



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 102712935 B

(45)授权公告日 2017.04.26

(21)申请号 201080059999.7

(22)申请日 2010.11.04

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 102712935 A

(43)申请公布日 2012.10.03

(30)优先权数据

61/280,510 2009.11.04 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2012.06.28

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/CA2010/001766 2010.11.04

(87)PCT国际申请的公布数据

W02011/140627 EN 2011.11.17

(73)专利权人 不列颠哥伦比亚大学

地址 加拿大不列颠哥伦比亚省

(72)发明人 P·R·库里斯 N·M·贝利维奥

C·L·G·汉森 J·胡弗特

J·泰勒 A·维尔德

S·马尔克姆 I·哈弗兹

A·勒恩格 D·沃克

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 罗菊华

(51)Int.Cl.

G12N 15/87(2006.01)

A61K 31/7088(2006.01)

A61K 48/00(2006.01)

A61K 47/22(2006.01)

A61K 47/24(2006.01)

A61K 47/10(2006.01)

(56)对比文件

US 20040262223 A1, 2004.12.30,

WO 2005120461 A2, 2005.12.22,

US 20060219307, 2006.10.05,

审查员 杨光

权利要求书2页 说明书28页

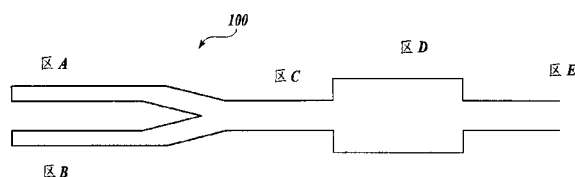
序列表1页 附图31页

(54)发明名称

含有核酸的脂质粒子及相关的方法

(57)摘要

本发明提供具有实体核心的脂质粒子,所述脂质粒子包含一种或更多阳离子脂质,一种或更多第2脂质,及一种或更多核酸,以及制造脂质粒子的装置和方法,及使用脂质粒子的方法。



1. 脂质粒子,其由下列组成:

- (a) 一种或更多阳离子脂质;
- (b) 一种或更多第2脂质,其选自:中性脂质、两性离子脂质和阴离子脂质;
- (c) PEG-脂质;
- (d) 甾醇;及
- (e) 一种或更多核酸,

其中以上 (a) ~ (e) 组装成具有实体核心的脂质粒子。

2. 权利要求1的粒子,其包含30~95摩尔百分率阳离子脂质。

3. 权利要求1的粒子,其包含1.0~10摩尔百分率PEG-脂质。

4. 权利要求1的粒子,其具有15nm~300nm的直径。

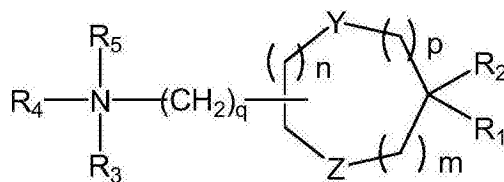
5. 权利要求1的粒子,其中当使用低温传输电子显微镜检可视化时,所述粒子是电子致密的。

6. 权利要求1的粒子,其中所述阳离子脂质是可离子化的脂质。

7. 权利要求1的粒子,其中所述阳离子脂质是氨基脂质。

8. 权利要求1的粒子,其中所述阳离子脂质选自:DODAC、DOTMA、DDAB、DOTAP、DOTAP • Cl、DC-Chol、DOSPA、DOGS、DOPE、DODAP、DODMA、DODMA和DMRIE。

9. 权利要求1的粒子,其中所述阳离子脂质具有下式:



其中

R1和R2相同或不同,且独立地是:任选地取代的C10~C24烷基,任选地取代的C10~C24烯基,任选地取代的C10~C24炔基,或任选地取代的C10~C24酰基;

R3和R4相同或不同,且独立地是:任选地取代的C1~C6烷基,任选地取代的C2~C6烯基,或任选地取代的C2~C6炔基或R3和R4可接合而形成任选地取代的4~6个碳原子和1或2个选自氮和氧的杂原子的杂环;

R5缺失或存在,且当存在时是氢或C1~C6烷基;

m、n和p相同或不同,且独立地是:0或1,前提是,m、n和p不同时是0;

q是0,1,2,3或4;以及

Y和Z相同或不同,且独立地是:O、S或NH。

10. 权利要求1的粒子,其中所述PEG-脂质选自:PEG-修饰的磷脂酰乙醇胺,PEG-修饰的磷脂酸,PEG-修饰的神经酰胺,PEG-修饰的二烷基胺,PEG-修饰的二酰基甘油,PEG-修饰的二烷基甘油。

11. 权利要求3的粒子,其包含1~5摩尔百分率的PEG-脂质。

12. 权利要求1的粒子,其中所述PEG-脂质选自:PEG-c-DMG,PEG-c-DMA和PEG-c-DMG。

13. 权利要求1的粒子,其中所述第2脂质选自:二酰基磷脂酰胆碱,二酰基磷脂酰乙醇胺,神经酰胺,鞘磷脂,二氢鞘磷脂,脑磷脂和脑苷脂。

14. 权利要求1的粒子,其中所述第2脂质是1,2-二硬脂酰-sn-甘油基-3-磷酸胆碱

(DSPC)。

15. 权利要求1的粒子,其中所述甾醇是胆甾醇。
16. 权利要求1的粒子,其中所述核酸是DNA、RNA或锁核酸。
17. 权利要求1的粒子,其中所述核酸是质粒。
18. 权利要求16的粒子,其中所述核酸是ssDNA或dsDNA。
19. 权利要求16的粒子,其中所述核酸是mRNA、siRNA或微RNA。
20. 权利要求1的粒子,其中所述核酸是反义寡核苷酸。
21. 权利要求4的粒子,其具有30nm~200nm的直径。
22. 组合物,其包含多个权利要求1的脂质粒子。

含有核酸的脂质粒子及相关的方法

【技术领域】

[0001] 本申请要求2009年11月4日提交的美国临时申请No.61/280,510的权益,将其通过引用整体并入本文。

【背景技术】

[0002] 脂质纳米粒子(LNP)是接收了调控批准的最临床进展的具有基于7个LNP的药物的药物递送系统。这些批准的药物含有小分子诸如抗癌药物及相比“游离的”药物呈现改善的功效和/或减少的毒性。LNP载体技术也已应用于递送“遗传”药物诸如用于表达治疗性蛋白或用于沉默贡献于疾病进展的基因的小干扰RNA(siRNA)寡核苷酸(OGN)的质粒。siRNA OGN和其他遗传药物的有效体内递送的作出方法是阻碍这些剂作为治疗剂的革命性的潜力的主要问题。

[0003] 遗传药物的包裹和递送需要的LNP技术的新近发展及阳离子脂质的设计点亮了LNP系统解决体内递送问题的潜力。LNP-siRNA系统已显示在静脉内(静脉内)注射之后诱导动物模型,包括非-人灵长类动物中治疗关联的靶基因的沉默,且目前在几个临床试验中评估下。

[0004] 已开发各种方法来配制含有遗传药物的LNP系统。这些方法包括在乙醇的存在下混合预形成的LNP与OGN或混合溶解于乙醇的脂质与含有OGN的水性介质和得到具有100nm或更小的直径的LNP和65~95%的OGN包裹效率。这些方法均依赖于阳离子脂质的存在,以达到OGN和聚(乙二醇)(PEG)脂质的包裹,以抑制大结构的聚集和形成。产生的LNP系统的性质,包括尺寸和OGN包裹效率,敏感于各种制剂参数诸如离子强度,脂质和乙醇浓度,pH,OGN浓度及混合速度。一般而言,使用当前制剂过程难于控制参数诸如在混合时的相对脂质和OGN浓度,以及混合速度,导致在制备物之内及之间产生的LNP的特征的变异性。

[0005] 微流体装置提供以nL尺度控制性地和快速混合流体的能力,精确控制温度,驻留时间和溶质浓度。控制的及快速微流体混合已之前应用于合成无机纳米粒子和微粒,及可胜过纳米粒子的大规模产生中的大规模系统。微流体2-相滴技术已应用于产生单分散聚合物微粒用于药物递送或用于产生用于细胞包裹的大囊泡,蛋白或其他生物分子。已展示水动力流聚焦,常见的微流体技术的使用以提供试剂的快速混合,以创建控制的尺寸的单分散脂质体。此技术也已证明相比本体产生方法,对于随着小分子的更高包裹,获得更小,更多单分散粒子的聚合物纳米粒子的产生有用。

[0006] 尽管含有遗传药物的LNP系统的方法的开发的发展,存在对制备含有治疗性物质的脂质纳米粒子的装置和方法,以及改善的含有治疗性物质的脂质纳米粒子的需求。本发明寻求实现此需求及提供进一步相关的优势。

【发明概述】

[0008] 一方面,本发明提供包含核酸的脂质粒子。

[0009] 在一实施方式中,脂质粒子包含(a)一种或更多阳离子脂质,(b)一种或更多第2脂质,及(c)一种或更多核酸,其中脂质粒子包含基本上实体核心,如本文定义。

[0010] 在一实施方式中,阳离子脂质是DLin-KC2-DMA。在特定实施方式中,粒子包含约30~约95摩尔百分率阳离子脂质。

[0011] 在一实施方式中,第2脂质是PEG-c-DMA。在一实施方式中,第2脂质是1,2-二硬脂酰-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DSPC)。在特定实施方式中,粒子包含约1~约10摩尔百分率第2脂质。

[0012] 核酸可为DNA,RNA,锁核酸,核酸类似物,或能表达DNA或RNA的质粒。

[0013] 在另一实施方式中,脂质粒子包含(a)一种或更多阳离子脂质,(b)一种或更多中性脂质,(c)一种或更多PEG-脂质,(d)一种或更多甾醇;及(e)一种或更多核酸,其中脂质粒子包含基本上实体核心,如本文定义。在一实施方式中,阳离子脂质是DLin-KC2-DMA。在一实施方式中,PEG-脂质是PEG-c-DMA。在一实施方式中,中性脂质是1,2-二硬脂酰-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DSPC)。在一实施方式中,甾醇是胆甾醇。在一实施方式中,核酸是siRNA。

[0014] 在进一步实施方式中,脂质粒子由一种或更多阳离子脂质,及一种或更多核酸组成。在一实施方式中,脂质粒子包含基本上实体核心,如本文定义。在一实施方式中,阳离子脂质是DLin-KC2-DMA。在一实施方式中,核酸是siRNA。

[0015] 在其他方面,本发明提供使用脂质粒子的方法。

[0016] 在一实施方式中,本发明提供给受试者施用核酸的方法,包括施用本发明的脂质粒子给有需求的受试者。

[0017] 在一实施方式中,本发明提供将核酸导入细胞的方法,包括使细胞接触本发明的脂质粒子。

[0018] 在一实施方式中,本发明提供调节靶多核苷酸或多肽的表达的方法,包括使细胞接触本发明的脂质粒子,其中核酸能调节靶多核苷酸或多肽的表达。

[0019] 在一实施方式中,本发明提供治疗受试者中表征为多肽的过表达的疾病或病症的方法,包括给受试者施用本发明的脂质粒子,其中核酸能沉默或降低多肽表达。

[0020] 在其他方面,本发明提供制造脂质粒子的方法。

[0021] 在一实施方式中,本发明提供制造含有核酸的脂质粒子的方法,包括:

[0022] (a)将在第1溶剂中包含核酸的第1流导入微流体装置;其中装置具有适于将一个或更多流导入装置的第1区和用于用微流体混合器混合一个或更多流的内容物的第2区;

[0023] (b)将在第2溶剂中包含脂质粒子-形成物质的第2流导入装置以提供在层流条件下流动的第1和第2流,其中装置具有适于将一个或更多流导入微通道的第1区和用于混合一个或更多流的内容物的第2区,其中脂质粒子-形成物质包含阳离子脂质,且其中第1和第2溶剂不相同;

[0024] (c)使一个或更多第1流和一个或更多第2流从装置的第1区流入装置的第2区;以及

[0025] (d)在装置的第2区中混合在层流条件下流动的一个或更多第1流和一个或更多第2流的内容物以提供包含具有包裹的核酸的脂质纳米粒子的第3流。

[0026] 在另一实施方式中,本发明提供制造含有核酸的脂质粒子的方法,包括:

[0027] (a)将在第1溶剂中包含核酸的第1流导入通道;其中装置具有适于将一个或更多流导入通道的第1区和用于混合一个或更多流的内容物的第2区;

[0028] (b)导入在第2溶剂中包含脂质粒子-形成物质的第2流;其中通道具有适于将一个

或更多流导入通道的第1区和用于混合一个或更多流的内容物的第2区；

[0029] (c) 使一个或更多第1流和一个或更多第2流从通道的第1区流入通道的第2区，而维持2个流的物理隔离，其中一个或更多第1流和一个或更多第2流先不混合，直到到达通道的第2区后才混合；以及

[0030] (d) 在微通道的第2区中混合在层流条件下流动的一个或更多第1流和一个或更多第2流的内容物以提供包含具有包裹的核酸的脂质纳米粒子的第3流。

[0031] 在以上方法的特定实施方式中，混合一个或更多第1流和一个或更多第2流的内容物包括改变一个或更多第1流和一个或更多第2流的浓度或相对混合速度。

[0032] 在以上方法的特定实施方式中，方法还包含用水性缓冲剂稀释第3流。在特定实施方式中，稀释第3流包含使第3流和水性缓冲剂流入第2混合结构。

[0033] 在以上方法的特定实施方式中，方法还包含透析包含具有包裹的核酸的脂质粒子的水性缓冲剂以减少第2溶剂的量。

[0034] 在以上方法的特定实施方式中，第1溶剂是水性缓冲剂。在以上方法的特定实施方式中，第2溶剂是含水醇。

[0035] 在以上方法的特定实施方式中，所述混合第1和第2流的内容物包括杂乱平流。在以上方法的特定实施方式中，所述混合第1和第2流的内容物包括用微混合器混合。

[0036] 在以上方法的特定实施方式中，核酸包裹效率是约90~约100%。

[0037] 在以上方法的特定实施方式中，一个或更多第1流和一个或更多第2流的混合在第1区中被屏障阻止。在特定实施方式中，屏障是通道壁，鞘流体或同心管道。

[0038] 在本发明的另一方面，提供制造脂质粒子的装置。在一实施方式中，本发明提供产生包裹核酸的脂质粒子的装置，包括：

[0039] (a) 第1入口，其用于接收在第1溶剂中包含核酸的第1溶液；

[0040] (b) 第1入口微通道，其与第1入口流通连接以提供在第1溶剂中包含核酸的第1流；

[0041] (c) 第2入口，其用于接收在第2溶剂中包含脂质粒子-形成物质的第2溶液；

[0042] (d) 第2入口微通道，其与第2入口流通连接以提供在第2溶剂中包含脂质粒子-形成物质的第2流；以及

[0043] (e) 第3微通道，其用于接收第1和第2流，其中第3微通道具有适于在层流条件下将第1和第2流导入微通道的第1区和适于混合第1和第2流的内容物的第2区以提供包含具有包裹的核酸的脂质粒子的第3流。

[0044] 在一实施方式中，装置还包含用于稀释第3流的设施以提供稀释的包含稳定化的具有包裹的核酸的脂质粒子的流。在特定实施方式中，用于稀释第3流的设施包含微混合器。

[0045] 在一实施方式中，微通道具有约20~约300 μm 的水动力直径。

[0046] 在一实施方式中，微通道的第2区包含浅浮雕结构。在一实施方式中，微通道的第2区具有主流方向和一个或更多表面，所述表面具有至少一个限定于其中的凹槽或突起，凹槽或突起具有与主方向成角的取向。在一实施方式中，第2区包含微混合器。

[0047] 在特定实施方式中，装置还包含用于改变第1和第2流的流速的设施。

[0048] 在特定实施方式中，装置还在第1区中包含对于物理隔离一个或更多第1流与一个或更多第2流有效的屏障。

【附图说明】

[0049] 本发明的上述方面和许多伴随优势会变得更加容易被同意为与通过参考下列详述，参照附图更佳明白的相同的。

[0050] 图1是本发明的代表流体装置的示意图。

[0051] 图2是本发明的代表流体装置的示意图，其为图1中例证的装置的明细。

[0052] 图3是本发明的代表流体装置的示意图，其为图2中例证的装置的明细。

[0053] 图4是本发明的代表流体装置和方法的示意图。

[0054] 图5是本发明的代表阵列的示意图，其包含图4中例证的流体装置中的10个。

[0055] 图6是本发明的代表流体装置的示意图。

[0056] 图7是本发明的代表阵列的示意图，其包含图6中例证的代表流体装置中的10个。

[0057] 图8是本发明的代表流体装置的示意图，其具有3个入口和单个出口（装置800包括混合通道810）。

[0058] 图9是本发明的代表流体装置的示意图，其具有2个入口和单个出口（装置900包括混合通道910）。

[0059] 图10是本发明的代表流体装置的示意图，其具有多重（n）系列个入口和单个出口（装置1000包括混合通道1010a, 1010b, 1010c和1010d）。

[0060] 图11是本发明的代表流体装置的示意图，其具有3个入口和单个出口（装置1100包括混合通道1110a, 1110b和1110c）。

[0061] 图12是本发明的代表流体装置的示意图，其具有7个入口和单个出口（装置1200包括混合通道1210a, 1210b, 1210c和1210d）。

[0062] 图13是本发明的代表流体装置的示意图，其具有多层混合器（装置1300包括混合通道1310）。

[0063] 图14是图14中例证的多层混合器的近观视图。

[0064] 图15A是制造脂质纳米粒子（LNP）的本发明的代表微流体（MF）方法的示意图：脂质-乙醇和siRNA-水溶液泵入微流体混合装置的入口；装置的鲑骨状特征诱导层式流的杂乱平流及导致脂质物质与水流快速混合及形成脂质纳米粒子。混合通道是200 μ m宽和79 μ m高。鲑骨状结构是31 μ m高和50 μ m厚。

[0065] 图15B是制造脂质纳米粒子（LNP）的预形成的囊泡（PFV）方法的示意图：(a) 将脂质-乙醇溶液加入水溶液，pH4.0，导致囊泡类型粒子的形成；(b) 通过80nm聚碳酸酯膜（Nuclepore）于室温使用Lipex挤出机的挤出提供更均一的粒子分布；及(c) 添加siRNA溶液而涡旋及于35 $^{\circ}$ C温育30分钟促进siRNA的包裹。

[0066] 图16A~16C例证微流体装置中的流速对混合及LNP粒径的影响。2个10 μ M荧光素（在pH8.8荧光，在pH5.15非-荧光）溶液混合而产生完全荧光溶液。图16A比较了通过沿着通道宽度的平均荧光强度测定的混合程度（%）作为从平均流体速度及行进长度（0.2, 0.8, 1.4和2mL/min）计算的混合时间（msec）的函数。图16B和16C比较由以40:11.5:47.5:1的摩尔比，siRNA-总脂质比0.06wt/wt的Dlin-KC2-DMA/DSPC/胆甾醇/PEG-c-DMA组成的LNP的平均粒径，10mM脂质-乙醇相与含有siRNA的25mM乙酸盐缓冲剂，pH4混合。图16B比较LNP的平均粒径（nm）作为流速（mL/min）的函数。图16C比较LNP的平均粒径（nm）作为乙醇/水流速比

的函数。误差条代表通过动态光散射测量的平均粒径的标准偏差。

[0067] 图17通过比较平均粒径 (nm) 作为乙醇中的脂质浓度 (mM) 的函数例证脂质浓度对LNP粒径的影响。增加脂质浓度导致平均粒径 增加。在微流体芯片中混合的乙醇相中的总脂质含量变动为10mM~50mM。LNP由以40:11.5:47.5:1的摩尔比, siRNA-总脂质比0.06wt/wt的DLin-KC2-DMA/DSPC/胆甾醇/PEG-c-DMA组成。微流体混合器之内的总流速维持在2ml/min。误差条代表通过动态光散射测量的平均粒径的标准偏差。

[0068] 图18A和18B例证PEG-脂质和阳离子脂质对LNP系统的影响。图18A比较平均粒径 (nm) 作为通过PFV和MF方法制备的LNP的PEG-c-DMA含量 (LNP中的mol %) 的函数。PEG-脂质在LNP组合中变动为1mol %~10mol %。PEG-脂质含量的改变通过调节胆甾醇含量而补偿。LNP由以40:11.5:47.5:1 (-x):1 (+x) 的摩尔比, (其中x=1~9), siRNA-总脂质比0.06wt/wt的DLin-KC2-DMA/DSPC/胆甾醇/PEG-c-DMA组成。图18B比较平均粒径 (nm) 作为通过PFV和MF方法制备的LNP的DLin-KC2-DMA含量 (mol %) 的函数。阳离子脂质变动为40mol %~70mol %。PEG-c-DMA保持恒定在1mol %和与DSPC-胆甾醇维持0.25摩尔比。微流体混合器之内的总流速维持在2ml/min。10mM脂质-乙醇相与含有siRNA的25mM乙酸盐缓冲剂, pH4混合。误差条代表通过动态光散射测量的平均粒径的标准偏差。

[0069] 图19通过比较平均粒径 (nm) 及包裹 (%) 作为siRNA/脂质比 (wt/wt) (也表达为核苷酸/磷酸 (N/P)) 的函数而例证siRNA/脂质比对粒径和包裹的影响。通过使用阴离子交换旋柱从游离的siRNA分离LNP悬浮液测定包裹。LNP由以40:11.5:47.5:1的摩尔比, siRNA-总脂质比0.06wt/wt的DLin-KC2-DMA/DSPC/胆甾醇/PEG-c-DMA组成。微流体混合器之内的总流速维持在2ml/min。10mM脂质-乙醇相与含有siRNA的25mM乙酸盐缓冲剂, pH4混合。误差条代表通过动态光散射测量的平均粒径的标准偏差。

[0070] 图20A和20B例证通过微流体混合器使用冷冻-传输电子显微镜检 (TEM) 制备的PEG-脂质和阳离子脂质LNP系统的形态。LNP通过Cryo-TEM以29K放大率成像。图20A是由以40:11.5:47.5:1的 摩尔比的DLin-KC2-DMA/DSPC/胆甾醇/PEG-c-DMA组成的空LNP的像。图20B是由以40:11.5:47.5:1的摩尔比, siRNA-总脂质比0.06wt/wt的DLin-KC2-DMA/DSPC/胆甾醇/PEG-c-DMA组成的siRNA装载的LNP的像。使用微流体混合器以20mM脂质在乙醇相中进行制剂。含有1mol %PEG-c-DOMG的装载的LNP-siRNA和空粒子呈现同一形态, 且结构非常均质。比例尺代表100nm。

[0071] 图21通过比较相对FVII蛋白水平 (%) 作为LNP中的DLin-KC2-DMA含量40mol %~60mol %变化的siRNA剂量 (mg/kg) 的函数例证因子VII小鼠模型中的LNP产生的微流体的体内沉默活性。含有1mol %PEG-c-DOMG和60mol %DLin-KC2-DMA的LNP制剂提供类似于之前报道的使用替代性的方法的FVII沉默。在40mol %~60mol %的范围, 含有DLin-KC2-DMA的LNP基因沉默渐进地改善。通过尾静脉注射 (n=3每剂量水平) 进行LNP-siRNA向小鼠的系统性注射。在注射后24小时之后进行血收集和因子VII水平通过比色测定来测定。LNP DSPC:胆甾醇比保持在0.2wt/wt及含有1mol %PEG-c-DOMG。LNP siRNA:脂质比是0.06wt/wt。

[0072] 图22A~22C例证通过微流体学方法制备的脂质纳米粒子的冷冻电子显微镜检。通过微流体学制备的空脂质纳米粒子 (40%DLinKC2-DMA, 11.5% DSPC, 47.5%胆甾醇, 1%PEG-c-DMA) 显示指示实体核心结构的电子致密内部 (图22A)。用POPC组成的样品显示与水性核心囊泡关联的欠密内部 (图22B)。具有被POPC的单层围绕的三油精疏水核心的含有

POPC/三油精的系统显示类似于样品A的电子致密内部(图22C)。

[0073] 图23例证用DLinKC2-DMA/PEG-脂质系统(90/10, mol/mol)使用微流体混合制备的限制尺寸LNP通过比较平均粒径(nm)作为LNP的乙醇/水流速比的函数, LNP在siRNA存在(N/P=1)及siRNA不存在(无siRNA)下产生。制剂使用与25mM乙酸盐缓冲剂, pH4混合的10mM脂质-乙醇相进行。粒径通过动态光散射测定及报道数-加权的平均直径。

[0074] 图24A~24C例证使用微流体混合在50%DLinKC2-DMA, 45%胆甾醇和5%PEG-c-DMA中包裹的siRNA的³¹P NMR。忽略DSPC以避免从磷脂发生的冲突磷信号。完整LNP或添加150mM乙酸钠之后不可检测来自siRNA的³¹P信号(图24A)(图24B)。仅可在添加1%SDS而溶解粒子之后检测信号(图24C)。

[0075] 图25是例证RNA酶保护测定的结果的电泳凝胶。siRNA使用微流体方法(MF)或PFV方法包裹, 或保持未包裹。将Triton X-100加入, 以完全溶解及裂解脂质粒子。在20%天然聚丙烯酰胺凝胶上进行凝胶电泳, 并将siRNA通过用CYBR-SAFE染色来可视化。

[0076] 图26例证以百分率脂质混合作为时间(秒)的函数代表的脂质混合融合测定的结果。为了评定LNP的最外层中存在的暴露的阳离子脂质的量, 制备3个LNP系统: 在siRNA缺失下(无siRNA), 以N/P=4, 及N/P=1。在pH5.5进行脂质测定, 以确保阳离子脂质的几乎完全电离, 及反应通过将LNP注射进含有高度阴离子DOPS/NBD-PE/Rh-PE(98:1:1摩尔比)囊泡的比色杯来起始。

[0077] 图27是通过根据本发明的方法微流体混合而形成的实体核心LNP siRNA系统的示意图。

[0078] 图28A和28B分别例证平均粒径(nm)及 ζ 电势(mV), 作为使用微流体混合器制备的连续脂质纳米粒子组合物的函数。

[0079] 图29是用于脂质纳米粒子的连续组装的本发明的代表装置和方法的示意图。

[0080] 图30是本发明的代表装置和方法的示意图。

[0081] 图31是本发明的代表装置和方法的示意图。

[0082] 图32是本发明的代表装置和方法的示意图。

[0083] 图33是本发明的代表装置和方法的示意图。

[0084] **【发明详述】**

[0085] 本发明提供含有治疗剂的脂质粒子, 制造含有治疗剂的脂质粒子的方法和装置, 及使用脂质粒子递送治疗剂的方法。

[0086] **【脂质粒子】**

[0087] 一方面, 本发明提供含有治疗剂的脂质粒子。脂质粒子包括一种或更多阳离子脂质, 一种或更多第2脂质, 及一种或更多核酸。

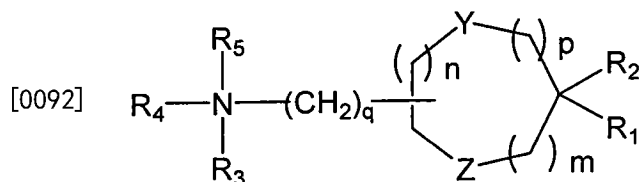
[0088] 阳离子脂质. 脂质粒子包括阳离子脂质。如本文所用, 术语“阳离子脂质”指称阳离子或随着pH降低到脂质的可离子化的基团的pK以下成为阳离子(质子化的), 但是在更高pH值渐进地更中性的脂质。在pK以下的pH值, 则脂质能结合带负电的核酸(例如, 寡核苷酸)。如本文所用, 术语“阳离子脂质”包括推定在pH减小后正电荷的两性离子脂质。

[0089] 术语“阳离子脂质”指称在选择性pH, 诸如生理学pH携带净正电荷的许多脂质物质之任何。该脂质包括, 但未限制于, N,N-二油基-N,N-二甲基铵氯化物(DODAC); N-(2,3-二油酰氧基)丙基)-N,N,N-三甲基铵氯化物(DOTMA); N,N-二硬脂基-N,N-二甲基铵溴化物

(DDAB); N-(2,3-二油酰氧基)丙基)-N,N,N-三甲基铵氯化物(DOTAP); 3-(N-(N',N'-二甲基氨基乙烷)-氨基甲酰基)胆甾醇(DC-Chol)和N-(1,2-二肉豆蔻酰氧基丙-3-基)-N,N-二甲基-N-羟乙基溴化铵(DMRIE)。此外,阳离子脂质的许多商业制备物可在本发明中使用。这些包括,例如,LIPOFECTIN[®](可商购的阳离子脂质体包含DOTMA和1,2-二油酰-sn-3-磷酸乙醇胺(DOPE),自GIBCO/BRL,Grand Island,NY);阳离子脂质体[®](可商购的阳离子脂质体包含N-(1-(2,3-二油酰氧基)丙基)-N-(2-(精胺羧酰氨基)乙基)-N,N-二甲基铵三氟乙酸盐(DOSPA)和(DOPE),自GIBCO/BRL);及TRANSFECTAM[®](可商购的阳离子脂质体包含乙醇中的二-十八烷基氨基甘氨酸羧基精胺(DOGS)自Promega Corp.,Madison,WI)。下列脂质是阳离子且在生理学pH以下具有正电荷:DODAP,DODMA,DMDMA,1,2-二亚油基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLinDMA),1,2-二亚油基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLenDMA)。

[0090] 在一实施方式中,阳离子脂质是氨基脂质。在本发明中有用的适合的氨基脂质包括描述于W0 2009/096558的那些,其通过引用整体并入本文。代表氨基脂质包括1,2-二亚油基氧基-3-(二甲基氨基)乙酰氧基丙烷(DLin-DAC),1,2-二亚油基氧基-3-吗啉代丙烷(DLin-MA),1,2-二亚油酰-3-二甲基氨基丙烷(DLinDAP),1,2-二亚油基硫代-3-二甲基氨基丙烷(DLin-S-DMA),1-亚油酰-2-亚油基氧基-3-二甲基氨基丙烷(DLin-2-DMA),1,2-二亚油基氧基-3-三甲基氨基丙烷氯化物盐(DLin-TMA·Cl),1,2-二亚油酰-3-三甲基氨基丙烷氯化物盐(DLin-TAP·Cl),1,2-二亚油基氧基-3-(N-甲基哌嗪并)丙烷(DLin-MPZ),3-(N,N-二亚油基氨基)-1,2-丙二醇(DLinAP),3-(N,N-二油基氨基)-1,2-丙二醇(DOAP),1,2-二亚油基氧代-3-(2N,N-二甲基氨基)乙氧基丙烷(DLin-EG-DMA)和2,2-二亚油基-4-二甲基氨基甲基-[1,3]-二氧杂环戊烷(DLin-K-DMA)。

[0091] 适合的氨基脂质包括具有下式的那些:



[0093] 其中R₁和R₂相同或不同,且独立地是:任选地取代的C₁₀~C₂₄烷基,任选地取代的C₁₀~C₂₄烯基,任选地取代的C₁₀~C₂₄炔基,或任选地取代的C₁₀~C₂₄酰基;

[0094] R₃和R₄相同或不同,且独立地是:任选地取代的C₁~C₆烷基,任选地取代的C₂~C₆烯基,或任选地取代的C₂~C₆炔基或R₃和R₄可接合而形成任选地取代的4~6个碳原子和1或2个选自氮和氧的杂原子的杂环;

[0095] R₅缺失或存在,且当存在时是氢或C₁~C₆烷基;

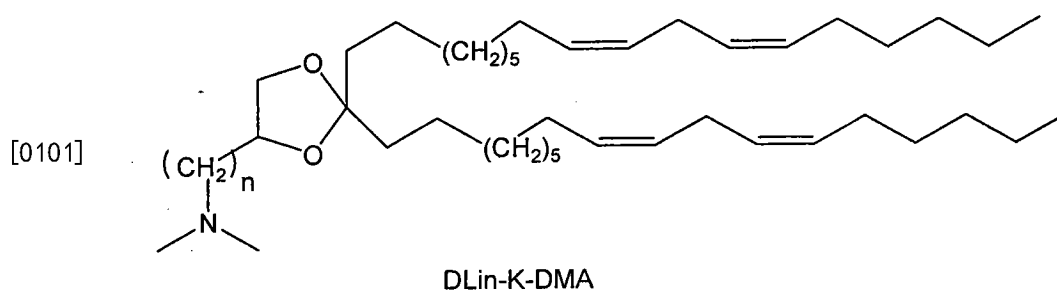
[0096] m,n和p相同或不同,且独立地是:0或1,前提是,m,n和p不同时是0;

[0097] q是0,1,2,3或4;以及

[0098] Y和Z相同或不同,且独立地是:O,S或NH。

[0099] 在一实施方式中,R₁和R₂各是亚油基,且氨基脂质是二亚油基氨基脂质。在一实施方式中,氨基脂质是二亚油基氨基脂质。

[0100] 代表性的有用的二亚油基氨基脂质具有下式:



[0102] 其中n是0,1,2,3或4。

[0103] 在一实施方式中,阳离子脂质是DLin-K-DMA。在一实施方式中,阳离子脂质是DLin-KC2-DMA (DLin-K-DMA以上,其中n是2)。

[0104] 其他适合的阳离子脂质包括,在约生理学pH携带净正电荷的阳离子脂质,除了上述那些特别之外,N,N-二油基-N,N-二甲基铵氯化物(DODAC);N-(2,3-二油基氧基)丙基-N,N,N-三乙基铵氯化物(DOTMA);N,N-二硬脂基-N,N-二甲基铵溴化物(DDAB);N-(2,3-二油酰氧基)丙基)-N,N,N-三甲基铵氯化物(DOTAP);1,2-二油基氧基-3-三甲基氨基丙烷氯化物盐(DOTAP·Cl);3β-(N-(N',N'-二甲基氨基乙烷)氨基甲酰基)胆甾醇(DC-Chol),N-(1-(2,3-二油酰氧基)丙基)-N-2-(精胺羧酰氨基)乙基)-N,N-二甲基铵三氟乙酸盐(DOSPA),二十八烷基氨基甘氨酸羧基精胺(DOGS),1,2-二油酰-3-二甲基铵丙烷(DODAP),N,N-二甲基-2,3-二油酰氧基)丙胺(DODMA)和N-(1,2-二肉豆蔻酰氧基丙-3-基)-N,N-二甲基-N-羟乙基溴化铵(DMRIE)。此外,可使用阳离子脂质的许多商业制备物,诸如,例如,LIPOFECTIN(包括DOTMA和DOPE,可获自GIBCO/BRL),及阳离子脂质体(包含DOSPA和DOPE,可获自GIBCO/BRL)。

[0105] 阳离子脂质以约30~约95摩尔百分率的量存在于脂质粒子中。在一实施方式中,阳离子脂质以约30~约70摩尔百分率的量存在于脂质粒子中。在一实施方式中,阳离子脂质以约40~约60摩尔百分率的量存在于脂质粒子中。

[0106] 在一实施方式中,脂质粒子包括仅一种或更多阳离子脂质和一种或更多核酸(“由其组成”)。由阳离子脂质和核酸组成的本发明的脂质粒子的制备和表征在实施例5中描述。

[0107] 第2脂质.在特定实施方式中,脂质粒子包括一种或更多第2脂质。适合的第2脂质稳定化它们的形成期间的粒子形成。

[0108] 术语“脂质”指称是脂肪酸的酯,且特征在于在水中不溶但在许多有机溶剂中可溶的一组有机化合物。脂质通常分为至少3类:(1)“简单脂质”,其包括脂肪和油以及蜡;(2)“化合物脂质”,其包括磷脂和糖脂;及(3)“衍生的脂质”诸如甾。

[0109] 适合的稳定化脂质包括中性脂质和阴离子脂质。

[0110] 中性脂质.术语“中性脂质”指称以在生理学pH不带电的或中性两性离子形式存在的许多脂质物质中的任何一种。代表中性脂质包括二酰基磷脂酰胆碱,二酰基磷脂酰乙醇胺,神经酰胺,鞘磷脂,二氢鞘磷脂,脑磷脂和脑苷脂。

[0111] 例示脂质包括,例如,二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC),二油酰磷脂酰胆碱(DOPC),二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC),二油酰磷脂酰甘油(DOPG),二棕榈酰磷脂酰甘油(DPPG),二油酰-磷脂酰乙醇胺(DOPE),棕榈酰油酰磷脂酰胆碱(POPC),棕榈酰油酰-磷脂酰乙醇胺(POPE)和二油酰-磷脂酰乙醇胺4-(N-马来酰亚胺甲基)-环己烷-1-羧酸{盐|酯}(DOPE-mai),二棕榈酰磷脂酰乙醇胺(DPPE),二肉豆蔻酰磷酸乙醇胺(DMPE),二硬脂酰-磷脂酰乙醇胺(DSPE),16-0-单甲基PE,16-0-二甲基PE,18-1-反式PE,1-硬脂酰-2-油酰-磷脂酰乙醇

胺(SOPE)和1,2-二反油酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(transDOPE)。

[0112] 在一实施方式中,中性脂质是1,2-二硬脂酰-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DSPC)。

[0113] 阴离子脂质.术语“阴离子脂质”指称在生理学pH带负电的任何脂质。这些脂质包括磷脂酰甘油,心磷脂,二酰基磷脂酰丝氨酸,二酰基磷脂酸,N-十二烷酰磷脂酰乙醇-胺,N-琥珀酰磷脂酰乙醇胺,N-戊二酰磷脂酰乙醇胺,赖氨酰磷脂酰甘油,棕榈酰油酰磷脂酰甘油(POPG),及接合到中性脂质的其他阴离子修饰基团。

[0114] 其他适合的脂质包括糖脂(例如,单唾液酸神经节苷酯GM₁)。其他适合的第2脂质包括甾醇,诸如胆甾醇。

[0115] 聚乙二醇-脂质.在特定实施方式中,第2脂质是聚乙二醇-脂质。适合的聚乙二醇-脂质包括PEG-修饰的磷脂酰乙醇胺,PEG-修饰的磷脂酸,PEG-修饰的神经酰胺(例如,PEG-CerC14或PEG-CerC20),PEG-修饰的二烷基胺,PEG-修饰的二酰基甘油,PEG-修饰的二烷基甘油。代表聚乙二醇-脂质包括PEG-c-DMG,PEG-c-DMA和PEG-s-DMG。在一实施方式中,聚乙二醇-脂质是N-[(甲氧基聚(乙二醇)₂₀₀₀)氨基甲酰基]-1,2-二肉豆蔻基氧基丙基-3-胺(PEG-c-DMA)。在一实施方式中,聚乙二醇-脂质是PEG-c-DMG)。

[0116] 在特定实施方式中,第2脂质以约1~约10摩尔百分率的量存在于脂质粒子中。在一实施方式中,第2脂质以约1~约5摩尔百分率的量存在于脂质粒子中。在一实施方式中,第2脂质以约1摩尔百分率存在于脂质粒子中。

[0117] 核酸.本发明的脂质粒子对于核酸的系统性或局部递送有用。如本文所述,将核酸在其形成期间并入脂质粒子。

[0118] 如本文所用,术语“核酸”意指包括任何寡核苷酸或多核苷酸。含有达50个核苷酸的片段通常被称为寡核苷酸,及更长片段被称为多核苷酸。在特定实施方式中,本发明的寡核苷酸是20~50个核苷酸长。在本发明的情景中,术语“多核苷酸”和“寡核苷酸”指称由天然存在的碱,糖和糖间(主链)连接组成的核苷酸或核苷单体的聚合物或寡聚体。术语“多核苷酸”和“寡核苷酸”也包括包含类似地发挥功能的非-天然存在的单体,或其部分的聚合物或寡聚体。该修饰的或取代的寡核苷酸常常相比天然形式优选,因为性质诸如,例如,在核酸酶存在下增强的细胞摄取及增加的稳定性。寡核苷酸分类为脱氧核糖寡核苷酸或核糖寡核苷酸。脱氧核糖寡核苷酸由称之为脱氧核糖的5-碳糖在此糖的5'和3'碳共价接合到磷酸而形成交替,未分支的聚合物组成。核糖寡核苷酸由其中5-碳糖是核糖的类似重复结构组成。存在于本发明的脂质粒子中的核酸包括任何形式的知道的核酸。本文所用的核酸可为单链DNA或RNA,或双链DNA或RNA,或DNA-RNA杂交体。双链DNA的例包括结构基因,包括控制和终止区的基因,及自身-复制系统诸如病毒或质粒DNA。双链RNA的例包括siRNA和其他RNA干扰试剂。单链核酸包括反义寡核苷酸,核酶,微RNA和三联体-形成寡核苷酸。

[0119] 在一实施方式中,多核酸是反义寡核苷酸。在特定实施方式中,核酸是反义核酸,核酶,tRNA,snRNA,siRNA,shRNA,ncRNA,miRNA,预凝缩的DNA,或适体。

[0120] 术语“核酸”也指称核糖核苷酸,脱氧核苷酸,修饰的核糖核苷酸,修饰的脱氧核糖核苷酸,修饰的磷酸-糖-主链寡核苷酸,其他核苷酸,核苷酸类似物和其组合,且可为单链,双链或含有双链和单链序列的部分,如果适当。

[0121] 术语“核苷酸”,如本文所用,属类上包括下文定义的下列术语:核苷酸碱,核苷,核苷酸类似物,及通用核苷酸。

[0122] 术语“核苷酸碱基”，如本文所用，指称取代的或未经取代的母体芳族环。在一些实施方式中，芳族环含有至少一个氮原子。在一些实施方式中，核苷酸碱基能与适当互补核苷酸碱基形成Watson-Crick和/或Hoogsteen氢键。例示核苷酸碱基和其类似物包括，但未限制于，嘌呤诸如2-二氨基嘌呤，2,6-二氨基嘌呤，腺嘌呤(A)，亚乙基腺嘌呤，N6-2-异戊烯基腺嘌呤(6iA)，N6-2-异戊烯基-2-异戊烯基腺嘌呤(2ms6iA)，N6-甲基腺嘌呤，鸟嘌呤(G)，异鸟嘌呤，N2-二甲基鸟嘌呤(dmG)，7-甲基鸟嘌呤(7mG)，2-硫代嘧啶，6-硫代鸟嘌呤(6sG)次黄嘌呤和06-甲基鸟嘌呤；7-脱氮-嘌呤诸如7-脱氮腺嘌呤(7-脱氮-A)和7-脱氮鸟嘌呤(7-脱氮-G)；嘧啶诸如胞嘧啶(C)，5-丙炔基胞嘧啶，异胞嘧啶，胸腺嘧啶(T)，4-硫代胸腺嘧啶(4sT)，5,6-二氢胸腺嘧啶，04-甲基胸腺嘧啶，尿嘧啶(U)，4-硫代尿嘧啶(4sU)和5,6-二氢尿嘧啶(二氢尿嘧啶；D)；吡咯诸如硝基吡咯和4-甲基吡咯；吡咯诸如硝基吡咯；水粉蕈素；碱基(Y)；在一些实施方式中，核苷酸碱基是通用核苷酸碱基。额外的例示核苷酸碱基可见于Fasman, 1989, Practical Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, pp. 385-394, CRC Press, Boca Raton, Fla., 及该文引用的参考文献。通用碱基的进一步例可发现于例如Loakes, N.A.R. 2001, vol 29: 2437-2447和Seela N.A.R. 2000, vol 28: 3224-3232。

[0123] 术语“核苷”，如本文所用，指称具有共价连接于戊糖的C-1'碳的核苷酸碱基的化合物。在一些实施方式中，连接是经杂芳族环氮。典型戊糖包括，但未限制于，一个或更多碳原子各独立地用一个或更多相同的或不同-R，-OR，-NRR或卤素基团取代的那些戊糖，其中各R独立地是氢，(C1~C6)烷基或(C5~C14)芳基。戊糖可饱和或不饱和。例示戊糖和其类似物包括，但未限制于，核糖，2'-脱氧核糖，2'-(C1~C6)烷氧基核糖，2'-(C5~C14)芳氧基核糖，2',3'-二脱氧核糖，2',3'-二脱氢核糖，2'-脱氧-3'-卤代核糖，2'-脱氧-3'-氟核糖，2'-脱氧-3'-氯代核糖，2'-脱氧-3'-氨基核糖，2'-脱氧-3'-(C1~C6)烷基核糖，2'-脱氧-3'-(C1~C6)烷氧基核糖和2'-脱氧-3'-(C5~C14)芳氧基核糖。也见，例如，2'-O-甲基，4'. α -异头核苷酸，1'. α -异头核苷酸(Asseline (1991) Nucl. Acids Res. 19: 4067-74)，2'-4'-及3'-4'-连接的和“锁的”或“LNA”，双环糖修饰(WO 98/22489; WO 98/39352; WO 99/14226)。“LNA”或“锁核酸”是构象上锁的使得核糖环被2'-氧和3'-或4'-碳之间的亚甲基连接约束的DNA类似物。被连接强加的构象限制常常增加对互补序列的结合亲和力和增加该双联体的热稳定性。

[0124] 糖包括在2'-或3'-位置的修饰，诸如甲氧基，乙氧基，烯丙氧基，异丙氧基，丁氧基，异丁氧基，甲氧基乙基，烷氧基，苯氧基，叠氮基，氨基，烷氨基，氟，氯和溴。核苷和核苷酸包括天然的D构型异构体(D-型)，以及L构型异构体(L-型)(Beigelman, U.S. Pat. No. 6, 251, 666; Chu, U.S. Pat. No. 5, 753, 789; Shudo, EP 0540742; Garbesi (1993) Nucl. Acids Res. 21: 4159-65; Fujimori (1990) J. Amer. Chem. Soc. 112: 7435; Urata, (1993) Nucleic Acids Symposium Ser. No. 29: 69-70)。当核碱基是嘌呤时，例如，A或G，核糖糖附接于核碱基的N9-位置。当核碱基是嘧啶时，例如，C，T或U，戊糖附接于核碱基的N1-位置(Kornberg and Baker, (1992) DNA Replication, 2. sup. nd Ed., Freeman, San Francisco, Calif.)。

[0125] 核苷的一个或更多戊糖碳可用磷酸酯取代。在一些实施方式中，磷酸酯附接于戊糖的3'-或5'-碳。在一些实施方式中，核苷是核苷酸碱基是嘌呤，7-脱氮嘌呤，嘧啶，通用核苷酸碱基，特定核苷酸碱基，或其类似物的那些。

[0126] 术语“核苷酸类似物”，如本文所用，指称核苷的戊糖和/或核苷酸碱基和/或一个或更多磷酸酯可用其相应类似物取代的实施方式。在一些实施方式中，例示戊糖类似物是上述那些。在一些实施方式中，核苷酸类似物具有上述核苷酸碱基类似物。在一些实施方式中，例示磷酸酯类似物包括，但未限制于，烷基磷酸酯，甲基磷酸酯，氨基磷酸酯，磷酸三酯，硫代磷酸酯，二硫代磷酸酯，硒代磷酸酯，二硒代磷酸酯，苯胺基硫代磷酸酯，苯胺基磷酸酯，氨基磷酸酯，硼烷磷酸酯和可包括关联的对离子。其他核酸类似物和碱基包括例如嵌入核酸 (INA, 如描述于Christensen和Pedersen, 2002) 和AEGIS碱基 (Eragen, 美国专利No. 5, 432, 272)。各种核酸类似物的额外的描述也可见于例如 (Beaucage et al., Tetrahedron 49 (10): 1925 (1993) 和该文中的参考文献; Letsinger, J. Org. Chem. 35: 3800 (1970); Sprinzl et al., Eur. J. Biochem. 81: 579 (1977); Letsinger et al., Nucl. Acids Res. 14: 3487 (1986); Sawai et al., Chem. Lett. 805 (1984), Letsinger et al., J. Am. Chem. Soc. 110: 4470 (1988); and Pauwels et al., Chemica Scripta 26: 141 (1986)), 硫代磷酸酯 (Mag et al., Nucleic Acids Res. 19: 1437 (1991); and U.S. Pat. No. 5, 644, 048)。其他核酸类似物包含二硫代磷酸酯 (Briu et al., J. Am. Chem. Soc. 111: 2321 (1989)), 0-甲基亚磷酰胺键 (见Eckstein, Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, Oxford University Press), 具有阳性主链的那些 (Denpcy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 6097 (1995)); 非-离子主链 (U.S. Pat. Nos. 5, 386, 023, 5, 386, 023, 5, 637, 684, 5, 602, 240, 5, 216, 141, and 4, 469, 863. Kiedrowski et al., Angew. Chem. Intl. Ed. English 30: 423 (1991); Letsinger et al., J. Am. Chem. Soc. 110: 4470 (1988); Letsinger et al., Nucleoside & Nucleotide 13: 1597 (1994): Chapters 2 and 3, ASC Symposium Series 580, "Carbohydrate Modifications in Antisense Research", Ed. Y.S. Sanghui and P. Dan Cook; Mesmaeker et al., Bioorganic & Medicinal Chem. Lett. 4: 395 (1994); Jeffs et al., J. Biomolecular NMR 34: 17 (1994); Tetrahedron Lett. 37: 743 (1996)) 和非-核糖主链, 包括描述于美国专利No. 5, 235, 033和5, 034, 506, 及Chapters 6 and 7, ASC Symposium Series 580, "Carbohydrate Modifications in Antisense Research", Ed. Y.S. Sanghui and P. Dan Cook的那些。含有一种或更多碳环糖的核酸也包括在核酸的定义之内 (见Jenkins et al., Chem. Soc. Rev. (1995) pp169-176)。几种核酸类似物是也描述于Rawls, C & E News 1997年6月2日第35页。

[0127] 术语“通用核苷酸碱基”或“通用碱基”，如本文所用，指称可含或可不含氮原子的芳族环部分。在一些实施方式中，可将通用碱基共价附接于戊糖的C-1'碳而制造通用核苷酸。在一些实施方式中，通用核苷酸碱基不特别与另一核苷酸碱基氢键键合。在一些实施方式中，通用核苷酸碱基与核苷酸碱基氢键键合，达及包括全部核苷酸碱基尤其是靶多核苷酸。在一些实施方式中，核苷酸碱基可与相同的核酸链上的相邻核苷酸碱基通过疏水堆叠相互作用。通用核苷酸包括，但未限制于，脱氧-7-氮杂吡啶三磷酸 (d7AITP)，脱氧异喹诺酮三磷酸 (dICSTP)，脱氧丙炔基异喹诺酮三磷酸 (dPICSTP)，脱氧甲基-7-氮杂吡啶三磷酸 (dM7AITP)，deoxy ImPy三磷酸 (dImPyTP)，deoxyPP三磷酸 (dPPTP)，或脱氧丙炔基-7-氮杂吡啶三磷酸 (dP7AITP)。该通用碱基的进一步例可尤其见于公开的美国申请No. 10/290672, 及美国专利No. 6, 433, 134。

[0128] 如本文所用,术语“多核苷酸”和“寡核苷酸”互换使用,且是指核苷酸单体的单链和双链聚合物,包括2'-脱氧核糖核苷酸(DNA)和核糖核苷酸(RNA),其通过核苷酸间磷酸二酯键连接,例如,3'-5'和2'-5',倒置的连接,例如,3'-3'和5'-5',分支的结构,或核苷酸间类似物连接。多核苷酸关联了对离子,诸如 H^+ , NH_4^+ ,三烷基铵, Mg^{2+} , Na^+ ,等。多核苷酸可完全由脱氧核糖核苷酸组成,完全由核糖核苷酸组成,或其嵌合混合物。多核苷酸可包含间核苷酸,核碱基和/或糖类似物。多核苷酸一般在尺寸上是从少单体单元,例如,当它们是在本领域中更通常称之为寡核苷酸时是3~40,至几千个单体核苷酸单元。除非另外表示,无论何时表示多核苷酸序列,核苷酸均以5'到3'顺序从左至右表示,且“A”表示脱氧腺苷,“C”表示脱氧胞嘧啶,“G”表示脱氧鸟苷,及“T”表示胸苷,除非另外定义。

[0129] 如本文所用,“核碱基”是指那些天然存在的和那些非-天然存在的利用核酸技术或利用肽核酸技术而由此产生可与核酸序列特异性结合的聚合物的人们通常知道的杂环部分。适合的核碱基的非限制性例包括:腺嘌呤,胞嘧啶,鸟嘌呤,胸腺嘧啶,尿嘧啶,5-丙炔基-尿嘧啶,2-硫代-5-丙炔基-尿嘧啶,5-甲基胞嘧啶,假异胞嘧啶,2-硫代尿嘧啶和2-硫代胸腺嘧啶,2-二氨基嘌呤,N9-(2-氨基-6-氯代嘌呤),N9-(2,6-二氨基嘌呤),次黄嘌呤,N9-(7-脱氮-鸟嘌呤),N9-(7-脱氮-8-氮杂-鸟嘌呤)和N8-(7-脱氮-8-氮杂-腺嘌呤)。适合的核碱基的其他非限制性例包括Buchardt等人(W092/20702或W092/20703)的图2(A)和2(B)中例证的那些核碱基。

[0130] 如本文所用,“核碱基序列”是指任何段,或2个或更多段的聚集物(例如2个或更多寡聚体块的聚集核碱基序列),包含含有核碱基的亚基的聚合物的聚集物。适合的聚合物或聚合物段的非限制性例包括寡脱氧核苷酸(例如DNA),寡核糖核苷酸(例如RNA),肽核酸(PNA),PNA嵌合体,PNA组合寡聚体,核酸类似物和/或核酸模拟物。

[0131] 如本文所用,“多核碱基链”是指包含核碱基亚基的完全单聚合物链。例如,双链核酸的单核酸链是多核碱基链。

[0132] 如本文所用,“核酸”是含有核碱基序列的聚合物,或聚合物段,其具有由核苷酸,或其类似物形成的主链。

[0133] 优选的核酸是DNA和RNA。

[0134] 如本文所用,核酸也可指称“肽核酸”或“PNA”是指包含2个或更多PNA亚基(残留物),但不是核酸亚基(或其类似物)的任何寡聚体或聚合物段(例如嵌段寡聚体),包括但不限于下列文献中称之为肽核酸或作为肽核酸要求的任何寡聚体或聚合物段:美国专利No.5,539,082,5,527,675,5,623,049,5,714,331,5,718,262,5,736,336,5,773,571,5,766,855,5,786,461,5,837,459,5,891,625,5,972,610,5,986,053和6,107,470;均通过引用并入本文。术语“肽核酸”或“PNA”应也应用于描述于下列出版物的那些核酸模拟物的包含2个或更多亚基的任何寡聚体或聚合物段:Lagriffoul et al.,Bioorganic&Medicinal Chemistry Letters,4:1081-1082(1994);Petersen et al.,Bioorganic &Medicinal Chemistry Letters,6:793-796(1996);Diderichsen et al.,Tett.Lett.37:475-478(1996);Fujii et al.,Bioorg.Med.Chem.Lett.7:637-627(1997);Jordan et al.,Bioorg.Med.Chem.Lett.7:687-690(1997);Krotz et al.,Tett.Lett.36:6941-6944(1995);Lagriffoul et al.,Bioorg.Med.Chem.Lett.4:1081-1082(1994);Diederichsen, U.,Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters,7:1743-1746(1997);Lowe et al.,

J.Chem.Soc.Perkin Trans.1,(1997)1:539-546;Lowe et J.Chem.Soc.Perkin Trans.11:547-554(1997);Lowe et al.,J.Chem.Soc.Perkin Trans.11:555-560(1997);Howarth et al.,J.Org.Chem.62:5441-5450(1997);Altmann,K-H et al.,Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters,7:1119-1122(1997);Diederichsen,U.,Bioorganic & Med.Chem.Lett.,8:165-168(1998);Diederichsen et al.,Angew.Chem.Int.Ed.,37:302-305(1998);Cantin et al.,Tett.Lett.,38:4211-4214(1997);Ciapetti et al.,Tetrahedron,53:1167-1176(1997);Lagriffoule et al.,Chem.Eur.J.,3:912-919(1997);Kumar et al.,Organic Letters 3(9):1269-1272(2001);以及如公开于W096/04000的Shah等人的Peptide-Based Nucleic Acid Mimics (PENAMS)。

[0135] 【脂质粒子特征】

[0136] 形态.本发明的脂质粒子不同于其他类似地构成的物质在于其形态,且表征为具有基本上实体核心。具有基本上实体核心的脂质粒子是在内部不具有延伸的水性区且具有主要是脂质的内部的粒子。在一实施方式中,延伸的区是体积大于半粒子体积的连续水性区。在第2实施方式中,延伸的水性区大于25%的粒子体积。内部水性区的程度可通过电子显微镜测定及呈现为低电子密度的区。而且,因为实体核心纳米粒子的内部主要是脂质,粒子的水含量(“捕获的体积”)/构成粒子的脂质小于具有相同的半径的单层双层脂质囊泡预期的。在一实施方式中,捕获的体积小于50%的具有相同的半径的单层双层囊泡预期的。在第2实施方式中,捕获的体积小于25%相同的尺寸的单层双层囊泡预期的。在第3实施方式中,捕获的体积小于20%的粒子的总体积。在一实施方式中,捕获的体积/脂质小于 $2\mu\text{l}/\mu\text{mol}$ 脂质。在另一实施方式中,捕获的体积小于 $1\mu\text{l}/\mu\text{mol}$ 脂质。此外,当随着囊泡半径增加而双层脂质囊泡的捕获的体积/脂质基本上增加时,随着实体核心纳米粒子的半径增加而捕获的体积/脂质基本上不增加。在一实施方式中,随着平均尺寸从20nm的直径到100nm的直径的增加而捕获的体积/脂质增加小于50%。在第2实施方式中,随着平均尺寸从20nm的直径到100nm的直径的增加而捕获的体积/脂质增加小于25%。捕获的体积可采用描述于文献的各种技术测量。因为实体核心系统在粒子之内含有脂质,每摩尔的脂质产生的给定半径的粒子总数小于双层囊泡系统预期的。每摩尔的脂质产生的粒子数可通过尤其荧光技术测量。

[0137] 本发明的脂质粒子也可通过电子显微镜检表征。本发明的粒子具有基本上具有通过电子显微镜检见到的电子致密核心的实体核心。电子致密定义为实体核心粒子的内部50%的投射的区的区-平均的电子密度(如在2-D冷冻EM像中见到的)不小于x%(x=20%,40%,60%)的在粒子周边最大电子密度。电子密度计算为目的区的成像强度与不含有纳米粒子的区中的背景强度的差异的绝对值。

[0138] 粒径.本发明的脂质粒子具有约15~约300nm的直径(平均粒径)。在一些实施方式中,脂质粒子具有约300nm或更小,250nm或更小,200nm或更小,150nm或更小,100nm或更小,或50nm或更小的直径。在一实施方式中,脂质粒子具有约15~约100nm的直径。这些粒子通常呈现相比大粒子增加的体内循环寿命。在一实施方式中,脂质粒子具有约15~约50nm的直径。这些粒子能有利地逃逸出血管系统。在一实施方式中,脂质粒子具有约15~约20nm的直径。这些粒子接近含有核酸的粒子的限制尺寸;该粒子可包括单个多核苷酸(例如,sirRNA)。

[0139] 本发明的脂质粒子在它们的粒度分布上基本上均质。在特定实施方式中,本发明的脂质粒子具有约65~约25%的平均粒径标准偏差。在一实施方式中,本发明的脂质粒子具有约60,50,40,35或30%的平均粒径标准偏差。

[0140] 包裹效率.本发明的脂质粒子可还区别在包裹效率。如下文所述,本发明的脂质粒子通过在形成过程中使用的几乎100%的核酸包裹在粒子中的方法制备。在一实施方式中,脂质粒子通过在形成过程中使用的约90~约95%的核酸包裹在粒子中的方法制备。

[0141] 【制造脂质粒子的微流体方法】

[0142] 一方面,本发明提供制造含有治疗剂的脂质粒子的方法。在一实施方式中,方法包括:

[0143] (a) 将在第1溶剂中包含治疗剂(例如,多核酸)的第1流导入微通道;其中微通道具有适于将一个或更多流导入微通道的第1区和用于混合一个或更多流的内容物的第2区;

[0144] (b) 将在第2溶剂中包含脂质粒子-形成物质的第2流导入微通道以提供在层流条件下流动的第1和第2流,其中脂质粒子-形成物质包含可离子化的脂质,且其中第1和第2溶剂不相同;

[0145] (c) 使一个或更多第1流和一个或更多第2流从微通道的第1区流入微通道的第2区;以及

[0146] (d) 在微通道的第2区中混合在层流条件下流动的一个或更多第1流和一个或更多第2流的内容物以提供包含具有包裹的治疗剂的脂质粒子的第3流。

[0147] 第1和第2流的内容物可通过杂乱平流混合。在一实施方式中,混合一个或更多第1流和一个或更多第2流的内容物包括改变一个或更多第1流和一个或更多第2流的浓度或相对混合速度。在以上实施方式中,与知道的方法不同,方法不包括混合之后稀释。

[0148] 为了进一步稳定化含有具有包裹的治疗剂的脂质粒子的第3流,方法可,但不必需还包括,包括用水性缓冲剂稀释第3流。在一实施方式中,稀释第3流包括使第3流和水性缓冲剂流入第2混合结构。在另一实施方式中,透析包含具有包裹的治疗剂的脂质粒子的水性缓冲剂以减少第2溶剂的量。

[0149] 第1流在第1溶剂中包括治疗剂。适合的第1溶剂包括治疗剂是可溶性且与第2溶剂混溶的溶剂。适合的第1溶剂包括水性缓冲剂。代表第1溶剂包括柠檬酸盐和乙酸盐缓冲剂。

[0150] 第2流在第2溶剂中包括脂质粒子-形成物质。适合的第2溶剂包括可离子化的脂质是可溶性且与第1溶剂混溶性的溶剂。适合的第2溶剂包括1,4-二噁烷,四氢呋喃,丙酮,乙腈,二甲基亚砜,二甲基甲酰胺,酸和醇。代表第2溶剂包括水性乙醇90%。

[0151] 本发明的方法以几种方式区别于其他微流体混合方法。然而特定知道的方法需要等同或基本上等比例的水性溶剂和有机溶剂(即,1:1),本发明的方法通常利用超过1:1的水性溶剂对有机溶剂的溶剂比。在特定实施方式中,水性溶剂对有机溶剂的溶剂比是约2:1。在特定实施方式中,水性溶剂对有机溶剂的溶剂比是约3:1。在特定实施方式中,水性溶剂对有机溶剂的溶剂比是约4:1。在特定其他实施方式中,水性溶剂对有机溶剂的溶剂比是约5:1,约10:1,约50:1,约100:1,或更大。

[0152] 本发明的脂质粒子有利地在利用相对快速混合及高流速的微流体方法中形成。快速混合提供具有以上提及的有利的性质(包括尺寸,同质性,包裹效率)的脂质粒子。本发明的方法的实践中使用的混合速度范围约100 μ s~约10ms。代表性混合速度包括约1~约5ms。

然而水动力流聚焦方法用相对低脂质体积以相对低流速(例如,5~100 μ L/分钟)操作,本发明的方法以相对高流速和相对高脂质体积操作。在特定实施方式中,对于合并单混合区的方法(即,混合器),流速是约1mL/min。对于利用混合器阵列(例如,10混合器)的本发明的方法,采用40mL/分钟的流速(对于100混合器,流速400mL/min)。由此,本发明的方法可容易缩放以提供要求产生需求必需的脂质粒子的量。偶联于实现的有利的粒径和同质性和包裹效率,本发明的方法克服了产生脂质粒子的知道的微流体方法的缺点。本发明的制造脂质粒子的方法的一个优势是方法是可缩放的,这是指方法在缩放过程中不变化且在缩放过程中有优良的对应。

[0153] 【制造脂质粒子的微流体装置】

[0154] 在另一方面,本发明提供产生包裹核酸的脂质粒子的装置。在一实施方式中装置包括:

[0155] (a) 第1入口,其用于接收在第1溶剂中包含核酸的第1溶液;

[0156] (b) 第1入口微通道,其与第1入口流通连接以提供在第1溶剂中包含核酸的第1流;

[0157] (c) 第2入口,其用于接收在第2溶剂中包含脂质粒子-形成物质的第2溶液;

[0158] (d) 第2入口微通道,其与第2入口流通连接以提供在第2溶剂中包含脂质粒子-形成物质的第2流;

[0159] (e) 第3微通道,其用于接收第1和第2流,其中第3微通道具有适于在层流条件下将第1和第2流导入微通道的第1区和适于混合第1和第2流的内容物的第2区以提供包含具有包裹的核酸的脂质粒子的第3流。

[0160] 在一实施方式中,装置还包括用于稀释第3流的设施以提供包含稳定化的具有包裹的治疗剂的脂质粒子的稀释的流。

[0161] 本发明的装置是微流体装置包括一个或更多微通道(即,具有其小于1mm的最大尺度的通道)。在一实施方式中,微通道具有约20~约300 μ m的水动力直径。如上所述,微通道具有2个区:第1区用于接收及在层流条件下流动至少2个流(例如,一个或更多第1流和一个或更多第2流)。第1和第2流的内容物在微通道的第2区混合。在一实施方式中,微通道的第2区具有主流方向和一个或更多表面,所述表面具有至少一个限定于其中的凹槽或突起,凹槽或突起具有与主方向成角的取向(例如,交错的鲑骨状混合器),如描述于美国申请公开No. 2004/0262223,其通过引用整体并入本文。在一实施方式中,微通道的第2区包含浅浮雕结构。为了达到最大混合速度,其对避免在混合区之前过度流体抗性是有利的。由此,本发明的一实施方式是具有大于1000 μ m的尺度的非-微流体通道的用于将流体递送到单混合通道的装置。

[0162] 在本发明的其他方面,将第1和第2流用其他微混合器混合。适合的微混合器包括滴混合器,T-混合器,之字型混合器,多层混合器或其他活动混合器。

[0163] 第1和第2流的混合也可用于改变浓度和相对第1和第2流的流速的设施实现。

[0164] 在另一实施方式中,产生包裹核酸的脂质粒子的装置包括用于接收第1和第2流的微通道,其中微通道具有适于在层流条件下将第1和第2流导入微通道的第1区和适于混合第1和第2流的内容物的第2区以提供包含具有包裹的治疗剂的脂质粒子的第3流。在此实施方式中,将第1和第2流利用不是以上提及的第1和第2微通道的微通道导入微通道。

[0165] 为了达到最大混合速度,其对避免在混合区之前过度流体抗性是有利的。由此,本

发明的一实施方式是具有大于1000 μm 的尺度的非-微流体通道的用于将流体递送到单混合通道的装置。此产生包裹核酸的脂质粒子的装置包括：

[0166] (a) 单入口微通道,其用于接收在第1溶剂中包含核酸的第1溶液和在第2溶剂中包含脂质粒子-形成物质的第2溶液；

[0167] (b) 适于混合第1和第2流的内容物的第2区以提供包含具有包裹的核酸的脂质粒子的第3流。

[0168] 在该一实施方式中,将第1和第2流通过单入口或通过不具有微-尺度的1个或2个通道,例如,具有大于1000 μm 的尺度(例如,1500或2000 μm 或更大)的通道导入微通道。这些通道可使用相邻或同心 大尺寸的通道导入入口微通道。

[0169] 图1是本发明的代表流体装置的示意图。说到图1,装置100包括用于接收在第1溶剂中包含治疗剂的第1流的区A和用于接收在第2溶剂中包含脂质粒子-形成物质的流的区B。将第1和第2流导入在层流条件下流动的区C,到其中快速混合发生的区D,然后到其中最终产物,含有治疗剂的脂质粒子,出装置的区E。

[0170] 图2是本发明的代表流体装置的示意图,其为图1中例证的装置和方法的明细。说到图2,装置200包括用于接收在第1溶剂中包含治疗剂的第1流到微通道的区A,其中微通道具有第1区,其适于一个或更多流的流动(A-a)引导(A-b)及混合(A-c);用于接收在第2溶剂中包含脂质粒子-形成物质的第2流的区B,其中微通道具有第1区,其适于一个或更多流的流动(B-a)引导(B-b)及混合(B-c);区C在层流条件下引导区A和区B的流(C-a)和快速混合(C-b);及区D,其中制剂准备用于进一步处理诸如稀释,pH调节或纳米粒子合成需要的其他事件,或其中最终产物,含有治疗剂的脂质粒子,出装置。

[0171] 图3是本发明的代表流体装置的示意图,其为图2中例证的装置和方法的明细。说到图3,装置300包括用于接收在第1溶剂中包含治疗剂的第1流到微通道的区A,其中微通道具有第1区,其适于一个或更多流的流动(A-a)引导(A-b)及混合(A-c);用于接收在第2溶剂中包含脂质粒子-形成物质的第2流的区B,其中微通道具有第1区,其适于一个或更多流的流动(B-a)引导(B-b)及混合(B-c);区C在层流条件下引导区A和区B的流(C-a)和快速混合(C-b);区D,其用于接收包含任意数的包括其他粒子-形成物质的物质的第3流,稀释,pH调节,或纳米粒子合成需要的其他事件;区E在层流条件下引导区C和区D的流(E-a)和快速混合(E-b);区F,其中制剂准备用于进一步处理如稀释,pH调节或纳米粒子合成需要的其他事件,或其中最终产物,含有治疗剂的脂质粒子,出装置。

[0172] 图4是本发明的另一代表流体装置(400)的示意图。图5是图4 中例证的代表流体装置的代表阵列的示意图。

[0173] 图6是本发明的另一代表流体装置(600)的示意图。说到图6,装置600包括混合通道610a,610b和610c。图7是图6中例证的代表流体装置的代表阵列的示意图。

[0174] 微流体装置上纳米粒子的形成被参与混合事件的试剂体积,及装置可在渗漏发生之前抵御的限制的后压所限制。相比滴或流聚焦方法,鲐骨状或多层混合器的单元件流速达到100~1000倍数增加。为了达到生产规模通量,可阵列多混合器元件。在一实施方式中,使用低阻抗总线通道将各试剂分布于个体混合器元件。如果总线通道的阻抗相比混合器元件的阻抗是可忽略的,各混合器的入口的个体流速是相同的。由于多个混合器元件平行操作,系统阻抗减小导致更高体积测定通量。

[0175] 此具有优势,使用单混合器元件观察的混合特征可维持在混合器阵列中。在一实施方式中,通过将多个流导入微通道来实现在各混合器阵列元件中的混合。在此情况中,流会通过扩散混合。流线宽度可通过控制经过注射通道的相对流速(例如,通过调整这些通道的尺度)来改变(图5)。在另一实施方式中,混合通过杂乱平流(交错的鲑骨状混合器,SHM)达到。如显示于图7,阵列的各混合器元件可由一系列混合器组成。通过添加元件到各阵列子集,额外的功能性可线内整合于微流体装置。该功能性可包括芯片上稀释,透析,pH调节或需要交错的流线,共享相同的通道的流或通过多孔物质彼此分离的流的其他事件。在一实施方式中,在各阵列子集的第1混合器元件中将10mM POPC溶于100%乙醇及与磷酸盐缓冲液(PBS),pH7.4混合。将混合之后形成的LNP通过将混合物用PBS稀释2倍来稳定化。

[0176] 表1比较在单混合器和由10个个体混合器组成的混合器阵列上形成的粒子的粒度分布。通过单混合器的总流速可为4ml/min,在各交叉的混合比为50:50。体积测定通量可通过平行操作10个混合器增加10倍得到40ml/min的总体积测定流速。当阵列通量依从生产规模合成时,维持LNP尺度。

[0177] 表1.在单混合器和由10个个体混合器组成的混合器阵列上形成的粒子的粒度分布。

[0178]

单混合器			
尺寸测量方法	平均直径 (nm)	标准偏差(nm)	×方
强度	73.0	37.8	1.58
体积	62.8	32.5	
数	25.7	13.3	

混合器阵列			
尺寸测量方法	平均直径 (nm)	标准偏差(nm)	×方
强度	72.1	35.1	1.08
体积	62.7	32.4	
数	27.0	13.7	

[0179] 任意数的并行试剂入口,连续混合室,及分支构造的任何组合可用于优化纳米粒子制剂过程。此具有优势,不同制剂过程可精确地控制且纳米粒子制剂过程的多个步骤可整合。例包括,但未限制于,下列:(a) 导入由不同(图8)或相同的(图9)试剂的组合组成的2个或更多入口而允许独立输入控制(使用包括输入试剂的流速的独立控制,改变输入试剂之间,及其他之间的比);(b) 2个或更多按顺序的混合器而允许纳米粒子试剂或制剂处理步骤的连续添加(图10)(使用包括按顺序添加输入试剂用于纳米粒子的控制的底部组装,制剂过程的整合,如稀释,pH调节或纳米粒子合成需要的其他事件,及其他);或(c) 输入,混合室及分支构造的任何组合,图11和图12例证具有改变数的并行试剂输入及分支微流体结构的2步骤和3步骤混合器(使用包括制剂过程的多个步骤的整合,其包括纳米粒子试剂的芯片上混合,纳米粒子有核化及生长,芯片上稀释,透析,pH调节或纳米粒子合成需要的其他事件)。

[0180] 图13是本发明的代表流体装置的示意图,其具有多层混合器。说到图13,装置1300包括混合通道1310。图14是图14中例证的多层混合器的近观视图。

[0181] 如上所述,制造脂质微/纳米粒子的方法曾经是常规“倒置”方法,其中更大结构通过脂质在水中的分散,之后是通过具有诸如100nm的孔径的聚碳酸酯滤器或替代性地,使用超声处理的多层囊泡(微米尺寸范围)的分裂而形成。

[0182] 该批过程中缺少的一方面是精确地控制各脂质混合物成分的结构和组装的能力。此尤其重要,如果特定成分是容易降解的,如果暴露于它们的外部环境,或如果特定配体必需在靶向目的的粒子外部。例如,用治疗剂,可为重要的是首先产生具有净阳性或负表面电荷以关联特定治疗性药物的粒子。然后,可需要进一步处理来完全组装,通过用其他脂质物质包裹该粒子,或修饰其表面特征。此可例如包括添加脂质,以产生净中性粒子,或添加必需在功能目的的粒子外部的靶向分子。

[0183] 在一实施方式中,制造脂质纳米粒子的方法包括通过电荷关联,及还可提供治疗性小干扰RNA(siRNA)的包裹来进行脂质纳米粒子的连续组装和生长。此方法可用于完全改变从净阳性到净阴性和反之亦然表面电荷特征。

[0184] 包裹siRNA(-ive)的脂质纳米粒子用约2(+ive/-ive)的电荷比制备。脂质包括90mol% Dlin-KC2-DMA(+ive)和10mol%PEG-c-DMA。得到的粒子的直径是23nm(图28A)及具有约7mV的正 ζ 电势(图28B)。然后将阴离子脂质以4倍过量经微流体混合并合到阳离子脂质。此导致粒径增加到33nm及转变为-14mV的负 ζ 电势。还进一步并合额外的阳离子脂质(以4倍过量到之前的DOPS)然后并合DOPS导致粒径的持续的增加,和净正及净负 ζ 电势之间的改变。

[0185] 通过在单微流体混合器中混合获得结果,回收,然后再注射进微混合器,以添加下一脂质组分。但是,单微流体装置可设计为以连续方式产生该粒子(图29)。

[0186] 下列装置最小化流体阻抗和在进入微混合器之前脂质和水流体之间的相互作用。

[0187] 图30是本发明的代表装置3000和方法的示意图。说到图30,装置3000包括:区A,其中在第1溶剂中包含多个核酸的第1流进入大宽度的通道(>2mm);和区B,其中在第2溶剂中包含脂质粒子-形成物质的流进入大宽度的通道(>2mm)。将流导入区C,其中在微混合器中发生快速混合,然后最终到区D,最终产物。

[0188] 图31是本发明的代表装置和方法的示意图。说到图31,装置3100包括:区A,其中在第1溶剂中包含多个核酸的第1流进入大宽度的通道(>2mm);和区B,其中在第2溶剂中包含脂质粒子-形成物质的流进入大宽度的通道(>2mm)。将流导入区C,其中在微混合器中发生快速混合,然后最终到区D,最终产物。

[0189] 图32是本发明的代表装置和方法的示意图。说到图32,装置3200包括:区A,其中在第1溶剂中包含多个核酸的第1流进入大宽度的通道(>2mm);区B,其中第2流包含第1溶剂而发挥区A的流的鞘流体的作用;区C,其中在第2溶剂中包含脂质粒子-形成物质的流进入大宽度的通道(>2mm);及区D,其中第2流包含第2溶剂而发挥区C的流的鞘流体的作用,将流导入区E,其中在微混合器中发生快速混合,然后最终到区F,最终产物。虚线代表流体界面。

[0190] 图33是本发明的代表装置和方法的示意图。说到图33,装置3300包括:区A,其中在第1溶剂中包含多个核酸的第1流和在第2溶剂中包含脂质粒子-形成物质的第2流向心流入通道,导入区B,其中在微混合器中发生快速混合,然后最终到区C,其中我们具有最终产物。区A中的2个流体可通过物理屏障或通过交叉截面图中展示的鞘流体隔离。

[0191] 【使用脂质粒子递送治疗剂的方法】

[0192] 本发明的脂质粒子可用于将治疗剂体外或体内递送到细胞。在特定实施方式中，治疗剂是核酸，将其使用本发明的核酸-脂质粒子递送到细胞。方法和组合物可容易适于用于会受益于该治疗的任何疾病或病症的治疗的任何适合的治疗剂的递送。

[0193] 在特定实施方式中，本发明提供将核酸导入细胞的方法。优选的用于导入细胞的核酸是siRNA, miRNA, 免疫-刺激寡核苷酸, 质粒, 反义和核酶。这些方法可通过使本发明的粒子或组合物与细胞接触足够发生细胞内递送的时间来进行。

[0194] 典型应用包括使用熟知的过程以提供siRNA的细胞内递送，以敲除或沉默特定细胞靶。替代性地应用包括递送编码治疗有用的多肽的DNA或mRNA序列。以此方式，通过供给缺陷或缺乏的基因产物而提供治疗用于遗传疾病。本发明的方法可体外，离体或体内实践。例如，本发明的组合物也可用于将核酸使用本领域技术人员已知的方法体内递送到细胞。

[0195] 以下描述了通过本发明的脂质粒子的siRNA的递送和其在沉默基因表达中的有效性。

[0196] 体内施用，药物组合物是优选施用的肠胃外（例如，关节内，静脉内，腹膜内，皮下或肌肉内）。在特定实施方式中，药物组合物通过推注静脉内或腹膜内施用。其他施用途径包括局部（皮肤，眼，粘液膜），口腔，肺部，鼻内，舌下，直肠和阴道。

[0197] 在一实施方式中，本发明提供调节靶多核苷酸或多肽的表达的方法。这些方法通常包含使细胞接触本发明的相关于能调节靶多核苷酸或多肽的表达的核酸的脂质粒子。如本文所用，术语“调节”指称改变靶多核苷酸或多肽的表达。调节可表示增加或增强，或其可表示降低或减少。

[0198] 在相关的实施方式中，本发明提供治疗受试者中表征为多肽的过表达的疾病或病症的方法，包括给受试者提供本发明的药物组合物，其中治疗剂选自siRNA, 微RNA, 反义寡核苷酸，及能表达siRNA, 微RNA, 或反义寡核苷酸的质粒，且其中siRNA, 微RNA或反义RNA包含特异性结合编码多肽的多核苷酸，或其补体的多核苷酸。

[0199] 在再一方面，本发明提供药物组合物，其包含本发明的脂质粒子和药学可接受的载体或稀释剂。代表性的药学可接受的载体或稀释剂包括静脉内注射用溶液（例如，盐水或右旋糖）。组合物可取霜剂，软膏，凝胶，悬浮液或乳剂的形式。

[0200] 下列是代表性的LNP系统，制造LNP系统的装置和方法，及使用LNP递送治疗剂的方法的描述。

[0201] 快速微流体混合允许单分散脂质纳米粒子的产生。脂质纳米粒子的制剂通过在设计为诱导杂乱平流的微流体混合器之内快速混合脂质-乙醇溶液与水性缓冲剂来进行（图15B）及提供中间Reynolds数 ($24 < Re < 240$) 的控制的混合环境。微流体通道含有通过变化半循环之间的鲑骨状结构的取向产生杂乱流的鲑骨状件，导致局部旋转及扩展流中心的周期性变化。

[0202] 为了测定装置之内的混合性能，使用荧光素的pH灵敏度，其中将2个10 μ M荧光素流混合，一个荧光在pH8.88而其他非-荧光在pH5.15。发生混合（混合程度>95%）需要的通道长度发现为0.8cm和1.0cm之间。此导致对0.1ml/min, 0.4ml/min, 0.7ml/min和1.0ml/min的流速，分别约45ms, 10ms和5ms和3ms的混合时间。在杂乱流中预期混合长度的小差异，所述杂乱流仅以Péclet数对数性地生长 ($Pe = Ul/D$ ，其中U是流体速度，l是交叉部分通道长度，

及D是分子扩散)。

[0203] 下列代表制剂包括可离子化的阳离子脂质, DLin-KC2-DMA, 具有明显的6.7的pKa, 致使脂质适合以低pH包裹siRNA, 及在生理学pH提供接近中性阳离子表面电荷密度。使用此LNP-siRNA方案作为模型系统, 测定流速对LNP形成的效应。由于随着增加的流速混合时间显著减小, 脂质导入水相的速度预期为影响它们的最终尺寸及分散性。使用同一流速, 0.1ml/min~1ml/min/通道, 图16B显示通过微流体混合器产生的LNP-siRNA系统的平均粒径。缓冲剂含有siRNA以产生0.06 (wt/wt) 的siRNA/总脂质比, 并将LNP混合物直接稀释进缓冲剂, 以减少乙醇含量到约22vol%。当增加总流速0.2ml/min~2ml/min时, 粒径显著降低。粒径在0.2ml/min的流速下最大, 而LNP达到约40nm的限制尺寸, 如由数-加权的粒径测定。或者, 也通过变化乙醇和水流比来调整混合时间。有效增加水流流速提供脂质用水流的更快稀释。随着脂质-乙醇流保持恒定在0.5ml/min, 水流速的增加导致粒径减小(图16C)。随着水流速的3-倍增加的粒径的实质性降低, 约70nm~35nm, 表明快速减少乙醇含量的重要性。

[0204] 因为这些LNP预期自发形成作为脂质迎对更水性环境, 探索脂质浓度的效应也重要。随着脂质浓度增加, 可利用来合并到LNP的脂质量会预期增加或另外形成额外的粒子。将其监控, 随着乙醇流中的脂质浓度从10mM增加到50mM。随着脂质浓度的增加观察到平均粒径约40nm~70nm的增加(图17)。

[0205] 快速微流体混合提供广制剂范围的LNP-siRNA系统。随着阳离子脂质的新近改善进展了LNP效力几倍, 也变得明显, 进一步改善可经LNP组合物的优化来提供。尤其是, 其可影响它们的双层-去稳定化容量及体内溶解潜力或可影响它们的在生理学pH的循环行为。例如, 具有更少PEG-脂质及增加的阳离子脂质的制剂显示了靶向肝细胞的LNP系统的体内功效的显著改善。此在小鼠因子VII模型的新近报道中观察到, 其提供优化的LNP中ED50的进一步5倍减小。尽管PEG-脂质对于粒子稳定性是必需的, 其也可减少这些LNP系统的膜-去稳定化性质。用预形成的囊泡(PFV)方法, 当尝试产生具有小于5mol%PEG-脂质的LNP系统时困难已迎对; 此大概是由于增加LNP之间的融合的囊泡外部的更少PEG含量。而且, 预形成的脂质粒子的再组织和siRNA的包裹必需的温育步骤需要30% (v/v) 的范围的乙醇溶液。此增加的脂质流动性可促进不稳定性和导致预形成的脂质粒子的额外的聚集和融合。

[0206] 使用PEG-c-DMA, 探索微流体(MF)方法(25%乙醇(v/v)以下的LNP稀释之前的快混合时间和短驻留)产生具有改变的PEG-脂质含量的LNP-siRNA系统的能力。以0.06 (wt/wt) 的siRNA/总脂质比使用DLin-KC2-DMA, DSPC, 胆甾醇和PEG-c-DMA的初始组合物(40:11.5:38.5:10mol/mol)。额外的胆甾醇用于补偿降低的量的PEG-c-DMA。使用微流体方法PEG-c-DMA到2mol%的滴定导致粒径的仅少量增加。进一步减小到1mol%PEG导致直径约20nm~约40nm的增加(图18A)。相反, 使用PFV方法的平均粒径显示随着PEG-脂质含量降低到1mol%, 粒径20nm~70nm的恒定增加。除了产生具有低量的PEG-脂质的LNP之外, 有兴趣能改变阳离子脂质的量。随着DLin-KC2-DMA从40mol%增加到70mol%, 通过微流体方法产生的那些观察到粒径的从约40nm到70nm的一般增加(图18B)。

[0207] 微流体装置的自组装可产生具有接近完全的包裹的LNP。在产生LNP-siRNA系统中, 稳健的过程必然会提供OGN产物的高百分率包裹。通过从0.01到0.2 (wt/wt) 改变siRNA/总脂质比使用具有1mol%PEG的LNP-siRNA制剂来评价siRNA包裹。LNP制剂在此范围达到接

近100%的百分率包裹(图19)。达到0.21 (wt/wt)的siRNA/总脂质比,对应于阳离子脂质和阴离子siRNA之间的电荷平衡($N/P=1$)之后,观察到包裹减少(数据未显示)。此之后趋势预期是由于复合siRNA及包裹在LNP内需要的不足的阳离子电荷。

[0208] 形态.将通过微流体及预形成的囊泡方法产生的LNP用冷冻-TEM可视化。LNP的粒径类似于通过动态光散射测量的。含有具有0.06wt/wt的siRNA:脂质比的40/11.5/47.5/1mol%的DLin-KC2-DMA/DSPC/胆甾醇/PEG-c-DOMG的LNP-siRNA系统显示于图20A。此外,相同的组成的空LNP样品显示于图20B。产生的粒子在尺寸上主要是球形和均质的。也将用预形成的方法配制的且同一组成的LNP成像。这些与微流体LNP共享类似特征,尽管也观察到其他特征诸如咖啡-豆结构。这些LNP尺寸也更大,如从动态光散射结果预期的。

[0209] 通过微流体学产生的LNP siRNA系统可为高度有力的体内基因沉默剂。使用小鼠因子VII模型研究静脉内注射后LNP siRNA系统诱导体内基因沉默的能力。使用微流体方法创建含有具有0.06 (w/w)的siRNA:脂质比的DLin-KC2-DMA/DSPC/胆甾醇/PEG-c-DOMG的制剂。LNP-siRNA通过尾静脉注射施用。阳离子脂质,DLin-KC2-DMA,变动为30mol%~60mol%而保持0.2wt/wt的DSPC:胆甾醇比。增加LNP中的阳离子脂质含量导致FVII沉默的进行性改善。最佳表现的LNP含有60mol% DLin-KC2-DMA,导致约0.03mg/kg的50%FVII沉默的有效剂量(图21)。有兴趣地注意到,进一步增加到70mol%导致无超过60mol%DLin-KC2-DMA LNP的功效的可观察的改善。

[0210] 结果展示,含有交错的鲐骨状混合器的微流体装置可用于产生具有各种脂质组合物的LNP,可用于有效包裹OGN诸如siRNA,且展示,产生的LNP siRNA系统呈现优良的体外和体内基因沉默能力。

[0211] 本发明的微流体学装置和系统允许形成LNP和含有100nm尺寸或更小的OGN的LNP及提供OGN包裹100%。关于LNP的形成,混合的速度和比明显是重要参数。乙醇-脂质溶液与水性缓冲剂的快速混合导致介质的增加的极性,其减小溶解的脂质的溶解度,导致它们沉淀出溶液及形成纳米粒子。快速混合导致溶液快速达到脂质均体贯穿整个混合体积的高过饱和状态,导致纳米粒子的快速和均质有核化。纳米粒子的增加的有核化及生长耗竭周围液体的游离脂质,由此通过游离脂质的聚集限制随后生长。此建议的机理与下列观察一致:乙醇中更低浓度的脂质(减少的游离的脂质)导致更小LNP(见图17),更高流速,导致至过饱和的更快的和更均质方法,导致更小LNP的形成,及增加水性溶剂对有机溶剂组分的相对比也导致更小粒子(图17)。

[0212] 通过微流体学方法配制的本发明的LNP OGN系统呈现接近100%的OGN包裹效率。使用对于反义OGN的PFV技术的之前冷冻-TEM研究揭示了小多层囊泡的存在,导致以下可能性,包裹涉及向预形成的囊泡的OGN吸附,其作为与围绕原囊泡的额外的预形成的囊泡关联的有核化点。相反,通过微流体学方法产生的LNP OGN的冷冻-TEM研究显示,大多数LNP系统是“实体核心”结构及提示,OGN包裹的不同机理是操作性的。尤其是,这些结构是与siRNA在纳米粒子组装之前或与纳米粒子组装同时与阳离子脂质单体关联一致的。微流体学方法独立于核酸组成而辅助反义和siRNA OGN接近100%的包裹效率的能力是胜过之前报道的方法的主要优势。

[0213] 微流体学方法提供超过3种替代性的LNP合成技术的优势,包括典型的用于产生LNP的挤出过程,预形成的囊泡方法,及用于OGN包裹的自发囊泡形成方法。微流体学方法提

供100nm尺寸范围或更小的LNP及,当阳离子脂质存在时,允许LNP用低水平的稳定化PEG-脂质形成。微流体学方法的缺点涉及制备之后移出乙醇的需求,特定脂质在乙醇中是相对不溶性的,及潜在可缩放性问题。微流体学方法提供包裹效率的优势,使用PFV过程难采用的高阳离子脂质含量和低PEG-脂质水平的使用,对产生预形成的囊泡的需求的去除,及使用少至150 μ g的寡核苷酸,由于设备的小死亡体积(1 μ l)的少损失而产生小规模批的能力。

[0214] 相比用于产生装载OGN的LNP系统的SVF“T管”过程,微流体学方法的优势类似于PFV过程指示的那些,除了未需要预形成的囊泡之外。T管的孔径是约1.5mm直径,需要高流速(>1ml/s),以达到发生快速混合需要的速度。微混合器允许LNP OGN制剂在良好定义的,可再现的条件下以低得多的流速及减少的由于死亡体积的损失而发生,允许用于LNP优化和体外测试的小规模批的更直接制备。

[0215] LNP OGN系统可缩放。尽管具有1ml/min的最大流速的装置可不足,单微流体学芯片可含有10个或更多微混合器,以达到约10ml/min的总流速。假定此技术的相对廉价性质,平行使用许多该芯片是可实践的,潜在地允许从单个台式仪器100ml/min或更高的流速。此外,可容易将上游流体操作合入该装置,以允许从多个组分精确的可编程的制剂,会是在合成制剂和参数的筛选及优化中高度有利的特征。

[0216] 【实体核心LNP】

[0217] 特定的LNP siRNA制剂模型提示siRNA在水性内部的内侧的LNP的双层囊泡结构。但是许多观察提示,该模型不正确,至少对于通过微流体混合方法产生的LNP siRNA系统而言。例如,通过微流体混合产生的LNP siRNA系统的冷冻-电子显微镜检指示存在电子致密核心,而非与囊泡结构一致的水性核心。如上所述,LNP siRNA系统的制剂可常规导致接近100%的siRNA包裹效率,是与其中可预期50%的最大包裹效率的双层结构不一致的观察。

[0218] 采用各种物理和酶促测定评价LNP siRNA系统的结构。获得的结果指示,这些LNP siRNA系统具有由与阳离子脂质复合的siRNA单体组成的实体核心内部以及组织进倒置的微团的脂质或相关的结构。

[0219] LNP系统呈现在包裹的siRNA的存在和缺失下通过冷冻EM指示的电子致密实体核心结构。通过微流体混合产生的LNP系统呈现如通过冷冻EM可视化的电子致密核心,与实体核心一致,与通过替代性的方法创建的LNP siRNA系统推荐的水性核心结构相反。此确认如就由以0.06siRNA/脂质(wt/wt)含量含有siRNA的DLin-KC2-DMA/DSPC/Chol/PEG-脂质(40/11.5/47.5/1;mol/mol)组成的LNP siRNA制剂显示于图22A,其对应于4的负电荷(在siRNA上)对正电荷(在完全质子化的阳离子脂质上)N/P比。结果约75%的阳离子脂质未复合到LNP中的siRNA。实体核心电子致密结构与由POPC组成的囊泡系统的欠密内部成对比(图22B),且视觉上类似POPC/三油精(POPC/TO)LNP的电子致密内部(图22C)。通过微流体混合产生的POPC/TO LNP由被POPC的单层围绕的TO的疏水核心组成。

[0220] 图22A的感兴趣的特征是,75%的可离子化的阳离子脂质未复合于siRNA,但LNP siRNA粒子全体呈现实体核心内部。此提示,阳离子脂质可贡献于实体核心内部,甚至当其未复合于siRNA时。采用微流体学过程配制具有相同的脂质组成但无siRNA的LNP系统,及通过冷冻EM表征。如显示于图22B,电子致密核心中观察到siRNA的缺失,指示,可离子化的阳离子脂质诸如DLin-KC2-DMA,可能与DSPC和胆甾醇组合,可在LNP内部采用非-薄层状电子致密结构。

[0221] LNP结构呈现限制尺寸指示,可离子化的阳离子脂质在LNP内部形成倒置的微团结构。阳离子脂质对电子致密LNP核心的贡献提起该LNP系统可为什么分子结构的问题。由此合理建议,与对离子关联的阳离子脂质采用倒置的结构,诸如倒置的微团,与这些脂质的对于在与阴离子脂质的混合物中倒置的结构诸如六角形H_{II}相的倾向一致。进而,此会提示,由净阳离子脂质组成的LNP系统应呈现10nm范围内的直径的限制尺寸,其基本上是围绕具有直径2~3nm的倒置的微团内部的2个双层的厚度。H_{II}相中磷脂酰乙醇胺发现的水性通道的直径是2.6nm。微流体学制剂过程提供驱动对LNP系统的限制尺寸系统产生的快混合动力学。评价可对DLin-KC2-DMA/PEG-脂质系统(90/10,mol/mol)达到的限制尺寸。如显示于图23,通过对这些通过微流体方法形成的LNP的动态光散射的测量确认,粒径在直径上是约10nm,发现与显著水性核心或捕获的体积不一致。

[0222] 相关的问题关乎阳离子脂质-siRNA复合物的结构。再次,合理地推测,其由围绕siRNA寡核苷酸的阳离子脂质的扭曲的倒置的微团组成。进而,此会提示15~20nm的范围的限制尺寸,推定此倒置的微团中含有的siRNA被阳离子脂质的内部单层围绕,然后被余下脂质的外部单层围绕,且siRNA的尺度是2.6nm直径和4.8nm长。为了测定是否此与实验一致,限制尺寸的LNP siRNA系统由以对应于测定的N/P比的高水平的siRNA的DLin-KC2-DMA和PEG-脂质(90/10;mol/mol)组成。如显示于图23,siRNA的包括导致约21nm直径的限制尺寸系统,这与假说一致。

[0223] 包裹的siRNA固定在LNP中。如果siRNA与阳离子脂质复合及定位于LNP之内的实体核心,会预期相比如果在双层囊泡系统的水性内部内自由地倒塌欠移动。siRNA的运动性可使用³¹P NMR技术探查。尤其是,会预期限制的运动平均会对于复合的siRNA是可能的,由于磷酸盐磷的大化学位移各向异性,导致非常广"固体状态"³¹P NMR共振。在采用的条件下,该共振不会是可检测的。如果,另一方面,siRNA能在水性环境中自由地倒塌,快速运动平均会预期导致窄,容易可检测的,³¹P NMR谱。为了消除出现自出现自磷脂磷的³¹P NMR信号的并发现象,从LNP制剂DSPC忽略,以测试此假说。如显示于图24A,对于具有脂质组成DLin-KC2-DMA/Chol/PEG-脂质(50/45/5mol%)及含有siRNA(0.06siRNA/脂质;wt/wt)的LNP siRNA系统,对包裹的siRNA观察不到³¹P NMR信号,与LNP核心之内的固定一致。如果将去污剂十二烷基硫酸钠添加(1%)以溶解LNP和释放包裹的 siRNA,则检测到窄³¹P NMR信号,如显示于图24C。

[0224] 包裹的siRNA被完全保护免于被外部RNA酶A降解。siRNA的内化的测试是,如果siRNA在LNP核心内隔绝,它们应被完全保护免于被外部添加的RNA酶降解。将具有脂质组成DLin-KC2-DMA/DSPC/Chol/PEG-脂质(40/11/44/5mol%)的LNPsiRNA系统与RNA酶A温育,以测定是否包裹的siRNA可消化。如显示于图25中提供的凝胶,游离的siRNA降解,而siRNA关联的LNP粒子之内制造的通过微流体方法完全被保护(图25箭标)。如也显示于图25,去污剂Triton X-100添加到LNP导致LNP的溶解,siRNA的释放,及RNA酶存在下的降解。

[0225] 包裹的siRNA与内化的阳离子脂质复合。LNP siRNA系统的实体核心由与阳离子脂质复合的包裹的siRNA组成,且余下脂质(阳离子脂质,胆甾醇和PEG-脂质)是存在于倒置的微团或类似结构内的核心中,或在LNP外部。对于高siRNA含量,其中基本上全部的阳离子脂质与内化的siRNA复合,会预期,少阳离子脂质会定位于LNP外部。开发荧光共振能量转移(FRET)测定来测定外部阳离子脂质。测定需要制备由以高(自身-猝灭)浓度含有FRET配对,

NBD-PE/Rh-PE的二油酰基磷脂酰丝氨酸(DOPS)组成的带负电的囊泡LNP。然后将带负电的DOPS LNP与由pH5.5的DLin-KC2-DMA/DSPC/Chol/PEG-脂质(40/11.5/47.5/1mol%)组成的LNP siRNA系统温育。DLin-KC2-DMA的pKa是6.7,由此,LNP之外部的几乎全部DLin-KC2-DMA会在pH5.5带电,促进与带负电的DOPS LNP的相互作用和潜在地融合。融合报道为在535nm处的NBD-PE荧光的增加,如脂质混合之后,NBD-PE和Rh-PE探针变得稀释。

[0226] 如显示于图26,当LNP系统不含有siRNA时,观察到实质性融合与显著的比例的在LNP系统的外部单层的DLin-KC2-DMA一致。但是,当LNP系统以0.06 (wt/wt) 的siRNA对脂质比,其对应于4的正(阳离子脂质)电荷对负(siRNA) N/P电荷比含有siRNA时,融合显著减少(图26),然而,对于用1的N/P制备的LNP siRNA系统,观察到少或无融合,指示,少或无DLin-KC2-DMA存在于LNPsiRNA外部。此支持假说,高siRNA含量,基本上全部阳离子脂质与siRNA复合,且在LNP内部隔绝。

[0227] 结果提供证据,LNP siRNA系统的内部由由与阳离子脂质复合的siRNA单体组成的实体核心,以及以倒置的微团或相关的结构排列的脂质组成。这些结果暗示LNP siRNA结构的模型,提供可达到的高siRNA包裹效率的原理及提示用对于特定应用适当的性质生产LNPsiRNA系统的方法。

[0228] 基于结果的LNP siRNA结构的模型显示于图27。模型建议,包裹的siRNA在被阳离子脂质围绕的扭曲的倒置的微团内,及余下脂质组织进围绕阴离子对离子的倒置的微团中和也构成最外层。

[0229] 模型提供在微流体混合制剂过程期间如何可达到接近100%的siRNA包裹效率的理解。此是在双层系统中siRNA包裹的主要问题,因为,推定阳离子脂质等同分布在双层的两侧,会预期最大50%siRNA内化。模型指向LNP siRNA尺寸,组成和表面电荷可容易调节的方式。关于尺寸,限制尺寸结构明显是含有一个siRNA单体/粒子的结构,提示约15~20nm的限制尺寸。该LNP siRNA粒子使用本发明的微流体方法容易达到。由siRNA的单体组成的限制尺寸LNPsiRNA系统可潜在地使用微流体混合技术用作构件,以达到改变组成和表面电荷的LNP siRNA系统。预形成的限制尺寸LNP siRNA与含有带负电的脂质的乙醇溶液的快速混合,例如,可预期导致与过量阳离子脂质相互作用以产生内部倒置的微团核心结构和带负电的表面。

[0230] 本文所述的本发明的脂质粒子包括(即,包含)叙述的组分。在特定实施方式中,本发明的粒子包括叙述的组分和不影响粒子(即,基本上由叙述的组分组成的粒子)的特征的其他额外的组分。影响粒子'特征的额外的组分包括如下组分,诸如不利地改变或影响粒子的治疗性特征和功效的额外的治疗剂,不利地改变或影响粒子的溶解叙述的治疗性组分的能力的额外的组分,及不利地改变或影响粒子的增加 叙述的治疗性组分的生物利用度的能力的额外的组分。在其他实施方式中,本发明的粒子包括仅叙述的组分(即,由其组成)。

[0231] 以例证目的提供下列实施例,其不限制,要求保护的发明。

【实施例】

[0232] 【材料】

[0233] 1,2-二油酰-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DOPC),1,2-二硬脂酰-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DSPC),1,2-二油酰-sn-甘油基-3-磷酸丝氨酸(DOPS),1,2-二油酰-sn-甘油基-3-磷酸

乙醇胺-N-(7-硝基-2-1,3-苯并噁二唑-4-基) (NBD-PE), 1,2-二油酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-(丽丝胺若丹明B磺酰基) (Rh-PE) 获自Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL)。4-(2-羟乙基)哌嗪-1-乙磺酸 (HEPES) 和胆甾醇获自Sigma (St Louis, MO)。N-[(甲氧基聚(乙二醇)₂₀₀₀)氨基甲酰基]-1,2-二肉豆蔻基氧基丙基-3-胺 (PEG-C-DMA) 由AlCana Technologies合成。2-(N-吗啉代)乙磺酸 (MES) 获自BDH。乙酸铵, 乙酸钠和氯化钠获自Fisher Scientific (Fair Lawn, NJ)。RNA酶A获自Applied Biosystems/Ambion (Austin, TX)。因子VII (FVII) 靶向, 及低GC阴性对照siRNA购自Invitrogen (Carlsbad, CA)。因子VII siRNA: (SEQ ID NO:1) 5'-GGAUCAUCUCAAGUCUUACTT-3' (FVII正义), 及 (SEQ ID NO:2) 5'-GUAAGACUUGAGAUGAUCCTT-3' (FVII反义)。DLin-KC2-DMA获自AlCana Technologies Inc. (Vancouver, BC)。

[0234] 【实施例1:LNP系统的制备:预形成的囊泡方法】

[0235] 在本实施例中,描述了使用预形成的囊泡方法的LNP-siRNA系统的制备。

[0236] 使用如描绘于图15A和如描述于N.Maurer, K.F.Wong, H.Stark, L.Louie, D.McIntosh, T.Wong, P.Scherrer, S.Semple and P.R.Cullis, Spontaneous Entrapment of Polynucleotides Upon Electrostatic Interaction With Ethanol Destabilized Cationic Liposomes: Formation of Small Multilamellar Liposomes, Biophys.J.; 80: 2310-2326 (2001) 的预形成的囊泡方法制造LNP-siRNA系统。将阳离子脂质, DSPC, 胆甾醇和PEG-脂质首先以适当的摩尔比溶解于乙醇。然后将脂质混合物滴加到水性缓冲剂(柠檬酸盐或乙酸盐缓冲剂, pH4), 同时涡旋至30% (v/v) 的最终乙醇和脂质浓度。然后将水合的脂质通过2个堆叠的80nm孔隙-尺寸的滤器(Nuclepore) 于室温使用Lipex挤出机(Northern Lipids, Vancouver, Canada) 挤出5次。将siRNA (溶解于含有30%乙醇的同一水溶液) 加入囊泡悬浮液而混合。通常使用0.06 (wt/wt) 的靶siRNA/脂质比。将此混合物于35℃温育30分钟看, 以允许囊泡再组织和siRNA包裹。然后移出乙醇, 并将外部缓冲剂用磷酸盐缓冲液(PBS) 通过透析(12-14k MW截止值, Spectrum medical instruments) 取代到50mM柠檬酸盐缓冲剂, pH4.0, 然后透析到PBS, pH7.4。

[0237] 【实施例2:LNP系统的制备:微流体交错的鲑骨状混合器】

[0238] 在本实施例中,描述了使用微流体交错的鲑骨状混合器的本发明的代表LNP-siRNA系统。

[0239] LNP-siRNA制备。在pH4.0的25mM乙酸盐缓冲剂中制备寡核苷酸(siRNA)溶液。依赖于期望的寡核苷酸:脂质比和制剂浓度, 以0.3mg/ml~1.9mg/ml总脂质的靶浓度制备溶液。在乙醇中制备以适当的摩尔比含有DLin-KC2-DMA, DSPC, 胆甾醇, 及PEG-脂质的脂质溶液及用25mM乙酸盐缓冲剂稀释至达到90% (v/v) 的乙醇浓度。图15B是此例中使用的微流体设备的示意图。装置具有2个入口, 一个用于以上制备的各溶液, 及一个出口。微流体装置通过软光刻, 弹性体中微建造的母板的复制模塑来产生。装置特征为200μm宽和79μm高, 具有特征为在通道顶上的形成为31μm高和50μm厚的鲑骨状结构的混合通道。流体连接用附接于用于与注射器连接的21G1针的1/32" I.D., 3/32" O.D. 管道进行。1ml注射器通常用于2个入口流。双注射器泵(KD200, KD科学) 用于控制通过装置的流速。各流的流速变动为0.1ml/min~1ml/min。注射器泵将2种溶液导入微流体装置(图15B中的入口a和入口b), 其中它们在Y-连接接触。在层流下通过在此点的扩散而发生不显著的混合, 然而2种溶液随它们经过鲑骨状

结构而混合。

[0240] 这些结构中通过杂乱平流发生的混合,导致层压流的特征性分离变得越来越小,由此促进快速扩散。此混合以ms时间尺度发生,并导致脂质转移到渐进地更水性环境,减小它们的溶解度及导致LNP的自发形成。通过在脂质组合中包括阳离子脂质,通过带正电的脂质头基团和带负电的寡核苷酸的关联获得寡核苷酸物质的获集。在微流体装置中混合之后,将LNP混合物通常稀释进含有2体积的搅拌的缓冲剂的玻璃瓶中。通过透析到50mM柠檬酸盐缓冲剂,pH4.0然后透析到PBS,pH7.4来最终移出乙醇。从缓冲溶液缺乏的寡核苷酸类似地产生空囊泡。

[0241] LNP图像分析.通过具有不同pH值的荧光素溶液的混合的荧光成像来测量混合时间。使用Olympus倒置的共聚焦显微镜使用10×物镜和具有2扫描每线的Kalman过滤模式收集像。沿着通道高度取25个等同间隔的片,及组合以测定总强度特征。对于各成像的位置,将沿着流方向的像素的10个相邻行平均,以获得沿着通道宽度的强度特征,及用以测定混合程度。混合实验用补充0.5M NaCl的2个10μM荧光素溶液进行,以由于钠和磷酸根离子浓度的大差异而抑制液体连接势的形成。一种溶液含有14mM磷酸盐缓冲剂,pH8.88,而其他含有1mM磷酸盐缓冲剂,pH5.15。起初在pH5.15的溶液荧光的增加会压倒碱性溶液中荧光的小降低,导致总荧光强度增加2倍。混合程度沿着通道长度使用0.1ml/min,0.4ml/min,0.7ml/min和1.0ml/min的个体流的流速测定为约2.1mm,6.2mm和10.1mm。

[0242] LNP表征.粒径通过动态光散射使用Nicomp模型370 Submicron Particle Sizer (Particle Sizing Systems,Santa Barbara,CA)测定。使用数-加权的和强度-加权的分布数据。通过使用来自Wako Chemicals USA (Richmond,VA)的胆甾醇E酶促测定来测量总胆甾醇来确证脂质浓度。游离的siRNA的去除用VivaPureD MiniH柱(Sartorius Stedim Biotech GmbH,Goettingen,德国)进行。然后在75%乙醇中裂解洗脱液,并将siRNA通过在260nm处测量吸光度来定量。由在游离的寡核苷酸含量移出之前及之后的寡核苷酸比测定包裹效率,标准化为脂质含量。

[0243] LNP Cyro-传输电子显微镜检.通过将3μL的含有20~40mg/ml总脂质的LNP的PBS应用于具有穿孔的碳膜的标准电子显微镜检网格来制备样品。通过用Vitrobot系统(FEI, Hillsboro,OR)印迹然后在液体乙烷中塞-冷冻LNP悬浮液而在无定形冰的薄膜中快速冷冻囊泡来去除过量液体。在低温条件下,以29K的放大率,用AMT HR CCD侧安装照相机摄像。在FEI G20 Lab6 200kV TEM中的Gatan 70度冷冻-转移支架,在低剂量条件下,用5~8μm的弱焦装载样品,以增强图像对比度。

[0244] 对于FVII活性的LNP-siRNA的体内活性.6~8周龄,雌性C57Bl/6小鼠获自Charles River Laboratories。将含有因子VII siRNA的LNP-siRNA通过0.2μm滤器过滤并在使用之前在无茵磷酸盐缓冲液中稀释到需要的浓度。经侧尾静脉,以10ml/kg的体积静脉内施用制剂。24h之后,动物用氯胺酮//赛拉嗪麻醉,并通过心脏穿刺收集血。将样品加工为血清(Microtainer Serum Separator Tubes;Becton Dickinson,NJ),并立即测试或存储于-70℃用于此后血清因子VII水平的分析。根据Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC)可应用的及批准的地区,州和联邦规定进行全部过程。

[0245] 使用比色Biophen VII检定试剂盒(Anaira)测定血清因子VII水平。将对照血清合并及连续稀释(200%~3.125%)以产生用于计算处理的动物的FVII水平的校准曲线。使用

Biophen VII试剂盒根据生产商的使用说明分析来自处理的动物的适当稀释的血浆样品 ($n=3$ 每剂量) 和盐水对照组 ($n=4$)。在96-孔, 平底, 非-结合聚苯乙烯测定板 (Corning, Corning, NY) 中进行分析, 并在405nm处测量吸光度。由用连续稀释的对照血清产生的校准曲线测定处理的动物中的因子VII水平。

[0246] 【实施例3:LNP系统:实体核心】

[0247] 在本实施例中, 描述了本发明的具有实体核心的代表LNP-siRNA系统的结构。

[0248] 脂质纳米粒子的制备. 通过将期望的体积的乙醇中的脂质浓储物溶液与水相采用上述微-混合器混合来制备LNP。对于siRNA的包裹, 将期望的量的siRNA与25mM乙酸钠缓冲剂, pH4混合。将等体积的脂质/乙醇相和siRNA/水相以含有鲐骨状结构的微-混合器合并, 以促进混合。在移开微-混合器后将乙醇含量用乙酸钠缓冲剂快速稀释为25%。通过微-混合的流速使用双-注射器泵 (Kd Scientific) 调控。脂质混合物然后在50mM MES/柠檬酸钠缓冲剂 (pH6.7) 中经历4小时透析, 之后是在磷酸盐缓冲液 (pH7.4) 中过夜透析。

[0249] 冷冻-EM. 通过将3 μ L的含有20~40mg/ml总脂质的LNP的PBS应用于具有穿孔的碳膜的标准电子显微镜检网格来制备样品。通过用Vitrobot系统 (FEI, Hillsboro, OR) 印迹, 然后在液体乙烷中塞-冷冻LNP悬浮液而在无定形, 玻璃体冰薄膜中快速冷冻囊泡来去除过量液体。在低温条件下, 以29K的放大率, 用AMT HR CCD侧安装照相机摄像。用FEI G20 Lab6 200kV TEM中的Gatan 70程度冷冻-转移支架, 在低剂量条件下, 用5~8 μ m的弱焦装载样品, 以增强成像对比度。

[0250] RNA酶保护测定. 将因子VII siRNA用40%DLinKC2-DMA, 11% DSPC, 44%胆甾醇和5%PEG-c-DMA使用微流体学混合方法包裹。将1 μ g的siRNA在50 μ L的20mM HEPES (pH7.0) 中, 与0.05 μ gRNA酶A (Ambion, Austin, TX) 于37 $^{\circ}$ C温育1小时。在温育终了, 将10 μ L等份的反应混合物添加到30 μ L FA染料 (去离子化的甲酰胺, TBE, PBS, 二甲苯蓝, 溴酚蓝, 酵母tRNA), 以暂停RNA酶反应。使用20%天然聚丙烯酰胺凝胶进行凝胶电泳, 并将核酸通过用 CYBR-SAFE (Invitrogen, Carlsbad, CA) 染色可视化。

[0251] 31 P-NMR研究. 使用以162MHz操作的Bruker AVII 400分光计获得质子去偶联的 31 P NMR谱。对应于约 10^4 扫描的自由诱导衰变 (FID) 以15 μ s, 55-度脉冲, 1s脉冲间延迟及64kHz的光谱宽度获得。在Fourier转化之前将对应于50Hz的线宽的指数倍增应用于FID。使用Bruker BVT 3200温度单元调控样品温度。于25 $^{\circ}$ C进行测量。

[0252] FRET膜融合研究. 通过采用荧光共振能量转移的脂质混合测定来检定LNP siRNA纳米粒子和阴离子DOPS囊泡之间的融合。通过用适当的缓冲剂直接再水化脂质膜, 之后是通过100nm孔径聚碳酸酯膜使用Lipex挤出机10次挤出来制备含有NBD-PE和Rh-PE (1mol 各%) 的标记的DOPS囊泡。用0, 0.06和0.24的siRNA:脂质比 (D/L比, wt/wt) 制备包含40% DLinKC2-DMA, 11.5% DSPC, 47.5%胆甾醇, 1% PEG-c-DMA的LNP。D/L=0.24代表等摩尔比的正 (阳离子脂质) 对负 (siRNA) 电荷 (N/P=1)。进行脂质混合实验。将标记的DOPS囊泡及未标记的LNP以1:2摩尔比混合进含有2mL的10mM乙酸盐, 10mM MES, 10mM HEPES, 130mM NaCl平衡到pH5.5的搅拌比色杯。使用465nm激发, 及535nm发射使用LS-55 Perkin Elmer荧光计使用1 $\times$ 1cm比色杯在连续低速搅拌下, 监控NBD-PE的荧光。将脂质混合监控约10min, 其之后将20 μ L的10% Triton X-100加入, 以破坏全部脂质囊泡, 代表无限探针稀释。使用下列方程测定作为无限探针稀释的百分率的脂质混合: %脂质混合 = $(F-F_0) / (F_{\max}-F_0) \times 100$, 其

中F是测定期间在535nm处的荧光强度,F₀是初始荧光强度,及F_{max}是添加Triton X-100之后无限探针稀释的最大荧光强度。

[0253] 【实施例4:脂质纳米粒子的连续组装】

[0254] 在此例中,描述了本发明的代表方法,用于制造脂质纳米粒子的连续组装。

[0255] 在25mM乙酸盐缓冲剂,pH4.0中以1.31mg/ml制备寡核苷酸(siRNA)溶液。脂质混合物制备成含有90mol%阳离子脂质(DLin-KC2-DMA)和10mol% PEG-c-DMA(10mM总脂质溶解于乙醇)。将2种溶液使用微流体混合器以总流速2ml/min混合及用25mM乙酸盐缓冲剂,pH4.0,稀释2倍以使得乙醇降到约23vol%,形成初始或核心纳米粒子。通过取此初始脂质粒子悬浮液,将其与含有溶解于甲醇的阴离子脂质二油酰基磷脂酰丝氨酸(DOPS)的另一脂质溶液混合,并还稀释成约25vol%溶剂(甲醇和乙醇)来进行连续组装。以对阳离子脂质约4×摩尔过量添加第2脂质,DOPS。通过阳离子脂质和阴离子脂质之间交替重复连续组装过程。

[0256] 粒径通过动态光散射使用Malvern Zetasizer Nano-ZS(Malvern Instruments Ltd,Malvern,Worcestershire,UK)测定。使用数-加权的分布数据。用Malvern Zetasizer使用可布置的毛细管池(DTS1060,Malvern Instruments Ltd.)测量提供LNP系统的表面电荷的量的度的 ζ 电势。将LNP系统在25mM乙酸盐缓冲剂,pH4.0中稀释成约0.3mg/ml总脂质。

[0257] 【实施例5:代表脂质粒子的制备和表征】

[0258] 在此例中,描述了仅由阳离子脂质和核酸(DLin-KC2-DMA-siRNA)组成的本发明的代表脂质粒子。

[0259] 在25mM乙酸盐缓冲剂,pH4.0中以0.38mg/ml制备siRNA溶液。脂质溶液制备成在乙醇中以10mM的浓度含有DLin-KC2-DMA。siRNA:脂质比是0.06(wt/wt)。将各溶液以等同流速和2ml/min的总流速输入微流体混合器。将样品用25mM乙酸盐缓冲剂,pH4.0进一步稀释,使乙醇含量为25vol%。

[0260] 粒径通过动态光散射使用Nicomp模型370 Submicron Particle Sizer(Particle Sizing Systems,Santa Barbara,CA,USA)测定。在25mM乙酸盐中进行样品测量,并使用数-加权的分布数据。粒子具有14.2nm的平均粒径,变异系数是0.487,及 x^2 是1.93。

[0261] 已例证及描述了例示实施方式,本领域技术人员会同意,可进行各种变化而不脱离本发明的精神和范围。

序列表

	<110> The University of British Columbia Cullis, P.R. Belliveau, N.M. Hansen, C.L. Huft, J.	
	<120> 含有核酸的脂质粒子及相关的方法	
	<130> UOBC-1-35680	
	<150> US 61/280510	
	<151> 2009-11-04	
	<160> 2	
	<170> PatentIn version 3.5	
	<210> 1	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
[0001]	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(21)	
	<223> 序列是DNA/RNA杂交体	
	<400> 1	
	ggaucaucuc aagucuuact t	21
	<210> 2	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(21)	
	<223> 序列是DNA/RNA杂交体	
	<400> 2	
	guaagacuug agaugaucct t	21

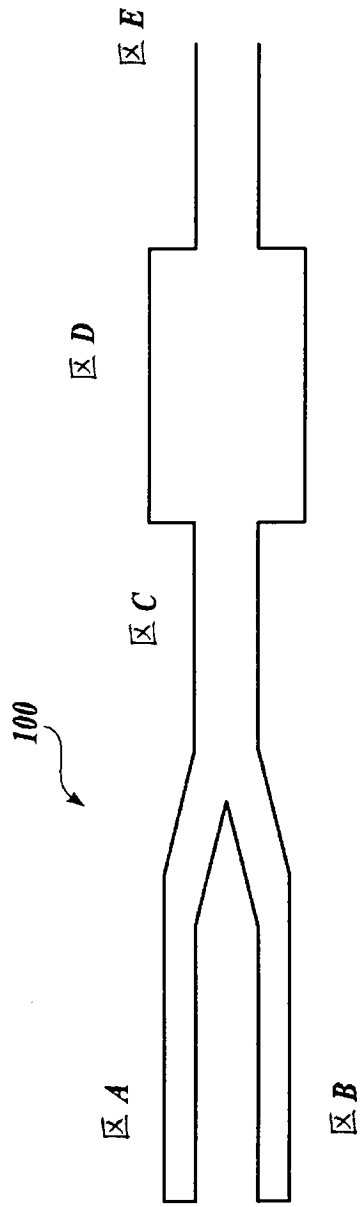


图1

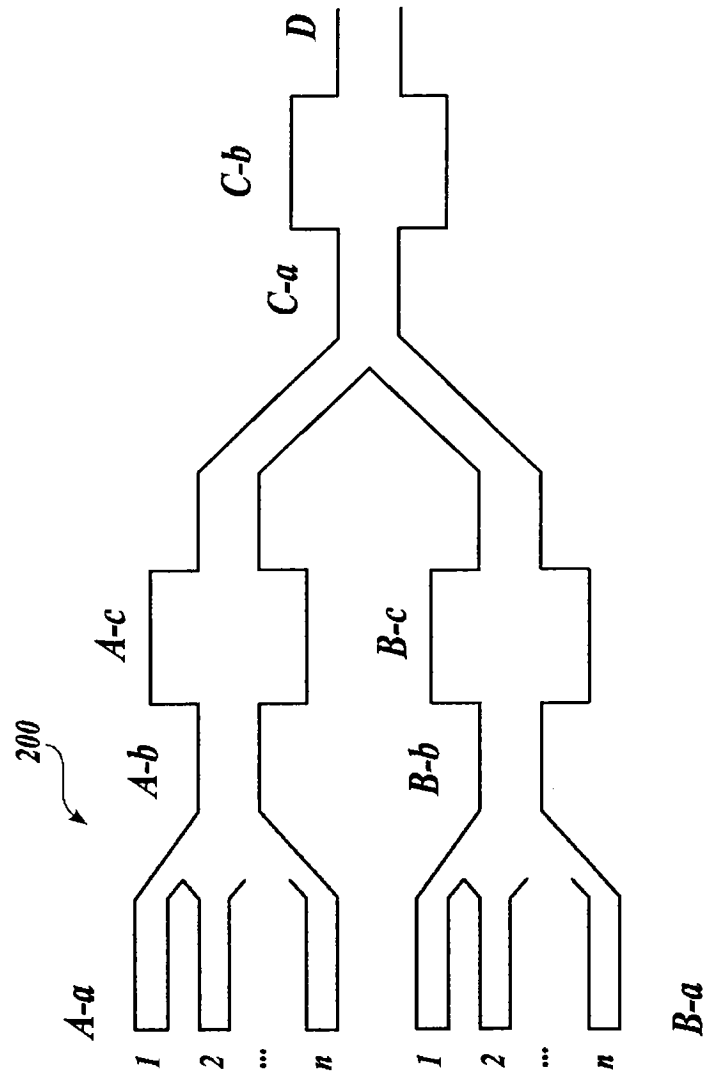


图2

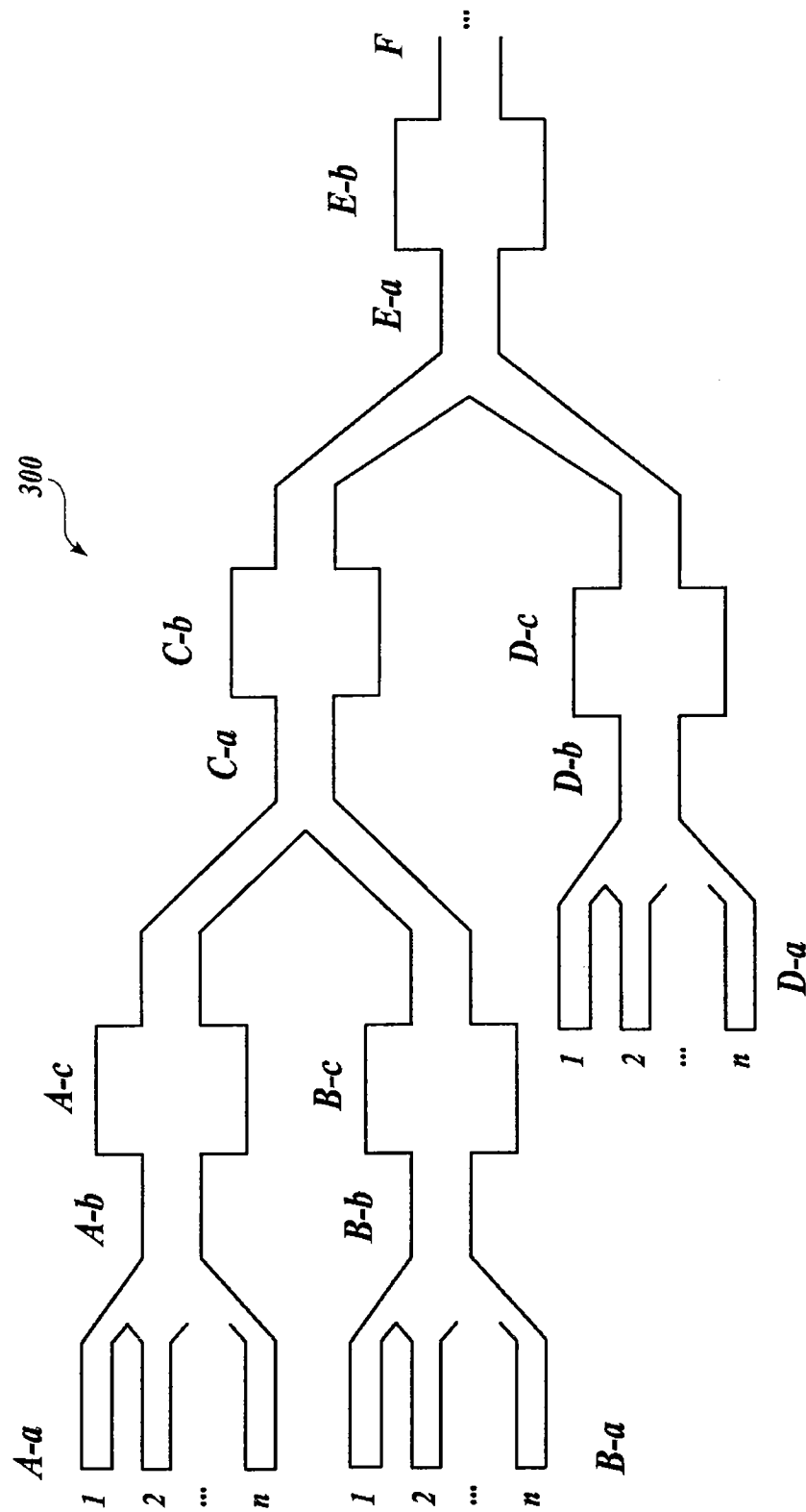


图3

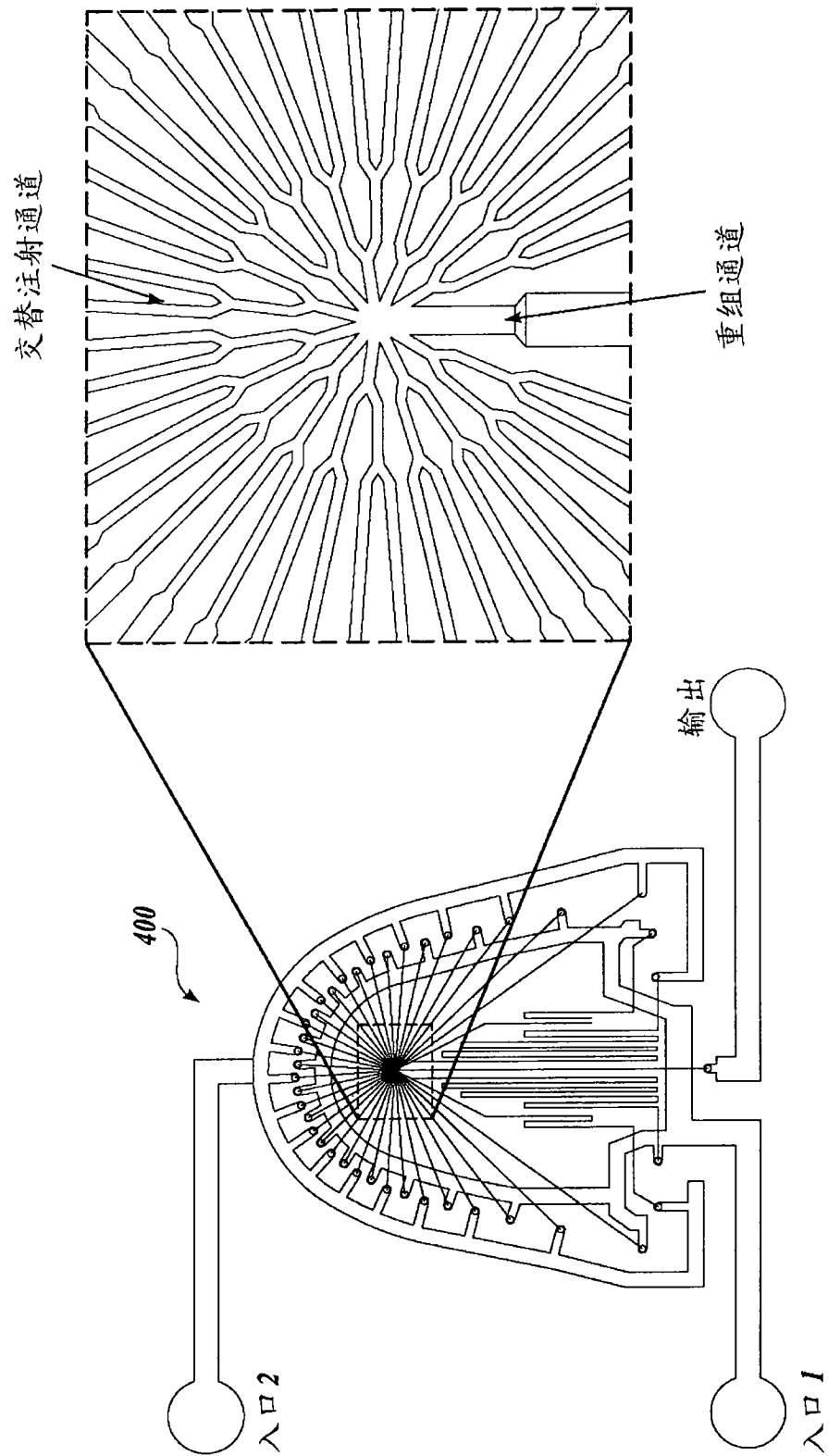


图4

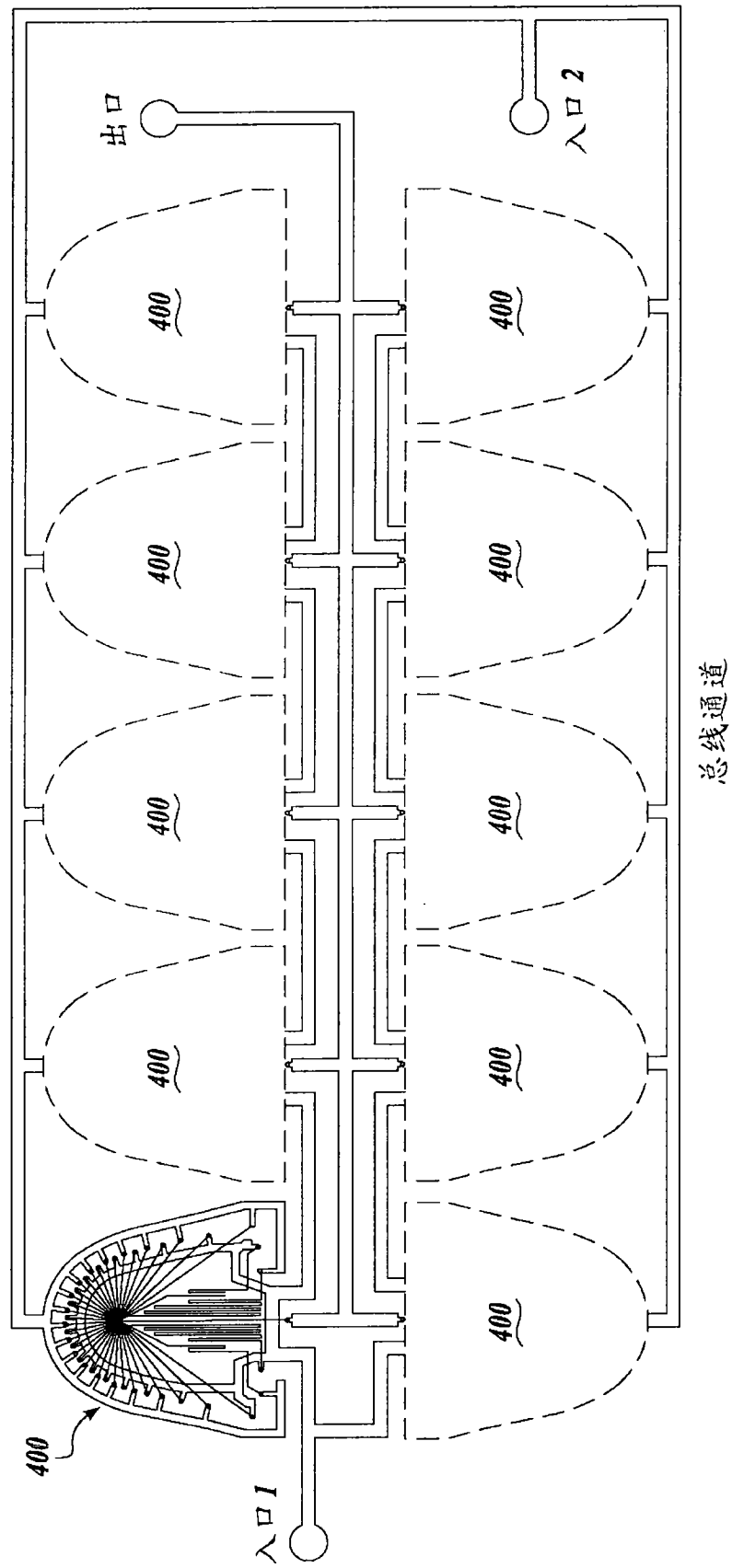


图5

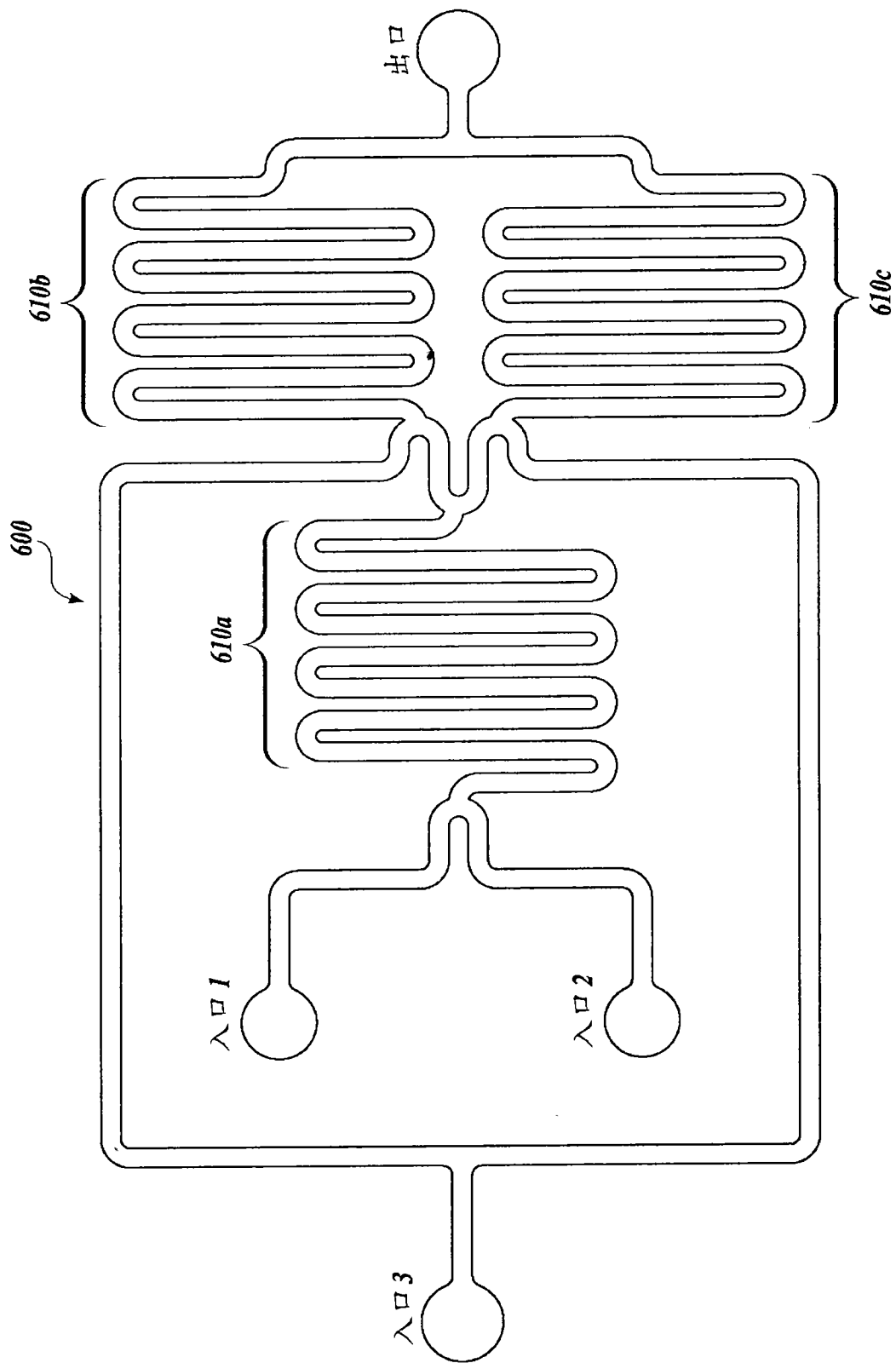


图6

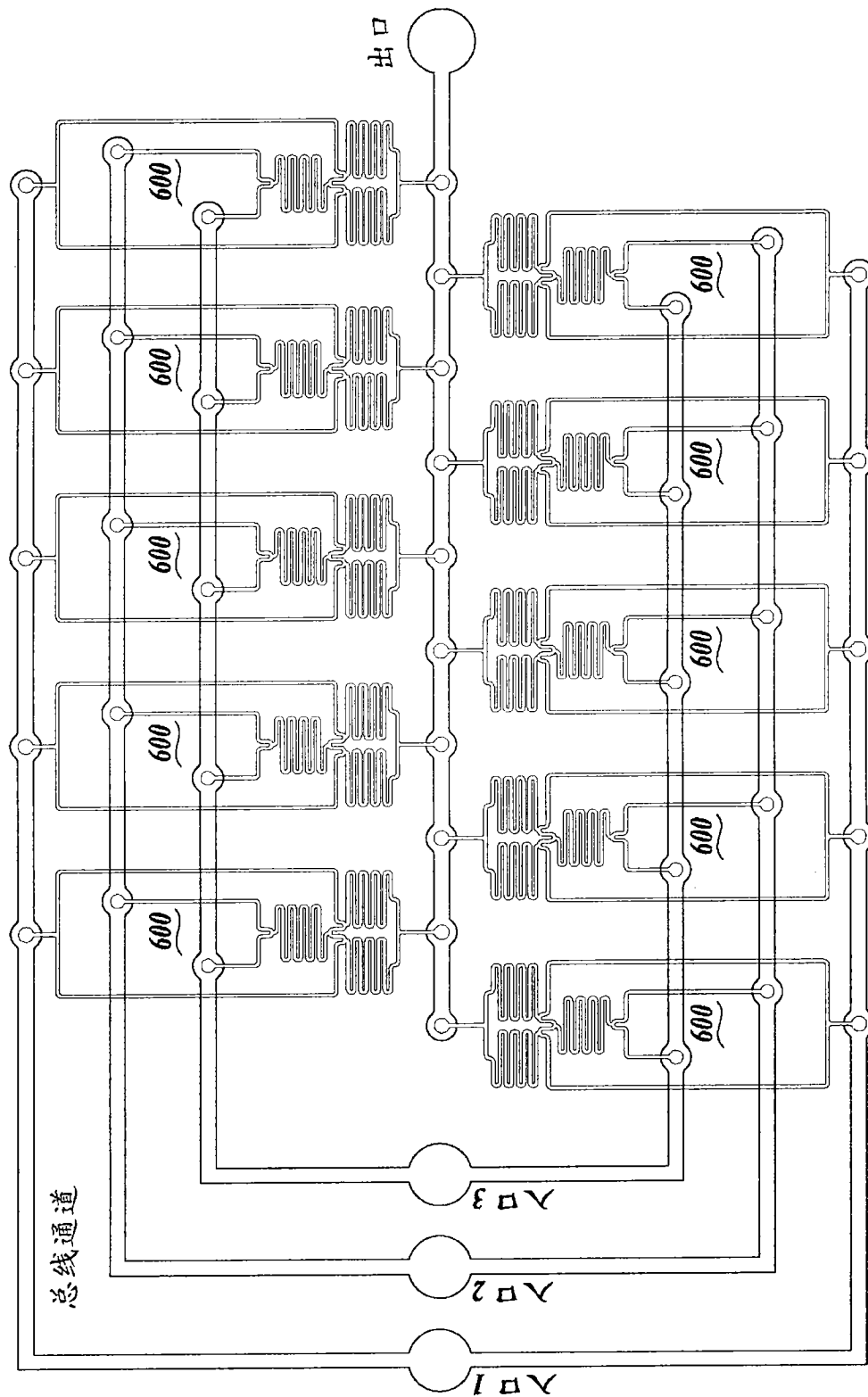


图7

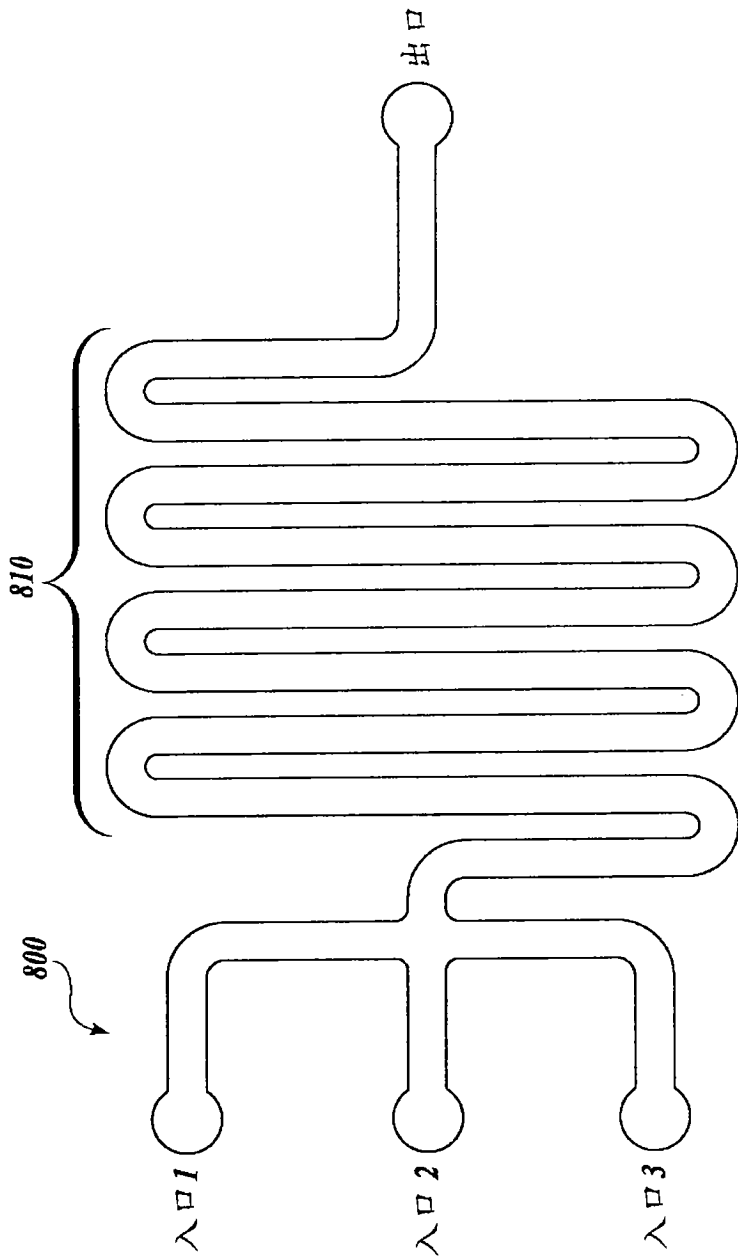


图8

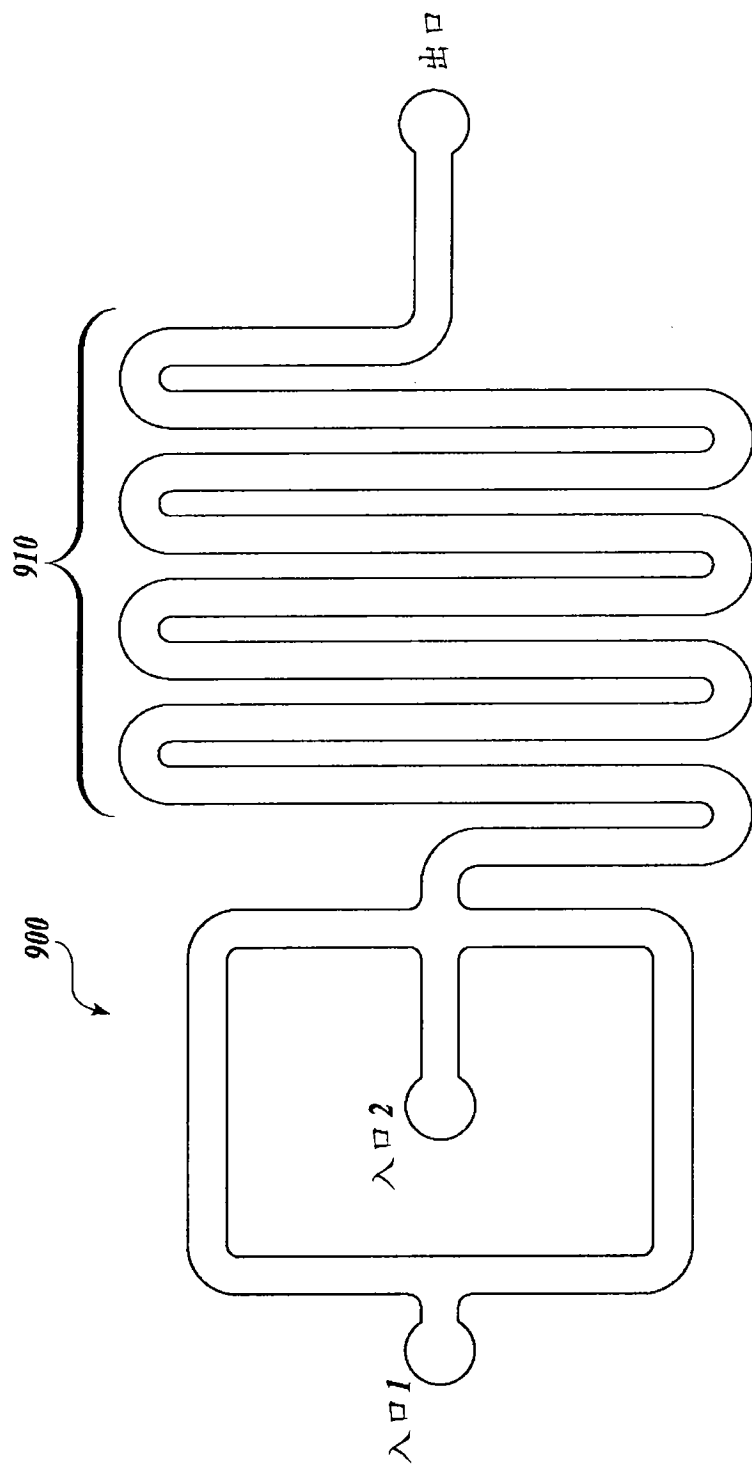


图9

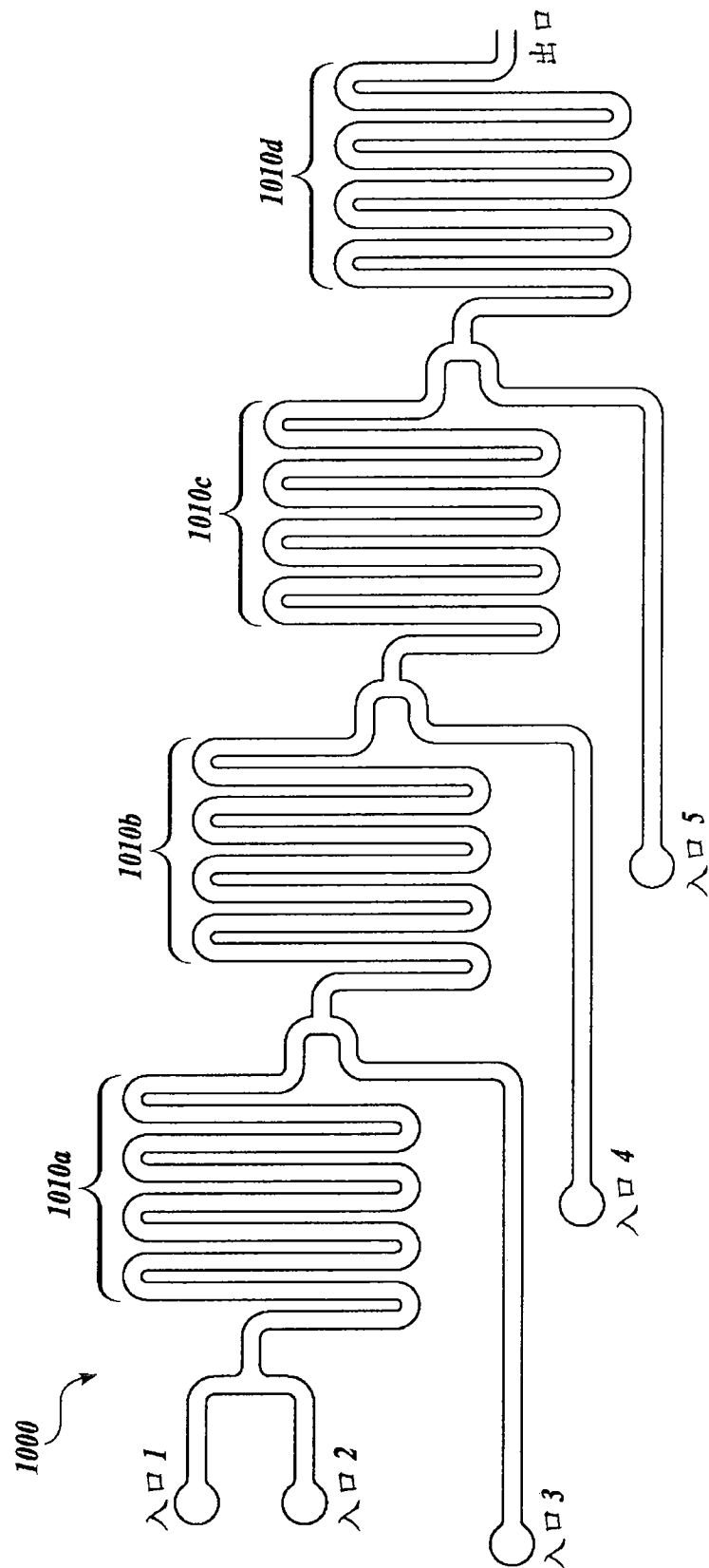


图10

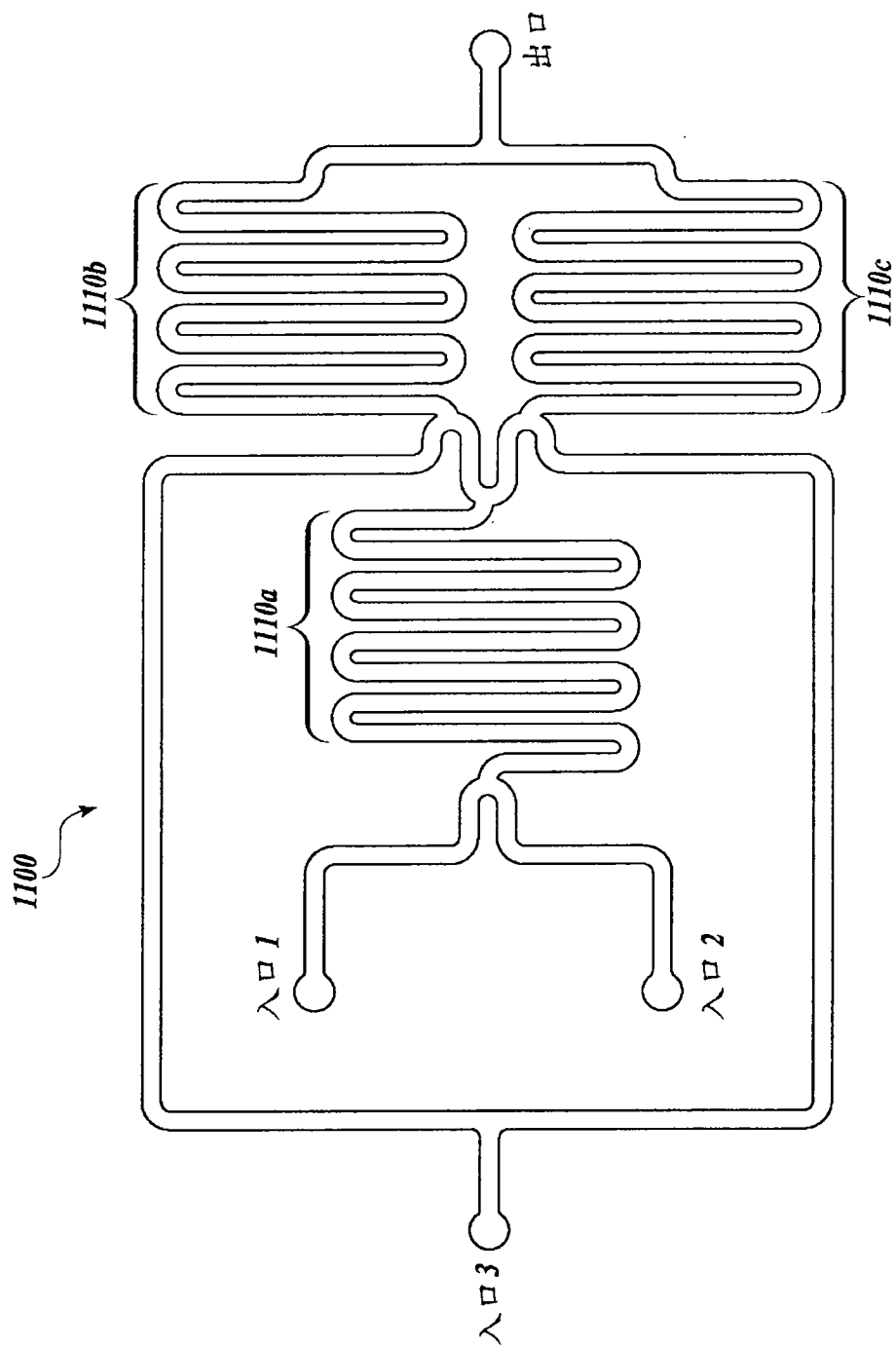


图11

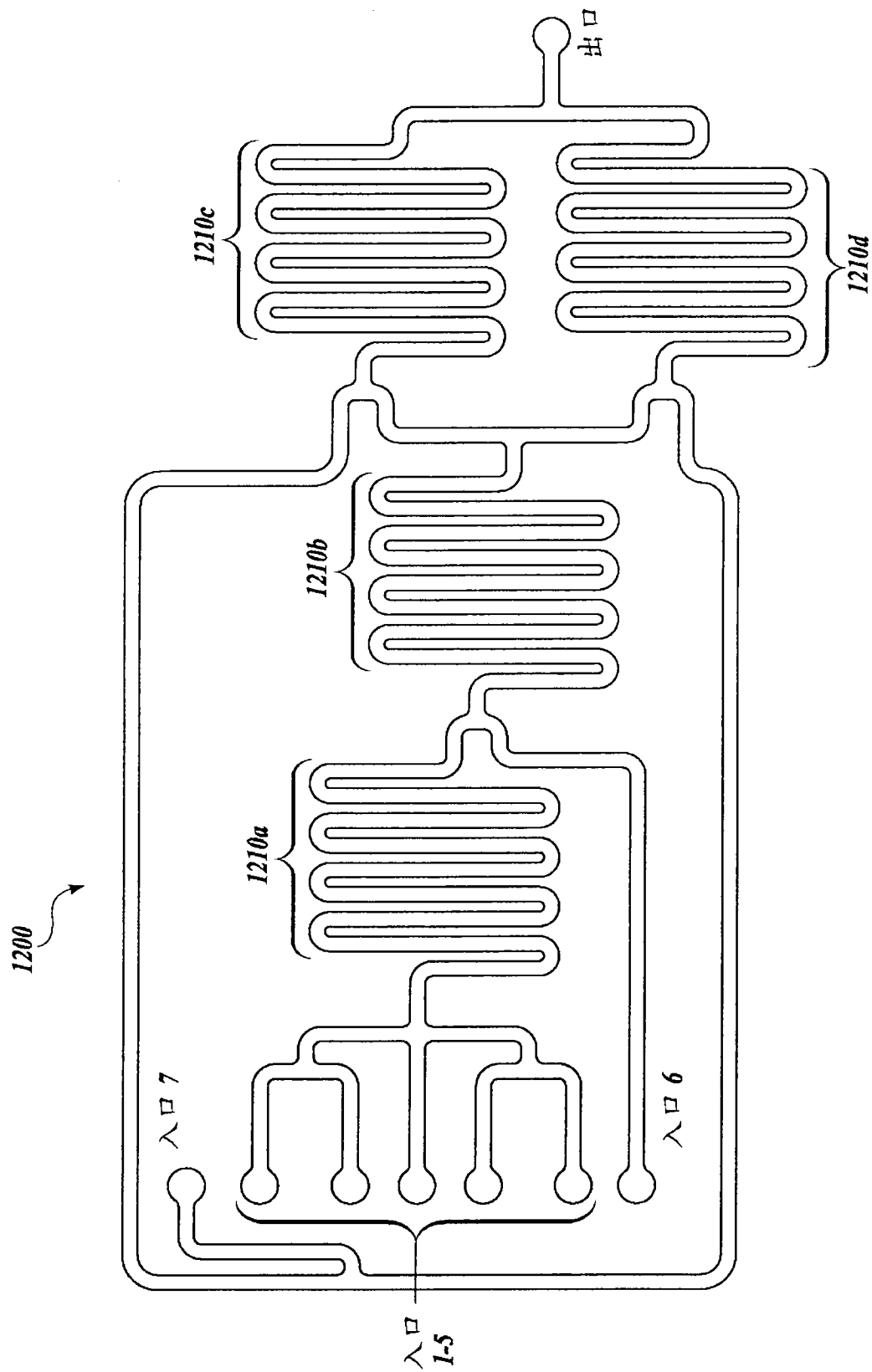


图12

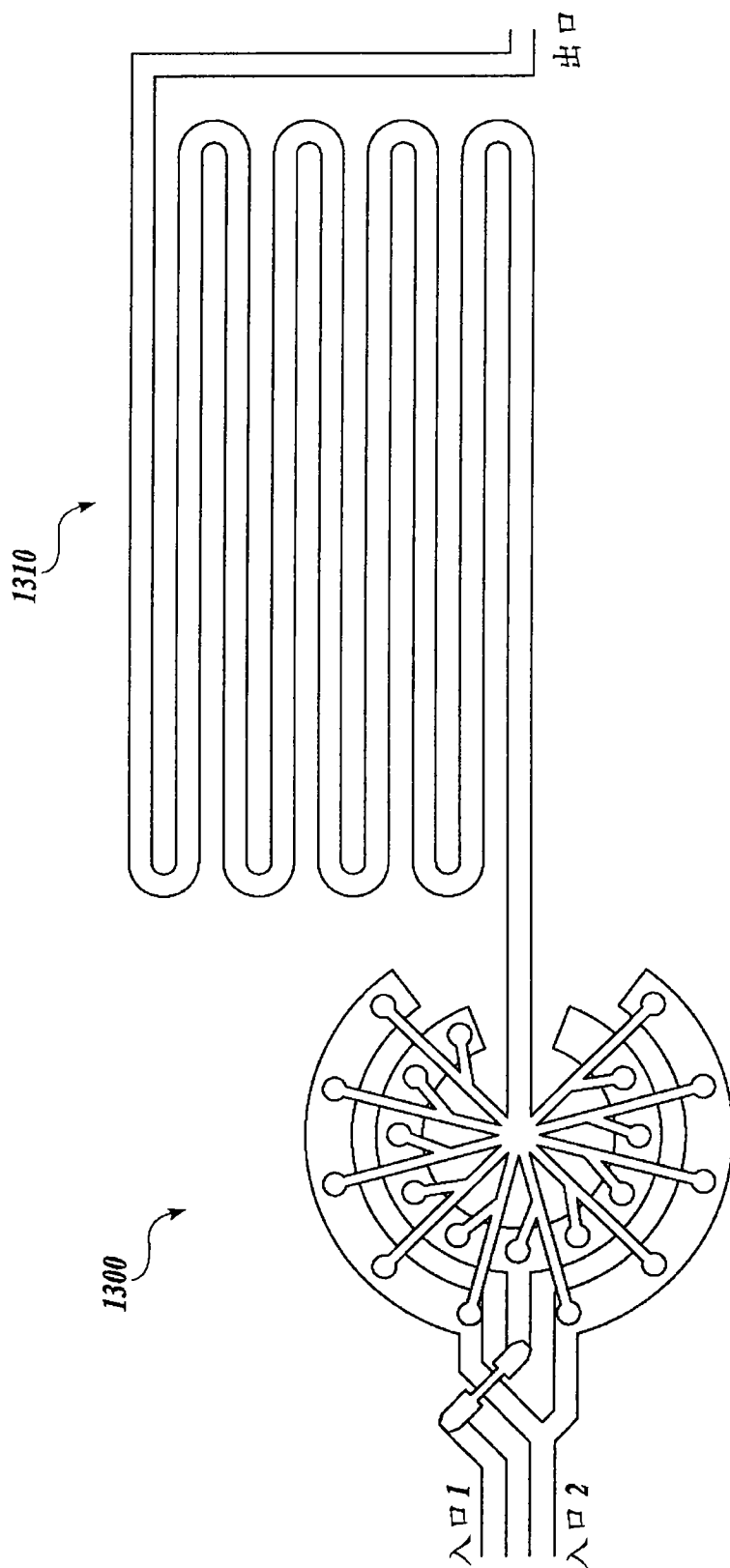


图13

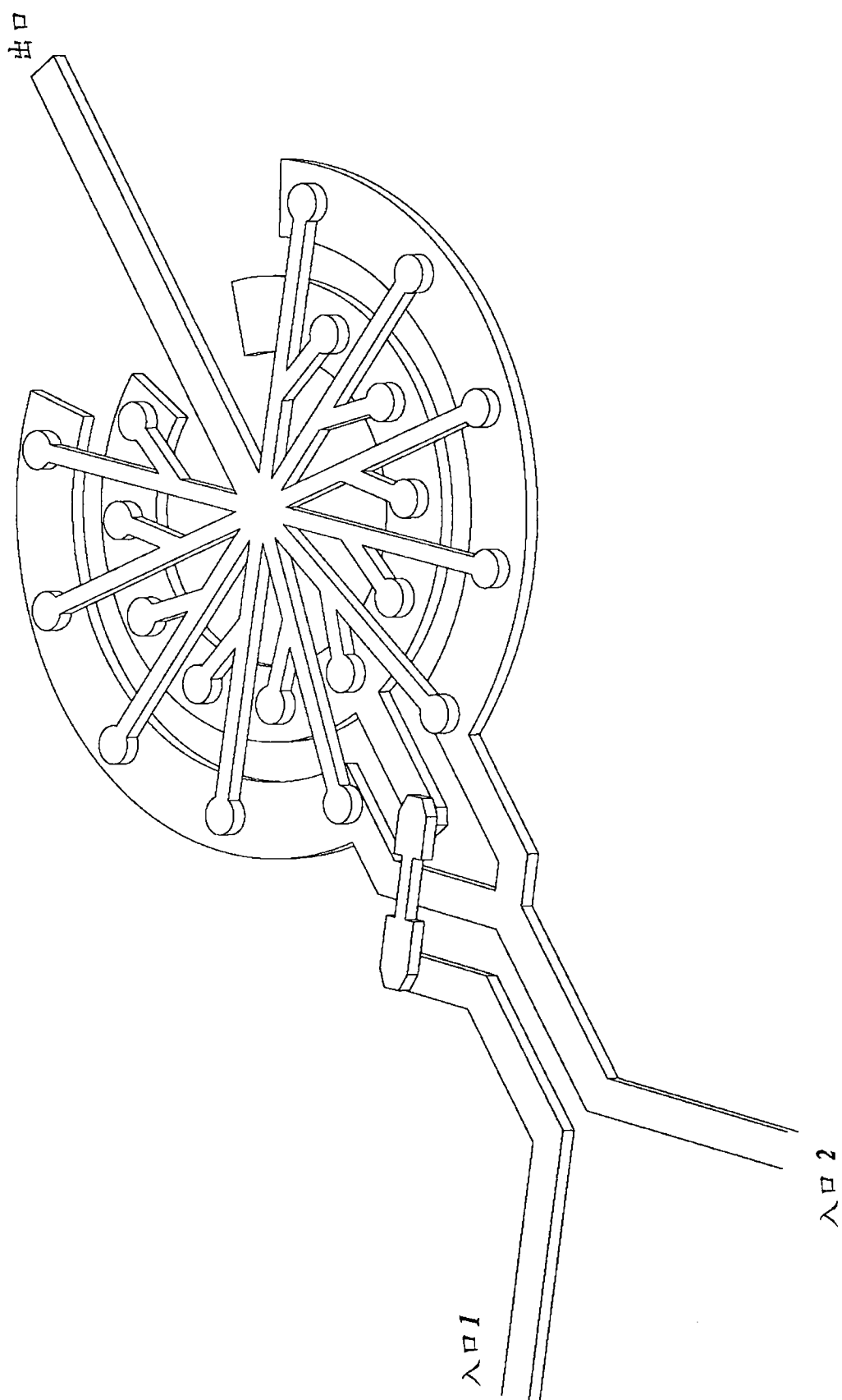


图14

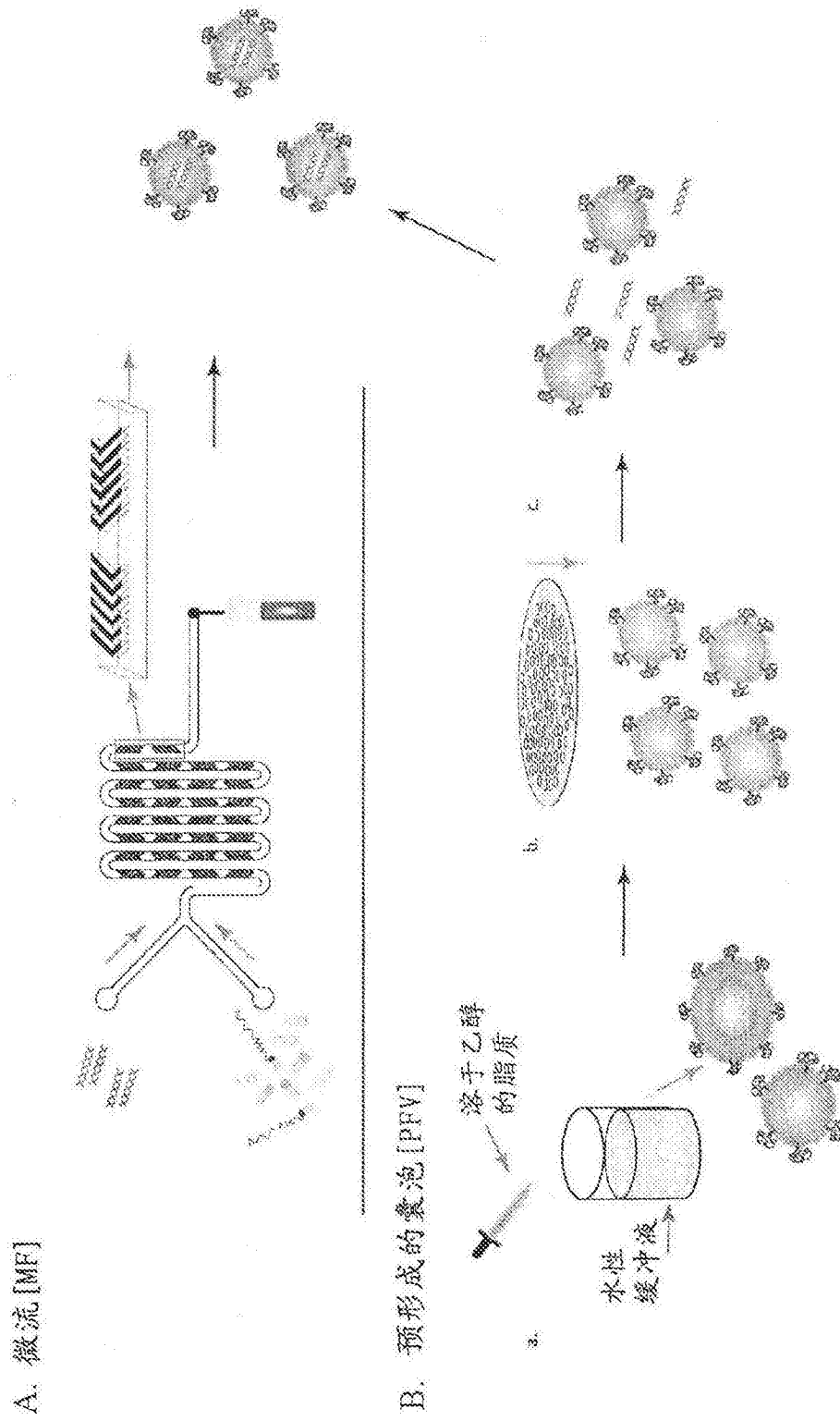


图15A-15B

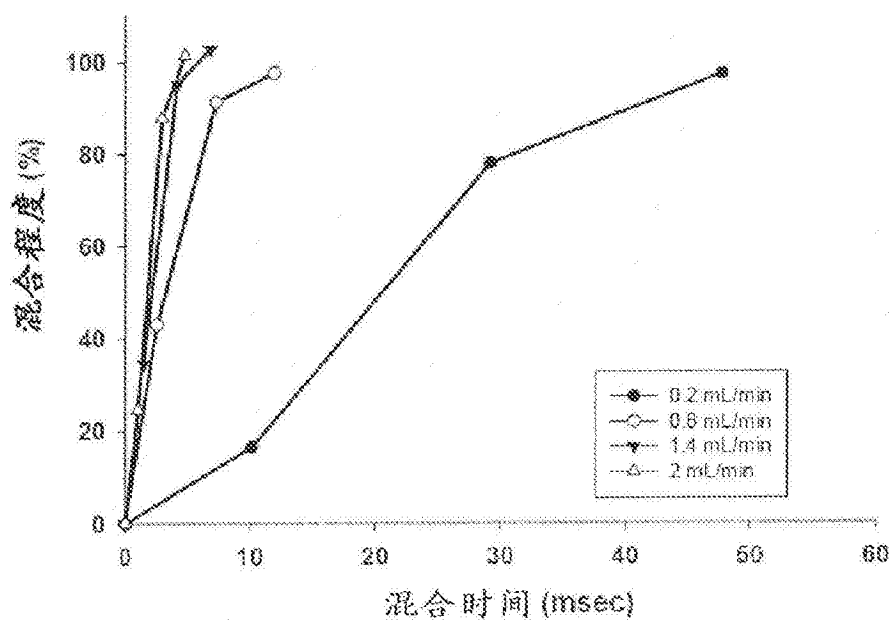


图16A

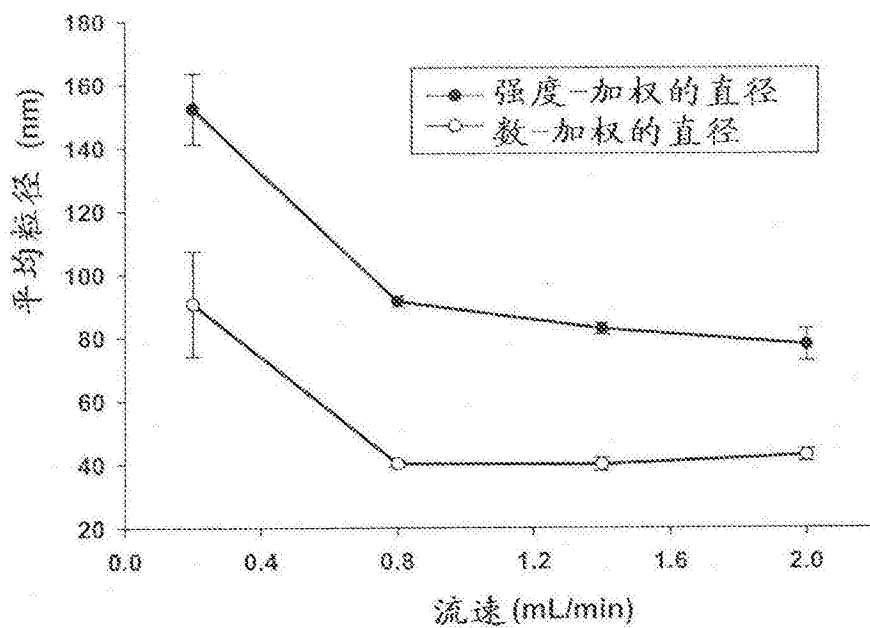


图16B

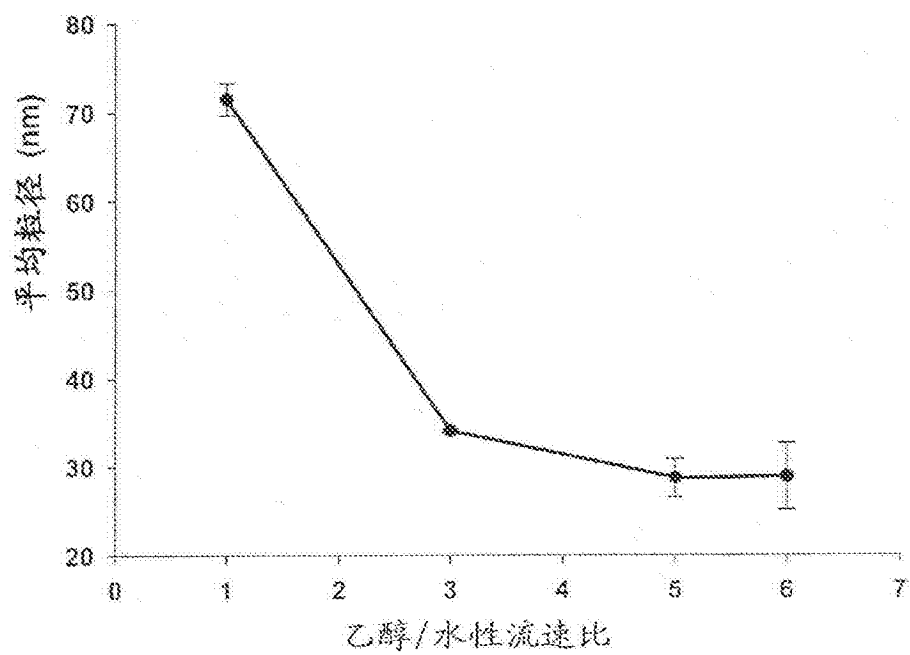


图16C

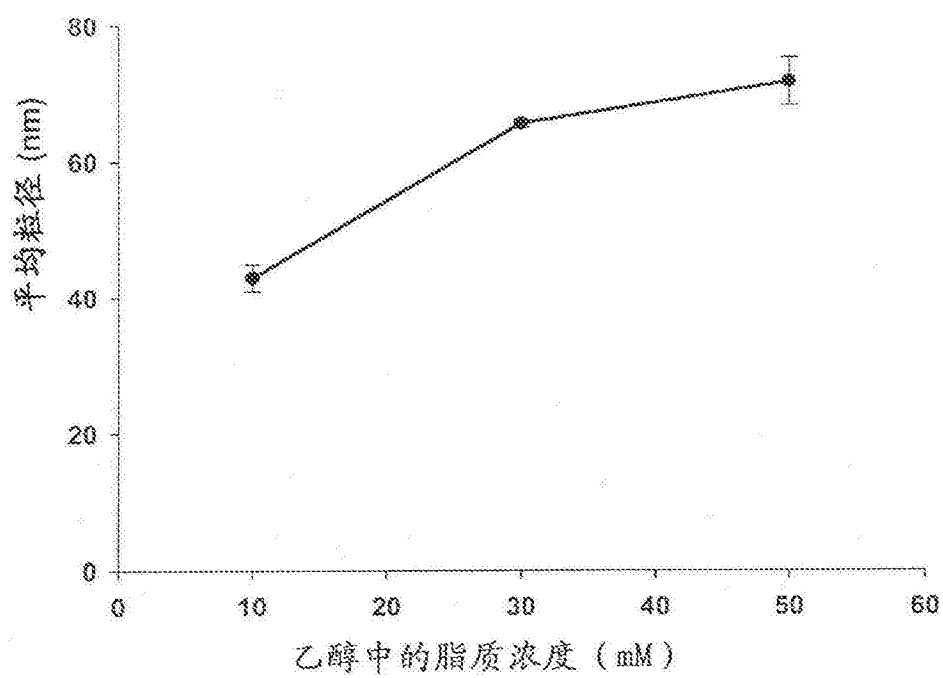


图17

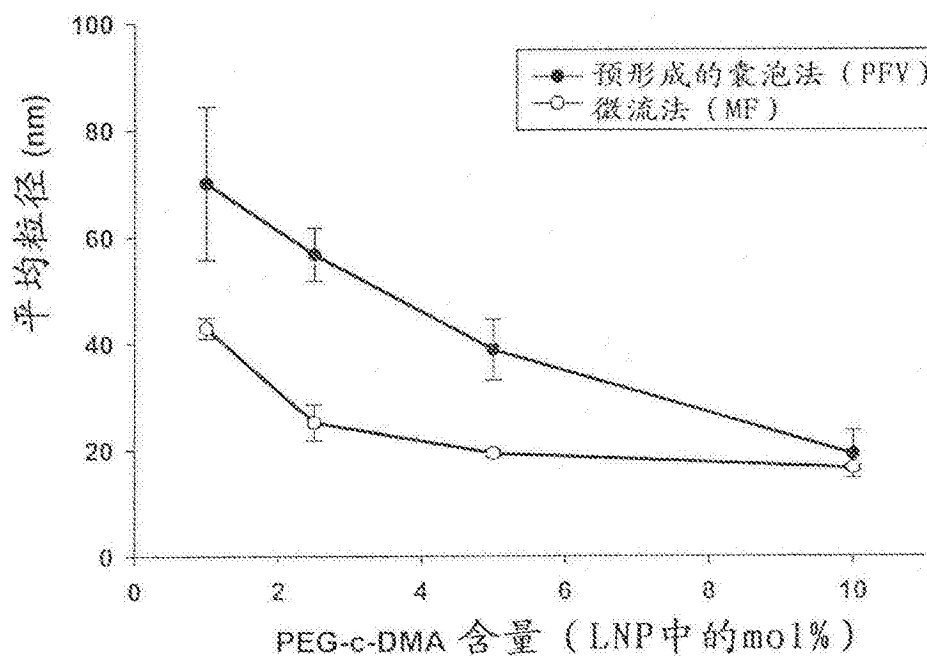


图18A

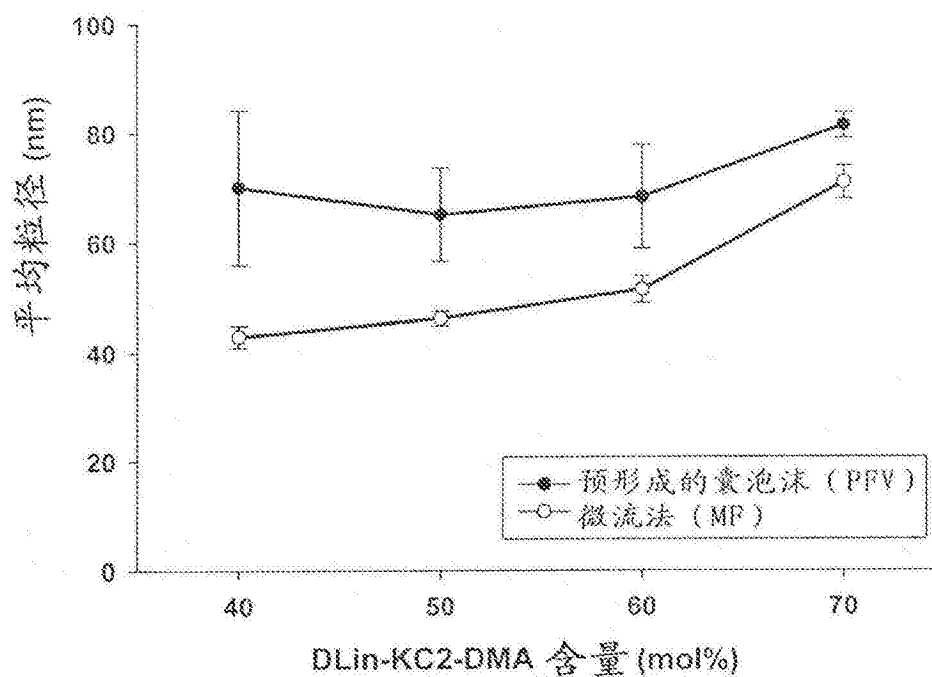


图18B

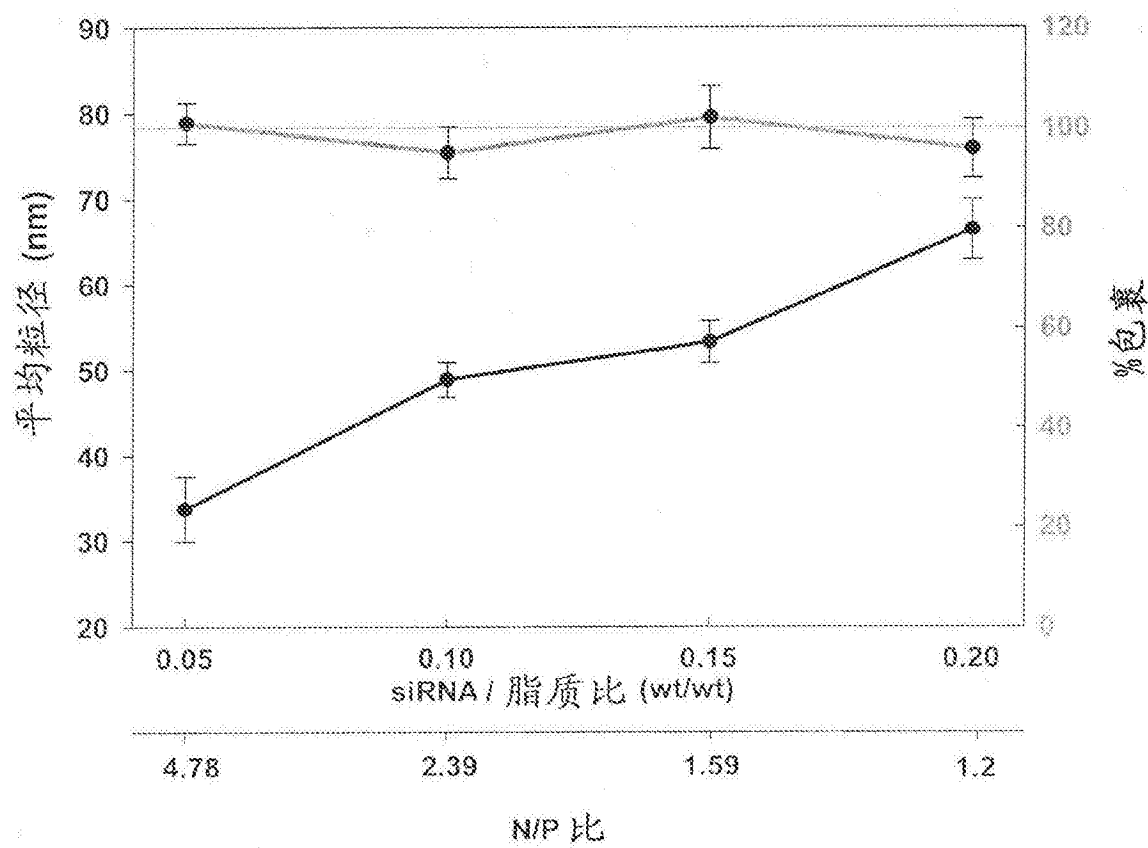


图19

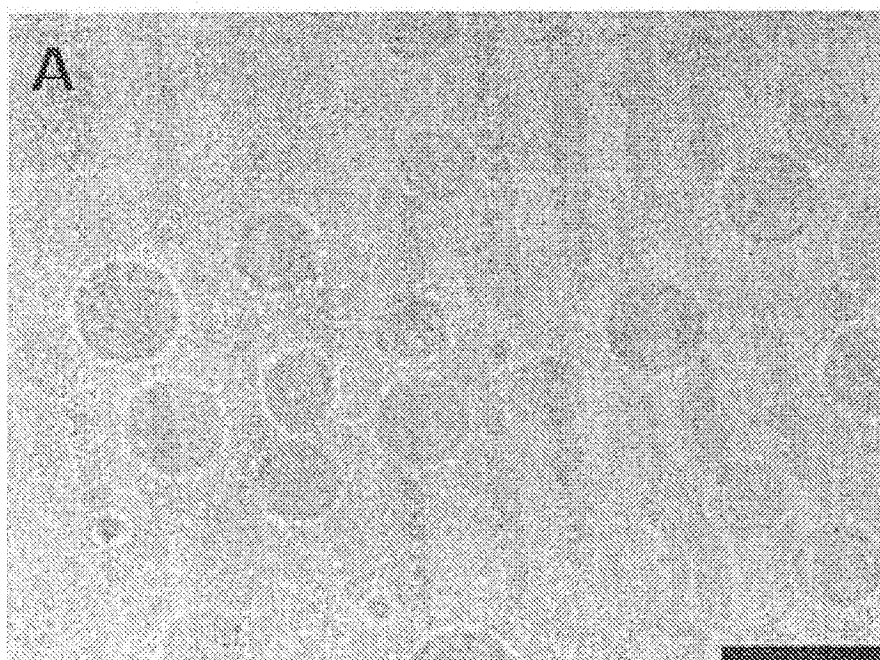


图20A

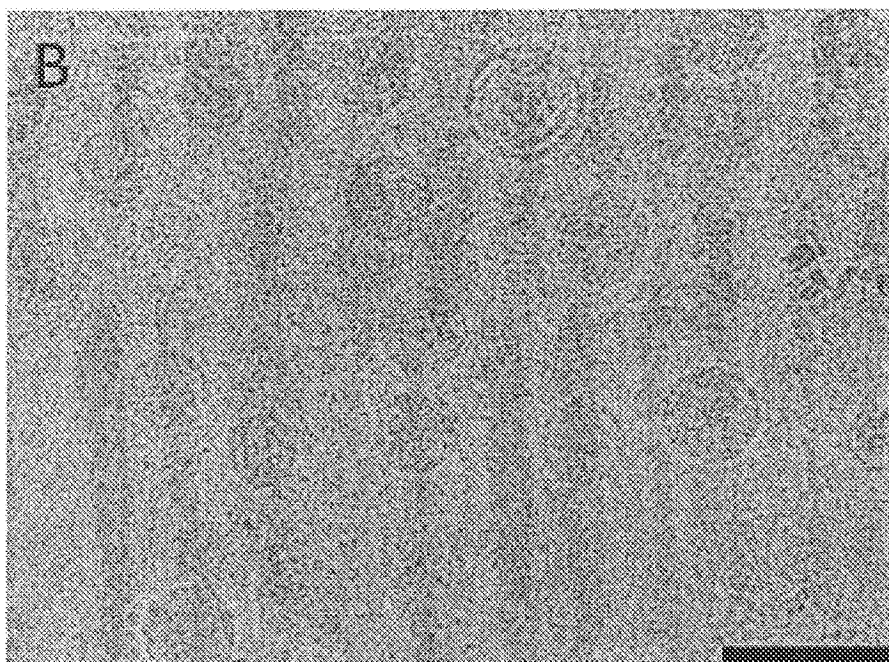


图20B

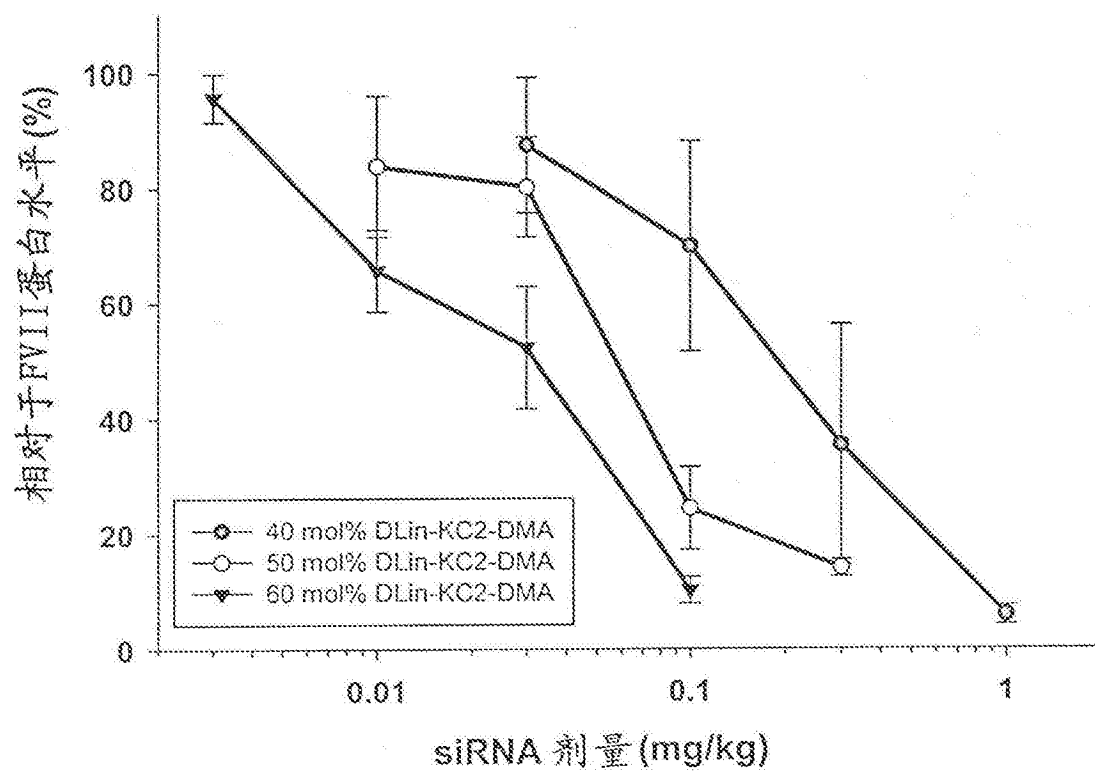


图21



图22A

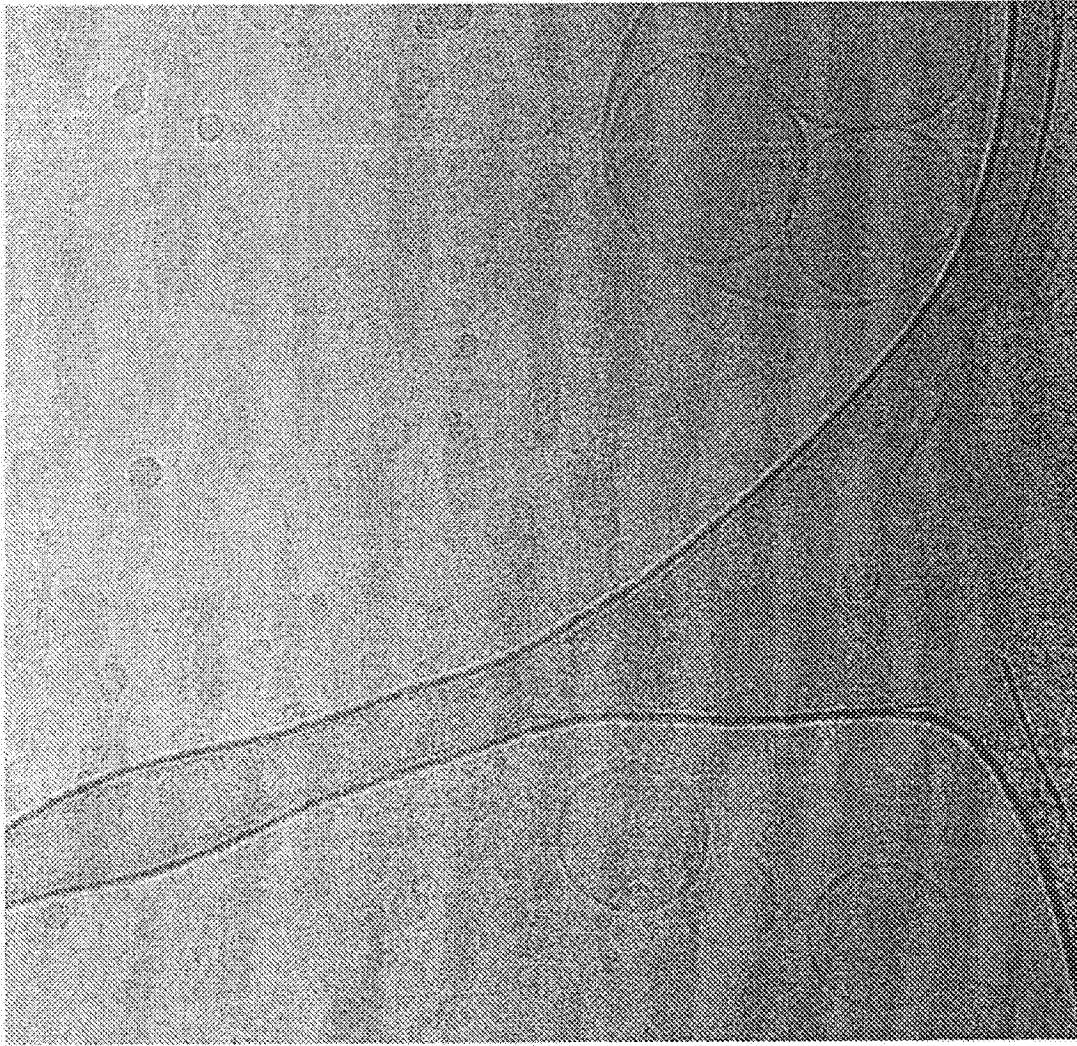


图22B

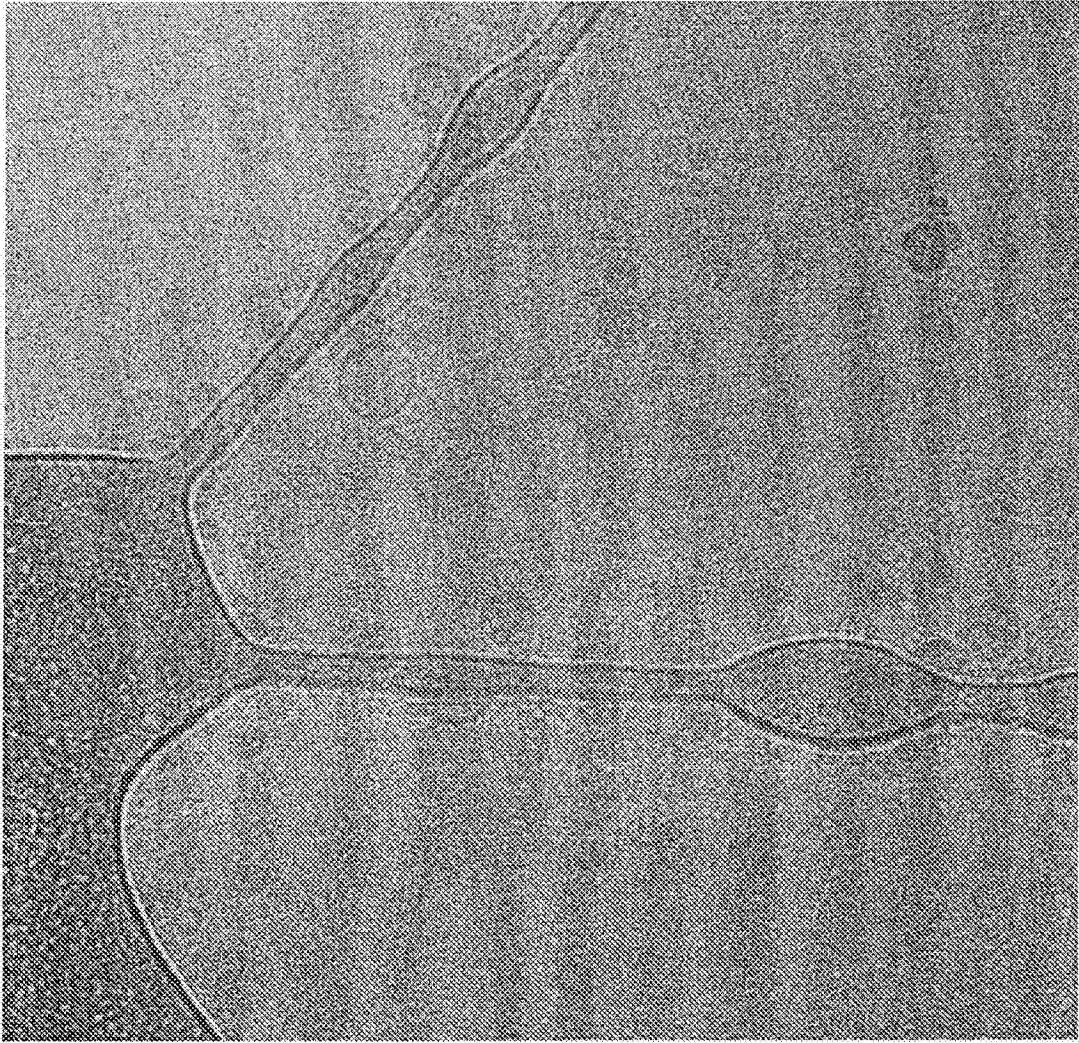


图22C

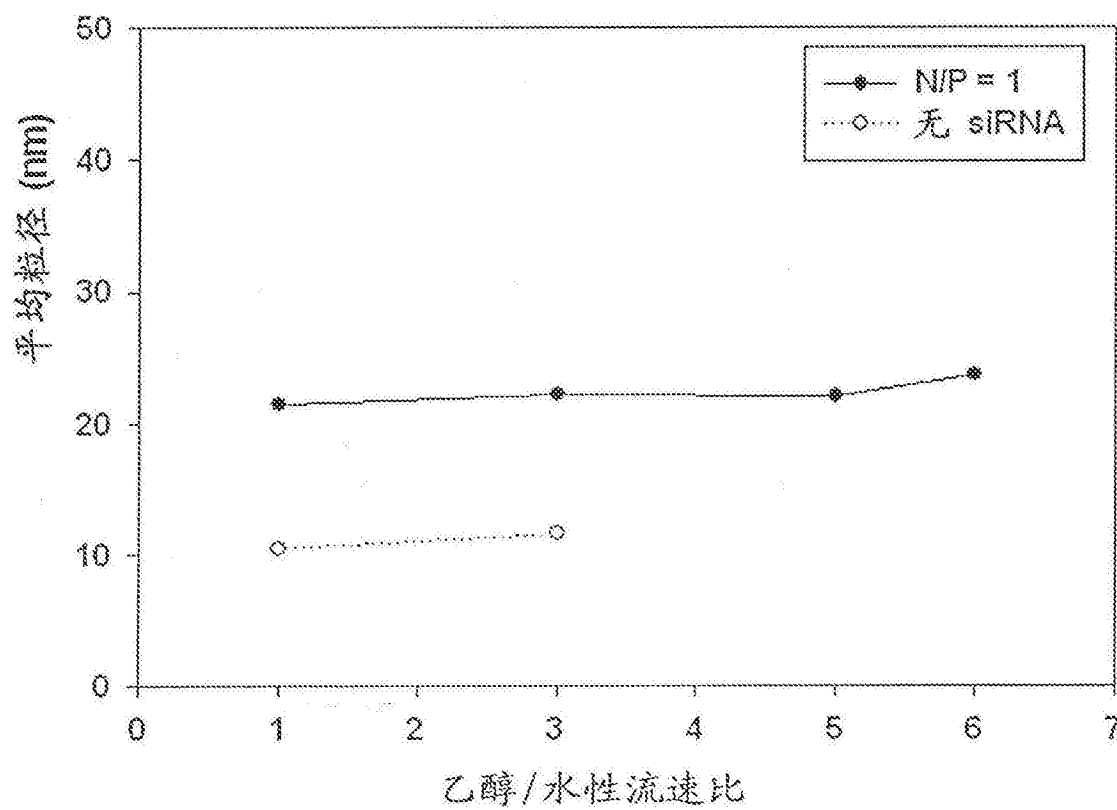


图23

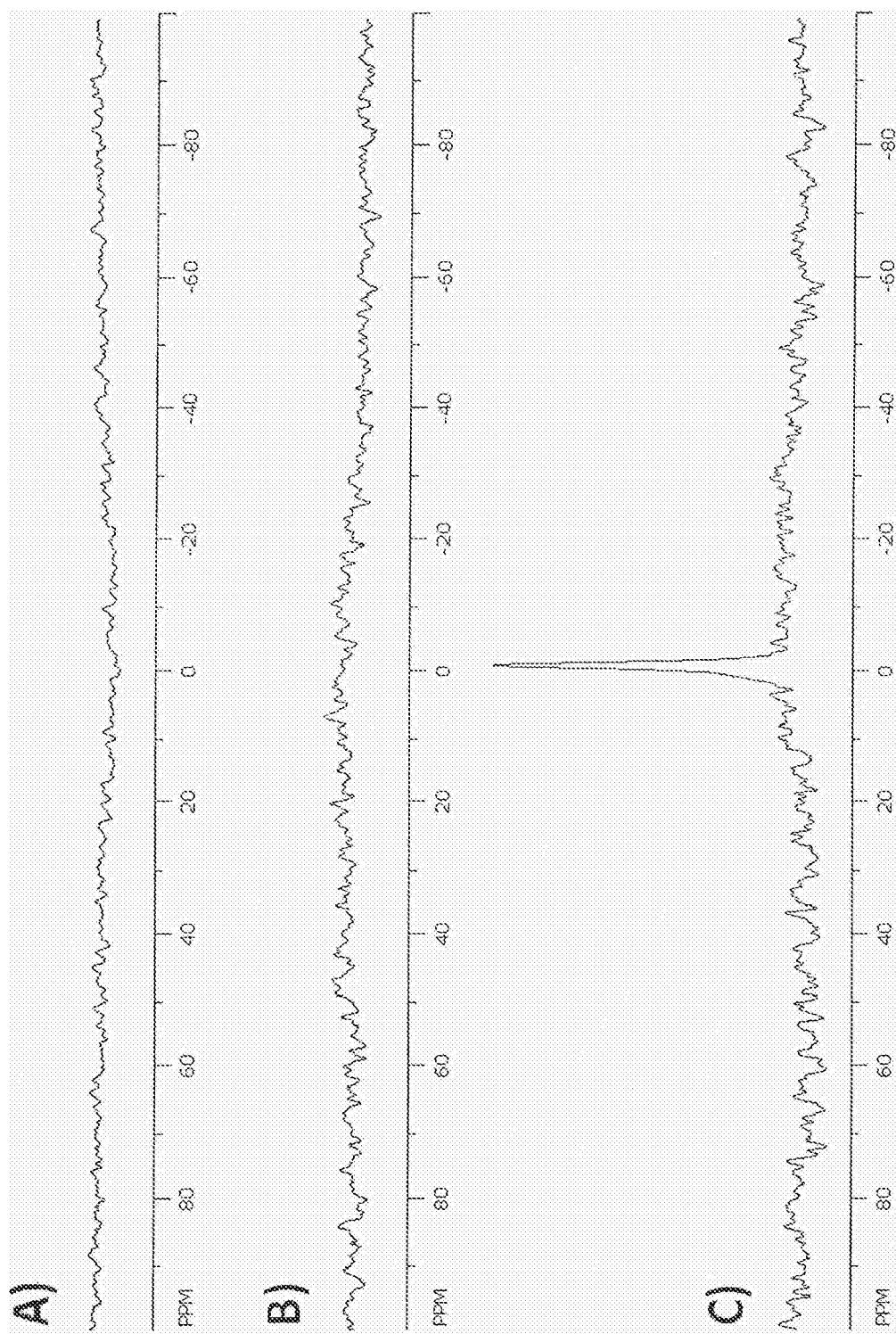


图24A-24C

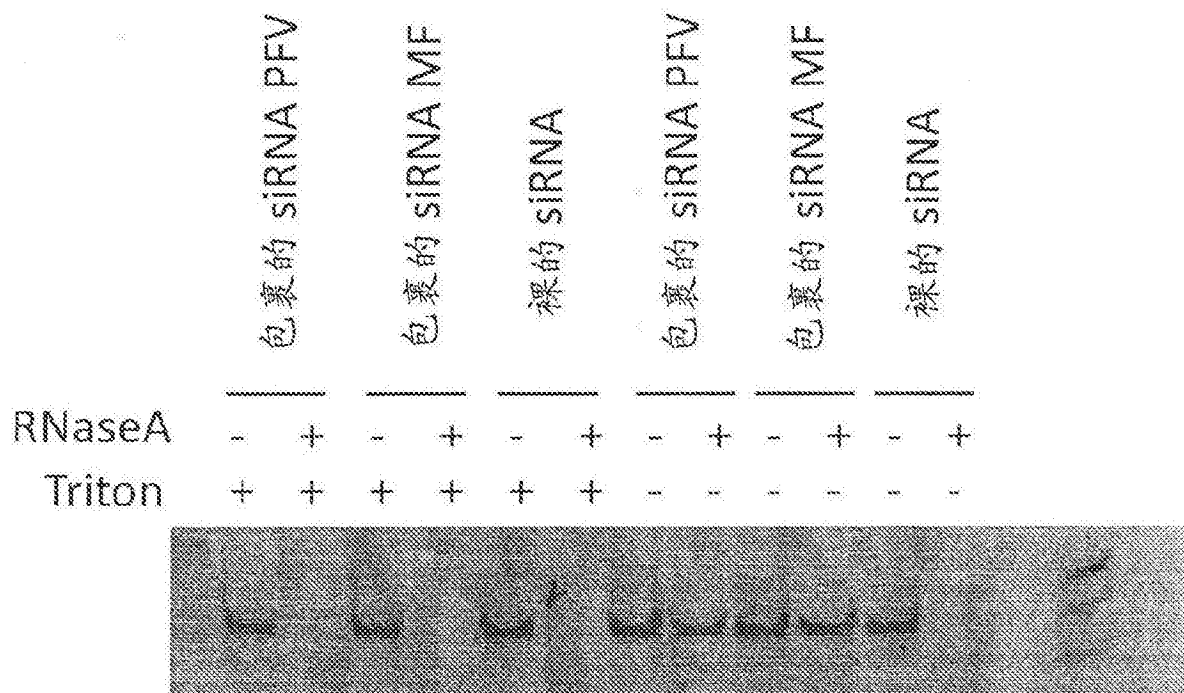


图25

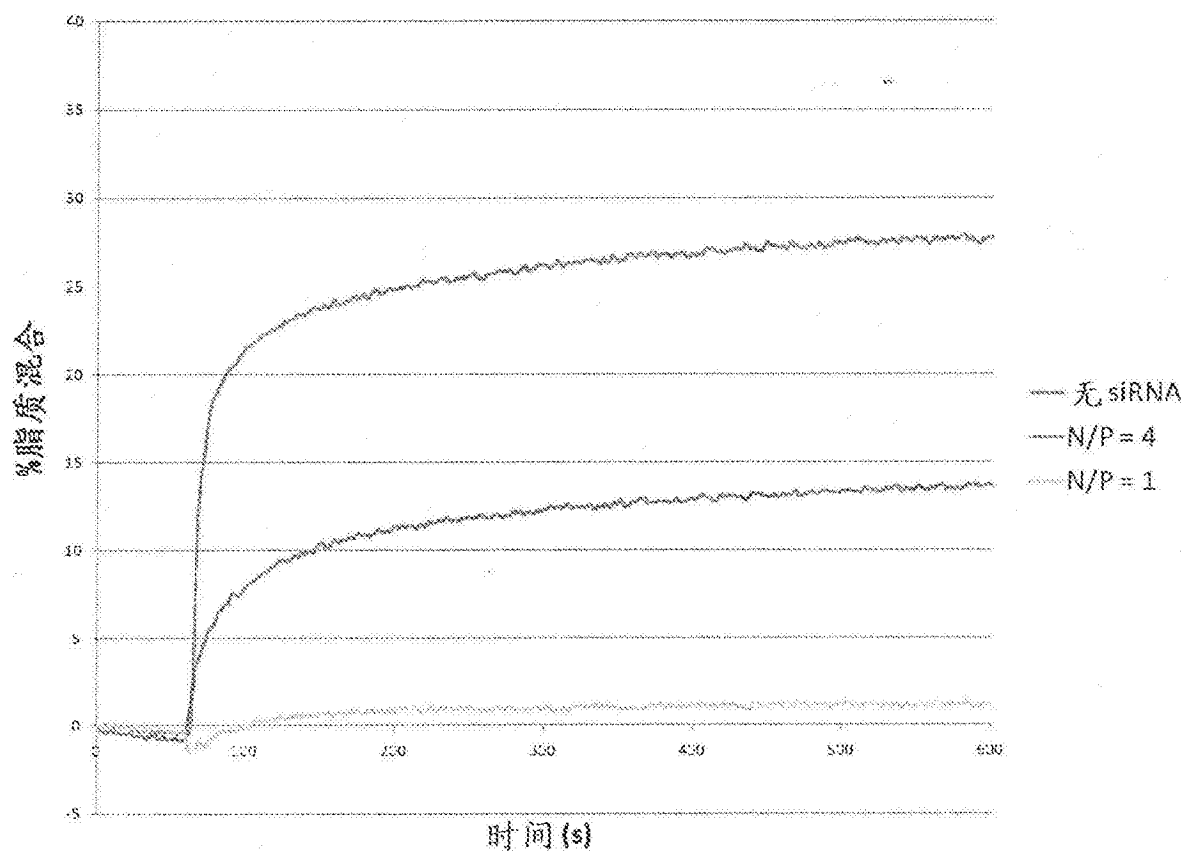


图26

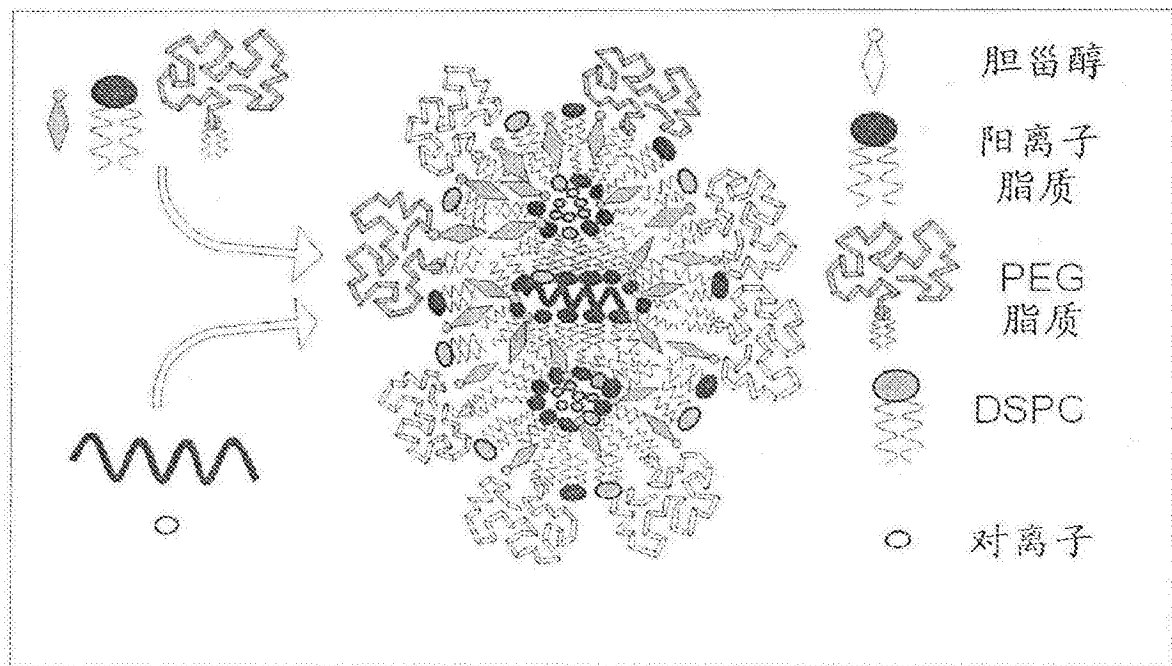


图27

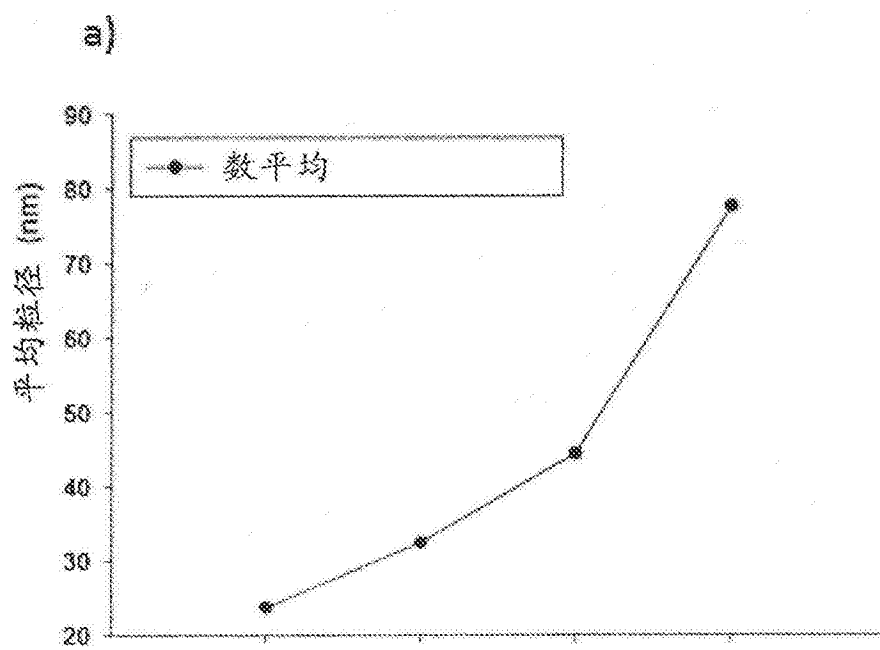


图28A

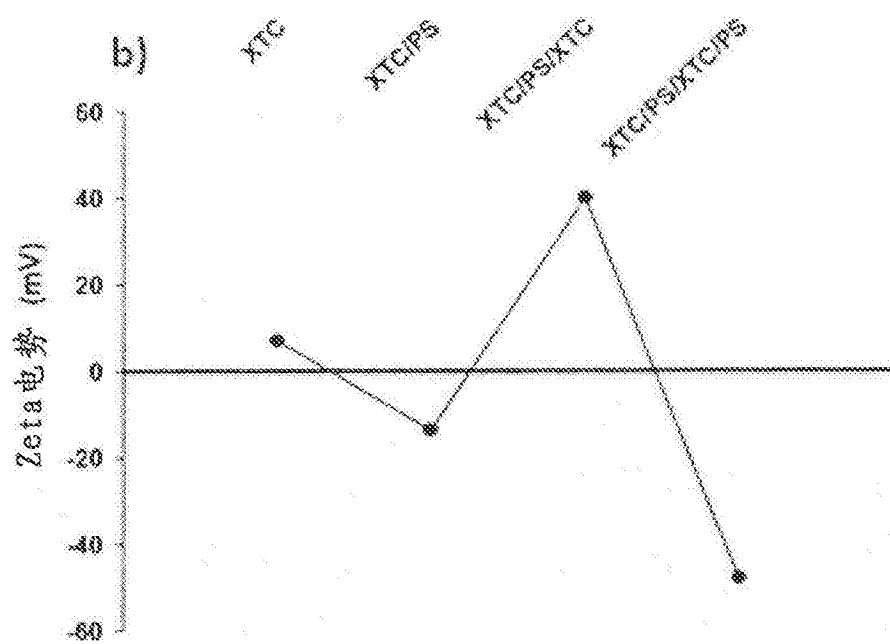


图28B

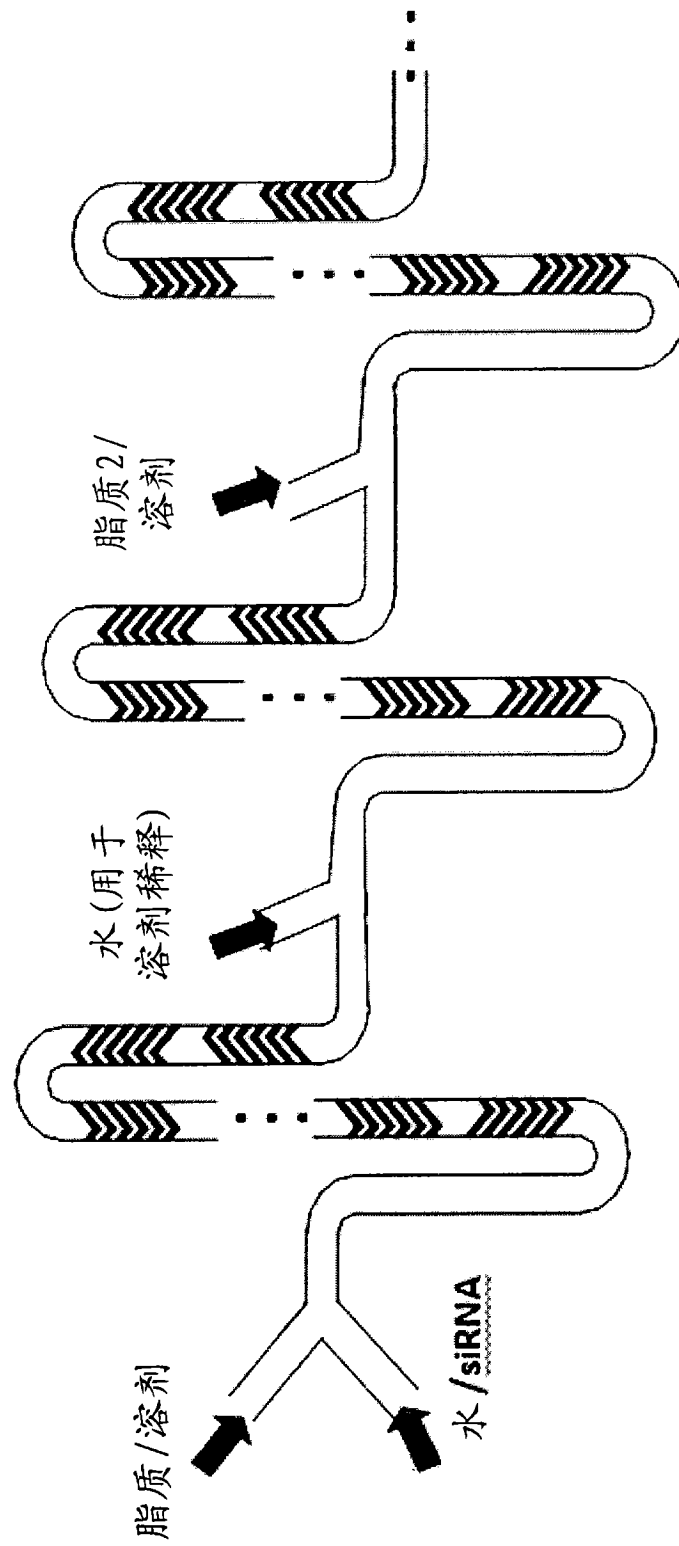


图29

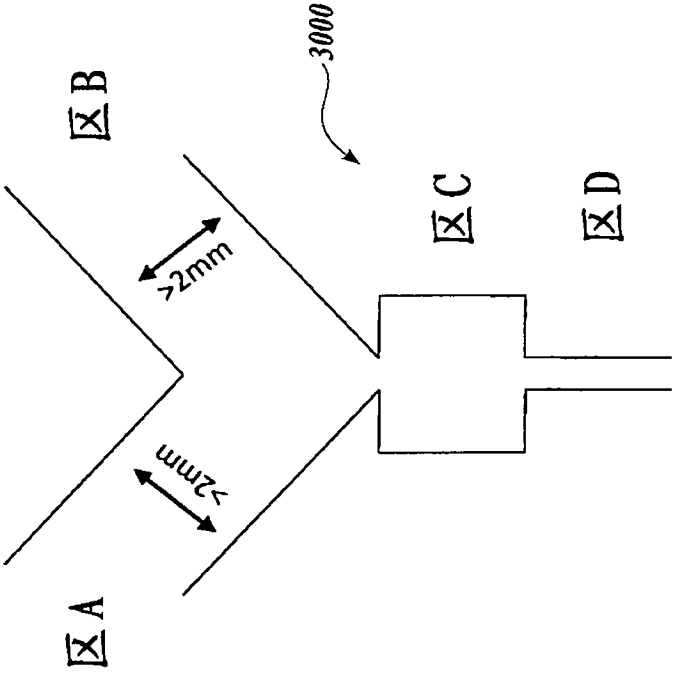


图30

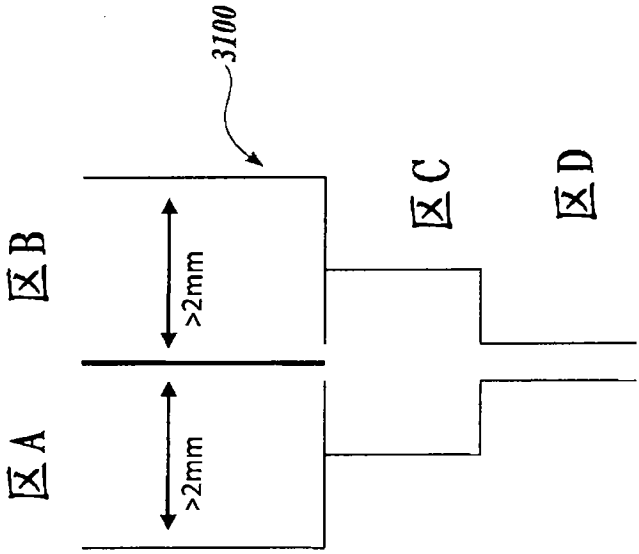


图31

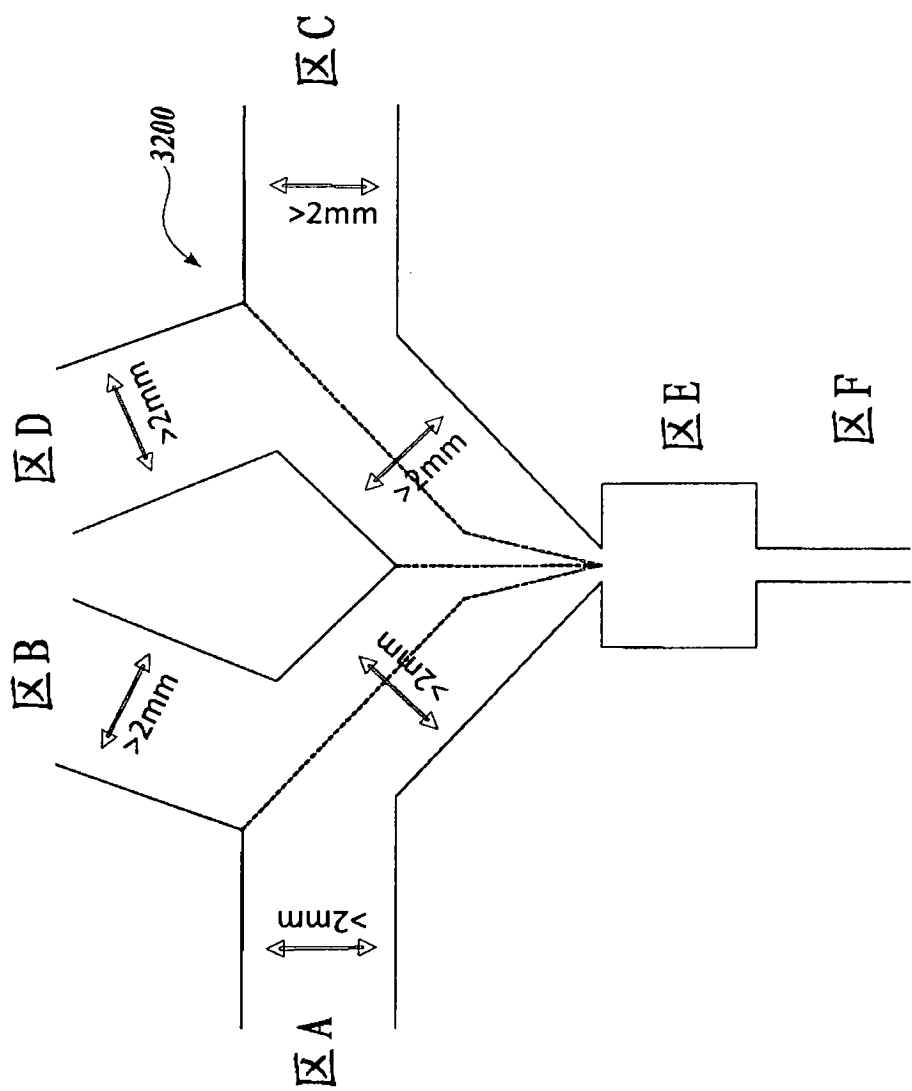


图32

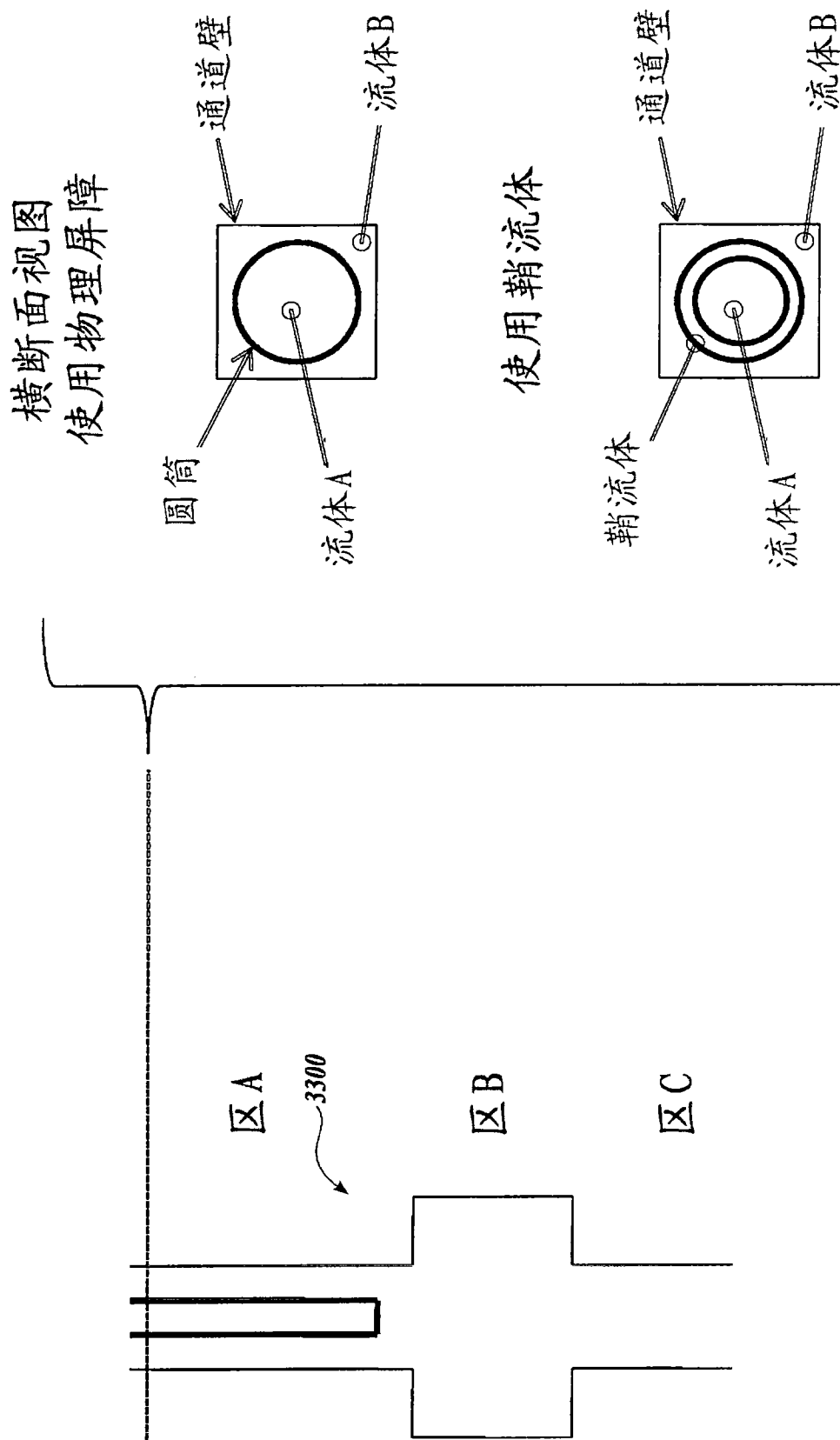


图33