(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 116723892 A
(43)申请公布日 2023.09.08

(21)申请号 202180087564.1
(22)申请日 2021.12.24
(30)优先权数据
2027229 2020.12.24 NL
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2023.06.26
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/IB2021/062306 2021.12.24
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2022/137214 EN 2022.06.30
(71)申请人 美德斯普瑞公司
地址 荷兰恩斯赫德
(72)发明人 科内利斯·约翰内斯·玛利亚·范里恩
(74)专利代理机构 北京德崇智捷知识产权代理有限公司 11467
专利代理师 申雪梅
(51)Int.Cl.
B01J 13/00(2006.01)

权利要求书2页 说明书9页 附图3页

(54)发明名称

气溶胶化纳米颗粒制剂的方法

(57)摘要

为了在空气中递送纳米颗粒,提供包括所述纳米颗粒的液体制剂并将其加压至升高的操作压力p。所述液体制剂在所述升高的操作压力下通过至少一个喷雾孔口的喷雾喷嘴孔口供给,以将所述液体制剂作为包含所述纳米颗粒的至少一个纳米颗粒的连续液滴的射流排出。所述纳米颗粒在伸长断裂前具有长度λ和最大长度λ_{max},并且所述液体制剂在通过所述喷雾喷嘴孔口时受到壁剪切速率γ_{wall}[每秒]的影响。根据本发明,所述液体制剂在小于$\lambda_{max}/(\lambda.\gamma_{wall})$秒的有限剪切时间t内在所述喷雾喷嘴孔口内暴露于所述壁剪切速率。

CN 116723892 A

1.一种用于在空气中递送纳米颗粒的方法,包括:

在液体中提供具有颗粒长度(λ)的纳米颗粒以形成液体制剂;

将所述液体制剂加压至中等操作压力(p)以提供加压的液体制剂;和

通过喷雾喷嘴孔口供给所述加压液体制剂,所述喷雾喷嘴孔口具有在所述孔口的入口和出口之间的通道长度(L)和在所述入口和所述出口之间的平均通道直径(H),以产生具有一定速度的所述液体制剂的液流;

其中所述中等操作压力保持在10MPa以下,并且所述速度小于100m/s;

其中所述孔口具有比所述平均通道直径(H)短的通道长度(L);和

其中所述液流在所述出口处被收集为连续液滴的射流,所述连续液滴各自包含所述纳米颗粒中的至少一个纳米颗粒。

2.根据权利要求1所述的方法,其中所述液体制剂包含剪切应力敏感的纳米颗粒,所述纳米颗粒选自含有复杂蛋白质、大生物分子、长链DNA和RNA、病毒、大囊泡、脂质体、噬菌体和抗体的组;和

其中所述孔口的通道长度(L)短于所述平均通道直径(H)的一半。

3.根据权利要求2所述的方法,其中,所述孔口的通道长度(L)至多为所述平均通道直径(H)的四分之一。

4.根据权利要求2或3所述的方法,其中所述液体制剂包含分子量大于100000g/mol的蛋白质和/或抗体分子和/或核苷酸化合物如DNA或RNA分子。

5.根据权利要求2或3所述的方法,其中所述液体制剂包括平均尺寸大于20纳米的噬菌体。

6.根据权利要求2或3所述的方法,其中所述液体制剂包含脂质纳米颗粒或脂质体,特别是肺表面活性剂,其所述长度λ大于20纳米。

7.根据权利要求6所述的方法,其中所述液体制剂包含囊泡,所述囊泡具有内容物,所述内容物包含从含有分子量高于100000Da的蛋白质、生物分子、DNA、RNA、疫苗、病毒、噬菌体和抗体的组中获得的纳米颗粒。

8.根据权利要求2或3所述的方法,其中,所述喷嘴孔口具有在1微米和10微米之间的基本恒定的直径(H)。

9.根据权利要求2或3所述的方法,其中所述喷嘴孔口的平均直径(H)在1微米和10微米之间;并且其中所述孔口在从所述入口到所述出口的所述长度的至少一部分上逐渐变细。

10.根据权利要求9所述的方法,其中,所述喷嘴孔口设置有正锥形,从所述入口进口到所述出口以大致5°至45°之间的锥形变窄。

11.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中,所述喷嘴孔口的内壁设置有疏水可滑流涂层。

12.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中,所述流体的质量密度(ρ)、所述孔口内的流体速度(V)和所述喷嘴直径(H)的乘积除以所述流体粘度(η)表示为ρ.V.H/η,保持在2500以下。

13.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述纳米颗粒在伸长断裂之前具有最大颗粒长度λ_{max};其中所述液体制剂在通过所述喷雾喷嘴孔口时经受壁剪切速率γ_{wall}[每秒];并且其中所述液体制剂在小于$\lambda_{max}/(\lambda.\gamma_{wall})$秒的剪切时间(t)期间在所述喷雾喷

嘴孔口内暴露于所述壁剪切速率。

14.根据权利要求13所述的方法，其中，所述壁剪切速率γ_{wall}远高于100000，特别是高于1000000每秒。

15.根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中所述纳米颗粒包含分子量大于100000g/mol的大分子；并且其中所述大分子具有的比率λ_{max}/λ至少为2，并且优选比率λ_{max}/λ至少为4。

16.根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中，所述喷嘴孔口是延伸穿过由基材支撑的公共膜层的基本上相同的喷嘴孔口的集合的一部分，其中所述基材具有延伸到所述孔口的集合的所述喷嘴孔口的至少一个空腔，并且其中所述液体制剂在所述操作压力下共同输送到所述空腔，以供应所述孔口的集合的所述喷嘴孔口。

气溶胶化纳米颗粒制剂的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及气溶胶化纳米颗粒制剂的方法，所述纳米颗粒制剂包括含有蛋白质、肽、DNA、RNA、囊泡、脂质体和抗体的制剂。

背景技术

[0002] 目前的水性气溶胶化装置是例如喷雾器和软雾吸入器。喷雾器通过使用压缩空气、超声波动力源或振动网/膜来分散制剂，从而产生气溶胶。软雾吸入器通过微射流以非常高的速度碰撞产生细水滴的薄雾。

[0003] 欧洲专利申请EP 3563894公开了这种软雾吸入器的一个例子，其用于雾化非牛顿流体，特别是像悬浮液或乳液或使用小直径喷嘴的脂质体流体。这种已知的喷雾器包括流体泵，该流体泵用于将流体加压至5至250Mpa的操作压力并迫使加压流体通过两个相互倾斜的流动通道，该流动通道具有在3至20微米范围内的液压直径。这产生了两个以极高速度交叉的流体射流，它们将相互撞击，产生细水滴的薄雾。两种流体射流在高速下的这种碰撞对流体和其中包含的任何颗粒都有显著影响。事实证明，易碎、纤细的纳米颗粒在这些条件下往往会受损，在许多情况下不太可能在气溶胶化过程中幸存下来。

[0004] 国际专利申请WO 02/13786A2公开了一种从流体流中产生颗粒的装置和方法，其中使用振动器迫使流体流成为单个液滴。流体是带电的，并且振动器特别包括超声压电换能器，该超声压电转换器能够作用于从具有至少100微米直径的喷嘴通道出现的带电流体。这种已知的方法和装置使流体由于超声源或振动网/膜而承受相当大的机械应力。流体中包含的分子暴露于该应力，导致剪切应力引起的这些分子的降解。因此，使用这种已知的装置和方法，任何纤细的和易碎的分子都容易降解。此外，这种喷射机构与至少100微米的喷嘴直径一起使得这种已知的装置仅适用于相对大尺寸的应用。例如，将喷嘴直径从100微米减小到5微米，将使对任何封装化合物造成的损害按数量因数增加。因此，这种已知的方法和装置在需要更小喷嘴并且在减小喷嘴直径时由于越来越大的壁剪切力对流体包含的任何化合物造成甚至更大损坏的亚微米范围内没有潜在用途。

发明内容

[0005] 本发明的一个目的尤其是提供一种使流体组合物气溶胶化的方法，所述流体组合物包含在使应力敏感的纳米颗粒气溶胶化时保持分子完整性的纳米颗粒，例如含有复杂蛋白质、肽、长链DNA和RNA、大囊泡、脂质体和/或抗体的制剂。

[0006] 为此，本发明提供了一种在空气中递送纳米颗粒的方法，包括：

[0007] 在液体中提供具有颗粒长度(λ)的纳米颗粒以形成液体制剂；

[0008] 将所述液体制剂加压至中等操作压力(p)以提供加压的液体制剂；和

[0009] 通过喷雾喷嘴孔口供给所述加压液体制剂，所述喷雾喷嘴孔口具有在所述孔口的入口和出口之间的通道长度(L)和在所述入口和所述出口之间的平均通道直径(H)，以产生具有一定速度的所述液体制剂的液流；

[0010] 其中所述中等操作压力保持在10Mpa以下，并且所述速度小于100m/s；

[0011] 其中所述孔口具有比所述平均通道直径(H)短的通道长度(L)；和

[0012] 其中所述液流在所述出口处被收集为连续液滴的射流，所述连续液滴各自包含所述纳米颗粒中的至少一个纳米颗粒。

[0013] 在一个具体实施方式中，根据本发明的方法的特征在于，所述液体制剂包含剪切应力敏感的纳米颗粒，所述纳米颗粒选自含有复杂蛋白质、大生物分子、长链DNA和RNA、病毒、大囊泡、脂质体、噬菌体和抗体的组，其中，所述孔口的通道长度(L)短于所述平均通道直径(H)的一半，并且优选地，其中所述孔口具有最多为所述平均通道直径(H)的四分之一的通道长度(L)。实际上事实证明，当满足上述条件时，即使是这些纤细的和易碎的分子和纳米颗粒的完整性也可以保持。

[0014] 在根据本发明的方法的一个实施方式中，所述液体制剂包含分子量大于100000g/mol的蛋白质和/或抗体分子，特别是核苷酸化合物如DNA或RNA分子。

[0015] 在根据本发明的方法的另一个实施方式中，所述液体制剂包括平均尺寸大于20纳米的噬菌体。

[0016] 在根据本发明的方法的另一个实施方式中，所述液体制剂包括脂质纳米颗粒或脂质体，特别是肺表面活性剂，其所述长度大于20纳米，其中特别是所述液体制剂包括囊泡，所述囊泡的内容物包括纳米颗粒，所述纳米颗粒选自包含分子量大于100000Da的蛋白质、生物分子、DNA、RNA、疫苗、病毒、噬菌体和抗体的组。

[0017] 在根据本发明的方法的另一个实施方式中，所述喷嘴孔口具有在1微米和10微米之间的基本恒定的直径(H)。

[0018] 在根据本发明的方法的另一个实施方式中，所述喷嘴孔口的平均直径(H)在1微米和10微米之间；并且其中，所述孔口在从所述入口到所述出口的所述长度的至少一部分上逐渐变细，其中，特别地，所述喷嘴孔口具有正锥形，从所述入口进口至所述出口基本上以5°至45°之间的锥形变窄。

[0019] 在根据本发明的方法的另一个实施方式中，所述喷嘴孔口的内壁设置有疏水可滑流涂层。

[0020] 在一个特定的实施方式中，根据本发明的方法的特征在于，所述纳米颗粒在伸长断裂之前具有最大颗粒长度λ_{max}；其中所述液体制剂在通过所述喷雾喷嘴孔口时经受壁剪切速率γ_{wall}[每秒]；并且其中所述液体制剂在小于$\lambda_{max}/(\lambda.\gamma_{wall})$秒的剪切时间(t)期间在所述喷雾喷嘴孔口内暴露于所述壁剪切速率。

[0021] 对于脂质纳米颗粒、囊泡、脂质体和其他球形核壳颗粒，实验发现比率λ_{max}/λ在3-5之间的典型小范围内，平均为4，几乎与20nm以上的颗粒尺寸无关。对于线性、卷曲和坚硬的分子或纳米颗粒(如DNA、RNA、带电聚电解质等)，实验发现对于分子量或纳米颗粒重量高于100000的分子，比率λ_{max}/λ在4-6之间的范围内。

[0022] 较短的分子表现出较小的最大伸长率，但另一方面也更硬，并且不易由于剪切力而破裂。较大的分子(大于500000Da)表现出较大的最大伸长率，但另一方面更容易由于剪切力而破裂。这些流体力学效应往往相互补偿破裂的敏感性。

[0023] 对于柔性分子(如蛋白质和大抗体)，实验发现对于分子量高于100000的分子，比率λ_{max}/λ在2和5之间的典型范围内。对于诸如噬菌体和病毒的半刚性纳米颗粒，实验发现对

于高于100000的纳米颗粒重量，比率λ_{max}/λ在2和6之间的宽范围内。为了安全起见，根据本发明的方法的优选实施方式的特征在于，比率λ_{max}/λ设置为4。

[0024] 对于极度应力敏感、高度复杂和大的纳米颗粒(>100nm)(例如肺表面活性剂)，实验发现比率λ_{max}/λ在2和6之间的典型范围内。同样在这里，所述纳米颗粒尺寸效应倾向于相对于破裂的敏感性相互补偿。然而，对于这些高度复杂类型的纳米颗粒，包括补偿效应，比率λ_{max}/λ可以最好地设置为2而不是4。

[0025] 体积平均降解由γ_{part}确定，其值始终小于壁剪切速率γ_{wall}。这意味着根据本实施方式，以防万一设置避免纳米颗粒制剂降解的一般标准，即$\gamma_{wall}t=\lambda_{max}/\lambda<4$，其将保护尺寸λ大于20nm和/或分子量大于100000Da的应力敏感纳米颗粒。对于高度复杂和大的纳米颗粒(λ>100nm)，可以将更安全的幅度设置在$\gamma_{wall}t=\lambda_{max}/\lambda<2$。

[0026] 在壁剪切速率和剪切时间的这种相互条件下，看起来意料之外可能的是，在气溶胶化过程中保持长链分子和囊泡的分子完整性，以使用具有1微米至10微米之间的小直径和不超过2微米的长度的喷雾喷嘴制造2微米至20微米之间的液滴。令人惊讶的是，已经发现，即使使用比传统喷雾器高至少十到一百倍的大的壁剪切速率，在很短的时间内，纳米颗粒制剂的分子完整性仍然可以保持。

[0027] 根据本发明的一个见解是，这些条件特别通过使用具有在1微米和10微米之间的小直径和小于2微米的喷嘴长度的喷雾孔口来满足。因此，喷嘴以这样的方式构造，使得即使具有高壁剪切速率γ_{wall}，流体中离喷嘴壁更远的纳米颗粒也较少受到高壁剪切速率γ_{wall}的影响。壁剪切速率γ_{wall}是靠近壁和垂直于壁的速度差除以到壁的距离(单位为尺寸/秒)。纳米颗粒上的剪切应力源于粒子长度上的局部速度梯度，而纳米颗粒上的速度差除以纳米颗粒的尺寸在这里被称为颗粒剪切速率γ_{part}(单位为尺寸/秒)。

[0028] 本发明背后的另一个见解是，施加在纳米颗粒上的阻力主要与颗粒剪切速率γ_{part}成比例，该阻力可能导致纳米颗粒的张紧和随后的断裂，颗粒剪切速率的值基本上小于壁剪切速率γ_{wall}。在具有抛物线速度分布的长管中，壁附近的壁剪切速率γ_{wall}和颗粒剪切速率γ_{part}为8V/H。然而，管道中间的颗粒剪切速率γ_{part}为零。此外，液体以2V的速度在管道中间流动，而管道壁附近基本上没有流动。因此，取决于流动类型和管道长度，管道中的体积平均颗粒剪切速率γ_{part}可以在长管道或中管道的约4V/H到短管道或孔口的基本上较小的值之间变化。为了降低体积平均颗粒剪切速率γ_{part}，根据本发明使用了与其直径相比相对短的孔口，因为使用相对短的管道或孔口似乎更有利。

[0029] 根据本发明的一个见解是，大的大分子或大的囊泡没有足够的刚性或固有阻力来承受由于与颗粒剪切速率γ_{part}成比例的流体动力剪切力而产生的变形力。本发明的进一步见解是，体积平均颗粒剪切速率γ_{part}基本上小于壁附近的壁剪切速率γ_{wall}，并且保持纳米颗粒完整性的安全条件是剪切时间优选小于$\lambda_{max}/(\lambda.\gamma_{wall})$。在$\lambda_{max}/(\lambda.\gamma_{wall})$秒的剪切时间内，壁附近的纳米颗粒被拉长或变形，其长度λ约为γ_{wall}乘以λ乘以$\lambda_{max}/(\lambda.\gamma_{wall})=\lambda_{max}$。气溶胶化装置应当能够提供在小于$\lambda_{max}/(\lambda.\gamma_{wall})$秒的超短剪切时间t期间施加壁剪切速率$\gamma_{wall}$每秒的条件。因此，不仅喷嘴壁附近的纳米颗粒将保持其完整性，而且距离喷嘴壁更远的纳米颗粒也将保持其完整性。

[0030] 在根据本发明的方法的另一个实施方式中，所述壁剪切速率γ_{wall}远高于100000，特别是高于1000000每秒。

[0031] 在根据本发明方法的另一个实施方式中，所述纳米颗粒包括分子量大于100000g/mol的大分子；并且其中所述大分子或纳米颗粒具有至少2的比率λ_{max}/λ，并且优选至少4的比率λ_{max}/λ。

[0032] 在根据本发明的方法的另一个实施方式中，喷嘴孔口产生具有平均速度V的射流，该射流从具有直径H和长度L的孔口出来，并且剪切条件为：

[0033] $\gamma_{part}<\gamma_{wall}-8V/H$且$t=L/V=\lambda_{max}/(\lambda.\gamma_{wall})<\lambda_{max}/(\lambda.\gamma_{part})$

[0034] 或

[0035] $\gamma_{part}.t<\gamma_{wall}.t=8L/H$。

[0036] 根据本发明的方法的一个特定实施方式的特征在于，纳米颗粒制剂在气溶胶化过程中，通过直径H在1微米和10微米之间、长度L小于2微米的小喷嘴产生尺寸为2-20微米的气溶胶液滴，在显著小于$4x10^{-6}$秒的超短剪切时间t期间受到显著高于1000000每秒的壁剪切速率γ_{wall}(最大纳米颗粒伸长率λ_{max}/λ为4，我们得到$\gamma_{wall}.t<4$)。当气溶胶化包括剪切应力敏感纳米颗粒(例如蛋白质、肽、DNA和RNA、囊泡、脂质体、脂质纳米颗粒和抗体)的液体制剂时，条件$\gamma_{wall}.t=8L/H$给出$L<H/2$，或者喷嘴长度L不应超过喷嘴直径H的一半。

[0037] 喷嘴长度的进一步减小将减小整个喷嘴壁表面，从而减小其对纳米颗粒上的壁剪切的贡献，并且优选地，喷嘴长度L不应超过喷嘴直径的四分之一，因此$L<H/4$。这特别适用于尺寸通常大于100nm的高度复杂和应力敏感的纳米颗粒。优选地，根据本发明，喷嘴与具有短长度的孔口一起使用，因为它们表现出在运行期间减小纳米颗粒剪切速率的塞流和滑流条件。在塞流条件下，由于更均匀的速度分布，远离喷嘴壁的颗粒剪切速率显著降低，并且产生滑流条件(例如使用疏水喷嘴壁)，也降低了喷嘴壁附近的颗粒剪切速率。优选喷嘴同时结合塞流和滑流，从而降低体积平均颗粒剪切速率。

[0038] 根据本发明的方法的另一个实施方式的特征在于，该装置产生从喷嘴出来的平均速度V的射流，该喷嘴具有在1到10微米之间的直径H和长度L，使得$L<H/2$，并且喷嘴压力在10到100巴之间。还发现通过增加喷嘴压力将射流的速度V增加到10m/s以上可以减少降解量，并且发现约30-80巴的最佳操作压力可以减少纳米颗粒制剂降解的风险。

[0039] 已经发现在100巴或以上的操作压力下约$V=100m/s$或以上的平均流速对纳米颗粒的完整性是有害的，这可能是因为超过100巴的高操作压力实现了可能在制剂中导致严重湍流从而破坏纳米颗粒的速度。同样，在如此高的喷嘴压力下，从喷嘴出来的液体射流需要如此多的动能，以至于射流在能够产生大约是射流直径两倍的连续液滴射流之前立即分解。射流的不希望的湍流和分解也导致体积平均颗粒剪切速率的强烈增加和纳米颗粒的破坏水平的增加。只要射流质量密度ρ乘以射流速度V乘以喷嘴直径H除以射流粘度η的比值大于2500($\rho.V.H/\eta>2500$)，就可能发生这种向湍流和分解的不希望的转变。因此，根据本发明的方法的另一个优选实施方式的特征在于，所述流体的质量密度(ρ)、所述孔口内的流体速度(V)和所述喷嘴直径(H)的乘积除以所述流体粘度(η)(表示为$\rho.V.H/\eta$)保持在2500以下。

[0040] 在另一个优选实施方式中，根据本发明的方法的特征在于，所述喷嘴孔口是延伸穿过由基材支撑的公共膜层的基本相同的喷嘴孔口的集合的一部分，其中所述基材具有延伸到所述孔口集合的所述喷嘴孔口的至少一个空腔，并且其中所述液体制剂在所述操作压力下共同输送到所述空腔，以供应所述孔口集合的所述喷嘴孔口。

[0041] 对于最小直径H在1到10微米之间、总长度L小于2微米、锥角在5°到45°之间的略微

正锥形或负锥形的短孔口，也获得了令人满意的结果。

附图说明

[0042] 图1示出了剪切流中大分子的破裂。

[0043] 图2示出了剪切流中囊泡的破裂。

[0044] 图3示出了在强剪切流中囊泡的破裂。

[0045] 图4示出了囊泡通过长管道。

[0046] 图5示出了囊泡通过孔口。

[0047] 图6示出了囊泡通过正锥形孔口。

[0048] 图7示出了囊泡通过负锥形孔口。

具体实施方式

[0049] 图1示出了剪切流中大分子的破裂。图1A示出了在不存在剪切流的情况下具有回转直径λ的正常球状大分子(1)。

[0050] 图1B示出了球形大分子在箭头(2,3)所示的剪切流存在下的初始拉伸。图1C示出了大分子进一步拉伸到最大长度λ_{max}以及以较高速度移动的大分子的上部开始与较小速度的下部分离。上部(4)和下部(5)仅通过一个或两个剩余的共价键分开。图1D示出分为两部分后的大分子，这是由于流体动力剪切力作用于大分子的上部和下部，导致大分子中间的共价键断裂。

[0051] 分子量大于100000g/mol的长而重的大分子，如大蛋白质、长RNA和DNA链、抗体等，易受剪切导致破碎。在下面的表1中，总结了在气溶胶化过程中具有不同分子量的免疫球蛋白(蛋白质/抗体)的剪切降解的一些结果。

[0052]

大分子（重量%）	分子量（g/mol）	存活（%）振动膜喷雾器	存活（%）t=200ns 孔口 2μm	存活（%）t=200ns 25° 锥角	存活（%）t=50ns 孔口 2μm	存活（%）t=10ns 孔口 2μm
牛 IGG（0.1%）	160000	85	100	100	100	100
牛 IGG（1%）	160000	63	100	100	100	100
牛 IGG（5%）	160000	33	98	99	99	94
牛 IGG（10%）	160000	20	97	98	97	93
牛 IGG（20%）	160000	15	96	97	98	93
牛 IGM（0.1%）	900000	23	100	100	100	80
牛 IGM（1%）	900000	18	100	100	100	82
牛 IGM（5%）	900000	8	98	99	99	73
牛 IGM（10%）	900000	5	97	100	100	70

[0053] 表1

[0054] 使用具有制剂储存器的振动膜喷雾器，在8分钟的喷雾时间内产生了2-10微米范围内的1ml气溶胶液滴。具有较大分子量(>100000g/mol)的蛋白质/抗体的稀释制剂明显遭受剪切降解。根据本发明，还通过使具有抗体的相同制剂以平均速度V＝5m/s通过具有直径H＝2微米和长度L＝1微米的孔口来制备平均尺寸为4微米的气溶胶液滴，并且通过时间t为约200纳秒。根据本发明，由于这种短的剪切时间，液滴中存在的大分子受到的降解显著减少。使用具有25°正锥形轮廓的孔口，即使分子量远高于1000000g/mol，抗体也几乎不会降解。在V＝20m/s的平均速度下，通过未变窄孔口的通过时间t约为50纳秒，并且发现比在5m/s的平均速度的情况下更少的降解。然而，将平均速度增加到V＝100m/s(t＝10ns)会导致制剂的显著降解。将喷嘴长度L减小到0.5微米(H＝2微米)，与1微米长度喷嘴的情况相比，降解损失相对减少15％。

[0055] 大分子如DNA和RNA核酸经常用于基因治疗，特别是具有信使RNA(mRNA)的非病毒基因递送载体和迷你DNA载体。这些大分子的范围可以在100-10000个核苷酸或碱基对之

间，对应的轮廓长度从30纳米到3微米，使它们容易经受剪切诱导降解。在下面的表2中，总结了一些关于这些载体分子的剪切降解的结果。

[0056]

碱基对长度	载体分子	分子量（g/mol）	存活（%）振动膜喷雾器	存活（%）孔口 2μm t=200ns	存活（%）孔口 2μm t=50ns	存活（%）孔口 2μm t=10ns
336	mv281	208000	85	100	100	95
1109	mv-KB4TAL-Gluc	698000	63	100	100	88
1714	mv-CMV-mCherry	1080000	30	99	99	84
3000	pBLUESCRIPT	1890000	10	98	99	76
5302	pCR2.1-norE	3340000	2	95	97	69

[0057] 表2

[0058] 使用具有制剂储存器的振动膜喷雾器，在8分钟的喷雾时间内产生2-10微米范围内的1ml气溶胶液滴。具有较大分子量(>200000g/mol)的DNA或RNA载体(5pg/ml)的制剂明显受到降解。根据本发明，还通过使具有载体分子的相同制剂以平均速度V＝5m/s通过具有直径H＝2微米和长度L＝1微米的孔口来制备平均尺寸为4微米的气溶胶液滴。由于塞流条件，体积平均壁剪切速率将显著低于4V/H＝10x10^6/秒，而通过时间t约为200纳秒。由于根据本发明的这种短剪切时间，存在于液滴中的载体分子受到的降解明显较少。在V＝20m/s的平均速度下，通过未变窄孔口的通过时间t约为50纳秒，并且发现比在5m/s的平均速率的情况下更少的降解。然而，将平均速度增加到V＝100m/s(t＝10ns)会导致制剂的显著降解。使用长度为1微米的25°负锥形轮廓的孔，即使分子量远高于1000000g/mol，在速度V＝50m/s时，抗体也几乎不会降解。将喷嘴长度L减小到0.5微米(H＝2微米，不是锥形的)，得到的降解损失平均比1微米长度的非锥形喷嘴的情况下小10％。具有疏水性氟涂层(水接触角为112°)的喷嘴的结果也产生了较低的降解损失，通常比未涂覆的喷嘴低5-15％。

[0059] 图2说明了在剪切流中囊泡或脂质体的破裂。图2A示出了在不存在剪切流的情况下具有尺寸λ的球形囊泡(11)。图2B示出了在箭头(12,13)所示的剪切流存在下囊泡的初始拉伸。图2C示出了囊泡进一步拉伸到最大长度λ_{max}，因为囊泡的上部以比下部更高的速度移动。图2D示出了分为两部分(14、15)后的囊泡，这是由于施加在囊泡上部和下部的流体动力剪切力导致囊泡中部破裂。

[0060] 图3说明了囊泡或脂质体在强剪切流中的破裂。图3A示出了在不存在剪切流的情况下具有尺寸λ的囊泡(11)。图3B示出了在箭头(12,13)所示的剪切流存在的情况下囊泡的初始拉伸。图3C示出了囊泡进一步极端拉伸至最大长度λ_{max}，因为囊泡的上部以比下部高得多的速度移动。图3D示出了破裂为三部分(14,15,16)的囊泡，这是由于施加在囊泡上的大的流体动力学剪切力导致囊泡分为三部分。

[0061] 图4示出了囊泡或脂质体(21)在长度为L和直径为H的长管道(22)中的破裂。在进入管道之前，由于没有大的剪切流，囊泡(21)是圆形的。当囊泡进入管道时，它将受到剪切

流(23)的作用,在囊泡的拉伸阶段之后,它在离开管道之前断裂成三个细长部分。这三个部分在射流中行进得更远,并且由于没有剪切,这三个部分获得它们的球形。

[0062] 图5示出了囊泡或脂质体(21)行进通过长度为L和直径为H的孔口。在进入孔口之前,由于没有大的剪切流,囊泡(21)是圆形的。当囊泡通过孔口时,它将受到剪切流(23)的作用,变得细长,但不会破裂。囊泡接下来进入射流部分,并将再次达到其球形。

[0063] 图6示出了囊泡或脂质体(21)行进通过长度为L、直径为H的正锥形孔口,表现出塞流。在进入锥形孔口之前,囊泡是圆形的,由于塞流中的小剪切,它主要保持球形。囊泡随后进入射流部分并达到其球形。

[0064] 图7说明了囊泡或脂质体(21)行进通过长度为L、直径为H的负锥形孔口(也称为扩散器)。由于加宽,流动中的纳米颗粒上的剪切降低。

[0065] 很明显,根据本发明的具有宽锥角的锥形孔口也可以被选为具有基本上大于最窄直径的总长度,因为对纳米颗粒完整性的有害影响在根据本发明提出的具有窄部分长度L与窄直径H之比的锥形孔口的最窄部分中是最大的。

[0066] 囊泡和脂质体也经常用于基因治疗,特别是促进将包封的RNA和DNA载体递送到肺部。这些囊泡的尺寸通常在0.02到2微米之间,这使得它们在气溶胶化过程中可能容易经受剪切导致的破碎。在下面的表3中,总结了一些关于大量这些囊泡的剪切降解的结果。

[0067]

囊泡尺寸 nm	脂质体(摩尔比)	破碎(%) 振动膜喷雾器	破碎(%) t=200ns 孔口 2μm	破碎(%) t=50ns 孔口 2μm	破碎(%) t=10ns 孔口 2μm
44	HSPC:CH(1:1)	5	0	0	<1

[0068]

78	HSPC:CH(1:1)	14	0	0	<3
126	HSPC:CH(1:1)	26	<1	<1	<4
254	HSPC:CH(1:1)	43	<2	<1	<6
780	HSPC:CH(1:1)	38	<3	<3	<8
1250	HSPC:CH(1:1)	64	<10	<5	<10
500-1200	固尔苏	>90	<20	<20	>40

[0069] 表3

[0070] 使用具有制剂储存器的振动膜喷雾器,在8分钟的喷雾时间内产生了2-10微米范围内的1ml气溶胶液滴。所有含有氢化大豆磷脂酰胆碱(HSPC)和胆固醇(CH)的脂质体制剂(15pg/ml)都会发生破裂,较大的囊泡比较小的囊泡多。根据本发明,还通过使具有囊泡的相同制剂以平均速度V=5m/s通过具有直径H=2微米和长度L=1微米的孔口来制备平均尺寸为4微米的气溶胶液滴。由于塞流条件,体积平均壁剪切速率将显著低于4V/H=10x10^6/秒,而通过时间t约为100纳秒。根据本发明,由于这种短的剪切时间,存在于液滴中的囊泡几乎不会发生降解或破碎。在V=20m/s的平均速度下,通过未变窄孔口的通过时间t约为50

纳秒，并且发现比在10m/s的平均速度的情况下更少的降解。然而，将平均速度增加到V＝100m/s(t＝10ns)会导致制剂的显著降解。将喷嘴长度L减小到0.5微米(H＝2微米)，与1微米长度喷嘴的情况相比，降解损失相对减少10-40％。与振动膜喷雾器相比，肺表面活性剂固尔苏的破损主要相对降低。具有疏水性氟涂层(水接触角为112°)的2微米喷嘴的结果也产生了较小的降解损失，通常减少5-20％。

[0071] 优选地，提供了包含脂质纳米颗粒(LNP)或聚合物混合纳米颗粒(HNP)的制剂，所述LNP或HNP具有的长度或尺寸λ大于20纳米，并且所述LNP或HNP具有内容物，所述内容物包含选自包含蛋白质、生物分子、DNA、RNA、mRNA和抗体的组的其它纳米颗粒。通过这种方法，易受剪切降解影响的大型纳米颗粒得到了更安全的保护。

[0072] 很明显，根据本发明的具有宽锥角的锥形孔口也可以被选择为具有基本上大于最窄直径的总长度，因为对纳米颗粒完整性的有害影响在根据本发明提出的具有窄部分长度L与窄直径H之比的锥形孔口的最窄部分中是最大的。

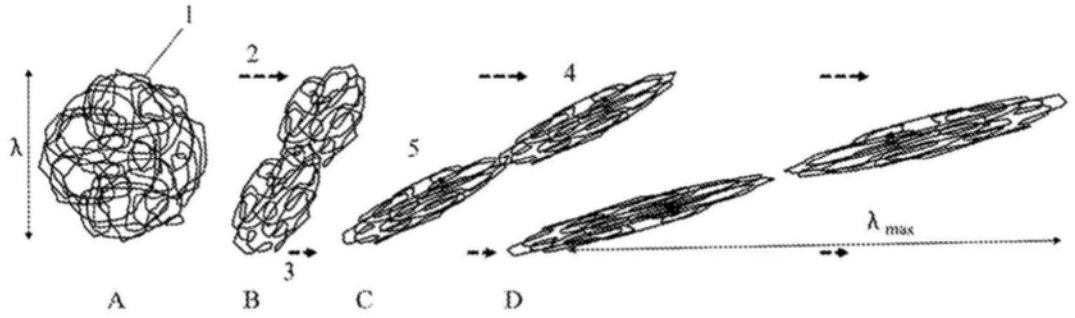

1
2
4
5
λ
λ max
3
A
B
C
D

图1

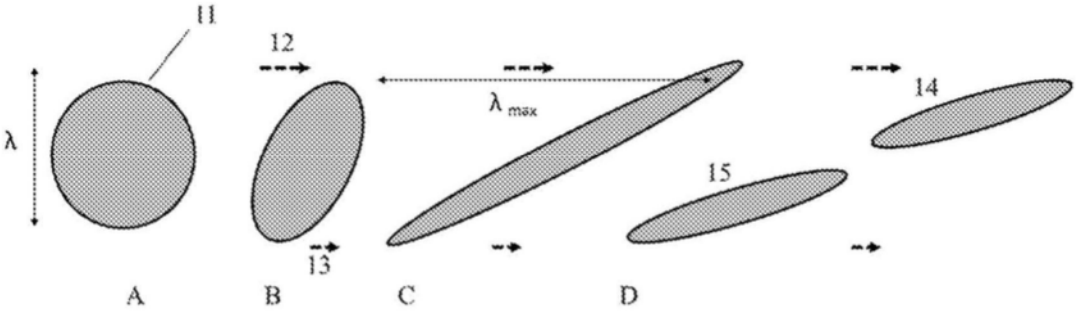

11
12
λ max
14
λ
15
13
A
B
C
D

图2

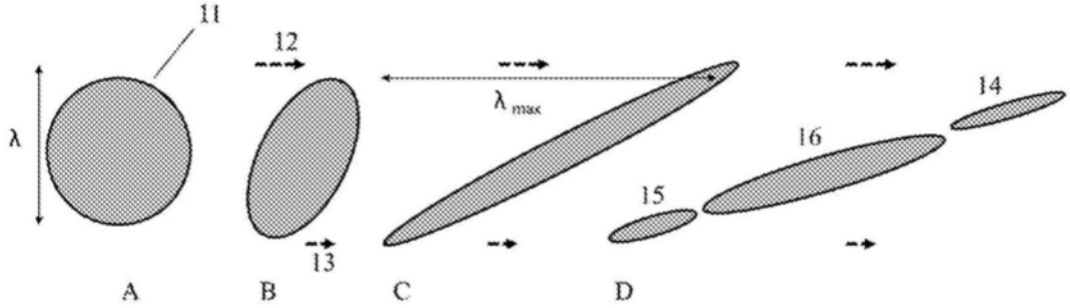

11
12
λ max
14
λ
16
15
13
A
B
C
D

图3

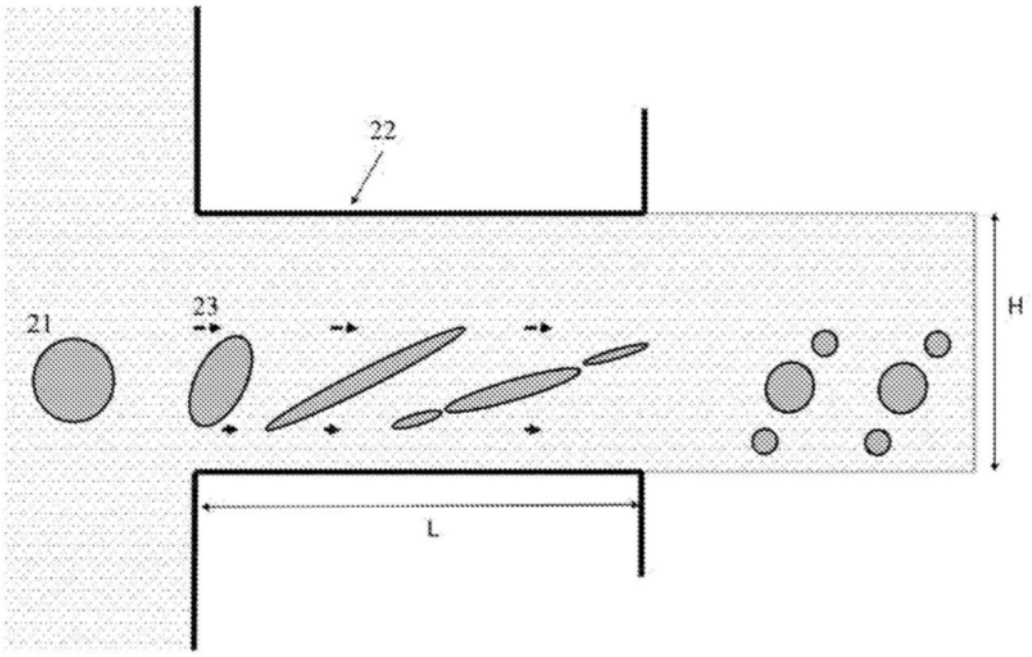


图4

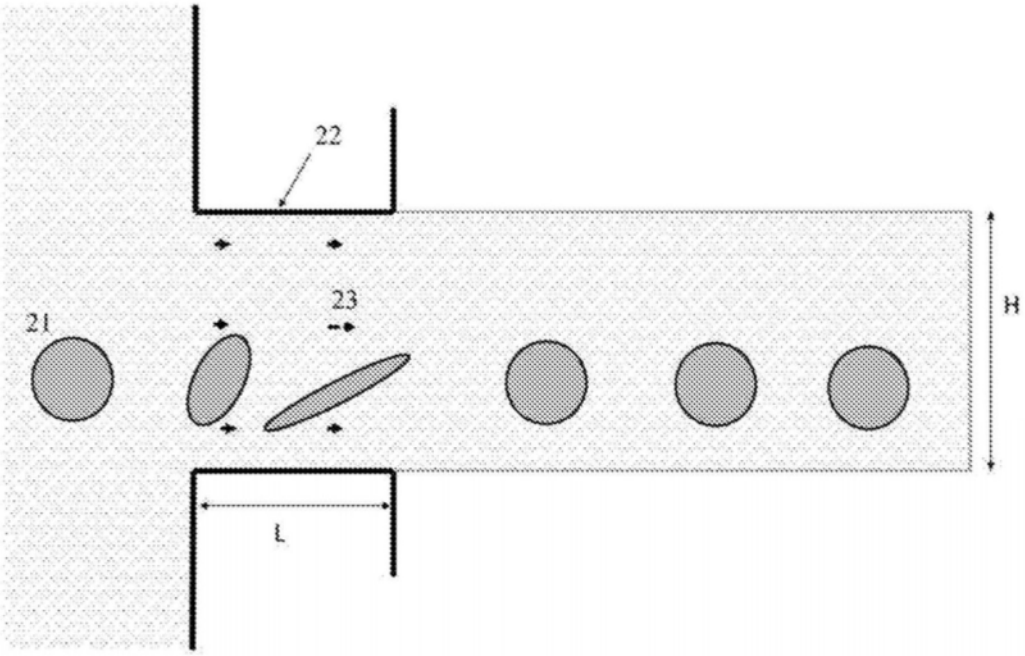


图5

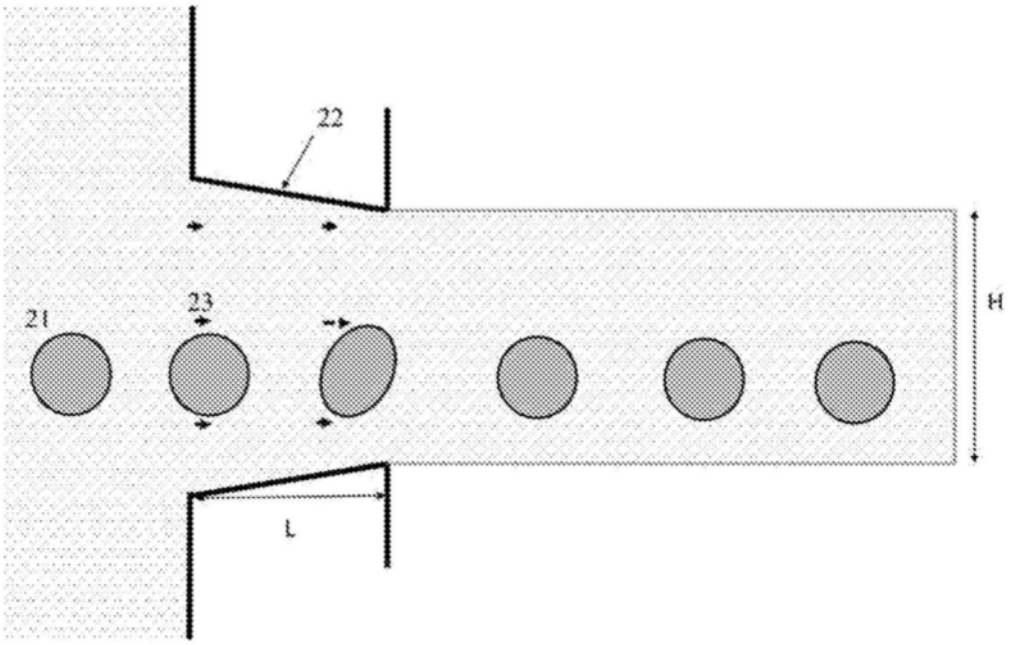


图6

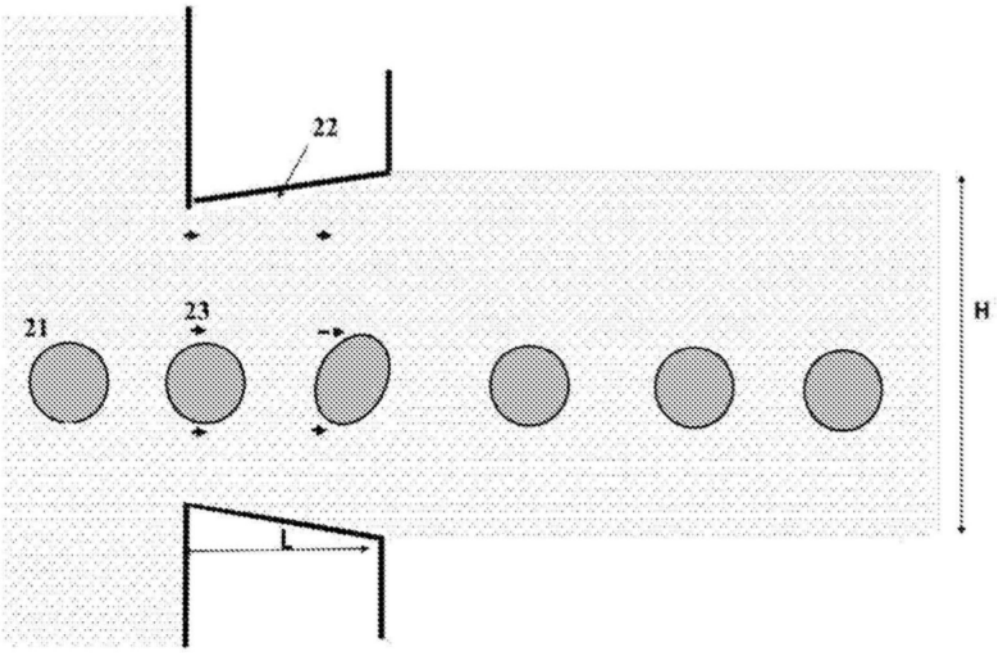


图7