

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6149041号  
(P6149041)

(45) 発行日 平成29年6月14日(2017.6.14)

(24) 登録日 平成29年5月26日(2017.5.26)

(51) Int.Cl.

F 1

A 61 K 9/127	(2006.01)	A 61 K 9/127
A 61 K 31/713	(2006.01)	A 61 K 31/713
A 61 K 47/10	(2006.01)	A 61 K 47/10
A 61 K 47/28	(2006.01)	A 61 K 47/28
A 61 K 47/34	(2017.01)	A 61 K 47/34

請求項の数 20 (全 36 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-540571 (P2014-540571)
(86) (22) 出願日	平成24年11月2日 (2012.11.2)
(65) 公表番号	特表2014-534232 (P2014-534232A)
(43) 公表日	平成26年12月18日 (2014.12.18)
(86) 國際出願番号	PCT/IB2012/002916
(87) 國際公開番号	W02013/064911
(87) 國際公開日	平成25年5月10日 (2013.5.10)
審査請求日	平成27年10月16日 (2015.10.16)
(31) 優先権主張番号	61/556,124
(32) 優先日	平成23年11月4日 (2011.11.4)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	000003964 日東電工株式会社 大阪府茨木市下穂積1丁目1番2号
(74) 代理人	100102842 弁理士 葛和 清司
(72) 発明者	キノボヴ、ヴィクター アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92 056、オーシャンサイド、シー クリフ ウェイ 2104
(72) 発明者	ウィッテ、リチャード、ピー。 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92 110、サンディエゴ、スプリング タイ ド テラス 3462

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】脂質-核酸粒子を無菌的に生成するための単回使用システム

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

脂質-薬物ナノ粒子を無菌的に調製するためのシステムであって、  
水混和性の有機溶媒中の脂質を含む有機脂質溶液を保持するための、第1保持ユニット；

薬物を含む水性溶液を保持するための、第2保持ユニット；  
前記第1保持ユニットから移送された有機脂質溶液と前記第2保持ユニットから移送された水性薬物溶液とを混合して脂質-薬物混合物を生成するための、混合ユニット；  
前記第1保持ユニットからの有機脂質溶液を前記混合ユニットに含有される水性薬物溶液に、前記混合ユニット内の溶液の有機溶媒濃度がその注入初期値から注入終期値への勾配を形成するように添加するための、注入手段；

水性緩衝液を保持するための、第3保持ユニット；  
前記混合ユニットから移送された脂質-薬物混合物を、前記第3保持ユニットから移送された水性緩衝液で希釈してリポソーム懸濁液を生成するための、希釈ユニット；  
前記リポソーム懸濁液を濃縮し、前記有機溶媒を除去するためのトランスフローフィルターを含む、濃縮ユニット；および  
前記の有機溶媒除去後の濃縮リポソーム懸濁液を回収するための、単回使用ベッドを含む；

ここで、前記システムが、単回のバッチ使用に適合されるように、滅菌された使い捨ての構成要素を含む、前記システム。

**【請求項 2】**

第1保持ユニットに接続された、有機脂質溶液を調製するためのユニットをさらに含む、請求項1に記載のシステム。

**【請求項 3】**

有機脂質溶液が第1保持ユニットに移送される間に該溶液を殺菌するためのフィルターをさらに含む、請求項1または2に記載のシステム。

**【請求項 4】**

脂質溶液、薬物溶液、脂質-薬物混合物および懸濁液が、無菌である、請求項1～3のいずれか一項に記載のシステム。

**【請求項 5】**

濃縮ユニットが、単回使用ポンプ室付きのダイヤフラム定量ポンプを含む、請求項1～4のいずれか一項に記載のシステム。

10

**【請求項 6】**

脂質が、カチオン性脂質、ヘルパー脂質、ステロール、およびポリエチレングリコール(PEG) - 脂質結合体を含む、請求項1～5のいずれか一項に記載のシステム。

**【請求項 7】**

脂質が、標的脂質をさらに含む、請求項1～6のいずれか一項に記載のシステム。

**【請求項 8】**

薬物が、d s R N A分子である、請求項1～7のいずれか一項に記載のシステム。

**【請求項 9】**

水混和性の有機溶媒が、エタノールである、請求項1～8のいずれか一項に記載のシステム。

20

**【請求項 10】**

第1および第2の溶液が、35～40 の温度で混合される、請求項1～9のいずれか一項に記載のシステム。

**【請求項 11】**

第2保持ユニットが、薬物を水性緩衝液中にpH3.5～pH4.5で含有する、請求項1～10のいずれか一項に記載のシステム。

**【請求項 12】**

第3保持ユニットが、水性緩衝液を中性pHで含む、請求項1～11のいずれか一項に記載のシステム。

30

**【請求項 13】**

薬物を封入したリポソームの平均粒子径が、50nm～150nmである、請求項1～12のいずれか一項に記載のシステム。

**【請求項 14】**

注入手段が、混合ユニット内の水性溶液の空気と水との界面に有機溶液を送達する注入ポートを含む、請求項1～13のいずれか一項に記載のシステム。

**【請求項 15】**

注入手段が、混合ユニット内の水性溶液中に浸漬されており、そこに有機溶液を送達する注入ポートを含む、請求項1～13のいずれか一項に記載のシステム。

40

**【請求項 16】**

凍結乾燥手段をさらに含む、請求項1～13のいずれか一項に記載のシステム。

**【請求項 17】**

凍結乾燥手段が、凍結手段および乾燥手段を含む、請求項16に記載のシステム。

**【請求項 18】**

水性緩衝液が、スクロースまたはトレハロースを含む、請求項16または17に記載のシステム。

**【請求項 19】**

凍結手段が、脂質-薬物混合物を1 / 分で20 から - 40 まで冷却する、請求項17または18に記載のシステム。

50

**【請求項 20】**

乾燥手段が、脂質 - 薬物混合物を約 - 15 ~ 約 - 35 にて乾燥する手段を含む、請求項 17 ~ 19 のいずれか一項に記載のシステム。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】****関連出願の相互参照**

本出願は、2011年11月4日に出願された米国仮出願第61/556,124号の利益を主張し、これはその全体が参照によって本明細書に組み込まれる。

**【0002】**

10

本明細書は、脂質 - 核酸ナノ粒子を、簡単にかつ再現性よく無菌条件下で形成する方法のための、単回使用構成要素を含むシステムに向けられている。

**【背景技術】****【0003】**

脂質は、治療用分子の送達、特に核酸の送達のための担体として潜在的に有用である。脂質はリポソームを形成し、これは核酸分子を封入、複合化、または取り込むことができ、それにより、このクラスの治療用分子の標的細胞への送達を、例えば静脈内から循環へ等の投与によって増強する。医薬組成物におけるそれらの有用性は、脂質 - 核酸ナノ粒子を再現性よく生成するために利用可能な方法によって制限される。様々な方法が、かかるナノ粒子を生成するために考案されている。

20

脂質（小胞）のみからなるナノ粒子を、簡単にかつ再現性よく、超音波処理することなく生成する一つの方法は、Batzri et al., 1973, *Biophys Biochem Acta* 298:1015-19およびKremer et al., 1977, *Biochemistry* 16:3932-35に記載されたエタノール注入を利用し、ここでは、エタノール中に溶解された脂質を水性溶液中に注入して、リポソームを自発的に形成させる。

**【0004】**

Van Buitenen et al. US 7468151には、リポソームなどの微粒子を殺菌するための閉回路システムが記載されている。回路システムは、トランスマッパー（transflow）濾過（TFF）ユニットに接続された混合室を含む。TFFユニットは、微粒子の分散液を無菌条件下で精製する。液体は、TFFを介して混合室から無菌的にポンプで送りこまれる。TFFに保持された物質（保持液）は、精製される前に、混合室とTFFユニットを介して再利用される。精製プロセスは、TFF保持液中の微粒子を除去することなく、一つの装置で無菌的に行われる。

30

**【0005】**

他では、核酸 - リポソーム粒子を、脂質と核酸を結合する特定の方法を用いて生成する方法が記載されている。Hirota et al., 1999, *BioTechniques* 27:286-89には、核酸分子でコーティングされたリポソームが、エタノール中のカチオン性脂質が核酸の水性溶液中に注入された場合に、自発的に形成されることを教示している。Maurer et al., 2001, *Biophysical J.*, 80:2310-26およびMaurer et al. US 7094423には、リポソーム中に核酸分子を封入する方法を教示している。この方法は、カチオン性脂質を含む予備成形リポソームの使用を含む。リポソームは、エタノールを水性溶液に添加することによって不安定化される。核酸分子は、不安定な脂質に添加される。エタノールを除去すると、リポソームは、再形成しつつ核酸を封入する。核酸をリポソームに封入する別の方法は、Semple et al., 2001, *Biophys Biochem Acta* 1510:152-66およびSemple et al. US 6858225に教示されている。この方法は、リポソームを形成するためにイオン化可能なカチオン性脂質を用いて、封入効率を高める。脂質のエタノール溶液を、低pHで緩衝された水性溶液中の核酸と混ぜ合わせる。次にエタノールを、pHを中性の値に上昇させつつ、除去する。再構成中の凝集がサイズに大きなばらつきをもたらすため、どちらの方法も、得られたりポソームの更なる処理を必要とする。

40

**【0006】**

50

MacLachlan et al. US 7901708には、核酸を封入した均一サイズのリポソームを生成するための、方法および装置が記載されている。水性緩衝液におけるRNAの流れは、エタノール中のカチオン性脂質の流れと、Tコネクタにおいてほぼ等しい流量で混合され、ここで脂質小胞は、高エタノール濃度(45%)で瞬時に形成される。溶媒および溶質濃度は、混合プロセス全体を通して一定に保たれる。リポソームが希釈される静的ミキサーは関与しない。安定した核酸リポソームは、プロセスの終了時において、滅菌充填ステップの直前に滅菌される。

上記の方法は、リポソームの生成プロセス中に細菌汚染を最小限にするための多大な労力を必要とし、これには、オートクレーブ処理、洗浄、規制的負荷を満たすこと含む。予備形成されたリポソームを調製するための大規模な機械的処理ステップを必要とせず、脂質-核酸粒子を単分散集団に減少させる処理ステップも必要とすることなく核酸を封入するための製造方法に対する、未だに満たされていない必要性が存在する。  
10

#### 【発明の概要】

##### 【0007】

本説明の一側面は、脂質-核酸ナノ粒子を無菌的に調製するためのシステムであって、水混和性の有機溶媒中の脂質を含む有機脂質溶液用の、第1保持ユニット；治療薬を含む水性溶液用の、第2保持ユニット；静的ミキサー付き混合ユニット、有機脂質溶液を混合室に添加する、注入手段；水性緩衝液用の、第3保持ユニット；  
20 希釈ユニット；リポソーム懸濁液を濃縮し、有機溶媒を除去するためのトランスマルチフィルターを含む、濃縮ユニット；および

有機溶媒を除去した後の濃縮リポソーム懸濁液を回収するための、単回使用ベッドを含む；ここで、混合ユニットは水性薬物溶液を含有し、脂質溶液は、混合ユニットの薬物溶液に少なくとも5分間定常に添加されて、最大で12:1の脂質:RNA比を有する脂質-薬物混合物を生成し、

ここで、脂質-薬物混合物は希釈ユニットに移送され、水性緩衝液の添加により希釈され；および

ここで、前記システムは滅菌された使い捨ての構成要素から構成されて、単回のバッチ使用に適合するようになっている、前記システムである。  
30

##### 【0008】

システムはさらに、第1保持ユニットに接続された、有機脂質溶液を調製するためのユニットを含んでよい。システムはさらに、有機脂質溶液を、これが第1保持ユニットに移送される間に殺菌するためのフィルターを含んでよい。システムはさらに、無菌の、脂質溶液、薬物溶液、脂質-薬物混合物および懸濁液を含んでよい。濃縮ユニットは、単回使用ポンプ室付きのダイヤフラム定量ポンプを含んでよい。脂質は、カチオン性脂質、ヘルパー脂質、ステロール、およびポリエチレンジコール(P EG)-脂質結合体を含むことができ、さらに標的脂質を含んでよい。治療薬はdsRNA分子である。混合物中の脂質とdsRNAの濃度は、2.5:1の脂質:RNA電荷比からなる。水混和性の有機溶媒は、エタノールであってよい。第1および第2の溶液は、35~40の温度で混合されてよい。第2保持ユニットは、治療薬を水性緩衝液中にpH3.5~pH4.5で含有してよい。第3保持ユニットは、水性緩衝液を中性pHで含むことができる。治療薬を封入したリポソームの平均粒子径は、80nm~150nmであってよい。注入手段は、混合ユニット内の水性溶液の空気と水との界面に有機溶液を送達する注入ポートを含むか、または、混合ユニット内の水性溶液中に浸漬されておりそこに有機溶液を送達する注入ポートを含む。システムはさらに、凍結乾燥ステップを含んでよい。凍結乾燥ステップは、凍結ステップおよび乾燥ステップを含んでよい。水性緩衝液は、スクロースまたはトレハロースを含んでよい。凍結ステップは、脂質-薬物混合物を1/分で20から-40まで冷却することができる。乾燥ステップは、脂質-薬物混合物を約-15~-約-35  
40

にて乾燥するステップを含む。

【図面の簡単な説明】

【0009】

【図1】図1は、本説明の単回使用システムを示す図である。

【0010】

例示の態様の詳細な説明

本明細書に提供される説明は、例えば核酸、タンパク質、およびペプチド等の負に荷電した治療用ポリマーなどの、脂質に封入された治療用分子を作製するための方法に関する。本明細書に提供される説明は、脂質に封入された核酸分子を作製するための方法を含む。この方法は、リポソームに封入された治療用分子からなる粒子の大規模製造に特に適している。この方法は、生成された粒子が、単分散性（すなわち、本明細書で規定されるように、0.2未満の多分散性指数（PDI））で、50～150nmの間の狭くかつ均一なサイズ分布であるという、予想外で驚くべき結果を提供する。この方法は、エタノールなどの水混和性の有機溶媒に溶解した脂質を水性溶液中に溶解した負に荷電した治療用ポリマーと混合して、有機溶媒を除去することにより、封入するという手段を提供する。脂質および負に荷電した治療用ポリマーの絶対的および相対的な濃度は、小さな粒子を生成するのに十分である。記載の方法により生成された粒子は、単分散の集団を得るために、例えば押出しなどの機械的処理を必要としない。10

【0011】

説明の方法は従来方法に比べて、大容量にスケールアップ可能な容易さ、ならびに温度、溶質、pH、および処理時間の広い範囲にわたって堅固であることにより、利点を有する。20

説明の方法は従来方法に比べて、均一な粒子の集団を、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。

【0012】

説明の方法は従来方法に比べて、均一なナノ粒子の集団を、脂質と負に荷電した治療用ポリマーの混合により生成される粒子を機械的に処理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。これらの追加のステップには、例えば、それらのサイズを減少させ、治療上許容される範囲の均一性を達成するための、超音波処理、均質化、または押出しが挙げられる。30

説明の方法は、ナノ粒子を生成するための追加の処理ステップなしに、従来の方法と同等かまたはより優れた核酸封入効率を達成するという利点を有する。

説明の方法の他の利点は、脂質成分および条件に関する明細書の説明においてさらなる詳細が提供されているため、明らかになるであろう。

【0013】

以下の略語を、本説明で使用する。

V F : ベントフィルター

T G : 温度計

S U B : 単回使用ベッド

T F F : トランスマルチフィルター

P P : 蠕動ポンプ

P G : 圧力計

スケール : 重量を測定する手段

【0014】

図1は、以下の要素を含む単回使用システムを示す。

脂質ストック：この容器は、選択した脂質を水混和性の有機溶媒中に含む。好ましい溶媒として、エタノールが示されている。脂質の濃度は、スループットが増加するように調整することができる。容器は、T G付きの使い捨てバッグと混合手段で構成される。バッグは、96～100%エタノールに脂質を添加するための開口部、V F、およびバルブによって制御される出口管を有する。バッグは、加熱可能かつ再利用可能で電気的に接地さ4050

れた容器内に収納されている。バッグは、脂質溶液を動作濃度に希釈するための、追加のエタノールを添加する手段を有する。

#### 【0015】

P P 1 : 蠕動ポンプ1。これは、脂質ストックを、脂質ストック容器から0.45/0.22 μmフィルターを通して、濾過脂質ストック容器にポンプで送り込む。

濾過脂質ストック：この容器は、動作濃度の脂質を含む。容器は、混合手段とTG付きの使い捨てバッグである。これは、脂質ストックを入れるための開口部、VF、およびバルブ制御の出口管を有する。バッグは、加熱可能かつ再利用可能で電気的に接地された、スケール付き容器内に収納されている。

#### 【0016】

s i R N Aストック：この容器は、水性緩衝液中に選択された薬物を含む。好ましい薬物はs i R N Aであり、好ましい緩衝液はクエン酸緩衝液である。濃度は、スループットが増加するように調整することができる。容器は、混合手段を有する使い捨てバッグである。バッグは、溶質と溶媒を添加するための開口部と、バルブ制御の出口管を有する。バッグは、R N A溶液を動作濃度に希釈するための、追加の緩衝液を添加する手段を有する。

P P 2 : 蠕動ポンプ2。これは、s i R N Aストックを、s i R N Aストック容器から0.45/0.22 μmフィルターを通して、濾過s i R N Aストック容器にポンプで送り込む。

#### 【0017】

濾過s i R N Aストック：この容器は、s i R N Aを動作濃度で含む。この要素はスケールを含む。容器は、再利用可能な容器に収納された使い捨てのバッグである。これは、s i R N Aストック用の1または2以上の開口部および、バルブ制御の出口管を有する。バッグは、スケール付き再使用可能容器に収納されている。

#### 【0018】

P P 3 : 濾過脂質ストックを[35%エタノール中のリポソームs i R N A]とラベルした容器に移送するための、蠕動ポンプ3。これはPG(PG1)を装備。

P P 4 : 濾過s i R N Aストックを[35%エタノール中のリポソームs i R N A]容器に移送するための、蠕動ポンプ4。これもPG(PG2)を装備。

#### 【0019】

[35%エタノール中のリポソームs i R N A]：この容器は、35%エタノールでリポソームと薬物の混合物を含む。この要素は、VFおよびTGを含む。濾過脂質およびs i R N Aストック用の開口部は、バルブ制御の出口管から分離されている。好ましいユニットは、再利用可能な容器に収納された使い捨てバッグである。

リン酸緩衝液：この容器は、緩衝液(好ましくはリン酸緩衝液)、混合手段、およびスケールを含む。これは、開口用蓋およびバルブ付き出口管を有する大型の容器である。

#### 【0020】

濾過リン酸緩衝液：この容器は、リン酸緩衝液容器に、チューブ、0.45/0.22 μmフィルター、および蠕動ポンプによって接続されている。これは、混合手段およびバルブ付き出口管を有し、該出口管は、P P 5を介して[10%エタノール中のリポソームs i R N A]容器およびT F F S U B容器に至るチューブにつながっている。容器は、使い捨てライナーで裏打ちされた、再利用可能な容器である。

P P 5 : これは、濾過リン酸緩衝液を、濾過リン酸緩衝液容器から[10%エタノール中のリポソームs i R N A]容器へ、およびT F F S U B容器へと、ポンプで送り込む。P P 5は、PG(PG4)に接続されている。

#### 【0021】

[10%エタノール中のリポソームs i R N A]：この容器は、35%エタノール中のリポソームと薬物を濾過リン酸緩衝液容器内で希釈した後に、リポソームと薬物の混合物を10%エタノール中に含む。この容器は、使い捨てライナーで裏打ちされた再利用可能な容器であり、リポソームs i R N A溶液用の入口、VF、スケール、およびT F F S U

10

20

30

40

50

B 容器へ導くバルブ付き出口管を有する。

P P 6 : これは、10%エタノール中のリポソームおよび薬物を、[10%エタノール中のリポソーム si RNA]容器から、0.45 / 0.22 μmフィルターを通して、T F F S U B 容器へと、ポンプで送り込む。

#### 【0022】

T F F S U B : この容器は、流入ポートであって、[10%エタノール中のリポソーム si RNA]容器からの10%エタノール中のリポソームと薬物用の；濾過リン酸緩衝液容器からの緩衝液用の；および T F F ユニットからの保持液用の、全てバルブ付きの前記流入ポートを含む。これはまた、V F およびバルブ付き出口管も含む。

使い捨てポンプヘッド付き計量ポンプ : この高圧ポンプは、2つのP G (P G 3 および P G 4 )に接続されている。これは、リポソームおよび薬物を、T F F S U B から T F F ユニットに移送する。

#### 【0023】

T F F : このユニットは、1本の対角線が描かれた長方形の対として識別される。動作中に、エタノール溶液中のリポソーム / 薬物は T F F ユニットを通過して、エタノールが除去される。T F F ユニットにより除去されたエタノールは、システムから出る。2つ以上の T F F を、バルブで接続して並列に動作させることができる。保持される溶液（保持液）は T F F から出て T F F S U B に再循環され、必要に応じて T F F ユニットを介してリサイクルされて全てのエタノールを除去する。圧力計 (P G 4 ) は、保持液の圧力を監視する。タンク N<sub>2</sub> に保存された窒素ガスを用いて計量ポンプを強化し、必要に応じて背圧を生成して、T F F 保持液の第1の10 LのS U B 容器への移送を最終的に促進する。

#### 【0024】

10 LのS U B : これはスケールを装備した単回使用容器である。任意に、S U S は、3つの10 LのS U B 容器のシリーズを含む。T F F 保持液を0.45 / 0.22 μmフィルターを通してポンプで送り、バイオバーデン（汚染微生物数）を減少させ、処理ストリームに侵入し得た微生物汚染に起因する微生物汚染から、生成物が完全に自由であることを確実にする。全プロセス装置が真に無菌であれば、後者の濾過ステップを省略することも可能となり得る。得られたT F F 保持液を、無菌充填時に包装する。

#### 【0025】

無菌充填 : このステップは、異なる装置を使用して別のプロセスとして実行される凍結乾燥に先行する。凍結乾燥前の無菌充填ステップは、担体材料の添加、例えばマンノース、グルコース、またはバルクを提供するためもしくは凍結乾燥ステップ中にRNAを安定化させるための他の材料の添加を含むことができる。

システムは、各ステップを通る物質の移動を、手動で制御するように構成されている。脂質、薬物、溶媒、および緩衝液と接触する全ての要素は単回使用であり、使い捨てである。このシステムは10 Lのバッチについて示されており、1000 L以上にまで拡張可能である。要素は、リポソーム / 薬物のバッチ毎に1度使用するように設計されている。

#### 【0026】

製造プロセスを達成する手段は、フロー図（図1）に示すように、次のような一連のステップである。

脂質と薬物のストック溶液を、脂質ストック容器および si RNAストック容器に別々に調製する。ストック溶液は、高濃度で調製することができる。混合は、ストック容器内で攪拌することによって行う。脂質ストック溶液の温度は、設定温度に調整することができる。脂質ストックを調製するために使用する容器は、純粋な有機溶媒を高温で使用する場合には、最小限の浸出可能な（leachable）物質を有するように選択する。

#### 【0027】

ストック溶液を、0.45 / 0.22 μmフィルターを通して、濾過脂質ストック容器および濾過 si RNAストック容器に別々にポンプで送り込む。ストック溶液は、濾過ストック容器への移送の前または間に、ストック溶液を希釈するためのさらなる溶媒と混合することができる。

10

20

30

40

50

同様に、水性緩衝液をリン酸緩衝液容器中に調製し、濾過リン酸緩衝液容器にポンプで送ることにより、滅菌濾過する。

濾過 s i R N A 溶液を、[ 3 5 % エタノール中のリポソーム s i R N A ] 容器にポンプで送る。

#### 【 0 0 2 8 】

有機溶媒中の脂質を、[ 3 5 % エタノール中のリポソーム s i R N A ] 容器内の水性 s i R N A 溶液中に、水性溶液を混合しつつ、制御された設定温度下で、3 5 % エタノールの最終濃度で脂質 - 薬物粒子を形成するのに有効な速度で、ポンプで送る。

#### 【 0 0 2 9 】

脂質の添加は、針または針のセットを介し、単一のポートまたは複数のポートを通して行うことができる。これは、水性溶液の表面に上方から行うか、表面下より水性溶液に注入してもよい。添加および混合により、[ 3 5 % エタノール中のリポソーム s i R N A ] 容器内の溶液のエタノール濃度は、3 0 % ~ 4 0 % へ、好ましくは 3 5 % へ増加される。増加は緩やかであり、初期値（好ましくは 0 % ）から最終値（好ましくは 3 5 % ）への勾配を形成する。この勾配は、1 分 ~ 6 0 分またはそれ以上に延長してよい。

#### 【 0 0 3 0 】

[ 3 5 % エタノール中のリポソーム s i R N A ] 容器内の溶液が最終エタノール濃度（好ましくは 3 5 % ）に達すると、溶液は [ 3 5 % エタノール中のリポソーム s i R N A ] 容器からポンプで排出され、濾過リン酸緩衝液容器から別々にポンプ排出された緩衝液と混合され、混合物が水混和性のアルコールで、好ましくは 1 0 % ~ 2 0 % のエタノールで、最も好ましくは 1 0 % エタノールで希釈されて、[ 1 0 % エタノール中のリポソーム s i R N A ] 容器に移送される。

#### 【 0 0 3 1 】

1 0 % エタノール溶液は、水性緩衝液に対してダイアフィルトレーションして、エタノールを除去する。

T F F 保持液（0 % エタノール、1 0 0 % 水性緩衝液）は、第 1 の 1 0 L S U B に保存される。

T F F 保持液は、任意に濾過されて、無菌充填のためにバイオバーデンを減少させることもできる。

#### 【 0 0 3 2 】

無菌充填は、凍結乾燥ステップを含む。凍結乾燥ステップは、ステップ 1 0 における滅菌 T F F 保持液を生成するプロセスとは連続していない。すなわち、このステップは、T F F 保持液を提供する S U S ユニットとは異なる場所で実行されるのが好ましい。例えばスクロースまたはグルコースなどの炭水化物を凍結乾燥の前に加えることができ、これによりナノ粒子を安定化させ、および / またはバルクを追加する。

#### 【 0 0 3 3 】

説明の方法で使用される脂質混合物は、少なくとも、負に荷電した治療用ポリマーと複合化するための正に荷電した脂質（カチオン性脂質）、および凝集を防止するためのポリエチレングリコール含有脂質結合体（P E G 脂質）を含む。カチオン性脂質は、広範囲の p H 条件下での永久カチオン性電荷であるか、低い p H ( p H 6 未満 ) で荷電し中性 p H ( p H 6 . 5 ~ 8 ) において正味の荷電のないイオン化可能なカチオン性脂質であるか、または永久カチオン性脂質とイオン化可能カチオン性脂質の組み合わせであることができる。脂質混合物はまた、標的脂質、ポリマー、ステロイド、リン脂質、または別の脂質グループのメンバーである、脂肪、ワックス、脂溶性ビタミン、モノグリセリドもしくはジグリセリド、脂肪酸アシル、グリセロ脂質、グリセロリン脂質、スフィンゴ脂質、サッカロ脂質およびポリケチドなども、含有することができる。この方法はまた、中性または負に荷電した成分のみによるリポソームの形成にも、使用することができる。

好ましくは、脂質混合物の成分は以下の群から選択してもよい。

#### 【 0 0 3 4 】

カチオン性脂質

10

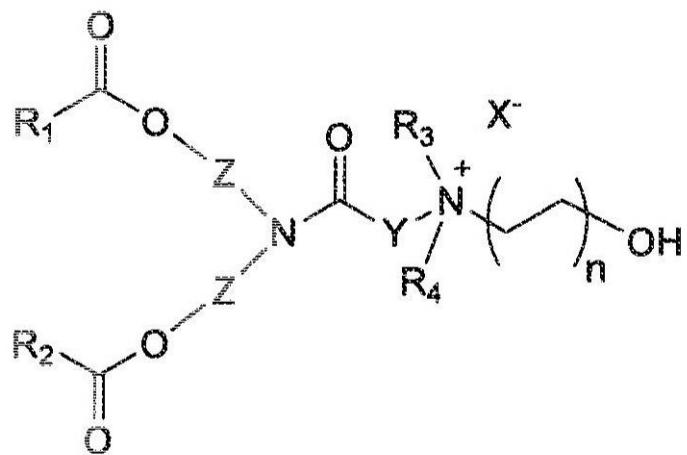
20

30

40

50

本明細書の範囲内であるのは、式 I で表されるカチオン性脂質である：  
【化 1】



10

式中、

Z = アルキルリンカー、C<sub>2</sub> ~ C<sub>4</sub> アルキル、

Y = アルキルリンカー、C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキル、

R<sub>1</sub> および R<sub>2</sub> は、各々独立して、C<sub>10</sub> ~ C<sub>30</sub> アルキル、C<sub>10</sub> ~ C<sub>30</sub> アルケニル  
、または C<sub>10</sub> ~ C<sub>30</sub> アルキニル、C<sub>10</sub> ~ C<sub>30</sub> アルキル、C<sub>10</sub> ~ C<sub>20</sub> アルキル  
、C<sub>12</sub> ~ C<sub>18</sub> アルキル、C<sub>13</sub> ~ C<sub>17</sub> アルキル、C<sub>13</sub> アルキル、C<sub>10</sub> ~ C<sub>30</sub>  
アルケニル、C<sub>10</sub> ~ C<sub>20</sub> アルケニル、C<sub>12</sub> ~ C<sub>18</sub> アルケニル、C<sub>13</sub> ~ C<sub>17</sub> アル  
ケニル、C<sub>17</sub> アルケニルであり；R<sub>3</sub> および R<sub>4</sub> は、各々独立して、水素、C<sub>1</sub> ~ C  
6 アルキル、または -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH、C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキル、C<sub>1</sub> ~ C<sub>3</sub> アルキルであ  
り；n は 1 ~ 6 であり；および X は、任意の窒素対イオンなどの対イオンであり、この用  
語は、当技術分野において容易に理解される。好ましい窒素対イオンはハロゲンを含み、  
塩化物および臭化物が特に好ましい。別の好ましい対イオンは、メシレート (-SO<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>) である。

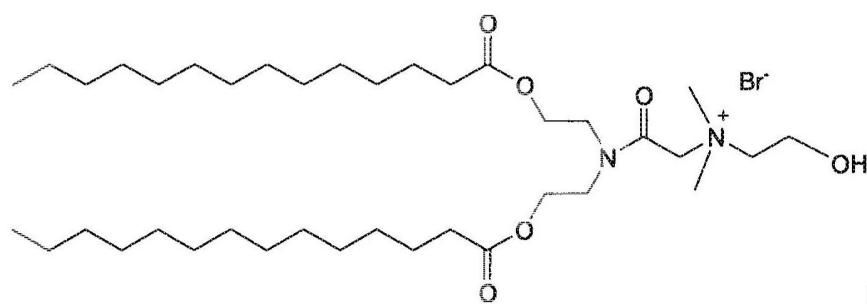
【0035】

20

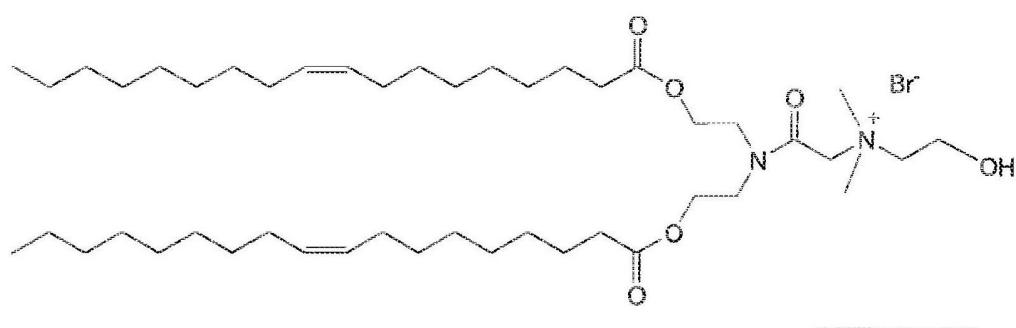
式 I の例示の化合物としては、以下を含む：

30

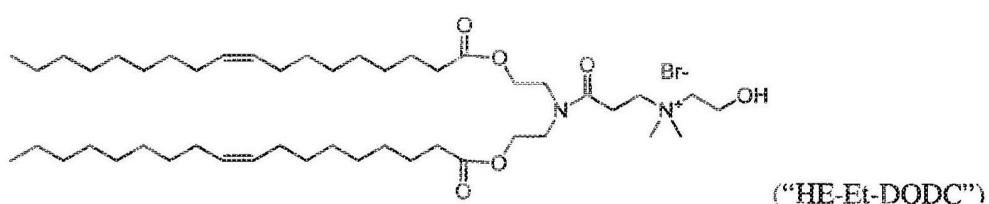
## 【化2】



および



および



## 【0036】

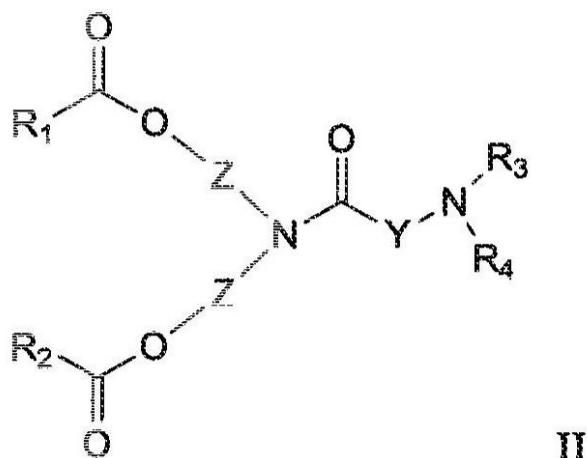
生理的pHにおける他のカチオン性荷電脂質としては、限定はされないが、N,N-ジオレイル-N,N-ジメチルアンモニウムクロリド（「DODAC」）；N-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド（「DOTMA」）；N,N-ジステアリル-N,N-ジメチルアンモニウムブロミド（「DDAB」）；N-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド（「DOTAP」）；N-(1,2-ジミリストイルオキシプロブ-3-イル)-N,N-ジメチル-N-ヒドロキシエチルアンモニウムブロミド（「DMRIE」）、3-(N-(N',N'-ジメチルアミノエタン)カルバモイル)コレステロール（「DC-Chol」）、ジオクタデシルアミドグリシルカルボキスピペルミジン（「DODGS」）；およびN-(1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル)-N-(2-(スペルミンカルボキサミド)エチル)-N,N-ジメチルアンモニウムトリフルオロアセテート（「DOSPA」）が挙げられる。

## 【0037】

イオン化可能カチオン性脂質。

本明細書の範囲内であるのは、式II：

## 【化3】



式中、

Z = アルキルリンカー、C<sub>2</sub> ~ C<sub>4</sub> アルキル、-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-、

Y = アルキルリンカー、C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキル、

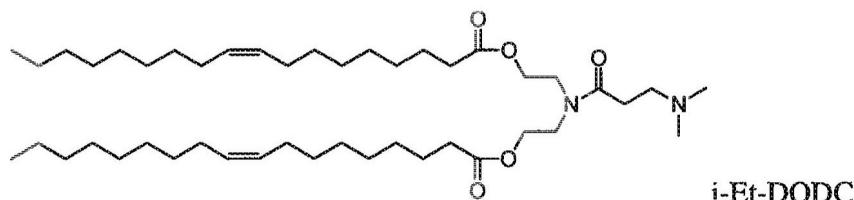
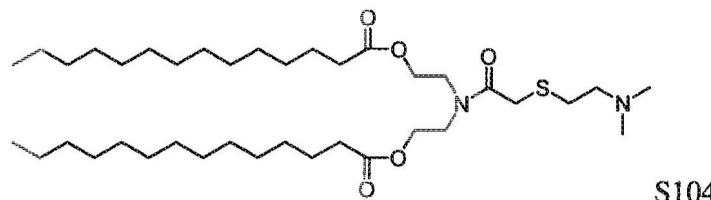
R<sub>1</sub> および R<sub>2</sub> は、各々独立して、C<sub>10</sub> ~ C<sub>30</sub> アルキル、C<sub>10</sub> ~ C<sub>30</sub> アルケニル、またはC<sub>10</sub> ~ C<sub>30</sub> アルキニル、C<sub>10</sub> ~ C<sub>30</sub> アルキル、C<sub>10</sub> ~ C<sub>20</sub> アルキル、C<sub>12</sub> ~ C<sub>18</sub> アルキル、C<sub>13</sub> ~ C<sub>17</sub> アルキル、C<sub>13</sub> アルキル、C<sub>10</sub> ~ C<sub>30</sub> アルケニル、C<sub>10</sub> ~ C<sub>20</sub> アルケニル、C<sub>12</sub> ~ C<sub>18</sub> アルケニル、C<sub>13</sub> ~ C<sub>17</sub> アルケニル、C<sub>17</sub> アルケニルであり；R<sub>3</sub> および R<sub>4</sub> は、各々独立して、水素、C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキル、または-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH、C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキル、C<sub>1</sub> ~ C<sub>3</sub> アルキルである；

で表されるイオン化可能カチオン性脂質である。

## 【0038】

いくつかの正に荷電した脂質は、生理的pHまたはその付近のpKaを有し、穏やかな酸性条件でカチオン性であり、生理的pHで弱いカチオン性である。かかるイオン化可能なカチオン性脂質としては、限定はされないが、((2-((2-(ジメチルアミノ)エチル)チオ)アセチル)アザンジイル)ビス(エタン-2,1-ジイル)ジテトラデカノエート(「S104」)、(Z)-((3-(ジメチルアミノ)プロパンオイル)アザンジイル)ビス(エタン-2,1-ジイル)ジオレエート(「i-Et-DODC」)、N-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル)N,N-ジメチルアンモニウムクロリド(「DODMA」)、および1,2-ジオレオイル-3-ジメチルアンモニウム-プロパン(「DODAP」)が挙げられる。

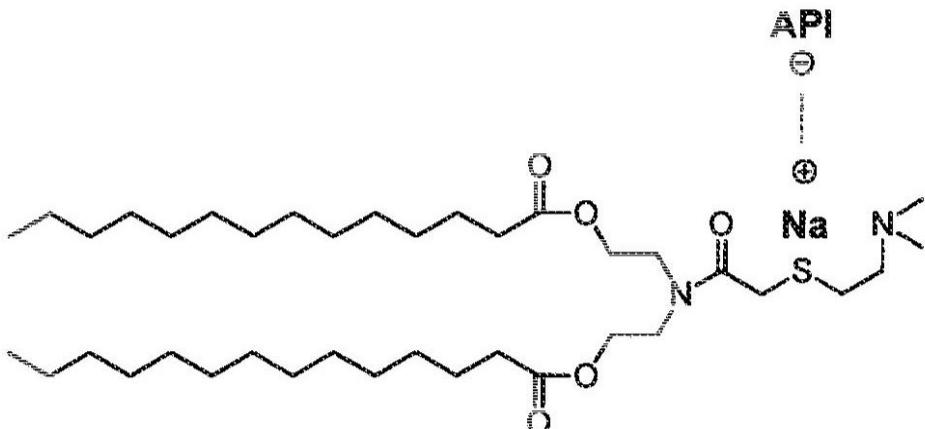
## 【化4】



## 【0039】

以下に示すように、イオン化可能な脂質は、医薬品有効成分（A P I）の結合および／または放出を促進できることが認識されている。

【化 5】



10

【0040】

中性脂質

中性脂質の例としては、限定はされないが、リン脂質、アミノ脂質、およびスフィンゴ脂質が挙げられる。中性脂質は、両親媒性脂質を含む。リン脂質の代表例としては、限定はされないが以下が挙げられる：ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジン酸、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン、リゾホスファチジルコリン、リゾホスファチジルエタノールアミン、ジパルミトイロホスファチジルコリン、ジオレオイルホスファチジルコリン、ジステアロイルホスファチジルコリン、またはジリノレオイルホスファチジルコリン。リンを欠いている他の化合物、例えばスフィンゴ脂質、スフィンゴ糖脂質ファミリー、ジアシルグリセロールおよび3-アシルオキシ酸なども、両親媒性脂質として指定されたグループに含まれる。さらに、上記の両親媒性脂質は、トリグリセリドおよびステロールなどの他の脂質と混合することができる。

20

【0041】

P E G 脂質

二重層安定化成分は、ポリエチレングリコール（「P E G」）が、ホスファチジルエタノールアミンなどの脂質頭部基に結合したものである。別の二重層安定化成分は、P E Gがセラミドに結合したものである。P E Gはホスファチジルエタノールアミンあるいはセラミドに、当業者に知られており使用される標準的なカップリング反応を用いてに結合することができる。さらに、予備形成されたP E G - ホスファチジルエタノールアミン結合体（「P E G - P E」）も市販されている。

30

【0042】

様々な分子量のP E Gを用いて、本発明の二重層安定化成分を形成することができる。様々な分子量のP E Gは、多くの異なる供給源から市販されているか、あるいは、当業者によく知られた標準的な重合技術を用いて合成することができる。本発明の好適な態様において、ポリエチレングリコールは、200～10000Da、好ましくは500～4000Da、最も好ましくは1000～2000Daの範囲の分子量を有する。一般に、P E Gの分子量が増加すると、安定化を達成するために必要な二重層安定化成分の濃度が低下することが見出されている。

40

【0043】

様々な鎖長および飽和度の種々のアシル鎖基を有するホスファチジルエタノールアミンをP E Gに結合して、二重層安定化成分を形成することができる。かかるホスファチジルエタノールアミンは市販されており、または当業者に周知の従来技術を用いて、単離もし

50

くは合成することができる。C 20 ~ C 10 の範囲の炭素鎖長を有する飽和または不飽和脂肪酸を含有するホスファチジルエタノールアミンが好ましい。モノ - またはジ不飽和脂肪酸および飽和および不飽和脂肪酸の混合物を有するホスファチジルエタノールアミンを、使用することもできる。適切なホスファチジルエタノールアミンとしては、限定されないが、以下が挙げられる：ジミリストイルホスファチジルエタノールアミン（D M P E）、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン（D P P E）、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（D O P E）、およびジステアロイルホスファチジルエタノールアミン（D S P E）。

#### 【0044】

前述の組成物はまた、PEG - リン脂質およびPEG - セラミドなどのそれ自体が当該分野で知られているPEG結合脂質を含むことができ、例えば以下から選択される1または2以上の分子である：PEG 2000 - DSPE、PEG 2000 - DPPE、PEG 2000 - DMPE、PEG 2000 - DOPE、PEG 1000 - DSPE、PEG 1000 - DPPE、PEG 1000 - DMPE、PEG 1000 - DOPE、PEG 550 - DSPE、PEG 550 - DPPE、PEG - 550 DMPE、PEG - 1000 DOPE、PEG - コリステロール、PEG 2000 - セラミド、PEG 1000 - セラミド、PEG 750 - セラミド、およびPEG 550 - セラミド。

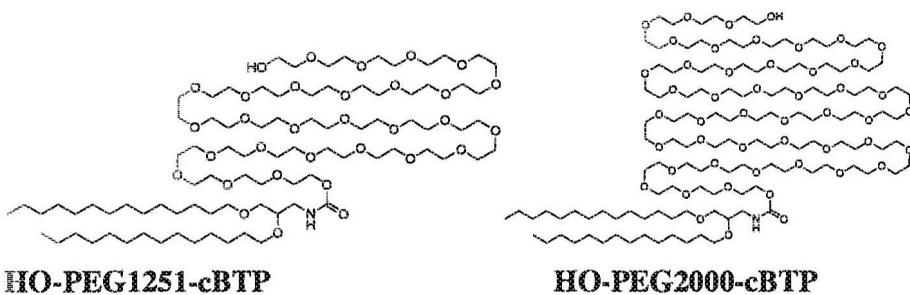
10

#### 【0045】

さらに、組成物はまた、一般式が $m d$ PEG - リンカ - 脂質である単分散( $m d$ )PEG脂質も含むことができ、例えば、限定はされないが、例として以下を含むことができる：83 - ヒドロキシ - 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42, 45, 48, 51, 54, 57, 60, 63, 66, 69, 72, 75, 78, 81 - ヘプタコサオキサトリオクタコンチル(2, 3 - ビス(テトラデシルオキシ)プロピル)カルバメート(「HO - PEG 1251 - cBTP」)および134 - ヒドロキシ - 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42, 45, 48, 51, 54, 57, 60, 63, 66, 69, 72, 75, 78, 81, 84, 87, 90, 93, 96, 99, 102, 105, 108, 111, 114, 117, 120, 123, 126, 129, 132 - テトラテトラコンタオキサテトラトリアコンタヘクチル(2, 3 - ビス(テトラデシルオキシ)プロピル)カルバメート(「HO - PEG 2000 - cBTP」)。

20

#### 【化6】



30

#### 【0046】

ステロイド

ステロイドには、コレスタン（例えば、コレステロール）、コランおよび胆汁酸（例えば、ケノデオキシコラートおよびコラート）、エルゴステロール、ラノステロール、コルチコステロイド（例えば、グルココルチコイド）、ブレグナン（例えば、プロゲステロン）、およびフィトステロールが含まれる。これらは、例えばポリエチレングリコールなどの親水性部分との結合体の形態においても、含めることができる。好適なステロイドは、コレステロールである。

#### 【0047】

40

50

## 標的脂質

標的脂質の例は、式(A)の化合物である：



式中、

- ・脂質(L)は、DSPE、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

10

- ・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(ビタミンA)、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またはその誘導体からなる群から選択される。

### 【0048】

標的脂質の別の例は、式(B)の化合物である：



式中、

20

- ・リンカー(X)は、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-ペントオキサノナデカン-1,19-ジアミド(「ビスアミド-PEG」)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-ペントオキサノナデカン-1,19-ジアミド(「lys-ビスアミド-PEG-lys」)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(ビタミンA)、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またはその誘導体からなる群から選択される。

30

### 【0049】

その他の標的分子も脂質混合物に含めることができ、例えば、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である。

### 【0050】

#### 薬物-脂質粒子の組成物および製剤

本説明は、活性剤を有するか有さない脂質粒子を含有する組成物を含み、ここで活性剤が存在する場合、これは脂質粒子と関連している。特定の態様において、活性剤は治療剤である。特定の態様において、活性剤は、脂質粒子の水性内部内に封入されている。他の態様において、活性剤は、脂質粒子の1または2以上の脂質層内に存在する。他の態様において、活性剤は、脂質粒子の脂質表面外部または内部に結合している。

40

### 【0051】

特定の態様において、本発明の脂質粒子は核酸と関連しており、核酸-脂質粒子がもたらされる。特定の態様において、核酸は完全に脂質粒子に封入されている。本明細書で使用する用語「核酸」は、任意のオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドを含むことを意味する。50個までのヌクレオチドを含有する断片は、一般にオリゴヌクレオチドと呼ばれ、より長い断片はポリヌクレオチドと呼ばれる。特定の態様において、本発明のオリゴヌクレオチドは、15~50ヌクレオチドの長さである。

### 【0052】

50

用語「ポリヌクレオチド」(PNA)および「オリゴヌクレオチド」は本明細書において、天然に存在する塩基、糖および糖間(骨格)結合からなる、ヌクレオチドまたはヌクレオシドモノマーの、ポリマーまたはオリゴマーを指す。用語「ポリヌクレオチド」および「オリゴヌクレオチド」はまた、天然に存在しないモノマーを含むポリマーもしくはオリゴマーまたはその一部であって、同様に機能するものを含む。このように修飾または置換されたオリゴヌクレオチドは、多くの場合に天然型よりも好ましく、その理由は、ヌクレアーゼの存在下における細胞取り込みの強化および安定性の増加などの特性による。

#### 【0053】

オリゴヌクレオチドは、オリゴデオキシリボヌクレオチドまたはオリゴリボヌクレオチドとしてあってよい。オリゴデオキシリボヌクレオチドは、この糖の5'および3'炭素においてリン酸に共有結合して非分岐の交互ポリマーを形成する、デオキシリボースから構成される。オリゴリボヌクレオチドは、同様の繰り返し構造であって、各ヌクレオチドがリボース糖基を有するものから構成される。修飾リボース分子が、オリゴリボヌクレオチドに含まれてもよい。

#### 【0054】

本発明による脂質-核酸粒子に存在する核酸としては、任意の形態の知られている核酸を含む。本明細書で用いられる核酸は、一本鎖DNAもしくはRNA、または二本鎖DNAもしくはRNA、またはDNA-RNAハイブリッドまたはPNA二本鎖のRNA-PNAおよび/もしくはDNA-PNAハイブリッドとすることができる。二本鎖DNAの例としては、構造遺伝子、制御および終結領域を含む遺伝子、および、ウイルスまたはプラスミドDNAなどの自己複製系が挙げられる。二本鎖RNAの例には、siRNAおよび他のRNA干渉試薬を含む。一本鎖核酸としては、例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム、マイクロRNA、および三重鎖形成オリゴヌクレオチドが挙げられる。

#### 【0055】

核酸は、一般に核酸の特定の形態に依存して、様々な長さのものであってよい。例えば、特定の態様において、プラスミドまたは遺伝子は、長さが約1,000~100,000ヌクレオチド残基であってよい。特定の態様において、オリゴヌクレオチドは、約10~100ヌクレオチド長の範囲であってよい。種々の関連する態様において、オリゴヌクレオチドは、一本鎖、二本鎖、および三本鎖に関わらず、長さ約15~約50ヌクレオチド、約21~約50ヌクレオチド、約15~約30ヌクレオチド、約20~約30ヌクレオチドの範囲であってよい。

#### 【0056】

特定の態様において、オリゴヌクレオチド(またはその鎖)は、標的ポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズするか、またはこれに相補的であってよい。「特異的にハイブリダイズ可能」とは、「相補的」とは、DNAまたはRNA標的とオリゴヌクレオチドとの間に安定かつ特異的な結合が生じるような、十分な程度の相補性を示すために使用される用語である。オリゴヌクレオチドは、特異的にハイブリダイズ可能であるために、その標的核酸配列に100%相補的である必要はないことが理解される。オリゴヌクレオチドが特異的にハイブリダイズ可能であるのは、以下の場合である：標的に対するオリゴヌクレオチドの結合が標的分子の正常な機能を妨害して、その有用性または発現の損失を引き起こし、十分な程度の特定の塩基対形成が存在して、特異的結合が望まれる条件下で、すなわち、in vivoアッセイまたは治療的処置の場合には生理的条件下において、またはin vitroアッセイの場合にはアッセイが実施される条件下において、オリゴヌクレオチドの非標的配列への非特異的結合を回避する場合。したがって、他の態様において、このオリゴヌクレオチドは、標的化されるかまたはこれが特異的にハイブリダイズする遺伝子またはmRNA配列の領域と比較して、1、2または3つの塩基置換を含む。

#### 【0057】

特定の態様において、核酸-脂質粒子は、RNA干渉(RNAi)分子と結合することができる。RNAi分子を用いたRNA干渉法を用いて、目的の遺伝子またはポリヌクレ

10

20

30

40

50

オチドの発現を破壊することができる。s i RNAは、通常は15～30ヌクレオチドの長さのRNA二本鎖であって、RNAi誘導性サイレンシング複合体(RISC)として知られている細胞質多タンパク質複合体と結合することができるものである。s i RNAを負荷されたRISCは、相同的なmRNA転写物の分解を媒介する；したがってs i RNAは、高い特異性でタンパク質発現をノックダウンするように設計可能である。他のアンチセンス技術とは異なり、天然の機構を介したs i RNAの機能は、非コードRNAを介して遺伝子発現を制御するように進化した。これは一般に、それらの活性が、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはリボザイムのどちらよりも、in vitroおよびin vivoでより強力であることの理由であると考えられる。RNAi試薬は、DNAセンス：RNAアンチセンスハイブリッド、RNAセンス：DNAアンチセンスハイブリッドを含むことができ、およびDNA：DNAハイブリッドは、RNAiを媒介することができる。したがって、これらの異なるタイプの二本鎖分子のいずれかを含むRNAi分子を、使用することができる。さらに、RNAi分子は様々な形態で使用され、細胞に導入され得ることが理解される。したがって、本明細書で使用する場合、RNAi分子は、細胞においてRNAi応答を誘導することができる任意の全ての分子を包含し、これには、限定はされないが以下を含む：2つの別個の鎖、すなわちセンス鎖およびアンチセンス鎖を含む、二本鎖ポリヌクレオチド、例えば小分子干渉RNA(s i RNA)；二本鎖領域を形成する相補的配列のヘアピングループを含むポリヌクレオチド、例えばshRNAi分子、および二本鎖ポリヌクレオチドを単独または別のポリヌクレオチドと組み合わせて形成することができる1または2以上のポリヌクレオチドを発現する発現ベクター。

10

20

#### 【0058】

RNA干渉(RNAi)を用いて、標的ポリヌクレオチドの発現を特異的に阻害することができる。遺伝子および核酸の発現の二本鎖RNA媒介性の抑制は、本発明に従って、dsRNA、s i RNAまたはshRNAを細胞または生物に導入することにより、達成することができる。s i RNAは、二本鎖RNA、またはRNAとDNAの両方、例えば1つのRNA鎖および1つのDNA鎖を含むハイブリッド分子、またはsi si RNAであってもよい。

#### 【0059】

特定のポリヌクレオチドを標的とするRNAi分子は、当技術分野で周知の手順に従つて容易に調製することができる。したがって、当業者は、多種多様の異なるs i RNA分子を用いて、特定の遺伝子または転写物を標的化できることを理解するであろう。特定の態様において、本発明のs i RNA分子は、二本鎖で16～30または18～25(数値の間の各整数を含む)ヌクレオチドの長さである。

30

#### 【0060】

一般的には、s i RNA分子は、標的DNA分子の1つの鎖に完全に相補的である。他の態様において、s i RNAは、修飾された組成、例えば、2' - デオキシまたは2' - O - メチル修飾を有することができる。しかし好ましい態様において、s i RNAの鎖の全体は、2' - デオキシまたは2' - O - 修飾塩基のいずれかで作られてはいない。

#### 【0061】

一定の態様において、本発明は、核酸が脂質層内に封入された、脂質に封入された核酸粒子を生成するための方法および組成物に関する。s i RNAオリゴヌクレオチドを組み込んだかかる核酸-脂質粒子は、以下を含む、種々の生物物理学的パラメータを用いて特徴付けられる：(1)核酸対脂質比；(2)封入効率；および(3)粒子サイズ。高い封入効率、良好なヌクレアーゼ耐性および血清安定性および制御可能な粒子サイズ、一般に200nm未満の直径が望ましい。さらに、核酸ポリマーの性質は重要であるが、その理由は、ヌクレアーゼ耐性を付与する努力において、核酸の修飾は治療薬のコストを増大させ、一方で多くの場合、限られた耐性のみを提供するからである。特に断らない限り、これらの基準は、本明細書で以下のようにして計算される。

40

#### 【0062】

核酸：脂質比は、規定の製剤体積中の核酸の量を、同じ体積中の脂質の量で除した値で

50

ある。これは、モル当たりのモル、または重量当たりの重量、またはモル当たりの重量に基づいて表される。最終的な投与レディ製剤については、核酸：脂質比は、透析、クロマトグラフィーおよび／または酵素（例えば、ヌクレアーゼ）消化を用いて、可能な限りの外部核酸を除去した後に算出される。

#### 【0063】

##### 封入

脂質 - 核酸粒子中に封入された siRNA のパーセントで表した siRNA 封入効率 (EE) を決定するために、RiboGreen アッセイを次のように利用する。この手順を用いて、溶液中の二本鎖および一本鎖 RNA または DNA の濃度を決定することができる。

#### 【0064】

装置は、BioTek Instruments, Inc. FLx800、可変ピペット、およびボルテックスミキサーを含む。試薬は、RNase フリー水 (MilliQ グレードまたは同等)、20 × TE 緩衝液「RNase フリー」(Invitrogen, T11493、または同等)、Quant-iT RiboGreen 試薬 (Invitrogen, R11491)、および水中 10% Triton X-100 (Thermo Scientific, 28314、または同等) を含む。

#### 【0065】

1 × TE 緩衝液の調製は、38 mL の RNase フリー水を、50 mL のメスシリンドーを用いて 50 mL の遠心分離管に移送すること；および 2 mL の 20 × TE 緩衝液を遠心分離管にピペットし、ボルテクサー (vortexer) を使用して混合することを含む。

#### 【0066】

2% Triton X-100 および 1% Triton X-100 の、1 × TE 緩衝液中での調製は、それぞれ 2 mL または 1 mL の 10% Triton X-100 を RNase フリーの 15 mL 円錐管にピペットし、それぞれ 8 mL または 9 mL の 1 × TE 緩衝液を加え、回転させてよく混合することを含む。

#### 【0067】

RiboGreen 希釀標準溶液の調製は、RiboGreen 試薬の凍結ストックを取り出して室温に温め、TE 緩衝液で 1 : 200 に希釀することを含む。遠心分離管をアルミホイルで包んで、任意の余分な光が溶液に到達するのを防止する。

#### 【0068】

標準は、TE 緩衝液中に RNA 溶液を調製し、96 ウェルプレートにプレートすることにより調製する。試料は、約 80 µg / mL の siRNA の最終濃度に希釀し、図 1 に示すように、96 ウェルプレートに移送する。RiboGreen 希釀標準溶液を添加し、各試料および標準と混合する。試料は、分析の前に 1 ~ 2 分間、暗所でインキュベートする。

#### 【0069】

次に TE 緩衝液中の 1% Triton X-100 を加えて試料を複製し、ついで RiboGreen 希釀標準溶液を加える。

#### 【0070】

封入効率は、各試料からの蛍光結果の平均を用いた蛍光測定から、外部試料の平均 (RNA の非存在下での RiboGreen 試薬の蛍光) のベースライン測定について補正し、Triton X-100 の存在によるシグナル強度の 8 % 低下について補正した後に、決定する。次に封入効率を、以下の式を用いて算出する。

$$EE = (Triton \text{ 試料} - \text{リポソーム試料}) / (Triton \text{ 試料})$$

#### 【0071】

すなわち、封入効率は、総 RNA 値 (リポソームを洗剤で溶解した後に測定) と無傷のリポソーム値との差を、総 RNA 値で除算したものである。無傷のリポソーム試料から得られた蛍光は、溶液中のフリーの RNA に、リポソームの外表面に吸着した RNA をプラスしたものからなる。

#### 【0072】

##### サイズ

サイズは、形成される粒子のサイズ (直径) を示す。サイズ分布は、Malvern Zetasize 50

r Nano-ZS動的光散乱 (DLS) 測定器を用いて決定することができる。

**【0073】**

この手順は、処理中のリポソーム試料の体積平均直径、Z平均直径、および多分散性の測定に適用される。多分散性は、粒子サイズ分布についての数値である。

**【0074】**

測定は室温で行う。試料および試薬は、室温に平衡化する必要がある。体積加重平均粒子サイズおよび多分散性指数が決定される。

**【0075】**

製造方法

リポソームの調製

10

脂質混合物は、水混和性の有機溶媒、好ましくは無水エタノール中に溶解することができる。多くの態様において、有機溶媒は、それが市販されている形態で使用される。

**【0076】**

例示的な一態様において、脂質の混合物は、カチオン性アミノ脂質、中性脂質（アミノ脂質以外）、ステロイド（例えば、コレステロール）、およびPEG修飾脂質（例えば、PEG-S-DMG、PEG-C-DOMGまたはPEGDMA）の混合物であり、有機溶媒中に共溶解されている。好ましい態様において、脂質混合物は、カチオン性アミノ脂質、中性脂質、コレステロールおよびPEG修飾脂質から本質的になる。さらに好ましい態様において、脂質混合物は、種々のモル比での、カチオン性脂質、DOPC（または別のヘルパー脂質で、イオン化可能または永久的なカチオン性電荷のいずれか）、コレステロールおよびPEG結合脂質からなる。好ましいモル範囲は、40～60モル%のカチオン性脂質、10～30%の中性脂質、20～40%のコレステロール、および1～10%のPEG修飾脂質である。

20

**【0077】**

標的脂質は、脂質混合物に添加することができ、例えば、0.1対5（標的脂質：総脂質）のモル比でのd<sub>i</sub>VA-PEG750-d<sub>i</sub>VA（または他のVA結合標的脂質）である。

**【0078】**

脂質の総濃度は25mg/ml未満、好ましく5mg/ml未満である。脂質混合物は、例えば0.45または0.2μmフィルターなどの膜を通して濾過される。

30

**【0079】**

本発明に従って、脂質混合物を緩衝水性溶液と混合する。緩衝水性溶液は、緩衝液が脂質混合物中のプロトン化脂質のpKa未満のpHを有する溶液であつてよい。適切な緩衝液の例としては、クエン酸塩、リン酸塩、および酢酸塩が挙げられる。特に好ましい緩衝液は、クエン酸緩衝液である。好ましい緩衝液は、封入する核酸の化学的性質に依存して、アニオンの1～1000mMの濃度範囲であり、緩衝液濃度の最適化は、高い負荷レベルを達成するために重要となり得る。例えば、粒子を透析してエタノールを除去し、pHを上昇させ、または薬学的に許容し得る担体もしくは希釈剤と混合する場合に、粒子膜を通じて浸透ポテンシャルをバランスさせる抗凍結剤および/または非イオン性溶質を添加することが適切な場合もある。緩衝液中の核酸の量は、約0.08～0.8mg/mlである。

40

**【0080】**

エタノールの添加時に、水性溶液の温度は25～45、好ましくは30～40である。エタノール溶液の水性溶液への添加は、空気-水界面に狭い流れで噴霧するか、または水性溶液中に浸漬された管を通じて送達されるエタノールとの間の液-液界面を介してのいずれかにより、行われる。

**【0081】**

有機溶液の添加は、重力によって、あるいは制御された速度、好適には一定の速度で有機溶液を水性溶液に送達するポンプによって、行われる。有機溶液の送達は、1分～100分内、好ましくは1～25分内で完了することができる。有機溶液は、管またはノズル

50

を通って、またはマルチノズルシステムを通って、単一のスプレーまたは流れを介して添加することができる。有機溶液を水性溶液に添加しながら、得られた溶液を、攪拌、振とう、または再循環することによって混合することができる。添加のステップにより、好ましくは25～45%エタノール、最も好ましくは35%のエタノールの最終濃度がもたらされる。

#### 【0082】

最終的な溶液は、有機溶媒を除去するために、透析または濾過により、好ましくはダイアフィルトレーションにより、処理される。エタノールを除去しつつ、水性溶液は、中性pH、pH6.8～pH7.5、好ましくはpH7.2での緩衝液に、例えばリン酸塩またはHEPES緩衝液に変換される。得られた水性溶液は好ましくは、貯蔵または使用の前に、例えば0.22μmのフィルターを通して濾過することにより、滅菌される。10

#### 【0083】

負に荷電した治療用ポリマーを封入したリポソーム

本明細書に記載の方法は、例えばRNA分子などの負に荷電した治療用ポリマーを有する脂質粒子を調製するのに有用である。本明細書に記載の方法において、脂質の混合物を、ポリマーの水性溶液と組み合わせる。ポリマーは、得られた脂質粒子に効率的に封入されている。

#### 【0084】

ナノ粒子は、ポリアニオン性活性剤または治療剤、例えば、RNAおよび1、2または3種の生体適合性ポリマーを含むことができる。例示的な治療剤には、核酸、タキサンなどの抗腫瘍薬が挙げられる。20

#### 【0085】

負に荷電したポリマーの全電荷は、添加時の脂質混合物中の正電荷の数より少ないか、またはこれと同じでなければならず、好ましくは0.06～0.16(w:w)である。例えばRNAが使用される場合、封入された核酸は、0.06～0.16のRNA:脂質の最終比、電荷:電荷(-/+比は好ましくは1:2.5～1:1で存在する。

#### 【0086】

脂質の混合物が電荷を有するカチオン性脂質を含む場合、脂質小胞を負に荷電したポリマーの存在下で形成してポリマーを封入し取り込んでもよい。得られた粒子は、培地のpHを生理的pH以上に高めることによって中和することができる。このようにして形成された小胞は、核酸の含有量の高い、均一な小胞サイズの製剤を提供する。30

#### 【0087】

いずれの例においても、ポリマーを封入した小胞(ナノ粒子)は、50～150nmのサイズ範囲を有する。

#### 【0088】

本明細書に記載の方法に従って、脂質混合物を、負に帶電したポリマーを含有してもよい緩衝水性溶液と混合する。緩衝水性溶液は、緩衝液が脂質混合物中のプロトン化脂質のpKa未満のpHを有する溶液であってもよい。適切な緩衝液の例には、クエン酸塩、リン酸塩、酢酸塩、およびMESが挙げられる。特に好ましい緩衝液は、クエン酸緩衝液である。好ましい緩衝液は、封入されるポリマーの化学的性質に依存して、アニオンの1～1000mMの濃度範囲であり、緩衝液濃度の最適化は、高い負荷レベルを達成するため重要な得る。40

#### 【0089】

粒子を透析してエタノールを除去し、pHを上昇させ、または薬学的に許容し得る担体および/もしくは希釈剤と混合する場合に、粒子膜を通る浸透ポテンシャルをバランスさせる抗凍結剤および/または非イオン性溶質を添加することが適切な場合もある。

#### 【0090】

RNAに対して、本明細書に記載の方法の概略図を図1に示す。溶液の調製を、凍結乾燥材料または固体材料を水中で溶解し、好ましくはpH3.5～4.5で、例えば50mMのクエン酸塩で緩衝することにより行う。緩衝液中の核酸の量は、0.08～0.8m50

g / mL である。エタノールの添加時に、水性溶液の温度は 25 ~ 45 °C 、好ましくは 30 ~ 40 °C である。一本鎖核酸を使用する場合は、高温で短時間、例えば 65 °C で 1 ~ 2 分間加熱することが有用であり得る。

#### 【0091】

エタノール溶液の水性溶液への添加は、空気 - 水界面に狭い流れで噴霧するか、または、容器に接続された管を通じて送達されるエタノールと水性溶液の間の液 - 液界面を介してのいずれかにより、行われる。

#### 【0092】

有機溶液は、制御された速度、好適には一定の速度で有機溶液を水性溶液に送達することで、添加される。有機溶液の送達は、1分 ~ 100 分内、好ましくは 1 ~ 25 分内で完了することができる。有機溶液は、管またはノズルを通じて、またはマルチノズルシステムを通じて、単一のスプレーまたは流れを介して添加することができる。有機溶液を水性溶液に添加しながら、得られた溶液を、攪拌、振とう、または再循環することによって混合することができる。添加のステップにより、リポソーム二重層構造を破壊するのに十分な最終濃度、好ましくは 25 ~ 45 % エタノール、最も好ましくは 35 % のエタノールの最終濃度がもたらされる。

10

#### 【0093】

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

20

#### 【0094】

最終的な溶液は、有機溶媒を除去するために、透析または濾過により、好ましくはダイアフィルトレーションにより処理される。エタノールを除去しつつ、水性溶液は、中性 pH 、 pH 6.8 ~ pH 7.5 、好ましくは pH 7.2 での緩衝液に、例えばリン酸緩衝液に変換される。得られた水性溶液は好ましくは、貯蔵または使用前に、例えば 0.22 μm のフィルターを通して濾過することにより、滅菌される。

#### 【0095】

最終的な封入効率は、85 % より大である。最終的な平均粒子径は、50 ~ 150 nm である。多分散性指数 PDI は、0.2 未満、好ましくは 0.1 未満である。

30

#### 【0096】

##### 凍結乾燥

本開示は部分的に、再構成された場合に最小量の大きな凝集体を有する、凍結乾燥された医薬組成物に関する。かかる大きな凝集体は、約 0.2 μm を超える、または約 0.5 μm を超える、または約 1 μm を超えるサイズを有する可能性があり、再構成された溶液中に望ましくない場合がある。凝集体サイズは、参照により本明細書に組み入れられる米国薬局方 32 <788> に示されたものを含む、様々な技術を用いて測定することができる。試験は、光遮蔽粒子計数試験、顕微鏡的粒子計数試験、レーザー回折、および単一粒子光学検知を含むことができる。一態様において、所与の試料中の粒子サイズは、レーザー回折および / または単一粒子光学検知を用いて測定される。動的光散乱 ( DLS ) を用いて粒子サイズを測定してもよいが、この手法はブラウン運動に依存するため、いくつかの大きな粒子を検出できない可能性がある。レーザー回折は、粒子と懸濁媒体の間の屈折率の差に依存する。この手法は、サブミクロンからミリメートル範囲の粒子を検出することができる。大きな粒子の比較的小さい量 ( 例えば、約 1 ~ 5 重量 % ) は、ナノ粒子懸濁液中で決定することができる。単一粒子光学センシング ( SPOS ) は、希薄懸濁液の光遮蔽を用いて、約 0.5 pm の個々の粒子をカウントする。測定試料の粒子濃度を知ることにより、凝集体の重量パーセントまたは凝集体濃度 ( 粒子数 / mL ) を算出することができる。

40

#### 【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

50

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 Anchordoquy, 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 (lyoprotectant) 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、ゲンチビウロース (gentiobiose)、マンノビアーゼ (mannobiase)、メリビオース、メリビルロース (melibiose)、ルチノース、ルチヌロース (rutinulose)、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。10

#### 【0098】

以前には、ガラス質の賦形剤に高分子を固定化するプロセスであるガラス化は、リポソームの凝集防止に寄与する因子ではなく、糖の高張溶液が必要であると考えられていた (Alison et al.)。本発明者らは、凍結乾燥の凍結および乾燥ステップの結果は、特定の脂質：多糖類比 (w:w) に依存することを見出し、これは、リポソームの凝集、リポソーム拡散障壁の破壊、および封入 RNA が放出されて核酸リポプレックスを形成することを防止するための手段を提供する。一態様において、組成物は、12~15% のスクロースおよび 5~20 mg / ml の脂質、好ましくは 12% のスクロースおよび 9 mg / ml の脂質を含む。より好ましくは、組成物はさらに、緩衝剤、最も好ましくは中性 pH の HEPES を含む。20

#### 【0099】

凍結乾燥ステップは、好適なガラス容器、好ましくは 10 ml の円筒形ガラスバイアル中で行われる。ガラスバイアルは、-40 未満および室温を超える温度の短時間での急激な変化に耐えなければならず、均一な形状にカットされる。增量剤および核酸を封入したりポソームを含む組成物は、好ましくは 3 ml 容量で、および好ましくは 9 ml / ml の脂質で、バイアルに加えられる。

#### 【0100】

凍結乾燥ステップは、約 -40 を越えるか、または例えば約 -30 未満の温度で組成物を凍結し、凍結組成物を形成すること；および凍結組成物を乾燥させて、凍結乾燥組成物を形成することを含む。凍結ステップは好ましくは、約 6 分間にわたって最終温度までの直線的な温度低下、好ましくは 1 / 分にて 20~-40 への低下をもたらす。より好ましくは、12~15% のスクロースを使用することができ、乾燥ステップは、約 50~150 mTorr にて、最初は約 -15~-35 の低温で、その後、室温から約 25 のより高い温度で、3~7 日間で完了される。本開示の別の態様において、トレハロースを使用することができ、乾燥ステップは約 50~100 mTorr にて、最初は約 0~-15 の低温で、その後より高い温度で行われる。30

#### 【0101】

別の側面において、本発明は、医薬ナノ粒子組成物中の粒子の実質的凝集を防止する方法であって、凍結乾燥製剤に糖および塩を添加して、凝集およびリポソームの内部からの核酸の放出を防ぐことを含む、前記方法を提供する。40

#### 【0102】

##### 医薬組成物

本明細書に開示された脂質粒子は、特に治療薬と関連付けられている場合には、医薬組成物として製剤化してもよく、これは例えば、薬学的に許容し得る希釈剤、賦形剤、または担体、例えば生理食塩水またはリン酸緩衝液などを、投与経路および標準的な医薬の実務に従って選択してさらに含む。当業者によって理解されるように、担体は、以下に説明する投与経路、標的組織の位置、送達される薬物、薬物送達の時間経過などに基づいて選50

択することができる。

#### 【0103】

特定の態様において、本発明の脂質 - 核酸粒子を含む医薬組成物は標準技法に従って調製され、薬学的に許容し得る担体をさらに含む。一般に、通常生理食塩水が、薬学的に許容し得る担体として使用される。他の適切な担体としては、例えば、水、緩衝水、0.9%生理食塩水、0.3%グリシン、糖または多糖類、例えばスクロース、および／またはトレハロースなどで、安定性を高めるための糖タンパク質を含み、例えばアルブミン、リポタンパク質、グロブリンなどが挙げられる。增量剤、抗凍結剤および／または溶解保護剤、ならびにEDTAなどの金属除去剤も、含まれていてもよい。担体を含有する生理食塩水または他の塩を含む組成物において、担体は、好ましくは脂質粒子形成後に添加される。したがって、脂質 - 核酸組成物が形成された後、組成物は、生理食塩水などの薬学的に許容し得る担体中に希釈することができる。10

#### 【0104】

得られた医薬製剤は、従来の周知の滅菌技術により滅菌することができる。次に水性溶液を、使用のために包装し、または無菌条件下で濾過して凍結乾燥することができ、凍結乾燥製剤は投与前に、滅菌水性溶液と合わせられる。組成物は、必要に応じて、生理的条件に近づけるために薬学的に許容し得る補助物質を含有してもよく、例えばpH調整剤および緩衝剤、等張化剤など、例えば酢酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、または塩化カルシウム等である。さらに、脂質懸濁液は、貯蔵時にフリーラジカルおよび脂質過酸化損傷から脂質を保護する、脂質保護剤を含んでいてもよい。親油性フリーラジカルクエンチャーラー、例えばα-トコフェロールおよびフェリオキサミンなどの水溶性鉄特異的キレート剤が適している。20

#### 【0105】

医薬製剤中の脂質粒子または脂質 - 核酸粒子の濃度は広範に変化することができ、すなわち、約0.01%未満、通常少なくとも約0.05～5%から、最大で10～30重量%までであり、選択された特定の投与様式に応じて、主として流体容量、粘度などに応じて選択される。例えば、濃度は、処置に関連する流体負荷を低下させるために、増加させることができる。これは、アテローム性動脈硬化症関連のうっ血性心不全または重度の高血圧を有する患者において、特に望ましい場合がある。あるいは、刺激性の脂質からなる複合体は、投与部位における炎症を軽減するために、低濃度に希釈してもよい。一群の態様において、核酸は、付着された標識を有し、診断に使用される（相補的な核酸の存在を示すことによって）。この場合、投与される複合体の量は、使用される特定の標識、診断される疾患状態、および臨床医の判断に依存するが、一般に、約0.01～約50mg/体重1kg、好ましくは約0.001～約5mg/体重1kgである。30

#### 【0106】

##### 使用法

本明細書に記載の脂質粒子は、核酸を、in vitroまたはin vivoで細胞へ送達するため使用することができる。本発明の脂質粒子および関連する医薬組成物を使用する様々な方法の以下の説明は、核酸 - 脂質粒子に関連する説明によって例示されるが、これらの方法および組成物は、かかる処置により利益を受けるであろう任意の疾患または障害の処置のための、任意の治療剤の送達用に容易に適合され得ることが、理解される。40

#### 【0107】

特定の態様において、本発明は、核酸を細胞に導入するための方法を提供する。細胞内への導入のための好ましい核酸は、siRNA、免疫刺激オリゴヌクレオチド、プラスミド、アンチセンスおよびリボザイムである。これらの方法は、本発明の粒子または組成物を、細胞内送達が生じるのに十分な時間、細胞と接触させることにより実施することができる。

#### 【0108】

本発明の組成物は、ほぼ全ての細胞型に吸着可能である。一度吸着すると、核酸 - 脂質粒子は、細胞の一部によりエンドサイトーシスされるか、脂質を細胞膜と交換するか、ま50

たは細胞と融合することができる。複合体の核酸部分の転移または取り込みは、これらの経路のいずれかを介して生じることができる。本発明の範囲に関して限定を意図するものではないが、エンドサイトシスによって細胞内に取り込まれる粒子の場合、粒子は次にエンドソーム膜と相互作用し、おそらく非二分子層相の形成によってエンドソーム膜の不安定化が生じ、封入された核酸の細胞原形質への導入がもたらされると考えられている。同様に、細胞と細胞原形質膜の直接融合の場合には、融合が生じると、リポソーム膜は細胞膜に組み込まれ、リポソームの内容物は細胞内液と混合される。in vitroで行われる場合、細胞と脂質 - 核酸組成物の間の接触は、生物学的に適合する培地中で起こる。組成物の濃度は、特定の用途に応じて幅広く変化するが、一般に $1 \mu\text{mol} \sim 10 \text{ mmol}$ の間である。一定の態様において、細胞の脂質 - 核酸組成物による処理は、一般に、生理的温度(37)で1~24時間、好ましくは2~8時間行われる。in vitro用途のために、核酸は培養中で増殖する任意の細胞に対して送達することができ、植物または動物起源、脊椎動物または無脊椎動物かどうかに関わらず、任意の組織または型であってよい。好ましい態様において、細胞は、動物細胞、より好ましくは哺乳動物細胞、最も好ましくはヒト細胞である。

#### 【0109】

一群の態様において、脂質 - 核酸粒子懸濁液を、約 $10^3 \sim 10^5$ 細胞 / mL、より好ましくは約 $2 \times 10^4$ 細胞 / mLの細胞密度を有する、60~80%集密のプレートされた細胞に添加する。細胞に添加した懸濁液の濃度は、好ましくは約 $0.01 \sim 20 \mu\text{g}$  / mL、より好ましくは約 $1 \mu\text{g}$  / mLである。

#### 【0110】

代表的な用途としては、よく知られている手順を使用して、特定の細胞標的をノックダウンまたはサイレンスさせるためのsiRNAの細胞内送達を提供することを含む。代替的に、用途は、治療的に有用なポリペプチドをコードするDNAまたはmRNA配列の送達を含む。

#### 【0111】

本発明の方法は、in vitro、ex vivo、またはin vivoで実施してよい。例えば、本発明の組成物はまた、当業者に周知の方法を用いて、in vivoの細胞への核酸の送達のために使用することができる。

#### 【0112】

in vivo投与のために、医薬組成物は好ましくは非経口的に、すなわち、関節内、静脈内、腹腔内、皮下、または筋肉内に投与される。特定の態様において、医薬組成物は、ボーラス注入によって静脈内または腹腔内に投与される。

#### 【0113】

他の方法において、医薬製剤は、製剤を組織へ直接適用することにより、標的組織と接触させることができる。適用は、局所的な「開」または「閉」手順によって行うことができる。「局所的」により、皮膚、中咽頭、外耳道などの環境に曝露された組織への、医薬製剤の直接適用を意味する。「開」の手順は、患者の皮膚を切開し、医薬製剤を適用する下部組織を直接可視化することが含まれるような手順である。これは一般に外科的処置により、例えば肺にアクセスするための開胸術、腹部内臓にアクセスするための開腹術、または標的組織に対する他の直接的な外科的アプローチにより、達成される。「閉」の手順は、内部標的組織は直接には可視化されないが、皮膚の小さな傷を通して挿入した機器を介してアクセスされる、非侵襲的処置である。例えば、製剤は、ニードル洗浄によって腹膜に投与してもよい。同様に、医薬製剤は、腰椎穿刺中に注入し、続いて脊椎麻酔または脊髄のメトリザミドイメージングのために一般に実施されるように患者を適切に位置させることにより、髄膜または脊髄に投与してもよい。あるいは、製剤は、内視鏡装置を介して投与することができる。

#### 【0114】

脂質 - 核酸組成物はまた、エアロゾルで肺に吸入されるか、または疾患部位へ直接注入することにより、投与することができる。

## 【0115】

本発明の方法は、種々の対象または宿主において実施することができる。好ましい対象または宿主には、哺乳動物種、例えばヒト、非ヒト靈長類、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ヒツジなどが挙げられる。特定の態様において、対象は、疾患もしくは障害の処置または予防が必要な、例えば疾患または障害があると診断されたか、そのリスクがあると考えられる、ヒトなどの哺乳動物である。

## 【0116】

本発明の脂質 - 治療剤粒子の投与量は、治療剤と脂質の比率、ならびに患者の年齢、体重、および状態に基づく、投与する医師の意見に依存する。

## 【0117】

一態様において、本発明は、標的ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの発現を調節する方法を提供する。これらの方法は一般に、細胞を、標的ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの発現を調節することができる核酸と関連している本発明の脂質粒子と、接触させることを含む。本明細書で使用される「調節」という用語は、標的ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの発現を変化させることを意味する。別の態様において、調節は、増大もしくは増強を意味することも、または減少もしくは低減を意味することもできる。標的ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの発現を測定する方法は当分野で知られおり利用可能であり、例えば、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（R T - P C R）および免疫組織化学法を用いる方法が挙げられる。特定の態様において、標的ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの発現のレベルは、適切な対照値と比較して、少なくとも 10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、または 50 % を超えて、増加または減少される。

10

## 【0118】

例えば、ポリペプチドの発現の増加が望まれる場合には、核酸は、所望のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターであってもよい。逆に、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの発現の低下が望まれる場合には、この核酸は、例えばアンチセンスオリゴヌクレオチド、s i R N A、またはマイクロ R N A であって、標的ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズするポリヌクレオチド配列を含むものであり、それにより、標的ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの発現が破壊される。あるいは、核酸は、かかるアンチセンスオリゴヌクレオチド、s i R N A、またはマイクロ R N A を発現するプラスミドであってもよい。

20

## 【0119】

特定の態様において、核酸活性剤または治療剤は、s i R N A、マイクロ R N A、アンチセンスオリゴヌクレオチド、および s i R N A、マイクロ R N A、またはアンチセンスオリゴヌクレオチドを発現することができるプラスミドから選択され、ここで前記の s i R N A、マイクロ R N A、またはアンチセンス R N A は、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに特異的に結合するオリゴヌクレオチド、またはその相補体を、前記ポリペプチドの発現が低減されるような様式で含む。

30

## 【0120】

別の態様において、核酸は、ポリペプチドまたはその機能的変異体もしくは断片を、前記ポリペプチドまたはその機能的変異体もしくは断片の発現が増加されるようにコードするプラスミドである。

40

## 【0121】

関連する態様において、本発明は、対象における、ポリペプチドの過剰発現を特徴とする疾患または障害を処置する方法を提供し、ここで該方法は以下を含む：対象に対して本発明の医薬組成物を提供すること、ここで、治療剤は、s i R N A、マイクロ R N A、アンチセンスオリゴヌクレオチド、および s i R N A、マイクロ R N A、またはアンチセンスオリゴヌクレオチドを発現することができるプラスミドから選択され、ここで前記の s i R N A、マイクロ R N A、またはアンチセンス R N A は、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに特異的に結合するオリゴヌクレオチド、またはその相補体を含む。

## 【0122】

50

別の関連する態様において、本発明は、対象における、ポリペプチドの過少発現を特徴とする疾患または障害を処置する方法を提供し、ここで該方法は以下を含む：対象に対して本発明の医薬組成物を提供すること、ここで、治療剤は、ポリペプチドまたはその機能的変異体もしくは断片をコードするプラスミドである。

#### 実施例

##### 【0123】

###### 例1

リポソーム／RNAナノ粒子、および脂質のみのナノ粒子を、図1を参照し、20L～200Lの範囲の様々なスケールで2種の異なるsiRNAを用いて調製した。

ストック脂質溶液を次のように混合した。全ての脂質成分（カチオン性脂質、DOPPE、コレステロール、PEG複合脂質、およびdiVA-PEG750-diVA）を、無水エタノールに4.5mg/mLの重量濃度で溶解した。エタノール中の脂質を35～40に高め、目視で溶解するまで混合した。

脂質溶液を、脂質ストック容器から0.45/0.22μmフィルターを通して、濾過脂質ストック容器にポンプで送った。

##### 【0124】

siRNAは、siRNAストック容器内の50mMのクエン酸緩衝液中に、最終siRNA：脂質比に応じて、0.26mg/mLまたは0.16mg/mLの濃度で溶解した。siRNA溶液を、siRNAストック容器から0.45/0.22μmフィルターを通して、[35%エタノール中のリポソームsiRNA]容器に、ポンプで送った。

[35%エタノール中のリポソームsiRNA]容器を、内容物を連続的に攪拌しつつ35～40にした。脂質溶液を、siRNA含有緩衝液の表面にノズルを用いて噴霧して、siRNA負荷リポソームを自然に形成させた。脂質とsiRNAを合わせて、総脂質：siRNA比が14:1または9:1（重量：重量）のいずれか、およびエタノール濃度が35%となるようにした。

##### 【0125】

次にリポソーム溶液を、0.22μmで濾過したPBS緩衝液で希釈して、20リットルのFlex Boy単回使用バッグに入れ、約10%の最終エタノール濃度とした。得られたリポソーム溶液を濃縮した後、10×容量のPBSに対してダイアフィルトレーションしてエタノールを除去し、緩衝液を交換した。濃縮およびダイアフィルトレーションステップはすべて、単回使用的ポンプ室を装備したQuattro Flow（ダイヤフラム）ポンプ、単回使用的フレキシブルチューブ、および単回使用的中空糸膜カートリッジを用いて行った。最終懸濁液は、バイオバーデン減少のために0.45/0.22μmフィルターを通して濾過して、最終の単回使用収集ボトルに入れた。結果を表1に示す。

##### 【表1】

表1

バッチ容積 [L]	製剤原料	脂質:薬物 [wt/wt]	粒子サイズ		EE [%]	生成物收率 [siRNA回収率]
			平均[nm]	PDI		
20	siRNA 1	14:1	79.6	0.144	95%	>90%
20	空のリポソーム (siRNAなし)	na	78.1	0.129	na	>90%
20	siRNA 2	9:1	88.8	0.156	92%	>90%
50	siRNA 2	14:1	80.2	0.146	94%	>90%
120	空のリポソーム (siRNAなし)	na	79.1	0.107	na	>90%
120	siRNA 2	9:1	89.9	0.138	92%	>90%
200	siRNA 1	14:1	89.1	0.154	94%	>90%
200	siRNA 2	14:1	83.7	0.143	94%	>90%

##### 【0126】

###### リポソームの調製

例示的な一態様において、脂質の混合物は、カチオン性アミノ脂質、中性脂質（アミノ脂質以外）、ステロイド（例えば、コレステロール）、およびPEG修飾脂質（例えば、PEG-S-DMG、PEG-C-DOMGまたはPEGDMA）の混合物であり、有機溶媒中に共溶解されている。好ましい態様において、脂質混合物は、カチオン性アミノ脂質、中性脂質、コレステロールおよびPEG修飾脂質から本質的になる。さらに好ましい態様において、脂質混合物は、種々のモル比での、カチオン性脂質、DOPC（または別のヘルパー脂質で、イオン化可能または永久的なカチオン性電荷のいずれか）、コレステロールおよびPEG結合脂質からなる。好ましいモル範囲は、40～60モル%のカチオン性脂質、10～30%の中性脂質、20～40%のコレステロール、および1～10%のPEG修飾脂質である。標的脂質は、脂質混合物、例えばd i V A - P E G 7 5 0 - d i V A（または他のVA結合標的脂質）に、0.1対5（標的脂質：総脂質）のモル比で添加することができる。脂質混合物はまた、ポリマーの混合物または天然（例えばキトサン）もしくは合成（例えばPEI）起源の加工助剤を含んでもよい。脂質の総濃度は25mg/mL未満、好ましく5mg/mL未満である。脂質混合物は、例えば0.45または0.2μmフィルターなどの膜を通して濾過される。

#### 【0127】

本発明に従って、脂質混合物を緩衝水性溶液と混合する。緩衝水性溶液は、緩衝液が脂質混合物中のプロトン化可能な脂質のpKa未満のpHを有する溶液であつてよい。適切な緩衝液の例としては、クエン酸塩、リン酸塩、酢酸塩、およびMESが挙げられる。特に好ましい緩衝液は、クエン酸緩衝液である。好ましい緩衝液は、封入される核酸の化学的性質に依存して、アニオンの1～1000mMの濃度範囲であり、緩衝液濃度の最適化は、高い負荷レベルを達成するために重要となり得る。代替的に、HCl、H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>などを用いてpH5～6の酸性にした純水を用いてもよい。代替的に、例えば、粒子を透析してエタノールを除去し、pHを上昇させ、または通常生理食塩水などの薬学的に許容し得る担体と混合するなどの場合に、粒子膜を通じて浸透ポテンシャルをバランスさせる非イオン性溶質を添加することが、適切な場合もある。緩衝液はまた、加工助剤（例えばポロキサマー、界面活性剤、洗剤）、增量剤（例えばマンニトール）または抗凍結剤（スクロース、トレハロース、ガラクトース、イヌリン）を含んでもよい。緩衝液中の核酸の量は、約0.08～0.8mg/mLである。

#### 【0128】

エタノールの添加時に、水性溶液およびエタノールの温度は25～45℃、好ましくは30～40℃である。エタノール溶液は水性溶液に液-液界面を介して添加され、エタノールは、水性溶液中に浸漬された管またはノズルを通じて送達される。

有機溶液の添加は、制御された速度、好適には一定の速度で有機溶液を水性溶液に送達するポンプによって行われる。有機溶液の送達は、1分～100分内、好ましくは2～20分内で完了することができる。有機溶液は、単一のオリフィスもしくはノズルを通して、または複数のオリフィスもしくはノズルシステムを通して、添加してよい。単一（またはマルチノズルアレイ）のオリフィスの直径は、10～1000μm、好ましくは300～600μmであつてよい。添加は、0～30psiを有機物の流れに適用して分散を支援することにより、行ってもよい。有機溶液を水性溶液に添加しつつ、得られた溶液を、攪拌または再循環することによって混合する。添加のステップにより、好ましくは25～45%エタノール、最も好ましくは35%エタノールの最終濃度がもたらされる。

#### 【0129】

最終的な溶液は、有機溶媒を除去するために、透析または好ましくはダイアフィルトレーションにより処理される。エタノールを除去しつつ、水性溶液は、中性pH、pH6.8～pH7.5、好ましくはpH7.2での緩衝液に、例えばリン酸緩衝液に変換される。緩衝液はまた、加工助剤（例えばポロキサマー、界面活性剤、洗剤）、增量剤（例えばマンニトール）または抗凍結剤（スクロース、トレハロース、ガラクトース、イヌリン）をさらに含んでもよい。得られた水性溶液は好ましくは、貯蔵または使用の前に、例えば0.22μmのフィルターを通して濾過することにより、滅菌される。

**【 0 1 3 0 】**

リポソーム生成のこの方法は、SUSサブユニットシステムを含むマニホールドSUSに関連して使用することができる。このマニホールドシステムは、以下のサブユニットから構成されてもよい：水混和性の有機溶媒中に脂質溶液を調製するための脂質混合バッグ、脂質保持バッグ、および脂質溶液を脂質ユニットから脂質保持ユニットに移送する手段からなる、脂質混合ユニット；RNA溶液を調製するためのRNA混合バッグ、RNA保持バッグ、およびRNA溶液をRNAユニットからRNA保持ユニットに移送する手段からなる、RNA混合ユニット；脂質溶液を脂質保持バッグからRNA溶液に移送する手段；ならびに、中空糸膜、単回使用ダイヤフラムポンプヘッド、および種々の保持バッグからなる、ダイアフィルトレーションシステム。

10

SUS装置は、予め滅菌し、無菌的な接続／切断を使用して操作することができ、無菌操作法を用いてリポソームを生成する。無菌処理は、最終的な無菌濾過(0.22μm)の必要性を取り除く。0.22μmフィルターの不在は、より大きな範囲の粒子サイズ(>200nm)が処理されることを可能にし、全ての可能なフィルター／薬物製品の互換性の問題を解決する。

**【 0 1 3 1 】****例 2 : RNA - 脂質の粒子サイズに対する、濃度の効果**

この例は、siRNAおよび脂質濃度の、粒子サイズに対する効果を記載する。

ナノ粒子を、本明細書に記載の方法により調製する。カチオン性脂質、DOPPE、コレステロール、PEG-BML、およびdiVA-PEG750-diVAを、無水エタノールにそれぞれ50:10:38:2:5のモル比で溶解した。siRNAを、pH4.5の50mMのクエン酸緩衝液中に溶解した。

20

**【 0 1 3 2 】**

混合容器内で連続して攪拌しながら、siRNA含有緩衝液を35～40にした。次にエタノール／脂質混合物を、siRNA含有緩衝液の表面にマニホールド／ノズルアレイを用いて噴霧して、siRNA負荷リポソームを自然に形成させた。脂質およびRNA濃度を調節して、0.05～0.5mg/mLの範囲の最終siRNA濃度、0.08(重量:重量)の薬物:脂質比、および35%のエタノール濃度に到達させた。脂質のsiRNAに対する比率は、試験した全ての条件について一定に保った。

**【 0 1 3 3 】**

30

siRNA負荷リポソームを~10%エタノールに希釈して粒子を安定化させ、次に10×容積のPBS(pH7.2)に対してダイアフィルトレーションしてエタノールを除去し、緩衝液を交換した。最終生成物を、バイオバーデン(汚染微生物数)の減少のために、0.22μmの滅菌グレードPESフィルターで濾過した。体積、平均粒子サイズおよび多分散性指数(PDI)は、動的光散乱(DLS)を用いて測定した。結果を表2に示す。

## 【表2】

表2

最終 siRNA	体積平均径 [nm]		
	平均	SD	PDI
005	96.7	7.0	0.084
010	105.7	10.1	0.073
025	116.8	8.4	0.125
050	141.9	10.0	0.105

## 【0134】

結果は、粒子サイズが、 siRNA 濃度 (mg / mL 単位) の増加と共に増加することを示す。脂質および siRNA 濃度を (相対比率を一定に維持しつつ) 低下させると粒子サイズが減少し、一方、濃度を増加させると粒子サイズが増加する。0.05 ~ 0.5 mg / mL の間の最終 siRNA 濃度は、 96.7 ~ 141.9 nm で 150 nm 未満の平均粒子径と 0.2 未満の多分散性指数を有するナノ粒子を、全ケースにおいて生成する。

## 【0135】

150 nm 未満の粒子サイズで 0.2 未満の PDI のものは、本明細書に記載の方法により、予備形成された空の脂質小胞を調製することなく、および / または機械的な処理なしで生成される。

## 【0136】

例3：プロセスパラメータの RNA - 脂質粒子形成に対する効果

この例は、様々なプロセスパラメータの、 RNA - 脂質粒子形成に対する効果について記載する。いくつかのパラメータをこの実験の間にスクリーニングしたが、それには、温度、エタノール濃度、緩衝液、脂質 : siRNA 比、および脂質溶液を分散させるために用いたノズルタイプを含む。

## 【0137】

HEDC、DOPC、コレステロール、PEG - BML、および d i V A - P E G 750 - d i V A を、無水エタノールにそれぞれ 40 : 30 : 25 : 5 : 2 のモル比で溶解した。混合容器内で連続して攪拌しながら、 siRNA 含有緩衝液を示す温度にした。次にエタノール / 脂質混合物を、 siRNA 含有緩衝液の表面にノズルを用いて噴霧して、 siRNA 負荷リポソームを自然に形成させた。脂質を siRNA と混合して、 0.1 mg / mL の最終 siRNA 濃度に、指示された薬物 : 脂質比および指示された最終エタノールパーセントにて、到達させた。

## 【0138】

siRNA は、 25 ~ 100 mM および pH 3.5 ~ 6.5 の強さで変化させたクエン酸緩衝液中に溶解した。混合物の温度は 25 ~ 45 °C で変化させた。最終エタノール濃度は 25 ~ 45 % で変化させた。薬物 : 脂質比 (重量 / 重量) は、 0.07 ~ 0.11 で変化させた。水和ノズルの内径 (ID) は、 0.005 ~ 0.125 インチで変化させた。各条件は、それぞれのプロセスパラメータの効果を比較するための測定として実施した。別の指定がない限り、各条件は、 50 mM のクエン酸緩衝液、 pH 4.5, 35 °C, 35 % の最終エタノール、 0.07 の薬物 : 脂質比、 0.005 インチのノズル ID で実施した。

10

20

30

40

50

## 【0139】

s i R N A 負荷リポソームを ~ 1 0 % エタノールに希釈して粒子を安定化させ、次に 1 0 × 容積の P B S ( p H 7 . 2 ) に対してダイアフィルトレーションしてエタノールを除去し、緩衝液を交換した。最終生成物を、バイオバーデン（汚染微生物数）の減少のために、0 . 2 2  $\mu$ m の滅菌グレード P E S フィルターで濾過した。

## 【0140】

表 3 は、p H の、脂質 - 核酸ナノ粒子の平均径および P D I に対する効果を示す。緩衝液の p H の増加は、平均粒子サイズが 1 5 0 n m 未満ではあるが、粒子サイズの増大をもたらした。

## 【表 3】

10

表 3

緩衝液 p H	体積平均径 [ n m ]		
	平均	S D	P D I
6.5	130.7	17.7	0.111
4.5	108.5	7.1	0.163
3.5	86.1	10.2	0.149

20

## 【0141】

表 4 は、緩衝液濃度の、種々のパラメータに対する効果を示す。結果は、緩衝液の濃度の増加が s i R N A 回収率を低下させることを示した。平均粒子サイズおよび P D I は影響を受けないようであった。最小粒子サイズは p H 3 . 5 で観察され、最大の s i R N A 回収率は、2 5 m M のクエン酸緩衝液で観察された。

## 【表 4】

30

表 4

緩衝液濃度 [mM]	体積平均径 [ n m ]			EE [%]	siRNA回収 率 [%]
	平均	S D	P D I		
25	103.1	13.4	0.179	96	94
50	113.8	15.5	0.156	94	87
100	101.0	9.4	0.185	94	80

40

## 【0142】

表 5 は、水和温度の 2 5 から 4 5 への上昇が、粒子サイズを 1 3 5 . 7 から 1 0 2 . 2 n m に減少させ、一方で i R N A 回収率を 8 0 % から 8 7 % 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、s i R N A 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 8 8 % に低下させた。

## 【表5】

表5

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

## 【0143】

表6は、薬物：脂質比が減少すると、siRNA回収率が80%から87%へ上昇することを示す。最大回収率は、0.07の薬物：脂質比(w:w)で観察された。その他の測定された特性全ては、薬物：脂質比によって影響を受けなかった。この結果は、MaurerらおよびSempleらの開示を考慮すると驚くべき予想外のものであり、何故ならば両者とも、最適な回収率は、薬物：脂質(w:w)が0.16以上(薬物：脂質(w:w)が6.25以下)の場合であると記載しているからである。本結果は、本明細書に記載の方法を用いて反対の傾向が得られることを示唆する。

## 【表6】

表6

脂質: siRNA [重量/重量]	体積平均径 [nm]			EE [%]	siRNA回 収率
	平均	SD	PDI		
9:1	93.9	17.6	0.186	95	80
12:1	85.6	14.0	0.218	95	82
14:1	113.8	15.5	0.156	94	87

## 【0144】

表7は、ノズルIDを25倍増加しても、粒子サイズ、封入効率またはsiRNA回収率に影響はなかったことを示す。エタノール/脂質の緩衝液表面への添加に用いられたノズルのオリフィスは、実質的に柔軟である。この柔軟性が、スケールアップの間に主要な利点を提供した可能性がある。

10

20

30

40

## 【表7】

表7

ノズルID [インチ]	体積平均径 [nm]			EE [%]	siRNA回収率
	平均	SD	PDI		
0.005	105.2	5.8	0.119	98	81
0.050	100.7	11.7	0.124	96	87
0.125	109.7	13.3	0.097	96	81

10

## 【0145】

例4：記載プロセスの、リポソームのバッチ生産のための参考方法との比較

これらの結果は、本明細書に記載の脂質／核酸粒子を調製するための方法を、Sempleらによる米国特許第6,858,225号に記載の方法（対照方法または対照方法により用いられる対照組成物）と比較した。これらは、例3の組成物に従って、または対照方法を用いて調製した。

## 【0146】

例3の組成物は、カチオン性脂質、DOPPE、コレステロール、PEG複合脂質、および標的脂質を、40:30:25:5:2のモル比（上記の例2を参照のこと）で共溶解したものから構成された。

20

## 【0147】

対照組成物は、DODAP、DSPC、コレステロール、およびPEG-CER-14を、25:20:45:10のモル比で共溶解したものから構成された。

## 【0148】

例3の方法において、脂質は、無水エタノール中4.32mg/mlで溶解し、siRNAは50mMのクエン酸塩中0.163mg/mlにて、pH4.5で溶解した。siRNA溶液を、混合容器内で連続的に攪拌しつつ35~40にした。次にエタノール／脂質混合物を、siRNA含有緩衝液の表面にマニホールド／ノズルアレイを用いて噴霧した。最終エタノール濃度は35%であり、最終脂質／siRNA比は、14:1(w:w)であった。得られた粒子を次に10%エタノールに希釈し、続いて10×容積のPBS(pH7.2)に対してダイアフィルトレーションした。

30

## 【0149】

対照方法において、脂質は、無水エタノール中25mg/mlで溶解し、siRNAは300mMのクエン酸塩中4.17mg/mlにて、pH4.0で溶解した。siRNA含有緩衝液は、混合容器内で連続的に攪拌しつつ室温に維持した。次にエタノール／脂質混合物を、siRNA含有緩衝液の表面に单一のノズルを用いて噴霧し、siRNA負荷リポソームを自然に形成させた。最終エタノール濃度は40%であり、最終脂質／siRNA比は、6:1(重量:重量)であった。混合後、脂質／siRNAの懸濁液を、2つの100nmのポリカーボネート膜を用いて調製した10mLの押出機に移送し、65で予め平衡化した。懸濁液を300psiで10回の通過により押出した。得られた粒子を、10×容積のPBS(pH7.2)に対してダイアフィルトレーションした。

40

## 【0150】

各方法から得られた粒子を0.22μmフィルターに通した。平均粒子サイズ、PDI、およびEEを、本明細書に記載のようにして測定した。

## 【0151】

例3の方法は、押し出しステップなしで、対照方法よりも小さい脂質ナノ粒子を生成した。対照方法により生成された粒子の大きさを、押し出し前に測定した。NDT-0009組成物から対照方法を用いて調製された粒子は、250nm粒子よりも大きい平均粒子サイズを有し

50

ていた。押出しありダイアフィルトレーション後に、平均粒子サイズは 128 nmまで減少した。例 3 の方法は、押出しなしで、150 nm未満の平均粒子サイズの粒子を生成した。同様の傾向は、対照組成物から出発した場合にも観察された。

#### 【0152】

例 3 の方法は、siRNA を脂質ナノ粒子に封入するのに、対照方法よりも効率的であった。例 3 の方法により調製された粒子の封入効率 (EE) は、対照方法によって形成された粒子よりも高い（両方の生成物において、ダイアフィルトレーションの前に測定）。例 3 の方法により調製された粒子の EE は 95 % より高く、対照方法によって形成された粒子について見られるものよりも高い。対照方法では、遊離 siRNA の多くはダイアフィルトレーション後に除去され、これにより最終生成物の EE の改善がもたらされる。

10

#### 【0153】

例 3 の方法は、対照方法よりも高い封入効率のナノ粒子を生成する。例 3 の方法による siRNA の最終的な回収率は、両方の生成物においてダイアフィルトレーション後に測定された場合、対照方法で得られる値の 2 倍以上である。（72 % 対 33 %）。これらのデータは、EE の改善並びに例 3 の方法における押出しステップの欠如を反映している。例 3 の方法は、より良い siRNA 回収率を提供し、これは、対照方法の余分な押出しステップがリポソームを構造的に改変し、siRNA を粒子から明らかに解離するためである。これらの結果は、本明細書に記載の方法は、プロセスのステップ数を低減しつつ、一方で封入効率および平均粒子サイズが 150 nm 未満のナノ粒子の収率を向上させることにより、対照方法に比べていくつかの利点を提供することを示している。

20

#### 【0154】

例 5：リポソームのバッチ生産のスケールアップ時の変動性の比較

例 3 に記載したプロセスを、永久荷電 (HEDC) カチオン性脂質とイオン化可能 (S104) カチオン性脂質分子の組み合わせを含む、異なる脂質組成を用いて実施した。HEDC、S104、DOPPE、コレステロール、PEG-BML、および d i V A - P E G 750 - d i V A を、無水エタノールに 20 : 20 : 30 : 25 : 5 : 2 のモル比で溶解した。スケールアップの間、異なる siRNA 分子、異なるバッチ容積、および異なる siRNA (薬物) / 脂質比を評価した。表 8 は、条件の範囲から得られたナノ粒子を特徴づける結果をまとめたものである。

#### 【表 8】

30

表 8

バッチ 容積 [L]	製剤原料	薬物/ 脂質		粒子サイズ [nm]	PDI	EE [%]	生成物収率 [siRNA 回収率]
		[wt/wt]					
5	siRNA 1	0.07		93	0.14	97%	>90%
20	siRNA 1	0.07		83	0.15	95%	>90%
20	空のリポソーム (siRNA なし)	na		83	0.14	na	na
20	siRNA 2	0.11		90	0.16	92%	>90%
50	siRNA 2	0.07		82	0.14	94%	>90%
120	空のリポソーム (siRNA なし)	na		86	0.14	na	na
120	siRNA 2	0.11		82	0.14	94%	>90%
200	siRNA 1	0.07		86	0.17	94%	>90%
200	siRNA 2	0.07		86	0.17	96%	>90%

40

#### 【0155】

この結果は、本明細書に記載の方法が非常に堅牢であることを示す。類似する粒子サイズおよび PDI が、50 倍の範囲にわたるスケールアップの間に得られた。粒子サイズは一定して 10 nm 未満であり、>90 % の生成物収率である。多分散指数の値は非常に低い範囲にあり、ほぼ単分散の小胞の集団を示す。

50

## 【0156】

例6：スクロース含有製剤についてのリポソームバッチ生産のスケールアップ時の変動性の比較

例3に記載したプロセスを、HEDC、S104、DOPE、コレステロール、PEG-BML、およびdIVA-PEG750-dIVAを無水エタノールに20:20:30:25:5:2のモル比で溶解して実施した。スクロースを、本明細書に記載のように、小胞の調製に含めた。異なるバッチ容積を評価し、凍結解凍に供した。表9は、条件の範囲から得られたナノ粒子を特徴づける結果をまとめたものである。

【表9】

表9

10

## 半単回使用製造装置を用いて調製した、凍結（スクロース含有）製剤

バッチ容積 [L]	薬物／脂質 [wt/wt]	サイズ [nm]	凍結前			解凍後			生成物收率 [siRNA回収率]
			PDI	EE [%]	サイズ [nm]	PDI	EE [%]		
5	siRNA 2	0.11	94	0.12	95	96	0.14	93	>90%
20	siRNA 2	0.11	98	0.15	94	97	0.16	90	>90%
120	siRNA 2	0.11	96	0.14	90	96	0.14	89	>90%
120	siRNA 2	0.11	97	0.15	91	99	0.15	89	>90%
120	siRNA 2	0.11	100	0.15	91	tbd	tbd	tbd	>90%

20

## 【0157】

結果は、凍結解凍が脂質ナノ粒子の特性を変化させなかつことを示す。結果はまた、バッチ間のばらつきが非常に小さく、プロセスが、均一なナノ粒子を再現性よく生成することを示した。

【0158】

凍結乾燥による、薬物：脂質粒子の安定化のための条件が確立されている。例2に従つて調製された薬物：脂質粒子は、活性を失うことなく凍結乾燥することができた。薬物：脂質粒子が形成されたスクロースの最終濃度は、8% (w/v) であった。凍結乾燥製剤を、蒸留水を加えることにより再構成し、マウスの肺におけるi.v.注入後のそのトランسفェクション活性を測定した。再構成された製剤の凍結および解凍は、活性に影響しなかつた。表10に示す結果は、本明細書に記載の方法で調製した粒子が、凍結乾燥の間にその特性を保持し、したがって安定であることを実証する。具体的には、粒子サイズは安定化され、凍結乾燥の前、間およびその後にも保存される。

30

【表10】

表10

## 半単回使用製造装置を用いて調製したLyo（スクロース含有）製剤

バッチ容積 [L]	薬物／脂質 [wt/wt]	凍結前			解凍後			凍結乾燥+再構成後			
		サイズ [nm]	PDI	EE [%]	サイズ [nm]	PDI	EE [%]	サイズ [nm]	PDI	EE [%]	
20	siRNA 2	0.11	98	0.15	94	97	0.16	90	115	0.15	93

40

## 【0159】

粒子の安定性は、脂質組成物、脂質：RNA (w:w) の値、および製剤に使用される多糖類の選択の関数である。in vivoで高い生物活性を示す脂質：RNA複合体の安定な製剤の生成のための、本明細書に記載の方法論的アプローチは、薬学的に許容し得る製剤を確立するための利点を付与し、したがってリポソームベースのRNAの送達を容易にする。

【0160】

例7：脂質のサブマージ注入

50

例 3 に記載のプロセスを、サブマージ注入を用いて小胞を調製することにより修正して実施した。H E D C、S 1 0 4、D O P E、コレステロール、P E G - B M L、およびd i V A - P E G 7 5 0 - d i V A を、無水エタノールに 2 0 : 2 0 : 3 0 : 2 5 : 5 : 2 のモル比で溶解した。表 1 1 は、表面添加処理と比較して、サブマージ添加プロセスから得られたナノ粒子を特徴づける結果をまとめたものである。結果は、脂質をサブマージ注入により水相に添加した場合に、平均粒子サイズが実質的に減少するという、驚くべき予想外の結果を示す。

【表 1 1】

表 1 1

10

## 半単回使用製造装置を用いて調製した液体製剤

バッチ容積		薬物／脂質		粒子サイズ		EE	生成物 収率 [siRNA 回収率]
[L]	製剤原料	[wt/wt]	添加方法	平均[nm]	PDI	[%]	
5	siRNA 1	0.07	表面	93	0.136	97	>90%
5	siRNA 1	0.07	サブマージ	57	0.104	97	>90%

## 半単回使用製造装置を用いて調製した、凍結（スクロース含有）製剤

バッチ容積		薬物／脂質		粒子サイズ		EE	生成物 収率 [siRNA 回収率]
[L]	製剤原料	[wt/wt]	添加方法	平均[nm]	PDI	[%]	
5	siRNA 1	0.11	表面	94	0.119	95	>90%
1	siRNA 1	0.11	サブマージ	63	0.102	95	>90%

【0 1 6 1】

同様の処理方法を用いて、緩衝液中にスクロースを含有するリポソームを調製した。表 1 2 は、異なる添加時間から得られたナノ粒子を特徴づける結果をまとめたものであり、表 1 3 は、サブマージ添加と比べて、表面添加を用いて調製したナノ粒子を特徴づける結果をまとめたものである。

【表 1 2】

表 1 2

20

## 半単回使用製造装置を用いて調製した液体製剤

添加時間 [min]	添加方法	粒子サイズ		EE	生成物収率 [siRNA 回収率]
		平均 [nm]	PDI		
0.5	サブマージ	66	0.140	90	>90%
2.0	サブマージ	93	0.112	94	>90%
5.0	サブマージ	99	0.133	92	>90%
10	サブマージ	98	0.137	91	>90%

30

40

【表 1 3】

表 1 3

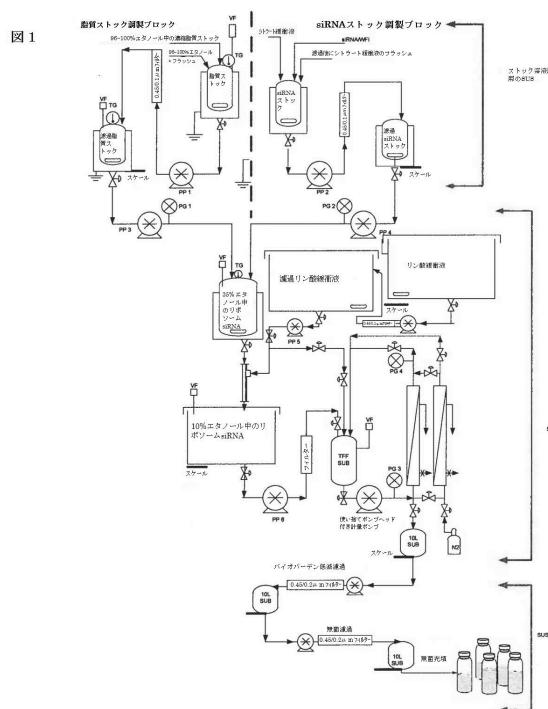
## 半単回使用製造装置を用いて調製した液体製剤

バッチ 容積 [L]	添加時間 [min]	添加方法	粒子サイズ		EE [%]	生成物收率 [siRNA 回收率]]	10
			平均 [nm]	PDI			
5	15	表面	93	0.136	95	>90%	
1	1.5	サブマージ	63	0.102	95	>90%	

## 【0162】

結果は、脂質をサブマージ注入により 2 分未満の添加時間で水相に添加した場合に、平均粒子サイズが実質的に減少するという、驚くべき予想外の結果を示す。結果はまた、脂質をサブマージ注入により水相に添加した場合に、平均粒子サイズが実質的に減少するという、驚くべき予想外の結果を示す。

## 【図 1】



---

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I

A 6 1 K 47/24	(2006.01)	A 6 1 K 47/24
A 6 1 K 47/18	(2006.01)	A 6 1 K 47/18

(72)発明者 カルマリ，ブリヤ

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92122、サンディエゴ、ノーベル ドライブ 4353  
、ユニット #68

(72)発明者 リー，ロビン

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92128、サンディエゴ、ヴィア カラノヴァ 1561  
2

(72)発明者 ウェップ，デイヴィッド

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92056、オーシャンサイド、ベイクリフ ウェイ 41  
47

審査官 小堀 麻子

(56)参考文献 特表2007-527306 (JP, A)

国際公開第2010/109136 (WO, A1)

国際公開第2010/085195 (WO, A1)

特表平01-501228 (JP, A)

特表平08-512056 (JP, A)

特表2003-504390 (JP, A)

国際公開第2010/021865 (WO, A1)

WAGNER ANDREAS, LIPOSOMES PRODUCED IN A PILOT SCALE: PRODUCTION, PURIFICATION AND EFFICIENCY ASPECTS, EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICS AND BIOPHARMACEUTICS, NL, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, 2002年 9月 1日, V54 N2, P213-219  
血管医学, 2009年, Vol.10, No.4, p.373-380

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 9 / 0 0

A 6 1 K 4 7 / 0 0