



(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 I615156 B

(45)公告日：中華民國 107 (2018) 年 02 月 21 日

(21)申請案號：101141084

(22)申請日：中華民國 101 (2012) 年 11 月 05 日

(51)Int. Cl. : *A61K9/127 (2006.01)*

(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)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

US 5653996 US 7468151B2

WO 2011/090965A1

AAPS PharmSciTech, Vol, No. 2, June 2008, pp.335-341

審查人員：張子威

申請專利範圍項數：20 項 圖式數：1 共 59 頁

(54)名稱

用於無菌製造脂質-核酸粒子之單次使用系統

SINGLE USE SYSTEM FOR STERILELY PRODUCING LIPID-NUCLEIC ACID PARTICLES

(57)摘要

本發明闡述一種簡單且可再現地在包括單次使用組件之無菌條件下形成脂質-核酸奈米粒子之方法。

What is described is a process of forming lipid-nucleic acid nanoparticles simply and reproducibly under aseptic conditions comprising single use components.

指定代表圖：

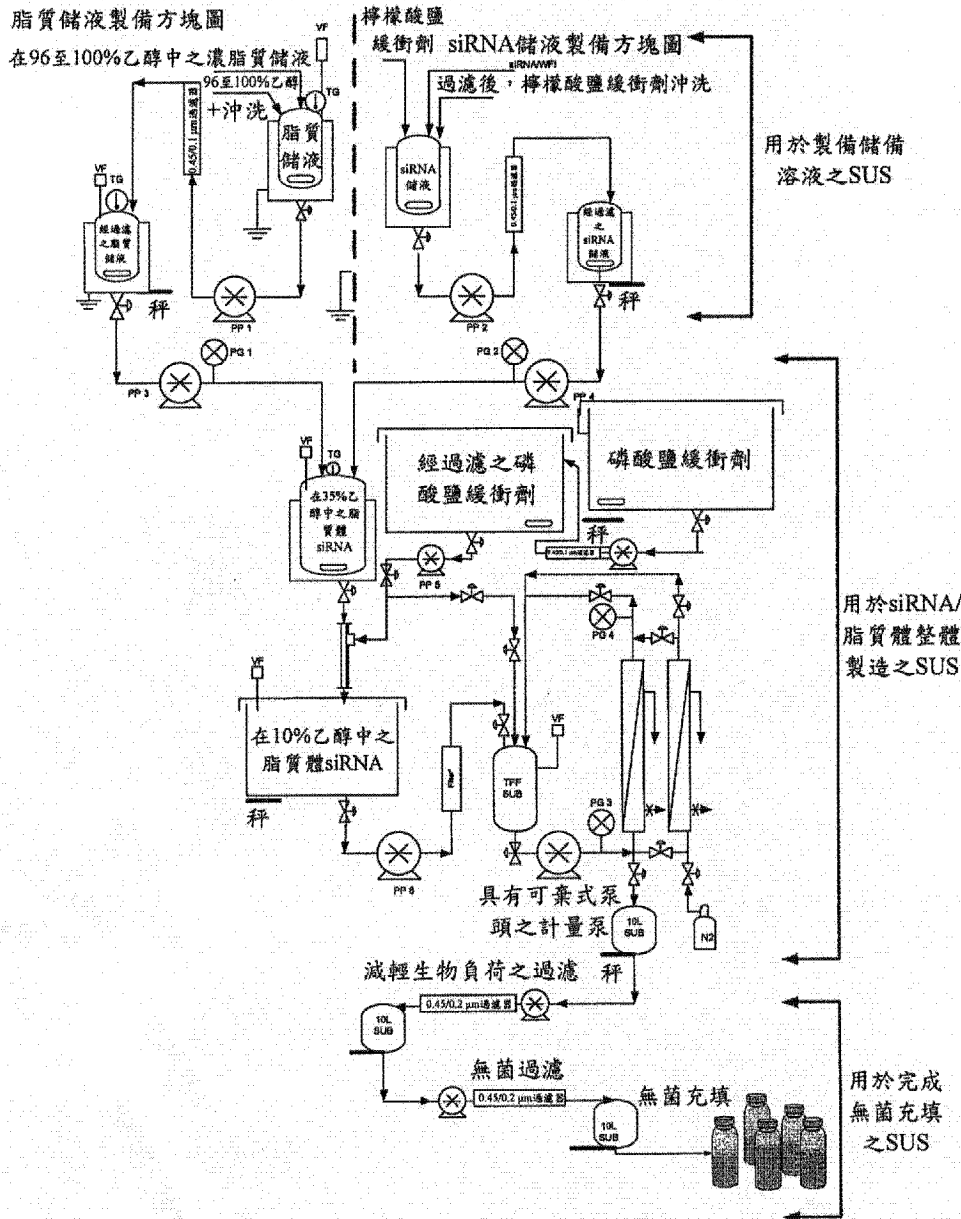


圖 1

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於一種系統，該系統係用於簡單及可再現地在包括單次使用組件之無菌條件下形成脂質-核酸奈米粒子之方法。

相關申請案的交叉參考

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】

脂質潛在地適用作為用於傳遞治療分子(特定言之，用於傳遞核酸)之載體。脂質形成脂質體，該脂質體可囊封、複合、或包埋核酸分子，及藉此增進此類治療分子在投與(例如經靜脈內投與至循環)時之傳遞至標靶細胞。其於醫藥組合物中之有用性受限於可再現地製造脂質-核酸奈米粒子之可用方法。已設計出多種方法來製造該等奈米粒子。

不利用音波處理而簡單且可再現地製造單獨由脂質(囊泡)所組成之奈米粒子之一種方法係利用Batzri等人，1973，*Biophys Biochem Acta* 298:1015-19及Kremer等人，1977，*Biochemistry* 16:3932-35所述之乙醇注入，其中將溶解於乙醇中之脂質注入至水溶液中以自發地形成脂質體。

Van Buitenen等人之US 7468151闡述一種用於滅菌包含

脂質體之微米粒子之閉式循環系統。該循環系統包括連接至橫流型(transflow)過濾(TFF)單元之混合室。該TFF單元在無菌條件下純化微米粒子之液體懸浮液。該液體自該混合室無菌地泵送通過該TFF。使滯留於TFF中之物質(滯留物)再循環通過該混合室及該TFF單元直至純化為止。該純化製程係在一種無需將TFF滯留物中之微米粒子移除之裝置中無菌地進行。

他人闡述藉由採用特定方法將脂質與核酸組合來製造核酸-脂質體粒子之方法。Hirota等人，1999，BioTechniques 27:286-89教示當將在乙醇中之陽離子脂質注入核酸水溶液中時，自發地形成塗覆有核酸分子之脂質體。Maurer等人，2001，Biophysical J，80:2310-26及Maurer等人US 7094423教示一種以脂質體囊封核酸分子之方法。該方法涉及使用包含陽離子脂質之預形成之脂質體。藉由添加乙醇至該水溶液使該脂質體變得不穩定。將核酸分子添加至該不穩定之脂質。當移除乙醇時，該脂質體囊封該核酸同時重整。Semple等人，2001，Biophys Biochem Acta 1510:152-66及Semple等人US 6858225教示一種以脂質體囊封核酸之替代性方法。該方法藉由使用可游離陽離子脂質以形成脂質體來提高囊封效率。使脂質之乙醇溶液與存於經緩衝在低pH下之水溶液中的核酸。然後移除乙醇同時提高pH至中性值。兩種方法均需要進一步處理所得之脂質體，因為復原期間之聚集會導致尺寸的寬廣變化。

MacLachlan等人之US 7901708闡述一種用於製造囊封核

酸之均勻大小脂質體之方法及裝置。在T連接器中以大致相等的流速使在水性緩衝劑中之RNA物流與在乙醇中之陽離子脂質物流混合，其中脂質囊泡立刻呈高乙醇濃度(45%)形式形成。在整個混合過程中，溶劑及溶質濃度維持不變。未涉及其中該等脂質體經稀釋的靜態混合器。在該過程結束時，緊接於無菌充填步驟之前將該等穩定的核酸脂質體滅菌。

上述方法需要大量勞力來使脂質體製造過程中之細菌污染降至最低，包括高壓蒸汽滅菌、沖洗及滿足管制負擔。尚需要一種囊封核酸而不需要大量機械加工步驟來製造預形成之脂質體，且不需要加工步驟來使脂質-核酸粒子減小至單分散群體之製造方法。

【發明內容】

本發明之一態樣係一種用於無菌製造脂質-核酸奈米粒子之系統，該系統包括：

第一保存單元，用於包含在水可混溶有機溶劑中之脂質之有機脂質溶液；

第二保存單元，用於包含治療藥物之水溶液；

具有靜態混合器之混合單元，

注入構件，用於添加該有機脂質溶液至混合室；

第三保存單元，用於水性緩衝劑；

稀釋單元；

包括橫流型過濾器之濃縮單元，用於濃縮脂質體懸浮液及移去有機溶劑；及

單次使用床，用於在移去有機溶劑之後收集經濃縮之脂質體懸浮液；

其中該混合單元裝納該水性藥物溶液，及該脂質溶液係穩定地添加至含於該混合單元中之該藥物溶液歷時至少5分鐘，而製得至多具有12:1之脂質：RNA比之脂質-藥物混合物，

其中該脂質-藥物混合物係經傳送至該稀釋單元且藉由添加該水性緩衝劑來稀釋；

及其中該系統係由無菌及可棄式組件組成以適用於單批使用。該系統可進一步包括用於製備該有機脂質溶液之單元，其係連接至該第一保存單元。該系統可進一步包括在該有機脂質溶液被轉移至該第一保存單元之同時用於滅菌該溶液之過濾器。該系統可進一步包括脂質溶液、藥物溶液、脂質-藥物混合物及無菌懸浮液。該濃縮單元可包括具有單次使用泵腔之隔膜計量泵。該等脂質可包括陽離子脂質、輔助脂質、固醇及聚乙烯(PEG)-脂質結合物，及進一步包括靶向脂質。該治療藥物為dsRNA分子。脂質及dsRNA於該混合物中之濃度係由2.5之脂質：RNA電荷比組成。該水可混溶有機溶劑可為乙醇。該等第一及第二溶液可於35至40°C之溫度下組合。該第二保存單元可裝納在pH 3.5至pH 4.5之水性緩衝劑中之治療藥物。該第三保存單元可裝納中性pH之水性緩衝劑。囊封治療藥物之該脂質體之平均粒徑可為80 nm至150 nm。該注入構件包括傳送該有機溶液至該混合單元中之該水溶液之空氣水界面之注入

口，或替代性地，浸沒於該混合單元中之該水溶液中及向其傳送該有機溶液之注入口。該系統可進一步包括冷凍乾燥步驟。該冷凍乾燥步驟可包括冷凍步驟及乾燥步驟。該水性緩衝劑可包括蔗糖或海藻糖。該冷凍步驟可使該脂質-藥物混合物以 $1^{\circ}\text{C}/\text{分鐘}$ 自 20°C 冷卻至 -40°C 。該乾燥步驟包括於約 -15 至約 -35°C 下乾燥該脂質-藥物混合物之步驟。

【實施方式】

本文提供之發明說明係關於一種用於製造經脂質囊封之治療分子(包括帶負電荷的治療聚合物，例如核酸、蛋白質及肽)之方法。本文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之治療分子所組成之粒子。該方法提供所製得粒子為單分散(亦即，如本文中所定義，多分散性指數(PDI)係小於0.2)、尺寸分佈窄且均勻且介於50及150 nm之間的意想不到及驚人結果。該方法提供以下的囊封方式：使溶解於水可混溶有機溶劑(諸如乙醇)中之脂質與溶解於水溶液中之帶負電荷之治療聚合物組合，並移去該有機溶劑。脂質及帶負電荷之治療聚合物之絕對及相對濃度係足以製得小粒子。本發明方法所製得的該等粒子不需要諸如擠壓之機械加工來獲得單分散群體。

本發明之方法由於可輕易擴大至大體積且其於寬廣範圍之溫度、溶質、pH及加工時間內穩固而具有優於先前方法之優點。

本發明之方法由於可再現地製得粒子之均勻群體，無需

製得預形成囊泡之額外步驟，而具有優於先前方法之優點。

本發明之方法由於可再現地製得奈米粒子之均勻群體，無需機械加工在脂質與帶負電荷之治療聚合物混合時所製得離子之額外步驟，而具有優於先前方法之優點。該等額外步驟包括：例如，音波處理、均質化或擠壓，以減小其尺寸及達成治療可接受範圍之均一性。

本發明之方法具有無需額外加工步驟來製得奈米粒子，而達成與先前方法相當或更佳之核酸囊封效率之優點。

自本文中關於脂質組份及條件之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。

於發明說明中使用以下縮寫。

VF：通風孔過濾器(vent filter)

TG：溫度計

SUB：單次使用床

TFF：橫流型過濾器

PP：蠕動泵

PG：壓力計

秤：測定重量之構件

圖1顯示包括下述元件之單次使用系統。

脂質儲液：此容器裝納在有機水可混溶溶劑中之所選擇脂質。顯示乙醇作為較佳溶劑。脂質濃度可經調整以增加生產量。該容器係由具有TG及混合構件之可棄式袋所組成。該袋具有用於添加在96至100%乙醇中之脂質之開

孔、VF及由閥控制之出口管。該袋係置於可加熱、可再利
用的電接地容器中。該袋具有用於添加額外乙醇以將該脂
質溶液稀釋至操作濃度之構件。

PP1：蠕動泵1。其將脂質儲液自該脂質儲液容器泵送通
過0.45/0.22 μm 過濾器至經過濾脂質儲液之容器。

經過濾之脂質儲液：此容器裝納操作濃度下之脂質。該
容器為具有混合構件及TG之可棄式袋。其具有用於供脂
質儲液進入之開孔、VF及由閥控制之出口管。該袋係置於
具有秤之可加熱、可再利用的電接地容器中。

sRNA儲液：此容器裝納在水性緩衝劑中之所選擇藥
物。siRNA為較佳之藥物，及檸檬酸鹽緩衝劑為較佳之緩
衝劑。濃度可經調整以增加生產量。該容器為具有混合構
件之可棄式袋。該袋具有用於添加溶質及溶劑之開孔及由
閥控制之出口管。該袋具有用於添加額外緩衝劑以將該
RNA溶液稀釋至操作濃度之構件。

PP2：蠕動泵2。其將siRNA儲液自該siRNA儲液容器泵
送通過0.45/0.22 μm 過濾器至經過濾siRNA儲液之容器。

經過濾之siRNA儲液：此容器裝納操作濃度下之
siRNA。此元件包含秤。該容器為置於可再利用容器中之
可棄式袋。其具有用於siRNA儲液之一或多個開孔及由閥
控制之出口管。該袋係置於具有秤之可再利用容器中。

PP3：用於傳送經過濾之脂質儲液至標示為脂質體
siRNA含於35%乙醇中之容器的蠕動泵3。其配備
PG(PG1)。

PP4：蠕動泵 4，其用於傳送過濾器 siRNA 儲液至含於 35% 乙醇中之脂質體 siRNA 之容器。其亦配備有 PG(PG2)。

含於 35% 乙醇中之脂質體 siRNA：此容器裝納 35% 乙醇下之脂質體與藥物之混合物。此元件包括 VF 及 TG。用於經過濾之脂質及 siRNA 儲液之開孔係與由閥控制之出口管分開。較佳之單元為置於可再利用容器中之可棄式袋。

磷酸鹽緩衝劑：此容器包括緩衝劑(較佳係磷酸鹽緩衝劑)、混合構件及秤。其係具有開孔蓋及具有閥之出口管之大容器。

經過濾之磷酸鹽緩衝劑：此容器藉由管件、0.45/0.22 μm 過濾器、及蠕動泵連接至磷酸鹽緩衝劑容器。其具有混合構件及具有閥之出口管，該閥通向通過 PP 5 至含於 10% 乙醇中之脂質體 siRNA 之容器及 TFF SUB 容器之管件。該容器為內襯可棄式襯裏之可再利用容器。

PP 5：其將經過濾之磷酸鹽緩衝劑自該經過濾磷酸鹽緩衝劑之容器泵送至含於 35% 乙醇容器中之脂質體 siRNA 之容器及至該 TFF SUB 容器。PP 5 係耦合至 PG(PG4)。

含於 10% 乙醇中之脂質體 siRNA：此容器裝納在利用該經過濾磷酸鹽緩衝劑容器中之緩衝劑稀釋含於 35% 乙醇中之脂質體及藥物後之含於 10% 乙醇中之脂質體及藥物之混合物。該容器為內襯可棄式襯裏之可再利用容器，其具有用於脂質體 siRNA 溶液之入口、VF、秤、及通向該 TFF SUB 容器之具有閥的出口。

PP 6：其將含於 10% 乙醇中之脂質體及藥物自含於 10%

乙醇中之脂質體 siRNA 之容器泵送通過 0.45/0.22 μm 過濾器至該 TFF SUB 容器。

TFF SUB：此容器包括用於來自含於 10% 乙醇中之脂質體 siRNA 之容器之含於 10% 乙醇中之脂質體及藥物之進入口、用於來自該經過濾磷酸鹽緩衝劑之容器之緩衝劑之進入口及用於來自該 TFF 單元之滯留物之進入口，各者皆具有閥。其亦包括 VF 及具有其閥之出口。

具有可棄式泵頭之計量泵：此高壓泵與兩 PG (PG 3 及 PG 4) 耦合。其將脂質體及藥物自 TFF SUB 傳送至該 TFF 單元。

TFF：此單元圖示為一對具有對角線的矩形。於操作期間，該含於乙醇溶液中之脂質體/藥物通過 TFF 單元以移去乙醇。經該 TFF 單元所移去的乙醇離開系統。可有超過一個 TFF 藉由閥連接而並聯操作。滯留溶液(滯留物)離開該 TFF，再循環至該 TFF SUB，並視需要再循環通過該 TFF 單元以移去所有乙醇。壓力計 (PG 4) 監測滯留物之壓力。使用儲存於 N_2 槽中之氮氣來給計量泵增壓，以視需要產生背壓，及最終有助於將 TFF 滯留物轉移至第一 10 L SUB 容器。

10L SUB：此係配備秤之單次使用容器。視情況，該 SUS 包括一連串之三個 10L SUB 容器。該 TFF 滯留物經泵送透過 0.45/0.22 μm 過濾器以減輕生物負荷及確保產物完全不含微生物污染，該微生物污染係歸因於可能已進入處理物流之微生物污染。假若整個處理流程真正無菌，則可能

可省去後面的過濾步驟。所得TFF滯留物在無菌充填期間進行包裝。

無菌充填：此步驟係於冷凍乾燥之前進行，冷凍乾燥係使用不同設備作為個別製程進行。冷凍乾燥之前之無菌充填步驟可包括添加載體物質，諸如甘露糖、葡萄糖或用於提供塊體或在該冷凍乾燥步驟期間用於穩定RNA之其他物質。

該系統係經配置以人工控制物質之移動通過各步驟。與脂質、藥物、溶劑及緩衝劑接觸之所有組件係單次使用及可棄式的。該系統係經顯示用於10 L批次，但可放大至1000 L以上。組件係經設計成每批脂質體/藥物使用一次。

完成製程之方式顯示在如隨後流程圖(圖1)所示之步驟順序中。

將脂質及藥物儲備溶液分別製備於脂質儲液及siRNA儲液容器中。該等儲備溶液可以高濃度製得。於該等儲液容器中藉由攪拌進行混合。脂質儲備溶液之溫度可經調整至設定溫度。選擇用於製備脂質儲液之容器，以在高溫下使用純有機溶劑時使其具有最少之可浸出物質。

使該等儲備溶液分別泵送通過0.45/0.22 μm 過濾器至經過過濾之脂質儲液容器及經過過濾之siRNA儲液容器。該等儲備溶液可與更多溶劑組合，以在轉移至該等經過過濾儲液之容器之前或期間稀釋該儲備溶液。

同樣地，於磷酸鹽緩衝劑容器中製備水性緩衝劑，及藉由泵送至經過過濾磷酸鹽緩衝劑之容器來進行過濾器滅菌。

將經過濾之 siRNA 溶液泵送至含於 35% 乙醇中之脂質體 siRNA 之容器。

在受控設定溫度下混合水溶液之同時以可有效形成含於最終濃度 35% 乙醇中之脂質-藥物粒子之速率將在有機溶劑中之脂質泵送至存於含於 35% 乙醇中之脂質體 siRNA 之容器中之水性 siRNA 溶液中。

脂質之添加可經由單口或多口，藉由針或針組進行。其可自水溶液之上方添加至表面，或其可自表面下方注入該水溶液中。透過添加及混合，含於 35% 乙醇中之脂質體 siRNA 容器中溶液之乙醇濃度增加至 30% 至 40%，較佳 35%。該濃度逐漸增加，而形成自初始(較佳 0%)至最終(較佳 35%)值之梯度。該梯度可自 1 分鐘延長至 60 分鐘或更長。

一旦含於 35% 乙醇中之脂質體 siRNA 之容器中的溶液達到最終乙醇濃度(較佳 35%)，即將該溶液從含於 35% 乙醇中之脂質體 siRNA 之容器中泵出及於線內與分開地自經過濾磷酸鹽緩衝劑容器泵送之緩衝劑混合，以稀釋含於水可混溶醇(較佳 10% 至 20% 乙醇、最佳 10% 乙醇)中之混合物，並轉移至含於 10% 乙醇中之脂質體 siRNA 之容器。

使該 10% 乙醇溶液進行針對水性緩衝劑之濾洗以移去乙醇。

將 TFF 滯留物(0% 乙醇、100 水性緩衝劑)儲存於第一 10 L SUB 中。

該 TFF 滯留物可視需要經過濾以減輕無菌充填之生物負

荷。

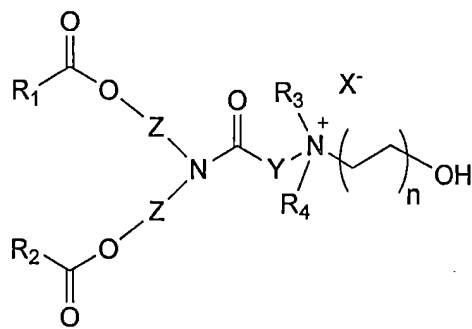
無菌充填包括冷凍乾燥步驟。該冷凍乾燥步驟與步驟10下產生無菌TFF滯留物之製程係不連續的。換言之，該步驟較佳係在與提供TFF滯留物之SUS單元不同的位置進行。可能可在冷凍乾燥之前添加諸如蔗糖或葡萄糖之碳水化合物來穩定奈米粒子及/或增加體積。

用於該論述方法中之脂質混合物至少包含帶正電荷之脂質(陽離子脂質)來與帶負電荷之治療聚合物錯合及含聚乙二醇之脂質結合物(PEG-脂質)來防止聚集。該陽離子脂質可係在寬廣pH條件範圍內之永久陽離子電荷、於低pH(小於pH 6)下帶電荷及於中性pH(pH 6.5至8)下無淨電荷之可游離陽離子脂質或永久及可游離陽離子脂質之組合。該脂質混合物亦可包含靶向脂質、聚合物、類固醇、磷脂或另一脂質群組之成員，包括脂肪、蠟、脂溶性維生素、單甘油酯或二甘油酯、脂肪鹽基、甘油酯、甘油磷脂、神經鞘脂質、糖脂質及聚酮。該方法亦可用於形成僅具有中性或帶負電荷組份之脂質體。

優先地，該脂質混合物之該等組份可選自以下群組。

陽離子脂質

本發明範疇中包括化學式I之陽離子脂質：



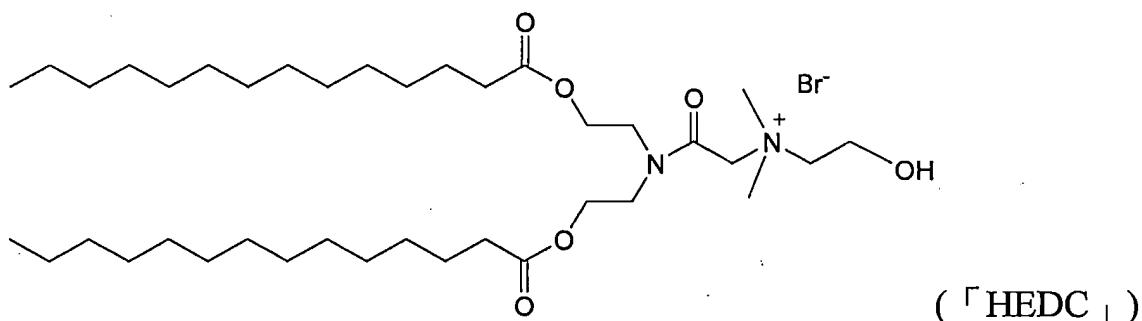
其中

Z=烷基連接子、C₂-C₄烷基

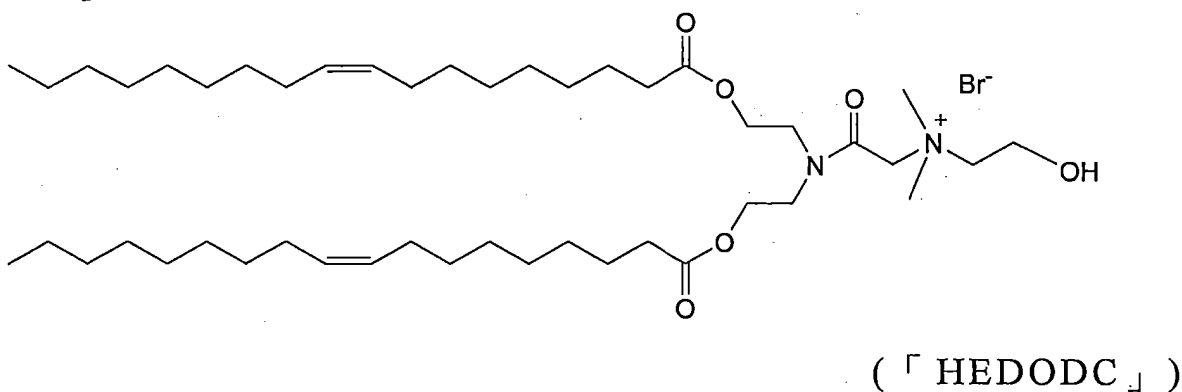
Y=烷基連接子、C₁-C₆烷基

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、C₁₃-C₁₇烯基、C₁₇烯基；R₃與R₄各自獨立地為氫、C₁-C₆烷基或-CH₂CH₂OH、C₁-C₆烷基、C₁-C₃烷基；n為1至6；及X為抗衡離子，包括任何氮抗衡離子，該術語為相關技藝中所可輕易明瞭。較佳之氮抗衡離子包括鹵素，其中氯離子及溴離子尤佳。另一較佳抗衡離子為甲磺酸根(-SO₃CH₃)。

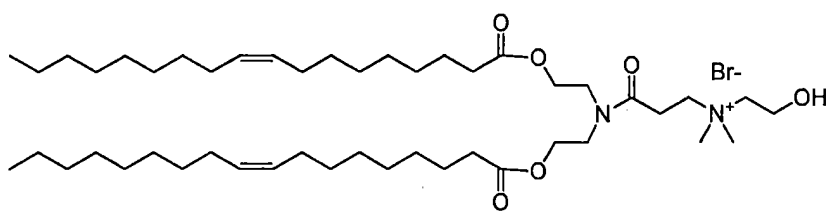
化學式I之例示性化合物包括：



及



及

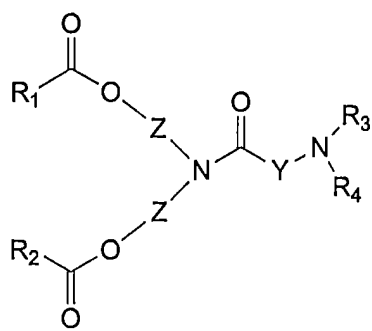


(「HE-Et-DODC」)

在生理 pH 下之其他陽離子帶電荷脂質包括(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'-二甲基胺基乙烷)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-(精胺甲醯胺基)乙基)-N,N-二甲基銨三氟乙酸鹽(「DOSPA」)。

可游離陽離子脂質

本發明範疇中包括化學式 II 之可游離陽離子脂質：



II

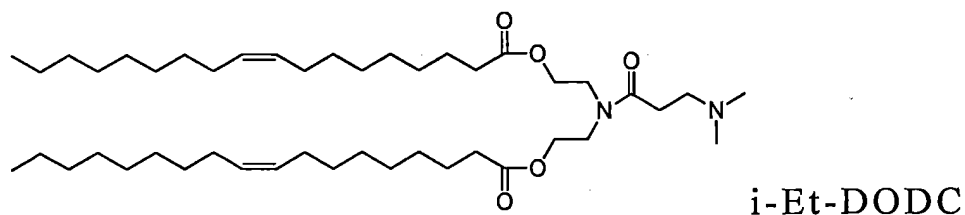
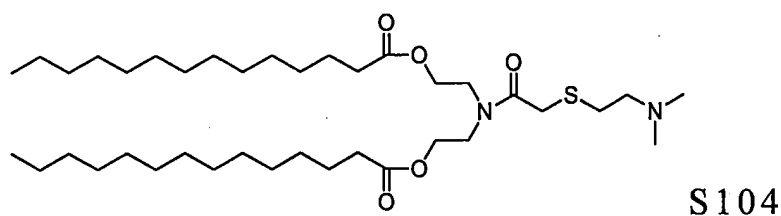
其中

Z=烷基連接子、C₂-C₄ 烷基、-CH₂SCH₂CH₂-

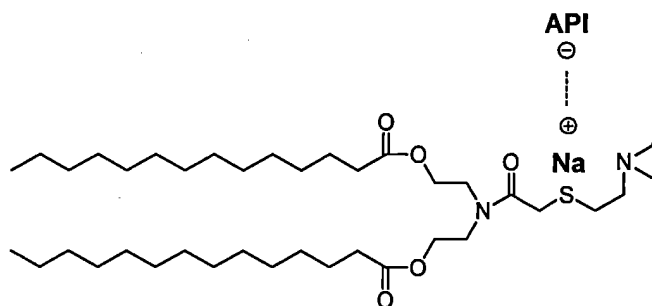
Y=烷基連接子、C₁-C₆ 烷基

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 $-CH_2CH_2OH$ 、 C_1 - C_6 烷基、 C_1 - C_3 烷基。

一些帶正電荷之脂質具有在生理pH下或接近生理pH之pKa，且在弱酸條件下為陽離子性及在生理pH下為弱陽離子性。該等可游離陽離子脂質包括(但不限於)((2-((2-(二甲胺基)乙基)硫基)乙醯基)氮烷二基)雙(乙烷-2,1-二基)二十四烷酸酯(「S104」)、(Z)-((3-(二甲胺基)丙醯基)氮烷二基)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」)。



應明瞭可游離脂質可有助於結合及/或釋放如下所示之活性醫藥成分(API)。



中性脂質

中性脂質之實例包括(但不限於)磷脂、胺脂質及神經鞘脂質。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、溶血磷脂醯乙醇胺、二棕櫚醯磷脂醯膽鹼、二油醯基磷脂醯膽鹼、二硬脂醯基磷脂醯膽鹼或二亞油醯基磷脂醯膽鹼。諸如神經鞘脂質、糖神經鞘脂質家族、二醯基甘油及3-醯氧基酸之缺乏磷之其他化合物亦在稱為兩性脂質之群組中。另外，可將上述兩性脂質與包括三酸甘油酯及固醇之其他脂質混合。

PEG-脂質

雙層穩定組份為結合至脂質頭部基團(例如，磷脂醯乙醇胺)之聚乙二醇(「PEG」)。另一雙層穩定組份為結合至神經醯胺之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醯乙醇胺或者結合至神經醯胺。另外，預形成之PEG-磷脂醯乙醇胺(「PEG-PE」)結合物可於市面獲得。

可使用不同分子量之PEG來形成本發明之雙層穩定組份。各種不同分子量之PEG可購自許多不同來源，或者，

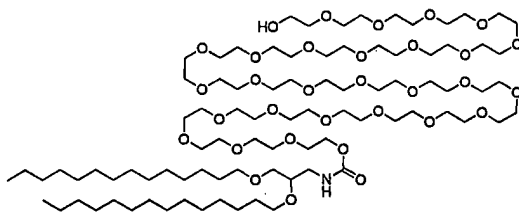
其等可利用擅長該技藝者所熟知之標準聚合技術合成。於目前較佳之一實施例中，聚乙二醇具有範圍自200至10000 Da、較佳500至4000 Da及最佳1000至2000 Da之分子量。一般而言，已發現增大PEG之分子量使達成穩定化所需的雙層穩定組份濃度減小。

可使具有多種不同鏈長度及飽和度之醯基鏈群組之磷脂醯乙醇胺與PEG結合，以形成雙層穩定組份。該等磷脂醯乙醇胺可於市面獲得，或可利用擅長該技藝者所熟知之習知技術分離或合成。較佳為含有碳鏈長度在C10至C20範圍內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與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)。

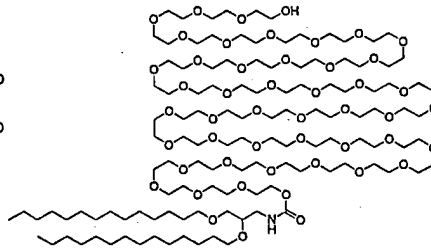
前述組合物亦可包括本身為相關技藝所熟知之與PEG結合之脂質，包括PEG-磷脂及PEG-神經醯胺，其包含選自以下之一或多種分子：PEG2000-DSPE、PEG2000-DPPE、PEG2000-DMPE、PEG2000-DOPE、PEG1000-DSPE、PEG1000-DPPE、PEG1000-DMPE、PEG1000-DOPE、PEG550-DSPE、PEG550-DPPE、PEG-550DMPE、PEG-1000DOPE、PEG-膽固醇、PEG2000-神經醯胺、PEG1000-神經醯胺、PEG750-神經醯胺及PEG550-神經醯胺。

此外，組合物亦可包括具有通式mdPEG-連接子-脂質之

單分散(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氧雜八十三碳烷基(2,3-雙(十四烷氧基)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氧雜三十四碳烷基庚基(2,3-雙(十四烷氧基)丙基)胺基甲酸酯(「HO-PEG2000-cBTP」)。



HO-PEG1251-cBTP



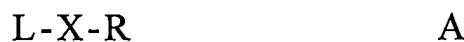
HO-PEG2000-cBTP

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、皮質類固醇(例如，糖皮質激素)、孕甾烷(例如，孕酮)及植物固醇。此等亦可包含呈與親水性部分(例如，聚乙二醇)之結合物形式。較佳之類固醇為膽固醇。

靶向脂質

靶向脂質之一實例為式(A)之化合物，



其中脂質(L)係選自由DSPE、DOPE及DC組成之群；連接

子(X)係選自由無、PEG550、PEG2000、PEG-麩胺酸酯(-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烷-1,19-二醯胺組成之群；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或其衍生物組成之群。

靶向脂質之另一實例為化學式(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烷-1,19-二醯胺(「雙醯胺基-PEG」)或N1,N19-雙(16,20-二胺基-15-側氧基-4,7,10-三氧雜-14-氮雜二十烷基)-4,7,10,13,16-五氧雜十九烷-1,19-二醯胺(「lys-雙醯胺基-PEG-lys」)；及類視色素(R)係選自由維生素A酸、阿達帕林、視黃醇、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。

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

RNA-脂質粒子組合物及調配物

本發明包括含脂質粒子之組合物，該等脂質粒子可包含及不含活性劑，其中該活性劑當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，該活性劑係囊封於脂質粒子之水性內部。於其他實施例中，該活性劑係存在於該脂質粒子之一或多個脂質層中。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，本發明之脂質粒子係與核酸相結合，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。含有至多50個核苷酸之片段通常稱為寡核苷酸，及更長之片段稱為多核苷酸。於特定實施例中，本發明之寡核苷酸的長度為15至50個核苷酸。

本文中術語「多核苷酸」及「寡核苷酸」係指由自然生成之鹼、糖及糖間(主鏈)鍵聯所組成之核苷酸或核苷單體之聚合物或寡聚物。術語「多核苷酸」及「寡核苷酸」亦包括包含非自然生成之單體或其功能類似之部分之聚合物或寡聚物。該等經修飾或取代之寡核苷酸因諸如例如細胞吸收增強及於核酸酶存在下之穩定性增加之特性而通常優於天然形式。

寡核苷酸可為如寡脫氧核糖核苷酸或寡核糖核苷酸。寡脫氧核糖核苷酸係由脫氧核糖於該糖的5'及3'碳處共價結合至磷酸酯以形成交替、非支鏈聚合物所組成。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。

存在於根據本發明之脂質-核酸粒子中之核酸包括任何已知形式之核酸。本文所使用之核酸可係單股DNA或RNA、或雙股DNA或RNA或DNA-RNA雜合體或RNA-PNA及/或PNA二螺旋之DNA-PNA雜合體。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干擾試劑。單股核酸包括(例如)反義寡核苷酸、核酶、微型RNA及三螺旋形成寡核苷酸。

核酸可具不同長度，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個核苷酸殘基。於特定實施例中，寡核苷酸之長度可自約10至100個核苷酸。於不同相關實施例中，不論係單股、雙股及三股，寡核苷酸之長度皆可在自約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個核苷酸之範圍內。

於特定實施例中，寡核苷酸(或其之股)可特異地雜交或互補至標靶多核苷酸。「可特異地雜交」及「互補」為用以指示致使DNA或RNA標靶與寡核苷酸之間發生穩定及特異結合之足夠互補程度之術語。應明瞭寡核苷酸無需100%互補至其之欲可特異地雜交之標靶核酸序列。寡核苷酸在該寡核苷酸結合至標靶干擾標靶分子之正常功能以引起自其之效用或表現損耗時係可特異地雜交，及特異性

鹼基配對之程度係足以在需要特異性結合之條件下(亦即，在活體內檢測或治療劑治療之情況下於生理條件下，或者在體外檢測之情況下，於實施該等檢測之條件下)防止寡核苷酸非特異性地結合至非標靶序列。因此，於其他實施例中，該寡核苷酸相較於其所靶向或其所特異性地雜交之基因或mRNA序列之區域包含1、2或3個鹼基取代。

於特定實施例中，核酸-脂質粒子可與RNA干擾(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二螺旋，其可與稱為RNAi-誘導之沉默複合體(RISC)之細胞質多蛋白複合體結合。載有siRNA之RISC介導同源mRNA轉錄體之降解；因此，siRNA可經設計成降低具有高特異性之蛋白表現。不同於其他反義技術，siRNA透過經演進之自然機轉發揮作用以透過非編碼RNA控制基因表現。此通常被認為是其體外及體內活性較反義寡核苷酸或核酶中任一者更強效之原因。RNAi試劑可包括DNA正義(DNA sense)：RNA反義雜合體、RNA正義：DNA反義雜合體及DNA：DNA雜合體可介導RNAi。因此，可使用包含該等不同類型雙股分子中之任一者之RNAi分子。另外，應明瞭RNAi分子可以不同形式使用並引入細胞內。因此，如本文所使用，RNAi分子涵蓋可誘導細胞內RNAi反應之任何及所有分子，包括(但不限於)包含兩個別股(亦即，正義股及反義股)之雙股多核苷酸，例如，小的干擾RNA(siRNA)；包含形成雙股區域之互補序

列之髮夾環之多核苷酸，例如，shRNAi分子，及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個多核苷酸的表現載體。

可使用RNA干擾(RNAi)來特異地抑制標靶多核苷酸之表現。雙股RNA介導之基因抑制及核酸表現可依據本發明藉由將dsRNA、siRNA或shRNA引入細胞或生物中來達成。siRNA可為雙股RNA或同時包含RNA及DNA之雜交分子(例如，一股RNA及一股DNA，或sisiRNA)。

靶向特定多核苷酸之RNAi分子可依據相關技藝熟知之程序輕易地製得。因此，擅長該技藝者應明瞭可使用許多不同siRNA分子來靶向特定的基因或轉錄體。於某些實施例中，根據本發明之siRNA分子係雙股的及長度為16至30個或18至25個(包括在中間之各整數)核苷酸。

一般而言，siRNA分子與標靶DNA分子之一股完全互補。於其他實施例中，siRNA可具有經修飾之組成，諸如(例如)2'-脫氧或2'-O-甲基修飾物。然而，於較佳實施例中，並非整股siRNA皆由2'脫氧或2'-O-修飾之鹼基構成。

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-脂質粒子係使用包括以下之多種生物物理參數來表徵：(1)核酸對脂質比率；(2)囊封效率；及(3)粒度。期望高囊封效率、良好的抗核酸酶性及血清穩定性及可控制的粒度(直徑大致小於200 nm)。另外，核酸聚合物之特性極為重要，因為致力於修飾核酸以

賦予抗核酸酶性使得治療成本增加，同時在許多情況下僅提供有限的抗性。除非另作指明，否則本說明書中該等標準係計算如下：

核酸：脂質比為一定製備體積中之核酸量除以相同體積中之脂質量。此比率可以每莫耳基礎之莫耳數，或以每重量基礎之重量數，或以每莫耳基礎之重量數表示。針對最終準備投與之調配物，在已利用透析、層析及/或酵素(例如，核酸酶)分解移去盡可能多的外部核酸之後，計算核酸：脂質比。

囊封

為測定表示為脂質-核酸粒子中之經囊封 siRNA 百分比之 siRNA 囊封效率 (EE)，利用如下述的 RiboGreen 試驗。可使用該程序來測定溶液中二螺旋及單股 RNA 或 DNA 之濃度。

設備包括 BioTek Instruments, Inc. FLx800、可變式吸移管及旋渦混合器。試劑包括不含 RNase 之水 (MilliQ 等級，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 緩衝劑之製備涉及使用 50 mL 量筒將 38 mL 不含 RNase 之水轉移至 50 mL 離心管中；及吸移 2 mL 20×TE 緩衝劑溶液至該離心管中並使用旋渦混合器混合。

於 1×TE 緩衝劑中之 2% Triton X-100 及 1% Triton X-100 之製備涉及分別吸移 2 mL 或 1 mL 10% Triton X-100 至不含

RNase之15 mL圓錐管中，分別添加8 mL或9 mL 1×TE緩衝劑，及使其回旋以均勻混合。

RiboGreen工作溶液之製備涉及移出RiboGreen試劑之冷凍儲液，升溫至室溫，及使用TE緩衝劑以1:200稀釋。以鋁箔包覆離心管以防止任何過量光接觸該溶液。

藉由製備於TE緩衝劑中之RNA溶液，及將其平板接種於96孔板中來製得標準物。將樣本稀釋至約80 µg/mL siRNA之最終濃度並轉移至圖1所示之96孔板。添加RiboGreen工作溶液及與各樣本及標準物混合。分析之前，在黑暗中培養該等樣本歷時1至2分鐘。

然後將含於TE緩衝劑中之1% Triton X-100添加至複製樣本並接著添加RiboGreen工作溶液。

囊封效率係自螢光測量值，使用來自各樣本之螢光結果之平均值，校正外部樣本之平均值的基線測量值(不存在RNA情況下之RiboGreen試劑之螢光)，及在校正因存在Triton X-100所致之信號強度的8%減小後測得。然後利用以下公式計算囊封效率：

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

換言之，囊封效率為總RNA值(於以清潔劑溶解脂質體之後所測得)與未處理脂質體值間之差除以總RNA值。自未處理脂質體樣本所獲得的螢光將係由溶液中之游離RNA加上吸收於脂質體外表面上之RNA所組成。

尺寸

尺寸指示所形成粒子之尺寸(直徑)。可使用 Malvern

Zetasizer Nano-ZS 動態光散射 (DLS) 儀器來測定尺寸分佈。

此程序適用於量測處理中脂質體樣本之體積平均直徑、Z-平均直徑及多分散度。多分散度為粒度分佈之數值。

測量係在室溫下進行。應使樣本及試劑平衡至室溫。測得體積加權平均粒徑及多分散度指數。

製造方法

脂質體之製法

脂質混合物可經溶解於水可混溶有機溶劑(較佳係無水乙醇)中。於大多數實施例中，有機溶劑係以其市售形式使用。

於一例示性實施例中，脂質之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(除胺基脂質外)、類固醇(例如，膽固醇)及經 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係由陽離子胺基脂質、中性脂質、膽固醇及經 PEG 修飾之脂質組成。於更佳實施例中，該脂質混合物係由陽離子脂質、DOPE(或另一輔助脂質，具有可游離或永久陽離子電荷)、膽固醇及與 PEG 結合之脂質以不同莫耳比組成。較佳之莫耳範圍為 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% 經 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，二 VA-PEG750-二 VA(或其他 VA 結

合之靶向脂質)。

脂質總濃度係小於25 mg/ml，較佳小於5 mg/ml。使該脂質混合物過濾通過薄膜(例如，0.45或0.2 μm 過濾器)。

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pKa小之pH之溶液。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。較佳之緩衝劑將係陰離子濃度範圍為1至1000 mM者，其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達成高負載程度。可適宜地添加冷凍保護劑及/或例如在該等粒子經透析以移除乙醇時平衡跨粒子膜之滲透勢、增大pH或與醫藥可接受載劑或稀釋劑混合之非離子溶質。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 $^{\circ}\text{C}$ ，較佳為30至40 $^{\circ}\text{C}$ 。乙醇溶液係藉由呈窄流形式噴灑於空氣-水界面上，或通過藉由浸沒於該水溶液中之管所傳遞的乙醇間之液-液界面添加至該水溶液。

有機溶液係藉由重力或藉由泵浦傳遞將有機溶液以受控速率(較佳恆定速率)添加至水溶液。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。該有機溶液可通過單一噴霧或液流、通過管或噴嘴、或通過多噴嘴系統來添加。儘管將有機溶液添加於水溶液中，然所得溶液可藉由攪拌、搖動或再循環來混合。該添加步驟達成較佳25至45%乙醇、最佳35%乙醇之最終濃度。

藉由透析或過濾(較佳藉由濾洗(diafiltration))處理最終溶液以移除有機溶劑。在移除乙醇時，將水溶液轉變成經緩衝於中性pH(pH 6.8至pH 7.5，較佳pH 7.2)下，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經滅菌處理，例如，藉由透過0.22 μm 過濾器過濾。

囊封帶負電荷之治療聚合物之脂質體

本文中所述之方法適用於製備具有帶負電荷之治療聚合物(例如，RNA分子)之脂質粒子。於本文所述之方法中，使脂質之混合物與聚合物之水溶液組合。該聚合物經有效地囊封於所得脂質粒子中。

奈米粒子可包含聚陰離子活性劑或治療劑，例如RNA與一、二或三種生物相容性聚合物。治療劑之實例包括核酸、諸如紫杉烷類之抗癌劑。

帶負電荷聚合物之總電荷必須小於或等於在添加時脂質混合物中之正電荷數，較佳為0.06至0.16(w:w)。例如，當使用RNA時，經囊封之核酸係以RNA：脂質0.06至0.16、電荷：電荷(-/+)較佳1:2.5至1:1之最終比率存在。

當脂質之混合物包含具有電荷之陽離子脂質時，可於帶負電荷聚合物之存在下形成脂質囊泡以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或更高而中和。如此形成之該等囊泡提供具有高含量核酸之均勻囊泡尺寸之調配物。

於任一實例中，囊封聚合物(奈米粒子)之該等囊泡具有50至150 nm之尺寸範圍。

根據本文所述之方法，使脂質混合物與可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脂質之pKa小之pH之溶液。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。較佳之緩衝劑將係在1至1000 mM陰離子範圍內，其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。

可適宜地添加冷凍保護劑及/或在粒子經透析以移除乙醇時平衡跨粒子膜之滲透勢、增加pH或與醫藥可接受載劑及/或稀釋劑混合之非離子溶質。

關於RNA，圖1出示本文所述方法之示意圖。藉由使凍乾或固體物質溶解於水中，較佳緩衝於pH 3.5至4.5下(例如，利用50 mM檸檬酸鹽)來製備溶液。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。假若使用單股核酸，則於提高之溫度下短暫加熱可能有用，例如，於65°C下加熱1至2分鐘。

乙醇溶液藉由呈窄流形式噴灑於空氣-水界面上，或藉由通過連接至含該水溶液之容器之管所傳遞之乙醇間之液-液界面添加至水溶液。

有機溶液係藉由以受控速率(較佳以恆定速率)傳遞該有機溶液至水溶液而添加。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。該有機溶液可通過單一噴霧或液流，通過管或噴嘴，或通過多噴嘴系統來添加。

在將有機溶液添加於水溶液中的同時，可藉由攪拌、搖動或再循環來混合所得溶液。該添加步驟達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)(2.5:1至1:1，電荷：電荷比)。

藉由透析或過濾(較佳藉由濾洗)處理該最終溶液以移除有機溶劑。在移除乙醇時，將水溶液轉變成經緩衝於中性pH(pH 6.8至pH 7.5，較佳pH 7.2)下，例如磷酸鹽緩衝劑。所得水溶液較佳在儲存或使用之前經滅菌處理，例如，藉由透過0.22 μm 過濾器過濾。

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

冷凍乾燥

本揭示案部分係關於在復原時具有最少量大聚集物之凍乾醫藥組合物。該等大聚集物可具有大於約0.2 μm 、大於約0.5 μm 或大於約1 μm 之尺寸，且可能係復原溶液所不期望。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)測量。測試可包括光遮蔽粒子計數測試、顯微粒子計數測試、雷射繞射及單一粒子光學感測。於一實施例中，利用雷射繞射及/或單一粒子光學感測測定給定樣本中之

粒度。可使用動態光散射(DLS)來量測粒度，但其依賴布朗運動(Brownian motion)，因此該技術可能無法偵測到一些較大顆粒。雷射繞射依賴顆粒與懸浮介質間之折射率差。該技術可偵測亞微米至毫米範圍之粒子。在奈米粒子懸浮液中可測得相對少(例如，約1至5重量%)量之較大粒子。單一粒子光學感測(SPOS)利用稀釋懸浮液之光遮蔽來計算約0.5 μm 之個別粒子的數目。藉由知曉測量樣本之粒子濃度，可計算聚集物之重量%或聚集物濃度(粒子數/mL)。

聚集物之形成可例如因粒子表面脫水而於冷凍乾燥之冷凍及/或乾燥步驟期間發生。冷凍製程具有可在冰形成時使該等粒子間之距離減小之濃縮效應(Alison等人，*Biochim Biophys Acta*. 2000年9月29日；1468(1-2):127-138；Armstrong及Anchordoquy，*J Pharm Sci*. 2004年11月；93(11):2698-709)。該脫水可藉由在冷凍乾燥之前於懸浮液中使用冷凍保護劑(諸如多醣)而避免。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)、龍膽二糖(gentiobiose)、松二糖(turanose)、麥芽酮糖、巴拉金糖(palatinose)、葡萄糖 $\beta(1\rightarrow6)$ 果糖(gentiobiulose)、甘露二糖(mannobiase)、蜜二糖(melibiose)、車前二糖(melibiulose)、芸香糖(rutinose)、蘆丁糖(rutinulose)及木二糖(xylobiose)。於一實施例中，該組合物包含為蔗糖之

多醣。於另一實施例中，該組合物包含為海藻糖之多醣。申請人的結果顯示，相較於起始懸浮液，於復原時獲得相當的DLS尺寸分佈。

先前認為玻璃化(以玻璃狀賦形劑固定大分子之過程)並非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取決於特定的脂質：多醣比(w:w)，此提供防止脂質體聚集、破壞脂質體擴散障壁、及釋出經囊封之RNA從而形成核酸脂複合體之方式。於一實施例中，該組合物包含12至15%(w:w)蔗糖及5至20 mg/ml脂質，較佳12%蔗糖及9 mg/ml脂質。更佳地，該組合物亦包含緩衝劑，最佳為中性pH的HEPES。

冷凍乾燥步驟係在適宜的玻璃容槽中進行，較佳在10 ml圓筒玻璃瓶中進行。該玻璃瓶必須耐受在短時間內低於-40°C及高於室溫之極端溫度變化，及經切割成均勻形狀。將包含填充劑及囊封核酸之脂質體之組合物添加至較佳3 ml體積及較佳含有9 mg/ml脂質之該瓶。

該冷凍乾燥之步驟可包括在高於約-40°C之溫度下(或例如低於約-30°C)使組合物冷凍，形成冷凍組合物；及將該冷凍組合物乾燥而形成凍乾組合物。該冷凍步驟較佳導致溫度在約6分鐘內線性減低至最終值，較佳以1°C/分鐘自20減低至-40°C。更佳地，可使用12至15%之蔗糖，及乾燥步驟係在約50至150毫托下，先在約-15至約-35°C之低溫下，此後在室溫至約25°C之更高溫度下，及在3至7天內完

成。於本揭示案之另一實施例中，可使用海藻糖，及該乾燥步驟係在約50至100毫托下，先在約0至約-15°C之低溫下，隨後在更高溫度下。

於另一態樣中，本發明提供一種防止醫藥奈米粒子組合物中粒子大量聚集之方法，該方法包括將糖及鹽添加至凍乾調配物以防止核酸聚集及自脂質體之內部釋放出來。

醫藥組合物

本發明之脂質粒子(特定言之，在與治療劑結合之情況下)可經調配為醫藥組合物，例如，其進一步包含根據投藥途徑及標準醫藥實務所選擇之醫藥可接受之稀釋劑、賦形劑或載劑(諸如生理鹽水或磷酸酯緩衝劑)。

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且進一步包含醫藥可接受載劑。一般而言，使用生理鹽水作為醫藥可接受載劑。其他適宜載劑包括：例如，水、緩衝水、0.9%鹽水、0.3%甘胺酸、糖或多醣，例如，蔗糖及/或海藻糖及類似物，包括用於增強穩定性之醣蛋白，諸如白蛋白、脂蛋白、球蛋白。可包括填充劑、cyro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熟知之習知滅菌技術進行滅菌。該等水溶液隨後可封裝供使用或於無菌條件下過濾並凍乾，

在投藥之前將該凍乾製劑與該無菌水溶液組合。該等組合物可包含近似生理條件所需的醫藥可接受之輔助物質，諸如pH調節及緩衝劑、張性調節劑及類似物，例如乙酸鈉、乳酸鈉、氯化鈉、氯化鉀、氯化鈣等等。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在儲存時之過氧化損耗的脂質保護劑。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調配物中之濃度可寬廣地變化，亦即，自低於約0.01%(通常，約0.05(或至少約0.05)至5%)至10至30重量%之多，且其主要將依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，可增加濃度以減低與治療相關聯之流體負載。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，此點可能特別理想。另一選擇為，可將由刺激脂質所組成之複合體稀釋至低濃度以減輕投藥部位處之發炎。於一組實施例中，核酸將具有貼附標籤，及可用於臨床診斷(經由指示互補核酸之存在)。於該情況下，複合物的投與量將取決於所使用的特定標籤、要診斷的疾病狀況及臨床醫生的判斷，但一般將在約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

本文所述之脂質粒子可用以傳遞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

法之以下論述係以與核酸-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，本發明提供用於將核酸引入細胞中之方法。適於引入細胞中之較佳核酸為siRNA、免疫刺激寡核苷酸、質體、反義體及核酶。該等方法之實施可藉由使本發明之粒子或組合物與細胞接觸一段足以發生細胞內傳遞的時間。

本發明之組合物可吸附至幾乎任何細胞類型。一旦經吸附，核酸-脂質粒子即可被一部分細胞內吞，使得脂質與細胞膜交換，或與該等細胞融合。複合物中核酸部份之轉移或併入可經由該等路徑中之任何一者發生。在無意受本發明範疇限制下，咸認為，在粒子藉由內吞作用吸收至細胞中的情況中，該等粒子隨後與核內體膜相互作用，使得該核內體膜變得不穩定，可能係因形成非雙層相，導致經囊封之核酸引入細胞質中。類似地，在粒子直接與細胞質膜融合之情況中，在發生融合時，脂質體膜整合至細胞膜中及脂質體之內含物與細胞內流體組合。於體外進行之情況下，細胞與脂質-核酸組合物間之接觸將係在生物相容性介質中發生。組合物之濃度可視特定應用寬廣地變化，但一般係在1 μmol 至10 mmol 之間。於某些實施例中，利用脂質-核酸組合物處理細胞一般係在生理溫度(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，核酸可傳遞至於培養基中生長之不論植物或動物來

源、脊椎動物或無脊椎動物及任何組織或類型的任何細胞。於較佳實施例中，該等細胞將係動物細胞，更佳為哺乳動物細胞，及最佳為人類細胞。

於一組實施例中，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%融合平板接種細胞。添加至該等細胞之該懸浮液之濃度較佳為約0.01至20 $\mu\text{g/mL}$ ，更佳為約1 $\mu\text{g/mL}$ 。

典型應用包括使用熟知之程序來提供siRNA之細胞內傳遞以降低或壓下特定的細胞標靶。選擇性地，應用包括傳遞編碼治療有用多肽之DNA或mRNA序列。

本發明之方法可於體外(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，亦可使用本發明之組合物來將核酸傳遞至活體內細胞。

就活體內投藥而言，該等醫藥組合物較佳係非經腸道投與，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一次全劑量注射(bolus injection)經靜脈內或經腹膜內投與。

於其他方法中，該等醫藥製劑可藉由直接施用製劑至組織而與標的組織接觸。該施用可經由局部、「開放」或「閉合」程序進行。所謂「局部」意指將該醫藥製劑直接施用至暴露至環境之組織，諸如皮膚、口咽、外耳道及類似物。「開放」程序為包括切開病患的皮膚及直接觀察醫藥製劑所施用之下方組織之彼等程序。此一般係藉由外科

手術程序達成，諸如胸廓切開術以接近肺、剖腹術以接近腹部內臟或其他接近標的組織的直接外科手術法。「閉合」程序為未直接觀察內部標的組織，而係經由通過皮膚中之小傷口插入儀器來接近的侵入性程序。例如，該等製劑可藉由針筒灌洗術投與腹膜。同樣地，該等醫藥製劑可藉由在腰椎穿刺期間輸注，接著一如通常實施脊柱麻醉或甲泛葡胺(metrazamide)脊髓造影地適宜定位病患而投與至腦膜或脊髓。選擇性地，該等製劑可經由內視鏡裝置投與。

亦可以氣霧劑吸入肺或藉由直接注射於疾病部位來投與該等脂質-核酸組合物。

本發明之方法可針對多種受試者或主體實施。較佳之受試者或主體包括哺乳動物物種，諸如人類、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，例如經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-治療劑粒子之劑量將取決於治療劑對脂質之比及主治醫師基於病患年齡、體重及健康狀態之意見。

於一實施例中，本發明提供一種調節標靶多核苷酸或多肽表現之方法。該等方法一般包括使細胞與和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

可意指減少或降低。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並可用，及包括(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宜對照值增加或減少至少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，假若期望多核苷酸或多肽之表現減少，則核酸可為(例如)反義寡核苷酸、siRNA或微型RNA，其包含特異雜交至編碼標靶多肽之多核苷酸，因而干擾標靶多核苷酸或多肽表現之多核苷酸序列。選擇性地，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，核酸活性劑或治療劑係選自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包含特異結合至編碼多肽之多核苷酸或其補體之寡核苷酸，使得多肽之表現減少。

於其他實施例中，核酸為編碼多肽或其功能性變體或片段之質體，使得多肽或其功能性變體或片段之表現增加。

於相關實施例中，本發明提供一種治療特徵在於個體中多肽過度表現之疾病或病症之方法，該方法包括向個體提供本發明之醫藥組合物，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 包含特異結合至編碼多肽之多核苷酸或其補體之寡核苷酸。

於另一相關實施例中，本發明包括一種治療特徵在於個體中多肽表現不足之疾病或病症之方法，該方法包括向個體提供本發明之醫藥組合物，其中該治療劑為編碼多肽或其功能性變體或片段之質體。

實例

實例 1

參考圖 1 以範圍自 20 L 至 200 L 之不同規模使用 2 種不同 siRNA 製備脂質體/RNA 奈米粒子及僅含脂質之奈米粒子。

將脂質儲備溶液混合如下。將所有脂質組份(陽離子脂質、DOPE、膽固醇、與 PEG 結合之脂質及二 VA-PEG750-二 VA)溶解於無水乙醇中達 4.5 mg/mL 之重量濃度。使乙醇中之脂質升溫至 35 至 40°C 且混合直到顯然溶解為止。

將該脂質溶液自脂質儲液容器泵送通過 0.45/0.22 μm 過濾器至經過濾脂質儲液容器。

使 siRNA 以 0.26 mg/mL 或 0.16 mg/ml 之濃度(取決於最終的 siRNA 對脂質比)溶解於 siRNA 儲液容器中之 50 mM 檸檬酸鹽緩衝劑中。使該 siRNA 溶液自 siRNA 儲液容器泵送通過 0.45/0.22 μm 過濾器至含於 35% 乙醇中之脂質體 siRNA 之容器。

使該含於 35% 乙醇中之脂質體 siRNA 之容器達到 35 至 40°C，同時不斷地攪拌該等內含物。使用噴嘴將該脂質溶

液噴灑於含 siRNA 之緩衝劑之表面上，以自發地形成負載有 siRNA 之脂質體。將脂質與 siRNA 組合以達成 14:1 或 9:1(重量：重量)之最終總脂質對 siRNA 比及 35% 之乙醇濃度。

然後利用經 0.22 μm 過濾器過濾之 PBS 緩衝劑將該脂質體溶液稀釋於 20 公升 Flex Boy 單次使用袋中至約 10% 之最終乙醇濃度。濃縮所得的脂質體溶液然後進行 10 倍體積 PBS 之濾洗以移除乙醇且交換緩衝劑。總體濃縮及濾洗步驟係使用安裝單次使用泵腔、單次使用撓性管件及單次使用中空纖維膜筒之 Quattro Flow(隔膜)泵進行。使最終懸浮液通過 0.45/0.22 μm 過濾器過濾以減輕生物負荷至最終單次使用收集瓶中。結果顯示於表 1 中。

表 1

批料體積 [L]	藥物	脂質：藥物 [重量/重量]	粒度		EE [%]	產物產率 [siRNA 回收率]
			平均值 [nm]	PDI		
20	siRNA 1	14:1	79.6	0.144	95%	>90%
20	空脂質體(不含 siRNA)	不適用	78.1	0.129	不適用	>90%
20	siRNA 2	9:1	88.8	0.156	92%	>90%
50	siRNA 2	14:1	80.2	0.146	94%	>90%
120	空脂質體(不含 siRNA)	不適用	79.1	0.107	不適用	>90%
120	siRNA 2	9:1	89.9	0.138	92%	>90%
200	siRNA 1	14:1	89.1	0.154	94%	>90%
200	siRNA 2	14:1	83.7	0.143	94%	>90%

質體之製法

於一例示性實施例中，脂質之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)及經 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、膽固醇及經PEG修飾之脂質組成。於更佳實施例中，該脂質混合物由陽離子脂質、DOPE(或另一輔助脂質，具有可游離或永久陽離子電荷)、膽固醇及與PEG結合之脂質以不同莫耳比所組成。較佳之莫耳範圍為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% 經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，例如二VA-PEG750-二VA(或其他與VA結合之靶向脂質)。該脂質混合物亦可包括可以是自然(例如，甲殼素)或合成(例如，PEI)來源之聚合物或加工助劑之混合物。脂質總濃度係小於25 mg/ml，較佳小於5 mg/ml。使該脂質混合物通過薄膜(例如，0.45或0.2 μm 過濾器)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可質子化脂質之pKa小之pH之溶液。適宜緩衝劑之實例包括檸檬酸鹽、磷酸鹽、乙酸鹽及MES。一尤佳的緩衝劑為檸檬酸鹽緩衝劑。較佳之緩衝劑將係在1至1000 mM陰離子濃度範圍內，其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。或者，可使用經HCl、 H_2SO_4 或類似物酸化至pH 5至6之純水。適宜者可為例如在透析該等粒子以移除乙醇時平衡跨粒子膜之滲透勢、增大pH或與諸如生理鹽水之醫藥可接受載劑混合之非離子溶

質。緩衝劑亦可包括加工助劑(例如, 泊洛沙姆(poloxamer)、表面活性劑、清潔劑)、填充劑(例如, 甘露醇)或冷凍保護劑(例如, 蔗糖、海藻糖、半乳糖、菊糖)。核酸於緩衝劑中的量為約0.08至0.8 mg/mL。

於添加乙醇時, 水溶液及乙醇之溫度為25至45°C, 較佳為30至40°C。該乙醇溶液係通過液-液界面添加至該水溶液及該乙醇係通過浸沒於該水溶液中之管或噴嘴傳遞。

有機溶液係藉由以受控速率(較佳恆定速率)傳遞該有機溶液至水溶液之泵浦添加。該有機溶液之傳遞可在1分鐘至100分鐘, 較佳在2至20分鐘內完成。該有機溶液可通過單孔或噴嘴, 或通過多孔或噴嘴系統添加。單(或多噴嘴陣列)之孔徑可為10至1000 μm , 較佳為300至600 μm 。添加可藉由向有機物流施加0至30 psi以幫助分散而進行。在將該有機溶液添加至水溶液中的同時, 藉由攪拌或再循環混合所得溶液。該添加步驟達成較佳25至45%乙醇、最佳35%乙醇之最終濃度。

藉由透析或較佳藉由濾洗處理最終溶液以移除有機溶劑。在移除乙醇時, 水溶液經轉變成緩衝於中性pH(pH 6.8至pH 7.5, 較佳pH 7.2)下, 例如磷酸鹽緩衝劑。緩衝劑亦可包括加工助劑(例如, 泊洛沙姆、表面活性劑、清潔劑)、填充劑(例如, 甘露醇)或冷凍保護劑(例如, 蔗糖、海藻糖、半乳糖、菊糖)。所得水溶液較佳在儲存或使用之前經滅菌處理, 例如, 藉由通過0.22 μm 過濾器過濾。

此脂質體之製造方法可與包括SUS子單元之系統之歧管

SUS結合採用。此歧管系統可包括以下子單元：脂質混合單元，由用於製備在水可混溶有機溶劑中之脂質溶液之脂質混合袋、脂質保存袋及將該脂質溶液自該脂質單元傳送至該脂質保存單元之構件組成；RNA混合單元，由用於製備RNA溶液之RNA混合袋、RNA保存袋及將該RNA溶液自該RNA單元傳送至該RNA保存單元之構件組成；將該脂質溶液自該脂質保存袋傳送至該RNA溶液之構件；及濾洗系統，由中空纖維膜、單次使用隔膜泵頭、及各種保存袋組成。

該SUS設備可經預滅菌及採用無菌連接/切斷利用無菌製程進行操作以製得脂質體。無菌處理免除對最終無菌(0.22 μm)過濾的需求。不存在0.22 μm 過濾器容許處理較大範圍之粒度(>200 nm)並解決任何可能的過濾器/藥品相容性問題。

實例2：濃度對RNA-脂質粒度之影響。

本實例論述siRNA及脂質濃度對粒度之影響。

為藉由本文所述方法製備奈米粒子。使陽離子脂質、DOPE、膽固醇、PEG-BML及二VA-PEG750-二VA各別地以50:10:38:2:5之莫耳比溶解於無水乙醇中。使siRNA溶解於pH 4.5的50 mM檸檬酸鹽緩衝劑中。

使含siRNA之緩衝劑達到35至40°C，同時於混合容器中持續攪拌。然後利用歧管/噴嘴陣列將乙醇/脂質混合物噴灑至該含siRNA之緩衝劑之表面上，以自發地形成經負載siRNA之脂質體。調整脂質及RNA濃度以達到自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。對於受測試之所有條件，脂質對 siRNA 比保持恆定。

使該經負載 siRNA 之脂質體稀釋至~10%乙醇以穩定該等粒子，然後進行10倍體積PBS(pH 7.2)之濾洗以移除乙醇且交換緩衝劑。使最終產物通過0.22 μm (滅菌級)PES過濾器過濾以減輕生物負荷。利用動態光散射(DLS)測定體積、平均粒度及多分散度指數(PDI)。結果顯示於表2中。

表 2

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

結果顯示粒度隨 siRNA 濃度(單位為 mg/ml)之增加而增大。減低脂質及 siRNA 濃度(保持相同的相對比)使粒度減小，同時增加濃度使粒度增大。在所有情況中，介於0.05至0.5 mg/ml之間之最終 siRNA 濃度製得具有96.7至141.9 nm、小於150 nm之平均粒徑及小於0.2之多分散度指數之奈米粒子。

在無需製備空的預形成脂質囊泡及/或機械加工下，藉由本文所述方法得到小於150 nm之粒度與小於0.2之PDI。

實例3：製程參數對RNA-脂質粒子形成之影響

本實例論述不同製程參數對RNA-脂質粒子形成之影

響。於此實驗期間篩選若干參數，包括溫度、乙醇濃度、緩衝劑、脂質：siRNA比及用於分散脂質溶液之噴嘴類型。

使 HEDC、DOPE、膽固醇、PEG-BML 及二 VA-PEG750-二 VA 以 40:30:25:5:2 之莫耳比溶解於無水乙醇中。使含有 siRNA 之緩衝劑達到指示溫度，同時於混合容器中持續攪拌。然後利用噴嘴將該乙醇/脂質混合物噴灑至該含 siRNA 之緩衝劑之表面上，以自發地形成經負載 siRNA 之脂質體。以所指示的藥物/脂質比將脂質與 siRNA 組合以達成 0.1 mg/mL 之最終 siRNA 濃度及所指示的最終乙醇%。

將 siRNA 溶解於強度自 25 變化至 100 mM 及 pH 3.5 至 pH 6.5 之檸檬酸鹽緩衝劑中。混合物溫度自 25 變化至 45°C。最終乙醇濃度自 25 變化至 45%。藥物：脂質比 (wt/wt) 自 0.07 變化至 0.11。水合噴嘴內徑 (ID) 自 0.005 變化至 0.125 英寸。實施各條件作為比較各製程參數之影響的測量。除非另有指明，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 0.005 英寸之噴嘴 ID 下進行。

將該經負載 siRNA 之脂質體稀釋至 10% 乙醇以穩定該等粒子，然後進行 10 倍體積 PBS (pH 7.2) 之濾洗以移除乙醇且交換緩衝劑。使最終產物通過 0.22 μm (滅菌級) PES 過濾器過濾以減輕生物負載。

表 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 導致粒度增大，儘管仍小於 150 nm 平均

粒度。

表 3

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 4 顯示緩衝劑濃度對不同參數之影響。結果顯示增加緩衝劑濃度使 siRNA 回收率減小。平均粒徑及 PDI 看來不受影響。pH 3.5 時觀察到最小粒度及 25 mM 檸檬酸鹽緩衝劑時觀察到最大 siRNA 回收率。

表 4

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 5 顯示水合溫度自 25 增加至 45°C 時，粒度自 135.7 減小至 102.2 nm，同時 siRNA 回收率自 80% 增加至 87%。增加最終乙醇%使得粒度增大，對 siRNA 回收率沒有影響，但使囊封效率減低至 88%。

表 5

水合 溫度[°C]	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 6 顯示增加藥物：脂質比，使 siRNA 回收率自 80 增加

至 87%。在藥物：脂質 (w:w) 比為 0.07 時觀察到最大回收率。所有其他測量特性未受藥物：脂質比影響。鑑於 Maurer 等人及 Semple 等人之揭示內容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，因此該結果係驚人及意想不到的。當前結果顯示利用本文所述方法獲得相反之趨勢。

表 6

脂質：siRNA [重量/重量]	體積平均直徑 [nm]			EE [%]	siRNA 回收率
	平均值	SD	PDI		
9:1	93.9	17.6	0.186	95	80
12:1	85.6	14.0	0.218	95	82
14:1	113.8	15.5	0.156	94	87

表 7 顯示使噴嘴 ID 增加 25 倍不會影響粒度、囊封效率或 siRNA 回收率。用於添加乙醇/脂質至緩衝劑表面之噴嘴孔具有實質的彈性。該彈性可在放大期間提供重大的優點。

表 7

噴嘴 ID [英寸]	體積平均直徑 [nm]			EE [%]	siRNA 回收率
	平均值	SD	PDI		
0.005	105.2	5.8	0.119	98	81
0.050	100.7	11.7	0.124	96	87
0.125	109.7	13.3	0.097	96	81

實例 4：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 3 之組合物或利用對照方法得到本文所述用於製造脂質/核酸粒子之方法與 Semple 等人之美國專利案 6,858,225 所述方法 (對照方法或該對照方法所使用的對照組合物) 之該等比較性結果。

實例 3 之該組合物係由以 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3之該方法中，使脂質以4.32 mg/ml溶解於無水乙醇中，及使siRNA以0.163 mg/ml溶解於50 mM檸檬酸鹽(pH 4.5)中。使siRNA溶液達到35至40°C，同時於混合容器中持續攪拌。然後利用歧管/噴嘴陣列將該乙醇/脂質混合物噴灑至含siRNA之緩衝劑之表面上。最終乙醇濃度為35%及最終脂質/siRNA比為14:1(w:w)。然後將所得粒子稀釋至10%乙醇然後進行10倍體積PBS(pH 7.2)之濾洗。

於該對照方法中，使脂質以25 mg/ml溶解於無水乙醇中，及使siRNA以4.17 mg/ml溶解於300 mM檸檬酸鹽(pH 4.0)中。使該含siRNA之緩衝劑維持在室溫下，同時於混合容器中持續攪拌。然後利用單一噴嘴將該乙醇/脂質混合物噴灑至含siRNA之緩衝劑之表面上，以自發地形成經負載siRNA之脂質體。最終乙醇濃度為40%，及最終脂質/siRNA比為6:1(wt:wt)。於混合之後，使脂質/siRNA懸浮液傳送至由兩片100 nm聚碳酸酯膜所製得且預平衡於65°C下的10 mL擠壓機中。利用300 psi下之10次通過擠出該懸浮液。使所得粒子進行10倍體積PBS(pH 7.2)之濾洗。

使由各方法得到的該等粒子通過0.22 μm 過濾器。如本文所述測量平均粒度、PDI及EE。

實例3之該方法製得相較無擠出步驟之對照方法更小的

脂質奈米粒子。於擠出之前測量藉由該對照方法所製得粒子之粒度。利用對照方法自NDT-0009組合物所製得之粒子具有大於250 nm粒子的平均粒度。於擠出及濾洗之後，平均粒度減小至128 nm。實例3之該方法在無擠出下製得平均粒度小於150 nm之粒子。以對照組合物開始，觀察到類似的趨勢。

實例3之該方法相較於對照方法更有效地將siRNA囊封於脂質奈米粒子中。由實例3之該方法所製得粒子之囊封效率(EE)高於由對照方法所形成粒子之囊封效率(EE)(兩產物均在濾洗之前進行測定)。由實例3之該方法所製得粒子之EE大於95%，高於針對由對照方法形成粒子所測得者。於該對照方法中，許多游離siRNA在濾洗之後移去，此導致最終產物之EE的改良。

實例3之該方法製得相較對照方法具有更高囊封效率之奈米粒子。藉由實例3方法之最終siRNA回收率為以對照方法所達成者之兩倍以上(72%對33%)，兩種產物均係在濾洗之後進行測定。該等數據反映實例3方法中EE的改良以及不存在擠出步驟。實例3之該方法提供較佳的siRNA回收率，因為對照方法之該附加擠出步驟結構上地改變脂質體，及使得siRNA顯著地自粒子解離。該等結果顯示本文所述方法經由減少製程步驟數量同時改良囊封效率及平均粒度小於150 nm之奈米粒子之產率而提供優於對照方法之若干優點。

實例5：放大脂質體分批製造規模期間變化性之比較

利用包括永久帶電(HEDC)陽離子脂質與可游離(S104)陽離子脂質分子之組合之不同脂質組合物進行如實例3中所述之方法。以20:20:30:25:5:2之莫耳比使HEDC、S104、DOPE、膽固醇、PEG-BML及二VA-PEG750-二VA溶解於無水乙醇中。於放大規模期間，評估不同siRNA分子、不同批料體積及不同siRNA(藥物)/脂質比。表8概述由一系列條件所得到奈米粒子之特徵化結果。

表 8

批料體積 [L]	藥物	藥物/脂質 [重量/重量]	粒度 [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相當穩健。在放大跨越50倍範圍規模期間獲得類似粒度及PDI。粒度始終小於100 nm，且產物產率>90%。多分散度指數值介於極低範圍內，指示幾近單分散之囊泡群體。

實例6：在放大用於含蔗糖調配物之脂質體分批製造規模期間變化性之比較

利用以20:20:30:25:5:2之莫耳比溶解於乙醇中之HEDC、S104、DOPE、膽固醇、PEG-BML及二VA-PEG750-二VA進行如實例3中所述之方法。在此處所述囊泡之製備中包

括蔗糖。評估不同批料體積且進行冷凍-融解。表9概述由一系列條件所得奈米粒子之特徵化結果。

表 9

利用半單次使用製造系列製備之冷凍(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			融解之後			產物產率 [siRNA 回收率]
			尺寸 [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解不會改變該等脂質奈米粒子之特性。該等結果亦顯示批料之間的變化性相當低及製程再現地製得均勻之奈米粒子。

已針對藉由冷凍乾燥使藥物：脂質粒子穩定來建立條件。依據實例2製得的藥物：脂質粒子可經凍乾而不會損失活性。其中形成藥物：脂質粒子之蔗糖之最終濃度為8% (w/v)。藉由添加蒸餾水使凍乾製劑復原及測定其於靜脈內注射後於老鼠肺中之轉染活性。冷凍及融解復原製劑並不會影響活性。示於表10中之結果證實利用本文所述方法製得的粒子於冷凍乾燥期間保持其特性，因此係穩定的。明確言之，於冷凍乾燥之前、期間及之後，粒度穩定且經保持。

表 10

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	EF(%)	尺寸(nm)	PDI	EF(%)
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)值及用於調配物中之多醣的選擇成函數關係。本文所述用於製造展現高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提供用於建立醫藥可接受製劑之優點，因此有利於基於脂質體之RNA傳遞。

實例 7：脂質之浸沒式注射

藉由利用浸沒式注射製造囊泡來改良地進行實例 3 中所述之該方法。以 20:20:30:25:5:2 之莫耳比使 HEDC、S104、DOPE、膽固醇、PEG-BML 及二 VA-PEG750-二 VA 溶解於乙醇中。表 11 概述由浸沒式添加法相較於表面添加法所得奈米粒子之特徵化結果。該等結果顯示以下驚人及意想不到的結果：當藉由浸沒式注射將脂質添加至水相時，平均粒度實質上地減小。

表 11

利用半單次使用製造系列所製得的液體調配物							
批料體積	藥物/脂質			粒度		EE	產物產率
[L]	藥物	[重量/重量]	添加方法	平均值[nm]	PDI	[%]	[siRNA 回收率]
5	siRNA 1	0.07	表面	93	0.136	97	>90%
5	siRNA 1	0.07	浸沒式	57	0.104	97	>90%

利用半單次使用製造系列所製得的冷凍(含蔗糖)調配物							
批料體積	藥物/脂質			粒度		EE	產物產率
[L]	藥物	[重量/重量]	添加方法	平均值[nm]	PDI	[%]	[siRNA 回收率]
5	siRNA 1	0.11	表面	94	0.119	95	>90%
1	siRNA 1	0.11	浸沒式	63	0.102	95	>90%

使用相同製程方法來製造包含蔗糖含於緩衝劑中之脂質體。表12概述由不同添加時間所得奈米粒子之特徵化結果及表13概述利用表面方式相較於浸沒式添加所製得奈米粒子之特徵化結果。

表 12

利用半單次使用製造系列所製得的液體調配物

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

表 13

利用半單次使用製造系列所製得的液體調配物

批料體積 [L]	添加時間[min]	添加方法	粒度		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	浸沒式	63	0.102	95	>90%

該等結果顯示如下驚人及意想不到的結果：當以少於2分鐘之添加時間藉由浸沒式注射將脂質添加至水相時，平均粒度實質上地減小。該等結果亦顯示如下驚人結果：當藉由浸沒式注射將脂質添加至水相時，平均粒度實質上地減小。

【圖式簡單說明】

圖1顯示本發明之單次使用系統。



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： 101141084

※ 申請日：

101.11.5

※IPC 分類：A61K 9/127

(2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

用於無菌製造脂質-核酸粒子之單次使用系統

SINGLE USE SYSTEM FOR STERILELY PRODUCING LIPID-
NUCLEIC ACID PARTICLES

二、中文發明摘要：

本發明闡述一種簡單且可再現地在包括單次使用組件之無菌條件下形成脂質-核酸奈米粒子之方法。

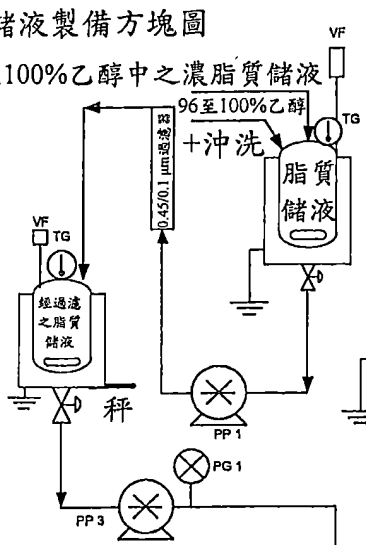
三、英文發明摘要：

What is described is a process of forming lipid-nucleic acid nanoparticles simply and reproducibly under aseptic conditions comprising single use components.

八、圖式：

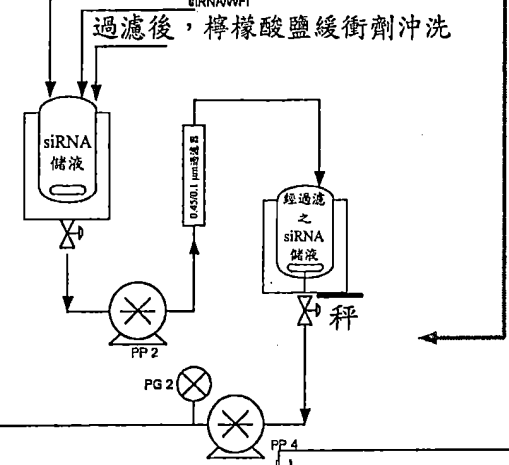
脂質儲液製備方塊圖

在96至100%乙醇中之濃脂質儲液

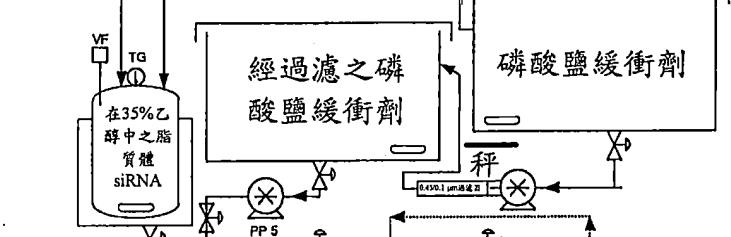


檸檬酸鹽緩衝劑 siRNA儲液製備方塊圖

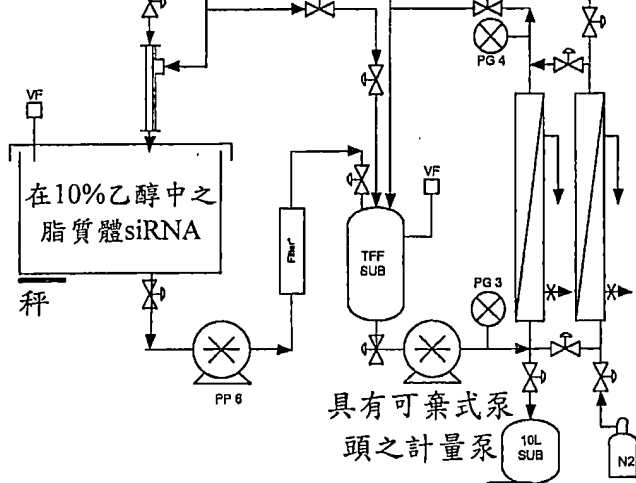
過濾後，檸檬酸鹽緩衝劑沖洗



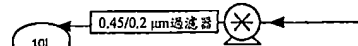
用於製備儲備溶液之SUS



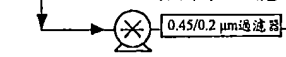
用於siRNA/脂質體整體製造之SUS



減輕生物負荷之過濾



無菌過濾



無菌充填



用於完成無菌充填之SUS

圖 1

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(1)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

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. 一種用於無菌製造脂質-核酸奈米粒子之系統，該系統包括：

第一保存單元，其用於保存包含在水可混溶有機溶劑中之脂質之有機脂質溶液；

第二保存單元，其用於保存含治療藥物之水溶液；

混合單元，其用於將自該第一保存單元所傳送之該有機脂質溶液與自該第二保存單元所傳送之該水性藥物溶液加以混合，以製造脂質-藥物混合物；

注入構件，其將來自該第一保存單元之該有機脂質溶液添加至包含於該混合單元中之該水性藥物溶液，以於該混合單元中形成自注入初始值至注入最終值之溶液中有機溶劑濃度之梯度；

第三保存單元，其用於保存水性緩衝劑；

稀釋單元，其用於以自該第三保存單元所傳送之該水性緩衝劑稀釋自該混合單元所傳送之該脂質-藥物混合物，以製造脂質體懸浮液；

包括橫流型(transflow)過濾器之濃縮單元，其用於濃縮該脂質體懸浮液及移去該有機溶劑；及

單次使用床，其用於在移去有機溶劑之後收集經濃縮之脂質體懸浮液；

及其中該系統包括無菌及可棄式組件以適用於單批使用。

2. 如請求項1之系統，其進一步包括用於製備該有機脂質溶液之單元，其係與該第一保存單元連接。

3. 如請求項1至2中任一項之系統，其進一步包括在將該有機脂質溶液傳送至該第一保存單元之同時用於滅菌該溶液之過濾器。
4. 如請求項1至2中任一項之系統，其中該脂質溶液、該藥物溶液、該脂質-藥物混合物及該懸浮液係無菌的。
5. 如請求項1至2中任一項之系統，其中該濃縮單元包括具有單次使用泵腔之隔膜計量泵。
6. 如請求項1至2中任一項之系統，其中該等脂質包括陽離子脂質、輔助脂質、固醇及聚乙烯(PEG)-脂質結合物。
7. 如請求項1至2中任一項之系統，其中該等脂質進一步包括靶向脂質。
8. 如請求項1至2中任一項之系統，其中該治療藥物為dsRNA分子。
9. 如請求項1至2中任一項之系統，其中該水可混溶有機溶劑為乙醇。
10. 如請求項1至2中任一項之系統，其中該等第一及第二溶液係在35至40°C之溫度下組合。
11. 如請求項1至2中任一項之系統，其中該第二保存單元裝納在pH 3.5至pH 4.5之水性緩衝劑中之治療藥物。
12. 如請求項1至2中任一項之系統，其中該第三保存單元裝納中性pH之水性緩衝劑。
13. 如請求項1至2中任一項之系統，其中囊封該治療藥物之該脂質體之平均粒徑為50 nm至150 nm。
14. 如請求項1至2中任一項之系統，其中該注入構件包括傳

送該有機溶液至該混合單元中該水溶液之空氣水界面之注入口。

15. 如請求項1至2中任一項之系統，其中該注入構件包括浸沒於該混合單元中之該水溶液中及向其傳送該有機溶液之注入口。
16. 如請求項1至2中任一項之系統，其進一步包括冷凍乾燥步驟。
17. 如請求項16之系統，其中該冷凍乾燥步驟包括冷凍步驟及乾燥步驟。
18. 如請求項1至2中任一項之系統，其中該水性緩衝劑包括蔗糖或海藻糖。
19. 如請求項17之系統，其中該冷凍步驟使該脂質-藥物混合物以 $1^{\circ}\text{C}/\text{分鐘}$ 自 20°C 冷卻至 -40°C 。
20. 如請求項17之系統，其中該乾燥步驟包括在約 -15 至約 -35°C 下乾燥該脂質-藥物混合物之步驟。