



## (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104428005 B

(45)授权公告日 2019.05.10

(21)申请号 201380026005.5

(51)Int.CI.

(22)申请日 2013.05.23

A61K 47/64(2017.01)

(续)

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104428005 A

(56)对比文件

(43)申请公布日 2015.03.18

US 5908777 A, 1999.06.01,

(30)优先权数据

61/650,729 2012.05.23 US

(续)

CN 1701077 A, 2005.11.23,

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2014.11.18

WO 2009120247 A2, 2009.10.01,

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/042454 2013.05.23

US 20110177155 A1, 2011.06.21,

(87)PCT国际申请的公布数据

W02013/177415 EN 2013.11.28

CN 1809583 A, 2006.07.26,

(73)专利权人 俄亥俄州立大学

地址 美国俄亥俄州

US 7060291 B1, 2006.06.13,

(72)发明人 罗伯特·J·李 李永福 金德中

安昌浩

Dagmar Fischer et al. Cationized human

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司

11227

serum albumin as a non-viral vector

代理人 郑斌 彭鲲鹏

system for gene delivery?

Characterization of complex formation

with plasmid DNA and transfection

efficiency.《International Journal of

Pharmaceutics》.2001, 第225卷(第1-2期), (续)

审查员 刘应梅

权利要求书2页 说明书19页

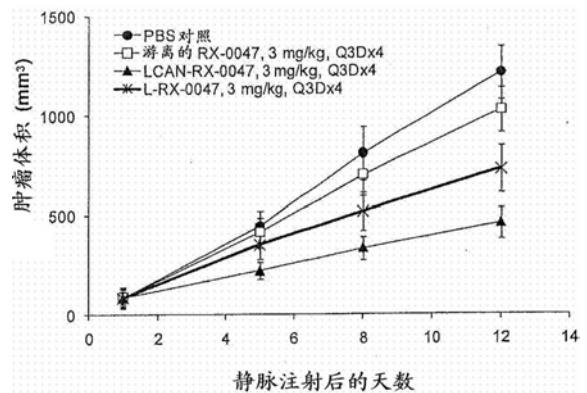
序列表3页 附图4页

(54)发明名称

物制剂、制备所述脂质纳米颗粒的方法和使用所述脂质纳米颗粒的方法,例如用于治疗癌症。

用于反义寡核苷酸递送的脂质纳米颗粒组合物

(57)摘要

B  
CN 104428005

本发明描述了脂质纳米颗粒组合物,其包含与聚合物缀合的大分子和靶向剂。该组合物可包含治疗剂。所述治疗剂可以是反义寡核苷酸(ASO)。示例性ASO靶向编码Akt-1之核酸的一部分并且调节Akt-1的表达;或者靶向编码HIF-1之核酸的一部分并且调节HIF-1的表达。本发明还描述了包含与聚合物缀合之大分子和治疗剂的脂质纳米颗粒组合物,所述治疗剂是ASO,例如靶向编码Akt-1之核酸的一部分并且调节Akt-1之表达的ASO;或者靶向编码HIF-1之核酸的一部分并且调节HIF-1之表达的ASO。本发明还公开了药

[接上页]

(30)优先权数据

61/784,892 2013.03.14 US

(51)Int.Cl.

A61K 47/54(2017.01)

A61K 47/59(2017.01)

A61K 47/69(2017.01)

A61P 35/00(2006.01)

(56)对比文件

Wei Wang et al. Transferrin-PEG-PE modified dexamethasone conjugated cationic lipid carrier mediated gene delivery system for tumor-targeted transfection.《International Journal of Nanomedicine》.2012, 第7卷

1. 脂质纳米颗粒组合物,其包含:

阳离子脂质体;

靶向剂;

治疗剂,其包含选自以下的反义寡核苷酸(ASO):靶向编码Akt-1之核酸的一部分并且调节Akt-1之表达的ASO;和靶向编码HIF-1之核酸的一部分并且调节HIF-1之表达的ASO;和

高度阳离子化的白蛋白-聚合物缀合物(APC),其包含五亚乙基六胺(PEHA)和人血清白蛋白(HSA),其中PEHA与HSA的比例为5至20,

其中所述阳离子脂质体包封所述高度阳离子化的白蛋白-聚合物缀合物(APC)从而形成脂质包被的白蛋白纳米颗粒(LCAN),

其中所述APC包含白蛋白和聚合物,

其中所述脂质纳米颗粒包含DOTAP、soyPC和TPGS。

2. 根据权利要求1所述的脂质纳米颗粒组合物,其中所述缀合物通过交联剂缀合。

3. 根据权利要求1所述的脂质纳米颗粒组合物,其中PEHA分子与HSA分子的比为11:1。

4. 根据权利要求1所述的脂质纳米颗粒组合物,其中所述脂质纳米颗粒包含两种或更多种低分子量聚合物的混合物。

5. 根据权利要求1所述的脂质纳米颗粒组合物,其中所述脂质纳米颗粒的DOTAP:soyPC:TPGS的摩尔比为25:70:5。

6. 根据权利要求1所述的脂质纳米颗粒组合物,其中所述反义寡核苷酸是具有包含5'gctgcatgatctccttggcg 3'(Seq.Id.No.:1)之序列的化合物,其靶向编码人Akt-1的核酸分子并调节Akt-1的表达。

7. 根据权利要求1所述的脂质纳米颗粒组合物,其中所述反义寡核苷酸是具有包含5'aatgagccaccagtgtccaa 3'(Seq.Id.No.:2)之序列的化合物,其靶向编码人HIF-1的核酸分子并调节HIF-1的表达。

8. 根据权利要求1所述的脂质纳米颗粒组合物,其还包含基因融合肽。

9. 根据权利要求1所述的脂质纳米颗粒组合物,其中所述脂质纳米颗粒的颗粒大小小于300nm。

10. 根据权利要求1所述的脂质纳米颗粒组合物,其中所述脂质纳米颗粒的颗粒大小小于150nm。

11. 根据权利要求1所述的脂质纳米颗粒组合物,其中所述靶向剂通过直接连接或者通过交联剂与所述脂质纳米颗粒的外表面相结合。

12. 根据权利要求1所述的脂质纳米颗粒组合物,其中所述靶向剂包含抗体或抗体片段。

13. 根据权利要求1所述的脂质纳米颗粒组合物,其中所述靶向剂包含选自以下的部分:cRGD肽、含半乳糖的部分、转铁蛋白、叶酸、低密度脂蛋白、表皮生长因子和抗体。

14. 根据权利要求13所述的脂质纳米颗粒组合物,其中所述靶向剂包含cRGDfC或叶酸。

15. 根据权利要求14所述的脂质纳米颗粒组合物,其中所述靶向剂包含选自以下的缀合物:叶酸-PEG-CHEMS(叶酸-聚乙二醇-半琥珀酸胆固醇酯)、叶酸-PEG-DSPE(叶酸-聚乙二醇-二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺)和cRGDfC-PEG-DSPE(环(RGDfC)-聚乙二醇-二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺)。

16. 药物组合物,其包含根据前述权利要求中任一项所述的脂质纳米颗粒组合物和可药用赋形剂。

17. 根据权利要求16所述的药物组合物,其中所述药物组合物是无菌溶液或混悬液。

18. 一种制备脂质包被的白蛋白纳米颗粒(LCAN)的方法,所述方法包括:

合成HSA-PEHA缀合物,其中PEHA与HSA的比例为5至20;

制备脂质混合物,所述脂质混合物包含阳离子脂质和靶向剂;

向所述HSA-PEHA缀合物中添加所述脂质混合物;和

向所述脂质混合物和所述HSA-PEHA缀合物中添加反义寡核苷酸(ASO),以得到LCAN前体;

其中所述脂质混合物包含DOTAP、soyPC和TPGS,

其中所述脂质混合物形成包封所述HSA-PEHA缀合物的阳离子脂质体,并且

其中所述ASO选自靶向编码Akt-1之核酸的一部分并且调节Akt-1之表达的ASO;和靶向编码HIF-1之核酸的一部分并且调节HIF-1之表达的ASO。

19. 根据权利要求18所述的方法,其中所述靶向剂包含选自以下的部分:cRGD肽、含半乳糖的部分、转铁蛋白、叶酸、低密度脂蛋白、表皮生长因子和抗体。

20. 根据权利要求19所述的方法,其中所述靶向剂包含cRGDFC或叶酸。

21. 根据权利要求20所述的方法,其中所述靶向剂包括选自以下的缀合物:叶酸-PEG-CHEMS(叶酸-聚乙二醇-半琥珀酸胆固醇酯)、叶酸-PEG-DSPE(叶酸-聚乙二醇-二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺)和cRGDFC-PEG-DSPE(环(RGDFC)-聚乙二醇-二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺)。

22. 根据权利要求18所述的方法,其中所述靶向剂包含cRGDFC-PEG-DSPE。

23. 根据权利要求22所述的方法,其中DOTAP:soyPC:TPGS:cRGDFC-PEG-DSPE的摩尔比为25:70:4:1。

24. 根据权利要求18的方法,其中所述脂质混合物的DOTAP:soyPC:TPGS的摩尔比为25:70:5。

25. 根据权利要求18所述的方法,其中所述反义寡核苷酸(ASO)是具有包含5' gctgcatgatctccttggcg 3'(Seq.Id.No.:1)之序列的化合物,其靶向编码人Akt-1的核酸分子并且调节Akt-1的表达。

26. 根据权利要求18所述的方法,其中所述反义寡核苷酸(ASO)是具有包含5' aatgagccaccagtgtccaa 3'(Seq.Id.No.:2)之序列的化合物,其靶向编码人HIF-1的核酸分子并且调节HIF-1的表达。

27. 权利要求16所述的药物组合物在制备用于在有此需要的患者中诊断或治疗癌症或感染性疾病的药物中的用途。

28. 根据权利要求27所述的用途,其中所述癌症选自:脑癌、膀胱癌、肺癌、乳腺癌、黑素瘤、皮肤癌、表皮癌、结肠癌、直肠癌、非霍奇金淋巴瘤、子宫内膜癌、胰腺癌、肾(肾细胞)癌、前列腺癌、白血病、甲状腺癌、头颈部癌、卵巢癌、肝细胞癌、宫颈癌、肉瘤、胃癌、多发性骨髓瘤、淋巴瘤、胃肠癌以及子宫癌。

29. 根据权利要求27所述的用途,其中所述癌症选自乳腺癌、表皮癌和胰腺癌。

## 用于反义寡核苷酸递送的脂质纳米颗粒组合物

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求于2012年5月23日提交的美国临时申请No. 61/650,729和2013年3月14日提交的美国临时申请No. 61/784,892的优先权,其内容通过引用整体并入本文。

[0003] 关于联邦资助研究的声明

[0004] 本发明在美国国立卫生研究院授予的资助号R01CA135243、DK088076和CA152969的政府支持下作出。政府享有本发明的某些权利。

[0005] 序列表

[0006] 本申请包含序列表,其已通过EFS网以ASCII形式提交,并且通过引用整体并入本文。所述ASCII拷贝创建于2013年5月23日,命名为41890-349711\_SL.txt,并且大小为3,404字节。

### 技术领域

[0007] 本公开内容描述了可用于递送核酸的脂质纳米颗粒及相关的化合物。

### 背景技术

[0008] siRNA及其他治疗性寡核苷酸的递送是限制其临床转化(translation)之潜能的主要技术挑战。

[0009] 脂质体是由一个或更多个脂质双层构成的囊泡,其能够在水性核心内携带亲水分子或者在其脂双层内携带疏水分子。脂质纳米颗粒(LN)是用于描述亚微米范围的基于脂质之颗粒的通用术语。它们可具有脂质体的结构特征和/或具有作为替代的非双层型结构。通过LN经全身途径递送药物需要克服若干生理屏障。网状内皮系统(RES)可负责从循环中清除LN。LN一旦逃离血管系统并达到靶细胞,即通常通过内吞作用而被摄取,并且必须在酸性内体条件下降解之前将药物释放到胞质中。

[0010] 在制备LN时必须考虑ζ电位或表面电荷。对于全身递送而言,LN的ζ电位通常不应过于正或过于负。带有过多正电荷的LN倾向于与靶细胞和循环血浆蛋白非特异性地相互作用,并且可引起细胞毒性。或者,带有过多负电荷的LN不能有效并入同样带负电的核酸中,而且可引起RES介导的迅速清除,从而降低治疗效力。中性至带有适度电荷的LN最适于体内药物和基因递送。

[0011] LN构成了用于递送传统治疗性化合物和基于核酸之治疗剂的有前景的平台。使用LN配制的药物通常可在体内表现出优越的药代动力学(PK)特性,例如血液循环时间提高和由于增强的透性和滞留(EPR)效应在实体瘤处的积累提高。此外,LN可在表面包被聚乙二醇以降低由血清蛋白引起的LN的调理作用以及所导致的RES介导的摄取。LN还可用细胞特异性配体包被以提供靶药物递送。

[0012] 在过去的几十年中,对基于核酸的治疗剂出现了很大的关注。基于核酸的治疗剂在引入核酸(NA)以促进或抑制基因表达的前提下起作用。由于认为基因突变和miRNA谱改变是癌症及其他疾病的的根本原因,所以基于核酸的试剂可潜在地直接作用于该根本病

因,使治疗潜能最大化。基于核酸的治疗剂的几个实例包括质粒DNA (pDNA)、小干扰RNA (siRNA)、小发夹RNA (shRNA)、微RNA (miR) 模拟物 (mimic或mimetic)、anti-miR/antagomir/miR抑制剂和反义寡核苷酸 (antisense oligonucleotide, ASO),其均包括在本公开内容所用术语核酸的范围内。基于核酸的治疗剂的临床转化在其实施中面临若干障碍。将核酸运输至其胞内靶标特别有挑战性,因为核酸相对不稳定,并且易于被血清和细胞核酸酶降解。此外,核酸上的大量负电荷也使其不能跨细胞膜运输,这限制了其实用性。已经开发了病毒载体来解决这个问题,但是大多数都因为体内免疫应答的活化和在宿主基因组中诱导了非期望的突变而失败。也对非病毒载体进行了广泛的研究,但是只有很少取得了成功的临床结果,而且还需要进一步改进。

[0013] 传统上,已经使用阳离子LN作为非病毒载体用于基因递送。在一些实例中,用阴离子脂质来代替阳离子脂质或者将阳离子脂质与阴离子脂质组合使用。阳离子LN的正电荷有助于与带负电核酸的静电相互作用。可以将阴离子脂质与阳离子脂质或阳离子聚合物组合,这将进而介导与核酸的相互作用。这些可通过本领域中已知的多种技术来制备,例如,乙醇稀释、冻融、渗滤和薄膜水合。除了阳离子组分以外,LN通常还包含辅助脂质,其包括形成双层的磷脂组分,例如磷脂酰胆碱及胆固醇。辅助脂质(例如二油酰基磷脂酰乙醇胺(DOPE))并不利于双层相,反而有助于在靶部位处破坏脂质双层,以释放治疗剂。可以添加稳定用组分,例如D- $\alpha$ -生育酚聚乙二醇1000琥珀酸酯(TPGS)(其为PEG化剂)或mPEG-DSPE来稳定制剂并保护LN免受RES介导的摄取。

[0014] 开发高效递送载剂是寡核苷酸(ON)治疗剂之临床转化的关键。理想地,脂质纳米颗粒制剂应能够(1)保护药物免受酶促降解;(2)穿过毛细血管内皮;(3)特异性地达到靶细胞类型而不引起免疫原性或脱靶细胞毒性;(4)促进内吞作用和内体释放;以及(5)形成具有胶体稳定性和长货架期(shelf-time)的稳定制剂。

[0015] 发明概述

[0016] 本文中提供了脂质纳米颗粒,其可高效包封治疗性寡核苷酸并且满足有效递送的物理学和生物学标准。在本发明中,某些实施方案包括含RX0201 (**Archexin**<sup>®</sup>) 和/或RX-0047的脂质纳米颗粒,其中所述RX0201 (**Archexin**<sup>®</sup>) 是20聚体硫代磷酸酯反义寡核苷酸,其具有包含针对Akt-1之5' gctgcatgatctccttggcg3' (Seq. Id. No.:1) 的序列,所述RX-0047是20聚体硫代磷酸酯反义寡核苷酸,其具有包含5' aatgagccaccagtgtccaa3' (Seq. Id. No.:2) 的序列,RX-0047是“缺氧诱导因子-1 $\alpha$ ”(HIF-1 $\alpha$ )的强效抑制剂。

[0017] 在某些实施方案中,脂质纳米颗粒包含高度阳离子化和/或pH-响应的HSA聚合物缀合物。在某些实施方案中,HSA-聚合物缀合物包括HSA-PEHA。在某些实施方案中,脂质纳米颗粒使白蛋白-聚合物缀合物(albumin-polymer conjugate, APC)高度阳离子化,以提高脂质纳米颗粒制剂的转染效率。

[0018] 本文中还提供了药物组合物,制备脂质包被的白蛋白纳米颗粒的方法及治疗癌症或其他疾病的方法。

[0019] 在一些实施方案中,本发明是脂质纳米颗粒组合物,其包含与聚合物缀合的大分子和靶向剂。在一些实施方案中,所述脂质纳米颗粒组合物还包含治疗剂,例如核酸、蛋白质、多糖、脂质、放射性物质、治疗剂、前药及其组合。在一些实施方案中,所述治疗剂是核

酸。在一些实施方案中，所述核酸是pDNA、反义寡核苷酸、miR、anti miR、shRNA、siRNA或其组合。在一些实施方案中，所述治疗剂是反义寡核苷酸(ASO)，其可以是靶向编码Akt-1之核酸的一部分并且调节Akt-1之表达的ASO；或者可以是靶向编码HIF-1之核酸的一部分并且调节HIF-1之表达的ASO。

[0020] 本发明的一些实施方案还包括脂质纳米颗粒组合物，其包含与聚合物缀合的大分子和治疗剂，所述治疗剂为ASO，例如靶向编码Akt-1之核酸的一部分并且调节Akt-1之表达的ASO；或者靶向编码HIF-1之核酸的一部分并且调节HIF-1之表达的ASO。

[0021] 在本发明的任意实施方案中，聚合物可以是带电的，例如，聚合物可以是带正电的。在本发明的一些实施方案中，大分子包含白蛋白。在一些示例性实施方案中，与聚合物缀合的大分子是白蛋白-聚阳离子缀合物。缀合可以例如通过交联剂。所述大分子或带正电的聚合物可以是例如五亚乙基六胺(PEHA)、四亚乙基六胺和四亚乙基五胺(TEPA)。在一些实施方案中，所述大分子包含五亚乙基六胺(PEHA)，并且所述聚合物包含人血清白蛋白(HSA)。PEHA分子与HSA分子之比可为约11:1。本发明的脂质纳米颗粒可包含两种或更多种低分子量聚合物的混合物。所述脂质纳米颗粒可包含DOTAP、SPC和TPGS，例如摩尔比为约25:70:5的DOTAP:SPC:TPGS。

[0022] 在包括ASO的一些实施方案中，所述反义寡核苷酸是具有包含5'gctgcatgatctccttggcg3'(Seq.Id.No.:1)之序列的化合物，其靶向编码人Akt-1的核酸分子并且调节Akt-1的表达。在另一些实施方案中，所述反义寡核苷酸是具有包含5'aatgagccaccagtgtccaa3'(Seq.Id.No.:2)之序列的化合物，其靶向编码人HIF-1之核酸分子并且调节HIF-1的表达。所述脂质纳米颗粒组合物还可包含融合肽。在一些实施方案中，所述脂质纳米颗粒的颗粒大小小于约300nm或者小于约150nm。

[0023] 所述靶向剂可通过直接连接或通过交联剂只与脂质纳米颗粒的外表面相结合。所述靶向剂可以是抗体或抗体片段。所述靶向剂还可以是cRGD肽、含半乳糖的部分、转铁蛋白、叶酸、低密度脂蛋白和表皮生长因子。在一些示例性实施方案中，所述靶向剂是cRGDfC或叶酸。所述靶向剂可以是缀合物，例如叶酸-PEG-CHEMS(叶酸-聚乙二醇-半琥珀酸胆固醇酯)、叶酸-PEG-DSPE(叶酸-聚乙二醇-二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺)或cRGDfC-PEG-DSPE(环(RGDfC)-聚乙二醇-二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺)。

[0024] 在一些实施方案中，本发明是包含如上所述脂质纳米颗粒组合物和可药用赋形剂的药物组合物。所述药物组合物可制备成无菌溶液或混悬液。

[0025] 在另一些实施方案中，本发明是制备脂质包被的白蛋白纳米颗粒(LCAN)的方法，其中所述方法包括以下步骤：合成HSA-PEHA缀合物；制备脂质混合物；向HSA-PEHA缀合物中添加脂质混合物；向脂质和HSA-PEHA缀合物的混合物添加反义寡核苷酸(ASO)以得到LCAN前体；其中ASO选自：靶向编码Akt-1之核酸的一部分并且调节Akt-1之表达的ASO；和靶向编码HIF-1之核酸的一部分并且调节HIF-1之表达的ASO。在另一些实施方案中，本发明是制备脂质包被的白蛋白纳米颗粒(LACN)的方法，其包括以下步骤：合成HSA-PEHA缀合物；制备脂质混合物；以及向HSA-PEHA缀合物添加靶向剂和脂质混合物。所述靶向剂可以是上述的任意靶向剂。在一些实施方案中，脂质混合物包含并且靶向剂包括DOTAP、soyPC、TPGS和cRGDfC-PEG-DSPE，例如，其中摩尔比为约25:70:4:1的DOTAP:soyPC:TPGS:cRGD-PEG-DSPE。在另一些实施方案中，所述脂质混合物包含(例如摩尔比为约25:70:5的)DOTAP、SPC和

TPGS。

[0026] 本发明还是通过向有此需要的患者施用有效量的本文中所述药物组合物来诊断或治疗癌症或感染性疾病的方法。所治疗的癌症可以是例如脑癌、膀胱癌、肺癌、乳腺癌、黑色素瘤、皮肤癌、表皮癌、结肠直肠癌(colon and rectal cancer)、非霍奇金淋巴瘤、子宫内膜癌、胰腺癌(pancreatic cancer)、肾(肾细胞)癌、前列腺癌、白血病、甲状腺癌、头颈部癌(head and neck)、卵巢癌、肝细胞癌、宫颈癌(cervical cancer)、肉瘤、胃癌、多发性骨髓瘤、淋巴瘤、胃肠癌(gastrointestinal cancer)和子宫癌。在一些实施方案中，所述癌症是乳腺癌、表皮癌或胰腺癌。

[0027] 考虑到下述描述、附图以及非限制性实施例，本发明的其他目的和优点以及优选实施方案的结构和功能将变得明显。

## 附图说明

[0028] 图1示出在用L-RX-0047和cRGD-L-RX-0047处理之后，MDA-MB-435细胞中HIF-1 $\alpha$ mRNA下调。

[0029] 图2示出用游离的RX-0047、L-RX-0047和LCAN-RX-0047处理之后，KB细胞中HIF-1 $\alpha$ mRNA的表达。

[0030] 图3示出在用LCAN-RX-0201处理之后，KB细胞中Akt-1mRNA下调。

[0031] 图4示出在LCAN-RX-0201处理之后，Panc-1细胞中Akt-1mRNA下调。

[0032] 图5示出在KB异种移植物肿瘤模型中的体内肿瘤抑制。用3mg/kg的PBS、游离的RX-0047、L-RX-0047或LCAN-RX-0047对小鼠(每组5只小鼠)进行静脉注射，每3天4次(Q3D×4)。通过每3至4天用卡尺测量来测定肿瘤尺寸。

[0033] 图6示出在KB异种移植物肿瘤模型中的体内HIF-1 $\alpha$ mRNA表达。用3mg/kg的PBS、游离的RX-0047、L-RX-0047或LCAN-RX-0047对小鼠(每组5只小鼠)进行静脉注射，每3天4次(Q3D×4)。通过实时RT-PCR来测定HIF-1 $\alpha$ mRNA的肿瘤内(intratumoral)表达。

[0034] 图7示出在KB异种移植物肿瘤模型中用LCAN-RX-0047处理之后的动物存活。用3mg/kg的PBS、游离的RX-0047或LCAN-RX-0047对小鼠(每组10只小鼠)进行静脉内注射，每3天4次(Q3D×4)。

## 发明详述

[0036] 本文中在脂质纳米颗粒的上下文中描述了许多实施方案。本领域普通技术人员将认识到，以下实施方案的详细描述仅是示例性的，而非旨在以任何方式进行限制。在本公开内容的教导下，对于本领域技术人员而言提出其他实施方案是容易的。在本文中提及“实施方案”、“方面”或“实施例/实例”表示这样描述的本发明之实施方案可包括特定特征、结构或特性，但并非每个实施方案都必然包括所述特定特征、结构或特性。此外，重复使用短语“在一个实施方案中”尽管可以指同一实施方案，但并非必然指同一实施方案。

[0037] 为了清楚起见，本文中并未示出和描述本文所述实施或方法的全部常规特征。当然将理解，在研发任何这样的实际实施时，将作出许多实施特异性的决定以实现具体目标，例如依从施用、治疗和对象相关的限制，而且这些具体的目的将在实施之间不同并且在使用者之间不同。此外，将理解，这样的开发工作可能是复杂且耗时的，但在本公开内容的教导下，这对于本领域普通技术人员而言不过是常规工作。

[0038] 本文只不过提供了具有提高的转染活性的脂质纳米颗粒(LN)。所述脂质纳米颗粒可以分隔脂质膜内的疏水分子和/或包封水性核心内的水溶性颗粒。LN制剂可包含单一脂质或脂质混合物，一般包含带电脂质和中性脂质，并且任选地还包含PEG化脂质和/或胆固醇。本公开内容的LN制剂可包含白蛋白-聚合物缀合物。在某些实施方案中，所述脂质纳米颗粒包含高度阳离子化的白蛋白-聚阳离子缀合物(APC)。LN的直径可小于300nm，或者通常为约50nm至约200nm。根据本发明的LN(尤其是在见于全身施用期间的高血清条件下)可表现出一个或更多个优点，例如提高的转染和降低的细胞毒性。LN适用于范围广泛的现有治疗剂和系统，并且可表现出血清稳定性、靶向递送和/或高转染效率。

[0039] 本文中使用的术语“脂质纳米颗粒”是指任何由一种或更多种脂质组分形成的囊泡。本文中所述的LN制剂可包括阳离子脂质。阳离子脂质是在任何生理pH下均携带净正电荷的脂质。正电荷用于通过静电相互作用与带负电的治疗剂(例如ASO)缔合。合适的阳离子脂质包括但不限于3 $\beta$ -[N-(N',N'-二甲基氨基乙烷)-氨基甲酰基]胆固醇盐酸盐(DC-Chol)；1,2-二油酰基-3-三甲基铵-丙烷(DOTAP)；1,2-二油酰基-3-二甲基铵-丙烷(DODAP)；二甲基二(十八烷基)溴化铵盐(DDAB)；1,2-二月桂酰基-sn-甘油基-3-乙基磷酸胆碱氯化物(DL-EPC)；N-[1-(2,3-二油酰基氧基)丙基]-N-N-N-三甲基氯化铵(DOTMA)；N-[1-(2,3-二油酰基氧基)丙基]-N-N-N-二甲基氯化铵(DODMA)；1,2-二月桂酰基-sn-甘油基-3-乙基磷酸胆碱氯化物(DOTMA)；N,N-二(十八烷基)-N,N-二甲基氯化铵(DODAC)；N-(1-(2,3-二油酰基氧基)丙基)-N-2-(精胺羧酰胺)乙基)-N,N-二甲基铵三氟乙酸盐(DOSPA)；1,2-二肉豆蔻基氧基丙基-3-二甲基羟乙基溴化铵(DMRIE)；二(十八烷基)酰胺基甘氨酰精胺(DOGS)；与阳离子修饰基团缀合的中性脂质；及其组合。此外，可以使用作为市售制剂的多种阳离子脂质，例如LIPOFECTIN(来自GIBCO/BRL)、LIPOFECTAMINE(来自GIBCO/MRL)、siPORT NEOFX(来自Applied Biosystems)、TRANSFECTAM(来自Promega)和TRANSFECTIN(来自Bio-Rad Laboratories, Inc.)。本领域中已知的或者以后开发的其他阳离子脂质也可在本发明中使用。本领域技术人员将认识到，有更多种阳离子脂质适合包含在本发明的LN制剂中。本公开内容的阳离子脂质可在制剂中以脂质的约0至约60.0摩尔百分比的浓度存在，或者可在制剂中以脂质的约5.0至约50.0摩尔百分比的浓度存在。本文使用的“制剂”指脂质包被的白蛋白纳米颗粒(LCAN)，其包含本文中限定的含核酸的脂质纳米颗粒和阳离子化的白蛋白-聚合物缀合物。所述制剂还包含靶向剂(如果存在的话)。

[0040] 本文公开的LN制剂可包含阴离子脂质。阴离子脂质是在生理pH下携带净负电荷的脂质。这些脂质在与阳离子脂质组合时用于降低LN的总表面电荷，和引入LN双层结构的pH依赖的破坏，通过在酸性pH下引起非薄层(nonlamellar)相或者引起与细胞膜融合来促进核苷酸释放。合适的阴离子脂质的实例包括但不限于脂肪酸，例如油酸、亚油酸和亚麻酸；半琥珀酸胆固醇酯(CHEMS)；1,2-二-0-十四烷基-sn-甘油基-3-磷-(1'-rac-甘油)(二酰PG)；1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油基-3-磷-(1'-rac-甘油)(钠盐)；1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油基-3-磷-L-丝氨酸(钠盐)；1-十六烷酰基,2-(9Z,12Z)十八碳二烯酰基-sn-甘油基-3-磷酸酯；1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-[磷-rac-(1-甘油)](DOPG)；二油酰基磷脂酸(DOPA)和1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷-L-丝氨酸(DOPS)；与中性脂质缀合的阴离子修饰基团及其组合。本领域中已知或者以后开发的其他阴离子脂质也可在本发明中使用。本公开内容的阴离子脂质以制剂的约0至约60.0摩尔百分比的浓度存在，或者以制剂的约5.0至约25.0

摩尔百分比的浓度存在。

[0041] 带电LN有利于转染,但可能发生脱靶效应,例如细胞毒性和RES介导的摄取。为了减弱细胞毒性和/或RES介导的摄取,可以使亲水性分子(例如,聚乙二醇(PEG))与脂质锚定物(anchor)缀合,并且包含在本文所述的LN中以阻碍LN聚集或者与膜相互作用。亲水性聚合物可与脂质组分共价键合或者使用交联剂与官能团(例如,胺)缀合。用于缀合的合适的亲水性聚合物和亲水性聚合物缀合物包括但不限于:聚乙烯醇(PVA);聚山梨酯80;1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-PEG2000(DSPE-PEG2000);琥珀酸D- $\alpha$ -生育酚聚乙二醇1000(TPGS);二肉豆蔻酰基磷脂酰乙醇胺-PEG2000(DMPE-PEG2000)和二棕榈酰基磷脂酰乙醇胺-PEG2000(DPPE-PEG2000)。本领域中已知的或者以后开发的其他亲水性聚合物也可在本发明中使用。亲水性聚合物可以以制剂的约0至约15.0摩尔百分比的浓度存在,或者制剂的约5.0至约10.0摩尔百分比。所用亲水性聚合物(例如PEG)的分子量可以为约100Da至约10,000Da、约100Da至约5,000Da或者约100Da至约2,000Da。

[0042] 本文所述LN还可包含中性脂质和/或两亲性脂质作为辅助脂质。这些脂质用于稳定制剂,降低体内清除,或者提高转染效率。LN可配制于糖类溶液中以促进冷冻稳定性(lyostability)和低温稳定性(cryostability),所述糖类例如但不限于葡萄糖、山梨醇、蔗糖、麦芽糖、海藻糖、乳糖、纤维二糖、棉子糖、麦芽三糖、葡聚糖或其组合。

[0043] 中性脂质在生理pH下具有零净电荷。本文中公开的任何LN制剂均可包含一种中性脂质或数种中性脂质的组合。合适的中性脂质包括但不限于:磷脂酰胆碱(PC)、磷脂酰乙醇胺、神经酰胺(ceramide)、脑苷脂(cerebroside)、前列腺素、鞘磷脂(sphingomyelin)、脑磷脂、胆固醇、甘油二酯、糖基化的甘油二酯、异戊二烯醇(prenol)、溶酶体PLA2底物、N-酰基甘氨酸及其组合。

[0044] 其他合适的脂质包括但不限于:磷脂酰胆碱、磷脂酸、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰甘油、磷脂酰胆碱和溶血磷脂酰乙醇胺;固醇,例如胆固醇、链甾醇(demosterol)、谷甾醇、酵母甾醇、薯蓣皂苷配基、羊毛甾烯醇、豆甾醇、烯胆固醇(lathosterol)和脱氢表雄酮;和鞘脂类,例如鞘氨醇、神经酰胺、鞘磷脂、神经节甘脂、鞘糖脂、磷酸神经鞘脂(phosphosphingolipid)、植物鞘胺醇(phytoshingosine);及其组合。

[0045] 本文所述的LN制剂还可包含融合脂质或融合包衣以促进膜融合。合适的融合脂质的实例包括但不限于甘油单油酸酯、油酸、棕榈酸、磷脂酸、磷酸肌醇4,5-二磷酸(PIP2),及其组合。本领域中已知的或者以后开发的其他融合脂质也可在本发明中使用。

[0046] 本文中所述的LN制剂还可包含阳离子聚合物或阳离子聚合物的缀合物。阳离子聚合物或其缀合物可单独使用或者与脂质纳米载体组合使用。合适的阳离子聚合物包括但不限于:聚乙烯亚胺(PEI)、五亚乙基六胺(PEHA);精胺;亚精胺;聚(L-赖氨酸);聚(酰氨基胺)(PAMAM)树状聚合物;聚亚丙基亚胺树状聚合物;聚(二甲氨基乙基)-甲基丙烯酸酯(pDMAEMA);壳聚糖;三(2-氨乙基)胺及其甲基化衍生物;及其组合。本领域中已知或以后开发的其他阳离子聚合物或缀合物也可在本发明中使用。在聚合物递送系统的实施中考虑链长度和分支。使用高分子量聚合物(例如,分子量为约25,000的PEI)作为转染剂,但会遭受细胞毒性。低分子量聚合物(例如,分子量为约600的PEI)可能不会引起细胞毒性,但可能由于无法促进与核酸的稳定缩合而使用受限。因此,将低分子量聚合物与较大颗粒(例如白蛋白)缀合是可用于在制剂中提高核酸缩合的活性同时降低细胞毒性的方法。

[0047] 阴离子聚合物也可并入本文所公开的LN制剂中。合适的阴离子聚合物包括但不限于：聚(丙基丙烯酸) (PPAA)；聚(谷氨酸) (PGA)；藻酸类；葡聚糖；黄原胶；衍生的聚合物；及其组合。本领域中已知的或者以后开发的其他阴离子聚合物也可在本发明中使用。

[0048] 在某些实施方案中，LN制剂包含聚合物的缀合物。所述缀合物可以与靶向剂、亲脂性部分、肽、蛋白质或提高总体治疗效力的其他分子相交联。合适的交联剂包括但不限于：N-琥珀酰亚胺基3-[2-吡啶基二硫基]-丙酸酯 (SPDP)；3,3'-二硫代双丙酸亚胺酸酯 (dimethyl 3,3'-dithiobispropionimidate, DTBP)；二环己基碳二亚胺 (DCC)；二异丙基碳二亚胺 (DIC)；1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺 (EDC)；N-羟磺基琥珀酰亚胺 (Sulfo-NHS)；N'-N'-羰基二咪唑 (CDI)；N-乙基-5-苯基异恶唑-3' 磺酸酯 (Woodward的试剂K)；及其组合。

[0049] 多种制备LN的方法适于合成本公开内容的LN，包括本领域中已知的方法。例如，可以采用乙醇稀释、冻融、薄膜水化、超声处理、挤压、高压均质化、洗涤剂透析、微流化 (microfluidization)、切向流渗透、无菌过滤和/或冻干。此外，可采用数种方法来减小LN的尺寸。例如，可以在适于脂质均质化的任何装置上进行均质化，例如Avestin Emulsiflex C5。经均质化的LN可再循环回到循环中用于进一步均质化。挤出可以在使用合适孔径 (0.05  $\mu\text{m}$  至 0.2  $\mu\text{m}$ ) 之聚碳酸酯膜的Lipex Biomembrane挤出机上进行。可以进行多个颗粒大小减小循环来使样品内的尺寸差异最小化并实现期望的尺寸。然后，可使所得LN通过Sepharose CL4B以除去过量的反应剂或者通过切向流渗透来处理。

[0050] 本文所述LN的任意实施方案还可在LN混悬剂中包含乙醇。在LN制剂中并入约10%至40%的乙醇使脂质双层透化。破坏脂质双层有助于与带电部分 (例如，ASO和siRNA) 缩合。以此方式制备的LN在施用之前稀释以减小由于乙醇的存在而导致的细胞膜裂解。或者，可以通过透析和渗透除去乙醇，而这也会除去未包封的核酸。

[0051] 可以对LN进行灭菌。这可通过使LN通过0.2  $\mu\text{m}$  或0.22  $\mu\text{m}$  的无菌滤器来实现，进行或者不进行预过滤。

[0052] LN的物理表征可通过许多方法来实现。可以使用动态光散射 (DLS) 或原子力显微镜 (AFM) 来确定平均直径及其标准偏差。理想地，LN应落在200nm的直径以下。用 $\zeta$ 电位计来测量 $\zeta$ 电位可用于测定颗粒的相对稳定性。动态光散射分析和 $\zeta$ 电位分析二者均可使用去离子水或合适的缓冲液中的稀释样品来进行。可以使用低温透射电子显微镜 (Cryo-TEM) 和扫描电子显微镜 (SEM) 来确定LN的详细形态。

[0053] 本文所述的LN在冷藏条件下可稳定数月。在LN的合成与施用之间的时间需要延长的情况下，可使用标准方法来冷冻LN。可以在冷冻之前向LN混悬液中添加冷冻保护剂 (例如，10% 蔗糖) 以维持制剂的完整性。冷冻干燥的加载的LN制剂因其长期稳定性而被推荐。

[0054] APC

[0055] 除了阳离子脂质以外，阳离子聚合物也可用于核酸递送系统。单独使用阳离子聚合物或者组合使用阳离子聚合物与LN作为转染剂常常有益于转染效率。最良好表征的聚合物转染剂是高分子量的聚乙烯亚胺 (分子量为约25kDa的大聚合物，其在本文中被成为PEI25K。PEI25在将pDNA递送至细胞方面已经取得了很大的成功；然而，细胞毒性限制了其使用。也对分子量为约600kDa的毒性较低的低分子量PEI进行了研究，但这显示出缩合与递送核酸的能力消失。据此，本文提供了高度阳离子化的白蛋白-聚合物缀合物 (APC)。APC可单

独用于递送试剂(例如pDNA)或者与基于脂质的制剂组合用来递送试剂(例如siRNA或ASO)。白蛋白因其疏水核心还具有内体裂解活性,一旦发生构象变化所述疏水核心即可暴露并可引起双层破坏或膜融合。白蛋白-PEI600缀合物具有响应于pH变化的离子化特征谱(profile)。电荷密度在内体pH下增加。

[0056] 在一个实施方案中,APC与阳离子脂质组合进行结合从而装配成阳离子脂质-APC-核酸纳米颗粒。在另一个实施方案中,APC与阴离子脂质组合进行结合从而装配成脂质-APC-核酸纳米颗粒。在某些实施方案中,所述脂质纳米颗粒包含高度阳离子化的白蛋白-聚阳离子缀合物。这些脂质纳米颗粒具有高转染效率而没有额外的细胞毒性。在另一个实施方案中,低分子量的五亚乙基六胺(PEHA)通过交联剂与人血清白蛋白缀合,产生高度阳离子化的响应于pH的APC,在本文中也被称为HSA-PEHA。就HSA-PEHA而言,PEHA与HSA之比为1至30,优选5至20,更优选8至15,更优选10至12。当并入纳米颗粒时,所得的包含脂质纳米颗粒和并入的高度阳离子化的响应pH之缀合物(例如HSA-PEHA)的制剂在本文中被称为脂质包被的白蛋白纳米颗粒(LCAN)。示例性LCAN是脂质包被的白蛋白纳米颗粒,其包含DOTAP/SPC/TPGS/HSA-PEHA。

[0057] LCAN尤其可用于递送NA,例如反义寡核苷酸,pDNA、siRNA、shRNA、miR和anti-miR。不希望受到理论限制,认为HSA-PEHA提高了纳米颗粒的稳定性和生物学活性。在某些实施方案中,此制剂中的脂质是DOTAP、SPC和TPGS。在一些实施方案中,DOTAP:SPC:TPGS之比为约25:70:5(m/m)。在一些示例性实施方案中,总脂质与HSA-PEHA的重量比为20至1,例如15至2或12.5至2.5。

#### [0058] 靶向剂

[0059] 向LN中添加靶向剂可提供超过被动靶向方法的提高的效力。靶向涉及并入特异性靶向部分,其例如但不限于:配体或抗体、细胞表面受体、肽、脂蛋白、糖蛋白、激素、维生素、抗体、抗体片段、前药和缀合物,或者这些部分的组合。靶向剂的一些非限制性实例包括叶酸、cRGD(例如,环(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Cys)(RGDFC)肽、含半乳糖的部分、转铁蛋白、EPPT1肽、低密度脂蛋白、表皮生长因子和抗体。cRGD可指相关的cRGD肽或其任何衍生物,例如,cRGDFc、cRGDFK、cRGDFE等。在一些示例性实施方案中,所述cRGD肽是cRGDFc(环(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Cys))。在一些实施方案中,可通过用合适的靶向部分包被LN的表面而非包封靶向剂来实现靶向效率的最大化。该方法可使LN与细胞表面受体的相互作用最优化。靶向剂可以在合成过程中直接并入LN中,或者在后续步骤中添加。靶向部分上的官能团及具体的治疗应用(例如,可降解连接)可有助于确定合适的并入LN中的方法。不具有亲脂区的靶向部分无法容易地直接插入LN的脂质双层中,并且可能需要在插入之前事先与脂质缀合,或者可以与LN形成静电复合物。在某些情况下,靶向配体可能不能直接与亲脂性锚定物结合。在这些情况下,可以利用交联剂形式的分子桥来促进相互作用。在锚定的靶向部分的空间限制阻止与预期生理学靶标充分相互作用的情况下可以使用交联剂。此外,如果靶向部分只在某些定向(orientations)情况下(例如,单克隆抗体)起作用,则经交联剂与脂质锚定物连接可能是有益的。可以使用常规的生物缀合方法来连接靶向剂与LN。可以使用可还原(reducible)或可水解的连接来防止制剂在体内积累以及防止后续的细胞毒性。

[0060] 在本申请的一些示例性实施方案中,并入RGD(或cRGD)或叶酸靶向剂作为靶向缀合物,例如,叶酸-PEG-CHEMS(叶酸-聚乙二醇-半琥珀酸胆固醇酯)或叶酸-PEG-DSPE(叶酸-

聚乙二醇-二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺)或cRGDfC-PEG-DSPE(环(RGDfC)-聚乙二醇-二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺)。在一些靶向缀合物中,最少5摩尔%的缀合物包含靶向剂。在一些实施方案中,所述缀合物包含至少约50摩尔%、至少约80摩尔%、至少约90摩尔%、或者至少约95摩尔%的靶向剂。在另一些示例性实施方案中,所述缀合物包含约50摩尔%、约80摩尔%、约90摩尔%或约95摩尔%的靶向剂。在一些示例性实施方案中,在总脂质中靶向缀合物的摩尔百分比为约0.05摩尔%至20摩尔%,例如约0.5摩尔%至5摩尔%。

[0061] 治疗剂

[0062] 多种治疗剂或诊断剂可与本文所述的LN组合使用。这样的治疗剂和诊断剂的非限制性实例包括核酸、蛋白质、多糖、脂质、放射性物质、治疗剂、前药及其组合。治疗剂包括但不限于抗肿瘤剂、抗感染剂、局部麻醉剂、抗过敏剂、抗贫血剂、血管发生抑制剂(angiogenesis, inhibitor)、 $\beta$ -肾上腺素能受体阻滞剂、钙通道拮抗剂、抗高血压剂、抗抑郁剂、抗惊厥剂、抗菌剂(anti-bacterial)、抗真菌剂、抗病毒剂、抗风湿剂、驱肠虫剂(anthelminithics)、抗寄生虫剂、皮质类固醇、激素、激素拮抗剂、免疫调节剂、神经递质拮抗剂、抗糖尿病剂、抗癫痫剂、抗出血剂、抗高渗剂(anti-hypertonic)、抗青光眼剂(antiglaucoma agent)、免疫调节细胞因子、镇静剂、趋化因子、维生素、毒素、麻醉剂(narcotic)、成像剂,及其组合。

[0063] 基于核酸的治疗剂非常适用于本公开内容的LN制剂。这样的基于核酸之治疗剂的实例包括但不限于pDNA、siRNA、miRNA、anti-miRNA、反义寡核苷酸(ASO)、及其组合。为了保护免受血清核酸酶和稳定治疗剂,可以对取代核酸和/或磷酸二酯键进行修饰。这样的修饰包括但不限于:骨架修饰(例如,硫代磷酸酯键);2'修饰(例如,2'-0-甲基取代的碱基);两性离子修饰(6'-氨基己基修饰的ODN);添加亲脂性部分(例如,脂肪酸、胆固醇或胆固醇衍生物)及其组合。

[0064] 在本发明的一个示例性实施方案中,治疗剂是靶向编码Akt-1之核酸的一部分并且调节Akt-1之表达的ASO。寡核苷酸化合物设计成特异性地与一个或更多个编码Akt-1的核酸杂交。这样的ASO公开于美国专利7,122,527中,其内容通过引用整体并入本文。一个示例性的ASO(RX-0201(**Archexin®**)),其是20聚体硫代磷酸酯反义寡核苷酸)靶向Akt-1基因之编码区中具有如下序列的位点:Akt-1基因第1,478位的5'cgccaaggagatcatgcagc3'(Seq.Id.No.:3)。RX-0201的骨架序列与该位点互补。

[0065] 另一个ASO(RX-0194)靶向Akt-1基因中具有如下序列的位点:Akt-1基因的第1,271位的5'agtggactggtggtggggctgg3'(Seq.Id.No.:4)。RX-0194骨架的序列与该位点互补。包含来自取得20聚体RX-0194之序列的上游和下游5或10个核苷酸的寡聚物示出可测量的Akt-1mRNA表达抑制。RX-0194和RX-0201的截短变体也示出抑制癌细胞增殖。除了上述2种ASO以外,下调Akt-1mRNA表达并且引起对癌细胞系之细胞毒性的另外5个反义寡核苷酸化合物包括:

[0066] RX-0616,其包含可与Akt-1基因的在第2101位起始的位点杂交的5'agatagctggtgacagacag3'(Seq.Id.No.:5),所述Akt-1基因的在第2101位起始的位点具有如下序列:5'ctgtctgtcaccagctatct3'(Seq.Id.No.:6);

[0067] RX-0627,其包含可与Akt-1基因的在第2473位起始的位点杂交的5'cggtggagagatcatctgagg3'(Seq.Id.No.:7),所述Akt-1基因的在第2473位起始的位点具有

如下序列:5'cctcagatgatctctccacg3' (Seq. Id.No.:8) ;

[0068] RX-0628, 其包含可与Akt-1基因的在第2493位起始的位点杂交的5' tcgaaaaggtaagtgtac3' (Seq. Id.No.:9), 所述Akt-1基因的在第2493位起始的位点具有如下序列:5'gtgcacttgacccttcga3' (Seq. Id.No.:10) ;

[0069] RX-0632, 其包含可与Akt-1基因的在第2603位起始的位点杂交的5' tggcagcggcagcggcag3' (Seq. Id.No.:11), 所述Akt-1基因的在第2603位起始的位点具有如下序列:5'ctgccgtccgctgcacca3' (Seq. Id.No.:12) ;

[0070] RX-0638, 其包含可与Akt-1基因的在第170位起始的位点杂交的5' ggccgcagcgccggcctagc3' (Seq. Id.No.:2), 所述Akt-1基因的在第170位起始的位点具有如下序列:5'gctaggcccgcgtcgcc3' (Seq. Id.No.:13) 。

[0071] 在另一些实施方案中,治疗剂是靶向编码HIF-1之核酸的一部分并且调节HIF-1之表达的ASO。寡核苷酸化合物设计成特异性地与一个或更多个编码HIF-1的核酸杂交。这样的ASO公开于美国专利7,205,283中,其内容通过引用整体并入本文。一个示例性的ASO (RX-0047, 包含5'aatgagccaccagtgtccaa 3' (Seq. Id.No.:2) 的20聚体硫代磷酸酯反义寡核苷酸) 是“缺氧诱导因子-1 $\alpha$ ”(HIF-1 $\alpha$ ) 的强效抑制剂,并且靶向HIF-1基因中具有如下序列的位点:HIF-1基因第2,772位的5'ttggacactggctcatt3' (Seq. Id.No.:14) 。RX-0047的骨架序列与该位点互补。根据本实施方案的另一个示例性ASO (包含5' ggagctaacaatctccaagtc3' (Seq. Id.No.:15) 的RX-0149) 靶向HIF-1基因的编码区中具有如下序列的位点:HIF-1基因的第1,936位的5'gacttggagatgttagtcc3' (Seq. Id.No.:16) 。RX-0149骨架的序列与该位点互补。包含来自取得20聚体RX-0047和RX-0149之序列的上游和下游5或10个核苷酸的寡聚物示出可测量的HIF-1mRNA表达抑制和癌细胞增殖抑制。RX-0047和RX-0149的示出一些HIF-1mRNA表达抑制的截短变体也示出癌细胞增殖的抑制。

[0072] 本发明包括另一些寡聚反义化合物,包括但不限于寡核苷酸模拟物 (oligonucleotide mimetic)。反义化合物可包括约10至约30个核酸碱基,例如,寡核苷酸具有约20个核苷碱基(nucleobases) (即,约20个相连的核苷)。如本领域中已知的,核苷是碱基-糖组合。核苷的碱基部分通常是杂环碱基。这样的杂环碱基的两个最常见的类别是嘌呤和嘧啶。核苷酸是包括与核苷的糖部分共价连接之磷酸基团的核苷。就包含呋喃戊糖基糖的那些核苷而言,磷酸基团可与糖的2'、3' 或5' 羟基部分连接。在形成寡核苷酸时,相邻的核苷彼此之间通过磷酸基团共价连接从而形成线性聚合物化合物。进而,该线性聚合物结构的各端可进一步相连以形成环结构,然而,一般优选开放的线性结构。在寡核苷酸结构中,磷酸基团通常指形成寡核苷酸之核苷间的骨架。RNA和DNA通常的键或骨架是3' 或5' 磷酸二酯键。

[0073] 本发明的反义化合物包括任何可药用盐、酯或这些酯的盐或者在施用于动物(包括人)之后能够(直接或间接)提供生物活性代谢物或其残余物的任何其他化合物。因此,例如,本公开内容还包括本发明化合物的前药和可药用盐,这些前药的可药用盐以及其他生物等价物(bioequivalent)。

[0074] 应用

[0075] 根据应用,本文中公开的脂质纳米颗粒可设计成有利的特性,例如提高的与核酸的相互作用、提高的血清稳定、降低的RES介导的摄取、靶向递送或内体内pH敏感性释放。由

于LN制剂的不同性质,本文提供的数种方法中的任意一种可用于实现特定治疗目的。可以使用阳离子脂质、阴离子脂质、PEG脂质、中性脂质、融合脂质、阳离子聚合物、阴离子聚合物、聚合物缀合物、肽、靶向部分及其组合来满足具体目的。

[0076] 本文中所述的脂质纳米颗粒可用作治疗性递送寡核苷酸(ON)治疗剂的平台,所述ON治疗剂例如cDNA、siDNA、shDNA、miRNA、anti-miR和反义寡核苷酸(ASO)。该治疗剂可用于治疗多种疾病,例如多种类型的癌症、白血病、病毒感染以及其他疾病。当然,根据本发明可治疗的特定疾病取决于并入本发明之LN中的治疗剂。本发明特别适于包封核酸,例如反义寡核苷酸。核酸(特别是反义寡核苷酸)尤其可用于治疗肿瘤和癌症。根据本发明可治疗的肿瘤和癌症的实例包括例如脑癌、膀胱癌、肺癌、乳腺癌、黑素瘤、皮肤癌、表皮癌、结肠直肠癌、非霍奇金淋巴瘤、子宫内膜癌、胰腺癌、肾(肾细胞)癌、前列腺癌、白血病、甲状腺癌、头颈部癌、卵巢癌、肝细胞癌、宫颈癌、肉瘤、胃癌、多发性骨髓瘤、淋巴瘤、胃肠癌和子宫癌。具体实例包括表皮癌、胰腺癌和乳腺癌。

[0077] 许多肿瘤在其细胞表面过表达受体。靶向部分(例如cRGD肽、叶酸、转铁蛋白(Tf)、抗体、低密度脂蛋白(LDL)及表皮生长因子)可通过使得能够进行靶向的药物递送而大大提高活性。多靶向的系统是另一个可能,并且可进一步用于明确特定靶细胞亚型。

[0078] 单独或者彼此组合实施本文中所述LN制剂的实施方案与现有范例脂质纳米颗粒设计协同作用。

[0079] 根据治疗应用,本文所述的LN可通过以下方法施用:经口、肠胃外,静脉内、肌内、皮下、腹膜内、经皮、肿瘤内、动脉内、全身或传递增强的递送。在一些特定实施方案中,LN经静脉内、肌内、皮下或肿瘤内递送。可使用替代性施用途径来进行不同或类似LN的后续给药。

[0080] 本公开内容的药物组合物包含有效量的本文公开的脂质纳米颗粒制剂和/或溶解或分散于可药用载体中的额外的试剂。术语“药学”或“可药用”指在施用于动物(例如,人)后不产生不良反应、变态反应或其他不希望的反应的分子实体和组合物。在本公开内容的教导下,制备包含至少一种化合物或另外的活性成分的药物组合物对于本领域技术人员而言将是已知的,如Remington's Pharmaceutical Sciences,2003中所示,其通过引用并入本文。此外,对于动物(例如,人)施用,将理解,所述制剂应满足FDA局之生物标准所要求的无菌、致热原性(pyrogenicity)、一般安全性和纯度标准。

[0081] 本文中所公开的组合物可包含不同类型的载体,取决于其以固体、液体还是气雾剂形式施用以及其用于诸如注射施用等途径是否需要灭菌。本文中所公开的组合物可以通过以下方式施用:静脉内、皮内、经皮、鞘内、动脉内、腹膜内、鼻内、阴道内、直肠内、表面、肌内、皮下、经粘膜、子宫内、经口、表面、局部、经吸入(例如,气雾剂吸入)、通过注射、通过输注、通过连续输注、通过局部灌注直接洗浴靶细胞、经导管、经灌洗、以乳膏剂、以脂质组合物(例如,脂质体)或者通过本领域普通技术人员已知的其他方法或前述的任意组合(参见,例如,Remington's Pharmaceutical Sciences,2003,其通过引用并入本文)。

[0082] 施用于动物或人患者的本文中所述公开之组合物的实际给药量可通过物理因素和生理因素来确定,例如体重、病症的严重程度、被治疗疾病的类型、之前或同时进行的治疗干预、患者的特发性疾病(idiopathy)以及施用途径。根据该剂量和施用途径,有效量和/或优选剂量的施用次数可根据对象的响应而变化。在任何情况下,负责施用的医学工作者

将确定组合物中活性成分的浓度和对于个体对象而言合适的剂量。

[0083] 在某些实施方案中，药物组合物可包含例如至少约0.1%的活性化合物。在另一些实施方案中，活性化合物可占单位重量的约2%至约75%，或者约25%至约60%，例如其间可得出的任何范围。自然而言，可以这样的方式制备的每种可治疗用组合物中活性化合物的量为将在任何给定单位剂量的化合物中得到的合适的剂量。制备这样的药物制剂的本领域技术人员将考虑到例如以下因素：溶解度、生物利用度、生物半衰期、施用途径、产品货架期以及其他药理学考虑因素，因此，可期望多种剂量和治疗方案。

[0084] 在另一些非限制性实例中，一次投药还可包含每次施用约1微克/kg/体重、约5微克/kg/体重、约10微克/kg/体重、约50微克/kg/体重、约100微克/kg/体重、约200微克/kg/体重、约350微克/kg/体重、约500微克/kg/体重、约1毫克/kg/体重、约5毫克/kg/体重、约10毫克/kg/体重、约50毫克/kg/体重、约100毫克/kg/体重、约200毫克/kg/体重、约350毫克/kg/体重、约500毫克/kg/体重、约1000mg/kg/体重或者更多，以及其间可得出的任何范围。从本文所列举的数值可得出范围的非限制性实例中，基于上述数值，可施用如下范围：约5mg/kg/体重至约100mg/kg/体重、约5微克/kg/体重至约500毫克/kg/体重等。

[0085] 在某些实施方案中，本文的组合物和/或另外的试剂配制成经消化途径施用。消化途径包括其中组合物与消化道直接接触的所有可能的施用途径。具体地，本文公开的药物组合物可经口、口腔(bucally)、经直肠或经舌下施用。因此，这些组合物可以与惰性稀释剂或者与可吸收的可食用载体一起配制。

[0086] 在另一些实施方案中，本文中所述的组合物可以通过肠胃外途径施用。本文使用的术语“肠胃外”包括绕开消化道的途径。特别地，本文中公开的药物组合物可以经例如但不限于以下途径施用：静脉内、皮内、肌内、动脉内、鞘内、皮下或腹膜内施用(美国专利6,753,514、6,613,308、5,466,468、5,543,158、5,641,515和5,399,363各自特别地通过引用整体并入本文)。

[0087] 作为游离碱或可药用盐的本文所公开之组合物的溶液可在水中合适地与表面活性剂(例如，羟丙基纤维素)混合制备。分散体还可在如下中制备：甘油、脂质聚乙二醇及其混合以及油。在常规储存和使用条件下，这些制剂包含防腐剂以防止微生物生长。适于注射用的药物形式包括无菌水溶液或分散体以及用于临时制备无菌注射液或分散体的无菌散剂(美国专利5,466,468，其特别地通过引用整体并入本文)。在所有情况下，剂型(form)都必须是无菌的并且必须是以易于注射的流动程度存在。其在制造和储存条件下必须是稳定的，并且必须保存为免受微生物(例如细菌和真菌)的污染作用。载体可以是含以下的溶剂或分散介质，例如水、乙醇、多元醇(即，甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)、其合适的混合物和/或植物油。可以例如通过以下来保持合适的流动性：使用包衣，例如卵磷脂；在分散体的情况下保持所需的颗粒大小以及使用表面活性剂。可以通过多种抗菌剂和抗真菌剂(例如对羟基苯甲酸酯类、氯丁醇、酚、山梨酸、硫柳汞等)来防止微生物的作用。在许多情况下，优选包括等渗剂，例如糖或氯化钠。可以通过在组合物中使用延迟吸收的试剂(例如，单硬脂酸铝或明胶)来实现可注射组合物的延长的吸收。

[0088] 就水溶液的肠胃外施用而言，例如，如果必要的话，应合适地缓冲溶液，首先用足量的盐水或葡萄糖使液体稀释剂等渗。这些特定水溶液尤其适于静脉内、肌内、皮下和腹膜内施用。就此而言，在本公开内容的教导下，本领域技术人员将知晓可使用的无菌水性介

质。例如,可以将1个剂量溶解于等渗的NaCl溶液中,或者添加到1000ml的皮下灌注术流体中或者在推荐的输注部位注射(参见例如,“Remington's Pharmaceutical Sciences”第15版,第1035至1038和1570至1580页)。根据接受治疗之对象的病症,剂量必然会发生一些变化。在任何情况下,负责施用的人将确定对于个体对象而言合适的剂量。此外,就人施用而言,制剂应满足FDA局生物标准所要求的无菌、致热原性、一般安全性及纯度标准。

[0089] 无菌注射溶液通过如下所述来制备:向具有多种上文列举的其他成分(根据需要)的合适溶剂中添加需要量的组合物,接着进行过滤除菌。一般而言,分散体通过如下所述来制备:向含基本分散介质和所需的上文所列举之其他成分的无菌载体中添加多种无菌组合物。在用于制备无菌注射溶液的无菌散剂的情况下,一些制备方法是真空干燥和冷冻干燥技术,其产生活性成分加上来自其此前的经过滤无菌溶液之任何其他期望成分的散剂。在使用或者不使用稳定剂的情况下,将粉末化的组合物与液体载体(例如,水或盐水溶液)组合。

[0090] 在另一些实施方案中,所述组合物可配制成经多种混杂途径施用,例如表面(即,经皮)施用、经粘膜施用(鼻内、经阴道等)和/或经吸入。

[0091] 用于局部施用的药物组合物可包括配制用于给药应用的组合物,例如软膏、糊剂、乳膏剂或散剂。软膏包括所有用于局部施用的油质的吸收性乳剂和基于水溶性的组合物,而乳膏剂和洗剂是仅包括乳剂基质的那些组合物。局部施用的药物可包含渗透增强剂以促进活性成分通过皮肤吸收。合适的渗透增强剂包括甘油、醇类、烷基甲基亚砜、吡咯烷酮及luarocapram。对于用于表面施用的组合物而言的可用的基质包括聚乙二醇、羊毛脂、冷霜和矿脂以及任何其他合适的吸收、乳剂或水溶性软膏基质。表面制剂在必要时还可包含乳化剂、凝胶化剂和抗微生物防腐剂以保存该组合物和提供均匀的混合物。所述组合物的经皮施用还可包括使用“贴剂(patch)”。例如,贴剂可以预定速率和连续的方式在固定时间段提供一种或更多种组合物。

[0092] 在某些实施方案中,所述组合物可通过滴眼剂、鼻内喷雾剂(intranasal spray)、吸入剂和/或其他气雾剂递送载体来递送。用于将组合物经鼻内气雾喷雾直接递送至肺的方法描述于美国专利5,756,353和5,804,212中(均特别地通过引用整体并入本文)。同样,使用鼻内微颗粒树脂(Takenaga等,1998)和溶血磷脂酰甘油化合物(美国专利5,725,871,其特别地通过引用整体并入本文)进行药物递送在药学领域是公知的,并且可用于递送本文所述的组合物。同样,以聚四氟乙烯支持物基质的形式进行透粘膜药物递送描述于美国专利5,780,045(其特别地通过引用整体并入本文)中,并且可用于递送本文所述的组合物。

[0093] 还考虑,本文公开的组合物可经气雾剂递送。术语气雾剂指分散于液化或加压气体抛射剂中的微细固体或液体颗粒的胶体系统。用于吸入的典型气雾剂由活性成分在液体抛射剂或者液体抛射剂与合适溶剂之混合物中的悬浮液组成。合适的抛射剂包括烃和烃醚。合适的容器将根据抛射剂的压力要求而不同。气雾剂的施用将根据对象的年龄、体重以及症状的严重程度和响应而不同。

## 实施例

[0094] 实施例1. 脂质体制剂和LCAN制剂的制备

[0095] 1. 制备和表征用于反义寡核苷酸的脂质体制剂

[0096] 通过乙醇扩散方法来制备用于RX-0047的脂质体制剂(L-RX-0047)。脂质体组合物为摩尔比为45:50:5的DOTAP/DOPE/TPGS或DOTAP/soyPC/TPGS。简言之,将脂质溶解于含有或不含PEI2K(即,分子量为约2000的PEI)的乙醇中。脂质与PEI2K之比为12.5:1。将RX-0047溶解于柠檬酸盐缓冲液(20mM,pH4)中,然后在涡旋下添加到脂质溶液或脂质/PEI2K溶液中,从而在40%(v/v)的乙醇浓度自发形成预脂质体。RX-0047与脂质的重量比为12.5:1。然后在室温下用柠檬酸盐缓冲液(20mM,pH4)对该复合物进行透析2小时,接着在室温下用HEPES缓冲盐水(HBS,20mM HEPES,145mM NaCl,pH 7.4)透析过夜,使用MWCO 10000 Dalton Spectra/Por Float-A-Lyzer仪(SDectrum Laboratories,Rancho Dominguez,CA)除去游离的RX-0047。

[0097] 按照与如上所述相同的方法制备用于RX-0047的叶酸靶向的脂质体制剂(F-L-RX-0047)。该脂质体包含摩尔比为45/50/4.5/0.5或45/50/4/1的DOTAP/sPC/TPGS/F-PEG-CHEMS。

[0098] 按照与如上所述相同的方法制备用于RX-0047的RGD靶向的脂质体制剂(cRGD-L-RX-0047)。该脂质体包含摩尔比为45/50/4.5/0.5或45/50/4/1的DOTAP/sPC/TPGS/cRGD-PEG-DSPE。

[0099] 2.HSA-PEHA缀合物的合成

[0100] 通过用EDC活化HSA上的羧基并与PEHA上的胺形成酰胺键来合成HSA-PEHA缀合物。在合成期间使用的HSA:PEHA:EDC摩尔比为1:1500:200(mol/mol)。通过使HSA与大幅过量的PEHA在50mM硼酸缓冲液或水(pH 8.0)中的1-乙基-3-(3-二甲氨基)-丙基碳二亚胺(EDC)和碘基-N-羟基琥珀酰亚胺的存在下反应来使HSA(25%,购自Octapharma)与五亚乙基六胺缀合(PEHA,购自Sigma-Aldrich)。简言之,将5g的PEHA(MW 232.37,工业级)溶解于80mL ddH<sub>2</sub>O中,然后使用1M HC1调节至pH 8.0。然后,在搅拌下向PEHA溶液中添加1g(4mL)的HSA和562.5mg的1-乙基-3-(3-二甲氨基)-丙基碳二亚胺(EDC,溶解于DMSO中)。反应在室温持续3至4小时。通过凝胶膜色谱在PD-10脱盐柱上纯化HSA-PEHA产物,或者使用MWCO 10,000色谱膜用ddH<sub>2</sub>O(双蒸水)在4℃进行透析以除去未反应的PEHA和副产物。每3至4小时更换透析缓冲液一次,直到通过标准的茚三酮或三硝基苯磺酸(TNBS)胺测定在透析循环结束时的3小时时间点的外部缓冲液中检测不到来自PEHA的胺。对于大规模合成,应当用切向流渗滤来代替透析方法,例如使用Millipore Pellicon盒系统或Spectropor中空纤维系统。该方法可用于将产物浓缩至期望的浓度。使产物通过0.22μm无菌滤器进入无菌容器中,并且在4℃保存。对于长期储存而言,产物可在-20℃保存。还可以将产物冻干。

[0101] 通过BCA蛋白质测定来测定产物蛋白质浓度,并使用基于PEHA的标准曲线通过TNBS胺含量测定来测定产物中的PEHA含量。通过基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱法(MALDI TOF MS)来测定HSA-PEHA缀合物的分子量。平均上,基于示出m/z为66405.756的结果,每个HSA连接有11个PEHA。SDS-PAGE分析示出,缀合物作为一个单独的条带迁移,表明HSA-PEHA产物中缺少分子间交联。

[0102] 3.cRGDfC-PEG-DSPE缀合物的合成

[0103] cRGDfC(环(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Cys))和PEG-DSPE-马来酰亚胺通过-SH和-马来酰亚胺反应形成的硫醚键缀合。反应期间使用的cRGDfC和PEG-PSPE-马来酰亚胺摩尔比为1.5:1。合并分别溶解于含5mM EDTA(pH=7.0)的PBS缓冲液中的cRGDfC和PEG-DSPE溶液,并

伴随搅拌于室温反应6小时。通过在PD-10柱上凝胶过滤来纯化产物以从产物中除去未反应的/过量的cRGDfC。对于大规模反应,可以用GPC(使用MWCO 2000膜的透析)或切向流渗滤来代替凝胶过滤。可以将产物冷冻或冻干以保持长期稳定性。通过HPLC和LC-MS来确认产物纯度。按照说明书可以建立最低的cRGDfC缀合水平(例如,80%)和游离肽含量(例如,<1%)。可以通过BCA蛋白质测定来确定产物中的cRGDfC含量。

[0104] 4. 叶酸-PEG-DSPE缀合物的合成

[0105] 使10mg叶酸与在具有少量三乙胺(20 $\mu$ l)之DMSO(0.5ml)中的7mg的N,N'-二环己基碳二亚胺(DCC)和2.87mg的N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)以叶酸/DCC/NHS=1/1.5/1.1的摩尔比在室温反应3小时。对反应混合物进行离心以出去副产物二环己基脲。将77mg的DSPE-PEG-胺溶解于具有少量三乙胺(20 $\mu$ l)的DMSO(0.5ml)中,然后与以上合成的叶酸-NHS以1:1的摩尔比在室温反应3小时。通过用10×体积丙酮沉淀来纯化叶酸-PEG-DSPE。通过离心来收集沉淀物,然后在真空下干燥。使用MWCO 2000膜用ddH<sub>2</sub>O通过透析进一步纯化产物,接着进行冻干。通过HPLC来确认产物纯度。按照说明书建立相对于全部PEG化脂质的最低叶酸缀合水平(例如,80%)并且检测不到的游离叶酸含量。通过UV光谱在371nm处或者通过HPLC测定产物中的叶酸含量

[0106] 5. 叶酸-PEG-DSPE缀合物的合成

[0107] 通过使叶酸-PEG-胺与CHEMS-NHS反应来进行叶酸-PEG-CHEMS的合成。叶酸-PEG-胺与CHEMS-NHS二者均通过先前所述方法来合成(Xiang等,Int J Pharm.,356 (2008) 29-36)。简言之,对于叶酸-PEG-双-胺的合成,将叶酸(26.5mg)和PEG-双-胺(167.5mg)溶解于1mL DMSO中。然后,向溶液中添加8.6mg的NHS和15.5mg的DCC,使反应在室温过夜进行。然后通过Sephadex G-25凝胶过滤色谱来纯化产物叶酸-PEG-胺。对于CHEMS-NHS的合成,使CHEMS(1g)与四氢呋喃中的475mg NHS和1.25g DCC在室温反应过夜。通过重结晶纯化产物CHEMS-NHS。最后,对于F-PEG-CHEMS的合成,将叶酸-PEG-胺(137mg,40 $\mu$ mol)和CHEMS-NHS(29.2mg,50 $\mu$ mol)溶解于CHCl<sub>3</sub>(50mL)中,并在室温下反应过夜。然后通过旋转蒸发除去溶剂(CHCl<sub>3</sub>),并在50mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(10mL)中水合残余物以形成F-PEG-CHEMS胶束。然后使用分子量截止(MWCO)为14kDa的谱透析膜用去离子水来透析胶束,以除去低分子量副产物。然后通过冻干来干燥产物F-PEG-CHEMS,其产生黄色粉末产物(130mg),产率为76.5%。通过薄层色谱(TLC)以及通过DMSO-d<sub>6</sub>中的<sup>1</sup>H NMR来确认产物的身份。

[0108] 6. 制备与表征用于反义寡核苷酸的LCAN制剂

[0109] 通过乙醇稀释方法来制备脂质包被的白蛋白纳米颗粒(LCAN)。将脂质1,2-二油酰基-3-三甲基铵-丙烷(DOTAP)(Avanti Polar Lipids)、来自大豆的L- $\alpha$ -磷脂酰胆碱(SPC)(Avanti Polar Lipids)以及d- $\alpha$ -生育酚聚乙二醇1000琥珀酸酯(TPGS)(Eastman Chemical)溶解于乙醇中。以25:70:5(mol/mol)组合脂质。将HSA-PEHA与脂质溶液以12.5:3的重量比混合。反义组合物/总脂质/HSA-PEHA的重量比为1:10:3。简言之,在涡旋下将Hepes缓冲剂(20mM,pH 7.4)中的HSA-PEHA与溶解于EtOH中的脂质混合,所得的EtOH浓度为60%。将RX-0047或RX-0201溶解于Hepes缓冲液(20mM,pH 7.4)中,然后在涡旋下添加到脂质和HSA-PEHA溶液中,从而在40%(v/v)的EtOH浓度自发形成预LCAN。然后在室温用Hepes缓冲液(20mM,pH 7.4)对该复合物进行透析2小时,然后在室温使用HEPES缓冲盐水(HBS,20mM HEPES,145mM NaCl,pH 7.4)对复合物进行透析过夜,使用MWCO 10000Dalton

Snakeskin透析管除去游离的ASO。

[0110] 将LCAN制剂浓缩到20倍然后用Hepes缓冲液(5mM, pH 7.4)洗涤以除去NaCl。将产物稀释至期望的浓度并添加10%蔗糖。然后经0.45μm滤器过滤终产物，然后储存在-70℃。

[0111] 7. 制备和表征用于反义寡核苷酸的靶向LCAN制剂

[0112] 按照与实施例5所述相似的方法制备RGD靶向的LCAN制剂。对于该RGD靶向的LCAN制剂，脂质由DOTAP/soyPC/TPGS/cRGDfC-PEG-DSPE以25:70:4:1的摩尔比构成，并且反义组合物/总脂质/HSA-PEHA的重量比为1:10:3。通过以25:70:4:1的比例混合DOTAP、soyPC、TPGS和cRGDfC-PEG-DSPE来制备含靶向剂的脂质混合物。通过两个泵和Y连接器将60%乙醇中的脂质混合物组分(溶液A)和20%乙醇中的等体积HSA-PEHA(溶液B)合并以得到40%乙醇溶液(溶液C)。将RX-0201(**Archexin<sup>®</sup>**)溶解于具有40%乙醇的HEPES缓冲液(20mM, pH 7.4)中，以形成溶液D。通过两个泵和Y连接器将等体积的溶液C和溶液D合并以得到40%乙醇溶液(溶液E)，并且边搅拌边用ddH<sub>2</sub>O将溶液E稀释四倍得到10%乙醇。向溶液E中添加等体积的0.5M NaCl以产生含250mM NaCl和5%乙醇浓度的溶液(溶液F)。通过切向流渗透来纯化RGD靶向的LCAN产物溶液F，MWCO 30kDa膜中包括将溶液F中RX-0201浓缩为0.5mg/mL的浓度作为第一步，用5mM磷酸缓冲液(pH7.4)进行渗透直至渗透液滴中的RX-0201浓度降低至低于10μg/mL作为第二步骤，而产物的浓度达到RX-0201浓度为2.5mg/mL为最终步骤。向产物中添加1/4体积的50%蔗糖以产生10%的蔗糖溶液，并经过0.22μm无菌滤器过滤；如果必要的话采用预过滤。对于冻干，在无菌条件下，将经过滤的产物(10mL)转移到50mL小瓶中，采用2阶段程序冷冻和冻干：将托架(she1f)冷却到0℃，以0.5℃/分钟冷却到-40℃，将压力降低至0.12-0.16个大气压(atm)，在-25℃初始干燥30小时。以5℃/分钟加热到25℃，进行6小时最大真空干燥。将最终的cRGD靶向LCAN产物储存在4℃，并在使用时用水重新构建用于注射。

[0113] 其他靶向的LCAN产物例如叶酸-LCAN-RX-0201、cRGD-LCAN-RX-0047和叶酸-LCAN-RX-0047按照与如上所述相同的方法来制备。

[0114] 实施例2：脂质体制剂和LCAN制剂的表征

[0115] RGD靶向的脂质体制剂由DOTAP/sPC/TPGS/cRGDfC-PEG-DSPE以45/50/4.5/0.5或45/50/4/1的摩尔比组成。颗粒大小和ζ电位示于表1中。cRGDfC-PEG-DSPE浓度不改变脂质体颗粒大小和ζ电位。

[0116] 表1.RGD靶向脂质体制剂的表征

[0117]

制剂	颗粒大小 (nm)	ζ 电位 (mV)
DOTAP/sPC/TPGS/cRGDfC-PEG-DSPE (45/50/4.5/0.5)	91.3±4.3	18.8±1.3
DOTAP/sPC/TPGS/cRGDfC-PEG-DSPE (45/50/4.0/1.0)	90.2±6.2	20.4±2.1

[0118] LCAN产物的药物负载效率对于寡核苷酸浓度为2mg/mL，其通过OligoGreen ssDNA定量试剂(Invitrogen)来测定，如表2所示。产物中寡核苷酸的回收百分比为60%至76%。用NCMP article Sizer Model 370 (Particle Sizing Systems, Santa Barbara, CA)分析LCAN产物的颗粒大小，介于92.7nm至124nm。采用体积-重量高斯分布分析来测定平均颗粒

大小和大小分布。用ZetaPALS(Brookhaven Instruments Corp.,Worcestershire,NY)测定 $\zeta$ 电位。所有测量均一式三份地进行。 $\zeta$ 电位为14.5至29.4mV。

[0119] 表2:具有RX-0201或RX-0047的LCAN纳米颗粒的表征

[0120]

制剂	浓度 (mg/ml)	颗粒大小 (nm)	$\zeta$ 电位 (mV)	包封效率 (%)
LCAN-RX-0201	2.0±0.2	97.4±4.5	29.4±3.2	72.6±7.8
叶酸-LCAN-RX-0201	2.0±0.1	92.7±6.5	25.3±2.4	70.7±6.3
cRGDfC-LCAN-RX-0201	2.0±0.3	102.5±10.3	26.5±4.8	68.4±5.6
LCAN-RX-0047	2.0±0.1	113.7±7.8	25.4±3.8	76.2±6.9
叶酸-LCAN-RX-0047	2.0±0.2	117.9±11.3	14.5±2.0	62.1±7.6
cRGDfC-LCAN-RX-0047	2.0±0.2	123.8±8.5	20.9±2.2	60.0±5.9
LCAN-对照	-	80.0±7.0	46.2±6.6	-

[0121] 实施例3:冻融稳定性和冻干

[0122] 合成了两个不同批次的脂质体制剂。在冻融循环之前和之后测量颗粒大小、 $\zeta$ 电位和RX-0047含量。对于冻干而言,在LABCONCO冻干机中对含5ml LCAN制剂的每个小瓶进行冻干。完整的干燥过程有三个阶段:冷冻、首次干燥和二次干燥。在二次干燥后,将小瓶储存在4°C或者用ddH<sub>2</sub>O悬浮产物以检测颗粒大小、 $\zeta$ 电位和药物含量。

[0123] 对在4°C的稳定性和冻融稳定性进行评价。如表3所示,在4°C储存两周之后,颗粒大小和 $\zeta$ 电位稍微而非显著增加。在重复进行三次冻融过程之后,冻融前后,颗粒大小和 $\zeta$ 电位未发生显著变化(表3)。

[0124] 表3:在4°C及在冻融后LCAN-RX-0047的稳定性

[0125]

参数	初始值	在4°C 两周后	冻融后		
			一次	两次	三次
颗粒大小 (nm)	97.8±5.3	106.9±4.9	93.2±2.8	91.5±5.2	92.0±3.2
$\zeta$ 电位 (mV)	29.2±2.41	32.8±0.7	27.3±0.9	30.0±0.6	29.3±1.41
药物含量 (mg/ml)	0.98±0.25	0.92±0.21	0.92±0.06	0.98±0.12	0.95±0.15

[0126] 实施例4:生物学测试

[0127] 1.通过脂质体制剂和LCAN制剂在癌细胞中下调mRNA和蛋白质

[0128] 使用KB(人表皮癌)细胞、PANC-1(人胰腺)细胞和MDA-MB-435(人乳腺)细胞来进行基因下调研究。在含10%热灭活胎牛血清(FBS)、2mM L-谷氨酰胺、100U/ml青霉素和100mg/ml链霉素的RPMI1640培养基中培养KB细胞。在含10%热灭活胎牛血清(FBS)、2mM L-谷氨酰胺、100U/ml青霉素和100mg/ml链霉素的DMEM培养基中培养PANC-1细胞和MDA-MB-435细胞。将细胞保持在37°C、5%CO<sub>2</sub>的湿润培养箱中。

[0129] 将细胞以 $2 \times 10^5$ 个细胞/孔的密度平板接种到6孔板中，并培养过夜。在37°C，用L-RX-0047或F-L-RX-0047或cRGDfC-L-RX-0047转染细胞4小时。对于受体阻断研究而言，在F-L-RX-0047或cRGDfC-L-RX-0047暴露过程中，向培养基中添加100μM的叶酸或cRGDfC。在转染之后，用新鲜生长培养基替换培养基，将细胞在37°C于5%CO<sub>2</sub>的气氛下孵育48小时。然后收集细胞，并通过实时qRT-PCR分析HIF-1αmRNA水平以及通过western印迹分析来分析HIF-1α蛋白质(核蛋白)表达。

[0130] 通过实时RT-PCR(图1)确定用RX-0047浓度为0.25μM的L-RX-0047或cRGDfC-L-RX-0047处理引起的HIF-1αmRNA下调。结果示出，cRGDfC-L-RX-0047使MDA-MB-435细胞中HIF-1αmRNA表达降低。与含有0.5% cRGDfC的cRGDfC-L-RX-0047相比，含有1.0% cRGDfC的cRGDfC-L-RX-0047显示出更多的HIF-1αmRNA下调。与非靶向RX-0047相比，两种cRGDfC靶向的RX-0047制剂也都导致更多的HIF-1αmRNA表达降低。此外，通过添加1mM的cRGDfC阻断了该HIF-1α下调效应(图1)。这些结果表明，cRGDfC-L-RX-0047通过αvβ3整合素受体选择性地靶向肿瘤细胞。

[0131] 通过实时RT-PCR来确定LCAN制剂的体外基因靶向效率。在KB细胞中，与RX-0047浓度为0.5μM的含RX-0047脂质体制剂(L-RX-0047)相比，LCAN-RX-0047显著降低HIF-1αmRNA表达(图2)。另外，与游离RX-0047或对照组相比，L-RX-0047示出显著的HIF-1αmRNA下调。

[0132] 在KB和Panc-1细胞中评价含RX-0201的LCAN制剂(LCAN-RX-0201)的体外基因靶向效率。在KB细胞中，与RX-0201浓度为1μM的LCAN对照相比，LCAN-RX-0201显著降低Akt-1mRNA表达(图3)。同样的方式，与LCAN对照或RX-0201浓度为1μM的游离RX-0201相比，用LCAN-RX-0201处理的Panc-1细胞示出显著的Akt-1mRNA表达降低(图4)。

[0133] 2. 在KB异种移植物肿瘤模型中，L-RX-0047和LCAN-RX-0047的体内治疗效率

[0134] 在携带KB肿瘤异种移植物的无胸腺裸鼠中评价游离RX-0047、L-RX-0047和LCAN-RX-0047的治疗效力。用 $4 \times 10^6$ 个KB细胞皮下接种雌性小鼠(18至22g)。当肿瘤达到50至100mm<sup>3</sup>的体积时，将小鼠随机分为四组(每组5只小鼠)，并静脉内注射3mg/kg的不同制剂，每3天4次(Q3D×4)。通过用卡尺测量来测定肿瘤的尺寸，并通过体积=0.5×(长度×宽度×高度)来计算肿瘤体积(mm<sup>3</sup>)。就分析HIF-1α下调而言，在最后一次处理之后24小时处死小鼠。然后收集肿瘤用于分析HIF-1α基因表达。通过Kaplan-Meier分析来评价动物存活。

[0135] 在KB异种移植物肿瘤模型中评价LCAN-RX-0047的体内基因靶向效率。如图5所示，3mg/kg剂量的游离RX-0047相对于PBS对照仅稍稍减小肿瘤体积，但差异不显著。与PBS对照或3mg/kg剂量的游离RX-0047相比，L-RX-0047显著降低肿瘤生长。相比之下，LCAN-RX-0047与L-RX-0047相比更显著地降低肿瘤生长。

[0136] 与这些数据相一致的是，在KB异种移植物小鼠中，3mg/kg剂量的L-RX-0047和LCAN-RX-0047显著下调肿瘤组织中HIF-1α的表达水平(图6)，并且LCAN制剂的活性高得多。

[0137] 同时，通过Kaplan-Meier分析来评价动物存活，并且通过ILS=(经处理小鼠的平均存活时间/对照小鼠的平均存活时间-1)×100%来评价寿命提高(increase-in-lifespan, ILS, %)。对小鼠(每组10只小鼠)静脉内注射3mg/kg的PBS、游离RX-0047或LCAN-RX-0047，每3天4次(Q3D×4)。PBS组、游离RX-0047组、或LCAN-RX-0047组的中位存活时间(median survival time, MeST)分别为19天、26天和37天(图7)。LCAN-RX-0047的ILS百分比值为94.7%。此外，10只小鼠中有2只在用LCAN-RX-0047处理之后被完全治愈。这些结果表

明,LCAN-RX-0047作为单治疗剂具有强效抗癌活性。

[0138] 上述实施例中对本文所公开的制剂和方法的某些实施方案进行了限定。应理解,这些实施例虽然示出了本发明的特定实施方案,但其仅通过示例的方式给出。从上述讨论和这些实施例,本领域技术人员可确定本公开内容的基本特征而不脱离其精神和范围,可作出多种改变和修改以使本文所述的组合物和方法适于多种用途和条件。可以作出多种改变并且可以用等同物来替代其元素而不脱离本公开内容的实质范围。而且,可以作出多种改变以使特定情况或材料适用于本公开内容的教导而不脱离本公开内容的实质范围。

## 序列表

<110> THE OHIO STATE UNIVERSITY  
<120> 用于反义寡核苷酸递送的脂质纳米颗粒组合物  
<130> 41890-349711  
<140>  
<141>  
<150> 61/784, 892  
<151> 2013-03-14  
<150> 61/650, 729  
<151> 2012-05-23  
<160> 16  
<170> PatentIn version 3.5  
<210> 1  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<221> 来源  
<223> /注释="人工序列的描述: 合成的寡核苷酸"  
<400> 1  
gctgcatgat ctccttggcg 20  
  
[0001] <210> 2  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<221> 来源  
<223> /注释="人工序列的描述: 合成的寡核苷酸"  
<400> 2  
aatgagccac cagtgtccaa 20  
  
<210> 3  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人  
<400> 3  
cgccaaggag atcatgcagc 20  
  
<210> 4  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人  
<400> 4  
agtggactgg tgggggctgg 20  
  
<210> 5  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>

<221> 来源		
<223> /注释="人工序列的描述: 合成的寡核苷酸"		
<400> 5 agatagctgg tgacagacag	20	
<210> 6 <211> 20 <212> DNA <213> 人		
<400> 6 ctgtctgtca ccagctatct	20	
<210> 7 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列		
<220>		
<221> 来源		
<223> /注释="人工序列的描述: 合成的寡核苷酸"		
<400> 7 cgtaggaga tcatctgagg	20	
<210> 8 <211> 20 <212> DNA <213> 人		
<400> 8 [0002] cctcagatga tctctccacg	20	
<210> 9 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列		
<220>		
<221> 来源		
<223> /注释="人工序列的描述: 合成的寡核苷酸"		
<400> 9 tcgaaaaggta caagtgtac	20	
<210> 10 <211> 20 <212> DNA <213> 人		
<400> 10 gttagcacttg acctttcga	20	
<210> 11 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列		
<220>		
<221> 来源		
<223> /注释="人工序列的描述: 合成的寡核苷酸"		
<400> 11 tggtgtcagcgc gcagcggcag	20	

<210> 12 <211> 20 <212> DNA <213> 人	
<400> 12 ctgcccgtgc cgctgcacca	20
<210> 13 <211> 20 <212> DNA <213> 人	
<400> 13 gctaggccccg cgctcgccg	20
<210> 14 <211> 20 <212> DNA <213> 人	
[0003] <400> 14 ttggacactg gtggctcatt	20
<210> 15 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <221> 来源 <223> /注释="人工序列的描述: 合成的寡核苷酸"	
<400> 15 ggagctaaca tctccaagtc	20
<210> 16 <211> 20 <212> DNA <213> 人	
<400> 16 gacttggaga tgttagctcc	20

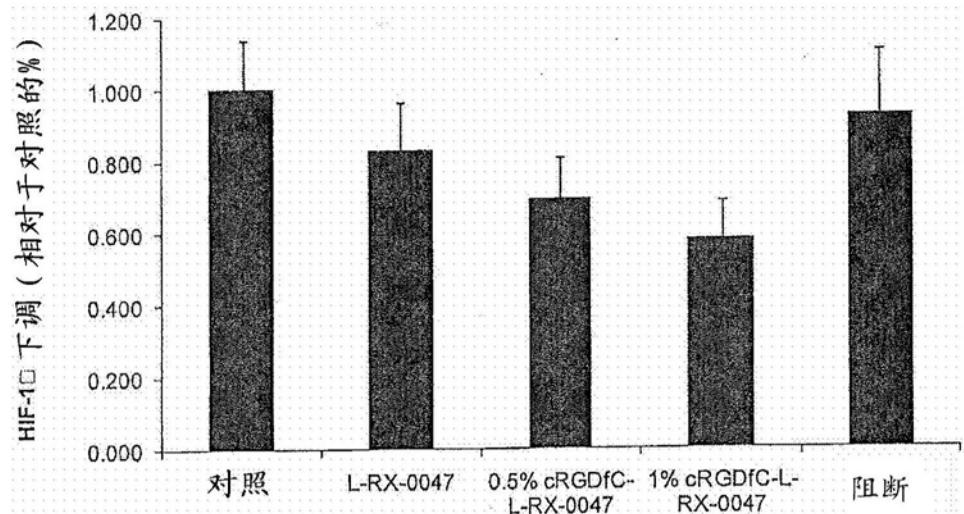


图1

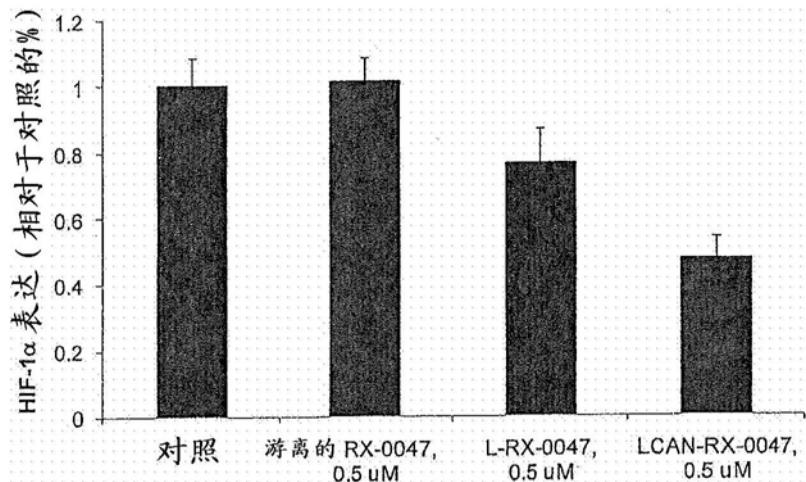


图2

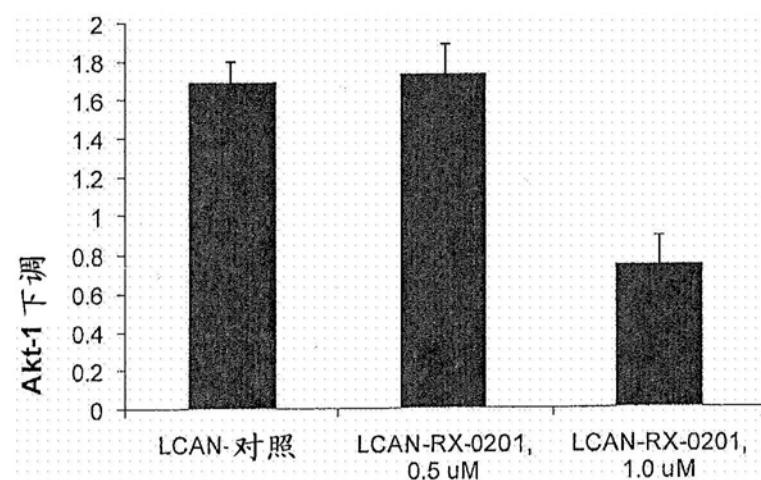


图3

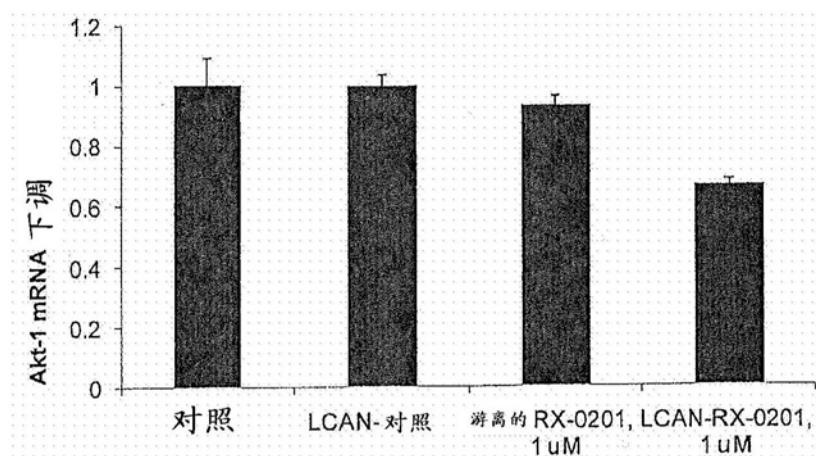


图4

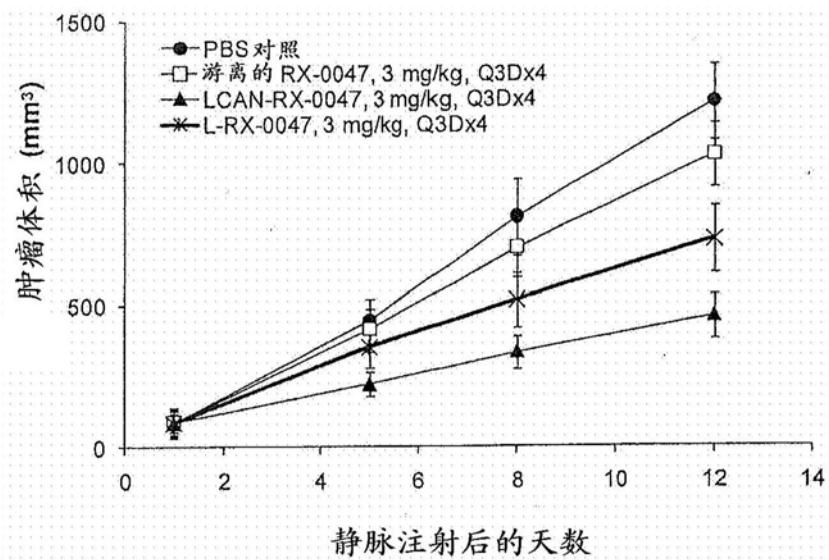


图5

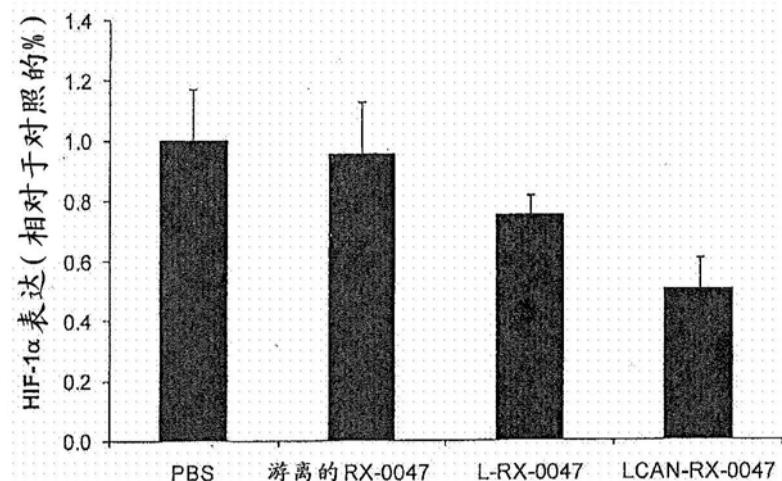


图6

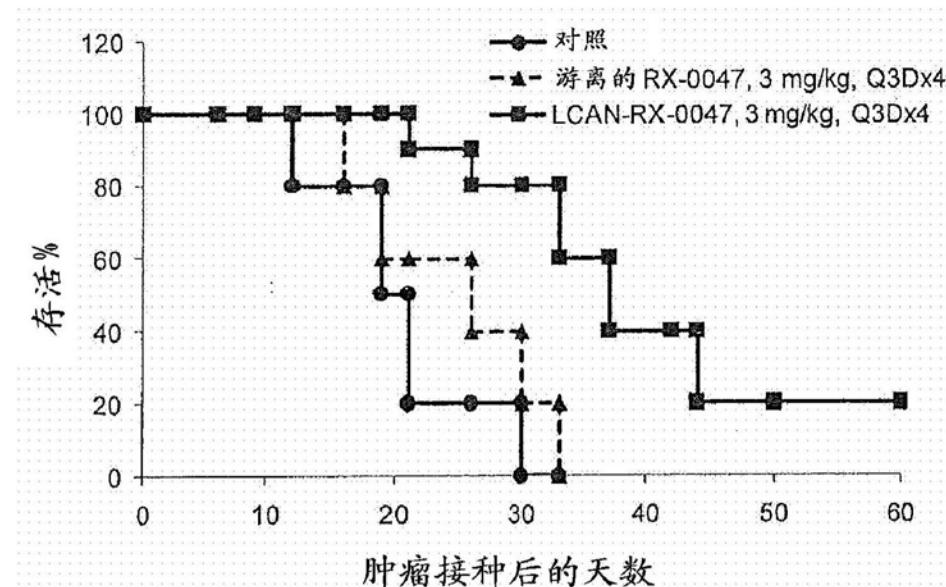


图7