



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116981481 A

(43) 申请公布日 2023. 10. 31

(21) 申请号 202180070287.3

(22) 申请日 2021.10.13

(30) 优先权数据

20201629.1 2020.10.13 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.04.13

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2021/078320 2021.10.13

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2022/079105 EN 2022.04.21

(71) 申请人 路德维希-马克西米利安-慕尼黑大学

地址 德国慕尼黑

申请人 英属哥伦比亚大学

(72) 发明人 奥利维娅·莫尼卡·梅克尔

托拜厄斯·凯尔

克里斯托夫·马丁·齐默尔曼

多米齐亚·巴尔达西

多米尼克·维兹格曼

彼得·拉特·卡利斯

(74) 专利代理机构 北京汇思诚业知识产权代理有限公司 11444

专利代理师 刘海庭 葛强

(51) Int.Cl.

A61K 47/69 (2006.01)

权利要求书2页 说明书30页 附图17页

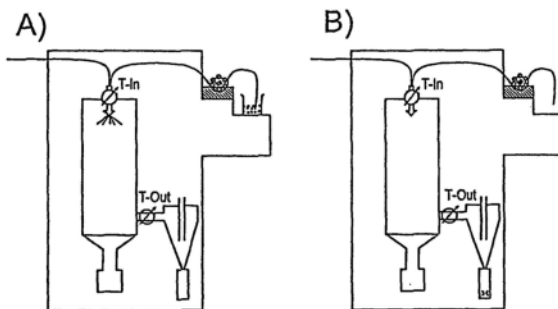
(54) 发明名称

微包纳siRNA干粉末、生产该干粉末的方法以及粉末制剂的用途

(57) 摘要

一种用于生产高产率的微包纳(NIM)生物活性siRNA干粉末的方法,包括以下步骤:-提供包含多聚复合物的水性悬浮液,特别是由至少聚胺和/或聚酰胺和/或聚酯和siRNA形成的聚电解质复合物的水性悬浮液,其中多聚复合物被提供有水溶性赋形剂,和/或包裹至水溶性赋形剂中,特别是高纯水和/或糖醇和/或糖;-使用喷雾干燥装置(优选Büchi B-290)对水性悬浮液进行喷雾干燥,包括将水性悬浮液,特别是通过用于悬浮液和雾化气体的多组分喷雾喷嘴进料至喷雾干燥雾化喷嘴,并使雾化的液滴经受载气,优选干燥且清洁的空气中的加热气流;-在喷雾干燥装置的积聚部件中收集喷雾干燥的粉末,其特征在于,在将水性悬浮液进料到喷嘴期间,将所述喷雾干燥装置的出口开口附近的温度,特别是将喷雾干燥室与积聚部件连接的出口开口附近的温度,通过温度控制部件进行控制以将所述温度限

制到上阈值温度,所述上阈值温度等于或低于各裸siRNA的熔融温度。



1. 一种用于生产高产率的微包纳(NIM)生物活性siRNA干粉末的方法,包括以下步骤:

-提供包含多聚复合物的水性悬浮液,特别是包含由至少聚胺和/或聚酰胺和/或聚酯和siRNA形成的聚电解质复合物的水性悬浮液,其中,所述多聚复合物被提供有水溶性赋形剂和/或包裹至水溶性赋形剂中,所述水溶性赋形剂特别是高纯水和/或糖醇和/或糖,或

提供包含脂质纳米颗粒的水性悬浮液,特别是包含由至少能离子化的阳离子脂质、辅助脂质、聚乙二醇化脂质、胆固醇和siRNA形成的Onpattro®制剂的水性悬浮液,其中,脂质纳米颗粒被提供有水溶性赋形剂和/或包裹至水溶性赋形剂中,所述水溶性赋形剂特别是高纯水和/或糖醇和/或糖;

-使用喷雾干燥装置(优选Büchi B-290)对水性悬浮液进行喷雾干燥,包括将水性悬浮液,特别是通过用于悬浮液和雾化气体的多组分喷雾喷嘴进料至喷雾干燥雾化喷嘴,并使雾化的液滴经受载气,优选干燥且清洁的空气中的加热气流;和

-在喷雾干燥装置的积聚部件中收集喷雾干燥的粉末,其特征在于,

在将水性悬浮液进料到喷嘴期间,将所述喷雾干燥装置的出口开口附近的温度,特别是将喷雾干燥室与积聚部件连接的出口开口附近的温度,通过温度控制部件进行控制以将所述温度限制到上阈值温度,所述上阈值温度等于或低于各裸siRNA的熔融温度。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述上阈值温度,特别对于包含多聚复合物的水性悬浮液的所述上阈值温度,设置为90°C,特别是80°C。

3. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述上阈值温度,特别是对于包含脂质纳米颗粒的水性悬浮液的所述上阈值温度,设置为63°C,特别是63±2°C。

4. 根据权利要求1至3所述的方法,其特征在于,siRNA与糖和/或糖醇的质量比,特别是对于包含脂质纳米颗粒的水性悬浮液中的siRNA与糖和/或糖醇的质量比,在0.001%至0.02%之间。

5. 根据权利要求4所述的方法,其特征在于,乳糖被用作糖或与糖醇一起使用,特别是对于包含脂质纳米颗粒的水性悬浮液。

6. 根据权利要求1至5所述的方法,其特征在于,所述水性悬浮液通过高等级的管材、特别是高等级的硅基管材、特别是Pumpsil®被进料至喷嘴。

7. 根据权利要求1至6所述的方法,其特征在于,进行另外的干燥步骤,其中,通过喷雾干燥装置,特别是雾化喷嘴来进料载气,所述载气不与水性悬浮液混合,特别是当喷雾干燥的粉末已经转移到积聚部件时。

8. 根据权利要求7所述的方法,其特征在于,所述另外的干燥步骤是在通过温度控制部件控制所述喷雾干燥喷嘴的附近的温度使得所述温度被限制到上阈值温度的情况下进行的,所述上阈值温度特别是90°C,并且特地别,对于包含多聚复合物的水性悬浮液,所述上阈值为80°C,和/或,对于包含脂质纳米颗粒的水性悬浮液,所述上阈值为63°C。

9. 根据权利要求8所述的方法,其特征在于,所述另外的干燥步骤进行至直到所述喷雾干燥的粉末的剩余水分小于3%,特别是小于2%。

10. 根据权利要求1至9所述的方法,其特征在于,聚乙烯亚胺-接枝-聚己内酯-嵌段-聚乙二醇(PEI-g-PCL-b-PEG或PPP)和/或聚乙烯亚胺的生物结合物,特别是转铁蛋白偶联聚乙烯亚胺(Tf-PEI)和/或多精胺被用作聚胺。

11. 一种根据权利要求1到10中的任一方法生产的含有生物活性siRNA的粉末,所述粉末的形式为多聚复合物,特别是由至少聚胺、聚酰胺和/或聚酯和siRNA形成的聚电解质复合物,或者所述粉末的形式为至少由能离子化的阳离子脂质、辅助脂质、聚乙二醇化脂质、胆固醇和siRNA形成的脂质纳米颗粒,其中,所述多聚复合物和/或脂质纳米颗粒被包裹至水溶性赋形剂中,所述水溶性赋形剂特别是甘露糖和/或海藻糖和/或乳糖,其剩余水分小于5%,优选具有空气动力学直径(MMAD)在0.5 μ m和10 μ m之间,优选是1 μ m和5 μ m。

12. 根据权利要求11所述的粉末,其特征在于,所述粉末能够在水中重新悬浮成多聚复合物或多聚复合物悬浮液,或脂质纳米颗粒或脂质纳米颗粒悬浮液,其与喷雾干燥前的初始制剂在尺寸、多分散性和 ζ 电位方面没有显著差异,特别是不超过 $\pm 10\%$ 。

13. 根据权利要求11或12所述的粉末,其特征在于,所述聚胺是聚乙烯亚胺-接枝-聚己内酯-嵌段-聚乙二醇(PEI-g-PCL-b-PEG或PPP)和/或聚乙烯亚胺的生物结合物,特别是转铁蛋白偶联聚乙烯亚胺(Tf-PEI)和/或多精胺。

14. 一种至少包含根据权利要求12至14所述的粉末的粉末组合物或共混物作为药物制剂的用途,特别是用于肺内给药的用途。

15. 一种至少包含根据权利要求12至14所述的粉末的粉末组合物或共混物的用途,其中,所述siRNA能够有效地沉默信使RNA翻译为引起肺部疾病的蛋白质。

微包纳siRNA干粉末、生产该干粉末的方法以及粉末制剂的用途

技术领域

[0001] 本发明涉及根据权利要求1的用于生产微包纳 (NIM) siRNA干粉末 (Nano-in-Micro encapsulated siRNA dry powder) 的方法。本发明还涉及根据权利要求12的包含微包纳 siRNA的粉末。本发明进一步涉及根据权利要求15和16的粉末组合物或共混物的用途。

背景技术

[0002] 将药物直接应用于其作用部位是减少剂量和副作用的最佳方法。对于哮喘等肺部疾病,肺给药因此受到青睐。[1] 具有较低的酶活性和缓慢的表面清除[2],酶活性物质是这种给药途径的完美候选。此外,干粉吸入器能够提供具有高保质期的药物,也为患者提供了一种易于使用的工具,同时具有高依从性。[3] 尽管有多种可用的肺部疾病治疗方法,但基因疗法是一种很有前景的新工具,可以解决不可控的疾病变异,如严重的、不可控的哮喘,而且特别是无可用抗病毒化合物的病毒。了解病毒的基因组足以开发出基于核酸的治疗方法,从而抑制病毒复制。[4] siRNA (siRNA) 可沉默信使RNA翻译为病理上调的蛋白,减轻疾病症状。然而,siRNA疗法在细胞递送和酶稳定性方面面临一些挑战。为了解决这些问题,纳米颗粒被首选用于保护和包裹siRNA。文献报道了多种载体,用以摄取和转染具有siRNA的细胞。[6] 然而,目前唯一临床批准的siRNA药物靶向肝脏,而肺递送仍在研究中。[7,8]

[0003] 阳离子聚合物是一类核酸纳米载体,其中聚乙烯亚胺 (PEI) 是研究最多的一种。然而,由于PEI的细胞毒性特点,其使用受到限制。为了克服PEI的毒性特性,申请人开发了具有更好安全性特点的PEI共聚物。这些共聚物结合了PEI的核酸凝聚和保护效率,也分别结合了聚己内酯 (PCL) 和聚乙二醇 (PEG) 的转染和稳定效果。研究表明,这些PEG-PCL-PEI (PPP) 或转铁蛋白结合聚乙烯亚胺 (Tf-PEI) 的共聚物可以通过静电相互作用在纳米尺度上与核酸形成所谓的多聚复合物 (polyplexes),并在体外和体内成功转染细胞[9-11],为了将这些纳米颗粒递送到肺部,需要掺入到空气动力学直径在1至5 μm 之间的微粒中。这些微粒的基质需要由赋形剂组成,这些赋形剂在对肺内液影响时容易溶解,并释放出它们的纳米货物。[12] 因此需要使用水溶性物质。

[0004] 脂质纳米颗粒是另一类纳米载体。基于脂质纳米颗粒的siRNA微包纳是特别受关注的,这是因为由于COVID-19疫苗的开发带来的进步,这些载体系统最近获得了跨越式的普及。此外,脂质纳米颗粒的优点是具有规整的结构,无论是内部还是表面。它们进一步表现出单分散性。这些特征在多个方面都是有利的,特别是在考虑临床试验和批准流程的要求时。最后,使用脂质纳米颗粒作为载体是有利的,因为随着已经获得临床批准的物质 **Onpattro®** 和各自的 **Onpattro®**-制剂是可用的,使用 **Onpattro®** 及其衍生物的方法预计将更方便地获得临床批准。

[0005] 一种已知的生产这种微包纳 (NIM) 颗粒的技术是喷雾干燥。它是一种广泛应用于食品、化妆品、化工和制药行业的方法,且可以温和地干燥小液滴。[13] 此外,它比也用于生产siRNA疗法的可吸入干粉制剂的喷雾冷冻干燥快得多,时间和能源消耗也少得多。然而,

由于喷雾干燥对样品进行加热,这一过程可能会降解或灭活siRNA和/或核酸纳米载体,如PPP或Tf-PEI。[12]作为干粉制剂中具有生物活性的siRNA的绝对和相对数量及其可靠的再生,特别是在大规模应用中,不仅是药品审批过程的关键参数,也是此类干粉末和药物组合物的经济生产的关键参数,因此建立喷雾干燥过程和由此产生的干粉末很重要,该干粉末呈现了所需的颗粒尺寸的几何特性和分布,且具有成功包裹和具有生物活性的siRNA的可靠的高百分数。

[0006] 如US 2020/00022921A1所述,对于基于脂质纳米颗粒的mRNA的微包纳包裹,以前如果在喷雾干燥之前进行多聚复合物或聚合物的进一步包封或稳定时,使用喷雾干燥才会成功。然而,在脂质纳米颗粒之外使用多聚复合物或聚合物不仅使方法更加复杂,而且阻碍了临床批准。

发明内容

[0007] 因此,本发明的目的是提出一种生产含有高数量和完整性的生物活性微包纳siRNA的干粉末的方法,从而使siRNA纳米颗粒具有高度的再分散性。

[0008] 根据独立权利要求1的方法解决了这一问题,该方法用于生产高产率的微包纳(NIM)生物活性siRNA干粉末的方法,包括以下步骤:

[0009] -提供包含多聚复合物,特别是由至少聚胺和/或聚酰胺和/或聚酯和siRNA形成的聚电解质复合物的水性悬浮液,其中所述多聚复合物被提供有水溶性赋形剂和/或包裹到水溶性赋形剂中,特别是高纯水和/或糖醇和/或糖,或提供包含脂质纳米颗粒的水性悬浮液,特别是由至少能离子化的阳离子脂质、辅助脂质、聚乙二醇化脂质、胆固醇和siRNA形成的Onpattro®制剂,其中脂质纳米颗粒被提供有水溶性赋形剂和/或包裹到水溶性赋形剂中,特别是高纯水和/或糖醇和/或糖;

[0010] -使用喷雾干燥装置(优选Büchi B-290)对水性悬浮液进行喷雾干燥,包括,将水性悬浮液,特别是通过用于悬浮液和雾化气体的多组分喷雾喷嘴进料到喷雾干燥雾化喷嘴,并将雾化的液滴经受载气(优选干燥且清洁的空气)的加热气流中;

[0011] -在喷雾干燥装置的积聚部件中收集喷雾干燥的粉末,其特征在于,在水性悬浮液进料到喷嘴期间,所述喷雾干燥装置的出口开口附近的温度,特别是将喷雾干燥室与积聚部件连接的出口开口附近的温度,通过温度控制部件将其限制到上阈值温度,所述上阈值温度等于或低于各自裸siRNA的熔融温度。

[0012] 本发明的基本思想是根据喷雾干燥的参数,特别是控制出口温度,以及通过多聚复合物和/或脂质纳米颗粒在喷雾干燥后的再分散来量化siRNA,并保持喷雾干燥材料的纳米颗粒特性。已经发现,出口温度对减少生物活性siRNA的损失起着重要作用,尽管入口温度也可以监测,通常是限制以从而控制出口温度的温度显著较高。

[0013] 令人惊讶的是,与使用较低的出口温度获得的结果相比,高于各自裸siRNA已知熔融温度的出口温度导致喷雾干燥后生物活性或功能siRNA的损失显著增加,并可能导致再分散。根据经验,出口温度等于或略高于已知喷雾干燥过程中粉末或干燥溶液/悬浮液加热到的温度。然而,令人惊讶的是,即使与聚酰胺和/或聚胺和/或聚酯和/或脂质纳米颗粒结合,并包裹到水溶性赋形剂基质中,siRNA在喷雾干燥过程中既没有热屏蔽或也没有化学稳定到显著或可测量的程度,这反映在高于裸siRNA熔融温度的出口温度上,这不会导致喷雾

干燥后生物活性siRNA的损失显著增加。特别有利的是,通过本发明方法,生成了干粉末组合物,其呈现出药物用途、特别是肺递送所必需的颗粒尺寸分布。

[0014] 更令人惊讶的是,该发明方法使得通过喷雾干燥可以喷雾干燥以脂质纳米颗粒为基础的微包纳(NIM)生物活性siRNA干粉末,而无需如US 2020/00022921A1所披露的通过另外的聚合物或多聚复合物对系统或悬浮液进行另外的包裹或稳定。换句话说,这意味着提供包含脂质纳米颗粒的水性悬浮液的方法步骤明确不包括向悬浮液中添加聚合物或多聚复合物。

[0015] 基于包含脂质纳米颗粒的水性悬浮液,本发明的微包纳(nano-in-micro,NIM)生物活性siRNA干粉末的方法具有许多优点。脂质纳米颗粒能实现siRNA的物理和/或几何包裹,使siRNA的屏蔽更加有效。此外,脂质纳米颗粒的单分散性和已批准的制剂使类似siRNA药物更容易获得临床批准。总之,脂质纳米颗粒载体系统能为微包纳(NIM)生物活性siRNA干粉末提供了良好限定的系统。

[0016] 甘露醇可用作糖醇。但其他糖醇也同样是合适的候选物。海藻糖和/或乳糖可以用作糖。同样,也可以使用其他糖。如下所述,目前某些糖和糖醇看起来分别是多聚复合物和脂质纳米颗粒途径的有前景的候选者。然而,其他具有不同糖和/或糖醇或不同组成的水溶性赋形剂正在研究中。

[0017] 本发明的有利实施方式中,将喷雾干燥装置的出口开口附近的温度或出口温度或上阈值温度控制到比相应裸siRNA的熔融温度低5°C范围内的值,特别是比相应裸siRNA的熔融温度低3°C范围内的值。

[0018] 根据本发明的另一个有利实施方式,上阈值温度或出口温度设置为90°C,特别是80°C。对于不同的siRNA序列,这是允许生物活性siRNA的高产率且同时达到低剩余水分和所需的颗粒尺寸和干粉末的尺寸分布的温度。该上出口阈值温度对于含有多聚复合物的水性悬浮液是尤其有利的。

[0019] 在本发明的进一步实施方式中,上出口阈值温度限制为 $63 \pm 2^\circ\text{C}$,优选为 $51 \pm 2^\circ\text{C}$,特别是 $41 \pm 2^\circ\text{C}$ 。如果包含脂质纳米颗粒的水性悬浮液被喷雾干燥,则这些上出口阈值温度特别有利。令人惊讶的是,在如此低的出口温度下喷雾干燥后的剩余水分足够低,以形成具有可接受的保质期的稳定干粉末。

[0020] 根据本发明的进一步有利实施方式,siRNA与糖和/或糖醇的质量比在0.001%和0.02%之间,特别是对于包含脂质纳米颗粒的水性悬浮液。出于至少有两个原因,siRNA与糖和/或糖醇的质量比是重要的。一方面,高比例是合意的,使得所得到的并入或包含一定数量的活性siRNA的干粉末的数量(特别是质量和体积)是低的。这不仅从生产的角度来看是合意的,而且从医学或药学的角度来看也是合意的,因为siRNA与糖和/或糖酒精的比例越低,将待给药或从干粉末中再分散的干粉末剂量就越高。另一方面,得出本发明的研究看起来表明,在水性悬浮液中,siRNA与糖和/或糖醇的比例看起来对本发明方法生产具有高数量或百分数的活性siRNA的干粉末的能力产生了迄今未知或无法解释的影响。

[0021] 特别是对于包含脂质纳米颗粒的水性悬浮液,上述确定的比例或所述比例的范围令人惊讶地允许成功的喷雾干燥,而不需要进一步用聚合物或多聚复合物包裹脂质纳米颗粒,这使得该方法对于大规模工业应用非常有吸引力,由于不需要通过多聚复合物或聚合物进一步稳定,与多聚复合物和聚合物的不太明确的性质相比,该方法可以更容易地执行,

并且更受益于脂质纳米颗粒的明确性质。此外,制剂可以保持简单,以实现直接的批准过程,并且可以减少赋形剂的使用。

[0022] 在本发明的另一个有用的实施方式中,水性悬浮液通过低磨管材被送入喷嘴,特别是低磨硅基管材,特别是Pumpsil®。令人惊讶地发现,管材对喷雾干粉末中具有生物活性的siRNA的数量或百分数有显著影响。特别是,如果按照上述温度控制,水性悬浮液通过低磨管材被进料到喷嘴,siRNA的损失可以减少到siRNA含量的10%以下,即小于原来使用的siRNA质量的10%,特别是小于siRNA含量或质量的5%。特别有利的是,低磨管材对喷雾干燥方法和得到的干粉末没有负面影响。

[0023] 根据进一步有利的实施方式,使用被进料到雾化喷嘴的雾化气体(优选为氮气)和被进料到喷雾干燥装置的喷雾干燥室的加热载气(优选为干燥空气),进行喷雾干燥。在将这些气体分别送入雾化喷嘴或喷雾干燥室之前,可以对这些气体进行过滤以去除灰尘和颗粒。

[0024] 在本发明的进一步实施方式中,进行另外的干燥步骤,其中载气通过喷雾干燥装置,特别是雾化喷嘴而进料,且不与水溶液或悬浮液混合,并且优选地同时喷雾干燥粉末已经转移到积聚部件。虽然以与实际喷雾干燥过程中相同的方式向喷雾干燥装置提供载气是有利的,但由于过程和装置不需要调整以执行各自的工艺步骤,因此还可以通过不同的部件(例如单独的喷嘴等),通过喷雾干燥粉末也可以进料用于另外的干燥步骤的载气。

[0025] 另外的干燥步骤或另外喷雾干燥步骤在不损害多聚复合物和/或siRNA的情况下减少了剩余水分,从而增加了粉末的细颗粒分数(FPF)。这再次有利于到细胞的递送以及多聚复合物和/或脂质纳米颗粒的再悬浮。

[0026] 另外的干燥步骤对于喷雾干燥包含脂质纳米颗粒的水性悬浮液是特别有用的。如上所述,较低的阈值温度对那些系统是有利的。因此,另外的干燥步骤可以特别有助于减少这种粉末中的剩余水分,特别是当获得非晶粉末时。

[0027] 在另一优选实施方式中,进行另外的干燥步骤,其中,通过温度控制部件控制出口开口附近的温度,该温度被设置为上阈值温度,特别是上阈值温度等于或低于裸siRNA的熔融温度,特别是比相应裸siRNA的熔融温度低5°C范围内的值,特别是比相应裸siRNA的熔融温度低3°C范围内的值。换句话说,另外的干燥步骤可以在与喷雾干燥本身相同的温度下进行。这是特别有利的,因为这减少了喷雾干燥方法的工艺变量或方法参数的数量。因此,在水性悬浮液通过雾化喷嘴进料后,保持载气运行另外的一段时间,特别是不改变载气温度,可以进行另外的干燥步骤。在优选实施方式中,载气的体积流量在另外的干燥步骤期间也保持不变。在喷雾干燥含有siRNA的水性悬浮液后,可以直接进行另外的干燥步骤。或者,喷雾干燥还可以包括一个方法步骤,其中在水性悬浮液喷雾干燥后,特别是在执行另外的干燥步骤之前,中间溶液或悬浮液(例如,核糖核酸酶游离水)进行1至5分钟的时间段。

[0028] 进一步优选的是,进行另外的干燥步骤,直至剩余水分小于3%,特别是小于2%。这导致所得到的干粉末有较长的保质期。

[0029] 进一步发现,当聚乙烯亚胺-接枝-聚己内酯-嵌段-聚乙二醇(PEI-g-PCL-b-PEG或PPP)和/或聚乙烯亚胺与肽或蛋白质的生物结合物(如转铁蛋白结合聚乙烯亚胺(Tf-PEI))用作聚胺时,siRNA在另外的干燥步骤中保持了非常高程度的生物活性状态。这尤其具有优势,因为Tf-PEI是一种聚酰胺,很有希望用各自的干粉末靶向T细胞。PPP由于其细胞毒性低

而具有优势。

[0030] 在喷雾干燥包含脂质纳米颗粒的水性悬浮液的方法的有利实施方式中,可电离的阳离子脂质是MC3类脂质。

[0031] 在进一步实施方式中,辅助脂质从以下脂质组中选择:1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DSPC),1,2-二脂酰-3-三甲基氨丙烷(DOTAP)和1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸-(1'-rac-甘油)(DSPG)。它们被用于形成分别具有接近中性电位、正电位和负 ζ 电位的LNP-siRNA系统。

[0032] 在进一步的有利实施方式中,聚乙二醇化脂质可以是PEG-DMG。

[0033] 上述目的还通过含有具有生物活性的siRNA的粉末来实现,这些粉末以由至少聚胺和/或聚酰胺和/或聚酯和siRNA形成的多聚复合物、特别是聚电解质复合物的形式,或者以由至少能离子化的阳离子脂质、辅助脂质、聚乙二醇化脂质、胆固醇和siRNA形成的脂质纳米颗粒的形式,其中,多聚复合物被包裹至水溶性赋形剂,特别是甘露醇和/或海藻糖和/或乳糖,优选具有0.5和10 μm 之间的气动直径(MMAD),特别是1和5 μm ,其中粉末根据上述方法来生产。

[0034] 对于至少由能离子化的阳离子脂质、辅助脂质、聚乙二醇化脂质、胆固醇和siRNA形成的脂质纳米颗粒形式的含有生物活性siRNA的干粉末,值得一提的是,该干粉末不包括聚合物或多聚复合物,因为干粉末是喷雾干燥的,而没有这种多聚复合物或聚合物。

[0035] 对于以由至少可离子化的阳离子脂质、辅助性脂质、聚乙二醇化脂质、胆固醇和siRNA形成的脂质纳米颗粒形式含有生物活性siRNA的干粉末,siRNA与糖和/或糖醇的质量比优选在0.001%至0.02%之间。优选地,质量比至少为0.004%,特别是至少为0.01%。

[0036] 根据本发明的优选实施方式,该粉末可以在水中重悬为与其在喷雾干燥前的初始制剂在尺寸、多分散性和 ζ 电位方面没有显著差异、特别是其变化不超过 $\pm 10\%$ 的多聚复合物或多聚复合物悬浮液或脂质纳米颗粒或脂质纳米颗粒悬浮液。该实施方式允许有效地将粉末吸收到细胞中。因此,本发明的粉末在重新悬浮后未表现出显著的团聚物,该团聚物会降低可潜在地被细胞吸收的多聚复合物的百分数。

[0037] 本发明粉末由于剩余水分较低而具有较长的保质期。此外,该粉末包括最初提供的处于生物活性状态的高数量或高产率的siRNA,从而允许有效生产siRNA粉末。由于具有生物活性的siRNA含量是可再现的,对于核酸类药物的药物注册过程,该粉末是一个很好的平台。

[0038] 根据优选实施方式,所包封的多聚复合物的聚胺是聚乙烯-接枝-聚己内酯-嵌段-聚乙二醇(PEI-g-PCL-b-PEG或PPP)和/或聚乙烯亚胺或聚精胺与肽或蛋白质的生物结合物,如转铁蛋白结合聚乙烯亚胺(Tf-PEI)。对于干粉末医药用途,这些聚胺是有前景的候选物。

[0039] 在优选实施方式中,颗粒表现为球形结构。

[0040] 通过使用至少包含上述所公开的作为药物制剂的粉末组合物或共混物,特别是用于肺给药,也可以实现上述目的。在这方面,特别有利的是,喷雾干燥过程产生适合于肺递送的颗粒尺寸和尺寸分布。

[0041] 上述目的还通过使用包含至少上述粉末的粉末组合物或共混物来实现,其中siRNA在将信使RNA翻译为引起肺部疾病的蛋白质方面具有活性。

具体实施方式

[0042] 下面将更详细地描述本发明的实施方式和非本发明的比较实施方式。本发明实施方式只是技术公开的具体实施例：

[0043] 材料和方法

[0044] 基于包含多聚复合物的水性悬浮液的实施例和实施方式：

[0045] 靶向绿色荧光蛋白的双链siRNA (DsiRNA EGFP 1) (siGFP) 和无序非特异性对照 (siNC) 可从IDT (集成DNA技术公司, 比利时, 鲁汶) 获得。本发明将就这些siRNA样品进行更详细的描述。然而, 本发明并不限于此类siRNA的使用。也可使用其他siRNA, 特别是用于制药用途。

[0046] 超支化聚乙烯亚胺 (PEI) (25kDa) 由巴斯夫 (路德维希港, 德国) 出售。异源双功能聚乙二醇 (HO-PEG-COOH, 2.5kDa) 由JenKem技术公司 (普莱诺, TX, 美国) 生产。通过默克KGaA (达姆施塔特, 德国) 可获得S-己内酯, 来自猪肠黏膜的肝素 (H3393, >180单位/mg, I-A级), 苦基磺酸 (TNBS) (P2297), 三EDTA缓冲液1x (TE-buffer) (93283), 用于NGI分析的三EDTA缓冲液100x (T9285), 三硼酸盐EDTA缓冲液 (TBE-缓冲液) (T 3913), RMMI-1640培养基 (R8758), 胎牛血清 (FBS) (F9665), 青霉素-链霉素 (P/S) (P4333), G 418二硫酸盐溶液 (G8168), Dulbecco的磷酸盐缓冲液 (PBS) (D8537) 和D-甘露醇。从VWR国际GmbH (达姆施塔特, 德国) 获取D (+)-海藻糖二水合物 (28719.290)。黑白96孔板 (10307451), GeneRuler Ultra Low Range DNA Ladder (10400280), SYBRTMSafeTMDNA-凝胶染色和聚丙烯酰胺凝胶 (NovexTM TBE凝胶, 4-20%, EC62252BOX) 由Fisher Scientific (Schwerte, 德国) 出售。SYBRTM金染料是从Life Technologies (Carlsbad, 加利福尼亚州, 美国) 获得的。使用来自沃森-马洛GmbH (Rommerskirchen, 德国) 的Pumpsil[®]管, 其内径和厚度为1.6mm。

[0047] 聚胺合成

[0048] 可以按照之前描述的进行聚乙烯亚胺-接枝-聚己内酯-嵌段-聚乙二醇 (PEI-g-PCL-b-PEG或PPP) 聚胺的合成。[24] 该文献以及EP 3277 743A4和WO 2008 151 150 A2通过引用的方式被并入作为本公开的一部分。总之, 通过将异双官能二嵌段共聚物丙烯酸酯-PCL-b-PEG-炔烃偶联到PEI上, 合成了聚乙烯亚胺-接枝-聚己内酯-嵌段-聚乙二醇 (PEI-g-PCL-b-PEG) (PPP)。如前所述, 用¹H NMR和UV光谱进行了表征[10]。

[0049] 转铁蛋白结合的聚乙烯亚胺 (Tf-PEI) 是根据[24a]的公开和US 20020137670 A1合成的, 在此也通过引用并入本文。

[0050] 其他可能的聚胺可并入聚氨酯、聚脲、聚丙烯酰胺、聚酰胺、聚(酯)或聚氨基酯。精胺是一种生物源性聚胺, 由两个伯胺和两个仲胺组成, 在所有pH值下都以聚阳离子的形式存在。精胺基聚丙烯酰胺可通过丙烯酸活性酯的(甲基)丙烯酸酯的自由基聚合或活自由基聚合(例如RAFT)与精胺类后聚合合成, 也可直接通过由精胺组成的丙烯酰胺聚合合成。这种聚胺是首选的, 因为它们是可生物降解的和生物相容性的。

[0051] 多聚复合物制备

[0052] 制备浓度分别为100 μ m和1mg/ml的siGFP和PPP的原液。用30 μ g总量的siGFP制备多聚复合物。因此, 以 μ g计, PPP (m_{PEI}) 的量计算如下：

$$[0053] \quad m_{PPP} = \left(\frac{m_{siGFP}}{17950,36 \text{ g/mol}} \right) \cdot 43.1 \cdot N/P \quad (\text{等式 1})。$$

[0054] 将计算量的PPP在指定溶剂(高纯水(HPW)、海藻糖或甘露醇5或10%)中稀释至250 μL,并加入250μL的含有30μg的siGFP的相同溶剂。为了使多聚复合物形成,将混合物孵育10分钟。然后,加入4500μL的相同指定溶剂,多聚复合物悬浮液再孵育10分钟。

[0055] 对管材的吸附

[0056] 为了减少管材在泵送通过各自的管道期间对多聚复合物的吸附,不同的管材进行实验之前使用预热的HPW进行洗涤,并使其干燥。插入配备有Easy-Load II头模块(77201 - 60)的Masterflex L/S(7520-47, Cole-Parmer GmbH, Wertheim, 德国)后,泵的速率设置为1.2-1.4mL/min。多聚复合物在HPW中制备,并通过管泵入,收集在5ml的管中用于进一步分析。该过程进行三次。

[0057] 喷雾干燥

[0058] 对于微粒制备,使用B-290(Büchi Labortechnik, Essen, 德国)作为喷雾干燥装置。由于Pumpsil®管不适合Büchi预装泵,Masterflex L/S(见上文)使用的泵速率为1.2-1.4mL/min。氮气被用作雾化气体,而载气是空气。为了避免灰尘和其他空气中的颗粒,氮气源和空气源都通过0.22μm的孔隙过滤器进行过滤。为了保证空气源的充分加热,避免Büchi真空泵的过热,使用了加压空气。通过调节加压空气的水平,将吸气器设置为70%,真空度设置为-40mbar。气流设置为40mm,对应于473NL/h。为了进行颗粒收集,高效旋风分离器附接到喷雾干燥装置的出口开口上。在5%或10% m/V海藻糖或甘露醇中制备多聚复合物。

[0059] 例如,所有制剂都是同一天制备的,以避免与环境温度和湿度相关的日间差异。为了进行分析,在不同的三天内生产了三个批次。在不同入口温度(T-In)的情况下,测量的出口温度(T-Out)被显示在T-In旁边,以更好地理解这一过程。在喷雾干燥过程中,观测到T-Out的微小变化。因此,T-Out被报道为平均值,其偏差为±1.5℃。

[0060] 另外的干燥步骤

[0061] 在一次喷雾干燥过程中,总量30.00μg的siGFP用5%的在核酸核糖酶游离水中的海藻糖溶液稀释到总体积250μL。因此,所需数量的PPP[1]也用5%的在核酸核糖酶游离水中的海藻糖溶液稀释到总体积250μL。将该PPP溶液加入到siGFP溶液中,并大力上下移液。孵育20分钟,以形成多聚复合物。随后,将4500μL的5%海藻糖溶液加入多聚复合物悬浮液中。小心地转动管子进行混合。与此同时,打开喷雾干燥机;参数设置为入口温度145℃,吸气器70%,气流40mm(473NL/h),水冷却的喷嘴。核酸核糖酶游离水以1.4mL/min进行喷雾干燥。如果达到145℃的恒定入口温度,则开始使用聚合物-海藻糖分散体的喷雾干燥过程。在过程结束时,将样管更换为核酸核糖酶游离水,其再喷雾干燥2分钟。至此,泵停止工作。喷雾干燥过程完成,开始纳米嵌入微粒的另外的喷雾干燥步骤。计时器设置为5分钟,其他所有参数保持不变。因此,随后的干燥步骤在145℃的入口温度下进行。最后,停止喷雾干燥过程,收集喷雾干燥后的粉末。

[0062] 喷雾干燥过程结束后,所有粉末进行收集,称重,并使用试样进行进一步分析。为了量化喷雾干燥后微粒粉末中的PPP和siGFP的含量,将粉末的试样溶解在HPW(高纯水)中,并进行肝素竞争分析,以解离NIM粉末中的siGFP-PPP多聚复合物。随后,从该多聚复合物中

释放的siGFP通过改性的SYBR®金分析[1]进行测定,而PPP浓度通过TNBS分析[2]进行测定。

[0063] 首先,该批次的NIM粉末在容量瓶中溶解于2mL的HPW中。以下过程进行三次:根据siGFP的理论内容,选择体积,以实现每个样品约0.04 μ g的siGFP。在试管中,该溶液用HPW稀释至每个样品150 μ L的最终体积。随后,在每个试管中加入75 μ L的58k IU肝素溶液的 μ L,在2小时后实现多聚复合物的完全解离。该溶液进一步稀释为450 μ L,并分发到白色的96孔板(Thermo Scientific™ BioLite microwell plate,Thermo Scientific GmbH,Schwerte,德国)中,每个100 μ L,一式三份。为了量化siGFP,在每个孔中加入30 μ L的4 \times SYBR®金溶液,并在室温下在黑暗中孵育10分钟。使用Synergy 2多模式酶标仪(BioTek仪器,Winooski,VT,美国)在485/20nm的激发波长和520/20nm的发射波长对每个样品的荧光进行量化,并与用SYBR®金染料孵育的新近制备的游离siGFP标准曲线进行比较。

[0064] 为了量化PPP,将100 μ L的每个批次溶解在2mL的0.1M硼砂缓冲液(十水硼酸钠,Sigma Aldrich,德国)中的溶液用30 μ L的3mM的TNBS溶液三联孵育,使用Synergy 2多模式酶标仪(BioTek仪器,Winooski,VT,美国)孵育1小时后测定405nm的吸光度。将测定的吸光度值与用TNBS试剂孵育的新近制备的游离PPP的标准曲线进行比较。为了验证每个量化分析方法,新近制备内部标准且进行并行分析。这些标准包括已知量的siGFP和PPP,其分别根据样品中被分析的siGFP或PPP的理论量来进行选择。这些是每个孔中0.04 μ g的siGFP用于核酸量化,以及0.48至1.2 μ g的PPP用于聚合物量化。偏差小于内部标准10%的测量被视为是精确的,并考虑用于进一步的分析。

[0065] 喷雾干燥后NIM粉末的剩余水含量使用Aqua 40.00Karl Fischer滴定器和耶拿分析公司(德国耶拿)相应的软件由库仑测量来确定。样品(约15mg)装入2R小瓶,放入加热室,在100 $^{\circ}$ C下测量,直到测量漂移达到起始漂移 $\leq \pm 2\mu$ g/min或直到最终测量时间为10min。在大约1小时的平衡后,起始漂移建立,显示速率小于10 μ g/min。试剂为Hydranal Coulomat AG(Riedel-deHaen,Seelze,德国)。在每次实验前,滴定仪均以1%的水标准进行校准。水分含量计算为相对于总样品重量的水的重量百分数。

[0066] Z-平均值和PDI测量值

[0067] 为了比较泵送和喷雾干燥对多聚复合物含量的影响,将70份新近制备的多聚复合物悬浮液与进一步处理后的多聚复合物进行了比较。对于泵吸附实验,在泵送后取用70 μ L。对于喷雾干燥制剂的再分散性,5%和10%的基质制剂分别约3.5mg和7.0mg溶解在70 μ L的HPW中。所有样品均在一次性试管(Brand有限公司,Wertheim,德国)中进行分析,并使用Zetasizer Nano ZS(马尔文仪器公司,马尔文,英国)进行分析。因此,在软件中设置水、甘露醇或海藻糖在25 $^{\circ}$ C下指示浓度的折射率,并以173 $^{\circ}$ 的背散射角进行检测。对于每个实验,测量都进行三次,共15次,然后取平均值。

[0068] 静态光散射

[0069] 将数 μ g的喷雾干粉末悬浮在约2mL的乙醚中。在测量前大约30分钟,HORIBA LA-950(Retsch技术有限公司,哈恩,德国)被打开以进行平衡。将比色皿装满乙醚,插入设备,记录吸吮和空白测量值。通过上下移液,将样品悬浮液充分混合,并少量加入比色皿。此外,插入小型磁性搅拌棒进行样品搅拌。调整速度,以实现红光的85%至90%和蓝光的80%至90%之间的透光率。对比色皿中的粉末的量进行相应的调整。使用以下指标进行测量:

[0070] 真实折射率-甘露醇:1.330 虚折射率-甘露醇:10.0

[0071] 真实折射率-海藻糖:1.652 虚折射率-海藻糖:2.0

[0072] 折射率乙醚:1.352

[0073] 实验中选择虚折射率以获得尽可能小的R参数(这里,在所有测量中, $R < 0.08$)。这些测量的质量是由R参数给出的,当粒径分布测量的预测散射与样品的检测散射相吻合时,R参数会降低。[25]测量以三个不同批次进行。

[0074] 扫描电子显微镜

[0075] 将少量粉末放在涂有双面碳带的短棒上。在分析之前,在真空下用碳涂覆短棒40秒。使用FEI Helios G3 UC(Thermo Fisher Scientific, Schwerte, 德国)扫描电子显微镜(SEM)检测颗粒的形态。

[0076] 剩余水含量

[0077] 对于海藻糖和甘露醇微粒,将约5mg和15mg分别称量到2R小瓶中。测量了三个不同批次,每个批次为三份。此外,制备了约为10毫克的1%的水标准品。充满后,在顶部涂上一小块陶瓷棉(耶拿分析公司,耶拿,德国),以避免通过滴定器吸入颗粒。小瓶用塑料塞子封闭。作为空白值的空瓶进行相应处理。对于库仑测量,使用了耶拿分析公司(耶拿,德国)的Aqua 40.00Karl Fischer滴定器和相应的软件。首先将烘箱加热到100°C,通过插入空的封闭小瓶并激活泵来清除系统的剩余湿度,直到达到小于8.0 $\mu\text{g}/\text{min}$ 的最终漂移。使用指定的漂移,并将停止条件设置为总测量时间为10分钟或直到漂移达到初始漂移的 $\leq 2.0\mu\text{g}/\text{min}$ 。执行空白测量,并自动从标准品和样品中减去。如果1%水标准的测量值得到0.9至1.1%之间的值,则认为测量是正确的。

[0078] 差示扫描量热法

[0079] 对于量热测量,将3至5mg样品称量到凹盘中并封闭。参比品是空的封闭的凹盘。参比品和样品在设定点25°C下插入烤箱,并关闭烤箱。测量使用DSC 214Polyma(Erich NETZSCH GmbH&Co., 持有KG, Selb, 德国),从-10°C开始,斜率为8°K/min,直到对于海藻糖,温度达到160°C或,对于甘露醇制剂,温度达到200°C。数据使用Proteus分析软件进行分析。

[0080] XRPD

[0081] 为了识别晶体和或非结晶结构,XRPD使用3000TT衍射仪(Seifert, Ahrensburg, 德国)执行。配备电压为40kV、电流为30mA的铜阳极,使用0.154178nm的波长。闪烁探测器的电压为1000V。放在铜样品架上的样品在5-40°2- θ (theta)范围内以0.05°的2- θ 的步长进行分析。

[0082] 空气动力学性能

[0083] 对于空气动力学性能,使用来自Copley Scientific(诺丁汉,UK)的欧洲药典的设备E。下一代冲击器(NGI)安装了预分离器(PS)和进气口(IP)。该仪器连接到一个临界流量控制器(TPK 2, ERWEKA GmbH, 兰根, 德国),以确保阀门在预定的时间内正确打开,可使每次测量的总容积为4L的空气通过该仪器。进一步,TPK连接到高性能真空泵(HVP 1000, ERWEKA GmbH)产生流速,该流速由TSI 4040流量计(TSI仪器有限公司, high Wycombe, UK)设置为30L/min(容积L/min)。通过将0.5mL的100x TE与299.5mL的HPW混合,制备0.167x的Tris-EDTA(TE)溶液的原液。在每次分析之前,预分离器内充满10mL的肝素-TE溶液(23.3mg肝素在60mL的0.167xTE中)(HTE),杯子上涂有10 μL 的含有83%甘油、14%乙醇和3% Brij 35的

溶液。[26] 预先用涂覆溶液润湿的棉签用于将涂覆溶液分布在整個杯区。为了进行分析, 4个或8个羟丙基甲基纤维素胶囊分别装入约45mg的5%或10%的m/V喷雾干燥制剂。每个胶囊装入 **Handihaler®** (Boehringer Ingelheim Pharma GmbH&Co.KG, 英格尔海姆, 德国) 并通过穿刺激活。根据制造商手册, 胶囊被释放两次, 两次驱动之间的间隔是5秒。将胶囊内容物倒入撞击器后, IP小心地取出, 并且插入10mL的HTE后用两个橡胶塞封闭。此外, 小心地取出PS, 并用塑料塞封闭两个开口。IP和PS均竖向和水平摇动1min。最后, 将NGI分解, 小杯内充满2mL的HTE, 大杯内充满4mL的HTE。所有的杯子都盖上塑料盖, 以避免溶剂蒸发。将杯子放在振动器上5至10分钟, 旋转速度设置为避免溢出但确保颗粒完全分散的方式。从包括IP和PS的每个阶段制备了3个100μL的试样用于进一步分析。各个阶段沉积的siGFP的质量使用2.12的描述进行分析, 并向下限扩展标准点线。本实验使用三个不同批次进行。质量中值空气动力学直径(MMAD)、几何标准差(GSD)、细颗粒剂量(FPD)和细颗粒分数(FPF)按照欧洲药典[19]中所描述的进行计算, “细颗粒”被认为是所有小于5μm的颗粒。

[0084] siRNA和PPP量化

[0085] 量化分析如前所述。[12] 简而言之, 50mg的5%基质制剂, 100mg的10%基质制剂分别转移到2ml的量瓶中, 并且溶解在HPW中, 以释放多聚复合物。这些溶液用于以下分析:

[0086] TNBS分析

[0087] 取用每个样品的100μL的试样, 与在0.1M硼砂中的0.088% m/v的TNBS进行混合。在1小时的孵育时间后, 样品在UV-1600PC分光光度计(VWR国际GmbH, 达姆施塔特, 德国)的石英比色管中在405nm的吸光度处进行分析。结果与相同处理的标准稀释系列(0.166μg至1.914μg)进行比较, 其中添加了相应数量的siGFP, 以避免偏差。只有在如2.3所制备的内部标准(iS)表明与理论量相比, 偏差小于±10%的情况下, 测量值才考虑进行进一步分析。

[0088] 肝素SYBR金分析(HepSYBR)

[0089] 取用每个样品的60μL的试样, 用HPW稀释至150μL。为了使siGFP从PPP中解离, 加入75μL的2.33mg/ml的在TE缓冲液中的肝素溶液, 孵育2h。用HPW稀释至450μL后, 将100μL一式三份移入黑色96孔板。制备了从0.09μg/100μL开始的稀释系列, 并以一式三份添加到相同的96黑孔板中。为了验证siGFP和PPP的完全解离, 我们按照2.3所述的制备了iS, 并进行了相同处理和以一式三份进行分析。在HPW中制备4x SYBR金溶液, 用于插入双链RNA, 每孔用8通道多吸管加入30μL。荧光在 **FLUOstar®Omega** 多模酶标仪(BMG LABTECH GmbH, Ortenberg, 德国)上测量, 激发波长为485/20nm, 发射波长为520/20nm。如果iS表明测量值与理论值的偏差小于±10%, 则测量值考虑用于进一步分析。

[0090] 完整性测试

[0091] 为了实现每通道150ng的siGFP的最终凝胶装载量 ($m(\text{siGFP})_{\text{通道}}$), 考虑(回收)了HepSYBR所检测到的siRNA损失, 并使用以下算式来确定喷雾干粉末的量 ($m(\text{NIM})$):

$$[0092] \quad m(\text{NIM}) = m(\text{siGFP})_{\text{通道}} * \frac{m(\text{tsc})}{m(\text{siGFP})_{\text{sd}}} * \text{回收} \quad (\text{等式 2});$$

[0093] 其中 $m(\text{tsc})$ 是喷雾干燥粉末的总固体含量, $m(\text{siGFP})_{\text{sd}}$ 是用于喷雾干燥的siGFP初始量, 即30μg。粉末进行称重并在15μL的HPW和5μL的肝素(12μg肝素/5μL的TE-缓冲液)中重组。孵育30分钟后, 加入4μL的6x装载染料, 并将4-20%的TBE凝胶(EC62252BOX,

ThermoScientific, 德国) 装载24 μ L的每个样品。对于对照样,同时装载游离siGFP和肝素siGFP。凝胶在200V的恒定电压下在三硼酸-EDTA缓冲液(TBE)中运行长达1小时,直到通道分离。将凝胶从腔室中取出,置于20mL的1x的SYBRsafe溶液中,在50rpm的振动下持续30分钟。凝胶使用ChemiDoc荧光检测器(BioRad Laboratories GmbH, Feldkirchen, 德国)进行分析。

[0094] 体外敲除

[0095] 对于体外敲除特性,使用了稳定表达增强型绿色荧光蛋白(GFP)的非小细胞肺癌系H1299(ATCC CRL-5803)。在补充FBS(10%)、P/S(1%)和G418(0.4%)的RPMI-1640培养基中培养细胞,用于在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂条件下进行选择。将细胞接种于24孔板中,密度为每孔2 \times 10⁵个细胞,总体积为500 μ L的培养基。转染当天用400 μ L的新近培养基替代培养基,100 μ L的样品被施加以获得最终浓度为100nM的siGFP或siNC。由于测试了不同浓度下的喷雾干燥剂,并考虑到检测到的损失,必须调整粉末的量,从而调整赋形剂的量。因此,同一组内的样品被处理为含有等量的赋形剂,以获得更好的可比性。72h后,丢弃培养基,细胞用PBS洗涤、胰蛋白酶处理然后后收集。400rcf离心5分钟后,丢弃上清液,将细胞球丸在PBS中重悬。样品使用流式细胞法(Attune[®]声学聚焦细胞仪,Life Technologies)分析,以及使用488nm激发和530/30nm带通发射滤波器组(BL-1H)测量中位荧光强度(MFI)。对于每个批次,样品按一式三份,针对10000个活细胞的集合,每个样品使用基于前向/侧向散射的形态学选通。通过生成平均值来总结每个批次的一式三份。

[0096] Tf-PEI和GATA3制剂

[0097] 如文献[27,28]所述,制备了转铁蛋白-PEI(Tf-PEI)。为了下调GATA3,以1:1的比例混合物(HS_GATA3_8-SI04212446和HS_GATA3_9-SI04364101)使用QIAGEN GmbH(Hilden, 德国)的两种不同的靶向GATA3的siRNA序列(siGATA3)。

[0098] 如2.4章所述,对制剂进行喷雾干燥以含1760pmol/5ml 5%v/v海藻糖或甘露醇。根据第2.11章对粉末进行分析,以确保用于转染的siGATA3的准确量。

[0099] 用原代CD4⁺T细胞进行转染,这些细胞是从新近获得的buffy涂层(DRK, Berlin, 德国)中分离出来的。在补充有10%的FBS、1%的P/S、10mM的HEPES、1mM的丙酮酸钠和4500mg/L的葡萄糖的RPMI培养基中培养细胞。

[0100] 对于GATA3敲除,将8 \times 10⁶原代T细胞接种于含200 μ L培养基的48孔板中。通过使用Dynabeads[™]人T激活剂CD3/CD28(11131D, 生命技术公司),按照供应商的珠粒和细胞1:1混合的方案,进行原代T细胞的激活。喷雾干燥粉末再次分散在核酸酶游离水中。用Tf-PEI或LF制备由siGATA3或siNC组成的对照样。在T细胞激活两天后,将样品应用于细胞,从而获得最终浓度为100nM的siRNA。根据制造商的方案(12183025, 赛默飞世尔科学公司),去除用PureLink RNA微型试剂盒裂解的免疫磁珠后,将细胞孵育48小时。简而言之,细胞被洗涤、裂解,以及通过另外的DNase消化步骤来分离RNA。然后,利用大容量cDNA合成试剂盒(#4368814, Applied Biosystems)合成cDNA。获得cDNA后,将溶液稀释1:10,用定制合成的GATA3正反向引物(Thermo Fisher)和[β -肌动蛋白引物(Qiagen, Hilden, 德国)]进行qRT-PCR,用于归一化。循环阈值通过qPCRsoft软件(Analytik Jena AG, 耶拿, 德国)内的自动设置来获得。

[0101] 基于含脂质纳米颗粒的水性悬浮液的实施例和实施方式:

[0102] 包埋siRNA的脂质纳米颗粒(LNP)的制备:

[0103] LNP-siRNA制剂具有基于临床批准的Onpattro[58,59]制剂的脂质组成,并且如前所述[59,60]进行制备。简单而言,摩尔比为50:10:38.5:1.5mol%的脂质成分(MC3类离子化阳离子脂质、辅助脂质、胆固醇和PEG-DMG)溶于乙醇中至浓度为10mM的总脂质。不同的辅助脂质,即1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DSPC),1,2-二油酰-3-三甲基铵-丙烷(DOTAP)和1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸-(1'-rac-甘油)(DSPG),分别用于形成接近中性 ζ 电位、正 ζ 电位和负 ζ 电位的LNP-siRNA系统。将纯化的siRNA(siGFP)溶解于25mM的醋酸钠pH 4缓冲液中,以实现3的N/P比。两种溶液通过T型接头混合器进行混合,总流速为20mL/min,流速比为3:1v/v(水相:有机相)。得到的LNP悬液随后在PBS pH 7.4下透析过夜,无菌过滤(0.2 μ m),浓缩为0.5mg/mL的siRNA。通过Quant-iT Ribogreen Assay(生命技术)测量,LNP系统中siGFP的包裹效率超过95%。将LNP-siRNA制剂的原液稀释至浓度为在4500 μ L的指定溶剂(高纯水(HPW)、乳糖、海藻糖或甘露醇,5wt/wt)中30 μ g的siRNA。

[0104] 喷雾干燥

[0105] 对于微粒制备,使用了B-290(Büchi Labortechnik,Essen,德国)。使用1.6mm \times 1.6mm的Pumpsil Tubing(Watson Marlow油管,Falmouth,英国),泵速为1.4mL/min。氮气被用作雾化气体,而干燥气体是空气。为了避免灰尘和其他空气中的颗粒,氮气源和空气源都通过0.22 μ m的孔隙进行过滤。为了确保空气源的充分加热,并避免Büchi真空泵的过热,使用了加压空气。通过调节加压空气的水平,将吸气器设置为70%,真空度设置为-40mbar。气流设置为40mm,对应473NL/h。为了进行颗粒收集,另外了一个高效率的旋风分离器。在5%w/V乳糖(Inhalac)、海藻糖或甘露醇中制备了LNP。

[0106] 例如,所有制剂都是同一天制备的,以避免与环境温度和湿度相关的日间差异。为了进行分析,在三个不同的日子里生产了三个批次。入口温度(T-In)根据指示而变化(T-In=60 $^{\circ}$ C、80 $^{\circ}$ C、100 $^{\circ}$ C或120 $^{\circ}$ C),因此导致测量的出口温度(T-Out)相应地较低(T-Out=41 $^{\circ}$ C、51 $^{\circ}$ C、62 $^{\circ}$ C或72 $^{\circ}$ C)。在喷雾干燥过程中,T-Out有微小变化。因此,T-Out报告为平均值,偏差为 $\pm 2.0^{\circ}$ C。

[0107] Z-平均值和PDI测量值

[0108] 对于喷雾干燥制剂的再分散性实验,大约3.5mg的5%的基质制剂溶解在70 μ L的HPW中。所有样品均在一次性试管(Brand GmbH,Wertheim,德国)中进行分析,并使用Zetasizer Nano ZS(马尔文仪器公司,马尔文,英国)进行分析。因此,在软件中设置水、甘露醇、海藻糖或乳糖在25 $^{\circ}$ C下用于指示浓度的折射率,并以173 $^{\circ}$ 的背散射角进行检测。对于每个实验,一式三份进行测量,分别进行15次,然后取平均值。

[0109] 剩余水含量

[0110] 对于乳糖、海藻糖和甘露醇的微粒,分别将大约10毫克称量到2R小瓶中。分别以一式三份测量了三个不同批次。此外,制备了1%的水标准约20毫克。充满后,在顶部涂上一小块陶瓷棉(耶拿分析公司,耶拿,德国),以避免通过滴定器吸入颗粒。小瓶用塑料塞子封闭。作为空白值的空瓶进行相应处理。对于库仑测量,使用了Aqua 40.00Karl Fischer滴定器和来自耶拿分析公司(耶拿,德国)的相应软件。首先将烘箱加热到100 $^{\circ}$ C,通过插入一个空的封闭小瓶并激活泵来清除系统的剩余湿度,直到达到小于10.0 μ g/min的最终漂移。使用指定的漂移,并将停止条件设置为总测量时间为10分钟或直到漂移达到初始漂移的 $\leq 2.0\mu$

g/min。执行空白测量,并自动从标准品和样品中减去。如果1%的水标准测量得到在0.9%至1.1%之间的值,则测量值被认为是正确的。

[0111] 差示扫描量热法

[0112] 对于量热测量,将5至10mg样品称入凹盘并封闭。参考物是一个空的封闭的凹盘。参照品和样品以25℃的设定点插入烤箱,烤箱关闭。测量使用DSC 214Polyma (Erich NETZSCH GmbH&Co.Holding KG, Selb, 德国)从-10℃开始,斜率为8°K/min,直到对于乳糖制剂,温度达到200℃。数据使用Proteus分析软件进行分析。

[0113] 体外敲除

[0114] 对于体外敲除特性,使用了稳定表达增强型绿色荧光蛋白(GFP)的非小细胞肺癌系H1299(ATCC CRL-5803)。在补充FBS(10%)、P/S(1%)和G418(0.4%)的RPMI-1640培养基中培养细胞,用于在37℃、5% CO₂条件下进行选择。将细胞接种于24孔板中,密度为每孔2x10⁵个细胞,总体积为500μL的培养基。转染当天用400μL的新近培养基替代培养基,100μL的样品被施加以获得如图中指示的最终浓度(2μg/ml相当于111nM浓度的siGFP或打乱的对照siRNA)。48h后,丢弃培养基,细胞用PBS洗涤、胰蛋白酶处理然后后收集。400rcf离心5分钟后,丢弃上清液,将细胞球丸在PBS/2mM EDTA中重悬。样品使用流式细胞法(Attune®声学聚焦细胞仪,Life Technologies)分析,以及使用488nm激发和530/30nm带通发射滤波器组(BL-1H)测量中位荧光强度(MFI)。对于每个批次,样品按一式三份,针对10000个活细胞的集合,每个样品使用基于前向/侧向散射的形态学选通。通过生成平均值来总结每个批次的一式三份。

[0115] 统计数据

[0116] 通过GraphPad Prism 5软件使用One Way或Two Way ANOVA重复测量来检查实验数据是否存在显著差异,Bonferroni或Dunnetts事后测试,如果p<0.05则认为不显著(ns),p>0.05,*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001。

[0117] 下面将参考附图来讨论有利实施方式和比较实施方式,附图示出:

[0118] 图1A:各个T-In/T-Out下多聚复合物(N/p5)喷雾干燥后siGFP的量化;

[0119] 图1B:用指示的T-In喷雾干燥后再分散的多聚复合物的琼脂糖凝胶。用肝素孵育时,siGFP从多聚复合物中释放。通道1:内部标准(iS),通道2:在65℃T-In下喷雾干燥的粉末,通道3:在145℃T-In下喷雾干燥的粉末粉末喷雾,通道5:低范围DNA碱基对阶梯;

[0120] 图1C:通过标准硅管和Pumpsil管泵送多聚复合物后siGFP的量化。(n=3);

[0121] 图2:新近制备的(深灰色条)和再分散的(浅灰色条)多聚复合物的DLS测量值。PDI用红色圆圈表示。(n=3);

[0122] 图3:用甘露醇或海藻糖在指示的T-In处喷雾干燥后再分散的琼脂糖凝胶。与肝素孵育时,从多聚复合物中释放siGFP-PPP。

[0123] M5/T5:5% m/V的siGFP-PPP的甘露醇/海藻糖制剂;喷雾干燥。

[0124] M10/T10:10% m/V的siGFP-PPP的甘露醇/海藻糖制剂;喷雾干燥。

[0125] L:超低范围碱基对阶梯;

[0126] 图4:A) siRNA(siGFP)和B) 聚合物(PPP)在两种不同温度、由两种不同赋形剂在两种不同浓度下喷雾干燥后的量化。(n=4)

[0127] M5/T5:5% m/V的siGFP-PPP的甘露醇/海藻糖制剂;喷雾干燥。

- [0128] M10/T10:10%*m/V*的siGFP-PPP的甘露醇/海藻糖制剂;喷雾干燥;
- [0129] 图5A:海藻糖制剂的DSC测量;
- [0130] 1.2)T5-120°C,2.2)T5-145°C,3.2)T10-120°C,4.2)T10-145°C,5.2)海藻糖脱水;
- [0131] 图5B:甘露醇制剂的DSC测定;
- [0132] 1.2)结晶的甘露醇,2.2)T5-120°C,3.2)T5-145°C,4.2)T10-120°C,5.2)T10-145°C;
- [0133] 图6A:在145°C/79°C的T-In/T-Out下喷雾干燥的海藻糖制剂的XRPD测量值;
- [0134] 图6B:在145°C/79°C的T-In/T-Out下喷雾干燥的甘露醇制剂的XRPD测量值;
- [0135] 图7:M5-145°C下SLS所测量的粒径分布,
- [0136] M10-145°C、T5-145°C、T10-145°C;
- [0137] 图8A-D:A)T5-145°C B)T10-145°C C)M5-145°C D)M10-145°C的SEM图像。白色箭头标记单一海藻糖颗粒之间的水桥;
- [0138] 图9:在稳定表达eGFP的H1299细胞系中,GFP的体外敲除。在每一组中,样品中所含赋形剂的量与图例中所示的赋形剂的量相同。LF:脂质体,PPP:PEG-PCL-PEI嵌段共聚物,siNC:阴性对照siRNA,siGFP:针对eGFP的siRNA序列,SD:145°C T-In下由PPP和siGFP组成的喷雾干燥多聚复合物,5% (wA/) 总固体含量;
- [0139] 图10:原代CD4+T细胞内GATA3的体外敲除;LF:脂质体,Tf-PEI:转铁蛋白结合的PEI,siNC:阴性对照siRNA,siGATA:针对GATA3的siRNA序列,M5-145°C/T5-145°C:具有5%甘露醇或5%海藻糖的在145°C T-In下Tf-PEI和siGATA的喷雾干燥的多聚复合物;
- [0140] 图11:在5%海藻糖溶液中由siGFP和PEG-PCL-PEI (PPP)组成的纳米颗粒的喷雾干燥(A)和随后在相同温度下纳米嵌入式微粒(NIM)持续5分钟的干燥过程(B)。喷雾干燥参数设置为145°C,入口温度(T-In),70%的吸入器性能,气流为40mm (473NL/h)。泵流量设置为1.4mL/min,然后停止用于随后的后续干燥;
- [0141] 图12:喷雾干燥的纳米颗粒在5%海藻糖溶液中后续干燥后的siGFP和ppp损失。后续干燥时间为5分钟。通过HepSYBR分析检测siGFP损失和通过TNBS分析PPP-损失。数据点表示平均值±SD。(n=4),
- [0142] 图13:喷雾干燥纳米颗粒后续干燥前后的剩余水分。siGFP-PPP纳米颗粒在5%海藻糖中喷雾干燥前后的Karl-Fischer表征(n=4)。单因素方差分析,Tukey后验,**P<0.05,
- [0143] 图14:新近制备的(深灰色条)和再分散的(浅棕色条)LNP的DLS测量值。PDI用黑色方块表示。(n=3)带中性(neutr)、正(+)或负(-)电荷的LNP制剂在80°或100°C下的喷雾干燥后被再分散,
- [0144] 图15:乳糖制剂的DSC测量:1.3)L5 100°C,
- [0145] 2.3)L5 LNP-80°C,5.3)L5 LNP-100°C,6.3)L5 LNP+80°C,
- [0146] 7.3)L5 LNP+100°C,8.3)L5 n LNP 80°C,9.3)L5 n LNP 100°C,
- [0147] 图16:甘露醇制剂的DSC测量:1.3)M5 LNP-100°C,2.3)M5 LNP+100°C 3.3)M5 n LNP 100°C 4.3)M5 100°C,
- [0148] 图17:在稳定表达eGFP的H1299细胞系中,GFP的体外敲除。在每组中,sLNP包含scRNA:阴性(干扰)对照siRNA或siGFP:针对eGFP的siRNA序列。制剂1(LNP中性)是含有Onpattro™制剂的中性LNP。制剂2(LNP阴性)是含有DSPG的阴性LNP,制剂3(LNP阳性)是含有

DOTAP的阳性LNP,

[0149] 图18:在稳定表达eGFP的H1299细胞系中GFP蛋白的体外敲除。细胞仅用5%的乳糖处理,或用在指定的温度下喷雾干燥的再分散LNP处理,并按指定的浓度(中性(n)、阳性(+)或阴性(-)LNP)添加到细胞中,

[0150] 图19:在稳定表达eGFP的H1299细胞系中GFP蛋白的体外敲除。细胞仅用5%的甘露醇处理,或用在指定的温度下喷雾干燥的再分散LNP处理,并按指定的浓度(中性(n)、阳性(+)或阴性(-)LNP)添加到细胞中。

[0151] 基于含有多聚复合物的水性悬浮液的实施例和实施方式:

[0152] 热评价和完整性

[0153] 喷雾干燥是制备微粒的众所周知的技术。然而,热是一个关键参数,其可对siRNA有巨大的影响。因此,我们在不同的进口温度(T-In)下,在存在海藻糖(10%*m/V*)的情况下,将多聚复合物喷雾干燥,其在出口开口附近得到相应的温度(T-Out)。图1示出了T-Out低于90°C的三个创造性实施例和T-Out为100°C的比较实施例。如图1所示,增加T-In至170°和相应的89°C的T-Out对siGFP的数量没有显著影响。在200°C/100°C的T-In/T-Out下,siGFP损失检测到显著增加。

[0154] 由于裸siRNA在90°C左右融化,并从双链转换为单链形式,根据本发明,可以发现,与相应的裸siRNA相比,多聚复合物的形成及其加入赋形剂基质并没有在热或化学上明显屏蔽或稳定siRNA,使其热敏性降低,并允许更高的喷雾干燥温度,特别是T-Out。因此,本发明的一项重要成就是,在将完整siRNA的损失降至最低的情况下,成功的喷雾干燥包括避免将siRNA制剂加热至高于裸siRNA熔融温度的温度延长一段时间。

[0155] 喷雾干燥过程期间达到的产品温度确定为T-Out。[29]因此,影响产品的温度等于T-Out,因此对稳定性和完整性是至关重要的。对于200°C的T-In和随后的100°C的T-Out,siRNA的熔融看起来已经发生,从而导致更容易的降解。[22,30]这样的高温也可潜在地导致多聚复合物的解离以及siRNA从多聚复合物释放。因此,siRNA抵抗高温和剪切力的保护作用会受到阻碍,这可以解释在如此高的温度下损失更大的原因。然而,siRNA的损失受到限制,因为这些温度下的暴露时间极低。此外,在170°C/89°C的T-In/T-Out喷雾条件下,观测到siRNA回收率的较大差异,反映在较大的标准偏差上。在这里,偏差很小(89°±1.5°C)的T-Out刚好达到siRNA的熔融温度。同样,在某些情况下,这会导致熔融,从而导致更大的siRNA损失。因此,在本研究中,通过喷雾干燥制备siRNA的温度测定为145°C的T-In和随后的79°C的T-Out,siRNA损失最小。此外,看起来可能的是,如果设置了设备,并且以T-Out保持在90°C以进行该方法,则喷雾干燥也可以在甚至更高的T-In时不增加损失的情况下成功。这可以例如通过在增加T-In的同时增加进料或吸入器速率来实现。[29]

[0156] 由于本文描述的siRNA量化依赖于荧光染料的插入,而荧光染料不能反映核酸的完整性,后者必须单独确认。这是通过凝胶阻滞分析实现的,样品在最低T-In和最高可接受的T-In(145°C)下获得的。图1B确认了内部标准样品以及在两个工艺参数下获得的喷雾干燥样品的双相长度约为25bp。因此,即使在79°C的T-Out时,回收材料中的siRNA完整性也得到了保持。

[0157] 虽然通过降低T-In/T-Out来减少siRNA损失,并证实了双重完整性,但核酸损失仍然相当高,约为40%。为了进一步阐明这些损失的原因,研究了从样品容器向喷雾干燥器中

泵入多聚复合物悬浮液的效果。为了测试这一效果,通过连接到喷雾干燥器的硅管泵送多聚复合物悬浮液,然后收集。有趣的是,上述实验中所使用的常规质量的硅管泵入后siGFP的量化显示约40%的损失(图1C)。

[0158] 这些损失对应于喷雾干燥后检测到的再分散多聚复合物的损失。因此,我们推断,喷雾干燥期间所测量到的损失(图1A)并不是与喷雾干燥过程本身严格地联系在一起,而是取决于泵送步骤和使用的管材。

[0159] 可以认为,siGFP的吸附来源是由于疏水相互作用,而以前只针对DNA研究。[15]此外,我们还测试了高质量的硅胶管是否会减少siRNA的吸附。事实上,使用Pumpsil管时,siGFP损失降低至0%(图1C)。高质量与普通质量硅管上siRNA多聚复合物吸附行为不同的一个解释可能是后一种管发生磨损,导致腔隙形成。这些表面变化导致了表面积的增加和再生,从而增加了siGFP和管材之间可能的相互作用。因此,低磨损的管,如Pumpsil,看起来有利于加工多聚复合物。然而,吸附的详细机制尚不完全清楚。

[0160] 纳米粒子的特点

[0161] 除了加热,喷雾干燥还对纳米颗粒施加剪切力,可以分解多聚复合物。因此,在喷雾干燥前后进行DLS测量,以可视化任何可能的影响。因此,将微粒溶解在HPW中进行纳米颗粒再分散,以模拟肺部的嵌塞和溶解。如图2所示,新近制备和再分散的多聚复合物的Z-平均值在统计上没有差异。此外,未观测到PDI的差异。然而,我们认识到高PDI值可能在一定程度上由糖/糖醇单体解释。Weinbuch等人表明,在高浓度溶液中可以看到糖和糖醇的单体。[31]事实上,我们相应地检测到在1nm左右的单体,如果在HPW中严格地制备多聚复合物,这些单体是不可见的(S1-图1)。随着赋形剂用量的增加,1nm处的峰增加,这一事实强调了这一假设(S1-图1)。这一现象也解释了赋形剂溶液浓度越高,PDI值越高的趋势。尽管如此,Z平均值和PDI在一个赋形剂组内无显著差异。然而,海藻糖配制的多聚复合物比甘露醇配制的多聚复合物显示出更高的PDI值,这可能再次归因于较高的单体含量。总之,在每个制剂中,喷雾干燥对多聚复合物的尺寸和分布没有影响。此外,为了确认所有制剂中siRNA的完整性和碱基对长度,进行了凝胶分析。图3显示,分别独立于所选择的制剂和T-In和T-Out,在检测到相同碱基对长度的所有条带时,siRNA在所有情况下都是完整的。未检测到表明siRNA降解的分子量较小的条带。所有喷雾干燥样品的涂片均归因于肝素,在含有游离siRNA的混合肝素样品中显示了类似的效应,但在含有游离siRNA的不含肝素的样品中则没有。因此,我们认为siRNA的碱基对长度不受喷雾干燥的影响。

[0162] 然而,Z平均值、PDI和碱基对长度被认为是确定喷雾干燥成功的定性方法,而siRNA和聚合物含量的测定是量化的,因此与正确的剂量极其相关。

[0163] 因此,分析了再分散颗粒中siRNA的含量,发现当在甘露醇存在的情况下对多聚复合物进行喷雾干燥时,发现了相当大的损失(图4A)。虽然不显著,但值得一提的是,当温度升高时,损失从约17%增加到21%。这是合理的,因为如前所解释的,较高的产品温度可能导致更大的损失。这些发现也与Wu等人发表的一篇文章一致,在60°C至125°C的T-Out温度下,在甘露醇的存在下,将裸siRNA喷雾干燥。然而,当用海藻糖喷雾干燥时,与siRNA的应用量相比,没有明显的变化。因此,观测到在两个喷雾干燥温度下,两种不同基质制剂之间在喷雾干燥后的siRNA回收方面有统计学显著差异。通过两种方差分析,赋形剂的选择被确定为方差源,占总方差的58.6%,p值为0.0013,表明影响非常显著。同样,当用海藻糖配制多

聚复合物时,聚合物量化导致喷雾干燥后的回收率没有差异,但当用5%甘露醇或10%甘露醇配制时,分别显示出约53%和65%的损失。在这里,在每个赋形剂组中都没有检测到温度和浓度之间的统计差异。然而,所有甘露醇制剂都显示出明显高于海藻糖制剂的聚合物损失。因此,甘露醇制剂在siRNA和聚合物回收率方面优于海藻糖制剂。

[0164] 这一观测结果可以解释为海藻糖制剂倾向于形成非结晶颗粒,而甘露醇倾向于在喷雾干燥时结晶。其他几份出版物表明,在干燥过程中,非结晶结构可以稳定生物大分子。[32-35]虽然这一效应在之前的文献中没有针对多聚复合物显示过,但海藻糖也能稳定多聚复合物也就不足为奇了。对这一现象的一种解释是水置换理论。[36]在干燥期间,海藻糖通过形成氢键和保持三维结构来稳定被包裹分子的结构。此外,海藻糖制剂的较高的剩余水分含量会增加到这一事实,通过形成另外的氢键和充当增塑剂,实现更大的稳定性。相反,结晶甘露醇被证明不能有效稳定生物药品,并且可能无法保护制剂免受干燥应力诱导的链解离或双链siRNA的潜在降解。[37]双链siRNA由于接近熔点的温度而解离,这可能导致如2.12章所述的基于荧光量化方法(不能检测单链短RNA)的插入而带来的siRNA的检出率下降。如果发生双链断裂,则会发现无法检测到较小的双链核酸株,这一事实加强了这一提出的机制(图3)。

[0165] 微粒的特征

[0166] 经由干粉末制剂的肺递送需要低的剩余水分,以避免聚集过程。虽然上面已经讨论过剩余水分可能在喷雾干燥过程中作为稳定多聚复合物的增塑剂,但它仍然可能导致微粒聚集,并可能是微生物不稳定和核酸核糖酶污染的来源。因此,所有制剂的水含量均使用Karl Fischer滴定法测定。如表1所示,海藻糖制剂显示在4.6至3.8%之间的剩余水分,而甘露醇制剂显示在0.4至0.2%之间的剩余水分。这些结果是预期的,并且与文献的结果一致。[38-40]

[0167] 通过DSC证实,海藻糖通常在喷雾干燥时以非结晶状态凝固(图5)。除了海藻糖的吸湿特性外,形成非结晶结构的原因是快速干燥步骤没有提供足够的时间让海藻糖分子排列成有序结构,随后形成晶核和生长。[41]所有海藻糖制剂都表现出在38°到53°C之间的温度的玻璃化转变,其对应于它们的剩余水分含量(表1)。

[0168] 表1

	剩余水分 (%)
T5-120°C	4.53 ± 0.20
T5-145°C	3.85 ± 0.05
T10-120°C	4.61 ± 0.17
[0169] T10-145°C	3.82 ± 0.04
M5-120°C	0.40 ± 0.03
M5-145°C	0.27 ± 0.04
M10-120°C	0.26 ± 0.02
M10-145°C	0.19 ± 0.03

[0170] 这个温度 (T_g) 对于存储期间的稳定性预测很重要, 因为非晶固体形式是热力学不稳定的, 以及如果接近或高于 T_g 存储, 往往会结晶。[42] 如上所述关于喷雾干燥后 siRNA 的回收, 制剂的非结晶态有利于多聚复合物的保存。因此, 为了将这些产品在室温下或在冰箱中保存更长的时间, 高 T_g 值是必要的。然而, 这与水含量率密切相关: 剩余水越多, T_g 越低。[43] 而且, 剩余水分含量越低, 降解过程发生的可能性就越小。[43] 因此, 进一步减少海藻糖制剂中的剩余水分, 以避免随时间的推移成核和降解过程, 并保持制剂的非结晶状态是非常有意义的。虽然储存对复合物质量 (尺寸、PDI) 和数量的影响尚未进行研究, 但目前在优化制剂和工艺参数的更大方案中对这些方面正在进行研究。为了确认海藻糖的非结晶状态, 我们还用 XRPD 对制剂进行了测试, 并检测了典型的非结晶光晕 (图 6A)。另一方面, 喷雾干燥的甘露醇制剂显示出与结晶起始物质相同的温度分布, 通过 DSC 研究在 170°C 有一个熔融峰 (图 5B)。这一发现表明了甘露醇的结晶形式。为了区分可能出现的甘露醇多态性, 对 T-In 145°C 下制备的制剂进行了 XRPD。对于两种测试的甘露醇制剂, 检测到 14.6° 和 16.8° $2-\theta$ 处的峰, 这两种峰都与甘露醇的 β 形式有关 (图 6B)。[41, 44] 没有检测到 α 或 δ 形式的特异性峰, 这表明喷雾干燥后, β 甘露醇是主要的多态。虽然喷雾干燥制剂的干燥时间很短, 并可

能导致如海藻糖获得的非结晶状态,但甘露醇的吸湿性和可溶性较小。这些特性导致甘露醇溶液在喷雾干燥过程中干燥得更快并结晶。由于在较高温度下制备的制剂的剩余水分含量较低,并且在两种不同温度下制备的制剂之间没有发现显著的纳米颗粒特性差异,因此所有后续实验都是在T-In 145°C下制备的制剂进行的。

[0171] 为了初步了解微粒尺寸特征,在乙醚(其中甘露醇和海藻糖都是不可溶的)中进行了静态光散射。如图7所示,制剂之间的差异取决于它们所制成的赋形剂的性质:与海藻糖制剂相比,两种甘露醇制剂在10、50和90百分位上的值都显著较低(数据未显示)。对于5%和10%的制剂,甘露醇制剂的几何中值粒径分别为7 μm 和8 μm 左右,而海藻糖制剂的几何中值粒径为24 μm 左右(表2)。

[0172] 表2

	几何中值粒径 (μm)	MMAD (μm)	GSD (μm)	FPF (%)	FPD (μg)
[0173] T5-145°	24.13 \pm 1.47	4.65 \pm 0.14	1.88 \pm 0.07	14.0 \pm 2.4	0.15 \pm 0.09
T10-145°	24.02 \pm 1.85	5.19 \pm 0.47	1.95 \pm 0.04	18.3 \pm 5.0	0.11 \pm 0.03
M5-145°	6.77 \pm 0.35	4.77 \pm 0.15	1.94 \pm 0.03	32.3 \pm 5.3	0.54 \pm 0.05
M10-145°	8.02 \pm 1.11	5.50 \pm 0.29	1.97 \pm 0.06	22.5 \pm 2.4	0.21 \pm 0.07

[0174] 这可以用这样一个事实来解释,即剩余水分较高的非结晶海藻糖颗粒表现出通过水桥的颗粒融合倾向。[45]因此,虽然经SEM证实,实际生产的颗粒直径与甘露醇制剂相似(图8),但这些颗粒聚集并可形成更大的二次颗粒。在SEM显微图中可以解释这种聚集(图8)。甘露醇颗粒的记录证实了SLS测量的结果,而海藻糖颗粒的直径要小得多。此外,可以观测到白色箭头所示的水桥。同样,海藻糖微粒水含量的降低可以大大降低这种影响。关于颗粒的表面,甘露醇制剂一般表现出非常光滑的圆形结构。海藻糖颗粒在10%的制剂中也表现出良好的光滑表面,而5%的制剂则显示出一些粗糙的表面。

[0175] 对于肺部递送,在1 μm 至5 μm 之间的空气动力学尺寸对于如上讨论的成功递送是至关重要的,如上所述。虽然几何中值粒径大于5 μm ,但气动直径也取决于颗粒密度和孔隙度,

因此可能比几何直径低。[46]事实上,对NGI中压紧的siRNA的测量显示,海藻糖和甘露醇制剂的MMAD值接近或低于 $5\mu\text{m}$,表明肺递送成功。此外,GSD的计算表明,颗粒分布可以考虑用于肺应用。FPF被认为是与NGI所有阶段的总体压紧的药物相比,在 $5\mu\text{m}$ 以下的颗粒中递送药物的百分数。FPF越高,药物可能被递送到作用部位的数量就越多。因此,分别为海藻糖约27%和甘露醇约37%的细颗粒组分被认为是非常好的。虽然在NGI中收集的颗粒只有少量低于 $5\mu\text{m}$,并有可能到达细支气管和肺泡,但哮喘是一种支气管疾病,大于 $5\mu\text{m}$ 的颗粒也可能沉积在较大的气道中。但为了优化沉积剂量,减少潜在的副作用,降低MMAD将是有利的。与FPF相比,FPD被认为是实际以小于 $5\mu\text{m}$ 的颗粒递送的以 μg 计的药物剂量。因此,它不是一个比例,而是可以使用的确切剂量。在本研究中,在甘露醇制剂和海藻糖制剂之间,FPD不同:而甘露醇制剂可递送超过 $0.5\mu\text{g}$ 的siRNA,而上述海藻糖制剂目前只能递送不到 $0.2\mu\text{g}$ 的siRNA。虽然海藻糖形成的多聚复合物的FPF小得多,但这一发现不能单独解释FPD的差异。为了解释这一现象,必须考虑到FPF计算只考虑NGI内的药物沉积量。没有考虑在预分离器、感应端口、甚至在吸入器本身的沉淀物。事实上,在应用装置的胶囊架内壁上发现了大量粉末,不幸的是,这些粉末无法量化。这一发现只在海藻糖中发现,而在甘露醇制剂中没有发现。对这一观测结果最合理的解释可能是粉末的非结晶结构和海藻糖制剂的较高剩余水分。通过真空和由此产生的离心力,粉末从胶囊中释放后,颗粒跟随气流被迫离开吸入器。较小和较轻的颗粒可以直接跟随气流,而大部分可能聚集的颗粒只有在撞击胶囊架的内壁并从内壁反弹后才会跟随气流,从而可能解离。然而,由于海藻糖颗粒的高的剩余水含量和随后的可塑性,大量的粉末可粘附在设备内其余的壁上。这解释了为什么合适值是根据海藻糖制剂中NGI内沉积的药物量计算的MMAD、GSD和FPF的 $\sim 27\%$ 。另一方面,胶囊架上没有检测到甘露醇粉末,因此建议成功地将甘露醇粉末引入NGI,而没有进一步的损失。

[0176] 从对微粒性质的总体评估中,我们因此得出结论,晶体结构在所有分析的性质中都优于非结晶物质,即使非结晶态在多聚复合物稳定性方面看起来是有利的。

[0177] 体外性能

[0178] 对于siRNA的递送来说,保持分子的生物活性是至关重要的。因此,重组了喷雾干粉末,并将表达H1299细胞的增强型绿色荧光蛋白用再分散的多聚复合物转染。脂质体(Lipofectamine, LF)是体外标准转染剂,用作阳性对照。[47]它被用来显示核酸的最大可能的作用,即mRNA的siRNA下调和随后的蛋白表达(GFP)。在所有情况中,由于GFP表达显著降低,siRNA均有活性(图9)。有趣的是,在5%葡萄糖的标准体外制剂中所用的脂质体-siGFP复合物显示出在所有5组中观测到的最高的下调,相对降幅 $>95\%$ (与含有阴性对照siRNA序列的LF-siNC相比)。脂质体复合物与海藻糖或甘露醇在各自的赋形剂浓度下虽然成功下调,但仅显示出70%至80%之间的相对降低。造成这种差异的一个可能的机制可能由以下事实解释,即转染是一个消耗能量的过程,因此为细胞提供能量的因子(如葡萄糖)是有利的。[48]因此,用海藻糖或甘露醇交换葡萄糖会降低这种正效应,细胞吸收颗粒的效率可能低于葡萄糖参照组。这种效应或这里使用的基质溶液的粘度是否会导致转染减少尚不清楚,这是未来研究的一部分。

[0179] 在之前的研究中,由PPP和siRNA制成的多聚复合物在体外中显示了约50%的敲除效率[49],以及甚至在体内显示了 $>70\%$ 的敲除效率,其中脂质体是不稳定且毒性太大。[9]因此,在喷雾干燥过程中保持转染能力和转染效率对于体外实验和体内后续研究是非常重

要的。如图9所示, siGFP和PPP形成的多聚复合物的表现优于其阴性对照制剂(PPP-siNC)。重要的是, 所有喷雾干燥的多聚复合物(SD)的表现与新近制备的多聚复合物一样好。这种效果与赋形剂的性质及其浓度(用灰色标记)无关。在确认生物活性后, 将这一知识转移到临床更相关的模型中, 在该模型中, GATA结合蛋白3(GATA3)试图在CD4+T细胞中下调。在严重失控的哮喘中, Th2细胞在下游效应的激活中发挥关键作用, 这些效应协调了由GATA3表达上调引起的哮喘的充分表现。[50]如其他基于siRNA的疗法所示, 这些过表达蛋白的下调可导致治疗和给药频率显著改善, 从而获益。[51]因此, 我们的团队优化了递送系统, 用于siRNA的T细胞转染siRNA, 即转铁蛋白偶联的PEI(Tf-PEI), [52]其与两个靶向GATA3的siRNA序列联合喷雾干燥。如前所述, 对siGATA的数量进行了量化, 以确保转染的数量。孵育2天后, 分析GATA3 mRNA的量, 并将其归一化到 β -肌动蛋白。正如预期的那样, 脂质体在阴性对照siRNA和siGATA之间无显著差异(图10)。然而, 由Tf-PEI和siGATA组成的新近制备的多聚复合物介导了GATA3表达的显著降低, 并且大多数由5%甘露醇(M5-145°)喷雾干燥的Tf-PEI和siGATA的大多数多聚复合物显示出相同的效果。重要的是, M5-145°的基因沉默效果与含多重复合物的新近制备的siGATA没有显著差异, 证实了保留的生物活性和转染效率。然而, 用5%海藻糖喷雾干燥的多聚复合物根本没有显示出转染效果。这是令人惊讶的, 因为可以预计, 像海藻糖这样的非结晶物质会比结晶甘露醇使转铁蛋白(79kDa的蛋白质)更稳定, 特别是因为后者赋形剂已知会在喷雾干燥时诱导蛋白质聚集。[53]然而, 在这里, 甘露醇制剂同样稳定了转铁蛋白, 并允许成功转染。考虑到图8所示的聚集趋势, 海藻糖制剂缺乏基因沉默的一个合理原因可能是用于转染的相当小体积的再分散问题。通过PEI可以潜在地实现成功稳定甘露醇制剂中的转铁蛋白。PEI参与多聚复合物的形成, 而且也可以直接在转铁蛋白内相互作用。事实上, 正如所示的, PEI能够物理交联蛋白质, 并在pH变化和搅拌诱导的压力期间增加其稳定性。[54]这可以解释Tf的稳定性和构象的维持能够使Tf修饰的多聚复合物识别T细胞的Tf受体。进一步的研究将集中在单独喷雾干燥、与PEI混合以及在甘露醇或海藻糖中作为Tf-PEI结合物时, Tf的蛋白质聚集体的形成、二级结构和结合动力学, 以更好地理解这些发现背后的过程。

[0180] 另外的喷雾干燥步骤

[0181] 在一次喷雾干燥过程中, 总量30.00 μ g的siGFP用5%的在核酸核糖酶游离水中的海藻糖溶液稀释到总体积250 μ L。因此, 所需数量的PPP[1]也用5%的在核酸核糖酶游离水中的海藻糖溶液稀释到总体积250 μ L。将该PPP溶液加入到siGFP溶液中, 并大力上下移液。孵育20分钟, 以形成多聚复合物。随后, 将4500 μ L的5%海藻糖溶液加入多聚复合物溶液中。小心地转动管子进行混合。与此同时, 打开喷雾干燥机; 参数设置为入口温度145 $^{\circ}$ C, 吸气器70%, 气流40mm(473NL/h), 水冷却的喷嘴。核酸核糖酶游离水以1.2至1.4mL/min进行喷雾干燥。如果达到145 $^{\circ}$ C的恒定入口温度, 则开始使用聚合物-海藻糖分散体的喷雾干燥过程。在过程结束时, 将样管更换为核酸核糖酶游离水, 其再喷雾干燥2分钟。至此, 泵停止工作。喷雾干燥过程完成, 开始纳米嵌入微粒的随后的干燥。计时器设置为5分钟, 其他所有参数保持不变。因此, 随后的干燥在145 $^{\circ}$ C的入口温度下进行, 如图11中所示。最后, 停止喷雾干燥过程, 收集喷雾干燥后的粉末。

[0182] 喷雾干燥过程结束后, 所有粉末进行收集, 称重, 并使用试样进行进一步分析。为了量化喷雾干燥后微粒粉末中的PPP和siGFP的含量, 将粉末的试样溶解在HPW(高纯水)中,

并进行肝素竞争分析,以解离NIM粉末中的siGFP-PPP多聚复合物。随后,从该多聚复合物中释放的siGFP通过改性的**SYBR®**金分析[1]进行测定,而PPP浓度通过TNBS分析[2]进行测定。首先,该批次的NIM粉末在容量瓶中溶解于2mL的HPW中。以下过程进行三次:根据siGFP的理论内容,选择体积,以实现每个样品约0.04 μ g的siGFP。在试管中,该溶液用HPW稀释至每个样品150 μ L的最终体积。随后,在每个试管中加入75 μ L的58k IU肝素的 μ L,在2小时后实现多聚复合物的完全解离。该溶液进一步稀释为450 μ L,并分发到白色的96孔板(Thermo Scientific™ BioLite microwell plate,Thermo Scientific GmbH,Schwerte,德国)中,每个100 μ L,共三份。为了量化siGFP,在每个孔中加入30 μ L的4 \times **SYBR®**金溶液,并在室温下在黑暗中孵育10分钟。使用Synergy 2多模式酶标仪(BioTek仪器,Winooski,VT,美国)在485/20nm的激发波长和520/20nm的发射波长对每个样品的荧光进行量化,并与用**SYBR®**金染料孵育的新近制备的游离siGFP标准曲线进行比较。为了量化PPP,将100 μ L的批次溶解在2mL的0.1M硼砂缓冲液(十水硼酸钠,Sigma Aldrich,德国)中的溶液用30 μ L的3mM的TNBS溶液三联孵育,使用Synergy 2多模式酶标仪(BioTek仪器,Winooski,VT,美国)孵育1小时后测定405nm的吸光度。将测定的吸光度值与用TNBS试剂孵育的新近制备的游离PPP的标准曲线进行比较。为了验证每个量化分析方法,新近制备内部标准且进行并行分析。这些标准包括已知量的siGFP和PPP,其分别根据样品中被分析的siGFP或PPP的理论量来进行选择。这些是每个孔中0.04 μ g的siGFP用于核酸量化,以及0.48至1.2 μ g的PPP用于聚合物量化。偏差小于内部标准10%的测量被视为是精确的,并考虑用于进一步的分析。

[0183] 对喷雾干燥粉末进行另外的干燥后的分析显示,在喷雾干燥过程中,损失约10%的siRNA和聚合物,如图12所示。相应的损失有助于多聚复合物在喷雾干燥过程中的稳定性,并证实了在另外的干燥步骤中没有另外的物质损失。

[0184] 喷雾干燥后NIM粉末的剩余水含量使用Aqua 40.00Karl Fischer滴定器和耶拿分析公司(德国耶拿)相应的软件由库仑测量来确定,如图13所示。样品(约15mg)装入2R小瓶,放入加热室,在100 $^{\circ}$ C下测量,直到测量漂移达到起始漂移 $\leq \pm 2\mu$ g/min或直到最终测量时间为10min。在大约1小时的平衡后,起始漂移建立,显示速率小于10 μ g/min。试剂为Hydranal Coulomat AG(Riedel-deHaen,Seelze,德国)。在每次实验前,滴定仪均以1%的水标准进行校准。水分含量计算为相对于总样品重量的水的重量百分数。

[0185] 对另外的干燥步骤前后粉末的分析证实,另外的干燥步骤实现了剩余水分在统计上显著地减少。相应地,海藻糖制剂的细颗粒分数(FPF)在另外的干燥步骤后也增加了。类似的结果也可适用于其他非晶赋形剂。

[0186] 这再次增加了粉末的细颗粒分数,即气动直径(MMAD)小于5 μ m的分数。基于这种改进后的小颗粒分数,可以大大提高粉末的药物活性剂量。

[0187] 总结

[0188] 综上所述,根据本发明,高于裸siRNA的熔融温度的喷雾干燥导致喷雾干燥后回收的siRNA的数量发生显著变化,即使siRNA存在于包裹在赋形剂基质中的多聚复合物中。本发明在熔融温度或低于熔融温度下的喷雾干燥显示出在回收量和碱基对长度方面没有显著差异。此外,令人惊讶的发现,由于管材和siRNA之间的相互作用看起来大规模地发生,管材可以对喷雾干燥的多聚复合物的制备和加工产生巨大的影响。

[0189] 我们证明了喷雾干燥不影响多聚复合物的尺寸和PDI,而与本研究中使用的不同

赋形剂及其浓度无关。siRNA的完整性也证明了这一点。量化分析表明,当用结晶物质的代表甘露醇配制时,喷雾干燥后siGFP和PPP显著损失。然而,当用海藻糖(用于非结晶微粒的典型基质)喷雾干燥时,没有观测到关于这两种多聚复合物组分的回收率的变化。因此,可以认为,对于纳米颗粒性能而言,非结晶物质对于通过加工最小化损失是至关重要的。

[0190] 另外的干燥步骤对喷雾干粉末具有积极作用,而不会显著增加siRNA损失。所得到的粉末显示出剩余水分含量的减少,并在不降低纳米颗粒稳定性的情况下表现出改进的微粒特性。

[0191] 在微粒特性方面,甘露醇制剂在颗粒特性方面明显优于海藻糖制剂。由于结晶结构和随后较低的剩余水分,甘露醇颗粒表现出较小的几何中值粒径,并表现出良好的气动特性。

[0192] 对于体外分析,两种制剂表明在eGFP表达细胞系中有效的GFP下调,这指示所有测试制剂都保留了生物活性。这些发现被转化为原代CD4+T细胞,而原代CD4+T细胞在哮喘等炎症性疾病的发病机制中发挥核心作用,在哮喘等炎症性疾病中可以观测到GATA3上调。我们证明了多聚复合物的喷雾干燥在与甘露醇配制时对效率没有负面影响,用于干粉末吸入的喷雾干燥的甘露醇制剂实现了原代T细胞在体外的成功转染,如通过高效和序列特异性的GATA3沉默所反映的。

[0193] 对于通过非结晶基质的稳定,以及对于通过晶体材料的最佳微粒特性,结合晶体和非结晶颗粒的有益特性,这是本发明的有利实施方式。

[0194] 基于包括脂质纳米颗粒的水性悬浮液的实施例和实施方式:

[0195] 纳米颗粒的特性

[0196] 除了加热外,喷雾干燥对LNP-siRNA系统施加剪切力,以及可以熔融、分解、破坏或合并LNP。因此,在喷雾干燥前后进行DLS测量,以可视化任何可能的效果。因此,微粒被溶解在HPW中进行LNP再分散,以模拟肺内撞击和基质赋形剂溶解。如图14所示,新近制备的LNP和再分散的LNP的Z均值在统计学上没有差异。此外,未观测到PDI的差异。然而,我们认识到高PDI值可在一定程度上由糖/糖醇单体解释。Weinbuch等人表明,在高浓度溶液中可以看到糖和糖醇的单体。[61]综上所述,在每种制剂内,LNP粒径和分布不受喷雾干燥的影响。

[0197] 微粒特性

[0198] 通过干粉末制剂进行的肺递送需要低的剩余水分,以避免聚集过程。虽然上面讨论了剩余水分在喷雾干燥过程中可充当稳定LNP的塑化剂,但它仍然可能导致微粒聚集,并可能是微生物不稳定和核酸核糖酶污染的来源。因此,所有制剂的水含量均使用Karl Fischer滴定法测定。如表3所示,粉末在低温(60°或80°C)干燥后在冰箱中储存8周看起来会导致剩余水分增加。对于所有其他制剂,独立于LNP的电荷和干燥温度,观测到大约4%的剩余水分。

[0199] 表3:以5%wA/乳糖为赋形剂,在60°、80°C、100°C或120°C的T-In下喷雾干燥LNP的剩余水分,以及回收的喷雾干燥(SD)质量和产率

在LNP中的 siRNA(μg)	名称	SD 质量 (mg)	SD 产率 (%)	剩余水分 (%)
5	LNP 中性 60°C	168.36	67.3	6.94 (在冰箱中 存储8周)
5	LNP 中性 80°C	157.25	62.9	7.20 (在冰箱中 存储8周)
[0200] 5	LNP 中性 100°C	159.40	63.8	4.21
10	LNP 中性 120°C	184.15	73.6	3.21
10	LNP (+) 80°C	155.66	62.3	4.94
10	LNP (+) 100°C	166.75	66.7	4.46
10	LNP (+) 120°C	146.61	58.6	3.34
10	LNP (-) 80°C	183.88	73.6	4.44
10	LNP (-) 100°C	178.75	71.5	3.99

[0201] 乳糖通常在喷雾干燥后以非结晶状态凝固,这是通过DSC证实的(图15)。除了乳糖的吸湿性质外,形成非结晶结构的原因是快速干燥步骤,其没有提供足够的时间让乳糖分子排列成有序结构,随后晶体成核和生长,其通过约120°C的玻璃化转变温度来证实。[62]所有乳糖制剂显示出均在45°C至56°C的温度下对应于其剩余水分含量而发生玻璃化转变(图15(DSC乳糖)和表3)。该温度(T_g)对于存储期间的稳定性预测很重要,因为非结晶固体形式在热力学上不稳定,如果存储接近或高于 T_g ,往往会结晶。[63]制剂的非结晶状态有利于LNP的保存。因此,为了将这些产品在室温下或在冰箱中保存更长的时间,高 T_g 值是必要的。然而,这与水含量密切相关:剩余水含量率越高, T_g 越低。[64]此外,剩余水分含量越低,降解过程发生的可能性就越小。[64]因此,非常有意义的是,进一步减少海藻糖制剂中的剩余水分,以避免随着时间的推移成核和降解过程,以便保持制剂的非结晶状态。虽然储存对LNP质量(尺寸,PDI)和数量的影响尚未详细研究,但这些方面目前正在更大的方案中进行研究,以优化制剂和工艺参数。相比之下,在图16中,甘露醇呈现出起始温度为164°C至166°C的结晶结构。

[0202] 体外性能

[0203] 对于siRNA的递送来说,在喷雾干燥和储存过程中保持分子的生物活性是至关重要的。因此,重组了喷雾干粉末,并将表达H1299细胞的增强型绿色荧光蛋白用再分散的LNP转染。为了进行比较,新近制备的不同电荷的LNP(中性、阴性和阳性)用于设定LNP最大基因沉默功效的基线。细胞用相当于55.7nM siGFP的1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的siRNA或干扰对照siRNA转染。在所有情况中,装载针对GFP的siRNA的LNP均显著降低GFP表达(图18)。体外标准制剂中使用的LNP再分散于细胞培养基中表明,在所有三组中均观测到非常强的下调,相对降幅>90%(与含有siNC的LNP相比,含有阴性对照siRNA序列)。

[0204] 如图17所示,与装载干扰对照siRNA(scRNA)的LNP相比,由siGFP形成的LNP显著沉默GFP表达。重要的是,所有喷雾干燥的LNP(SD)表现至少与新近制备的LNP相同,如图18所

示。这对于5%乳糖制剂和5%甘露醇制剂是正确的(图19)。

[0205] 在下一步骤中,将5%甘露醇或5%乳糖中喷雾干燥LNP所获得的粉末再分散于HPW中,以获得100 μ L再分散粉末中含1 μ g的siRNA或0.5 μ g的siRNA的LNP,以及细胞用1 μ g/mL的siRNA(相当于55.7nM siRNA)的转染。相比之下,细胞未处理(培养基对照),仅使用糖(酒精)(培养基+5%乳糖或甘露醇)处理,使用游离siRNA处理,使用Onpattro™制剂新近制备的LNP,或使用Onpattro™制剂在100℃下用5%乳糖(L)或甘露醇喷雾干燥的LNP。

[0206] 为了比较,其他含有阳性LNP和阴性LNP的制剂被喷雾干燥,并在不同浓度下进行测试。如图18所示,无论喷雾干燥温度如何(在1 μ g/mL的siRNA下的中性LNP,在60°、80°或100℃下喷雾干燥),均未观测到含有相同浓度siRNA的制剂之间有显著差异。此外,当将相同浓度的siRNA用于阳性LNP和阴性LNP(80℃下0.5 μ g/mL的siRNA)时,未观测到纳米颗粒的电荷有差异。只有100℃下喷雾干燥的LNP呈现,与0.5 μ g/mL的阴性LNP或1 μ g/mL的中性LNP相比,0.5 μ g/mL的阳性LNP之间的略微差异更高效。如图19所示,在甘露醇中喷雾干燥的LNP呈现与在乳糖中喷雾干燥相同的结果。

[0207] 结论与展望

[0208] 综上所述,我们示出了在72℃的T-Out或低于72℃的T-Out的条件下,在5%的乳糖中喷雾干燥装载siRNA的LNP导致在喷雾干燥和再分散后siRNA和LNP活性的保持。

[0209] 我们证明喷雾干燥不影响LNP的尺寸和PDI。

[0210] 关于粉末特性,乳糖制剂中含有约4%的剩余水分,而与所施加的喷雾干燥温度无关。

[0211] 对于体外分析,所有三种制剂都显示出在eGFP表达细胞系中GFP的有效下调,表明所有试验制剂都保留了生物活性。效能不取决于喷雾干燥温度和制剂,而仅取决于siRNA浓度和使用5%乳糖或甘露醇作为赋形剂。然而,我们的方法与TranslateBio公司(现为赛诺菲)选择的方法之间的一个差异是粉末中RNA的重量百分数。而Karve等人使用的RNA浓度为0.133% [65],而我们观测到更多的过量赋形剂可以更有效地保护LNP。本方法可用于最终粉末产品中0.001%至0.02%w/w的RNA。由于>90%的水在喷雾干燥过程中蒸发,RNA的这一百分数取决于用于喷雾干燥的饲料分散中的固体含量。

[0212] 致谢

[0213] 本项目由欧洲研究理事会(ERC)在欧盟地平线2020研究与创新计划(资助协议编号:StG-2014-637830)资助。

[0214] 参考文献

[0215] [1]S.Weber,A.Zimmer,J.Pardeike,Solid Lipid Nanoparticles (SLN) and Nanostructured Lipid Carriers (NLC) for pulmonary application:a review of the state of the art,Eur.J.Pharm.Biopharm.,86(2014)7-22.

[0216] [2]A.Ray,A.Mandal,A.K.Mitra,Recent Patents in Pulmonary Delivery of Macromolecules,Recent Pat Drug Deliv Formul,9(2015)225-236.

[0217] [3]G.K.Crompton,Dry powder inhalers:advantages and limitations,J.Aerosol Med.,4(1991)151-156.

[0218] [4]P.Hematti,E.G.Schmuck,J.A.Kink,A.N.Raval,Generation of therapeutic cells using extracellular components of target organs,in,US PatentUS20180282698A1

2018.

[0219] [5]G.J.Hannon, RNA interference, *Nature*, 418 (2002) 244-251.

[0220] [6]H.J.Kim, A.Kim, K.Miyata, K.Kataoka, Recent progress in development of siRNA delivery vehicles for cancer therapy, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 104 (2016) 61-77.

[0221] [7]S.S.Titze-de-Almeida, P.R.P.Brandao, I.Faber, R.Titze-de-Almeida, Leading RNA Interference Therapeutics Part 1: Silencing Hereditary Transthyretin Amyloidosis, with a Focus on Patisiran, *Mol. Diagn. Ther.*, (2019) 1-11.

[0222] [8]P.de Paula Brandao, S.Titze-de-Almeida, R.Titze-de-Almeida, Leading RNA Interference Therapeutics Part 2: Silencing Delta-Aminolevulinic Acid Synthase 1, with a Focus on Givosiran, *Mol. Diagn. Ther.*, (2019) 1-8.

[0223] [9]D.P.Feldmann, Y.Xie, S.K.Jones, D.Yu, A.Moszczynska, O.M.Merkel, The impact of microfluidic mixing of triblock micelleplexes on in vitro in vivo gene silencing and intracellular trafficking, *Nanotechnology*, 28 (2017) 224001.

[0224] [10]S.K.Jones, V.Lizzio, O.M.Merkel, Folate Receptor Targeted Delivery of siRNA and Paclitaxel to Ovarian Cancer Cells via Folate Conjugated Triblock Copolymer to Overcome TLR4 Driven Chemotherapy Resistance, *Biomacromolecules*, 17 (2016) 76-87.

[0225] [11]T.Endres, M.Zheng, M.Beck-Broichsitter, T.Kissel, Lyophilised ready-to-use formulations of PEG-PCL-PEI nano-carriers for siRNA delivery, *Int. J. Pharm.*, 428 (2012) 121-124.

[0226] [12]T.W.M.Keil, D.P.Feldmann, G.Costabile, Q.Zhong, S.da Rocha, O.M.Merkel, Characterization of spray dried powders with nucleic acid containing PEI nanoparticles, *Eur J Pharm Biopharm.*, (2019).

[0227] [13]K.Cal, K.Sollohub, Spray drying technique. I: Hardware and process parameters, *J. Pharm. Sci.*, 99 (2010) 575-586.

[0228] [14]T.Okuda, M.Morishita, K.Mizutani, A.Shibayama, M.Okazaki, H.Okamoto, Development of spray-freeze-dried siRNA/PEI powder for inhalation with high aerosol performance and strong pulmonary gene silencing activity, *J. Control. Release*, 279 (2018) 99-113.

[0229] [15]M.Cardenas, A.Braem, T.Nylander, B.Lindman, DNA compaction at hydrophobic surfaces induced by a cationic amphiphile, *Langmuir*, 19 (2003) 7712-7718.

[0230] [16]J.Horn, J.Schanda, W.Friess, Impact of fast and conservative freeze-drying on product quality of protein-mannitol-sucrose-glycerol lyophilizates, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 127 (2018) 342-354.

[0231] [17]M.T.Cicerone, M.J.Pikal, K.K.Qian, Stabilization of proteins in solid form, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 93 (2015) 14-24.

[0232] [18]United-States-Pharmacopeial-Convention, Particle Size-

Aerodynamic Size Distribution, in: 601 Aerosols, Nasal Sprays, Metered-Dose Inhalers, and Dry Powder Inhalers, USP 35, 2012, pp. 232-252.

[0233] [19] European Pharmacopoeia Commission, Aerodynamic Assessment of Fine Particles, in: 2.9.18 Preparations for Inhalation, Ph. Eur. 9.0, 2017, pp. 440-454.

[0234] [20] W. Liang, M. Y. Chow, P. N. Lau, Q. T. Zhou, P. C. Kwok, G. P. Leung, A. J. Mason, H. K. Chan, L. L. Poon, J. K. Lam, Inhalable dry powder formulations of siRNA and pH-responsive peptides with antiviral activity against H1N1 influenza virus, *Mol. Pharmaceutics*, 12 (2015) 910-921.

[0235] [21] W. L. Liang, M. Y. T. Chow, S. F. Chow, H. K. Chan, P. C. L. Kwok, J. K. W. Lam, Using two-fluid nozzle for spray freeze drying to produce porous powder formulation of naked siRNA for inhalation, *Int. J. Pharm.*, 552 (2018) 67-75.

[0236] [22] J. Wu, L. Wu, F. Wan, J. Rantanen, D. Cun, M. Yang, Effect of thermal and shear stresses in the spray drying process on the stability of siRNA dry powders, *Int. J. Pharm.*, 566 (2019) 32-39.

[0237] [23] J. Schulze, S. Kuhn, S. Hendriks, M. Schulz-Siegmund, T. Polte, A. Aigner, Spray-Dried Nanoparticle-in-Microparticle Delivery Systems (NiMDS) for Gene Delivery, Comprising Polyethylenimine (PEI)-Based Nanoparticles in a Poly(Vinyl Alcohol) Matrix, *Small*, 14 (2018) e1701810.

[0238] [24] L. Liu, M. Zheng, D. Librizzi, T. Renette, O. M. Merkel, T. Kissel, Efficient and Tumor Targeted siRNA Delivery by Polyethylenimine-graft-polycaprolactone-block-poly(ethylene glycol)-folate (PEI-PCL-PEG-Fol), *Molecular pharmaceutics*, 13 (2015) 134-143.

[0239] [24a] Y. Xie, N. Kim, V. Nadithe, D. Schalk, A. Thakur, A. Kilic, D. Bassett, L. Lum, O. Merkel, Targeted delivery of siRNA to activated T cells via transferrin-polyethylenimine (Tf-PEI) as a potential therapy of asthma, *Journal of Controlled Release*, 229 (2016) 120-129.

[0240] [25] HORIBA, Understanding the Chi Square and R Parameter Calculations in the LA-950 Software, <https://www.horiba.com/fileadmin/uploads/Scientific/Documents/PSA/TN1>

[0241] 53.pdf, 4.

[0242] [26] S. Claus, C. Weiler, J. Schiewe, W. Friess, Optimization of the fine particle fraction of a lyophilized lysozyme formulation for dry powder inhalation, *Pharm. Res.*, 30 (2013) 1698-1713.

[0243] [27] R. Kandil, Y. Xie, R. Heermann, L. Isert, K. Jung, A. Mehta, O. M. Merkel, Coming in and Finding Out: Blending Receptor-Targeted Delivery and Efficient Endosomal Escape in a Novel Bio-Responsive siRNA Delivery System for Gene Knockdown in Pulmonary T Cells, *Advanced therapeutics*, 2 (2019) 1900047.

[0244] [28] Y. R. Xie, N. H. Kim, V. Nadithe, D. Schalk, A. Thakur, A. Kilic, L. G. Lum, D. J. P. Bassett, O. M. Merkel, Targeted delivery of siRNA to activated T cells via

transferrin-polyethylenimine (Tf-PEI) as a potential therapy of asthma, *J. Control. Release*, 229 (2016) 120-129.

[0245] [29] Büchi-Labortechnik-AG, Training Papers Spray Drying, https://static1.Büchi.com/sites/default/files/downloads/Set_3_Training_Papers_Spray_Drying_en_01.pdf?996b2db24007502bd69c913b675467cfc63880ba, (1997-2002).

[0246] [30] M. Terrazas, E. T. Kool, RNA major groove modifications improves iRNA stability and biological activity, *Nucleic Acids Res.*, 37 (2009) 346-353.

[0247] [31] D. Weinbuch, J. K. Cheung, J. Ketelaars, V. Filipe, A. Hawe, J. den Engelsman, W. Jiskoot, Nanoparticulate Impurities in Pharmaceutical-Grade Sugars and their Interference with Light Scattering-Based Analysis of Protein Formulations, *Pharm. Res.*, 32 (2015) 2419-2427.

[0248] [32] N. K. Jain, I. Roy, Effect of trehalose on protein structure, *Protein Sci.*, 18 (2009) 24-36.

[0249] [33] I. Vollrath, W. Friess, A. Freitag, A. Hawe, G. Winter, Comparison of ice fog methods and monitoring of controlled nucleation success after freeze-drying, *Int. J. Pharm.*, 558 (2019) 18-28.

[0250] [34] J. H. Gitter, R. Geidobler, I. Presser, G. Winter, A comparison of controlled ice nucleation techniques for freeze-drying of a therapeutic antibody, *J. Pharm. Sci.*, 107 (2018) 2748-2754.

[0251] [35] J. H. Crowe, L. M. Crowe, D. Chapman, Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose, *Science*, 223 (1984) 701-703.

[0252] [36] J. H. Crowe, F. A. Hoekstra, L. M. Crowe, Anhydrobiosis, *Annu. Rev. Physiol.*, 54 (1992) 579-599. [37] K. Izutsu, S. Kojima, Excipient crystallinity and its protein-structure-stabilizing effect during freeze-drying, *Journal of pharmacy and pharmacology*, 54 (2002) 1033-1039.

[0253] [37] K. Izutsu, S. Kojima, Excipient crystallinity and its protein-structure-stabilizing effect during freeze-drying, *Journal of pharmacy and pharmacology*, 54 (2002) 1033-1039.

[0254] [38] M. Adler, G. Lee, Stability and surface activity of lactate dehydrogenase in spray-dried trehalose, *J. Pharm. Sci.*, 88 (1999) 199-208.

[0255] [39] M. Maury, K. Murphy, S. Kumar, L. Shi, G. Lee, Effects of process variables on the powder yield of spray-dried trehalose on a laboratory spray dryer, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 59 (2005) 565-573.

[0256] [40] N. Y. Chew, H. -K. Chan, Influence of particle size, air flow, and inhaler device on the dispersion of mannitol powders as aerosols, *Pharm. Res.*, 16 (1999) 1098-1103.

[0257] [41] Y. Y. Lee, J. X. Wu, M. Yang, P. M. Young, F. van den Berg, J. Rantanen, Particle size dependence of polymorphism in spray-dried mannitol, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 44 (2011) 41-48.

- [0258] [42] K. J. Geh, M. Hubert, G. Winter, Progress in formulation development and sterilisation of freeze-dried oligodeoxynucleotide-loaded gelatin nanoparticles, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 129 (2018) 10-20.
- [0259] [43] E. Y. Shalaev, G. Zograf, How does residual water affect the solid-state degradation of drugs in the amorphous state?, *J. Pharm. Sci.*, 85 (1996) 1137-1141.
- [0260] [44] J. H. Gitter, R. Geidobler, I. Presser, G. Winter, Significant Drying Time Reduction Using Microwave-Assisted Freeze-Drying for a Monoclonal Antibody, *J. Pharm. Sci.*, 107 (2018) 2538-2543.
- [0261] [45] L. Weng, S. Ziaei, G. D. Elliott, Effects of Water on Structure and Dynamics of Trehalose Glasses at Low Water Contents and its Relationship to Preservation Outcomes, *Sci. Rep.*, 6 (2016) 28795.
- [0262] [46] I. Gonda, A. F. Abdelkhalik, On the Calculation of Aerodynamic Diameters of Fibers, *Aerosol Sci. Technol.*, 4 (1985) 233-238.
- [0263] [47] F. Cardarelli, L. Digiacomo, C. Marchini, A. Amici, F. Salomone, G. Fiume, A. Rossetta, E. Gratton, D. Pozzi, G. Caracciolo, The intracellular trafficking mechanism of Lipofectamine-based transfection reagents and its simplification for gene delivery, *Sci. Rep.*, 6 (2016) 25879.
- [0264] [48] J. S. Kim, T. J. Yoon, K. N. Yu, M. S. Noh, M. Woo, B. G. Kim, K. H. Lee, B. H. Sohn, S. B. Park, J. K. Lee, Cellular uptake of magnetic nanoparticle is mediated through energy-dependent endocytosis in A549 cells, *J. Vet. Sci.*, 7 (2006) 321-326.
- [0265] [49] Y. Liu, O. Samsonova, B. Sproat, O. Merkel, T. Kissel, Biophysical characterization of hyper-branched polyethyleneimine-graft-polycaprolactone-block-mono-methoxyl-poly(ethylene glycol) copolymers (hy-PEI-PCL-mPEG) for siRNA delivery, *J. Control. Release*, 153 (2011) 262-268.
- [0266] [50] A. Ray, L. Cohn, Th2 cells and GATA-3 in asthma: new insights into the regulation of airway inflammation, *J. Clin. Invest.*, 104 (1999) 985-993.
- [0267] [51] S. M. Hoy, Patisiran: First Global Approval, *Drugs*, 78 (2018) 1625-1631.
- [0268] [52] R. Kandil, Y. Xie, R. Heermann, L. Isert, K. Jung, A. Mehta, O. M. Merkel, Coming in and Finding Out: Blending Receptor-Targeted Delivery and Efficient Endosomal Escape in a Novel Bio-Responsive siRNA Delivery System for Gene Knockdown in Pulmonary T Cells, *Adv. Then (Weinheim, Ger.)*, 2 (2019) 1900047.
- [0269] [53] S. Schiile, W. Friel, K. Bechtold-Peters, P. Garidel, Conformational analysis of protein secondary structure during spray-drying of antibody/mannitol formulations, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 65 (2007) 1-9.
- [0270] [54] C. Garcia-Galan, O. Barbosa, R. Fernandez-Lafuente, Stabilization of the hexameric glutamate dehydrogenase from *Escherichia coli* by cations and polyethyleneimine, *Enzyme Microb Technol*, 52 (2013) 211-217.
- [0271] [55] J. Hom, E. Tolardo, D. Fissore, W. Friess, Crystallizing amino acids

asbulking agents in freeze-drying, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 132 (2018) 70-82. [56] R E. Johnson, C. F. Kirchhoff, H. T. Gaud, Mannitol-sucrose mixtures—versatile formulations for protein lyophilization, *J. Pharm. Sci.*, 91 (2002) 914-922.

[0272] [56] R E. Johnson, C. F. Kirchhoff, H. T. Gaud, Mannitol-sucrose mixtures—versatile formulations for protein lyophilization, *J. Pharm. Sci.*, 91 (2002) 914-922.

[0273] [57] A. Hawe, W. Friess, Physicochemical characterization of the freezing behavior of mannitol-human serum albumin formulations, *AAPS PharmSciTech*, 7 (2006) 94.

[0274] [58] A. Akinc, M. A. Maier, M. Manoharan, K. Fitzgerald, M. Jayaraman, S. Barros, S. Ansell, X. Du, M. J. Hope, T. D. Madden, B. L. Mui, S. C. Semple, Y. K. Tam, M. Ciufolini, D. Witzigmann, J. A. Kulkarni, R. van der Meel, P. R. Cullis, The Onpattro story and the clinical translation of nanomedicines containing nucleic acid-based drugs, *Nat Nanotechnol*, 14 (2019) 1084-1087.

[0275] [59] J. A. Kulkarni, D. Witzigmann, S. Chen, P. R. Cullis, R. van der Meel, Lipid Nanoparticle Technology for Clinical Translation of siRNA Therapeutics, *Acc Chem Res*, 52 (2019) 2435-2444.

[0276] [60] J. A. Kulkarni, D. Witzigmann, J. Leung, Y. Y. C. Tam, P. R. Cullis, On the role of helper lipids in lipid nanoparticle formulations of siRNA, *Nanoscale*, 11 (2019) 21733-21739.

[0277] [61] D. Weinbuch, J. K. Cheung, J. Ketelaars, V. Filipe, A. Hawe, J. den Engelsman, W. Jiskoot, Nanoparticulate Impurities in Pharmaceutical-Grade Sugars and their Interference with Light Scattering-Based Analysis of Protein Formulations, *Pharm. Res.*, 32 (2015) 2419-2427.

[0278] [62] O. C. Chidavaenzi, G. Buckton, F. Koosha, R. Pathak, The use of thermal techniques to assess the impact of feed concentration on the amorphous content and polymorphic forms present in spray dried lactose, *International Journal of Pharmaceutics*, 159 (1997) 67-74.

[0279] [63] K. J. Geh, M. Hubert, G. Winter, Progress in formulation development and sterilisation of freeze-dried oligodeoxynucleotide-loaded gelatin nanoparticles, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 129 (2018) 10-20. [64] E. Y. Shalaev, G. Zografis, How does residual water affect the solid-state degradation of drugs in the amorphous state?, *J. Pharm. Sci.*, 85 (1996) 1137-1141.

[0280] [64] E. Y. Shalaev, G. Zografis, How does residual water affect the solid-state degradation of drugs in the amorphous state?, *J. Pharm. Sci.*, 85 (1996) 1137-1141.

[0281] [65] S. Karve, F. De Rosa, M. Heartlein, Z. Patel, A. Sarode, Dry powder formulations for messenger RNA, in: T. B. Inc (Ed.), 2019.

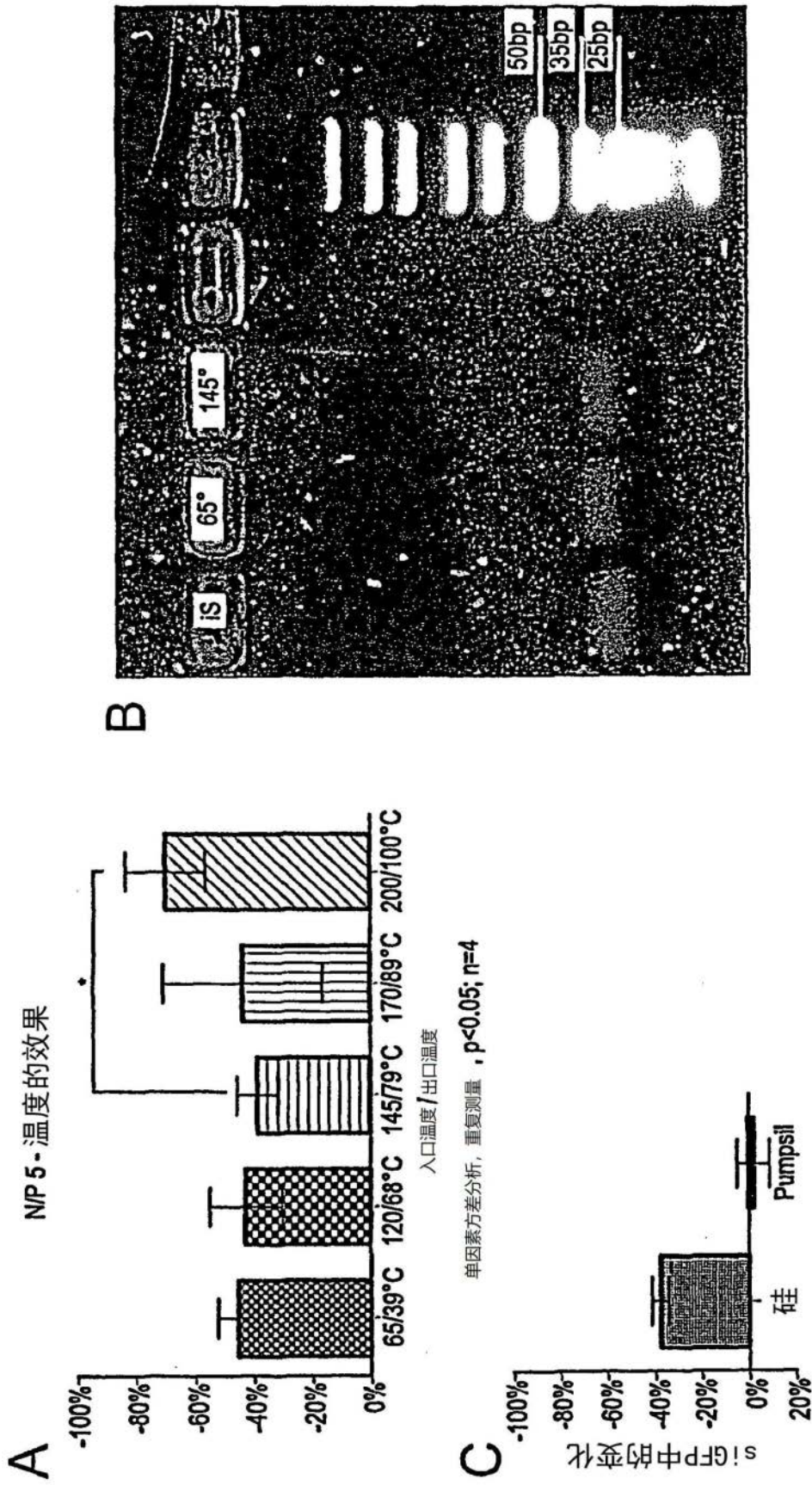


图1

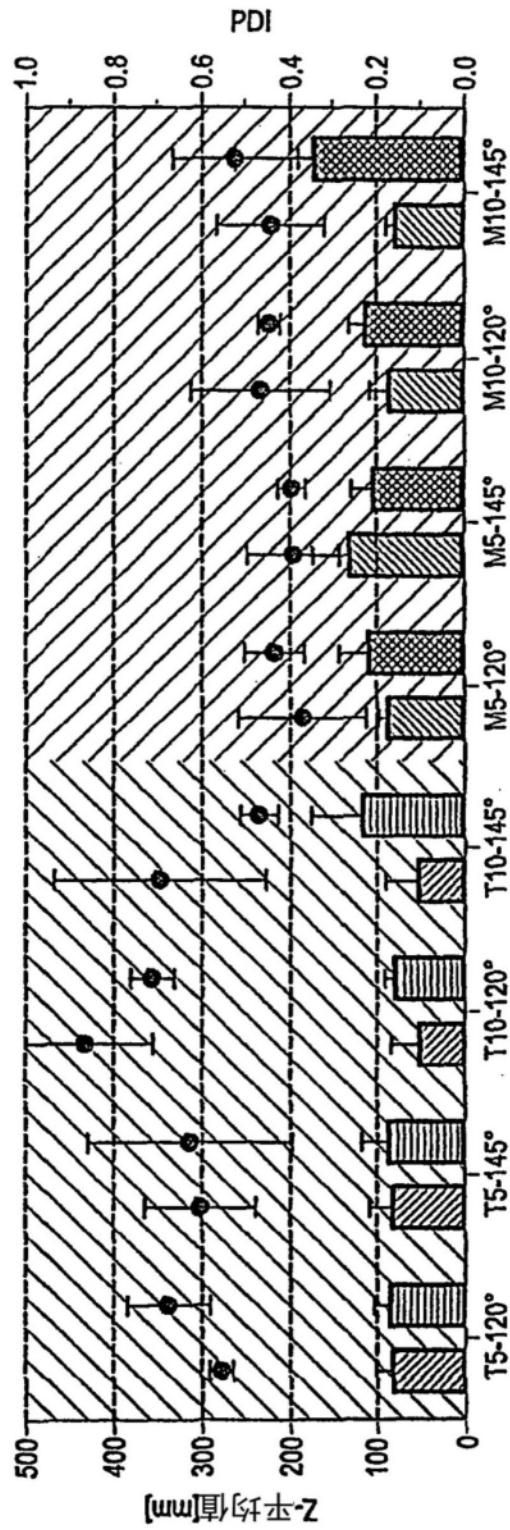


图2

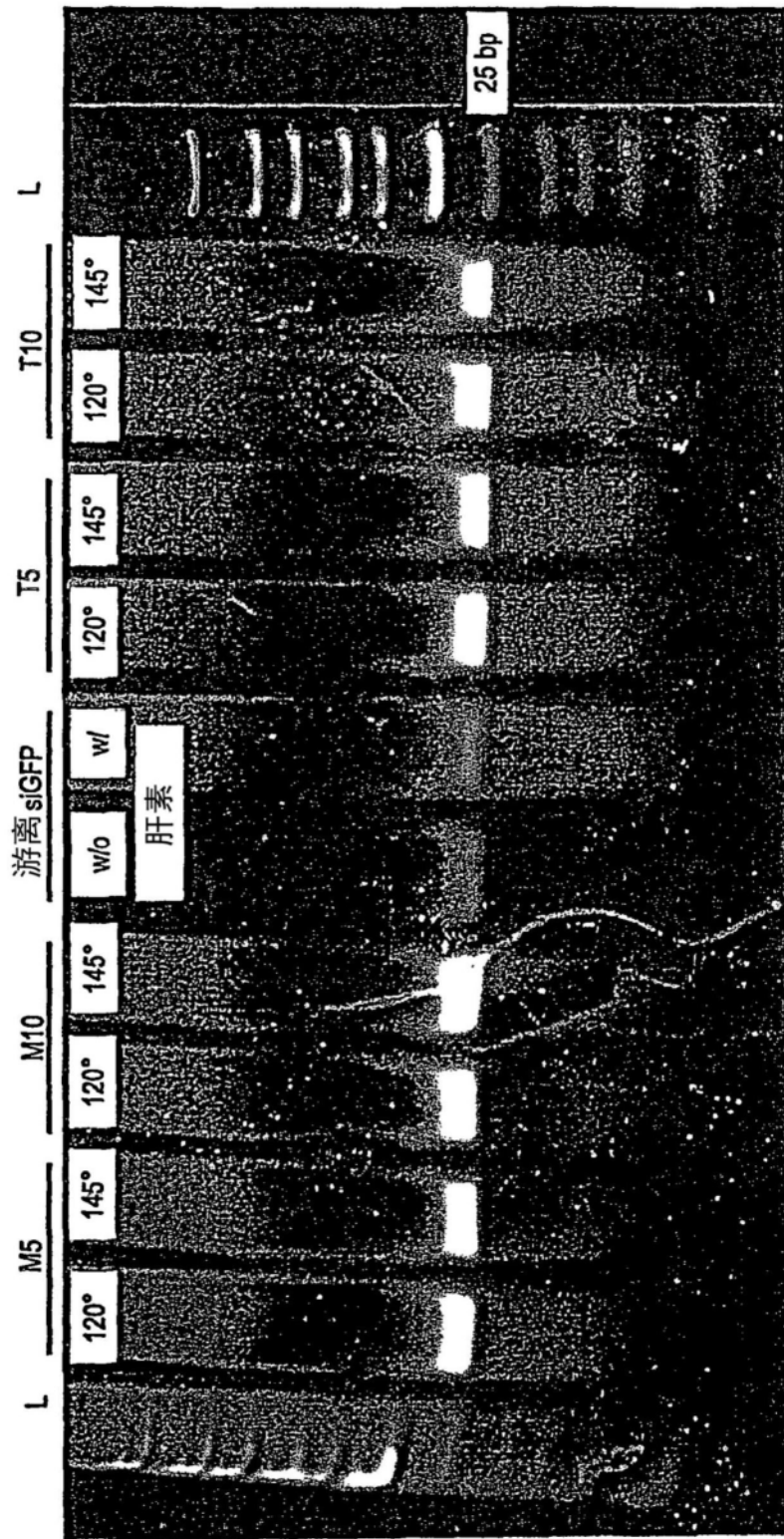


图3

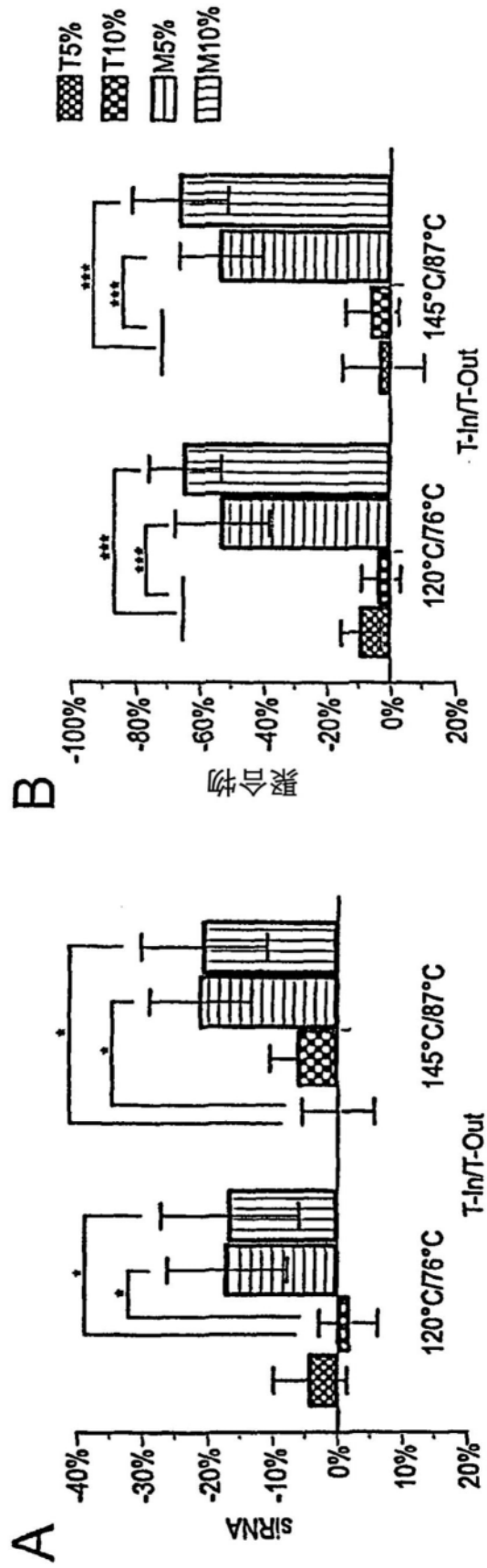


图4

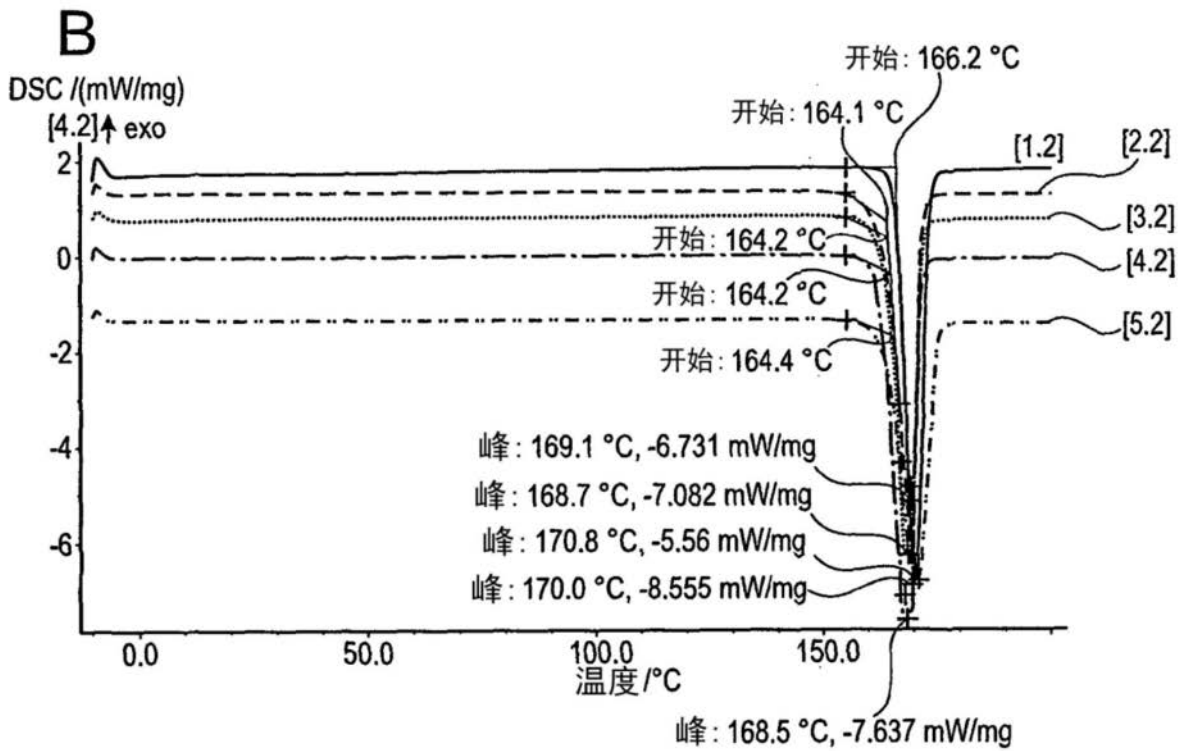
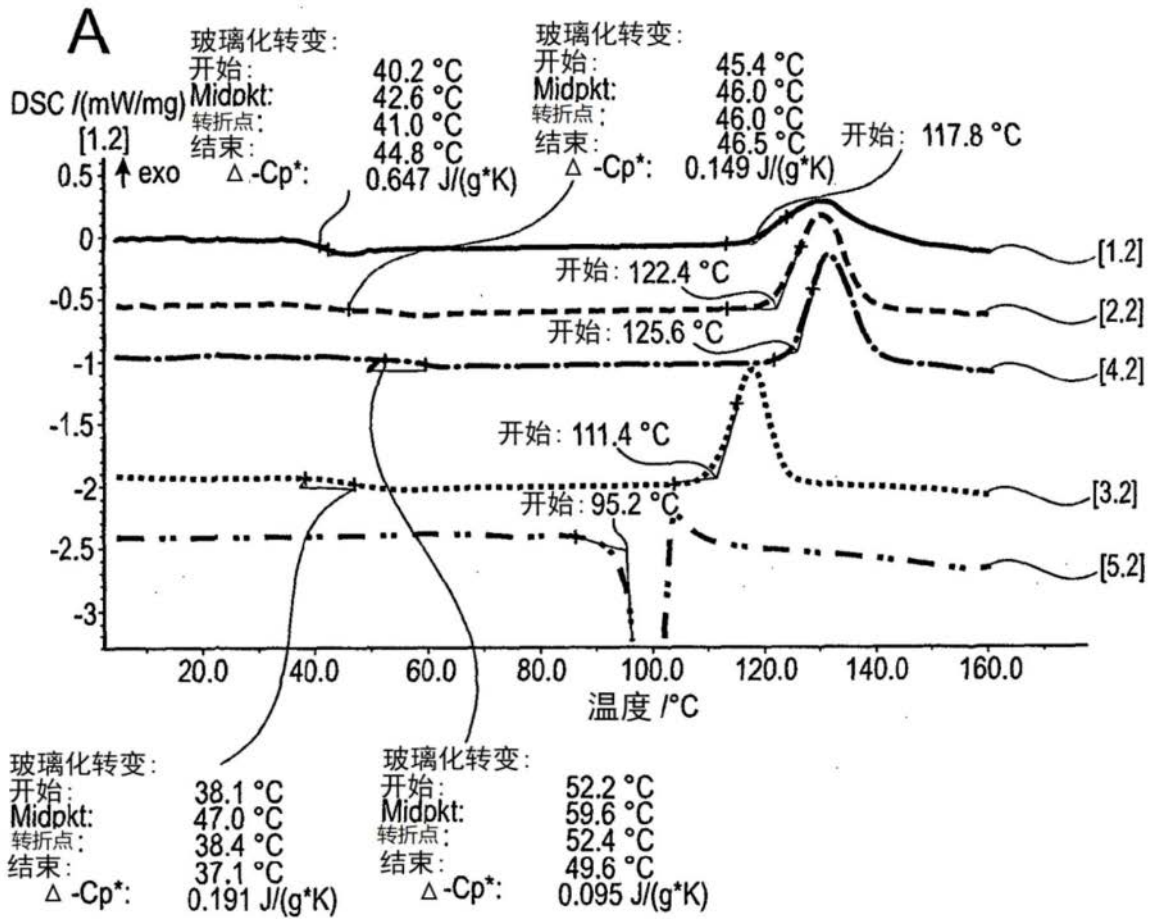


图5

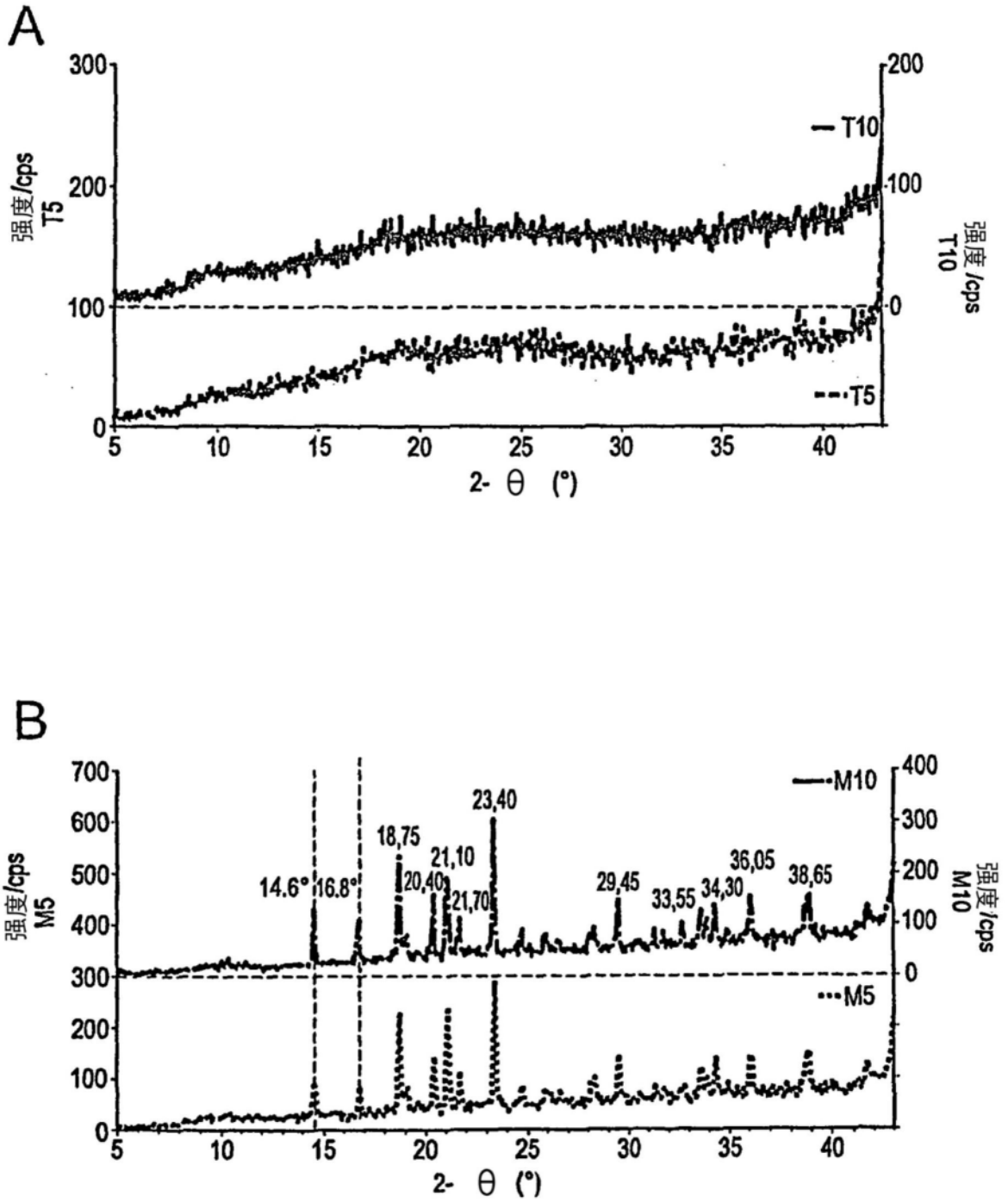


图6

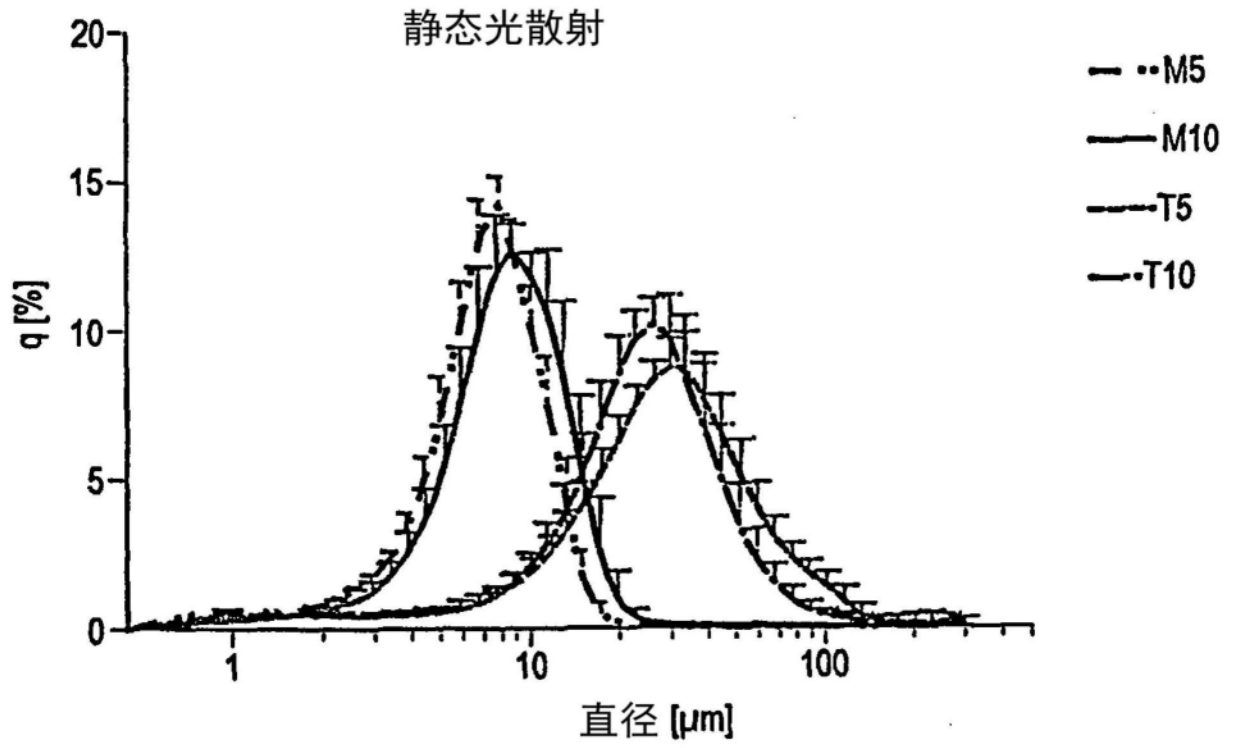


图7

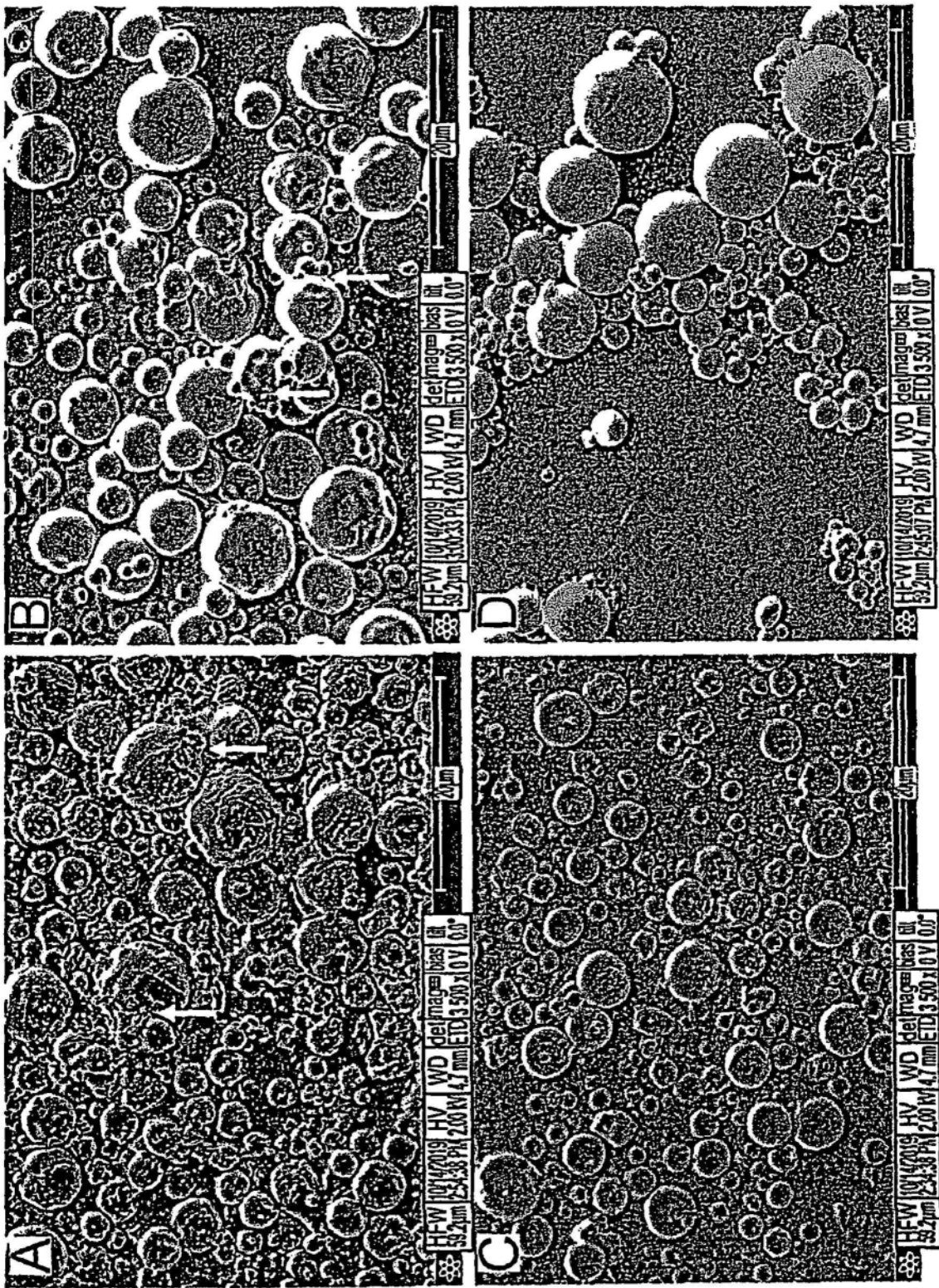


图8

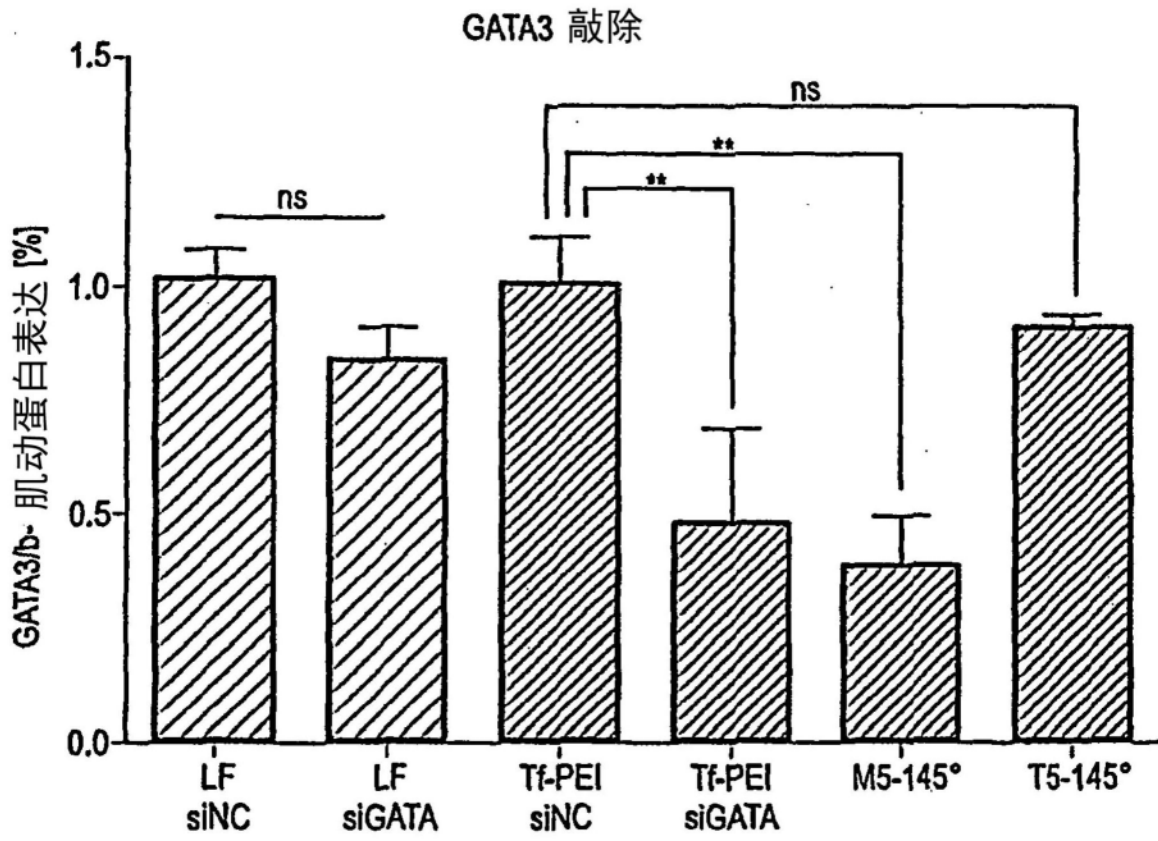


图10

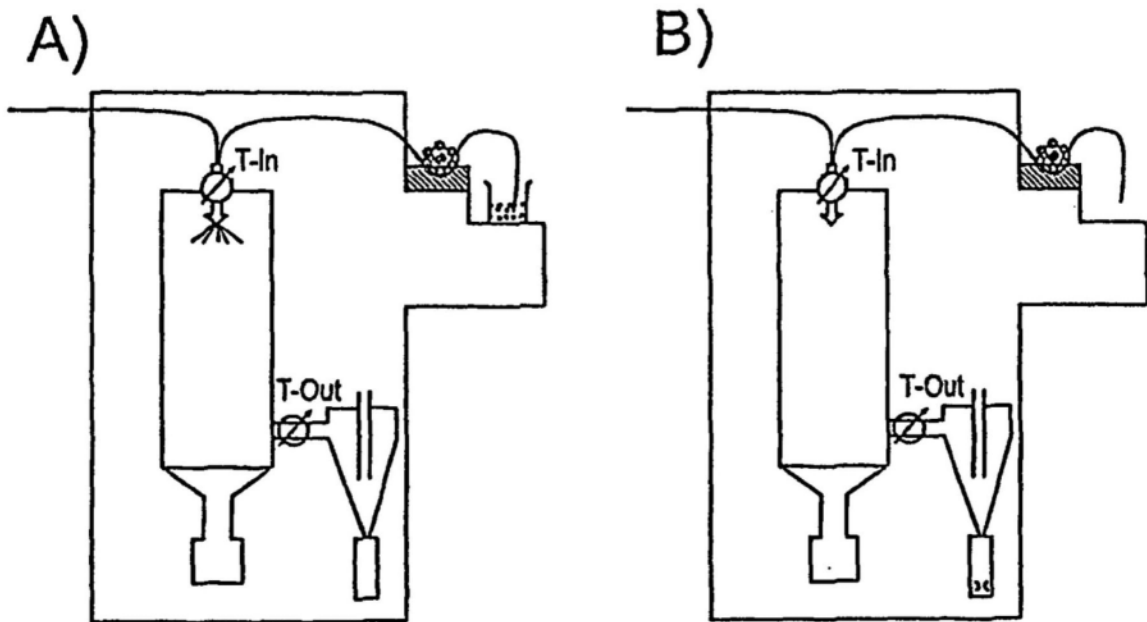


图11

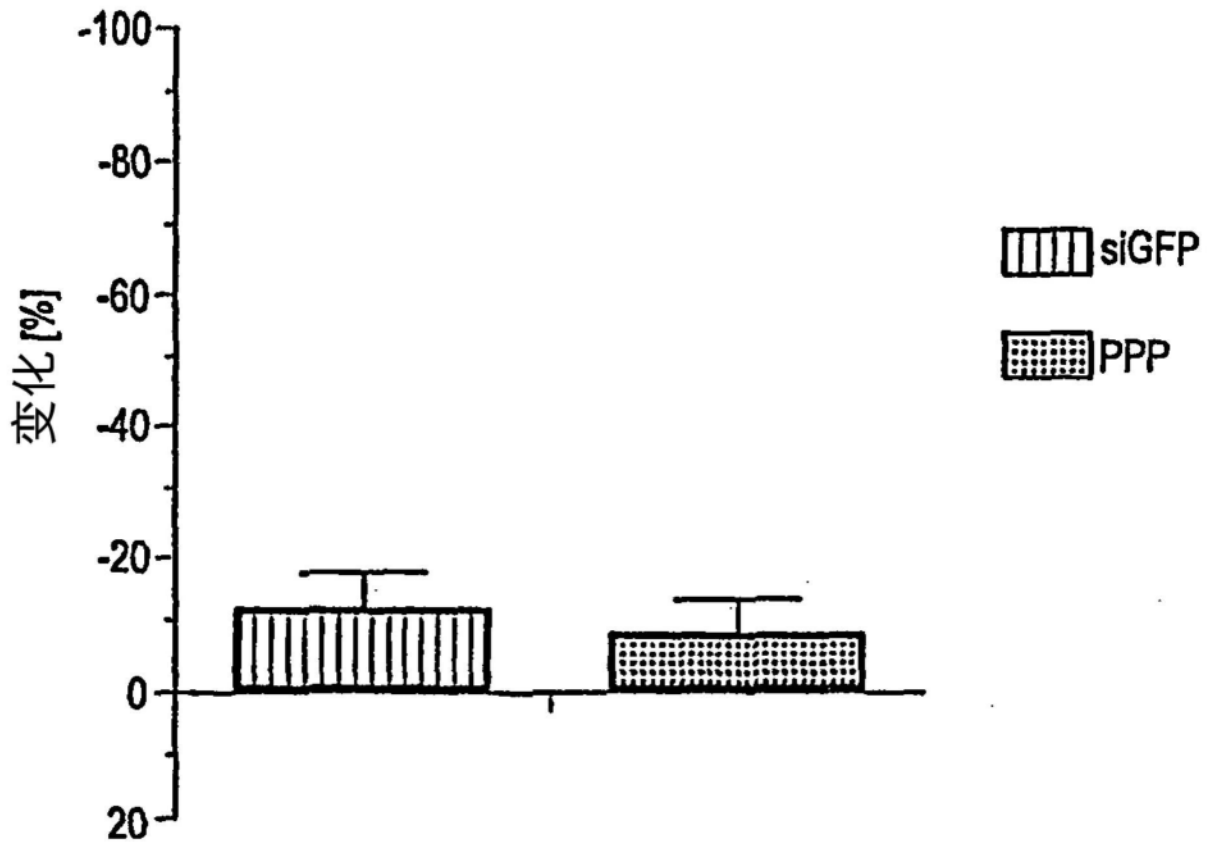


图12

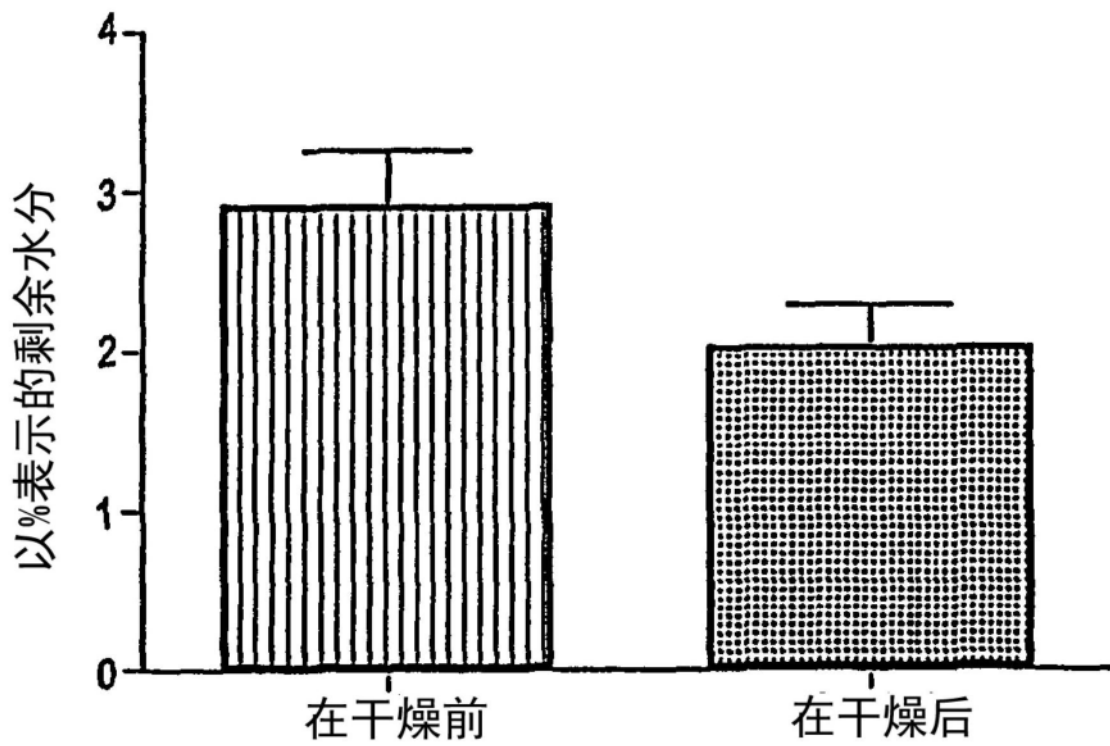


图13

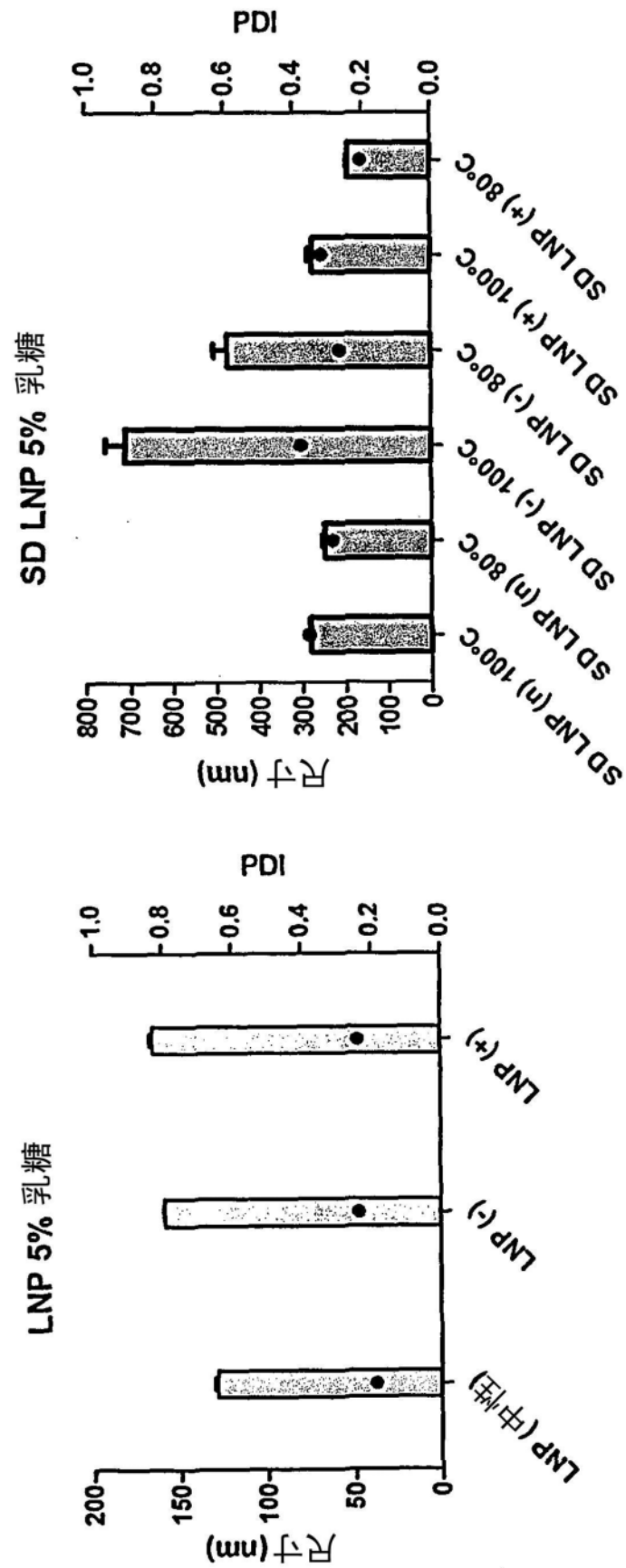


图14

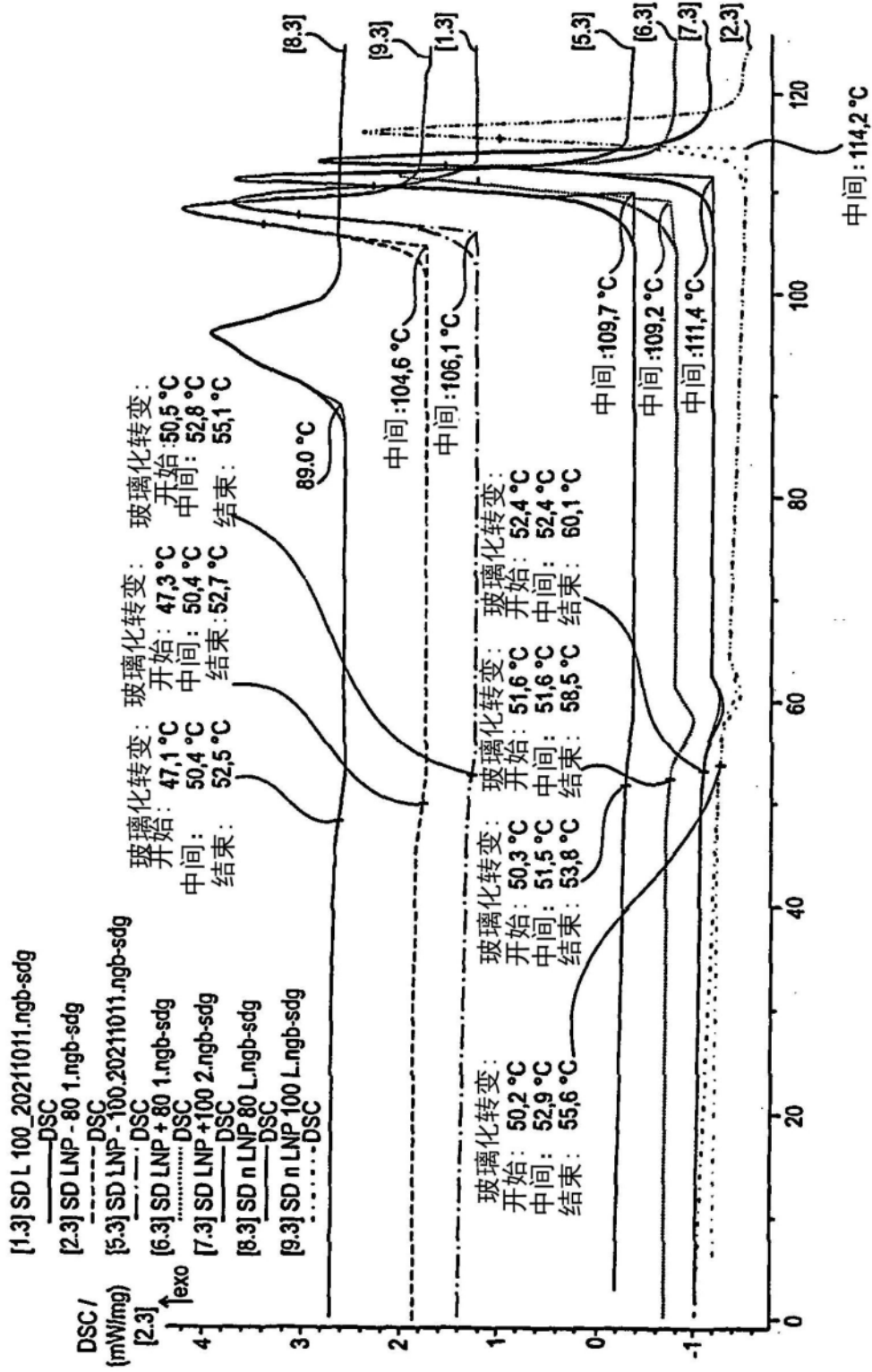


图15

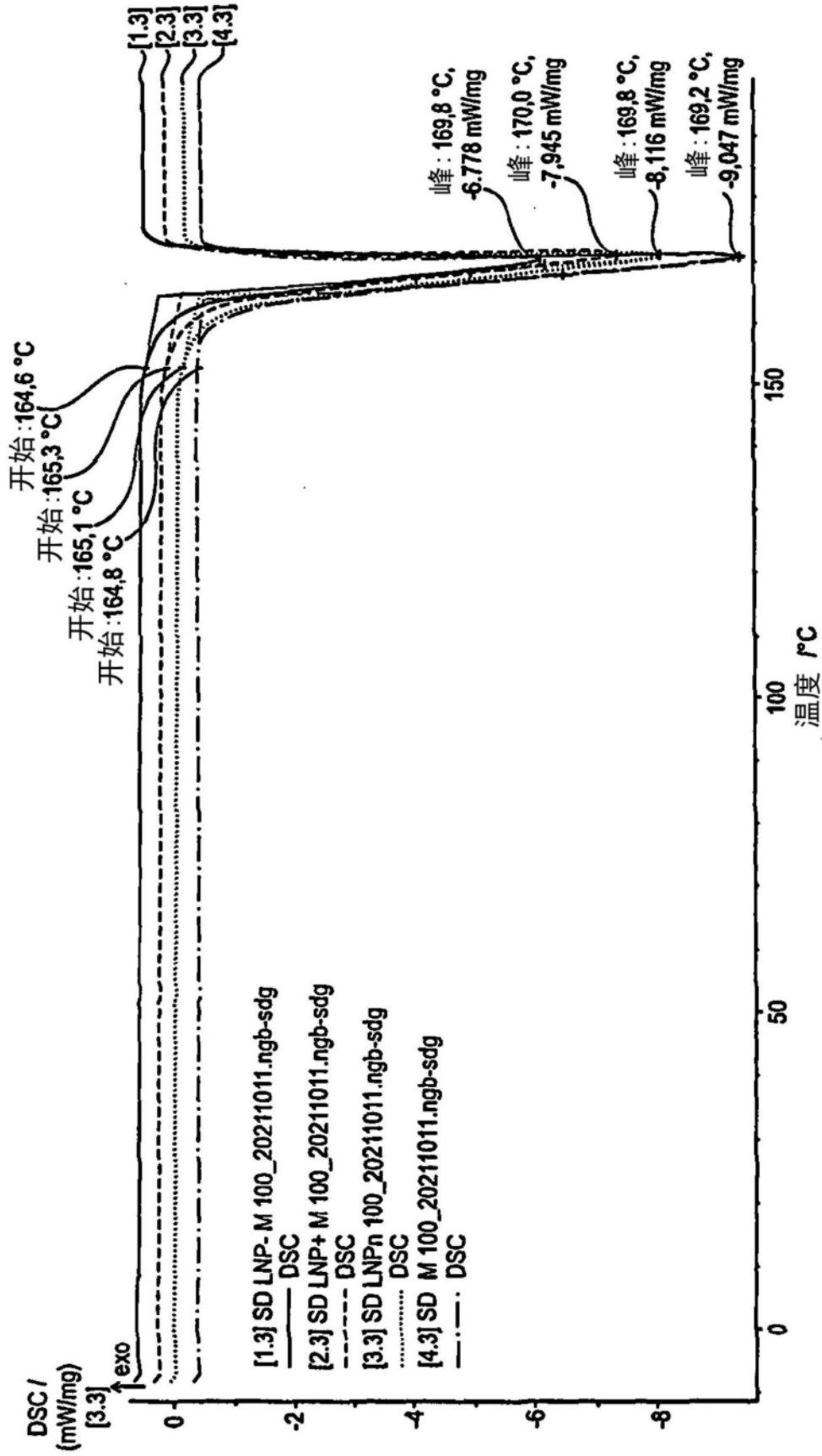


图16

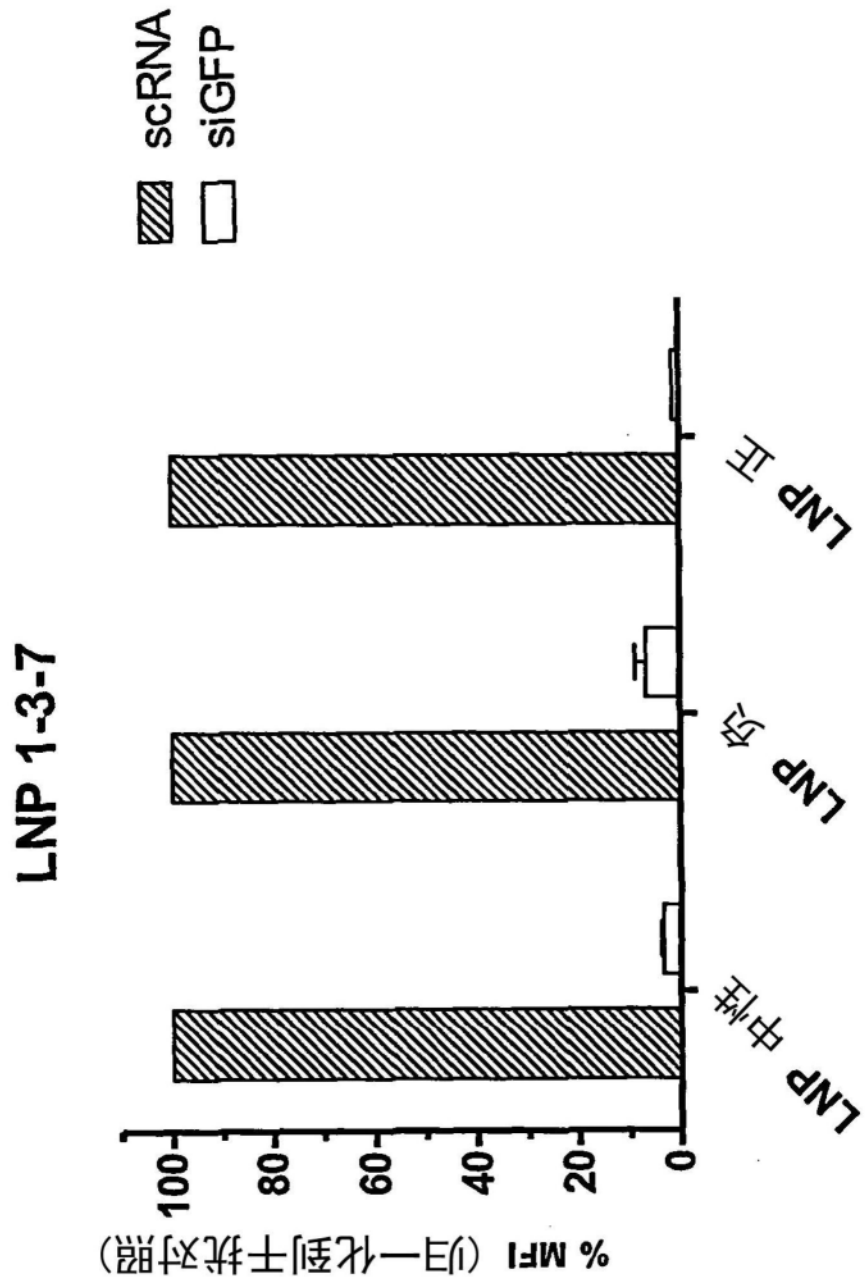


图17

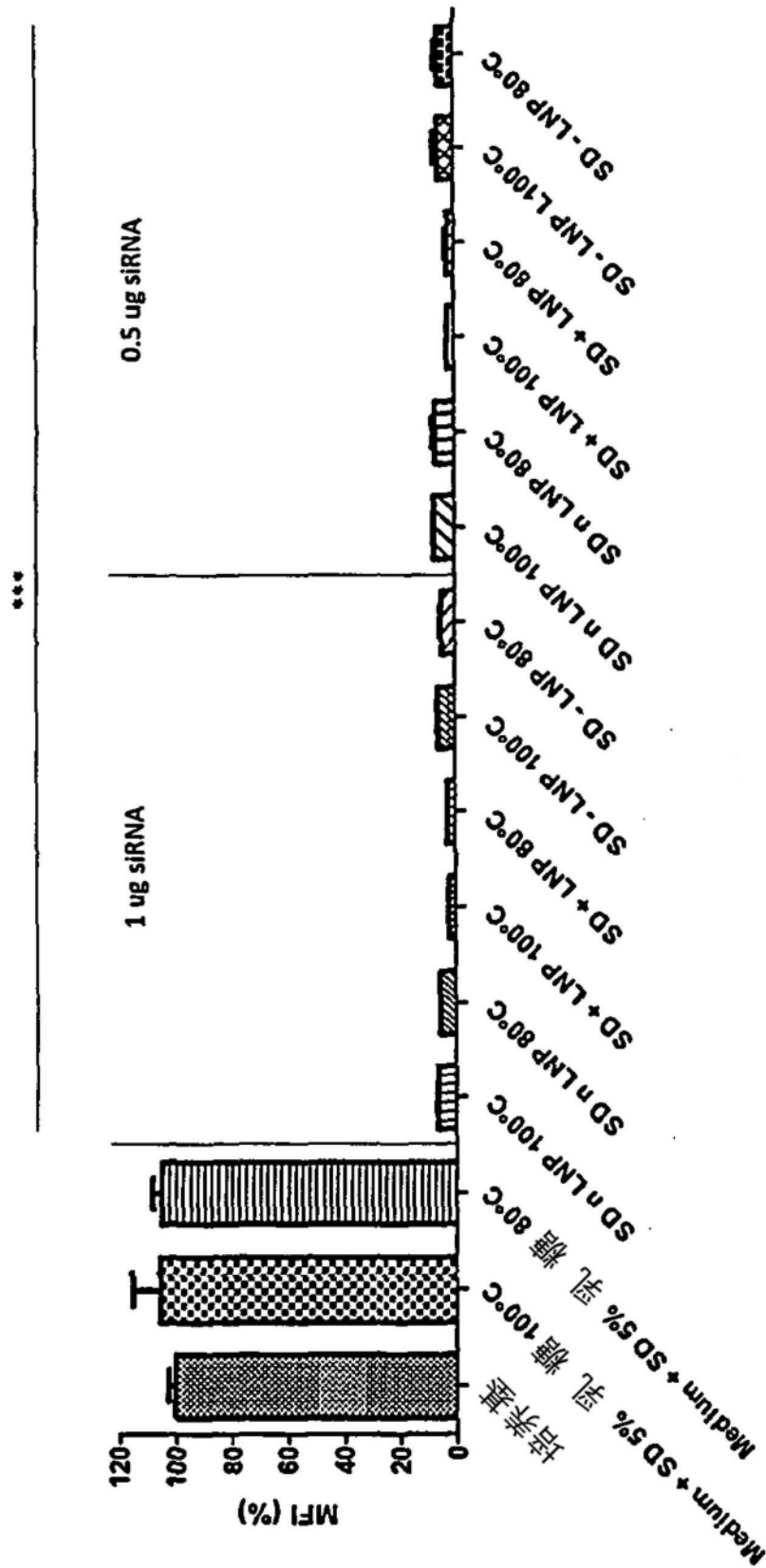


图18

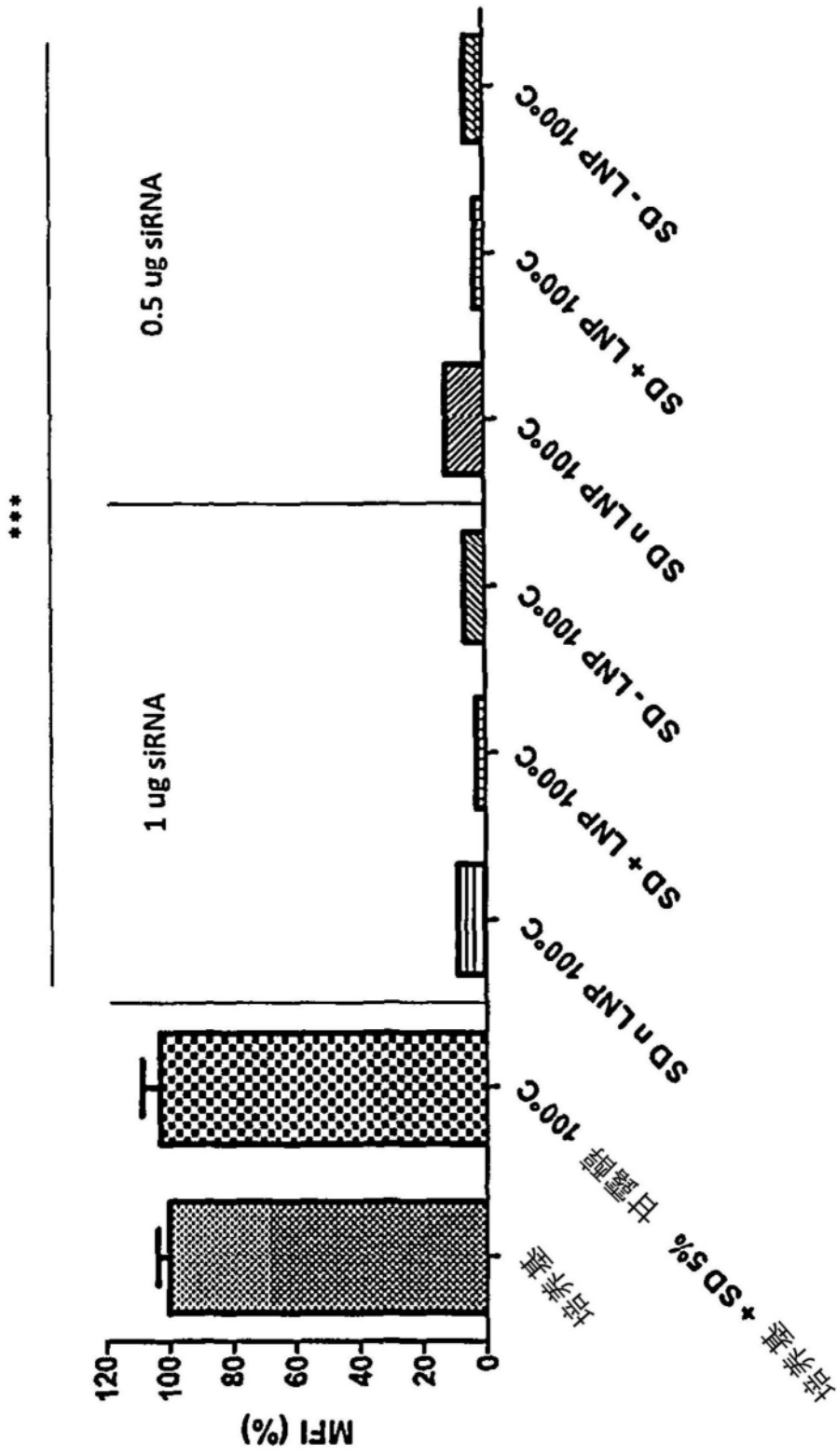


图19