



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102892406 B

(45) 授权公告日 2015.04.08

(21) 申请号 201180006572.5

(22) 申请日 2011.01.18

(30) 优先权数据

61/296,040 2010.01.19 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2012.07.19

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IL2011/000054 2011.01.18

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/089595 EN 2011.07.28

(73) 专利权人 波利皮得有限公司

地址 以色列佩克提克瓦市

(72) 发明人 诺姆·埃马努埃尔

优素福·波森菲尔德

(74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限  
责任公司 11240

代理人 张英 王玉桂

(51) Int. Cl.

A61K 9/00(2006.01)

A61F 2/02(2006.01)

(56) 对比文件

US 200302288355 A1, 2003.12.11, 权利要求  
1, 24, 65.

US 20010000470 A1, 2001.04.26, 权利要求  
1-15.

US 20050191344 A1, 2005.09.01, 权利要求  
7.

US 20080095849 A1, 2008.04.24, 权利要求  
1-49.

US 20090259302 A1, 2009.10.15, 摘要.

审查员 刘启明

权利要求书3页 说明书31页

序列表1页 附图11页

(54) 发明名称

缓释核酸基质组合物

(57) 摘要

本发明提供了用于延长释放核酸药剂,一种可生物降解聚合物的组合物。本发明还提供了生产基质组合物的方法和用于利用基质组合物来提供核酸药剂的控释的方法。

1. 一种基质组合物,包含:
  - a. 生物相容性聚合物连同第一脂质成分,所述第一脂质成分包含至少一种具有极性基团的脂质;
  - b. 第二脂质成分,所述第二脂质成分包含具有至少 14 个碳的脂肪酸部分的至少一种磷脂;和
  - c. 至少一种基于核酸的药剂;以及
  - d. 聚乙二醇;其中所述基质组合物是脂质饱和的并且适于提供核酸成分的缓释和 / 或控释。
2. 根据权利要求 1 所述的基质组合物,其中,所述 PEG 是分子量在 1,000-10,000 范围内的线性 PEG。
3. 根据权利要求 2 所述的基质组合物,其中,所述 PEG 具有可达 5,000 的分子量。
4. 根据权利要求 1 所述的基质组合物,其中,所述具有极性基团的脂质选自由甾醇、生育酚和磷脂酰乙醇胺组成的组。
5. 根据权利要求 4 所述的基质组合物,其中,所述甾醇是胆固醇。
6. 根据权利要求 5 所述的基质组合物,其中,所述胆固醇以所述基质组合物的总脂质含量的 5-50 摩尔%的量存在。
7. 根据权利要求 1 所述的基质组合物,其中,所述第二脂质成分包括选自由磷脂酰胆碱;磷脂酰胆碱的混合物;磷脂酰乙醇胺;以及它们的任意组合组成的组中的磷脂。
8. 根据权利要求 1 所述的基质组合物,还包含阳离子脂质,所述阳离子脂质选自由 DC-胆固醇、1,2-二油酰基-3-三甲基铵-丙烷、二甲基双十八烷基铵、1,2-二月桂酰基-sn-甘油基-3-乙基磷酸胆碱、1,2-二-0-十八烯基-3-三甲基铵丙烷以及它们的任意组合组成的组。
9. 根据权利要求 1 所述的基质组合物,其中,所述生物相容性聚合物选自由可生物降解聚合物、不可生物降解聚合物和它们的组合组成的组。
10. 根据权利要求 9 所述的基质组合物,其中,所述可生物降解聚合物是可生物降解聚酯,所述可生物降解聚酯选自由聚乳酸、聚乙醇酸、聚(乳酸共乙醇酸)和它们的组合组成的组。
11. 根据权利要求 10 所述的基质组合物,其中,所述不可生物降解聚合物选自由聚乙二醇、PEG 丙烯酸酯、PEG 甲基丙烯酸酯、甲基丙烯酸甲酯、甲基丙烯酸乙酯、甲基丙烯酸丁酯、甲基丙烯酸-2-乙基己酯、甲基丙烯酸月桂酯、甲基丙烯酸羟乙酯、2-甲基丙烯酰基氧基乙基磷酸胆碱、聚苯乙烯、聚赖氨酸、聚 N-乙基-4-乙烯基-吡啶溴化物、聚甲基丙烯酸酯、硅酮、聚甲醛、聚氨酯、聚酰胺、聚丙烯、聚氯乙烯、聚甲基丙烯酸和它们的组合组成的组。
12. 根据权利要求 11 所述的基质组合物,其中,所述生物相容性聚合物包含可生物降解聚合物和不可生物降解聚合物的共嵌段。
13. 根据权利要求 1 所述的基质组合物,其中,总脂质与所述可生物降解聚合物的重量比为 1:1 以上至 9:1 以下。
14. 根据权利要求 1 所述的基质组合物,其中,所述基质组合物是均匀的。
15. 根据权利要求 1 所述的基质组合物,还包含鞘脂。

16. 根据权利要求 1 所述的基质组合物,还包含生育酚。
17. 根据权利要求 1 所述的基质组合物,还包含选自磷脂酰丝氨酸、磷脂酰甘油、和磷脂酰肌醇组成的组中的另外的磷脂。
18. 根据权利要求 1 所述的基质组合物,还包含具有 14 个以上碳原子的游离脂肪酸。
19. 根据权利要求 1 所述的基质组合物,还包含聚乙二醇化脂质。
20. 根据权利要求 1 所述的基质组合物,用于所述基于核酸的药剂的缓释,其中至少 30%的所述药剂以零级动力学从所述组合物释放。
21. 根据权利要求 20 所述的基质组合物,用于所述基于核酸的药剂的缓释,其中至少 50%的所述药剂以零级动力学从所述组合物释放。
22. 根据权利要求 1 所述的基质组合物,其中,所述基于核酸的药剂选自由质粒 DNA、选自多核苷酸和寡核苷酸的线状 DNA、染色体 DNA、信使 RNA、反义 DNA/RNA、RNAi、siRNA、微 RNA、核糖体 RNA、寡核苷酸 DNA 单和双链、siRNA、CpG 免疫刺激序列、锁定核酸以及核酶组成的组。
23. 根据权利要求 1 所述的基质组合物,所述基质包含 (a) 可生物降解聚酯;(b) 甾醇;(c) 具有至少 14 个碳的脂肪酸部分的磷脂酰乙醇胺;(d) 具有至少 14 个碳的脂肪酸部分的磷脂酰胆碱;(e) 核酸药剂;以及 (f) PEG。
24. 一种植入物,包含根据权利要求 1 所述的基质组合物。
25. 一种用于将基于核酸的药剂给予需要其的受试者的药物组合物,包含根据权利要求 1 所述的基质组合物。
26. 根据权利要求 1 至 23 中任一项所述的基质组合物在制备用于将基于核酸的药剂给予需要其的受试者的药物中的应用。
27. 一种医疗装置,包括:基体和沉积在所述基体的至少一部分上的生物相容性涂层,其中所述生物相容性涂层包含根据权利要求 1 至 23 中任一项所述的基质组合物。
28. 根据权利要求 27 所述的医疗装置,其中,所述生物相容性涂层包括多层。
29. 一种生产用于核酸药剂的递送和缓释和 / 或控释的基质组合物的方法,包括以下步骤:
  - a. 将 (i) 生物相容性聚合物和 (ii) 包含至少一种具有极性基团的脂质的第一脂质成分混合到第一挥发性有机溶剂中;
  - b. 将聚乙二醇混合到所述核酸药剂的水基溶液中;
  - c. 将在步骤 (b) 中获得的溶液与第二挥发性有机溶剂和包含至少一种磷脂的第二脂质成分混合,其中所述磷脂具有至少 14 个碳的脂肪酸部分;
  - d. 混合在步骤 (a) 和 (c) 中获得的溶液以形成均匀混合物;以及
  - e. 除去所述挥发性溶剂和水,从而生产包含所述核酸药剂的均匀聚合物-磷脂基质。
30. 根据权利要求 29 所述的方法,其中,步骤 (c) 还包括 (i) 通过蒸发、冷冻干燥或离心来除去所述溶剂以形成沉积物;以及 (ii) 将所得的沉积物悬浮在所述第二挥发性有机溶剂中。
31. 根据权利要求 29 所述的方法,其中,所述 PEG 是分子量在 1,000-10,000 范围内的线性 PEG。

32. 根据权利要求 29 所述的方法,其中,具有极性基团的所述脂质选自由甾醇、生育酚和磷脂酰乙醇胺组成的组。

33. 根据权利要求 29 所述的方法,其中,所述第二脂质成分包含选自由磷脂酰胆碱;磷脂酰胆碱的混合物;磷脂酰乙醇胺;以及它们的任意组合组成的组中的磷脂。

34. 根据权利要求 29 所述的方法,其中,所述生物相容性聚合物选自由可生物降解聚合物、不可生物降解聚合物和它们的组合组成的组。

35. 根据权利要求 34 所述的方法,其中,所述可生物降解聚合物是选自由聚乳酸、聚乙醇酸、聚(乳酸-共-乙醇酸)、阳离子生物相容性聚合物和它们的组合组成的组中的可生物降解聚酯。

36. 根据权利要求 34 所述的方法,其中,所述不可生物降解聚合物选自由聚乙二醇、PEG 丙烯酸酯、PEG 甲基丙烯酸酯、甲基丙烯酸甲酯、甲基丙烯酸乙酯、甲基丙烯酸丁酯、甲基丙烯酸-2-乙基己酯、甲基丙烯酸月桂酯、甲基丙烯酸羟乙酯、2-甲基丙烯酰基氧基乙基磷酰胆碱、聚苯乙烯、聚赖氨酸、聚 N-乙基-4-乙烯基-吡啶溴化物、聚甲基丙烯酸酯、硅酮、聚甲醛、聚氨酯、聚酰胺、聚丙烯、聚氯乙烯、聚甲基丙烯酸和它们的组合组成的组。

37. 根据权利要求 29 所述的方法,其中,在步骤 (d) 以后,将所获得的溶液引入到模具中,并随后除去液体,以获得特定结构的基质。

## 缓释核酸基质组合物

### 技术领域

[0001] 本发明提供了用于延长释放和 / 或控释基于核酸的药物 / 药剂 (试剂) 的组合物, 该组合物包含含有生物相容性聚合物的基于脂质的基质 (脂质类基质)。本发明还提供了制备基质组合物 (matrix compositions) 的方法以及利用基质组合物来提供核酸活性剂的控释的方法。

### 背景技术

#### [0002] 治疗性核酸

[0003] 基因疗法是药物开发中的主要研究领域。已认为基因疗法是这样的期望的机制, 其用来纠正导致与无法产生某些蛋白质有关的疾病的遗传缺损并且用来克服获得性疾病如自身免疫病和癌症。基因疗法可以为许多疾病的治疗提供新的预防途径。然而, 基因疗法的商业化的技术障碍在于, 对于多核苷酸的递送以及缓释和 / 或控释, 需要实用、有效和安全的方式。由于在带负电荷的细胞膜和在多核苷酸上的高负电荷之间的电荷排斥, 多核苷酸并不容易渗透细胞膜。因此, 多核苷酸具有较差的生物利用度, 并且摄取进入细胞, 通常 <1%。在动物模型中, 基于病毒的载体已成功用来将基因给予期望的组织。在一些情况下, 这些途径已导致治疗水平的蛋白质的长期 (>2 年) 表达。然而, 已广泛地报告了基于病毒途径的限度。例如, 借助于这些载体的重新给予是不可能的, 这是由于相对于病毒蛋白产生的体液免疫反应。除为获得适当的可重复的载体供应所面临的制造挑战以外, 还存在与病毒载体有关的显著的安全问题, 尤其是对于那些靶向肝用于基因表达的病毒载体。尽管存在与病毒基因疗法有关的问题, 但许多人已认为病毒比非病毒递送载体更有效。

[0004] 通过寡核酸并利用称作反义疗法、RNA 干扰 (RNAi)、和酶核酸分子的技术, 可以影响在细胞中特定基因表达的沉默或下调。反义疗法是指通过使用互补 DNA 或 RNA 寡核酸来灭活靶 DNA 或 mRNA 序列从而抑制基因转录或翻译的方法。反义分子可以是单链、双链或三链螺旋。能够抑制表达的其它药剂是例如酶核酸分子如 DNA 酶和核酶, 其能够特异性地切割感兴趣的 mRNA 转录物。DNA 酶是单链脱氧核糖核苷酸, 其能够切割单和双链靶序列。核酶是催化核糖核酸分子, 其越来越多地用于基因表达的序列特异性抑制, 其中通过编码感兴趣的蛋白质的 mRNA 的切割。RNA 干扰是基因表达的转录后抑制的方法, 其中上述基因表达在许多真核生物体中是保守的。它有助于控制哪些基因是主动的以及它们是如何主动的。对于 RNA 干扰来说, 两种类型的小 RNA 分子 - 微 RNA (miRNA) 和小分子干扰 RNA (siRNA) - 是重要的。RNA 是基因的直接产物, 并且这些小 RNA 可以结合于特定的其它 RNA 并增加或降低它们的活性, 例如通过防止信使 RNA 产生蛋白质。RNA 干扰在防卫细胞以抵抗寄生基因 (病毒和转座子) 方面以及一般地在引导扩生和基因表达方面具有重要作用。虽然 RNA 干扰效应 (其是通过小分子干扰 RNA (siRNA) 或微 RNA 加以介导) 对人类治疗具有潜在的应用, 但通常用于寡核苷酸的快速给予的流体力学方法不适用于人类。对于制药业来说, 基于 RNAi 的疗法的开发是相对较新的。虽然已克服开发上述药物的许多障碍, 但 RNAi 化合物到适当组织并进入细胞的最佳递送仍然是一种挑战。

### [0005] 核酸的递送

[0006] 非病毒基因疗法的一个问题是实现足够核酸的递送和表达以导致有形的、生理有关的表达。虽然数年以前已表明,在等渗盐水中的 DNA 质粒(所谓的“裸”DNA)可以体内转染各种细胞,但这样的未受保护的质粒易被酶降解,从而导致在动物模型中摄取的不可重现性以及高度可变的表达和生物反应。在大多数组织中“裸”质粒的非常低的生物利用度还需要给予高剂量的质粒以产生药理反应。因而,非病毒基因递送的领域已被引向开发更加有效的合成递送系统,其能够增加质粒递送的效率、赋予长期表达并提供储存稳定剂型(如其它药剂剂型所预期的)。

[0007] 促进细胞摄取 DNA 的化学方法包括使用 DEAE-葡聚糖。然而,这可以导致细胞活力的丧失。磷酸钙也是常用的化学药剂,当和 DNA 共沉淀时,其将 DNA 引入细胞。

[0008] 引入 DNA 的物理方法已变成用来再现地转染细胞的有效方式。直接微注射是一种这样的方法,其可以将 DNA 直接递送到细胞核(Capecci 1980, Cell, 22, 479)。这便于分析单细胞转染子。所谓的“生物导弹”方法利用涂布有 DNA 的高速颗粒物理上将 DNA 插入到细胞和/或细胞器中。电穿孔是用来转染 DNA 的最常用的方法之一。该方法涉及使用高电压电荷来瞬间通透细胞膜,从而使它们可渗透大分子复合物。然而,由于细胞内损伤,用来引入 DNA 的物理方法确实会导致细胞活力的相当大的丧失。最近一种称作免疫穿孔的方法已变成用于将核酸引入细胞的公认的技术(Bildirici et al 2000, Nature, 405, 298)。取决于所使用的核酸,可以实现 40-50% 的转染效率。因而这些方法需要广泛的优化并且还需要昂贵的设备。

[0009] 为了克服核酸(通常质粒 DNA (“pDNA”)、或 siRNAs/ 微 RNA)的降解问题和增强基因转染的效率,已开发了阳离子缩合剂(如多聚季铵盐、树状聚物、壳聚糖、脂质、和肽)来保护核酸,其中通过借助于静电相互作用来缩合它。然而,与“裸”DNA 的转染相比,缩合质粒颗粒用于体内转染大量的例如肌细胞并不成功。

[0010] 另外的策略,其包括通过与保护性的、可相互作用的非缩合系统的相互作用来调节质粒表面电荷和疏水性,已显示出优越于使用“裸”DNA 来直接给予实体组织(例如,国际申请公开号 WO 96/21470)。

[0011] 封装核酸的生物可降解微球体也已用于基因递送。例如,国际申请公开号 WO 00/78357 披露了包括透明质酸的基质、薄膜、凝胶和水凝胶,其用二胍加以衍生化并交联于核酸,以形成缓慢释放微球体。

[0012] 基于脂质的药物递送系统在医药科学领域中是众所周知的。通常它们用来配制具有较差的生物利用度或高毒性或两者的药物。在已获得接受的流行的剂型中,有许多不同类型的脂质体,其包括小单层囊泡、多片层囊泡和许多其它类型的脂质体;不同类型的乳液,其包括油包水乳液、水包油乳液、水中油包水双重乳液、亚微米乳液、微乳状液;胶束和许多其它疏水性药物载体。这些类型的基于脂质的递送系统可以高度专门用来允许靶向药物递送或降低的毒性或增加的代谢稳定性等。在数天、数周和更长时间内的延长释放并不是通常伴随基于脂质的体内药物递送系统的分布。对于体外和体内基因递送,由两亲阳离子分子构成的脂质体是有用的非病毒载体。在理论上,脂质的阳离子头缔合于 DNA 的带负电荷的核酸主链以形成脂质:核酸复合物。作为基因转移载体,脂质:核酸复合物具有许多优点。不同于病毒载体,脂质:核酸复合物可以用来转移基本上大小不受限制的表达盒。

因为上述复合物缺乏蛋白质,所以它们可以诱发很少免疫原性和炎性反应。另外,它们不能复制或重组以形成传染剂并且具有低整合频率。阳离子脂质(例如脂质体)的使用已变成常用方法,因为它并不具有化学方法所显示的毒性度。

[0013] 存在许多出版物,通过显示在体外培养细胞中报道基因的可检测表达,其令人信服地表明,两亲阳离子脂质可以体内和体外介导基因递送。由于脂质:核酸复合物有时并不和病毒载体同样有效地实现成功的基因转移,所以很多努力已致力于发现具有增加的转染效率的阳离子脂质(Gao et al., 1995, Gene Therapy 2, 710-722)。

[0014] 许多工作已报道了在动物中以及在人类中两亲阳离子脂质:核酸复合物用于体内转染(在 Thierry et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1995, 92, 9742-9746 中加以评论)。然而,用于制备具有稳定保质期的复合物的技术问题还没有得到解决。例如,不同于病毒载体制备,就颗粒尺寸而言,脂质:核酸复合物是不稳定的。因而难以获得具有适用于全身注射的尺寸分布的均匀的脂质:核酸复合物。脂质:核酸复合物的大多数制剂是相对稳定的。因而,通常必须在 30 分钟至数小时的短时期内使用这些复合物。在使用阳离子脂质作为用于 DNA 递送的载体的临床试验中,在床侧混合两种成分并立即使用。结构不稳定性以及随着时间的推移脂质:核酸复合物的转染活性的丧失一直是脂质介导基因疗法的未来开发的挑战。在本领域中的许多的最新发展已专注于通过结合经过证实的阳离子递送剂与另一个部分来改进阳离子系统。然而,阳离子主链共轭物(结合物)还没有成功克服毒性并且没有一种被批准用于治疗用途。

[0015] 国际申请公开号 W0 95/24929 披露了基因在生物相容性基质中的封装或分散,优选可生物降解的聚合物基质,其中在延长期间内基因能够扩散出基质。优选地,基质具有以下形式:微颗粒如微球体、微胶囊、薄膜、植入物、或在装置如支架上的涂层。

[0016] 美国专利号 6,048,551 披露了控释基因递送系统,其采用聚(丙交酯-共-乙交酯)(PLGA)、邻苯二甲酸羟丙基甲基纤维素、邻苯二甲酸醋酸纤维素、和 Ludragit R、L、和 E 系列的聚合物以及共聚物微球体来封装基因载体。

[0017] 美国申请公开号 20070141134 披露了可以增强多核苷酸的细胞内递送的组合物,其中可以将多核苷酸加入 PEG 屏蔽胶束颗粒以促进多核苷酸穿过细胞膜的递送。通过共价和非共价方式来将多核苷酸加入屏蔽胶束颗粒。还可以将其它细胞靶向剂共价偶联于屏蔽胶束颗粒以增强在体内的定位。

[0018] 国际专利申请公开号 W0 2008/124634 披露了一种方法,该方法用于在可生物降解聚合物中封装核酸,尤其是 siRNA、shRNA、微 RNA、基因疗法质粒、和其它寡核苷酸,从而在通过纳米沉淀来形成纳米颗粒以前将核酸配制成由无毒性和/或天然存在的脂质构成的反胶团。

[0019] 国际申请公开号 W0 2009/127060 披露一种核酸-脂质颗粒,该颗粒,除核酸以外,还包含阳离子脂质、非阳离子脂质和结合的脂质,其可以抑制颗粒的聚集。

[0020] 国际专利申请公开号 W0 2010/007623(授权给本发明的一些发明人并在本发明的优先权日以后公布)披露了用于延长释放疏水性分子如类固醇和抗生素的组合物,该组合物包含含有可生物降解聚合物的基于脂质的基质。

[0021] 理想地,缓释药物递送系统应呈现通过所使用的特定赋形剂的类型和比例容易控制的动力学和其它特性。目前仍然未得到满足的需求是:改善的核酸组合物和方法,用于受

控和延长递送治疗性核酸药剂以接近组织和进入细胞,进而进行基因疗法。在现有技术中,并没有提出,包含脂质和生物相容性聚合物的基质组合物将具有用于递送基于核酸的药剂的改善的性能。

## 发明内容

[0022] 本发明提供了用于延长释放核酸药剂,尤其是基于核酸的药物的组合物,该组合物包含含有生物相容性聚合物的基于脂质的基质。基质组合物特别适用于核酸药剂(核酸剂)的局部递送或局部应用。本发明还提供了用来产生基质组合物的方法和用来利用基质组合物以提供活性核酸组分的受控和/或缓释的方法。

[0023] 本发明部分地基于以下意外的发现:可以有效地将在包含聚乙二醇(PEG)的水基溶液中存在的带负电荷的核酸加载到包含至少一种生物相容性聚合物的基于脂质的基质,其中聚合物可以是可生物降解聚合物、不可生物降解聚合物(非生物降解聚合物,不能生物降解聚合物)或它们的组合。另外,核酸可以以受控和/或延长的方式释放自基质。

[0024] 本发明的基质组合物优越于迄今已知的用于核酸递送的组合物和基质,这是因为它结合了核酸药剂到细胞或组织的有效局部递送和核酸药剂的受控和/或持续释放。

[0025] 在一个方面,本发明提供了基质组合物,该组合物包含:(a) 药用生物相容性聚合物连同第一脂质成分,其包含至少一种具有极性基团的脂质;(b) 第二脂质成分,其包含至少一种具有至少 14 个碳子的脂肪酸部分的磷脂;(c) 至少一种核酸药剂(试剂);以及(d) 聚乙二醇(PEG),其中基质组合物适应于提供核酸的缓释和/或控释。

[0026] 具有治疗或诊断效用的任何核酸分子可以用作本发明的基质组合物的一部分。核酸药剂可以包括 DNA 分子、RNA 分子、单链、双链、三链或四链。核酸药剂的非限制性清单包括:质粒 DNA、线状 DNA(多核苷酸和寡核苷酸)、染色体 DNA、信使 RNA(mRNA)、反义 DNA/RNA、RNAi、siRNA、微 RNA(miRNA)、核糖体 RNA、锁定核酸类似物(LNA)、寡核苷酸 DNA(ODN) 单和双链、免疫刺激序列(ISS)、和核酶。

[0027] 根据本发明的核酸药剂可以包括天然分子、修饰分子或人造分子。

[0028] 根据某些实施方式,核酸具有与 PEG 的非共价相互作用。

[0029] 根据某些实施方式,PEG 是分子量为 1,000-10,000 的线性 PEG。根据典型的实施方式,PEG 分子量为 1,000-8,000,更通常低于 8,000。根据本发明的教导,还可以使用生物可降解 PEG 分子,尤其是包含可降解间隔区并具有较高分子量的 PEG 分子。

[0030] 分子量为 5,000 以下的 PEG 分子目前被批准用于制药用途。因而,根据某些典型的实施方式,活性 PEG 分子具有可达 5,000 的分子量。

[0031] 根据一些实施方式,基质组合物包含至少一种阳离子脂质。根据某些实施方式,阳离子脂质选自由 DC-胆固醇、1,2-二油酰基-3-三甲基铵-丙烷(DOTAP)、二甲基双十八烷基铵(DDAB)、1,2-二月桂酰基-sn-甘油基-3-乙基磷酸胆碱(乙基 PC)、1,2-二-0-十八烯基-3-三甲基铵丙烷(DOTMA)、和其它阳离子脂质组成的组。每种可能性表示本发明的单独的实施方式。

[0032] 根据某些实施方式,生物相容性聚合物选自由可生物降解聚合物、不可生物降解聚合物和它们的组合组成的组。根据某些实施方式,可生物降解聚合物包含聚酯,其选自由 PLA(聚乳酸)、PGA(聚乙醇酸)、PLGA(聚(乳酸-共-乙醇酸))和它们的组合组成的组。



根据其它实施方式,不可生物降解聚合物选自自由聚乙二醇(PEG)、PEG 丙烯酸酯、PEG 甲基丙烯酸酯、甲基丙烯酸甲酯、甲基丙烯酸乙酯、甲基丙烯酸丁酯、甲基丙烯酸-2-乙基己酯、甲基丙烯酸月桂酯、甲基丙烯酸羟乙酯、2-甲基丙烯酰羟乙基磷酸胆碱(2-甲基丙烯酰基乙氧基磷酸胆碱)(MPC)、聚苯乙烯、衍生化聚苯乙烯、聚赖氨酸、聚 N-乙基-4-乙烯基吡啶溴化物、聚甲基丙烯酸酯、硅氧烷、聚甲醛、聚氨酯、聚酰胺、聚丙烯、聚氯乙烯、聚甲基丙烯酸、和它们的单独的衍生物或它们的共聚混合物组成的组。每种可能性表示本发明的单独的实施方式。

[0033] 根据另外的实施方式,不可生物降解聚合物和可生物降解聚合物形成嵌段共聚物,例如,PLGA-PEG-PLGA 等。

[0034] 根据某些实施方式,具有极性基团的脂质选自自由甾醇、生育酚和磷脂酰乙醇胺组成的组。根据某些特定的实施方式,具有极性基团的脂质是甾醇或其衍生物。根据典型的实施方式,甾醇是胆固醇。

[0035] 根据某些实施方式,混合第一脂质成分与生物相容性聚合物以形成非共价缔合。

[0036] 根据某些特定的实施方式,第一脂质成分是甾醇或其衍生物,而生物相容性聚合物是可生物降解聚酯。根据这些实施方式,借助于非共价键,可生物降解聚酯缔合于甾醇。

[0037] 根据一些实施方式,第二脂质成分包含磷脂酰胆碱(卵磷脂)或其衍生物。根据其它实施方式,第二脂质成分包含磷脂酰胆碱或其衍生物的混合物。根据另一些实施方式,第二脂质成分包含磷脂酰胆碱和磷脂酰乙醇胺或它们的衍生物的混合物。根据另外的实施方式,第二脂质成分进一步包含甾醇和其衍生物。根据典型的实施方式,甾醇是胆固醇。根据进一步的实施方式,第二脂质成分包含各种类型的磷脂的混合物。根据某些典型的实施方式,第二脂质成分进一步包含鞘脂、生育酚和聚乙二醇化脂质中的至少一种。

[0038] 根据另外的实施方式,总脂质与生物相容性聚合物的重量比为 1:1 以上至 9:1 以下。

[0039] 根据某些实施方式,基质组合物是均匀的(均质的,均相的)。在其它实施方式中,基质组合物具有基于脂质的基质的形式,其形状和边界由可生物降解聚合物来确定。在进一步的实施方式中,基质组合物具有植入物的形式。

[0040] 在某些特定的实施方式中,本发明提供了基质组合物,该组合物包含:(a) 可生物降解聚酯;(b) 甾醇;(c) 磷脂酰乙醇胺,其具有至少 14 个碳原子的脂肪酸部分;(d) 磷脂酰胆碱,其具有至少 14 个碳原子的脂肪酸部分;(e) 核酸药剂;和 (f) PEG。

[0041] 在某些实施方式中,基质组合物包含按重量计至少 50% 脂质。在某些另外的实施方式中,基质组合物进一步包含靶向部分。

[0042] 在某些实施方式中,基质组合物能够体内被降解成小泡,释放核酸的一些或所有质量被整合到其中。在其它实施方式中,基质组合物能够体内被降解以形成小泡,其中整合有活性剂和靶向部分。每种可能性表示本发明的单独的实施方式。

[0043] 根据另外的方面,本发明提供了一种药物组合物,该组合物包含本发明的基质组合物和药用赋形剂。

[0044] 根据某些实施方式,在除去有机溶剂和水以后,本发明的基质组合物具有植入物的形式。在另一种实施方式中,植入物是均匀的。每种可能性表示本发明的单独的实施方式。

[0045] 根据某些实施方式,从本发明的组合物产生植入物的方法包括以下步骤:(a) 根据本发明的方法,产生散装材料(bulk material)形式的基质组合物;以及(b) 将散装材料转移到期望形状模具或固体容器中。

[0046] 按照另一个方面,本发明提供了用来制备用于递送以及缓释和/或控释核酸药剂的基质组合物的方法,该方法包括:

[0047] (a) 将(i)生物相容性聚合物和(ii)包含至少一种具有极性基团的脂质的第一脂质成分混合到第一挥发性有机溶剂中;

[0048] (b) 将聚乙二醇混合到核酸药剂的水基溶液中;

[0049] (c) 将在步骤(b)中获得的溶液与第二挥发性有机溶剂和第二脂质成分混合,所述第二脂质成分包含至少一种具有至少14个碳原子的脂肪酸部分的磷脂;

[0050] (d) 混合在步骤(a)和(c)中获得的溶液以形成均匀混合物;以及

[0051] (e) 除去挥发性溶剂和水,

[0052] 从而产生包含核酸药剂的均匀多聚体-磷脂基质。

[0053] 根据某些实施方式,步骤(c)可选地进一步包括(i)通过蒸发除去溶剂,冷冻干燥或离心,以形成沉积物;以及(ii)将获得的沉积物悬浮于第二挥发性有机溶剂中。

[0054] 根据在特定制剂中所使用的特定核酸和其它物质和活性核酸的预期用途,以及根据本文描述的本发明的实施方式,来选择特定溶剂。按照核酸所期望的释放速率并根据本文描述的本发明的实施方式来选择形成本发明的基质的特定脂质。

[0055] 通常在根据所获得的溶液的性能确定的受控温度下通过蒸发来除去溶剂。利用真空进一步除去有机溶剂和水的残留物。

[0056] 根据本发明,不同类型的挥发性有机溶液的使用使得能够形成均匀的防水的基于脂质的基质组合物。根据各种实施方式,第一和第二溶剂可以是相同或不同的。根据一些实施方式,一种溶剂可以是非极性溶液而其它溶剂优选为水混溶性溶剂。

[0057] 根据某些实施方式,基质组合物是基本上没有水。术语“基本上没有水”是指包含按重量计小于1%水的组合物。在另一种实施方式中,该术语是指包含按重量计小于0.8%水的组合物。在另一种实施方式中,该术语是指包含按重量计小于0.6%水的组合物。在另一种实施方式中,该术语是指包含按重量计小于0.4%水的组合物。在另一种实施方式中,该术语是指包含按重量计小于0.2%水的组合物。在另一种实施方式中,该术语是指不存在影响基质的防水性能的水量。每种可能性表示本发明的单独的实施方式。

[0058] 在其它实施方式中,基质组合物是基本上没有水。“基本上没有”是指包含按重量计小于0.1%水的组合物。在另一种实施方式中,该术语是指包含按重量计小于0.08%水的组合物。在另一种实施方式中,该术语是指包含按重量计小于0.06%水的组合物。在另一种实施方式中,该术语是指包含按重量计小于0.04%水的组合物。在另一种实施方式中,该术语是指包含按重量计小于0.02%水的组合物。在另一种实施方式中,该术语是指包含按重量计小于0.01%水的组合物。每种可能性表示本发明的单独的实施方式。

[0059] 在另一种实施方式中,基质组合物没有水。在另一种实施方式中,该术语是指不包含可检出量水的组合物。每种可能性表示本发明的单独的实施方式。

[0060] 根据某些典型的实施方式,本发明提供了制备基质组合物的方法,该方法包括以下步骤:

[0061] (a) 将 (i) 可生物降解聚酯与 (ii) 甾醇混合到非极性挥发性有机溶剂中；

[0062] (b) 将分子量为 1,000-8,000 的聚乙二醇混合到核酸药剂的水基溶液中；

[0063] (c) 混合在步骤 (b) 中获得的溶液与水混溶性挥发性有机溶剂,所述有机溶剂包含磷脂酰乙醇胺和 / 或磷脂酰胆碱和 / 或甾醇 ;以及

[0064] (d) 混合在步骤 (a) 和 (c) 中获得的溶液以形成均匀混合物；

[0065] (e) 除去有机溶剂和水 ;以及

[0066] (f) 通过真空进一步除去剩余溶剂。

[0067] 根据某些实施方式,可生物降解聚酯选自由 PLA、PGA 和 PLGA 组成的组。在其它实施方式中,可生物降解聚酯是本领域已知的任何其它适宜的可生物降解聚酯或聚胺。在另外的实施方式中,在混合与水混溶性挥发性有机溶剂混合物以前,均化包含非极性有机溶剂的混合物。在其它实施方式中,在混合与包含非极性有机溶剂的混合物以前,均化包含水混溶性有机溶剂的混合物。在某些实施方式中,在步骤 (a) 的混合物中的聚合物是脂质饱和的。在另外的实施方式中,基质组合物是脂质饱和的。每种可能性表示本发明的单独的实施方式。

[0068] 本发明的基质组合物可以用于完全或部分地涂布不同基体(基底,衬底,底物)的表面。根据某些实施方式,待涂布的基体包括至少一种材料,该材料选自碳纤维、不锈钢、钴铬、钛合金、钽、陶瓷和胶原或明胶组成的组。在其它实施方式中,基体可以包括任何医疗装置和骨填料颗粒。骨填料颗粒可以是任何以下一种:同种异体骨颗粒(即,来自人源)、异种骨颗粒(即,来自动物源)和人工骨颗粒。在其它实施方式中,利用涂布基体的治疗和涂布基体的给予将按照本领域已知的用于类似的未涂布基体的治疗和给予的程序。

[0069] 必须强调的是,可以考虑到以下 4 个主要因素来计划利用本发明的组合物的缓释期:(i) 聚合物和脂质含量之间的重量比,尤其是具有至少 14 个碳原子的脂肪酸部分的磷脂;(ii) 生物聚合物和脂质的生化和 / 或生物物理特性;(iii) 在给定组合中所使用的不同脂质之间的比例;以及 (iv) 核酸药剂与聚乙二醇的温育时间。

[0070] 具体地,应考虑聚合物的降解速率和脂质的流动性。例如,PLGA (85:15) 聚合物将比 PLGA (50:50) 聚合物更慢地降解。在体温下,磷脂酰胆碱 (14:0) 比磷脂酰胆碱 (18:0) 是更为流体的(更小刚性和更少有序的)。因此,例如,与加入由 PLGA (50:50) 和磷脂酰胆碱 (14:0) 构成的基质中的核酸药剂的释放速率相比,加入包含 PLGA (85:15) 和磷脂酰胆碱 (18:0) 的基质组合物中的核酸药剂的释放速率将更慢。将确定释放速率的另一个方面是核酸的物理特性。另外,通过在第二脂质成分的配方中添加其它脂质可以进一步控制核酸药剂,尤其是基于核酸的药物的释放速率。这可以包括不同长度的脂肪酸如月桂酸 (C12:0)、膜活性甾醇(如胆固醇)或其它磷脂如磷脂酰乙醇胺。核酸药剂与聚乙二醇的温育时间会影响核酸从基质的释放速率。较长温育时间(许多小时)导致较高释放速率。根据各种实施方式,经所期望的数天至数月的时间,活性剂释放自组合物。

[0071] 根据某些实施方式,至少 30% 的基于核酸的药剂以零级动力学释放自基质组合物。根据其它实施方式,至少 50% 的基于核酸的药剂以零级动力学释放自组合物。

[0072] 根据下文的本发明的详细描述,本发明的这些和其它特点和优点将变得更容易理解和显而易见。

## 附图说明

[0073] 图 1 是标准曲线,其示出在 ssDNA 浓度和连接于 ssDNA 的 5' 端的荧光探针的荧光强度之间的关系。

[0074] 图 2 示出随着时间的推移(天数)加载到在没有聚乙二醇(PEG)的情况下制备的基质组合物中的 ssDNA 的释放速率。相对于加载的 ssDNA 的估计量来归一化释放速率。

[0075] 图 3A 和 3B 表示光学显微镜(X400)图片,其示出在来自实施例 2 中描述的基质组合物的 ssDNA 的水合以后释放的脂小泡。图 3A 示出在水合以后释放到介质中的典型的脂小泡。图 3B 示出来自相同小泡的绿色荧光发射,其表明这些小泡包含荧光探针。

[0076] 图 4 示出用释放自基质组合物的 ssDNA 扩增的 PCR 产物的琼脂糖凝胶。

[0077] 图 5 示出通过基因扫描分析测得的释放自基质组合物的 ssDNA 的大小。

[0078] 图 6 示出在 ssDNA 和 PEG 的不同温育时间下随着时间的推移(天数)加载到用聚乙二醇(PEG)制备的基质组合物中的 ssDNA 的释放速率。

[0079] 图 7 示出在基质组合物内使用具有不同长度的脂肪酸链作为主要脂质的磷脂对加载的 ssDNA 的释放速率的影响。

## 具体实施方式

[0080] 本发明提供了用于延长释放和/或控释核酸的组合物,该组合物包含含有生物相容性聚合物的基于脂质的基质。尤其是,本发明的基质组合物适用于核酸的局部释放。本发明还提供了制备基质组合物的方法以及利用基质组合物来在对需要其的受试者体内提供活性组分的控释的方法。

[0081] 根据一个方面,本发明提供了一种基质组合物,该组合物包含:(a) 药用生物相容性聚合物连同第一脂质成分,所述第一脂质成分包含至少一种具有极性基团的脂质;(b) 第二脂质成分,其包含至少一种具有至少 14 个碳原子的脂肪酸部分的磷脂;(c) 至少一种核酸药剂;以及(d) 聚乙二醇(PEG),其中基质组合物适于提供核酸的缓释。

[0082] 根据某些实施方式,生物相容性聚合物是可生物降解的。根据其它实施方式,生物相容性聚合物是非生物可降解的。根据另外的实施方式,生物相容性聚合物包含生物可降解和不可生物降解聚合物的组合,可选地作为嵌段共聚物。

[0083] 根据某些实施方式,本发明提供了一种基质组合物,该组合物包含:(a) 药用可生物降解聚酯;(b) 磷脂,其具有至少 14 个碳原子的脂肪酸部分;(c) 药物活性核酸药剂;以及(d) PEG。

[0084] 核酸药剂包含具有治疗或诊断效用的任何核酸分子。根据一些实施方式,核酸药剂包含 DNA 分子、RNA 分子、单链、双链、三链或四链。根据其它实施方式,基于核酸的药剂选自自由质粒 DNA、线状 DNA(多核苷酸和寡核苷酸)、染色体 DNA、信使 RNA(mRNA)、反义 DNA/RNA、RNAi、siRNA、微 RNA(miRNA)、核糖体 RNA、锁定核酸类似物(LNA)、单和双链寡核苷酸 DNA(ODN)、免疫刺激序列(ISS)、和核酶组成的组。根据某些典型的实施方式,核酸药剂用于治疗用途。

[0085] 根据一些实施方式,脂质饱和的基质组合物包含至少一种阳离子脂质。术语“阳离子脂质”是指任何数目的脂质物质,其在所选 pH 值(如生理 pH 值)下携带净正电荷。这样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-二硬脂酰-N,N-二甲基溴化铵 (“DDAB”);N-(2,3-二油酰基氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵 (“DOTAP”);3-(N-(N',N'-二甲基氨基乙烷)氨基甲酰基)胆固醇 (“DC-Chol”)和N-(1,2-二肉豆蔻基氧基丙-3-基)-N,N-二甲基-N-羟乙基溴化铵 (“DMRIE”)。另外,可获得阳离子脂质的许多商业制剂,其可以用于本发明。这些商业制剂包括,例如,LIPOFECTIN<sup>®</sup>(市售阳离子脂质体,其包含DOTMA和1,2-二油酰基-sn-3-磷酸乙醇胺 (“DOPE”),来自GIBCO/BRL,Grand Island,N.Y.,USA);LIPOFECTAMINE<sup>®</sup>(市售阳离子脂质体,其包含N-(1-(2,3-二油基氧基)丙基)-N-(2-(精胺甲酰胺)乙基)N,N-二甲基三氟乙酸铵 (“DOSPA”)和 (“DOPE”),来自GIBCO/BRL);以及TRANSFECTAM<sup>®</sup>(市售阳离子脂质,其包含在乙醇中的双十八烷基酰胺基甘氨酸羧基精胺 (“DOGS”),来自Promega Corp.,Madison,Wis.,USA)。在生理pH值以下,以下脂质是阳离子脂质并具有正电荷:DODAP、DODMA、DMDMA等。不希望受限于任何具体理论或作用机制,基质的阳离子脂质可以促进将本发明的基质(包含核酸药剂)内化到细胞或组织中。根据某些实施方式,细胞和/或组织形成人体的一部分。

[0086] 根据其它实施方式,可生物降解聚合物包含阳离子聚合物,如阳离子化瓜尔胶、二烯丙基季铵盐/丙烯酰胺共聚物、季铵化聚乙烯吡咯烷酮和它们的衍生物、以及各种聚季铵盐化合物。

[0087] 根据某些实施方式,第二脂质成分的磷脂是具有至少14个碳原子的脂肪酸部分的磷脂酰胆碱。在另一种实施方式中,第二脂质成分的磷脂进一步包含具有至少14个碳原子的脂肪酸部分的磷脂酰乙醇胺。在另一种实施方式中,第二脂质成分的磷脂进一步包括甾醇,尤其是胆固醇。

[0088] 在某些实施方式中,基质组合物是脂质饱和的。如在本文中所使用的,“脂质饱和的”是指在基质组合物的聚合物中脂质(包括磷脂)的饱和度,连同在基质中存在的任何核酸药剂和可选的靶向部分,以及可以存在的任何其它脂质。基质组合物由存在的无论什么脂质来饱和。本发明的脂质饱和基质呈现另外的优点:不需要合成乳化剂或表面活性剂如聚乙烯醇;因而,本发明的组合物通常基本上没有聚乙烯醇。为获得脂质饱和度来确定聚合物:脂质比率的方法和确定基质的脂质饱和度的方法在本领域中是已知的。

[0089] 在其它实施方式中,基质组合物是均匀的。在另外的实施方式中,基质组合物具有脂质饱和基质的形式,其形状和边界由可生物降解聚合物来确定。根据某些实施方式,基质组合物具有植入物的形式。

[0090] 在某些特定的实施方式中,本发明提供了一种基质组合物,该组合物包含:(a)可生物降解聚酯;(b)甾醇;(c)具有至少14个碳原子的脂肪酸部分的磷脂酰乙醇胺;(d)具有至少14个碳原子的脂肪酸部分的磷脂酰胆碱;(e)至少一种基于核酸的药物;以及(f)PEG。在其它典型的实施方式中,基质组合物是脂质饱和的。

[0091] 在其它典型的实施方式中,本发明提供了一种基质组合物,该组合物包含:(a)可生物降解聚酯;(b)甾醇;(c)具有至少14个碳原子的脂肪酸部分的磷脂酰乙醇胺;(d)具有至少14个碳原子的脂肪酸部分的磷脂酰胆碱;(e)基于核酸的活性剂;以及(f)PEG。

[0092] 根据某些实施方式,可生物降解聚酯经由非共价键而缔合于甾醇。

[0093] 如在本文中所提供的,本发明的基质能够被模塑成具有不同厚度和形状的三维构造。因此,可以产生成形的基质以呈现特定的形状,包括球体、立方体、棒、管、片、或带子。在

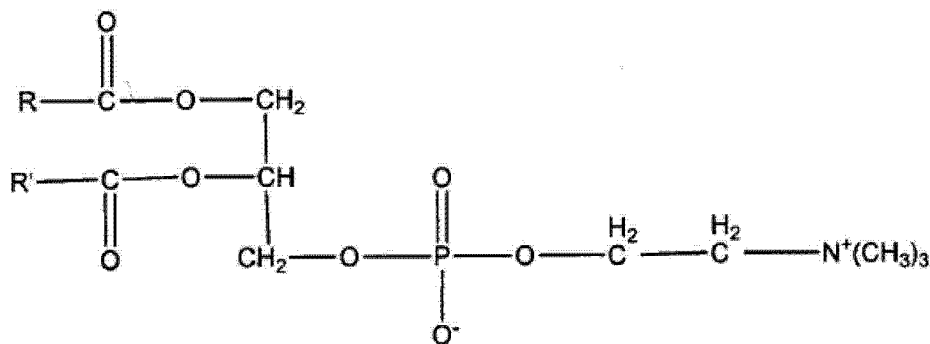
基质的制备期间采用冷冻干燥步骤的情况下,形状取决于模具或支撑物的形状,上述模具或支撑物可以制造自任何惰性材料并且可以在所有侧面(对于球体或立方体)或在有限数目的侧面(对于片)接触基质。当植入物设计需要时,可以将基质成形为体腔的形式。借助于剪刀、解剖刀、激光束或任何其它切割仪器来除去部分基质可以产生三维结构所需要的任何完善。每种可能性表示本发明的单独的实施方式。

[0094] 根据另外的实施方式,本发明的基质组合物提供了骨移植材料的涂层。根据某种实施方式,骨移植材料选自由同种异体移植物、异质移植物、和异种移植物组成的组。根据另外的实施方式,本发明的基质可以结合于胶原或胶原基质蛋白。

[0095] 脂质

[0096] “磷脂酰胆碱”是指具有磷酸胆碱首基的磷酸甘油酯。在另一种实施方式中,磷脂酰胆碱化合物具有以下结构:

[0097]



[0098] 磷脂酰胆碱

[0099] R 和 R' 部分是脂肪酸,通常为天然存在的脂肪酸或天然存在的脂肪酸的衍生物。在一些实施方式中,脂肪酸部分是饱和脂肪酸部分。在一些实施方式中,脂肪酸部分是不饱和脂肪酸部分。“饱和的”是指在烃链中不存在双键。在另一种实施方式中,脂肪酸部分具有至少 14 个碳原子。在另一种实施方式中,脂肪酸部分具有 16 个碳原子。在另一种实施方式中,脂肪酸部分具有 18 个碳原子。在另一种实施方式中,脂肪酸部分具有 16-18 个碳原子。在另一种实施方式中,选择脂肪酸部分,以致所获得的基质的凝胶-液晶转变温度为至少 40° C。在另一种实施方式中,脂肪酸部分均为棕榈酰。在另一种实施方式中,脂肪酸部分均为硬脂酰。在另一种实施方式中,脂肪酸部分均为花生酰。在另一种实施方式中,脂肪酸部分是棕榈酰和硬脂酰。在另一种实施方式中,脂肪酸部分是棕榈酰和花生酰。在另一种实施方式中,脂肪酸部分是花生酰和硬脂酰。在另一种实施方式中,脂肪酸部分均为肉豆蔻酰。每种可能性表示本发明的单独的实施方式。

[0100] 在另一种实施方式中,磷脂酰胆碱是天然存在的磷脂酰胆碱。在另一种实施方式中,磷脂酰胆碱是合成磷脂酰胆碱。在另一种实施方式中,磷脂酰胆碱包含天然存在分布的同位素。在另一种实施方式中,磷脂酰胆碱是氘化磷脂酰胆碱。通常,磷脂酰胆碱是对称磷脂酰胆碱(即,这样的磷脂酰胆碱,其中两个脂肪酸部分是相同的)。在另一种实施方式中,磷脂酰胆碱是非对称磷脂酰胆碱。

[0101] 磷脂酰胆碱的非限制性实例是 1, 2- 二硬脂酰 -sn- 甘油基 -3- 磷酸胆碱 (DSPC)、二棕榈酰 - 磷脂酰胆碱 (DPPC)、二肉豆蔻酰 - 磷脂酰胆碱 (DMPC)、二油酰 - 磷脂酰胆碱 (DOPC)、1- 棕榈酰 -2- 油酰 - 磷脂酰胆碱、以及用以上列举的任何脂肪酸部分加以修饰的磷

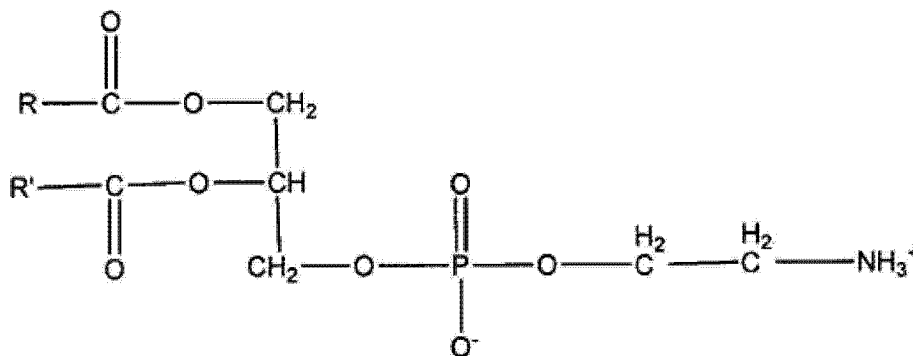
脂酰胆碱。在某些实施方式中，磷脂酰胆碱选自由 DSPC、DPPC 和 DMPC 组成的组。在另一种实施方式中，磷脂酰胆碱是本领域已知的任何其它磷脂酰胆碱。每种磷脂酰胆碱表示本发明的单独的实施方式。

[0102] 氘化磷脂酰胆碱的非限制性实例是氘化 1, 2- 二硬脂酰 -sn- 甘油基 -3- 磷酸胆碱 (氘化 DSPC)、氘化二油酰 - 磷脂酰胆碱 (氘化 DOPC)、和氘化 1- 棕榈酰基 -2- 油酰基 - 磷脂酰胆碱。在另一种实施方式中，磷脂酰胆碱选自由氘化 DSPC、氘化 DOPC、和氘化 1- 棕榈酰 -2- 油酰基 - 磷脂酰胆碱组成的组。在另一种实施方式中，磷脂酰胆碱是本领域已知的任何其它氘化磷脂酰胆碱。

[0103] 在某些实施方式中，磷脂酰胆碱 (PC) 构成至少 30% 的基质组合物的总脂质含量。在其它实施方式中，PC 构成至少 35% 的总脂质含量，可替换地至少 40% 的总脂质含量，进一步可替换地至少 45%、至少 50%、至少 55%、至少 60%、至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90% 或至少 95% 的总脂质含量。在另一种实施方式中，PC 构成 95% 以上的总脂质含量。每种可能性表示本发明的单独的实施方式。

[0104] “磷脂酰乙醇胺”是指具有磷酸乙醇胺首基的磷酸甘油酯。在另一种实施方式中，磷脂酰乙醇胺化合物具有以下结构：

[0105]



[0106] R 和 R' 部分是脂肪酸，通常为天然存在的脂肪酸或天然存在的脂肪酸的衍生物。在另一种实施方式中，脂肪酸部分是饱和脂肪酸部分。在另一种实施方式中，“饱和的”是指在烃链中不存在双键。在另一种实施方式中，脂肪酸部分具有至少 14 个碳原子。在另一种实施方式中，脂肪酸部分具有至少 16 个碳原子。在另一种实施方式中，脂肪酸部分具有 14 个碳原子。在另一种实施方式中，脂肪酸部分具有 16 个碳原子。在另一种实施方式中，脂肪酸部分具有 18 个碳原子。在另一种实施方式中，脂肪酸部分具有 14-18 个碳原子。在另一种实施方式中，脂肪酸部分具有 14-16 个碳原子。在另一种实施方式中，脂肪酸部分具有 16-18 个碳原子。在另一种实施方式中，选择脂肪酸部分使得获得的基质的凝胶 - 液晶转变温度为至少 40° C。在另一种实施方式中，脂肪酸部分均为肉豆蔻酰。在另一种实施方式中，脂肪酸部分均为棕榈酰。在另一种实施方式中，脂肪酸部分均为硬脂酰。在另一种实施方式中，脂肪酸部分均为花生酰。在另一种实施方式中，脂肪酸部分是肉豆蔻酰和硬脂酰。在另一种实施方式中，脂肪酸部分是肉豆蔻酰和花生酰。在另一种实施方式中，脂肪酸部分是肉豆蔻酰和棕榈酰。在另一种实施方式中，脂肪酸部分是棕榈酰和硬脂酰。在另一种实施方式中，脂肪酸部分是棕榈酰和花生酰。在另一种实施方式中，脂肪酸部分是花生酰和硬脂酰。每种可能性表示本发明的单独的实施方式。

[0107] 在另一种实施方式中，磷脂酰乙醇胺是天然存在的磷脂酰乙醇胺。在另一种实施

方式中,磷脂酰乙醇胺是合成磷脂酰乙醇胺。在另一种实施方式中,磷脂酰乙醇胺是氘化磷脂酰乙醇胺。在另一种实施方式中,磷脂酰乙醇胺包含天然存在分布的同位素。通常,磷脂酰乙醇胺是对称磷脂酰乙醇胺。在另一种实施方式中,磷脂酰乙醇胺是非对称磷脂酰乙醇胺。

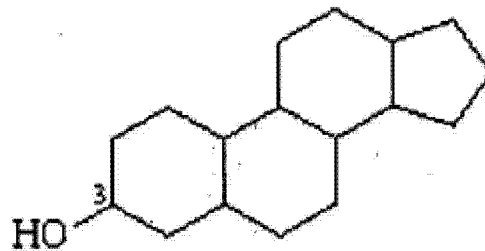
[0108] 磷脂酰乙醇胺的非限制性实例是二甲基二肉豆蔻酰磷脂酰乙醇胺 (DMPE) 和二棕榈酰 - 磷脂酰乙醇胺 (DPPE)、以及用以上列举的任何脂肪酸部分修饰的磷脂酰乙醇胺。在另一种实施方式中,磷脂酰乙醇胺选自由 DMPE 和 DPPE 组成的组。

[0109] 氘化磷脂酰乙醇胺的非限制性实例是氘化 DMPE 和氘化 DPPE。在另一种实施方式中,磷脂酰乙醇胺选自由氘化 DMPE 和氘化 DPPE 组成的组。在另一种实施方式中,磷脂酰乙醇胺是本领域已知的任何其它氘化磷脂酰乙醇胺。

[0110] 在另一种实施方式中,磷脂酰乙醇胺是本领域已知的任何其它磷脂酰乙醇胺。每种磷脂酰乙醇胺表示本发明的单独的实施方式。

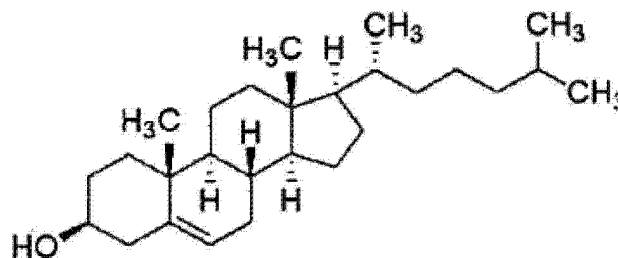
[0111] 在一种实施方式中,“甾醇”是指在 A 环的 3 位置处具有羟基的类固醇。在另一种实施方式中,该术语是指具有以下结构的类固醇:

[0112]



[0113] 在另一种实施方式中,本发明的方法和组合物的甾醇是动物甾醇。在另一种实施方式中,甾醇是胆固醇:

[0114]



[0115] 在另一种实施方式中,甾醇是本领域已知的任何其它动物甾醇。在另一种实施方式中,甾醇的摩尔可达 40% 摩尔的存在的总脂质。在另一种实施方式中,将甾醇加入到基质组合物中。每种可能性表示本发明的单独的实施方式。

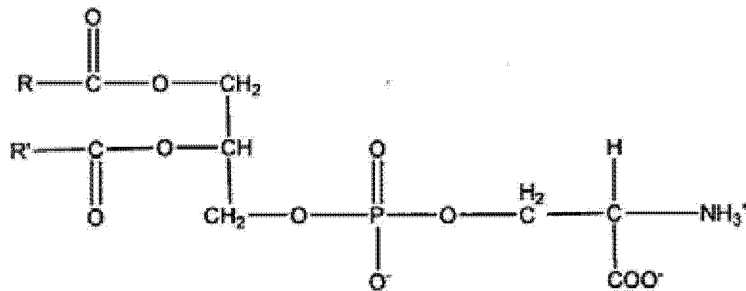
[0116] 在另一种实施方式中,基于基质组合物的脂质含量的总重量,胆固醇的存在量为 10-60%。在另一种实施方式中,重量百分比是 20-50%。在另一种实施方式中,重量百分比是 10-40%。在另一种实施方式中,重量百分比是 30-50%。在另一种实施方式中,重量百分比是 20-60%。在另一种实施方式中,重量百分比是 25-55%。在另一种实施方式中,重量百分比是 35-55%。在另一种实施方式中,重量百分比是 30-60%。在另一种实施方式中,重量百分比是 30-55%。在另一种实施方式中,重量百分比是 20-50%。在另一种实施方式中,重量百分比是 25-55%。每种可能性表示本发明的单独的实施方式。



[0117] 在另一种实施方式中,本发明的组合物进一步包含不同于磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、或甾醇的脂质。根据某些实施方式,另外的脂质是磷酸甘油酯。根据其它实施方式,另外的脂质选自由磷脂酰丝氨酸、磷脂酰甘油、和磷脂酰肌醇组成的组。在另外的实施方式中,另外的脂质选自由磷脂酰丝氨酸、磷脂酰甘油、磷脂酰肌醇、和鞘磷脂组成的组。根据进一步的实施方式,在本发明的基质内存在以上另外的脂质的任何 2 种或更多种的组合。根据某些实施方式,将聚合物、磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、甾醇、和另外的脂质均加入到基质组合物中。每种可能性表示本发明的单独的实施方式。

[0118] 根据另外的实施方式,本发明的组合物进一步包含磷脂酰丝氨酸。如在本文中所使用的,“磷脂酰丝氨酸”是指具有磷酸丝氨酸首基的磷酸甘油酯。在另一种实施方式中,磷脂酰丝氨酸化合物具有以下结构:

[0119]



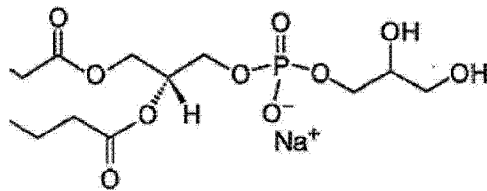
[0120] R 和 R' 部分是脂肪酸,通常为天然存在的脂肪酸或天然存在的脂肪酸的衍生物。在另一种实施方式中,脂肪酸部分是饱和脂肪酸部分。在另一种实施方式中,脂肪酸部分具有至少 14 个碳原子。在另一种实施方式中,脂肪酸部分具有至少 16 个碳原子。在另一种实施方式中,选择脂肪酸部分,使得所获得的基质的凝胶-液晶转变温度是至少 40° C。在另一种实施方式中,脂肪酸部分均为肉豆蔻酰。在另一种实施方式中,脂肪酸部分均为棕榈酰。在另一种实施方式中,脂肪酸部分均为硬脂酰。在另一种实施方式中,脂肪酸部分均为花生酰。在另一种实施方式中,脂肪酸部分是肉豆蔻酰和硬脂酰。在另一种实施方式中,脂肪酸部分是上述脂肪酸部分的两种的组合。

[0121] 在其它实施方式中,磷脂酰丝氨酸是天然存在的磷脂酰丝氨酸。在另一种实施方式中,磷脂酰丝氨酸是合成磷脂酰丝氨酸。在另一种实施方式中,磷脂酰丝氨酸是氘化磷脂酰丝氨酸。在另一种实施方式中,磷脂酰丝氨酸包含天然存在分布的同位素。在另一种实施方式中,磷脂酰丝氨酸是对称磷脂酰丝氨酸。在另一种实施方式中,磷脂酰丝氨酸是非对称磷脂酰丝氨酸。

[0122] 磷脂酰丝氨酸的非限制性实例是用以上列举的任何脂肪酸部分修饰的磷脂酰丝氨酸。在另一种实施方式中,磷脂酰丝氨酸是本领域已知的任何其它磷脂酰丝氨酸。每种磷脂酰丝氨酸表示本发明的单独的实施方式。

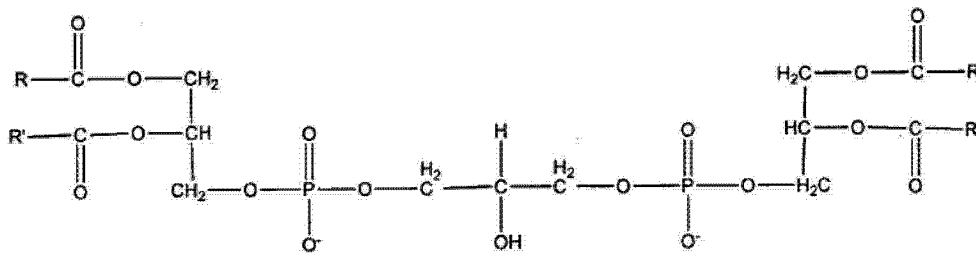
[0123] 在其它实施方式中,本发明的组合物进一步包含磷脂酰甘油。如在本文中所使用的,“磷脂酰甘油”是指具有磷酸甘油首基的磷酸甘油酯。在另一种实施方式中,磷脂酰甘油化合物具有以下结构:

[0124]



[0125] 左边的两个键连接于脂肪酸,通常为天然存在的脂肪酸或天然存在的脂肪酸的衍生物。在另一种实施方式中,磷脂酰甘油是天然存在的磷脂酰甘油。在另一种实施方式中,磷脂酰甘油是合成磷脂酰甘油。在另一种实施方式中,磷脂酰甘油是氘化磷脂酰甘油。在另一种实施方式中,磷脂酰甘油包含天然存在分布的同位素。在另一种实施方式中,磷脂酰甘油是对称磷脂酰甘油。在另一种实施方式中,磷脂酰甘油是非对称磷脂酰甘油。在另一种实施方式中,该术语包括具有以下结构的二磷脂酰甘油:

[0126]

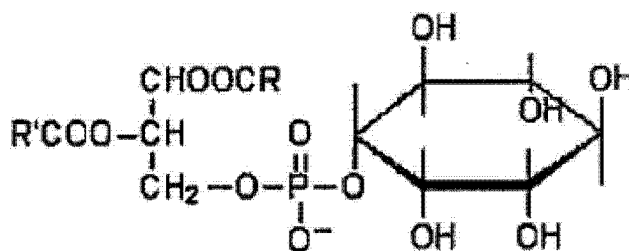


[0127] R 和 R' 部分是脂肪酸,通常为天然存在的脂肪酸或天然存在的脂肪酸的衍生物。在另一种实施方式中,脂肪酸部分是饱和脂肪酸部分。在另一种实施方式中,脂肪酸部分具有至少 14 个碳原子。在另一种实施方式中,脂肪酸部分具有至少 16 个碳原子。在另一种实施方式中,选择脂肪酸部分,使得所获得的基质的凝胶-液晶转变温度是至少 40° C。在另一种实施方式中,脂肪酸部分均为肉豆蔻酰。在另一种实施方式中,脂肪酸部分均为棕榈酰。在另一种实施方式中,脂肪酸部分均为硬脂酰。在另一种实施方式中,脂肪酸部分均为花生酰。在另一种实施方式中,脂肪酸部分是肉豆蔻酰和硬脂酰。在另一种实施方式中,脂肪酸部分是以上脂肪酸部分的两种的组合。

[0128] 磷脂酰甘油的非限制性实例是用以上列举的任何脂肪酸部分修饰的磷脂酰甘油。在另一种实施方式中,磷脂酰甘油是本领域已知的任何其它磷脂酰甘油。每种磷脂酰甘油表示本发明的单独的实施方式。

[0129] 在另外的实施方式中,本发明的组合物进一步包含磷脂酰肌醇。如在本文中所使用的,“磷脂酰肌醇”是指具有磷酸肌醇首基的磷酸甘油酯。在另一种实施方式中,磷脂酰肌醇化合物具有以下结构:

[0130]



[0131] R 和 R' 部分是脂肪酸,通常为天然存在的脂肪酸或天然存在的脂肪酸的衍生物。在另一种实施方式中,脂肪酸部分是饱和脂肪酸部分。在另一种实施方式中,脂肪酸部分具

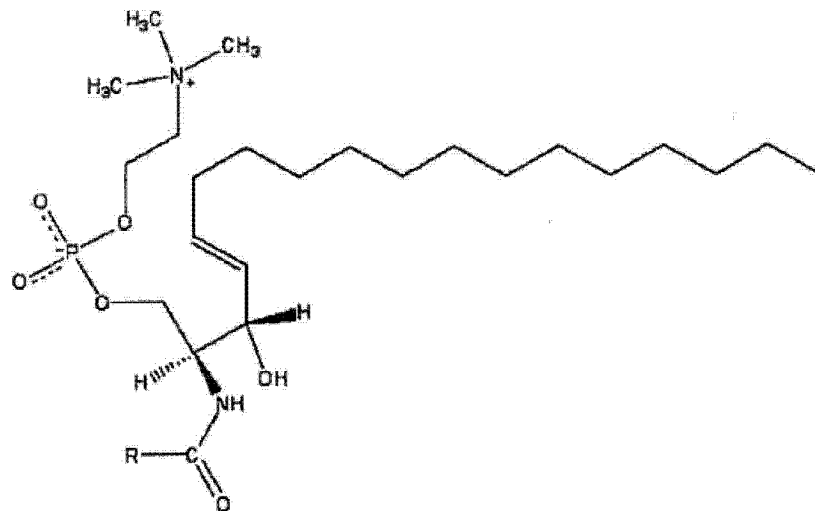
有至少 14 个碳原子。在另一种实施方式中，脂肪酸部分具有至少 16 个碳原子。在另一种实施方式中，选择脂肪酸部分，使得所获得的基质的凝胶-液晶转变温度是至少 40° C。在另一种实施方式中，脂肪酸部分均为肉豆蔻酰。在另一种实施方式中，脂肪酸部分均为棕榈酰。在另一种实施方式中，脂肪酸部分均为硬脂酰。在另一种实施方式中，脂肪酸部分均为花生酰。在另一种实施方式中，脂肪酸部分是肉豆蔻酰和硬脂酰。在另一种实施方式中，脂肪酸部分是上述脂肪酸部分的两种的组合。

[0132] 在另一种实施方式中，磷脂酰肌醇是天然存在的磷脂酰肌醇。在另一种实施方式中，磷脂酰肌醇是合成磷脂酰肌醇。在另一种实施方式中，磷脂酰肌醇是氘化磷脂酰肌醇。在另一种实施方式中，磷脂酰肌醇包含天然存在分布的同位素。在另一种实施方式中，磷脂酰肌醇是对称磷脂酰肌醇。在另一种实施方式中，磷脂酰肌醇是非对称磷脂酰肌醇。

[0133] 磷脂酰肌醇的非限制性实例是用以上列举的任何脂肪酸部分修饰的磷脂酰肌醇。在另一种实施方式中，磷脂酰肌醇是本领域已知的任何其它磷脂酰肌醇。每种磷脂酰肌醇表示本发明的单独的实施方式。

[0134] 在进一步的实施方式中，本发明的组合物进一步包含鞘脂。在某些实施方式中，鞘脂是神经酰胺。在其它实施方式中，鞘脂是鞘磷脂。“鞘磷脂”是指源自鞘氨醇的磷脂。在另一种实施方式中，鞘磷脂化合物具有以下结构：

[0135]



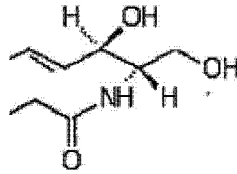
[0136] R 部分是脂肪酸，通常为天然存在的脂肪酸或天然存在的脂肪酸的衍生物。在另一种实施方式中，鞘磷脂是天然存在的鞘磷脂。在另一种实施方式中，鞘磷脂是合成鞘磷脂。在另一种实施方式中，鞘磷脂是氘化鞘磷脂。在另一种实施方式中，鞘磷脂包含天然存在分布的同位素。

[0137] 在另一种实施方式中，本发明的方法和组合物的鞘磷脂的脂肪酸部分具有至少 14 个碳原子。在另一种实施方式中，脂肪酸部分具有至少 16 个碳原子。在另一种实施方式中，选择脂肪酸部分，使得所获得的基质的凝胶-液晶转变温度是至少 40° C。

[0138] 鞘磷脂的非限制性实例是用以上列举的任何脂肪酸部分修饰的鞘磷脂。在另一种实施方式中，鞘磷脂是本领域已知的任何其它鞘磷脂。每种鞘磷脂表示本发明的单独的实施方式。

[0139] “神经酰胺”是指具有以下结构的化合物：

[0140]



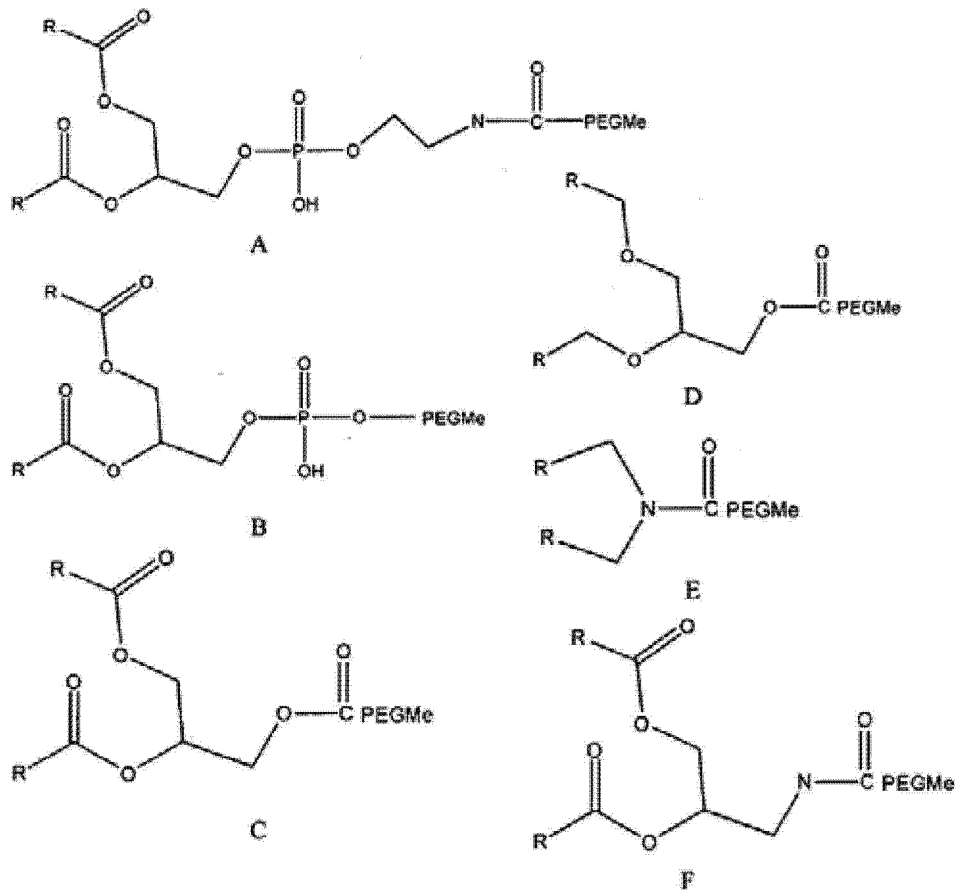
[0141] 将左边的两个键连接于脂肪酸,通常为天然存在的脂肪酸或天然存在的脂肪酸的衍生物。在另一种实施方式中,脂肪酸是较长链(至  $C_{24}$  或更大)。在另一种实施方式中,脂肪酸是饱和脂肪酸。在另一种实施方式中,脂肪酸是单烯脂肪酸。在另一种实施方式中,脂肪酸是  $n-9$  单烯脂肪酸。在另一种实施方式中,脂肪酸包含在位置 2 处的羟基。在另一种实施方式中,脂肪酸是本领域已知的其它适宜脂肪酸。在另一种实施方式中,神经酰胺是天然存在的神经酰胺。在另一种实施方式中,神经酰胺是合成神经酰胺。在另一种实施方式中,将神经酰胺加入到基质组合物中。每种可能性表示

[0142] 本发明的单独的实施方式。

[0143] 每种鞘脂表示本发明的单独的实施方式。

[0144] 在某些实施方式中,本发明的组合物进一步包含聚乙二醇化脂质。在另一种实施方式中,PEG 部分具有 500-5000 道尔顿的 MW。在另一种实施方式中,PEG 部分具有任何其它适宜的 MW。适宜的 PEG 修饰脂质的非限制性实例包括具有甲氧基端基的 PEG 部分,例如 PEG 修饰磷脂酰乙醇胺和磷脂酸(结构 A 和 B)、PEG 修饰的二酰甘油和二烷基甘油(结构 C 和 D)、PEG 修饰的二烷基胺(结构 E)和 PEG 修饰的 1,2-二酰氧基丙烷-3-胺(结构 F)(如下所示)。在另一种实施方式中,PEG 部分具有在本领域中使用的任何其它端基。在另一种实施方式中,聚乙二醇化脂质选自由 PEG 修饰的磷脂酰乙醇胺、PEG 修饰的磷脂酸、PEG 修饰的二酰甘油、PEG 修饰的二烷基甘油、PEG 修饰的二烷基胺、和 PEG 修饰的 1,2-二酰氧基丙烷-3-胺组成的组。在另一种实施方式中,聚乙二醇化脂质是本领域已知的任何其它聚乙二醇化磷脂。每种可能性表示本发明的单独的实施方式。

[0145]



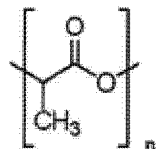
[0146] 根据某些实施方式,基于在基质组合物中的总脂质,聚乙二醇化脂质的存在量为约 50 摩尔%。在其它实施方式中,百分比为约 45 摩尔%,可替换地约 40 摩尔%、约 35 摩尔%、约 30 摩尔%、约 25 摩尔%、约 20 摩尔%、约 15 摩尔%、约 10 摩尔%、和约 5 摩尔%或更少。每种可能性表示本发明的单独的实施方式。

#### [0147] 聚合物

[0148] 根据某些实施方式,生物相容性聚合物是可生物降解的。根据某些目前典型的实施方式,可生物降解聚合物是聚酯。

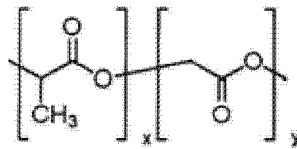
[0149] 根据某些实施方式,根据本发明的教导采用的可生物降解聚酯是 PLA(聚乳酸)。根据典型的实施方式,“PLA”是指聚(L-丙交酯)、聚(D-丙交酯)、和聚(DL-丙交酯)。以下示出了聚(DL-丙交酯)的代表性结构:

[0150]



[0151] 在其它实施方式中,聚合物是 PGA(聚乙醇酸)。在另外的实施方式中,聚合物是 PLGA(聚(乳酸-共-乙醇酸))。包含在 PLGA 中的 PLA 可以是本领域已知的任何 PLA,例如对映体或外消旋混合物。以下示出 PLGA 的代表性结构。

[0152]



[0153] 根据某些实施方式,PLGA 包含比率为 1:1 的乳酸/乙醇酸。在另一种实施方式中,比率是 60:40。在另一种实施方式中,比率是 70:30。在另一种实施方式中,比率是 80:20。在另一种实施方式中,比率是 90:10。在另一种实施方式中,比率是 95:5。在另一种实施方式中,比率是适用于延长的体内释放曲线(如本文定义的)的另一个比率。在另一种实施方式中,比率是 50:50。在某些典型的实施方式中,比率是 75:25。PLGA 可以是无规或嵌段共聚物。PLGA 还可以是与其它聚合物如 PEG 的嵌段共聚物。每种可能性表示本发明的单独的实施方式。

[0154] 在另一种实施方式中,可生物降解聚酯选自自由聚己内酯、聚羟基链烷酸酯、聚丙烯延胡索酸酯、聚原酸酯、聚酞、和聚氰基丙烯酸烷基酯组成的组,只要聚酯包含氢键受体部分。在另一种实施方式中,可生物降解聚酯是包含任何两种单体的组合的嵌段共聚物,上述单体选自自由 PLA、PGA、PLGA、聚己内酯、聚羟基链烷酸酯、聚丙烯延胡索酸酯、聚原酸酯、聚酞、和聚氰基丙烯酸烷基酯组成的组。在另一种实施方式中,可生物降解聚酯是包含上文所列单体的任何两种的组合的无规共聚物。每种可能性表示本发明的单独的实施方式。

[0155] 在另一种实施方式中,根据本发明的教导的可生物降解聚酯的分子量(MW)是约 10-150KDa。在另一种实施方式中,MW 是约 20-150KDa。在另一种实施方式中,MW 是约 10-140KDa。在另一种实施方式中,MW 是约 20-130KDa。在另一种实施方式中,MW 是约 30-120KDa。在另一种实施方式中,MW 是约 45-120KDa。在另一种典型的实施方式中,MW 是约 60-110KDa。在另一种实施方式中,采用不同 MW 的 PLGA 聚合物的混合物。在另一种实施方式中,不同聚合物均具有在上述范围之一内的 MW。每种可能性表示本发明的单独的实施方式。

[0156] 在另一种实施方式中,可生物降解聚合物选自自由聚胺组成的组,其中聚胺包括含有一种或多种类型的氨基酸的肽、以及至少 10 个氨基酸。

[0157] 如在本文中所使用的,“可生物降解的”是指在生理 pH 值下通过自然生物过程能够被分解的物质。“生理 pH 值”是指身体组织的 pH 值,通常为 6-8。“生理 pH 值”并不指胃液的高度酸性 pH 值,其通常为 1 至 3。

[0158] 根据一些实施方式,生物相容性聚合物是不可生物降解聚合物。根据某些实施方式,不可生物降解聚合物可以选自但不限于聚乙二醇、聚乙二醇(PEG)丙烯酸酯、聚甲基丙烯酸酯(例如 PEG 甲基丙烯酸酯、聚甲基丙烯酸甲酯、聚甲基丙烯酸乙酯、聚甲基丙烯酸丁酯、聚甲基丙烯酸-2-乙基己酯、聚甲基丙烯酸月桂酯、聚甲基丙烯酸羟乙酯)、聚甲基丙烯酸酯、2-甲基丙烯酰羟乙基磷酸胆碱(MPC)、聚苯乙烯、衍生化聚苯乙烯、聚赖氨酸、聚 N-乙基-4-乙基吡啶溴化物、硅酮、乙烯-醋酸乙烯酯共聚物、聚乙烯、聚丙烯、聚四氟乙烯、聚氨酯、聚丙烯酸酯、聚乙酸乙烯酯、乙烯乙酸乙烯酯、聚乙烯、聚氯乙烯、聚氟乙烯、乙烯-醋酸乙烯酯和酰基取代的乙酸的聚合物的共聚物、聚(乙烯基咪唑)、氯磺酸酯聚烯烃、聚环氧乙烷、以及它们的混合物。

[0159] 核酸药剂

[0160] 本发明的核酸药剂或寡核苷酸的长度优选不大于约 1000 个碱基,通常不大于约

100 个碱基。在其它典型的实施方式中,寡核苷酸的长度不大于 30 个核苷酸(或碱基对)。核酸药剂可以是单链、双链、三链螺旋、或它们的任何组合。如果核酸药剂包括一个以上链,则上述链不一定需要是 100% 互补的。

[0161] 术语“寡核苷酸”、“寡核酸”和“多核苷酸”可以互换使用并且是指核糖核酸(核糖寡核苷酸或核糖寡核苷)或脱氧核糖核酸的低聚体或多聚体。这些术语包括核酸链,其包括天然存在的核苷碱基、糖和共价糖间键、以及具有功能类似的非天然存在的部分的寡核苷酸。上述修饰或取代的寡核苷酸可以优选于原始形式,这是由于有价值的特性,其包括,例如,在有血浆核酸酶存在的条件下增加的稳定性,以及增强的细胞摄取。

[0162] 根据某些实施方式,根据本发明的教导使用的核酸是反义分子。如在本文中所使用的,术语“反义分子”、“反义片段”或“反义”可以指具有抑制反义活性的任何多核苷酸,所述活性引起相应基因的内源性基因拷贝的表达的降低。反义分子是多核苷酸,该多核苷酸包含连续核苷酸,其具有足够长度的序列和与在靶基因的序列内存在的序列的同源性,以允许反义分子与基因的杂交。反义分子可以灭活靶 DNA 和 / 或 RNA(如,例如,mRNA、微 RNA 等)序列,并且它可以是单链、双链或三链螺旋。在反义分子包括一个以上的链的情况下,链不一定需要是 100% 互补的。

[0163] RNA 干扰 (RNAi)

[0164] 术语“RNA 干扰”或“RNAi”通常是指一种过程,其中双链 RNA 分子改变核酸序列的表达,借此,双链或短发夹 RNA 分子共享显著或全部同源性。术语“RNAi 剂”是指诱发 RNAi 的 RNA 序列。

[0165] 两种类型的小 RNA 分子 - 微 RNA(miRNA) 和小分子干扰 RNA(siRNA) - 对于 RNA 干扰是重要的。RNA 是基因的直接产物,并且这些小 RNA 可以结合于特定的其它 RNA 以及增加或降低它们的活性,例如通过防止信使 RNA 产生蛋白质。RNA 干扰在细胞抵抗寄生基因(病毒和转座子)的自然防卫方面、但一般还在引导扩生以及基因表达方面具有重要作用。

[0166] 在本文中按照它在本领域中的一般意义来使用术语“微 RNA”或“miRNA”。miRNA 是约 18-26 个核苷酸的单链非编码 RNA 分子。处理 miRNA:从称作初级 miRNA 的初级转录物到称前 miRNA 作的短茎环结构并最后到功能性 miRNA。通常,切割前体 miRNA 的一部分以产生最终 miRNA 分子。茎环结构可以为,例如,约 50 至约 80 个核苷酸、或约 60 核苷酸至约 70 个核苷酸(包括 miRNA 残基、那些配对于 miRNA 的核苷酸、和任何间插节段)。成熟 miRNA 分子部分地互补于一个或多个信使 RNA(mRNA) 分子,并且它们用来调节基因表达。根据本发明的方式使用的 miRNA 的实例包括但不限于在称作 miRBase 的 miRNA 数据库 (<http://microrna.sanger.ac.uk/>) 中找到的 miRNA。

[0167] “小分子干扰 RNA”,还被称作“短干扰 RNA”或“siRNA”是短双链 RNA (“dsRNA”) 分子,其存在于细胞中。dsRNA 会破坏信使 RNA (“mRNA”),其在一个核苷酸分辨率内共享与 siRNA 的序列同源性。据认为,siRNA 和靶向 mRNA 结合于“RNA 诱导的沉默复合物”或“RISC”,其切割靶向 mRNA。很像多周转酶,siRNA 被明显地再循环,其中 1 个 siRNA 分子能够诱导大约 1000 个 mRNA 分子的切割。因而与目前可用的用于抑制靶基因的表达的技术相比,mRNA 的 siRNA 介导的 RNAi 降解是更加有效的。

[0168] 通常,siRNA 是包含两个核苷酸链的双链核酸分子。每个链的长度可以显著不同。当指双链干扰 RNA 时,术语“长度”是指,反义和有义链单独地具有一定长度,包括干扰 RNA

分子,其中通过连接分子来连接有义和反义链。siRNA 具有明确定义的结构:RNA 的短双链,并在任何一端具有 2-核苷酸 3' 突出端。

[0169] RNA 干扰是两步过程。在第一步(其称作起始步骤)期间,或许通过 Dicer 的作用,将输入的 dsRNA 消化成 21-23 个核苷酸(nt)小分子干扰 RNAs(siRNA),上述 Dicer 是 dsRNA 特异性核糖核酸酶的核糖核酸酶 III 家族的成员,其以 ATP 依赖性方式切割 dsRNA(直接或经由表达载体、盒或病毒引入的)。

[0170] 术语“ddRNAi 剂”是指转录自载体的 RNAi 剂。术语“短发夹 RNA”或“shRNA”是指具有双链体区和环区的 RNA 结构。

[0171] 虽然 RNA 干扰效应(其由小分子干扰 RNA(siRNA)或微 RNA 介导)对于人类治疗具有认可的潜在应用,但它的应用受到限制,这是由于缺少适用于人类使用的递送方式。

[0172] 可以按照本领域已知的任何核酸生产方法(包括酶合成和固相合成)以及利用本领域中众所周知的重组方法来产生本发明的核酸药剂。

[0173] 用于进行固相合成的设备和试剂可商业上获自,例如,Applied Biosystems。还可以采用用于上述合成的任何其它方式;核酸药剂的实际合成是在本领域技术人员的能力范围内,并且可以经由确立的方法来完成,如详述于,例如:Sambrook, J. and Russell, D. W. (2001), "Molecular Cloning: A Laboratory Manual"; Ausubel, R. M. et al., eds. (1994, 1989), "Current Protocols in Molecular Biology," Volumes I-III, John Wiley & Sons, Baltimore, Maryland; Perbal, B. (1988), "A Practical Guide to Molecular Cloning," John Wiley & Sons, New York.

[0174] 应当理解,如下文进一步描述的,还可以利用表达载体来产生本发明的核酸药剂。

[0175] 可选地,本发明的核酸药剂是修饰核酸药剂。可以利用本领域已知的各种方法来修饰核酸药剂。

[0176] 在某些实施方式中,如本领域中已知的和如下文描述的,可以在主链、核苷间键、或碱基中修饰核酸药剂。

[0177] 根据本发明的这些实施方式有用的核酸药剂的具体实例包括包含修饰主链或非天然核苷间键的寡核苷酸或多核苷酸。具有修饰主链的寡核苷酸或多核苷酸的实例包括那些在主链中保留磷原子的寡核苷酸或多核苷酸。其它修饰的寡核苷酸主链包括,例如:硫代磷酸酯;手性硫代磷酸酯;二硫代磷酸酯;磷酸三酯;氨基烷基磷酸三酯;甲基和其它烷基磷酸酯,包括 3'-亚烷基磷酸酯和手性磷酸酯;亚膦酸酯;氨基磷酸酯,包括 3'-氨基氨基磷酸酯和氨基烷基氨基磷酸酯;硫羰氨基磷酸酯;硫羰烷基磷酸酯;硫羰烷基磷酸三酯;以及具有正常 3'-5' 键的硼代磷酸酯、这些硼代磷酸酯的 2'-5' 连接类似物、和那些具有相反极性的硼代磷酸酯,其中连接核苷单位的相邻对:3'-5' 到 5'-3' 或 2'-5' 到 5'-2'。还可以使用上述修饰的各种盐、混合盐、和游离酸形式。

[0178] 可替换地,其中并不包括磷原子的修饰寡核苷酸主链具有这样的主链,其形成自短链烷基或环烷基核苷间键、混合的杂原子和烷基或环烷基核苷间键、或一个或多个短链杂原子或杂环核苷间键。这些主链包括那些具有吗啉代键的主链(部分地形成自核苷的糖部分);硅氧烷主链;硫化物、亚砷、和砷主链;乙酰基和硫代乙酰基主链;亚甲基乙酰基和硫代乙酰基主链;包含烯烃的主链;氨基磺酸酯主链;亚甲基亚氨基和亚甲基胍基主链;磺酸酯和磺酰胺主链;酰胺主链;以及具有混合的 N、O、S 和 CH<sub>2</sub> 组成部分的其它主



链。

[0179] 由本发明设想的寡核苷酸或多核苷酸的其它非限制性实例包括包含双环和三环核苷的核酸类似物和核苷酸类似物,其称作“锁定核酸”、“锁定核苷类似物”、或“LNA”(参见,例如,美国专利号 6,083,482)。

[0180] 根据本发明可以使用的其它核酸药剂是那些在糖和核苷间键中被修饰的核酸药剂,即,核苷酸单元的主链被新基团替换。基本单元被保持,用于与适当多核苷酸靶的互补作用。本发明的核酸药剂还可以包括碱基修饰或替换。如在本文中所使用的,“未修饰”或“自然”碱基包括嘌呤碱基腺嘌呤(A)和鸟嘌呤(G)和嘧啶碱基胸腺嘧啶(T)、胞嘧啶(C)、和尿嘧啶(U)。“修饰”碱基包括但不限于其它合成和自然碱基,如:5-甲基胞嘧啶(5-me-C);5-羟甲基胞嘧啶;黄嘌呤;次黄嘌呤;2-氨基腺嘌呤;腺嘌呤和鸟嘌呤的6-甲基和其它烷基衍生物;腺嘌呤和鸟嘌呤的2-丙基和其它烷基衍生物;2-硫代尿嘧啶、2-硫代胸腺嘧啶、和2-硫代胞嘧啶;5-卤代尿嘧啶和胞嘧啶;5-丙炔基尿嘧啶和胞嘧啶;6-偶氮尿嘧啶、胞嘧啶、和胸腺嘧啶;5-尿嘧啶(假尿嘧啶);4-硫代尿嘧啶;8-卤代、8-氨基、8-硫羟、8-硫代烷基、8-羟基、和其它8-取代的腺嘌呤和鸟嘌呤;5-卤代,尤其是5-溴基、5-三氟甲基、和其它5-取代的尿嘧啶和胞嘧啶;7-甲基鸟嘌呤和7-甲基腺嘌呤;8-氮杂鸟嘌呤和8-氮杂腺嘌呤;7-去氮杂鸟嘌呤和7-去氮杂腺嘌呤;以及3-去氮杂鸟嘌呤和3-去氮杂腺嘌呤。

[0181] 可以利用本领域中众所周知的标准的重组和合成方法来产生本发明的基于核酸的药剂。分离的核酸序列可以获自它的天然来源,作为整个(即完全)基因或其一部分。还可以利用重组DNA技术(例如,聚合酶链反应(PCR)扩增、克隆)或化学合成来产生核酸分子。核酸序列包括自然核酸序列和其同源物,其包括但不限于自然等位基因变体和修饰核酸序列,其中已以这样的方式插入、缺失、替代、和/或转化核苷酸,使得上述修饰并不显著干扰核酸分子的功能。

[0182] 可以利用本领域技术人员已知的许多方法来产生核酸分子同源物。例如,可以利用各种技术来修饰核酸分子,上述技术包括但不限于经典诱变技术和重组DNA技术,如定位诱变、核酸分子的化学处理以诱发突变、核酸片段的限制性内切酶酶切、核酸片段的连接、核酸序列的所选区的聚合酶链反应(PCR)扩增和/或诱变、寡核苷酸混合物的合成和混合基团的连接以“建造”核酸分子的混合物以及它们的组合。

#### [0183] 聚乙二醇

[0184] 本发明部分地基于意外的发现:用聚乙二醇(PEG)温育包含多核苷酸的水溶液会增强在基于脂质的基质内多核苷酸的捕捉并在适当条件下会影响多核苷酸自基质的释放速率。如在本领域中常用的,聚乙二醇通常是指线性形式的聚乙二醇,因为这些聚乙二醇是最常见的、市售PEG。线性PEG可以由化学式 $\text{OH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{OH}$ (二醇)或 $\text{mPEG}$ 、 $\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{OH}$ 表示,其中 $n$ 是重复环氧乙烷基团的平均数。这些PEG化合物可商业上获得,例如,Sigma-Aldrich,并具有1000至300,000的各种分子量。可作为单功能或双功能形式来获得线性PEG。PEG'可以包含在链任何一端的功能性反应基团并且可以是同双官能的(两个相同的反应基)或异双官能的(两个不同的反应基)。例如,化学式 $\text{NH}_2-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{COOH}$ 的异双官能PEG可商业上获得并且可用于形成PEG衍生物。存在许多等级的PEG化合物,其由它们的平均分子量来表示。药品级PEG通常具有可达5,000的分子量范围。根

据某些典型的实施方式,根据本发明的教导使用的 PEG 具有可达 1,000 的分子量,通常约 2,000-5000。

#### [0185] 另外的成分

[0186] 本发明的基质组合物可选地进一步包含游离脂肪酸。在某些实施方式中,游离脂肪酸是  $\omega$ -6 脂肪酸。在其它实施方式中,游离脂肪酸是  $\omega$ -9 脂肪酸。在另一种实施方式中,游离脂肪酸选自由  $\omega$ -6 和  $\omega$ -9 脂肪酸组成的组。在进一步的实施方式中,游离脂肪酸具有 14 或更多碳原子。在另一种实施方式中,游离脂肪酸具有 16 或更多碳原子。在另一种实施方式中,游离脂肪酸具有 16 个碳原子。在另一种实施方式中,游离脂肪酸具有 18 个碳原子。在另一种实施方式中,游离脂肪酸具有 16-22 个碳原子。在另一种实施方式中,游离脂肪酸具有 16-20 个碳原子。在另一种实施方式中,游离脂肪酸具有 16-18 个碳原子。在另一种实施方式中,游离脂肪酸具有 18-22 个碳原子。在另一种实施方式中,游离脂肪酸具有 18-20 个碳原子。在另一种实施方式中,游离脂肪酸是亚油酸。在另一种实施方式中,游离脂肪酸是亚麻酸。在另一种实施方式中,游离脂肪酸是油酸。在另一种实施方式中,游离脂肪酸选自由亚油酸、亚麻酸、和油酸组成的组。在另一种实施方式中,游离脂肪酸是本领域已知的另一种适当的游离脂肪酸。在另一种实施方式中,游离脂肪酸将柔韧性加入基质组合物。在另一种实施方式中,游离脂肪酸会放慢释放速率,包括体内释放速率。在另一种实施方式中,游离脂肪酸可以改善尤其是体内控释的一致性。在另一种实施方式中,游离脂肪酸是饱和的。在另一种实施方式中,具有至少 14 个碳原子的饱和脂肪酸的掺入会增加所获得的基质组合物的凝胶-流体转变温度。

[0187] 在另一种实施方式中,将游离脂肪酸加入到基质组合物中。

[0188] 在另一种实施方式中,游离脂肪酸被氧化。在另一种实施方式中,脂质酰基链的氧化会降低凝胶-流体转变温度。

[0189] 每种类型的脂肪酸表示本发明的单独的实施方式。

[0190] 根据某些实施方式,本发明的基质组合物进一步包括生育酚。在另一种实施方式中,生育酚是 E307( $\alpha$ -生育酚)。在另一种实施方式中,生育酚是  $\beta$ -生育酚。在另一种实施方式中,生育酚是 E308( $\gamma$ -生育酚)。在另一种实施方式中,生育酚是 E309( $\delta$ -生育酚)。在另一种实施方式中,生育酚选自由  $\alpha$ -生育酚、 $\beta$ -生育酚、 $\gamma$ -生育酚、和  $\delta$ -生育酚组成的组。在另一种实施方式中,将生育酚加入到基质组合物中。每种可能性表示本发明的单独的实施方式。

[0191] 本发明的基质组合物可选地进一步包含生理上可接受的缓冲盐,其是本领域中众所周知的。生理上可接受的缓冲盐的非限制性实例是磷酸盐缓冲液。磷酸盐缓冲液的典型实例是 40 份 NaCl、1 份 KCl、7 份  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  和 1 份  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 。在另一种实施方式中,缓冲盐是本领域已知的任何其它生理上可接受的缓冲盐。每种可能性表示本发明的单独的实施方式。

#### [0192] 基质组合物的释放速率和一般特性

[0193] 在适宜条件下,相对于本发明的基质组合物,90% 活性组分的释放时间优选为 4 天至 6 个月。在另一种实施方式中,释放时间为 1 周至 6 个月。在另一种实施方式中,释放时间为 1 周至 5 个月。在另一种实施方式中,释放时间为 1 周至 5 个月。在另一种实施方式中,释放时间为 1 周至 4 个月。在另一种实施方式中,释放时间为 1 周至 3 个月。在另一种

实施方式中,释放时间为1周至2个月。在另一种实施方式中,释放时间为2周至6个月。在另一种实施方式中,释放时间为2周至5个月。在另一种实施方式中,释放时间为2周至4个月。在另一种实施方式中,释放时间为2周至3个月。在另一种实施方式中,释放时间为3周至6个月。在另一种实施方式中,释放时间为3周至5个月。在另一种实施方式中,释放时间为3周至4个月。在另一种实施方式中,释放时间为3周至3个月。每种可能性表示本发明的单独的实施方式。

[0194] 可以计划使用本发明的组合物的缓释期,其中考虑到4个主要因素:(i)聚合物和脂质含量之间的重量比,尤其是具有至少14个碳原子的脂肪酸部分的磷脂;(ii)所使用的生物聚合物和脂质的生化和/或生物物理特性;(iii)在给定组合中所使用的不同脂质之间的比率;以及(iv)用聚乙二醇温育核酸药剂的时间。

[0195] 如下文举例说明的,当基质缺乏脂质部分时,大部分加载的多核苷酸在第一小时内被释放,这表明,脂质质量是多核苷酸的逐渐释放所必不可少的。为了实现脂质饱和度,可以通过许多方法来确定总脂质与聚合物的比率,如本文描述的。根据某些实施方式,本发明的组合物的脂质:聚合物重量比为1:1至9:1。在另一种实施方式中,比率为1.5:1以上至9:1以下。在另一种实施方式中,比率为2:1以上至9:1以下。在另一种实施方式中,比率为3:1以上至9:1以下。在另一种实施方式中,比率为4:1以上至9:1以下。在另一种实施方式中,比率为5:1以上至9:1以下。在另一种实施方式中,比率为6:1以上至9:1以下。在另一种实施方式中,比率为7:1以上至9:1以下。在另一种实施方式中,比率为8:1以上至9:1以下。在另一种实施方式中,比率为1.5:1以上至5:1以下。每种可能性表示本发明的单独的实施方式。

[0196] 在另一种实施方式中,为了说明的目的,在聚合物主要为40KDa PLGA(聚(乳酸-共-乙醇酸),1:1比率)的情况下,总脂质与40KDa PLGA的摩尔比率通常为20以上至100以下。在另一种实施方式中,总脂质与40KDa PLGA的摩尔比率为20以上至200以下。在另一种实施方式中,摩尔比率为10以上至100以下。在另一种实施方式中,摩尔比率为10以上至200以下。在另一种实施方式中,摩尔比率为10以上至50以下。在另一种实施方式中,摩尔比率为20以上至50以下。每种可能性表示本发明的单独的实施方式。

#### [0197] 植入物和其它药物组合物

[0198] 在除去有机溶剂和水以后,可以将本发明的基质组合物模塑成植入物的形式。通常通过在室温至90°C的特定温度下的蒸发,接着真空,来除去溶剂。

[0199] 在另一种实施方式中,植入物是均匀的。在另一种实施方式中,通过以下方法来制造植入物,所述方法包括冷冻干燥在模具中的材料的步骤。每种可能性表示本发明的单独的实施方式。

[0200] 根据另外的实施方式,本发明提供了包含基质组合物的植入物,其中上述基质组合物包含本发明的基于核酸的药剂。

[0201] 本发明进一步提供了从本发明的组合物来产生植入物的方法,该方法包括以下步骤:(a)根据本发明的方法来产生散装材料形式的基质组合物;(b)将散装材料转移到期望形状的模具或固体容器中;(c)冷冻散装材料;以及(d)冷冻干燥该散装材料。

[0202] 在另外的实施方式中,本发明提供了一种药物组合物,该药物组合物包含本发明的基质组合物。根据某些实施方式,药物组合物进一步包含另外的药用赋形剂。在另外的

实施方式中,药物组合物具有胃肠道外可注射形式。在其它实施方式中,药物组合物具有可输注形式。在另外的实施方式中,赋形剂是注射相容的。在进一步的实施方式中,赋形剂是输注相容的。每种可能性表示本发明的单独的实施方式。

[0203] 本发明的基质组合物用于生产 100nm 至 50 $\mu$ m 的微泡也包括在本发明的范围内。

[0204] 根据某些实施方式,在除去有机溶剂和水以后,本发明的基质组合物具有微球体的形式。在其它实施方式中,微球体是均匀的。根据某些实施方式,通过包括喷雾干燥的步骤的方法来制造微球体。每种可能性表示本发明的单独的实施方式。

[0205] 在另一种实施方式中,本发明提供了由本发明的基质组合物制备的微球体。在另一种实施方式中,本发明提供了一种药物组合物,该药物组合物包含本发明的微球体和药用赋形剂。每种可能性表示本发明的单独的实施方式。

[0206] 在另一种实施方式中,本发明的微球体的颗粒尺寸大约为 500-2000nm。在另一种实施方式中,颗粒尺寸为约 400-2500nm。在另一种实施方式中,颗粒尺寸为约 600-1900nm。在另一种实施方式中,颗粒尺寸为约 700-1800nm。在另一种实施方式中,颗粒尺寸为约 500-1800nm。在另一种实施方式中,颗粒尺寸为约 500-1600nm。在另一种实施方式中,颗粒尺寸为约 600-2000nm。在另一种实施方式中,颗粒尺寸为约 700-2000nm。在另一种实施方式中,颗粒具有适用于药物给予的任何其它尺寸。每种可能性表示本发明的单独的实施方式。

[0207] 制备本发明的基质组合物的方法

[0208] 本发明进一步提供了用来产生用于缓释核酸药剂的基质组合物的方法,该方法包括:

[0209] (a) 在第一挥发性有机溶剂中混合 (i) 可生物降解聚合物和 (ii) 第一脂质成分,其包含至少一种具有极性基团的脂质;

[0210] (b) 将聚乙二醇混合到核酸药剂的水基溶液中;

[0211] (c) 混合在步骤 (b) 中获得的溶液与第二挥发性有机溶剂和第二脂质成分,其包含至少一种具有至少 14 个碳原子的脂肪酸部分的磷脂;

[0212] (d) 混合在步骤 (a) 和 (c) 中获得的溶液以形成均匀混合物;以及

[0213] (e) 除去挥发性溶剂和水。

[0214] 从而产生包含核酸药剂的均匀多聚体-磷脂基质。

[0215] 根据某些典型的实施方式,上述方法包括以下步骤:(a) 在第一挥发性有机溶剂中混合 (i) 可生物降解聚酯和 (ii) 甾醇;(b) 在不同的包含在含有聚乙二醇的水基溶液中的基于核酸的药物的容器中 (1) 在第二水混溶性挥发性有机溶剂中的磷脂酰胆碱和 / 或 (2) 在水混溶性挥发性有机溶剂中的磷脂酰乙醇胺和 (3) 在给定温度下混合所获得的溶液 (4) 可选地通过离心或通过冷冻干燥来沉淀所获得的物质并可选地在所选挥发性溶剂中重新悬浮沉淀物;以及 (c) 混合和均化获自步骤 (a) 和 (b) 的产物。

[0216] 根据某些实施方式,可生物降解聚合物选自 PLGA、PGA、PLA 或它们的组合组成的组。在其它实施方式中,可生物降解聚酯是本领域已知的任何其它适宜的可生物降解聚酯。根据另外的实施方式,可生物降解聚合物是聚胺。在第一有机溶剂中,通常在室温下混合聚合物和至少一种具有极性基团的脂质(非限制性实例是甾醇,尤其是胆固醇)。可选地,将  $\alpha$ -和 / 或  $\gamma$ -生育酚加入溶液。从而形成脂质-聚合物基质。

[0217] 通常在搅拌下,混合包含至少一种基于核酸的药剂和聚乙二醇的水基溶液与第二挥发性有机溶剂(选自但不限于由N-甲基吡咯烷酮、乙醇、甲醇、乙酸乙酯或它们的组合组成的组),其包含至少一种磷脂。根据某些实施方式,磷脂是磷酸胆碱或磷脂酰胆碱或它们的衍生物。根据其它实施方式,磷脂是磷脂酰胆碱或其衍生物。根据另外的实施方式,第二挥发性有机溶剂包含磷脂酰胆碱、磷脂酰胆碱或它们的衍生物的组合。根据某些实施方式,基于基质中的所有脂质,磷酸胆碱或磷脂酰胆碱或它们的衍生物的存在量为10-90质量%,即10-90质量%的磷脂、甾醇、神经酰胺、脂肪酸等。根据其它实施方式,基于基质中的所有脂质,磷脂酰乙醇胺的存在量为10-90质量%。

[0218] 根据另一些实施方式,在加入包含核酸和PEG的水基溶液以前,在有机溶剂中,以与磷脂酰乙醇胺的不同比率,混合磷酸胆碱或磷脂酰胆碱衍生物或它们的组合。

[0219] 在另一种实施方式中,在第一脂质成分中还包括磷脂酰乙醇胺。

[0220] 在另一种实施方式中,在混合与包含水混溶性有机溶剂的混合物以前,均化含有有机溶剂的混合物(a)。在另一种实施方式中,在混合与含有另一种类型的有机溶剂的混合物以前,均化含有水混溶性有机溶剂的混合物(c)。在另一种实施方式中,在步骤(a)的混合物中的聚合物是脂质饱和的。在另一种实施方式中,基质组合物是脂质饱和的。通常,将聚合物和磷脂酰胆碱加入到基质组合物中。在另一种实施方式中,还将活性剂加入到基质组合物中。在另一种实施方式中,基质组合物具有脂质饱和基质的形式,其形状和边界由可生物降解聚合物确定。每种可能性表示本发明的单独的实施方式。

[0221] 在另一种实施方式中,磷脂酰乙醇胺具有饱和脂肪酸部分。在另一种实施方式中,脂肪酸部分具有至少14个碳原子。在另一种实施方式中,脂肪酸部分具有14-18个碳原子。每种可能性表示本发明的单独的实施方式。

[0222] 在另一种实施方式中,磷脂酰胆碱具有饱和脂肪酸部分。在另一种实施方式中,脂肪酸部分具有至少14个碳原子。在另一种实施方式中,脂肪酸部分具有至少16个碳原子。在另一种实施方式中,脂肪酸部分具有14-18个碳原子。在另一种实施方式中,脂肪酸部分具有16-18个碳原子。每种可能性表示本发明的单独的实施方式。

[0223] 在另一种实施方式中,在非极性有机溶剂中总脂质与聚合物的摩尔比率是这样的,使得在该混合物中的聚合物是脂质饱和的。在另一种实施方式中,为了说明的目的,在聚合物主要为50KDa PLGA(聚(乳酸-共-乙醇酸),1:1比率)的情况下,总脂质与50KDa PLGA的摩尔比率通常为10以上至50以下。在另一种实施方式中,总脂质与50KDa PLGA的摩尔比率为10以上至100以下。在另一种实施方式中,摩尔比率为20以上至200以下。在另一种实施方式中,摩尔比率为20以上至300以下。在另一种实施方式中,摩尔比率为30以上至400以下。每种可能性表示本发明的单独的实施方式。

[0224] 以与本发明的基质组合物的相应成分相同的方式来定义本发明的上述方法和其它方法的每种成分。

[0225] 在另一种实施方式中,生产方法的步骤(a)进一步包括添加挥发性有机溶剂,通常非极性溶剂,磷脂酰乙醇胺。在另一种实施方式中,磷脂酰乙醇胺是在步骤(c)中包括的相同磷脂酰乙醇胺。在另一种实施方式中,磷脂酰乙醇胺是不同的磷脂酰乙醇胺,其可以是本领域已知的任何其它磷脂酰乙醇胺。在另一种实施方式中,磷脂酰乙醇胺选自由步骤(c)的磷脂酰乙醇胺和不同的磷脂酰乙醇胺组成的组。每种可能性表示本发明的单独的实施方式。

式。

[0226] 在另一种实施方式中,生产方法的步骤(c)进一步包括添加挥发性有机溶剂,通常水混溶性溶剂,磷脂,其选自磷脂酰丝氨酸、磷脂酰甘油、鞘磷脂、和磷脂酰肌醇组成的组。

[0227] 在另一种实施方式中,生产方法的步骤(c)进一步包括添加水混溶性挥发性有机溶剂,鞘脂。在另一种实施方式中,鞘脂是神经酰胺。在另一种实施方式中,鞘脂是鞘磷脂。在另一种实施方式中,鞘脂是本领域已知的任何其它鞘脂。每种可能性表示本发明的单独的实施方式。

[0228] 在另一种实施方式中,生产方法的步骤(c)进一步包括添加水混溶性、挥发性有机溶剂, $\omega$ -6 或  $\omega$ -9 游离脂肪酸。在另一种实施方式中,游离脂肪酸具有 16 或更多个碳原子。每种可能性表示本发明的单独的实施方式。

[0229] 在混合以后,形成均匀混合物,这是因为在步骤(a)的混合物中聚合物是脂质饱和的。在另一种实施方式中,均匀混合物采用均匀液体的形式。在另一种实施方式中,在冷冻干燥或喷雾干燥混合物以后,形成小泡。每种可能性表示本发明的单独的实施方式。

[0230] 在另一种实施方式中,生产方法进一步包括以下步骤:除去在步骤(d)的产物中存在的溶剂和水。在某些实施方式中,利用混合物的雾化来除去溶剂和水。在其它实施方式中,将混合物雾化成干燥的热空气。通常,变成热空气的雾化会立即蒸发所有水,从而排除对随后的干燥步骤的需要。在另一种实施方式中,将混合物雾化成无水溶剂。在另一种实施方式中,通过喷雾干燥来进行液体去除。在另一种实施方式中,通过冷冻干燥来进行液体去除。在另一种实施方式中,利用液氮来进行液体去除。在另一种实施方式中,利用已经与乙醇预混合的液氮来进行液体去除。在另一种实施方式中,利用本领域已知的另一种适宜的技术来进行液体去除。每种可能性表示本发明的单独的实施方式。

[0231] 在另一种实施方式中,本发明的方法进一步包括真空干燥组合物的步骤。在另一种实施方式中,在蒸发步骤以后,进行真空干燥的步骤。每种可能性表示本发明的单独的实施方式。

[0232] 在另一种实施方式中,本发明的方法进一步包括通过加热步骤(d)的产物来蒸发有机挥发性溶剂的步骤。在室温至 90°C 的典型温度下,持续加热,直到消除溶剂。在另一种实施方式中,在蒸发步骤以后,进行真空干燥的步骤。每种可能性表示本发明的单独的实施方式。

#### [0233] 脂质饱和以及其测定技术

[0234] 如在本文中所使用的,“脂质饱和的”是指磷脂连同在基质中存在的核酸药剂和可选的靶向部分、以及可以存在的任何其它脂质对基质组合物的聚合物的饱和。如本文描述的,在一些实施方式中,本发明的基质组合物包含不同于磷脂酰胆碱的磷脂。在其它实施方式中,基质组合物可以包含不同于磷脂的脂质。由存在的无论什么脂质来饱和基质组合物。“饱和”是指一种状态,其中基质包含大量的可以加入到基质中的所用类型的脂质。用于确定为获得脂质饱和的聚合物:脂质比率的方法和用于确定基质的脂质饱和的方法对于本领域技术人员来说是已知的。每种可能性表示本发明的单独的实施方式。

[0235] 根据某些典型的实施方式,相对于迄今已知的用于核酸递送的基于脂质的基质,本发明的最终基质组合物基本上没有水。换句话说,即使最初将活性组分溶解于水溶液中,

但在制备脂质聚合物组合物的过程中也除去所有溶剂。在最终组合中基本上没有水可以保护生物活性核酸以免受降解或化学修饰,尤其是免受酶降解。在将组合物应用于含水生物环境以后,基质组合物的外表面接触生物液体,而基本上无水的内部部分则保护剩余的活性组分,从而使得能够缓释未损坏的活性组分。

[0236] 根据某些实施方式,术语“基本上没有水”是指包含按重量计小于 1% 水的组合物。在另一种实施方式中,该术语是指包含按重量计小于 0.8% 水的组合物。在另一种实施方式中,该术语是指包含按重量计小于 0.6% 水的组合物。在另一种实施方式中,该术语是指包含按重量计小于 0.4% 水的组合物。在另一种实施方式中,该术语是指包含按重量计小于 0.2% 水的组合物。在另一种实施方式中,该术语是指不存在影响基质的防水性能的量的水。

[0237] 在另一种实施方式中,基质组合物基本上没有水。“基本上没有”是指包含按重量计小于 0.1% 水的组合物。在另一种实施方式中,该术语是指包含按重量计小于 0.08% 水的组合物。在另一种实施方式中,该术语是指包含按重量计小于 0.06% 水的组合物。在另一种实施方式中,该术语是指包含按重量计小于 0.04% 水的组合物。在另一种实施方式中,该术语是指包含按重量计小于 0.02% 水的组合物。在另一种实施方式中,该术语是指包含按重量计小于 0.01% 水的组合物。每种可能性表示本发明的单独的实施方式。

[0238] 在另一种实施方式中,基质组合物没有水。在另一种实施方式中,该术语是指不包含可检出量的水的组合物。每种可能性表示本发明的单独的实施方式。

[0239] 用于制备本发明的基质的方法仅包括一个其中使用水溶液的步骤。将该溶液与有机挥发性溶剂混合,并在其后除去所有液体。因而本发明的方法能够实现脂质饱和度。脂质饱和度赋予基质组合物抵抗体内大量降解的能力,因而,基质组合物呈现在数周或数月的尺度上介导延长释放的能力。

[0240] 在另一种实施方式中,基质组合物是干燥的。在另一种实施方式中,“干燥的”是指不存在可检出量的水或有机溶剂。

[0241] 在另一种实施方式中,已最小化基质组合物的水渗透性。“最小化”水渗透性是指主要在有机溶剂(如本文描述的)中并在有一定量脂质(已确定其可以最小化添加水的渗透的渗透性)存在的条件下来产生基质组合物的过程。可以通过用包含氘标记水的溶液水合小泡来确定所需要的脂质的量(如本文描述的)。

[0242] 在另一种实施方式中,“脂质饱和”是指在如由聚合物主链的外部边界所限定的脂质基质内的内部间隙(自由体积)的填充。用磷脂连同任何其它类型的脂质、核酸药剂和可选的靶向部分(存在于基质中)来填充间隙,到这样的程度以致不再能在明显的程度上将另外的脂质部分加入到基质中。

[0243] “零级释放速率”或“零级释放动力学”是指核酸药剂自聚合物基质的不变、线性、连续的缓释和控释速率,即,释放的核酸药剂的量与时间的关系曲线是线性的。

#### [0244] 核酸药剂的治疗性应用

[0245] 本发明还涉及各种应用,其中期望在整个真核生物体(例如,哺乳动物或植物)中或在其一部分(例如,组织、器官、细胞等)中,调节,例如,一种或多种靶基因、致病病毒的病毒复制等。在这样的方法中,将有效量的核酸活性剂给予宿主或引入到靶细胞中。术语“有效量”是指足以调节靶病毒基因的表达的剂量,根据需要,例如,从而实现病毒复制的期望的抑制。如上所述,在这种类型的应用的某些实施方式中,主题方法用来在宿主中降低一种

或多种靶基因的表达,以实现期望的治疗结果。

[0246] 当靶基因是病毒基因时,例如,当期望抑制病毒复制时,靶病毒基因可以来自许多不同的病毒。代表性的病毒包括但不限于:HBV、HCV、HIV、甲型流感病毒、甲型肝炎病毒、微小 RNA 病毒、 $\alpha$ -病毒、疱疹病毒等。

[0247] 本文描述的方法还适用于抑制靶基因在肿瘤细胞中的表达。本发明涉及任何类型的癌症,包括实体肿瘤和非实体肿瘤。实体肿瘤包括但不限于 CNS 肿瘤、肝癌、结肠直肠癌、乳癌、胃癌、胰腺癌、膀胱癌、宫颈癌、头颈部肿瘤、外阴癌和皮肤肿瘤,其包括黑色素瘤、鳞状细胞癌和基底细胞癌。非实体肿瘤包括淋巴细胞增生性障碍,其包括白血病和淋巴瘤。每种可能性表示本发明的单独的实施方式。

[0248] 主题方法的另一种应用是阐明基因功能,其中通过功能分析真核细胞、或真核非人生物体,优选哺乳动物细胞或生物体,并且最优选人细胞,例如,细胞系如 HeLa 或 293,或啮齿动物,例如大鼠和小鼠。通过用同源于编码适宜 RNA 分子的预定靶基因的载体分子进行转染,可以在靶细胞中获得特定的敲除表型,例如在细胞培养物中或在靶生物体中。

[0249] 本发明还可以用来产生具有改善特性的植物,上述改善特性包括但不限于对生物压力和非生物压力、昆虫感染、病原体感染的降低的易感性,和包括成熟特性的改善的农业特征。在农业界可以确定的任何一种或多种基因可以是上述专门选择的核酸的潜在的一种或多种靶。

[0250] 实施例

[0251] 实施例 1:用来生产用于递送基于核酸的药剂的药物载体组合物的平台技术

[0252] I. 第一溶液的制备

[0253] 在挥发性有机溶剂(例如乙酸乙酯并具有/没有氯仿)中混合聚合物(例如,PLGA、PGA、PLA、或它们的组合)和甾醇(例如胆固醇)和/或 $\alpha$ -或 $\gamma$ -生育酚。在室温下进行整个过程。从而获得脂质-聚合物基质。

[0254] II. 第二溶液的制备

[0255] 将至少一种基于核酸的药剂溶解于水,并添加聚乙二醇(PEG)1,000-8000,通常 PEG 5,000。通常在搅拌下,将获得的溶液与挥发性有机溶剂(通常为 N-甲基吡咯烷酮、乙醇、甲醇、乙酸乙酯或它们的组合)混合,所述挥发性有机溶剂包含:

[0256] 磷酸胆碱或磷脂酰胆碱衍生物,例如氘化 1,2-二硬脂酰-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DSPC)或二油酰-磷脂酰胆碱(DOPC)、二棕榈酰-磷脂酰胆碱(DPPC)、二肉豆蔻酰-磷脂酰胆碱(DMPC)、二油酰-磷脂酰胆碱(DOPC)、1-棕榈酰-2-油酰-磷脂酰胆碱,基于基质中的所有脂质,其存在量为 10-90 质量%,即 10-90 质量%的磷脂、甾醇、神经酰胺、脂肪酸等;

[0257] 可选地,基于在基质中的所有脂质,磷脂酰乙醇胺,例如,二甲基二肉豆蔻酰磷脂酰乙醇胺(DMPE)或二棕榈酰-磷脂酰乙醇胺(DPPE),的存在量为 10-90 质量%;

[0258] 可选地,在添加 NA 药物水基溶液以前,在有机溶剂中混合磷酸胆碱或磷脂酰胆碱衍生物或它们的组合(在不同比率的磷脂酰乙醇胺下);

[0259] 可选地,基于在基质中的所有脂质,阳离子脂质的用量为 0.1-10mol%;

[0260] 可选地,基于在基质中的所有脂质,0.1-15 质量%的游离脂肪酸,例如亚油酸(LN)、或油酸(OA),的用量为 0.1-10 质量%;



[0261] 对混合物进行均化、声处理或用于涂布医疗装置的表面。通常在室温下进行整个过程,但通常当使用高度饱和的脂质时,可以使用可达约 90° C 的较高温度。

#### [0262] III. 混合聚合物与核酸-PEG 混合物

[0263] 在搅拌下将第二悬浮液(或溶液)加入到第一溶液中。持续搅拌长达约 5h。在室温和可达 90° C 下进行整个过程,其均根据具体配方、所使用的脂质的特性和特定核酸药剂。所获得的混合物应是均匀的,但也可以是轻微浑浊的。

#### [0264] IV. 溶剂的去除

[0265] 当进行表面的涂布时,将来自阶段 III 的悬浮液与待涂布的颗粒或装置混合,接着蒸发挥发性有机溶剂。在约 30-90° C 的温度下进行整个涂布过程。

[0266] 可以可选地将来自阶段 III 的溶液雾化成干燥的热空气。

[0267] 可替换地,将来自阶段 III 的溶液雾化成水基溶液,其可以包含碳水化合物,或雾化成由液氮覆盖的乙醇或没有乙醇的单独液氮,其后蒸发氮和 / 或乙醇(如上述)。

#### [0268] V. 真空干燥

[0269] 真空干燥基质组合物、涂布颗粒和涂布装置。除去所有有机溶剂和水残留物。包含核酸药剂的基于脂质的基质准备好储存。

#### [0270] 实施例 2:在没有 PEG 的情况下,包含核酸的基质的制备

##### [0271] 基质制备

##### [0272] 储备溶液:

[0273] 储备溶液 1(SS1):PLGA 75/25,300mg/ml,在乙酸乙酯(EA)中。

[0274] 储备溶液 2(SS2):胆固醇(CH),30mg/ml,在 EA 中。

[0275] 储备溶液 3(SS3):DPPC,300mg/ml,在甲醇:EA(3:1v/v)中。

[0276] 单链 DNA 寡核苷酸(ssDNA)(23 聚体,具有序列 CCATCAACGACCCCTTCATGGAC(SEQ ID NO:1)),在 5' 端用 FAM(荧光标记探针)标记,0.5mM,在 DDW 中。

[0277] 通过混合 0.2 体积的 SS1 和 1 体积的 SS2(PLGA 50mg/ml, CH 25mg/ml) 来获得溶液 A。

[0278] 溶液 B 借助于漩涡通过以 1:1 体积与体积比混合 SS3 和 SS4 来获得。

[0279] 溶液 AB 借助于漩涡通过混合 1 体积的溶液 B 和 1.5 体积的溶液 A 并在 45° C 下温育混合物 5 分钟来获得。

[0280] 向 1 体积的 AB 溶液中添加 1 体积的 MetOH:DDW(v/v),接着漩涡并在 45° C 下温育 10 分钟(溶液变得均匀的和乳白色的)。

##### [0281] 涂布

[0282] 用 0.25ml 的基质溶液(溶液 AB)涂布 100mg 的商用人工骨替代物(磷酸三钙颗粒, TCP)。

[0283] 通过在 45° C 下温育 1h 直到看不见液体,接着真空过夜,来蒸发溶剂。

#### [0284] 实施例 3:从在没有 PEG 的条件下制备的基质组合物释放 ssDNA

[0285] 用水来水合用包含 FAM 标记 ssDNA 的基质(如在上文的实施例 2 中所描述的加以制备)涂布的 TCP 颗粒,然后在 37° C 下温育。在 1h 以后,收集水并用新鲜水替换。每日重复该程序,时间为 23 天。借助于定量荧光测定法,通过测量 FAM(5 羧基-荧光素)荧光来评估寡核苷酸到收集水样品中的释放。(激发波长-485nm,发射波长-520nm)。按照绘

制的标准曲线（荧光与寡核苷酸浓度，图 1）来测量释放的 ssDNA 的浓度。在 0.05–25 皮摩尔 /  $\mu$ l 的范围内获得线性标准曲线。相对于加载到基质中的寡核苷酸的估计量来归一化释放的寡核苷酸的百分比。

[0286] 图 2 表明，在 1 小时以后，约 20% 的加载 ssDNA 被释放到水中。因此，该图清楚地表明，在寡核苷酸溶液中 PEG 的缺乏会负面影响加载到脂肪基质中的 ssDNA 量。此后，在接着的两天中，释放类似量（约 10%）。从第 5 天直到第 16 天，观测到 ssDNA 的零级释放；每天释放平均 1–1.8% 的累积的 ssDNA。从第 16 天开始，ssDNA 的释放下降直到第 23 天，其时在样品中的 ssDNA 浓度是在检出限以下。

[0287] 还在光学显微镜 (X400) 下检查了样品。如图 3A 所示，在水合以后，存在典型类型的脂小泡释放到介质中。图 3B 示出来自相同小泡的绿色荧光发射，其表明这些小泡包含荧光探针。

#### [0288] 实施例 4：测试释放的寡核苷酸的功能

[0289] 将加载到基质中的 ssDNA（具有在 SEQ ID NO:1 中阐述的核酸序列）设计为正向引物以扩增小鼠管家基因 GapDH 的片段。还制备了互补于上述基因的反向引物，其包括核酸序列 GGATGACCTTGCCACAGCCTTG (SEQ ID NO:2)。在评估了释放的 ssDNA 的浓度以后，获取 100 皮摩尔的来自不同时间点的释放的寡核苷酸，用于 PCR 反应。源自小鼠脾脏的 cDNA 用作模板。释放自基质的寡核苷酸和反向引物用来扩增预计大小为约 500bp 的 GapDH 片段。利用 ReadyMix™ (Sigma) 成分进行 PCR 反应。

[0290] 图 4 示出 PCR 产物的琼脂糖凝胶。获得预计 500bp 片段，这证实了，在测试的所有时间点释放的 ssDNA 是活性的并且能够扩增正确的基因片段。

[0291] 通过基因扫描分析来评估在许多时间点释放的 ssDNA 的大小。测试了在 1、2、5、7、9、12、14、16 和 20 天以后释放的 ssDNA 的样品。在除在第 14 和 16 天获得的那些样品以外的所有样品中，检测到大小为 23bp 的完整的寡核苷酸（图 5）。峰强度的差异是起因于样品中 ssDNA 的浓度以及 DNA 自释放复合物的沉淀质量。首先观测到的峰可能起因于寡核苷酸（通过脱盐作用来洗涤它）的纯度。

#### [0292] 实施例 5：在存在 PEG 的条件下包含核酸的基质的制备

##### [0293] 基质制备

##### [0294] 储备溶液：

[0295] 储备溶液 1 (SS1)：PLGA 75/25, 300mg/ml, 在乙酸乙酯 (EA) 中。

[0296] 储备溶液 2 (SS2)：胆固醇 (CH), 30mg/ml, 在 EA 中。

[0297] 储备溶液 3a (SS3a)：单链 DNA 寡核苷酸 (23 聚体，具有在 SEQ ID NO:1 中阐述的核酸序列)，在 5' 引物处用 FAM 标记, 0.5mM, 在 DDW 中。

[0298] 储备溶液 3b (SS3b)：溶解于储备溶液 3a 中的聚乙二醇 8000 (PEG8000) (PEG 最终浓度为 250mg/ml)。

[0299] 储备溶液 3c (SS3c)：稀释 x10 到 MeOH:EA 溶液 (v/v) 中的储备溶液 3b；(ssDNA 0.05mM；PEG 25mg/ml)。

[0300] 溶液 A 通过混合 0.2 体积的 SS1 与 1 体积的 SS2 (PLGA 50mg/ml, CH 25mg/ml) 来获得。

[0301] 溶液 B 含有溶解于 SS3c 中的磷脂 (DPPC、DMPC、DSPC 或 DPPC/DPPE 9:1w/w)，其包

含 ssDNA 和 PEG。

[0302] 溶液 AB通过混合(通过漩涡)1 体积的溶液 B 与 1.5 体积的溶液 A 并在 45° C 下温育混合物 5 分钟来获得。

[0303] 涂布

[0304] 用 0.25ml 的基质溶液(溶液 AB)来涂布 100mg 的商用人工骨替代物(磷酸三钙颗粒, TCP)。通过在 45° C 下温育 1h 直到看不见液体,接着真空过夜,来蒸发溶剂。

[0305] 实施例 6 :ssDNA 从在有 PEG 存在的条件下制备的基质的释放

[0306] 用水来水合用包含 FAM 标记 ssDNA 的基质(如在以上实施例 5 中所描述的加以制备(包括用 PEG 温育 ssDNA))涂布的 TCP 颗粒,然后在 37° C 下温育。

[0307] 在 1 小时以后,收集水并用新鲜水替换。每日重复该程序,时间为 40 天。如在以上实施例 3 中所描述的,通过测量 FAM 荧光来评估寡核苷酸进入收集水样品中的释放。

[0308] 还检查了用 PEG 温育 ssDNA 的持续时间对 ssDNA 自涂布颗粒的释放的影响。

[0309] 在温育 1 小时(短期温育)以后和在温育 18 小时(长期温育)以后,将储备溶液 3b(PEG 8,000 溶解于 ssDNA 的水溶液)稀释到 MeOH/EA 中。

[0310] 图 6 示出随着时间的推移释放的 ssDNA 的累积量。从图清楚地表明(i)为了获得 ssDNA 自基质的逐渐的缓慢释放,聚合物和脂质成分的存在是必要的:在不存在脂质(在特定实施例中为 DPPC)的情况下大部分 ssDNA 会立即释放到水合水中;以及(ii)在存在 PEG 的条件下,寡核苷酸的较长温育时间导致在水合基质以后核酸的较长的释放期。

[0311] 实施例 7 :磷脂组成对 ssDNA 的释放速率的影响

[0312] 还检查了磷脂类型并且尤其是磷脂酰基链的长度对 ssDNA 自本发明的基质释放的速率的影响。图 7 示出,酰基链越长,则 ssDNA 释放的速率越低,其中 DMPC(14:0)>DPPC(16:0)>DSPC(18:0)。在 DMPC 的情况下,在最初 5 天内释放大部分的 ssDNA。相比之下,用 DPPC 制备的基质则以稳定速率(零级)释放 ssDNA,可达 30 天。在 DSPC 的情况下,释放速率显著低于其它两种磷脂。

[0313] 因而,可以通过磷脂组成来控制 ssDNA 从本发明的基质的释放速率。

[0314] 具体实施方式的以上描述将如此充分地揭示本发明的一般特性,使得通过运用现有的知识,本领域技术人员可以容易地对上述具体实施方式改进和/或适于各种应用而无需过度实验并且没有偏离一般概念,因而,这样的适应和改进应当并旨在理解为是在所披露的实施方式的等效方式的含义和范围内。应当理解,本文采用的用语或术语是说明性的而不是限制性的。在不偏离本发明的情况下,用于实施各种所披露功能的方式、材料和步骤可以采取各种替代形式。

[0001]

## 序列表

- <110> 波利皮得有限公司  
 <120> 缓释核酸基质组合物  
 <130> P57796WEBB  
 <140> PCT/IL2011/000054  
 <141> 2011-1-18  
 <150> US 61/296,040  
 <151> 2010-1-19  
 <160> 2  
 <170> PatentIn version 3.5  
 <210> 1  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成肽(引物)  
 <400> 1  
 ccatcaacga ccccttcatg gac 23  
 <210> 2  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成肽(引物)  
 <400> 2  
 ggatgacctt gccacagcc ttg 23

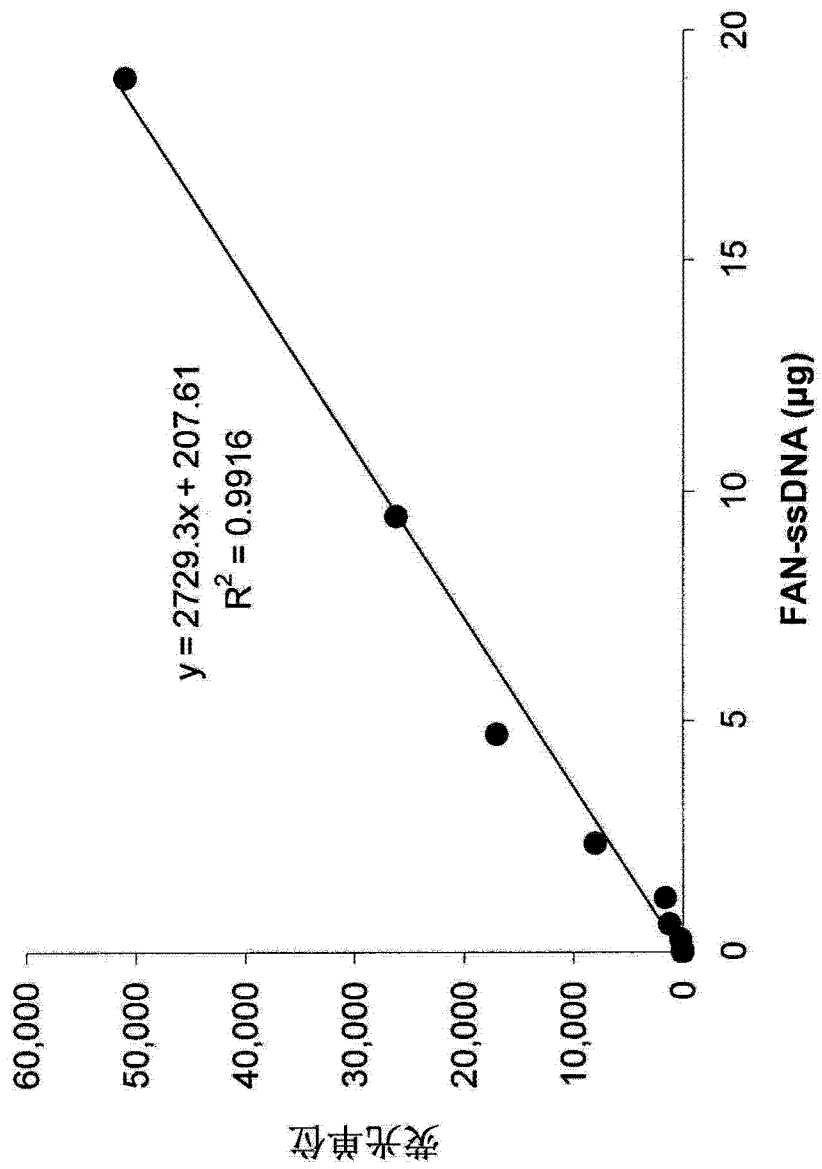


图 1

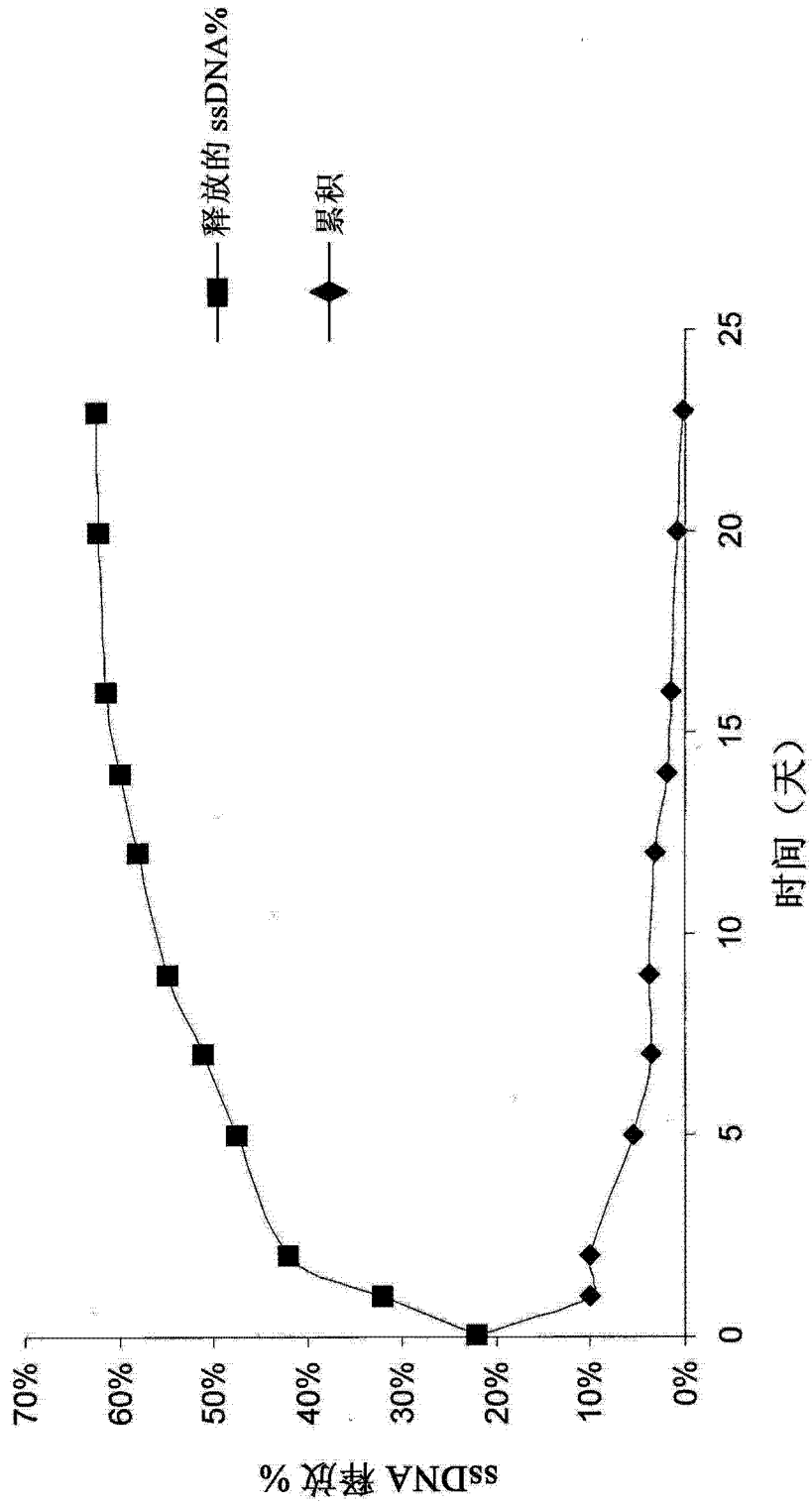


图 2

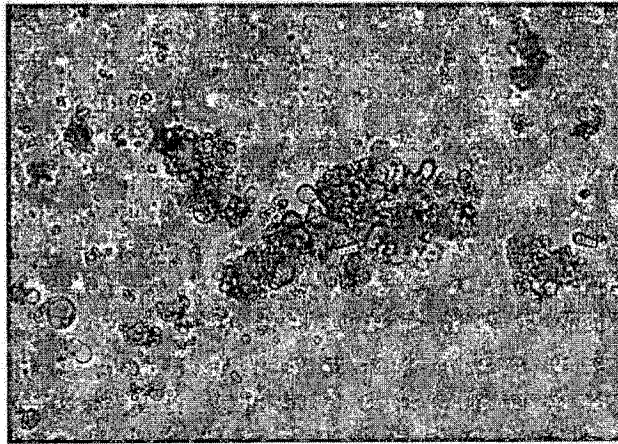


图 3A

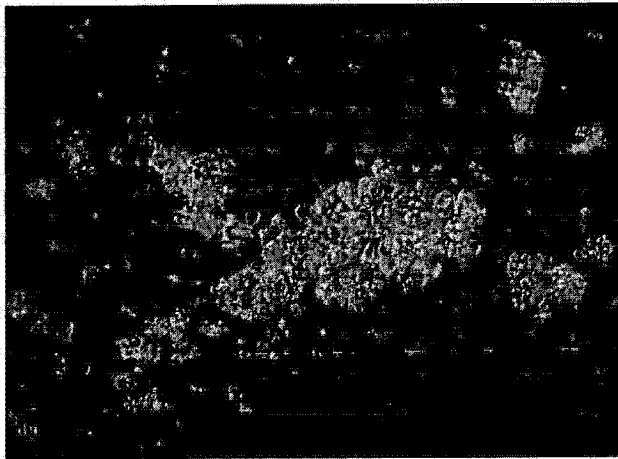


图 3B

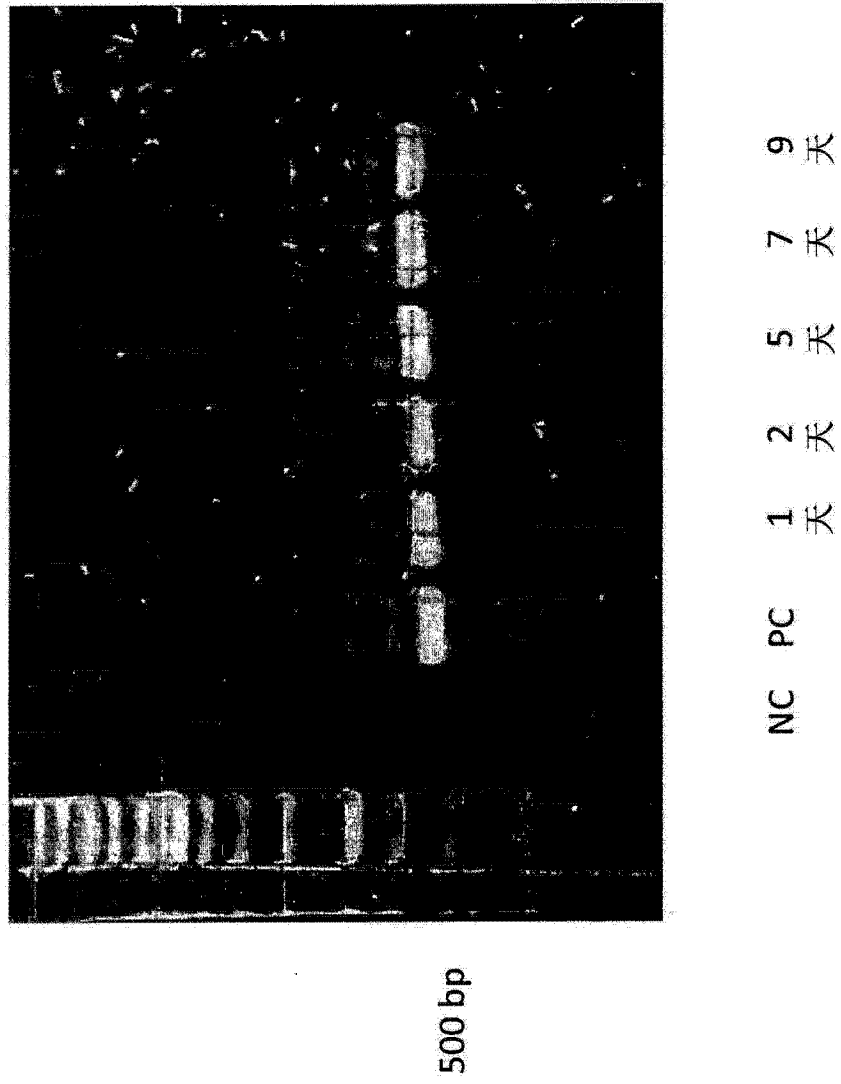
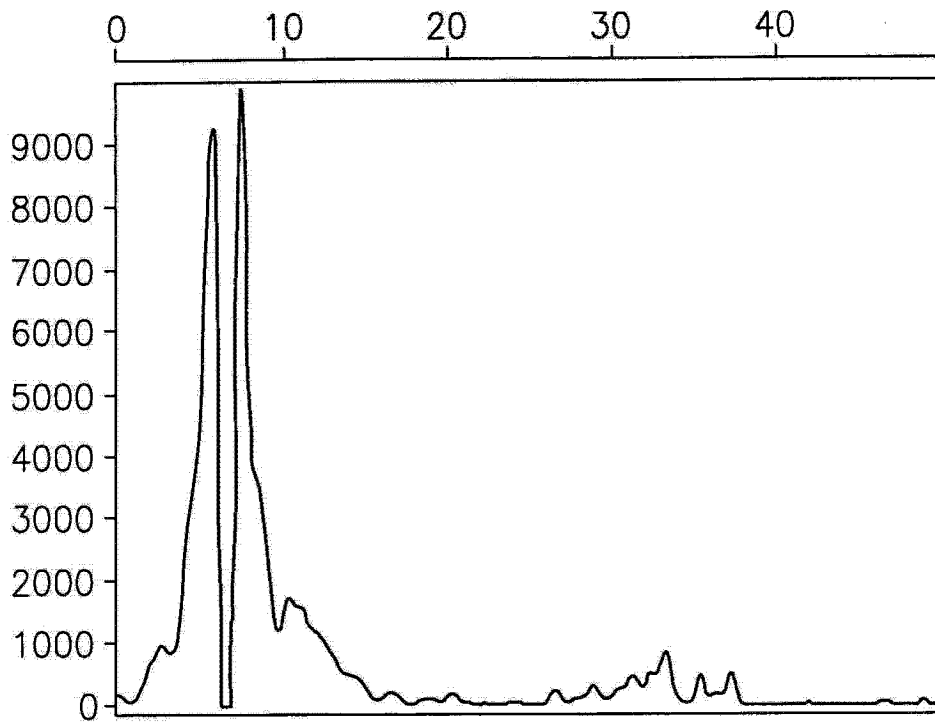
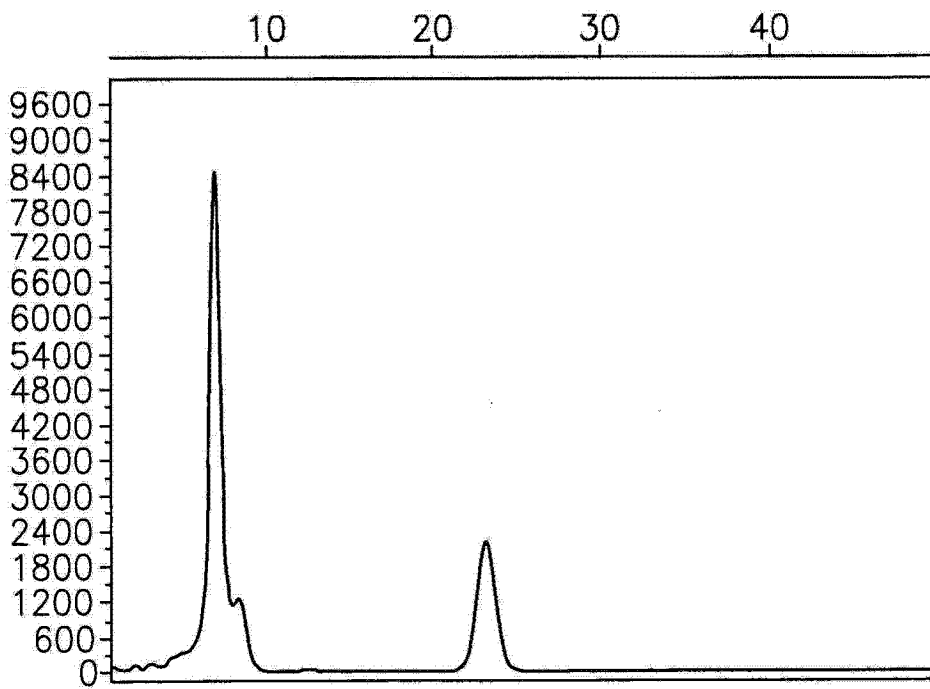


图 4





标准



第1天

图 5

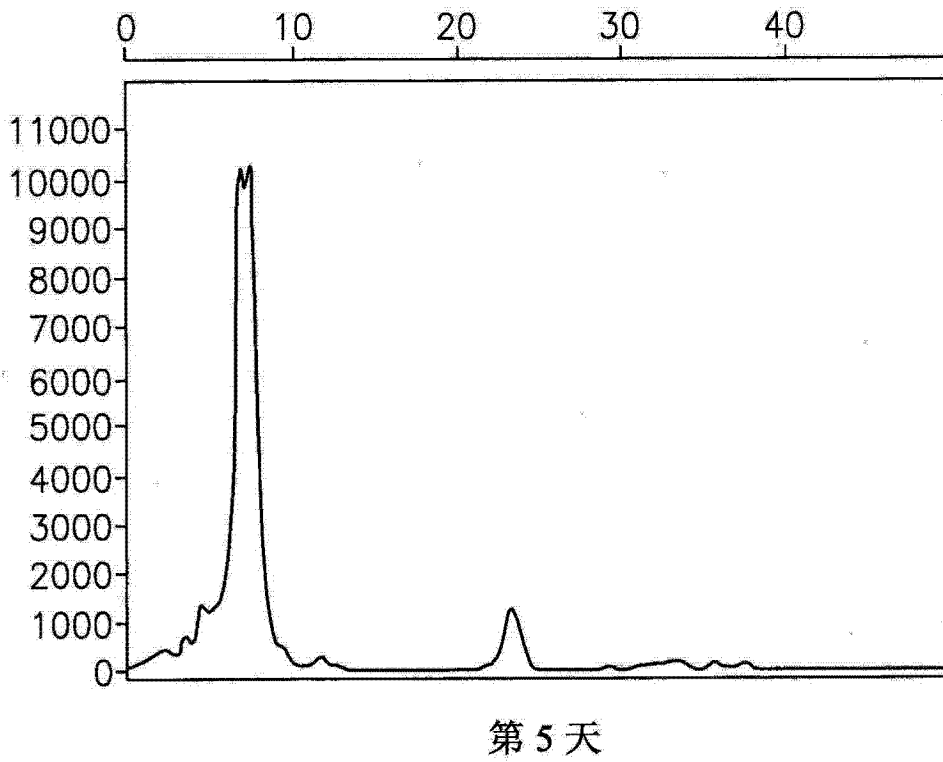
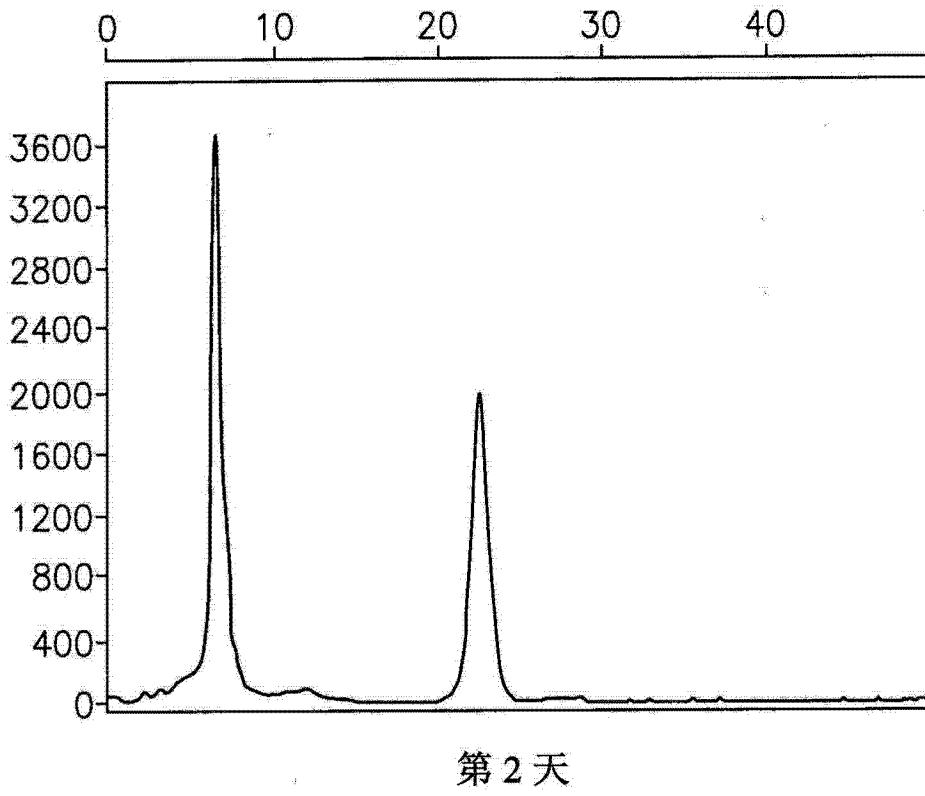
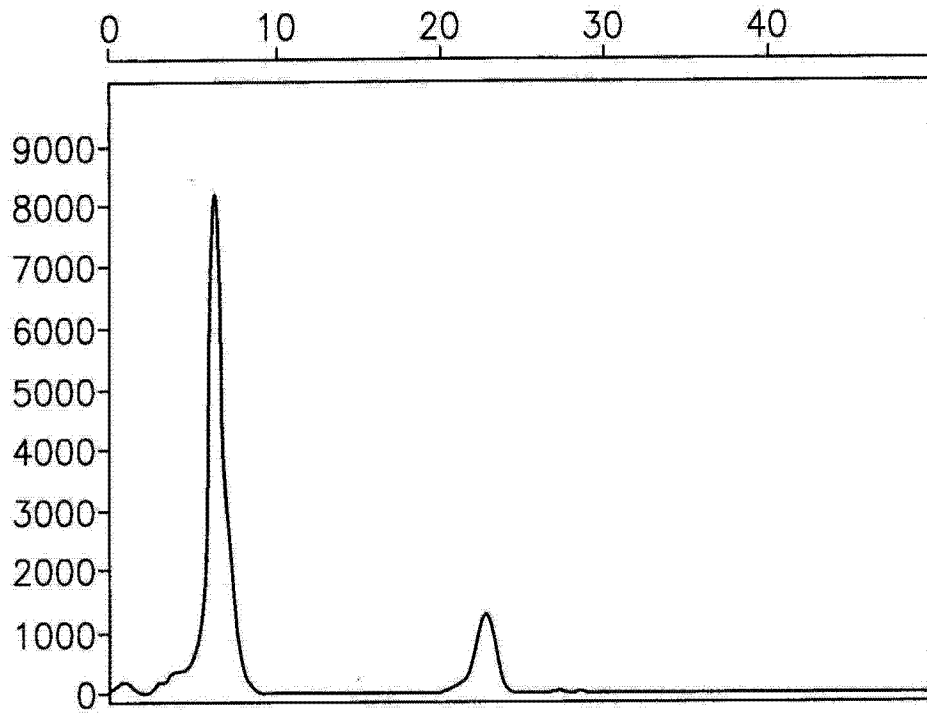
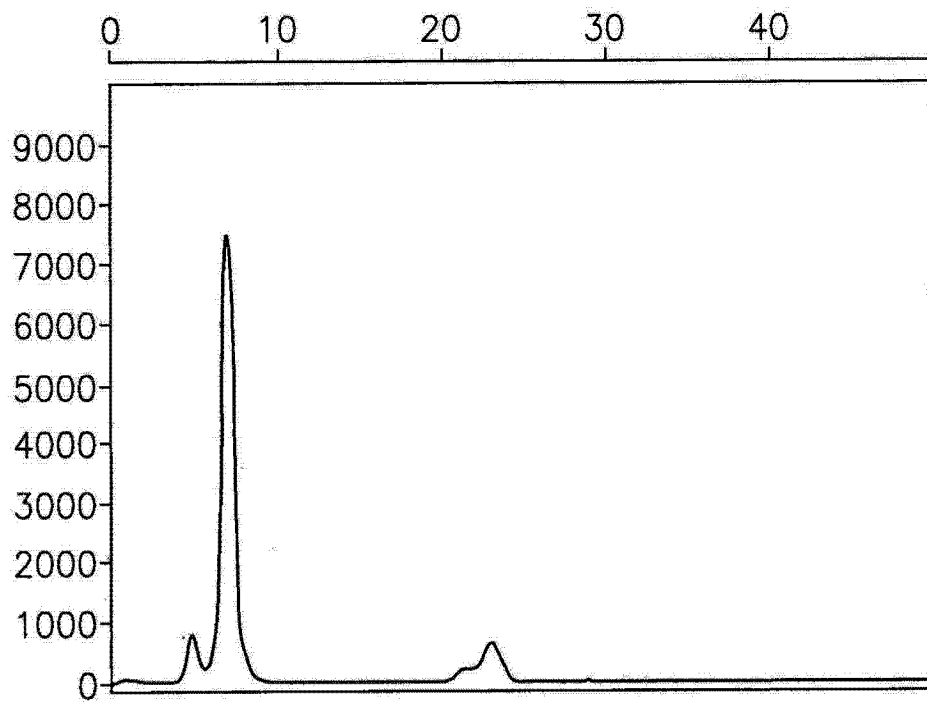


图 5 续 1



第7天



第9天

图5续2

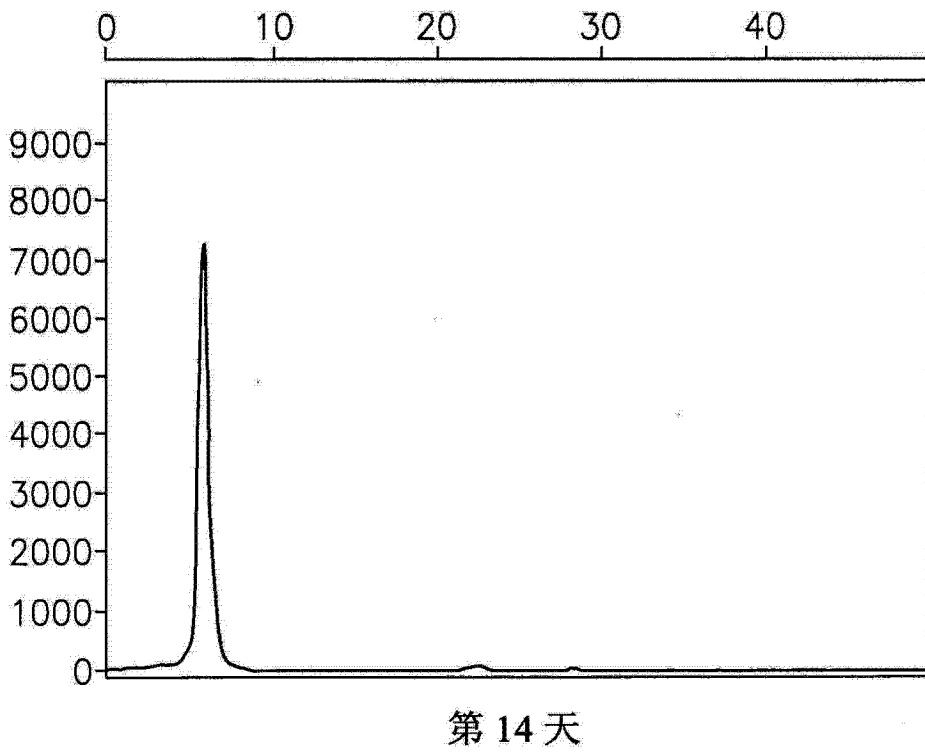
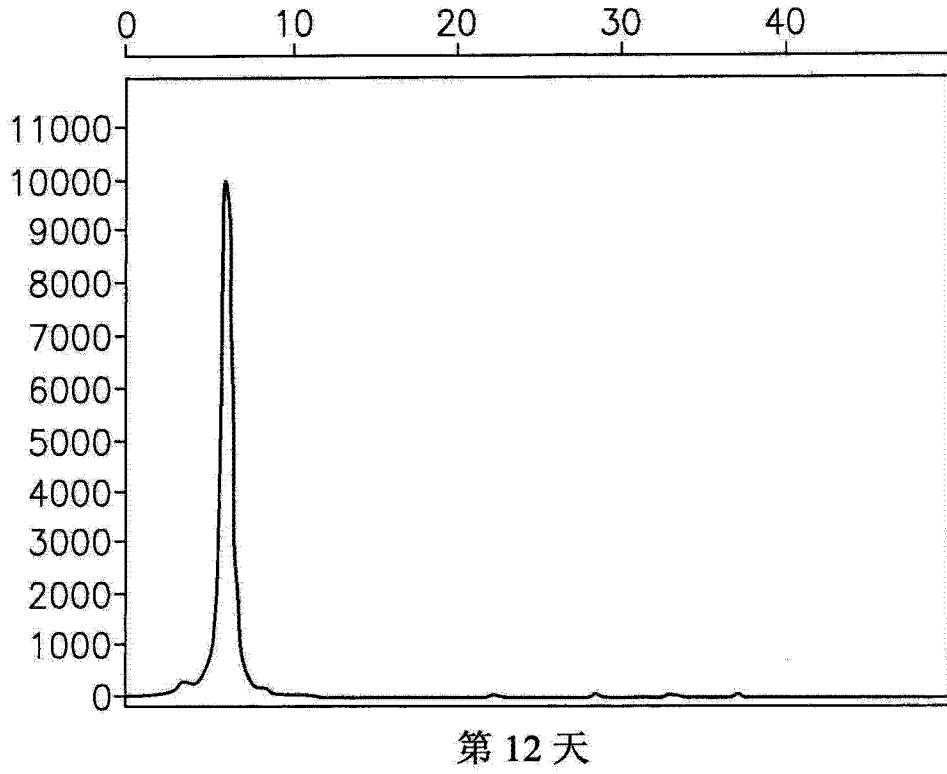


图 5 续 3

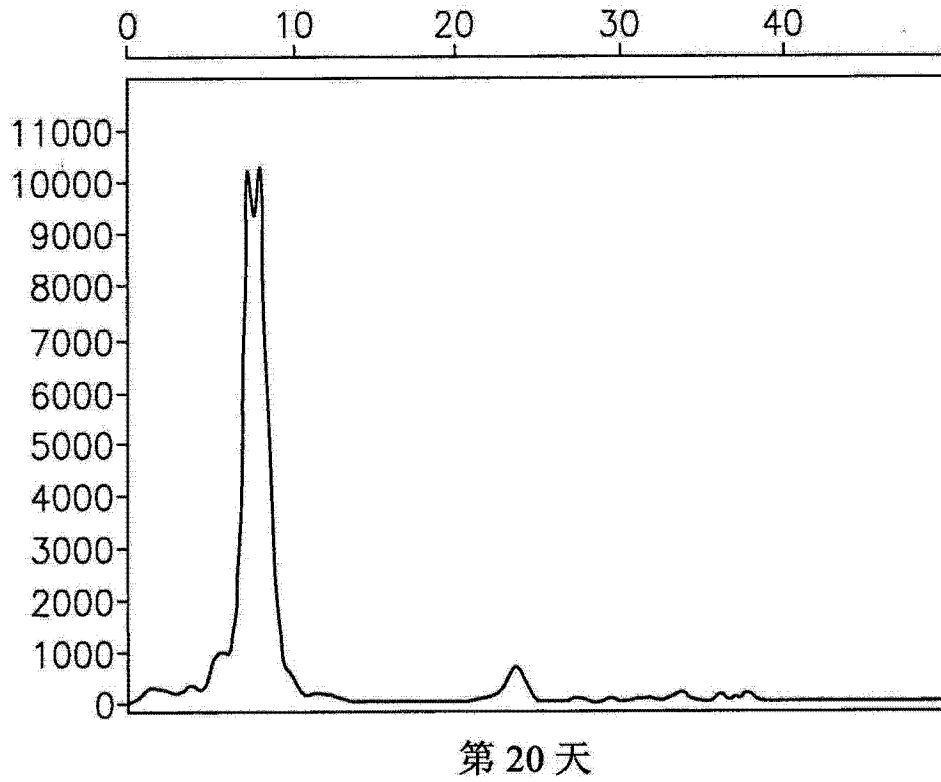
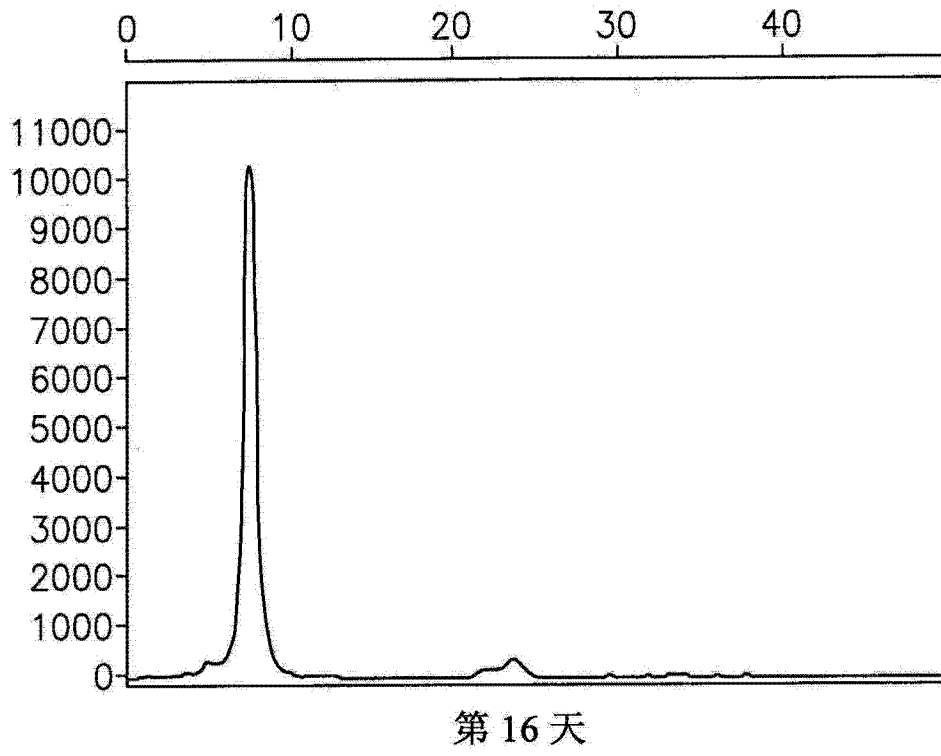


图 5 续 4

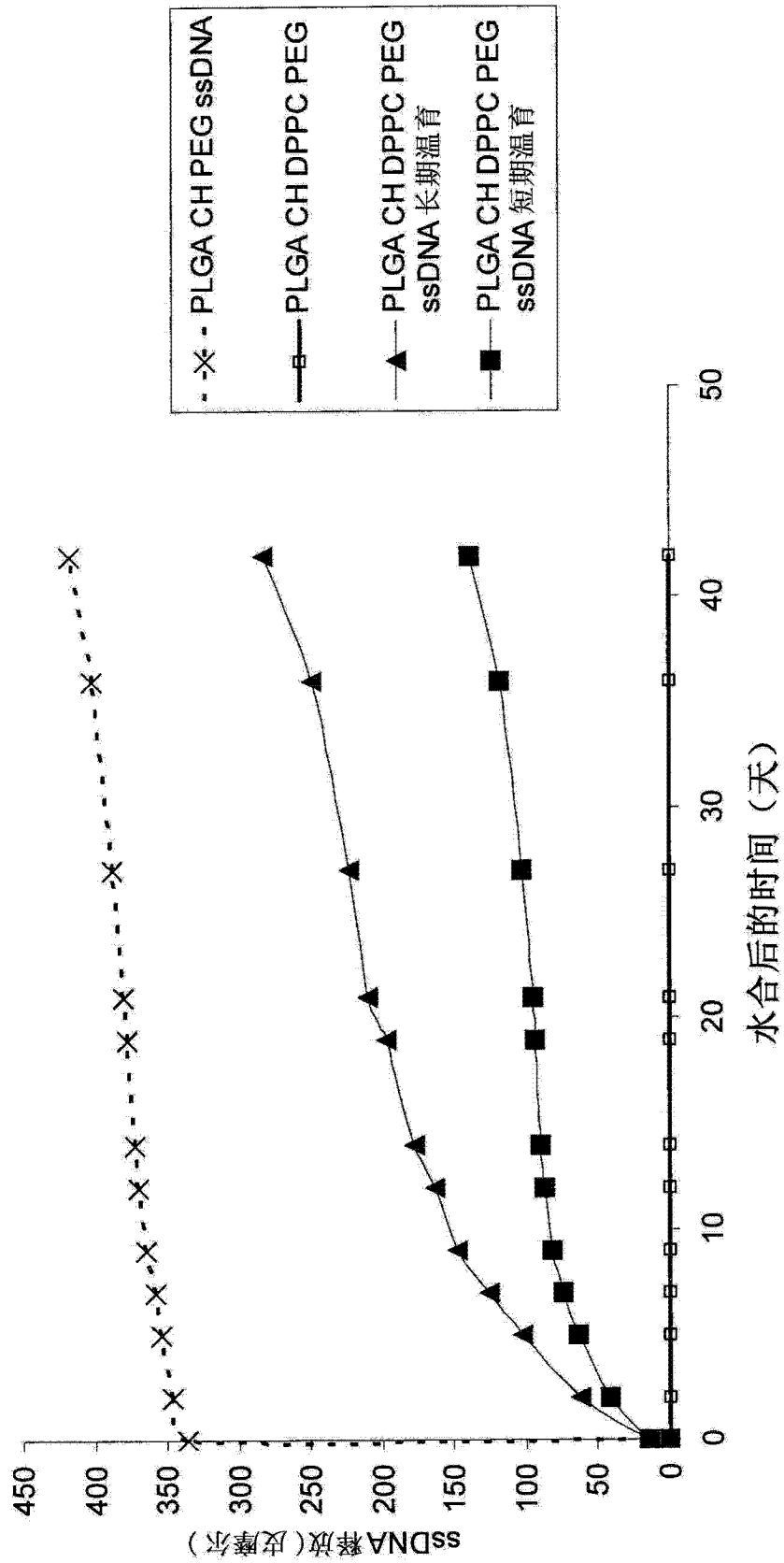


图 6

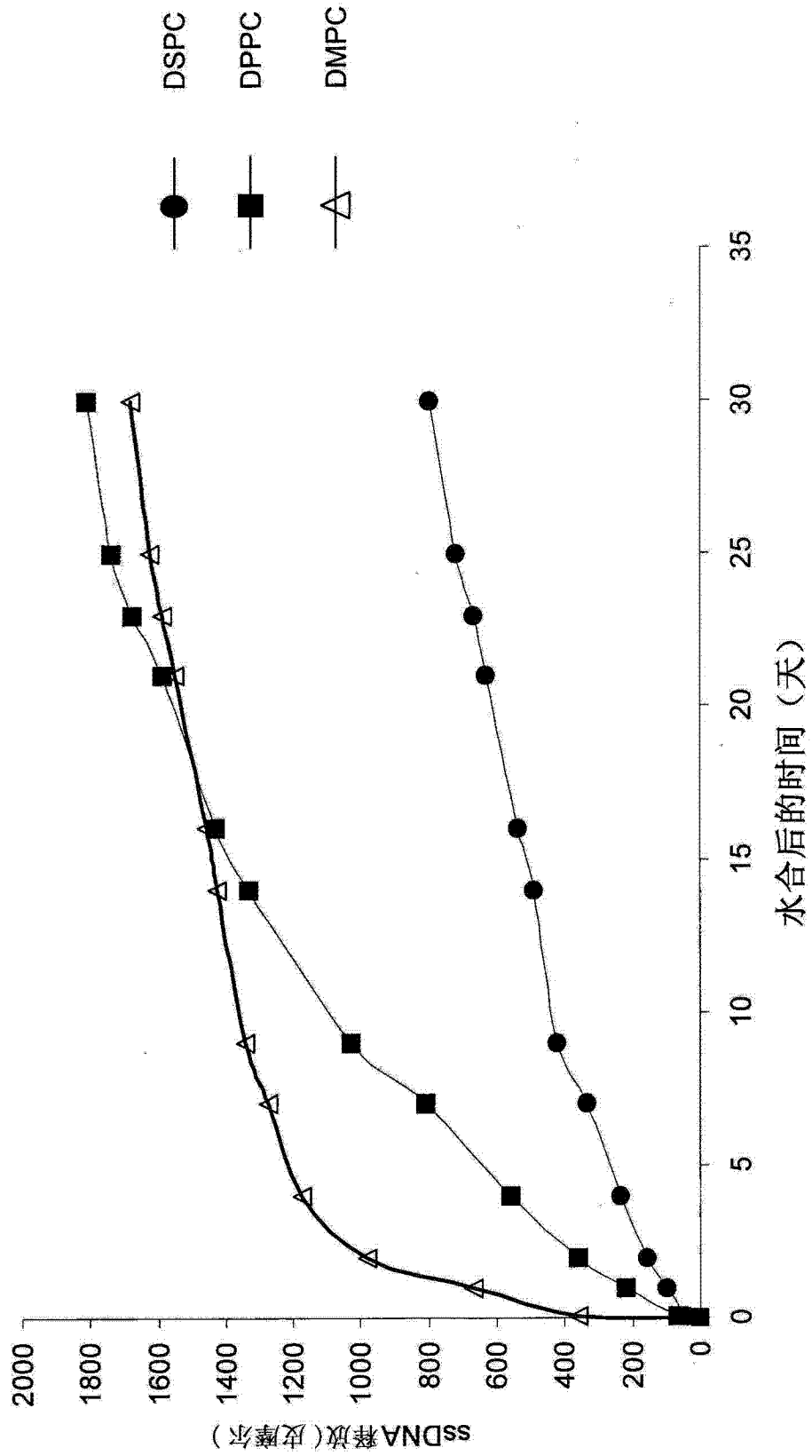


图 7