



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107735079 A

(43)申请公布日 2018.02.23

(21)申请号 201680039770.4

(22)申请日 2016.05.05

(30)优先权数据

238643 2015.05.05 IL

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.01.04

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/IL2016/050477 2016.05.05

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/178233 EN 2016.11.10

(71)申请人 耶路撒冷希伯来大学伊森姆研究发

展有限公司

地址 以色列耶路撒冷

(72)发明人 A·霍克伯格 詹妮弗·加吕拉

(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理
有限公司 11262

代理人 王玮玮 郑霞

(51)Int.Cl.

A61K 9/19(2006.01)

A61K 48/00(2006.01)

权利要求书6页 说明书30页 附图7页

(54)发明名称

核酸-阳离子聚合物组合物及其制备和使用
方法

(57)摘要

本文提供了冻干前的组合物,所述冻干前的组合物包含核酸、阳离子聚合物和碳水化合物。还提供了冻干的物质组合物和重构的组合物以及使用所述冻干的物质组合物和重构的组合物用于治疗患者中肿瘤的方法。

1. 一种组合物,所述组合物包含核酸、阳离子聚合物和碳水化合物溶液,其中所述核酸和所述阳离子聚合物形成复合物,并且其中所述碳水化合物与所述核酸-聚合物复合物的w/w比率在50与1,000之间。

2. 根据权利要求1所述的组合物,所述组合物呈冻干前或冻干的形式。

3. 根据权利要求1或2所述的组合物,其中所述复合物呈纳米颗粒的形式,所述纳米颗粒包含所述至少一种核酸和至少一种阳离子聚合物。

4. 根据权利要求3所述的组合物,其中所述纳米颗粒的尺寸在约40nm与约90nm之间。

5. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述比率低于500。

6. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述比率低于250。

7. 根据权利要求1所述的组合物,其中至少一种核酸为至少一种包含核酸的材料。

8. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述核酸为DNA或RNA。

9. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述核酸为DNA或RNA的碱基类似物。

10. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述碱基类似物选自4-乙酰胞嘧啶、8-羟基-N6-甲基腺苷、吡丙啶基胞嘧啶、假异胞嘧啶、5-(羧基羟基-甲基)尿嘧啶、5-氟尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-羧甲基氨基甲基-2-硫尿嘧啶、5-羧甲基氨基甲基尿嘧啶、二氢尿嘧啶、肌苷、N6-异戊烯腺嘌呤、1-甲基腺嘌呤、1-甲基假尿嘧啶、1-甲基鸟嘌呤、1-甲基肌苷、2,2-二甲基鸟嘌呤、2-甲基腺嘌呤、2-甲基鸟嘌呤、3-甲基胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、N6-甲基腺嘌呤、7-甲基鸟嘌呤、5-甲基氨基甲基尿嘧啶、5-甲氧基-氨基甲基-2-硫尿嘧啶、5'-甲氧基羰基甲基尿嘧啶、5-甲氧基尿嘧啶、2-甲硫基-N6-异戊烯基腺嘌呤、尿嘧啶-5-氧基乙酸甲酯、尿嘧啶-5-氧基乙酸、oxybutoxosine、假尿嘧啶、queosine、2-硫胞嘧啶、5-甲基-2-硫尿嘧啶、2-硫尿嘧啶、4-硫尿嘧啶、5-甲基尿嘧啶、尿嘧啶-5-氧基乙酸、queosine、2-硫胞嘧啶和2,6-二氨基嘌呤。

11. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述核酸为质粒。

12. 根据权利要求11所述的组合物,其中所述质粒核酸选自DNA、shRNA、siRNA和寡核苷酸。

13. 根据权利要求11所述的组合物,其中所述质粒具有H19调节序列。

14. 根据权利要求13所述的组合物,其中所述H19序列选自H19启动子、H19增强子以及所述H19启动子和所述H19增强子两者。

15. 根据权利要求14所述的组合物,其中所述H19调节序列包括所述H19启动子和增强子,并且所述异源序列编码选自以下组成的组的蛋白:β-半乳糖苷酶、白喉毒素、假单胞菌(Pseudomonas)毒素、蓖麻毒蛋白、霍乱毒素、成视网膜细胞瘤基因、p53、单纯疱疹胸苷激酶、水痘带状疱疹胸苷激酶、胞嘧啶脱氨酶、硝基还原酶、细胞色素p-450 2B1、胸苷磷酸化酶、嘌呤核苷磷酸化酶、碱性磷酸酶、羧肽酶A和G2、亚麻苦苷酶、β-内酰胺酶和黄嘌呤氧化酶。

16. 根据权利要求13所述的组合物,其中所述调节序列为IGF-2P4启动子或IGF-2P3启动子。

17. 根据权利要求13所述的组合物,其中所述H19增强子在所述异源序列的3'。

18. 根据权利要求17所述的组合物,其中所述异源序列选自以下的编码序列:β-半乳糖苷酶;白喉毒素;假单胞菌毒素;蓖麻毒蛋白;霍乱毒素;成视网膜细胞瘤基因;p53;单纯疱

疹胸苷激酶;水痘带状疱疹胸苷激酶;胞嘧啶脱氨酶;硝基还原酶;细胞色素p-450 2B1;胸苷磷酸化酶;嘌呤核苷磷酸化酶;碱性磷酸酶;羧肽酶A和G2;亚麻苦苷酶;β-内酰胺酶;黄嘌呤氧化酶;和反义序列,所述反义序列与编码选自以下组成的组的基因的序列特异性杂交:cdk2、cdk8、cdk21、cdc25A、细胞周期蛋白D1、细胞周期蛋白E、细胞周期蛋白A、cdk4、致癌形式的p53、c-fos、c-jun、Kr-ras和Her2/neu,所述异源序列还可编码特异性裂解编码选自以下组成的组的基因的RNA的核酶:cdk2、cdk8、cdk21、cdc25A、细胞周期蛋白D1、细胞周期蛋白E、细胞周期蛋白A、cdk4、致癌形式的p53、c-fos、c-jun、Kr-ras和Her2/neu。

19. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述至少一种碳水化合物为具有通式 $(CH_2O)_n$ 的化合物并且选自糖类、多糖和寡糖。

20. 根据权利要求19所述的组合物,其中所述至少一种碳水化合物选自单糖、二糖、三糖和寡糖以及多糖。

21. 根据权利要求20所述的组合物,其中所述至少一种碳水化合物选自糖原、纤维素和淀粉。

22. 根据权利要求19所述的组合物,其中所述至少一种碳水化合物选自单糖。

23. 根据权利要求22所述的组合物,其中所述单糖选自葡萄糖、果糖、甘露糖、木糖、阿拉伯糖和半乳糖。

24. 根据权利要求19所述的组合物,其中所述至少一种碳水化合物选自二糖。

25. 根据权利要求24所述的组合物,其中所述二糖选自海藻糖、蔗糖、纤维二糖、麦芽糖和乳糖。

26. 根据权利要求19所述的组合物,其中所述至少一种碳水化合物选自寡糖。

27. 根据权利要求26所述的组合物,其中所述寡糖选自棉子糖、水苏糖和麦芽糖糊精。

28. 根据权利要求19所述的组合物,其中所述至少一种碳水化合物选自海藻糖、葡萄糖、蔗糖、乳糖、甘露糖醇、山梨糖醇、棉子糖、PVP和右旋糖。

29. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述至少一种碳水化合物不为葡萄糖或蔗糖。

30. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述至少一种碳水化合物选自单糖和二糖。

31. 根据权利要求1或19或25所述的组合物,其中所述至少一种碳水化合物为海藻糖。

32. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述至少一种阳离子聚合物为亲水性或两亲性阳离子聚合物。

33. 根据权利要求32所述的组合物,其中所述阳离子聚合物选自包含伯胺、仲胺、叔胺和/或季胺基团的聚合物。

34. 根据权利要求33所述的组合物,其中所述至少一种阳离子聚合物选自聚乙烯亚胺,聚烯丙胺,聚醚胺,聚乙烷基吡啶,其上具有带正电荷官能团的多糖,聚氨基酸,聚-L-组氨酸,聚-D-赖氨酸,聚-DL-赖氨酸,聚-L-赖氨酸,聚-e-CBZ-O-赖氨酸,聚-e-CBZ-DL-赖氨酸,聚-e-CBZ-L-赖氨酸,聚-OL-鸟氨酸,聚-L-鸟氨酸,聚-DELTA-CBZ-DL-鸟氨酸,聚-L-精氨酸,聚-DL-丙氨酸-聚-L-赖氨酸,聚(L-组氨酸,L-谷氨酸)-聚DL-丙氨酸-聚-L-赖氨酸,聚(L-苯丙氨酸,L-谷氨酸)-聚-DL-丙氨酸-聚-L-赖氨酸,聚(L-酪氨酸,L-谷氨酸)-聚DL-丙氨酸-聚-L-赖氨酸,L-精氨酸与色氨酸、酪氨酸或丝氨酸的共聚物,D-谷氨酸与D-赖氨酸的共聚物,L-谷氨酸与赖氨酸、鸟氨酸或赖氨酸和鸟氨酸的混合物的共聚物,以及聚-(L-谷氨酸)。

35. 根据权利要求34所述的组合物,其中所述至少一种阳离子聚合物为聚乙烯亚胺(PEI)。

36. 根据权利要求35所述的组合物,其中所述至少一种阳离子聚合物为线性聚乙烯亚胺(PEI)。

37. 根据权利要求32所述的组合物,其中所述PEI的胺基团的摩尔与所述核酸的磷酸基团的摩尔比率在2与10之间。

38. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,所述组合物通过在允许在所述至少一种核酸与所述至少一种阳离子聚合物之间形成复合物的条件下将核酸/碳水化合物溶液添加到阳离子聚合物/碳水化合物溶液中来制备。

39. 根据权利要求38所述的组合物,其中所述核酸/碳水化合物溶液和所述阳离子聚合物/碳水化合物溶液被各自单独地且独立地制备。

40. 根据权利要求38所述的组合物,其中所述制备方法包括:

- (a) 获得至少一种核酸和至少一种碳水化合物的溶液;
- (b) 获得至少一种阳离子聚合物和至少一种碳水化合物的溶液;
- (c) 在允许在所述至少一种核酸与所述至少一种阳离子聚合物之间形成复合物的条件下将所述核酸/碳水化合物溶液添加到所述阳离子聚合物/碳水化合物溶液中;以及
- (d) 任选地将所组合的核酸/阳离子聚合物/碳水化合物溶液冻干以形成冻干的组合物。

41. 根据权利要求40所述的组合物,其中所述方法还包括形成所述核酸/碳水化合物溶液的步骤和形成所述阳离子聚合物/碳水化合物溶液的步骤。

42. 根据权利要求40所述的组合物,其中所述方法还包括:

- (a) 将一定量的所述至少一种核酸与第一量的所述至少一种碳水化合物混合以形成核酸/碳水化合物溶液;以及
- (b) 将一定量的所述至少一种阳离子聚合物与第二量的所述至少一种碳水化合物混合以形成阳离子聚合物/碳水化合物溶液。

43. 根据权利要求38所述的组合物,其中所述核酸/碳水化合物溶液向所述阳离子聚合物/碳水化合物溶液中的添加在室温进行。

44. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,所述组合物为冻干的。

45. 一种用于制备组合物的方法,所述组合物包含至少一种核酸、至少一种阳离子聚合物和至少一种碳水化合物,所述方法包括在允许在所述至少一种核酸与所述至少一种阳离子聚合物之间形成复合物的条件下将核酸/碳水化合物溶液添加到阳离子聚合物/碳水化合物溶液中。

46. 根据权利要求45所述的方法,其中所述核酸/碳水化合物溶液和所述阳离子聚合物/碳水化合物溶液被各自单独地且独立地制备。

47. 根据权利要求45所述的方法,所述方法包括:

- (a) 获得至少一种核酸和至少一种碳水化合物的溶液;
- (b) 获得至少一种阳离子聚合物和至少一种碳水化合物的溶液;
- (c) 在允许在所述至少一种核酸与所述至少一种阳离子聚合物之间形成复合物的条件下将所述核酸/碳水化合物溶液添加到所述阳离子聚合物/碳水化合物溶液中;以及

(d) 任选地将所组合的核酸/阳离子聚合物/碳水化合物溶液冻干以形成冻干的组合物。

48. 根据权利要求45所述的方法,所述方法还包括形成所述核酸/碳水化合物溶液的步骤和形成所述阳离子聚合物/碳水化合物溶液的步骤。

49. 根据权利要求45所述的方法,所述方法包括:

(a) 将一定量的所述至少一种核酸与第一量的所述至少一种碳水化合物混合以形成核酸/碳水化合物溶液;以及

(b) 将一定量的所述至少一种阳离子聚合物与第二量的所述至少一种碳水化合物混合以形成阳离子聚合物/碳水化合物溶液。

50. 根据权利要求49所述的方法,其中在所述至少一种核酸与所述至少一种阳离子聚合物之间的复合物被形成材料纳米颗粒,每一个纳米颗粒的尺寸为纳米。

51. 根据权利要求50所述的方法,其中每一个纳米颗粒包含所述至少一种核酸和至少一种阳离子聚合物。

52. 根据权利要求51所述的方法,其中所述纳米颗粒的尺寸在约40nm与约90nm之间。

53. 根据权利要求45所述的方法,其中所述核酸/碳水化合物溶液向所述阳离子聚合物/碳水化合物溶液中的添加在室温进行。

54. 根据权利要求53所述的方法,其中所述添加是以恒定速率并且在恒定混合下。

55. 根据权利要求45所述的方法,其中在所述至少一种碳水化合物与所述至少一种核酸之间的比率低于1,000或低于950或低于900或低于850或低于800或低于750或低于700或低于650或低于600或低于550或低于500或低于450或低于400或低于350或低于300或低于250或低于200或低于150或低于100。

56. 根据权利要求55所述的方法,其中所述比率低于500。

57. 根据权利要求55所述的方法,其中所述比率低于250。

58. 根据权利要求45所述的方法,所述方法还包括冻干所述组合物的步骤。

59. 根据权利要求45所述的方法,其中至少一种核酸为至少一种包含核酸的材料。

60. 根据权利要求59所述的方法,其中所述核酸为DNA或RNA。

61. 根据权利要求59所述的方法,其中所述核酸为DNA或RNA的碱基类似物。

62. 根据权利要求61所述的方法,其中所述碱基类似物选自4-乙酰胞嘧啶、8-羟基-N6-甲基腺苷、吡丙啶基胞嘧啶、假异胞嘧啶、5-(羧基羟基-甲基)尿嘧啶、5-氟尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-羧甲基氨基甲基-2-硫尿嘧啶、5-羧甲基氨基甲基尿嘧啶、二氢尿嘧啶、肌苷、N6-异戊烯腺嘌呤、1-甲基腺嘌呤、1-甲基假尿嘧啶、1-甲基鸟嘌呤、1-甲基肌苷、2,2-二甲基鸟嘌呤、2-甲基腺嘌呤、2-甲基鸟嘌呤、3-甲基胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、N6-甲基腺嘌呤、7-甲基鸟嘌呤、5-甲基氨基甲基尿嘧啶、5-甲氧基-氨基甲基-2-硫尿嘧啶、5'-甲氧基羰基甲基尿嘧啶、5-甲氧基尿嘧啶、2-甲硫基-N6-异戊烯基腺嘌呤、尿嘧啶-5-氧基乙酸甲酯、尿嘧啶-5-氧基乙酸、oxybutoxosine、假尿嘧啶、queosine、2-硫胞嘧啶、5-甲基-2-硫尿嘧啶、2-硫尿嘧啶、4-硫尿嘧啶、5-甲基尿嘧啶、尿嘧啶-5-氧基乙酸、queosine、2-硫胞嘧啶和2,6-二氨基嘌呤。

63. 根据权利要求45所述的方法,其中所述核酸为质粒。

64. 根据权利要求63所述的方法,其中所述质粒核酸选自DNA、shRNA、siRNA和寡核苷

酸。

65. 根据权利要求63所述的方法,其中所述质粒具有H19调节序列。

66. 根据权利要求65所述的方法,其中所述H19序列选自H19启动子、H19增强子以及所述H19启动子和所述H19增强子两者。

67. 根据权利要求65所述的方法,其中所述H19调节序列包括所述H19启动子和增强子,并且所述异源序列编码选自由以下组成的组的蛋白:β-半乳糖苷酶、白喉毒素、假单胞菌毒素、蓖麻毒蛋白、霍乱毒素、成视网膜细胞瘤基因、p53、单纯疱疹胸苷激酶、水痘带状疱疹胸苷激酶、胞嘧啶脱氨酶、硝基还原酶、细胞色素p-450 2B1、胸苷磷酸化酶、嘌呤核苷磷酸化酶、碱性磷酸酶、羧肽酶A和G2、亚麻苦苷酶、β-内酰胺酶和黄嘌呤氧化酶。

68. 根据权利要求65所述的方法,其中所述调节序列为IGF-2P4启动子或IGF-2P3启动子。

69. 根据权利要求65所述的方法,其中所述H19增强子在所述异源序列的3'。

70. 根据权利要求69所述的方法,其中所述异源序列选自以下的编码序列:β-半乳糖苷酶;白喉毒素;假单胞菌毒素;蓖麻毒蛋白;霍乱毒素;成视网膜细胞瘤基因;p53;单纯疱疹胸苷激酶;水痘带状疱疹胸苷激酶;胞嘧啶脱氨酶;硝基还原酶;细胞色素p-450 2B1;胸苷磷酸化酶;嘌呤核苷磷酸化酶;碱性磷酸酶;羧肽酶A和G2;亚麻苦苷酶;β-内酰胺酶;黄嘌呤氧化酶;和反义序列,所述反义序列与编码选自由以下组成的组的基因的序列特异性杂交:cdk2、cdk8、cdk21、cdc25A、细胞周期蛋白D1、细胞周期蛋白E、细胞周期蛋白A、cdk4、致癌形式的p53、c-fos、c-jun、Kr-ras和Her2/neu,所述异源序列还可编码特异性裂解编码选自由以下组成的组的基因的RNA的核酶:cdk2、cdk8、cdk21、cdc25A、细胞周期蛋白D1、细胞周期蛋白E、细胞周期蛋白A、cdk4、致癌形式的p53、c-fos、c-jun、Kr-ras和Her2/neu。

71. 根据权利要求45所述的方法,其中至少一种碳水化合物为具有通式(CH₂O)_n的化合物并且选自糖类、多糖和寡糖。

72. 根据权利要求45所述的方法,其中所述至少一种碳水化合物选自单糖、二糖、三糖和寡糖以及多糖。

73. 根据权利要求72所述的方法,其中所述至少一种碳水化合物选自糖原、纤维素和淀粉。

74. 根据权利要求45所述的方法,其中所述至少一种碳水化合物选自单糖。

75. 根据权利要求74所述的方法,其中所述单糖选自葡萄糖、果糖、甘露糖、木糖、阿拉伯糖和半乳糖。

76. 根据权利要求45所述的方法,其中所述至少一种碳水化合物选自二糖。

77. 根据权利要求76所述的方法,其中所述二糖选自海藻糖、蔗糖、纤维二糖、麦芽糖和乳糖。

78. 根据权利要求45所述的方法,其中所述至少一种碳水化合物选自寡糖。

79. 根据权利要求78所述的方法,其中所述寡糖选自棉子糖、水苏糖和麦芽糖糊精。

80. 根据权利要求45所述的方法,其中所述至少一种碳水化合物选自海藻糖、葡萄糖、蔗糖、乳糖、甘露糖醇、山梨糖醇、棉子糖、PVP和右旋糖。

81. 根据权利要求45所述的方法,其中所述至少一种碳水化合物不为葡萄糖或蔗糖。

82. 根据权利要求45所述的方法,其中所述至少一种碳水化合物选自单糖和二糖。

83. 根据权利要求82所述的方法, 其中所述至少一种碳水化合物为海藻糖。

84. 根据权利要求45所述的方法, 其中所述至少一种阳离子聚合物为亲水性或两亲性阳离子聚合物。

85. 根据权利要求84所述的方法, 其中所述阳离子聚合物选自包含伯胺、仲胺、叔胺和/或季胺基团的聚合物。

86. 根据权利要求85所述的方法, 其中所述至少一种阳离子聚合物选自聚乙烯亚胺, 聚烯丙胺, 聚醚胺, 聚乙烷基吡啶, 其上具有带正电荷官能团的多糖, 聚氨基酸, 聚-L-组氨酸, 聚-D-赖氨酸, 聚-DL-赖氨酸, 聚-L-赖氨酸, 聚-e-CBZ-O-赖氨酸, 聚-e-CBZ-DL-赖氨酸, 聚-e-CBZ-L-赖氨酸, 聚-OL-鸟氨酸, 聚-L-鸟氨酸, 聚-DELTA-CBZ-DL-鸟氨酸, 聚-L-精氨酸, 聚-DL-丙氨酸-聚-L-赖氨酸, 聚(-L-组氨酸, L-谷氨酸)-聚DL-丙氨酸-聚-L-赖氨酸, 聚(L-苯丙氨酸, L-谷氨酸)-聚-DL-丙氨酸-聚-L-赖氨酸, 聚(L-酪氨酸, L-谷氨酸)-聚DL-丙氨酸-聚-L-赖氨酸, L-精氨酸与色氨酸、酪氨酸或丝氨酸的共聚物, D-谷氨酸与D-赖氨酸的共聚物, L-谷氨酸与赖氨酸、鸟氨酸或赖氨酸和鸟氨酸的混合物的共聚物, 以及聚-(L-谷氨酸)。

87. 根据权利要求86所述的方法, 其中所述至少一种阳离子聚合物为聚乙烯亚胺(PEI)。

88. 根据权利要求87所述的方法, 其中所述至少一种阳离子聚合物为线性聚乙烯亚胺(PEI)。

89. 根据权利要求87所述的方法, 其中所述PEI的胺基团的摩尔与所述核酸的磷酸基团的摩尔比率在2与10之间。

90. 根据权利要求45所述的方法, 其中所述至少一种核酸为质粒, 所述至少一种阳离子聚合物为PEI, 并且至少一种碳水化合物为海藻糖。

91. 根据权利要求90所述的方法, 其中所述至少一种核酸和所述至少一种阳离子聚合物形成复合物, 并且其中所述碳水化合物与所述核酸-聚合物复合物的w/w比率在50与1,000之间。

92. 根据权利要求1所述的组合物, 其中所述至少一种核酸为质粒, 所述至少一种阳离子聚合物为PEI, 并且至少一种碳水化合物为海藻糖。

核酸-阳离子聚合物组合物及其制备和使用方法

技术领域

[0001] 本发明总体涉及肿瘤细胞生物学、基因疗法和癌症治疗的领域。更具体地,本发明涉及可以被冻干的核酸和阳离子聚合物的物质组合物以及其制备和使用方法。

[0002] 背景

[0003] 将DNA质粒作为通过治疗性递送到患者细胞中来治疗疾病的药物的使用,为针对迄今被认为不可治疗的广谱病理的新颖药物剂的开发中即将出现的技术之一。

[0004] 为了通过克服体内的核酸酶降解来实现细胞内的功能性DNA质粒的有效递送,核酸分子应该被包装在“载体”内。

[0005] 尽管最初关于基因疗法的大多数研究均集中于病毒介导的载体的开发上,但非病毒转染子已经被开发作为潜在的安全和有效的基因疗法递送方法。

[0006] 与病毒载体相比,这些非病毒递送系统显示出几个优势,包括低的毒性和免疫原性、对核酸酶的耐受性和改进的安全性谱。

[0007] 此类非病毒递送系统的非限制性实例包括已经产生并且能够在转染过程期间保护DNA免于降解的新分子诸如lipoplex和/或polyplex。

[0008] 为了形成lipoplex,将质粒DNA用具有有组织结构的阳离子脂质(例如,胶束或脂质体)覆盖。这些阳离子脂质与带负电荷的DNA复合,并且带正电荷的脂质也与细胞膜相互作用,由此允许发生lipoplex的胞吞。lipoplex内的DNA随后被释放到细胞质中。

[0009] polyplex为DNA与聚合物的复合物。通常,polyplex利用阳离子聚合物,其与聚阴离子DNA相互作用并复合。

[0010] 在已经开发的宽范围非病毒载体中,阳离子聚合物线性聚乙烯亚胺(PEI)(参见美国专利第6,013,240号,其通过引用以其整体并入本文)在质粒递送方面已经显示出若干优势(参见Pathak等,Biotechnol.J.4:1559-1572(2009);Kasper等Journal of Controlled Release 151:246-255(2011))并且已经被用于临床研究(参见Gofrit等,The Journal of Urology 191(6):1697-1702(2014);Abraham等,The Journal of Urology 180(6):2379-2383(2008))。因此,PEI被认为是非病毒载体的“金标准”。(参见Pathak等,Biotechnol.J.4:1559-1572(2009);Kasper等Journal of Controlled Release151:246-255(2011))。

[0011] 基于线性聚乙烯亚胺(LPEI)和DNA质粒的polyplex因其在宽范围转染子的转染效率方面的有利品质而被已知。然而,此类复合物在水性溶液(特别地,在高DNA浓度溶液)中的稳定性是有限的,并且对施用之前新鲜制备的复合物的需求增加了批次间变化的风险。在这样的情况下,这些复合物的重现性和受控制的品质不能被保证达到在药物产品方面所要求的程度。

背景技术

[0012] [1]美国专利第6,013,240号

[0013] [2]Pathak等,Biotechnol.J.4:1559-1572(2009)

- [0014] [3]Kasper等,Journal of Controlled Release 151:246-255 (2011)
- [0015] [4]Gofrit等,The Journal of Urology 191 (6) :1697-1702 (2014)
- [0016] [5]Abraham等,The Journal of Urology 180 (6) :2379-2383 (2008)
- [0017] [6]Pathak等,Biotechnol.J.4:1559-1572 (2009)
- [0018] [7]PCT/IL1998/000486 (WO 1999/018195)
- [0019] [8]PCT/IL2008/001405 (WO 2009/053982)
- [0020] [9]PCT/IL2006/001110 (WO 2007/034487)
- [0021] [10]PCT/IL2006/000785 (US 8,067,573)
- [0022] [11]PCT/IL2008/000071 (US 7,928,083)
- [0023] [12]Brus等,Journal of Controlled Release 95:119-131 (2004)
- [0024] [13]Kasper等,European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics77:182-185 (2011)
- [0025] [14]Julia Christina Kasper,Doctoral Thesis“Lyophilization of Nucleic Acid Nanoparticles-Formulation Development,Stabilization Mechanisms,and Process Monitoring”(2012)
- [0026] 发明概述
- [0027] 因此,本领域对制备核酸-阳离子聚合物物质组合物的方法仍然存在需求,所述方法更流线型并且可以容易地扩大规模至工业上有用的比例。
- [0028] 本文公开的发明的发明人已经开发了一种用于生产包含核酸、阳离子聚合物和碳水化合物的冻干前的、冻干的和重构的组合物/制剂的独特方法,所述组合物/制剂在水性溶液中的稳定性得到了极大改进,为本领域已知的类似组合物提供了极好的替代品。本发明的方法以及由此产生的组合物提供了对用于治疗性应用的精确制备的、安全的和工业上可扩大规模的复合物的需求的解答。
- [0029] 本发明的方法允许工业生产稳定的、可精确定量(dosable)和均质的组合物/制剂,所述组合物/制剂可以被配制为冻干的或冻干前的制剂而不会不利地影响制剂的任何组分的构造、完整性、稳定性和生物可利用度。
- [0030] 因此,在第一方面,本发明提供了一种用于制备组合物的方法,所述组合物包含至少一种核酸、至少一种阳离子聚合物和至少一种碳水化合物,所述方法包括在允许在至少一种核酸与至少一种阳离子聚合物之间形成复合物的条件下将核酸/碳水化合物溶液添加到阳离子聚合物/碳水化合物溶液中。
- [0031] 在一些实施方案中,核酸/碳水化合物溶液和阳离子聚合物/碳水化合物溶液可以被各自单独地且独立地制备。如列举的,可以在溶液组合之前同时或在不同的时间点制备好溶液中的每一种。
- [0032] 在一些实施方案中,该方法包括获得两种溶液中的每一种,并且在允许在至少一种核酸与至少一种阳离子聚合物之间形成复合物的条件下将核酸/碳水化合物溶液添加到阳离子聚合物/碳水化合物溶液中,而不是相反,以获得本发明的组合物。
- [0033] 在一些实施方案中,该方法包括:
- [0034] (a) 获得至少一种核酸和至少一种碳水化合物的溶液;
- [0035] (b) 获得至少一种阳离子聚合物和至少一种碳水化合物的溶液;

[0036] (c) 在允许在至少一种核酸与至少一种阳离子聚合物之间形成复合物的条件下将核酸/碳水化合物溶液添加到阳离子聚合物/碳水化合物溶液中;以及

[0037] (d) 任选地将所组合的核酸/阳离子聚合物/碳水化合物溶液冻干以形成冻干的组合物。

[0038] 在一些实施方案中,该方法包括制备核酸/碳水化合物溶液的步骤和制备阳离子聚合物/碳水化合物溶液的步骤。

[0039] 在一些实施方案中,该方法因此包括:

[0040] (a) 将一定量的至少一种核酸与第一量的至少一种碳水化合物混合以形成核酸/碳水化合物溶液;以及

[0041] (b) 将一定量的至少一种阳离子聚合物与第二量的至少一种碳水化合物混合以形成阳离子聚合物/碳水化合物溶液。

[0042] 如以上指出的,至少一种碳水化合物以单独的批次或数量用于本发明的方法中。将第一批或数量或者第一量与至少一种核酸混合,并且将第二批或数量或者第二量与至少一种阳离子聚合物混合。确定并选择第一或第二量为足以允许复合物的形成并提供稳定的任选地固体的产物的至少一种碳水化合物的最小量。

[0043] 如本文使用的,本发明的组合物或制剂包含至少一种核酸与至少一种阳离子聚合物之间的复合物,所述组合物的稳定性和独特性归因于所述复合物。术语“复合物”、“polyplex”、“polyplex制剂”、“polyplex物质组合物”、“物质组合物”等在本文可互换地使用,以指本发明的整个组合物/制剂而不是其任何特定的组分。

[0044] 如本文例示的,步骤(a)和(b)的溶液中的每一种可以独立于另一种制备,并且可以在使用前储存。如以上列举的,溶液中的每一种可以依次或以任何其他顺序制备,条件是它们如步骤(c)中指示被添加至彼此,即将核酸/碳水化合物溶液添加到阳离子聚合物/碳水化合物溶液中,而不是相反。溶液中的一种到另一种中的这种特定顺序特异性添加,允许在至少一种核酸与至少一种阳离子聚合物之间容易地形成独特且稳定的复合物;当以逆转的方式添加溶液时,复合物不能以大量形成。

[0045] 如列举的,组合物组分中的一种向另一种中的这种添加而不是相反情况,还允许降低碳水化合物材料的量,并随后增加组合物中至少一种核酸的相对量。换言之,通过能够降低至少一种碳水化合物的量,同时保持组合物中至少一种核酸的量,至少一种碳水化合物与至少一种核酸之间的比率可以被降低一或两个数量级。

[0046] 至少一种核酸与至少一种阳离子聚合物之间的复合物被形成为材料纳米颗粒,其中每一个纳米颗粒的尺寸为纳米(在纳米颗粒形状为球形的情况直径为纳米,或者在纳米颗粒形状不为球形的情况具有纳米轴),并且每一个包含至少一种核酸、至少一种阳离子聚合物和任选地少量的至少一种碳水化合物。在冻干前的组合物中形成的并且也存在于冻干的组合物中,并且还存在于重构的制剂中的纳米颗粒在冻干前的组合物中尺寸在约40nm至约50nm之间,而在重构的组合物中纳米颗粒尺寸范围为从约80nm至约90nm。当利用较高浓度时获得较大的纳米颗粒,如下文详述的。

[0047] 核酸/碳水化合物溶液向阳离子聚合物/碳水化合物溶液中的添加可以在室温或任何期望的温度进行,除其他以外,取决于所利用的特定组分、组合物的体积和其他参数。在一些实施方案中,添加是以恒定速率并在恒定混合下以形成组合的核酸/阳离子聚合

物溶液。在一些实施方案中,对于正在制备的每一种体积修改速率,并且确定合适的恒定速率在本领域的常规技术水平内。

[0048] 在一些实施方案中,如以上指出的,对于小的制品,添加以2ml/min与7ml/min之间的速率来进行,或者对于1升制品,速率可以以80ml/min来进行,或者速率可以取决于待制备的组合物/制剂或制品的体积而改变(增加或减少)。也可以利用较大的速率。

[0049] 例如,使用1升包含100ml初始浓度为4mg/ml的核酸(例如,质粒)的polyplex,以在1升溶液中总计为0.4g。1升溶液包含100g碳水化合物,例如,海藻糖。因此,在该实例中,1升溶液中海藻糖的重量与1升溶液中DNA的重量的比率为100/0.4或250。

[0050] 在另一个实例中,核酸的量在约2.5ml与约100ml之间,并且10%w/v海藻糖溶液的第一有效量在约10ml与约400ml之间。另外地(或可选地),阳离子聚合物的量在约1.2ml与约48ml之间,并且10%w/v海藻糖溶液的第二有效量在约11.3ml与约452ml之间。

[0051] 如可以理解的,可以制备本发明的组合物或溶液的多种体积,例如,在约25ml与约1,000ml之间;诸如25ml、50ml、75ml、100ml、125ml、150ml、175ml、200ml、225ml、250ml、275ml、300ml、325ml、350ml、375ml、400ml、425ml、450ml、475ml、500ml、525ml、550ml、575ml、600ml、625ml、650ml、675ml、700ml、725ml、750ml、775ml、800ml、825ml、850ml、875ml、900ml、925ml、950ml、975ml、或1,000ml。还可以制备更大体积或更小体积或中间体积。

[0052] 本领域技术人员将认识到,可以容易地修改本文描述的方法以形成比1,000ml高得多的组合的核酸/阳离子聚合物溶液的体积,例如,1,000ml、1,500ml、2,000ml、2,500ml、3,000ml、3,500ml、4,000ml、4,500ml、5,000ml、5,500ml、6,000ml、6,500ml、7,000ml、7,500ml、8,000ml、8,500ml、9,000ml、9,500ml、10,000ml或更多。

[0053] 与本领域的许多组合物不同,根据本发明的方法制备的包含核酸/阳离子聚合物溶液的组合物形成均质的悬浮液。如本文使用的,本发明的“组合物”、“制剂(formulation)”、“制品(preparation)”可以呈液体形式,例如,作为溶液、悬浮液或分散体,或呈固体形式,任选地冻干的。在其中组合物为液体组合物的一些实施方案中,组合物呈水悬浮液的形式。在一些实施方案中,液体组合物通常可以呈悬浮液的形式,其中一定量的任何一种的组合物组分为完全或部分可溶的。在其中组合物呈固体形式的一些实施方案中,组合物为冻干的物质组合物。

[0054] 本发明的方法可以任选地包括将本发明的组合物冻干以提供冻干的组合物的步骤。冻干的组合物可以在临使用之前重构。

[0055] 因此,根据本发明的方法可以不含冻干步骤,在该情况下,获得的组合物或制剂为冻干前的组合物或制剂。如果需要或期望冻干步骤,则可以在诸如本领域已知的用于湿组合物冻干的条件下处理组合物。

[0056] 在一些实施方案中,本发明的方法包括冻干循环,所述冻干循环包括在低于0℃的温度冷冻溶液。在一些实施方案中,温度在-50℃与0℃之间、在-45℃与0℃之间、-40℃与0℃之间、-35℃与0℃之间。在一些实施方案中,冻干在约-45℃±5℃的温度实现。

[0057] 在一些实施方案中,本发明的方法包括冻干循环,所述冻干循环包括将溶液冷冻持续以下的时间段:至少12小时、至少20小时、至少24小时、至少30小时、至少36小时、至少48小时、至少52小时、至少60小时、至少66小时、至少72小时。

[0058] 在一些实施方案中,将溶液冻干至少24小时与72小时之间。

[0059] 在一些实施方案中,本发明的方法包括冻干循环,所述冻干循环包括将溶液在约-45℃±5℃的温度冷冻持续至少12小时、至少20小时、至少24小时、至少30小时、至少36小时、至少48小时、至少52小时、至少60小时、至少66小时、至少72小时。

[0060] 冻干的物质组合物可以使用本领域已知产生重构的物质组合物的任何方法重构。例如,它可以通过添加适当体积的双蒸水DDW或IV注射用水来重构。通常,添加至冻干的物质组合物中的体积为在冻干之前最初添加至小瓶中的体积。

[0061] 根据本文描述的方法制备的冻干前的物质组合物的纳米颗粒范围为从约40nm至约50nm,而重构的物质组合物的纳米颗粒范围为从约80nm至约90nm。

[0062] 在核酸与阳离子聚合物之间形成的复合物可以是,使得复合物中碳水化合物与核酸-阳离子聚合物的w/w比率可以根据除其他以外用于形成组合物的特定碳水化合物和核酸而变化。在一些实施方案中,比率在50与5,000之间。

[0063] 在一些实施方案中,比率在50与4,000之间。在一些实施方案中,比率在50与3,000之间。在一些实施方案中,比率在50与2,000之间。在一些实施方案中,比率在50与1,000之间。在一些实施方案中,比率在50与500之间。

[0064] 在一些实施方案中,比率为约50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、205、210、215、220、225、230、235、240、245、250、255、260、265、270、275、280、285、290、295、300、305、310、315、320、325、330、335、340、345、350、355、360、365、370、375、380、385、390、395、400、405、410、415、420、425、430、435、440、445、450、455、460、465、470、475、480、485、490、495、或500。

[0065] 在一些实施方案中,比率为约950、955、960、965、970、975、980、985、990、995、1,000、1,005、1,010、1,015、1,020、1,025、1,030、1,035、1,040、1,045、1,050、1,055、1,060、1,065、1,070、1,075、1,080、1,085、1,090、1,095、2,000、2,005、2,010、2,015、2,020、2,025、2,030、2,035、2,040、2,045、2,050、2,055、2,060、2,065、2,070、2,075、2,080、2,085、2,090、2,095、3,000、3,005、3,010、3,015、3,020、3,025、3,030、3,035、3,040、3,045、3,050、3,055、3,060、3,065、3,070、3,075、3,080、3,085、3,090、3,095、4,000、4,005、4,010、4,015、4,020、4,025、4,030、4,035、4,040、4,045、4,050、4,055、4,060、4,065、4,070、4,075、4,080、4,085、4,090、4,095、或5,000。

[0066] 在一些实施方案中,比率为约125或250或500或1,000。

[0067] 在一些实施方案中,比率低于1,000。在一些实施方案中,比率为125或500。

[0068] 在另一个方面,本发明提供了源自本发明方法的产物。

[0069] 在另一个方面,本发明提供了冻干的物质组合物,所述冻干的物质组合物包含至少一种核酸、至少一种阳离子聚合物和至少一种碳水化合物,其中至少一种核酸和至少一种阳离子聚合物形成复合物,使得至少一种碳水化合物与核酸-阳离子聚合物的w/w比率在50与5000之间。

[0070] 本发明的产物(通过本发明的方法制备的那些和通过其他方法制备并且本身是新颖的那些)可以是包含至少一种核酸、至少一种阳离子聚合物和至少一种碳水化合物的冻干前的、冻干的和重构的组合物或溶液,其中至少一种核酸和至少一种阳离子聚合物形成

复合物,使得至少一种碳水化合物与核酸-阳离子聚合物的w/w比率在50与5,000之间。

[0071] 术语“冻干前的组合物”等指根据本文描述的方法制备的中间体。具体地,冻干前的物质组合物以其中将核酸添加至聚合物中的“逆转(reverse)”顺序来制备。此类“冻干前的物质组合物”包括核酸(例如,DNA)、聚合物(例如,PEI)和碳水化合物溶液(例如,海藻糖)。

[0072] 术语“冻干的组合物”等指干燥材料(即在冻干后的冻干前的物质组合物)。

[0073] 术语“重构的物质组合物”等指冻干的物质组合物和用于重构的液体载体(例如,DDW或IV注射用水)。通常,重构的物质组合物在施用至患者之前由医学从业者(例如,医师)重构。

[0074] 在一些实施方案中,组合物为还包含液体介质(例如,水)的冻干前的组合物或溶液。在一些实施方案中,冻干的组合物为不含水的干燥组合物。

[0075] 本文描述的冻干的物质组合物为无定形粉末。冻干前和重构(即在注射用水中重构之后)的物质组合物保持浅白色乳白色(slightly white opalescent)的颜色(即,它们不显示降解迹象)。

[0076] 此外,冻干前的物质组合物可以使用本领域已知的或本文描述的任何冻干方法来为了长期储存时间段冻干,以产生冻干的物质组合物。在冻干后,冻干的物质组合物具有至少12个月(例如,至少12个月、13个月、14个月、15个月、16个月、17个月、18个月、19个月、20个月、21个月、22个月、23个月、24个月、或更多个月)的货架期。

[0077] 冻干的物质组合物可以在使用之前使用本领域已知的或本文描述的任何方法重构以提供重构的物质组合物。在重构后,重构的组合物保持浅白色乳白色的颜色(即,不显示降解迹象)。

[0078] 可以被配制为本发明的组合物或制剂的至少一种核酸为任何包含核酸的分子,包括DNA或RNA。术语“核酸”还涵盖包含DNA和RNA的任何已知的碱基类似物的序列,所述碱基类似物诸如4-乙酰胞嘧啶、8-羟基-N6-甲基腺苷、吡丙啶基胞嘧啶(aziridinylcytosine)、假异胞嘧啶(pseudoisocytosine)、5-(羧基羟基-甲基)尿嘧啶、5-氟尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-羧甲基氨基甲基-2-硫尿嘧啶、5-羧甲基氨基甲基尿嘧啶、二氢尿嘧啶、肌苷、N6-异戊烯腺嘌呤(N6-isopentenyladenine)、1-甲基腺嘌呤、1-甲基假尿嘧啶、1-甲基鸟嘌呤、1-甲基肌苷、2,2-二甲基鸟嘌呤、2-甲基腺嘌呤、2-甲基鸟嘌呤、3-甲基胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、N6-甲基腺嘌呤、7-甲基鸟嘌呤、5-甲基氨基甲基尿嘧啶、5-甲氧基-氨基甲基-2-硫尿嘧啶、5'-甲氧基羰基甲基尿嘧啶、5-甲氧基尿嘧啶、2-甲基-N6-异戊烯基腺嘌呤、尿嘧啶-5-氧基乙酸甲酯、尿嘧啶-5-氧基乙酸、oxybutoxosine、假尿嘧啶、queosine、2-硫胞嘧啶、5-甲基-2-硫尿嘧啶、2-硫尿嘧啶、4-硫尿嘧啶、5-甲基尿嘧啶、尿嘧啶-5-氧基乙酸、queosine、2-硫胞嘧啶和2,6-二氨基嘌呤。

[0079] 在一些实施方案中,核酸为质粒,即包含与编码细胞毒性基因产物的异源序列可操作地连接的调节序列的多核苷酸,其中调节序列来自在癌细胞中特异性表达的基因组印记基因。

[0080] 在一些实施方案中,如本文使用的术语“质粒”意指如定义的任何核酸(即,DNA、shRNA、siRNA、寡核苷酸等)。

[0081] 在一些实施方案中,至少一种核酸为通过引用并入本文的PCT/IL1998/000486(WO

1999/018195)或源自其的任何美国申请中列举的质粒。

[0082] 在一些实施方案中,至少一种核酸为通过引用并入本文的PCT/IL2008/001405 (WO 2009/053982)或源自其的任何美国申请中列举的质粒。

[0083] 在一些实施方案中,至少一种核酸为通过引用并入本文的PCT/IL2006/001110 (WO 2007/034487)或源自其的任何美国申请中列举的质粒。

[0084] 在一些实施方案中,至少一种核酸为通过引用并入本文的PCT/IL2006/000785 (US 8,067,573)或源自其的任何美国申请中列举的质粒。

[0085] 在一些实施方案中,至少一种核酸为通过引用并入本文的PCT/IL2008/000071 (US 7,928,083)或源自其的任何美国申请中列举的质粒。

[0086] 在一些实施方案中,质粒中的调节序列可以是H19调节序列(例如,H19启动子、H19增强子、或H19启动子和H19增强子两者)。例如,H19调节序列可以包括H19启动子和增强子,并且异源序列编码选自自由以下组成的组的蛋白: β -半乳糖苷酶、白喉毒素、假单胞菌(Pseudomonas)毒素、蓖麻毒蛋白、霍乱毒素、成视网膜细胞瘤基因、p53、单纯疱疹胸苷激酶、水痘带状疱疹胸苷激酶、胞嘧啶脱氨酶、硝基还原酶、细胞色素p-450 2B1、胸苷磷酸化酶、嘌呤核苷磷酸化酶、碱性磷酸酶、羧肽酶A和G2、亚麻苦苷酶(linamarase)、 β -内酰胺酶和黄嘌呤氧化酶。

[0087] 在其他实施方案中,其中调节序列为IGF-2P4启动子或IGF-2P3启动子。

[0088] 用于在本文描述的方法中使用的合适的质粒可以包括包含与编码细胞毒性基因产物的异源序列可操作地连接的调节序列的多核苷酸,其中调节序列来自在癌细胞中特异性表达的基因组印记基因。

[0089] 调节序列可以是H19调节序列(例如,H19启动子、H19增强子、或H19启动子和H19增强子两者)、IGF-2P4启动子或IGF-2P3启动子。例如,H19调节序列可以是H19启动子和增强子,并且异源序列编码选自自由以下组成的组的蛋白: β -半乳糖苷酶、白喉毒素、假单胞菌毒素、蓖麻毒蛋白、霍乱毒素、成视网膜细胞瘤基因、p53、单纯疱疹胸苷激酶、水痘带状疱疹胸苷激酶、胞嘧啶脱氨酶、硝基还原酶、细胞色素p-450 2B1、胸苷磷酸化酶、嘌呤核苷磷酸化酶、碱性磷酸酶、羧肽酶A和G2、亚麻苦苷酶、 β -内酰胺酶和黄嘌呤氧化酶。H19增强子可以被置于异源序列的3'。

[0090] 本领域技术人员将认识到,异源序列可以选自以下中的任何一个或更多个:以下的编码序列: β -半乳糖苷酶;白喉毒素;假单胞菌毒素;蓖麻毒蛋白;霍乱毒素;成视网膜细胞瘤基因;p53;单纯疱疹胸苷激酶;水痘带状疱疹胸苷激酶;胞嘧啶脱氨酶;硝基还原酶;细胞色素p-450 2B1;胸苷磷酸化酶;嘌呤核苷磷酸化酶;碱性磷酸酶;羧肽酶A和G2;亚麻苦苷酶; β -内酰胺酶;黄嘌呤氧化酶;和反义序列,所述反义序列与编码选自自由以下组成的组的基因的序列特异性杂交:cdk2、cdk8、cdk21、cdc25A、细胞周期蛋白D1、细胞周期蛋白E、细胞周期蛋白A、cdk4、致癌形式的p53、c-fos、c-jun、Kr-ras和Her2/neu。异源序列还可编码特异性裂解编码选自自由以下组成的组的基因的RNA的核酶:cdk2、cdk8、cdk21、cdc25A、细胞周期蛋白D1、细胞周期蛋白E、细胞周期蛋白A、cdk4、致癌形式的p53、c-fos、c-jun、Kr-ras和Her2/neu。

[0091] 本文描述的冻干前的和重构的物质组合物内的核酸的浓度可以在0.1mg/mL与0.8mg/mL之间(例如,0.1mg/mL、0.2mg/mL、0.3mg/mL、0.4mg/mL、0.5mg/mL、0.6mg/mL、

0.7mg/mL、或0.8mg/mL),或更低。该核酸浓度是现有技术组合物中观察到的核酸载量(即,约0.01-0.05mg/mL)的大约8至40倍大。在本文描述的冻干前的和重构的物质组合物中,核酸和PEI两者均被稀释到海藻糖溶液中。

[0092] 用于本发明的方法和制剂中的至少一种碳水化合物为如本领域已知的任何碳水化合物材料。如本文使用的,“碳水化合物”意指包括具有通式 $(CH_2O)_n$ 的任何化合物,并且可以与术语“糖类”、“多糖”、“寡糖”和“糖”可互换地使用,如在碳水化合物化学领域熟知的。

[0093] 碳水化合物可以是单糖、二糖、三糖和寡糖,以及多糖诸如糖原、纤维素和淀粉中的任何一种。

[0094] 在一些实施方案中,至少一种碳水化合物选自单糖诸如葡萄糖、果糖、甘露糖、木糖、阿拉伯糖、半乳糖以及其他;选自二糖诸如海藻糖、蔗糖、纤维二糖、麦芽糖、乳糖以及其他;寡糖诸如棉子糖、水苏糖、麦芽糖糊精以及其他;多糖诸如纤维素、半纤维素、淀粉以及其他。

[0095] 在一些实施方案中,至少一种碳水化合物选自海藻糖、葡萄糖、蔗糖、乳糖、甘露糖醇、山梨糖醇、棉子糖、PVP和右旋糖。

[0096] 在一些实施方案中,至少一种碳水化合物不为葡萄糖或蔗糖。

[0097] 在一些实施方案中,至少一种碳水化合物为单糖或二糖。

[0098] 在一些实施方案中,至少一种碳水化合物为海藻糖。

[0099] 术语“阳离子聚合物”为包含阳离子基团和/或可以被离子化为阳离子基团的基团的天然的、合成的或半合成的任何聚合物。阳离子聚合物可以是亲水性的或两亲性的。在一些实施方案中,阳离子聚合物选自包含伯胺、仲胺、叔胺和/或季胺基团的聚合物。胺基团可以是主聚合物链的一部分,或者可以悬垂于链上,或者可以经由与链连接的一个或多个侧基与链缔合。

[0100] 在一些实施方案中,至少一种阳离子聚合物选自聚乙烯亚胺,聚烯丙胺,聚醚胺,聚乙烯基吡啶,其上具有带正电荷官能团的多糖,聚氨基酸,聚-L-组氨酸,聚-D-赖氨酸,聚-DL-赖氨酸,聚-L-赖氨酸,聚-e-CBZ-O-赖氨酸,聚-e-CBZ-DL-赖氨酸,聚-e-CBZ-L-赖氨酸,聚-OL-鸟氨酸,聚-L-鸟氨酸,聚-DELTA-CBZ-DL-鸟氨酸,聚-L-精氨酸,聚-DL-丙氨酸-聚-L-赖氨酸,聚(L-组氨酸,L-谷氨酸)-聚DL-丙氨酸-聚-L-赖氨酸,聚(L-苯丙氨酸,L-谷氨酸)-聚-DL-丙氨酸-聚-L-赖氨酸,聚(L-酪氨酸,L-谷氨酸)-聚DL-丙氨酸-聚-L-赖氨酸,L-精氨酸与色氨酸、酪氨酸或丝氨酸的共聚物,D-谷氨酸与D-赖氨酸的共聚物,L-谷氨酸与赖氨酸、鸟氨酸或赖氨酸和鸟氨酸的混合物的共聚物,以及聚-(L-谷氨酸)。

[0101] 在一些实施方案中,至少一种阳离子聚合物为聚乙烯亚胺(PEI)。

[0102] 不受理论束缚,认为在本文描述的冻干前的、冻干的和重构的物质组合物中,将三种组分(即,质粒、阳离子聚合物和碳水化合物)组合在一起以提供新颖的材料形式。相比之下,在现有技术的物质组合物中,碳水化合物被添加至先前形成的复合物中,并且仅用作冷冻保护剂和稳定剂两者,由此与本发明的物质组合物相比需要更高的比率。因此,在本文描述的物质组合物中碳水化合物与核酸的比率是现有技术中使用的比率的大约约40至约400倍低。

[0103] 在一些实施方案中,PEI的胺基团的摩尔与核酸的磷酸基团的摩尔的比率在2与10之间(例如,2、3、4、5、6、7、8、9、10、或在6与8之间)。

[0104] 在一些实施方案中,物质组合物不包含组氨酸和/或氯化钠。

[0105] 在这些物质组合物中,带正电荷的PEI和带负电荷的核酸在碳水化合物(例如,海藻糖)的存在下形成纳米颗粒。冻干前的溶液的纳米颗粒范围为从约40nm至约50nm(例如,约40nm、41nm、42nm、43nm、44nm、45nm、46nm、47nm、48nm、49nm或50nm),并且用于重构的产物的纳米颗粒范围为从约80nm至约90nm(例如,约80nm、81nm、82nm、83nm、84nm、85nm、86nm、87nm、88nm、89nm或90nm)。

[0106] 一般来说,并且取决于除其他以外,构成纳米颗粒的带正电荷的PEI和带负电荷的核酸,纳米颗粒尺寸可以在40nm至约500nm之间变化。因此,纳米颗粒可以具有选自以下的尺寸:40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、205、210、215、220、225、230、235、240、245、250、255、260、265、270、275、280、285、290、295、300、305、310、315、320、325、330、335、340、345、350、355、360、365、370、375、380、385、390、395、400、405、410、415、420、425、430、435、440、445、450、455、460、465、470、475、480、485、490、495和500nm。

[0107] 本发明还预期了如本文公开的制剂。

[0108] 还预期了根据本发明的组合物、制剂和制品的用途。在一些实施方案中,根据本发明的组合物、制剂和制品可以被配制用于在药品中使用。因此,本发明还提供了药物组合物、制剂和制品。

[0109] 本发明还提供了根据本发明的组合物、制剂或制品在制备药物中的用途。

[0110] 在一些实施方案中,药物用于在治疗罹患通过根据本发明采用的一种或更多种核酸可治疗的疾病或紊乱的受试者的方法中使用。

[0111] 在一些实施方案中,通过一种或更多种核酸可治疗的疾病或紊乱选自增殖性疾病和紊乱。

[0112] 在一些实施方案中,疾病为类风湿关节炎。

[0113] 因此,还提供了治疗或预防至少一种增殖性疾病或紊乱以及用于治疗或预防类风湿关节炎的方法。

[0114] 至少一种增殖性疾病或紊乱可以选自癌症。因此,本发明还预期了在治疗或预防患者中的肿瘤中的用途。根据本发明的一般治疗方法可以包括获得冻干的组合物并将该组合物例如使用双蒸水(DDW)或IV注射用水重构为有效量的组合物,并将重构的组合物施用于受试者。

[0115] 在其中增殖性疾病为癌症的一些实施方案中,它可以选自由以下组成的组:膀胱癌、肝细胞癌、肝母细胞瘤(hepatoblastoma)、横纹肌肉瘤、卵巢癌、宫颈癌、肺癌、乳腺癌、头颈部鳞状细胞癌、食道癌、甲状腺癌、星形细胞瘤、成神经节细胞瘤(ganglioblastoma)和成神经细胞瘤。

[0116] 在一个实施方案中,膀胱癌为非肌肉浸润性膀胱癌,并且组合物经膀胱内、静脉内、肿瘤内或使用本领域已知的任何其他合适的方法施用。

[0117] 除非另外定义,否则本文使用的所有技术术语和科学术语具有与本发明所属技术领域的普通技术人员所通常理解的相同的含义。尽管与本文描述的那些相似或等同的方法和材料可以用于实践或测试本发明,但下文描述了合适的方法和材料。本文提及的所有出版物、专利申请、专利及其他参考文献均通过引用以其整体并入。在冲突的情况下,将以本

说明书,包括定义为准。另外,材料、方法和实例仅为说明性的而并非意图限制。

[0118] 本发明的其他特征和优势将从以下详述和权利要求变得明显。

[0119] 附图简述

[0120] 为了更好地理解本文公开的主题并且为了例示主题可以如何在实践中进行,现在将参考附图通过仅非限制性实例的方式描述实施方案,在附图中:

[0121] 图1A-1B为显示冻干之前(冻干前的组合物,图1A)和重构之后(重构的,图1B)的溶液的效价的测定的图示。Luc 4=无效价(基线;最大发光;所有细胞均为存活的);Comp=常规制品的效价;Rev=本发明新制备方法的效价;以及Usual=新鲜组合物。

[0122] 图2示出了样品电泳的结果。泳道1为标志物;泳道2为质粒BC-819;泳道3为5%葡萄糖中的BC-819/in vivo-jetPEI[®]组合物(标准制品);泳道4为海藻糖中的组合物(逆转方案);泳道5为用DDW重构之后的冻干组合物(重构的物质组合物);以及泳道6为5%海藻糖中的BC-819/in vivo-jetPEI[®]组合物。

[0123] 图3为显示使用本文描述的标准方法和逆转方法制备的PEI/BC-819组合物的颗粒的体积的尺寸分布(size distribution by volume)的图。

[0124] 图4为显示使用本文描述的标准方法和逆转方法制备的PEI/BC-819组合物的颗粒的 ζ 电位分布的图。

[0125] 图5为显示下文实施例3中描述的分光光度法测试的结果的图。

[0126] 图6呈现了使用下文实施例3中描述的方法的另外样品的电泳的结果。泳道1为梯状条带;泳道2为BC-819质粒;泳道3为葡萄糖溶液中的组合物(标准方案);泳道4为海藻糖中的组合物(逆转方案);泳道5为再水合之后的冻干的polyplex(重构的组合物);以及泳道6为海藻糖溶液中的组合物。

[0127] 图7A-7B为显示葡萄糖组合物(图7A)和海藻糖组合物(图7B)的外观的TEM照片。

[0128] 图8为显示在组合物沉淀之后的样品的TEM照片。

[0129] 图9A-9B为显示透射电子显微术(TEM)的结果的照片。

[0130] 图10为显示与5%葡萄糖对照相比,接受现有技术的物质组合物或重构的冻干组合物的三次注射的裸小鼠中HCT-116细胞的肿瘤进展的图。

[0131] 实施方式的详细描述

[0132] 如本文使用的,术语“葡萄糖polyplex”、“葡萄糖物质组合物”等指使用葡萄糖而不是海藻糖作为多糖制备的现有技术的物质组合物。同样地,术语“标准polyplex制品”、“标准物质组合物”等指通过将聚合物添加至质粒中而制备的现有技术的物质组合物(即,“非逆转”顺序)。

[0133] 如本文使用的,术语“聚集(aggregation)”、“聚集体(aggregate)”等指具有比被视为可接受的最高粒径更大的尺寸的颗粒。为了确定最高可接受的粒径,提供了不同的光散射量度,并且比较了标准制备方法和新制备方法以观察是否存在任何差异。

[0134] 可以用于指导异源编码序列的肿瘤细胞特异性表达的调节序列是本领域已知的。例如,H19调节序列,包括上游H19启动子区域和/或下游H19增强子区域,被描述于美国专利第6,087,164号,其通过引用以其整体并入本文。任选地,人类H19基因的下游增强子区域可以被添加至H19启动子/异源基因构建体以提供增强水平的肿瘤细胞特异性表达。

[0135] 美国专利第6,087,164号也描述了IGF-2P3和P4启动子与H19增强子或其活性片段组合的用途。

[0136] 本领域技术人员将能够使用来自在癌细胞中表达的基因组印记和非印记基因的调节序列,以指导异源编码序列在适当的宿主细胞例如表达H19的癌细胞(例如,膀胱癌细胞,举例说明)中的肿瘤特异性表达。保留其指导肿瘤特异性表达的能力的任何改变的调节序列被掺入到重组表达载体中以供进一步使用。

[0137] 可以在这些调节序列的控制下表达多种异源基因,诸如编码毒性基因产物、潜在的毒性基因产物、以及抗增殖或抑制细胞生长的基因产物的基因。还可以表达标志物基因,包括酶(例如CAT、 β -半乳糖苷酶、萤光素酶),荧光蛋白诸如绿色荧光蛋白或抗原标志物。

[0138] 细胞毒性基因产物被广义地定义为包括毒素和凋亡诱导因子(apoptosis-inducing agents)两者。另外,细胞毒性基因产物包括将前药转化为细胞毒性产物的药物代谢酶。可以在本发明的方法中使用的细胞毒性基因产物的实例包括白喉毒素、假单胞菌毒素、蓖麻毒蛋白、霍乱毒素、PE40和肿瘤抑制基因诸如成视网膜细胞瘤基因和p53。另外,可以使用编码诱导细胞凋亡的凋亡肽的序列。此类凋亡肽包括阿尔茨海默氏A β 肽(参见LaFerla等,Nat.Genet.9:21-30(1995))、心房利尿钠肽(参见Wu等,J.Biol.Chem.272:14860-14866(1997))、降钙素基因相关肽(参见Sakuta等,J.Neuroimmunol.67:103-109(1996)),以及已知或待发现的其他凋亡肽。

[0139] 将前药转化为细胞毒性产物的药物代谢酶包括胸苷激酶(来自单纯疱疹或水痘带状疱疹病毒)、胞嘧啶脱氨酶、硝基还原酶、细胞色素p-450 2B1、胸苷磷酸化酶、嘌呤核苷磷酸化酶、碱性磷酸酶、羧肽酶A和G2、亚麻苦苷酶、 β -内酰胺酶和黄嘌呤氧化酶(关于背景,参见Rigg和Sikora,Mol.Med.Today,第359-366页(August 1997))。

[0140] 另外,可以使用表达构建体将反义、反基因(antigene)或适体(aptameric)寡核苷酸递送至癌细胞。还可以在癌细胞中表达核酶或单链RNA以抑制感兴趣的特定基因的表达。这些反义或核酶分子的靶基因将是编码对于细胞维持或对于维持癌性细胞表型所必需的基因产物的那些靶基因。此类靶基因包括但不限于,cdk2、cdk8、cdk21、cdc25A、细胞周期蛋白D1、细胞周期蛋白E、细胞周期蛋白A和cdk4。

[0141] 例如,将在来自癌细胞中表达的印记基因的调节序列或IGF-1启动子的控制下表达对致癌形式的p53、c-fos、c-jun、Kr-ras和/或Her2/neu的转录物特异性的反义RNA或核酶的载体引入到细胞中以下调内源基因的表达。表达H19并且能够活化H19调节序列(或特异性地活化IGF-1、IGF-2P3或P4启动子)的肿瘤细胞能够由于表达反义RNA或核酶RNA而被特异地靶向。

[0142] 反义方法包括设计与靶mRNA互补的寡核苷酸(在这种情况下,mRNA)。反义寡核苷酸将与互补的靶mRNA转录物结合,并且阻止翻译。不需要绝对的互补性。如本文提及的与RNA的一部分“互补”的序列意指一种具有能够与RNA杂交,形成稳定的双链体的足够互补性的序列。杂交能力将取决于互补性的程度和反义核酸的长度两者。通常,所杂交的核酸越长,它可能包含的与RNA的碱基错配越多,且仍然形成稳定的双链体(或三链体,视具体情况而定)。本领域的技术人员可以通过使用标准程序确定双链体的解链温度(melting point),以确定错配的可容许程度。

[0143] 与靶信使RNA的5'末端,例如多达并包括AUG起始密码子的5'非翻译序列互补的寡

核苷酸,将最有效地起抑制翻译的作用。然而,最近已经表明,与mRNA的3'非翻译序列互补的序列也有效地抑制mRNA的翻译。通常参见,Wagner,R.,Nature 372:333-335(1994)。因此,与靶基因转录物的5'-或3'-非翻译、非编码区域互补的寡核苷酸可以用于反义方法,以抑制内源基因的翻译。与mRNA的5'非翻译区域互补的寡核苷酸应包括AUG起始密码子的互补序列。与mRNA编码区域互补的反义寡核苷酸为较不有效的翻译抑制物,但可以根据本发明使用。无论被设计为与靶mRNA的5'、3'或与编码区域杂交,反义核酸长度应该为至少6个核苷酸,并且优选地为长度范围在从6个至约50个核苷酸的寡核苷酸。例如,寡核苷酸为至少10个核苷酸、至少17个核苷酸、至少25个核苷酸或至少50个核苷酸。

[0144] 被设计为催化性裂解必需靶基因的核酶分子也可以用于阻止靶mRNA的翻译。(参见,例如,1990年10月4日公布的PCT国际公布W090/11364;Sarver等,Science 247:1222-1225(1990))。当核酶对编码癌细胞生长必需的蛋白的基因转录物为特异性时,此类核酶可以引起癌性细胞表型的逆转。虽然在位点特异性识别序列处裂解mRNA的核酶可以被用于破坏靶mRNA,但优选使用锤头状核酶。锤头状核酶在由侧翼区域指定的位置处裂解mRNA,所述侧翼区域与靶mRNA形成互补碱基对。唯一的要求是,靶mRNA具有以下2个碱基的序列:5'-UG-3'。锤头状核酶的构建和产生是本领域熟知的,并且在Haseloff和Gerlach,Nature, 334:585-591(1988)中被更完全地描述。优选地核酶被工程化为使得裂解识别位点位于靶mRNA的5'末端附近;即增加效率并使非功能性mRNA转录物的细胞内积累最小化。

[0145] 核酶还包括RNA内切核糖核酸酶(下文被称为“Cech型核酶”),诸如在嗜热四膜虫中(*Tetrahymena thermophila*)天然存在的核酶(被称为IVS,或L-19IVS RNA),并且该酶由Thomas Cech和合作者深入地描述(Zaug等,Science,224:574-578(1984);Zaug和Cech,Science,231:470-475(1986);Zaug等,Nature,324:429-433(1986);University Patents Inc.的公布的国际专利申请第W0 88/04300号;Been和Cech,Cell,47:207-216(1986))。Cech型核酶具有一个8碱基对的活性位点,该位点与靶RNA序列杂交,然后在此处发生靶RNA的裂解。

[0146] 本领域已知的任何质粒均可以用于本发明的方法和组合物中。通过非限制性实例的方式,可以使用质粒BC-819和BC-821(BioCancell,Israel)。这些质粒在美国专利第6,087,164号和美国公布的专利申请第20100256225号中被更详细描述,其通过引用以其整体并入本文。

[0147] 再活化印记基因表达的细胞也将能够特异性活化包含与异源基因可操作地连接的此类印记基因调节区域的表达构建体。此类细胞,特别地肿瘤细胞,为用于本发明的基因疗法方法的适当的靶。H19、和IGF-2P3和P4在肿瘤和细胞系两者中的特异性表达可以使用RNA分析、原位杂交和报告物基因构建体的技术来确定。另外,具有活化的IGF-1基因表达的肿瘤细胞可以相似地确定,并且在基因疗法中使用IGF-1启动子靶向以指导异源基因的表达。

[0148] 具有活化的H19表达的示例性肿瘤类型如下:

[0149] A. 小儿实体肿瘤

[0150] 1. 肾母细胞瘤(Wilm's tumor)

[0151] 2. 肝母细胞瘤

[0152] 3. 胚胎横纹肌肉瘤

[0153] B.生殖细胞肿瘤和滋养细胞肿瘤

[0154] 1.睾丸生殖细胞肿瘤

[0155] 2.卵巢未成熟畸胎瘤

[0156] 3.骶尾部肿瘤

[0157] 4.绒毛膜癌

[0158] 5.胎盘部位滋养细胞肿瘤

[0159] C.成人上皮肿瘤

[0160] 1.膀胱癌

[0161] 2.肝细胞癌

[0162] 3.卵巢癌

[0163] 4.宫颈癌

[0164] 5.肺癌

[0165] 6.乳腺癌

[0166] 7.头颈部鳞状细胞癌

[0167] 8.食管癌

[0168] 9.甲状腺癌

[0169] D.神经源性肿瘤

[0170] 1.星形细胞瘤

[0171] 2.成神经节细胞瘤

[0172] 3.成神经细胞瘤

[0173] 任何这些癌症均可通过本发明的方法治疗。事实上,活化H19表达的任何肿瘤均可通过本发明的方法治疗。另外,活化IGF-1和IGF-2P3和P4启动子的肿瘤也可通过本发明的方法治疗。例如,IGF-2P3和P4启动子在儿童肿瘤诸如肾母细胞瘤、横纹肌肉瘤、成神经细胞瘤和肝母细胞瘤中被活化。

[0174] 疗法

[0175] 本发明还预期了包含与异源基因可操作地连接的调节区域的多核苷酸用于在治疗癌症和过度增殖性疾病的疗法中使用的用途。出于疗法的目的,本发明的表达构建体可以在任何生物有效的载体中施用,所述载体例如,能够将该核苷酸构建体有效地体内递送至细胞的任何制剂或组合物。

[0176] 除了病毒转移方法以外,非病毒方法也可以用于在动物组织中引导期望的异源基因的定向表达。大多数非病毒基因转移方法依赖于由哺乳动物细胞使用的大分子摄取和细胞内转运的正常机制。在一些实施方案中,本发明的非病毒基因递送系统依赖于胞吞途径,以由靶向细胞摄取主题表达构建体。这种类型的示例性基因递送系统包括例如polyplex。

[0177] polyplex形成和冻干

[0178] 如本文描述的,阳离子聚合物可以与核酸(例如,质粒)组合用作转染试剂以介导到细胞和组织中的有效核酸(例如,DNA、shRNA、siRNA、寡核苷酸等)递送。当核酸与阳离子聚合物复合时形成物质组合物。

[0179] 本领域技术人员将认识到,本领域常用的其他添加剂,诸如,例如,脂质、脂质体、胆固醇、聚乙二醇(PEG)、胶束、透明质酸、蛋白、乳化剂、表面活性剂、病毒载体和/或靶向部

分也可以用于本发明的组合物中。

[0180] 然而,在一些实施方案中,polyplex制剂(例如,冻干前的物质组合物)仅包含核酸、阳离子聚合物、糖和任选的缓冲液。相比之下,本领域中使用的其他制剂包含其他组分,诸如,例如,组氨酸。

[0181] 用于在polyplex形成中使用的一种示例性阳离子聚合物为聚乙烯亚胺(PEI)。(参见美国专利第6,013,240号,通过引用并入)。例如,可以使用线性聚乙烯亚胺(*in vivo-jetPEI*[®], Polyplus-transfection S.A., France)。*in vivo-jetPEI*[®]为150mM溶液(以氮残基表示)。可选地,线性PEI可以通过水解商购可得的支化PEI或通过本领域已知的任何其他方法来制备。

[0182] 本领域技术人员将认识到,阳离子聚合物/核酸物质组合物内的离子平衡为至关重要的,并且为了有效进入细胞,物质组合物应该为阳离子的。N/P比率被定义为阳离子聚合物中每核酸磷酸的氮残基的数目。优选地,对于体内核酸递送,N/P比率在2-10之间(例如,在6-8之间)。N/P比率的确定在本领域的常规技术水平内。

[0183] 核酸-PEI物质组合物(例如,冻干前的物质组合物)包含在PEI、质粒DNA和碳水化合物混合期间形成的纳米颗粒。当混合时,阳离子聚合物的正电荷和质粒的负电荷形成纳米颗粒。

[0184] 可以使用任何合适的递送途径,例如:静脉内(IV)、腹膜内(IP)、肿瘤内、皮下、局部、鞘内、皮内、玻璃体内、皮内、皮质内、睾丸内、动脉内、膀胱内(例如,进入膀胱)、门静脉内、脑内、眶后注射、鼻内等。在一些实施方案中,基因递送媒介物可以通过导管引入。(参见美国专利第5,328,470号)。将核酸递送到细胞或组织中可以在体外、体内、离体或原位进行。

[0185] 如下文实施例1中概述的,标准polyplex形成通过将在5%右旋糖溶液中稀释的转染试剂(例如,*in vivo-jetPEI*[®])引入到在5%右旋糖溶液中稀释的DNA质粒(例如,BC-819质粒)中,随后进行强力混合来完成。这种用于制备质粒/阳离子聚合物物质组合物为标准方法为非常敏感的,并且如果不按正确的顺序进行,则易于导致沉淀。此外,所得的polyplex物质组合物可能不稳定并且在室温3小时之后观察到浅黄色。另外,当用标准方案进行制备时,先前试图逆转将质粒添加至转染试剂的方法未导致纳米颗粒的形成。此外,这些溶液被限制为微体积(micro-volume),并且需要冷冻保护剂与纳米颗粒的高比率以实现冻干。

[0186] 因此,需要这样的polyplex形成的方法:所述方法可以扩大规模用于大规模制备和长期储存定义明确且稳定的溶液或冷冻干燥的物质组合物,其将确保在再水合后可预测的品质和增加的稳定性。

[0187] 一些之前的研究已经表明,在冻干保护剂以高浓度(即,碳水化合物/DNA质粒的高比率w/w)的存在下,DNA质粒/LPEI物质组合物可以被冻干并保持其初始品质。(参见Brus等,Journal of Controlled Release 95:119-131 (2004))。已经报道了,在用PEI的情况下,7500的糖/DNA比率保护复合物。此外,阳离子脂质-DNA(非LPEI)需要250的比率。然而,Brus等中使用的冻干方法不可以大规模重现。此外,这些研究中使用的高浓度冻干保护剂在体内可能不被耐受,并且因此可能导致最终产品对于在临床研究中使用时可能不恰当。

[0188] 事实上,本发明的发明人已经出乎意料地发现,在冻干方法中使用低得多的碳水

化合物(糖)与核酸的比率,由此产生具有降低的碳水化合物与核酸比率的物质组合物是可能的。不受理论束缚,本发明人认为,本文描述的物质组合物的三种组分(DNA、Jet-PEI和碳水化合物)组合以形成可以被容易地冻干的新化学实体。因此,需要低得多的浓度的碳水化合物。

[0189] 这些较低的浓度对于体内应用更好地耐受。例如,人类血液的渗透压度(osmolality)的正常生理范围为大约280mOsmol/L至310mOsmol/L,而在葡萄糖中制备的物质组合物为250,并且用于在膀胱中使用海藻糖中的物质组合物为280。因此,为膀胱制备的溶液轻微低渗,但它正在膀胱内施用。对于IV制品,浓度将增加至多达300的DNA/海藻糖比率。

[0190] 这些研究也已经提出了制备高体积polyplex溶液的挑战性方面,并且报道了开发微混合器系统方法(参见Kasper等,European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 77:182-185(2011))以实现该目标。然而,这种微混合器系统仍需要扩大规模开发以达到工业规模。

[0191] 下文实施例3描述了在5%海藻糖溶液存在下冻干前的物质组合物的制备,所述冻干前的物质组合物包括在H19基因调节序列控制下表达白喉毒素A链(DTA)的非病毒载体BC-819和in vivo-jetPEI[®]。

[0192] 先前已经报道了新的基于DNA的疗法用于癌症治疗的用途,其中BC-819(也被称为H19-DTA)和BC-821质粒(也被称为H19-DTA-P4-IGF2)在H19(对于BC-819)或H19和IGF2P4(对于BC-821)调节元件的控制下驱动DTA的表达以选择性地靶向癌细胞。(参见Ohana等,International Journal of Cancer 98(5):645-650(2002);Ohana等,The Journal of Gene Medicine 7(3):366-374(2005);Abraham等,The Journal of Urology 180(6):2379-2383(2008))。这些疗法在结肠癌至肝转移瘤、膀胱癌、胰腺癌和卵巢癌的治疗中表现出良好的结果。(参见Ohana等,The Journal of Gene Medicine 7(3):366-374(2005);Mizrahi等,Journal of Translational Medicine 7:69(2009);Ohana等,Gene Therapy and Molecular Biology 8:181-192(2004);Scaiewicz等,Journal of Oncology 178174(2010);Sorin等,International Journal of Oncology 39(6):1407-12(2011);Abraham等,The Journal of Urology 180(6):2379-2383(2008))。

[0193] 在这些膀胱癌临床试验中,BC-819作为与in vivo-jetPEI[®]的复合物(N/P=6)以在最终体积为50ml 5%葡萄糖中为0.4mg/ml的最终浓度施用。

[0194] 然而,由于对于混合组分的严格建议以及在该浓度形成的物质组合物的相对不稳定性,制备高品质物质组合物仍然是一个挑战。(参见Kasper等,European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 77:182-185(2011))。

[0195] 如下文实施例1中描述的,在患者的床边,将质粒和PEI溶液两者单独地在5%w/v葡萄糖溶液中稀释,并且然后将PEI溶液非常快地添加至质粒溶液中。与方案的任何偏差均可能导致物质组合物品质的下降,或者甚至更糟的是沉淀。因此,物质组合物的制备要求在每一次剂量施用时高度合格的工作人员参与。另外,所得的polyplex溶液具有短的货架期。

[0196] 因此,确保施用可重现的良好品质polyplex的最佳方式为向药房提供具有至少24个月的货架期的即用产品(例如,冻干的物质组合物)。该产品在使用之前将需要用水简单

重构。

[0197] 本文描述的方法允许在例如随后可以以治疗性剂量冻干的海藻糖溶液中以期望的浓度以高体积来制备物质组合物溶液。

[0198] 在制备期间使用的最终海藻糖浓度提供了等渗环境,这允许形成稳定的物质组合物并且当体内施用时是耐受的以及新制的(fresh-made)溶液。

[0199] 稳定的冻干前的物质组合物溶液的形成对于确保成功的冷冻干燥方法是至关重要的。

[0200] 使用这种方法还允许通过逆转混合两种组分的顺序来克服高体积polyplex制品的技术限制。在此,实现了以相对高浓度制备等渗且稳定的冻干前的物质组合物溶液,其可以进行冷冻干燥而不改变产物。

[0201] 该方法为质粒-LPEI(线性PEI)物质组合物的生成的突破,该方法可以被扩大规模至工业生产,并将提供稳定的产物,所述产物可以在施用至患者之前容易地储存和均匀地制备。

[0202] 为了克服标准polyplex形成方法的限制,本文提供了冻干前的物质组合物溶液形成方法,其中核酸(例如,BC-819质粒)、阳离子聚合物(例如,in vivo-jetPEI[®])和碳水化合物(例如,海藻糖)以逆转的顺序混合(与标准方案相比)。该方法在本文可互换地被称为“逆转工艺”、“逆转方法”和/或“逆转polyplex形成”。以这种方式,将质粒以缓慢和受控制的方法添加至转染试剂中,伴随着形成的物质组合物溶液的连续混合。重要地,冻干前的物质组合物溶液包含核酸、LPEI和碳水化合物以形成非常稳定的新化学实体(NCE)以确保良好的冻干产物。

[0203] 所得的冻干的物质组合物仅包含三种组分:PEI、DNA质粒和海藻糖。此外,物质组合物不再被定义为复合的PEI/质粒。而是,它为一种具有不同化学结构的无定形粉末。

[0204] 根据本文描述的逆转方法制备的物质组合物具有比当使用本领域已知的其他polyplex形成方法时所观察到的比率低得多的碳水化合物与核酸-聚合物物质组合物比率。

[0205] 冻干为溶解的化合物的脱水方法而无需加热介导的蒸发。在冻干方法中,将溶液冷冻并经历低压环境,在该低压环境下促进水升华过程,对溶解的化合物的损伤为零至最小。

[0206] 在阳离子聚合物与核酸使用逆转方案复合后,可以根据本文描述的或本领域已知的任何冻干方法将其冻干。在本发明之前,当将海藻糖、甘露糖醇或蔗糖以10 μ g/mL至50 μ g/mL的浓度添加至polyplex时,在冻干之后观察到功效减少。(参见Brus等,Journal of Controlled Release 95(2004)119-131)。

[0207] 冻干的物质组合物可以以冻干的形式储存直至使用,并且在注射到患者中之前重构(例如,用DDW)。冻干的物质组合物将具有大于3个月的货架期(即,大于3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、12个月、13个月、14个月、15个月、16个月、17个月、18个月、19个月、20个月、21个月、22个月、23个月、24个月、或更多个月)。

[0208] 在重构之后,物质组合物的外观与根据逆转制备方法制备的新鲜物质组合物溶液的外观相似,并且未观察到沉淀。同样地,重构的样品显示与标准或新制备方法无差异。重要地,polyplex溶液中的核酸浓度不受冻干方法的影响。

[0209] 通过现有技术方法制备的新鲜复合物产生在50–500nm范围内的颗粒。以逆转顺序制备冻干前溶液产生在40–50nm范围内的颗粒。在冻干之后重构的样品(使用逆转顺序)产生在80–90nm范围内的颗粒。因此,在重构后,纳米颗粒的尺寸与新鲜物质组合物的尺寸相当。相比之下,如Kasper等中描述的,当使用用于低DNA浓度复合物的微混合器制备时,所得的颗粒在65–170nm的范围内。

[0210] 在室温3h之后,通过现有技术方法制备(用葡萄糖制备)的新鲜的物质组合物表现出降解的迹象(即,微黄色)。相比之下,根据逆转制备方法(在海藻糖中的冻干前的情况)制备的重构样品和溶液两者均未显示出可见的降解迹象,并且为浅白色乳白色的颜色。在室温24h之后,通过现有技术方法制备(用葡萄糖制备)的新鲜物质组合物为黄色,而根据逆转制备方法(在海藻糖中冻干前)制备的重构的样品和溶液未显示出可见的降解迹象并且保持浅白色乳白色的颜色。

[0211] 因此,将逆转制备方法与冻干组合使用将解决许多与标准方法相关的问题。

[0212] 例如,在患者的床边,医学从业者将仅需将冻干的粉末(冻干的物质组合物)溶解于IV注射用水中,以便在使用之前重构冻干的物质组合物,由此简化了制备和施用。此外,冻干的粉末由于其预期的改进的稳定性而更易于运输。另外,冻干的产物的特性与原始的含水(即,非冻干的)质粒相当。

[0213] 本文描述的逆转polyplex配制方法(在海藻糖中冻干前的物质组合物)也不同于2012年Julia Christina Kasper的题为“Lyophilization of Nucleic Acid Nanoparticles-Formulation Development, Stabilization Mechanisms, and Process Monitoring.”的博士论文中描述的方法。Kasper认识到对用于制备稳定的polyplex溶液的定义明确的方法的需求,并且理解,当试图冻干polyplex时在冻干的冷冻步骤期间出现通常观察到的纳米颗粒的聚集。

[0214] 为了克服这些问题,Kasper开发了一种不同的方法来制备polyplex。与本文描述的逆转方案(在海藻糖中预冷冻)相比的该方法的概述提供于表1中。

[0215]

	Kasper	逆转方案
质粒	pCMVluc (商业的) https://www.addgene.org/45968/	BC-819 (BioCancell, Israel)
用于稀释质粒的缓冲液	10 mM 组氨酸缓冲液 pH 6.0	Tris EDTA pH 8.0
用于稀释 PEI 的缓冲液	10 mM 组氨酸缓冲液 pH 6.0	注射用水(WFI)
PEI	支化 PEI 的 内部水解	<i>In vivo</i> -jetPEI®
N/P 比率	6	6
制备体积	0.5 ml	1 l
制备方法	微混合器(仍需要开发用于更大 体积的方法)	将在海藻糖溶液中稀释的 质粒以 3-5 ml/min 的速率添 加至在海藻糖溶液中稀释 的 PEI 中, 同时以 500 rpm 搅拌

[0216] 表1

[0217] 下文表2对Kasper polyplex制备和冻干方案与本文描述的逆转polyplex制备和冻干方法的技术方面进行了比较。

[0218]

	Kasper	逆转方案+冻干
质粒	pCMVluc (商业的) https://www.addgene.org/45968/	BC-819 (BioCancell, Israel)
用于稀释质粒的缓冲液	10 mM 组氨酸缓冲液 pH 6.0	Tris EDTA pH 8.0
用于稀释 PEI 的缓冲液	HBG 缓冲液 pH 7.4 (5%葡萄糖 20 mM Hepes)或 10 mM 组氨酸 缓冲液 pH 6.0	WFI
PEI	支化 PEI 的 内部水解	<i>In vivo</i> -jetPEI®
海藻糖添加	在 10 mM 组氨酸缓冲液 pH 6.0 与 中混合 并且以 1:1 添加至 polyplex	与 质粒和 PEI 以 5%混合
N/P 比率	6	6
制备方法	微混合器(仍需要开发用于更大 体积的方法)	将在海藻糖溶液中稀释的质 粒以 3-5 ml/min 的速率添加至 在海藻糖溶液中稀释的 PEI 中, 同时以 500 rpm 搅拌
最终质粒浓度	0.1 mg/ml	0.4 mg/ml
最终溶液体积	0.5 ml, 多达 5 ml	1 l

[0219]

溶液 DSC 测试	是	是
冻干机	冷冻干燥机 Lyostar II, SP Scientific, Stone Ridge USA	冷冻干燥机 LyoBeta 25 Telstar spain
稳定性	2°C-8°C、20°C、40°C持续 6 周	迄今, 在 2°C-8°C 2 周

[0220] 表2

[0221] Kasper还描述了制备稳定物质组合物的重要性以及冻干方法中冷冻步骤的影响。下文表3概述了在Kasper实验室的Kasper polyplex制备和冻干与本文描述的逆转polyplex制备和冻干方法的技术方面。

[0222]

	Kasper	BioCancell
质粒	pCMVluc (商业的) https://www.addgene.org/45968/	BC-819 (BioCancell, Israel)
用于稀释质粒的缓冲液	10 mM 组氨酸缓冲液 pH 6.0	Tris EDTA pH 8.0
用于稀释 PEI 的缓冲液	10 mM 组氨酸缓冲液 pH 6.0	WFI
PEI	支化 PEI 的 内部水解	Polyplus (商业的)
碳水化合物添加	将蔗糖在 10 mM 组氨酸缓冲液 pH 6.0 中混合并且 以 1:1 添加至 polyplex	在 IV 注射用水中的海藻糖与 质粒和 PEI 两者以 5%混合
碳水化合物/DNA 比率	1200 至 14000	125
N/P 比率	6	6
制备方法	微混合器(仍需要开发用于更大 体积的方法)	将在海藻糖溶液中稀释的质 粒以 3-5 ml/min 的速率添加 至在海藻糖溶液中稀释的 PEI 中, 同时以 500 rpm 搅拌
最终质粒 浓度	0.01 mg/ml 和 0.05 mg/ml	0.4 mg/ml
最终溶液体积	0.5 ml	1 l
在干燥之前的 冷冻方法	货架斜坡(Shelf ramp)对“标准” 减压...	货架斜坡
在货架斜坡冷冻方法的 冷冻速率	-1°C或-5°C/min 至-45°C	-1°C/ min 至-45°C
粒径	DLS (65 nm 至 170 nm)	DLS (80-90 nm)
稳定性	2°C-8°C、20°C、40°C持续 6 周	迄今, 在 2°C-8°C 2 周

[0223] 表3

[0224] 如在Kasper中指出的,polyplex的尺寸受到冷冻干燥影响:随着蔗糖与质粒DNA的比率增加,粒径得到更好的保持。

[0225] 具体地,Kasper教导了,0.05mg/ml的DNA溶液可以用至少2800的蔗糖/DNA比率来稳定。根据Kasper,稳定剂/DNA的比率对于实现完全稳定至关重要。临界比率取决于冷冻方法。

[0226] 相比之下,用本文描述的逆转polyplex、冻干和重构方法未观察到颗粒聚集。另

外,这些方法中使用的海藻糖与核酸的比率为125和250,这比Kasper中描述的低得多。

[0227] 另外,通过本文描述的逆转方法制备的冻干前溶液产生具有约40–50nm尺寸范围的物质组合物(例如,冻干前的物质组合物或polyplex)。在重构后,重构的物质组合物具有约80–90nm的粒径。相比之下,在Kasper中描述的微混合器产生在冻干之前具有65–170nm的范围尺寸的polyplex。此外,Kasper报道在冻干之后polyplex的z-直径的微小增加。Kasper还教导了,只要粘度足够高以避免在冷冻阶段期间颗粒移动,赋形剂的选择较不重要。货架斜坡方法比用于冷冻物质组合物的任何其他确认的方法压力小。

[0228] 因此,Kasper得出如下结论:在没有限制的情况下,无论是质粒DNA还是siRNA均未被成功地冻干。例如,在第一冻融研究中,需要高浓度的常用二糖即蔗糖或海藻糖来维持粒径,并且这些大大超过了等渗性水平,由此表明稳定剂与polyplex的临界比率的先决条件(~4000)。事实上,在Kasper中,较高分子量的赋形剂,诸如低聚乳果糖(lactosucrose)、羟丙基-β-环糊精(hydroxypropyl betadex) (HP-b-CD) 或聚维酮(PVP) 在冷冻和干燥期间在低渗透压下对足够的颗粒稳定性是有益的。与先前的研究相比,使用具有14%低聚乳果糖、10%HP-b-CD/6.5%蔗糖、或10%PVP/6.3%蔗糖的等渗制剂,在冻干和多达40℃储存6周以上,polyplex尺寸保持得更好(<170nm)。

[0229] 因此,通过使用低聚乳果糖或CD/蔗糖制剂,Kasper证明了,pDNA/LPEI polyplex可以被冻干,其中仅尺寸微小增加并且保持了生物活性。

[0230] 此外,Kasper还描述了为了制备物质组合物而开发的微混合器设备。(参见Kasper 2012,图4-1)。该设备用于通过在T型连接器的连接处混合LPEI和质粒溶液来制备体积最多5ml的质粒-LPEI物质组合物。混合速度通过使用注射器将溶液插入设备中来控制。

[0231] 使用LPEI在比率N/P=6 (LPEI氮(N) 与DNA磷酸(P) 的摩尔比率;指示polyplex浓度,指样品的质粒DNA浓度) 下,可以以这种方式成功地制备的物质组合物最多为50μg/ml。然而,更高质粒浓度的溶液(特别地400μg/ml溶液) 产生具有高尺寸纳米颗粒的不稳定的物质组合物。

[0232] 此外,在Kasper方法中,将质粒和LPEI两者均混合到10mM组氨酸缓冲液pH 6中,并且物质组合物溶液需要另外的高浓度赋形剂,以在冻干方法期间使其稳定。具体地,Kasper碳水化合物/DNA比率为1,200至14,000。

[0233] 相比之下,本文描述的逆转方法在标准混合容器中以夹紧桨叶式涡轮机进行。该逆转方法提供了一种确保以可重现的良好品质制备大规模polyplex溶液(即,冻干前的物质组合物)的方法。

[0234] 具体地,如以上指出的,混合顺序对于确保高质量的冻干前物质组合物是关键的。在此,LPEI溶液和质粒各自与5%海藻糖溶液混合。然后将PEI溶液置于混合容器中,并且将质粒溶液添加至LPEI中,同时混合。

[0235] 出乎意料地,在海藻糖的存在下将带负电荷的质粒溶液插入到带高正电荷的LPEI溶液中,产生具有小纳米颗粒尺寸(约50nm) 且具有高稳定性的均质的冻干前物质组合物溶液。

[0236] 以这种方式,获得1000ml浓度为400μg/ml DNA与in vivo-jetPEI® 以比率N/P=6 (LPEI氮(N) 与DNA磷酸(P) 的摩尔比率;指示polyplex浓度,指样品的质粒DNA浓度) 复合的溶液。碳水化合物(海藻糖)/DNA的比率为125。

[0237] 然后将所得的溶液填充入100ml小瓶中并冻干以产生冻干的物质组合物。在一个非限制性实例中,小瓶在实验室冷冻干燥机LyoBeta 25中经历冷冻干燥循环,包括在-45℃冷冻步骤持续至少4小时,在25℃初始干燥至少41小时,优选地至少80小时,更优选地至少140小时(例如,至少41小时、50小时、60小时、70小时、80小时、90小时、100小时、110小时、120小时、130小时或140小时),并且第二干燥至少8小时,两种干燥均在0.150mb的压力。

[0238] 本领域技术人员将认识到,冻干的物质组合物可以使用任何合适的方法重构以形成重构的物质组合物。

[0239] 迄今,Kasper设备已经不能以相对高浓度与良好品质(低尺寸颗粒、稳定的物质组成等)以大体积产生物质组合物溶液。相比之下,本文描述的逆转polyplex形成方法为简单的并且以相对高浓度产生高品质、稳定的冻干前的物质组合物溶液,而不需要赋形剂在经历冻干方法时保护物质组合物。

[0240] 治疗终点和剂量

[0241] 本领域普通技术人员将认识到,从医学从业者或患者的角度来看,事实上与癌性状况相关的不期望的症状(例如,疼痛、敏感、体重减轻等)的任何减轻或预防将是期望的。另外,肿瘤质量或生长速率的任何降低,以及肿瘤组织病理学照片的改进是期望的。因此,如本文使用的,本文使用的术语“治疗”、“治疗性用途”或“医学用途”将指所要求保护的组合物的任何和所有用途,其补救疾病状态或症状,或以其他方式预防、阻止、减缓或以无论任何方式逆转疾病或其他不期望症状的进展。

[0242] 有效的剂量和治疗方案可以通过常规手段来确定,从实验室动物中的低剂量开始,并且然后在监测作用的同时增加剂量,并且还系统地改变剂量方案。动物研究,优选地哺乳动物研究,通常用于确定每千克体重的生物活性剂的最大耐受剂量或MTD。本领域技术人员有规律地外推对其他物种包括人类有功效并避免毒性的剂量。

[0243] 在进行人类功效研究之前,患者中的I期临床研究有助于建立安全剂量。当确定用于给定受试者的最佳剂量时,临床医师可以考虑许多因素。这些中主要为选择的异源基因产物的毒性和半衰期。另外的因素包括患者的尺寸、患者的年龄、患者的一般状况、被治疗的特定癌性疾病、疾病的严重程度、患者中其他药物的存在、基因产物的体内活性等。在考虑动物研究结果和临床文献之后,将选择试验剂量。

[0244] 在美国专利第6,087,164号中提供了包含与编码细胞毒性剂的异源基因可操作地连接的H19调节区域或IGF-2P3或P4启动子区域的腺病毒载体的有效人类剂量的实例。

[0245] 对于在治疗受试者中的癌性状况中使用,本发明还在其方面之一提供了一种呈无菌填充小瓶或安瓿形式的试剂盒或包装,所述试剂盒或包装包含核酸、阳离子聚合物、碳水化合物(例如,海藻糖)溶液(即,冻干的组合物)。在一个实施方案中,试剂盒包含通过本文描述的逆转方法以冻干形式制备的呈任一单位剂量或多剂量量的polyplex溶液,其中所述包装包含指导重构以形成重构的物质组合物以及其内容物用于治疗癌症的使用的标签。

[0246] 已经描述了本发明,以下实施例通过说明性方式来提供,并非限制。

实施例

[0247] 实施例1:当前的polyplex制备方法

[0248] 在当前的polyplex制备方法中,质粒(BC-819)和阳离子聚合物(PEI)作为两种组

分单独地提供。BC-819 (以前被称为DTA-H19) 在包含5.3mL的小瓶中以4mg/mL的浓度来提供,并且聚乙烯亚胺 (PEI) 在包含2.6mL的150mM无菌溶液的小瓶中来提供。

[0249] 表4-制备和施用:

[0250]

步骤 A	从冷冻器中取出 1 个 BC-819 小瓶和 1 个 PEI 小瓶,并且允许在室温解冻 15 分钟。	
步骤 B	处理 BC-819	处理 PEI
	1.用 20 cc 注射器从 5%无菌右旋糖溶液取出 15 mL,并且添加至空的 50 mL 玻璃瓶中。	2.用 20 cc 注射器从 5%无菌右旋糖溶液中取出 17.6 mL,并且添加至空的 20 mL 玻璃瓶中。
	2.使用 5 cc 注射器,取出 5 mL 的 BC-819,并且添加至 50 mL 具有右旋糖的玻璃瓶中,使最终体积至 20 mL。	3.使用 5 cc 注射器,取出 2.4 mL 的 PEI,并且添加至 20 mL 包含右旋糖的玻璃瓶中至 20 mL 的最终体积。
	不要弃去使用的 BC-819 小瓶。	不要弃去使用的 PEI 小瓶。
步骤 C	1.使用 20 cc 注射器将包含 PEI 的小瓶的内含物转移到包含 BC-819 的较大的小瓶中并搅拌 10 秒钟。 始终以该顺序工作(将 PEI 添加至 BC-819)是重要的。 2.将混合物在室温放置至少 15 分钟,但不多于 1 小时(该步骤对 PEI 与	

[0251]

	BC-819 结合是重要的)。 3.最后的步骤为用 5%无菌右旋糖使溶液加到总计 50 mL,这可以通过以下两种方法之一来完成: a.使用 20 cc 注射器,将 10 mL 5%无菌右旋糖添加至包含 BC-819/PEI 物质组合物的小瓶中以使总体积到 50 mL,或者 b.用 10 mL 5%无菌右旋糖填充 50 mL 注射器,并且将 40 mL BC-819/PEI 混合物拉到该注射器中,使总体积为 50 mL。
步骤 D	BC-819/PEI (50 mL)将使用 Foley 导管通过膀胱内滴注来施用。患者将被要求将药物保持在膀胱中约 2 小时。

[0252] 实施例2:冻干方案

[0253] 该方案的目的是制备即用的包含BC-819质粒和in vivo-jetPEI® (聚乙烯亚胺) 的冻干的物质组合物。在该方案中,事实上在患者的床边制备BC-819/in vivo-jetPEI® 物质组合物。

[0254] 重要地,与该方案制备的任何偏差均可能导致可能影响治疗结果的差的物质组合物品质。

[0255] 使用这种冻干的物质组合物将降低治疗品质偏差的风险。

[0256] 材料和设备:

[0257] 材料

[0258]	说明
	BC-819 溶液
	<i>in vivo</i> -jetPEI®溶液
	5%无菌海藻糖溶液
	70%乙醇
	乳胶手套
	5 mL 无菌移液管(pipette)
	10 mL 无菌移液管
	15 ml 聚丙烯管
	125 ml 聚丙烯杯
	塑料烧杯
	用于冻干机的玻璃器皿+适配器
	干燥器+干燥剂

[0259] 表5

[0260] 设备

[0261]

说明
磁搅拌器
磁铁覆盖125ml聚丙烯杯底部的50%
涡旋
冷冻器
冻干机
计时器
移液器辅助器 (Pipet Aid)
层流净化罩 (Laminar flow hood)

[0262] 表6

[0263] 安全性要求

[0264] 当进行该程序时,应该穿戴乳胶或丁腈手套和干净的实验服。需要测试的一些材料可能为潜在地生物危害的,并且应该进行适当的处置。

[0265] 程序:

[0266] 制备用于在体外细胞培养中使用的所有溶液应该在无菌条件下在层流净化罩中制备。

[0267] 1. 制备

[0268] a. 解冻一瓶BC-819和一瓶*in vivo*-jetPEI®。

[0269] b. 将2.5ml BC-819与10ml 5%海藻糖溶液在50ml聚丙烯管中混合。

[0270] c. 将1.2ml *in vivo*-jetPEI®与11.3ml 5%海藻糖溶液在125ml聚丙烯杯中混合并添加搅拌器。

[0271] d. 将包含*in vivo*-jetPEI®/海藻糖溶液的杯子置于磁板上并且打开电源。

[0272] e. 将BC-819/海藻糖溶液以2ml/min的速率滴入到*in vivo*-jetPEI®/海藻糖溶液

中。

[0273] f. 允许物质组合物在磁板上形成持续另外3min。

[0274] g. 将溶液转移到适合冻干的玻璃器皿中。

[0275] h. 将形成的物质组合物转移到 $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ 冷冻器中持续48小时。

[0276] i. 将瓶子转移到装有冰的塑料容器中。

[0277] j. 将瓶连接至冻干机, 并且打开电源持续72h使冰保持新鲜。

[0278] k. 将获得的粉末保存在干燥器中直至重构。

[0279] 2. 通过添加25ml无菌双蒸水(DDW) 重构粉末。重构的溶液不应该显示任何沉淀物。外观为浅乳白色(slightly opalescent)。检查重构溶液的效价测定。(参见图1A和1B)。

[0280] 实施例3: 稳定的BC819质粒-聚乙烯亚胺物质组合物的开发

[0281] 材料:

[0282] BC-819如先前描述来制备(参见Ohana等, International Journal of Cancer 98 (5) (2002) 645-650; Ohana等, The Journal of Gene Medicine 7 (3) (2005) 366-374), 并且在Altheas工厂(San Diego, USA) 以大量产生。in vivo-jetPEI[®]从Polyplus (Strasbourg, France) 购买。

[0283] 100ml玻璃瓶、溴化丁基瓶塞和密封剂在Schott (Germany) 购买。

[0284] 方法:

[0285] 以小规模的物质组合物制备:

[0286] 将5ml在TE缓冲液中的4mg/ml BC-819溶液添加至20ml 5%海藻糖溶液中。

[0287] 将2.4ml in vivo-jetPEI[®]添加至22.6ml 5%海藻糖溶液中。然后将质粒溶液添加至PEI溶液中, 同时搅拌以允许两种组分完全均质化。将溶液在室温孵育少于1小时。以这种方式, 获得了0.4mg/ml DNA与in vivo-jetPEI[®]以比率N/P=6 (LPEI氮(N) 与DNA磷酸(P) 的摩尔比率) 复合的50ml溶液。所指示的polyplex浓度指样品的质粒DNA浓度。

[0288] 以中等规模的物质组合物制备:

[0289] 将100ml在TE缓冲液中的4mg/ml BC-819溶液添加至400ml 5%海藻糖溶液中。将48ml in vivo-jetPEI[®]添加至452ml 5%海藻糖溶液中。然后将质粒溶液添加至PEI溶液中, 同时搅拌以允许两种组分完全均质化。将溶液在室温孵育少于1小时。以这种方式, 获得了0.4mg/ml DNA与in vivo-jetPEI[®]以比率N/P=6 (LPEI氮(N) 与DNA磷酸(P) 的摩尔比率) 复合的1000ml溶液。所指示的polyplex浓度指样品的质粒DNA浓度。

[0290] 将polyplex溶液填充入小瓶中并如下文描述进行冷冻干燥。

[0291] 与标准方案相比, 该溶液以逆转顺序制备。这种逆转polyplex制备方案不需要任何设备开发, 并且可以容易地在任何工业设施中扩大规模。

[0292] 冻干:

[0293] 冻干前的物质组合物溶液如以上描述新鲜制备, 并将其转移到100ml小瓶中用于冷冻干燥方法。

[0294] 瓶样品在实验室冷冻干燥机LyoBeta 25中经历冷冻干燥循环, 包括在 -45°C 持续至少4小时的冷冻步骤, 在 25°C 初始干燥至少41小时, 并且第二干燥至少8小时, 两种干燥均在0.150mb的压力。

[0295] 粒径确定:

[0296] 样品的z-平均颗粒直径使用来自Malvern instruments (Herrenberg, Germany) 的zetasizer (nano-s), 角度180°在25℃以633nm的波长来测量(粘度、折射率)。

[0297] ζ电位确定:

[0298] 样品的ζ电位使用来自Malvern instruments (Herrenberg, Germany) 的zetasizer (nano-s) 来确定。

[0299] 分光光度法/浊度:

[0300] nanodrop (ThermoScientific nanodrop2000分光光度计) 用于进行该测试:将样品在260nm处进行检查以评价溶液中的DNA浓度和在600nm处检查以评价溶液的浊度。

[0301] 溶液的光谱在200nm与400nm之间运行。(参见图5)。

[0302] 电泳凝胶:

[0303] 将样品装载到1%琼脂糖凝胶上并在100mV下运行1h。该测试识别未与in vivo-jetPEI®复合的任何DNA质粒或任何降解。(参见图6)。

[0304] TEM(形状和尺寸或原子力显微术):

[0305] 将样品吸附至Formvar涂覆的铜网格上。将网格用1% (w/v) 乙酸双氧铀 (uranyl acetate) 染色并空气干燥。用配备有MegaView II CCD照相机和Analysis®3.0版软件 (SoftImaging System GmbH, Münster, Germany) 的Tecnai 12TEM 100kV (Phillips, Eindhoven, the Netherlands) 观察样品。

[0306] 检查样品以评价溶液中或干燥产物中的polyplex的形状。

[0307] 溶液的pH:

[0308] 溶液的pH使用pH计 (mettler Toledo, Swiss) 来检查。

[0309] 渗透压测定 (osmometry):

[0310] 使用fiske®201型微渗压计 (Advanced Instruments, Inc. Norwood, MA) 测试样品的渗透压测定。

[0311] 转染:

[0312] 水分含量/LOD:

[0313] 体内效价评价:

[0314] 稳定性:

[0315] 结果:

[0316] 将样品在再水合后立即用过滤的双蒸水 (DDW) 以其原始体积的量溶解并且孵育5min, 然后在以下测试中使用。

[0317]

溶液	尺寸 (d.nm) 平均值
现有技术的方法 (在5%葡萄糖中)	45.6
冻干前溶液 (在海藻糖中的逆转制品) 0.4mg/ml	35.7
冻干粉末重构之后0.4mg/ml	49.01
冻干粉末重构之后0.8mg/ml	264.9

[0318] 表7-粒径确定:

[0319] 如图3中示出的, 在冻干之后获得的物质组合物与用海藻糖或葡萄糖溶液制备的

新鲜物质组合物未显示出显著差异。当新鲜制备时,葡萄糖溶液显示从50nm至240nm的尺寸范围。

[0320]

溶液	ζ电位 (mV)
现有技术的方法(在5%葡萄糖中)	113
冻干前溶液(在海藻糖中的逆转制品)0.4mg/ml	110
冻干的粉末重构之后0.4mg/ml	116
冻干的粉末重构之后0.8mg/ml	125

[0321] 表8-ζ电位确定

[0322] 分光光度法:

[0323] 如下文表9和图5中示出的,当与在海藻糖或葡萄糖中新鲜制备的溶液相比时,再水合的溶液中的DNA浓度未显示出显著差异。

样品 ID	核酸浓度	单位	A260	A280	260/280	260/230	类型	因子
1	483.2	ng/μl	9.663	6.105	1.58	1.75	DNA	50
1	485.1	ng/μl	9.703	6.145	1.58	1.75	DNA	50
1	483.5	ng/μl	9.67	6.13	1.58	1.75	DNA	50
2	472.3	ng/μl	9.446	5.757	1.64	1.88	DNA	50
2	472.2	ng/μl	9.444	5.73	1.65	1.88	DNA	50
2	473.3	ng/μl	9.465	5.751	1.65	1.88	DNA	50
3	446.4	ng/μl	8.929	5.561	1.61	1.81	DNA	50
3	446.6	ng/μl	8.933	5.558	1.61	1.81	DNA	50
3	447.7	ng/μl	8.954	5.568	1.61	1.81	DNA	50

[0325] 表9-1:现有技术的方法(在5%葡萄糖中)。2:冻干前的溶液(在海藻糖中的逆转制品)0.4mg/ml。3:重构之后的冻干的粉末0.4mg/ml

[0326] TEM(形状和尺寸或原子力显微术):

[0327] 当在葡萄糖或海藻糖中制备时观察的样品未显示出差异。(参见图7A-B)。图8示出了在沉淀之后的样品。

[0328] 溶液的pH:

[0329] 在冻干之前或之后,在5%葡萄糖或海藻糖中制备的所有样品均为约pH 3.0。

[0330] 渗透压测定:

[0331]

溶液	渗透压度 (mosm/kg)
5%葡萄糖溶液	274
5%海藻糖溶液	147
现有技术的方法(在5%葡萄糖中)。	240
现有技术的方法,在5%海藻糖中	135

冻干前溶液(在海藻糖中的逆转制品) 0.4mg/ml	138
[0332] 表10	
[0333] 转染:	
[0334] 水分含量/LOD:	
[0335] 在第一循环之后干燥的产物中测试的水分含量为2.4%。	
[0336] 体内效价评价:	
[0337] 稳定性:	
[0338] 结论:	
[0339] 总之,该研究的结果显示,在相对高浓度的BC-819/in vivo-jetPEI [®] polyplex可以使用可以容易地转移至工业规模的技术以大规模来制备。	
[0340] 产生的物质组合物的品质允许BC-819/in vivo-jetPEI [®] 的冻干而不需要另外的赋形剂。	
[0341] 初步结果显示,冻干的polyplex保持在床边制备的物质组合物的所需表征和另外的优势:在5℃保持2周的干燥的产物显示出polyplex的可重复尺寸、可重复的ζ电位以及再水合之后稳定的产物。	
[0342] 因此,物质组合物可以作为重构即用的冻干粉末提供至临床研究场所。该新颖制剂将确保用于临床使用的可重现的施用。	
[0343] <u>实施例4:不同溶液的稳定性的检查</u>	
[0344] 完成实验以在特定的、预定的时间间隔(即,距离制备/重构1小时、3小时、3天、1周内)检查不同溶液的稳定性。具体地,检查三种复合物溶液(在5%葡萄糖中(现有技术制备)、在海藻糖中新鲜制备的(冻干前(逆转制备方法))和在海藻糖中从冻干物重构的(在10ml IV注射用水中重构的))并且比较以下参数:纳米尺寸、ζ电位、渗透压、pH计、具有阴性染色的透射电子显微术(TEM)、nanodrop-DNA浓度、在600nm处的浊度、和凝胶电泳。	
[0345] 除了这些测试以外,还将对干燥的产物进行以下测试:扫描电子显微术(SEM)、原子力显微术(AFM)、Karl Fisher、Cryo-TEM和x-射线。	
[0346] 外观	
[0347] 现有技术制品(葡萄糖样品)在室温3小时之后变黄,而冻干前(在海藻糖中的逆转方法)和重构的冻干的产物未显示出外观的变化。	
[0348] TEM	
[0349] 透射电子显微术(TEM)的结果示于图9A中。在第一行的三张照片示出了在三个不同的时间点的根据标准制备制备的复合物(小黑点)。在一周之后,观察到较少的黑点,这可以表明复合物降解。	
[0350] 在第二行的三张照片示出了在三个时间点的冻干前的样品(逆转制品)。未观察到黑点的减少。	
[0351] 最后,在底行的三张照片示出了在三个时间点的重构的产物。同样未观察到黑点的减少。	
[0352] 图9B示出了海藻糖中的沉淀物复合物。	
[0353] pH计	
[0354] 下文表11示出了观察到的pH值的范围:	

样品 时间	1 小时	3-5 小时	3 天	1 周
在重构之后(lyo IV)	2.94-2.96	2.93-2.97	2.97-3.00	2.92-3.03
冻干前(treh iv)	2.9-2.99	2.88-3.01	2.85-3.03	2.96-3.00
现有技术制品(glu bag)	2.86-2.98	2.84-2.99	2.86-2.93	2.83-2.9

[0356] 表11

[0357] 这些结果显示,溶液与不同时间间隔之间的pH不存在变化。

[0358] 渗透压度 (mosm/kg)

[0359] 测量渗透压度以评价液体中固体颗粒的浓度。下文表12示出了观察到的值的范围。

[0360]

样品 时间	1 小时	3-5 小时	3 天	1 周
在重构之后(lyo IV)	99-120	102-122	118-120	97-125
冻干前(treh iv)	132-134	130-137	129-163	134-165
现有技术制品(glu bag)	243-247	241-250	241-247	239-253

[0361] 表12

[0362]

溶液	5%葡萄糖	5%海藻糖
渗透压度 (mosm/l)	280	135
Mw (gr/mol)	180.16	378.33

[0363] 表13

[0364] 以上结果显示在海藻糖中的新鲜溶液与冻干物之间未观察到差异。葡萄糖中的复合物显示出较高的渗透压。将进行实验来检查和理解当被施用至膀胱时这种差异的意义。

[0365] 纳米尺寸 (d.nm)

[0366] DLS方法考虑了组分的粘度和折射率以设定粒径。下文表14示出了观察到的值 (nm) 的范围。

[0367]

样品 时间	1 小时	3-5 小时	3 天	1 周
在重构之后(lyo IV)	81.25-90.3	74.42-91.75	87.28-91.95	92.19-105.3
冻干前(treh iv)	41.39-51.58	42.69-51	42.94-54.46	48.93-55.47
现有技术制品(glu bag)	51.29-94	48.78-90.33	58.71-74.03	57.79-68.92

[0368] 表14

[0369] 这些结果显示,对于每一种溶液,在粒径方面随着时间推移不存在显著的变化。

[0370] ζ 电位 (mV)

[0371] ζ 电位为胶体分散体中的电动电位,并且为体系稳定性的指标。下文表15示出了观察到的值的范围。

[0372]

样品 时间	1 小时	3-5 小时	3 天	1 周
在重构之后(lyo IV)	64.9-66.9	61.9-67.2	64.6-67.1	64.3-66.7
冻干前(treh iv)	59.7-68	59-66.9	61.4-63.4	63.8-65.2
现有技术制品(glu bag)	68.4-71.4	66.6-70.8	65.2-66.9	66.3-69.6

[0373] 表15

[0374]

ζ 电位 (mV)	胶体的稳定性行为
从0至 ± 5	快速凝结或絮凝
从 ± 10 至 ± 30	初期不稳定性
从 ± 30 至 ± 40	中度稳定性
从 ± 40 至 ± 60	良好稳定性
多于 ± 61	出色稳定性

[0375] 表16

[0376] 这些结果显示,溶液在测量的时间段内表现出稳定性,并且在检查的所有样品之间不存在差异。

[0377] DNA浓度 (ng/ μ l)

[0378] 下文表16示出了观察到的值的范围。

[0379]

样品 时间	1 小时	3-5 小时	3 天	1 周
在重构之后(lyo IV)	455-459.4	438.4-441.1	424.5-457.4	435.6-440.1
冻干前(treh iv)	455.7-466.6	459-464.1	458.1-467.8	452.1-463.6
现有技术制品(glu bag)	456.6-477.4	461.8-475.6	442-507.4	481.3-491.5

[0380] 表16

[0381] 这些结果显示DNA浓度随着时间推移保持在正确的范围内。未观察到降低。

[0382] 浊度 (细胞/ml)

[0383] 下文表17示出了观察到的值 (在600nm处的吸光度) 的范围。

[0384]

样品 时间	1 小时	3-5 小时	3 天	1 周
在重构之后(lyo IV)	0.01-0.014	0.009-0.012	0.009-0.012	0.011-0.014
冻干前(treh iv)	0.004-0.009	0.004-0.009	0.006-0.008	0.004-0.007
现有技术制品(glu bag)	0.005-0.01	0.009-0.016	0.007-0.012	0.009-0.014

[0385] 表17

[0386] 随着时间推移,在溶液中无可测量的浊度。将进行另外的实验来测量浊度。

[0387] 从250nm至600nm的光谱

[0388] 在所观察的时间内,在葡萄糖中制备的复合物在约380nm处显示出吸光度(紫色)。将进行另外的实验以确定引起该吸光度的残余化合物是什么。

[0389] 实施例5:体内测试

[0390] 将200万个HCT-116细胞注射到无胸腺裸小鼠的背部。当肿瘤达到待治疗的尺寸时,小鼠接受现有技术或重构的样品与5%葡萄糖(对照)的三次注射。结果示于图10中。

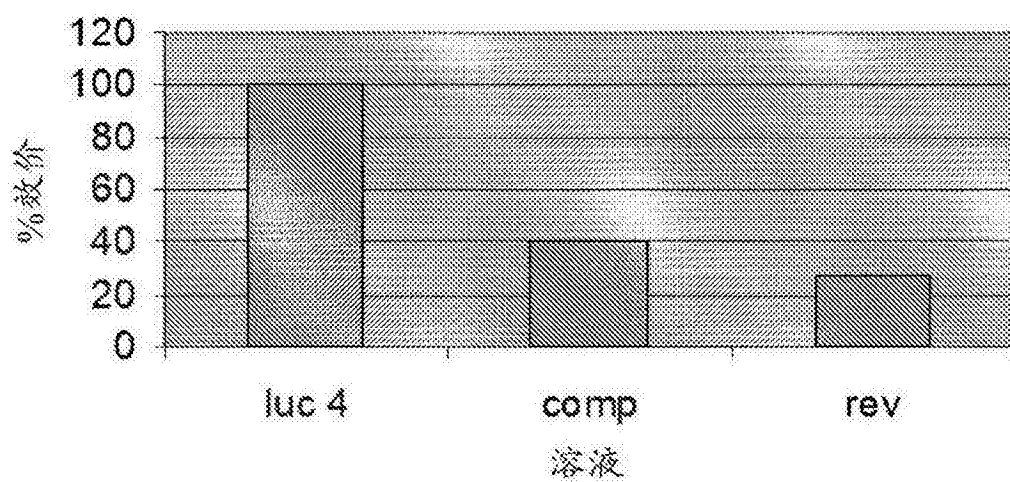


图1A

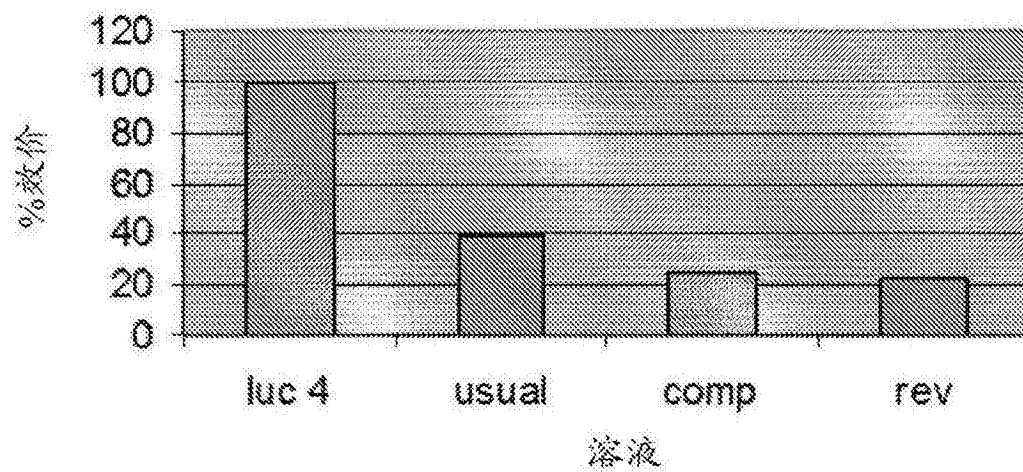


图1B

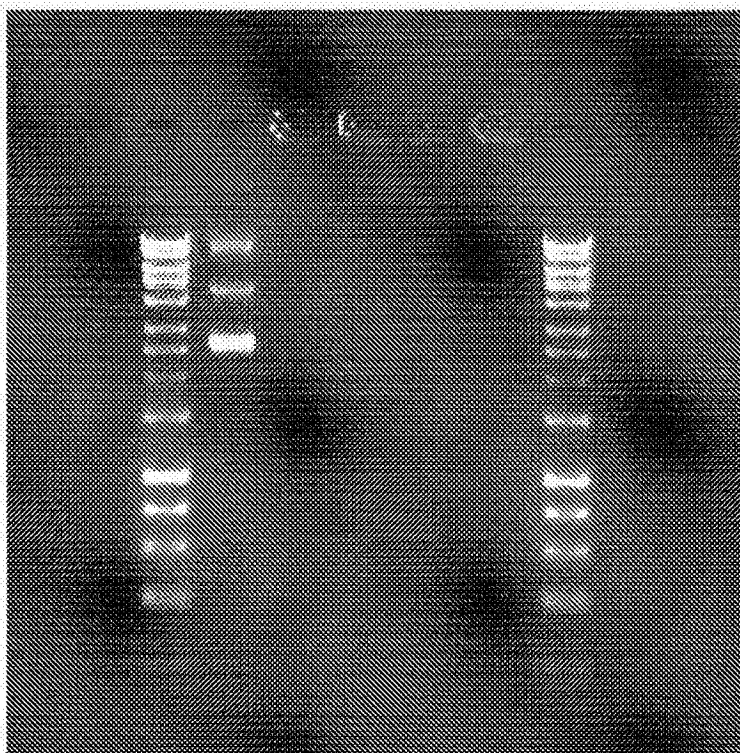


图2

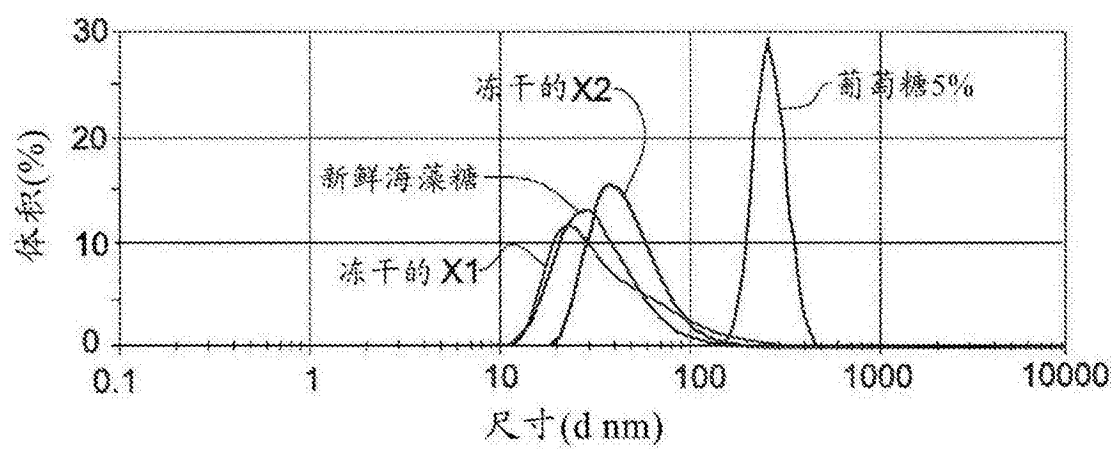


图3

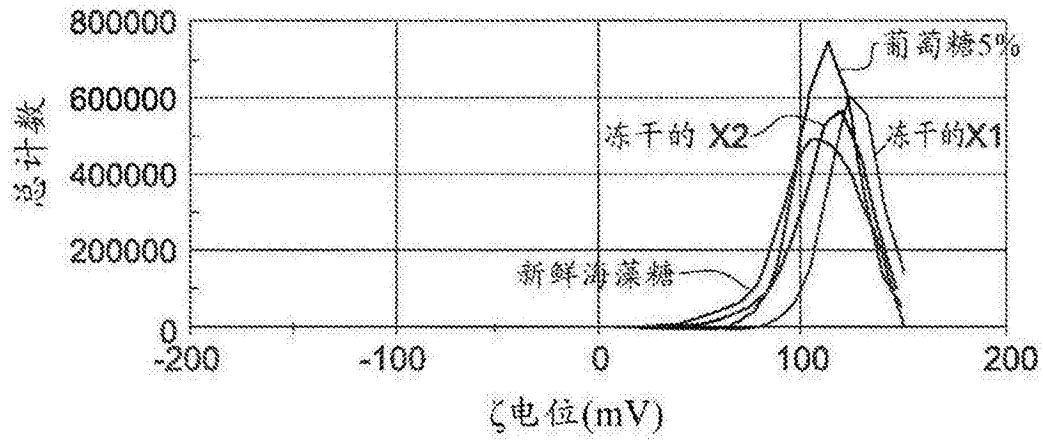


图4

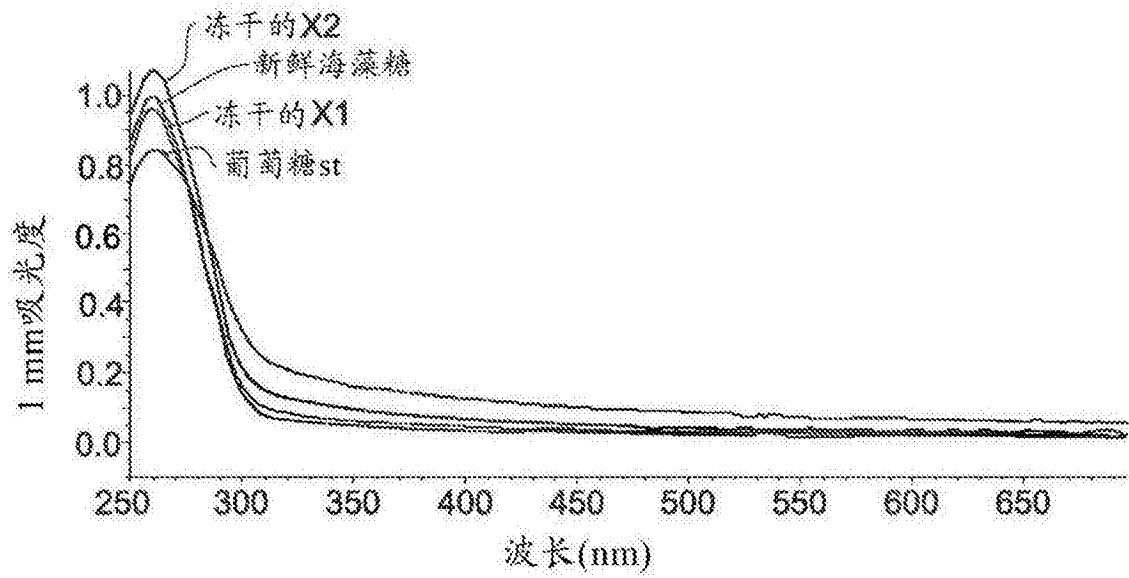


图5

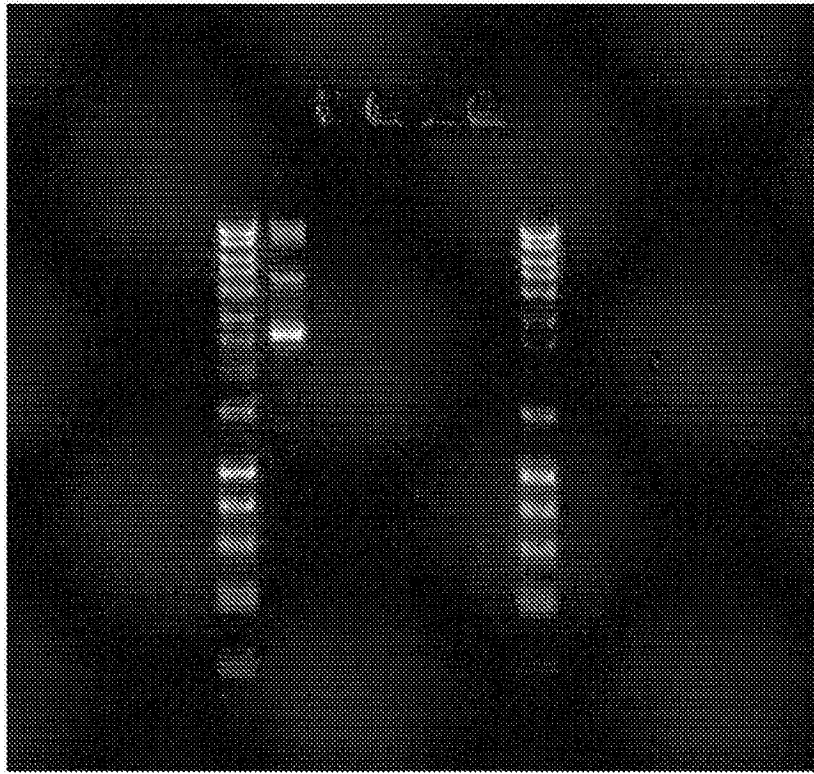


图6

葡萄糖复合物

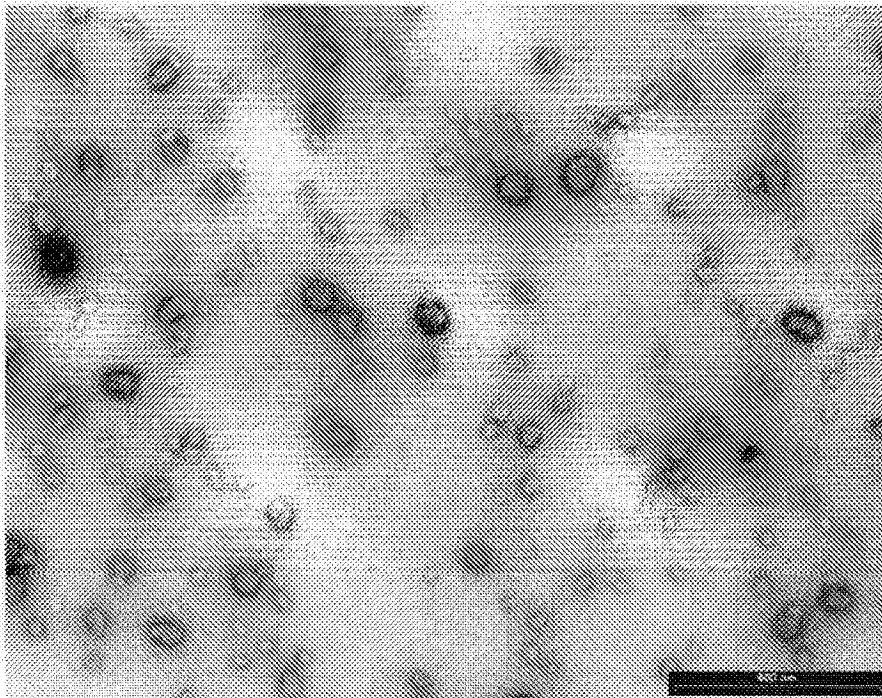


图7A

海藻糖复合物

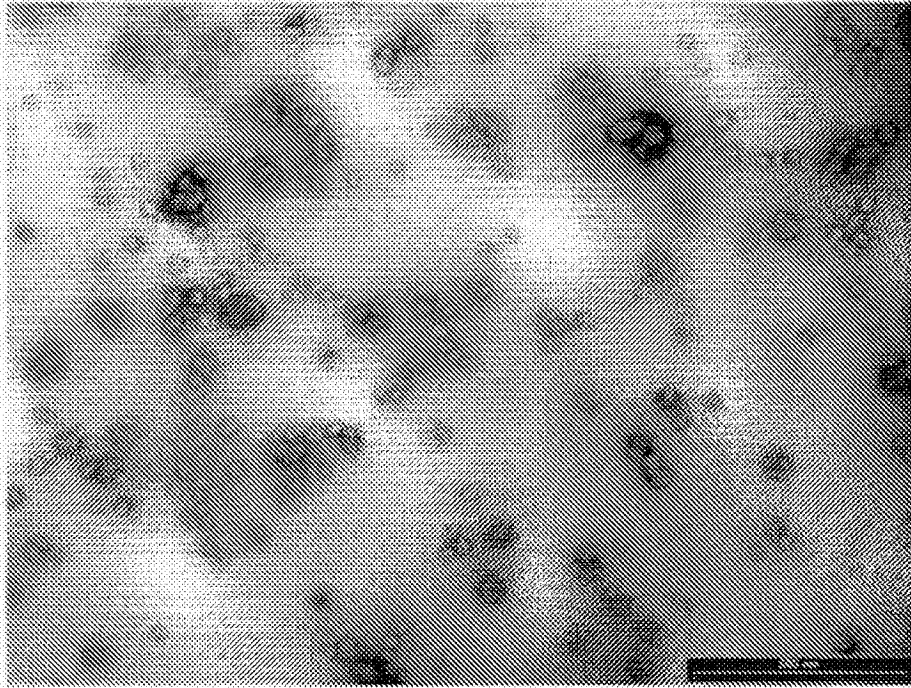


图7B

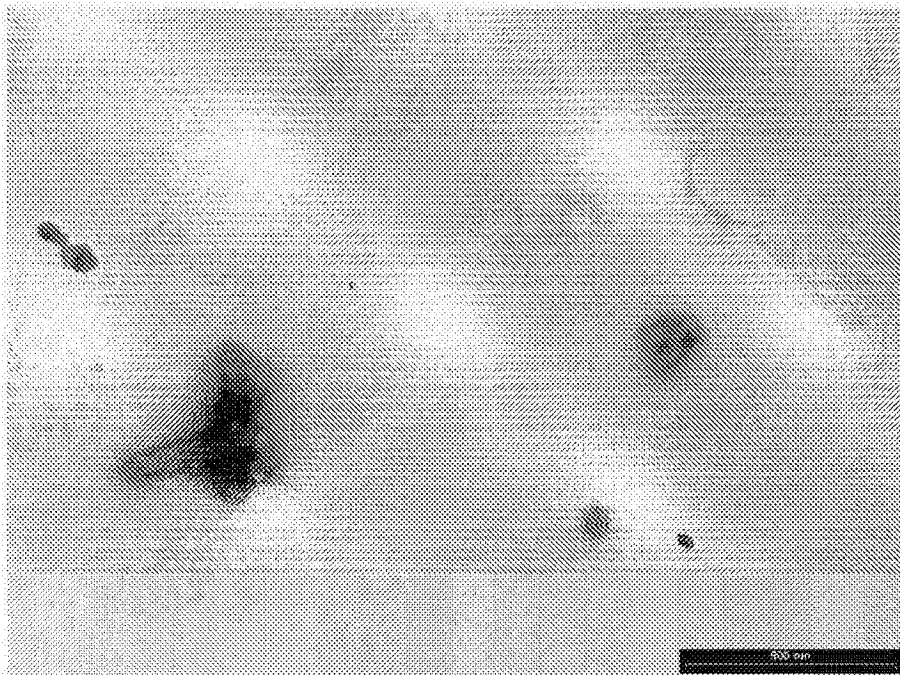


图8

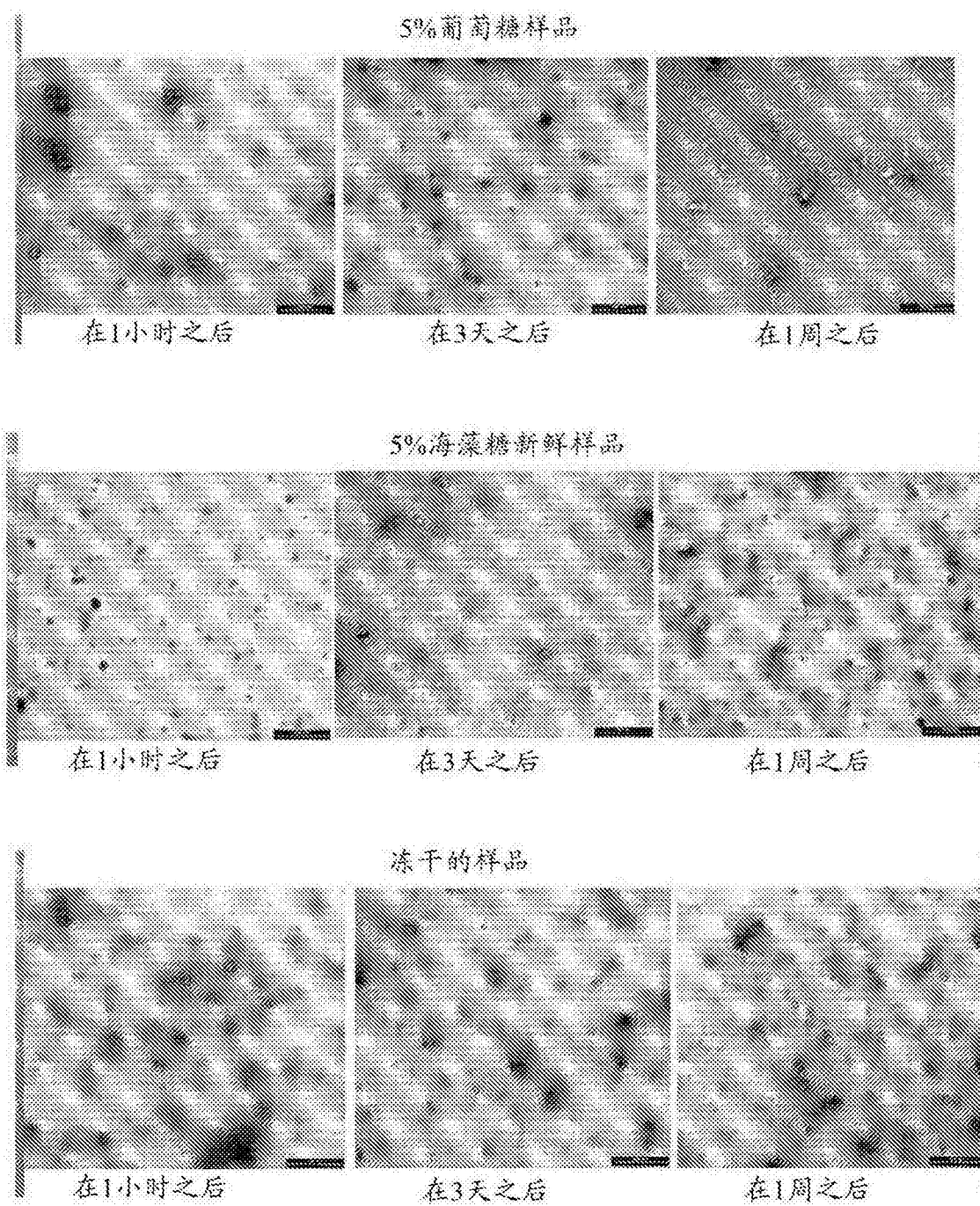


图9A

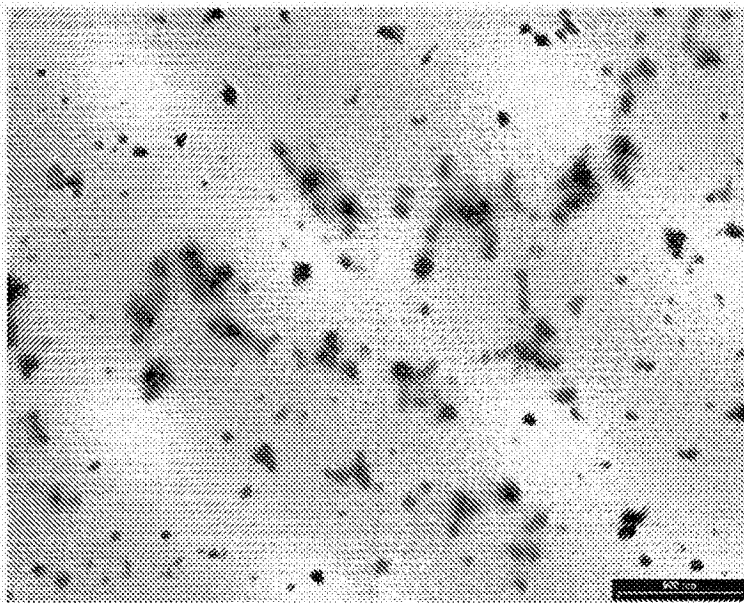


图9B

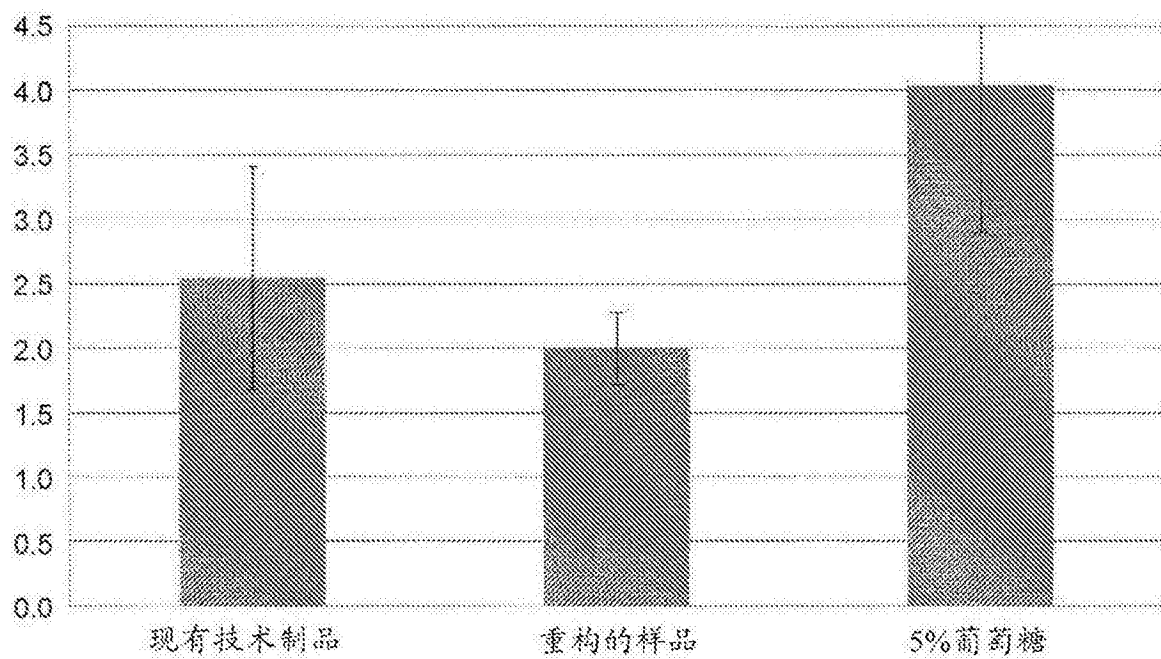


图10