

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
A61K 9/14 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200880009732.X

[43] 公开日 2010年3月10日

[11] 公开号 CN 101668512A

[22] 申请日 2008.1.31

[21] 申请号 200880009732.X

[30] 优先权

[32] 2007.1.31 [33] US [31] 60/887,553

[86] 国际申请 PCT/US2008/052728 2008.1.31

[87] 国际公布 WO2008/095144 英 2008.8.7

[85] 进入国家阶段日期 2009.9.25

[71] 申请人 新泽西鲁特格斯州立大学

地址 美国新泽西州

[72] 发明人 约阿希姆·B·寇恩

波采娜·米史耐克 戴维·德沃尔

拉瑞萨·希海特 帕拉富拉·钱桌拉

普瑞亚·贝兹嘉

[74] 专利代理机构 天津市北洋有限责任专利代理
事务所

代理人 陆 艺

权利要求书4页 说明书19页 附图6页

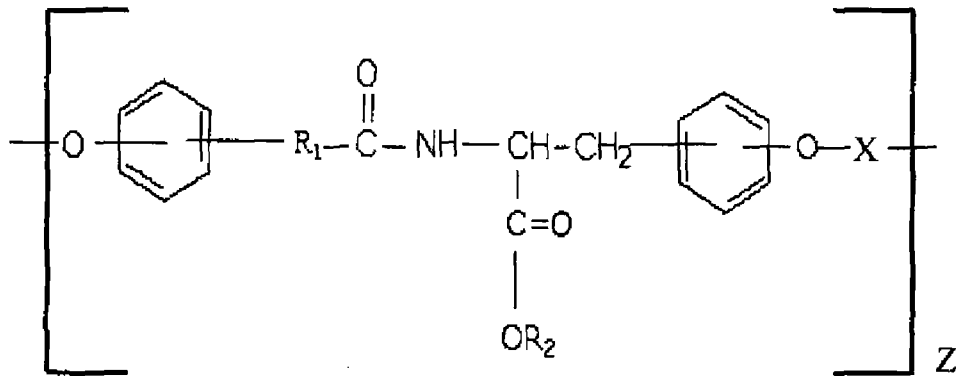
[54] 发明名称

皮肤中活性物质的控制释放

[57] 摘要

本发明提供局部组合物，其中用于通过角质层局部递送的活性化合物与具有 A-B-A 结构三嵌段共聚物的纳米球络合，其中每个 A 端基嵌段是水溶、亲水和无毒的聚合物或低聚物；并且疏水中间 B 嵌段是具有相同或不同重复单元疏水聚合物或低聚物，所述重复单元具有如式(I)的结构，其中 X 是 -C-R-C- 或 -C-；Z 是 2 和约 100 之间，包括 2 和约 100 在内；R₁ 是 CH=CH 或 (CH₂)_n，其中 n 是 0 至 18，包括 0 和 18 在内；R₂ 选自氢以及含有直至 18 个碳原子的直链和支链烷基、烷氧基、烷基芳基和烷氧基芳基；并且 R 选自键或含有直至 18 个碳原子的直链和支链烷基、烷氧基、烷基芳基和烷氧基芳基。

1. 一种局部组合物，其包括用于通过角质层局部递送的活性化合物，其中所述活性化合物与具有 A-B-A 结构三嵌段共聚物的纳米球络合，其中每个 A 端基嵌段是水溶、亲水和无毒的聚合物或低聚物；以及所述中间 B 嵌段是具有相同或不同重复单元的疏水聚合物或低聚物，所述重复单元具有如下通式的结构：



其中 X 是 $-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{R}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-$ 或 $-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-$ ；Z 是 2 和约 100 之间，包括 2 和约 100 在内；R₁ 是 CH=CH 或 (CH₂)_n，其中 n 是 0 至 18，包括 0 和 18 在内；R₂ 选自氢及含有直至 18 个碳原子的直链和支链烷基、烷氧基、烷基芳基和烷氧基芳基；并且 R 选自键或含有直至 18 个碳原子的直链和支链烷基、烷氧基、烷基芳基和烷氧基芳基。

2. 根据权利要求 1 所述的局部组合物，其进一步包括药学上可接受的载体。

3. 根据权利要求 2 所述的局部组合物，其中所述药学上可接受的载体包括一种或多种成分，其选自稀释剂、增溶剂、润滑剂、助悬剂、封装材料、溶剂、增稠剂、分散剂、缓冲剂、抗氧化剂、防腐剂、碳水化合物、糖、螯合剂、糖醇、反离子和非离子表面活性剂。

4. 根据权利要求 3 所述的局部组合物，其中所述药学上可接受的载体被配制为水分散液、乳液、霜、软膏、凝胶状或固体聚合物基质或多孔陶瓷基质。

5. 根据权利要求 1 所述的局部组合物，其中所述活性化合物是亲水的。

6. 根据权利要求 1 所述的局部组合物，其中所述活性化合物是疏水的。

7. 根据权利要求 1 所述的局部组合物，其中所述活性化合物是系统给药药物。

8. 根据权利要求 1 所述的局部组合物, 其中所述活性化合物是局部给药药物。

9. 根据权利要求 1 所述的局部组合物, 其中所述活性化合物包括至少一种化合物选自抗生素、抗菌剂、抗痤疮剂、抗癌药、非甾体抗炎剂 (NSAIDS)、抗组胺剂、镇咳剂、镇咳剂、止痒剂、抗胆碱能剂、抗呕吐和抗恶心剂、食欲抑制剂、中枢兴奋剂、抗心律失常药、 β -肾上腺素阻断剂、强心剂、抗高血压剂、利尿剂、血管扩张剂、血管收缩剂、抗溃疡剂、麻醉剂、抗抑郁剂、镇静剂和镇痛剂、抗精神病剂、抗微生物剂、抗肿瘤剂、抗疟剂、肌肉松弛剂和止泻剂。

10. 根据权利要求 1 所述的局部组合物, 其中所述活性化合物包括至少一种化合物选自防晒剂、皮肤漂白和增亮剂、保湿剂、除臭剂和止汗剂活性物质以及 UV-A 和 UV-B 吸收化合物。

11. 一种洗发液或护发素, 其包括根据权利要求 1 所述的局部组合物。

12. 根据权利要求 1 所述的局部组合物, 其中所述活性化合物包括一种或多种化妆医药品成分, 其选自天然维生素、矿物质、天然油、植物化学品、酶、抗氧化剂、抗衰老剂、 α -羟基酸、乙醇酸和水杨酸。

13. 根据权利要求 1 所述的局部组合物, 其中所述活性化合物包括一种或多种治疗剂用于治疗皮肤疾病或病症, 所述皮肤疾病或病症选自寄生感染、真菌感染、细菌感染、病毒感染、丘疹鳞屑性疾病、色素性病症、癌症和皮肤药物反应。

14. 根据权利要求 1 所述的局部组合物, 其进一步包括真皮穿透增强剂。

15. 根据权利要求 14 所述的局部组合物, 其中所述真皮穿透增强剂选自脂肪酸、脂肪酸酯、脂肪醇、萜、乙二醇和乙二醇酯、1,3-二氧戊环、含有至少 12 碳原子的大环酮、噁唑烷酮和噁唑烷酮衍生物、烷基-2-(N,N-二取代的氨基)-链烷酸酯、(N,N-二取代的氨基)-烷醇链烷酸及其混合物。

16. 根据权利要求 15 所述的局部组合物, 其中所述真皮穿透增强剂选自油酸、油醇、环十五酮 (CPE- 218™)、失水山梨醇单油酸酯、甘油单油酸酯、丙烯乙二醇单月桂酸酯、聚乙烯乙二醇单月桂酸酯、2-正-壬基 1,3-二氧戊环 (SEPA™)、2-(N,N-二甲基-氨基)-丙酸十二烷酯 (DDAIP) 或其盐衍生物、2-乙基己基 2-乙基己酸酯、异丙基肉豆蔻酸酯、异山梨醇酐二甲醚、4-癸基噁唑烷-2-酮 (SR 38™, TCPI, Inc.)、3-甲基-4-癸基噁唑烷-2-酮、辛基二甲基-对氨基苯甲酸、辛基对甲氧基肉桂酸酯、辛基水杨酸及其混合物。

17. 一种通过将角质层活性化合物递送至下表皮和真皮的局部方法, 其包括局部施用于患者的角质层, 所述患者患有的疾病或病症需要用根据权利要求 1 所述的局部组合物的有效量治疗, 其中所述局部组合物的活性化合物有效治疗所述患者的疾病或病症。

18. 根据权利要求 17 所述的方法, 其中所述活性化合物包括至少一种化合物选自抗生素、抗菌剂、抗痤疮剂、抗癌药、非甾体抗炎剂 (NSAIDS)、抗组胺剂、镇咳剂、镇咳剂、止痒剂、抗胆碱能剂、抗呕吐和抗恶心剂、食欲抑制剂、中枢兴奋剂、抗心律失常药、 β -肾上腺素阻断剂、强心剂、抗高血压剂、利尿剂、血管扩张剂、血管收缩剂、抗溃疡剂、麻醉剂、抗抑郁剂、镇静剂和镇痛剂、抗精神病剂、抗微生物剂、抗肿瘤剂、抗疟剂、肌肉松弛剂和止泻剂。

19. 根据权利要求 17 所述的方法, 其中所述疾病或病症是皮肤疾病或病症, 其选自寄生感染、真菌感染、细菌感染、病毒感染、丘疹鳞屑性疾病、色素性病症、癌症和皮肤药物反应, 并且所述活性化合物包括一种或多种治疗剂用于所述皮肤疾病或病症的治疗。

20. 根据权利要求 17 所述的方法, 其中所述活性化合物是系统递送。

21. 根据权利要求 17 所述的方法, 其中所述活性化合物是局部递送。

22. 根据权利要求 17 所述的方法, 其中所述局部组合物进一步包括药学上可接受的载体。

23. 根据权利要求 22 所述的方法, 其中所述药学上可接受的载体包括选自稀释剂、增溶剂、润滑剂、助悬剂、封装材料、溶剂、增稠剂、分散剂、缓冲剂、抗氧化剂、防腐剂、碳水化合物、糖、螯合剂、糖醇、反离子和非离子表面活性剂的一种或多种成分。

24. 根据权利要求 23 所述的方法, 其中所述药学上可接受的载体被配制为水分散液、乳液、霜、软膏、凝胶状或固体聚合物基质或多孔陶瓷基质。

25. 根据权利要求 17 所述的方法, 其中所述局部组合物进一步包括真皮穿透增强剂。

26. 根据权利要求 25 所述的方法, 其中所述真皮穿透增强剂选自脂肪酸、脂肪酸酯、脂肪醇、萜、乙二醇和乙二醇酯、1,3-二氧戊环、含有至少 12 碳原子的大环酮、噁唑烷酮和噁唑烷酮衍生物、烷基-2-(N,N-二取代的氨基)-链烷酸酯、(N,N-二取代的氨基)-烷醇链烷酸及其混合物。

27. 根据权利要求 17 所述的方法, 其中所述方法进一步包括结合物理方法应用所述局部组合物用于皮肤递送的增强。

28. 根据权利要求 27 所述的方法, 其中所述物理增强方法选自热能方法、超声方法、磁电泳方法、光化学波方法和激光烧蚀方法、无线电频率能量方法、脉冲电场方法, 电泳方法、离子导入方法、微切割的微管路方法、膜电穿孔方法、实心 and 空心微针方法、穿刺方法、穿孔方法、研磨方法、无针注射方法、吸引方法和拉伸法。

29. 一种用于局部涂敷的水凝胶, 其由权利要求 1 所述的局部组合物组成。

30. 一种透皮药物递送装置，其包括活性化合物储存，其由权利要求 29 所述的水凝胶组成。

31. 根据权利要求 30 所述的透皮药物递送装置，其中所述水凝胶进一步包括真皮穿透增强剂。

32. 根据权利要求 17 所述的方法，其中所述局部组合物是以水凝胶的形式。

33. 根据权利要求 32 所述的方法，其中所述水凝胶是所述透皮药物递送装置的活性化合物储存。

34. 根据权利要求 32 或 33 所述的方法，其中所述水凝胶进一步包括真皮穿透增强剂。

35. 根据权利要求 34 所述的方法，其中所述真皮穿透增强剂选自脂肪酸、脂肪酸酯、脂肪醇、萜、乙二醇和乙二醇酯、1,3-二氧戊环、含有至少 12 碳原子的大环酮、噁唑烷酮和噁唑烷酮衍生物、烷基-2-(N,N-二取代的氨基)-链烷酸酯、(N,N-二取代的氨基)-烷醇链烷酸及其混合物。

皮肤中活性物质的控制释放

相关申请交叉参考

本专利申请是 2005 年 7 月 27 日提交的美国专利申请 US11/191, 181 的部分继续申请, 是 2005 年 11 月 7 日提交的美国专利申请 10/514,215 的部分继续申请, 并根据 35 U. S. C. §365(c)的规定要求了于 2003 年 5 月 15 日提交的、并指定美国的国际申请 PCT/US03/015600 的优先权, 该国际申请根据 35 U.S.C. § 1 19(e)的规定要求了于 2002 年 5 月 15 日提交的美国临时专利申请为 60/378,042 的优先权。根据 35 U.S.C. § 1 19(e)的规定, 本申请还要求了 2007 年 1 月 31 日提交的美国临时专利申请 60/887,553 的优先权。所有以上五个申请的公开内容通过引用并入本文。

背景技术

皮肤是发挥许多生理功能的复合膜, 例如新陈代谢、合成、温度调节和排泄。它的上层, 即角质层, 被认为是外源物质经皮渗透的主要屏障。

目前, 存在几类药学产品, 其靶向于皮肤或利用皮肤作为进入机体的港口。这些药学产品包括透皮和局部药物递送系统(贴片)、凝胶、霜、软膏、洗液, 以及皮下移植和真皮接种。当与其他递送途径一起时, 运输至或穿过皮肤的不利因素主要是并非所有的药物都是合适的候选物。

许多物理化学参数已被确定, 例如分子疏水性、分子大小、以及与其他分子相互作用的能力(如影响扩散过程的氢键的形成), 和渗透速率的变化可发生在不同皮肤类型、患者、不同种族之间以及长幼之间。以可逆和无害方式克服皮肤对渗透的抗性和治疗上有效的局部和透皮制剂设计, 是目前主要的挑战。

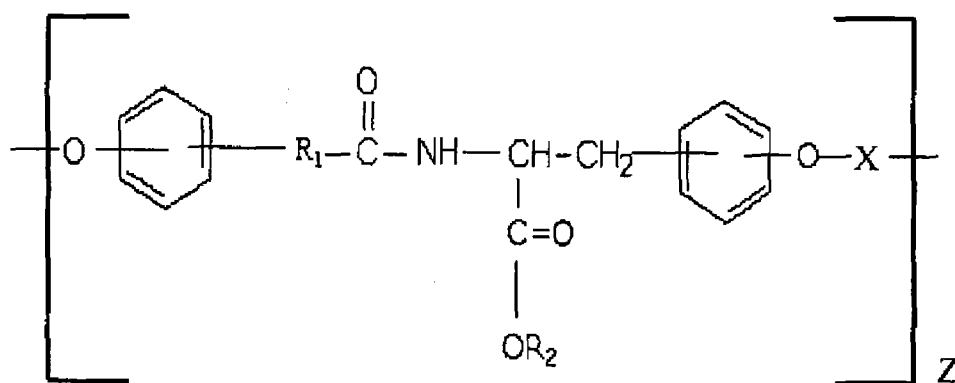
局部和透皮药物递送系统的发展已旨在通过无毒和无刺激方法克服人类皮肤显著有效的屏障性质。研究人员已研究了大量化学和物理方法来克服皮肤强大的屏障功能, 并且可分为被动或主动方法。增强皮肤渗透的主动方法包括的技术例如离子导入(电学方法)、使用微针(机械方法)、超声、激光以及光学机械波。被动方法包括使用渗透增强剂、脂质体、或其他载体、前体药物或代谢方法、药物扩散驱动力的增强(热动力学活性)和/或增加皮肤的渗透性。

为了在药物的溶解性/分散性和稳定性方面获得合适的性质 (profile), 制剂的选择也是非常重要的。最具功能性的制剂应能够溶解疏水和亲水物质, 并同时增加吸收效率而不导致对皮肤显著的损害。在局部递送至皮肤中的另外一个挑战是少数适当的药物, 其通常限于小的、适度亲脂性且高度有效的药物。通常, 高度亲脂性分子不能从主要由脂质组成的角质层良好地转移至较多水相有活力的表皮, 并且其结果通常是高度亲脂性分子具有较差的可渗透性。

已发展了几种用于改善皮肤递送的方法, 包括复合物理增强方法, 例如离子导入、超声导入和电穿孔, 但是这些技术更适于亲水、水溶物质。关于被动增强方法, 过饱和的制剂或新型载体系统, 例如微乳液、脂质体和胶态聚合的悬浮液, 也已被研究作为针对更“传统”化学渗透增强剂系统的可选替代物。已对少数生物可降解的、聚合物微粒子以及固体-脂纳米粒子关于它们用于透皮药物施用的潜能进行研究。但是高亲脂性分子的经皮穿透仍存在问题, 因此迫切需要合适的递送载体。

发明内容

本发明满足了上述需要, 提供了一种局部组合物, 其含有用于通过角质层局部递送的活性化合物, 所述活性化合物与具有 A-B-A 结构三嵌段共聚物的纳米球络合, 其中每个 A 端基嵌段是水溶、亲水和无毒的聚合物或低聚物; 并且中间 B 嵌段是具有相同或不同重复单元的疏水的聚合物或低聚物, 所述重复单元具有如所述通式的结构:



其中 X 是 $-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{R}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-$ 或 $-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-$; Z 是 2 和约 100 之间, 包括 2 和约 100 在内; R₁ 是 CH=CH 或 (CH₂)_n, 其中 n 是 0 至 18, 包括 0 和 18 在内; R₂ 选自氢及含有直至 18 个碳原子的直链和支链烷基、烷氧基、烷基芳基和烷氧基芳基; 并且 R 选自键或含有直至 18 个碳原子的直链和支链烷基、烷氧基、烷基芳基和烷氧基芳基。

根据一个具体实施方式，局部组合物进一步包括药学上可接受的载体。所述药学上可接受的载体可包括选自稀释剂、增溶剂、润滑剂、助悬剂、封装材料、溶剂、增稠剂、分散剂、缓冲剂、抗氧化剂、防腐剂、碳水化合物、糖、螯合剂、糖醇、反离子和非离子表面活性剂的一种或多种成分。药学上可接受的载体可以被配制为水分散液、乳液、霜、软膏、凝胶状或固体聚合物基质或多孔陶瓷基质。

活性化合物可以是亲水的和疏水的。另外，活性化合物可以是局部或系统给药的药物。活性化合物的例子包括抗生素、抗菌剂、抗痤疮剂、抗癌药、非甾体抗炎剂（NSAIDs）、抗组胺剂、镇咳剂、止痒剂、抗胆碱能剂、抗呕吐和抗恶心剂、食欲抑制剂、中枢兴奋剂、抗心律失常药、 β -肾上腺素阻断剂、强心剂、抗高血压剂、利尿剂、血管扩张剂、血管收缩剂、抗溃疡剂、麻醉剂、抗抑郁剂、镇静剂和镇痛剂、抗精神病剂、抗微生物剂、抗肿瘤剂、抗疟剂、肌肉松弛剂和止泻剂。

本发明的局部组合物还以个人护理产品的形式提供，例如洗发液、护发素、沐浴液、护肤液、除臭剂、止汗剂等等，其中活性化合物是洗发液、皮肤洗涤、头发或皮肤护理活性成分或除臭剂或止汗剂活性成分。还提供了根据本发明的其他局部组合物用于局部施用于皮肤，其中活性化合物包括是防晒剂、皮肤漂白和增亮剂、保湿剂或 UV-A 或 UV-B 吸收化合物。

本发明还提供化妆医药品局部组合物，其含有是化妆医药品成分的一种或多种活性化合物。化妆医药品成分的例子包括天然维生素、矿物质、天然油、植物化学品、酶、抗氧化剂、抗衰老剂、 α -羟基酸、乙醇酸和水杨酸。

本发明还提供用于皮肤疾病或病症的治疗的局部组合物。根据本发明该实施方式的局部组合物含有一种或多种活性化合物用于疾病或病症治疗。用于皮肤疾病或病症治疗的活性化合物的例子包括治疗剂，其用于治疗寄生感染、真菌感染、细菌感染、病毒感染、丘疹鳞屑性疾病、色素性病症、癌症和皮肤药物反应。

根据本发明的局部组合物可含有真皮穿透增强剂。真皮穿透增强剂的例子包括脂肪酸、脂肪酸酯、脂肪醇、萜、乙二醇和乙二醇酯、1,3-二氧戊环、含有至少 12 碳原子的大环酮、噁唑烷酮和噁唑烷酮衍生物、烷基-2-(N,N-二取代的氨基)-链烷酸酯、(N,N-二取代的氨基)-烷醇链烷酸及其混合物。

本发明还提供用于局部递送活性化合物的方法。如一个具体实施方式，提供了通过局部施用于患者的角质层，将活性化合物穿过角质层递送至下表皮和真皮的局部方法，所述患者患有的疾病或病症需要用本发明的局部组合物的有效量治疗，其中所述局部组合物的活性化合物是有效治疗所述患者的疾病或病症。

如一个具体实施方式，所述疾病或病症是皮肤疾病或病症，其选自寄生感染、真菌感染、细菌感染、病毒感染、丘疹鳞屑性疾病、色素性病征、癌症和皮肤药物反应，并且所述活性化合物包括用于皮肤疾病或病症的治疗的一种或多种治疗剂。

本发明的前述和其他目的、特征和优势将结合附图对如下优选实施方式的详细描述中更加显而易见。

附图说明

图 1 是聚乙二醇-嵌段-寡聚 (DTO 辛二酸) -Z) -嵌段-聚乙二醇 (PEG-*b*-oligo(DTO-SA)-Z) -*b*-PEG) 三嵌段共聚物、5-十二烷基氨基荧光素 (dodecanoylamino fluorescein, DAF)、尼罗红 (Nile Red, NR) 和姜黄素 (Curcumin) 的结构示意图；

图 2 是描述由动力光散射(积累量拟合)测量的溶质-纳米球制剂大小分布的图，其中 (v) 纳米球-尼罗红络合物；(□) 纳米球-DAF 络合物；(v) 纳米球-姜黄素络合物。插图：单独纳米球的大小分布；

图 3 包括在水溶液中由 PEG-*b*-oligo(DTO-SA)-Z) -*b*-PEG 三嵌段共聚物制成的纳米球的透射电子显微镜 (Transmission Electron Microscopy, TEM) 图像。其中，上图：负染色方法 (2% 乙酸双氧铀)；下图：Pt/C 阴影方法；

图 4A-I 是被动渗透 24 小时后获得的横截面荧光图像。其中(A) PG-DAF；(B) NSP-DAF；(C) PG-姜黄素；(D) NSP-姜黄素；(E) PG-NR；(F) NSP-NR。被动渗透 24 小时后，NSP 对于 PG 的穿透效果 ($PE \pm$ 标准差, $*p < 0.01$)。 (v) PG 和(□) NSP；(G) DAF；(H) 姜黄素；(I) NR。EP：角质层和有活力的表皮；SD：浅表真皮；LD：深层真皮；

图 5 是冰冻切片皮肤(左)和 H&E 染色(右)示意图；以及

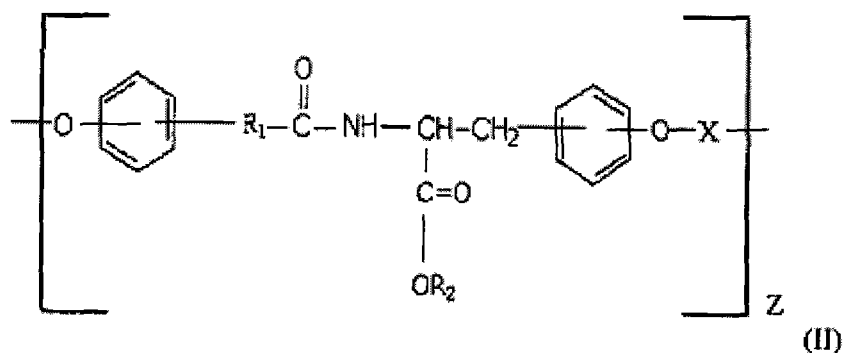
图 6A-B 是被动渗透 1、3 和 6 小时后获得的横截面图像。(A) PG-NR；(B) NSP-NR。被动渗透 1、3 和 6 小时后 NSP 对于 PG 的穿透效果 ($PE \pm$ 标准差, $*p < 0.01$)。其中(v) PG-NR 和(□) NSP- NR；EP：角质层和有活力的表皮；SD：浅表真皮；LD：深层真皮。

具体实施方式

本发明将美国公开号为 2006/0013882 专利申请公开的基于酪氨酸的 ABA-型三嵌段共聚物纳米球的应用延伸至用于被动皮肤渗透的活性化合物的递送载体。

三嵌段共聚物源自水溶、亲水和无毒的端基嵌段以及聚芳酯或聚碳酸酯的疏水中间嵌段。三嵌段共聚物具有 A-B-A 结构，其中每个 A 端基嵌段是水溶、亲水和无毒的聚合物或低聚物，并且 B 中间嵌段是疏水的基于酪氨酸的聚碳酸酯或聚芳酯聚合物或低聚物。

三嵌段共聚物自发地自组装形成生物相容性的、生物可降解的纳米球，其用于甚至在极低浓度的药物和其他活性物质的递送。因此，提供组合物，其中用于通过角质层局部递送的活性化合物与具有 A-B-A 结构三嵌段共聚物的纳米球络合，其中每个 A 端基嵌段是水溶、亲水和无毒的；并且疏水中间 B 嵌段是疏水的，其具有如所述式(II)结构的相同或不同重复单元：



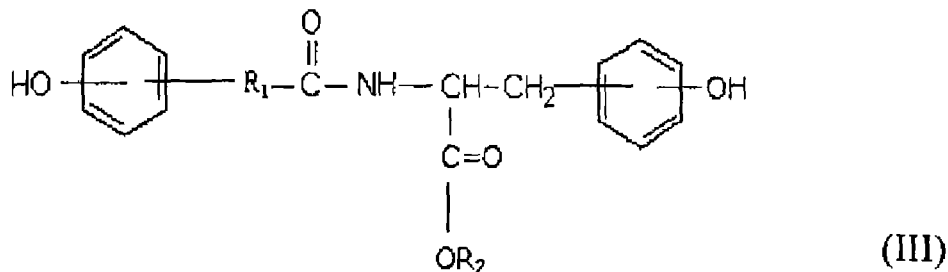
其中 X 是 $-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{R}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-$ 或 $-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-$ ；Z 是 2 和约 100 之间，包括 2 和约 100 在内；R₁ 是 CH=CH 或 (CH₂)_n，其中 n 是 0 至 18，包括 0 和 18 在内；R₂ 选自氢和含有直至 18 个碳原子的直链和支链烷基、烷氧基、烷基芳基和烷氧基芳基；并且 R 选自键或含有直至 18 个碳原子的直链和支链烷基、烷氧基、烷基芳基和烷氧基芳基。

本发明的共聚物是 A-B-A 型三嵌段共聚物。A 端基嵌段是水溶、亲水和无毒的，优选地选自聚(烯化氧)，并且疏水中间 B 嵌段是聚芳酯或聚碳酸酯。在优选的聚芳酯实施方式中，中间嵌段由源自酪氨酸的苯二酚和二酸共聚合成，并由基于酪氨酸的苯二酚的酚羟基与二酸的羧酸基之间的酯键连接在一起。在其他优选的实施方式中，聚碳酸酯中间嵌段由相同的二羟基单体共聚合成。

更优选的聚(烯化氧)端基嵌段是聚乙烯乙二醇、聚丙烯乙二醇、聚丁烯乙二醇、Pluronic™ 聚合物等等。聚乙烯乙二醇是优选的。

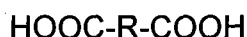
本发明的聚芳酯中间嵌段是通过根据美国专利 US5,216,115 所述的方法将二酸与苯二酚缩合而制备的，其中苯二酚化合物与脂肪族或芳香族二羧酸以碳二亚胺调节的直接聚酯化进行反应，使用 4-(二甲基-氨基)-吡啶-对-甲苯磺酸 (DPTS) 作为催化剂。上面述及的美国专利 5,216,115 的公开内容通过引用并入本文。双-二酸被选择作为聚芳酯中间嵌段以使共聚物的每个末端 A 端基嵌段被连接。

苯二酚化合物是美国专利 5,587,507 和 5,670,602 的基于酪氨酸的苯二酚单体, 这两个专利的公开内容在此也通过引用并入本文。使用具有式 III 结构的基于酪氨酸的苯二酚单体制备聚芳酯:



其中 R_1 和 R_2 与如上关于式 II 的描述相同。

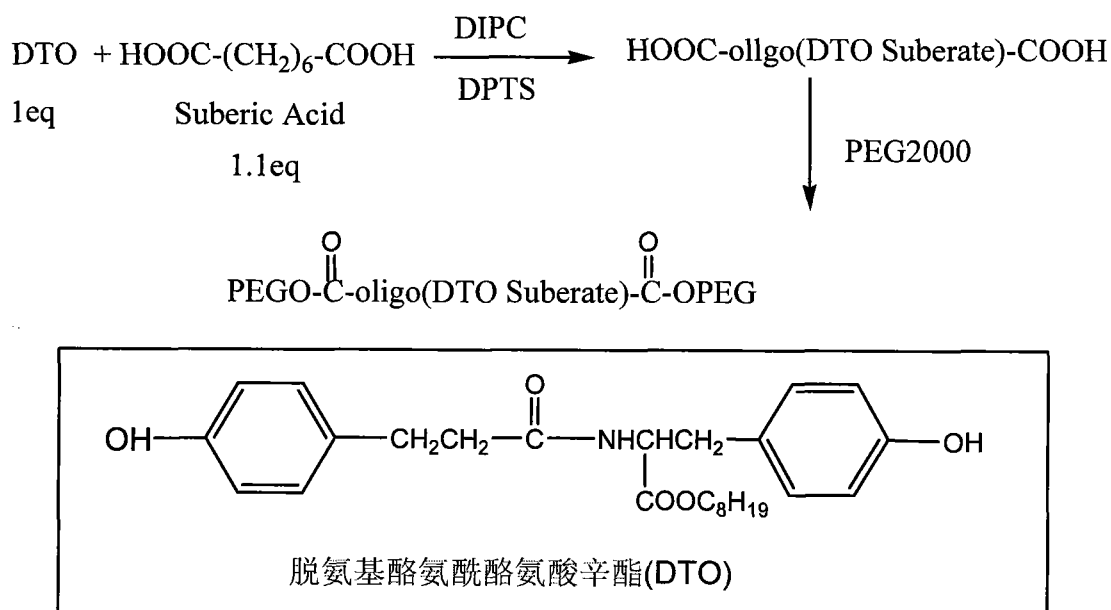
优选的苯二酚单体是脱氨基酪氨酸-酪氨酸羧酸及其酯, 其中 R_1 是 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$, 其被称为 DT 酯。为了实现本发明的目的, 乙基酯 ($R_2 = \text{乙基}$) 被称为 DTE, 苄基酯 ($R_2 = \text{苄基}$) 称为 DTBn 等等。两项专利公开了制备这些单体的方法。为了本发明的目的, 无脱氨基酪氨酸-酪氨酸的羧酸 ($R_2 = \text{氢}$) 被称为 DT。聚芳酯二羧酸具有结构:



其中 R 与如上述通式 II 的描述相同, 并且优选地含有直至 12 个碳原子。 R 是优选选择的以使用作起始原料的二羧酸是重要的自然形成代谢物或高度生物相容性的化合物。因此, 优选的式 IV 二羧酸包括被称为 Krebs 循环的细胞呼吸途径的中间体二羧酸。这些二羧酸包括 α -酮戊二酸、琥珀酸、延胡索酸、苹果酸和草酰乙酸, 其中 R 分别是 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-$ 和 $-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ 。

另一个自然形成的、优选的二羧酸是甜菜汁中发现的己二酸 ($R = (-\text{CH}_2)_4$)。其他优选的生物相容性二羧酸包括草酸 (无 R)、丙二酸 ($R = -\text{CH}_2-$)、戊二酸 ($R = (\text{CH}_2)_3$)、庚二酸 ($R = (-\text{CH}_2)_5$)、辛二酸 ($R = (-\text{CH}_2)_6$) 和壬二酸 ($R = (-\text{CH}_2)_7$)。换言之, 合适的用于本发明的二羧酸是一类 R 表示 $(-\text{CH}_2)_z$ 的化合物, 其中, 其中 z 是 0 至 12 之间的整数, 包括 0 和 12 在内。高度生物相容性芳香族二羧酸的优选种类是双(对-羧基苯氧基)烷烃, 例如双(对-羧基苯氧基)丙烷。

用一锅法使用非-官能化的聚(烯化氧)单烷基醚和寡聚(DTO 辛二酸)的原位碳二亚胺耦联合成聚芳酯三嵌段低聚物。以下是阐明 PEG-寡聚-(DTO 辛二酸)-PEG 合成的总体设计的具体例子:



本发明的聚碳酸酯中间嵌段可用聚合苯二酚的常规方法制备成相同，如美国专利 US5,099,060 所述，其公开内容在此通过引用并入本文。这些方法涉及在催化剂存在下，将氨基酸衍生的苯二酚化合物与光气或光气前驱体（例如双光气或三光气）的反应，其包括美国专利号 4,980,449 所述的，其公开内容在此通过引用并入本文。适合的处理方法，相关催化剂和溶剂是本领域已知的，并在 Schnell, *Chemistry and Physics of Polycarbonates* (Interscience, New York 1964) 中教导，所述教导通过引用并入本文。

无自由羧基与共聚单体的交叉反应从具有无侧链的羧基的苯二酚来聚合具有无侧链的羧基低聚物是不可能。因此，苄基酯二苯基单体例如 DTBn 的均聚物或共聚物可以通过选择去除苄基，通过钨的催化氢解法转化成相应的自由羧基均聚物和共聚物，所述的催化氢解方法是已由共同未决和共同所有的美国专利 6,120,491 公开。该专利的公开内容在此通过引用并入本文。催化氢解是非常必要的，因为低聚物骨架的不稳定性抑制了粗糙水解技术的应用。另一个方法，由共同未决和共同所有的美国专利申请 US10/952,202 公开，包括从水解不稳定的聚合物选择去除叔-丁基酯基以形成新的聚合物组合物，其具有自由羧基来替代叔-丁基酯基。该申请的公开内容也通过引用并入。

三嵌段共聚物的分子量可通过限制反应时间或组分比率来控制。也可通过使用的碳二亚胺耦联试剂的数量来控制分子量。

优选的聚芳酯具有约 1,000 和 100,000 g/mol 之间的重均分子量，优选地为约 3,000 和 50,000 g/mol 之间，并且更优选地为约 10,000 和 25,000 g/mol 之间。分子量可通过凝胶渗透层析，相对于四氢呋喃中的聚苯乙烯标准而不进一步校正来计算。因此，三嵌段共聚物具有约 2,500 和 130,000 g/mol 之间的重均分子量，优选地为约 5,000 和 80,000 g/mol 之间，并且更优选地为约 10,000 和 50,000 g/mol 之间。

根据本发明优选的聚碳酸酯具有重均分子量的范围在约 1,000 和 100,000 g/mol 之间, 优选地为约 3,000 和 50,000 g/mol 之间, 并且更优选地为约 10,000 和 25,000 g/mol 之间。分子量可通过凝胶渗透层析相对于四氢呋喃中的聚苯乙烯标准来计算, 而不进一步校正。因此, 三嵌段共聚物具有约 2,500 和 130,000 g/mol 之间的重均分子量, 优选地为约 5,000 和 80,000 g/mol 之间, 并且更优选地为约 10,000 和 50,000 g/mol 之间。

三嵌段共聚物由水解降解至原始的起始材料, 即, 酪氨酸衍生的苯二酚、二羧酸以及水溶、亲水和无毒低聚物端基嵌段。本发明的共聚物是高度亲水的, 其有利于纳米球药物递送系统。但是, 共聚物的亲水:疏水平衡可以几种方式变化。苯二酚侧链的酯可改变为增加疏水性的较长链酯基。增加 A 端基嵌段的分子量, 例如通过增加聚(烯化氧)的烯烃基碳的数量也可增加疏水性。改变二羧酸也可改变亲水:疏水平衡。

本发明的三嵌段共聚物在稀释水溶液中形成 5 - 200 nm 范围 (直径) 的泡状结构。优选的结构具有 50 和 150 nm 之间的直径。例如, 聚(乙二醇)-嵌段-寡聚-(DTO 辛二酸)-嵌段-聚(乙二醇), 即 PEG-寡聚-(DTO 辛二酸)-PEG 三嵌段低聚物在稀释水溶液中形成具有约 100 nm 范围直径的泡状结构。用常规技术, 即光散射, 确定泡的特征。

本发明的递送系统适合于需要局部递送的应用, 以及需要系统递送的情况。纳米球可与或不与活性化合物络合施用以提供治疗效果。

术语“活性化合物”包括疏水和亲水化合物。因此, 三嵌段共聚物可用于形成纳米球疏水药物递送系统。三嵌段共聚物的合成, 其包含无细胞毒性和生物可降解的结构嵌段并由自组装方法能够形成纳米球, 对用于许多生物医学应用是重要的, 这些应用包括但不限于用作疏水药物的载体。为了本发明的目的, 疏水活性剂被定义为活性剂, 例如药物或其他生物活性材料, 其具有相对于辛醇的 $\log P > 0$, 其中 P 是分配系数。

目前已充分确定了两性分子的自组装依赖于潜在材料的几个相关性质, 即它的化学结构、构造或分子量。但是, 假定自组装驱动力主要由疏水相互作用控制, 自组装嵌段共聚物的设计固有地依赖于它的分子量以及疏水对亲水的平衡。在稀释水溶液中三嵌段共聚物的自组装由简单的逐滴添加诱导并且可以由超声、高剪切混合、纳米沉淀或乳化方法来促进。通过在纳米球形成前在合适的溶剂中预先混合三嵌段和疏水产物或者通过在将被络合的产物的溶液或悬浮液中形成纳米球, 络合形成活性疏水产品。

本发明的纳米球络合物使用多种剂量形式被局部应用, 其中剂量形式可任选地包括适合于局部剂量形式的一种或多种载体。本发明酪氨酸衍生聚合物自组装纳米球能够渗透角质层并在人类皮肤层内分布。这些纳米球能够包封活性化合物例如疏水药物, 并且将它们递送至表皮和真皮。因此, 本发明还包括通过由本发明纳米球包封的疏水或亲水活性化合物的局部施用的方法将药物穿过角质层递送至表皮和真皮的方法。治疗的组合物和方法用于兽类和人类药物及其给药, 并且除人类患者外, 也可被施用至哺乳动物和其他动物, 例如鸟类、鱼类、爬行类和两栖类动物。

活性化合物在从纳米球络合物分离之前可以是无活性的,或它可保持在纳米球内并以这种形式具有活性。例如,UV-A和UV-B吸收化合物,其在防晒乳(sun block)和防晒剂(sun screens)中用作活性成分,可保持与纳米球络合,并在它们应用的部位吸收有害UV辐射。

用于治疗用途的可接受的局部药学载体是药学领域熟知的,并在例如, *Remington's Pharmaceutical Science*, Mac Publishing Co., (A. R. Gennaro ed. 1985)中描述。这些材料以应用的剂量和浓度对接受者是无毒的,并且包括稀释剂、增溶剂、润滑剂、助悬剂、封装材料、溶剂、增稠剂、分散剂、缓冲剂例如磷酸盐、柠檬酸盐、醋酸盐和其他有机酸盐,抗氧化剂例如抗坏血酸,防腐剂,低分子量(小于约10个残基)肽例如聚精氨酸,蛋白例如血清白蛋白、凝胶或免疫球蛋白,亲水聚合物例如聚(乙烯基吡咯烷酮),氨基酸例如甘氨酸、谷氨酸、天门冬氨酸或精氨酸,单糖、双糖和其他碳水化合物其包括纤维素或其衍生物、葡萄糖、甘露糖或糊精,螯合剂例如EDTA,糖醇例如甘露醇或山梨醇,反离子例如钠和/或非离子表面活性剂例如Tween™、Pluronic™或PEG。在一个实施方式中,用于通过角质层递送至表皮和真皮的纳米球络合物包含在水分散液、乳液、霜、软膏、凝胶状或固体聚合物基质或多孔陶瓷基质中。

包封被递送的疏水剂的纳米球还可作为该试剂的储存库被分散在控制释放装置的低聚物基质中。宿主低聚物基质可以是水凝胶或其他可生物蚀解的低聚物。这些分散液应具有例如透皮药物递送装置中活性剂储存物的用途。

可使用或不使用用于皮肤递送的物理和/或化学增强方法来递送纳米球络合物。其中,合适的物理增强方法包括热能、超声其包括超声透入和超声导入、磁电泳、光化学波和激光烧蚀、无线电频率能量、脉冲电场、电泳方法、离子导入、微切割的微管路、膜电穿孔、实心 and 空心微针、穿刺,穿孔、研磨、无针注射、吸引和拉伸。化学增强包括使用脂肪酸、脂肪酸酯、脂肪醇、萜、乙二醇和乙二醇酯、1,3-二氧戊环、含有至少12碳原子的大环酮、噁唑烷酮和噁唑烷酮衍生物、烷基-2-(N,N-二取代的氨基)-链烷酸酯、(N,N-二取代的氨基)-烷醇链烷酸、防晒酯及其混合物。更优选地,真皮穿透增强剂选自包括油酸、油醇、环十五酮(CPE-218™)、失水山梨醇单油酸酯、甘油单油酸酯、丙烯乙二醇单月桂酸酯、聚乙烯乙二醇单月桂酸酯、2-正-壬基1,3-二氧戊环(SEPA™)、2-(N,N-二甲基氨基)-丙酸十二烷酯(DDAIP)或其盐衍生物、2-乙基己基2-乙基己酸酯、异丙基肉豆蔻酸酯、二甲基异山梨醇酯、4-癸基噁唑烷-2-酮(SR 38™, TCPI, Inc.)、3-甲基-4-癸基噁唑烷-2-酮、辛基二甲基-对-氨基苯甲酸、辛基对-甲氧基肉桂酸酯、辛基水杨酸的列表及其混合物。

递送系统及其制备方法是特别适合使用活性化合物例如药理学上的活性蛋白、大分子、肽、疫苗、核酸、其包括质粒、寡核苷酸和SiRNA等等,以及用其他亲水和疏水小药理学活性分子和对比剂。适当的活性化合物包括,但不限于,合成的和天然的药物、抗生素、抗菌剂、抗痤疮剂、抗癌药、非甾体抗炎剂(NSAIDs)、抗组胺剂、镇咳剂、镇

咳剂、止痒剂、抗胆碱能剂、抗呕吐和抗恶心剂、食欲抑制剂、中枢兴奋剂、抗心律失常药、 β -肾上腺素阻断剂、强心剂、抗高血压剂、利尿剂、血管扩张剂、血管收缩剂、抗溃疡剂、麻醉剂、抗抑郁剂、镇静剂和镇痛剂、抗精神病剂、抗微生物剂、抗肿瘤剂抗疟剂、肌肉松弛剂、止泻剂、防晒鞣剂、皮肤漂白（或增亮）剂、化妆品、将药物和化妆品性质组合的产品（“化妆医药品”）其包括天然维生素、矿物质、天然油、植物化学品、酶、抗氧化剂、抗衰老剂、角质层分离剂（ α -羟基酸、乙醇酸和水杨酸）、和保湿剂、皮肤清洁剂、头发清洁剂、除臭剂、洗发液、调节剂（**conditioners**）、着色剂、晒伤预防剂 and 治疗方法，以及皮肤疾病包括寄生、真菌、细菌和病毒感染、丘疹鳞屑性疾病、色素性病症、癌症和对药物的皮肤反应的治疗的治疗剂。

示例性活性化合物包括水杨酸、硫、乳酸、乙二醇、丙酮酸、尿素、间苯二酚、**N**-乙酰半胱氨酸、类维生素 **A** 例如视黄酸及其衍生物（例如，顺式和反式）、抗生素和抗菌剂例如过氧化苯甲酰、吡啶酮乙醇胺盐（**octopirox**）、红霉素、四环素、三氯生、壬二酸及其衍生物、苯氧乙醇和苯氧丙醇、乙酸乙酯、克林霉素、甲氯环素、**sebastats** 例如黄酮、羟基酸、胆汁盐例如鲨胆甾醇硫酸盐及其衍生物、脱氧胆酸盐、胆酸盐、丙酸 **NSAIDS** 其包括但不限于阿司匹林、对乙酰氨基酚、布洛芬、萘普生、苯噻洛芬、氟比洛芬、非诺洛芬、芬布芬、酮洛芬、吲哚洛芬、吡洛芬、卡布洛芬、奥沙普秦、普拉洛芬、咪洛芬、噻洛芬、舒洛芬、阿米洛芬、噻洛芬酸、氟洛芬、布氯酸、甾体抗炎药物其包括氢化可的松及类似物、曲普利啶、苯海拉明、抗敏安、吡拉明、苯茛达明、异丙嗪、赛庚啶、阿扎他定、氯马斯汀、卡比沙明、曲吡那敏、特非那丁、右氯苯那敏、溴苯那敏、氯环嗪、二苯拉林、非尼拉敏、苯托沙敏、右美沙芬、可待因、卡拉美芬、咳必清、甲安非他明（**methdilazine**）、阿利马嗪、东莨菪碱、阿托品、后马托品、左旋多巴、双环胺、莨菪碱、丙环定、苯海索、二乙异丙嗪、赛克利嗪、敏可静、氯丙嗪、安其敏、胃复安、丙氯拉嗪、曲美苄胺、苄非他明、芬特明、氯苯丁胺、芬氟拉明、安非拉酮、苯甲曲秦、苯丙胺、甲基苯丙胺、右旋安非他命、哌甲酯、普萘洛尔、普鲁卡因、吡二丙胺、奎尼丁、恩卡胺、**flecanaide**、美西律和托卡胺、**3S**-羟基-**10, 11**-双氢奎尼丁、**3R**-羟基-**10, 11**-双氢奎尼丁、**3R**-羟基-**O**-乙酰基-**10, 11**-双氢奎尼丁、**3S**-羟基-**O**-乙酰基-**10, 11**-双氢奎尼丁、特别是 **3S**-羟基-**10, 11**-双氢奎尼丁、美托洛尔、醋丁洛尔、倍他洛尔、拉贝洛尔、噻吗洛尔、酒石酸美多洛尔、醋丁洛尔盐酸盐、倍他洛尔盐酸盐、盐酸柳胺苄心定、马来酸噻吗洛尔、米力农盐、氨力农、多巴酚丁胺、**14**-氨基类固醇衍生物、依那普利盐、可乐定、胍屈嗪、米诺地尔（其也是头发生长刺激药物）、胍那决尔、胍乙啶、维拉帕米、美加明、甲基多巴乙酯、帕吉林、酚苄明、哌唑嗪、阿米洛利、氢氯噻嗪、地尔硫卓（**diltazem**）、胺碘酮、苯氧丙酚胺、苄丙酚胺、妥拉苏林、维拉帕米、双氢麦角胺、麦角胺、二甲麦角新碱、雷尼替丁、西咪替丁、利多卡因、布比卡因、氯普鲁卡因、狄布卡因、依替卡因、甲哌卡因、丁卡因、达克罗宁、海克卡因、普鲁卡因、可卡因、氯胺酮、普莫卡因、苯酚、丙咪嗪、地昔帕明、阿米替林、去甲替林、普罗替林（丙氮环庚烯）、多虑平、马普替林、苯乙肼、反苯环丙胺、曲唑酮、三甲丙咪嗪、甲氨二氮卓、贝那替秦、苯喹胺、氟西洋、

安他乐、洛沙平、丙嗪、氯普噻吨、氟奋乃静、氟哌啶醇、吗茛酮、甲硫达嗪、三氟拉嗪、 β -内酰胺药物、喹诺酮药物、环丙沙星、氟哌酸、四环素、红霉素、丁胺卡那霉素、三氯生、多西环素、卷曲霉素、氯己定、金霉素、土霉素、克林霉素、乙胺丁醇、甲硝唑、喷他脒、庆大霉素、卡那霉素、林可霉素 (lineomycin)、甲烯土霉素、乌洛托品、米诺环素、新霉素、奈替米星、巴龙霉素、链霉素、妥布霉素、咪康唑、阿马诺嗪、盐酸四环素、依托红霉素、红霉素硬脂酸 (盐)、硫酸阿米卡星、盐酸多西环素、硫酸卷曲霉素、葡萄糖酸洗必太、盐酸洗必太、盐酸金霉素、盐酸土霉素、盐酸克林霉素、盐酸乙胺丁醇、盐酸甲硝唑、盐酸喷他脒、硫酸双生霉素、硫酸卡那霉素、盐酸林可霉素、盐酸甲烯土霉素、乌洛托品马尿酸盐、孟德立酸乌洛托品、盐酸二甲胺四环素、硫酸新霉素、硫酸奈替米星、硫酸巴龙霉素、硫酸链霉素、硫酸妥布霉素、盐酸咪康唑、盐酸阿马诺嗪、硫酸阿马诺嗪、三氯生、羟甲辛吡酮、对氯间二甲酚、制霉菌素、托萘酯、克霉唑、博来霉素、柔红霉素、阿霉素、氮芥、甲基苄肼、米帕林、他莫昔芬、长春碱、长春新碱、氯喹、羟氯喹伯氨喹、奎宁、桂麻黄碱、环苯扎珠、黄酮哌酯、邻甲苯海拉明、罂粟碱、甲苯凡林、异达维林、利托君、地芬诺酯 (dephenoxylate)、丹曲林、阿珠莫林、洛哌丁胺、二羟基丙酮、吡啶衍生物和类似物、对苯二酚、抗坏血酸、曲酸、偏亚硫酸氢盐钠。

合适用本发明的纳米球络合物治疗的病症包括但不限于系统疾病, 例如, 肠病性肢端皮炎、肢痛症、急性发热性嗜中性皮肤病、淀粉样变性病、血管性水肿、环形红斑、抗磷脂综合征、银中毒、白塞病 (Behcet disease)、生物素反应皮肤病、钙化防御、胡萝卜素血症、冻疮、氯痤疮、结缔组织疾病、克罗恩病、冷球蛋白血症 (cryoglobulinaemia)、库欣综合征、皮肤恶性肿瘤标志、恶性萎缩性丘疹病 (Degos 病)、疱疹样皮炎、皮炎、糖尿病、糖尿病足溃疡、唐氏综合征、药疹、爱-唐综合征 (Ehler Danlos syndrome)、嗜酸性筋膜炎、多形性红斑、结节性红斑、红细胞生成性原卟啉病、面红、胰高血糖素瘤、戈林综合征 (Gorlin syndrome)、移植物抗宿主病、环状肉芽肿、血色病、组织细胞增多症、高嗜酸性粒细胞综合征、色素失禁症、缺铁性贫血、皮肤瘙痒、工作综合征、夸休可尔症 (Kwashiorkor)、LEOPARD 综合征、网状青斑、红斑狼疮、莱姆病、马凡综合征 (Marfan syndrome)、肥大细胞增多症、更年期、局限性硬皮病、黏蛋白病、粘液瘤综合征、类脂质渐进性坏死、坏死松解性游走性红斑、脂膜炎、PAPA 综合征、光敏性、结节性多动脉炎、妊娠的多形性出疹、迟发性皮肤卟啉症、胫前黏液水肿、结节性痒疹、普洛提斯综合征 (Proteus syndrome)、瘙痒、弹性假黄瘤、坏疽性脓皮病、赖特综合征 (Reiter syndrome)、网状红斑黏蛋白病、类风湿关节炎、SAPHO 综合征、结节病、硬皮病 (局部)、硬肿症、硬化性黏液水肿、坏血病、Sezary 综合征、干燥综合征 (Sjogren syndrome)、移植受者的皮肤癌、气孔皮肤问题、sweet 疾病、系统硬化症、休止期脱发、甲状腺疾病、中毒性表皮坏死松解症、结节性硬化症、荨麻疹、血管炎、韦格纳肉芽肿病、Wells 综合征、Wilson 病、黄色瘤、着色性干皮病、损伤、肿瘤和癌症、痤疮/滤泡疾病、湿疹、皮炎和过敏、疱病、免疫学病症、有鳞性皮肤病、糜烂及溃疡、血管皮肤问题、色素沉着问题、瘙痒 (疥疮)、外用剂的反应、光化性角化病、皮肤老化、血管

角化瘤、血管肉瘤、皮肤再生不良、非典型纤维黄瘤、非典型痣、基底细胞癌、**Bazex** 综合症（肢端角化症）、**Bazex** 综合症（滤泡皮肤萎缩-基底细胞癌）、**Becker** 痣、胎记、蓝痣、**Bowen's** 病（非生殖器）、阴茎 **Bowen's** 病、外阴 **Bowen's** 病、褐色斑和雀斑、冻疮、结节性软骨皮炎（**chondrodermatitis nodularis**）、透明细胞棘皮瘤、黑头粉刺痣（**comedone naevus**）、先天性黑色素细胞痣、鸡眼和胼胝、皮肤 B 细胞淋巴瘤、皮肤 T 细胞淋巴瘤、皮肤纤维瘤（组织细胞瘤）、隆突性皮肤纤维肉瘤、表皮痣、表皮状囊肿、发疹性角化棘皮瘤、乳房外 **Paget** 病、播散性浅表性光线性汗孔角化病、增值性红斑 **Gorlin's** 综合征、**Grzybowski** 综合征、血管瘤、晕痣（**halo moles**）、婴儿指/趾纤维瘤（**infantile digital fibroma**）、炎症线性疣状表皮痣、幼年黄色肉芽肿、**Kaposi** 肉瘤、瘢痕疙瘩和增生性瘢痕、角化棘皮瘤、雀斑样痣、单纯雀斑样痣、苔藓样角化病、线性汗孔角化病、脂肪瘤、黑色素瘤、**Merkel** 细胞癌、转移、**Meyerson** 痣、胎块、胎斑（**Mongolian spot**）、局限性硬皮病（局部硬皮病、硬斑病）、粘膜（黏液）囊肿、蕈样肉芽肿、痣、**Ota & Ito** 痣（**naev**）（痣，**nevi**）、类脂质渐进性坏死、神经纤维瘤、**Paget** 病、阴茎上皮瘤样病变、毛母质瘤、化脓性肉芽肿、皮脂腺囊肿、皮脂腺增生、皮脂腺痣、脂溢性角化病、**Sezary** 综合征、皮肤癌、皮肤癌转移、皮赘（**skin tags**）、日光（老年）粉刺、日光性角化病、**Spitz** 痣、鳞状细胞癌、鳞状细胞乳头状瘤、多发性脂囊瘤、汗管瘤、毛发上皮瘤、毛囊瘤（**trichofolliculomas**）、小棘状毛壅症（**trichostasis spinulosa**）、外阴上皮内瘤样病变、外阴癌黄色肉芽肿、湿疹、皮炎、过敏症、过敏性接触性皮炎、血管性水肿、过敏性皮炎（异位性湿疹）、过敏性皮炎、过敏性皮炎并发症、自身湿疹化、慢性光化性皮炎、乳痂、皮炎、疱疹样皮炎、皮肤划痕症、盘状湿疹、皮肤干燥、尘螨、出汗障碍、湿疹、裂纹湿疹、剥脱性角质松解症、固定性药疹、引力性湿疹、手部皮炎、擦烂红斑、刺激性接触性皮炎、青少年足底皮肤病、单纯性苔藓、线状苔藓、尿布皮炎、硬币形皮炎（**nummular dermatitis**）、外耳道炎、丘疹性荨麻疹、斑贴试验、口周皮炎、光接触性皮炎、光敏性、光敏性皮炎、光测试、糠疹、多形性日光疹、妊娠多形性出疹、汗疱疹、结节性痒疹、肛门瘙痒、外阴瘙痒、脂溢性皮炎（**Seborrhoeic** 皮炎）、荨麻疹、冬季疥疮、疱病、疱疹样皮炎、**Hailey-Hailey** 病（家族性良性天疱疮病）、大疱性类天疱疮、瘢痕性类天疱疮、获得性大疱性表皮松解症、大疱性表皮松解症、线性 **IgA** 皮肤病、副肿瘤性天疱疮、妊娠性类天疱疮、落叶型天疱疮、寻常性天疱疮、起泡皮肤感染、禽痘（水痘）、丹毒、手足口病、单纯疱疹、带状疱疹（**herpes zoster**）（**shingles**，带状疱疹）、脓疱疮、疥疮、葡萄球菌烫伤皮肤综合征、湿疹、出汗障碍（汗疱疹）、盘状（硬币形）湿疹、植物皮炎（**plant dermatitis**）、免疫病症、疱病、结缔组织疾病、皮炎、影响头发指甲以及出汗的病症、扁平苔藓、扁平苔藓硬化、牛皮癣、鳞状皮肤疾病、获得性角化病、光化性（阳光）角化病、**BCC**（浅表）、**Bowen's** 病（原位鳞状细胞癌）、慢性浅表鳞状皮肤病（副银屑病）、裂足跟、乳痂、皮肤 T 细胞淋巴瘤、**Darier** 病、皮炎（湿疹）、火棉胶样婴儿、融合性网状乳头瘤病、弥漫性遗传性角化症、播散性浅表光线性汗孔角化病、皮肤干燥、红癣、脱落性角质层分离、焦点性遗传性角化病、真菌感染、**Grover's** 病、鱼

鳞病、青少年足底皮肤病、角皮症、Kyrle 疾病、线状苔藓、红斑狼疮、Netherton 综合征、掌跖角化病、糙皮病、白色糠疹、苔藓样糠疹、玫瑰糠疹、圆形糠疹、毛发红糠疹、花斑糠疹、牛皮癣、点状皮肤角化症、Reiter 综合征、Seborrhoeic 皮炎、角层下脓疱病（Sneddon Wilkinson 病）、癣感染、糜烂和溃疡、外伤、血瘀/静脉曲张/静脉溃疡、褥疮、高血压腿部溃疡、动脉硬化溃疡、神经性溃疡如糖尿病、溃烂皮肤癌（BCC、SCC、恶性黑色素瘤）、脂膜炎、血管炎溃疡、皮肤结节性多动脉炎、坏疽性脓皮病、Wegener 肉芽肿、免疫抑制的细菌、病毒或真菌感染、蕈样肉芽肿、蜘蛛咬伤、非典型分枝杆菌感染、生殖器感染、迟发性皮肤卟啉病、红细胞生成性原卟啉病、通常的伤口、耳轮结节性软骨皮炎、糜烂性脓疱性皮肤病、口疮性溃疡（口腔及生殖器）、皮肤再生不良、血管皮肤问题、匍行性血管瘤、血管肉瘤、共济失调毛细血管扩张症、泛红、毛细管炎、色素性紫癜、Schamberg 病、毛细血管、畸形（鲜红斑痣、鲑肉色斑）、皮肤血管炎、大理石样皮肤、持久性隆起性红斑、红斑性肢痛症、特发性毛细血管扩张、血管瘤（haemangioma）（血管瘤、草莓胎记）、遗传性出血性毛细血管扩张症、Kaposi 肉瘤、淋巴水肿、皮肤异色病（Poikiloderma of Civatte）、结节性多动脉炎、紫癜、化脓性肉芽肿、酒渣鼻、类固醇酒渣鼻、持久性发疹性斑状毛细管扩张、荨麻疹性血管炎、静脉畸形（包括血管球瘤）、血管炎和色素沉着的问题。

治疗上有效的剂量可由体内或体外方法测定。对于本发明的每个具体化合物，可进行个别测定以测定所需的最适剂量。治疗上有效的剂量的范围应自然地受施用途径、治疗客体和患者条件的影响。对于各种合适的施用途径，必须用药理学已知的方法个别测定每个活性化合物的吸收效率。因此，对临床医学家来说，滴定剂量并修饰所需要的施用途径以获得最适治疗效果是必要的。有效的剂量水平——即获得所期望效果必需的剂量水平——的测定应在本领域技术人员范围内。典型地，化合物的应用以较低剂量水平着手，逐渐增加剂量水平，直到获得所期望的效果。本发明的活性化合物从制剂的释放速率在本领域普通技术路径内变化，以测定优势分布，其依赖于将用于治疗的治疗条件。

常用剂量可以在约 0.001 mg/kg 至约 1000mg/kg 的范围，优选地约 0.01 mg/kg 至约 100 mg/kg，并且更优选地约 0.10 mg/kg 至约 20 mg/kg。有利地，本发明的化合物可以是一天几次施用，并且其他剂量用法也是可用的。

本发明的纳米球-药物络合物可以在合适于药物活性保存的条件下以及保持共聚物的完整性，其包括冻干法制备，并通常合适于保存在环境或冷却的温度。灭菌可用常规方法容易实现。

本文以下所述的下列非限制实施例说明了本发明的某些方面。所有的分数和百分比都是按重量计，除非另有说明，并且所有温度都是摄氏度。

实施例

实施例 1：聚合物和纳米球-溶质制剂的制备

化学品：二氯甲烷 (HPLC 级)、甲醇 (HPLC 级)、2-丙醇和最佳切割温度化合物 (optimal cutting temperature compound, OCT) 购自 Fisher Scientific 公司, (Pittsburgh, PA)。辛二酸(SA)、4-二甲基氨基吡啶-对-甲苯硫酸盐 (DMPTS)、姜黄素、丙烯乙二醇 (PG)、聚(乙二醇)单甲醚 (Mw 5000) 和 Dulbecco's 磷酸缓冲盐 (PBS, pH 7.4) 购自 Aldrich 化学试剂公司 (Milwaukee, WI); 二异丙基碳二亚胺 (DIPC) 购自 Tanabe Chemicals 公司 (San Diego, CA); DMF (N,N-二甲基甲酰胺) 和 THF (四氢呋喃) 获自 Merck 公司 (EM Science, Darmstadt, Germany), 以及二甲基亚砷 (DMSO) 获自 Merck 公司和 Sigma 公司; DAF (5-十二烷基氨基荧光素) 和 NR (尼罗红) 获自 Molecular Probes 公司 (Eugene, OR); 所有试剂以获得时状态直接使用。

聚合物制备和表征：用一锅法在 20°C 使用原位碳二亚胺将 PEG 和 oligo(DTO-SA) 耦联合成三嵌段共聚物，如公开号 US2006/0013882 的美国专利申请所述，所述内容通过引用并入本文。共聚物的化学结构和纯度由 $^1\text{H NMR}$ 确定 (d6-DMSO, Varian Unity 300 分光光度计, Palo Alto, CA)。使用凝胶渗透层析测定分子量 (Mn 和 Mw)，GPC (PL-凝胶柱，孔径大小为 105 和 104 Å, Perkin-Elmer 公司, Shelton, CT; Waters 410 示差折光检测器，流速为 1 mL/min THF 和聚苯乙烯标准作为 Mw 标准。基于酪氨酸的三嵌段共聚物的主要化学结构如图 1 所述。

纳米球-溶质制剂的制备：含有或不含有溶质化合物的纳米球络合物通过将 60 mg 的三嵌段共聚物与在 600 μL DMF 中的 600 μg DAF 或姜黄素或尼罗红组合来制备。伴随持续搅拌将这些溶液逐滴添加至 14.4 mL 去离子水。为了去除直径大于 220 nm 的粒子，产生的混浊的水分散液通过 0.22 μm PVDF 注射器滤器 (Millipore 公司, Bedford, MA) 过滤，并且滤液用于所有后续表征。

我们对纯化的纳米球进行下述处理：通过 0.22 μm 滤器过滤自组装的纳米球-溶质悬浮液；通过以 65 000 rpm (290 000 \times g) 对 12.25 mL 纳米球溶液在 25°C 超速离心 3 小时分离过滤悬浮液 (Beckman L8-70M 超速离心机, Beckman Coulter 公司, Fullerton, CA), 随后去除上清液；然后，沉淀的纳米球用水洗涤两次，并且在 25°C 下的 1 mL 水中轻微搅拌重悬。然后，通过添加水，将重悬沉淀的体积增加至 3 mL，并且最终，将溶液再次过滤除菌 (0.22 μm)。

实施例 2：纳米球-溶质制剂的表征

尺寸，尺寸分布和形态：纳米球的水动力直径由动力光散射获得，其动力光散射在 $q = 90^\circ$ 、 $\lambda = 523 \text{ nm}$ 和 $T = 298 \text{ K}$ 条件下且使用积累量拟合分析 (Lexel 氙离子激光 (Fremont, CA) ; Brookhaven Instruments goniometer and correlator BI-2030; Holtsville, NY)。

纳米球的形态使用透射电子显微镜 (TEM) 测定。对于负染色实验，将一滴纳米球分散液置于 Formvar 预包被的格子 (grid) 1 分钟。过量的样品用滤纸轻柔吸取来去除，并且将一滴染色溶液 (2% 乙酸双氧铀) 与样品接触 1 分钟。然后，通过将格子边缘接触至

滤纸楔的边缘，小心去除过量染料。对于 Pt/C 阴影方法实验，将一滴纳米球涂覆在 Formvar/碳覆盖的微栅铜网上约 1 分钟。用滤纸的撕片轻柔吸取网格来去除过量的流体。将网格风干并用 2.5 nm Pt/C (30°) 使用高真空冷冻蚀刻装置 BAF 300 (Balzers 公司, Elgin, IL) 遮蔽 (shadow)。在 JEM 100 CX 型号透射电子显微镜 (JEOL 有限公司, Peabody, MA) 上拍摄电子显微照片。

纳米球-溶质络合物的粒径分布显示于图 2。不同溶质不存在(插图)或存在的情况下制备的纳米球的水动力直径具有相对窄的大小分布，平均为 55 nm，其表明纳米球制备中溶质的存在和溶质疏水性均不对纳米球尺寸有显著影响。图 3 显示使用 2% 乙酸双氧铀染色的负染色和 Pt/C 阴影方法获得的透射电子显微照片。这些图像表示纳米球的球形形态，但是它们的粒径分布结果显示大于光散射分析观察的结果，其直径为 30 至 200 nm 的范围。这种差异可归因于在制备用于电子显微镜的样本中的干燥，其可导致纳米球的收缩和/或结块。假定经表皮的亲水途径的平均宽度是依次为 0.4 (水蒸发途径) 至约 100 nm (intercorneocyte 空间)，相对较小尺寸的酪氨酸衍生的纳米球应使它们容易地沿皮肤上的表面皱纹穿透至角质层。

溶质结合效率：研究并确证灵敏、特异且可再生的 HPLC 方法用于定量测定共聚物系统中的 DAF、尼罗红和姜黄素。用高效液相层析 (HPLC) 分析溶质浓度，使用 Wasters 2695 HPLC 系统，配置 UV/vis 检测器 (Wasters 2487, Dual 1 Absorbance 检测器)。在 25°C 使用 RP-C 18 柱 (Perkin-Elmer Brownlee Analytical C-18 柱, 33 mm x 4.6 mm) 获得层析分离。流动相是水 (0.1% TFA) / 乙腈 (0.1% TFA) 以 35/65 (v/v)、40/60 (v/v) 和 57/43 (v/v) 的比率的混合物分别用于 DAF、NR 和姜黄素分析。以 1 mL/min 流速递送流动相。UV/vis 检测器设定为 270、550 和 390 nm 分别用于 DAF、NR 和姜黄素的分析。对于所有溶质以浓度 1 至 50 µg/mL 的范围制备标准校正样品。校正曲线显示了约三级强度浓度范围的线性行为。检测限制基于噪音比率 3 的信号评价，并且对于 DAF 为 0.07 µg/mL，对于 NR 为 0.04 µg/mL 以及对于姜黄素为 0.02 µg/mL。质量控制样品的日内和日间的精密度和准确度的测定比校正曲线的范围优于 10%。另外，通过将在分析只含有纳米球的对照剂 (placebo) 上清液中得到的结果与那些溶质中所有标准溶液的分析得到的结果进行比较来测定特异性，并且没有观察到来自纳米球的干扰。

为了测定溶质结合效率，取出纯化的纳米球-溶质络合物悬浮液的预定部分并冷冻干燥，并且在完全溶解与萃取溶剂后，将干燥剩余物准确称重。在含有 DAF 或姜黄素的纳米球的情况下，将低压冻干的络合物溶解于 5 mL 的甲醇 (萃取溶剂) 并剧烈涡旋 1 小时。在 NSP-NR 的情况下，通过将低压冻干的络合物溶于乙醇，萃取染料。由纳米球进行的溶质络合作用由下列比值表征：

$$\text{结合效率 (\%)} = \text{纳米球中药物质量} / \text{给药中的药物质量}$$

通过在室温搅拌在丙烯乙二醇 PG 中的过量分子 24 小时来制备在 PG 中每个溶质的溶液。通过 0.22 μm PVDF 注射器滤器 (Millipore 公司, Bedford, MA) 过滤样品, 并且将滤液用于所有后续表征和实验。对于被动渗透实验, 通过随后用 PG 对 PG-溶质溶液的稀释或用 PBS 对 NSP-溶质制剂的稀释获得在 PG 和 NSP (纳米球) 中所有溶质的相等浓度 (使用 RP-HPLC 确定)。

实施例 3: 皮肤渗透测试

使用亲脂性模式染料并应用图像分析, 我们研究了这些纳米球克服经皮穿透屏障的潜能。选择的荧光团 (图 1) 是 DAF 和 NR, 其之前已用于观察在皮肤中微胞和脂质体分布。姜黄素的选择基于它的固有荧光和在对黑素瘤的治疗组合中所推荐的潜能 (proposed potential)。无论溶质疏水性和溶质分子量程度均可得到所有溶质与纳米球 65% 的结合效率。纳米球溶液中溶质最终浓度: DAF 为 180 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、姜黄素为 190 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 NR 为 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 因此, 约 0.02% 的纳米球-溶质制剂或 PG-溶质溶液用于穿透研究, 提供足够强的可被荧光显微镜检测到的信号。

人类皮肤: 经皮刀切割的、源自高加索女性尸体腹部的全部厚度 (约 500 μm) 的人类皮肤获自 AlloSource 公司 (Englewood, CO) 并储存在 -80°C 。仅在每个实验之前, 皮肤才允许解冻至室温, 然后立刻用于体外运输研究。

运输研究: 全部厚度人类皮肤块置于 Franz 扩散池上 (PermeGear 公司, Bethlehem, PA), 其显示出 0.64 cm^2 的扩散表面面积。受体区室充满 0.155 M 的磷酸盐缓冲剂 (pH 7.4, 5.1 mL), 其以 600 rpm 搅拌。每个受体区室内的流体的温度通过使用温度调节水泵 (Haake DC 10, Karlsruhe, Germany) 维持在 $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, 其中水泵是利用围绕在每个主要小室的套封的循环水来进行。在这些条件下, 皮肤表面的温度为 $32 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 。为了促进膜的水合, 初始时将皮肤留在 Franz 扩散池 1 小时。

这一阶段后, 将 0.3 mL 合适的制剂的溶质 (在 NSP 或 PG 中) 置于每个皮肤样品表面上, 对于 NR 渗透实验进行 1、3、6 和 24 小时以及对于 DAF 和姜黄素渗透研究进行 24 小时。在所有实验中, 每个 Franz 扩散池的取样口的供体区室用按教导的 parafilm® 层覆盖, 并且全部装置用铝箔加顶以防止染料漂白。每个渗透实验进行六次重复或四次重复 (在时间-依赖实验的情况)。

在渗透实验的最后, 从皮肤表面去除过量的制剂, 从扩散池分离皮肤部分, 并用 PBS 洗涤三次, 并用金佰利无尘纸 (Kimwipes) 轻轻擦干。将皮肤于 -20°C 下冷冻, 从处理区域切出 0.2 x 0.5 cm 块, 然后包埋于最佳切割温度化合物 (OCT 包埋剂)。低温保持器 (Leica 低温保持器 CM 3050S, Wetzlar, Germany) 用于制备皮肤表面完全皮肤的纵切片。可获得九至十二个厚度为 20 μm 纵切片, 并在 -4°C 下储存直到用显微镜分析。

皮肤吸收：体外被动渗透实验，其包括将 NSP-溶质制剂和/或 PG-溶质溶液局部施用至人类尸体皮肤 24 小时，显示在受体区室中溶质的量低于检测限。在该项研究中，通过纳米球递送对所有测试染料缺乏可检测到的渗透表明基于酪氨酸的纳米球不能促进穿过人类皮肤的运输。类似的结果在以前使用 PLGA 荧光微粒子中报道，其在皮肤层中清晰可见，但不能到达扩散池的受体区室。因此该结果与以往报道颗粒药物载体的使用显示出提高药物在皮肤中的滞留而不增加运输的研究一致。

荧光显微镜：将皮肤切片用于荧光和相差显微镜，使用配置了 UV 光源和用于荧光测量的滤器的 Olympus CK40 显微镜。使用 Olympus Microsuite TM B35V 程序实现图像的获取及分析。激发和发射波长对于 DAF 和姜黄素分别为 485 和 520 nm，对于 NR(尼罗红)分别为 546 和 585 nm。设定相机积分时间为 500 ms 来记录图像。将相同参数用于所有样品的取像并且对背景荧光无校正。使用图像处理软件(ImageJ, vl .36, NIH)来记录荧光产量，像素亮度值的积分 (任意单位, arbitrary units, ABU) 给出相应染料的情况。

用 PBS 处理和/或单独用基于酪氨酸的纳米球处理的皮肤的图像未显示任何明显荧光信号 (结果未显示)。图 4 描述局部应用 DAF、姜黄素和 NR 24 小时后纵切的人类皮肤的荧光显微镜图像的代表性例子。在显影定性地显示与 PG 相比，在皮肤层:酪氨酸衍生纳米球中最显著的荧光染色趋势，其被明显增强了染料的渗透。这些差异比 NSP-NR 的情况更明显 (图 4, E 与 F)。

另外，所用载体的性质影响角质层中染料的分布。通过 PG 递送的所有染料在该层所观察到的强烈荧光归因于该载体的高粘度，因此，在实验最后，水洗不能从皮肤顶部去除过量的 PG 制剂。另外，已表明增加的溶剂粘度具有降低皮肤渗透性和溶质扩散的能力。染料穿透至皮肤的定量分析通过计算从皮肤切片的荧光测量的像素强度获得。如图 5 所示，对表皮 (EP; 由角质层和生长表皮层 (viable epidermis) 组成)、浅表真皮 (SD) 和深层真皮 (LD) 进行图像分析。浅表真皮被定义为表皮以下测量约 100 μm 的区域，以及深层真皮是浅表真皮以下真皮的其余部分。

冰冻切片皮肤组织学：使用制造商提供的苏木精和曙红 (H&E) 染色方法的改进来检测由冷冻切片获得的皮肤切片的组织学。简言之，将皮肤切片在蒸馏水中水合 1 分钟，然后用 Gill 2 苏木精 (Sigma 公司, St. Louis, MO) 染色 4 分钟。通过在蒸馏水中洗涤载玻片三次来洗去过量染料，每次 1 分钟，然后添加 Scott's 溶液 (0.1% 碳酸氢钠) 洗涤 2 分钟。在蒸馏水中短暂清洗后，将皮肤切片在酸化曙红 Y (Sigma 公司, St. Louis, MO) 中复染 3 分钟。然后，使用依次用 95%、80% 和 70% 的乙醇将载玻片脱水，每次 1 分钟。在三次更换二甲苯每次 1 分钟的清洗后，将含有皮肤切片的载玻片固定在 Paramount 固定液中，并干燥过夜并用显微镜分析。

使用皮肤切片的 H&E 染色 (图 5) 来确定上述层用于进行染料穿透的定量分析。在皮肤不同层 DAF、姜黄素和 NR 的荧光强度以任意单位 (ABU) 表示并显示于图 4 (G-I)。

施用 24 小时后，皮肤不同层的 DAF 和姜黄素的穿透显示出非常相似的模式，其中来自 PG-染色的表皮荧光 (DAF 和姜黄素的 PE 值分别为 30.3 ± 1.2 和 31.6 ± 2.5) 明显高于 NSP-染色制剂 (DAF 和姜黄素的 PE 值分别为 15.3 ± 0.8 和 14.5 ± 0.2 , $p < 0.01$)。浅表和深层真皮的染色分布对于 DAF 和姜黄素未有明显不同 ($p > 0.01$)，无论它们如何被递送 (图 4)。观察到的低于预期的由 NSP 递送的 DAF 和姜黄素荧光，特别是在 SD 和 LD 中的荧光，可归因于纳米球的荧光淬灭效应。

但是，在 NR 的条件下，荧光分布显示出完全不同的模式 (图 4 (E、F、I))。当使用纳米球施用剂时，在 EP、SD 和 LD 中的尼罗红浓度明显高于那些使用 PG 递送的，其分别为在 SD 和 LD 中增加约四倍和三倍。次要但明显的 NSP-NR 穿透增加还出现于 EP 中，对 PG 和纳米球的 PE 值分别为 48.6 ± 1.3 和 59.4 ± 2.5 。

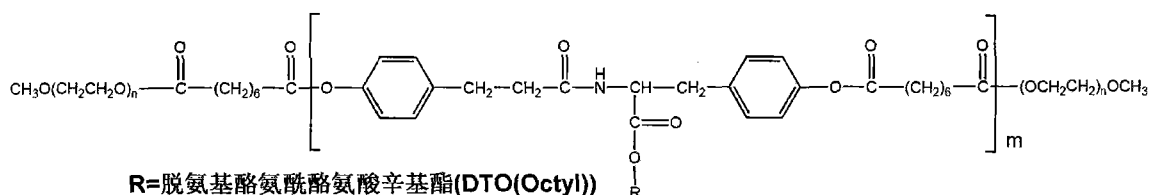
有趣的是，在 PG 中所有染料的渗透经过 EP 延伸至真皮，其中对于 DAF 和姜黄素减少量为两倍半，并且对于 NR 减少量约五倍 (图 4 (G-I))。另一方面，纳米球的 PE 产生对 DAF 和姜黄素的从 EP 至 LD 的染色穿透增加，而对于 NR，来自 NSP-染色制剂的荧光强度从 EP 至 LD 显示 2.5 倍降低。由于纳米球导致的 DAF 和姜黄素荧光的可能淬灭，我们猜想在 EP 和 SD 皮层中 NSP-DAF 和 NSP-姜黄素的某些荧光强度被掩盖。因此，在该项研究中，我们认为用 NR 得到的结果比描述纳米球递送潜能更准确。图 6 一般性地支持了通过纳米球递送的所有疏水溶质的皮肤渗透效率等于或高于用 PG 递送这一事实。

另一方面，施用 NSP 和 PG 后，获得染色渗透的时间依赖的比较 (图 6)。施用各自样品 1 小时后 (图 6, A-1 和 B-1)，对于用 PG-NR 和 NSP-NR 处理的皮肤，在 EP 中检测到荧光强度的明显差异；而对于二者在皮肤下层 (SD & LD) 中未见染色分布差异。在对照样品 (PG) 中测量的 PE 值在 EP 中为 45.9 以及在 SD 和 LD 中为 13.3，与在 EP 中 26.6 以及在 SD 和 LD 中 18.9 的对比表明在第一次过程中，纳米球扩散至皮肤下层比 PG 高出约 60% (图 6)。这表明酪氨酸衍生的纳米球不但能将疏水化合物递送至皮肤，而且可在更短的时间获得治疗剂量。6 小时后 (图 6, A-6 和 B-6) 在两种制剂中 NR 的应用，在皮肤所有层中均观察到增加的荧光强度；而且，对于 NSP-NR，荧光还持续至更大的深度。PE 值对于 PG-NR 在 SD 和 LD 中分别为 13.9 ± 1.1 和 13.7 ± 0.9 ，对于 NSP-NR 在 SD 和 LD 中分别为 34.4 ± 4.0 和 21 ± 1.1 。这些数值转化为在 SD 中 NSP-NR 扩散约增加 40%，与在 LD 中增加约 10% 比较。

纳米球-姜黄素制剂的体外评价：自由的和纳米球-姜黄素络合物的生物活性使用人类黑色素瘤 B16 细胞测定。将自由姜黄素 (在 DMSO 中) 和纯化的纳米球-姜黄素制剂的连续稀释物也添加至 B16 细胞，并且将细胞在 $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$ 条件下生长。生长三天后，根据制造商所述条件，用 MTS 分析 (CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation

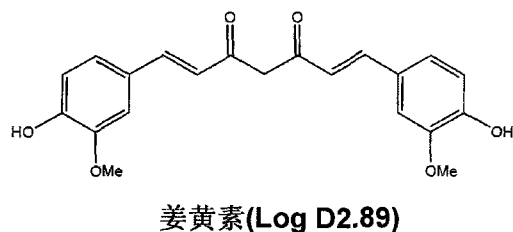
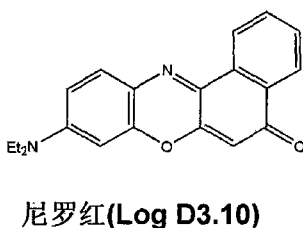
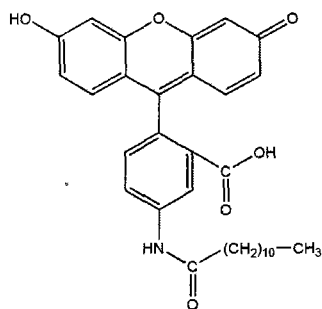
Assay; Promega 公司, Madison, WI)间接测定 50%细胞生长抑制所需浓度 (LC50)。
纯化的纳米球与自由姜黄素的 LC50 比较提供了纳米球对姜黄素活性的效果说明。

前述实施例和优选实施方式的描述应理解为说明而不是限制由权利要求限定的本发明。应易于理解的是,可使用如上所述的特征的众多变化和组合而不偏离如权利要求所述的本发明。这些变化不能认为是偏离本发明的精神和范围,并且所有这些修改意图是包括在如下权利要求的范围内。



R=脱氨基酪氨酰酪氨酸辛基酯(DTO(Octyl))

X=辛二酸, 辛二酸盐



5-十二烷基氨基荧光素(Log D7.54)

图 1

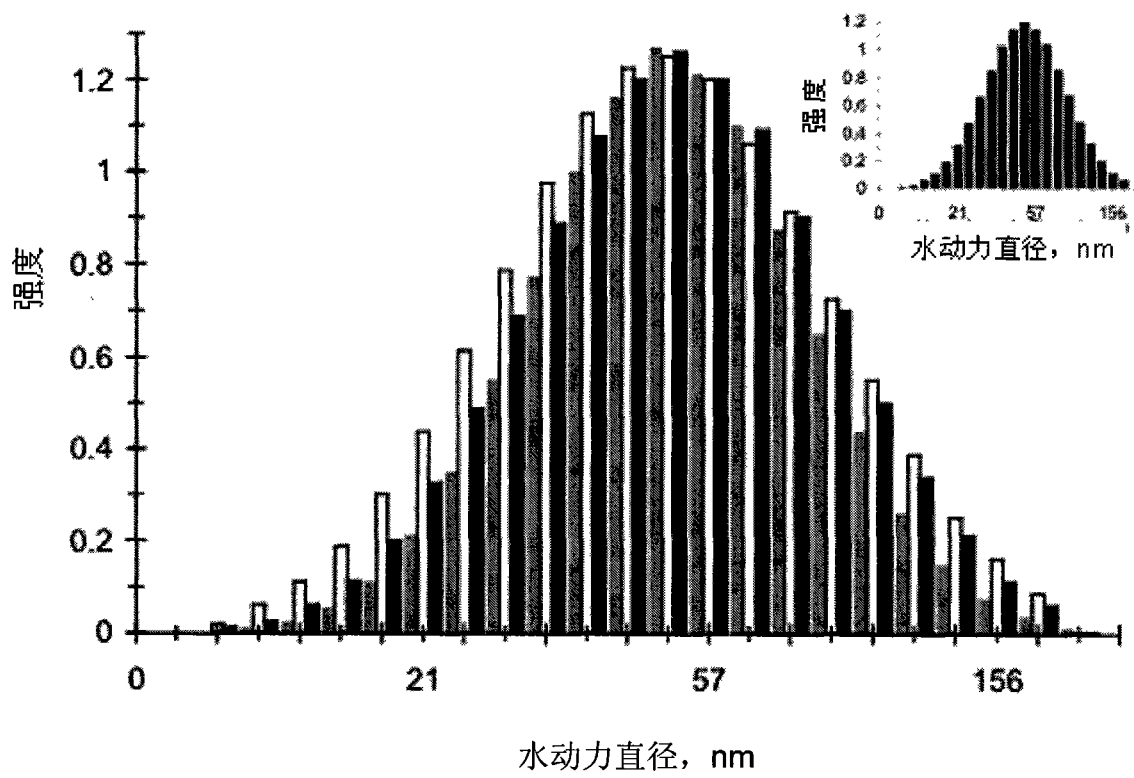


图 2

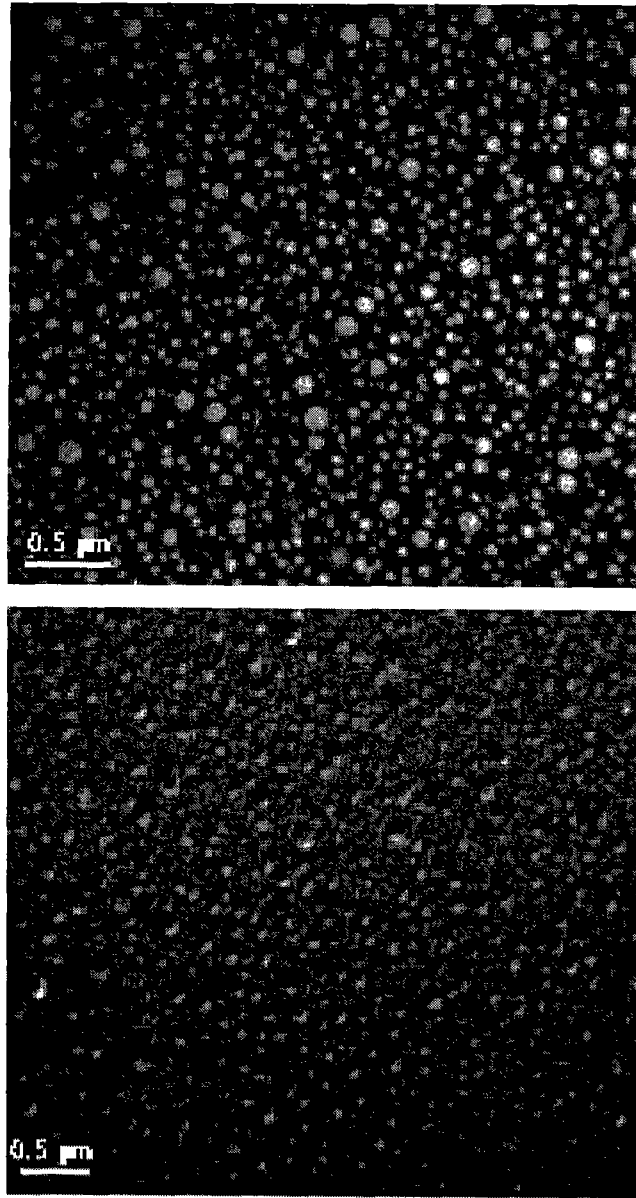


图 3

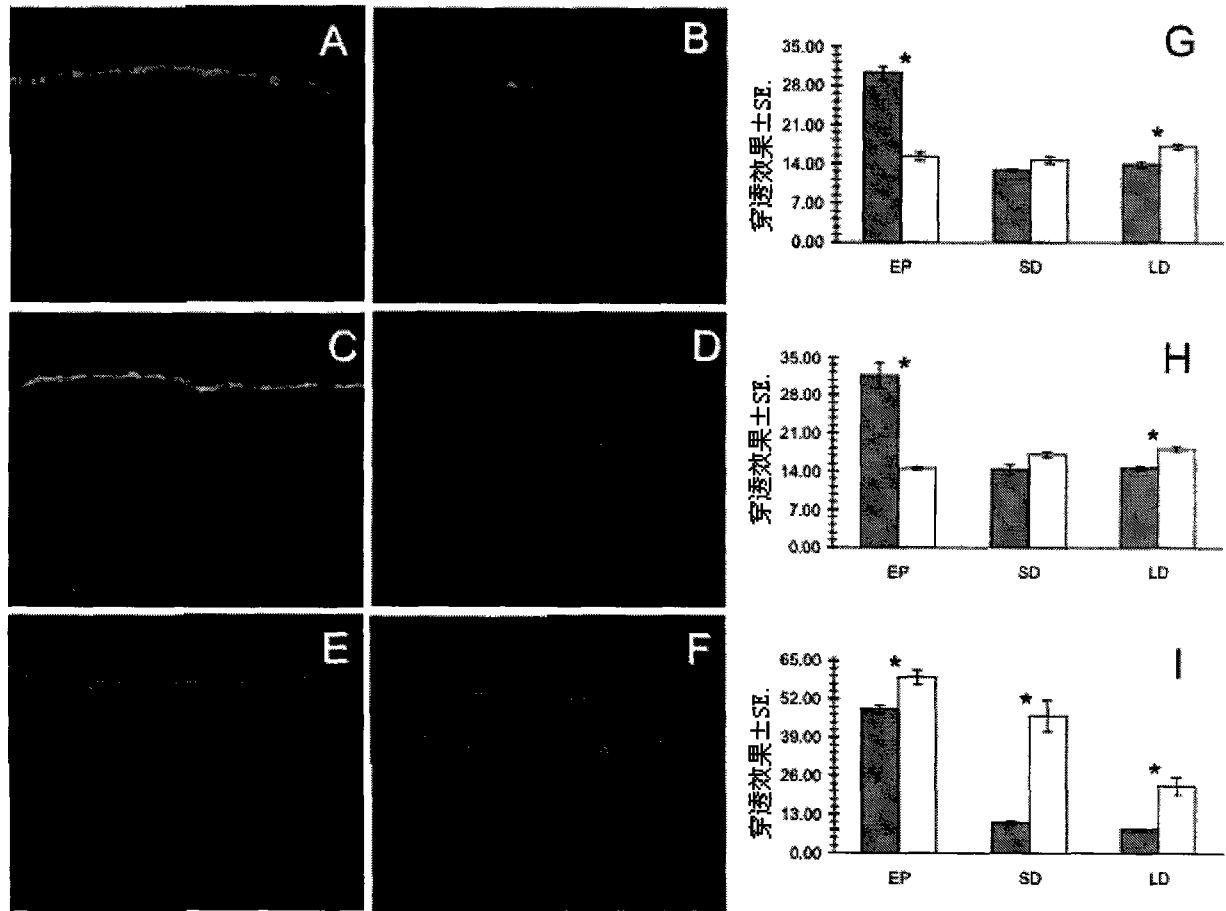


图 4

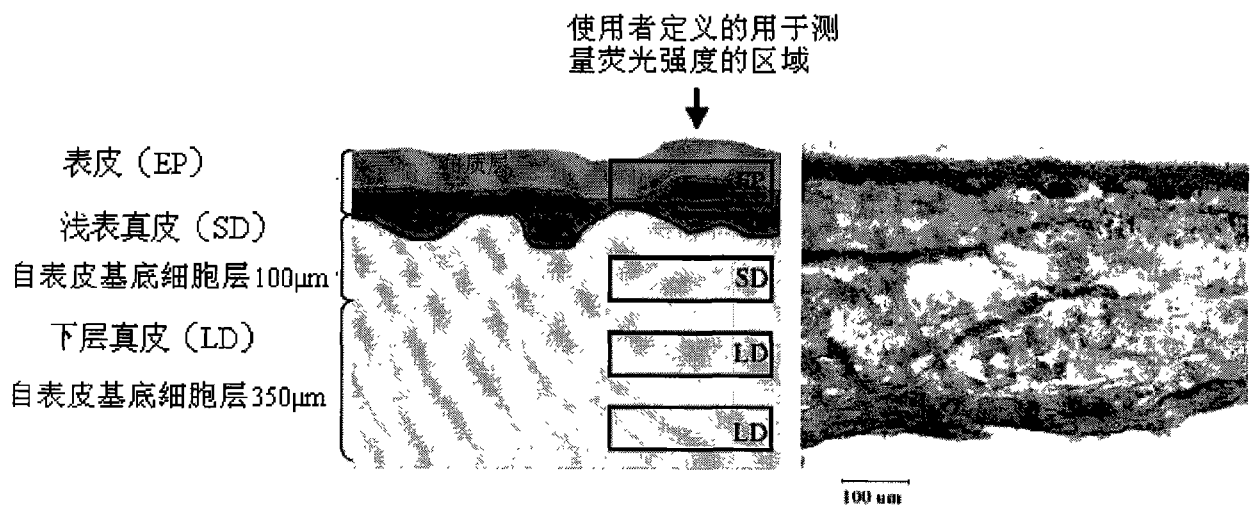


图 5

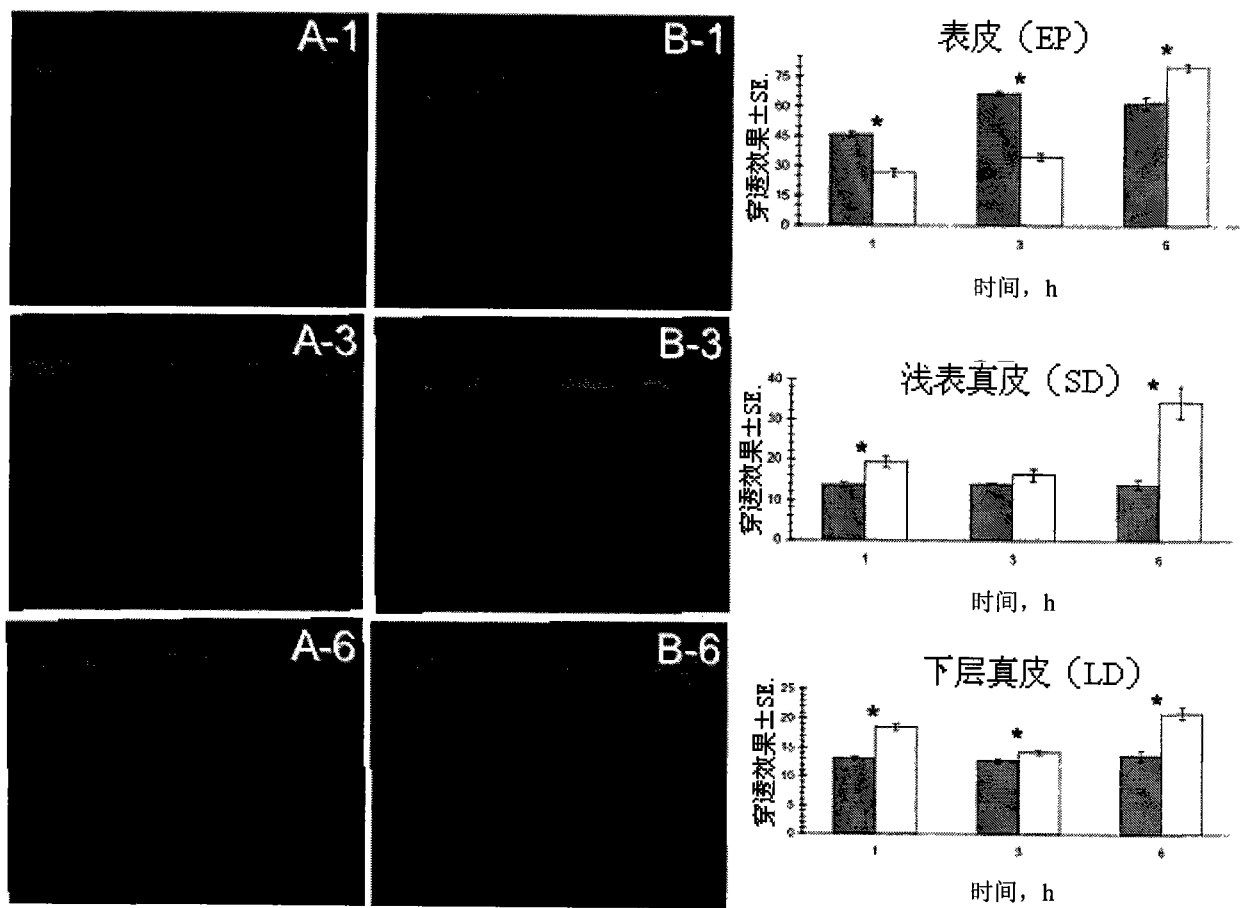


图 6