

(21)申請案號：098125813

(22)申請日：中華民國 98 (2009) 年 07 月 31 日

(51)Int. Cl.：

A61K9/127 (2006.01)

A61K31/7125 (2006.01)

A61K48/00 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2008/07/31

美國

61/085,289

(71)申請人：安龍製藥公司 (美國) ENZON PHARMACEUTICALS, INC. (US)

美國

(72)發明人：趙 洪 ZHAO, HONG (US)；史連軍 SHI, LIANJUN (CN)

(74)代理人：桂齊恆；閻啟泰

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：35 項 圖式數：15 共 124 頁

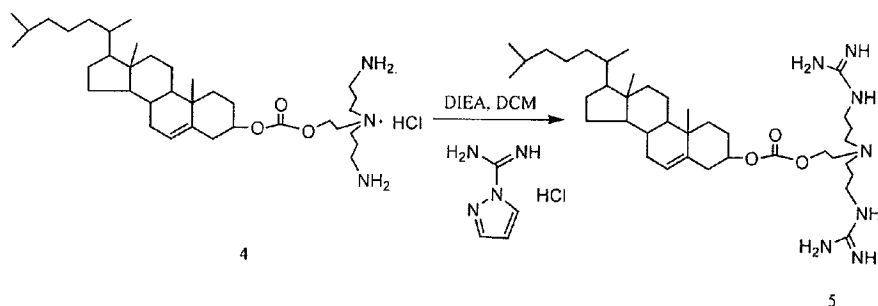
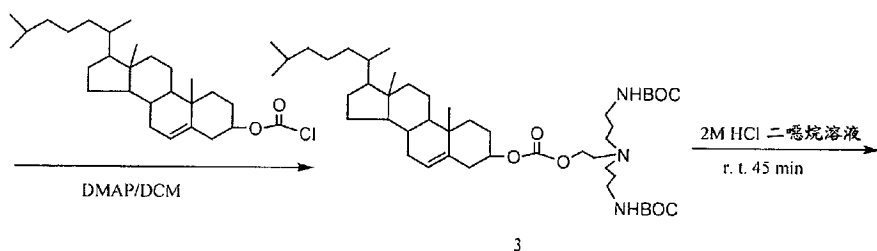
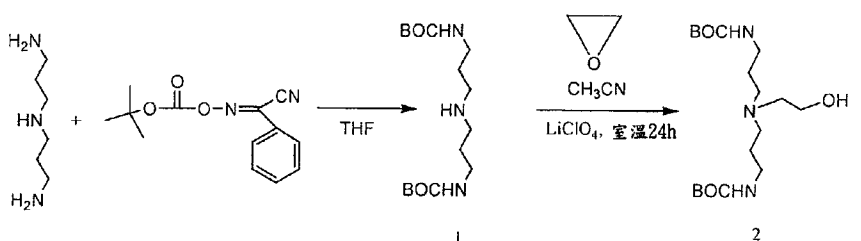
(54)名稱

用於核酸遞送系統的奈米顆粒組成物

NANOPARTICLE COMPOSITIONS FOR NUCLEIC ACIDS DELIVERY SYSTEM

(57)摘要

本發明係針對用於遞送寡核苷酸之奈米顆粒組成物及使用該等奈米顆粒組成物調節標靶基因之表現的方法。詳言之，本發明係關於包封在陽離子性脂質、融合性脂質及 PEG 脂質之混合物中的寡核苷酸。



(21)申請案號：098125813

(22)申請日：中華民國 98 (2009) 年 07 月 31 日

(51)Int. Cl.：

A61K9/127 (2006.01)

A61K31/7125 (2006.01)

A61K48/00 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2008/07/31

美國

61/085,289

(71)申請人：安龍製藥公司 (美國) ENZON PHARMACEUTICALS, INC. (US)

美國

(72)發明人：趙 洪 ZHAO, HONG (US)；史連軍 SHI, LIANJUN (CN)

(74)代理人：桂齊恆；閻啟泰

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：35 項 圖式數：15 共 124 頁

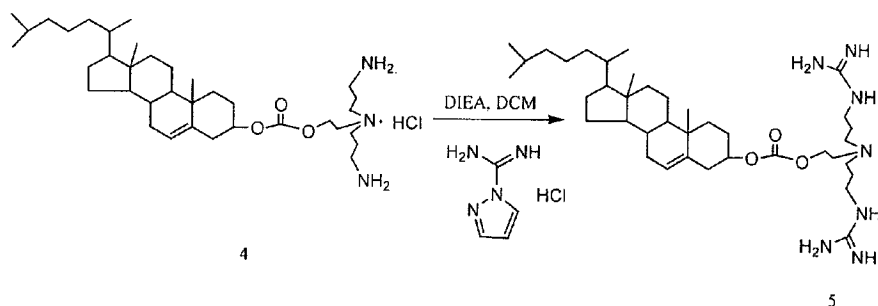
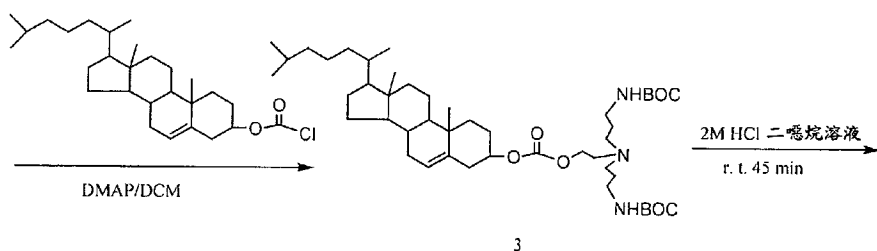
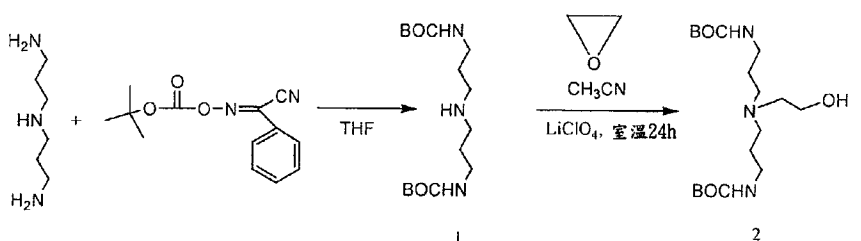
(54)名稱

用於核酸遞送系統的奈米顆粒組成物

NANOPARTICLE COMPOSITIONS FOR NUCLEIC ACIDS DELIVERY SYSTEM

(57)摘要

本發明係針對用於遞送寡核苷酸之奈米顆粒組成物及使用該等奈米顆粒組成物調節標靶基因之表現的方法。詳言之，本發明係關於包封在陽離子性脂質、融合性脂質及 PEG 脂質之混合物中的寡核苷酸。



六、發明說明：

【相關申請案之交互參照】

本申請案主張 2008 年 7 月 31 申請之美國臨時專利申請案第 61/085,289 號之優先權權益，該申請案之內容以引用之方式併入本文中。

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於用於遞送寡核苷酸之奈米顆粒組成物及使用奈米顆粒組成物調節基因表現之方法。

【先前技術】

在過去數年中，人們一直試圖將使用核酸之療法用於治療各種疾病。諸如反義療法之療法在治療疾病方面為強有力的方法，此係由於治療性基因可選擇性地調節與疾病相關之基因表現，且將使用其他治療方法時產生之副作用減至最少。

然而，使用核酸之療法過去一直由於基因之穩定性不良及遞送效率低而受到限制。人們已提出若干基因遞送系統來克服該等障礙，並將治療性基因有效地引至標靶區域，諸如試管內及活體內之癌細胞或組織。該等改良遞送及增強治療性基因之細胞攝取的努力係針對脂質體之利用。

雖然在質體遞送方面已取得了一些進展，但現行脂質體並不能有效地向體內遞送寡核苷酸。在寡核苷酸遞送中，理想遞送系統應包括足以中和寡核苷酸之負電荷的正電荷。最近，Stuart, D.D. 等人 *Biochim. Biophys. Acta*, 2000,

1463:219-229 及 Semple, S.C., 等人, *Biochim. Biophys. Acta*, 2001, 1510:152-166 分別描述了經塗佈陽離子性脂質體 (CCL) 與穩定核酸-脂質顆粒 (SNALP) 調配物, 其被報導為可提供具有較小尺寸、較高核酸包封率、良好血清穩定性及較長循環時間的奈米顆粒。然而, 與使用裸 (naked) 寡核苷酸相比, 其並未顯示在活體內活性 (尤其在除肝以外的器官中) 方面的顯著改良。需要提供能夠增強細胞攝取且增加寡核苷酸在細胞 (例如癌細胞) 中之生物可用性的核酸遞送系統。亦需要核酸遞送系統具有儲存穩定性及臨床使用安全性。

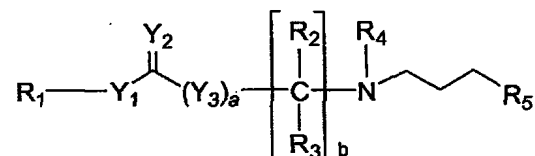
儘管已做出努力並取得進展, 但仍然需要提供改良之核酸遞送系統。本發明即滿足此需要。

【發明內容】

本發明提供用於遞送核酸之奈米顆粒組成物。諸如寡核苷酸之核酸係包封在奈米顆粒複合物內, 該等複合物含有陽離子性脂質、融合性脂質及 PEG 脂質之混合物。

根據本發明之此態樣, 用於遞送核酸 (例如寡核苷酸) 之奈米顆粒組成物包括:

(i) 式 (I) 之陽離子性脂質:



其中:

R_1 為膽固醇或其類似物;

Y_1 及 Y_3 獨立地為 O、S 或 NR_7 , 較佳為 O 或 S, 且更

佳為 O；

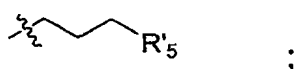
Y_2 為 O、S 或 NR_7 ，較佳為 O 或 S，且更佳為 O；

(a) 為 0 或 1；

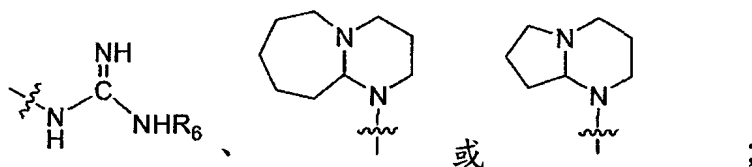
R_2 及 R_3 獨立地為氫或低碳烷基；

(b) 為約 2 至約 10 之正整數（例如 2、3、4、5、6、7、8、9 及 10，較佳為 2）；

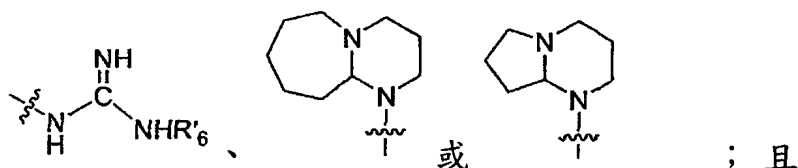
R_4 為氫、低碳烷基或



R_5 為



R'_5 為 NH_2 、



R_6 、 R'_6 及 R_7 獨立地為氫或低碳烷基；

(ii) 融合性脂質；及

(iii) PEG 脂質。

本發明亦提供用於在活體內及試管內向細胞或組織遞送核酸（較佳為寡核苷酸）的方法。本文中描述之方法所引入之寡核苷酸可調節標靶基因之表現。

本發明之一較佳態樣提供抑制標靶基因（例如致癌基因及與炎症相關之基因）在哺乳動物、較佳為人類中表現的方法。該等方法包括使細胞（諸如癌細胞）或組織與由本文中描述之奈米顆粒組成物製成之奈米顆粒接觸。包封

在奈米顆粒內的寡核苷酸被釋放，且介導所治療之細胞或組織中之 mRNA 或蛋白質下調。在治療惡性疾病中，以奈米顆粒治療可調節標靶基因之表現並可獲得與其相關之隨附效益，諸如抑制癌細胞生長。該等療法可作為單一治療進行，或作為與一或多種適用及/或經核准治療之組合療法的一部分來進行。

其他態樣包括製造式 (I) 之陽離子性脂質以及含有其之奈米顆粒的方法。

本發明之一個優勢在於，本文中描述之含有陽離子性脂質的奈米顆粒組成物提供在活體內以及試管內投予核酸之方法。此遞送技術可增強穩定性、轉染效率及治療性寡核苷酸在體內的生物可用性，因而使技術人員獲得寡核苷酸之所要治療效能。

本文中描述之奈米顆粒已改良了人類癌細胞中含 LNA 之寡核苷酸 (LNA-ON) 的試管內細胞攝取，且增強了哺乳動物中 LNA-ON 向腫瘤之遞送。

本文中描述之陽離子性脂質中和核酸之負電荷，且有助於含核酸之奈米顆粒的細胞攝取。本文中之陽離子性脂質進一步對於每個膽固醇部分提供多個單元之陽離子性部分，以便在以下方面獲得更高效率：(i) 中和核酸之負電荷；及 (ii) 與核酸形成緊密離子性複合物。此技術宜用於遞送治療性寡核苷酸，及使用治療性寡核苷酸（其包括 LNA，及基於 siRNA、微型 RNA 及反義 MOE 之彼等）治療哺乳動物，例如人類。

本文中描述之陽離子性脂質之另一優勢在於，其提供藉由與核酸形成多種離子性複合物來控制奈米顆粒之尺寸的方法。

本文中描述之陽離子性脂質使奈米顆粒複合物及其中之核酸在生物流體中較為穩定。在不受任何理論束縛的情況下，咸信，奈米顆粒複合物至少部分地藉由隔離分子與核酸酶而增強經包封之核酸的穩定性，從而防止降解。基於本文中描述之式（I）陽離子性脂質之奈米顆粒可穩定經包封之核酸。

與此項技術中已知的中性或帶負電之奈米顆粒（典型地，其具有約 10% 或小於 10% 的負載）相比，本文中描述之陽離子性脂質獲得更高效率（例如，70% 以上，較佳 80% 以上）的核酸（寡核苷酸）負載。在不受任何理論束縛的情況下，高負載部分地藉由以下而達成：本文中描述之式（I）陽離子性脂質的具有高 pK_a （13-14）之胍基與核酸之磷酸酯基實質上形成緊密的兩性離子性氫鍵，從而能夠將更多的核酸有效包封在奈米顆粒之內部隔室內。

與中性或帶負電之奈米顆粒相比，本文中描述之奈米顆粒的另一優勢在於，發生奈米顆粒聚集或沈澱之可能性更小。在不受任何理論束縛的情況下，所要性質係部分地歸因於，與核酸形成氫鍵或靜電相互作用之陽離子性脂質係包封在奈米顆粒內，而非陽離子/融合性脂質及 PEG 脂質包圍該陽離子性脂質及核酸。

本文中描述之奈米顆粒的另一優勢在於，諸如轉染效

率較高。本文中描述之奈米顆粒在無轉染劑輔助下即允許試管內及活體內之細胞轉染。該等奈米顆粒為安全的，此係由於與此項技術中已知且需要轉染劑之奈米顆粒不同，其並不具有毒性。奈米顆粒之轉染效率較高，亦提供向細胞核中遞送治療性核酸的方法。

本文中描述之奈米顆粒在製備奈米顆粒時亦提供有利的穩定性及靈活性。可在較寬 pH 值範圍內製備奈米顆粒，諸如 2 至 12。本文中描述之奈米顆粒亦可在所需生理 pH 值下用於臨床，諸如 7.2 至 7.6。

本文中描述之奈米顆粒遞送系統亦允許足量治療性寡核苷酸經由 EPR（增強滲透與滯留）效應而選擇性地用於所要標靶區域（諸如癌細胞）處。因而，本文中描述之奈米顆粒組成物改良了癌細胞或組織中的特異性 mRNA 下調。

另一優勢在於，本文中描述之陽離子性脂質能夠製備在儲存期間奈米顆粒尺寸均一且穩定的均質奈米顆粒。含有本文中描述之陽離子性脂質的奈米顆粒複合物在緩衝條件下為穩定的。與先前技術相比，此為顯著優勢，因為此特徵向臨床醫師提供可靠且靈活的治療方案。穩定之奈米顆粒適合於 LNA-ON 之全身（systemic）遞送。

另一優勢在於，本文中描述之奈米顆粒允許遞送一或多種不同的標靶寡核苷酸，從而在治療疾病時達到協同效應。

在基因水準（level）上治療人類疾病已日益具有吸引力。寡核苷酸（包括鎖核酸及 siRNA）具有阻止不需要之基

因表現的潛力。本發明用於在標靶區域、細胞或組織中增強核酸（諸如 LNA-ON）之細胞攝取及積聚。此外，與病毒遞送系統相比，本文中描述之陽離子性脂質基奈米顆粒在活體內可安全地遞送寡核苷酸，以改良其藥物動力學分布、細胞穿透及特定腫瘤靶向。

本發明之另一優勢在於，本文中描述之奈米顆粒能夠在無轉染劑輔助下有效下調多種人類腫瘤細胞中之標靶 mRNA，並改良核酸在腫瘤負荷（tumor-bearing）哺乳動物體內的細胞遞送。當靜脈內給藥時，包封在奈米顆粒中之寡核苷酸對肝及腫瘤中之沉默 mRNA 的效果分別為裸寡核苷酸的 30 倍以上及 3 倍以上。

根據以下描述，其他優勢將顯而易見。

為本發明之目的，術語「殘基」應理解為意謂化合物（其係指例如膽固醇等）在與另一化合物進行取代反應之後剩餘的部分。

為本發明之目的，術語「烷基」係指飽和脂肪族烴基，包括直鏈烷基、支鏈烷基，及環狀烷基。術語「烷基」亦包括烷基-硫-烷基、烷氧基烷基、環烷基烷基、雜環烷基，及 C₁₋₆ 烷基羰基。較佳地，烷基具有 1 至 12 個碳。其更佳為具有約 1 至 7 個碳、且更佳為約 1 至 4 個碳的低碳烷基。烷基可經取代或未經取代。當經取代時，取代基較佳包括鹵基、氧基、疊氮基、硝基、氰基、烷基、烷氧基、烷基-硫、烷基-硫-烷基、烷氧基烷基、烷基胺基、三鹵代甲基、羥基、巰基、羥基、氰基、烷基矽烷基、環烷基、

環烷基烷基、雜環烷基、雜芳基、烯基、炔基、C₁₋₆ 烴基、芳基，及胺基。

為本發明之目的，術語「經取代」係指添加來自下列之群的一個部分，或以來自下列之群的一個部分替換官能基或化合物內含有之一或多個原子：鹵基、氧基、疊氮基、硝基、氰基、烷基、烷氧基、烷基-硫、烷基-硫-烷基、烷氧基烷基、烷基胺基、三鹵代甲基、羥基、巰基、羥基、氰基、烷基矽烷基、環烷基、環烷基烷基、雜環烷基、雜芳基、烯基、炔基、C₁₋₆ 烷基羰基、芳基，及胺基。

為本發明之目的，術語「烯基」係指含有至少一個碳碳雙鍵的基團，包括直鏈烯基、支鏈烯基，及環狀烯基。較佳地，烯基具有約 2 至 12 個碳。其更佳為具有約 2 至 7 個碳、且更佳為約 2 至 4 個碳的低碳烯基。烯基可經取代或未經取代。當經取代時，取代基較佳包括鹵基、氧基、疊氮基、硝基、氰基、烷基、烷氧基、烷基-硫、烷基-硫-烷基、烷氧基烷基、烷基胺基、三鹵代甲基、羥基、巰基、羥基、氰基、烷基矽烷基、環烷基、環烷基烷基、雜環烷基、雜芳基、烯基、炔基、C₁₋₆ 烴基、芳基，及胺基。

為本發明之目的，術語「炔基」係指含有至少一個碳碳參鍵的基團，包括直鏈炔基、支鏈炔基，及環狀炔基。較佳地，炔基具有約 2 至 12 個碳。其更佳為具有約 2 至 7 個碳、且更佳為約 2 至 4 個碳的低碳炔基。炔基可經取代或未經取代。當經取代時，取代基較佳包括鹵基、氧基、疊氮基、硝基、氰基、烷基、烷氧基、烷基-硫、烷基-硫-

烷基、烷氧基烷基、烷基胺基、三鹵代甲基、羥基、巰基、羥基、氰基、烷基矽烷基、環烷基、環烷基烷基、雜環烷基、雜芳基、烯基、炔基、 C_{1-6} 烴基、芳基，及胺基。「炔基」之實例包括炔丙基、丙炔，及 3-己炔。

為本發明之目的，術語「芳基」係指含有至少一個芳環的芳族烴環系統。芳環可視情況與其他芳族烴環或非芳族烴環稠合或連接。芳基之實例包括例如苯基、萘基、1,2,3,4-四氫化萘及聯苯基。芳基之較佳實例包括苯基及萘基。

為本發明之目的，術語「環烷基」係指 C_{3-8} 環狀烴。環烷基之實例包括環丙基、環丁基、環戊基、環己基、環庚基及環辛基。

為本發明之目的，術語「環烯基」係指含有至少一個碳碳雙鍵之 C_{3-8} 環狀烴。環烯基之實例包括環戊烯基、環戊二烯基、環己烯基、1,3-環己二烯基、環庚烯基、環庚三烯基，及環辛烯基。

為本發明之目的，術語「環烷基烷基」係指經 C_{3-8} 環烷基取代之烷基。環烷基烷基之實例包括環丙基甲基及環戊基乙基。

為本發明之目的，術語「烷氧基」係指具有指定數目之碳原子且藉由氧橋與母體分子部分連接的烷基。烷氧基之實例包括例如甲氧基、乙氧基、丙氧基及異丙氧基。

為本發明之目的，「烷基芳基」係指經烷基取代之芳基。

為本發明之目的，「芳烷基」係指經芳基取代之烷基。

為本發明之目的，術語「烷氧基烷基」係指經烷氧基取代之烷基。

為本發明之目的，術語「烷基-硫-烷基」係指烷基-S-烷基硫醚，例如甲基硫甲基或甲基硫乙基。

為本發明之目的，術語「胺基」係指藉由以有機基團替換一或多個氫基而衍生自氮之含氮基團，如此項技術中所已知。舉例而言，術語「鹽基胺基」及「烷基胺基」係指分別具有鹽基及烷基取代基的特定 N-取代有機基團。

為本發明之目的，術語「烷基羰基」係指經烷基取代之羰基。

為本發明之目的，術語「鹵素」或「鹵基」係指氟、氯、溴，及碘。

為本發明之目的，術語「雜環烷基」係指含有至少一個選自氮、氧及硫之雜原子的非芳族環系統。雜環烷基環可視情況與其他雜環烷基環及/或非芳族烴環稠合或者連接。較佳雜環烷基具有 3 至 7 個成員。雜環烷基之實例包括例如哌啶、嗎啉、哌啶、四氫呋喃、吡咯啶，及吡啶。較佳雜環烷基包括哌啶基、哌啶基、嗎啉基，及吡咯啶基。

為本發明之目的，術語「雜芳基」係指含有至少一個選自氮、氧及硫之雜原子的芳族環系統。雜芳基環可視情況與一或多個雜芳基環、芳族烴環或非芳族烴環，或雜環烷基環稠合或連接。雜芳基之實例包括例如吡啶、呋喃、噻吩、5,6,7,8-四氫異喹啉及嘧啶。雜芳基之較佳實例包括噻吩基、苯并噻吩基、吡啶基、喹啉基、吡啶基、嘧啶基、

咪唑基、苯并咪唑基、呋喃基、苯并呋喃基、噻唑基、苯并噻唑基、異噁唑基、噁二唑基、異噻唑基、苯并異噻唑基、三唑基、四唑基、吡咯基、吡啶基、吡唑基及苯并吡唑基。

為本發明之目的，術語「雜原子」係指氮、氧，及硫。

在一些具體實例中，經取代之烷基包括羧基烷基、胺基烷基、二烷基胺基、羥基烷基及巰基烷基；經取代之烯基包括羧基烯基、胺基烯基、二烯基胺基、羥基烯基及巰基烯基；經取代之炔基包括羧基炔基、胺基炔基、二炔基胺基、羥基炔基及巰基炔基；經取代之環烷基包括諸如 4-氯環己基之部分；芳基包括諸如萘基之部分；經取代之芳基包括諸如 3-溴苯基之部分；芳烷基包括諸如甲苯基之部分；雜烷基包括諸如乙基噻吩之部分；經取代之雜烷基包括諸如 3-甲氧基-噻吩之部分；烷氧基包括諸如甲氧基之部分；且苯氧基包括諸如 3-硝基苯氧基之部分。鹵基應理解為包括氟基、氯基、碘基及溴基。

為本發明之目的，「正整數」應理解為包括等於或大於 1，且如一般熟習此項技術者應瞭解，由具有一般技術之技術人員置於合理範圍內的整數。

為本發明之目的，術語「鍵聯」應理解為包括一個基團與另一基團共價（較佳）或非共價地連接（例如由於化學反應）。

為本發明之目的，術語「有效量」及「足量」將意謂達成一般熟習此項技術者所理解之所要效果或治療效果的

量。

術語使用本文中描述之奈米顆粒組成物形成之「奈米顆粒」及/或「奈米顆粒複合物」係指脂質基奈米複合物。奈米顆粒含有核酸，諸如包封在陽離子性脂質、融合性脂質及 PEG 脂質之混合物中的寡核苷酸。或者，奈米顆粒可形成為不含核酸。

為本發明之目的，術語「治療性寡核苷酸」係指用作藥用或診斷用試劑之寡核苷酸。

為本發明之目的，「調節基因表現」應廣泛理解為包括下調或上調（不考慮投藥途徑，與不存在本文中描述之奈米顆粒的治療中觀察到的基因表現相比）任何類型之基因，較佳為與癌症及炎症相關之基因。

為本發明之目的，「抑制標靶基因表現」應理解為意謂當與不存在本文中描述之奈米顆粒之治療中的觀察結果相比時，mRNA 表現或所轉譯之蛋白質的量降低或減少。該抑制之適合檢定包括，例如，使用熟習此項技術者已知之技術檢測蛋白質或 mRNA 含量，諸如墨點法（dot blot）、北方墨點法（northern blot）、原位雜交法、ELISA、免疫沈澱法、酶功能法，以及熟習此項技術者已知的表型檢定。舉例而言，所治療之狀況可藉由細胞（較佳癌細胞）或組織中 mRNA 含量之降低來確定。

廣泛而言，當獲得所要反應時，將認為產生了成功的抑制或治療。舉例而言，成功的抑制或治療可定義為例如與腫瘤生長抑制相關之基因下調 10% 或 10% 以上（例如

20%、30%、40%)。或者，成功的治療可定義為與不存在本文中描述之奈米顆粒的治療中所觀察到的結果相比，癌細胞或組織中致癌基因 mRNA 含量或所編碼蛋白質含量（包括此項技術中之技術人員所預期的其他臨床標記）下降至少 20%或較佳 30%，更佳 40%或 40%以上（例如 50%或 80%）。

此外，在描述中為方便起見而使用之單數術語不意欲以任何方式侷限於此。因而，舉例而言，提及包含一寡核苷酸、膽固醇類似物、融合性脂質、PEG 脂質等之組成物係指一或多個寡核苷酸分子、膽固醇類似物分子、融合性脂質分子、PEG 脂質分子等。亦預期寡核苷酸可為相同或不同種類之基因。亦應理解，本發明並不侷限於本文中所揭示之特定組成物、處理步驟，及材料，因為該等組成物、處理步驟，及材料可能在某種程度上進行變化。

亦應理解，本文中採用之術語係僅用於描述特定具體實例之目的，而並不意欲具有限制性，此係由於本發明之範疇將受附隨申請專利範圍及其等效物所限制。

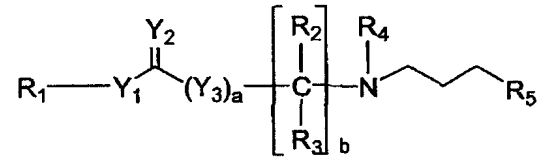
【實施方式】

A.概觀

在本發明之一態樣中，提供用於遞送核酸之奈米顆粒組成物。該奈米顆粒組成物含有（i）陽離子性脂質；（ii）融合性脂質；及（iii）PEG 脂質。所預期之核酸包括寡核苷酸或質體，且較佳為寡核苷酸。使用本文中描述之奈米顆粒組成物製備之奈米顆粒包括包封在脂質載劑中的核酸。

B. 陽離子性脂質

本文中描述之奈米顆粒組成物含有式 (I) 之陽離子性脂質：



其中：

R_1 為膽固醇或其類似物；

Y_1 及 Y_3 獨立地為 O、S 或 NR_7 ，較佳為 O 或 S，且更佳為 O；

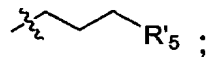
Y_2 為 O、S 或 NR_7 ，較佳為 O 或 S，且更佳為 O；

(a) 為 0 或 1；

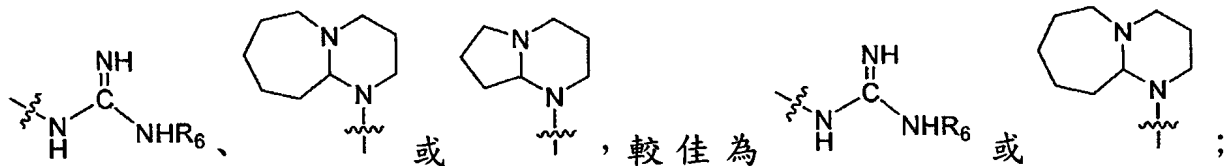
R_2 及 R_3 係獨立地選自氫或低碳烷基，諸如 C_{1-7} 烷基，較佳為氫或 C_{1-4} 烷基；

(b) 為約 2 至約 10 之正整數（例如 2、3、4、4、5、6、7、8、9 及 10，且在一些具體實例中較佳為 2、3、4，更佳為 2）；

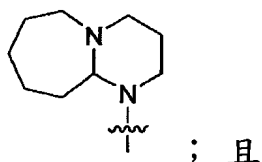
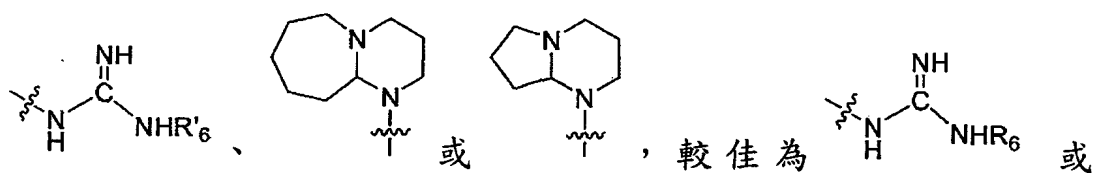
R_4 為氫、諸如 C_{1-7} 烷基（例如 C_{1-4} 烷基）之低碳烷基，或



R_5 為



R'_5 為 NH_2 、

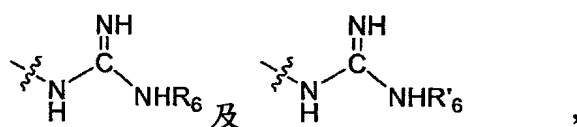


R_6 、 R'_6 及 R_7 係獨立地選自氫或諸如 C_{1-7} 烷基之低碳烷基，較佳為氫或 C_{1-4} 烷基。

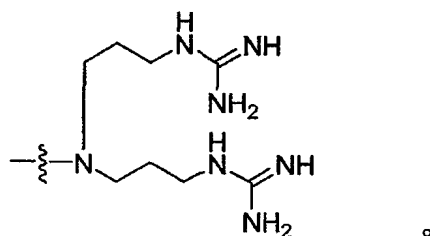
為本發明之目的，當(b)等於或大於 2 時， $C(R_2)(R_3)$ 相同或不同。

在本發明之一較佳態樣中，本文中描述之陽離子性脂質包括多於一個（例如兩個）含有帶正電基團的部分。

在另一較佳態樣中，陽離子性脂質包括含有下列結構之各 R_5 及 R'_5 ：



其中， R_6 及 R'_6 較佳均為氫。陽離子性脂質較佳具有兩個胍基丙基單元，諸如：



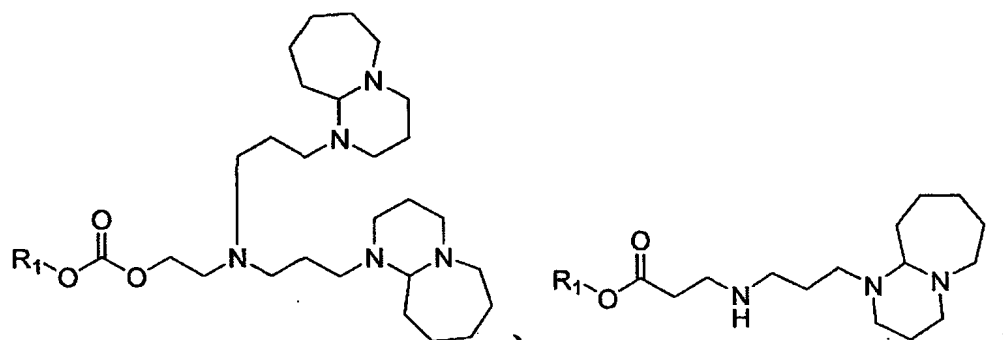
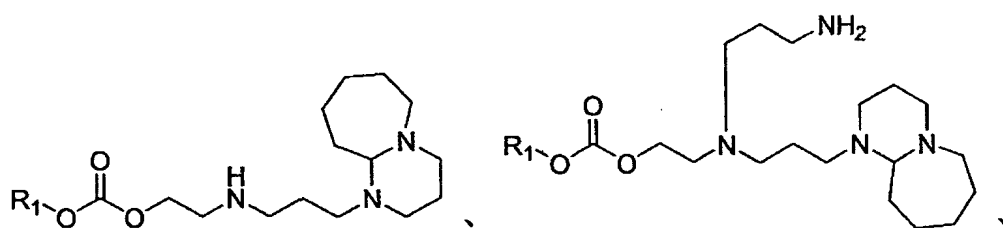
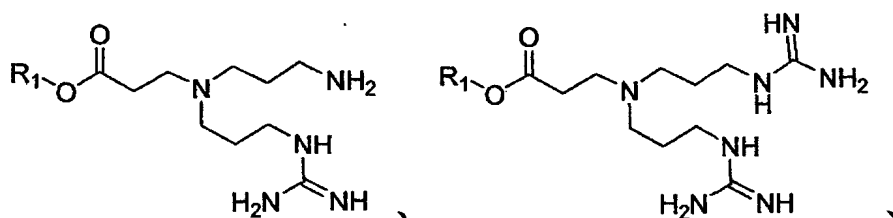
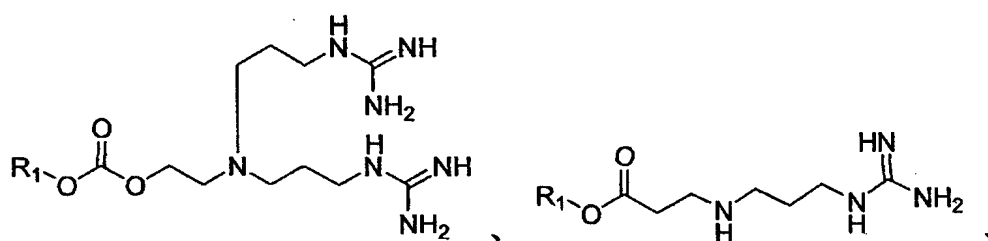
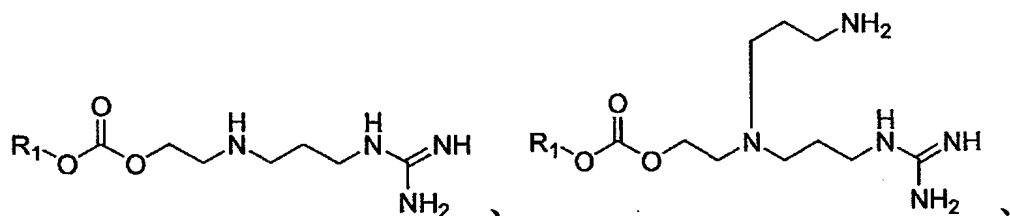
在又一較佳態樣中，式 (I) 之 Y_1 、 Y_2 及 Y_3 均為氧。

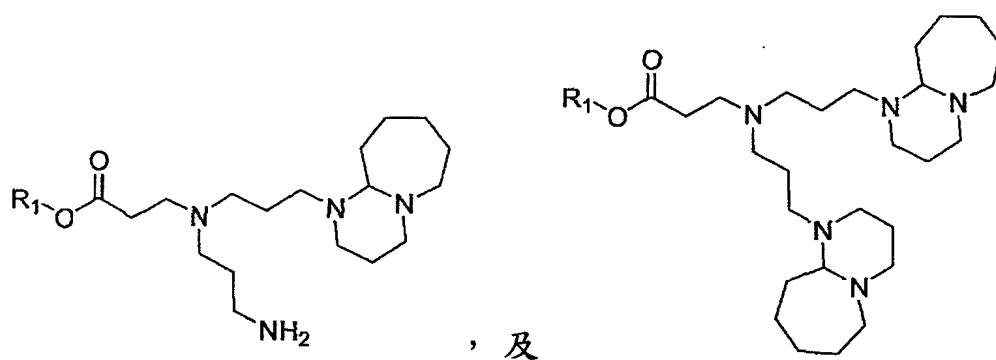
在陽離子性脂質之又一較佳態樣中，(a)為 1 且(b)為 2。

在陽離子性脂質之又一較佳態樣中， R_2 及 R_3 均為氫。

本文中描述之式 (I) 陽離子性脂質在所選 pH 值下，
諸如 pH<13 (例如，pH 6-12、pH6-8)，帶有淨正電荷。

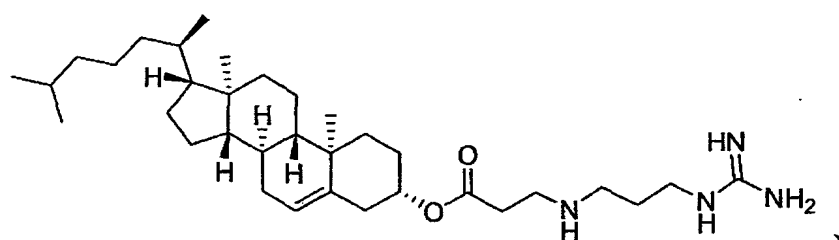
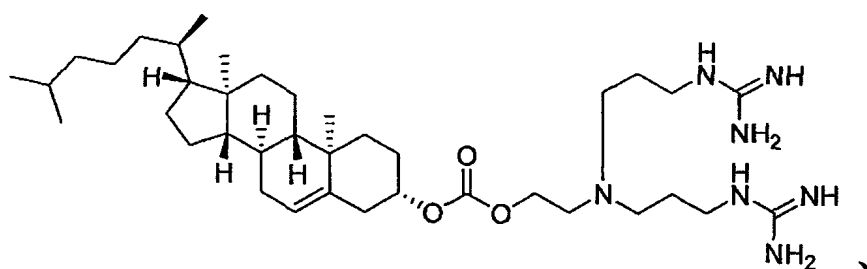
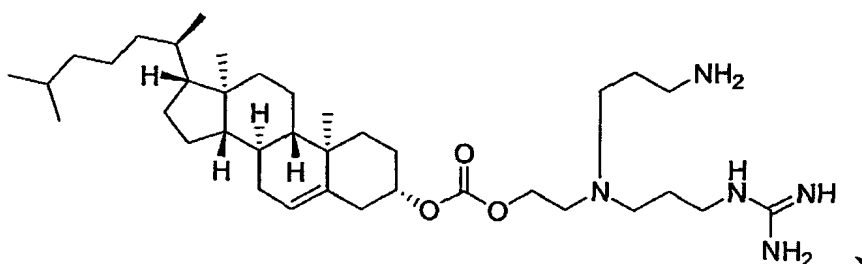
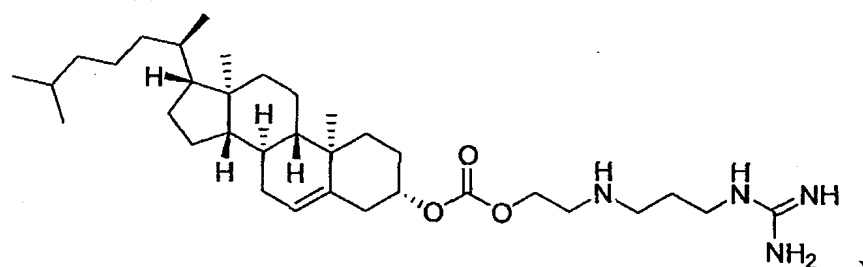
在一特定具體實例中，本文中描述之奈米顆粒組成物
包括具有如下結構之陽離子性脂質：

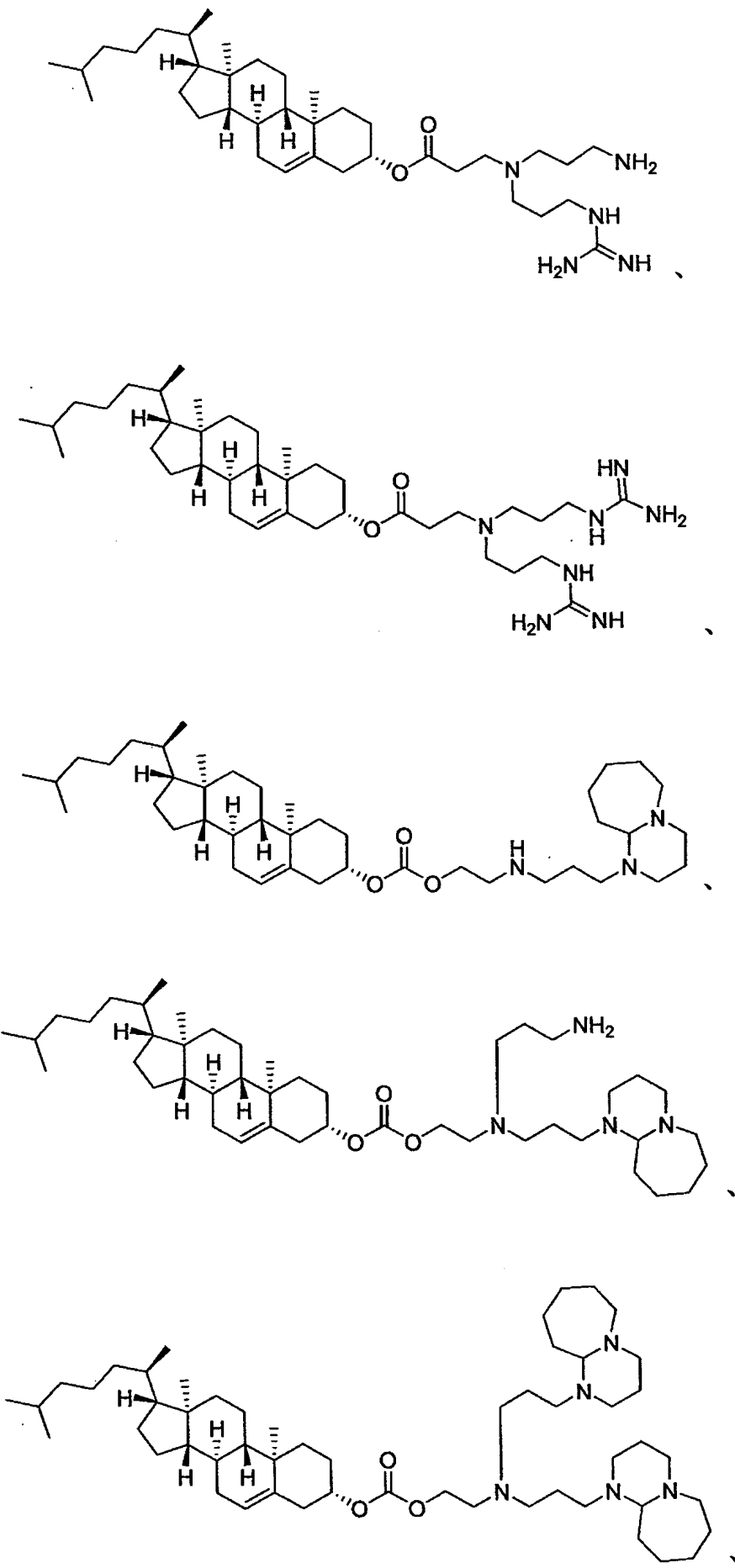


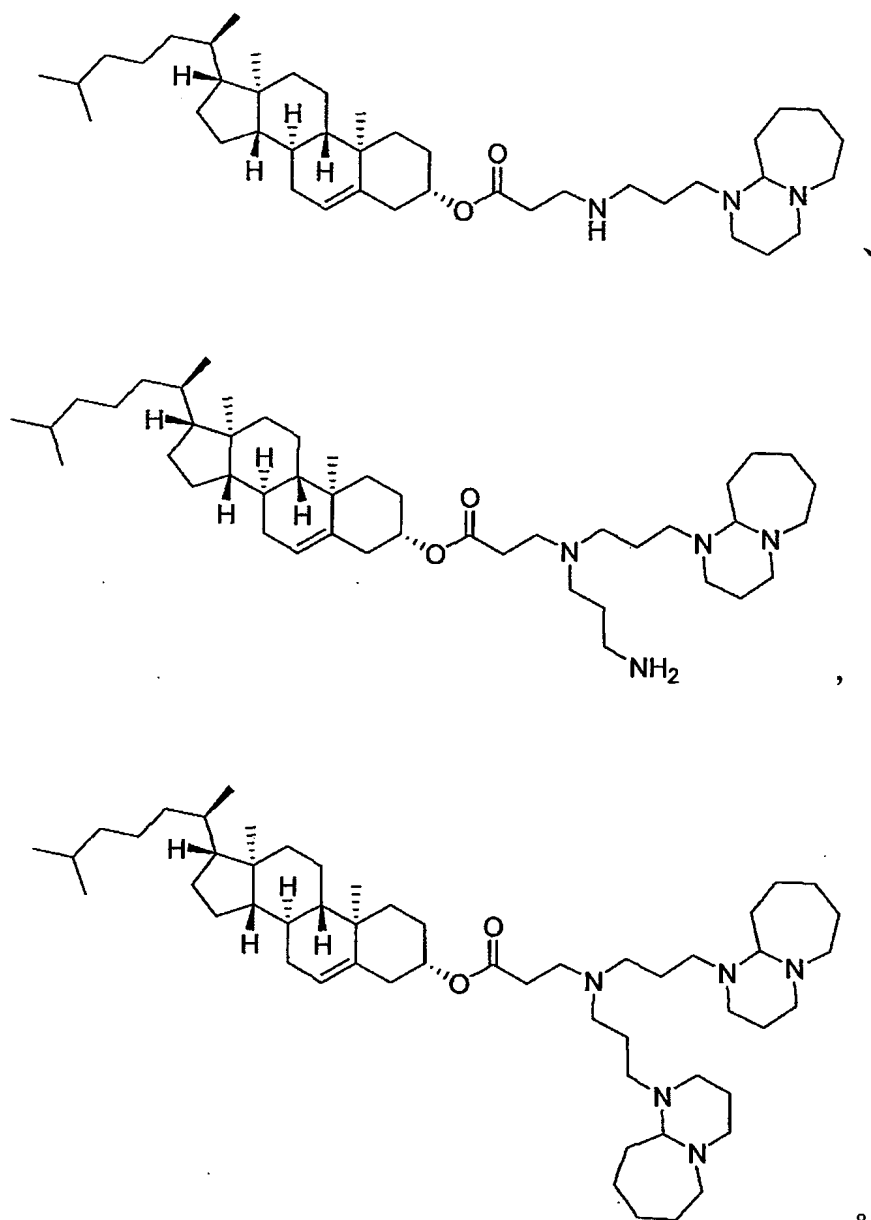


其中， R_1 為膽固醇或其類似物。

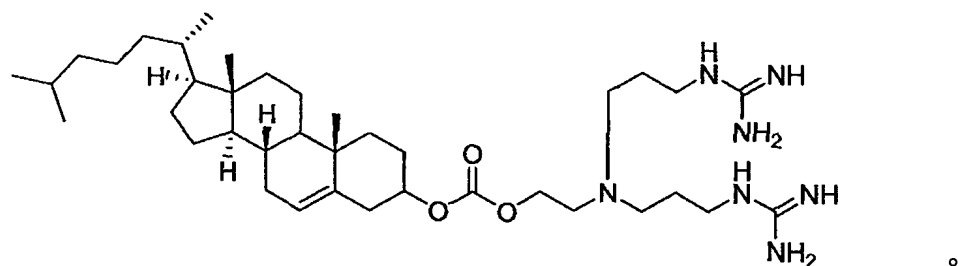
本文中描述之奈米顆粒組成物較佳包括具有如下結構之陽離子性脂質：







本文中描述之奈米顆粒組成物更佳包括具有如下結構之陽離子性脂質：



在本發明之另一態樣中，本文中描述之奈米顆粒組成物可包括其他陽離子性脂質。所思及之其他適合脂質包

括，例如：

N-(1-(2,3-二油醯氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化銨 (DOTMA)；

1,2-二油醯氧基-3-(三甲基銨)丙烷或 N-(2,3-二油醯氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化銨 (DOTAP)；

1,2-二肉豆蔻醯氧基-3-(三甲基銨)丙烷 (DMTAP)；

1,2-二肉豆蔻氧基丙基-3-二甲基羥乙基溴化銨，或 N-(1,2-二肉豆蔻氧基丙-3-基)-N,N-二甲基-N-羥乙基溴化銨 (DMRIE)；

二甲基二(十二烷基)溴化銨 (DDAB)；

3-(N-(N',N'-二甲基胺基乙烷)胺甲醯基)膽固醇 (DC-膽固醇)；

3 β -((N',N'-二胍基乙基-胺基乙烷)胺甲醯基)膽固醇 (BGTC)；

2-(2-(3-(雙(3-胺基丙基)胺基)丙基胺基)乙醯胺基)-N,N-二(十四烷基)乙醯胺 (RPR209120)；

1,2-二烯醯基-sn-甘油基-3-乙基磷酸膽鹼 (例如，1,2-二油醯基-sn-甘油基-3-乙基磷酸膽鹼、1,2-二硬脂醯基-sn-甘油基-3-乙基磷酸膽鹼，及 1,2-二棕櫚醯基-sn-甘油基-3-乙基磷酸膽鹼)；

四甲基四棕櫚醯基精胺 (TMTPS)；

四甲基四油基精胺 (TMTOS)；

四甲基四月桂基精胺 (TMTLS)；

四甲基四肉豆蔻基精胺 (TMTMS)；

四甲基二油基精胺 (TMDOS)；

2,5-雙(3-胺基丙基胺基)-N-(2-(二(十八烷基)胺基)-2-側氧乙基)戊醯胺 (DOGS)；

2,5-雙(3-胺基丙基胺基)-N-(2-(二(Z)-十八碳-9-二烯基胺基)-2-側氧乙基-1)戊醯胺 (DOGS-9-en)；

2,5-雙(3-胺基丙基胺基)-N-(2-(二(9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯基胺基)-2-側氧乙基)戊醯胺 (DLinGS)；

N4-精胺膽固醇胺基甲酸酯 (GL-67)；

(9Z,9'Z)-2-(2,5-雙(3-胺基丙基胺基)戊醯胺基)丙-1,3-二基-二(十八碳)-9-烯酸酯 (DOSPER)；

2,3-二油基氧基-N-[2(精胺甲醯胺基)乙基]-N,N-二甲基-1-丙基三氟乙酸銨 (DOSPA)；

1,2-二肉豆蔻醯基-3-三甲基銨-丙烷；1,2-二硬脂醯基-3-三甲基銨-丙烷；

二(十八烷基)二甲基銨 (DODMA)；

二甲基二(十八烷基)銨 (DODAB)；

二硬脂基二甲基銨 (DSDMA)；

N,N-二油基-N,N-二甲基氯化銨 (DODAC)；及

其醫藥學上可接受之鹽及其混合物。

陽離子性脂質亦詳細描述於 US2007/0293449 及美國專利第 4,897,355 號、第 5,279,833 號、第 6,733,777 號、第 6,376,248 號、第 5,736,392 號、第 5,686,958 號、第 5,334,761 號、第 5,459,127 號、第 2005/0064595 號、第 5,208,036 號、第 5,264,618 號、第 5,279,833 號、第 5,283,185 號、第

5,753,613 號，及第 5,785,992 號中。

此外，可使用包括陽離子性脂質之市售製劑：例如，LIPOFECTIN[®]（含有 DOTMA 及 DOPE 之陽離子性脂質體，得自 GIBCO/BRL（Grand Island，New York，USA））；LIPOFECTAMINE[®]（含有 DOSPA 及 DOPE 之陽離子性脂質體，得自 GIBCO/BRL（Grand Island，New York，USA））；及 TRANSFECTAM[®]（含有 DOGS 之陽離子性脂質體，得自 Promega 公司（Madison，Wisconsin，USA））。

C. 融合性/非陽離子性脂質

在本發明之另一態樣中，奈米顆粒組成物含有融合性脂質。融合性脂質包括非陽離子性脂質，諸如中性不帶電脂質、兩性離子性脂質及陰離子性脂質。出於本發明之目的，術語「融合性脂質」及「非陽離子性脂質」可互換。

中性脂質包括在所選 pH 值（較佳為生理 pH 值）下以不帶電離子或中性兩性離子形式存在的脂質。該等脂質之實例包括二醯基磷脂醯膽鹼、二醯基磷脂醯乙醇胺、神經醯胺（ceramide）、鞘磷脂（sphingomyelin）、腦磷脂（cephalin）、膽固醇、腦苷脂（cerebroside）及二醯基甘油。

陰離子性脂質包括在生理 pH 值下帶負電之脂質。此等脂質包括但不限於磷脂醯甘油、心磷脂（cardiolipin）、二醯基磷脂醯絲胺酸、二醯基磷脂酸、N-十二烷醯基磷脂醯乙醇胺、N-琥珀醯基磷脂醯乙醇胺、N-戊二醯基磷脂醯乙醇胺、離胺醯基磷脂醯甘油、棕櫚醯基油醯基磷脂醯甘油（POPG），及經其他陰離子性修飾基團修飾之中性脂質。

許多融合性脂質包括兩親性脂質且在水溶液中可形成小泡 (vesicle)，該等兩親性脂質一般具有一疏水性部分及一極性頭部基團。

所預期之融合性脂質包括天然存在之磷脂及合成磷脂，以及相關脂質。

非陽離子性脂質之非限制性列表選自磷脂及非磷脂質基材料，諸如卵磷脂 (lecithin)；溶血卵磷脂 (lysolecithin)；二醯基磷脂醯膽鹼；溶血磷脂醯膽鹼；磷脂醯乙醇胺；溶血磷脂醯乙醇胺；磷脂醯絲氨酸；磷脂醯肌醇；鞘磷脂；腦磷脂；神經醯胺；心磷脂；磷脂酸；磷脂醯甘油；腦苷脂；磷酸二鯨蠟酯。

1,2-二月桂醯基-sn-甘油 (DLG)；

1,2-二肉豆蔻醯基-sn-甘油 (DMG)；

1,2-二棕櫚醯基-sn-甘油 (DPG)；

1,2-二硬脂醯基-sn-甘油 (DSG)；

1,2-二月桂醯基-sn-甘油基-3-磷脂酸 (DLPA)；

1,2-二肉豆蔻醯基-sn-甘油基-3-磷脂酸 (DMPA)；

1,2-二棕櫚醯基-sn-甘油基-3-磷脂酸 (DPPA)；

1,2-二硬脂醯基-sn-甘油基-3-磷脂酸 (DSPA)；

1,2-二花生醯基-sn-甘油基-3-磷酸膽鹼 (DAPC)；

1,2-二月桂醯基-sn-甘油基-3-磷酸膽鹼 (DLPC)；

1,2-二肉豆蔻醯基-sn-甘油基-3-磷酸膽鹼 (DMPC)；

1,2-二棕櫚醯基-sn-甘油基-3-乙基磷酸膽鹼 (DPePC)；

1,2-二棕櫚醯基-sn-甘油基-3-磷酸膽鹼或二棕櫚醯基

磷脂醯膽鹼 (DPPC) ;

1,2-二硬脂醯基-sn-甘油基-3-磷酸膽鹼或二硬脂醯基
磷脂醯膽鹼 (DSPC) ;

1,2-二月桂醯基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺 (DLPE) ;

1,2-二肉豆蔻醯基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺，或二肉豆
蔻醯基磷酸乙醇胺 (DMPE) ;

1,2-二棕櫚醯基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺，或二棕櫚醯
基磷脂醯乙醇胺 (DPPE) ;

1,2-二硬脂醯基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺，或二硬脂醯
基磷脂醯乙醇胺 (DSPE) ;

1,2-二油醯基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺，或二油醯基磷
脂醯乙醇胺 (DOPE) ;

1,2-二月桂醯基-sn-甘油基-3-磷酸甘油 (DLPG) ;

1,2-二肉豆蔻醯基-sn-甘油基-3-磷酸甘油 (DMPG)，或
1,2-二肉豆蔻醯基-sn-甘油基-3-磷酸-sn-1-甘油
(DMP-sn-1-G) ;

1,2-二棕櫚醯基-sn-甘油基-3-磷酸甘油，或二棕櫚醯基
磷脂醯甘油 (DPPG) ;

1,2-二硬脂醯基-sn-甘油基-3-磷酸甘油(DSPG)，或 1,2-
二硬脂醯基-sn-甘油基-3-磷酸-sn-1-甘油 (DSP-sn-1-G) ;

1,2-二棕櫚醯基-sn-甘油基-3-磷酸-L-絲胺酸 (DPPS) ;

1-棕櫚醯基-2-亞油醯基-sn-甘油基-3-磷酸膽鹼
(PLinoPC) ;

1-棕櫚醯基-2-油醯基-sn-甘油基-3-磷酸膽鹼，或棕櫚

醯基油醯基磷脂醯膽鹼 (POPC) ;

1-棕櫚醯基-2-油醯基-sn-甘油基-3-磷酸甘油 (POPG) ;

1-棕櫚醯基-2-溶血-sn-甘油基-3-磷酸膽鹼
(P-lyso-PC) ;

1-硬脂醯基-2-溶血-sn-甘油基-3-磷酸膽鹼
(S-lyso-PC) ;

二植烷醯基磷脂醯乙醇胺 (DPhPE) ;

1,2-二油醯基-sn-甘油基-3-磷酸膽鹼，或二油醯基磷脂
醯膽鹼 (DOPC) ;

1,2-二植烷醯基-sn-甘油基-3-磷酸膽鹼 (DPhPC) ;

二油醯基磷脂醯甘油 (DOPG) ;

棕櫚醯基油醯基磷脂醯乙醇胺 (POPE) ;

二油醯基-磷脂醯乙醇胺 4-(N-馬來醯亞胺基甲基)-環
己烷-1-甲酸酯 (DOPE-mal) ;

16-O-單甲基 PE ;

16-O-二甲基 PE ;

18-1-反式 PE ; 1-硬脂醯基-2-油醯基-磷脂醯乙醇胺
(SOPE) ;

1,2-二反油醯基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺 (反式
DOPE) ; 及

其醫藥學上可接受之鹽及其混合物。融合性脂質係詳細描述於美國專利公開案第 2007/0293449 號及第 2006/0051405 號中。

非陽離子性脂質包括固醇或類固醇，諸如膽固醇。

其他非陽離子性脂質為例如，硬脂胺、十二胺、十六胺、棕櫚酸乙酯 (acetylpalmitate)、蓖麻油酸甘油酯、硬脂酸十六酯、肉豆蔻酸異丙酯、兩性 (amphoteric) 丙烯酸類聚合物、硫酸三乙醇胺月桂酯、烷基芳基硫酸酯聚乙氧基化脂肪酸鹽胺，及二(十八烷基)二甲基溴化銨。

所提及之陰離子性脂質包括磷脂鹽絲胺酸、磷脂酸、磷脂鹽膽鹼、血小板活化因子 (PAF)、磷脂鹽乙醇胺、磷脂鹽-DL-甘油、磷脂鹽肌醇、心磷脂、溶血磷脂、氫化磷脂、鞘脂 (sphingolipid)、神經節苷脂 (ganglioside)、植物鞘胺醇 (phytosphingosine)、二氫鞘胺醇 (sphinganine)、其醫藥學上可接受之鹽及其混合物。

可用於製備本文中描述之奈米顆粒組成物的適合之非陽離子性脂質包括二鹽基磷脂鹽膽鹼 (例如，二硬脂鹽基磷脂鹽膽鹼、二油鹽基磷脂鹽膽鹼、二棕櫚鹽基磷脂鹽膽鹼及二亞油鹽基磷脂鹽膽鹼)、二鹽基磷脂鹽乙醇胺 (例如，二油鹽基磷脂鹽乙醇胺及棕櫚鹽基油鹽基磷脂鹽乙醇胺)、神經鹽胺或鞘磷脂。此等脂質中之鹽基較佳為具有飽和及不飽和碳鏈之脂肪酸，諸如亞麻基 (linoyl)、異硬脂基、油基、反油基 (elaidyl)、岩芹基 (petroselinyl)、次亞麻基 (linolenyl)、桐油基 (elaeostearyl)、花生基 (arachidyl)、肉豆蔻鹽基、棕櫚鹽基，及月桂鹽基。鹽基更佳為月桂鹽基、肉豆蔻鹽基、棕櫚鹽基、硬脂鹽基或油鹽基。或者及/或較佳地，脂肪酸具有飽和及不飽和之 C_8-C_{30} (較佳 $C_{10}-C_{24}$) 碳鏈。

適用於本文中描述之奈米顆粒組成物中的各種磷脂醯膽鹼包括：

1,2-二癸醯基-sn-甘油基-3-磷酸膽鹼 (DDPC, C10:0, C10:0)；

1,2-二月桂醯基-sn-甘油基-3-磷酸膽鹼 (DLPC, C12:0, C12:0)；

1,2-二肉豆蔻醯基-sn-甘油基-3-磷酸膽鹼 (DMPC, C14:0, C14:0)；

1,2-二棕櫚醯基-sn-甘油基-3-磷酸膽鹼 (DPPC, C16:0, C16:0)；

1,2-二硬脂醯基-sn-甘油基-3-磷酸膽鹼 (DSPC, C18:0, C18:0)；

1,2-二油醯基-sn-甘油基-3-磷酸膽鹼 (DOPC, C18:1, C18:1)；

1,2-二芥子醯基 (dierucoyl)-sn-甘油基-3-磷酸膽鹼 (DEPC, C22:1, C22:1)；

1,2-二(二十碳五烯醯基)-sn-甘油基-3-磷酸膽鹼 (EPA-PC, C20:5, C20:5)；

1,2-二(二十二碳六烯醯基)-sn-甘油基-3-磷酸膽鹼 (DHA-PC, C22:6, C22:6)；

1-肉豆蔻醯基-2-棕櫚醯基-sn-甘油基-3-磷酸膽鹼 (MPPC, C14:0, C16:0)；

1-肉豆蔻醯基-2-硬脂醯基-sn-甘油基-3-磷酸膽鹼 (MSPC, C14:0, C18:0)；

1- 棕櫚醯基 -2- 硬脂醯基 -sn- 甘油基 -3- 磷酸膽鹼
(PMPC , C16:0 , C14:0) ;

1- 棕櫚醯基 -2- 硬脂醯基 -sn- 甘油基 -3- 磷酸膽鹼
(PSPC , C16:0 , C18:0) ;

1- 硬脂醯基 -2- 肉豆蔻醯基 -sn- 甘油基 -3- 磷酸膽鹼
(SMPC , C18:0 , C14:0) ;

1- 硬脂醯基 -2- 棕櫚醯基 -sn- 甘油基 -3- 磷酸膽鹼
(SPPC , C18:0 , C16:0) ;

1,2- 肉豆蔻醯基 - 油醯基 -sn- 甘油基 -3- 磷酸乙醇胺
(MOPC , C14:0 , C18:0) ;

1,2- 棕櫚醯基 - 油醯基 -sn- 甘油基 -3- 磷酸乙醇胺
(POPC , C16:0 , C18:1) ;

1,2- 硬脂醯基 - 油醯基 -sn- 甘油基 -3- 磷酸乙醇胺
(POPC , C18:0 , C18:1) ; 及其醫藥學上可接受之鹽及其混合物。

適用於本文中描述之奈米顆粒組成物中的各種溶血磷脂醯膽鹼包括：

1- 肉豆蔻醯基 -2- 溶血 -sn- 甘油基 -3- 磷酸膽鹼
(M-LysoPC , C14:0) ;

1- 棕櫚醯基 -2- 溶血 -sn- 甘油基 -3- 磷酸膽鹼
(P-LysoPC , C16:0) ;

1- 硬脂醯基 -2- 溶血 -sn- 甘油基 -3- 磷酸膽鹼
(S-LysoPC , C18:0) ; 及其醫藥學上可接受之鹽及其混合物。

適用於本文中描述之奈米顆粒組成物的各種磷脂醯甘

油係選自：

氫化大豆磷脂醯甘油 (HSPG)；

非氫化卵磷脂醯甘油 (EPG)；

1,2-二肉豆蔻醯基-sn-甘油基-3-磷酸甘油 (DMPG, C14:0, C14:0)；

1,2-二棕櫚醯基-sn-甘油基-3-磷酸甘油 (DPPG, C16:0, C16:0)；

1,2-二硬脂醯基-sn-甘油基-3-磷酸甘油 (DSPG, C18:0, C18:0)；

1,2-二油醯基-sn-甘油基-3-磷酸甘油 (DOPG, C18:1, C18:1)；

1,2-二芥子醯基-sn-甘油基-3-磷酸甘油 (DEPG, C22:1, C22:1)；

1-棕櫚醯基-2-油醯基-sn-甘油基-3-磷酸甘油 (POPG, C16:0, C18:1)；及其醫藥學上可接受之鹽及其混合物。

適用於本文中描述之奈米顆粒組成物中的各種磷脂酸包括：

1,2-二肉豆蔻醯基-sn-甘油基-3-磷脂酸 (DMPA, C14:0, C14:0)；

1,2-二棕櫚醯基-sn-甘油基-3-磷脂酸 (DPPA, C16:0, C16:0)；

1,2-二硬脂醯基-sn-甘油基-3-磷脂酸 (DSPA, C18:0, C18:0)；及

其醫藥學上可接受之鹽及其混合物。

適用於本文中描述之奈米顆粒組成物中的各種磷脂醯乙醇胺包括：

氫化大豆磷脂醯乙醇胺 (HSPE)；

非氫化卵磷脂醯乙醇胺 (EPE)；

1,2-二肉豆蔻醯基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺 (DMPE, C14:0, C14:0)；

1,2-二棕櫚醯基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺 (DPPE, C16:0, C16:0)；

1,2-二硬脂醯基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺 (DSPE, C18:0, C18:0)；

1,2-二油醯基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺 (DOPE, C18:1, C18:1)；

1,2-二油醯基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺 (DEPE, C22:1, C22:1)；

1,2-二芥子醯基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺 (POPE, C16:0, C18:1)；及其醫藥學上可接受之鹽及其混合物。

適用於本文中描述之奈米顆粒組成物中的各種磷脂醯絲胺酸包括：

1,2-二肉豆蔻醯基-sn-甘油基-3-磷酸-L-絲胺酸 (DMPS, C14:0, C14:0)；

1,2-二棕櫚醯基-sn-甘油基-3-磷酸-L-絲胺酸 (DPPS, C16:0, C16:0)；

1,2-二硬脂醯基-sn-甘油基-3-磷酸-L-絲胺酸 (DSPS, C18:0, C18:0)；

1,2-二油醯基-sn-甘油基-3-磷酸-L-絲胺酸 (DOPS, C18:1, C18:1) ;

1-棕櫚醯基-2-油醯基-sn-3-磷酸-L-絲胺酸 (POPS, C16:0, C18:1) ; 及其醫藥學上可接受之鹽及其混合物。

在一較佳具體實例中，可用於製備本文中描述之奈米顆粒組成物的適合中性脂質包括，例如：

二油醯基磷脂醯乙醇胺 (DOPE) ;

二硬脂醯基磷脂醯乙醇胺 (DSPE) ;

棕櫚醯基油醯基磷脂醯乙醇胺 (POPE) ;

卵磷脂醯膽鹼 (EPC) ;

二棕櫚醯基磷脂醯膽鹼 (DPPC) ;

二硬脂醯基磷脂醯膽鹼 (DSPC) ;

二油醯基磷脂醯膽鹼 (DOPC) ;

棕櫚醯基油醯基磷脂醯膽鹼 (POPC) ;

二棕櫚醯基磷脂醯甘油 (DPPG) ;

二油醯基磷脂醯甘油 (DOPG) ;

二油醯基-磷脂醯乙醇胺 4-(N-馬來醯亞胺基甲基)-環己烷-1-甲酸酯 (DOPE-mal) ; 膽固醇；其醫藥學上可接受之鹽及其混合物。

在某些較佳具體實例中，本文中描述之奈米顆粒組成物包括 DSPC、EPC、DOPE 等，及其混合物。

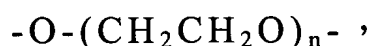
在本發明之另一態樣中，該奈米顆粒組成物含有非陽離子性脂質，諸如固醇。奈米顆粒組成物較佳含有膽固醇或其類似物，且膽固醇更佳。

D. PEG 脂質

在本發明之另一態樣中，本文中描述之奈米顆粒組成物含有 PEG 脂質。PEG 脂質延長本文中描述之奈米顆粒的循環時間，且防止奈米顆粒過早自體內排泄。PEG 脂質可減少體內的免疫反應。PEG 脂質亦增強奈米顆粒之穩定性。

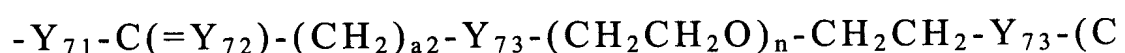
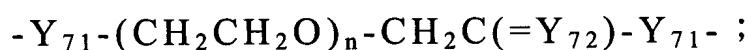
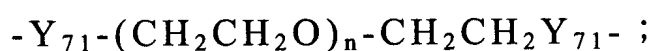
適用於奈米顆粒組成物之 PEG 脂質包括融合性/非陽離子性脂質之 PEG 化形式。PEG 脂質包括，例如：與二醯基甘油結合之 PEG (PEG-DAG)；與二醯基咪唑雙醯胺 (diacylglycamide) 結合之 PEG；與二烷氧基丙基結合之 PEG (PEG-DAA)；與磷脂結合之 PEG，諸如與磷脂醯乙醇胺偶合之 PEG (PEG-PE)；與神經醯胺結合之 PEG (PEG-Cer)；與膽固醇衍生物結合之 PEG (PEG-Chol) 或其混合物。參看美國專利第 5,885,613 號及第 5,820,873 號，以及美國專利公開案第 2006/051405 號，各文獻之內容係以引用之方式併入本文中。

PEG 一般表示為如下結構：



其中，(n) 為約 5 至約 2300、較佳約 5 至約 460 之正整數，以便 PEG 脂質之聚合部分具有約 200 至約 100,000 道爾頓、較佳約 200 至約 20,000 道爾頓之數量平均分子量。

或者，聚乙二醇 (PEG) 殘基部分可表示為下列結構：



$H_2)_{a2}-C(=Y_{72})-Y_{71}-$ ；及

$-Y_{71}-(CR_{71}R_{72})_{a2}-Y_{73}-(CH_2)_{b2}-O-(CH_2CH_2O)_n-(CH_2)_{b2}-Y_{73}-(CR_{71}R_{72})_{a2}-Y_{71}-$ ，

其中：

Y_{71} 及 Y_{73} 獨立地為 O、S、SO、SO₂、NR₇₃ 或鍵；

Y_{72} 為 O、S，或 NR₇₄；

R_{71-74} 係獨立地選自：氫、C₁₋₆ 烷基、C₂₋₆ 烯基、C₂₋₆ 炔基、C₃₋₁₉ 支鏈烷基、C₃₋₈ 環烷基、C₁₋₆ 經取代之烷基、C₂₋₆ 經取代之烯基、C₂₋₆ 經取代之炔基、C₃₋₈ 經取代之環烷基、芳基、經取代之芳基、雜芳基、經取代之雜芳基、C₁₋₆ 雜烷基、經取代之 C₁₋₆ 雜烷基、C₁₋₆ 烷氧基、芳氧基、C₁₋₆ 雜烷氧基、雜芳氧基、C₂₋₆ 烷酯基、芳基羰基、C₂₋₆ 烷氧基羰基、芳氧基羰基、C₂₋₆ 烷酯基氧基、芳基羰氧基、C₂₋₆ 經取代之烷酯基、經取代之芳基羰基、C₂₋₆ 經取代之烷酯基氧基、經取代之芳氧基羰基、C₂₋₆ 經取代之烷酯基氧基，及經取代之芳基羰氧基，氫、甲基、乙基或丙基較佳；

(a2)及(b2)獨立地為零或正整數，零或約 1 至約 6（例如，1、2、3、4、5、6）之整數較佳，且 1 或 2 更佳；且

(n)為約 5 至約 2300 之整數，約 5 至約 460 較佳。

PEG 之末端可以 H、NH₂、OH、CO₂H、C₁₋₆ 烷基（例如，甲基、乙基、丙基）、C₁₋₆ 烷氧基、酯基或芳基結束。在一較佳具體實例中，PEG 之末端羥基係經甲氧基或甲基取代。在一較佳具體實例中，PEG 脂質中採用之 PEG 為甲氧基 PEG。

PEG 可直接與脂質結合，或可經由連接子部分與脂質結合。供與脂質結構結合之聚合物係藉由使用美國專利第 5,122,614 號及第 5,808,096 號中所描述之活化技術及此項技術已知之其他技術，在不過度實驗的情況下轉化成適當活化之聚合物。

適用於製備 PEG 脂質的活化 PEG 之實例包括，例如：甲氧基聚乙二醇-琥珀酸酯、mPEG-NHS、甲氧基聚乙二醇-琥珀醯亞胺基琥珀酸酯、甲氧基聚乙二醇-乙酸 (mPEG-CH₂COOH)、甲氧基聚乙二醇-胺 (mPEG-NH₂)，及甲氧基聚乙二醇-三氟乙基磺酸酯 (mPEG-TRES)。

在某些態樣中，具有羧基末端之聚合物可用於本文中描述之 PEG 脂質中。以高純度製備具有羧酸末端之聚合物的方法係描述於美國專利申請案第 11/328,662 號中，該申請案之內容係以引用之方式併入本文中。

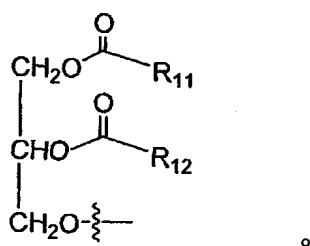
在替代性態樣中，具有胺基末端之聚合物可用於製造本文中描述之 PEG 脂質。以高純度製備含有胺末端之聚合物的方法係描述於美國專利申請案第 11/508,507 號及第 11/537,172 號中，各申請案之內容係以引用之方式併入本文中。

PEG 及脂質可經由鍵聯 (linkage) 結合，例如非含酯之連接子部分或含酯之連接子部分。適合之非含酯連接子包括但不限於醯胺基連接子部分、胺基連接子部分、羧基連接子部分、胺基甲酸酯連接子部分、碳酸酯 (OC(=O)O) 連接子部分、尿素連接子部分、醚連接子部分、琥珀醯基

連接子部分，及其組合。適合之酯連接子部分包括，例如琥珀醯基 (succinoyl)、磷酸酯 ($-O-P(=O)(OH)-O-$)、磺酸酯，及其組合。

在一具體實例中，本文中描述之奈米顆粒組成物包括聚乙二醇-二醯基甘油 (PEG-DAG) 或聚乙二醇-二醯基咪唑雙醯胺。適合之聚乙二醇-二醯基甘油或聚乙二醇-二醯基咪唑雙醯胺結合物包括烷基鏈長度為獨立地含有約 C_4 至約 C_{30} (較佳約 C_8 至約 C_{24}) 飽和或不飽和碳原子的二烷基甘油或二烷基咪唑雙醯胺基團。二烷基甘油或二烷基咪唑雙醯胺基團可進一步包括一或多個經取代之烷基。

本文中所使用之術語「二醯基甘油」(DAG) 係指具有兩個脂肪醯基鏈 R_{11} 及 R_{12} 之化合物。DAG 具有如下通式：



R_{11} 及 R_{12} 具有相同或不同、約 4 至約 30 (較佳約 8 至約 24) 個碳，且藉由酯鍵聯與甘油鍵結。醯基可為飽和或不飽和 (具有各種不飽和度) 的。

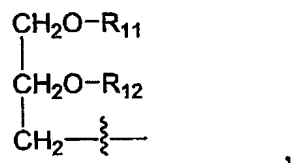
在一較佳具體實例中，PEG-二醯基甘油結合物為 PEG-二月桂基甘油 (C_{12})、PEG-二肉豆蔻基甘油 (C_{14} , DMG)、PEG-二棕櫚醯基甘油 (C_{16} , DPG) 或 PEG-二硬脂基甘油 (C_{18} , DSG)。熟習此項技術者應容易地瞭解到，亦預期將其他二醯基甘油用於 PEG-二醯基甘油結合物中。適用於本發明之 PEG-二醯基甘油結合物以及其製造及使用方法係描

述於美國專利公開案第 2003/0077829 號及 PCT 專利申請案第 CA 02/00669 號中，各文獻之內容係以引用之方式併入本文中。

PEG-二醯基甘油結合物之實例可選自：PEG-二月桂基甘油（C₁₂）、PEG-二肉豆蔻基甘油（C₁₄）、PEG-二棕櫚醯基甘油（C₁₆）、PEG-二硬脂基甘油（C₁₈）。PEG-二醯基咪唑雙醯胺結合物之實例包括 PEG-二月桂基咪唑雙醯胺（C₁₂）、PEG-二肉豆蔻基咪唑雙醯胺（C₁₄）、PEG-二棕櫚醯基咪唑雙醯胺（C₁₆）、及 PEG-二硬脂基咪唑雙醯胺（C₁₈）。

在另一具體實例中，本文中描述之奈米顆粒組成物包括聚乙二醇-二烷氧基丙基結合物（PEG-DAA）。

術語「二烷氧基丙基」係指具有兩個烷基鏈 R₁₁ 及 R₁₂ 之化合物。R₁₁ 及 R₁₂ 烷基包括相同或不同的介於約 4 至約 30（較佳約 8 至約 24）個之間的碳。烷基可為飽和的，或可具有不同的不飽和度。二烷氧基丙基具有如下通式：



其中，R₁₁ 及 R₁₂ 烷基為具有約 4 至約 30（較佳約 8 至約 24）個碳之相同或不同的烷基。烷基可為飽和或不飽和的。適合之烷基包括但不限於月桂基（C₁₂）、肉豆蔻基（C₁₄）、棕櫚基（C₁₆）、硬脂基（C₁₈）、油醯基（C₁₈）及二十烷基（C₂₀）。

在一具體實例中，R₁₁ 與 R₁₂ 相同，例如，R₁₁ 及 R₁₂ 均為肉豆蔻基（C₁₄），或均為硬脂基（C₁₈），或均為油醯基（C₁₈）。

等。在另一具體實例中， R_{11} 與 R_{12} 不同，例如， R_{11} 為肉豆蔻基 (C_{14})，而 R_{12} 為硬脂基 (C_{18})。在一較佳具體實例中，PEG-二烷基丙基結合物包括相同的 R_{11} 及 R_{12} 。

在又一具體實例中，本文中描述之奈米顆粒組成物包括與磷脂醯乙醇胺結合之 PEG (PEG-PE)。適用於 PEG 脂質結合之磷脂醯乙醇胺可含有碳鏈長度處於約 4 至約 30 (較佳約 8 至約 24) 個碳範圍內的飽和或不飽和脂肪酸。適合之磷脂醯乙醇胺包括但不限於：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)。

在又一具體實例中，本文中描述之奈米顆粒組成物包括與神經醯胺結合之 PEG (PEG-Cer)。神經醯胺僅具有一個醯基。神經醯胺可具有碳鏈長度處於約 4 至約 30 (較佳約 8 至約 24) 個碳範圍內的飽和或不飽和脂肪酸。

在替代性具體實例中，本文中描述之奈米顆粒組成物包括與膽固醇衍生物結合之 PEG。術語「膽固醇衍生物」意謂含有經修飾之膽固醇結構 (例如，其取代及/或缺失) 的任何膽固醇類似物。本文中之術語膽固醇衍生物亦包括類固醇激素及膽汁酸。

在一較佳態樣中，PEG 為數量平均分子量介於約 200 至約 20,000 道爾頓、更佳約 500 至約 10,000 道爾頓、更佳約 1,000 至約 5,000 道爾頓 (例如約 1,500 至約 3,000 道爾頓) 之聚乙二醇。在一特定具體實例中，PEG 具有約 2,000

道爾頓之數量平均分子量。在另一特定具體實例中，PEG 具有約 750 道爾頓之數量平均分子量。

PEG 脂質之說明性實例包括 N-(羧基-甲氧基聚乙二醇)-1,2-二肉豆蔻醯基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺 ($^{2\text{kDa}}$ mPEG-DMPE 或 $^{5\text{kDa}}$ mPEG-DMPE)；N-(羧基-甲氧基聚乙二醇)-1,2-二棕櫚醯基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺 ($^{2\text{kDa}}$ mPEG-DPPE 或 $^{5\text{kDa}}$ mPEG-DPPE)；N-(羧基-甲氧基聚乙二醇)-1,2-二硬脂醯基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺 ($^{750\text{Da}}$ mPEG-DSPE、 $^{2\text{kDa}}$ mPEG-DSPE、 $^{5\text{kDa}}$ mPEG-DSPE)；及其醫藥學上可接受之鹽（例如，鈉鹽）及其混合物。

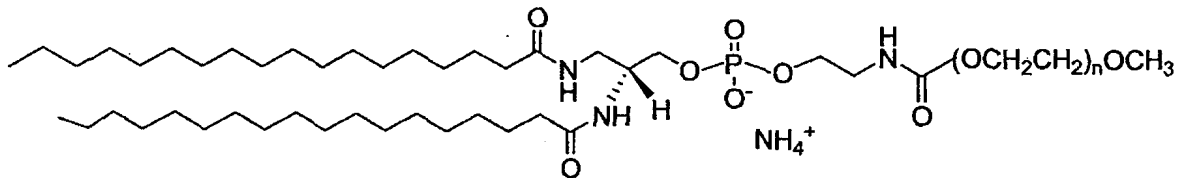
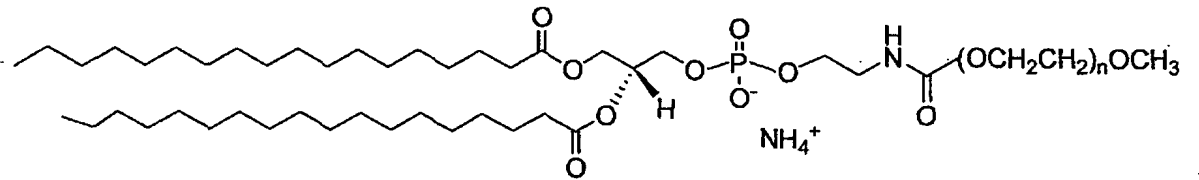
在某些較佳具體實例中，本文中描述之奈米顆粒組成物包括具有 PEG-DAG 或 PEG-神經醯胺之 PEG 脂質，其中 PEG 具有約 200 至約 20,000、較佳約 500 至約 10,000 且更佳約 1,000 至約 5,000 之分子量。

在表 1 中提供 PEG-DAG 及 PEG-神經醯胺之幾個說明性具體實例。

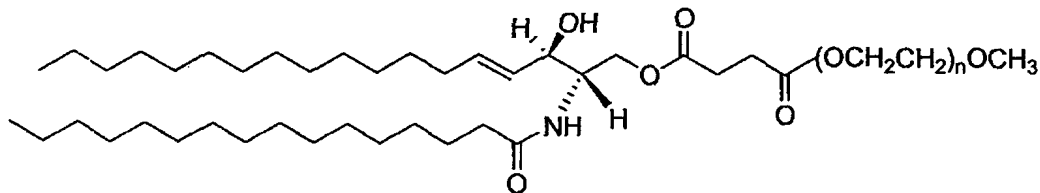
表 1.

PEG 脂質	
PEG-DAG	mPEG-二肉豆蔻醯基甘油
	mPEG-二棕櫚醯基甘油
	mPEG-二硬脂醯基甘油
PEG-神經醯胺	mPEG-CerC8
	mPEG-CerC14
	mPEG-CerC16
	mPEG-CerC20

本文中描述之奈米顆粒組成物較佳包括選自下列中的 PEG 脂質：PEG-DSPE、PEG-二棕櫚醯基咪唑雙醯胺 (C_{16})、PEG-神經醯胺 (C_{16}) 等，及其混合物。mPEG-DSPE、mPEG-二棕櫚醯基咪唑雙醯胺 (C_{16}) 及 mPEG-神經醯胺 (C_{16}) 之結構如下：



，及



其中，(n)為約 5 至約 2300 之整數，約 5 至約 460 較佳。

在一特定具體實例中，(n)為約 45。

在另一具體實例中且作為 PAO 基聚合物（諸如 PEG）之替代物，可使用一或多種有效非抗原性材料，諸如聚葡萄糖、聚乙烯醇、碳水化合物基聚合物、羥丙基甲基丙烯醯胺 (HPMA)、聚氧化烯，及/或其共聚物。可用於替換 PEG 之適合聚合物之實例包括但不限於聚乙烯吡咯啉酮、聚甲基噁唑啉、聚乙基噁唑啉、聚羥丙基甲基丙烯醯胺、聚甲基丙烯醯胺及聚二甲基丙烯醯胺、聚乳酸、聚乙醇酸，及

衍生纖維素，諸如羥甲基纖維素或羥乙基纖維素。亦參看共同讓渡之美國專利第 6,153,655 號，該專利之內容係以引用之方式併入本文中。一般熟習此項技術者應理解，可採用如本文中所描述對於 PAO（諸如 PEG）的相同類型之活化。一般熟習此項技術者亦應瞭解，以上列表僅為說明性的，且具有本文中描述之品質的所有聚合材料均在預期之內。出於本發明之目的，「實質上或有效非抗原性」意謂此項技術中理解為無毒且在哺乳動物中不會引起明顯免疫原反應的所有材料。

E. 核酸/寡核苷酸

本文中描述之奈米顆粒組成物可用於向細胞或組織中遞送各種核酸。核酸包括質體及寡核苷酸。本文中描述之奈米顆粒組成物較佳用於遞送寡核苷酸。

為了更充分理解本發明之範疇，定義以下術語。技術人員應瞭解，術語「核酸」或「核苷酸」適用於去氧核糖核酸（「DNA」）、核糖核酸（「RNA」）（二者均可為單股或雙股，除非另外說明）及其任何化學修飾產物。「寡核苷酸」一般為相對較短之多核苷酸，例如，尺寸上介於約 2 至約 200 個核苷酸，較佳約 8 至約 50 個核苷酸，更佳約 8 至約 30 個核苷酸，且尤佳約 8 至約 20 個核苷酸或約 15 至約 28 個核苷酸長。除非另外說明，否則本發明之寡核苷酸一般為合成核酸，且為單股。本文中，術語「多核苷酸」與「多核酸（polynucleic acid）」亦可作同義使用。

寡核苷酸（類似物）不侷限於單一種類寡核苷酸，而

是設計成具有多種該等部分；應瞭解，連接子可與一或多個 3'-或 5'-末端連接，通常為核苷酸之 PO_4 基或 SO_4 基。所預期之核酸分子可包括硫代磷酸酯核苷酸間鍵聯 (internucleotide linkage) 修飾、糖修飾、核酸鹼基 (nucleic acid base) 修飾及/或磷酸酯骨架 (phosphate backbone) 修飾。寡核苷酸可含有天然磷酸二酯骨架或硫代磷酸酯骨架或任何其他經修飾骨架類似物，諸如 LNA (鎖核酸)、PNA (具有肽骨架之核酸)、CpG 寡聚物，及類似物，諸如 Tides 2002, Oligonucleotide and Peptide Technology Conferences, 2002 年 5 月 6 日至 8 日, Las Vegas, NV 及 Oligonucleotide & Peptide Technologies, 2003 年 11 月第 18 期 & 第 19 期, Hamburg, Germany 中所揭示之彼等，該等文獻之內容係以引用之方式併入本文中。

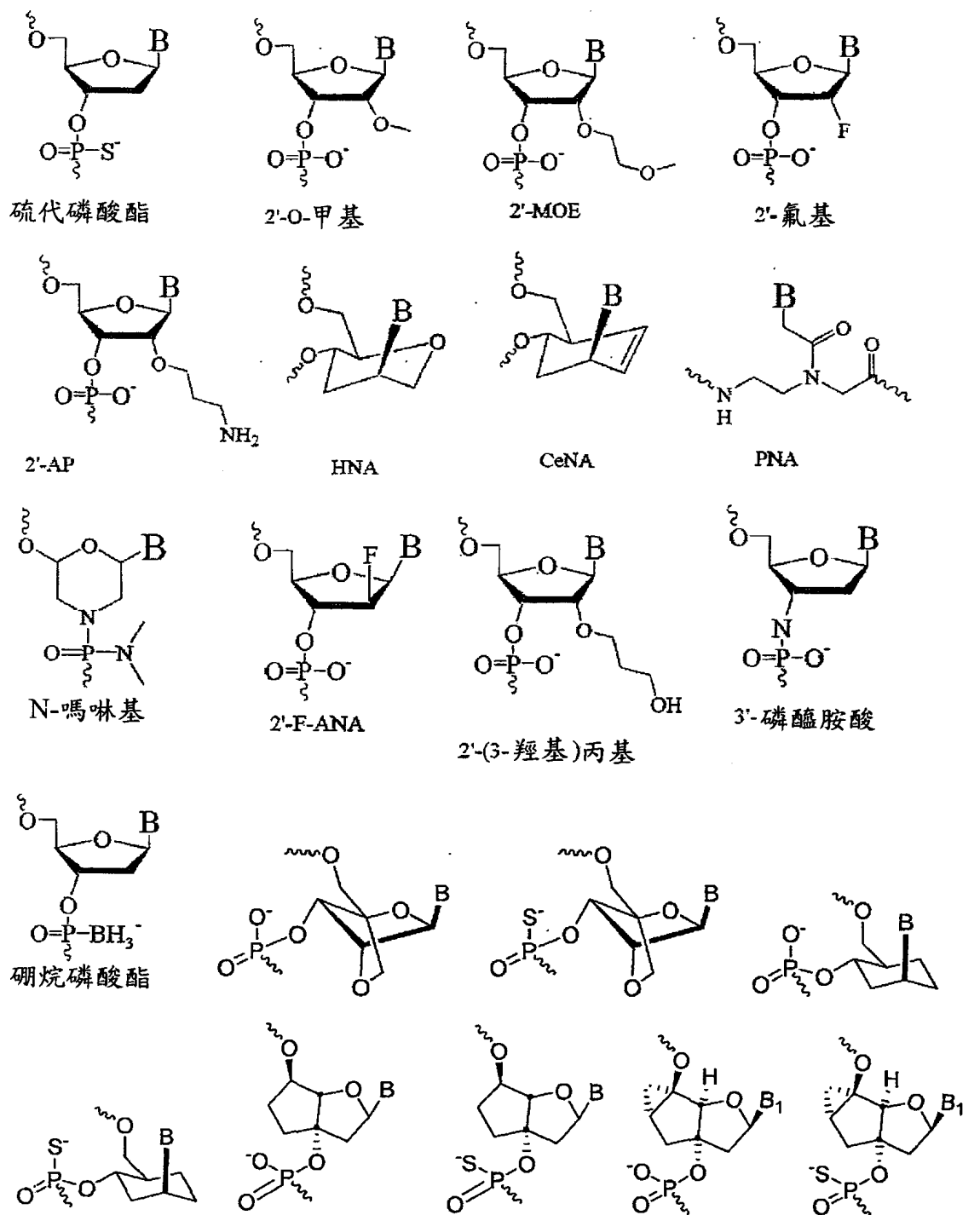
本發明預期之寡核苷酸修飾包括，例如，向寡核苷酸中併入額外電荷、極化性、氫鍵結、靜電相互作用及官能性之官能部分的添加或取代。該等修飾包括但不限於 2'-位糖修飾、5-位嘧啶修飾、8-位嘌呤修飾、環外胺 (exocyclic amine) 處之修飾、4-硫代尿苷 (4-thiouridine) 取代、5-溴代尿嘧啶或 5-碘代尿嘧啶取代、骨架修飾、甲基化、鹼基配對組合 (諸如異鹼基 (isobase) 異胞苷與異胍、及類似組合)。本發明範疇內預期之寡核苷酸亦可包括 3'帽結構及/或 5'帽結構。

為本發明之目的，「帽結構」應理解為意謂已併入寡核苷酸之任一末端處的化學修飾。該帽可存在於 5'-末端 (5'-

帽) 或 3'-末端 (3'-帽) 處, 或可存在於兩個末端上。5'-帽之非限制性實例包括反向無鹼基 (inverted abasic) 殘基 (部分), 4',5'-亞甲基核苷酸; 1-(β -D-赤型呋喃糖基)核苷酸、4'-硫代核苷酸、碳環核苷酸; 1,5-失水己糖醇核苷酸; L-核苷酸; α -核苷酸; 修飾鹼基核苷酸; 二硫代磷酸酯鍵聯; 蘇型-呋喃戊糖基核苷酸; 無環 3',4'-開環 (seco) 核苷酸; 無環 3,4-二羥丁基核苷酸; 無環 3,5-二羥戊基核苷酸; 3'-3'-反向核苷酸部分; 3'-3'-反向無鹼基部分; 3'-2'-反向核苷酸部分; 3'-2'-反向無鹼基部分; 1,4-丁二醇磷酸酯; 3'-磷醯胺酸 (3'-phosphoramidate); 己基磷酸酯; 胺己基磷酸酯; 3'-磷酸酯; 3'-硫代磷酸酯; 二硫代磷酸酯; 或者橋接或非橋接甲基磷酸酯部分。細節係描述於 WO 97/26270 中, 該文獻以引用之方式併入本文中。3'-帽可包括例如 4',5'-亞甲基核苷酸; 1-(β -D-赤型呋喃糖基)核苷酸; 4'-硫代核苷酸、碳環核苷酸; 磷酸 5'-胺基烷酯; 磷酸 1,3-二胺基-2-丙酯; 磷酸 3-胺基丙酯; 磷酸 6-胺基己酯; 磷酸 1,2-胺基十二烷酯; 磷酸羥基丙酯; 1,5-失水己糖醇核苷酸; L-核苷酸; α -核苷酸; 修飾鹼基核苷酸; 二硫代磷酸酯; 蘇型-呋喃戊糖基核苷酸; 無環 3',4'-開環核苷酸; 3,4-二羥丁基核苷酸; 3,5-二羥戊基核苷酸; 5'-5'-反向核苷酸部分; 5'-5'-反向無鹼基部分; 5'-磷醯胺酸; 5'-硫代磷酸酯; 1,4-丁二醇磷酸酯; 5'-胺基; 橋接及/或非橋接 5'-磷醯胺酸、硫代磷酸酯及/或二硫代磷酸酯; 橋接或非橋接甲基磷酸酯; 及 5'-巰基部分。亦參看 Beaucage 及 Iyer, 1993, Tetrahedron 49,1925; 該文

獻之內容係以引用之方式併入本文中。

核苷類似物之非限制性列表具有如下結構：



參看 Freier & Altmann; *Nucl. Acid Res.*, 1997, 25, 4429-4443 及 Uhlmann; *Curr. Opinion in Drug Development*, 2000, 3(2), 293-213 中描述之更多核苷類似物實例，該等文獻之內容係以引用之方式併入本文中。

如本文中所使用，術語「反義」係指與編碼基因產物或編碼控制序列之特定 DNA 序列或 RNA 序列互補的核苷酸序列。術語「反義股」用於指與「有義」股互補之核酸股。在正常進行之細胞代謝中，DNA 分子之有義股為編碼多肽及/或其他基因產物的股。有義股充當合成信使 RNA（「mRNA」）轉錄物（反義股）之模板，信使 RNA 轉錄物反過來又引導任何經編碼基因產物之合成。可藉由此項技術中任何已知方法產生反義核酸分子，包括藉由以相反定向將相關基因與病毒啟動子（其允許合成一互補股）接合而進行合成。一旦引入細胞中，此轉錄股即與細胞產生之天然序列結合，以形成雙股體（duplex）。接著，此等雙股體阻斷 mRNA 之進一步轉錄或其轉譯。在此項技術中亦已知標識「負」或(-)係指反義股；且在此項技術中亦已知「正」或(+)係指有義股。

出於本發明之目的，「互補」應理解為意謂一核酸序列與另一核酸序列形成氫鍵。互補百分比表示一核酸分子中可與第二核酸序列形成氫鍵（例如，沃森-克里克（Watson-Crick）鹼基配對）之相鄰殘基的百分比，例如在 10 個殘基中有 5、6、7、8、9、10 個形成氫鍵即為 50%、60%、70%、80%、90%，及 100%互補。「完美互補」意謂一核酸序列之所有相鄰殘基均與第二核酸序列中相同數目之相鄰殘基形成氫鍵。

適用於本文中描述之奈米顆粒中的核酸（諸如，一種或多種相同或不同的寡核苷酸或寡核苷酸衍生物）可包括約 5

至約 1000 個核酸，且較佳為相對較短的多核苷酸，例如尺寸上較佳介於約 8 至約 50（例如，約 8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 或 30）個核苷酸長。

在包封於本文中描述之奈米顆粒內之適用核酸的一態樣中，具有天然磷酸二酯骨架或硫代磷酸酯骨架或其他經修飾之任何骨架類似物的寡核苷酸及寡去氧核苷酸包括：

LNA（鎖核酸）；

PNA（具有肽骨架之核酸）；

短干擾 RNA（siRNA）；

微型 RNA（miRNA）；

具有肽骨架之核酸（PNA）；

磷醯二胺 N-嗎啉基寡核苷酸（PMO）；

三環 DNA；

誘餌 ODN（雙股寡核苷酸）；

催化性 RNA 序列（RNAi）；

核酶（ribozyme）；

適配子（aptamer）；

鏡像異構適配子（spiegelmer）（L-構型寡核苷酸）；

CpG 寡聚物；及類似物，諸如下列文獻中所揭示之各者：

Tides 2002, Oligonucleotide and Peptide Technology Conferences, 2002 年 5 月 6 日至 8 日, Las Vegas, NV；及 Oligonucleotide & Peptide Technologies, 2003 年 11 月第 18

期 & 第 19 期, Hamburg, Germany, 該等文獻之內容係以引用的方式併入本文中。

在包封於奈米顆粒內之核酸的另一態樣中，寡核苷酸可視情況包括任何此項技術中已知的適合核苷酸類似物及衍生物，包括下表 2 中所列出者：

表 2. 代表性核苷酸類似物及衍生物

4-乙醯基胞苷	5-甲氧基胺甲基-2-硫代尿苷
5-(羧基羥甲基)尿苷	β ,D-甘露糖基腺苷 (beta, D-mannosylqueuosine)
2'-O-甲基胞苷	5-甲氧基羧甲基-2-硫代尿苷
5-甲氧基羧甲基尿苷	5-羧基甲基胺甲基-2-硫代尿苷
5-甲氧基尿苷	5-羧基甲基胺基甲基尿苷
二氫尿苷	2-甲基硫-N6-異戊烯基腺苷
2'-O-甲基假尿苷	N-[(9- β -D-呋喃核糖基-2-甲基硫代嘌呤-6-基)胺甲醯基]蘇胺酸
D-半乳糖基腺苷	N-[(9- β -D-呋喃核糖基嘌呤-6-基)N-甲基胺甲醯基]蘇胺酸
2'-O-甲基鳥苷	尿苷-5-氧基乙酸-甲酯
2'-鹵基-腺苷	2'-鹵基-胞苷
2'-鹵基-鳥苷	2'-鹵基-胸腺嘧啶
2'-鹵基-尿苷	2'-鹵基-甲基胞苷
2'-胺基-腺苷	2'-胺基-胞苷
2'-胺基-鳥苷	2'-胺基-胸腺嘧啶
2'-胺基-尿苷	2'-胺基-甲基胞苷

肌苷	尿苷-5-氧基乙酸
N6-異戊烯基腺苷	Wybutoxosine
1-甲基腺苷	假尿苷
1-甲基假尿苷	辦苷
1-甲基鳥苷	2-硫代胞苷
1-甲基肌苷	5-甲基-2-硫代尿苷
2,2-二甲基鳥苷	2-硫代尿苷
2-甲基腺苷	4-硫代尿苷
2-甲基鳥苷	5-甲基尿苷
3-甲基胞苷	N-[(9-β-D-呋喃核糖基嘌呤-6-基)-胺甲醯基]蘇胺酸
5-甲基胞苷	2'-O-甲基-5-甲基尿苷
N6-甲基腺苷	2'-O-甲基尿苷
7-甲基鳥苷	懷丁苷 (Wybutosine)
5-甲基胺甲基尿苷	3-(3-胺基-3-羧基-丙基)尿苷
鎖腺苷	鎖胞苷
鎖鳥苷	鎖胸腺嘧啶
鎖尿苷	鎖甲基胞苷

在一較佳態樣中，包封在奈米顆粒中之標靶寡核苷酸包括，例如但不限於致癌基因、促血管新生路徑 (pro-angiogenesis pathway) 基因、促細胞增殖路徑 (pro-cell proliferation pathway) 基因、病毒感染因子 (viral infectious agent) 基因，及促發炎路徑 (pro-inflammatory pathway) 基因。

在一較佳具體實例中，包封在本文中描述之奈米顆粒內的寡核苷酸參與靶向腫瘤細胞或下調與腫瘤細胞相關之基因或蛋白質表現及/或腫瘤細胞對抗癌治療之抗性。舉例而言，用於下調此項技術中已知的與癌症相關之任何細胞蛋白（例如，BCL-2）的反義寡核苷酸均可用於本發明。參看 2004 年 4 月 9 日申請之美國專利申請案第 10/822,205 號，該申請案之內容係以引用之方式併入本文中。較佳治療性寡核苷酸之非限制性列表包括：反義 HIF1- α 寡核苷酸、反義存活素（survivin）寡核苷酸、反義 ErbB3 寡核苷酸、反義 β -索煙素（ β -catenine）寡核苷酸，及反義 Bcl-2 寡核苷酸。

本文中描述之本發明寡核苷酸更佳包括硫代磷酸酯骨架及 LNA。

在一較佳具體實例中，寡核苷酸可為例如反義存活素 LNA、反義 ErbB3 LNA，或反義 HIF1- α LNA。

在另一較佳具體實例中，寡核苷酸可為例如，具有與根納三思（Genasense）（a/k/a 奧利默森鈉（oblimersen sodium），由 Genta 公司（Berkeley Heights, NJ）生產）相同或實質上相似之核苷酸序列的寡核苷酸。根納三思為 18 基體（18-mer）硫代磷酸酯反義寡核苷酸 TCTCCCAGCGT GCGCCAT（SEQ ID NO:4），其與人類 bcl-2 mRNA 之起始序列的前六個密碼子互補（人類 bcl-2 mRNA 為此項技術中已知的，且在美國專利第 6,414,134 號中描述為例如 SEQ ID NO:19，該專利係以引用之方式併入本文中）。美國食品與

藥品管理署 (FDA) 在 2000 年 8 月授予根鈉三思孤兒藥 (Orphan Drug) 身分。

所預期之較佳具體實例包括：

(i) 反義存活素 LNA , Oligo-1 (SEQ ID NO:1)
5'-^mCT^mCAatccatgg^mCAGc-3' ,

其中 , 大寫字母表示 LNA , ^mC 表示甲基化胞嘧啶 , 且核苷間鍵聯為硫代磷酸酯 ;

(ii) 反義 ErbB3 LNA , Oligo-2 (SEQ ID NO:2)
5'-TAGcctgtcactt^mCT^mC-3' ,

其中 , 大寫字母表示 LNA , ^mC 表示甲基化胞嘧啶 , 且核苷間鍵聯為硫代磷酸酯 ;

(iii) 根鈉三思 , Oligo-4 (SEQ ID NO:4)
5'-tctcccagcgtgcgcccat-3' ,

其中小寫字母表示 DNA , 且核苷間鍵聯為硫代磷酸酯 ;

(V) 反義 HIF-1 α LNA , Oligo-5 (SEQ ID NO:5)
5'-TGGcaagcatccTGTa-3' ,

其中大寫字母表示 LNA , 且核苷間鍵聯為硫代磷酸酯 ; 及

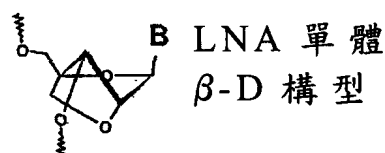
(vi) 反義 Bcl2 siRNA :

有義 5'-gcaugcggccucuguuugadTdT-3' (SEQ ID NO:6) ;

反義 3'-dTdTcguacgccggagacaaacu-5' (SEQ ID NO:7) ,

其中 , dT 表示 DNA 。

LNA 包括如下所示之 2'-O,4'-C 亞甲基雙環核苷酸 :



混雜 (scrambled) 反義 ErbB3 LNA, Oligo-3 (SEQ ID NO:3) 具有如下序列：

5'-TAGcttgtccatt^mCT^mC-3'，

其中，大寫字母表示 LNA，^mC 表示甲基化胞嘧啶，且核苷間鍵聯為硫代磷酸酯。

參看名為「LNA Oligonucleotides and the Treatment of Cancer」之美國專利申請公開案第 2006/0154888 號及名為「Oligomeric Compounds for the Modulation Survivin Expression」之第 2005/0014712 號中所揭示之存活素 LNA 的詳細描述，各公開案之內容係以引用之方式併入本文中。亦參看名為「Oligomeric Compounds for the Modulation HIF-1 Alpha Expression」之美國專利申請公開案第 2004/0096848 號及名為「Potent LNA Oligonucleotides for Inhibition of HEF-1A Expression」之第 2006/0252721 號，該等公開案之內容亦以引用之方式併入本文中。亦參看，其內容以全文引用之方式併入本文中。

適合之標靶基因的實例係描述於 PCT 公開案第 WO 03/74654 號、PCT/US03/05028，及美國專利申請案第 2007/0042983 號中，該等文獻之內容係以引用之方式併入本文中。

F. 靶向基團

視情況/較佳地，本文中描述之奈米顆粒組成物進一步

包括針對特定細胞或組織類型之靶向配體。靶向基團可藉由使用連接子分子與奈米顆粒組成物（較佳為融合性脂質及 PEG 脂質）之任何組分連接，該連接子分子為諸如醯胺（amide）、胺基（amido）、羰基、酯、肽、二硫化物、矽烷、核苷、無鹼基核苷、聚醚、多胺、聚醯胺、肽、碳水化合物、脂質、聚烴、磷酸酯、磷醯胺酸、硫代磷酸鹽、烷基磷酸酯、馬來醯亞胺基連接子，或對光不安定性（photolabile）連接子。此項技術中之任何已知技術均可用於在不過度實驗下使靶向基團與奈米顆粒組成物之任何組分結合。

舉例而言，靶向藥劑可與 PEG 脂質之聚合部分連接，以將奈米顆粒導向活體內之標靶區域。本文中描述之奈米顆粒之標靶遞送增強包封治療性核酸之奈米顆粒的細胞攝取，從而具有更好療效。在某些態樣中，一些細胞穿透性肽可以各種靶向肽替換，從而向腫瘤位點進行標靶遞送。

在本發明之一較佳態樣中，諸如單股抗體（SCA）或單股抗原結合抗體、單株抗體、細胞黏附肽（諸如 RGD 肽及選擇素（Selectin））、細胞穿透性肽（CPP）（諸如 TAT、穿透素（Penetratin）及 (Arg)₉）、受體配體、靶向碳水化合物分子或凝集素（lectin）之靶向部分使奈米顆粒特異地針對標靶區域。參看 *J Pharm Sci.* 2006 年 9 月；95(9):1856-72 Cell adhesion molecules for targeted drug delivery，該文獻之內容係以引用之方式併入本文中。

較佳的靶向部分包括單股抗體（SCA）或抗體之單股可

變片段 (sFv)。SCA 含有可結合或識別靶向腫瘤細胞之特異分子的抗體結構域。除維持抗原結合位點之外，與 PEG 脂質結合之 SCA 尚可降低抗原性，並增加 SCA 在血流中之半衰期。

術語「單股抗體」(SCA)、「單股抗原結合分子或抗體」或「單股 Fv」(sFv) 可互換使用。單股抗體對抗原具有結合親和性。可用若干方式構造單股抗體 (SCA) 或單股 Fv，且已用若干方式構造單股抗體或單股 Fv。單股抗原結合蛋白之理論及產生的描述可獲自共同讓渡之美國專利申請案第 10/915,069 號及美國專利第 6,824,782 號中，各文獻之內容係以引用之方式併入本文中。

典型地，SCA 或 Fv 結構域可選自以文獻中之縮寫而為吾人已知的單株抗體，如：26-10、MOPC 315、741F8、520C9、McPC 603、D1.3、鼠類 phOx、人類 phOx、RFL3.8 sTCR、1A6、Se155-4、18-2-3、4-4-20、7A4-1、B6.2、CC49、3C2、2c、MA-15C5/K₁₂G₀、Ox 等（參看 Huston, J. S. 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883 (1988); Huston, J. S. 等人, SIM News 38(4) (Supp):11 (1988); McCartney, J. 等人, ICSU Short Reports 10:114 (1990); McCartney, J. E. 等人, unpublished results (1990); Nedelman, M. A. 等人, J. Nuclear Med. 32 (Supp.):1005 (1991); Huston, J. S. 等人, Molecular Design and Modeling: Concepts and Applications, B 部分, J. J. Langone 編, Methods in Enzymology 203:46-88 (1991); Huston, J. S. 等人, Advances in the Applications of

Monoclonal Antibodies in Clinical Oncology, Epenetos, A. A. (編), London, Chapman & Hall (1993); Bird, R. E. 等人, Science 242:423-426 (1988); Bedzyk, W. D. 等人, J. Biol. Chem. 265:18615-18620 (1990); Colcher, D. 等人, J. Nat. Cancer Inst 82:1191-1197 (1990); Gibbs, R. A. 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:4001-4004 (1991); Milenic, D. E. 等人, Cancer Research 51:6363-6371 (1991); Paritoliano, M. W. 等人, Biochemistry 30:10117-10125 (1991); Chaudhary, V. K. 等人, Nature 339:394-397 (1989); Chaudhary, V. K. 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1066-1070 (1990); Batra, J. K. 等人, Biochem. Biophys. Res. Comm. 171:1-6 (1990); Batra, J. K. 等人, J. Biol. Chem. 265:15198-15202 (1990); Chaudhary, V. K. 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:9491-9494 (1990); Batra, J. K. 等人, Mol. Cell. Biol. 11:2200-2205 (1991); Brinkmann, U. 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8616-8620 (1991); Seetharam, S. 等人, J. Biol. Chem. 266:17376-17381 (1991); Brinkmann, U. 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:3075-3079 (1992); Glockshuber, R. 等人, Biochemistry 29:1362-1367 (1990); Skerra, A. 等人, Bio/Technol. 9:273-278 (1991); Pack, P. 等人, Biochemistry 31:1579-1534 (1992); Clackson, T. 等人, Nature 352:624-628 (1991); Marks, J. D. 等人, J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991); Iverson, B. L. 等人, Science 249:659-662 (1990); Roberts, V. A. 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6654-

6658 (1990) ; Condra, J. H. 等人 , J. Biol. Chem. 265:2292-2295 (1990) ; Laroche, Y. 等人 , J. Biol. Chem. 266:16343-16349 (1991) ; Holvoet, P. 等人 , J. Biol. Chem. 266:19717-19724 (1991) ; Anand, N. N. 等人 , J. Biol. Chem. 266:21874-21879 (1991) ; Fuchs, P. 等人 , Biol Technol. 9:1369-1372 (1991) ; Breitling, F. 等人 Gene 104:104-153 (1991) ; Seehaus, T. 等人 , Gene 114:235-237 (1992) ; Takkinen, K. 等人 Protein Engng. 4:837-841 (1991) ; Dreher, M. L. 等人 , J. Immunol. Methods 139:197-205 (1991) ; Mottez, E. 等人 , Eur. J. Immunol. 21:467-471 (1991) ; Traunecker, A. 等人 , Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8646-8650 (1991) ; Traunecker, A. 等人 , EMBO J. 10:3655-3659 (1991) ; Hoo, W. F. S. 等人 , Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4759-4763 (1993))。上述出版物中之每一者均以引用之方式併入本文中。

靶向基團之非限制性列表包括血管內皮細胞生長因子、FGF2、體抑素 (somatostatin) 及體抑素類似物、轉鐵蛋白 (transferrin)、促黑素 (melanotropin)、ApoE 及 ApoE 肽、溫韋伯氏因子 (von Willebrand's Factor) 及溫韋伯氏因子肽、腺病毒纖維蛋白及腺病毒纖維蛋白肽、PD1 及 PD1 肽、EGF 及 EGF 肽、RGD 肽、葉酸鹽等。此項技術之技術人員所瞭解之其他視情況選用之靶向藥劑亦可用於本文中描述之奈米顆粒中。

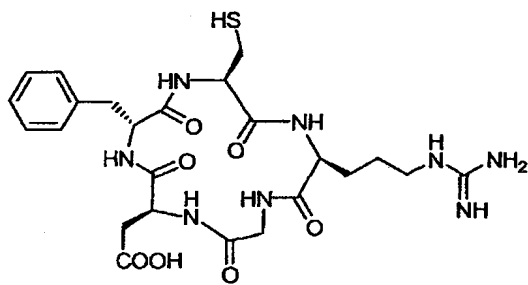
在一較佳具體實例中，適用於本文中描述之奈米顆粒

的靶向藥劑包括單股抗體 (SCA)、RGD 肽、選擇素、TAT、
 穿透素、(Arg)₉、葉酸等，且此等藥劑之一些較佳結構為：

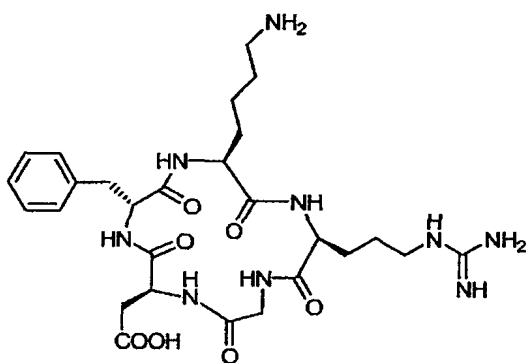
C-TAT : (SEQ ID NO:8) CYGRKKRRQRRR ;

C-(Arg)₉ : (SEQ ID NO:9) CRRRRRRRRRR ;

RGD 可為線性或環狀：



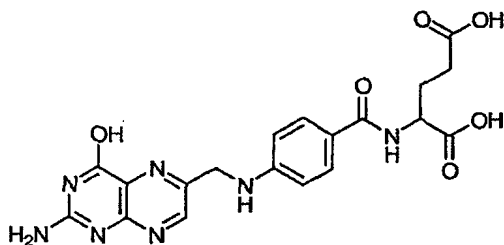
;



或

; 且

葉酸為如下之殘基：



。

Arg₉ 可包括用於結合之半胱胺酸，諸如
 CRRRRRRRRRR，且 TAT 可在肽末端處添加額外半胱胺酸，
 諸如 CYGRKKRRQRRRC (SEQ ID NO:10)。

出於本發明之目的，本說明書及圖中所使用之縮寫表示以下結構：

(i) C-diTAT (SEQ ID NO:11) = CYGRKKRRQRRRYGRKKRRQRRR-NH₂;

(ii) 線性 RGD (SEQ ID NO:12) = RGDC;

(iii) 環狀 RGD (SEQ ID NO:13) = c-RGDFC;

(iv) RGD-TAT (SEQ ID NO:14) = CYGRKKRRQRRRGGRGDS-NH₂; 及

(v) Arg₉ (SEQ ID NO:15)。

或者，靶向基團包括：糖及碳水化合物，諸如半乳糖、半乳糖胺，及 N-乙醯半乳糖胺；激素，諸如雌激素、睾固酮、助孕酮、葡糖皮質酮 (glucocortisone)、腎上腺素 (adrenaline)、胰島素、升糖素 (glucagon)、皮質醇 (Cortisol)、維生素 D、甲狀腺激素、視黃酸，及生長激素；生長因子，諸如 VEGF、EGF、NGF，及 PDGF；神經遞質 (neurotransmitter)，諸如 GABA、麩胺酸鹽、乙醯膽鹼；NOGO；三磷酸肌醇酯；腎上腺素 (epinephrine)；去甲腎上腺素 (norepinephrine)；氧化氮；肽；維生素，諸如葉酸鹽及吡哆醇 (pyridoxine)；在活體內或試管內可與受體相互作用的藥物、抗體及任何其他分子。

G. 製備式 (I) 之陽離子性脂質

一般而言，製備本文中描述之式 (I) 陽離子性脂質的方法包括使含胺膽固醇 (官能化膽固醇) 與 1H-吡啶-1-甲脒反應以提供胍部分。與膽固醇連接之胺可為一級胺及/或

二級胺，且 1H-吡啶-1-甲脒中之胺可未經取代或經取代。

製備本文中描述之膽固醇基陽離子性脂質的一個實例如圖 1 中所示。以 Boc 基團選擇性地保護 N-(3-胺基丙基)-1,3-丙二胺之末端一級胺，接著使雙-N-Boc-(3-胺基丙基)-1,3-丙二胺（化合物 2）之二級胺與環氧化物反應以製備含有親核基團 OH 之化合物 2。活化膽固醇碳酸酯（諸如氯甲酸膽固醇酯、膽固醇基 NHS 碳酸酯，或膽固醇基 PNP 碳酸酯）可與親核基團 OH 反應，以獲得化合物 3。藉由在酸性條件下之 Boc 部分去保護，製得含胺膽固醇（化合物 4）。化合物 4 之胺與 1H-吡啶-1-甲脒反應，以獲得含有胍部分之膽固醇基陽離子性脂質（化合物 5）。

在另一具體實例中，可藉由在鹼存在下，使用一般熟習此項技術者已知的偶合劑，諸如 1,3-二異丙基碳化二亞胺（DIPC）、二烷基碳化二亞胺、2-鹵基-1-烷基吡啶鹵化物、1-(3-二甲基胺丙基)-3-乙基碳化二亞胺（EDC）、丙烷膦酸環酐（PPACA）及二氯磷酸苯酯，使用標準有機合成技術，進行含胺化合物與膽固醇之連接。

或者，當膽固醇或含胺化合物以離去基團（諸如 NHS、PNP 或氯甲酸酯）活化時，該反應可在鹼存在下且在無偶合劑的情況下進行。

一般而言，本文中描述之式（I）陽離子性脂質較佳係藉由使經活化膽固醇與含胺親核試劑（諸如化合物 2）在鹼（諸如 DMAP 或 DIEA）存在下反應來製備。該反應較佳在諸如二氯甲烷、三氯甲烷、甲苯、DMF 或其混合物之惰性

溶劑中進行。亦較佳在約 -4°C 至約 70°C (例如 -4°C 至約 50°C) 之溫度下、在諸如 DMAP、DIEA、吡啶、三乙胺等鹼存在下進行反應。在一較佳具體實例中，反應係在約 0°C 至約 25°C 之溫度下或在 0°C 至約室溫下進行。

自含胺化合物 (諸如化合物 3) 去除保護基可用諸如三氟乙酸 (TFA)、HCl、硫酸等之強酸，或藉由催化氫化作用、自由基反應等進行。在一具體實例中，Boc 基團之去保護係用 HCl 二噁烷溶液進行。去保護反應可在約 -4°C 至約 50°C 之溫度下進行。該反應較佳係在約 0°C 至約 25°C 或至室溫之溫度下進行。在另一具體實例中，Boc 基團之去保護係在室溫下進行。

胺轉化成胍基之步驟係藉由在諸如二氯甲烷、三氯甲烷、DMF 或其混合物之惰性溶劑中使與膽固醇連接之胺 (例如化合物 4 之胺) 與 1H-吡唑-1-甲脒反應來進行。亦可使用其他試劑將胺轉化成胍部分，諸如 N-BOC-1H-吡唑-1-甲脒或 N,N'-二-(第三丁氧基羰基)硫脲及偶合試劑。該反應中可採用一般熟習此項技術者已知的偶合劑，諸如 1,3-二異丙基碳化二亞胺 (DIPC)、二烷基碳化二亞胺、2-鹵基-1-烷基吡啶鹵化物、1-(3-二甲基胺丙基)-3-乙基碳化二亞胺 (EDC)、丙烷膦酸環酐 (PPACA) 及二氯磷酸苯酯。反應較佳在約 -4°C 至約 50°C 之溫度下、在諸如 DMAP、DIEA、吡啶、三乙胺等鹼存在下進行。在一較佳具體實例中，反應係在約 0°C 至約 25°C 或至室溫之溫度下進行。

H. 奈米顆粒組成物/調配物

本文中描述之奈米顆粒組成物含有式 (I) 之陽離子性脂質、融合性脂質及 PEG 脂質。

在一較佳態樣中，奈米顆粒組成物包括膽固醇。

在本發明之另一態樣中，本文中描述之奈米顆粒組成物可含有此項技術中已知的其他陽離子性脂質。亦預期含有不同融合性脂質（非陽離子性脂質）之混合物及/或不同 PEG 脂質之混合物的奈米顆粒組成物。

在另一態樣中，本文中描述之奈米顆粒組成物含有以奈米顆粒組成物中所存在之總脂質（藥物載劑）計，介於約 10% 至約 99.9% 之莫耳比的本文中描述之式 (I) 陽離子性脂質。

陽離子性脂質組分可介於奈米顆粒組成物中所存在之總脂質的約 2% 至約 60%、約 5% 至約 50%、約 10% 至約 45%、約 15% 至約 25%，或約 30% 至約 40%。

在一特定具體實例中，陽離子性脂質係以奈米顆粒組成物中所存在之總脂質之約 15% 至約 25%（例如，15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24% 或 25%）的量存在。

在本文中描述之奈米顆粒組成物的另一態樣中，組成物含有以奈米顆粒組成物中所存在之總脂質計，約 20% 至約 85%、約 25% 至約 85%、約 60% 至約 80%（例如，65%、75%、78% 或 80%）之莫耳比的總融合性/非陽離子性脂質（包括膽固醇基及/或非膽固醇基融合性脂質）。在一特定具體實例中，總融合性/非陽離子性脂質為奈米顆粒組成物中所存

在之總脂質的約 80%。

在又一態樣中，非膽固醇基融合性/非陽離子性脂質，以奈米顆粒組成物中所存在之總脂質計，以約 25%至約 78% (25%、35%、47%、60%或 78%) 或約 60%至約 78%之莫耳比存在。在一特定具體實例中，非膽固醇基融合性/非陽離子性脂質為奈米顆粒組成物中所存在之總脂質的約 60%。

在又一態樣中，除了非膽固醇融合性脂質以外，奈米顆粒組成物以奈米顆粒組成物中所存在之總脂質計，包括莫耳比介於約 0%至約 60%、約 10%至約 60%，或約 20%至約 50% (例如，20%、30%、40%或 50%) 之膽固醇。在一特定具體實例中，膽固醇為奈米顆粒組成物中所存在之總脂質的約 20%。

在本發明之又一態樣中，奈米顆粒組成物中所含有之 PEG 脂質的莫耳比，以奈米顆粒組成物中所存在之總脂質計，介於約 0.5%至約 20%、約 1.5%至約 18%。在奈米顆粒組成物之一具體實例中，包括以總脂質計，約 2%至約 10% (例如，2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%或 10%) 之莫耳比的 PEG 脂質。舉例而言，總 PEG 脂質為奈米顆粒組成物中所存在之總脂質的約 2%。

I. 製備奈米顆粒

本文中描述之奈米顆粒可在不過度實驗的情況下藉由任何此項技術中已知之方法製備。舉例而言，奈米顆粒可藉由以下步驟製得：在第一貯器中提供核酸 (諸如寡核苷酸) 水溶液 (或不含核酸之水溶液，用於比較研究)；在第

二貯器中提供含有本文中描述之奈米顆粒組成物的有機脂質溶液；及混合水溶液與有機脂質溶液，以使有機脂質溶液與水溶液混合，從而產生包封核酸之奈米顆粒。該方法之細節係描述於美國專利公開案第 2004/0142025 號中，該公開案之內容係以引用之方式併入本文中。

或者，本文中描述之奈米顆粒可藉由使用此項技術已知之任何方法來製備，包括例如清潔劑透析法，或改進型逆相法（該方法在混合各組分期間利用有機溶劑提供單一相）。在清潔劑透析法中，核酸（例如 LNA、siRNA 等）與陽離子性脂質之清潔劑溶液接觸以形成經塗佈之核酸複合物。

在本發明之一具體實例中，陽離子性脂質與諸如寡核苷酸之核酸組合以產生約 1:1 至約 20:1、約 1:1 至約 12:1，且更佳為約 2:1 至約 6:1 的電荷比。或者，奈米顆粒組成物之氮磷比（N/P）介於約 2:1 至約 5:1（例如，2.5:1）。

在另一具體實例中，本文中描述之奈米顆粒可藉由使用雙泵系統製備。一般而言，該方法包括在第一貯器中提供含核酸之水溶液及在第二貯器中提供含有所描述之奈米顆粒組成物的脂質溶液。藉由使用雙泵系統混合兩種溶液以提供奈米顆粒。隨後，所得混合溶液以水性緩衝液稀釋，且所形成之奈米顆粒可藉由透析進行純化及/或分離。奈米顆粒可藉由濾過 0.22 μm 過濾器來進一步處理以進行滅菌。

該等含有核酸之奈米顆粒的直徑介於約 5 nm 至約 300 nm。奈米顆粒較佳具有小於約 150 nm（例如，約 50-150 nm）

之中數直徑，更佳為直徑小於約 100 nm，如使用 DLS 技術所量測。大多數奈米顆粒具有約 30 nm 至 100 nm（例如，59.5 nm、66 nm、68 nm、76 nm、80 nm、93 nm、96 nm）之中數直徑，較佳為約 60 nm 至約 95 nm。技術人員應瞭解，與 DLS 技術相比，使用其他此項技術中已知技術之量測（諸如 TEM）可能使中數直徑數值減少一半。本發明之奈米顆粒的尺寸實質上為均勻的，如多分散性（polydispersity）所示。

視情況，可藉由此項技術已知之任何方法進行奈米顆粒之分級（sizing）。可按照技術人員之要求控制尺寸。可進行分級，以達成所要尺寸範圍以及相對狹窄之奈米顆粒尺寸分布。有若干技術可用於將奈米顆粒分級為所要尺寸。參看例如美國專利第 4,737,323 號，該專利之內容係以引用之方式併入本文中。

本發明提供製備血清穩定性奈米顆粒以將核酸（例如 LNA 或 siRNA）包封在脂質多層結構中（例如雙層脂質（lipid bilayer））並防止降解的方法。本文中描述之奈米顆粒在水溶液中為穩定的。奈米顆粒中所包括之核酸受到保護而免受體液中存在之核酸酶的破壞。

此外，根據本發明製備之奈米顆粒在生理 pH 值下較佳為中性或帶正電。

使用本文中描述之奈米顆粒組成物製得的奈米顆粒或奈米顆粒複合物包括：(i) 式 (I) 之陽離子性脂質；(ii) 中性脂質/融合性脂質；(iii) PEG 脂質；及 (iv) 核酸，諸

如寡核苷酸。

在一具體實例中，奈米顆粒組成物包括下列之混合物：

式 (I) 之陽離子性脂質、二醯基磷脂醯乙醇胺、與磷脂醯乙醇胺結合之 PEG (PEG-PE)，及膽固醇；

式 (I) 之陽離子性脂質、二醯基磷脂醯膽鹼、與磷脂醯乙醇胺結合之 PEG (PEG-PE)，及膽固醇；

式 (I) 之陽離子性脂質、二醯基磷脂醯乙醇胺、二醯基磷脂醯膽鹼、與磷脂醯乙醇胺結合之 PEG (PEG-PE)，及膽固醇；

式 (I) 之陽離子性脂質、二醯基磷脂醯乙醇胺、與神經醯胺結合之 PEG (PEG-Cer)，及膽固醇；或

式 (I) 之陽離子性脂質、二醯基磷脂醯乙醇胺、與磷脂醯乙醇胺結合之 PEG (PEG-PE)、與神經醯胺結合之 PEG (PEG-Cer)，及膽固醇。

其他奈米顆粒組成物可藉由改質含有此項技術中已知之陽離子性脂質的組成物而製得。含有此項技術中已知之陽離子性脂質的奈米顆粒組成物可藉由以式 (I) 之陽離子性脂質替換此項技術中已知之陽離子性脂質及/或添加式 (I) 陽離子性脂質來進行改質。參看美國專利申請公開案第 2008/0020058 號之表 IV 中所描述的此項技術中已知之組成物，該公開案之內容係以引用之方式併入本文中。

在表 3 中闡述用於製備奈米顆粒之奈米顆粒組成物的非限制性列表。

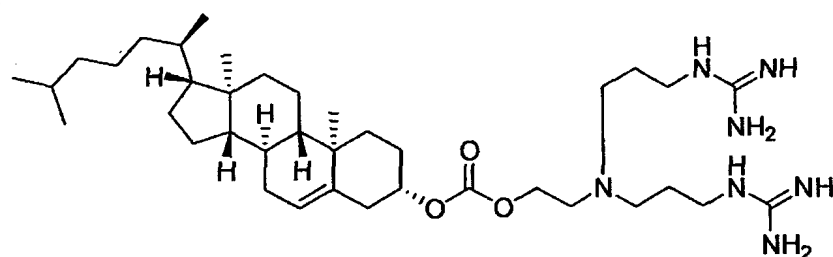
表 3

樣品號	奈米顆粒組成物	莫耳比	寡核苷酸
1	化合物 5 : DOPE:DSPC:Chol:DSPE-PEG	15:15:20:40:10	Oligo-1
2	化合物 5 : DOPE:DSPC:Chol:DSPE-PEG	15:5:20:50:10	Oligo-1
3	化合物 5 : DOPE:DSPC:Chol:DSPE-PEG	25:15:20:30:10	Oligo-1
4	化合物 5 : EPC:Chol:DSPE-PEG	20:47:30:3	Oligo-1
5	化合物 5 : DOPE:Chol:DSPE-PEG	17:60:20:3	Oligo-1
6	化合物 5 : DOPE:DSPE-PEG	20:78:2	Oligo-1
7	化合物 5 : DOPE:Chol:C16mPEG-神經醯胺	17:60:20:3	Oligo-2
8	化合物 5 : DOPE:Chol:DSPE-PEG:C16mPEG-神經醯胺	18:60:20:1:1	Oligo-2

在一具體實例中，奈米顆粒中陽離子性脂質（化合物 5）、DOPE、膽固醇、PEG-DSPE、C16mPEG-神經醯胺分別以奈米顆粒組成物（第 8 號樣品）中所存在之總脂質計，其莫耳比為約 18%:60%:20%:1%:1%。

在另一具體實例中，以奈米顆粒組成物（第 7 號樣品）中所存在之總脂質計，奈米顆粒含有約 17%:60%:20%:3%之莫耳比的陽離子性脂質（化合物 5）、DOPE、膽固醇及 C16mPEG-神經醯胺。

此等奈米顆粒組成物較佳含有具有如下結構之陽離子性脂質：



如本文中所使用之莫耳比係指相對於奈米顆粒組成物中所存在之總脂質的量。

J.治療方法

本文中描述之奈米顆粒可在治療中單獨使用或與其他療法組合使用，來預防、抑制、降低或治療與細胞或組織中標靶基因表現水準有關或響應於細胞或組織中標靶基因表現水準的任何病徵、疾病或病狀。該方法包括向有需要之哺乳動物投予本文中描述之奈米顆粒。

本發明之一態樣提供在活體內及/或試管內向哺乳動物之細胞中引入或遞送治療性核酸（諸如寡核苷酸）的方法。本發明之方法包括使細胞與本文中描述之奈米顆粒接觸。可作為適合之醫藥組成物的一部分在活體內進行遞送，或直接遞送至活體外環境中之細胞。

在另一態樣中，本發明適用於向哺乳動物引入寡核苷酸。本文中描述之奈米顆粒可投予哺乳動物，較佳為人類。

在又一態樣中，本發明較佳提供抑制或下調（或調節）哺乳動物細胞或組織中的基因表現的方法。基因表現之下調或抑制可在活體內、活體外及/或試管內進行。該等方法包括使人類細胞或組織與本文中描述之包封核酸的奈米顆粒接觸，或向有需要之哺乳動物投予奈米顆粒。一旦發生接觸後，當與不存在本文中描述之奈米顆粒的情況下所觀察之結果相比，基因表現或蛋白質含量在活體內、活體外或試管內被抑制或下調至少約 10%、較佳至少約 20%或 20%以上（例如，至少約 25%、30%、40%、50%、60%）時，

將認為成功抑制或下調了基因表現（諸如在 mRNA 方面）或蛋白質含量。

出於本發明之目的，「抑制」或「下調」應理解為意謂當與不存在本文中描述之奈米顆粒的情況下所觀察之結果相比時，標靶基因之表現，或者編碼一或多個蛋白質次單元之 RNA 或等效 RNA 的水準，或者一或多個蛋白質次單元（諸如 ErbB3、HIF-1a、存活素及 BCL2）之活性降低。

在一較佳具體實例中，標靶基因包括，例如但不限於致癌基因、促血管新生路徑基因、促細胞增殖路徑基因、病毒感染因子基因，及促發炎路徑基因。

較佳地，標靶基因之基因表現在癌細胞或組織中受抑制，例如在腦癌細胞、乳癌細胞、結腸直腸癌細胞、胃癌細胞、肺癌細胞、口腔癌細胞、胰腺癌細胞、前列腺癌細胞、皮膚癌細胞或子宮頸癌細胞中。癌細胞或組織可來自下列中之一或多者：實體腫瘤、淋巴瘤、小細胞肺癌、急性淋巴球性白血病（ALL）、胰腺癌、膠質母細胞瘤、卵巢癌、胃癌、乳癌、結腸直腸癌、前列腺癌、子宮頸癌、卵巢癌、腦腫瘤、KB 癌、肺癌、結腸癌、表皮癌等。

在一特定具體實例中，根據本文中描述之方法的奈米顆粒包括例如反義 bcl-2 寡核苷酸、反義 HIF-1a 寡核苷酸、反義存活素寡核苷酸及反義 ErbB3 寡核苷酸。

本文預期之療法使用包封在上述奈米顆粒中之核酸。在一具體實例中，含有 8 個或 8 個以上連續反義核苷酸之治療性核苷酸可在治療中使用。

在一特定治療中，可使用包括多種寡核苷酸（SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4，及 SEQ ID NO:5）之奈米顆粒。

或者，亦提供治療哺乳動物之方法。該等方法包括向有需要之患者投予有效量的含有本文中描述之奈米顆粒的醫藥組成物。方法之療效將取決於核酸對所治療之病狀的效力。本發明提供治療哺乳動物之各種醫學病狀的方法。該等方法包括向需要該治療之哺乳動物投予有效量的含有經包封治療性核酸之奈米顆粒。本文中描述之奈米顆粒尤其適用於治療例如但不限於癌症、發炎性疾病及自體免疫性疾病之疾病。

在一具體實例中，亦提供治療患有惡性腫瘤或癌症之患者的方法，該等方法包含向有需要之患者投予有效量的含有本文中描述之奈米顆粒的醫藥組成物。所治療之癌症可為下列中之一或多者：實體腫瘤、淋巴瘤、小細胞肺癌、急性淋巴球性白血病（ALL）、胰腺癌、膠質母細胞瘤、卵巢癌、胃癌、結腸直腸癌、前列腺癌、子宮頸癌、腦腫瘤、KB 癌、肺癌、結腸癌、表皮癌等。

奈米顆粒適用於藉由下調標靶基因之基因表現來治療哺乳動物之贅生性疾病、降低腫瘤負荷、預防贅生物轉移及預防腫瘤/贅生物生長之再發。舉例而言，奈米顆粒適用於治療轉移性疾病（例如，轉移至肝中之癌症）。

在又一態樣中，本發明提供在活體內或試管內抑制癌細胞生長或增殖的方法。該等方法包括使癌細胞與本文中

描述之奈米顆粒接觸。在一具體實例中，本發明提供抑制活體內或試管內癌細胞生長的方法，其中該等細胞表現 ErbB3 基因。癌細胞與自本文中描述之奈米顆粒所釋放之反義 ErbB3 寡核苷酸接觸。與自人類 ErbB3 基因表現之 mRNA 互補的反義股抑制癌細胞生長，並降低 ErbB3 基因在癌細胞（諸如淋巴瘤細胞或白血病細胞）中之表現。或者，本發明提供調節癌細胞之細胞凋亡的方法。該方法包括使細胞與本文中描述之奈米顆粒接觸。

在又一態樣中，亦提供在活體內或試管內增加癌細胞或組織對化學治療劑之敏感度的方法。在一特定態樣中，該等方法包括向癌細胞中引入包封在本文中描述之奈米顆粒中的寡核苷酸（例如，反義寡核苷酸，其包括 LNA），以降低癌細胞或組織中的基因（例如，存活素、HIF-1 α 或 ErbB3）表現，其中反義寡核苷酸與 mRNA 結合且降低基因表現。

在又一態樣中，提供在活體內或試管內殺死腫瘤細胞的方法。該等方法包括向腫瘤細胞中引入本文中描述之奈米顆粒以降低基因（諸如 ErbB3 基因）表現，並使腫瘤細胞與足以殺死一部分腫瘤細胞之量的至少一種化學治療劑接觸。因而，所殺死之腫瘤細胞部分可多於將會由相同量之化學治療劑在不存在本文中描述之奈米顆粒下所殺死之部分。

在本發明之另一態樣中，在採用本文中描述之奈米顆粒的方法中，可同時或依序地組合使用化學治療劑。可在

投予化學治療劑之前，或與化學治療劑同時，或在投予化學治療劑之後投予本文中描述之奈米顆粒。

或者，本文中描述之奈米顆粒組成物可用於向哺乳動物遞送較佳具有負電荷或中性電荷之醫藥學活性化合物。可向有需要之哺乳動物投予包封醫藥學活性化合物之奈米顆粒。醫藥學活性化合物包括小分子量分子。典型地，醫藥學活性化合物具有小於約 1,500 道爾頓（例如，小於 1,000 道爾頓）之分子量。

在另一具體實例中，本文中描述之化合物可用於遞送核酸、醫藥學活性劑，或其組合。

在又一具體實例中，與治療相關之奈米顆粒可含有一或多種治療性核酸（相同或不同，例如，含有 LNA 之相同或不同的寡核苷酸）與協同應用之醫藥學活性劑的混合物。

K. 奈米顆粒之醫藥組成物/調配物

包括本文中描述之奈米顆粒的醫藥組成物/調配物可連同一或多種生理學上可接受之載劑進行調配，該等載劑包含有助於將活性化合物加工成醫藥學上可使用之製劑的賦形劑及助劑。適當調配物係視所選擇之投藥途徑而定，例如是局部治療還是全身治療。

適合之形式部分上視使用方式或進入途徑而定，例如，經口、經皮或注射。對於製備適當調配物，此項技術已知之考慮因素包括但不限於毒性及將會阻礙組成物或調配物發揮其效用的任何不利因素。

本文中描述之奈米顆粒的醫藥組成物可經口、經肺、

局部（例如，經表皮、經皮、經眼及經黏膜，包括經陰道及直腸遞送），或非經腸（包括靜脈內、動脈內、皮下、腹膜內，或肌肉內注射，或輸液）投予。

在一較佳具體實例中，含有治療性寡核苷酸之奈米顆粒係經靜脈內（i.v.）、腹膜內（i.p.）投予，或快速注射（bolus injection）。在本發明之許多態樣中，非經腸途徑較佳。

為了進行注射（包括但不限於靜脈內注射、肌肉內注射及皮下注射），本發明之奈米顆粒可在水溶液中、較佳在諸如生理鹽水緩衝液或極性溶劑（包括但不限於吡咯啉酮或二甲亞砷）之生理相容性緩衝液中進行調配。

奈米顆粒亦可經調配供快速注射或持續輸液。注射調配物可以單位劑型呈現，例如於安瓿中或多劑量容器中。適用之組成物包括但不限於處於油性媒劑或水性媒劑中之懸浮液、溶液或乳液，且可含有其它佐劑，諸如懸浮劑、穩定劑及/或分散劑。用於非經腸投藥之醫藥組成物包括水溶性形式之水溶液。水性注射懸浮液可含有調節懸浮液黏度之物質，諸如羧甲基纖維素鈉、山梨醇，或聚葡萄糖。視情況，懸浮液亦可含有適合之穩定劑及/或增加奈米顆粒在溶液中之濃度的試劑。或者，奈米顆粒可呈粉末形式，供在使用前以適合之媒劑（例如，無菌無熱原水）復水。

對於經口投藥，本文中描述之奈米顆粒可藉由將奈米顆粒與此項技術中眾所周知的醫藥學上可接受之載劑組合來進行調配。該等載劑使本發明之奈米顆粒能夠調配成供患者經口攝取之錠劑、藥丸、口含劑、糖衣錠、膠囊、液

體、凝膠、糖漿、糊劑、漿液、溶液、懸浮液、供稀釋於患者之飲用水中的濃溶液及懸浮液；供稀釋於患者之食物中的預混物；及類似物。供經口使用之醫藥製劑可使用固體賦形劑製造，視情況研磨所得混合物，且（必要時在添加其他適合助劑之後）加工顆粒之混合物，即獲得錠劑或糖衣錠核。詳言之，適用之賦形劑為填充劑，諸如糖（包括乳糖、蔗糖、甘露醇，或山梨醇）；纖維素製劑，諸如玉米澱粉、小麥澱粉、大米澱粉及馬鈴薯澱粉；及其他材料，諸如明膠、黃耆樹膠（gum tragacanth）、甲基纖維素、羥丙基甲基纖維素、羧甲基纖維素鈉，及/或聚乙炔吡咯啉酮（PVP）。必要時，可添加崩解劑，諸如交聯聚乙炔吡咯啉酮、瓊脂，或海藻酸。亦可使用諸如海藻酸鈉之鹽。

對於吸入投藥，本發明之奈米顆粒可以氣溶膠噴霧形式，使用加壓包或噴霧器及適合之推進劑便利地遞送。

奈米顆粒亦可使用例如習知栓劑基質（諸如可可脂或其他甘油酯）調配成直腸用組成物，諸如栓劑或保留灌腸劑。

除先前描述之調配物以外，奈米顆粒亦可調配成積存式（depot）製劑。該等長效調配物可藉由植入（例如，皮下或肌肉內）或藉由肌肉內注射進行投藥。本發明奈米顆粒可用適合之聚合材料或疏水性材料（例如，在乳液中，用藥理學上可接受之油）、離子交換樹脂進行調配，或調配成微溶性衍生物（諸如但不限於微溶鹽），以使用於此種投藥途徑。

此外，可使用持續釋放系統遞送奈米顆粒，諸如含有奈米顆粒的固體疏水性聚合物之半滲透性基質。人們已確定各種持續釋放材料並為熟習此項技術者所熟知。

此外，抗氧化劑及懸浮劑可用於本文中描述之奈米顆粒的醫藥組成物中。

L.劑量

治療有效量之確定係完全處於熟習此項技術者之能力範圍內，尤其根據本文中之揭示內容。

對於本發明方法中使用之任何治療性核酸，均可根據試管內檢定初步估算治療有效量。接著，可調配該劑量以用於動物模型中，以便獲得包括有效劑量之循環濃度範圍。接著，可使用該資訊來更精確地確定患者之適用劑量。

所投予之醫藥組成物的量將視其中所包括之核酸的效能而定。一般而言，治療中所使用之含核酸奈米顆粒的量為在哺乳動物中有效達成所要治療結果的量。當然，各種奈米顆粒之劑量將依據其中（寡核苷酸，諸如反義 LNA 分子）所包封之核酸（或醫藥學活性劑）而稍加變化。此外，劑量當然可依據劑型及投藥途徑而變化。然而，一般而言，包封在本文中描述之奈米顆粒中的核酸的投予量可介於約 0.1 毫克/公斤/劑量至約 1 公克/公斤/劑量、較佳約 1 至約 500 毫克/公斤/劑量且更佳 1 至約 100 毫克/公斤/劑量（例如，約 2 至約 60 毫克/公斤/劑量）。療法中所投予之反義寡核苷酸的量可介於約 4 至約 25 毫克/公斤/劑量。舉例而言，治療方案包括投予介於約 0.1 毫克/公斤/週至約 1 公克/公斤

/週、較佳約 1 至約 500 毫克/公斤/週且更佳 1 至約 100 毫克/公斤/週（例如，約 2 至約 60 毫克/公斤/週）的反義寡核苷酸。

在一具體實例中，方案包括投予每週約 4 至約 18 毫克/公斤/劑量或每週約 4 至約 9.5 毫克/公斤/劑量的量的反義寡核苷酸。

在一特定具體實例中，治療方案包括在 6 週之週期中經 3 週每週約 4 至約 18 毫克/千克/劑量（例如，約 8 毫克/千克/劑量）之量的反義寡核苷酸。另一特定具體實例包括每週約 4 至約 9.5 毫克/公斤/劑量（例如，約 8 或 4.1 毫克/公斤/劑量）。

上述範圍為說明性的，且熟習此項技術者將根據臨床經驗及治療指徵（treatment indication）來確定最佳劑量。此外，個別醫師可鑒於患者之病狀選擇準確調配物、投藥途徑及劑量。此外，可藉由標準醫藥學程序在細胞培養物或實驗動物中使用此項技術中眾所周知之方法測定本文中描述之化合物的毒性及療效。

或者，在治療中可視核酸之效能使用約 0.1 毫克/公斤/天至約 140 毫克/公斤/天（0.1 至 100 毫克/公斤/天）之量。劑量單位形式一般含有介於約 1 毫克至約 500 毫克活性劑寡核苷酸。

在一具體實例中，本發明之治療包括以約 0.1 至約 50 毫克/公斤/劑量，諸如約 0.5 至約 45 毫克/公斤/劑量（例如，以單劑量療法或以多劑量療法）的量向哺乳動物投予包封

在本文中描述之奈米顆粒內的寡核苷酸。

或者，包封在本文中描述之奈米顆粒內的寡核苷酸的遞送包括使濃度為約 0.1 至約 1000 nM、較佳約 10 至約 1500 nM（例如，約 30 至約 1000 nM）之寡核苷酸在活體內、活體外或試管內與腫瘤細胞或組織接觸。

組成物可每日投予一次，或分成多個劑量，該等多個劑量可作為多週治療方案之一部分而提供。如一般熟習此項技術者所瞭解，精確劑量將取決於病狀之階段及嚴重程度、疾病之感受性（諸如腫瘤對核酸之感受性）及所治療之患者的個別特徵。

在本發明之投予奈米顆粒的所有態樣中，所提及之給藥量係基於寡核苷酸分子之量而非所投予之奈米顆粒的量。

思及治療將進行一或多天，直至獲得所要臨床結果。包封治療性核酸（或醫藥學活性劑）之奈米顆粒的準確投藥量、投藥頻率及投藥時段當然將視患者之性別、年齡及醫學病狀以及主治臨床醫師所確定之疾病嚴重程度而變化。

又一些態樣包括組合本文中描述之本發明奈米顆粒與其他抗癌療法，以獲得協同效益或相加效益。

實施例

下列實施例用於提供對本發明之進一步瞭解，而不欲以任何方式限制本發明之有效範疇。

在實施例中，所有合成反應均在乾燥氮氣或氬氣氛圍

下進行。N-(3-胺基丙基)-1,3-丙二胺、BOC-ON、環氧乙烷 (ethylene oxide)、LiOCl₄、膽固醇及 1H-吡啶-1-甲脒-HCl 係購自 Aldrich 公司。所有其他試劑及溶劑均未經進一步純化而使用。諸如靶向存活素基因之 Oligo-1、靶向 ErbB3 基因之 Oligo-2、及 Oligo-3 (混雜之 Oligo-2) 之含 LNA 寡核苷酸均為自製，且其序列描述於表 4 中。寡核苷酸中之核苷間鍵聯包括硫代磷酸酯，^mC 表示甲基化胞嘧啶，且大寫字母指示 LNA。

表 4

LNA 寡核苷酸	序列
Oligo-1 (SEQ ID NO:1)	5'- ^m CT ^m CAatccatgg ^m CAGc-3'
Oligo-2 (SEQ ID NO:2)	5'-TAGcctgtcactt ^m CT ^m C-3'
Oligo-3 (SEQ ID NO:3)	5'-TAGcttgcccat ^m CT ^m C-3'

下列縮寫用於所有實施例中，諸如：LNA (鎖核酸寡核苷酸)、BACC (碳酸 2-[N,N'-二(2-胍丙基)]胺乙基膽固醇酯)、2-(Boc-氧基亞胺基)-2-苯乙腈 (BOC-ON)、Chol (膽固醇)、DIEA (二異丙基乙胺)、DMAP (4-N,N-二甲胺基-吡啶)、DOPE (L- α -二油醯基磷脂醯乙醇胺；Avanti Polar Lipids, USA 或 NOF, Japan)、DLS (動態光散射；Dynamic Light Scattering)、DSPC (1,2-二硬脂醯基-sn-甘油基-3-磷酸膽鹼) (NOF, Japan)、DSPE-PEG (1,2-二硬脂醯基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-(聚乙二醇)2000 銨鹽或鈉鹽；Avanti Polar Lipids, USA 及 NOF, Japan)、KD (known down)、EPC (卵磷脂醯膽鹼；Avanti Polar Lipids,

USA) 及 C16mPEG-神經醯胺 (N-棕櫚醯基-鞘胺醇 (sphingosine) -1-[琥珀醯基(甲氧基聚乙二醇)2000; Avanti Polar Lipids, USA])。亦使用其他縮寫，諸如 FAM (6-羧基螢光素)、FBS (胎牛血清)、GAPDH (甘油醛-3-磷酸脫氫酶)、DMEM (杜貝氏改良伊格爾培養基; Dulbecco's Modified Eagle's Medium)、MEM (改良伊格爾培養基)、TEAA (四乙基乙酸銨)、TFA (三氟乙酸)、RT-qPCR (逆轉錄-定量聚合酶反應)。

除非另外說明，否則使用 Varian Mercury 300 NMR 光譜儀及氘化三氯甲烷溶劑，在 300 MHz 下獲得 ^1H NMR 光譜，且在 75.46 MHz 下獲得 ^{13}C NMR。化學位移 (δ) 報導為離四甲基矽烷 (TMS) 之低磁場的百萬分率 (ppm)。

實施例 1. 製備雙[3-(Boc-胺基)丙基]胺 (化合物 1)

N-(3-胺基丙基)-1,3-丙二胺 (1.45 g, 11.05 mmol) 於 50 mL 無水 THF 中之溶液在冰浴中劇烈攪拌 20 分鐘。經 2 小時向該溶液中緩慢添加於 20 mL 無水 THF 中之 BOC-ON (5.998 g, 24.36 mmol)。添加完畢之後，撤去冰浴，且在室溫下再攪拌反應混合物 45 分鐘。接著，在減壓下濃縮反應混合物。藉由管柱層析 (乙酸乙酯/甲醇=4:1 至 3:2, v/v) 獲得化合物 1，產率為 57%： ^1H NMR 5.18, 3.23-3.17, 2.67-2.63, 1.68-1.60, 1.44； ^{13}C NMR 155.9, 78.99, 47.51, 39.04, 29.87, 28.51。

實施例 2. 製備 2-[雙(3-N-Boc-胺基丙基)]胺基醇 (化合物 2)

向 100 mL 圓底燒瓶中添加雙[3-(Boc-胺基)丙基]胺(化合物 1, 2 g, 6 mmol)、 LiClO_4 (0.64 g, 6 mmol) 及 CH_3CN (24 mL)。溶解完畢之後，將燒瓶轉移至冰浴中，並添加 2 mL 環氧乙烷。接著，密封燒瓶，且在室溫下攪拌反應混合物 24 小時。濾出 LiClO_4 之後，在減壓下濃縮反應混合物，且以 100 mL 水稀釋。藉由以乙醚萃取 (30 mL $\times$ 3) 獲得粗產物。以鹽水洗滌合併之有機層，且經無水硫酸鈉乾燥。在真空中濃縮並藉由管柱層析 (乙酸乙酯/甲醇=4/1, v/v) 純化之後，獲得化合物 2，產率為 72%： ^1H NMR 5.05, 3.60-3.56, 3.20-2.14, 2.56-2.46, 1.68-1.60, 1.44； ^{13}C NMR 155.99, 79.13, 58.98, 56.00, 51.63, 38.93, 28.48, 27.38。

實施例 3. 製備碳酸 2-[雙(3-N-Boc-胺基丙基)]胺乙基膽固醇酯 (化合物 3)

向 250 mL 圓底燒瓶中添加 2-[雙(3-N-Boc-胺基丙基)]胺基醇 (化合物 2, 3.2 g, 8.5 mmol)、DMAP (3.13 g, 25.6 mmol) 及 100 mL 無水二氯甲烷。溶解完畢之後，在冰浴中將反應混合物冷卻至 0°C。添加氯甲酸膽固醇酯 (11.48 g, 25.6 mmol)，且在冰浴中攪拌反應混合物 4 小時，且接著在室溫下攪拌約 20 小時。其後，在真空中除去溶劑。將殘餘物溶解於 100 mL 無水乙醚中並過濾。在真空中濃縮濾液，且在藉由管柱層析 (乙酸乙酯) 純化之後回收白色固體狀化合物 3，產率為 72%。

實施例 4. 製備碳酸 2-[雙(3-胺基丙基)]胺乙基膽固醇酯二鹽酸鹽 (化合物 4)

在 100 mL 圓底燒瓶中，將碳酸 2-[雙(3-N-Boc-胺基丙基)]胺乙基膽固醇酯（化合物 3，5.0 g，6.34 mmol）溶解於 30 mL 無水二噁烷中。向該溶液添加 30 mL 2M HCl 二噁烷溶液，且在室溫下攪拌反應混合物約 1 小時。反應完畢之後，在真空中濃縮反應混合物以獲得淡黃色粉末狀殘餘物。殘餘物以乙醚洗滌 3 次，且真空乾燥獲得化合物 4，產率為 98%。

實施例 5. 製備碳酸 2-[雙(3-胍丙基)]胺乙基膽固醇酯（化合物 5）

在 250 mL 圓底燒瓶中置入碳酸 2-[雙(3-胺基丙基)]胺乙基膽固醇酯二鹽酸鹽（化合物 4，1.0 g，1.43 mmol）、1H-吡唑-1-甲脒鹽酸鹽（0.446 g，3.04 mmol）及 DIEA（1.00 g，7.7 mmol），且向該混合物添加 100 mL 無水二氯甲烷。在室溫下攪拌反應混合物 24 小時。反應完畢之後，添加 300 mL 無水乙醚以自溶液中沈澱出白色固體。藉由以乙醚及己烷交替洗滌該固體 3 次獲得白色固體狀化合物 5。產率為 68%。

實施例 6. 製備奈米顆粒

在此實施例中，製備包封各種核酸（諸如含 LNA 之寡核苷酸）之奈米顆粒組成物。舉例而言，在 10 mL 90%乙醇中，以莫耳比 18:60:20:1:1（總脂質 30 μ mol）混合化合物 5、DOPE、Chol、DSPE-PEG 及 C16mPEG-神經醯胺。將 LNA 寡核苷酸（0.4 μ mol）溶解於 10 mL 20 mM Tris 緩衝液中（pH 7.4 -7.6）。加熱至 37°C 之後，藉由雙注射器泵將兩種溶液混

合在一起，且隨後以 20 mL 20 mM Tris 緩衝液（300 mM NaCl，pH 7.4-7.6）稀釋經混合之溶液。混合物在 37°C 下保溫 30 分鐘，且在 10 mM PBS 緩衝液（138 mM NaCl，2.7 mM KCl，pH 7.4）中透析。藉由透析自混合物除去乙醇之後，獲得穩定顆粒。藉由離心作用濃縮奈米顆粒溶液。將奈米顆粒溶液轉移至 15 mL 離心過濾器裝置中（Amicon Ultra-15，Millipore，USA）。離心期間離心機速度為 3,000 rpm，且溫度為 4°C。在指定時間之後收集濃縮之懸浮液，且藉由濾過 0.22 μm 之注射過濾器（Millex-GV，Millipore，USA）來滅菌。獲得均質懸浮液。

在 Plus 90 型粒度分析器動態光散射儀（Brookhaven，New York）上，在 25°C 下，於介質水（Sigma）中量測奈米顆粒之直徑及多分散性。

藉由 UV-VIS（Agilent 8453）測定 LNA 寡核苷酸之包封效率。藉由掃描溶液獲得背景 UV-vis 光譜，該溶液為包含 PBS 緩衝鹽水（250 μL ）、甲醇（625 μL ）及三氯甲烷（250 μL ）之混合溶液。為了測定經包封之核酸濃度，向 PBS 緩衝鹽水奈米顆粒懸浮液（250 μL ）中添加甲醇（625 μL ）及三氯甲烷（250 μL ）。混合之後，獲得澄清溶液，且此溶液經超音波處理 2 分鐘，接著在 260 nm 處量測吸光度。根據等式（1）及等式（2）計算經包封之核酸濃度及負載效率：

$$C_{\text{en}} (\mu\text{g/mL}) = A_{260} \times \text{OD}_{260} \text{ 單位} (\mu\text{g/mL}) \times \text{稀釋因數} (\mu\text{L}/\mu\text{L}) \quad (1)$$

其中，稀釋因數係藉由檢定體積（ μL ）除以樣品儲備液體積（mL）而獲得。

$$\text{包封效率 (\%)} = [C_{\text{en}} / C_{\text{initial}}] \times 100 \quad (2)$$

其中， C_{en} 為純化之後包封在奈米顆粒懸浮液中的核酸（例如，LNA 寡核苷酸）濃度，而 C_{initial} 為形成奈米顆粒懸浮液之前的初始核酸（LNA 寡核苷酸）濃度。

各種奈米顆粒組成物之粒度、多分散性及核酸（LNA 寡核苷酸）負載效率係匯總於表 5 及表 6 中。可見，在奈米顆粒之尺寸低於 100 nm 且多分散性較低下，此等奈米顆粒組成物達到了較高核酸負載效率（79%-87%）。

表 5

樣品號	奈米顆粒組成物	莫耳比	寡核苷酸	粒度 (nm)	多分散性	寡核苷酸負載效率
1	化合物 5: DOPE:DSPC:Chol:PEG-DSPE	15:15:20:40:10	Oligo-1	68	0.178	85
2	化合物 5: DOPE:DSPC:Chol:PEG-DSPE	15:5:20:50:10	Oligo-1	95	0.199	86
3	化合物 5: DOPE:DSPC:Chol:PEG-DSPE	25:15:20:30:10	Oligo-1	96	0.19	79
4	化合物 5: EPC:Chol:PEG-DSPE	20:47:30:3	Oligo-1	59.5	0.149	85
5	化合物 5: DOPE:Chol:PEG-DSPE	17:60:20:3	Oligo-1	76	0.135	80
6	化合物 5: DOPE:PEG-DSPE	20:78:2	Oligo-1	93	0.036	83
7	化合物 5: DOPE:Chol:C16mPEG-神經醯胺	17:60:20:3	Oligo-2	66	0.155	87
8	化合物 5: DOPE:Chol:PEG-DSPE:C16mPEG-神經醯胺	18:60:20:1:1	Oligo-2	80	0.129	82

表 6

樣品號	奈米顆粒組成物	莫耳比	寡核苷酸	粒度 (nm)	Zeta 電位 (mV)	多分散性	寡核苷酸濃度 (mg/mL)
NP1	化合物 5: DOPE:Chol:PEG-DSPE:C16mPEG-神經醯胺	18:60:20:1:1	Oligo-2	79.9	+24	0.125	1.6
NP2	化合物 5: DOPE:Chol:PEG-DSPE:C16mPEG-神經醯胺	18:60:20:1:1	混雜 Oligo-2 (=Oligo-3)	84.6	+21	0.092	1.57
NP3	化合物 5: DOPE:Chol:PEG-DSPE:C16mPEG-神經醯胺	18:60:20:1:1	FAM-Oligo-2	85.6	+22	0.073	1.75
NP4	化合物 5: DOPE:Chol:PEG-DSPE:C16mPEG-神經醯胺	18:60:20:1:1	無	77.9	+38	0.243	0

實施例 7. 奈米顆粒穩定性

奈米顆粒穩定性定義為在 4°C 下，在 PBS 緩衝液中，其隨時間保持結構完整性的能力。奈米顆粒之膠體穩定性係藉由監控平均直徑隨時間之變化來評估。將由表 6 中第 NP1 號樣品製得的奈米顆粒分散在 10 mM PBS 緩衝液 (138 mM NaCl, 2.7 mM KCl, pH 7.4) 中，且在 4°C 下儲存。在指定時間點處，取約 20-50 μ L 奈米顆粒懸浮液，且以純水稀釋至達 2 mL。在 25°C 下藉由 DLS 量測奈米顆粒之尺寸。結果顯示，當觀察經 120 天時，第 8 號樣品之奈米顆粒的粒度幾乎無變化。結果如圖 2 中所示。結果顯示，含有本文中描述之陽離子性脂質 (化合物 5) 作為脂質載劑之組分的奈米顆粒，在 4°C 下經實質上較長之時段極為穩定。第 NP101

號、第 NP102 號、第 NP103 號及第 NP104 號（表 7）樣品之奈米顆粒亦顯示類似穩定性，如圖 2 所示。

表 7

樣品號	奈米顆粒組成物	莫耳比	寡核苷酸	粒度 (nm)	多分散性	寡核苷酸濃度 (mg/mL)
NP101	化合物 5: DOPE:Chol:C16 mPEG-神經醯胺	17:60:20:3	Oligo-2	66.5	0.155	103.2
NP102	化合物 5: DOGP:Chol:C16 mPEG-神經醯胺	17:60:20:3	Oligo-2	64.2	0.183	104.3
NP103	化合物 5: DOPE:Chol:PEG- DSPE:C16mPEG- 神經醯胺	18:60:20:1:1	Oligo-2	77.7	0.103	105.5
NP103	化合物 5: DOGP:Chol:PEG- DSPE:C16mPEG- 神經醯胺	18:60:20:1:1	Oligo-2	72.2	0.98	104.2

實施例 8. 試管內奈米顆粒細胞攝取

在人類前列腺癌細胞（15PC3 細胞系）中，評估包封在本文中描述之奈米顆粒內的核酸（LNA 寡核苷酸 Oligo-2）之細胞攝取效率。使用實施例 6 中描述之方法製得第 NP3 號樣品之奈米顆粒。以 FAM 標記 LNA 寡核苷酸（Oligo-2）供進行螢光顯微術研究。

在 15PC3 細胞系中評估奈米顆粒。該等細胞係維持在完全培養基（DMEM，補充有 10% FBS）中。在 37°C 下，培育各孔中含有 2.5×10^5 個細胞的 12 孔培養盤隔夜。以 Opti-MEM 洗滌細胞 1 次，且向各孔添加 400 mL Opti-MEM。接著，以包封核酸（經 FAM 修飾之 Oligo-2）

的第 NP3 號樣品之奈米顆粒溶液 (200 nM)，或以不存在奈米顆粒之自由核酸 (經 FAM 修飾之裸 Oligo-2) 溶液作為對照來處理該等細胞。在 37°C 下，培育細胞 24 小時。以 PBS 洗滌細胞 5 次，且接著以每孔 300 μ L Hoechst 溶液染色 30 分鐘，接著以 PBS 洗滌 5 次。在 -20°C 下，以預冷卻 (-20°C) 之 70% EtOH 固定該等細胞 20 分鐘。在螢光顯微鏡下觀察細胞，且影像示於圖 3 中。

在相同條件下以自由核酸處理之細胞並未展示任何核酸細胞攝取，如圖 3A 所示。以奈米顆粒培育之細胞具有顯著的核酸細胞核積聚 (圖 3B)。此外，以奈米顆粒處理之細胞顯示核酸較大之彌散性 (diffuse) 細胞質定位。亦已觀察到核酸之數個額外細胞質間斷 (punctuate) 積聚圖案，此對於細胞內攝小泡 (endocytic vesicle) 而言係典型狀況，如圖 3B 所示。以第 NP105 號 (表 8) 樣品之奈米顆粒處理的細胞亦顯示類似於圖 3 中所示之核酸細胞攝取。

表 8.

樣品號	奈米顆粒組成物	莫耳比	寡核苷酸	粒度 (nm)	多分散性	寡核苷酸濃度 (mg/mL)
NP105	化合物 5: DOPE:Chol:PEG-DSPE	17:60:20:3	FAM-Oligo-2	78.3	0.12	132

結果顯示，包封核酸之奈米顆粒在無轉染劑輔助下穿越細胞膜，且在細胞核及細胞質中積聚。本文中描述之奈米顆粒提供向細胞 (較佳為腫瘤細胞) 內部遞送核酸的方法。

實施例 9. 奈米顆粒對人類表皮癌細胞中 mRNA 下調之試管內效力

在人類表皮癌細胞（A431 細胞系）中評估第 NP5 號樣品之效力。A431 細胞過度表現表皮生長因子受體（EGFR）。以包封反義 ErbB3 寡核苷酸之奈米顆粒（樣品 NP5）處理該等細胞。亦以包封具有混雜序列之寡核苷酸的奈米顆粒（第 NP6 號樣品），或以不含寡核苷酸（empty）之安慰劑奈米顆粒（第 NP7 號樣品）作為對照來處理細胞。使用實施例 6 中所描述之方法製備奈米顆粒（表 9）。

表 9

樣品號	奈米顆粒組成物	莫耳比	寡核苷酸	粒度 (nm)	多分散性	寡核苷酸濃度 ($\mu\text{g/mL}$)
NP5	化合物 5: DOPE:Chol:PEG-DSPE:C16mPEG-神經醯胺	18:60:20:1:1	Oligo-2	80	0.129	129.5
NP6	化合物 5: DOPE:Chol:PEG-DSPE:C16mPEG-神經醯胺	18:60:20:1:1	Oligo-3	85.5	0.197	139.1
NP7	化合物 5: OPE:Chol:PEG-DSPE:C16mPEG-神經醯胺	18:60:20:1:1	無	77.9	0.243	0

該等細胞係維持在完全培養基（F-12K 或 DMEM，補充有 10% FBS）中。在 37°C 下，培育各孔中含有 2.5×10^5 個細胞的 12 孔培養盤隔夜。以 Opti-MEM[®] 洗滌細胞 1 次，且向各孔添加 400 μL Opti-MEM[®]。接著，以第 NP5 號、第 NP6 號或第 NP7 號樣品之奈米顆粒處理該等細胞。培育細胞 4

小時，接著每孔添加 600 μ L 培養基，且培育 24 小時。處理 24 小時之後，藉由 RT-qPCR 量測標靶基因（諸如人類 ErbB3）及管家基因（housekeeping gene）（諸如 GAPDH）之細胞內 mRNA 含量。將 ErbB3 mRNA 基因之表現水準標準化至 GAPDH 之表現水準。

對於 mRNA 下調研究，藉由使用 RNAqueous Kit[®]（Ambion）按照製造商說明書製備總 RNA。藉由 OD_{260 nm} 使用 Nanodrop 測定 RNA 濃度。所有試劑均購自 Applied Biosystems 公司：大容量 cDNA 逆轉錄套組（High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit[®]；目錄號 4368813）、20 $\times$ PCR 主混合物（master mix）（目錄號 4304437），及人類 GAPDH 之 TaqMan[®] 基因表現檢定套組（TaqMan[®] Gene Expression Assays kit；目錄號 0612177）。

包封反義 ErbB3 寡核苷酸之奈米顆粒（第 NP5 號樣品）在人類表皮癌細胞中顯示劑量依賴性 mRNA 調降（knockdown）且 IC₅₀ 低至 100 nM（圖 4A）。此 mRNA 調降與 ErbB3 蛋白質含量相關（圖 4B）。ErbB3 表現之下調藉由以西方墨點法（Western Blot method）量測細胞之 ErbB3 蛋白質含量來確認。抗 ErbB3 抗體係購自 Santa Cruz 公司（SC285）並應用。包封混雜寡核苷酸之奈米顆粒（第 NP6 號樣品）並不抑制 ErbB3 表現。

結果顯示，包封反義寡核苷酸之奈米顆粒選擇性地且以劑量依賴性方式抑制標靶基因表現。本文中描述之奈米顆粒提供在無轉染劑存在下抑制標靶基因表現的方法。

實施例 10. 奈米顆粒對人類胃癌細胞中 mRNA 下調之試管內效力

在人類胃癌細胞（N87 細胞系）中評估本文中描述之奈米顆粒的效力。用下列中之一者處理該等細胞：包封反義 ErbB3 寡核苷酸之奈米顆粒（第 NP5 號樣品）；包封具有混雜序列之寡核苷酸的奈米顆粒（第 NP6 號樣品）；或不含寡核苷酸之安慰劑奈米顆粒（第 NP7 號樣品）。藉由實施例 9 中所描述之程序量測各奈米顆粒對 ErbB3 表現下調之試管內效力。

包封反義寡核苷酸之奈米顆粒在人類胃癌細胞中劑量依賴性地抑制標靶基因或蛋白質表現。抑制具有序列特異性。混雜寡核苷酸並不抑制標靶 ErbB3 基因或蛋白質表現。結果示於圖 5 中。

實施例 11. 奈米顆粒對人類肺癌細胞中 mRNA 下調之試管內效力

亦在人類肺癌細胞（A549 細胞系）中評估本文中描述之奈米顆粒的效力。用下列中之一者處理該等細胞：包封反義 ErbB3 寡核苷酸之奈米顆粒（第 NP5 號樣品）；包封具有混雜序列之寡核苷酸的奈米顆粒（第 NP6 號樣品）；或不含寡核苷酸之安慰劑奈米顆粒（第 NP7 號樣品）。藉由實施例 9 中所描述之程序量測各奈米顆粒對 ErbB3 表現下調之試管內效力。

包封反義寡核苷酸之奈米顆粒在人類肺癌細胞中劑量依賴性地抑制標靶基因或蛋白質表現。結果顯示，在該等

癌細胞中 IC_{50} 為約 200 nM。抑制具有序列特異性。混雜寡核苷酸並不抑制標靶 ErbB3 基因或蛋白質表現。結果示於圖 6 中。

實施例 12. 奈米顆粒對人類前列腺癌細胞中 mRNA 下調之試管內效力

亦在人類前列腺癌細胞（15PC3 細胞系）中評估本文中描述之奈米顆粒的效力。用下列中之一者處理該等細胞：包封反義 ErbB3 寡核苷酸之奈米顆粒（第 NP5 號樣品）；包封具有混雜序列之寡核苷酸的奈米顆粒（第 NP6 號樣品）；或不含寡核苷酸之安慰劑奈米顆粒（第 NP7 號樣品）。藉由實施例 9 中所描述之程序量測各奈米顆粒對 ErbB3 表現下調之試管內效力。

包封反義寡核苷酸之奈米顆粒在人類前列腺癌細胞中劑量依賴性地抑制標靶基因或蛋白質表現， IC_{50} 為約 100 nM。抑制具有序列特異性。混雜寡核苷酸並不抑制標靶 ErbB3 基因或蛋白質表現。結果示於圖 7 中。

實施例 13. 奈米顆粒對人類乳癌細胞中 mRNA 下調之試管內效力

亦在人類乳癌細胞（MCF7 細胞系）中評估本文中描述之奈米顆粒的效力。用下列中之一者處理該等細胞：包封反義 ErbB3 寡核苷酸之奈米顆粒（第 NP5 號樣品）；包封具有混雜序列之寡核苷酸的奈米顆粒（第 NP6 號樣品）；或不含寡核苷酸之安慰劑奈米顆粒（第 NP7 號樣品）。藉由實施例 9 中所描述之程序量測各奈米顆粒對 ErbB3 表現下調之

試管內效力。

包封反義寡核苷酸之奈米顆粒在人類乳癌細胞中劑量依賴性地抑制標靶基因或蛋白質表現。結果顯示，在該等癌細胞中 IC_{50} 約為 150 nM。抑制具有序列特異性。混雜寡核苷酸並不抑制標靶 ErbB3 基因或蛋白質表現。結果示於圖 8 中。

實施例 14. 奈米顆粒對人類 KB 癌細胞中 mRNA 下調之試管內效力

亦在人類 KB 癌細胞（KB 細胞系）中評估本文中描述之奈米顆粒的效力。用下列中之一者處理該等細胞：包封反義 ErbB3 寡核苷酸之奈米顆粒（第 NP5 號樣品）；包封具有混雜序列之寡核苷酸的奈米顆粒（第 NP6 號樣品）；或不含寡核苷酸之安慰劑奈米顆粒（第 NP7 號樣品）。藉由實施例 9 中所描述之程序量測各奈米顆粒對 ErbB3 表現下調之試管內效力。

包封反義寡核苷酸之奈米顆粒在人類 KB 癌細胞中劑量依賴性地抑制標靶基因或蛋白質表現。抑制具有序列特異性。混雜寡核苷酸並不抑制標靶 ErbB3 基因或蛋白質表現。結果示於圖 9 中。

實施例 15. 奈米顆粒對人類前列腺癌細胞中 mRNA 下調之試管內效力

亦在另一類型之人類前列腺癌細胞（DU145 細胞系）中評估本文中描述之奈米顆粒的效力。用下列各者處理該等細胞：包封反義 ErbB3 寡核苷酸之奈米顆粒（第 NP5 號

樣品)；包封具有混雜序列之寡核苷酸的奈米顆粒(第 NP6 號樣品)；或不含寡核苷酸之安慰劑奈米顆粒(第 NP7 號樣品)。藉由實施例 9 中所描述之程序量測各奈米顆粒對 ErbB3 表現下調之試管內效力。

包封反義寡核苷酸之奈米顆粒在人類前列腺癌細胞中劑量依賴性地抑制標靶基因或蛋白質表現。抑制具有序列特異性。混雜寡核苷酸並不抑制標靶 ErbB3 基因或蛋白質表現。結果示於圖 10 中。

本文中描述之奈米顆粒向各種癌細胞中遞送核酸，諸如人類肺癌細胞、前列腺癌細胞、乳癌細胞及 KB 癌細胞。如圖 6 至圖 10 中所描述，該等癌細胞系中之 mRNA KD 效力介於約 50 nM 至約 400 nM 包封在奈米顆粒中之反義寡核苷酸，順序為 15PC3>MCF7~A431~N87>A549>DU145~KB。mRNA KD 與各個測試癌細胞中之蛋白質 KD 有關。

實施例 16. 奈米顆粒對人類前列腺癌異種移植小鼠模型之腫瘤及肝中 mRNA 下調的活體內效力

在人類前列腺癌異種移植小鼠中評估本文中描述之奈米顆粒的活體內效力。藉由在裸小鼠中向右側脅腹(right auxiliary flank)皮下注射 5×10^6 個細胞/小鼠而建立 15PC3 人類前列腺腫瘤。當腫瘤達到 100 mm^3 之平均體積時，將小鼠隨機分組，每組 5 隻小鼠。各組之小鼠以包封反義 ErbB3 寡核苷酸之奈米顆粒(樣品 NP5)或相應裸寡核苷酸(Oligo-2)治療。奈米顆粒係以 15 毫克/公斤/劑量、5 毫克/公斤/劑量、1 毫克/公斤/劑量，或 0.5 毫克/公斤/劑量靜脈

內 (i.v.) 給藥，q3d×4 (每 3 天一次，共 4 次)，歷時 12 天。給藥量係基於奈米顆粒中寡核苷酸之量。裸寡核苷酸係以 30 毫克/公斤/劑量腹膜內 (i.p.) 給藥或者以 25 毫克/公斤/劑量或 45 毫克/公斤/劑量靜脈內給藥，q3d×4，歷時 12 天。在最後一次給藥之後 24 小時，處死小鼠。收集小鼠之血漿樣品，且在 -20℃ 下儲存。亦收集小鼠之腫瘤樣品及肝樣品。分析該等樣品之 mRNA KD。

在以奈米顆粒治療之小鼠的腫瘤樣品中，治療可劑量依賴性地抑制 ErbB3 mRNA 表現。在 15 毫克/公斤之劑量下 (G2)，ErbB3 表現被抑制了約 51% 以上。在以裸寡核苷酸治療之動物的腫瘤樣品中，在 45 毫克/公斤 oligo-2 之劑量下 (G8)，ErbB3 mRNA 表現僅被抑制了約 37%。結果示於圖 11 中。

在肝樣品中，與裸寡核苷酸相比，奈米顆粒在低劑量下在下調標靶基因表現方面極為有效。奈米顆粒在 15 毫克/公斤/劑量下 (G2) 顯示約 93% KD 活性。奈米顆粒在 1 毫克/公斤/劑量下 (G4) 亦顯示約 87% KD 活性，其與 25 毫克/公斤/劑量之 Oligo-2 (G7) 同樣有效。結果示於圖 12 中。

結果顯示，與裸 LNA 寡核苷酸相比，包封反義寡核苷酸之奈米顆粒顯著且有效地抑制了腫瘤及肝中之標靶基因表現。

實施例 17. 奈米顆粒對人類結腸癌異種移植小鼠模型之 mRNA 下調的活體內效力

在人類結腸癌異種移植小鼠中評估本文中描述之奈米

顆粒的活體內效力。經由腫瘤內注射，向患有人類 DLD-1 腫瘤之小鼠投予本文中描述之奈米顆粒（樣品 NP5）， $q3d \times 4$ ，歷時 12 天。亦向小鼠投予裸寡核苷酸（Oligo-2）、混雜寡核苷酸（Oligo-3）及含有混雜寡核苷酸之奈米顆粒（樣品 NP6）。收集各測試組之小鼠的腫瘤樣品，並使用 qRT-PCR 分析 mRNA 下調。

與裸反義寡核苷酸或含有混雜寡核苷酸之奈米顆粒相比，在以含有反義 ErbB3 寡核苷酸之奈米顆粒治療的小鼠中，該治療顯著抑制 ErbB3 mRNA 表現。結果示於圖 13 中。結果顯示，與裸 LNA 寡核苷酸相比，包封反義寡核苷酸之奈米顆粒顯著且有效地抑制了腫瘤中之標靶基因表現。

實施例 18. 奈米顆粒對具有肝轉移之人類癌症異種移植小鼠模型中 mRNA 下調的活體內效力

在具有肝轉移之人類癌症異種移植小鼠中評估本文中描述之奈米顆粒的活體內效力。脾內注射 A549 癌細胞，接著進行脾切除術以建立轉移性肝病。脾切除術後 2 天，以 0.5 毫克/公斤/劑量向各組小鼠靜脈內投予包封反義 ErbB3 寡核苷酸之奈米顆粒（樣品 NP5）或包封混雜寡核苷酸之奈米顆粒（樣品 NP6）， $q3d \times 10$ （每 3 天一次，共 10 次）。以 35 毫克/公斤/劑量靜脈內投予裸反義 ErbB3 寡核苷酸（Oligo-2）， $q3d \times 4$ 。觀測動物之存活時間。

與對照組動物之存活時間約 73 天相比，以含有反義 ErbB3 寡核苷酸之奈米顆粒治療時的存活時間有所增加（約 85 天）。結果示於圖 14 中。總體觀察表明，動物之死亡係

歸因於肝轉移。具有肝轉移之代表性動物的影像示於圖 15 中。

結果顯示，與裸 LNA 寡核苷酸相比，包封反義寡核苷酸之奈米顆粒改善了轉移性癌症（例如，肝中之轉移性癌）。

【圖式簡單說明】

圖 1 示意性地說明製備碳酸 2-[雙(3-胍丙基)]胺乙基膽固醇酯（化合物 5）之反應流程，如實施例 1 至實施例 5 中所描述。

圖 2 描述奈米顆粒的穩定性，如實施例 7 中所描述。

圖 3 描述包封核酸之奈米顆粒的細胞攝取及細胞內分配，如實施例 8 中所描述。

圖 4 描述奈米顆粒對人類表皮癌細胞中之 ErbB3 表現的試管內效力，如實施例 9 中所描述。

圖 5 描述奈米顆粒對人類胃癌細胞中之 ErbB3 表現的試管內效力，如實施例 10 中所描述。

圖 6 描述奈米顆粒對人類肺癌細胞中之 ErbB3 表現的試管內效力，如實施例 11 中所描述。

圖 7 描述奈米顆粒對人類前列腺癌細胞中之 ErbB3 表現的試管內效力，如實施例 12 中所描述。

圖 8 描述奈米顆粒對人類乳癌細胞中之 ErbB3 表現的試管內效力，如實施例 13 中所描述。

圖 9 描述奈米顆粒對人類 KB 癌細胞中之 ErbB3 表現的試管內效力，如實施例 14 中所描述。

圖 10 描述奈米顆粒對人類前列腺癌細胞中之 ErbB3 表

現的試管內效力，如實施例 15 中所描述。

圖 11 描述奈米顆粒對人類前列腺癌異種移植小鼠之腫瘤中的 ErbB3 表現的活體內效力，如實施例 16 中所描述。

圖 12 描述奈米顆粒對人類前列腺癌異種移植小鼠之肝中的 ErbB3 表現的活體內效力，如實施例 16 中所描述。

圖 13 描述奈米顆粒對人類結腸癌異種移植小鼠之腫瘤中的 ErbB3 表現的活體內效力，如實施例 17 中所描述。

圖 14 描述奈米顆粒對具有肝轉移之人類癌症異種移植小鼠中的 ErbB3 表現的活體內效力，如實施例 18 中所描述。

【主要元件符號說明】

無

序列表

	<110> 安龍製藥公司	
5	<120> 用於核酸遞送系統的奈米顆粒組成物	
	<130> 213.1306-PCT	
10	<150> 61/085,289	
	<151> 2008-07-31	
	<160> 15	
15	<170> PatentIn 3.3 版	
	<210> 1	
	<211> 16	
	<212> DNA	
20	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列之敘述： 合成的寡核苷酸	
25	<400> 1	
	ctcaatccat ggcagc	16
30	<210> 2	
	<211> 16	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
35	<223> 人工序列之敘述： 合成的寡核苷酸	
40	<400> 2	
	tagcctgtca cttctc	16
45	<210> 3	
	<211> 17	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
50	<223> 人工序列之敘述： 合成的寡核苷酸	
	<400> 3	
	tagcttgtcc cattctc	17
55	<210> 4	

<211> 19
 <212> DNA
 <213> 人工序列

5 <220>
 <223> 人工序列之敘述：
 合成的寡核苷酸

10 <400> 4
 tctcccagcg tgcgccat 19

15 <210> 5
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> 人工序列

20 <220>
 <223> 人工序列之敘述：
 合成的寡核苷酸

<400> 5
 tggcaagcat cctgta 16

25 <210> 6
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列

30 <220>
 <223> 組合的 DNA/RNA 分子之敘述：
 合成的寡核苷酸

35 <220>
 <221> misc_特性
 <222> (1) (19)
 <223> RNA

40 <400> 6
 gcaugcggcc ucuguuugat t 21

45 <210> 7
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列

50 <220>
 <223> 組合的 DNA/RNA 分子之敘述：
 合成的寡核苷酸

55 <220>
 <221> misc_特性
 <222> (1) (19)

	<223> RNA	
5	<400> 7 ucaaacagag gccgcaugct t	21
10	<210> 8 <211> 12 <212> PRT <213> 人工序列	
15	<220> <223> 人工序列之敘述： 合成的胜肽	
20	<400> 8 Cys Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg 1 5 10	
25	<210> 9 <211> 10 <212> PRT <213> 人工序列	
30	<220> <223> 人工序列之敘述： 合成的胜肽	
35	<400> 9 Cys Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg 1 5 10	
40	<210> 10 <211> 13 <212> PRT <213> 人工序列	
45	<220> <223> 人工序列之敘述： 合成的胜肽	
50	<400> 10 Cys Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Cys 1 5 10	
55	<210> 11 <211> 23 <212> PRT <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列之敘述：	

201004658

合成的胜肽

<400> 11

5 Arg Arg Arg Gln Arg Arg Lys Lys Arg Gly Tyr Arg Arg Arg Gln Arg
1 5 10 15

Arg Lys Lys Arg Gly Tyr Cys
20

10

<210> 12

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

15

<220>

<223> 人工序列之敘述：
合成的胜肽

20

<400> 12

Arg Gly Asp Cys

25

<210> 13

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

30

<220>

<223> 人工序列之敘述：
合成的胜肽

35

<400> 13

Arg Gly Asp Phe Cys
5

40

<210> 14

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

45

 $\langle 220 \rangle$

<223> 人工序列之敘述： 合成的胜肽

50

<400> 14

Ser Asp Gly Arg Gly Gly Gly Arg Arg Arg Gln Arg Arg Lys Lys Arg
1 5 10 15

Gly Tyr Cys

55

<210> 15

<211> 9

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
5 <223> 人工序列之敘述：
合成的胜肽

<400> 15
10 Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：98125813

A61k 9/127 (2006.01)

※ 申請日：98.7.31

※IPC 分類：

A61k 31/7125 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

A61k 48/00 (2006.01)

用於核酸遞送系統的奈米顆粒組成物 A61p 35/00 (2006.01)

NANOPARTICLE COMPOSITIONS FOR NUCLEIC
ACIDS DELIVERY SYSTEM

二、中文發明摘要：

本發明係針對用於遞送寡核苷酸之奈米顆粒組成物及使用該等奈米顆粒組成物調節標靶基因之表現的方法。詳言之，本發明係關於包封在陽離子性脂質、融合性脂質及PEG脂質之混合物中的寡核苷酸。

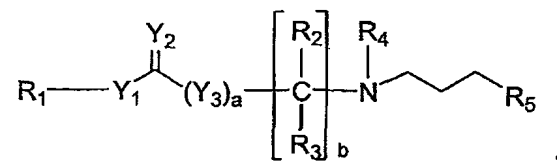
三、英文發明摘要：

The present invention is directed to nanoparticle compositions for the delivery of oligonucleotides and methods of modulating an expression of a targeted gene using the nanoparticle compositions. In particular, the invention relates to oligonucleotides encapsulated in a mixture of a cationic lipid, a fusogenic lipid and a PEG lipid.

七、申請專利範圍：

1. 一種奈米顆粒組成物，其包含：

(i) 具有式 (I) 之陽離子性脂質：



其中：

R_1 為膽固醇或其類似物；

Y_1 及 Y_3 獨立地為 O、S 或 NR_7 ；

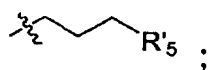
Y_2 為 O、S 或 NR_7 ；

(a) 為 0 或 1；

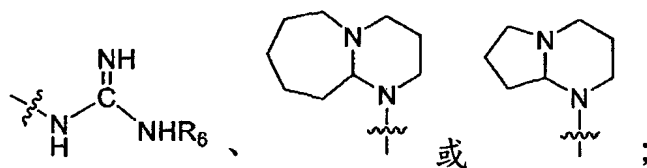
R_2 及 R_3 獨立地為氫或低碳烷基；

(b) 為約 2 至約 10 之正整數；

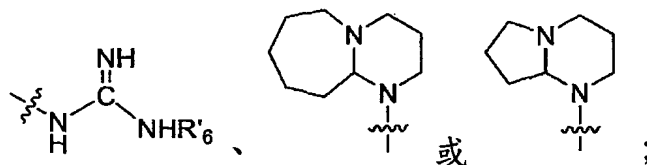
R_4 為氫、低碳烷基或



R_5 為



R'_5 為 NH_2 、

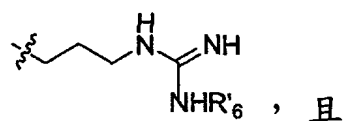


R_6 、 R'_6 及 R_7 獨立地為氫或低碳烷基；

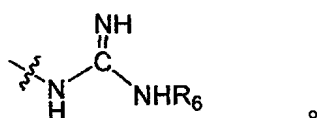
(ii) 融合性 (fusogenic) 脂質；及

(iii) PEG 脂質。

2.如申請專利範圍第 1 項之奈米顆粒組成物，其中 R_4 為



R_5 為



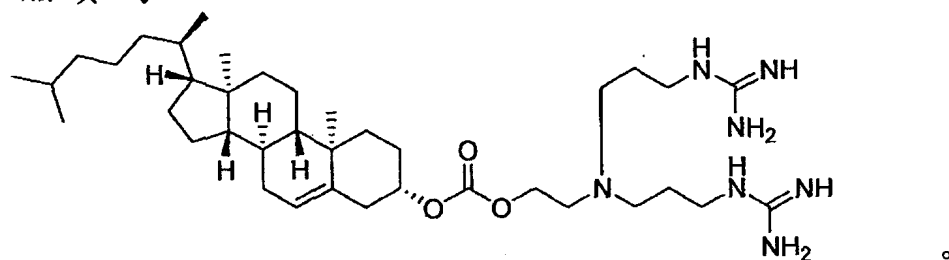
3.如申請專利範圍第 2 項之奈米顆粒組成物，其中 R_6 及 R'_6 為氫。

4.如申請專利範圍第 1 項之奈米顆粒組成物，其中 Y_1 、 Y_2 及 Y_3 均為氧。

5.如申請專利範圍第 1 項之奈米顆粒組成物，其中 (a) 為 1 且 (b) 為 2。

6.如申請專利範圍第 1 項之奈米顆粒組成物，其中 R_2 及 R_3 均為氫。

7.如申請專利範圍第 1 項之奈米顆粒組成物，其中該陽離子性脂質為



8.如申請專利範圍第 1 項之奈米顆粒組成物，其中該融合性脂質係選自由 DOPE、DOGP、POPC、DSPC、EPC 及其組合組成之群。

9.如申請專利範圍第 1 項之奈米顆粒組成物，其中該

PEG 脂質係選自由 PEG-DSPE、PEG-二棕櫚醯基咪唑雙醯胺(PEG-dipalmitoylglycamide)、C16mPEG-神經醯胺及其組合組成之群。

10.如申請專利範圍第 1 項之奈米顆粒組成物，其進一步包含膽固醇。

11.如申請專利範圍第 1 項之奈米顆粒組成物，其中該陽離子性脂質的莫耳比以該奈米顆粒組成物中所存在之總脂質計，於約 10%至約 99.9%的範圍。

12.如申請專利範圍第 11 項之奈米顆粒組成物，其中該陽離子性脂質的莫耳比以該奈米顆粒組成物中所存在之總脂質計，於約 15%至約 25%的範圍。

13.如申請專利範圍第 1 項之奈米顆粒組成物，其中以該奈米顆粒組成物中所存在之總脂質計，陽離子性脂質、非膽固醇基融合性脂質、PEG 脂質及膽固醇之莫耳比為約 15-25%:20-78%:0-50%:2-10%。

14.如申請專利範圍第 1 項之奈米顆粒組成物，其係選自下列混合物之群：

式 (I) 之陽離子性脂質、二醯基磷脂醯乙醇胺、共軛至磷脂醯乙醇胺之 PEG (PEG-PE)，及膽固醇；

式 (I) 之陽離子性脂質、二醯基磷脂醯膽鹼、共軛至磷脂醯乙醇胺之 PEG (PEG-PE)，及膽固醇；

式 (I) 之陽離子性脂質、二醯基磷脂醯乙醇胺、二醯基磷脂醯膽鹼、共軛至磷脂醯乙醇胺之 PEG (PEG-PE)，及膽固醇；

式 (I) 之陽離子性脂質、二醯基磷脂醯乙醇胺、共軛至神經醯胺之 PEG (PEG-Cer)，及膽固醇；及

式 (I) 之陽離子性脂質、二醯基磷脂醯乙醇胺、共軛至磷脂醯乙醇胺之 PEG (PEG-PE)、共軛至神經醯胺之 PEG (PEG-Cer)，及膽固醇。

15. 一種奈米顆粒，其包含用如申請專利範圍第 1 項之奈米顆粒組成物包封之核酸。

16. 如申請專利範圍第 15 項之奈米顆粒，其中該核酸為單股或雙股寡核苷酸。

17. 如申請專利範圍第 15 項之奈米顆粒，其中該核酸係選自由下列組成之群：去氧核苷酸、核糖核苷酸、鎖核酸 (LNA)、短干擾 RNA (siRNA)、微型 RNA (miRNA)、適配子 (aptamers)、肽核酸 (PNA)、磷醯二胺 N-嗎啉基寡核苷酸 (PMO)、三環 DNA、雙股寡核苷酸 (誘餌 ODN)、催化性 RNA (RNAi)、適配子、鏡像異構適配子 (spiegelmer)、CpG 寡聚物，及其組合。

18. 如申請專利範圍第 16 項之奈米顆粒，其中該寡核苷酸為反義寡核苷酸。

19. 如申請專利範圍第 16 項之奈米顆粒，其中該寡核苷酸具有硫代磷酸酯鍵聯。

20. 如申請專利範圍第 16 項之奈米顆粒，其中該寡核苷酸包括 LNA。

21. 如申請專利範圍第 16 項之奈米顆粒，其中該寡核苷酸具有約 8 至 50 個核苷酸。

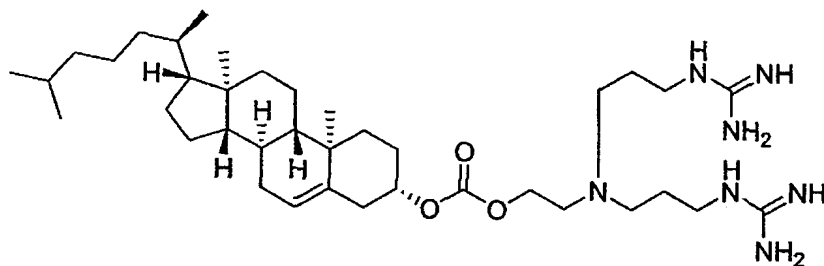
22.如申請專利範圍第 16 項之奈米顆粒，其中該寡核苷酸抑制致癌基因、促血管新生路徑基因、促細胞增殖路徑基因、病毒感染因子基因及促發炎路徑基因之表現。

23.如申請專利範圍第 16 項之奈米顆粒，其中該寡核苷酸係選自由反義 HIF-1 α 寡核苷酸、反義存活素寡核苷酸、反義 ErbB3 寡核苷酸、 β -索煙素(β -catenine)寡核苷酸及反義 Bcl-2 寡核苷酸組成之群。

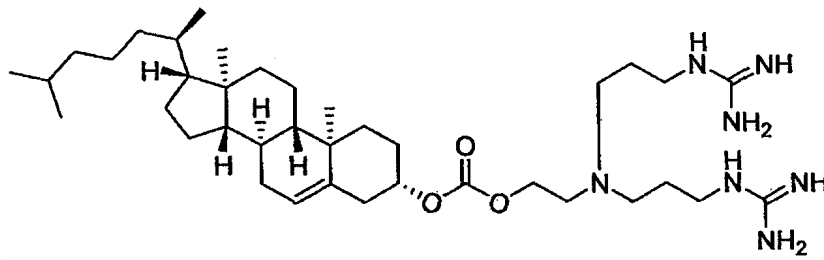
24.如申請專利範圍第 15 項之奈米顆粒，其中該陽離子性脂質與該等核酸之電荷比係於約 1:1 至約 20:1 的範圍。

25.如申請專利範圍第 15 項之奈米顆粒，其中該奈米顆粒具有於約 50 nm 至約 150 nm 之尺寸的範圍。

26.如申請專利範圍第 1 項之奈米顆粒組成物，其中以該奈米顆粒組成物中所存在之總脂質計，該陽離子性脂質、DOPE、膽固醇及 C16mPEG-神經醯胺係以約 17%:60%:20%:3%之莫耳比包括在內，其中該陽離子性脂質為



27.如申請專利範圍第 1 項之奈米顆粒組成物，其中以該奈米顆粒組成物中所存在之總脂質計，該奈米顆粒含有約 18%:60%:20%:1%:1%之莫耳比的該陽離子性脂質、DOPE、膽固醇、PEG-DSPE 及 C16mPEG-神經醯胺，其中該陽離子性脂質為



28.一種將寡核苷酸引入細胞的方法，該方法包含：

使細胞與如申請專利範圍第 15 項之奈米顆粒接觸。

29.一種抑制人類細胞或組織中之基因表現的方法，該方法包含：

使人類細胞或組織與如申請專利範圍第 15 項之奈米顆粒接觸。

30.如申請專利範圍第 29 項之方法，其中該等細胞或組織為癌細胞或組織。

31.一種下調哺乳動物中之基因表現的方法，該方法包含：

對有需要之哺乳動物投予有效量的如申請專利範圍第 15 項之奈米顆粒。

32.一種抑制癌細胞生長或增殖的方法，該方法包含：

使癌細胞與如申請專利範圍第 15 項之奈米顆粒接觸。

33.如申請專利範圍第 32 項之方法，該方法進一步包含投予化學治療劑。

34.一種治療哺乳動物之癌症的方法，該方法包含：

對有需要之哺乳動物投予有效量的如申請專利範圍第 15 項之奈米顆粒。

35.如申請專利範圍第 34 項之方法，其中該癌症係轉移至肝中。

八、圖式：

(如次頁)

圖 1

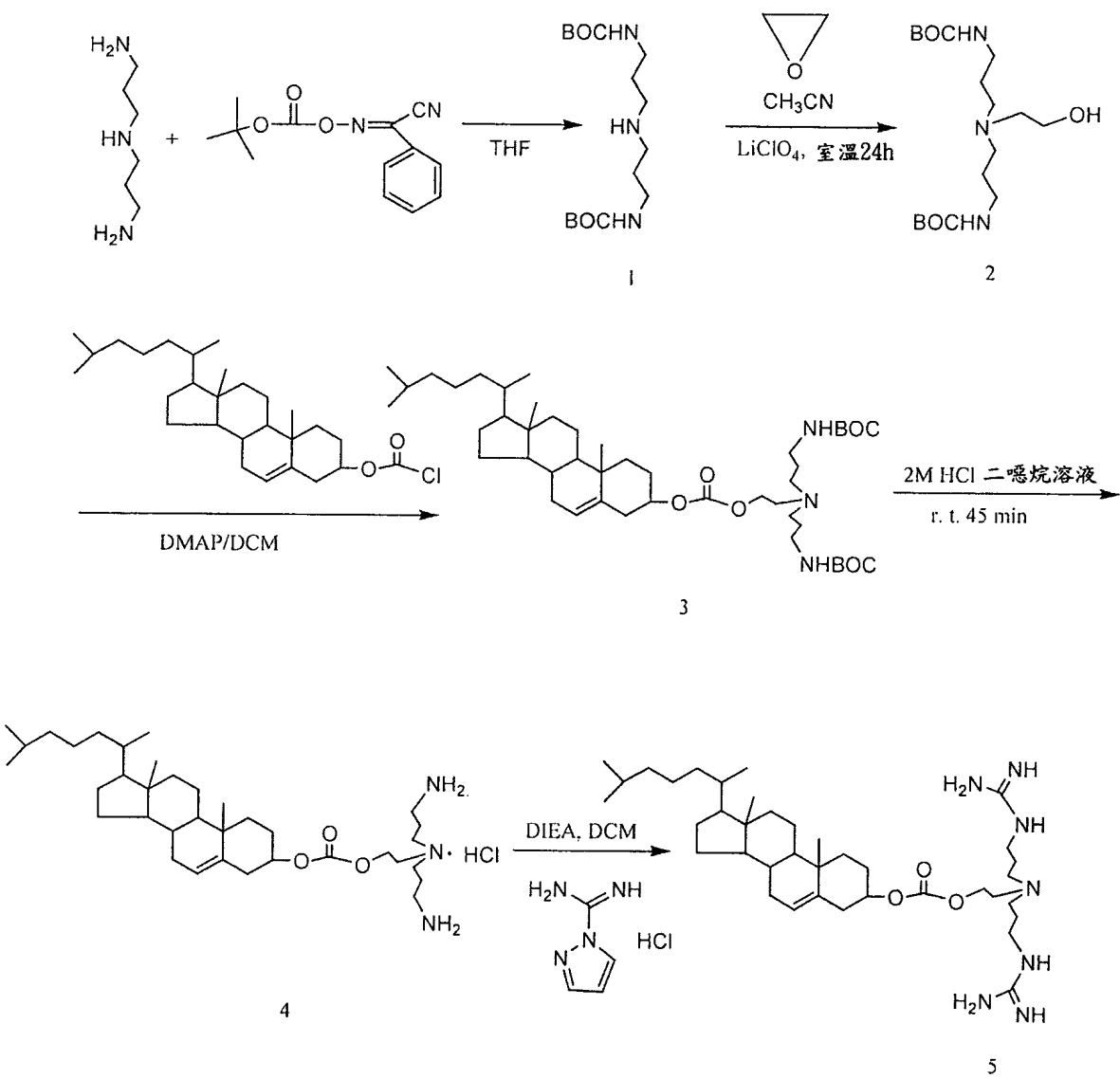


圖2

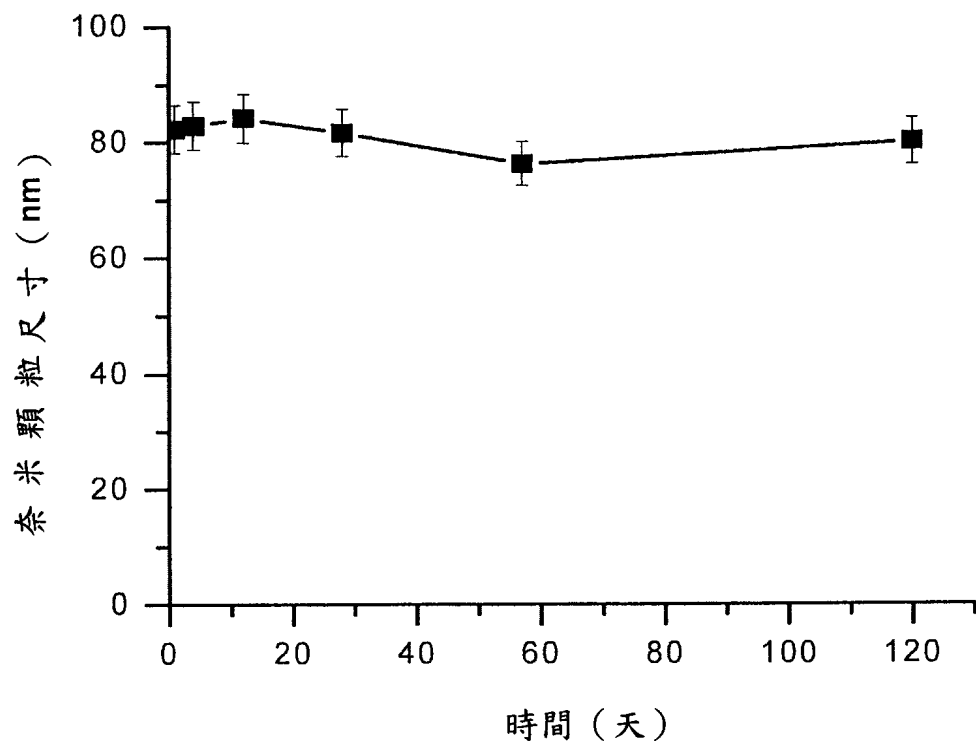
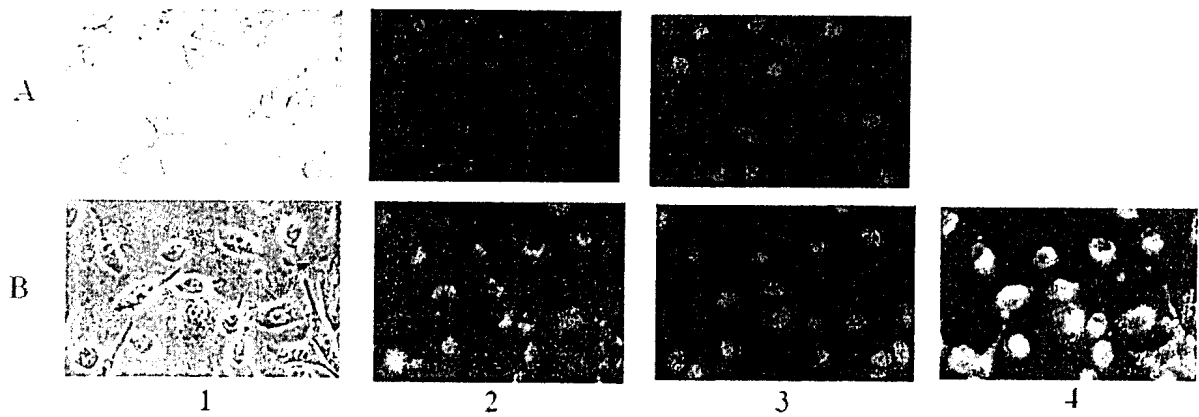


圖3



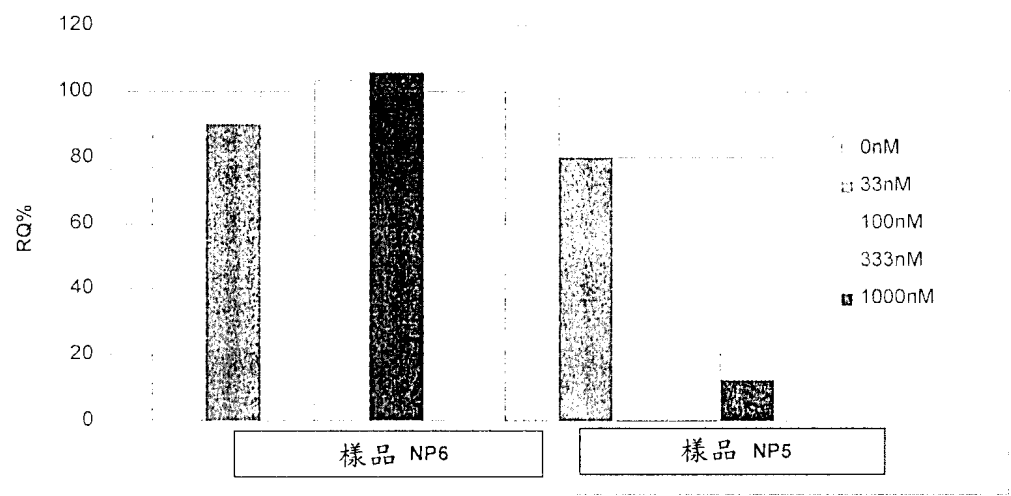
A：以裸LAN-ON (Oligo 2) 處理之細胞

B：以NP3處理之細胞

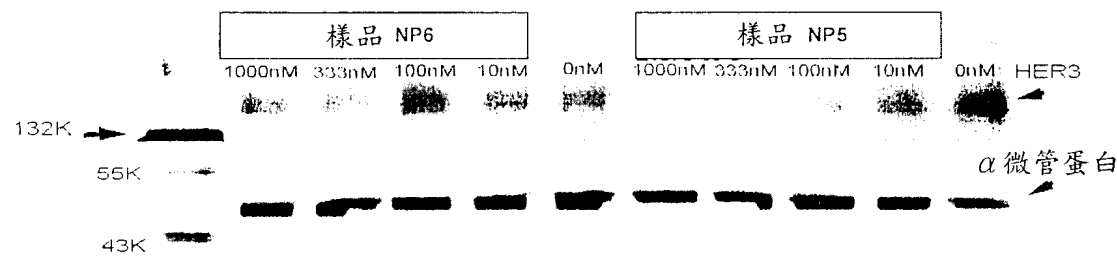
(1)光影像 (2)綠色FAM (3)藍色Hoechst細胞核染料
(4)紅色染料若丹明 (rhodamine)

圖4

人類表皮癌細胞中之Erb33表現下調



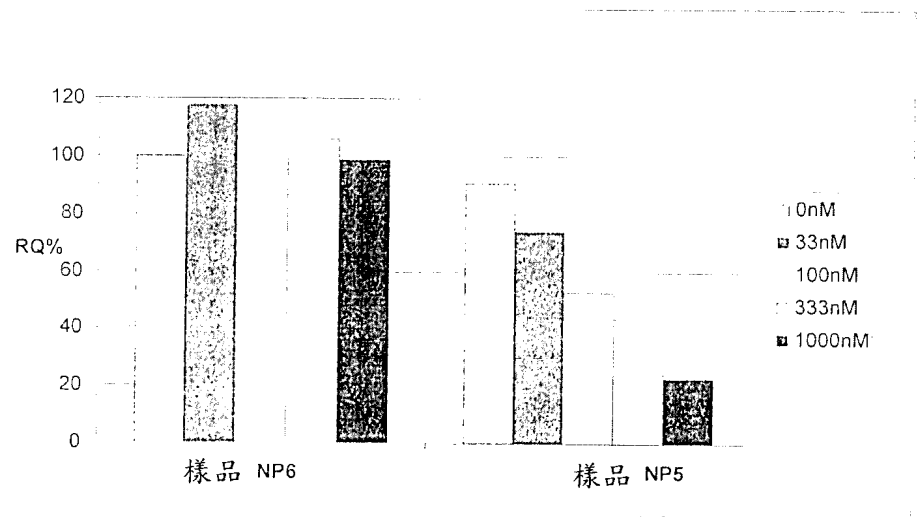
(A)



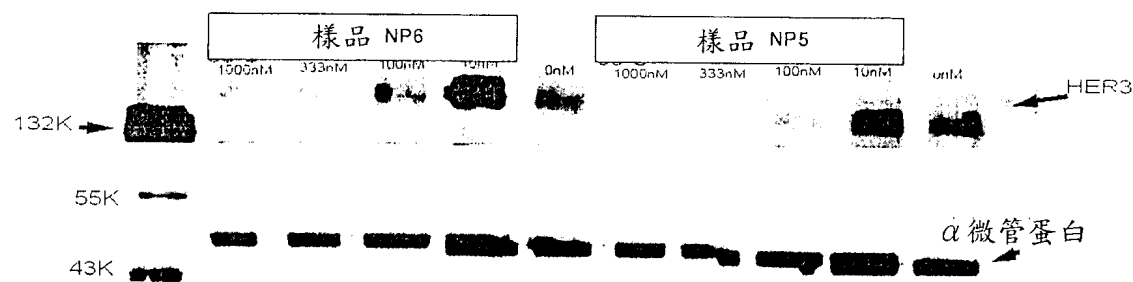
(B)

圖5

人類胃癌細胞中之ErbB3表現下調



(A)



(B)

圖6

人類肺癌細胞中之ErbB3表現下調

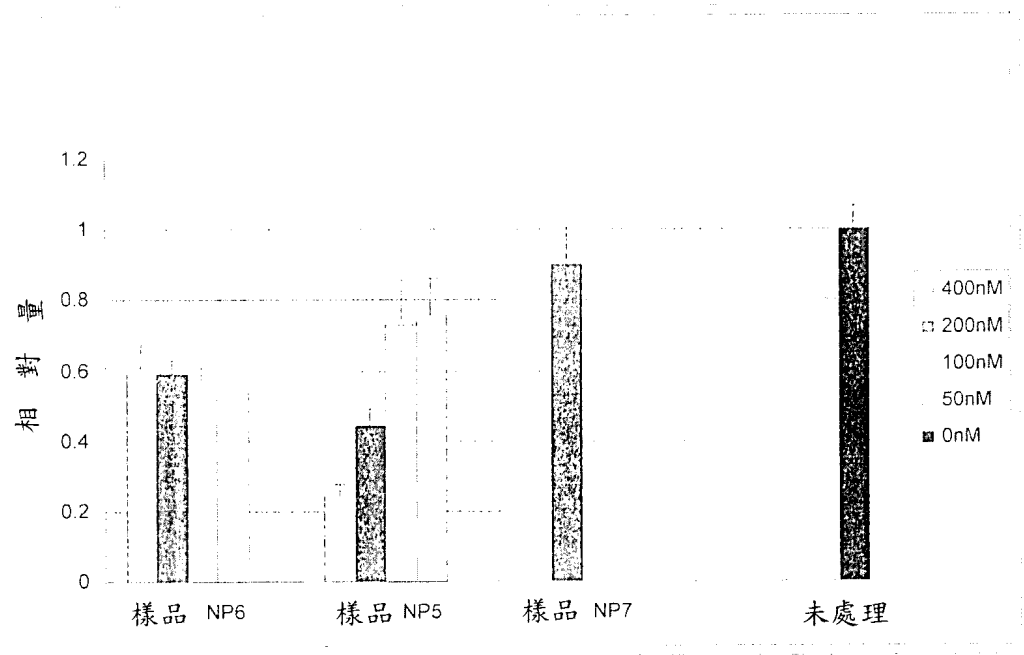


圖 7

人類前列腺癌細胞中之ErbB3表現下調

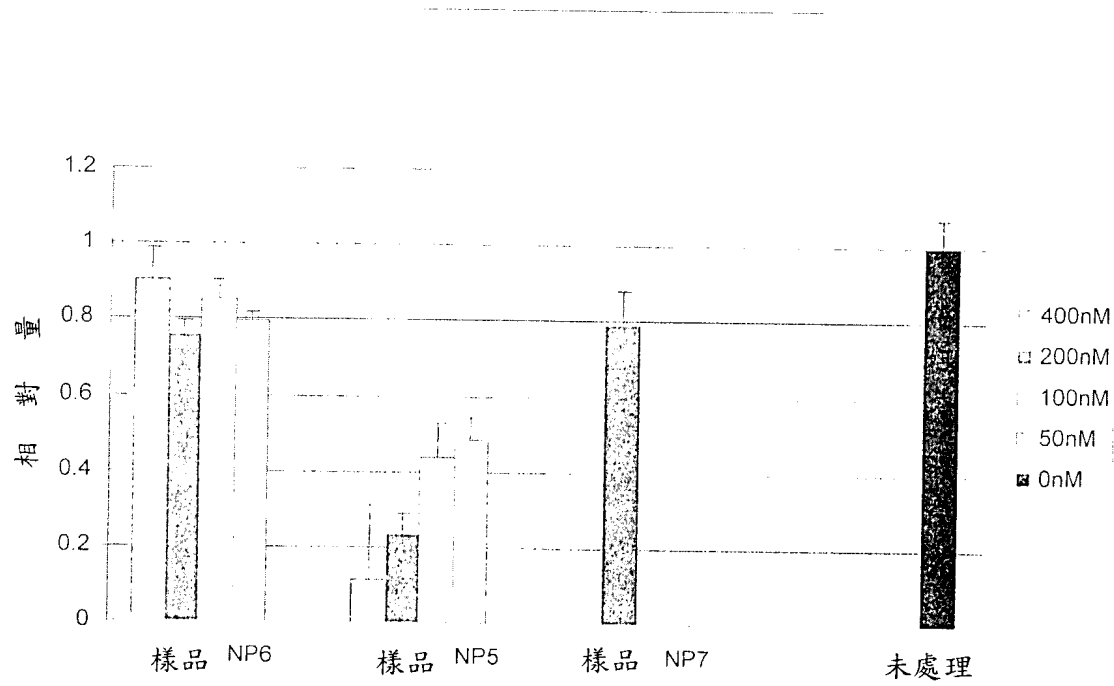


圖8

人類乳癌細胞中之ErbB3表現下調

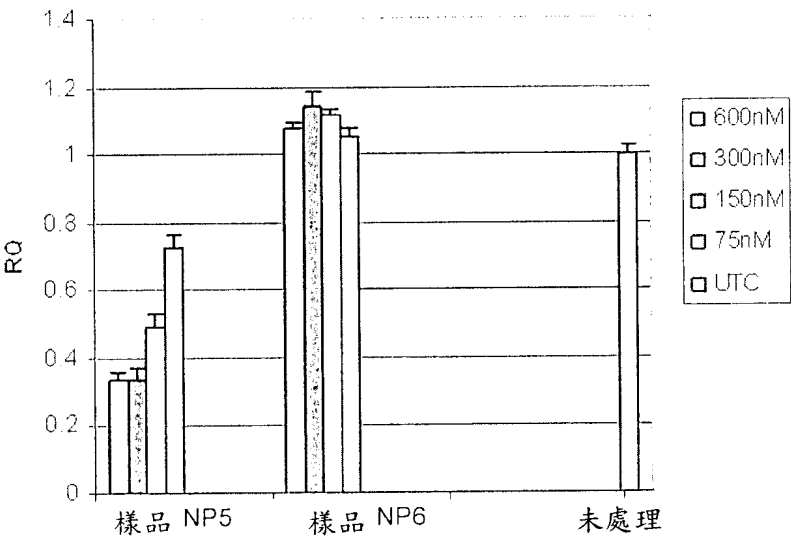


圖 9

人類KB癌細胞中之ErbB3表現下調

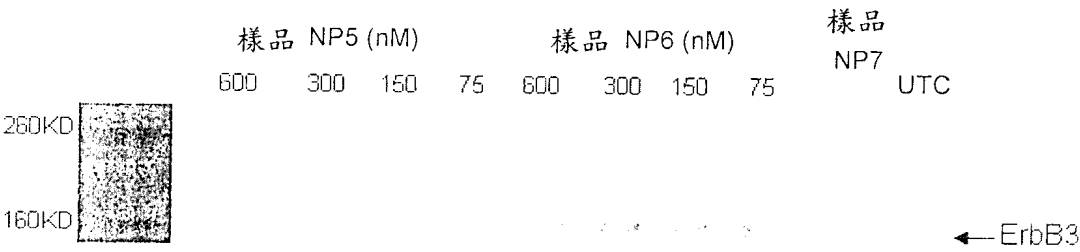


圖10

人類前列腺癌細胞中之ErbB3表現下調

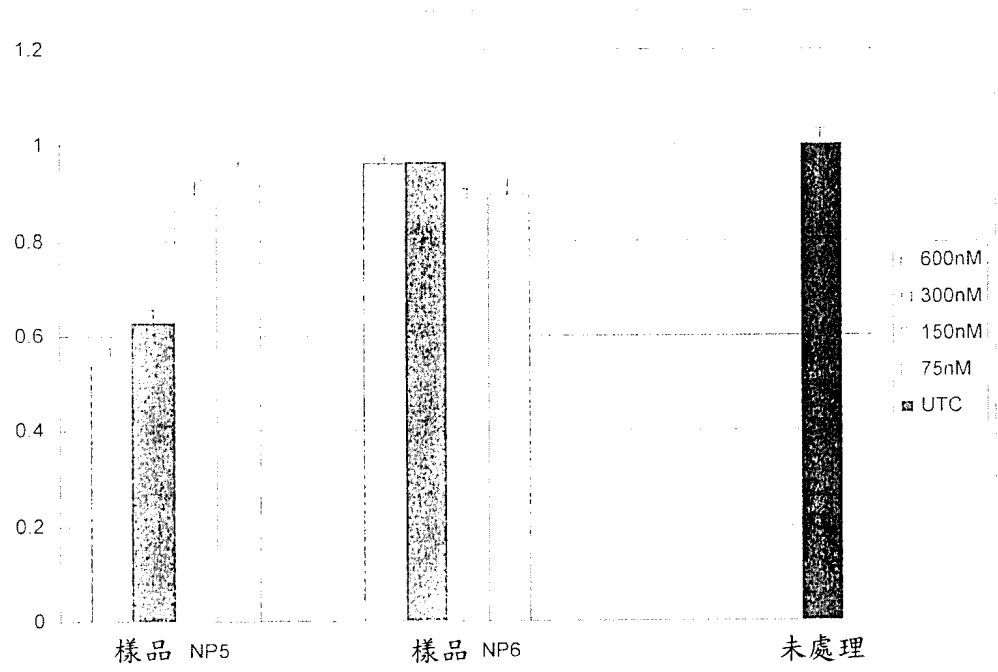
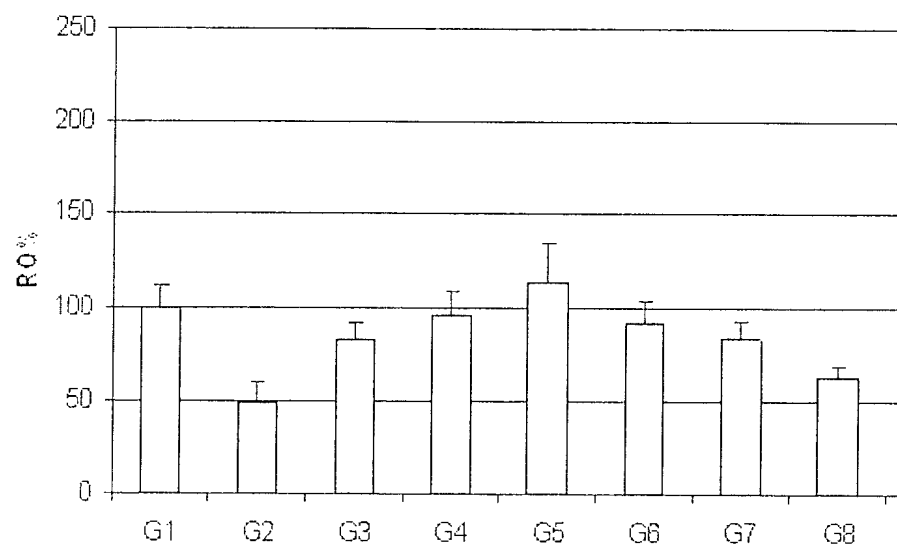


圖11

人類前列腺癌模型的腫瘤中ErbB3表現之活體內下調



G1：鹽水（KD 0%）；

G2：樣品NP5, 15mg/kg（KD 51.4%）；

G3：樣品NP5, 5mg/kg（KD 16.9%）；

G4：樣品NP5, 1mg/kg（KD 4.3%）；

G5：樣品NP5, 0.5mg/kg（KD 0%）；

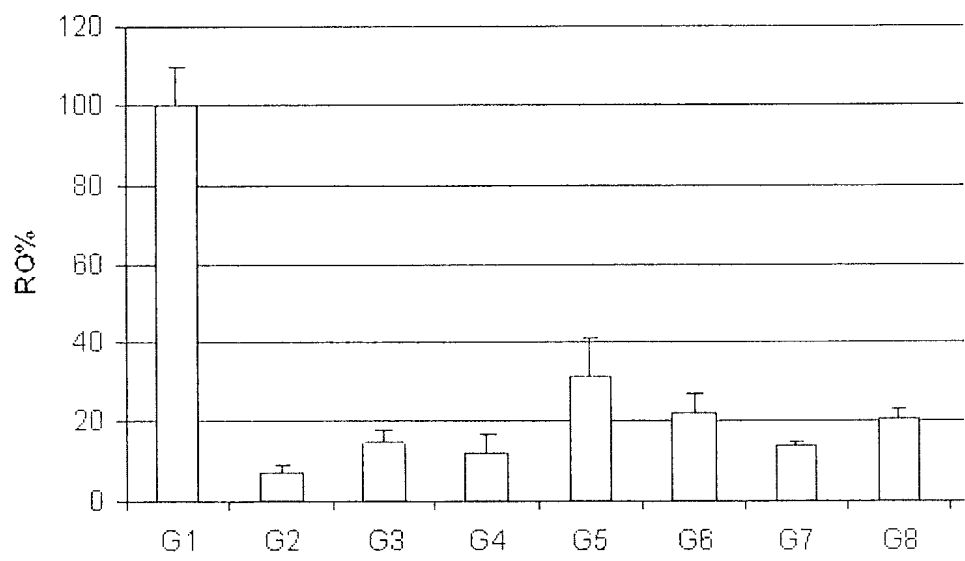
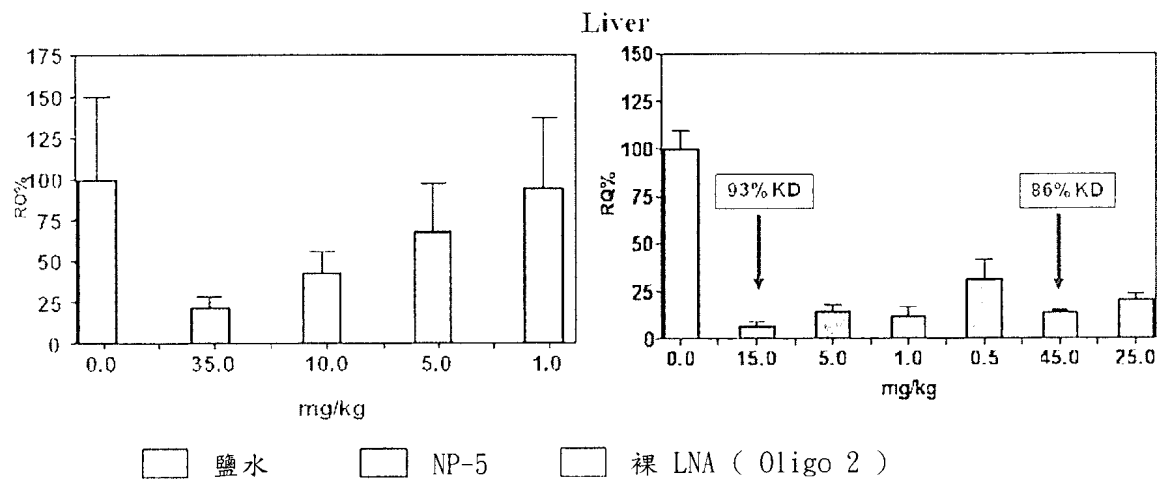
G6：裸Oligo-2, 腹膜內, 30mg/kg（KD 7.9%）；

G7：裸Oligo-2, 25mg/kg（KD 15.6%）；及

G8：裸Oligo-2, 45mg/kg（KD 36.6%）。

圖12

人類前列腺癌模型的肝中ErbB3表現之活體內下調



- G1：鹽水 (KD 0%)；
- G2：樣品NP5, 15mg/kg (KD 93%)；
- G3：樣品NP5, 5mg/kg (KD 85.2%)；
- G4：樣品NP5, 1mg/kg (KD 87.8%)；
- G5：樣品NP5, 0.5mg/kg (KD 68.5%)；
- G6：樣品NP5, 腹膜內, 30mg/kg (KD 77.5%) ；
- G7：裸Oligo-2, 25mg/kg (KD 86.16%) ；及
- G8：裸Oligo-2, 45mg/kg (KD 79.2%) 。

圖13

人類結腸癌模型中ErbB3表現之活體內下調

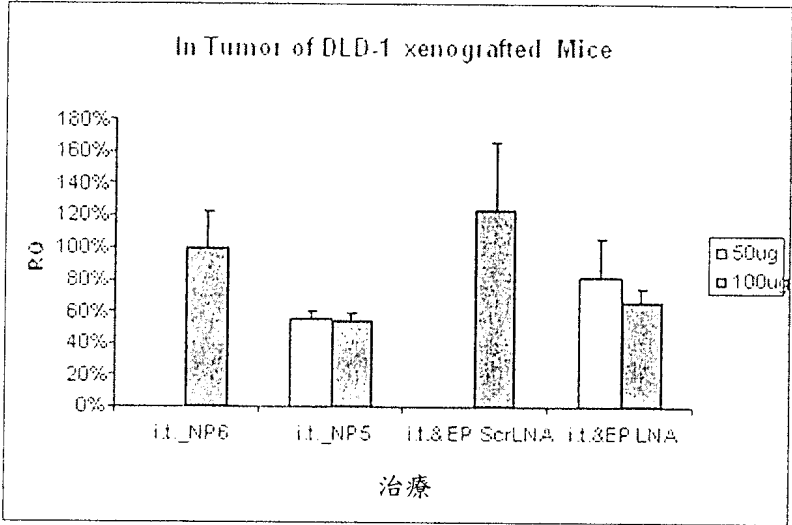


圖14

具有肝轉移之人類癌症異種移植模型中的活體內效力

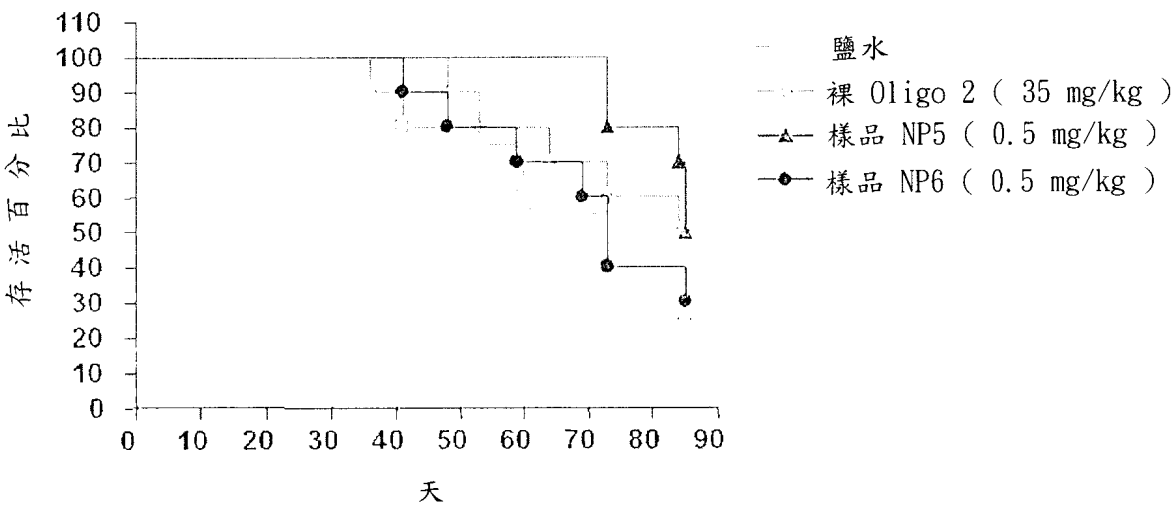
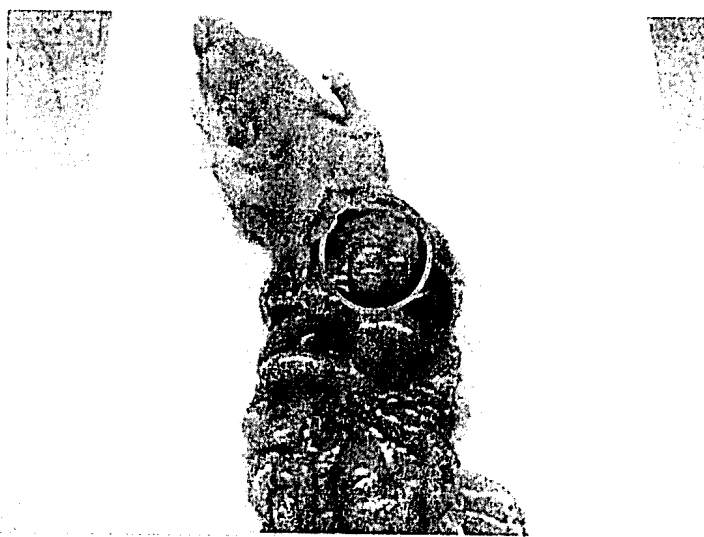


圖15



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：

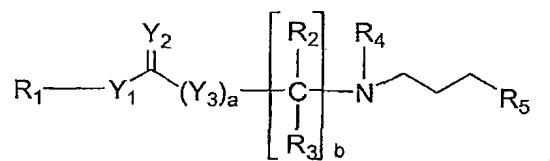
無

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

98.10.79

(i) 具有式 (I) 之陽離子性脂質：



R_1 為膽固醇或其類似物；

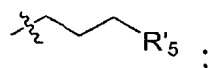
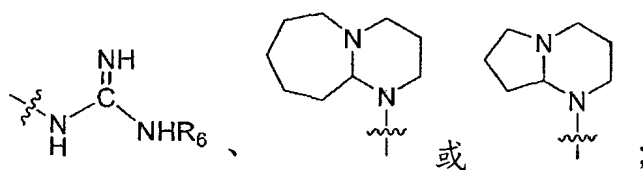
Y₂ 為 O、S 或 NR₇；

(a) 為 0 或 1；

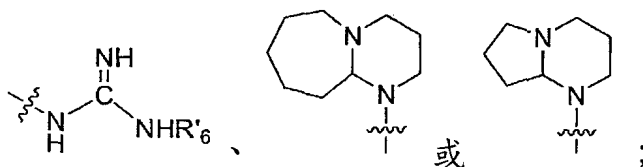
R_2 及 R_3 獨立地為氫或低碳烷基；

(b) 為約 2 至約 10 之正整數；

R₄ 為 氫、低 碳 烷 基 或

 R_5 為

R'₅ 為 NH₂、

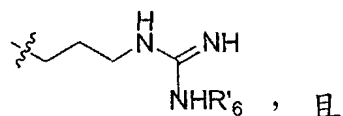


R_6 、 R'_6 及 R_7 獨立地為氫或低碳烷基；

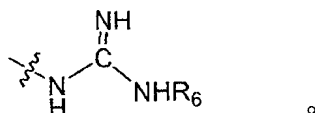
(ii) 融合性(fusogenic)脂質；及

(iii) PEG 脂質。

2.如申請專利範圍第 1 項之奈米顆粒組成物，其中 R_4 為



R_5 為



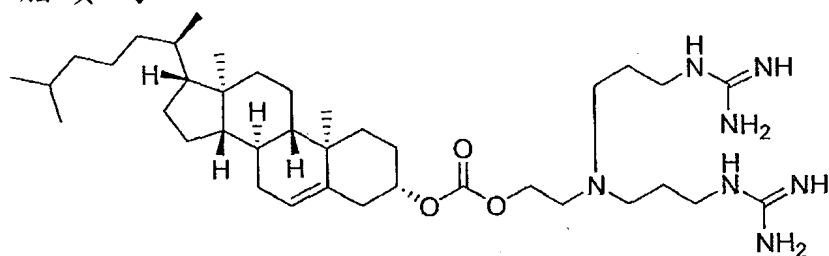
3.如申請專利範圍第 2 項之奈米顆粒組成物，其中 R_6 及 R'_6 為氫。

4.如申請專利範圍第 1 項之奈米顆粒組成物，其中 Y_1 、 Y_2 及 Y_3 均為氧。

5.如申請專利範圍第 1 項之奈米顆粒組成物，其中 (a) 為 1 且 (b) 為 2。

6.如申請專利範圍第 1 項之奈米顆粒組成物，其中 R_2 及 R_3 均為氫。

7.如申請專利範圍第 1 項之奈米顆粒組成物，其中該陽離子性脂質為



8.如申請專利範圍第 1 項之奈米顆粒組成物，其中該融合性脂質係選自由 DOPE、DOGP、POPC、DSPC、EPC 及其組合組成之群。

9.如申請專利範圍第 1 項之奈米顆粒組成物，其中該

PEG 脂質係選自由 PEG-DSPE、PEG-二棕櫚醯基咪唑雙醯胺 (PEG-dipalmitoylglycamide)、C16mPEG-神經醯胺及其組合組成之群。

10.如申請專利範圍第 1 項之奈米顆粒組成物，其進一步包含膽固醇。

11.如申請專利範圍第 1 項之奈米顆粒組成物，其中該陽離子性脂質的莫耳比以該奈米顆粒組成物中所存在之總脂質計，於約 10%至約 99.9%的範圍。

12.如申請專利範圍第 11 項之奈米顆粒組成物，其中該陽離子性脂質的莫耳比以該奈米顆粒組成物中所存在之總脂質計，於約 15%至約 25%的範圍。

13.如申請專利範圍第 1 項之奈米顆粒組成物，其中以該奈米顆粒組成物中所存在之總脂質計，陽離子性脂質、非膽固醇基融合性脂質、PEG 脂質及膽固醇之莫耳比為約 15-25%:20-78%:0-50%:2-10%。

14.如申請專利範圍第 1 項之奈米顆粒組成物，其係選自下列混合物之群：

式 (I) 之陽離子性脂質、二醯基磷脂醯乙醇胺、共軛至磷脂醯乙醇胺之 PEG (PEG-PE)，及膽固醇；

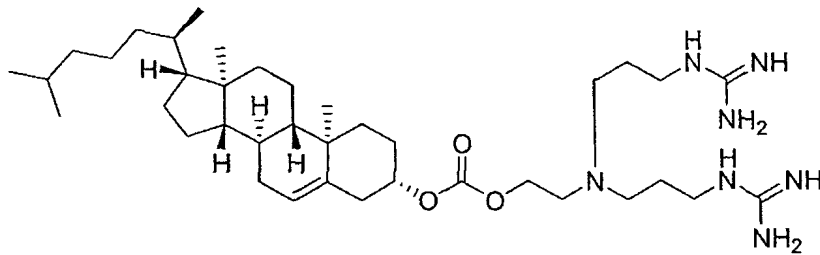
式 (I) 之陽離子性脂質、二醯基磷脂醯膽鹼、共軛至磷脂醯乙醇胺之 PEG (PEG-PE)，及膽固醇；

式 (I) 之陽離子性脂質、二醯基磷脂醯乙醇胺、二醯基磷脂醯膽鹼、共軛至磷脂醯乙醇胺之 PEG (PEG-PE)，及膽固醇；

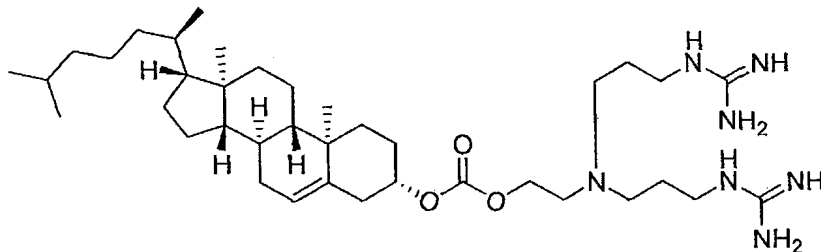
式 (I) 之陽離子性脂質、二醯基磷脂醯乙醇胺、共軛至神經醯胺之 PEG (PEG-Cer)，及膽固醇；及

式 (I) 之陽離子性脂質、二醯基磷脂醯乙醇胺、共軛至磷脂醯乙醇胺之 PEG (PEG-PE)、共軛至神經醯胺之 PEG (PEG-Cer)，及膽固醇。

15. 如申請專利範圍第 1 項之奈米顆粒組成物，其中以該奈米顆粒組成物中所存在之總脂質計，該陽離子性脂質、DOPE、膽固醇及 C16mPEG-神經醯胺係以約 17%:60%:20%:3% 之莫耳比包括在內，其中該陽離子性脂質為



16. 如申請專利範圍第 1 項之奈米顆粒組成物，其中以該奈米顆粒組成物中所存在之總脂質計，該奈米顆粒含有約 18%:60%:20%:1%:1% 之莫耳比的該陽離子性脂質、DOPE、膽固醇、PEG-DSPE 及 C16mPEG-神經醯胺，其中該陽離子性脂質為



17. 一種奈米顆粒，其包含用如申請專利範圍第 1 項之

奈米顆粒組成物包封之核酸。

18.如申請專利範圍第 17 項之奈米顆粒，其中該核酸為單股或雙股寡核苷酸。

19.如申請專利範圍第 17 項之奈米顆粒，其中該核酸係選自由下列組成之群：去氧核苷酸、核糖核苷酸、鎖核酸 (LNA)、短干擾 RNA (siRNA)、微型 RNA (miRNA)、適配子 (aptamers)、肽核酸 (PNA)、磷醯二胺 N-嗎啉基寡核苷酸 (PMO)、三環 DNA、雙股寡核苷酸 (誘餌 ODN)、催化性 RNA (RNAi)、適配子、鏡像異構適配子 (spiegelmer)、CpG 寡聚物，及其組合。

20.如申請專利範圍第 18 項之奈米顆粒，其中該寡核苷酸為反義寡核苷酸。

21.如申請專利範圍第 18 項之奈米顆粒，其中該寡核苷酸具有硫代磷酸酯鍵聯。

22.如申請專利範圍第 18 項之奈米顆粒，其中該寡核苷酸包括 LNA。

23.如申請專利範圍第 18 項之奈米顆粒，其中該寡核苷酸具有約 8 至 50 個核苷酸。

24.如申請專利範圍第 18 項之奈米顆粒，其中該寡核苷酸抑制致癌基因、促血管新生路徑基因、促細胞增殖路徑基因、病毒感染因子基因及促發炎路徑基因之表現。

25.如申請專利範圍第 18 項之奈米顆粒，其中該寡核苷酸係選自由反義 HIF-1 α 寡核苷酸、反義存活素寡核苷酸、反義 ErbB3 寡核苷酸、 β -索煙素 (β -catenine) 寡核苷酸及反

義 Bcl-2 寡核苷酸組成之群。

26.如申請專利範圍第 17 項之奈米顆粒，其中該陽離子性脂質與該等核酸之電荷比係於約 1:1 至約 20:1 的範圍。

27.如申請專利範圍第 17 項之奈米顆粒，其中該奈米顆粒具有於約 50 nm 至約 150 nm 之尺寸的範圍。

28.一種將寡核苷酸引入細胞的方法，該方法包含：

使細胞與如申請專利範圍第 17 項之奈米顆粒接觸。

29.一種抑制人類細胞或組織中之基因表現的方法，該方法包含：

使人類細胞或組織與如申請專利範圍第 17 項之奈米顆粒接觸。

30.如申請專利範圍第 29 項之方法，其中該等細胞或組織為癌細胞或組織。

31.一種如申請專利範圍第 17 項之奈米顆粒在製備用於下調哺乳動物中之基因表現的醫藥的用途。

32.一種抑制癌細胞生長或增殖的方法，該方法包含：

使癌細胞與如申請專利範圍第 17 項之奈米顆粒接觸。

33.如申請專利範圍第 32 項之方法，該方法進一步包含投予化學治療劑。

34.一種如申請專利範圍第 17 項之奈米顆粒在製備用於治療哺乳動物之癌症的醫藥的用途。

35.如申請專利範圍第 34 項之用途，其中該癌症係轉移至肝中。

八、圖式：

(如 次 頁)