



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108472250 A

(43)申请公布日 2018.08.31

(21)申请号 201680075874.0

(74)专利代理机构 上海德昭知识产权代理有限公司 31204

(22)申请日 2016.10.31

代理人 郁旦蓉

(30)优先权数据

62/248,432 2015.10.30 US

(51)Int.Cl.

A61K 9/00(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.06.22

A61K 9/51(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/059661 2016.10.31

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/075565 EN 2017.05.04

(71)申请人 约翰霍普金斯大学

地址 美国马里兰州

(72)发明人 J·哈尼斯 K·梅塞尔

L·M·恩塞恩 R·康

权利要求书2页 说明书22页 附图5页

(54)发明名称

高分子量粘液穿透颗粒和致密涂层

(57)摘要

粘液穿透颗粒(MPP)包括一种或多种核心聚合物;一种或多种治疗剂、预防剂和/或诊断剂;以及一种或多种表面改性剂。表面改性剂以相对于没有表面改性过的等效纳米颗粒,足以增强改性纳米颗粒在整个粘膜中的扩散的密度涂布颗粒表面。纳米颗粒能够用分子量10kD到40kD或更大的聚(乙二醇)(PEG)足够密集地涂布,以约0.1到约100个分子/100nm²、优选约0.5到约50个分子/100nm²、更优选约0.9到约45个分子/100nm²的表面密度涂布。

1. 一种用于通过粘膜将治疗剂、预防剂或诊断剂递送到受试者的下层上皮的粘液穿透颗粒,包含:

一种或多种形成所述颗粒的核心聚合物;

一种或多种治疗剂、预防剂和/或诊断剂;以及

一种或多种表面改性剂,包含聚氧化烯聚合物,并且分子量是大于约5kDa到约100kDa且包括端值,优选地约10kDa到约40kDa,

其中当通过¹H NMR测量时,所述表面改性剂的密度是约0.1到约100个分子/100nm²,

足以相对于没有表面改性过的颗粒增强改性颗粒的粘膜扩散。

2. 根据权利要求1所述的粘液穿透颗粒,其中所述表面改性剂是选自由聚(乙二醇)、聚乙二醇-聚氧化乙烯嵌段共聚物、聚(乙烷基吡咯烷酮)、聚(丙烯酰胺)以及其共聚物组成的群组的中性聚合物。

3. 根据权利要求2所述的粘液穿透颗粒,其中一种表面改性剂是分子量为约5kDa到约40kDa且包括端值、更优选地约20kDa的聚(乙二醇)。

4. 根据权利要求1到3中任一项所述的粘液穿透颗粒,其中当通过¹H NMR测量时,聚(乙二醇)的表面密度是约0.5到约50个分子/100nm²,更优选地约0.9到约45个分子/100nm²。

5. 根据权利要求1到4中任一项所述的粘液穿透颗粒,其中当根据下式测量时,聚(乙二醇)的表面堆积密度是1.5或大于1.5:

$$\Gamma / SA = \text{表面堆积密度}$$

其中 Γ 是能够被不受限制的聚(乙二醇)覆盖的总表面积,并且SA是总纳米颗粒表面积。

6. 根据权利要求1到5中任一项所述的粘液穿透颗粒,其中存在能够有效地使所述颗粒的表面电荷在生理流体中呈中性或基本上呈中性的量的一种或多种表面改变材料。

7. 根据权利要求1到6中任一项所述的粘液穿透颗粒,其中所述颗粒的zeta电位介于约-10mV与10mV之间且包括端值,优选地介于约-5mV与5mV之间且包括端值,最优选地介于约-2mV与2mV之间且包括端值。

8. 根据权利要求1到7中任一项所述的粘液穿透颗粒,包含选自由聚(己内酯)、聚羧基酸、聚氨基酸、聚酸酐以及聚原酸酯组成的群组的核心聚合物。

9. 根据权利要求8所述的粘液穿透颗粒,其中所述核心聚合物是选自由以下组成的群组的聚羧基酸:聚(乳酸)、聚(L-乳酸)、聚(乙醇酸)、聚(乳酸-共-乙醇酸)、聚(L-乳酸-共-乙醇酸)、聚(D,L-丙交酯)、聚(D,L-丙交酯-共-己内酯)、聚(D,L-丙交酯-共-己内酯-共-乙醇酸)、聚(D,L-丙交酯-共-PEO-共-D,L-丙交酯)以及聚(D,L-丙交酯-共-PPO-共-D,L-丙交酯)。

10. 根据权利要求1到9中任一项所述的粘液穿透颗粒,其中所述核心聚合物与表面改性材料共价结合。

11. 根据权利要求1到10中任一项所述的粘液穿透颗粒,其中所述颗粒的流体动力学直径介于约50nm与500nm之间且包括端值,优选地介于约60nm与300nm之间且包括端值。

12. 根据权利要求1到11中任一项所述的粘液穿透颗粒,用药学上可接受的赋形剂配制以便通过选自由肠内、肠胃外或局部给药组成的群组的途径给药到身体内或身体上。

13. 一种向有需要的受试者给予一种或多种治疗剂、预防剂和/或诊断剂的方法,所述

方法包含向所述受试者给予有效量的根据权利要求1到12中任一项所述的颗粒。

14. 根据权利要求13所述的方法,其中所述颗粒通过选自由肠内、肠胃外或局部组成的群组的途径给予。

15. 根据权利要求14所述的方法,其中所述颗粒给予到选自由阴道上皮、结肠直肠道、眼上皮、呼吸道、口腔以及其组合组成的群组的位置处的粘膜上皮。

16. 根据权利要求15所述的方法,其中所述颗粒给予到子宫颈阴道粘液、结肠直肠粘液或上呼吸道或下呼吸道中的粘液。

高分子量粘液穿透颗粒和致密涂层

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2015年10月30日提交的第62/248,432号美国临时申请的权益,该申请特此以全文引用的方式并入本文中。

[0003] 关于联邦政府资助的研究和开发的声明

[0004] 本发明是在政府支持下进行的,遵循美国国立卫生研究院(National Institutes of Health)的协议R01HD062844、5R21/R33AI079740、5R21/R33AI094519和U19AI133127。美国政府享有本发明的某些权利。

技术领域

[0005] 本发明属于纳米颗粒、尤其是用高分子量聚合物密集地涂布以实现快速粘液穿透的纳米颗粒,和其制造方法和使用方法的领域。

背景技术

[0006] 通过生物可降解的纳米颗粒局部递送治疗剂常常具有优于全身性给药的优点,包括降低全身性副作用和控制目标部位的药物水平。然而,粘膜表面的受控药物递送通常会因为保护性粘液层的存在而受到限制。

[0007] 粘液是覆盖所有粘膜表面的第一道防线,是粘性、粘弹性凝胶,如果微粒大于和/或粘附到粘液网,那么粘液能够有效地防止微粒到达上皮表面(Cone,《粘膜免疫学》(Mucosal Immunology),第3版2005,49-72;Cone,《先进药物递送综述》(Adv Drug Deliv Rev),2009,61,75-85;Lai等人,《美国国家科学院院刊》(Proc Natl Acad Sci U S A),2007,104,1482-1487;Olmsted等人,《生物物理杂志》(Biophys J),2001,81,1930-1937;Ensign,《科学·转化医学》(Sci Transl Med),2012,4,138ra179)。

[0008] 粘膜由上皮组成,由一层或多层上皮细胞和一个下层疏松结缔组织固有层形成。粘膜通过分泌粘液来确保下层结缔组织固有层保持湿润。粘液能通过空间机制和粘附机制有效地捕获外来颗粒和微粒,促进快速清除并妨碍药物递送。

[0009] 药物颗粒和/或递送媒剂粘附到粘液上会显著降低药物递送效率。举例来说,大部分局部递送到粘膜表面的治疗剂都有因为粘液翻转所导致的保留与分布不良的缺点。因此,“粘膜粘附”已被证明会导致直接递送到粘膜的药物在阴道、肺和结肠直肠组织的分布受到限制(Ensign,《科学·转化医学》,2012,4,138ra179;Ensign等人,《生物材料》(Biomaterials),2013,34,6922-6929;Suk等人,《控释杂志》(J Control Release),2014,178,8-17;Maisel等人,《控释杂志》,2015,10,197,48-57,电子版2014年11月4日),这严重限制了这些药物的功效。

[0010] 关于药物或基因递送应用,治疗性颗粒必须能够实现在相关粘膜表面上的均一分布并有效地越过粘液屏障以避免快速粘液清除,确保其治疗性有效载荷有效递送到下层细胞(das Neves J和Bahia MF,《国际制药学杂志》(Int J Pharm),2006,318,1-14;Lai等人,《先进药物递送综述》,2009,61,158-171;Ensign等人,《科学·转化医学》,2012,4,

138ra179,1-10;Eyles等人,《药学与药理学杂志》(J Pharm Pharmacol),1995,47,561-565)。

[0011] 已知造成纳米颗粒的粘膜粘附特征的因素有很多(Lai等人,《美国国家科学院院刊》,2007,104,1482-1487;Ensign,《科学·转化医学》,2012,4,138ra179)。通常,带正电表面和/或未涂布的疏水性表面被认为是高度粘膜粘附表面。PEG一直被用来增强粘膜粘附(Peppas,《生物材料科学杂志:聚合物版》(J Biomater Sci Polym Ed),1998,9,535-542;Peppas等人,《先进药物递送综述》,2004,56,1675-1687;Peppas等人,《生物材料》,1996,17,1553-1561;Peppas等人,《生物材料科学杂志:聚合物版》,2009,20,1-20;Sahlin等人,《生物材料科学杂志:聚合物版》,1997,8,421-436;Huang等人,《控释杂志》,2000,65,63-71;Smart等人,《先进药物递送综述》,2005,57,1556-1568;Serra等人,《欧洲制药学与生物制药学杂志》(Eur J Pharm Biopharm),2006,63,11-18)。高分子量PEG已被描述为充当粘膜粘附“胶水”,它与粘蛋白纤维相互穿透并缠绕(Peppas,《生物材料科学杂志:聚合物版》,1998,9,535-542;Peppas和Sahlin,《生物材料》,1996,17,1553-1561)或与粘蛋白纤维的碳水化合物区域形成氢键(Deascentiis等人,《控释杂志》,1995,33,197-201;Peppas,《生物材料科学杂志:聚合物版》,1998,9,535-542;Peppas和Huang,《先进药物递送综述》,2004,56,1675-1687;Peppas和Sahlin,《生物材料》,1996,17,1553-1561;Peppas等人,《生物材料科学杂志:聚合物版》,2009,20,1-20;Martini等人,《国际制药学杂志》(International Journal ofPharmaceutics),1995,113,223-229;Sahlin和Peppas,《生物材料科学杂志:聚合物版》,1997,8,421-436;Huang等人,《控释杂志》,2000,65,63-71)。据报道,分子量高达10kDa的PEG对已涂布颗粒的粘液穿透的影响不一致。举例来说,涂层密度与2kDa PEG(例如PEG 2kDa)相当的10kDa PEG引起粘膜粘附(Wang等人,《应用化学国际英文版》(Angew Chem Int Ed Engl),2008,47,9726-9729)或展现与非涂布颗粒类似的粘膜粘附能力(Deascentiis等人,《控释杂志》,1995,33,197-201)。在另一个实例中,使用乳液法形成的PLGA-PEG纳米颗粒使得PEG能够在缓慢硬化过程中分配到颗粒表面,为高达10kDa的PEG产生足够高的表面密度用于粘液穿透涂层(Xu等人,《控释杂志》,2013,170,279-286)。

[0012] 其它研究确定,密集地涂有如PEG 1kD的低分子量亲水性聚合物的纳米颗粒能够穿透粘液屏障,到达上皮表面并均一地涂布上皮表面(Lai等人,《美国国家科学院院刊》,2007,104,1482-1487;Ensign,《科学·转化医学》,2012,4,138ra179;Suk等人,《控释杂志》,2014,178,8-17;Maisel等人,《控释杂志》,2015,10,197,48-57,电子版2014年11月4日)。此外,相比于粘膜粘附微粒,这些粘液穿透纳米颗粒(MPP)在子宫颈阴道和呼吸道中的保留时间更长(Ensign,《科学·转化医学》,2012,4,138ra179;Suk等人,《控释杂志》,2014,178,8-17),表明MPP可能更适合将药物分配到整个上皮表面并提供延长的药物保留。

[0013] 需要能够将广泛范围的药物封装到纳米颗粒中而不减弱如上所述的粘液穿透特性的新的粘液穿透颗粒制备方法。类似地还需要通过注射给予的制品。

[0014] 因此,本发明的目标是提供能够将广泛范围的药物封装到生物可降解的纳米颗粒中而不减弱粘液穿透特性的颗粒制备方法和所得颗粒。

[0015] 本发明的另一个目标是提供具有高载药量和致密的表面改变材料涂层的颗粒,如纳米颗粒和微粒,用于通过各种给药途径、包括通过粘膜表面来提供有效药物递送。

发明内容

[0016] 粘液穿透颗粒 (Mucus penetrating particle, MPP) 包括一种或多种核心聚合物; 一种或多种治疗剂、预防剂和/或诊断剂; 以及一种或多种表面改性剂。表面改性剂以相对于没有表面改性过的等效纳米颗粒, 足以增强改性纳米颗粒遍及粘液的扩散的密度涂布颗粒表面。纳米颗粒能够用分子量10,000道尔顿到40,000道尔顿或更大的聚(乙二醇) (PEG) 足够密集地涂布, 从而促使纳米颗粒离体和体内都能快速扩散遍及粘液。

[0017] 在纳米颗粒表面, 存在最低PEG堆积密度阈值, 必须超过这个阈值才能有效地保护颗粒表面不与粘液相互作用。表面堆积密度充足与表面堆积密度不充足之间的界限很窄。在一些实施例中, 表面改性剂是聚(乙二醇), 其分子量是大于约5kDa到约100kDa且包括端值, 优选地约10kDa到约40kDa且包括端值, 更优选地约20kDa。粘液穿透纳米颗粒用表面改性剂以足以实现遍及粘液的扩散的密度涂布, 甚至用分子量大于5-10kD的PEG涂布。在一些实施例中, 表面改性剂的面密度通过¹H NMR测量。通常, 当PEG是表面改性剂时, MPP以约0.1到约100个分子/100nm², 优选地约0.5到约50个分子/100nm², 更优选地约0.9到约45个分子/100nm²的表面密度涂布。

[0018] 在一些实施例中, 表面堆积密度根据下式测量:

[0019] $\Gamma / SA = \text{表面堆积密度}$

[0020] 其中 Γ 是假定PEG构象在颗粒表面上不受限制的情况下PEG分子所能够提供的总表面积覆盖范围, 并且SA是总纳米颗粒表面积。当PEG是表面改性剂时, MPP以1.5或更大的表面堆积密度涂布。在一些实施例中, 表面改性剂呈能够有效地使MPP的表面电荷在生理流体中呈中性或基本上呈中性的量。举例来说, 在一些实施例中, 纳米颗粒的zeta电位介于约-10mV与10mV之间且包括端值, 优选地介于约-5mV与5mV之间且包括端值, 最优选地介于约-2mV与2mV之间且包括端值。

[0021] MPP的流体动力学直径通常介于约50nm与500nm之间且包括端值, 优选地介于约60nm与300nm之间且包括端值。

[0022] 在一些实施例中, 纳米颗粒包括用于给药到身体内或身体上的药学上可接受的赋形剂。示范性药物组合物被配制用于通过肠内、肠胃外或局部给药来给药。

[0023] 还提供了粘液穿透纳米颗粒的制造方法。方法包括以下步骤: 将核心聚合物纳米颗粒悬浮在pH 7.4的硼酸盐缓冲剂中, 形成保温混合物; 向保温混合物中添加甲氧基-聚(乙二醇)-胺; 将甲氧基-聚(乙二醇)-胺共价结合到核心聚合物纳米颗粒; 以及从混合物分离粘液穿透纳米颗粒。

[0024] 还提供了使用MPP向有需要的受试者递送一种或多种治疗剂、预防剂和/或诊断剂的方法。方法包括向受试者给予有效量的MPP来实现所期望的生物作用。举例来说, 在一些实施例中, MPP呈能够有效地诊断、预防或治疗疾病或病症的一种或多种症状的量。一般来说, 用表面改性剂以能够有效地穿透粘液并使颗粒在受试者的粘膜上皮均一分布的密度涂布MPP。示范性粘膜上皮包括阴道上皮、结肠直肠道、眼上皮、呼吸道、口腔以及其组合。在一个具体实施例中, 用表面改性剂以能够有效地穿透子宫颈阴道粘液、结肠直肠粘液、呼吸道粘液或其组合的密度涂布MPP。

附图说明

[0025] 图1显示200nm PS和使用硼酸盐或MES方法涂有10kDa PEG的PS-PEG NP就长达3秒的时间来说的系综均方位移(mean-squared displacement, <MSD>), 包括200nm纳米颗粒在水(W)中的理论MSD。数据代表 $n \geq 3$ 个样品。

[0026] 图2A显示200nm PS在1秒时标下的单独颗粒MSD的对数的分布。图2B显示使用MES方法涂有10kDa PEG的PS-PEG NP在1秒时标下的单独颗粒MSD的对数的分布。图2C显示使用硼酸盐方法涂有10kDa PEG的PS-PEG NP在1秒时标下的单独颗粒MSD的对数的分布。

[0027] 图3A、图3B和图3C显示200nm PS (3A) 和PS-PEG NP (3B、3C) 在人类子宫颈阴道粘液中运动3秒的代表性轨迹。PS-PEG NP使用MES方法 (3B) 或硼酸盐方法 (3C) 涂上10kDa PEG。数据代表 $n \geq 3$ 个样品。

[0028] 图4显示200nm PS和使用硼酸盐方法涂有5kDa、10kDa、20kDa或40kDa PEG的PS-PEG NP随长达3秒的时间而变的系综平均的均方位移(<MSD>), 包括200nm颗粒在水(W)中的理论MSD。

[0029] 图5A、图5B、图5C、图5D和图5E显示200nm PS (5A) 和PS-PEG NP (5B-5E) 在人类子宫颈阴道粘液中运动3秒的代表性轨迹。图5B、图5C、图5D和图5E分别显示使用硼酸盐方法涂有5kDa、10kDa、20kDa和40kDa PEG的PS-PEG NP。数据代表 $n \geq 3$ 个样品。

[0030] 图6显示100nm PS和使用硼酸盐方法涂有5kDa、10kDa、20kDa或40kDa PEG的PS-PEG NP随时间而变的在人类子宫颈阴道粘液中的系综平均的均方位移(<MSD>), 包括100nm颗粒(PS-PEG_{10kDa}的大小) 在水(W)中的理论MSD。

[0031] 图7A、图7B、图7C、图7D和图7E显示100nm PS (7A) 和PS-PEG NP (7B-7E) 在人类子宫颈阴道粘液中运动3秒的代表性轨迹。图7B、图7C、图7D和图7E分别显示使用硼酸盐方法涂有5kDa、10kDa、20kDa和40kDa PEG的PS-PEG NP。数据代表 $n \geq 3$ 个样品。

具体实施方式

[0032] I. 定义

[0033] 术语“纳米颗粒”一般是指直径是约1nm到约1微米但不包括约1微米、更优选地约5nm到约500nm、最优选地约5nm到约100nm的任何形状的颗粒。具有球形形状的纳米颗粒一般被称为“纳米球”。

[0034] 术语“平均粒度”一般是指颗粒群体中的颗粒的统计平均粒度(直径)。基本上呈球形的颗粒的直径可被称为物理直径或流体动力学直径。非球形颗粒的直径可优先指流体动力学直径。如所使用的, 非球形颗粒的直径可以是指颗粒表面上两点之间的最大直线距离。平均粒度可以使用本领域中已知的方法测量, 如动态或静态光散射、快速蛋白质液相色谱等。

[0035] 术语“粘液”是指主要含有粘蛋白糖蛋白和其它材料的天然粘弹性物质, 它保护不同器官/组织的上皮表面, 包括呼吸系统、鼻子、子宫颈阴道、胃肠道、直肠、视觉和听觉系统。如本文中所用的“痰”是指由各种大分子组成的高度粘弹性粘液分泌, 这些大分子除了粘蛋白糖蛋白之外, 例如是DNA、肌动蛋白以及其它从死细胞释放的细胞碎片。“痰”一般存在于罹患阻塞性肺病的患者的病原性气道中, 阻塞性肺病包括但不限于哮喘、COPD和CF。如

本文中所用的“CF粘液”和“CF痰”分别是指来自患有囊肿性纤维化的患者的粘液和痰。

[0036] 术语“并入”和“封装”是指将活性剂并入、配制或以其它方式包括到能够在所期望的应用中释放,例如持续释放所述活性剂的组合物中和/或该组合物上。这些术语涵盖任何用于将治疗剂或其它材料并入到聚合物基质中的方式,包括例如:与这类聚合物的单体连接(通过共价相互作用、离子相互作用或其它结合相互作用)、物理混合、将药剂包裹到聚合物涂层中、并入到聚合物中、分布在整个聚合物基质中、附着到聚合物基质表面上(通过共价相互作用或其它结合相互作用)、封装在聚合物基质内部等。术语“共并入”或“共封装”是指将治疗剂或其它材料与至少一种其它治疗剂或其它材料一起并入主题组合物中。

[0037] 术语“生物相容性”是指本身对宿主(例如,动物或人类)无毒,也不在宿主中以产生有毒浓度的单体或低聚亚单元或其它副产物的速率降解(如果聚合物降解)的一种或多种材料。

[0038] 术语“有效量”或“治疗有效量”意指足以治疗、抑制或缓解待治疗病症的一种或多种症状或以其它方式提供所期望的药理和/或生理效应的剂量。精确剂量将根据各种因素而改变,如受试者因变量(例如年龄、免疫系统健康等)、疾病或病症以及待实施的治疗。

[0039] II. 粘液穿透纳米颗粒(MPP)

[0040] 因为保护性粘液层的存在,所以药物到粘膜表面的受控递送具有挑战性。如果表面密度足够高,那么有可能用分子量超过5kD的亲水性聚合物来涂布颗粒,基于这一发现,粘液穿透颗粒(MPP)在粘膜表面显示出改良的药物分布、保留和功效。

[0041] A. 核心聚合物

[0042] 可以使用任何数量的生物相容性聚合物来制备纳米颗粒。在一个实施例中,生物相容性聚合物是生物可降解的。在另一个实施例中,颗粒是不可降解的。在其它实施例中,颗粒是可降解颗粒与不可降解颗粒的混合物。

[0043] 示范性聚合物包括但不限于:由内酯制备的聚合物,如聚(己内酯)(PCL);聚羧酸和其共聚物,如聚(乳酸)(PLA)、聚(L-乳酸)(PLLA)、聚(乙醇酸)(PGA)、聚(乳酸-共-乙醇酸)(PLGA)、聚(L-乳酸-共-乙醇酸)(PLLGA)、聚(D,L-丙交酯)(PDLA)、聚(D,L-丙交酯-共-己内酯)、聚(D,L-丙交酯-共-己内酯-共-乙交酯)、聚(D,L-丙交酯-共-PEO-共-D,L-丙交酯)、聚(D,L-丙交酯-共-PP0-共-D,L-丙交酯)以及其掺合物;聚氰基丙烯酸烷基酯;聚氨基甲酸酯;聚氨基酸,如聚-L-赖氨酸(PLL)、聚(戊酸)和聚-L-谷氨酸;甲基丙烯酸羟丙酯(HPMA);聚酸酐;聚原酸酯;聚(酯酰胺);聚酰胺;聚(酯醚);聚碳酸酯;乙烯乙酸乙烯酯聚合物(EVA);聚乙烯醇(PVA);聚乙烯醚;聚乙烯酯,如聚(乙酸乙烯酯);聚乙烯基卤化物,如聚(氯乙烯)(PVC);聚乙烯基吡咯烷酮;聚硅氧烷;聚苯乙烯(PS);纤维素,包括衍生纤维素,如烷基纤维素、羟烷基纤维素、纤维素醚、纤维素酯、硝基纤维素、羟丙基纤维素以及羧甲基纤维素;丙烯酸聚合物,如聚((甲基)丙烯酸甲酯)(PMMA)、聚((甲基)丙烯酸乙酯)、聚((甲基)丙烯酸丁酯)、聚((甲基)丙烯酸异丁酯)、聚((甲基)丙烯酸己酯)、聚((甲基)丙烯酸异癸酯)、聚((甲基)丙烯酸月桂酯)、聚((甲基)丙烯酸苯酯)、聚(丙烯酸甲酯)、聚(丙烯酸异丙酯)、聚(丙烯酸异丁酯)、聚(丙烯酸十八烷酯)(在本文中统称为“聚丙烯酸”);聚对二氧环己酮和其共聚物;聚羧基烷酸酯;聚丙烯富马酸盐;聚甲醛;泊洛沙姆(poloxamer);聚(丁酸);三亚甲基碳酸酯以及聚磷腈。

[0044] 在优选实施例中,聚合物是FDA批准的生物可降解聚合物,如羧基酸(PLA、PLGA、

PGA)、聚酸酐或聚羟基烷酸酯,如聚(3-丁酸酯)或聚(4-丁酸酯)或其共聚物。

[0045] 还可以使用以上物质的共聚物,如无规共聚物、嵌段共聚物或接枝共聚物,或以上所列的聚合物的掺合物。可以将聚合物上的官能团封端以改变聚合物的特性和/或修改(例如减小或增加)官能团的反应性。举例来说,羧酸的羧基末端含有聚合物,如含有丙交酯和乙交酯的聚合物,可以任选地例如通过酯化封端,并且羟基末端可以任选地例如通过醚化或酯化封端。

[0046] 重均分子量可以根据指定聚合物而改变,但是一般是约1kD到1,000kD、1kD到500kD、1kD到250kD、10kD到100kD、5kD到100kD、5kD到75kD、5kD到50kD、或大于5kD到25kD。

[0047] B. 表面改性剂

[0048] 纳米颗粒优选一种或多种表面改变剂或表面改变材料涂布或形成表面。术语“表面改变剂”是指修改颗粒表面的一种或多种特性和/或增强在如粘液的体液和/或组织中的转移或遍及体液和/或组织的转移的试剂或材料,这一种或多种特性包括但不限于亲水性(例如,使颗粒的亲水性变大或变小)、表面电荷(例如使表面呈中性或接近中性或更负或更正)。最优选的材料是聚氧化烯,如聚(乙二醇)(PEG)。

[0049] 在优选实施例中,颗粒涂有或含有聚(乙二醇)(PEG),如分子量至少10,000道尔顿的PEG。

[0050] PEG(CAS编号25322-68-3)是具有许多有用特性的线性聚醚二醇,有用特性例如生物相容性(Powell GM. 聚乙二醇(Polyethylene glycol). 编者Davidson RL,《水溶性胶和树脂手册》(Handbook of water soluble gums and resins). 麦格劳-希尔公司(McGraw-Hill):1980. 第18-31页)、在水性介质和有机介质中的溶解性、无毒、极低的免疫原性和抗原性(Dreborg等人,《治疗药物载体系统评论》(Crit Rev Ther Drug Carrier Syst), 1990, 315-65)以及良好的排泄动力学(Yamaoka等人,《药物科学杂志》(J Pharm Sci), 1994, 83:601-6)。举例来说,聚(乙二醇)已被用以衍生治疗性蛋白质和肽,增加药物稳定性和溶解性,降低毒性,增加半衰期(Caliceti等人,《先进药物递送综述》,2003, 55, 1261-77),减小清除和免疫原性。已在衍生化中使用支化PEG具体观察到了这些益处(Monfardini等人,《生物结合物化学》(Bioconj Chem), 1998, 9, 418-50)。

[0051] PEG分子的分子量和结构可以针对特定目的加以调节。在优选实施例中,PEG的分子量是10,000道尔顿(PEG-10kDa)或更大。

[0052] 可以使用高分子量PEG或其衍生物与以上所述的核心聚合物中的任一个的共聚物来制造聚合物颗粒。在某些实施例中,PEG或衍生物可以位于共聚物的内部位置。优选地,PEG或衍生物可以位于共聚物的末端位置附近或末端位置处。举例来说,以上聚合物中的一个或多个可以用聚乙二醇或聚氧化乙烯(PLURONIC®)的嵌段、聚乙二醇与聚氧化乙烯的嵌段共聚物封端。

[0053] 在一些实施例中,核心聚合物是聚乙二醇化聚合物与非聚乙二醇化聚合物的掺合物,其中基础聚合物是相同的(例如,聚苯乙烯(PS)和PS-PEG)或不同的(例如,PS-PEG和聚(乳酸))。

[0054] 可以在颗粒表面上涂覆高分子量PEG作为涂层。在某些实施例中,在PEG区域能够相分离或以其它方式定位到颗粒表面的条件下形成纳米颗粒。单独的表面局部化PEG区域就可以执行表面改变剂的功能或包括表面改变剂。在其它实施例中,颗粒由一种或多种以

聚乙二醇嵌段作为表面改变材料封端的聚合物制备。PEG可以采用与用于形成颗粒的核心聚合物共价结合(例如,在内部或在一个或两个末端处)的嵌段的形式。在特定实施例中,颗粒由含有PEG的嵌段共聚物形成。在更特定的实施例中,颗粒由含有PEG的嵌段共聚物制备,其中PEG与基础聚合物的末端共价结合。

[0055] 用于配制到粘液穿透颗粒中的PEG的代表性分子量包括10,000道尔顿(10kDa)、15kDa、20kDa、30kDa、40kDa、50kDa、60kDa、100kDa、200kDa、500kDa和1MDa以及在10kDa到1MDa的范围内的所有值。在一些实施例中,PEG的分子量是10kDa或大于10kDa,如20kDa到100kDa且包括端值,优选地20kDa到40kDa。任何指定分子量的PEG在其它特征方面可能不同,其它特征例如长度、密度和支化。

[0056] 其它有用的聚合物包括聚(乙烯基吡咯烷酮)和聚(丙烯酸酰胺)。

[0057] 表面改性剂的密度

[0058] 表面改变剂的密度是决定纳米颗粒穿透粘液的能力的关键参数并影响体内活性剂到粘膜上皮的成功递送。

[0059] 可以采用不同的技术来测量纳米颗粒上的表面PEG密度,包括直接测量纳米颗粒的物理化学特性的改变的技术,所述物理化学特性例如表面电荷和流体动力学直径。通常,用于测定表面密度的方法提供关于每平方纳米颗粒表面的PEG链的数量的定量信息。

[0060] 可以使用热重分析(Thermogravimetric analysis,TGA)来计算PEG含量。通常,TGA局限于无机材料并要求使用相对较大数量的样品。

[0061] 可以使用染料和试剂(如荧光染料)与功能性PEG的反应来进行PEG定量。在这些方法中,含有官能团(如-SH、-NH₂等)的未反应的PEG分子通过在与某些试剂反应之后的荧光分析或比色定量法来定量,并且通过减去上清液中的未反应的PEG部分确定表面PEG密度。然而,这些方法局限于表面聚乙二醇化和功能性PEG。用于通过测量上清液中的未反应的荧光素-PEG的信号来定量PRINT纳米颗粒上的表面PEG密度的类似方法局限于含有PEG的纳米颗粒的表面改性。这些定量分析不适用于测定由含有PEG的嵌段共聚物制备的生物可降解纳米颗粒上的PEG密度,含有PEG的嵌段共聚物例如广泛使用的聚(乳酸-共-乙醇酸)-聚(乙二醇)(PLGA-PEG)和聚(乳酸)-聚(乙二醇)(PLA-PEG)。

[0062] 在其它实施例中,使用核磁共振(nuclear magnetic resonance,NMR)来定性地和定量地评定含有PEG的聚合物纳米颗粒上的表面PEG密度(通常在约3.65ppm处观察到PEG峰)。当纳米颗粒分散于NMR溶剂D₂O内时,只有表面PEG才能被NMR直接检测到,嵌入于核心内的PEG就不行。因此,NMR提供一种用于直接测量PEG的表面密度的手段。

[0063] 在一些实施例中,通过从聚乙二醇化与非聚乙二醇化颗粒的混合物制备颗粒来控制PEG表面密度。举例来说,可以通过从聚(乳酸-共-乙醇酸)与聚(乙二醇)的混合物(PLGA-PEG)制备颗粒来精确地控制PLGA纳米颗粒上的PEG的表面密度。通常,使用定量¹H NMR来测量纳米颗粒上的表面PEG密度。

[0064] 先前确定,低分子量PEG(例如PEG 2kDa)的低密度涂层相比于相同PEG的高密度涂层引起粘膜粘附,并且涂层密度与低分子量PEG(例如PEG 2kDa)相当的高分子量PEG(例如PEG 10kDa)引起粘膜粘附(Wang等人,《应用化学国际英文版》,2008,47,9726-9729)。高分子量PEG粘液穿透纳米颗粒包括密度足够穿透本文所述的粘液屏障的表面改性剂,尽管分子量较高,还是能穿透粘液。

[0065] 已确定,表面涂层的密度与涂布剂本身的分子量相反,介导纳米颗粒穿透粘液的能力。

[0066] 表面堆积密度表示为总的不受限制的PEG表面积覆盖范围(Γ)除以总颗粒表面积(SA):

[0067] $(\Gamma/SA) = \text{堆积密度}$

[0068] 在一些实施例中,存在最低堆积密度阈值,必须超过这个阈值才能有效地保护纳米颗粒表面不与粘液相互作用。在某些实施例中,涂层堆积密度充足与涂层堆积密度不充足之间的界限很窄。

[0069] 在一些实施例中,根据上式确定的1.3或小于1.3的表面密度值在子宫颈阴道粘液(cervicovaginal mucus,CVM)中产生粘附。因此,在一些实施例中,粘液穿透纳米颗粒的PEG表面密度(Γ/SA)是 ≥ 1.5 ,例如1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5或大于2.5。

[0070] 发生粘液穿透的阈值表面堆积密度值可以通过实验确定,例如通过分析在粘液中的系综平均的均方位移(MSD)对比类似大小的颗粒在水中的理论MSD(MSD_w)。

[0071] 通常,每 100nm^2 的颗粒表面积的PEG分子的数量随着PEG MW增加而减小,这可能是由于随着MW增加,每个PEG链所占据的空间的量增加;举例来说,一个不受限制的5kDa PEG链所占据的面积是约 23nm^2 ,对比不受限制的40kDa PEG分子的约 180nm^2 。

[0072] 生物可降解纳米颗粒上的致密PEG涂层因为极大地降低了粘液组分与纳米颗粒之间的粘附相互作用,所以能够快速穿透粘液。如实例中所展示,在人类粘液中的多颗粒跟踪和在小鼠阴道中的粘蛋白结合和组织分布研究揭示存在PEG密度阈值。在一些实施例中,关于与分子量10,000道尔顿的PEG结合的聚苯乙烯(PS)纳米颗粒,要有效穿透粘液,表面堆积阈值是约1到5个PEG链/ 100nm^2 且包括端值,或更大。

[0073] 表面堆积密度阈值可以根据各种因素而不同,包括用于制备颗粒的核心聚合物、粒度和/或PEG的分子量。

[0074] 涂层密度可以根据各种因素而不同,包括表面改变材料和颗粒的组成。在一个实施例中,如通过 ^1H NMR所测量,如PEG的表面改变材料的密度是至少0.1、0.2、0.5、0.8、0.9、1.0、1.2、1.5、1.8、2.0、2.9、3.0、3.3、4.0、4.4、5.0或大于5.0条链/ 100nm^2 。以上范围包括所有从0.1到100个单元/ nm^2 的值,且包括端值。

[0075] 在特定实施例中,如PEG的表面改变材料的密度是约0.001到约2条链/ nm^2 、约0.01到约0.1条链/ nm^2 、约0.05到约0.5条链/ nm^2 、约0.1到约0.2条链/ nm^2 或约0.15到约0.2条链/ nm^2 。如PEG的表面改变材料的浓度也可以不同。在一些实施例中,如PEG的表面改变材料的目标浓度是至少0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%或25%或更高。以上范围包括所有从0.5%到25%的值。在另一个实施例中,如PEG的表面改变材料在颗粒中的浓度是至少0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%或25%。以上范围包括所有从0.5%到25%的值。在其它实施例中,颗粒表面上的表面改变材料(例如PEG)的含量是至少0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%或25%。以上范围包括所有从0.5%到25%的值。

[0076] 在特定实施例中,表面改变材料(例如PEG)的密度使得表面改变材料(例如PEG)采用延长的刷子配置。

[0077] 在其它实施例中,表面改变部分的质量是颗粒质量的至少1/10,000、1/7500、1/5000、1/4000、1/3400、1/2500、1/2000、1/1500、1/1000、1/750、1/500、1/250、1/200、1/150、1/100、1/75、1/50、1/25、1/20、1/5、1/2或9/10。以上范围包括所有从1/10,000到9/10的值。

[0078] 通常,纳米颗粒在聚乙二醇化后的流体动力学直径随着PEG MW增加而增加;举例来说,PEG链的密集堆积引起延伸,因此较高MW的PEG链将产生较厚的冠状物。

[0079] C. 治疗剂、预防剂、营养剂和/或诊断剂

[0080] 粘液穿透纳米颗粒(MPP)可以用一种或多种用于递送到粘膜表面的活性剂配制。通常,MPP包括一种或多种治疗剂、预防剂、营养剂和/或诊断剂。

[0081] 关于将一种或多种治疗剂、预防剂和/或诊断剂封装在聚合物纳米颗粒内和/或与纳米颗粒的表面结合的那些实施例,载药量百分比是约1%到约80%、约1%到约50%,优选地约1重量%到约40重量%,更优选地约1重量%到约20重量%,最优选地约1重量%到约10重量%。以上范围包括所有从1%到80%的值。关于药剂与颗粒表面结合的那些实施例,载药百分比可能更高,因为药物量不受封装方法的限制。在一些实施例中,待递送的药剂可以封装在纳米颗粒内和与颗粒表面结合。

[0082] 下面更详细地论述示范性活性剂。

[0083] 在一些实施例中,将一种或多种治疗剂封装在颗粒中、分散在颗粒中和/或使颗粒表面与一种或多种治疗剂共价或非共价结合。治疗剂可以是小分子、蛋白质或肽、糖或多糖、核酸分子和/或脂质。

[0084] 小分子治疗剂的示范性类别包括但不限于止痛剂、消炎药、退热剂、抗抑郁剂、抗癫痫剂、抗精神病剂(antiopsychotic agent)、神经保护剂、抗增殖剂,如抗癌剂、抗感染剂,如抗细菌剂和抗真菌剂、抗组胺剂、抗偏头痛药、抗毒蕈碱药、抗焦虑药、镇静剂、安眠药、抗精神病药(antipsychotics)、支气管扩张剂、抗哮喘药、心血管药、皮质类固醇、多巴胺能剂(dopaminergics)、电解质、胃肠道药、肌肉松弛剂、营养剂、维生素、拟副交感神经剂、刺激剂、减食欲剂以及抗发作性睡眠剂。

[0085] 示范性预防剂包括疫苗抗原。

[0086] 在一些实施例中,药剂是一种或多种核酸。核酸可以改变、改正或代替内源性核酸序列。核酸用于治疗癌症,改正其它肺病和代谢疾病中的基因缺陷。

[0087] 示范性核酸包括DNA、RNA、化学修饰的核酸以及其组合。用于提高核酸半衰期的稳定性和对酶促裂解的抗性的方法是本领域中已知的。

[0088] 示范性诊断材料包括顺磁性分子、荧光化合物、磁性分子和放射性核素。合适的诊断剂包括但不限于x射线成像剂和造影剂。也可以使用放射性核素作为成像剂。其它合适的造影剂的实例包括气体或散发气体的化合物,其是不透射线的。纳米颗粒可以进一步包括适用于确定所给予颗粒的位置的试剂。适用于这一目的的试剂包括荧光标签、放射性核素和造影剂。

[0089] 关于将一种或多种治疗剂、预防剂和/或诊断剂封装在聚合物纳米颗粒内和/或与纳米颗粒的表面结合的那些实施例,载药量百分比是约1%到约80%、约1%到约50%,优选地约1重量%到约40重量%,更优选地约1重量%到约20重量%,最优选地约1重量%到约10

重量%。以上范围包括所有从1%到80%的值。关于药剂与颗粒表面结合的那些实施例,载荷百分比可能更高,因为药物量不受封装方法的限制。在一些实施例中,待递送的药剂可以封装在纳米颗粒内和与颗粒表面结合。还可以并入营养食品。这些营养食品可以是维生素;补充剂,如钙或生物素;或天然成分,如植物提取物或植物激素。

[0090] D. 颗粒的特性

[0091] 粒度、zeta电位(ζ -电位)、PEG表面密度(PEG所覆盖的面积/总表面积或 Γ /SA)是能够影响纳米颗粒在粘液中移动并穿透粘液的能力的所有因素。可以使用在粘液中的系综平均的MSD(\langle MSD \rangle)与类似大小的颗粒在水中的理论MSD(MSD_w)的比较来指示纳米颗粒在粘液中移动得有多慢,MSD_w/ \langle MSD \rangle 。

[0092] 1. 表面电荷和粒度

[0093] 为了促进纳米颗粒扩散遍及粘液,纳米颗粒通常具有接近中性的表面电荷。在某些实施例中,纳米颗粒的 ζ -电位介于约10mV与约-10mV之间且包括端值,优选地介于约5mV与约-5mV之间,更优选地介于约3mV与约-3mV之间,最优选地介于约2mV与约-2mV之间。

[0094] 通常,表面改变材料(例如PEG)必须按足以形成冠状物的密度存在,该冠状物屏蔽了带正电或带负电的核心聚合物,产生了有效中性表面。

[0095] 虽然本文所述的颗粒被称为纳米颗粒,但是平均直径通常在1nm到约1微米的范围内,但不包括约1微米,更优选地约50nm到约900nm,最优选地约60nm到约500nm。在某些实施例中,颗粒的平均直径是约60nm到约300nm。然而,可以制备大小在微米范围内的颗粒。可以改变用于制备颗粒的条件和/或材料来改变颗粒大小。

[0096] 在某些实施例中,纳米颗粒在4°C下雾化或储存至少1个月、更优选地至少2个月、最优选地至少3个月之后保持其粒度和 ζ -电位。

[0097] 在一个示范性实施例中,涂有5-40kDa PEG的200nm聚苯乙烯纳米颗粒(PS NP)(PS-PEG-NP)快速穿透子宫颈阴道粘液(CVM),如由所测得的平均均方位移(\langle MSD \rangle)值所指示,并且展现扩散性能,与未涂布的PS NP形成鲜明对比(参见表1)。

[0098] III. 药物组合物

[0099] 在一些实施例中,将粘液穿透纳米颗粒(MPP)配制成用于给药到身体上或身体内的药学上可接受的组合物。

[0100] 本文所述的配制品含有有效量的纳米颗粒("MPP")于适合于给药到粘膜表面的药物载剂中。

[0101] A. 溶液、乳液和凝胶

[0102] 颗粒可以在药学上可接受的配制品中给予,如无菌盐水、磷酸盐缓冲盐水或增强吸收的低渗溶液。在一些实施例中,将药物载剂调节成具有一定的所期望的张力。举例来说,在某些实施例中,将药物载剂调节成低渗的。基于本文所述的优选张力范围,一旦鉴别出期望治疗的组织,本领域普通技术人员即可常规地调节药物载剂的张力。

[0103] 张力是'有效渗透压摩尔浓度'并且等于能够施加跨膜渗透力的溶质的浓度总和。许多不同材料都可以用来调节张力。举例来说,USP 29-NF 24列举了五种归类为"张力"剂的赋形剂,包括右旋糖、甘油;氯化钾;甘露糖醇;以及氯化钠。参见例如美国药典委员会公司(United States Pharmacopeial Convention, Inc.)美国药典29-国家处方集24. 马里兰州洛克维尔市(Rockville MD):美国药典委员会公司;2005:3261;Day, A. 右旋糖

(Dextrose). Rowe RC、Sheskey PJ和Owen SC编《药物赋形剂手册》(Handbook of Pharmaceutical Excipients).第5版华盛顿哥伦比亚特区(Washington DC):美国药剂师协会(American Pharmaceutical Association);2005:231-233;Price JC.甘油(Glycerin).Rowe RC、Sheskey PJ和Owen SC编《药物赋形剂手册》第5版华盛顿哥伦比亚特区:美国药剂师协会;2005:301-303;Price JC.甘油.Rowe RC、Sheskey PJ和Owen SC编《药物赋形剂手册》第5版华盛顿哥伦比亚特区:美国药剂师协会;2005:301-303;Armstrong NA.甘露糖醇(Mannitol).Rowe RC、Sheskey PJ和Owen SC编《药物赋形剂手册》第5版华盛顿哥伦比亚特区:美国药剂师协会;2005:449-453;Owen SC.氯化钠(Sodium Chloride).Rowe RC、Sheskey PJ和Owen SC编《药物赋形剂手册》第5版华盛顿哥伦比亚特区:美国药剂师协会;2005:671-674。在欧洲,甘露糖醇是公认适用作食品添加剂的GRAS所列成分的一个实例,包括在FDA非活性成分数据库(FDA Inactive Ingredients Database;IP、IM、IV和SC注射;输注;颊内、口服和舌下片剂、粉末剂和胶囊;眼用制剂;局部溶液)中,包括在英国特许的非肠胃外和肠胃外药品中且包括在加拿大天然健康产品成分数据库(Canadian Natural Health Products Ingredients Database)中。5.07%w/v水溶液是与血清等渗的。

[0104] 优选介于20-220mOsm/kg范围内的最小低渗配制品能使MPP快速并均一地递送到整个阴道表面且上皮毒性风险最小。结肠中的渗透压摩尔浓度较高,使得渗透压摩尔浓度高于血浆渗透压摩尔浓度(通常视为在约300mOsm/kg下等渗)的媒剂引起在结肠中的分布改良。以结肠中的低渗媒剂改良的结肠分布的范围是约20mOsm/kg-450mOsm/kg,如果配制品中的溶质的主要部分由Na⁺离子组成,那么由于这些Na⁺离子将被上皮主动吸入(吸收),因此使得配制品有效低渗,即使其相对于血液是高渗的。

[0105] B.经肺配制品

[0106] 在一些实施例中,粘液穿透纳米颗粒(MPP)被配制成用于经肺给药。干粉配制品和液体配制品两者均可用于形成气雾剂配制品。如本文中所使用的术语气雾剂是指颗粒细雾制剂,其可以呈溶液或悬浮液形式,无论其是否使用推进剂来产生。干粉配制品可通过经肺吸入对患者给药,无需借助于除空气或合适的推进剂之外的任何载剂。

[0107] 药物载剂可以包括膨胀剂或脂质或表面活性剂。最优选的是天然表面活性剂,如二棕榈酰基磷脂酰胆碱(DPPC)。合成的和动物衍生的经肺界面活性剂包括Exosurf,添加有十六醇和泰洛沙泊(tyloxapol)作为扩散剂的DPPC混合物;Pumactant(人工肺扩张化合物或ALEC),DPPC与PG的混合物;KL-4,由DPPC、棕榈酰基-油酰基磷脂酰甘油和棕榈酸组成,与模拟SP-B的结构特征的21氨基酸合成肽组合;Venticute,DPPC、PG、棕榈酸和重组SP-C;Alveofact,从牛肺灌洗液中提取;Curosurf,从衍生自剁碎的猪肺的材料中提取;Infasurf,从小牛肺灌洗液中提取;以及Survanta,用额外的DPPC、棕榈酸和三棕榈酸甘油酯从剁碎的牛肺中提取。在美国,FDA目前批准使用的表面活性剂是Exosurf、Curosurf、Infasurf和Survanta。

[0108] 药物载剂还可以包括一种或多种稳定剂或分散剂。药物载剂还可以包括一种或多种pH调节剂或缓冲剂。合适的缓冲剂包括从有机酸和碱制备的有机盐,如柠檬酸钠或抗坏血酸钠。药物载剂还可以包括一种或多种盐,如氯化钠或氯化钾。干粉配制品通常通过使一个或多个粘液穿透纳米颗粒与一种或多种药学上可接受的载剂掺合来制备。任选地,可以

将额外的活性剂并入如下文所论述的混合物中。然后使混合物成型为适用于使用本领域中已知的技术经肺给药的颗粒,这些技术例如冻干、喷雾干燥、聚集、喷涂、凝聚、低温铸造、研磨(例如空气摩擦研磨(喷射研磨)、球磨)、高压均质化和/或超临界流体结晶。

[0109] 在某些实施例中,粘液穿透纳米颗粒(MPP)被配制用于以气雾剂形式给药。上述干粉配制品和液体配制品可用于形成用于经肺给药的气雾剂配制品。用于将治疗剂和/或其它活性剂递送到呼吸道的气雾剂是本领域中已知的。如本文中所使用的术语气雾剂是指悬浮于气体中的固体或液体颗粒的细雾的任何制剂。在一些情况下,气体可以是推进剂;然而,这不是必需的。气雾剂可以使用多种标准技术制造,包括超声波处理或高压处理。

[0110] 在一些情况下,使用装置来向肺给予配制品。合适的装置包括但不限于干粉吸入器、加压定剂量吸入器、喷雾器以及电流体动力学气雾剂装置。吸入可通过患者的鼻子和/或口腔进行。可通过在吸入时自我给予配制品或通过呼吸器向戴呼吸器的患者给予配制品来进行给药。

[0111] C. 局部配制品和眼用配制品

[0112] 在某些实施例中,粘液穿透纳米颗粒(MPP)被配制用于对眼部粘膜表面给药。局部或肠内配制品可以使用本领域中已知的技术以水性组合物形式制备。通常,可以将此类组合物制备成溶液或悬浮液;适用于在注射前在添加重构介质之后制备溶液或悬浮液的固体形式;乳液,如油包水型(w/o)乳液、水包油型(o/w)乳液以及其微乳液、脂质体、乳脂体、喷雾剂、凝胶、乳膏或软膏。

[0113] 载体可以是含有例如水、乙醇、一种或多种多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇)、油,如植物油(例如花生油、玉米油、芝麻油等)以及其组合的溶剂或分散介质。可以例如通过使用如卵磷脂的包衣、通过在分散液情况下维持所需粒度和/或通过表面活性剂来维持适当流动性。在多数情况下,包括例如糖或氯化钠的试剂来调节张力将是优选的。

[0114] 呈游离酸或碱或其药学上可接受的盐形式的活性化合物的溶液和分散液可以在水或另一种溶剂或分散介质中适当地与一种或多种药学上可接受的赋形剂混合来制备,药学上可接受的赋形剂包括但不限于表面活性剂、分散剂、乳化剂、pH调节剂以及其组合。

[0115] 合适的表面活性剂可以是阴离子型、阳离子型、两性或非离子型表面活性剂。合适的阴离子型表面活性剂包括但不限于含有羧酸根、磺酸根以及硫酸根离子的表面活性剂。阴离子型表面活性剂的实例包括长链烷基磺酸和烷基芳基磺酸的钠盐、钾盐、铵盐,如十二烷基苯磺酸钠;二烷基磺基琥珀酸钠,如十二烷基苯磺酸钠;二烷基磺基琥珀酸钠,如双-(2-乙基硫氧基)-磺基琥珀酸钠;以及烷基硫酸盐,如月桂基硫酸钠。阳离子型表面活性剂包括但不限于季铵化合物,如苯扎氯铵(benzalkonium chloride)、苄索氯铵(benzethonium chloride)、十六烷基三甲基溴化铵(cetrimonium bromide)、硬脂基二甲基苯甲基氯化铵、聚氧乙烯以及椰子胺。非离子型表面活性剂的实例包括乙二醇单硬脂酸酯、丙二醇肉豆蔻酸酯、单硬脂酸甘油酯、硬脂酸甘油酯、聚甘油基-4-油酸酯、脱水山梨糖醇酐化物、蔗糖酐化物、PEG-150月桂酸酯、PEG-400单月桂酸酯、聚氧乙烯单月桂酸酯、聚山梨醇酯、聚氧乙烯辛基苯基醚、PEG-1000鲸蜡基醚、聚氧乙烯十三烷基醚、聚丙二醇丁基醚、Poloxamer®401、硬脂酰基单异丙醇酰胺以及聚氧乙烯氢化动物脂酰胺。两性表面活性剂的实例包括N-十二烷基-β-丙氨酸钠、N-月桂基-β-亚氨基二丙酸钠、肉豆蔻酰两性乙酸盐、

月桂基甜菜碱和月桂基磺基甜菜碱。

[0116] 配制品可含有防腐剂以防止微生物生长。合适的防腐剂包括但不限于对羟苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸和硫柳汞。配制品还可以含有抗氧化剂以防止活性剂降解。

[0117] 通常将配制品缓冲到pH 3-8以便在重构后给药。合适的缓冲剂包括但不限于磷酸盐缓冲剂、乙酸盐缓冲剂以及柠檬酸盐缓冲剂。

[0118] 常常在药物配制品中使用水溶性聚合物。合适的水溶性聚合物包括但不限于聚乙烯吡咯烷酮、葡聚糖、羧甲基纤维素以及聚乙二醇。可以通过视需要用一种或多种上文所列的赋形剂将活性化合物以所需量并入适当的溶剂或分散介质中,随后过滤灭菌来制备无菌溶液。一般来说,通过将各种灭菌后的活性成分并入含有碱性分散介质和来自上文所列成分中的所需其它成分的无菌媒剂中来制备分散液。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下,优选制备方法是真空干燥和冷冻干燥技术,其由预先经过无菌过滤的溶液得到活性成分加上任何其它所需成分的粉末。可以一种方式制备粉末,使得颗粒在本质上是多孔的,这可以增加颗粒的溶解。制备多孔颗粒的方法在本领域中是总所周知的。

[0119] 用于眼部给药的药物配制品优选采用由一种或多种聚合物-药物结合物形成的颗粒的无菌水溶液或悬浮液的形式。可接受的溶剂包括例如水、林格氏溶液(Ringer's solution)、渗透(PBS)和等渗氯化钠溶液,然后将其调节到眼部所期望的低渗性,如使用MPP观察渗透诱导的水流(泪液)来确定。配制品也可以是在如1,3-丁二醇的无毒的、肠胃外可接受的稀释剂或溶剂中的无菌溶液、悬浮液或乳液。

[0120] 在一些情况下,配制品以液体或半固体形式分布或包装,如溶液(滴眼剂)、悬浮液、凝胶、乳膏或软膏。或者,用于眼部给药的配制品可以例如通过冻干合适的液体配制品获得的固体形式包装。固体可以在给药前用适当的载剂或稀释剂重构。

[0121] 用于眼部给药的溶液、悬浮液或乳液可以用维持适用于眼部给药的pH所需的有效量的缓冲剂缓冲。有用的缓冲剂的实例是乙酸盐、硼酸盐、碳酸盐、柠檬酸盐和磷酸盐缓冲剂。用于眼部给药的溶液、悬浮液或乳液还可以含有一种或多种张力剂以将配制品的张力调节至在适当低渗范围内。合适的张力剂在本领域中是众所周知的并且一些实例包括甘油、甘露糖醇、山梨糖醇、氯化钠以及其它电解质。

[0122] 用于眼部给药的溶液、悬浮液或乳液还可以含有一种或多种防腐剂以防止眼用制剂被细菌污染。合适的防腐剂是本领域中已知的,并且包括聚六亚甲基双胍(PHMB)、苯扎氯铵(BAK)、稳定的氧氯复合物(另外被称为Purite®)、乙酸苯汞、氯丁醇、山梨酸、氯己定(chlorhexidine)、苯甲醇、对羟基苯甲酸酯、硫柳汞以及其混合物。

[0123] 用于眼部给药的溶液、悬浮液或乳液还可以含有一种或多种本领域中已知的赋形剂,如分散剂、润湿剂和悬浮剂。

[0124] 在其它实施例中,纳米颗粒被配制用于对粘膜局部给药。合适的局部给药剂型包括乳膏、软膏、药膏、喷雾剂、凝胶、洗剂和乳液。

[0125] 配制品可以含有一种或多种赋形剂,如润肤剂、表面活性剂和乳化剂。“润肤剂”是软化或润滑皮肤的外部涂覆剂并且通常是本领域中所已知的并且概略地列举于如《药物赋形剂手册》,第4版,医药出版社(Pharmaceutical Press),2003中。这些润肤剂包括但不限于杏仁油、蓖麻油、长角豆属提取物、鲸蜡基硬脂酰基醇、鲸蜡醇、鲸蜡酯蜡、胆固醇、棉籽油、环聚二甲基硅氧烷、乙二醇棕榈基硬脂酸酯、甘油、甘油单硬脂酸酯、单油酸甘油酯、肉

豆蔻酸异丙酯、棕榈酸异丙酯、羊毛脂、卵磷脂、轻矿物油、中链甘油三酯、矿物油和羊毛脂醇、矿脂、矿脂和羊毛脂醇、大豆油、淀粉、硬脂醇、葵花油、木糖醇以及其组合。在一个实施例中，润肤剂是硬脂酸乙基己酯和棕榈酸乙基己酯。

[0126] 在一些实施例中，粘液穿透纳米颗粒用一种或多种表面活性剂配制。表面活性剂是降低表面张力并且从而增加产物的乳化、起泡、分散、扩散以及润湿特性的表面活性剂。合适的非离子型表面活性剂包括乳化蜡、单油酸甘油酯、聚氧乙烯烷基醚、聚氧乙烯蓖麻油衍生物、聚山梨醇酯、脱水山梨糖醇酯、苯甲醇、苯甲酸苯甲酯、环糊精、甘油单硬脂酸酯、泊洛沙姆、聚维酮(povidone)以及其组合。在一个实施例中，非离子型表面活性剂是硬脂醇。

[0127] 在一些实施例中，粘液穿透纳米颗粒用一种或多种乳化剂配制。乳化剂是促进一种液体于另一种液体中的悬浮并且促进油与水的稳定混合物或乳液的形成的表面活性物质。常用乳化剂是：金属皂、某些动物油和植物油以及各种极性化合物。合适的乳化剂包括阿拉伯胶、阴离子型乳化蜡、硬脂酸钙、卡波姆(carbomer)、鲸蜡基硬脂醇、鲸蜡醇、胆固醇、乙二醇胺、乙二醇棕榈基硬脂酸酯、甘油单硬脂酸酯、单油酸甘油酯、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羊毛脂、含水羊毛脂醇、卵磷脂、中链甘油三酯、甲基纤维素、矿物油和羊毛脂醇、磷酸二氢钠、单乙醇胺、非离子型乳化蜡、油酸、泊洛沙姆(poloxamer/poloxamers)、聚氧乙烯烷基醚、聚氧乙烯蓖麻油衍生物、聚氧乙烯脱水山梨糖醇脂肪酸酯、聚氧乙烯硬脂酸酯、丙二醇海藻酸酯、自乳化单硬脂酸甘油酯、脱水柠檬酸钠、月桂基硫酸钠、脱水山梨糖醇酯、硬脂酸、葵花油、黄芪、三乙醇胺、黄原胶以及其组合。在一个实施例中，乳化剂是甘油硬脂酸酯。

[0128] 合适类别的穿透增强剂是本领域中已知的并且包括但不限于脂肪醇、脂肪酸酯、脂肪酸、脂肪醇醚、氨基酸、磷脂、卵磷脂、胆酸盐、酶、胺和酰胺、络合剂(脂质体、环糊精、改性纤维素以及二酰亚胺)、大环物质(如大环内酯、酮和酸酐以及环脲)、表面活性剂、N-甲基吡咯烷酮和其衍生物、DMSO和相关化合物、离子化合物、氮酮和相关化合物以及溶剂，如醇、酮、酰胺、多元醇(例如二醇)。这些类别的实例是本领域中已知的。

[0129] 在一些实施例中，粘液穿透纳米颗粒被配制成“油”。“油”是含有至少95wt%亲脂性物质的组合物。亲脂性物质的实例包括但不限于天然存在的和合成的油、脂肪、脂肪酸、卵磷脂、甘油三酯以及其组合。

[0130] “连续相”是指悬浮着固体或分散着另一种液体的液滴的液体，并且有时被称为外相。连续相也指内部分布着固体或流体颗粒的胶体的流体相。如果连续相是水(或另一种亲水性溶剂)，那么水溶性或亲水性药物将溶解于连续相中(相较于分散)。在多相配制品(例如乳液)中，不连续相悬浮或分散于连续相中。

[0131] 在一些实施例中，粘液穿透纳米颗粒被配制成乳液。乳液是含有均匀掺合在一起的不可混溶组分的混合物。在特定实施例中，不可混溶组分包括亲脂性组分和水性组分。乳液是一种液体以小液珠形式分布于另一种液体的整个主体中的制剂。分散液体是不连续相，而分散介质是连续相。当油是分散液体并且水溶液是连续相时，称为水包油型乳液，而当水或水溶液是分散相并且油或油性物质是连续相时，称为油包水型乳液。油相和水相中的任一个或两个可以含有一种或多种表面活性剂、乳化剂、乳液、稳定剂、缓冲剂以及其它赋形剂。优选的赋形剂包括表面活性剂，尤其是非离子型表面活性剂；乳化剂，尤其是乳化蜡；以及液体非挥发性非水性材料，尤其是二醇，如丙二醇。油相可以含有其它油状的药学

上批准的赋形剂。举例来说,如羟基化蓖麻油或芝麻油的材料可以作为表面活性剂或乳化剂用于油相中。

[0132] 乳液的子集是自乳化系统。这些药物递送系统通常是胶囊(硬壳或软壳),包括分散于或溶解于表面活性剂与亲脂性液体的混合物中的药物,亲脂性液体如油或其它水不可混溶液体。当胶囊暴露于水性环境并且明胶外壳溶解时,水性介质与胶囊内容物之间的接触立即产生非常小的乳滴。这些乳滴通常在胶束或纳米颗粒的大小范围内。如典型地在乳液配制工艺中的情况那样,产生乳液无需混合力。

[0133] 在一些实施例中,粘液穿透纳米颗粒被配制成洗剂。洗剂是低粘度到中等粘度的液体配制品。洗剂可以含有通过使用悬浮剂和分散剂可溶于分散介质中的细粉状物质。或者,洗剂可以具有不可与媒剂混溶并且通常借助于乳化剂或其它合适的稳定剂分散的液体物质作为分散相。在一个实施例中,洗剂呈粘度介于100与1000厘沓之间的乳液形式。洗剂的流动性允许在宽阔的表面区域上快速并且均一的涂覆。通常打算使洗剂在皮肤上干燥,在皮肤表面上留下其药物组分的薄涂层。

[0134] 在一些实施例中,粘液穿透纳米颗粒被配制成乳膏。乳膏是“水包油”或“油包水型”粘性液体或半固体乳液。乳膏可以含有乳化剂和/或其它稳定剂。在一个实施例中,配制品呈粘度大于1000厘沓、通常在20,000-50,000厘沓范围内的乳膏形式。随着时间推移,乳膏往往比软膏优选,因为乳膏一般更容易铺开而且更容易去除。

[0135] 在一些实施例中,粘液穿透纳米颗粒被配制成软膏。软膏是含有软膏基质和任选地一种或多种活性剂的半固体制剂。合适的软膏基质的实例包括烃基质(例如矿脂、白矿脂、黄色软膏以及矿物油);吸收基质(亲水性矿脂、无水羊毛脂、羊毛脂以及冷乳膏);水可去除的基质(例如亲水性软膏)以及水溶性基质(例如聚乙二醇软膏)。糊剂与软膏的不同之处通常在于糊剂含有更大百分比的固体。糊剂通常比用相同组分制备的软膏更具吸收性并且油腻性更小。

[0136] 在一些实施例中,粘液穿透纳米颗粒被配制成凝胶。凝胶是含有小分子或大分子于液体媒剂中的分散液的半固体系统,其通过溶解或悬浮于液体媒剂中的增稠剂或聚合物材料的作用而呈现半固体状。液体可以包括亲脂性组分、水性组分或两者。一些乳液可以是凝胶或以其它方式包括凝胶组分。然而,一些凝胶因为其不含不可混溶的组分的均质化掺合物所以不是乳液。合适的胶凝剂包括但不限于改性纤维素,如羟丙基纤维素和羟乙基纤维素;Carbopol均聚物和共聚物;以及其组合。液体媒剂中的合适的溶剂包括但不限于二甘醇单乙醚;烷二醇,如丙二醇;二甲基异山梨醇;醇,如异丙醇和乙醇。溶剂通常根据其溶解药物的能力来加以选择。还可以并入改善配制品的皮肤感觉和/或润肤作用的其它添加剂。此类添加剂的实例包括但不限于肉豆蔻酸异丙酯、乙酸乙酯、苯甲酸C₁₂-C₁₅烷基酯、矿物油、角鲨烷、环聚二甲基硅氧烷、癸酸/辛酸甘油三酯以及其组合。

[0137] 在一些实施例中,粘液穿透纳米颗粒被配制成泡沫材料。泡沫材料由乳液以及气态推进剂或气体发射组分组成。在一些实施例中,粘液穿透纳米颗粒用一种或多种用于控制组合物的pH的缓冲剂配制。优选地,缓冲剂将组合物从pH约4缓冲到pH约7.5,更优选地从pH约4缓冲到pH约7,并且最优选地从pH约5缓冲到pH约7。

[0138] D. 肠内配制品

[0139] 在一些实施例中,粘液穿透纳米颗粒被配制成用于肠内给药。合适的口服剂型包

括片剂、胶囊、溶液、悬浮液、糖浆以及口含片。片剂可以使用本领域中众所周知的压制或模制技术来制备。明胶或非明胶胶囊可以使用本领域中众所周知的技术制备成硬或软胶囊外壳,胶囊外壳能够封装液体、固体以及半固体填充材料。配制品可使用一种或多种药学上可接受的赋形剂制备,包括稀释剂、防腐剂、粘合剂、润滑剂、崩解剂、溶胀剂、填充剂、稳定剂以及其组合。

[0140] 还可以使用赋形剂形成包覆组合物用于肠内给药,这类赋形剂包括塑化剂、色素、着色剂、稳定剂和助流剂。延迟释放剂型配制品可以如标准参考文献中所述制备,如《药物剂型片剂》(Pharmaceutical dosage form tablets),Lieberman等人编(纽约(New York),马塞尔德克公司(Marcel Dekker,Inc.),1989)、《雷明顿-药学的科学与实践》(Remington-The science and practice of pharmacy),第20版,马里兰州巴尔的摩的利平科特·威廉斯·威尔金斯出版公司(Lippincott Williams&Wilkins,Baltimore,MD),2000和《药物剂型和药物递送系统》(Pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems),第6版,Ansel等人,(宾夕法尼亚州米迪亚(Media,PA):威廉斯·威尔金斯出版公司(Williams and Wilkins),1995)。这些参考文献提供关于用于制备片剂和胶囊以及片剂、胶囊以及颗粒剂的延迟释放剂型的赋形剂、材料、设备以及方法的信息。

[0141] 举例来说,可以包覆胶囊以在颗粒通过胃的酸性环境之后延迟释放。合适的包衣材料的实例包括但不限于纤维素聚合物,如邻苯二甲酸乙酸纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、邻苯二甲酸羟丙基甲基纤维素以及琥珀酸乙酸羟丙基甲基纤维素;聚乙酸乙酯邻苯二甲酸酯、丙烯酸聚合物和共聚物以及可以商标名EUDRAGIT®(德国威特史丹特的罗斯药厂(Roth Pharma,Westerstadt,Germany))在市面上购得的甲基丙烯酸树脂、玉米蛋白、虫胶以及多糖。

[0142] IV. 制造方法

[0143] 纳米颗粒的制造技术是本领域中已知的并且包括但不限于溶剂蒸发、溶剂去除、喷雾干燥、相转化、低温铸造以及纳米沉淀,例如如WO/2013/110028中所述。

[0144] 在一些实施例中,通过一种或多种核心聚合物、一种或多种表面改变材料以及一种或多种低分子量乳化剂的乳液形成纳米颗粒。举例来说,在一些实施例中,纳米颗粒通过如下制造:将一种或多种核心聚合物溶解在有机溶剂中,向乳化剂的水溶液或悬浮液中添加一种或多种核心聚合物的溶液以形成乳液,然后向乳化剂的第二溶液或悬浮液中添加该乳液以促使形成纳米颗粒。

[0145] 药学上可接受的赋形剂,包括pH调节剂、崩解剂、防腐剂和抗氧化剂,可以任选地在颗粒形成过程中并入到颗粒中。如上所述,也可以在颗粒形成过程中将一种或多种额外活性剂并入到纳米颗粒中。一种或多种表面改性剂也在颗粒配制过程中并入到颗粒中和/或随后连接到颗粒表面。

[0146] V. 使用方法

[0147] 已确定,密集地涂有高分子量聚(乙二醇)的纳米颗粒能够穿透粘液,向受试者递送治疗剂、预防剂、营养剂和/或诊断剂。

[0148] MPP直接给予到受试者的特定身体位置。举例来说,在一些实施例中,MPP直接递送到眼睛、阴道、消化道、结肠、直肠、口腔、鼻、耳或肺的粘膜表面。在一些实施例中,MPP通过直接局部给药到粘膜上或粘膜中来给药。在其它实施例中,给药途径使MPP直接靶向特定器

官。

[0149] 包括MPP的药物组合物可以按各种方式给予,这取决于期望局部给药还是全身给药,并且取决于待治疗的区域。

[0150] 可以在疾病症状发作之前、发作期间或发作之后的一段时间内,或在一种或多种疾病症状发作之前、发作期间或发作之后的各段时间的任何组合,给予MPP的组合物。

[0151] 术语“有效量”或“治疗有效量”意指足以治疗、抑制或缓解待治疗病症的一种或多种症状或以其它方式提供所期望的药理和/或生理效应的剂量。精确剂量将根据各种因素而改变,如受试者因变量(例如年龄、免疫系统健康等)、疾病或病症以及待实施的治疗。

[0152] 可以将MPP的作用与对照进行比较。合适的对照是本领域中已知的并且包括例如未处理细胞或未处理受试者。在一些实施例中,对照是已处理受试者的未处理组织或未处理受试者。优选地,对照的细胞或组织来源于与已处理细胞或组织相同的组织。在一些实施例中,未处理的对照受试者患有与已处理受试者相同的疾病或病况或有患该疾病或病况的风险。举例来说,在一些实施例中,未处理的对照受试者不接受由MPP所赋予的所期望的治疗、预防或诊断作用。

[0153] 将通过参考以下非限制性实例进一步理解本发明。

[0154] 实例

[0155] 实例1. 反应缓冲剂影响高分子量PEG的涂层密度。

[0156] 材料和方法

[0157] 纳米颗粒(NP)涂布方法

[0158] 使用先前所述的两种方法(Nance等人,《科学·转化医学》,2012,4,149-119)合成涂有PEG的纳米颗粒。关于“MES缓冲法”,将过量甲氧基-聚乙二醇(mPEG)-胺(10kDa)溶解于pH 6的50mM 2-(N-吗啉基)乙磺酸(MES)缓冲剂(西格玛(Sigma))中。向MES/PEG溶液中添加大小为200nm的羧酸盐改性的聚苯乙烯(PS)纳米颗粒(分子探针公司(Molecular Probes))并且声处理10分钟。以0.1:1:1:1:1COOH:PEG:EDC:NHS的比率添加1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)-碳化二亚胺(EDC,西格玛)和N-羟基磺基琥珀酰亚胺(NHS,西格玛)。将混合物在37°C下保温过夜,然后通过离心收集纳米颗粒并用DI水洗涤两次。关于“硼酸盐缓冲法”,用分子量5kDa、10kDa、20kDa或40kDa的聚乙二醇(PEG)涂布40nm、100nm或200nm羧酸盐改性的PS纳米颗粒(分子探针公司)。将PS纳米颗粒悬浮于200mM硼酸盐缓冲剂(pH 7.4)中,并添加过量的甲氧基-PEG-胺。添加过量的NHS和EDC。将纳米颗粒混合物在室温下保温过夜,随后用DI水洗涤两次。

[0159] 表征所配制的纳米颗粒

[0160] 将纳米颗粒悬浮于10mM NaCl溶液中,并且使用Zetasizer Nano ZS90(马尔文仪器公司(Malvern Instruments)),分别通过动态光散射(dynamic light scattering,DLS)和激光多普勒风速测定法表征大小和 ζ -电位。DLS在90°散射角下进行,并且所有测量都在25°C下根据仪器设置进行。

[0161] 结果

[0162] 在10kD PEG接枝到PS纳米颗粒(PS NP)的表面上的过程中,比较反应缓冲剂MES和硼酸盐缓冲剂。使用MES法涂有10kDa PEG的PS NP(PS-PEG_{MES}, 220 ± 10nm; -12 ± 0.4mV)以粘附方式固定在CVM中;相比于类似大小的纳米颗粒在水中的理论扩散速率,PS-PEG_{MES} NP在

粘液中的系综平均的均方位移(<MSD>)慢>10,000倍(表1)。相比之下,使用硼酸盐方法涂有10kDa PEG的相同PS NP(PS-PEG_{硼酸盐}, 260±7nm; -0.7±0.5mV)在CVM中快速扩散。PS-PEG_{硼酸盐} NP在CVM中的系综平均的均方位移<MSD>相比于其在水中的理论扩散速率MSD_w只慢11倍(表1,图1),并且比未涂布的PS NP(180±1nm; -59±2mV)或PS-PEG_{MES}高约1,000倍(图1,表1)。PS-PEG_{MES} NP的<MSD>(图1)和单独MSD值的对数分布(图2A、图2B)类似于未涂布的PS纳米颗粒,如先前所报道的(Wang等人,《应用化学国际英文版》,2008,47,9726-9729)。PS-PEG_{硼酸盐} NP的单独MSD值的对数分布远大于未涂布的纳米颗粒和PS-PEG_{MES} NP(图2C)。代表CVM中的3秒移动的纳米颗粒轨迹进一步强调了转移性能的差异,如PS-PEG_{硼酸盐} NP的运动反映扩散运动,而PS和PS-PEG_{MES} NP的轨迹则受到高度限制(图3A到图3C)。

[0163] 表1. 通过各种方法制备的100和200nm PS和PS-PEG NP的大小、 ζ -电位、PEG表面密度(由PEG覆盖的面积/总表面积或 Γ /SA),以及在粘液中的系综平均的MSD(<MSD>)与类似大小的颗粒在水中的理论MSD(MSD_w)的比较。

[0164]

大小 (nm)	类型	PEG MW (kDa)	流体动力学直径 (nm)	ζ -电位 (mV)	Γ /SA	PEG 链数 /100 nm ²	MSD _w / \langle MSD \rangle
40	PS	-	56±2	-33±0.6	不适用	不适用	不适用
	PS-PEG	5	60±1	-2.2±0.2	不适用	不适用	不适用
		10	68±0.4	-2.9±0.4	不适用	不适用	不适用
		20	84±3	-2.6±0.2	不适用	不适用	不适用
		40	97±1	-3.4±0.5	不适用	不适用	不适用
100	PS	-	90±1	-51±1.6	0	0	>10,000
	PS-PEG	5	110±2	-3.1±0.3	>2*	~9*	10
		10	120±7	-0.5±0.1	2.0±0.1	4.4±0.2	18
		20	130±4	-0.4±0.1	3±0.1	3.3±0.1	6
		40	170±8	-1±0.1	2.1±0.2	1.2±0.1	20
200	PS	-	180±1	-59±2	0	0	>10,000
	PS-PEG	5	230±5	-1.6±0.1	1.6±0.1	7.1±0.4	9
		10	260±7	-0.7±0.5	1.5±0.1	3.3±0.1	11
		10 (MES)	220±10	-12±0.4	1.3±0.1	2.9±0.3	>10,000
		20	270±7	-2±0.7	1.7±0.1	1.9±0.2	10
40	300±5	-1±0.6	1.7±0.1	1±0.1	15		

[0165] *基于Nance等人,《科学·转化医学》,2012,4,149-119。

[0166] 除非另外指明,否则PS-PEG NP通过硼酸盐方法制备。值是n≥3个样品的平均值。

[0167] 实例2.涂布在PS NP的表面上的10kD PEG的密度。

[0168] 材料和方法

[0169] 测量PEG表面密度

[0170] 如先前所述(Nance等人,《科学·转化医学》,2012,4,149-119;Xu等人,《控释杂志》,2013,170,279-286),计算PEG密度。简单来说,将纳米颗粒完全溶解于氘代氯仿(CDCl₃,西格玛)、三氟乙酸-d(TFAd,西格玛)以及已知浓度的四甲基硅烷(TMS,1%w/v)中。使用Bruker REM400在400MHz下获得¹H-NMR光谱。从PEG峰(3.6ppm)和内标TMS峰(0ppm)的积分计算PEG密度或 Γ /SA。为了计算每个颗粒上的PEG链所占据的面积,使用随机漫步统计模

型来寻找由一定长度的PEG占据的面积。这些计算得到了直径 $d=0.76(m_b)^{0.5}$ 的球体,其中 m_b 是所讨论的PEG的分子量,根据 $A=\pi(d/2)^2$ 得到由PEG占据的面积(Boylan等人,《控释杂志》,2012,157,72-79)。然后使用所占据的面积计算每 100nm^2 PEG链的数量和由PEG链占据的面积/总颗粒表面积(Γ/SA)。使用PEG 5 kDa校准溶液中的PEG浓度。关于PEG表面密度计算,假定纳米颗粒表面是光滑的并且其直径等于通过DLS测量得到的直径。

[0171] 结果

[0172] 在PS-PEG NP上的PEG表面密度的定量过程中,使用定量NMR法,根据堆积密度(Γ/SA ,其中 Γ 是接枝PEG链所覆盖的不受限制的表面积并且 SA 是总纳米颗粒表面积)来推断PEG链的物理构象(Nance等人,《科学·转化医学》,2012,4,149-119;Xu等人,《控释杂志》,2013,170,279-286)。PS-PEG_{10kDa}NP的 $\Gamma/SA(1.5\pm 0.0)$ 相比于PS-PEG_{5kDa}NP的 1.3 ± 0.1 来说增加了(表1),表明PEG链更密集地堆积在PS-PEG_{10kDa}NP的表面上。PS-PEG_{10kDa}NP的 Γ/SA 值对应于 3.3 ± 0.1 10kDa PEG链/ 100nm^2 ,对比PS-PEG_{5kDa}NP的 2.9 ± 0.3 10kDa PEG链/ 100nm^2 。以前使用间接法定量PEG表面密度,该方法包括使荧光染料与PEG结合之后在纳米颗粒表面上剩余的未反应的羧酸基结合(Wang等人,《应用化学国际英文版》,2008,47,9726-9729)。在此间接法中,PS NP表面上的羧酸基的约69%与2kDa PEG结合,并且PS NP表面上的羧酸基的约65%与10kDa PEG结合(Wang等人,《应用化学国际英文版》,2008,47,9726-9729)。

[0173] 定量NMR方法和计算的结果暗示,存在一个最小PEG密度阈值,必须超过这个阈值才能有效地保护PS NP表面不与CVM相互作用,并且涂层充足与涂层不充足之间的界限很窄。

[0174] 类似地,Nance等人,《科学·转化医学》,2012,4,149-119的结果进一步暗示,所需要的PEG涂层的密度也取决于纳米颗粒大小和PEG MW。对于涂有5kDa PEG的100nm PS纳米颗粒来说,需要至少2.0的 Γ/SA 才能有效地穿透脑细胞外基质(Nance等人,《科学·转化医学》,2012,4,149-119),而 $\Gamma/SA=1.7$ 是不充足的涂层。

[0175] 取决于反应过程和底物,实现不同水平的PEG涂层密度。Xu等人,《控释杂志》,2013,170,279-286观察到,由PEG(MW高达10kDa)与聚(乳酸-共-乙醇酸)的嵌段共聚物(PLGA-PEG)组成的生物可降解纳米颗粒足够密集地涂有PEG,以便在人类CVM中快速扩散。因为PLGA-PEG纳米颗粒是使用使PEG在缓慢硬化过程中分配到纳米颗粒表面的乳液法形成的,而不是将PEG接枝到预先形成的纳米颗粒的表面上,所以实现了2.3和更大的 Γ/SA 值(10kDa PEG的 $\Gamma/SA=3.0$)(Xu等人,《控释杂志》,2013,170,279-286)。

[0176] 实例3.致密涂层中的高分子量(HMW)PEG有助于颗粒穿透粘液。

[0177] 材料和方法

[0178] 纳米颗粒(NP)涂层配制

[0179] 如Nance等人,《科学·转化医学》,2012,4,149-119;Lai等人,《美国国家科学院院刊》,2007,104,1482-1487所述,制备纳米颗粒。简单来说,使用指定缓冲剂,用5kDa到40kDa甲氧基-PEG-胺涂布40、100和200nm羧酸盐改性的聚苯乙烯(PS)珠粒。

[0180] 人类子宫颈阴道粘液中的多颗粒跟踪

[0181] 如先前所述(Lai等人,《美国国家科学院院刊》,2007,104,1482-1487;Boskey等人,《性传播疾病》(Sex Transm Dis),2003,30,107-109),获得人类子宫颈阴道粘液(CVM)样品。简单来说,使用自动收集法,采用月经液收集装置,根据约翰霍普金斯医疗机构

(Johns Hopkins Medical Institution)的机构审查委员会批准的方案,从阴道微生物群正常的女性获得未稀释的CVM。在使用前,将粘液样品储存在4℃下,并且在收集4小时内使用。向定制孔中30μL体积的CVM中添加至多2μL的颗粒溶液(0.02-0.08%w/v)。用超强力胶水粘上盖玻片来密封孔。通过EMCCD摄像机(Evolve 512;Photometries)作为倒置式落射荧光显微镜装备(Zeiss Axio Observer)的一部分,采用100×/1.46NA油浸物镜获得影片。用Metamorph软件(分子仪器公司(Molecular Devices))以66.7ms的时间分辨率捕捉影片20秒。使用MATLAB(Schuster等人,《生物材料》2013,34,3439-3446)以每个颗粒最少跟踪30帧来获得纳米颗粒轨迹和均方位移(MSD),并且MSD按 $\langle \Delta r^2(\tau) \rangle = [x(t+\tau) - x(t)]^2 + [y(t+\tau) - y(t)]^2$ (τ =时标或时滞)计算(Lai等人,《美国国家科学院院刊》,2007,104,1482-1487;Suh等人,《先进药物递送综述》,2005,57,63-78;Dawson等人,《生物技术进展》(Biotechnol Prog),2004,20,851-857)。在n=3个独立样品中跟踪至少150个颗粒。我们先前的研究指示,静态误差据估计可以低于20nm,比平均颗粒位移小得多(Suh等人,《先进药物递送综述》,2005,57,63-78;Suk等人,《控释杂志》,2014,178,8-17)。

[0182] 结果

[0183] 使用硼酸盐方法涂有5-40kDaPEG的200nm PS NP(PS-PEG_{5-40kDa},最终大小230-300nm,表1)能够快速穿透CVM,如由所测得的高<MSD>值指示(图4)。此外,所有PS-PEG_{5-40kDa}NP的3秒轨迹反映扩散性能,与未涂布的PS NP形成鲜明对比(图5A到图5E)。PS-PEG_{5-40kDa}NP也具有高PEG密度, $\Gamma/SA \geq 1.5$ (表1)。显而易见,每100nm²PEG分子的数量随着PEG MW增加而减小,这可能是由于每个PEG链所占据的空间的量随着MW增加而增加;一个不受限制的5kDa PEG链所占据的面积是约23nm²,对比不受限制的40kDa PEG分子的约180nm²。另外,纳米颗粒在聚乙二醇化后的流体动力学直径随着PEG MW增加而增加;PEG链的密集堆积引起延伸,因此较高MW的PEG链将产生较厚的冠状物。

[0184] 假设,不管PEG MW,通过在纳米颗粒表面上密集地堆积PEG链,PEG变得对齐并且空间上受到限制而不能穿透到粘蛋白凝胶中。粘附性显示为取决于PEG链移动,并且因此如果链受到足够的限制,那么链将不能与粘液网互相穿透,导致粘膜粘附减小(Huang等人,《控释杂志》,2000,65,63-71)。

[0185] Yang和合作者发现,关于 $\Gamma/SA > 2.8$,涂有高达20kDa PEG的纳米颗粒的<20%被体循环清除。在此PEG表面密度下,他们确定,相邻的PEG链极不可能同时达到延长的配置,这会使颗粒表面暴露于蛋白质吸附。他们还发现,即使很小的PEG密度减小都会导致体循环时间减少到<2小时(Yang等人,《分子药剂学》(Mol Pharm),2014,11,1250-1258)。类似地,我们发现,纳米颗粒PEG表面密度小幅减小引起从非粘膜粘附表面特性转变为粘膜粘附表面特性。

[0186] 实例4. 纳米颗粒的核大小影响PEG涂层密度和粘液穿透。

[0187] 材料和方法

[0188] 如Nance等人,《科学·转化医学》,2012,4,149-119;Lai等人,《美国国家科学院院刊》,2007,104,1482-1487所述,制备纳米颗粒。简单来说,使用指定缓冲剂,用5kDa到40kDa甲氧基-PEG-胺涂布40、100和200nm羧酸盐改性的聚苯乙烯(PS)珠粒。

[0189] 结果

[0190] 使用硼酸盐方法,用5kDa-40kDa PEG涂布100nm PS NP(PS-PEG_{5-40kDa},最终大小

110-170nm)。表1和图6显示,100nm PS-PEG_{5-40kDa}NP的 Γ/SA 值全都 >2 ,导致NP快速扩散通过CVM。涂有PEG的纳米颗粒的轨迹反映扩散运动,与未涂布的PS形成鲜明对比(图7A到图7E)。所有100nm和200nm PS-PEG_{5-40kDa}NP配制品在CVM中相比于其在水中的理论扩散速率全都慢 <20 倍(表1)。

[0191] 假设,不管PEG MW,通过在纳米颗粒表面上密集地堆积PEG链,PEG变得对齐并且空间上受到限制而不能穿透到粘蛋白凝胶中。粘附性显示为取决于PEG链移动,并且因此如果链受到足够的限制,那么链将不能与粘液网互相穿透,导致粘膜粘附减小(Huang等人,《控释杂志》,2000,65,63-71)。

[0192] 实例5.PEG MW对涂布颗粒在体内的分布的影响。

[0193] 材料和方法

[0194] 在逆光循环设施(12小时光,12小时黑暗)中圈养6-8周龄雌性CF-1小鼠一周使其适应。关于阴道分布,如先前所述(Champlin等人,《繁殖生物学》(Biol Reprod),1973,8,491-494),通过小鼠阴道口的外观选择自然循环发情的小鼠。发情期小鼠的阴道最类似于人类阴道(Asscher等人,《解剖学杂志》(JAnat),1956,90,547-552;Smith等人,《美国解剖学杂志》Am JAnat),1934,54,27-85),并且其子宫颈阴道粘液与人类CVM具有类似的屏障特性(Ensign等人,《分子药剂学》,2013,10,2176-2182)。关于结肠直肠分布,使小鼠饥饿24小时,因为这么做能不太频繁地产生较软的尿粒(Maisel等人,《控释杂志》,2015,10,197,48-57,电子版2014年11月4日)。使用异氟烷麻醉小鼠,并且给予在DI水中的5 μ L(阴道内)或20 μ L(直肠内)0.02%w/v的100nm(阴道内)或40nm(直肠内)纳米颗粒(Maisel等人,《控释杂志》,2015,10,197,48-57,电子版2014年11月4日;Ensign等人,《科学·转化医学》,2012,4,138-179;Maisel等人,《控释杂志》,2015,209,280-287)。5-10分钟后处死小鼠,切下组织并快速冷冻在Tissue-Tek O.C.T.化合物中。在Leica CM-3050-S低温恒温器下,沿着阴道和结肠直肠的整个长度,将组织切成6 μ m切片。用10%福尔马林固定切片并使用ProLong Gold antifade®试剂染色,用DAPI对细胞核染色并保持颗粒的荧光性。使用倒置式落射荧光显微镜装备(Zeiss Axio Observer)获得图像。所有实验全都由约翰霍普金斯大学动物护理和使用委员会(Johns Hopkins University Animal Care and Use Committee)批准。

[0195] 结果

[0196] 在给予含有涂布后的PS-PEG NP的溶液之后5-10分钟获得的横向阴道和结肠直肠组织冷冻切片中所观察到,密集地涂有各种MW(5kDa、10kDa、20kDa、40kDa)的PEG的PS-PEG NP均一地分布在小鼠的子宫颈阴道和结肠直肠中。申请人先前观察到,所给予的适当大小的PS-PEG NP当其充分聚乙二醇化并且在诱导上皮流体吸收的低渗媒剂中给予时均一地分布在小鼠阴道(约100nm)和结肠直肠(约40nm)中(Ensign等人,《科学·转化医学》,2012,4,138-179;Ensign等人,《生物材料》,2013,34,6922-6929;Maisel等人,《控释杂志》,2015,10,197,48-57,电子版2014年11月4日;Maisel等人,《控释杂志》,2015,209,280-287)。类似于申请人先前的观察结果,未涂布的PS NP聚集在内腔粘液层中,但是所有具有足够致密的PEG涂层以便在离体粘液样品中扩散的PS-PEGNP配制品(PS-PEG_{5-40kDa})在体内快速并均一地转移到阴道和结肠直肠上皮表面。这个结果符合前述观察结果:纳米颗粒在离体粘液中的扩散与所观察到的在体内在粘膜表面的分布非常相关,即,在离体粘液中快速扩散/不受阻碍的颗粒也更加均一地分布在整个粘膜表面,于是,当将颗粒局部给予到粘膜组织时,颗

粒的存留时间较长。纳米颗粒分布改良有助于更有效地治疗和预防粘膜部位的疾病,包括预防子宫颈阴道中的疱疹(HSV-2)感染、预防哮喘诱发的肺部炎症以及治疗子宫颈癌(Ensign等人,《科学·转化医学》,2012,4,138-179;Suk等人,《控释杂志》,2014,178,8-17;Yang等人,《先进医疗材料》(Adv Healthc Mater),2014,3,1044-1052;da Silva等人,《控释杂志》,2014,180,125-133)。

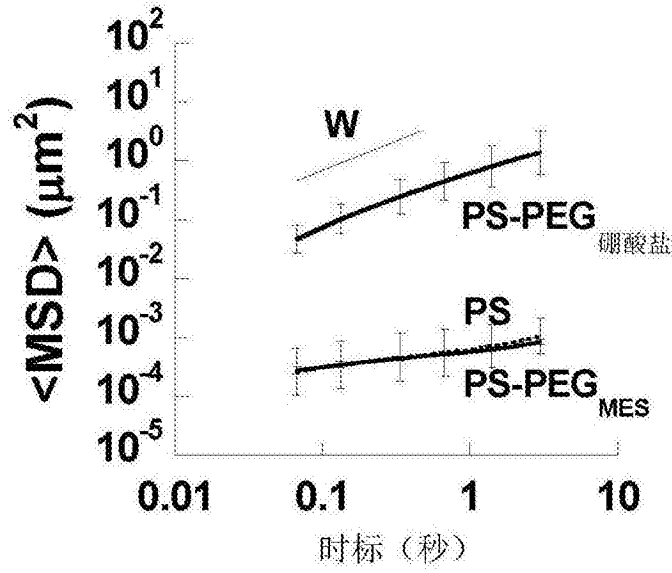


图1

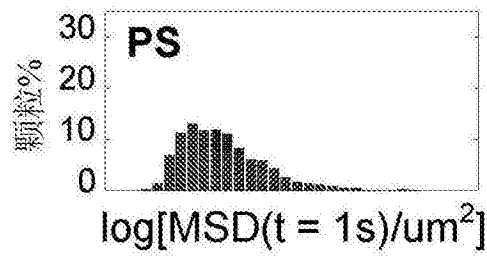


图2A

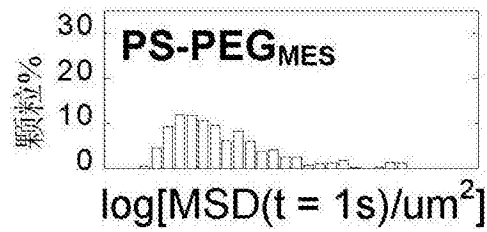


图2B

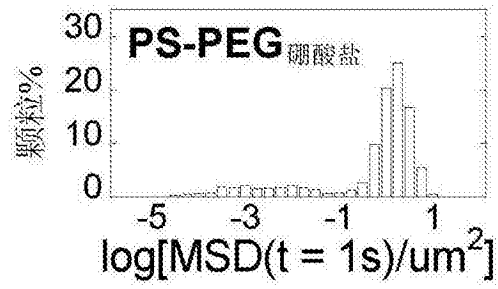


图2C

PS

•

图3A

PS-PEG
MES

•

图3B

PS-PEG
磷酸盐



图3C

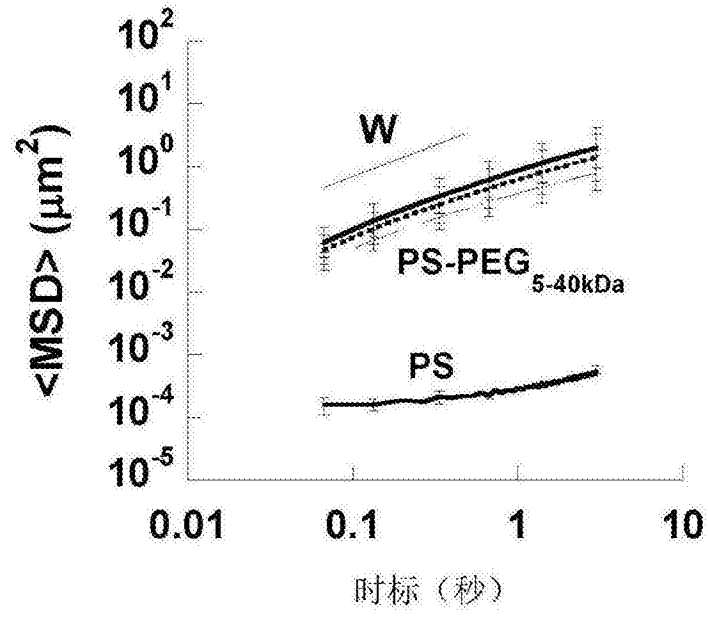


图4

PS

.

图5A

PS-PEG_{5kDa}



图5B

PS-PEG_{10kDa}



图5C



图5D



图5E

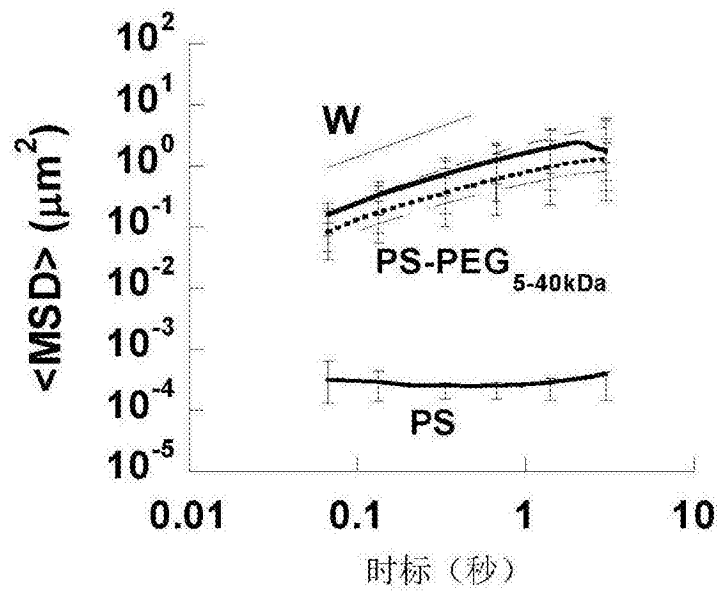


图6

PS

•

图7A



图7B

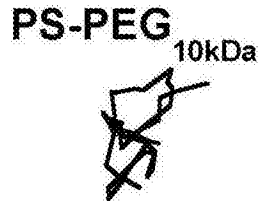


图7C



图7D

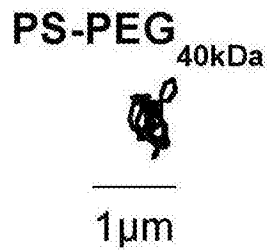


图7E