



## (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105813721 B

(45)授权公告日 2019.11.05

(21)申请号 201480068147.2

C·威尔士

(22)申请日 2014.10.16

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

(65)同一申请的已公布的文献号

利商标事务所 11038

申请公布号 CN 105813721 A

代理人 罗菊华

(43)申请公布日 2016.07.27

(51)Int.Cl.

(30)优先权数据

B01F 3/08(2006.01)

61/891,758 2013.10.16 US

B01F 5/02(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

F16K 11/02(2006.01)

2016.06.15

(86)PCT国际申请的申请数据

(56)对比文件

PCT/US2014/060961 2014.10.16

US 2010022680 A1,2010.01.28,

(87)PCT国际申请的公布数据

EP 1391237 A3,2006.03.22,

W02015/057998 EN 2015.04.23

CN 1612780 A,2005.05.04,

(73)专利权人 不列颠哥伦比亚大学

US 5417956 A,1995.05.23,

地址 加拿大不列颠哥伦比亚省

US 2007242560 A1,2007.10.18,

(72)发明人 A·维尔德 R·J·泰勒 T·利弗

WO 2006018644 A1,2006.02.23,

K·欧 E·拉姆塞 A·安萨里

US 7718099 B2,2010.05.18,

CN 101523168 A,2009.09.02,

审查员 徐习岭

权利要求书2页 说明书23页 附图8页

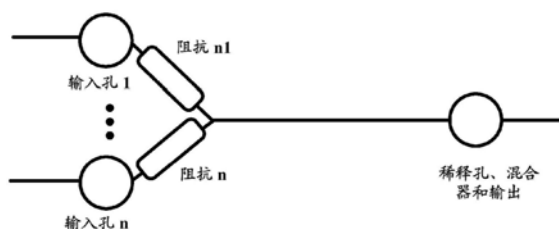
(54)发明名称

用于以小体积配制颗粒的装置

(57)摘要

用于以小体积制造颗粒的方法和装置。

用于以小体积制备颗粒的示例性装置的示意图



1. 一种装置,其包含:

(a) 用于接收包含第一溶剂的第一溶液的第一孔;

(b) 与所述第一孔流体连通的具有第一阻抗的第一通道;

(c) 用于接收包含第二溶剂的第二溶液的第二孔;

(d) 与所述第二孔流体连通的具有第二阻抗的第二通道;

(e) 用于接收分别从所述第一和第二孔流过所述第一和第二通道的第一和第二液流的第三通道,其中所述第三通道具有适于使引入的所述第一和第二液流流入所述通道的第一区域,和适于混合所述第一和第二液流的内容物以提供第三液流的第二区域;和

(f) 用于接收第三液流的第三孔,其中所述第三孔被配置为当用第三溶液填充时,提供第三通道中的反压,所述反压将使从第一孔和第二孔的流体运动停止直至前向压力施加至第一孔和第二孔;

其中所述第一阻抗与第二阻抗不同,从而导致通过所述第一通道和第二通道的不同的流速。

2. 权利要求1的装置,其还包含被配置为使至第三孔的流体运动停止的阀。

3. 权利要求1的装置,其中第一阻抗与第二阻抗之间的不同源自于第一通道和第二通道的性质的不同,所述性质选自通道长度、通道高度、通道宽度、通道表面及其组合。

4. 权利要求1的装置,其中第一阻抗对第二阻抗的比率为2.5:1至3:1。

5. 权利要求4的装置,其中所述第一阻抗对第二阻抗的比率源自于第一通道具有与第二通道不同的长度。

6. 权利要求1的装置,其中第三微通道的第二区域具有20微米至400微米的流体动力学直径。

7. 权利要求1的装置,其中第三微通道的第二区域包含微混合器。

8. 权利要求1的装置,其中第三微通道的第二区域包含混沌平流微混合器。

9. 权利要求1的装置,其中第三微通道的第二区域包含浅浮雕结构。

10. 权利要求9的装置,其中所述浅浮雕结构包括多个鲑骨状浅浮雕结构。

11. 权利要求1的装置,其中第三微通道的第二区域具有主流动方向和一个或多个表面,所述表面具有至少一个在其中限定的槽或突起,所述至少一个槽或突起具有与主方向形成角度的取向。

12. 权利要求1的装置,其还包含压力歧管,所述压力歧管被配置为形成压力源和第一入口及第二入口之间的密封连接,以使得可递送相同的压力至所述第一入口和第二入口。

13. 权利要求12的装置,其还包含夹持装置,所述夹持装置被配置为维持所述第一入口、第二入口和压力歧管之间的密封连接。

14. 权利要求12的装置,其中所述压力源包含被配置为与所述压力歧管形成密封连接的注射器。

15. 使用权利要求1的装置制造颗粒的方法,包括:

(a) 将第一溶液引入该装置的第一孔;其中第一溶剂包含治疗性物质和任选地一种或多种颗粒形成物质;

(b) 使第一溶液流过该装置的第一通道以产生第一液流;

(c) 将包含第二溶剂中的一种或多种颗粒形成物质和任选地治疗性物质的第二溶液引

入第二孔,其中第二溶剂和第一溶剂是不同的;

(d) 使第二溶液流过第二通道以产生第二液流;

(e) 将第一和第二液流引入第三通道的第一区域;

(f) 使第一液流和第二液流从第三通道的第一区域流入第三通道的第二区域,以使得一个或多个第一液流和一个或多个第二液流基本上同时到达所述第二区域用于混合;和

(g) 在通道的第二区域中混合第一液流和第二液流的内容物,以提供包含颗粒的第三液流。

## 用于以小体积配制颗粒的装置

### 发明领域

[0001] 本发明涉及制造颗粒,以及用于以小体积配制颗粒的装置和方法。

### [0002] 发明背景

[0003] 颗粒是在医药和其它应用中重要的一类材料。颗粒以纳米或微米尺度存在,并被用于广泛的应用,包括药物、医疗装置、研究工具、化妆品、涂料和油墨、工业应用以及其它应用。例如,对于许多活性药物成分(治疗性物质)的主要挑战是不能递送足够浓度至靶细胞以引发生物效应。某些治疗性物质,包括许多化学治疗物质,是有毒的,并且不能以对疾病有作用所需的剂量进行全身性施用,然而其它治疗性物质,包括许多生物制品如寡核苷酸治疗性物质,无法穿过细胞膜来到达它们的作用部位。聚合物、脂质和其它物质提供用于包封治疗性物质并将它们在颗粒中转运至患病细胞和组织的有前景的解决方案。这样的颗粒可通过降低毒性(通过将治疗性物质与健康组织隔离),通过靶向患病组织增强治疗性物质的功效和通过使得治疗性物质能够主动递送至它们的作用部位来增加治疗性物质的治疗指数。

[0004] 各种方法已被开发来制造颗粒。这些方法包括自组装、沉淀和匀化。各种装置包括微流体装置已证明了以对温度、停留时间和溶质浓度精确控制的方式可控地和快速地混合呈连续流动形式的流体的能力。微流体已证明应用于无机纳米颗粒和微粒的合成,并且可在颗粒的大规模生产中优于大尺度系统。液滴技术已被应用于生产用于治疗性物质递送的单分散微粒或应用于生产用于细胞、蛋白质或其它生物分子的包封的大囊泡。流体动力学流动聚焦(一种提供试剂的快速混合的常用微流体技术)已被用来产生受控尺寸的单分散脂质颗粒。该技术也被证明在其中获得较小的更具单分散性的颗粒的聚合物颗粒的生产中是有用的,其中相较于大体积生产方法小分子的包封更高。湍流混合器(包括具有 $>0.1\text{mm}$ 的通道尺寸的T、W或Y混合器)已被成功地用于微粒和纳米粒子的制造。

[0005] 尽管可获得制造颗粒系统的方法,但小规模( $<1\text{mL}$ )的高质量颗粒的制造因将极小体积有效地混合在一起的困难以及在装置和与装置的连接件中流体的消耗或流体“死体积”而仍然是一个挑战。本发明的目的是满足这种需要,并提供其它相关的优势。

### [0006] 发明概述

[0007] 在本发明的一个方面,提供了用于制备颗粒的方法。

[0008] 在一个实施方案中,所述方法包括:

[0009] (a) 将包含第一溶剂的第一液流引入通道;其中所述通道具有适于使一个或多个被引入的液流流入通道的第一区域和用于混合一个或多个液流的内容物的第二区域;并且其中所述第一溶剂包含治疗性物质和任选地一种或多种颗粒形成物质;

[0010] (b) 将包含第二溶剂中的一种或多种颗粒形成物质和任选地治疗性物质的第二液流引入通道,以提供第一和第二液流,并且其中所述第一和第二溶剂是不同的;

[0011] (c) 使所述一个或多个第一液流和所述一个或多个第二液流从通道的第一区域流入所述通道的第二区域,以使得所述一个或多个第一液流和所述一个或多个第二液流基本上同时到达所述第二区域用于混合;和

[0012] (d) 在通道的第二区域中混合所述一个或多个第一液流和所述一个或多个第二液流的内容物, 以提供包含颗粒的第三液流。

[0013] 在另一个实施方案中, 所述方法包括:

[0014] (a) 将包含第一溶剂的液流引入通道; 其中所述通道具有适于使一个或多个被引入的液流流入通道的第一区域; 和

[0015] (b) 引导所述第一液流通过通道并进入包含第二溶剂的贮液池,

[0016] 其中将所述第一液流引导入贮液池包括将所述第一液流的内容物与贮液池的内容物混合以提供颗粒。

[0017] 在另一个方面, 本发明提供了用于制造颗粒的装置。

[0018] 在一个实施方案中, 所述装置包括:

[0019] (a) 用于接收包含第一溶剂的第一溶液的第一孔;

[0020] (b) 与第一孔流体连通的第一通道;

[0021] (c) 用于接收包含第二溶剂的第二溶液的第二孔;

[0022] (d) 与第二孔流体连通的第二通道;

[0023] (e) 用于接收分别从第一和第二孔流过第一和第二通道的第一和第二液流的第三通道, 其中所述第三通道具有适于使引入的第一和第二液流流入通道的第一区域, 和适于混合所述第一和第二液流的内容物以提供包含颗粒的第三液流的第二区域; 和

[0024] (f) 用于接收包含颗粒的第三液流的第三孔。

[0025] 在一个实施方案中, 所述装置包括:

[0026] (a) 用于接收包含第一溶剂的第一溶液的第一孔;

[0027] (b) 与第一孔流体连通的第一通道; 和

[0028] (c) 用于接收包含第二溶剂的第二溶液的第二孔, 其中所述第二孔还接收从第一孔流过第一通道的第一液流, 并且其中所述第二孔适于在第二孔中混合第一液流和第二溶液的内容物, 以提供包含颗粒的第三溶液。

[0029] 附图概述

[0030] 当结合附图考虑时, 本发明的前述方面和许多伴随的优势将变得更容易理解, 通过参考下文的详细描述也将变得更好理解。

[0031] 图1是以小体积制造颗粒的挑战的示意图。所述示意图包括 (a) 对于定时流体混合以使制造的颗粒的产率最大化的要求; (b) 关于流体损耗的区域。

[0032] 图2是用于以小体积制备颗粒的本发明的代表性装置和方法的示意图: 使用输入和输出贮液池 (孔) 的组合以控制流速和流动定时的装置。在该装置中, 输入孔用于包含输入流体。通道阻抗用于测定来自输入的液流之间的相对流速。添加出口孔。在某些实施方案中, 将反压或阻塞物应用于出口孔以使来自输入的流体运动因流体在输入孔中的重量或其它现象而停止, 随后施加压力至输入。在某些实施方案中, 反压通过在将流体添加至输入孔之前将流体添加至出口孔来获得。在该情况下, 最后添加具有最低表面张力的流体, 因为这些是以最高速率移动通过芯片的流体。随后将输入流体添加至输入贮液池中, 并对输入加压以产生流体流动。通过从输入至混合室的通道的阻抗控制不同流动的流速。可通过同时对输入孔加压来对流动定时以在相似的时间到达混合器。在某些实施方案中, 通过在纳米颗粒制造后对输入施加流体 (气体或液体) 并流过混合器来清除装置的剩余流体。

[0033] 图3是在图2的示意图中举例说明的代表性装置的实例。该装置具有2个入口孔(一个用于水相,一个用于乙醇/脂质相)和一个出口孔。在实践中,将稀释缓冲液加载至出口孔中,该缓冲液在装置的输出上施加反压,并降低使颗粒稳定的终产物的乙醇浓度。将水性试剂和乙醇中的脂质加载至输入孔中,随后将歧管夹在入口孔上方,并使用注射器或其它机械装置加压。参见图8。加压将试剂推入入口孔通过混合器(例如,交错的鲑骨状混合器)和进入出口孔。随后使用移液器回收配制的颗粒。所显示的装置被设计来具有3份水对1份乙醇的流量比,这利用从输入孔至混合器的不同通道长度来实现。在此情况下,使用2.5:1的比率,这考虑了所需的流量比和输入试剂之间的粘度差异。

[0034] 图4是用于以小体积制备颗粒的本发明的代表性装置和方法的示意图:将溶剂第一液流(输入孔1至n)流入口贮液池(稀释孔)中包含的第二溶剂的装置。第一液流与出口贮液池的内容物的混合可通过各种机制发生,所述机制包括(i)通过将第一液流引入贮液池发生的对流流动和(ii)组合的流体随着第一液流被引入贮液池时的主动混合。

[0035] 图5是图4的示意图中举例说明的代表性装置的实例。所述装置具有用于脂质/乙醇溶液的单个输入孔和向其中加载水溶液的出口孔。所述装置具有导入出口孔的大量微通道,微通道的阻抗相较于提供它们的通道是高的。这对于流体的均匀分布是必需的。在加载试剂后,对入口孔加压。入口孔中的流体流过微通道并进入输出孔中。通过对流和通过流入口孔的气泡混合流体。

[0036] 图6是用于以小体积制备颗粒的本发明的代表性装置和方法的示意图:在入口或出口使用阀以对流体流动至混合室中的引入定时的装置。

[0037] 图7是图2和3中示意性举例说明的本发明的代表性装置的图像。

[0038] 图8是进一步包括压力致动歧管的图7中显示的代表性装置的图像。

[0039] 图9是进一步包括夹持装置和压力致动歧管的图7中显示的代表性装置的图像。

[0040] 图10是代表图2和3中描述的装置的一次性装置的图像。图10A显示装置+歧管,图10B显示覆盖装置的入口孔的歧管。所述歧管允许连接空注射器并且推下注射器柱塞迫使流体通过混合装置。

[0041] 图11比较使用NanoAssembler和零死体积芯片(Zero Dead Volume Chip)合成的siRNA-LNP导致的PTEN敲低。

[0042] 图12比较在利用NanoAssembler和零死体积芯片制剂的处理后GFP表达的水平。

[0043] 发明详述

[0044] 本发明提供了用于以小体积制备颗粒的方法和装置。

[0045] 在一个方面,本发明提供了用于制造含有治疗性物质的颗粒的方法。

[0046] 在另一个方面,本发明提供了用于制造含有治疗性物质的颗粒的装置。

[0047] 在其它方面,本发明提供了用于制造脂质纳米颗粒、脂质体颗粒、乳剂或其它含脂质颗粒的方法和装置。

[0048] 在其它方面,本发明提供了用于制造含有治疗性物质的脂质纳米颗粒、脂质体颗粒、乳剂或其它含脂质颗粒的方法和装置。

[0049] 在其它方面,本发明提供了用于制造聚合物颗粒的方法和装置。

[0050] 在其它方面,本发明提供了用于制造含有治疗性物质的聚合物颗粒的方法和装置。

[0051] 在其它方面,本发明提供了用于通过脂质、聚合物、蛋白质、核酸和其它物质的组合制造颗粒的方法和装置。

[0052] 在另一个方面,本发明提供了用于制造含有聚合物、天然聚合物、合成聚合物、合成共聚物、半合成聚合物、聚合物缀合物、聚合物-治疗性物质缀合物、聚合物-药物缀合物的颗粒的方法和装置。

[0053] 在其它方面,本发明提供了用于以小体积制造含有研究试剂的颗粒的方法和装置。

[0054] 在其它方面,本发明提供了用于制造含有研究试剂的脂质纳米颗粒、脂质体颗粒、乳剂或其它含脂质颗粒的方法和装置。

[0055] 在本发明的其它方面,提供了通过本发明的方法和装置制造的颗粒。

[0056] 用于以小体积制造颗粒的方法

[0057] 在一个方面,本发明提供了用于以小体积制备颗粒的方法。如本文中所用,术语“小体积”是指小于2mL的体积,并且在某些实施方案中,体积小于1mL。本发明的方法提供了数十微升(例如50,100,150,200,250,300,400,450,500,550,600,650,700,750,800,850,900,950 $\mu$ L)体积的颗粒。小体积是指本发明的装置和方法制备纳米颗粒而无物质损失的能力。例如,本发明的装置和方法能够制造100 $\mu$ L的纳米颗粒而无物质损失:添加至装置的颗粒形成物质(例如,脂质)和治疗性物质(例如,RNA)的体积为各自约20 $\mu$ L(体积的其余部分代表如图2和3中所示的另外的区域(例如,装置的第三孔)中的稀释缓冲液)。

[0058] 在一个实施方案中,用于制造颗粒的方法包括:

[0059] (a) 将包含第一溶剂的第一液流引入通道;其中所述通道具有适于使引入的一个或多个液流流入通道的第一区域,和用于混合所述一个或多个液流的内容物的第二区域;并且其中所述第一溶剂包含治疗性物质和任选地一种或多种颗粒形成物质;

[0060] (b) 将包含第二溶剂中的一种或多种颗粒形成物质和任选地治疗性物质的第二液流引入通道,以提供第一和第二液流,并且其中所述第一溶剂和第二溶剂不同。

[0061] (c) 使所述一个或多个第一液流和所述一个或多个第二液流从通道的第一区域流入通道的第二区域,以使得所述一个或多个第一液流和所述一个或多个第二液流基本上同时到达第二区域用于混合;和

[0062] (d) 在通道的第二区域中混合所述一个或多个第一液流和所述一个或多个第二液流的内容物,以提供包含颗粒的第三液流。

[0063] 在上述方法中,死体积被最小化,并且小体积颗粒的产生通过在混合之前基本上同时组合第一和第二液流来最大化。通过此方法,使含有包含第一和第二液流各自的组分的颗粒的混合体积最小化。

[0064] 在一个实施方案中,以连续的方式将一个液流(例如,包含第二溶剂(诸如乙醇)中的颗粒形成物质的第二液流)引入通道,并且通过引入第二液流(例如,不连续体积的包含治疗性物质的第一液流)中断流动液流,以产生第一和第二液流的组合体积的阻塞物。随后将组合的体积混合以提供组合的体积中的颗粒。在此方法中,使组合的体积在前,随后为第二液流。在此方法中,包含治疗性物质的相对有价值的第一液流在含有治疗性物质的颗粒形成的背景中是有限的,并且过量使用包含颗粒形成物质的第二液流。

[0065] 在本发明的方法中,待组合的液流(即,第一和第二液流)是不同的。每一个液流的

组成可以变化,并且在某些实施方案中,每一个均可包含治疗性物质和颗粒形成物质。将理解,每一个液流的组成是使得颗粒形成不发生直到液流混合。如下面进一步描述的,用于第一和第二液流的溶剂是可混溶的,并且在它们混合后产生颗粒。如本文所述,本发明的方法和装置对于一般性制造含治疗性物质的颗粒和特别是制造小体积的含治疗性物质的颗粒是特别有用的。

[0066] 在某些实施方案中,上述方法还包括一个或多个以下特征:

[0067] (i) 使一个或多个第一液流和一个或多个第二液流以确定的流量比从通道的第一区域流入通道的第二区域,所述流量比通过跨一个或多个流动通道的预定的压降、通过将预定的压力施加至一个或多个流动通道、或通过两者的组合来建立(参见图2-5中举例说明的阻抗);

[0068] (ii) 在制造颗粒之后或期间,使流体(气体或液体)流入一个或多个第一液流和/或一个或多个第二液流,以将第一和第二液流从通道排出;

[0069] (iii) 对一个或多个第一液流和一个或多个第二液流施加足以阻止流动(因重力、芯吸或毛细管作用)进入通道的反压,直至实现预定的前向压力以使第一液流流入第一通道和使第二液流流入第二通道;

[0070] (iv) 通过物理阻塞输出通道来建立足以阻止流动(因重力、芯吸或毛细管作用)进入第一和第二通道的反压,直至实现预定的前向压力以使第一液流流入第一通道和使第二液流流入第二通道;或,

[0071] (v) 使用系统中的输入或输出阀来确保一个或多个第一液流和一个或多个第二液流从通道的第一区域流入第二区域的定时(例如,第一通道还包含有效地对第一液流至第一通道的流动定时的第一输入阀,第二通道还包含有效地对第二液流至第二通道的流动定时的第二输入阀,和/或输出通道还包含有效地对第一和/或第二液流分别至第一和第二液流的流动定时的输出阀)。参见,例如,图6。

[0072] 在此方法的某些实施方案中,第一液流或第二液流而非另一液流进入通道的第二区域的时间被最小化,并使流体一起的混合最大化。可使用阀、压力、阻抗匹配或实现定时的任何其它方法来实现流体流动的定时。

[0073] 在上述方法的某些实施方案中,可以通过混沌平流、湍流混合、喷射、涡旋方法和搅拌来混合第一和第二液流的内容物。混合可通过主动混合装置或被动混合装置来实现。混合可以以连续流动形式或确定体积的形式发生。混合可使用微流体混合器包括鲱骨状混合器、Z字形混合器、微射流混合器、微涡旋混合器、特斯拉混合器(tesla mixer)、泪滴混合器、气泡混合机、声流来实现。混合可以使用宏观混合器,包括T型混合器、Y型混合器、W型混合器和混合管来实现。

[0074] 在上述方法的某些实施方案中,将一个或多个第一液流和一个或多个第二液流的内容物混合包括改变所述一个或多个第一液流和所述一个或多个第二液流的浓度或相对混合速率。可通过施加于液流的不同压力、跨流动通道的不同压降、施加于第一和第二液流不同通道阻抗或其中的组合来使得能够使流量不同。通过改变通道高度、宽度、长度或表面性质产生的不同通道阻抗可用于实现不同的流速。一个或多个第一液流和一个或多个第二液流中的流动的流体表面张力、粘度和其它表面性质可用于或被考虑用来实现不同的流速。



[0075] 在上述方法的某些实施方案中,在颗粒制造之后或期间,通过将流体或气体从通道的第一区域至通道的第二区域内流入所述一个或多个第一液流和所述一个或多个第二液流以排出第一液流和第二液流。在此方法下第一和第二通道可被充分清洗或部分清洗。可以使用气体诸如空气、氮气、氩气或其它气体。可使用液体包括水、水性缓冲液、乙醇、油或任何其它液体。

[0076] 在上述方法的某些实施方案中,施加反压以确保所述一个或多个第一液流和所述一个或多个第二液流从所述通道的第一区域至第二区域的流动受到限制,直到达到所需的起始输入压力。这可通过对出口通道施加压力、对输入通道施加负压来实现。这可通过用最终颗粒溶液中可能需要或可能不需要的流体加载出口贮液池来实现。

[0077] 在上述方法的某些实施方案中,以使流体损耗降至最少的方式将流体引入装置。这可以通过用移液器将流体移入装置,用移液器将流体移出装置,将装置连接至注射器来实现。

[0078] 在另一个实施方案中,本发明提供了用于制造颗粒的方法,其包括:

[0079] (a) 将包含第一溶剂的液流引入通道;其中所述通道具有适于使一个或多个被引入的液流流入通道的第一区域;和

[0080] (b) 引导第一液流通过通道并进入包含第二溶剂的贮液池,

[0081] 其中引导第一液流进入贮液池包括将第一液流的内容物与贮液池的内容物混合以提供颗粒。

[0082] 此实施方案例示于图4和5中。

[0083] 在此实施方案中,液流和贮液池第一和第二液流是如上文描述的方法中的。第一和第二溶剂是不同的并且是可混溶的。液流和贮液池是不相同的并且各自可包含治疗性物质和颗粒形成物质。在一个实施方案中,液流包含第一溶剂(乙醇)和颗粒形成物质并且贮液池包含第二溶剂(水)和治疗性物质。在另一个实施方案中,液流包含第一溶剂(水)和治疗性物质并且贮液池包含第二溶剂(乙醇)和颗粒形成物质。

[0084] 在方法的此实施方案的某些实施方案中,所述方法还包括上述特征(i)-(v)的一个或多个特征。

[0085] 用于以小体积制备颗粒的装置

[0086] 在另一个方面,本发明提供了用于以小体积产生颗粒的装置。在某些实施方案中,所述装置可用于执行本发明的方法。

[0087] 在一个实施方案中,所述装置包括:

[0088] (a) 用于接收包含第一溶剂的第一溶液的第一孔;

[0089] (b) 与第一孔流体连通的第一通道;

[0090] (c) 用于接收包含第二溶剂的第二溶液的第二孔;

[0091] (d) 与第二孔流体连通的第二通道;

[0092] (e) 用于接收分别从第一和第二孔流过第一和第二通道的第一和第二液流的第三通道,其中所述第三通道具有适于使引入的第一和第二液流流入通道的第一区域和适于混合所述第一和第二液流的内容物以提供包含颗粒的第三液流的第二区域;和

[0093] (f) 用于接收包含颗粒的第三液流的第三孔。

[0094] 此实施方案在图2、3和6-8中进行了举例说明。

[0095] 应理解,本发明的装置可包括一个或多个第一孔、一个或多个第一通道、一个或多个第二孔、一个或多个第二通道、一个或多个第三通道以及一个或多个第三孔。

[0096] 在一个实施方案中,该装置还包括用于稀释第三液流以提供包含稳定化的颗粒的稀释液流的装置。

[0097] 在另一个实施方案中,所述装置包括:

[0098] (a) 用于接收包含第一溶剂的第一溶液的第一孔;

[0099] (b) 与所述第一孔流体连通的第一通道;和

[0100] (c) 用于接收包含第二溶剂的第二溶液的第二孔,其中所述第二孔还接收从第一孔流过第一通道的第一液流,并且其中所述第二孔适于在第二孔中混合所述第一液流和第二溶液的内容物,以提供包含颗粒的第三溶液。

[0101] 此实施方案在图4和5中进行举例说明。

[0102] 应该理解的是,本发明的装置可包括一个或多个第一孔、一个或多个第一通道以及一个或多个第二孔。

[0103] 在某些实施方案中,本发明的装置是宏流体或微流体装置。在某些实施方案中,第一和第二液流可通过混沌平流、湍流混合、喷射、涡流法、气泡混合、微声流、搅拌或其它混合方法进行混合。混合可通过主动混合装置或被动混合装置来实现。混合可以以连续流动形式或限定体积形式发生。混合可使用微流体混合器,包括鲐骨状混合器、Z字形混合器、微射流混合器或微涡流混合器来实现。混合可使用宏观混合器(包括T型混合器、Y型混合机或W型混合器)来实现。

[0104] 在某些实施方案中,本发明的装置是包含一个或多个微通道(即,其最大尺寸小于1毫米的通道)的微流体装置。在一个实施方案中,所述微通道具有约20至约400 $\mu\text{m}$ 的流体动力学直径。在某些实施方案中,所述微通道具有两个区域:用于接收至少两个液流(例如一个或多个第一液流和一个或多个第二液流)并使其流入装置的第一区域。在微通道的第二区域中混合第一和第二液流的内容物。在一个实施方案中,所述微通道的第二区域具有主流动方向和一个或多个具有至少一个在其中限定的槽或突起的表面,所述槽或突起具有与主方向形成角度的取向(例如,交错鲐骨状混合器),如美国专利申请公开No. 2004/0262223(明确地通过引用整体并入本文)中描述的。在一个实施方案中,所述微通道的第二区域包含浅浮雕结构。为了达到最大的混合率,有利的是在混合区之前避免不适当的流体阻力。因此,本发明的一个实施方案是其中将具有大于1000微米尺寸的非微流体通道用于输送流体到单个混合通道的装置。

[0105] 在某些实施方案中,第一和第二液流的混合还可利用用于改变第一和第二液流的浓度和相对流速的装置来实现。可通过对流体施加的不同压力、跨流动通道的不同压降、对第一和第二液流施加的不同通道阻抗或其中的组合来使得能够使流量不同。通过改变通道高度、宽度、长度或表面性质产生的不同通道阻抗可用于实现不同的流速。一个或多个第一液流和一个或多个第二液流中的流动的流体表面张力、粘度和其它表面性质可用于或被考虑用来实现不同的流速。

[0106] 在某些实施方案中,装置还包括用于将系统全部或部分清洗以使损耗体积最小化的装置。在颗粒制造后或期间,该装置能够使流体或气体从通道的第一区域至通道的第二区域流入所述一个或多个第一液流和所述一个或多个第二液流以排出所述第一液流和第

二液流。在此方法下可充分清洗或部分清洗第一和第二通道。可以使用气体诸如空气、氮气、氩气或其它气体。可使用液体包括水、水性缓冲液、乙醇、油或任何其它液体。

[0107] 在某些实施方案中,装置使得能够施加反压以确保所述一个或多个第一液流和所述一个或多个第二液流从所述通道的第一区域至第二区域的流动受到限制,直到达到所需的起始输入压力。这可通过对出口通道施加压力、对输入通道施加负压来实现。这可通过用最终颗粒溶液中可能需要或可能不需要的流体加载出口贮液池来实现。

[0108] 在某些实施方案中,装置被设计来使得以使流体损耗降至最少的方式将流体引入装置。这可以通过用移液器将流体移入装置,用移液器将流体移出装置,将装置连接至注射器或其它方法来实现。

[0109] 在某些实施方案中,装置是微流体的,并且通过软光刻技术、微加工的母板在弹性体中的复制成型产生。装置具有两个入口(一个用于上文中制备的溶液的每一种)和一个出口。微流体装置通过软光刻技术、微加工的母板在弹性体中的复制成型产生。在一个实例中,装置特征是200 $\mu\text{m}$ 宽和约70 $\mu\text{m}$ 高的混合通道,其中在通道顶部由约25 $\mu\text{m}$ 高和50 $\mu\text{m}$ 厚的特征件形成鲐骨状结构。使用氧等离子体处理将装置密封至75 $\times$ 25 $\times$ 1.5mm载玻片。其它实例包括具有更小(120 $\mu\text{m}$ 宽)或更大(300 $\mu\text{m}$ 宽)的宽度和相关相对尺寸的装置。将输入和输出端口钻入装置。

[0110] 在第二实施方案中,装置是微流体的,并从硬热塑性塑料诸如环烯烃共聚物产生。使用CNC磨机械制造负形工具(negative tool)并使用注射成型形成装置。通过在垂直表面上添加1 $^{\circ}$ 至5 $^{\circ}$ 之间的模锻斜度保留通道尺寸。使用多种技术将成型片密封至基板,所述技术包括但不限于:层压、溶剂焊接、热压及其组合。将粘结装置退火,以从生产过程去除残余应力。一旦形成,安装装置,将其以与弹性体装置相同的方式用于定制仪器中。

[0111] 为了达到最大混合率,有利的是避免在混合区域之前不适当的流体阻力。因而本发明的一个实施方案是其中将具有大于1000微米尺寸的非微流体通道用于输送流体到单个混合通道的装置。用于产生颗粒的该装置包括:

[0112] (a) 单个入口通道,其用于接收包含溶剂且没有或有一定溶液的第一溶液以及包含第二溶剂中的颗粒组分的第二溶液;和

[0113] (b) 第二区域,其适于混合第一和第二液流的内容物,以提供包含颗粒的第三液流。

[0114] 在这样的实施方案中,所述第一和第二液流通过单个入口或通过一个或两个不具有微尺寸的通道(例如,具有大于1000 $\mu\text{m}$ (例如,1500或2000 $\mu\text{m}$ 或更大)尺寸的通道)来引入通道。这些通道可使用相邻或同心的宏观化通道来引入入口通道。

[0115] 在上文针对本发明的装置的描述中,溶剂和液流的组成是如上文针对本发明的方法所描述的。

[0116] 在某些实施方案中,该装置包括本文所述的组件,并且可包括附加组件。在这些实施方案中,该装置“包含”指定的组件。在其它实施方案中,该装置包括本文所述的组件,并且可包括不改变装置的特性的附加组件(例如,不包括改变该装置的创造性方面的组件)。在这些实施方案中,该装置“基本上由”指定的组件组成。在其它实施方案中,该装置仅包括本文所述的组件而无其它组件。在这些实施方案中,该装置“由指定的组件”组成。

[0117] 使用所述方法和装置产生的颗粒

[0118] 在本发明的另外方面,提供了由本发明的方法和/或装置产生的颗粒。

[0119] 在上述方法和装置的某些实施方案中,所述方法和装置用于制造直径<100nm的颗粒。在上述方法和装置的某些实施方案中,所述方法和装置用于制造直径>100nm并<1000nm的颗粒。在述方法和装置的某些实施方案中,所述方法和装置用于制造直径>1000nm的那些颗粒。

[0120] 在上述方法中,从一个或多个包含颗粒形成物质的溶液、液流或贮液池形成颗粒。除了颗粒形成物质以外,所述方法还利用包含0种、1种或多种脂质组分;0种、1种或多种聚合物组分;0种、1种或多种蛋白质组分;0、1种或多种寡核苷酸组分;或0种、1种或多种脂质组分的任意组合的溶液、液流和贮液池。

[0121] 在某些实施方案中,第一溶剂(例如,含有治疗性物质的溶液)可包括水性缓冲液,例如柠檬酸盐和醋酸盐缓冲液,或有机溶剂,例如水性乙醇、1,4-二噁烷、四氢呋喃、丙酮、二甲基亚砷、二甲基甲酰胺、酸和醇,以及90%的乙腈。可在或可以不在第一液流中包含颗粒的分子组分。

[0122] 在某些实施方案中,第二溶剂与第一溶剂可混溶。合适的溶剂包括水性缓冲液,例如柠檬酸盐和醋酸盐缓冲液,或有机溶剂,例如,水性乙醇、1,4-二噁烷、四氢呋喃、丙酮、二甲基亚砷、二甲基甲酰胺、酸和醇,以及90%的乙腈。

[0123] 在某些实施方案中,在利用相对快速的混合和高流速的微流体工艺中形成形成颗粒。快速混合提供了具有有利的性质(包括尺寸、均匀性、包封效率)的颗粒。用于本发明的方法的实践的混合速率在约100 $\mu$ sec至约20msec的范围内。代表性混合速率包括约0.5至约20msec。

[0124] 在本发明的一个应用中,所述方法和装置用于制造包含生物活性剂的脂质颗粒。在所述方法和装置中,包含第一溶剂中的多核酸的第一液流和包含第二溶剂中的脂质颗粒形成物质的第二液流被引入通道,所述通道具有适于接收被引入其中的液流和使其流动的第一区域,和用于将两个液流的内容物混合以提供包含具有包封的治疗剂的脂质颗粒的第三液流的第二区域。

[0125] 在一个方面,本发明提供了用于制造含有治疗剂的脂质颗粒的方法。在一个实施方案中,所述方法包括:

[0126] (a) 将包含第一溶剂中的多核酸的第一液流引入通道;其中所述通道具有适于使一个或多个被引入的液流流入通道的第一区域和用于混合一个或多个液流的内容物的第二区域;

[0127] (b) 将包含第二溶剂中的脂质颗粒形成物质的第二液流引入通道以提供第一和第二液流流动,其中所述脂质颗粒形成物质包含可电离的脂质,并且其中所述第一和第二溶剂是不相同的;

[0128] (c) 将一个或多个第一液流和一个或多个第二液流从通道的第一区域流入通道的第二区域;和

[0129] (d) 将流入通道的第二区域的所述一个或多个第一液流和所述一个或多个第二液流的内容物混合,以提供包含具有包封的多核酸的脂质颗粒的第三液流。

[0130] 在本实施方案的某些实施方案中,所述方法还包括上述特征(i)-(v)的一个或多个特征。

[0131] 通过混沌平流混合所述第一和第二液流的内容物。在一个实施方案中,混合所述一个或多个第一液流和所述一个或多个第二液流的内容物包括改变所述一个或多个第一液流和所述一个或多个第二液流的浓度或相对混合速率。

[0132] 为了稳定含有具有包封的多核酸的脂质颗粒的第三液流,此方法可进一步包括用水性缓冲液稀释第三液流。在一个实施方案中,稀释所述第三液流包括使第三液流和水性缓冲液流入第二混合结构。在另一个实施方案中,将包含具有包封的多核酸的脂质颗粒的水性缓冲液透析以减少第二溶剂的量。

[0133] 所述第一液流包含第一溶剂中的多核酸。合适的第一溶剂包括多核酸在其中是可溶的并且能与第二溶剂混溶的溶剂。适合的第一溶剂包括水性缓冲液。代表性第一溶剂包括柠檬酸盐和醋酸盐缓冲液。

[0134] 所述第二液流包含第二溶剂中的脂质颗粒形成物质。合适的第二溶剂包括可电离的脂质在其中是可溶的并且能与第一溶剂混溶的溶剂。合适的第二溶剂包括水性醇。代表性第二溶剂包括90%的水性乙醇。

[0135] 本发明的方法具有约60%至约100%的多核酸包封效率。在某些实施方案中,多核酸包封效率为约100%。

[0136] 在另外的方面,本发明提供通过本发明的方法和/或装置制造的脂质颗粒。本发明的脂质颗粒具有约30至约200nm的直径。在一个实施方案中,脂质颗粒具有约80nm的直径。

[0137] 有利地,脂质颗粒包括约1至约5摩尔百分比的PEG-脂质、基于PEG的表面活性剂或其它稳定剂。在一个实施方案中,脂质颗粒包括约1.5摩尔百分比的PEG-脂质。在一个实施方案中,脂质颗粒包括约1-10摩尔百分比的表面活性剂。在一个实施方案中,脂质颗粒包括约2.5摩尔百分比的稳定剂,如表面活性剂。

[0138] 定义

[0139] 脂质纳米颗粒

[0140] 在一个方面,本发明提供了含有阴离子性高分子的脂质纳米颗粒。该脂质纳米颗粒包括一种或多种阳离子性脂质、一种或多种第二脂质和一种或多种核酸。

[0141] 阳离子性脂质

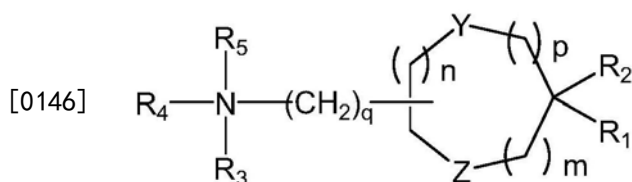
[0142] 脂质纳米颗粒包括阳离子性脂质。如本文所用,术语“阳离子性脂质”是指当pH下降至脂质的可电离基团的pK以下时为阳离子性的或变成阳离子性的(质子化的),但在较高pH值时逐渐更加中性的脂质。在pK以下的pH值,脂质随后能够与带负电荷的核酸(例如,寡核苷酸)缔合。如本文所用,术语“阳离子性脂质”包括假定在pH值降低时带正电荷的两性离子脂质。

[0143] 术语“阳离子性脂质”是指在选择的pH诸如生理pH下携带净正电荷的许多脂质种类的任一种。这样的脂质包括,但不限于N,N-二油酰-N,N-二甲基氯化铵(DODAC);N-(2,3-二油酰氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTMA);N,N-二硬脂酰-N,N-二甲基溴化铵(DDAB);N-(2,3-二油酰氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTAP);3-(N--(N',N'-二甲基氨基乙烷)-氨甲酰基)胆固醇(DC-Chol);和N-(1,2-二肉豆蔻酰氧丙烷-3-基)-N,N-二甲基-N-羟乙基溴化铵(DMRIE)。另外,可用于本发明的阳离子性脂质的许多商业制剂是可获得的。这些包括,例如,**LIPOFECTIN®**(包含DOTMA和1,2-二油酰基-sn-3-磷酸乙醇胺(DOPE)的商购可得的阳离子性脂质体,来自GIBCO/BRL,Grand Island,N.Y.);

**LIPOFECTAMINE®** (包含N-(1-(2,3-二油酰氧基)丙基)-N-(2-(精胺甲酰胺基)乙基)-N,N-二甲基-三氟乙酸铵(DOSPA)和(DOPE)的商购可得的阳离子性脂质体,来自GIBCO/BRL);和**TRANSFECTAM®** (在乙醇中包含二(十八烷基)酰胺甘氨酸羧基精胺(DOGS)的商购可得的阳离子性脂质,来自Promega Corp.,Madison,Wis.)。以下脂质是阳离子性的并且在低于生理pH下具有正电荷:DODAP、DODMA、DMDMA、1,2-二亚油酰基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLinDMA)、1,2-二亚麻基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLenDMA)、1,17-双(2-辛基环丙基)十七烷-9-基4-(二甲基氨基)丁酸酯。

[0144] 在一个实施方案中,阳离子性脂质是氨基脂质。可用于本发明的适当的氨基脂质包括W0 2012/016184(通过引用整体并入本文)中描述的那些氨基脂质。代表性氨基脂质包括1,2-二亚油基氧-3-(二甲基氨基)乙酰氧基丙烷(DLin-DAC)、1,2-二亚油基氧-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-亚油酰基-2-亚油基氧-3-二甲基氨基丙烷(DLin-2-DMA)、1,2-二亚油基氧-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(DLin-TAP.Cl)、1,2-二亚油基氧基-3-(N-甲基哌嗪)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-3-(2-N,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]-二氧戊烷(DLin-K-DMA)。

[0145] 合适的氨基脂质包括具有下式的那些氨基脂质:



[0147] 其中R<sub>1</sub>和R<sub>2</sub>相同或不同并且独立地是任选地取代的C<sub>10</sub>-C<sub>24</sub>烷基,任选地取代的C<sub>10</sub>-C<sub>24</sub>烯基,任选地取代的C<sub>10</sub>-C<sub>24</sub>炔基,或任选地取代的C<sub>10</sub>-C<sub>24</sub>酰基;

[0148] R<sub>3</sub>和R<sub>4</sub>相同或不同,并且独立地是任选地取代的C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基,任选地取代的C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>烯基,或任选地取代的C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>炔基或R<sub>3</sub>和R<sub>4</sub>可连接以形成4至6个碳原子和选自氮和氧的1或2个杂原子的任选地取代的杂环;

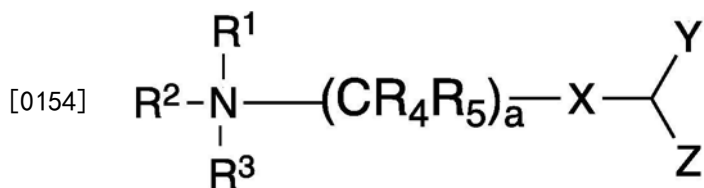
[0149] R<sub>5</sub>可不存在或存在,并且当存在时为氢或C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基;

[0150] m、n和p相同或不同,并且独立地为0或1,前提是m、n和p不同时为0;

[0151] q为0、1、2、3或4;和

[0152] Y和Z相同或不同,并且独立地是O、S或NH。

[0153] 在另一个实施方案中,阳离子性脂质具有下式:



[0155] 或其药学上可接受的盐,其中:

[0156] R<sub>1</sub>和R<sub>2</sub>各自独立地为H、烷基、烯基、炔基、环烷基、芳基、杂芳基和杂环基,

[0157] 其中烷基、烯基、炔基、环烷基、芳基、杂芳基和杂环基各自任选地被H、卤素、羟基、氰基、氧、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基取代；C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基任选地被卤素、羟基或烷氧基取代；

[0158] 或R<sub>1</sub>和R<sub>2</sub>与它们连接的氮原子结合在一起形成3-8元杂芳基或杂环基；其中杂芳基和杂环基各自任选地被H、卤素、羟基、氰基、氧、硝基、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基取代；C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基任选地被卤素、羟基或烷氧基取代；

[0159] R<sub>3</sub>不存在，或R<sub>3</sub>为H、烷基、烯基、炔基、环烷基、芳基、杂芳基或杂环基；

[0160] R<sub>4</sub>和R<sub>5</sub>各自独立地为H、烷基、烯基、炔基、环烷基、芳基、杂芳基或杂环基；

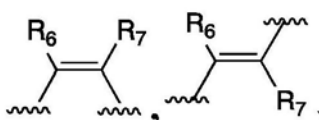
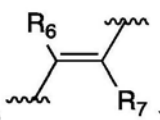
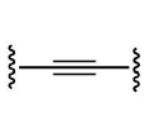
[0161] 其中烷基、烯基、炔基、环烷基、芳基、杂芳基和杂环基任选地被H、卤素、羟基、氰基、氧、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基取代；C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基任选地被卤素、羟基或烷氧基取代；

[0162] X为-O-、-S-、-NR<sub>4</sub>-、-S-S-、-OC(=O)-、-C(=O)O-、-OC(=O)O-、-NR<sub>4</sub>C(=O)-、C(=O)NR<sub>4</sub>-、-NR<sub>4</sub>C(=O)O-、-OC(=O)NR<sub>4</sub>-、-NR<sub>4</sub>C(=O)NR<sub>4</sub>-、-NR<sub>4</sub>C(=S)O-、OC(=S)NR<sub>4</sub>-、-NR<sub>4</sub>C(=S)NR<sub>4</sub>-、-CR<sub>4</sub>R<sub>5</sub>-；

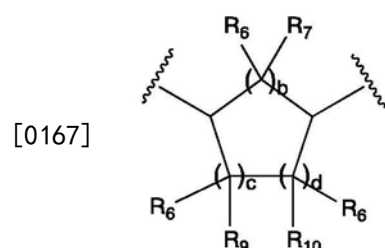
[0163] Y和Z独立地为具有式L<sub>1</sub>-(CR<sub>6</sub>R<sub>7</sub>)<sub>α</sub>-[L<sub>2</sub>-(CR<sub>6</sub>R<sub>7</sub>)<sub>β</sub>]<sub>γ</sub>-L<sub>3</sub>-R<sub>8</sub>的C<sub>10</sub>至C<sub>30</sub>基团，其中

[0164] L<sub>1</sub>为键、-(CR<sub>6</sub>R<sub>7</sub>)-、-O-、-CO-、-NR<sub>8</sub>-、-S-或其组合；

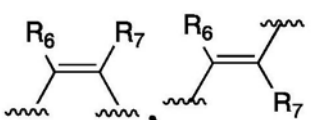
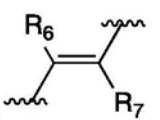
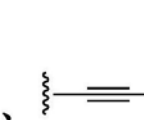
[0165] R<sub>6</sub>和R<sub>7</sub>各自独立地为H、卤素、羟基、氰基、任选地被卤素、羟基或烷氧基取代的C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基：

[0166] L<sub>2</sub>为键、-(CR<sub>6</sub>R<sub>7</sub>)-、-O-、-CO-、-NR<sub>8</sub>-、-S-、, , 或其

组合，或具有下式：

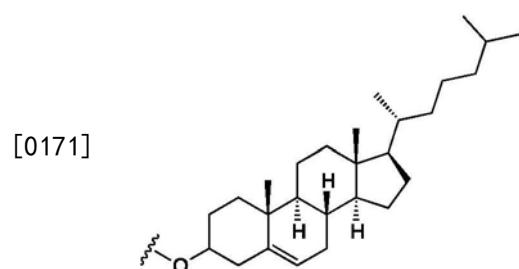


[0168] 其中b、c和d各自独立地为0、1、2或3，只要b、c和d之和为至少1并且不大于8；并且R<sub>9</sub>和R<sub>10</sub>各自独立地为R<sub>7</sub>，或相邻的R<sub>9</sub>和R<sub>10</sub>一起任选地为键；

[0169] L<sub>3</sub>为键、-(CR<sub>6</sub>R<sub>7</sub>)-、-O-、-CO-、-NR<sub>8</sub>-、-S-、, , 或其

其组合。

[0170] R<sub>8</sub>独立地为H、卤素、羟基、氰基、任选地被卤素、羟基或烷氧基取代的C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基、芳基、杂芳基或杂环基；或R<sub>8</sub>具有下式：



[0172] a为0、1、2、3或4；

[0173]  $\alpha$ 为0-6；

[0174]  $\beta$ 各自独立地为0-6；

[0175]  $\gamma$ 为0-6。

[0176] 其它合适的阳离子性脂质包括在约生理pH下具有净正电荷的阳离子性脂质,除了上文明确描述的那些阳离子性脂质外,还包括,N,N-二油酰-N,N-二甲基氯化铵(DODAC);N-(2,3-二油酰氧基)丙基-N,N--N-三乙基氯化铵(DOTMA);N,N-二硬脂酰-N,N-二甲基溴化铵(DDAB);N-(2,3-二油酰氧基)丙基-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTAP);1,2-二油酰氧基-3-三甲氨基丙烷盐酸盐(DOTAP.Cl);3. $\beta$ -(N--N',N'-二甲氨基乙烷)氨甲酰基)胆固醇(DC-Chol),N-(1-(2,3-二油酰氧基)丙基)-N-2-(精胺甲酰胺基)乙基)-N,N-二甲基三氟乙酸铵(DOSPA)、二(十八烷基)酰胺甘氨酸羧基精胺(DOGS)、1,2-二油酰基-3-二甲基丙烷铵(DODAP),N,N-二甲基-2,3-二油酰氧基)丙胺(DODMA)和N-(1,2-二肉豆蔻酰氧丙烷-3-基)-N,N-二甲基-N-羟乙基溴化铵(DMRIE)。另外,可使用许多商购可得的阳离子性脂质制剂诸如,例如,**LIPOFECTIN®**(包括DOTMA和DOPE,可从GIBCO/BRL获得),和**LIPOFECTAMINE®**(包含DOSPA和DOPE,可从GIBCO/BRL获得)。

[0177] 阳离子脂质以约30至约95的摩尔百分比的量存在于颗粒中。在一个实施方案中,阳离子性脂质以约30至约70的摩尔百分比的量存在。在一个实施方案中,阳离子性脂质以约40至约60的摩尔百分比的量存在。

[0178] 中性脂质

[0179] 在某些实施方案中,颗粒包括一种或多种中性脂质。

[0180] 术语“脂质”是指一组有机化合物,其为脂肪酸的酯并且特征在于在水中是不溶的但在许多有机溶剂中是可溶的。脂质通常被分为至少3类:(1)“简单脂质”,其包括脂肪和油以及蜡;(2)“复合脂质”,其包括磷脂类和糖脂类,和(3)“衍生脂质”诸如甾类。

[0181] 术语“中性脂质”是指在生理pH下以不带电荷或中性两性离子形式存在的许多脂质种类的任一种。代表性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。

[0182] 示例性脂质包括,例如,二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)、二油酰基磷脂酰胆碱(DOPC)、二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)、二油酰基磷脂酰甘油(DOPG)、二棕榈酰磷脂酰甘油(DPPG)、二油酰基-磷脂酰乙醇胺(DOPE)、棕榈酰油酰基磷脂酰胆碱(POPC)、棕榈酰油酰基-磷脂酰乙醇胺(POPE)和二油酰基-磷脂酰乙醇胺4-(N-马来酰亚胺基甲基)-环己烷-1-羧化物(DOPE-mal)、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-油酰基-磷脂酰乙醇胺(SOPE)和1,2-二油基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(transDOPE)。

[0183] 在一个实施方案中,中性脂质为1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DSPC)。

[0184] 甾醇

[0185] 在某些实施方案中,颗粒包含一种或多种甾醇。

[0186] 术语“甾醇”是指也被称为甾类醇的一个甾类亚组。甾醇通常被分为两类:(1)也称为“植物固醇”的植物甾醇和(2)也称为“动物固醇”的动物甾醇。



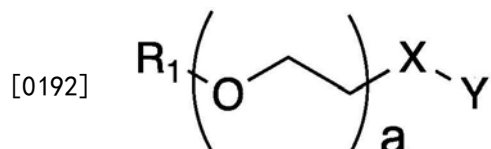
[0187] 示例性甾醇包括,例如,油菜甾醇、谷甾醇、豆甾醇、麦角固醇和胆固醇。在一个实施方案中,甾醇是胆固醇。

[0188] 表面活性剂

[0189] 在某些实施方案中,颗粒包含一种或多种表面活性剂。

[0190] 如本文中所用,术语“表面活性剂”是指含有疏水基团和亲水基团的非离子性、两亲性化合物。

[0191] 在一个实施方案中,表面活性剂由下式表示



[0193] 其中

[0194]  $R_1$ 为H、 $C_1$ - $C_6$ 烷基;

[0195]  $X$ 为 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NR_2-$ 、 $-S-S-$ 、 $-OC(=O)-$ 、 $-C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)O-$ 、 $-NR_2C(=O)-$ 、 $-C(=O)NR_2-$ 、 $-NR_2C(=O)O-$ 、 $-OC(=O)NR_2-$ 、 $-NR_2C(=O)NR_2-$ 、 $-NR_2C(=S)O-$ 、 $OC(=S)NR_2-$ 、 $-NR_2C(=S)NR_2-$ 、 $-CR_2R_3-$ ;

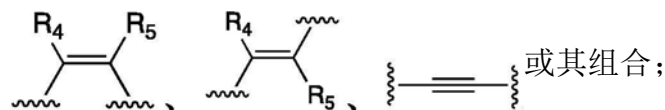
[0196]  $R_2$ 和 $R_3$ 各自独立地是H、烷基、烯基、炔基、环烷基、芳基、杂芳基或杂环基;

[0197] 其中烷基、烯基、炔基、环烷基、芳基、杂芳基和杂环基各自任选地被H、卤素、羟基、氰基、氧、 $C_1$ - $C_6$ 烷基取代; $C_1$ - $C_6$ 烷基任选地被卤素、羟基或烷氧基取代;

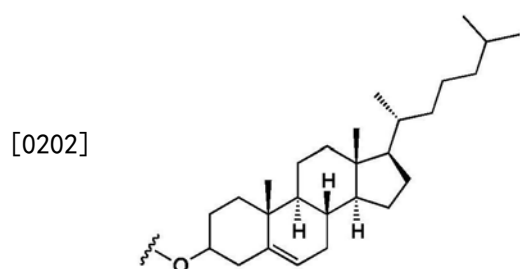
[0198]  $Y$ 为具有式 $L_1-(CR_4R_5)_\alpha-[L_2-(CR_4R_5)_\beta]_\gamma-L_3-R_6$ 的 $C_{10}$ 至 $C_{40}$ 基团,其中:

[0199]  $L_1$ 为键、 $-(CR_4R_5)-$ 、 $-O-$ 、 $-CO-$ 、 $-NR_2-$ 、 $-S-$ 或其组合; $R_4$ 和 $R_5$ 各自独立地为H、卤素、羟基、氰基、任选地被卤素、羟基或烷氧基取代的 $C_1$ - $C_6$ 烷基;

[0200]  $L_2$ 和 $L_3$ 各自独立地为键、 $-(CR_4R_5)-$ 、 $-O-$ 、 $-CO-$ 、 $-NR_2-$ 、 $-S-$ 、



[0201]  $R_6$ 独立地为H、卤素、羟基、氰基、任选被卤素、羟基或烷氧基取代的 $C_1$ - $C_6$ 烷基、芳基、杂芳基、或杂环基;或 $R_6$ 具有下式:



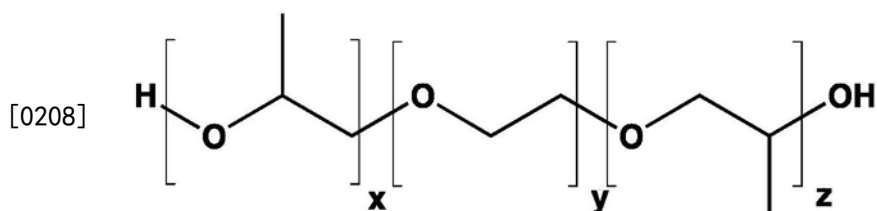
[0203]  $a$ 为2-100;

[0204]  $\alpha$ 为0-6;

[0205]  $\beta$ 各自独立地为0-6;

[0206]  $\gamma$ 为0-6。

[0207] 在另一个实施方案中,表面活性剂由下式表示



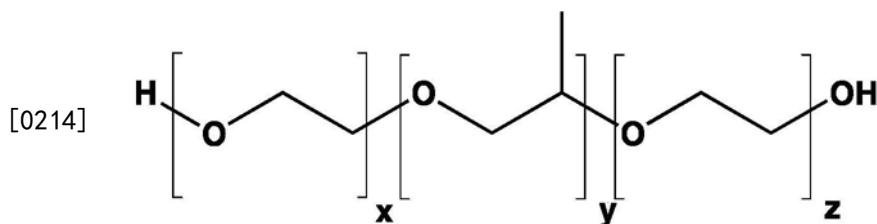
[0209] 其中：

[0210]  $x=1$ 至50；

[0211]  $y=1$ 至50；并且

[0212]  $z=1$ 至50。

[0213] 在另一个实施方案中，表面活性剂由下式表示



[0215] 其中：

[0216]  $x=1$ 至50；

[0217]  $y=1$ 至50；和

[0218]  $z=1$ 至50。

[0219] 在某些实施方案中，所述表面活性剂选自聚氧乙烯烷基醚、聚氧乙烯烷基酯、二嵌段共聚物和三嵌段共聚物。合适的表面活性剂包括聚氧乙烯(20)油基醚、聚氧乙烯(23)月桂基醚、聚氧乙烯(40)硬脂酸酯、聚(丙二醇)<sub>11</sub>-嵌段-聚(乙二醇)<sub>16</sub>-嵌段-聚(丙二醇)<sub>11</sub>、聚(丙二醇)<sub>12</sub>-嵌段-聚(乙二醇)<sub>28</sub>-嵌段-聚(丙二醇)<sub>12</sub>。

[0220] 在某些实施方案中，表面活性剂以约0.1至约20的摩尔百分比的量存在于颗粒中。在一个实施方案中，表面活性剂以约0.5至约10的摩尔百分比的量存在。在一个实施方案中，表面活性剂以约2的摩尔百分比存在于脂质纳米颗粒中。

[0221] 在一个实施方案中，表面活性剂为聚氧乙烯(20)油基醚。

[0222] 在一个实施方案中，表面活性剂为聚氧乙烯(40)硬脂酸酯。

[0223] 阴离子性高分子

[0224] 本发明的脂质纳米颗粒可用于阴离子性高分子的全身性或局部递送。

[0225] 如本文中所用，术语“阴离子性高分子”是这样的高分子，当pH升高至高分子的可电离基团的pK以上时，其为阴离子性的或变成阴离子性的(去质子化的)，但在更低的pH值下逐渐变得更加中性。在pK以上的pH值下，所述高分子则能与带正电荷的脂质(例如，阳离子性脂质)缔合。如本文中所用，术语“阴离子性高分子”包括假定在pH升高时带负电荷的两性离子性高分子。

[0226] 术语“阴离子性高分子”是指在选定的pH诸如生理pH下携带净负电荷的许多种类的任何种类。这样的高分子包括但不限于核酸、蛋白质、肽和碳水化合物。

[0227] 核酸

[0228] 本发明的脂质纳米颗粒可用于核酸的全身性或局部递送。

[0229] 如本文中所用,术语“核酸”意欲包括任何寡核苷酸或多核苷酸。含有多至50个核苷酸的片段通常称为寡核苷酸,更长的片段称为多核苷酸。在具体实施方案中,本发明的寡核苷酸的长度为20-50个核苷酸。在本发明的上下文中,术语“多核苷酸”和“寡核苷酸”是指由天然存在的碱基、糖和糖间(主链)键联组成的核苷酸或核苷单体的聚合物或寡聚物。术语“多核苷酸”和“寡核苷酸”还包括功能类似的包含非天然存在的单体的聚合物或寡聚物或其部分。这样的经修饰的或取代的寡核苷酸通常因性质诸如增强的细胞吸收和在核酸酶存在的情况下增强的稳定性而优先于天然形式。寡核苷酸被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为脱氧核糖的5-碳糖组成,所述脱氧核糖共价地连接至该糖的5'和3'碳上的磷酸以形成交替的无支链的聚合物。核糖寡核苷酸由类似的重复结构组成,其中5-碳糖是核糖。存在于根据本发明的脂质纳米颗粒中的核酸包括已知的核酸的任何形式。本文使用的核酸可以是单链DNA或RNA,或双链DNA或RNA,或DNA-RNA杂合体。双链DNA的实例包括结构基因,包括控制区和终止区的基因,和自我复制系统,诸如病毒或质粒DNA。双链RNA的实例包括siRNA和其它RNA干扰试剂。单链核酸包括反义寡核苷酸、核酶、microRNA、mRNA和三链形成寡核苷酸。

[0230] 在一个实施方案中,所述多核酸是反义寡核苷酸。在某些实施方案中,核酸是反义核酸、核酶、tRNA、snRNA、siRNA、shRNA、ncRNA、miRNA、mRNA、预凝缩的DNA或适体。

[0231] 术语“核酸”还指核糖核苷酸,脱氧核苷酸,经修饰的核糖核苷酸,经修饰的脱氧核糖核苷酸,经修饰的磷酸-糖主链寡核苷酸,其它核苷酸,核苷酸类似物及其组合,并且可以是单链的,双链的,或适当时,含有双链序列和单链序列两者的部分。

[0232] 如本文中所用,术语“核苷酸”一般包括下文中定义的以下术语:核苷酸碱基、核苷、核苷酸类似物和通用核苷酸。

[0233] 如本文所用,术语“核苷酸碱基”是指取代的或未取代的母体芳环。在一些实施方案中,芳环含有至少一个氮原子。在一些实施方案中,核苷酸碱基能够与适当地互补的核苷酸碱基形成Watson-Crick和/或Hoogsteen氢键。示例性核苷酸碱基及其类似物包括,但不限于,嘌呤诸如2-氨基嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、腺嘌呤(A)、亚乙烯基腺嘌呤、N6-2-异戊烯腺嘌呤(6iA)、N6-2-异戊烯基-2-甲基硫腺嘌呤(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-巯基嘧啶、6-巯鸟嘌呤(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-巯基胸腺嘧啶(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;烟支杯伞素;碱基(Y)。在一些实施方案中,核苷酸碱基是通用核苷酸碱基。另外的示例性核苷酸碱基可见于Fasman,1989,Practical Handbook of Biochemistry and Molecular Biology,pp.385-394,CRC Press,Boca Raton,Fla.及本文中引用的参考文献。通用碱基的其它实例可见于,例如,Loakes,N.A.R.2001,29:2437-2447和Seela N.A.R.2000,28:3224-3232中。

[0234] 如本文中所用,术语“核苷”是指具有共价连接于五碳糖的C-1'碳的核苷酸碱基的化合物。在一些实施方案中,键联是通过杂芳环氮的。典型的五碳糖包括但不限于这样的无碳糖,其中碳原子的一个或多个各自独立地被相同或不同的--R、--OR、--NRR或卤素基团的一个或多个取代,其中每一个R独立地为氢、(C1-C6)烷基或(C5-C14)芳基。五碳糖可以是饱

和的或未饱和的。示例性五碳糖及其类似物包括,但不限于,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'-氟代核糖、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。也参见,例如,2'-O-甲基、4'- $\alpha$ -异头核苷酸、1'- $\alpha$ -异头核苷酸(Asseline (1991) Nucl. Acids Res. 19:4067-74)、2'-4'-和3'-4'-连接的和其它"锁定的"或"LNA"二环糖修饰(WO 98/22489; WO 98/39352; WO 99/14226)。"LNA"或"锁核酸"是被构象锁定以使核糖环被2'-氧与3'-或4'-碳之间的亚甲基键联约束的DNA类似物。由键联强加的构象约束通常增强针对互补序列的结合亲和力和增强这样的双链体的热稳定性。

[0235] 糖包括2'-或3'-位上的修饰,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、烷基氨基、氟基、氯基和溴基。核苷和核苷酸包括天然D构型异构体(D-型),以及L构型异构体(L-型)(Beigelman, 美国专利No. 6, 251, 666; Chu, 美国专利No. 5, 753, 789; Shudo, EP0540742; 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)。当核碱基为嘌呤例如A或G时,核糖附接于核碱基的N9-位置。当核碱基为嘧啶例如C、T或U时,五碳糖附接于核碱基的N1位置(Kornberg和Baker, (1992) DNA Replication, 第2版, Freeman, San Francisco, Calif.)。

[0236] 核苷的五碳糖碳的一个或多个可被磷酸酯取代。在一些实施方案中,所述磷酸酯附接于五碳糖人3'-或5'-碳。在一些实施方案中,核苷是其中核苷酸碱基为嘌呤、7-脱氮杂嘌呤、嘧啶、通用核苷酸碱基、特定核苷酸碱基或其类似物的那些核苷。

[0237] 如本文中所用,术语"核苷酸类似物"是指其中五碳糖和/或核苷酸碱基和/或核苷的一个或多个磷酸酯可被其各自的类似物替代的实施方案。在一些实施方案中,示例性五碳糖类似物是上述的那些类似物。在一些实施方案中,核苷酸类似物具有上述核苷酸碱基类似物。在一些实施方案中,示例性磷酸酯类似物包括,但不限于,烷基膦酸酯、甲基膦酸酯、氨基膦酸酯、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、phosphoroanilothioate、phosphoroanilidate、氨基膦酸酯、硼代磷酸酯,并且可包括相关抗衡离子。其它核酸类似物和碱基包括例如嵌入核酸(INA, 如Christensen and Pedersen, 2002中描述的)和AEGIS碱基(Eragen, 美国专利No. 5, 432, 272)。各种核酸类似物的另外的描述还可见于例如以下文献中:Beaucage等, Tetrahedron 49(10):1925(1993)和本文中的参考文献; Letsinger, J. Org. Chem. 35:3800(1970); Sprinzl等, Eur. J. Biochem. 81:579(1977); Letsinger等, Nucl. Acids Res. 14:3487(1986); Sawai等, Chem. Lett. 805(1984); Letsinger等, J. Am. Chem. Soc. 110:4470(1988); 和Pauwels等, Chemica Scripta 26:141(1986)、硫代磷酸酯(Mag等, Nucleic Acids Res. 19:1437(1991); 和美国专利No. 5, 644, 048。其它核酸类似物包含二硫代磷酸酯(Briu等, J. Am. Chem. Soc. 111:2321(1989))、O-甲基亚磷酰胺键联(参见Eckstein, Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, Oxford University Press)、具有阳性主链的那些(Denpcy等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:6097(1995); 非离子性主链(美国专利No. 5, 386, 023、5, 386, 023、5, 637, 684、5, 602, 240、5, 216, 141和4, 469, 863; Kiedrowshi等, Angew. Chem. Intl. Ed. English 30:423(1991); Letsinger等, J. Am. Chem. Soc. 110:4470

(1988); Letsinger等, *Nucleoside&Nucleotide* 13:1597 (194); 第2和3章, ASC Symposium Series 580, "Carbohydrate Modifications in Antisense Research," Ed. Y.S. Sanghui 和 P. Dan Cook; Mesmaeker等, *Bioorganic&Medicinal Chem. Lett.* 4:395 (1994); Jeffs等, *J. Biomolecular NMR* 34:17 (1994); *Tetrahedron Lett.* 37:743 (1996)) 和非核糖主链, 包括美国专利 No. 5,235,033 和 5,034,506 以及 Chapters 6 and 7, ASC Symposium Series 580, "Carbohydrate Modifications in Antisense Research," Ed. Y.S. Sanghui 和 P. Dan Cook 的第6和7章中描述的那些非核糖主。含有一个或多个碳环糖的核酸也包括在核酸的定义内 (参见 Jenkins等, *Chem. Soc. Rev.* (1995) pp.169-176)。在 Rawls, *C&E News* Jun. 2, 1997, 第55页中也描述了几种核酸类似物。

[0238] 如本文中所用, 术语“通用核苷酸碱基”或“通用碱基”是指芳环部分, 其可含有或不含有氮原子。在一些实施方案中, 通用碱基可共价附接于五碳糖的 C-1' 碳, 以产生通用核苷酸。在一些实施方案中, 通用核苷酸碱基不与另一个核苷酸碱基特异性氢键合。在一些实施方案中, 通用核苷酸碱基与核苷酸碱基氢键合, 多至和包括特定靶多核苷酸中的所有核苷酸碱基。在一些实施方案中, 核苷酸碱基可通过疏水堆积与同一核酸链上的相邻核苷酸碱基相互作用。通用核苷酸包括, 但不限于脱氧-7-氮杂吡啶三磷酸 (d7AITP)、脱氧异喹啉酮三磷酸 (dICSTP)、脱氧丙炔基异喹啉酮三磷酸 (dPICSTP)、脱氧甲基-7-氮杂吡啶三磷酸 (dM7AITP)、脱氧 ImPy 三磷酸 (dImPyTP)、脱氧 PP 三磷酸 (dPPTP) 或脱氧丙炔基-7-氮杂吡啶三磷酸 (dP7AITP)。这样的通用碱基的其它实例可见于, 除其它以外公开的美国申请系列 No. 10/290,672 和美国专利 No. 6,433,134 中。

[0239] 如本文中所用, 术语“多核苷酸”和“寡核苷酸”可互换使用并且意指核苷酸单体的单链和双链聚合物, 包括通过核苷酸间磷酸二酯键键联例如 3'-5' 和 2'-5' 反向键联例如 3'-3' 和 5'-5' 分支结构或核苷酸间类似物连接的 2'-脱氧核糖核苷酸 (DNA) 和核糖核苷酸 (RNA)。多核苷酸具有相关抗衡离子, 诸如 H<sup>+</sup>、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>、三烷基铵、Mg<sup>2+</sup>、Na<sup>+</sup> 等。多核苷酸可完全由脱氧核糖核苷酸, 完全由核糖核苷酸或由其嵌合成分组成。多核苷酸可包含核苷酸间、核碱基和/或糖类似物。多核苷酸的大小通常为少数单体单元例如 3-40 个 (此时它们在本领域中更常见地通常被称为寡核苷酸) 至数千个单体核苷酸单元。除非另有所指, 否则每当提及多核苷酸序列表示时, 将理解核苷酸是从左至右的 5' 至 3' 的顺序, 并且“A”表示脱氧腺苷, “C”表示脱氧胞嘧啶, “G”表示脱氧鸟苷, 以及“T”表示胸苷, 除非另有所指。

[0240] 如本文中所用, “核碱基”是指为利用核酸技术或利用肽核酸技术来由此产生可序列特异性结合于核酸的多聚体的技术人员所公知的那些天然存在的和非天然存在的杂环部分。合适的核碱基的非限定性实例包括: 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-氨基嘌呤、N9-(2-氨基-6-氯嘌呤)、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)。合适的核碱基的其它非限定性实例包括 Buchardt 等 (W092/20702 或 W092/20703) 的图 2 (A) 和 2 (B) 中举例说明的那些核碱基。

[0241] 如本文中所用, “核碱基序列”意指包含含有核碱基的亚单位的多聚体的任何区段, 或两个或更多个区段的聚集体 (例如, 两个或更多个寡聚物嵌段的聚集核碱基序列)。合适的多聚体或多聚体区段的非限制性实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组合寡聚物、核酸类似物和/或核酸模拟物。

[0242] 如本文中所用,“多核碱基链”意指包含核碱基亚单位的完整单个聚合物链。例如,双链核酸的单核酸链为多核碱基链。

[0243] 如本文中所用,“核酸”为具有从核苷酸或其类似物形成的主链的含核碱基序列聚合物或聚合物区段。

[0244] 优选的核酸为DNA和RNA。

[0245] 如本文中所用,核酸还可指“肽核酸”或“PNA”,其意指包含两个或更多个PNA亚单位(残基)而非核酸亚单位(或其类似物)的任何寡聚物或聚合物区段(例如,嵌段寡聚物),包括,但不限于如美国专利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(所述专利全部通过引用并入本文)中所提及或称为肽核酸的寡聚物或聚合物区段的任一种。术语“肽核酸”或“PNA”还适用于包含以下出版物中描述的那些核酸模拟物的两个或更多个亚单位的任何寡聚物或聚合物区段:Lagriffoul等,Bioorganic&Medicinal Chemistry Letters,4:1081-1082(1994);Petersen等,Bioorganic&Medicinal Chemistry Letters,6:793-796(1996);Diderichsen等,Tett.Lett.37:475-478(1996);Fujii等,Bioorg.Med.Chem.Lett.7:637-627(1997);Jordan等,Bioorg.Med.Chem.Lett.7:687-690(1997);Krotz等,Tett.Lett.36:6941-6944(1995);Lagriffoul等,Bioorg.Med.Chem.Lett.4:1081-1082(1994);Diederichsen,U.,Bioorganic&Medicinal Chemistry Letters,7:1743-1746(1997);Lowe等,J.Chem.Soc.Perkin Trans.1,(1997)1:539-546;Lowe等,J.Chem.Soc.Perkin Trans.11:547-554(1997);Lowe等,J.Chem.Soc.Perkin Trans.11:555-560(1997);Howarth等,J.Org.Chem.62:5441-5450(1997);Altmann,K-H等,Bioorganic&Medicinal Chemistry Letters,7:1119-1122(1997);Diederichsen,U.,Bioorganic&Med.Chem.Lett.,8:165-168(1998);Diederichsen等,Angew.Chem.Int.Ed.,37:302-305(1998);Cantin等,Tett.Lett.,38:4211-4214(1997);Ciapetti等,Tetrahedron,53:1167-1176(1997);Lagriffoule等,Chem.Eur.J.,3:912-919(1997);Kumar等,Organic Letters 3(9):1269-1272(2001);以及如W096/04000中公开的Shah等的基于肽的核酸模拟物(PENAMS)。

[0246] 本发明的脂质纳米颗粒与其它类似构成材料的不同在于其形态学,并且特征为具有基本上固体的核心。具有基本上固体的核心的脂质纳米颗粒是在内部不具有扩展的水性区域并且具有主要为脂质的内部的颗粒。在一个实施方案中,扩展的区域是具有大于一半颗粒体积的体积的连续水性区域。在第二实施方案中,扩展的水性区域超过颗粒体积的25%。内部水性区域的程度可以通过电子显微镜来测定,并显示为低电子密度的区域。另外,因为固体核心纳米颗粒的内部主要是脂质,因此每构成颗粒的脂质的颗粒水含量(“截留容积”)少于具有相同半径的单层双分子层脂质囊泡所预期的水性量。在一个实施方案中,截留容积小于具有相同半径的单层双分子层囊泡所预期的截留容积的50%。在第二实施方案中,截留容积小于具有相同半径的单层双分子层囊泡所预期的截留容积的25%。在第三实施方案中,截留容积小于颗粒的总体积的20%。在一个实施方案中,每脂质的截留容积小于2微升/微摩尔脂质。在另一个实施方案中,截留容积小于1微升/微摩尔脂质。另外,虽然双分子层脂质囊泡的每脂质截留容积随着囊泡的半径增加而显著增加,但每脂质截留

容积不随着固体核心纳米颗粒的半径增加而显著增加。在一个实施方案中,随着平均尺寸从20nm的直径增加至100nm的直径,每脂质截留容积增加小于50%。在第二实施方案中,随着平均尺寸从20nm的直径增加至100nm的直径,每脂质截留容积增加小于25%。截留容积可使用文献中描述的多种技术来测量。因为固体核心系统在颗粒内部含有脂质,所以每摩尔脂质产生的给定半径的颗粒的总数小于双分子层囊泡系统所预期的总数。每摩尔脂质产生的颗粒数目可通过除其它以外荧光技术来测量。

[0247] 本发明的脂质纳米颗粒还可通过电子显微镜来表征。具有基本上固体的核心的本发明的颗粒具有如通过电子显微镜所看到的电子致密核心。电子密度是确定的以使得固体核心颗粒的投影区域的内部50%的区域平均电子密度不少于颗粒周围的最大电子密度的x% (x=20%、40%、60%)。电子密度被计算为目标区域的图像密度与不含有纳米颗粒的区域中的背景强度之差的绝对值。

#### [0248] 治疗性物质

[0249] 如本文中所用,术语“治疗性物质”被定义为旨在提供药理活性或以其它方式在疾病的诊断、治愈、缓解、治疗或预防中具有直接作用,或在恢复、校正或修改生理功能中具有直接作用的物质。治疗性物质包括但不限于小分子药物、核酸、蛋白质、肽、多糖、无机离子和放射性核素。

#### [0250] 研究试剂

[0251] 如本文中所用,术语“研究试剂”被定义为旨在提供确定的活性或以其它方式对细胞、组织或器官的生物学效应具有直接影响的物质。研究试剂包括但不限于小分子有机化合物(例如,具有小于800g/摩尔或小于500g/摩尔的分子量的有机化合物)、核酸、蛋白质、肽、多糖、无机离子和放射性核素。核酸研究试剂的实例包括但不限于:反义寡核苷酸、核酶、microRNA、mRNA、核酶、tRNA、snRNA、siRNA、shRNA、ncRNA、miRNA、mRNA、预凝缩的DNA、pDNA或适体。核酸研究试剂被用于沉默基因(使用例如siRNA)、表达基因(使用例如mRNA)、编辑基因组(使用例如CRISPR/Cas9)。

#### [0252] 聚合物

[0253] 如本文中所用,术语“聚合物”是指主要或完全从大量键合在一起的相似单元构建的通常高分子量的化合物。这样的聚合物包括众多天然、合成和半合成聚合物的任一种。

#### [0254] 天然聚合物

[0255] 术语“天然聚合物”是指来源于自然界的许多聚合物种类的任一种。这样的聚合物包括但不限于多糖、纤维素、壳多糖和藻酸盐。

#### [0256] 合成聚合物

[0257] 术语“合成聚合物”是指未在自然界中发现的许多合成聚合物种类的任一种。这样的合成聚合物包括,但不限于合成同聚物和合成共聚物。合成同聚物包括,但不限于聚乙二醇、聚丙交酯、聚乙交酯、聚丙烯酸酯、聚甲基丙烯酸酯、聚-ε-己内酯、聚原酸酯、聚酐、多聚赖氨酸和聚乙烯亚胺。“合成共聚物”是指由两个或更多个合成同聚物亚单位构成的多种合成聚合物种类的任一种。这样的合成共聚物包括,但不限于聚(丙交酯-共-乙交酯)、聚(丙交酯)-聚(乙二醇)、聚(丙交酯-共-乙交酯)-聚(乙二醇)和聚(ε-己内酯)-聚(乙二醇)。

#### [0258] 半合成聚合物

[0259] 术语“半合成聚合物”是指通过天然聚合物的化学或酶促处理衍生的许多聚合物

的任一种。这样的聚合物包括,但不限于羧甲基纤维素、乙酰化羧甲基纤维素、环糊精、壳聚糖和明胶。

[0260] 聚合物缀合物

[0261] 如本文中所用,术语“聚合物缀合物”是指通过将一个或多个分子种类共价或非共价地缀合于聚合物制备的化合物。这样的聚合物缀合物包括,但不限于聚合物-治疗性物质缀合物。

[0262] 聚合物-治疗性物质缀合物

[0263] 如本文中所用,术语“聚合物-治疗性物质缀合物”是指其中缀合的分子种类的一种或多种是治疗性物质的聚合物缀合物。这样的聚合物-治疗性物质缀合物包括,但不限于,聚合物-药物缀合物。

[0264] 聚合物-药物缀合物

[0265] 如本文中所用,术语“聚合物-药物缀合物”是指缀合至任意多种药物种类的任意多种聚合物种类。这样的聚合物药物缀合物包括,但不限于乙酰基甲基纤维素-聚乙二醇-多西紫杉醇。

[0266] 如上文中指出的,本发明的纳米颗粒由颗粒形成物质组成。颗粒形成物质包括,除其它组分以外,如本文所述的脂质和聚合物。

[0267] 以下实施例被提供用于举例说明而非限制本发明的目的。

## 实施例

[0268] 材料

[0269] 1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DSPC)购自Avanti Polar Lipids (Alabaster,AL,USA),胆固醇获自Sigma(St Louis,MO,USA),1,17-双(2-辛基环丙基)十七烷-9-基4-(二甲基氨基)丁酸酯(CL,例如,阳离子性脂质)由Avanti Polar Lipids (Alabaster,AL,USA)合成,聚乙二醇-二肉豆蔻酰基丙胺(PEG-c-DMA)由药物研究和开发中心(Center for Drug Research and Development)(Vancouver,BC,Canada)合成。21聚体双链体siRNA用于包封在LNP系统中。

[0270] 小体积的siRNA-LNP系统的代表性制备

[0271] 首先将CL、DSPC、胆固醇和PEG-脂质以50:10:38.5:1.5的摩尔比和30.5mg/mL的总脂质浓度溶解在乙醇中以产生乙醇脂质溶液。将siRNA以0.927mg/mL的浓度溶解在25mM醋酸盐,pH=4.0缓冲液中以产生水性siRNA溶液。使用0.09(wt/wt)的靶siRNA/脂质比率。将40μL PBS用移液器移入装置的出口孔。将30μL水性siRNA溶液用移液器转移至siRNA入口孔中。将10μL乙醇脂质溶液用移液器移入脂质入口孔。随后将歧管夹在入口孔上方,使用Luer-锁式注射器进行加压。加压推动入口孔中的试剂通过装置并进入出口孔,其中它们立即被预加载在出口孔中的PBS以1:1的比率稀释。通过用移液器移出出口孔来回收80μL的样品体积,将其以1:1的比率用80μL PBS进一步稀释。

[0272] 以下方案参考图3、7、9和10。

[0273] 低死体积装置方案(160μL制剂):

[0274] 1.将40μL的稀释缓冲液(1X PBS)添加至出口端口。

[0275] 2.将30μL水性原液(具有siRNA)添加至标记有“水相”的入口端口。



- [0276] 3. 将10μL的脂质原液添加至标记有“脂质”的入口端口。
- [0277] 4. 随后,将芯片置于夹持装置中,其中歧管在芯片顶部,以使得两个入口端口均被定位在O型环内部(使用夹持装置上的棒作为引导放置歧管以确保两个入口端口均被定位在O型环内部)。
- [0278] 5. 小心地降低夹持块以使得其位于歧管上并推动杠杆朝向芯片以将芯片原位固定以及密封入口端口在歧管的O型环内。
- [0279] 6. 用约2mL的空气充入3mL注射器,将其固定至歧管的顶侧上的Luer锁端口。
- [0280] 7. 快速推动柱塞。
- [0281] 8. 从出口端口收集制剂。
- [0282] 9. 将80μL的稀释缓冲液(1X PBS)添加至制剂并上下抽吸数次以确保良好混合。
- [0283] 洗涤装置:
- [0284] 1. 将40μL稀释的水和乙醇添加至分别标记有“水相”和“脂质”的入口端口。
- [0285] 2. 将芯片固定在歧管上并利用2mL的空气加压。从出口端口除去废液。
- [0286] 3. 重复上述步骤直至芯片清洁和不含任何沉积物。
- [0287] 4. 将空气推动通过芯片(无任何液体)以排出芯片内部的剩余流体。
- [0288] 5. 用Kimwipe擦拭所有3个端口。
- [0289] 6. 让芯片在室温干燥(花费约1.5至2小时)。
- [0290] 制造的纳米颗粒是包封21-核苷酸双链体siRNA的阳离子性脂质:DSPC:胆固醇:PEG-脂质(50:10:38.5:1.5)。纳米颗粒溶液的终体积为160μL。
- [0291] 小体积的mRNA-LNP系统的代表性制备
- [0292] 上述用于siRNA-LNP系统的方法可适用于制备mRNA-LNP。除将mRNA溶解在75mM醋酸盐,pH=4.0缓冲液外,方法基本上相同,并且如以正的氨基基团对负的磷酸基团的比率表示的(+/-)电荷比从3:1增加至8:1。
- [0293] LNP表征。使用Malvern Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments, Westboro, MA, USA),通过动态光散射测定粒度。使用强度加权分布数据,将两个独立测量的平均值用于每一个样品。使用Quant-iT RiboGreen RNA测定试剂盒(Life Technologies, Carlsbad, CA, USA),在LNP裂解去垢剂Triton X-100不存在和存在的情况下从样品的荧光信号的比率测定包封效率(%EE)。使用下式计算包封效率:
- [0294]  $\%EE = 1 - (F_{\text{Triton}}) / (F_{+\text{Triton}})$
- [0295] 其中:
- [0296]  $F_{\text{Triton}}$  = 在Triton X-100不存在的情况下的荧光信号
- [0297]  $F_{+\text{Triton}}$  = 在Triton X-100存在的情况下的荧光信号
- [0298] 所有报告的结果被报告为三个(3)独立实验的平均值。
- [0299] 使用图3的装置如上所述制备的脂质纳米颗粒的生产的粒度、颗粒多分散性和被包封的活性剂的百分比概述于表1中。
- [0300] 表1. 液体纳米颗粒的特征

[0301]

混合器通道宽度	尺寸 (nm)	PDI	包封效率
200 $\mu\text{m}$	94.1	0.11	90.60%

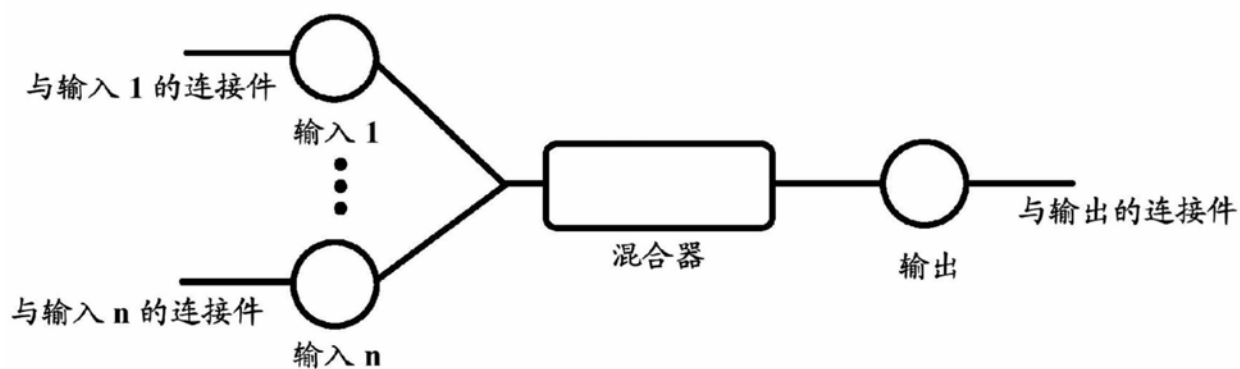
[0302] ZDV制剂的体外测试

[0303] 通过在大鼠E18皮质神经元培养物(与神经胶质和星形细胞共培养的)上进行体外测试,来将使用本发明的代表性小体积微流体装置(零死体积芯片(Zero Dead Volume Chip))合成的siRNA-脂质纳米颗粒(siRNA-LNP)与使用NanoAssemblr(可从Precision NanoSystems, Vancouver, British Columbia, Canada商购获得的用于制造纳米颗粒的流体装置)制备的那些siRNA-脂质纳米颗粒进行比较。在DIV 13(体外天数)以每ml细胞培养基100ng PTEN siRNA的剂量转染细胞。随后在第3天和第8天通过RT-qPCR(以肌动蛋白 $\beta$ 用作参照基因)分析PTEN基因表达的敲低。两种siRNA-LNP制剂的PTEN敲低的水平相似,如图11中所示。

[0304] 通过在大鼠E18皮质神经元培养物(与神经胶质和星形细胞共培养的)上进行体外测试,来将使用小体积微流体装置(零死体积装置)合成的GFP mRNA-LNP与使用NanoAssemblr制备的那些GFP mRNA-LNP进行比较。在DIV 13(体外天数)以每ml细胞培养基500ng GFP mRNA的剂量转染细胞。在第3天通过流式细胞术分析GFP的表达。观察到NanoAssemblr和零死体积芯片mRNA-LNP制剂的GFP表达水平与如在图12中可看到的相似。

[0305] 虽然已举例说明和描述了本发明的优选实施方案,应当理解,可在其中进行各种改变而不背离本发明的精神和范围。

以小体积制造颗粒的挑战的示意图



包含损耗流体的死体积存在于:

- 1) 与输入的连接件
- 2) 输入
- 3) 从输入至混合器的通道
- 4) 混合器
- 5) 从混合器至输出的通道

图1

用于以小体积制备颗粒的示例性装置的示意图

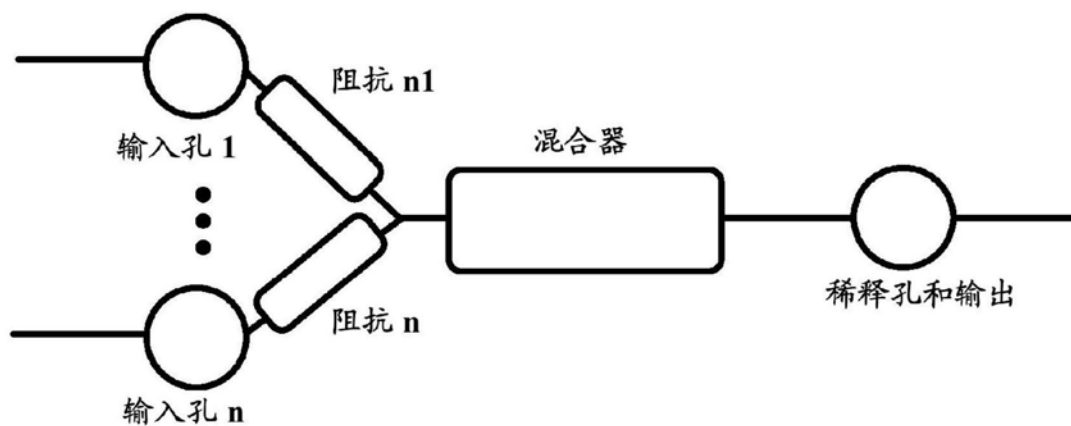


图2

用于以小体积制备颗粒的示例性装置

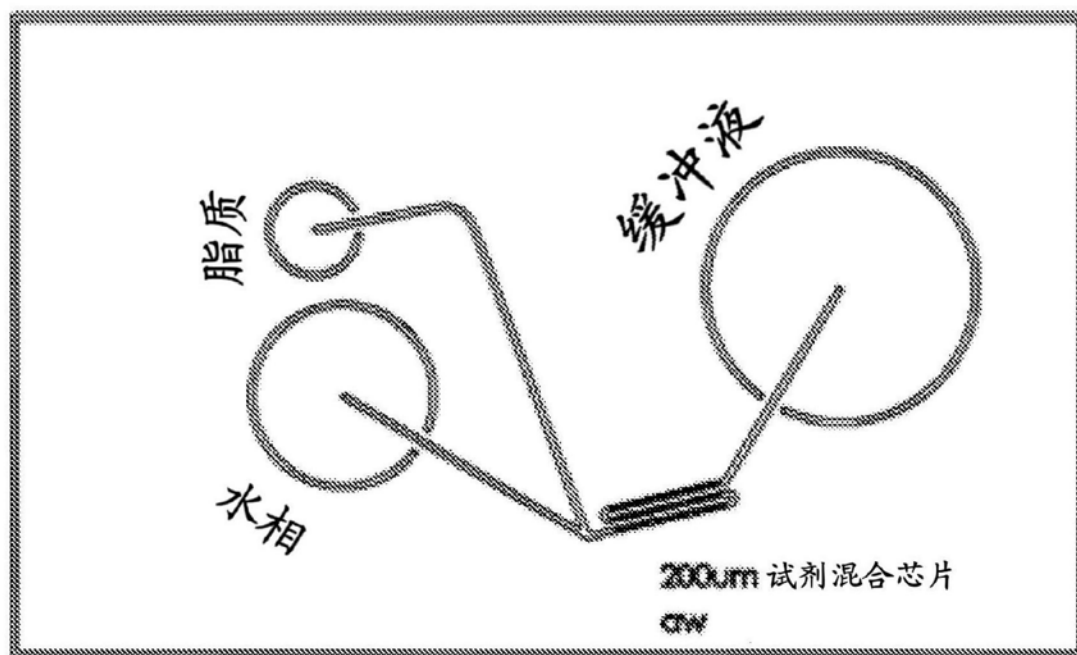


图3

用于以小体积制备颗粒的示例性装置的示意图

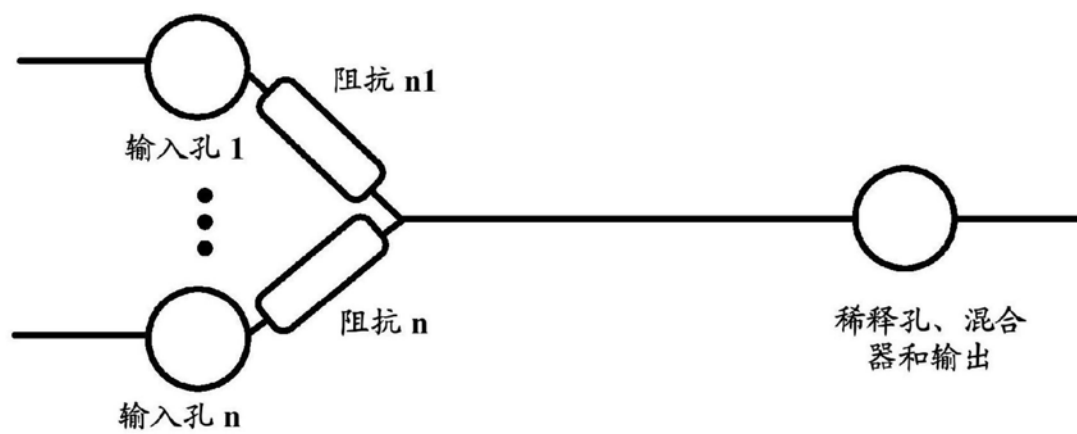


图4

用于以小体积制备颗粒的示例性装置

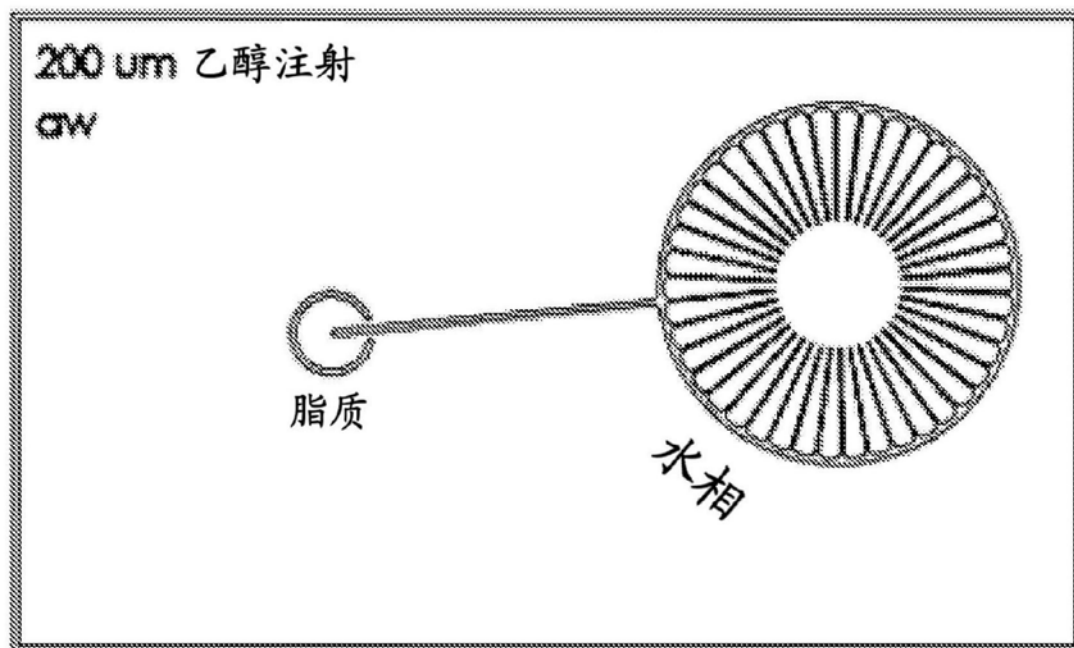


图5

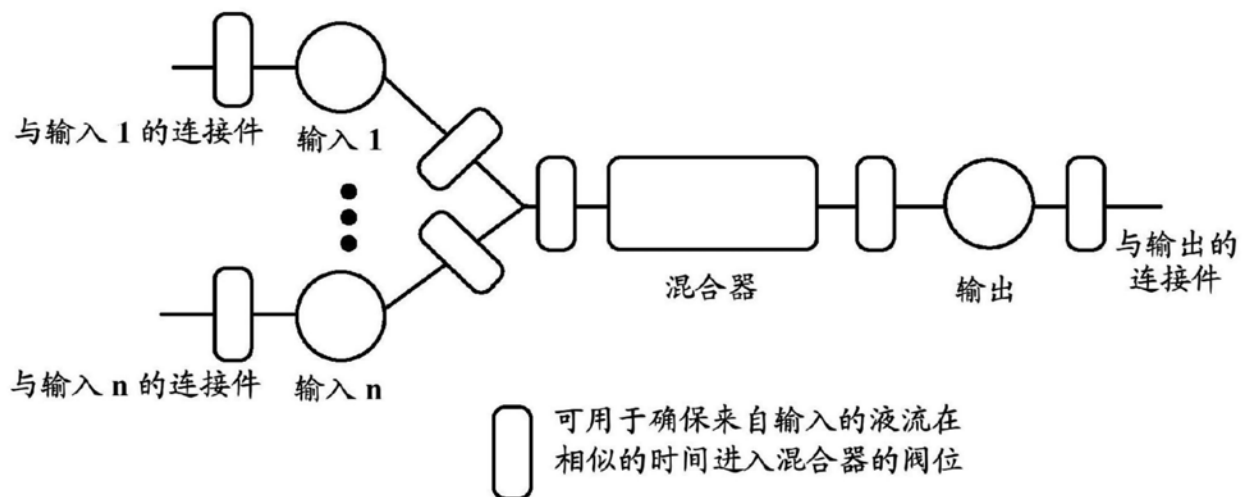


图6

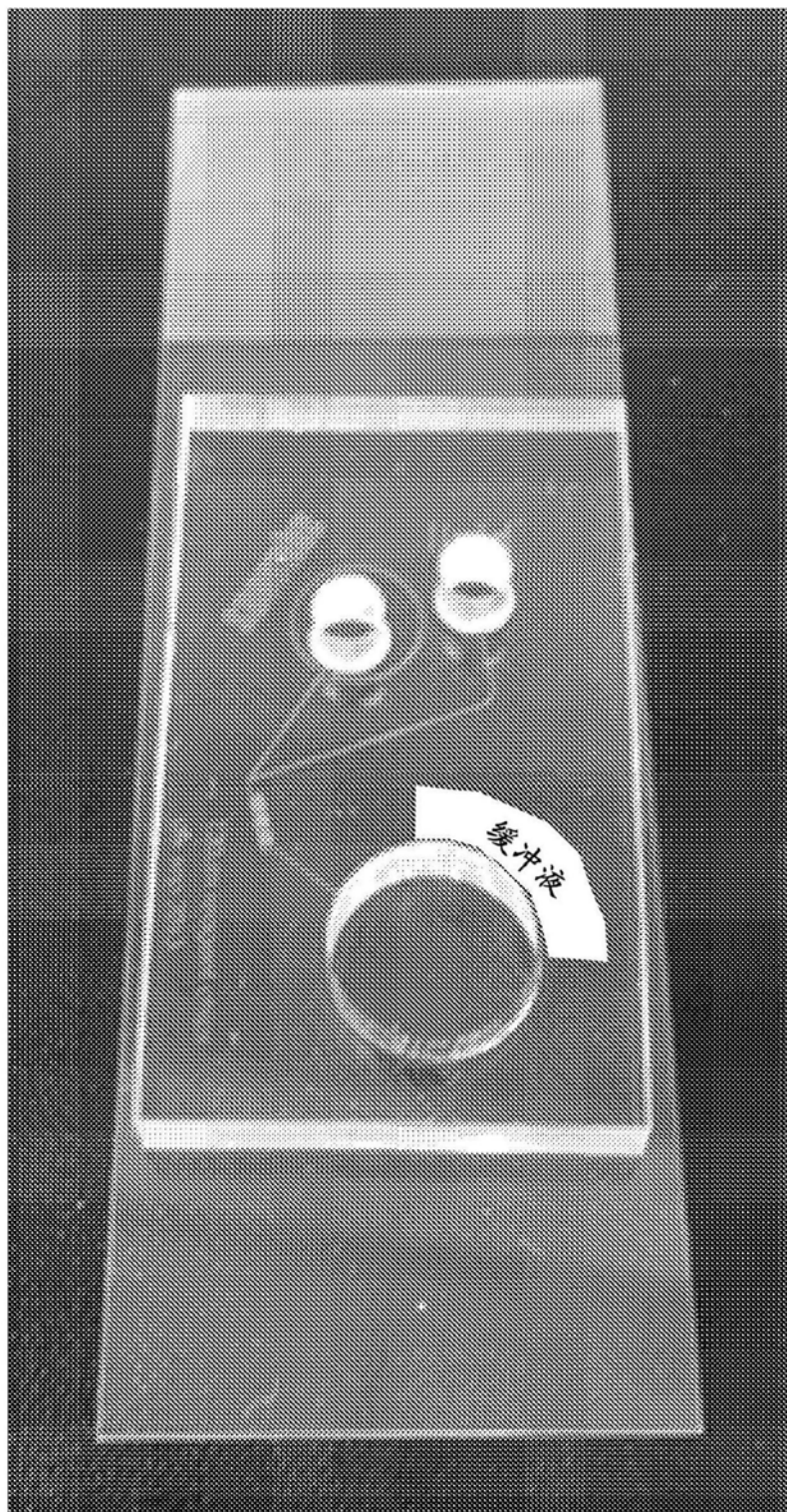


图7

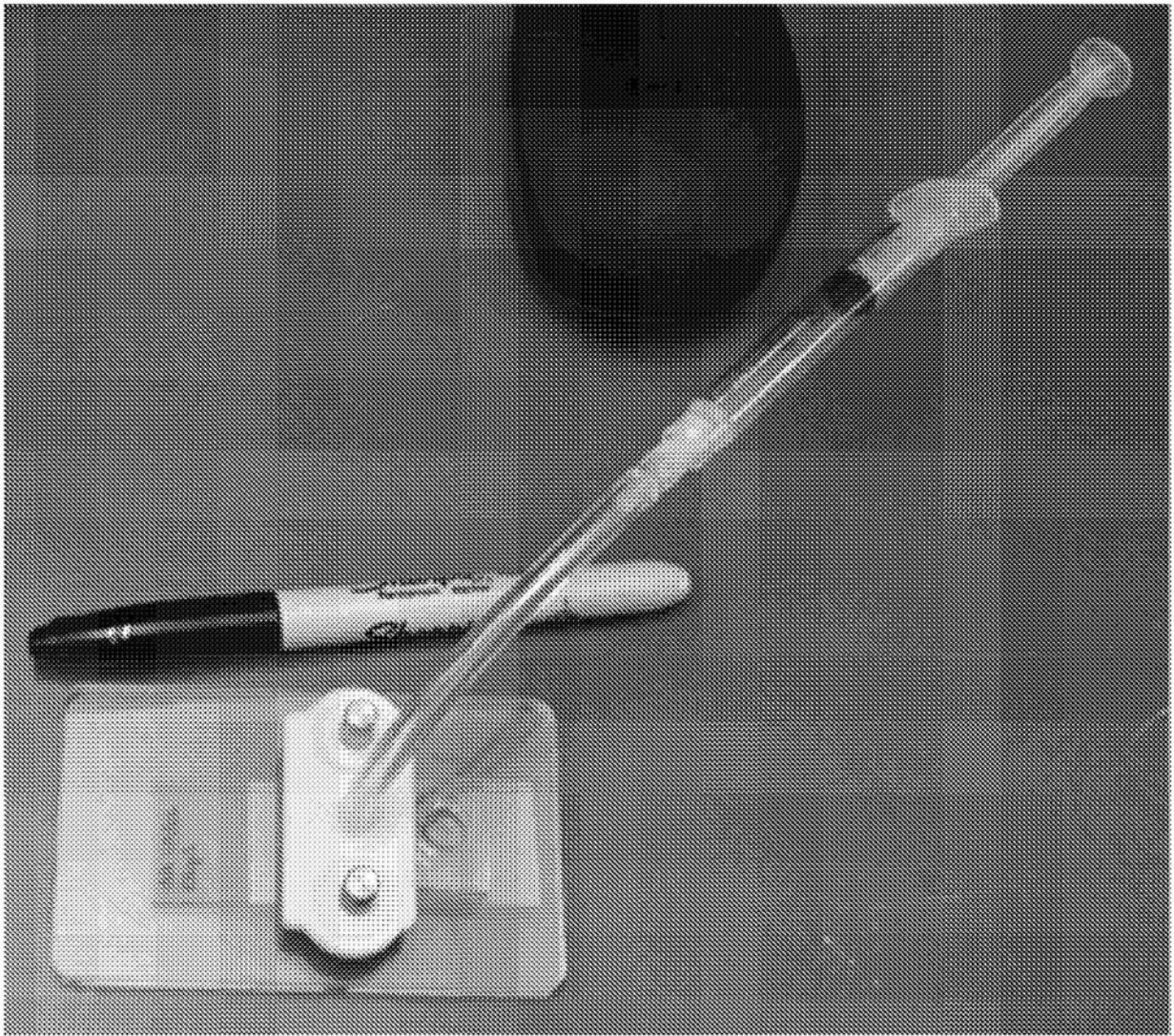


图8



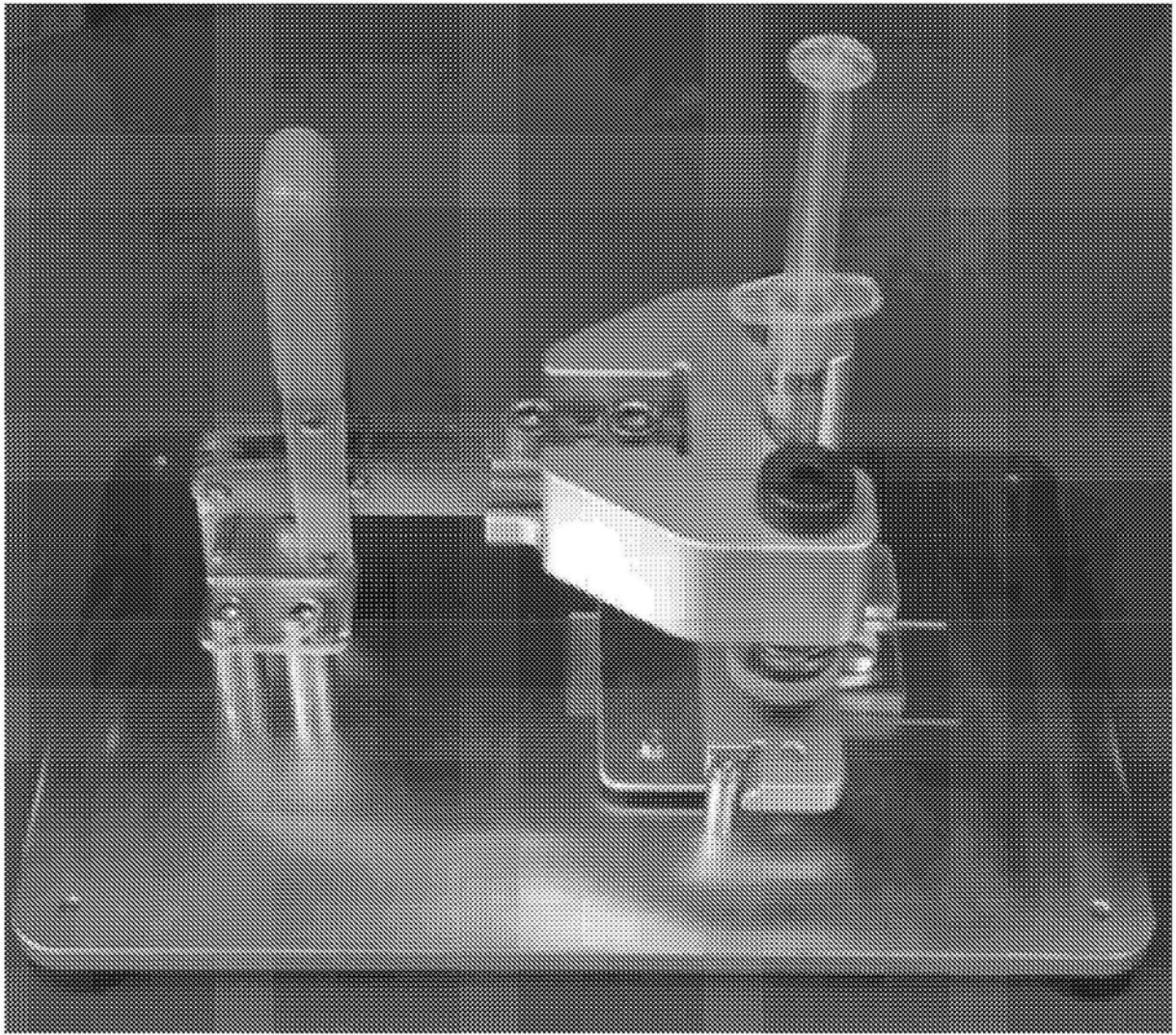


图9



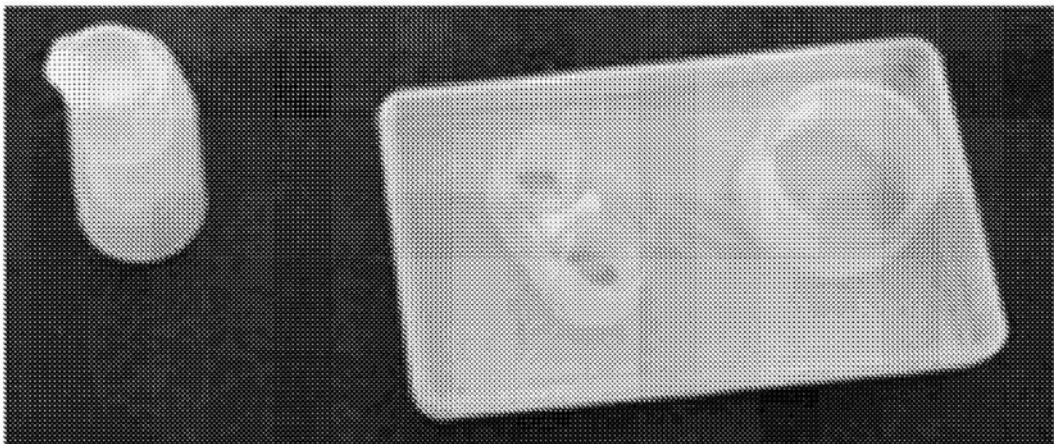


图10

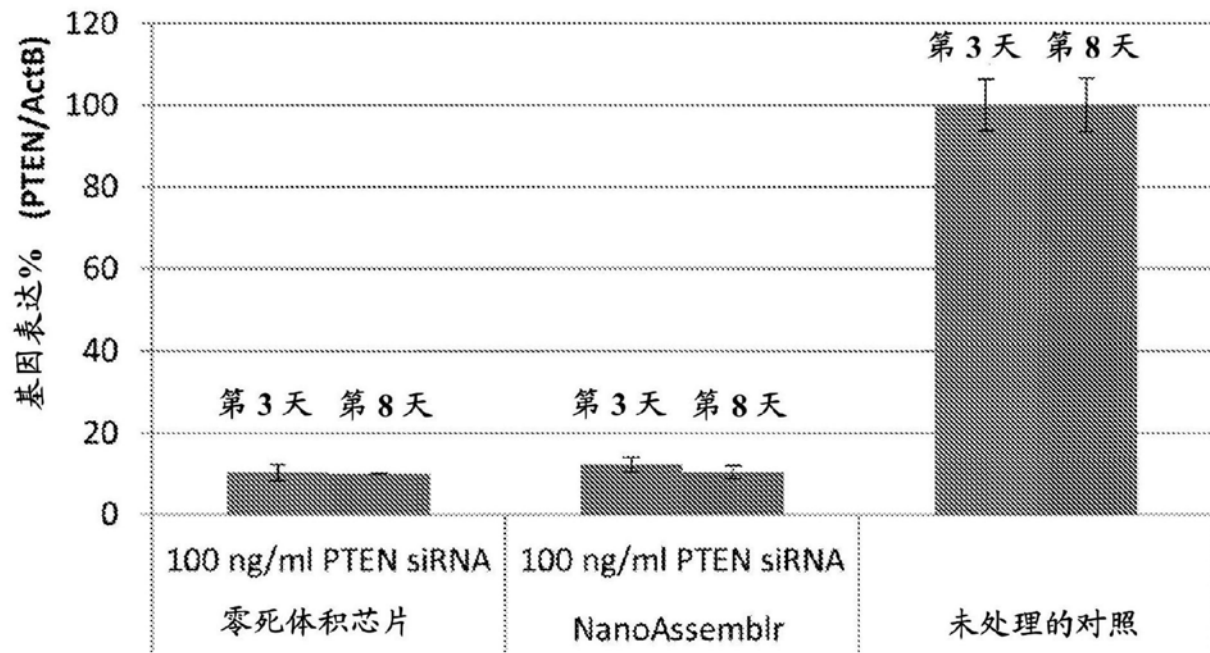


图11

## GFP 表达

■ 第 3 天

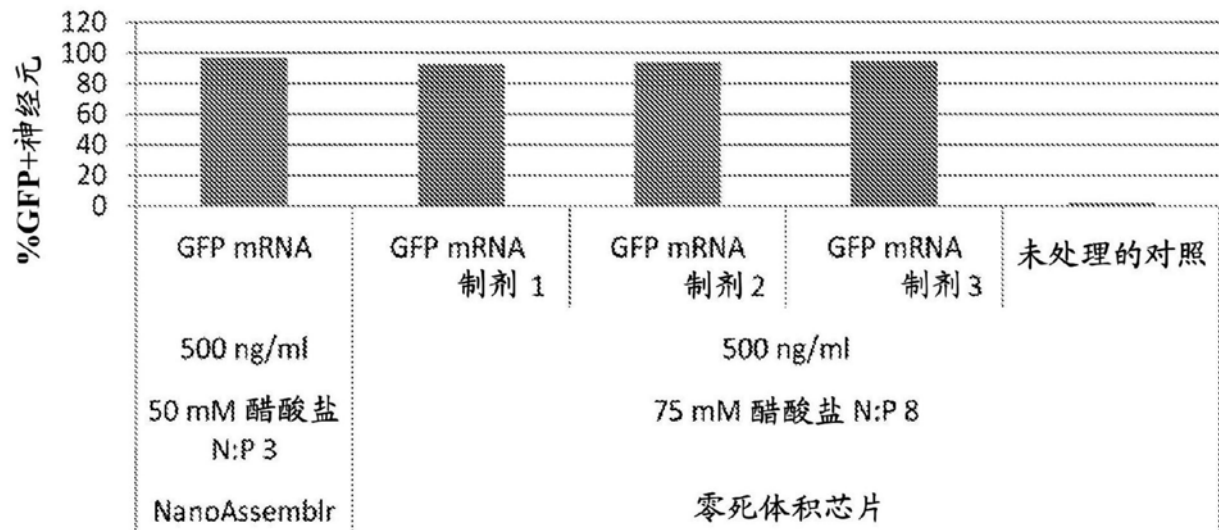


图12