



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I618548 B

(45)公告日：中華民國 107 (2018) 年 03 月 21 日

(21)申請案號：101141082

(22)申請日：中華民國 101 (2012) 年 11 月 05 日

(51)Int. Cl. : A61K9/51 (2006.01)

A61K47/44 (2017.01)

B01J13/10 (2006.01)

B82Y5/00 (2011.01)

(30)優先權：2011/11/04 美國

61/556,124

(71)申請人：日東電工股份有限公司 (日本) NITTO DENKO CORPORATION (JP)
日本(72)發明人：諾波夫 維克多 KNOPOV, VICTOR (US)；威特 理查 P WITTE, RICHARD P.
(US)；卡馬利 佩利亞 KARMALI, PRIYA (IN)；李 羅賓 LEE, ROBIN (US)；
韋伯 大衛 WEBB, DAVID (US)；寇派恩 凡歐里特 AKOPIAN, VIOLETTA (US)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

US 5653996

US 2009/0048197A1

P Yadava, et al, "Effect of Lyophilization and Freeze-thawing on the
Stability of siRNA-liposome Complexes", AAPS PharmSciTech,
335~341, Vol. 9, No. 2, June 2008.

審查人員：張子威

申請專利範圍項數：23 項 圖式數：6 共 60 頁

(54)名稱

用於藥物傳遞之脂質奈米粒子的製造方法

METHOD OF PRODUCING LIPID NANOPARTICLES FOR DRUG DELIVERY

(57)摘要

本發明揭示一種用於製造可有效囊封負電荷治療性聚合物(例如 siRNA)之脂質體的方法。該方法涉及以可與水混溶之有機溶劑(諸如乙醇)製備含陽離子脂質之脂質混合物，及將該溶液注入至已溶於水中之聚合物中，以使溶於水中達 35%乙醇之最終濃度，從而製得具有 50 至 150 nm 平均粒徑及藥物：脂質最終電荷比為 1：2.5 之奈米粒子。

What is described is a method for preparing a liposome that efficiently encapsulates a negatively charged therapeutic polymer, e.g., siRNA. The process involves preparing a lipid mixture comprising a cationic lipid in a water miscible organic solvent such as ethanol, and injecting this solution to the polymer dissolved in water to a final concentration of 35% ethanol in water to produce nanoparticles having a mean size of 50 to 150 nm and a final charge ratio of drug:lipid is 1:2.5.

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於一種簡單地及重複性地形成脂質-核酸粒子之方法。該方法可產生出具有平均粒徑為50至150 nm之顆粒均勻分散的粒子。

相關申請案之交叉參考

本申請案主張2011年11月4日申請之美國臨時申請案第61/556,124號之權益，該案全文以引用的方式併入本文中。

【先前技術】

脂質潛在性地可作為用於傳遞治療分子之載體，特定言之，係用於傳遞核酸。脂質可形成脂質體，脂質體可囊封、複合化或包埋核酸分子及藉此促進此類別治療分子在投與(例如經靜脈內投與至循環)時傳遞至標靶細胞。其等在醫藥組合物中之有用性受限於可用以重複性地製造脂質-核酸奈米粒子之方法。許多各種方法業已設計用來製造該等奈米粒子。

Batzri等人，1973，*Biophys Biochem Acta* 298:1015-19及Kremer等人，1977，*Biochemistry* 16:3932-35論述藉由將脂質溶解於乙醇中，然後將該乙醇溶液注入至其中脂質可自發性地形成脂質體的水溶液中，以製造脂質囊泡。Hirota等人，1999，*BioTechniques* 27:286-89論述藉由將陽離子脂質溶解於乙醇中，然後將該乙醇溶液注入至含有核酸分子之水溶液中，以製造經以核酸分子塗覆之脂質囊

泡。此種方法卻無法製得囊封核酸之脂質體。

Maurer等人之US 7094423論述藉由在水溶液中先製備預形成單壁脂質囊泡所產生的囊封核酸之脂質體。該等預形成脂質囊泡係藉由將脂質溶解於乙醇，然後將該脂質混合物注入至水性緩衝劑中製得。製備空的預形成囊泡之方法包括藉由擠壓成形定尺寸。該等空的預形成囊泡於定尺寸後加入乙醇，使得彼等變得不穩定，然後將含於40%乙醇中之核酸添加至該等不穩定脂質囊泡中。於培養之後，將該混合物進行濾洗以移除乙醇。乙醇百分比、溫度、培養時間、脂質組合物、藥物/脂質的比率及初始核酸濃度之差異均會影響該方法之囊封效率及產率。例如，Maurer等人揭示包埋率會隨著寡核苷酸：脂質比率的增加而增加，當每1 mg脂質具有0.16 mg以上反義寡核苷酸的最大值時，同時使得較大脂質體的數量及其多分散性會增加。

Semple等人之US 6858225係使用可離子化的陽離子脂質來製造囊封RNA之脂質體。將脂質溶於乙醇中，然後與低pH下溶於水性緩衝劑的核酸組合。移除乙醇，並將pH調整成中性pH以形成脂質體。所得脂質體是非均勻性的，且需要進行均質化或擠壓成形以獲得顆粒均勻分散的脂質囊泡。與Maurer等人發表的一致，Semple等人揭示包埋率會隨著寡核苷酸：脂質比的增加而增加，當每1 mg脂質具有0.16 mg以上反義寡核苷酸的最大值時，同時使得較大脂質體的數量及其多分散性會增加。

MacLachlan等人之US 7901708係論述製造囊封RNA之脂

質囊泡，其係藉由將溶於乙醇的脂質與溶於水溶液中的RNA在其中該等脂質與RNA可逐步稀釋之混合槽(T-管)中混合，藉此實質性即刻形成囊泡。

Wheeler等人之US 20100041152係論述製造囊封RNA之脂質體，其係藉由將陽離子脂質溶解於乙醇中，然後與含於65至85%乙醇中之RNA混合，以產生可溶性電荷中性的複合物，將非陽離子脂質添加至該複合物而形成脂質-核酸混合物，然後移去乙醇。該等脂質體需要進行均質化或擠壓成形以獲得顆粒均勻分散的脂質囊泡。

仍需要一種無需大規模機械加工步驟即可囊封核酸以製得預成形脂質體及無需加工步驟即可使脂質-核酸顆粒減小成顆粒均勻分散群體之製造方法。

【發明內容】

本發明一個態樣是用以製備囊封聚陰離子之脂質奈米粒子的方法，該方法包括以下步驟：在恆定速率下，將包含溶於可與水混溶有機溶劑中之脂質的第一溶液添加至包含溶於水性緩衝劑中之聚陰離子的第二溶液中，同時攪拌該第二溶液，以製得包含25至45%(v:v)有機溶劑之混合物；及藉由逆對中性pH水性緩衝溶液進行濾洗，移除該混合物的有機溶液。將該第一溶液添加至該第二溶液較佳係在1至100分鐘內完成。該聚陰離子可為核酸，例如，RNA分子。該聚陰離子較佳為0.08至0.8 mg/ml濃度。該脂質奈米粒子之藥物：脂質比率(w:w)較佳為0.06至0.16。該脂質奈米粒子之藥物：脂質電荷比較佳為1:25:1至1:1。

另一方法實施例係使用含於水溶液中之聚醣。該聚醣較佳選自由蔗糖、海藻糖、甘露醇、山梨糖醇、木糖醇、乳糖、麥芽糖及菊糖組成之群。該方法另一實施例進一步包括冷凍乾燥囊封聚陰離子之脂質奈米粒子的步驟。

於另一方法實施例中，該有機溶劑較佳為乙醇。較佳地，脂質與聚陰離子完成混合後，該混合物包含35%(v:v)乙醇。

於另一方法實施例中，該等脂質包含陽離子脂質、輔助脂質、固醇及PEG脂質。較佳地，該陽離子脂質佔該等脂質40至60莫耳%。較佳地，該陽離子脂質選自由HEDC、HEDODC及HE-Et-DODC組成之群，更佳者為可離子化或非可離子化正電荷組成者。較佳地，該等脂質進一步包含靶向脂質。

於另一方法實施例中，乙醇及水溶液係在25至55℃下混合，且較佳是以檸檬酸鹽緩衝至pH 3.5至6.5。

本發明另一態樣為一種包含囊封聚陰離子之脂質奈米粒子之醫藥調配物，該脂質奈米粒子係藉由包括以下步驟之方法製造：在恆定速率下，將包含溶於可與水混溶有機溶劑中之脂質的第一溶液添加至包含溶於水性緩衝劑中之聚陰離子的第二溶液中，同時攪拌該第二溶液，以製得包含25至45%(v:v)有機溶劑之混合物；及藉由逆對中性pH水性緩衝溶液進行濾洗，移除該混合物的有機溶劑。

一實施例係包括一種包含核酸、RNA分子或雙股siRNA分子之醫藥調配物。較佳地，該脂質奈米粒子之藥物：脂

質比率為0.06至0.16(w:w)，及該脂質奈米粒子之藥物：脂質電荷比為1:25:1至1:1。

於另一醫藥調配物實施例中，該等脂質包含陽離子脂質、輔助脂質、固醇及PEG脂質。較佳地，該陽離子脂質佔該等脂質40至60莫耳%。該陽離子脂質較佳選自由HEDC、HEDODC及HE-Et-DODC組成之群。該陽離子脂質可由可離子化或非可離子化正電荷組成。該等脂質可進一步包含靶向脂質。

另一醫藥調配物實施例進一步包含聚醣，較佳係選自由蔗糖、海藻糖、甘露醇、山梨糖醇、木糖醇、乳糖、麥芽糖及菊糖組成之群。較佳地，製備該醫藥調配物之方法進一步包括冷凍乾燥經脂質體囊封之聚陰離子。該醫藥調配物可進一步包含檸檬酸鹽。該醫藥調配物可進一步包含由泊洛沙姆(poloxamer)、表面活性劑、清潔劑或聚羥基或聚羥乙基聚合物所組成之處理助劑。

於另一實施例中，該醫藥調配物係由具有平均粒徑為50至150 nm，更佳小於100 nm，最佳者是最小化多分散之囊封RNA分子之脂質奈米粒子所組成。

【實施方式】

本文所提供之發明說明係關於一種用於製造經脂質囊封治療分子(包括負電荷治療性聚合物，例如核酸、蛋白質及肽)之方法。本文所提供之發明說明包括一種用於製造經脂質囊封之核酸分子之方法。該方法特別適用於大規模地製造由經脂質體囊封治療分子所組成之粒子。該方法可

製得粒子粒徑分佈介於50及150 nm之間及多分散性指數(polydispersity index ; PDI)小於0.2之意想不到及驚人結果。該方法提供以下囊封方法：將溶於可與水混溶的有機溶劑(諸如乙醇)之脂質與溶於水溶液中之負電荷治療性聚合物組合，然後移除該有機溶劑。脂質及負電荷治療性聚合物之絕對及相對濃度足以製得小粒子。以本發明方法所製得的該等粒子不需要機械處理(諸如擠壓成形)即可得到具有PDI小於0.2之粒子群。

本發明方法較以往方法具有優點，該方法輕易地即可擴大規模至大體積並在廣泛範圍之溫度、溶質、pH及加工次數下仍具有有效可行。

本發明方法較以往方法具有優點，該方法可重複性地製得具有PDI小於0.2、較佳小於0.1之粒子群，且無需用以產生預成形囊泡之額外步驟。

本發明方法較以往方法具有優點，該方法可重複性地製得均一奈米粒子群，且無需用以將脂質與負電荷治療性聚合物混合後產生機械性處理顆粒之額外步驟。該等額外步驟包括：例如，超音波、均質化或擠壓成形，以減小其尺寸及達到治療可接受範圍之均一性。

本發明方法具有在無需額外處理步驟下即可製得奈米粒子而達到與以往方法相當或更佳之核酸囊封效率之優點。

自本文中脂質組份及條件相關論述所提供之進一步細節當可明瞭本發明方法之其他優點。

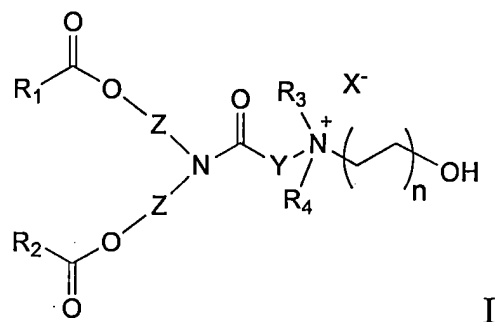
用於本發明方法中之脂質混合物包含至少一種為與負電

荷治療性聚合物複合之正電荷脂質(陽離子脂質)及含聚乙二醇脂質結合物(PEG-脂質)以防止聚集。該陽離子脂質可為廣泛範圍pH條件之永久陽離子電荷、在低pH(小於pH 6)時帶電荷而在中性pH(pH 6.5至8)時無淨電荷之可離子化陽離子脂質，或永久陽離子脂質及可離子化陽離子脂質之組合。該脂質混合物亦可包含靶向脂質、聚合物、類固醇、磷脂或包括脂肪、蠟、脂溶性維生素、單甘油酯或二甘油酯、脂肪鹽、甘油脂、甘油磷脂、神經鞘脂、糖脂質及聚酮化合物之另一脂質群組成員之一。該方法亦可用於形成僅帶有中性或負電荷組份之脂質體。

該脂質混合物之該等組份優先地選自下述群組。

陽離子脂質

本發明範疇內者是如式I之陽離子脂質：



其中

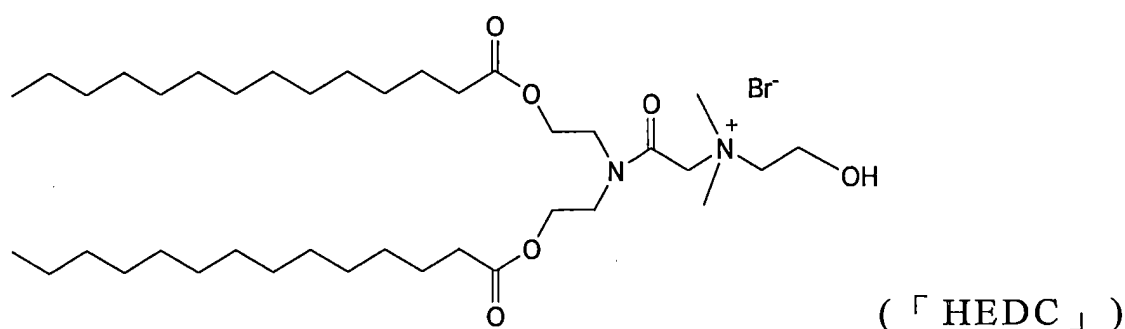
Z=烷基連接子、C₂-C₄烷基

Y=烷基連接子、C₁-C₆烷基

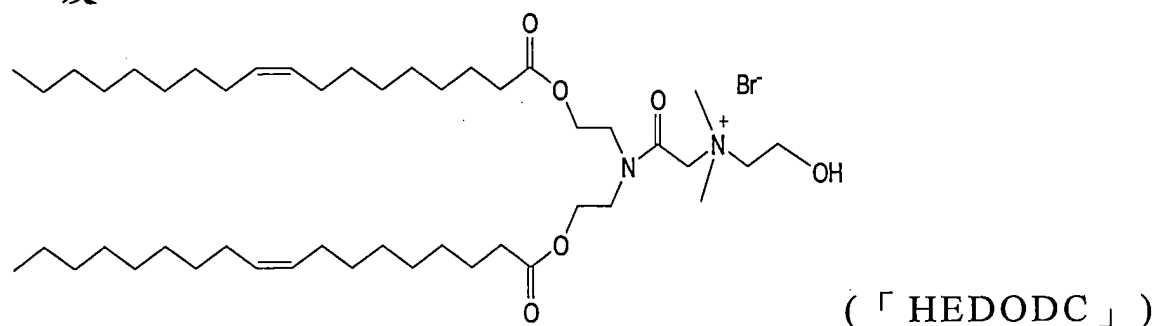
R₁與R₂各自獨立地為C₁₀-C₃₀烷基、C₁₀-C₃₀烯基或C₁₀-C₃₀炔基、C₁₀-C₃₀烷基、C₁₀-C₂₀烷基、C₁₂-C₁₈烷基、C₁₃-C₁₇烷基、C₁₃烷基、C₁₀-C₃₀烯基、C₁₀-C₂₀烯基、C₁₂-C₁₈烯基、

C_{13} - C_{17} 烯基、 C_{17} 烯基； R_3 與 R_4 各自獨立地為氫、 C_1 - C_6 烷基或 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ 、 C_1 - C_6 烷基、 C_1 - C_3 烷基； n 為 1 至 6；及 X 為抗衡離子，包括任何氮抗衡離子，該術語是相關技藝中可輕易明瞭的。較佳之氮抗衡離子包括鹵離子，且氯離子及溴離子尤佳。另一較佳抗衡離子為甲磺酸根($-\text{SO}_3\text{CH}_3$)。

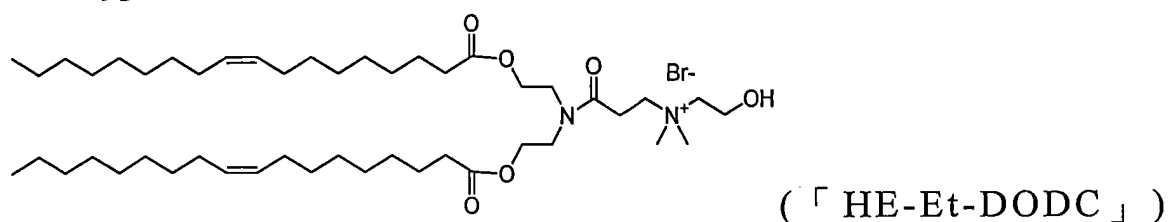
式 I 之例示性化合物包括：



及



及

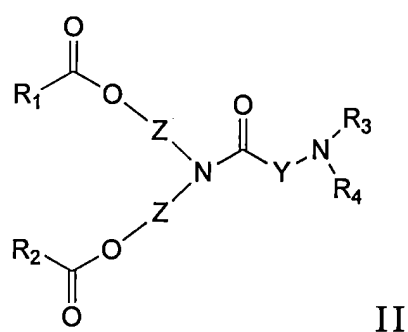


生理 pH 下之其他陽離子電荷脂質包括(但不限於)氯化 N,N -二油醯基- N,N -二甲基銨(「DODAC」)；氯化 N -(2,3-二油醯基氧基)丙基)- N,N,N -三甲基銨(「DOTMA」)；溴化 N,N -二硬脂基- N,N -二甲基銨(「DDAB」)；氯化 N -(2,3-

二油醯基氧基)丙基)-N,N,N-三甲基銨(「DOTAP」); 溴化 N-(1,2-二肉豆蔻基氧基丙-3-基)-N,N-二甲基-N-羥乙基銨(「DMRIE」)、 3β -(N-(N',N'-三甲基胺基乙烷)胺甲醯基)膽固醇(「DC-Chol」)、二-十八烷基醯胺基甘胺醯基羧基亞精胺(「DOGS」); 及 N-(1-(2,3-二油醯基氧基)丙基)-N-(2-(亞精胺甲醯胺基)乙基)-N,N-二甲基銨三氟乙酸鹽(「DOSPA」)。

可離子化陽離子脂質

本發明範疇內者是如式II之可離子化陽離子脂質：



其中

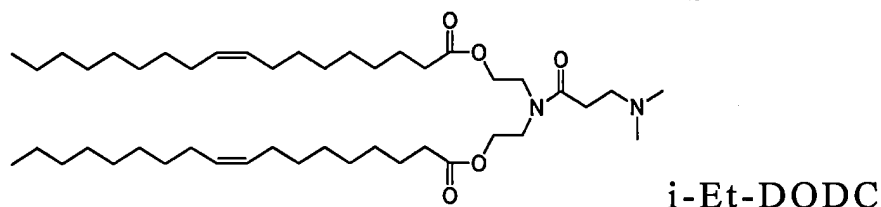
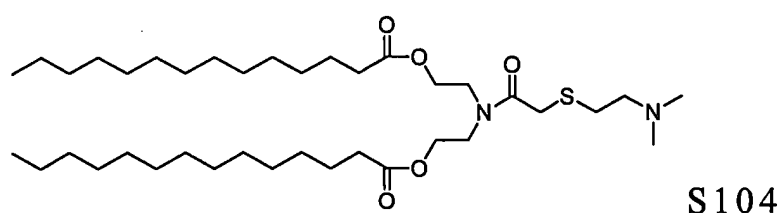
Z=烷基連接子、 C_2 - C_4 烷基、 $-\text{CH}_2\text{SCH}_2\text{CH}_2-$

Y=烷基連接子、 C_1 - C_6 烷基

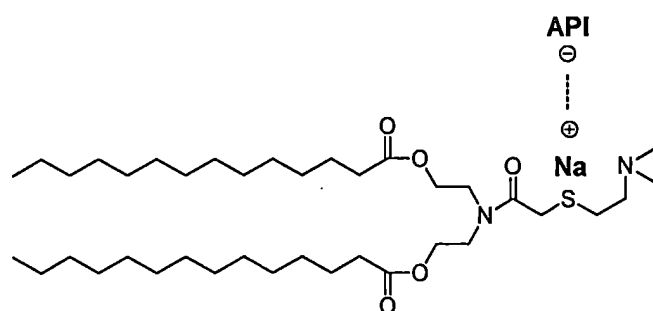
R_1 與 R_2 各自獨立地為 C_{10} - C_{30} 烷基、 C_{10} - C_{30} 烯基或 C_{10} - C_{30} 炔基、 C_{10} - C_{30} 烷基、 C_{10} - C_{20} 烷基、 C_{12} - C_{18} 烷基、 C_{13} - C_{17} 烷基、 C_{13} 烷基、 C_{10} - C_{30} 烯基、 C_{10} - C_{20} 烯基、 C_{12} - C_{18} 烯基、 C_{13} - C_{17} 烯基、 C_{17} 烯基； R_3 與 R_4 各自獨立地為氫、 C_1 - C_6 烷基或 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ 、 C_1 - C_6 烷基、 C_1 - C_3 烷基。

一些帶正電荷之脂質具有在或近生理pH之pKa，且在弱酸條件下為陽離子而在生理pH時具弱陽離子性。該等可離

子化陽離子脂質包括(但不限於)((2-((2-(二甲胺基)乙基)硫
基)乙醯基)氮二基)雙(乙烷-2,1-二基)二-十四烷酸酯
(「S104」)、(Z)-((3-(二甲胺基)丙醯基)氮二基)雙(乙烷-
2,1-二基)二油酸酯(「i-Et-DODC」)、氯化N-(2,3-二油醯
基氧基)丙基)N,N-二甲基銨(「DODMA」)及1,2-二油醯基-
3-二甲基銨-丙烷(「DODAP」)。



應明瞭，可離子化脂質有助於結合及/或釋放如下所示
之活性醫藥成分(active pharmaceutical ingredient; API)。



中性脂質

中性脂質之實例包括(但不限於)磷脂、胺脂質及神經鞘
脂。中性脂質包括兩性脂質。磷脂之代表性實例包括(但
不限於)磷脂醯膽鹼、磷脂醯乙醇胺、磷脂醯絲胺酸、磷
脂醯肌醇、磷脂酸、棕櫚醯油醯磷脂醯膽鹼、溶血磷脂醯

膽鹼、溶血磷脂鹼乙醇胺、二棕櫚鹼磷脂鹼膽鹼、二油鹼基磷脂鹼膽鹼、二硬脂鹼基磷脂鹼膽鹼或二亞油鹼基磷脂鹼膽鹼。其他缺乏磷的化合物(諸如神經鞘脂、糖原神經鞘脂家族、二脂鹼甘油及3-鹼氧基酸)亦落在稱為兩性脂質之群組中。另外，上述兩性脂質可與包括三酸甘油酯及固醇之其他脂質混合。

PEG-脂質

雙層穩定組份係為結合至脂質頭部基團(例如，磷脂鹼乙醇胺)之聚乙二醇(「PEG」)。另一雙層穩定組份係為結合至神經鹼胺之PEG。PEG可利用擅長該技藝者所熟知及使用之標準偶合反應結合至磷脂鹼乙醇胺或者結合至神經鹼胺。另外，預成形PEG-磷脂鹼乙醇胺(「PEG-PE」)結合物可商業購得。

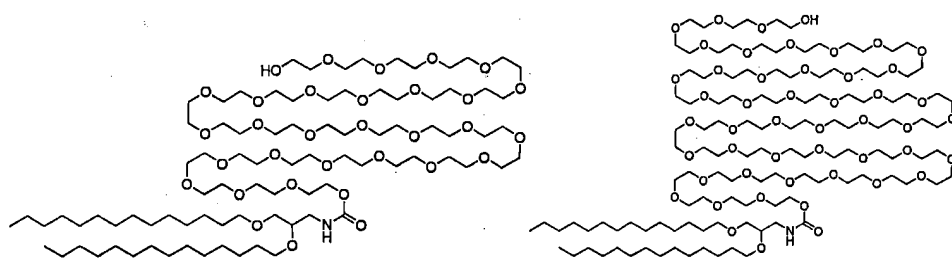
各種不同分子量之PEG可用以形成本發明之雙層穩定組份。各種不同分子量之PEG可購自許多不同的來源，或者，彼等可利用擅長該技藝者所熟知之標準聚合技術合成。於目前較佳之一實施例中，聚乙二醇具有範圍自200至10000 Da、較佳500至4000 Da及最佳1000至2000 Da之分子量。一般而言，咸已發現PEG分子量增加可降低達到穩定所需要的雙層穩定組份濃度。

具有不同鏈長度及飽和度之多種鹼基鏈群組之磷脂鹼乙醇胺可與PEG結合，以形成雙層穩定組份。該等磷脂鹼乙醇胺可商業購得，或可利用擅長該技藝者所熟知之傳統技術分離或合成。較佳為含有碳鏈長度在C10至C20範圍之

飽和或不飽和脂肪酸之磷脂醯乙醇胺。亦可使用具有單-或二-不飽和脂肪酸及飽和及不飽和脂肪酸之混合物之磷脂醯乙醇胺。適宜之磷脂醯乙醇胺包括(但不限於)以下：二肉豆蔻醯基磷脂醯乙醇胺(DMPE)、二棕櫚醯基磷脂醯乙醇胺(DPPE)、二油醯基磷脂醯乙醇胺(DOPE)及二硬脂醯基磷脂醯乙醇胺(DSPE)。

前述組合物亦可包括本身為相關技藝所熟知之經PEG結合之脂質，包括PEG-磷脂及PEG-神經醯胺，其包含選自以下之一或多種分子：PEG2000-DSPE、PEG2000-DPPE、PEG2000-DMPE、PEG2000-DOPE、PEG1000-DSPE、PEG1000-DPPE、PEG1000-DMPE、PEG1000-DOPE、PEG550-DSPE、PEG550-DPPE、PEG-550DMPE、PEG-1000DOPE、PEG-膽固醇、PEG2000-神經醯胺、PEG1000-神經醯胺、PEG750-神經醯胺及PEG550-神經醯胺。

此外，該等組合物亦可包括具有通式mdPEG-連接子-脂質之顆粒均勻分散(md)PEG脂質，例如，實例包括(但不限於)83-羥基-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60,63,66,69,72,75,78,81-廿七碳烷基氧雜八十三碳烷基(2,3-雙(十四碳烷基氧基)丙基)胺基甲酸酯(「HO-PEG1251-cBTP」)及134-羥基-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60,63,66,69,72,75,78,81,84,87,90,93,96,99,102,105,108,111,114,117,120,123,126,129,132-四十四碳烷基氧雜三十四碳烷基庚基(2,3-雙(十四碳烷基氧基)丙基)胺基甲酸酯(「HO-PEG2000-cBTP」)。



HO-PEG1251-cBTP

HO-PEG2000-cBTP

類固醇

類固醇包括膽甾烷(例如，膽固醇)、膽烷及膽汁酸(例如，鵝脫氧膽酸酯及膽酸鹽)、麥角甾醇、羊毛甾醇、腎上腺皮質類固醇(例如，糖皮質激素)、孕甾烷(例如，孕酮)及植物甾醇。彼等亦可包含於帶有親水性部分(例如，聚乙二醇)之結合物的形式中。較佳之類固醇為膽固醇。

靶向脂質

靶向脂質一實例為式(A)之化合物，

L-X-R

A

其中

- 脂質(L)選自由DSPE、DOPE及DC組成之群；
- 連接子(X)選自由不存在、PEG550、PEG2000、PEG-麩胺酸(-Glu)、Glu、C6、甘胺酸及GluNH、N1,N19-雙(3-(2-(2-(3-胺基丙氧基)乙氧基)乙氧基)丙基)-4,7,10,13,16-五氧雜十九碳烷-1,19-二醯胺組成之群；及
- 類視色素(R)選自由維生素A酸(tretinoin)、阿達帕林(adapalene)、視黃醇、4-羥基(苯基)視黃醯胺(4-HPR)、視黃酸(維生素A)、9-(2,6,6-三甲基環己-1-烯-1-基)壬酸、3,7-二甲基-9-(2,6,6-三甲基環己-1-烯-1-基)壬酸、3,7-二甲基-9-(2,2,6-三甲基環己基)壬酸及

任何部分或完全飽和類視色素或其衍生物組成之群。

靶向脂質另一實例為式(B)之化合物，



其中

- 連接子(X)為N1,N19-雙(3-(2-(2-(3-胺基丙氧基)乙氧基)乙氧基)丙基)-4,7,10,13,16-五氧雜十九碳烷基-1,19-二醯胺(「雙胺基-PEG」)或N1,N19-雙(16,20-二胺基-15-側氧基-4,7,10-三氧雜-14-氮雜二十碳烷基)-4,7,10,13,16-五氧雜十九碳烷基-1,19-二醯胺(「lys-雙胺基-PEG-lys」)；及
- 類視色素(R)選自由維生素A酸、阿達帕林、視黃素、4-羥基(苯基)視黃醯胺(4-HPR)及視黃酸(維生素A)、9-(2,6,6-三甲基環己-1-烯-1-基)壬酸、3,7-二甲基-9-(2,6,6-三甲基環己-1-烯-1-基)壬酸、3,7-二甲基-9-(2,2,6-三甲基環己基)壬酸及任何部分或完全飽和類視色素或其衍生物組成之群。

其他靶向分子可包含於脂質混合物中，例如葉酸、維生素E、肽配體及/或單株抗體。

藥物-脂質粒子組合物及調配物

本發明包括組合物，該組合物含有帶有或不帶有活性劑之脂質粒子，其中該活性劑存在時係與脂質粒子相結合。於特定實施例中，該活性劑為治療劑。於特定實施例中，該活性劑為囊封於脂質粒子水性內部內之負電荷治療性聚合物。於其他實施例中，該活性劑係存在於該脂質粒子之

一或多層脂質層中。於其他實施例中，該活性劑係結合至脂質粒子之外部或內部脂質表面。

於某些實施例中，本發明脂質粒子可與核酸相結合，從而得到核酸-脂質粒子。於特定實施例中，該核酸係完全地囊封在該脂質粒子中。如本文所用，術語「核酸」意欲包括任何寡核苷酸或多核苷酸。於特定實施例中，本發明寡核苷酸長度為15至50之核苷酸。

本文中術語「多核苷酸」(PNA)及「寡核苷酸」係指核苷酸或核苷單體之聚合物或寡聚物，該等係由天然存在的鹼基、糖及在糖之間(主鏈)的鍵聯所組成。術語「多核苷酸」及「寡核苷酸」亦包括包含非天然存在單體之聚合物或寡聚物，或其具有類似功能部分。該等經修飾或經取代之寡核苷酸通常較天然形式者為佳，因為具有諸如(例如)促進細胞吸收及在核酸酶存在下可增加穩定性之特性。

寡核苷酸可呈寡脫氧核糖核苷酸或寡核糖核苷酸形式。寡脫氧核糖核苷酸係由脫氧核糖以該糖的5'及3'碳原子共價結合至磷酸酯而形成負電荷交替非支鏈聚合物所組成的。寡核糖核苷酸係由其中各核苷酸均具有核糖基之類似重複結構所組成。經修飾之核糖分子可包含於寡核糖核苷酸中。

存在於根據本發明脂質-核酸粒子中之核酸包括所熟知核酸之任一形式。用於本文中之核酸可以是單股DNA或RNA或雙股DNA或RNA或DNA-RNA雜交物或RNA-PNA及/或DNA-PNA雜交物或PNA雙重體。雙股DNA之實例包括結

構基因、包含控制及終止區域之基因，及諸如病毒或質體DNA之自我複製系統。雙股RNA之實例包括siRNA及其他RNA干擾劑。單股核酸包括包括(例如)反義寡核苷酸、核酶、微型RNA及三股體形成寡核苷酸。

核酸可具有不同長度，大致上係取決於核酸之特定形式。例如，於特定實施例中，質體或基因之長度可為約1,000至100,000核苷酸殘基。於特定實施例中，寡核苷酸長度範圍自約10至100個核苷酸。於不同相關實施例中，不論單股、雙股及三股，寡核苷酸長度範圍自約10至約50個核苷酸、約21至約50個核苷酸、約15至約30個核苷酸、約20至約30個核苷酸變化。50個核苷酸或更少之多核苷酸通常稱之為「片段」。

於特定實施例中，寡核苷酸(或其股鏈)可特異性地雜交或互補至標靶多核苷酸。「可特異性地雜交」及「互補」係用以顯示可使DNA或RNA標靶與寡核苷酸之間呈現穩定及特異性結合之足夠互補程度的術語。應明瞭，寡核苷酸無需100%互補至其意欲特異性雜交之標靶核苷酸序列。當寡核苷酸結合至具有標靶分子正常功能之標靶干擾分子而造成因此效用或表現減少或損失，且在所需要的特異性結合條件下(亦即，在活體內檢測或治療劑治療之情況下的生理條件下，或者，在體外試驗檢測之情況下，實施該檢測之條件)，有足夠程度的特異性鹼基配對以避免寡核苷酸以非特異性結合至非標靶序列上，即可稱該寡核苷酸具有可特異性雜交性。因此，於其他實施例中，相較該寡

核苷酸可靶向或特異性雜交之基因或 mRNA 序列區域而言，此寡核苷酸包含 1、2 或 3 個鹼基突變。

於特定實施例中，核酸-脂質粒子可與 RNA 干擾劑 (RNAi) 分子結合。利用 RNAi 分子之 RNA 干擾方法可用以干擾所關注的基因或多核苷酸之表現。siRNA 為通常 15 至 30 個核苷酸長度之 RNA 雙重體，其可與稱之為 RNAi-誘導之沉默複合體 (RNAi-induced silencing complex; RISC) 之細胞質多蛋白複合體結合。經負載 siRNA 之 RISC 可介導同源 mRNA 轉錄物之降解；因此 siRNA 可設計成可敲除具有高特異性之蛋白表現。不同於其他反義技術，siRNA 經演進之自然機轉可發揮作用以控制基因藉由非編碼 RNA 表現。此通常被認為是其體外及活體內活性相較反義寡核苷酸或核酶中任一者而言更強效之原因所在。RNAi 試劑包括可介導 RNAi 之 DNA 正義：RNA 反義之雜交物、RNA 正義：DNA 反義之雜交物及 DNA：DNA 之雜交物。因此，包含該等不同類型雙股分子中之任一者之 RNAi 分子均可使用。另外，應明瞭，RNAi 分子可以不同形式使用並引入至細胞內。相應地，用於本文中之 RNAi 分子包含可誘導細胞內 RNAi 反應之任何及所有分子，包括(但不限於)包含兩股個別股(亦即，正義股及反義股)之雙股多核苷酸，例如，小干擾 RNA (siRNA)；包含互補序列之可形成雙股區域之髮夾環之多核苷酸(例如，shRNAi 分子)，及表現載體，其係表現可單獨或與另一多核苷酸組合形成雙股多核苷酸之一或多種多核苷酸。

RNA干擾劑(RNAi)可用以特異性地抑制標靶多核苷酸之表現。依據本發明將dsRNA、siRNA或shRNA引入至細胞或生物中可完成雙股RNA所介導抑制的基因及核酸表現。siRNA可為雙股RNA或同時包含RNA及DNA之雜交分子(例如，一股為RNA股及一股DNA股，或sisiRNA)。

RNAi分子靶向特異性多核苷酸可依據相關技藝所熟知程序輕易地製得。因此，擅長該技藝者應明瞭許多各種不同的siRNA分子可用以標向特異性基因或轉錄物。於某些實施例中，根據本發明之siRNA分子係雙股及長度為16至30個或18至25個(包括中間之各整數)核苷酸。

一般而言，siRNA分子係完全互補至標靶DNA分子之一股。於其他實施例中，siRNA可具有經修飾之組分，諸如(例如)2'-脫氧或2'-O-甲基修飾物。然而，於較佳實施例中，整股siRNA並不是由2'脫氧修飾之鹼基或2'-O-修飾之鹼基所構成的。

於某些實施例中，本發明係關於用於製造經脂質囊封之核酸粒子之方法及組合物，其中核酸係囊封於脂質層中。併有siRNA寡核苷酸之該等核酸-脂質粒子之特徵係使用包括以下之多種生物物理參數：(1)核酸對脂質的比率；(2)囊封效率；及(3)粒徑。高囊封效率、良好的抗核酸酶性及血清穩定及粒徑可控制在直徑通常小於200 nm是令人滿意的。另外，因為致力修飾核酸以賦予抗核酸酶特性使治療成本增加，同時在許多情況下僅能提供有限的抗性，因此核酸聚合物之特性極為重要。除非另作指明，否則該說明

書中該等標準依據下述算得：

藥物：脂質的比率是製造所界定體積中之藥物量除以該體積中之脂質量。該比率係表示成每莫耳基礎之莫耳數，或以每重量基礎之重量計，或以每莫耳基礎之重量計。就最終準備投與之調配物而言，在經以透析、層析及/或酵素(例如，核酸酶)分解以儘可能移除外部藥物之後，算出藥物：脂質的比率。

囊封

為測定以脂質-核酸粒子中囊封 siRNA 百分比表示之 siRNA 囊封效率(EE)，依下述使用 RiboGreen 進行試驗。該程序可用以測定溶液中雙重體及單股 RNA 或 DNA 之濃度。

設備包括 BioTek Instruments, Inc. FLx800、可變式吸移管及渦旋混合器。試劑包括不含 RNase 之水(MilliQ 級別，或相當)、20×TE 緩衝劑「不含 RNase」(Invitrogen, T11493, 或等效物)、Quant-iT RiboGreen 試劑(Invitrogen, R11491)及 10% Triton X-100(含於水中)(Thermo Scientific, 28314, 或等效物)。

1×TE 緩衝劑之製備係使用 50 mL 量筒將 38 mL 不含 RNase 之水移至 50 mL 離心管中；然後吸移 2 mL 20×TE 緩衝劑溶液至該離心管中，並使用渦旋混合器混合。

製備 1×TE 緩衝劑中之 2% Triton X-100 及 1% Triton X-100 係分別地吸移 2 mL 或 1 mL 10% Triton X-100 至不含 RNase 之 15 mL 圓錐管中，分別地添加 8 mL 或 9 mL 1×TE 緩衝劑，然後使其回旋以均勻混合。

RiboGreen工作溶液之製備係取出Ribogreen試劑之冷凍儲備液回溫至室溫，然後以TE緩衝劑稀釋1:200。以鋁箔紙包覆離心管以防止任何過量光接觸該溶液。

如圖1所示，藉由在TE緩衝劑中製備RNA溶液，並添加至96孔板中以製得標準品。將該等樣本稀釋至約80 µg/mL siRNA之最終濃度，並移至96孔板中。添加Ribogreen工作溶液，並與各樣本及標準品混合。分析前，在黑暗下培養該等樣本1至2分鐘。

然後將含於TE緩衝劑中之1% Triton X-100添加至二重複的樣本中，接著添加Ribogreen工作溶液。

囊封效率係藉由螢光測量值決定，求出各樣本螢光值之平均，以基線測量值為基礎校正外部樣本之平均(不存有RNA之Ribogreen試劑之螢光)，及由於Triton X-100之存在，校正後信號強度會減小8%。然後利用以下公式計算囊封效率：

$$EE = (\text{Triton樣本} - \text{脂質體樣本}) / (\text{Triton樣本})$$

也就是說，囊封效率為總RNA值(以清潔劑溶解之脂質體之後所測得)與未處理脂質體值間之差除以總RNA值。未處理脂質體樣本所得的螢光係由溶液中之游離RNA加上吸附於脂質體外表面之RNA所組成的。

尺寸

尺寸係指所形成粒子之大小(直徑)。可使用Malvern Zetasizer Nano-ZS動態光散射(DLS)儀器測定尺寸分佈。

此程序適用於量測過程中脂質體樣品的體積平均直徑、

Z-平均直徑及多分散性。多分散性為粒徑分佈之數值。

測量係在室溫下進行。樣本及試劑應平衡至室溫。測定體積加權平均粒徑及多分散性指數。

製造方法

脂質體之製備

脂質混合物可以溶解於可與水混溶之有機溶劑(較佳為無水乙醇)中。於大多數實施例中，有機溶劑是使用市售形式。

於一個例示性實施例中，該脂質混合物為共溶解於有機溶劑中之陽離子胺基脂質、中性脂質(除了胺基脂質外)、類固醇(例如，膽固醇)及PEG修飾之脂質(例如，PEG-S-DMG、PEG-C-DOMG或PEGDMA)之混合物。於較佳實施例中，該脂質混合物基本上由陽離子胺基脂質、中性脂質、膽固醇及PEG修飾之脂質組成。於進一步較佳之實施例中，該脂質混合物係由不同莫耳比之陽離子脂質、DOPE(或另一輔助脂質，具有可離子化或永久陽離子電荷中任一者)、膽固醇及與PEG結合之脂質所組成。較佳莫耳範圍為40至60莫耳%陽離子脂質、10至30%中性脂質、20至40%膽固醇及1至10% PEG修飾之脂質。

可以0.1至5之莫耳比(靶向脂質：總脂質)，將靶向脂質添加至脂質混合物，例如diVA-PEG750-diVA(或其他VA結合靶向脂質)。

脂質總濃度小於25 mg/ml，較佳小於5 mg/ml。該脂質混合物係經薄膜(例如，0.45或0.2 μm 濾膜)過濾。

根據本發明，使脂質混合物與緩衝水溶液組合。該緩衝水溶液可為其中緩衝劑具有較脂質混合物中質子化脂質之 pK_a 小之 pH 的溶液。適宜緩衝劑之實例包括檸檬酸鹽、磷酸鹽及乙酸鹽。一尤佳緩衝劑為檸檬酸鹽緩衝劑。較佳之緩衝劑為1至1000 mM陰離子濃度範圍者，取決於所要囊封核酸之化學性質，及最優化緩衝劑濃度可有效地達成高負載程度。可適宜地添加冷凍保護劑及/或可在(例如)該等粒子經透析以移除乙醇、增大 pH 或利用醫藥可接受載劑或稀釋劑進行混合時可平衡跨粒子膜滲透勢之非離子溶質。核酸於緩衝劑中的量為約0.08至0.8 mg/mL。

於添加乙醇時，水溶液之溫度為25至45°C，較佳為30至40°C。藉由呈現細流形式噴灑於空氣-水界面或藉由浸沒於該水溶液中之管狀物傳遞介於乙醇間的液-液界面，而將乙醇溶液添加至該水溶液中。

藉由重力或泵浦以可控速率(較佳是恆定速率)傳遞有機溶液，以便將有機溶液添加至水溶液中。有機溶液之傳遞可在1分鐘至100分鐘，較佳在1至25分鐘內完成。該有機溶液可藉以單噴霧或液流通過管或噴嘴或多噴嘴系統來添加。將有機溶液添加於水溶液的同時，所得溶液本身可藉由攪拌、振動或再循環進行混合。該添加步驟得到較佳25至45%乙醇、最佳35%乙醇之最終濃度。

最終溶液係藉由透析或過濾(較佳是濾洗)處理以移除有機溶劑。在移除乙醇的同時，將水溶液轉變成中性 pH (pH 6.8至 pH 7.5，較佳 pH 7.2)之經緩衝者，例如磷酸鹽或

HEPES緩衝劑。所得水溶液較佳在儲存或使用之前進行滅菌處理，例如，藉由透過0.22 μm 濾膜過濾。

囊封帶負電荷治療性聚合物之脂質體

述於本文中之方法適用於利用帶負電荷治療性聚合物(例如RNA分子)來製造脂質粒子。於述於本文中之方法中，該脂質混合物經與該聚合物水溶液組合，該聚合物可有效地囊封於該等所得脂質粒子中。

該奈米粒子可包含聚陰離子活性劑或治療劑，例如RNA與一、兩種或三種生物相容性聚合物。治療劑實例包括核酸、諸如紫杉烷類之抗癌藥物。

帶負電荷聚合物之總電荷必須小於或等於脂質混合物之正電荷數，於添加之時，較佳為0.06至0.16(w:w)。例如，當使用RNA時，經囊封核酸係以RNA：脂質為0.06至0.16，而電荷：電荷(-/+)較佳為1:2.5至1:1之最終比率存在。

當脂質混合物包含帶電荷之陽離子脂質時，脂質囊泡可於帶負電荷聚合物之存在下形成囊封並包埋該聚合物。所得粒子可藉由使介質之pH增加至生理pH或更高而加以中和化。如此形成之該等囊泡可提供囊泡尺寸均勻及核酸含量高之調配物。

於任一實例中，該囊封聚合物之囊泡(奈米粒子)具有50至150 nm之尺寸範圍。

根據述於本文中之方法，將該脂質混合物與包含帶負電荷聚合物之緩衝水溶液組合。該緩衝水溶液可為其中緩衝

劑具有較脂質混合物中質子化質體之 pK_a 小之 pH 的溶液。適宜緩衝劑之實例包括檸檬酸鹽、磷酸鹽、乙酸鹽及MES。一尤佳緩衝劑為檸檬酸鹽緩衝劑。較佳之緩衝劑在1至1000 mM陰離子範圍，取決於所要囊封聚合物之化學性質，及最優化緩衝劑濃度可有效地達成高負載程度。

宜可添加冷凍保護劑及/或可在粒子經透析以移除乙醇、增加 pH 或利用醫藥可接受載劑及/或稀釋劑進行混合時可平衡跨粒子膜滲透勢之非離子溶質。

關於RNA，圖1出示本文所述方法之示意圖。使凍乾或固體物質溶解於水中，較佳(例如)利用50 mM檸檬酸鹽緩衝達 pH 3.5至4.5以製備溶液。核酸於緩衝劑中的量為0.08至0.8 mg/mL。於添加乙醇時，水溶液之溫度為25至45°C，較佳為30至40°C。假若要使用單股核酸，在高溫下短暫加熱是有用的，例如，於65°C下加熱1至2分鐘。

藉由呈細流形式噴灑於空氣-水界面或藉由連接至含該水溶液之容器管狀物傳遞乙醇之液-液界面，將乙醇溶液添加至水溶液中。

藉由可控速率(較佳是恆定速率)傳遞該有機溶液，以便將有機溶液添加至水溶液中。該有機溶液之傳遞可在1分鐘至100分鐘、較佳1至25分鐘內完成。該有機溶液可藉以單噴霧或液流通過管或噴嘴或多噴嘴系統來添加。將有機溶液添加於水溶液的同時，所得溶液本身可藉由攪拌、振動或再循環進行混合。該添加步驟係完成足以破壞脂質體雙層結構之較佳25至45%乙醇、最佳35%乙醇之最終濃

度。

就脂質-核酸粒子而言，最終RNA濃度為0.001至1 mg/ml，較佳為0.01至0.5 mg/ml，最佳為0.05至0.5 mg/ml。最終藥物/脂質比為0.06至0.16(w:w)(電荷：電荷比為2.5:1至1:1)。

最終溶液係藉由透析或過濾(較佳是濾洗)處理以移除有機溶劑。在移除乙醇時，將水溶液轉變成中性pH(pH 6.8至pH 7.5，較佳pH 7.2)之緩衝劑，例如磷酸鹽或緩衝劑。所得水溶液較佳在儲存或使用之前進行滅菌處理，例如，藉由透過0.22 μm 濾膜過濾。

最終囊封效率大於85%。最終平均粒徑為50至150 nm。多分散性指數PDI小於0.2，較佳小於0.1。

冷凍乾燥

本發明某種程度上係關於當重新復水組合時具有最少量的大聚集物之凍乾醫藥組合物。該等大聚集物具有大於約0.2 μm 、大於約0.5 μm 或大於約1 μm 之尺寸，且該等大聚集物是重新復水溶液中不想要的。聚集物尺寸可利用多種技術(包括以引用方式併入本文中之美國藥典(U.S. Pharmacopeia)32<788>中所指明之彼等)測得。該等測試包括光不透液體粒子計數測試、顯微粒子計數測試、雷射繞射及單粒子光學感測。於一個實施例中，利用雷射繞射及/或單粒子光學感測測定給定樣本中之粒徑。動態光散射(DLS)可用以量測粒徑，但其係依賴布朗運動(Brownian motion)，因此該技術可能無法偵測到某些較大的顆粒。雷

射繞射係依賴於顆粒與懸浮介質間之折射率差。該技術能夠偵測到次微米至毫米範圍之粒子。奈米粒子懸浮液中可測得相對少量(例如, 約1至5重量%)之較大粒子。粒子光學感測(single particle optical sensing; SPOS)係利用稀釋懸浮液之不透光度來計算約0.5 μm 個別粒子的數目。在得知所測樣本之粒子濃度下, 可算出一或多種聚集物之濃度重量%(粒子數/mL)。

(例如)因為粒子表面脫水而會在冷凍乾燥之冷凍及/或乾燥步驟形成聚集物。冷凍製程具有濃縮效應, 致使會使得顆粒間的距離如冰形式一般減小(Alison等人, *Biochim Biophys Acta*. 2000年9月29日; 1468(1-2):127-38; Armstrong與Anchordoquy, *J Pharm Sci*. 2004年11月; 93(11):2698-709)。冷凍乾燥前, 藉由在懸浮液中使用冷凍保護劑(諸如多醣)可避免此脫水作用。適宜之多醣包括蔗糖、乳酮糖、乳糖、麥芽糖、海藻糖或纖維二糖、麴二糖、黑麴黴糖(nigerose)、異麥芽糖、海藻糖、2-葡糖- β -葡糖苷(sophorose)、昆布二糖(laminaribiose)、隆膽二糖(gentiobiose)、松二糖(turanose)、麥芽酮糖、帕拉金糖(palatinose)、葡萄糖 β (1 $\rightarrow$ 6)果糖(gentiobiulose)、甘露二糖(mannobiase)、木蜜貳糖(melibiose)、車前二糖(melibiulose)、芸香糖(rutinose)、蘆丁糖(rutinulose)及木二糖(xylobiose)。於一個實施例中, 該組合物包含蔗糖之聚醣。於另一實施例中, 該組合物包含海藻糖之聚醣。申請人得出結論顯示, 與起始懸浮液相較, 重新復水組合後

會獲得相等的DLS尺寸分佈。

過去咸認為玻璃化(即以玻璃狀賦形劑固定大分子之方法)不是防止脂質體聚集之影響因素且需要糖之高張溶液(Alison等人)。本發明者發現，冷凍乾燥之冷凍及乾燥步驟之結果係取決於特定的脂質：聚糖比(w:w)，此可提供防止脂質體之聚集、破壞脂質體擴散障壁、及釋放出經囊封之RNA從而形成核酸脂質複合體之方法。於一個實施例中，該組合物包含12至15% (w:w)蔗糖及5至20 mg/ml脂質，較佳為12%蔗糖及9 mg/ml脂質。更佳地，該組合物亦可包含緩衝劑，最佳為HEPES(中性pH)。

冷凍乾燥步驟在適宜的玻璃容器中進行，較佳在10 ml圓筒玻璃瓶中進行。該玻璃瓶在溫度方面必須能夠耐受短時間內-40°C以下及室溫以上之極值變化，及切割成均勻形狀。包含稠化劑及囊封核酸之脂質體的組合物係添加至較佳3 ml體積及較佳含有9 mg/ml脂質之小瓶中。

該等冷凍乾燥之步驟包括在約-40°C以上之溫度下(或例如小於約-30°C)使組合物冷凍，形成冷凍組合物；然後將該冷凍組合物乾燥而形成凍乾組合物。該冷凍步驟較佳地導致溫度在約6分鐘內以線性方式降低至最終溫度者，較佳地，以1°C/分鐘從20降低至-40°C。更佳地，係使用12至15%蔗糖，而乾燥步驟係約50至150毫托，先在約-15至約-35°C之低溫，此後在室溫至約25°C之更高溫度，及在3至7天內完成。於本揭示案之另一實施例中，係使用海藻糖，而該乾燥步驟係約50至100毫托，先在約0至約-15°C之

低溫，此後在更高溫度。

於另一態樣中，本發明係提供一種避免醫藥奈米粒子組合物中粒子實質聚集之方法，該方法包括將糖及鹽添加至凍乾調配物中以防止核酸聚集及自脂質體內部釋放出來。

醫藥組合物

本文所揭示脂質粒子(特定言之，在與治療劑相結合之情況下)可調配呈醫藥組合物形式，例如，其進一步包含醫藥可接受稀釋劑、賦形劑或根據投藥途徑及標準醫藥操作所選擇之載劑(諸如生理鹽水或磷酸酯緩衝劑)。據擅長該技藝者所知，該等載劑係以後文所述的投藥途徑、標靶組織之位置、待傳遞之藥物、藥物傳遞時程等為基礎加以選擇的。

本發明醫藥組合物可藉由相關技藝所熟知任何方法投與給病患，包括口服及非經腸式途徑。本文所用術語「病患」係指人以及非人類，包括：例如，哺乳動物、鳥類、爬行動物、兩棲類動物及魚類。例如，非人類可為哺乳動物(例如，啮齒動物、小鼠、大鼠、兔、猴、狗、貓、靈長類動物或豬)。於某些實施例中，非經腸式途徑是令人滿意的，因為該等途徑可避免與消化道中所存在的消化酵素接觸。根據該等實施例，本發明組合物可藉由注射投與(例如，經靜脈內投與、皮下注射或經肌肉內投與、腹膜內注射)、經直腸投與、經陰道投與、經局部投與(例如粉劑、霜劑、軟膏或滴劑)或經吸入投與(例如，噴霧劑)。

於一特定實施例中，本發明奈米粒子係以系統性方式投

與給有其需要的個體，例如以非經腸式投與或藉由靜脈內輸注或注射。

於特定實施例中，包含本發明脂質-核酸粒子之醫藥組合物係根據標準技術製得及進一步包含醫藥可接受載劑。一般而言，可使用鹽水作為醫藥可接受載劑。其他適宜載劑包括：例如，水、經緩衝的水、0.9%鹽水、0.3%甘胺酸、糖或聚醣，例如，蔗糖、麥芽糖、海藻糖、角叉菜膠、黃原膠、甘露醇、果聚糖(例如菊糖)、環糊精、木糖醇、山梨糖醇或聚乙二醇(PGE)，包括用於增強穩定性之醣蛋白，諸如白蛋白、脂蛋白、球蛋白。可包括增積劑、冷凍保護劑及/或凍乾保護劑以及金屬清除劑(例如EDTA)。於包含鹽水或其他含鹽載劑之組合物中，載劑較佳係在脂質粒子形成之後進行添加。因此，於形成脂質-核酸組合物之後，可將該等組合物稀釋於諸如生理鹽水之醫藥可接受載劑中。

所得醫藥製劑可藉由已為吾人所熟知之傳統式滅菌技術進行滅菌。然後將該水溶液封裝供使用或於無菌條件下過濾及凍乾，該凍乾製劑在投與之前與無菌水溶液組合。該等組合物可包含近似生理條件所必須的醫藥可接受輔助物質，諸如pH調節及緩衝劑、張性調節劑、(例如乙酸钠、乳酸鈉、氯化鈉、氯化鉀或氯化鈣)。另外，該脂質懸浮液可包含保護脂質免遭自由基影響及防止脂質儲存時會過氧化損耗之脂質保護劑。適宜者為親脂性自由基淬滅劑(諸如 α -生育酚)及水溶性鐵特異性螯合劑(諸如鐵草胺(ferrioxamine))。

脂質粒子或脂質-核酸粒子於該等醫藥組合物中之濃度可廣泛性地變化，亦即，自約0.01%以下(通常，約0.05(或至少約0.05)至5%)至10至30重量%之多，且其主要係根據所選擇的特定投藥方式基於流體體積、黏度等進行選擇。例如，可增加濃度以減少與治療相關聯之流體負載量。對於患有與動脈粥樣硬化相關之充血性心臟衰竭或重度高血壓之病患，此點可能是特別理想的。另一選擇為，由刺激性脂質所組成之複合體可經稀釋至低濃度以減輕投藥部位之處發炎。於一組實施例中，核酸具有貼附標籤，及可用於臨床診斷(根據所指示存有互補核酸)。於該情況下，所投與複合物的量係取決於所使用的特定標籤指示、要診斷的疾病狀況及臨床診斷，但通常會介於約0.01至約50 mg/公斤體重之間，較佳在約0.001至約5 mg/kg體重之間。

使用方法

本文所述脂質粒子可用以傳遞負電荷治療性聚合物(諸如核酸)至體外或活體內細胞。儘管使用本發明脂質粒子及相關醫藥組合物之不同方法之下述論述係以列舉與核酸-脂質粒子相關之論述為例，但應明瞭，該等方法及組合物可輕易地適用於傳遞用於治療可自該治療獲得效益之任何疾病或病症之任何治療劑。

於某些實施例中，本發明係提供用於將核酸引入至細胞之方法。適於引入至細胞中之較佳核酸為siRNA、免疫刺激寡核苷酸、質體、反義及核酶。該等方法係藉由將本發明粒子或組合物與細胞接觸一段足以進行細胞內傳遞的時

間即可完成。

本發明組合物可吸附至幾乎任何細胞類型。核酸-脂質粒子一旦被吸附即可被一部分細胞內吞，使得質體與細胞膜交換，或與該等細胞融合。複合物中核酸部份之轉移或併入可藉由該等路徑中之任何一者發生。在無意受本發明範疇約束下，咸認為，就細胞中吸收粒子而言，藉由內吞該等粒子然後與胞內體膜相互作用，使得該等胞內體膜變得不穩定，可能因為形成非雙層相，導致經囊封之核酸併入細胞質中。類似地，就粒子直接與漿細胞膜融合而言，在發生融合時，脂質體膜會整合形成細胞膜及脂質體之內含物會與胞內流體組合。於體外進行之情況下，細胞與脂質-核酸組合物會在生物相容性介質中發生接觸。組合物之濃度可根據特定應用而廣泛地變化，但大致上介於1 μmol 至10 mmol 之間。於某些實施例中，以脂質-核酸組合物處理細胞通常係在生理溫度(37°C)下進行，時間為1至24小時，較佳2至8小時。就體外應用而言，不論植物或動物來源、脊椎動物或無脊椎動物及任何組織類型，核酸可傳送至以培養基生長之任何細胞中。於較佳實施例中，該等細胞可為動物細胞，更佳為哺乳動物細胞，及最佳為人類細胞。

於一組實施例中，係將脂質-核酸粒子懸浮液添加至具有約 10^3 至約 10^5 個細胞/mL、更佳約 2×10^4 個細胞/mL之細胞密度之60至80%匯合接種細胞中。添加至該等細胞之懸浮液濃度較佳為約0.01至20 $\mu\text{g/mL}$ ，更佳為約1 $\mu\text{g/mL}$ 。

典型應用包括使用吾人所熟知程序以細胞內傳遞 siRNA 使特異性細胞標靶敲除或使特異性細胞標靶沉默化。選擇性地應用包括傳遞編碼治療有用多肽之 DNA 或 mRNA 序列。

本發明方法可於體外(活體外)或活體內實施。例如，利用擅長該技藝者所熟知的方法，本發明組合物亦可用於傳遞核酸至活體內細胞。

就活體內投藥而言，該等醫藥組合物較佳係非經腸式投與，亦即，經關節內投與、經靜脈內投與、經腹膜內投與、經皮下投藥或經肌肉內投與。於特定實施例中，該等醫藥組合物係藉由單次注射經靜脈內或經腹膜內投與的。

於其他方法中，該等醫藥製劑可藉由直接施用製劑至組織以與標靶組織接觸。該施用可依據局部「開放」或「閉合」程序進行。所謂「局部」意指將該醫藥製劑直接施至暴露於環境之組織，諸如皮膚、口咽、外耳道及類似者。「開放」程序為包括切開病患的皮膚及可直接觀察到醫藥製劑施用皮下組織之其等程序。此通常係藉由外科手術程序達成，諸如進入肺臟的胸廓切開術、進入腹部內臟之剖腹手術或其他進入標靶組織的直接外科手術法。「閉合」程序是無法直接觀察到內部標靶組織之侵入性程序，但可藉由插入性儀器穿過皮膚之小傷口進入。例如，該等製劑可藉由細針穿刺腹膜腔灌洗術投與。同樣地，該等醫藥製劑可藉由在腰部穿刺期間輸注接著一如通常實施脊柱麻醉或經甲泛葡胺脊髓造影地適宜定位病患而投與至腦膜

或脊髓。另外，該等製劑可藉由內視鏡檢查裝置投與。

該等脂質-核酸組合物亦可以氣霧劑形式吸入至肺或藉由直接注射於疾病部位投與。

本發明方法可針對多種受試者或宿主實施。較佳受試者或宿主包括哺乳動物物種，諸如人、非人類靈長類動物、狗、貓、牛、馬、羊等。於特定實施例中，該受試者為哺乳動物，諸如，需要治療或預防疾病或病症之人類，例如確診罹患疾病或病症或被認為處於疾病或病症風險之個體。

本發明脂質-治療劑粒子之劑量係取決於治療劑對脂質比及責任醫師基於年齡、體重及病患健康狀態之意見。

於一個實施例中，本發明提供一種可調節標靶多核苷酸或多肽表現之方法。該等方法概況而言係包括將細胞與與可調節標靶多核苷酸或多肽表現之核酸相關聯之本發明脂質粒子接觸。本文所用術語「調節」係指改變標靶多核苷酸或多肽之表現。於不同實施例中，調節可意指增加或提高，或其可意指降低或減少。量測標靶多核苷酸或多肽表現水平之方法為相關技藝所熟知及有效的，且包括(例如)利用逆轉錄-聚合酶鏈反應(RT-PCR)及免疫組織化學技術之方法。於特定實施例中，標靶多核苷酸或多肽之表現水平相較於適當對照值係增加或減少至少10%、20%、30%、40%、50%或50%以上。

例如，假若期望多肽之表現增加，則該核酸可為包括編碼該期望多肽之多核苷酸之表現載體。另一方面，假若多

核苷酸或多肽之表現降低為所期望的，則核酸可為(例如)反義寡核苷酸、siRNA或微型RNA，該等包含可特異性雜合至編碼標靶多肽之多核苷酸藉此干擾標靶多核苷酸或多肽表現之多核苷酸序列。另外，該核酸可為表現此種反義寡核苷酸、siRNA或微型RNA之質體。

於特定實施例中，該核酸活性劑或治療劑選自siRNA、微型RNA、反義寡核苷酸及可表現siRNA、微型RNA或反義寡核苷酸之質體，及其中該siRNA、微型RNA或反義RNA包含經可特異性結合至編碼多肽之多核苷酸或其互補股之寡核苷酸，如此使得多肽之表現降低。

於其他實施例中，該核酸為可編碼該多肽或功能性變體或其片段之質體，如此使得該多肽或其功能性變體或片段之表現降低。

於相關實施例中，本發明係提供一種治療顯示個體中多肽過度表現特徵之疾病或病症之方法，該方法包括對個體提供本發明醫藥組合物，其中該治療劑係選自siRNA、微型RNA、反義寡核苷酸及可表現siRNA、微型RNA或反義寡核苷酸之質體，及其中該siRNA、微型RNA或反義RNA包含經可特異性結合至編碼多肽之多核苷酸或其互補股之寡核苷酸。

於另一相關實施例中，本發明包括一種治療顯示個體中多肽不完全表現特徵之疾病或病症之方法，該方法包括對個體提供本發明醫藥組合物，其中治療劑為可編碼多肽或其功能性變體或片段之質體。

存放期分析

本文所用術語「存放期」係指脂質：RNA奈米粒子在喪失其生物活性之前可儲存(於定義條件下，例如，含於緩衝劑中，4°C)之時間段。用於測定本發明存放期之生物活性係該脂質：RNA奈米粒子經以靜脈內投與後於活體內轉染哺乳動物細胞之能力。

於一較佳實施例中，如上所述及如實例所例示說明，將脂質：RNA奈米粒子儲存不同時間段、以奈米粒子注射一或多種測試動物及分析動物所選擇組織之轉染(例如，報導子基因之表現)以測定存放期。

咸知，存放期可以絕對值表示，即組合物在喪失其活性前可以儲存之時間長度。或者，存放期可以參考不同組合物之相對值表示。因此，例如，當脂質：RNA奈米粒子顯示儲存固定時段後之轉染活性且該活性大於不同複合物以類似方式儲存相同量時間時之活性時，則稱標題複合物相較不同複合物具有較長之存放期。

包括經脂質體囊封之聚陰離子治療劑之套組

本發明亦提供用於製造本文所述脂質：RNA奈米粒子之套組。該等套組可如上所述藉由容易取得之物質及試劑製得。例如，該等套組可包括以下物質中之任何一者或多者：脂質體、核酸(單或雙股RNA、DNA)、親水性聚合物、以靶向部分(諸如Fab'片段)所衍生之親水性聚合物及使用說明書。可根據本發明說明製得許多套組及組件，端視該套組所意欲使用者及使用者的特殊需要。例如，該套

組可裝納用於使得複合物靶向如上述特定細胞類型之許多靶向部分中之任何一者。

該套組可視需要包括說明材料，其包含作為脂質：RNA奈米粒子使細胞活體內、活體外或體外轉染之用法之指導說明(即，計畫書)。典型地，該說明材料闡述自如上所述脂質體及核酸製造脂質：RNA奈米粒子之程序。該等說明材料亦闡述如何將親水性聚合物與脂質：RNA奈米粒子混合。另外，該等說明材料可闡述以脂質：RNA奈米粒子轉染細胞之程序。

實例

實例1：濃度對RNA-脂質粒徑之影響。

此實例論述siRNA及脂質濃度對粒徑之影響。

依本文所述方法製備奈米粒子。分別將陽離子脂質、DOPE、膽固醇、PEG-BML及diVA-PEG750-diVA以50:10:38:2:5之莫耳比溶解於無水乙醇中。將siRNA溶解於50 mM檸檬酸鹽緩衝劑(pH 4.5)中。

使混合容器中的含siRNA緩衝劑處於35至40°C狀態，同時持續攪拌。然後利用歧管/噴嘴配置將乙醇/脂質混合物噴灑至該含siRNA緩衝劑的表面上，以自發性地形成經siRNA負載之脂質體。將脂質及RNA濃度調整至0.05至0.5 mg/mL之最終siRNA濃度範圍、0.08 (wt:wt)之藥物：脂質比及35%之乙醇濃度。脂質對siRNA之比例在所有的測試的條件下都保持恆定。

將該經siRNA負載之脂質體稀釋成~10%乙醇以穩定該等

粒子，然後逆對10×體積PBS(pH 7.2)進行濾洗以移除乙醇及進行緩衝劑之交換。將終產物經以0.22 μm (無菌級)PES濾膜過濾以減少微生物附著量。利用動態光散射(dynamic light scattering; DLS)測定體積、平均粒徑及多分散性指數(PDI)。結果顯示於表1及圖2中。

表 1

最終 siRNA	體積平均直徑[nm]		PDI
	平均值	SD	
0.05	96.7	7.0	0.084
0.10	105.7	10.1	0.073
0.25	116.8	8.4	0.125
0.50	141.9	10.0	0.105

結果顯示，粒徑會隨著siRNA濃度(單位為mg/ml)增加而增大。脂質及siRNA濃度降低(保持相同的相對比)粒徑會減小，而增加濃度會增大粒徑。所有情況下，濃度介於0.05至0.5 mg/ml間之最終siRNA可製得具有96.7至141.9 nm、小於150 nm之平均粒徑及小於0.2之多分散性指數之奈米粒子。

在無需製備空的預成形脂質囊泡及/或機械加工下，依本文所述方法可製得小於150 nm之粒徑與小於0.2之PDI。

實例2：製程參數對RNA-脂質粒子形成之影響

此實例論述各種不同製程參數對RNA-脂質粒子形成之影響。本實驗期間選擇了若干參數，包括溫度、乙醇濃度、緩衝劑、脂質：siRNA比及用以散佈該脂質溶液之噴嘴類型。

將 HEDC、DOPE、膽固醇、PEG-BML 及 diVA-PEG750-diVA 以 40:30:25:5:2 之莫耳比溶解於無水乙醇中。使混合容器中的含 siRNA 緩衝劑達到指示溫度，同時持續攪拌。然後利用噴嘴將該乙醇/脂質混合物噴灑至含 siRNA 緩衝劑之表面上，以自發性地形成經 siRNA 負載之脂質體。以所指示藥物/脂質比，將脂質與 siRNA 組合以達到 0.1 mg/mL 之最終 siRNA 濃度及所指示的最終乙醇百分比。

將 siRNA 溶解於自 25 至 100 mM 不同強度及 pH 3.5 至 pH 6.5 之檸檬酸鹽緩衝劑中。混合物溫度係自 25 至 45°C 之間變化。最終乙醇濃度係自 25 至 45% 變化。藥物：脂質比 (wt:wt) 係自 0.07 至 0.11 變化。水合噴嘴內徑 (ID) 係自 0.005 至 0.125 英吋變化。實施各條件，以測量值比較各製程參數之影響。除非指明，否則各條件係在利用 50 mM 檸檬酸鹽緩衝劑、pH 4.5、35°C、35% 最終乙醇、0.07 之藥物：脂質比及 ID 為 0.005 英吋之噴嘴下進行。

將該經 siRNA 負載之脂質體稀釋成 10% 乙醇以穩定該等粒子，然後逆對 10× 體積 PBS (pH 7.2) 進行濾洗以移除乙醇及進行緩衝劑之交換。將最終產物經以 0.22 μm (無菌級) PES 濾膜過濾以減少微生物附著量。

表 2 及圖 3 顯示 pH 對脂質-核酸奈米粒子之平均粒徑及 PDI 之影響。增加緩衝劑 pH 會導致粒徑增加，雖然仍小於 150 nm 平均粒徑。

表 2

緩衝劑 pH	體積平均直徑[nm]		PDI
	平均值	SD	
6.5	130.7	17.7	0.111
4.5	108.5	7.1	0.163
3.5	86.1	10.2	0.149

表 3 顯示緩衝劑濃度對各種不同參數之影響。結果顯示，增加緩衝劑濃度會減少 siRNA 回收率。平均粒徑及 PDI 似乎不受影響。在 pH 3.5 時觀察到最小粒徑，及在 25 mM 檸檬酸鹽緩衝劑時觀察到最大的 siRNA 回收率。

表 3

緩衝劑濃度 [mM]	體積平均直徑[nm]		PDI	EE [%]	siRNA 回收率[%]
	平均值	SD			
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

表 4 顯示水合溫度自 25 增加至 45℃，粒徑會自 135.7 減小至 102.2 nm，同時使得 siRNA 回收率自 80% 增加至 87%。增加最終乙醇百分比會增加粒徑，而對 siRNA 回收率沒有影響，但使得囊封效率減低至 88%。

表 4

水合 溫度[℃]	最終 %EtOH	體積平均直徑[nm]		PDI	EE [%]	siRNA 回收率[%]
		平均值	SD			
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

表 5 顯示藥物：脂質比之增加減小，siRNA 回收率自 80 增加至 87%。在藥物：脂質 (w:w) 為 0.07 時觀察到最大回收

率。所有其他測得的特性均未受藥物：脂質比影響。鑑於 Maurer及 Semple等二人之揭示內容中均論述最佳回收率係在藥物：脂質(w:w)等於或大於0.16(脂質：藥物(w:w)等於或小於6.25)時，此結果令人驚訝且意想不到的。本結果顯示，利用本文所揭示方法會獲得相反之趨勢。

表 5

脂質：siRNA [重量/重量]	體積平均直徑[nm]		PDI	EE [%]	siRNA 回收率
	平均值	SD			
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

表 6顯示使噴嘴ID增加25倍並不會影響粒徑、囊封效率或 siRNA回收率。用以將乙醇/脂質添加至緩衝劑表面之噴嘴孔具有實質性的彈性。此彈性對於在擴產規模期間可以提供較多的優勢。

表 6

噴嘴 ID [英寸]	體積平均直徑[nm]		PDI	EE [%]	siRNA 回收率
	平均值	SD			
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

實例 3：所論述方法與用於分批製造脂質體之參考方法之比較

依據實例 2之組合物或利用對照法得到本文所述用於製造脂質/核酸粒子之方法所得之結果與 Semple等人之美國專利案 6,858,225所述方法(對照法或該對照法所使用的對照組合物)之結果比較。

實例 2之組合物係藉由以 40:30:25:5:2之莫耳比共溶解之

陽離子脂質、DOPE、膽固醇、與PEG結合之脂質及靶向脂質(參見上述實例2)所組成。

對照組合物係藉由以25:20:45:10之莫耳比共溶解之DODAP、DSPC、膽固醇及PEG-CER-14所組成。

於實例2之方法中，將脂質以濃度4.32 mg/ml溶解於無水乙醇中，及將siRNA濃度以0.163 mg/ml溶解於50 mM檸檬酸鹽(pH 4.5)中。將混合容器中的siRNA溶液處於35至40°C狀態，同時持續攪拌。然後利用歧管/噴嘴配置將該乙醇/脂質混合物噴灑至含siRNA緩衝劑表面上。最終乙醇濃度為35%及最終脂質/siRNA比為14:1(wt:wt)。然後將所得粒子稀釋至10%乙醇，然後逆對10×體積PBS(pH 7.2)進行濾洗。

於該對照法中，將脂質以濃度25 mg/ml溶解於無水乙醇中，及將siRNA以濃度4.17 mg/ml溶解於300 mM檸檬酸鹽(pH 4.0)中。該混合容器中的含siRNA緩衝劑維持在室溫下同時持續攪拌。然後利用單噴嘴將該乙醇/脂質混合物噴灑至含siRNA緩衝劑表面上，以自發性地形成經siRNA負載之脂質體。最終乙醇濃度為40%，及最終脂質/siRNA比為6:1(重量：重量)。混合後，將脂質/siRNA懸浮液移至由兩層100 nm聚碳酸酯膜所製得並經65°C下預平衡的10 mL擠壓器中。在300 psi壓力下，10次通過擠壓出該懸浮液。所得粒子逆對10×體積PBS(pH 7.2)進行濾洗。

將各方法所得的粒子經以0.22 μ m濾膜過濾。如本文所述測得平均粒徑、PDI及EE。

實例2之方法可製得相較無擠壓步驟之對照法(圖4)更小的脂質奈米粒子。進行擠壓前，測定藉由該對照法所製得粒子之粒徑。利用對照法自NDT-0009組合物所製得之粒子具有較250 nm粒子更大的平均粒徑。在擠壓及經過濾洗之後，平均粒徑會減小至128 nm。實例2之方法在無擠壓下可製得具有平均粒徑小於150 nm之粒子。以對照組合物開始可觀察到類似的趨勢。

相較對照法，實例2之方法將siRNA囊封至脂質粒子中更為有效率(圖5)。實例2之方法所製得粒子之囊封效率(EE)高於對照法所形成粒子之囊封效率(EE) (兩產物均係在濾洗之前進行測定)。實例2之方法所製得粒子之EE大於95%，高於對照法所形成粒子所觀測者。於該對照法中，許多游離siRNA會在濾洗之後被移除，此舉導致改善最終產物之EE。

實例2之方法相較對照法可製得具有更高囊封效率之奈米粒子(圖6)。如實例2方法之最終siRNA回收率是對照法所得者之兩倍以上(72%對33%)，兩種產物均係在濾洗之後進行測定的。該等數據反應實例2方法中EE的改善以及不存在擠壓步驟。實例2之方法提供較佳的siRNA回收率，因為對照法額外的擠壓步驟會結構性地改變脂質體，及使得siRNA顯著地從粒子解離。該等結果顯示，本文所述方法提供因減少製程步驟數，同時改良囊封效率及平均粒徑小於150 nm之奈米粒子之產率而優於對照法之若干優點。

實例4：擴產脂質體分批製造規模期間變化性之比較

以包括永久帶電荷(HEDC)陽離子脂質與游離(S104)陽離子脂質分子所組合之不同脂質組合物進行實例2方法。將HEDC、S104、DOPE、膽固醇、PEG-BML及diVA-PEG750-diVA以20:20:30:25:5:2之莫耳比溶解於無水乙醇中。於擴產規模期間，評估不同siRNA分子、不同批料體積及不同siRNA(藥物)/脂質比。表7概述由一系列條件所得到奈米粒子之特徵化結果。

表 7

批料體積 [L]	藥物	藥物/脂質 [重量/重量]	粒徑 [nm]	PDI	EE [%]	產物產率 [siRNA回收率]
5	siRNA 1	0.07	93	0.14	97%	>90%
20	siRNA 1	0.07	83	0.15	95%	>90%
20	空的脂質體 (不含siRNA)	不適用	83	0.14	不適用	不適用
20	siRNA 2	0.11	90	0.16	92%	>90%
50	siRNA 2	0.07	82	0.14	94%	>90%
120	空的脂質體 (不含siRNA)	不適用	86	0.14	不適用	不適用
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%

該等結果顯示本文所述方法呈現相當堅實。跨越50倍範圍的擴產規模期間仍會獲得類似粒徑及PDI。粒徑始一致性地小於100 nm，且產物產率>90%。多分散性指數值介於極低範圍內，顯示幾乎是顆粒均勻分散之囊泡群體。

實例5：擴產脂質體分批製造含蔗糖調配物規模期間變化性之比較

將HEDC、S104、DOPE、膽固醇、PEG-BML及diVA-PEG750-diVA以20:20:30:25:5:2之莫耳比溶解於乙醇中進

行述於實例2中之方法。在製造本文所述囊泡期間併入蔗糖。評估不同批料體積且進行冷凍-融溶。表8概述由一系列條件所得奈米粒子之特徵化結果。

表 8

利用單次使用半加工系列製備冷凍(含蔗糖)調配物

批料 體積 [L]	藥物	藥物/ 脂質 [重量/ 重量]	冷凍之前			融溶之後			產物產率 [siRNA 回收率]
			粒徑 [nm]	PDI	EE [%]	尺寸 [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	待確定	待確定	待確定	>90%

該等結果顯示冷凍融溶並不會改變該等脂質粒子之特性。該等結果亦顯示批料之間的變化性相當低，及重複性製程均可製得均勻之奈米粒子。

已建立用於藉由凍乾法以穩定藥物：脂質粒子之條件。依實例2所製得的藥物：脂質粒子可經凍乾而不會喪失活性。藥物：脂質粒子中蔗糖的最終濃度為8%(重量/體積)。凍乾製劑可藉由添加蒸餾水重新復水組合及測定其於i.v.注射後老鼠肺中之轉染活性。重新復水組合製劑經冷凍及融溶不會影響活性。示於表9中之結果證實利用本文所述方法所製得的粒子在冷凍乾燥期間仍保持其特性，因此係穩定的。明確言之，於冷凍乾燥之前、期間及之後，粒徑是穩定並保持著。

表 9

利用單次使用半加工系列製備冷凍(含蔗糖)調配物											
批料體積 (L)	藥物	藥物/ 脂質 (重量/重量)	冷凍之前			融溶之後			冷凍+重新組合之後		
			尺寸 (nm)	PDI	EF(%)	尺寸(nm)	PDI	EE(%)	尺寸(nm)	PDI	EE(%)
20	siRNA2	0.11	98	0.15	94	97	0.16	90	115	0.15	93

該等粒子之穩定性與脂質組合物、脂質：RNA(w:w)數值及調配物中所選用之聚醣成函數關係。本文所述用於製造呈現具有高度活體內生物活性之脂質：RNA複合物之穩定調配物之方法學方法顯示可用於確定醫藥可接受製劑之優點，因此有利於以脂質體為基礎之RNA傳遞。

實例 6：脂質之浸沒式注射

利用浸沒式注射製造囊泡來改良述於實例 2 中之方法。將 HEDC、S104、DOPE、膽固醇、PEG-BML 及 diVA-PEG750-diVA 以 20:20:30:25:5:2 之莫耳比溶解於乙醇中。表 10 概述由浸沒式添加法相較表面添加法所製得的奈米粒子之特徵化結果。該等結果顯示以下令人驚訝及意想不到的結果：藉由浸沒式注射將脂質添加至水相之情況下，平均粒徑實質上會減小。

表 10

利用單次使用半加工系列所製得的液體調配物

批料體積 [L]	藥物	藥物/脂質		粒徑		EE [%]	產物產率 [siRNA 回收率]
		[wt/wt]	添加方法	平均值 [nm]	PDI		
5	siRNA 1	0.07	表面	93	0.136	97	>90%
5	siRNA 1	0.07	浸沒	57	0.104	97	>90%

利用單次使用半加工系列製備冷凍(含蔗糖)調配物

批料體積 [L]	藥物	藥物/脂質		粒徑		EE [%]	產物產率 [siRNA 回收率]
		[wt/wt]	添加方法	平均值 [nm]	PDI		
5	siRNA 1	0.11	表面	94	0.119	95	>90%
1	siRNA 1	0.11	浸沒	63	0.102	95	>90%

該相同製程方法係用以製造蔗糖含於緩衝劑中之脂質體。表 11 概述藉由添加次數不同所製得奈米粒子之特徵化結果，及表 12 概述利用表面方式相較浸沒式添加所製得奈米粒子之特徵化結果。

表 11

利用單次使用半加工系列製備液體調配物

添加時間 [min]	添加方法	粒徑		EE [%]	產物產率 [siRNA回收率]
		平均值[nm]	PDI		
0.5	浸沒	66	0.140	90	>90%
2.0	浸沒	93	0.112	94	>90%
5.0	浸沒	99	0.133	92	>90%
10	浸沒	98	0.137	91	>90%

表 12

利用單次使用半加工系列製備液體調配物

批料體積 [L]	添加時間 [min]	添加方法	粒徑		EE [%]	產物產率 [siRNA回收率]
			平均值 [nm]	PDI		
5	15	表面	93	0.136	95	>90%
1	1.5	浸沒	63	0.102	95	>90%

該等結果顯示如下令人驚訝及意想不到的結果：添加時間少於2分鐘內，藉由浸沒式注射將脂質添加至水相之情況下，平均粒徑實質上會減小。該等結果亦顯示如下令人驚訝的結果：藉由浸沒式注射將脂質添加至水相之情況下，平均粒徑實質上會減小。

【圖式簡單說明】

圖 1 顯示本文所述用於製造脂質-核酸奈米粒子之方法之示意圖。該方法每一步驟的細節述於上文中。

圖 2 顯示單位為奈米(nm)之平均粒徑與 0.05 至 0.5 mg/mL

之最終RNA濃度成函數關係。實驗細節提供於實例1中。

圖3顯示將脂質混合至RNA時單位為nm之平均粒徑與緩衝劑pH成函數關係。實驗細節提供於實例2中。

圖4顯示利用如實例2方法(NDT-0009)或實例3所述Semple法所製得粒子之平均粒徑。左側的長條圖是混合後之粒徑測量值。右側的長條圖是最終產物(就Semple法之產物而言，係經擠壓及濾洗之後)的測量值。

圖5顯示利用如實例2之方法(實例方法2)或如實例3所述之Semple法所製得粒子之囊封效率(EE)，以百分比表示。左側的長條圖是混合之後之粒徑測量值。右側之長條圖為最終產物(就Semple法之產物而言，係擠壓及濾洗之後)的測量值。

圖6顯示利用如實例2之方法或如實例3所述之Semple法所製得粒子之siRNA回收率，以百分比表示。

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：101141082

※ 申請日：101.11.5

※IPC 分類：A61K 9/51 (2006.01)

A61K 47/44 (2006.01)

B61J 13/10 (2006.01)

B82Y 5/00 (2011.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

用於藥物傳遞之脂質奈米粒子的製造方法

METHOD OF PRODUCING LIPID NANOPARTICLES FOR DRUG
DELIVERY

二、中文發明摘要：

本發明揭示一種用於製造可有效囊封負電荷治療性聚合物(例如 siRNA)之脂質體的方法。該方法涉及以可與水混溶之有機溶劑(諸如乙醇)製備含陽離子脂質之脂質混合物，及將該溶液注入至已溶於水中之聚合物中，以使溶於水中達35%乙醇之最終濃度，從而製得具有50至150 nm平均粒徑及藥物：脂質最終電荷比為1:2.5之奈米粒子。

三、英文發明摘要：

What is described is a method for preparing a liposome that efficiently encapsulates a negatively charged therapeutic polymer, e.g., siRNA. The process involves preparing a lipid mixture comprising a cationic lipid in a water miscible organic solvent such as ethanol, and injecting this solution to the polymer dissolved in water to a final concentration of 35% ethanol in water to produce nanoparticles having a mean size of 50 to 150 nm and a final charge ratio of drug:lipid is 1:2.5.

八、圖式：

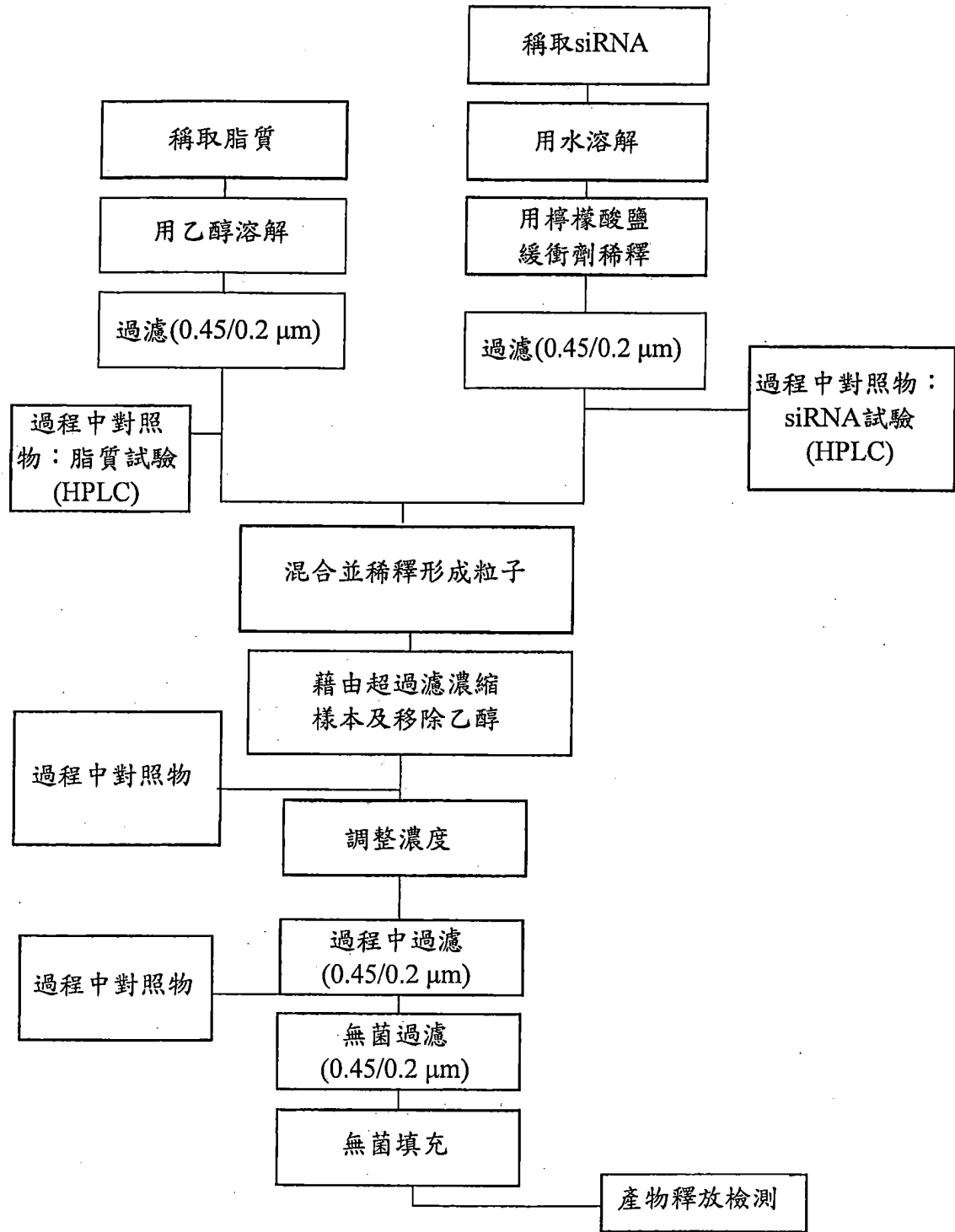


圖 1

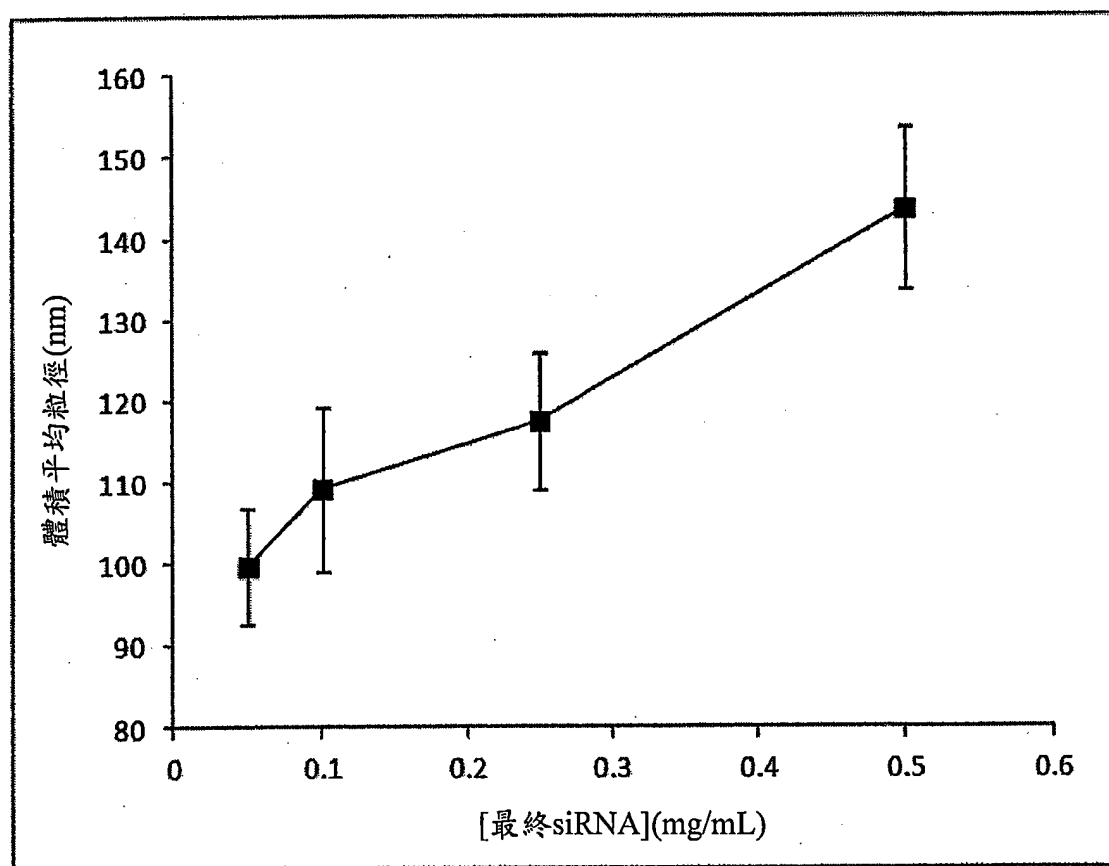


圖 2

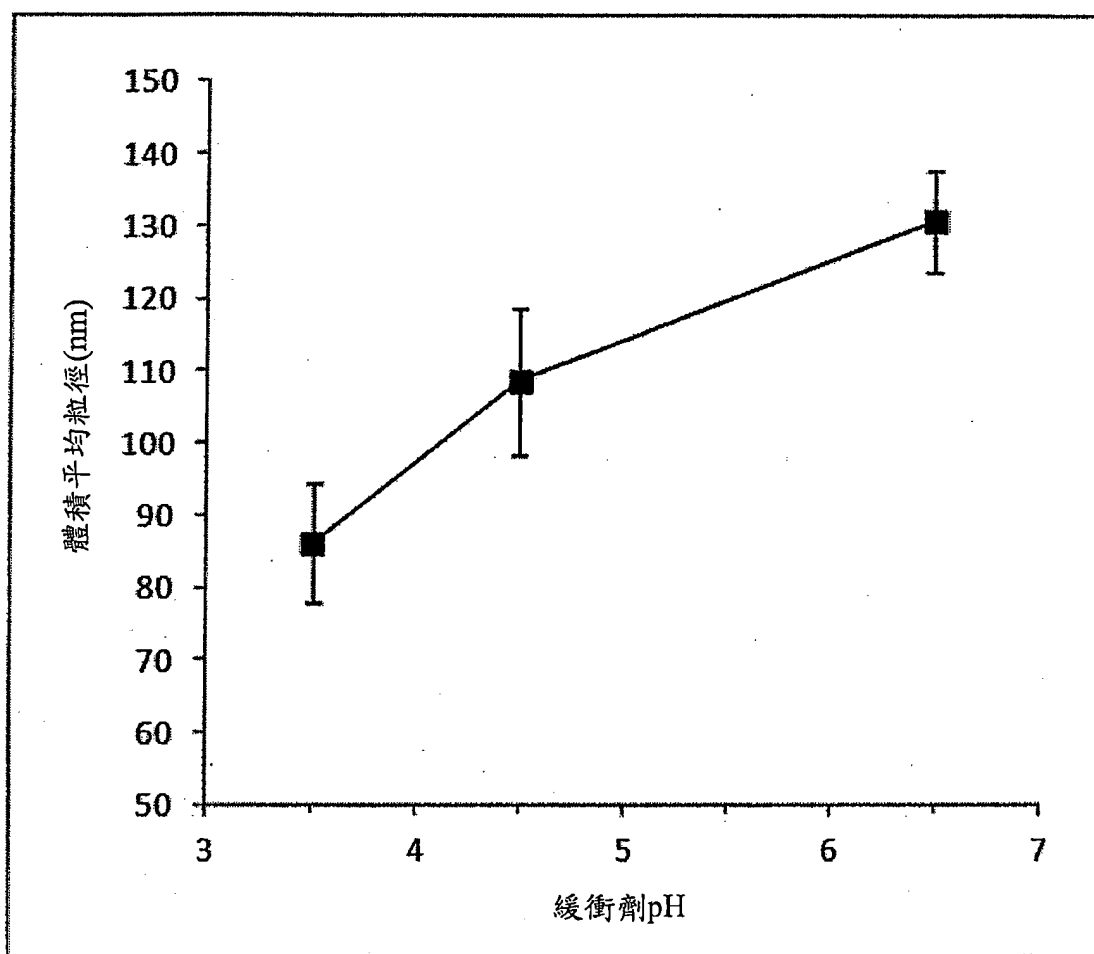


圖 3

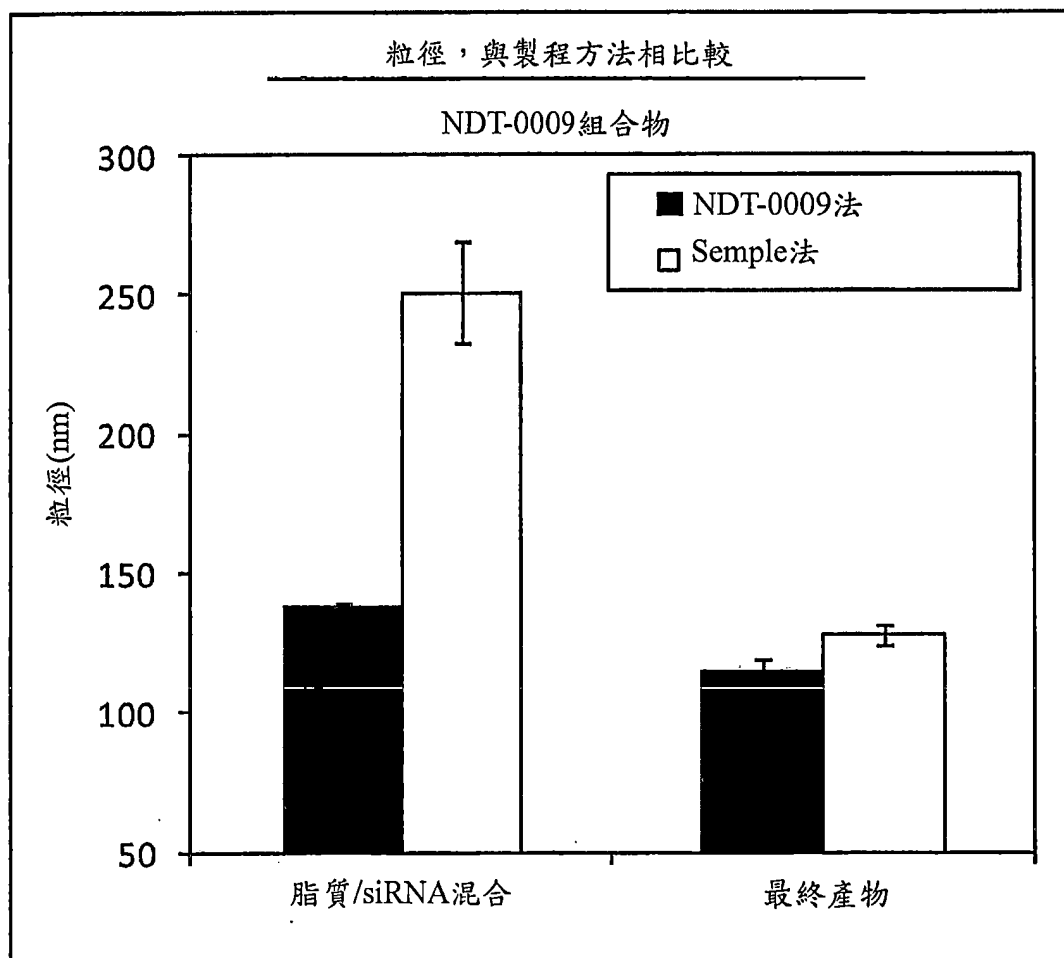


圖 4

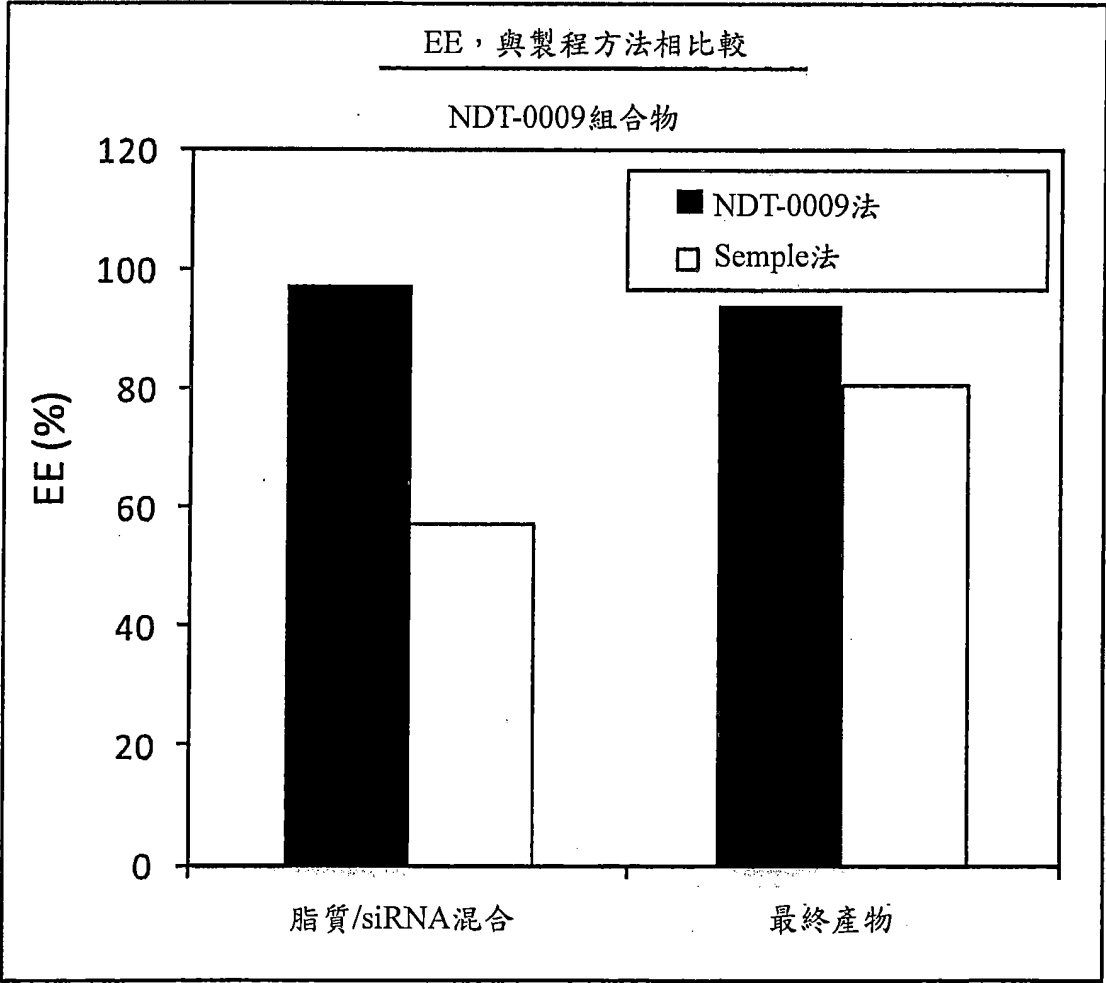


圖 5

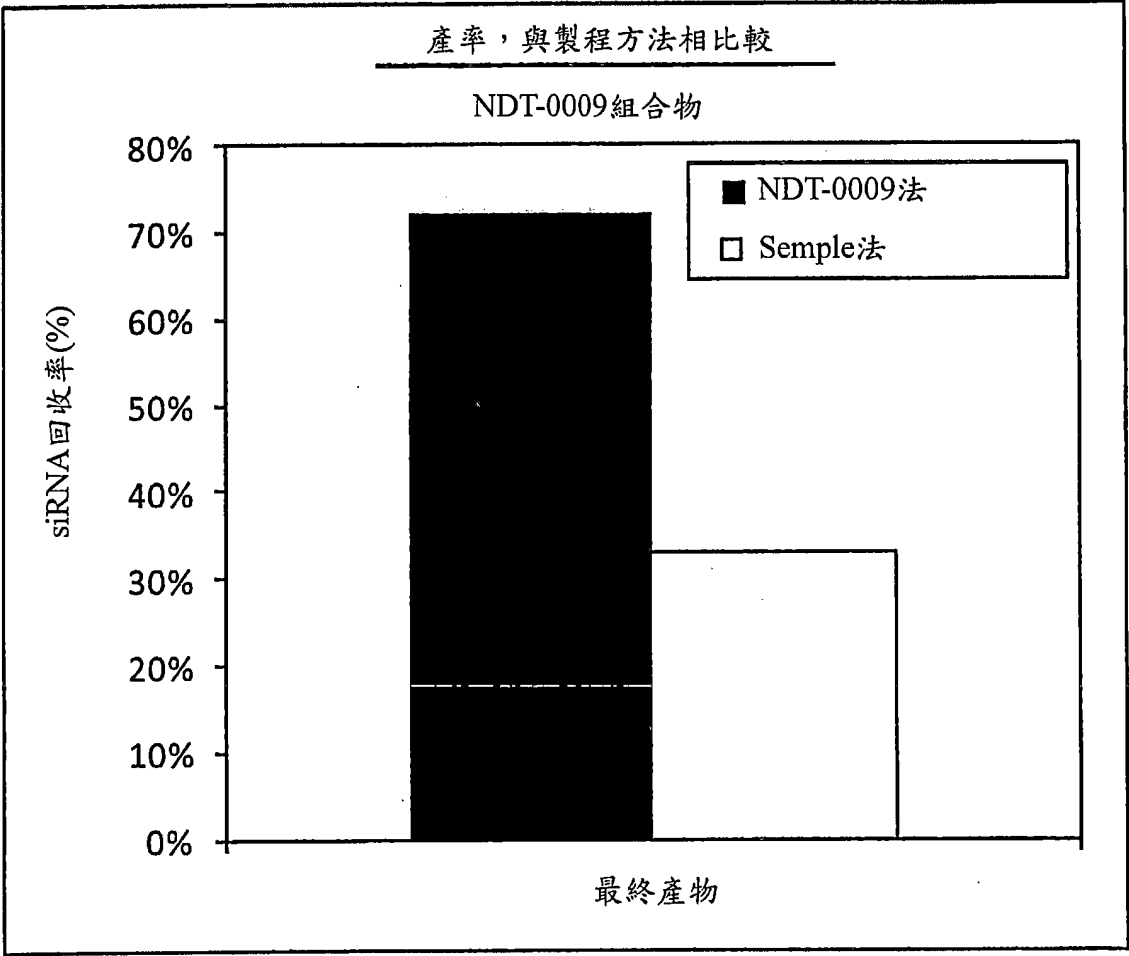


圖 6

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：(無)

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)



七、申請專利範圍：

1. 一種方法，其係用於製造囊封核酸分子之脂質奈米粒子，該方法包括以下步驟：

製備包含溶解於可與水混溶有機溶劑中之陽離子脂質、輔助脂質、固醇及PEG脂質之脂質溶液；

製備包含核酸分子及pH 3.5-6.5水性緩衝劑之第一水溶液；

以恆定速率在1至100分鐘內，在攪拌於混合容器內之該水溶液的同時將該脂質溶液注入至包含於該混合容器內之該水溶液中，以達到含有25至45%(v:v)有機溶劑、以及具有核酸：脂質比為0.06至0.16(w:w)及核酸：脂質電荷比為1:2.5至1:1之脂質奈米粒子之最終溶液；及

藉由逆對中性pH之第二水性緩衝溶液進行濾洗，移除該混合物中的有機溶劑。

2. 如請求項1之方法，其中該第二溶液進一步包含聚醣。
3. 如請求項2之方法，其中該聚醣選自由蔗糖、海藻糖、甘露醇、山梨糖醇、木糖醇、乳糖、麥芽糖及菊糖組成之群。
4. 如請求項1至3中任一項之方法，其進一步包括冷凍乾燥囊封核酸分子的脂質奈米粒子之步驟。
5. 如請求項1至3中任一項之方法，其中該有機溶液為乙醇。
6. 如請求項1至3中任一項之方法，其中陽離子脂質佔該等脂質之40至60莫耳%。

7. 如請求項1至3中任一項之方法，其中該陽離子脂質選自由HEDC、HEDODC及HE-Et-DODC組成之群。
8. 如請求項1至3中任一項之方法，其中該陽離子脂質係選自永久陽離子脂質、可離子化陽離子脂質、或永久陽離子脂質及可離子化陽離子脂質之組合。
9. 如請求項1至3中任一項之方法，其中該等脂質溶液進一步包括選自下述之化合物：

式(A)之化合物：



其中

脂質(L)係選自由DSPE、DOPE及DC所組成之群，

連接子(X)係選自由不存在、PEG550、PEG2000、PEG-麩胺酸(-Glu)、Glu、C6、甘胺酸及GluNH、N1,N19-雙(3-(2-(2-(3-胺基丙氧基)乙氧基)乙氧基)丙基)-4,7,10,13,16-五氧雜十九碳烷-1,19-二醯胺所組成之群，及

類視色素(R)係選自由維生素A酸(tretinoin)、阿達帕林(adapalene)、視黃醇、4-羥基(苯基)視黃醯胺(4-HPR)、視黃酸(維生素A)、9-(2,6,6-三甲基環己-1-烯-1-基)壬酸、3,7-二甲基-9-(2,6,6-三甲基環己-1-烯-1-基)壬酸、3,7-二甲基-9-(2,2,6-三甲基環己基)壬酸及任何部分或完全飽和類視色素所組成之群；

式(B)之化合物：



其中

連接子(X)為N1,N19-雙(3-(2-(2-(3-胺基丙氧基)乙氧基)乙氧基)丙基)-4,7,10,13,16-五氧雜十九碳烷基-1,19-二醯胺(「雙胺基-PEG」)或N1,N19-雙(16,20-二胺基-15-側氧基-4,7,10-三氧雜-14-氮雜二十碳烷基)-4,7,10,13,16-五氧雜十九碳烷基-1,19-二醯胺(「lys-雙胺基-PEG-lys」), 及

類視色素(R)選自由維生素A酸、阿達帕林、視黃素、4-羥基(苯基)視黃醯胺(4-HPR)及視黃酸(維生素A)、9-(2,6,6-三甲基環己-1-烯-1-基)壬酸、3,7-二甲基-9-(2,6,6-三甲基環己-1-烯-1-基)壬酸、3,7-二甲基-9-(2,2,6-三甲基環己基)壬酸及任何部分或完全飽和類視色素所組成之群;

葉酸; 維生素E; 肽配體及單株抗體。

10. 如請求項1至3中任一項之方法, 其中該第一溶液及該第二溶液處於25至55°C下。
11. 如請求項1至3中任一項之方法, 其中該第一經緩衝溶液包含檸檬酸鹽。
12. 如請求項1至3中任一項之方法, 其中該乙醇溶液係透過多噴嘴注射至空氣-水界面而添加至該水溶液中。
13. 如請求項1至3中任一項之方法, 其中該乙醇溶液係藉由浸沒式注射而添加至該水溶液中。
14. 一種醫藥調配物, 其包含如請求項1至13中任一項之方法所製得之囊封核酸分子之脂質奈米粒子, 其中該脂質奈米粒子具有小於0.2之多分散性指數。

15. 如請求項14之醫藥調配物，其中陽離子脂質佔該等脂質之40至60莫耳%。
16. 如請求項14之醫藥調配物，其中該陽離子脂質選自由HEDC、HEDODC及HE-Et-DODC組成之群。
17. 如請求項14之醫藥調配物，其中該陽離子脂質係選自永久陽離子脂質、可離子化陽離子脂質、或永久陽離子脂質及可離子化陽離子脂質之組合。
18. 如請求項14至17中任一項之醫藥調配物，其中該脂質奈米粒子進一步包括選自下述之化合物：

式(A)之化合物：



其中

脂質(L)係選自由DSPE、DOPE及DC所組成之群，

連接子(X)係選自由不存在、PEG550、PEG2000、PEG-麩胺酸(-Glu)、Glu、C6、甘胺酸及GluNH、N1,N19-雙(3-(2-(2-(3-胺基丙氧基)乙氧基)乙氧基)丙基)-4,7,10,13,16-五氧雜十九碳烷-1,19-二醯胺所組成之群，及

類視色素(R)係選自由維生素A酸(tretinoin)、阿達帕林(adapalene)、視黃醇、4-羥基(苯基)視黃醯胺(4-HPR)、視黃酸(維生素A)、9-(2,6,6-三甲基環己-1-烯-1-基)壬酸、3,7-二甲基-9-(2,6,6-三甲基環己-1-烯-1-基)壬酸、3,7-二甲基-9-(2,2,6-三甲基環己基)壬酸及任何部分或完全飽和類視色素所組成之群；

式(B)之化合物：

R-X-R (B)

其中

連接子(X)為N1,N19-雙(3-(2-(2-(3-胺基丙氧基)乙氧基)乙氧基)丙基)-4,7,10,13,16-五氧雜十九碳烷基-1,19-二醯胺(「雙胺基-PEG」)或N1,N19-雙(16,20-二胺基-15-側氧基-4,7,10-三氧雜-14-氮雜二十碳烷基)-4,7,10,13,16-五氧雜十九碳烷基-1,19-二醯胺(「lys-雙胺基-PEG-lys」), 及

類視色素(R)選自由維生素A酸、阿達帕林、視黃素、4-羥基(苯基)視黃醯胺(4-HPR)及視黃酸(維生素A)、9-(2,6,6-三甲基環己-1-烯-1-基)壬酸、3,7-二甲基-9-(2,6,6-三甲基環己-1-烯-1-基)壬酸、3,7-二甲基-9-(2,2,6-三甲基環己基)壬酸及任何部分或完全飽和類視色素所組成之群;

葉酸; 維生素E; 肽配體及單株抗體。

19. 如請求項14至17中任一項之醫藥調配物, 其中該方法進一步包括囊封核酸分子之脂質體之冷凍乾燥。
20. 如請求項14至17中任一項之醫藥調配物, 其進一步包含聚醣。
21. 如請求項20之醫藥調配物, 其中該聚醣選自由蔗糖、海藻糖、甘露醇、山梨糖醇、木糖醇、乳糖、麥芽糖及菊糖組成之群。
22. 如請求項14至17中任一項之醫藥調配物, 其中囊封核酸分子之脂質奈米粒子之平均粒徑為50至100 nm。
23. 如請求項18之醫藥調配物, 其進一步包含聚醣。