



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 120051273 A

(43) 申请公布日 2025. 05. 27

(21) 申请号 202380071512.4

(22) 申请日 2023.10.17

(30) 优先权数据

2022-167048 2022.10.18 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2025.04.07

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2023/037566 2023.10.17

(87) PCT国际申请的公布数据

W02024/085149 JA 2024.04.25

(71) 申请人 狄普敦股份有限公司

地址 日本爱知县

(72) 发明人 丹羽贵子 森田浩司 小林知之

加藤海里

(74) 专利代理机构 成都超凡明远知识产权代理

有限公司 51258

专利代理师 王佳媛

(51) Int.Cl.

A61K 9/48 (2006.01)

A61K 31/713 (2006.01)

A61K 38/02 (2006.01)

A61K 47/10 (2006.01)

A61K 47/18 (2006.01)

A61K 47/24 (2006.01)

A61K 47/28 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 7/00 (2006.01)

A61P 37/04 (2006.01)

B01J 19/22 (2006.01)

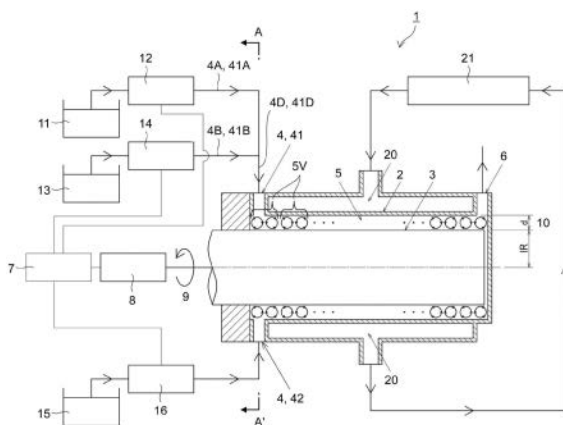
权利要求书3页 说明书23页 附图6页

(54) 发明名称

泰勒反应装置及胶囊粒子的制造方法

(57) 摘要

课题在于提供一种胶囊粒子的制造方法。提供一种通过使用泰勒反应装置来制造胶囊粒子的方法。



1. 一种胶囊粒子的制造方法,其中,使用泰勒反应装置。
2. 根据权利要求1所述的制造方法,其中,泰勒反应装置具有外筒、内筒以及一个以上的流入口,内筒以能够旋转的方式配置在外筒内,并在与外筒之间形成环状的反应室,流入口中的至少一个流入口被配置为使流体流入反应室内。
3. 根据权利要求2所述的制造方法,其中,一个以上的流入口包括第一流入口和第二流入口,第一流入口与第二流入口相互独立,并分别与反应室连结,从第一流入口向反应室注入粒子形成成分,从第二流入口向反应室注入封入成分,使内筒旋转,将粒子形成成分和封入成分在反应室内混合。
4. 根据权利要求2所述的制造方法,其中,一个以上的流入口包括第一管线和第二管线,第一管线与第二管线被配置为合流,合流的管线经由共同的流入口与反应室连结,从第一管线注入粒子形成成分,从第二管线注入封入成分,将粒子形成成分和封入成分在反应室跟前混合并生成粒子形成成分-封入成分混合溶液,接着经由共同的流入口向反应室注入粒子形成成分-封入成分混合溶液,使内筒旋转,将粒子形成成分-封入成分混合溶液在反应室内进一步混合。
5. 根据权利要求3或4所述的制造方法,其中,粒子形成成分包含聚合物成分或脂质成分,封入成分包含核酸、蛋白质、多肽、肽或低分子化合物。
6. 根据权利要求5所述的制造方法,其中,粒子形成成分包含脂质成分,封入成分包含核酸。
7. 根据权利要求3所述的制造方法,其中,先注入粒子形成成分,然后注入封入成分。
8. 根据权利要求3所述的制造方法,其中,先注入封入成分,然后注入粒子形成成分。
9. 根据权利要求3所述的制造方法,其中,同时注入粒子形成成分和封入成分。
10. 根据权利要求2~9中任一项所述的制造方法,其中,内筒的圆周速度为0.5~47m/s。
11. 根据权利要求2~10中任一项所述的制造方法,其中,内筒与外筒之间的间隙宽度为0.01mm~5mm。
12. 根据权利要求1~11中任一项所述的制造方法,其中,进行泰勒反应的搅拌时间为1分钟以下的搅拌时间。
13. 根据权利要求3、5~12中任一项所述的制造方法,其中,粒子形成成分的注入速度与封入成分的注入速度之比为从1:1~1:9的范围中选择的比。

14. 根据权利要求3~13中任一项所述的制造方法,其中,第一流入口与第二流入口的内径相同或者大致相同。
15. 根据权利要求3~13中任一项所述的制造方法,其中,第一流入口与第二流入口的内径不同。
16. 一种泰勒反应装置,在胶囊粒子的制造方法中使用,其中,具有外筒、内筒以及一个以上的流入口,内筒以能够旋转的方式配置在外筒内,并在与外筒之间形成环状的反应室,流入口中的至少一个流入口被配置为使流体流入反应室内。
17. 根据权利要求16所述的装置,其中,一个以上的流入口包括第一流入口和第二流入口,第一流入口与第二流入口相互独立,并分别与反应室连结,第一流入口用于注入粒子形成成分,第二流入口用于注入封入成分,内筒用于通过旋转来将粒子形成成分和封入成分在反应室内混合。
18. 根据权利要求16所述的装置,其中,一个以上的流入口具有第一管线和第二管线,第一管线用于注入粒子形成成分,第二管线用于注入封入成分,第一管线与第二管线在反应室跟前合流,在合流部分的下游侧形成粒子形成成分-封入成分混合溶液管线,接着经由共同的流入口与反应室连结,内筒用于通过旋转来将粒子形成成分-封入成分混合溶液在反应室内进一步混合。
19. 根据权利要求17或18所述的装置,其中,粒子形成成分包含聚合物成分或脂质成分,封入成分包含核酸、蛋白质、多肽、肽或低分子化合物。
20. 根据权利要求19所述的装置,其中,粒子形成成分包含脂质成分,封入成分包含核酸。
21. 根据权利要求17或从属于权利要求17的权利要求19所述的装置,其中,若将向反应室供给液体的一侧设为上游侧,将从反应室排出液体的一侧设为下游侧,则第一流入口配置在上游侧,第二流入口配置在下游侧。
22. 根据权利要求17或从属于权利要求17的权利要求19所述的装置,其中,若将向反应室供给液体的一侧设为上游侧,将从反应室排出液体的一侧设为下游侧,则第二流入口配置在上游侧,第一流入口配置在下游侧。
23. 根据权利要求17或从属于权利要求17的权利要求19所述的装置,其中,第一流入口与第二流入口配置在与内筒的轴向垂直的同一剖面上。
24. 根据权利要求16~23中任一项所述的装置,其中,内筒与外筒之间的间隙宽度为0.01mm~5mm。
25. 根据权利要求17、19~24中任一项所述的装置,其中,

粒子形成成分的注入速度与封入成分的注入速度之比为从1:1 ~ 1:9的范围中选择的比。

26. 根据权利要求17 ~ 25中任一项所述的装置,其中,第一流入口与第二流入口的内径相同或者大致相同。

27. 根据权利要求17 ~ 25中任一项所述的装置,其中,第一流入口与第二流入口的内径不同。

泰勒反应装置及胶囊粒子的制造方法

技术领域

[0001] 本公开涉及一种泰勒反应装置及胶囊粒子的制造方法。

背景技术

[0002] 作为用于将封入物送达到标的物的手段,可举出胶囊粒子。胶囊粒子外侧的胶囊部分通常将内容物封入内侧。由此能够提高稳定性或能够将内容物送达到标的物。作为使用胶囊粒子的示例,可举出化妆品、医药品、功能性食品、印刷技术、工业用化学药品等。作为制造胶囊粒子的方法,已知有溶媒注入法、手摇法(handshake method)、逆相蒸发法、透膜pH梯度法、气泡法、微流动法、薄膜水合法、加热法、冻结融解法、脱水再水合法等各种方法。

[0003] 正在进行使用了质粒DNA、反义寡核苷酸、siRNA(Small interfering RNA:小干扰核糖核酸)、miRNA(microRNA:微核糖核酸)、mRNA(Messenger RNA:信使核糖核酸)等各种核酸的医药品的研究开发。例如,mRNA疫苗是通过将mRNA施用到生物体内来使目标蛋白质在生物体内表达,由此引起免疫反应的疫苗的一种。作为mRNA疫苗中的抗原蛋白质,可举出病毒抗原或癌抗原,近年来,有SARS-CoV-2(新型冠状病毒)的突起蛋白的示例。另外,还尝试有施用编码正常蛋白质的mRNA来治疗遗传性疾病。

[0004] 核酸即使直接施用也是负电荷的高分子,因此不能透过细胞膜。尤其,作为课题可举出mRNA在血液中迅速分解、在生物体内引起炎症反应。因此,核酸的送达使用各种药物传递系统。

[0005] 作为用于送达核酸的药物传递系统,例如可举出脂质纳米粒子。脂质纳米粒子主要是球状或像球状的形状。作为脂质,可以使用脂肪酸、酰基甘油、蜡以及它们与表面活性剂的混合物。也可以使用稳定剂,作为稳定剂,可以使用磷脂、鞘磷脂等生物体膜脂质、胆汁酸盐、固醇类(例如胆固醇)等。对于脂质纳米粒子,例如参照Shah等人的Lipid Nanoparticles:Production,Characterization and Stability(脂质纳米粒子:制备、表征和稳定性),Springer(施普林格),2015。

[0006] 作为脂质纳米粒子的脂质成分,例如可举出磷脂、胆固醇、pH响应性阳离子性脂质及PEG化(PEGylation:聚乙二醇化)的脂质,其中包埋(encapsulate)有核酸。

[0007] 包埋有核酸的脂质纳米粒子(LNP)的制造流程一般如下。首先,使脂质乙醇溶液与核酸水溶液(酸性)接触,进行脂质溶液与核酸溶液的混合(混合工序)。接着根据需要进行稀释(稀释工序)。接着,进行超滤或透析过滤,进行浓缩(精制工序)。在这个阶段,游离的核酸被去除,溶媒(乙醇)被去除,进行向最终介质的置换,脂质纳米粒子被浓缩为目标浓度。接着进行过滤器过滤。

[0008] 作为现有的脂质成分和核酸成分的混合法,已知有滴下混合法、在线混合法(Inline mixing method)及微流路混合法。滴下混合法的课题在于,由于是分批式因此不适合连续生产,以及所得到的粒子的品质不均匀。在线混合虽然可以连续生产,但由于流路为毫米级,因此所得到的粒子尺寸大,品质不均匀,并且缺乏复现性。微流路混合法能够将

粒子尺寸控制得较小且复现性较高,但另一方面,由于流路小到0.1mm左右,因此产量较低。

[0009] 需要适合大规模生产的胶囊粒子的制造方法。

[0010] 现有技术文献

[0011] 非专利文献

[0012] 非专利文献1:Shah等人,Lipid Nanoparticles:Production,Characterization and Stability(脂质纳米粒子:制备、表征和稳定性),Springer(施普林格),2015。

发明内容

[0013] 发明要解决的问题

[0014] 本发明人的课题在于,提供一种至少部分解决现有的粒子制造的问题的胶囊粒子的制造方法。

[0015] 用于解决问题的手段

[0016] 本发明人等为了解决上述课题而反复进行了研究,结果发现,作为一个示例,通过使用泰勒反应装置能够制造胶囊粒子,从而完成了将该发现作为一个实施方式来包含的本发明。

[0017] 本公开包含以下的实施方式。

[0018] [1]一种胶囊粒子的制造方法,其中,使用泰勒反应装置。

[0019] [2]根据实施方式1中记载的制造方法,其中,

[0020] 泰勒反应装置具有外筒、内筒以及一个以上的流入口,

[0021] 内筒以能够旋转方式配置在外筒内,并在与外筒之间形成环状的反应室,

[0022] 流入口中的至少一个流入口被配置为能够使流体流入反应室内。

[0023] [3]根据实施方式2中记载的制造方法,其中,

[0024] 一个以上的流入口包括第一流入口和第二流入口,第一流入口与第二流入口相互独立,并分别与反应室连结,

[0025] 从第一流入口向反应室注入粒子形成成分,

[0026] 从第二流入口向反应室注入封入成分,

[0027] 使内筒旋转,将粒子形成成分和封入成分在反应室内混合。

[0028] [4]根据实施方式2中记载的制造方法,其中,

[0029] 一个以上的流入口包括第一管线和第二管线,第一管线与第二管线被配置为合流,合流的管线经由共同的流入口与反应室连结,

[0030] 从第一管线注入粒子形成成分,从第二管线注入封入成分,将粒子形成成分和封入成分在反应室跟前混合并生成粒子形成成分-封入成分混合溶液,接着经由共同的流入口向反应室注入粒子形成成分-封入成分混合溶液,使内筒旋转,将粒子形成成分-封入成分混合溶液在反应室内进一步混合。

[0031] [5]根据实施方式3或4中记载的制造方法,其中,

[0032] 粒子形成成分包含聚合物成分或脂质成分,

[0033] 封入成分包含核酸、蛋白质、多肽、肽或低分子化合物。

[0034] [6]根据实施方式5中记载的制造方法,其中,

[0035] 粒子形成成分包含脂质成分,

- [0036] 封入成分包含核酸。
- [0037] [7]根据实施方式3中记载的制造方法,其中,先注入粒子形成成分,然后注入封入成分。
- [0038] [8]根据实施方式3中记载的制造方法,其中,先注入封入成分,然后注入粒子形成成分。
- [0039] [9]根据实施方式3中记载的制造方法,其中,同时注入粒子形成成分和封入成分。
- [0040] [10]根据实施方式2~9中任一项所记载的制造方法,其中,内筒的圆周速度为0.5~47m/s。
- [0041] [11]根据实施方式2~10中任一项所记载的制造方法,其中,内筒与外筒之间的间隙宽度为0.01mm~5mm。
- [0042] [12]根据实施方式1~11中任一项所记载的制造方法,其中,进行泰勒反应的搅拌时间为1分钟以下的搅拌时间。
- [0043] [13]根据实施方式3、5~12中任一项所记载的制造方法,其中,粒子形成成分的注入速度与封入成分的注入速度之比为从1:1~1:9的范围中选择的比。
- [0044] [14]根据实施方式3~13中任一项所记载的制造方法,其中,第一流入口与第二流入口的内径相同或者大致相同。
- [0045] [15]根据实施方式3~13中任一项所记载的制造方法,其中,第一流入口与第二流入口的内径不同。
- [0046] [16]一种泰勒反应装置,在胶囊粒子的制造方法中使用,其中,具有外筒、内筒及一个以上的流入口,
- [0047] 内筒以能够旋转的方式配置在外筒内,并在与外筒之间形成环状的反应室,
- [0048] 流入口中的至少一个流入口被配置为能够使流体流入反应室内。
- [0049] [17]根据实施方式16中记载的装置,其中,
- [0050] 一个以上的流入口包括第一流入口和第二流入口,第一流入口与第二流入口相互独立,并分别与反应室连结,
- [0051] 第一流入口用于注入粒子形成成分,
- [0052] 第二流入口用于注入封入成分,
- [0053] 内筒用于通过旋转来将粒子形成成分和封入成分在反应室内混合。
- [0054] [18]根据实施方式16中记载的装置,其中,
- [0055] 一个以上的流入口具有第一管线和第二管线,
- [0056] 第一管线用于注入粒子形成成分,
- [0057] 第二管线用于注入封入成分,
- [0058] 第一管线与第二管线在反应室跟前合流,
- [0059] 在合流部分的下流侧形成粒子形成成分-封入成分混合溶液管线,接着经由共同的流入口与反应室连结,
- [0060] 内筒用于通过旋转来将粒子形成成分-封入成分混合溶液在反应室内进一步混合。
- [0061] [19]根据实施方式17或18中记载的装置,其中,
- [0062] 粒子形成成分包含聚合物成分或脂质成分,

- [0063] 封入成分包含核酸、蛋白质、多肽、肽或低分子化合物。
- [0064] [20]根据实施方式19中记载的装置,其中,
- [0065] 粒子形成成分包含脂质成分,
- [0066] 封入成分包含核酸。
- [0067] [21]根据实施方式17或从属于实施方式17的实施方式19中记载的装置,其中,若将向反应室供给液体的一侧设为上游侧,将从反应室排出液体的一侧设为下游侧,则第一流入口配置在上游侧,第二流入口配置在下游侧。
- [0068] [22]根据实施方式17或从属于实施方式17的实施方式19中记载的装置,其中,若将向反应室供给液体的一侧设为上游侧,将从反应室排出液体的一侧设为下游侧,则第二流入口配置在上游侧,第一流入口配置在下游侧。
- [0069] [23]根据实施方式17或从属于实施方式17的实施方式19中记载的装置,其中,第一流入口与第二流入口配置在与内筒的轴向垂直的同一剖面上。
- [0070] [24]根据实施方式16~23中任一项所记载的装置,其中,内筒与外筒之间的间隙宽度为0.01mm~5mm。
- [0071] [25]根据实施方式17及19~24中任一项所记载的装置,其中,粒子形成成分的注入速度与封入成分的注入速度之比为从1:1~1:9的范围中选择的比。
- [0072] [26]根据实施方式17~25中任一项所记载的装置,其中,第一流入口与第二流入口的内径相同或者大致相同。
- [0073] [27]根据实施方式17~25中任一项所记载的装置,其中,第一流入口与第二流入口的内径不同。
- [0074] 本说明书包含作为本申请的优先权基础的日本专利申请号2022-167048号的公开内容。
- [0075] 发明的效果
- [0076] 作为本公开的效果,能够制造胶囊粒子。

附图说明

- [0077] 图1是泰勒反应装置的示意图。
- [0078] 图2示出具有第一管线及第二管线的流入口的配置。
- [0079] 图3示出第一流入口和第二流入口的配置。
- [0080] 图4示出具有第一管线、第二管线及第三管线的流入口的配置。
- [0081] 图5示出具有第一管线、第二管线的第一流入口及第二流入口的配置。图5与图1中的A-A'剖面对应。
- [0082] 图6示出第一流入口、第二流入口及第三流入口的配置。
- [0083] 图7是示出封入TfR2 siRNA(Transferrin receptor 2small interfering RNA:转铁蛋白受体2小干扰核糖核酸)的核酸脂质粒子施用前的小鼠的血浆中铁浓度的图。
- [0084] 图8是示出封入TfR2 siRNA的核酸脂质粒子的施用1天后的小鼠的血浆中铁浓度的图。
- [0085] 图9是示出封入TfR2 siRNA的核酸脂质粒子的施用7天后的小鼠的血浆中铁浓度的图。

[0086] 图10是示出封入A_Sin_GP1908_2015_H1 mRNA的核酸脂质粒子(参考例2、检体9、检体10及检体11)施用后的小鼠的血清中HA(Heterophilic antibody:嗜异性抗体)特异性IgG(免疫球蛋白G)浓度的图。

[0087] 图11是示出封入A_Sin_GP1908_2015_H1 mRNA的核酸脂质粒子(参考例3、参考例4、检体12、检体13及检体14)施用后的小鼠的血清中HA特异性IgG浓度的图。

具体实施方式

[0088] 在一些实施方式中,本公开提供一种使用泰勒反应装置的胶囊粒子的制造方法。

[0089] 胶囊粒子是指内容物被胶囊化(encapsulated)的粒子。在本说明书中,有时将被封入胶囊粒子的内容物称为封入成分(被封入的成分)。另外,在本说明书中,有时将包围被封入的内容物的成分称为形成粒子的成分(粒子形成成分)或胶囊形成成分。另外,在胶囊粒子中,封入成分与粒子形成成分可以形成复合体。胶囊粒子包括但不限于脂质粒子及聚合物粒子。在一些实施方式中,胶囊粒子可以是具有10nm以上、20nm以上、30nm以上、40nm以上、50nm以上、60nm以上、70nm以上、80nm以上、90nm以上、100nm以上、1 μ m以上、10 μ m以上、100 μ m以上、例如1mm以上、2mm以下、1mm以下、100 μ m以下、10 μ m以下、1 μ m以下、例如100nm以下、90nm以下、80nm以下、70nm以下、60nm以下、50nm以下、40nm以下、30nm以下、20nm以下、例如10nm以下的平均粒径的粒子,但不限于此。此外,胶囊粒子可以包含任意的内容物(封入成分)。另外,胶囊粒子可以根据粒子形成成分或封入成分而适当调整尺寸或平均粒径。例如,粒径可以根据粒子形成成分或封入成分及它们的组合而变化。

[0090] 在一些实施方式中,粒子形成成分可以包含聚合物成分、脂质成分及辅助成分等。作为聚合物成分,例如可举出生物降解性聚合物。作为这种生物降解性聚合物,可举出聚乳酸、聚乙醇酸(Polyglycolic acid)、聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)及聚缩酚酸肽-乳酸共聚物(Polydepsipeptide-Lactic Acid Copolymer),但不限于此。作为脂质成分,例如可举出双离子性脂质、中性脂质、阳离子性脂质。具体地,可举出磷脂、鞘脂、糖脂、甘油酯、固醇酯、聚合物复合脂,但不限于此。在一些实施方式中,粒子形成成分能够进行溶解等使用。作为封入成分,可举出核酸、蛋白质、多肽、肽、低分子化合物、例如药剂化合物、化妆品或者化妆品成分、色素、护肤成分、营养品成分等,但不限于此。在一些实施方式中,封入成分能够进行溶解等使用。

[0091] 在本说明书中,只要没有特别说明,则平均粒径是指基于动态光散射法的原理通过测量、计算而求出的体积平均粒径。在此,按照粒径从小到大的顺序,具有d1、d2、 \dots di、 \dots dk的粒径的粒子分别有n1个、n2个、 \dots ni个、 \dots nk个。另外,将每个粒子的体积设为vi。此时,体积平均粒径(mean volume diameter)可通过下式求出。

[0092] [式1]

$$[0093] \quad MV = \Sigma (Vi \cdot di) / \Sigma (di)$$

[0094] 聚合物粒子是指包含聚合物材料的粒子。在一些实施方式中,聚合物粒子可以是具有10nm以上、20nm以上、30nm以上、40nm以上、50nm以上、60nm以上、70nm以上、80nm以上、90nm以上、100nm以上、1 μ m以上、10 μ m以上、100 μ m以上、例如1mm以上、2mm以下、1mm以下、500 μ m以下、400 μ m以下、300 μ m以下、200 μ m以下、例如100 μ m以下、10 μ m以下、1 μ m以下、例如100nm以下、90nm以下、80nm以下、70nm以下、60nm以下、50nm以下、40nm以下、30nm以下、20nm以下、

例如10nm以下的平均粒径的粒子,但不限于此。在一些实施方式中,聚合物粒子可以是具有10nm~500 μ m、例如20nm~400 μ m、30nm~300 μ m、20nm~200 μ m、例如10nm~100 μ m的平均粒径的粒子,但不限于此。作为聚合物粒子,例如可举出包含生物降解性聚合物作为粒子形成成分的粒子。作为生物降解性聚合物,例如可举出包含聚乳酸的聚合物。作为包含聚乳酸的聚合物,可举出聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)及聚缩酚酸肽-乳酸共聚物等,但不限于此。聚合物粒子可以包含任意的内容物(封入成分)。

[0095] 脂质粒子是指包含脂质成分的粒子。脂质粒子的结构没有特别限制,可以是脂质多层、脂质双层或脂质单层,也可以部分地具有脂质多层、脂质双层或脂质单层。作为脂质粒子,例如,可举出具有脂质双层的粒子、例如具有脂质双层的脂质体或者类脂质体、具有脂质单层的粒子、例如包含四醚型脂质的脂质单层粒子、部分地具有脂质单层及/或脂质双层的粒子、具有脂质多层的粒子、脂质纳米粒子(LNP)等,但不限于此。脂质粒子可以包含任意的内容物(封入成分),但作为封入成分,例如可举出核酸、蛋白质、肽、低分子化合物、药剂化合物,优选核酸,更优选可举出信使RNA(mRNA)、小干扰RNA(siRNA)、双链RNA(dsRNA)、双链DNA(dsDNA)、单链DNA(ssDNA),进一步优选可举出mRNA(将核酸作为封入成分的脂质粒子有时特别称为核酸脂质粒子)。此外,脂质体是指至少具有一个脂质双层的脂质粒子。作为脂质体,可举出小单层囊泡(SUV)、大单层囊泡(LUV)、多层囊泡(MLV)、寡层囊泡(OLV)、中型单层囊泡(MUV)、巨型单层囊泡(GUV)、巨型多层囊泡(GMV)等。LUV一般粒径可以为100nm以上,但也有50nm以上的分类。SUV一般粒径可以为20~100nm,但也有小于50nm的分类。虽然可以采用任意分类,但LUV和SUV都采用相同的分类。MLV中各个囊泡具有2个以上的双层。在MLV内可以形成单独的水性分区。脂质体可以具有由磷脂构成的双层膜。类脂质体可以具有由非离子型表面活性剂构成的双层膜。例如参照日本特表第2013-536803号。通过参照的形式将其与脂质体有关的记载并入本说明书中。

[0096] 脂质成分大致分为双离子性脂质、中性脂质、阴离子性脂质、阳离子性脂质。作为脂质成分,没有特别限制,可举出磷脂、鞘脂、糖脂、甘油酯、固醇酯、聚合物复合脂,但不限于此。

[0097] 作为阳离子性脂质,可举出不受pH影响的脂质分子具有净正电荷的脂质、以及在生理学上的pH等所选择的pH下,与该脂质所具有的pKa(酸度系数)相对应地一部分的脂质分子具有净正电荷的脂质(有时称为pH响应性阳离子性脂质)。作为不受pH影响的脂质分子具有净正电荷的脂质,例如可举出N,N-二油烯基-N,N-二甲基氯化铵(DODAC)、N,N-二硬脂基-N,N-二甲基溴化铵(DDAB)、N-[1-(2,3-二油酰基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTAP)、N,N-双十八烷基酰胺甘氨酸羧基精胺(DOGS)、N-[1-(2,3-二油烯氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTMA)、2,3-二油烯氧基-N-[2(精胺甲酰胺)乙基]-N,N-二甲基-1-丙基三氟乙酸铵(DOSPA)、N-[1-(2,3-二肉豆蔻酰氧基)丙基]-N,N-二甲基-N-(2-羟乙基)溴化铵(DMRIE)、 3β -N-(N',N',-二甲基氨基乙烷)-氨甲酰基胆固醇(DC-Chol),但不限于此。作为pH响应性阳离子性脂质,例如可举出1,2-二油酰基-3-二甲基铵丙烷(DODAP)、N,N-二甲基-(2,3-二油烯氧基)丙胺(DODMA)、1,2-二亚油基氧基-3-二甲基铵丙烷(DLinDMA)、2,2-二亚油基-4-(2-二甲基氨基乙基)-[1,3]-二氧戊烷(DLin-KC2-DMA)、三十七烷-6,9,28,31-四烯-19-基-4-(二甲基氨基)丁酸酯(DLin-MC3-DMA)等,但不限于此。例如参照国际公开第2015/005253号、国际公开第2021/060440号刊物。通过参照的形式将其与阳离子性脂质有关的记

载并入本说明书中。

[0098] 两亲性脂质是指具有亲水性基团及疏水性基团双方的脂质。作为两亲性脂质,可举出离子性脂质、磷脂、鞘脂、糖脂、甘油酯等,但不限于此。作为磷脂,例如可举出甘油磷脂、鞘氨醇磷脂(sphingophospholipid)。作为甘油磷脂,可举出磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、磷脂酰胆碱等。作为鞘氨醇磷脂,例如可举出鞘磷脂(Sphingomyelin)、鞘胆胺等。作为糖脂,可举出甘油糖脂和鞘糖脂。作为甘油糖脂,例如可举出单半乳糖甘油二酯、双半乳糖甘油二酯、硫代异鼠李糖甘油二酯(Sulfoquinovosyldiacylglycerol)等。作为鞘糖脂,例如可举出神经酰胺、神经节苷脂等。

[0099] 作为具体的磷脂,例如可举出1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DOPC)、1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DMPC)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DSPC)、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)、1,2-二酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(PC)、1,2-二酰基-sn-甘油-3-磷脂酰乙醇胺(PE)、1,2-二酰基-sn-甘油-3-磷脂酰丝氨酸(PS)、1,2-二酰基-sn-甘油-3-磷脂酰甘油(PG)、1,2-二酰基-sn-甘油-3-磷脂酸(PA)、1,2-二癸酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DDPC)、1,2-二月桂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DLPC)、1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DPPC)、1,2-二亚油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DLoPC)、1,2-二芥酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DEPC)、1-肉豆蔻酰基-2-棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(MPPC)、1-肉豆蔻酰基-2-硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(MSPC)、1-棕榈酰基-2-肉豆蔻酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(PMPC)、1-棕榈酰基-2-硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(PSPC)、1-棕榈酰基-2-油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(POPC)、1-硬脂酰基-2-油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(SOPC)等,但不限于此。例如参照国际公开第2021/060440号刊物。通过参照的形式将其与磷脂有关的记载并入本说明书中。

[0100] 作为固醇脂,例如可举出来自动物的固醇、来自植物的固醇、来自微生物的固醇等。作为来自动物的固醇,例如可举出胆固醇、胆固醇琥珀酸酯、二氢胆固醇、7-脱氢胆固醇、羊毛固醇、二氢羊毛固醇、链甾醇等。作为来自植物的固醇,例如可举出菜籽固醇、菜油甾醇、豆甾醇、谷甾醇。作为来自微生物的固醇,例如可举出酵母甾醇、麦角固醇。

[0101] 聚合物复合脂是指加成有非离子性聚醚、非离子性聚酯、非离子性聚氨基酸或者非离子性多肽、或它们的末端被烷氧化的聚合物等的脂质。作为加成到聚合物复合脂的聚合物没有特别限制,但优选非离子性聚醚或者非离子性聚酯或它们的末端被烷氧化的聚合物,更优选非离子性聚醚或非离子性单烷氧基聚醚,进一步优选聚烷撑二醇或单甲氧基聚烷撑二醇,进一步更优选聚乙二醇或单甲氧基聚乙二醇。聚氧化烯化脂质是被聚烷撑二醇或其衍生物修饰的脂质,例如可举出聚亚甲基二醇化脂质、聚乙二醇化脂质(PEG脂质)、聚丙二醇化脂质、聚四亚甲基二醇化脂质、聚六亚甲基二醇化脂质(Polyhexamethylene glycol lipid)等,但不限于此。聚烷撑二醇的重均分子量可以是例如200~10,000Da。作为PEG脂质,可举出PEG-胆固醇、PEG-磷脂、PEG-神经酰胺、PEG-甘油二酯,但不限于此。PEG脂质的PEG部分例如可以具有200~10,000Da的分子量。PEG部分可以是直链状,也可以是分支状。通过PEG进行修饰时,可以使用硬脂酰化聚乙二醇、N-[羰基-甲氧基聚乙二醇-1000]-1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、N-[羰基-甲氧基聚乙二醇-2000]-1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、n-[羰基-甲氧基聚乙二醇-5000]-1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、N-[羰基-甲氧基聚乙二醇-750]-1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、N-

[羰基-甲氧基聚乙二醇-1000]-1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、N-[羰基-甲氧基聚乙二醇-2000]-1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、N-[羰基-甲氧基聚乙二醇-5000]-1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二肉豆蔻酰-rac-甘油-3-甲氧基聚乙二醇-2000 (PEG-DMG) 等聚乙二醇衍生物等,但不限于此。例如参照国际公开第2020/262150号刊物。通过参照的形式将其与聚氧化烯化脂质有关的记载并入本说明书中。

[0102] 脂质成分可以是单一的,也可以是多个。在一些实施方式中,脂质成分可以是包含阳离子性脂质的脂质。在其他实施方式中,脂质成分可以包含两亲性脂质、阳离子性脂质、固醇脂及聚合物复合脂。在其他特定的实施方式中,所使用的脂质成分整体中的各脂质的含量可以是包含5~30mol%磷脂作为两亲性脂质,例如12.5mol%、例如17.5mol%,包含10~75mol%阳离子性脂质,例如30~70mol%、例如40~65mol%、例如45mol%、例如60mol%,包含15~50mol%胆固醇,例如21mol%、例如41mol%及包含1~10mol%聚氧化烯化脂质,例如1~5mol%、例如1.5mol%的脂质。例如参照国际公开2009/127060号、国际公开第2015/005253号。将其与脂质成分的组分量有关的记载并入本说明书中。

[0103] 作为胶囊粒子中包含的封入成分(内容物),可举出核酸、蛋白质、多肽、肽、低分子化合物及药剂化合物,但不限于此。作为核酸,可举出DNA及RNA。作为RNA,可举出信使RNA(mRNA)、小干扰RNA(siRNA)、单链RNA(antisense oligo)、核小RNA(snRNA)、非编码RNA(ncRNA)、长链非编码RNA(lncRNA)、微小RNA(miRNA)、双链RNA(dsRNA)及环状RNA,但不限于此。作为DNA,可举出质粒、单链DNA及双链DNA,但不限于此。作为低分子化合物,可举出药剂化合物、抗癌剂、作用于生物体的化合物、具有生理活性的物质、代谢物质等,但不限于此。作为蛋白质、多肽或肽,可举出抗原蛋白质、治疗用蛋白质、具有生理活性的蛋白质、抗体等,但不限于此。

[0104] 粒子形成成分和封入成分的组合没有特别限制。在特定的实施方式中,粒子形成成分和封入成分的组合可以考虑电荷、极性等来选定。在一些实施方式中,在封入成分带负电荷的情况下,例如能够选择带正电荷的成分作为粒子形成成分(例如脂质成分)。在一些实施方式中,在封入成分带正电荷的情况下,例如能够选择带负电荷的成分作为粒子形成成分(例如脂质成分)。在一些实施方式中,在封入成分不带电荷或几乎不带电荷的情况下,例如能够选择不带电荷或几乎不带电荷的成分作为粒子形成成分(例如脂质成分)。在一些实施方式中,在封入成分为疏水性高的成分的情况下,可以使溶解封入成分的介质与溶解粒子形成成分的介质为同一介质。在另一实施方式中,在封入成分为疏水性高的成分的情况下,可以使溶解封入成分的介质与溶解粒子形成成分的介质为不同介质。

[0105] 在本发明的一些实施方式中,胶囊粒子是使用核酸作为封入成分的脂质粒子(有时称为核酸脂质粒子)。作为核酸脂质粒子,例如可举出封入核酸的脂质纳米粒子(LNP)及封入核酸的脂质体等。作为用于粒子形成成分的脂质成分,例如可举出双离子性脂质、中性脂质、阳离子性脂质、阴离子性脂质、两亲性脂质、固醇脂、聚合物复合脂等,能够将它们单独使用或使用两种以上。在使用多个脂质作为核酸脂质粒子中的脂质成分的情况下,从生物体内的药物传递的观点出发,优选使用阳离子性脂质、两亲性脂质、固醇脂及聚合物复合脂,更优选使用pH响应性阳离子性脂质、磷脂、胆固醇及PEG脂质。所使用的脂质成分整体中的各脂质的含量能够根据所使用的脂质的种类及封入的核酸等而适当调整,例如能够将磷脂设为5~30mol%,例如12.5mol%、例如17.5mol%,将阳离子性脂质设为10~75mol%,例

如30~70mol%、例如40~65mol%、例如45mol%、例如60mol%、将胆固醇设为15~50mol%、例如21mol%、例如41mol%以及将PEG化脂质设为1~10mol%、例如1~5mol%、例如1.5mol%。作为封入成分使用的核酸没有特别限制,但优选可举出信使RNA(mRNA)、小干扰RNA(siRNA)、双链RNA(dsRNA)、双链DNA(dsDNA)、单链DNA(ssDNA),更优选可举出mRNA。另外,在使用阳离子性脂质作为脂质成分的情况下,核酸脂质粒子内的阳离子性脂质的分子数(N)与来自核酸的磷原子数(P)的比率(N/P比率)例如能够为约2.0~15.0,优选为约2.0~12.0,更优选为约2.0~9.0,进一步优选为约3.0~9.0。N/P比率的下限例如能够为2.0,优选为2.5,更优选为3.0,上限例如能够为15.0,优选为12.0,更优选为9.0。作为核酸脂质粒子的平均粒径没有特别限制,但例如能够为1nm~1 μ m,优选为10nm~500nm,更优选为30nm~300nm,进一步优选为50nm~200nm,最优选为75nm~150nm。

[0106] 如图1所示,泰勒反应装置1是指进行泰勒反应(也称为泰勒涡流反应)的装置。在一些实施方式中,泰勒反应装置1具有内筒3及外筒2。在内筒3的外径(innerradius,IR)与外筒2的内径(outerradius,OR)之间形成有间隙部分(d),将其用作反应室5(也称为反应槽)(OR=IR+d)。因此,泰勒反应装置1具有外筒2及内筒3,内筒3可旋转地配置在外筒2内,在与外筒2之间形成有环状的反应室5。泰勒反应装置1可以具有用于使液体流入反应室5内的一个以上的流入口4(包括第一流入口41、第二流入口42)。在本说明书中,有时将流入口4、第一流入口41、第二流入口42称为注入口或者注入口。另外,泰勒反应装置1可以具有至少一个用于使反应室5内的液体向外部流出的流出口6。在本说明书中,有时将流出口6称为排出口或者流出口。此外,附图标记7是控制装置,进行使内筒3旋转的马达8的转速控制和第一泵12、第二泵14及第三泵16的供给量控制。附图标记20是冷却反应室5的外罩(jacket),附图标记21是使外罩20内的冷却介质循环来进行温度调节的外罩温度调节用冷却器。

[0107] 封入成分及粒子形成成分可以在溶液状态下反应并形成粒子。因此,可以根据封入成分及粒子形成成分的性质适当选定各自的溶媒。在核酸脂质粒子的制造中,例如,核酸可以以溶解于柠檬酸缓冲液的状态,脂质可以以溶解于乙醇的状态供给到装置。因此,封入成分及粒子形成成分能够分别通过溶媒以溶液的状态来准备,并能够分别供给到装置。

[0108] 在一些实施方式中,本公开的粒子的制造方法可以具有将粒子形成成分和封入成分混合的工序。在反应室5内,在相对于内筒3的旋转轴垂直的方向的剖面观察下,一组涡列5V相互反向地沿轴向形成多个,在该多个涡列5V在轴向上移动的过程中,进行各种溶液的混合(泰勒涡流反应)。在特定的实施方式中,首先从装有粒子形成成分的溶液的第一罐11经由第一泵12从第一管线4A供给,从装有封入成分的溶液的第二罐13经由第二泵14从第二管线4B供给并在混合溶液管线4D中混合,接着将其经由流入口4(也是权利要求中记载的共同的流入口)供给到泰勒反应装置1的反应室5(参照图1、2)。由于两种液体的混合是在向反应室5的注入的跟前进行的,所以为了方便,在本说明书中有时将其称为在“反应室跟前(反应槽跟前)”的混合。在另一实施方式中,粒子形成成分和封入成分不相互接触,分别经由独立的注入口(第一流入口41、第二流入口42)供给到泰勒反应装置1的反应室5中,接着在反应室5内首次混合两种液体(参照图3)。由于两种液体的混合是在反应室5内进行的,所以为了方便,在本说明书中有时将其称为在“反应室内(反应槽内)”的混合。注入溶液的顺序没有特别限制,粒子形成成分和封入成分可以同时注入,也可以先注入粒子形成成分,也可

以先注入封入成分。

[0109] 在另一实施方式中,本公开的粒子的制造方法可以将预先混合的包含粒子形成成分和封入成分的混合用液体从第一流入口41供给到反应室5。在该情况下,粒子形成成分和封入成分的混合可以在泰勒反应装置1之外进行。另外,可以从与注入混合用液体的第一流入口41不同的第二流入口42注入稀释溶液(参照图3)。例如,在粒子形成成分和封入成分均为脂溶性或疏水性的情况下,可以将粒子形成成分及封入成分溶解于同一或不同的溶媒中并混合。并且可以将这种预先混合的溶液用于本公开的粒子的制造方法中。

[0110] 在一些实施方式中,本公开的粒子的制造方法可以具有进一步注入稀释溶液的工序。稀释溶液可以在任何阶段注入。在一些实施方式中,首先从第一管线4A供给粒子形成成分,接着从第三管线4C供给稀释溶液并混合,生成粒子形成成分-稀释溶液混合溶液,接着从第二管线4B将封入成分供给到粒子形成成分-稀释溶液混合溶液中并在混合溶液管线4D生成粒子形成成分-封入成分-稀释溶液混合溶液,并可将其经由流入口4(也是权利要求中记载的共同的流入口)供给到反应室5中(参照图4)。在另一实施方式中,首先混合封入成分和稀释溶液,生成封入成分-稀释溶液混合溶液,接着将封入成分-稀释溶液混合溶液和粒子形成成分混合并生成粒子形成成分-封入成分-稀释溶液混合溶液,并可将其供给到反应室中。在另一实施方式中,首先混合粒子形成成分和封入成分,生成粒子形成成分-封入成分混合溶液,接着将粒子形成成分-封入成分混合溶液和稀释溶液混合并生成第一-二-三混合溶液,并可将其供给到反应室中。在另一实施方式中,首先从装有粒子形成成分的溶液的第一罐11经由第一泵12从第一管线41A供给,并从装有封入成分的溶液的第二罐13经由第二泵14从第二管线41B供给并进行混合,并在混合溶液管线41D中生成粒子形成成分-封入成分混合溶液,将其经由第一流入口41供给到反应室5,接着,从装有稀释溶液的第三罐15经由第三泵16从第二流入口42供给到反应室5中,从而可生成粒子形成成分-封入成分-稀释溶液混合溶液(参照图1、5)。将溶液注入反应室的顺序没有特别限制。可以先将稀释溶液供给到反应室,接着将粒子形成成分-封入成分混合溶液供给到反应室。另外,也可以将稀释溶液和粒子形成成分-封入成分混合溶液同时供给到反应室。

[0111] 在一些实施方式中,稀释溶液可以使封入成分稳定化。在另一实施方式中,稀释溶液可以通过稀释所形成的胶囊粒子来减少粒子彼此的缔合。稀释溶液的种类能够使用中性缓冲液、酸性缓冲液或碱性缓冲液中的任一种,可根据粒子形成成分或封入成分适当选择。作为稀释溶液,例如可举出柠檬酸缓冲液、乙酸缓冲液、磷酸缓冲液、包含Good's缓冲剂(两性离子缓冲剂)的缓冲液等,但不限于此。在粒子形成成分包含pH响应性阳离子性脂质且封入成分为核酸的情况下,稀释溶液能够优选为中性或弱酸性的缓冲液,例如能够使用磷酸缓冲液作为中性的缓冲液,或使用柠檬酸缓冲液作为弱酸性的缓冲液等。在粒子形成成分包含中性的两亲性脂质的情况下,稀释液可以包含中性附近的缓冲液,例如磷酸缓冲液等。在粒子形成成分包含阴离子性脂质的情况下,稀释液可以包含例如碱性或者弱碱性缓冲液。在一些实施方式中,在核酸脂质粒子的制造中,为了降低溶解有脂质的溶媒(例如乙醇)的含量而使粒子稳定化,可以使用与封入成分的溶媒相同的溶媒(例如如果封入成分的溶媒使用了柠檬酸缓冲液,则使用柠檬酸缓冲液)作为稀释溶液。

[0112] 在另一实施方式中,首先混合粒子形成成分和稀释溶液并生成粒子形成成分-稀释溶液混合溶液,接着将粒子形成成分-稀释溶液混合溶液供给到反应室,接着,将封入成

分供给到反应室,从而可生成粒子形成成分-封入成分-稀释溶液混合溶液。将溶液注入反应室的顺序没有特别限制。也可以将封入成分供给到反应室,同时或者接着将粒子形成成分-稀释溶液混合溶液供给到反应室。在另一实施方式中,首先混合封入成分和稀释溶液,生成封入成分-稀释溶液混合溶液,接着将封入成分-稀释溶液混合溶液供给到反应室,接着,将粒子形成成分供给到反应室,从而可生成粒子形成成分-封入成分-稀释溶液混合溶液。将溶液注入反应室的顺序没有特别限制。也可以将粒子形成成分供给到反应室,同时或者接着将封入成分-稀释溶液混合溶液供给到反应室。在另一实施方式中,将粒子形成成分经由第一流入口41供给到反应室5,将封入成分经由第二流入口42供给到反应室5,将稀释溶液经由第三流入口43供给到反应室5,从而可在反应室5生成粒子形成成分-封入成分-稀释溶液混合溶液(参照图6)。将溶液注入反应室的顺序没有特别限制。也可以将粒子形成成分供给到反应室,同时或者接着将稀释溶液供给到反应室,同时或者接着将封入成分供给到反应室。也可以将封入成分供给到反应室,同时或者接着将粒子形成成分供给到反应室,同时或者接着将稀释溶液供给到反应室。也可以将封入成分供给到反应室,同时或者接着将稀释溶液供给到反应室,同时或者接着将粒子形成成分供给到反应室。也可以将稀释溶液供给到反应室,同时或者接着将粒子形成成分供给到反应室,同时或者接着将封入成分供给到反应室。也可以将稀释溶液供给到反应室,同时或者接着将封入成分供给到反应室,同时或者接着将粒子形成成分供给到反应室。也可以将粒子形成成分、封入成分及稀释溶液这三种液体同时供给到反应室。

[0113] 对于粒子形成成分、封入成分及/或稀释溶液以外的溶液也同样。即,在一些实施方式中,本公开的粒子的制造方法可以进一步具有除了粒子形成成分、封入成分及/或稀释溶液以外将一种以上的其他溶液注入的工序。其他溶液可以分别独立地为溶解了粒子形成成分的溶液、溶解了封入成分的溶液、或者稀释溶液、或它们的混合用液体。

[0114] 此外,关于本公开的使用泰勒反应装置1的粒子的制造方法,粒子不一定必须仅在反应室5内被制造。例如,在混合粒子形成成分和封入成分,接着将其供给到泰勒反应装置1的反应室5的方式中,从混合了粒子形成成分和封入成分的阶段开始,可以形成一部分目标粒子。通过这样的过程所形成的目标粒子也相当于通过本公开的制造方法制造的目标粒子或通过本公开的装置制造的目标粒子。此外,在混合步骤在反应槽跟前进行的情况下,在反应室5内不仅形成目标粒子,还能实现粒子的均质化。

[0115] 在一些实施方式中,泰勒反应装置1具有用于将混合了粒子形成成分和封入成分的粒子形成成分-封入成分混合溶液注入反应室5的流入口4(也是权利要求中记载的共同的流入口)(参照图2)。在一些实施方式中,粒子制造方法包括从流入口4注入粒子形成成分-封入成分混合溶液,使内筒3旋转并进一步混合粒子形成成分-封入成分混合溶液的工序。在反应室5中,粒子形成成分-封入成分混合溶液被供于泰勒涡流反应,可以被进一步混合。

[0116] 在一些实施方式中,泰勒反应装置1具有用于将粒子形成成分注入反应室5的第一流入口41及用于将封入成分注入反应室5的第二流入口42(参照图3)。在一些实施方式中,粒子制造方法包括从第一流入口41注入粒子形成成分,从第二流入口42注入封入成分,使内筒3旋转并混合粒子形成成分和封入成分的工序。在反应室5中,粒子形成成分和封入成分可被供于泰勒涡流反应。

[0117] 在一些实施方式中,泰勒反应装置1可以进一步具有用于将稀释溶液注入反应室5的第三流入口43(参照图6)。在一些实施方式中,粒子制造方法包括从第三流入口43注入稀释溶液,并使内筒3旋转的工序。在反应室5中,稀释溶液和反应室5内的溶液可被供于泰勒涡流反应。对于用于注入第四溶液的第四流入口、用于注入第五溶液的第五流入口、用于注入第n溶液的第n流入口也同样($n=6$ 以上的自然数)。即,在一些实施方式中,本公开的泰勒反应装置1可以进一步具有第四流入口、第五流入口……第n流入口。

[0118] 在一些实施方式中,所制造的粒子可以是脂质粒子。在一些实施方式中,脂质粒子可以包含脂质成分及核酸等被封入的成分。在一些实施方式中,粒子形成成分可以包含脂质成分,封入成分可以包含核酸等被封入的成分。在另一实施方式中,粒子形成成分可以包含核酸等被封入的成分,封入成分可以包含脂质成分。

[0119] 在特定的实施方式中,稀释溶液可以降低溶解有脂质的有机溶媒(乙醇等)的含量,使粒子稳定化。稀释溶液可以在任意的时机与包含脂质成分的溶液接触。

[0120] 在一些实施方式中,本公开提供一种用于制造粒子的泰勒反应装置1。作为所制造的粒子,可举出胶囊粒子,但不限于此。在一些实施方式中,泰勒反应装置1具有内筒3及外筒2。在内筒3的外径与外筒2的内径之间形成有间隙部分,将其用作反应室5。因此,泰勒反应装置1具有外筒2及内筒3,内筒3以能够旋转的方式配置在外筒2内,并在与外筒2之间形成有环状的反应室5。泰勒反应装置1可以具有一个以上用于使液体流入反应室5内的流入口4。泰勒反应装置1可以具有至少一个用于使反应室5内的液体流出到外部的流出口6。

[0121] 在一些实施方式中,泰勒反应装置1可以构成为在“反应室跟前”混合粒子形成成分和封入成分。在该情况下,注入粒子形成成分的第一管线4A与注入封入成分的第二管线4B合流(图2)。为了方便,在本申请说明书中,有时将合流部分之后(即下游侧)的部分称为粒子形成成分-封入成分混合溶液管线4D或共同管线。在粒子形成成分-封入成分混合溶液管线4D中,粒子形成成分和封入成分被混合。接着,粒子形成成分-封入成分混合溶液管线4D将粒子形成成分-封入成分混合溶液经由流入口4(也是权利要求中记载的共同的流入口)供给到反应室5内。在另一实施方式中,泰勒反应装置1可以构成为在“反应室内”混合粒子形成成分和封入成分。在该情况下,在反应室5中设置有用于注入粒子形成成分的第一流入口41(也称为第一注入端口)及用于注入封入成分的第二流入口42(也称为第二注入端口)(图3)。无论是在“反应室跟前”混合粒子形成成分和封入成分的情况,还是在“反应室内”混合粒子形成成分和封入成分的情况下,注入溶液的顺序没有特别限制,粒子形成成分和封入成分可以同时注入,也可以先注入粒子形成成分,也可以先注入封入成分。

[0122] 在反应室5中设置用于注入粒子形成成分的第一流入口41及用于注入封入成分的第二流入口42的情况下,第一流入口41及第二流入口42可以为任意的相对配置。在一些实施方式中,第一流入口41与第二流入口42可以配置为从用于使内筒3旋转的旋转轴方向观察(从与内筒3的圆形剖面垂直的方向观察),相互形成约15度、约30度、约45度、约60度、约75度、约90度、约105度、约120度、约135度、约150度、约165度、约180度、约195度、约210度、约225度、约240度、约255度、约270度、约285度、约300度、约315度、约330度、约345度或约360度的角度,但不限于此。在此,针对角度,“约”是指所示出的角度的 ± 7.5 度的范围。在一些实施方式中,第一流入口41与第二流入口42从相对于用于使内筒3旋转的旋转轴垂直的方向观察(从相对于内筒的长方形剖面垂直的方向观察),可以相邻,也可以隔开规定的间

隔而分离。

[0123] 若将向反应室5供给液体的一侧设为上游侧,将从反应室5排出液体的一侧设为下游侧,则在一些实施方式中,可以将第一流入口41配置在上游侧,将第二流入口42配置在下游侧。在另一实施方式中,可以将第二流入口42配置在上游侧,将第一流入口41配置在下游侧。在另一实施方式中,可以将第一流入口41和第二流入口42配置在与内筒3的轴向垂直的同一剖面上(图3)。在该情况下,第一流入口41和第二流入口42不是其中一个在上游其中一个在下游,而是两个都在相同的旋转剖面上。第三流入口43也可以任意配置。即,可以将第三流入口43配置在第一流入口41的上游侧、与第一流入口41相同的旋转剖面上、第一流入口41的下游侧且第二流入口42的上游侧、与第二流入口42相同的旋转剖面上或第二流入口42的下游侧。或者,可以将第一流入口、第二流入口及第三流入口43配置在相同的旋转剖面上(图6)。针对第四流入口、第五流入口、……、第n流入口也同样($n=6$ 以上的自然数)。

[0124] 在特定的实施方式中,关于粒子的制造方法,及/或关于泰勒反应装置1,内筒3的圆周速度例如能够为 $0.5 \sim 47\text{m/s}$ 、例如为 0.4m/s 以上、 0.41m/s 以上、 0.42m/s 以上、 0.43m/s 以上、 0.44m/s 以上、 0.45m/s 以上、 0.46m/s 以上、 0.47m/s 以上、 0.48m/s 以上、 0.49m/s 以上、 0.5m/s 以上、 0.51m/s 以上、 0.52m/s 以上、 0.53m/s 以上、 0.54m/s 以上、 0.55m/s 以上、 0.6m/s 以上、 0.65m/s 以上、 0.7m/s 以上、 0.75m/s 以上、 0.8m/s 以上、 0.85m/s 以上、 0.9m/s 以上、 0.95m/s 以上、 1m/s 以上、 1.5m/s 以上、 2m/s 以上、 2.5m/s 以上、 3m/s 以上、 4m/s 以上、 5m/s 以上、 6m/s 以上、 7m/s 以上、 8m/s 以上、 9m/s 以上、 10m/s 以上、 11m/s 以上、 12m/s 以上、 13m/s 以上、 14m/s 以上、 15m/s 以上、 20m/s 以上、 25m/s 以上、 30m/s 以上、 35m/s 以上、 40m/s 以上、 41m/s 以上、 42m/s 以上、 43m/s 以上、 44m/s 以上、 45m/s 以上、 46m/s 以上、例如为 47m/s 以上,例如为 55m/s 以下、 54m/s 以下、 53m/s 以下、 52m/s 以下、 51m/s 以下、 50m/s 以下、 49m/s 以下、 48m/s 以下、 47m/s 以下、 46m/s 以下、 45m/s 以下、 44m/s 以下、 43m/s 以下、 42m/s 以下、 41m/s 以下、 40m/s 以下、 35m/s 以下、 30m/s 以下、 25m/s 以下、 20m/s 以下、 15m/s 以下、 14m/s 以下、 13m/s 以下、 12m/s 以下、 11m/s 以下、 10m/s 以下、 9m/s 以下、 8m/s 以下、 7m/s 以下、 6m/s 以下、 5m/s 以下、 4m/s 以下、 3m/s 以下、 2m/s 以下、 1m/s 以下、 0.95m/s 以下、 0.9m/s 以下、 0.85m/s 以下、 0.8m/s 以下、 0.75m/s 以下、 0.7m/s 以下、 0.65m/s 以下、 0.6m/s 以下、 0.55m/s 以下、 0.54m/s 以下、 0.53m/s 以下、 0.52m/s 以下、 0.51m/s 以下、 0.5m/s 以下、 0.49m/s 以下、 0.48m/s 以下、 0.47m/s 以下、 0.46m/s 以下、 0.45m/s 以下、 0.44m/s 以下、 0.43m/s 以下、 0.42m/s 以下、例如为 0.41m/s 以下,例如能够为它们的任意的上限及下限的组合,例如为 $0.4 \sim 55\text{m/s}$ 、 $0.45 \sim 54\text{m/s}$ 、 $0.5 \sim 53\text{m/s}$ 、 $0.5 \sim 52\text{m/s}$ 、 $0.5 \sim 51\text{m/s}$ 、 $0.5 \sim 50\text{m/s}$ 、 $0.5 \sim 49\text{m/s}$ 、 $0.5 \sim 48\text{m/s}$ 、 $0.5 \sim 47\text{m/s}$ 、 $0.51 \sim 46\text{m/s}$ 、 $0.52 \sim 45\text{m/s}$ 、 $0.53 \sim 44\text{m/s}$ 、 $0.54 \sim 43\text{m/s}$ 、 $0.55 \sim 42\text{m/s}$ 、 $0.6 \sim 41\text{m/s}$ 、 $0.7 \sim 40\text{m/s}$ 、 $0.8 \sim 35\text{m/s}$ 、 $0.9 \sim 30\text{m/s}$ 、 $1 \sim 25\text{m/s}$ 、 $1.5 \sim 20\text{m/s}$ 、 $2 \sim 15\text{m/s}$ 、 $3 \sim 14\text{m/s}$ 、 $4 \sim 13\text{m/s}$ 、 $5 \sim 12\text{m/s}$ 、 $6 \sim 11\text{m/s}$ 、 $7 \sim 10\text{m/s}$,例如为 $8 \sim 9\text{m/s}$,但不限于此。此外,在本说明书中,只要没有特别说明,圆周速度定义为下式。

[0125] [式2]

[0126] 圆周速度 = 内筒外径 $\times \pi \times$ 转速

[0127] (式中, π 表示圆周率)

[0128] 在特定的实施方式中,在外筒内径为 $\phi 30\text{mm}$ 的情况下,能够将内筒3的转速设为例如 $500 \sim 30000\text{rpm}$ 、 $550 \sim 25000\text{rpm}$ 、 $600 \sim 20000\text{rpm}$ 、 $650 \sim 15000\text{rpm}$ 、 $700 \sim 10000\text{rpm}$ 、 750

~9000rpm、800~8000rpm、850~7000rpm、900~6000rpm、例如1000~6000rpm,但不限于此。在特定的实施方式中,在外筒内径为 $\phi 30\text{mm}$ 的情况下,能够将内筒外径设为 $\phi 20\text{mm}$ 以上、 $\phi 21\text{mm}$ 以上、 $\phi 22\text{mm}$ 以上、 $\phi 23\text{mm}$ 以上、 $\phi 24\text{mm}$ 以上、 $\phi 25\text{mm}$ 以上、 $\phi 26\text{mm}$ 以上、 $\phi 27\text{mm}$ 以上、 $\phi 28\text{mm}$ 以上、 $\phi 29\text{mm}$ 以上、 $\phi 29.1\text{mm}$ 以上、 $\phi 29.2\text{mm}$ 以上、 $\phi 29.3\text{mm}$ 以上、 $\phi 29.4\text{mm}$ 以上、 $\phi 29.5\text{mm}$ 以上、 $\phi 29.6\text{mm}$ 以上、 $\phi 29.7\text{mm}$ 以上、 $\phi 29.8\text{mm}$ 以上、 $\phi 29.9\text{mm}$ 以上、 $\phi 29.91\text{mm}$ 以上、 $\phi 29.92\text{mm}$ 以上、 $\phi 29.93\text{mm}$ 以上、 $\phi 29.94\text{mm}$ 以上、 $\phi 29.95\text{mm}$ 以上、 $\phi 29.96\text{mm}$ 以上、 $\phi 29.97\text{mm}$ 以上、 $\phi 29.98\text{mm}$ 以上、 $\phi 29.99\text{mm}$ 以上,但不限于此。

[0129] 在特定的实施方式中,关于粒子的制造方法,及/或关于泰勒反应装置1,能够将内筒3与外筒2之间的间隙宽度d设为0.01mm以上、0.02mm以上、0.03mm以上、0.04mm以上、0.05mm以上、0.06mm以上、0.07mm以上、0.08mm以上、0.09mm以上、0.1mm以上、0.11mm以上、0.12mm以上、0.13mm以上、0.14mm以上、0.15mm以上、例如0.21mm以上、0.75mm以上、1.5mm以上、例如5mm以下、4.9mm以下、4.8mm以下、4.7mm以下、4.6mm以下、4.5mm以下、4.4mm以下、4.3mm以下、4.2mm以下、4.1mm以下、4mm以下、3.5mm以下、3mm以下、2.5mm以下、2mm、1.5mm以下、1.0mm以下、例如0.01mm~5mm、0.02mm~4.9mm、0.03mm~4.8mm、0.04mm~4.7mm、0.05mm~4.6mm、0.06mm~4.5mm、0.07mm~4.4mm、0.08mm~4.3mm、0.09mm~4.2mm、0.1mm~4.1mm、0.11mm~4mm、0.12mm~3.5mm、0.13mm~3mm、0.14mm~2mm、例如0.15mm~1.5mm,但不限于此。

[0130] 关于粒子的制造方法,及/或关于泰勒反应装置1,圆周速度和间隙宽度d能够设定为作为将剪切力简化的计算式的搅拌力R。搅拌力R通过下式计算。

[0131] [式3]

[0132] 搅拌力R=圆周速度 \div 间隙宽度d

[0133] 在一些实施方式中,可以设定内筒3的转速及内筒3与外筒2之间的间隙宽度d,以使搅拌力R为 $0.5/5 < R < 47/0.01$ 、 $100 \sim 5,000,000\text{s}^{-1}$ 、 $104 \sim 4,900,000\text{s}^{-1}$ 、 $105 \sim 4,900,000\text{s}^{-1}$ 、 $110 \sim 4,800,000\text{s}^{-1}$ 、 $120 \sim 4,710,000\text{s}^{-1}$ 、 $130 \sim 4,700,900\text{s}^{-1}$ 、 $140 \sim 4,700,000\text{s}^{-1}$ 、 $150 \sim 4,600,000\text{s}^{-1}$ 、 $160 \sim 4,500,000\text{s}^{-1}$ 、 $170 \sim 4,400,000\text{s}^{-1}$ 、 $180 \sim 4,300,000\text{s}^{-1}$ 、 $190 \sim 4,200,000\text{s}^{-1}$ 、 $200 \sim 4,100,000\text{s}^{-1}$ 、 $250 \sim 4,000,000\text{s}^{-1}$ 、 $300 \sim 3,900,000\text{s}^{-1}$ 、 $400 \sim 3,800,000\text{s}^{-1}$ 、 $500 \sim 3,700,000\text{s}^{-1}$ 、 $600 \sim 3,600,000\text{s}^{-1}$ 、 $700 \sim 3,500,000\text{s}^{-1}$ 、 $800 \sim 3,400,000\text{s}^{-1}$ 、 $900 \sim 3,300,000\text{s}^{-1}$ 、 $1000 \sim 3,200,000\text{s}^{-1}$ 、 $1500 \sim 3,100,000\text{s}^{-1}$ 、 $2000 \sim 3,000,000\text{s}^{-1}$ 、 $3000 \sim 2,500,000\text{s}^{-1}$ 、 $4000 \sim 2,000,000\text{s}^{-1}$ 、 $5000 \sim 1,500,000\text{s}^{-1}$ 、 $10,000 \sim 1,000,000\text{s}^{-1}$ 或它们的上限及下限的任意组合的范围。

[0134] 各溶液能够以适当的注入速度相互混合,并能够注入反应室5中。若为本领域技术人员,则可以适当设定溶液的注入速度。另外,若为本领域技术人员,则可以适当设定各溶液的注入速度之比。在一些实施方式中,能够将粒子形成成分的注入速度与封入成分的注入速度之比设为从1:1~1:9的范围中选择的比,例如1:2~1:9、1:3~1:9、例如1:1、1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、例如1:9,但不限于此。注入速度可以根据粒子形成成分和封入成分的组合来决定。粒子形成成分或封入成分的注入速度可以是例如1mL/min以上、1.1mL/min以上、1.2mL/min以上、1.3mL/min以上、1.4mL/min以上、1.5mL/min以上、1.6mL/min以

上、1.7mL/min以上、1.8mL/min以上、1.9mL/min以上、2mL/min以上、2.1mL/min以上、2.2mL/min以上、2.3mL/min以上、2.4mL/min以上、2.5mL/min以上、2.6mL/min以上、2.7mL/min以上、2.8mL/min以上、2.9mL/min以上、3mL/min以上、3.5mL/min以上、4mL/min以上、4.5mL/min以上、5mL/min以上、6mL/min以上、7mL/min以上、8mL/min以上、9mL/min以上、10mL/min以上、20mL/min以上、30mL/min以上、40mL/min以上、50mL/min以上、60mL/min以上、70mL/min以上、80mL/min以上、90mL/min以上、100mL/min以上、110mL/min以上、120mL/min以上、130mL/min以上、140mL/min以上、例如150mL/min以上、150mL/min以下、140mL/min以下、130mL/min以下、120mL/min以下、110mL/min以下、100mL/min以下、90mL/min以下、80mL/min以下、70mL/min以下、60mL/min以下、50mL/min以下、40mL/min以下、30mL/min以下、20mL/min以下、10mL/min以下、9mL/min以下、8mL/min以下、7mL/min以下、6mL/min以下、5mL/min以下、4.5mL/min以下、4mL/min以下、3.5mL/min以下、3mL/min以下、2.9mL/min以下、2.8mL/min以下、2.7mL/min以下、2.6mL/min以下、2.5mL/min以下、2.4mL/min以下、2.3mL/min以下、2.2mL/min以下、2.1mL/min以下、2mL/min以下、1.9mL/min以下、1.8mL/min以下、1.7mL/min以下、1.6mL/min以下、1.5mL/min以下、1.4mL/min以下、1.3mL/min以下、1.2mL/min以下、1.1mL/min以下、例如1mL/min以下。

[0135] 在一些实施方式中,可以将进行泰勒反应的搅拌时间设为5分钟以下、4分钟以下、3分钟以下、2分钟以下、90秒以下、60秒以下、50秒以下、40秒以下、30秒以下、20秒以下、15秒以下、例如10秒以下,但不限于此。在一些实施方式中,可以将进行泰勒反应的搅拌时间设为1秒以上、2秒以上、3秒以上、4秒以上、例如5秒以上,但不限于此。此外,在本说明书中,只要没有特别说明,则“搅拌时间”是指注入的液体从流入反应槽后到通过出口端口为止的时间。有时将注入的液体从流入反应槽后到通过出口端口为止的时间称为一次通过的时间。另外,搅拌时间是在存在多个流入端口的情况下,最晚注入的液体从流入反应槽后到通过出口端口为止的时间。

[0136] 在一些实施方式中,第一流入口41和第二流入口42的内径可以相同或大致相同。大致相同是指包括 $\pm 5\%$ 的值。在另一实施方式中,第一流入口41和第二流入口42的内径可以不同。

[0137] 实施例

[0138] 以下,通过实施例具体地说明本发明。此外,这些实施例仅用于说明本发明,并不限制本发明的范围。

[0139] [实施例1]

[0140] 封入siRNA的核酸脂质粒子的制备

[0141] 作为检体1~3,以如下方式制备了封入siRNA的核酸脂质粒子。将二硬脂酰磷脂酰胆碱(1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine:以下记为DSPC,NOF CORPORATION)、胆固醇(Cholesterol:以下记为Chol,Sigma-Aldrich,Inc.)、阳离子性脂质1(WO2015/005253中记载的化合物)(以下记为LP1)及聚乙二醇的分子量约为2000的1,2-二肉豆蔻酰-sn-甘油甲氧基聚乙二醇(1,2-Dimyristoyl-sn-Glycero-3-Methoxypolyethyleneglycol,以下记为PEG2000-DMG,NOF CORPORATION)以DSPC:Chol:LP1:PEG2000-DMG=10:48:40:2的摩尔比溶解于乙醇中,以使总脂质浓度为1.96mg/mL。

[0142] 另一方面,将相对于Transferin Receptor2(转铁蛋白受体2)的siRNA(AD-47882)

溶解于柠檬酸缓冲液(20mM Citrate Buffer, pH4.0)中,以使其为51.4 μ g/mL。此外,AD-47882是W02012/177921中记载的相对于小鼠TfR2的siRNA。

[0143] 通过将上述的脂质溶液和siRNA溶液从表1中记载的各自的“注入端口”以表1中记载的“注入速度(脂质溶液和siRNA溶液的注入速度之和)”用泵注入内筒以表1中记载的“圆周速度”旋转并具有表1中记载的内筒与外筒之间的“间隙宽度”的泰勒反应装置中来进行混合,并从出口端口得到了核酸脂质粒子的分散液。脂质溶液与siRNA溶液的注入速度比设为了1:3。在本实施例的装置中,第一流入口在上游侧,第二流入口在下游侧,从第一流入口注入了封入成分即siRNA溶液,从第二流入口注入了粒子形成成分即脂质溶液。此外,关于表1所示的“注入端口”,“反应槽内(反应室内)”和“反应槽跟前(反应室跟前)”是与两种液体的混合位置有关的条件。如果注入端口在“反应槽内”,则可以将两种液体在反应槽中混合。如果注入端口在“反应槽跟前”,则能够将两种液体在反应槽的跟前混合,接着将该混合溶液注入泰勒反应装置的反应部,即内筒与外筒之间的间隙部分。对于表2~5也同样。另外,关于表1所示的“有无稀释”,在进行核酸脂质粒子的稀释的情况下,从出口端口跟前的注入端口以与表1中记载的“注入速度”相等的速度用泵注入了柠檬酸缓冲液(20mM Citrate Buffer, pH4.0)作为稀释溶液。通过将得到的核酸脂质粒子的分散液用约25~50倍量的PBS(聚丁二酸丁二醇酯, pH7.4)进行12~18小时透析(Float-A-Lyzer G2, MWCO:1,000kD, Spectra/Por),进行乙醇去除,得到了被精制的封入siRNA的核酸脂质粒子的分散液。

[0144] 此外,LP1按照W02015/005253中记载的方法进行了合成。作为参考,将与LP1的合成有关的W02015/005253的记载并入本说明书中。

[0145] [实施例2]

[0146] 封入dsDNA的核酸脂质粒子的制备

[0147] 作为检体4~8,以如下方式制备了封入dsDNA的核酸脂质粒子。将二硬脂酰磷脂酰胆碱(1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine:以下记为DSPC,NOF CORPORATION)、胆固醇(Cholesterol:以下记为Chol,Sigma-Aldrich,Inc.)、LP1以及聚乙二醇分子量约为2000的1,2-二肉豆蔻酰-sn-甘油甲氧基聚乙二醇(1,2-Dimyristoyl-sn-Glycero-3-Methoxypolyethyleneglycol,以下记为PEG2000-DMG,NOF CORPORATION)以DSPC:Chol:LP1:PEG2000-DMG=12.5:41:45:1.5的摩尔比溶解于乙醇中,以使总脂质浓度为3.16mg/mL。

[0148] 另一方面,用柠檬酸缓冲液(20mM Citrate Buffer, pH4.0)对 β -catenin dsDNA进行了稀释制备,以使其为52.7 μ g/mL。

[0149] 通过将上述的脂质溶液和dsDNA溶液从表2中记载的“注入端口”以表2中记载的“注入速度(脂质溶液和dsDNA溶液的注入速度之和)”用泵注入内筒以表2中记载的“圆周速度”旋转并具有表2中记载的内筒与外筒之间的“间隙宽度”的泰勒反应装置中来进行混合,并从出口端口得到了核酸脂质粒子的分散液。脂质溶液与dsDNA溶液的注入速度比设为了1:3。另外,关于表2所示的“有无稀释”,在进行核酸脂质粒子的稀释的情况下,从出口端口跟前的注入端口以与表2中记载的“注入速度”相等的速度用泵注入了柠檬酸缓冲液(20mM Citrate Buffer, pH4.0)作为稀释溶液。通过将核酸脂质粒子的分散液用约25~50倍量的PBS(pH7.4)进行12~18小时透析(Float-A-Lyzer G2, MWCO:1,000kD, Spectra/Por),进行

乙醇去除,得到了被精制的封入dsDNA的核酸脂质粒子的分散液。

[0150] 此外,LP1按照W02015/005253中记载的方法进行了合成。

[0151] [实施例3]

[0152] 封入mRNA的核酸脂质粒子的制备

[0153] 作为检体9~11,以如下方式制备了封入mRNA的核酸脂质粒子。将二硬脂酰磷脂酰胆碱(1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine:以下记为DSPC,NOF CORPORATION)、胆固醇(Cholesterol:以下记为Chol,Sigma-Aldrich,Inc.)、LP1以及聚乙二醇分子量约为2000的1,2-二肉豆蔻酰-sn-甘油甲氧基聚乙二醇(1,2-Dimyristoyl-sn-Glycero-3-Methoxypolyethyleneglycol,以下记为PEG2000-DMG,NOF CORPORATION)以DSPC:Chol:LP1:PEG2000-DMG=12.5:41:45:1.5的摩尔比溶解于乙醇中,以使总脂质浓度为3.16mg/mL。

[0154] 另一方面,用柠檬酸缓冲液(20mM Citrate Buffer,pH4.0)对A_Sin_GP1908_2015_H1 mRNA进行了稀释制备,以使其为52.7 μ g/mL。

[0155] 通过将上述的脂质溶液和mRNA溶液从表3中记载的“注入端口”以表3中记载的“注入速度(脂质溶液和mRNA溶液的注入速度之和)”用泵注入内筒以表3中记载的“圆周速度”旋转并具有表3中记载的内筒与外筒之间的“间隙宽度”的泰勒反应装置中进行混合,并从出口端口得到了核酸脂质粒子的分散液。脂质溶液与mRNA溶液的注入速度比设为了1:3。另外,关于表3所示的“有无稀释”,在进行核酸脂质粒子的稀释的情况下,从出口端口跟前的注入端口以与表3中记载的“注入速度”相等的速度用泵注入了柠檬酸缓冲液(20mM Citrate Buffer,pH4.0)作为稀释溶液。通过将核酸脂质粒子的分散液用约25~50倍量的PBS(pH7.4)进行12~18小时透析(Float-A-LyzerG2,MWC0:1,000kD,Spectra/Por),进行乙醇去除,得到了被精制的封入mRNA的核酸脂质粒子的分散液。

[0156] 此外,LP1按照W02015/005253中记载的方法进行了合成。

[0157] [实施例4]

[0158] 封入mRNA的核酸脂质粒子的制备

[0159] 作为检体12、13,以如下方式制备了封入mRNA的核酸脂质粒子。将二硬脂酰磷脂酰胆碱(1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine:以下记为DSPC,NOF CORPORATION)、胆固醇(Cholesterol:以下记为Chol,Sigma-Aldrich,Inc.)、LP1以及聚乙二醇分子量约为2000的1,2-二肉豆蔻酰-sn-甘油甲氧基聚乙二醇(1,2-Dimyristoyl-sn-Glycero-3-Methoxypolyethyleneglycol,以下记为PEG2000-DMG,NOF CORPORATION)以DSPC:Chol:LP1:PEG2000-DMG=12.5:41:45:1.5的摩尔比溶解于乙醇中,以使总脂质浓度为3.16mg/mL。

[0160] 另一方面,用柠檬酸缓冲液(20mM Citrate Buffer,pH4.0)对A_Sin_GP1908_2015_H1 mRNA进行了稀释制备,以使其为52.7 μ g/mL。

[0161] 通过将上述的脂质溶液和mRNA溶液从表4中记载的“注入端口”以表4中记载的“注入速度(脂质溶液和mRNA溶液的注入速度之和)”用泵注入内筒以表4中记载的“圆周速度”旋转并具有表4中记载的内筒与外筒之间的“间隙宽度”的泰勒反应装置中进行混合,并从出口端口得到了核酸脂质粒子的分散液。脂质溶液与mRNA溶液的注入速度比设为了1:3。另外,从出口端口跟前的注入端口以与表4中记载的“注入速度”相等的速度用泵注入了柠

檬酸缓冲液(20mM Citrate Buffer,pH4.0)作为稀释溶液。通过将核酸脂质粒子的分散液用约25~50倍量的10mM组氨酸(Histidine)300mM蔗糖(Sucrose)(pH7.0)进行12~18小时透析(Float-A-LyzerG2,MWC0:1,000kD,Spectra/Por),进行乙醇去除,得到了被精制的封入mRNA的核酸脂质粒子的分散液。

[0162] 此外,LP1按照W02015/005253中记载的方法进行了合成。

[0163] [实施例5]

[0164] 封入mRNA的核酸脂质粒子的制备

[0165] 作为检体14,以如下方式制备了封入mRNA的核酸脂质粒子。将二硬脂酰磷脂酰胆碱(1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine:以下记为DSPC,NOF CORPORATION)、胆固醇(Cholesterol:以下记为Chol,Sigma-Aldrich,Inc.)、阳离子性脂质2(W02015/005253中记载的化合物)(以下记为LP2)以及聚乙二醇分子量约为2000的1,2-二肉豆蔻酰-sn-甘油甲氧基聚乙二醇(1,2-Dimyristoyl-sn-Glycero-3-Methoxypolyethyleneglycol,以下记为PEG2000-DMG,NOF CORPORATION)以DSPC:Chol:LP2:PEG2000-DMG=17.5:21:60:1.5的摩尔比溶解于乙醇中,以使总脂质浓度为3.08mg/mL。

[0166] 另一方面,用柠檬酸缓冲液(20mM Citrate Buffer,pH4.0)对A_Sin_GP1908_2015_H1 mRNA进行了稀释制备,以使其为51.3 μ g/mL。

[0167] 通过将上述的脂质溶液和mRNA溶液从表5中记载的“注入端口”以表5中记载的“注入速度(脂质溶液和mRNA溶液的注入速度之和)”用泵注入内筒以表5中记载的“圆周速度”旋转并具有表5中记载的内筒与外筒之间的“间隙宽度”的泰勒反应装置中进行混合,并从出口端口得到了核酸脂质粒子的分散液。脂质溶液与mRNA溶液的注入速度比设为了1:3。另外,从出口端口跟前的注入端口以与表5中记载的“注入速度”相等的速度用泵注入了柠檬酸缓冲液(20mM Citrate Buffer,pH4.0)作为稀释溶液。通过将核酸脂质粒子的分散液用约25~50倍量的10mM组氨酸(Histidine)300mM蔗糖(Sucrose)(pH7.0)进行12~18小时透析(Float-A-LyzerG2,MWC0:1,000kD,Spectra/Por),进行乙醇去除,得到了被精制的封入mRNA的核酸脂质粒子的分散液。

[0168] 此外,LP2按照W02015/005253中记载的方法进行了合成。作为参考,将与LP2的合成有关的W02015/005253的记载并入本说明书中。

[0169] [实施例6]

[0170] 封入核酸的核酸脂质粒子的特性评价

[0171] 针对检体1~14,进行了包含核酸脂质粒子的分散液的特性评价。对各自的特性评价的方法进行说明。

[0172] (1)核酸的封入率

[0173] 核酸的封入率使用Quant-iT RiboGreen RNA定量检测试剂盒(Invitrogen),根据附件进行了测量。

[0174] 即,在存在及不存在0.015%TritonX-100(曲拉通X-100)表面活性剂的情况下,对核酸脂质粒子的分散液中的核酸进行定量,通过下式计算了封入率。

[0175] [数4]

[0176] $\{([存在表面活性剂的情况下的核酸量] - [不存在表面活性剂的情况下的核酸量]) / [存在表面活性剂的情况下的核酸量]\} \times 100(\%)$

[0177] (2) 平均粒径、多分散指数(PDI)

[0178] 核酸脂质粒子的平均粒径及多分散指数用Zeta Potential/Particle Sizer (Zeta电位与粒度仪)NICOMP(商标)380ZLS(PARTICLE SIZING SYSTEMS:粒度测定系统)进行了测量。表中的平均粒径表示体积平均粒径。另外,PDI是根据(标准偏差/平均粒径)的平方而计算出的多分散度指数(poly dispersity index),有时也简称为分散度。

[0179] 将特性评价的结果在表1~5中示出。如表中所示,得到了平均粒径为80~200nm,核酸封入率为85%以上的核酸脂质粒子。这证明了通过泰勒反应装置能够制造封入有核酸的脂质粒子。另外,还证明了能够通过微流路制造的粒子也可以通过泰勒反应装置制造。

[0180] (参考例) 基于微流路混合的核酸脂质粒子的制备

[0181] (参考例1) 封入siRNA的核酸脂质粒子的制备及特性评价

[0182] 以如下方式制备了参考例1。将DSPC、Chol、LP1以及PEG2000-DMG以DSPC:Chol:LP1:PEG2000-DMG=10:48:40:2的摩尔比溶解于乙醇中,以使总脂质浓度为1.96mg/mL。另一方面,将相对于Transferin Receptor2(转铁蛋白受体2)的siRNA(AD-47882)溶解于柠檬酸缓冲液(20mM Citrate Buffer,pH4.0)中,以使其为51.4 μ g/mL。使用纳米颗粒合成系统(NanoAssemblr BenchTop,PrecisionNanosystems Inc.)将上述的脂质溶液和mRNA溶液在微流路内混合,以使其体积比为1:3,得到了核酸脂质粒子的粗分散液。通过将核酸脂质粒子的分散液用约25~50倍量的缓冲液进行12~18小时透析(Float-A-LyzerG2,MWC0:1,000kD,Spectra/Por),进行乙醇去除,得到了被精制的封入siRNA的核酸脂质粒子的分散液。

[0183] 针对得到的参考例1的核酸脂质粒子,用与实施例6同样的方法实施了特性评价,将结果记载在表6中。

[0184] (参考例2、3) 封入mRNA的核酸脂质粒子的制备及特性评价

[0185] 以如下方式制备了参考例2、3。将DSPC、Chol、LP1及PEG2000-DMG以DSPC:Chol:LP1:PEG2000-DMG=12.5:41:45:1.5的摩尔比溶解于乙醇中,以使总脂质浓度为3.16mg/mL。另一方面,用柠檬酸缓冲液(20mM Citrate Buffer,pH4.0)对A_Sin_GP1908_2015_H1 mRNA(序列信息)进行了稀释制备,以使其为52.7 μ g/mL。使用纳米颗粒合成系统(NanoAssemblr BenchTop,PrecisionNanosystems Inc.)将上述的脂质溶液和mRNA溶液在微流路内混合,以使其体积比为1:3,得到了核酸脂质粒子的粗分散液。通过将核酸脂质粒子的分散液用约25~50倍量的缓冲液进行12~18小时透析(Float-A-LyzerG2,MWC0:1,000kD,Spectra/Por),进行乙醇去除,得到了被精制的封入mRNA的核酸脂质粒子的分散液。

[0186] 针对得到的参考例2、3的核酸脂质粒子,用与实施例6同样的方法实施了特性评价,将结果记载在表6中。

[0187] (参考例4) 封入mRNA的核酸脂质粒子的制备及特性评价

[0188] 以如下方式制备了参考例4。将DSPC、Chol、LP2以及PEG2000-DMG以DSPC:Chol:LP2:PEG2000-DMG=17.5:21:60:1.5的摩尔比溶解于乙醇中,以使总脂质浓度为3.08mg/mL。另一方面,用柠檬酸缓冲液(20mM Citrate Buffer,pH4.0)对A_Sin_GP1908_2015_H1 mRNA(序列信息)进行了稀释制备,以使其为51.3 μ g/mL。使用纳米颗粒合成系统(NanoAssemblr BenchTop,PrecisionNanosystems Inc.)将上述的脂质溶液和mRNA溶液在微流路内混合,以使其体积比为1:3,得到了核酸脂质粒子的粗分散液。通过将核酸脂质粒

子的分散液用约25~50倍量的缓冲液进行12~18小时透析(Float-A-LyzerG2, MWC0:1, 000kD, Spectra/Por), 进行乙醇去除, 得到了被精制的封入mRNA的核酸脂质粒子的分散液。

[0189] 针对得到的参考例4的核酸脂质粒子, 用与实施例6同样的方法实施了特性评价, 将结果记载在表6中。

[0190] 如表6所示, 针对参考例1~4, 得到了平均粒径为90~140nm、核酸封入率为95%以上的核酸脂质粒子。

[0191] [表1]

检体	注入端口	间隙宽度 (mm)	圆周速度 (m/s)	雷诺数	搅拌时间 (sec)	注入速度 (mL/min)	有无稀释	平均粒径 (nm)	PDI	核酸封入率 (%)
[0192] 1	反应槽内	0.21	9.29	770	3	32	无	98	0.043	97
2	反应槽内	0.21	0.77	64	20	2.4	有	129	0.024	98
3	反应槽内	0.75	8.95	2649	60	2.8	有	128	0.105	97

[0193] TR2 siRNA

[0194] DSPC:Chol:LP1:PEG2000-DMG=10:48:40:2

[0195] [表2]

检体	注入端口	间隙宽度 (mm)	圆周速度 (m/s)	雷诺数	搅拌时间 (sec)	注入速度 (mL/min)	有无稀释	平均粒径 (nm)	PDI	核酸封入率 (%)
[0196] 4	反应槽跟前	1.5	8.48	5021	2.5	128	无	145	0.269	93
5	反应槽跟前	0.21	0.77	64	10	4.8	无	182	0.075	98
6	反应槽跟前	0.21	9.29	770	0.5	96	有	101	0.030	96
7	反应槽内	0.21	9.29	770	10	4.8	有	116	0.112	94
8	反应槽内	0.21	4.65	385	5	9.6	有	83	0.181	95

[0197] β catenin dsDNA

[0198] DSPC:Chol:LP1:PEG2000-DMG=12.5:41:45:1.5

[0199] [表3]

检体	注入端口	间隙宽度 (mm)	圆周速度 (m/s)	雷诺数	搅拌时间 (sec)	注入速度 (mL/min)	有无稀释	平均粒径 (nm)	PDI	核酸封入率 (%)
[0200] 9	反应槽内	0.21	0.77	64	3	32	无	161	0.012	97
10	反应槽内	0.21	9.29	770	20	2.4	有	140	0.104	94
11	反应槽内	0.75	8.95	2649	60	2.8	有	151	0.028	98

[0201] A_Sin_GP1908_2015_H1 mRNA

[0202] DSPC:Chol:LP1:PEG2000-DMG=12.5:41:45:1.5

[0203] [表4]

检体	注入端口	间隙宽度 (mm)	圆周速度 (m/s)	雷诺数	搅拌时间 (sec)	注入速度 (mL/min)	有无稀释	平均粒径 (nm)	PDI	核酸封入率 (%)
[0204] 12	反应槽内	0.21	9.29	770	1	48*	有	98	0.036	97
13	反应槽内	1.5	8.48	5021	4	81*	有	89	0.074	97

[0205] *注射泵

[0206] A_Sin_GP1908_2015_H1 mRNA

[0207] DSPC:Chol:LP2:PEG2000-DMG=12.5:41:45:1.5

[0208] [表5]

检体	注入端口	间隙宽度 (mm)	圆周速度 (m/s)	雷诺数	搅拌时间 (sec)	注入速度 (mL/min)	有无稀释	平均粒径 (nm)	PDI	核酸封入率 (%)
14	反应槽内	0.21	9.29	770	1	48*	有	137	0.083	89

[0210] *注射泵

[0211] A_Sin_GP1908_2015_H1 mRNA

[0212] DSPC:Chol:LP2:PEG2000-DMG=17.5:21:60:1.5

[0213] [表6]

参考例	核酸	脂质组成 (mol%)	平均粒径 (nm)	PDI	核酸封入率 (%)
1	TfR2 siRNA	DSPC:Chol:LP1:PEG2000-DMG=10:48:40:2	92	0.045	97
2	A_Sin_GP1908_2015_H1 mRNA	DSPC:Chol:LP1:PEG2000-DMG=12.5:41:45:1.5	112	0.049	98
3	A_Sin_GP1908_2015_H1 mRNA	DSPC:Chol:LP1:PEG2000-DMG=12.5:41:45:1.5	112	0.185	98
4	A_Sin_GP1908_2015_H1 mRNA	DSPC:Chol:LP2:PEG2000-DMG=17.5:21:60:1.5	132	0.110	96

[0215] [试验例1]正常小鼠中的封入TfR2 siRNA的核酸脂质粒子的药效评价试验

[0216] 据报道,在上述的实施例1及参考例1中,封入脂质粒子的TfR2 siRNA会使正常小鼠的血浆中铁浓度上升(WO2012/177921)。因此,使用利用泰勒反应装置制造的封入TfR2 siRNA的核酸脂质粒子(检体1~3)和通过微流路混合制造的封入TfR2 siRNA的核酸脂质粒子(参考例1)进行了以下的试验。

[0217] 将封入脂质粒子的TfR2 siRNA以0.3mg/kg(0.3mpk)的用量向雄性的C57BL/6Njcl小鼠(日本CLEA公司制造)进行了尾静脉内施用(i.v.)(n=4/组)。作为载体(vehicle)组,尾静脉内施用了PBS(n=4/组)。在siRNA或PBS的处理前(Pre)、处理1天后(Day1)、7天后(Day7)进行了尾静脉采血,使用Metallo assay(メタロアッセイ)铁测量试剂盒(Metallogenics公司制造),测量了血浆中铁浓度(plasma Fe(ug/mL))。将各血浆中铁浓度的结果分别在图7~9中示出(平均值±标准误差)。

[0218] 如图7~9所示,在施用封入TfR2 siRNA的核酸脂质粒子1天后及7天后,与vehicle组相比,发现了血浆中铁浓度的上升效果。这些结果表明使用泰勒反应装置制造的封入TfR2 siRNA的核酸脂质粒子在生物体内起作用。

[0219] [试验例2]1价LNP-mRNA的免疫原性:封入A Singapore GP19082015H1 mRNA的核酸脂质粒子的HA特异性IgG的生成诱导能力

[0220] 为了调查使用泰勒反应装置制造的封入mRNA的核酸脂质粒子的在生物体内的免

疫诱导能力,使用封入A_Sin_GP1908_2015_H1 mRNA的核酸脂质粒子(检体9~14)和通过微流路混合制造的封入A_Sin_GP1908_2015_H1 mRNA的核酸脂质粒子(参考例2~4)进行了以下的试验。

[0221] 在7周龄BALB/c小鼠的腓肠肌内,以两周间隔施用了两次0.2 μ g的参考例2、检体9、检体10及检体11。在最后施用两周后进行采血,制备了血清。同样地,向6周龄BALB/c小鼠施用参考例3、参考例4、检体12、检体13及检体14,制备了血清。用Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA:酶联免疫吸附测定)法检测了针对HA的血清中特异性IgG。

[0222] ELISA法的固相化处理通过如下方式进行了实施,即,向96well孔板中以25 μ L/well添加0.5 μ g/mL的重组A/Michigan/45/2015(流感抗原A/密歇根州/45/2015)的HA,在4 $^{\circ}$ C下静置一夜。同时,为了制作标准曲线,对已知浓度的小鼠IgG进行分级稀释,同样地进行了固相化。去除固相化液体后,用包含0.05%的Tween20(聚山梨醇酯-20)的DPBS(DPBST)清洗3次,用包含1%的牛血清白蛋白(BSA)及0.05%的Tween20的杜氏磷酸盐缓冲生理盐水(DPBS)(DPBST/BSA)进行了阻断处理。血清用DPBST/BSA进行了分级稀释。在阻断处理之后,用DPBST清洗3次,以25 μ L/well添加了稀释血清。向标准曲线用的well(孔位)中添加了DPBST/BSA来代替稀释血清。在室温下反应1小时以上之后,用DPBST清洗3次,添加了用DPBST/BSA稀释的辣根过氧化物酶(HRP)标记的抗小鼠IgG。在室温下反应1小时后,用DPBST清洗3次,以30 μ L/well添加了3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)过氧化物酶基质。在室温下静置约10分钟使其显色后,以30 μ L/well添加包含盐酸的显色停止液,测量了450nm的吸光度。根据标准曲线对血清中的特异性IgG浓度进行了计算。

[0223] 将施用了参考例2、检体9、检体10及检体11的结果在图10中示出。检体10示出了与参考例2相同程度的特异性IgG诱导水平,检体9及检体11示出了高于参考例2的特异性IgG诱导水平。

[0224] 同样地,将施用了参考例3、参考例4、检体12、检体13及检体14的结果在图11中示出。参考例3及参考例4示出了相同程度的特异性IgG诱导水平。另外,检体12、检体13及检体14示出了与两个参考例相同程度的特异性IgG诱导水平。

[0225] 这些结果表明,使用泰勒反应装置制造的封入A_Sin_GP1908_2015_H1mRNA的核酸脂质粒子在生物体内诱导HA特异性IgG的生成。

[0226] 产业上的可利用性

[0227] 根据本公开,能够制造胶囊粒子。这例如可用于RNA疫苗或siRNA医药的制造。另外,可以连续制造胶囊粒子。另外,可以大规模生产胶囊粒子,但本发明不限于此。

[0228] 在本说明书中引用了包括专利申请及制造商手册的多个文件。这些文件的公开不被视为与本发明的专利性相关,但通过参照的形式将其整体并入本说明书中。更详细而言,与具体且单独地示出各个文件均通过参照的形式被并入的情况相同地,将所有参照文件通过参照的形式并入本说明书中。在与所引用的文件之间发生记载的不一致或矛盾的情况下,本说明书优先。

[0229] 附图标记说明

[0230] 1:泰勒反应装置、

[0231] 2:外筒、

[0232] 3:内筒、

- [0233] 4:流入口、
- [0234] 4A:第一管线、
- [0235] 4B:第二管线、
- [0236] 4D:混合溶液管线、
- [0237] 5:反应室、
- [0238] 5V:涡列、
- [0239] 6:流出口、
- [0240] 7:控制装置、
- [0241] 8:马达、
- [0242] 11:第一罐、
- [0243] 12:第一泵、
- [0244] 13:第二罐、
- [0245] 14:第二泵、
- [0246] 15:第三罐、
- [0247] 16:第三泵、
- [0248] 20:外罩、
- [0249] 21:外罩温度调节用冷却器、
- [0250] 41:第一流入口、
- [0251] 41A:第一管线、
- [0252] 41B:第二管线、
- [0253] 41D:混合溶液管线、
- [0254] 42:第二流入口、
- [0255] 43:第三流入口、
- [0256] IR:内筒外径、
- [0257] d:间隙宽度。

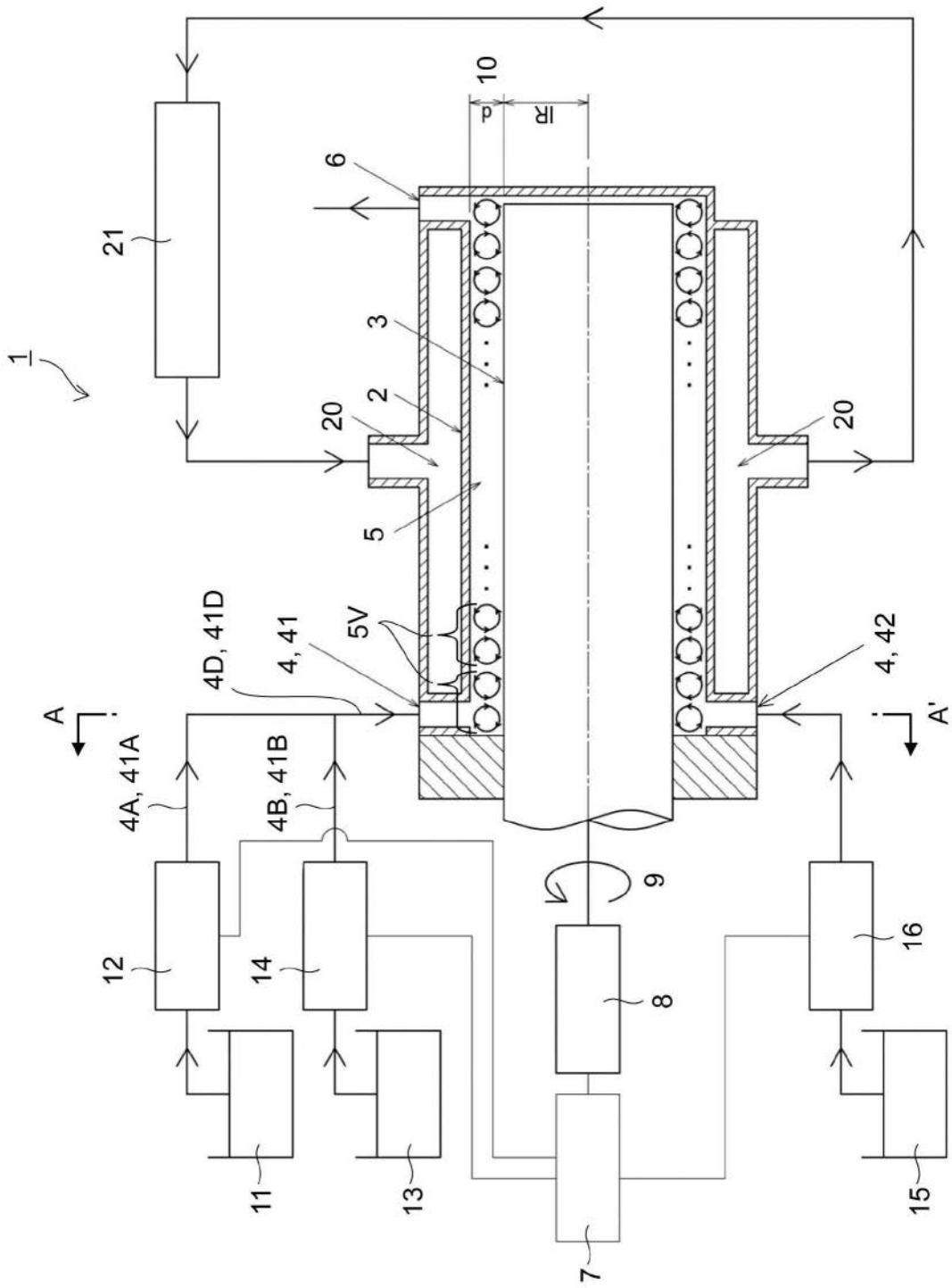


图1

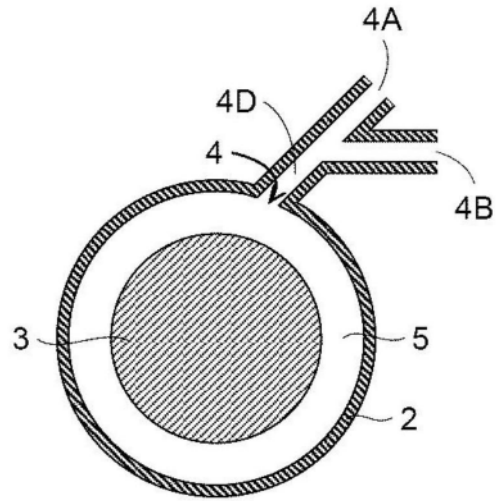


图2

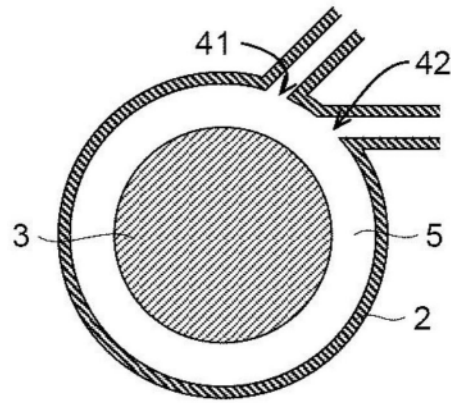


图3

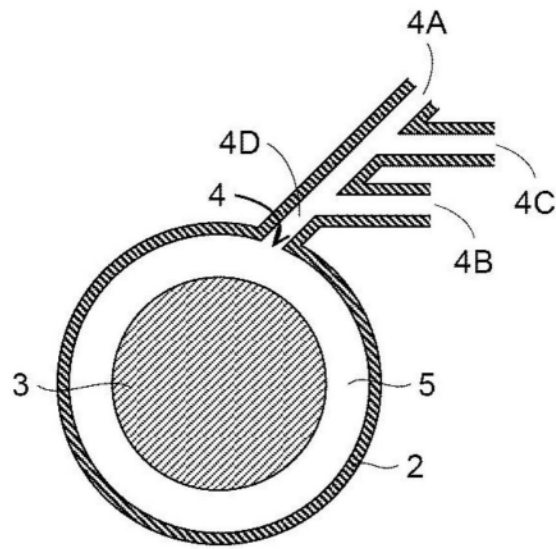


图4

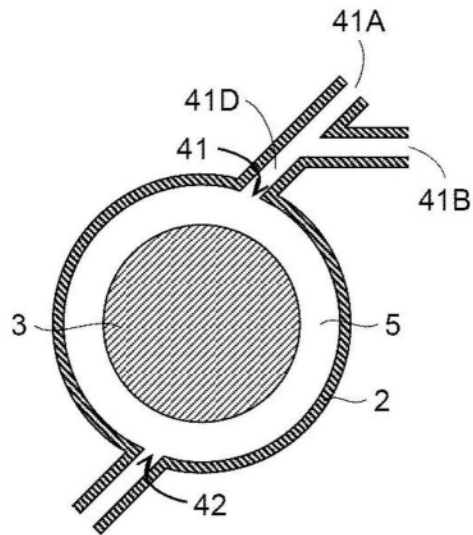


图5

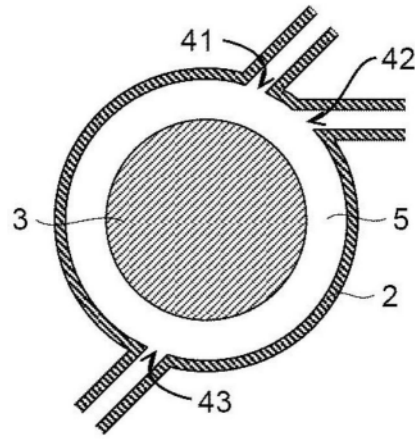


图6

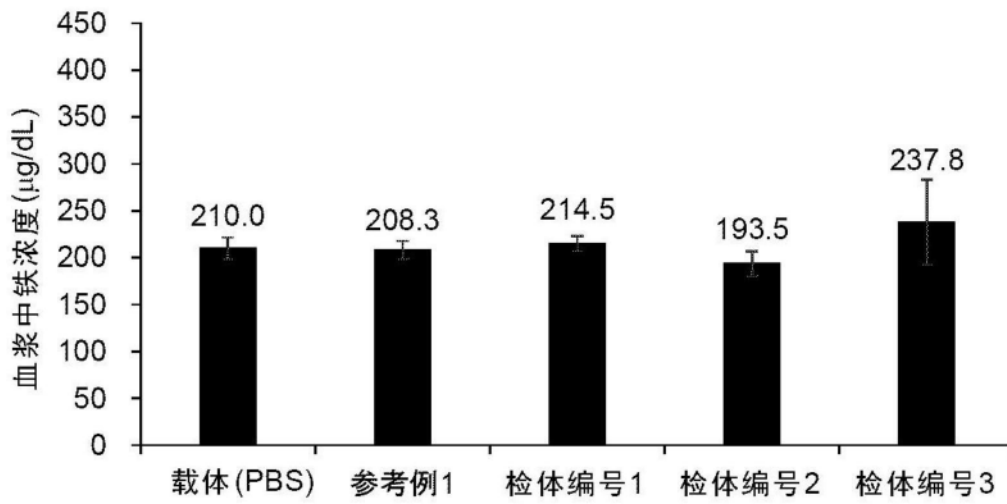


图7

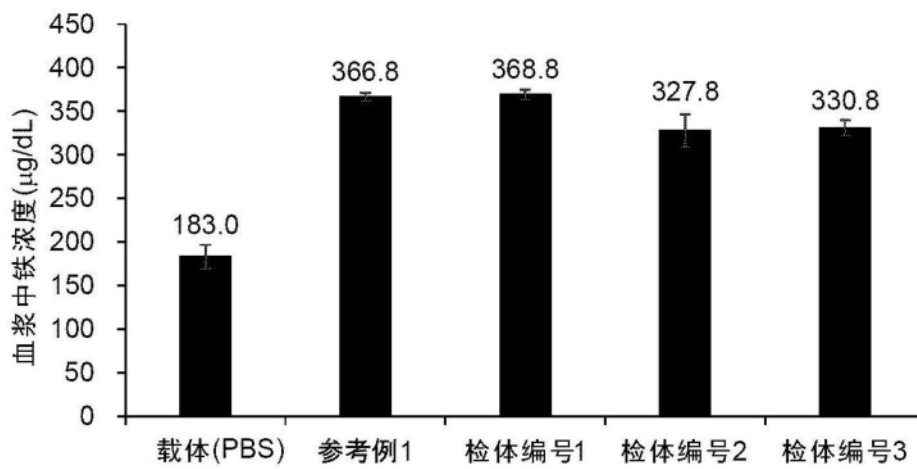


图8

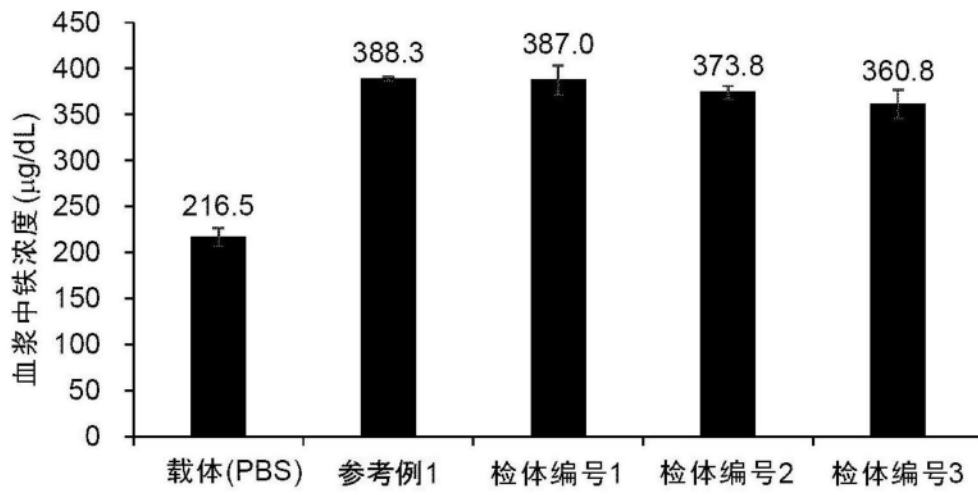


图9

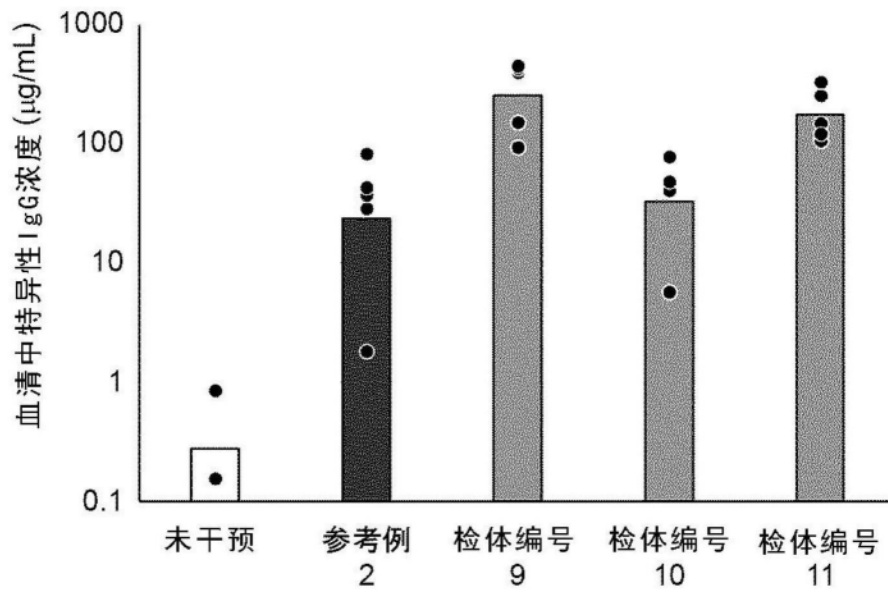


图10

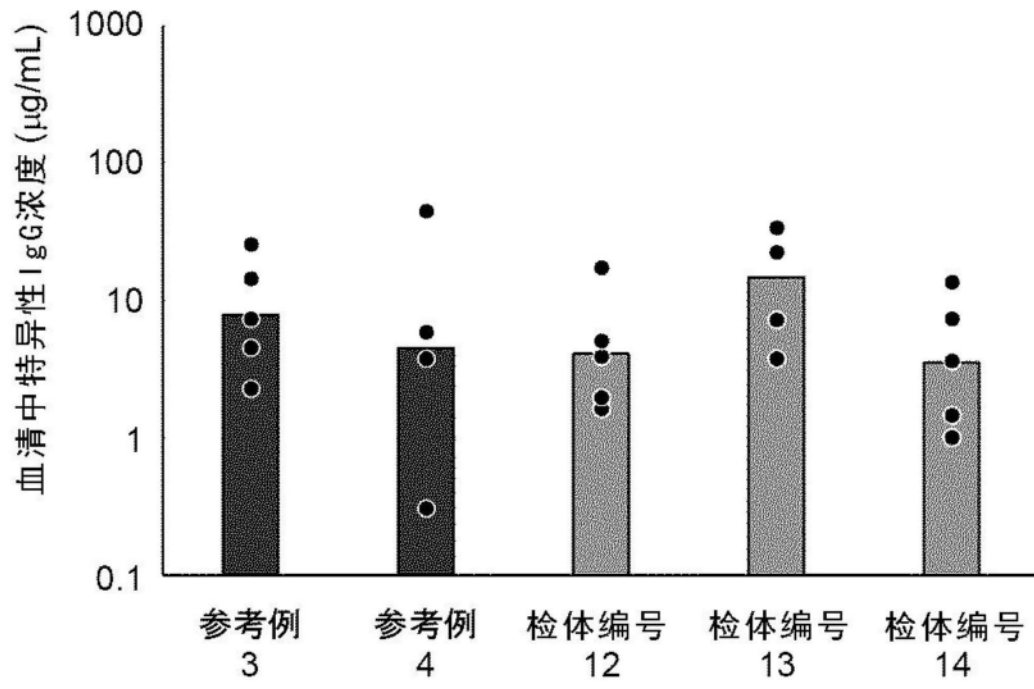


图11