

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2017年3月23日 (23.03.2017)



(10) 国际公布号
WO 2017/045628 A1

- (51) 国际专利分类号:
A61K 9/16 (2006.01) *A61P 31/10* (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01) *A61K 31/19* (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2016/099136
- (22) 国际申请日: 2016年9月14日 (14.09.2016)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201510594983.0 2015年9月17日 (17.09.2015) CN
- (71) 申请人: 阿赖耶识(上海)生物技术有限公司 (ALAYA (SHANGHAI) BIOSCIENCE CO., LTD) [CN/CN]; 中国上海市金山区漕泾镇展业路199号1幢漕泾镇展业路199号1幢, Shanghai 201507 (CN)。
- (72) 发明人: 谈贇 (TAN, Yun); 中国上海市金山区漕泾镇展业路199号1幢, Shanghai 201507 (CN)。 王刚 (WANG, Gang); 中国上海市金山区漕泾镇展业路199号1幢, Shanghai 201507 (CN)。
- (74) 代理人: 上海一平知识产权代理有限公司 (XU & PARTNERS, LLC.); 中国上海市普陀区真北路958号天地科技广场1号楼106室, Shanghai 200333 (CN)。
- (81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。
- (84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 在修改权利要求的期限届满之前进行, 在收到该修改后将重新公布(细则48.2(h))。

(54) Title: HIGHLY STABLE NON-VESICULAR NANOPARTICLES AND APPLICATION THEREOF IN TREATING MICROBIAL INFECTION

(54) 发明名称: 一种高稳定的非囊泡型纳米颗粒及其在治疗微生物感染中的应用

(57) Abstract: Non-vesicular nanoparticles which have antibacterial activity and are made from a C8-C28 fatty acid or a derivative thereof, a surfactant and an optional lipid.

(57) 摘要: 一种具备抗菌活性的由 C8-C28 的脂肪酸或其衍生物、表面活性剂以及任选的脂质构成的非囊泡型纳米颗粒。



WO 2017/045628 A1

一种高稳定的非囊泡型纳米颗粒及其在治疗微生物感染中的应用

技术领域

5 本发明涉及药物领域。具体地说，本发明涉及一种高稳定的、非囊泡型纳米颗粒，以及这种纳米颗粒在治疗微生物感染中的应用。

背景技术

10 微生物是个体难以用肉眼观察的一切微小生物的统称，包括细菌、真菌以及一些小型的原生生物、显微藻类等在内的一大类生物群体以及病毒。它们个体微小，与人类关系密切，涵盖了有益和有害的众多种类，广泛涉及食品、医药、工农业、环保等诸多领域。

15 微生物对人类最重要的影响之一是导致传染病的流行。在疾病的预防和治疗方面，人类取得了长足的进展，但是新出现的和再现的微生物感染还是不断发生。一些微生物感染的致病机制并不清楚，从而导致缺乏有效的治疗药物。而大量的广谱抗生素的滥用又造成强大的选择压力，致使许多菌株发生变异，导致耐药性的产生，人类健康受到新的威胁。例如，耐药性结核杆菌的出现使原本已近控制住的结核感染又在世界范围内猖獗起来。

20 再例如，葡萄球菌，特别是金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 是一种引发致命性院内感染以及社区感染的主要原因之一。在近几十年来，金黄色葡萄球菌经历了数波对抗生素的抵抗并现在对整个 β 内酰胺类的抗生素具有抗药性，包括青霉素类、头孢霉素类和碳青霉烯类抗生素。这些对 β 内酰胺类抗生素有抗药性的金黄色葡萄球菌也被称为甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌 (MRSA)，或者超级细菌。MRSA 感染日益增加导致了万古霉素的普遍使用，万古霉素是目前仅有的仍对 MRSA 有效的抗生素之一。但是万古霉素也只能抑制 MRSA 却无法根除它们。
25 此外，自从 1990 年代后期，万古霉素的大量使用导致了耐万古霉素金黄色葡萄球菌株的出现。所有的这些事实都凸显了对开发新型有效治疗 MRSA 方法的需求的重要性与迫切性。

30 最近关于新型抗 MRSA 的药物研究主要包括在已有抗生素基础上合成新药物，开发免疫球蛋白以靶向清除 MRSA 毒素，及开发一些天然抗菌素，例如阳离子抗菌肽、脂质体和其他内源物。尽管这些新型合成药物取得了不错的临床试验结果，但是它们与已有抗生素具备相似的结构和抗菌机理，因此，在合成类药物被广泛临床使用后不久，MRSA 就会对它们产生抗药性。通过注射抗毒球蛋白和抗体片段来被动中和细菌毒素因子可能对改善急性感染是有益的，但是这种方法并不能够抑制或根除细菌本身。而且在长期看来，还是会导致复发性感染。

35 有些微生物因为感染特定的部位，从而造成药物或者无法到达或者无法起作

用。例如在胃部发现的幽门螺旋杆菌(*Helicobacter Pylori*)是世界上最常见的细菌性病原体，其感染一半以上的世界人口。幽门螺杆菌感染导致多种胃部疾病，包括慢性胃炎、胃溃疡以及胃癌等。

5 目前，世界上针对幽门螺旋杆菌感染通用的治疗方案为三联疗法，即，两种
抗生素(克拉霉素+阿莫西林或甲硝唑)联用一种质子泵抑制剂。然而，由于耐受现有
10 抗生素的幽门螺旋杆菌菌株的快速出现，目前的治疗方案对它们的根除率迅速
下降。例如，三联疗法对于幽门螺旋杆菌的清除率已经降至 60 到 75%。其主要原
因在于幽门螺旋杆菌菌株对这些抗生素出现耐药性。尤其是对三联疗法中关键成
分甲硝唑的耐药性比较明显。在发达国家，该耐药性为 40%，发展中国家则为 90%。
15 针对这些出现的耐药性，人们开发了不同类型的抗生素，但是结果均不理想。另
外，新开发的抗生素及其应用也受困于患者依从性较差、毒副作用高、以及抗生
素治疗高昂的成本。很明显，目前临床急需具有卓越治疗效果、更小副作用的新
型治疗方案。

15 还有一些微生物感染虽然一般不产生严重的，例如致命性的后果，但会严重
影响人们的生活质量。例如，痤疮感染是一种常见皮肤病，80 %的人都会或曾经
受其影响。痤疮的起因主要是皮脂过度分泌，导致毛囊堵塞，因而产生局部的低
氧或无氧环境，这会刺激痤疮丙酸杆菌(*Propionibacterium acnes*)迅速繁殖。痤疮
20 丙酸杆菌是一种革兰氏阳性的厌氧性细菌，与痤疮感染密切相关。痤疮丙酸杆菌
的过度生长会导致毛囊壁破裂，于是宿主免疫细胞会对入侵的细菌产生反应，导
致炎症性痤疮发生。严重发炎的痤疮病变可引起色素沉淀和永久性皮肤疤痕，给
人们带来尴尬、压力和自卑感，从而影响他们的心理健康和心理发育。

许多种抗菌药物已经研发出来并批准用于治疗痤疮，包括阿达帕林、他扎罗
汀、红霉素、克林达霉素、过氧化苯甲酰 (BPO)，及其它的抗生素。尽管这些
25 抗生素类药物有着显著的抗痤疮疗效，但这些药物通常会产生严重的副作用。例
如，BPO 是最常用的治疗痤疮的皮肤药物之一；但它导致的红斑、鳞屑、皮肤灼
烧和毛发变白的发生率很高。口服抗生素虽然也非常有效，但常常伴随着破坏肠
道菌群，诱发耐药性痤疮丙酸杆菌等风险。例如，异维 A 酸是一种治疗特严重型
30 痤疮的维生素 A 衍生药维甲酸药物，它的使用受到严格的监管。由于其具有强烈
致畸作用，因此绝大多数痤疮患者都不能使用该药。因此，新的抗痤疮药物不仅
要具有良好的治疗效果，还要具有非常小的毒副作用并且不诱导耐药株产生。

除细菌外，真菌也是对人类健康产生严重威胁的一类微生物。根据真菌侵犯
人体的部位，真菌感染性疾病分为 4 类：浅表真菌病、皮肤真菌病、皮下组织真
35 菌病和系统性真菌病；前二者合称为浅部真菌病，后二者又称为深部真菌病。

目前，随着骨髓和器官移植、肿瘤化疗、糖皮质激素长期应用以及广谱抗生

素的普遍使用，致使侵袭性真菌感染发病率逐年攀升，新的致病菌不断出现，病情也日趋严重。深部真菌病在真菌感染中危害最大，也是院内感染类型之一，其临床症状体征无特异性，缺乏有效诊断工具，病程进展快，预后差，预防性治疗和
5 经验性治疗的应用越来越普遍。目前的临床抗真菌药物大致分为四类：唑类、多烯类、丙烯胺类、氟胞嘧啶类等，其中唑类药物应用最广泛。现有抗真菌药物普遍存在诸如抗菌谱窄、副作用大等局限性，导致其临床应用受限。同时随着抗真菌药物的大量使用，真菌的耐药率持续上升，从而影响了药物的治疗效果。

在过去的几十年，纳米技术在药物学中的应用被广泛地探索。通过物理包覆
10 或化学结合，药物可以被装入纳米颗粒，从而相比于游离药物，显著提高了药物的动力学指数和治疗指数。这些基于纳米颗粒的药物输送系统的优点多集中在：提高药物的血清溶解度、延长药物的体循环周期以及持续、可控地释放药物等方面。由于这些纳米颗粒中的药物多为传统的抗生素，仍然会产生耐药株。而且，所使用的纳米颗粒制备过程复杂，成本高，并且稳定性有限，从而严重影响了这
15 类药物的实际应用价值。

因此，本领域急需高效的、不诱导产生耐药株的抵御微生物感染的新型治疗药物。

发明内容

20 本发明的目的在于提供一种高效的、不诱导产生耐药株的抵御微生物感染的新型治疗药物。

在第一方面，本发明提供一种非囊泡型纳米颗粒，所述颗粒由脂肪酸或其衍生物、表面活性剂以及任选的脂质构成。

25 在优选的实施方式中，所述脂肪酸是 C8-C28，优选 C12-C24，最优选 C12-C18 的饱和或不饱和脂肪酸；所述脂肪酸衍生物是 C10-C14，优选 C11-C13 的脂肪酸的单甘油酯、双甘油酯或三甘油酯。

在优选的实施方式中，所述不饱和脂肪酸含有 1-6 个，优选 1-4 个，例如 1 个、2 个或 3 个不饱和键，优选双键。

30 在优选的实施方式中，所述脂肪酸包括但不限于：棕榈酸、硬脂酸、油酸、亚麻酸、亚油酸、月桂酸、肉豆蔻油酸、花生四烯酸、二十碳五烯酸（下称 EPA）、二十二碳六烯酸（下称 DHA）、辛酸和壬酸。

在具体的实施方式中，所述脂肪酸是亚麻酸、月桂酸、肉豆蔻油酸；所述脂肪酸衍生物是月桂酸单甘油酯、双甘油酯或三甘油酯，优选月桂酸单甘油酯。

35 在优选的实施方式中，所述表面活性剂包括但不限于以下的一种或多种：硬脂酸钠、4-(5-十二烷基)苯磺酸盐、聚氧乙烯乙二醇、聚山梨醇酯 20、聚山梨醇酯 40、山

梨醇酯 60、聚山梨醇酯 80、泊洛沙姆、聚乙二醇辛基苯基醚和 Triton X-100。

在优选的实施方式中，所述脂质为磷脂和/或胆固醇。

在优选的实施方式中，所述磷脂包括但不限于以下的一种或多种：磷脂酰乙醇胺、磷脂酰肌醇、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰胆碱、二肉豆蔻酰基卵磷脂、二棕榈酰磷脂酰胆碱、棕榈酰磷脂酰甘油和二油磷脂酰乙醇胺。

在优选的实施方式中，所述脂质和表面活性剂的质量比为 10~0 : 1；优选 5~0 : 1；更优选 2.5~0 : 1。

在优选的实施方式中，所述脂肪酸或其衍生物的浓度为 0.001~5%w/v；优选 0.1~5%w/v；更优选 0.2~4%w/v；更优选 0.3~3%w/v。

10 在具体的实施方式中，所述的纳米颗粒的粒径为 1-90 nm；优选 2-80 nm；更优选 5-50 nm；更优选 5-20 nm；最优选 5-15 nm。

在优选的实施方式中，制得的纳米颗粒的粒径可以为 1-30 nm；10-40 nm；20-50 nm；30-60 nm；40-70 nm；50-80 nm；60-90 nm；或者，所述纳米颗粒的粒径可以为 5-25 nm；15-35 nm；25-45 nm；35-55 nm；45-65 nm；55-75 nm；65-85 nm 或者，所述纳米颗粒的粒径可以为 10-30 nm；20-40 nm；30-50 nm；40-60 nm；50-70 nm；60-80 nm；70-90 nm。

在具体的实施方式中，所述纳米颗粒的多分散性系数为<0.3；优选<0.2。

在优选的实施方式中，所述纳米颗粒的粒径处于较窄的范围内，例如约 5-10 nm、约 15-25 nm、约 20-30 nm、约 40-50 nm、约 65-75 nm、约 80-90 nm 或约 100-110 nm。

20 在具体的实施方式中，所述非囊泡型纳米颗粒的稳定性为：

在室温~37℃下储存 3 个月后，与新鲜制备的纳米颗粒相比，所述纳米颗粒的“最小抑菌浓度”与“最小杀菌浓度”值的改变小于 20%；优选小于 10%；或者，

在室温下储存 1.5 个月后，优选 3 个月后，与新鲜制备的纳米颗粒相比，所述纳米颗粒的粒径改变小于 20%；优选小于 15%；更优选小于 10%。

在具体的实施方式中，所述纳米颗粒由以下方法制备，所述方法包括：

- 1). 将表面活性剂和任选的脂质悬浮在水中；
- 2). 搅拌 1)得到的悬浮液直至形成均相悬浮液；
- 3). 加热 2)得到的均相悬浮液到其所含表面活性剂和任选的脂质的熔点以上；
- 30 4). 将脂肪酸或其衍生物加入 3)得到的热悬浮液中并搅拌；
- 5). 降温，静置 4)得到的悬浮液，从而得到本发明的非囊泡型纳米颗粒悬浮液。

在具体的实施方式中，本发明的纳米颗粒用于制备抗微生物感染的试剂，或可用于治疗微生物感染。

所述微生物包括：细菌、真菌；所述细菌包括：革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌；
35 所述革兰氏阳性菌包括：葡萄球菌 (*Staphylococcus*)；优选金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)；更优选甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌 (*Methicillin-resistant*

Staphylococcus aureus); 丙酸杆菌 (*Propionibacterium*); 优选费氏丙酸杆菌 (*Propionibacterium freudenreichii*)、痤疮丙酸杆菌 (*Propionibacterium acnes*)、卵白丙酸杆菌 (*Propionibacterium avidum*)、颗粒丙酸杆菌 (*Propionibacterium granulosum*); 更优选痤疮丙酸杆菌 (*Propionibacterium acnes*); 和

5 所述革兰氏阴性菌包括: 幽门螺旋杆菌 (*Helicobacter Pylori*)、绿脓杆菌 (*Pseudomonas aeruginosa*); 优选幽门螺旋杆菌;

所述真菌包括但不限于: 球孢子菌、类球孢子菌、皮炎芽生菌、着色真菌、足分支菌、孢子丝菌、毛癣菌、念珠菌属、隐球菌、曲菌、毛霉菌、放线菌、奴卡菌等等; 优选毛癣菌和曲菌; 更优选红色毛癣菌 (*Trichophyton rubrum*)、烟曲霉 (*Aspergillus fumigatus*)、白色念珠菌 (*Candida albicans*)、黄癣菌 (*Mycelium yellow ringworm*); 最优选红色毛癣菌、烟曲霉。

10

在第二方面, 本发明提供本发明第一方面所述的非囊泡型纳米颗粒的制备方法, 包括以下步骤:

15 1). 将表面活性剂和任选的脂质悬浮在水中;
2). 搅拌 1)得到的悬浮液直至形成均相悬浮液;
3). 加热 2)得到的均相悬浮液到其所含表面活性剂和任选的脂质的熔点以上;
4). 将脂肪酸或其衍生物加入 3)得到的热悬浮液中并搅拌;
5). 降温, 静置 4)得到的悬浮液, 从而得到权利要求 1-5 中任一项所述的非囊泡
20 型纳米颗粒。

在优选的实施方式中, 所述方法中的熔点温度为 20°C-80°C, 例如 20°C, 30°C, 40°C、50°C、60°C、70°C 或 80°C。

在优选的实施方式中, 所述方法还可包括检测所得纳米颗粒的流体动力学尺寸。

在优选的实施方式中, 所述脂肪酸是 C8-C28, 优选 C12-C24, 最优选 C12-C18
25 的饱和或不饱和脂肪酸; 所述脂肪酸衍生物是 C10-C14, 优选 C11-C13 的脂肪酸的单甘油酯、双甘油酯或三甘油酯。

在优选的实施方式中, 所述不饱和脂肪酸是含有一个或多个, 优选 1-4 个双键的脂肪酸。

在优选的实施方式中, 所述脂肪酸包括但不限于: 棕榈酸、硬脂酸、油酸、亚麻
30 酸、亚油酸、月桂酸、肉豆蔻油酸、花生四烯酸、EPA、DHA、辛葵酸和壬酸。

在优选的实施方式中, 所述表面活性剂包括但不限于以下的一种或多种: 硬脂酸钠、4-(5-十二烷基)苯磺酸盐、聚氧乙烯乙二醇、聚山梨醇酯 20、聚山梨醇酯 40、山梨醇酯 60、聚山梨醇酯 80、泊洛沙姆、聚乙二醇辛基苯基醚和 Triton X-100。

在优选的实施方式中, 所述脂质为磷脂和/或胆固醇。

35 在优选的实施方式中, 所述磷脂包括但不限于以下的一种或多种: 磷脂酰乙醇胺、磷脂酰肌醇、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰胆碱、二肉豆蔻酰基卵磷脂、二棕榈酰磷脂酰胆

碱、棕榈酰磷脂酰甘油和二油磷脂酰乙醇胺。

在优选的实施方式中，所述脂质和表面活性剂的质量比为 10~0 : 1；优选 5~0 : 1；更优选 2.5~0 : 1。

在优选的实施方式中，所述脂肪酸的浓度为 0.001~5%w/v；优选 0.1~5%w/v；更优选 0.2~4%w/v；更优选 0.3~3%w/v。

在优选的实施方式中，制得的纳米颗粒的粒径为 1-90 nm；优选 2-80 nm；更优选 5-50 nm；更优选 5-20 nm；最优选 5-15 nm。

在优选的实施方式中，制得的纳米颗粒的粒径可以为 1-30 nm；10-40 nm；20-50 nm；30-60 nm；40-70 nm；50-80 nm；60-90 nm；或者，所述纳米颗粒的粒径可以为 5-25 nm；15-35 nm；25-45 nm；35-55 nm；45-65 nm；55-75 nm；65-85 nm 或者，所述纳米颗粒的粒径可以为 10-30 nm；20-40 nm；30-50 nm；40-60 nm；50-70 nm；60-80 nm；70-90 nm。

在优选的实施方式中，所述纳米颗粒的多分散性系数为<0.3；优选<0.2。

在优选的实施方式中，所述纳米颗粒的粒径处于较窄的范围内，例如约 5-10 nm、约 15-25 nm、约 20-30 nm、约 40-50 nm、约 65-75 nm、约 80-90 nm 或约 100-110 nm。

在优选的实施方式中，所述非囊泡型纳米颗粒的稳定性为：

在室温~37℃下储存 3 个月后，与新鲜制备的纳米颗粒相比，所述纳米颗粒的“最小抑菌浓度”与“最小杀菌浓度”值的改变小于 20%；优选小于 10%；或者，

在室温下储存 1.5 个月后，优选 3 个月后，与新鲜制备的纳米颗粒相比，所述纳米颗粒的粒径改变小于 20%；优选小于 15%；更优选小于 10%。

在第三方面，本发明提供一种药物组合物，其包含本发明第一方面所述的非囊泡型纳米颗粒以及任选的药学上可接受的载体。

在优选的实施方式中，所述药物组合物的剂型包括但不限于：适合全身性给药的剂型、或外用或局部给药的剂型；

进一步地，所述剂型包括但不限于：片剂、溶液剂、混悬液、胶囊剂、颗粒剂、粉剂、注射剂、贴剂、喷剂、软膏剂、油膏剂、乳膏剂、凝胶剂、霜剂、滴剂、喷雾剂、洗剂；

优选外用或局部给药的剂型，包括但不限于：贴剂、喷剂、软膏剂、油膏剂、乳膏剂、凝胶剂、霜剂、滴剂、喷雾剂、洗剂。

在优选的实施方式中，所述药学上可接受的载体包括但不限于：水；生理盐水；结合剂（例如聚乙烯吡咯烷酮或羟丙基甲基纤维素）；填料（例如乳糖和其它糖类、明胶或硫酸钙）；润滑剂（例如淀粉、聚乙二醇或乙酸钠）；崩解剂（例如淀粉或羟基乙酸淀粉钠）；以及润湿剂（例如月桂基硫酸钠）。

在优选的实施方式中，所述药物组合物还可含有穿透促进剂；所述穿透促进

剂包括但不限于：表面活性剂（例如十二烷基硫酸钠、聚氧乙烯-9-月桂基醚和聚氧乙烯-20-十六烷基醚）；胆汁酸盐（例如胆酸、脱氢胆酸和脱氧胆酸）；螯合剂（例如乙二胺四乙酸二钠、柠檬酸和水杨酸盐）；以及非螯合性非表面活性剂（例如不饱和和环脲）。

5 在具体的实施方式中，所述药物组合物还可包含其它抗生素。

在优选的实施方式中，所述抗生素是治疗葡萄球菌，优选金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)；更优选甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌 (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*)感染的抗生素，包括但不限于：万古霉素、头孢菌素、利奈唑胺、替考拉宁、阿贝卡星、奎宁始霉素、达福普汀、喹努普丁、克林霉素、达托霉

10 素、利福平、替拉万星、四环素类如替加环素等药物；或者，
所述抗生素是治疗痤疮丙酸杆菌感染的抗生素，包括但不限于：阿达帕林、他扎罗汀、红霉素、克林达霉素、阿奇霉素、米诺环素、罗红霉素、异维 A 酸和过氧化苯甲酰 (BPO)；

15 或者，所述抗生素是治疗幽门螺旋杆菌 (*Helicobacter Pylori*)感染的抗生素，包括但不限于：克拉霉素、阿莫西林、甲硝唑、替硝唑、呋喃唑酮、四环素等药物；

或者，所述抗生素是抗真菌感染的抗生素，包括但不限于：克霉唑、制霉菌素、氟康唑、酮康唑、伊曲康唑、咪康唑、特比萘芬、萘替芬、阿莫罗芬、两性霉素 B、灰黄霉素、环吡酮胺、卡泊芬净等；

20 或者，所述抗生素还可以是喹诺酮类、 β -内酰胺类、大环内酯类、氨基糖甙类、酰胺醇类、硝基咪唑类等。

在具体的实施方式中，所述药物组合物是水性药物组合物。

在第四方面，本发明提供本发明第一方面所述的纳米颗粒或本发明第三方面所述的药物组合物在制备抗微生物试剂中的用途。

25 在具体的实施方式中，所述微生物包括：细菌、真菌。

在具体的实施方式中，所述细菌包括：革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌。

在具体的实施方式中，所述革兰氏阳性菌包括：葡萄球菌 (*Staphylococcus*)；优选金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)；更优选甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌 (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*)；丙酸杆菌 (*Propionibacterium*)；优选费氏丙酸杆菌 (*Propionibacterium freudenreichii*)、痤疮丙酸杆菌 (*Propionibacterium acnes*)、卵白丙酸杆菌 (*Propionibacterium avidum*)、颗粒丙酸杆菌 (*Propionibacterium granulosum*)；更优选痤疮丙酸杆菌 (*Propionibacterium acnes*)；和

35 所述革兰氏阴性菌包括：幽门螺旋杆菌 (*Helicobacter Pylori*)、绿脓杆菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)；优选幽门螺旋杆菌。

在具体的实施方式中，所述真菌包括但不限于：球孢子菌、类球孢子菌、皮

炎芽生菌、着色真菌、足分支菌、孢子丝菌、毛癣菌、念珠菌属、隐球菌、曲菌、毛霉菌、放线菌、奴卡菌等等；优选毛癣菌和曲菌；更优选红色毛癣菌 (*Trichophyton rubrum*)、烟曲霉 (*Aspergillus fumigatus*)、白色念珠菌 (*Candida albicans*)、黄癣菌 (*Mycelium yellow ringworm*)；最优选红色毛癣菌、烟曲霉。

5

在第五方面，本发明提供一种治疗方法，所述治疗方法包括将本发明第一方面所述的纳米颗粒给予对象以治疗微生物感染。

本发明还提供一种治疗方法，所述治疗方法包括将本发明第一方面所述的纳米颗粒与其它抗生素联合给予对象以治疗微生物感染。

10 在优选的实施方式中，所述抗生素是治疗葡萄球菌，优选金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)；更优选甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌 (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*) 感染的抗生素，包括但不限于：万古霉素、头孢菌素、利奈唑胺、替考拉宁、阿贝卡星、奎宁始霉素、达福普汀、喹努普丁、克林霉素、达托霉素、利福平、替拉万星、四环素类如替加环素等药物；

15 所述抗生素是治疗丙酸杆菌，例如痤疮丙酸杆菌、卵白丙酸杆菌、颗粒丙酸杆菌，优选痤疮丙酸杆菌感染的抗生素，包括但不限于：阿达帕林、他扎罗汀、红霉素、克林达霉素、阿奇霉素、米诺环素、罗红霉素、异维 A 酸和过氧化苯甲酰 (BPO)；

所述抗生素是治疗幽门螺旋杆菌感染的抗生素，包括但不限于：克拉霉素、阿莫西林、甲硝唑、替硝唑、呋喃唑酮、四环素等药物；

20 所述抗生素是治疗绿脓杆菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 感染的抗生素，包括但不限于：哌拉西林、阿洛西林、头孢曲松、头孢哌酮舒巴坦、阿米卡星、庆大霉素、多粘霉素 B 等；

25 所述抗生素是治疗真菌感染的抗生素，包括但不限于：克霉唑、制霉菌素、氟康唑、酮康唑、伊曲康唑、咪康唑、特比萘芬、萘替芬、阿莫罗芬、两性霉素 B、灰黄霉素、环吡酮胺、卡泊芬净等。

在优选的实施方式中，所述纳米颗粒与其它抗生素利用相同或不同的给药途径，在相同或不同的给药时间给予。

30 应理解，在本发明范围内中，本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合，从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅，在此不再一一累述。

附图说明

35 图 1 是一组本发明纳米颗粒的照片；其中：图 A 显示亚麻酸 (linolenic acid) 浓度从 (a) 0.1% w/v 到 (h) 中的 4% w/v (其中 %w/v 等于 wt%)；图 B 显示月桂酸 (lauric acid) 浓度从 (a) 0.1% w/v 至 (f) 5% w/v；图 C 显示肉豆蔻油酸 (myristoleic

acid)浓度从(a) 0.1% w/v 到(h)中的 4% w/v; 图 D 显示月桂酸单甘油酯浓度从 0.1% w/w 到 0.8% w/w。根据这些样品的聚集度和澄清度等物理性质, 可以确定理想的纳米颗粒剂型。

5 图 2 显示了通过动态光散射法检测含不同浓度的肉豆蔻油酸的本发明纳米颗粒的(A)流体动力学尺寸 (直径, nm)和(B)多分散性 (PDI)。

图 3 显示了含 1%w/v 亚麻酸的本发明纳米颗粒的长期稳定性, 通过在 3 个月的时间跨度中检测它们的流体动力学直径。在这个时间跨度中, 这些纳米颗粒被分别保存在 4°C、25°C 和 37°C, 直径却增长不到 2 nm。

10 图 4 显示了不同温度下含有 1% w/v 月桂酸的本发明纳米颗粒的流体动力学直径(nm), 在较大范围的温度下(-40°C 至+100°C), 纳米颗粒的尺寸保持稳定状态。

图 5 显示了 20°C 条件下含有 1% w/v 月桂酸的本发明纳米颗粒的存储稳定性, 在 5 个月的检测期内, 纳米颗粒的尺寸保持稳定状态。

图 6 显示了含 0.3%w/v 肉豆蔻油酸的本发明纳米颗粒的悬浮液分别在-20°C、4°C、25°C 和 37°C 保存 3 个月, 直径增加不到 2 nm。

15 图 7 显示了本发明的纳米颗粒(包含 0.4%w/v 月桂酸单甘油酯)的稳定性, 在 6 周的检测期内, 纳米颗粒的尺寸保持稳定状态。

图 8 显示了含 1%w/v 亚麻酸的本发明纳米颗粒对 MRSA252 的体外最小抑菌浓度 (MIC)。不同浓度的纳米颗粒在与 MRSA252 (1×10^6 CFU/mL) (CFU: 菌落形成单位)一起培育, 分别在 5 小时和 24 小时测量细菌在 OD₆₀₀ 下的吸收度。结果
20 表明本发明纳米颗粒在浓度高于 0.1%w/v 或更高的情况下能够抑制细菌的生长。5 小时和 24 小时细菌和本发明纳米颗粒混合悬浮液的图片显示 0.1%w/v 纳米颗粒的溶液清澈透明, 表明 0.1% w/v 是本发明纳米颗粒的 MIC。

图 9 显示了含有 1% w/v 月桂酸的本发明纳米颗粒对痤疮丙酸杆菌的体外最小抑菌浓度 (MIC), 其中图(b)是图(a)的放大图。

25 图 10 显示了含 0.3%w/v 肉豆蔻油酸的本发明纳米颗粒对幽门螺旋杆菌 (悉尼菌株 1, HPSS1)的体外最小抑菌浓度 (MIC)。不同浓度的本发明纳米颗粒在与 HPSS1 (5×10^6 CFU/mL) (CFU: 菌落形成单位)一起培育 18 小时, 测量细菌在 OD₆₀₀ 下的吸收度。结果表明本发明纳米颗粒在浓度大于或等于 0.0015%w/v 时能够有效抑制细菌的生长。表明 0.0015% w/v 是本发明纳米颗粒的 MIC。

30 图 11 显示了含 1%w/v 亚麻酸的本发明纳米颗粒对 MRSA252 的体外最小杀菌浓度 (MBC)。不同浓度的本发明纳米颗粒与 MRSA252 (1×10^6 CFU/mL)共同培育了 24 小时, 然后 5 μ L 的悬浮液在 37°C 下隔夜培育并在 TSB 琼脂板上被观察。MRSA252 的 CFU 值得以量化。(A) 图像显示不同浓度的本发明纳米颗粒和 MRSA252 在琼脂板上共育 24 小时后观察到的 MRSA252 的 CFU; (B)结果表明
35 0.2%w/v 的本发明纳米颗粒杀死了 99.9%的 MRSA252。此外细菌在本发明纳米颗粒的浓度到达 0.4%w/v 或者更高时被全部杀死。

图 12 显示的是本发明纳米颗粒 (1% w/v 月桂酸)对不同浓度的痤疮丙酸杆菌的抗菌活性曲线图: (a) 1×10^6 CFU/mL, (b) 1×10^7 CFU/mL, (c) 1×10^8 CFU/mL 和(d) 1×10^9 CFU/mL。本发明纳米颗粒与每个浓度的菌样品共孵育 5 小时。之后, 样品用 PBS 稀释, 稀释倍数为 1: 10 至 1: 10^6 , 每个样品取 10 μ L 接种到 RCM 琼脂平板上。然后在 37°C 厌氧条件下培养 3 天, 计数痤疮丙酸杆菌的菌落形成单位 (CFU) (UD: 检测不到)。

图 13 显示本发明纳米颗粒 (1% w/v 月桂酸)对 1×10^7 CFU/mL 痤疮丙酸杆菌的抗菌活性与时间的关系图。孵育 5 小时之后, 痤疮丙酸杆菌完全被杀死 (UD: 检测不到)。

10 图 14 显示经过 5 小时孵育后, 本发明纳米颗粒 (1% w/v 月桂酸)对 1×10^7 CFU/mL 痤疮丙酸杆菌的抗菌活性与温度的关系图。结果显示, 在室温 (20°C)或更高温度下, 痤疮丙酸杆菌完全被杀死 (UD: 检测不到)。

图 15 显示了含有 1% w/v 月桂酸的本发明纳米颗粒对痤疮丙酸杆菌的体外最小杀菌浓度 (MBC), 其中图(b)是图(a)的放大图。

15 图 16 显示了含 0.3%w/v 肉豆蔻油酸的本发明纳米颗粒对 HPSS1 的体外最小杀菌浓度 (MBC)。不同浓度的 TNAN-3 与 HPSS1 (5×10^6 CFU/mL)共同培育了 18 小时, 然后 5 μ L 的悬浮液在 37°C 下隔夜培育。HPSS1 的 CFU 值得以量化。(A) 图像显示不同浓度的本发明纳米颗粒和 HPSS1 在琼脂板上共育 18 小时后观察到的 HPSS1 的 CFU。(B)结果表明 0.0015%w/v 的本发明纳米颗粒杀死了 99.9%的
20 HPSS1。此外细菌在本发明纳米颗粒浓度达到 0.003% w/v 或者更高时被全部杀死。

图 17 显示了 MRSA252 在含 1%w/v 亚麻酸的本发明纳米颗粒处理前的形态(A)和处理后的形态(B)。在(B)中, 细菌与本发明纳米颗粒培育了 24 小时后成像。在所有的实验中, 细菌的初始浓度都是 1×10^6 CFU/mL。图片中的比例尺为 1 μ m。

25 图 18 显示扫描电镜 (SEM)图片: (a)未处理的痤疮丙酸杆菌, (b) 含有 1% w/v 月桂酸的本发明纳米颗粒处理的痤疮丙酸杆菌。电镜观察到本发明纳米颗粒处理后痤疮丙酸杆菌的菌膜受到了破坏。

图 19 显示了 HPSS1 在含 0.3%w/v 肉豆蔻油酸的本发明纳米颗粒处理前(A)和(B)处理后的形态。在(B)中, 细菌与 0.003 %w/v 的本发明纳米颗粒培育 18 小时后成像。在所有的实验中, 细菌的初始浓度都是 2.5×10^6 CFU/mL。图片中的比例
30 尺为 1 μ m。

图 20 显示了含 1%w/v 亚麻酸的本发明纳米颗粒的长期抗菌活性。本发明纳米颗粒在室温下保存两个月后和新鲜制备的本发明纳米颗粒显示出了相似的 MIC 与 MBC 值。储存 3 个月后的样本 MIC 略微提高到 0.2%w/v, 而 MBC 值则与之前一致。

35 图 21 显示在不同温度下存储 5 个月的本发明纳米颗粒 (1% w/v 月桂酸)对 1×10^7 CFU/mL 痤疮丙酸杆菌的抗菌活性。在 37°C 存储条件下, 痤疮丙酸杆菌完全

被杀死 (UD: 检测不到)。

图 22 显示了含 0.3%w/v 肉豆蔻油酸的本发明纳米颗粒的长期抗菌活性。所述纳米颗粒以悬浮液形式在室温下保存 3 个月后显示与新鲜制备的纳米颗粒相似的 MIC 和 MBC 值。

5 图 23 显示了含 0.3%w/v 肉豆蔻油酸的本发明纳米颗粒的长期抗菌活性。所述纳米颗粒以冻干的形式在 -20℃ 保存 3 个月后显示与新鲜制备的纳米颗粒相似的 MIC 与 MBC 值。

图 24 显示了含 1%w/v 亚麻酸的本发明纳米颗粒对 MRSA252 的体内抗菌活性。小鼠被感染了 1×10^7 CFU 的 MRSA252。然后含有本发明纳米颗粒的凝胶每天
10 使用一次，连续 5 天。载菌量在 MRSA252 接种 5 天后，小鼠身上的感染皮肤被取下来，均化并在琼脂板上培育，以记录细菌 CFU。数据表明了六个单独实验的平均值±标准差。*代表了 p 值的显著性 (**p<0.01)

图 25 显示了含 1%w/v 亚麻酸的本发明纳米颗粒对 MRSA252 皮下感染的小鼠的体内抗菌活性。试验中小鼠被皮下注入了 1×10^6 CFU 的 MRSA252，随后在相同位置 20 分钟后又注射了本发明纳米颗粒。图片显示了注射处在 MRSA 注射 24、
15 48 和 72 小时后，损伤部位的情况。

图 26 显示了含 1%w/v 亚麻酸的本发明纳米颗粒外用凝胶剂型的 7 天体内毒性研究。用 Draize 打分系统表明本发明纳米颗粒剂型的使用没有产生明显的水肿或红斑。图像是每组 5 只小鼠的代表。

20 图 27 显示了 H&E (左列)和 TUNEL (右列)的评价结果以评估含 1%w/v 亚麻酸的本发明纳米颗粒的体内毒性。空白的 PBS 凝胶被用作阴性对照组。本发明纳米颗粒剂型没有产生炎症和没有明显的细胞死亡。图像是每组 5 只小鼠的代表。

图 28 显示了巨噬细胞对皮肤浸润的评价结果。评估含 1%w/v 亚麻酸的本发明纳米颗粒的使用安全性。皮肤的冰冻切片制备出来后，用 DAPI 给细胞核染色，
25 用 FITC-抗小鼠 f4/80 抗体给皮肤巨噬细胞染色。染色过后，皮肤样本立即使用 Nikon Delta Macroview 荧光显微镜成像。图像是每组 5 只小鼠的代表。图片中的比例尺为 400 μm。

图 29 显示用小鼠耳朵模型测试本发明纳米颗粒 (1% w/v 月桂酸)在活体内对痤疮丙酸杆菌的抗菌活性。ICR 小鼠的耳朵 (左耳和右耳)经皮内注射了痤疮丙酸杆菌 (1×10^7 CFU, 混于 20 μL 的 PBS 中)。痤疮丙酸杆菌注射部位再分别注射本
30 发明纳米颗粒 (1 wt%月桂酸)或 PBS。注射 24 小时后，取出被细菌感染的皮肤组织进行细菌计数。(a) 注射后 24 小时，注射部位的组织损伤。(b) 注射后 24 小时，注射部位的微生物负载 (UD: 检测不到)。

图 30 显示本发明纳米颗粒 (1% w/v 月桂酸)对小鼠背部皮肤的毒性测试结果。凝胶形式的本发明纳米颗粒贴在剃毛的小鼠背部皮肤上。24 小时后取下凝胶，
35 对皮肤进行分析。本发明纳米颗粒处理过的皮肤保持了正常结构，未观察到红斑

或水肿。苏木精&伊红染色 (H & E)结果显示本发明纳米颗粒处理过的皮肤结构完好，真皮层上带有一层健康的表皮细胞。使用本发明纳米颗粒处理的观察结果与使用 PBS 处理的结果相同，表明本发明纳米颗粒不会对皮肤造成可检测到的毒性。

5 图 31 显示 98 名痤疮志愿者使用本发明纳米颗粒凝胶后的反馈结果。在第 3 天、第 7 天和第 21 天分别采集反馈结果。

图 32 显示了含 1%w/v 亚麻酸的本发明纳米颗粒的尺寸分布曲线。

图 33 显示了本发明纳米颗粒(1% w/v 月桂酸)的尺寸分布曲线。

图 34 显示了本发明的纳米颗粒(0.4%w/v 月桂酸单甘油酯)的尺寸分布曲线。

图 35 显示了本发明纳米颗粒的结构示意图。

10 图 36 对比了含 1%w/v 亚麻酸的本发明纳米颗粒与游离脂肪酸在水性环境中的最小杀菌浓度。

图 37 对比了本发明纳米颗粒(1% w/v 月桂酸)与游离脂肪酸在水性环境中的最小杀菌浓度。

15 图 38 显示在 PBS 缓冲液中，游离的肉豆蔻油酸不能表现出抗幽门螺旋杆菌的活性，但是以本发明纳米颗粒形式存在的肉豆蔻油酸 (0.3%w/v) 表现出抗幽门螺旋杆菌的活性。

具体实施方式

20 发明人经过广泛而深入的研究，出乎意料地发现将脂肪酸或其衍生物(例如，脂肪酸甘油酯)、表面活性剂以及任选的脂质制成的非囊泡型纳米颗粒 (胶束纳米颗粒结构)不仅具备显著的抗菌活性，还能具备优异的稳定性，并且本发明的非囊泡型纳米颗粒不诱导耐药株的产生，从而能够作为优秀的抗菌药物。在此基础上完成了本发明。

25 脂肪酸

本文所用的术语“脂肪酸”具有本领域技术人员常规理解的含义；即，所述脂肪酸是由一个疏水的碳氢链和亲水的羧酸头基组成的两亲性分子。

30 本领域技术人员已知某些脂肪酸具备一定的抗微生物的能力，但脂肪酸本身的特殊性质，例如不溶于水的特性，使得脂肪酸无法直接作为药物应用，或者需要利用有机溶剂进行给药。例如，月桂酸是存在于人的皮脂中的一种游离脂肪酸，其抗菌活性强于过氧化苯甲酰。但其水溶性较差，因此必须用二甲亚砜 (DMSO)等溶剂来溶解月桂酸以形成外用剂型，而 DMSO 具有刺激性和毒性副作用。因此，在现有技术中，将脂肪酸用作药物存在诸多限制。

35 相比于现有技术，本发明能够在不利用有机溶剂的条件下递送脂肪酸从而产生抗微生物感染的作用，打破了脂肪酸在作为药物应用中的限制，可以利用大量在现有技术中难以用作药物的脂肪酸。适用于本发明的脂肪酸是 C8-C28，优选 C12-C24，更

优选 C12-C18 的饱和或不饱和脂肪酸。在优选的实施方式中，所述不饱和脂肪酸含有 1-6 个，优选 1-4 个，例如，1、2、3 或 4 个不饱和键，优选双键。在具体的实施方式中，适用于本发明的脂肪酸包括但不限于：棕榈酸、硬脂酸、油酸、亚麻酸、亚油酸、月桂酸、肉豆蔻油酸、花生四烯酸、EPA、DHA、辛葵酸和壬酸。在进一步优选的实施方式中，适用于本发明的脂肪酸包括但不限于：亚麻酸、月桂酸、肉豆蔻油酸。

鉴于本发明的教导，本领域技术人员应理解，本文所述的“脂肪酸”包括其衍生物，即，本文所述的“脂肪酸”包含脂肪酸的酸、盐和酯三种形式。在具体的实施方式中，本发明的非囊泡型纳米颗粒中的脂肪酸衍生物是 C10-C14，优选 C11-C13 的脂肪酸的单甘油酯、双甘油酯或三甘油酯。在具体的实施方式中，所述脂肪酸是饱和脂肪酸，优选月桂酸。在优选的实施方式中，所述脂肪酸衍生物是月桂酸单甘油酯。本文所用的术语“月桂酸单甘油酯”包括月桂酸单甘油酯中甘油羟基采取 R、S 不同构型的异构体，1-羟基取代的月桂酸单甘油酯、2-羟基取代的月桂酸单甘油酯、以及它们任意混合物等多种形式。

非囊泡型纳米颗粒

本文所用的术语，“纳米颗粒”、“本发明纳米颗粒”、“非囊泡型纳米颗粒”以及“本发明的非囊泡型纳米颗粒”具备相同的含义，均是指不具有囊泡型式的纳米颗粒。具体地说，本发明的非囊泡型纳米颗粒是相对于其它的具有空腔结构的纳米颗粒而言的，即，本发明的非囊泡型纳米颗粒是其中不具备空腔的纳米颗粒。此外，基于下文所述的本发明纳米颗粒的制备方法，本领域技术人员可以理解，本发明的纳米颗粒是一种纳米颗粒体系，即，处于水性体系中的纳米颗粒，或包含纳米颗粒的水性体系整体；换言之，本发明所述的纳米颗粒是一种纳米颗粒的水性体系，即，一种不含有机溶剂的纳米颗粒体系。

本发明的纳米颗粒可以用于输送，例如脂肪酸及其衍生物（如月桂酸单甘油酯）类的天然抗菌物质到微生物，例如细菌或真菌的感染处，而避免使用诸如 DMSO 等溶剂。本发明提供的非囊泡型纳米颗粒由脂肪酸或其衍生物、表面活性剂以及任选的脂质构成。这些组成成分的分子都具有亲水的部分和一个伸长的碳氢链构成的疏水部分。例如，脂肪酸是由一个疏水的碳氢链和亲水的羧酸头基组成的两亲性分子，再例如，脂肪酸甘油酯，如月桂酸单甘油酯这样的脂肪酸酯是由一个疏水的碳氢链和亲水的甘油头基组成的两亲性分子。这种结构使得脂肪酸或脂肪酸酯能够纳入纳米胶束这样具有两亲性环境的纳米颗粒中。在水的存在下，它们的亲水部分和表面活性剂排列形成一个面对着水的表面，与此同时疏水部分排列形成一个远离水的核心，从而形成了胶束的纳米结构（如图 35 所示）。

本发明的非囊泡型纳米颗粒包含的脂质可以是磷脂和/或胆固醇。在具体的实施

方式中，所述脂质为磷脂，包括但不限于以下的一种或多种：磷脂酰乙醇胺、磷脂酰肌醇、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰胆碱、二肉豆蔻酰基卵磷脂、二棕榈酰磷脂酰胆碱、棕榈酰磷脂酰甘油和二油磷脂酰乙醇胺。

适用于本发明的表面活性剂包括但不限于以下的一种或多种：硬脂酸钠、4-(5-十二烷基)苯磺酸盐、聚氧乙烯乙二醇、聚山梨醇酯 20、聚山梨醇酯 40、山梨醇酯 60、聚山梨醇酯 80、泊洛沙姆、聚乙二醇辛基苯基醚和 Triton X-100。

在具体的实施方式中，本发明的纳米颗粒的赋形剂材料可以包含磷脂酰胆碱、胆固醇、卵磷脂、聚山梨醇酯 20、聚山梨醇酯 80 和十二烷基硫酸钠。

在本发明的非囊泡型纳米颗粒中，脂质和表面活性剂的配比可以为 10~0 : 1；优选 5~0 : 1；更优选 2.5~0 : 1。

本发明的非囊泡型纳米颗粒成分包含适量的脂肪酸或其衍生物。在具体的实施方式中，所述脂肪酸或其衍生物的浓度为 0.001~5%w/v；优选 0.1~5%w/v；更优选 0.2~4%w/v；更优选 0.3~3%w/v。在优选的实施方式中，本发明的纳米颗粒中可以包含 1.0% w/v 的亚麻酸或月桂酸，或 0.3% w/v 的肉豆蔻油酸，或 0.4%w/v 的月桂酸单甘油酯。本领域技术人员应理解，本文所述的脂肪酸或其衍生物的浓度是指该脂肪酸或其衍生物在包含本发明纳米颗粒的体系，特别是水性体系，例如水性悬浮液的浓度。

本发明的非囊泡型纳米颗粒具备一系列的理化特征，例如纳米颗粒的直径和亚麻酸或月桂酸甘油酯的浓度(即，亚麻酸或月桂酸甘油酯在整个纳米颗粒悬浮液中的质量百分比)。纳米颗粒的直径可以采用动态光散射法来测量。本发明的非囊泡型纳米颗粒的平均直径约为 1 至 90 nm；优选 2-80 nm；更优选 5-50 nm；更优选 5-20 nm；最优选 5-15 nm。

在其它实施方式中，所述纳米颗粒的粒径可以为 1-30 nm；10-40 nm；20-50 nm；30-60 nm；40-70 nm；50-80 nm；60-90 nm；或者，所述纳米颗粒的粒径可以为 5-25 nm；15-35 nm；25-45 nm；35-55 nm；45-65 nm；55-75 nm；65-85 nm 或者，所述纳米颗粒的粒径可以为 10-30 nm；20-40 nm；30-50 nm；40-60 nm；50-70 nm；60-80 nm；70-90 nm。

本发明的非囊泡型纳米颗粒的粒径分布均一，其多分散性系数为<0.3；优选<0.2。在优选的实施方式中，所述纳米颗粒的粒径处于较窄的范围内，例如约 5-10 nm、约 15-25 nm、约 20-30 nm、约 40-50 nm、约 65-75 nm、约 80-90 nm 或约 100-110 nm。

本发明的非囊泡型纳米颗粒具备优异的稳定性。在具体的实施方式中，在各种温度下储存 3 个月后，与新鲜制备的纳米颗粒相比，本发明纳米颗粒的“最小抑菌浓度”与“最小杀菌浓度”值的改变小于 20%；优选小于 10%。在另一实施方式中，在室温下储存 1.5 个月后，优选 3 个月后，与新鲜制备的纳米颗粒相比，本

发明纳米颗粒的粒径改变小于 20%；优选小于 15%；更优选小于 10%。本文所用的术语“室温”具有本领域技术人员常规理解的意义，一般是指 25℃±5℃，或者 25℃±3℃，或者 25℃±1℃。

5 本发明的非囊泡型纳米颗粒具备优异的抗微生物感染的活性。在具体的实施方式中，本发明的纳米颗粒能够抑制或杀灭细菌或真菌。

在具体的实施方式中，所述细菌包括但不限于：革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌；

所述革兰氏阳性菌包括但不限于：葡萄球菌 (*Staphylococcus*)；优选金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)；更优选甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌

10 (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*)；丙酸杆菌 (*Propionibacterium*)；优选费氏丙酸杆菌(*Propionibacterium freudenreichii*)、痤疮丙酸杆菌 (*Propionibacterium acnes*)、卵白丙酸杆菌 (*Propionibacterium avidum*)、颗粒丙酸杆菌 (*Propionibacterium granulosum*)；更优选痤疮丙酸杆菌 (*Propionibacterium acnes*)；

15 所述革兰氏阴性菌包括但不限于：幽门螺旋杆菌 (*Helicobacter Pylori*)、绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)。

在另一具体的实施方式中，所述真菌包括但不限于：球孢子菌、类球孢子菌、皮炎芽生菌、着色真菌、足分支菌、孢子丝菌、毛癣菌、念珠菌属、隐球菌、曲菌、毛霉菌、放线菌、奴卡菌等等；优选毛癣菌和曲菌；更优选白色念珠菌(*Canidia albicans*)、红色毛癣菌 (*Trichophyton rubrum*)、烟曲霉 (*Aspergillus fumigatus*)、黄癣菌

20 (*Mycelium yellow ringworm*)；最优选红色毛癣菌 (*Trichophyton rubrum*)、烟曲霉 (*Aspergillus fumigatus*)。

在具体的实施方式中，本发明的纳米颗粒针对 1×10^6 CFU 的 MRSA 最小抑菌浓度(MIC)为 0.1%w/v，最小杀菌浓度(MBC)为 0.2%w/v；在另一具体的实施方式中，

25 本发明的纳米颗粒针对痤疮丙酸杆菌的最小抑菌浓度(MIC)为 0.0125%w/v，最小杀菌浓度(MBC)为 0.02%w/v；在还有另一具体的实施方式中，本发明的纳米颗粒针对 5×10^6 CFU 的幽门螺旋杆菌的最小抑菌浓度(MIC)为 0.0015%w/v，最小杀菌浓度(MBC)也为 0.0015%w/v。在还有另一具体的实施方式中，本发明的非囊泡型纳米颗粒针对红色毛癣菌的 MIC 为 0.006%w/v，针对烟曲霉的 MIC 为 0.1%w/v。

30 本发明的纳米颗粒抑制微生物的能力可以如下测定。例如，将待测微生物与本发明的纳米颗粒在体外培养基中共孵育，或者在动物模型中共孵育。然后测量微生物的菌落数 (表征为 CFU)。本文使用的术语“抑制生长”指本发明的纳米颗粒与某种微生物共育时抑制 CFU 增长的能力。因此，当某种微生物与本发明的纳

35 米颗粒接触时，其 CFU 不会变化或者会下降。

本文使用的术语“最小抑菌浓度”(MIC)是指能够抑制微生物，例如某种细

菌，例如金黄色葡萄球菌，或某种真菌，例如红色毛癣菌和烟曲霉菌生长的药物，例如本发明纳米颗粒的最小浓度。MIC 值可以通过测量该微生物在接触各种浓度的本发明纳米颗粒后的光密度来确定，尤其是比较 OD₆₀₀ 值或 OD₄₅₀ 值是否发生变化。经过一段时间后，如果 OD₆₀₀ 或 OD₄₅₀ 值并未升高，则表明培养液中的细菌或真菌数量没有升高。

本文使用的术语“最小杀菌浓度”(MBC)是指能够杀死微生物细胞的药物，例如本发明纳米颗粒的最低浓度。MBC 可以通过，例如计数某种特定条件下(例如 37°C)与不同浓度的本发明颗粒共育的培养基上的菌落生长情况来测定。

本文所用的术语“约”是指所引用的实际数字或数值，以及在所引用数字或数值的上下 10% 范围内。

本发明的非囊泡型纳米颗粒的制备方法

本发明的非囊泡型纳米颗粒可采用以下方法制备，包括以下步骤：

- 1). 将表面活性剂和任选的脂质悬浮在水中；
- 2). 搅拌 1) 得到的悬浮液直至形成均相悬浮液；
- 3). 加热 2) 得到的均相悬浮液到其所含表面活性剂和任选的脂质的熔点以上；
- 4). 将脂肪酸或其衍生物加入 3) 得到的热悬浮液中并搅拌；
- 5). 降温，静置 4) 得到的悬浮液，从而得到本发明的非囊泡型纳米颗粒悬浮液。

在具体的实施方式中，所述方法中的熔点温度为 20°C-80°C，例如 20°C、30°C、40°C、50°C、60°C、70°C 或 80°C。

在进一步的实施方式中，所述方法还可包括检测所得纳米颗粒的流体动力学尺寸。

本发明的非囊泡型纳米颗粒的制备需要考虑如下参数，例如原材料和将被包含进纳米颗粒里的材料的物理化学性质，用来分散纳米颗粒的介质的性质，被载物质的有效浓度和他的潜在毒性，应用/运送纳米颗粒所涉及的加工过程，最适尺寸，多聚分散性和保质期，批次重现性和大规模生产安全且高效产品的可能性。

本发明的纳米颗粒的制备并不是自发形成的，当有足够的能量提供给水中的脂肪酸，例如亚麻酸和赋形剂材料时才能形成(例如通过超声处理、均化、振动或加热)。

本发明的纳米颗粒可以通过多种本发明所提供的成分和方法制备。适用于本发明纳米颗粒的其它制备方法包括搅拌法和加热法，包括高速搅拌。这种技术的优点在于设备简单，生产容易。

在有些实施方式中，所述纳米颗粒可以通过高压匀浆法形成。高压匀浆法广泛用于多种行业，被认为是最可行的工业应用方法。这项技术包含了在高于或低于室温下制备固态脂质纳米颗粒，气蚀和涡流作用可使颗粒尺寸减小。使用热高压匀浆法可使脂质体和药物融化，并在同等温度下与表面活性剂水溶液组合。热

的预乳浊液再在控温的高压匀浆机中进行加工，一般要在 500bar 的条件下进行最多 3 个循环。所获得的纳米乳浊液在冷却至室温后重结晶，形成固态脂质体纳米颗粒。冷高压匀浆法可用于加工亲水性药物。

除了上述方法以外，其它任何用于制备固态脂质体纳米颗粒的方法都可以用来生产本发明的纳米颗粒。此类方法包括微乳液法、乳化-溶剂挥发法、乳化溶剂扩散法、溶剂注入法和倒相法。

本发明的制备方法得到的纳米颗粒在结构和生物学活性上具备优异的稳定性；本发明的制备方法对脂肪酸或其衍生物的利用率也非常充分。

10 药物组合物及其使用方法

本发明的纳米颗粒可以制成药物组合物以便用于人和其它哺乳动物。使用的时候可以与其它药物载体或稀释剂混合在一起，并根据哺乳动物病情的特征和严重性来确定给药的剂量和周期。通常情况下，本发明纳米颗粒中的脂肪酸或其衍生物，应能达到药学有效剂量；例如，能够有效减少哺乳动物，例如人感染的微生物，例如金黄色葡萄球菌或真菌数量的剂量。

制剂和给药方法都是本行业有经验的人所熟知的。通常情况下，根据所治病病情的严重性与药效反应来给药，疗程持续数日至数月，直到病情缓解为止。最佳给药剂量、给药方法和重复率也是本领域普通人士所能决定的。最佳给药剂量可以根据本发明纳米颗粒的相对疗效进行调整，一般可根据体外和体内动物模型的 MIC 和 MBC 值来估测使用效果。给药频率可以为每天一次或多次、一周两次，每周一次或更长时间一次。治疗成功后，应继续进行一些维护治疗，以防感染复发。

本文所用的术语“药学上可接受的载体”与“赋形剂”具备相同的含义，均是指用于向使用对象输送本发明纳米颗粒的药学认可的溶剂、悬浮剂或任何其它药学惰性的赋形剂。药学可接受载体可以为液体或固体，应根据所计划的给药方式来选择载体，从而当本发明的纳米颗粒和一种或多种有治疗作用的化合物或其他药学成分联用时，可以达到理想的剂量、一致性、及其它药物传输和化学的特性。

不会与本发明的纳米颗粒产生有害反应或破坏本发明纳米颗粒的纳米结构的药学可接受载体包括但不限于：水；生理盐水；结合剂（例如聚乙烯吡咯烷酮或羟丙基甲基纤维素）；填料（例如乳糖和其它糖类、明胶或硫酸钙）；润滑剂（例如淀粉、聚乙二醇或乙酸钠）；崩解剂（例如淀粉或羟基乙酸淀粉钠）；以及润湿剂（例如月桂基硫酸钠）。

本发明的纳米颗粒可以采用多种方法给药，但通常是局部给药。本发明的纳米颗粒可以与其它分子混合，或者与其它分子、分子结构或化合物的混合物一起使用，例如聚乙二醇、凡士林，或其它外用制剂，从而促进药物的摄取、分布和/

或吸收。局部给药的剂型可包括无菌和非无菌水溶液，以及常用溶剂的非水溶液（例如乙醇或液体或固体油基质溶液）。此类溶液也可以含有缓冲液、稀释剂和其它合适的添加剂。局部给药的药物剂型包括透皮贴、软膏、洗剂、霜剂、凝胶剂、滴剂、喷雾剂、液体和粉末；其中尤其优选洗剂、霜剂和凝胶剂。在使用的时

5 常可能需要常规药物载体（水基质、粉末基质或油基质的），也可能用到增稠剂等其它物质。在有些情况下，本发明的纳米颗粒可能悬浮在水基质、非水基质或混合基质中的悬浮液中。悬浮液中还可以含有增加悬浮液粘度的物质，例如羧甲基纤维素钠、山梨醇和/或葡聚糖。悬浮液还可以包含稳定剂。

在优选的实施方式中，本发明的药物组合物还可含有穿透促进剂以提高本发明

10 明纳米颗粒有效穿透哺乳动物皮肤的功能。穿透促进剂可同时提高亲脂性与非亲脂性药物穿过细胞膜的能力。穿透促进剂包括但不限于：表面活性剂（例如十二烷基硫酸钠、聚氧乙烯-9-月桂基醚和聚氧乙烯-20-十六烷基醚）；胆汁酸盐（例如胆酸、脱氢胆酸和脱氧胆酸）；螯合剂（例如乙二胺四乙酸二钠、柠檬酸和水杨酸盐）；以及非螯合性非表面活性剂（例如不饱和环脲）。

15 另外，在某些实施方式中，本发明的纳米颗粒可以通过离子电渗法进行递送，利用带有电荷的透皮贴来“驱使”该纳米颗粒达到真皮。

本发明的药物组合物中通常也可以含有一些其它辅助药物成分。这些包括相容的药物活性材料，如止痒剂、收敛剂、局部麻醉剂或消炎药、以及其它用来改

20 进剂型物理性能的材料（例如染色剂、防腐剂、抗氧化剂、遮光剂、增稠剂和稳定剂等）。另外还可以加入一些辅助试剂，如润滑剂、防腐剂、稳定剂、润湿剂、乳化剂、用于影响渗透压的盐、缓冲液、着色剂和芳香物质等。当然，这些辅助物质的加入不应该干扰本发明纳米颗粒的活性和使用效果。如有需要，制剂配好后应进行灭菌处理。

25 鉴于本发明的内容以及现有技术中的教导，本领域技术人员可将本发明的药物组合物制成各种剂型。在具体的实施方式中，本发明的药物组合物的剂型包括但不限于：适合全身性给药的剂型、或外用或局部给药的剂型。进一步地，所述剂型包括但不限于：片剂、溶液剂、混悬液、胶囊剂、颗粒剂、粉剂、注射剂、贴剂、喷剂、软膏剂、油膏剂、乳膏剂、凝胶剂、霜剂、滴剂、喷雾剂、洗剂。在具体的实施方式

30 中，本发明的药物组合物是外用或局部给药的剂型，包括但不限于：贴剂、喷剂、软膏剂、油膏剂、乳膏剂、凝胶剂、霜剂、滴剂、喷雾剂、洗剂。

本发明的药物组合物可以用作抗微生物感染的试剂。所述微生物包括细菌或真

35 菌。例如，所述细菌包括但不限于：革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌；所述革兰氏阳性菌包括但不限于：葡萄球菌；优选金黄色葡萄球菌；更优选甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌；或者，丙酸杆菌；优选费氏丙酸杆菌、痤疮丙酸杆菌、卵白丙酸杆菌、颗粒丙酸杆菌；更优选痤疮丙酸杆菌；所述革兰氏阴性菌包括但不限于：幽门螺旋杆菌、绿

脓杆菌。再例如，所述真菌包括但不限于：球孢子菌、类球孢子菌、皮炎芽生菌、着色真菌、足分支菌、孢子丝菌、毛癣菌、念珠菌属、隐球菌、曲菌、毛霉菌、放线菌、奴卡菌等等；优选毛癣菌和曲菌；更优选白色念珠菌、红色毛癣菌、烟曲霉、黄癣菌；最优选红色毛癣菌、烟曲霉。

5

本发明的药物组合物尤其可以通过减少哺乳动物 (例如人类) 体表或体内存活的微生物，例如葡萄球菌、丙酸杆菌、幽门螺杆菌或真菌数量来治疗这些微生物的感染。这些方法包括将本发明的药物组合物或本发明的纳米颗粒施加到受感染的哺乳动物的病灶部位，例如皮肤上，来减少所感染的葡萄球菌或丙酸杆菌或真菌细胞的数量。本发明的药物组合物或纳米颗粒还可以减轻微生物，例如金黄色葡萄球菌或痤疮丙酸杆菌或真菌感染的症状。

10

本发明的药物组合物还可包含其它常规抗生素，从而与其它抗生素联用，只要这些其它常规抗生素与本发明纳米颗粒不对彼此产生不良影响。与单用常规抗生素相比，上述联用起到降低常规抗生素的用量、降低毒副作用以及提高治疗效果等有益效果。所述其它抗生素可以是治疗与本发明纳米颗粒所治疗的相同微生物感染的抗生素，从而提高疗效；也可以是治疗与本发明纳米颗粒所治疗的不同微生物感染的抗生素，从而能够治疗不同的微生物感染或复杂的微生物感染。所述其它常规抗生素可以是喹诺酮类、 β -内酰胺类、大环内酯类、氨基糖甙类、酰胺醇类、硝基咪唑类等药物。例如，所述其它常规抗生素包括但不限于：万古霉素、头孢菌素、利奈唑胺、替考拉宁、阿贝卡星、奎宁始霉素、达福普汀、喹努普丁、克林霉素、达托霉素、利福平、替拉万星、四环素类如替加环素等药物；或者，所述其它常规抗生素包括但不限于：阿达帕林、他扎罗汀、红霉素、克林达霉素、阿奇霉素、米诺环素、罗红霉素、异维 A 酸和过氧化苯甲酰 (BPO)；或者，所述其它常规抗生素包括但不限于：克拉霉素、阿莫西林、甲硝唑、替硝唑、呋喃唑酮、四环素等药物；或者，所述其它常规抗生素是抗真菌感染药物，包括但不限于：克霉唑、制霉菌素、氟康唑、酮康唑、伊曲康唑、咪康唑、特比萘芬、萘替芬、阿莫罗芬、两性霉素 B、灰黄霉素、环吡酮胺、卡泊芬净等。

15

20

25

30

35

此外，本领域技术人员应该知晓，上文所述的其它抗生素可以采用与本发明的纳米颗粒相同的给药途径、在同一给药时间给予；也可以采用与本发明的纳米颗粒不同的给药途径、在同一给药时间给予；也可以采用与本发明的纳米颗粒相同的给药途径、在不同的给药时间给予。例如，上述其它抗生素可以与本发明的纳米颗粒离散地存在于同一药物组合物中 (例如，试剂盒中)，从而可以利用相同或不同的给药途径，在相同或不同的给药时间给予。

在优选的实施方式中，本发明的药物组合物是水性药物组合物，即，不含有机溶

剂的药物组合物。本领域技术人员可根据本发明的教导以及实际需求决定药物组合物中脂肪酸或其衍生物的浓度。

本发明的优点：

- 5 1. 本发明的非囊泡型纳米颗粒具备显著的抗菌活性；
2. 本发明的非囊泡型纳米颗粒选用天然来源的成分，安全性高，无毒副作用；
3. 本发明的非囊泡型纳米颗粒具备优异的稳定性；
4. 本发明的非囊泡型纳米颗粒避免使用诸如 DMSO 等有机溶剂来递送药物；
- 10 5. 本发明非囊泡型纳米颗粒的制备方法简单，无需使用氯仿等有毒有害的有机溶剂，从而降低了生产成本并且对环境友好；
6. 本发明非囊泡型纳米颗粒粒径小，更易进入组织内部发挥杀菌作用；
7. 本发明非囊泡型纳米颗粒多分散性小，均一性好，杀菌效果稳定。

15 除非特别说明，本发明中使用的所有技术术语和科学术语都为本发明所属技术领域的普通技术人员通常所理解的。虽然本发明可以使用与本专利所阐述的相似或等同的方法与材料来实施，但下文仍然阐述了适合的方法与材料。本专利中所提到的所有出版物、专利申请、专利和其它参考资料一经引用即全文纳入。如这些出版物、专利申请、专利和其它参考资料与本专利申请有冲突，以本说明书(包括定义在内)为准。此外，本专利申请中的材料、方法和实例仅用作说明，并
20 不是限制性的。

下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不用来限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，例如 Sambrook 等人，分子克隆：实验室手册 (Cold Spring
25 Harbor Laboratory Press, 2001)中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明，否则百分比和份数按重量计算。

实施例

材料和方法

30 材料：

蛋黄卵磷脂 (egg PC)、胆固醇、C6-NBD 植物鞘氨醇 (C6NBD)和 1,2-二肉豆蔻酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-丽丝胺若丹明 B 磺酰基 (DMPE-RhB)购自 Avanti Polar Lipids 有限公司 (Alabaster, AL)；亚麻酸、胰蛋白酶大豆肉汤(TSB)、磷酸盐缓冲盐(PBS)、三氟乙酸(TFA)、乙腈和葡聚糖凝胶 G-75 购自 Sigma Aldrich (St.
35 Louis, MO)；琼脂购自 BD (sparks, MD)。

月桂酸购自 Sigma Aldrich (St. Louis, MO)。KHCO₃ 购自 Fisher Scientific 司

(Pittsburgh, PA)。3,4-二氟苯甲酰甲基溴购自 Maybridge 公司 (Cambridge, 英国)。布氏培养基 (批号 211088), 吸气装置(批号 260683)和人琼脂 (批号 214010)购自 BD 公司(Sparks, MD)。每升布氏培养基含有 10.0 g 酪蛋白的胰蛋白酶消化物、10.0 g 动物组织的胃蛋白酶消化物、1.0 g 葡萄糖、2.0 g 酵母浸膏、5.0 g 氯化钠和 0.1 g 亚硫酸氢钠。去纤维蛋白绵羊血 (批号为 R54016 和 R54008)与氯高铁血红素和维生素 K 溶液 (批号 R450951)购自 Remel 公司(Lenexa, KS)。强化梭菌培养基 (批号 OXCM0149B)购自 Oxoid 公司(Hampshire,英国)。

肉豆蔻油酸、胰蛋白酶大豆肉汤 (TSB)、磷酸盐缓冲盐 (PBS)、三氟乙酸 (TFA)、乙腈和葡聚糖凝胶 G-75 购自 Sigma Aldrich (St. Louis, MO)。琼脂购自 BD (sparks, MD)。

月桂酸单甘油酯购自 TCI (Tokyo Chemical Industry)、红色毛癣菌株 216-3664 (获自华山医院真菌室)、烟曲霉 116-7490 (获自华山医院真菌室)、PDA 成品干粉 (购自德国默克公司)、RPMI1640 (购自美国 GIBCO 公司)。

15 细菌的培养:

MRSA252 菌株(获自 ATCC) 从冰冻存储中取出, 在 37°C 胰蛋白酶大豆琼脂板上培养过夜。接下来一个单独菌落在胰蛋白酶大豆培养基(TSB)接种, 并在 37 °C 下培育, 摇晃直到培养介质的 OD₆₀₀ 到达 0.7 左右 (对数生长阶段)。细菌然后通过离心 4000*g 3 分钟后得到, 之后使用无菌 PBS 清洗两次。当通过离心去除 PBS 后, 获得的细菌被悬浮在适量新鲜的 TSB 中供以后使用。

20 痤疮丙酸杆菌 (ATCC 6919)用布氏培养基培养, 培养基中添加 5% (v/v)去纤维蛋白绵羊血、维生素 K (5 µg/mL)和氯高铁血红素(50 µg/mL), 在吸气装置产生的 37°C 无氧环境中进行培养。挑取单克隆接种到强化梭菌培养基中, 并在 37°C 无氧条件下培养, 直到 OD₆₀₀ 达到约 1.0(对数生长期)为止。5000 g 离心 10 分钟, 收菌并用 PBS 洗涤, 然后用适当量的 PBS 重溶用于试验。

25 幽门螺旋杆菌悉尼菌株 1 (HPSS1, 来自 ATCC)从冰冻存储中取出, 于 37°C 常规保存在哥伦比亚琼脂 (含 5%裂解马血 (FBS))的微需氧环境下 (10% CO₂、85% N₂ 和 5% O₂)。在实验中, 将琼脂板上培育的新鲜菌落接种到添加了 5%胎牛血清的脑心浸液(BHI)中, 然后在 37°C 微需氧条件下适度的来回振荡并培养过夜, 从而制得幽门螺旋杆菌的肉汤培养物。HPSS1 的过夜肉汤培养物以 5000 * g 离心 10 分钟以获得细菌沉淀物。离心除去培养基后, 将获得的细菌悬浮在适量的含 5%FBS 的新鲜 BHI 中待用。

真菌的培养:

35 红色毛癣菌株 216-3664 和烟曲霉 116-7490 从冰冻存储中取出, 在 37° C 条件下接种于 PDA 脂板上培养 48h。

本发明纳米颗粒的制备及表征：将 200 mg 表面活性剂（聚山梨醇酯 20 或聚山梨醇酯 80）和脂质（蛋黄卵磷脂：胆固醇=9: 1 重量比）的混合物悬浮在 4 mL 的水中，其中表面活性剂：脂质体的比率分别为 10: 0、8: 2、5: 5、3: 7、1: 9 或 0: 10。悬浮液搅拌直至形成均相溶液，然后加热到表面活性剂和脂质的熔点以上（20°C、30°C、40°C、50°C、60°C、70°C 或 80°C，取决于使用的表面活性剂和脂质及其比率）。相应浓度的脂肪酸，例如亚麻酸（0.1%w/v 到 4%w/v）、月桂酸（0.1% w/v - 5% w/v）、肉豆蔻油酸（0.1wt%到 4wt%）或月桂酸单甘油酯（0.1%w/v 到 0.8%w/v）被加入至悬浮液中并搅拌 30 分钟。此后溶液室温下放置过夜。本发明纳米颗粒的流体动力学尺寸，用马尔文 Zetasizer ZS 仪器（英国马尔文仪器公司，英国）测量。本发明纳米颗粒的平均直径是通过动态光散射（DLS）测定。所有的性质测量在 25°C 重复 3 次。

本发明纳米颗粒的稳定性：本发明纳米颗粒的长期稳定性通过将纳米颗粒溶液在不同温度下储存一定时间来考察；在每个预先确定的时间点，测量样品的粒径以判断本发明纳米颗粒在不同温度下的稳定性。

本发明纳米颗粒的体外抗菌活性（MIC 与 MBC 值）：采用本领域的常规方法检测本发明纳米颗粒对不同细菌的体外 MIC 和 MBC。

本发明纳米颗粒处理的细菌的形态学：通过常规方法，利用扫描电子显微镜（SEM）测量经本发明纳米颗粒处理过或未处理过的细菌的形态。

本发明纳米颗粒对 MRSA252 的体内抗菌活性的测定：
在以下两个模型中评估本发明纳米颗粒对 MRSA252 感染的体内抗菌活性和治疗效果：小鼠表皮伤口感染模型和小鼠皮下感染模型。

为了建立表皮伤口模型，小鼠（来自 Charles River laboratories）被进行氯胺酮和甲苯噻嗪腹腔注射，麻醉过后，小鼠的黑色毛发被剃掉，皮肤被乙醇垫清洗。皮肤擦伤伤口在小鼠后背表皮被制造出来，通过在指定的 1*1cm² 区域用 28G 针头划成 6*6 的交叉线。这些划痕制造的方式确保他们只划伤角质层和表皮上层，但不划伤真皮。划伤 5 分钟后，50μL 含有 1×10⁷CFU 的 MRSA252 细菌 PBS 悬浮液通过微量移液管被接种在交互划伤的区域。接种 30 分钟后，本发明纳米颗粒的 PBS 凝胶用于损伤区域。所用凝胶是由羟乙基纤维素，甘油，聚乙二醇按适当比率调制而成的水凝胶。这些药物在连续 5 天内每天涂抹一次。空白的悬浮凝胶也被涂抹用作对照实验。在第 6 天，小鼠被实施安乐死；皮肤组织通过 8 mm 的皮肤穿孔机取下并将其包含的细菌数量进行计数。

为了建立皮下感染模型，小鼠的黑色毛发被剃掉，皮肤被乙醇垫清洗。之后，20 μL 的 1×10^6 CFU 的 MRSA252 细菌 PBS 悬浮液被皮下注射到剃毛区域，继而在相同区域注射入 200 μL 的本发明纳米颗粒。无菌 PBS 作为空白对照实验被注入。(感染处的)生理表象和形态被仔细观察。细菌接种 3 天后，记录伤口的组织学分析结果。

本发明纳米颗粒对痤疮丙酸杆菌的体内抗菌活性测定：用 ICR 小鼠 (来自 Charles River laboratories) 进行皮内注射来检测生理环境下本发明纳米颗粒对痤疮丙酸杆菌的抗菌活性。具体来说，皮内注射痤疮丙酸杆菌 (1×10^7 CFU, 溶于 20 μL PBS) 到 ICR 小鼠双耳上 (包括左耳和右耳)，随后痤疮丙酸杆菌的注射部位再分别注射本发明纳米颗粒 (1% w/v 月桂酸) 或 PBS (用作阴性对比试验)。注射 24 小时后，用 8 mm 活检穿孔采集小鼠耳朵样品，然后用 1 mL 无菌 PBS (Mini-Beadbeater™) 匀浆。匀浆液用 PBS 稀释，稀释比为 1:10 至 1:10⁶。每个稀释液取 10 μL 涂布在 RCM 琼脂平板上。琼脂平板在 37°C、无氧条件下培养 3 天，然后再计数痤疮丙酸杆菌的 CFU。每组使用 6 只小鼠 (n = 6)，实验重复三次以验证统计学显著性。

本发明纳米颗粒 (1% w/v 亚麻酸) 的体内毒性研究：用 ICR 小鼠的背部皮肤测试本发明纳米颗粒的皮肤毒性。具体地说，小鼠的背部在研究前 24 小时被剃毛。之后在 7 天之内每天用本发明纳米颗粒凝胶在剃毛区域涂抹一次。用 PBS 涂抹的小鼠用作对照组。为了避免凝胶干燥，(小鼠) 皮肤被纱布覆盖着。最后一次外用给药的 24 小时后，小鼠被实施安乐死，皮肤被 8 mm 的截面切片横切用作组织学检查。每只小鼠的皮肤组织在 10% 的缓冲福尔马林处理 18 小时，然后置入石蜡中。这些组织切片用 H&E 法染色。上皮细胞的凋亡用 TUNEL 法进行分析评估。切片继而被 Hamamatsu NanoZoomer 2.0 HT (数字切片扫描仪) 成像。图片用 NDP 图像软件处理。每组实验中有 5 只小鼠 (n=5)。为了评估毒性，组织样品根据 Draize 系统评分。评分系统如下：0-没有刺激的证明；1-极小，几乎难以察觉；2-表皮层中明确，可见的刺激；3-表皮层中严重的刺激；4-表皮层中严重刺激，伴随着真皮层刺激；5-表皮层和真皮层严重的刺激。为了分析巨噬细胞浸润，小鼠的皮肤组织通过 8 mm 截面切片被采集。这些冰冻的皮肤切片，对皮肤巨噬细胞使用 FITC-抗-小鼠 f4/80 抗体进行染色，而对细胞核使用 DAPI 进行染色。染色后，皮肤样品立刻通过 Nikon Delta Macroview 荧光显微镜成像。

皮肤毒性：在 ICR 小鼠的背部皮肤上检测本发明纳米颗粒的皮肤毒性。具体来说，研究开始之前 24 小时，小鼠背部进行脱毛，然后局部给服本发明纳米颗粒 (1% w/v 月桂酸) 纤维素凝胶 (由羟乙基纤维素、甘油、聚乙二醇按适当比率调制

而成的水凝胶)。空白 PBS 凝胶 (不含本发明纳米颗粒)用作阴性对比试验。24 小时后,检测皮肤的形态学并拍照。根据 Draize 打分系统对皮肤受刺激结果进行打分。用 8 mm 活检穿孔取皮肤的横截面切片,用苏木精和伊红(H&E)染色,然后用显微镜拍照来观察皮肤的组织学。每组使用 6 只小鼠(n = 6),实验重复三次以验证统计学显著性。

本发明非囊泡型纳米颗粒的体外抗真菌活性(MIC)测定:挑取 PDA 平板上培养红色毛癣菌株 216-3664 菌落置于无菌双蒸水中,配置成浊度 10^6 CFU 的菌液,然后用 RPMI 1640 液体稀释 1000 倍,使最终菌液浓度在 10^3 CFU。取有盖的 96 孔板,将倍比稀释的药液由高到低的浓度加入 96 孔板中,每 1-10 孔加入药液 100 μ l, 11 孔加入 RPMI 1640 液体培养基 100 μ l(不含药液)作为阳性对照, 12 孔加入 RPMI 1640 液体培养基 200 μ l(不含药液)作为阴性对照。1-11 孔中加入菌悬液 100 μ l。每种菌株作一行复孔,平行操作一次。将制备好的培养板放入 35°C 电热恒温培养箱中湿盒孵育 48h 后,通过观察菌未生长的最低药液浓度,得到药物的 MIC 值。

采用类似的过程测量本发明的非囊泡型纳米颗粒对烟曲霉 116-7490 的体外 MIC 值。具体地说,挑取 PDA 平板上培养的烟曲霉 116-7490 菌落置于无菌双蒸水中,配置成浊度 10^6 CFU 的菌液。MIC 测定方法同药物对红色毛癣菌株 216-3664 的测定方法。

实施例 1 本发明纳米颗粒的制备和表征

如“材料和方法”部分所述制备本发明的纳米颗粒。

本发明纳米颗粒的流体动力学粒径通过两个参数来描述:z-平均粒径和多分散性指数,两个参数都是通过动态光散射测量的累积量分析计算得来的。

通过改变亚麻酸浓度,本发明人制备了一系列的纳米颗粒并检测以判断最适剂型。如图 1A 所示,当亚麻酸浓度是 1%w/v,溶液呈现澄清而透明(d),其中的本发明纳米颗粒的平均粒径为 10 nm,以及 0.2 的多分散性指数。因此,在后续实验中选择纳米颗粒包含 1%w/v 亚麻酸,其中脂质与表面活性剂的质量比为 2:1(本文也称为 TNAN-2)。此外,本发明人还检测了当所含亚麻酸的浓度在 0.2%w/v 到 0.9%w/v 之间时本发明纳米颗粒在水中的表面电势在 -3mV~-6mV。

通过改变月桂酸的浓度,本发明人制备了一系列本发明纳米颗粒,通过反复试验来鉴定最佳配方。如图 1B 所示,当月桂酸浓度为 1%w/v 时,溶液看上去澄清且透明(c),该纳米颗粒的平均直径为 11.1 nm,平均多分散性指数为 0.09。因此,在后续实验中选择制剂是 1%w/v 月桂酸(脂质与表面活性剂的质量比为 2:1,本文也称为 TNAN-1)。此外,本发明人还检测了本发明纳米颗粒在水中的表面电势在 -5mV~-15mV。

本发明人还制备了 0.1-4 %w/v 的不同肉豆蔻油酸加载率的本发明纳米颗粒,

如图 1C 所示, 从而选出纳米颗粒的最佳收率, 同时保持可接受的纳米颗粒尺寸 (约 9 nm)。本发明人发现, 当肉豆蔻油酸的初始加载浓度增加时, 纳米颗粒尺寸也增加 (图 2)。为后续实验选择的最佳制剂是 0.3%w/v 肉豆蔻油酸 (脂质与表面活性剂的质量比为 2:1, 本文也称为 TNAN-3), 平均粒径约为 8.6 nm, 低于 10 nm 的阈值。纳米颗粒的质量通过动态光散射法检测, 以多聚分散性参数来表征。0.3 %w/v 肉豆蔻油酸的纳米颗粒的 PDI 约为 0.2, 表明相对较窄的粒径分布。

本发明人还通过表面 Z-电势确定肉豆蔻油酸掺入本发明纳米颗粒制剂。加载有 0.1~0.5%w/v 肉豆蔻油酸的制剂在去离子水中的表面 Z-电势范围在-3 到-13 mV。制剂中肉豆蔻油酸的载量较高导致更多的表面负电荷。表面 z-电势的这种降低与肉豆蔻油酸加载相关是肉豆蔻油酸掺入本发明纳米颗粒所致, 因为肉豆蔻油酸的羧酸基团在接近生理 pH 值 7.4 的条件下会脱质子变成 COO^- 。

本发明人还制备了 0.1-0.8 %w/v 的不同月桂酸单甘油酯浓度的一系列非囊泡型纳米颗粒, 检测这些纳米颗粒以判断最适剂型。当月桂酸单甘油酯浓度是 0.4wt%, 溶液呈现澄清而透明 (如图 1D 所示), 其中, 纳米颗粒的平均粒径为 7.5 nm, 以及多分散性指数平均为 0.17 (如图 34 所示)。

实施例 2-1. 本发明的纳米颗粒的体外抗菌活性-1

本发明的纳米颗粒(亚麻酸)对 MRSA252 的体外抗菌活性是通过检查当细菌和不同浓度的本发明的纳米颗粒共育时出现的抑菌和杀菌作用来评估的。在研究中, 首先测量最小抑制细菌生长的本发明的纳米颗粒浓度 (MIC)。具体地说, 1×10^6 CFU 的 MRSA252 与 0-0.6%w/v 浓度的本发明纳米颗粒共育。与不少于 0.1%w/v 浓度的本发明纳米颗粒培养的细菌保持明显的澄清液, 说明了这一浓度对细菌生长有显著抑制作用 (图 8A)。相比之下, 当本发明纳米颗粒的浓度低于 0.1%w/v 时, 细菌培养液就变得浑浊, 表现出大量的细菌生长。为了量化分析细菌的生长, 在培育的 5 小时或 24 小时后, 混合液需被测量 OD_{600} 来判断细菌数量 (1 OD_{600} 对应着 10^8 CFU/mL)。如图 8B 和 8C 所示, 当本发明纳米颗粒的浓度高于 0.1%w/v 时, 细菌的生长得以抑制。综上所述, 0.1%w/v 便是本发明纳米颗粒针对 MRSA252 的 MIC。

还检测了本发明纳米颗粒对 MRSA252 的最小杀菌浓度 (MBC)。具体地说, 确定的 MBC 值定义为能够杀死 99.9%目标细菌 MRSA252 的最低抗菌浓度。在一个体外实验中, 不同的浓度的本发明纳米颗粒与 MRSA252(1×10^6 CFU)共育 24 小时。这样的培育使得本发明纳米颗粒与 MRSA252 接触并进行杀菌。培育过后, 从细菌培养液中取 5 μL 放在琼脂板上, 继而在 37°C 下隔夜培育, 然后对 MRSA252 的 CFU 进行计数。图 11A 便是不同浓度的本发明纳米颗粒与细菌液共育 24 小时后取样 5 μL 于琼脂板培育的代表照片。很明显, 使用的药物浓度越高, 琼脂板剩下可见的菌落越少。之后每组细菌培养基取 5 μL , 进行 1:10 到 1:10⁵ 稀释, 之后

放在 TSB 琼脂板上观察并计量 CFU。如图 11B 所示, 0.2%w/v 的本发明纳米颗粒杀死了 99.9% 的 MRSA252。当亚麻酸的浓度升到 0.2%w/v 以上时, 细菌全部死亡。因此, 0.2%w/v 即为本发明纳米颗粒针对 MRSA252 的 MBC 值。

5 以上结果显示出发明纳米颗粒对 MRSA252 的 MBC:MIC 比值大致是 2: 1, 表明此纳米颗粒对该细菌是杀菌剂。同时, 此纳米颗粒在 24 小时内使得细菌数量降低 3 个对数级, 表明此纳米颗粒对 MRSA 的杀菌作用。此研究可以为将来体内评价的浓度和药物接触时间起指导作用。

10 为了对本发明纳米颗粒杀死 MRSA252 的机制有更深刻的理解, 本发明人进一步检查了 MRSA252 细菌在本发明纳米颗粒处理前后的形态学变化。在处理之前, SEM 成像表示 MRSA252 细胞有着典型 0.6-1 μm 直径的葡萄状, 聚集形态, 和完整的细胞壁/膜结构(图 17A)。经过本发明的纳米颗粒处理 24 小时后, SEM 成像显示出细菌形态的实质性变化, 包括显著的细胞结构破坏, 不规则的聚集形态, 和破损模糊的细胞边缘(图 17B)。此形态改变意味着本发明纳米颗粒对细菌细胞的强烈破坏性效应, 从而抑制细菌生长。

15

实施例 2-2. 本发明的纳米颗粒的体外抗菌活性-2

本发明纳米颗粒 (1%w/v 月桂酸)与不同浓度的痤疮丙酸杆菌 (1×10^6 CFU/mL, 1×10^7 CFU/mL, 1×10^8 CFU/mL 和 1×10^9 CFU/mL)在 37°C 下共孵育 5 小时, 以此来检测其在体外的抗菌活性。共孵育完成后, 样品用 PBS 稀释, 稀释比为 1: 10 至 1: 10^6 , 然后每个样品取 10 μL , 涂布在 RCM 琼脂平板上。样品在 20 37°C、无氧条件下培养 3 天, 然后计数痤疮丙酸杆菌的 CFU。如图 12 所示, 当细菌浓度低于 1×10^7 CFU/mL 时, 本发明纳米颗粒能够完全杀死痤疮丙酸杆菌。当细菌浓度升高至 1×10^9 CFU/mL 时, 本发明纳米颗粒可降低细菌负载达 5 个数量级, 剩余细菌浓度大约为 1×10^4 CFU/mL。这表明细菌在高浓度下, 所述纳米颗粒 (1% w/v 月桂酸)不足以清除所有细菌, 原因可能是溶液中纳米颗粒的量不足。

本发明纳米颗粒的时间依赖性抗菌活性试验结果显示只有当本发明纳米颗粒与细菌 (1×10^7 CFU/mL)共孵育 5 小时后, 才能完全杀死细菌。随着共孵育时间减少, 抗菌性能也随之减弱 (图 13)。

30 本发明纳米颗粒的这种抗菌活性还和操作温度相关。当所述纳米颗粒 (1% w/v 月桂酸)与细菌 (1×10^7 CFU/mL)共孵育 5 小时后, 结果显示, 在室温 (20°C) 或更高温度下, 细菌被完全清除 (图 14)。

为测定本发明纳米颗粒对痤疮丙酸杆菌的体外 MIC, 在厌氧条件下, 将不同浓度的本发明纳米颗粒与痤疮丙酸杆菌 (1×10^6 CFU/mL)培育 5 小时, 然后检测样品在 600nm 处的吸收度 (600nm 处的光密度, OD₆₀₀)。所有的检测都平行操作三次。结果显示当本发明的纳米颗粒浓度为 0.0125% w/v 或更高时, 其抑制细菌的

35

生长，如图 9 所示。

为测定本发明纳米颗粒对痤疮丙酸杆菌的体外 MBC，在 37℃，厌氧条件下，将不同浓度的本发明纳米颗粒与痤疮丙酸杆菌 (1×10^6 CFU/mL) 培育 5 小时。培育后，样品用 PBS 作 1: 10 至 1: 10^6 稀释，取 5 μ L 稀释液接种于 RCM 琼脂板上。

5 琼脂板在 37℃，厌氧条件下培养 3 天，之后定量测定痤疮丙酸杆菌的 CFU (菌落形成单位)。结果显示，0.02% w/v 的本发明纳米颗粒杀死了 99.9% 的痤疮丙酸杆菌。此外，0.05% w/v 和更高的本发明纳米颗粒杀死全部细菌，如图 15 所示。

以上结果显示出本发明纳米颗粒对痤疮丙酸杆菌的 MBC: MIC 比值大致是 1.6: 1，表明此纳米颗粒对该细菌是杀菌剂。

10 定量分析本发明纳米颗粒对痤疮丙酸杆菌的体外抗菌活性之后，用扫描电镜来观察所述纳米颗粒处理对细菌形态产生的影响。痤疮丙酸杆菌与所述纳米颗粒共孵育 5 小时后，用 2% 的戊二醛固定，然后再用扫描电镜观察。如图 18 所示，未处理样品 (即与 PBS 缓冲液共孵育) 的扫描电镜图显示痤疮丙酸杆菌具有规则的杆状结构，菌表面光滑，具有菌毛。相反，使用本发明纳米颗粒处理过的细菌
15 表现出明显的异常；细菌表面出现不规则变形和收缩，无菌毛 (图 18)。以上结果表明，本发明纳米颗粒可能会破坏细菌膜的结构，从而实现其杀菌的功能。

实施例 2-3. 本发明的纳米颗粒的体外抗菌活性-3

20 通过针对幽门螺旋杆菌的 MIC (定义为抑制细菌生长的最低浓度) 和 MBC (定义为杀死 99.9% 目标细菌的最低) 值来确定本发明纳米颗粒 (肉豆蔻油酸) 对幽门螺旋杆菌 (悉尼菌株 1, HPSS1) 的体外抗菌活性。

为测定 MIC, 0.05 OD₆₀₀ (对应于 5×10^6 CFU/mL) 的幽门螺旋杆菌与不同浓度 (0 到 0.012% w/v) 的本发明纳米颗粒共同培养。为了量化细菌生长情况，培养 18 小时后，测定细菌培养物的 OD₆₀₀ 值，记录与初始值相比的变化值。变化值反映了细菌在本发明纳米颗粒影响下的生长情况。如图 10 所示，当本发明纳米颗粒的
25 浓度低于 0.0015% w/v 时，共培育后的 OD₆₀₀ 值与初始值相比变化明显 (> 5%)，提示即使在此浓度的 TNAN-3 存在下，细菌生长明显。相反，当肉豆蔻油酸的浓度高于 0.0015 %w/v，OD₆₀₀ 的变化值小于 5%，说明了细菌生长得到了有效抑制。所以，0.0015 %w/v 确定为本发明纳米颗粒的 MIC。

30 本发明人还测定了本发明纳米颗粒对幽门螺旋杆菌的杀菌作用。将幽门螺旋杆菌 (5×10^6 CFU) 和不同浓度的本发明纳米颗粒共同培养 18 小时。这种培养过程使得本发明纳米颗粒与幽门螺旋杆菌相互作用，从而杀伤它们。培育后，将 5 μ L 细菌培养液接种于哥伦比亚琼脂上，然后在 37℃ 下培育 4 天，来对细菌计数。图 16A 显示了将不同浓度的本发明纳米颗粒处理 18 小时后的 5 μ L 细菌，接种于琼
35 脂板培育过夜的代表性照片。很明显，本发明纳米颗粒的浓度越高，琼脂板上可见的菌落越少。

如图 16B 所示,0.0015%w/v 的本发明纳米颗粒杀死了 99.9%的幽门螺旋杆菌。当肉豆蔻油酸的浓度升到 0.0015 %w/v 以上时,细菌全部死亡。因此,0.0015 %w/v 即为本发明纳米颗粒针对幽门螺旋杆菌的 MBC 值。

5 本发明的结果显示本发明纳米颗粒对 HPSS1 的 MBC: MIC 比值大致是 1: 1, 表明此制剂对该病原菌是杀菌剂。同时,此制剂在 18 小时内将细菌计数降低超过 3 个数量级,表明此药物对 HPSS1 的杀菌作用,从而为进一步体内评价浓度和药物接触时间起指导作用。

为了对本发明纳米颗粒制剂杀死幽门螺旋杆菌的机制有更深刻的理解,本发明人进一步检查了幽门螺旋杆菌细胞在本发明纳米颗粒处理前后的形态学变化。10 在处理之前,SEM 图像显示幽门螺旋杆菌细胞有着正常的弯曲形态和完整的细胞膜(图 19A)。典型的螺旋状幽门螺旋杆菌细胞有 2-4 μm 长、0.5-0.8 μm 宽,拥有可见的护套鞭毛。本发明纳米颗粒处理 18 小时后,SEM 图像显示细菌形态的显著变化,包括正常弯曲形态的完全丧失,原生质体圆柱体型的破坏,细胞溶解,细菌细胞膜的片段化以及严重的聚团形态(图 19B)。此形态改变表明本发明纳米15 颗粒制剂的强烈破坏作用,从而抑制细菌生长。

实施例 2-4. 本发明的纳米颗粒的体外抗菌活性-4

通过检查真菌和不同浓度的本发明纳米颗粒(月桂酸单甘油酯浓度不同的一系列非囊泡型纳米颗粒)共孵育时出现的抑菌作用来评估本发明纳米颗粒对真菌20 的体外抗菌活性。

首先测量最小抑制细菌生长的本发明纳米颗粒浓度(MIC)。具体地说,将 1×10^3 CFU 的红色毛癣菌 216-3664 与 0-0.4%w/v 浓度的本发明纳米颗粒共孵育。根据 NCCLS-M27-A3 微量稀释法进行测定,在药敏板孵育 48 小时后,结果判定以空白对照菌未生长,生长对照菌已生长,各浓度纳米颗粒培养基:菌已生长示25 无抑制作用,菌未生长示有抑菌作用。菌未生长所对应的纳米颗粒培养基最低浓度,即为 MIC。通过观察,本发明的纳米颗粒对红色毛癣菌 216-3664 的 MIC 值为 0.006%w/v。

此外,将 1×10^3 CFU 的烟曲霉 116-7490 与 0-0.4%w/v 浓度的本发明纳米颗粒共孵育。采用的方法与红色毛癣菌 216-3664 的方法相同,本发明的纳米颗粒针30 对烟曲霉 116-7490 的 MIC 为 0.1%w/v。

实施例 3. 本发明纳米颗粒的储存稳定性

本发明人考察了本发明纳米颗粒(1%w/v 亚麻酸)在不同温度下的 3 个月的长期稳定性。稳定性的变化通过检测粒径来体现。如图 3 中所示,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、25 $^{\circ}\text{C}$ 和35 37 $^{\circ}\text{C}$ 下储存的纳米颗粒的粒径仅仅从 11 nm 增长到 13 nm,变化可以忽略不计,表明了本发明的纳米颗粒在所有储存条件下的高稳定性。

5 作为药用，本发明纳米颗粒很关键的一点就要能够在长时间保存下保持有效杀菌作用，即，在要有稳定的结构之余，还要有稳定的活性。为了评估这种能力，本发明人检查了在储存 3 个月的时间内本发明纳米颗粒的 MIC 和 MBC 值。如图 20 所示，当在室温下储存三个月后，本发明纳米颗粒显示了与新鲜制备的样品近

10 研究显示，本发明纳米颗粒(1%w/v 月桂酸)的抗菌活性与样品的储存温度也有关系。本发明纳米颗粒在 37°C 下储存 5 个月后，其抗菌活性与新鲜纳米颗粒相同，可以完全杀死 1×10^7 CFU/mL 的痤疮丙酸杆菌。然而，当储存温度为 20°C 或 4°C 时，其抗菌活性下降，分别只能杀死 4.4 和 1.8 个数量级的原始痤疮丙酸杆菌量(1×10^7 CFU/mL) (图 21)。

15 基于此，本发明人进一步对本发明的纳米颗粒(1%w/v 月桂酸)在极端高温和极端低温条件下的稳定性和药效进行了检测。根据颗粒尺寸 (图 4)和最小杀菌浓度 (MBC)结果 (实施例 2, 图 14)，处在 20 至 100°C 温度下的颗粒很稳定，其抗菌活性保持不变。此外，更低温度 (4 至 -80°C)下保存的颗粒不能完全清除浓度为 1×10^7 CFU/mL 的痤疮丙酸杆菌，-80°C 下冷冻的 TNAN-1 极不稳定。

进一步的长期稳定试验发现该纳米颗粒在 20°C 下可以稳定保存 5 个月。在试验期间，颗粒体积和多分散性指数均保持几乎恒定不变 (图 5)。

20 通过监测纳米颗粒的尺寸，本发明人还考察了其它所选制剂 (0.3%w/v 肉豆蔻油酸)在不同保存温度下在 3 个月时间跨度下的长期稳定性。如图 6 所示，在包括 -20°C (冻干制剂)、4°C、25°C 和 37°C (悬浮液形式)的各种条件下保存的纳米颗粒胶束显示尺寸改变在 8.2-9.7nm 之间，可忽略不计，提示本发明纳米颗粒在各种保存条件下的高稳定性。

25 对于本发明的纳米颗粒制剂，能够在长时间保存下保持有效杀菌作用是很关键的。为评估这种能力，本发明人检查了储存 3 个月的时间内本发明纳米颗粒的 MIC 和 MBC 值。如图 22 和 23 所示，无论是室温下以悬浮液保存 3 个月，还是在 -20°C 以冻干形式保存 3 个月，本发明的纳米颗粒均显示与新鲜制备的样品相当的 MIC 和 MBC 值。

30 对于包含月桂酸单甘油酯的本发明纳米颗粒，其也表现出优异的储存稳定性。本发明人将包含 0.4%w/v 月桂酸单甘油酯的本发明纳米颗粒在室温下储存 6 周。其稳定性的变化通过检测粒径大小得以体现。如图 7 所示，室温下储存 6 周的本发明纳米颗粒的粒径保持在 7.5~8.0 nm 之间，其粒径变化几乎可以忽略不计，表

35 明了本发明的纳米颗粒在此储存条件下的高稳定性。

实施例 4-1. 本发明纳米颗粒的体内抗菌功效-1

本发明纳米颗粒(1%w/v 亚麻酸)对 MRSA252 感染的体内抗菌活性和治疗效果通过使用 ICR 小鼠的皮肤擦伤感染模型进一步被评估。(小鼠的)感染由 MRSA252 引起被连续 5 天内每天涂以内分泌纳米颗粒的凝胶和空白凝胶。细菌载量在 MRSA252 感染后的第 6 天被测定。皮肤组织首先在 PBS 中匀质化,并用 MRSA 特异性的琼脂板(甘露醇盐琼脂)上进行隔夜培育。专门选择甘露醇琼脂板进行 MRSA 培养是因为琼脂的颜色会随着 MRSA 的生长从粉色变成黄色。如图 24A 所示,本发明纳米颗粒处理过的 MRSA 琼脂板保持粉色,然而那些(使用空白凝胶)对照组的琼脂板变成了黄色。这项观察意味着本发明纳米颗粒在皮肤擦伤感染处有强大的杀菌活性。除目测观察外,本发明人还进一步对样本的 CFU 值进行了计数量化。结果表明,空白凝胶处理过的小鼠皮肤上的细菌存留量是本发明纳米颗粒处理过的大约 66 倍,其中 t 分布检的假定值低于 0.01(图 24B)。

为了更好的评估本发明纳米颗粒的抗 MRSA 活性,还在 ICR 小鼠皮下感染的模型中得到进一步测试了该纳米颗粒。在这项研究中,感染 24 小时后,空白凝胶治疗的小鼠在感染处显示出了含脓损伤。本发明纳米颗粒的凝胶治疗的小鼠在感染处附近显示出皮疹,但是严重程度轻得多(图 25)。72 小时后,空白凝胶治疗的小鼠的病变变得更加明显,意味着小鼠体内感染的扩散。相比之下,本发明纳米颗粒的凝胶治疗的小鼠表现出不明显的病变。此项比较表明本发明纳米颗粒的优异抗 MRSA 疗效。

20

实施例 4-2. 本发明纳米颗粒的体内抗菌功效-2

对 ICR 小鼠进行皮内注射,以此来检测本发明纳米颗粒(1%w/v 月桂酸)对痤疮丙酸杆菌的体内抗菌活性。在本实施例中,选择小鼠耳朵进行皮内注射,因为小鼠耳朵的结构能使接种细菌停留在注射区域。为了检测生理环境下本发明的纳米颗粒对痤疮丙酸杆菌的抗菌活性,在 ICR 小鼠的双耳(左耳和右耳)皮内注射痤疮丙酸杆菌(1×10^7 CFU,溶于 20 μ L PBS)。注射痤疮丙酸杆菌的部位再分别注射本发明的纳米颗粒(1% w/v 月桂酸)或 PBS(用作阴性对比试验)。注射 24 小时后,用直径为 8-mm 活检穿孔采集小鼠耳朵样品,然后进行匀浆及培养,以计数剩余的痤疮丙酸杆菌菌数。如图 29 所示,使用本发明纳米颗粒治疗可完全清除小鼠耳朵上接种的痤疮丙酸杆菌。相反,阴性对照组(PBS 缓冲液处理)检测到的菌数为 1.2×10^4 CFU/mL。以上结果证明本发明的纳米颗粒在生理环境下(例如在真皮内)能够有效杀死痤疮丙酸杆菌。

30

实施例 5-1. 本发明纳米颗粒对正常皮肤组织的毒性-1

通过 5 天内将本发明纳米颗粒(1%w/v 亚麻酸)的凝胶剂型外用在剃毛小鼠的表皮上来测试本发明纳米颗粒的毒性。如图 26 所示,没有发现本发明纳米颗粒引

35

起任何红斑或水肿刺激。

为了进一步评估刺激性和细胞凋亡，进行了 H&E 染色和末端脱氧核苷酸转移酶标记(TUNEL)实验。如图 27 所示，本发明纳米颗粒处理过的皮肤表面保持着未被破坏的结构，真皮层上方有一层清晰的健康表皮细胞，这和未经处理的皮肤样本一模一样。H&E 染色同样证明了，与未经处理的皮肤相比，本发明纳米颗粒处理没有引起任何组织内炎症。除此之外，还进行了 TUNEL 分析来评估皮肤组织中产生严重 DNA 破坏和坏死细胞生成的数量。在图 27 中，本发明纳米颗粒处理过的皮肤组织比起未处理皮肤并没有显示出明显的凋亡染色增加。

为了进一步验证本发明纳米颗粒的安全性，尤其是是否引起皮肤炎症，我们测量了皮肤渗透的巨噬细胞水平。在此研究中，经本发明纳米颗粒处理过的和未被处理过的皮肤组织中的皮肤巨噬细胞，用 FITC-抗-小鼠 f4/80 抗体进行染色。如图 28 所示，可以在真皮层上方的表皮层的较低部位中观测到皮肤巨噬细胞，本发明纳米颗粒的处理并没有改变这样的组织分布。比起未经处理的皮肤样品，那些本发明纳米颗粒处理过的样品没有表现出渗透巨噬细胞的明显增加，表明没有明显的炎症。

实施例 5-2. 本发明纳米颗粒对正常皮肤组织的毒性-2

在 ICR 小鼠的背部皮肤上局部使用本发明纳米颗粒(1%w/v 月桂酸)的凝胶之后，通过检查皮肤形态学的变化来检测所述纳米颗粒对正常皮肤组织可能产生的毒性。在本实施例中，给药前 24 小时对小鼠背部皮肤进行刮毛，这样有足够的时间让皮肤角质层从可能受到的刮伤中恢复过来，在实验开始之前用 PBS 润湿皮肤。然后将本发明纳米颗粒样品局部用药到皮肤上，过 24 小时后除去药物，并用 PBS 清洗润湿。如图 30 所示，本发明纳米颗粒处理过的皮肤保持了正常结构，未出现红斑或水肿。所述纳米颗粒处理过的皮肤结构与阴性对照，即空白 PBS 凝胶处理过的皮肤结构相似。根据 Draize 的皮肤刺激打分系统，本发明纳米颗粒处理过的皮肤红斑和水肿打分均为 0 分，表明并未出现明显的皮肤刺激。采集皮肤活检样品，并用苏木精和伊红 (H & E)染色进行组织学检测和分析，结果显示 (图 30，下行)本发明纳米颗粒处理过的皮肤结构完好，真皮层上带有一层健康的表皮细胞，与 PBS 处理的结果相同。这一结果进一步确认了本发明纳米颗粒的使用安全性。

实施例 6. 本发明纳米颗粒的人体测试

招募 98 名志愿者使用本发明纳米颗粒(1%w/v 月桂酸)的凝胶，这些志愿者都患有不同阶段的痤疮感染。凝胶每天使用两次，连续使用 3 周。在第 3、7 和 21 天收集使用者的反馈结果。统计结果表明在第 3、7 和 21 天，正面肯定本发明纳米颗粒的凝胶有效率的比率分别为 72.4%、82.7%和 90.8% (图 31)。志愿者提供的

反馈结果表明，本发明的纳米颗粒能够有效减少或清除痤疮丙酸杆菌导致的痤疮感染。

实施例 7. 脂肪酸在水性体系中的抗菌作用

5 本发明人进一步测试了水性体系中的本发明纳米颗粒以及游离脂肪酸的抗菌作用。

结果如图 36-38 所示，在水性体系中 (PBS)，包含亚麻酸的本发明纳米颗粒能够显著杀灭 MRSA，而游离的亚麻酸在水性体系中几乎没有杀菌作用；

10 包含月桂酸的本发明纳米颗粒能够显著杀灭痤疮丙酸杆菌，而游离的月桂酸在水性体系中几乎没有杀菌作用；

相同浓度的肉豆蔻油酸的游离形式并不显示针对幽门螺旋杆菌的杀菌活性，而本发明纳米颗粒形式的肉豆蔻油酸显示出针对幽门螺旋杆菌的杀菌活性。

这证明，只有将游离的脂肪酸制备成本发明的纳米颗粒形式，脂肪酸才能发挥其抗菌作用。

15

在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考，就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解，在阅读了本发明的上述讲授内容之后，本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

20

权 利 要 求

1. 一种非囊泡型纳米颗粒，所述颗粒由脂肪酸或其衍生物、表面活性剂以及任选的脂质构成。

5 2. 如权利要求 1 所述的非囊泡型纳米颗粒，其特征在于，所述脂肪酸是亚麻酸、月桂酸、肉豆蔻油酸，所述脂肪酸衍生物是月桂酸单甘油酯。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的非囊泡型纳米颗粒，其特征在于，所述的纳米颗粒的粒径为 1-90 nm；优选 2-80 nm；更优选 5-50 nm；更优选 5-20 nm；最优选 5-15 nm。

10 4. 如权利要求 1 或 2 所述的非囊泡型纳米颗粒，其特征在于，所述纳米颗粒的多分散性系数为 <0.3 ；优选 <0.2 。

5. 如权利要求 1 或 2 所述的非囊泡型纳米颗粒，其特征在于，所述非囊泡型纳米颗粒的稳定性为：

15 在室温 $\sim 37^{\circ}\text{C}$ 下储存 3 个月后，与新鲜制备的纳米颗粒相比，所述纳米颗粒的“最小抑菌浓度”与“最小杀菌浓度”值的改变小于 20%；优选小于 10%；或者，

在室温下储存 1.5 个月后，与新鲜制备的纳米颗粒相比，所述纳米颗粒的粒径改变小于 20%；优选小于 15%；更优选小于 10%；

20 优选地，在室温下储存 3 个月后，与新鲜制备的纳米颗粒相比，所述纳米颗粒的粒径改变小于 20%；优选小于 15%；更优选小于 10%。

6. 如权利要求 1 或 2 所述的非囊泡型纳米颗粒，其特征在于，所述纳米颗粒由以下方法制备，所述方法包括：

1). 将表面活性剂和任选的脂质悬浮在水中；

2). 搅拌 1)得到的悬浮液直至形成均相悬浮液；

25 3). 加热 2)得到的均相悬浮液到其所含表面活性剂和任选的脂质的熔点以上；

4). 将脂肪酸或其衍生物加入 3)得到的热悬浮液中并搅拌；

5). 降温，静置 4)得到的悬浮液，从而得到本发明的非囊泡型纳米颗粒悬浮液。

30 7. 权利要求 1-5 中任一项所述的非囊泡型纳米颗粒的制备方法，包括以下步骤：

1). 将表面活性剂和任选的脂质悬浮在水中；

2). 搅拌 1)得到的悬浮液直至形成均相悬浮液；

3). 加热 2)得到的均相悬浮液到其所含表面活性剂和任选的脂质的熔点以

35 上；

4). 将脂肪酸或其衍生物加入 3)得到的热悬浮液中并搅拌；

5) 降温，静置 4) 得到的悬浮液，从而得到权利要求 1-5 中任一项所述的非囊泡型纳米颗粒。

8. 一种药物组合物，其包含权利要求 1-6 中任一项所述的非囊泡型纳米颗粒以及任选的药学上可接受的载体。

5 9. 如权利要求 8 所述的药物组合物，其特征在于，所述药物组合物还可包含其它抗生素。

10. 如权利要求 8 或 9 所述的药物组合物，其特征在于，所述药物组合物是水性药物组合物。

10 11. 权利要求 1-6 中任一项所述的纳米颗粒或权利要求 8-10 中任一项所述的药物组合物在制备抗微生物试剂中的用途。

12 如权利要求 11 所述的用途，其特征在于，所述微生物包括：细菌、真菌。

13. 如权利要求 12 所述的用途，其特征在于，所述细菌包括：革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌。

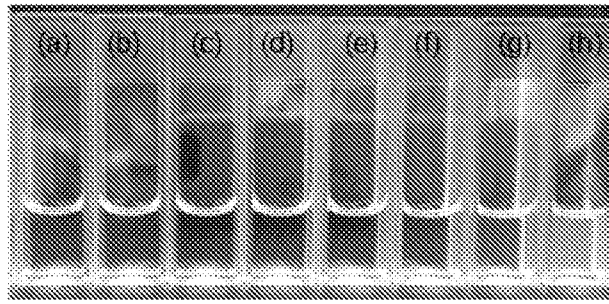
15 14. 如权利要求 13 所述的用途，其特征在于，所述革兰氏阳性菌包括：葡萄球菌 (*Staphylococcus*)；优选金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)；更优选甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌 (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*)；丙酸杆菌 (*Propionibacterium*)；优选费氏丙酸杆菌 (*Propionibacterium freudenreichii*)、痤疮丙酸杆菌 (*Propionibacterium acnes*)、卵白丙酸杆菌 (*Propionibacterium avidum*)、颗粒丙酸杆菌 (*Propionibacterium granulosum*)；更优选痤疮丙酸杆菌
20 (*Propionibacterium acnes*)；和

所述革兰氏阴性菌包括：幽门螺旋杆菌 (*Helicobacter Pylori*)、绿脓杆菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)；优选幽门螺旋杆菌。

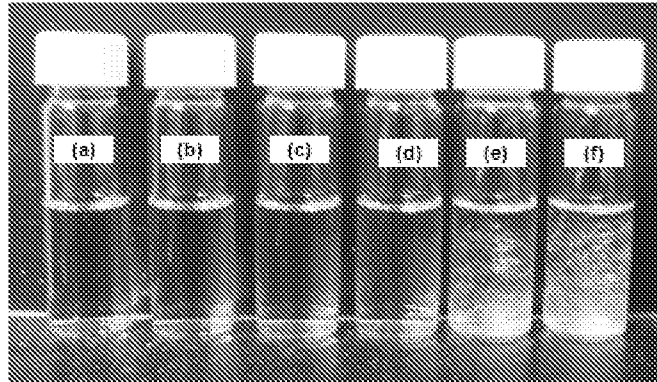
25 15. 如权利要求 12 所述的用途，其特征在于，所述真菌包括：所述真菌包括但不限于：球孢子菌、类球孢子菌、皮炎芽生菌、着色真菌、足分支菌、孢子丝菌、毛癣菌、念珠菌属、隐球菌、曲菌、毛霉菌、放线菌、奴卡菌等等；优选毛癣菌和曲菌；更优选红色毛癣菌 (*Trichophyton rubrum*)、烟曲霉 (*Aspergillus fumigatus*)、白色念珠菌 (*Candida albicans*)、黄癣菌 (*Mycelium yellow ringworm*)；最优选红色毛癣菌、烟曲霉。

30 16. 一种治疗方法，所述治疗方法包括将权利要求 1-6 中任一项所述的纳米颗粒给予对象以治疗微生物感染。

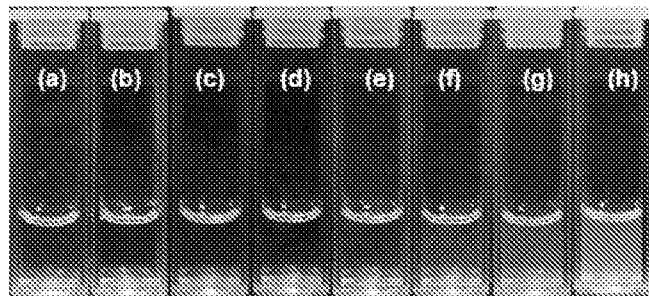
17. 一种治疗方法，所述治疗方法包括将权利要求 1-6 中任一项所述的纳米颗粒与其它抗生素联合给予对象以治疗微生物感染。



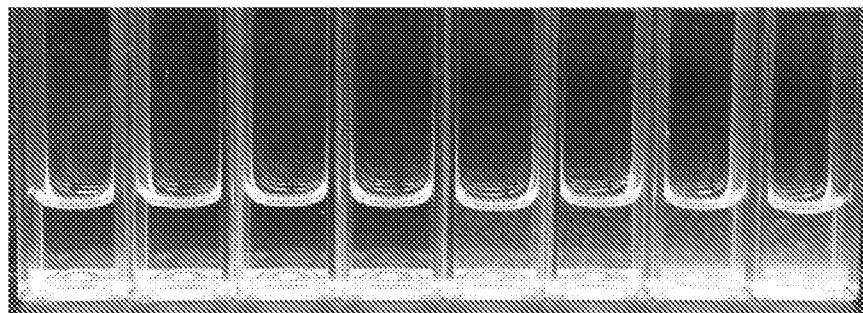
(A)



(B)



(C)



GML(%w/w)

0.1

0.2

0.3

0.4

0.5

0.6

0.7

0.8

(D)

图 1

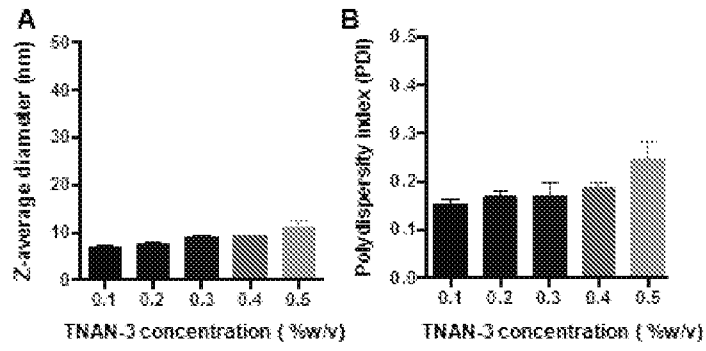


图 2

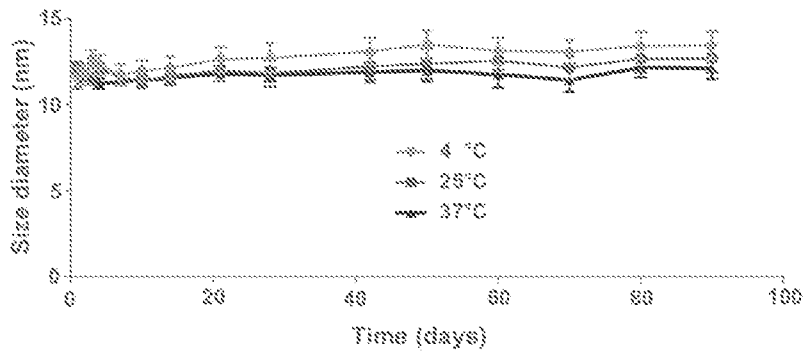


图 3

Stability of TNAN-1 at different temperature

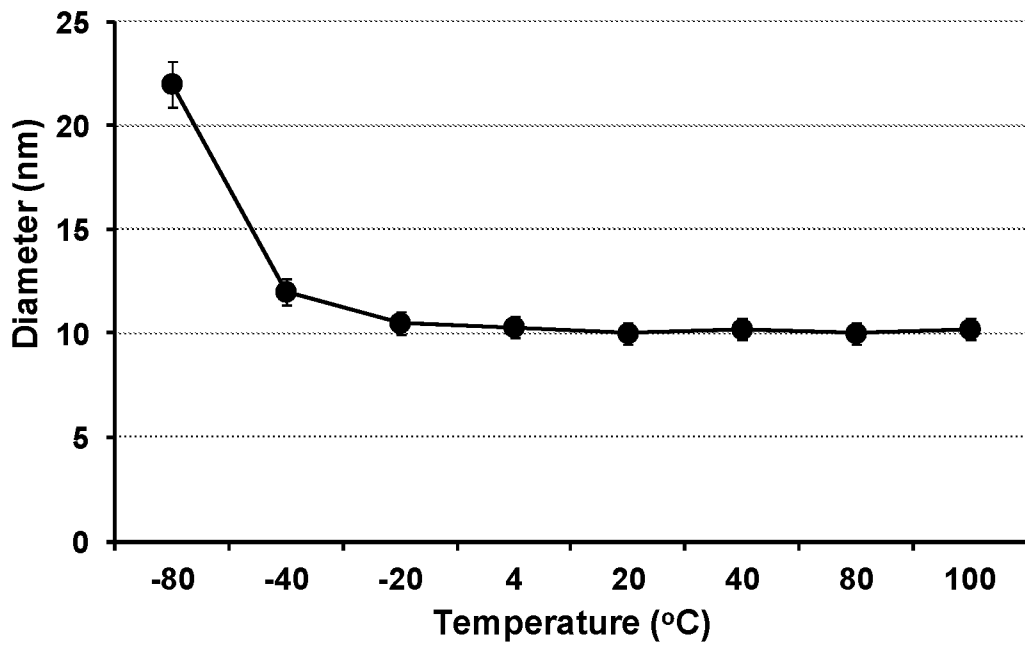


图 4

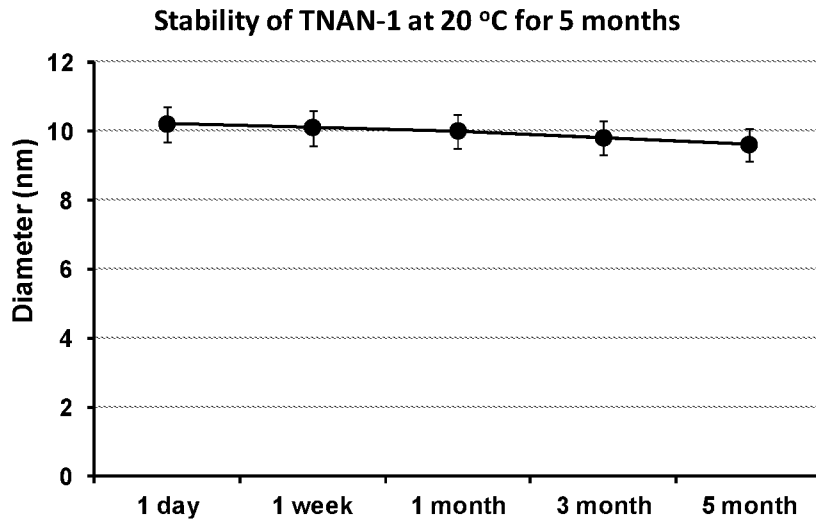


图 5

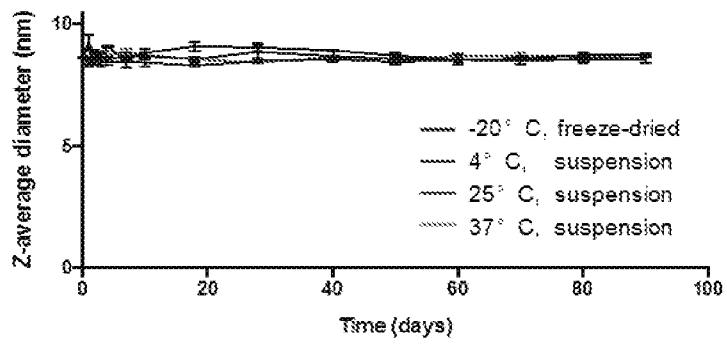


图 6

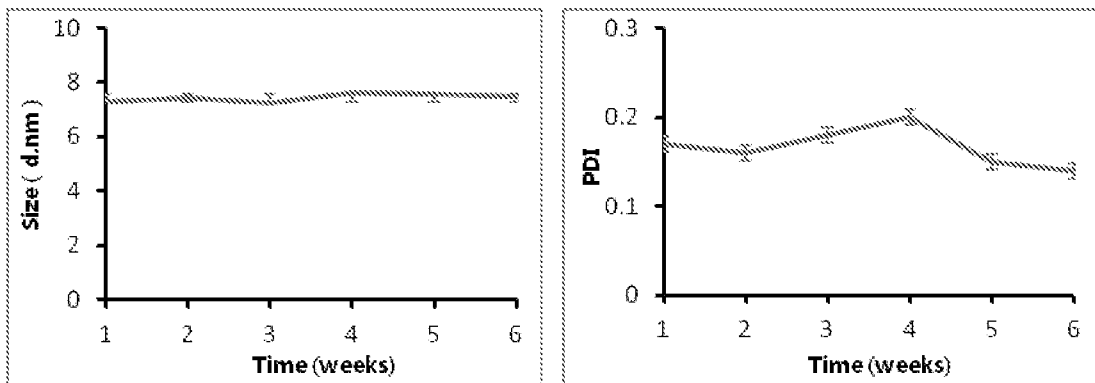


图 7

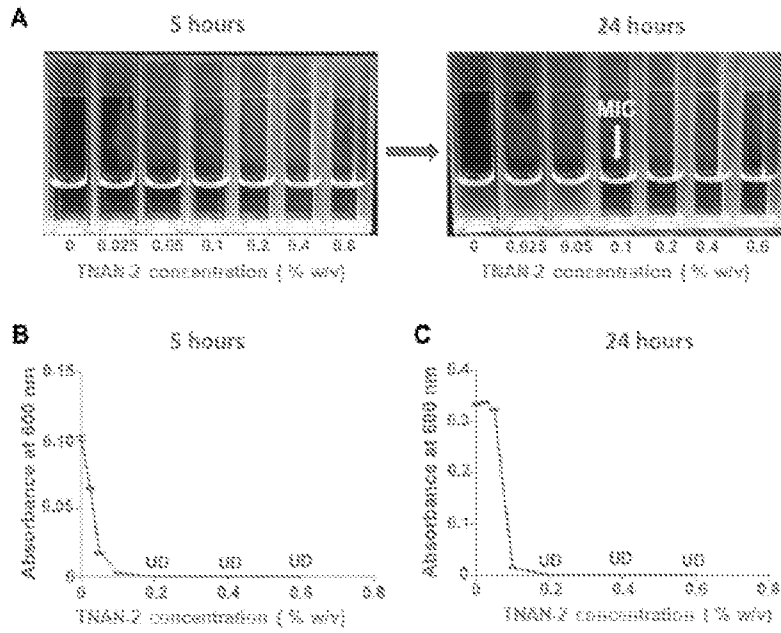


图 8

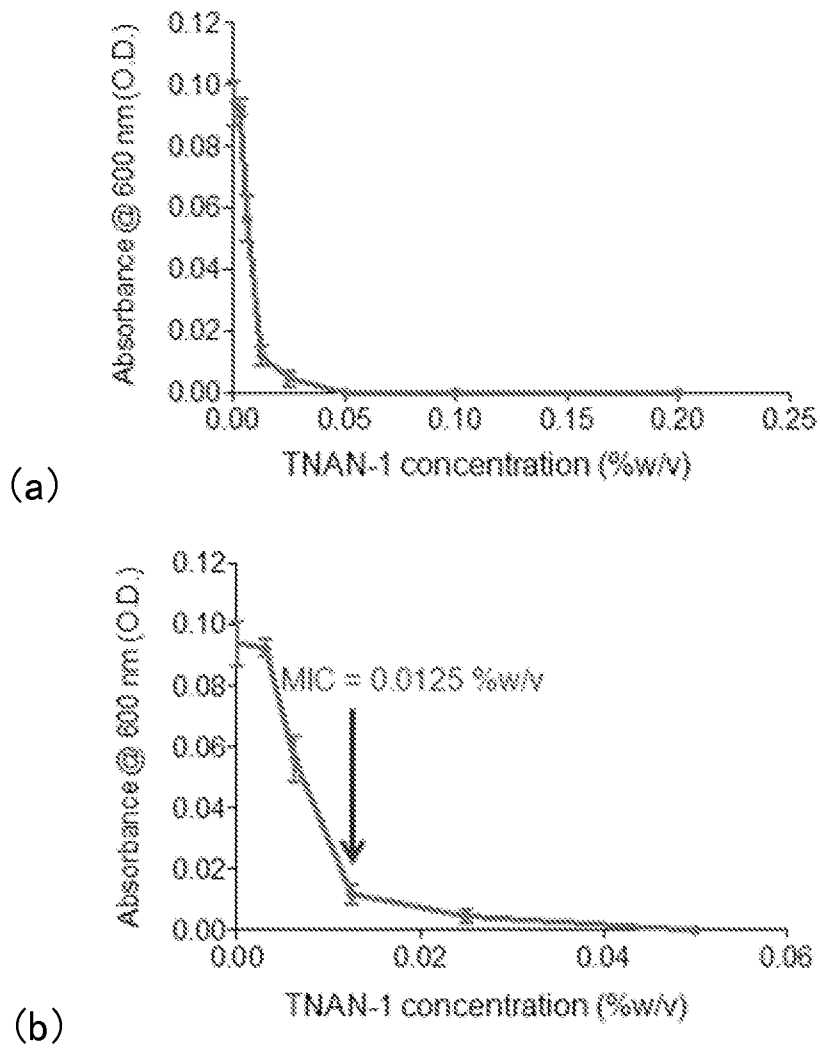


图 9

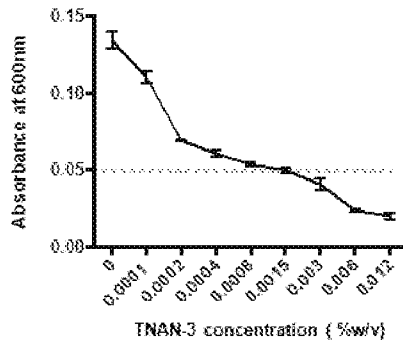


图 10

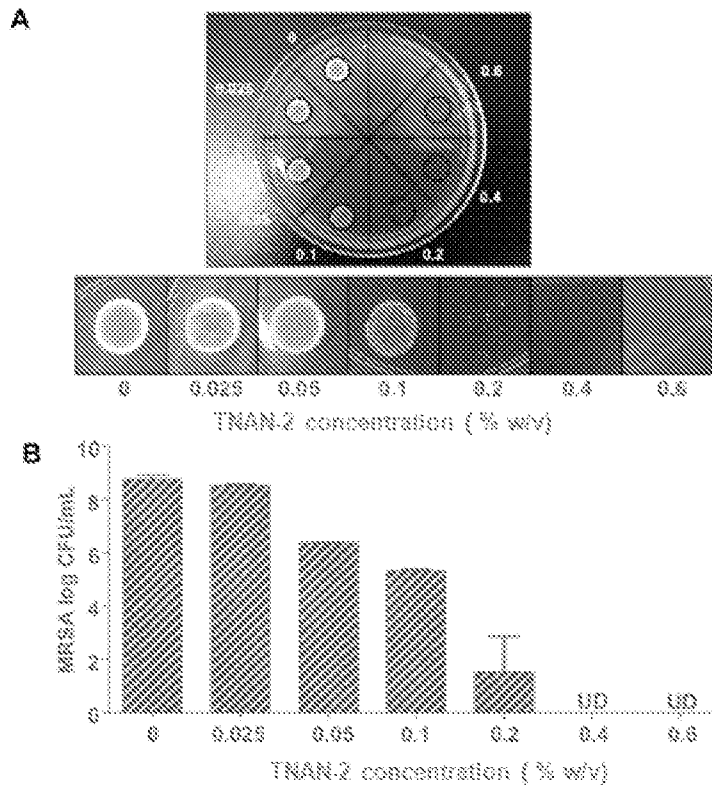


图 11

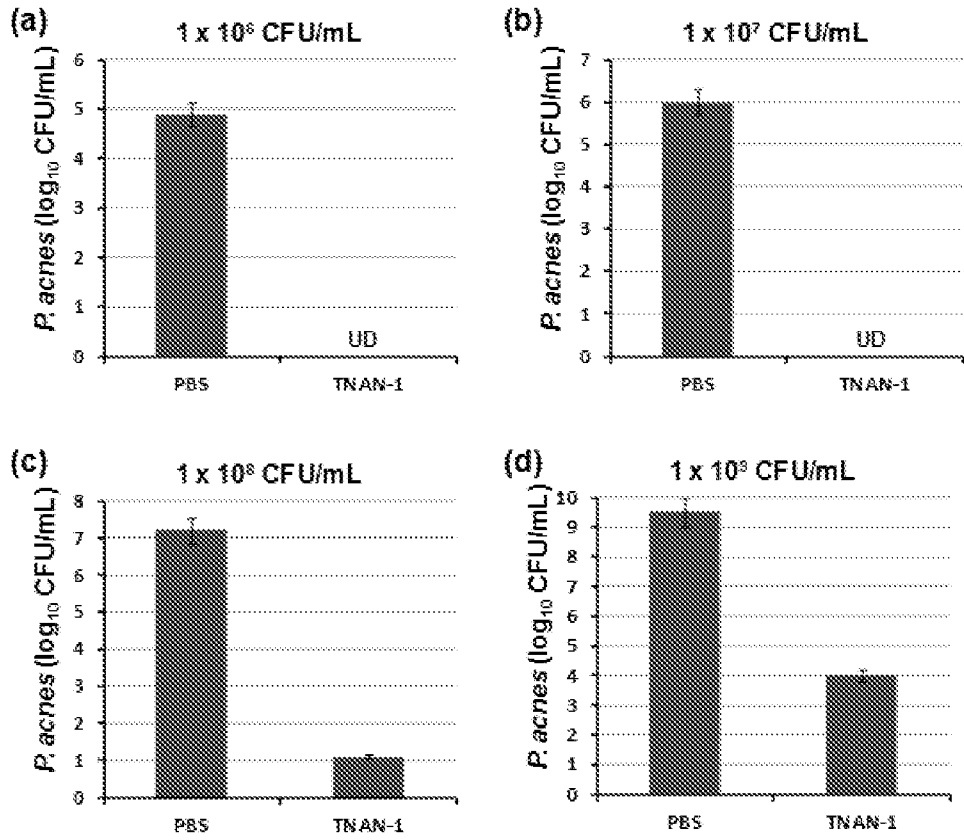


图 12

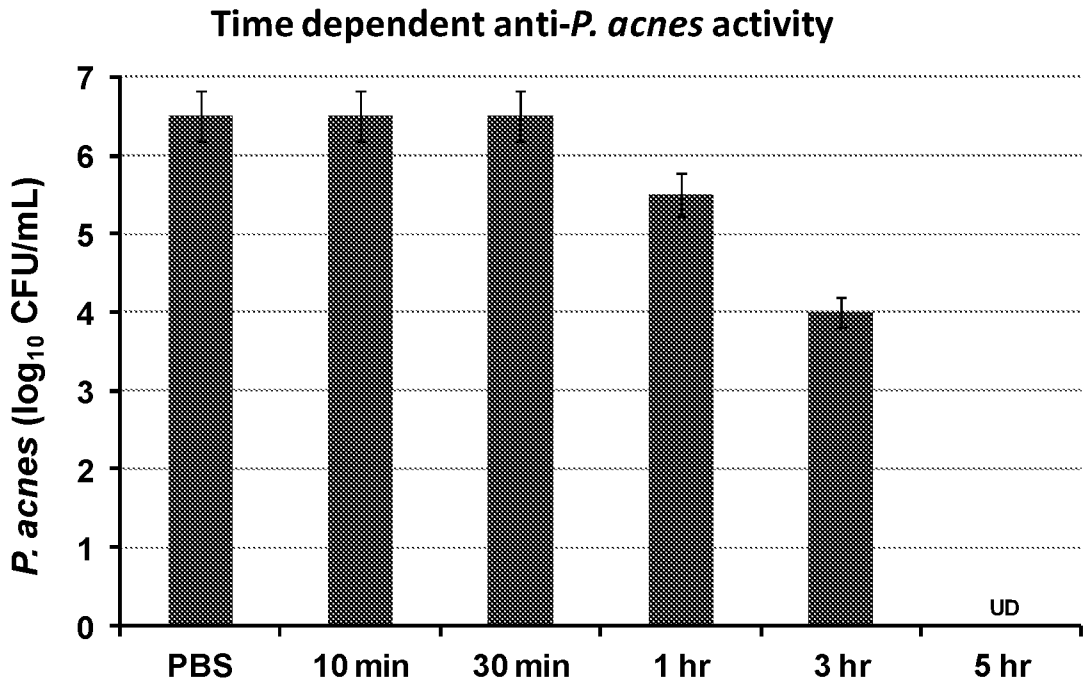


图 13

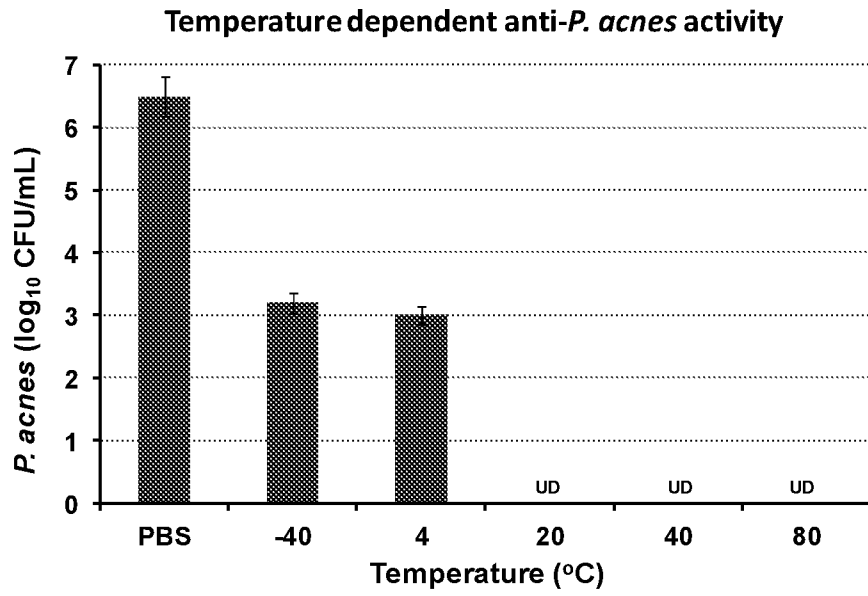


图 14

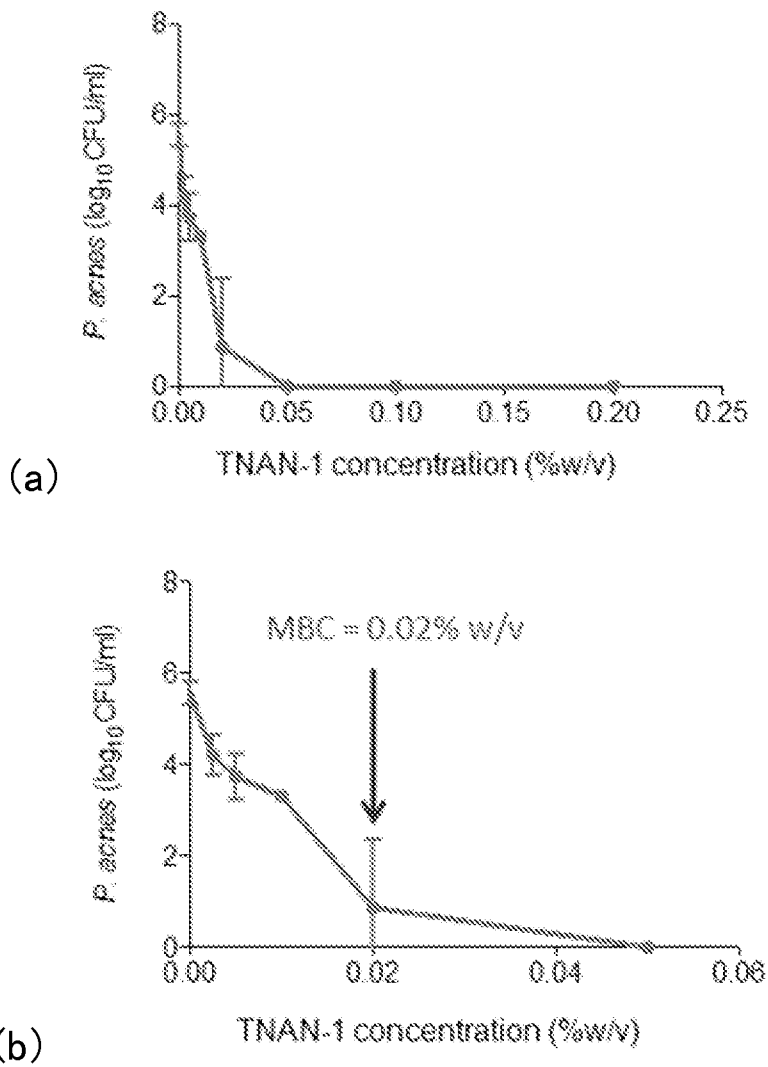


图 15

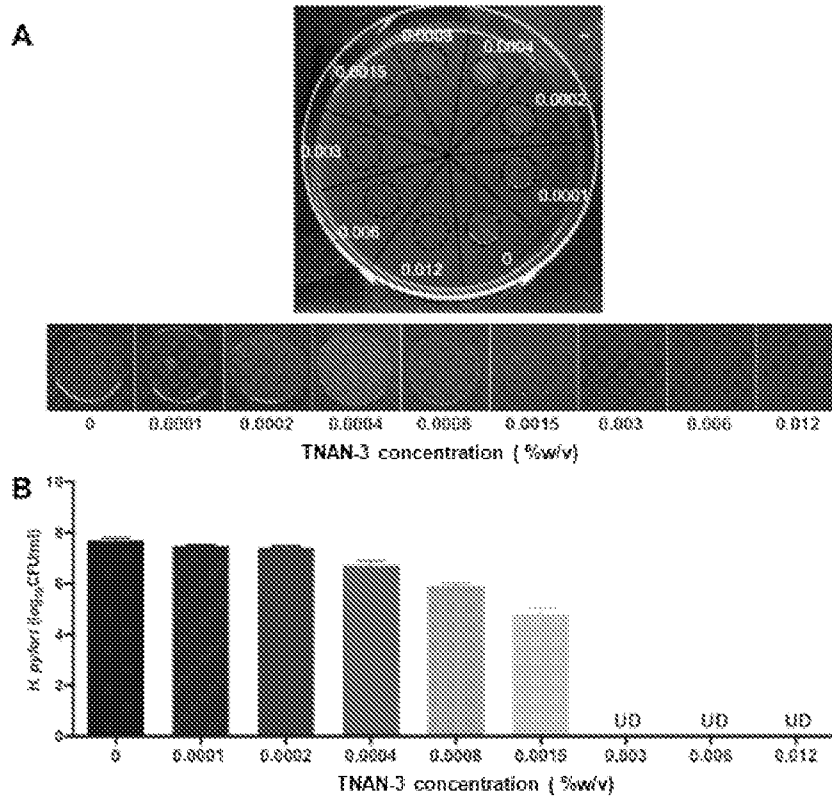


图 16

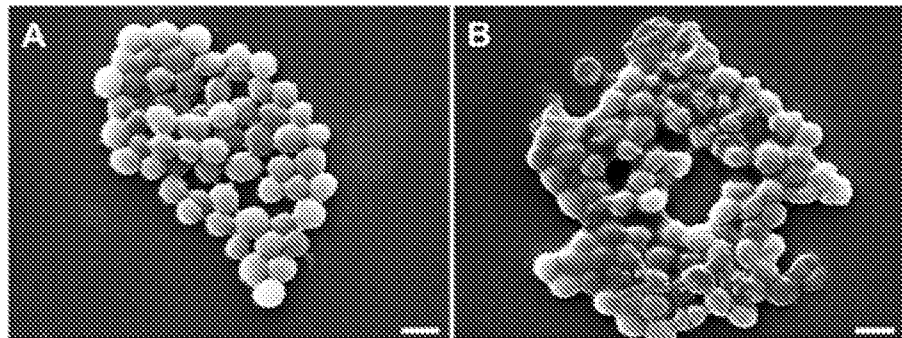


图 17

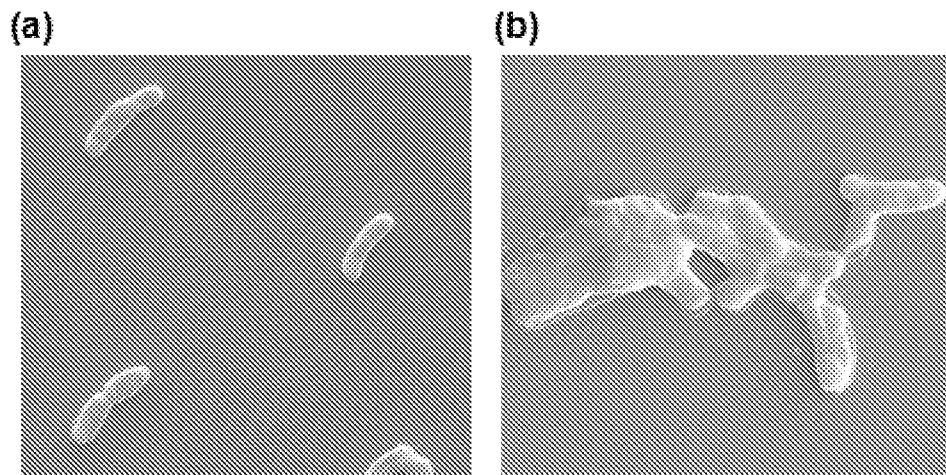


图 18

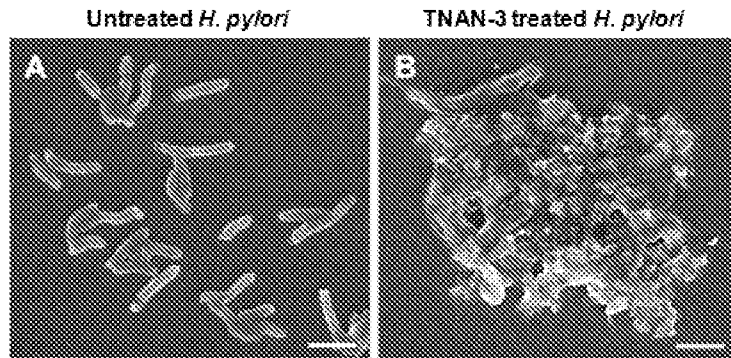


图 19

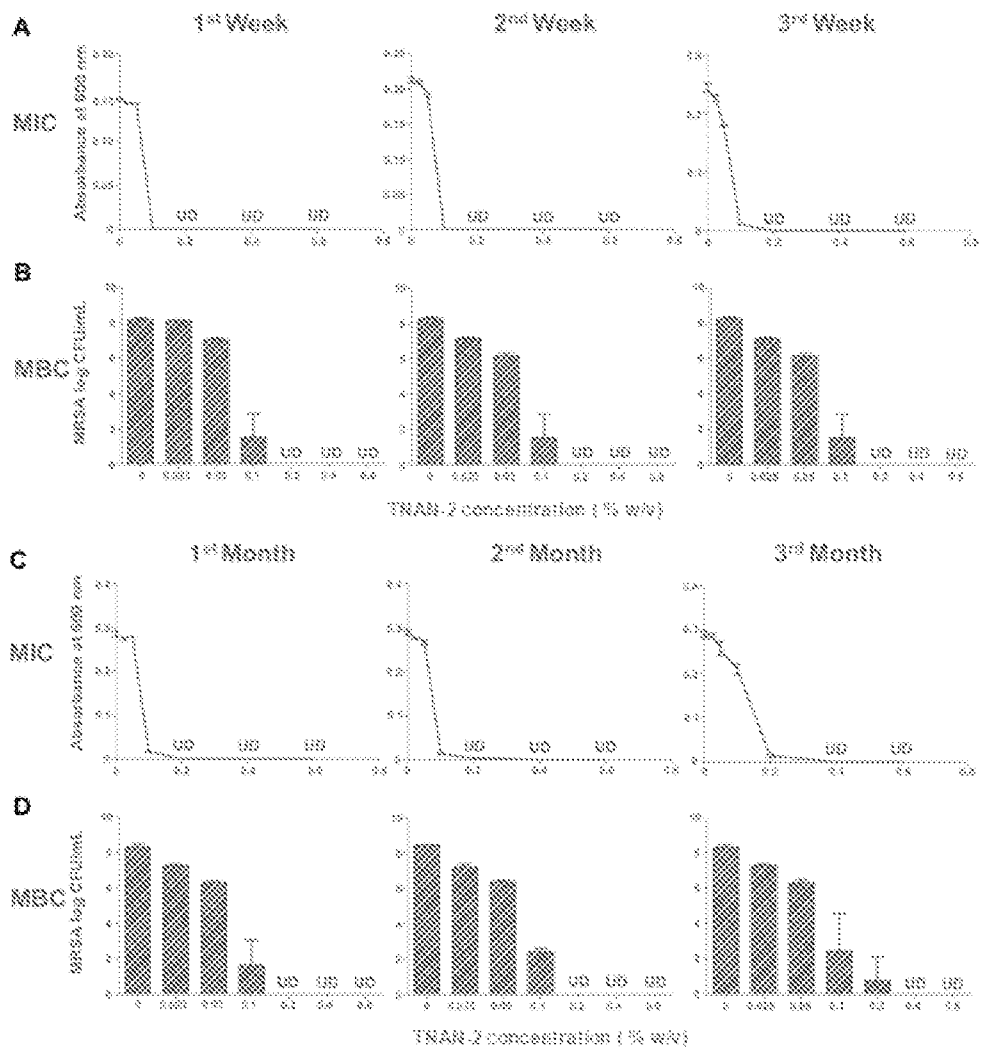


图 20

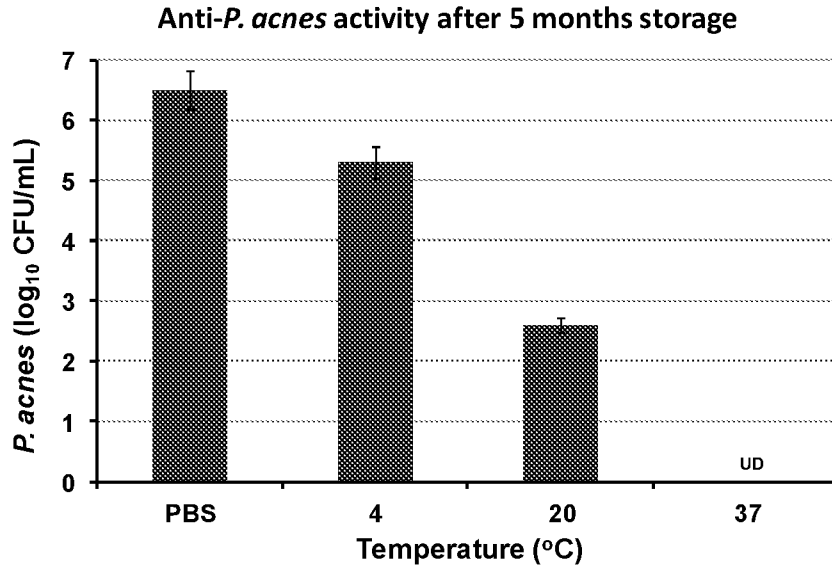


图 21

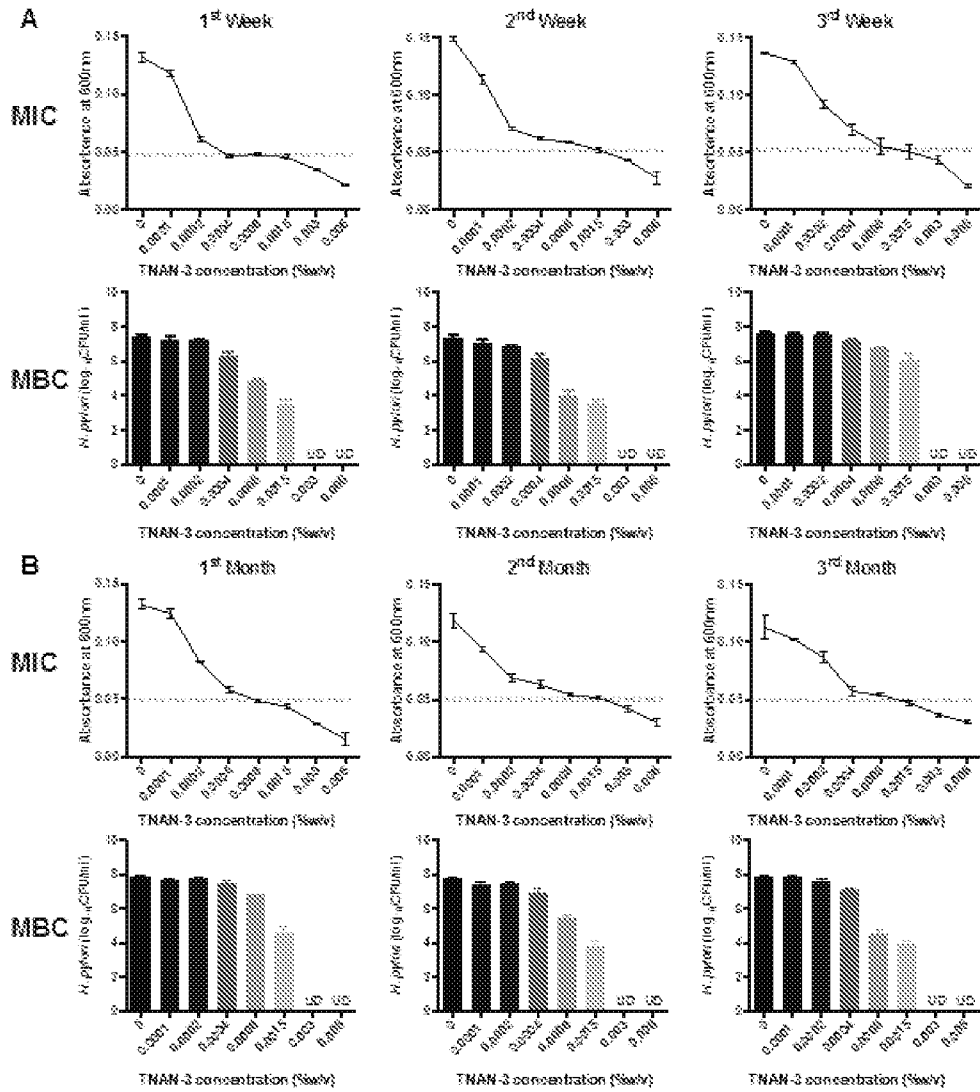


图 22

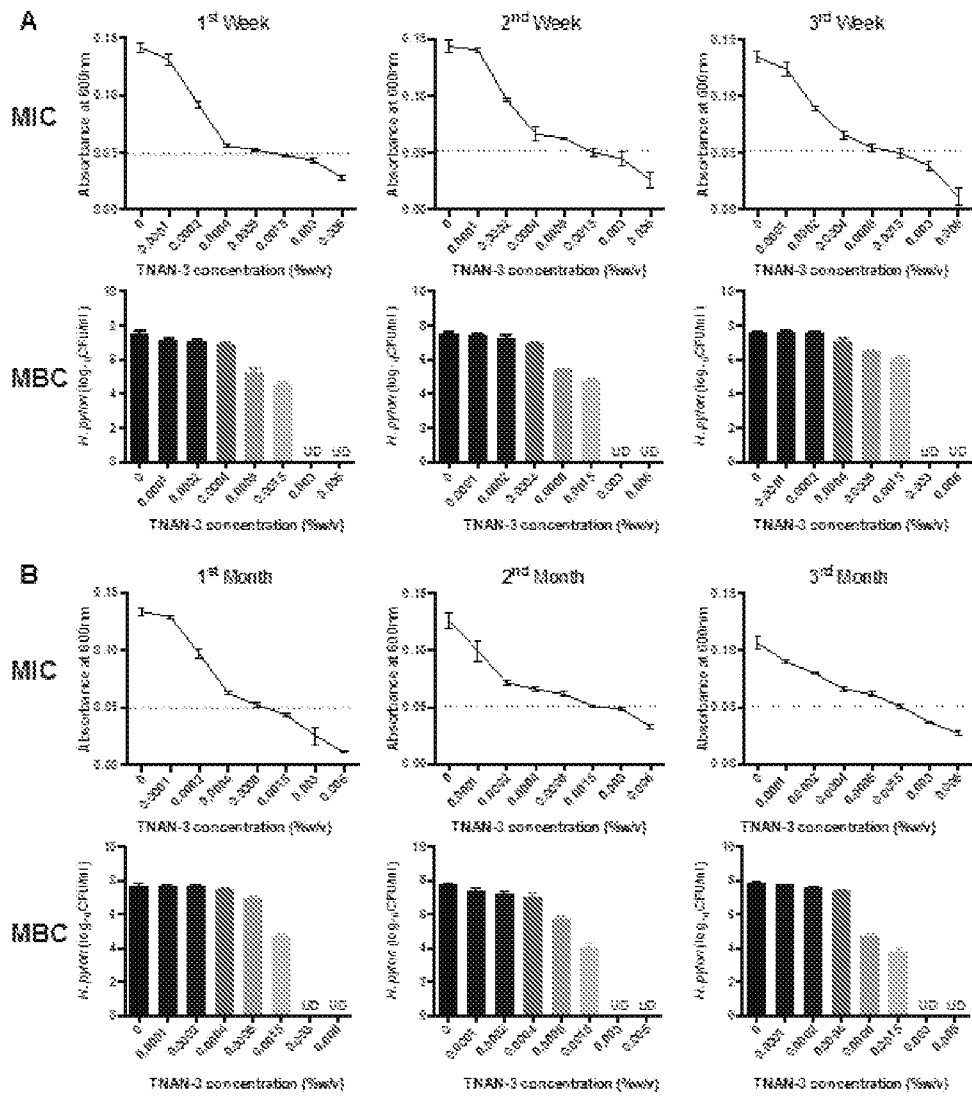


图 23

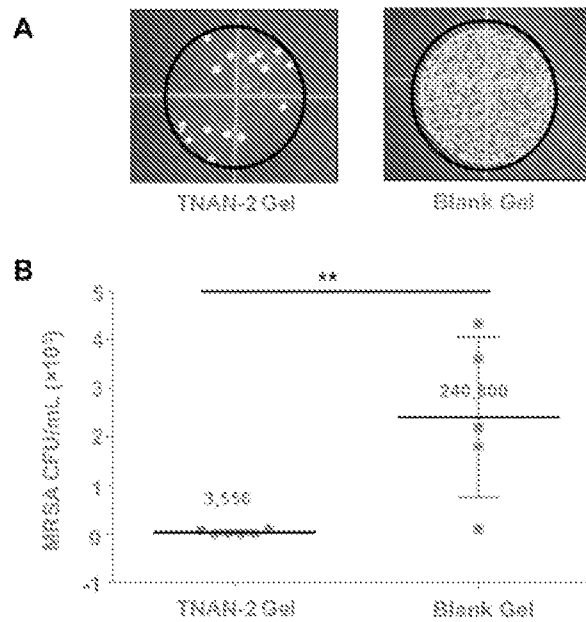


图 24

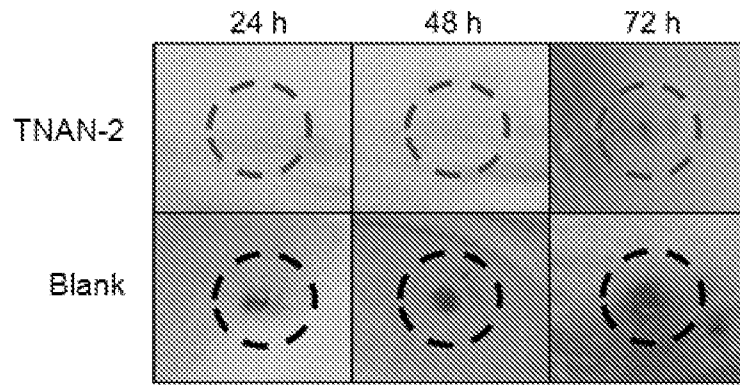


图 25

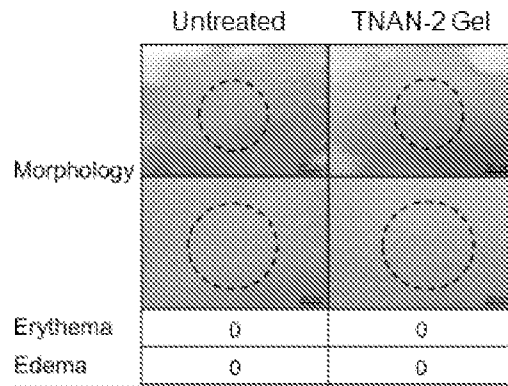


图 26

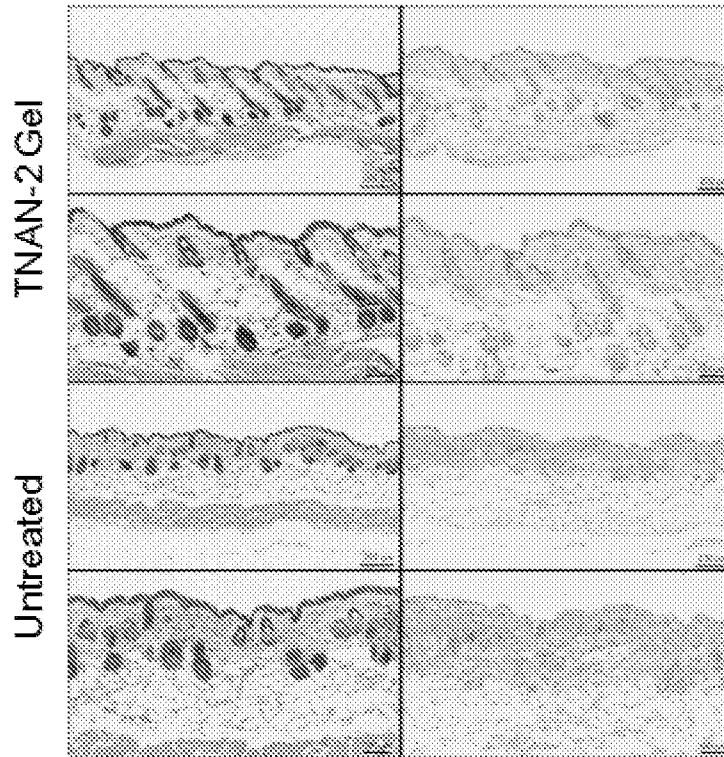


图 27

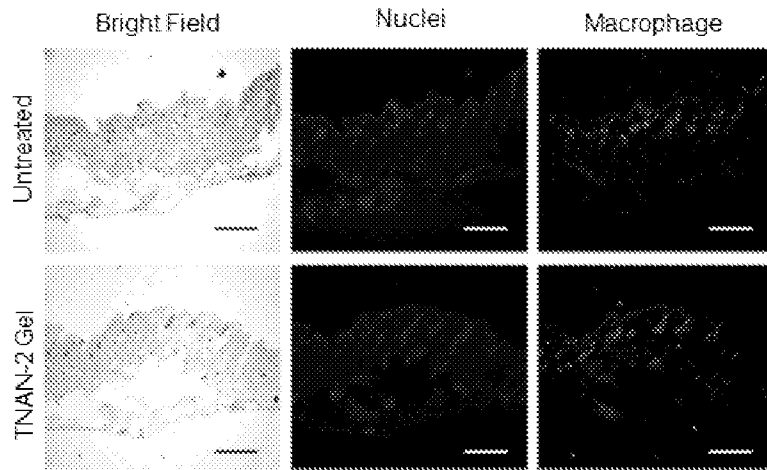


图 28

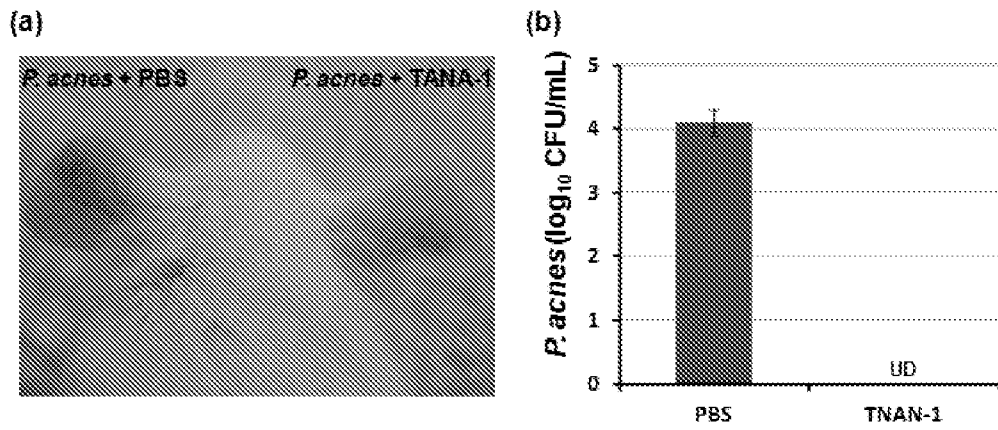


图 29

	TNAN-1	PBS
Morphology		
Erythema	0	0
Edema	0	0
H&E Staining		

图 30

Feedback from volunteered acne patients

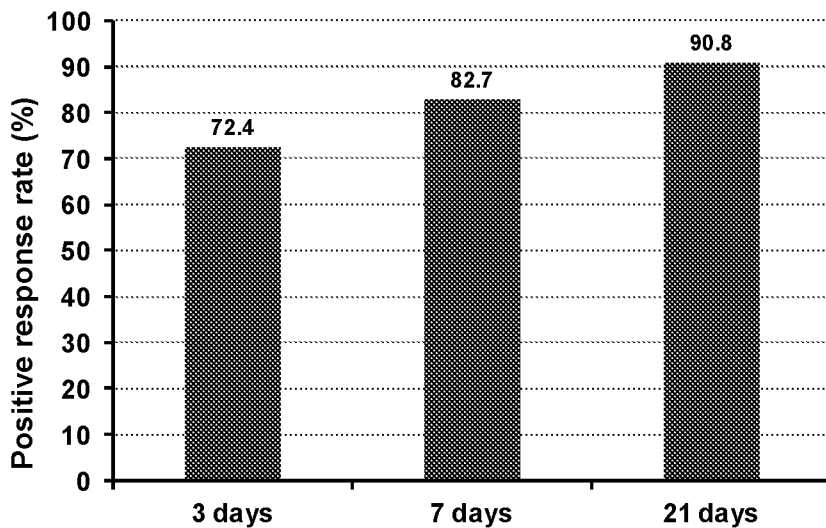
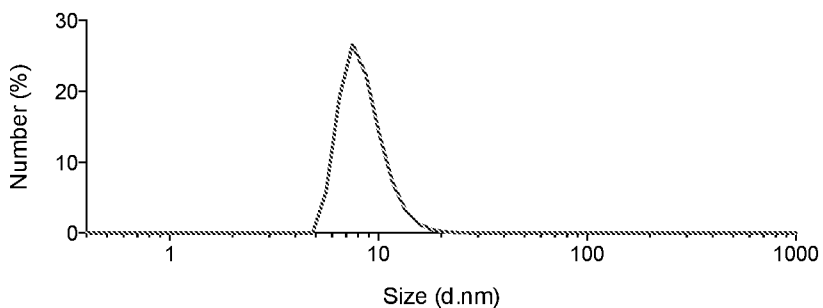
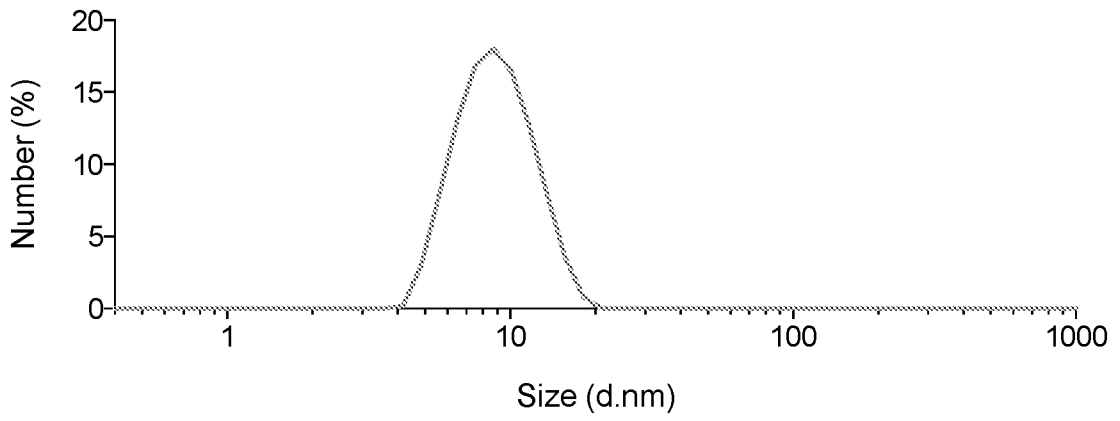


图 31



Size (d.nm)	Number (%)
4.849	0.000
5.615	5.762
6.503	19.116
7.531	26.680
8.721	22.344
10.100	13.883
11.696	7.110
13.545	3.166
15.686	1.262
18.166	0.458
21.037	0.153
24.363	0.047
28.214	0.014
32.674	0.004
37.840	0.001
43.821	0.000

图 32



Size (d.nm)	Number (%)
3.615	0.000
4.187	0.200
4.849	3.000
5.615	7.800
6.503	13.000
7.531	16.800
8.721	18.000
10.100	16.400
11.700	12.600
13.540	7.800
15.690	3.500
18.170	0.800
21.040	0.000

图 33

	Diam. (nm)	% Intensity	Width (nm)
Z-Average (d.nm): 7.502	Peak 1: 8.821	100.0	3.265
Pdf: 0.170	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.840	Peak 3: 0.000	0.0	0.000

Result quality Refer to quality report

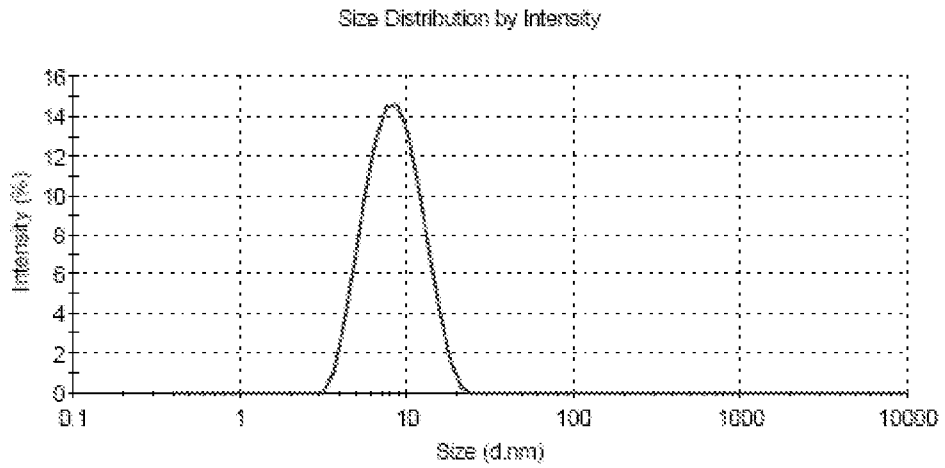


图 34

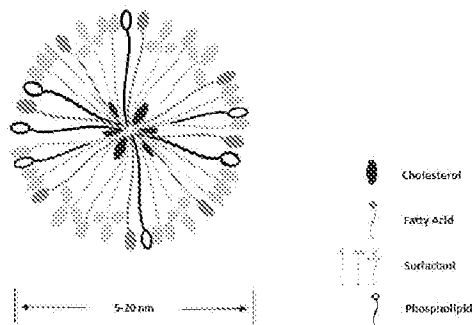


图 35

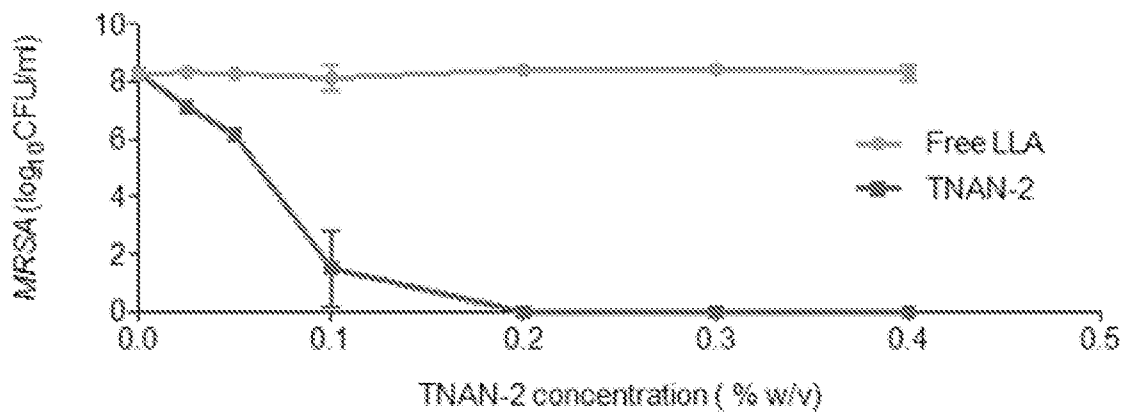


图 36

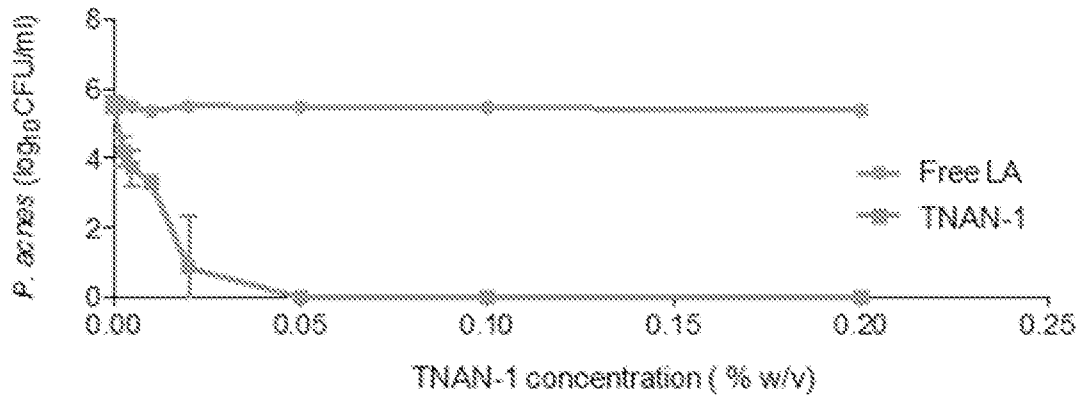


图 37

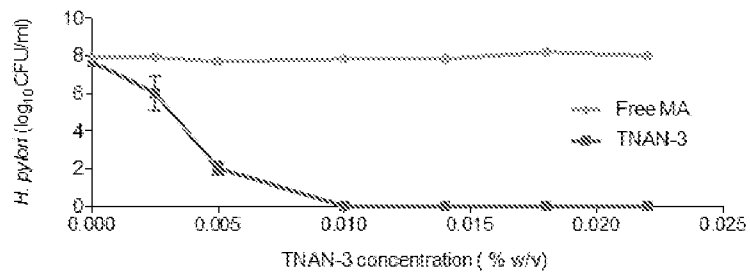


图 38

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2016/099136

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 9/16 (2006.01) i; A61P 31/04 (2006.01) i; A61P 31/10 (2006.01) i; A61K 31/19 (2006.01) i
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K; A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CPRSABS, EPQDOC, WPI, CNKI, CA, MEDLINE, Chinese Pharmaceutical Patent Database: nanometer, granule, myristoleic acid, glycerol monolaurate, nanoparticle, fatty acid, surface active agent, linolenic acid, lauric acid, glyceryl laurate ester laurin, antibacterial, germ, fungus

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 101530390 A (XI'AN ZHONGJI HIGH TECH INDUSTRY DEVELOPMENT CO., LTD.), 16 September 2009 (16.09.2009), the whole document	1-15
A	CN 104837482 A (MEDICAL RESEARCH COUNCIL), 12 August 2015 (12.08.2015), the whole document	1-15
A	MA, Wanshun et al. "Progress of Antibacterial Mechanisms Study on Nanoparticles", BIOPHYSICS REPORTS, vol. 26, no. 8, 31 August 2010 (31.08.2010), pages 638-648	1-15
X	CN 102639129 A (FOLAN, M.A.), 15 August 2012 (15.08.2012), claims 1-31	1-15

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
---	---

Date of the actual completion of the international search
13 December 2016 (13.12.2016)

Date of mailing of the international search report
23 January 2017 (23.01.2017)

Name and mailing address of the ISA/CN:
State Intellectual Property Office of the P. R. China
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao
Haidian District, Beijing 100088, China
Facsimile No.: (86-10) 62019451

Authorized officer
LOU, Dujuan
Telephone No.: (86-10) **62411137**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2016/099136

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 16 and 17
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
[1] claims 16 and 17 relate to a treatment method (PCT Rule 39.1(iv))

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2016/099136

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 101530390 A	16 September 2009	None	
CN 104837482 A	12 August 2015	WO 2014033453 A1	06 March 2014
		CA 2882705 A1	06 March 2014
		AU 2013308245 A1	09 April 2015
		EP 2890365 A1	08 July 2015
		US 2015224054 A1	13 August 2015
		JP 2015530382 A	15 October 2015
		IN 777KOLNP2015 A	25 December 2015
CN 102639129 A	15 August 2012	WO 2011061237 A1	26 May 2011
		CA 2781550 A1	26 May 2011
		EP 2501375 A1	26 September 2012
		US 2012289591 A1	15 November 2012
		US 2015157720 A1	11 June 2015

<p>A. 主题的分类</p> <p>A61K 9/16(2006.01)i; A61P 31/04(2006.01)i; A61P 31/10(2006.01)i; A61K 31/19(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>																	
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>A61K; A61P</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>CPRSABS, EPODOC, WPI, CNKI, CA, MEDLINE, 中国药物专利数据库: 纳米, 颗粒, 脂肪酸, 表面活性剂, 亚麻酸, 月桂酸, 肉豆蔻油酸, 月桂酸单甘油酯, 抗菌, 细菌, 真菌, nanoparticle, fatty acid, surface active agent, linolenic acid, lauric acid, glyceryl laurate ester laurin, antibacterial, germ, fungus</p>																	
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>CN 101530390 A (西安中基高技术产业发展有限公司) 2009年 9月 16日 (2009 - 09 - 16) 全文</td> <td>1-15</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 104837482 A (医学研究委员会) 2015年 8月 12日 (2015 - 08 - 12) 全文</td> <td>1-15</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>马万顺等. "纳米颗粒抗菌机理的研究进展" 生物物理学报, 第26卷, 第8期, 2010年 8月 31日 (2010 - 08 - 31), 第638-648页</td> <td>1-15</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CN 102639129 A (迈克尔. A. 福兰) 2012年 8月 15日 (2012 - 08 - 15) 权利要求1-31</td> <td>1-15</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	A	CN 101530390 A (西安中基高技术产业发展有限公司) 2009年 9月 16日 (2009 - 09 - 16) 全文	1-15	A	CN 104837482 A (医学研究委员会) 2015年 8月 12日 (2015 - 08 - 12) 全文	1-15	A	马万顺等. "纳米颗粒抗菌机理的研究进展" 生物物理学报, 第26卷, 第8期, 2010年 8月 31日 (2010 - 08 - 31), 第638-648页	1-15	X	CN 102639129 A (迈克尔. A. 福兰) 2012年 8月 15日 (2012 - 08 - 15) 权利要求1-31	1-15
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求															
A	CN 101530390 A (西安中基高技术产业发展有限公司) 2009年 9月 16日 (2009 - 09 - 16) 全文	1-15															
A	CN 104837482 A (医学研究委员会) 2015年 8月 12日 (2015 - 08 - 12) 全文	1-15															
A	马万顺等. "纳米颗粒抗菌机理的研究进展" 生物物理学报, 第26卷, 第8期, 2010年 8月 31日 (2010 - 08 - 31), 第638-648页	1-15															
X	CN 102639129 A (迈克尔. A. 福兰) 2012年 8月 15日 (2012 - 08 - 15) 权利要求1-31	1-15															
<p><input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>																	
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)</p> <p>"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p> <p>"T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了解发明之理论或原理的在后文件</p> <p>"X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</p> <p>"Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</p> <p>"&" 同族专利的文件</p>																	
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2016年 12月 13日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2017年 1月 23日</p>															
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>		<p>受权官员</p> <p>楼杜鹃</p> <p>电话号码 (86-10)62411137</p>															

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. 权利要求： 16-17
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
[1] 权利要求16-17涉及治疗方法（PCT细则39.1（iv））

2. 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索， 具体地说：

3. 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2016/099136

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	101530390	A	2009年 9月 16日	无			
CN	104837482	A	2015年 8月 12日	WO	2014033453	A1	2014年 3月 6日
				CA	2882705	A1	2014年 3月 6日
				AU	2013308245	A1	2015年 4月 9日
				EP	2890365	A1	2015年 7月 8日
				US	2015224054	A1	2015年 8月 13日
				JP	2015530382	A	2015年 10月 15日
				IN	777KOLNP2015	A	2015年 12月 25日
CN	102639129	A	2012年 8月 15日	WO	2011061237	A1	2011年 5月 26日
				CA	2781550	A1	2011年 5月 26日
				EP	2501375	A1	2012年 9月 26日
				US	2012289591	A1	2012年 11月 15日
				US	2015157720	A1	2015年 6月 11日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)