



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103906504 B

(45)授权公告日 2017. 11. 17

(21)申请号 201280054027.8

(22)申请日 2012.11.02

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 103906504 A

(43)申请公布日 2014.07.02

(30)优先权数据

61/556,124 2011.11.04 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2014.05.04

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2012/003109 2012.11.02

(87)PCT国际申请的公布数据

W02013/093648 EN 2013.06.27

(73)专利权人 日东电工株式会社

地址 日本大阪

(72)发明人 V·克诺波夫 R·P·维特

P·卡尔玛里 R·李 D·韦布

V·阿科皮扬

(74)专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
72002

代理人 过晓东

(51)Int.Cl.

A61K 9/127(2006.01)

C12N 15/113(2006.01)

(56)对比文件

CN 103857654 A,2014.06.11,

WO 2011/090965 A1,2011.07.28,

US 5653996 A,1997.08.05,

US 4781871 A,1988.11.01,

Preeti Yadava et al.,.Effect of

Lyophilization and Freeze-thawing on the
Stability of siRNA-liposome Complexes.

《AAPS Pharm Sci Tech》.2008,第9卷(第2期),
第335-341页,尤其第336页右栏第1-2段,第338
页左栏最后1段至右栏第1段.

审查员 刘明

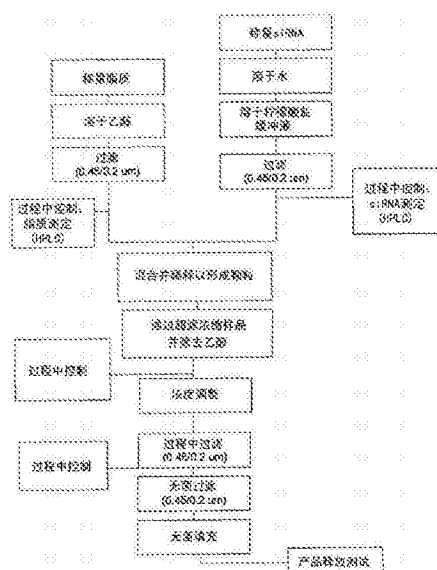
权利要求书3页 说明书23页 附图6页

(54)发明名称

制备用于药物递送的脂质纳米颗粒的方法

(57)摘要

本文描述一种制备有效包裹带负电荷的治疗聚合物如siRNA的脂质体的方法。所述方法包括制备在与水混溶的有机溶剂如乙醇中包含阳离子脂质的脂质混合物,并且将该溶液注射至溶于水的聚合物到水中35%乙醇的终浓度以制备具有50-150nm的平均大小的纳米颗粒,并且药物:脂质的最终电荷比例为1:2.5。



1. 一种制备包裹双链RNA分子的脂质纳米颗粒的方法,所述方法包括以下步骤:

制备脂质溶液,其包含溶于乙醇中的阳离子脂质、DOPE、甾醇和PEG脂质;

制备第一水溶液,其包含0.08-0.8mg/ml的所述RNA分子和pH 4-6的水性缓冲液;

以恒定速率在1-100分钟内,通过浸入注射将所述脂质溶液通过管泵入容器中包含的水溶液,从而所述脂质溶液与所述水溶液混合以制备包含25-45%v:v有机溶剂和脂质纳米颗粒的混合物,所述脂质纳米颗粒具有0.06-0.16w:w的RNA:脂质比例以及2.5:1-1:1的RNA:脂质电荷比例,在添加所述脂质溶液的同时,通过搅拌、振荡或再循环来混合所述容器中所得的混合物;以及

相对于pH 6-8的第二水性缓冲溶液进行渗滤,由此从所述混合物去除所述有机溶剂。

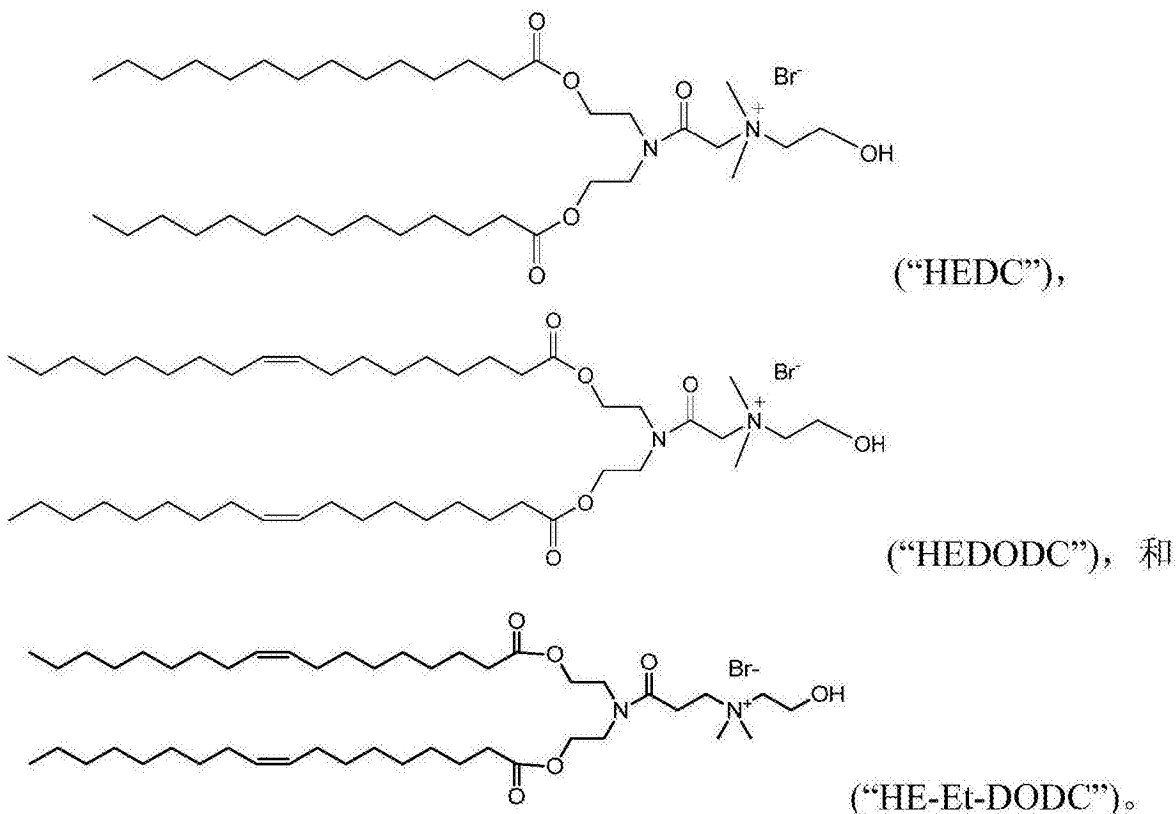
2. 权利要求1的方法,其中所述第一水溶液还包含多糖。

3. 权利要求2的方法,其中所述多糖选自蔗糖、海藻糖、乳糖、麦芽糖和菊粉。

4. 权利要求1的方法,其还包括冷冻干燥所述包裹RNA分子的脂质纳米颗粒的步骤。

5. 权利要求1的方法,其中所述阳离子脂质为所述脂质的40-60摩尔%。

6. 权利要求1的方法,其中所述阳离子脂质选自HEDC、HEDODC和HE-Et-DODC:



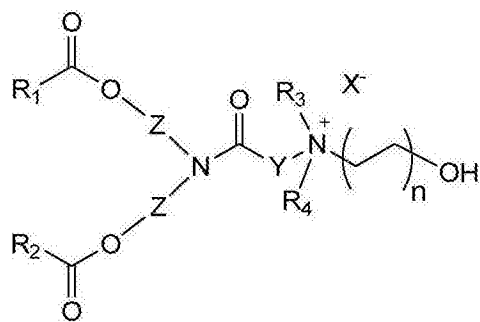
7. 权利要求1的方法,其中所述阳离子脂质由可电离或不可电离的正电荷组成。

8. 权利要求1的方法,其中所述脂质还包含一种含类视黄醇分子的化合物。

9. 权利要求1的方法,其中所述脂质溶液和所述第一水溶液处于25-55℃。

10. 权利要求1的方法,其中所述第一水溶液包含柠檬酸盐。

11. 一种药物制剂,其包含通过权利要求1-10中任一项的方法制备的包裹双链RNA分子的脂质纳米颗粒,其中所述阳离子脂质由结构式I组成:



其中

Z为烷基接头, C₂-C₄烷基;

Y为烷基接头, C₁-C₆烷基;

R₁和R₂互相独立地为C₁₂-C₃₀烷基或C₁₂-C₃₀烯基;

R₃和R₄互相独立地为氢、C₁-C₆烷基或-CH₂CH₂OH;

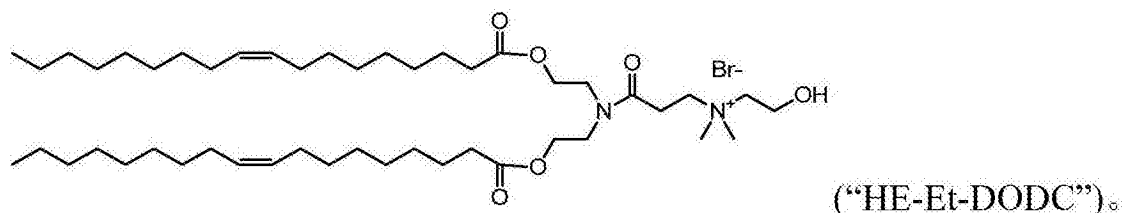
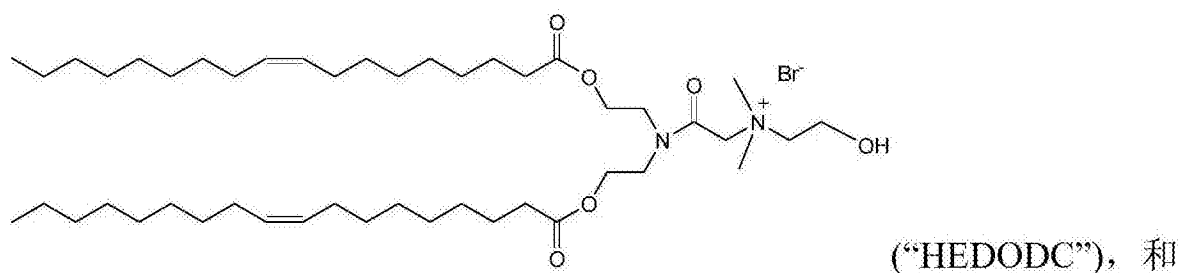
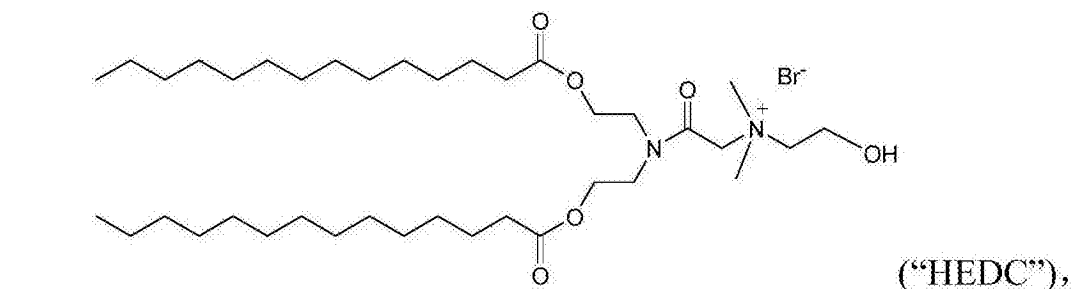
n为1-6;

X为反荷离子; 并且

其中所述药物制剂包含多糖。

12. 权利要求11的药物制剂, 其中所述阳离子脂质为所述脂质的40-60摩尔%。

13. 权利要求11的药物制剂, 其中所述阳离子脂质选自HEDC、HEDODC和HE-Et-DODC:



14. 权利要求11的药物制剂, 其中所述阳离子脂质由可电离或不可电离的正电荷组成。

15. 权利要求11的药物制剂, 其中所述脂质还包含一种含类视黄醇分子的化合物。

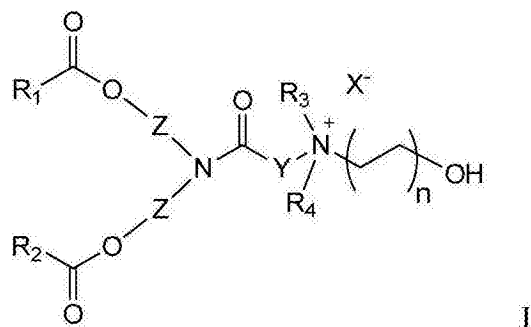
16. 权利要求11的药物制剂, 其中所述方法还包括冷冻干燥所述脂质纳米颗粒包裹的RNA分子。

17. 权利要求11的药物制剂, 其中所述多糖选自蔗糖、海藻糖、乳糖、麦芽糖和菊粉。

18. 权利要求11的药物制剂,其中所述包裹RNA分子的脂质纳米颗粒的体积加权的平均粒径为50-100nm。

19. 权利要求11-18中任一项的药物制剂,其中所述包裹RNA分子的脂质纳米颗粒具有小于0.2的多分散性指数。

20. 一种用于制备包裹双链RNA分子的脂质纳米颗粒的试剂盒,其中所述包裹双链RNA分子的脂质纳米颗粒是通过权利要求1-10中任一项的方法制备的,所述试剂盒包含溶于乙醇中的阳离子脂质、DOPE、甾醇和PEG脂质,其中所述阳离子脂质由结构式I组成:



其中

Z为烷基接头, C₂-C₄烷基;

Y为烷基接头, C₁-C₆烷基;

R₁和R₂互相独立地为C₁₂-C₃₀烷基或C₁₂-C₃₀烯基;

R₃和R₄互相独立地为氢、C₁-C₆烷基或-CH₂CH₂OH;

n为1-6;且

X为反荷离子;并且

其中所述方法还包括冷冻干燥所述脂质纳米颗粒包裹的RNA分子。

制备用于药物递送的脂质纳米颗粒的方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2011年11月4日提交的美国临时专利申请第61/556,124 号的优先权，其整体援引加入本文。

技术领域

[0003] 本文涉及一种简单且可重复地形成脂质-核酸颗粒的方法。所述方法产生平均大小为50-150nm的单分散的颗粒。

背景技术

[0004] 脂质可以用作载体用于递送治疗分子，特别是用于递送核酸。脂质形成脂质体，其可以包裹、络合或包埋核酸分子，从而在给药（例如静脉内给药至循环）时增加递送这类治疗分子至靶细胞。它们在药物组合物中的有用性受到可用于可重复地制备脂质-核酸纳米颗粒的方法的限制。已设计各种方法以制备这类纳米颗粒。

[0005] Batzri et al., 1973, Biophys Biochem Acta 298:1015-19 和 Kremer et al., 1977, Biochemistry 16:3932-35 描述了通过将脂质溶于乙醇并将该乙醇溶液注入水溶液来制备脂质囊泡，其中脂质自发地形成脂质体。Hirota et al., 1999, BioTechniques 27:286-89 描述了通过将阳离子脂质溶于乙醇并将该乙醇溶液注入包含核酸分子的水溶液来制备包被核酸分子的脂质囊泡。这种方法不能制备包裹核酸的脂质体。

[0006] Maurer et al. US7094423 描述了通过首先制备水溶液中的预制单层脂质囊泡来制备包裹核酸的脂质体。通过将脂质溶于乙醇并将该脂质混合物注入水性缓冲液来制备预制脂质囊泡。制备空的预制囊泡的过程包括通过挤出分选大小。分选大小之后将乙醇添加至空的预制囊泡以使它们不稳定，并且将40%乙醇中的核酸添加至不稳定的脂质囊泡。温育之后，将该混合物渗滤以去除乙醇。乙醇百分比、温度、温育时间、脂质组成、药物/脂质比例和初始核酸浓度的变化均影响这种方法的包裹效率和收率。例如，Maurer等人证实包埋随着寡核苷酸:脂质比例的增加而增加，在超过0.16mg 反义寡核苷酸/mg脂质时达到最大，同时产生较大脂质体的数量和它们的多分散性的增加。

[0007] Semple et al. US6858225 利用可电离的阳离子脂质制备包裹RNA的脂质体。将脂质溶于乙醇并与低pH的水性缓冲液中的核酸组合。去除乙醇并将pH调至中性pH以形成脂质体。所得的脂质体是异质的，需要匀浆或挤出以获得单分散脂质囊泡。与Maurer等人一致，Semple等人证实包埋随着寡核苷酸:脂质比例的增加而增加，在超过0.16mg反义寡核苷酸/mg脂质时达到最大，同时产生较大脂质体的数量和它们的多分散性的增加。

[0008] MacLachlan et al. US7901708 描述了通过在混合室(T-管)中混合溶于乙醇的脂质与水溶液中的RNA来制备包裹RNA的脂质囊泡，其中将脂质和RNA逐步稀释，从而基本上立即形成囊泡。

[0009] Wheeler et al. US20100041152 描述了制备包裹RNA的脂质体，将阳离子脂质溶于乙醇并与65-85%乙醇中的RNA混合以产生可溶的电荷中和的复合物，将非阳离子脂质添加

至这个复合物以形成脂质-核酸混合物并去除乙醇。脂质体需要匀浆或挤出以获得单分散脂质囊泡。

[0010] 对包裹核酸而不需要广泛的机械加工步骤以制备预制脂质体且不需要加工步骤将脂质-核酸颗粒减少为单分散群体的制备方法仍有相当的需求。

发明内容

[0011] 本文的一方面是一种制备包裹聚阴离子的脂质纳米颗粒的方法,所述方法包括以下步骤:以恒定速率将包含溶于与水混溶的有机溶剂的脂质的第一溶液添加至包含水性缓冲液中的聚阴离子的第二溶液,同时搅拌所述第二溶液以制备包含25-45% (v:v) 的所述有机溶剂的混合物;以及通过相对于中性pH的水性缓冲溶液进行渗滤来从所述混合物去除所述有机溶剂。将所述第一溶液添加至所述第二溶液优选在1-100分钟内完成。所述聚阴离子可以为核酸,例如RNA分子。所述聚阴离子优选的浓度为0.08-0.8mg/ml。所述脂质纳米颗粒的药物:脂质比例 (w:w) 优选为0.06-0.16。所述脂质纳米颗粒的药物:脂质电荷比例为1:25:1-1:1。

[0012] 所述方法的另一实施方案为使用水溶液中的多糖。所述多糖优选自蔗糖、海藻糖、甘露醇、山梨醇、木糖醇、乳糖、麦芽糖和菊粉。所述方法的另一实施方案还包括冷冻干燥所述包裹聚阴离子的脂质纳米颗粒的步骤。

[0013] 在所述方法的另一实施方案中,所述有机溶液优选为乙醇。优选地,在完成所述脂质和所述聚阴离子的混合物时,所述混合物包含35% (v:v) 的乙醇。

[0014] 在所述方法的另一实施方案中,所述脂质包含阳离子脂质、辅助脂质、甾醇和PEG脂质。优选地,所述阳离子脂质为所述脂质的40-60摩尔%。优选地,所述阳离子脂质选自HEDC、HEDODC和HE-Et-DODC,更优选由可电离或不可电离的正电荷组成的阳离子脂质。优选地,所述脂质还包含靶向脂质。

[0015] 在所述方法的另一实施方案中,将所述乙醇和水溶液在25-55℃下混合,并且在pH3.5-6.5下优选用柠檬酸盐缓冲。

[0016] 本文的另一方面是一种药物制剂,其包含包裹聚阴离子的脂质纳米颗粒,所述脂质纳米颗粒通过包括以下步骤的方法制备:以恒定速率将包含溶于与水混溶的有机溶剂的脂质的第一溶液添加至包含水性缓冲液中的聚阴离子的第二溶液,同时搅拌所述第二溶液以制备包含25-45% (v:v) 的所述有机溶剂的混合物;以及通过相对于中性pH的水性缓冲溶液进行渗滤来从所述混合物去除所述有机溶剂。

[0017] 一实施方案包括一种药物制剂,其包含核酸、RNA分子或双链siRNA 分子。优选地,所述脂质纳米颗粒的药物:脂质比例为0.06-0.16 (w:w),并且所述脂质纳米颗粒的药物:脂质电荷比例为1:25:1-1:1。

[0018] 在所述药物制剂的另一实施方案中,所述脂质包含阳离子脂质、辅助脂质、甾醇和PEG脂质。优选地,所述阳离子脂质为所述脂质的40-60摩尔%。所述阳离子脂质优选自HEDC、HEDODC和HE-Et-DODC。所述阳离子脂质可以由可电离或不可电离的正电荷组成。所述脂质还可以包含靶向脂质。

[0019] 所述药物制剂的另一实施方案还包含多糖,其优选自蔗糖、海藻糖、甘露醇、山梨醇、木糖醇、乳糖、麦芽糖和菊粉。优选地,制备所述药物制剂的方法还包括冷冻干燥所述脂

质体包裹的聚阴离子。所述药物制剂还可以包含柠檬酸盐。所述药物制剂还可以包含由泊洛沙姆、表面活性剂、去污剂或者多羟基或多羟基乙烯聚合物组成的加工助剂。

[0020] 在另一实施方案中,所述药物制剂由包裹RNA分子的脂质纳米颗粒组成,所述脂质纳米颗粒具有50-150nm的平均粒径,更优选小于100nm,最优选最小多分散。

附图说明

[0021] 图1示出本文所述的用于制备脂质-核酸纳米颗粒的方法的示意图。所述方法的每个步骤的细节在下文中描述。

[0022] 图2示出作为从0.05至0.5mg/mL的最终RNA浓度的函数的以纳米 (nm) 计的平均粒径。实验细节在实施例1中提供。

[0023] 图3示出在混合脂质与RNA的同时作为缓冲液pH的函数的以nm计的平均粒径。实验细节在实施例2中提供。

[0024] 图4示出如实施例3所述利用实施例2的方法 (NDT-0009) 或Semple方法制备的颗粒的平均粒径。左边的条为混合之后大小的尺寸的测量。右边的条为最终产物(对于Semple方法的产物,挤出和渗滤之后)的测量。

[0025] 图5示出如实施例3所述利用实施例2的方法(实施例2的方法)或 Semple方法制备的颗粒的以百分比计的包裹效率(EE)。左边的条为混合之后大小的尺寸的测量。右边的条为最终产物(对于Semple方法的产物,挤出和渗滤之后)的测量。

[0026] 图6示出如实施例3所述利用实施例2的方法或Semple方法制备的颗粒的以百分比计的siRNA回收率。

具体实施方式

[0027] 本文涉及一种制备脂质包裹的治疗分子的方法,所述治疗分子包括带负电荷的治疗聚合物,例如核酸、蛋白和肽。本文包括一种制备脂质包裹的核酸分子的方法。所述方法特别适合大规模制备由脂质体包裹的治疗分子组成的颗粒。所述方法提供出人意料和令人惊讶的结果,所制备的颗粒具有50-150nm的大小分布,多分散性指数(PDI)小于0.2。这种方法提供一种包裹方式,组合溶于与水混溶的有机溶剂如乙醇的脂质与溶于水溶液的带负电荷的治疗聚合物,并且去除所述有机溶剂。脂质和带负电荷的治疗聚合物的绝对和相对浓度足以产生小颗粒。通过本文的方法制备的颗粒不需要机械加工如挤出以获得具有小于0.2的PDI的颗粒群体。

[0028] 本文的方法相对于以前的方法具有优势,其可以容易地放大至大体积,并且其对于广泛的温度、溶质、pH和加工时间是稳健的。

[0029] 本文的方法相对于以前的方法具有优势,其可重复地制备具有小于0.2、优选小于0.1的PDI的颗粒群体,并且没有制备预制囊泡所需的额外步骤。

[0030] 本文的方法相对于以前的方法具有优势,其可重复地制备纳米颗粒的均匀群体而没有机械加工脂质和带负电荷的治疗聚合物的混合物所产生的颗粒所需的额外步骤。这些额外步骤包括例如超声、匀浆或挤出以减小它们的大小并使均匀性达到治疗可接受的范围。

[0031] 本文的方法具有优势,其达到等于或优于以前方法的核酸包裹效率而没有制备纳

米颗粒的额外加工步骤。

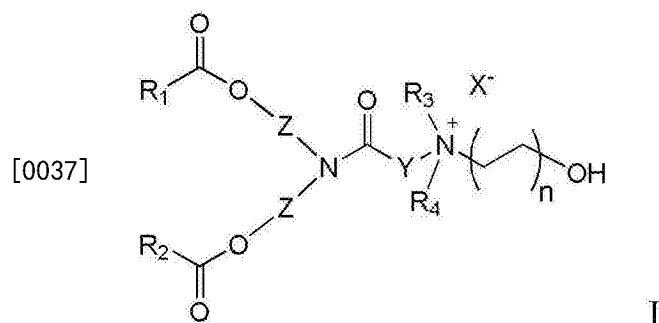
[0032] 本文的方法的其他优势会随着本文中提供的关于脂质组分和条件的进一步细节而变得显而易见。

[0033] 用于本文的方法的脂质混合物包含至少带正电荷的脂质(阳离子脂质) 以与带负电荷的治疗聚合物和包含聚乙二醇的脂质缀合物(PEG-脂质) 复合以防止聚集。阳离子脂质可以是在广泛的pH条件下永久的阳离子电荷;可电离的阳离子脂质,其在低pH(低于pH6) 下带电荷而在中性pH(pH6.5-8) 下没有净电荷;或者永久和可电离的阳离子脂质的组合。脂质混合物还可以包含靶向脂质、聚合物、类固醇、磷脂或另一脂质组的成员,包括脂肪、蜡、脂溶性维生素、单酸甘油酯或甘油二酯、脂肪酰基、甘油酯、甘油磷脂、鞘脂类、糖脂和聚酮。这种方法还可以用于仅用中性或带负电荷的组分形成脂质体。

[0034] 优选地,脂质混合物的组分可以选自以下组。

[0035] 阳离子脂质

[0036] 在本文的范围内为式I的阳离子脂质



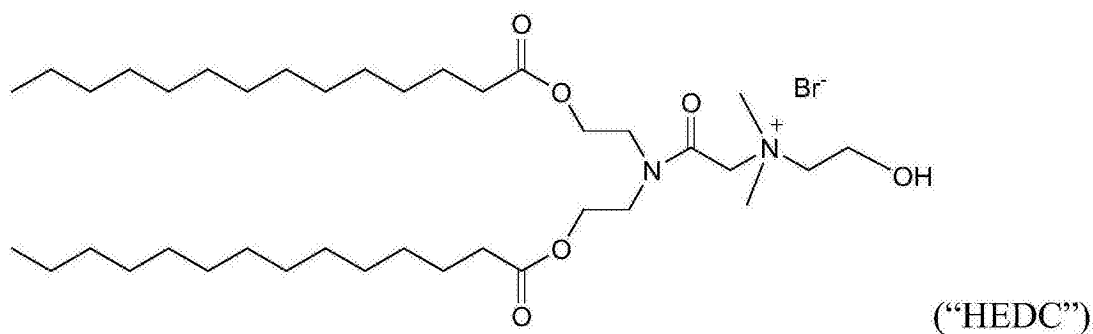
[0038] 其中

[0039] Z=烷基接头,C₂-C₄烷基

[0040] Y=烷基接头,C₁-C₆烷基

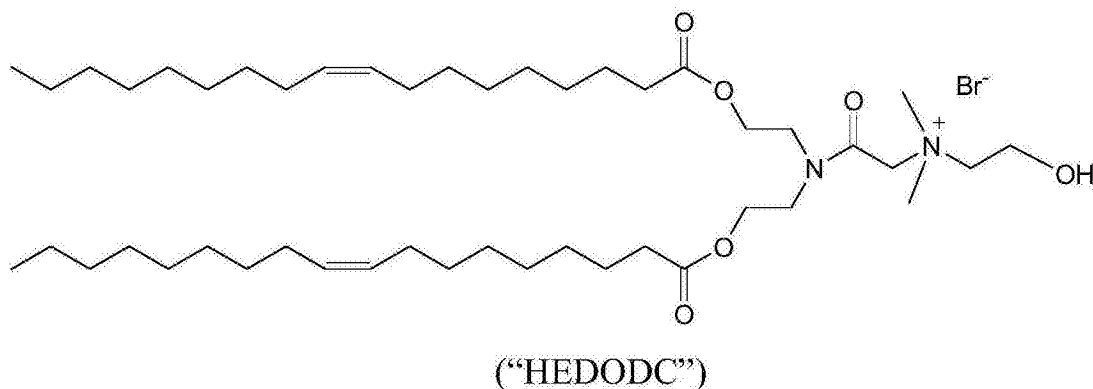
[0041] R₁和R₂互相独立地为C₁₀-C₃₀烷基、C₁₀-C₃₀烯基、或C₁₀-C₃₀炔基、C₁₀-C₃₀烷基、C₁₀-C₂₀烷基、C₁₂-C₁₈烷基、C₁₃-C₁₇烷基、C₁₃烷基、C₁₀-C₃₀烯基、C₁₀-C₂₀烯基、C₁₂-C₁₈烯基、C₁₃-C₁₇烯基、C₁₇烯基;R₃和R₄互相独立地为氢、C₁-C₆烷基、或-CH₂CH₂OH、C₁-C₆烷基、C₁-C₃烷基;n为1-6;并且X为反荷离子,包括任何氮反荷离子,该术语在本领域中容易理解。优选的氮反荷离子包括卤素,特别优选氯化物和溴化物。另一优选的反荷离子为甲磺酸盐(-SO₃CH₃)。

[0042] 式I的示例性化合物包括:



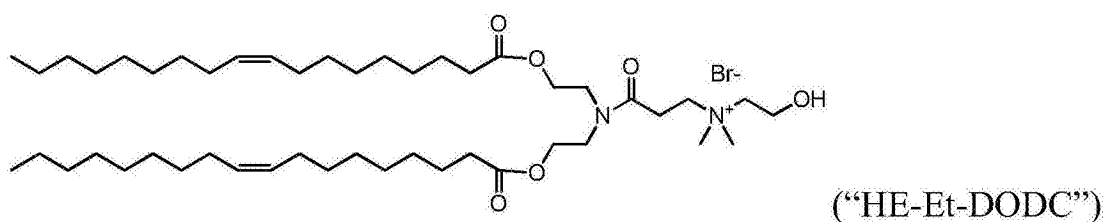
和

[0043]



和

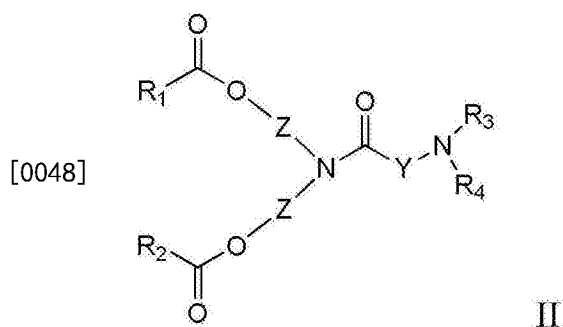
[0044]



[0045] 其他在生理pH下带阳离子电荷的脂质包括但不限于N,N-二油基-N,N-二甲基氯化铵(“DODAC”);N-(2,3-二油基氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵(“DOTMA”);N,N-二硬脂基-N,N-二甲基溴化铵(“DDAB”);N-(2,3-二油基氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵(“DOTAP”);N-(1,2-二肉豆蔻基氧基丙-3-基)-N,N-二甲基-N-羟基乙基溴化铵(“DMRIE”)、3β-(N-(N',N'-二甲基氨基乙烷)氨甲酰基)胆固醇(“DC-Chol”)、二十八烷基酰氨基甘氨酸羧基亚精胺(“DOGS”);以及N-(1-(2,3-二油基氧基)丙基)-N-(2-(精胺酰氨基)乙基)-N,N-二甲基三氟乙酸铵(“DOSPA”)。

[0046] 可电离的阳离子脂质

[0047] 在本文的范围内为式II的可电离的阳离子脂质



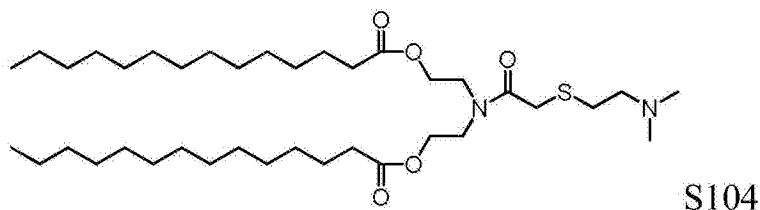
[0049] 其中

[0050] Z=烷基接头, C₂-C₄烷基, -CH₂SCH₂CH₂-

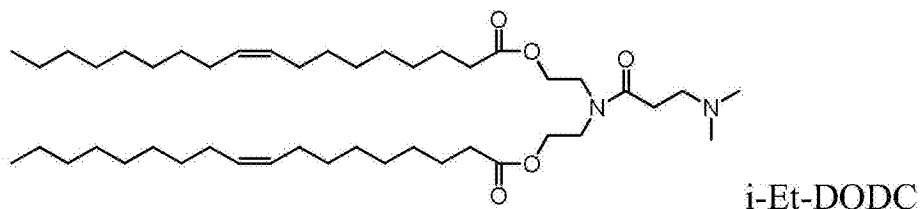
[0051] Y=烷基接头, C₁-C₆烷基

[0052] R₁和R₂互相独立地为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和R₄互相独立地为氢、C₁-C₆烷基、或-CH₂CH₂OH、C₁-C₆烷基、C₁-C₃烷基。

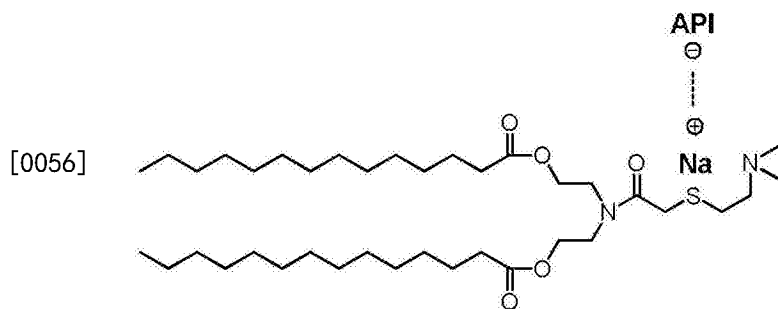
[0053] 一些带正电荷的脂质具有生理pH或接近生理pH的pK_a, 并且在弱酸条件下为阳离子, 在生理pH下为弱阳离子。这类可电离的阳离子脂质包括但不限于((2-((2-(二甲基氨基)乙基)硫代)乙酰基)氮烷二基)双(乙烷-2,1-二基)二癸酸酯("S104")、(Z)-((3-(二甲基氨基)丙酰基)氮烷二基)双(乙烷-2,1-二基)二油酸酯("i-Et-DODC")、N-(2,3-二油基氧基)丙基N,N-二甲基氯化铵 ("DODMA") 和1,2-二油酰基-3-二甲基铵-丙烷("DODAP")。



[0054]



[0055] 应当认识到如下文所示, 可电离的脂质可以促进活性药物成分 (API) 的结合和/或释放。



[0057] 中性脂质

[0058] 中性脂质的实例包括但不限于磷脂、氨基脂质和鞘脂类。中性脂质包括两亲脂质。

磷脂的代表性实例包括但不限于磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、磷脂酸、棕榈酰油酰基磷脂酰胆碱、溶血磷脂酰胆碱、溶血磷脂酰乙醇胺、二棕榈酰磷脂酰胆碱、二油酰基磷脂酰胆碱、二硬脂酰基磷脂酰胆碱或二亚油酰基磷脂酰胆碱。缺少磷的其他化合物如鞘脂类、鞘糖脂家族、二酰基甘油和3-酰氧基酸也在称为两亲脂质的组内。此外,上述两亲脂质可以与包括甘油三酯和甾醇在内的其他脂质混合。

[0059] PEG-脂质

[0060] 双层稳定组分为缀合至脂质头基如磷脂酰乙醇胺的聚乙二醇(“PEG”)。另一双层稳定组分为缀合至神经酰胺的PEG。可以利用本领域技术人员已知并使用的标准偶联反应将PEG缀合至磷脂酰乙醇胺,或者缀合至神经酰胺。此外,预制的PEG-磷脂酰乙醇胺(“PEG-PE”)缀合物是可商购的。

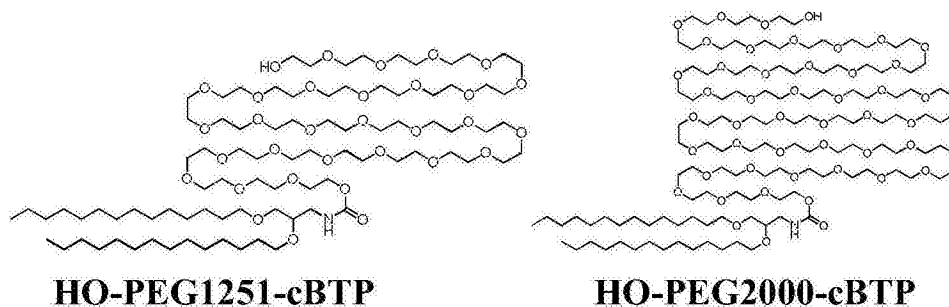
[0061] 不同分子量的PEG可以用来形成本发明的双层稳定组分。不同分子量的PEG可商购自许多不同来源,或者它们可以利用本领域技术人员公知的标准聚合技术来合成。在目前优选的实施方案中,聚乙二醇具有200-10000 Da、优选500-4000Da、并且最优选1000-2000Da的分子量。一般来说,已发现增加PEG的分子量减少达到稳定所需的双层稳定组分的浓度。

[0062] 可以将具有各种不同链长度和饱和程度的酰基链基团的磷脂酰乙醇胺缀合至PEG以形成双层稳定组分。这类磷脂酰乙醇胺是可商购的,或者可以利用本领域技术人员已知的常规技术分离或合成。优选具有C10-C20的碳链长度的包含饱和或不饱和脂肪酸的磷脂酰乙醇胺。还可以使用具有单或二不饱和脂肪酸以及饱和和不饱和脂肪酸的混合物的磷脂酰乙醇胺。合适的磷脂酰乙醇胺包括但不限于以下:二肉豆蔻酰基磷脂酰乙醇胺(DMPE)、二棕榈酰磷脂酰乙醇胺(DPPE)、二油酰基磷脂酰乙醇胺(DOPE)和二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺(DSPE)。

[0063] 上述组合物还可以包括本领域已知的PEG缀合的脂质,包括PEG-磷脂和PEG-神经酰胺,包括选自以下的一种或多种分子: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-胆固醇、PEG2000-神经酰胺、PEG1000-神经酰胺、PEG750-神经酰胺和PEG550-神经酰胺。

[0064] 此外,组合物还可以包括单分散(md)PEG-脂质,其具有通式mdPEG-接头-脂质,实例包括但不限于83-羟基-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60,63,66,69,72,75,78,81-二十七氧杂八十三烷酰基(heptacosaoxatrioctacontyl)(2,3-双(十四烷基氧基)丙基)氨基甲酸酯(“HO-PEG1251-cBTP”)和134-羟基-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杂一百三十四烷酰基(tetratetracontaoxatetatriacontahectyl)(2,3-双(十四烷基氧基)丙基)氨基甲酸酯(“HO-PEG2000-cBTP”)。

[0065]



[0066] 类固醇

[0067] 类固醇包括胆甾烷(例如,胆固醇)、胆烷和胆汁酸(例如,鹅脱氧胆酸酯和胆酸酯)、麦角甾醇、羊毛甾醇、皮质类固醇(例如,糖皮质激素)、孕烷(例如,孕酮)和植物甾醇。还可以与亲水部分如聚乙二醇的缀合物形式包括这些。优选的类固醇为胆固醇。

[0068] 靶向脂质

[0069] 靶向脂质的实例为式(A)的化合物,

[0070] L-X-R A

[0071] 其中

[0072] • 脂质(L)选自DSPE、DOPE和DC;

[0073] • 接头(X)选自无(nothing)、PEG550、PEG2000、PEG-谷氨酸酯(-Glu)、Glu、C6、甘氨酸、和GluNH、N1,N19-双(3-(2-(2-(3-氨基丙氧基)乙氧基)乙氧基)丙基)-4,7,10,13,16-五氧杂十九烷-1,19-二酰胺;并且

[0074] • 类视黄醇(R)选自维甲酸、阿达帕林、视黄醇、4-羟基(苯基)维甲酰胺(4-HPR)、视黄酸(维生素A)、9-(2,6,6-三甲基环己-1-烯-1-基)壬酸、3,7-二甲基-9-(2,6,6-三甲基环己-1-烯-1-基)壬酸、3,7-二甲基-9-(2,2,6-三甲基环己基)壬酸,以及任何部分或完全饱和的类视黄醇或者它们的衍生物。

[0075] 靶向脂质的另一实例为式(B)的化合物,

[0076] R-X-R B

[0077] 其中

[0078] • 接头(X)为N1,N19-双(3-(2-(2-(3-氨基丙氧基)乙氧基)乙氧基)丙基)-4,7,10,13,16-五氧杂十九烷-1,19-二酰胺(“双酰氨基-PEG”)或N1,N19-双(16,20-二氨基-15-氧代-4,7,10-三氧杂-14-氮杂二十级烷基(azaicosyl))-4,7,10,13,16-五氧杂十九烷-1,19-二酰胺(“lys-双酰氨基-PEG-lys”);并且

[0079] • 类视黄醇(R)选自维甲酸、阿达帕林、视黄醇、4-羟基(苯基)维甲酰胺(4-HPR)、和视黄酸(维生素A)、9-(2,6,6-三甲基环己-1-烯-1-基)壬酸、3,7-二甲基-9-(2,6,6-三甲基环己-1-烯-1-基)壬酸、3,7-二甲基-9-(2,2,6-三甲基环己基)壬酸,以及任何部分或完全饱和的类视黄醇或者它们的衍生物。

[0080] 脂质混合物中可以包括其他靶向分子,例如叶酸、维生素E、肽配体和/或单克隆抗体。

[0081] 药物-脂质颗粒组合物和制剂

[0082] 本文包括包含有或没有活性剂的脂质颗粒的组合物,其中所述活性剂在存在时与所述脂质颗粒相关联。在具体实施方案中,所述活性剂为治疗剂。在具体实施方案中,所述

活性剂为包裹在所述脂质颗粒的水性内部的带负电荷的治疗聚合物。在其他实施方案中,所述活性剂存在于所述脂质颗粒的一个或多个脂质层内。在其他实施方案中,所述活性剂结合至脂质颗粒的脂质外表面或内表面。

[0083] 在某些实施方案中,本发明的脂质颗粒与核酸相关联,导致核酸-脂质颗粒。在具体实施方案,核酸完全包裹在脂质颗粒中。如本文所用,术语“核酸”包括任何寡核苷酸或多核苷酸。在具体实施方案中,本发明的寡核苷酸长度为15-50个核苷酸。

[0084] 在本文中术语“多核苷酸”(PNA)和“寡核苷酸”指由天然存在的碱基、糖和糖间(骨架)键组成的核苷酸或核苷单体的聚合物或寡聚物。术语“多核苷酸”和“寡核苷酸”还包括这样的聚合物或寡聚物,其包含功能相似的非天然存在的单体或其部分。相对于天然形式,常优选这类修饰或取代的寡核苷酸,这是因为特性,例如增加的细胞摄取以及在核酸酶的存在下增加的稳定性。

[0085] 寡核苷酸可以为寡脱氧核糖核苷酸或寡核糖核苷酸。寡脱氧核糖核苷酸由脱氧核糖组成,脱氧核糖在这种糖的5'和3'碳共价连接至磷酸酯以形成带负电荷的交替的不分支的聚合物。寡核糖核苷酸有相似的重复结构组成,其中每个核苷酸具有核糖基团。寡核糖核苷酸中可以包括修饰的核糖分子。

[0086] 存在于本发明的脂质-核酸颗粒中的核酸包括已知的任何形式的核酸。本文所用的核酸可以为单链DNA或RNA,或者双链DNA或RNA,或者DNA-RNA杂化物或PNA双链体的RNA-PNA和/或DNA-PNA杂化物。双链DNA的实例包括结构基因,包括控制和终止区的基因以及自我复制系统如病毒或质粒DNA。双链RNA的实例包括siRNA和其他RNA干扰试剂。单链核酸包括例如反义寡核苷酸、核糖核酸酶、微RNA和三链形成寡核苷酸。

[0087] 核酸可以具有各种长度,一般取决于核酸的具体形式。例如,在具体实施方案中,质粒或基因长度可以为约1,000-100,000个核苷酸残基。在具体实施方案中,寡核苷酸长度可以为约10-100个核苷酸。在各种相关实施方案中,无论单链、双链或三链,寡核苷酸长度可以为约10-约50个核苷酸,约21-约50个核苷酸,约15-约30个核苷酸,约20-约30个核苷酸。50个核苷酸或更少的多核苷酸一般称为“片段”。

[0088] 在具体实施方案中,寡核苷酸(或其链)可以特异性地杂交至靶多核苷酸或与靶多核苷酸互补。“可特异性地杂交”或“互补”是用于指示足够程度的互补性的术语,从而DNA或RNA靶标与寡核苷酸之间发生稳定和特异性的结合。应当理解寡核苷酸不必与其靶核酸序列100%互补以便可特异性地杂交。当寡核苷酸与其靶标的结合干扰靶分子的正常功能以引起功用或由此表达的减少或丧失,并且有足够程度的特异性碱基配对以避免在期望特异性结合的条件下(即,在体内测定或治疗的情况下在生理条件下,或者在体外测定的条件下在进行测定的条件下)寡核苷酸与非靶标序列的非特异性结合时,寡核苷酸可特异性地杂交。因此,在其他实施方案中,与其靶向或特异性杂交的基因或mRNA序列的区域相比,这种寡核苷酸包括1、2或3个碱基取代。

[0089] 在具体实施方案中,核酸-脂质颗粒可以与RNA干扰(RNAi)分子相关联。利用RNAi分子的RNA干扰方法可以用来破坏所关注的基因或多核苷酸的表达。siRNA是通常15-30个核苷酸长的RNA双链,其可以与称为RNAi诱导的沉默复合物(RISC)的细胞质多蛋白复合物相关联。装有siRNA的RISC介导同源mRNA转录物的降解;因此可以设计siRNA以高特异性地敲低蛋白表达。不像其他反义技术,siRNA通过非编码RNA控制基因表达所发展的天然机制

来发挥功能。一般认为这是为什么它们的活性在体外和体内比反义寡核苷酸或核糖核酸酶更强的原因。RNAi试剂可以包括DNA正义:RNA反义杂化物、RNA正义:DNA反义杂化物,并且DNA:DNA杂化物能够介导RNAi。因此,可以使用包含任何这些不同类型的双链分子的RNAi分子。此外,应当理解可以以各种形式使用RNAi分子和将RNAi分子引入细胞。因此,如本文所用,RNAi分子涵盖能够在细胞中诱导RNAi反应的任何和所有分子,包括但不限于包含两个不同链,即正义链和反义链的双链多核苷酸,例如小干扰RNA(siRNA);包含形成双链区的互补序列的发夹环的多核苷酸,例如shRNAi分子,以及表达能够单独或与另一多核苷酸组合形成双链多核苷酸的一种或多种多核苷酸的表达载体。

[0090] RNA干扰(RNAi)可以用来特异性地抑制靶多核苷酸的表达。双链RNA介导的基因和核酸表达的抑制可以根据本发明通过将dsRNA、siRNA或shRNA引入细胞或生物体来完成。siRNA可以为双链RNA,或者包含RNA和DNA的杂交分子,例如一条RNA链和一条DNA链,或者sisRNA。

[0091] 可以根据本领域已知的方法容易地制备靶向特异性多核苷酸的RNAi分子。因此,本领域技术人员会理解各种不同的siRNA分子可以用来靶向特异性基因或转录物。在某些实施方案中,本发明的siRNA分子为长链,长度为16-30或18-25个核苷酸,包括其间的每个整数。

[0092] 一般来说,siRNA分子与靶DNA分子的一条链完全互补。在其他实施方案中,siRNA可以具有修饰的组成,例如2'脱氧或2'-O-甲基修饰。但是,在优选实施方案中,siRNA的整条链没有2'脱氧或2'-O-修饰的碱基。

[0093] 在某些实施方案中,本发明涉及用于制备脂质包裹的核酸颗粒的方法和组合物,其中核酸包裹在脂质层内。这类掺入siRNA寡核苷酸的核酸-脂质颗粒的特征在于使用各种生物物理参数,包括:(1)核酸比脂质比例;(2)包裹效率;以及(3)粒径。高包裹效率、良好的核酸酶抗性和血清稳定性以及可控的粒径(直径一般小于200nm)是期望的。此外,核酸聚合物的性质具有显著性,因为努力赋予核酸酶抗性的核酸修饰增加疗法的费用,但是在许多情况下仅提供有限的抗性。除非另有说明,在本说明书中这些标准计算如下:

[0094] 药物:脂质比例是在限定的制品体积中药物的量除以相同体积中脂质的量。这可以以摩尔/摩尔基础或重量/重量基础或重量/摩尔基础表示。对于最终的准备给药的制剂,在透析、色谱和/或酶(例如,核酸酶)消化已用来去除尽可能多的外部药物之后计算药物:脂质比例。

[0095] 包裹

[0096] 为了确定表示为脂质-核酸颗粒中包裹的siRNA百分比的siRNA包裹效率(EE),利用RiboGreen测定如下。该方法可以用来确定溶液中双链和单链RNA或DNA浓度。

[0097] 设备包括BioTek Instruments, Inc. FLx800, 可变移液器和涡旋混合器。试剂包括不含RNA酶的水(MilliQ级,或者相当), 20x TE缓冲液“不含RNA酶”(Invitrogen, T11493, 或者相当), Quant-iT RiboGreen试剂(Invitrogen, R11491)以及水中的10%曲拉通(Triton) X-100 (Thermo Scientific, 28314, 或者相当)。

[0098] 1X TE缓冲液的制备包括利用50mL量筒将38mL不含RNA酶的水转移入50mL离心管; 以及将2mL的20X TE缓冲液移入该离心管并利用涡旋器混合。

[0099] 1X TE缓冲液中2%曲拉通X-100和1%曲拉通X-100的制备包括分别将2mL或1mL的

10%曲拉通X-100移入不含RNA酶的15mL锥形管,分别添加8mL或9mL的1X TE缓冲液,并且旋转以混匀。

[0100] RiboGreen工作液的制备包括取出Ribogreen试剂的冷冻储液,升温至室温并用TE缓冲液1:200稀释。将离心管用铝箔包裹以防止任何过量的光到达溶液。

[0101] 通过制备TE缓冲液中的RNA溶液并加入96孔板来制备标准品。如图1所示,将样品稀释至约80 μ g/mL siRNA的终浓度并转移至96孔板。添加Ribogreen工作液并与每个样品和标准品混合。分析之前将样品在黑暗中温育1-2分钟。

[0102] 然后将TE缓冲液中的1%曲拉通X-100添加至重复的样品,然后添加 Ribogreen工作液。

[0103] 从利用每个样品所得的荧光平均值的荧光测量确定包裹效率,对外部样品的平均值基线测量(不存在RNA的情况下Ribogreen试剂的荧光)进行修正,之后由于曲拉通X-100的存在,修正信号强度减少8%。然后利用以下等式计算包裹效率:

[0104] $EE = (\text{曲拉通样品} - \text{脂质体样品}) / (\text{曲拉通样品})$

[0105] 即,包裹效率为总RNA值(用去污剂溶解脂质体之后测量)与完整脂质体值之间的差异除以总RNA值。获得自完整脂质体样品的荧光由溶液中的游离RNA加上吸附在脂质体外表面上的RNA组成。

[0106] 大小

[0107] 大小表示形成的颗粒的大小(直径)。可以利用Malvern Zetasizer Nano-ZS动态光散射(DLS)仪器确定大小分布。

[0108] 这种方法用来测量加工中的脂质体样品的体积平均直径、Z-平均直径和多分散性。多分散性是粒径分布的数值。

[0109] 在室温下进行测量。应当将样品和试剂平衡至室温。确定体积加权的平均粒径和多分散性指数。

[0110] 制备方法

[0111] 脂质体的制备

[0112] 可以将脂质混合物溶于与水混溶的有机溶剂,优选无水乙醇。在大多数实施方案中,以可商购的形式使用有机溶剂。

[0113] 在一示例性实施方案中,脂质混合物为阳离子氨基脂质、中性脂质(除氨基脂质以外)、类固醇(例如,胆固醇)和PEG修饰的脂质(例如, PEG-S-DMG、PEG-C-DMG或PEGDMA)的混合物,共溶于有机溶剂。在优选实施方案中,脂质混合物基本上由阳离子氨基脂质、中性脂质、胆固醇和PEG修饰的脂质组成。在其他优选实施方案中,脂质混合物由各种摩尔比的阳离子脂质、DOPE(或其他辅助脂质,具有可电离或永久的阳离子电荷)、胆固醇和PEG缀合的脂质组成。优选的摩尔范围为40-60摩尔%阳离子脂质、10-30%中性脂质、20-40%胆固醇和1-10%PEG修饰的脂质。

[0114] 可以将靶向脂质以0.1-5的摩尔比(靶向脂质:总脂质)添加至脂质混合物,例如 diVA-PEG750-diVA(或其他VA缀合的靶向脂质)。

[0115] 脂质的总浓度小于25mg/mL,优选小于5mg/mL。将脂质混合物通过膜如0.45或0.2 μ m滤器过滤。

[0116] 根据本发明,将脂质化合物与缓冲水溶液组合。缓冲水溶液可以是其中缓冲液具

有低于脂质混合物中质子化脂质的pKa的pH的溶液。合适的缓冲液的实例包括柠檬酸盐、磷酸盐和乙酸盐。特别优选的缓冲液为柠檬酸盐缓冲液。优选的缓冲液在1-1000mM阴离子的浓度范围中,这取决于包裹的核酸的化学性质,并且缓冲液浓度的优化对于达到高负荷水平具有重要意义。可以适当地添加冷冻保护剂和/或非离子溶质,这会平衡整个颗粒膜的渗透势,例如,在透析颗粒以去除乙醇时,增加pH,或者与药学可接受的载体或稀释剂混合。缓冲液中核酸的量为约0.08-0.8mg/mL。

[0117] 在添加乙醇时,水溶液的温度为25-45℃,优选30-40℃。通过喷洒在气水界面上,在细流中,或者通过浸入水溶液的管递送的乙醇之间的液体-液体界面来将乙醇溶液添加至水溶液。

[0118] 通过重力或通过泵来添加有机溶液,以受控速率,优选恒定速率将有机溶液递送至水溶液。有机溶液的递送可以在1分钟-100分钟中进行,优选1-25分钟。可以通过单一喷洒或流,通过管或喷嘴,或者通过多喷嘴系统来添加有机溶液。在将有机溶液加入水溶液的同时,可以通过搅拌、振荡或再循环来混合所得的溶液。添加步骤导致优选25-45%乙醇,最优选35%乙醇的终浓度。

[0119] 通过透析或过滤,优选通过渗滤处理终溶液以去除有机溶剂。去除乙醇的同时,将水溶液转化为缓冲在中性pH, pH6.8-pH7.5、优选pH7.2的水溶液,例如磷酸盐或HEPES缓冲液。优选在储存或使用之前例如通过 0.22μm滤器过滤来将所得的水溶液灭菌。

[0120] 包裹带负电荷的治疗聚合物的脂质体

[0121] 本文所述的方法可用于制备具有带负电荷的治疗聚合物如RNA分子的脂质颗粒。在本文所述的方法中,将脂质的混合物与聚合物的水溶液组合。聚合物有效地包裹在所得的脂质颗粒中。

[0122] 纳米颗粒可以包括聚阴离子活性剂或治疗剂,例如RNA,以及1、2 或3种生物相容的聚合物。示例性治疗剂包括核酸、抗肿瘤剂如紫杉烷类。

[0123] 在添加时带负电荷的聚合物的总电荷必须少于或等于脂质混合物中正电荷的数量,优选0.06-0.16 (w:w)。例如,在使用RNA时,包裹的核酸以 RNA:脂质0.06-0.16,电荷:电荷(-/+),优选1:2.5-1:1的最终比例存在。

[0124] 当脂质混合物包含具有电荷的阳离子脂质时,可以在带负电荷的聚合物的存在下形成脂质囊泡以包裹和包埋所述聚合物。可以通过将介质的pH 增加至生理pH或更高来中和所得的颗粒。以这种方式形成的囊泡提供核酸含量高的囊泡大小均匀的制剂。

[0125] 在任一情况下,包裹聚合物的囊泡(纳米颗粒)具有50-150nm的大小范围。

[0126] 根据本文所述的方法,将脂质混合物与可以包含带负电荷的聚合物的缓冲水溶液组合。缓冲水溶液可以是其中缓冲液具有低于脂质混合物中质子化脂质的pKa的pH的溶液。合适的缓冲液的实例包括柠檬酸盐、磷酸盐、乙酸盐和MES。特别优选的缓冲液为柠檬酸盐缓冲液。优选的缓冲液在1-1000mM阴离子的范围中,这取决于包裹的聚合物的化学性质,并且缓冲液浓度的优化对于达到高负荷水平具有重要意义。

[0127] 可以适当地添加冷冻保护剂和/或非离子溶质,这会平衡整个颗粒膜的渗透势,在透析颗粒以去除乙醇时增加pH,或者与药学可接受的载体或稀释剂混合。

[0128] 对于RNA,本文所述方法的示意图如图1所示。通过将冻干或固体材料溶于水来制备溶液,优选例如用50mM柠檬酸盐缓冲在pH3.5-4.5下。缓冲液中核酸的量为0.08-0.8mg/

mL。在添加乙醇时,水溶液的温度为 25-45℃,优选30-40℃。如果使用单链核酸,在升高的温度下短暂加热是可用的,例如在65℃下1-2分钟。

[0129] 通过喷洒在气水界面上,在细流中,或者通过连接至具有水溶液的容器的管递送的乙醇之间的液体-液体界面来将乙醇溶液添加至水溶液。

[0130] 通过以受控速率,优选恒定速率将有机溶液递送至水溶液来添加有机溶液。有机溶液的递送可以在1分钟-100分钟中进行,优选1-25分钟。可以通过单一喷洒或流,通过管或喷嘴,或者通过多喷嘴系统来添加有机溶液。在将有机溶液加入水溶液的同时,可以通过搅拌、振荡或再循环来混合所得的溶液。添加步骤导致足以破坏脂质体双层结构的终浓度,优选 25-45%乙醇,最优选35%乙醇。

[0131] 对于脂质-核酸颗粒,最终RNA浓度为0.001-1mg/ml,优选0.01-0.5 mg/ml,最优选0.05-0.5mg/ml。最终药物/脂质比例为0.06-0.16w:w (2.5:1-1:1,电荷:电荷比例)。

[0132] 通过透析或过滤,优选通过渗滤处理终溶液以去除有机溶剂。去除乙醇的同时,将水溶液转化为缓冲在中性pH,pH6.8-pH7.5、优选pH7.2的水溶液,例如磷酸盐缓冲液。优选在储存或使用之前例如通过0.22μm滤器过滤来将所得的水溶液灭菌。

[0133] 最终包裹效率大于85%。最终平均粒径为50-150nm。多分散性指数 PDI小于0.2,优选小于0.1。

[0134] 冷冻干燥

[0135] 本文部分涉及冷冻干燥的药物组合物,在复原时,其具有最少量的大聚集体。这类大聚集体可以具有大于约0.2μm,大于约0.5μm,或者大于约1μm的大小,并且在复原溶液中可以是不期望的。可以利用各种技术测量聚集体大小,包括美国药典32<788>所示的那些方法,其援引加入本文。测试可以包括光阻粒子计数测试、显微粒子计数测试、激光衍射和单粒子光学传感。在一实施方案中,利用激光衍射和/或单粒子光学传感测量给定样品中的粒径。动态光散射(DLS)可以用来测量粒径,但是其依赖于布朗运动,所以该技术不可以检测一些较大的颗粒。激光衍射依赖于颗粒与悬浮介质之间折射率的差异。该技术能够在亚微米至毫米范围内检测颗粒。可以在纳米颗粒悬浮液中确定相对少量(例如,约1-5重量%)的较大颗粒。单粒子光学传感(SPOS)使用稀悬浮液的不透光度以计数约0.5pm的单个颗粒。通过知道测量的样品中的颗粒浓度,可以计算聚集体的重量百分比或聚集体浓度(颗粒/mL)。

[0136] 聚集体的形成可以在冷冻干燥的冷冻和/或干燥步骤发生,例如由于颗粒表面的脱水。冷冻过程具有浓缩效果,在冰形成时可以减少颗粒之间的距离(Alison et al., Biochim Biophys Acta.2000Sep29;1468(1-2):127-38; Armstrong and Anchordoquy, J Pharm Sci.2004Nov;93(11):2698-709)。通过在冷冻干燥之前于悬浮液中使用冻干保护剂如多糖可以避免这种脱水。合适的多糖包括蔗糖、乳果糖、乳糖、麦芽糖、海藻糖、或纤维素二糖、曲二糖、黑曲霉二糖、异麦芽糖、海藻糖、2-葡萄糖-β-葡萄糖苷、昆布二糖、龙胆二糖、松二糖、麦芽酮糖、帕拉金糖、gentiobiulose、甘露二糖、蜜二糖、车前二糖、芸香糖、芦丁糖(rutinulose)和木二糖。在一实施方案中,所述组合物包含为蔗糖的多糖。在另一实施方案中,所述组合物包含为海藻糖的多糖。申请人的结果显示当与起始悬浮液相比时,在复原时获得相当的DLS 大小分布。

[0137] 以前认为在玻璃状赋形剂中固定大分子的过程玻璃化在防止脂质体聚集中不是促进因素,并且需要糖的高渗溶液(Alison等人)。本发明人发现冷冻干燥的冷冻和干燥步

骤的结果取决于一定的脂质:多糖比例(w:w),这提供一种防止脂质体聚集、脂质体扩散屏障的破坏以及释放包裹的RNA以形成核酸脂质复合物的方式。在一实施方案中,所述组合物包含12-15% (w:w) 蔗糖和5-20mg/ml脂质,优选12%蔗糖和9mg/ml脂质。更优选地,所述组合物还包含缓冲液,最优选中性pH的HEPES。

[0138] 冷冻干燥步骤在合适的玻璃容器中进行,优选10ml的圆柱形玻璃小瓶。所述玻璃小瓶必须承受在短时间内低于-40℃和高于室温的极端温度变化,并且切割为均匀形状。将包含膨胀剂和包裹核酸的脂质体的组合物添加至小瓶,优选体积为3ml,并且优选具有9mg/ml脂质。

[0139] 冷冻干燥的步骤可以包括在高于约-40℃,或者例如低于约-30℃的温度下冷冻所述组合物,形成冷冻组合物,并且干燥所述冷冻组合物以形成冻干组合物。冷冻步骤优选在约6分钟内导致温度线性降低至最终温度,优选以1℃/分钟从20℃至-40℃。更优选地,可以使用12-15%的蔗糖,并且干燥步骤在约50-150毫托(mTorr)下,首先在约-15℃至约-35℃的低温下,此后在室温至约25℃的较高温度下,并且在3-7天内完成。在本公开的另一实施方案中,可以使用海藻糖,并且干燥步骤在约50-100毫托下,首先在约0℃至约-15℃的低温下,然后在较高温度下。

[0140] 在另一方面,本发明提供一种防止药物纳米颗粒组合物中颗粒大量聚集的方法,所述方法包括将糖和盐添加至冻干制剂以防止聚集以及从脂质体内部释放核酸。

[0141] 药物组合物

[0142] 本文公开的脂质颗粒,特别是当与治疗剂关联时,可以配制为药物组合物,例如其还包含药学可接受的稀释剂、赋形剂或载体,如生理盐水或磷酸盐缓冲液,根据给药途径和标准药物实践来选择。本领域技术人员会理解,可以基于如下文所述的给药途径、靶组织的部位、递送的药物、药物递送的时间进程等选择载体。

[0143] 可以通过本领域已知的任何方式将本发明的药物组合物给药至患者。如本文所用,术语“患者”指人以及非人,包括例如哺乳动物、鸟、爬行动物、两栖动物和鱼。例如,非人可以为哺乳动物(例如,啮齿动物、小鼠、大鼠、兔、猴、狗、猫、灵长类或猪)。在某些实施方案中,肠胃外途径是期望的,因为它们避免与消化道中发现的消化酶接触。根据这类实施方案,本发明的组合物可以通过注射(例如,静脉内、皮下或肌肉内、腹腔内注射)、直肠、阴道、局部(如通过粉末、乳膏剂、软膏剂或滴剂)或通过吸入(如通过喷雾)给药。

[0144] 在具体实施方案中,将本发明的纳米颗粒全身如肠胃外,或者通过静脉内输注或注射给药至有需要的个体。

[0145] 在具体实施方案中,根据标准技术制备包含本发明的脂质-核酸颗粒的药物组合物,并且其还包含药学可接受的载体。一般来说,盐水用作药学可接受的载体。其他合适的载体包括例如水,缓冲水,0.9%盐水,0.3%甘氨酸,糖或多糖,例如蔗糖、麦芽糖、海藻糖、角叉菜聚糖、黄原胶、甘露醇、果聚糖(例如,菊粉)、环糊精、木糖醇、山梨醇或聚乙二醇(PGE)包括增加稳定性的糖蛋白,例如白蛋白、脂蛋白、球蛋白。可以包括膨胀剂、冷冻保护剂和/或冻干保护剂以及金属清除剂如EDTA。在包含盐水或其他包含盐的载体的组合物中,优选在脂质颗粒形成之后添加载体。因此,在形成脂质-核酸组合物之后,可以将组合物稀释入药学可接受的载体如生理盐水。

[0146] 可以通过常规的公知的灭菌技术将所得的药物制品灭菌。然后可以将水溶液包装

使用或者在无菌条件下过滤并冻干,在给药之前将冻干的制品与无菌水溶液组合。在需要时所述组合物可以包含药学可接受的辅助物质以接近生理条件,例如pH调节剂和缓冲剂,张力调节剂,如乙酸钠、乳酸钠、氯化钠、氯化钾或氯化钙。此外,脂质悬浮液可以包括脂质保护剂,其在储存时保护脂质免受自由基和脂质过氧化损伤。亲脂性自由基猝灭剂如生育酚和水溶性铁特异性螯合剂如铁草胺(ferrioxamine)是合适的。

[0147] 药物制剂中脂质颗粒或脂质-核酸颗粒的浓度可以广泛变化,即从少于约0.01重量%,通常为或至少为约0.05-5重量%至多达10-30重量%,并且会根据所选的具体给药模式主要通过流体体积、粘度等来选择。例如,可以增加浓度以降低与治疗相关的流体负荷。在患有动脉粥样硬化相关的充血性心力衰竭或严重高血压的患者中这可以是特别可取的。可选地,可以将由刺激性脂质组成的复合物稀释至低浓度以减轻给药部位的炎症。在一组实施方案中,核酸具有连接的标记并用于诊断(通过指示互补核酸的存在)。在这种情况下,给药的复合物的量会取决于所用的具体标记、诊断的疾病状态和临床医生的判断,但是一般为约0.01-约50mg/公斤体重,优选约0.001-约5mg/kg体重。

[0148] 使用方法

[0149] 本文所述的脂质颗粒可以用来在体外或体内将带负电荷的治疗聚合物如核酸递送至细胞。虽然使用本发明的脂质颗粒和相关药物组合物的各种方法的以下描述通过与核酸-脂质颗粒相关的描述来示例,但是应当理解这些方法和组合物可以容易地适合递送任何治疗剂用于治疗会受益于这类治疗的任何疾病或病症。

[0150] 在某些实施方案中,本发明提供将核酸引入细胞的方法。用于引入细胞的优选核酸为siRNA、免疫刺激寡核苷酸、质粒、反义和核糖核酸酶。这些方法可以通过使本发明的颗粒或组合物与细胞接触足以发生细胞内递送的一段时间来进行。

[0151] 本发明的组合物可以吸附至几乎任何细胞类型。一旦吸附,核酸-脂质颗粒可以被一部分细胞胞吞,与细胞膜交换脂质或者与细胞融合。复合物的核酸部分的转移或掺入可以通过这些途径中的任一种进行。为了不限制本发明的范围,据信在颗粒通过胞吞作用摄入细胞的情况下,颗粒与核内体膜相互作用,导致核内体膜不稳定,可能通过非双层相的形成,导致将包裹的核酸引入细胞质。相似地,在颗粒与细胞质膜直接融合的情况下,当融合发生时,脂质体膜融入细胞膜,并且脂质体的内容物与细胞内流体组合。当在体外进行时,细胞与脂质-核酸组合物之间的接触在生物相容的介质中进行。组合物的浓度可以根据具体应用而广泛变化,但是一般为1 μmol -10mmol。在某些实施方案中,用脂质-核酸组合物处理细胞一般在生理温度(37°C)下进行1-24小时的时间,优选2-8小时。对于体外应用,可以将核酸递送至培养物中生长的任何细胞,无论植物或动物来源、脊椎动物或无脊椎动物以及任何组织或类型。在优选实施方案中,细胞为动物细胞,更优选哺乳动物细胞,并且最优选人细胞。

[0152] 在一组实施方案中,将脂质-核酸颗粒悬浮液添加至60-80%汇合的平板细胞,其具有约 10^3 -约 10^5 个细胞/mL的细胞密度,更优选约 2×10^4 个细胞/mL。添加至细胞的悬浮液的浓度优选为约0.01-20 $\mu\text{g/mL}$,更优选约1 $\mu\text{g/mL}$ 。

[0153] 典型的应用包括利用公知的方法提供siRNA的细胞内递送以敲低或沉默特异性细胞靶标。可选地,应用包括递送编码治疗可用的多肽的DNA或 mRNA序列。

[0154] 本发明的方法可以在体外、离体或体内实施。例如,本发明的组合物还可以用于在

体内将核酸递送至细胞,使用本领域技术人员已知的方法。

[0155] 对于体内给药,优选肠胃外给药所述药物组合物,即关节内、静脉内、腹腔内、皮下或肌肉内给药。在具体实施方案中,通过团注射静脉内或腹腔内给药所述药物组合物。

[0156] 在其他方法中,可以通过将制品直接应用至组织来使药物制品与靶组织接触。施用可以通过局部、“开放”或“封闭”方法进行。“局部”表示将药物制品直接施用至暴露于环境的组织,例如皮肤、口咽、外耳道等。“开放”方法是包括切开患者的皮肤并直接可见施用药物制品的皮下组织的方法。这一般通过外科手术完成,例如胸廓切开术以接近肺,腹部探查术以接近腹部内脏,或者其他直接手术方法至靶组织。“封闭”方法为侵入性方法,其中内部靶组织并不直接可见,但是通过皮肤中的小伤口插入仪器来接近。例如,可以通过针灌洗来将制品给药至腹膜。同样地,可以通过如通常用于脊髓麻醉或脊髓的甲泛葡胺成像的在腰椎穿刺期间输液然后患者的适当定位来将药物制品给药至脑膜或脊髓。可选地,可以通过内窥镜设备给药所述制品。

[0157] 脂质-核酸组合物还可以在吸入肺的气雾剂中给药,或者通过在疾病部位直接注射来给药。

[0158] 本发明的方法可以在各种个体或宿主中实施。优选的个体或宿主包括哺乳动物物种如人、非人灵长类、狗、猫、牛、马、羊等。在具体实施方案中,所述个体为需要治疗或预防疾病或病症的哺乳动物如人,例如诊断患有疾病或病症或者认为有疾病或病症风险的个体。

[0159] 本发明的脂质-治疗剂颗粒的剂量取决于治疗剂比脂质的比例以及基于患者的年龄、体重和疾病状况的主管医生的意见。

[0160] 在一实施方案中,本发明提供一种调节靶多核苷酸或多肽表达的方法。这些方法一般包括使细胞与本发明的脂质颗粒接触,所述脂质颗粒与能够调节靶多核苷酸或多肽表达的核酸相关联。如本文所用,术语“调节”指改变靶多核苷酸或多肽的表达。在不同实施方案中,调节可以表示增加或提高,或者其可以表示减少或降低。测量靶多核苷酸或多肽的表达水平的方法在本领域中是已知和可用的,并且包括例如采用反转录-聚合物链式反应(RT-PCR)和免疫组化技术的方法。在具体实施方案中,与适当的对照值相比,靶多核苷酸或多肽的表达水平增加或减少至少10%、20%、30%、40%、50%或大于50%。

[0161] 例如,如果期望多肽的表达增加,则核酸可以是包括编码期望多肽的多核苷酸的表达载体。另一方面,如果期望多核苷酸或多肽的表达减少,则核酸可以是例如反义寡核苷酸、siRNA或微RNA,其包含特异性杂交至编码靶多肽的多核苷酸的多核苷酸序列,从而破坏靶多核苷酸或多肽的表达。可选地,核酸可以是表达这样的反义寡核苷酸、siRNA或微RNA的质粒。

[0162] 在具体实施方案中,核酸活性剂或治疗剂选自siRNA、微RNA、反义寡核苷酸以及能够表达siRNA、微RNA或反义寡核苷酸的质粒,并且其中siRNA、微RNA或反义RNA包含特异性结合编码多肽的多核苷酸的寡核苷酸或其互补物(complement),从而多肽的表达减少。

[0163] 在其他实施方案中,核酸为编码多肽或者其功能变体或片段的质粒,从而多肽或者其功能变体或片段的表达增加。

[0164] 在相关实施方案中,本发明提供一种治疗疾病或病症的方法,所述疾病或病症的特征在于个体中多肽的过量表达,所述方法包括向所述个体提供本发明的药物组合物,其

中治疗剂选自siRNA、微RNA、反义寡核苷酸以及能够表达siRNA、微RNA或反义寡核苷酸的质粒,并且其中所述 siRNA、微RNA或反义RNA包含特异性结合编码所述多肽的多核苷酸的寡核苷酸或其互补物。

[0165] 在另一相关实施方案中,本发明包括一种治疗疾病或病症的方法,所述疾病或病症的特征在于个体中多肽的低表达,所述方法包括向所述个体提供本发明的药物组合物,其中治疗剂为编码所述多肽或者其功能变体或片段的质粒。

[0166] 测定保存期

[0167] 术语“保存期”在本文中用来指脂质:RNA纳米颗粒在丧失其生物学活性之前可以储存(在定义条件下,例如在缓冲液中于4℃下)的时间。在本发明中为了确定保存期所测定的生物学活性为脂质:RNA纳米颗粒在静脉内给药之后体内转染哺乳动物细胞的能力。

[0168] 在一优选实施方案中,如上文所述和如实施例中说明的,通过将脂质:RNA纳米颗粒储存不同时间,用所述纳米颗粒注射一只或多只测试动物并测定所述动物中所选组织的转染(例如,报道基因的表达)来确定保存期。

[0169] 应当理解保存期可以用绝对值表示,即组合物在丧失活性之前可以储存的时间长度。可选地,保存期可以参考不同组合物以相对值表示。因此,例如,当脂质:RNA纳米颗粒在储存固定时间之后表现出转染活性,并且这种活性大于相似地储存相同时间的不同复合物的活性时,认为与所述不同复合物相比,目标复合物具有增加的保存期。

[0170] 包含脂质体包裹的聚阴离子治疗剂的试剂盒

[0171] 本发明还提供制备本文所述的脂质:RNA纳米颗粒的试剂盒。如上文所述,这类试剂盒可以从容易获得的材料和试剂制备。例如,这类试剂盒可以包含任何一种或多种以下材料:脂质体、核酸(RNA、DNA,单链或双链)、亲水聚合物、用靶向部分如Fab'片段衍生的亲水聚合物以及仪器。根据本文可以制备各种试剂盒和组分,这取决于试剂盒的目标用户和用户的具体需要。例如,如上文所述,试剂盒可以包含许多将复合物靶向特异性细胞类型的靶向部分中的任一种。

[0172] 试剂盒可以任选地包括说明材料,其包含提供脂质:RNA纳米颗粒在体内、离体或体外转染细胞中的使用的指导(即,方案)。通常,如上文所述,说明材料描述从脂质体和核酸制备脂质:RNA纳米颗粒的方法。说明材料还描述如何混合亲水聚合物与脂质:RNA纳米颗粒。此外,说明材料可以描述用脂质:RNA纳米颗粒转染细胞的方法。

[0173] 实施例

[0174] 实施例1:浓度对RNA-脂质粒径的影响

[0175] 这个实施例描述siRNA和脂质浓度对粒径的影响。

[0176] 通过本文所述的方法制备纳米颗粒。分别以50:10:38:2:5的摩尔比将阳离子脂质、DOPE、胆固醇、PEG-BML和diVA-PEG750-diVA溶于无水乙醇。将siRNA溶于pH4.5的50mM柠檬酸盐缓冲液。

[0177] 在混合容器中连续搅拌的同时使包含siRNA的缓冲液达到35-40℃。然后利用歧管/喷嘴阵列将乙醇/脂质混合物喷在包含siRNA的缓冲液的表面以自发地形成负载siRNA的脂质体。调整脂质和RNA浓度以达到 0.05-0.5mg/mL的最终siRNA浓度范围、0.08(wt:wt)的药物:脂质比例以及 35%的乙醇浓度。对于所有测试的条件,脂质比siRNA比例保持恒定。

[0178] 将负载siRNA的脂质体稀释至~10%乙醇以稳定颗粒,然后对10X体积的PBS (pH7.2) 渗滤以去除乙醇并交换缓冲液。通过0.22 μ m的灭菌级 PES滤器过滤最终产物以减少生物负荷。利用动态光散射 (DLS) 确定体积、平均粒径和分散性指数 (PDI)。结果如表1和图2所示。

[0179] 表1.

最终 siRNA	体积平均直径 [nm]		
	平均	SD	PDI
[0180] 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

[0181] 结果显示粒径随着siRNA浓度(以mg/ml计)的增加而增加。减少脂质和siRNA浓度(保持相同的相对比例)会减少粒径,而增加浓度会增加粒径。在所有情况下,0.05-0.5mg/ml的最终siRNA浓度产生具有96.7-141.9nm、小于150nm的平均粒径且具有小于0.2的分散性指数的纳米颗粒。

[0182] 通过本文所述的方法制备了小于150nm的粒径和小于0.2的PDI,不制备空的预制脂质囊泡和/或不机械加工。

[0183] 实施例2:过程参数对RNA-脂质颗粒形成的影响

[0184] 这个实施例描述各种过程参数对RNA-脂质颗粒形成的影响。在这个实验期间筛查几个参数,包括温度、乙醇浓度、缓冲液、脂质:siRNA比例以及用来分散脂质溶液的喷嘴类型。

[0185] 以40:30:25:5:2的摩尔比将HEDC、DOPE、胆固醇、PEG-BML和diVA-PEG750-diVA溶于无水乙醇。在混合容器中连续搅拌的同时使包含 siRNA的缓冲液达到所示温度。然后利用喷嘴将乙醇/脂质混合物喷在包含 siRNA的缓冲液的表面以自发地形成负载siRNA的脂质体。以所示药物/脂质比例和所示最终乙醇百分比将脂质与siRNA组合以达到0.1mg/mL的最终siRNA浓度。

[0186] 将siRNA溶于柠檬酸盐缓冲液,所述柠檬酸盐缓冲液浓度为25-100 mM且pH3.5-pH6.5变化。混合物温度为25-45 $^{\circ}$ C。最终乙醇浓度为25-45%。药物:脂质比例(wt/wt)为0.07-0.11。水合喷嘴内径(ID)为0.005-0.125英寸。每个条件均作为测量进行以比较每个过程参数的影响。除非说明,每个条件用50mM柠檬酸盐,pH4.5,35 $^{\circ}$ C,35%最终乙醇,0.07的药物:脂质比例以及0.005英寸的喷嘴ID进行。

[0187] 将负载siRNA的脂质体稀释至10%乙醇以稳定颗粒,然后对10X体积的PBS (pH7.2) 渗滤以去除乙醇并交换缓冲液。通过0.22 μ m的灭菌级PES 滤器过滤最终产物以减少生物负荷。

[0188] 表2和图3示出pH对脂质-核酸纳米颗粒的平均直径和PDI的影响。增加缓冲液pH导致粒径增加,尽管小于150nm平均粒径。

[0189] 表2

	缓冲液 pH	体积平均直径 [nm]		
		平均	SD	PDI
[0190]	6.5	130.7	17.7	0.111
	4.5	108.5	7.1	0.163
	3.5	86.1	10.2	0.149

[0191] 表3示出缓冲液浓度对各种参数的影响。结果显示增加缓冲液浓度减少siRNA回收率。平均粒径和PDI看来不受影响。对pH3.5观察到最小粒径,并且对25mM柠檬酸盐缓冲液观察到最大siRNA回收率。

[0192] 表3

	缓冲液浓度 [mM]	体积平均直径 [nm]			EE [%]	siRNA	
		平均	SD	PDI		回收率	[%]
[0193]	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	

[0194] 表4示出将水合温度从25增加至45℃,粒径从135.7减少至102.2nm,同时siRNA回收率从80%提高至87%。增加最终乙醇百分比会增加粒径,对siRNA回收率没有影响,但是将包裹效率减少至88%。

[0195] 表4

[0196]

水合 温度 [°C]	最终 %EtOH	体积平均直径 [nm]			EE [%]	siRNA	
		平均	SD	PDI		回收率	[%]
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	

[0197] 表5示出渐增的药物:脂质比例减少,siRNA回收率从80增加至87%。在0.07药物:脂质(w:w)比例观察到最大回收率。所有其他测量的特征均不受药物:脂质比例影响。鉴于Maurer等人和Semple等人的公开,这个结果是令人惊讶和出人意料的,两者均描述最佳回收率在等于或大于0.16的药物:脂质(w:w)(等于或小于6.25的药物:脂质(w:w))。目前的结果表明利用本发明获得了相反趋势。

[0198] 表5

	脂质:siRNA [wt/wt]	体积平均直径 [nm]			EE [%]	siRNA	
		平均	SD	PDI		回收率	[%]
[0199]	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	

[0200] 表6示出增加喷嘴ID25倍不影响粒径、包裹效率或siRNA回收率。用来将乙醇/脂质

添加至缓冲液表面的喷嘴孔有很大的灵活性。这种灵活性在放大期间可以提供主要优点。

[0201] 表6

[0202]

喷嘴 ID [英寸]	体积平均直径 [nm]			EE [%]	siRNA 回收率
	平均	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

[0203] 实施例3:用于批量制备脂质体的所述方法与参考方法的比较

[0204] 这些结果比较用于制备脂质/核酸颗粒的本文所述的方法与Semple, 等人美国专利6,858,225所述的方法(对照方法或对照方法所用的对照组合物)。根据实施例2的组合物或利用对照方法制备。

[0205] 实施例2的组合物由以40:30:25:5:2的摩尔比共溶的阳离子脂质、DOPE、胆固醇、PEG缀合的脂质和靶向脂质组成(参见上文实施例2)。

[0206] 对照组合物由以25:20:45:10的摩尔比共溶的DODAP、DSPC、胆固醇和PEG-CER-14组成。

[0207] 在实施例2的方法中,将脂质以4.32mg/ml溶于无水乙醇,并且将 siRNA以0.163mg/ml溶于50mM柠檬酸盐,pH4.5。在混合容器中连续搅拌的同时使siRNA溶液达到35-40℃。然后利用歧管/喷嘴阵列将乙醇/脂质混合物喷在包含siRNA的缓冲液的表面。最终的乙醇浓度为35%,并且最终的脂质/siRNA比例为14:1(wt:wt)。然后将所得的颗粒稀释至10%乙醇,然后对10x体积的PBS(pH7.2)渗滤。

[0208] 在对照方法中,将脂质以25mg/ml溶于无水乙醇,并且将siRNA以4.17mg/ml溶于300mM柠檬酸盐,pH4.0。在混合容器中连续搅拌的同时使包含siRNA的缓冲液保持室温。然后利用单一喷嘴将乙醇/脂质混合物喷在包含siRNA的缓冲液的表面以自发地形成负载siRNA的脂质体。最终的乙醇浓度为40%,并且最终的脂质/siRNA比例为6:1(wt:wt)。混合之后,将脂质/siRNA悬浮液转移入用2个100nm聚碳酸酯膜制备并在65℃下预平衡的10mL挤出机。在300psi下利用10通道挤出悬浮液。将所得的颗粒对10x体积的PBS,pH7.2渗滤。

[0209] 使每种方法所得的颗粒通过0.22μm滤器。如本文所述测量平均粒径、PDI和EE。

[0210] 实施例2的方法产生比没有挤出步骤的对照方法更小的脂质纳米颗粒(图4)。在挤出之前测量通过对照方法制备的颗粒的大小。利用对照方法制备自NDT-0009组合物的颗粒具有大于250nm颗粒的平均粒径。挤出和渗滤之后,平均粒径减少至128nm。实施例2的方法产生具有小于150nm的平均粒径的颗粒而不挤出。用对照组合物开始观察到相似的趋势。

[0211] 在将siRNA包裹入脂质纳米颗粒方面,实施例2的方法比对照方法更高效(图5)。通过实施例2的方法制备的颗粒的包裹效率(EE)高于通过对照方法形成的颗粒的包裹效率(在两种产物中于渗滤之前测量)。通过实施例2的方法制备的颗粒的EE大于95%,高于通过对照方法形成的颗粒的EE。在对照方法中,在渗滤之后去除了许多游离的siRNA,这导致最终产物的EE的提高。

[0212] 实施例2的方法产生具有比对照方法更高的包裹效率的纳米颗粒(图 6)。如在两种产物中渗滤之后所测量的,通过实施例2的方法的siRNA的最终回收率是通过对照方法获得的回收率的2倍以上(72%比33%)。这些数据反映EE的提高以及在实施例2的方法中缺少挤出步骤。实施例3的方法提供更好的siRNA回收率,因为对照方法的额外的挤出步骤结构上改变脂质体,并且显然从颗粒解离siRNA。这些结果表明本文所述的方法相对于对照方法提供几个优势,减少加工步骤的数目,同时提高包裹效率以及具有小于150nm的平均粒径的纳米颗粒的收率。

[0213] 实施例4:脂质体批量生产的放大期间变异性的比较

[0214] 用包括永久带电的(HEDC)阳离子脂质和可电离的(S104)阳离子脂质分子的组合的不同脂质组合物进行实施例2所述的方法。以20:20:30:25:5:2 的摩尔比将HEDC、S104、DOPE、胆固醇、PEG-BML和diVA-PEG750-diVA 溶于无水乙醇。放大期间,评价不同siRNA分子、不同批次体积以及不同 siRNA (药物)/脂质比例。表7总结了表征条件范围所得的纳米颗粒的结果。

[0215] 表7

[0216]

批体积	药物物质	药物/脂质	粒径	PDI	EE	产物收率
[L]		[wt/wt]	[nm]		[%]	[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	空脂质体(无 siRNA)	na	83	0.14	na	na
20	siRNA 2	0.11	90	0.16	92%	>90%
50	siRNA 2	0.07	82	0.14	94%	>90%
120	空脂质体(无 siRNA)	na	86	0.14	na	na
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%

[0217] 结果显示本文所述的方法非常稳健。在跨越50倍范围的放大期间获得相似的粒径和PDI。粒径始终小于100nm,具有>90%的产物收率。多分散性指数值在非常低的范围中,表明接近单分散群体的囊泡。

[0218] 实施例5:对于包含蔗糖的制剂脂质体批量生产的放大期间变异性的比较

[0219] 用以20:20:30:25:5:2的摩尔比溶于乙醇的HEDC、S104、DOPE、胆固醇、PEG-BML和diVA-PEG750-diVA进行实施例2所述的方法。在如本文所述的囊泡的制品中包括蔗糖。评价不同的批体积并进行冻融。表8总结了表征一定范围的条件所得的纳米颗粒的结果。

[0220] 表8

[0221] 利用半单次使用的制备列制备的冷冻(包含蔗糖的)制剂

[0222]

批体积 [L]	药物物质	药物/脂质 [wt/wt]	冷冻之前			融解之后			产物收率 [siRNA 回收率]
			大小[nm]	PDI	EE [%]	大小[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	tbd	tbd	tbd	>90%

[0223] 结果显示冻融不改变脂质纳米颗粒的特性。结果还显示批次之间的变异性非常低,并且所述方法可重复地产生均匀的纳米颗粒。

[0224] 已建立通过冷冻干燥稳定药物:脂质颗粒的条件。可以将根据实施例2 制备的药物:脂质颗粒冷冻干燥而不损失活性。其中形成药物:脂质颗粒的蔗糖的终浓度为8% (w/v)。通过添加蒸馏水来复原冻干制品,并且测量i.v. 注射之后它们在小鼠肺中的转染活性。冷冻和融解复原制品不影响活性。表9所示的结果证实使用本文所述的方法制备的颗粒在冷冻干燥期间保留它们的特性,因此是稳定的。具体地,在冷冻干燥之前、期间和之后稳定并保留粒径。

[0225] 表9

[0226]

利用半单次使用的制备列制备的液体剂型(包含蔗糖的)制剂											
批体积 [L]	药物物质	药物:脂质 [wt/wt]	冷冻之前			融解之后			冷冻干燥-复原之后		
			大小[nm]	PDI	EE [%]	大小[nm]	PDI	EE [%]	大小[nm]	PDI	EE [%]
20	siRNA 2	0.11	98	0.15	94	97	0.16	90	115	0.15	93

[0227] 颗粒的稳定性是脂质组成、脂质:RNA (w:w) 值以及制剂中使用的多糖的选择的函数。本文所述的制备在体内表现出高生物活性的脂质:RNA复合物的稳定制剂的有条理的方法赋予建立药学可接受的制品的优势,并且因此促进基于脂质体的RNA递送。

[0228] 实施例6:脂质的浸入注射

[0229] 进行实施例2所述的方法,修改为利用浸入注射制备囊泡。以20:20:30:25:5:2的摩尔比将HEDC、S104、DOPE、胆固醇、PEG-BML和 diVA-PEG750-diVA溶于乙醇。表10总结了与表面添加方法相比,表征浸入添加方法所得的纳米颗粒的结果。结果显示令人惊讶和出人意料的结果,当通过浸入注射将脂质添加至水相时,平均粒径大大减少。

[0230] 表10

[0231] 利用半单次使用的制备列制备的液体剂型

[0232]

批体积 [L]	药物物质	药物/脂质 [wt/wt]	添加方法	粒径		EE [%]	产物收率 [siRNA 回收率]
				平均[nm]	PDI		
5	siRNA 1	0.07	表面	93	0.136	97	>90%
5	siRNA 1	0.07	浸入	57	0.104	97	>90%

[0233] 利用半单次使用的制备列制备的冷冻(包含蔗糖的)制剂

[0234]

批体积	药物物质	药物/脂质	添加方法	粒径		EE	产物收率
[L]		[wt/wt]		平均[nm]	PDI	[%]	[siRNA 回收率]
5	siRNA 1	0.11	表面	94	0.119	95	>90%
1	siRNA 1	0.11	浸入	63	0.102	95	>90%

[0235] 相同的加工方法用来制备在缓冲液中包含蔗糖的脂质体。表11总结了表征不同添加时间所得的纳米颗粒的结果,并且表12总结了与浸入添加相比,表征利用表面制备的纳米颗粒的结果。

[0236] 表11

[0237] 利用半单次使用的制备列制备的液体制剂

[0238]

添加时间	添加方法	粒径		EE	产物收率
[min]		平均[nm]	PDI	[%]	[siRNA 回收率]
0.5	浸入	66	0.140	90	>90%
2.0	浸入	93	0.112	94	>90%
5.0	浸入	99	0.133	92	>90%
10	浸入	98	0.137	91	>90%

[0239] 表12

[0240] 利用半单次使用的制备列制备的液体制剂

[0241]

批体积	添加时间	添加方法	粒径		EE	产物收率
			平均[nm]	PDI		
[L]	[min]				[%]	[siRNA 回收率]
5	15	表面	93	0.136	95	>90%
1	1.5	浸入	63	0.102	95	>90%

[0242] 结果显示令人惊讶和出人意料的结果,当通过浸入注射在少于2分钟的添加时间将脂质添加至水相时,平均粒径大大减少。结果还显示令人惊讶的结果,当通过浸入注射将脂质添加至水相时,平均粒径大大减少。

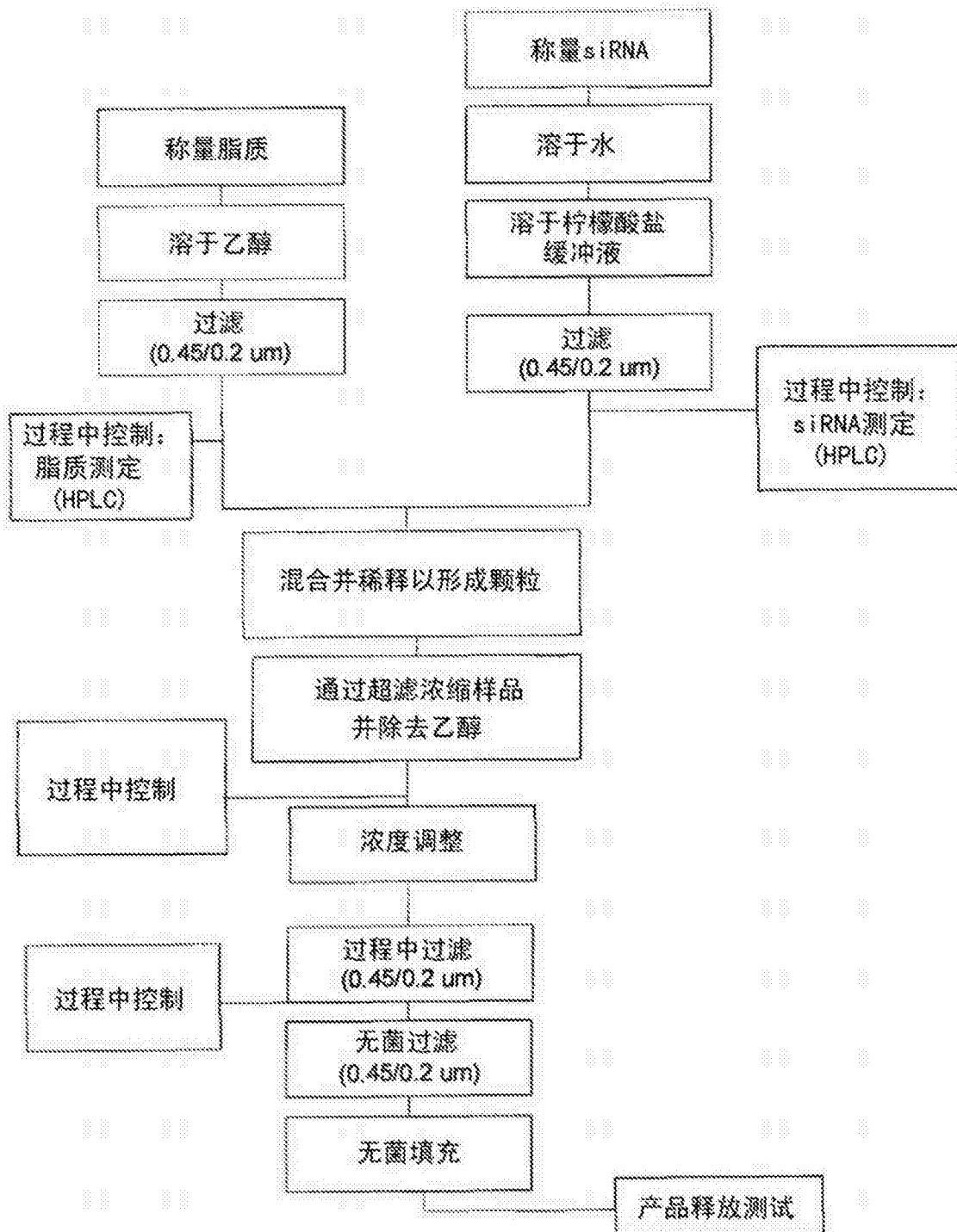


图1

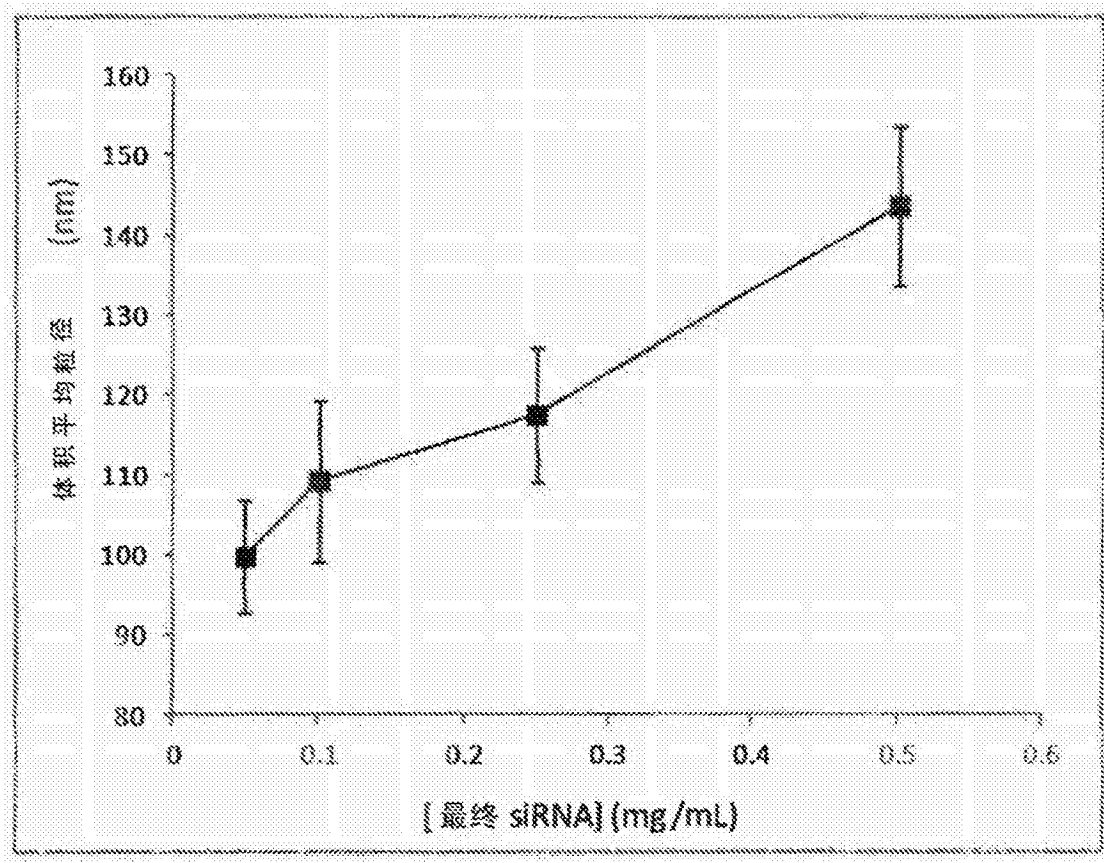


图2

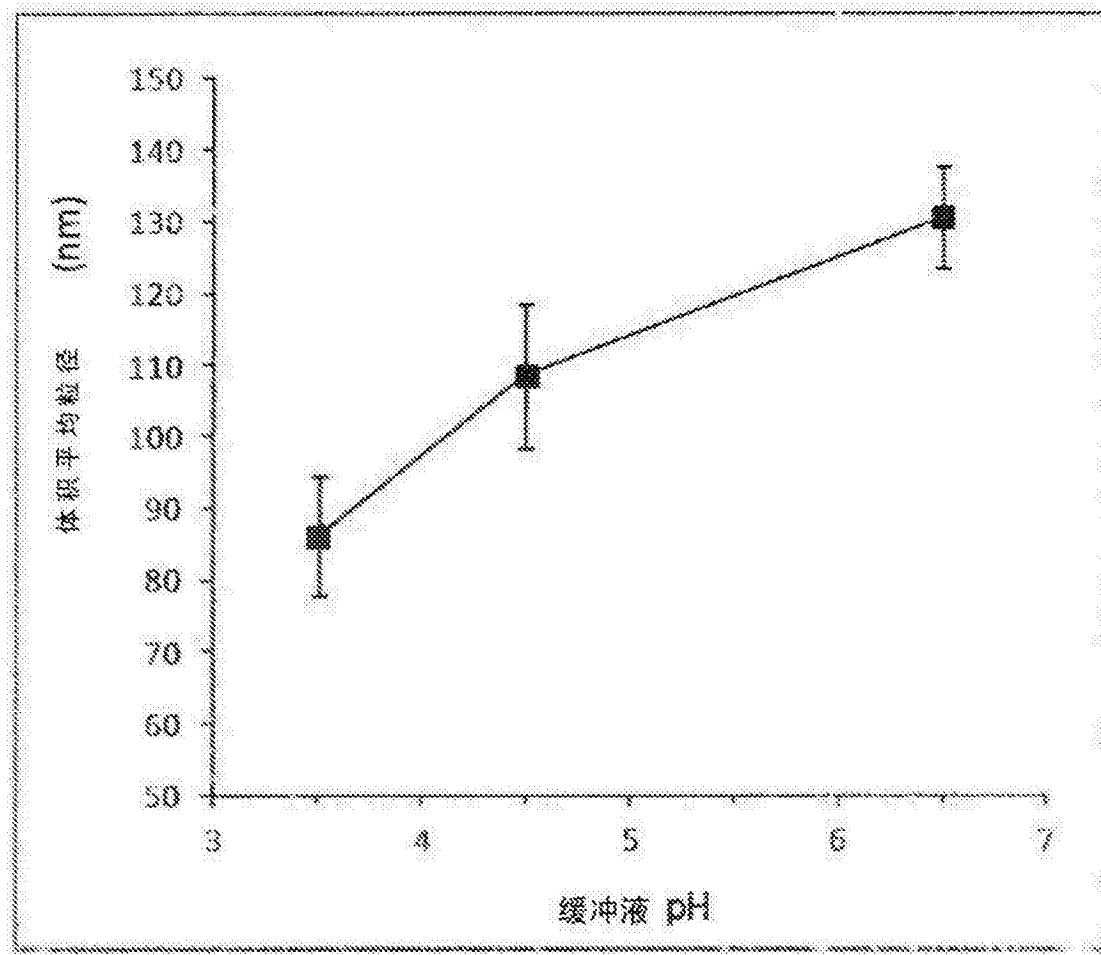


图3

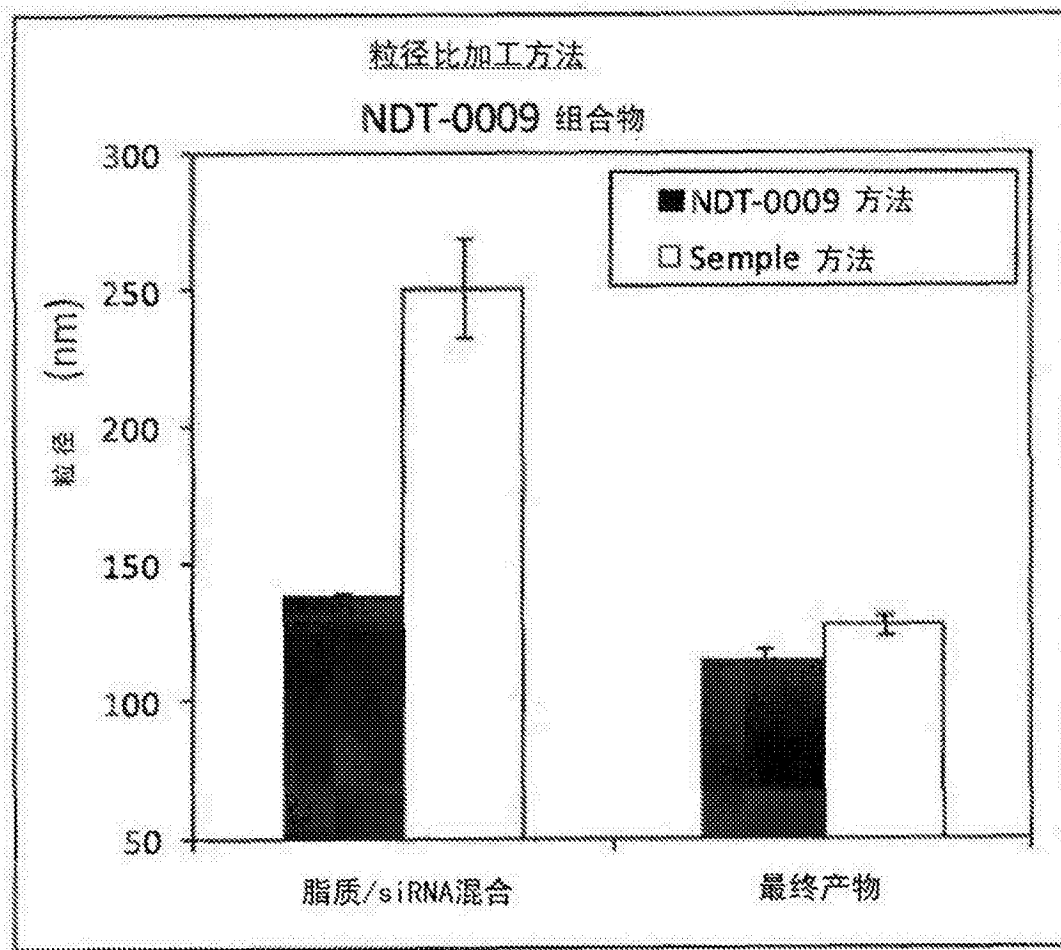


图4

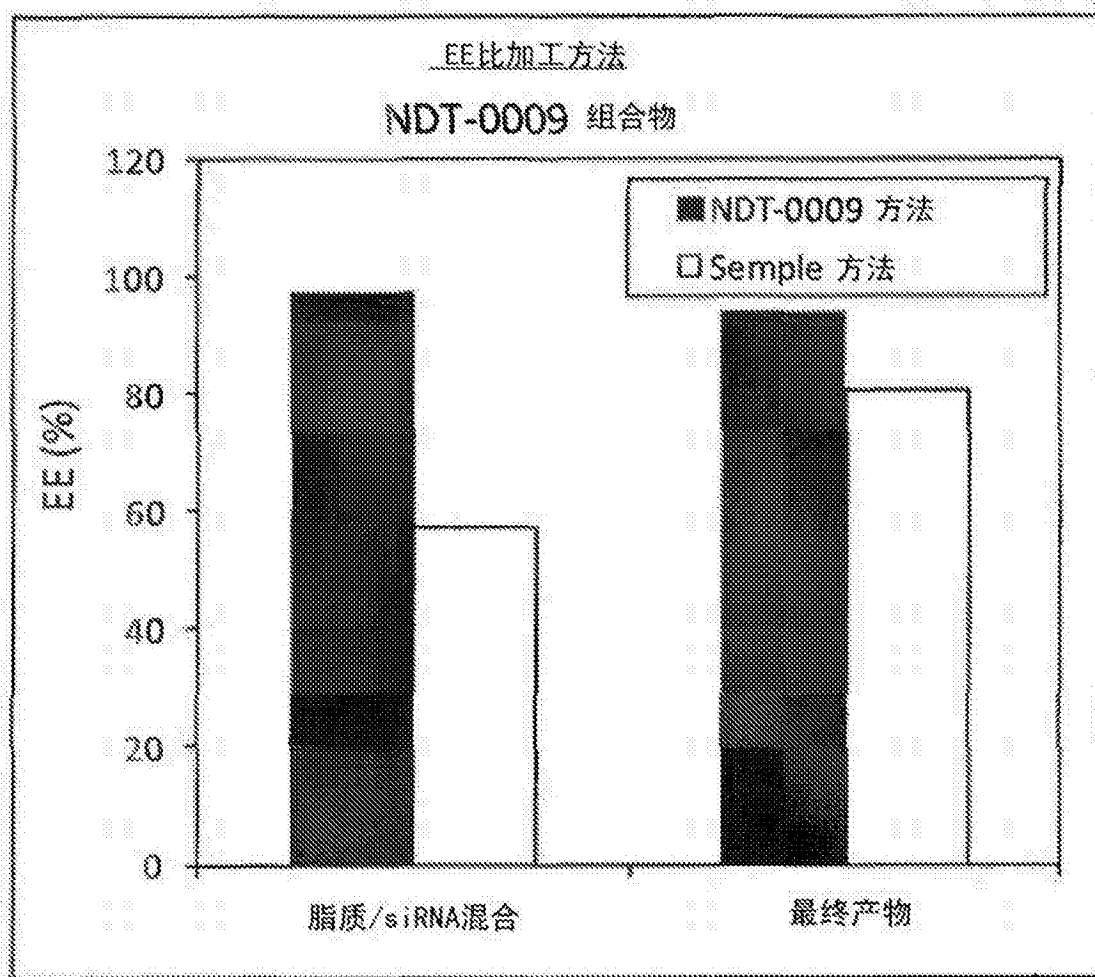


图5

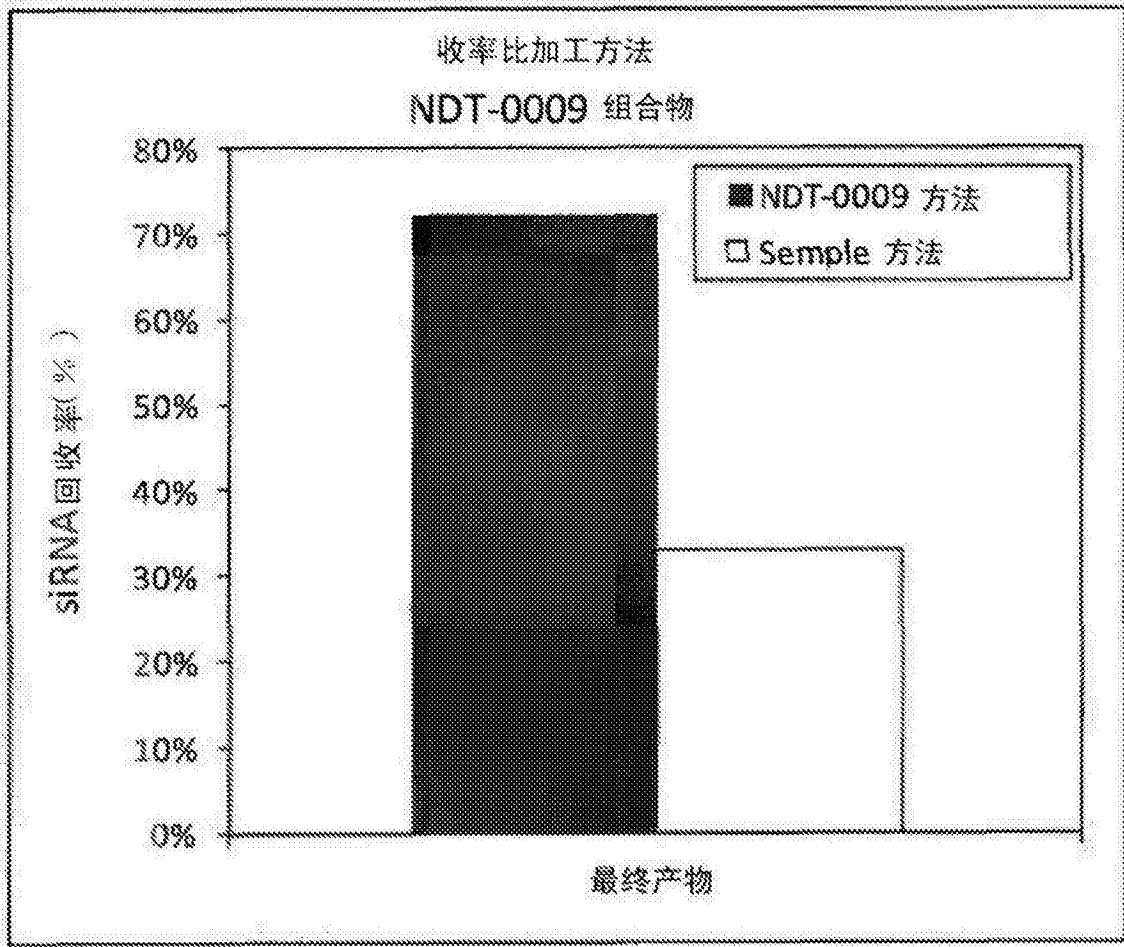


图6