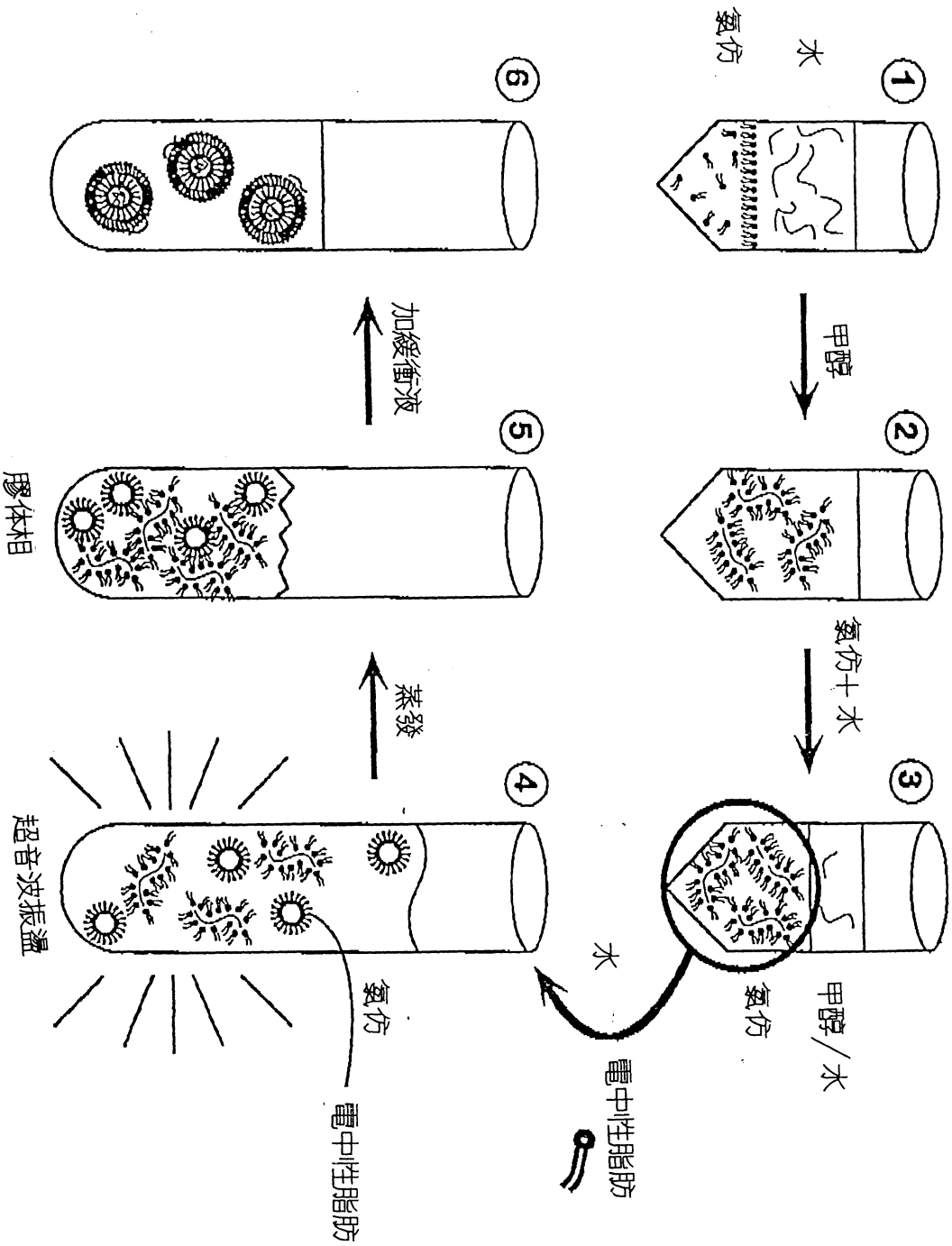
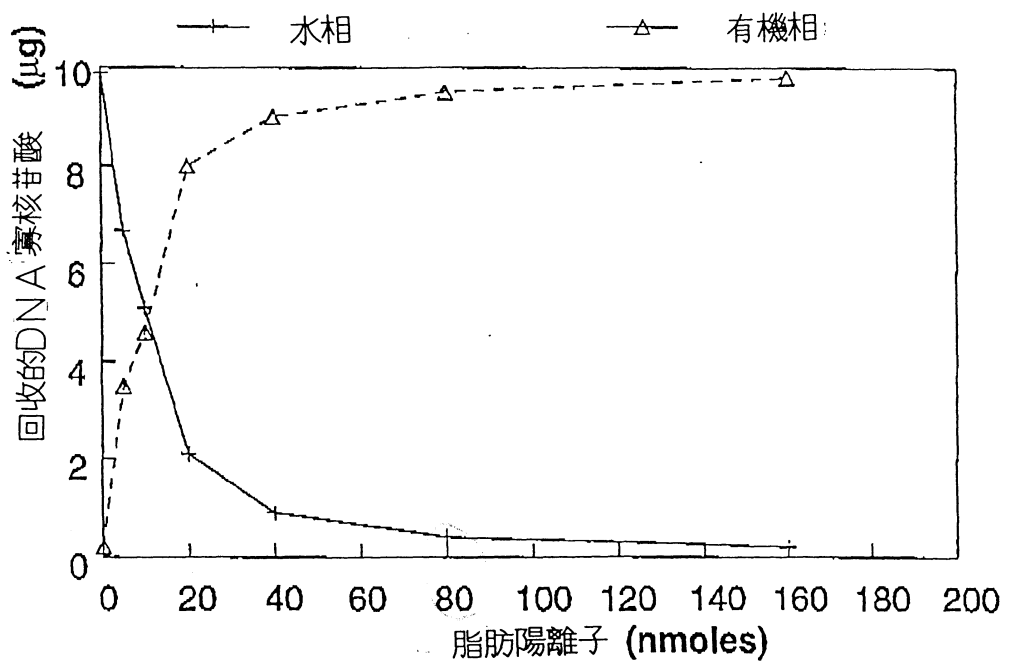


4566-100

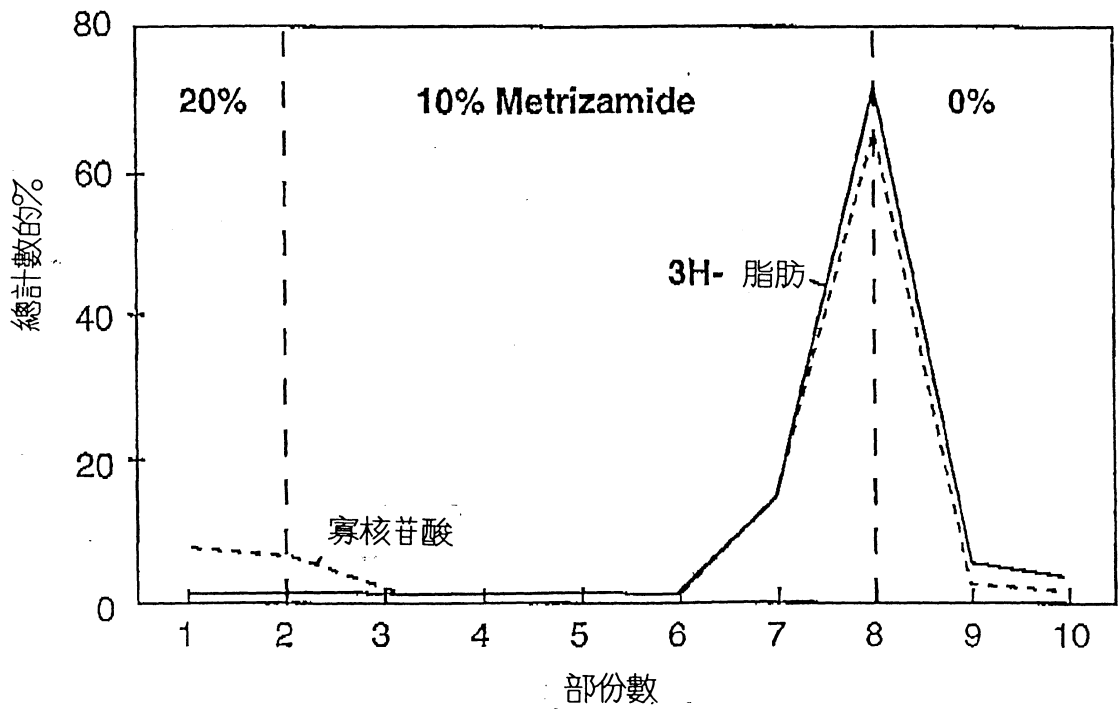
公告本



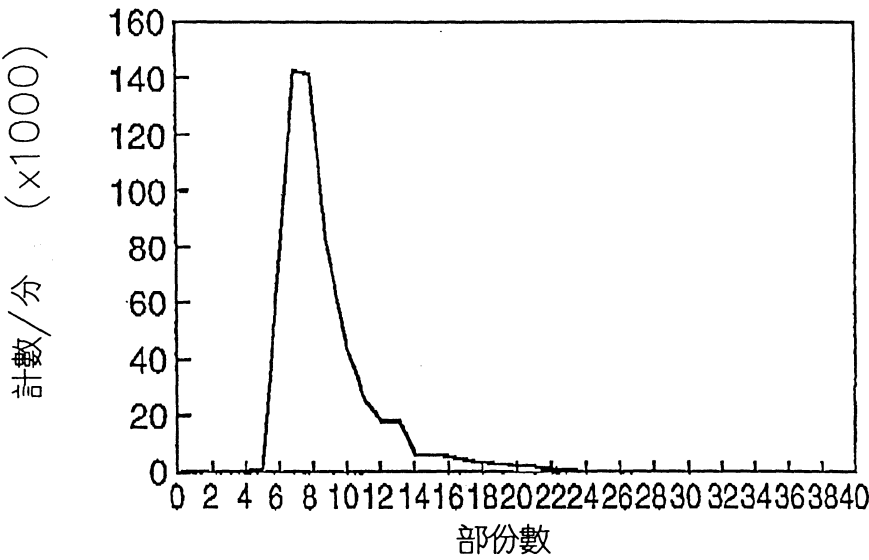
第 1 圖



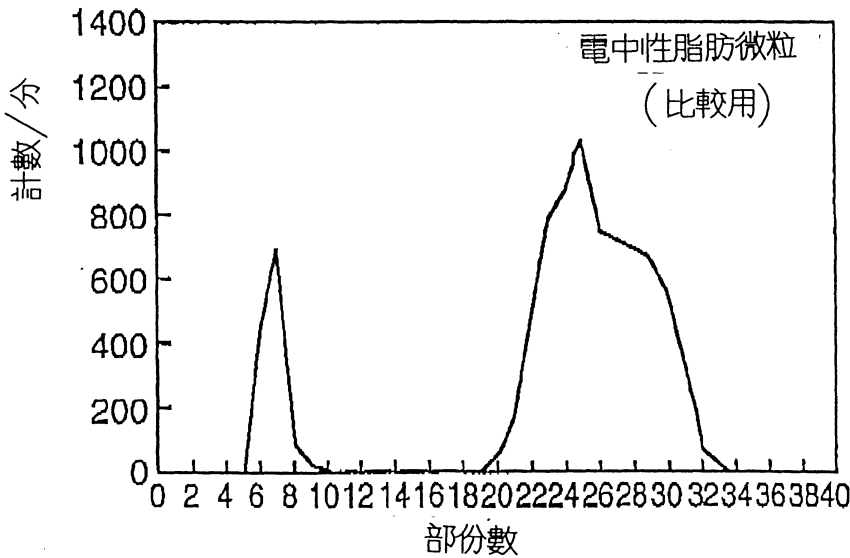
第 2 圖



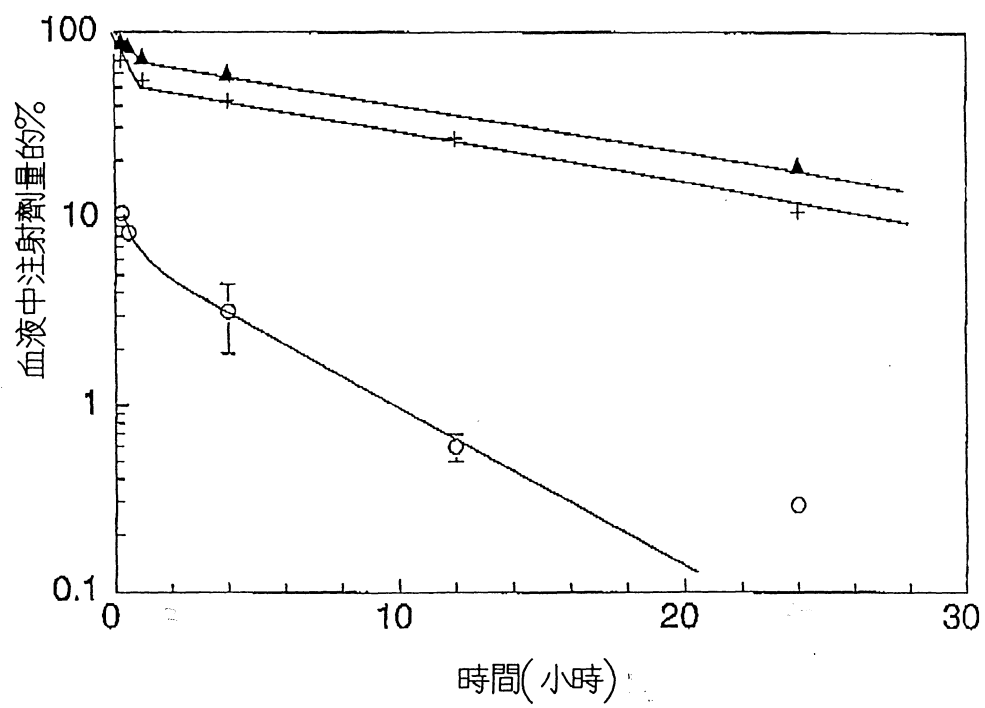
第 3 圖



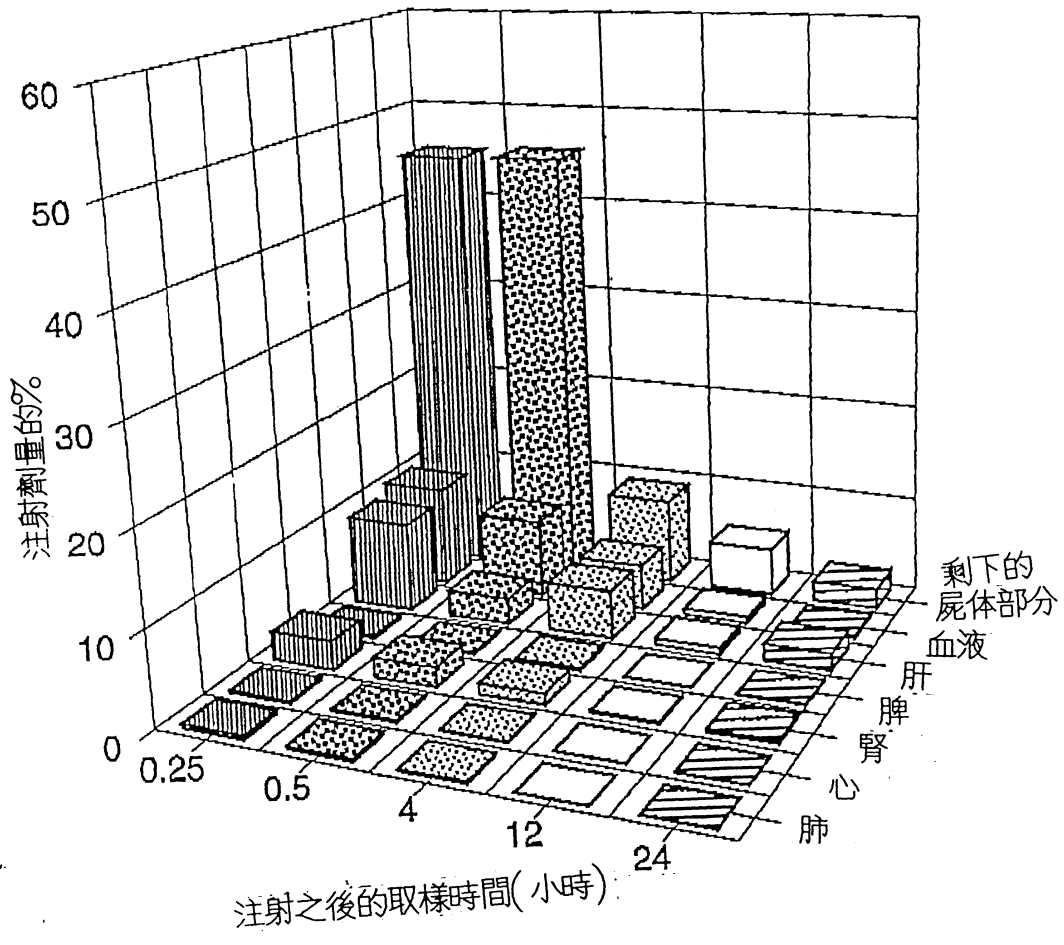
第 4A 圖



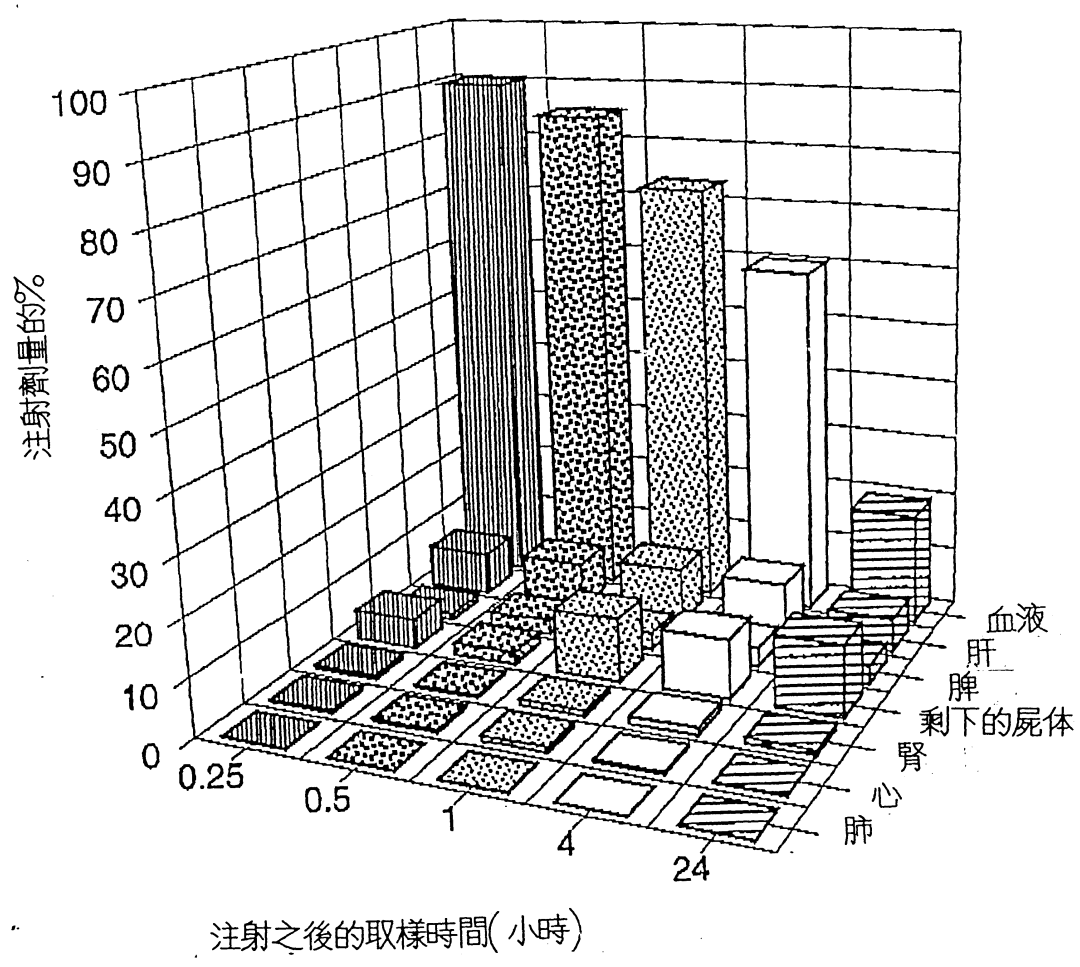
第 4B 圖



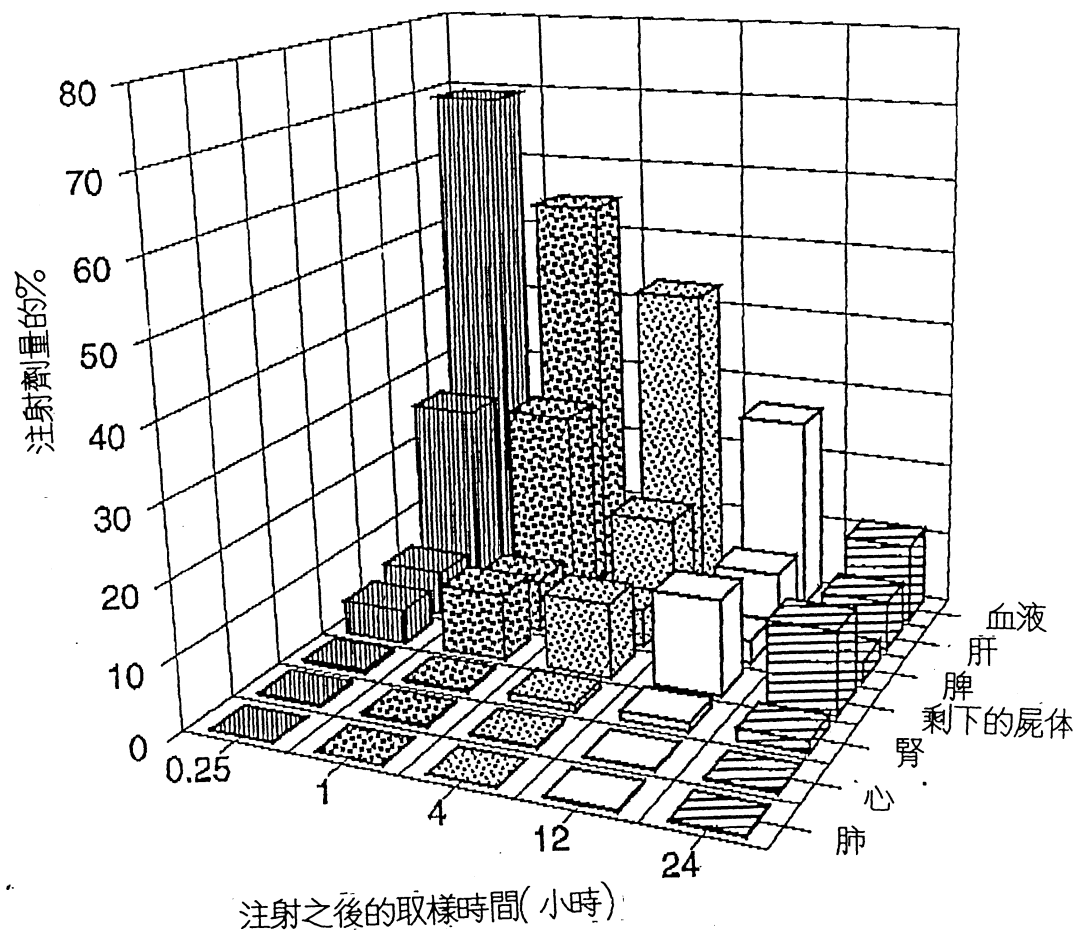
第 5 圖



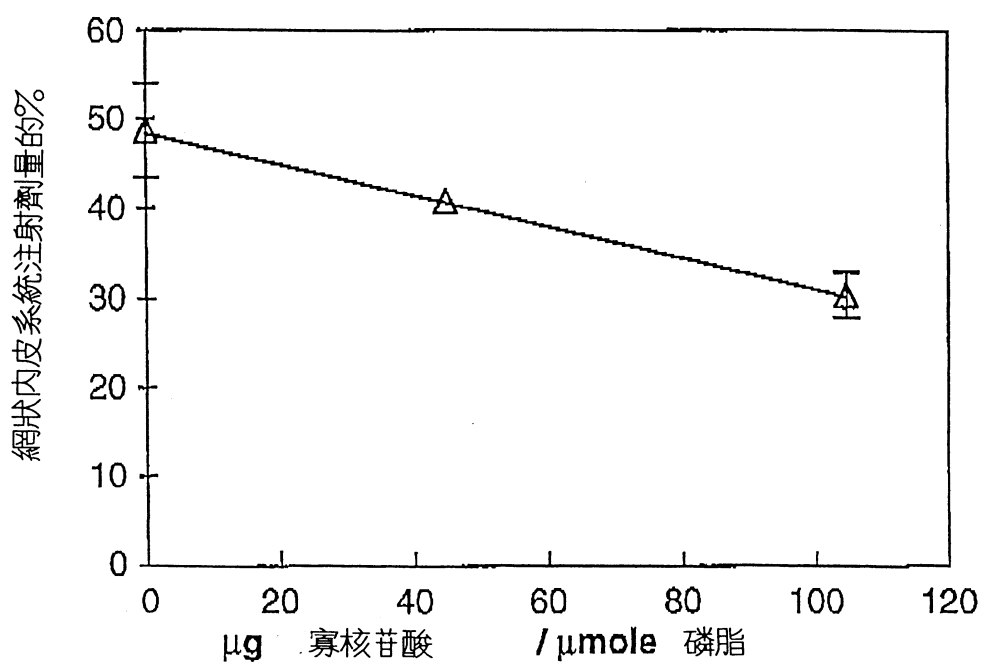
第6A圖



第 6B 圖



第 6C 圖



第 7 圖



I225412

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： 87109984

※ 申請日期： 87. 6. 22

※IPC 分類： A61K 9/14

壹、發明名稱：(中文/英文)

脂肪微粒包埋聚核苷酸的組成物和方法

LIPOSOME-ENTRAPPED POLYNUCLEOTIDE COMPOSITION
AND METHOD

貳、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

斯快爾斯製藥股份有限公司

SEQUUS PHARMACEUTICALS, INC.

代表人：(中文/英文) 莎麗 A. 達分波特 /SALLY A. DAVENPORT

住居所或營業所地址：(中文/英文)

美國加州 94025 曼露廣場漢米敦巷 960

960 HAMILTON COURT, MENLO PARK, CALIFORNIA 94025, US

國籍：(中文/英文) 美國/US

參、發明人：(共 2 人)

姓名：(中文/英文)

1. 泰雷莎 M. 艾倫 / ALLEN, THERESA M.

2. 達倫 D. 斯圖亞特 / STUART, DARRIN D.

住居所地址：(中文/英文)

1. 加拿大 T6G 0B4 亞伯達省艾德蒙頓 72 街 11223

11223 72ND STREET, EDMONTON, ALBERTA T6G 0B4,

CANADA

2. 加拿大 T6H 4M4 亞伯達省艾德蒙頓米契諾廣場 101
101 MICHENER PARK, EDMONTON, ALBERTA T6H 4M4,
CANADA

國 籍：（中文/英文）

1. ~ 2. 加拿大 / CA

肆、聲明事項：

☐ 本案係符合專利法第二十條第一項 ☐ 第一款但書或 ☐ 第二款但書規定之期間，其日期為： 年 月 日。

◎本案申請前已向下列國家（地區）申請專利 ☐ 主張國際優先權：

【格式請依：受理國家（地區）；申請日；申請案號數 順序註記】

1. 美國；1997/06/23；60/050,490

2.

3.

4.

5.

☐ 主張國內優先權(專利法第二十五條之一)：

【格式請依：申請日；申請案號數 順序註記】

1.

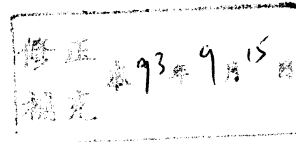
2.

☐ 主張專利法第二十六條微生物：

☐ 國內微生物 【格式請依：寄存機構；日期；號碼 順序註記】

☐ 國外微生物 【格式請依：寄存國名；機構；日期；號碼 順序註記】

☐ 熟習該項技術者易於獲得，不須寄存。



玖、發明說明：

本發明是有關於一種包埋有聚核苷酸(polynucleotide)的脂肪微粒(liposome)之組成物以及製備方法。

近幾年來，聚核苷酸因為具有改變基因表現的能力，因此被研究是否可做為一種治療藥劑。基因療法可用來補足某種不足或缺少的基因功能，或者抑制某種基因功能的表現，特別是已經被廣泛研究的抗意識寡核苷酸(antisense oligonucleotides)。抗意識寡核苷酸是由單股核苷酸所組成的，其鹼基的排列順序和目標訊息核糖核酸(m-RNA)的去氧核糖核酸(DNA)模版之鹼基排列順序彼此是以 Watson-Crick 鹼基配對方式來互補的。如此，其治療機構通常為藉著活化核糖核酸分解酵素 H (RNase H)、防止參與轉譯的各種生化分子組合在一起或抑制基因轉譯(translation)步驟的進行來達成治療目的 (Branch, A.D., *Hepatology* 24(6):1517-1529(1996))。

使用聚核苷酸、RNA、DNA 以及寡核苷酸來進行基因治療的一個問題是這些分子橫越細胞膜的能力很低，因此不容易穿透細胞膜進入細胞質，以到達他們的分子作用處來進行作用。聚核苷酸因為分子本身帶負電荷，使得本身無法自由穿越細胞膜。

另外一個問題是聚核苷酸可以和細胞外各式各樣的分子相互作用，這些細胞外分子會改變聚核苷酸的生物可利用性。尤其是聚核苷酸在生物體液(biological fluids)中非常容易被降解(degradation)。而整個降解過程所表現的藥物動

力學(pharmacokinetics)，在一些治療應用中未必是有利的。

其中一個解決這些問題的方法是讓聚核苷酸進入由脂肪分子所組成的液泡，再一起服用。脂肪分子組成的液泡，例如脂肪微粒，或各式各樣以脂肪微粒為基礎的組成(Zelphati, O., and Szoka, F. C., *J. Control. Res.* 41:99-119(1996)) 已經被提出來了。例如有一種組成是由聚核苷酸和預先形成的帶正電荷之脂肪微粒混合在一起。像這種帶正電荷之脂肪微粒通常是由脂肪陽離子、約同莫耳濃度(equimolar concentration)的會使薄膜不安定的脂肪以及/或電中性脂肪分子所組成的，例如雙油醯磷脂醯乙醇胺(dioleoylphosphatidyl-ethanolamine, DOPE)。聚核苷酸和預先形成的帶正電荷之脂肪微粒互相混合，藉著彼此的靜電吸引力形成聚核苷酸-脂肪微粒複合物(complex)。在活體外或試管內(*in vitro*)的實驗中，這種複合物已經有些能力來調節細胞對聚核苷酸的攝取能力。然而複合物的尺寸太大了(200~2000 nm)以及其不佳的穩定度，使得不適合應用於活體內的治療上(*in vivo*)，尤其是要將此複合物送入肝以及肺以外的內臟(Bennet, C. F., *et al.*, *J. Control. Rel.* 41:121-130(1996); Litzinger, D. C., *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* 1281:139-149(1996))，是更加困難。

另外一種的組成是讓聚核苷酸被包在電中性脂肪微粒中空核心的水溶液中，而電中性脂肪微粒是由電中性脂肪分子所組成的液泡。這些脂肪微粒通常是由高濃度的聚核苷酸水溶液水合(hydrating)乾脂肪薄膜而成(Juliano, R. L.,

and Akhrar, S., *Antisense Res. Dev.* 2:165-176(1992))，或用逆向蒸發方法(reverse evaporation method, REV)所製備出來的(Ropert, C., *et al.*, *Pharm. Res.* 10 (10): 1427-1433 (1993); Szoka, F. C., and Papahadjopoulos, D., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75(9):4194-4198(1978))。

由這些方法做出來的聚核苷酸-脂肪微粒有一個問題是這些脂肪微粒對聚核苷酸的包埋效率(trapping efficiency)都偏低，尤其是尺寸較小的單層膜液泡(<100 nm)，曾經報導過有聚核苷酸包埋效率只有 2 ~ 4 % (Zelphati, O., *et al.*, *Antiviral Res.* 25:13-25(1994))。因為聚核苷酸非常貴，如此低的聚核苷酸包埋效率是很難被接受的。因為回收沒有被脂肪微粒包埋的聚核苷酸所需的高花費和/或時間的大量消耗，使這問題的解決陷入瓶頸。

因此本發明的主要目的就是在提供一種活體可服用的聚核苷酸-脂肪微粒的組成，聚核苷酸是被包埋在脂肪微粒的中空核心部份。

本發明的另一目的是在提供一種方法來製造這種聚核苷酸-脂肪微粒複合物，使能達到較高的聚核苷酸包埋效率。

本發明的另一目的是在提供一種可在活體內穩定的脂肪微粒組成，其穩定性可由脂肪微粒在活體外或試管內的實驗時並不會聚集成團的實驗結果來得知。

本發明的另一目的是在提供一種可在生物血液循環系統內具有長生命期的脂肪微粒，而聚核苷酸被包埋在內。

根據本發明之上述目的，提出一種包括可供活體服用聚核苷酸的脂肪微粒組成。其組成包括具有雙層膜結構的脂肪微粒懸浮液，而脂肪微粒是由帶正電的脂肪陽離子和電中性脂肪分子所組成的液泡。脂肪微粒具有一由內表面所包圍的中空核心部份，而且聚核苷酸主要是位於(localize)脂肪微粒的中空核心之內表面上。

依照本發明一較佳實施例，其中聚核苷酸包括 DNA、RNA 或者是 DNA、RNA 的片段和類似者。另外一個實施例，其中聚核苷酸是指抗意識寡核苷酸。

脂肪陽離子可包括 1,2-雙油醯氧基-3-(三甲基胺)丙烷(1,2-dioleoyloxy-3-(trimethylamino) propane，DOTAP)；氮-[1-(2,3-雙十四烷氧基)丙基]-氮,氮-雙甲基-氮-氫氧乙基溴化銨(N-[1-(2,3-ditetradecyloxy) propyl]-N,N-dimethyl-N-hydroxyethylammonium bromide，DMRIE)；氮-[1-(2,3-雙油醯氧基)丙基]-氮,氮,雙甲基-氮-氫氧乙基溴化銨(N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N-dimethyl-N-hydroxyethyl ammonium bromide，DORIE)；氮-[1-(2,3-雙油醯氧基)丙基]-氮,氮,氮-三甲基氯化銨(N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium chloride，DOTMA)；3 β -(氮-[氮',氮'-雙甲基胺乙烷)羰胺基]膽固醇(3 β [N-(N', N'-dimethylaminoethane) carbamoyl] cholesterol，DC-Chol)；或雙甲基雙十八烷基溴化銨(dimethyldioctadecylammonium bromide，DDAB)。

在其中一個實施例之可形成液泡的電中性脂肪分子有

磷脂質。另外一個實施例則為電中性脂肪分子的親水性(hydrophilic)高分子衍生物，例如聚乙烯甘醇(polyethylene glycol, PEG)。

一般來說，脂肪微粒的尺寸小於 300 nm，較佳為在約 50 ~ 300 nm 之間。

在另一個實施例中，脂肪微粒還包括一個用來瞄準活體內選定作用位置的配體(ligand)分子，例如特定的身體組織區域或特定的細胞。

在另一方面，本發明提出一種脂肪微粒包埋聚核苷酸的製備方法。此方法包括在可溶解脂肪陽離子的非極性有機溶劑(lipid solvent)中形成聚核苷酸-脂肪陽離子微粒。再加入可形成液泡的電中性脂肪分子至含有這些微粒的非極性有機溶劑中，接著蒸發非極性有機溶劑來形成內部包埋有聚核苷酸的脂肪微粒。

在其中一個實施例中，這些聚核苷酸-脂肪陽離子微粒是經由將聚核苷酸溶解在和非極性有機溶劑無法互溶的去離子溶劑中所形成的。這些溶解的核苷酸和非極性有機溶劑中等電量的脂肪陽離子互相接觸，而整個系統還有第三種溶劑，可以使整個系統為單相(single phase)溶液系統。再加入非離子(non-ionic)溶劑或非極性有機溶劑至這單相溶液系統中，使其回復至雙相系統，最後將去離子溶劑自此系統中移除。

在一個實施例中，聚核苷酸是溶解在水中，而且和溶解在氯仿(chloroform)-甲醇(methanol)溶液系統中的脂肪陽

離子互相接觸。

在一個實施例中，先將非極性有機溶劑蒸發，再以水溶液來進行水合作用。

在另一方面，本發明包括藉著上述之方法，藉由實驗對象服用脂肪微粒懸浮液讓聚核苷酸可以進入實驗對象。

為讓本發明之上述和其他目的、特徵、和優點能更明顯易懂，下文特舉一較佳實施例，並配合所附圖式，作詳細說明如下：

圖式之簡單說明：

第 1 圖是依照本發明之使用萃取和蒸發的方法來形成脂肪微粒的製造過程圖。

第 2 圖是繪示使用含有不同量(μg)的 DOTAP 脂肪陽離子之有機溶劑將聚核苷酸自水層萃取出來後，聚核苷酸在水層(十字形符號/實線標示者)、有機層(三角形符號/虛線標示者)中含量的分配。

第 3 圖是繪示同位素標記脂肪陽離子(實線標示)和聚核苷酸(虛線標示)隨著部份數(fraction number)變化的密度梯度分佈圖，縱軸座標為放射線劑量總數之百分比(percentage of total counts)，橫座標為部份數。

第 4A 圖為使用 Sepharose 管柱分離包埋有聚核苷酸之脂肪微粒組成所得的分佈結果圖。

第 4B 圖為使用 Sepharose 管柱分離來分析由電中性脂肪所組成的脂肪微粒的比較結果圖。

第 5 圖係繪示依照本發明之老鼠血液中隨著時間所保

留原靜脈注射之聚核苷酸劑量的百分比之變化圖，藥劑中的自由(free)聚核苷酸是用空心圓表示，聚核苷酸被包埋在電中性脂肪中是由實心三角形來表示，依本發明之聚核苷酸被包埋在陽離子脂肪中是由十字形來表示。

第 6A ~ 6C 圖係繪示依照本發明之老鼠體內各器官在靜脈注射後隨著時間變化之自由聚核苷酸(第 6A 圖)、聚核苷酸被包埋在電中性脂肪微粒中(第 6B 圖)以及聚核苷酸被包埋在陽離子脂肪微粒中(第 6C 圖)的分佈量圖。

第 7 圖係繪示老鼠在靜脈注射不同量的被包埋在脂肪微粒中之聚核苷酸後，網狀內皮系統(reticuloendothelial system, RES)之吸收量變化圖。

實施例

一、脂肪微粒的製造以及活體外或試管內的鑑定

脂肪微粒其中空核心含有聚核苷酸，而且通常是懸浮在溶液中。脂肪微粒具有雙層排列的脂肪分子所形成的薄膜，這些脂肪分子有可形成液泡的脂肪陽離子和電中性脂肪分子。被包埋的聚核苷酸分子是和脂肪陽離子在一起的，而且主要位於脂肪微粒中空核心的內表面上。

請參照第 1 圖，第 1 圖係繪示依照本發明之製備脂肪微粒的方法。在這方法中，聚核苷酸-脂肪陽離子組成的微粒是經由 Bligh 和 Dyer 單相(monophase)中萃取聚核苷酸所合成出來的(Bligh, E. G., and Dyer, W. J., *Can. J. Biochem. Physiol.* 37(8):911-917(1959))。聚核苷酸通常先以某種選定

的濃度來溶解在第一種去離子溶劑中。第一種溶劑例如包括去離子水和具有親水性之非水溶劑。而此去離子溶劑可以加入一些非電解質的溶質，例如蔗糖(sucrose)、葡萄糖(glucose)、聚葡萄糖(dextran)以及其他類似化合物。

選定的脂肪陽離子溶解在非極性有機溶劑中，而非極性有機溶劑必須和前述可溶解聚核苷酸的第一種溶劑不互溶才行。非極性有機溶劑，例如包括氯仿、四氯化碳、三氯乙烯、三氯乙烷、苯、己烷、戊烷、甲苯以及其他類似非極性有機溶劑。

溶解的聚核苷酸和脂肪陽離子是靠第三種溶劑來互相接近的，而第三種溶劑可讓原本為兩相的第一種和第二種溶劑互溶成為單相(第 1 圖之試管#2)。第三種溶劑可為醇類(alcohol)化合物如甲醇、乙醇，酮類(ketone)化合物如丙酮或醚類(ether)化合物。可為第三種溶劑者，即有能力讓第一種溶劑以及第二種非極性有機溶劑互溶成一單相系統者，可以經由測試溶解度的實驗來決定之。

請繼續參照第 1 圖，這單相系統先靜置一段時間，然後加入一定量的第一種和/或第二種溶劑，促使此系統再回復至兩相的狀態。密度較小的溶劑，可利用抽氣或傾析的方式移除。這對分析聚核苷酸在水性以及非極性有機溶劑中的分配溶解度非常有用，如此可以得知整個過程的萃取效率如何，並得知脂肪微粒包埋聚核苷酸的包埋效率高低。

在製造聚核苷酸-脂肪陽離子的微粒時，可以選擇聚

核苷酸以及脂肪陽離子的用量各多少，來形成一種電中性的聚核苷酸-脂肪陽離子微粒或帶電荷的微粒。正如同下面要討論的，網狀內皮系統對脂肪微粒的吸收量會受到脂肪陽離子和聚核苷酸陰離子彼此之間電荷作用程度的影響。

如第 1 圖之試管#4，加入可形成液泡之電中性脂肪分子至含有聚核苷酸-脂肪陽離子的有機相中。再加入一定量的去離子溶劑，利用搖晃(vortex)或超音波震盪的方式將這系統做充分的混合。接著利用旋轉抽氣(rotary evaporation)裝置將有機相蒸發掉(第 1 圖的試管#5)。有機相經過充分的蒸發後，整個系統又再回復至水相系統，並再形成具有由脂肪陽離子以及電中性脂肪分子所組成的雙層脂肪膜之脂肪微粒，其中空核心包埋有聚核苷酸。電中性脂肪分子主要是位於雙層脂肪膜的外側，而脂肪陽離子主要是位於雙層脂肪膜的內側靠中心位置。至於聚核苷酸則主要位於中空核心處，定域於雙層脂肪膜的內表面。

聚核苷酸-脂肪陽離子複合物中所包埋的聚核苷酸是用 18 ~ 21 個核苷所組成的反意識寡核苷酸來合成的。第一個例子敘述由 18 個核苷所組成的寡核苷酸和 DOTAP 脂肪陽離子作用形成複合物的製備方法。在本研究中，測量了能平衡寡核苷酸所帶的負電荷量之 DOTAP 所需的量。如第一例所示，固定量的寡核苷酸，包括將微量的 ^{125}I -寡核苷酸一起溶解在去離子溶劑(去離子水)中，再和溶解在氯仿中不同量的 DOTAP 混合在一起。然後將足以形成單

相之足夠量的甲醇加進來。經過一段時間的靜置，加入水和氯仿破壞單相溶劑系統，再回至雙相溶劑系統。

水相和有機相所含的聚核苷酸之量，是由 ^{125}I -寡核苷酸來定量的。第 2 圖繪示出聚核苷酸在有機層(三角形符號/虛線標示者)、水層(十字形符號/實線標示者)中含量隨著脂肪陽離子濃度而變化的情形。如圖所示，在較低的脂肪陽離子濃度情況下，大部份的寡核苷酸仍然停留在去離子的水相中。當脂肪陽離子濃度慢慢增加的情況下，越來越多的寡核苷酸重新被萃取到有機相中，而且在 80 nmol DOTAP 的情況下，基本上所有的寡核苷酸已經被萃取到有機相中了。在這一點，寡核苷酸和脂肪陽離子的莫耳數比為 1：50，正/負電荷比為 3：1。

其他支持本發明之研究顯示溶劑效應對形成聚核苷酸-脂肪陽離子微粒的萃取程序有相當之影響。在這些研究當中，例一的萃取程序是用溶有離子的水溶液，Hepes 緩衝溶液(25 mM Hepes, 140 mM NaCl, pH 7.4)。當水溶液中含有離子時，或許是因為靜電遮蔽(charge shielding)效應的影響，寡核苷酸將不會被萃取到有機相中。在其他研究中，則是用 10 % 的蔗糖水溶液來萃取寡核苷酸，得到如第 2 圖的結果。

以上所敘述的由 18 個核苷所組成的寡核苷酸和 DOTAP 脂肪陽離子所組成的脂肪微粒之合成步驟，能使用在任何聚核苷酸以及脂肪陽離子的組合上。可作為範例的聚核苷酸包括 DNA、RNA 以及它們的一些片段或同類的

核苷酸分子；而最多可由 100 個核苷所組成的寡核苷酸，包括含有可抗核酸分解酵素之經化學鍵結修飾後的衍生物，例如 phosphorothioate 和 methylphosphonate。

在實施例中，聚核苷酸，例如 DNA，可用帶有多個正電荷之陽離子凝聚劑和脂肪陽離子來一起使其凝聚起來，或用陽離子凝聚劑取代脂肪陽離子，也可使聚核苷酸分子凝聚在一起。可用的多電荷陽離子凝聚劑例如包括 spermine、spermidine、histones、poly-lysine 以及 protamine sulfate，可使聚核苷酸凝聚在一起，以利本發明之脂肪微粒包埋聚核苷酸。

脂肪陽離子在此被用來形成帶有淨正電荷的液泡，其所帶正電荷可為單一的或多重的。如同在此所定義的「可形成陽離子液泡之脂肪」是包括任何兩性脂肪(amphipathic lipid)分子。這類脂肪分子，例如磷脂類分子，具有疏水性的尾巴以及極性官能基的頭，在水中會自動形成雙層膜的液泡。通常這類脂肪分子具有雙醯基(diacyl)的長碳鍊，像磷脂類分子的醯基長碳鍊之碳數多為 14 ~ 22，而且具有數目不等之未飽和的碳碳雙鍵。

典型的可形成液泡之脂肪分子包括磷脂類，例如磷脂醯乙醇胺(phosphatidylethanolamine)。其衍生物分子的極性官能基頭(polar head)的部份帶有正電荷，例如離氨酸(lysine)。例子有 DOPE 脂肪陽離子的衍生物，具有 L-離氨酸(LYS-DOPE)的官能基(Guo, L., *et al.*, *Journal of Liposome Research* 3(1):51-70(1993))。這類可形成液泡之脂肪分子也

包括醯脂類分子，這類分子也具有帶正電的頭部官能基。另一類可形成液泡之脂肪分子為膽固醇胺類(cholesterol amine)的分子以及其他相關之帶正電荷的固醇類分子。

其他例子還包括脂肪陽離子可包括 1,2-雙油醯氧基-3-(三甲基胺)丙烷(DOTAP)；氮-[1-(2,3-雙十四烷氧基)丙基]-氮,氮-雙甲基-氮-氫氧乙基溴化鉍(DMRIE)；氮-[1-(2,3-雙油醯氧基)丙基]-氮,氮,雙甲基-氮-氫氧乙基溴化鉍(DORIE)；氮-[1-(2,3-雙油醯氧基)丙基]-氮,氮,氮-三甲基氯化鉍(DOTMA)；3 β (氮-[氮',氮'-雙甲基胺乙烷)羰基]膽固醇(DC-Chol)；或雙甲基雙十八烷基溴化鉍(DDAB)。

以上這些脂肪分子可以用購買或根據文獻來合成而取得。

有各種電中性脂肪分子可應用於本發明上。可形成液泡的電中性脂肪分子本身不帶任何淨電荷，這類分子包括磷脂類分子，如 phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, phosphatidylinositol 和 sphingomyelin。具有負電荷的脂肪分子亦可考慮單獨使用，或和電中性脂肪分子合併使用。帶負電荷的脂肪分子例如包括 phosphatidylserine, phosphatidylglycine 和 phosphatic acid。另外還有其他的脂肪分子亦可加以考慮，例如膽固醇以及一些其他的電中性固醇類分子，可和不同類的電中性或帶負電荷之可形成液泡的脂肪分子合併使用。

例二為例一用萃取步驟形成寡核苷酸-脂肪陽離子微粒的後續步驟。脂肪陽離子-寡核苷酸微粒是用 DOTAP 脂

肪陽離子和 21 個核苷所組成的寡核苷酸所製備出來的。其組成爲溶解 50 μg 的寡核苷酸於去離子的水溶液中以及 0.5 μmoles DOTAP 在非極性有機相中。將寡核苷酸自水相中萃取至有機相中，形成寡核苷酸-脂肪陽離子微粒。

將一定量之比例爲 2：1 的 phosphatidylcholine (碘數值 40) 和膽固醇加入寡核苷酸-脂肪陽離子微粒中。加入少量的去離子水，將這混合物用超音波震盪來達成乳化(emulsify)之目的，然後再將有機相蒸發掉。此時，只要這系統一回到水相系統中，就會立刻形成脂肪微粒。如上所述，被包埋的寡核苷酸多數都位於脂肪微粒中空核心之內表面上，主要是因爲脂肪陽離子和寡核苷酸之間的靜電作用力之故。電中性脂肪分子包在微粒的脂肪陽離子膜的外面，形成一雙層膜的結構。

例二中之包埋有寡核苷酸的脂肪微粒是由動態光散射(dynamic light scattering)以及 metrizamide 密度梯度管柱(density gradient column)來鑑定寡核苷酸被包埋的效率到底如何。如例三所述，脂肪微粒的懸浮液將會置入 metrizamide 密度梯度管柱內來分離包埋有寡核苷酸的脂肪微粒以及未被包埋的寡核苷酸。未被包埋的寡核苷酸會平衡在管柱較低位置的密度較大部份，即 20 % metrizamide 的部份。而脂肪微粒則會平衡在密度較小的部份。當脂肪微粒樣品放在管柱內之後，將會對此管柱進行離心的步驟。離心之後，脂肪微粒會平衡在 10 % metrizamide/水的界面上，而脂肪則成一模糊帶停留在 10 % / 20 % metrizamide 的界面上。

收集在 10 % metrizamide/水界面間的脂肪，計數 γ 射線的光子數，以此來分析磷酸根的含量。

表一

Phosphatidylcholine e (μ mole)	尺寸* (nm)	包埋效率* (%)	聚核苷酸 / 磷脂 比例* (nmol/ μ mol)
0.5	360 $\pm$ 60	72 $\pm$ 10	7.9 $\pm$ 2.1
1.0	530 $\pm$ 170	74 $\pm$ 4	5.4 $\pm$ 0.4
2.0	510 $\pm$ 200	73 $\pm$ 10	3.4 $\pm$ 0.5

*三組實驗之平均值 $\pm$ 標準誤差

由表一可知三組的脂肪微粒組成包含有不同量的 phosphatidylcholine。包埋效率是以被脂肪微粒包埋的核苷酸的放射線計數除以整隻層析管柱的放射線總計數而得的。所得的包埋效率約 73 %，遠比以前的實驗結果要改善許多。

由表一的脂肪微粒尺寸是由動力光散射方法所測量的。脂肪微粒的平均直徑大小為 360 ~ 530 nm，比活體服用的較佳尺寸(小於 300 nm)要大一些。而脂肪微粒的大小可藉由用孔洞大小為 100 nm 或堆疊的 200 nm 過濾器來過濾(extrude)達到。這些過濾器(extrusion)顯示在縮減脂肪微粒的大小之後仍可保持其原有的完整性，寡核苷酸依然在

脂肪微粒中空核心部份。這實驗也顯示出脂肪微粒若具有約 2 μmole 的中性脂肪，可以增加脂肪微粒在過濾過程的穩定性。

在本發明的一個實施例中，脂肪微粒包括一被親水性高分子長鍊包覆的表面，以有效地延長脂肪微粒在血液循環中存活的時間。適用的親水性高分子包括聚乙烯甘醇(PEG)， polylactic acid， polyglycolic acid， polyvinylpyrrolidone， polymethyloxazoline， polyethyloxazoline， polyhydroxypropyl methacrylamide， polymethacrylamide， polydimethylacrylamide， 以及纖維素(cellulose)的衍生物，例如 hydroxymethyl cellulose 或 hydroxyethyl cellulose。較佳的親水性高分子長鍊是 PEG，尤其是分子量介於 500 ~ 10,000 道爾吞(dalton)之間的 PEG 長鍊，較佳為分子量介於 1,000 ~ 5,000 道爾吞(dalton)之間的 PEG 長鍊。

除了用中性脂肪分子來包覆脂肪陽離子/寡核苷酸所形成的微粒以外，在本發明其中的一個實施例當中，還將中性脂肪的親水性高分子衍生物加入前述的中性脂肪分子內，一起包覆在脂肪陽離子/寡核苷酸微粒的外面。通常中性脂肪的親水性高分子衍生物，約佔組成的 1 ~ 20 莫耳百分比(mole percent)之間。製備這些脂肪分子以及形成具有高分子外衣的脂肪微粒之方法，已經在美國專利 5,013,556、5,631,018 和 5,395,619 上發表過了，上面還有進一步的參考文獻。這些高分子可以和脂肪分子穩定的結合在一起；或經由不穩定的鍵結連結在一起，使得包有高

分子外衣的微粒在血液循環系統中流動時，會釋放出它們的外衣高分子。

有如此的包覆外衣和中空核心包埋有聚核苷酸之脂肪微粒，是由 distearyl phosphatidylethanolamine (DSPE) 的 methoxy polyethylene glycol (mPEG) 衍生物所合成的。如同例三所述形成寡核苷酸-脂肪陽離子微粒，以及利用加入 2 : 1 : 0.1 莫耳比例的 phosphatidylcholine，膽固醇和 DSPE 來共同形成的脂肪微粒，經過 polycarbonate 的過濾器，使其直徑降至 200 nm 以下。其中 DSPE 的極性頭部官能基具有共價鍵連結的 mPEG (簡稱 mPEG-DSPE)。

如例三所述，具有 PEG 外衣的脂肪微粒對於寡核苷酸的包埋效率是由將脂肪微粒和未被包埋的寡核苷酸放入 metrizamide 梯度管柱中分離過後所決定的。脂肪微粒懸浮液的分離結果曲線在第 3 圖上，在梯度管柱上不同部位所佔總數的百分比是以不同管柱部份數之函數來表示的。如圖所示，幾乎所有的脂肪都位移至 10 % metrizamide/去離子水的界面間，除了非常少量的是在前面兩個部份以外，所有的寡核苷酸是和脂肪一起移動的。表二將兩個分離的結果作一整理。

表二

中性脂肪加入量 (μmoles)	尺寸(nm)	包埋效率 (%)	寡核苷酸 / 磷 脂 比例* (nmol/ μmol)
3	174	86	2.1
3	176	91	2.2

*以起始的寡核苷酸：磷脂比例為基礎，再校正未和脂肪在一起的寡核苷酸量所做的計算。

表二的資料顯示脂肪微粒的大小約 175 nm，非常適合活體服用。包埋效率大約在 90 %，文獻中曾經報導過以其他的脂肪微粒製備方式可大幅增進約 10 % 的包埋效率 (Ropert, *et al.*, 1993)。寡核苷酸比上磷脂的比例約 2 nmol/ μmol 左右。

在本發明其他的實施例中，脂肪微粒包含配體分子或具親和力分子使其可以結合在特定的組織區域或細胞上。像這樣具特定組織或細胞親和力的分子可附著在脂肪微粒表面或接在親水性高分子的末端上。典型可作為範例的此類分子包括抗體 (antibodies)，可和目標細胞表面受體 (receptors) 進行結合的配體分子 (ligands) 以及其他類似的分子，在共同擁有的 PCT 應用的 WO US94/03103 有詳細敘述。

A. 脂肪微粒的穩定性

在 25 % 的胎兒牛血清蛋白(fetal bovine serum, FBS)之脂肪微粒穩定性是由將包埋有寡核苷酸的脂肪微粒放在血清中，隨著時間過去來測量脂肪微粒大小的變化。

在本研究中，脂肪微粒的製造方法是依據本發明前面所述的方法，而所用的寡核苷酸具有 21 個核苷，脂肪陽離子為 DOTAP，中性脂肪含有 5 mol % mPEG-DSPE、2 μ mol phosphatidylcholine 和 1.25 μ mol 膽固醇(PC : Chol : mPEG-DSPE = 2 : 1 : 0.1)。

根據上述組成製備了兩種脂肪微粒懸浮液。第一種脂肪微粒懸浮液，是用去離子水來形成帶正電的脂肪-寡核苷酸微粒，以及作為溶劑蒸發後之再水合媒介物(medium)。第二種脂肪微粒懸浮液，則是用 5 % 的蔗糖溶液來取代去離子水。

請看表三，用去離子水製造的脂肪微粒大小，在過濾後約 174 nm；用 5 % 的蔗糖溶液製造的，在過濾後約 172 nm。

每個脂肪微粒懸浮液的樣品都會放在緩衝液裡(25 mM Hepes, 140 mM NaCl, pH 7.4)，然後再測量一次脂肪微粒的大小，如表三的數據，兩種脂肪微粒的大小在緩衝液中都有減小的現象，用水製造的其尺寸約 156 nm，用 5 % 的蔗糖溶液製造的約 157 nm。

每種脂肪微粒懸浮液的樣品一放在 25 % 的胎兒牛血清蛋白中，就立刻測量其大小為多少。然後將血清懸浮液

放置在 37 °C 下，每隔 24 小時再測量一次脂肪微粒的大小。如表三所示，脂肪微粒在兩種懸浮液中，經過內外滲透壓的平衡之後，都會有一些尺寸大小的改變。重要的是，都沒有觀察到脂肪微粒聚集成團的情況發生，指示脂肪微粒在進入活體內之後仍可保持穩定的狀態。

表三

試管 編號	中性脂 肪 (μ mole)	水相	過濾後 的 大小 (nm)	在 Hepes 7.4 的 大小 (nm)	在 25 % FBS 中的大 小(nm)		
					0 小時	24 小 時	48 小 時
1	2	去離 子水	174	156	171	160	165
2	2	5 % 蔗糖	172	157	226	166	198

二、脂肪微粒在活體內的鑑定

根據本發明所合成的脂肪微粒包括和 *MDRI* 基因互補的 18 單體之 phosphorothioate 寡核苷酸。用在活體內實驗的脂肪微粒，其表面有 DSPE 的 mPEG 親水性高分子長鍊的衍生物，mPEG-DSPE，如例 5B 所述。爲了比較電中性脂肪微粒，亦用習知的方法製備了脂肪薄膜，再用溶有寡

核苷酸的水溶液來加以水合之，如例 5A 所述。

第 4A ~ 4B 圖係動物實驗中將帶正電荷(第 4A 圖)以及電中性(第 4B 圖)的脂肪微粒做分級分離(fractionation)後的結果。分析圖形是由自由的寡核苷酸以及和脂肪在一起的寡核苷酸在 Sepharose CL-4B 層析管柱中做分離之後，再取樣得來的(例 5B)。如第 4A 圖所示在第 5 ~ 12 部份只有一根訊號，表示實際上 100 % 的核苷酸是和脂肪在一起的。相反的，如第 4B 圖所示，只有 20 % 的寡核苷酸是和中性脂肪微粒在一起。

脂肪微粒的大小是由動力光散射方法來測量的。慣例上，脂肪微粒的平均半徑約 197 ± 2 nm (聚合度分佈性 (polydispersity) 為 0.032 ± 0.012)，而本發明帶正電荷之脂肪微粒之平均直徑大小約 188 ± 1 nm (聚合度分佈性為 0.138 ± 0.018)。

兩種脂肪微粒組成都依據例 6 的步驟讓老鼠服用。自由的寡核苷酸也讓一群實驗動物服用。這些組成是用靜脈注射的方式，經由尾部血管將 $0.5 \mu\text{mol}$ 劑量的脂肪 (phosphatidylcholine) 一次注入體內。然後在特定的時間點、在每組實驗老鼠中各挑三隻出來犧牲，取出牠們的器官以及血液樣品來分析寡核苷酸的含量。

第 5 圖顯示老鼠血液中自由寡核苷酸(空心圓)和被脂肪微粒包埋的寡核苷酸的存活量變化圖，依據本發明所合成的脂肪微粒是以十字形來表示，至於對照組的電中性脂肪微粒是由實心三角形來表示。如圖所示，自由的 ^{125}I -標

記之寡核苷酸，具有起始(initial)的快速分佈相，而且在進入活體內兩小時之後，已有 50 % 的注入劑量消失(elimination)了。

相反的，被脂肪微粒包埋的寡核苷酸則顯示在血液中有相當不同的藥物動力學曲線。被電中性脂肪微粒包埋的寡核苷酸(實心三角形)在注射立即過後，具有較短的消失起始相，這一部份約佔注入劑量的 10 %。剩下的 90 % 注入劑量之消失速率較慢，所以在注射過後 24 小時，仍有 20 % 留在血液中。

被帶正電荷之脂肪微粒包埋的 ^{125}I -標記寡核苷酸也表現出類似的圖形。然而，起始快速消失相消耗掉約 30 % 的注射劑量。注射 24 小時之後，還留有 10 % 的注射劑量在血液中。

表四提供每次處置所計算出來的藥物動力學參數。停留時間(residence time)是指相當於有 66 % 的注入劑量自血液中消失所需要的時間，而本發明的脂肪微粒組成對停留時間有重大的改善。對於被包埋在本發明的脂肪微粒內之寡核苷酸曲線下的面積(area under curve, AUC)也同樣的比自由寡核苷酸的要大許多。而被包埋在本發明的脂肪微粒內之寡核苷酸曲線下的面積比被包埋在電中性脂肪微粒的也要大是因為其所服用的劑量較多之故(52.4 μg versus 6.5 μg)。如以上所討論的，進入體內的劑量主要是以脂肪量為基準，而不是以寡核苷酸為基準來計算的。因為當脂肪微粒的內含物漏出來的速率很慢的話，脂肪劑量對於脂肪

微粒的藥物動力學會有重大的效應(Allen, T. M. *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* 1068 : 133-141(1991))。寡核苷酸被包埋在帶正電荷脂肪微粒內的量要比電中性脂肪微粒內的大多了，因為帶正電荷脂肪微粒的包埋效率較高(第 4A、4B 圖)，也因此隨著帶正電荷脂肪微粒每單位磷脂所附帶注入的寡核苷酸量也就較多，導致較大的 AUC。當將數據標準化成 30 μg 寡核苷酸/老鼠時(假設藥物動力學是線性的)，被包埋在電中性脂肪微粒的寡核苷酸之 AUC(199.9)則大於被包埋在正電荷脂肪微粒的(128.1)以及自由的寡核苷酸之 AUC(10.4)。本發明改善正電荷脂肪微粒對於寡核苷酸之包埋效率，使得可以服入比用傳統的電中性脂肪微粒還要少的脂肪劑量即可達到給定的寡核苷酸之劑量，這是十分值得重視的。

請繼續參照表四，自由寡核苷酸的快速消失速率可由消失速率常數(eliminate rate constant, k)看出來，其 k 值約接近為用脂肪微粒的 4 倍大。兩種脂肪微粒處理的寡核苷酸之分佈體積(V_D)和所用的實驗動物的血液體積差不多一樣，但是對於自由寡核苷酸的 V_D 確是實驗動物血液體積的 5 倍大，顯示其是廣泛的分佈在組織中。

消失的起始相($T_{1/2\alpha}$)和剩下劑量的消失($T_{1/2\beta}$)之血液循環半生期($T_{1/2}$)也列在表四上。

表四

不同組成的寡核苷酸經計算所得的藥物動力學參數

實驗群	停留時間 (hrs)	AUC (μg hr/ml)	V_D (ml)	k (hr^{-1})	$T_{1/2\alpha}$ (hrs)	$T_{1/2\beta}$ (hrs)
電中性脂肪微粒 (6.5 μg)	17.6	43.4	1.96	0.08	0.39	12.4
正電荷脂肪微粒 (52.4 μg)	15.0	226.9	2.39	0.10	0.26	10.6
自由脂肪微粒(30 μg)	4.7	5.7	13.77	0.38	0.26	3.5

第 6A ~ 6C 圖係繪示在靜脈注射後動物體內寡核苷酸的分佈情況，第 6A 圖為自由聚核苷酸的分佈情況，第 6B 圖為被包埋在電中性脂肪微粒內之聚核苷酸的分佈情況，第 6C 圖為被包埋在依本發明的陽離子脂肪微粒內之聚核苷酸的分佈情況。

第 6A 圖顯示出在注射 15 分鐘過後，血液中就只剩有微量的自由寡核苷酸。動物體內自由寡核苷酸含量最多的部份是分佈在整個屍體中所有未解剖的組織當中，肝和腎也偵測到多量的放射線劑量。

第 6B 圖顯示所有定點時間所取得的資料，被包埋在

電中性脂肪微粒內之寡核苷酸含量最多的部份是分佈在血液中。血液中的含量幾乎和注射劑量相等，尤其是早期的時間取樣點。在肝臟和脾臟的部份，寡核苷酸含量在整個取樣的時間點上，幾乎維持一個定值。然而屍體部份的含量，在較晚的取樣點上，卻有上升的趨勢，這和自由寡核苷酸是由脂肪微粒所釋放出來的結果一致，也有可能是自脂肪微粒所釋放出來的寡核苷酸在組織中慢慢累積的結果。

第 6C 圖顯示被包埋在陽離子脂肪微粒內之聚核苷酸主要還是分佈在血液中。屍體中的含量還是隨時間上升，這和在組織中自由寡核苷酸的消失或慢慢在組織中累積寡核苷酸-脂肪微粒的結果互相一致。

在其他的研究中，研究了寡核苷酸/脂肪陽離子比例對網狀內皮系統吸收脂肪微粒效果的影響。脂肪微粒係利用本發明的方法(例 5B)來製備之，所用的寡核苷酸：脂肪陽離子(DOTAP)的比例分別為 0 (沒有寡核苷酸)、44.4 $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$ (+/-比例為 2.6 : 1) 和 104.8 $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$ (+/-比例為 1.1 : 1)。在不含寡核苷酸的脂肪微粒是在有 ^{125}I -標記 tyraminylinulin 的情況下進行水合步驟，如同 Sommerman 論文中所記述的 (Sommerman E. F., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 122 : 319-324(1984))。然後這些脂肪微粒組成經由靜脈注射至老鼠體內中，即在服用 ^{125}I -標記 tyraminylinulin 或 ^{125}I -標記寡核苷酸的 15 分鐘過後，對肝臟和脾臟進行分析。

結果在第 7 圖上，網狀內皮系統的殘餘量係以寡核苷

酸/脂肪陽離子比例的函數來表示。對於不含寡核苷酸的樣品，在注射 15 分鐘後約 50 % 的劑量都分佈至肝臟和脾臟了。當寡核苷酸：脂肪陽離子的比例為 $44.4 \mu\text{g}/\mu\text{mol}$ 時，約 40 % 的劑量分佈在肝臟和脾臟上。當寡核苷酸：脂肪陽離子的比例為 $104.8 \mu\text{g}/\mu\text{mol}$ 時，約 30 % 的劑量在注射 15 分鐘後分佈在肝臟和脾臟上。注射樣品為 $104.8 \mu\text{g}/\mu\text{mol}$ 的吸收力顯然和 $44.4 \mu\text{g}/\mu\text{mol}$ 以及 $0 \mu\text{g}/\mu\text{mol}$ 的不太相同 ($p < 0.05$)。

三、進入活體內的方法

在另一方面，本發明包括讓聚核苷酸進入活體內的方法。如上所述，聚核苷酸被包埋在陽離子脂肪微粒內，而進入活體內需要特定的方法。

被包埋在脂肪陽離子微粒內的聚核苷酸可以選自各種的 DNA、RNA 為基礎的聚核苷酸，包含 DNA、RNA 的片段或類似分子。在其中一個實施例中，聚核苷酸為一種抗意識 DNA 寡核苷酸，其鹼基順序和其目標為互補關係，目標通常為信息 RNA (mRNA) 或 mRNA 的前驅物。若 mRNA 帶有和抗意識寡核苷酸的功能、意義 (sense)、方向 (orientation) 以及結合等基因序列為互補的基因序列，將會被去活化以及被抑制轉譯成蛋白質。這類的抗意識分子是藉由生化實驗所找出來的，先找出某特定蛋白質是由何種 mRNA 轉譯而來，一旦知道此 mRNA 的順序，抗意識分子就可藉由 Watson-Crick 的鹼基配對和此 mRNA 互相結合在

一起。如此的抗意識分子通常含有 10-30 鹼基對，較佳為 10-25 之間，最好為 15-20 之間。

在本發明其中一個實施例中，對抗意識寡核苷酸做了一些修飾，以提高對核酸分解酵素對其水解作用的抵抗力。這一類的衍生物包括 phosphorothioate，methyl-phosphonate，phosphodiester 以及 p-ethoxy 寡核苷酸(WO 97/07784，1997 年 3 月 6 日出版)。

本發明之組成想要用在各式各樣的治療當中，包括但不受限於有關各種病毒感染(viral)的、致命的和發炎的疾病以及狀況，例如膀胱纖維化(cystic fibrosis)、腺嘌呤(adenosine)脫氨酵素缺乏症以及 AIDS。癌症的治療可服用抑制腫瘤基因表現的基因，例如 APC、DPC4、NF-1、NF-2、MTS1、RB、p53、WT1、BRCA1、BRCA2、VHL 或服入致癌基因(oncogene)，例如 PDGF、erb-B、erb-B2、RET、ras(包括 Ki-ras、N-ras)、c-myc、N-myc、L-myc、Bcl-1、Bcl-2 以及 MDM2 等皆可考慮。

也可考慮服用下列核酸以治療下列疾病，例如 HLA-B7 可治療惡性腫瘤(tumors)、結腸直腸腫瘤(colorectal carcinoma)、黑腫瘤(melanoma)；IL-2 可治療癌症，尤其是乳癌、肺癌、惡性腫瘤；IL-4 可治療癌症；TNF 可治療癌症；IGF-1 抗意識核苷酸可治療腦瘤；IFN 可治療交感神經母細胞瘤(neuroblastoma)；GM-CSF 可治療腎細胞瘤；MDR-1 可治療癌症，尤其是癌症末期、乳癌、卵巢癌；以及 HSV 胸腺嘧啶激酶(thymidine kinase)可治療腦瘤、頭部

以及頸部的惡性腫瘤、間皮瘤(mesothelioma)和卵巢癌。

本發明之組成對於自活體移出細胞，經基因治療該細胞後，再移植至活體內(*ex vivo*)的程序也有相當的應用性。

脂肪微粒通常是以懸浮液的形式，由非口服方式進入體內，較佳為靜脈注射的方式。其他適宜讓其進入體內的方式包括皮下的、肌肉內的、內傷的(interlesional；至惡性腫瘤)、由內呼吸管吸入(intertracheal by inhalation)、局部的(topical)、鼻內的(internasal)、眼內的(intraocular)、經由注射進入器官或靜脈內。

從前述內容可知為何本發明可達成各式各樣的特徵以及目標。本發明提供了內部包埋有聚核苷酸的脂肪微粒組成，藉由本製備方法，聚核苷酸主要位於脂肪微粒由脂肪陽離子所組成薄膜所圍成的中空核心部份之內表面上。最外一層是由電中性脂肪分子所組成的，藉此來穩定整個脂肪微粒的結構。

在本實施例中，脂肪微粒的薄膜包含親水性高分子鍊，使得脂肪微粒在血液循環中的生命期延長而且不易被網狀內皮系統所吸收。

另外本製備方法大幅提高了聚核苷酸的包埋效率，至少 80 % 的聚核苷酸都被包埋在脂肪微粒內。如前面研究所述，當正負電荷數比為 1：1 的脂肪陽離子：寡核苷酸時，約 95 % 的寡核苷酸自水相中被萃取至有機相中。接下來加入中性脂肪以及形成脂肪微粒後，寡核苷酸仍然和脂肪在一起(如第 4A 圖提供的證據)。

若需要的話，脂肪微粒的大小可以用過濾的方式來減少它的大小，使其更適於進入活體。通常脂肪微粒的大小最好少於 300 nm，較佳是介於 50-300 nm，尤其是在 100-200 nm 之間的。脂肪微粒的穩定性可由將其放入胎兒牛血清當中沒有聚集成團的現象、其大小沒有大改變以及活體內很低的肺臟和網狀內皮系統的吸收量來得知。

四、範例

下列的範例描述了依據本發明的脂肪微粒組成以及製備方法。這些範例並非用於限定本發明之範圍。

例一：形成聚核苷酸-脂肪陽離子微粒

A. 製備 ^{125}I -標記的寡核苷酸

^{125}I -標記的寡核苷酸是由下列方法合成的：1 ml 的錐型小瓶子用約 200 μg 的 Iodogen(Pierce, Rockford, IL)附著在其瓶壁，然後加入 500 μg 的寡核苷酸和 2400 pmol 的 ^{125}I (185 Mbq)，再加入 pH 4.0、300 μL 的 0.35 M 醋酸鈉，使整個總體積為 400 μL (Piatyszek, M.A., *Ana. Biochem.* 172: 356-359(1988))。整個混合物放置在 40 $^{\circ}\text{C}$ 下攪拌 1 小時。接下來倒出混合物，通入 Sephadex G-25 的層析管柱中以將自由的 ^{125}I 去除之。為了去除自由的 ^{125}I ，樣品先在 0.3 M 的醋酸鈉和 2.5 體積的 95%酒精中沈澱。將溶有自由的碘之上清液倒掉，再將已有標記的寡核苷酸行水合作用，以及在 Sephadex G-25 的層析管柱(Pharmacia, 瑞典)

中和二次蒸餾水互相平衡來進行去鹽步驟。結果用 PEI-纖維素薄片層析(J. T. Baker, Inc., Philipsburg, NJ)來分析自由 ^{125}I 的含量，結果小於 5 %。

B. 微粒的萃取和製備方法

7 個小瓶裝有 10 μg 摻有微量 ^{125}I -標記的寡核苷酸，寡核苷酸在 0.25 mL 蒸餾水中，而且是由 18 核苷所組成的。

脂肪陽離子 DOTAP (Avanti polar Lipids, Alabaster, Alabama)溶解在氯仿當中，濃度約在 1.8 ~ 1880 nmol/mL 之間。

將 0.25 mL 的脂肪陽離子的氯仿溶液和 0.51 mL 的甲醇加入每一小瓶內的寡核苷酸，經劇烈旋轉過後變成單相系統。

在室溫靜置 30 分鐘過後，0.25 mL 去離子水和 0.25 mL 的氯仿加入至每一小瓶中以破壞單相系統，形成一雙相系統。將小瓶內的東西混合一下並在 800 g 的離心力下離心 7 分鐘。吸出水-甲醇那一層放入另一個小瓶中，然後用 γ 計數器測量兩相中各含多少的寡核苷酸，結果在第 1 圖上。

例二：製備脂肪微粒

寡核苷酸-脂肪陽離子微粒是用例一的方式來製備的，將 50 μg 的具 21 核苷的寡核苷酸溶解在去離子水中。0.5 μmol 的 DOTAP 溶解在氯仿中，然後依據例一的方法將寡核苷酸萃取至氯仿中。

萃取之後，phosphatidylcholine (PC，碘數值 40)和膽固醇依 2：1 的比例(PC：chol)加入內有寡核苷酸-脂肪陽離子微粒的氯仿有機相中。通常 PC 的用量為 0.5 μmol 、1.0 μmol 或 2.0 μmol 。在加入中性脂肪之後，加入 0.2 mL 的去離子水，然後整個混合液用超音波進行震盪來進行乳化作用。接著有機相以減壓抽氣的方式在 500-700 mmHg 的真空度下蒸發掉。當整個系統重返回水相時，立刻就形成脂肪微粒。脂肪微粒的直徑大小通常介於 200-400 nm。

例三：聚核苷酸的包埋效率

依據例二的方法製備脂肪微粒懸浮液，然後加入微量的 ^{125}I -標記的寡核苷酸(製備方法在例一)。不同寡核苷酸-磷脂比例的包埋效率之決定方法在下面說明。

先將未被包埋的由 21 核苷所組成的寡核苷酸和被脂肪微粒包埋的寡核苷酸用 metrizamide 密度梯度管柱來進行分離，再分別用 γ 計數器來計算兩邊各有多少核苷酸。包埋效率是以被脂肪微粒包埋的寡核苷酸之量除以寡核苷酸之總量所計算出來的。

用 metrizamide 密度梯度管柱來進行分析的方法如下所述。在容量 12 mL 的離心管內依序放入 1.5 mL 的 20 % metrizamide、8 mL 的 10 % metrizamide 以及 2 mL 的去離子水，來設置 20 % metrizamid / 10 % metrizamide / 去離子水的梯度。自由寡核苷酸的控制實驗確定 100 % 自由的、不和脂肪在一起的寡核苷酸會停留在 20 % metrizamid 的部

份。

脂肪微粒樣品放入 metrizamid 密度梯度管柱內，然後在 4 °C 下以 240,000 g 的離心力來離心 4 小時。離心過後，可以看見有一個脂肪帶停留在 10 % metrizamide / 去離子水的界面上。然後用吸量管將脂肪吸出，再將溶劑抽氣抽掉，再以 γ 計數器來分析磷酸根的含量。自 0.5、1.0 或 2.0 μmol 的 phosphatidylcholine 所組成的脂肪微粒分析結果列在表一上。

例四：表面覆蓋有聚乙炔甘醇的脂肪微粒

表面覆蓋有聚乙炔甘醇(Polyethelene Glycol, PEG)的脂肪微粒是根據例二的程序製造的，先自去離子水中用含有 0.5 μmol DOTAP 的氯仿萃取出帶有微量 ^{125}I -標記的 50 μg 寡核苷酸。然後加入 3 μmol 的 phosphatidylcholine (PC40)、1.75 μmol 的膽固醇以及 0.175 μmol 的 distearol phosphatidylethanolamine 的 PEG 衍生物(mPEG-DSPE) (PC : Chol : mPEG 的莫耳比例為 2 : 1 : 0.1) 至含有 0.5 μmol 的 DOTAP 和萃取的寡核苷酸之有機相中。微量的 ^3H -Chol 也加入至有機相中。

然後自混合物中將氯仿蒸發掉，再加入 200 μL 的去離子水來增加體積以利後續的過濾。將脂肪微粒的懸浮液通過 400 nm 和 200 nm 的 polycarbonate 過濾器，濾成直徑小於 200 nm 的脂肪微粒。

脂肪微粒懸浮液依例三經過 metrizamid 密度梯度管柱

離心 12 小時後，分成未被包埋的寡核苷酸以及和脂肪在一起的寡核苷酸兩部份。離心後，在離心管的底部挖一個小洞，然後非常小心的將管柱內的東西分成好幾部份，以閃爍計數瓶來收集等滴數體積的樣品。測量 γ 射線(偵測 ^{125}I -寡核苷酸)和 β 射線(偵測 ^3H -Chol)的劑量。第 3 圖是個別的梯度分離曲線，結果整理在表二。

例五：活體內實驗用的脂肪微粒製備方法

A. 製備比較用的電中性脂肪微粒

電中性脂肪微粒包埋有 18 核苷所組成的抗意識寡核苷酸是將脂肪薄膜放入高濃度的寡核苷酸水溶液中水合而來的。部份氫化的黃豆 PC40、膽固醇和 mPEG-DSPE 以 2：1：0.1 的莫耳比例在氯仿中混合在一起。用旋轉蒸發的方式將混合物蒸乾至成薄膜狀，再以過夜抽真空的方式將殘餘的氯仿去除之。室溫下，將濃度 1.7 mM 的寡核苷酸溶液加至脂肪薄膜中，進行水合 6 小時，形成約 300 mM 的磷脂濃度。然後試管中加入等體積的寡核苷酸水溶液，旋轉攪拌一分鐘。接下來。混合溶液用 Hepes 緩衝液(25 mM Hepes, 140 mM NaCl, pH 7.4)稀釋至 75 mM，再用超音波震盪 2 分鐘。在 Hepes 緩衝液的脂肪微粒懸浮液以 Olson 等人的方式，在氮氣下用 200 nm Nuclepore polycarbonate 過濾器過濾之(Olson, F., *Biochim. Biophys. Acta* 557：9-23(1979))。脂肪微粒的大小是用 Brookhaven B190 微粒尺寸儀(particle sizer) (Brookhaven Instrument, Holtsville, NY)

以動力光散射方式來測量的。自由的以及和脂肪在一起的寡核苷酸，是用 Hepes 緩衝液以 Sepharose CL-4B 管柱過濾的方式來彼此分離的。

B. 製備表面覆蓋有 PEG 的陽離子脂肪微粒

1. 製備 ^{32}P -標記的寡核苷酸

互補於 *MDRI* 基因之由 18 核苷所組成的 phosphorothioate 寡核苷酸是由 Calgary 大學的 University Core DNA Services 實驗室(Calgary, AB)所合成的。而 ^{32}P -標記的寡核苷酸的合成方法則按照 Sambrook 等人的一般程序即可 (Sambrook, J. et al.(1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York)。

概要來說，100 ng 的寡核苷酸、50 μCi 的 ^{32}P - γ -ATP (ICN Pharmaceuticals, Inc., Irvine, CA) 和 5 倍濃度的反應緩衝液和 10 單位的 T4 kinase (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) 混合在一起至總體積為 20 μL 。混合液靜置在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下水浴 45 分鐘。靜置之後，加入 80 μL 緩衝液(10 mM Tris, 1 mM EDTA)，然後用苯酚/氯仿/異戊醇(25:24:1) (Fisher Biotech, Fair Lawn, NJ)。最後以 Sephadex G-50 (Pharmacia, 瑞典)自旋(spin)管柱來做分離以去除自由的 ^{32}P - γ -ATP。

2. 製備脂肪微粒

脂肪陽離子 DOTAP (Avanti Polar Lipids, Alabaster,

Alabama)經由 Bligh 和 Dyer 單相來萃取 18 單體的 phosphorothioate 寡核苷酸。最多可用 700 μg (約 0.118 μmol) 的 18 單體寡核苷酸稀釋在 250 μL 的二次蒸餾水中，還加入微量的 ^{125}I - 或 ^{32}P -標記的寡核苷酸。在另一根試管當中，最多可用約 2 μmol 的 DOTAP，加入 250 μL 的氯仿和 510 μL 的甲醇來稀釋之。將二次蒸餾水中的寡核苷酸加至含有 DOTAP 的氯仿/甲醇混合液，再混合成一單相系統。

接下來在室溫靜置 30 分鐘，依序加入 250 μL 的氯仿、250 μL 的二次蒸餾水。然後將試管旋轉混合一下，在 900 g 的離心力下離心 7 分鐘。於是系統變成兩相系，將上面的水層去除之，然後用放射線計數或測量在 260 nm 的 UV 吸收度來得知寡核苷酸的量為多少。當 DOTAP：寡核苷酸的 (+/-)電荷比為 1：1 時，整個程序使 95 % 的寡核苷酸被萃取至有機相中。

接下來，在氯仿中的部份水合黃豆 PC40、膽固醇和 mPEG-DSPE 加入至有機相中，使最後的 PC40：Chol：DOTAP：mPEG-DSPE 莫耳比為 3：2：1：0.2。然後將溶液轉移至玻璃試管內，加入足夠的二次蒸餾水，使得磷脂的濃度介於 20-30 mM 之間。再將此乳化液旋轉混合一下，用超音波震盪約 1 分鐘。接著在 400 mmHg 的真空度下以旋轉減壓的方式將有機溶劑抽走。在有機溶劑抽乾之後，整個系統會形成一膠狀物。讓系統返回至水相，旋轉混合一下，再抽乾一次。整個程序會形成直徑約 600-800 nm 的液泡，最後再依序用 400 nm、200 nm 的 polycarbonate 過濾

器過濾之。

脂肪微粒的大小是用 Brookhaven B190 微粒尺寸儀 (particle sizer) (Brookhaven Instrument, Holtsville, NY) 以動力光散射方式來測量的。電中性脂肪微粒具有 197 ± 2 nm (聚合度分佈性為 0.032 ± 0.012) 的直徑，而帶正電荷之 DOTAP 脂肪微粒之平均直徑大小約 188 ± 1 nm (聚合度分佈性為 0.138 ± 0.018)。這些脂肪微粒的尺寸可以在 4°C 下的緩衝液以及 37°C 下之 25 % 的 FBS 溶液下穩定至少 3 天(資料未在此顯示)。

自由的寡核苷酸以及和脂肪在一起的寡核苷酸是在 Sepharose CL-4B 的層析管柱 (Pharmacia, 瑞典) 內和 Hepes 緩衝液平衡之下來做過濾分離的。分離過後的部份圖形 (fractionation profile) 在第 4A、4B 圖上。

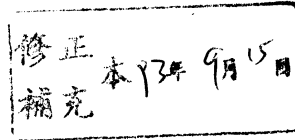
例六：活體服用脂肪微粒

女性的 ICR Ourbread 老鼠 (6-8 週大) 係購自查理士河 (Charles River)，在收到 5 週內而且重量在 24-30 g 左右時使用之。在老鼠的尾部血管注射一針 0.2 mL 的脂肪微粒，相當於每隻老鼠注入 $0.5 \mu\text{mol}$ 的磷脂劑量。每支接受注射的老鼠之放射線計數介於 $0.4 \sim 2 \times 10^5$ cpm 之間。在特定時間點 (0.25、0.5、1、4、12、24 小時) 自每組老鼠中選出三隻來犧牲，然後解剖開來，取出內臟、稱重以及用 Beckman γ 計數器來決定其放射線劑量。將肝臟、脾臟、肺臟、心臟、腎臟、100 μL 的血液以及甲狀腺解剖出來並測量放射

線劑量，其餘的屍體部份也做放射線劑量測量。每個組織以及屍體的放射線計數都以血液校正因子做校正，血液校正因子是之前就先決定好的 (Allen, T. M., U.C.L.A. Symposium on Molecular and Cellular Biology, *in Lopez-berestein, G. and fidler, I., eds.* 89: 405-415, Alan R. Liss, New York)，然後外插血液計數至老鼠總血液體積。

活體服用的結果在第 5、6、7 圖上。

雖然本發明已以一較佳實施例揭露如上，然其並非用以限定本發明，任何熟習此技藝者，在不脫離本發明之精神和範圍內，當可作各種之更動與潤飾，因此本發明之保護範圍當視後附之申請專利範圍所界定者為準。



伍、中文發明摘要：

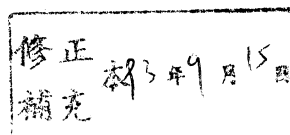
一種包埋有聚核苷酸的脂肪微粒之組成物以及製備方法。在懸浮液中的脂肪微粒主要是由可形成液泡的脂肪陽離子以及電中性脂肪分子所組成的雙層膜所構成的。聚核苷酸是被包埋在脂肪微粒的中空核心部份，主要定域在脂肪微粒中空核心的內表面上。

陸、英文發明摘要：

柒、指定代表圖：

- (一)本案指定代表圖為：第 () 圖。
- (二)本代表圖之元件代表符號簡單說明：

捌、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：



拾、申請專利範圍：

1.一種可用以活體施用一聚核苷酸之脂肪微粒的組成物，，該組成物主要包括有：

一主要由脂肪微粒所組成之水溶性脂肪微粒懸浮液，該脂肪微粒具有一雙層脂肪膜，包括：(i)可形成液泡的脂肪陽離子，該脂肪陽離子主要位於雙層之內層區域並包圍一聚核苷酸；以及(ii)可形成液泡的電中性脂肪分子，該電中性脂肪分子主要位於雙層之外層區域，並形成一圍繞著陽離子-聚核苷酸粒之包覆膜，而該脂肪微粒係將一乳化液中之一有機溶劑移除而形成，該乳化液之組成係由聚核苷酸-脂肪陽離子微粒與電中性可形成液泡脂肪分子溶於一非離子性水溶性溶劑與該有機溶劑而得。

2.如申請專利範圍第 1 項所述之脂肪微粒的組成物，其係用以活體施用一聚核苷酸，其中該聚核苷酸選自於 DNA、RNA 以及 DNA、RNA 的片段和類似者所組成之族群。

3.如申請專利範圍第 1 項所述之脂肪微粒的組成物，其係用以活體施用一聚核苷酸，其中該聚核苷酸是一種反義(Anti-sense)寡核苷酸。

4.如申請專利範圍第 1 項所述之脂肪微粒的組成物，其係用以活體施用一聚核苷酸，其中該脂肪陽離子選自於 1,2-雙油醯氧基-3-(三甲基胺)丙烷；氮-[1-(2,3-雙十四烷氧基)丙基]-氮,氮-雙甲基-氮-氫氧乙基溴化銨；氮-[1-(2,3-雙油醯氧基)丙基]-氮,氮-雙甲基-氮-氫氧乙基溴化銨；氮-[1-

(2,3-雙油醯氧基)丙基]-氮,氮,氮-三甲基氯化銨；3 β -(氮-[氮',氮'-雙甲基胺乙烷)羰胺基]膽固醇與雙甲基雙十八烷基溴化銨所組成之族群當中。

5.如申請專利範圍第 1 項所述之脂肪微粒的組成物，其係用以活體施用一聚核苷酸，其中該電中性脂肪分子包括磷脂。

6.如申請專利範圍第 1 項所述之脂肪微粒的組成物，其係用以活體施用一聚核苷酸，其中該脂肪微粒更包括一中性脂肪分子的親水性高分子衍生物，該親水性高分子使得該脂肪微粒具有一親水性表面。

7.如申請專利範圍第 6 項所述之脂肪微粒的組成物，其係用以活體施用一聚核苷酸，其中該親水性高分子係聚乙二醇。

8.如申請專利範圍第 1 項所述之脂肪微粒的組成物，其係用以活體施用一聚核苷酸，其中該脂肪微粒的大小係介於 50-300 nm。

9.如申請專利範圍第 1 項所述之脂肪微粒的組成物，其係用以活體施用一聚核苷酸，其中該脂肪微粒更包括一配體分子以附著在一選定區域。

10.一種製備申請專利範圍第 1 項脂肪微粒之組成物的方法，其係用以活體施用一聚核苷酸，包括：

(a) 製備複數個聚核苷酸-脂肪陽離子微粒在一有機溶液中；

(b) 在一非離子水溶性溶液存在得情況下，混合該些

微粒和一可形成液泡的電中性脂肪分子以形成一乳化液；以及

(c) 從該乳化液中移除該有機溶劑以形成複數個脂肪微粒，該些微粒具有：

(i) 一該電中性脂肪分子之外包覆層與一該脂肪陽離子之內包覆層，

(ii) 一中空核心具有一內表面，以及

(iii) 該聚核苷酸是被包埋在該中空核心而且主要是定域於該內表面上。

11. 如申請專利範圍第 10 項所述之方法，其中該製備步驟包括製備複數個聚核苷酸-脂肪陽離子微粒，而該些聚核苷酸係選自於 DNA、RNA 以及 DNA、RNA 的片段所組成的族群。

12. 如申請專利範圍第 10 項所述之方法，其中該製備步驟包括製備複數個聚核苷酸-脂肪陽離子微粒，而該些聚核苷酸是一種反義寡核苷酸。

13. 如申請專利範圍第 10 項所述之方法，更包括添加一中性脂肪分子的親水性高分子衍生物的步驟，以形成一親水性高分子鏈之表面包覆層。

14. 如申請專利範圍第 13 項所述之方法，其中該親水性高分子係聚乙烯甘醇。

15. 如申請專利範圍第 10 項所述之方法，其中該脂肪微粒的大小係介於 50-300 nm。

16. 如申請專利範圍第 10 項所述之方法，其中該脂肪

微粒更包括一配體分子以附著在一選定區域。

17.一種將一聚核苷酸包埋在如申請專利範圍第 1 項所述脂肪微粒之組成物的方法，包括：

在一適於溶解脂肪陽離子的脂肪溶劑中，形成一聚核苷酸-脂肪陽離子微粒，係藉由(i)將該聚核苷酸溶解於一不能與該脂肪溶劑互溶的非離子溶劑中；(ii)在一第三溶劑存在下，將該聚核苷酸與一電荷被中和且溶解於脂肪溶劑的一定量的脂肪陽離子作接觸，以有效形成一單一相的溶劑系統；(iii)在此條件下，將額外的非離子溶劑或脂肪溶劑加入至該單一相的溶劑系統中，以有效形成一二相系統；以及(iv)去除該非離子溶劑相而形成；

加入可形成液泡的電中性脂肪分子與一非離子水溶性溶劑至含該微粒之該脂肪溶劑中，以形成一乳化液；以及

蒸發該脂肪溶劑以形成包埋有該聚核苷酸之該脂肪微粒。

18.如申請專利範圍第 17 項所述之方法，其中該「溶解」一詞包括該聚核苷酸溶解在水中，該「接觸」一詞包括和溶解在氯仿和甲醇的混合溶劑中的脂肪陽離子做接觸。

19.如申請專利範圍第 17 項所述之方法，其中該「蒸發」一詞更包括和似水(aqueous)的媒介物進行水合作用。

20.一種如申請專利範圍第 1 項至第 9 項中任一項之脂肪微粒之組成物，其係用以將一聚核苷酸以一非口服(non-oral)途徑或一非腸胃(parenteral)途徑來施予至一對象。

21.一種活體施用聚核苷酸之醫藥組成物，其係利用根據如申請專利範圍第 1 項至第 9 項中任何一項之脂肪微粒之組成來製造者。