

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第3部門第2区分

【発行日】平成29年12月28日(2017.12.28)

【公開番号】特開2017-165748(P2017-165748A)

【公開日】平成29年9月21日(2017.9.21)

【年通号数】公開・登録公報2017-036

【出願番号】特願2017-83327(P2017-83327)

【国際特許分類】

A 6 1 K	31/713	(2006.01)
A 6 1 K	9/127	(2006.01)
A 6 1 K	47/10	(2006.01)
A 6 1 K	47/12	(2006.01)
A 6 1 K	47/18	(2006.01)
A 6 1 K	47/24	(2006.01)
A 6 1 K	47/26	(2006.01)
A 6 1 K	47/28	(2006.01)
A 6 1 K	47/34	(2017.01)
A 6 1 K	47/36	(2006.01)
B 8 2 Y	5/00	(2011.01)
B 8 2 Y	40/00	(2011.01)

【F I】

A 6 1 K	31/713
A 6 1 K	9/127
A 6 1 K	47/10
A 6 1 K	47/12
A 6 1 K	47/18
A 6 1 K	47/24
A 6 1 K	47/26
A 6 1 K	47/28
A 6 1 K	47/34
A 6 1 K	47/36
B 8 2 Y	5/00
B 8 2 Y	40/00

【手続補正書】

【提出日】平成29年11月15日(2017.11.15)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

核酸分子を封入した脂質ナノ粒子を調製するための方法であって、次のステップ：
水混和性有機溶媒中に溶解されたカチオン性脂質、ヘルパー脂質、ステロール、および
PEG脂質を含む、脂質の溶液を調製すること；
前記核酸分子およびpH3.5～6.5の水性緩衝液を含む、第1の水性溶液を調製すること；
前記脂質の溶液を、混合容器内で攪拌されている前記水性溶液中に、25～45% (v

: v) の有機溶媒を含む最終溶液が得られるまで、25～55 の温度にて、一定速度で1～100分かけて注入し、0.06～0.16 (w:w) の核酸:脂質比、および1:2.5～1:1の核酸:脂質の電荷比を有する、脂質ナノ粒子を生成すること；ならびに前記有機溶媒を、中性pHにて第2の水性緩衝溶液に対するダイアフィルトレーションにより、前記混合物から除去すること、
を含み、

ここで核酸は、10～100ヌクレオチド長である、前記方法。

【請求項2】

第2の溶液が、多糖類をさらに含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

多糖類が、スクロース、トレハロース、マンニトール、ソルビトール、キシリトール、ラクトース、マルトースおよびイヌリンからなる群から選択される、請求項2に記載の方法。

【請求項4】

核酸分子を封入した脂質ナノ粒子を凍結乾燥するステップをさらに含む、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項5】

有機溶媒が、エタノールである、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項6】

カチオン性脂質が、脂質の40～60モルパーセントである、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項7】

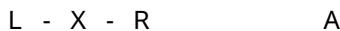
カチオン性脂質が、HEDC、HEDODCおよびHE-Et-DODCからなる群から選択される、請求項1～6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項8】

カチオン性脂質が、永久カチオン性脂質および/またはイオン化可能カチオン性脂質を含む、請求項1～6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項9】

脂質の溶液が、
式(A)の化合物



式中、

- ・脂質(L)は、DSP-E、DOP-E、およびDCからなる群から選択され；
- ・リンカー(X)は、不在、PEG550、PEG2000、PEG-グルタミン酸(-Glu)、Glu、C6、グリシン、およびGluNH、N1,N19-ビス(3-(2-(3-アミノプロポキシ)エトキシ)エトキシ)プロピル)-4,7,10,13,16-ペントオキサノナデカン-1,19-ジアミドからなる群から選択され；および
- ・レチノイド(R)は、トレチノイン、アダパレン、レチノール、4-ヒドロキシ(フェニル)レチニアミド(4-HPR)、レチノイン酸、9-(2,6,6-トリメチルシクロヘキス-1-エン-1-イル)ノナン酸、3,7-ジメチル-9-(2,6,6-トリメチルシクロヘキス-1-エン-1-イル)ノナン酸、3,7-ジメチル-9-(2,2,6-トリメチルシクロヘキシル)ノナン酸、および任意の部分的または完全飽和レチノイドからなる群から選択される、

式(B)の化合物



式中、

- ・リンカー(X)は、N1,N19-ビス(3-(2-(3-アミノプロポキシ)エトキシ)エトキシ)プロピル)-4,7,10,13,16-ペントオキサノナデカン-1,19-ジアミドまたはN1,N19-ビス(16,20-ジアミノ-15-オキソ

- 4 , 7 , 10 - トリオキサ - 14 - アザイコシル) - 4 , 7 , 10 , 13 , 16 - ペンタオキサンナデカン - 1 , 19 - ジアミドであり；および

・レチノイド(R)は、トレチノイン、アダパレン、レチノール、4 - ヒドロキシ(フェニル)レチニアミド(4 - H P R)、およびレチノイン酸、9 - (2 , 6 , 6 - トリメチルシクロヘキス - 1 - エン - 1 - イル)ノナン酸、3 , 7 - ジメチル - 9 - (2 , 6 , 6 - トリメチルシクロヘキス - 1 - エン - 1 - イル)ノナン酸、3 , 7 - ジメチル - 9 - (2 , 2 , 6 - トリメチルシクロヘキシル)ノナン酸、および任意の部分的または完全飽和レチノイドからなる群から選択される。

葉酸、ビタミンE、ペプチドリガンドおよび／またはモノクローナル抗体からなる群から選択される化合物をさらに含む、請求項1～8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

第1の溶液および第2の溶液が、25～55である、請求項1～9のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

第1の緩衝溶液がシトラートを含む、請求項1～10のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 2】

脂質の溶液を、マルチノズルを通して空気 - 水界面に注入することにより、水性溶液に添加する、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 3】

脂質の溶液を、サブマージ注入により水性溶液に添加する、請求項1～12のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 4】

請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の方法により生成された、核酸を封入した脂質ナノ粒子を含む、医薬製剤。

【請求項 15】

カチオン性脂質が、脂質の40～60モルパーセントである、請求項14に記載の医薬剤。

【請求項 1 6】

カチオン性脂質が、HEDC、HEDODC、およびHE-Et-DODCからなる群から選択される、請求項14または15に記載の医薬製剤。

【請求項 17】

カチオン性脂質が、イオン化可能または非イオン化可能な正電荷からなる、請求項 1 4 または 1 5 に記載の医薬製剤。

【請求項 18】

脂質の溶液が、

式 (A) の化合物

L - X - R A

式中、

・脂質（L）は、PSPE、DOPPE、およびDCからなる群から選択され、

・リンカー（X）は、不在、PEG550、PEG2000、PEG-グルタミン酸（-Glu）、Glu、C6、グリシン、およびGluNH、N1,N19-ビス（3-（2-（2-（3-アミノプロポキシ）エトキシ）エトキシ）プロピル）-4,7,10,13,16-ペンタオキサンオデカン-1,19-ジアミドからなる群から選択され；および

・レチノイド(R)は、トレチノイン、アダパレン、レチノール、4-ヒドロキシ(フェニル)レチニアミド(4-HPR)、レチノイン酸、9-(2,6,6-トリメチルシクロヘキス-1-エン-1-イル)ノナン酸、3,7-ジメチル-9-(2,6,6-トリメチルシクロヘキス-1-エン-1-イル)ノナン酸、3,7-ジメチル-9-(2,2,6-トリメチルシクロヘキシル)ノナン酸、および任意の部分的または完全飽和レチノ

イドからなる群から選択される、

式 (B) の化合物



式中、

・リンカー (X) は、N 1, N 19-ビス (3-(2-(2-(3-アミノプロポキシ)エトキシ)エトキシ)プロピル) - 4, 7, 10, 13, 16-ペンタオキサンナデカン - 1, 19-ジアミドまたはN 1, N 19-ビス (16, 20-ジアミノ-15-オキソ-4, 7, 10-トリオキサ-14-アザイコシル) - 4, 7, 10, 13, 16-ペンタオキサンナデカン - 1, 19-ジアミドであり；および

・レチノイド (R) は、トレチノイン、アダパレン、レチノール、4-ヒドロキシ(フェニル)レチニアミド (4-HPR)、およびレチノイン酸、9-(2, 6, 6-トリメチルシクロヘキス-1-エン-1-イル)ノナン酸、3, 7-ジメチル-9-(2, 6, 6-トリメチルシクロヘキス-1-エン-1-イル)ノナン酸、3, 7-ジメチル-9-(2, 2, 6-トリメチルシクロヘキシル)ノナン酸、および任意の部分的または完全飽和レチノイドからなる群から選択される、

葉酸、ビタミン E、ペプチドリガンドおよび / またはモノクローナル抗体

からなる群から選択される化合物をさらに含む、請求項 14 ~ 17 のいずれか一項に記載の医薬製剤。

【請求項 19】

方法がさらに、核酸を封入した脂質ナノ粒子の凍結乾燥を含む、請求項 14 ~ 18 のいずれか一項に記載の医薬製剤。

【請求項 20】

多糖類をさらに含む、請求項 14 ~ 19 のいずれか一項に記載の医薬製剤。

【請求項 21】

多糖類が、スクロース、トレハロース、ラクトース、マルトースおよびイヌリンからなる群から選択される、請求項 20 に記載の医薬製剤。

【請求項 22】

核酸を封入した脂質ナノ粒子の平均粒子径が、50 ~ 100 nm である、請求項 14 ~ 21 のいずれか一項に記載の医薬製剤。

【請求項 23】

核酸を封入した脂質ナノ粒子が、0.2 未満の多分散性指数を有する、請求項 14 ~ 22 のいずれか一項に記載の組成物。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0010

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0010】

本明細書の一側面は、ポリアニオンを封入した脂質ナノ粒子を調製するための方法であって、水混和性有機溶媒に溶解した脂質を含む第1の溶液を、水性緩衝液中のポリアニオンを含む第2の溶液中に、第2の溶液を攪拌しつつ一定の速度で添加して、有機溶媒を25 ~ 45% (v : v) で含む混合物を生成すること；および有機溶媒を混合物から、中性pHにて水性緩衝溶液に対するダイアフィルトレーションにより除去すること、のステップを含む、前記方法である。第1の溶液の第2の溶液への添加は、好ましくは1 ~ 100分で完了される。ポリアニオンは、核酸、例えばRNA分子であってよい。ポリアニオンは好ましくは、0.08 ~ 0.8 mg / ml の濃度である。脂質ナノ粒子の薬物：脂質比 (w : w) は、好ましくは0.06 ~ 0.16である。脂質ナノ粒子の薬物：脂質の電荷比は、好ましくは1 : 2.5 ~ 1 : 1である。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0016

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0016】

一態様は、核酸、RNA分子、または二本鎖 siRNA分子を含む医薬製剤を含む。好ましくは、脂質ナノ粒子の薬物：脂質比は0.06～0.16(w:w)であり、脂質ナノ粒子の薬物：脂質の電荷比は、1:2.5～1:1である。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0028

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0028】

説明の方法は従来方法に比べて、0.2未満、好ましくは0.1未満のPDIの粒子の集団を、予備形成された小胞を生成するために必要な追加のステップなしで再現性よく生成できることにより、利点を有する。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0093

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0093】

脂質-核酸粒子について、最終的なRNA濃度は0.001～1mg/ml、好ましくは0.01～0.5mg/ml、最も好ましくは0.05～0.5mg/mlである。最終的な薬物/脂質比は、0.06～0.16w:w(1:2.5～1:1の電荷:電荷比)である。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0097

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0097】

凝集体の形成は、例えば粒子表面の脱水のために、凍結乾燥の凍結および/または乾燥のステップ中に生じる可能性がある。凍結プロセスは、氷が形成されるにつれて粒子間の距離が短縮される、濃縮効果を有する(Alison et al., Biochim Biophys Acta. 2000 Sep 29;1468(1-2):127-38; Armstrong and Anchordoqui, J Pharm Sci. 2004 Nov;93(11):2698-709)。この脱水は、凍結乾燥前の懸濁液に、多糖類などの溶解保護剤(Iyoprotectant)を使用することによって回避することができる。適切な多糖類は、スクロース、ラクトース、マルトース、トレハロース、またはセロビオース、コージビオース、ニゲロース、イソマルトース、トレハロース、ソホロース、ラミナリビオース、ゲンチオビオース、ツラノース、マルツロース、パラチノース、ゲンチオビウロース(gentiobiofuranose)、マンノビオース(mannobiofuranose)、メリビオース、メリビウロース(melibiofuranose)、ルチノース、ルチヌロース(rutinofuranose)、およびキシロビオースを含む。一態様において、組成物は、スクロースである多糖類を含む。別の態様において、組成物は、トレハロースである多糖類を含む。出願人らによる結果は、出発懸濁液と比較した場合に、等価のDLSサイズ分布が再構成時に得られることを示している。

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0142

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0142】

表4は、水和温度の25から45への上昇が、粒子サイズを135.7から102.2nmに減少させ、一方でsiRNA回収率を80%から87%に改善することを示す。最終エタノールパーセントの上昇は、siRNA回収率に影響を与ることなく粒子サイズを増加させたが、封入効率を88%に低下させた。

【表4】

表4

水和温度 [°C]	最終 EtOH%	体積平均径 [nm]			EE [%]	siRNA回 収率[%]
		平均	SD	PDI		
25	35	135.7	15.9	0.057	95	80
35	25	103.8	9.8	0.178	94	84
35	35	113.8	15.5	0.156	94	87
35	45	130.8	11.7	0.136	88	86
45	35	102.2	3.4	0.182	93	87