

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
A61K 31/70
A61K 47/16 A61K 47/24
A61K 9/10
//C07H21/02



[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 99806563.3

[45] 授权公告日 2004 年 9 月 15 日 [11] 授权公告号 CN 1166366C

[22] 申请日 1999.5.24 [21] 申请号 99806563.3
[30] 优先权
[32] 1998. 5. 25 [33] JP [31] 142763/1998
[86] 国际申请 PCT/JP1999/002713 1999.5.24
[87] 国际公布 WO1999/061032 日 1999.12.2
[85] 进入国家阶段日期 2000.11.24
[71] 专利权人 日本新药株式会社
地址 日本京都府
[72] 发明人 杉原胜広 关纯造 平林加寿子
审查员 豆波建

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所
代理人 徐 迅

权利要求书 1 页 说明书 10 页 附图 1 页

[54] 发明名称 含有核酸的复合物制剂的制备方法
[57] 摘要

一种制备高质量的、均一的含核酸复合物的制剂的方法，该制剂能进行过滤除菌，该制剂的特征是不含被认为对人体不安全的 7 微米或更大的粗颗粒。含有阳离子载体与核酸聚合物的复合物的该制剂的制备方法，其特征在于，在阳离子载体或形成阳离子载体的材料中分别加入处于单链状态的、能至少部分形成双链的两个单链核酸聚合物，并对所有组分进行分散处理。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种含核酸复合物制剂的制备方法，所述复合物制剂含有阳离子载体与核酸聚合物，其特征在于，在所述含核酸复合物制剂的制备过程中，在阳离子载体或能形成阳离子载体的原料中，分别加入两个单链形式的能至少部分形成双链的单链核酸聚合物，然后对混合物进行分散处理，其中阳离子载体是 2-O-(2-二乙基氨基乙基)氨基甲酰-1,3-O-二油酰基甘油和磷脂作为必要组分形成的药物载体。
5
2. 根据权利要求 1 所述的含核酸复合物制剂的制备方法，其中能至少部分形成双链的两个单链核酸聚合物的平均碱基数均在 100 至 2000 范围内。
- 10 3. 根据权利要求 1 或 2 所述的含核酸复合物制剂的制备方法，其中能至少部分形成双链的两个单链核酸是聚 I 和聚 C。
4. 根据权利要求 1 所述的含核酸复合物制剂的制备方法，其中磷脂是卵磷脂。
5. 一种用权利要求 1 所述的制备方法获得的含核酸复合物制剂，它含有阳离子载体与核酸聚合物的复合物，其中阳离子载体是 2-O-(2-二乙基氨基乙基)氨基甲酰-
15 1,3-O-二油酰基甘油和磷脂作为必要组分形成的药物载体。
6. 根据权利要求 5 所述的含核酸复合物制剂，其中核酸聚合物的浓度在 0.1 至 10 毫克/毫升的范围内。

含有核酸的复合物制剂的制备方法

5

技术领域

本发明涉及含有阳离子载体和核酸聚合物的复合物制剂。该复合物有时称为脂质复合物(lipoplex)。

本文所用的术语“阳离子载体”指在水中有阳性电荷、能有效输送药物(尤其是将阴离子药物输送入细胞)的药物载体。最近已深入研究了以阳离子载体作为药物载体将基因和 RNA(如聚 I:C)输送入细胞。

“核酸聚合物”指天然存在的或合成或半合成的多核苷酸(DNA, RNA), 以及天然存在的、合成的或半合成的寡核苷酸。

15

背景技术

含有阳离子载体与具有双螺旋结构的聚阴离子双链核酸聚合物的复合物的含核酸复合物制剂只能通过将阳离子载体与双链核酸聚合物混合来制备。

然而, 在用该方法制得的含核酸复合物制剂中, 其颗粒通常较粗, 直径为数微米至数百微粒, 而且不均一。具有这些粗大的不均一颗粒的含核酸复合物制剂有这样的缺点, 即, 在关于核酸聚合物向胞内转移和信号表达方面没有充分地获得均一的数据。关于颗粒粗大的最关键问题是, 很难在工业规模上进行灭菌, 而且在静脉内给药的情况下, 尽管药剂是根据其安全给予人用的前提来制备的, 但是在注射针或毛细血管内可能会发生栓塞等现象。这些问题很难用上述单单通过混合来制备复合物制剂的方法解决, 而且也很难通过采用合适的乳化分散装置的分散方法来解决。

为使复合物制剂稳定化进行冷冻干燥而导致颗粒沉淀也是一个问题。

为了减少给药量, 在给药时减轻患者和医护人员的负担, 并且为了获得复合物制剂的生产效率, 希望复合物制剂中的核酸聚合物有高的浓度。然而, 在用传统方法时, 当核酸聚合物的总量为 0.1 毫克/毫升或更高, 尤其是 0.5 毫克/毫升或更高时, 在生产过程中发生显著的凝集, 产生了肉眼易确认的大的沉淀或悬浮固体。这些不能用任何分散方法来充分地分散。

从生理特性和对各种核酸酶的稳定性出发, 传统地根据常识采用具有双螺旋结构的双链的基因和 RNA(如聚 I:C)。例如, 已经知道, 通过分开给予聚 I 和聚 C 来代

替具有生理活性(如强的干扰素诱导作用和免疫增强作用等)的聚 I:C 没有获得足够的药理效果(Archives of Virology, 51, 199-215(1976))。因此, 已认为具有双螺旋结构的双链是基因以及诸如聚 I:C 的 RNA 所必需的。

对于含有阳离子载体与核酸聚合物的复合物的含核酸复合物制剂, 没有讨论双螺旋结构的必要性, 且在复合物制剂的生产过程中通常采用具有双螺旋结构的双链 DNA 和双链 RNA。

本申请人已经提交了作为癌细胞系中核酸酶激活制剂的含核酸复合物制剂的专利申请, 含核酸复合物制剂由阳离子载体和诸如聚 I:C 的双链 RNA 组成, 因为它激活了癌细胞中的核酸酶, 从而有效地治疗癌症; 本申请人还提交了含有核酸复合物制剂作为肝炎治疗剂的申请, 因为它们能长时间地诱导出对肝脏和脾脏特异的有效量的干扰素(PCT/JP98/04695, PCT/JP99/01438)。

发明揭示

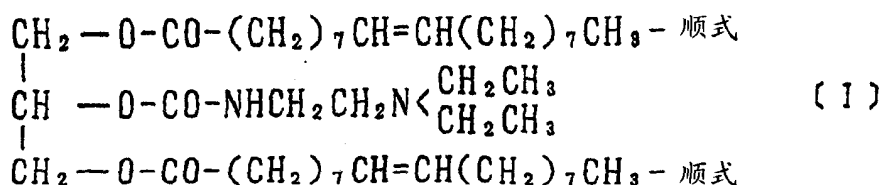
本发明的目的具体是提供一种制备高质量的均一的含核酸复合物制剂的方法, 该制剂的特征是能进行所谓的过滤除菌, 且该制剂不含被认为对人体安全有害的 7 微米或更大的粗颗粒。

本发明者首次发现, 在含有阳离子载体以及核酸聚合物的复合物的含核酸复合物制剂的制备过程中, 通过使用从双螺旋结构分离出的或最初未形成双链结构的具有单链的核酸聚合物, 而不使用通常具有双螺旋结构的双链 DNA 或双链 RNA, 可以一举解决上述问题而不会影响其药理活性, 从而完成了本发明。

因此, 本发明可包括一种制备含核酸复合物制剂的方法, 该方法的特征在于, 在所述含有阳离子载体和核酸聚合物的复合物的含核酸复合物制剂(后文称为“含核酸复合物制剂”)的制备过程中, 在阳离子载体或能形成阳离子载体的原料中, 分开加入两个单链形式的、至少能部分形成双链的单链核酸聚合物, 并进行分散处理。

下面将详细描述本发明。

适用于本发明的“阳离子载体”包括 PCT WO94/19314 中公开的药物载体, 如下式结构式[I]表示的 2-O-(2-二乙基氨基乙基)氨基甲酰-1,3-O-二油酰基甘油(后文称“化合物 A”), 以及磷脂作为必要成分形成的药物载体, 和诸如聚赖氨酸的药物载体, 此外还有市售的 Lipofectin(脂转染试剂, 商品名)、Lipofectamine(脂转染胺试剂, 商品名)、Lipofectace(商品名)、以及 DMRIE-C(商品名)。



适用于本发明的“两个单链核酸聚合物”例如包括，构成天然基因或人工重组的基因(如质粒)的两个单链 DNA 和单链 RNA，两个单链 RNA 如聚 I 和聚 C、聚 A 和聚 U、聚 I 和聚 C₁₂U、部分经化学修饰的聚 I(如聚(7-脱氮肌苷酸))和聚 C、聚 I 和有部分化学修饰的聚 C(例如聚(5-溴胞苷酸)、聚(2-硫代胞苷酸))，但是并不局限于这些，只要它们是能至少部分形成双链的单链核酸聚合物即可。本发明适用于两个单链 RNA，如聚 I 和聚 C，它们构成了具有生理活性(例如强的诱导干扰素的作用)的聚 I:C。本文所用的“聚 I”、“聚 C”、“聚 A”、“聚 U”和“聚 C₁₂U”分别指聚肌苷酸、聚胞苷酸、聚腺苷酸、聚尿苷酸以及胞苷酸和尿苷酸的共聚物(其中大约每 12 个胞苷酸中有一个被尿苷酸置换)。

“能至少部分形成双链”指互补的碱基处于这样的程度下，即生理条件下它们能在两个单链核酸聚合物中存在而形成双链的程度，而该程度因两个单链核酸聚合物的种类以及每个核酸聚合物的长度而异，具体地说，互补碱基的长度为 20 个碱基或更高。

每个单链核酸聚合物所具有的碱基数合适的为 10000 或更小，较佳的为 2000 或较小，更佳的在 100-2000 范围内，但并非特别局限于这些。碱基数可根据每个核酸聚合物所具有的特性来合适地选择。另外，两个单链核酸聚合物不必由数目相同的碱基组成。通常，每个核酸聚合物存在一个由各种数目的碱基所组成的一定的分布，但是各碱基数是指碱基数的最大分布，在本文中称为“平均碱基数”。

另外，例如可根据有效性和安全性之间的平衡来确定本发明中聚 I 和聚 C 的平均碱基数。具体地说，合适的在 30-3000 碱基范围内，较佳的在 60-2000 碱基范围内，更佳的 100-500 碱基范围内。

由上述化合物 A 和磷脂作为必要组分形成的药物载体(阳离子载体)中的磷脂没有特别的限制，只要它们是药学上可接受的。例如，它们包括磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰肌醇、磷脂酰丝氨酸、鞘磷脂和卵磷脂。还可包括氢化的磷脂。较佳的磷脂可包括卵黄磷脂酰胆碱、卵黄卵磷脂、大豆卵磷脂和卵黄磷脂。可采用两种或多种磷脂。另外，在这些阳离子载体中，磷脂酰胆碱或卵磷脂比阳离子载体中常用的磷脂酰乙醇胺更佳。

磷脂与化合物 A 的组分比因磷脂种类以及施加的两个单链核酸聚合物的种类等

而异,然而,对于1份重量的化合物A,磷脂约为0.1至10份重量,较佳的为0.5至5份重量,更佳的为1至2份重量。当用卵磷脂作为磷脂时,该比例是类似的。

核酸聚合物与阳离子载体的组分比因阳离子载体的来源种类以及所用的核酸聚合物种类等而异,然而,对于10份重量的阳离子载体,核酸聚合物的总量约为0.05至10份重量,较佳的为0.1至4份重量,更佳的为0.5至2份重量。同样,当复合物由聚I和聚C以及以化合物A和磷脂为必要组分制成的阳离子载体形成时,若两个单链核酸聚合物是聚I和聚C,则对于10份重量的阳离子载体来说,聚I和聚C的总量约为0.05至10份重量,较佳的为0.1至4份重量,更佳为0.5至2份重量。

本发明的含核酸复合物制剂(后文称为“本发明制剂”)例如可以这样制得:在分散有市售阳离子载体的水溶液中,或是分散了阳离子载体原料的水溶液经合适的乳化分散仪根据常规方法分散处理制得的分散有阳离子载体的水溶液中,或是在分散有形成阳离子载体的原料的水溶液中,依次或同时加入两种单链核酸聚合物,然后用合适的乳化分散仪通过常规方法来进行分散处理。本发明制剂也可这样制得:将两种单链核酸聚合物加入固体阳离子载体或其原料中,加入水,然后用合适的乳化分散仪对该混合物进行分散处理。加入的次序、体积、浓度、速度以及阳离子载体及其原料在溶液中的浓度是任选的,在本发明中没有特别限制。

更具体地说,当采用化合物A和磷脂作为必要组分制得的阳离子载体时,可在分散有阳离子载体的水溶液中分别逐渐滴入聚I和聚C的水溶液,对形成的混合物进行乳化分散处理,从而制得本发明制剂。本发明的制剂也可用这样的方法制得:对化合物A、磷脂、聚I和聚C进行称重,并加入烧杯中,加入水后用匀浆器粗分散,然后用加压的乳化分散仪进行分散处理。

可以采用通过常规操作分离双链核酸聚合物而获得的两个单链核酸聚合物。具体地说,该操作包括非酶促处理(如60℃或更高温度下加热),或是酶促处理。

上述市售的阳离子载体可不经加工或经适当加工后使用。

上述水溶液可包括注射用水、注射用蒸馏水和诸如生理盐水的电解质溶液以及葡萄糖溶液。

上述乳化分散仪例如包括:均相混合器、匀浆器、超声分散仪、超声匀浆器、高压乳化分散仪、Microfluidizer(商品名)、Nanomizer(商品名)、Ultimizer(商品名)、DeBEE2000(商品名)以及Manton-Gaulin型高压匀浆器,适合于医药用途的这些装置都足够应用。处理条件、时间及处理温度等可适当选择。

本发明制剂可含有适量的医药上容许的添加剂,例如乳化分散辅助剂、稳定剂、等渗剂、冻干助剂和pH调节剂。具体地说,它们可包括有6-22个碳原子的脂肪酸(如

辛酸、癸酸、月桂酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、油酸、亚油酸、花生四烯酸和二十二碳六烯酸)、及其医药上容许的盐(例如钠盐、钾盐和钙盐)、乳化分散助剂例如白蛋白和葡聚糖, 稳定剂如胆固醇和磷脂酸, 等渗剂例如氯化钠、葡萄糖、麦芽糖、乳糖和蔗糖, 冻干助剂, 以及 pH 调节剂如盐酸、硫酸、磷酸、乙酸、氢氧化钠、氢氧化钾和三乙醇胺。

上述医药上容许的任选调节剂可在分散前或分散后通过合适的方法加入。

分散后, 可使制剂任选地过滤通过 0.2 微米的滤膜除菌, 然后灌装入安瓿和小管内。几乎所有的本发明复合物的粒径均为 200 纳米或更小。因此, 约 100%的本发明制剂能通过 0.2 微米的除菌滤膜。

10 利用本发明的上述制备方法, 可以获得含有均一的细复合物颗粒的含核酸复合物制剂, 进而可获得溶液中含有 0.1 毫克/毫升以上的核酸聚合物的含核酸复合物制剂。

因此, 本发明还包括用上述制备方法获得的含核酸复合物制剂以及用上述制备方法获得的、且溶液中核酸聚合物的浓度为 0.1-10 毫克/毫升、在 0.5-10 毫克/毫升、15 1-10 毫克/毫升或 2-10 毫克/毫升的含核酸复合物制剂。另外, 本发明也不排除溶液中核酸聚合物的浓度比 10 毫克/毫升更高。

另外, 如果将通过如上所述分散处理制得的本发明制剂冷冻干燥, 则它们可以是本发明的冻干制剂。因此, 该冻干制剂也是本发明的制剂之一。冷冻干燥可用常规方法来进行。

20 本发明的冻干制剂例如可这样冷冻干燥获得, 即在分注入小管后, 在约-40℃至-20℃的条件下预冷冻约 2 小时, 然后在 0-10℃下初次减压干燥, 然后在约 15-25℃下二次减压干燥。通常在小管内填充氮气, 给小管塞上塞子, 从而获得本发明的冻干制剂。在采用冷冻干燥时, 宜使用形成冻干饼的冻干助剂。糖类是特别合适的, 而其中二糖、尤其是麦芽糖是最佳的。

25 本发明的冻干助剂通常可通过加入任选的合适溶液(重建溶液)再溶解并使用。这些重建溶液可包括注射用水、葡萄糖溶液、诸如生理盐水的电解质溶液以及其它一般输液。这些重建溶液的液体体积根据用途而异, 且没有特别限制, 但是冻干前液体体积的 0.5 至 2 倍或是 500 毫升或更少是合适的。

本发明制剂可以液体制剂形式(如注射剂和点滴剂)或冻干制剂形式来提供。

30 本发明制剂可以各种给药途径给予动物(包括人), 这些给药途径例如有静脉内给药、动脉内给药、皮下给药、肌内给药、吸入给药、滴鼻给药、滴眼给药、口服和直肠给药。剂型和剂量可根据需要来适当选择。另外, 该制剂还可用于动物、

植物、真菌和细菌等的培养细胞等的各种试剂和药物。

实施发明的最佳方式

下面将通过描述实施例、比较例以及试验例来更详细地描述本发明。

- 5 在实施例 1 至 5 中，用平均碱基数各约为 200 的聚 I 和聚 C 的单链 RNA 作为原料。另外，在每个实施例中分散过程后用 0.2 微米滤膜进行过滤灭菌时，过滤灭菌可以成功地进行而不会堵塞滤膜，所有核酸聚合物的滤液回收得率均为 98 至 102%，这表明几乎 100%可能过滤灭菌。

10 实施例 1

- 在 2 克化合物 A 和 2 克纯化的蛋黄卵磷脂中加入溶解了 40 克麦芽糖的 100 毫升注射用水，用匀浆器搅拌混合分散 5 分钟，获得阳离子载体的粗制分散液。用实验用小型乳化分散仪进一步分散 1 小时，用注射用水定容至 250 毫升，获得阳离子载体的分散液。在 250 毫升的该分散液中搅拌加入 75 毫升含有 250 毫克聚 I 的水溶液，然后搅拌加入 75 毫升含有 250 毫克聚 C 的水溶液，用实验用小型乳化分散仪进一步分散 1 小时，然后用 0.2 微米滤膜过滤灭菌，获得本发明制剂。经利用动力学光散射方法的粒径测定装置(DLS-700，大 电子社生产，下同)测得，本发明制剂内复合物颗粒的平均粒径为 138 纳米。另外，不含粒径为 1 微米或更大的颗粒。
- 15

- 随后，将 1 毫升本发明的该制剂分注到每个小管内，根据常规方法进行冷冻干燥制备。加入 0.9 毫升注射用水来重建所得冻干制剂。经利用动力学光散射方法的粒径测定装置(DLS-700，大 电子社生产，下同)测得，本发明的重建制剂中复合物颗粒的平均粒径为 140 纳米。而且，不含粒径为 1 微米或更大的颗粒。
- 20

实施例 2

- 25 在 50 克化合物 A 和 30 克卵黄磷脂中加入溶解了 4 千克蔗糖的 10 升注射用水，用 Manton-Gaulin 高压匀浆器分散该混合物 10 分钟，然后用注射用水定容至 25 升，获得阳离子载体分散液。在 20 升该分散液中搅拌加入 6 升含有 50 克聚 C 的水溶液，然后搅拌加入 6 升含有 50 克聚 I 的水溶液。用盐酸将该分散液的 pH 值调节至 5.5，用 Manton-Gaulin 高压匀浆器分散该分散液 30 分钟，然后用 0.2 微米滤膜过滤灭菌，获得本发明制剂。测得本发明制剂中复合物颗粒的平均粒径为 150 纳米。而且，不含粒径为 1 微米或更大的颗粒。
- 30

 随后，将 20 毫升本发明该制剂分注到每个小管内，根据常规方法进行冷冻干燥

制备。加入市售的 5%葡萄糖输液(500 毫升)来重建所得冻干制剂。经利用动力学光散射方法的粒径测定装置测得, 本发明的重建制剂中复合物颗粒的平均粒径为 151 纳米。而且, 不含粒径为 1 微米或更大的颗粒。

5 实施例 3

将 2 克化合物 A、2 克大豆卵磷脂、25 毫克聚 I 和 25 毫克聚 C 加入烧杯, 并在烧杯中加入溶解了 20 克葡萄糖的 100 毫升注射用水, 然后搅拌混合烧杯内的物质, 用匀浆器分散 5 分钟。用实验用小型高压乳化分散仪(800 千克/平方厘米)分散粗制分散液 1 小时, 用注射用水定容至 400 毫升, 然后用 0.2 微米滤膜过滤除菌, 获得本
10 发明制剂。经利用动力学光散射方法的粒径测定装置测得, 本发明此制剂中复合物颗粒的平均粒径为 121 纳米。而且, 不含粒径为 1 微米或更大的颗粒。

实施例 4

在 1.2 克化合物 A 和 2.0 克纯化的卵黄卵磷脂中加入溶解了 40 克麦芽糖的 100
15 毫升注射用水, 搅拌混合, 用实验用小型高压乳化分散仪分散 30 分钟, 然后用注射用水定容至 250 毫升, 获得阳离子载体的分散液。在 250 毫升此分散液中于搅拌下同时逐渐滴入 75 毫升含有 100 毫克聚 I 的水溶液以及 75 毫升含有 100 毫克聚 C 的水溶液, 用实验用小型加压乳化分散仪(1100 千克/平方厘米)进一步分散 2 小时, 然后用 0.2 微米滤膜过滤除菌, 获得本发明制剂。经利用动力学光散射方法的粒径测定装置测得, 本发明此制剂中复合物颗粒的平均粒径为 124 纳米。而且, 不含粒径
20 为 1 微米或更大的颗粒。

另外, 当用采用激光衍射散射方法的粒径测定装置(LA-910, 堀场制作所社生产, 下同)来测定本发明制剂的粒径大小分布时, 获得了图 1 所示的结果。根据该结果, 粒径大小分布的峰值为 139 纳米, 没有检测到有粗颗粒。

25

实施例 5

将溶解了 40 克麦芽糖的 100 毫升注射用水加入 4.8 克化合物 A 和 8.0 克纯化的卵黄卵磷脂中, 搅拌混合, 用实验用小型高压乳化分散仪分散 30 分钟, 然后用注射用水定容至 250 毫升, 获得阳离子载体分散液。在 250 毫升此分散液中于搅拌下
30 同时逐渐滴入 75 毫升含有 400 毫克聚 I 的水溶液和 75 毫升含有 400 毫克聚 C 的水溶液, 用实验用小型高压乳化分散仪(1100 千克/平方厘米)进一步分散 2 小时, 然后用 0.2 微米滤膜过滤除菌, 获得本发明制剂。经利用动力学光散射方法的粒径测定装置

测得，本发明此制剂中复合物颗粒的平均粒径为 138 纳米。而且，不含粒径为 1 微米或更大的颗粒。

实施例 6

5 在 70℃ 水浴中加热含有 100 微克市售 DNA 质粒载体(pMCIneo)的 1 毫升水溶液，同时搅拌 3 小时。在该溶液中加入以类似方式加热至 70℃ 的 2 毫升含有 2 毫克市售 Lipofectin(商品名)的分散液并搅拌，用探头型超声分散仪于 70℃ 分散该混合物 10 分钟，然后用 0.2 微米滤膜过滤除菌，获得本发明制剂。经利用动力学光散射方法的粒径测定装置测得，本发明此制剂中复合物颗粒的平均粒径为 145 纳米。而且，不含粒径为 1 微米或更大的颗粒。

实施例 7

用平均碱基数约为 1500 的聚 I 和聚 C 单链 RNA 作为原料。

15 将溶于 100 毫升注射用水的 40 克麦芽糖加入 1.2 克化合物 A 以及 2.0 克纯化的卵黄卵磷脂中，搅拌混合，用实验用小型高压乳化分散仪分散 30 分钟，然后用注射用水定容至 250 毫升，获得阳离子载体的分散液。在 250 毫升该分散液中于搅拌下同时滴入 75 毫升含有 100 毫克聚 I 的水溶液以及 75 毫升含有 100 毫克聚 C 的水溶液，用实验用小型高压乳化分散仪(1100 千克/平方厘米)进一步分散 2 小时，然后用 0.2 微米滤膜过滤除菌，获得本发明制剂。经利用动力学光散射方法的粒径测定装置

20 测得，本发明此制剂中复合物颗粒的平均粒径为 134 纳米。而且，不含粒径为 1 微米或更大的颗粒。

实施例 8

用与实施例 7 类似的方法，800 千克/平方厘米的分散处理压力，200 毫克平均

25 碱基数约为 350 的聚 I 以及 200 毫克平均碱基数约为 350 的聚 C，获得平均粒径为 130 纳米的本发明制剂。

实施例 9

用与实施例 7 类似的方法，800 千克/平方厘米的分散处理压力，200 毫克平均

30 碱基数约为 1450 的聚 I 以及 200 毫克平均碱基数约为 1450 的聚 C，获得平均粒径为 150 纳米的本发明制剂。

实施例 10

用与实施例 7 类似的方法, 800 千克/平方厘米的分散处理压力, 400 毫克平均碱基数约为 80 的聚 I 以及 400 毫克平均碱基数约为 80 的聚 C, 获得平均粒径为 135 纳米的本发明制剂。

5

比较例 1(对应于实施例 4 用常规方法生产)

将溶于 100 毫升注射用水的 40 克麦芽糖加入 1.2 克化合物 A 和 2.0 克纯化的卵黄卵磷脂中, 搅拌混合, 用实验用小型高压乳化分散仪分散 30 分钟, 然后用注射用水定容至 250 毫升, 获得阳离子载体分散液。在搅拌下将 150 毫升含有 200 毫克长约 200 碱基对的双链聚 I:C 的水溶液逐渐滴入该分散液中, 用实验用小型高压乳化分散仪(1100 千克/平方厘米)进一步分散 2 小时, 获得比较用制剂。经利用动力学光散射方法的粒径测定装置测得, 该比较用制剂中复合物颗粒的平均粒径为 182 纳米。

另外, 当用采用激光衍射散射方法的粒径测定装置以实施例 4 中相同方式来测定该比较用制剂的粒径大小分布时, 获得了图 2 所示的结果。根据该结果, 粒径大小分布的峰值为 243 纳米, 然而检测到有直径 8000 纳米的分布峰值的 3-20 微米的粗颗粒约 20%, 这表明颗粒呈双峰分布。

另外, 在试图使该比较用制剂过滤通过 0.2 微米滤膜时, 只有 50 毫升制剂通过该滤膜, 并导致滤膜堵塞, 不能进行过滤除菌。

比较例 2(对应于实施例 5 以常规方法制备)

将溶于 100 毫升注射用水的 40 克麦芽糖加入 4.8 克化合物 A 和 8.0 克纯化的卵黄卵磷脂中, 搅拌混合, 用实验用小型高压乳化分散仪分散 30 分钟, 然后用注射用水定容至 250 毫升, 获得阳离子载体分散液。在 250 毫升该分散液中于搅拌下逐渐滴入 150 毫升含有 800 毫克长约 200 碱基对的双链聚 I:C 的水溶液, 然后用实验用小型高压乳化分散仪(1100 千克/平方厘米)进一步分散 2 小时, 以收集比较用制剂。该比较用制剂是白色可沉淀悬浮液, 在收集后 5 分钟内发生凝集沉淀。它与酒糟悬浮液相似。不能测定粒径, 因为它们的大小超过了采用动力学光散射方法的粒径测定装置的测定范围。它们不能通过 0.2 微米滤膜来过滤除菌。

试验例 1

通过它们对子宫颈癌细胞(HeLa S3)增殖的抑制作用, 评价实施例 4 获得的本发明制剂以及比较例 1 获得的比较用制剂的生物活性。

在实验中，将 HeLa S3 细胞以 10^4 细胞/孔的浓度接种在 96 孔板上，在培育 5 小时或更长确认后与孔粘附，然后在培养物中加入各种制剂，然后继续培养，加入制剂后 3 天用 MTT 方法计数活细胞数。根据下式获得抑制率，计算 IC_{50} 的数值。结果显示在表 1 中。

5 $IC_{50} = [1 - (\text{制剂处理细胞的吸收度} / \text{盐水处理细胞的吸收度})] \times 100\%$

表 1

	IC_{50} 值(毫微克/毫升)
实施例 4 的本发明制剂	8.6 ± 2.5
比较例 1 的比较用制剂	8.7 ± 1.2

IC_{50} 值用聚 I 和聚 C 合并后的总核酸聚合物浓度表示。

如表 1 所示，实施例 4 的本发明制剂与比较例 1 的比较用制剂的生物活性没有差别。

10

发明效果

本发明例如具有以下效果。

- (1)能制得均一的、高质量的、没有粗的复合物颗粒的含核酸复合物制剂。
- (2)能制得均一的、高质量的、基本上不含复合物粗颗粒的含核酸复合物制剂。
- 15 该效果在较高浓度的核酸聚合物情况下尤为显著。
- (3)在重建根据本发明制得的含核酸复合物制剂的冻干制剂时，可以重建得到与冻干前同等的含核酸复合物制剂。
- (4)能提供基本上能 100%通过 0.2 微米除菌滤膜的含核酸复合物制剂。

20 附图简述

图 1 显示了实施例 4 的本发明制剂中复合物颗粒的粒径分布。横轴、左纵轴和右纵轴分别代表粒径(微米)、频度(%)和累积频度(%)。

图 2 显示了比较例 1 的比较用制剂中复合物颗粒的粒径分布。横轴、左纵轴和右纵轴分别代表粒径(微米)、频度(%)和累积频度(%)。

25

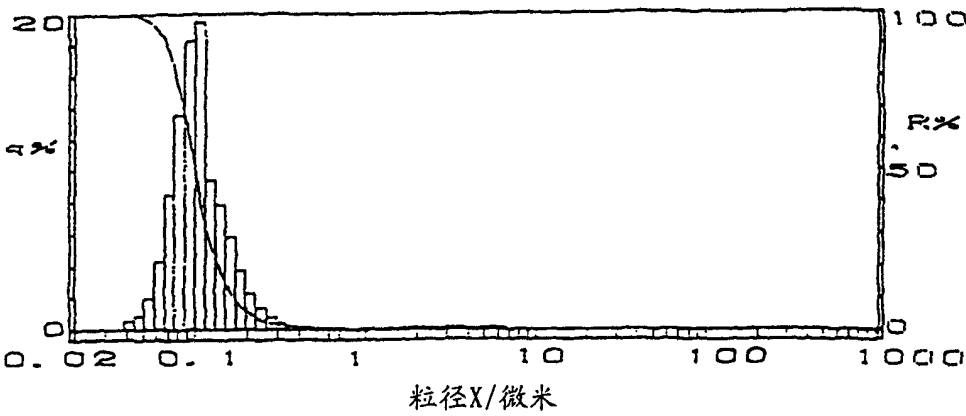


图 1

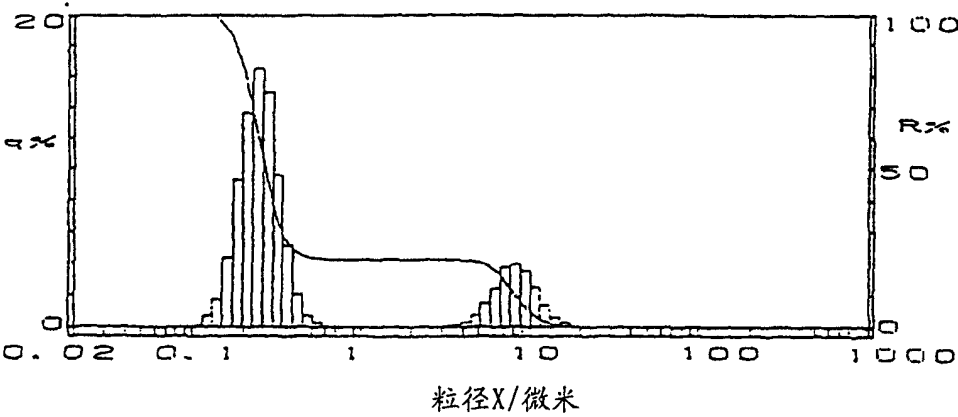


图 2