

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780012667.1

[51] Int. Cl.

A61K 49/00 (2006.01)

A61K 9/51 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

A61K 47/32 (2006.01)

C08F 220/26 (2006.01)

C08F 220/28 (2006.01)

[43] 公开日 2009 年 8 月 19 日

[11] 公开号 CN 101511392A

[51] Int. Cl. (续)

C08G 65/329 (2006.01)

C08G 65/334 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

[22] 申请日 2007.3.29

[21] 申请号 200780012667.1

[30] 优先权

[32] 2006.4.10 [33] US [31] 11/401,343

[86] 国际申请 PCT/US2007/007580 2007.3.29

[87] 国际公布 WO2008/036117 英 2008.3.27

[85] 进入国家阶段日期 2008.10.8

[71] 申请人 卡尔斯特里姆保健公司

地址 美国纽约州

[72] 发明人 J·W·莱昂 J·W·哈德

T·A·乔 J·R·贝内特

T·H·穆里 G·L·斯拉特

L·戴

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 曹雯 李连涛

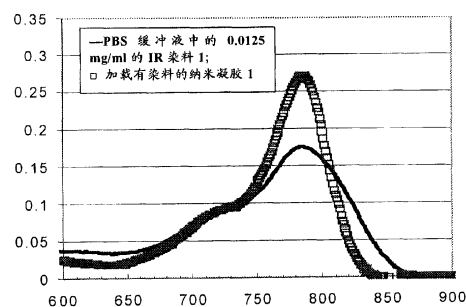
权利要求书 5 页 说明书 27 页 附图 1 页

[54] 发明名称

光学分子成像用纳米凝胶造影剂

[57] 摘要

本发明涉及一种纳米凝胶，其包含重复的、交联的式 I 烯键式不饱和单体的聚合物网络 (X)_m - (Y)_n - (Z)_o 式 I，其中 X 是含有离子或氢键键合部分的水溶性单体；Y 是含有与可聚合的烯键式不饱和基团结合的重复亲水单元的水溶性大分子单体；Z 是多官能交联单体；m 为 50 ~ 90mol%；n 为 2 ~ 30mol%；和 o 为 1 ~ 15mol%。本发明还涉及一种制备纳米凝胶的方法，其包括制备单体 X、Y 和 Z 的混合物和第一部分引发剂在水中的集管组合物，制备第二部分引发剂、表面活性剂和水的反应器组合物；使反应器组合物达到聚合温度；将反应器组合物保持在聚合温度下，在反应器组合物中加入集管组合物，以形成式 I 的纳米凝胶。



1. 一种纳米凝胶, 其包含重复的、交联的式 I 烯键式不饱和单体的水相容性、溶胀的、支化聚合物网络:



式 I

其中: X 是含有离子或氢键键合部分的水溶性单体;

Y 是含有与可聚合的烯键式不饱和基团结合的重复亲水单元的水溶性大分子单体;

Z 是多官能交联单体;

m 为 50~90mol %;

n 为 2~30mol %; 和

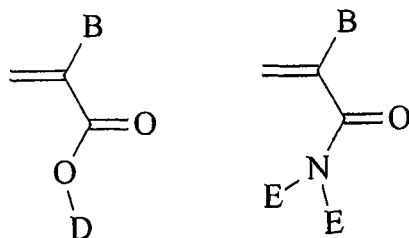
o 为 1~15mol %。

2. 如权利要求 1 所述的纳米凝胶, 其中 m 为 60~80mol %, n 为 10~20mol %, o 为 2~9mol %。

3. 如权利要求 1 所述的纳米凝胶, 其中 X 是含有离子或含可交换质子的部分的水溶性单体。

4. 如权利要求 1 所述的纳米凝胶, 其中 X 包含选自以下的至少一种: 醇、伯胺及仲胺、伯酰胺、仲酰胺、羧酸、氨基甲酸酯、酰亚胺、脲、膦酸、磺酸、亚磺酸和含有杂原子 (N、S、O、P)-氢键的任何其它单元。

5. 如权利要求 1 所述的纳米凝胶, 其中 X 由式 II 或式 III 表示:



式 II 或 式 III

其中: B 为 H 或 CH₃;

D 为 H、具有氢键键合部分并含有不多于三个碳原子的非离子单元、或含有至多六个碳原子的离子单元; 和

E 为 H 或 CH₃。

6. 如权利要求 1 所述的纳米凝胶, 其中 X 为甲基丙烯酸、丙烯酸、丙烯酰胺、甲基丙烯酰胺、氯丙基甲基丙烯酰胺盐酸盐、磺丙基甲基丙烯酸酯、丙烯酸

羟乙酯或甲基丙烯酸羟乙酯、N-甲基丙烯酰胺或N,N-二甲基丙烯酰胺。

7. 如权利要求1所述的纳米凝胶, 其中X为甲基丙烯酸x-羟乙酯或甲基丙烯酸。

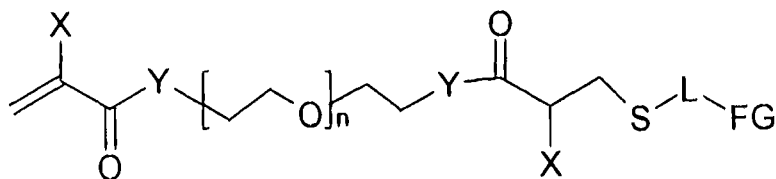
8. 如权利要求1所述的纳米凝胶, 其中X的logP计算值为0.4或更小。

9. 如权利要求1所述的纳米凝胶, 其中Y是分子量为200~20,000的水溶性大分子单体, 并包含水溶性重复单元。

10. 如权利要求1所述的纳米凝胶, 其中水溶性大分子单体Y为聚乙二醇大分子单体。

11. 如权利要求10所述的纳米凝胶, 其中Y选自聚乙二醇丙烯酸酯、聚乙二醇甲基丙烯酸酯、N-聚乙二醇丙烯酰胺、N-聚乙二醇甲基丙烯酰胺和含有苯乙烯末端的聚乙二醇大分子单体。

12. 如权利要求1所述的纳米凝胶, 其中Y是根据式I的聚乙二醇大分子单体主链, 在所述大分子单体主链的一端具有可自由基聚合的基团, 在所述大分子单体主链的另一端具有不同的反应性化学官能团:



式 I

其中X是CH₃、CN或H;

Y是O、NR₁或S;

L是连接基团或间隔基;

FG是除烷氧基硅烷以外的官能团;

n大于4且小于1000; 以及

其中R₁和R₂独立地选自取代或未取代的烷基、芳基或杂酰基。

13. 如权利要求1所述的纳米凝胶, 其中Z为亚甲基双丙烯酰胺、N,N'-(1,2-二羟乙烯)二丙烯酰胺、亚甲基二甲基丙烯酰胺、二乙烯基苯或二甲基丙烯酸乙二醇酯。

14. 如权利要求1所述的纳米凝胶, 其中Z为双官能团的、三官能团的或四官能团的, 分子量小于300道尔顿。

15. 如权利要求1所述的纳米凝胶, 其中X、Y和Z的总量的至少90%是高度亲水性或水溶性的。

16. 如权利要求 1 所述的纳米凝胶, 其中通过准弹性光散射在磷酸缓冲盐水中(137 mM NaCl、2.7 mM KCl、10 mM Na₂HPO₄、2 mM KH₂PO₄, pH 7.4)测定的所述纳米凝胶的体积中值流体力学直径为 10~50。

17. 如权利要求 1 所述的纳米凝胶, 其中通过静态光散射或尺寸排阻色谱测得的所述纳米凝胶的重均分子量为 15,000~6,000,000。

18. 如权利要求 1 所述的纳米凝胶, 其中所述纳米凝胶的重均聚合度为 50~86,000。

19. 如权利要求 1 所述的纳米凝胶, 其中所述纳米凝胶在水中的 ϕ_2 参数为 0.01~0.30。

20. 如权利要求 1 所述的纳米凝胶, 其中所述纳米凝胶在 1.5M NaCl 中稳定。

21. 如权利要求 1 所述的纳米凝胶, 其中所述纳米凝胶的特性粘数为 0.40 dL/g~0.85 dL/g。

22. 如权利要求 1 所述的纳米凝胶, 其中所述纳米凝胶的流体力学直径在温度从 25°C 升到 80°C 时发生净增加。

23. 如权利要求 1 所述的纳米凝胶, 其中所述纳米凝胶的聚合度为 20~1500。

24. 如权利要求 1 所述的纳米凝胶, 其中所述纳米凝胶的退溶胀比为 0.02~0.2。

25. 如权利要求 1 所述的纳米凝胶, 其中所述纳米凝胶对于牛血清白蛋白(BSA)而言是基本不吸附血清蛋白的。

26. 如权利要求 1 所述的纳米凝胶, 其中所述纳米凝胶进一步包含至少一种与所述纳米凝胶结合的被载化合物。

27. 如权利要求 26 所述的纳米凝胶, 其中所述至少一种与所述纳米凝胶结合的被载化合物为生物化合物、药物化合物或诊断化合物。

28. 如权利要求 26 所述的纳米凝胶, 其中所述至少一种与所述纳米凝胶结合的被载化合物是非共价结合的。

29. 如权利要求 26 所述的纳米凝胶, 其中所述至少一种与所述纳米凝胶结合的被载化合物是共价结合的。

30. 如权利要求 29 所述的纳米凝胶, 其中所述共价结合是与 X、Y 或 Z 形成的, 并在纳米凝胶的制备过程中直接聚合入纳米凝胶中。

31. 如权利要求 26 所述的纳米凝胶, 其中所述至少一种与所述纳米凝胶结合的被载化合物为染料。

32. 如权利要求 26 所述的纳米凝胶, 其中所述至少一种与所述纳米凝胶结合

的被载化合物为染料和靶向部分。

33. 一种制备纳米凝胶的方法，其包括：

a. 制备单体 X、Y 和 Z 的混合物与第一部分引发剂在水中的集管组合物，其中 X 是含有离子或氢键键合部分的水溶性单体，Y 是含有与可聚合的烯键式不饱和基团结合的重复亲水单元的水溶性大分子单体，Z 是多官能交联单体；

b. 制备第二部分引发剂、表面活性剂和水的反应器组合物，所述水所足以提供 1~10 % w/w 单体 X、Y 和 Z 的组合物；

c. 使所述反应器组合物处于聚合温度；

d. 在反应期间将所述反应器组合物保持在所述聚合温度下；和

e. 经一段时间将所述集管组合物加入到所述反应器组合物中，以形成反应混合物；

其中，所述纳米凝胶包含重复的、交联的式 I 烯键式不饱和单体的水相容性、溶胀的、支化聚合物网络：



式 I

其中：m 为 50~90mol %；

n 为 2~30mol %；

o 为 1~15mol %。

34. 如权利要求 33 所述的方法，其中所述单体 X、Y 和 Z 的混合物包含 50~90mol % X，2~30mol % Y 和 1~20mol % Z。

35. 如权利要求 33 所述的方法，其中所述引发剂为水溶性聚合引发剂。

36. 如权利要求 35 所述的方法，其中所述水溶性聚合引发剂为水溶性偶氮引发剂。

37. 如权利要求 33 所述的方法，其中所述引发剂为氧化还原引发剂。

38. 如权利要求 33 所述的方法，其中所述引发剂为双组分引发剂，其中所述双组分引发剂的一种组分包含在所述集管组合物中，所述双组分引发剂的另一种组分包含在所述反应器组合物中，从而当所述集管组合物和反应器组合物混合时稳定地产生自由基。

39. 如权利要求 33 所述的方法，其中所述引发剂为水溶性光引发剂。

40. 如权利要求 33 所述的方法，其中用于将所述集管组合物加入到所述反应器组合物中的所述时间为 30~1440 分钟。

41. 如权利要求 33 所述的方法, 其中以充分定时的加入速率将所述集管组合物加入到所述反应器组合物中, 以使当所述加入完成时单体总量的至少 80% 已反应。

42. 如权利要求 33 所述的方法, 其中所述集管组合物进一步包含表面活性剂。

43. 如权利要求 33 所述的方法, 其中进一步包括对所述反应混合物加热至多 48 小时。

44. 如权利要求 33 所述的方法, 其进一步包括通过渗析、超滤、渗滤或者用离子交换树脂处理来纯化所述的反应混合物。

45. 如权利要求 33 所述的方法, 其进一步包括将所述集管组合物和所述反应器组合物脱气以除去氧气。

46. 如权利要求 45 所述的方法, 其中通过用氮气或氩气或其它合适的惰性气体对内容物充气, 或者通过使内容物经过冷冻-抽吸-解冻的循环然后将内容物用氮气或氩气保护来进行所述脱气。

光学分子成像用纳米凝胶造影剂

发明领域

本发明涉及用于红外医学成像的可注射诊断试剂。

发明背景

近来,人们的强烈兴趣已集中在开发能在生命系统内运载和释放生物、药物或诊断成分的纳米粒子体系。这些体系典型包括与纳米粒子载体连接或包含在纳米粒子载体中的药物、治疗剂、诊断剂、生物相容功能剂、造影剂和靶向部分。这个领域研究的研究目标是提供具有诸如更长的循环寿命,更高的特异性,更低的毒性和更好的治疗效力等显著优点的成像剂和治疗剂。纳米粒子组装领域的研究有望在癌症和其它危及生命的疾病治疗方面取得重大改进,并有可能革新其临床诊断和治疗。

最近将某些纳米粒子提议作为某些药物的载体。参见例如, Sharma 等, *Oncology Research* 8, 281 (1996); Zobel 等, *Antisense Nucl. Acid Drug Dev.*, 7:483 (1997); de Verdiere 等, *Br. J. Cancer* 76, 198 (1997); Hussein 等, *Pharm. Res.*, 14, 613 (1997); Alyautdin 等, *Pharm. Res.* 14, 325 (1997); Hrkach 等, *Biomaterials*, 18, 27 (1997); Torchilin, *J. Microencapsulation* 15, 1 (1988); 以及它们的引用文献。纳米粒子化学提供广谱的刚性聚合物结构,其适用于药物的包封,药物传递和控制释放。这些载体的一些主要问题包括聚集、生理条件下的胶体不稳定性、低荷载能力、药物释放动力学的受限控制以及合成制备冗长且产物的产率非常低。

纳米粒子组装体的尺寸是决定它们在生物成分中的有用性的一个重要参数。在体内施用后,大颗粒被网状内皮系统除去,不能容易地被运输到疾病位点(参见例如, Volkheimer, *Pathologie* 14:247 (1993); Kwon 和 Kataoka, *Adv. Drug Del. Rev.* 16:295 (1995)。Moghimi 等, (Moghimi, S. M.; Hunter, A. C.; Murray, J. C. "Nanomedicine: Current Status and Future Prospects." *FASEB Journal* 2005, 19, 311-330) 报道大于 100nm 的颗粒容易被间质巨噬细胞清除,而 150nm 或更大的颗粒容易在肝脏内聚集。大颗粒在细胞中的运输和细胞内的递送也是有限的,或者没有意义。参见例如, Labhasetwar 等, *Adv. Drug Del. Res.* 24:63 (1997)。已证明,大小为 500nm 到大于 1 微米的聚集阳离子种类 (aggregated cationic species)

在细胞转染中是无效的。大颗粒（尤其是带正电荷的大颗粒）在身体中表现出高毒性，这部分是由于它们对肝脏和栓塞的不良作用。参见例如，Volkheimer, Pathologie 14:247 (1993); Khopade 等, Pharmazie 51:558 (1996); Yamashita 等, Vet. Hum. Toxicol, 39:71 (1997)。

已发现某些特定的凝胶是无毒的，且能够进入身体中的小毛细血管，在体内被运输到疾病位点，穿过生物屏障（包括但不限于血-脑屏障和肠上皮），吸收进入细胞胞吞小泡，穿过细胞膜并运输到细胞内的靶位点。相对于更大尺寸的微粒，据信该尺寸范围内的颗粒能够被更有效地转移通过动脉壁，参见 Labhasetwar 等, Adv. Drug Del. Res. 24:63 (1997)。不希望受任何具体理论的束缚，还认为由于高的表面积-体积比，小尺寸对于使用靶向分子成功靶向这些颗粒是必要的。另外，当纳米凝胶占据大部分是水的流体动力球（hydrodynamic sphere）时，它们以比固体颗粒更高的加载水平被感兴趣部分（生物靶向部分、染料等）功能化。

还相信，保持优选范围内的粒度分布和彻底清除较大颗粒对于纳米凝胶的有效性和安全是必需的。公认的是，纳米凝胶的有用性能仅由其尺寸和结构决定，而不依赖于所使用的制备方法。

由于纳米凝胶的独特结构，它们结合了交联聚合物凝胶和分散胶体颗粒的性能。它们可以很高的生物制剂/聚合物网络比率加载各种生物制剂，包括小分子和聚合物。生物制剂固定在纳米凝胶的整个网络体积内而不是它的表面，在特定条件下，纳米凝胶网络的微型凹陷（microcollapse）可一起发挥另外的掩蔽和保护生物制剂的作用。已鉴定，纳米凝胶在体内聚集会阻碍此类体系的应用。（参见 Sun, X.; Rossin, R.; Turner, J. L.; Becker, M. L.; Joralemon, M. J.; Welch, M. J.; Wooley, K. L. “An Assessment of the Effects of Shell Cross-Linked Nanoparticle Size, Core Composition, and Surface PEGylation on in Vivo Biodistribution” *Biomacromolecules* 2005, 6, 2541-2554.）

US 5,078,994 公开了通过乳液聚合制备的共聚物微粒，其衍生自以下单体：至少约 5 重量%的含游离羧酸基的乙烯基单体、其上附加有聚亚烷基氧的单体、亲油单体和其它非离子亲水单体。公开了包含这些共聚物的微凝胶，其水溶胀中值粒径为约 0.01~约 1.0 微米。公开了药物和诊断组合物，其包含治疗剂或诊断剂和微凝胶，所述微凝胶包含衍生自以下单体的共聚物：至少约 5 重量%的含非酯化羧酸基的乙烯基单体、亲油单体和其它非离子亲水单体。条件是当微凝胶的水溶胀中值粒径大于等于 0.1 微米时，至少 5 重量%的单体附加有聚亚烷基氧。还

公开了诊断和治疗方法，其中微凝胶基本不吸附蛋白质（protein non-adsorbent）并且几乎难于被吞噬作用吞噬（refractory to phagocytosis）。然而，这些颗粒含有大部分的疏水单体且聚乙二醇化程度低，因此其胶体稳定性和生物相容性较差。

US 2003/0211158 公开了新的微凝胶、微粒（尺寸一般为 0.1~10 微米）以及能将有用作疫苗或治疗剂的生物活性物质传递到细胞的相关聚合物材料。使用交联剂分子制备该材料，所述交联剂分子含有在弱酸条件下可裂解的键。交联剂分子例举为二丙烯酰缩醛交联剂。这些新材料有共同的特性，即能够在细胞的内体或溶酶体腔室中通常存在的条件下发生酸解降解，从而在细胞内释放其有效载荷。这些材料也可以用于传递治疗剂至肿瘤的酸性区域和发炎位置。然而，这些颗粒的尺寸范围大得足以被网状内皮系统摄取，这将带来问题。另外，聚乙二醇化程度低以及在体内结块也是一个问题（参见 Kwon, Y. J.; Standley, S. M.; Goh, S. L.; Frechet, J. M. J. *Journal of Controlled Release* 2005, 105, 199-212）。

US 6,333,051 公开了共聚物网络，其具有至少一种交联聚胺聚合物片段和至少一种非离子水溶性聚合物片段，以及公开了它们的组合物，其具有至少一种适当的生物制剂。该发明涉及聚合物技术，尤其是具有至少一种交联聚胺聚合物片段和至少一种非离子水溶性聚合物片段的聚合物网络，及其组合物。然而，这些纳米凝胶与本发明的纳米凝胶不同，它们并不基于烯键式不饱和主链。另外，这些纳米凝胶的制备冗长，而且只能得到少量产品。

The Journal of the American Chemical Society 124(51): 15198-15207 (“Polymeric Nanogels Produced via Inverse Microemulsion Polymerization as potential Gene and Antisense Delivery Agents”)描述了具有季胺官能团和 PEGDA 交联剂的交联丙烯酸酯纳米凝胶。此纳米凝胶的尺寸约为 40~200nm。然而，这些纳米凝胶不包含足够的聚乙二醇化，并且制备冗长，只能得到少量产品。

US 5,874,111 公开了高度单分散的聚合物亲水纳米凝胶的制备，所述纳米凝胶的尺寸至多 100nm，能将药物包封其中。该方法包括将单体水溶液或预聚物反胶束、交联剂、引发剂以及任选的药物或者靶物质的混合物进行聚合。通过脱除溶剂干燥聚合反应产物，得到干燥的纳米颗粒和用于反胶束制备过程中的表面活性剂。将干物质分散于水性缓冲液中，由此除去表面活性剂和其它有毒物质。该发明涉及制备高度单分散的聚合物亲水纳米颗粒的制备方法，所述纳米颗粒具有或没有包封其中的靶分子，尺寸高达 100nm 并且具有高度单分散性。此外，这些颗粒没有足够的聚乙二醇化以提供生物相容性，并且制备冗长。

很多作者已经描述了制备表面改性颗粒的稳定分散体的困难。在生理条件下 (pH 7.4 和 137 mM NaCl) 达到稳定甚至更困难。Burke 和 Barret (Langmuir, 19, 3297(2003))描述了使含胺的聚电解质、聚烯丙胺盐酸盐在盐的存在下吸附到 70~100nm 的二氧化硅颗粒上。该作者指出 (P.3299) “溶液中 NaCl 的浓度保持在 1.0mM, 因为更高的盐浓度会导致悬浮液产生絮凝”。

Siiman 等在 U.S. 5,248,772 中描述了胶体金属颗粒的制备, 所述胶体金属颗粒具有连接有侧基胺基的交联氨基葡聚糖涂层。以 0.24 重量%的很低固体浓度制得该胶体, 没有说明颗粒的最终尺寸, 也没有指明直接与胶体表面结合的氨基葡聚糖的分数。由于实施例 2 中壳物质的重量 (0.463g) 与核物质的重量 (0.021g) 的比率大约为 21:1, 看起来可能只有很小一部分的氨基葡聚糖与胶体的表面结合, 而绝大部分游离存在于溶液中。问题在于这会导致颗粒表面上的活性胺基数量很少, 从而胶体中的载体颗粒运载有用的生物成分, 药物成分或者诊断成分的能力很低。另一个问题在于未吸附到颗粒表面的聚合物可以干扰生物成分、药物成分或者诊断成分的后续结合或偶联。然而, 该参考文献描述了具有生物相容性涂层的固体金属颗粒, 该涂层与本发明的亲水纳米凝胶有本质的区别。

US 6,207,134 B1 描述了微粒诊断造影剂, 其包含磁性或超磁性金属氧化物和聚离子涂层剂。该涂层剂包括“可生理耐受的聚合物”, 其包括含胺聚合物。据说, 该造影剂“相对于常见颗粒, 稳定性和毒性都有改进”(第 6 栏, 第 11-13 行)。作者指出 (第 4 栏, 第 15-16 行) “不是所有的涂层剂都被沉积下来, 可能需要用 1.5~7, 一般大约两倍过量的...”涂层剂。作者进一步说明只有很少一部分聚合物吸附于颗粒。例如‘134 的图 1 中, 加入的 0.5mg/mL 聚合物只有大约 0.15mg/mL (或约 30%) 吸附。通过常规方法制备‘134 的表面改性颗粒, 所述方法涉及简单的混合、超声处理、离心和过滤。此外, 该文献描述了聚合物涂覆的固体金属颗粒, 其与本发明的亲水纳米凝胶有本质的区别。

要解决的问题

希望制备用作用于生物偶联 (bioconjugation) 和靶向给药的载体的纳米凝胶, 所述纳米凝胶是稳定的从而可进行体内注射, 特别是血管内注射。另外, 希望所述用作载体的纳米凝胶在生理条件下 (pH 7.4 和 137 mM NaCl) 稳定。此外, 希望所述颗粒能避免免疫系统的检测。希望使未吸附于纳米凝胶的聚合物的量达到最少。另外, 光学分子成像需要纳米凝胶探头, 其尺寸小于 100nm, 耐蛋白质吸附, 具有便于连接的部分, 用于与生物靶向单元连接, 且含有能在红外线 (IR)

中发射的发射染料。

发明概述

本发明一种纳米凝胶，其包含重复的、交联的式 I 烯键式不饱和单体的水相容性、溶胀的、支化聚合物网络：



式 I

其中 X 是含有离子或氢键键合部分的水溶性单体；Y 是含有与可聚合的烯键式不饱和基团结合的重复亲水单元的水溶性大分子单体；Z 是多官能 (multifunctional) 交联单体；m 为 50~90mol%；n 为 2~30mol%；和 o 为 1~15mol%。本发明还涉及制备纳米凝胶的方法，其包括制备单体 X、Y 和 Z 的混合物和第一部分引发剂在水中的集管 (header) 组合物，其中 X 是含有离子或氢键键合部分的水溶性单体，Y 是含有与可聚合的烯键式不饱和基团结合的重复亲水单元的水溶性大分子单体，Z 是多官能交联单体；制备第二部分引发剂、表面活性剂和水的反应器 (reactor) 组合物，所述水足以提供 1~10% w/w 单体 X、Y 和 Z 的组合物；使反应器组合物达到聚合温度；反应期间使反应器组合物保持在聚合温度下，经一段时间 (over time) 将集管组合物加入到反应器组合物中，以形成反应混合物，式 I 的纳米凝胶。其中纳米凝胶包含重复的、交联的式 I 烯键式不饱和单体的水相容性、溶胀的、支化聚合物网络：



式 I

其中 m 为 50~90mol%；n 为 2~30mol%；和 o 为 1~15mol%。

发明的有益效果

本发明包括数个优点，但并不是所有优点都包括在一个单独的实施方式中。本发明的材料提供了高染料加载水平的媒质，所述材料在宽范围条件下是稳定的，容易制备，显示出高的生物相容性。

附图简要说明

图 1 示出了示例的加载有染料的纳米凝胶 1 和 PBS 缓冲液中的 0.0125mg/ml 染料 1 的归一化吸收光谱。

发明详述

本发明涉及一种纳米凝胶，其包含特定通式的重复的、交联的烯键式不饱和

单体的水相容性、溶胀的、支化聚合物网络。

已发现某些特定的凝胶是无毒的，且能够进入身体中的小毛细管，在体内被运输到疾病位点，穿过生物屏障（包括但不限于血-脑屏障和肠上皮），吸收进入细胞胞吞小泡，穿过细胞膜并运输到细胞内的靶位点。相对于更大尺寸的微粒，据信该尺寸范围内的颗粒能够被更有效地转移通过动脉壁，参见 Labhasetwar 等, *Adv. Drug Del. Res.* 24:63 (1997)。不希望受任何具体理论的束缚，还认为由于高的表面积-体积比，小尺寸对于使用靶向分子成功靶向这些颗粒是必要的。另外，当纳米凝胶占据绝大部分是水的流体动力球时，它们以比固体颗粒更高的加载水平被感兴趣部分（生物靶向部分、染料等）功能化。

还相信，保持优选范围内的粒度分布和彻底清除较大颗粒对于纳米凝胶的有效性和安全是必需的。公认的是，纳米凝胶的有用性能仅由其尺寸和结构决定，而不依赖于所使用的制备方法。因此，本发明不受某些合成或纯化操作的限制，而是涵盖了生物制剂组合物中有用的新化学个体。

本发明的纳米凝胶在宽范围的生理和实验条件下是可溶的，高度稳定的且不发生聚集。纳米凝胶的荷载能力可高达几克或者几十克/克聚合物网络。这比纳米粒子所达到的荷载能力高得多。参见 Labhasetwar 等, *Adv. Drug Del. Res.*, 24:63 (1997)。与常规的药物传递粒子（例如固体纳米粒子（通常必须在生物制剂存在下制备））不同，可在网络合成后，将生物制剂加载聚合物网络。这大大简化了本发明的生物制剂组合物的制备和使用，允许使用含许多不同的生物制剂和组合物的多批纳米凝胶。

说明书中使用的术语应具有以下含义：

术语“纳米凝胶”是指溶胀的、相邻的（contiguous）交联聚合物网络，尺寸为 5~100 纳米，通过它可以追踪任何两个原子（不包括抗衡离子）之间的通过键途径（through-bond path）。

术语纳米粒子或纳米微粒是指尺寸小于 100nm 的颗粒。

术语“胶体”是指分散在液体（例如水）中的小颗粒的混合物。

术语“生物相容性”是指组合物不会破坏引入其的生物系统的正常功能。典型地，生物相容性组合物将会与血液相容，而不会在身体中引起不良作用。例如，作为生物相容性物质，其应是无毒的、无免疫原性的或不形成血栓的。

术语“生物可降解的”是指材料可在生理条件下可被酶促降解或水解降解成能够通过正常过程从体内排除的较小分子。

术语“刷状聚合物”是指具有相对均匀的大分子“臂”的聚合物，每个臂的分子量为 400 道尔顿或更大，从相邻的（contiguous）聚合主链伸出（eminate），其中所述臂仅在其两个可能的端部中的一端各自与主链连接，所述臂沿主链的分布是相对均匀的。

术语“溶胀”是指溶剂化状态，其中聚合物与溶剂分子结合而不是彼此结合，从而扩大了单个聚合物分子所占据的总体积。

术语“水相容性”是指材料在温度为 5~80℃的水中以溶胀状态存在。

纳米凝胶是稳定的溶液或分散体。如果通常在几个小时优选几周到几个月的时间内，固体颗粒没有聚集（由粒度测量确定）并从分散体中沉淀出来，就认为分散体是稳定的。描述不稳定性的术语包括聚集、结块、絮凝、胶凝和沉降。在其制备的一天内，平均粒径显著增长到直径大于核直径的约 3 倍，并且分散体有可见的沉淀，表明分散体不稳定。优选纳米凝胶于 20~35℃在 0.137M NaCl（pH 7.4）中是稳定的。最优选纳米凝胶在 0.8M NaCl 中是稳定的。

本发明的纳米凝胶基本上不吸附血清蛋白。对于体内应用，令人合意的是，纳米颗粒具有长的循环寿命。血清蛋白实体吸附在纳米颗粒表面上（调理作用）常常会妨碍它们从循环中的去除，通常通过被巨噬细胞或者单核细胞摄取来实现这种去除。即使没有将它们从循环中去除的情况下，蛋白质与纳米颗粒表面的非特异性结合也会污染表面，并遮蔽所需官能团，例如生物靶向部分。血清蛋白的例子包括免疫球蛋白的各种亚类、补体蛋白、载脂蛋白、血管性血友病（van Willebrand）因子、血小板反应蛋白、纤连蛋白、甘露糖结合蛋白和血浆蛋白（例如血清白蛋白）。就本发明而言，如果纳米凝胶不吸附牛血清白蛋白（BSA）（一种典型的血清蛋白），那么可以认为其基本上不吸附血清蛋白。可通过结合纳米凝胶与 BSA，并在 PBS 缓冲液中实施尺寸排阻色谱来测试该性能。如果纳米凝胶不吸附 BSA，那么 BSA 的保留体积将与 BSA 本身的体积没有差别，整个色谱曲线的形状将与单个成分（BSA 和纳米凝胶）的色谱曲线的形状的组合一样。

优选的实施方案中，纳米凝胶是由水相容性、溶胀的、支化聚合物或大分子单体制成，其中大分子单体是指重复的、交联的式 I 烯键式不饱和单体的大分子单体：



式 I

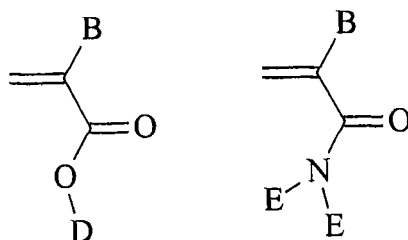
式 I 中，X 是高度亲水的单体，其含有离子部分或含可交换质子的部分；Y 是水

溶性的大分子单体,其含有与可聚合的烯键式不饱和基团结合的重复的亲水单元; Z 是多功能的交联单体。含可交换质子的部分可包括醇、伯胺及仲胺、伯酰胺、仲酰胺、羧酸、氨基甲酸酯、酰亚胺、脲、膦酸、磺酸、亚磺酸或含有杂原子(N、S、O、P)-氢键的任何其它单元。

“高度亲水的单体”定义为 $\log P$ 计算值小于等于 0.4。 $\log P$ 值是指化合物的辛醇-水分配系数的对数。化合物的辛醇/水分配系数(P)指平衡状态下,溶解于辛醇相中的物质的量除以水相中的浓度所得到的比值。 $\log P$ 经常用来描述分子倾向油(辛醇)或水相的相对趋势(参见 Leo and Hansch, "Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology," Wiley, New York, 1979, and in Leo, Hansch, and Elkins, *Chem. Rev.*, 6, 525, (1971))。它是分子疏水或亲水程度的量度。测量单体的分配系数会有难度;但是,已开发了从化合物分子结构计算 $\log P$ 的方法。例如由 SYRACUSE RESEARCH CORPORATION (Environmental Science Center, 6225 Running Ridge Road, North Syracuse, N.Y. 13212-2510) 开发的 KOWWIN© 程序 1.6 版本就是这样的程序。

本发明中, m 可以是 50~90mol%, 优选 60~80mol%。此外, n 可以是 2~30mol%, 优选 10~20mol%, o 可以是 1~15mol%, 优选 2~9mol%。

X 是含有离子或含可交换质子的部分的水溶性单体。特别有用的高度亲水的“X”单体可用下式描述



其中 B 是 H 或 CH_3 , D 可分别是 H、具有氢键键合部分并含有不多于三个碳原子的非离子单元、或含有至多六个碳原子的离子单元。E 可具有 B 的组成,除了 E 另外可以是 CH_3 。X 可以是但不一定限于甲基丙烯酸、丙烯酸、丙烯酰胺、甲基丙烯酰胺、氯丙基甲基丙烯酰胺盐酸盐、甲基丙烯酸磺基丙酯(sulfopropyl methacrylate)、丙烯酸羟乙酯或甲基丙烯酸羟乙酯、N-甲基丙烯酰胺或 N,N-二甲基丙烯酰胺。

Y 是水溶性大分子单体,分子量为 200~20,000,优选为 400~10,000,包含重复的水溶性单元。Y 优选是聚乙二醇大分子单体,例如聚乙二醇丙烯酸酯、聚乙二醇甲基丙烯酸酯、N-聚乙二醇丙烯酰胺、N-聚乙二醇甲基丙烯酰胺或具有苯乙

烯末端的聚乙二醇大分子单体。

交联单体 Z 可以是高度亲水的或者可溶于有机溶剂 (organic-soluble) 的交联剂, 例如亚甲基双丙烯酰胺、N,N'-(1,2-二羟乙烯)二丙烯酰胺、亚甲基二甲基丙烯酰胺二乙烯基苯、乙二醇二甲基丙烯酸酯。该交联单体优选是双官能团的 (difunctional)、三官能团的或四官能团的, 分子量小于 300 道尔顿。单体总量的至少 90% 应该是高度亲水或者水溶性单体。剩余的 10% 可包含可溶于有机溶剂或者非高度亲水的单体。

纳米凝胶的粒度可以通过很多方法或者多种方法的组合来表征, 所述方法包括光散射法、沉降法 (例如分析超速离心法)、水动力分离法 (例如场流分级法) 和尺寸排阻色谱法, 以及电子显微镜法。实施例中的纳米凝胶主要用光散射法来表征。可以用光散射法获得有关纳米凝胶的体积中值粒径、粒径、数量和体积分布、分布的标准偏差和分布宽度的信息。

纳米凝胶的体积平均流体力学体积中值直径可以在 10~100nm, 优选为 10~50nm, 在磷酸盐缓冲盐水 (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 2mM KH₂PO₄, pH 7.4) 中进行准弹性光散射测得。流体力学直径指由准弹性光散射法测定的聚合物和与它结合的溶剂的等效球体 (equivalent sphere) 的直径。

纳米凝胶的重均分子量也可以为 15,000~6,000,000, 优选为 80,000~800,000, 最优选为 100,000~400,000, 重均分子量由静态光散射法或尺寸排阻色谱法测得。纳米凝胶的重均平均聚合度可以是 50~86,000, 优选为 100~1500。该聚合度可由重均分子量、组分单体的分子量和摩尔分数计算得到。组分单体的摩尔分数可以由制备纳米凝胶的配方确定, 或通过其它合适的确定聚合物组成的分析方法 (NMR, 滴定法等) 确定。纳米凝胶在水中的 ϕ_2 参数可为 0.01~0.30, 优选为 0.02~0.20。该参数是流体动力球中纳米凝胶的密度的量度。其通过如下方程式计算:

$$\phi_2 = \frac{M_w}{N_A} \left(\frac{4}{3} \pi R_h^3 \right)^{-1}$$

其中 M_w 是由静态光散射法或尺寸排阻色谱法测得的重均分子量, R_h 是由准弹性光散射法或其它合适的方法测得的流体动力半径, N_A 是阿伏加德罗常数。

在 1,1,1,2,2,2-六氟-2-丙醇 (HFIP) 中测得的特性粘数为 0.40 dL/g~0.85 dL/g。特性粘数是聚合物在无限稀释的溶液中的粘度。它可以由毛细管粘度法测得, 例如在 Principles of Colloid and Surface Chemistry (Paul C. Heimenz and Raj Rajahgopalan, Marcel Dekker Inc, New York 1997) 或者 Colloidal Systems and

Interfaces (Sydney Ross and Ian Morrison, John Wiley and Sons, New York, 1988) 中描述的方法。

由于可在宽范围的化学条件下使用纳米凝胶，因此在升高温度下纳米凝胶不发生尺寸急剧缩小是有利的。许多已知的纳米凝胶和微凝胶材料在升高温度时会发生明显的形态变化，其中材料坍塌，有时发生剧烈的体积变化。这样的转变在药物递送和成像应用中是不利的，因为这种显著的形态变化可扰乱纳米凝胶组合物的有效载荷、形态以及表面基团的配置或造成重排。当这种转变在生理温度或接近生理温度下发生时尤其不利。因此本发明的纳米凝胶在温度从 25℃ 升至 80℃ 时，其流体动力直径会显示小的变化 (<25%) 或者净增加。

本发明的纳米凝胶可以用作运载生物、药物或诊断成分的载体。具体地，用作载体的纳米凝胶不需要将具体治疗剂或成像成分包裹起来，而是作为生物、药物或诊断成分的载体。生物、药物或诊断成分例如治疗剂、诊断剂、染料或者放射照像造影剂。术语“诊断剂”包括可作为造影剂从而在宿主哺乳动物中产生可检测的指示信号的成分。可检测的指示信号可以是 γ 射线发射的、放射性的、回声的、荧光镜的或生理学的信号等等。本文所用的术语“生物医药剂”包括有效治疗生理病症的生物活性物质、药品、酶、激素、类固醇、重组产物等等。治疗剂的例子为抗生素、溶血栓酶（例如尿激酶或链激酶）、胰岛素、生长激素、化学治疗剂（例如阿霉素）和抗病毒剂（例如干扰素和阿昔洛韦）。一经酶降解（例如用蛋白酶或水解酶降解），治疗剂可以在一段时间内被释放。

包含本发明聚合物网络和合适的靶向分子的组合物也在本发明的范围内。本文所用的术语“靶向分子”指连接于本发明聚合物网络以增强结合、运输、堆积、停留时间、生物利用度或修饰聚合物网络的生物活性或使本发明组合物在体内或细胞中表现出生物活性的任何分子、原子或离子。靶向分子将时常包含通常对某特定细胞表面抗原具有特异性的抗体、抗体片断或嵌合抗体分子。其也可以是，例如，与细胞表面受体有特定相互作用的激素，或者具有细胞表面受体的药物。例如，糖酯类可以靶向多糖受体。它也可以是，例如酶、外源凝集素和多糖。低分子质量 (mass) 配体，例如叶酸及其衍生物也可用于本发明的上下文。靶向分子也可以是多核苷酸、多肽、肽模拟物、包括多糖的碳水化合物、其衍生物或通过组合化学和生物学方法得到的其他化学实体。靶向分子可用于促进本发明的纳米凝胶的胞内运输，例如使用诸如促融肽（已由 Soukchareun 等在 Bioconjugate Chem., 6, 43, (1995) 中或 Arar 等在 Bioconjugate Chem., 6, 43 (1995) 中描述）、

核型 (caryotypic) 肽或提供向细胞内定点运输 (尤其, 从内涵体腔室排出到细胞质, 或传送到细胞核) 的其它生物特异性基团作为靶向分子运输到细胞核。

上述组合物可以进一步包含具有可以识别特定靶细胞的靶向部分的生物、药物或诊断成分。上述组合物的一个特征可以通过与上述用作载体的纳米凝胶结合的靶向分子识别和结合细胞表面受体。就本发明目的而言, 被纳米凝胶运载的化合物可以称为“被载”化合物。例如, 上述包含识别特定靶细胞的靶向分子的生物、药物或诊断成分是“被载”化合物。该特征利用这样的理解: 细胞表面结合事件通常是细胞级联的起始步骤, 细胞级联引起一系列事件, 特别是受体介导的内吞。术语“受体介导的内吞”(“RME”)一般描述通过将配体结合到位于细胞表面的受体上而催化受体结合的配体被内化入细胞的机制。许多蛋白质和其它结构通过受体介导的内吞进入细胞, 包括胰岛素、表皮生长因子、生长激素、甲状腺刺激激素、神经生长因子、降血钙素、胰高血糖素等等。

受体介导的内吞提供了一种将可能含有其它生物、药物或诊断成分的所述纳米凝胶运输到细胞内部的便利机制。在 RME 中, 配体与位于细胞表面上的受体的结合可引发细胞内信号, 所述细胞内信号可包括内吞反应。这样, 用作载体的、结合有靶向部分的纳米凝胶可以结合在细胞表面上, 随后内陷并内化于细胞中。可以用作对本发明组合物有用的靶向试剂的部分的代表性但非限制性列表包括蛋白质、肽、适体 (aptomers)、有机小分子、毒素、白喉毒素、假单胞菌毒素、霍乱毒素、蓖麻毒素、伴刀豆球蛋白 A、劳氏肉瘤病毒、塞姆利基 (Semliki) 森林病毒、水泡性口炎病毒、腺病毒、转铁蛋白、低密度脂蛋白、钴胺传递蛋白、卵黄蛋白、表皮生长因子、生长激素、甲状腺刺激激素、神经生长因子、降血钙素、胰高血糖素、泌乳刺激素、促黄体生成激素、甲状腺激素、血小板衍生生长因子、干扰素、儿茶酚胺、肽模拟物、糖酯类、糖蛋白类和多糖。也可以使用上述部分的同源物或片断。这些靶向部分可与纳米凝胶结合, 并用于将纳米凝胶引导到靶细胞, 随后在靶细胞中被内化。并不要求将整个部分用作靶向部分。已知与特定受体或其他结构相互作用的这些部分的更小片断也可以用作靶向部分。

抗体或抗体片段代表了最广泛使用的一类靶向部分, 其可用于增强纳米凝胶摄入细胞。可以通过本领域普通技术人员公知的各种技术中的任一种制备抗体。参见例如, Harlow 和 Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988。可以通过细胞培养技术制备抗体, 细胞培养技术包括产生单克隆体或通过将抗体基因转染到合适的细菌或哺乳动物细胞寄主, 以产生

重组抗体。在一种技术中,首先将包含多肽的免疫原注射入各种各样哺乳动物(例如小鼠、大鼠、兔子、绵羊或山羊)中的任一种。如果多肽连接到载体蛋白(例如牛血清白蛋白或钥孔虫戚血蓝蛋白)可得到优异的免疫应答反应。将免疫原注射入动物宿主,优选按照预定计划掺入一种或多种强化免疫,并对动物定期放血。然后,通过例如利用偶合到合适的固体支持物的多肽进行的亲合色谱法就可以将对该多肽具有特异性的多克隆抗体从抗血清中纯化出来。

对感兴趣的抗原性多肽具有特异性的单克隆体可以通过例如 Kohler 和 Milstein, Eur. J. Immunol. 6:511-519, 1976 中描述的技术和其改进技术制备。

单克隆体可以从生长中的杂交瘤克隆上清液中分离得到。另外,多种技术可用来增加产量,例如将杂交瘤细胞系注射入合适的脊椎动物宿主(例如小鼠)的腹腔中。然后可以从腹水或血液中收获单克隆抗体。可以用常规技术从抗体中除去污染物,例如色谱法、凝胶过滤法、沉淀法和萃取法。本发明的多肽可以用于纯化步骤(例如亲合色谱步骤)中。

已描述了大量含有衍生自非人免疫球蛋白的抗原结合位点的“人源化”抗体分子(Winter 等, (1991) Nature 349:293-299; Lobuglio 等, (1989) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86:4220-4224)。这些“人源化”分子被设计为将针对啮齿类抗人抗体分子的不良免疫应答最小化,所述不良免疫应答限制了那些部分在人类接受者中的治疗性应用的持续时间和有效性。

维生素和其它必需矿物质和营养素可用作靶向部分以增强细胞对纳米凝胶的摄取。特别地,维生素配体可以选自叶酸(folate)、叶酸受体-结合叶酸类似物(binding analogs of folate)、其它的叶酸受体-结合配体、生物素、生物素受体-结合生物素类似物和其它的生物素受体-结合配体、核黄素、核黄素受体-结合核黄素类似物、其它的核黄素受体-结合配体、硫胺素、硫胺素受体-结合硫胺素类似物和其它的硫胺素受体-结合配体。被认为触发受体介导的内吞作用,从而也能按照本发明公开的方法应用的另外的营养素为肉碱、肌醇、硫辛酸、烟酸、泛酸、吡哆醛和抗坏血酸,以及脂溶性维生素 A、D、E 和 K。另外,现有技术中描述的任何“免疫脂质体”(在脂质体表面连有抗体的脂质体)都适合与所述组合物一起使用。

由于并非所有的天然细胞膜都具有生物活性的生物素或叶酸受体,所述组合物在特定细胞系上的体外使用可包括首先改变或者其它形式修饰细胞系以保证存在生物活性的生物素或叶酸受体。这样,可以通过以下方法增加细胞膜上的生物

素或叶酸受体数目：在缺乏生物素或叶酸的培养基上使细胞系生长以促进生物素或叶酸受体的生成，或者表达插入的外源基因，所述外源基因编码与生物素或叶酸受体相应的蛋白质或载脂蛋白。

RME 不是将所述纳米凝胶转运入细胞的唯一方法。可采用的通过将适当的实体与纳米凝胶连接的其它摄取方法包括了膜孔的有利使用。吞噬和胞饮机制也提供了将纳米凝胶内化入细胞的有利机制。

识别部分可以进一步包含可被酶裂解或电化学裂解的序列。因此识别部分可包含易被存在于细胞内部各种位置的酶裂解的序列，所述酶例如为蛋白酶或限制性核酸内切酶（例如 DNA 酶或 RNA 酶）。

细胞表面识别序列不是必需的。因此，虽然细胞表面受体靶向部分可以用于靶向给定的细胞类型，或者用于引导所述纳米凝胶与细胞表面结合，但是并不要求在纳米凝胶的表面上存在细胞表面受体靶向部分。

为了将生物、药物或诊断成分组装到用作载体的所述纳米凝胶中，这些成分可以通过键合与纳米凝胶载体连接。“连接”是指成分被纳米凝胶携带。该成分可被溶解，并非共价地结合在纳米凝胶中。

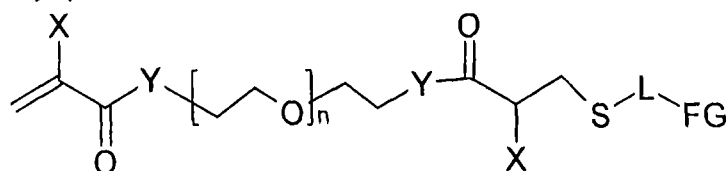
一般地，可使用任何方式在感兴趣的生物、药物或诊断成分与用作载体的纳米凝胶之间形成键合。这可以包括配体与外源分子通过连接基团直接或间接形成共价键合、离子键合或氢键键合。典型地，通过生物、药物或诊断成分与用作载体的纳米凝胶的共价键合形成键合，通过在复合物的各成分上的酸剂、醛基、羧基、氨基或联亚氨基之间形成酰胺、酯或亚胺键来形成所述共价键合。优选本领域公认的生物学不稳定的共价键合，例如亚胺键和含有 -COOCH₃、-O-O- 或 -COOCH₃ 键的所谓的“活性”酯。感兴趣的生物、药物或诊断成分可连接于预先形成的纳米凝胶，或者感兴趣的成分可以预先连接到可聚合单元，在纳米凝胶的制备过程中直接聚合入纳米凝胶。氢键键合（例如发生在核酸的互补链之间）也可用来形成键合。

在本发明的优选实施方案中，感兴趣的生物、药物或诊断成分通过与高度亲水性大分子单体单元末端的反应性化学单元反应而连接于纳米凝胶。优选该反应性化学单元是羧酸、胺或活化酯。最优选通过连接聚合物发生这种连接。

连接聚合物可用于酰化和烷基化方法中，其与水性和有机溶剂体系是相容的，因此在与有用基团反应方面有更大的灵活性，并且所需的产品在含水环境（例如生理环境）中更加稳定。连接聚合物具有聚乙二醇主链结构，其含有至少两个反

应基，每一端有一个。聚乙二醇大分子单体主链的一端含有可自由基聚合基团。该基团可以是但不必限于甲基丙烯酸酯、丙烯酸酯、丙烯酰胺、甲基丙烯酰胺、苯乙烯类 (styrenic)、烯丙基、乙烯基、马来酰亚胺或马来酸酯。聚乙二醇大分子单体主链的另一端另外含有反应性化学官能团，其可作为其它化学单元（例如猝灭剂或抗体）的连接点。该化学官能团可以是但不限于硫醇、羧酸、伯胺或仲胺、乙烯基磺酰基、醛、环氧、酰肼、琥珀酰亚胺酯、马来酰亚胺、 α -卤代羰基部分（例如碘乙酰基）、异氰酸酯、异硫氰酸酯和氮丙啶。优选这些官能团是羧酸、伯胺、马来酰亚胺、乙烯基磺酰基或仲胺。最优选反应基之一是丙烯酸酯、氰基丙烯酸酯或甲基丙烯酸酯，其用于形成纳米凝胶和乳胶，以及通过迈克尔 (Michael) 加成与硫醇进行反应。另外的反应基用于偶联造影剂、染料、蛋白质、氨基酸、肽、抗体、生物配体、治疗剂和酶抑制剂。连接聚合物可以是支化的或未支化的。优选地，对于最终产品制剂的治疗用途，连接聚合物将是药学上可接受的。聚乙二醇大分子单体的分子量可以是 300~10,000，优选为 500~5000。

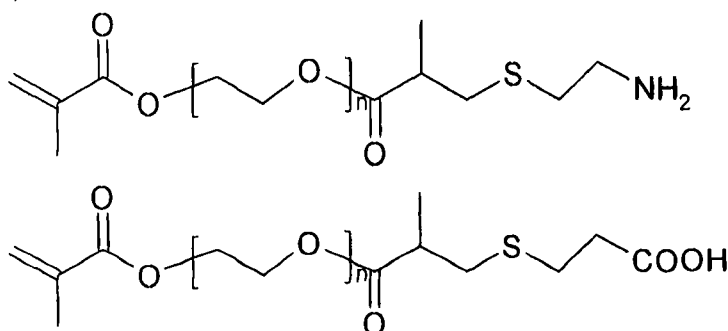
本文使用的特别优选的水溶性连接聚合物是式 I 的聚乙二醇衍生物。连接聚合物的聚乙二醇 (PEG) 主链是通式为 $\text{H}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$ (其中 $n > 4$) 的亲水的生物相容性无毒聚合物。

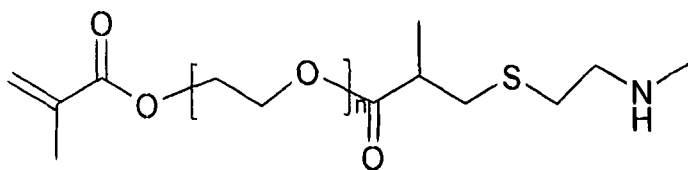


式 I

其中 $\text{X} = \text{CH}_3$ 或 H , $\text{Y} = \text{O}$ 、 NR 或 S , L 是连接基团或间隔基, FG 是官能团, n 大于 4 且小于 1000。最优选 $\text{X} = \text{CH}_3$, $\text{Y} = \text{O}$ 、 NR , L 是烷基或芳基, FG 是 NH_2 或 COOH , n 为 6~500 或 10~200。最优选 $n = 16$ 。

以下是优选的连接聚合物的列表，但无意成为根据本发明的所有连接聚合物的穷举和完全的列表：





以上讨论的任一种连接聚合物还用作本发明纳米凝胶的 Y 单体。

在制备足够纯的纳米凝胶（优选包含带有生物、医药或诊断成分的纳米凝胶）后，将纳米凝胶制备在可给予对象或样品的药物组合物中可能是合意的。优选的给药技术包括肠胃外给药、静脉内给药和直接输注入任何想要的靶组织，所述靶组织包括但不限于实体肿瘤或其它肿瘤组织。可通过采用最后的纯化步骤来完成纯化，所述步骤将纳米凝胶溶解在含有合适药物组合物的介质中。合适的药物组合物通常包含一定量的所需纳米凝胶和符合剂量信息（在每一个案基础上确定）的活性试剂。所述纳米凝胶可与药学上可接受的稀释剂或赋形剂（例如无菌水溶液）混合得到合适的终浓度。此类制剂可典型地包括诸如磷酸缓冲盐水（PBS）的缓冲剂，或诸如药物赋形剂、稳定剂（例如 BSA 或 HAS）的其它添加剂，或盐（例如氯化钠）。

对于肠胃外给药，通常希望进一步通过确保此类组合物无菌、无免疫原性和无致热性以使其是药学上可接受的。此类技术在本领域中通常是众所周知的。另外，对人类给药，制剂应满足 FDA 生物学标准所要求的无菌性、致热性、一般安全性和纯度标准。当所述纳米凝胶组合物被引入到悬浮于细胞培养物中的细胞时，足以在合适的生长培养基（例如 Luria 肉汤（LB））或适当的细胞培养基中将细胞和纳米凝胶一起培养。虽然可能有其它的引入方法，但这些引入处理是优选的，并可以不需要考虑存在于用作载体的纳米凝胶表面上的实体而实施。

可以通过连续加入单体进行溶液聚合制备本发明的纳米凝胶。该方法包括制备所有单体的混合物、第一部分引发剂和任选的溶于水中的表面活性剂的“集管”组合物；制备第二部分引发剂和表面活性剂及水的“反应器”组合物，所述水足以提供 1~10% w/w 总单体的组合物；使所述“反应器”组合物处于聚合温度；在反应期间将所述“反应器”组合物保持在所述聚合温度下；经一段时间将集管组合物加入到反应器组合物中，以形成反应混合物。此外，可将反应混合物加热至多 48 小时，并通过渗析、超滤、渗滤或用离子交换树脂处理可进一步纯化反应混合物。

“集管”组合物由所有的单体的混合物、0~100% 引发剂和 0~100% 表面活性剂（如果使用表面活性剂）和 0~100% 水制成。单体混合物包含 50~90mol% 一种或多种“X 型”单体（优选 60~80 mol%），2~30 mol% “Y 型”单体（优选 10~20 mol

%) 和 1~20 mol % “Z 型”单体 (优选 11~15 mol %) 。X、Y 和 Z 型单体已在本文文件的上面章节中描述。

引发剂可以是在加成聚合领域中已知的任何常用水溶性聚合引发剂。包括但不限于偶氮化合物, 例如 4,4'-偶氮二(4-氰基戊酸)和 2,2'-偶氮二(2-脒基丙烷) 二盐酸盐、2,2'-偶氮二(N,N'-二亚甲基异丁脒)及其二盐酸盐、2,2'-偶氮二[2-甲基-N-(2-羟乙基)丙酰胺]; 水溶性过氧化物; 氢过氧化物和过酸例如过乙酸和过氧化氢; 过硫酸盐, 例如过硫酸钾、过硫酸钠和过硫酸铵; 二硫化物; 四氮烯; 和氧化还原引发剂体系, 例如 $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ 、过硫酸盐/亚硫酸氢酸盐、草酸/ Mn^{3+} 、硫脲/ Fe^{3+} 。优选使用水溶性偶氮类引发剂。如果使用氧化还原或双组分引发剂, 则一个组分将典型地包含在集管组合物中, 另一组分将包含在反应器组合物中, 这样当该两种混合物混合时稳定地产生自由基。或者水溶性光引发剂可以与辐照源结合使用。

可在本发明中使用的表面活性剂可以是阴离子的、阳离子的、两性的、中性的、低分子量的、高分子、合成的或从天然来源中提取或衍生得到的表面活性剂。存在着大量的已知表面活性剂。有关表面活性剂的良好参考文献有 *Surfactant Handbook* (GPO: Washington, D.C., 1971) 和 *McCutcheon's Emulsifiers and Detergents* (Manufacturing Confectioner Publishing Company: Glen Rock, 1992)。一些实例包括但不限于: 十二烷基硫酸钠、十二烷基苯磺酸钠、磺基琥珀酸酯类(例如商品名为 AEROSOL[®] 的那些产品)、乙氧基化烷基酚(例如 TRITON[®] X-100 和 TRITON[®] X-705)、乙氧基化烷基酚硫酸盐(例如 RHODAPEX[®] CO-436)、磷酸酯表面活性剂 (例如 GAFAC[®] RE-90)、十六烷基三甲基溴化铵、十六烷基氯化吡啶鎓、聚氧乙烯化长链胺及其季铵化衍生物、链烷醇胺缩合物 (condensates)、聚氧化乙烯-聚氧化丙烯嵌段共聚物 (例如商品名为 PLURONIC[®] 和 TECTRONIC[®] 的产品)、N-烷基甜菜碱、N-烷基胺氧化物和磺化二苯醚 (例如商品名为 Dowfax[®] 的产品)。

“反应器”组合物由其余的引发剂、表面活性剂和水制成, 所述水足以提供 1~10 % w/w 总单体的组合物。

使反应器组合物处于聚合温度, 并在反应期间保持在该温度。该温度是已知聚合引发剂具有足够活性的温度。例如, 使用 AIBN 或过硫酸钾或 4,4'-偶氮二(4-氰基戊酸)时, 60~80℃通常是足够的。对于过硫酸盐/亚硫酸氢盐氧化还原系统, 25~40℃通常是足够的。

经 30~1440 分钟将集管组合物加入到反应器组合物中。优选充分定时 (timed)

将 335g 聚乙二醇二甲基丙烯酸酯 (Aldrich, $M_n=875$) 与 100ml 甲醇混合, 用 5.8g 半胱胺 (Aldrich, MW77) 和二异丙基乙胺 (Hunigs 碱) 处理, 室温下搅拌 2 天, 用旋转蒸发器浓缩。用 1L 乙酸乙酯吸收残余物并用 10% HCl 水溶液萃取。收集水层, 加入 50% 的氢氧化钠水溶液使之呈碱性, 然后乙酸乙酯萃取。有机层经 $MgSO_4$ 干燥, 过滤和浓缩。用无水二乙醚吸收残余物并用气态 HCl 处理并使之静置。将乙醚滗去, 以留下深蓝色的油。用新鲜的二乙醚洗涤该物质, 将二乙醚滗去。使用旋转蒸发器浓缩该深蓝色的油, 得到 37g 所需产物, 为盐酸盐。

1H -NMR (300MHz, $CDCl_3$): δ 1.18 (d, 3H), 1.93 (bs, 3H), 2.04 (bs, 2H), 2.43-2.77 (bm, 7H), 3.6-3.7 (vbs, $-CH_2CH_2O-$), 3.73 (bt, 2H), 3.29 (bt, 2H), 5.56 (bs, 1H), 6.12 (bs, 1H)。

实施例 2: 含有 9.30mol% 交联剂的磺化甲基丙烯酸纳米凝胶 (纳米凝胶 1)

用底部的 Ace # 15 玻璃丝 (glass thread) 以及用于连接内径 1/16 英寸的聚四氟乙烯管的一系列管接头对 500ml 的三颈圆底烧瓶进行改装。该烧瓶 (以下称为“集管”烧瓶) 配备有机械搅拌器、带有注射器针头氮气入口的橡胶隔片。该集管烧瓶装有甲基丙烯酸 (4.88g, $5.66 \times 10^{-2} \text{mol}$)、亚甲基二丙烯酰胺 (1.13g, $7.30 \times 10^{-3} \text{mol}$)、聚乙二醇单甲醚甲基丙烯酸酯 (11.81g, $1.07 \times 10^{-2} \text{mol}$, $M_n=1100$)、甲基丙烯酸钾磺基丙酯 (potassium sulfopropyl methacrylate) (0.95g, $3.80 \times 10^{-2} \text{mol}$)、2,2'-偶氮二(N,N'-二亚甲基异丁脒)二盐酸盐 (0.26g)、1N NaOH (3.96g) 和蒸馏水 (73.80 g)。配置机械搅拌器、回流冷凝器、氮气入口和橡胶隔片的 1 升三颈圆底烧瓶 (以下称为“反应器”) 中 2,2'-偶氮二(N,N'-二亚甲基异丁脒)二盐酸盐 (0.26g)、1N NaOH (3.96g) 和蒸馏水 (149.84g)。将集管烧瓶和反应器的内容物均搅拌至均匀, 并且用氮气鼓泡脱气 20 分钟。将反应器烧瓶放置在 50℃ 恒温水浴中, 使用 QG6 型实验室泵 (Fluid Metering Inc. Syossett, NY) 经 4 小时将集管烧瓶的内容物加入到反应器中。加料完成后, 加入追踪剂 (chaser) 2,2'-偶氮二(N,N'-二亚甲基异丁脒)二盐酸盐 (0.06g), 在 50℃ 下搅拌反应混合物 16 小时。使用 14K 截留膜 (cutoff membrane) 在连续补充水的浴中对反应混合物进行渗析 48 小时。获得 504 克含 1.98% 固体的无色溶液。通过准弹性光散射测得体积中值直径为 16.8nm, 变异系数为 0.3。在磷酸缓冲盐水中, 尺寸排阻色谱法得到 $M_n=24,700$, $M_w=64,600$, $M_z=122,000$ 以及 $M_w/M_n=2.61$, $M_z/M_w=1.88$ 。经计算, Φ_2 参数为 3.18%, 重均聚合度为 270。

实施例 3: 含有 8.22mol% 交联剂的胺官能化甲基丙烯酸纳米凝胶 (纳米凝胶 2)

这种纳米凝胶的制备方法与实施例 2 中所述的相同, 除了集管烧瓶内容物的加入时间为 2 小时, 采用 3.5K 截留膜进行渗析。集管烧瓶盛有甲基丙烯酸(3.85g, 4.47×10^{-2} mol)、二乙烯基苯(0.79g, 6.00×10^{-3} mol, 异构体的混合物, 纯度为 80%, 其余为乙基苯乙烯异构体)、实施例 1 中的胺端基聚乙二醇大分子单体(7.85g, 8.00×10^{-3} mol)、2,2'-偶氮二(N,N'-二亚甲基异丁脒)二盐酸盐(0.06g)、十六烷基氯化吡啶鎓(0.31g)、蒸馏水(76.40g)和 1N NaOH(3.13g)。反应器内容物为蒸馏水(155.11g)、2,2'-偶氮二(N,N'-二亚甲基异丁脒)二盐酸盐(0.06g)、十六烷基氯化吡啶鎓(0.94g)和 1N NaOH(3.13g)。“追踪剂”由 2,2'-偶氮二(N,N'-二亚甲基异丁脒)二盐酸盐(0.04g)组成。得到 187.4g 固体含量为 3.48% 的澄清分散体。通过准弹性光散射检测, 体积中值直径为 22.4nm, 变异系数为 0.45。在六氟-2-丙醇中, 通过尺寸排阻色谱测得 $M_n = 206,000$, $M_w = 1,113,000$, $M_z = 262,000$, $M_w/M_n = 5.41$, $M_z/M_w = 2.30$ 以及 HFIP 中 $[\eta] = 0.288$ dL/g。经计算, Φ_2 参数为 31.54%, 重均聚合度为 5230。

实施例 4: 含有 1.94mol% 交联剂的胺官能化甲基丙烯酸羟乙酯纳米凝胶(纳米凝胶 3)

这种纳米凝胶的制备方法与实施例 2 中所述的相同, 除了集管烧瓶内容物的加入时间为 2 小时。集管烧瓶盛有甲基丙烯酸羟乙酯(3.91g, 3.00×10^{-2} mol)、亚甲基双丙烯酰胺(0.12g, 7.46×10^{-4} mol)、实施例 1 的胺端基聚乙二醇大分子单体(7.48g, 7.57×10^{-3} mol)、2,2'-偶氮二(N,N'-二亚甲基异丁脒)二盐酸盐(0.12g)和蒸馏水(72.11g)。反应器内容物由蒸馏水(146.40g)和 2,2'-偶氮二(N,N'-二亚甲基异丁脒)二盐酸盐(0.12g)组成。“追踪剂”由 2,2'-偶氮二(N,N'-二亚甲基异丁脒)二盐酸盐(0.04g)组成。得到 252.0g 固体含量为 3.46% 的澄清分散体。通过准弹性光散射检测, 体积中值直径为 25.8nm, 变异系数为 0.3。在六氟-2-丙醇中, 通过尺寸排阻色谱测得 $M_n = 83,800$, $M_w = 383,000$, $M_z = 1,070,000$, $M_w/M_n = 4.57$, $M_z/M_w = 2.79$ 以及 HFIP 中 $[\eta] = 0.452$ dL/g。经计算, 参数 Φ_2 为 7.07%, 重均聚合度为 1278。

实施例 5: 含有 1.98mol% 交联剂的甲基丙烯酸羟乙酯纳米凝胶 (纳米凝胶 4)

这种纳米凝胶的制备方法与实施例 2 中所述的相同, 除了集管烧瓶内容物的加入时间为 2 小时。集管烧瓶盛有甲基丙烯酸羟乙酯(3.91g, 3.00×10^{-2} mol)、亚甲基双丙烯酰胺(0.12g, 7.46×10^{-4} mol)、聚乙二醇单甲醚甲基丙烯酸酯(7.48g,

$6.80 \times 10^{-3} \text{ mol}$)、2,2'-偶氮二(N,N'-二亚甲基异丁脒)二盐酸盐(0.12g)和蒸馏水(72.11g)。反应器内容物由蒸馏水(146.40g)和2,2'-偶氮二(N,N'-二亚甲基异丁脒)二盐酸盐(0.12g)组成。“追踪剂”由2,2'-偶氮二(N,N'-二亚甲基异丁脒)二盐酸盐(0.04g)组成。得到252.0g固体含量为3.46%的澄清分散体。通过准弹性光散射检测,体积中值直径为15.7nm,变异系数为0.3。在六氟-2-丙醇中,通过尺寸排阻色谱测得 $M_n=53,400$, $M_w=171,000$, $M_z=325,000$, $M_w/M_n = 3.20$, $M_z/M_w = 1.90$ 以及 HFIP 中 $[\eta] = 0.830 \text{ dL/g}$ 。经计算, Φ_2 参数为14.01%, 重均聚合度为559。

实施例6: 含有7.70mol%交联剂的甲基丙烯酸羟乙酯纳米凝胶(纳米凝胶5)

这种纳米凝胶的制备方法与实施例2中所述的相同,除了集管烧瓶内容物的加入时间为2小时。集管烧瓶盛有甲基丙烯酸羟乙酯(3.80g, $2.92 \times 10^{-2} \text{ mol}$)、亚甲基双丙烯酰胺(0.46g, $2.98 \times 10^{-3} \text{ mol}$)、聚乙二醇单甲醚甲基丙烯酸酯(7.25g, $6.59 \times 10^{-3} \text{ mol}$)、2,2'-偶氮二(N,N'-二亚甲基异丁脒)二盐酸盐(0.12g)和蒸馏水(72.11g)。反应器内容物由蒸馏水(146.40g)和2,2'-偶氮二(N,N'-二亚甲基异丁脒)二盐酸盐(0.12g)组成。“追踪剂”由2,2'-偶氮二(N,N'-二亚甲基异丁脒)二盐酸盐(0.04g)组成。得到252.0g固体含量为3.46%的澄清分散体。通过准弹性光散射检测,体积中值直径为21.8nm,变异系数为0.3。在六氟-2-丙醇中,通过尺寸排阻色谱测得 $M_n=117,000$, $M_w=283,000$, $M_z=555,000$, $M_w/M_n = 2.42$, $M_z/M_w = 1.96$ 以及 HFIP 中 $[\eta]=0.670$ 。经计算, Φ_2 参数为8.66%, 重均聚合度为952。

实施例7: 含有11.19mol%交联剂的甲基丙烯酸羟乙酯纳米凝胶(纳米凝胶6)

这种纳米凝胶的制备方法与实施例2中所述的相同,除了集管烧瓶内容物的加入时间为2小时。集管烧瓶盛有甲基丙烯酸羟乙酯(3.80g, $2.92 \times 10^{-2} \text{ mol}$)、亚甲基双丙烯酰胺(0.46g, $4.48 \times 10^{-3} \text{ mol}$)、聚乙二醇单甲醚甲基丙烯酸酯(7.48g, $6.38 \times 10^{-3} \text{ mol}$)、2,2'-偶氮二(N,N'-二亚甲基异丁脒)二盐酸盐(0.12g)和蒸馏水(72.11g)。反应器内容物由蒸馏水(146.40g)和2,2'-偶氮二(N,N'-二亚甲基异丁脒)二盐酸盐(0.12g)组成。“追踪剂”由2,2'-偶氮二(N,N'-二亚甲基异丁脒)二盐酸盐(0.04g)组成。得到255g固体含量为3.05%的澄清分散体。通过准弹性光散射检测,体积中值直径为27.7nm,变异系数为0.4。在1,1,1,3,3,3-六氟-2-丙醇中,通过尺寸排阻色谱测得 $M_n=533,000$, $M_w=1,265,000$,

$M_z=3,800,000$, $M_w/M_n = 2.37$, $M_z/M_w = 3.00$ 以及 HFIP 中 $[\eta]=0.773\text{dL/g}$ 。经计算, Φ_2 参数为 19.93%, 重均聚合度为 4,399。

在一系列温度下对纳米凝胶进行准弹性光散射。数据没有显示突然的尺寸减小, 表明在测试温度范围内具有较低的临界溶液温度。

表 1. 随温度变化的纳米凝胶 6 的流体动力学直径

温度 (°C)	流体动力学直径 (nm)
25	28.9
34	36.3
43	38.6
52	31.9
61	33.4
70	33.3

实施例 8: 含有 9.30mol% 交联剂的磺化甲基丙烯酸纳米凝胶 (纳米凝胶 7)

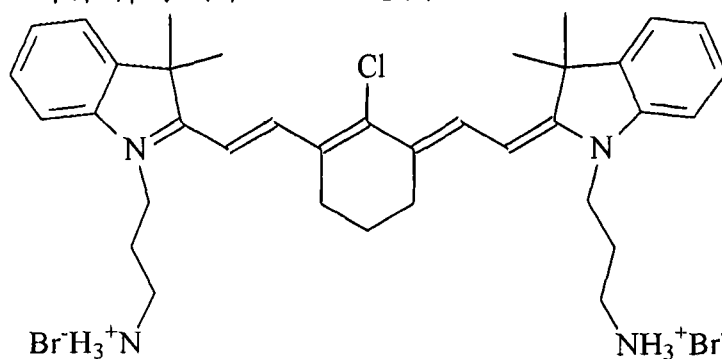
这种纳米凝胶的制备方法与实施例 2 中所述的相同, 除了集管烧瓶内容物的加入时间为 2 小时。集管烧瓶盛有甲基丙烯酸 (4.88g, $5.66 \times 10^{-2}\text{mol}$)、亚甲基双丙烯酰胺 (1.13g, $7.30 \times 10^{-3}\text{mol}$)、聚乙二醇单甲醚甲基丙烯酸酯 (11.81g, $1.07 \times 10^{-2}\text{mol}$)、甲基丙烯酸钾磺基丙酯 (0.94g, $3.81 \times 10^{-3}\text{mol}$)、2,2'-偶氮二(N,N'-二亚甲基异丁脒)二盐酸盐 (0.26g)、蒸馏水 (73.80g) 和 1N NaOH (3.96g)。反应器内容物由蒸馏水 (149.84g)、2,2'-偶氮二(N,N'-二亚甲基异丁脒)二盐酸盐 (0.26g) 和 1N NaOH (3.96g) 组成。“追踪剂”由 2,2'-偶氮二(N,N'-二亚甲基异丁脒)二盐酸盐 (0.06g) 组成。得到 441g 固体含量为 4.05% 的澄清分散体。通过准弹性光散射检测, 体积中值直径为 23.8nm, 变异系数为 0.3。在磷酸缓冲盐水中, 通过尺寸排阻色谱测得 $M_n=98,700$, $M_w=406,500$, $M_z=976,500$, $M_w/M_n = 4.12$, $M_z/M_w = 2.40$ 。经计算, 参数 Φ_2 为 9.56%, 重均聚合度为 1701。

实施例 9A: 含有 6.21mol% 交联剂的磺化甲基丙烯酸纳米凝胶 (纳米凝胶 8)

这种纳米凝胶的制备方法与实施例 2 中所述的相同, 除了集管烧瓶内容物的加入时间为 2 小时。集管烧瓶盛有甲基丙烯酸 (5.06g, $5.88 \times 10^{-2}\text{mol}$)、亚甲基双丙烯酰胺 (0.75g, $4.86 \times 10^{-3}\text{mol}$)、聚乙二醇单甲醚甲基丙烯酸酯 (12.00g, $1.09 \times 10^{-2}\text{mol}$)、甲基丙烯酸钾磺基丙酯 (0.94g, $3.81 \times 10^{-3}\text{mol}$)、2,2'-偶氮二(N,N'-二亚甲基异丁脒)二盐酸盐 (0.26g)、蒸馏水 (73.71g) 和 1N NaOH (4.11g)。

反应器内容物由蒸馏水 (149.65g)、2,2'-偶氮二 (N,N'-二亚甲基异丁脒) 二盐酸盐 (0.26g) 和 1N NaOH (4.11g) 组成。“追踪剂”由 2,2'-偶氮二 (N,N'-二亚甲基异丁脒) 二盐酸盐 (0.06g) 组成。得到 434.6g 固体含量为 3.87% 的澄清分散体。通过准弹性光散射检测, 体积中值直径为 22.0nm, 变异系数为 0.3。在磷酸缓冲盐水中, 通过尺寸排阻色谱测得 $M_n=60,100$, $M_w=186,500$, $M_z=403,000$, $M_w/M_n=3.10$, $M_z/M_w=2.16$ 。经计算, 参数 Φ_2 为 5.50%, 重均聚合度为 779。

实施例 9B: 将近红外染料与纳米凝胶 1 连接



IR 染料 1

通过将 IR 染料 1 (10.46mg(40 μ mol)和 26.15mg(100 μ mol))溶解于 1~2ml DMF 中制备两种染料溶液。类似地, 通过将冷冻干燥的纳米凝胶 1 (各 0.067g, 200 μ mol) 溶解于 1~2ml DMF 中制备纳米凝胶溶液。在各个纳米凝胶溶液中加入 0.2ml 0.45M HBTU (O-苯并三唑-N,N,N',N'-四甲脒六氟磷酸酯, 得自 Applied Biosystems), 然后搅拌 5 分钟。随后在纳米凝胶中加入 0.25ml 2M 二异丙基乙胺 (DIEA), 搅拌 1 分钟。最后, 将纳米凝胶的活性溶液转入染料溶液中, 然后在室温下震荡 4~6 小时。随后将各纳米凝胶/染料反应溶液倾入约 10ml 水中, 并加载入截留分子量为 30,000 道尔顿的 Centriprep[®] YM-30 滤筒中 (Micon Bioseparations), 以 3300RPM 离心直到约 75% 的液体通过膜扩散。然后用水再稀释膜上的浓缩物, 重复该操作直到渗透物为无色。

通过用已知浓度的染料溶液制备标准的紫外-可见光吸光度曲线来评估游离染料的量。检测偶合反应后的 10ml 滤液 (含有所有未偶合 (non-conjugated) 染料) 的吸光度值并用标准吸光度曲线对游离染料的量进行量化。在用 10.46mg IR 染料 1 的情况下, 偶合物 (conjugate) 的产率评估为 98%。UV/V 为染料-纳米凝胶偶合物分析, 显示 λ_{max} 为 784nm, 在约 725nm 处有小的肩峰 (shoulder) (参见图 1)。该肩峰 (表明存在非发射性聚集物) 相对较小, 相对于主峰来说, 不比水溶液中的游离 IR 染料的光谱明显。这说明了令人惊讶的结果, 即使加载量

相对较高，连接在颗粒上的染料显示相对较少的聚集。用准弹性光散射对偶合物进行的分析显示，体积平均直径从 18.6nm 增加到 24.1nm。

实施例 10：利用细胞生存力试验进行纳米凝胶的细胞毒性研究

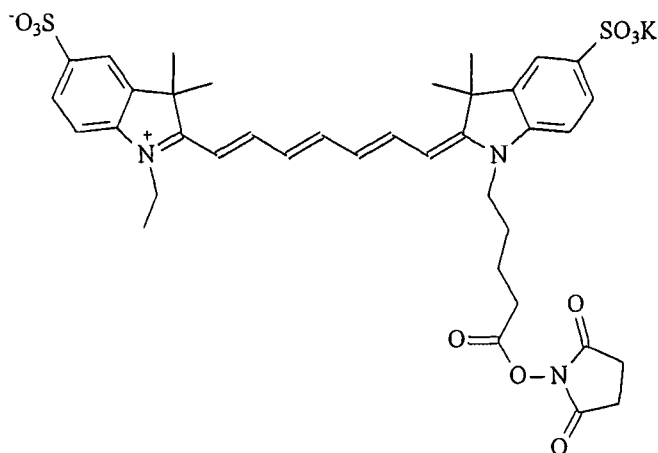
将人脐带内皮细胞(HUVEC, 从 Cascade Biologics, Inc. (Portland, OR)购得)维持在含有 2% 胎牛血清和抗生素的培养基(Medium)200 中。将 HUVEC(2×10^4 细胞/孔)平板培养于完全培养基中的 96 孔板上。第二天用无血清培养基洗涤板孔后，以表 2 列出的浓度加入纳米凝胶。24 小时后使用 CellTiter-Glo[®]发光细胞生存力试验试剂盒(Promega Corp., Madison, WI)测定细胞毒性。该试验是基于对存在的 ATP(代谢活性细胞的指示剂)量化来测定培养基中活细胞数目的匀相测定方法(homogeneous method)。将 CellTiter-Glo[®]试剂与 PH7.4 的磷酸缓冲盐水 1:1 混合，然后加入细胞培养孔中。每孔的发光用 Fluster OPTIMA 读板仪(BMG LABTECH)测定。用三次重复测定的平均值表示结果(见表 2)。纳米凝胶 1 是如实施例 2 中描述的重复批次(duplicate batch)。

表 2. 纳米凝胶 1、3、4 和 5 的细胞生存力试验结果

分析样品	% 生存力*
对照物	100.00
纳米凝胶 4 (0.2mg/ml)	98.71
纳米凝胶 4 (0.02mg/ml)	112.58
纳米凝胶 5 (0.2mg/ml)	96.89
纳米凝胶 5 (0.02mg/ml)	112.69
纳米凝胶 3 (0.2mg/ml)	99.36
纳米凝胶 3 (0.02mg/ml)	124.45
纳米凝胶 1 (重复批次) (0.2mg/ml)	81.33
纳米凝胶 1 (重复批次) (0.02mg/ml)	80.69
二氧化硅(0.2mg/ml)	26.20
二氧化硅(0.02mg/ml)	24.05

* % 生存力 = (样品 OD/对照物 OD)*100

实施例 11：将荧光染料连接到含胺的纳米凝胶(纳米凝胶 3)



NHS-Cy7

通过将 1mg NHS-cy7 染料（从 GE Healthcare, Buckinghamshire, UK 购得）溶解在 1mL DMF 中制备 NHS-cy7 染料储备溶液。在含有 0.05%（w/v）纳米凝剂的 PBS 缓冲液中加入 cy7 储备溶液的等分试样，至终体积为 10mL。混合物避光搅拌 3 小时，然后经 Centriprep® YM-30 过滤器(30,000MW 截留)过滤，用 PBS 缓冲液洗涤，保留滤液，直到滤液澄清。测定滤液的体积和吸光度以确定连接到纳米凝剂的 cy7 的数量。结果如表 3 所示。

表 3

样品编号	mg Cy7/mg 纳米凝胶粒子
11-1	0.045
11-2	0.088
11-3	0.166
11-4	0.237

实施例 12：将生物素 - PEG 连接到纳米凝胶

将各批生物素 - mPEG - NHS（从 Nektar 购得）（3.2mg、6.4mg 和 12.8mg）加入到 3 个含有 10mL 0.05% 纳米凝剂的 PBS 缓冲液的不同小瓶中。搅拌混合物 2 小时，通过 30,000MW 过滤器过滤，弃去滤液，用 PBS 缓冲液洗涤。用 PBS 缓冲液使所有样品过滤后的终体积为 4mL。

使用 HABA/抗生物素蛋白（从 Pierce 购得），通过配体取代试验测定连接于纳米凝胶的生物素的数量。在典型的试验中，在小瓶用 100μL PBS 缓冲液溶解 HABA/抗生物素蛋白，随后在 1cm 比色皿中用 800μL PBS 缓冲液溶解。将样品充分混合并记录在 500nm 处的吸光度。然后向 HABA/抗生物素蛋白溶液中加入 100mL 连接纳米凝胶的生物素，再次记录在 500nm 处的吸光度，两次测定的差

值用来计算连接于纳米凝胶的生物素样品的数量。在样品 12-1 中，在溶液中加入 NHS-cy7 并在黑暗中搅拌 2 小时。用 YM-30 过滤器过滤出未连接的染料，直到滤液澄清。测定滤液的体积和吸光度以确定连接的 cy7 的数量。结果如表 4 所示。

表 4

	500nm 处的吸光度	差值	%生物素连接	µg cy7/mg 纳米凝胶
对照	0.852	0		
12-1	0.727	0.0398	73.2%	210
12-2	0.691	0.0875	80.4%	
12-3	0.573	0.1857	85.3%	

实施例 11~12 的结果表明，本发明的纳米凝胶可用来以共价方式连接成像造影剂或治疗剂的有效负荷，也可以将生物靶向部分连接到纳米凝胶表面，用于生物靶向识别。

实施例 13. 纳米凝胶在 1.5M NaCl 中的稳定性

在 1.5M NaCl 溶液中对纳米凝胶 2~7 进行准弹性光散射测定。体积平均直径，均与在 PBS 缓冲液中的值非常相似，记录在下表 5 中。本实施例说明了纳米凝胶在浓电解质溶液中的胶体稳定性。

表 5. 纳米凝胶在 PBS 缓冲液以及在 1.5M NaCl 中的 QELS 结果

	在 PBS 缓冲液中的 D_v (nm)	在 1.5M NaCl 中的 D_v (nm)
纳米凝胶 2	22.4	22.2
纳米凝胶 3	25.8	20.4
纳米凝胶 4	15.7	16.5
纳米凝胶 5	21.8	22.0
纳米凝胶 6	27.7	25.8
纳米凝胶 7	23.8	23.3

实施例 14. 在磷酸缓冲盐水中蛋白质与纳米凝胶结合

将纳米凝胶 4、6、8、12 和 13 分别与等重量的浓度为 1.5mg/mL 的牛血清白蛋白 (BSA) 在磷酸缓冲盐水中混合。通过尺寸排阻色谱 (SEC) 在磷酸缓冲盐水中在两个 PSS Suprema 混合床柱上于 30℃ 检测混合物，将所得的色谱图与单独的纳米凝胶及 BSA 的色谱图进行比较。BSA 呈现一个尖的、可识别的单体峰（区别于二聚物和更大种类的特征高分子量肩峰），并且用在线 UV 检测器检测

到在 270nm 处有强紫外(UV)吸收。这些特征使得 BSA 的色谱峰明显区别于纳米凝胶的色谱峰, 纳米凝胶的色谱峰用 UV 检测器在 270nm 处是观察不到的, 只能通过示差折光检测器来检测。每个样品混合物中检测到的 BSA 峰与单独的 BSA 相比, 看上去没有变化。色谱图证据表明 BSA 的尺寸并没有增大, 而当纳米凝胶与 BSA 分子强力结合时, BSA 的尺寸会增大。

比较例 1: 用间歇反应法制备实施例 7 中的磺化甲基丙烯酸纳米凝胶的尝试

在配备有回流冷凝器、氮气入口和机械搅拌器的 1L 三颈圆底烧瓶中装入甲基丙烯酸 (4.88g, 5.66×10^{-2} mol)、亚甲基双丙烯酰胺 (1.13g, 7.30×10^{-3} mol)、聚乙二醇单甲醚甲基丙烯酸酯 (11.81g, 1.07×10^{-2} mol)、甲基丙烯酸钾磺基丙酯 (0.94g, 3.81×10^{-3} mol)、蒸馏水 (223.65g) 和 1N NaOH (7.922g)。将烧瓶置于 50℃ 恒温水浴中。当内容物达到 50℃ 时, 加入 2,2-偶氮二(N,N'-二亚甲基异丁脒)二盐酸盐 (0.52g)。两小时内反应内容物形成胶体。

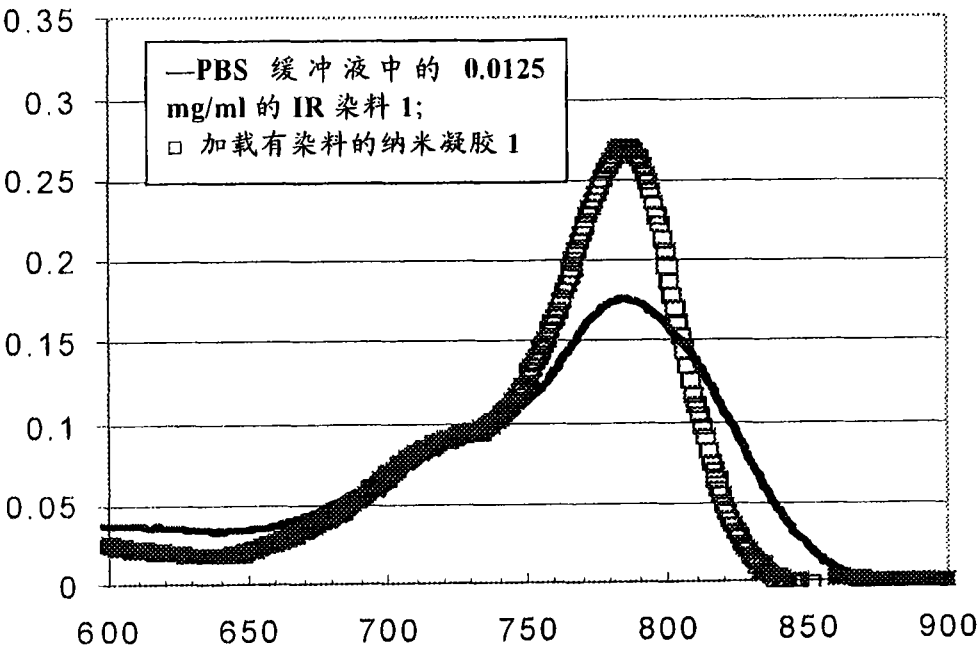


图 1