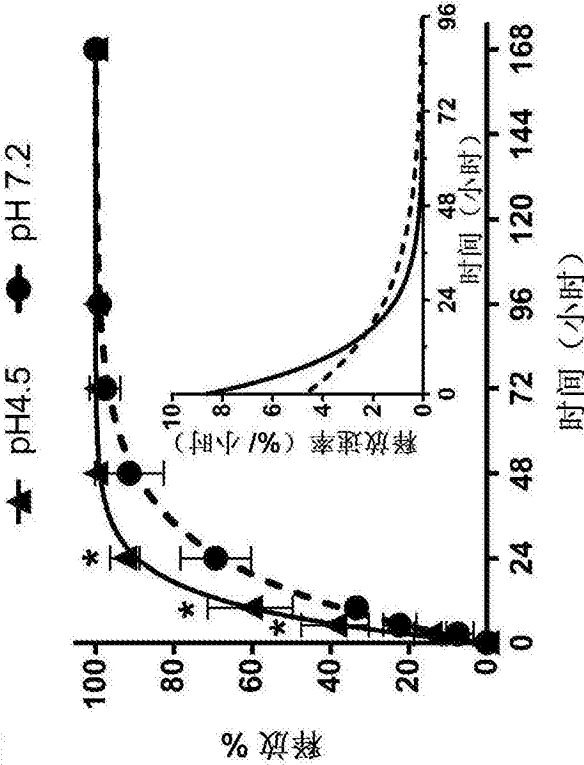


图8E-8G



B.



C.

pH	k_{obs} (1/hr)	$t_{1/2}$ (h)	r_0 (%/h)
4.5	0.094	7.3	~8.5
7.2	0.047	14.7	~4.5

图9A-9C

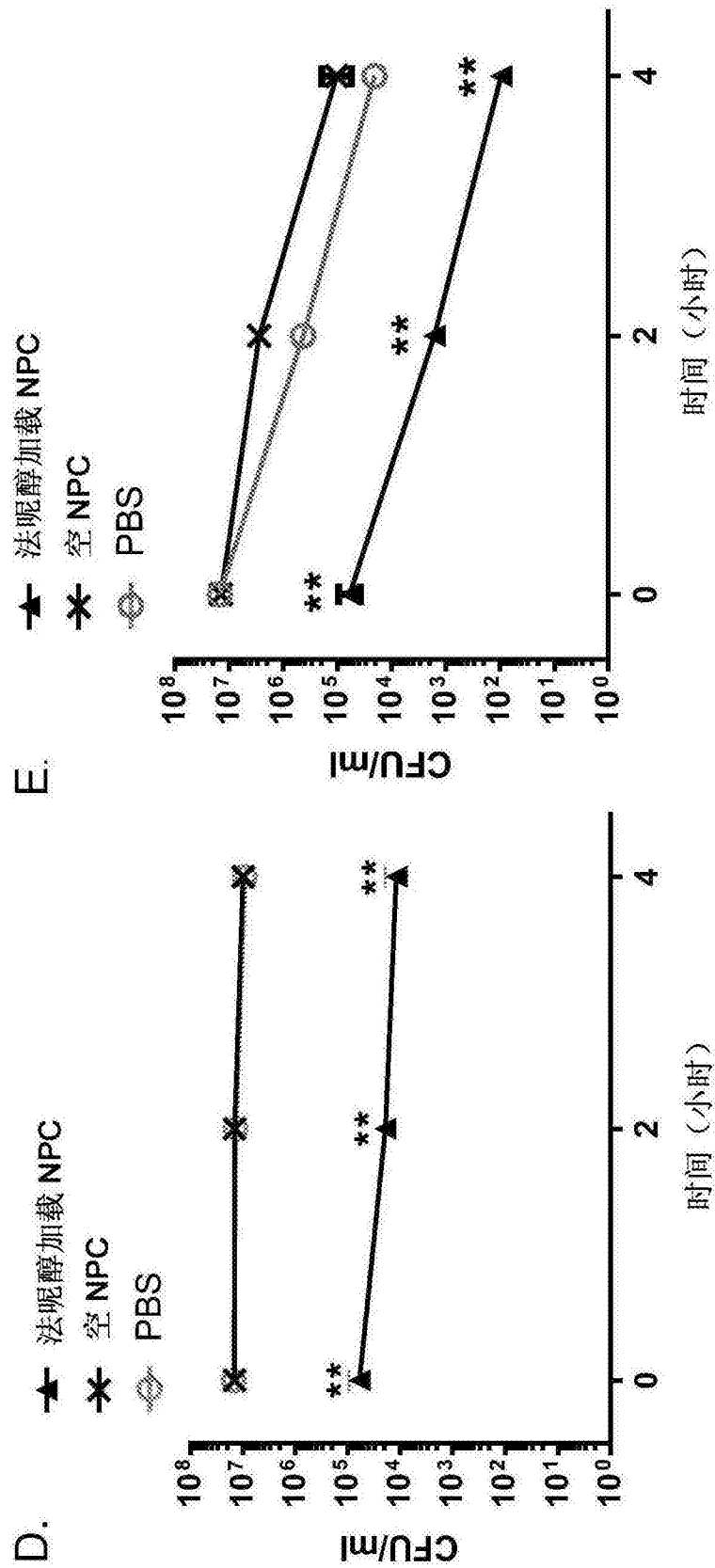


图9D-9E

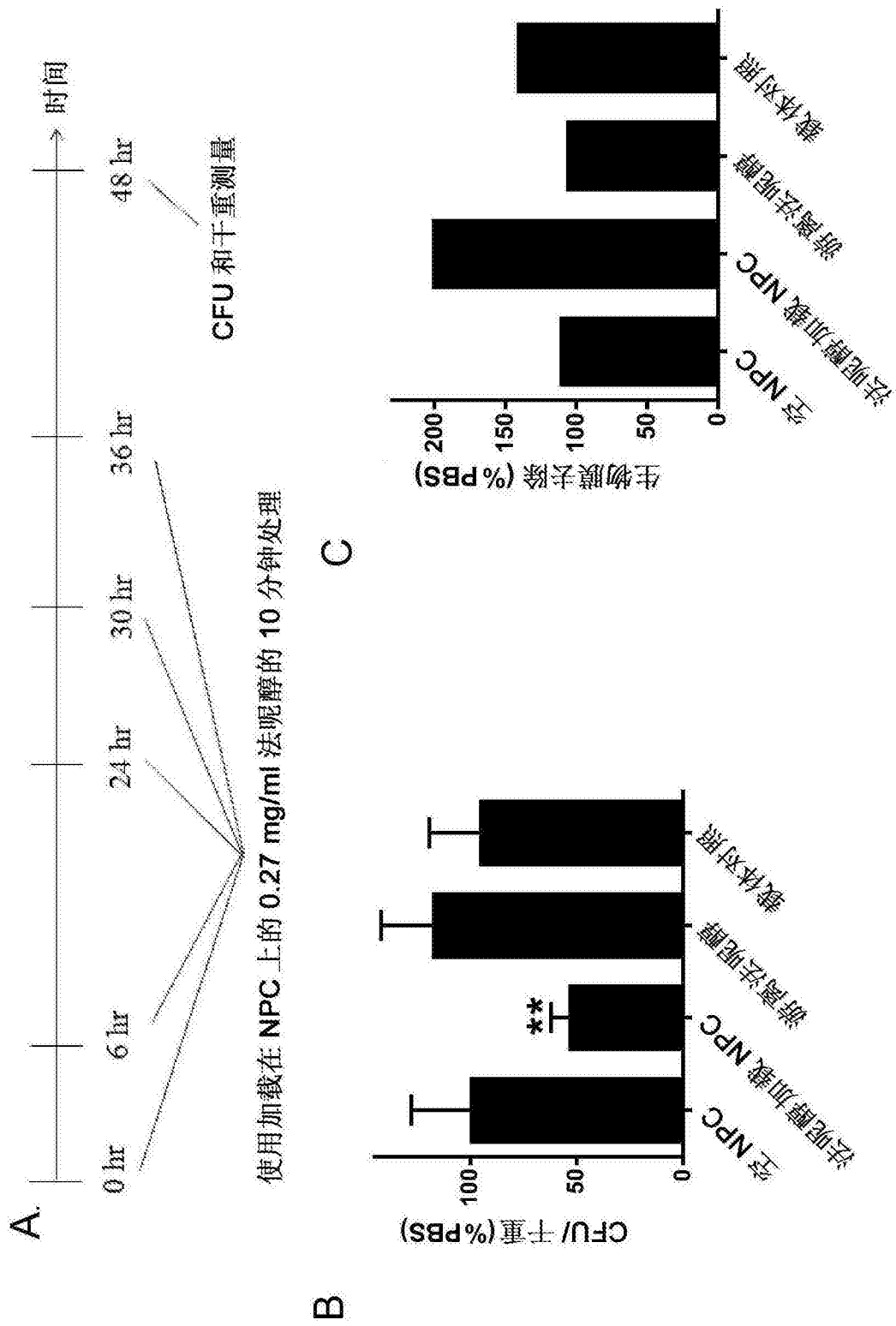


图10

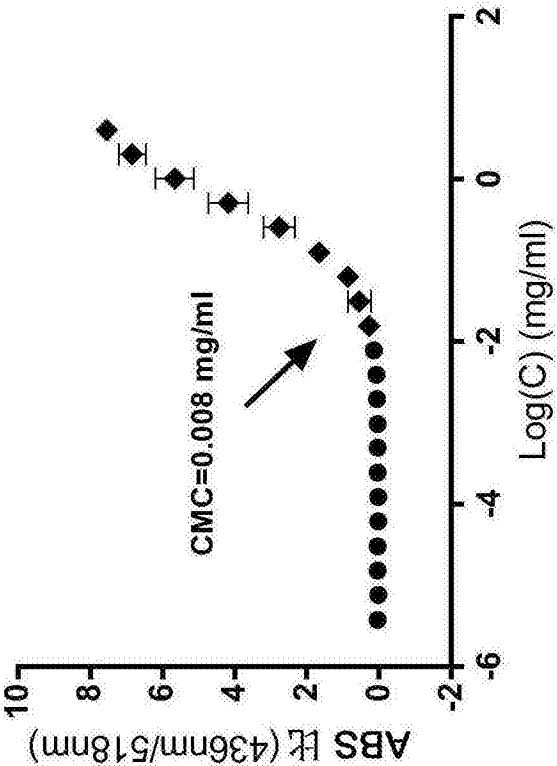


图11

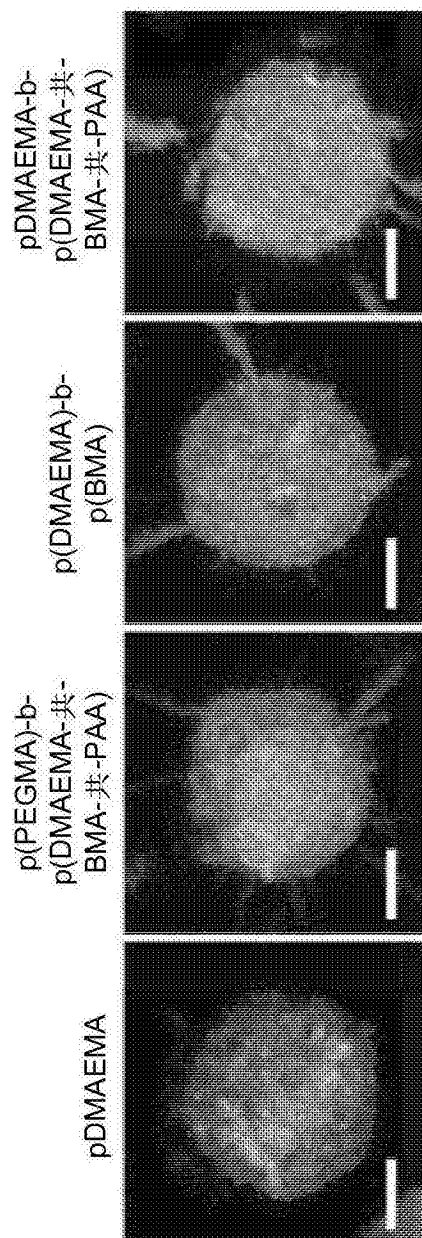


图12

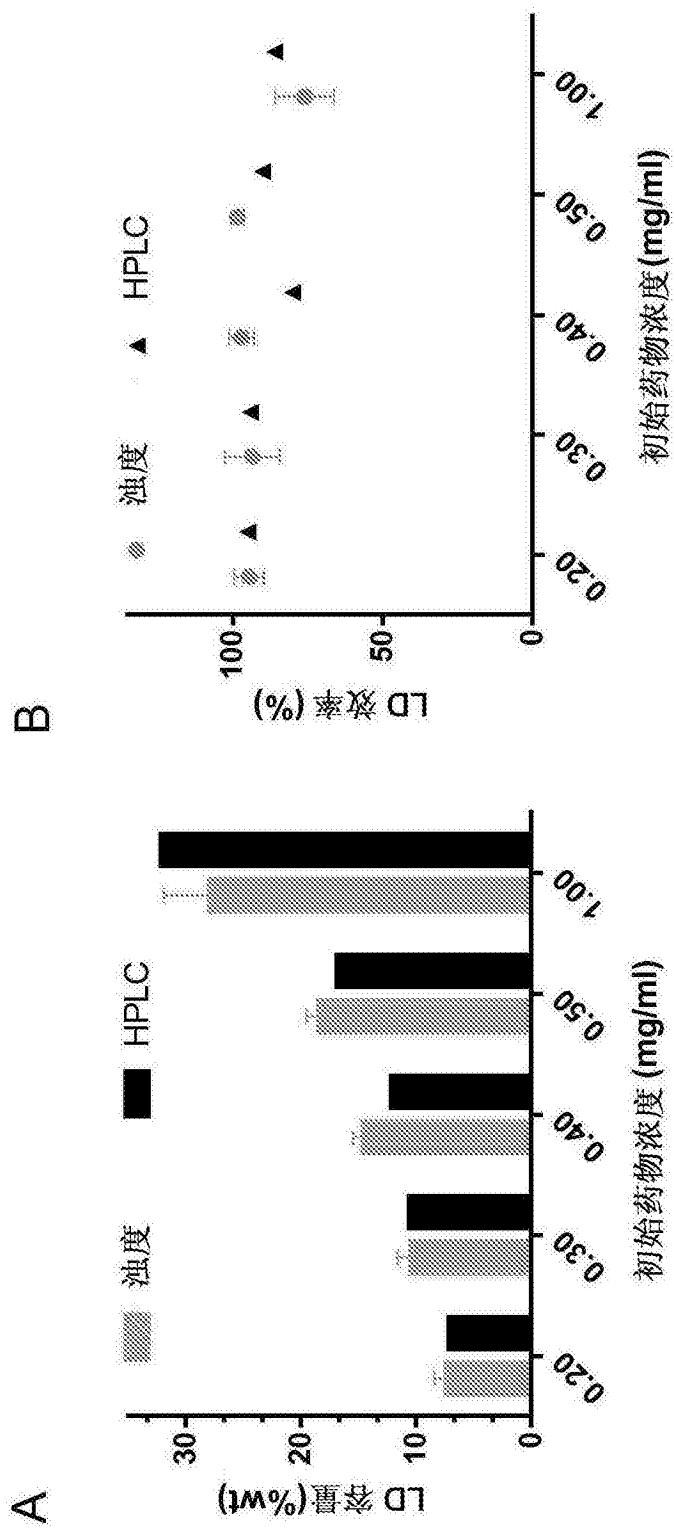


图13

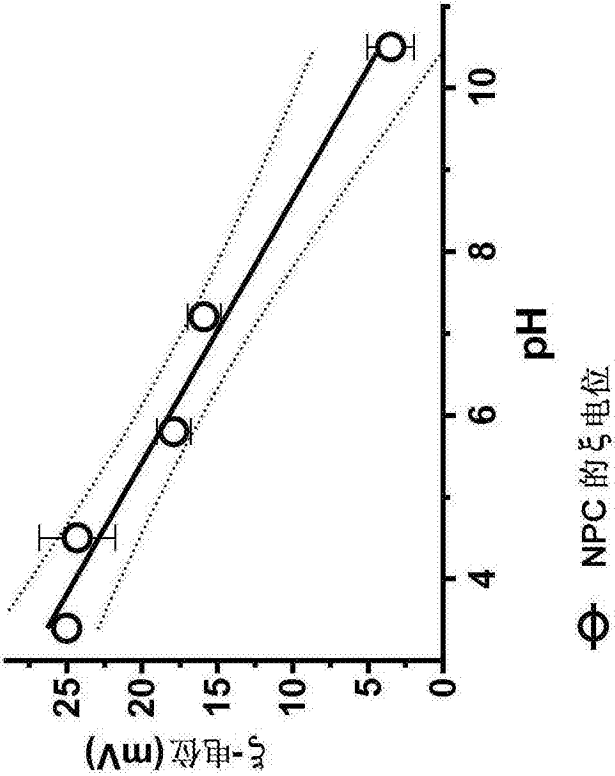


图14

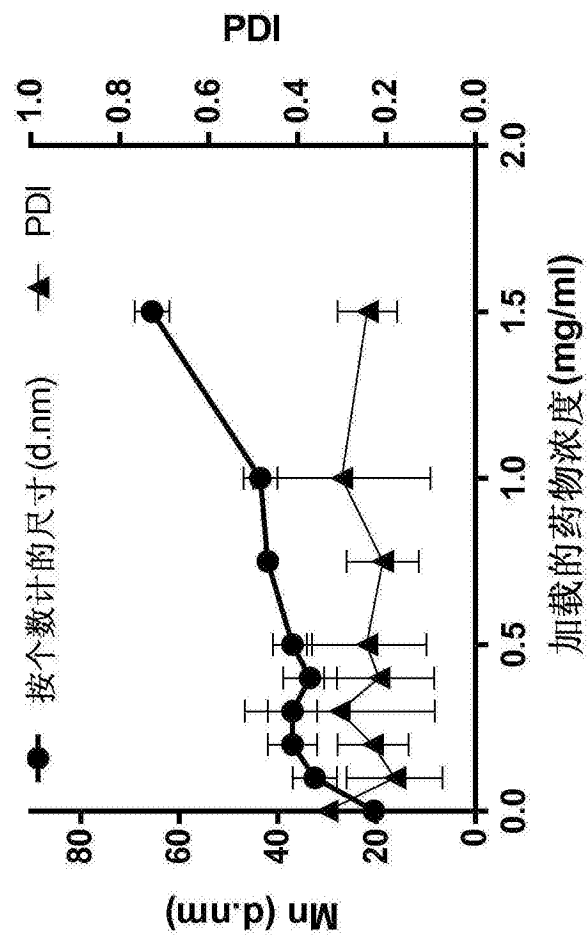


图15