



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113679689 B

(45) 授权公告日 2023. 09. 01

(21) 申请号 202110916430.8

(22) 申请日 2016.07.22

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 113679689 A

(43) 申请公布日 2021.11.23

(30) 优先权数据
62/195,356 2015.07.22 US

(62) 分案原申请数据
201680054543.9 2016.07.22

(73) 专利权人 日东电工株式会社
地址 日本大阪

(72) 发明人 应文斌 R·阿达米 王宇伟
尹海清 王莉萍 刘东

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
72002

专利代理师 安琪 张晓威

(51) Int.Cl.
A61K 9/51 (2006.01)
A61K 47/40 (2006.01)
A61K 47/26 (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 103748078 A, 2014.04.23
US 2011237686 A1, 2011.09.29
US 2013115274 A1, 2013.05.09
CN 102516417 A, 2012.06.27

审查员 李友

权利要求书3页 说明书26页 附图1页

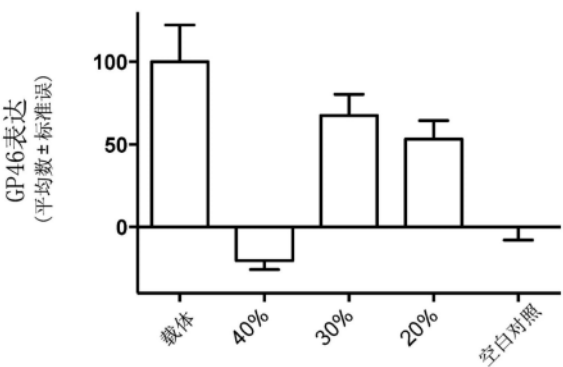
(54) 发明名称

用于纳米粒冷冻干燥物形式的组合物及方法

(57) 摘要

本发明涉及用于纳米粒冷冻干燥物形式的组合物及方法。具体而言,本发明提供一种固体冷冻干燥物,还提供一种用于制备一种或多种核酸活性剂的固体冷冻干燥物的组合物,其可以复原成药品。所述组合物可以包括:脂质纳米粒在药学上可接受的溶液中的含水悬浮液,其中所述脂质纳米粒封装一种或多种核酸活性剂;糊精化合物;和糖类化合物。所述核酸活性剂可为能够介导RNA干扰的RNAi分子以及其它RNA和寡核苷酸。

体内siRNA效力



1. 固体冷冻干燥物,其包含脂质纳米粒,所述脂质纳米粒包含一种或多种核酸活性剂、环糊精化合物和糖化合物,

其中所述环糊精化合物为(2-羟丙基)- β -环糊精;并且

其中所述糖化合物为蔗糖,

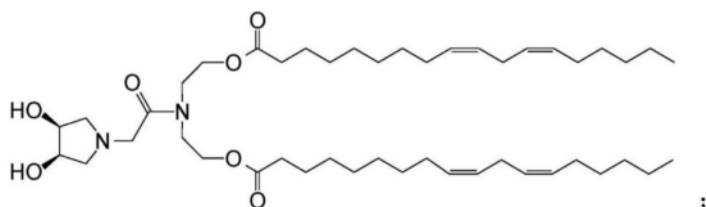
其中所述环糊精化合物和所述糖化合物的总量为所述组合物的10%至15% (w/v), 并且

其中所述环糊精化合物占所述环糊精化合物和所述糖化合物的总量的40%至45% (w/v)。

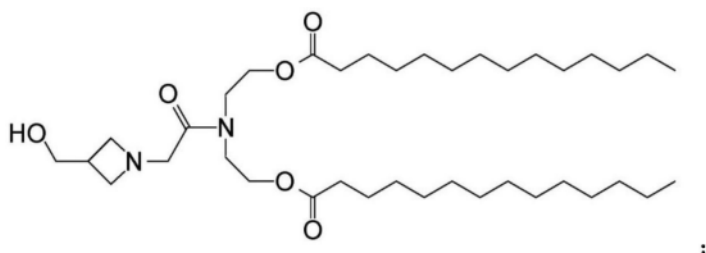
2. 如权利要求1所述的冷冻干燥物,其中所述脂质纳米粒具有45nm至110nm的平均直径。

3. 如权利要求1或2所述的冷冻干燥物,其中所述脂质纳米粒包含选自化合物A6、化合物A9、化合物AA、化合物AB、化合物C2、化合物F5、化合物F7、化合物C24和HEDC的化合物,其中

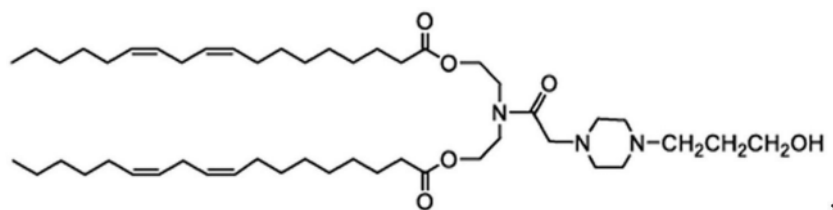
化合物A6为



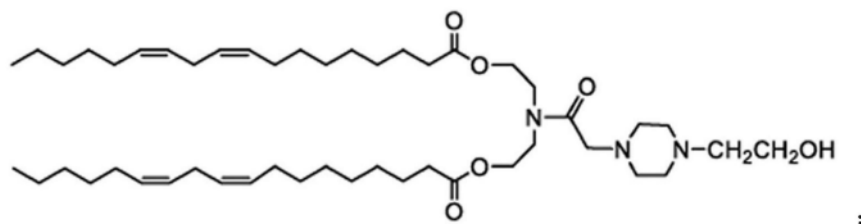
化合物A9为



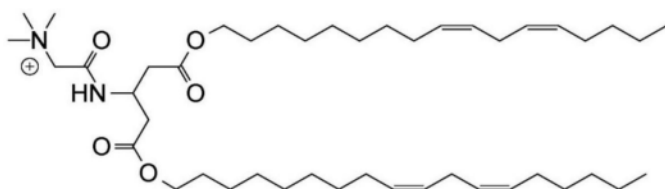
化合物AA为



化合物AB为

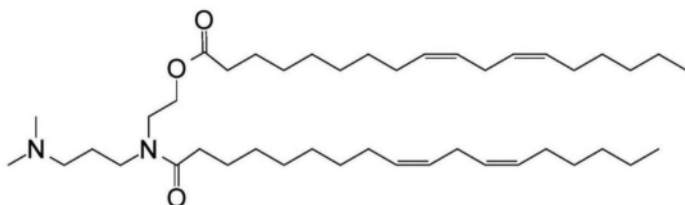


化合物C2为



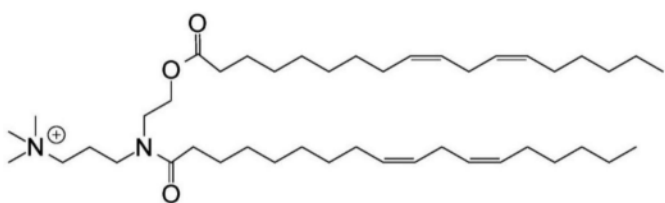
;

化合物F5为



;

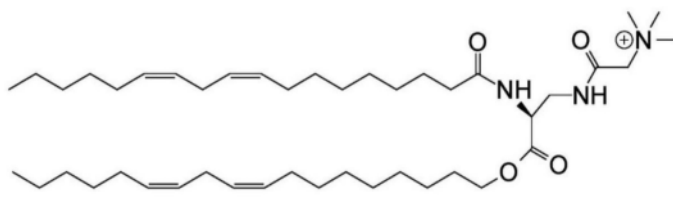
化合物F7为



且

;

化合物C24为



。

4. 如权利要求1-3中任一项所述的冷冻干燥物,其中所述一种或多种核酸活性剂为能够介导RNA干扰的RNAi分子。

5. 如权利要求4所述的冷冻干燥物,其中所述RNAi分子为siRNA、shRNA、ddRNA、piRNA或rasiRNA。

6. 如权利要求1-3中任一项所述的冷冻干燥物,其中所述一种或多种核酸活性剂为miRNA、反义RNA、质粒、杂合寡核苷酸或适配体。

7. 用于制备核酸药品的方法,其包括在药学上可接受的溶液中复原如权利要求1-6中任一项所述的冷冻干燥物。

8. 如权利要求7所述的方法,其中所述药学上可接受的溶液是马来酸、酒石酸、乳酸、乙酸、碳酸氢钠或甘氨酸的缓冲溶液。

9. 如权利要求7或8所述的方法,其进一步包括用赋形剂稀释复原的冷冻干燥物。

10. 如权利要求9所述的方法,其中所述赋形剂是乙酸钾、乙酸钠或碳酸氢钠缓冲剂。

11. 用于制备核酸药品的方法,所述方法包括:

合成脂质纳米粒,其中所述脂质纳米粒封装一种或多种核酸活性剂;

提供所述脂质纳米粒在药学上可接受的溶液中的含水悬浮液;

向所述含有所述脂质纳米粒的溶液加入环糊精化合物;

- 向所述含有所述脂质纳米粒的溶液加入糖化合物；
冷冻干燥所述含有所述脂质纳米粒的溶液，从而形成固体冷冻干燥物；以及
在药学上可接受的载体中复原所述冷冻干燥物，从而形成核酸药品，
其中所述环糊精化合物为(2-羟丙基)- β -环糊精；并且
其中所述糖化合物为蔗糖，
其中所述环糊精化合物和所述糖化合物的总量为所述含有所述脂质纳米粒的溶液的10%至15% (w/v)，并且
其中所述环糊精化合物占所述环糊精化合物和所述糖化合物的总量的40%至45% (w/v)。
12. 如权利要求11所述的方法，其中所述脂质纳米粒具有45nm至110nm的平均直径。
13. 如权利要求11或12所述的方法，其中所述核酸活性剂的浓度为1mg/mL至10mg/mL。
14. 如权利要求11-13中任一项所述的方法，其中所述一种或多种核酸活性剂为能够介导RNA干扰的RNAi分子。
15. 如权利要求11-14中任一项所述的方法，其中所述药学上可接受的载体是药学上可接受的溶液。
16. 如权利要求15所述的方法，其中所述药学上可接受的溶液是马来酸、酒石酸、乳酸、乙酸、碳酸氢钠或甘氨酸的缓冲溶液。
17. 如权利要求11-16中任一项所述的方法，其进一步包括用赋形剂稀释复原的冷冻干燥物。
18. 如权利要求17所述的方法，其中所述赋形剂是乙酸钾、乙酸钠或碳酸氢钠缓冲剂。

用于纳米粒冷冻干燥物形式的组合物及方法

[0001] 本申请是2016年7月22日提交的发明名称为“用于纳米粒冷冻干燥物形式的组合物及方法”的中国专利申请201680054543.9的分案申请。

[0002] 相关申请

[0003] 本申请要求于2015年7月22日提交的标题为用于纳米粒冷冻干燥物形式的组合物及方法的美国临时专利申请62/195,356的优先权,将其内容整体援引加入本文。

技术领域

[0004] 本发明涉及由基于核酸的分子组成的生物药物及治疗剂的领域。更特别地,本发明涉及用于核酸治疗组合物的冷冻干燥物形式(lyophile forms)的方法及组合物。

[0005] 发明背景

[0006] 基于核酸化合物的治疗剂包括各种RNA形式,如siRNA、反义RNA或微RNA,以及各种形式的DNA及质粒、杂合寡核苷酸及适配体等。

[0007] 核酸治疗剂及其它剂的转染是通过将活性分子封装于脂质纳米粒中而完成的。由于纳米粒或其封装的内容物的降解,此方法的缺点包括不能储存组合物以供后续使用。例如,封装siRNA分子的脂质纳米粒组合物在25℃下可能仅能保持稳定几分钟或几小时,且在4℃下可能仅能保持稳定几天或几周。进一步的缺点包括需要在非常低的温度下储存该脂质纳米粒组合物。

[0008] 一种提供治疗组合物长期储存的方法为制备成冷冻干燥物形式,其可被储存并被复原以提供用于给药治疗剂的制剂。

[0009] 然而,通常不可能产生含有核酸剂的脂质纳米粒的冷冻干燥物形式,使得该脂质纳米粒可以与封装的核酸剂再生以形成稳定的制剂。冷冻干燥过程可破坏该纳米粒和/或核酸剂。一些方法涉及将保护基团或组分化学连接于脂质纳米粒或核酸剂,这是不利的。其它方法可能使用脂质体作为辅剂,不提供核酸剂的封装。

[0010] 持续需要提供能够复原具有良好性质的纳米粒的冷冻干燥物形式的组合物及方法,这些性质包括转染活性、颗粒尺寸、储存时间和递送各种核酸剂的血清稳定性。

[0011] 需要用于形成能以固体冷冻干燥物形式储存的脂质纳米粒的稳定溶液或悬浮液的组合物和化合物,其中该纳米粒封装核酸剂。

[0012] 发明概述

[0013] 本发明提供用于由基于核酸的分子组成的治疗剂的方法及组合物。更特别地,本发明提供用于基于核酸的治疗组合物的冷冻干燥物形式的方法及组合物。

[0014] 本发明还提供可复原成有效的治疗组合物的纳米粒的冷冻干燥物形式,其可用于递送用于转染的治疗核酸剂。

[0015] 在一些方面,本发明提供用于形成在冷冻干燥过程中稳定的治疗脂质纳米粒的溶液或悬浮液的组合物及化合物。该治疗脂质纳米粒可封装核酸剂,且能以固体冷冻干燥物形式转换和储存。该冷冻干燥物形式可被复原以提供具有封装的核酸剂的治疗脂质纳米粒。该复原的脂质纳米粒具有惊人有利的转染性质,包括颗粒尺寸和分布。

[0016] 本发明的实施方案包括一系列用于形成治疗脂质纳米粒的溶液或悬浮液的组合物及化合物,该治疗脂质纳米粒可经冷冻干燥过程以提供稳定的固体冷冻干燥物形式而用于长期储存核酸治疗剂。

[0017] 本发明的实施方案包括以下:

[0018] 用于制备包含一种或多种核酸活性剂的脂质纳米粒的固体冷冻干燥物的组合物,所述组合物包含:

[0019] 所述脂质纳米粒在药学上可接受的溶液中的含水悬浮液,其中所述脂质纳米粒封装所述一种或多种核酸活性剂;

[0020] 糊精化合物;和

[0021] 糖类糖(saccharide sugar)化合物。

[0022] 如上所述的组合物,其中所述糊精化合物和糖化合物的总量为所述组合物的2%至20% (w/v)。

[0023] 如上所述的组合物,其中所述糊精化合物为所述糊精化合物和糖化合物的总量的40%至70% (w/v)。

[0024] 如上所述的组合物,其中所述糊精化合物为所述糊精化合物和糖化合物的总量的40%至55% (w/v)。

[0025] 如上所述的组合物,其中所述糊精化合物为所述糊精化合物和糖化合物的总量的40%至45% (w/v)。

[0026] 如上所述的组合物,其中所述组合物经冷冻干燥和复原,所述纳米粒的平均尺寸变化在其于初始组合物中的尺寸的10%以内。

[0027] 如上所述的组合物,其中所述组合物经冷冻干燥、储存和复原,所述纳米粒的平均尺寸变化在其于初始组合物中的尺寸的10%以内。

[0028] 如上所述的组合物,其中所述冷冻干燥的组合物在5℃下储存至少一个月。

[0029] 如上所述的组合物,其中所述冷冻干燥的组合物在-20℃下储存至少一个月。

[0030] 如上所述的组合物,其中所述纳米粒具有45nm至110nm的平均直径。

[0031] 如上所述的组合物,其中所述核酸活性剂的浓度为1mg/mL至10mg/mL,或为3mg/mL至5mg/mL。

[0032] 如上所述的组合物,其中所述一种或多种核酸活性剂为能够介导RNA干扰的RNAi分子。如上所述的组合物,其中所述RNAi分子为siRNA、shRNA、ddRNA、piRNA或rasiRNA。

[0033] 如上所述的组合物,其中所述一种或多种核酸活性剂为miRNA、反义RNA、质粒、杂合寡核苷酸或适配体。

[0034] 如上所述的组合物,其中所述药学上可接受的溶液为HEPES缓冲液、磷酸盐缓冲液、柠檬酸盐缓冲液或含有三(羟甲基)氨基甲烷的缓冲液。

[0035] 如上所述的组合物,其中所述糊精化合物为环糊精。

[0036] 如上所述的组合物,其中所述环糊精化合物的2、3和6羟基位置中的一个或多个被以下基团取代:磺烷基、苯磺烷基、乙酰烷基、羟烷基、琥珀酸羟烷基酯基、丙二酸羟烷基酯基、戊二酸羟烷基酯基、己二酸羟烷基酯基、羟烷基、马来酸羟烷基酯基、草酸羟烷基酯基、富马酸羟烷基酯基、柠檬酸羟烷基酯基、酒石酸羟烷基酯基、苹果酸羟烷基酯基或柠康酸羟烷基酯基。

[0037] 如上所述的组合物,其中所述环糊精化合物为(2-羟丙基)-β-环糊精、2-羟丙基-

β -环糊精琥珀酸酯、(2-羟丙基)- γ -环糊精或2-羟丙基- γ -环糊精琥珀酸酯。

[0038] 如上所述的组合物,其中所述环糊精化合物为磺丁基醚 β -环糊精或磺丁基醚 γ -环糊精。

[0039] 如上所述的组合物,其中所述环糊精化合物为甲基- β -环糊精或甲基- γ -环糊精。

[0040] 如上所述的组合物,其中所述环糊精化合物连接至聚合物链或网状结构。

[0041] 如上所述的组合物,其中所述环糊精化合物包括被吸附化合物。

[0042] 如上所述的组合物,其中所述被吸附化合物选自:胆固醇、羊毛甾醇、酵母固醇、二氢酵母固醇(zymostenol)、链甾醇、豆甾烷醇、二氢羊毛甾醇、7-脱氢胆固醇、聚乙二醇化胆固醇、胆固醇乙酸酯、胆固醇花生四烯酸酯、胆固醇丁酸酯、胆固醇己酸酯、胆固醇肉豆蔻酸酯、胆固醇棕榈酸酯、胆固醇山萘酸酯、胆固醇硬脂酸酯、胆固醇辛酸酯、胆固醇正癸酸酯、胆固醇十二烷酸酯、胆固醇神经酸酯、胆固醇壬酸酯、胆固醇正戊酸酯、胆固醇油酸酯、胆固醇反油酸酯、胆固醇芥酸酯、胆固醇庚酸酯、胆固醇反亚油酸酯、胆固醇亚油酸酯、 β -谷甾醇、菜油甾醇、麦角固醇、菜籽固醇、 δ -7-豆固醇和 δ -7-燕麦甾醇。

[0043] 如上所述的组合物,其中所述糖类糖化合物为单糖或二糖糖化合物。

[0044] 如上所述的组合物,其中所述糖化合物选自:蔗糖、乳糖、乳果糖、麦芽糖、海藻糖、纤维二糖、曲二糖、糖化曲二糖、异麦芽糖、槐糖、昆布二糖、龙胆二糖、松二糖、麦芽酮糖、异麦芽酮糖、龙胆二酮糖、甘露二糖、蜜二糖、车前二糖和木二糖。

[0045] 用于制备一种或多种核酸活性剂的固体冷冻干燥物的方法,所述方法包括将如上所述的组合物进行冷冻干燥。本发明还涵盖通过上述方法制备的固体冷冻干燥物,以及通过复原上述固体冷冻干燥物而制备的药品。

[0046] 本发明还包括用于制备核酸药品的方法,所述方法包括:

[0047] 合成脂质纳米粒,其中所述脂质纳米粒封装一种或多种核酸活性剂;

[0048] 提供所述脂质纳米粒在药学上可接受的溶液中的含水悬浮液;

[0049] 向所述含有所述脂质纳米粒的溶液加入糊精化合物;

[0050] 向所述含有所述脂质纳米粒的溶液加入糖类糖化合物;

[0051] 冷冻干燥所述含有所述脂质纳米粒的溶液,从而形成固体冷冻干燥物;

[0052] 在药学上可接受的载体中复原所述冷冻干燥物,从而形成核酸药品。

[0053] 如上所述的方法,其中所述糊精化合物和糖类糖化合物的总量为所述含有所述脂质纳米粒的溶液的2%至20% (w/v)。

[0054] 如上所述的方法,其中所述糊精化合物为所述糊精化合物和糖类糖化合物的总量的40%至70% (w/v)。

[0055] 如上所述的方法,其中所述糊精化合物为所述糊精化合物和糖类糖化合物的总量的40%至55% (w/v)。

[0056] 如上所述的方法,其中所述糊精化合物为所述糊精化合物和糖类糖化合物的总量的40%至45% (w/v)。

[0057] 如上所述的方法,其中经复原,所述纳米粒的平均尺寸变化在其于合成时的尺寸的10%以内。

[0058] 如上所述的方法,其还包括在复原之前储存所述冷冻干燥物。

[0059] 如上所述的方法,其中所述冷冻干燥物经储存和复原,所述纳米粒的平均尺寸变

化在其于合成时的尺寸的10%以内。

[0060] 如上所述的方法,其中所述冷冻干燥物在5℃下储存至少一个月。

[0061] 如上所述的方法,其中所述冷冻干燥物在-20℃下储存至少一个月。

[0062] 如上所述的方法,其中所述纳米粒具有45nm至110nm的平均直径。

[0063] 如上所述的方法,其中所述核酸活性剂的浓度为1mg/mL至10mg/mL。

[0064] 如上所述的方法,其中所述一种或多种核酸活性剂为能够介导RNA干扰的RNAi分子。如上所述的方法,其中所述RNAi分子为siRNA、shRNA、ddRNA、piRNA或rasiRNA。

[0065] 如上所述的方法,其中所述一种或多种核酸活性试剂为miRNA、反义RNA、质粒、杂合寡核苷酸或适配体。

[0066] 如上所述的方法,其中所述药学上可接受的载体为灭菌水、注射用水、灭菌生理盐水、注射用抑菌水或雾化溶液。

[0067] 如上所述的方法,其中所述药学上可接受的载体为药学上可接受的溶液。

[0068] 如上所述的方法,其中所述药学上可接受的溶液为HEPES缓冲液、磷酸盐缓冲液、柠檬酸盐缓冲液或含有三(羟甲基)氨基甲烷的缓冲液。

[0069] 如上所述的方法,其中所述糊精化合物为环糊精。

[0070] 如上所述的方法,其中所述环糊精化合物的2、3和6羟基位置中的一个或多个被以下基团取代:磺烷基、苯磺烷基、乙酰烷基、羟烷基、琥珀酸羟烷基酯基、丙二酸羟烷基酯基、戊二酸羟烷基酯基、己二酸羟烷基酯基、羟烷基、马来酸羟烷基酯基、草酸羟烷基酯基、富马酸羟烷基酯基、柠檬酸羟烷基酯基、酒石酸羟烷基酯基、苹果酸羟烷基酯基或柠康酸羟烷基酯基。

[0071] 如上所述的方法,其中所述环糊精化合物为(2-羟丙基)-β-环糊精、2-羟丙基-β-环糊精琥珀酸酯、(2-羟丙基)-γ-环糊精或2-羟丙基-γ-环糊精琥珀酸酯。

[0072] 如上所述的方法,其中所述环糊精化合物为磺丁基醚β-环糊精或磺丁基醚γ-环糊精。

[0073] 如上所述的方法,其中所述环糊精化合物为甲基-β-环糊精或甲基-γ-环糊精。

[0074] 如上所述的方法,其中所述环糊精化合物包括被吸附化合物。

[0075] 如上所述的方法,其中所述糖类糖化合物为单糖或二糖糖化合物。

[0076] 如上所述的方法,其中所述药学上可接受的载体为灭菌水、注射用水、灭菌生理盐水、注射用抑菌水或雾化溶液。

[0077] 如上所述的方法,其中所述药学上可接受的载体为药学上可接受的溶液。

[0078] 如上所述的方法,其中所述复原的核酸药品具有少于0.001% (w/v) 的尺寸大于0.2μm的聚集颗粒。

[0079] 如上所述的方法,其中所述核酸药品在3秒至30秒的时间内复原。

[0080] 如上所述的方法,其中所述核酸药品在经过6个月的储存期间之后复原,且保留所述核酸剂80%的活性。

[0081] 如上所述的方法,其中所述复原的核酸药品具有少于0.001% (w/v) 的尺寸大于0.2μm的聚集颗粒。

[0082] 如上所述的方法,其中所述复原的核酸药品具有降低的细胞因子激活作用。

[0083] 如上所述的方法,其中所述核酸药品在3秒至30秒的时间内复原。

[0084] 如上所述的方法,其中所述核酸药品在经过6个月的储存期间之后复原,且保留所

述核酸剂80%的活性。

[0085] 附图简述

[0086] 图1:图1示出核酸剂(靶向抑制Hsp47 (GP46)的siRNA)的体内效力实验结果,其使用最终药品(siRNA的固体冷冻干燥纳米粒制剂的复原溶液)而获得。复原的siRNA药物制剂用于二甲基亚硝胺(DMN)诱导的肝纤维化大鼠模型中。如图1所示,复原的siRNA纳米粒药物制剂在体内对Hsp47 (GP46)的基因沉默表现出深刻且令人惊讶的效力。体内效力是对含有核酸剂的冷冻干燥并复原的纳米粒的存活力的严格测试。冷冻干燥的siRNA纳米粒制剂包含10% (w/v)的总保护剂含量,其由40% (w/v)的(2-羟丙基)- β -环糊精和60%的蔗糖组成。

[0087] 图2:图2示出冷冻干燥并复原的siRNA纳米粒制剂在体内的血浆浓度药代动力学实验结果。靶向Hsp47 (GP46)的siRNA在脂质体纳米粒中配制。将纳米粒制剂与含有蔗糖和(2-羟丙基)- β -环糊精的保护剂组合物一起进行冷冻干燥。冷冻干燥的siRNA纳米粒制剂包含12.5% (w/v)含量的总保护剂,总保护剂由40% (w/v)的(2-羟丙基)- β -环糊精和60%的蔗糖组成。与冷冻制剂相比较,单次剂量水平静脉给药Sprague Dawley大鼠冷冻干燥制剂后,评估血浆PK曲线。通过基于杂交的ELISA方法测定血浆样品中的siRNA浓度。如图2中所示,冷冻干燥并复原的siRNA药物制剂的血浆浓度药代动力学与仅经过冷冻的比较对照制剂基本相同。

具体实施方案

[0088] 本发明提供用于由基于核酸的分子组成的治疗剂的方法及组合物。在一些实施方案中,本发明提供用于制备含有核酸剂的治疗组合物的冷冻干燥物形式的方法及组合物。

[0089] 在一些方面,本发明提供可复原成有效的治疗组合物的纳米粒的冷冻干燥物形式。所述纳米粒可封装核酸剂作为内容物。本发明的冷冻干燥物形式可用于重组及递送封装治疗性核酸剂的纳米粒制剂以用于转染。

[0090] 在进一步的方面,本发明提供用于形成在冷冻干燥过程中稳定的治疗脂质纳米粒的溶液或悬浮液的化合物及方法。本发明的冷冻干燥过程可提供治疗性脂质纳米粒的稳定的冷冻干燥物形式,其中所述纳米粒可封装核酸剂。该冷冻干燥物形式可储存一段时间,且可复原以提供具有封装的核酸剂的治疗性脂质纳米粒。

[0091] 在一些实施方案中,本发明包括一系列用于脂质纳米粒的溶液或悬浮液的组合物及化合物,该脂质纳米粒可经受冷冻干燥过程以提供稳定的固体冷冻干燥物形式而用于长期储存核酸治疗剂。本发明的组合物及方法可提供能复原并提供有利的活性、颗粒尺寸、储存时间及血清稳定性的冷冻干燥物形式。

[0092] 在进一步的方面,本发明涉及用于提供纳米粒以递送并分配活性剂或药物化合物至个体、组织和器官的化合物、组合物及方法。

[0093] 本发明提供一系列用于递送活性剂至细胞的脂质化合物及可离子化的化合物。本发明的脂质化合物及可离子化的化合物可用于形成纳米粒以递送及分配活性剂。

[0094] 本发明涵盖含有例如siRNA剂的脂质纳米粒药物制剂,其可通过将纳米粒的悬浮液冷冻干燥进行制备,且该纳米粒可复原成悬浮液。

[0095] 在一些实施方案中,可通过将脂质/乙醇溶液高速注入siRNA缓冲溶液中合成脂质纳米粒。可将第二缓冲液渗滤并用作外部缓冲液通过TFF盒(cartridge)以制备最终产物含

水悬浮液。

[0096] 在一些实施方案中,纳米粒可具有45nm至110nm的平均直径。核酸活性试剂的浓度可为1mg/mL至10mg/mL。

[0097] 令人惊讶地发现,当将悬浮液制成受保护的组合物时,脂质纳米粒可以在悬浮液的冷冻干燥情况下存活。

[0098] 在一些实施方案中,本发明的受保护的组合物可由脂质纳米粒在药学上可接受的溶液中的含水悬浮液、糊精化合物及糖类糖化合物组成。该脂质纳米粒可封装活性剂,如一种或多种核酸活性剂。

[0099] 受保护的悬浮液的冷冻干燥可提供固体冷冻干燥产物,其可复原成脂质纳米粒的悬浮液。

[0100] 复原的悬浮液可含有脂质纳米粒,其封装活性剂,且与冷冻干燥前的脂质纳米粒相当。

[0101] 在某些实施方案中,复原的悬浮液可提供封装的剂的活性,其与冷冻干燥前的悬浮液的封装的剂的活性相当。

[0102] 在进一步的方面,复原的悬浮液可提供与冷冻干燥前的悬浮液的纳米粒相当的稳定的纳米粒。在某些方面,纳米粒的平均颗粒尺寸可与冷冻干燥前的悬浮液中纳米粒的尺寸几乎相等。

[0103] 本发明的组合物及方法可提供由具有封装的剂的纳米粒组成的复原悬浮液令人惊讶的活性和稳定性。

[0104] 在进一步的方面,能被冷冻干燥并复原的受保护的悬浮液可含有用于冷冻干燥的保护剂组合物。本发明的保护剂组合物可由糊精化合物及糖类糖化合物组成。糊精化合物和糖化合物的总量可为受保护的悬浮液的2%至20% (w/v)。

[0105] 在一些实施方案中,糊精化合物可为保护剂组合物中的糊精化合物和糖化合物的总量的40%至70% (w/v)。在某些实施方案中,糊精化合物可为保护剂组合物中的糊精化合物和糖化合物的总量的40%至55% (w/v)。在进一步的实施方案中,糊精化合物可为保护剂组合物中的糊精化合物和糖化合物的总量的40%至45% (w/v)。这些组合物可提供复原的纳米粒悬浮液的出乎预料的有利性质,例如,纳米粒尺寸或活性不明显改变。

[0106] 在一些方面,受保护的纳米粒悬浮液经冷冻干燥及复原,该纳米粒的平均尺寸变化可以在其于冷冻干燥前的初始组合物中的尺寸的10%以内。在某些方面,受保护的纳米粒悬浮液经冷冻干燥及复原,该纳米粒的平均尺寸变化可以在其于冷冻干燥前的初始组合物中的尺寸的5%以内。

[0107] 本发明涵盖含有例如siRNA剂的脂质纳米粒药物制剂,其可通过将纳米粒的悬浮液冷冻干燥进行制备,且在储存一段时间后该纳米粒可复原成悬浮液。复原的悬浮液可提供封装的剂活性,其与冷冻干燥前的悬浮液的封装的剂的活性相当。

[0108] 在储存一段时间后而制备的复原的悬浮液可含有脂质纳米粒,其封装活性剂,且与冷冻干燥前的脂质纳米粒相当。

[0109] 在某些实施方案中,在储存一段时间后而制备的复原的悬浮液可提供封装的剂活性,其与冷冻干燥前的悬浮液的封装的剂的活性相当。

[0110] 在进一步的方面,在储存一段时间后制备的复原的悬浮液可提供与冷冻干燥前的

悬浮液的纳米粒相当的稳定的纳米粒。在某些方面,纳米粒的平均颗粒尺寸可与冷冻干燥前的悬浮液中纳米粒的尺寸几乎相等。

[0111] 在一些实施方案中,冷冻干燥的组合物可在5℃下储存至少一个月。在进一步的实施方案中,该冷冻干燥的组合物可在-20℃下储存至少一个月。

[0112] 活性剂

[0113] 本发明的组合物及方法可用于分配用于抑制基因表达的剂。用于抑制基因表达的剂的实例包括抑制性核酸分子,包括核酶、反义核酸及RNA干扰分子(RNAi分子)。

[0114] 本发明的治疗组合物可包括抑制性核酸分子。能够介导RNA干扰的核酸分子的实例包括RNA干扰中有活性的分子(RNAi分子),包括双链RNA,如siRNA(小干扰RNA)、miRNA(微RNA)、shRNA(短发夹RNA)、ddRNA(DNA指导的RNA)、piRNA(Piwi相互作用RNA)或rasiRNA(重复相关siRNA)及其修饰形式。

[0115] 本发明的活性治疗剂的实例包括DNA、质粒、杂合寡核苷酸或适配体。

[0116] 本发明的冷冻干燥前制剂中的活性核酸分子的浓度可为约1mg/mL至约10mg/mL。在一些实施方案中,本发明的制剂中的活性核酸分子的浓度可为约1mg/mL至约5mg/mL,或为2mg/mL至4mg/mL。

[0117] 冷冻干燥前脂质纳米粒制剂

[0118] 本发明的实施方案可提供脂质纳米粒的组合物,其含有用于冷冻干燥过程的保护剂化合物。

[0119] 脂质纳米粒可具有本领域中已知的任何组成。该脂质纳米粒可通过包括本领域中已知的方法在内的任何方法来合成并装载封装的内容物。

[0120] 在一些实施方案中,可通过浸没注射方法来制备脂质纳米粒。在US 2013/0115274中给出了用于脂质纳米粒的方法的一些实例。

[0121] 一些制备脂质体的实例在如下文章中给出:Szoka, Ann.Rev.Biophys.Bioeng.9: 467(1980); Liposomes, Marc J. Ostro, ed., Marcel Dekker, Inc., 纽约, 1983, 第一章。

[0122] 通常,可通过将在有机溶剂中的脂质组分与含有活性核酸剂的含水缓冲溶液进行混合来合成脂质纳米粒。脂质体可以通过过滤或挤出来确定尺寸。脂质体悬浮液或溶液可以通过渗滤进一步转化。

[0123] 对冷冻干燥过程稳定的本发明的脂质纳米粒组合物可以在悬浮液中含有包封一种或多种活性剂(如核酸剂)的脂质纳米粒。该悬浮液可为含水的,并可含有水混溶性的溶剂,如乙醇。对冷冻干燥过程稳定的组合物还可含有保护剂化合物以使脂质体在冷冻干燥过程中稳定。

[0124] 合成的脂质纳米粒的平均尺寸可为40nm至120nm,或45nm至110nm,或85nm至105nm。

[0125] 本发明的脂质纳米粒组合物中的活性剂的浓度可为约0.1mg/mL至约10mg/mL。在一些实施方案中,本发明的脂质纳米粒组合物中的活性剂的浓度可为0.5mg/mL至8mg/mL,或1mg/mL至6mg/mL,或2mg/mL至5mg/mL,或3mg/mL至4mg/mL。

[0126] 保护剂化合物的实例包括糊精化合物。

[0127] 糊精化合物的实例包括麦芽糖糊精、β-环糊精和γ-环糊精。

[0128] 糊精化合物的实例包括甲基化β-环糊精化合物和甲基化γ-环糊精化合物,以及

磺烷基醚 β -环糊精化合物和磺烷基醚 γ -环糊精化合物。

[0129] 糊精化合物的实例包括2、3和6羟基位置中的一个或多个被以下基团所取代的环糊精化合物：磺烷基、苯磺烷基、乙酰烷基、羟烷基、琥珀酸羟烷基酯基、丙二酸羟烷基酯基、戊二酸羟烷基酯基、己二酸羟烷基酯基、羟烷基、马来酸羟烷基酯基、草酸羟烷基酯基、富马酸羟烷基酯基、柠檬酸羟烷基酯基、酒石酸羟烷基酯基、苹果酸羟烷基酯基或柠康酸羟烷基酯基。

[0130] 糊精化合物的实例包括(2-羟丙基)- β -环糊精、2-羟丙基- β -环糊精琥珀酸酯、(2-羟丙基)- γ -环糊精和2-羟丙基- γ -环糊精琥珀酸酯。

[0131] 糊精化合物的实例包括羟乙基 β -环糊精。

[0132] 糊精化合物的实例包括二甲基 β -环糊精和三甲基 β -环糊精。

[0133] 糊精化合物的实例包括磺丁基醚 β -环糊精和磺丁基醚 γ -环糊精。

[0134] 糊精化合物的实例包括甲基- β -环糊精和甲基- γ -环糊精。

[0135] 糊精化合物的实例包括羟丙基-磺丁基- β -环糊精。

[0136] 糊精化合物的实例包括H107 SIGMA环糊精(Sigma-Aldrich Corp.)。

[0137] 糊精化合物的实例包括CAVAMAX环糊精、CAVASOL环糊精和CAVATRON环糊精(Ashland Inc.)。

[0138] 糊精化合物的实例包括KLEPTOSE环糊精和CRYSMEB环糊精(Roquette America Inc.)。

[0139] 糊精化合物的实例包括CAPTISOL环糊精(Ligand Pharmaceuticals, Inc.)。

[0140] 在一些实施方案中,糊精化合物的实例包括连接至聚合物链或网状结构的糊精化合物。例如,环糊精分子可连接至聚丙烯酸的聚合物。在进一步的实施方案中,环糊精分子可以与交联化合物如丙烯酰基连接在一起。在某些实施方案中,可以使用具有连接的环糊精化合物的丙烯酸乙烯酯水凝胶形式。

[0141] 在一些方面,在将用于本发明的脂质纳米粒组合物中的糊精化合物引入该脂质纳米粒组合物之前,该糊精化合物可与被吸附化合物结合。不希望受任何特定理论的约束,糊精化合物对固醇化合物的预吸附可形成包合物,该包合物能够防止复原药品中的活性剂的活性损失。

[0142] 被吸附化合物的实例包括胆固醇、羊毛甾醇、酵母固醇、二氢酵母固醇、链甾醇、豆甾醇、二氢羊毛甾醇、7-脱氢胆固醇。

[0143] 被吸附化合物的实例包括聚乙二醇化胆固醇和胆甾烷-3-氧代-(C1-22)酰基化合物,例如:胆固醇乙酸酯、胆固醇花生四烯酸酯、胆固醇丁酸酯、胆固醇己酸酯、胆固醇肉豆蔻酸酯、胆固醇棕榈酸酯、胆固醇山萘酸酯、胆固醇硬脂酸酯、胆固醇辛酸酯、胆固醇正癸酸酯、胆固醇十二烷酸酯、胆固醇神经酸酯、胆固醇壬酸酯、胆固醇正戊酸酯、胆固醇油酸酯、胆固醇反油酸酯、胆固醇芥酸酯、胆固醇庚酸酯、胆固醇反亚油酸酯和胆固醇亚油酸酯。

[0144] 被吸附化合物的实例包括植物固醇类, β -谷甾醇、菜油甾醇、麦角固醇、菜籽固醇、 δ -7-豆固醇和 δ -7-燕麦甾醇。

[0145] 保护剂化合物的另外的实例包括糖类化合物。糖类化合物的实例包括糖化合物。

[0146] 保护剂糖化合物的实例包括:单糖,如C(5-6)醛糖和酮糖,以及二糖,如蔗糖、乳糖、乳果糖、麦芽糖、海藻糖、纤维二糖、曲二糖、糖化曲二糖、异麦芽糖、槐糖、昆布二糖、龙胆二糖、松二糖、麦芽酮糖、异麦芽酮糖、龙胆二酮糖、甘露二糖、蜜二糖、车前二糖和木二

糖。

[0147] 保护剂糖类化合物的实例包括多糖,如聚蔗糖(ficoll)。

[0148] 冷冻干燥前的制剂中的保护剂化合物的浓度可为约1% (w/v) 至约25% (w/v)。

[0149] 在一些实施方案中,冷冻干燥前的制剂中的保护剂化合物的浓度可为2% (w/v) 至20% (w/v),或4% (w/v) 至16% (w/v),或5% (w/v) 至15% (w/v),或6% (w/v) 至14% (w/v),或8% (w/v) 至12% (w/v)。

[0150] 在某些实施方案中,冷冻干燥前的制剂中的保护剂化合物的浓度可为6% (w/v),或8% (w/v),或10% (w/v),或12% (w/v),或14% (w/v),或16% (w/v),或18% (w/v),或20% (w/v),或22% (w/v),或24% (w/v)。

[0151] 冷冻干燥过程

[0152] 冷冻干燥过程可在任何合适的容器中实施,如在药学领域中已知的,如玻璃容器,或例如玻璃小瓶,或双腔容器。

[0153] 可将含有保护剂化合物的本发明的稳定化的脂质纳米粒组合物引入到玻璃容器中。加至容器中的组合物的体积可为0.1-20mL,或为1-10mL。

[0154] 可使用任何冷冻干燥过程,包括在药学领域中已知的那些。参见,例如Remington's Pharmaceutical Sciences,第18版,Mack Publishing Co.,Easton,Penn.(1990)。

[0155] 冷冻干燥过程可包括在约-40℃至约-30℃的温度下冷冻经保护剂稳定化的脂质纳米粒组合物。可将该冷冻的组合物干燥以形成冷冻干燥组合物。

[0156] 在一些实施方案中,冷冻步骤可在数分钟内使温度从环境温度变至最终温度。该温度变化可为约1℃/分钟。

[0157] 在一些实施方案中,可在约-15℃至约-38℃的温度下,在约0-250mTorr或50-150mTorr的压力下实施干燥步骤。干燥步骤可在较高温度(高至环境温度)下持续长达数日的时间。固体冷冻干燥物中的残留水的水平可少于约5% (w/v),或少于4% (w/v),或少于3% (w/v),或少于2% (w/v),或少于1% (w/v)。

[0158] 本发明的经保护剂稳定化的脂质纳米粒组合物在冷冻干燥后可通过药学领域中已知的方法复原。

[0159] 在一些方面,本发明提供用于抑制复原药品中的聚集颗粒的水平的方法,该复原药品是由冷冻干燥之后的本发明的经保护剂稳定化的脂质纳米粒组合物所制备。

[0160] 在一些实施方案中,由冷冻干燥之后的本发明的经保护剂稳定化的脂质纳米粒组合物所制备的复原药品可具有降低水平的聚集颗粒。

[0161] 在某些实施方案中,由冷冻干燥之后的本发明的经保护剂稳定化的脂质纳米粒组合物所制备的复原药品可具有降低水平的尺寸大于约0.2μm,或大于约0.5μm,或大于约1μm的聚集颗粒。

[0162] 复原药品

[0163] 可将冷冻干燥物在药学上可接受的载体中复原。

[0164] 药学上可接受的载体的实例包括灭菌水、注射用水、灭菌生理盐水、注射用抑菌水和雾化溶液。

[0165] 药学上可接受的载体的实例包括药学上可接受的溶液。

[0166] 药学上可接受的溶液的实例包括HEPES缓冲液、磷酸盐缓冲液、柠檬酸盐缓冲液和

含有三(羟甲基)氨基甲烷的缓冲液。

[0167] 药学上可接受的溶液的实例包括药学上可接受的缓冲溶液。

[0168] 药学上可接受的溶液的实例包括马来酸、酒石酸、乳酸、乙酸、碳酸氢钠及甘氨酸的缓冲溶液。

[0169] 复原的冷冻干燥物可用作药品。

[0170] 复原的冷冻干燥物可用等渗盐水或其它赋形剂进一步稀释以提供预定的给药浓度。

[0171] 赋形剂的实例包括渗透压调节剂(tonicifier)。

[0172] 赋形剂的实例包括稳定剂,如人血清白蛋白、牛血清白蛋白、 α -酪蛋白、球蛋白、 α -乳清蛋白、LDH、溶菌酶、肌红蛋白、卵清蛋白及核糖核酸酶A(RNase A)。

[0173] 赋形剂的实例包括缓冲剂,如乙酸钾、乙酸钠和碳酸氢钠。

[0174] 赋形剂的实例包括氨基酸,如甘氨酸、丙氨酸、精氨酸、甜菜碱、亮氨酸、赖氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、组氨酸、脯氨酸、4-羟基脯氨酸、肌氨酸、 γ -氨基丁酸、N-(1-羧乙基)-L-丙氨酸(alanopine)、章鱼碱、N-羧甲基-L-丙氨酸(strombine)和三甲胺N-氧化物。

[0175] 赋形剂的实例包括非离子型表面活性剂,如聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯80和泊洛沙姆407。

[0176] 赋形剂的实例包括分散剂,如磷脂酰胆碱、乙醇胺、乙酰色氨酸酯、聚乙二醇、聚乙烯吡咯烷酮、乙二醇、甘油、丙三醇、丙二醇、山梨醇、木糖醇、葡聚糖和明胶。

[0177] 赋形剂的实例包括抗氧化剂,如抗坏血酸、半胱氨酸、硫代甘油、巯基乙酸、硫代山梨醇及谷胱甘肽。

[0178] 赋形剂的实例包括还原剂,如二硫苏糖醇、硫醇类和噻吩类。

[0179] 赋形剂的实例包括螯合剂,如EDTA、EGTA、谷氨酸和天冬氨酸。

[0180] 在一些实施方案中,可使用注射针头穿过带塞小瓶来复原冷冻干燥物。该冷冻干燥物可在摇晃或不摇晃小瓶的情况下复原。

[0181] 复原的时间可为3-30秒或更长时间。

[0182] 在一些实施方案中,复原的核酸药品可以具有少于0.001% (w/v) 的尺寸大于0.2 μ m的聚集颗粒。

[0183] 在某些方面,复原的核酸药品可具有降低的细胞因子激活作用。

[0184] 在其它方面,核酸药品可在经过6个月的储存期间之后复原,且保留该核酸剂80%的活性。

[0185] 在一些实施方案中,核酸药品可在经过6个月的储存期间之后复原,且脂质纳米粒的平均颗粒尺寸可小于比冷冻干燥前的125%。

[0186] 在某些实施方案中,核酸药品可在经过24个月的储存期间之后复原,且保留该核酸剂90%的活性。

[0187] 在进一步的实施方案中,核酸药品可在经过24个月的储存期间之后复原,且该脂质纳米粒的平均颗粒尺寸可小于冷冻干燥前的125%。

[0188] RNAi分子

[0189] 本发明组合物中所配制的活性RNA干扰诱导成分的量可以为不引起超过给药益处的有害作用的量。可通过使用培养的细胞的体外试验、或在模型动物或哺乳动物(如小鼠、

大鼠、狗或猪等)中进行试验来确定这样的量,这样的试验方法对于本领域技术人员而言是已知的。本发明的方法适用于任何动物,包括人类。

[0190] 所配制的活性成分的量可根据剂或组合物的给药方式而改变。例如,当一次给药使用多个单位的组合物时,可通过将一次给药所需的活性成分的量除以所述的多个单位来确定一个单位组合物中所配制的活性成分量。

[0191] 本发明的核酸分子及RNAi分子可以通过直接施用在脂质体制剂中的分子(以辅助、促进或便于进入细胞中)而递送或给药于细胞、组织、器官或个体。

[0192] 本发明的核酸分子及RNAi分子可与阳离子型脂质进行复合,封装在脂质体中并被递送至靶细胞或组织。核酸或核酸复合物可通过直接皮肤施用、透皮施用或注射而体外(ex vivo)或体内局部给药至相关组织。

[0193] 本发明的抑制性核酸分子或组合物可以单位剂量形式给药。可采用常见的药学实践来提供合适的制剂或组合物以将该化合物给药至患有疾病的患者。可采用任何合适的给药途径,例如给药可以为肠胃外、静脉、动脉、皮下、瘤内、肌内、颅内、眶内、眼部、脑室内(intraventricular)、肝内、囊内、鞘内、脑池内、腹膜内、鼻内、气雾剂、栓剂或口服给药。

[0194] 本发明的组合物及方法可包括表达载体,其包含以允许核酸分子表达的方式编码至少一种本发明的RNAi分子的核酸序列。

[0195] 可从插入到DNA载体或RNA载体中的转录单元来表达本发明的核酸分子及RNAi分子。重组载体可为DNA质粒或病毒载体。

[0196] 例如,载体可以含有编码双链RNAi分子的两条链的序列,或者自身互补的单个核酸分子,从而形成RNAi分子。表达载体可以包括编码两个或更多个核酸分子的核酸序列。

[0197] 核酸分子可以在细胞内由真核启动子表达。本领域技术人员认识到,任何核酸都可以由合适的DNA/RNA载体在真核细胞中表达。

[0198] 脂质制剂可通过静脉注射、肌内注射或腹膜内注射、或口服、或吸入或本领域已知的其它方法来给药至动物。

[0199] 用于给药寡核苷酸的药学上可接受的制剂是已知的,并可被使用。

[0200] 在上述方法的一个实施方案中,抑制性核酸分子以约5-500mg/m²/天的剂量给药,例如5mg/m²/天、25mg/m²/天、50mg/m²/天、100mg/m²/天、125mg/m²/天、150mg/m²/天、175mg/m²/天、200mg/m²/天、225mg/m²/天、250mg/m²/天、275mg/m²/天或300mg/m²/天。

[0201] 在一些实施方案中,本发明的抑制性核酸分子以约1-100mg/kg的剂量全身性给药,例如1mg/kg、5mg/kg、10mg/kg、20mg/kg、25mg/kg、50mg/kg、75mg/kg或100mg/kg。

[0202] 在进一步的实施方案中,该剂量可为约25-500mg/m²/天。

[0203] 本领域中已知用于制备制剂的方法可在例如,“Remington:The Science and Practice of Pharmacy”,A.R.Gennaro编著,Lippincourt Williams&Wilkins,Philadelphia,Pa.,2000”中找到。

[0204] 用于肠胃外给药的制剂可例如含有赋形剂、灭菌水或盐水、聚亚烷基二醇(如聚乙二醇)、植物来源的油或氢化的萘类化合物。可使用生物相容的、生物降解的丙交酯聚合物、丙交酯/乙交酯共聚物或聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物来控制化合物的释放。用于抑制性核酸分子的其它可用的肠胃外递送系统包括乙烯-乙酸乙烯酯共聚物颗粒、渗透泵、植入式输注系统及脂质体。用于吸入的制剂可含有赋形剂,例如乳糖,或可为含有例如聚氧乙烯-9-月

桂基醚、甘胆酸盐和脱氧胆酸盐的含水溶液,或可为以滴鼻剂形式来给药的油性溶液,或为凝胶。

[0205] 制剂可以以治疗有效量(例如,预防、消除或减少病理状况的量)给药至人类患者以提供用于肿瘤疾病或病况的治疗。本发明的核苷酸寡聚物的优选剂量可依据如病症的种类及程度、个别患者的整体健康状态、化合物赋形剂的制剂及其给药途径这样的变量而定。

[0206] 脂质组合物的实例

[0207] 在某些实施方案中,四种类脂质组分,即,一种或多种可离子化脂质分子、结构脂质、一种或多种稳定剂脂质及一种或多种用于降低组合物的免疫原性的脂质,可为组合物中的脂质组分的100%。

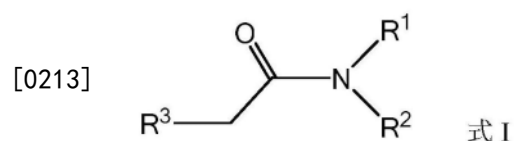
[0208] 表1中示出脂质纳米粒组合物的实例。

[0209] 表1:脂质组分的组成(各自在总量中的mol%)

可离子化	阳离子型	结构	稳定剂	降低免疫原性
17	0	35	40	8
20	0	35	40	5
25	0	35	39	1
25	0	35	35	5
25	0	30	40	5
25	0	40	30	5
30	0	25	40	5
35	0	25	35	5
40	0	30	25	5
25	5	30	35	5
25	10	30	30	5
25	15	25	30	5

[0211] 可离子化的类脂质分子

[0212] 可离子化分子的实例包括具有如式I所示结构的化合物



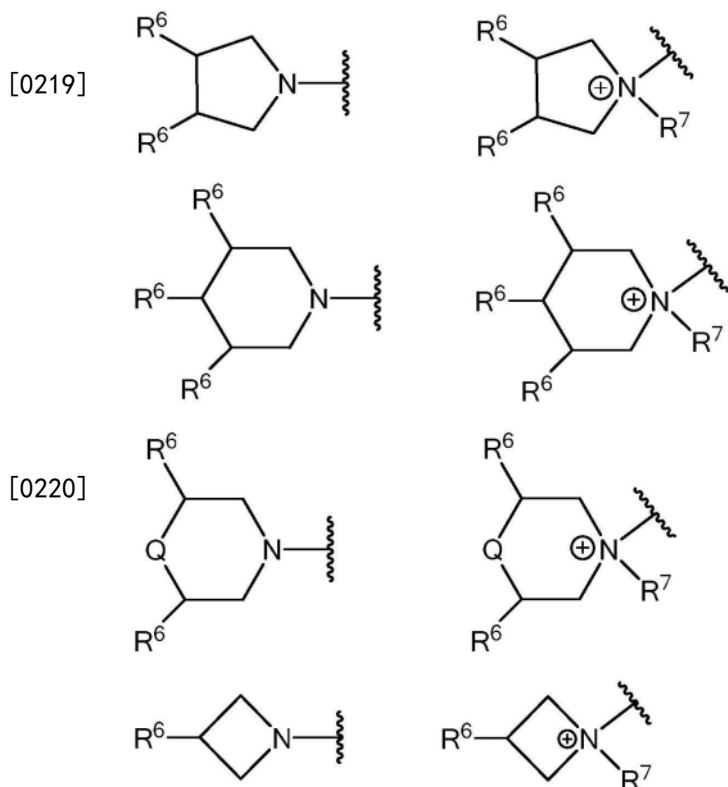
[0214] 其中 R^1 和 R^2 为

[0215] $R^1 = CH_2(CH_2)_nOC(=O)R^4$

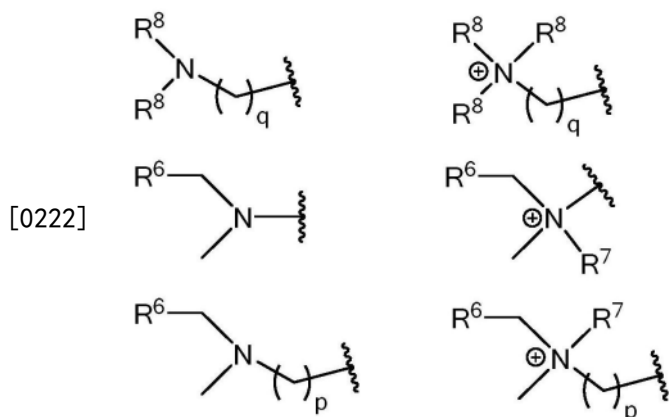
[0216] $R^2 = CH_2(CH_2)_mOC(=O)R^5$

[0217] 其中n及m各自独立地为1至2;且 R^4 及 R^5 在每次出现时独立地为C(12-20)烷基或C(12-20)烯基;

[0218] 其中 R^3 选自1-氮杂环丁烷类、1-吡咯烷类、1-哌啶类、4-吗啉类及1,4-哌嗪类,其中可在环的任意碳原子位置上发生取代,



[0221] R^3 也可选自氨基和氨基烷基基团,所述氨基和氨基烷基基团可以是被取代的:



[0223] 其中

[0224] 每个 R^6 独立地选自H、烷基、羟基、羟烷基、烷氧基、烷氧基烷氧基和氨基烷基;

[0225] 每个 R^7 独立地选自H、烷基、羟烷基和氨基烷基;

[0226] 每个 R^8 独立地选自H、烷基、羟烷基和氨基烷基,且任意两个 R^8 可形成环;

[0227] q 为0至4;

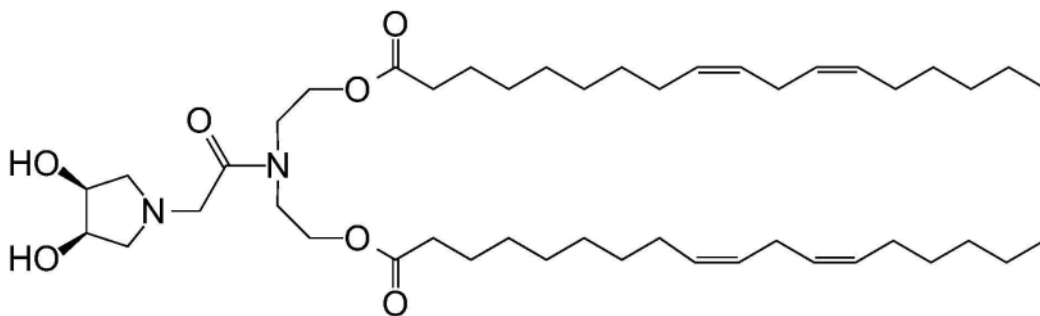
[0228] Q 为0或 NR^7 ;

[0229] p 为1至4。

[0230] 可离子化脂质的实例包括以下化合物:

[0231] 化合物A6

[0232]

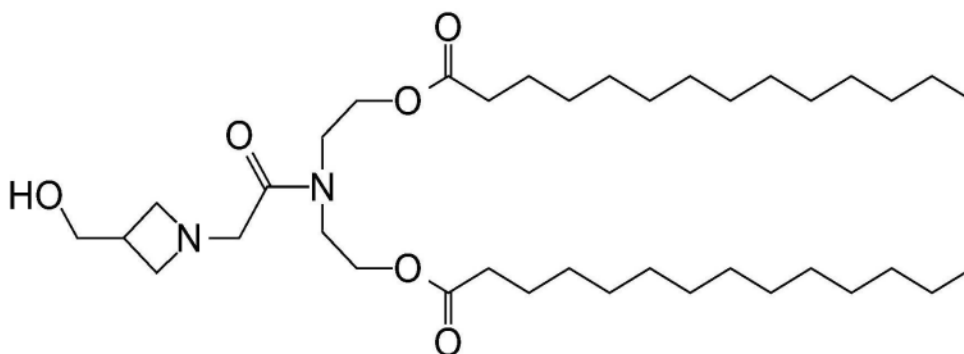


[0233] 其为((2-((3S,4R)-3,4-二羟基吡咯烷-1-基)乙酰基)氮烷二基)双(乙烷-2,1-二基)(9Z,9'Z,12Z,12'Z)-双(十八碳-9,12-二烯酸酯)。

[0234] 可离子化脂质的实例包括以下化合物：

[0235] 化合物A9

[0236]

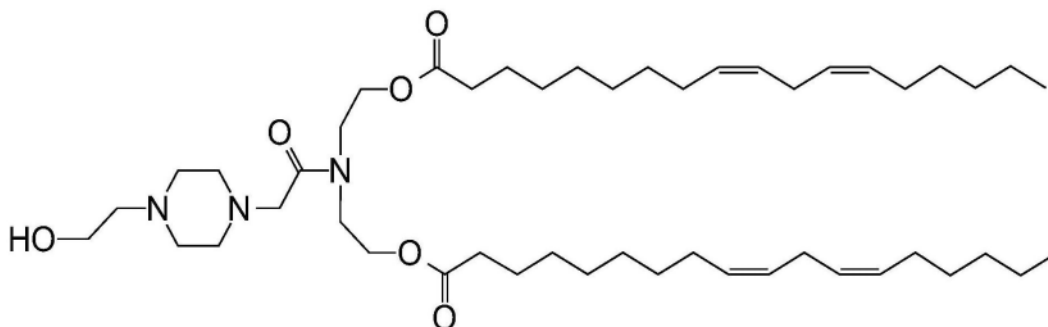


[0237] 其为((2-(3-(羟甲基)氮杂环丁烷-1-基)乙酰基)氮烷二基)双(乙烷-2,1-二基)双十四碳酸酯。

[0238] 可离子化脂质的实例包括以下化合物：

[0239] 化合物AA

[0240]

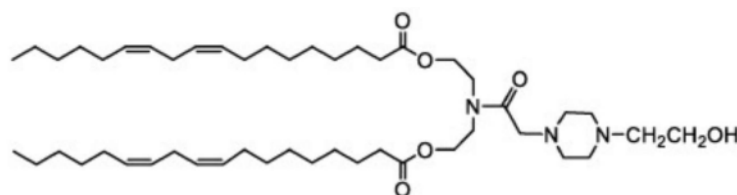


[0241] 其为((2-(4-(2-羟乙基)哌嗪-1-基)乙酰基)氮烷二基)双(乙烷-2,1-二基)(9Z,9'Z,12Z,12'Z)-双(十八碳-9,12-二烯酸酯)。

[0242] 可离子化脂质的实例包括以下化合物：

[0243] 化合物AB

[0244]

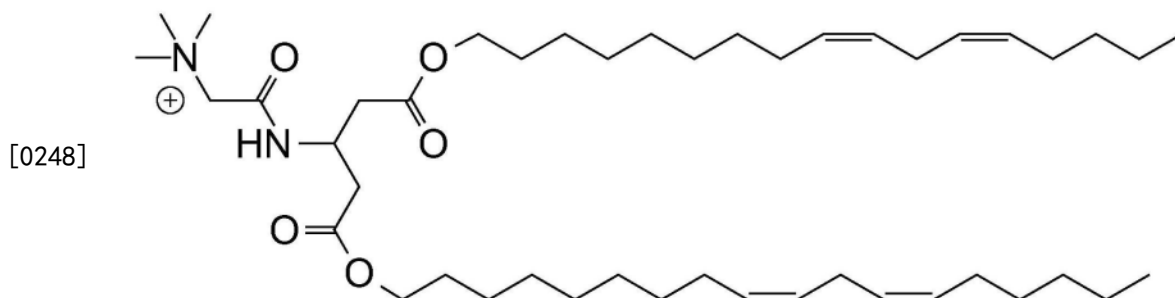


[0245] 其为((2-(4-(2-羟乙基)哌嗪-1-基)乙酰基)氮烷二基)双(乙烷-2,1-二基)(9Z,

9' Z, 12Z, 12' Z) - 双(十八碳-9, 12-二烯酸酯)。

[0246] 可离子化脂质的实例包括以下化合物：

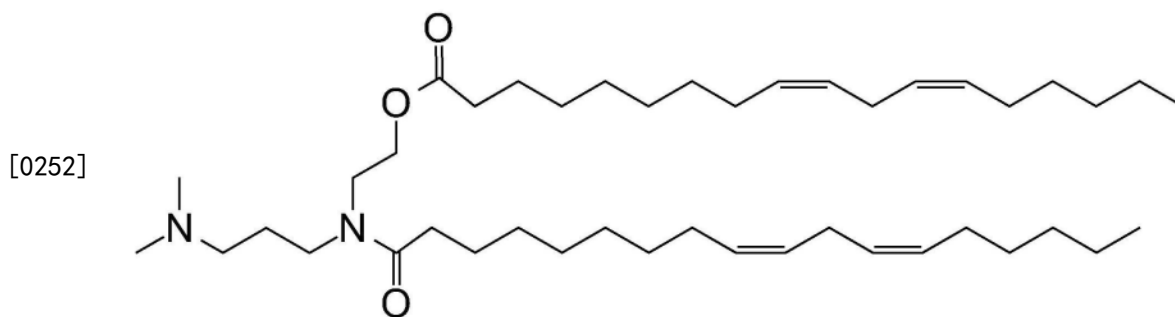
[0247] 化合物C2



[0249] 其为2-((1-(((9Z, 12Z) - 十七碳-9, 12-二烯-1-基)氧)-5-(((9Z, 12Z) - 十八碳-9, 12-二烯-1-基)氧)-1,5-二氧代戊烷-3-基)氨基)-N,N,N-三甲基-2-氧代乙烷-1-铵。

[0250] 可离子化脂质的实例包括以下化合物：

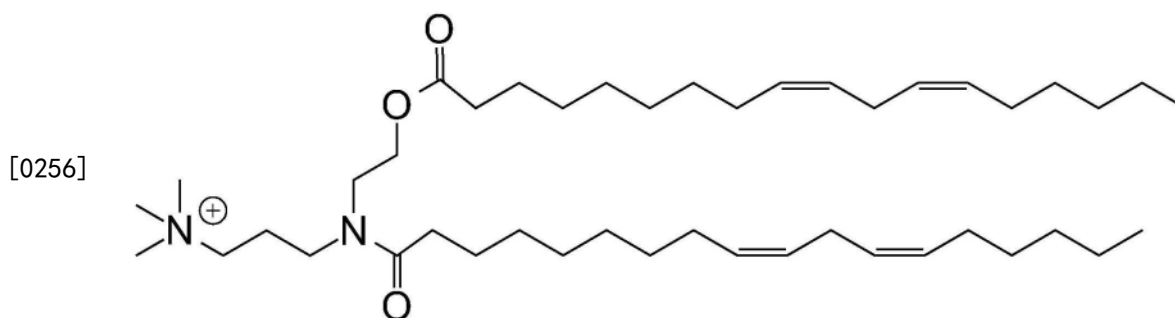
[0251] 化合物F5



[0253] 其为2-((9Z, 12Z) - N- (3- (二甲基氨基) 丙基) 十八碳-9, 12-二烯酰胺基) 乙基 (9Z, 12Z) - 十八碳-9, 12-二烯酸酯。

[0254] 可离子化脂质的实例包括以下化合物：

[0255] 化合物F7

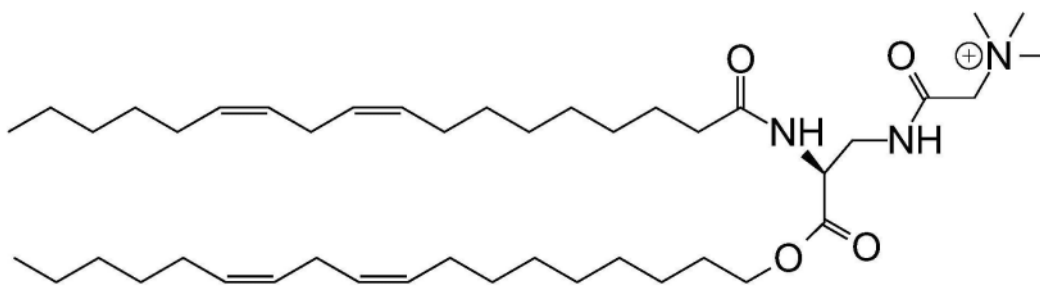


[0257] 其为N,N,N-三甲基-3-((9Z, 12Z) - N- (2-(((9Z, 12Z) - 十八碳-9, 12-二烯酰基)氧)乙基)十八碳-9, 12-二烯酰胺基)丙烷-1-铵。

[0258] 可离子化脂质的实例包括以下化合物：

[0259] 化合物C24

[0260]



[0261] 其为N,N,N-三甲基-2-(((S)-3-(((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯-1-基)氧)-2-((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯酰胺基)-3-氧代丙基)氨基)-2-氧代乙烷-1-铵。

[0262] 结构脂质

[0263] 结构脂质的实例包括胆固醇类、固醇类及类固醇类。

[0264] 结构脂质的实例包括胆酸烷类、胆甾烷类、麦角甾烷类、菜油甾烷类、poriferastanes、豆甾烷类、珊瑚甾烷类(gorgostanes)、羊毛甾烷类、甾烷类(gonanes)、雌甾烷类、雄甾烷类、孕甾烷类及环菠萝烷类。

[0265] 结构脂质的实例包括固醇类及动物固醇类,如胆固醇、羊毛甾醇、酵母固醇、二氢酵母固醇、链甾醇、豆甾醇、二氢羊毛甾醇及7-脱氢胆固醇。

[0266] 结构脂质的实例包括聚乙二醇化胆固醇和胆甾烷-3-氧代-(C1-22)酰基化合物,例如:胆固醇乙酸酯、胆固醇花生四烯酸酯、胆固醇丁酸酯、胆固醇己酸酯、胆固醇肉豆蔻酸酯、胆固醇棕榈酸酯、胆固醇山萘酸酯、胆固醇硬脂酸酯、胆固醇辛酸酯、胆固醇正癸酸酯、胆固醇十二烷酸酯、胆固醇神经酸酯、胆固醇壬酸酯、胆固醇正戊酸酯、胆固醇油酸酯、胆固醇反油酸酯、胆固醇芥酸酯、胆固醇庚酸酯、胆固醇反亚油酸酯和胆固醇亚油酸酯。

[0267] 结构脂质的实例包括固醇类,如植物固醇类, β -谷甾醇、菜油甾醇、麦角固醇、菜籽固醇、 δ -7-豆固醇和 δ -7-燕麦甾醇。

[0268] 稳定剂脂质

[0269] 稳定剂脂质的实例包括两性离子型脂质。

[0270] 稳定剂脂质的实例包括如磷脂类的化合物。

[0271] 磷脂类的实例包括磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、磷脂酸、棕榈酰基油酰基磷脂酰胆碱、溶血磷脂酰胆碱、溶血磷脂酰乙醇胺、二棕榈酰基磷脂酰胆碱、二油酰基磷脂酰胆碱、二硬脂酰基磷脂酰胆碱及二亚油酰基磷脂酰胆碱。

[0272] 稳定剂脂质的实例包括磷脂酰乙醇胺化合物及磷脂酰胆碱化合物。

[0273] 稳定剂脂质的实例包括1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DOPC)。

[0274] 稳定剂脂质的实例包括二植烷酰基磷脂酰乙醇胺(DPhPE)及1,2-二植烷酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DPhPC)。

[0275] 稳定剂脂质的实例包括1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DSPC)、1,2-二棕榈酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DPPC)、1,2-二棕榈酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DPPE)及1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DOPE)。

[0276] 稳定剂脂质的实例包括:1,2-二月桂酰基-sn-甘油(DLG);1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油(DMG);1,2-二棕榈酰基-sn-甘油(DPG);1,2-二硬脂酰基-sn-甘油(DSG);1,2-二花生四烯酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DAPC);1,2-二月桂酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DLPC);1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DMPC);1,2-二棕榈酰基-sn-甘油基-

0-乙基-3-磷酸胆碱(DPePC);1,2-二月桂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DLPE);1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DMPE);1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DSPE);1-棕榈酰基-2-亚油酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱;1-棕榈酰基-2-油酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(POPC);1-棕榈酰基-2-溶血-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(P-Lyso-PC);及1-硬脂酰基-2-溶血-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(S-Lyso-PC)。

[0277] 用于降低免疫原性的脂质

[0278] 用于降低免疫原性的脂质的实例包括聚合物及聚合物-脂质缀合物。

[0279] 用于降低免疫原性的脂质的实例包括具有聚乙二醇(PEG)区域的聚乙二醇化脂质。该PEG区域可为任意分子量。在一些实施方案中,PEG区域可具有200、300、350、400、500、550、750、1000、1500、2000、3000、3500、4000或5000Da的分子量。

[0280] 用于降低免疫原性的脂质的实例包括具有甲氧基聚乙二醇区域的化合物。

[0281] 用于降低免疫原性的脂质的实例包括具有羰基-甲氧基聚乙二醇区域的化合物。

[0282] 用于降低免疫原性的脂质的实例包括具有多支链PEG区域的化合物。

[0283] 用于降低免疫原性的脂质的实例包括具有聚甘油区域的化合物。

[0284] 用于降低免疫原性的脂质的实例包括聚合脂质,如DSPE-mPEG、DMPE-mPEG、DPPE-mPEG及DOPE-mPEG。

[0285] 用于降低免疫原性的脂质的实例包括PEG-磷脂及PEG-神经酰胺。

[0286] 阳离子型脂质

[0287] 阳离子型脂质的实例包括US 2013/022665 A1中所记载的HEDC化合物以及US 2013/0330401 A1和US 2013/0115274 A1中所记载的其它化合物。阳离子型脂质的其它实例在本领域中已知。

[0288] 纳米粒制剂

[0289] 本发明实施方案可提供脂质体纳米粒组合物。

[0290] 在某些实施方案中,本发明的可离子化分子可用于形成脂质体组合物,该脂质体组合物可具有类脂质分子的双层。

[0291] 纳米粒组合物可在脂质体结构、双层结构、胶束、层状结构或它们的混合物中具有一种或多种本发明的可离子化分子。

[0292] 在一些实施方案中,组合物可包含一种或多种液体载体组分。适合用于递送本发明活性剂的液体载体可为药学上可接受的液体载体。液体载体可包括有机溶剂或水与有机溶剂的组合。

[0293] 本发明的实施方案可提供具有10nm至1000nm的尺寸的脂质纳米粒。在一些实施方案中,脂质体纳米粒可具有10nm至150nm的尺寸。

[0294] 在某些实施方案中,本发明的脂质体纳米粒可封装RNAi分子,且在暴露在人血清中1小时后保留至少80%的封装的RNAi分子。本发明可提供用于将活性剂分配于细胞、组织或器官、有机体和个体中的组合物,其中该组合物包含一种或多种本发明的可离子化脂质分子。

[0295] 本发明的组合物可以包含一种或多种可离子化的脂质分子以及结构脂质、一种或多种稳定剂脂质及一种或多种用于降低组合物免疫原性的脂质。

[0296] 本发明的可离子化脂质分子可为本发明的组合物的任意的mol%。

[0297] 本发明的组合物的可离子化脂质分子可为组合物的脂质组分的15mol%至40mol%。在某些实施方案中,组合物的可离子化脂质分子可为组合物的脂质组分的20mol%至35mol%。在进一步的实施方案中,组合物的可离子化脂质分子可为组合物的脂质组分的25mol%至30mol%。

[0298] 本发明的组合物的结构脂质可为组合物的脂质组分的25mol%至40mol%。在某些实施方案中,组合物的结构脂质可为组合物的脂质组分的30mol%至35mol%。

[0299] 本发明的组合物的稳定剂脂质的总量可为组合物的脂质组分的25mol%至40mol%。在某些实施方案中,组合物的稳定剂脂质的总量可为组合物的脂质组分的30mol%至40mol%。

[0300] 在一些实施方案中,本发明的组合物可包含两种或更多种稳定剂脂质,其中各稳定剂脂质单独地可为组合物的脂质组分的5mol%至35mol%。在某些实施方案中,本发明组合物可包含两种或更多种稳定剂脂质,其中各稳定剂脂质单独地为组合物的脂质组分的10mol%至30mol%。

[0301] 在某些实施方案中,一种或多种稳定剂脂质的总量可为组合物的脂质的25mol%至40mol%,其中各稳定剂脂质单独地可为5mol%至35mol%。

[0302] 在某些实施方案中,一种或多种稳定剂脂质的总量可为组合物的脂质的30mol%至40mol%,其中各稳定剂脂质单独地可为10mol%至30mol%。

[0303] 一种或多种用于降低组合物的免疫原性的脂质可为组合物的脂质组分的总共1mol%至8mol%。在某些实施方案中,一种或多种用于降低组合物的免疫原性的脂质可为组合物的脂质组分的总共1mol%至5mol%。

[0304] 在其它方面,本发明的组合物可进一步包含阳离子型脂质,其可为组合物的脂质组分的5mol%至25mol%。在某些实施方案中,本发明的组合物可进一步包含阳离子型脂质,其可为组合物的脂质组分的5mol%至15mol%。在这些方面,本发明的组合物的阳离子型脂质与可离子化脂质分子的浓度的摩尔比可为5:35至25:15。

[0305] 在本发明的组合物中,全部的脂质组分可包括一种或多种可离子化脂质分子组分、一种或多种结构脂质、一种或多种稳定剂脂质及一种或多种用于降低组合物的免疫原性的脂质。

[0306] 在一些实施方案中,组合物可含有可离子化脂质化合物A6、结构脂质胆固醇、稳定剂脂质DOPC与DOPE以及用于降低免疫原性的脂质DPPE-mPEG。在某些实施方案中,化合物A6可为组合物的15mol%至25mol%;胆固醇、DOPC及DOPE合起来可为组合物的75mol%至85mol%;并且DPPE-mPEG可为组合物的5mol%。

[0307] 在一个实施方案中,化合物A6可为组合物的25mol%;胆固醇可为组合物的30mol%,DOPC可为组合物的20mol%,DOPE可为组合物的20mol%;且DPPE-mPEG(2000)可为组合物的5mol%。

[0308] 药物组合物

[0309] 本发明还涵盖通过向个体给药本发明的组合物而将活性剂分配至个体的器官以用于治疗疾病的方法。可治疗的器官包括肺、肝、胰腺、肾、结肠、骨、皮肤及肠。

[0310] 在进一步的方面,本发明提供一系列的药物制剂。

[0311] 本文的药物制剂可包含活性剂,以及药物载体或本发明的脂质,以及药学上可接

受的载体或稀释剂。通常,本说明书中的活性剂包括任何用于恶性肿瘤的活性剂,包括任何抑制性核酸分子及任何小分子药物。抑制性核酸分子的实例包括核酶、反义核酸及RNA干扰分子(RNAi分子)。

[0312] 本发明的药物制剂可含有以下各种中的一种或多种:表面活性剂、稀释剂、赋形剂、防腐剂、稳定剂、着色剂及悬浮剂。

[0313] 在Remington's Pharmaceutical Sciences,第18版,Mack Publishing Co., Easton, Penn. (1990)中,记载了一些用于药物制剂的药物载体、稀释剂及组分,以及用于配制及给药本发明的化合物和组合物的方法。

[0314] 防腐剂的实例包括苯甲酸钠、抗坏血酸及对羟基苯甲酸的酯。

[0315] 表面活性剂的实例包括醇类、酯类、硫酸酯化脂肪醇。

[0316] 赋形剂的实例包括蔗糖、葡萄糖、乳糖、淀粉、结晶纤维素、甘露醇、轻质无水硅酸盐、铝酸镁、硅酸铝镁(magnesium metasilicate aluminate)、合成硅酸铝、碳酸钙、碳酸氢钠、磷酸氢钙和羧甲基纤维素钙。

[0317] 悬浮剂的实例包括椰子油、橄榄油、芝麻油、花生油、大豆、邻苯二甲酸乙酸纤维素、甲基乙酸酯-甲基丙烯酸酯共聚物和邻苯二甲酸酯。

[0318] 用于递送一或多种有基因沉默活性的分子的本发明的治疗制剂可以向有此需要的哺乳动物给药。可以将可封装在脂质体中的治疗有效量的制剂和活性剂向哺乳动物给药以预防或治疗恶性肿瘤。

[0319] 给药途径可为局部或全身。

[0320] 可通过各种途径来给药本发明的治疗有效的制剂,包括静脉、腹膜内、肌内、皮下及口服。

[0321] 给药途径可包括,例如肠胃外递送,包括肌内注射、皮下注射、静脉注射、脊髓内注射,以及鞘内注射、直接脑室内注射、腹膜内注射、鼻内注射或眼内注射。

[0322] 制剂还可以缓释或控释剂型来给药,包括储库注射剂(depot injection)、渗透泵等等,用于以预定的速率来长期给药和/或定时脉冲给药。

[0323] 可通过包括口服和肠胃外途径的各种途径来给药本发明的组合物,其实例包括但不限于:口服、静脉、肌内、皮下、局部、肺内、气道内、气管内、支气管内、鼻、直肠、动脉、门静脉、脑室内、脊髓内、淋巴结内、淋巴管内、脑内、鞘内、脑室内、经粘膜、经皮肤、鼻内、腹膜内及子宫内途径,且其可配制成适合于各种给药途径的剂型。可从任何已知的剂型及方法中适当选择这样的剂型及制剂方法。参见例如Hyojun Yakuzaigaku, Standard Pharmaceuticals, Yoshiteru Watanabe等编著, Nankodo, 2003。

[0324] 适用于口服给药的剂型的实例包括但不限于:粉剂、颗粒剂、片剂、胶囊、液体、悬浮液、乳剂、凝胶和糖浆剂;适用于肠胃外给药的剂型的实例包括注射剂,如注射用溶液、注射用悬浮液、注射用乳剂和即用型注射剂。用于肠胃外给药的制剂可为诸如含水或不含水的等渗灭菌溶液或悬浮液的形式。

[0325] 用于肠胃外给药的药物制剂(例如通过快速注射或连续输注)包括水溶性形式的活性制剂的含水溶液。活性化合物的悬浮液可制备成合适的油性注射悬浮液。含水注射悬浮液可含有提高悬浮液的黏度的物质,如羧甲基纤维素钠、山梨醇或葡聚糖。任选地,悬浮液还可含有合适的稳定剂或提高化合物的溶解度的剂以允许制备高度浓缩溶液。

[0326] 注射用制剂可以单位剂量形式呈现,例如在安瓶中或在多剂量容器中,添加有防腐剂。该制剂可采用在油性或含水载体中的悬浮液、溶液或乳剂这样的形式,并可包含配制剂(formulary agent),如助悬剂、稳定剂和/或分散剂。或者,活性成分可为粉末形式,用于在使用前用合适的载体配制,例如灭菌无热源水。

[0327] 除了之前所述的制剂外,制剂也可配制成储库制剂。这样的长效制剂可通过肌肉注射来给药。因此,例如,制剂可使用合适的聚合物物质或疏水性物质来配制,例如作为在可接受的油中的乳剂,或离子交换型树脂,或作为微溶衍生物,例如作为微溶盐类。

[0328] 本发明的组合物和制剂也可以配制成用于局部递送,并且可以使用用于局部递送载体的施用的任何合适的方法施用于个体的皮肤。例如,可以手动方式、使用涂敷器或通过包括两者的方法来施用制剂。施用后,可通过例如摩擦使制剂作用到个体皮肤中。施用可每天进行多次或每天进行一次。例如,可每天一次、每天两次或每天多次向患者皮肤施用制剂,或可每两天一次、每三天一次或约每周一次、每两周一次或每几周一次施用制剂。

[0329] 可通过任何合适的方式向个体给药本文所述的制剂或药物组合物。给药方法的实例包括以下等:(a)通过注射给药,通过皮下、腹膜内、静脉、肌肉、皮内、眶内、囊内、脊柱内、胸骨内注射等,包括输注泵递送;(b)局部给药,如通过直接注射在肾脏或心脏区域中,例如通过储库植入;以及本领域技术人员认为使活性化合物与活组织接触适合的方法。

[0330] 个体医师可根据患者的情况来选择药物组合物的确切制剂、给药途径及剂量。参见例如Goodman&Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics,第12版,Sec.1,2011。通常,向患者给药的组合物的剂量范围可为约0.5mg/kg患者体重至1000mg/kg患者体重。根据患者的需求,剂量可以是在一天或多天的给药过程内单次给药或两次或多次系列给药。在已对至少一些病况建立了化合物的人用剂量的情况中,该剂量会大致相同,或剂量为已建立的人用剂量的约0.1%至约500%,更优选为约25%至约250%。在没有建立人用剂量的情况下,如在新发现的药物组合物的情况下,如通过在动物中的毒性研究及功效研究所证明的,可从ED₅₀或ID₅₀的值或从体外或体内研究所得到的其它适当值来推测出适合的人用剂量。

[0331] 实施例

[0332] 实施例1:通过冷冻干燥及复原来制备siRNA脂质纳米粒药物制剂

[0333] 通过将脂质/乙醇溶液高速注入siRNA缓冲溶液中约10分钟合成脂质纳米粒。随后,将选自柠檬酸盐缓冲液pH 6.1、PBS pH 7.0、Tris pH 7.2和HEPES pH 7.4的第二缓冲液渗滤并用作外部缓冲液通过TFF盒以制备最终产物含水悬浮液。

[0334] 将不同量的保护剂化合物添加至最终产物含水悬浮液中,然后进行0.2/0.8微米过滤。以500mL或1000mL批次制备脂质纳米粒。

[0335] 结果:令人惊讶地发现脂质纳米粒在冷冻干燥过程下存活,且冷冻干燥物提供的复原的脂质纳米粒悬浮液具有的平均颗粒尺寸与初始悬浮液中所存在的尺寸接近。

[0336] 实施例2:本发明的复原的siRNA药物制剂表现出稳定的颗粒尺寸及siRNA封装,其适合用于药品中。本发明的siRNA制剂的令人惊讶的稳定性水平来自于受保护的冷冻干燥组合物的性质。

[0337] 在本研究中,使用以下近似组成将靶向Hsp47的siRNA配制在脂质体纳米粒中:40mol%的可离子化脂质、30mol%的DOPE、25mol%的胆固醇及5.0mol%的PEG-DMPE。

[0338] 使用含有蔗糖和(2-羟丙基)- β -环糊精的保护剂组合物来冷冻干燥纳米粒制剂。组合物中的保护剂总含量为10% (w/v)。蔗糖的用量为6%，(2-羟丙基)- β -环糊精的用量为4%。因此，(2-羟丙基)- β -环糊精的含量为蔗糖加(2-羟丙基)- β -环糊精的总量的40% (w/v)。

[0339] 通过将脂质/乙醇溶液高速注入siRNA缓冲溶液中合成脂质纳米粒以制备最终产物含水悬浮液。含有siRNA的纳米粒的初始的大部分(bulk)制剂具有99-101nm的平均纳米粒尺寸。

[0340] 测试了冷冻干燥并复原的siRNA药物制剂的颗粒尺寸和siRNA封装的稳定性。

[0341] 通常,最优选siRNA纳米粒制剂在冷冻干燥前状态与冷冻干燥并复原状态间表现出少于约10%的平均颗粒尺寸变化。此外,最优选siRNA纳米粒制剂在冷冻干燥并复原状态表现出至少约85%的siRNA封装率。

[0342] 表2中示出复原的siRNA纳米粒产物的稳定性。在表2中示出冷冻干燥(AL)并复原后的平均颗粒尺寸和siRNA封装率,以及冷冻干燥前(BL)的冷冻并解冻溶液所得到的类似结果。

[0343] 表2:冷冻干燥前及复原后的纳米粒稳定性

总保护剂 % (w/v)	Z(avg) (nm)		PDI		Zeta (mV)		% EE		[siRNA] mg/mL
	BL	AL	BL	AL	BL	AL	BL	AL	
10% (A)*	105	108	0.140	0.167	-1.4	-1.7	91	86	1.9
10% (B)	106	110	0.156	0.138	-1.8	-1.7	92	87	2.0
10% (C)	106	108	0.150	0.165	-2.0	-1.7	92	87	1.9
[0344] 10% (D)	105	111	0.146	0.157	-1.7	-2.4	92	85	1.8
10% (A)	106	111	0.134	0.149	-1.5	-1.1	93	88	3.7
12.5% (A)	106	112	0.165	0.186	-1.7	-1.6	93	87	3.7
15% (A)	105	112	0.170	0.141	-1.3	-1.1	93	87	3.6
15% (A)	106	116	0.140	0.149	-1.3	-0.5	93	88	4.4
15% (B)	105	116	0.154	0.157	-1.3	-0.7	93	88	4.4
15% (C)	105	118	0.151	0.150	-1.1	-0.8	93	88	4.5

[0345] *在表2中:使用了来自四种不同市售来源A、B、C和D的(2-羟丙基)- β -环糊精保护剂化合物。

[0346] 在表2中,所有的保护剂组合物均表现出最终复原的siRNA药物制剂的合适的稳定性。除了具有最高水平的siRNA浓度及总保护剂(15%)的样品之外,siRNA纳米粒制剂在冷冻干燥前状态与冷冻干燥并复原状态间表现出少于10%的平均颗粒尺寸变化,以及在冷冻干燥并复原状态表现出至少约85%的siRNA封装率。

[0347] 表2中的结果显示,通过由含有60%的蔗糖和40%的(2-羟丙基)- β -环糊精的保护剂组合物来冷冻干燥纳米粒制剂而制备的本发明的复原的siRNA药物制剂,其在平均颗粒尺寸及siRNA封装率方面有利地是稳定的。

[0348] 实施例3:二甲基亚硝胺(DMN)诱导的肝纤维化大鼠模型

[0349] 本发明的复原的siRNA药物制剂在体内表现出深刻且令人惊讶的基因沉默效力。观察到用冷冻干燥并复原的siRNA制剂的体内基因敲落。封装在脂质体制剂中的siRNA用于

二甲基亚硝胺(DMN)诱导的肝纤维化大鼠模型中。

[0350] 使用以下近似组成将靶向Hsp47 (GP46)的siRNA配制在脂质体纳米粒中:40mol%的可离子化脂质、30mol%的DOPE、25mol%的胆固醇和5.0mol%的PEG-DMPE。

[0351] 使用含有蔗糖和(2-羟丙基)- β -环糊精的保护剂组合物来冷冻干燥纳米粒制剂。总保护剂含量为10% (w/v)。(2-羟丙基)- β -环糊精的含量为20%至40% (w/v)。

[0352] 得到样品为储存在-80℃下的新鲜的、当天的冷冻干燥团块。将样品用盐水复原并进一步用盐水稀释成含有0.17mg/mL的siRNA的浓度。复原时间为约20s,体积3mL。

[0353] 测试Hsp47 siRNA的最终药品复原溶液的体内效力,其为对含有核酸剂的冷冻干燥并复原的纳米粒的存活力的严格测试。

[0354] 在本研究中使用体重为180-200g的雄性幼年Sprague Dawley大鼠,分成10组,每组7-8只。使用含pH 7.4的PBS的液体剂型。在给药当天,给药之前,复原制剂并使用盐水稀释成各组的浓度。在给药前一天将冷冻对照制剂解冻并稀释。注射当天,将一定量的DMN加至pH 7.4的PBS中以得到5mg/mL的澄清给药溶液。以腹膜内注射来给药。第1-3天连续3天QD给药。使用0.17-0.5mg/mL的制剂浓度以3mL/kg的给药体积给药0.5-1.5mg/kg (siRNA)的剂量。在给药DMN之前,先对大鼠进行称重,并于第1-3天以腹膜内注射对动物注射10mg/kg的DMN(溶液浓度为5mg/mL),给药体积为2mL/kg。第4-6天,以1mL/kg药体积对动物注射DMN。在第5天,在给药之前,先将DMN处理的动物按体重(第5天)随机分组。第6天给药试验药物(注射DMN的首日为第1天)。在第7天获取大鼠的肝脏,并立即用pH 7.4的PBS(40mL,以20mL/min的速率)经剪断的肝门静脉来冲洗。从左侧叶收集2mm厚的横断肝切片。

[0355] gp46 mRNA敲落评估:使用RNeasy柱(Qiagen)提取大鼠肝脏的总RNA。使用Nanodrop分光光度计来定量RNA。

[0356] 如图1所示,用40%的(2-羟丙基)- β -环糊精保护的本发明的复原的siRNA药物制剂在体内对于Hsp47 (GP46)的基因沉默表现出深刻且令人惊讶的效力。

[0357] 特别地,用40%的(2-羟丙基)- β -环糊精保护的制剂的体内Hsp47 (GP46)基因沉默效力实质上为100%。

[0358] 相反,含有20%至30%的(2-羟丙基)- β -环糊精的制剂的体内效力表现出不可接受的低基因敲落,分别只有47%和32%。

[0359] 总之,该出乎预料的有利结果显示,可用在含有蔗糖和(2-羟丙基)- β -环糊精的组合物中至少40%的(2-羟丙基)- β -环糊精来制备本发明的用于冷冻干燥脂质体siRNA制剂的保护剂组合物。

[0360] 物理表征显示,通过由含有约40%至约70%的(2-羟丙基)- β -环糊精和其余部分的蔗糖的保护剂组合物冷冻干燥的纳米粒制剂制备的本发明的复原的siRNA药物制剂在平均颗粒尺寸方面有利地是稳定的。若(2-羟丙基)- β -环糊精低于约40%,该制剂倾向于具有异常增加的封装值,这指示不想要的结构变化。因此,(2-羟丙基)- β -环糊精组分的优选范围为约40%至约70%。

[0361] 结论是,本发明的复原的siRNA药物制剂使用40%至70%的(2-羟丙基)- β -环糊精在体内对于核酸药剂具有令人惊讶的效力。

[0362] 实施例4:本发明的复原的siRNA药物制剂在体内对于基因沉默表现出充足的血浆浓度。在体内观察冷冻干燥并复原的siRNA制剂的血浆药代动力学。

[0363] 使用以下近似组合物将靶向Hsp47 (GP46)的siRNA配制在脂质体纳米粒中：40mol%的可离子化脂质、30mol%的DOPE、25mol%的胆固醇和5.0mol%的PEG-DMPE。

[0364] 使用含有蔗糖和(2-羟丙基)- β -环糊精的保护剂组合物来冷冻干燥纳米粒制剂。保护剂总含量为12.5% (w/v)。(2-羟丙基)- β -环糊精的含量为总保护剂的40% (w/v)，其余部分为蔗糖。

[0365] 与冷冻制剂相比较，单次剂量水平静脉给药Sprague Dawley大鼠冷冻干燥制剂后，评估血浆PK曲线。通过基于杂交的ELISA方法测定血浆样品中的siRNA浓度。将Sprague-Dawley大鼠装配双颈静脉导管。在第1天，经15秒经一根颈静脉导管单次剂量快速静脉注射试验物质向动物给药。在每个时间点，从每只动物的颈静脉导管收集大约0.30mL的全血置于K2EDTA管中。

[0366] 如图2中所示，冷冻干燥并复原的siRNA药物制剂的血浆浓度药代动力学与仅经过冷冻的比较对照制剂基本相同。冷冻干燥并复原的siRNA核酸药物制剂提供令人惊讶的血浆中药剂的有效水平。

[0367] 对于本实验，表3中示出在单次剂量给药之后的时间-浓度曲线下面积 (AUC) 和峰血浆浓度 (C_{max})。

[0368] 表3：冷冻干燥并复原的核酸制剂的血浆药代动力学

[0369]

	复原	冷冻
AUC	2751	2683
C _{max}	2922	3350

[0370] 结论是，本实验示出冷冻干燥并复原的核酸药物制剂的血浆浓度药代动力学与仅经过冷冻的比较阳性对照制剂基本相同。因此，冷冻干燥并复原的siRNA核酸药物制剂提供令人惊讶的血浆中药剂的有效水平，并且相对于未冷冻干燥的组合物没有降解。

[0371] 实施例5：保护在100nm尺寸范围内的脂质纳米粒。

[0372] 将脂质/乙醇溶液分散在siRNA缓冲液中合成脂质纳米粒，以制备最终产物含水悬浮液。纳米粒具有105-106nm的平均尺寸。使用化合物HEDC作为可离子化脂质 (参见，例如US 2013/022665 A1) 合成该纳米粒。该纳米粒封装靶向Hsp47的siRNA。

[0373] 表4示出冷冻干燥前的纳米粒特征，其中该最终产物含水悬浮液仅被冷冻，并随后解冻。表5示出冷冻干燥后的纳米粒特征。

[0374] 从表4到表5，平均颗粒尺寸的增加仅为6.7%。

[0375] 表4：冷冻干燥前的纳米粒特征 (100nm的尺寸范围)

[0376]

编号	蔗糖/2HPBCD (wt%/wt%)	冷冻干燥前(冷冻)					
		Z(avg)(nm)	PDI	Zeta (mV)	EE (%)	[siRNA] (mg/mL)	产率 (%)
1	6/4	105	0.14	-1.4	91	2.1	103
2	6/4	106	0.16	-1.8	92	2.1	105
3	6/4	106	0.15	-2.0	92	2.1	104
4	6/4	105	0.15	-1.7	92	2.1	104
5	6/4	106	0.14	-1.3	93	5.1	101
6	6/4	105	0.15	-1.3	93	4.9	99
7	6/4	105	0.15	-1.1	93	5.2	103
8	6/4	106	0.16	-0.9	93	5.2	104

[0377] 表5:冷冻干燥后的纳米粒特征(100nm的尺寸范围)

[0378]

编号	蔗糖/2HPBCD (wt%/wt%)	冷冻干燥后 (复原)					
		Z(avg)(nm)	PDI	Zeta (mV)	EE (%)	[siRNA] (mg/mL)	产率 (%)
1	6/4	108	0.17	-1.7	86	1.9	94
2	6/4	110	0.14	-1.7	87	2.0	98
3	6/4	108	0.16	-1.7	87	1.9	95
4	6/4	111	0.16	-2.4	85	1.8	92
5	6/4	116	0.15	-0.5	88	4.4	88
6	6/4	116	0.16	-0.7	88	4.4	89
7	6/4	118	0.15	-0.8	88	4.5	90
8	6/4	114	0.12	-1.3	87	4.42	88

[0379] 在另外的试验中,测试含有6% (w/v) 的蔗糖、4% (w/v) 的(2-羟丙基)- β -环糊精和浓度为2mg/mL的靶向Hsp47的siRNA的九种最终产物溶液经冷冻干燥并复原的平均颗粒尺寸增加。与冷冻干燥前的最终产物溶液相比,冷冻干燥后,复原的药品显示出令人惊讶的小于5%的平均颗粒尺寸的略微增加,从102nm至107nm。

[0380] 实施例6:保护在50nm尺寸范围内的脂质纳米粒。

[0381] 通过将脂质/乙醇溶液高速注入siRNA缓冲液中合成脂质纳米粒,以制备最终产物含水悬浮液。该纳米粒具有48-50nm的平均尺寸。纳米粒使用化合物A6作为可离子化脂质合成。该纳米粒封装2mg/mL的靶向Hsp47的siRNA。

[0382] 表6示出在50nm范围内的纳米粒在冷冻干燥前(BL)和冷冻干燥后(AL)的纳米粒特征。

[0383] 表6:50nm范围内的纳米粒在冷冻干燥之前及之后的纳米粒特征

[0384]

蔗糖/2HPBCD (wt%/wt%)	Z(avg) (nm)		PDI		Zeta (mV)		% EE	
	BL	AL	BL	AL	BL	AL	BL	AL
5/5	48	53	0.07	0.13	-2.3	-3.3	76	66
6/4	48	51	0.07	0.14	-2.8	-4.8	81	68
12/0	50	75	0.08	0.25	-4.9	-2.0	86	81

[0385] 实施例7:保护siRNA脂质纳米粒用于长期储存。

[0386] 本发明的复原的siRNA药物制剂在体内对于基因沉默表现出长期稳定性。

[0387] 使用以下近似组合物将靶向Hsp47 (GP46) 的siRNA配制在脂质体纳米粒中: 40mol%的可离子化脂质、30mol%的DOPE、25mol%的胆固醇和5.0mol%的PEG-DMPE。

[0388] 使用含有蔗糖和(2-羟丙基)- β -环糊精的保护剂组合物冷冻干燥纳米粒制剂。保护剂总含量为10%至12.5%,或10%至15% (w/v)。(2-羟丙基)- β -环糊精的含量为40% (w/v),蔗糖为60%。环糊精为CAVITRON W7 HP5 PHARMA环糊精。

[0389] 小瓶在如表7中所示的温度下储存4周。经储存并复原后,如表7中所示,纳米粒的平均尺寸(PS,Z-avg)令人惊讶地稳定。

[0390] 如表7中所示,siRNA纳米粒的尺寸变化在其于初始组合物中的尺寸的4%以内。

[0391] 表7:纳米粒特征

样品总% 保护剂	温度 -20℃				温度 5℃			
	初始 Z-avg		1 mo Z-avg		初始 Z-avg		1 mo Z-avg	
	Z-avg	PDI	Z-avg	PDI	Z-avg	PDI	Z-avg	PDI
10	103	0.12	99	0.15	103	0.12	102	0.14
12.5	101	0.13	101	0.15	101	0.13	100	0.16
15	102	0.13	---	---	102	0.13	102	0.15
10	100	0.13	99	0.17	100	0.13	96	0.16
12.5	95	0.16	94	0.14	95	0.16	94	0.14
15	96	0.13	95	0.13	96	0.13	96	0.13
10	95	0.15	95	0.16	95	0.15	96	0.15
12.5	95	0.15	92	0.11	95	0.15	93	0.14
15	94	0.13	92	0.14	94	0.13	91	0.14

[0393] 实施例8:保护siRNA脂质纳米粒用于长期储存。

[0394] 本发明的复原的siRNA药物制剂在体内对于基因沉默表现出长期稳定性。

[0395] 使用以下近似组合物将靶向Hsp47 (GP46) 的siRNA配制在脂质体纳米粒中: 40mol%的可离子化脂质、30mol%的DOPE、25mol%的胆固醇和5.0mol%的PEG-DMPE。

[0396] 使用含有蔗糖和(2-羟丙基)- β -环糊精的保护剂组合物冷冻干燥纳米粒制剂。保护剂总含量为10%至12.5%,或10%至15% (w/v)。(2-羟丙基)- β -环糊精的含量为40% (w/v),蔗糖为60%。环糊精为CAVITRON W7 HP7 PHARMA环糊精。

[0397] 小瓶在如表8中所示的温度下储存4周。经储存并复原后,如表8中所示,纳米粒的平均尺寸(PS,Z-avg)令人惊讶地稳定。

[0398] 如表8中所示,siRNA纳米粒的尺寸变化在其于初始组合物中的尺寸的5%以内。

[0399] 表8:纳米粒特征

[0400]

样品总% 保护剂	温度-20℃				温度 5℃			
	初始 Z-avg		1 mo Z-avg		初始 Z-avg		1 mo Z-avg	
	Z-avg	PDI	Z-avg	PDI	Z-avg	PDI	Z-avg	PDI
10	103	0.11	99	0.14	103	0.11	99	0.15
12.5	101	0.14	99	0.15	101	0.14	98	0.15
15	102	0.15	---	---	102	0.15	97	0.14
10	96	0.13	95	0.13	96	0.13	93	0.13
12.5	94	0.12	91	0.12	94	0.12	91	0.13
15	94	0.13	89	0.14	94	0.13	91	0.14
10	94	0.15	89	0.15	94	0.15	89	0.13
12.5	91	0.15	87	0.13	91	0.15	88	0.14
15	90	0.14	86	0.15	90	0.14	87	0.12

[0401] 所有本文具体提及的出版物、专利及文献为所有目的整体援引加入。

[0402] 应当理解,本发明不限于所描述的具体方法、方案、材料和试剂,因为这些可以变化。还应当理解,本文使用的术语仅仅是为了描述特定实施方案的目的,并不意图限制本发明的范围。对于本领域技术人员来说显而易见的是,可以对本文公开的描述进行不同替换和修改,而不背离本说明书的范围和精神,并且这些实施方案在本说明书和所附权利要求的范围内。

[0403] 必须注意的是,除非上下文另外明确指出,否则如本文以及所附权利要求中所使用的,单数形式的“一”、“该”和“所述”包括复数形式。此外,术语“一”、“一种或多种”以及“至少一种”本文可互换使用。还应该注意的是,术语“包含”、“含有”、“包括”和“具有”可以互换使用,并且应该理解为扩展性的和没有限制的。

[0404] 除非本文中另外指出,本文中的值范围的叙述仅仅旨在用作单独地提及落入该范围内的各单独值的速记方法,并且各单独的值如在本文中单独列举一样被并入说明书。对于马库什组,本领域技术人员会认识到本说明书包括马库什组成员的单个成员以及亚组。

[0405] 在无进一步详细阐述下,相信本领域技术人员可以基于以上描述最大限度地利用本发明。因此,所列的具体实施方案解释为仅是示例性的,且不得以任何方式来限制本发明的其余内容。

[0406] 本说明书中公开的所有特征可以以任意组合结合。在本说明书中公开的各特征可以被用于相同、等同或类似目的的替代特征替代。

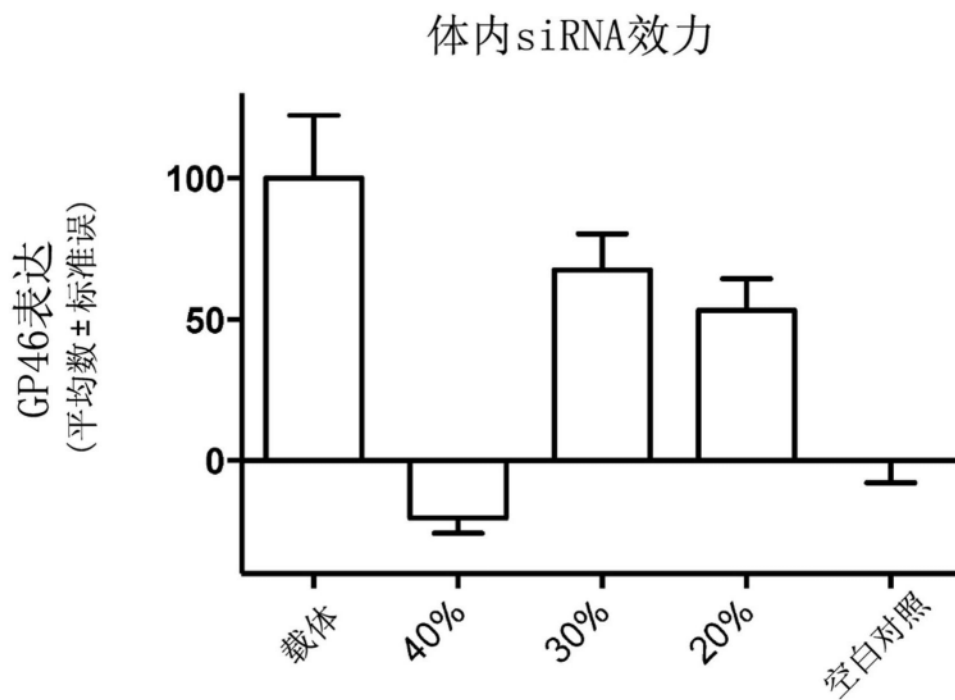


图1

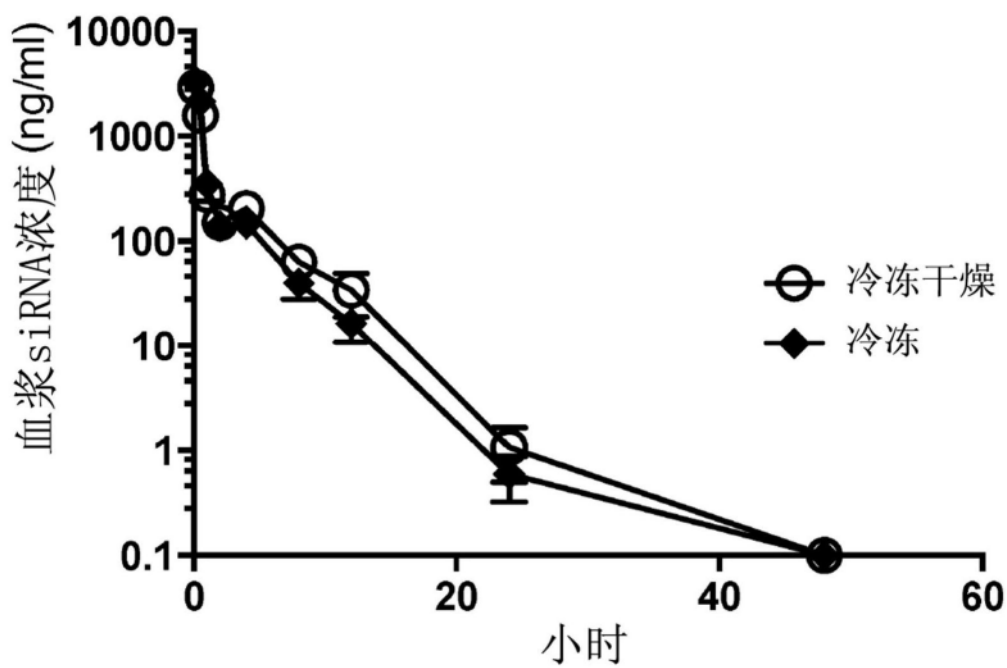


图2