



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I732773 B

(45)公告日：中華民國 110 (2021) 年 07 月 11 日

(21)申請案號：105123227

(22)申請日：中華民國 105 (2016) 年 07 月 22 日

(51)Int. Cl. : *A61K9/14 (2006.01)*
*C12N15/113 (2010.01)**A61K9/19 (2006.01)*

(30)優先權：2015/07/22 美國

62/195,356

(71)申請人：日商日東電工股份有限公司 (日本) NITTO DENKO CORPORATION (JP)
日本

(72)發明人：雅達米 羅傑 ADAMI, ROGER (US)；王 裕偉 WANG, YUWEI (US)；尹 海青 YIN, HAIQING (US)；王 立平 WANG, LIPING (US)；劉 棟 LIU, DONG (US)；應 文彬 YING, WENBIN (US)

(74)代理人：李世章

(56)參考文獻：

CN 103748078A

US 2011/0237686A1

審查人員：徐永任

申請專利範圍項數：43 項 圖式數：2 共 84 頁

(54)名稱

用於奈米顆粒冷凍乾燥形式的組成物及方法

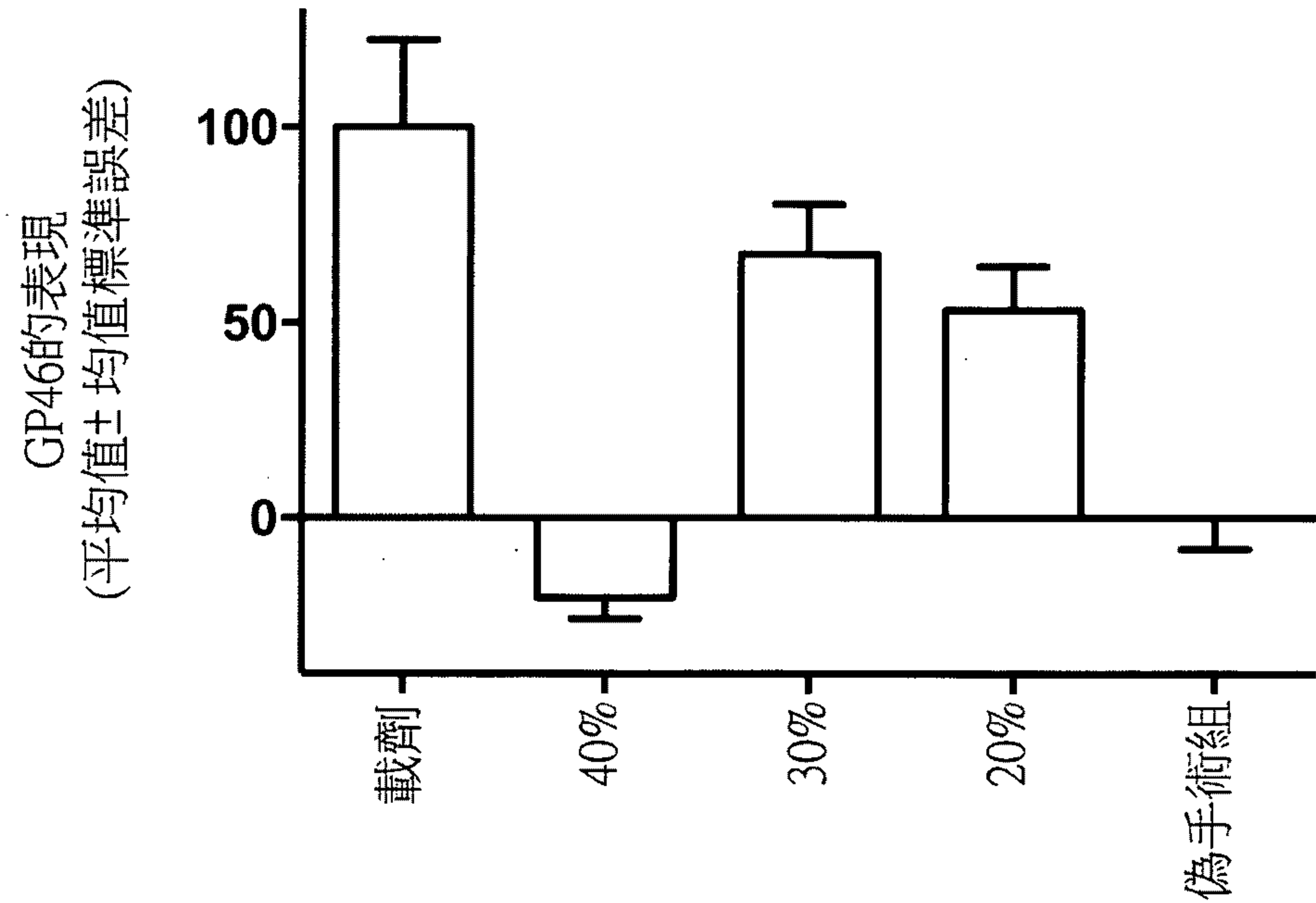
(57)摘要

本發明提供用於製造由一或更多種核酸活性劑所組成之固態冷凍乾燥物的組成物，該等固態冷凍乾燥物可重新復原成藥品。該組成物可包括由脂質奈米顆粒混於藥學可接受溶液中所形成的水性懸浮液，其中該等脂質奈米顆粒內包裹著一或更多種核酸活性劑、糊精化合物及醣類化合物。該等核酸活性劑可為能夠調節 RNA 干擾作用的 RNAi 分子以及其他 RNA 及寡聚核苷酸。

This invention provides compositions for making a solid lyophile of one or more nucleic acid active agents, which can be reconstituted as a drug product. The composition can include an aqueous suspension of lipid nanoparticles in a pharmaceutically acceptable solution, wherein the lipid nanoparticles encapsulate one or more nucleic acid active agents, a dextrin compound, and a saccharide compound. The nucleic acid active agents can be RNAi molecules capable of mediating RNA interference, as well as other RNAs and oligonucleotides.

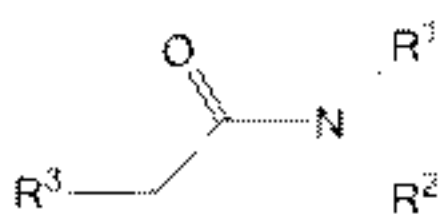
指定代表圖：

siRNA在活體內的效力



第1圖

特徵化學式：





申請日： 105年7月22日

I732773

IPC分類： A61K 9/14 (2006.01)
A61K 9/19 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)

【發明摘要】

【中文發明名稱】用於奈米顆粒冷凍乾燥形式的組成物及方法

【英文發明名稱】 COMPOSITIONS AND METHODS FOR NANOPARTICLE
LYOPHILE FORMS

【中文】

本發明提供用於製造由一或更多種核酸活性劑所組成之固態冷凍乾燥物的組成物，該等固態冷凍乾燥物可重新復原成藥品。該組成物可包括由脂質奈米顆粒混於藥學可接受溶液中所形成的水性懸浮液，其中該等脂質奈米顆粒內包裹著一或更多種核酸活性劑、糊精化合物及醣類化合物。該等核酸活性劑可為能夠調節RNA干擾作用的RNAi分子以及其他RNA及寡聚核苷酸。

【英文】

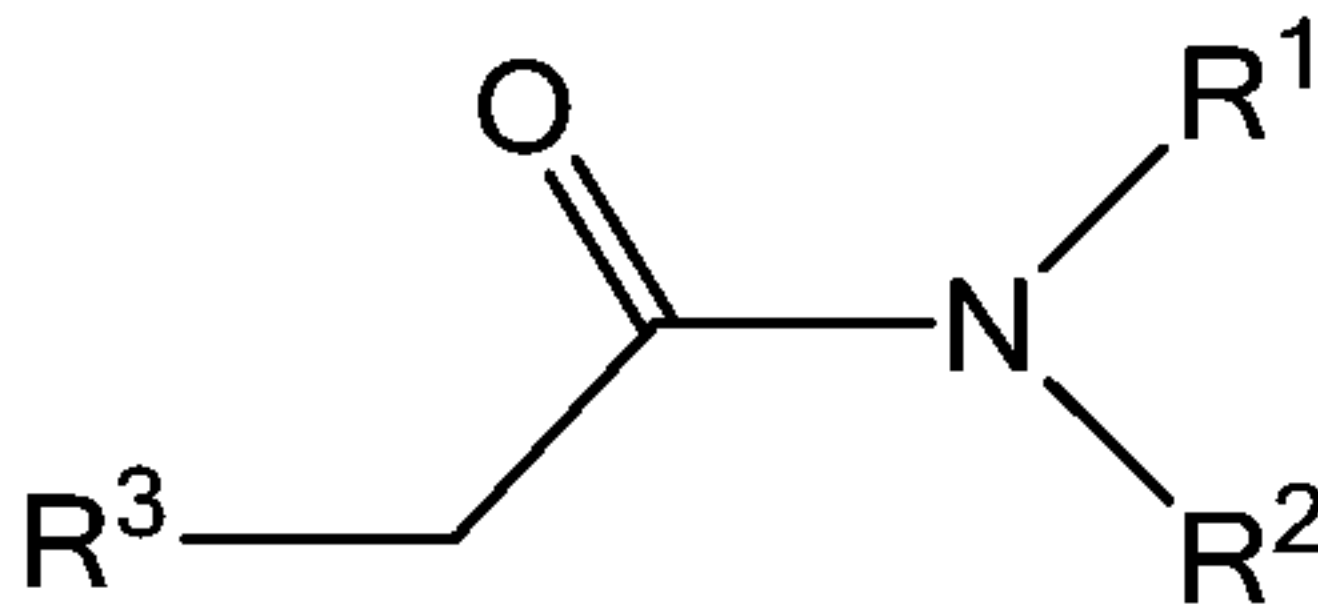
This invention provides compositions for making a solid lyophile of one or more nucleic acid active agents, which can be reconstituted as a drug product. The composition can include an aqueous suspension of lipid nanoparticles in a pharmaceutically acceptable solution, wherein the lipid nanoparticles encapsulate one or more nucleic acid active agents, a dextrin compound, and a saccharide compound. The nucleic acid active agents can be RNAi molecules capable of mediating RNA interference, as well as other RNAs and oligonucleotides.

【指定代表圖】第(1)圖。

【代表圖之符號簡單說明】

無

【特徵化學式】



【發明說明書】

【中文發明名稱】用於奈米顆粒冷凍乾燥形式的組成物及方法

【英文發明名稱】COMPOSITIONS AND METHODS FOR NANOPARTICLE
LYOPHILE FORMS

【技術領域】

【0001】 此申請案主張享有2015年7月22號申請且發明名稱為「用於奈米顆粒冷凍乾燥形式的組成物及方法 (COMPOSITIONS AND METHODS FOR NANOPARTICLE LYOPHILE FORMS)」之美國專利臨時申請案第62/195,356號的優先權，該案內容以引用方式全文併入本案。

【0002】 本發明關於由核酸型分子(nucleic acid based molecule)所組成之生物醫藥及治療藥物的領域。更明確言之，本發明是有關用於製造冷凍乾燥形式之核酸治療組成物的方法及組成物。

【先前技術】

【0003】 以核酸化合物為基礎的治療藥物包括各種RNA形式(例如，siRNA、反義RNA、微型RNA)及各種形式的DNA及質體(plasmid)、雜合寡聚核苷酸(hybrid oligonucleotides)及適配體(aptamer)，等等。

【0004】 核酸治療藥物及其他藥劑的轉染作用 (transfection) 是藉著將活性分子包裹在脂質奈米顆粒中來完成。由於奈米顆粒或其所包裹的內容物會分解，故此方法的缺點包括不能儲存組合物以供後續使用。例如，包裹住 siRNA 分子的脂質奈米粒子組成物在 25°C 下可能僅能保持穩定數分鐘或數小時，且在 4°C 下僅能保持穩定數天或數週。進一步的缺點包括需要極低的溫度來儲存該等脂質奈米顆粒組成物。

【0005】 其中一種可長時間儲存治療組成物的方法是製備成冷凍乾燥形式 (lyophilic form)，該冷凍乾燥形式可儲存及重新復原 (reconstituted) 以提供用來施用治療藥物的調配劑 (formulation)。

【0006】 然而，通常不能製造出含有核酸藥劑的冷凍乾燥形式之脂質奈米顆粒，所以該等脂質奈米顆粒可重新恢復原狀 (regenerated) 並與其所包裹住的核酸藥劑形成穩定的調配劑。冷凍乾燥製程可能破壞該等奈米顆粒及 / 或核酸藥劑。某些方法涉及以化學方式將保護基或成分連接於脂質奈米顆粒或連接至核酸藥劑上，但此種方式是不利的。其他方法可能使用脂質體 (liposome) 作為佐劑，而該等脂質體並非用來包裹該等核酸藥劑。

【0007】 目前依然需要用來提供冷凍乾燥形式之奈米顆粒的組成物及方法，且該等冷凍乾燥形式之奈米顆粒可重新復原並具有令人滿意的性質 (包括轉染活性、顆粒

尺寸、儲存時間及血清穩定性)以用來投遞各種核酸藥劑。

【0008】 故需要可用來形成脂質奈米顆粒之穩定溶液或懸浮液的組成物及化合物，該等奈米顆粒能以固態冷凍乾燥形式來加以儲存，且該等奈米顆粒中包有核酸藥劑。

【發明內容】

【0009】 本發明提供用來製造由核酸分子所組成之治療藥物的方法及組成物。更明確言之，本發明提供用來製造冷凍乾燥形式之核酸型治療組成物的方法及組成物。

【0010】 本發明進一步提供冷凍乾燥形式的奈米顆粒，該等冷凍乾燥形式的奈米顆粒可重新復原成有效的治療組成物，該等組成物可用來遞送治療用的核酸藥劑以用來進行轉染。

【0011】 在某些態樣中，本發明提供用來形成治療性脂質奈米顆粒溶液或懸浮液的組成物及化合物，該等脂質奈米顆粒在冷凍乾燥製程中是穩定的。該等治療性脂質奈米顆粒可包裹住核酸藥劑且能轉換成固態冷凍乾燥形式並以固態冷凍乾燥形式來儲存。該等冷凍乾燥形式可重新復原以提供內包核酸藥劑的治療性脂質奈米顆粒。該等重新復原的脂質奈米顆粒出乎意料地具有優越的轉染性質(包括顆粒大小及分佈)。

【0012】 本發明實施例包括一系列用來形成治療性脂質奈米顆粒溶液或懸浮液的組成物及化合物，該等治療性脂質奈米顆粒可進行冷凍乾燥製程以提供穩定的固態冷凍乾燥形式而可用來長期儲存核酸治療藥物。

【0013】 本發明實施例包括以下實施例：

【0014】 一種用於製造包含一或更多種核酸活性劑之脂質奈米顆粒固態冷凍乾燥物(lyophile)的組成物，該組成物包括：

該等脂質奈米顆粒混於藥學可接受溶液中所形成的水性懸浮液，其中該等脂質奈米顆粒內包裹著該一或更多種核酸活性劑；

糊精化合物；及

醣類糖化合物(saccharide sugar compound)。

【0015】 如上述組成物，其中該等糊精化合物與糖化合物的總量佔該組成物的2%至20%(w/v)。

【0016】 如上述組成物，其中該糊精化合物佔該等糊精化合物與糖化合物之總量的40%至70%(w/v)。

【0017】 如上述組成物，其中該糊精化合物佔該等糊精化合物與糖化合物之總量的40%至55%(w/v)。

【0018】 如上述組成物，其中該糊精化合物佔該等糊精化合物與糖化合物之總量的40%至45%(w/v)。

【0019】如上述組成物，其中當該組成物經冷凍乾燥及重新復原時，該等奈米顆粒的平均尺寸與該初始組成物中的奈米顆粒尺寸相差在10%以內。

【0020】如上述組成物，其中當該組成物經冷凍乾燥、儲存及重新復原，該等奈米顆粒的平均尺寸與該初始組成物中的奈米顆粒尺寸相差在10%以內。

【0021】如上述組成物，其中該已冷凍乾燥的組成物在5°C儲存至少一個月。

【0022】如上述組成物，其中該已冷凍乾燥的組成物在-20°C儲存至少一個月。

【0023】如上述組成物，其中該等奈米顆粒具有45奈米至110奈米的平均直徑。

【0024】如上述組成物，其中該等核酸活性劑的濃度為1毫克/毫升至10毫克/毫升或為3毫克/毫升至5毫克/毫升。

【0025】如上述組成物，其中該一或更多種核酸活性劑為能夠調節RNA干擾作用的RNAi分子。如上述組成物，其中該等RNAi分子為siRNA、shRNA、ddRNA、piRNA或重複相關序列小干擾RNA(rasiRNA)。

【0026】如上述組成物，其中該一或更多種核酸活性劑為miRNA、反義RNA、質體、雜合寡聚核苷酸或適配體。

【0027】如上述組成物，其中該藥學可接受溶液為 HEPES 緩衝液、磷酸鹽緩衝液、檸檬酸鹽緩衝液或含有三(羥甲基)胺基甲烷的緩衝液。

【0028】如上述組成物，其中該糊精化合物是環糊精。

【0029】如上述組成物，其中該環糊精化合物的第2羥基位置、第3羥基位置及第6羥基位置之中的一或更多個位置被磺烷基(sulfoalkyl)、苯磺烷基(benzenesulfoalkyl)、乙醯烷基(alkyl acetate)、羥烷基(hydroxyalkyl)、丁二酸羥烷酯(hydroxyalkyl succinate)、丙二酸羥烷酯(hydroxyalkyl malonate)、戊二酸羥烷酯(hydroxyalkyl glutarate)、己二酸羥烷酯(hydroxyalkyl adipate)、羥烷基(hydroxyalkyl)、順丁烯二酸羥烷酯(hydroxyalkyl maleate)、草酸羥烷酯(hydroxyalkyl oxalate)、反丁烯二酸羥烷酯(hydroxyalkyl fumarate)、檸檬酸羥烷酯(hydroxyalkyl citrate)、酒石酸羥烷酯(hydroxyalkyl tartrate)、蘋果酸羥烷酯(hydroxyalkyl malate)或檸檬康酸羥烷酯(hydroxyalkyl citraconate)基團所取代。

【0030】如上述組成物，其中該環糊精化合物為(2-羥丙基)- β -環糊精、2-羥丙基- β -環糊精丁二酸酯、(2-羥丙基)- γ -環糊精或2-羥丙基- γ -環糊精丁二酸酯。

【0031】如上述組成物，其中該環糊精化合物為磺丁基醚- β -環糊精或磺丁基醚- γ -環糊精。

【0032】如上述組成物，其中該環糊精化合物為甲基- β -環糊精或甲基- γ -環糊精。

【0033】如上述組成物，其中該環糊精化合物連接至聚合物鏈或網狀結構上。

【0034】如上述之組成物，其中該環糊精化合物包括被吸附質(adsorbate)化合物。

【0035】如上述組成物，其中該被吸附質化合物選自於以下群組中：膽固醇(cholesterol)、羊毛甾醇(lanosterol)、酵母甾醇(zymosterol)、酵母甾烯醇(zymostenol)、鏈甾醇(desmosterol)、豆甾烷醇(stigmastanol)、二氫羊毛甾醇(dihydrolanosterol)、7-去氫膽固醇(7-dehydrocholesterol)、聚乙二醇修飾膽固醇(pegylated cholesterol)、乙酸膽甾酯(cholesteryl acetate)、花生四烯酸膽甾酯(cholesteryl arachidonate)、丁酸膽甾酯(cholesteryl butyrate)、己酸膽甾酯(cholesteryl hexanoate)、肉豆蔻酸膽甾酯(cholesteryl myristate)、棕櫚酸膽甾酯(cholesteryl palmitate)、二十二酸膽甾酯(cholesteryl behenate)、硬脂酸膽甾酯(cholesteryl stearate)、辛酸膽甾酯(cholesteryl caprylate)、

正 - 癸酸膽甾酯 (cholesteryl n-decanoate)、月桂酸膽甾酯 (cholesteryl dodecanoate)、二十四烯酸膽甾酯 (cholesteryl nervonate)、壬酸膽甾酯 (cholesteryl pelargonate)、正 - 戊酸膽甾酯 (cholesteryl n-valerate)、油酸膽甾酯 (cholesteryl oleate)、反油酸膽甾酯 (cholesteryl elaidate)、芥子酸膽甾酯 (cholesteryl erucate)、庚酸膽甾酯 (cholesteryl heptanoate)、反亞油酸膽甾酯 (cholesteryl linolelaidate)、亞油酸膽甾酯 (cholesteryl linoleate)、 β - 穀甾醇 (beta-sitosterol)、菜油甾醇 (campesterol)、麥角甾醇 (ergosterol)、蕈苔甾醇 (brassicasterol)、 δ - 7 - 豆甾醇 (delta-7-stigmasterol) 及 δ - 7 - 燕麥甾醇 (delta-7-avenasterol)。

【0036】 如上述組成物，其中該醣類糖化合物是單醣或雙醣糖化合物。

【0037】 如上述組成物，其中該糖化合物選自於以下群組中：蔗糖 (sucrose)、乳糖 (lactose)、乳酮糖 (lactulose)、麥芽糖 (maltose)、海藻糖 (trehalose)、纖維二糖 (cellobiose)、麴二糖 (kojibiose)、糖化麴二糖 (sakebiose)、異麥芽糖 (isomaltose)、槐糖 (sophorose)、海帶二糖 (laminaribiose)、龍膽二糖 (gentiobiose)、松二糖 (turanose)、麥芽酮糖 (maltulose)、異麥芽酮糖

(i s o m a l t u l o s e)、龍膽二酮糖(g e n t i o b i u l o s e)、甘露二糖(m a n n o b i o s e)、蜜二糖(m e l i b i o s e)、蜜二酮糖(m e l i b i u l o s e)及木二糖(x y l o b i o s e)。

【0038】 一種用於製造由一或更多種核酸活性劑所形成之固態冷凍乾燥物的方法，該方法包括冷凍乾燥以上所述之組成物。本發明進一步思及一種使用上述方法所製成的固態冷凍乾燥物及一種藉著重新復原上述固態冷凍乾燥物所製成的藥品。

【0039】 本發明進一步包括一種用於製造核酸藥品的方法，該方法包括以下步驟：

合成脂質奈米顆粒，其中該等脂質奈米顆粒中包裹著一或更多種核酸活性劑；

提供使該等脂質奈米顆粒混於藥學可接受溶液中所形成的水性懸浮液；

在該含有該等脂質奈米顆粒的溶液中加入糊精化合物；

在該含有該等脂質奈米顆粒的溶液中加入醣類糖化合物；

冷凍乾燥該含有該等脂質奈米顆粒的溶液，從而形成固態冷凍乾燥物；

在藥學可接受載劑中重新復原該冷凍乾燥物，從而形成核酸藥品。

【0040】如上述方法，其中該等糊精化合物與醣類糖化合物的總量佔該含有該等脂質奈米顆粒之溶液的2%至20% (w/v)。

【0041】如上述方法，其中該糊精化合物佔該等糊精化合物與醣類糖化合物之總量的40%至70% (w/v)。

【0042】如上述方法，其中該糊精化合物佔該等糊精化合物與醣類糖化合物之總量的40%至55% (w/v)。

【0043】如上述方法，其中該糊精化合物佔該等糊精化合物與醣類糖化合物之總量的40%至45% (w/v)。

【0044】如上述方法，其中當重新復原時，該等奈米顆粒的平均尺寸與該等奈米顆粒在剛合成時的平均尺寸相差在10%以內。

【0045】如上述方法，進一步包括在重新復原之前，儲存該冷凍乾燥物。

【0046】如上述方法，其中該冷凍乾燥物經儲存並重新復原時，該等奈米顆粒的平均尺寸與該等奈米顆粒在剛合成時的平均尺寸相差在10%以內。

【0047】如上述方法，其中該冷凍乾燥物在5°C儲存至少一個月。

【0048】如上述方法，其中該已冷凍乾燥物在-20°C儲存至少一個月。

【0049】如上述方法，其中該等奈米顆粒具有45奈米至110奈米的平均直徑。

【0050】如上述方法，其中該等核酸活性劑的濃度為1毫克/毫升至10毫克/毫升。

【0051】如上述方法，其中該一或更多種核酸活性劑為能夠調節RNA干擾作用的RNAi分子。如上述方法，其中該等RNAi分子為siRNA、shRNA、ddRNA、piRNA或重複相關序列小干擾RNA(rasiRNA)。

【0052】如上述組成物，其中該一或更多種核酸活性劑為miRNA、反義RNA、質體、雜合寡聚核苷酸或適配體。

【0053】如上述方法，其中該藥學可接受載劑為滅菌水、注射用水、滅菌生理食鹽水、注射用抑菌水或霧化溶液(nebulizer solution)。

【0054】如上述方法，其中該藥學可接受載劑為藥學可接受溶液。

【0055】如上述方法，其中該藥學可接受溶液為HEPES緩衝液、磷酸鹽緩衝液、檸檬酸鹽緩衝液或含有三(羥甲基)胺基甲烷的緩衝液。

【0056】如上述方法，其中該糊精化合物是環糊精。

【0057】如上述方法，其中該環糊精化合物的第2羥基位置、第3羥基位置及第6羥基位置之中的一或更多個位置被磺烷基、苯磺烷基、乙醯烷基、羥烷基、丁二酸羥烷酯、丙二酸羥烷酯、戊二酸羥烷酯、己二酸羥烷酯、羥烷基、順丁烯二酸羥烷酯、草酸羥烷酯、反丁烯二酸

羧烷酯、檸檬酸羧烷酯、酒石酸羧烷酯、蘋果酸羧烷酯或檸檬酸羧烷酯基團所取代。

【0058】如上述方法，其中該環糊精化合物為(2-羧丙基)- β -環糊精、2-羧丙基- β -環糊精丁二酸酯、(2-羧丙基)- γ -環糊精或2-羧丙基- γ -環糊精丁二酸酯。

【0059】如上述方法，其中該環糊精化合物為磺丁基醚- β -環糊精或磺丁基醚- γ -環糊精。

【0060】如上述方法，其中該環糊精化合物為甲基- β -環糊精或甲基- γ -環糊精。

【0061】如上述方法，其中該環糊精化合物包括被吸附質化合物。

【0062】如上述方法，其中該醣類糖化合物是單醣或雙醣糖化合物

【0063】如上述方法，其中該藥學可接受載劑為滅菌水、注射用水、滅菌生理食鹽水、注射用抑菌水或霧化溶液。

【0064】如上述方法，其中該藥學可接受載劑是藥學可接受溶液。

【0065】如上述方法，其中該經重新復原之核酸藥品所具有之尺寸大於0.2微米的凝集顆粒少於0.001%(w/v)。

【0066】如上述方法，其中該核酸藥品在3秒至30秒的時間內重新復原。

【0067】如上述方法，其中該核酸藥品在經過6個月的儲存時間之後重新復原且保留該等核酸藥劑80%的活性。

【0068】如上述方法，其中該經重新復原之核酸藥品所具有之尺寸大於0.2微米的凝集顆粒少於0.001%(w/v)。

【0069】如上述方法，其中該經重新復原之核酸藥品具有降低的細胞激素(cytokine)活化作用。

【0070】如上述方法，其中該核酸藥品在3秒至30秒的時間內重新復原。

【0071】如上述方法，其中該核酸藥品在經過6個月的儲存時間之後重新復原且保留該等核酸藥劑80%的活性。

【圖式簡單說明】

【0072】第1圖：第1圖示出一種核酸藥劑的體內效力實驗結果，該核酸藥劑是用來抑制Hsp47(GP46)基因的siRNA，該實驗結果是使用該siRNA所製成之固態冷凍乾燥奈米顆粒調配劑重新復原成溶液的最終藥品進行實驗而得。重新復原的siRNA藥物調配劑是用於二甲基亞硝胺(DMN)誘發肝纖維化的大鼠模型中。如第1圖中所示，該重新復原的siRNA奈米粒子藥物調配劑在活體內對於使Hsp47(GP46)基因沈默化展現出深遠且驚人的效力。該體內效力是一項嚴謹的測試，用來測試含

有核酸藥劑之奈米顆粒經冷凍乾燥並復原後的活力。該經冷凍乾燥的 siRNA 奈米顆粒調配劑包含 10% (w/v) 的總保護劑含量，該保護劑是由 40% (w/v) 的 (2-羥丙基)- β -環糊精及 60% 的蔗糖所組成。

【0073】 第2圖：第2圖示出經冷凍乾燥並重新復原之 siRNA 奈米顆粒調配劑在活體內的血漿中濃度藥物動力學實驗結果。以 Hsp47 基因 (GP46) 為標靶的 siRNA 調配成脂質體奈米顆粒。使用含有蔗糖及 (2-羥丙基)- β -環糊精的保護劑組成物與該等奈米顆粒調配劑一起進行冷凍乾燥。該經冷凍乾燥的 siRNA 奈米顆粒調配劑包含 12.5% (w/v) 的總保護劑含量，且該保護劑是由 40% (w/v) 的 (2-羥丙基)- β -環糊精及 60% 的蔗糖所組成。以靜脈注射方式對斯潑累格·多雷 (Sprague Dawley) 大鼠施用單劑劑量的冷凍乾燥調配劑來體內評估血漿中藥物動力 (PK) 模式，並與冷凍 (frozen) 的調製劑做比較。利用雜合式 ELISA 法 (hybridization-based ELISA) 測量血漿樣本中的 siRNA 濃度。如第2圖中所示，該冷凍乾燥並重新復原之 siRNA 藥物調製劑的血漿中濃度藥物動力模式實質上與僅經過冷凍之對照控制組調製劑的藥物動力模式相同。

【實施方式】

【0074】 本發明提供用來製造由核酸分子所組成之治療藥物的方法及組成物。在某些實施例中，本發明提供用來製造冷凍乾燥形式之含核酸藥劑治療組成物的方法及組成物。

【0075】 在某些態樣中，本發明提供冷凍乾燥形式的奈米顆粒，該等冷凍乾燥形式的奈米顆粒可重新復原成有效的治療組成物。該等奈米顆粒可像運送貨物般地包裹住核酸藥劑。本發明的冷凍乾燥形式可用來重組及遞送包有治療性核酸藥劑的奈米顆粒調配劑以用於進行轉染。

【0076】 在進一步態樣中，本發明提供用來形成治療性脂質奈米顆粒溶液或懸浮液的化合物及方法，該等脂質奈米顆粒在冷凍乾燥製程中是穩定的。本發明的冷凍乾燥製程可提供穩定的冷凍乾燥形式之治療性奈米顆粒，且在該等奈米顆粒中可包有核酸藥劑。該等冷凍乾燥形式可儲存一段時間且可重新復原以提供內包有核酸藥劑的治療性脂質奈米顆粒。

【0077】 在某些實施例中，本發明實施例包括一系列用來形成脂質奈米顆粒溶液或懸浮液的組成物及化合物，該等脂質奈米顆粒可進行冷凍乾燥製程以提供穩定的固態冷凍乾燥形式而可用來長期儲存核酸治療藥物。本發明的組成物及方法可提供能重新復原且提供優越之活性、顆粒尺寸、儲存時間及血清穩定性的冷凍乾燥形式。

【0078】 在進一步態樣中，本發明有關提供可將活性藥劑或藥物化合物遞送並分配至個體、組織或器官中之奈米顆粒用的化合物、組成物及方法。

【0079】 本發明提供一系列用來將活性藥劑遞送至細胞的脂質化合物及可離子化之化合物。本發明的該等脂質化合物及可離子化之化合物可用於形成奈米顆粒以用來遞送及分配活性藥劑。

【0080】 本發明思及含有例如 siRNA 藥劑的脂質奈米顆粒藥物調配劑，該等脂質奈米顆粒藥物調配劑可藉著使該等奈米顆粒的懸浮液冷凍乾燥而製成，且該等奈米顆粒可重新復原成懸浮液。

【0081】 在某些實施例中，藉著將脂質/乙醇溶液以高速注入 siRNA 緩衝溶液中可合成出脂質奈米顆粒。第二緩衝液經過滲濾 (diafiltered) 並用來作為流過切流式過濾 (TFF) 盒的外部緩衝液以製造最終水性懸浮液產物。

【0082】 在某些實施例中，該等奈米顆粒可具有 45 奈米至 110 奈米的平均值徑。該核酸活性藥劑的濃度可為 1 毫克/毫升 (mg/mL) 至 10 毫克/毫升。

【0083】 驚訝地發現到，當將該懸浮液製成受保護的組成物時，脂質奈米顆粒可渡過懸浮液的冷凍乾燥過程而得以倖存。

【0084】 在某些實施例中，本發明的受保護組成物可由該等脂質奈米顆粒混於藥學可接受溶液中所形成的水

性懸浮液、糊精化合物及醣類糖化合物所組成。該等奈米顆粒內可活性藥劑，例如一或更多種核酸活性藥劑。

【0085】 冷凍乾燥該受保護懸浮液可提供固態冷凍乾燥產品，該固態冷凍乾燥產品可重新復原成脂質奈米顆粒懸浮液。

【0086】 重新復原的懸浮液可包含裝有該活性藥劑的脂質奈米顆粒，且該等脂質奈米顆粒與進行冷凍乾燥之前的該等脂質奈米顆粒相差無幾。

【0087】 在某些實施例中，重新復原的懸浮液所提供之包裹藥劑的活性與該懸浮液冷凍乾燥之前的包裹藥劑活性相差無幾。

【0088】 在進一步態樣中，該重新復原的懸浮液可提供與該懸浮液進行冷凍乾燥之前的奈米顆粒相差無幾的穩定奈米顆粒。在某些態樣中，該等奈米顆粒的平均顆粒尺寸與該懸浮液進行冷凍乾燥之前的奈米顆粒尺寸幾乎相等。

【0089】 本發明之組成物及方法可提供由包有藥劑之奈米顆粒所組成的復原懸浮液且該復原懸浮液具有出乎意料的活性及穩定性。

【0090】 在進一步態樣中，該受保護的懸浮液可含有保護劑組成物而可供進行冷凍乾燥，且該受保護的懸浮液可經冷凍乾燥並重新復原。本發明的保護劑組成物可由糊精化合物及醣類糖化合物所組成。該等糊精化合物

與糖化合物的總量可佔該受保護之懸浮液的 2 % 至 20 % (w / v) 。

【0091】 在某些實施例中，該糊精化合物可佔該保護劑組成物中的該等糊精化合物與糖化合物之總量的 40 % 至 70 % (w / v) 。在某些實施例中，該糊精化合物可佔該保護劑組成物中的該等糊精化合物與糖化合物之總量的 40 % 至 55 % (w / v) 。在進一步實施例中，該糊精化合物可佔該保護劑組成物中的該等糊精化合物與糖化合物之總量的 40 % 至 45 % (w / v) 。此等組成物可為重新復原的奈米顆粒懸浮液提供意料之外的有利性質，例如，不會明顯改變顆粒尺寸及活性。

【0092】 在某些態樣中，當該受保護的奈米顆粒組成物經冷凍乾燥及重新復原時，該等奈米顆粒的平均尺寸與冷凍乾燥前之初始組成物中的奈米顆粒尺寸相差在 10 % 以內。在某些態樣中，當該受保護的奈米顆粒組成物經冷凍乾燥及重新復原時，該等奈米顆粒的平均尺寸與冷凍乾燥前之初始組成物中的奈米顆粒尺寸相差在 5 % 以內。

【0093】 本發明思及含有例如 siRNA 藥劑的脂質奈米顆粒藥物調配劑，該等脂質奈米顆粒藥物調配劑可藉著使該等奈米顆粒懸浮液冷凍乾燥而製成，且該等奈米顆粒可在儲存一段時間之後重新復原成懸浮液。該重新復原的懸浮液所提供之包裹藥劑的活性與該懸浮液冷凍乾燥之前的包裹藥劑活性相差無幾。

【0094】 在儲存一段時間之後所製備而成的復原懸浮液可含有脂質奈米顆粒，該等脂質奈米顆粒中包有活性藥劑且與冷凍乾燥前的脂質奈米顆粒相差無幾。

【0095】 在某些實施例中，在儲存一段時間之後所製備而成的復原懸浮液可提供活性的包裹藥劑，且該包裹藥劑的活性與該懸浮液進行冷凍乾燥之前的包裹藥劑活性相差無幾。

【0096】 在進一步態樣中，在儲存一段時間之後所製備而成的復原懸浮液可提供與該懸浮液進行冷凍乾燥之前的奈米顆粒相差無幾的穩定奈米顆粒。在某些態樣中，該等奈米顆粒的平均顆粒尺寸可與該懸浮液進行冷凍乾燥之前的奈米顆粒尺寸幾乎相等。

【0097】 在某些實施例中，該已冷凍乾燥的組成物可儲存在 5°C 至少一個月。在進一步實施例中，該已冷凍乾燥的組成物可儲存在 -20°C 至少一個月。

【0098】 活性藥劑(active agent)

【0099】 本發明之組成物及方法可用來分配用於抑制基因表現的藥劑。用來抑制基因表現的藥劑實例包括抑制型核酸分子，包括核糖核酸酶(ribozyme)、反義核酸及RNA干擾分子(RNAi分子)。

【0100】 本發明的治療性組成物可包括抑制型核酸分子。能夠調節RNA干擾作用的核酸分子實例包括可活躍參與RNA干擾作用的分子(RNAi分子)，包括雙股RNA)，例如siRNA(小干擾RNA)、miRNA(微型

R N A) 、 s h R N A (小 髮 夾 R N A) 、 d d R N A (D N A 指 導 性 R N A) 、 p i R N A (p i w i 交 互 作 用 R N A) 或 重 複 相 關 小 干 擾 R N A (r a s i R N A) 及 上 述 R N A 分 子 的 修 改 型 。

【 0 1 0 1 】 本 發 明 的 活 性 治 療 藥 物 的 實 例 包 括 D N A 、 質 體 、 雜 合 寡 聚 核 苷 酸 或 適 配 體 。

【 0 1 0 2 】 冷 凍 乾 燥 前 (p r e - l y o p h i l i z a t i o n) 之 本 發 明 調 配 劑 中 的 活 性 核 酸 分 子 濃 度 可 為 約 1 毫 克 / 毫 升 至 約 1 0 毫 克 / 毫 升 。 在 某 些 實 施 例 中 ， 本 發 明 之 調 配 劑 中 的 活 性 核 酸 分 子 濃 度 可 為 約 1 毫 克 / 毫 升 至 約 5 毫 克 / 毫 升 或 為 2 毫 克 / 毫 升 至 4 毫 克 / 毫 升 。

【 0 1 0 3 】 冷 凍 乾 燥 之 前 的 脂 質 奈 米 顆 粒 調 配 劑

【 0 1 0 4 】 本 發 明 之 實 施 例 可 提 供 脂 質 奈 米 顆 粒 的 組 成 物 ， 該 等 組 成 物 含 有 可 用 於 進 行 冷 凍 乾 燥 製 程 的 保 護 劑 化 合 物 。

【 0 1 0 5 】 該 等 脂 質 奈 米 顆 粒 可 具 有 所 屬 技 術 領 域 中 已 知 的 任 何 組 成 。 可 使 用 任 何 製 程 (包 括 所 屬 技 術 領 域 中 已 知 的 製 程) 來 合 成 該 等 脂 質 奈 米 顆 粒 並 將 載 運 物 包 入 該 等 脂 質 奈 米 顆 粒 內 。

【 0 1 0 6 】 在 某 些 實 施 例 中 ， 可 使 用 浸 沒 式 注 射 (s u b m e r s i o n i n j e c t i o n) 製 程 來 製 備 該 等 脂 質 奈 米 顆 粒 。 在 美 國 專 利 申 請 案 U S 2 0 1 3 / 0 1 1 5 2 7 4 號 中 提 出 脂 質 奈 米 顆 粒 的 一 些 製 程 實 例 。

【 0 1 0 7 】 在 S z o k a 等 人 發 表 於 生 物 物 理 與 生 物 工 程 年 度 評 論 期 刊 (A n n u . R e v . B i o p h y s . B i o e n g .) 第 9

卷 4 6 7 頁 (1 9 8 0 年) 及在且由 M a r c J . O s t r o 編著並由 M a r c e l D e k k e r 出版公司所出版的書籍《脂質體 (L i p o s o m e s) 》第一章中提出一些製備脂質體的實例。

【 0 1 0 8 】 一般而言，藉著使溶在有機溶劑中的脂質成分與含有活性核酸藥劑的水性緩衝溶液進行混合可合成出脂質奈米顆粒。可利用過濾或擠壓來決定該等脂質體的尺寸大小。利用透析過濾法可進一步改變該脂質體懸浮液或溶液。

【 0 1 0 9 】 本發明的脂質奈米顆粒組成物經穩定化而可用於進行冷凍乾燥製程，且本發明的脂質奈米顆粒組成物可包含懸浮狀態的脂質奈米顆粒，且該等脂質奈米顆粒中包有一或更多種活性藥劑，例如包有核酸藥劑。該懸浮液可為水性且可能含有水溶性的溶劑，例如乙醇。該經過穩定化而可用於冷凍乾燥製程的組成物可進一步包含保護劑化合物以使脂質體在冷凍乾燥製程中保持穩定。

【 0 1 1 0 】 剛合成的脂質奈米顆粒之平均尺寸可為 4 0 奈米至 1 2 0 奈米，或 4 5 奈米至 1 1 0 奈米或是 8 5 奈米至 1 0 5 奈米。

【 0 1 1 1 】 本發明脂質奈米顆粒組成物中之活性藥劑濃度的範圍可為約 0 . 1 毫克 / 毫升至約 1 0 毫克 / 毫升。在某些實施例中，本發明之脂質奈米顆粒組成物中的活性藥劑濃度範圍可為 0 . 5 毫克 / 毫升至 8 毫克 / 毫升，或 1 毫克 /

毫升至 6 毫克 / 毫升，或 2 毫克 / 毫升至 5 毫克 / 毫升，或 3 毫克 / 毫升至 4 毫克 / 毫升。

【0112】保護劑化合物的實例包括糊精化合物。

【0113】糊精化合物的實例包括麥芽糊精、 β -環糊精及 γ -環糊精。

【0114】糊精化合物的實例包括甲基化 β -環糊精化合物及甲基化 γ -環糊精化合物及磺烷基醚- β -環糊精化合物及磺烷基醚- γ -環糊精化合物。

【0115】糊精化合物的實例包括在第 2 羥基位置、第 3 羥基位置及第 6 羥基位置之其中一或更多個位置被以下基團所取代的環糊精化合物：磺烷基、苯磺烷基、乙醯烷基、羥烷基、丁二酸羥烷酯、丙二酸羥烷酯、戊二酸羥烷酯、己二酸羥烷酯、羥烷基、順丁烯二酸羥烷酯、草酸羥烷酯、反丁烯二酸羥烷酯、檸檬酸羥烷酯、酒石酸羥烷酯、蘋果酸羥烷酯或檸檬酸羥烷酯基團。

【0116】糊精化合物的實例包括(2-羥丙基)- β -環糊精、2-羥丙基- β -環糊精丁二酸酯、(2-羥丙基)- γ -環糊精及 2-羥丙基- γ -環糊精丁二酸酯。

【0117】糊精化合物的實例包括羥乙基 β -環糊精。

【0118】糊精化合物的實例包括二甲基 β -環糊精及三甲基 β -環糊精。

【0119】糊精化合物的實例包括磺丁基醚 β -環糊精及磺丁基醚 γ -環糊精。

【0120】糊精化合物的實例包括甲基- β -環糊精及甲基- γ -環糊精。

【0121】糊精化合物的實例包括羥丙基-磺丁基- β -環糊精。

【0122】糊精化合物的實例包括H107 SIGMA環糊精(購自Sigma-Aldrich公司)。

【0123】糊精化合物的實例包括CAVAMAX環糊精、CAVASOL環糊精及CAVATRON環糊精(購自亞什蘭(Ashland)公司)。

【0124】糊精化合物的實例包括KLEPTOSE環糊精及CRYSMEB環糊精(購自美國羅蓋特(Roquette America)公司)。

【0125】糊精化合物的實例包括CAPTISOL環糊精(購自配體製藥公司(Ligand Pharmaceuticals)公司)。

【0126】在某些實施例中，糊精化合物的實例包括連接於聚合物鏈或網狀結構上的糊精化合物。例如，環糊精分子可連接至聚丙烯酸的聚合物。在進一步實施例中，可使用交聯化合物(例如，丙烯醯基基團)環糊精分子使環糊精化合物連接在一起。在某些實施例中，可使用連接有環糊精化合物之水凝膠狀乙酸乙烯酯。

【0127】於某些態樣中，在將可用於本發明之脂質奈米顆粒組成物中的糊精化合物引入該脂質奈米顆粒組成物之前，該糊精化合物可先與被吸附質化合物結合。在

無意受任何特定理論約束的情況下，使該糊精化合物預先吸附固醇化合物可形成包合複合物 (inclusion complex)，該包合複合物可防止該復原藥品中的活性藥劑損失活性。

【0128】 被吸附質化合物的實例包括膽固醇、羊毛甾醇、酵母甾醇、酵母甾烯醇、鏈甾醇、豆甾烷醇、二氫羊毛甾醇、7-去氫膽固醇。

【0129】 被吸附質化合物的實例包括聚乙二醇修飾膽固醇及膽甾烷 3-側氧-(C1-22)醯基化合物 (cholestane 3-oxo-(C1-22)acyl compound)，例如乙酸膽甾酯、花生四烯酸膽甾酯、丁酸膽甾酯、己酸膽甾酯、肉豆蔻酸膽甾酯、棕櫚酸膽甾酯、二十二酸膽甾酯、硬脂酸膽甾酯、辛酸膽甾酯、正-癸酸膽甾酯、月桂酸膽甾酯、二十四烯酸膽甾酯、壬酸膽甾酯、正-戊酸膽甾酯、油酸膽甾酯、反油酸膽甾酯、芥子酸膽甾酯、庚酸膽甾酯、反亞油酸膽甾酯、亞油酸膽甾酯。

【0130】 被吸附質化合物的實例包括植物固醇 (phytosterol)： β -穀甾醇、菜油甾醇、麥角甾醇、藝苔甾醇、 δ -7-豆甾醇及 δ -7-燕麥甾醇。

【0131】 保護劑化合物的附加實例包括醣類化合物 (saccharide compound)。醣類化合物的實例包括糖化合物 (sugar compound)。

【0132】 保護劑糖化合物的實例包括單醣 (例如，C(5-6)醛醣及酮醣)及雙醣 (例如，蔗糖、乳糖、乳酮糖、

麥芽糖、海藻糖、纖維二糖、麴二糖、糖化麴二糖、異麥芽糖、槐糖、海帶二糖、龍膽二糖、松二糖、麥芽酮糖、異麥芽酮糖、龍膽二酮糖、甘露二糖、蜜二糖、蜜二酮糖及木二糖)。

【0133】保護劑醣類化合物的實例包括多醣 (polysaccharide)，例如聚蔗糖。

【0134】該冷凍乾燥前之調配劑中的保護劑化合物濃度可為約 1 % (w/v) 至約 25 % (w/v)。

【0135】在某些實施例中，該冷凍乾燥前之調配劑中的保護劑化合物濃度可為 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)。

【0136】在某些實施例中，該冷凍乾燥前之調配劑中的保護劑化合物濃度可為 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)。

【0137】冷凍乾燥製程

【0138】冷凍乾燥製程可在任何合適的容器中進行，例如可在藥學領域中已知的玻璃容器或例如玻璃小瓶中進行，或在雙槽式容器中進行。

【0139】可將本發明含有保護劑化合物的穩定化脂質奈米顆粒組成物引入該玻璃容器中。加至該容器中的組成物體積可為 0.1 毫升至 20 毫升或為 1 毫升至 10 毫升。

【0140】 可使用任何冷凍乾燥製程，包括製藥領域中已知的該些冷凍乾燥製程。例如可參見由Mack出版公司(位於美國賓州伊斯頓)所出版的書籍《雷氏製藥科學(Remington's Pharmaceutical Sciences)》第18版(1990年)。

【0141】 該冷凍乾燥製程可包括在約 -40°C 至約 -30°C 的溫度下冷凍該經保護劑穩定化的脂質奈米顆粒組成物。可乾燥該已冷凍的組成物以形成冷凍乾燥組成物。

【0142】 在某些實施例中，該冷凍步驟可在數分鐘內使溫度從周遭環境溫度跳至最終溫度。該溫度變化速率(temperature ramp)可為約 $1^{\circ}\text{C}/\text{分鐘}$ 。

【0143】 在某些實施例中，可在約 $0\sim 250$ 毫托耳(mTorr)或 $50\sim 150$ 毫托耳的壓力及約 -15°C 至約 -38°C 的溫度下進行該乾燥步驟。可在較高溫度(可高達周遭環境溫度)下持續進行該乾燥步驟長達數天的時間。該固態冷凍乾燥物中的殘餘水份含量可少於約 $5\%(w/v)$ 、或少於 $4\%(w/v)$ 、或少於 $3\%(w/v)$ 、或少於 $2\%(w/v)$ 、或少於 $1\%(w/v)$ 。

【0144】 本發明之經保護劑穩定化的脂質奈米顆粒組成物在冷凍乾燥之後可使用藥學領域中已知的方法重新復原。

【0145】 在某些態樣中，本發明提供用於抑制復原藥品中之凝集顆粒含量(level)的方法，且該復原藥品是

由本發明之經保護劑穩定化脂質奈米顆粒組成物經冷凍乾燥之後所製成。

【0146】 在某些實施例中，由經冷凍乾燥後之本發明保護劑穩定化脂質奈米顆粒組成物所製成的復原藥品可具有降低數量的凝集顆粒。

【0147】 在某些實施例中，由經冷凍乾燥後的本發明之保護劑穩定化脂質奈米顆粒組成物製成復原藥品 (Reconstituted drug product)，該復原藥品可具有降低數量之尺寸大於約0.2微米或大於約0.5微米或大於約1微米的凝集顆粒。

【0148】 復原藥品

【0149】 可在藥學可接受的載劑中復原該冷凍乾燥物。

【0150】 藥學可接受載劑的實例包括滅菌水、注射用水、滅菌生理食鹽水、注射用抑菌水或霧化溶液。

【0151】 藥學可接受載劑的實例包括藥學可接受的溶液。

【0152】 藥學可接受溶液的實例包括 HEPES 緩衝液、磷酸鹽緩衝液、檸檬酸鹽緩衝液及含有三(羥甲基)胺基甲烷的緩衝液。

【0153】 藥學可接受溶液的實例包括藥學可接受的緩衝溶液。

【0154】 藥學可接受溶液的實例包括順丁烯二酸、酒石酸、乳酸、乙酸、碳酸氫鈉及甘胺酸的緩衝溶液。

【0155】 該復原的冷凍乾燥物可用來作為藥品。

【0156】 可進一步使用等張生理食鹽水或其他輔劑稀釋該復原的冷凍乾燥物以提供給藥的預定濃度。

【0157】 輔劑的實例包括滲透壓調節劑 (tonicifier)。

【0158】 輔劑的實例包括穩定劑 (stabilizer)，例如人血清白蛋白、小牛血清白蛋白、 α -酪蛋白、球蛋白、 α -乳白蛋白、LDH、溶菌酶、肌紅素、卵白蛋白及核糖核酸酶 A (RNase A)。

【0159】 輔劑的實例包括緩衝劑，例如乙酸鉀、乙酸鈉及碳酸氫鈉。

【0160】 輔劑的實例包括胺基酸，例如甘胺酸、丙胺酸、精胺酸、甜菜鹼 (betaine)、白胺酸、離胺酸、麩胺酸、天冬胺酸、組胺酸、脯胺酸、4-羥基脯胺酸、肌胺酸、 γ -胺基丁酸、阿蘭鹼 (alanopine)、章魚肉鹼 (octopine)、N-甲基亞胺基二乙酸 (strombine) 及三甲胺 N-氧化物。

【0161】 輔劑的實例包括非離子界面活性劑，例如聚山梨醇酯 20、聚山梨醇酯 80 及帕洛沙姆 407 (音譯自 poloxamer 407)。

【0162】 輔劑的實例包括分散劑，例如膽鹼磷脂 (phosphatidyl choline)、乙醇胺 (ethanolamine)、乙酰基色胺酸鹽 (acetyltryptophanate)、聚乙二醇

(polyethylene glycol)、聚乙炔吡咯啉酮 (polyvinylpyrrolidone)、乙二醇 (ethylene glycol)、甘油 (glycerin)、丙三醇 (glycerol)、丙二醇 (propylene glycol)、山梨醇 (sorbitol)、木糖醇 (xylitol)、聚葡萄糖 (dextran) 及明膠 (gelatin)。

【0163】 輔劑的實例包括抗氧化劑，例如抗壞血酸、半胱胺酸、硫代甘油 (thioglycerol)、巯乙酸 (thioglycolic acid)、硫代山梨醇 (thiosorbitol) 及麩胱甘肽 (glutathione)。

【0164】 輔劑的實例包括還原劑，例如二硫蘇糖醇 (dithiothreitol)、硫醇化合物 (thiols) 及噻吩化合物。

【0165】 輔劑的實例包括螯合劑，例如 EDTA、EGTA、麩胺酸及天冬胺酸。

【0166】 在某些實施例中，可使用注射針頭刺穿小塞瓶來重新復原該冷凍乾燥物。可在搖晃或不搖晃該小瓶的情況下使該冷凍乾燥物重新復原。

【0167】 復原的時間可為3秒～30秒或更長時間。

【0168】 在某些實施例中，復原的核酸藥品所含有的尺寸大於0.2微米的凝集顆粒可少於0.001% (w/v)。

【0169】 在某些態樣中，該復原的核酸藥品可能具有降低的細胞激素活化作用。

【0170】在附加態樣中，該核酸藥品在經過6個月的儲存時間之後可重新復原且保留該等核酸藥劑80%的活性。

【0171】在某些實施例中，該核酸藥品在經過6個月的儲存時間之後可重新復原且該等脂質奈米顆粒的平均顆粒尺寸可比冷凍乾燥前的平均顆粒尺寸的125%要小。

【0172】在某些實施例中，該核酸藥品在經過24個月的儲存時間之後可重新復原且保留該等核酸藥劑90%的活性。

【0173】在進一步實施例中，該核酸藥品在經過24個月的儲存時間之後可重新復原且該等脂質奈米顆粒的平均顆粒尺寸可比冷凍乾燥前的平均顆粒尺寸要大但不大超過25%。

【0174】RNAi分子

【0175】本發明組成物中所配置之活性RNA干擾誘導成分的量可以是不會造成副作用超過用藥所帶來之益處的量。可使用培養細胞進行體外試驗或在模型動物或哺乳動物(例如，小鼠、大鼠、犬或豬，等等)體內進行試驗來決定此用量，且此等試驗為所屬技術領域中熟悉技藝者所知悉。本發明的該等方法可應用於任何動物，包括人類。

【0176】所調配之活性成分的量可根據施用該藥劑或組成物的方式而改變。例如，當在一次給藥中是使用複

數個單位的組成物時，可將一次給藥所需的活性成分用量除以該複數個單位以決定一單位之組成物中所欲調配的活性成分含量。

【0177】可直接使用脂質體調配劑中之本發明的該等核酸分子及RNAi分子將該等分子遞送至或施用於細胞、組織、器官或受試者中，藉以輔助、促進或便於該等分子進入細胞中。

【0178】本發明的該等核酸分子及RNAi分子可與陽離子型脂質進行複合，使得該等核酸分子及RNAi分子被包裹在脂質體中且被遞送至目標細胞或組織。該等核酸或核酸複合物可透過直接皮膚給藥、經皮給藥或注射以間接體內或體內局部給藥方式施用於相關組織。

【0179】本發明的抑制型核酸分子或組成物可以單位劑型來給藥。可採用習知的藥學實務技術來提供合適的調配劑或組成物以將該等化合物供給受疾病所苦的患者。任何合適的給藥途徑皆可採用，例如可經由非腸胃道、經靜脈、經動脈、經皮下、經瘤內、經肌肉內、經顱內、經眼眶內、經眼、經心室/腦室(intraventricular)、經肝、經囊內、經鞘內、經腦內、經腹腔、經鼻內、氣膠噴霧、塞劑或口服方式來給藥。

【0180】本發明之組成物及方法可包括表現載體(expression vector)，該表現載體包含以允許該核酸

分子表現的方式編碼有本發明至少一RNAi分子的核酸序列。

【0181】 可從插入DNA載體或RNA載體中的轉錄單位來表現出本發明之該等核酸分子及RNAi分子。重組載體可為DNA質體或病毒載體。

【0182】 例如，該載體可包含：編碼有一雙股RNAi分子之兩股的序列，或編碼有單條核酸分子的序列(該單條核酸分子可自我互補且從而形成一RNAi分子)。表現載體可包含編碼著兩個或更多個核酸分子的核酸序列。

【0183】 可在細胞內藉由真核啟動子來表現核酸分子。所屬技術領域中之熟悉技藝者明白可藉由合適的DNA/RNA載體在真核細胞內表現任何核酸。

【0184】 可藉由靜脈注射、肌肉注射或腹腔內注射、或口服、或吸入或所屬技術領域中已知的其他方法來施用脂質調配劑。

【0185】 用來施用寡聚核苷酸的藥學可接受調配劑已為人所熟知且可使用。

【0186】 在上述方法的實施例中，該抑制型核酸分子的給藥劑量為約5毫克/平方公尺/天至500毫克/平方公尺/天，例如5、25、50、100、125、150、175、200、225、250、275或300毫克/平方公尺/天。

【0187】 在某些實施例中，本發明之抑制型核酸分子的全身性給藥劑量為約1毫克/公斤至100毫克/公斤，例如1、5、10、20、25、50、75或100毫克/公斤。

【0188】 在進一步實施例中，該劑量的範圍可為約25毫克/平方公尺/天至500毫克/平方公尺/天。

【0189】 例如，在由 A. R. Gennaro 編著且由 Lippincott Williams & Wilkins 出版公司(位於美國費城)所出版的《雷氏：製藥科學與實務 (Remington: The Science and Practice of Pharmacy)》(2000年)一書中可找到所屬技術領域中已知用來製造調配劑的方法。

【0190】 非腸胃道給藥的調配劑可例如包含輔劑、滅菌水或生理食鹽水、聚烷二醇化合物(例如，聚乙二醇)、植物來源的油或氫化的萘化合物。可使用生物可相容且生物可分解的乳酸交酯(lactide)聚合物、乳酸交酯/乙交酯共聚物或聚乙二醇-聚丙二醇共聚物來控制該等化合物的釋放。可用於抑制型核酸分子之其他可用的非腸胃道遞送系統包括乙烯-乙酸乙烯酯共聚物顆粒、滲透壓幫浦、植入式輸注系統及脂質體。吸入用的調配劑可包含輔劑(例如，乳糖)，或可為含有例如聚乙二醇-9-月桂基醚(polyoxyethylene-9-lauryl ether)、甘胺膽酸鹽(glycocholate)及去氧膽酸鹽(deoxycholate)的水性溶液，或可為以鼻滴劑形式來給藥的油性溶液，或為凝膠。

【0191】 可對人類患者施用治療有效量(例如，可預防、消除或降低病理狀況的量)的該等調配劑以用來治療腫瘤性的疾病或異常狀況。本發明之核苷酸寡聚物的較

佳劑量可依據諸如疾病的種類及程度、個別患者的整體健康狀態、該等化合物輔劑的配方及給藥途徑這類的變數而定。

【0192】 脂質組成物的實例

【0193】 在某些實施例中，該四種的類脂質成分(即，一或更多種可離子化脂質分子、結構性脂質、一或更多種穩定劑脂質及一或更多種用來降低該組成物之免疫抗原性的脂質)可佔該組成物中之該等脂質成分的100%。

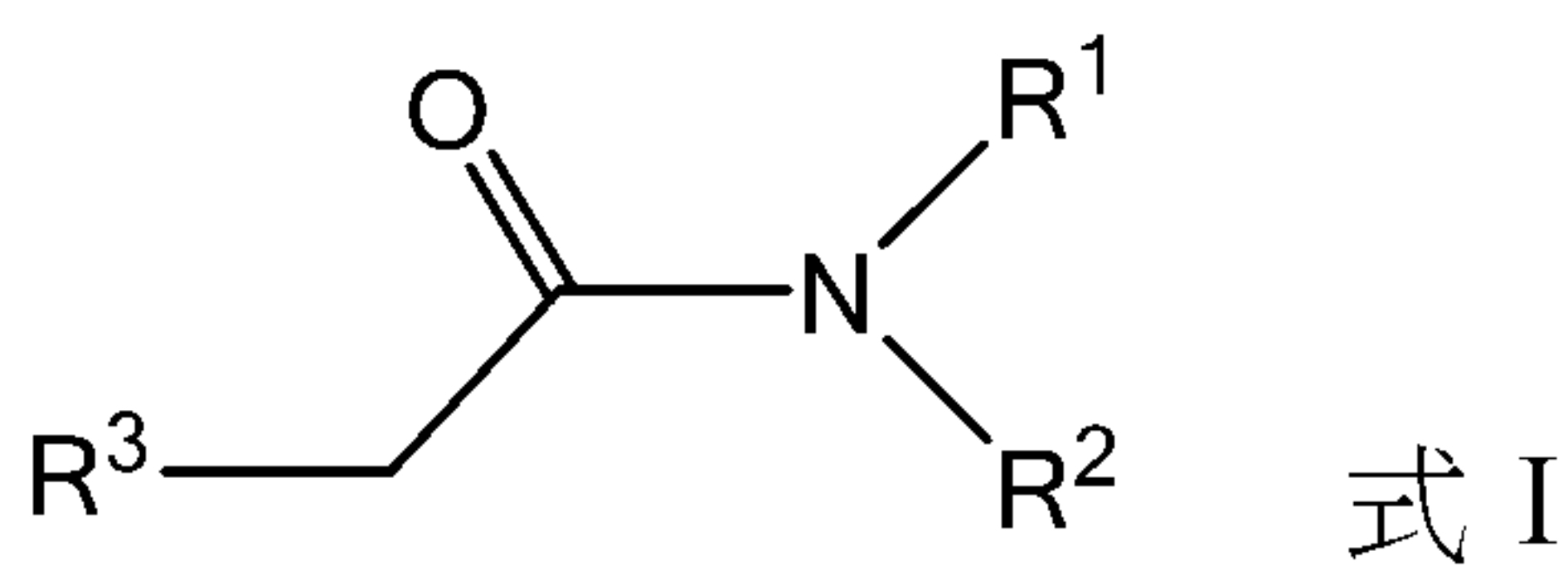
【0194】表1中示出脂質奈米顆粒組成物的實例

表 1：脂質成分的組成（各自在總量中所佔的莫耳%）

可離子化	陽離子型	結構型	穩定劑	降低免疫 抗原性
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

【 0 1 9 5 】 可 離 子 化 之 類 脂 質 分 子

【0196】可離子化分子的實例包括具有如式I所示結構的化合物。



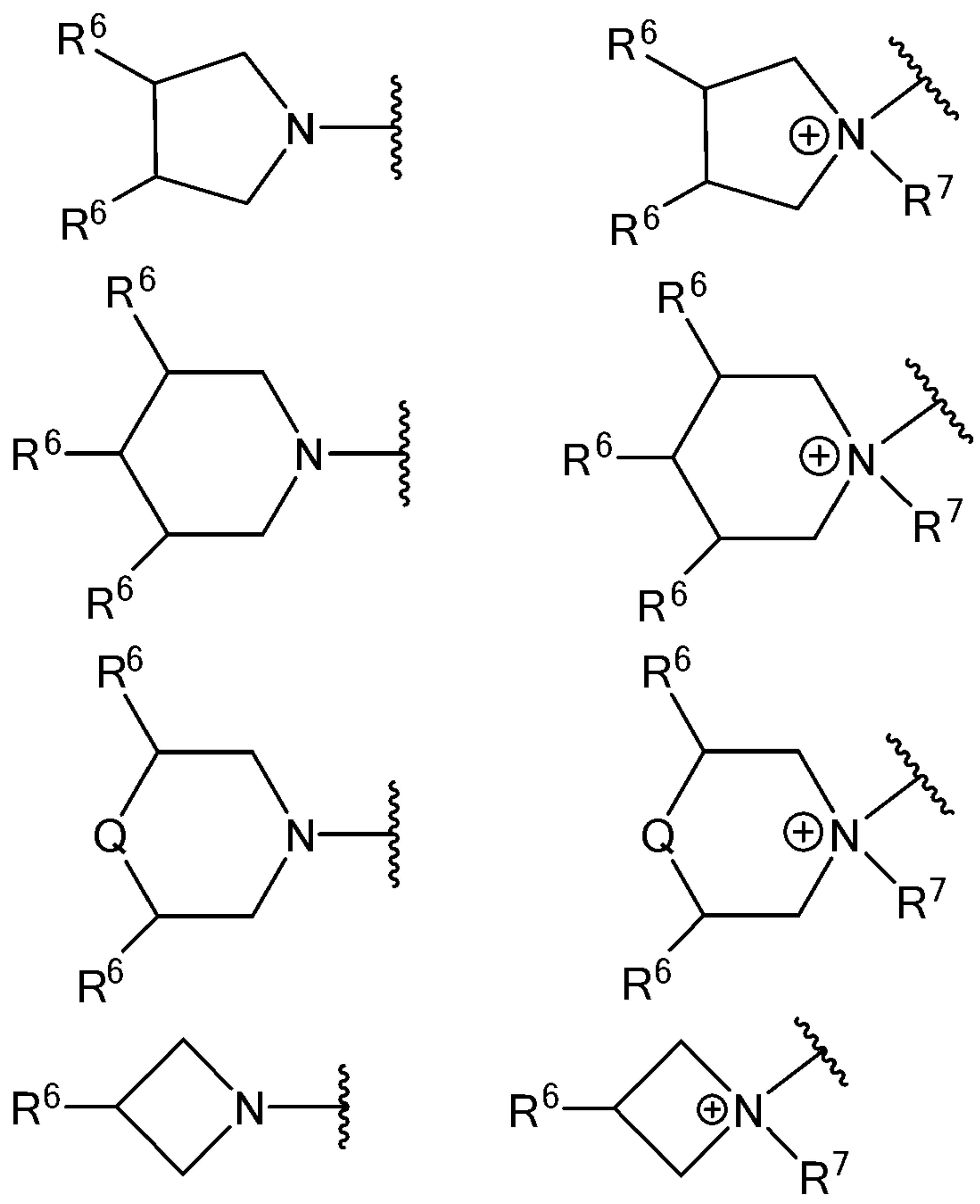
其中 R^1 及 R^2 為：

$$R^1 = CH_2(CH_2)_nOC(=O)R^4$$

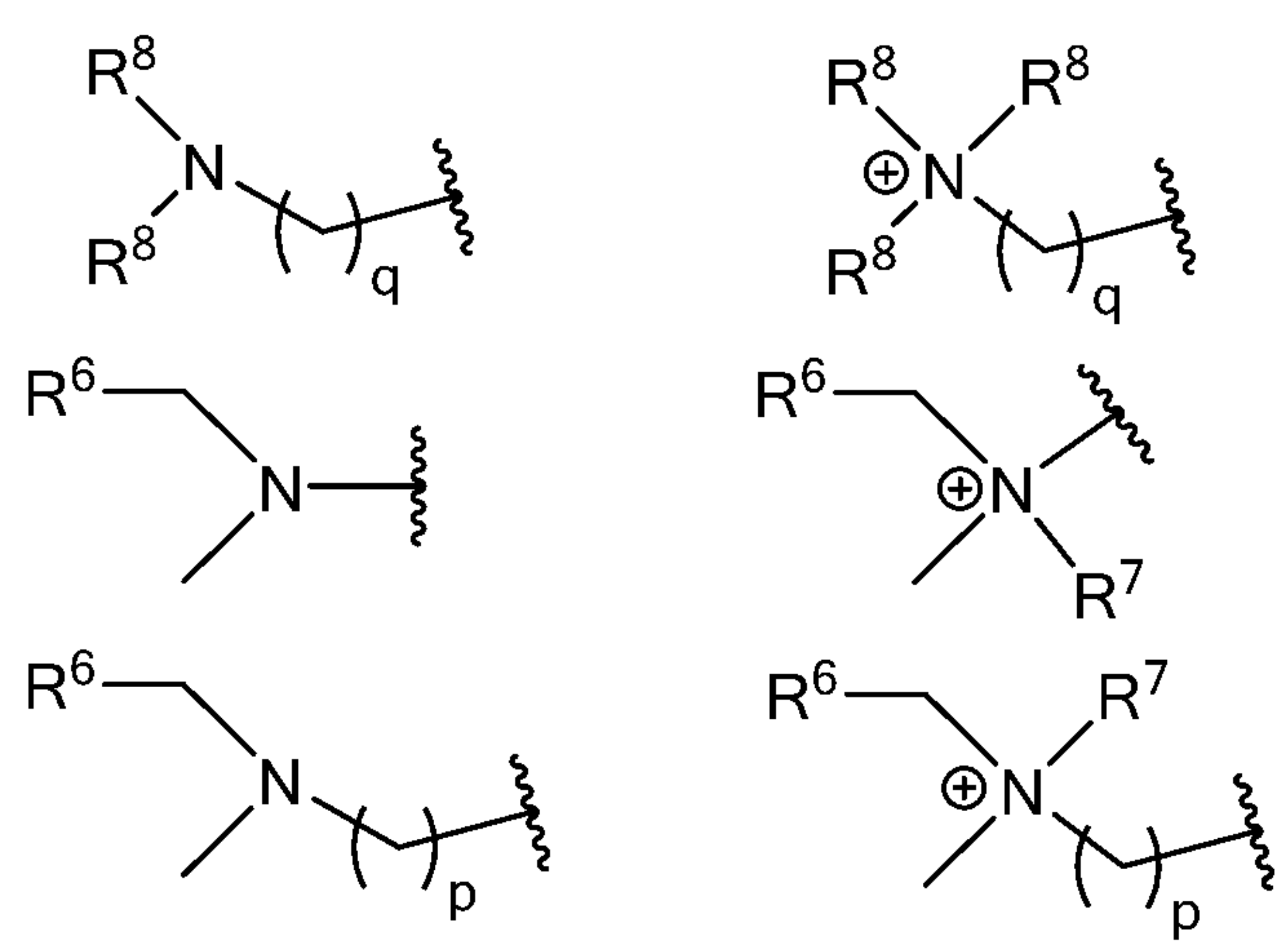
$$R^2 = CH_2(CH_2)_mOC(=O)R^5$$

其中 n 及 m 各自獨立為 1 至 2 ；及在每次出現 R⁴ 及 R⁵ 時，
R⁴ 及 R⁵ 可各自獨立為 C(12 ~ 20) 烷基或 C(12 ~ 20) 烯基；

其中 R³ 選自於下列之中：1-四氫吡啶化合物 (1-azetidines)、1-吡咯啉化合物 (1-pyrrolidines)、1-哌啶化合物 (1-piperidines)、4-哌啶化合物 (4-morpholines) 及 1,4-哌嗪化合物 (1,4-piperazines)，其中可在該等環的任意碳原子位置上做取代，



及 R³ 亦可選自於胺基或胺基烷基基團之中，且該等胺基或胺基烷基基團上亦可做取代：



其中

每個 R⁶ 各自獨立地選自於 H、烷基、羥基、羥烷基、烷氧基、烷氧基烷氧基及胺基烷基；

每個 R⁷ 各自獨立地選自於 H、烷基、羥烷基及胺基烷基；

每個 R⁸ 各自獨立地選自於 H、烷基、羥烷基及胺基烷基，且任意兩個 R⁸ 可形成一環；

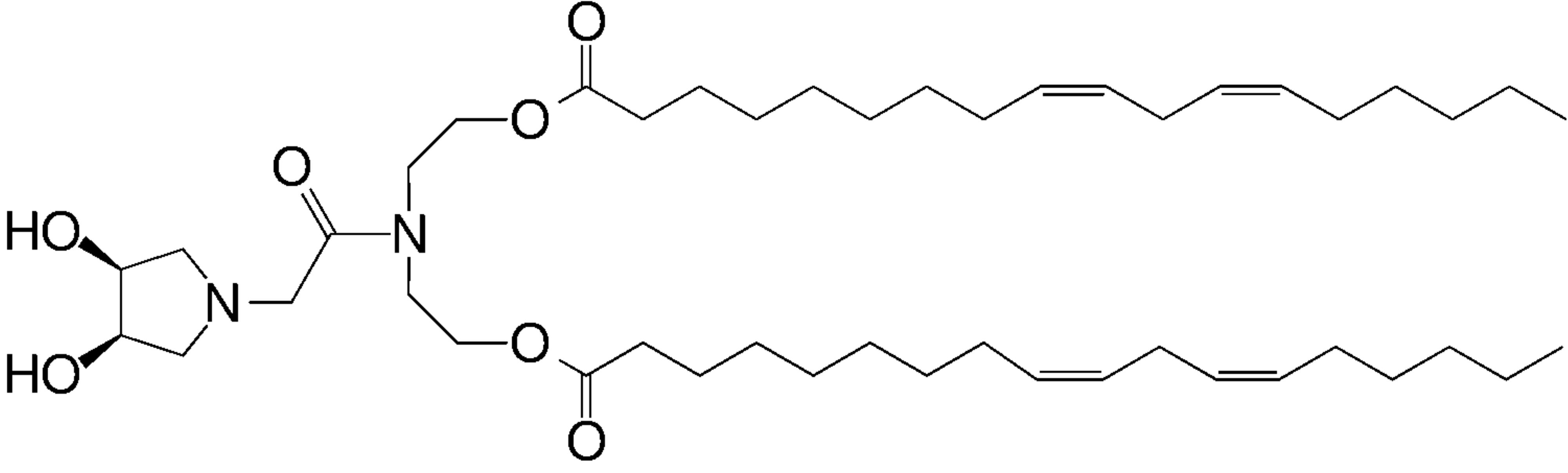
q 為 0 至 4 ；

Q 為 O 或 N R⁷ ；

p 為 1 至 4 。

【 0 1 9 7 】 可離子化脂質的實例包括以下化合物：

【 0 1 9 8 】 化合物 A 6

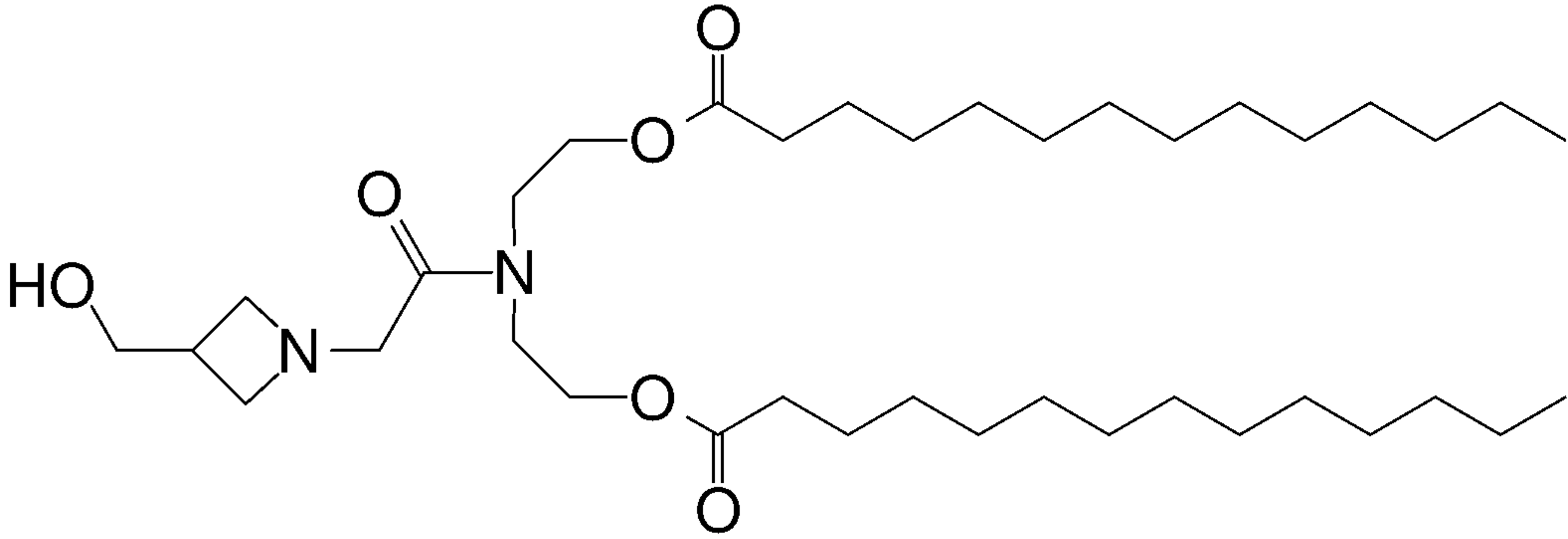


該化合物 A 6 為 ((2 - ((3 S , 4 R) - 3 , 4 - 二羥基吡咯啉 - 1 - 基) 乙 醯 基) 脲 二 基) 雙 (乙 烷 - 2 , 1 - 二 基) (9 Z , 9 ' Z , 1 2 Z , 1 2 ' Z) - 雙 (十 八 碳 - 9 , 1 2 - 二 烯 酸 酯)

[((2-((3S,4R)-3,4-dihydroxy pyrrolidin-1-yl)acetyl)azanediyl)bis(ethane-2,1-diyl)(9Z,9'Z,12Z,12'Z)-bis(octadeca-9,12-dienoate)]。

【0199】 可離子化脂質的實例包括以下化合物：

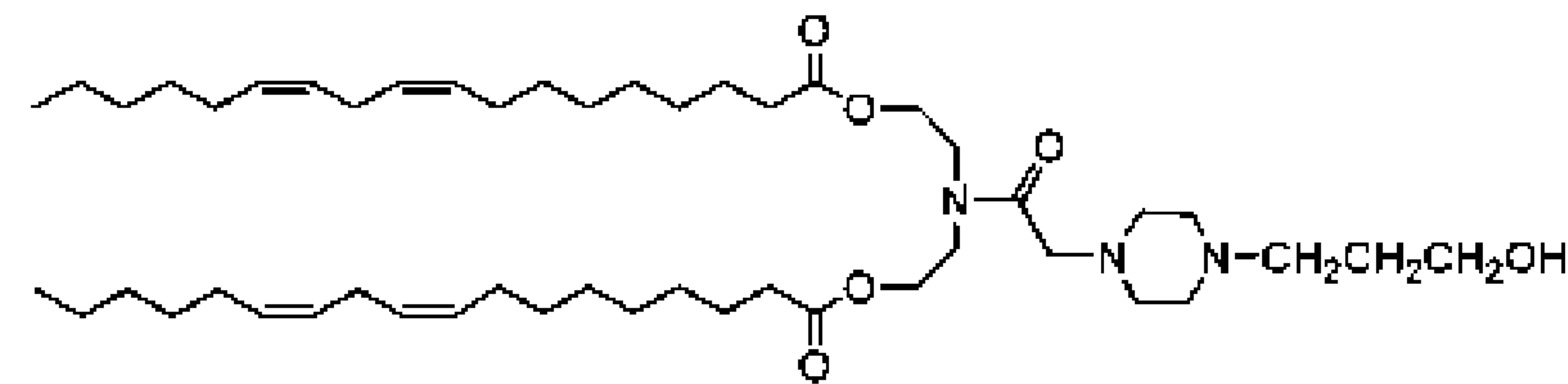
【0200】 化合物 A 9



該化合物 A 9 為 ((2-(3-(羥 甲 基) 四 氫 吡 啶 -1-基) 乙 醯 基) 脲 二 基) 雙 (乙 烷 -2,1-二 基) 雙 十 四 酸 酯
(((2-(3-(hydroxymethyl)azetidin-1-yl)acetyl)azanediyl)bis(ethane-2,1-diyl)ditetradecanoate)。

【0201】 可離子化脂質的實例包括以下化合物：

【0202】 化合物 A A

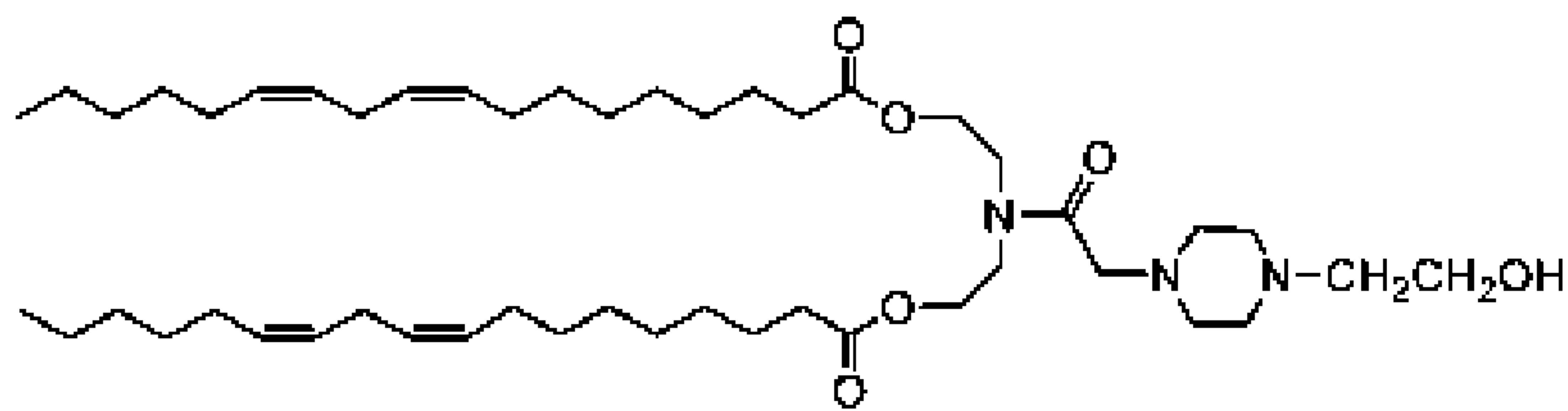


該化合物 A A 為 ((2-(4-(2-羥 乙 基) 哌 啶 -1-基) 乙 醯 基) 脲 二 基) 雙 (乙 烷 -2,1-二 基)
(9Z,9'Z,12Z,12'Z)-雙 (十 八 碳 -9,12-二 烯 酸 酯)

(((2 - (4 - (2 - h y d r o x y e t h y l) p i p e r a z i n - 1 - y l) a c e t y l) a z a n e d i y l) b i s (e t h a n e - 2 , 1 - d i y l) (9 Z , 9 ' Z , 1 2 Z , 1 2 ' Z) - b i s (o c t a d e c a - 9 , 1 2 - d i e n o a t e)) 。

【 0 2 0 3 】 可離子化脂質的實例包括以下化合物：

【 0 2 0 4 】 化合物 A B

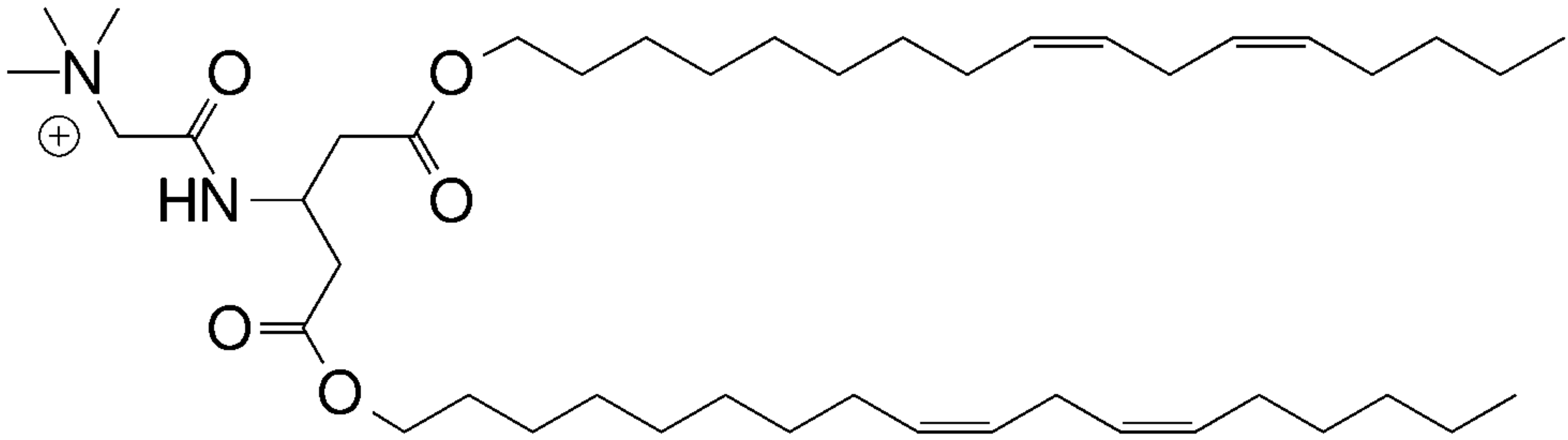


該化合物 A B 為 ((2 - (4 - (2 - 羥 乙 基) 哌 啶 - 1 - 基) 乙 醯 基) 脲 二 基) 雙 (乙 烷 - 2 , 1 - 二 基) (9 Z , 9 ' Z , 1 2 Z , 1 2 ' Z) - 雙 (十 八 碳 - 9 , 1 2 - 二 烯 酸 酯)

(((2 - (4 - (2 - h y d r o x y e t h y l) p i p e r a z i n - 1 - y l) a c e t y l) a z a n e d i y l) b i s (e t h a n e - 2 , 1 - d i y l) (9 Z , 9 ' Z , 1 2 Z , 1 2 ' Z) - b i s (o c t a d e c a - 9 , 1 2 - d i e n o a t e)) 。

【 0 2 0 5 】 可離子化脂質的實例包括以下化合物：

【 0 2 0 6 】 化合物 C 2



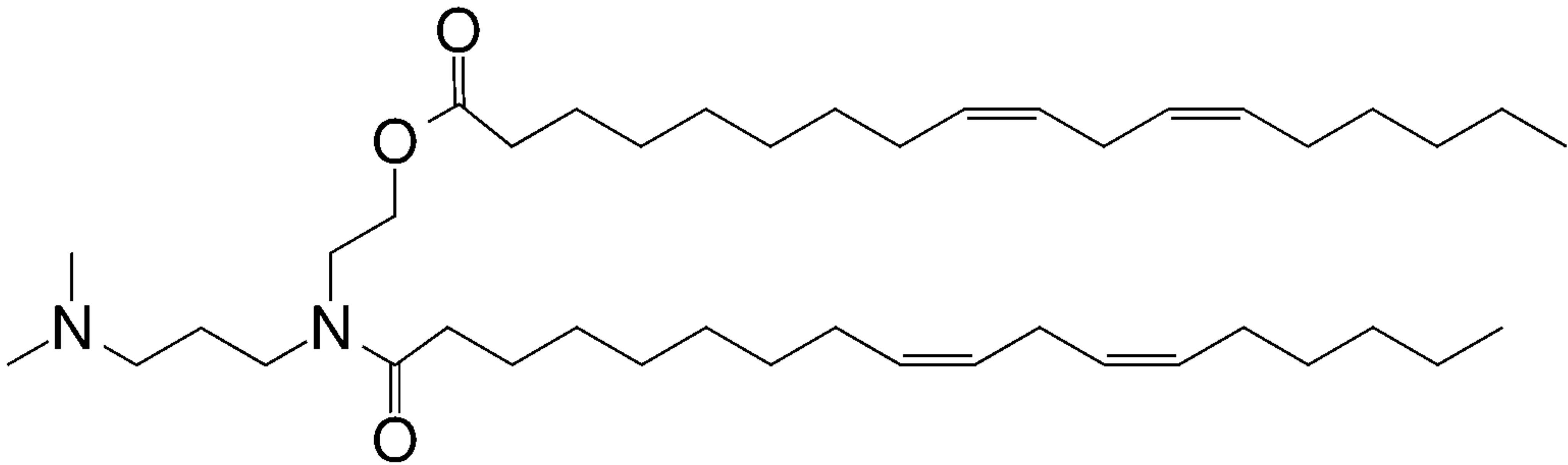
該化合物 C 2 為 2 - ((1 - (((9 Z , 1 2 Z) - 十 七 碳 - 9 , 1 2 - 二 烯 - 1 - 基) 氧) - 5 - (((9 Z , 1 2 Z) - 十 八 碳 - 9 , 1 2 - 二 烯 - 1 -

基)氧)-1,5-二側氧戊烷-3-基)胺基)-N,N,N-三甲基-2-側氧乙烷-1-銨鎗離子

(2-((1-(((9Z,12Z)-heptadeca-9,12-dien-1-yl)oxy)-5-(((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-yl)oxy)-1,5-dioxopentan-3-yl)amino)-N,N,N-trimethyl-2-oxoethan-1-aminium)。

【0207】 可離子化脂質的實例包括以下化合物：

【0208】 化合物 F 5

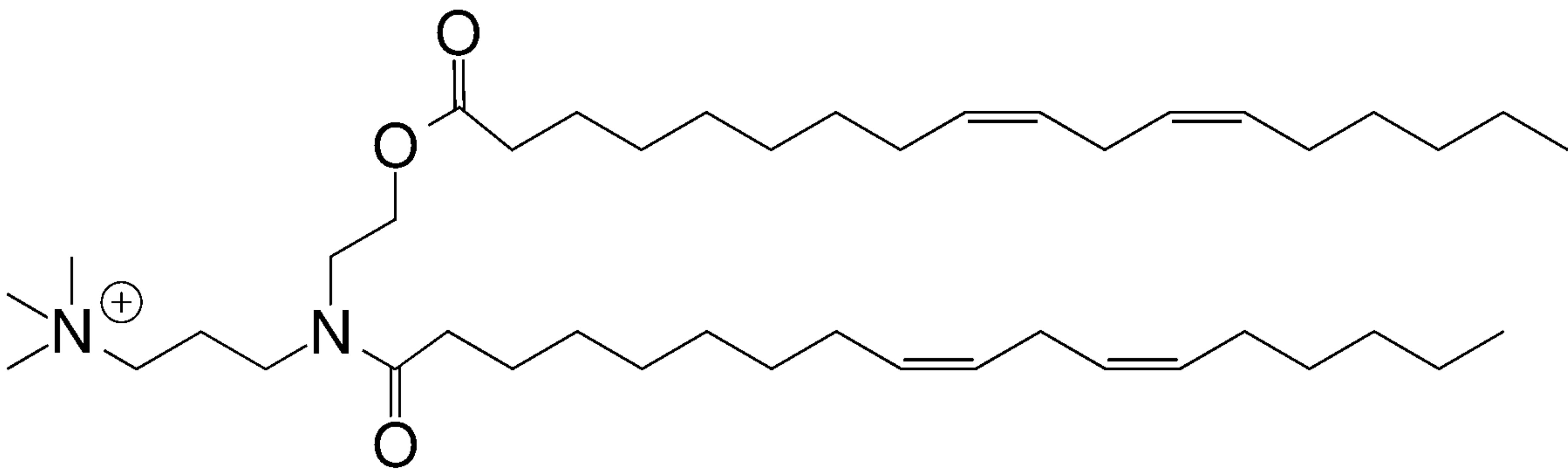


該化合物 F 5 為 2-((9Z,12Z)-N-(3-(二甲胺)丙基)十八碳-9,12-二烯醯胺基)乙基(9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯酸酯

(2-((9Z,12Z)-N-(3-(dimethylamino)propyl)octadeca-9,12-dienamido)ethyl(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoate)。

【0209】 可離子化脂質的實例包括以下化合物：

【0210】 化合物 F 7

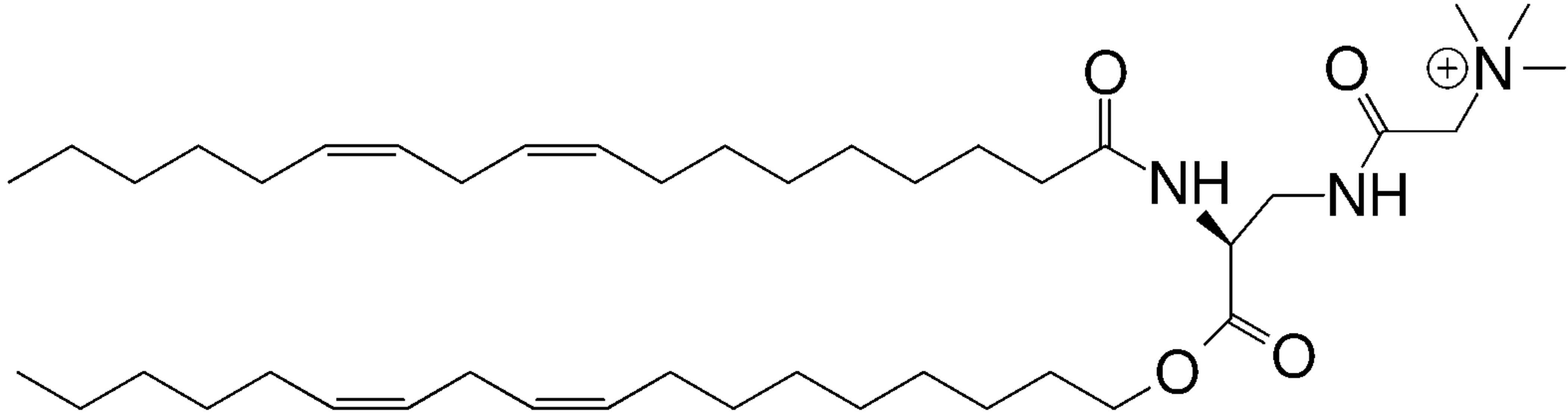


該化合物 F 7 為 N,N,N-三甲基-3-((9Z,12Z)-N-(2-(((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯醯基)氧)乙基)十八碳-9,12-二烯醯胺基)丙烷-1-銨鎘離子

(N,N,N-trimethyl-3-((9Z,12Z)-N-(2-(((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoyl)oxy)ethyl)octadeca-9,12-dienamido)propan-1-aminium)。

【0211】可離子化脂質的實例包括以下化合物：

【0212】化合物 C 2 4



該化合物 C 2 4 為 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-9,12-二烯醯胺基)-3-側氧丙基)胺基)-2-側氧乙烷-1-銨鎘離子 (N,N,N-trimethyl-2-(((S)-3-(((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-yl)oxy)-2-((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienamido)-3-oxopropyl)amino)-2-oxoethan-1-aminium)。

【0213】結構性脂質

【0214】結構性脂質的實例包括膽固醇化合物(cholesterols)、固醇化合物(sterols)及類固醇化合物(steroids)。

【0215】結構性脂質的實例包括膽烷化合物(cholanes)、膽甾烷化合物(cholestanes)、麥角甾烷化合物(ergostanes)、菜油甾烷化合物(campestanes)、多孔甾烷(poriferastanes)、豆甾烷化合物(stigmastanes)、珊瑚甾烷化合物(gorgostanes)、羊毛甾烷化合物(lanostanes)、腺甾烷化合物(gonanes)、雌甾烷化合物(estranes)、雄甾烷化合物(androstanes)、孕甾烷化合物(pregnanes)及環阿烷化合物(cycloartanes)。

【0216】結構性脂質的實例包括固醇化合物及動物固醇化合物，例如膽固醇、羊毛甾醇、酵母甾醇、酵母甾烯醇、鏈甾醇、豆甾烷醇、二氫羊毛甾醇及7-去氫膽固醇。

【0217】結構性脂質的實例包括聚乙二醇修飾膽固醇及膽甾烷3-側氧-(C1-22)醯基化合物，例如乙酸膽甾酯、花生四烯酸膽甾酯、丁酸膽甾酯、己酸膽甾酯、肉豆蔻酸膽甾酯、棕櫚酸膽甾酯、二十二酸膽甾酯、硬脂酸膽甾酯、辛酸膽甾酯、正-癸酸膽甾酯、月桂酸膽甾酯、二十四烯酸膽甾酯、壬酸膽甾酯、正-戊酸膽甾酯、油酸膽甾酯、反油酸膽甾酯、芥子酸膽甾酯、庚酸膽甾酯、反亞油酸膽甾酯、亞油酸膽甾酯。

【0218】結構性脂質的實例包括固醇化合物，例如植物固醇化合物、 β -穀甾醇、菜油甾醇、麥角甾醇、蕁苔甾醇、 δ -7-豆甾醇及 δ -7-燕麥甾醇。

【0219】穩定劑脂質

【0220】穩定劑脂質的實例包括兩性離子脂質 (zwitterionic lipids)。

【0221】穩定劑脂質的實例包括諸如磷脂類的化合物。

【0222】磷脂化合物的實例包括卵磷脂 (phosphatidylcholine)、磷脂醯乙醇胺 (phosphatidylethanolamine)、磷脂醯絲胺酸 (phosphatidylserine)、磷脂醯肌醇 (phosphatidylinositol)、磷脂酸 (phosphatidic acid)、棕櫚醯基油醯基磷脂醯基膽鹼 (palmitoyl oleoyl phosphatidylcholine)、溶血磷脂醯膽鹼 (lysophosphatidylcholine)、溶血磷脂醯乙醇胺 (lysophosphatidylethanolamine)、二棕櫚醯基磷脂醯膽鹼 (dipalmitoyl phosphatidylcholine)、二油醯基磷脂醯膽鹼 (dioleoyl phosphatidylcholine)、二硬脂醯基磷脂醯膽鹼 (distearoyl phosphatidylcholine) 及二亞油醯基磷脂醯膽鹼 (dilinoyleoyl phosphatidylcholine)。

【0223】穩定劑脂質的實例包括磷脂醯乙醇胺化合物及磷脂醯膽鹼化合物。

【0224】穩定劑脂質的實例包括1,2-二油醯-*sn*-甘油-3-磷酸膽鹼(1,2-Dioleoyl-*sn*-Glycerol-3-Phosphocholine, DOPC)。

【0225】穩定劑脂質的實例包括二植烷醯基磷脂醯乙醇胺(diphytanylpheosphatidylethanolamine, DPhPE)及1,2-二植烷醯-*sn*-甘油-3-磷酸膽鹼(1,2-Diphytanyl-*sn*-Glycerol-3-Phosphocholine, DPhPC)。

【0226】穩定劑脂質的實例包括1,2-二硬脂醯-*sn*-甘油-3-磷酸膽鹼(1,2-distearoyl-*sn*-glycerol-3-phosphocholine, DSPC)、1,2-二棕櫚醯-*sn*-甘油-3-磷酸膽鹼(1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycerol-3-phosphocholine, DPPC)、1,2-二棕櫚醯-*sn*-甘油-3-磷酸乙醇胺(1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycerol-3-phosphoethanolamine, DPPE)及1,2-二油醯-*sn*-甘油-3-磷酸乙醇胺(1,2-dioleoyl-*sn*-glycerol-3-phosphoethanolamine, DOPE)。

【0227】 穩定劑脂質的實例包括：1,2-二月桂醯-sn-甘油(1,2-dilauroyl-sn-glycerol, DLG)；1,2-二肉豆蔻醯-sn-甘油(1,2-dimyristoyl-sn-glycerol, DMG)；1,2-二棕櫚醯-sn-甘油(1,2-dipalmitoyl-sn-glycerol, DPG)；1,2-二硬脂醯-sn-甘油(1,2-distearoyl-sn-glycerol, DSG)；1,2-二花生四烯醯-sn-甘油-3-磷酸膽鹼(1,2-diarachidoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DAPC)；1,2-二月桂醯-sn-甘油-3-磷酸膽鹼(1,2-dilauroyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DLPC)；1,2-二肉豆蔻醯-sn-甘油-3-磷酸膽鹼(1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DMPC)；1,2-二棕櫚醯-sn-甘油-3-磷酸膽鹼(1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-O-ethyl-3-phosphocholine, DPePC)；1,2-二月桂醯-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(1,2-dilauroyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, DLPE)；1,2-二肉豆蔻醯-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, DMPE)；1,2-二硬脂醯-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethano

lamine, DSPE) ; 1-棕櫚醯-2-亞油醯-sn-甘油-3-
 磷 酸 膽 鹼
 (1-palmitoyl-2-linoleoyl-sn-glycerol-3-phosphocholine) ; 1-棕櫚醯-2-油醯-sn-甘油-3-磷酸膽
 鹼
 (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycerol-3-phosphocholine, POPC) ; 1-棕櫚醯-2-溶血-sn-甘油-3-磷
 酸 膽 鹼
 (1-palmitoyl-2-lyso-sn-glycerol-3-phosphocholine, P-Lyso-PC) ; 及 1-硬脂醯-2-溶血-sn-甘油
 -3- 磷 酸 膽 鹼
 (1-Stearoyl-2-lyso-sn-glycerol-3-phosphocholine, S-Lyso-PC) 。

【0228】 用來降低免疫抗原性的脂質

【0229】 用來降低免疫抗原性的脂質實例包括聚合化
 和物及聚合物-脂質接合物。

【0230】 用來降低免疫抗原性的脂質實例包括具有聚
 乙二醇(PEG)區域的聚乙二醇修飾脂質。該等PEG區域
 可為任意分子量。在某些實施例中，PEG區域可具有
 200、300、350、400、500、550、750、1000、
 1500、2000、3000、3500、4000或5000道耳頓(Da)
 的分子量。

【0231】 用來降低免疫抗原性的脂質實例包括具有甲
 氧基聚乙二醇區域的化合物。

【0232】 用來降低免疫抗原性的脂質實例包括具有羰基-甲氧基聚乙二醇區域的化合物。

【0233】 用來降低免疫抗原性的脂質實例包括具有多分枝狀PEG區域的化合物。

【0234】 用來降低免疫抗原性的脂質實例包括具有聚甘油區域的化合物。

【0235】 用來降低免疫抗原性的脂質實例包括聚合性脂質，例如 DSPE-mPEG、DMPE-mPEG、DPPE-mPEG及DOPE-mPEG。

【0236】 用來降低免疫抗原性的脂質實例包括PEG-磷脂及PEG-神經醯胺。

【0237】 陽離子型脂質

【0238】 陽離子型脂質的實例包括專利申請案US 2013/022665 A1中所描述的HEDC化合物以及專利申請案US 2013/0330401 A1與US 2013/0115274 A1中所描述的其他化合物。陽離子型脂質的附加實施例亦為所屬技術領域中所熟知。

【0239】 奈米顆粒調配劑

【0240】 本發明實施例可提供脂質體奈米顆粒組成物。

【0241】 在某些實施例中，本發明之可離子化分子可用於形成脂質體組成物，該等脂質體組成物可具有由類脂質分子所形成的雙層膜。

【0242】 奈米顆粒組成物在脂質體結構中可具有一或更多種的本發明可離子化分子，且該等分子可組成脂質體結構、雙層結構、微胞、層狀結構或上述結構的混合。

【0243】 在某些實施例中，組成物可包含一或更多種液體載劑成分。適合用於遞送本發明活性藥劑的液體載劑可為藥學可接受之液體載劑。液體載劑可包括有機溶劑，或水與有機溶劑的組合物。

【0244】 本發明實施例可提供具有10奈米至1000奈米之尺寸的脂質奈米顆粒。在某些實施例中，該等脂質體奈米顆粒可具有10奈米至150奈米的尺寸。

【0245】 在某些實施例中。本發明的脂質體奈米顆粒中可包有RNAi分子，且該等脂質體奈米顆粒暴露在人血清中一小時之後仍保有至少80%之所包裹的RNAi分子。本發明可提供一種用來將活性藥劑分配於細胞、組織或器官、生物體或受試個體(subject)中的組成物，其中，該組成物包括一或更多種本發明的可離子化脂質分子。

【0246】 本發明之組成物可包括該等可離子化脂質分子之其中一或更多者，且搭配一結構脂質、一或更多種穩定劑脂質及一或更多種用來降低該組成物之免疫抗原性的脂質。

【0247】 本發明的可離子化脂質分子可在本發明的組成物中佔有任意的莫耳%。

【0248】 本發明組成物中的可離子化脂質分子可在該組成物的該等脂質成分中佔15莫耳%至40莫耳%。在某些實施例中，一組成物中的可離子化脂質分子可在該組成物之該等脂質成分中佔20莫耳%至35莫耳%。在進一步實施例中，一組成物中的可離子化脂質分子可在該組成物之該等脂質成分中佔25莫耳%至30莫耳%。

【0249】 本發明組成物中的結構性脂質可在該組成物的該等脂質成分中佔25莫耳%至40莫耳%。在某些實施例中，一組成物中的結構性脂質可在該組成物的該等脂質成分中佔30莫耳%至35莫耳%。

【0250】 本發明組成物中之該等穩定劑脂質的總量可在該組成物的該等脂質成分中佔25莫耳%至40莫耳%。在某些實施例中，一組成物中之該等穩定劑脂質的總量可在該組成物的該等脂質成分中佔30莫耳%至40莫耳%。

【0251】 在某些實施例中，本發明組成物可包含兩種或更多種的穩定劑脂質，其中該等穩定劑脂質各自單獨在該組成物的該等脂質成分中佔5莫耳%至35莫耳%。在某些實施例中，本發明組成物可包含兩種或更多種的穩定劑脂質，其中該等穩定劑脂質可各自單獨在該組成物的該等脂質成分中佔10莫耳%至30莫耳%。

【0252】 在某些實施例中，該一或更多種穩定劑脂質的總量可在該組成物的該等脂質中佔25莫耳%至40莫耳%。

耳%，其中該等穩定劑脂質可各自單獨佔5莫耳%至35莫耳%。

【0253】 在某些實施例中，該一或更多種穩定劑脂質的總量可在該組成物的該等脂質中佔30莫耳%至40莫耳%，其中該等穩定劑脂質可各自單獨佔10莫耳%至30莫耳%。

【0254】 該一或更多種用來降低該組成物之免疫抗原性的脂質可在該組成物的該等脂質成分中總共佔1莫耳%至8莫耳%。在某些實施例中，該一或更多種用來降低該組成物之免疫抗原性的脂質可在該組成物的該等脂質成分中總共佔1莫耳%至5莫耳%。

【0255】 在附加態樣中，本發明的組成物可進一步包括陽離子型脂質，且該陽離子型脂質可在該組成物的該等脂質成分中佔5莫耳%至25莫耳%。在某些實施例中，本發明的組成物可進一步包括陽離子型脂質，且該陽離子型脂質可在該組成物的該等脂質成分中佔5莫耳%至15莫耳%。在此等態樣中，本發明組成物中之該陽離子型脂質濃度與該可離子化脂質分子濃度的莫耳比可為5：35至25：15。

【0256】 在本發明的組成物中，全部的脂質成分可包括一或更多種的可離子化脂質分子成分、一或更多種的結構性脂質、一或更多種的穩定劑脂質及一或更多種用來降低該組成物之免疫抗原性的脂質。

【0257】 在某些實施例中，一組成物可包含可離子化脂質化合物 A6、結構性脂質膽固醇、穩定劑脂質 DOPC 與 DOPE 以及用來降低免疫抗原性的脂質 DPP E - m P E G。在某些實施例中，化合物 A6 可佔該組成物的 15 莫耳%至 25 莫耳%；膽固醇、DOPC 及 DOPE 合起來可佔該組成物的 75 莫耳%至 85 莫耳%；及 DPP E - m P E G 可佔該組成物的 5 莫耳%。

【0258】 在一實施例中，化合物 A6 可佔該組成物的 25 莫耳%；膽固醇可佔該組成物的 30 莫耳%，DOPC 可佔該組成物的 20 莫耳%，DOPE 合起來可佔該組成物的 20 莫耳%；及 DPP E - m P E G (2000) 可佔該組成物的 5 莫耳%。

【0259】 藥學組成物

【0260】 本發明進一步思及藉由對患者施用本發明組成物而將活性藥劑分配至患者的器官中以用來治療疾病的方法。可接受治療的器官包括肺、肝、胰臟、腎臟、結腸、骨骼、皮膚及小腸。

【0261】 在進一步態樣中，本發明提供一系列的藥學調配劑。

【0262】 本文中的藥學調配劑可包括活性藥劑以及藥物載劑或本發明之脂質且伴隨有藥學上可接受之載劑或稀釋劑。大體上而言，本案說明內容中的活性藥劑包括可任何可用於惡性腫瘤的活性藥劑，包括任何抑制型核

酸分子及任何小分子藥物。抑制型核酸分子的實例包括核糖核酸酶、反義核酸及RNA干擾分子(RNAi分子)。

【0263】 本發明的藥學調配劑可包含一或更多個的以下每種成分：界面活性劑、稀釋劑、賦形劑、防腐劑、穩定劑、著色劑及助懸浮劑。

【0264】 在由Mack出版公司(位於美國賓州伊斯頓)所出版的《雷氏製藥科學(Remington's Pharmaceutical Sciences)》第18版(1990年)一書中描述一些可用於藥學調配劑的藥學載劑、稀釋劑及成分，以及描述可用來調配及施用本發明之該等組成物及化合物的方法。

【0265】 防腐劑的實例包括苯甲酸鈉、抗壞血酸及由p-羥苯甲酸所形成的酯類化合物。

【0266】 界面活性劑的實例包括醇類化合物、酯類化合物、硫酸化脂族醇。

【0267】 賦形劑的實例包括蔗糖、葡萄糖、乳糖、澱粉、結晶纖維素、甘露糖醇、輕質無水矽酸鹽、鋁酸鎂、矽酸鋁鎂(magnesium metasilicate aluminate)、合成矽酸鋁、碳酸鈣、碳酸氫鈉、磷酸氫鈣及羧甲基纖維素鈣。

【0268】 助懸浮劑的實例包括椰子油、橄欖油、芝麻油、花生油、大豆、乙酸酞酸纖維素(cellulose acetate phthalate)、乙酸甲酯-甲基丙烯酸酯共聚物及酞酸酯(ester phthalates)。

【0269】可對有需要的哺乳動物施用一種用於遞送一或更多種具有基因沈默活性之分子的本發明治療性調配劑。可對哺乳動物施用治療有效量的調配劑及活性藥劑(該調配劑及活性藥劑可包在脂質體中)以用來預防或治療惡性腫瘤。

【0270】給藥的途徑可為局部性或全身性。

【0271】可利用各種途徑來施用本發明的治療有效調配劑，該等途徑包括經靜脈、經腹腔內、經肌肉、經皮下及口服給藥。

【0272】給藥途徑可包括，例如非腸胃道遞送方式，包括肌肉注射、皮下注射、靜脈注射、脊髓內注射，以及鞘內注射、直接心室/腦室注射、腹腔注射、鼻內注射或眼內注射。

【0273】亦可以持續釋放或控制釋放劑型(包括積存注射、滲透壓幫浦及諸如此類者)來施用該調配劑而可以預定的速率來持續性給藥及/或定時脈衝式給藥。

【0274】可經由各種途徑來施用本發明的組成物，該等途徑可包括經口服途徑或非腸胃道途徑，且該等途徑的實例包括，但不限於：口服、靜脈、肌肉、皮下、局部給藥、肺內、氣道、氣管、支氣管、鼻、直腸、動脈、門靜脈(intraportal)、心室內、脊髓內、淋巴結內、淋巴管內、腦內、鞘內、腦室內、經黏膜、經皮膚、鼻腔內、腹腔內及子宮內途徑，且本發明之組成物可調配成適合用於每種給藥途徑的劑型。可從任何已知的劑型

及方法中適當選擇此一劑型及調配方法。可參見例如由渡辺喜照等人編著且由南江堂出版社於2003年出版之《標準藥劑學》(Hyojun Yakuzai gaku, Standard Pharmaceuticals, Ed. by Yoshiteru Watanabe et al., Nankodo, 2003)。

【0275】適用於口服給藥的劑型實例包括，但不限於，粉末、顆粒、錠劑、膠囊、液體、懸浮液、乳劑、凝膠及糖漿，及適用於非腸胃道給藥的劑型實例包括注射，例如注射用溶液、注射用懸浮液、注射用乳劑及即用型注射。用於非腸胃道給藥的調配劑可為諸如水性或非水性的等張滅菌溶液或懸浮液。

【0276】用於非腸胃道給藥(例如利用一次性全劑量注射或連續性輸注給藥)的藥學調配劑包括水溶性形式之活性調配劑的水性溶液。該等活性化合物的懸浮液可製備成合適的油性注射懸浮液。水性注射懸浮液可包含能提高懸浮液之黏性的物質，例如羧甲基纖維素鈉、山梨醇或聚葡萄糖。視情況需要，該懸浮液亦可含有合適的穩定劑或可提高該等化合物之溶解度的試劑以允許製備高濃縮溶液。

【0277】注射用調配劑可以單位劑型的形式呈現，例如以安瓿或以多次劑量瓶的形式呈現且可添加防腐劑。該等調配劑可採用在油性或水性載劑中調配成懸浮液、溶液或乳劑的這類形式，且可包含常規試劑，例如助懸

浮劑、穩定劑及/或分散劑。或者，該等活性成分可為粉末形式，並可在使用之前，使用合適的載劑進行勾兌。

【0278】除了先前所述的製備方式之外，該等調配劑亦可調配成積存式製劑。此種長效調配劑可藉由肌肉注射來給藥。因此，例如可使用合適的聚合物材料或疏水性材料來調配該等調配劑，例如以可接受之油類所配成的乳劑，或可使用離子交換性樹脂或微溶性衍生物，例如微溶性的鹽類。

【0279】亦可使用任何合適的製程及應用局部遞送載劑來調配出可供局部給藥之用且可塗敷於患者皮膚上的本發明組成物及調配劑調。例如，可以手動方式、使用塗敷工具或利用包含兩種方式的方法來塗敷該調配劑。於塗敷之後，可例如藉由按摩使該調配劑進入患者皮膚中。每天可塗敷多次或基本上每天塗敷一次。例如，可每天一次、每天兩次或每天多次在患者皮膚上塗敷該調配劑，或可每兩天塗敷一次、每三天塗敷一次或約每週塗敷一次、每兩週塗敷一次或每隔數週塗敷一次。

【0280】可利用任何適當方式對患者施用文中所述的該等調配劑或藥學組成物。給藥的方法實例包括，但不限於：(a)經由皮下、腹腔內、靜脈、肌肉內、皮膚內、眼眶內、囊內、脊柱內、胸骨內或諸如此類方式(包括輸注幫浦遞送法)來注射給藥；(b)局部給藥，例如藉由積存物植入法直接注射在腎臟或心臟區域中來局部給藥；

以及所屬技術領域中熟悉技藝者認為可使活性化合物與活組織接觸的適當方法。

【0281】 個別醫師可視患者的病況來選擇用於該等藥學組成物的確切配方、給藥途徑及劑型。可參考例如2011年所出版的《古德曼與吉爾曼之治療學藥理基礎 (Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics)》第12版第1章。通常，給予患者的該組成物之劑量範圍可為每公斤的患者體重給予約0.5毫克至1000毫克。視患者的需求，該劑量可以是單一次全給或可在一天或更多天的期間內接連地給藥兩次或更多次。若已針對至少某些疾病建立出化合物的人用劑量，則該等劑量將大致相同，或該劑量為已建立之人用劑量的約0.1%至約500%，更佳為約25%至約250%。若尚未建立人用劑量，例如在遇到新發現的藥學組成物的時候，可從ED50或ID50的值或是從活體外或活體內研究所得到的其他適當值來推測出適當的人用劑量，且需透過在動物上進行的毒性研究及藥效研究。

實施例

【0282】 **實施例1：**利用冷凍乾燥及重新復原來製備siRNA脂質奈米顆粒藥物調配劑

【0283】 將脂質/乙醇溶液以高速注入siRNA緩衝液中約10分鐘而合成出脂質奈米顆粒。隨後，使選自於檸檬酸鹽緩衝液pH6.1、PBS pH7.0、Tris pH7.2及HEPES pH7.4之中的第二緩衝液經過滲濾並用來作為

流過切流式過濾(TFF)盒的外部緩衝液以製造最終水性懸浮液產物。

【0284】 將不同量的保護劑化合物添加至該最終水性懸浮液產物中，且隨後進行0.2/0.8微米過濾。以500毫升或1000毫升的批量來製備脂質奈米顆粒。

【0285】 結果：驚訝地發現該等脂質奈米顆粒可安然渡過冷凍乾燥製程，且該冷凍乾燥物所提供重新復原之脂質奈米顆粒懸浮液具有的平均顆粒尺寸與該初始懸浮液中所呈現的平均顆粒尺寸相近。

【0286】 實施例2：重新復原的本發明siRNA藥物調配劑表現出穩定的顆粒尺寸及siRNA包裹作用而適合用於藥品中。該受保護之冷凍乾燥組成物的該等性質為本發明之siRNA調配劑帶來驚人的穩定性。

【0287】 在此研究中，使用以下適當組成物將以Hsp47基因(GP46)為標靶的siRNA調配在脂質體奈米顆粒中，該適當組成物為：40莫耳%的可離子化脂質、30莫耳%的DOPE、25莫耳%的膽固醇及5.0莫耳%的PEG-DMPE。

【0288】 使用含有蔗糖與(2-羥丙基)- β -環糊精的保護劑組成物來冷凍乾燥該等奈米顆粒調配劑。該組成物中的保護劑總含量為10% (w/v)。蔗糖的用量為6%，及(2-羥丙基)- β -環糊精的用量為4%。因此，(2-羥丙基)- β -環糊精佔該蔗糖加(2-羥丙基)- β -環糊精之總量的40% (w/v)。

【0289】 將脂質/乙醇溶液以高速注入 siRNA 緩衝液中來合成脂質奈米顆粒以製造出最終水性懸浮液產物。由含有 siRNA 之奈米顆粒所形成的初始大量調配劑具有 99 奈米至 101 奈米的平均奈米顆粒尺寸範圍。

【0290】 對該經冷凍乾燥且重新復原之 siRNA 藥物配方進行測試，以測定顆粒尺寸及 siRNA 之包裹作用的穩定性。

【0291】 大體上而言，最佳情況是，該等 siRNA 奈米顆粒調配劑在冷凍乾燥前 (pre-lyophilized) 的狀態與在經冷凍乾燥且重新復原後的狀態之間，該等 siRNA 奈米顆粒調配劑在平均顆粒尺寸上的變化少於約 10%。此外，最佳情況是該等 siRNA 奈米顆粒調配劑在經冷凍乾燥且重新復原後的狀態下表現出至少約 85% 的 siRNA 包裹率 (encapsulation efficiency)。

【0292】 表 2 中示出重新復原之 siRNA 奈米顆粒產物的穩定性。在表 2 中示出經冷凍乾燥後 (AL) 並重新復原的平均顆粒尺寸及 siRNA 包裹率，連同示出由在冷凍乾燥前 (BL) 的溶液在經冷凍並解凍後所得到的類似結果。

表 2：冷凍乾燥前及冷凍乾燥後的奈米顆粒穩定度

總 保護劑 % (w/v)	Z(avg) (奈米)		PDI		動電位 (mV)		% EE		[siRNA] 毫克/毫升
	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%	106	108	0.150	0.165	-2.0	-1.7	92	87	1.9

總 保護劑 % (w/v)	Z(avg) (奈米)		PDI		動電位 (mV)		% EE		[siRNA] 毫克/毫升
	BL	AL	BL	AL	BL	AL	BL	AL	
(C)									
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

【 0 2 9 3 】 * 在表 2 中：使用來自四種不同市售來源 A 、 B 、 C 及 D 的 (2 - 羥丙基) - β - 環糊精保護劑化合物。

【 0 2 9 4 】 在表 2 中，所有的保護劑組成物顯示出該等最終復原的 siRNA 藥物調配劑具有適當穩定性。除了具有最高 siRNA 濃度及總保護劑含量 (1 5 %) 的樣本之外，該等 siRNA 奈米顆粒調配劑顯示出在冷凍乾燥前的狀態與在經冷凍乾燥且重新復原後的狀態之間，其平均顆粒尺寸的變化少於約 1 0 % ，且顯示在重新復原後的狀態具有至少約 8 5 % 的 siRNA 包裹率。

【 0 2 9 5 】 表 2 中的結果顯示，藉由含有 6 0 % 之蔗糖及 4 0 % 之 (2 - 羥丙基) - β - 環糊精的保護劑組成物來冷凍乾燥奈米顆粒調配劑所製備而成的本發明 siRNA 藥物調

配劑在重新復原後，該復原的本發明 siRNA 藥物調配劑在平均顆粒尺寸及 siRNA 包裹率方面極為穩定。

【0296】 實施例 3：二甲基亞硝酸胺 (DMN) 誘發肝纖維化大鼠模型

【0297】 重新復原的本發明 siRNA 藥物調配劑在活體內展現出深遠且驚人的基因沈默效力。在活體內可觀察到該經冷凍乾燥且重新復原的 siRNA 調配劑能使基因表現減量 (knock down)。包裹在脂質體調配劑中的 siRNA 是用於二甲基亞硝酸胺 (DMN) 誘發肝纖維化的大鼠模型中。

【0298】 使用以下適當組成物將以 Hsp47 基因 (GP46) 為標靶的 siRNA 調配在脂質體奈米顆粒中，該適當組成為：40 莫耳 % 的可離子化脂質、30 莫耳 % 的 DOPE、25 莫耳 % 的膽固醇及 5.0 莫耳 % 的 PEG-DMPE。

【0299】 使用含有蔗糖及 (2-羥丙基)- β -環糊精的保護劑組成物來冷凍乾燥該等奈米顆粒調配劑。該總保護劑含量為 10 % (w/v)。(2-羥丙基)- β -環糊精的含量在 20 % 至 40 % (w/v) 間做變化。

【0300】 將當天冷凍乾燥所得到的新鮮塊狀樣本儲存在 -80°C。將該等樣本用生理食鹽水重新復原且進一步使用生理食鹽水稀釋成每毫升含有 0.17 毫克之 siRNA 的濃度。3 毫升體積的復原時間約為 20 秒。

【0301】 測試該 Hsp47 siRNA 之最終藥品復原溶液的活體內效力，此為一項嚴謹測試，用來測試在經冷凍乾燥並復原後該等含有核酸藥劑之奈米顆粒的活力。

【0302】 在此研究中使用體重範圍在180公克至200公克間的雄性 Sprague Dawley 大鼠，並將該等大鼠分成10組，每組7至8隻。使用含 pH 7.4 之 PBS 的液體劑型。在給藥當天，於給藥之前，重新復原調配劑並使用生理食鹽水稀釋成各組所需的濃度。在給藥的前一天將冷凍的控制組調配劑解凍並稀釋。於注射當天，將一定量的 DMN 量加至 pH 7.4 的 PBS 中以得到濃度為5毫克/毫升之澄清給藥溶液。以腹腔注射方式來給藥。於第1天至第3天，每日給藥1次(QD)，連續給藥3天。使用0.17毫克/毫升至0.5毫克/毫升的調配劑濃度範圍來給予0.5毫克/公斤至1.5毫克/公斤(siRNA)的劑量，且給藥體積為3毫升/公斤。在施用DMN之前，先對大鼠進行秤重，並於第1天至第3天以腹腔注射方式為該等動物注射10毫克/公斤的DMN(溶液濃度為5毫克/毫升)，給藥體積為2毫升/公斤。於第4天至第6天，為該等動物注射體積為1毫升/公斤的DMN。於第5天，在給予藥物之前，先將經DMN處理的動物按體重(第5天)隨機分組。於第6天施用待測藥物(注射DMN的首天為第1天)。於第7天取出大鼠的肝臟，且立即用pH 7.4的PBS(使用40毫升的PBS以20毫升/分鐘的速率)流經剪斷的肝門靜

脈來沖洗肝臟。從左側葉收集2毫米(mm)厚的橫斷肝切片。

【0303】 gp46 mRNA減量評估：使用RNeasy管柱(Qiagen)萃取出大鼠肝臟的總RNA。使用Nanodrop分光光度計來定量RNA。

【0304】 如第1圖中所示，受40%(2-羥丙基)- β -環糊精保護的本發明siRNA藥物調配劑於重新復原之後在活體內對於Hsp47(GP46)的基因沈默作用展現出深遠且驚人的效力。

【0305】 尤其是，該受40%(2-羥丙基)- β -環糊精所保護之調配劑的活體內Hsp47(GP46)基因沈默效力為實質100%。

【0306】 反之，該等含有20%至30%(2-羥丙基)- β -環糊精之調配劑的活體內效力所呈現出的基因減量效果則低得令人難以接受，其基因減量效果分別只有47%和32%。

【0307】 總之，該出乎預料之外有利的結果顯示，在含有蔗糖及(2-羥丙基)- β -環糊精的組成物中，可在該組成物中使用至少40%的(2-羥丙基)- β -環糊精來製成用來冷凍乾燥本發明之脂質體siRNA調配劑的保護劑組成物。

【0308】 生理特性顯示出，藉由含有約40%至約70%之(2-羥丙基)- β -環糊精且其餘部分為蔗糖的保護劑組成物來冷凍乾燥奈米顆粒調配劑所製備而成本發明

siRNA 藥物調配劑在重新復原後，該復原的本發明 siRNA 藥物調配劑在平均顆粒尺寸方面極為穩定。若 (2-羥丙基)- β -環糊精低於約 40%，該等調配劑易具有不正常增加的包裹值，這代表發生了不想要的結構變化。因此，(2-羥丙基)- β -環糊精成分的較佳範圍為約 40% 至約 70%。

【0309】 結論是，在活體中，重新復原的本發明 siRNA 藥物調配劑使用 40% 至 70% 的 (2-羥丙基)- β -環糊精對於核酸藥劑有著令人驚訝的效果。

【0310】 實施例 4：重新復原的本發明之 siRNA 藥物調配劑在活體內表現出足以用來進行基因沈默的血漿中濃度。觀察經冷凍乾燥且重新復原之 siRNA 調配劑在活體內的血漿中藥物動力模式。

【0311】 使用以下適當組成物將以 Hsp47 基因 (GP46) 為標靶的 siRNA 調配在脂質體奈米顆粒中，該適當組成為：40 莫耳%的可離子化脂質、30 莫耳%的 DOPE、25 莫耳%的膽固醇及 5.0 莫耳%的 PEG-DMPE。

【0312】 使用含有蔗糖與 (2-羥丙基)- β -環糊精的保護劑組成物來冷凍乾燥該等奈米顆粒調配劑。該保護劑總含量為 12.5% (w/v)。(2-羥丙基)- β -環糊精的含量佔該總保護劑的 40% (w/v)，其餘部分為蔗糖。

【0313】 將單劑劑量的該經冷凍乾燥之調配劑以靜脈注射方式給藥後，評估該調配劑在 Sprague Dawley

大鼠體內的血漿中藥物動力(PK)模式，並與經冷凍的調配劑做比較。使用雜合式ELISA法測量血漿樣本中的siRNA濃度。為Sprague Dawley大鼠插好雙頸靜脈導管。於第一天，經由一頸動脈導管以單劑一次性全劑量靜脈注射(single bolus intravenous dose injection)方式於15秒內將該試驗材料注入該等動物。於每個時間點，經由每隻動物的頸靜脈導管收集0.30毫升的全血於K2EDTA試管中。

【0314】 如第2圖中所示，該經冷凍乾燥且重新復原之siRNA藥物調配劑的血漿中濃度動力與僅經過冷凍之對照控制組調配劑的血中濃度藥物動力模式實質相同。該經冷凍且重新復原的siRNA核酸藥物調配劑提供令人驚訝的血漿中藥劑有效濃度(efficient level)。

【0315】 就此實施例而言，表3中示出在施用單劑劑量之後，於時間-濃度曲線(AUC)下方的面積及血漿中濃度峰值(Cmax)。

表3：經冷凍乾燥、重新復原之核酸調配劑的血漿中藥物

動力學		
	重新復原	冷凍
AUC	2751	2683
Cmax	2922	3350

【0316】 結論是，此實驗示出該經冷凍且重新復原之核酸藥物調配劑的血漿中濃度藥物動力模式與僅經過冷凍之正對照控制組調配劑的血漿中濃度藥物動力模式實

質相同。因此，該經冷凍且重新復原的 siRNA 核酸藥物調配劑在血漿中提供令人驚訝的血漿中藥劑有效濃度且未發生分解情形(相對於未經冷凍乾燥的組成物而言)。

【0317】 實施例 5：保護在 100 奈米尺寸範圍內的脂質奈米顆粒。

【0318】 將脂質/乙醇溶液分散在 siRNA 緩衝液中來合成脂質奈米顆粒，藉以製造最終水性懸浮液產物。該等奈米顆粒具有 105 奈米至 106 奈米的平均尺寸。該等奈米顆粒是使用化合物 HEDC 作為可離子化脂質(見，例如 US 2013/022665 A1)所合成而得。該等奈米顆粒中包有以 Hsp47 基因為標靶的 siRNA。

【0319】 表 4 示出冷凍乾燥前的奈米顆粒特性，其中該最終水性懸浮液僅被冷凍，且隨後加以解凍。表 5 示出冷凍乾燥後的奈米顆粒特性。

【0320】 從表 4 到表 5 在平均顆粒尺寸上僅增加 6.7%。

表 4：冷凍乾燥前的奈米顆粒特性(100 奈米之尺寸範圍)

編號	蔗糖/2HPBCD (重量%/重量%)	冷凍乾燥前(冷凍)					
		Z(avg) (奈米)	PDI	動電位 (mV)	EE (%)	[siRNA] (毫克/毫升)	產率 (%)
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

表 5：冷凍乾燥後的奈米顆粒特性(100奈米之尺寸範圍)

編號	蔗糖/2HPBCD (重量%/重量%)	冷凍乾燥後(重新復原)					
		Z(avg) (奈米)	PDI	動電位 (mV)	EE (%)	[siRNA] (毫克/毫升)	產率 (%)
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

【0321】在附加試驗中，針對含有6%(w/v)之蔗糖、4%(w/v)之(2-羥丙基)-β-環糊精及濃度為2毫克/毫升且以Hsp47基因為標靶之siRNA的九種最終產物溶液進行試驗，以測試當經冷凍乾燥及重新復原，平均顆粒尺寸是否增加。令人驚訝的是，相較於冷凍乾燥之前的最終產物溶液，經冷凍乾燥後而重新復原的藥品在平均顆粒尺寸方面表現出不到5%的些微增加，從102奈米提高到107奈米。

【0322】實施例6：保護在50奈米尺寸範圍內的脂質奈米顆粒。

【0323】將脂質/乙醇溶液以高速注入siRNA緩衝液中來合成脂質奈米顆粒，藉以製造最終水性懸浮液產物。該等奈米顆粒具有48奈米至50奈米的平均尺寸。該等奈米顆粒是使用化合物A6作為可離子化脂質所合成

而得。該等奈米顆粒中包有濃度為2毫克/毫升且以Hsp47基因為標靶的siRNA。

【0324】表6示出在50奈米範圍內的奈米顆粒於冷凍乾燥前(BL)及冷凍乾燥後(AL)的奈米顆粒特性。

表6：50奈米範圍內的奈米顆粒在冷凍乾燥之前及之後的奈米顆粒特性

蔗糖/2HPBCD (重量%/重量%)	Z(avg) (奈米)		PDI		動電位 (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

【0325】實施例7：保護siRNA脂質奈米顆粒以供長期儲存。

【0326】重新復原的本發明siRNA藥物調配劑在體內對於基因沈默作用表現出長效穩定性。

【0327】使用以下適當組成物將以Hsp47基因(GP46)為標靶的siRNA調配在脂質體奈米顆粒中，該適當組成物為：40莫耳%的可離子化脂質、30莫耳%的DOPE、25莫耳%的膽固醇及5.0莫耳%的PEG-DMPE。

【0328】使用含有蔗糖與(2-羥丙基)-β-環糊精的保護劑組成物來冷凍乾燥該等奈米顆粒調配劑。該保護劑總含量為10%至12.5%或10%至15%(w/v)。(2-羥丙基)-β-環糊精的含量為40%(w/v)，蔗糖佔60%。該環糊精為CAVITRON W7 HP5 PHARMA環糊精。

【 0 3 2 9 】 該 等 小 瓶 在 如 表 7 中 所 示 的 溫 度 下 儲 存 4 週。經儲存及重新復原之後，該等奈米顆粒的平均尺寸 (P S ， Z - a v g) 驚人地保持穩定，如表 7 中所示。

【 0 3 3 0 】 如 表 7 中 所 示 ， 該 等 s i R N A 奈 米 顆 粒 的 尺 寸 與 該 初 始 組 成 物 中 之 s i R N A 奈 米 顆 粒 的 尺 寸 相 差 在 4 % 以 內 。

表 7 ： 奈 米 顆 粒 特 性

樣本 總% 保護劑	溫度 -20°C				溫度 5°C			
	初始 Z-avg		1 個月 Z-avg		初始 Z-avg		1 個月 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

【 0 3 3 1 】 實 施 例 8 ： 保 護 s i R N A 脂 質 奈 米 顆 粒 以 供 長 期 儲 存 。

【 0 3 3 2 】 重 新 復 原 的 本 發 明 s i R N A 藥 物 調 配 劑 在 體 內 對 於 基 因 沈 默 作 用 表 現 出 長 效 穩 定 性 。

【 0 3 3 3 】 使 用 以 下 適 當 組 成 物 將 以 H s p 4 7 基 因 (G P 4 6) 為 標 靶 的 s i R N A 調 配 在 脂 質 體 奈 米 顆 粒 中 ， 該 適 當 組 成 物 為 ： 4 0 莫 耳 % 的 可 離 子 化 脂 質 、 3 0 莫 耳 % 的

D O P E 、 2 5 莫 耳 % 的 膽 固 醇 及 5 . 0 莫 耳 % 的 P E G - D M P E 。

【 0 3 3 4 】 使用含有蔗糖與(2 - 羥丙基) - β - 環糊精的保護劑組成物來冷凍乾燥該等奈米顆粒調配劑。該保護劑總含量為 1 0 % 至 1 2 . 5 % 或 1 0 % 至 1 5 % (w / v) 。 (2 - 羥丙基) - β - 環糊精的含量為 4 0 % (w / v) ，且蔗糖佔 6 0 % 。該環糊精為 C A V I T R O N W 7 H P 7 P H A R M A 環糊精。

【 0 3 3 5 】 該等小瓶在如表 8 中所示的溫度下儲存 4 週。經過儲存及重新復原之後，該等奈米顆粒的平均尺寸 (P S ， Z - a v g) 驚人地保持穩定，如表 8 中所示。

【 0 3 3 6 】 如表 8 中所示，該等 s i R N A 奈米顆粒的尺寸與該初始組成物中之 s i R N A 奈米顆粒的尺寸相差在 5 % 以內。

表 8 ： 奈 米 顆 粒 特 性

樣本 總% 保護劑	溫度 -20°C				溫度 5°C			
	初始 Z-avg		1 個月 Z-avg		初始 Z-avg		1 個月 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

【0337】文中明確提及的所有出版物、專利及文獻皆以引用方式全文併入本案以用於各種目的。

【0338】應明白，本發明不受限於文中所述的特定方法、規程、材料及試劑，因為該等方法、規程、材料及試劑可能有所改變。亦瞭解，文中所使用的術語僅作為描述特定實施例之用，且不欲用來限制本發明範圍。所述技術領域中熟悉技藝者將可無困難地改變替代物，並可在不偏離所述內容的範圍與精神下，對文中揭示的內容做出諸多修飾改變，且此等實施例落入本案說明內容及後附請求項的範圍內。

【0339】應注意，除非內文中另有明確指示，否則本文及後附請求項中所使用的單數形式「一」、「一個」及「該」包括複數之意。同樣的，該等用語「一(或一個)」、「一或更多個」及「至少一個」在本文中可互換使用。亦應注意，該等用語「包括」、「包含」、「含有」及「具有」可互換使用，且應以寬廣且不設限的方式來解讀該等用語。

【0340】除非文中另有指示，否則文中列舉的數值範圍僅欲作為用來提及落入該範圍中之每個單獨數值的便捷方法，且每個單獨數值應併入本案說明書中，就如同在本文中單獨載明該數值般。就馬庫西(Markush)群組方面，所屬技術領域中熟悉技藝者將意識到本案說明內容包括馬庫西群組成員中的個別成員及子群組。

【0341】 在無需進一步闡述的情況下，相信所屬技術領域中熟悉該項技藝者可依據以上說明內容來最大程度地運用本發明。因此，隨附的具體實施例可解釋為僅作示範說明之用，且不應以任何方式來限制本發明的其餘說明內容。

【0342】 本案說明書中揭示的所有特徵可以任意組合方式來進行組合。此說明書中揭示的每個特徵可替換成能達到相同、等效或類似目的的替代特徵。

【符號說明】

【0343】

無

【生物材料寄存】

【0344】 國內寄存資訊 (請依寄存機構、日期、號碼順序註記)

無

【0345】 國外寄存資訊 (請依寄存國家、機構、日期、號碼順序註記)

無

【發明申請專利範圍】

【第1項】 一種用於製造一包含一或更多種核酸活性劑之脂質奈米顆粒固態冷凍乾燥物的組成物，該組成物包括：

該等脂質奈米顆粒於一藥學可接受溶液中的一水性懸浮液，其中該等脂質奈米顆粒內包有該一或更多種核酸活性劑；

一糊精化合物；及

一醣類糖化合物 (saccharide sugar compound)；

其中該等糊精化合物與糖化合物的總量佔該組成物的 2% 至 20% (w/v)；並且

該糊精化合物佔該等糊精化合物與糖化合物之總量的 40% 至 70% (w/v)。

【第2項】 如請求項 1 所述之組成物，其中該糊精化合物佔該等糊精化合物與糖化合物之總量的 40% 至 55% (w/v)。

【第3項】 如請求項 1 所述之組成物，其中該糊精化合物佔該等糊精化合物與糖化合物之總量的 40% 至 45% (w/v)。

【第4項】 如請求項 1 所述之組成物，其中當該組成物經冷凍乾燥及重新復原時，該等奈米顆粒的平均尺寸

與該初始組成物中之該等奈米顆粒的平均尺寸相差在 10 % 以內。

【第 5 項】 如請求項 1 所述之組成物，其中當該組成物經冷凍乾燥、儲存及重新復原時，該等奈米顆粒的平均尺寸與該初始組成物中之該等奈米顆粒的平均尺寸相差在 10 % 以內。

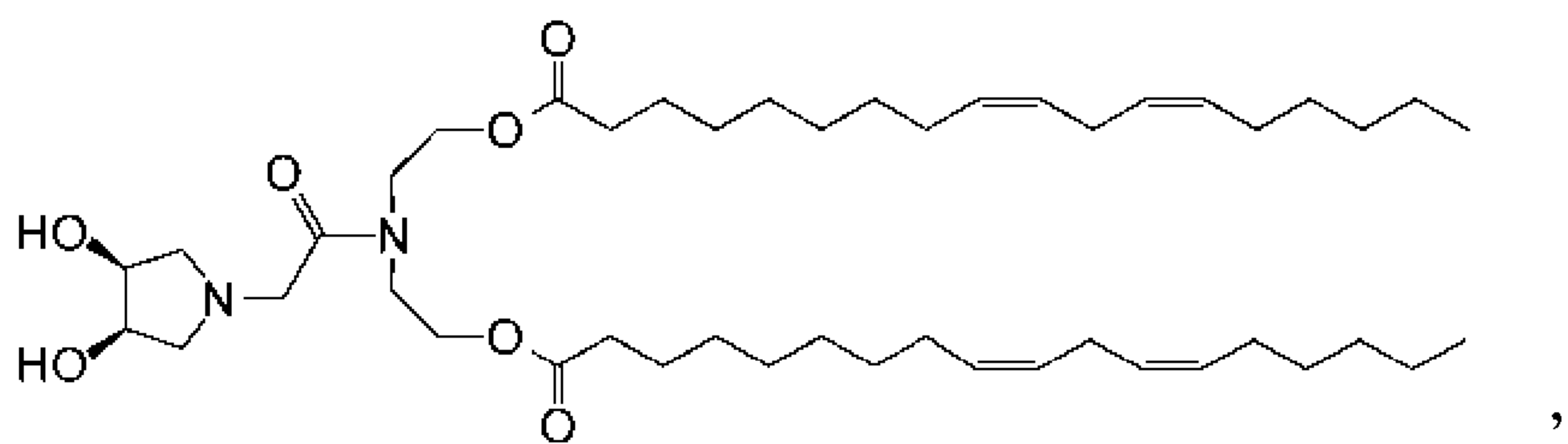
【第 6 項】 如請求項 5 所述之組成物，其中該已冷凍乾燥的組成物在 5 °C 儲存至少一個月。

【第 7 項】 如請求項 5 所述之組成物，其中該已冷凍乾燥的組成物在 -20 °C 儲存至少一個月。

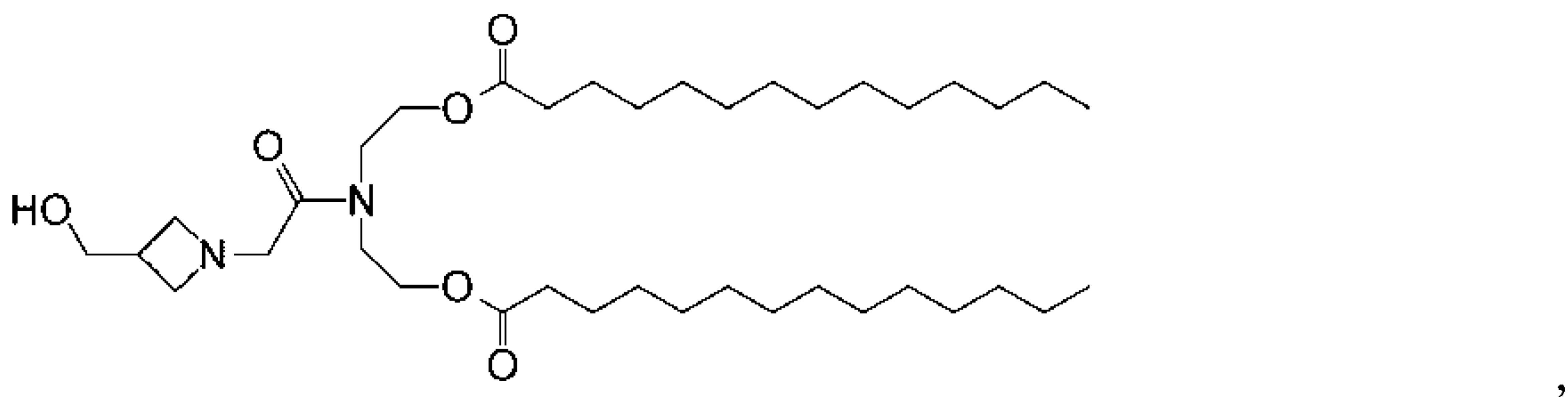
【第 8 項】 如請求項 1 所述之組成物，其中該等奈米顆粒具有 45 奈米至 110 奈米的一平均直徑。

【第 9 項】 如請求項 1 所述之組成物，其中該等核酸活性劑的濃度為 1 毫克/毫升至 10 毫克/毫升。

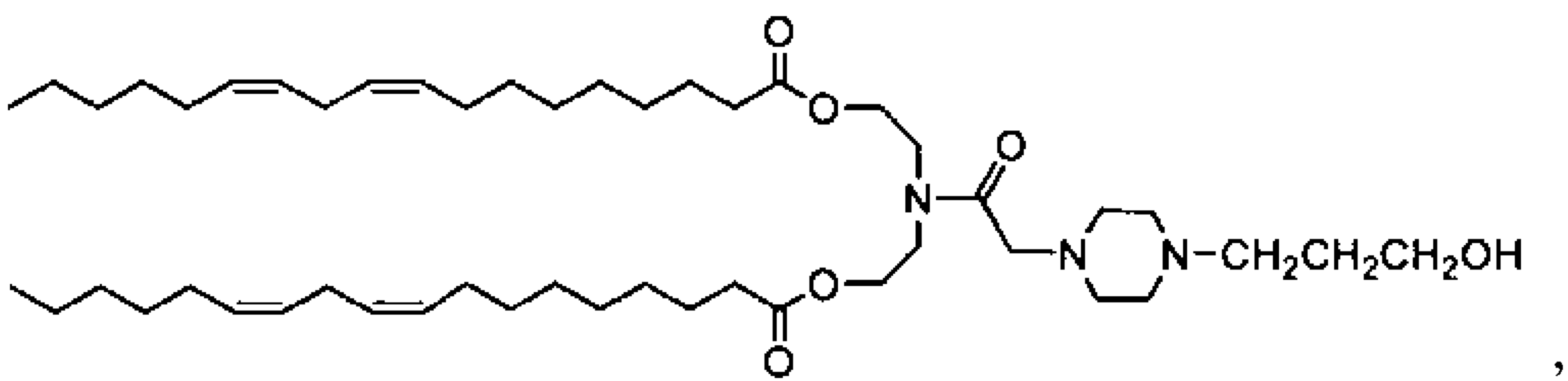
【第 10 項】 如請求項 1 所述之組成物，其中該等脂質奈米顆粒包括選自於以下的一化合物：化合物 A6、化合物 A9、化合物 AA、化合物 AB、化合物 C2、化合物 F5、化合物 F7、化合物 C24 及 HEDC，其中 HEDC 為(2-(雙(2-(十四醯氧基)乙基)胺基)-N-(2-羥乙基)-N,N-二甲基-2-側氧乙烷溴化胺鎘(2-(bis(2-(tetradecanoyloxy)ethyl)amino)-N-(2-hydroxyethyl)-N,N-dimethyl-2-oxoethan-aminium bromide)，化合物 A6 為



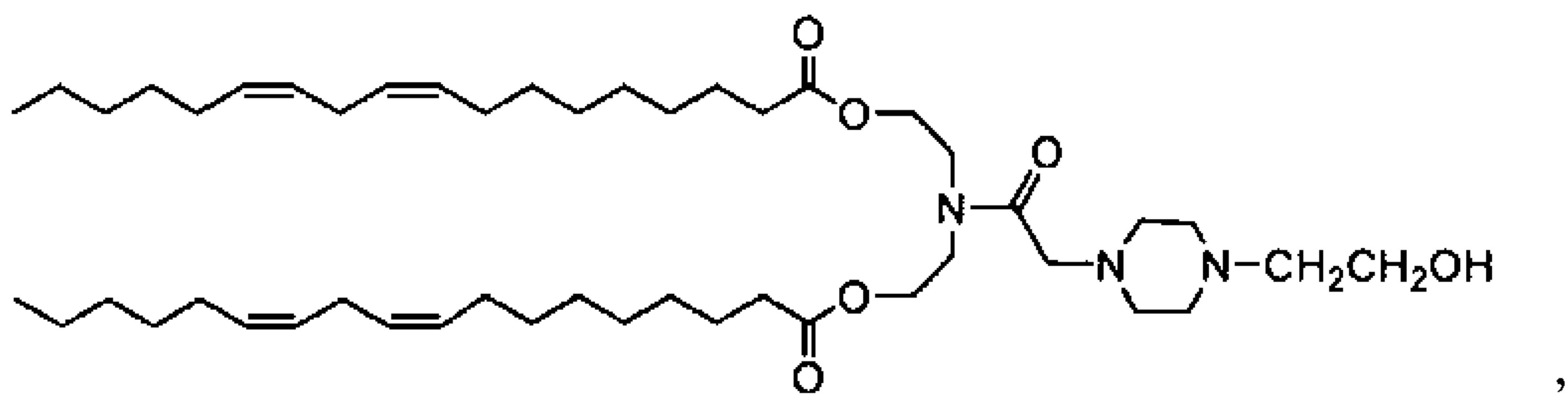
化 合 物 A 9 為



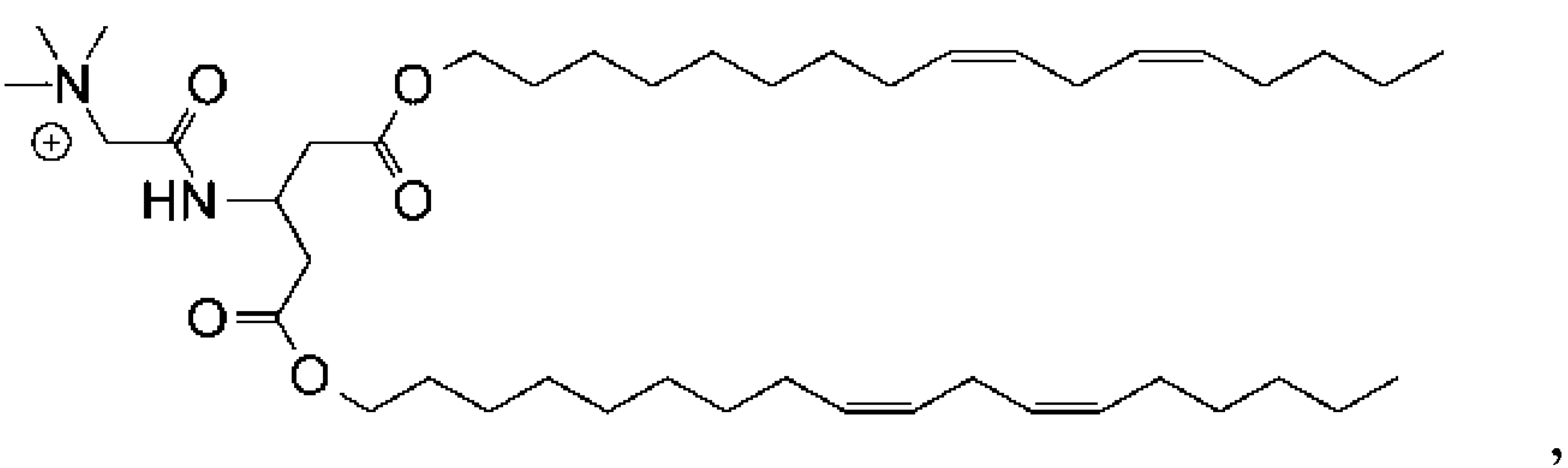
化 合 物 A A 為



化 合 物 A B 為



化 合 物 C 2 為



化 合 物 F 5 為



化合物 F7 為



化合物 C 2 4 為



【第 11 項】 如請求項 1 所述之組成物，其中該一或更多種核酸活性劑為能夠調節 RNA 干擾作用的 RNAi 分子。

【第12項】 如請求項11所述之組成物，其中該等RNAi分子為siRNAs、shRNAs、ddRNAs、piRNAs或rasiRNAs。

【第13項】 如請求項1所述之組成物，其中該一或更多種核酸活性劑為 miRNAs、反義 RNAs、質體、雜合寡聚核苷酸或適配體。

【第 14 項】 如請求項 1 所述之組成物，其中該藥學可

接受溶液為一 HEPES 緩衝液、一磷酸鹽緩衝液、一檸檬酸鹽緩衝液或一含有三(羥甲基)胺基甲烷的緩衝液。

【第 15 項】 如請求項 1 所述之組成物，其中該糊精化合物是一環糊精。

【第 16 項】 如請求項 15 所述之組成物，其中該環糊精化合物的第 2 羥基位置、第 3 羥基位置及第 6 羥基位置之中的一或更多個位置被下列基團所取代：磺烷基、苯磺烷基、乙醯烷基、羥烷基、丁二酸羥烷酯、丙二酸羥烷酯、戊二酸羥烷酯、己二酸羥烷酯、羥烷基、順丁烯二酸羥烷酯、草酸羥烷酯、反丁烯二酸羥烷酯、檸檬酸羥烷酯、酒石酸羥烷酯、蘋果酸羥烷酯或檸康酸羥烷酯。

【第 17 項】 如請求項 15 所述之組成物，其中該環糊精化合物為(2-羥丙基)- β -環糊精、2-羥丙基- β -環糊精丁二酸酯、(2-羥丙基)- γ -環糊精或 2-羥丙基- γ -環糊精丁二酸酯。

【第 18 項】 如請求項 15 所述之組成物，其中該環糊精化合物為磺丁基醚- β -環糊精或磺丁基醚- γ -環糊精。

【第 19 項】 如請求項 15 所述之組成物，其中該環糊精化合物為甲基- β -環糊精或甲基- γ -環糊精。

【第20項】 如請求項15所述之組成物，其中該環糊精化合物連接於一聚合物鏈或網狀結構。

【第21項】 如請求項15所述之組成物，其中該環糊精化合物包括一被吸附質化合物。

【第22項】 如請求項21所述之組成物，其中該被吸附質化合物選自於以下物質：膽固醇、羊毛甾醇、酵母甾醇、酵母甾烯醇、鏈甾醇、豆甾烷醇、二氫羊毛甾醇、7-去氫膽固醇、聚乙二醇修飾膽固醇、乙酸膽甾酯、花生四烯酸膽甾酯、丁酸膽甾酯、己酸膽甾酯、肉豆蔻酸膽甾酯、棕櫚酸膽甾酯、二十二酸膽甾酯、硬脂酸膽甾酯、辛酸膽甾酯、正-癸酸膽甾酯、月桂酸膽甾酯、二十四烯酸膽甾酯、壬酸膽甾酯、正-戊酸膽甾酯、油酸膽甾酯、反油酸膽甾酯、芥子酸膽甾酯、庚酸膽甾酯、反亞油酸膽甾酯、亞油酸膽甾酯、 β -穀甾醇、菜油甾醇、麥角甾醇、藝苔甾醇、 δ -7-豆甾醇及 δ -7-燕麥甾醇。

【第23項】 如請求項1所述之組成物，其中該醣類糖化合物是一單醣或雙醣糖化合物。

【第24項】 如請求項23所述之組成物，其中該糖化合物選自於以下物質：蔗糖、乳糖、乳酮糖、麥芽糖、海藻糖、纖維二糖、麴二糖、糖化麴二糖、異麥芽糖、槐糖、海帶二糖、龍膽二糖、松二糖、麥芽酮糖、異

麥芽酮糖、龍膽二酮糖、甘露二糖、蜜二糖、蜜二酮糖及木二糖。

【第25項】 一種用於製造一或更多種核酸活性劑之固態冷凍乾燥物的方法，該方法包括冷凍乾燥如請求項1至24中任一項所述之組成物。

【第26項】 一種使用如請求項25所述之方法所製造的固態冷凍乾燥物。

【第27項】 一種用於製造一藥品的方法，該方法包括重新復原如請求項25所述之一固態冷凍乾燥物。

【第28項】 一種使用如請求項27所述之方法所製造的藥品。

【第29項】 一種用於製造一固態冷凍乾燥物的方法，該方法包括以下步驟：

合成脂質奈米顆粒，其中該等脂質奈米顆粒中包有一或更多種核酸活性劑；

提供該等脂質奈米顆粒於一藥學可接受溶液中的一水性懸浮液；

在含有該等脂質奈米顆粒的該溶液中加入一糊精化合物；

在含有該等脂質奈米顆粒的該溶液中加入一醣類糖化合物；

冷凍乾燥含有該等脂質奈米顆粒的該溶液，從而形

成該固態冷凍乾燥物，

其中該等糊精化合物與醣類糖化合物的總量佔含有該等脂質奈米顆粒之該溶液的 2% 至 20% (w/v)，以及

該糊精化合物佔該等糊精化合物與醣類糖化合物之總量的 40% 至 70% (w/v)。

【第 30 項】 如請求項 29 所述之方法，其中該糊精化合物佔該等糊精化合物與醣類糖化合物之總量的 40% 至 55% (w/v)。

【第 31 項】 如請求項 29 所述之方法，其中該糊精化合物佔該等糊精化合物與醣類糖化合物之總量的 40% 至 45% (w/v)。

【第 32 項】 如請求項 29 所述之方法，其中該等奈米顆粒具有 45 奈米至 110 奈米的一平均直徑。

【第 33 項】 如請求項 29 所述之方法，其中該等核酸活性劑的濃度為 1 毫克/毫升至 10 毫克/毫升。

【第 34 項】 如請求項 29 所述之方法，其中該一或更多種核酸活性劑為能夠調節 RNA 干擾作用的 RNAi 分子。

【第 35 項】 如請求項 29 所述之方法，其中該糊精化合物是一環糊精。

【第 36 項】 如請求項 35 所述之方法，其中該環糊精

化合物的第 2 羥基位置、第 3 羥基位置及第 6 羥基位置之中的一或更多個位置被下列基團所取代：磺烷基、苯磺烷基、乙醯烷基、羥烷基、丁二酸羥烷酯、丙二酸羥烷酯、戊二酸羥烷酯、己二酸羥烷酯、羥烷基、順丁烯二酸羥烷酯、草酸羥烷酯、反丁烯二酸羥烷酯、檸檬酸羥烷酯、酒石酸羥烷酯、蘋果酸羥烷酯或檸康酸羥烷酯。

【第 37 項】 如請求項 35 所述之方法，其中該環糊精化合物為(2-羥丙基)- β -環糊精、2-羥丙基- β -環糊精丁二酸酯、(2-羥丙基)- γ -環糊精或 2-羥丙基- γ -環糊精丁二酸酯。

【第 38 項】 如請求項 35 所述之方法，其中該環糊精化合物為磺丁基醚- β -環糊精或磺丁基醚- γ -環糊精。

【第 39 項】 如請求項 35 所述之方法，其中該環糊精化合物為甲基- β -環糊精或甲基- γ -環糊精。

【第 40 項】 如請求項 35 所述之方法，其中該環糊精化合物包括一被吸附質化合物。

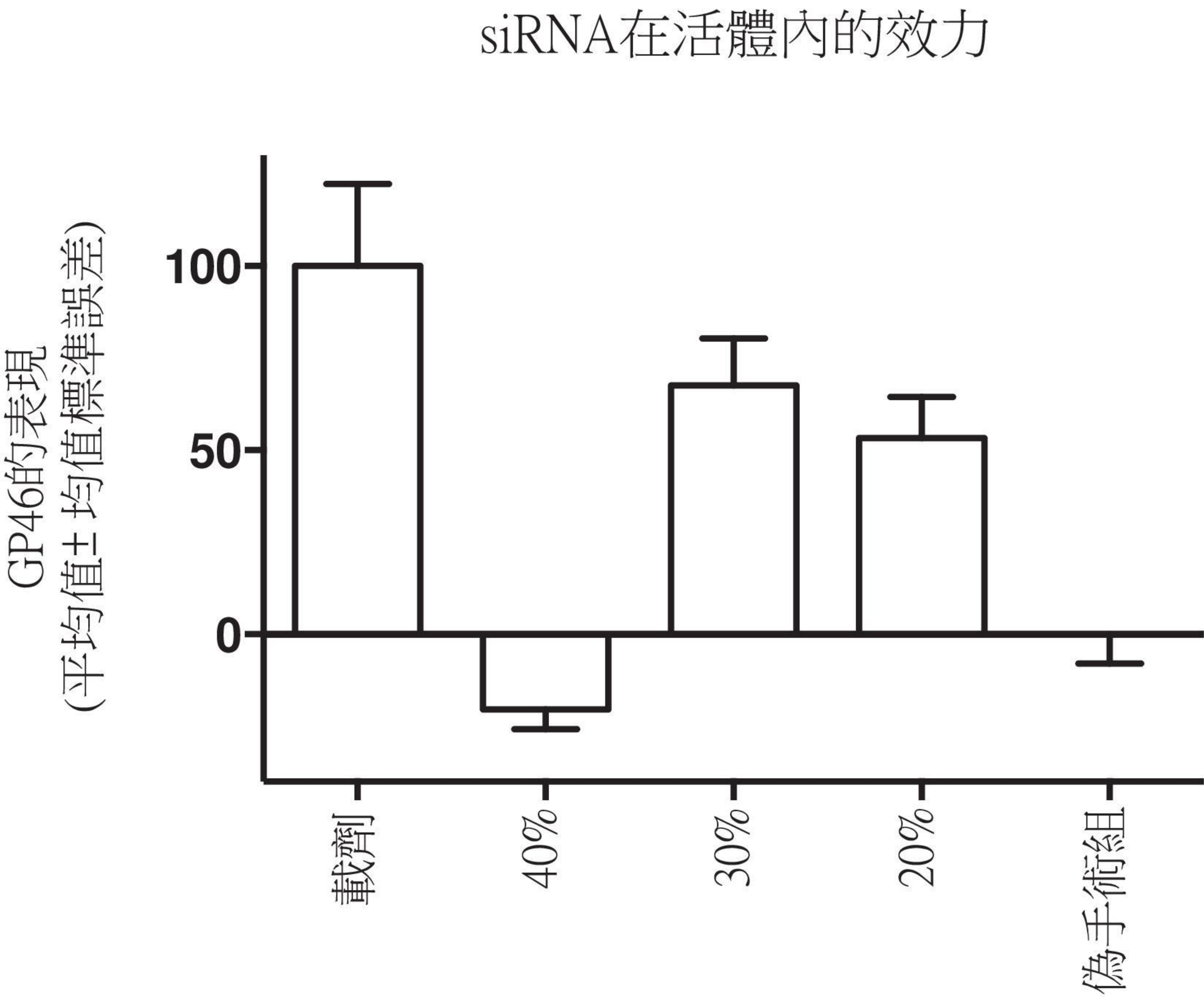
【第 41 項】 如請求項 29 所述之方法，其中該醣類糖化合物是一單醣或雙醣糖化合物

【第 42 項】 如請求項 1 所述之組成物，其中該組成物經冷凍乾燥及重新復原後，尺寸大於 0.2 微米的凝集

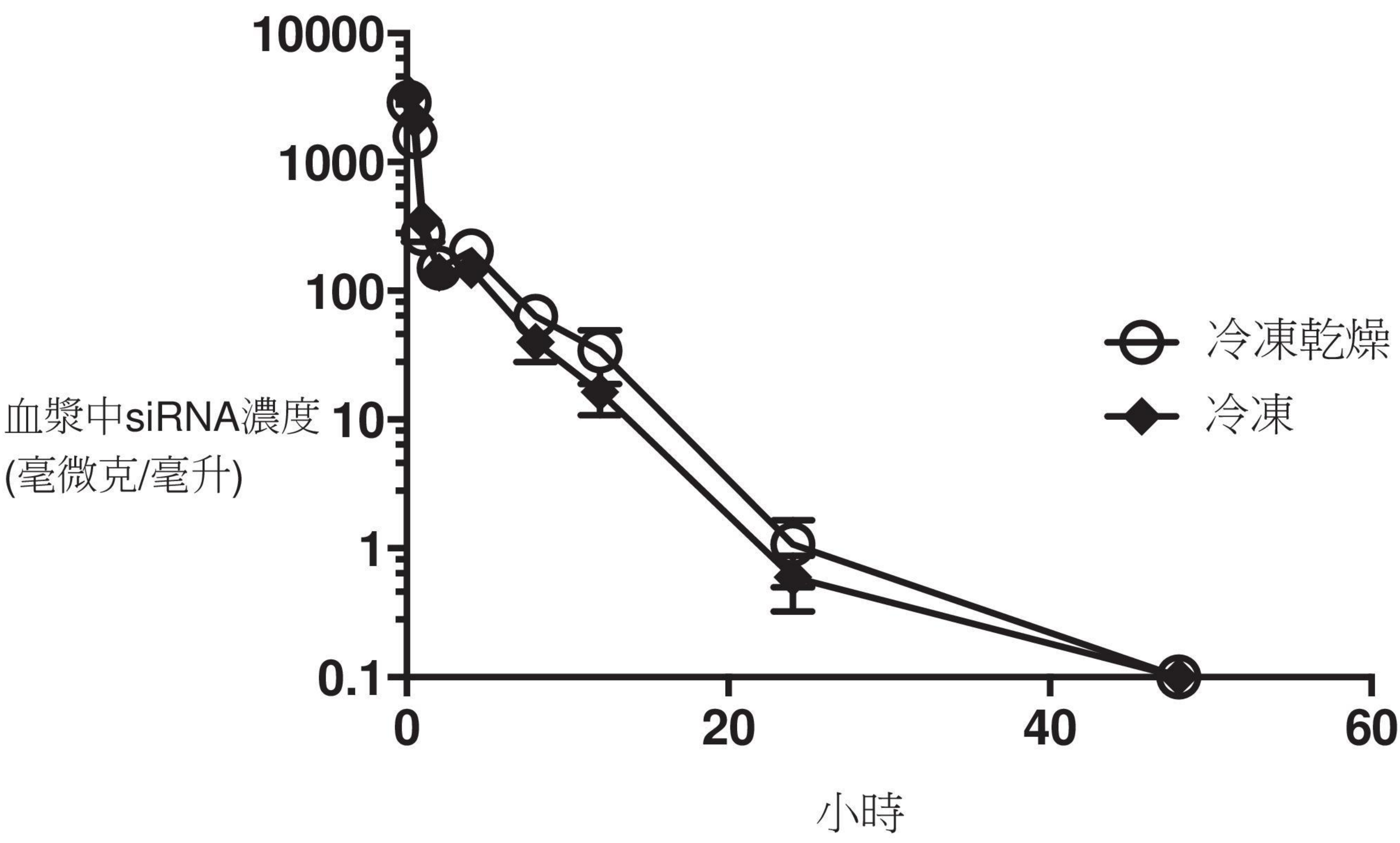
顆粒少於 0.001% (w/v)。

【第 43 項】 如請求項 5 所述之組成物，其中一核酸藥品在經過 6 個月的儲存時間之後重新復原且保留至少 80% 的活性。

【發明圖式】



第1圖



第 2 圖