



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108366964 A

(43)申请公布日 2018.08.03

(21)申请号 201680074444.7

(74)专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限

(22)申请日 2016.12.16

公司 11002

(30)优先权数据

代理人 张晶 赵赫

10-2015-0182265 2015.12.18 KR

(51)Int.Cl.

A61K 9/107(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

A61K 31/7088(2006.01)

2018.06.19

A61K 47/14(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

A61K 47/30(2006.01)

PCT/KR2016/014821 2016.12.16

A61K 9/00(2006.01)

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/105138 K0 2017.06.22

(71)申请人 株式会社三养生物制药

权利要求书3页 说明书19页 附图1页

地址 韩国首尔

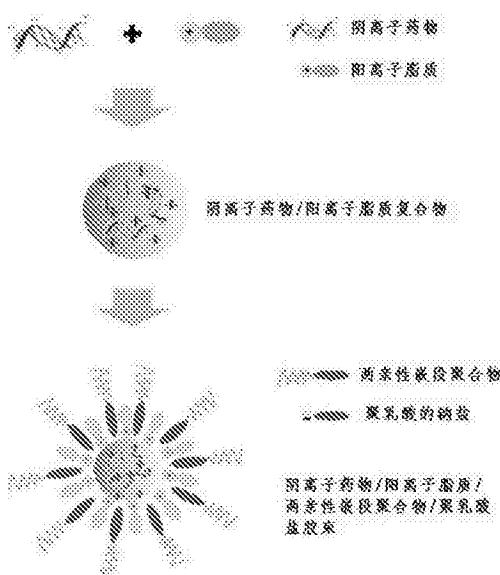
(72)发明人 南惠英 金详熹 徐敏孝 孙智娟

(54)发明名称

制备含阴离子药物的聚合物胶束的方法

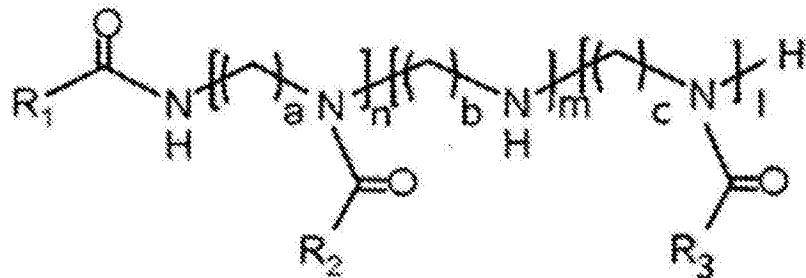
(57)摘要

本发明公开了一种产率提高的制备阴离子药物递送组合物的方法，其包括在水相中通过阴离子药物与阳离子化合物的静电相互作用形成纳米颗粒；以及将纳米颗粒纳入到包含两亲性聚合物和任选的聚乳酸盐的聚合物胶束中以增加静电相互作用和疏水性结合，从而提高阴离子药物在制剂中的包封率。



1. 制备用于递送阴离子药物的组合物的方法,其包括:
 - (a) 将阴离子药物和阳离子化合物分别溶解在水性溶剂中并混合;以及
 - (b) 将两亲性嵌段共聚物溶解在水性溶剂或有机溶剂中,并与步骤(a)中获得的混合物混合。
2. 根据权利要求1所述的方法,其还包括在步骤(b)中将聚乳酸盐溶解在水性溶剂或有机溶剂中并与步骤(a)中获得的混合物混合。
3. 根据权利要求1所述的方法,其还包括(c)将步骤(b)中获得的混合物在0-50℃的温度下稳定5-60分钟。
4. 根据权利要求1所述的方法,其包括:
 - (a') 将阴离子药物和阳离子化合物分别溶解在水性溶剂中并混合,然后冷冻干燥;
 - (b-1) 将步骤(a')中获得的冷冻干燥产物溶解在有机溶剂中;
 - (b-2) 将步骤(b-1)中获得的溶液与水性溶剂混合;以及
 - (b-3) 去除步骤(b-2)中获得的混合物中的有机溶剂,其中将两亲性嵌段共聚物溶解在步骤(b-1)的有机溶剂或步骤(b-2)的水性溶剂中。
5. 根据权利要求1-4中任一项所述的方法,其中在步骤(a)或步骤(a')中溶解有阳离子化合物的水性溶液与溶解有阴离子药物的水性溶液的体积比(阳离子化合物的水性溶液/阴离子药物的水性溶液)为1-20。
6. 根据权利要求1-4中任一项所述的方法,其中所述阴离子药物是肽、蛋白质或核酸。
7. 根据权利要求6所述的方法,其中所述核酸的至少一个末端用选自胆固醇、生育酚和具有10-24个碳原子的脂肪酸中的至少一种修饰。
8. 根据权利要求1-4中任一项所述的方法,其中所述阳离子化合物为选自阳离子脂质和阳离子聚合物中的至少一种。
9. 根据权利要求8所述的方法,其中所述阳离子脂质为化学式1所示的阳离子脂质:

化学式1



在式1中,

n、m和l各自为0-12,条件是 $1 \leq n+m+1 \leq 12$;a、b和c独立地为1-6;R₁、R₂和R₃独立地为氢或具有11-25个碳原子的饱和烃和不饱和烃,条件是R₁、R₂和R₃中的至少一个是具有11-25个碳原子的饱和烃或不饱和烃。

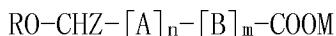
10. 根据权利要求1-4中任一项所述的方法,其中步骤(b)或(b-1)中的有机溶剂为选自丙酮、乙醇、甲醇、二氯甲烷、氯仿、二氧杂环己烷、二甲基亚砜、乙腈、乙酸乙酯和乙酸中的至少一种。

11. 根据权利要求1-4中任一项所述的方法,其中所述两亲性嵌段共聚物是包含亲水性嵌段(A)和疏水性嵌段(B)的AB型嵌段共聚物,其中所述亲水性嵌段A为选自聚亚烷基二醇、

聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚丙烯酰胺以及它们的衍生物中的至少一种；所述疏水性嵌段B为选自聚酯、聚酸酐、聚氨基酸、聚原酸酯和聚磷腈中的至少一种。

12. 根据权利要求2所述的方法，其中所述聚乳酸盐为选自化学式2-7表示的化合物中的至少一种：

[化学式2]



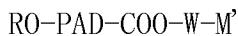
在式2中，A为-COO-CHZ-；B为-COO-CHY-、-COO-CH₂CH₂CH₂CH₂-或-COO-CH₂CH₂OCH₂；R为氢、乙酰基、苯甲酰基、癸酰基、棕榈酰基、甲基或乙基；Z和Y独立地为氢、甲基或苯基；M为Na、K或Li；n为1-30的整数；m为0-20的整数；

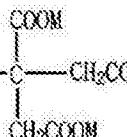
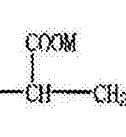
[化学式3]



在式3中，X为甲基；Y'为氢或苯基；p为0-25的整数，q为0-25的整数，条件是p+q为5-25的整数。R为氢、乙酰基、苯甲酰基、癸酰基、棕榈酰基、甲基或乙基；M为Na、K或Li；Z为氢、甲基或苯基；

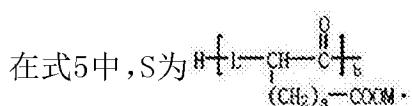
[化学式4]



在式4中，W-M'为  或  ；PAD选自D,L-聚乳酸、D-聚乳酸、聚扁桃酸、D,L-乳酸和乙醇酸的共聚物、D,L-乳酸和扁桃酸的共聚物、D,L-乳酸和己内酯的共聚物以及D,L-乳酸和1,4-二噁烷-2-酮的共聚物；R为氢、乙酰基、苯甲酰基、癸酰基、棕榈酰基、甲基或乙基；M独立地为Na、K或Li；

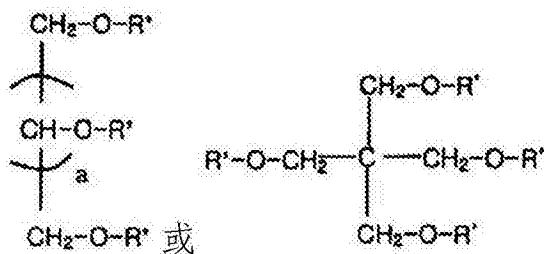
[化学式5]



在式5中，S为  L为-NR₁-或-O-，其中R₁为氢或C₁₋₁₀烷基；Q为CH₃、CH₂CH₃、(CH₂)_a-COOM；

CH₂CH₂CH₃、CH₂CH₂CH₂CH₃或CH₂C₆H₅；a为0-4的整数；b为1-10的整数；M为Na、K或Li；PAD为选自D,L-聚乳酸、D-聚乳酸、聚扁桃酸、D,L-乳酸和乙醇酸的共聚物、D,L-乳酸和扁桃酸的共聚物、D,L-乳酸和己内酯的共聚物以及D,L-乳酸和1,4-二噁烷-2-酮的共聚物中的至少一种；

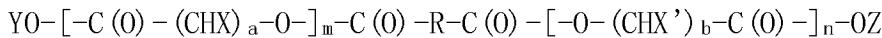
[化学式6]



在式6中，R'为-PAD-O-C(O)-CH₂CH₂-C(O)-OM，PAD选自D,L-聚乳酸、D-聚乳酸、聚扁桃酸、D,L-乳酸和乙醇酸的共聚物、D,L-乳酸和扁桃酸的共聚物、D,L-乳酸和己内酯的共聚物

以及D,L-乳酸和1,4-二噁烷-2-酮的共聚物;M为Na、K或Li;a为1-4的整数;

[化学式7]



在式7中,X和X'独立地为氢、具有1-10个碳原子的烷基或具有6-20个碳原子的芳基;Y和Z独立地为Na、K或Li;m和n独立地为0-95的整数,条件是 $5 < m+n < 100$;a和b独立地为1-6的整数;R为 $-(\text{CH}_2)_k-$ 、具有2-10个碳原子的二价烯基、具有6-20个碳原子的二价芳基或它们的组合,其中k为0-10的整数。

13.根据权利要求11所述的方法,其中所述疏水性嵌段B的末端羟基被选自胆固醇、生育酚和具有10-24个碳原子的脂肪酸中的至少一种修饰。

14.根据权利要求1-4中任一项所述的方法,其中所述有机溶剂包含促融合脂质。

15.根据权利要求14所述的方法,其中所述促融合脂质为选自以下的至少一种:二月桂酰磷脂酰乙醇胺、二肉豆蔻酰磷脂酰乙醇胺、二棕榈酰磷脂酰乙醇胺、二硬脂酰磷脂酰乙醇胺、二油酰磷脂酰乙醇胺、二亚油酰磷脂酰乙醇胺、1-棕榈酰-2-油酰磷脂酰乙醇胺、1,2-二植烷酰-3-sn-磷脂酰乙醇胺、二月桂酰磷脂酰胆碱、二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱、二棕榈酰磷脂酰胆碱、二硬脂酰磷脂酰胆碱、二油酰磷脂酰胆碱、二亚油酰磷脂酰胆碱、1-棕榈酰-2-油酰磷脂酰胆碱、1,2-二植烷酰-3-sn-磷脂酰胆碱、二月桂酰磷脂酸、二肉豆蔻酰磷脂酸、二棕榈酰磷脂酸、二硬脂酰磷脂酸、二油酰磷脂酸、二亚油酰磷脂酸、1-棕榈酰-2-油酰磷脂酸、1,2-二植烷酰-3-sn-磷脂酸、胆固醇和生育酚。

制备含阴离子药物的聚合物胶束的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种用于递送阴离子药物的、包含阴离子药物的药物组合物及其制备方法。

背景技术

[0002] 当疾病相关基因的表达由于多种因素而增加或由于突变而表现出异常活性时,会出现许多疾病。在转录后阶段siRNA(短干扰RNA)以序列特异性的方式抑制特定基因的表达,因此作为基因治疗剂获得了很大关注。特别是,由于其高活性和精确的基因选择性,预期siRNA可作为能够解决现有反义核苷酸、核酶等所具有的问题的核酸治疗剂。siRNA是短双链RNA,切割具有与其互补的核苷酸序列的基因的mRNA以抑制靶基因的表达(McManus and Sharp, Nature Rev. Genet. 3: 737 (2002); Elbashir, et al., Genes Dev. 15: 188 (2001))。然而,尽管有这些优点,但已知siRNA不仅被血液中的核酸酶迅速降解并迅速通过肾脏排出体外,而且因为它带有很强的负电荷,所以不容易通过细胞膜。

[0003] 很长时间以来,对安全和高效的药物递送技术进行了研究,并且在使用阴离子药物的治疗领域已经开发了各种递送系统和递送技术,例如,包含siRNA的核酸。递送系统主要分为使用腺病毒或逆转录病毒等的病毒递送系统和使用阳离子脂质、阳离子聚合物等的非病毒递送系统。

[0004] 已知病毒递送系统存在风险,包括非特异性免疫反应,并且由于生产过程复杂,其商业应用存在许多问题。因此,最近的研究趋势是使用非病毒递送系统克服病毒递送系统的缺点。这种非病毒递送系统比病毒递送系统效率低,但是具有在体内安全性方面伴随较少副作用并且在经济方面具有生产成本低的优点。

[0005] 非病毒递送系统的最具代表性的实例包括使用阳离子脂质的阳离子脂质-核酸复合物(lipoplex)和聚阳离子聚合物-核酸复合物(polyplex)。已经进行了许多研究,这些阳离子脂质或聚阳离子聚合物通过与阴离子药物的静电相互作用形成复合物,由此稳定阴离子药物并增加细胞内递送。然而,当使用达到足够效果所需的量时,其结果表明,虽然非病毒递送系统比病毒传递系统少,但它引起严重的毒性,因此其不适合用作药物。因此,需要开发一种阴离子药物递送技术,该技术可通过减少能够诱导毒性的阳离子聚合物或阳离子脂质的量来减少毒性,可以在血液和体液中保持稳定并且能够在细胞内递送以获得足够的效果。

[0006] 另一方面,已经进行了各种尝试以提供一种药物递送系统,其能够将水溶性差的药物以高分子胶束的形式溶解并通过使用两亲性嵌段共聚物使其在水性溶液中保持稳定(韩国专利第08180334号)。然而,尽管这些两亲性嵌段共聚物可通过形成具有疏水性的聚合物胶束而将具有疏水性的水溶性差的药物溶解在其中,但带负电荷的亲水性药物(如核酸)不能被包埋在聚合物的胶束结构中,因此它不适合包含这些核酸的阴离子药物的递送。因此,本发明人已经公开了一种用于递送阴离子药物的组合物及其各种制备方法,其通过与核酸的静电相互作用而形成复合物并且使复合物被包埋在两亲性嵌段共聚物的胶束结

构中。然而,仍然需要改进用于递送阴离子药物的组合物的产率和制备用于增强核酸稳定性的制剂的方法。

发明内容

[0007] 技术问题

[0008] 在这些情况下,本发明人进行了广泛的研究,以开发一种提高用于递送阴离子药物的组合物的产率并提高阴离子药物的稳定性的制备方法。结果,发明人发现,当将诸如 siRNA 的阴离子药物与阳离子化合物分别独立地溶解于水性溶剂中,并混合以形成在单相系统中的复合物,然后将其包埋于高分子胶束中时,可以显著改善阴离子药物产率,并且可以提高阴离子药物的稳定性,由此完成本发明。

[0009] 因此,本发明的一个目的是提供一种制备用于递送阴离子药物的组合物的方法,以及由该方法制备的用于递送阴离子药物的组合物,其中所述方法提高了含有阴离子药物的组合物的产率和核酸的稳定性。

[0010] 有益效果

[0011] 根据本发明的一个实施方案的制备方法使阴离子药物和阳离子化合物在水相中形成复合物,从而通过静电相互作用有效地形成纳米颗粒复合物。而且,在通过冷冻干燥去除水性溶液的过程中结合力增加,由此大大增加了最终制备的聚合物胶束的产率。另外,这种制备方法不仅由于使用相对少量的有机溶剂从而是环境友好的,而且生产极其容易,易于大规模生产。进一步地,当按照本发明实施方案的制备方法制备的用于递送阴离子药物的组合物被施用于体内时,其可以增加阴离子药物在血液或体液中的稳定性,具体而言,该组合物具有无需通过网状内皮系统而有效递送阴离子药物进入细胞的优点。

附图说明

[0012] 图1是说明按照本发明的一个实施方案制备的聚合物胶束递送系统的结构的示意图。

具体实施方案

[0013] 本发明的实施方案涉及一种制备用于递送阴离子药物的组合物的方法,该方法如下提高其产率:包含利用水相中阴离子药物和阳离子化合物的静电相互作用而形成的纳米颗粒,并将纳米颗粒纳入到包含两亲性聚合物和任选的聚乳酸盐的聚合物胶束中以增加静电相互作用和疏水结合,从而增加制剂中阴离子药物的包封率。

[0014] 具体而言,由本发明的实施方案制备的组合物是用于递送阴离子药物的具有胶束结构的组合物,其中药物与阳离子化合物的复合物被纳入到两亲性嵌段共聚物和任选的聚乳酸盐的胶束结构中,所述组合物包含:

[0015] 阴离子药物,作为有效成分;

[0016] 阳离子化合物;

[0017] 两亲性嵌段共聚物;和

[0018] 任选地,聚乳酸盐,

[0019] 其中阴离子药物通过与阳离子化合物的静电相互作用形成复合物,由此形成的复

合物被包埋在由两亲性嵌共聚物和任选的聚乳酸盐形成的胶束结构中。

[0020] 该制备方法的实施方案包括：

[0021] (a) 将阴离子药物和阳离子化合物分别溶解在水性溶剂中并混合；以及

[0022] (b) 将两亲性嵌段共聚物和任选的聚乳酸盐溶解在水性溶剂或有机溶剂中，并将该溶液与步骤(a)中获得的混合物混合。

[0023] 将在下文中对本发明进行更详细地描述。

[0024] 在制备方法的实施方案中，在步骤(a)中，为了制备阴离子药物和阳离子化合物的复合物，将它们分别溶解在水相例如水性溶剂中，然后混合在一起。

[0025] 在步骤(a)中，溶解于水性溶剂中的阴离子药物和阳离子化合物通过静电相互作用形成纳米颗粒形式的阴离子药物与阳离子化合物的复合物。该步骤中使用的水性溶剂可以是蒸馏水、注射用水或缓冲液。没有特别限定分别溶解有阴离子药物与阳离子化合物的水性溶液的混合比例，例如，阳离子化合物水性溶液与阴离子药物水性溶液的体积比例可以为1-20，更具体地，为1-4，但不限于此。

[0026] 通过本领域已知的适当混合装置将上述水性溶液混合，这种方法的实例包括超声波发生器等。

[0027] 步骤(a)中使用的阴离子药物是最终制备的组合物的活性成分，包括在水性溶液中分子带负电的所有物质，并且该活性成分具有药理学活性。在具体的实施方案中，阴离子性可以由选自羧基、磷酸基和硫酸基中的至少一种官能团提供。另外，在本发明的实施方案中，阴离子药物可以是肽、蛋白质或聚阴离子药物(如肝素或核酸)。

[0028] 此外，核酸可以是核酸药物，例如脱氧核糖核酸、核糖核酸，或其中的主链、糖或碱基被化学修饰或其末端被修饰的多核苷酸衍生物，更具体而言，其可以是至少一种选自以下物质的核酸：RNA、DNA、siRNA(短干扰RNA)、适体、反义ODN(反义寡聚脱氧核苷酸)、反义RNA、核酶、DNA酶等。此外，核酸的主链、糖或碱基可以被化学修饰，或者其末端可以被修饰以增加血液稳定性或减弱免疫应答。具体而言，可以将核酸的磷酸二酯键的一部分置换为硫代磷酸酯键或硼烷磷酸酯键，或者可以包含至少一种核苷酸，在所述核苷酸中，甲基、甲氧基乙基、氟等各种官能团被引入到一部分核糖的2'-OH位置。

[0029] 另外，核酸的至少一个末端可以用选自胆固醇、生育酚和具有10-24个碳原子的脂肪酸中的至少一种修饰。例如，对于siRNA，正义链和/或反义链的5'端或3'端或两端可以被修饰，优选地，正义链的末端可以被修饰。

[0030] 胆固醇、生育酚和具有10-24个碳原子的脂肪酸包括胆固醇、生育酚和脂肪酸的类似物、衍生物和代谢物。

[0031] siRNA指双链RNA(双螺旋RNA)，当该双链RNA与靶基因存在于相同细胞中时，其可以通过介导与siRNA序列互补的mRNA的降解来减少或抑制靶基因的表达，或者siRNA指在单链RNA内具有双链区域的单链RNA。双链之间的键由核苷酸之间的氢键形成，不需要双链中的所有核苷酸彼此互补结合，并且两个链可以分开或不分开。根据一个实施方案，siRNA的长度可以是约15个至约60个核苷酸(其意指双链RNA中一条链的核苷酸的数目，即碱基对的数目，并且在单链RNA的情况下，其意指单链RNA中双链的长度)，特别是约15个至约30个核苷酸，并且更具体地是约19个至约25个核苷酸。

[0032] 根据一个实施方案，双链siRNA在3'或5'末端或两个末端具有1-5个核苷酸的突出

端。根据另一实施方案，其是平端的，在两端没有突出端。具体而言，它可以是美国专利申请公开第2002-0086356号和美国专利第7,056,704号(其通过引用并入本文)中公开的siRNA。

[0033] 另外，siRNA可以具有两条链长度相同的对称结构，或者可以具有一条链比另一条链短的非对称双链结构。具体而言，它可以是非对称siRNA(小干扰RNA)分子，其中双链由19-21个核苷酸(nt)的反义链和具有与反义互补的序列的15-19nt的正义链组成，其中反义链的5'末端是平端，并且反义链的3'末端具有1-5个核苷酸的突出端。具体而言，可以是国际公开WO2009/078685中公开的siRNA。

[0034] 在一个实施方案中，基于最终制备的组合物的总重量，阴离子药物的含量可以为0.001重量%-10重量%，特别是0.01重量%-5重量%。如果该量小于0.001重量%，则递送系统的量与药物的量相比过大，因此可能由递送系统引起副作用，如果该量超过10重量%，则胶束可能变得太大以至于胶束的稳定性可能降低，并且可能增加过滤除菌期间的损失。

[0035] 根据一个实施方案，阳离子化合物和阴离子药物通过水相中的静电相互作用形成复合物，并且该复合物通过冷冻干燥脱水以形成阴离子药物与阳离子化合物的刚性复合物。因此，阳离子化合物可以是可通过静电相互作用与阴离子药物形成复合物的脂质，并且可溶于水相。

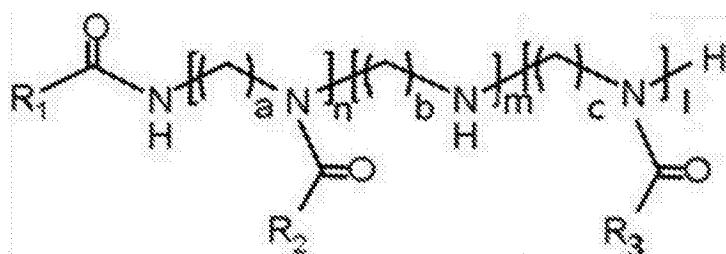
[0036] 阳离子化合物包括能够通过与阴离子药物的静电相互作用形成复合物的所有类型的化合物，并且可以是例如脂质和聚合物。阳离子脂质包括但不限于选自以下的一种或两种以上的组合：N,N-二油烯基-N,N-二甲基氯化铵(DODAC)、N,N-二硬脂基-N,N-二甲基溴化铵(DDAB)、N-(1-(2,3-二油酰氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTAP)、N,N-二甲基-(2,3-二油酰氧基)丙胺(DODMA)、N,N,N-三甲基-(2,3-二油酰氧基)丙胺(DOTMA)、1,2-二酰基-3-三甲基铵-丙烷(TAP)、1,2-二酰基-3-二甲基铵-丙烷(DAP)、3 β -[N-(N',N',N'-三甲基氨基乙烷)氨基甲酰基]胆固醇(TC-胆固醇)、3 β -[N-(N',N'-二甲基氨基乙烷)氨基甲酰基]胆固醇(DC-胆固醇)、3 β -[N-(N'-单甲氨基乙烷)氨基甲酰基]胆固醇(MC-胆固醇)、3 β -[N-(氨基乙烷)氨基甲酰基]胆固醇(AC-胆固醇)、胆固醇氨基丙烷-1-胺(COPA)、N-(N'-氨基乙烷)氨基甲酰基丙酸生育酚(AC-生育酚)和N-(N'-甲氨基乙烷)氨基甲酰丙酸生育酚(MC-生育酚)。当使用这样的阳离子脂质时，为了降低由阳离子性脂质引起的毒性，优选使用分子内具有高阳离子密度的聚阳离子性脂质，更具体而言，每分子的阳离子性脂质可具有在水性溶液中具有阳离子性的1个官能团。因此，在更优选的实施方案中，阳离子脂质可以是选自3 β -[N-(N',N',N'-三甲基氨基乙烷)氨基甲酰基]胆固醇(TC-胆固醇)、3 β -[N-(N',N'-二甲基氨基乙烷)氨基甲酰基]胆固醇(DC-胆固醇)、3 β -[N-(N'-单甲氨基乙烷)氨基甲酰基]胆固醇(MC-胆固醇)、3 β -[N-(氨基乙烷)氨基甲酰基]胆固醇(AC-胆固醇)、N-(1-(2,3-二油酰氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTAP)、N,N-二甲基-(2,3-二油酰氧基)丙胺(DODMA)、N,N-三甲基-(2,3-二油酰氧基)丙胺(DOTMA)。

[0037] 另外，阳离子脂质可以是每分子具有在水性溶液中具有阳离子性的多个官能团的脂质。具体而言，可以是选自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)、1,2-二酰基-3-三甲基铵-丙烷(TAP)、1,2-二酰基-3-二甲基铵-丙烷(DAP)。

[0038] 此外，阳离子脂质可以是其中1-12个寡聚亚烷基胺的胺官能团与具有11-25个碳原子的饱和烃或不饱和烃键合的阳离子脂质，阳离子脂质可以由以下化学式1表示。

[0039] [化学式1]

[0040]



[0041] 在式1中，

[0042] n、m和l各自为0-12, 条件是 $1 \leq n+m+1 \leq 12$; a、b和c各自为1-6; R₁、R₂和R₃各自独立地为氢或具有11-25个碳原子的饱和烃和不饱和烃, 条件是R₁、R₂和R₃中的至少一个是具有11-25个碳原子的饱和烃或不饱和烃。

[0043] 优选地, n、m和l独立地为0-7的整数, 其中 $1 \leq n+m+1 \leq 7$ 。

[0044] 优选地, a、b和c可以是2-4。

[0045] 优选地, R₁、R₂和R₃各自独立地为选自以下基团的至少一种: 月桂基、肉豆蔻基、棕榈基、硬脂基、花生基(arachidyl)、山嵛基、二十四烷基、蜡基(cerotyl)、顺-8-十四碳烯-1-基(myristoleyl)、(9Z)-9-十六碳烯-1-基(palmitoleyl)、顺-5-十六碳烯-1-基(sapienyl)、油烯基、亚油基、花生四烯基、二十碳五烯基(eicosapentaenyl)、瓢儿菜基(erucyl)、二十二碳六烯基和蜡基。

[0046] 阳离子脂质的具体实例可以为选自以下物质中的至少一种: 单油酰基三亚乙基四酰胺、二油酰基三亚乙基四酰胺、三油酰基三亚乙基四酰胺、四油酰基三亚乙基四酰胺、单亚油酰基四亚乙基五酰胺、二亚油酰基四亚乙基五酰胺、三亚油酰基四亚乙基五酰胺、四亚油酰基四亚乙基五酰胺、五亚油酰基四亚乙基五酰胺、单肉豆蔻酰二亚乙基三酰胺、二肉豆蔻酰二亚乙基三酰胺、单油酰基五亚乙基己酰胺、二油酰基五亚乙基己酰胺、三油酰基五亚乙基己酰胺、四油酰基五亚乙基己酰胺、五油酰基五亚乙基己酰胺和六油酰基五亚乙基己酰胺。

[0047] 同时, 阳离子聚合物选自壳聚糖、乙二醇壳聚糖、鱼精蛋白、聚赖氨酸、聚精氨酸、聚酰胺胺(PAMAM)、聚乙烯亚胺、葡聚糖、透明质酸、白蛋白、聚合型聚乙烯亚胺(PEI)、聚胺和聚乙烯胺(PVAm)。优选地, 它可以是选自聚合型聚乙烯亚胺(PEI)、聚胺和聚乙烯胺(PVAm)中的至少一种。

[0048] 基于最终制备的组合物的总重量, 用于本发明的阳离子化合物的含量可以为0.01重量%-50重量%, 特别是0.1重量%-10重量%。如果阳离子化合物的量小于0.01重量%, 则可能不足以与阴离子药物形成复合物, 如果其超过50重量%, 则胶束的尺寸可能变得太大, 从而可能降低胶束的稳定性并增加过滤除菌期间的损失。

[0049] 水相中阳离子化合物通过的静电相互作用与阴离子药物结合以形成复合物。

[0050] 根据具体的实施方案, 阳离子化合物(N)与阴离子药物(P)的电荷量之比(N/P:阳离子化合物的正电荷与阴离子药物的负电荷之比)为0.1-128, 具体为0.5-64, 更具体为1-32, 进一步具体为1-24, 最具体为6-24。如果该比率(N/P)小于0.1, 则阳离子化合物不能充分地与阴离子药物结合, 因此具有0.1以上的比例是有利的, 以使阳离子化合物和阴离子药物可通过静电相互作用形成包含足量阴离子药物的复合物。相反, 如果比率(N/P)超过128,

则可能诱发毒性,因此优选具有128或更小的比例。

[0051] 步骤(b)是将两亲性嵌段共聚物和任选的聚乳酸盐溶解在水性溶剂或有机溶剂中并将该溶液与步骤(a)中获得的混合物混合的步骤。

[0052] 当两亲性嵌段共聚物和任选的聚乳酸盐溶解在水性溶剂中并混合时,用于递送阴离子药物的组合物的制备在水相中进行,其中纳米颗粒形式的阴离子药物-阳离子化合物复合物被包埋在由两亲性嵌段共聚物和任选的聚乳酸盐形成的胶束结构中。

[0053] 此处,水性溶剂与步骤(a)中使用的水性溶剂相同。

[0054] 另外,两亲性嵌段共聚物可以是包含亲水性嵌段A和疏水性嵌段B的A-B型嵌段共聚物。A-B型嵌段共聚物在水性溶液中形成核-壳型聚合物胶束,其中疏水性嵌段B形成核(内壁)并且亲水性嵌段A形成壳(外壁)。

[0055] 就此而言,亲水性嵌段A可以是选自聚亚烷基二醇、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚丙烯酰胺及其衍生物中的至少一种。更具体地,亲水性嵌段A可以是选自单甲氧基聚乙二醇,单乙酰氧基聚乙二醇,聚乙二醇,聚乙二醇和丙二醇的共聚物和聚乙烯吡咯烷酮中的至少一种。亲水性嵌段A可以具有200道尔顿至50,000道尔顿、特别是1,000道尔顿至20,000道尔顿、更特别是1,000道尔顿至5,000道尔顿的数均分子量。

[0056] 此外,如果需要,可以将能够到达特定组织或细胞的官能团或配体或能够促进细胞内递送的官能团化学缀合至亲水性嵌段A的末端以控制体内由两亲性嵌段共聚物和任选的聚乳酸盐形成的聚合物胶束递送系统的分布,或增加聚合物胶束递送系统的细胞内递送效率。官能团或配体可以是选自单糖、多糖、维生素、肽、蛋白质和细胞表面受体抗体中的至少一种。更具体地,官能团或配体可以是选自茴香酰胺、维生素B9(叶酸)、维生素B12、维生素A、半乳糖、乳糖、甘露糖、透明质酸、RGD肽、NGR肽、转铁蛋白、转铁蛋白受体的抗体等。

[0057] 疏水性嵌段B是具有生物相容性和生物降解性的聚合物,并且其可以是选自聚酯、聚酸酐、聚氨基酸、聚原酸酯和聚磷腈中的至少一种。更具体地,疏水性嵌段B可以是选自聚丙交酯、聚乙交酯、聚己内酯、聚二氧化杂环己烷-2-酮、聚丙交酯和乙交酯的共聚物、聚丙交酯和聚二氧化杂环己烷-2-酮的共聚物、聚丙交酯和聚己内酯共聚物、以及聚乙交酯和聚己酸内酯的共聚物。根据另一实施方案,疏水性嵌段B可具有50道尔顿至50,000道尔顿、特别是200道尔顿至20,000道尔顿、更具体为1,000道尔顿至5,000道尔顿的数均分子量。另外,为了提高疏水性嵌段的疏水性并由此提高胶束的稳定性,可以将生育酚、胆固醇或具有10-24个碳原子的脂肪酸与疏水性嵌段末端的羟基化学缀合。

[0058] 基于组合物的总干重,包括亲水性嵌段(A)和疏水性嵌段(B)的两亲性嵌段共聚物的含量可以为40重量%-99.98重量%,具体为85重量%-99.8重量%,更具体为90重量%-99.8重量%。如果两亲性嵌段共聚物的量小于40重量%,则胶束的尺寸可能变得太大,以致胶束的稳定性可能降低并且可能增加过滤除菌过程中的损失,并且如果该量超过99.98重量%,则能够掺入的阴离子药物的量可能变得太小。

[0059] 此外,对于两亲性嵌段共聚物,基于共聚物的重量,亲水性嵌段(A)和疏水性嵌段(B)的组成比例可以为40-70重量%,特别是50-60重量%。如果亲水性嵌段(A)的比例小于40重量%,则可能因为聚合物在水中的溶解度低而难以形成胶束,因此,优选亲水性嵌段(A)为40重量%以上,使得共聚物在水中的溶解度足以形成胶束。相反,如果其超过70重量%,则亲水性可能太高,从而降低了聚合物胶束的稳定性,因此难以将其用作阴离子药

物/阳离子化合物复合物的增溶组合物。因此,考虑到胶束的稳定性,优选亲水性嵌段(A)的比例为70重量%以下。

[0060] 疏水性嵌段B的末端羟基可以被选自胆固醇、生育酚和具有10-24个碳原子的脂肪酸中的至少一种修饰。

[0061] 另外,聚乳酸盐(例如PLA_n)可以作为独立于两亲性嵌段共聚物的组分包含在胶束的内壁中,并分布在胶束的核心(内壁)中以增强疏水性从而稳定胶束,同时,它起到有效避开体内网状内皮系统(RES)的作用。即,聚乳酸盐的羧酸阴离子比聚乳酸更有效地与阳离子复合物结合,以降低聚合物胶束的表面电位,从而与不含聚乳酸盐的聚合物胶束相比降低表面电位的正电荷,因此较少被网状内皮系统捕获。因此,具有对期望部位(例如癌细胞、炎性细胞等)的递送效率优异的优点。

[0062] 聚乳酸盐优选具有500道尔顿至50,000道尔顿、特别是1,000道尔顿至10,000道尔顿的数均分子量。如果分子量小于500道尔顿,则疏水性太低,使得其难以存在于胶束的核心(内壁)中,如果分子量超过50,000道尔顿,则存在聚合物胶束的粒径变大的问题。

[0063] 基于100重量份的两亲性嵌段聚合物,聚乳酸盐可以以1-200重量份、具体地10-100重量份、更特别地30-60重量份的量使用。如果基于100重量份的两亲性嵌段聚合物,聚乳酸盐的量超过200重量份,则胶束的尺寸增大,因此使用无菌膜的过滤可能变得困难;如果该量小于1重量份,则不能充分获得所期望的胶束稳定效果和通过增强疏水性有效避开网状内皮系统的效果。

[0064] 根据一个实施方案,基于1重量份的阴离子药物,两亲性嵌段共聚物的用量可以是10-1,000重量份,聚乳酸盐的用量可以是5-500重量份。优选两亲性嵌段共聚物的用量可以为50-800重量份,更优选为100-500重量份。优选地,聚乳酸盐的用量可以为10-300重量份,更优选为50-100重量份。

[0065] 根据一个优选的实施方案,本发明的聚乳酸盐可以是选自以下化学式2-7表示的化合物的至少一种:

[0066] [化学式2]

[0067] RO-CHZ-[A]_n-[B]_m-COOM

[0068] 在式2中,A为-COO-CHZ-;B为-COO-CHY-、-COO-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-或-COO-CH₂CH₂OCH₂;R是氢原子或乙酰基、苯甲酰基、癸酰基、棕榈酰基、甲基或乙基;Z和Y各自为氢原子或甲基或苯基;M为Na、K或Li;n为1-30的整数;m为0-20的整数;

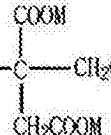
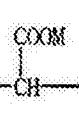
[0069] [化学式3]

[0070] RO-CHZ-[COO-CHX]_p-[COO-CHY']_q-COO-CHZ-COOM

[0071] 在式3中,X为甲基;Y'为氢原子或苯基;p为0-25的整数,q为0-25的整数,条件是p+q为5-25的整数。R为氢原子或乙酰基、苯甲酰基、癸酰基、棕榈酰基、甲基或乙基;M为Na、K或Li;Z为氢原子、甲基或苯基;

[0072] [化学式4]

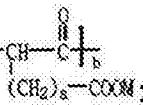
[0073] RO-PAD-COO-W-M'

[0074] 在式4中,W-M'为或;PAD选自D,L-聚乳酸、D-聚乳

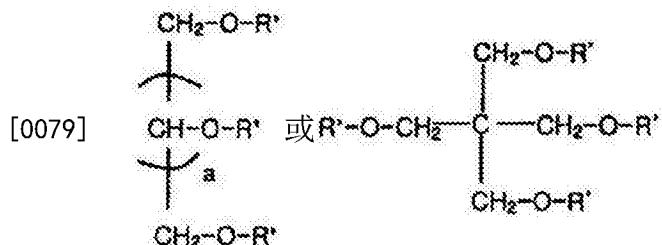
酸、聚扁桃酸、D,L-乳酸和乙醇酸的共聚物、D,L-乳酸和扁桃酸的共聚物、D,L-乳酸和己内酯的共聚物以及D,L-乳酸和1,4-二噁烷-2-酮的共聚物；R为氢原子或乙酰基、苯甲酰基、癸酰基、棕榈酰基、甲基或乙基；M独立地为Na、K或Li；

[0075] [化学式5]

[0076] S-O-PAD-COO-Q

[0077] 在式5中，S为，L为-NR₁-或-O-，其中R₁为氢原子或C₁-10烷基；Q为CH₃、CH₂CH₃、CH₂CH₂CH₃、CH₂CH₂CH₂CH₃或CH₂C₆H₅；a为0-4的整数；b为1-10的整数；M为Na、K或Li；PAD为选自D,L-聚乳酸、D-聚乳酸、聚扁桃酸、D,L-乳酸和乙醇酸的共聚物、D,L-乳酸和扁桃酸的共聚物、D,L-乳酸和己内酯的共聚物以及D,L-乳酸和1,4-二噁烷-2-酮的共聚物中的至少一种；

[0078] [化学式6]



[0080] 在式6中，R'为-PAD-O-C(0)-CH₂CH₂-C(0)-OM，PAD选自D,L-聚乳酸、D-聚乳酸、聚扁桃酸、D,L-乳酸和乙醇酸的共聚物、D,L-乳酸和扁桃酸的共聚物、D,L-乳酸和己内酯的共聚物以及D,L-乳酸和1,4-二噁烷-2-酮的共聚物；M为Na、K或Li；a为1-4的整数；

[0081] [化学式7]

[0082] YO-[C(0)-(CHX)_a-O-]_m-C(0)-R-C(0)-[-O-(CHX')_b-C(0)-]_n-OZ

[0083] 在式7中，X和X'独立地为氢、具有1-10个碳原子的烷基或具有6-20个碳原子的芳基；Y和Z独立地为Na、K或Li；m和n独立地为0-95的整数，条件是5<m+n<100；a和b独立地为1-6的整数；R为-(CH₂)_k-、具有2-10个碳原子的二价烯基、具有6-20个碳原子的二价芳基或它们的组合，其中k为0-10的整数。

[0084] 聚乳酸盐优选为由化学式2或化学式3表示的化合物。

[0085] 根据具体实施方案，两亲性嵌段共聚物通过形成胶束壁（任选地与聚乳酸盐一起），使阴离子药物与阳离子化合物的复合物在水溶液中被包埋在胶束结构内，其中阴离子药物与阳离子化合物的复合物(a)的重量与两亲性嵌段共聚物(b)的重量之比[a/b×100；(阴离子药物的重量+阳离子化合物的重量)/两亲性嵌段共聚物的重量×100]可以为0.001重量%-100重量%，具体为0.01重量%-50重量%，更具体为0.1重量%-10重量%。如果该重量比小于0.001重量%，则阴离子药物与阳离子脂质的复合物的量可能变得太低，因此可能难以满足阴离子药物可有效发挥作用的有效量。相反，如果超过100重量%，考虑到两亲性嵌段共聚物的分子量和阴离子药物与阳离子化合物的复合物的量，可能不能形成适当大小的胶束结构。

[0086] 根据本发明的一个实施方案，制备方法可以进一步包括步骤(c)：在0℃-50℃的温度下将步骤(b)中获得的混合物稳定5分钟至60分钟。可以通过使混合物静置或通过搅拌进

行稳定。稳定条件可以优选为0°C-50°C,更具体为4°C-30°C,持续5分钟-1小时,更具体为10分钟-30分钟,但不限于此。如果时间少于5分钟,则复合物不稳定,如果超过1小时,则可能会产生复合物的沉淀。

[0087] 同时,根据另一实施方案,制备本发明的用于递送阴离子药物的组合物的方法包括:

[0088] (a') 将阴离子药物和阳离子化合物独立地溶解在水性溶剂中并混合,然后冷冻干燥;

[0089] (b-1) 将步骤(a')中获得的冷冻干燥产物溶解在有机溶剂中;

[0090] (b-2) 将步骤(b-1)中获得的溶液与水性溶剂混合;以及

[0091] (b-3) 从步骤(b-2)中获得的混合物中除去有机溶剂。

[0092] 此处,两亲性嵌段共聚物和任选的聚乳酸盐可以溶解在步骤(b-1)的有机溶剂中或步骤(b-2)的水性溶剂中。

[0093] 在步骤(a')中,通过将阴离子药物和阳离子化合物独立地溶解在水性溶剂中,随后混合,并进行冷冻干燥得到混合物。在步骤(a')中,通过静电相互作用有效地形成复合物,并且由此形成的复合物的结合强度在通过冷冻干燥去除水的过程中得到增加。

[0094] 此外,在步骤(b-1)中,将干燥的纳米颗粒复合物溶解在有机溶剂中,并且此处使用的有机溶剂可以是选自丙酮、乙醇、甲醇、二氯甲烷、氯仿、二氧杂环己烷、二甲基亚砜、乙腈、乙酸乙酯和乙酸中的至少一种。优选地,它可以是选自乙醇、二甲基亚砜、乙酸乙酯和乙酸中的至少一种。

[0095] 有机溶剂可以包括促融合脂质。促融合脂质可以为选自以下物质中的至少一种:二月桂酰磷脂酰乙醇胺、二肉豆蔻酰磷脂酰乙醇胺、二棕榈酰磷脂酰乙醇胺、二硬脂酰磷脂酰乙醇胺、二油酰磷脂酰乙醇胺、二亚油酰磷脂酰乙醇胺、1-棕榈酰-2-油酰磷脂酰乙醇胺、1,2-二植烷酰-3-sn-磷脂酰乙醇胺、二月桂酰磷脂酰胆碱、二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱、二棕榈酰磷脂酰胆碱、二硬脂酰磷脂酰胆碱、二油酰磷脂酰胆碱、二亚油酰磷脂酰胆碱、1-棕榈酰-2-油酰磷脂酰胆碱、1,2-二植烷酰-3-sn-磷脂酰胆碱、二月桂酰磷脂酸、二肉豆蔻酰磷脂酸、二棕榈酰磷脂酸、二硬脂酰磷脂酸、二油酰磷脂酸、二亚油酰磷脂酸、1-棕榈酰-2-油酰磷脂酸、1,2-二植烷酰-3-sn-磷脂酸、胆固醇和生育酚。

[0096] 步骤(b-2)是通过使步骤(b-1)中获得的溶液在水性溶剂中混合将纳米颗粒形式的阴离子药物-阳离子化合物的混合物包埋在由两亲性嵌段共聚物和任选的聚乳酸盐形成的胶束结构内,其中所使用的水性溶剂可以是蒸馏水、注射用水或缓冲液。对所使用的水性溶剂的量没有特别限制,相对于步骤(b-1)的有机溶剂的量并以体积计,水性溶剂的量可以为例如1-10倍、更具体为1-5倍,但是不限于此。

[0097] 此外,步骤(b-1)或(b-2)中使用的两亲性嵌段共聚物和聚乳酸盐可以是相同种类,并且可以与上述的两亲性嵌段共聚物和聚乳酸盐相同的量使用。

[0098] 此外,在步骤(b-3)中,通过蒸发除去在步骤(b-2)中制备的混合物中的有机溶剂以获得聚合物胶束的水性溶液。

[0099] 此外,根据一个优选的实施方案,本发明的制备方法可以在步骤(b-3)之后进一步包括步骤(d):通过添加冷冻干燥助剂进行冷冻干燥。

[0100] 根据另一实施方案,本发明的制备方法可在步骤(d)的冷冻干燥之前进一步包括

使用除菌过滤器对步骤(b-3)中获得的聚合物胶束的水性溶液进行除菌。

[0101] 可以添加本发明的实施方案中使用的冷冻干燥助剂以使冷冻干燥的组合物保持块状形式或在冷冻干燥后的复原期间帮助在短时间内均匀地溶解两亲性嵌段共聚物组合物,具体而言,冷冻干燥助剂可以是选自乳糖、甘露糖醇、山梨糖醇和蔗糖中的至少一种。基于组合物的总干重,冷冻干燥助剂的量可以为1重量%-90重量%,更具体为10重量%-60重量%。

[0102] 根据本发明的制备方法的实施方案,使阴离子药物和阳离子化合物在水相中形成复合物,从而通过静电相互作用有效地形成纳米颗粒复合物。而且,在通过冷冻干燥去除水性溶液的过程中结合力增加,由此大大增加了最终制备的聚合物胶束的产率。此外,由于使用相对少量的有机溶剂,所述制备方法不仅对环境友好,而且通过防止由于阳离子脂质粘附于制造装置、容器等的倾向导致的组成比变化而保持再现性,并且非常易于生产。此外,通过形成复合物将阴离子药物转化为疏水性药物颗粒,可以容易地进行大量生产。

[0103] 另外,在根据本发明的实施方案制备的组合物中,由于阴离子药物和阳离子化合物的复合物保持包埋在由两亲性嵌段共聚物和任选地聚乳酸盐形成的胶束结构内部的状态,其在血液或体液中的稳定性增强。

[0104] 同时,根据另一实施方案,本发明涉及包含通过上述制备方法制备的聚合胶束的用于递送阴离子药物的组合物。

[0105] 根据本发明的制备方法,阴离子药物通过静电相互作用与阳离子化合物结合形成阴离子药物-阳离子化合物复合物,并制备由两亲性嵌段聚合物和任选的聚乳酸盐形成的聚合物胶束结构,其中复合物被包埋在胶束结构内。根据本发明一个实施方案制备的聚合物胶束递送系统的示意结构示于图1。

[0106] 如图1所示,由两亲性嵌段聚合物和任选的聚乳酸盐形成的胶束结构具有将阴离子药物和阳离子化合物的复合物包埋在形成的胶束内部的结构,其中两亲性嵌段共聚物的亲水性部分形成胶束的外壁,两亲性嵌段共聚物的疏水部分和作为独立组分而包含的聚乳酸盐形成胶束的内壁。

[0107] 与作为该组合物的构成成分的阴离子药物、阳离子化合物、两亲性嵌段聚合物、聚乳酸盐等有关的公开内容与本发明的制造方法中描述的内容相同。

[0108] 根据优选的实施方案,组合物中胶束的粒径可以为10-200nm,更具体地为10-100nm。此外,胶束颗粒的标准电荷为-20mV至20mV,更具体为-10mV至10mV。考虑到胶束结构的稳定性、构成成分的含量以及阴离子药物在体内的吸收和稳定性,所述粒径和标准电荷是优选的。

[0109] 根据本发明的实施方案,包含包埋在两亲性嵌段共聚物和任选的聚乳酸盐形成的胶束结构中的阴离子药物-阳离子化合物复合物的组合物可通过静脉内、肌肉内、皮下、口服、骨内、透皮、局部等方式施用,并且可将其制造成适用于施用途径的各种口服或肠胃外制剂。口服制剂的实例包括片剂、胶囊剂、粉剂和溶液,肠胃外制剂的实例包括滴眼剂、注射剂等。在一个优选的实施方案中,该制剂可以是注射制剂。例如,在将组合物冷冻干燥的情况下,可以使用注射用蒸馏水、0.9%盐水溶液、5%右旋糖水溶液等进行复原,从而将其制备成注射制剂形式。

[0110] 实施方案的详细描述

[0111] 以下,通过实施例对本发明进行详细说明。然而,这些实施例仅用于说明本发明,本发明的范围不以任何方式限制于此。

[0112] 比较例1.制备含有siRNA/1,6-二油酰三亚乙基四酰胺(dio-TETA)/mPEG-PLA-生育酚(2k-1.7k)/PLANa(1.7k)的组合物

[0113] 将126 μ g 1,6dioTETA溶于6.3 μ l氯仿中,并将5 μ g siRNA溶于4 μ l蒸馏水中。将0.5mg PLANa(1.7k)溶于10 μ l氯仿中,并将1mg mPEG-PLA-生育酚(2k-1.7k)溶于20 μ l氯仿中。加入3.7 μ l氯仿,使得有机层与水层的整体体积比为10倍。向4 μ l溶解有1mg mPEG-PLA-生育酚的氯仿的溶液(相当于0.2mg mPEG-PLA-生育酚(20重量%))中加入44 μ l氯仿,并将混合物加入到单颈圆底烧瓶中,并使用旋转蒸发器在减压下蒸馏除去溶剂。

[0114] 将dioTETA溶液、PLANa溶液和0.8mg mPEG-PLA-生育酚溶液混合,并使用超声波发生器制备乳液,同时滴加siRNA水性溶液。将该乳液加入到涂有0.2mg mPEG-PLA-生育酚的单颈圆底烧瓶中,并使用旋转蒸发器在减压下蒸馏除去溶剂。向烧瓶中加入100 μ l蒸馏水,轻轻振荡使其溶解,从而制备含有siRNA/dioTETA/mPEG-PLA-生育酚(2k-1.7k)/PLANa的组合物(比较例1)。

[0115] 比较例2-3.制备含有siRNA/1,6-二油酰基三亚乙基四酰胺(dio-TETA)/mPEG-PLA-生育酚(2k-1.7k)/DOPE/(PLANa)的组合物

[0116] 除了改变组成比之外,以与比较例1中相同的方式制备比较例2和3。将5 μ g siRNA溶解于4 μ l蒸馏水中,将除siRNA之外的组合物溶解于氯仿中,使得有机层与水层的比例为10倍。在比较例2的情况下,将94.5 μ g 1,6-dioTETA溶于5 μ l氯仿中,将1mg mPEG-PLA-生育酚(2k-1.7k)溶解于20 μ l氯仿中,将104 μ g DOPE溶于5.2 μ l氯仿中,并加入9.8 μ l氯仿。在比较例3的情况下,将94.5 μ g的1,6-dioTETA溶于5 μ l氯仿中,将1mg mPEG-PLA-生育酚(2k-1.7k)溶于20 μ l氯仿中,将0.3mg PLANa溶于9.8 μ l氯仿中,并将104 μ g DOPE溶于5.2 μ l氯仿中。向4 μ l溶解有1mg mPEG-PLA-生育酚的氯仿的溶液(相当于0.2mg mPEG-PLA-生育酚(20重量%))中加入44 μ l氯仿,并将混合物加入到单颈圆底烧瓶中,并使用旋转蒸发器在减压下蒸馏除去溶剂。

[0117] 将dioTETA溶液、0.8mg mPEG-PLA-生育酚溶液和(或)PLANa溶液或DOPE溶液混合,并使用超声发生器制备乳液,同时滴加siRNA水性溶液。将该乳液加入到涂有0.2mg mPEG-PLA-生育酚的单颈圆底烧瓶中,并使用旋转蒸发器在减压下蒸馏除去溶剂。向培养瓶中加入100 μ l蒸馏水,轻轻振荡使其溶解,从而制备含有siRNA/dioTETA/mPEG-PLA-生育酚(2k-1.7k)/DOPE的组合物(比较例2)、含有siRNA/dioTETA/mPEG-PLA-生育酚(2k-1.7k)/PLANa/DOPE的组合物(比较例3)。

[0118] 表1

[0119]

	组合物	比例	siRNA	脂质	聚合物1	聚合物2	促融合脂质
比较例1	siRNA/dioTETA/mPE G-PLA- 生育酚 (2k-1.7k)/PLANa(1.7k)	5-24-1-0.5	5 μg	150 μg	1 mg	0.5 mg	0 mg
比较例2	siRNA/dioTETA/mPE G-PLA- 生育酚 (2k-1.7k)/DOPE	5-18-1-1	5 μg	94.5 μg	1 mg	0 mg	104.2 mg
比较例3	siRNA/dioTETA/mPE G-PLA- 生育酚 (2k-1.7k)/PLANa (1.7K)/DOPE	5-18-1-0.3-1	5 μg	150 μg	1 mg	0.3 mg	104.2 mg

[0120] (组成比中各组分的单位如下: siRNA:μg, 脂质:N/P比, 聚合物:mg, 促融合脂质与脂质的摩尔比。聚合物1指mPEG-PLA-生育酚, 聚合物2指PLANa。同样适用于下表。)

[0121] 实施例1-2. 制备含有siRNA/1,6-dioTETA/mPEG-PLA-生育酚(2k-1.7k)/PLANa(1.7k)的组合物(水相中制剂的制备)

[0122] 将126μg dioTETA溶于252μl蒸馏水中, 然后放入超声波清洗机中10分钟以减小粒度。将5μg siRNA溶于4μl蒸馏水中, 并将1mg mPEG-PLA-生育酚(2k-1.7k)和500μg PLANa(1.7k)分别溶于10μl和2μl蒸馏水中。首先将siRNA和1,6-dioTETA混合, 然后将mPEG-PLA-生育酚和PLANa混合。加入蒸馏水使体积比为1:1。在超声下将siRNA和1,6-dioTETA的混合物以及mPEG-PLA-生育酚和PLANa的混合物逐滴混合。在4℃下保持10分钟以稳定制剂后, 将混合物通过0.45μm亲水性PVDF过滤器过滤以除去大颗粒。(实施例1)

[0123] 在实施例2中, 根据实施例1中的方法, 用500μg mPEG-PLA-生育酚(2k-1.7k)和100μg PLANa(1.7k)制备组合物。

[0124] 表2

[0125]

	组合物	比例	siRNA	脂质	聚合物1	聚合物2
实施例1	siRNA/dioTETA/mPEG-P LA- 生育酚 (2k-1.7k)/PLANa(1.7k)	5-24-1-0.5	5 μg	126 μg	1 mg	0.5 mg
实施例2	siRNA/dioTETA/mPEG-P LA- 生育酚 (2k-1.7k)/PLANa(1.7k)	5-24-0.5-0.1	5 μg	126 μg	0.5 mg	0.1 mg

[0126] 实施例3. 制备含有siRNA/1,6-dioTETA/mPEG-PLA-生育酚(2k-1.7k)/PLANa(1.7k)的组合物(在水相中形成siRNA/dioTETA纳米颗粒并将其包埋在乳液中的聚合物胶束中的制备方法)

[0127] 将5 μ g siRNA溶解于4 μ l蒸馏水中,将126 μ g dioTETA溶解于126 μ l蒸馏水中,然后在超声下逐滴混合。将该混合物冷冻干燥至粉末状态,并将粉末溶解于由300 μ g PLAna溶于50 μ l乙酸乙酯形成的溶液中。将由1mg mPEG-PLA-生育酚(2k-1.7k)溶于100 μ l蒸馏水形成的溶液滴加到siRNA、dioTETA和PLAna的混合物中以使用超声发生器制备乳液。将制备的乳液置于单颈圆底烧瓶中,使用旋转蒸发器在减压下蒸馏以选择性地除去乙酸乙酯以制备含有siRNA/1,6-二油酰三亚乙基四酰胺(dio-TETA)/mPEG-PLA-生育酚(2k-1.7k)/PLAna的聚合物胶束。

[0128] 实施例4-6.制备含有siRNA/1,6-dioTETA/mPEG-PLA-生育酚(2k-1.7k)/PLAna(1.7k)的组合物(在水相中形成siRNA/dioTETA纳米颗粒并将其包埋在乳液中的聚合物胶束中的制备方法)

[0129] 以类似于实施例3的方式制备含有siRNA/dioTETA/mPEG-PLA-生育酚(2k-1.7k)/PLAna(1.7k)的组合物,条件是改变组合物的混合顺序。溶剂的组成、种类和数量以及制备步骤相同,但根据溶解组合物的溶剂将以下实施例进行划分。在将siRNA和dioTETA粉末溶于含有mPEG-PLA-生育酚(2k-1.7k)的乙酸乙酯中后,使用溶解有PLAna的蒸馏水制备复合物乳液(实施例4)。在将粉末溶于乙酸乙酯(实施例5)后,通过使用溶解有mPEG-PLA-生育酚(2k-1.7k)和PLAna的蒸馏水制备复合物乳液。另外,在将粉末溶解在含有mPEG-PLA-生育酚(2k-1.7k)和PLAna的乙酸乙酯中后,使用蒸馏水制备复合物乳液(实施例6)。

[0130] 表3

[0131]

	组合物	比例	siRNA	脂质	聚合物1	聚合物2
实施例3-6	siRNA/dioTETA/mPE G-PLA- 生 育 酚 (2k-1.7k)/PLAna(1.7k)	5-24-1-0.3	5 μ g	126 μ g	1mg	0.3mg

[0132] 实施例7-12.制备含有siRNA/1,6-dioTETA/mPEG-PLA-生育酚(2k-1.7k)/PLAna(1.7k)的组合物(在水相中形成siRNA/dioTETA纳米颗粒并将其包埋于乳液中的聚合物胶束中的制备方法)

[0133] 除了使用不同的组合物外,以与实施例3相同的方式制备含有siRNA/dioTETA/mPEG-PLA-生育酚(2k-1.7k)/PLAna(1.7k)的组合物。

[0134] 实施例7-12中获得的组合物总结于下表4中:

[0135] 表4

[0136]

	组合物	比例	siRNA	脂质	聚合物 1	聚合物 2
实施例 7	siRNA/dioTETA/mPEG-PLA-生育酚(2k-1.7k)/PLANa(1.7k)	5-24-2-0.3	5 μg	126 μg	2 mg	0.3 mg
实施例 8	siRNA/dioTETA/mPEG-PLA-生育酚(2k-1.7k)/PLANa(1.7k)	5-24-0.5-0.3	5 μg	126 μg	0.5 mg	0.3 mg
实施例 9	siRNA/dioTETA/mPEG-PLA-生育酚(2k-1.7k)/PLANa(1.7k)	5-18-1-0.1	5 μg	95 μg	1 mg	0.1 mg
实施例 10	siRNA/dioTETA/mPEG-PLA-生育酚(2k-1.7k)/PLANa(1.7k)	5-18-0.5-0.1	5 μg	95 μg	0.5 mg	0.1 mg
实施例 11	siRNA/dioTETA/mPEG-PLA-生育酚(2k-1.7k)/PLANa(1.7k)	5-12-1-0.05	5 μg	63 μg	1 mg	0.05 mg
实施例 12	siRNA/dioTETA/mPEG-PLA-生育酚(2k-1.7k)/PLANa(1.7k)	5-12-0.5-0.05	5 μg	63 μg	0.5 mg	0.05 mg

[0137] 实施例13-14.制备含有siRNA/1,6-dioTETA/mPEG-PLA-生育酚(2k-1.7k)/DOPE的组合物(在水相中形成siRNA/dioTETA纳米颗粒并将其包埋于乳液中的聚合物胶束中的制备方法)

[0138] 除了使用不同的组合物之外,以与实施例6相同的方式制备含有siRNA/dioTETA/mPEG-PLA-生育酚(2k-1.7k)/DOPE的组合物。

[0139] 实施例13和14中获得的组合物总结于下表5中:

[0140] 表5

	组合物	比例	siRNA	脂质	聚合物 1	促融合脂质
[0141]	实施例 13	siRNA/dioTETA/mPEG-PLA-生育酚(2k-1.7k)/DOPE	5-18-1-0.5	5 μg	95 μg	1 mg
[0142]	实施例 14	siRNA/dioTETA/mPEG-PLA-生育酚(2k-1.7k)/DOPE	5-18-1-1	5 μg	95 μg	1 mg

[0143] 实施例15-16.制备含有siRNA/1,6-d 10TETA/mPEG-PLA-生育酚(2k-1.7k)/PLANa(1.7K)/DOPE的组合物(在水相中形成siRNA/dioTETA纳米颗粒并将其包埋于乳液中的聚合

物胶束中的制备方法)

[0144] 除了使用不同的组合物之外,以与实施例6相同的方式制备含有siRNA/dioTETA/mPEG-PLA-生育酚(2k-1.7k)/PLANa(1.7K)/DOPE的组合物。

[0145] 实施例15和16中获得的组合物总结于下表6中:

[0146] 表6

[0147]

	组合物	比例	siRNA	脂质	聚合物1	聚合物2	促融合脂质
实施例15	siRNA/dioTETA/mPEG-PLA - 生育酚 (2k-1.7k)/PLANa(1.7k)/DOPE	5-18-1-0.1 _1	5μg	95μg	1mg	0.1mg	104μg
实施例16	siRNA/dioTETA/mPEG-PLA - 生育酚 (2k-1.7k)/PLANa(1.7k)/DOPE	5-18-1-0.3 _1	5μg	95μg	1mg	0.3mg	104μg

[0148] 实验例1.根据制备方法比较聚合物胶束的siRNA含量

[0149] 称量siRNA含量以确认纳米颗粒的产率如何根据每种制备方法和组成进行变化。

[0150] 使用改进的Bligh&Dyer提取方法对制备的聚合物胶束中的siRNA的量进行定量。将聚合物胶束溶于50mM磷酸钠和75mM NaCl (pH 7.5) 中以形成Bligh-Dyer单相,并用100mM 磷酸钠、150mM NaCl (pH 7.5) 和氯仿萃取以使用Ribogreen试剂(Invitrogen) 定量水性溶液中的siRNA。

[0151] 下表7中显示按照以下制备方法制备的siRNA/dioTETA/mPEG-PLA-生育酚(2k-1.7k)/PLANa(1.7k) 聚合物胶束的siRNA含量:在水相中制备制剂,并在水相中形成siRNA/dioTETA纳米颗粒,随后将其包埋在聚合物胶束中。

[0152] 表7

[0153]

	制备方法	比例	siRNA含量(%)
比较例1	使用水混溶性溶剂的制备方法	5-24-1-0.5	42
实施例1	使用水相的制备方法	5-24-1-0.5	72
实施例2		5-24-0.5-0.1	82
实施例3	在水相中形成siRNA/dioTETA纳米颗粒并将其包埋于乳液中的聚合物胶束中的制备方法	5-24-1-0.3	63
实施例4		5-24-1-0.3	61
实施例5		5-24-1-0.3	71
实施例6		5-24-1-0.3	60

[0154] 下表8中显示根据以下制备方法制备的具有不同组成的实施例7-12的siRNA含量:在水相中形成siRNA/dioTETA纳米颗粒并将其包埋于乳液中的聚合物胶束中。

[0155] 表8

	组合物	比例	siRNA 含量(%)
[0156]	siRNA/dioTETA/mPEG-PLA-生育酚(2k-1.7k)/PLANa(1.7k)	5-24-2-0.3	70
		5-24-0.5-0.3	69
		5-18-1-0.1	50
		5-18-0.5-0.1	54
		5-12-1-0.02	42
		5-12-0.5-0.02	44

[0157] 下表9中显示根据以下制备方法制备的具有不同组成的实施例13-16的siRNA含量:在水相中形成siRNA/dioTETA纳米颗粒并将其包埋于乳液中的聚合物胶束中。

[0158] 表9

	组合物	比例	siRNA 含量 (%)
[0159]	siRNA/dioTETA/mPEG-PLA-生育酚(2k-1.7k)/DOPE	8-18-1-1	52
		5-18-1-0.5	62
		5-18-1-1	67
[0160]	siRNA/dioTETA/mPEG-PLA-生育酚(2k-1.7k)/PLANa(1.7K)/DOPE	5-18-1-0.3-1	60
		5-18-1-0.1-1	85
[0160]	实施例 16	5-18-1-0.3-1	89

[0161] 如表7、表8和表9所示,根据本发明的制备方法的实施方案制备的

[0162] 实施例1-16的组合物的siRNA含量显著优于比较例的siRNA含量。这样的结果表明,在水相中形成siRNA/dioTETA纳米颗粒的方法增强了siRNA与阳离子脂质之间的有效相互作用,从而有效地将siRNA包埋在胶束中。

[0163] 比较例4.制备含有siRNA/1,6-dioTETA/mPEG-PLA-生育酚(2k-1.7k)的组合物(制备复合物乳液的方法)

[0164] 将126 μ g dioTETA溶于氯仿中,并将5 μ g siRNA溶于蒸馏水中。将1mg mPEG-PLA-生育酚(2k-1.7k)溶于氯仿中。将dioTETA和mPEG-PLA-生育酚混合,使用超声波发生器制备乳剂,同时滴加siRNA。使用超声波发生器制备复合物乳液,同时将乳液加入蒸馏水中。将复合物乳液置于单颈圆底烧瓶中,使用旋转蒸发器通过减压蒸馏除去氯仿以制备含有siRNA/dioTETA/mPEG-PLA-生育酚(2k-1.7k)的组合物。

[0165] 表10

[0166]

	组合物	比例	siRNA	脂质	聚合物
比较例4	siRNA/1,6-dioTETA/mPEG-PLA-生育酚(2k-1.7k)	5-24-1	5 μ g	126 μ g	1mg

[0167] 实施例17.制备含有siRNA/1,6-dioTETA/mPEG-PLA-生育酚(2k-1.7k)的组合物(在水相中形成siRNA/dioTETA纳米颗粒并将其包埋在乳液中的聚合物胶束中的制备方法)

[0168] 将5 μ g siRNA溶解于4 μ l蒸馏水中,将126 μ g dioTETA溶解于126 μ l蒸馏水中,然后在超声下逐滴混合。将混合物冷冻干燥至粉末状,并将粉末溶于50 μ l乙酸乙酯中。将由1mg mPEG-PLA-生育酚(2k-1.7k)溶于100 μ l蒸馏水形成的溶液滴加到siRNA、dioTETA和PLA的混合物中以使用超声发生器制备乳剂。将制备的乳液置于单颈圆底烧瓶中,使用旋转蒸发器在减压下蒸馏以选择性地除去乙酸乙酯以制备含有siRNA/1,6-二油酰三亚乙基四胺(dio-TETA)/mPEG-PLA-生育酚(2k-1.7k)的聚合物胶束。

[0169] 表11

[0170]

	组合物	比例	siRNA	脂质	聚合物1
实施例 17	siRNA/dioTETA/mPEG-PLA -生育酚(2k-1.7k)	5-24-1	5 μ g	126 μ g	1 mg

[0171] 实验例2.根据siRNA/1,6-dioTETA/mPEG-PLA-生育酚(2k-1.7k)聚合物胶束的制备方法比较siRNA含量

[0172] 对siRNA含量进行定量以确认纳米颗粒的产率如何根据每种制备方法进行变化。

[0173] 使用改进的Bligh&Dyer提取方法对所制备的包含siRNA/dioTETA/mPEG-PLA-生育酚(2k-1.7k)的聚合物胶束中的siRNA的量进行定量。将聚合物胶束溶于50mM磷酸钠和75mM NaCl(pH 7.5)中以形成Bligh-Dyer单相,并用100mM磷酸钠、150mM NaCl(pH 7.5)和氯仿萃取以使用Ribogreen试剂(Invitrogen)定量水性溶液中的siRNA。

[0174] 下表12中显示比较例4和实验例17的胶束中包埋的siRNA含量的比较结果。

[0175] 表12

[0176]

	制备方法	比例	siRNA 含量(%)
比较例 4	使用复合物乳液的制备	5-24-1	50
实施例 17	在水相中形成 siRNA/dioTETA 纳米颗粒并将其包埋于乳液中的聚合物胶束中的制备方法	5-24-1	72

[0177] 如表12所示,根据本发明的制备方法的实施方案制备的实施例17的siRNA含量显著优于比较例。

[0178] 实验例3.聚合物胶束的稳定性比较(肝素竞争测定)

[0179] 进行肝素竞争测定以根据每种制备方法和组成研究体外稳定性。用40 μ g肝素处理10 μ l制剂(300ng siRNA)并使其在室温下反应10分钟。然后,通过电泳测量解离的siRNA。当siRNA解离降低时,制剂具有更高的稳定性,并且根据组成比的稳定性比较示于下表13中。

[0180] 表13

[0181]

	制备方法	比例	siRNA 解离(%)
比较例 1	使用水混溶性溶剂的制备方法	5-24-1-0.5	43
实施例 1	使用水相的制备方法	5-24-1-0.5	25
实施例 2		5-24-0.5-0.1	15
实施例 3	在水相中形成 siRNA/dioTETA 纳米颗粒并将其包埋于乳液中的聚合物胶束中的制备方法	5-24-1-0.3	9
实施例 4		5-24-1-0.3	9
实施例 5		5-24-1-0.3	13
实施例 6		5-24-1-0.3	13
实施例 7		5-24-2-0.3	27
实施例 8		5-24-0.5-0.3	2
实施例 9		5-18-1-0.1	38

[0182] 另外,下表14显示根据以下制备方法制备的具有不同组成的实施例13-16的稳定性比较:在水相中形成siRNA/dioTETA纳米颗粒并将其包埋在乳液中的聚合物胶束中的制备方法。

[0183] 表14

[0184]

	组合物	比例	siRNA 解离(%)
比较例 2	siRNA/dioTETA/mPEG-PLA-生育酚(2k-1.7k)/DOPE	8-18-1-1	46
实施例 13		5-18-1-0.5	22
实施例 14		5-18-1-1	12
比较例 3	siRNA/dioTETA/mPEG-PLA- 生育酚(2k-1.7k)/PLANa (1.7K)/DOPE	5-18-1-0.3-1	32
实施例 15		5-18-1-0.1-1	9
实施例 16		5-18-1-0.3-1	8

[0185] 表13和表14显示了通过肝素竞争对聚合物胶束递送系统的稳定性进行比较的结果。可以看出,按照本发明的制备方法的以下实施方案制备的递送系统通过肝素显示较低的解离:其中在水相中制备或形成siRNA/dioTETA纳米颗粒,然后将其包埋于乳剂中的聚合物胶束中。这些结果表明siRNA可以稳定地包埋在聚合物胶束中,从而在血液中或在体内保持稳定性。

[0186] 实验例4.根据制备方法比较聚合物胶束的再现性

[0187] 选择具体的组成比和制备方法以将制剂制备成200μg的规模(基于siRNA)。通过重复相同的实验三次,基于siRNA含量(产率)比较制剂的制备重现性。

[0188] 将根据比较例1的制备方法的制备再现性与实施例3和实施例7的制备再现性进行比较,结果示于下表15中。

[0189] 表15

[0190]

	第一次的量(%)	第二次的量(%)	第三次的量(%)	CV(%)
比较例1	25	42	10	16
实施例3	55	63	58	4
实施例7	70	75	79	4

[0191] (CV: 变异系数)

[0192] 实验例5.siRNA含量(产率)的比较,其中根据制备方法制备的聚合胶束的量逐渐增加

[0193] 选择具体的组成比和制备方法以将制剂制备成200μg、500μg、1000μg的规格(基于siRNA)。通过重复相同的实验两次来比较制备量增加时的产率。

[0194] 将比较例1制备量增加时的产率与实施例7制备量增加时的产率进行比较,结果示于下表16中。

[0195] 表16

[0196]

	200μg规模的量(%)	500μg规模的量(%)	1000μg规模的量(%)
比较例1	25	12	5
实施例7	78	81	85

[0197] 实验例6.聚合物胶束的血浆浓度分析

[0198] 将所制备的制剂施用于动物,并在施用后0.5小时和6小时收集血液,并且使用RT(逆转录)和qRT-PCR(定量逆转录-聚合酶链反应)通过以下步骤分析胶束的血液浓度。

[0199] 将制剂以1mg/kg的浓度静脉内注射到Balb/c小鼠中,并且在0.5小时和6小时后收集血液。将血液在4℃下以13000rpm的速度离心15分钟以仅将上层收集到新管中,用PBS稀释为从4μM至0.00256μM范围内的总共11个浓度范围来制备标准制剂的浓度。将1μl稀释的标准制剂加入到用于PCR的96孔板中,并向其中加入9μl Balb/c小鼠血清和90μl 0.25% triton X-100。在向实验组的10μl血液样品中加入90μl 0.25% triton X-100后,进行分解递送系统的预处理步骤。通过逆转录(RT)步骤将制剂分解时暴露的siRNA合成为cDNA,并使用合成的cDNA进行qRT-PCR(Bio-Rad CFX96实时系统)。使用Bio-Rad CFX Manager程序进行分析。

[0200] 表17

	血液浓度(ng/mL)		10
	0.5 小时	6 小时	
比较例 1	11650	5363	
实施例 3	14362	7701	
实施例 7	17410	8042	
实施例 14	12033	6462	
实施例 16	13250	8634	

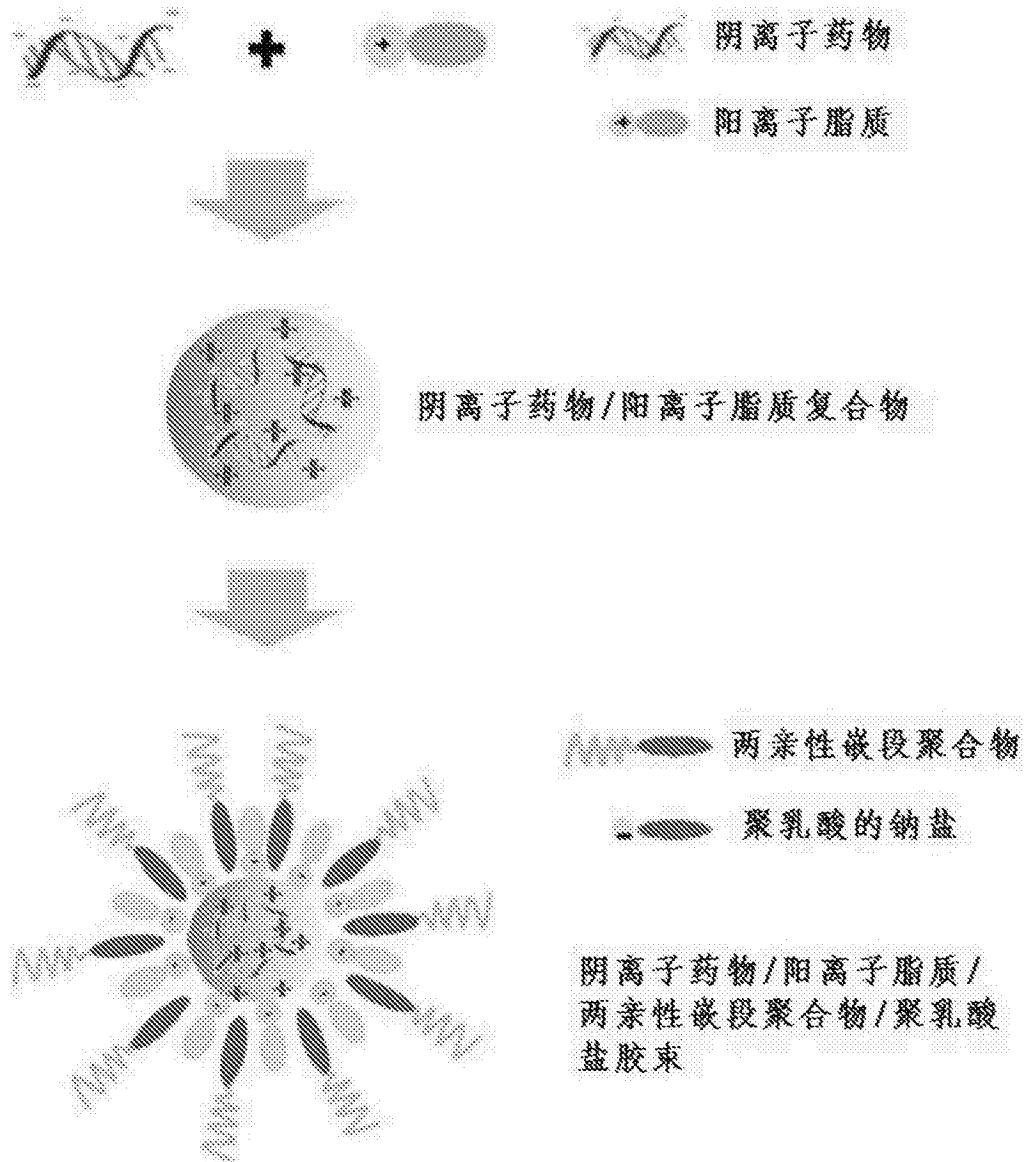


图1