



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114040780 A

(43) 申请公布日 2022. 02. 11

(21) 申请号 202080048080.1

克里斯汀·卡灵顿

(22) 申请日 2020.04.29

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

(30) 优先权数据

代理人 李敏春 郑霞

62/840,152 2019.04.29 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(51) Int. Cl.

2021.12.29

A61K 47/61 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

A61K 47/64 (2006.01)

PCT/US2020/030429 2020.04.29

A61K 9/51 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/223323 EN 2020.11.05

(71) 申请人 约翰霍普金斯大学

地址 美国马里兰州

(72) 发明人 毛海泉 胡一宗

马丁·吉尔伯特·波姆珀 刘恒彪

伊尔·米恩 克里斯托弗·厄尔曼

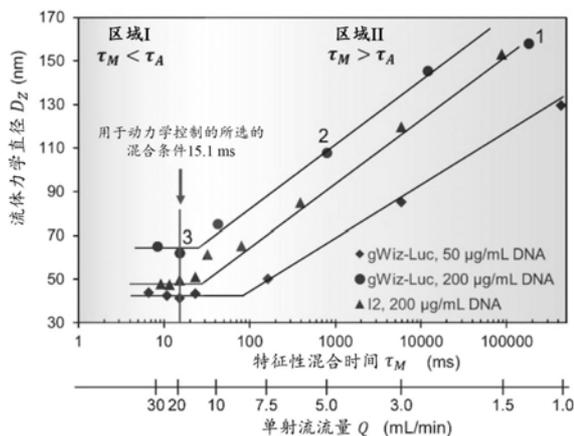
权利要求书3页 说明书36页 附图21页

(54) 发明名称

组成上明确的质粒DNA/聚阳离子纳米颗粒及其制备方法

(57) 摘要

本发明公开的主题提供在本文中称为“快速纳米复合”或“(FNC)”的动力学控制的混合过程,以加速聚阴离子溶液(例如质粒DNA溶液)与聚阳离子溶液的混合来通过微室中的湍流混合匹配聚电解质复合物(PEC)组装动力学,从而实现对纳米颗粒组装动力学条件的明确控制,如由纳米颗粒尺寸、组成、流体力学尺寸、流体力学密度、表面电荷和聚阴离子有效载荷的可调谐性所展示的。



1. 一种制备均匀的聚电解质复合物 (PEC) 纳米颗粒的方法, 所述方法包括在具有大于特征性混合时间 ( $\tau_M$ ) 的特征性组装时间 ( $\tau_A$ ) 的条件下将一种或更多种水溶性聚阳离子聚合物与一种或更多种水溶性聚阴离子聚合物均匀混合, 在所述特征性组装时间 ( $\tau_A$ ) 期间, 所述 PEC 纳米颗粒的组装发生, 在所述特征性混合时间 ( $\tau_M$ ) 期间, 所述一种或更多种水溶性聚阳离子聚合物和所述一种或更多种水溶性聚阴离子聚合物均匀混合。

2. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述方法包括快速纳米复合 (FNC) 方法。

3. 根据权利要求2所述的方法, 其中, 所述方法包括:

(a) 使包含一种或更多种水溶性聚阳离子聚合物的第一流以第一可变流量流入受限室;

(b) 使包含一种或更多种水溶性聚阴离子聚合物的第二流以第二可变流量流入所述受限室, 其中所述第一流和所述第二流在进入所述受限室时处于相对侧; 和

(c) 任选地使包含选自以下组成的组的一种或更多种组分的第三流以第三可变流量流入所述受限室: 一种或更多种水溶性治疗剂、一种或更多种可混溶的有机溶剂和/或一种或更多种冷冻保护剂; 其中每股流在进入所述受限室时与另外两股流等距;

其中所述第一可变流量、所述第二可变流量和所述第三可变流量在存在时可以是相同或不同的; 以及

(d) 使所述第一流、所述第二流和所述第三流在存在时在所述受限室中撞击, 直到雷诺数为约1,000至约20,000, 从而使所述一种或更多种水溶性聚阳离子聚合物和所述一种或更多种水溶性聚阴离子聚合物经历连续生成PEC纳米颗粒的聚电解质复合过程, 其中所述聚电解质复合过程发生在具有大于特征性混合时间 ( $\tau_M$ ) 的特征性组装时间 ( $\tau_A$ ) 的条件下, 在所述特征性组装时间 ( $\tau_A$ ) 期间, 所述 PEC 纳米颗粒的组装发生, 在所述特征性混合时间 ( $\tau_M$ ) 期间, 所述第一流、所述第二流和所述第三流的组分在存在时均匀混合。

4. 根据权利要求3所述的方法, 其中所述第一可变流量、所述第二可变流量和所述第三可变流量在存在时各自等于或大于约10毫升/分钟 (mL/min)。

5. 根据权利要求3或权利要求4所述的方法, 其中所述第一可变流量、所述第二可变流量和所述第三可变流量在存在时各自在约3mL/min至约30mL/min之间。

6. 根据权利要求3-5中任一项所述的方法, 其中所述特征性混合时间在约1ms至约200ms之间。

7. 根据权利要求1-6中任一项所述的方法, 其中所述特征性混合时间为约15ms。

8. 根据权利要求3-7中任一项所述的方法, 其中所述雷诺数具有约2,000至约5,000的范围。

9. 根据权利要求3-8中任一项所述的方法, 其中所述第一流的pH值和所述第二流的pH值各自具有约2.5至约8.4的范围。

10. 根据权利要求3-9中任一项所述的方法, 其中所述第一流的pH值和所述第二流的pH值各自为约3.5。

11. 根据权利要求1-10中任一项所述的方法, 其中所述一种或更多种水溶性聚阳离子聚合物选自壳聚糖、PAMAM树状大分子、聚乙烯亚胺 (PEI)、鱼精蛋白、聚(精氨酸)、聚(赖氨酸)、聚( $\beta$ -氨基酯)、阳离子肽及其衍生物组成的组。

12. 根据权利要求1-11中任一项所述的方法, 其中所述一种或更多种水溶性聚阴离子

聚合物选自自由聚(天冬氨酸)、聚(谷氨酸)、带负电荷的嵌段共聚物、硫酸肝素、硫酸葡聚糖、透明质酸、藻酸盐、三聚磷酸盐(TPP)、寡聚(谷氨酸)、细胞因子、蛋白质、肽、生长因子和核酸组成的组。

13. 根据权利要求12所述的方法,其中所述核酸选自自由反义寡核苷酸、cDNA、基因组DNA、指导RNA、质粒DNA、载体DNA、mRNA、miRNA、piRNA、shRNA和siRNA组成的组。

14. 根据权利要求3-13中任一项所述的方法,其中所述第一流和/或所述第二流还包含一种或更多种水溶性治疗剂。

15. 根据权利要求14所述的方法,其中所述一种或更多种水溶性治疗剂选自自由小分子、碳水化合物、糖、蛋白质、肽、核酸、抗体或其抗体片段、激素、激素受体、受体配体、细胞因子和生长因子组成的组。

16. 根据权利要求1-15中任一项所述的方法,其中所述一种或更多种水溶性聚阴离子聚合物是质粒DNA,并且所述一种或更多种水溶性聚阳离子聚合物是线性聚乙烯亚胺(PEI)或其衍生物。

17. 根据权利要求1-16中任一项所述的方法,包括使用在约25 $\mu$ g/mL至约800 $\mu$ g/mL之间的质粒DNA浓度。

18. 根据权利要求17所述的方法,其中所述质粒浓度选自自由约25 $\mu$ g/mL、约50 $\mu$ g/mL、约100 $\mu$ g/mL、约200 $\mu$ g/mL、约400 $\mu$ g/mL和约800 $\mu$ g/mL组成的组。

19. 由权利要求1-18中任一项所述的方法生成的一种均匀的聚电解质复合物(PEC)纳米颗粒或多于一种PEC纳米颗粒。

20. 根据权利要求19所述的PEC纳米颗粒,其中所述纳米颗粒具有约1个至约50个pDNA拷贝/纳米颗粒的平均值。

21. 根据权利要求20所述的PEC纳米颗粒,其中所述PEC纳米颗粒具有以下平均值:约1.3个至约21.8个pDNA拷贝/纳米颗粒;约1.3个至约1.4个pDNA拷贝/纳米颗粒;约1.3个至约1.6个pDNA拷贝/纳米颗粒;约1.3个至约1.7个pDNA拷贝/纳米颗粒;约1.3个至约2.3个pDNA拷贝/纳米颗粒;约1.3个至约2.6个pDNA拷贝/纳米颗粒;约1.3个至约3.5个pDNA拷贝/纳米颗粒;约1.3个至约4.4个pDNA拷贝/纳米颗粒;约1.3个至约4.7个pDNA拷贝/纳米颗粒;约1.3个至约5.0个pDNA拷贝/纳米颗粒;约1.3个至约6.1个pDNA拷贝/纳米颗粒;约1.3个至约8.0个pDNA拷贝/纳米颗粒;约1.3个至约8.5个pDNA拷贝/纳米颗粒;约1.3个至约9.1个pDNA拷贝/纳米颗粒;约1.3个至约9.5个pDNA拷贝/纳米颗粒;约1.3个pDNA拷贝/纳米颗粒;约3.5个pDNA拷贝/纳米颗粒;约4.4个pDNA拷贝/纳米颗粒;约5.0个pDNA拷贝/纳米颗粒;约6.1个pDNA拷贝/纳米颗粒;约8.0个pDNA拷贝/纳米颗粒;约8.1个pDNA拷贝/纳米颗粒;约8.5个pDNA拷贝/纳米颗粒;约9.1个pDNA拷贝/纳米颗粒;约9.5个pDNA拷贝/纳米颗粒;约1.3个至约10.0个pDNA拷贝/纳米颗粒;约1.3个至约13.5个pDNA拷贝/纳米颗粒;或者约21.8个pDNA拷贝/纳米颗粒。

22. 根据权利要求20所述的PEC纳米颗粒,其中所述PEC纳米颗粒具有一个pDNA/纳米颗粒。

23. 根据权利要求19-22中任一项所述的PEC纳米颗粒,其中所述纳米颗粒具有的平均尺寸在约30nm至约130nm之间。

24. 根据权利要求19-23中任一项所述的PEC纳米颗粒,其中所述一种或更多种水溶性

聚阳离子聚合物包含聚乙烯亚胺,并且所述一种或更多种水溶性聚阴离子聚合物包含质粒DNA。

25. 根据权利要求19-24中任一项所述的PEC纳米颗粒,其中所述PEC纳米颗粒具有的聚乙烯亚胺中的胺与质粒DNA中的磷酸的比(N/P)在约3至约10之间。

26. 根据权利要求25所述的PEC纳米颗粒,其中所述PEC纳米颗粒具有选自由约3、约4、约5、约6、约7、约8、约9和约10组成的组的N/P。

27. 根据权利要求19-26中任一项所述的PEC纳米颗粒,其中所述PEC纳米颗粒具有的结合的1PEI与总1PEI的百分比在约50%至约75%之间。

28. 根据权利要求19-28中任一项所述的PEC纳米颗粒,其中所述多于一种PEC纳米颗粒具有的多分散性指数(PDI)在约0.1至约0.25之间。

29. 根据权利要求19-28中任一项所述的PEC纳米颗粒,其中所述纳米颗粒具有的表观流体力学密度在约60Da/nm<sup>3</sup>至约80Da/nm<sup>3</sup>之间。

30. 一种药物制剂,包含在药学上可接受的运载体中的权利要求19-29中任一项所述的一种PEC纳米颗粒或多于一种PEC纳米颗粒。

31. 根据权利要求30所述的药物制剂,其中所述制剂包括冻干制剂。

32. 根据权利要求31所述的药物制剂,其中所述一种PEC纳米颗粒或多于一种PEC纳米颗粒表现出在-20℃至少9个月的长期稳定性。

## 组成上明确的质粒DNA/聚阳离子纳米颗粒及其制备方法

[0001] 联邦赞助研究或开发

[0002] 本发明根据由美国国立卫生研究院 (National Institute of Health) 授予的 EB018358 和 EB024495 在美国政府支持下进行。美国政府在本发明中具有某些权利。

[0003] 背景

[0004] 聚电解质复合物 (PEC) 形成已经被广泛用于组装用于递送广泛的大分子治疗剂 (包括质粒DNA (pDNA)、信使RNA (mRNA)、小干扰RNA (siRNA)、蛋白质和肽) 的颗粒状媒介物。作为一种有前途的非病毒基因递送手段, 在水性溶液中使用聚阳离子运载体使pDNA分子凝聚 (condensed) 并包装到PEC纳米颗粒中。组装的pDNA/聚阳离子纳米颗粒促进运输和进入靶细胞和细胞区室 (cellular compartments), 并且保护pDNA免受酶降解。Shi等人, 2017。正如最近的许多努力所揭示的, 基因递送的体内命运和功效以及纳米颗粒的转染率取决于纳米颗粒的特征, 诸如它们的尺寸范围和分布 (Hickey等人, 2015)、形态学 (Williford等人)、表面性质、组成和结构。Blanco等人, 2015。然而, 揭示对这些纳米颗粒的特征及它们与生物系统的相互作用之间的关系的关系的详细理解一直是一项挑战。这一挑战很大程度上是由于缺乏对决定组装纳米颗粒的特征的PEC组装动力学的充分控制。

[0005] 概述

[0006] 在一些方面, 本发明公开的主题提供一种制备均匀的聚电解质复合物 (PEC) 纳米颗粒的方法, 该方法包括在具有大于特征性混合时间 ( $\tau_M$ ) 的特征性组装时间 ( $\tau_A$ ) 的条件下将一种或更多种水溶性聚阳离子聚合物与一种或更多种水溶性聚阴离子聚合物均匀混合, 在所述特征性组装时间 ( $\tau_A$ ) 期间, PEC纳米颗粒的组装发生, 在所述特征性混合时间 ( $\tau_M$ ) 期间, 一种或更多种水溶性聚阳离子聚合物和一种或更多种水溶性聚阴离子聚合物均匀混合。

[0007] 在特定方面, 方法包括快速纳米复合 (flash nanocomplexation, FNC) 方法。在这样的方面, 方法包括通过以下连续生成均匀的聚电解质复合物 (PEC) 纳米颗粒: (a) 使包含一种或更多种水溶性聚阳离子聚合物的第一流以第一可变流量流入受限室 (confined chamber); (b) 使包含一种或更多种水溶性聚阴离子聚合物的第二流以第二可变流量流入受限室, 其中第一流和第二流在进入受限室时处于相对侧; 和 (c) 任选地使包含选自以下组成的组的一种或更多种组分的第三流以第三可变流量流入受限室: 一种或更多种水溶性治疗剂、一种或更多种可混溶的有机溶剂和/或一种或更多种冷冻保护剂; 其中每股流在进入受限室时与另外两股流等距; 其中第一可变流量、第二可变流量和第三可变流量在存在时可以是相同或不同的; 以及 (d) 将第一流、第二流和第三流在存在时在受限室中撞击, 直到雷诺数 (Reynolds number) 为约1,000至约20,000, 从而使一种或更多种水溶性聚阳离子聚合物和一种或更多种水溶性聚阴离子聚合物经历连续生成PEC纳米颗粒的聚电解质复合过程, 其中聚电解质复合过程发生在具有大于特征性混合时间 ( $\tau_M$ ) 的特征性组装时间 ( $\tau_A$ ) 的条件下, 在所述特征性组装时间 ( $\tau_A$ ) 期间, PEC纳米颗粒的组装发生, 在所述特征性混合时间 ( $\tau_M$ ) 期间, 第一流、第二流和第三流的组分在存在时均匀混合。

[0008] 在某些方面, 第一可变流量、第二可变流量和第三可变流量在存在时各自等于或

大于约3毫升/分钟 (mL/min)。在特定方面,第一可变流量、第二可变流量和第三可变流量在存在时各自在约3mL/min至约50mL/min之间。

[0009] 在某些方面,特征性混合时间在约1ms至约200ms之间。在特定方面,特征性混合时间为约15ms。

[0010] 在一些方面,雷诺数具有约2,000至约8,000或者约3,000至约5,000的范围。在一些方面,第一流的pH值和第二流的pH值各自具有约2.5至约8.4的范围。在特定方面,第一流的pH值和第二流的pH值各为约3.5。

[0011] 在一些方面,一种或更多种水溶性聚阳离子聚合物选自自由壳聚糖、PAMAM树状大分子、聚乙烯亚胺(PEI)、鱼精蛋白、聚(精氨酸)、聚(赖氨酸)、聚( $\beta$ -氨基酯)、阳离子肽及其衍生物组成的组。

[0012] 在一些方面,一种或更多种水溶性聚阴离子聚合物选自自由聚(天冬氨酸)、聚(谷氨酸)、带负电荷的嵌段共聚物、硫酸肝素、硫酸葡聚糖(Dextran sulfate)、透明质酸、藻酸盐、三聚磷酸盐(tripolyphosphate, TPP)、寡(聚谷氨酸)、细胞因子、蛋白质、肽、生长因子和核酸组成的组。在特定方面,核酸选自自由反义寡核苷酸、cDNA、基因组DNA、指导RNA、质粒DNA、载体DNA、mRNA、miRNA、piRNA、shRNA和siRNA组成的组。

[0013] 在其他方面,第一流和/或第二流还包含一种或更多种水溶性治疗剂。在某些方面,一种或更多种水溶性治疗剂选自自由小分子、碳水化合物、糖、蛋白质、肽、核酸、抗体或其抗体片段、激素、激素受体、受体配体、细胞因子和生长因子组成的组。

[0014] 在某些方面,一种或更多种水溶性聚阴离子聚合物是质粒DNA并且一种或更多种水溶性聚阳离子聚合物是线性聚乙烯亚胺(PEI)或其衍生物。在这样的方面,质粒DNA浓度在约25 $\mu$ g/mL至约800 $\mu$ g/mL之间。在特定方面,质粒浓度选自自由约25 $\mu$ g/mL、约50 $\mu$ g/mL、约100 $\mu$ g/mL、约200 $\mu$ g/mL、约400 $\mu$ g/mL和约800 $\mu$ g/mL组成的组。

[0015] 在其他方面,本发明公开的主题提供由本发明公开的方法生成的一种均匀的聚电解质复合物(PEC)纳米颗粒或多于一种PEC纳米颗粒。

[0016] 在一些方面,PEC纳米颗粒具有约1个至约50个pDNA拷贝/纳米颗粒的平均值。在特定方面,PEC纳米颗粒具有以下平均值:约1.7个至约21.8个pDNA拷贝/纳米颗粒;约1.7个至约3.5个pDNA拷贝/纳米颗粒;约1.7个至约5.0个pDNA拷贝/纳米颗粒;约1.7个至约6.1个pDNA拷贝/纳米颗粒;约1.7个至约8.0个pDNA拷贝/纳米颗粒;约1.7个至约8.5个pDNA拷贝/纳米颗粒;约1.7个至约9.1个pDNA拷贝/纳米颗粒;约1.7个至约9.5个pDNA拷贝/纳米颗粒;约1.7个pDNA拷贝/纳米颗粒;约3.5个pDNA拷贝/纳米颗粒;约4.4个pDNA拷贝/纳米颗粒;约5.0个pDNA拷贝/纳米颗粒;约6.1个pDNA拷贝/纳米颗粒;约8.0个pDNA拷贝/纳米颗粒;约8.1个pDNA拷贝/纳米颗粒;约8.5个pDNA拷贝/纳米颗粒;约9.1个pDNA拷贝/纳米颗粒;约9.5个pDNA拷贝/纳米颗粒;或者约21.8个pDNA拷贝/纳米颗粒。在更特定的方面,PEC纳米颗粒具有一个pDNA/纳米颗粒。

[0017] 在一些方面,PEC纳米颗粒具有约35nm至约130nm之间的平均尺寸。在特定方面,PEC纳米颗粒具有约80nm的平均尺寸。

[0018] 在某些方面,PEC纳米颗粒包含聚乙烯亚胺和质粒DNA。在这样的方面,PEC纳米颗粒具有的聚乙烯亚胺中的胺与质粒DNA中的磷酸(phosphate)的比(N/P)在约3至约10之间。在特定方面,PEC纳米颗粒具有选自自由约3、约4、约5、约6、约7、约8、约9和约10组成的组的N/

P。

[0019] 在一些方面,PEC纳米颗粒具有的结合的1PEI与1PEI总量的百分比在约50%至约75%之间。在某些方面,多于一种PEC纳米颗粒具有的多分散性指数(PDI)在约0.1至约0.25之间。在某些方面,PEC纳米颗粒具有的表面电荷在约+20mV至约+50mV之间。在某些方面,根据用于悬浮纳米颗粒的介质,PEC纳米颗粒具有的表观流体力学密度在约60Da/nm<sup>3</sup>至约80Da/nm<sup>3</sup>之间。

[0020] 在其他方面,本发明公开的主题提供包含本发明公开的一种PEC纳米颗粒或多于一种PEC纳米颗粒的制剂。在特定方面,制剂包括冻干制剂。在某些方面,一种PEC纳米颗粒或多于一种PEC纳米颗粒表现出在-20℃至少9个月的长期稳定性。

[0021] 上文已陈述了本发明公开的主题的某些方面,其全部或部分由本公开的主题所呈送,当结合下文作为最佳描述的所附实施例和附图考虑时,其他方面随着描述进行将变得明显。

[0022] 附图简述

[0023] 本专利或申请文件包含至少一幅以彩色制作的图。具有彩色附图的本专利或专利申请公布的副本将在依请求和支付必要费用后由主管局提供。

[0024] 已经如此概括地描述本发明公开的主题,现在将参考附图,附图不必按比例绘制,并且其中:

[0025] 图1A和图1B描绘本发明公开的受限撞击射流(confined impinging jet, CIJ)装置的代表性实施方案的示意图。图1A描绘用于在迅速混合条件下制造聚电解质复合物(PEC)纳米颗粒的CIJ装置的实施方案。流独立地装载有线性聚乙烯亚胺(1PEI)和质粒DNA,并且1PEI-DNA复合物纳米颗粒在收集前在小的受限室中形成;图1B描绘显示具有以120°角分开的3个射流的CIJ装置的示意图。射流1可以装载有带正电荷的聚合物,包括壳聚糖、PAMAM树状大分子、PEI、硫酸鱼精蛋白、聚(精氨酸)、聚(赖氨酸)和带正电荷的嵌段共聚物。射流2带有带负电荷的大分子,包括聚(天冬氨酸)、硫酸肝素、硫酸葡聚糖、透明质酸、三聚磷酸盐、寡聚(谷氨酸)、细胞因子、蛋白质、肽、生长因子、DNA、siRNA、mRNA。射流3可以被封端(capped)或装载有水混溶性有机溶剂以原位控制最终制剂的极性(现有技术;Mao等人的于2017年2月16日公布的美国专利申请公布第20170042829号, METHODS OF PREPARING POLYELECTROLYTE COMPLEX NANOPARTICLES, 其通过引用以其整体并入本文);

[0026] 图2A、图2B、图2C、图2D、图2E、图2F和图2G显示特征性混合时间 $\tau_M$ 对pDNA/1PEI纳米颗粒组装的影响。(图2A、图2B)混合动力学剖面(profile) ( $\tau_A$ 和流量Q)对平均纳米颗粒尺寸Dg(图2A)以及显示为通过DLS给出的尺寸分布宽度的均匀性(图2B)的影响。混合动力学尺度(scale)分为两个区域:区域I ( $\tau_M < \tau_A$ ) 和区域II ( $\tau_M > \tau_A$ )。标签1、2和3表示由三种不同混合条件生成的三种代表性制备物;(图2C)在Q=1.25mL/min,  $\tau_M=1.8 \times 10^5$ ms(制备物1), Q=5mL/min,  $\tau_M=790$ ms(制备物2), 以及Q=20mL/min,  $\tau_M=15$ ms(制备物3)制备的三组纳米颗粒的透射电子显微术(TEM)图像和DLS剖面。比例尺=50nm(左图)和200nm(右图);(图2D、图2E)输入pDNA浓度和质粒尺寸对由 $\tau_M=15$ ms制备的平均纳米颗粒尺寸Dg(图2D)和zeta电位(图2E)的影响;(图2F、图2G)N/P比对由 $\tau_M=15$ ms制备的平均纳米颗粒尺寸Dg(图2F)和Zeta电位(图2G)的影响。对于所测试的条件,pDNA/1PEI纳米颗粒的尺寸剖面和Zeta电位没有随N/P比(从4到6)而变化;

[0027] 图3A、图3B、图3C、图3D和图3E显示FNC-组装的pDNA/1PEI纳米颗粒的组成。(图3A)当以不同的输入pDNA浓度或用不同的质粒制备纳米颗粒时,结合的1PEI的分数和组装的纳米颗粒的组成保持相似;(图3B)在湍流混合条件( $Q=20\text{mL}/\text{min}$ ,  $\tau_M=15\text{ms}<\tau_A$ )和层流混合条件( $Q=5\text{mL}/\text{min}$ ,  $\tau_M=790\text{ms}>\tau_A$ )下组装的gWiz-Luc和gWiz-GFP纳米颗粒制剂在3至6的输入N/P比时的结合的1PEI对比游离1PEI的量和比例。标签:Luc和GFP分别对应gWiz-Luc和gWiz-GFP质粒纳米颗粒;(图3C)不同流量下用 $50\mu\text{g}/\text{mL}$ 或 $200\mu\text{g}/\text{mL}$ 的gWiz-Luc pDNA制备的纳米颗粒的结合的1PEI分数和zeta电位,表明所有gWiz-Luc/1PEI纳米颗粒共享相同的平均组成;(图3D)具有 $5.32\times 10^7\text{Da}$ 摩尔质量的I2/1PEI纳米颗粒的代表性齐姆图(Zimm plot),也显示接近零的第二维里系数 $A_2$ ;以及(图3E)通过不同输入浓度的I2质粒制备的gWiz-GFP/1PEI纳米颗粒的代表性德拜图(Debye plot);

[0028] 图4A、图4B、图4C和图4D以及图4E显示pDNA/1PEI PEC纳米颗粒的组装。(图4A、图4B)在湍流混合条件( $Q=20\text{mL}/\text{min}$ ,  $\tau_M=15\text{ms}$ )下组装的纳米颗粒的纳米颗粒平均摩尔质量和尺寸(图4A)与回转半径(图4B)的相关性。(图4A)和(图4B)中的每个数据点代表独立的制剂批次;(图4C)将由公式2(上图)和公式3(下图)的线性拟合应用于在 $Q=20\text{mL}/\text{min}$ 用不同的N/P比配制的纳米颗粒;(图4D)由不同混合条件(即有不同的 $\tau_M$ )产生的纳米颗粒的平均摩尔质量和尺寸的相关性。对于 $25\mu\text{g}/\text{mL}$ (橙色)的输入pDNA浓度,标记1至8分别代表7、11、15、23、163、 $5855.4\times 10^5\text{ms}$ 的 $\tau_M$ ,以及移液;对于 $100\mu\text{g}/\text{mL}$ (蓝色),标记1至6分别代表8、15、42、795、 $10^4$ 和 $2\times 10^5\text{ms}$ 的 $\tau_M$ ; (图4E)提出的在湍流混合条件( $\tau_M<\tau_A$ )下的两步pDNA/1PEI PEC纳米颗粒组装模型;

[0029] 图5A、图5B、图5C和图5D显示每个颗粒具有不同数量的pDNA的pDNA/1PEI纳米颗粒的转染过程和效率。(图5A)4小时孵育时间段(pDNA剂量= $0.6\mu\text{g}/10^4$ 个细胞)后,用3H-标记的pDNA制备的纳米颗粒在PC3前列腺细胞系中的细胞摄取定量测定;(图5B)使用4小时孵育(pDNA剂量= $0.6\mu\text{g}/10^4$ 个细胞),具有不同的N的纳米颗粒在PC3细胞中的体外转染效率。星号表示与 $N=6.1$ 的纳米颗粒的组相比的显著性水平;(图5C) i.v.注射纳米颗粒(剂量= $30\mu\text{g}$  pDNA/小鼠)后12小时Balb/c小鼠肺中的体内转染效率(生物发光辐射亮度);(图5D)每只小鼠i.v.注射含有 $30\mu\text{g}$  pDNA的经3H-标记的纳米颗粒后1小时纳米颗粒的全身生物分布。标签:H:心,K:肾,S:胃,SI:小肠。对于统计分析,\* $p<0.05$ ,\*\* $p<0.01$ ,以及\*\*\* $p<0.001$ ,根据单因素ANOVA和多重比较;

[0030] 图6A、图6B、图6C、图6D和图6E显示在具有不同N/P比和有效载荷水平(N)的动力学控制条件下产生的pDNA/1PEI纳米颗粒的转基因表达。(图6A)纳米颗粒(W1-8,见表4)在PC3癌细胞系中(剂量= $0.6\mu\text{g}$  gWiz-Luc质粒/ $10^4$ 个细胞)的体外转染效率;(图6B)每只小鼠i.v.注射含有 $40\mu\text{g}$  gWiz-Luc质粒的纳米颗粒(W1-8,见表4)后12小时,健康Balb/c小鼠肺中的体内转染效率(左)和转基因表达具有显著差异的组的代表性IVIS图像(右);(图6C)每只小鼠注射含有 $40\mu\text{g}$  PEG-Luc质粒的纳米颗粒(P1-8,见表4)后48小时,NSG小鼠中的LL2转移模型的肺中的体内转染效率(左)和转基因表达具有显著差异的组的代表性IVIS图像(右);(图6D)每只小鼠注射含有 $40\mu\text{g}$ 经3H-标记的gWiz-Luc质粒的纳米颗粒(W1、W2、W6、W8)后1小时在Balb/c小鼠中的全身生物分布。标签:H:心,K:肾,S:胃,SI:小肠;(图6E)在(图6D)中显示的小鼠肺中的生物分布;

[0031] 图7A、图7B、图7C、图7D和图7E显示现成的(off-the-shelf) pDNA/1PEI纳米颗粒的

扩大生产和长期储存稳定性。(图7A)使用FNC设置制备的纳米颗粒的冻干和重构;(图7B)储存于 $-20^{\circ}\text{C}$ 的冻干纳米颗粒在第0月、第1月、第3月、第6月和第9月在重构后的纳米颗粒特征。第0月代表刚完成冻干后的重构样品;

[0032] 图8A、图8B、图8C和图8D显示用不同输入pDNA浓度和输入N/P比及 $\tau_M < \tau_A$ 配制的PEC纳米颗粒的尺寸分布。由不同输入pDNA浓度制备的纳米颗粒的(图8A)尺寸分布和(图8B)多分散性指数(PDI);由不同输入N/P比制备的纳米颗粒的(图8A)尺寸分布和(图8B)多分散性指数(PDI);

[0033] 图9A和图9B显示由不同输入pDNA浓度和N/P比制备的纳米颗粒的TEM图像。用 $50\mu\text{g/mL}$ 和 $800\mu\text{g/mL}$ 的输入pDNA浓度制备的gWiz-LucPEC纳米颗粒的TEM图像(图9A)。注意,用 $200\mu\text{g/mL}$ 的输入pDNA浓度制备的gWiz-Luc PEC纳米颗粒的TEM图像在图2C中显示。这些TEM观察显示以 $Q=20\text{mL/min}$ 的撞击流量在湍流混合条件下制备的pDNA/体内-jetPEI®纳米颗粒的均匀性;(图9B)用3或6的输入N/P比制备的gWiz-GFPPEC纳米颗粒,展示跨越用不同N/P比制备的制备物的尺寸的相似性。比例尺= $50\text{nm}$ (对于左侧两图)和 $200\text{nm}$ (对于右图);

[0034] 图10A、图10B、图10C、图10E和图10F显示通过移液方法产生的不均匀的PEC纳米颗粒,其没有按照输入pDNA浓度的尺寸调谐性。由(图10A)I2质粒、(图10B)gWiz-GFP质粒、(图10C)gWiz-Luc质粒制成的PEC纳米颗粒的尺寸;以及由(图10D)I2质粒、(图10E)gWiz-GFP质粒、(图10F)gWiz-Luc质粒制成的PEC纳米颗粒的多分散性指数(PDI)。标签:B1、B2、B3和B4代表通过移液制造纳米颗粒所遵循的4种不同程序,见表2;

[0035] 图11显示PEC纳米颗粒悬浮液中pDNA浓度的确定。在PEI结合和组装后,pDNA分子在 $260\text{nm}$ 处的吸光度增加但仍遵循关于pDNA浓度的线性关系。该标准曲线用于评估任何PEC纳米颗粒悬浮液中的pDNA浓度;

[0036] 图12A、图12B、图12C、图12D、图12E和图12F显示用不同输入pDNA浓度和N/P比由 $20\text{mL/min}$ 的流量制备的纳米颗粒的SLS数据。(图12A)具有 $1.02 \times 10^7\text{Da}$ 的摩尔质量和1.7个pDNA/纳米颗粒的gWiz-LucPEC纳米颗粒的完整齐姆图;(图12B)具有 $3.59 \times 10^7\text{Da}$ 的摩尔质量和6.1个pDNA/纳米颗粒的完整齐姆图;(图12C)具有 $1.27 \times 10^8\text{Da}$ 的摩尔质量和21.8个pDNA/纳米颗粒的完整齐姆图,展示了普遍为零的第二维里系数;用不同输入pDNA浓度由(图12D)I2质粒和(图12E)gWiz-Luc质粒制备的PEC纳米颗粒的组合德拜图;或者(图12F)用不同输入N/P比由gWiz-Luc质粒制备的PEC纳米颗粒的组合德拜图。对于(图12A),将最初的 $34\mu\text{g/mL}$ (纳米颗粒中的总质量浓度)样品浓缩至 $81\mu\text{g/mL}$ 并且然后稀释至 $54\mu\text{g/mL}$ 。摩尔质量看起来在浓缩后略有下降。但总的来说,系统呈现等于0的第二维里系数;

[0037] 图13是定量评估生物样品中 $^3\text{H}$ -标记的pDNA的绝对量的标准曲线。将不同量的 $^3\text{H}$ -标记的pDNA溶液加入到7-mL玻璃闪烁瓶中包含的4mL闪烁液中。应用第1.6节中描述的相同读数程序来获得标准曲线。实际生物样品(细胞裂解物或小鼠组织溶质)的所有读数都落入该标准曲线中显示的量范围;

[0038] 图14A和图14B显示在具有不同平均pDNA拷贝数/纳米颗粒( $\bar{N}$ )的PEC纳米颗粒给药后肺中的体内转染效率。(图14A)注射含 $30\mu\text{g}$  pDNA的纳米颗粒/小鼠后12小时所有组的IVIS全身生物发光图像。比例尺:局部辐射亮度以 $10^{-6}$ 个光子/s/cm<sup>2</sup>/sr为单位;(图14B)在3只具有最高信号的小鼠的匀浆化肺中测量的萤光素酶丰度,显示出具有较高 $\bar{N}$ 的PEC纳米

颗粒在肺中给予更好的转染效率的感知趋势；

[0039] 图15A、图15B和图15C显示给药的具有不同pDNA拷贝数/纳米颗粒( $\bar{N}$ )的PEC纳米颗粒的生物分布。递送的pDNA在(图15A)肺、(图15B)肝和(图15C)脾中的丰度；

[0040] 图16显示IVIS感兴趣区域(ROI)定量结果和组织中萤光素酶丰度之间的相关性。IVIS ROI定量分析以暴露于肺区域的时间为30秒来进行,其中小鼠用具有如图15所示的不同 $\bar{N}$ 的PEC纳米颗粒给药。成像后立即从小鼠中收获肺并通过声处理探头(sonication probe)在萤光素酶测定报告裂解缓冲液(Promega, US)中匀浆以释放萤光素酶蛋白。然后如第1.6节中描述的确组织样品中的萤光素酶量用于体外转染效率评估；

[0041] 图17A、图17B和图17C显示在健康Ba1b/c小鼠中通过动力学控制条件制备的具有不同pDNA有效载荷和PEI组成的PEC纳米颗粒的体内转染效率。(图17A)每只小鼠注射含40 $\mu$ g pDNA的PEC纳米颗粒后12小时、24小时和48小时后用表4所列制剂给药的所有组的IVIS全身图像。标签D表示由于毒性而死亡的小鼠；比例尺:辐射亮度以 $10^{-7}$ 个光子/s/cm<sup>2</sup>/sr为单位；以及注射后(图17B)24小时和(图17C)48小时的IVIS ROI定量分析结果；

[0042] 图18A和图18B显示在NSG小鼠上的LL2肺转移模型中,通过动力学控制条件制备的具有不同pDNA有效载荷和PEI组成的PEC纳米颗粒的肿瘤特异性转染和表达效率。(图18A)每只小鼠注射含40 $\mu$ g pDNA的PEC纳米颗粒后48小时和72小时用表4所列制剂给药的所有组的IVIS全身图像。比例尺:辐射亮度以 $10^{-5}$ 个光子/s/cm<sup>2</sup>/sr为单位；(图18B)注射后72小时时间点的IVIS ROI定量分析结果；

[0043] 图19A和图19B显示PEC纳米颗粒制剂的生物分布数据,在转染和转基因活性中有显著发现。(图19A)肝中的pDNA丰度；(图19B)脾中的pDNA丰度；

[0044] 图20A显示经由移液制备纳米颗粒的三个独立实验,没有表现出再现性；

[0045] 图20B显示经由本发明公开的FNC-组装方法制备纳米颗粒的三个独立实验,表现出优异的再现性；

[0046] 图21A显示经由移液制备的纳米颗粒,其在制备后被监测1小时并显示出严重的聚集；以及

[0047] 图21B显示FNC-组装纳米颗粒在制备后被监测96小时,显示出良好的稳定性。

[0048] 详细描述

[0049] 现在将在下文中参考附图更全面地描述本发明公开的主题,在附图中示出本发明公开的主题的某些但不是全部的实施方案。相同的数字在全文中指代相同的元件。本发明公开的主题可以以许多不同的形式来体现并且不应该被解释为局限于本文列出的实施方案；相反,这些实施方案被提供以使得本公开内容将满足适用的法律要求。事实上,本发明公开的主题所属领域中的技术人员将想到具有在前面的描述和相关的附图中呈现的教导的益处的本文提出的本发明公开的主题的许多修改和其他实施方案。因此,应该理解,本发明公开的主题不限于所公开的具体实施方案并且修改形式和其他实施方案意图被包括在所附权利要求书的范围内。

[0050] 本发明公开的主题提供了用于以连续和可扩大的方式产生聚电解质复合物纳米颗粒的快速纳米复合(FNC)方法。本发明公开的FNC方法由于聚电解质复合产生纳米颗粒而不依赖于溶剂诱导的共聚物过饱和。通过FNC产生的聚电解质复合物纳米颗粒比使用常规

方法制备的聚电解质复合物具有更小的尺寸、更好的均匀性和更低的多分散性。例如,与批量制备方法相比,FNC过程允许在连续流操作过程中形成有可调尺寸的均匀的纳米颗粒,这适于扩大生产。FNC还提供更通用性及对颗粒尺寸和分布的控制,更高的药物封装效率,以及改进的胶体稳定性(Shen等人,2011;D'Addio等人,2013;D'Addio等人,2102;Gindy等人,2008;Lewis等人,2015;D'Addio等人,2011;Luo等人,2014;Santos等人,2014)。

[0051] 此外,本发明公开的方法通过改进的聚合物链缠结(entanglement)得到凝聚的和压缩的聚电解质纳米颗粒。另外,方法提供将治疗剂(诸如蛋白质或核酸)有效封装在聚电解质纳米颗粒中同时保持其固有的理化性质的手段(means)。此外,当与批量制备方法相比时,用这些新颖的方法制备的含DNA的纳米颗粒的制剂具有改进的颗粒尺寸和形状分布,并且表现出更高的细胞转染效率。

[0052] I. 组成上明确的(compositionally defined)质粒DNA/聚阳离子纳米颗粒及其制备方法

[0053] 在一些实施方案中,本发明公开的主题提供一种制备均匀的聚电解质复合物(PEC)纳米颗粒的方法,该方法包括在具有大于特征性混合时间( $\tau_M$ )的特征性组装时间( $\tau_A$ )的条件下将一种或更多种水溶性聚阳离子聚合物与一种或更多种水溶性聚阴离子聚合物均匀混合,在所述特征性组装时间( $\tau_A$ )期间,PEC纳米颗粒的组装发生,在所述特征性混合时间( $\tau_M$ )期间,一种或更多种水溶性聚阳离子聚合物和一种或更多种水溶性聚阴离子聚合物均匀混合。

[0054] 在特定实施方案中,方法包括快速纳米复合(FNC)方法。在这样的方面,方法包括通过以下连续生成均匀的聚电解质复合物(PEC)纳米颗粒:(a)使包含一种或更多种水溶性聚阳离子聚合物的第一流以第一可变流量流入受限室;(b)使包含一种或更多种水溶性聚阴离子聚合物的第二流以第二可变流量流入受限室,其中第一流和第二流在进入受限室时处于相对侧;和(c)任选地使包含选自以下组成的组的一种或更多种组分的第三流以第三可变流量流入受限室:一种或更多种水溶性治疗剂、一种或更多种可混溶的有机溶剂和/或一种或更多种冷冻保护剂;其中每股流在进入受限室时与另外两股流等距;其中第一可变流量、第二可变流量和第三可变流量在存在时可以是相同或不同的;以及(d)将第一流、第二流和第三流在存在时在受限室中撞击,直到雷诺数为约1,000至约20,000,从而使一种或更多种水溶性聚阳离子聚合物和一种或更多种水溶性聚阴离子聚合物经历连续生成PEC纳米颗粒的聚电解质复合过程,其中聚电解质复合过程发生在具有大于特征性混合时间( $\tau_M$ )的特征性组装时间( $\tau_A$ )的条件下,在所述特征性组装时间( $\tau_A$ )期间,PEC纳米颗粒的组装发生,在所述特征性混合时间( $\tau_M$ )期间,第一流、第二流和第三流的组分在第一流、第二流和第三流存在时均匀混合。

[0055] 如本文所用,“聚电解质复合物”(也称为聚电解质团聚体(polyelectrolyte coacervates)或“PEC”)是在带相反电荷的颗粒(例如,聚合物-聚合物、聚合物-药物和聚合物-药物-聚合物)之间形成的缔合复合物。聚电解质复合物是由于带相反电荷的聚离子(即,水溶性聚阳离子和水溶性聚阴离子)之间的静电相互作用而形成的。如本文所用,术语“连续”指在时间上不中断的过程,诸如当至少两股本发明公开的流流入受限室时PEC纳米颗粒的生成。如本文所用,术语“水溶性”指化合物能够在水中溶解的能力。

[0056] 在一些实施方案中,水溶性聚离子溶解在合适的溶剂中,导致基本电荷沿大分子

链分布。在各种实施方案中,当相反电荷的大分子被允许相互作用时,聚电解质复合物形成。例如,在一些实施方案中,聚电解质复合物的快速沉淀纳米颗粒是通过迅速且均匀地混合流(即,溶解在流中的水溶性聚阳离子和溶解在流中的水溶性聚阴离子)形成的。

[0057] 在一些实施方案中,流是包括一种或更多种流体组分的组合物并且能够在溶液或悬浮液中携带一种固体或更多种固体。典型地,流是极性的,例如乙酸或水。更典型地,流是水。

[0058] 流在受限室中撞击直到雷诺数为约1,000至约20,000,从而使水溶性聚阳离子聚合物和水溶性聚阴离子聚合物经历连续生成PEC纳米颗粒的聚电解质复合过程。如本文所用,术语“撞击”指至少两股流在受限室中以高流量相互碰撞。使用本发明公开的方法和装置,已经令人惊讶地显示分子(诸如DNA分子)在这样的高剪切条件下保持完整。

[0059] 例如,可通过其间流量和混合效率及速度得以控制的各种方法来实现第一流和第二流的迅速和均匀的混合以生成聚电解质复合物纳米颗粒。在一些实施方案中,聚电解质复合物纳米颗粒可以通过使用向心混合器或批次快速混合器(batch flash mixer)的快速纳米复合来产生。参见,例如,Johnson等人,美国专利申请公布第2004/0091546号,其通过引用以其整体并入本文。

[0060] 作为另一个实例,第一流和第二流的混合可以使用具有至少两个高速射流的受限撞击射流(CIJ)装置(图1A、图1B、图1C)来完成,该装置在Mao等人的于2017年2月16日公布的美国专利申请公布第20170042829号METHODS OF PREPARING POLYELECTROLYTE COMPLEX NANOPARTICLES中公开,该文献通过引用以其整体并入本文。在典型的实施方案中,通过数字控制注射泵(例如,New Era Pump System,NE-4000型号)将带相反电荷的流装载到分别的注射器中并送入CIJ装置的受限室中。在一些实施方案中,用作出口的长管流道(long tube runner)用于确保被带入受限室的相对流在收集之前充分反应。在一些实施方案中,第一流和第二流在进入受限室时位于相对侧。如本文所用,术语“相对侧”意指流彼此大体相对。在一些实施方案中,流彼此正相对(directly opposite)。在一些实施方案中,流可以不是彼此正相对的。

[0061] 本公开内容的方法还包括提供一个或更多个另外的流。例如,在一些实施方案中,方法可以包括提供第三流,该第三流包含其他添加剂诸如下文描述的治疗剂、盐溶液、水混溶性有机溶剂(例如,二甲基亚砷、二甲基甲酰胺、乙腈、四氢呋喃、甲醇、乙醇、异丙醇)来原位控制最终制剂的极性,或包含冷冻保护剂(例如,甘油、海藻糖、蔗糖、右旋糖)来改进重构后纳米颗粒的胶体稳定性。在一些实施方案中,第三、第四或甚至更进一步数量的射流被加入到CIJ装置中来容纳具有诸如本文所描述的那些添加剂的另外的流。

[0062] 在一些实施方案中,本发明公开的方法还包括使第三流流入受限室,其中每股流在进入受限室时与其他两股流等距。在一些实施方案中,保持流彼此等距允许发生流的均等混合。

[0063] 在一些实施方案中,第一流的pH值和第二流的pH值的范围在约2.5至约8.4,包括2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0和8.4。在一些实施方案中,第一流的pH值和第二流的pH值的范围在约3.5至约7.4,包括3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0和7.4。在一些实施方案中,第一流的pH值和第二流的pH值各为3.5。

[0064] 包含在上文描述的CIJ装置的注射器中的可以被撞击到受限室中的流的流量可以

经由例如可编程的注射泵容易地调节。进一步地,在一些实施方案中,特征性混合时间是流量的函数,并且可以靠改变流量来调整。例如,在高流量,流模式(flow pattern)可以呈现出湍流样特征并且混合时间可以处于几毫秒的量级。在这些条件下,实现了有效的质量传递,并且可以产生具有窄尺寸分布的离散且均匀的纳米颗粒。在各种实施方案中,最终平均颗粒尺寸是混合时间、聚电解质的浓度和化学组成的函数。

[0065] 混合效率和流性质(其影响混合速度)通常由雷诺数(Re)定义,雷诺数(Re)代表惯性流与黏性力的比的无量纲数。对于CIJ设备,通过累加多股流的贡献来计算总Re数:

$$[0066] \quad \text{Re} = \sum_{i=1}^n \text{Re}_i = \frac{4}{\pi d} \sum_{i=1}^n \frac{\rho_i Q_i}{\mu_i} \quad (1)$$

[0067] 其中 $\rho_i$ 是第i个进口流中溶液的密度( $\text{kg}/\text{m}^3$ ); $Q_i$ 是第i个进口流的流量( $\text{m}^3/\text{s}$ ); $\mu_i$ 是第i个进口流的流体粘度( $\text{Pa} \cdot \text{s}$ ); $d_i$ 是第i个进口喷嘴的直径(m),以及n是流的数量。

[0068] 在一些实施方案中,在反应物混合期间实现的雷诺数为约1,000至约20,000,诸如约1,600至约10,000,约2,000至约10,000,约2,000至约8,000,约1,900至约5,000,以及约3,000至约5,000。

[0069] 在一些实施方案中,流的可变流量的范围为约1毫升( $\text{mL}$ )/分钟至约50 $\text{mL}$ /分钟,诸如在约3 $\text{mL}$ /分钟至约50 $\text{mL}$ /分钟之间,诸如在约5 $\text{mL}$ /分钟至约30 $\text{mL}$ /分钟之间,以及在约10 $\text{mL}$ /分钟至约20 $\text{mL}$ /分钟之间。在一些实施方案中,流的可变流量大于约10 $\text{mL}$ /分钟。在其他实施方案中,流的可变流量大于约3 $\text{mL}$ /分钟。

[0070] 在特定实施方案中,第一可变流量、第二可变流量和第三可变流量在存在时各自等于或大于约10毫升/分钟( $\text{mL}/\text{min}$ )。在更特定的实施方案中,第一可变流量、第二可变流量和第三可变流量在存在时各自在约10 $\text{mL}/\text{min}$ 至约20 $\text{mL}/\text{min}$ 之间,包括10 $\text{mL}/\text{min}$ 、11 $\text{mL}/\text{min}$ 、12 $\text{mL}/\text{min}$ 、13 $\text{mL}/\text{min}$ 、14 $\text{mL}/\text{min}$ 、15 $\text{mL}/\text{min}$ 、16 $\text{mL}/\text{min}$ 、17 $\text{mL}/\text{min}$ 、18 $\text{mL}/\text{min}$ 、19 $\text{mL}/\text{min}$ 和20 $\text{mL}/\text{min}$ 。

[0071] 在某些实施方案中,特征性混合时间在约1 $\text{ms}$ 至约200 $\text{ms}$ 之间,包括约1 $\text{ms}$ 至约100 $\text{ms}$ 之间,以及约1 $\text{ms}$ 至约25 $\text{ms}$ 之间。在一些实施方案中,特征性混合时间短于约20 $\text{ms}$ 。在某些实施方案中,特征性混合时间在约1 $\text{ms}$ 至约25 $\text{ms}$ 之间,包括约1 $\text{ms}$ 、10 $\text{ms}$ 、15 $\text{ms}$ 、20 $\text{ms}$ 和25 $\text{ms}$ 。在特定实施方案中,特征性混合时间为约15 $\text{ms}$ 。

[0072] 在一些实施方案中,第二流的流量与第一流的流量的比为约0.1至约10。

[0073] 在一些实施方案中,添加剂被包括在流内。例如,治疗剂可以被添加到含有水溶性聚阳离子的流和/或含有水溶性聚阴离子的第二流中。在一些实施方案中,第一流和/或第二流还包含一种或更多种水溶性治疗剂。在一些实施方案中,生成的PEC纳米颗粒包封至少一种或更多种水溶性治疗剂。

[0074] 在一些实施方案中,一种或更多种水溶性治疗剂选自以下组成的组:小分子,诸如有机或无机小分子;糖类;低聚糖;多糖;选自由肽、蛋白质、肽类似物和衍生物组成的组的生物大分子;肽模拟物;核酸,诸如DNA、RNA干扰分子(选自由siRNA、shRNA、反义RNA、miRNA组成的组)以及核酶、树状大分子和适配体;抗体,包括抗体片段和内抗体(intrabodies);从选自由细菌、植物、真菌、动物细胞和动物组织组成的组的生物材料制成的提取物;天然存在的或合成的组合物;以及其任何组合。在一些实施方案中,一种或更多

种水溶性治疗剂选自由小分子、碳水化合物、糖、蛋白质、肽、核酸、抗体或其抗体片段、激素、激素受体、受体配体、细胞因子和生长因子组成的组。

[0075] 在一些实施方案中,一种或更多种水溶性聚阳离子聚合物选自壳聚糖、PAMAM树状大分子、聚乙烯亚胺(PEI)、鱼精蛋白、聚(精氨酸)、聚(赖氨酸)、聚( $\beta$ -氨基酯)、阳离子肽及其衍生物。

[0076] 在一些实施方案中,一种或更多种水溶性聚阴离子聚合物选自自由聚(天冬氨酸)、聚(谷氨酸)、带负电荷的嵌段共聚物(聚(乙二醇)-b-聚(丙烯酸)、聚(乙二醇)-b-聚(天冬氨酸)、聚(乙二醇)-b-聚(谷氨酸))、硫酸肝素、硫酸葡聚糖、透明质酸、藻酸盐、三聚磷酸盐(TPP)、聚(谷氨酸)、细胞因子(例如趋化因子、干扰素、白细胞介素、淋巴因子、肿瘤坏死因子)、蛋白质、肽、生长因子和核酸组成的组。

[0077] 本文所用的术语“多肽”和“蛋白”指氨基酸的聚合物。如本文所用,“肽”指氨基酸单体的短链,诸如约50个或更少的氨基酸。

[0078] 如本文所用,“生长因子”指能够刺激细胞生长、增殖、愈合和/或细胞分化的物质,诸如蛋白质或激素。生长因子的非限制性实例包括血小板衍生生长因子(PDGF)、转化生长因子 $\beta$ (TGF- $\beta$ )、胰岛素相关生长因子-I(IGF-I)、胰岛素相关生长因子-II(IGF-II)、成纤维细胞生长因子(FGF)、 $\beta$ -2-微球蛋白(BDGF II)和骨形态发生因子。

[0079] 如本文所用的,“核酸”或“多核苷酸”指呈单链形式或双链螺旋的核糖核苷(腺苷、鸟苷、尿苷或胞苷;“RNA分子”)或脱氧核糖核苷(脱氧腺苷、脱氧鸟苷、脱氧胸苷或脱氧胞苷;“DNA分子”)的磷酸酯聚合物形式,或其任何磷酸酯类似物(诸如硫代磷酸酯和硫酯)。双链DNA-DNA、DNA-RNA和RNA-RNA螺旋是可能的。术语核酸分子,并且特别是DNA或RNA分子,仅指该分子的一级结构和二级结构,并且不将其限于任何特定的三级形式。因此,此术语包括特别是以线性DNA分子或环状DNA分子发现的双链DNA(例如,限制性片段)、质粒和染色体。

[0080] 在一些实施方案中,核酸是RNA干扰剂。如本文所用,“RNA干扰剂”被定义为干扰或抑制靶基因表达(例如通过RNA干扰(RNAi))的任何剂。这样的RNA干扰剂包括,但不限于,反义分子、核酶、小抑制性核酸序列,例如但不限于指导RNA、小干扰RNA(siRNA)、短发夹RNA或小发夹RNA(shRNA)、微小RNA(miRNA)、转录后基因沉默RNA(ptgsRNA)、短干扰寡核苷酸、反义寡核苷酸、适配体、CRISPR RNA、与靶基因或其片段同源的核酸分子(包括RNA分子),以及通过RNA干扰(RNAi)干扰或抑制靶基因的表达的任何分子。

[0081] 在一些实施方案中,核酸选自由反义寡核苷酸、cDNA、基因组DNA、指导RNA、质粒DNA、载体DNA、mRNA、miRNA、piRNA、shRNA和siRNA组成的组。在一些实施方案中,核酸不是siRNA。如本文所用,术语“质粒DNA”指典型地为环形并能够独立复制的小DNA分子。

[0082] 在一些实施方案中,质粒DNA浓度在约25 $\mu$ g/mL至约800 $\mu$ g/mL之间,包括25 $\mu$ g/mL、50 $\mu$ g/mL、100 $\mu$ g/mL、200 $\mu$ g/mL、300 $\mu$ g/mL、400 $\mu$ g/mL、500 $\mu$ g/mL、600 $\mu$ g/mL、700 $\mu$ g/mL和800 $\mu$ g/mL。在特定实施方案中,质粒浓度选自由约25 $\mu$ g/mL、约50 $\mu$ g/mL、约100 $\mu$ g/mL、约200 $\mu$ g/mL、约400 $\mu$ g/mL和约800 $\mu$ g/mL组成的组。

[0083] 在一些实施方案中,一种或更多种水溶性聚阴离子聚合物是质粒DNA,并且一种或更多种水溶性聚阳离子聚合物选自由线性聚乙烯亚胺(PEI)及其衍生物(诸如但不限于聚(乙二醇)-b-PEI和聚(乙二醇)-g-PEI)组成的组。

[0084] 在一些实施方案中,第二流包含一种或更多种水溶性治疗剂并且聚电解质复合过

程将一种或更多种水溶性治疗剂包封在生成的聚电解质复合物 (PEC) 纳米颗粒中。

[0085] 在一些实施方案中,聚电解质复合物纳米颗粒包含聚阳离子和聚阴离子诸如壳聚糖/TPP、鱼精蛋白/硫酸肝素、PEI/DNA、壳聚糖-g-PEG17/Glu5、壳聚糖/聚-天冬氨酸钠盐以及硫酸鱼精蛋白/肝素。在一些实施方案中,第一流包含壳聚糖并且第二流包含三聚磷酸盐 (TPP) 和蛋白质,其中蛋白质由TPP和壳聚糖共同包封在生成的聚电解质复合物 (PEC) 纳米颗粒中。聚阳离子和聚阴离子的浓度取决于所用的具体大分子和对所得的聚电解质复合物纳米颗粒所期的形状和均匀性。具体实施方案在下文实施例中描述。

[0086] 在一些实施方案中,增加水溶性聚阳离子和/或水溶性聚阴离子的浓度和/或增加流的pH可能影响形状、颗粒尺寸和/或颗粒尺寸均匀性。例如,当含有DNA的流的浓度增加,而水溶性聚阳离子(诸如PEI)的浓度保持恒定时,在一些实施方案中,在快速纳米复合期间形成的所得纳米颗粒的形状可以是更棒状而不是球形。进一步地,增加水溶性聚阳离子和/或水溶性聚阴离子流中任一pH也可以导致更多棒状形状的纳米颗粒。相反地,在一些实施方案中,一般可以通过增加水溶性聚阳离子和/或水溶性聚阴离子流的浓度和/或pH获得具球形形状的纳米颗粒。

[0087] 如本文所述,在一些实施方案中,流含有添加剂诸如治疗剂,例如水溶性治疗剂。例如,水溶性治疗剂(诸如蛋白质)可以被加入到含有水溶性聚阴离子(诸如TPP)的流中。含有蛋白质的水溶性聚阴离子流和含有壳聚糖的水溶性聚阳离子流,例如,可以独立地装载到CIJ装置的注射器中以获得由壳聚糖和TPP共同包封的含有蛋白质的纳米颗粒。

[0088] 在一些实施方案中,水溶性治疗剂(诸如核酸(例如siRNA))可以与例如水溶性聚阳离子(诸如PEI)在纳米颗粒中复合。由此,本公开内容的水溶性聚阴离子可以既用于形成本文描述的本发明的聚电解质复合物纳米颗粒,又用作治疗剂。

[0089] II. 聚电解质复合纳米颗粒

[0090] 在一些实施方案中,本发明公开的主题提供由快速纳米复合 (FNC) 方法生成的均匀的聚电解质复合物 (PEC) 纳米颗粒制备物,该方法包括:(a) 使包含一种或更多种水溶性聚阳离子聚合物的第一流以第一可变流量流入受限室;(b) 使包含一种或更多种水溶性聚阴离子聚合物的第二流以第二可变流量流入受限室,其中第一流和第二流在进入受限室时处于相对侧;和(c) 任选地使包含选自以下的一种或更多种组分的第三流以第三可变流量流入受限室:一种或更多种水溶性治疗剂、一种或更多种可混溶的有机溶剂和/或一种或更多种冷冻保护剂;其中每股流在进入受限室时与另外两股流等距;其中第一可变流量、第二可变流量和第三可变流量在存在时可以是相同或不同的;以及(d) 将第一流、第二流和第三流在存在时在受限室中撞击,直到雷诺数为约1,000至约20,000,从而使一种或更多种水溶性聚阳离子聚合物和一种或更多种水溶性聚阴离子聚合物经历连续生成PEC纳米颗粒的聚电解质复合过程,其中聚电解质复合过程发生在具有大于特征性混合时间( $\tau_M$ )的特征性组装时间( $\tau_A$ )的条件下,在所述特征性组装时间( $\tau_A$ )期间,PEC纳米颗粒的组装发生,在所述特征性混合时间( $\tau_M$ )期间,第一流、第二流和第三流的组分在存在时均匀混合。

[0091] 本发明公开的均匀的聚电解质复合物纳米颗粒具有如上文以及在下文的实施例中描述的颗粒尺寸、颗粒尺寸的分布以及聚阴离子和聚阳离子组分。在一些实施方案中,本公开内容的均匀的聚电解质复合物纳米颗粒包封如本文所述的一种或更多种添加剂,诸如水溶性治疗剂。

[0092] 在一些实施方案中,根据本发明方法形成的聚电解质复合物纳米颗粒的颗粒尺寸是均匀的,即有窄的颗粒尺寸分布。例如,在一些实施方案中,本发明的纳米颗粒具有小于约500nm、小于约100nm、小于约60nm或小于约40nm(均匀的直径)的平均颗粒尺寸。一些实施方案中,生成的聚电解质复合物纳米颗粒的尺寸范围为直径约20nm至约500nm。在一些实施方案中,生成的聚电解质复合物纳米颗粒的尺寸范围为直径约25nm至约100nm。在一些实施方案中,生成的聚电解质复合物纳米颗粒的尺寸范围为直径约30nm至约80nm。在一些实施方案中,生成的聚电解质复合物纳米颗粒的尺寸范围为直径约25nm至约60nm。在一些实施方案中,生成的聚电解质复合物纳米颗粒的尺寸范围为直径约30nm至约45nm。在一些实施方案中,生成的聚电解质复合物纳米颗粒直径为约30nm。在特定实施方案中,生成的聚电解质复合物纳米颗粒的尺寸范围为直径约30nm至约80nm。在更特定的实施方案中,纳米颗粒具有的平均尺寸在约35nm至约130nm之间,包括35nm、40nm、45nm、50nm、55nm、60nm、65nm、70nm、75nm、80nm、85nm、90nm、100nm、105nm、110nm、115nm、120nm、125nm和130nm。在特定实施方案中,PEC纳米颗粒具有约80nm的平均尺寸。

[0093] 在一些实施方案中,本发明公开的PEC纳米颗粒具有约1个至约50个pDNA拷贝/纳米颗粒的平均值,包括1个、1.5个、2.0个、2.5个、3个、3.5个、4个、4.5个、5个、5.5个、6个、6.5个、7个、7.5个、8个、8.5个、9个、9.5个、10个、15个、20个、25个、30个、35个、40个、45个和50个pDNA拷贝/纳米颗粒。在特定实施方案中,PEC纳米颗粒具有以下平均值:约1.3个至约21.8个pDNA拷贝/纳米颗粒;约1.3个至约1.4个pDNA拷贝/纳米颗粒;约1.3个至约1.6个pDNA拷贝/纳米颗粒;约1.3个至约1.7个pDNA拷贝/纳米颗粒;约1.3个至约2.3个pDNA拷贝/纳米颗粒;约1.3个至约2.6个pDNA拷贝/纳米颗粒;约1.3个至约3.5个pDNA拷贝/纳米颗粒;约1.3个至约4.4个pDNA拷贝/纳米颗粒;约1.3个至约4.7个pDNA拷贝/纳米颗粒;约1.3个至约5.0个pDNA拷贝/纳米颗粒;约1.3个至约6.1个pDNA拷贝/纳米颗粒;约1.3个至约8.0个pDNA拷贝/纳米颗粒;约1.3个至约8.5个pDNA拷贝/纳米颗粒;约1.3个至约9.1个pDNA拷贝/纳米颗粒;约1.3个至约9.5个pDNA拷贝/纳米颗粒;约1.3个pDNA拷贝/纳米颗粒;约3.5个pDNA拷贝/纳米颗粒;约4.4个pDNA拷贝/纳米颗粒;约5.0个pDNA拷贝/纳米颗粒;约6.1个pDNA拷贝/纳米颗粒;约8.0个pDNA拷贝/纳米颗粒;约8.1个pDNA拷贝/纳米颗粒;约8.5个pDNA拷贝/纳米颗粒;约9.1个pDNA拷贝/纳米颗粒;约9.5个pDNA拷贝/纳米颗粒;约1.3个至约10.0个pDNA拷贝/纳米颗粒;约1.3个至约13.5个pDNA拷贝/纳米颗粒;或者约21.8个pDNA拷贝/纳米颗粒。在特定实施方案中,PEC纳米颗粒具有少于40个pDNA拷贝/纳米颗粒的平均值。

[0094] 在特定实施方案中,PEC纳米颗粒具有约1.3个至约21.8个pDNA拷贝/纳米颗粒的平均值;在一些实施方案中,在约1.3个至约13.5个pDNA拷贝/纳米颗粒之间,包括1.3个、1.7个、2.3个、4.7个和13.5个pDNA拷贝/纳米颗粒,例如对于I2质粒;在一些实施方案中,在约1.6个至约10.0个pDNA拷贝/纳米颗粒之间,包括1.6个、1.7个、2.6个、6.1个和10.0个pDNA拷贝/纳米颗粒,例如对于gWiz-GFP;在一些实施方案中,在约1.4个至约21.8个pDNA拷贝/纳米颗粒,包括1.4个、1.7个、3.5个、6.1个和21.8个pDNA拷贝/纳米颗粒,例如对于gWiz-Luc;以及,在一些实施方案中,在约4.4个至约9.1个pDNA拷贝/纳米颗粒之间,包括4.4个、5.0个、6.1个和9.1个pDNA拷贝/纳米颗粒,例如对于有不同的N/P比的gWiz-Luc。在更特定的实施方案中,PEC纳米颗粒具有一个pDNA/纳米颗粒。

[0095] 在一些实施方案中,PEC纳米颗粒包含聚乙烯亚胺和质粒DNA。在某些实施方案中,PEC纳米颗粒具有的聚乙亚胺中的胺与质粒DNA中的磷酸的比(N/P)在约3至约6之间。在特定实施方案中,PEC纳米颗粒具有选自约3、约4、约5和约6组成的组的N/P。在更特定的实施方案中,PEC纳米颗粒具有在约50%至约75%之间的结合的1PEI与总1PEI的百分比,包括约50%、55%、60%、65%、70%、71%、72%、73%、74%和75%的结合的1PEI与总1PEI的百分比。

[0096] 在一些实施方案中,多于一种生成的聚电解质复合物纳米颗粒的多分散性指数(PDI)的范围可以为约0.05至约0.2。在特定实施方案中,多于一种PEC纳米颗粒具有的PDI在约0.1和约0.25之间,包括0.01、0.11、0.12、0.13、0.14、0.15、0.16、0.17、0.18、0.19、0.20、0.21、0.22、0.23、0.24和0.25。

[0097] 在一些实施方案中,PEC纳米颗粒具有的表面电荷在约+20mV至约+50mV之间,包括+20、+21、+22、+23、+24、+25、+26、+27、+28、+29、+30、+31、+32、+33、+34、+35、+36、+37、+38、+39、+40、+41、+42、+43、+44、+45、+46、+47、+48、+49和+50mV。在一些实施方案中,PEC纳米颗粒具有的表观流体学密度在约60Da/nm<sup>3</sup>至约80Da/nm<sup>3</sup>之间,包括60Da/nm<sup>3</sup>、61Da/nm<sup>3</sup>、62Da/nm<sup>3</sup>、63Da/nm<sup>3</sup>、64Da/nm<sup>3</sup>、65Da/nm<sup>3</sup>、66Da/nm<sup>3</sup>、67Da/nm<sup>3</sup>、68Da/nm<sup>3</sup>、69Da/nm<sup>3</sup>、70Da/nm<sup>3</sup>、71Da/nm<sup>3</sup>、72Da/nm<sup>3</sup>、73Da/nm<sup>3</sup>、74Da/nm<sup>3</sup>、75Da/nm<sup>3</sup>、76Da/nm<sup>3</sup>、77Da/nm<sup>3</sup>、78Da/nm<sup>3</sup>、79Da/nm<sup>3</sup>和80Da/nm<sup>3</sup>。在特定实施方案中,PEC纳米颗粒具有约67.68Da/nm<sup>3</sup>的表观流体学密度。

[0098] 在一些实施方案中,本发明公开的主题提供了一种药物制剂,所述药物制剂包含药学上可接受的运载体中的本发明公开的一种PEC纳米颗粒或多于一种PEC纳米颗粒。在某些实施方案中,药物制剂包括冻干制剂。在特定实施方案中,一个PEC纳米颗粒或多于一个PEC纳米颗粒的药物制剂表现出在-20℃至少9个月(包括1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月和9个月)的长期稳定性。

[0099] 如本文所用,“药学上可接受的运载体”旨在包括,但不限于,水、盐水、右旋糖溶液、人类血清白蛋白、脂质体、水凝胶、微米颗粒和纳米颗粒。这样的介质和剂用于药物活性组合物的用途是本领域熟知的,并且因此将各自以有效水平掺入组合物的另外的实例和方法不需要在本文讨论。

[0100] 根据被治疗的具体状况,本发明公开的纳米颗粒可以被配制成液体或固体剂型且被全身或局部施用。剂可以例如,以本领域技术人员已知的定时释放形式或持续低释放形式被递送。制剂和施用的技术可以在Remington:The Science and Practice of Pharmacy(第20版)Lippincott,Williams&Wilkins(2000)中找到。适合的途径可以包括口服、含服、通过吸入喷雾、舌下、直肠、经皮、阴道、经黏膜、鼻或肠施用;胃肠外递送,包括肌肉内、皮下、髓内注射,以及鞘内、直接心室内、静脉内、关节内、胸内、滑膜内、肝内、病灶内、颅内、腹膜内、鼻内或眼内注射或其他递送模式。

[0101] 虽然施用的形式和/或途径可以变化,在一些实施方案中,本发明公开的纳米颗粒或药物组合物是肠胃外施用的(例如,通过皮下、静脉内或肌肉内施用),或者在一些实施方案中直接施用至肺。向肺局部施用可以通过各种制剂策略实现,包括药物气雾剂,其可以是溶液气雾剂或粉末气雾剂。粉末制剂典型地包含小颗粒。合适的颗粒可以使用本领域已知的任何手段制备,例如通过在空气喷射磨、球磨或振动磨中研磨、过筛、微沉淀、喷雾干燥、

冻干或受控结晶。典型地,颗粒的直径为约10微米或更小。粉末制剂可以任选地包含至少一种本领域技术人员已知的颗粒状药学上可接受的运载体。合适的药物运载体的实例包括,但不限于,糖类,包括单糖、二糖、多糖和糖醇诸如阿拉伯糖、葡萄糖、果糖、核糖、甘露糖、蔗糖、海藻糖、乳糖、麦芽糖、淀粉、葡聚糖、甘露醇或山梨醇。可选地,可以使用本领域技术人员已知的任何手段制备溶液气雾剂,例如,提供有适于递送计量剂量的组合物的阀的气雾剂小瓶。当活性成分的可吸入形式是可雾化的水性、有机或水性/有机分散体时,吸入装置可以是喷雾器,例如传统的气动喷雾器诸如空气喷射喷雾器,或超声波喷雾器,其可以含有例如1mL至50mL,通常1mL至10mL的分散体;或者其允许更小的雾化体积(例如10 $\mu$ L至100 $\mu$ L)的手持式喷雾器。

[0102] 对于注射,本公开内容的剂可以在水性溶液中,诸如在生理学上相容的缓冲液诸如Hank氏溶液、林格氏溶液或生理盐水缓冲液或等渗糖溶液中配制和稀释。

[0103] 使用药学上可接受的惰性运载体将用于实践本公开内容的本文公开的化合物配制为适用于全身施用的剂量在本公开内容的范围内。在适当选择运载体和适合的制造实践的情况下,本公开内容的组合物,特别是配制为溶液的那些,可以被胃肠外施用,诸如通过静脉内注射。化合物可使用本领域熟知的药学上可接受的运载体容易地被配制成适合于口服施用的剂量。这样的运载体使得本公开内容的化合物被配制为片剂、丸剂、胶囊、液体、凝胶、糖浆、浆液、悬液等,用于被治疗的受试者(例如,患者)口服摄入。

[0104] 对于鼻或吸入递送,本公开内容的剂还可以通过本领域技术人员已知的方法来配制,并且可以包括,例如,但不限于,增溶、稀释或分散物质的实例,诸如盐水、防腐剂,诸如苯醇、吸收促进剂和碳氟化合物。

[0105] 尽管本文中采用了具体术语,但它们仅用于一般的和描述性的意义,而非用于限制的目的。除非另有定义,本文使用的所有技术术语和科学术语具有与由本发明描述的主题所属领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。

[0106] 遵循长期存在的专利法惯例,术语“a(一)”、“an(一)”和“the(该)”当用于本申请(包括权利要求书)时指“一个或更多个”。因此,例如,提及“受试者(a subject)”包括多于一个受试者,除非上下文清楚地是意思相反的(例如,多于一个受试者)等等。

[0107] 贯穿本说明书和权利要求书,术语“包含(comprise)”、“包含(comprises)”和“包含(comprising)”以非排他性含义使用,除非当上下文另有要求时。同样地,术语“包括(include)”和其语法变体旨在非限制,使得列表中项目的列举不排除可被取代或添加至所列项目的其他类似的项目。

[0108] 为了本说明书以及所附的权利要求书的目的,应理解,除非另有说明,在说明书和权利要求书中使用的表示量、尺寸、维度、比例、形状、配方、参数、百分比、参数、数量、特征及其他数值的所有数字在所有情况下均由术语“约”修饰,即使术语“约”可能未明确地与该值、量或范围一起出现。因此,除非相反地指示,在以下说明书和所附的权利要求书中列出的数值参数不是且不需要是精确的,但是如所期的可以是接近的和/或更大或更小,反映了公差、转换因子、四舍五入、测量误差等,以及本领域技术人员已知的其他因素,取决于本公开的主题寻求获得的期望性质。例如,当术语“约”指值时能够意在包括与指定的量的在一些实施方案中 $\pm 100\%$ 、在一些实施方案中 $\pm 50\%$ 、在一些实施方案中 $\pm 20\%$ 、在一些实施方案中 $\pm 10\%$ 、在一些实施方案中 $\pm 5\%$ 、在一些实施方案中 $\pm 1\%$ 、在一些实施方案中 $\pm$

0.5%、以及在一些实施方案中 $\pm 0.1\%$ 的差异,因为这样的差异对于进行所公开的方法或采用所公开的组合物是适当的。

[0109] 此外,当与一个或多个数值或数值范围关联使用时,术语“约”应理解为指所有这样的数值,包括范围内的所有数值以及通过将边界延伸至高于和低于所列出的数值修改该范围。通过端点陈述的数值范围包括归入该范围内的所有数值例如全部的整数,包括其分数(例如,1至5的陈述包括1、2、3、4和5,以及其分数,例如1.5、2.25、3.75、4.1等)以及在该范围内的任何范围。

## 实施例

[0110] 以下实施例已被包括以提供本领域普通技术人员用于实践本发明公开的主题的代表性实施方案的指导。根据本公开内容和本领域中的一般技术水平,本领域技术人员可以理解,以下实施例意在仅是示例性的,且可以采用许多变化、修改和改变而不偏离本发明公开的主题的范围。以下实施例通过说明的方式而非通过限制的方式来提供。

### [0111] 实施例1

#### [0112] 质粒DNA/聚阳离子复合纳米颗粒的组装中的动力学控制

[0113] 1.1. 概述。由质粒DNA (pDNA) 和聚阳离子(诸如线性聚乙烯亚胺(1PEI)) 组装的聚电解质复合物(PEC) 纳米颗粒代表了用于基因疗法的主要非病毒递送媒介物。控制pDNA/聚阳离子纳米颗粒的尺寸、形状和表面性质的努力主要集中于微调聚阳离子运载体的分子结构和组装条件,诸如介质极性、pH和温度。然而,鉴于组装过程和纳米颗粒结构的非平衡性质,这些纳米颗粒的可再现产生取决于控制组装动力学的能力。

[0114] 在一些实施方案中,本发明公开的主题采用动力学控制的混合过程,在本文中称为“快速纳米复合”或(“FNC”) 来加速pDNA溶液与聚阳离子1PEI溶液的混合以通过微室中的湍流混合来匹配PEC组装动力学,从而实现对pDNA/1PEI纳米颗粒组装的动力学条件的明确控制,如由纳米颗粒尺寸、组成和pDNA有效载荷的可调谐性所展示的。使用实验和模拟相结合的手段,以比批量混合方法更均匀的和可扩大的方式制备了具有约1.7个至约21.8个pDNA拷贝/纳米颗粒的平均值和约35nm至约130nm的平均尺寸的pDNA/1PEI纳米颗粒。使用这些有良好定义的组成和尺寸的纳米颗粒,pDNA有效载荷和纳米颗粒制剂组成能够与这些纳米颗粒的转染效率和毒性相关联。这些纳米颗粒在冻干制剂中表现出在 $-20^{\circ}\text{C}$ 至少9个月的长期稳定性,验证了具有用于基因疗法的良好定义的特征的现成纳米颗粒产品的可扩大制备。

[0115] 1.2背景。组装组分的聚电解质性质表明,与聚合物链的静电复合速率相比聚合物链的扩散速率较慢。因此,PEC组装产生了非平衡的、动力学抑制的(kinetically arrested) 复合结构。在组装过程期间,不同组分的瞬时和局部浓度剖面决定每个PEC组装如何开始、增长和终止以形成不同的纳米颗粒。只有当混合比组装过程更快时,才能控制这些动力学条件以允许在纳米颗粒开始组装之前组装组分以均匀的方式进行分布。均匀混合不仅确保PEC纳米颗粒以均匀的特征产生,还提供通过对进入组装系统中的输入条件的操纵来控制纳米颗粒的尺寸、表面性质和组成的机会。该组装条件要求将不同组装组分均匀地混合的特征性混合时间( $\tau_M$ ) 减少到小于发生PEC纳米颗粒组装的特征性组装时间( $\tau_A$ )。包括移液和涡旋在内的传统混合方法无法满足这一要求。

[0116] 混合通过组装组分跨不同流的界面的扩散发生。实现小 $\tau_m$ 的最常见手段是缩短扩散路径,其可以由层流设置和湍流设置二者来实现。在层流设置中,在不同的流路径引入小区室内时实现混合。然而,由于制造上的困难,工程手段(诸如流体力学聚焦(Lu等人,2014;Lu等人,2016)以及液滴限制(droplet confinement)(Juul等人,2012))被开发以进一步增加表面-体积比。相比之下,在湍流设置中,湍流涡能够使流迅速分解到微小的维度进行有效的扩散。湍流(flow turbulence)可以通过以下递送:“T”型连接器(Kasper等人,2011)、Tesla混合器和人字形(herring-bone)混合器(Feng等人,2016)、同轴射流混合器(Liu等人,2015;Liu等人,2017)、受限撞击射流(CIJ)(Johnson和Prud'homme;Liu和Fox,2006),以及多进口涡旋混合器(MIVM)(Liu等人,2008;He等人,2017;He等人,2018)。

[0117] 由于对组装组分的混合动力学的较高等度的控制,与常规方法相比在制备具有更均匀特征的载药纳米颗粒方面已经取得了各种程度的成功。CIJ混合器中的湍流混合最近被用于生成pDNA/1PEI纳米颗粒,以展示该方法的可扩大性和控制尺寸的可行性(Santos等人,2016),但是混合和纳米颗粒组装的动力学尚未被分析。针对两亲性聚合物胶束的自组装,动力学受限组装已经被很好地说明,其中在称为快速纳米沉淀(FNP)的过程中纳米颗粒的形成可以由溶剂混合速率对比聚合物聚集和药物在混合溶剂中的分配速率进行调节。Saad和Prud'homme,2016。FNP在MIVM或CIJ混合器中使用湍流混合以在比疏水链聚集的特征性时间更短的时间内混合携带可混溶溶剂的两股相对的射流。均匀的纳米颗粒可以由均匀的过饱和条件而产生(Nikoubashman等人,2016;Zhang等人,2012)。通过在这样的混合状态下改变动力学条件,用于纳米颗粒形成的扩散受限的和融合主导的聚集机制(Johnson和Prud'homme,2003)以及用于预测纳米颗粒尺寸的定量模型(Pagels等人,2018)已经被提出。

[0118] 1.3工作范围。本发明公开的主题部分地调查pDNA/聚阳离子PEC纳米颗粒组装的动力学控制方面。更特定地,本发明公开的主题展示了在CIJ混合器中使用称为“快速纳米复合(FNC)”的湍流混合手段对PEC组装和纳米颗粒形成的动力学控制。FNC中的聚电解质pDNA和线性聚乙烯亚胺(1PEI)的扩散动力学显著不同于FNP中的溶剂和聚合物的扩散动力学,其中通过聚电解质电荷中和介导的复合动力学比FNP中聚合物链段的疏水聚集更快,并且PEC在没有有机溶剂混合(其在FNP中发生)的水性介质中发生。这些因素对在FNC中将PEC组装成纳米颗粒的动力学控制的独特过程和额外挑战有贡献。对于本发明公开的研究,由于体内-jetPEI®的体内高转染效率(作为非病毒运载体的基准),其在GMP质量中的可用性以及其作为具有均匀的电荷密度的聚阳离子的分子简单性,体内-jetPEI®被选择作为测试的运载体。使用体内-jetPEI®的PEC纳米颗粒和典型尺寸为4kb至7 kb的质粒作为模型系统,使用流体动力学模拟检查了CIJ混合器中的混合流方案(mixing flow regimen),并分析了实现对PEC组装过程的动力学控制的要求。通过对动力学条件的操纵展示了对pDNA/体内-jetPEI®纳米颗粒组成的精确控制,并表征了纳米颗粒组成、尺寸和表面特征对其体外和体内转染效率的影响。关于动力学控制条件下组装的pDNA/体内-jetPEI®纳米颗粒用于非病毒基因疗法的转染效率和翻译潜力分析了其优势。

[0119] 1.4代表性结果和讨论。混合作为跨湍流结构中pDNA和1PEI流之间的界面的分子扩散发生。

[0120] 1.4.1. 特征性混合时间 $\tau_M$ 对pDNA/1PEI纳米颗粒组装结果的影响。接下来,实验性地检查了当撞击gWiz-Luc pDNA (6.7 kb) 溶液时流量Q对pDNA/1PEI纳米颗粒的FNC组装的影响。在本研究中以下条件没有变化:1PEI溶液的pH在3.5保持一致以维持1PEI的相同的质子化度在75%左右,并且从而维持1PEI的相同电荷密度。Curtis等人,2016。类似地,检查时DNA溶液的浓度维持在200 $\mu$ g/mL的浓度,并且体内-jetPEI®溶液维持在对应于NP为4的浓度。当增加Q时,即减少 $\tau_M$ 时,由纳米颗粒的动态光散射(DLS)测量(z-平均流体力学直径, $D_g$ )给予的尺寸减小直到其达到下限的平台(图2A)。

[0121] 当质粒浓度从200 $\mu$ g/mL减少至50 $\mu$ g/mL,或质粒尺寸从6.7 kb降低至4.4kb(I2质粒,见表1)时,测得的纳米颗粒尺寸遵循相同的趋势。通过降低输入pDNA浓度,使临界 $Q_0$ (高于该临界 $Q_0$ 获得一致的DLS尺寸)从大约15mL/min降低到大约8.5mL/min(临界 $\tau_{M,0}$ 从大约20ms增加到大约85ms)。DLS给予的纳米颗粒的尺寸分布宽度(见第1.6节)显示出对Q的相同的依赖性(图2B),表明随着 $\tau_M$ 的降低,纳米颗粒的均匀性增加。通过透射电子显微术(TEM)观察确认了流量依赖的平均尺寸和均匀性(图2C)。

[0122] 表1. 本研究中使用的代表性质粒DNA

	质粒	长度	说明
	gWiz-Luc	6732 bp	编码作为报告物的萤光素酶蛋白。在本研究中,主要用于评价体外或体内的转染效率的目的。
[0123]	gWiz-GFP	5757 bp	编码 GFP 蛋白。在本研究中,仅用于改变质粒尺寸的目的。
	I2	4393 bp	由 Cancer Targeting Systems Inc.提供的专有的质粒构建体。在本研究中,仅用于改变质粒尺寸的目的。
	PEG-Luc	5314 bp	构建有 PEG-3 启动子,从而提供作为报告物的萤光素酶蛋白的肿瘤特异性转染和表达。

[0124] 基于这些发现,特征性混合时间 $\tau_M$ 或流量Q的场(field)可以分为两个区域:

[0125] “区域I”对应于其中平均DLS尺寸和均匀性保持恒定而不依赖Q或 $\tau_M$ 的动力学条件。这表明微室内的混合条件已经达到最大程度的均匀性以允许组装均匀地发生,从而所有纳米颗粒具有相似的组装路径。该组装过程有被定义为特征性组装时间( $\tau_A$ )的时间尺度,并且当 $\tau_M < \tau_A$ ,几乎所有的pDNA/1PEI纳米颗粒都在相同的定义条件(pDNA和1PEI的浓度、温度、介质pH、离子强度等)下组装。换句话说,组装组分pDNA和1PEI可以以比纳米颗粒形成更快的速率混合,以几乎“同时”并且在几乎相同的微环境中启动纳米颗粒组装。如上文讨论的, $D_{PEI} \gg D_{DNA}$ ,而且主要扩散到pDNA流区域中的是1PEI分子,导致1PEI分子均匀分布到pDNA分子附近。这确定了由pDNA和1PEI的输入浓度剖面定义的均匀的初始动力学条件。

[0126] “区域II”对应于其中 $\tau_M > \tau_A$ 使得分子混合过程在大于纳米颗粒组装过程的时间尺度上发生的动力学条件。在这种条件下,随着混合的进行,纳米颗粒的组装以非均匀的方式发生,并且部分形成的纳米颗粒可以以未定义的方式进一步与晚到达的分子缔合。这导致不均匀的和可能更大的纳米颗粒尺寸;并且纳米颗粒的组成取决于流量和混合条件。随着流量增加并接近允许 $\tau_M = \tau_A$ 的临界条件,组装混合物更接近湍流混合结构,而且变得更均匀;混合物组成变得更接近于pDNA和1PEI的输入浓度剖面。例如,当比较制备物1(Q=1.25mL/min且 $\tau_M = 1.8 \times 10^5$ ms)、制备物2(Q=5mL/min且 $\tau_M = 7.9 \times 10^2$ ms)和制备物3(Q=20mL/min且 $\tau_M = 15$ ms)时,纳米颗粒系综显示出与该分析(图2A、图2C)一致的特征。随着流量增加,即随着 $\tau_M$ 减少,流混合剖面(flow mixing profile)经历了从层流混合到湍流混合

的转变,这与纳米颗粒组装从区域II ( $\tau_M > \tau_A$ ) 到区域I ( $\tau_M < \tau_A$ ) 的转变相符。这显示通过将流量从1mL/min变化至50mL/min,CIJ装置中湍流混合使溶液混合时间尺度与pDNA/1PEI纳米颗粒组装时间尺度相匹配的能力。

[0127] 1.4.2. pDNA浓度和N/P比对pDNA/1PEI纳米颗粒组装的影响。当组装发生在区域I中定义的动力学条件时,pDNA和1PEI的组装浓度剖面由输入浓度剖面(即撞击溶液中的pDNA浓度和N/P比)良好地定义。这提供了检查组装浓度剖面对纳米颗粒特征的影响的机会。选择20L/min的流量( $\tau_M = 15\text{ms}$ ,如图2A、图2B所标)用于此比较。如图2D所示,pDNA浓度的增加导致纳米颗粒尺寸的增加。这些制剂的相对窄的尺寸分布和低PDI(0.12-0.16)(图8A、图8B),以及TEM观察(图9A)确认了pDNA/1PEI纳米颗粒的动力学控制混合和均匀的组装。另一方面,当输入pDNA浓度固定在400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,以不同的N/P比组装的纳米颗粒给出相似的尺寸(图2E和图9B),表明质粒在这种混合条件下被最有效地压缩而不依赖初始1PEI浓度,而且即使当N/P比降低到3时仍达到最大的压缩程度。这一观察进一步确认了在组装过程期间具有 $\tau_M < \tau_A$ 的湍流混合使1PEI分子的可及性(access)最大化以与pDNA复合的有效性。此外,zeta电位评估揭示,无论所用质粒、pDNA浓度(图2E)或输入N/P比(图2G)如何,所有制剂的在+40mV左右的相似表面电荷。这表明纳米颗粒表面是相似的并且由过量的1PEI分子组成。用于制备pDNA/聚阳离子纳米颗粒的常规混合方法(诸如移液)提供秒量级的混合时间,因此落入该动力学尺度上的区域II中。先移液后涡旋的方法(表2)生成了具有与以流量 $Q < 1.5\text{mL}/\text{min}$ 制备的FNC制备物的平均尺寸和均匀性相似的平均尺寸和均匀性的纳米颗粒(图9)。不存在纳米颗粒尺寸对输入pDNA浓度的明确依赖性。此外,由于实施例1.4.7中采用不同的移液程序(表2),因此存在更高程度的可变性。

[0128] 表2. 通过移液制备PEC纳米颗粒的程序

程序	说明
B1	在 50 $\mu\text{L}$ DNA 工作溶液顶部缓慢(2 秒)加入 50 $\mu\text{L}$ PEI 工作溶液,紧接着涡旋 30 秒; 并施加 5 分钟的稳定化。
[0129] B2	将 50 $\mu\text{L}$ PEI 工作溶液快速注入 50 $\mu\text{L}$ DNA 工作溶液中,紧接着涡旋 30 秒; 并施加 5 分钟的稳定化。
B3	将 100 $\mu\text{L}$ PEI 工作溶液快速注入 100 $\mu\text{L}$ DNA 工作溶液中,紧接着涡旋 30 秒; 并施加 5 分钟的稳定化。
B4	将 50 $\mu\text{L}$ DNA 工作溶液快速注入 50 $\mu\text{L}$ PEI 工作溶液中,紧接着涡旋 30 秒; 并施加 5 分钟的稳定化。

[0130] 1.4.3. 平均纳米颗粒组成和游离1PEI测量。以大于3的N/P比实现pDNA被1PEI的完全复合;因此,具有 $N/P \geq 3$ 的组装会导致纳米颗粒悬浮液中过量的未结合1PEI或游离1PEI。Yue等人,2011。为了评估组装的纳米颗粒的实际组成,游离1PEI的量首先根据已公布的方案来表征。Bertschinger等,2004。当pDNA/1PEI纳米颗粒在如图2中定义的湍流混合条件( $Q = 20\text{mL}/\text{min}$ 且 $\tau_M = 15\text{ms}$ )下组装时,只要输入N/P比固定在4,具有不同pDNA浓度输入的所有纳米颗粒制剂都具有相同的结合1PEI对比游离1PEI组成(图3A)。结合的1PEI的量几乎都在70%左右,其对应于纳米颗粒中2.7的N/P比。当以一致的pDNA浓度输入将输入N/P从3调整到6时(图3B,左图),无论输入N/P比如何,发现与纳米颗粒结合的1PEI的量都是一致的。这表明与pDNA结合的1PEI的量在不同制备条件下制备的纳米颗粒之间是相同的;并且该平均组成对应于纳米颗粒中 $2.74 \pm 0.14$ 的N/P比( $n = 28$ 个单个制备物)。这些因而得到的“过度

充电的”纳米颗粒与并非所有带电基团都可以参与PEC形成过程中的电荷中和的事实相一致。Berret, 2005。测试的两种质粒之间有一个微小的差异,即随着N/P比减小,gWiz-Luc看起来导致结合的1PEI稍微降低。尽管如此,总的结论是明确的,1PEI与pDNA结合以形成PEC不受pDNA或者1PEI之一的浓度的影响,也不受输入N/P比的影响。

[0131] 1.4.4. 电荷中和不是PEC纳米颗粒组装的速率限制步骤。发现这种用于pDNA中和的一致性的最小结合N/P比对于在非湍流混合条件下制备的纳米颗粒而言也是正确的(图3B右图和图3C)。在不同混合条件下制备的纳米颗粒测量的表面电荷(即zeta电位)也保持相同(图3C)。由于纳米颗粒中的1PEI含量和zeta电位与电荷中和及复合物形成过程直接相关,图3A、图3B和图3C中突出显示的发现表明电荷中和及pDNA-1PEI结合对纳米颗粒组装不是速率限制的。换句话说,电荷中和以比pDNA/1PEI PEC凝聚和链折叠成纳米颗粒快得多的速率发生,即它发生的时间尺度比总特征性组装时间 $\tau_A$ 短得多。在动力学控制的混合条件下实现的pDNA/1PEI PEC纳米颗粒组装过程现在可以被建模为两个不同的步骤,其与几篇文献报告(Barreleiro和Lindman, 2003; Santhiya等人, 2012)一致:

[0132] 步骤1: 电荷中和步骤,其中1PEI分子只要扩散到pDNA分子附近就与pDNA结合。在本研究中,无论输入pDNA浓度或N/P比如何,1PEI与pDNA始终以大约2.7的N/P比复合。该步骤形成pDNA/1PEI PEC,并且不是速率限制的;

[0133] 步骤2: PEC链组装,其中中和的pDNA/1PEI复合物通过折叠经历变形和凝聚(Osada等人, 2012; Takeda等人, 2017),这显著降低了复合物体积,即发生压缩。这是速率限制步骤,因此步骤2的时间尺度比步骤1的时间尺度大得多。因此,特征性装配时间 $\tau_A$ 主要由步骤2的完成时间决定。在组装过程期间,在通过排斥净正表面电荷来稳定结构之前,当相邻的pDNA或PEC足够接近以扩散至彼此时,涉及多于一个PEC的压缩和组装可以发生,导致多于一个pDNA被包装到单个不同的纳米颗粒中。

[0134] 1.4.5. 每个pDNA/1PEI纳米颗粒中平均pDNA拷贝数的表征。鉴于本发明公开的纳米颗粒可以以窄的尺寸分布和一致的组成制备,纳米颗粒的摩尔质量使用静态光散射(SLS)技术表征。在固定的纳米颗粒内pDNA/1PEI质量比(图3A)的情况下,假定纳米颗粒的折射增量( $dn/dc$ )值是恒定的并且遵循加法法则(additive rule)(见第1.6节)。Dai和Wu, 2012。通过测量散射光的强度以获得关于每个散射角和每个纳米颗粒质量浓度的瑞利散射比(Rayleigh scattering ratio),并在齐姆图上将浓度和角度依赖曲线外推至零浓度和零角度;纳米颗粒的重量平均摩尔质量 $\bar{M}_{w, \text{纳米颗粒}}$ ,由此可以计算每个纳米颗粒的pDNA的平均拷贝数( $\bar{N}$ )(见第1.6节)。Dubin等人, 2012; Hiemenz和Lodge, 2007。

[0135] 图3D中显示具有 $\bar{N} = 13.5$ 的pDNA/1PEI纳米颗粒的代表性齐姆图。对于由该方法测量的所有纳米颗粒(图3D和图12A、图12B、图12C),齐姆图分析表明这些纳米颗粒的第二维里系数(A)接近零。这一发现暗示,用于SLS测量的溶剂(水)和温度(25°C)条件满足 $\theta$ 条件,即PEC-溶剂相互作用抵消了范德瓦耳相互作用(Vander Waals interaction)和PEC链的体积膨胀,使得PEC链以随机堆积(random packing)的方式压缩。这种 $\theta$ 条件显著简化了平均摩尔质量的测量,因为这些纳米颗粒的光散射行为的浓度依赖性可以被忽略并且瑞利比可以以固定的浓度测量,并且使用德拜图的计算可以被测量(图3E和图12D、图12E、图12F)。另一方面,不同输入N/P比显示每个纳米颗粒中质粒的平均数量有微小的改变。当输入400 $\mu$

g/mL pDNA的输入N/P比从3变为6时,  $\bar{N}$ 从N/P=3的9.2降至N/P=4的6.1, N/P=5的5.0, N/P=6的4.4 (图12F)。

[0136] 1.4.6. pDNA/1PEI纳米颗粒的DLS尺寸与摩尔质量的相关性。当对所有三种质粒在不同条件制备的纳米颗粒的测量的重量平均摩尔质量相对于它们的流体力学体积维度(即  $D_z^3$ ) 作图时 (图4A), 出现了共同的线性相关性:

$$[0137] \quad [\bar{M}_{w, \text{纳米颗粒}}, \text{Da}] = 67.68 \times [D_z, \text{nm}]^3 + 1.93 \times 10^6 \quad (2)$$

[0138] 其中  $D_z$  是通过纳米颗粒悬浮液的DLS测量的z-平均尺寸, 而  $M_w$  是由SLS给出的纳米颗粒的重量平均摩尔质量。这样的不依赖于用于纳米颗粒组装的质粒和条件的对各种纳米颗粒的“普遍的”适用表明这些纳米颗粒的PEC组装单元和压缩程度是相似的。更具体地, 这些纳米颗粒具有相同的  $67.68 \text{ Da/nm}^3$  的表观流体力学密度, 即无论有多少pDNA被包装到单个纳米颗粒, pDNA都被凝聚到相同的程度。

[0139] 相似地, 也鉴定出另一种组成-尺寸相关性 (纳米颗粒的重量平均摩尔质量与回转半径的二次幂(即  $R_g^2$ ) 成线性比例) (图4B):

$$[0140] \quad [\bar{M}_{\text{纳米颗粒}}, \text{Da}] = 22,251 \times [R_g, \text{nm}]^2 + 4.17 \times 10^6 \quad (3)$$

[0141] 这种相关性很好地适用于有50nm和130nm之间的  $D_z$  的纳米颗粒, 并且随着尺寸变得小于50nm, 实验数据点的偏差增大。  $\bar{M}$  和  $R_g^2$  之间的线性关系进一步确认这些pDNA/1PEI纳米颗粒是在  $\theta$  条件下组装的; 并且PEC单元在测试的溶剂和温度条件下呈现随机堆积表现。Hiemenz和Lodge, 2007。

[0142] 如果在步骤1中形成的每条PEC链 (pDNA以及所有其结合的1PEI) 被认为是用于步骤2中纳米颗粒组装的堆积单元 (即PEC单元), 则pDNA/1PEI纳米颗粒可以被建模为包含一个或多个PEC单元的实体。纳米颗粒组装遵循量化的组合模式。由从4到6变化的N/P生成的纳米颗粒具有相似的摩尔质量, 而由N/P=3生成的纳米颗粒的摩尔质量更重但仍然落入等式2和等式3的两种线性拟合中 (图4C)。推定在输入N/P大于2.7的情况下 (其中1PEI超过了充分压缩pDNA所要求的量), 量化的组合保持有效。该模型进一步被层流混合条件 ( $\tau_M > \tau_A$ ) 下制备的纳米颗粒也遵循相关性的事实支持 (图4D)。值得注意的是, 具有较低均匀性 (即, 较宽分布) 的纳米颗粒看起来具有与每个纳米颗粒有更少的pDNA拷贝的更均匀的纳米颗粒相同的表观流体力学密度。该分析与以下假设一致: 步骤1中形成的PEC单元是纳米颗粒组装的构建单元 (building blocks), 并且它们以与在  $\theta$  条件下的溶液中PEC单元链的随机折叠相似的方式被压缩和缔合。

[0143] 1.4.7. 对湍流混合条件下FNC中pDNA/1PEI纳米颗粒组装动力学建模。基于这些发现和以上提及的纳米颗粒组装模型, 可以分析  $\tau_M < \tau_A$  条件下的组装动力学以理解用于确定每个纳米颗粒的pDNA拷贝数的浓度依赖性机制 (图4E)。步骤1中pDNA-1PEI结合 (即PEC单元形成) 的速率比步骤2中PEC压缩和缔合的速率快得多 (如从图3A、图3B、图3C得出的结论), 使得  $\tau_{\text{步骤1}} \ll \tau_{\text{步骤2}}$ , 并且  $\tau_A \cong \tau_{\text{步骤2}}$ 。

[0144] 特征性组装时间  $\tau_A$  推定地受到参与纳米颗粒组装的聚电解质的内在性质诸如质粒长度、1PEI结构和分子量、pDNA-1PEI结合的化学计量和空间性质等的影响。在湍流结构 (定义为  $t=0$ ) 生成后, 混合主要通过1PEI分子向pDNA溶液区域扩散而发生, 并且1PEI扩散

在 $\tau_M$ 的时间进程中进行。当1PEI扩散时,1PEI快速结合到pDNA以大约2.7的N/P比发生。当 $t \geq \tau_M$ 时,混合完成并导致几乎所有的pDNA与相同量的1PEI结合,形成即将进行到步骤2作为纳米颗粒组装的构建单元的均匀的PEC单元。在 $\theta$ 条件(图3D、图4B和等式2)下发生组装,其中PEC链-链相互作用抵消了PEC-溶剂相互作用。与单个PEC链折叠相反,多于一个-PEC链折叠和缔合没有额外的障碍。因此,无论单个纳米颗粒组装中涉及的pDNA的数量如何(即,无论最终的 $\bar{N}$ 如何),PEC单元的压缩都以相同的凝聚度结束。当使多于一个PEC单元通过以足够快以使多于一个-PEC链被压缩成单个纳米颗粒的速率扩散而接触时, $\bar{N} > 1$ 是可能的。因此,单个纳米颗粒组装中涉及的PEC单元的数量主要由 $\tau_A$ 的时间进程内的PEC扩散决定。较高的输入pDNA浓度导致湍流结构中pDNA流区域中较高的pDNA浓度,因而导致溶液中pDNA分子之间较低的平均距离,使得由于PEC单元之间较短的扩散距离,更多的PEC单元可以在类似于 $\tau_A$ 的时间尺度内缔合。因此,有可能在FNC过程中定义的动力学控制的混合条件(即当 $\tau_M < \tau_A$ 时)明确控制要包装到单个纳米颗粒中的pDNA的数量。

[0145] 基于以上分析,如果输入pDNA浓度足够低,以至于任何两个pDNA分子之间的平均距离太大以至于它们不能经 $\tau_A$ 的时间尺度扩散至彼此,可能产生含单个质粒的纳米颗粒。利用重量平均摩尔质量和纳米颗粒尺寸的相关性(图4A),对本研究中测试的质粒(4.4kb至6.7kb),当 $c \rightarrow 0$ 时外推尺寸极限落入30nm和40nm之间(图2D),代表含有仅一个pDNA/纳米颗粒的pDNA/1PEI纳米颗粒的典型尺寸。由于移液的混合动力学控制差,这种小尺寸和单pDNA有效载荷从未通过移液实现,如图10中用25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的最低输入pDNA浓度所示的。

[0146] 1.4.8. 具有不同pDNA拷贝数/纳米颗粒的pDNA/1PEI纳米颗粒的转染效率。使用不同浓度的gWiz-Luc质粒,在FNC装置中以20mL/min的流量与 $\bar{N} = 1.7$ (输入 $c = 100\mu\text{g}/\text{mL}$ )、3.5(输入 $c = 200\mu\text{g}/\text{mL}$ )、6.1(输入 $c = 400\mu\text{g}/\text{mL}$ )和21.8(输入 $c = 800\mu\text{g}/\text{mL}$ )生成纳米颗粒。利用这一系列纳米颗粒,检查了 $\bar{N}$ 对这些纳米颗粒的体外和体内转染效率的影响。重要的是注意到这些纳米颗粒的尺寸也是不同的,即使表面电荷(zeta电位)和组成(结合和游离的1PEI分数)是相同的(表3)。

[0147] 表3. 体外和体内测试的具有不同平均pDNA拷贝数/纳米颗粒( $\bar{N}$ )的纳米颗粒的特征的总结

	FNC 输入 pDNA 浓度	$\bar{N}$	流体力学尺 寸* (nm)	zeta 电位* (mV)	结合的 PEI 百分比(%)	游离 PEI/ $\mu\text{g}$ pDNA 剂量 ( $\mu\text{M}$ )
[0148]	100	1.7	49.4 $\pm$ 0.5	+42.3 $\pm$ 1.5	73.1 $\pm$ 0.7	3.24 $\pm$ 0.08
	200	3.5	63.4 $\pm$ 0.5	+41.1 $\pm$ 1.8	69.1 $\pm$ 1.2	3.64 $\pm$ 0.12
	400	6.1	88.8 $\pm$ 0.6	+41.6 $\pm$ 1.8	69.7 $\pm$ 2.6	3.63 $\pm$ 0.32
	800	21.8	132.1 $\pm$ 0.6	+39.7 $\pm$ 0.7	67.2 $\pm$ 2.1	3.94 $\pm$ 0.26

[0149] \*数据以平均值 $\pm$ 标准偏差的形式显示,其中 $n = 3$ 次测量。

[0150] 之前的报告展示出,由于表面接触、亲合力和运送动力学的差异,细胞摄取对纳米颗粒的尺寸的依赖性。Hickey等人,2015。3H-标记的pDNA用于组装具有不同的 $\bar{N}$ 的纳米颗粒(见1.6节)以评估经与PC3前列腺癌细胞进行的4小时孵育时间段的其细胞摄取。数据显示这些纳米颗粒组中没有差异(图5A)。由于转染测试的总pDNA剂量是固定的(每 $1 \times 10^4$ 个

细胞 $0.6\mu\text{g}$ , 24孔板中 $5 \times 10^4$ 个/孔), 测得的纳米颗粒摄取(从总的给药的纳米颗粒中)的总分数是每个细胞可用的纳米颗粒总数和摄取率的函数。据推定, 有较高的 $\bar{N}$ 的制剂具有数量上较少的纳米颗粒, 并且因此具有较高的细胞摄取率。每个被考虑的时间点有相似的摄取pDNA的量,  $\bar{N} = 6.1$ 和21.8可以在细胞内递送过程(诸如内体逃逸(endosomal escape)、pDNA解离和核转运)中具有更高的效率。在先前的文献报道中, pDNA/1PEI纳米颗粒在静脉内(i.v.)注射后通常在肺中给予转染和转基因活性。Boeckle等人, 2004。在PC3癌细胞系中的体外转染效率实验显示,  $\bar{N} = 6.1$ 和21.8具有相似的转染效率水平, 远远高于 $\bar{N} = 1.7$ 或3.5的转染效率水平(图5B)。

[0151] 与体外发现一致,  $\bar{N} = 1.7$ 显示出比其他制剂明显更低的转染效率, 而且对具有 $\bar{N} = 3.5$ 、 $6.1$ 和21.8的纳米颗粒有感知趋势, 即更高的 $\bar{N}$ 给出更好的转染效率(图5C和图14)。通过以 $30\mu\text{g}$  pDNA/小鼠的剂量i.v.注射 $^3\text{H}$ -标记的纳米颗粒, 在Balb/c小鼠中进行生物分布研究。纳米颗粒给药后1小时处死小鼠, 并收集主要器官和血液样品并称重。生物样品被溶解, 并且溶液进行液体闪烁评估以定量样品中的 $^3\text{H}$ -标记的pDNA。结果揭示出所有制剂纳米颗粒在1小时内向器官和组织中的快速分布(>95%)。这些纳米颗粒的分布模式相似, 除了具有1.7的 $\bar{N}$ 的那些导致较少的纳米颗粒沉积在肺中(图5D和图15A); 并且经由脾的清除更显著(图15C)。对所有的组, 与5%-8%的到肺的剂量相比, 即使总剂量的42%-45%最终进到肝中(图15B), 肝中并没有可检测到的转基因表达水平。这可能是由于肝中的库普弗(Kupffer)细胞对纳米颗粒的快速清除和降解。Tsoi等人, 2016。

[0152] 这些纳米颗粒中体内递送效率的较小差异可能是由于以下事实: pDNA/1PEI纳米颗粒与血清组分强烈相互作用并在i.v.注射后迅速聚集, 导致在肺微血管中截留并被肝和肺中的内吞细胞大量摄取(Ogris等人, 1999), 这将掩蔽由于控制 $\bar{N}$ 而导致的有效载荷能力的差异。鉴定具有较低的调理和聚集倾向的纳米颗粒(例如PEG化的纳米颗粒)以及理解血清包被的机制会有助于更好地揭示具有定义的组成和尺寸的纳米颗粒对体内转染效率的详细影响。

[0153] 1.4.9. 动力学控制条件下制备的pDNA/1PEI纳米颗粒的pDNA有效载荷和PEI组成(即结合的PEI浓度对比游离PEI浓度)对其体外和体内转染效率的影响。以上初步研究揭示, 具有6或更高的 $\bar{N}$ 的纳米颗粒比具有更低质粒有效载荷的纳米颗粒在体外和体内显示出更好的转染效率。然后在不同的N/P比检查在湍流混合条件( $Q = 20\text{mL}/\text{min}$ ,  $\tau_M = 15\text{ms} < \tau_A$ )下制备的纳米颗粒, 并将其与在 $Q = 5\text{mL}/\text{min}$ ,  $\tau_M = 790\text{ms} \gg \tau_A$ 下制备的纳米颗粒比较。用gWiz-Luc质粒制备了两个系列的纳米颗粒, 其中详细特征在表4中显示。

表4. 用不同混合条件和 N/P 比制备的 pDNA/PEI 纳米颗粒

纳米颗粒 代码	质粒	Q (mL/min)	输入 N/P	$D_z$ (nm)	$\bar{N}$
W1	gWiz-Luc	20	3	$88.8 \pm 0.6$	9.1
W2			4	$81.2 \pm 0.2$	6.1
W3			5	$79.3 \pm 1.0$	5.0
W4			6	$77.5 \pm 0.7$	4.4
W5		5	3	$153.0 \pm 3.7$	40.7*
W6			4	$158.9 \pm 1.0$	45.6*
W7			5	$148.1 \pm 0.9$	37.0*
W8			6	$155.5 \pm 0.8$	42.8*
W9			移液	6	$171.2 \pm 1.2$
P1	PEG-fLuc	20	3	$81.4 \pm 0.2$	8.1*
P2			4	$86.0 \pm 0.9$	9.5*
P3			5	$82.7 \pm 0.6$	8.5*
P4		6	$81.0 \pm 0.1$	8.0*	
P5		5	3	$146.9 \pm 1.9$	45.7*
P6			4	$151.1 \pm 0.6$	49.7*

[0155]

[0156] 表4. 用不同混合条件和N/P比制备的pDNA/1PEI纳米颗粒

纳米颗粒 代码	质粒	Q (mL/min)	输入 N/P	$D_z$ (nm)	$\bar{N}$
P7			5	$145.6 \pm 2.9$	44.5*
P8			6	$134.1 \pm 2.4$	34.9*

[0158] \*根据等式2和7计算。

[0159] 首先,用gWiz-Luc质粒制备的所有纳米颗粒在PC3癌细胞系中进行测试(图6A)。对于两组纳米颗粒(W1-4和W5-8),更高的N/P比(即,因此更高的游离PEI分数)产生更高的转染效率,这与先前的文献报道一致。Boeckle等人,2004;Klauber等人,2016。

[0160] 具有较低的有效载荷的纳米颗粒显示出比具有较高的有效载荷的纳米颗粒更好的性能,特别是对于N/P=4和6。然后将相同组的纳米颗粒施用于Balb/c小鼠,并在注射后12小时、24小时和48小时的时间点监测它们在肺中的转染效率。结果(图6B和图17)显示与体外实验相似的模式。对于低有效载荷和高有效载荷纳米颗粒二者,以3的N/P比制备的纳米颗粒的转基因表达活性是低的。在N/P=4的情况,具有低有效载荷( $\bar{N}=6.1$ )的纳米颗粒比具有高有效载荷( $\bar{N}=45.6$ )的纳米颗粒更有效。N/P=4、 $\bar{N}=6.1$ 的制剂以及在N/P=5和6制备的纳米颗粒的转基因活性,显示出相似的荧光素酶表达水平,无论有效载荷水平 $\bar{N}$ 如何。

[0161] 来自本系列的四种选定的纳米颗粒制剂的生物分布也被表征,其中它们的转染效率具有最大的不同:具有较低的有效载荷和较低的N/P比的纳米颗粒(表4,W1:N/P=3且 $\bar{N}=9.1$ ,W2:N/P=4且 $\bar{N}=6.1$ ),和具有较高的有效载荷和较高的N/P比的纳米颗粒(表4,W6:N/P=4且 $\bar{N}=45.6$ ,W8:N/P=6且 $\bar{N}=42.8$ )。在Balb/c小鼠中,3H-标记的纳米颗粒被以

与用于图6B和图6C相同的剂量*i.v.*注射。注射的纳米颗粒剂量的大部分(>95%) 在1小时内分布到组织和器官(图6E)。与其他纳米颗粒制剂相比,W1纳米颗粒具有最低的分布到肺中的纳米颗粒分数(1.4%) (图6D,图6E)、具有最高的分布到肝(54.0%,虽然没有统计显著性)和脾(6.0%)的分布水平(图19),与肺中最低的转染效率相关。W2显示出与W8相似的分布到肺的分布水平(图6D,图6E),这与这两种制剂之间相似的转基因表达水平相关(图6C)。尽管W6产生了与W2相似的生物分布剖面,但给出比W2显著更低的转染效率。这可以归因于如体外研究中显示的有效性较差的细胞内递送效率(图6A)以及递送至肺的纳米颗粒的数量的7.5倍减少。对于较低有效载荷的纳米颗粒制剂,更大数量的纳米颗粒可以促进更高数量的细胞中的更多转染事件。另一方面,这些纳米颗粒的较小尺寸可以影响纳米颗粒在组织中的运送以及对于肿瘤组织的可及性。比较W6和W8纳米颗粒,即使它们的有效载荷( $\bar{N}=45.6$ 和42.8)及尺寸( $D_g=158.9\text{nm}$ 和 $155.5\text{nm}$ )是相似的,较高水平的游离1PEI(图3B, 1.75mM对比0.74mM)导致较低水平的肝清除(图6D和图19A)。与较高的细胞内递送效率(图6A)一起,这一因素可能对肺中相对较高的转基因表达活性负责。

[0162] 1.4.10. 现成的冻干pDNA/1PEI纳米颗粒的扩大生产。非病毒DNA递送基因疗法的成功临床转化取决于高递送和转染效率、良好的生物相容性、可扩大的生产过程、延长的储存稳定性以及高性能一致性(即低批次间可变性)。目前通过PEC纳米颗粒全身递送pDNA的方法依赖于临施用前在诊所现场混合治疗性pDNA和体内-JetPEI®溶液(即类似于手动移液,如表4中的W9)。如预期的,纳米颗粒形成的再现性和性能一致性会难以定义(图9)。这里报道的通过FNC过程的纳米颗粒制备提供了连续且高度可扩大的和可再现的方法。使用单个台架模型(bench-model)设备,0.5克的pDNA可以在一小时内包装成pDNA/1PEI纳米颗粒,这相当于12,500剂的40 $\mu\text{g}$  pDNA/小鼠。得到的纳米颗粒悬浮液可以进行优化的冻干方案以将其变成包括9.5%w/w海藻糖作为冷冻保护剂的粉末形式(图7A)。冻干的pDNA/1PEI纳米颗粒在-20 $^{\circ}\text{C}$ 储存时持续至少9个月是稳定的。在每个时间点重构后,尺寸、PDI、zeta电位、PEI回收和DNA回收都与新鲜制备的样品一致(图7B)。重构过程简单地通过加入水而不需要涡旋,在室温放置少于1分钟后生成没有任何聚集的澄清悬浮液(图7A)。重构的pDNA/1PEI纳米颗粒维持稳定性至少4天。

[0163] 1.5总结

[0164] 本发明公开的主题结合了模拟方法和实验手段,以提供对用于允许输入pDNA和1PEI溶液的流量与特征性混合时间相关的pDNA/1PEI纳米颗粒的FNC组装的CIJ微室中的混合动力学的详细理解。通过控制混合动力学使得溶液能够在微室中湍流混合,展示了对纳米颗粒尺寸、表面电荷和组成的明确控制,具有高均匀性和可扩大性。由对FNC组装的pDNA/1PEI纳米颗粒的静态光散射测量和组成分析,领会了纳米颗粒流体力学尺寸和pDNA有效载荷/纳米颗粒之间的“普遍的”相关性,表明对在不同条件下用不同pDNA有效载荷组装的纳米颗粒实现了相同程度的pDNA中和及压缩。这些发现不仅允许对pDNA/1PEI纳米颗粒进行对纳米颗粒尺寸的控制以及对组成的更精细控制,而且为探索pDNA/1PEI纳米颗粒组装的动力学过程提供实验证据。确认了在形成PEC单元中pDNA和1PEI分子之间的电荷中和不是速率限制的步骤,并且发现特征性组装时间主要由PEC单元的链折叠和压缩决定。包装到每个纳米颗粒中的pDNA的数量主要由PEC单元的扩散距离(即局部pDNA浓度)决定。通过由FNC

在动力学控制的条件下以从50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 到800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 控制输入pDNA浓度,可以组装平均约1.7个至约21.8个pDNA,这与35nm至130nm的平均流体力学尺寸相关。这些良好定义的纳米颗粒使得调查pDNA有效载荷和制剂组成对这些纳米颗粒的转染效率的影响成为可能。在本研究测试的癌细胞模型中,发现纳米颗粒中中等有效载荷的质粒DNA对于体内最高的递送效率是最佳的,并且与其体外转染活性良好地相关。在健康小鼠模型和荷瘤小鼠模型二者中的体内转基因表达显示在pDNA/1PEI纳米颗粒中的中等pDNA有效载荷有利于肺中的转基因表达。这些纳米颗粒能以可扩大的方式作为在储存期间在-20 $^{\circ}\text{C}$ 保持其稳定性至少9个月的现成的冻干制剂生产。此外,这种纳米制剂易于重构和施用。由于这种方法不具体依赖于运载体结构以及质粒的长度和类型,它广泛适用于许多其他潜在的聚阳离子运载体。因此,这种FNC生产工艺为用于基因递送的非病毒纳米颗粒媒介物的临床转化提供独特的技术优势。

#### [0165] 1.6实验

[0166] 1.6.1.pDNA/体内- *jetPEI*<sup>®</sup>聚电解质复合物(PEC)纳米颗粒的制备。所有的CIJ设备由Johns Hopkins Whiting School of Engineering机器车间基于典型的CIJ设计制造。Johnson和Prud'homme,2003。体内*jetPEI*<sup>®</sup>按照所接收到的进行使用,并通过超纯水稀释至期望浓度,所述期望浓度对应于3至6的不同输入N/P比。通过NaOH或HCl将溶液的pH(无论浓度如何)调整到3.50,以跨越所有实验保持PEI分子上一致的电荷密度。在调查输入pDNA浓度对具有4的输入N/P比的纳米颗粒的影响时,pDNA由制造商在纯水中递送(表1)并通过超纯水稀释至50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度范围。通过高压注射泵以预设的流量将两种工作溶液注入CIJ室来配制PEC纳米颗粒。PEC纳米颗粒在离开CIJ后立即稳定,不需要任何额外的孵育时间,并直接进行下游表征和应用。当要求等渗条件时,在代替水的9.5%(w/w)海藻糖中制备pDNA工作溶液和PEI工作溶液。所有制剂在室温至少一个月是稳定的。对于通过移液制备的PEC纳米颗粒制备物(W9,表4),使用表2中显示的B3程序。

[0167] 1.6.2.未复合的PEI的评估。采用了先前报道(Bertschinger等人,2004)的方法。将稀释的纳米颗粒悬浮液的500 $\mu\text{L}$ 等分试样加入到Vivaspin 500离心浓缩器(PES,100,000的MWC0,Sartorius,每个样品n=4个浓缩器)中。然后将浓缩器离心1分钟以得到不含纳米颗粒而仅含未复合的PEI分子的流通溶液。将60 $\mu\text{L}$ 流通溶液的等分试样加入96孔板的一个孔中(每个过滤溶液n=3个孔)。将ProteinRed Advanced蛋白测定(PRAPA,Cytoskeleton US)溶液(200 $\mu\text{L}$ )加入孔中,并且将混合物在室温孵育10分钟。

[0168] 1.6.3.PEC纳米颗粒的表征。在25 $^{\circ}\text{C}$ 使用Malvern ZEN3690 Zetasizer进行用于尺寸测量的动态光散射(DLS)和用于zeta电位测量的相位分析光散射(PALS)。作为来自Zetasizer的最可靠的结果,获得了z-平均流体力学直径,并将其用作本研究中所有分析的PEC纳米颗粒的尺寸。由于DLS机器提供的多分散性(PDI)(其遵循ISO 13321中的程序)取决于纳米颗粒尺寸,我们使用尺寸分布宽度来评价图2A中具有不同尺寸的纳米颗粒的均匀性。该尺寸分布宽度由DLS机器作为尺寸标准偏差的标准化术语直接给出,对于单个尺寸峰:

$$[0169] \quad \text{尺寸分布宽度} = \text{DLS 尺寸标准偏差} = \left( \frac{PDI}{D_z^2} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (4)$$

[0170] zeta电位测量在低盐缓冲液(5mM NaCl)中进行以给出悬浮液的0.6mS/cm的电导

率用于可靠评估。

[0171] 1.6.4. 静态光散射 (SLS) 在 Wyatt DAWN HELEOS 18-angle 激光散射光度计上进行, 该光度计配备了具有 658nm 的波长的激光源和作为光学区室的熔融石英流动池。根据手册对机器进行了适当的校准, 其中所有激光检测器针对各向同性散射进行归一化 (3nm 葡聚糖, MW 9000-11000, Sigma US)。稀释至适当浓度的 PEC 悬浮液通过具有 450nm 或 1 $\mu$ m 的尺寸截止值的过滤器引入流动池。每个样品以 200 $\mu$ L/min 的流量运行 5 分钟以建立来自检测器的稳定信号。数据收集进行了 5 分钟以给出每个检测器的时间平均强度。从机器中出来的 PEC 纳米颗粒被收集, 并进行 DLS 和 DNA 回收评估 (通过 NanoDrop, 图 11) 以确保在过程期间纳米颗粒特征和浓度不受影响。数据处理 (生成齐姆图或德拜图) 由 Wyatt ASTRA 6.1 软件进行。对每个样品进行 n=3 次独立运行, 并且本文呈现的摩尔质量结果是平均值。在 SLS36 下 PEC 纳米颗粒可被视为由两种组分组成的共聚物以给出由光散射理论指导的重量平均摩尔质量。Hiemenz 和 Lodge, 2007。

[0172] 为了确定 PEC 纳米颗粒的折射率增量 ( $dn/dc$ ), 我们遵循先前描述的法加法则 (Dai 和 Wu, 2012):

$$[0173] \quad \left(\frac{dn}{dc}\right)_{\text{纳米颗粒}} = w_{pDNA} \left(\frac{dn}{dc}\right)_{pDNA} + w_{PEI} \left(\frac{dn}{dc}\right)_{PEI} \quad (5)$$

[0174] 其中  $w_{pDNA}$  和  $w_{PEI}$  分别是复合在 PEC 纳米颗粒中的 pDNA 和 PEI 的重量分数。 $dn/dc$  值可通过插入输入 pDNA 浓度和来自游离 PEI 评估的结果中的结合的 PEI 分数获得。基于所提出的通过 FNC 的纳米颗粒组装的模型, 对于每一个 pDNA 分子, 所有相关的结合 PEI 具有以下的摩尔质量:

$$[0175] \quad M_{\text{相关的 IPEI}} = \gamma \times \frac{c_m(\text{PEI})}{c_m(\text{pDNA})} \times M_{pDNA} \quad (6)$$

[0176] 其中  $\gamma$  是由游离 PEI 评估给出的结合 PEI 分数;  $c_m(\text{PEI})$  和  $c_m(\text{pDNA})$  分别是用于制剂的 PEI 和 pDNA 的输入质量浓度; 以及  $M_{pDNA}$  是所用 pDNA 的分子量。然后 (重量) 平均 pDNA 拷贝数/纳米颗粒可通过以下计算:

$$[0177] \quad \bar{N} = \frac{\bar{M}_{\text{纳米颗粒}}}{M_{\text{相关的 IPEI}} + M_{pDNA}} \quad (7)$$

[0178] 其中  $\bar{M}_{\text{纳米颗粒}}$  是由 SLS 给出的纳米颗粒的重量平均摩尔质量。

[0179] 1.6.5. 透射电子显微术 (TEM)。在装载样品之前, 对碳涂覆的铜网格 (Electron Microscopy Services, US) 进行 30 秒的等离子体处理 ( $N_2$  辉光放电) 以提供膜亲水性。PEC 纳米颗粒悬浮液在网格上孵育 20 分钟, 然后通过滤纸干燥。将 2% (w/v) 的醋酸铀酰溶液的 10 $\mu$ L 的等分试样滴到网格上, 孵育 1 分钟并且然后通过滤纸干燥。在成像前允许网格在通风橱下干燥 24 小时。由于染料溶液具有使得铀酰基团带正电荷以与 pDNA 分子强烈反应的低 pH, 负染色图案 (纳米颗粒位于外围有清晰的标记的染料层上) 被搜索并成像。在运行于 100kV 的 FEI Tecnai 12Twin 透射电子显微镜上进行成像。所有图像均由 Megaview III 广角相机拍摄。

[0180] 1.6.6. 体外转染活性。将 PC3 癌细胞以  $5 \times 10^4$  个细胞/孔的密度接种在 24 孔板中以形成单层细胞培养物。培养 24 小时后, 吸出每个孔中的培养基。将含有 3 $\mu$ g pDNA 的 50 $\mu$ L PEC

纳米颗粒悬浮液的等分试样加入500 $\mu$ L新鲜培养基中,涡旋20秒以混合,并将整个混合物加入每个孔中。细胞与PEC纳米颗粒一起孵育1小时至4小时。孵育后,吸出混合物,并且用PBS洗涤细胞两次,并置于新鲜培养基中。再孵育24小时后以允许细胞表达萤光素酶。为了收获,在每个孔中加入100 $\mu$ L的报告物裂解缓冲液(Promega,US),并且整个板进行两次冻融循环。进行标准萤光素酶定量测定(Promega,US)和蛋白质定量测定(Pierce BCA试剂,Thermo Scientific,US),以给出关于ng萤光素酶/mg裂解物中的总蛋白质的转染效率。对于所有测试,所测试的每组n=4个孔。

[0181] 1.6.7.体内转染效率。所有体内实验程序都由Johns Hopkins机构动物护理和使用委员会(JHU ACUC)批准。PEC纳米颗粒用30 $\mu$ g或40 $\mu$ g pDNA/小鼠的剂量以200 $\mu$ g pDNA/mL的浓度通过小鼠侧尾静脉静脉内注射。对于在制备物中具有较低输入pDNA浓度的组,纳米颗粒悬浮液由具有3,000的MWC0的Amicon Ultra-2离心过滤单元浓缩至200 $\mu$ g pDNA/mL来以相同的比例浓缩PEC和游离PEI分子二者。使用IVISR Spectrum(PerkinElmer,US)进行体内生物发光成像并且用Living Image软件(PerkinElmer,US)处理图像。感兴趣区域(ROI)定量分析结果与肺中萤光素酶蛋白丰度具有呈现线性关系的良好相关性(图16),因此组织匀浆没有被广泛用于监测转基因活性的动力学。初步测试揭示,对于健康Balb/c小鼠模型(Jackson Laboratory,US),转基因表达水平(健康肺组织或肺中肿瘤细胞的萤光素酶浓度)在注射后12小时和48小时左右达到峰值。相应地设置IVIS评估时间点,其中通过异氟醚麻醉小鼠并在i.p.注射100 $\mu$ L的30mg/mL D-萤光素(Gold Biotechnology,US)溶液和5分钟的扩散时间段后通过IVIS系统成像。对于LL2肿瘤模型,在PEC给药前3天,通过i.v.注射含有 $5 \times 10^5$ 个癌细胞的200 $\mu$ L PBS溶液进行接种。

[0182] 1.6.8.3H-标记的PEC纳米颗粒的制备。细胞摄取和生物分布研究。在纳米颗粒制备前,由以S-腺苷-L[甲基-3H]甲硫氨酸(3H-SAM)为来源进行的pDNA的甲基化来进行PEC纳米颗粒的氙标记。该过程导致pDNA上不会明显影响组装过程的微小结构变化。这种标记技术的巨大优势在于通过经由闪烁流体测定计数每分钟的崩解事件(DPM)来评估生物样品中标记的pDNA的绝对量的能力,因此理想地用于在给药PEC纳米颗粒后进行细胞摄取和生物分布研究。在工作范围内,DPM与测定中标记的pDNA量是成线性比例的(图13)。为了标记pDNA,将水、10 $\times$ NEB缓冲液(New England Biolabs,US)、3H-SAM(PerkinElmer,US)、pDNA(1mg/mL)及M.Sss1酶(New England Biolabs,US)以12:2:2:1:1(v/v)的比例加入50mL管中。

[0183] 使溶液充分混合,在37 $^{\circ}$ C孵育反应2小时并通过加热至65 $^{\circ}$ C持续>30分钟猝灭。反应混合物通过EB缓冲液进行稀释,其中用QIAprep Spin Miniprep试剂盒(Qiagen,US)纯化标记的pDNA,并且最后与未标记的pDNA混合以给出用于PEC组装的工作溶液。对于细胞摄取实验,采用与体外转染实验相同的给药方法。在每个时间点,排出含有纳米颗粒的培养基,并且细胞通过新鲜的PBS洗涤两次并且然后收获。对于生物分布研究,采用与体内转染实验相同的剂量和制剂浓度。在注射后1小时,处死动物,收获组织并称重。向组织中加入充足的SOLVABLE增溶液(PerkinElmer,US)并在70 $^{\circ}$ C孵育48小时。将组织裂解物充分混合并在7mL闪烁瓶中将100 $\mu$ L的每个样品(n=3个独立测量)加入到4mL Ultima Gold闪烁混合液(PerkinElmer,US)中。DPM由Tri-Carb 2200CA液体闪烁分析仪(Packard Instrument Company,US)以5分钟的测量时间进程进行评估。

[0184] 实施例2

[0185] 对比实施例-快速纳米复合FNC-组装的纳米颗粒与通过批量混合制备的纳米颗粒的组成的比较

[0186] 如上文提供的,本发明公开的DNA纳米颗粒的组成关于平均DNA数量/颗粒、平均颗粒尺寸和尺寸分布、良好定义的DNA和聚合物含量以及呈冻干和储存稳定(shelf-stable)形式的颗粒制剂是独特的。其他报道的DNA纳米颗粒制剂没有完全相同的组成报告,因此很难直接比较这些基准参数中的一些。然而,有具体的物理性质测量可以提供关于本发明公开的FNC-生产的纳米颗粒和那些用批量混合方法(例如移液方法)生产的纳米颗粒之间的独特差异的证据。

[0187] 本发明公开的FNC-组装的纳米颗粒相比于由移液方法生成的纳米颗粒具有不同的物理性质,所述移液方法为以实验室规模使用的普通批量制备方法。移液方法在本文作为批量混合制备的对比实施例提供。注意,以下结果是在0.4mL至1.0mL总体积的批次规模制备的。在更大的批次尺寸,所得的纳米颗粒远不是良好定义的而且更有可能生成聚集体。

[0188] 用在200 $\mu$ g/mL的相同质粒浓度、在3.5的1PEI溶液的pH、在9.5%w/w的海藻糖浓度以及在4或6的N/P比(例如由PEI制造商推荐的最低水平)制备时,FNC-组装的纳米颗粒更均匀,具有接近约80nm的平均尺寸,与平均pDNA有效载荷为5个至10个质粒/纳米颗粒(取决于质粒尺寸)相关,相比之下,由批量混合生成的纳米颗粒不太均匀、具有更大的160nm的平均尺寸并且对应于多于40个质粒/纳米颗粒的平均pDNA有效载荷。

[0189] 此外,相比于由本发明公开的FNC方法(图20B)制备的纳米颗粒,由本领域已知的批量混合方法(图20A)生成的纳米颗粒的尺寸和有效载荷的再现性差得多并且具有更高的变化程度。这些结果表明,本发明公开的FNC方法提供低得多的水平的在制剂之间和操作者之间的批次间差异。进一步地,纳米颗粒的质量取决于移液的精确实践,包括移液的溶液、移液速度以及如何或是否进行额外的混合方法(诸如涡旋)。一些移液实践得到在制备后数小时内不稳定的聚集体(见图21A)。相反,本发明公开的FNC-组装的纳米颗粒在产生后在室温至少96小时是稳定的(图21B)。

[0190] 下面的表6提供本发明公开的FNC-纳米颗粒和批量混合生成的纳米颗粒之间的更详细的比较。

[0191] 实施例3

[0192] 对比实施例-快速纳米复合FNC组装的纳米颗粒与由批量混合制备的纳米颗粒的转染效率和毒性的比较

[0193] 与在相同制备条件(N/P=4)下经由批量混合制备的纳米颗粒相比,本发明公开的FNC纳米颗粒的独特组成和性质转化为高转染效率(见表6)。本发明公开的FNC纳米颗粒显示出较低的体内毒性(表6)。当以40 $\mu$ g pDNA/小鼠给药时,与在4的N/P比的FNC-组装的纳米颗粒相比,由在6的N/P比的批量混合生成的纳米颗粒导致严重的毒性,具有在注射后不久1/5动物死亡,更高的丙氨酸氨基转移酶(ALT)水平和肝中的显著坏死。使用FNC在相同的6的N/P比产生纳米颗粒使得到的坏死面积减少了近两倍。在所有纳米颗粒制剂中,在4的N/P比的FNC-组装的纳米颗粒表现出最低的肝毒性水平,具有最低的ALT血清水平增加。进一步地,在FNC纳米颗粒(组)中观察到如由组织学检查评估的坏死部位的低频率(<5%)。

方法		FNC-组装的	移液 (批量混合)	移液 (批量混合)
制备条件	N/P 比	4	4	6
	质粒浓度	200 µg/mL	200 µg/mL	200 µg/mL
	制备中 PEI 的 pH	3.5	3.5	3.5
	流量	20 mL/min	N/A	N/A
组成	尺寸	80 nm	变化的 总是 > 160 nm	变化的 总是 > 160 nm
	pDNA/纳米颗粒	5-10 取决于质粒尺寸	总是 > 40	总是 > 40
	游离 PEI 浓度	0.7 mM	0.7 mM	1.8 mM
物理性质	均匀性	在 TEM 下均匀; 在 DLS 下 PDI 总是 < 0.25	在 TEM 下非均匀; 在 DLS 下 PDI 经常 > 0.25	
	制备后的稳定性	室温中稳定至少 4 天	室温下用某些移液实践可能在数小时内聚集	
生产能力	任何两批次之间的 再现性	好 总是 < 10 nm	差 有时 > 60 nm	
	生产可扩大性	480 mg pDNA/小时/设备 连续生产	0.2 mg/批 (2 mL 批次) 50 批/小时 (10 mg/小时) 批次模式	

[0194]

[0195]

方法		FNC-组装的	移液 (批量混合)	移液 (批量混合)
生物活性	肺中转染效率*	高	低	高
	肝毒性	低 坏死区域 < 5% 对于所有小鼠	轻度至中等 坏死区域 ≥ 5% 偶尔	严重 坏死区域 > 10% 对于所有小鼠

[0196] \*以 40µgDNA/小鼠的剂量进行测试。

[0197] 实施例 4

[0198] 哺乳动物细胞展示

[0199] 哺乳动物展示是一种用于从在细胞表面上表达的分子组合文库中选择亲和试剂的强大方法。质粒 DNA 分子文库可用于表达不同蛋白质的文库,所述不同蛋白质可以使用前导序列(例如 Igκ)和膜跨越区(例如 PGFR)被引导到细胞膜。不同结合结构域(诸如抗体可变区)的文库可以然后暴露在膜的细胞外侧并自由结合靶配体(例如癌症抗原)。靶抗原可以用生物素标记并用链霉抗生物素蛋白-R-藻红蛋白检测,例如,使得表达对配体有合适亲和力的文库成员的细胞结合配体和标记并且可以使用流式细胞术从非结合克隆群体中选择。DNA 质粒可以然后从细胞中分离、转化并在例如大肠杆菌中生长。DNA 质粒克隆可以被转染回哺乳动物细胞而且该程序可以被重复。因此,在连续几轮的表达、结合、分选和富集之后,可以从大的组合群体(包含结合物和非结合物)中分离出对靶配体具有高亲和力的小结合群体。

[0200] 为了使选择过程有效,每个细胞应当转染有限数量的质粒,否则表达非结合物的质粒和表达结合物的质粒二者都不会充分分离到不同的细胞中,并且会在流式细胞术中一起富集,因为例如抗体片段的异质群体会在每个细胞表面上表达。因此,希望每个细胞转染一个质粒或几个质粒(few plasmids),使得每个细胞表达一个(或几个(a few))抗体克隆,并且在每个选择循环通过流式细胞术从非结合克隆中有效地选择表达具有最高亲和力的抗体片段的克隆,并实现富集。

[0201] 虽然用于哺乳动物展示的方法在本领域中是已知的(见,例如Ho和Pastan,2009),但是用于实现定义的数量质粒/纳米颗粒的包装的方法不是已知的。上文提供的实施例描述了包装约1个质粒/纳米颗粒至约50个质粒/纳米颗粒之间并实现高转染水平的方法。出于文库目的,使用约1个纳米颗粒/细胞和约10个纳米颗粒/细胞之间(含有约1个质粒至约50个质粒之间)适于实现低数量的质粒克隆/细胞的转染,并因此实现在哺乳动物展示方法中的有效富集。

[0202] 参考文献

[0203] 在说明书中提到的所有出版物、专利申请、专利和其他参考文献表示本发明公开的主题所属领域的技术人员的水平。说明书中提及的所有出版物、专利申请、专利和其他参考文献(例如网站、数据库等)通过引用以其整体并入本文,其程度与每个单独出版物、专利申请、专利和其他参考文件被具体地和单独地指明为通过引用并入相同。将理解的是,尽管本文提到了许多专利申请、专利和其他参考文献,但这样的参考文献并不构成对这些文件中的任何一个文件构成了本领域公知常识的一部分的承认。在说明书与任何并入的参考文献之间存在冲突的情况下,应以说明书(包括可以基于并入的参考文献的任何修改)为准。除非另外指明,本文使用的是标准的技术上接受的术语的含义。本文使用了各种术语的标准缩写。

[0204] Barreleiro,P.C.A.;Lindman,B.,The Kinetics of DNA-Cationic Vesicle Complex Formation.The Journal of Physical Chemistry B 2003,107(25),6208-6213.

[0205] Baum,C.;O.Kustikova,U.Modlich,Z.Li,B.Fehse,Hum Gene Ther2006,17,253.

[0206] Beh,C.W.;Pan,D.;Lee,J.;Jiang,X.;Liu,K.J.;Mao,H.Q.;Wang,T.H.Direct interrogation of DNA content distribution in nanoparticles by a novel microfluidics-based single-particle analysis.Nano Lett 2014,14,4729-35.

[0207] Berret,J.-F.,Evidence of overcharging in the complexation between oppositely charged polymers and surfactants.The Journal of Chemical Physics2005,123(16),164703.

[0208] Bertrand,N.;J.Wu,X.Xu,N.Kamaly,O.C.Farokhzad,Advanced Drug Delivery Reviews 2014,66,2.

[0209] Bertschinger,M.;Chaboche,S.;Jordan,M.;Wurm,F.M.,A spectrophotometric assay for the quantification of polyethylenimine in DNA nanoparticles.Anal Biochem 2004,334(1),196-198.

[0210] Bessis,N.,GarciaCozar,F.J.,Boissier,M.C.,Gene Ther 2004,11 Suppl1, S10.

[0211] Bhang,H.-e.C.;Gabrielson,K.L.;Laterra,J.;Fisher,P.B.;Pomper,M.G.,

Tumor-specific imaging through progression elevated gene-3promoter-driven gene expression. *Nature Medicine* 2010,17,123.

[0212] Blanco, E.; Shen, H.; Ferrari, M., Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nature Biotechnology* 2015,33, 941.

[0213] Boeckle, S.; von Gersdorff, K.; van der Piepen, S.; Culmsee, C.; Wagner, E.; Ogris, M., Purification of polyethylenimine polyplexes highlights the role of free polycations in gene transfer. *The Journal of Gene Medicine* 2004,6(10), 1102-1111.

[0214] Bonnet, M.-E.; P. Erbacher, A.-L. Bolcato-Bellemin, *Pharmaceutical Research* 2008,25,2972.

[0215] Buscail, L.; B. Bournet, F. Vernejoul, G. Cambois, H. Lulka, N. Hanoun, M. Dufresne, A. Meulle, A. Vignolle-Vidoni, L. Ligat, N. Saint-Laurent, F. Pont, S. Dejean, M. Gayral, F. Martins, J. Torrisani, O. Barbey, F. Gross, R. Guimbaud, P. Otal, F. Lopez, G. Tiraby, P. Cordelier, *Mol Ther* 2015,23,779.

[0216] Chauhan, V. P., Jain, R. K., *Nature Materials* 2013,12,958.

[0217] Chollet, P.; Favrot, M. C.; Hurbin, A.; Coll, J.-L., Side-effects of a systemic injection of linear polyethylenimine-DNA complexes. *The Journal of Gene Medicine* 2002,4(1),84-91.

[0218] Curtis, K. A.; Miller, D.; Millard, P.; Basu, S.; Horkay, F.; Chandran, P. L., Unusual Salt and pH Induced Changes in Polyethylenimine Solutions. *PLOS ONE* 2016,11(9), e0158147.

[0219] D'Addio, S. M.; Prud'homme, R. K. Controlling drug nanoparticle formation by rapid precipitation. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2011,63,417-426.

[0220] D'Addio, S. M.; Saad, W.; Ansell, S. M.; Squiers, J. I.; Adamson, D. H.; Herrera-Alonso, M.; Wohl, A. R.; Hoyer, T. R.; Macosko, C. W.; Mayer, L. D.; Vauthier, C.; Prud'homme, R. K. Effects of block copolymer properties on nanocarrier protection from in vivo clearance. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society* 2012,162,208-217.

[0221] D'Addio, S. M.; Baldassano, S.; Shi, L.; Cheung, L. L.; Adamson, D. H.; Bruzek, M.; Anthony, J. E.; Laskin, D. L.; Sinko, P. J.; Prud'homme, R. K. Optimization of cell receptor-specific targeting through multivalent surface decoration of polymeric nanocarriers. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society* 2013,168,41-49.

[0222] Dai, Z.; Wu, C., How Does DNA Complex with Polyethylenimine with Different Chain Lengths and Topologies in Their Aqueous Solution Mixtures? *Macromolecules* 2012,45(10),4346-4353.

[0223] Dubin, P.; Bock, J.; Davis, R.; Schulz, D. N.; Thies, C., *Macromolecular complexes in chemistry and biology*. Springer Science & Business Media: 2012.

- [0224] Feng, Q.; Sun, J.; Jiang, X., Microfluidics-mediated assembly of functional nanoparticles for cancer related pharmaceutical applications. *Nanoscale* 2016, 8 (25), 12430-12443.
- [0225] Gindy, M.E.; Ji, S.X.; Hoye, T.R.; Panagiotopoulos, A.Z.; Prud'homme, R.K. Preparation of Poly(ethylene glycol) Protected Nanoparticles with Variable Bioconjugate Ligand Density. *Biomacromolecules* 2008, 9, 2705-2711.
- [0226] Ginn, S.L.; I.E. Alexander, M.L. Edelstein, M.R. Abedi, J. Wixon, J. *Gene Med* 2013, 15, 65.
- [0227] Han, J.; Zhu, Z.X.; Qian, H.T.; Wohl, A.R.; Beaman, C. I.; Hoye, T.R.; Macosko, C.W. A simple confined impingement jets mixer for flash nanoprecipitation. *J Pharm Sci-US* 2012, 101, 4018-4023.
- [0228] He, Z.; Santos, J.L.; Tian, H.; Huang, H.; Hu, Y.; Liu, L.; Leong, K.W.; Chen, Y.; Mao, H.-Q., Scalable fabrication of size-controlled chitosan nanoparticles for oral delivery of insulin. *Biomaterials* 2017, 130, 28-41.
- [0229] He, Z.; Hu, Y.; Nie, T.; Tang, H.; Zhu, J.; Chen, K.; Liu, L.; Leong, K.W.; Chen, Y.; Mao, H.-Q., Size controlled lipid nanoparticle production using turbulent mixing to enhance oral DNA delivery. *Acta Biomaterialia* 2018, 81, 195-207.
- [0230] Hickey, J.W.; Santos, J.L.; Williford, J.-M.; Mao, H.-Q., Control of polymeric nanoparticle size to improve therapeutic delivery. *Journal of Controlled Release* 2015, 219, 536-547.
- [0231] Hiemenz, P.C.; Lodge, T.P., *Polymer chemistry*. CRC press: 2007.
- [0232] Ho, M.; Pastan, I. *Mammalian Cell Display for Antibody Engineering*. *Methods Mol Biol*. 2009; 525: 337-52.
- [0233] Ho, Y.P.; Grigsby, C.L.; Zhao, F.; Leong, K.W. Tuning Physical Properties of Nanocomplexes through Microfluidics-Assisted Confinement. *Nano Lett* 2011, 11, 2178-2182.
- [0234] Jere, D.; H.L. Jiang, R. Arote, Y.K. Kim, Y.J. Choi, M.H. Cho, T. Akaike, C.S. Cho, *Expert Opinion on Drug Delivery* 2009, 6, 827.
- [0235] Johnson, B.K.; Prud'homme, R.K. Chemical processing and micromixing in confined impinging jets. *Aiche J* 2003, 49, 2264-2282.
- [0236] Johnson, B.K.; Prud'homme, R.K. Flash NanoPrecipitation of organic actives and block copolymers using a confined impinging jets mixer. *Aust J Chem* 2003, 56, 1021-1024.
- [0237] Johnson, B.K.; Prud'homme, R.K. Mechanism for rapid self-assembly of block copolymer nanoparticles. *Physical review letters* 2003, 91, 118302.
- [0238] Juul, S.; Nielsen, C. J. F.; Labouriau, R.; Roy, A.; Tesauro, C.; Jensen, P. W.; Harmsen, C.; Kristoffersen, E. L.; Chiu, Y. -L.; Frohlich, R.; Fiorani, P.; Cox-Singh, J.; Tordrup, D.; Koch, J.; Bienvenu, A. -L.; Desideri, A.; Picot, S.; Petersen, E.; Leong, K. W.; Ho, Y. -P.; Stougaard, M.; Knudsen, B. R., Droplet Microfluidics Platform for

Highly Sensitive and Quantitative Detection of Malaria-Causing Plasmodium Parasites Based on Enzyme Activity Measurement. *ACS Nano* 2012,6(12),10676-10683.

[0239] Kamaly, N.; Xiao, Z.; Valencia, P. M.; Radovic-Moreno, A. F.; Farokhzad, O. C. Targeted polymeric therapeutic nanoparticles: design, development and clinical translation. *Chemical Society reviews* 2012,41,2971-3010.

[0240] Kasper, J. C.; Schaffert, D.; Ogris, M.; Wagner, E.; Friess, W., The establishment of an up-scaled micromixer method allows the standardized and reproducible preparation of well-defined plasmid/LPEI polyplexes. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2011,77(1),182-185.

[0241] Klauber, T. C. B.; Sondergaard, R. V.; Sawant, R. R.; Torchilin, V. P.; Andresen, T. L., Elucidating the role of free polycations in gene knockdown by siRNA polyplexes. *Acta Biomaterialia* 2016,35,248-259.

[0242] Kolishetti, N.; Dhar, S.; Valencia, P. M.; Lin, L. Q.; Kamik, R.; Lippard, S. J.; Langer, R.; Farokhzad, O. C. Engineering of self-assembled nanoparticle platform for precisely controlled combination drug therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010,107,17939-44.

[0243] Lai, E.; van Zanten, J. H., Monitoring DNA/Poly-L-Lysine Polyplex Formation with Time-Resolved Multiangle Laser Light Scattering. *Biophysical Journal* 2001,80(2),864-873.

[0244] Lewis, D. R.; Petersen, L. K.; York, A. W.; Zablocki, K. R.; Joseph, L. B.; Kholodovych, V.; Prud'homme, R. K.; Urich, K. E.; Moghe, P. V. Sugar-based amphiphilic nanoparticles arrest atherosclerosis in vivo. *P Natl Acad Sci USA* 2015,112,2693-2698.

[0245] Lim, J. M.; Swami, L. M.; Gilson, S.; Chopra, S.; Choi, J.; Wu, R.; Langer, R.; Karnik, O. C.; Farokhzad, ACS *Nano* 2014,8,6056.

[0246] Liu, D.; Cito, S.; Zhang, Y.; Wang, C.-F.; Sikanen, T. M.; Santos, H. A., A Versatile and Robust Microfluidic Platform Toward High Throughput Synthesis of Homogeneous Nanoparticles with Tunable Properties. *Advanced Materials* 2015,27(14),2298-2304.

[0247] Liu, D.; Zhang, H.; Cito, S.; Fan, J.; Makila, E.; Salonen, J.; Hirvonen, J.; Sikanen, T. M.; Weitz, D. A.; Santos, H. A., Core/Shell Nanocomposites Produced by Superfast Sequential Microfluidic Nanoprecipitation. *Nano Letters* 2017,17(2),606-614.

[0248] Liu, Y.; Fox, R. O., CFD predictions for chemical processing in a confined impinging-jets reactor. *AIChE Journal* 2006,52(2),731-744.

[0249] Liu, Y.; Cheng, C.; Liu, Y.; Prud'homme, R. K.; Fox, R. O., Mixing in a multi-inlet vortex mixer (MIVM) for flash nano-precipitation. *Chemical Engineering Science* 2008,63(11),2829-2842.

- [0250] Lu, M.; Ho, Y.-P.; Grigsby, C.L.; Nawaz, A.A.; Leong, K.W.; Huang, T.J., Three-Dimensional Hydrodynamic Focusing Method for Polyplex Synthesis. *ACS Nano* 2014, 8(1), 332-339.
- [0251] Lu, M.; Ozcelik, A.; Grigsby, C.L.; Zhao, Y.; Guo, F.; Leong, K.W.; Huang, T.J., Microfluidic hydrodynamic focusing for synthesis of nanomaterials. *Nano Today* 2016, 11(6), 778-792.
- [0252] Luo, H.Y.; Santos, J.L.; Herrera-Alonso, M. Toroidal structures from brush amphiphiles. *Chem Commun* 2014, 50, 536-538.
- [0253] Mangraviti, A.; Tzeng, S.Y.; Kozielski, K.L.; Wang, Y.; Jin, Y.; Gullotti, D.; Pedone, M.; Buaron, N.; Liu, A.; Wilson, D.R.; Hansen, S.K.; Rodriguez, F.I.; Gao, G.D.; DiMeco, F.; Brem, H.; Olivi, A.; Tyler, B.; Green, J.J. Polymeric nanoparticles for nonviral gene therapy extend brain tumor survival *in vivo*. *ACS Nano* 2015, 9, 1236-49.
- [0254] Mastorakos, P.; da Silva, A.L.; Chisholm, J.; Song, E.; Choi, W.K.; Boyle, M.P.; Morales, M.M.; Hanes, J.; Suk, J.S. Highly compacted biodegradable DNA nanoparticles capable of overcoming the mucus barrier for inhaled lung gene therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2015.
- [0255] Minn, I.; Bar-Shir, A.; Yarlagadda, K.; Bulte, J.W.M.; Fisher, P.B.; Wang, H.; Gilad, A.A.; Pomper, M.G., Tumor-specific expression and detection of a CEST reporter gene. *Magnetic Resonance in Medicine* 2015, 74(2), 544-549.
- [0256] Mittal, R.; Dong, H.; Bozkurttas, M.; Najjar, F.M.; Vargas, A.; von Loebbecke, A., A versatile sharp interface immersed boundary method for incompressible flows with complex boundaries. *Journal of Computational Physics* 2008, 227(10), 4825-4852.
- [0257] Mura, S., J. Nicolas, P. Couvreur, *Nature Materials* 2013, 12, 991.
- [0258] Murday, J.S.; Siegel, R.W.; Stein, J.; Wright, J.F. Translational nanomedicine: status assessment and opportunities. *Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine* 2009, 5, 251-73.
- [0259] Nikoubashman, A.; Lee, V.E.; Sosa, C.; Prud'homme, R.K.; Priestley, R.D.; Panagiotopoulos, A.Z., Directed Assembly of Soft Colloids through Rapid Solvent Exchange. *ACS Nano* 2016, 10(1), 1425-1433.
- [0260] Ogris, M.; Brunner, S.; Schuller, S.; Kircheis, R.; Wagner, E., PEGylated DNA/transferrin-PEI complexes: reduced interaction with blood components, extended circulation in blood and potential for systemic gene delivery. *Gene Therapy* 1999, 6, 595.
- [0261] Osada, K.; Shiotani, T.; Tockary, T.A.; Kobayashi, D.; Oshima, H.; Ikeda, S.; Christie, R.J.; Itaka, K.; Kataoka, K., Enhanced gene expression promoted by the quantized folding of pDNA within polyplex micelles. *Biomaterials* 2012, 33(1),

325-332.

[0262] Pack, D.W.; Hoffman, A.S.; Pun, S.; Stayton, P.S., *Nature Reviews Drug Discovery* 2005, 4, 581.

[0263] Pagels, R.F.; Edelstein, J.; Tang, C.; Prud'homme, R.K., *Controlling and Predicting Nanoparticle Formation by Block Copolymer Directed Rapid Precipitations*. *Nano Letters* 2018, 18 (2), 1139-1144.

[0264] Patnaik, S.; K.C. Gupta, *Expert Opinion on Drug Delivery* 2013, 10, 215.

[0265] Peer, D.; J.M. Karp, S. Hong, O.C. Farokhzad, R. Margalit, R. Langer, *Nature Nanotechnology* 2007, 2, 751.

[0266] Romanowsky, M.B.; Abate, A.R.; Rotem, A.; Holtze, C.; Weitz, D.A. *High throughput production of single core double emulsions in a parallelized microfluidic device*. *Lab on a chip* 2012, 12, 802-7.

[0267] Saad, W.S.; Prud'homme, R.K., *Principles of nanoparticle formation by flash nanoprecipitation*. *Nano Today* 2016, 11 (2), 212-227.

[0268] Santhiya, D.; Dias, R.S.; Dutta, S.; Das, P.K.; Miguel, M.G.; Lindman, B.; Maiti, S., *Kinetic Studies of Amino Acid-Based Surfactant Binding to DNA*. *The Journal of Physical Chemistry B* 2012, 116 (20), 5831-5837.

[0269] Santos, J.L.; Herrera-Alonso, M. *Kinetically Arrested Assemblies of Architecturally Distinct Block Copolymers*. *Macromolecules* 2014, 47, 137-145.

[0270] Santos, J.L.; Ren, Y.; Vandermark, J.; Archang, M.M.; Williford, J.-M.; Liu, H.-W.; Lee, J.; Wang, T.-H.; Mao, H.-Q., *Continuous Production of Discrete Plasmid DNA-Polycation Nanoparticles Using Flash Nanocomplexation*. *Small* 2016, 12 (45), 6214-6222.

[0271] Seo, J.H.; Mittal, R., *A sharp-interface immersed boundary method with improved mass conservation and reduced spurious pressure oscillations*. *Journal of Computational Physics* 2011, 230 (19), 7347-7363.

[0272] Shen, H.; Hong, S.Y.; Prud'homme, R.K.; Liu, Y. *Self-assembling process of flashnanoprecipitation in a multi-inlet vortex mixer to produce drug-loaded polymeric nanoparticles*. *J Nanopart Res* 2011, 13, 4109-4120.

[0273] Shi, B.; Zheng, M.; Tao, W.; Chung, R.; Jin, D.; Ghaffari, D.; Farokhzad, O.C., *Challenges in DNA Delivery and Recent Advances in Multifunctional Polymeric DNADelivery Systems*. *Biomacromolecules* 2017, 18 (8), 2231-2246.

[0274] Takeda, K.M.; Osada, K.; Tockary, T.A.; Dirisala, A.; Chen, Q.; Kataoka, K., *Poly (ethylene glycol) Crowding as Critical Factor To Determine pDNA Packaging Scheme into Polyplex Micelles for Enhanced Gene Expression*. *Biomacromolecules* 2017, 18 (1), 36-43.

[0275] Tennekes, H.; Lumley, J.L.; Lumley, J., *A first course in turbulence*. MIT press: 1972.

[0276] Tsoi, K.M.; MacParland, S.A.; Ma, X.-Z.; Spetzler, V.N.; Echeverri, J.; Ouyang,

B.; Fadel, S.M.; Sykes, E.A.; Goldaracena, N.; Kathis, J.M.; Conneely, J.B.; Alman, B.A.; Selzner, M.; Ostrowski, M.A.; Adeyi, O.A.; Zilman, A.; McGilvray, I.D.; Chan, W.C.W., Mechanism of hard-nanomaterial clearance by the liver. *Nature Materials* 2016, 15, 1212.

[0277] Valencia, P.M.; Farokhzad, O.C.; Karnik, R.; Langer, R. Microfluidic technologies for accelerating the clinical translation of nanoparticles. *Nat Nanotechnol* 2012, 7, 623-9.

[0278] Wightman, L.; Kircheis, R.; Rossler, V.; Carotta, S.; Ruzicka, R.; Kurs, M.; Wagner, E., *Journal of Gene Medicine* 2001, 3, 362.

[0279] Williford, J.-M.; Santos, J.L.; Shyam, R.; Mao, H.-Q., Shape control in engineering of polymeric nanoparticles for therapeutic delivery. *Biomaterials Science* 2015, 3 (7), 894-907.

[0280] Yang, J.; Hendricks, W.; Liu, G.S.; McCaffery, J.M.; Kinzler, K.W.; Huso, D.L.; Vogelstein, B.; Zhou, S.B. A nanoparticle formulation that selectively transfects metastatic tumors in mice. *P Natl Acad Sci USA* 2013, 110, 14717-14722.

[0281] Yin, H.; Kanasty, A.A.; Eltoukhy, A.J.; Vegas, J.R.; Dorkin, D.G.; Anderson, Nat Rev Genet 2014, 15, 541.

[0282] Yue, Y.; Jin, F.; Deng, R.; Cai, J.; Chen, Y.; Lin, M.C.M.; Kung, H.-F.; Wu, C., Revisit complexation between DNA and polyethylenimine—Effect of uncomplexed chains free in the solution mixture on gene transfection. *Journal of Controlled Release* 2011, 155 (1), 67-76.

[0283] Zhang, C.; Pansare, V.J.; Prud'homme, R.K.; Priestley, R.D., Flash nanoprecipitation of polystyrene nanoparticles. *Soft Matter* 2012, 8 (1), 86-93.

[0284] Zhu, Z.X. Flash Nanoprecipitation: Prediction and Enhancement of Particle Stability via Drug Structure. *Molecular pharmaceutics* 2014, 11, 776-786.

[0285] 虽然为了清楚理解的目的通过说明和实例的方式相当详细地描述了前述主题,但是本领域技术人员将理解,在所附权利要求书的范围内可以进行某些改变和修改。

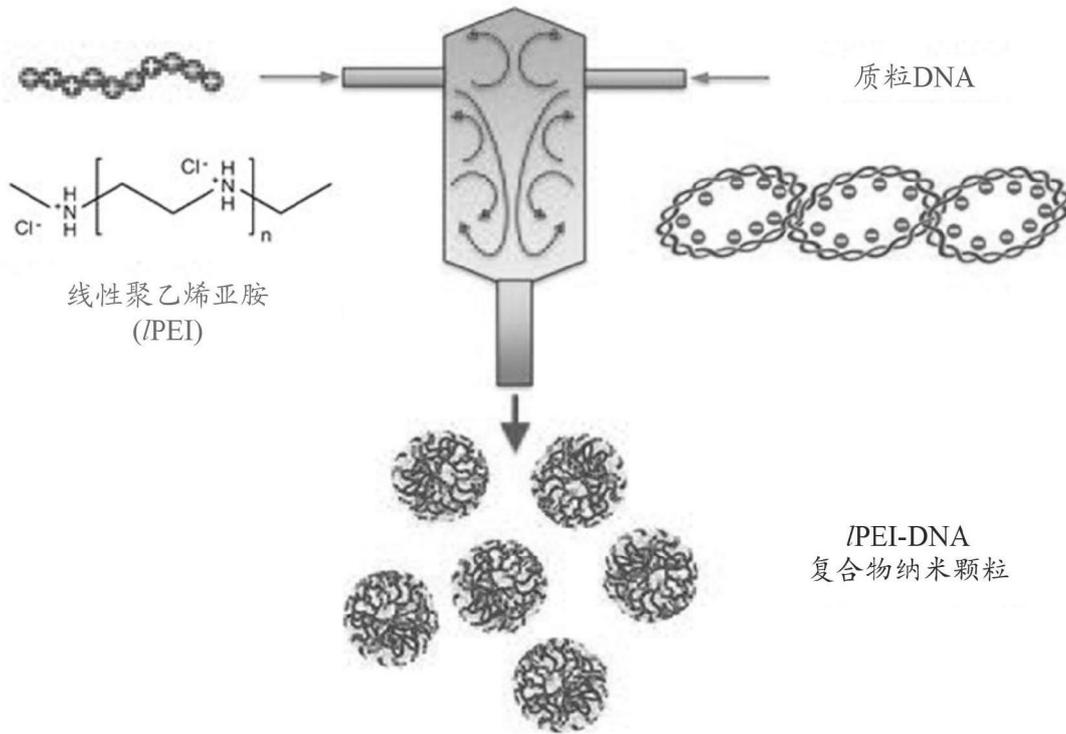


图1A(现有技术)

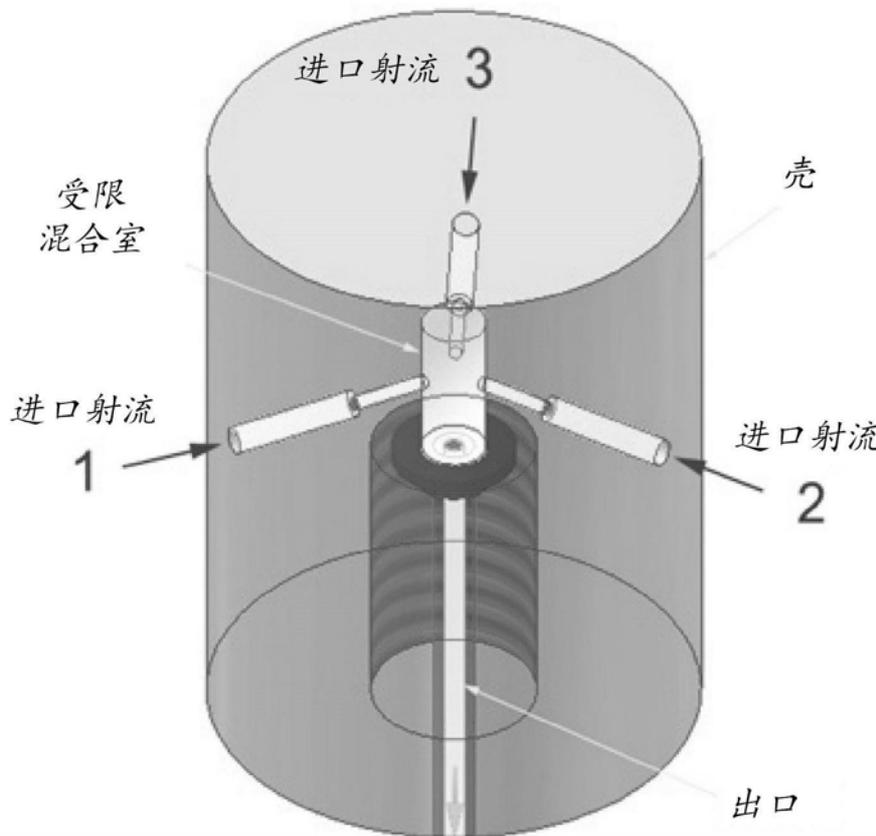


图1B(现有技术)

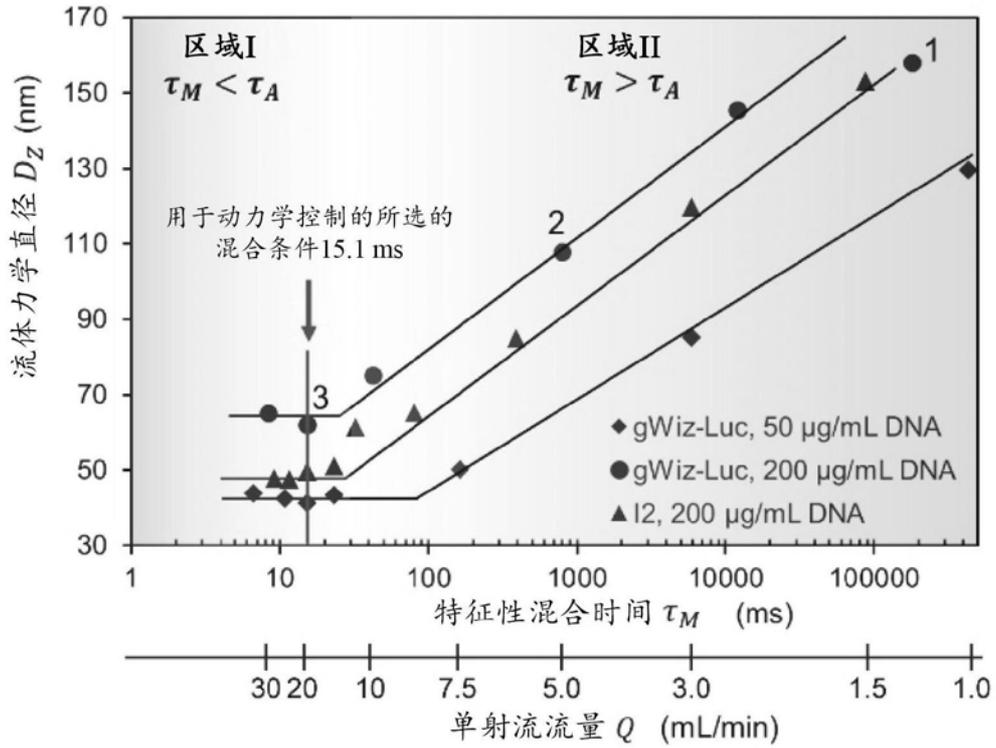


图2A

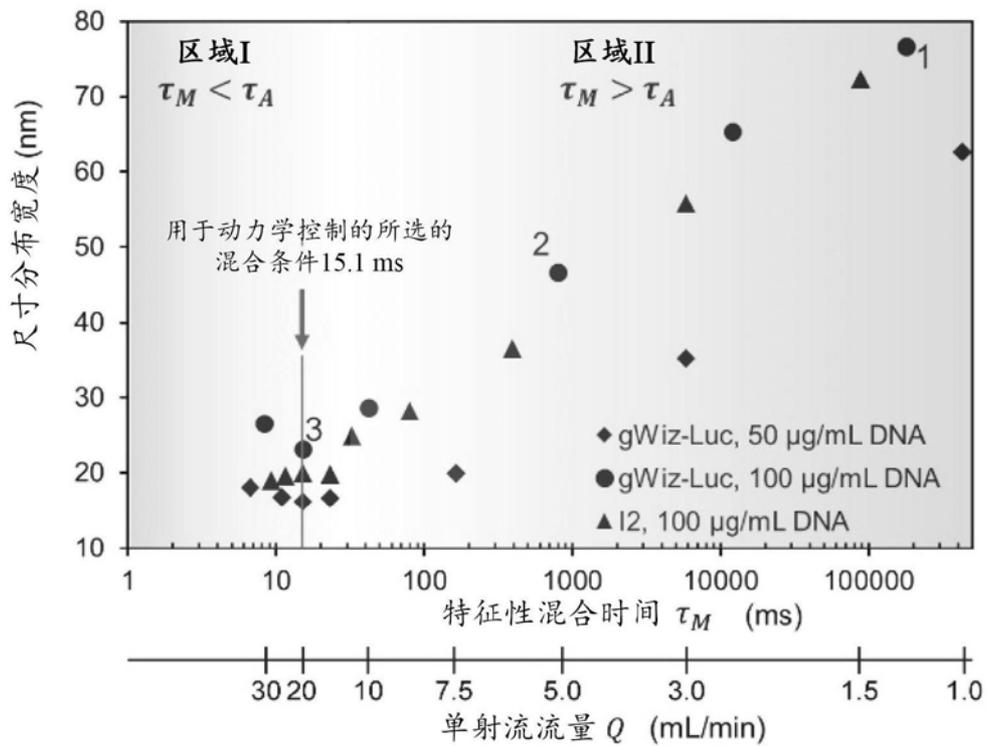


图2B

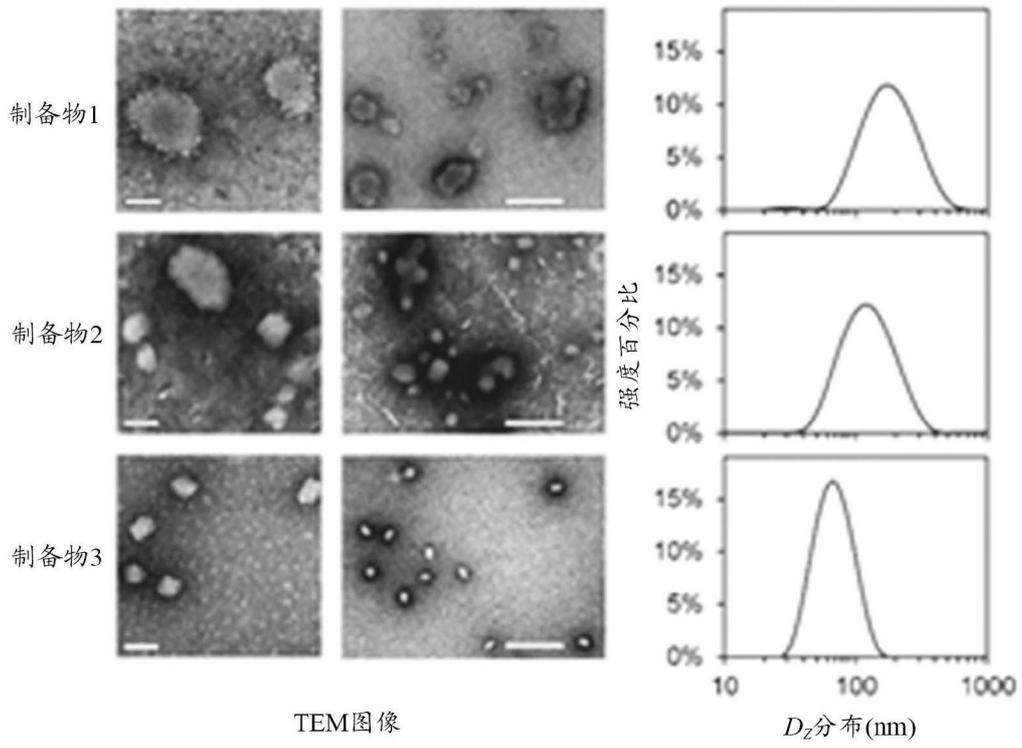


图2C

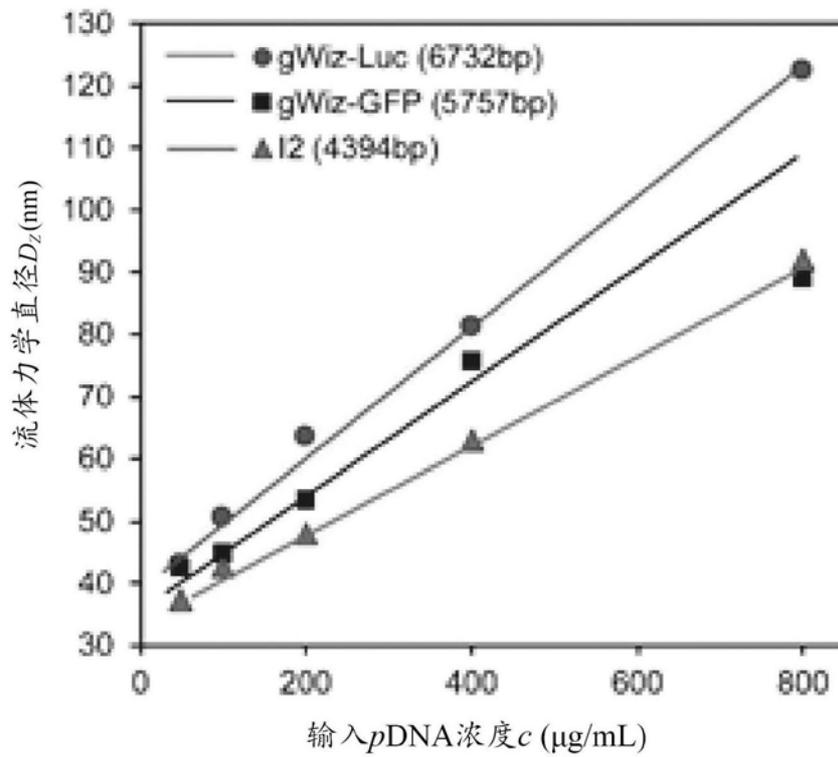


图2D

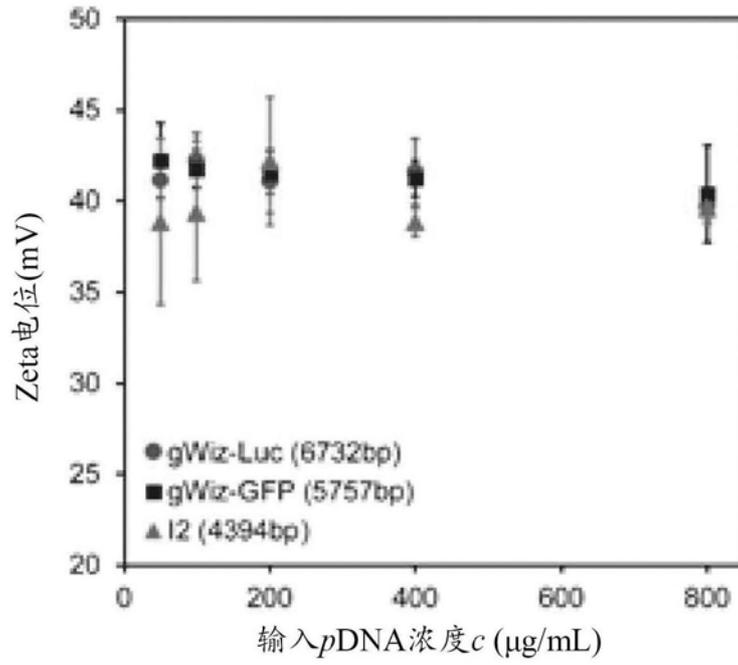


图2E

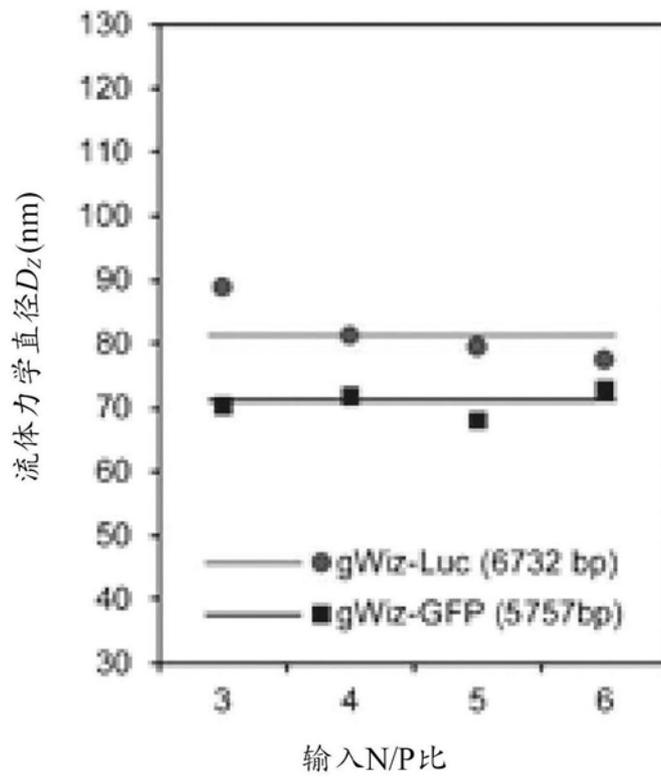


图2F

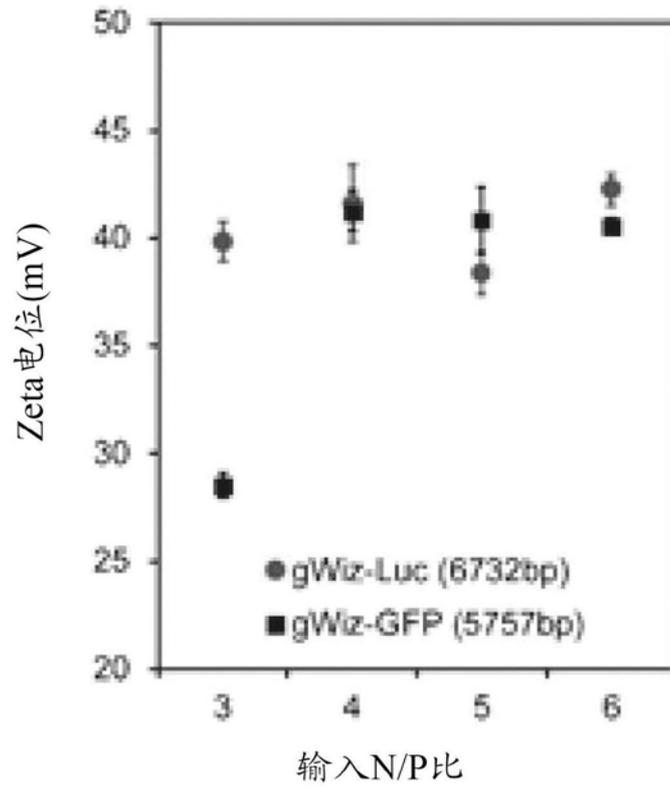


图2G

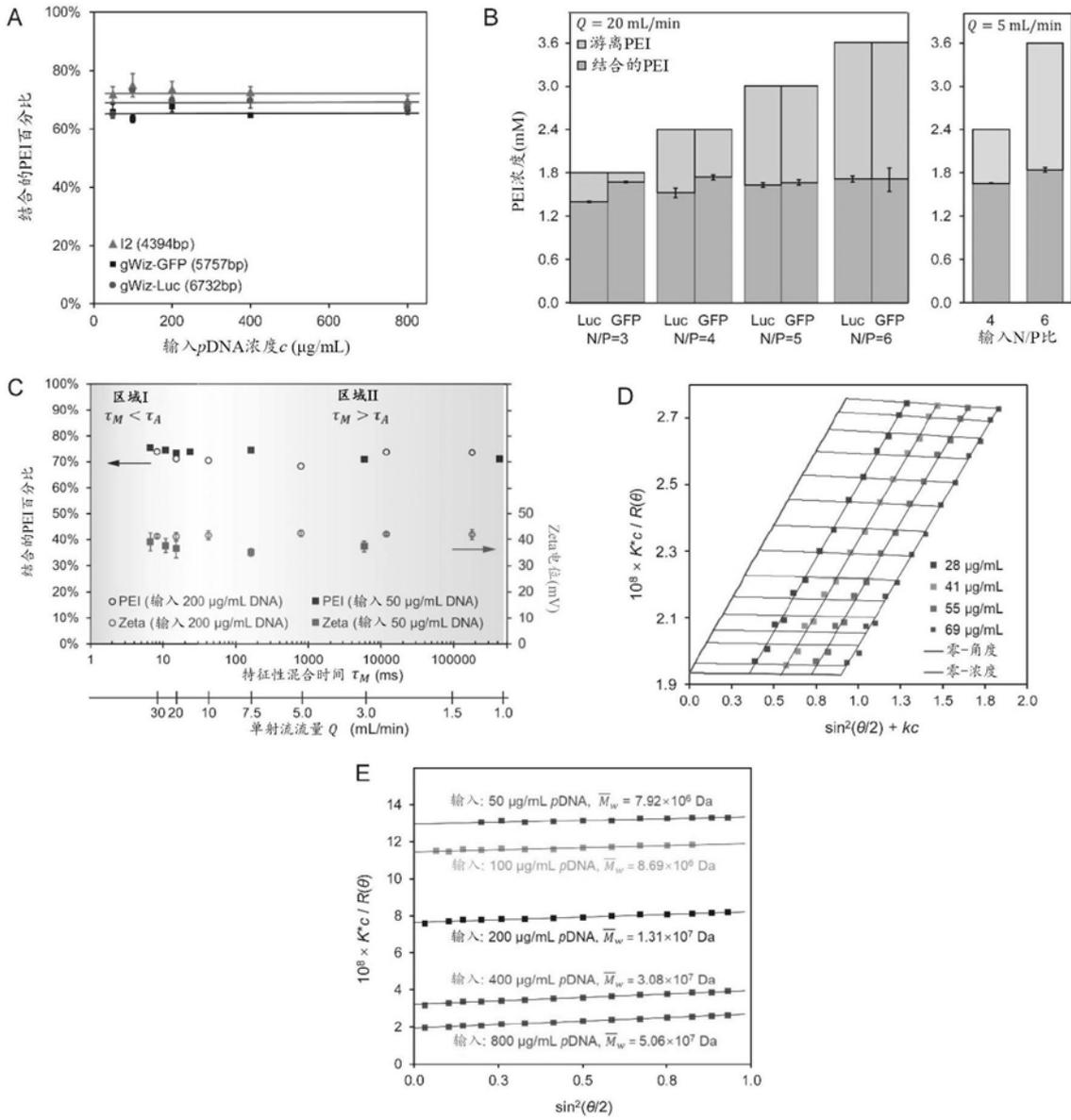


图3

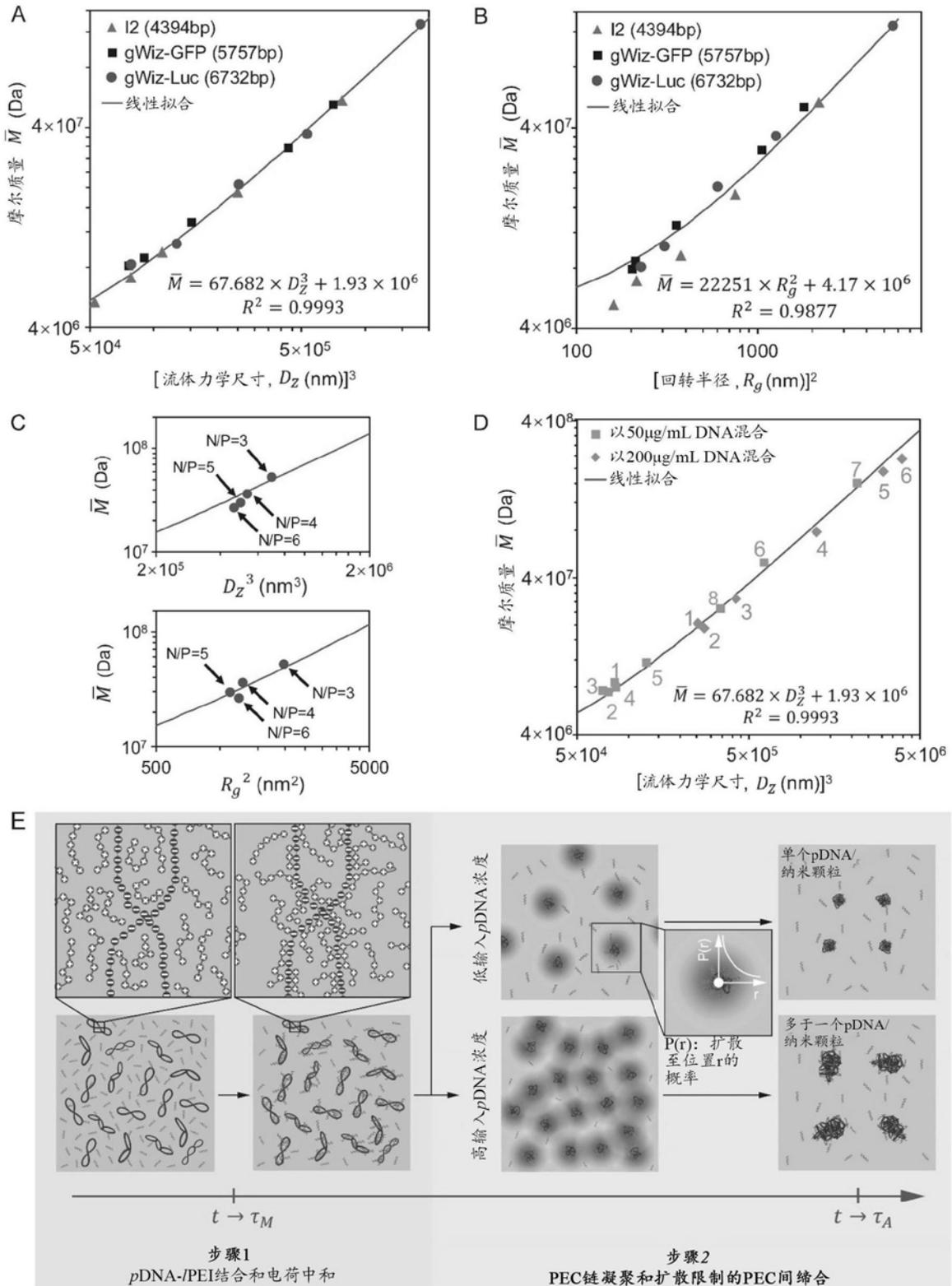


图4

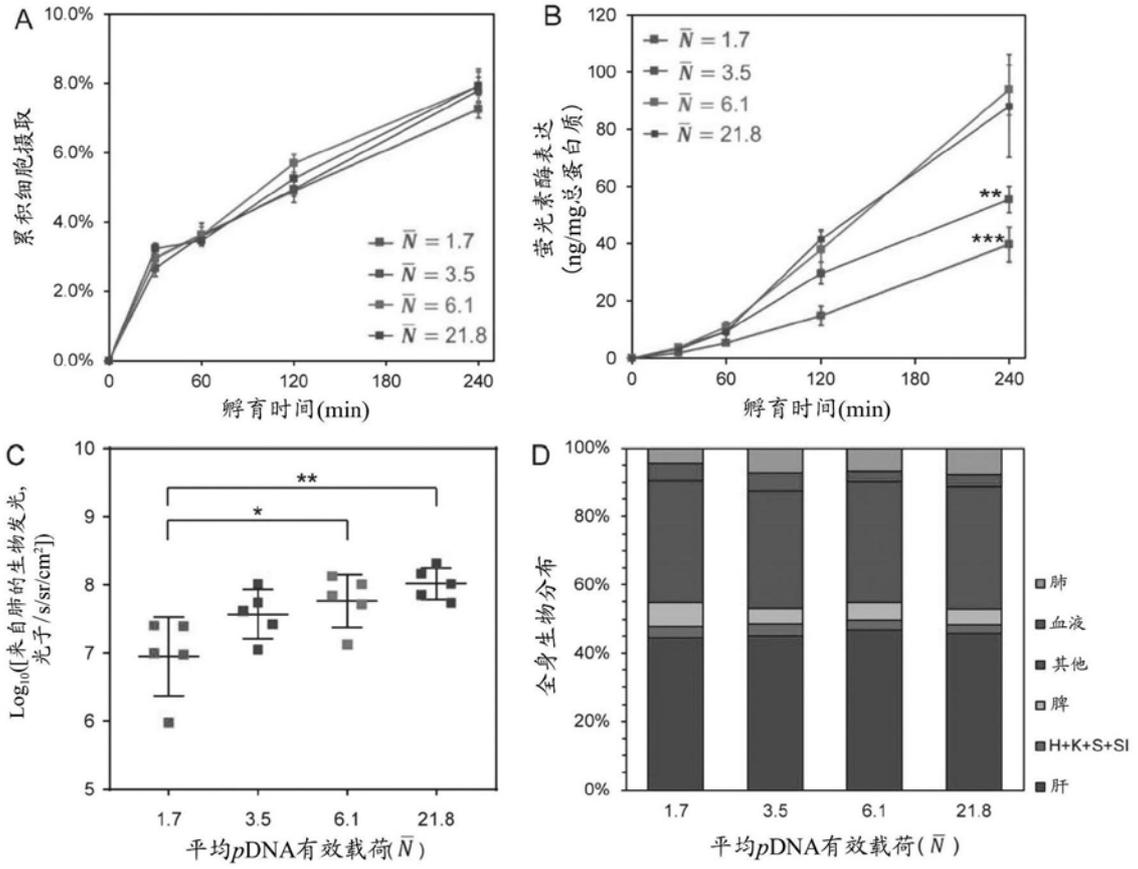


图5

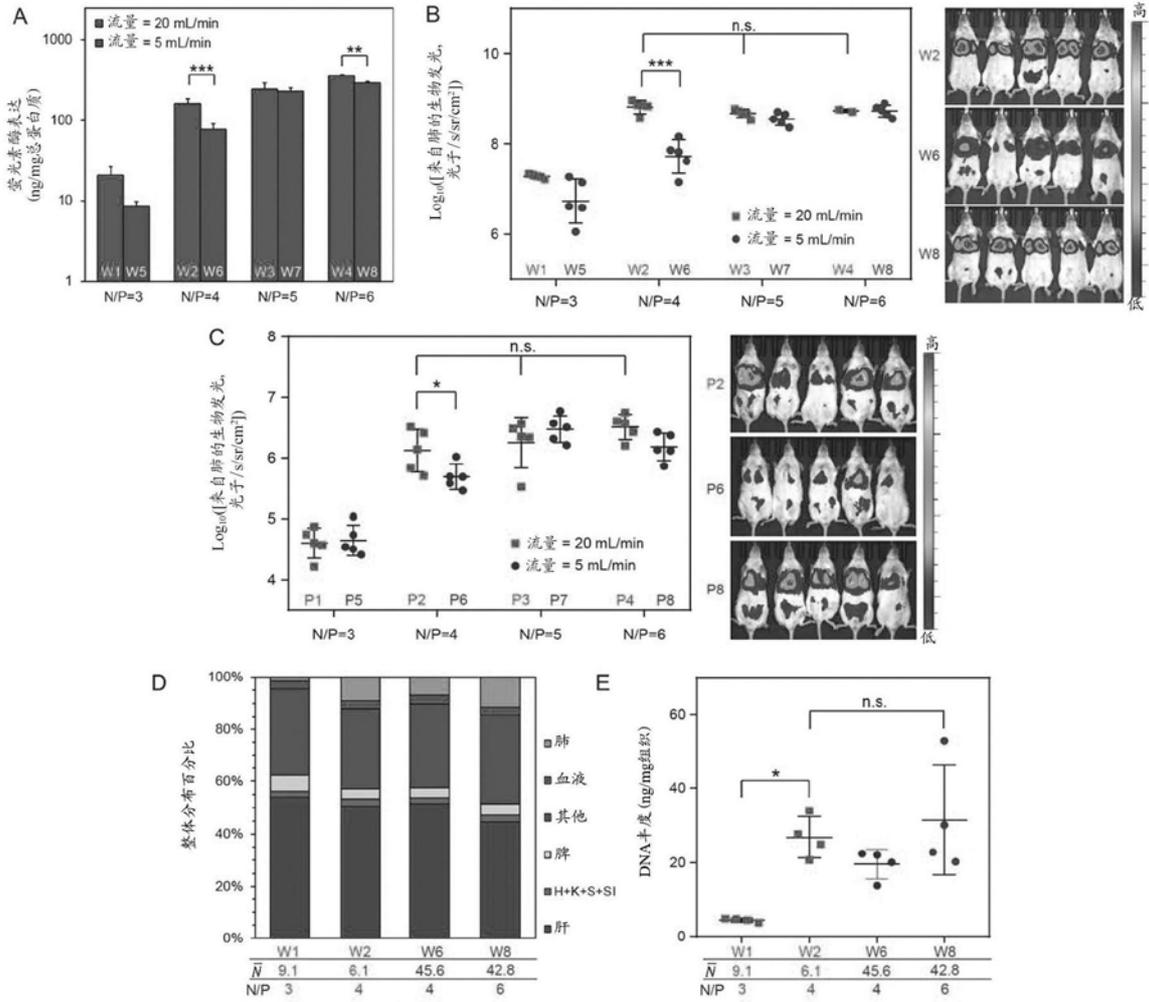


图6

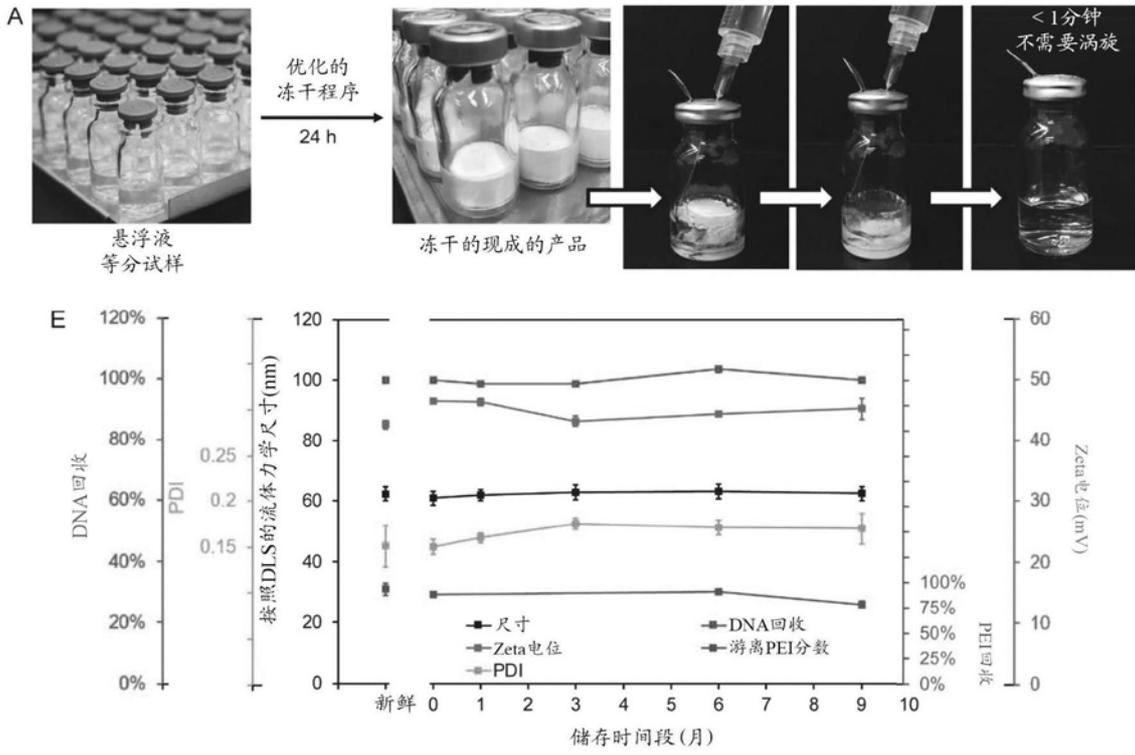


图7

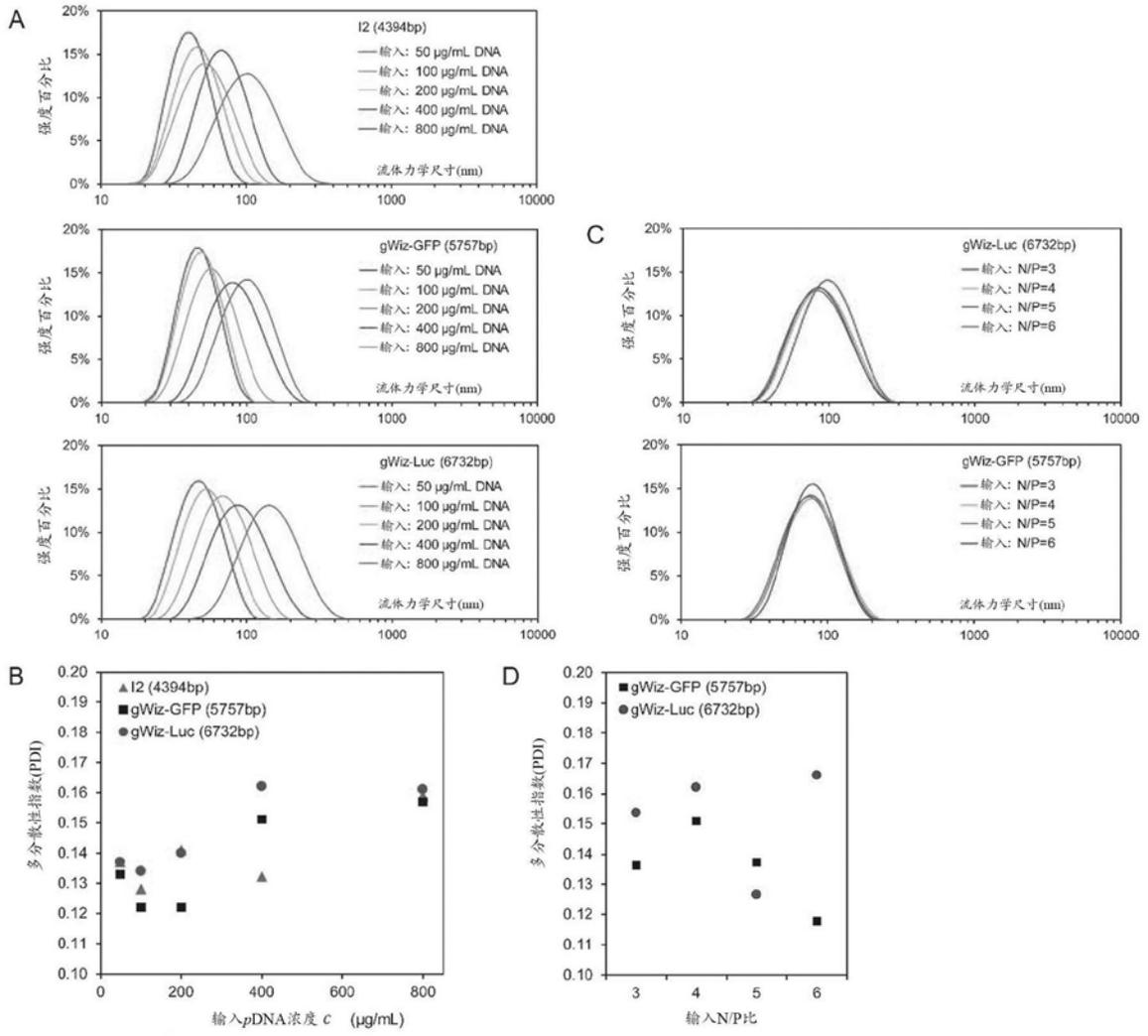


图8

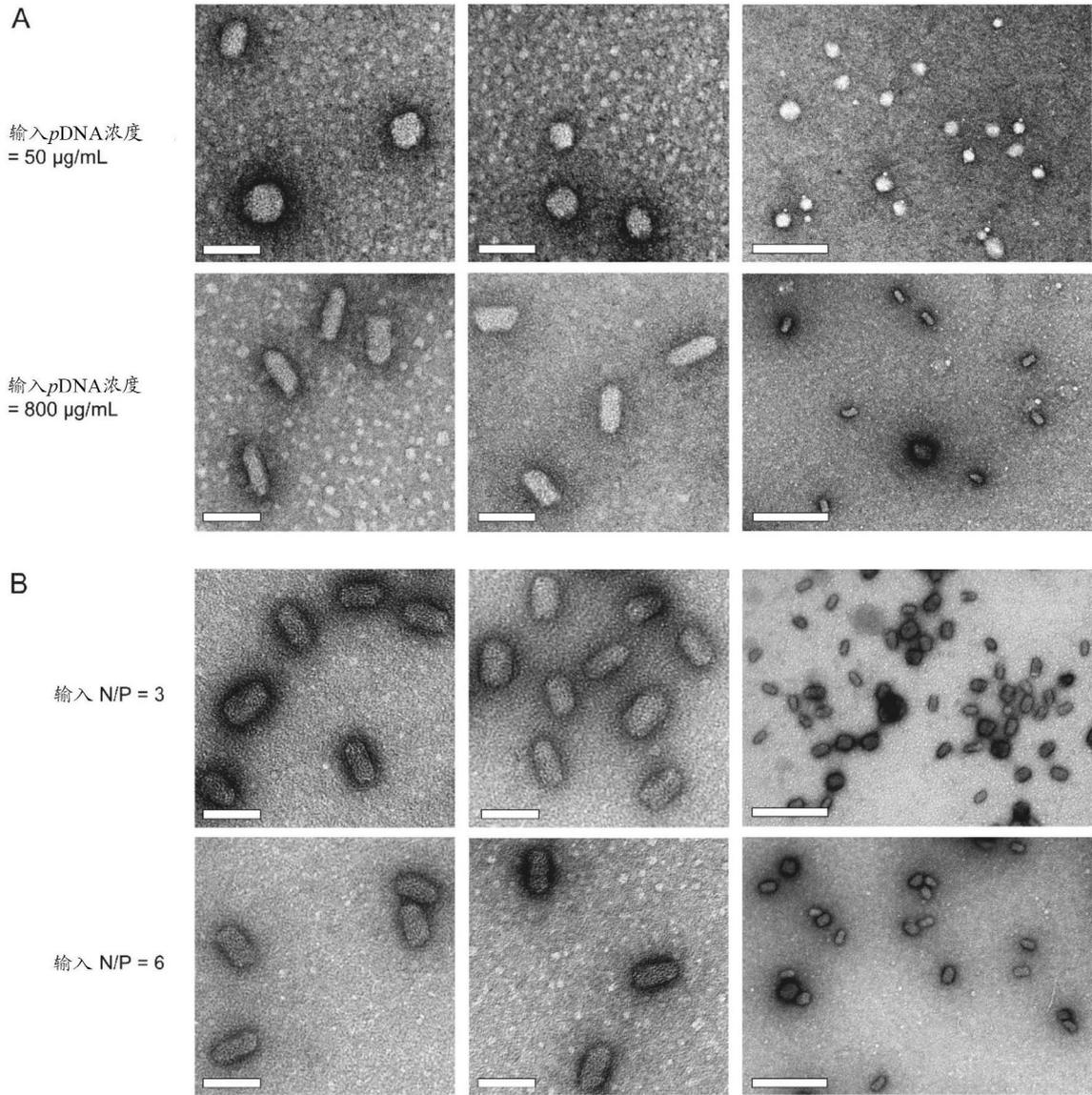


图9

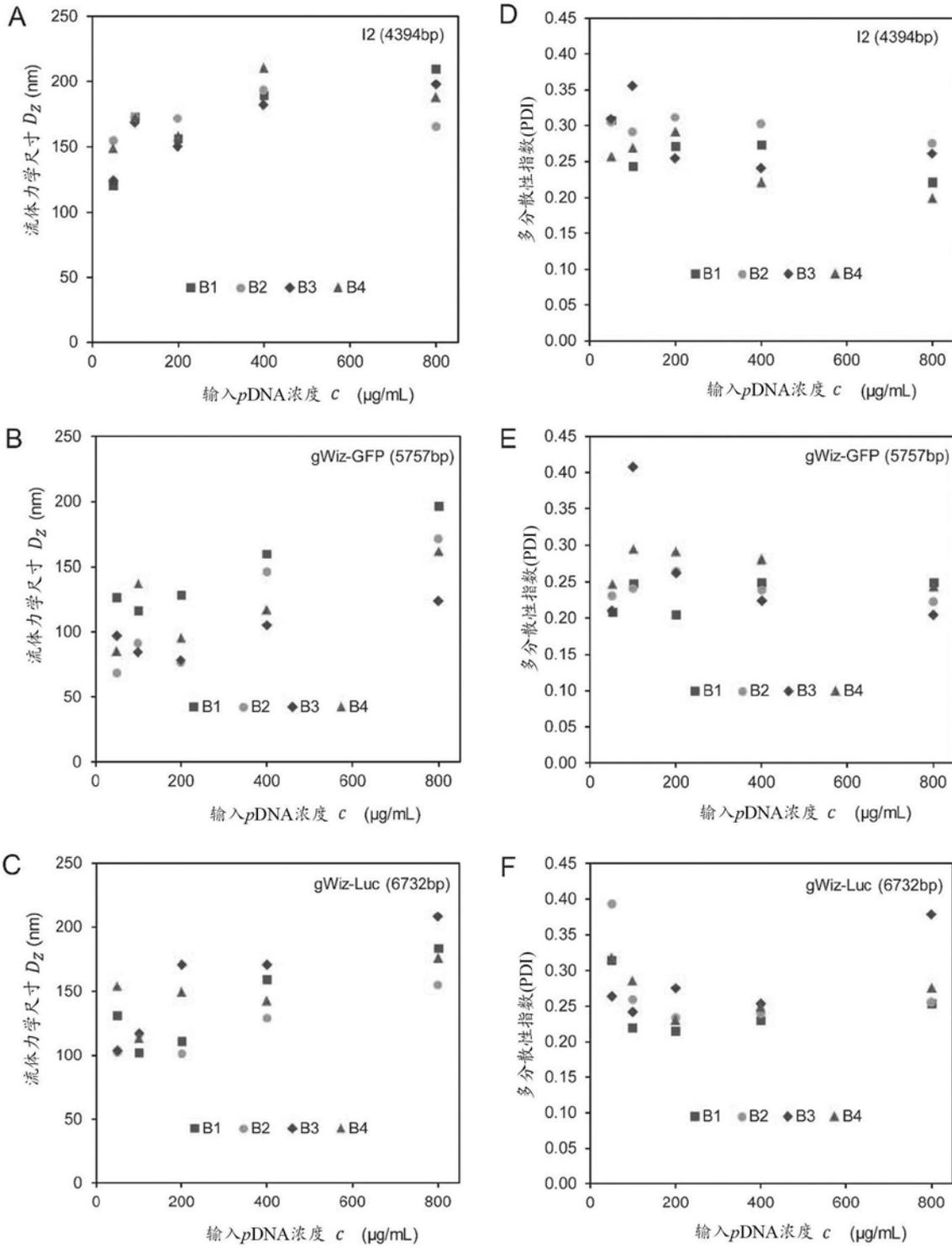


图10

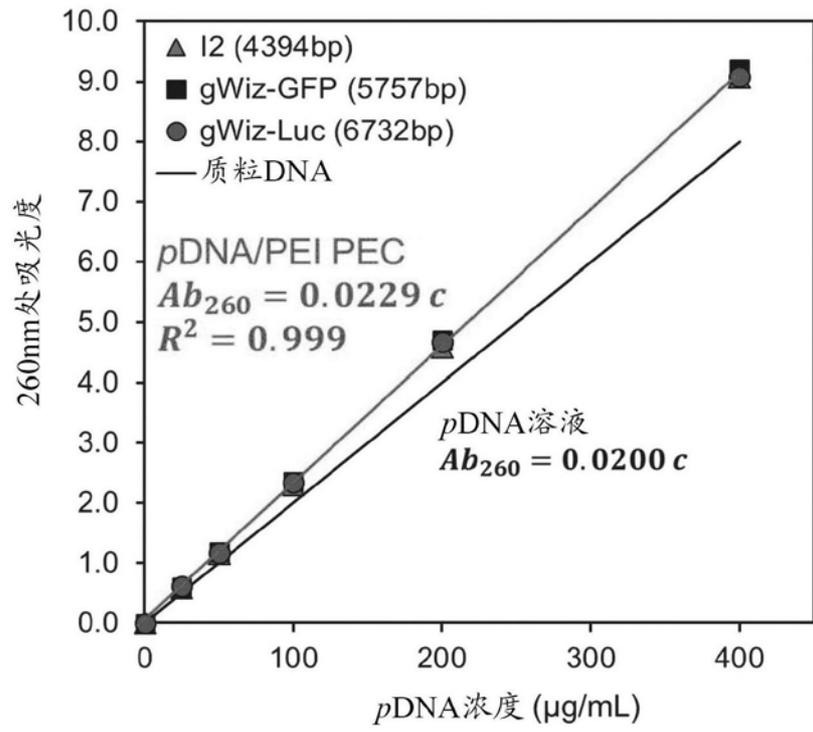


图11

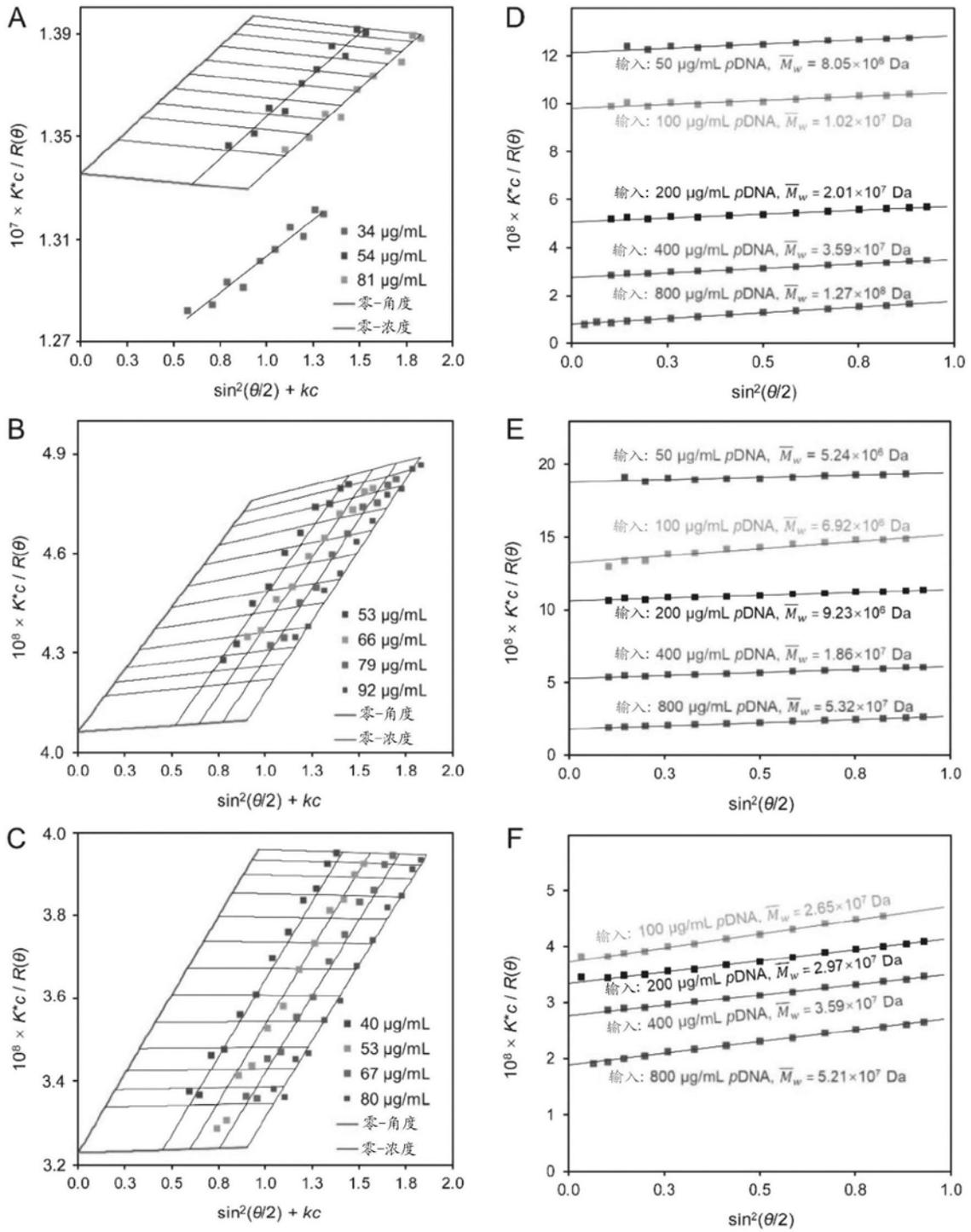


图12

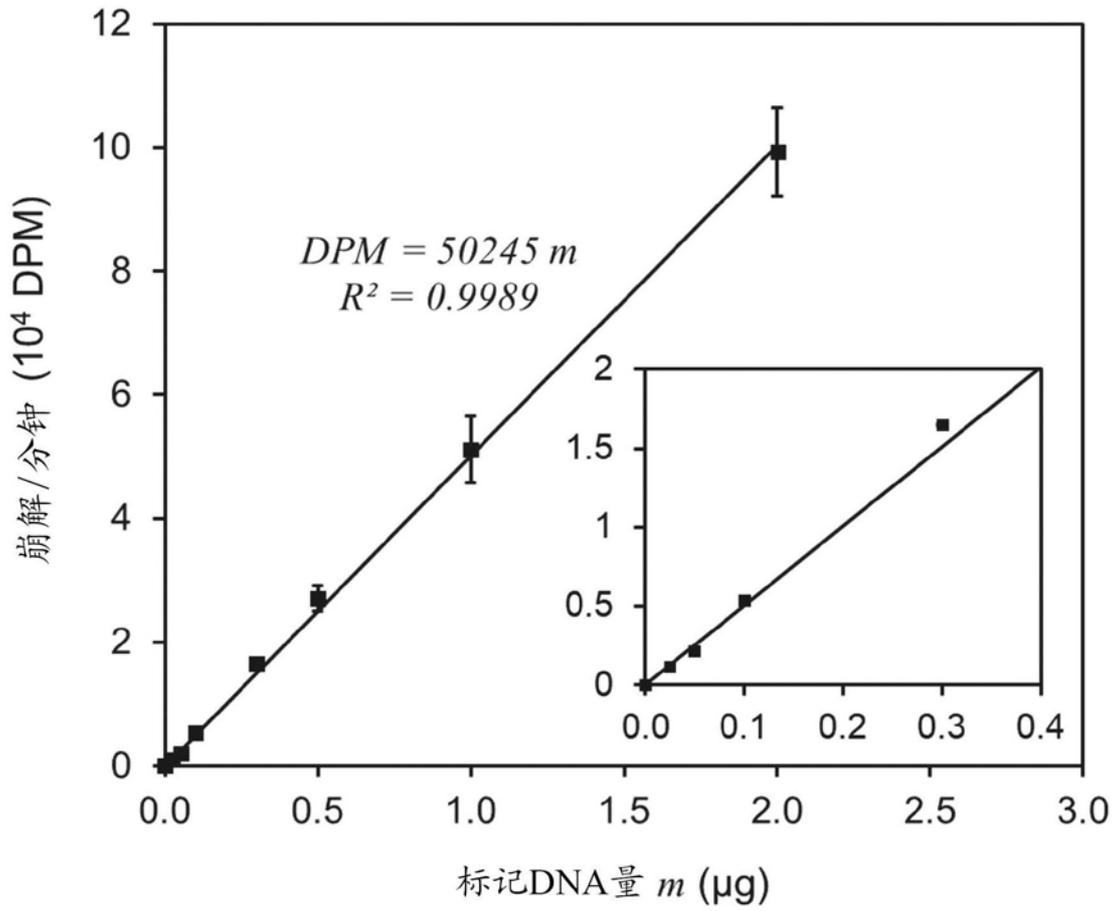


图13

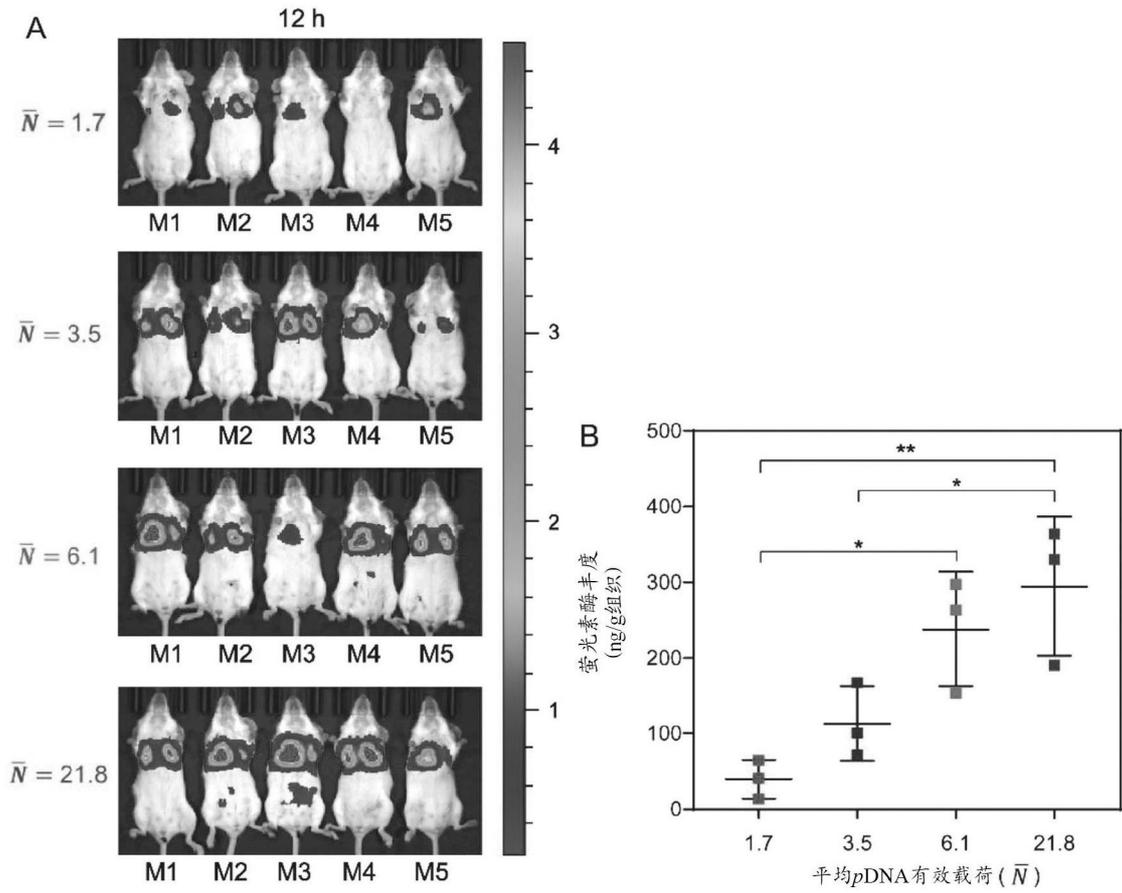


图14

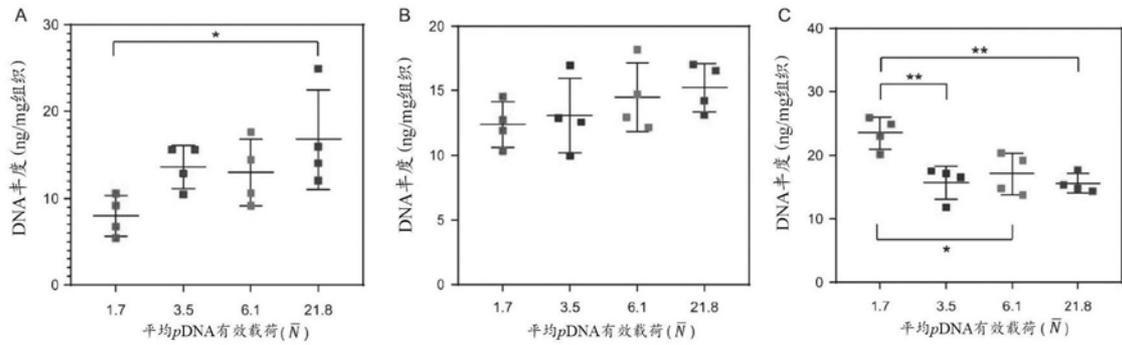


图15



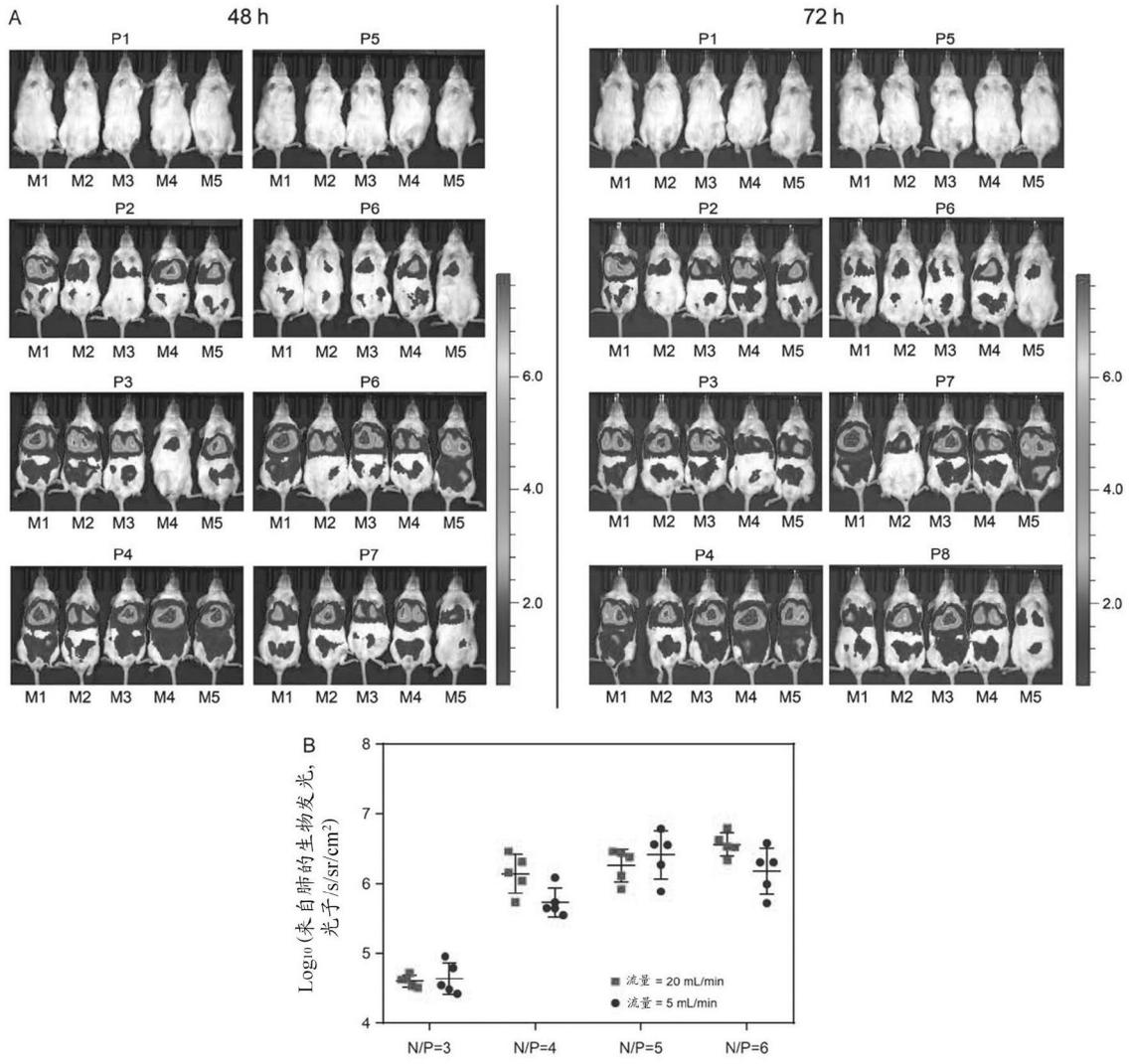


图18

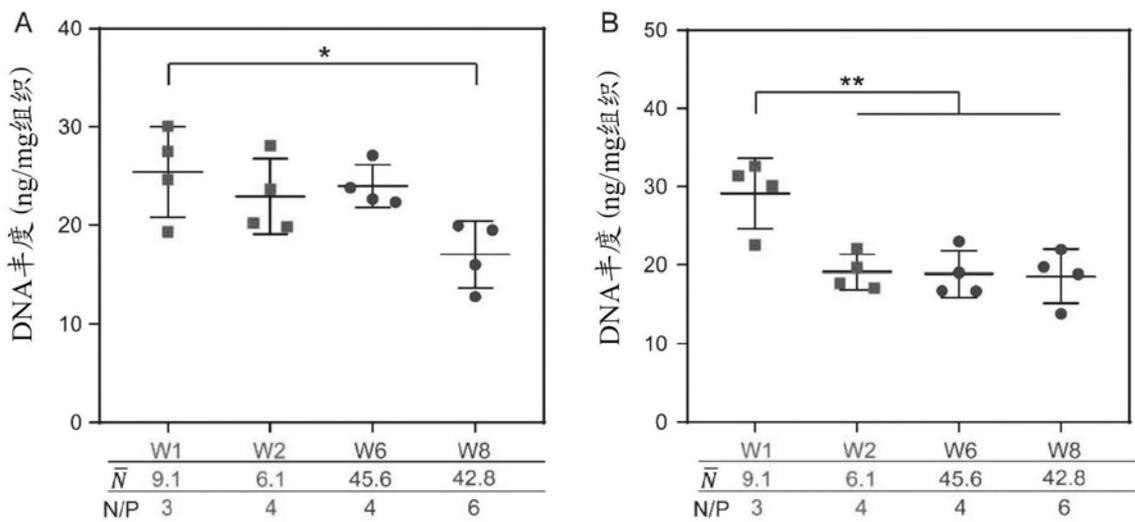


图19

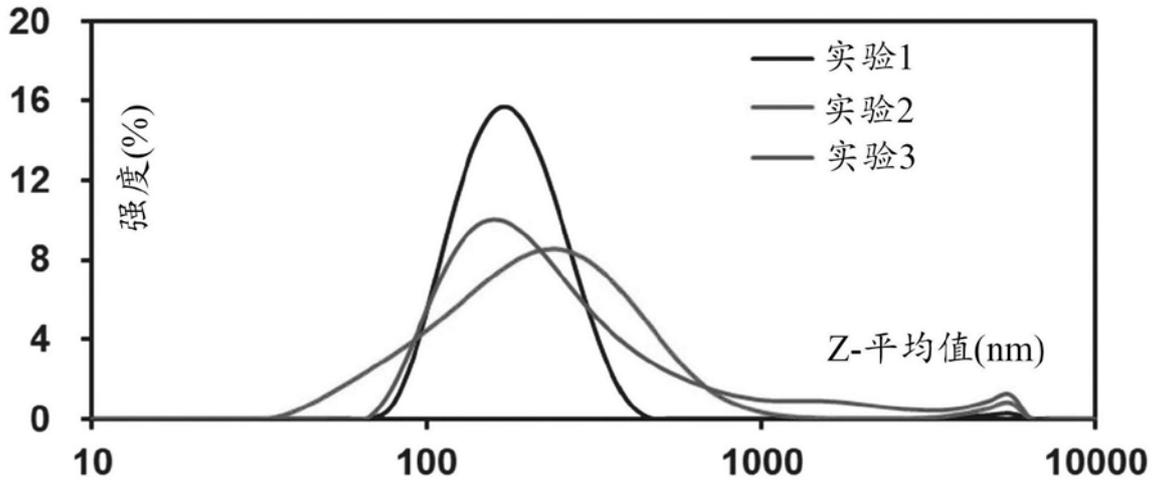


图20A

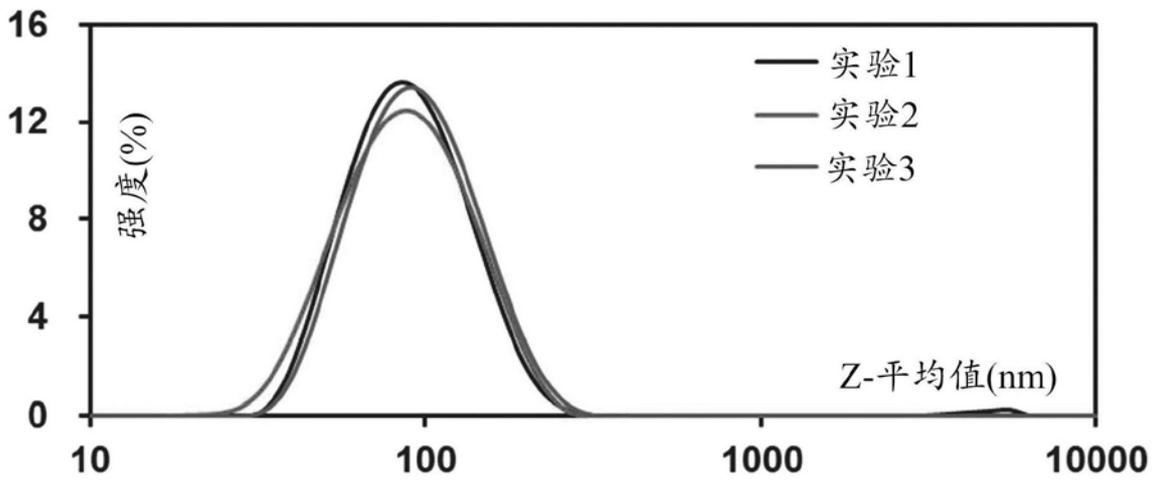


图20B

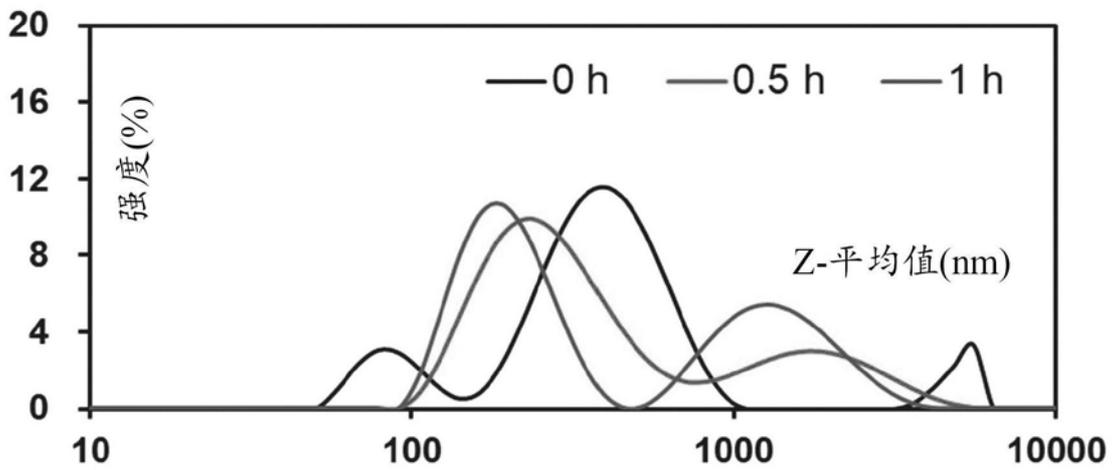


图21A

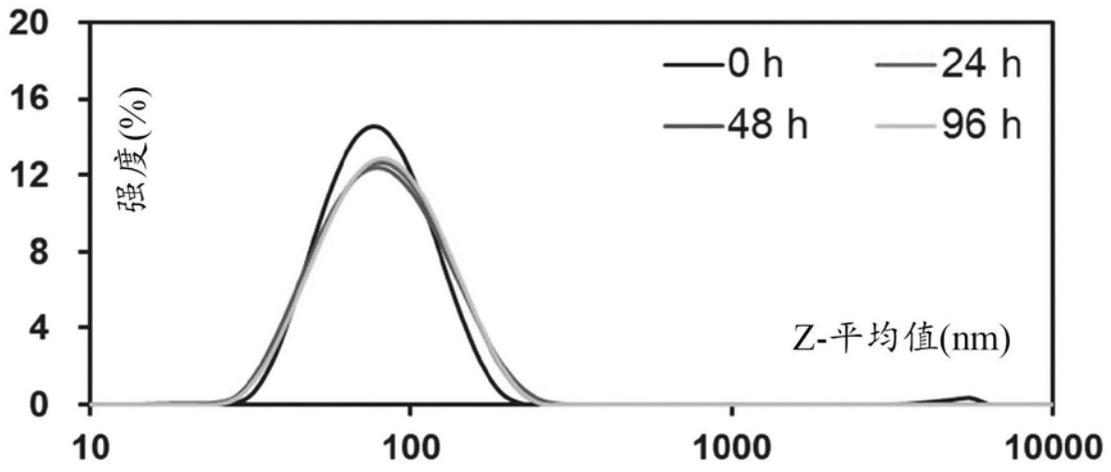


图21B