

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **201890367** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
**2018.06.29**

(51) Int. Cl. **A61K 9/00** (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
**2016.07.22**

(54) **КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ ЛИОФИЛЬНЫХ ФОРМ НАНОЧАСТИЦ**

(31) **62/195,356**

(32) **2015.07.22**

(33) **US**

(86) **PCT/US2016/043537**

(87) **WO 2017/015552 2017.01.26**

(71) Заявитель:

**НИТТО ДЕНКО КОРПОРЕЙШН (JP)**

(72) Изобретатель:

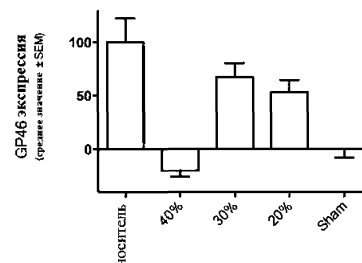
**Йинг Венбин, Адами Роджер, Ванг Ювей, Йин Хайкинг, Ванг Липинг, Лиу Донг (US)**

(74) Представитель:

**Квашнин В.П. (RU)**

(57) Настоящее изобретение обеспечивает композиции для получения твердого лиофила одного или более активных агентов на основе нуклеиновых кислот, которые могут быть восстановлены в качестве лекарственного продукта. Композиция может включать водную суспензию липидных наночастиц в фармацевтически приемлемом растворе, где липидные наночастицы инкапсулируют один или более активных агентов на основе нуклеиновых кислот, соединение декстрина и сахаридное соединение. Активными агентами на основе нуклеиновых кислот могут быть РНК-и молекулы, способные опосредовать РНК интерференцию, а также другие РНК и олигонуклеотиды.

эффективность siРНК in vivo



**A1**

**201890367**

**201890367**

**A1**

## **КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ ЛИОФИЛЬНЫХ ФОРМ НАНОЧАСТИЦ**

### **Описание**

#### **Родственные заявки**

Настоящая заявка заявляет приоритет согласно предварительной заявке на патент США № 62/195,356, поданной 22 июля 2015, под названием Композиции и способы для лиофильных форм наночастиц, содержание которой включено в настоящую заявку в полном объеме посредством ссылки.

#### **Область изобретения**

Настоящее изобретение относится к областям биофармацевтики и терапевтических средств, состоящих из молекул на основе нуклеиновых кислот. Более конкретно, настоящее изобретение относится к способам и композициям для лиофильных форм терапевтических композиций на основе нуклеиновых кислот.

#### **Уровень техники**

Терапевтические средства, основанные на соединениях нуклеиновых кислот, включают в себя различные формы РНК, такие как siРНК, антисмысловые РНК, микроРНК, а также различные формы ДНК и плазмиды, гибридные олигонуклеотиды и аптамеры, среди прочих.

Трансфекция терапевтических средств нуклеиновой кислоты и других агентов осуществлялась путем инкапсуляции активных молекул в липидные наночастицы.

Недостатками этой методики являются неспособность сохранять композиции для последующего использования из-за деградации наночастиц или их инкапсулированного вещества. Например, композиции липидных наночастиц, которые инкапсулируют молекулы siРНК, могут быть стабильными в течение нескольких минут или часов при 25 ° С и всего несколько дней или недель при 4 ° С. Другие недостатки включают необходимость очень низкой температуры при хранении композиций липидных наночастиц.

Одним из способов обеспечения длительного хранения терапевтической композиции является получение лиофильной формы, которую можно хранить и восстанавливать, чтобы получить препарат для введения терапевтических средств.

Однако в общем оказалось невозможным создать лиофильные формы липидных наночастиц, содержащих агенты на основе нуклеиновых кислот, так чтобы липидная наночастица могла быть восстановлена с инкапсулированным агентом нуклеиновой кислоты, с образованием стабильной композиции. Процесс лиофилизации может разрушить наночастицы и/или агенты на основе нуклеиновых кислот. Некоторые методы включали химическое присоединение защитных групп или компонентов к липидным наночастицам или к агенту на основе нуклеиновых кислот, что является невыгодным. Другие методы могут использовать липосомы в качестве адьюванта, без обеспечения инкапсуляции агентов на основе нуклеиновых кислот.

Существует постоянная потребность в композициях и способах для обеспечения лиофильных форм наночастиц, которые могут быть восстановлены с благоприятными свойствами, включая трансфекционную активность, размер частиц, время хранения и стабильность в сыворотке для доставки различных агентов на основе нуклеиновых кислот.

Необходимы композиции и соединения для получения стабильных растворов или суспензий липидных наночастиц, которые могут храниться в твердых лиофильных формах, где наночастицы инкапсулируют агенты на основе нуклеиновых кислот.

## **Сущность изобретения**

Настоящее изобретение обеспечивает способы и композиции для терапевтических средств, состоящих из молекул на основе нуклеиновых кислот. Более конкретно, настоящее изобретение обеспечивает способы и композиции для лиофильных форм терапевтических композиций на основе нуклеиновых кислот.

Настоящее изобретение также обеспечивает лиофильные формы наночастиц, которые могут быть восстановлены в эффективные терапевтические композиции, которые могут применяться для доставки терапевтических агентов на основе нуклеиновых кислот для трансфекции.

В некоторых вариантах выполнения настоящего изобретения, настоящее изобретение обеспечивает композиции и соединения для получения растворов или суспензий терапевтических липидных наночастиц, которые являются стабильными в процессе лиофилизации. Терапевтические липидные наночастицы могут инкапсулировать агенты на основе нуклеиновых кислот, и могут быть трансформированы и храниться в твердых лиофильных форм. Леофильные формы могут быть восстановлены с обеспечением терапевтических липидных наночастиц с инкапсулированными агентами на основе нуклеиновых кислот. Восстановленные липидные наночастицы могут иметь неожиданно предпочтительные трансфекционные свойства, включая размер и распределение частиц.

Варианты выполнения настоящего изобретения включают диапазон композиций и соединений для образования растворов или суспензий терапевтических липидных наночастиц, которые могут подвергаться процессу лиофилизации с обеспечением стабильных, твердых лиофильных форм для длительного хранения терапевтических средств на основе нуклеиновых кислот.

Варианты выполнения настоящего изобретения включают следующее:

Композиция для получения твердых лиофильных липидных наночастиц, содержащая один или более активных агентов на основе нуклеиновых кислот, причем композиция содержит:

водную суспензию липидных наночастиц в фармацевтически приемлемом растворе, где липидные наночастицы инкапсулируют один или более активных агентов на основе нуклеиновых кислот;

соединение декстрина; и

сахаридное соединение сахара.

Вышеуказанная композиция, в которой общее количество соединений декстрина и сахара составляет от 2% до 20% (мас./об.) композиции.

Вышеуказанная композиция, в которой соединение декстрина составляет от 40 % до 70% (мас./об.) от общего количества соединений декстрина и сахара.

Вышеуказанная композиция, в которой соединение декстрина составляет от 40 % до 55% (мас./об.) от общего количества соединений декстрина и сахара.

Вышеуказанная композиция, в которой соединение декстрина составляет от 40% до 45% (мас./об.) от общего количества соединений декстрина и сахара.

Вышеуказанная композиция, в которой при лиофилизации и восстановлении композиции, средний размер наночастиц находится в пределах 10% от их размера в первоначальной композиции.

Вышеуказанная композиция, при лиофилизации хранения и восстановлении композиции, средний размер наночастиц находится в пределах 10% от их размера в первоначальной композиции.

Вышеуказанная композиция, где лиофилизированная композиция хранится при 5°C в течение по меньшей мере одного месяца.

Вышеуказанная композиция, где лиофилизированная композиция хранится при -20°C в течение по меньшей мере одного месяца.

Вышеуказанная композиция, в которой наночастицы имеют средний диаметр от 45 нм до 110 нм.

Вышеуказанная композиция, в которой концентрация активных агентов на основе нуклеиновых кислот составляет от 1 мг/мл до 10 мг/мл, или от 3 мг/мл до 5 мг/мл.

Вышеуказанная композиция, в которой один или более активных агентов на основе нуклеиновых кислот представляют собой РНКi молекулы, способные опосредовать РНК интерференцию. Вышеуказанная композиция, в которой РНКi молекулами являются siРНК, shРНК, ddРНК, piРНК, или gasiРНК.

Вышеуказанная композиция, в которой один или более активных агентов на основе нуклеиновых кислот представляют собой miРНК, антисмысловые РНК, плазмиды, гибридные олигонуклеотиды или аптамеры.

Вышеуказанная композиция, в которой фармацевтически приемлемый раствор представляет собой HEPES буфер, фосфатный буфер, цитратный буфер, или буфер, содержащий трис(гидроксиметил)аминометан.

Вышеуказанная композиция, в которой соединением декстрина является циклодекстрин.

Вышеуказанная композиция, в которой соединение циклодекстрина имеет одно или более из 2, 3 и 6 гидроксильных положений, замещенные сульфоалкильными,

бензолсульфоалкильными, ацетоалкильными, гидроксиалкильными, гидроксиалкилсукцинатными, гидроксиалкилмалонатными, гидроксиалкилглутаратными, гидроксиалкиладипатными, гидроксиалкильными, гидроксиалкилмалеатными, гидроксиалкилоксалатными, гидроксиалкилфумаратными, гидроксиалкилцитратными, гидроксиалкилтартратными, гидроксиалкилмалатными или гидроксиалкилцитратонатными группами.

Вышеуказанная композиция, в которой соединением циклодекстрина является (2-гидроксипропил)- $\beta$ -циклодекстрин, 2-гидроксипропил- $\beta$ -циклодекстрин сукцинат, (2-гидроксипропил)- $\gamma$ -циклодекстрин, или 2-гидроксипропил- $\gamma$ -циклодекстрин сукцинат.

Вышеуказанная композиция, в которой соединением циклодекстрина является сульфобутиловый простой эфир  $\beta$ -циклодекстрина или сульфобутиловый простой эфир  $\gamma$ -циклодекстрина.

Вышеуказанная композиция, в которой соединением циклодекстрина является метил- $\beta$ -циклодекстрин или метил- $\gamma$ -циклодекстрин.

Вышеуказанная композиция, в которой соединение циклодекстрина присоединено к полимерной цепи или сети.

Вышеуказанная композиция, в которой соединение циклодекстрина включает адсорбируемое соединение.

Вышеуказанная композиция, в которой адсорбируемое соединение выбирают из холестерина, ланостерина, зимостерина, зимостенола, демостерола, стигмастанола, дигидроланостерина, 7-дегидрохолестерина, пегилированного холестерина, холестерилацетата, холестериларахидоната, холестерилбутирата,

холестерилгексаноата, холестерилмирилата, холестерилпальмитата, холестерилбегената, холестерилстеарата, холестерилкаприлата, холестерил н-деcanoата, холестерилдодеcanoата, холестерилнервоната, холестерилпеларгоната, холестерил н-валерата, холестерилолеата, холестерилэлаидата, холестерилэруката, холестерилгептаноата, холестериллинолелаидата, холестериллинолеата, бета-ситостерина, кампестерина, эргостерина, брассикастерина, дельта-7-стигмастерина, и дельта-7-авенастерина.

Вышеуказанная композиция, в которой сахаридное соединение сахара представляет собой моносахаридное или дисахаридное соединение сахара.

Вышеуказанная композиция, в которой соединение сахара выбирают из сахарозы, лактозы, лактулозы, мальтозы, трегалозы, целлобиозы, койбиозы, сакебиозы, изомальтозы, софорозы, ламинарибиозы, гентибиозы, туранозы, мальтулозы, изомальтулозы, генцибиулозы, маннобиозы, мелибиозы, мелибиулозы и ксилобиозы.

Способ получения твердого лиофила одного или более активных агентов на основе нуклеиновых кислот, причем способ включает лиофилизацию вышеописанной композиции. Настоящее изобретение также охватывает твердый лиофил, полученный вышеуказанным способом, а также лекарственный продукт, полученный восстановлением вышеописанного твердого лиофила.

Настоящее изобретение также включает способ получения лекарственного продукта на основе нуклеиновых кислот, причем способ включает:

    синтез липидных наночастиц, где липидные наночастицы инкапсулируют один или более активных агентов на основе нуклеиновых кислот;

    обеспечение водной суспензии липидных наночастиц в фармацевтически приемлемом растворе;

    добавление соединения декстрина в раствор, содержащий липидные наночастицы;

    добавление сахаридного соединения сахара в раствор, содержащий липидные



наночастицы;

лиофилизацию раствора, содержащего липидные наночастицы, таким образом получая твердый лиофил;

восстановление лиофида в фармацевтически приемлемый носитель, таким образом получая лекарственный продукт на основе нуклеиновых кислот.

Вышеуказанный способ, в котором общее количество соединений декстрина и сахара составляет от 2% до 20% (мас./об.) раствора, содержащего липидные наночастицы.

Вышеуказанный способ, в котором соединение декстрина составляет от 40% до 70% (мас./об.) от общего количества соединений декстрина и сахара.

Вышеуказанный способ, в котором соединение декстрина составляет от 40% до 55% (мас./об.) от общего количества соединений декстрина и сахара.

Вышеуказанный способ, в котором соединение декстрина составляет от 40% до 45% (мас./об.) от общего количества соединений декстрина и сахара.

Вышеуказанный способ, в котором при восстановлении средний размер наночастиц в пределах 10% от их размера при синтезе.

Вышеописанный способ, дополнительно включающий хранение лиофила перед восстановлением.

Вышеуказанный способ, в котором при хранении и восстановлении лиофила, средний размер наночастиц находится в пределах 10% от их размера при синтезе.

Вышеуказанный способ, в котором лиофил хранят при 5°C в течение по меньшей мере одного месяца.

Вышеуказанный способ, в котором лиофил хранят при  $-20^{\circ}\text{C}$  в течение по меньшей мере одного месяца.

Вышеуказанный способ, в котором наночастиц имеют средний диаметр от 45 нм до 110 нм.

Вышеуказанный способ, в котором концентрация активных агентов на основе нуклеиновых кислот составляет от 1 мг/мл до 10 мг/мл.

Вышеуказанный способ, в котором один или более активных агентов на основе нуклеиновых кислот представляют собой РНКi молекулы, способные опосредовать РНК интерференцию. Вышеуказанный способ, в котором РНКi молекулы представляют собой siРНК, shРНК, ddРНК, piРНК или gasiРНК.

Вышеуказанный способ, в котором один или более активных агентов на основе нуклеиновых кислот представляют собой miРНК, антисмысловые РНК, плазмиды, гибридные олигомеры или аптамеры.

Вышеуказанный способ, в котором фармацевтически приемлемый носитель представляет собой стерильную воду, воду для инъекции, стерильный нормальный соляной раствор, бактериостатическую воду для инъекции или раствор для распылителя.

Вышеуказанный способ, в котором фармацевтически приемлемый носитель представляет собой фармацевтически приемлемый раствор.

Вышеуказанный способ, в котором фармацевтически приемлемый раствор представляет собой HEPES буфер, фосфатный буфер, цитратный буфер, или буфер, содержащий трис(гидроксиметил)аминометан.

Вышеуказанный способ, в котором соединением декстрина является циклодекстрин.

Вышеуказанный способ, в котором соединением циклодекстрина имеет одно или более из 2, 3 и 6 гидроксильных положений, замещенные сульфоалкильными, бензолсульфоалкильными, ацетоалкильными, гидроксиалкильными, гидроксиалкилсукцинатными, гидроксиалкилмалонатными, гидроксиалкилглутаратными, гидроксиалкиладипатными, гидроксиалкильными, гидроксиалкилмалеатными, гидроксиалкилоксалатными, гидроксиалкилфумаратными, гидроксиалкилцитратными, гидроксиалкилтартратными, гидроксиалкилмалатными или гидроксиалкилцитратонатными группами.

Вышеуказанный способ, в котором соединением циклодекстрина является (2-гидроксипропил)- $\beta$ -циклодекстрин, 2-гидроксипропил- $\beta$ -циклодекстрин сукцинат, (2-гидроксипропил)- $\gamma$ -циклодекстрин, или 2-гидроксипропил- $\gamma$ -циклодекстрин сукцинат.

Вышеуказанный способ, в котором соединением циклодекстрина является сульфобутиловый простой эфир  $\beta$ -циклодекстрина или сульфобутиловый простой эфир  $\gamma$ -циклодекстрина.

Вышеуказанный способ, в котором соединением циклодекстрина является метил- $\beta$ -циклодекстрин или метил- $\gamma$ -циклодекстрин.

Вышеуказанный способ, в котором соединением циклодекстрина включает адсорбируемое соединение.

Вышеуказанный способ, в котором сахаридное соединение сахара представляет собой моносахаридное или дисахаридное соединение сахара.

Вышеуказанный способ, в котором фармацевтически приемлемый носитель представляет собой стерильную воду, воду для инъекции, стерильный нормальный соляной раствор, бактериостатическую воду для инъекции или раствор для распылителя.

Вышеуказанный способ, в котором фармацевтически приемлемый носитель представляет собой фармацевтически приемлемый раствор.

Вышеуказанный способ, в котором восстановленный лекарственный продукт на основе нуклеиновых кислот имеет менее 0.001% (мас./об.) агрегированных частиц с размером более 0.2 мкм.

Вышеуказанный способ, в котором лекарственный продукт на основе нуклеиновых кислот восстанавливается в период времени от 3 до 30 секунд.

Вышеуказанный способ, в котором лекарственный продукт на основе нуклеиновых кислот восстанавливается после периода хранения в течение шести месяцев и сохраняет 80% активности агентов на основе нуклеиновых кислот.

Вышеуказанный способ, в котором восстановленный лекарственный продукт на основе нуклеиновых кислот имеет менее 0.001% (мас./об.) агрегированных частиц с размером более 0.2 мкм.

Вышеуказанный способ, в котором восстановленный лекарственный продукт на основе нуклеиновых кислот имеет уменьшенную цитокиновую активацию.

Вышеуказанный способ, в котором лекарственный продукт на основе нуклеиновых кислот восстанавливается в период времени от 3 до 30 секунд.

Вышеуказанный способ, в котором лекарственный продукт на основе нуклеиновых кислот восстанавливается после периода хранения в течение шести месяцев и сохраняет 80% активности агентов на основе нуклеиновых кислот.

#### Краткое описание чертежей

Фиг. 1: на Фиг.1 показаны экспериментальные результаты для активности *in vivo* агента на основе нуклеиновой кислоты, который был siРНК нацеленным на подавление Hsp47 (GP46), полученного с конечным лекарственным продуктом, которым был восстановленный раствор твердой лиофилизированной наночастичной композиции siРНК. Восстановленные лекарственные композиции siРНК использовались на модели фиброза печени крыс, индуцированного диметилнитрозамином (DMN). Как показано на Фиг.1, восстановленная лекарственная композиция siРНК на основе наночастиц проявляла сильную и удивительную активность при подавлении экспрессии гена Hsp47 (GP46) *in vivo*. Эффективность *in vivo* является строгим испытанием на жизнеспособность лиофилизированных восстановленных наночастиц, содержащих агент на основе нуклеиновых кислот. Композиция siРНК на основе наночастиц, которая была лиофилизирована, включает общее содержание защитного вещества 10% (мас./об.), которое состояло из 40% (мас./об.) (2-гидроксипропил)- $\beta$ -циклодекстрина и 60% сахарозы.

Фиг. 2: на Фиг.2 показаны экспериментальные результаты для фармакокинетики концентрации в плазме *in vivo* лиофилизированной, восстановленной композиции siРНК на основе наночастиц. siРНК, нацеленная на Hsp47 (GP46), была получена в виде композиции липосомальных наночастиц. Композиции на основе наночастиц были лиофилизированы с защитной композицией, содержащей сахарозу и (2-гидроксипропил)- $\beta$ -циклодекстрин. Композиция siРНК на основе наночастиц, которая была лиофилизирована, включала общее содержание защитного вещества 12,5% (мас./об.), которое состояло из 40% (мас./об.) (2-гидроксипропил)- $\beta$ -циклодекстрина и 60% сахарозы. PK-профили в плазме оценивали на крысах Sprague

Dawley после внутривенного введения однократной дозы лиофилизированного препарата по сравнению с замороженной композицией. Концентрации siРНК в образцах плазмы определяли методом ELISA на основе гибридизации. Как показано на Фиг.2, фармакокинетика концентрации в плазме лиофилизированной восстановленной лекарственной композиции siРНК по существу была такой же, как и сравнительной контрольной композиции, которая была только заморожена.

## ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение обеспечивает способы и композиции для терапевтических средств, состоящих из молекул на основе нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах выполнения настоящего изобретения, настоящее изобретение способы и композиции для получения лиофильных форм терапевтических композиций, содержащих агенты на основе нуклеиновых кислот.

В некоторых вариантах выполнения настоящего изобретения, настоящее изобретение обеспечивает лиофильные формы наночастиц, которые могут быть восстановлены в эффективные терапевтические композиции. Наночастицы могут инкапсулировать агенты на основе нуклеиновых кислот. Лيوфильные формы согласно настоящему изобретению могут применяться для восстановления и доставки композиций наночастиц, инкапсулирующих терапевтические агенты на основе нуклеиновых кислот, для трансфекции.

В других вариантах настоящее изобретение обеспечивает соединения и способы для получения растворов и суспензий терапевтических липидных наночастиц, которые являются стабильными в процессах лиофилизации. Способы лиофилизации согласно настоящему изобретению могут обеспечить стабильные лиофильные формы терапевтических липидных наночастиц, в которых наночастицы могут инкапсулировать агенты на основе нуклеиновых кислот. Лيوфильные формы могут храниться в течение времени и восстанавливаться с обеспечением терапевтических липидных наночастиц с инкапсулированными агенты на основе нуклеиновых кислот.

В некоторых вариантах выполнения настоящего изобретения, настоящее изобретение включает диапазон композиций и соединений для растворов или суспензий липидных наночастиц, которые могут подвергаться процессу лиофилизации, с обеспечением стабильных, твердых лиофильных форм для длительного хранения терапевтических средств на основе нуклеиновых кислот. Композиции и способы согласно настоящему изобретению могут обеспечить лиофильные формы, которые могут быть восстановлены и обеспечить предпочтительную активность, размер частиц, время хранения и стабильность в сыворотке.

В других вариантах выполнения, настоящее изобретение относится к соединениям, композициям и способам для обеспечения наночастиц для доставки и распределения активных агентов или лекарственных соединений в субъектах, тканях, и органах.

Настоящее изобретение обеспечивает диапазон липидных соединений и ионизируемых соединений для доставки активных агентов в клетки. Липидные соединения и ионизируемые соединения согласно настоящему изобретению могут применяться для образования наночастиц для доставки и распределения активных агентов.

Настоящее изобретение охватывает композиции лекарственного средства на основе липидных наночастиц, содержащие, например, siРНК агенты, которые могут быть получены посредством лиофилизации суспензии наночастиц, и восстановления наночастиц в суспензию.

В некоторых вариантах выполнения настоящего изобретения липидные наночастицы могут быть синтезированы путем высокоскоростной инъекции раствора липид/этанол в буферный раствор siРНК. Второй буфер можно подвергнуть диафильтрации и использовать в качестве внешнего буфера через картриджи TFF для получения конечной водной суспензии продукта.

В некоторых вариантах выполнения настоящего изобретения, наночастицы могут иметь средний диаметр от 45 нм до 110 нм. Концентрация активных агентов на основе нуклеиновых кислот может составлять от 1 мг/мл до 10 мг/мл.

Неожиданно было обнаружено, что липидные наночастицы могут пережить лиофилизацию суспензии, когда суспензию превращают в защищенную композицию.

В некоторых вариантах выполнения настоящего изобретения, защищенная композиция согласно настоящему изобретению может состоять из водной суспензии липидных наночастиц в фармацевтически приемлемом растворе, соединения декстрина и сахаридного соединения сахара. Липидные наночастицы могут инкапсулировать активный агент, как например один или более активных агентов на основе нуклеиновых кислот.

Лиофилизация защищенной суспензии может обеспечить твердый лиофильный продукт, который может быть восстановлен в суспензию липидных наночастиц.

Восстановленная суспензия может содержать липидные наночастицы, которые инкапсулируют активный аген, и сопоставимы с липидными наночастицами перед лиофилизацией.

В некоторых вариантах выполнения настоящего изобретения, восстановленная суспензия может обеспечить активность инкапсулированного агента, которая сопоставима с активностью суспензии перед лиофилизацией.

В других вариантах выполнения, восстановленная суспензия может обеспечить стабильные наночастицы, сопоставимые с наночастицами суспензии перед лиофилизацией. В отдельных вариантах выполнения настоящего изобретения средний размер частиц наночастиц может быть почти равен размеру наночастиц в суспензии перед лиофилизацией.



Композиции и способы согласно настоящему изобретению могут обеспечить неожиданную стабильность и активность восстановленной суспензии, состоящей из наночастиц, имеющих инкапсулированный агент.

В других вариантах выполнения защищенная суспензия, которая может быть лиофилизирована и восстановлена, может содержать защитную композицию для лиофилизации. Защитная композиция согласно настоящему изобретению может состоять из соединения декстрина и сахаридного соединения сахара. Общее количество соединений декстрина и сахара может составлять от 2% до 20% (мас./об.) от защищенной суспензии.

В некоторых вариантах выполнения настоящего изобретения, соединение декстрина может составлять от 40 % до 70% (мас./об.) от общего количества соединений декстрина и сахара в защитной композиции. В некоторых вариантах выполнения настоящего изобретения, соединение декстрина может составлять от 40 % до 55% (мас./об.) от общего количества соединений декстрина и сахара в защитной композиции. В других вариантах выполнения настоящего изобретения, соединение декстрина может составлять от 40% до 45% (мас./об.) от общего количества соединений декстрина и сахара в защитной композиции. Эти композиции могут обеспечить неожиданно выгодные свойства восстановленной суспензии наночастиц, например, незначительное изменение размера или активности наночастиц

В некоторых вариантах выполнения настоящего изобретения, при лиофилизации и восстановлении защищенной композиции наночастиц, средний размер наночастиц может быть в пределах 10% от их размера в первоначальной композиции, перед лиофилизацией. В определенных вариантах выполнения настоящего изобретения, при лиофилизации и восстановлении защищенной композиции наночастиц, средний размер наночастиц может находиться в пределах 5% от их размера в первоначальной композиции, перед лиофилизацией.

Настоящее изобретение охватывает композиции лекарственного средства на основе липидных наночастиц, содержащих, например, siРНК агенты, которые могут быть получены лиофилизацией суспензии наночастиц и восстановлением наночастиц в суспензию после периода хранения. Восстановленная суспензия может обеспечить активность инкапсулированного агента, которая сопоставима с активностью суспензии перед лиофилизацией.

Восстановленная суспензия, полученная после периода хранения, могут содержать липидные наночастицы, которые инкапсулируют активный агент и сопоставимы с липидными наночастицами перед лиофилизацией.

В некоторых вариантах выполнения настоящего изобретения, восстановленная суспензия, полученная после периода хранения, может обеспечить активность инкапсулированного агента, которая сопоставима с активностью суспензии перед лиофилизацией.

В других вариантах выполнения восстановленная суспензия, полученная после периода хранения, может обеспечить стабильные наночастицы, сопоставимые с наночастицами суспензии перед лиофилизацией. В определенных вариантах выполнения настоящего изобретения, средний размер частиц наночастиц может быть почти равен размеру наночастиц в суспензии перед лиофилизацией

В некоторых вариантах выполнения настоящего изобретения, лиофилизируемая композиция может храниться при 5°C в течение по меньшей мере одного месяца. В других вариантах выполнения настоящего изобретения, лиофилизируемая композиция может храниться при -20°C в течение по меньшей мере одного месяца.

### Активные агенты

Композиции и способы согласно настоящему изобретению могут быть использованы для распределения агентов для подавления экспрессии генов. Примеры агента для подавления экспрессии гена включают ингибирующие молекулы нуклеиновой кислоты, включая рибозимы, антисмысловые нуклеиновые кислоты и интерференционные молекулы РНК (молекулы РНКi).

Терапевтические композиции согласно настоящему изобретению могут включать ингибирующие молекулы нуклеиновой кислоты. Примерами молекул нуклеиновых кислот, способных опосредовать интерференцию РНК, являются молекулы, активные в интерференции РНК (молекулы РНКi), включая дуплексную РНК, такую как siРНК (малая интерферирующая РНК), miРНК (микро РНК), shРНК (короткая шпилечная РНК), ddРНК (ДНК-направленная РНК), piРНК (Piwi-взаимодействующая РНК) или gasiРНК (ассоциированная с повторами siРНК) и их модифицированные формы.

Примеры активных терапевтических средств согласно настоящему изобретению включают ДНК, плазмиды, гибридные олигонуклеотиды или аптамеры.

Концентрация активных молекул нуклеиновой кислоты в композиции для предварительной лиофилизации согласно настоящему изобретению может составлять от около 1 мг/мл до около 10 мг/мл. В некоторых вариантах выполнения настоящего изобретения, концентрация активных молекул нуклеиновой кислоты в композиции согласно настоящему изобретению может составлять от около 1 мг/мл до около 5 мг/мл, или от 2 мг/мл до 4 мг/мл.

### Композиции на основе липидных наночастиц для предварительной лиофилизации

Варианты выполнения настоящего изобретения могут обеспечить композиции липидных наночастиц, композиции которых содержат защитное соединение для процесса лиофилизации.

Липидные наночастицы могут иметь любую композицию, известную в данной области техники. Липидные наночастицы могут быть синтезированы и загружены инкапсулированным веществом любым способом, включая процессы, известные в данной области техники.

В некоторых вариантах выполнения настоящего изобретения, липидные наночастицы могут быть получены способом погружного впрыскивания. Некоторые примеры способов липидных наночастиц приведены в US 2013/0115274.

Некоторые примеры получения липосом приведены в Szoka, *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 9:467 (1980); *Liposomes*, Marc J. Ostro, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1983, Chapter 1.

В общем, липидные наночастицы могут быть синтезированы путем смешивания липидных компонентов в органическом растворителе с водным буферным раствором, содержащим активные агенты на основе нуклеиновых кислот. Липосомы могут быть разделены по размеру путем фильтрации или экструзии. Липосомальную суспензию или раствор можно дополнительно трансформировать путем диафильтрации.

Композиция на основе липидных наночастиц согласно настоящему изобретению, которая стабилизирована для процесса лиофилизации, может содержать липидные наночастицы, которые инкапсулируют один или более активных агентов, таких как агенты на основе нуклеиновых кислот, в суспензию. Суспензия может быть водной и

может содержать смешивающийся с водой растворитель, такой как этанол. Композиция, стабилизированная для процесса лиофилизации, может дополнительно содержать защитные соединения для стабилизации липосом в процессе лиофилизации.

Средний размер липидных наночастиц в виде синтезированных может составлять от 40 нм до 120 нм, или от 45 нм до 110 нм, или от 85 нм до 105 нм.

Концентрация активного агента в композиции на основе липидных наночастиц согласно настоящему изобретению может быть в интервале от около 0.1 мг/мл до около 10 мг/мл. В некоторых вариантах выполнения настоящего изобретения, концентрация активного агента в композиции на основе липидных наночастиц согласно настоящему изобретению может составлять от 0.5 мг/мл до 8 мг/мл, или от 1 мг/мл до 6 мг/мл, или от 2 мг/мл до 5 мг/мл, или от 3 мг/мл до 4 мг/мл.

Примеры защитных соединений включают соединения декстрина.

Примеры соединений декстрина включают мальтодекстрины, и бета- и гамма-циклодекстрины.

Примеры соединений декстрина включают метилированные бета- и гамма-циклосоединения декстрина, и сульфоалкиловые простые эфиры бета- и гамма-циклосоединений декстрина.

Примеры соединений декстрина включают соединения циклодекстрина, имеющие одно или более из 2, 3 и 6 гидроксильных положений, замещенные сульфоалкильными, бензолсульфоалкильными, ацетоалкильными, гидроксиалкильными, гидроксиалкилсукцинатными, гидроксиалкилмалонатными, гидроксиалкилглутаратными, гидроксиалкиладипатными, гидроксиалкильными, гидроксиалкилмалеатными, гидроксиалкилоксалатными,

гидроксиалкилфумаратными, гидроксиалкилцитратными,  
гидроксиалкилтартратными, гидроксиалкилмалатными или  
гидроксиалкилцитраконатными группами.

Примеры соединений декстрина включают (2-гидроксипропил)- $\beta$ -циклодекстрин, 2-гидроксипропил- $\beta$ -циклодекстрин сукцинат, (2-гидроксипропил)- $\gamma$ -циклодекстрин, и 2-гидроксипропил- $\gamma$ -циклодекстрин сукцинат.

Примеры соединений декстрина включают гидроксиэтил  $\beta$ -циклодекстрин.

Примеры соединений декстрина включают диметил  $\beta$ -циклодекстрин и триметил  $\beta$ -циклодекстрин.

Примеры соединений декстрина включают сульфобутиловый простой эфир  $\beta$ -циклодекстрина и сульфобутиловый простой эфир  $\gamma$ -циклодекстрина.

Примеры соединений декстрина включают метил- $\beta$ -циклодекстрин и метил- $\gamma$ -циклодекстрин.

Примеры соединений декстрина включают гидроксипропил-сульфобутил- $\beta$ -циклодекстрин.

Примеры соединений декстрина включают H107 SIGMA циклодекстрин (Sigma-Aldrich Corp.).

Примеры соединений декстрина включают CAVAMAX, CAVASOL, и CAVATRON циклодекстрины (Ashland Inc.).

Примеры соединений декстрина включают KLEPTOSE и CRYSMEB циклодекстрины (Roquette America Inc.).

Примеры соединений декстрина включают CAPTISOL циклодекстрины (Ligand Pharmaceuticals, Inc.).

В некоторых вариантах выполнения настоящего изобретения, примеры соединений декстрина включают соединения декстрина, присоединенные к полимерной цепи или сети. Например, циклодекстриновые молекулы могут быть присоединены к полимерам полиакриловой кислоты. В других вариантах выполнения настоящего изобретения молекулы циклодекстрина могут быть связаны вместе сшивающими соединениями, такими как акрилоильные группы. В некоторых вариантах выполнения настоящего изобретения могут быть использованы виниловые акрилатные гидрогелевые формы с прикрепленным соединением циклодекстрина.

В некоторых вариантах выполнения настоящего изобретения, соединение декстрина, которое будет использоваться в композиции на основе липидных наночастиц согласно настоящему изобретению, может быть объединено с адсорбируемым соединением перед введением в композицию на основе липидных наночастиц. Не желая связываться какой-либо одной конкретной теорией, предварительная адсорбция стерольного соединения соединением декстрина может образовывать комплекс включения, который может предотвратить потерю активности активного агента в восстановленном лекарственном продукте.

Примеры адсорбируемых соединений включают холестерин, ланостерин, зимостерин, зимостенол, десмостерин, стигмастанол, дигидроланостерин, 7-дегидрохолестерин.

Примеры адсорбируемых соединений включают ПЭГилированные холестерин и холестан 3-оксо-(C1-22)ацильные соединения, например, холестерил ацетат, холестерил арахионат, холестерил бутират, холестерил гексаноат, холестерил мирилат, холестерил пальмитат, холестерил бегенат, холестерил стеарат, холестерил каприлат, холестерил н-деcanoат, холестерил додеcanoат, холестерил нервоат, холестерил пеларгонат, холестерил н-валерат, холестерил олеат, холестерил элаидат,

холестерил эрукат, холестерил гептаноат, холестерил линолелаидат и холестерил линолеат.

Примеры адсорбируемых соединений включают фитостерины, бета-ситостерин, кампестерин, эргостерин, брассикастерин, дельта-7-стигмастерин и дельта-7-авенастерин.

Дополнительные примеры защитных соединений включают сахаридные соединения. Примеры сахаридных соединений включают соединения сахара.

Примеры защитных соединений сахара включают моносахариды, такие как С(5-6) альдозы и кетозы, а также дисахариды, такие как сахароза, лактоза, лактулоза, мальтоза, трегалоза, целлобиоза, койбиоза, сакебиоза, изомальтоза, софороза, ламинарибиоза, гентибиоза, тураноза, мальтулоза, изомальтулоза, генцибиулоза, маннобиоза, мелибиоза, мелибиулоза и ксилобиоза.

Примеры защитных сахаридных соединений включают полисахариды, такие как фиколл.

Концентрация защитных соединений в композициях для предварительной лиофилизации может составлять от около 1% (мас./об.) до около 25% (мас./об.).

В некоторых вариантах выполнения настоящего изобретения, концентрация защитных соединений в композициях для предварительной лиофилизации может составлять от 2% (мас./об.) до 20% (мас./об.), или от 4% (мас./об.) до 16% (мас./об.), или от 5% (мас./об.) до 15% (мас./об.), или от 6% (мас./об.) до 14% (мас./об.), или от 8% (мас./об.) до 12% (мас./об.).

В некоторых вариантах выполнения настоящего изобретения, концентрация защитных соединений в композициях для предварительной лиофилизации может



составлять 6% (мас./об.), или 8% (мас./об.), или 10% (мас./об.), или 12% (мас./об.), или 14% (мас./об.), или 16% (мас./об.), или 18% (мас./об.), или 20% (мас./об.), или 22% (мас./об.), или 24% (мас./об.).

### Процессы лиофилизации

Процессы лиофилизации могут проводиться в любом подходящем сосуде, таком как стеклянные сосуды или, например, стеклянные флаконы или сосуды с двумя камерами, как известно в фармацевтической области.

В стеклянный сосуд можно ввести стабилизированную композицию на основе липидных наночастиц согласно настоящему изобретению, содержащую защитное соединение. Добавленный в сосуд объем композиции может составлять от 0,1 до 20 мл или от 1 до 10 мл.

Можно использовать любой процесс лиофилизации, в том числе известный в фармацевтической области. Смотрите, например, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., Mack Publishing Co., Easton, Penn. (1990).

Процесс лиофилизации может включать замораживание стабилизированной защитным веществом композиции на основе липидных наночастиц при температуре от около -40 °C до около -30 °C. Замороженную композицию может быть высушенной формой лиофилизированной композиции.

В некоторых вариантах выполнения настоящего изобретения стадия замораживания может снизить температуру от температуры окружающей среды до конечной температуры в течение нескольких минут. Температурный диапазон может составлять около 1 °C/мин.

В некоторых вариантах выполнения настоящего изобретения стадию сушки можно проводить при давлении около 0-250 мТорр, или 50-150 мТорр, при температуре от около -15 °С до около -38 °С. Стадию сушки можно продолжать при более высокой температуре, вплоть до температуры окружающей среды, в течение периода времени до нескольких дней. Уровень остаточной воды в твердом лиофиле может составлять менее около 5% или менее 4% или менее 3% или менее 2% или менее 1% (мас./об.).

Защищенная стабилизированная композиции липидных наночастиц согласно настоящему изобретению, после лиофилизации, может быть восстановлена способами, известными в фармацевтической области.

В некоторых вариантах выполнения настоящего изобретения настоящее изобретение обеспечивает способы ингибирования уровня агрегированных частиц в восстановленном лекарственном продукте, полученном из стабилизированной защищенной композиции на основе липидных наночастиц согласно настоящему изобретению после лиофилизации.

В некоторых вариантах выполнения настоящего изобретения, восстановленный лекарственный продукт, полученный из стабилизированной защищенной композиции на основе липидных наночастиц согласно настоящему изобретению, после лиофилизации может иметь уменьшенный уровень агрегированных частиц.

В некоторых вариантах выполнения настоящего изобретения восстановленный лекарственный препарат, полученный из стабилизированной защищенной композиции на основе липидных наночастиц согласно настоящему изобретению, после лиофилизации может иметь уменьшенные уровни агрегированных частиц с размером более около 0,2 мкм или больше, чем около 0,5 мкм, или больше, чем около 1 мкм.

### Восстановленный лекарственный продукт

Лиофил может быть восстановлен в фармацевтически приемлемом носителе.

Примеры фармацевтически приемлемого носителя включают стерильную воду, воду для инъекции, стерильный нормальный соляной раствор, бактериостатическую воду для инъекции или раствор для распылителя.

Примеры фармацевтически приемлемого носителя включают фармацевтически приемлемый раствор.

Примеры фармацевтически приемлемого носителя включают HEPES буфер, фосфатные буферы, цитратные буферы и буфер, содержащий трис(гидроксиметил)аминометан.

Примеры фармацевтически приемлемого носителя включают фармацевтически приемлемые буферные растворы.

Примеры фармацевтически приемлемого носителя включают буферные растворы малеиновой кислоты, винной кислоты, молочной кислоты, уксусной кислоты, бикарбоната натрия и глицина.

Восстановленный лиофил можно использовать в качестве лекарственного продукта.

Восстановленный лиофил можно дополнительно разбавить изотоническим солевым раствором или другими наполнителями для обеспечения заданной концентрации для введения.

Примеры эксципиентов включают модификаторы тоничности.

Примеры эксципиентов включают стабилизаторы, такие как человеческий сывороточный альбумин, бычий сывороточный альбумин,  $\alpha$ -казеин, глобулины,  $\alpha$ -лактальбумин, LDH, лизоцим, миоглобин, овальбумин и РНКаза.

Примеры эксципиентов включают буферы, такие как ацетат калия, ацетат натрия и бикарбонат натрия.

Примеры эксципиентов включают аминокислоты, такие как глицин, аланины, аргинин, бетаин, лейцин, лизин, глутаминовую кислоту, аспарагиновую кислоту, гистидин, пролин, 4-гидроксипролин, саркозин,  $\gamma$ -аминомасляную кислоту, аланопин, октопин, стромбин и триметиламин N-оксид.

Примеры эксципиентов включают неионные поверхностно-активные вещества, такие как полисорбат 20, полисорбат 80 и полоксамер 407.

Примеры эксципиентов включают диспергирующие агенты, такие как фосфотидилхолин, этаноламин, ацетилтриптофанат, полиэтиленгликоль, поливинилпирролидон, этиленгликоль, глицерин, глицерол, пропиленгликоль, сорбит, ксилит, декстран и желатин.

Примеры эксципиентов включают антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, цистеин, тиоглицерин, тиогликолевая кислота, тиосорбит и глутатион.

Примеры эксципиентов включают восстанавливающие агенты, такие как дитиотреитол, тиолы и тиофены.

Примеры эксципиентов включают хелатирующие агенты, такие как ЭДТА, ЭГТА, глутаминовая кислота и аспарагиновая кислота.

В некоторых вариантах выполнения настоящего изобретения лиофил можно восстановить с применением иглы шприца через флакон, закрытый пробкой. Лиофил можно восстановить с или без встряхивания флакона.

Время восстановления может составлять от 3-30 секунд или более.

В некоторых вариантах выполнения настоящего изобретения восстановленный лекарственный продукт на основе нуклеиновых кислот может содержать менее 0.001% (мас./об.) агрегированных частиц с размером более 0.2 мкм.

В определенных вариантах выполнения настоящего изобретения восстановленный лекарственный продукт на основе нуклеиновых кислот может иметь уменьшенную цитокиновую активацию.

В дополнительных вариантах выполнения лекарственный продукт на основе нуклеиновых кислот может быть восстановлен после периода хранения 6 месяцев и сохранить 80% активности агентов на основе нуклеиновых кислот.

В некоторых вариантах выполнения настоящего изобретения лекарственный продукт на основе нуклеиновых кислот может быть восстановлен после периода хранения шесть месяцев, а средний размер частиц липидных наночастиц может быть менее чем на 25% больше чем перед лиофилизацией.

В некоторых вариантах выполнения настоящего изобретения, лекарственный продукт на основе нуклеиновых кислот может быть восстановлен после периода хранения 24 месяца и сохранять 90% активности агентов на основе нуклеиновых кислот.

В других вариантах выполнения настоящего изобретения, лекарственный продукт на основе нуклеиновых кислот может быть восстановлен после периода хранения 24

месяца, и средний размер частиц липидных наночастиц может быть менее чем на 25% больше чем перед лиофилизацией.

### РНКі молекулы

Количество активного ингредиента, индуцирующего интерференцию РНК, входящего в состав композиции согласно настоящему изобретению, может быть количеством, которое не вызывает неблагоприятного эффекта, превышающего преимущество введения. Такое количество может быть определено с помощью теста *in vitro* с использованием культивируемых клеток или теста на модели животного или млекопитающего, такого как мышь, крыса, собака или свиньи и т.д., и такие методы испытаний известны тем специалисту в данной области. Способы согласно настоящему изобретению могут быть применимы к любому животному, включая людей.

Количество активного ингредиента в форме композиции может варьироваться в зависимости от способа введения агента или композиции. Например, когда для одного введения используют множество единиц композиции, количество активного ингредиента, который содержится в композиции, в одной единице композиции может быть определено путем деления количества активного ингредиента, необходимого для одного введения, на указанное множество единиц.

Молекулы нуклеиновой кислоты и молекулы РНКі согласно настоящему изобретению могут быть доставлены или введены в клетку, ткань, орган или субъекту путем непосредственного применения молекул в липосомальных композициях для содействия, усиления или облегчения проникновения в клетку.

Молекулы нуклеиновой кислоты и молекулы РНКі согласно настоящему изобретению могут быть объединены с катионными липидами, упакованными внутри липосом, и доставляться в клетки-мишени или ткани. Нуклеиновая кислота и

комплексы нуклеиновых кислот могут локально вводиться в соответствующие ткани *ex vivo* или *in vivo* посредством прямого дермального применения, трансдермального применения или инъекции.

Ингибирующую молекулу нуклеиновой кислоты или композицию согласно настоящему изобретению можно вводить в виде стандартной лекарственной формы. Обычную фармацевтическую практику можно использовать для обеспечения подходящих составов или композиций для введения соединений пациентам, страдающим от заболевания. Может быть использован любой подходящий способ введения, например, введение может быть парентеральным, внутривенным, внутриартериальным, подкожным, внутриутробным, внутримышечным, внутричерепным, внутриглазничным, офтальмологическим, внутрижелудочковым, внутripеченочным, внутрикапсулярным, интратекальным, интрацистернальным, внутрибрюшинным, интраназальным, аэрозольным, или пероральным.

Композиции и способы согласно настоящему изобретению могут включать экспрессионный вектор, который включает последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую по меньшей мере одну молекулу РНК<sub>i</sub> согласно настоящему изобретению, таким образом, что позволяет экспрессию молекулы нуклеиновой кислоты.

Молекулы нуклеиновой кислоты и молекулы РНК<sub>i</sub> согласно настоящему изобретению могут быть экспрессированы из единиц транскрипции, вставленных в ДНК или РНК-векторы. Рекомбинантными векторами могут быть ДНК-плазмиды или вирусные векторы.

Например, вектор может содержать последовательности, кодирующие обе нити молекулы РНК<sub>i</sub> дуплекса или одну молекулу нуклеиновой кислоты, которая является самокомплементарной и, таким образом, образует молекулу РНК<sub>i</sub>. Вектор экспрессии может включать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую две или более молекулы нуклеиновых кислот.

Молекула нуклеиновой кислоты может быть экспрессирована в клетках из эукариотических промоторов. Специалисты в данной области техники понимают, что любая нуклеиновая кислота может быть экспрессирована в эукариотических клетках из соответствующего вектора ДНК/РНК.

Липидные композиции можно вводить животным внутривенной, внутримышечной или внутривентриальной инъекцией или перорально или путем ингаляции или другими способами, известными в данной области.

Фармацевтически приемлемые композиции для введения олигонуклеотидов известны и могут применяться.

В одном варианте выполнения вышеописанного способа, ингибирующая молекула нуклеиновой кислоты вводится при дозе около от 5 до 500 мг/м<sup>2</sup>/день, например, 5, 25, 50, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, или 300 мг/м<sup>2</sup>/день.

В некоторых вариантах выполнения настоящего изобретения, ингибирующие молекулы нуклеиновых кислот согласно настоящему изобретению вводятся системно при дозах около от 1 до 100 мг/кг, например, 1, 5, 10, 20, 25, 50, 75, или 100 мг/кг.

В других вариантах выполнения настоящего изобретения, доза может находиться в диапазоне от около 25 до 500 мг/м<sup>2</sup>/день.

Способы, известные в данной области техники, для получения композиций обнаруживаются, например, в "Remington: The Science and Practice of Pharmacy" Ed. A. R. Gennaro, Lippincourt Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa., 2000.

Препараты для парентерального введения могут, например, содержать эксципиенты, стерильную воду или физиологический раствор, полиалкиленовые гликоли, такие как полиэтиленгликоль, масла растительного происхождения или гидрированные



нафталины. Биосовместимый биоразлагаемый лактидный полимер, сополимер лактид/гликолид или сополимеры полиоксиэтилен-полиоксипропилена могут использоваться для контроля высвобождения соединений. Другие потенциально пригодные парентеральные системы доставки для ингибирующих молекул нуклеиновой кислоты включают частицы сополимера этилен-винилацетат, осмотические насосы, имплантируемые инфузионные системы и липосомы. Препараты для ингаляции могут содержать эксципиенты, например лактозу, или могут представлять собой водные растворы, содержащие, например, полиоксиэтилен-9-лауриловый простой эфир, гликохолат и деоксихолат, или могут быть масляными растворами для введения в виде назальных капель или в виде геля.

Препараты могут вводиться пациентам людям в терапевтически эффективных количествах (например, количествах, которые предотвращают, устраняют или уменьшают патологическое состояние), чтобы обеспечить терапию для неопластических заболеваний или состояний. Предпочтительная дозировка нуклеотидного олигомера согласно изобретению может зависеть от таких переменных, как тип и степень нарушения, общее состояние здоровья конкретного пациента, композиция соединений эксципиентов и способ введения.

#### Примеры липидных композиций

В некоторых вариантах выполнения настоящего изобретения, четыре липид-подобных компонента, т.е. одна или более ионизируемых липидных молекул, структурный липид, один или более стабилизирующих липидов, и один или более липидов для уменьшения иммуногенности композиции, могут составлять 100% от липидных компонентов композиции.

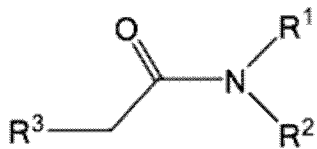
Примеры композиций липидных наночастиц показаны в Таблице 1.

Таблица 1: Композиции липидных компонентов (каждый в мол.% от общего)

Ионизируемый	Катионный	Структурный	Стабилизатор	Уменьшающий иммуногенность
17	0	35	40	8
20	0	35	40	5
25	0	35	39	1
25	0	35	35	5
25	0	30	40	5
25	0	40	30	5
30	0	25	40	5
35	0	25	35	5
40	0	30	25	5
25	5	30	35	5
25	10	30	30	5
25	15	25	30	5

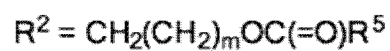
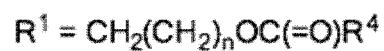
### Ионизируемые липид-подобные молекулы

Примеры ионизируемой молекулы включают соединения, имеющие структуру, показанную в Формуле I



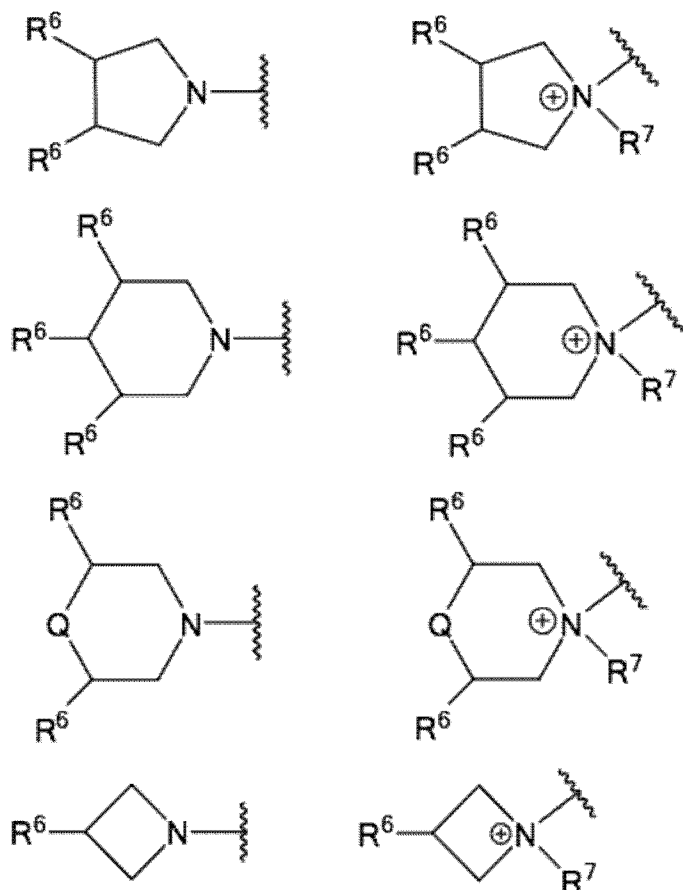
Формула I,

в которой  $R^1$  и  $R^2$  представляют собой

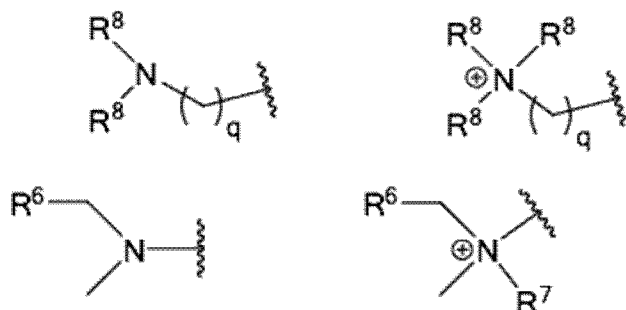


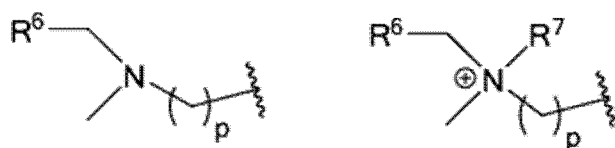
где  $n$  и  $m$  каждый независимо равен от 1 до 2; и  $R^4$  и  $R^5$  независимо друг от друга

представляют собой C(12-20)алкильную группу или C(12-20)алкенильную группу; где R<sup>3</sup> выбирают из 1-азетидинов, 1-пирролидинов, 1-пиперидинов, 4-морфолинов, и 1,4-пиперазинов, где кольца могут быть замещены при любом положении атома углерода,



и могут также быть выбраны из amino и aminoалкильных групп, которые могут быть замещены,





где

каждый  $R^6$  независимо выбирают из H, алкила, гидроксила, гидроксилалкила, алкокси, алкоксиалкокси и аминоалкила;

каждый  $R^7$  независимо выбирают из H, алкила, гидроксилалкила и аминоалкила;

каждый  $R^8$  независимо выбирают из H, алкила, гидроксилалкила и аминоалкила, и любые два  $R^8$  могут образовывать кольцо;

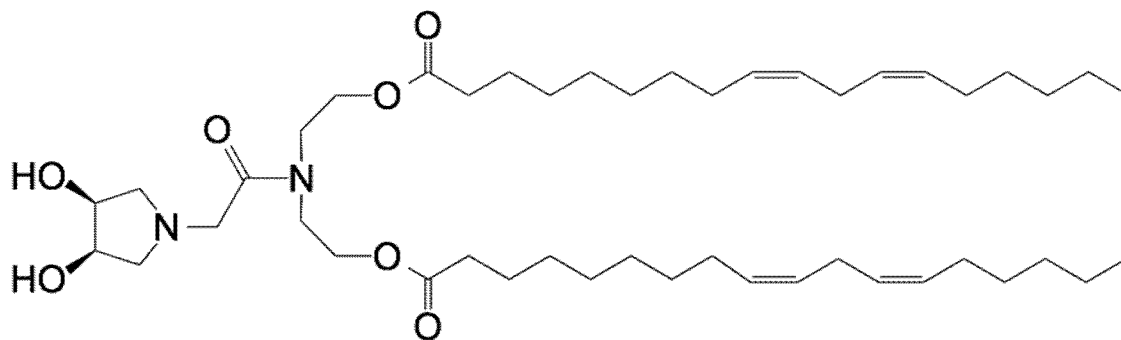
$q$  равно от нуля до четырех;

$Q$  представляет собой O или  $NR^7$ ;

$p$  равно от 1 до 4.

Примеры ионизируемого липида включают следующее соединение:

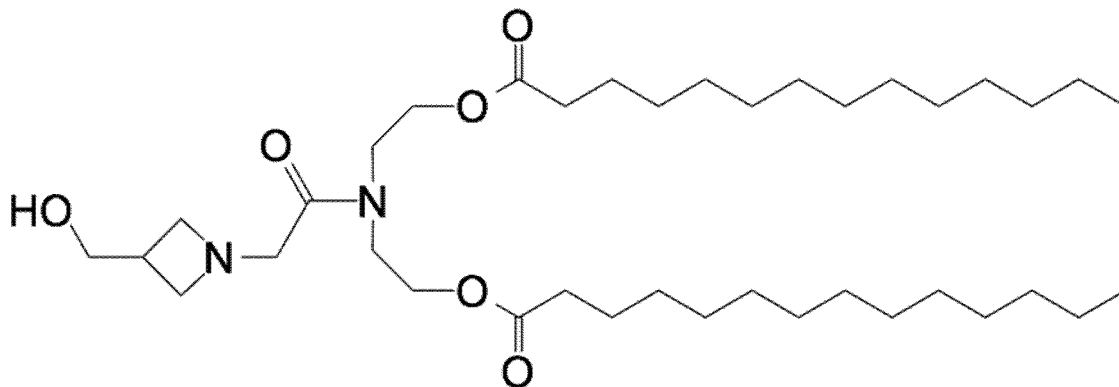
Соединение А6



которое представляет собой ((2-((3*S*,4*R*)-3,4-дигидропирролидин-1-ил)ацетил)азандиил)бис(этан-2,1-диил) (9*Z*,9'*Z*,12*Z*,12'*Z*)-бис(октадека-9,12-диеноат).

Примеры ионизируемого липида включают следующее соединение:

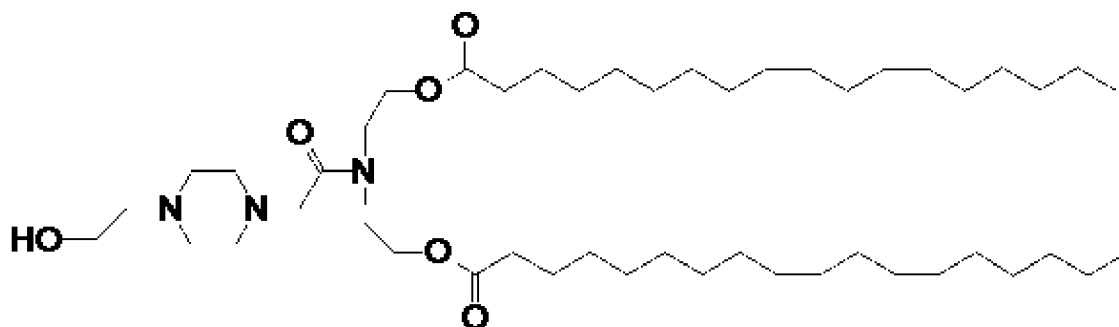
## Соединение А9



которое представляет собой ((2-(3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил)ацетил)азандиил)бис(этан-2,1-диил)дитетрадеканоат.

Примеры ионизируемого липида включают следующее соединение:

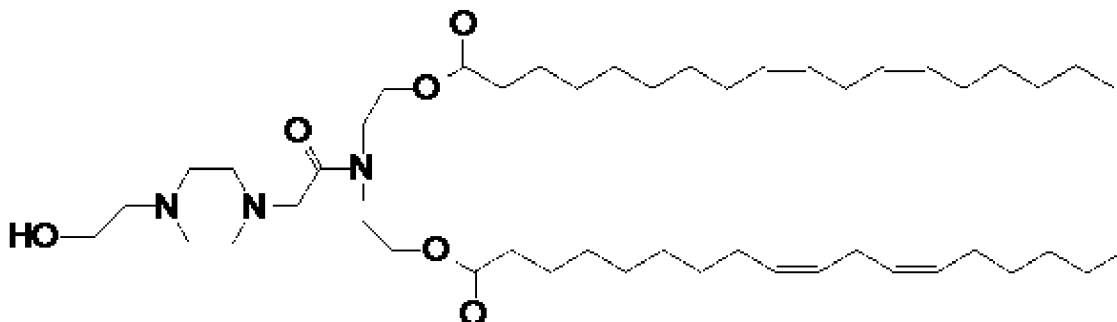
## Соединение АА



которое представляет собой ((2-(4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-ил)ацетил)азандиил)бис(этан-2,1-диил) (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат).

Примеры ионизируемого липида включают следующее соединение:

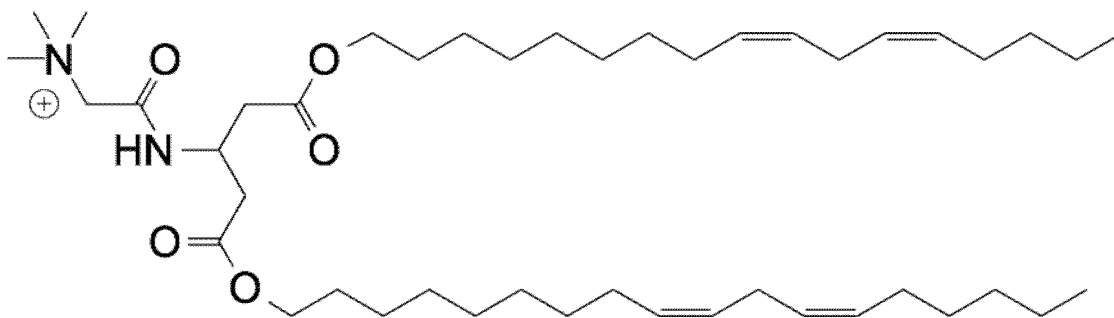
## Соединение АВ



которое представляет собой ((2-(4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-ил)ацетил)азандиил)бис(этан-2,1-диил) (9Z,9'Z,12Z,12'Z)-бис(октадека-9,12-диеноат).

Примеры ионизируемого липида включают следующее соединение:

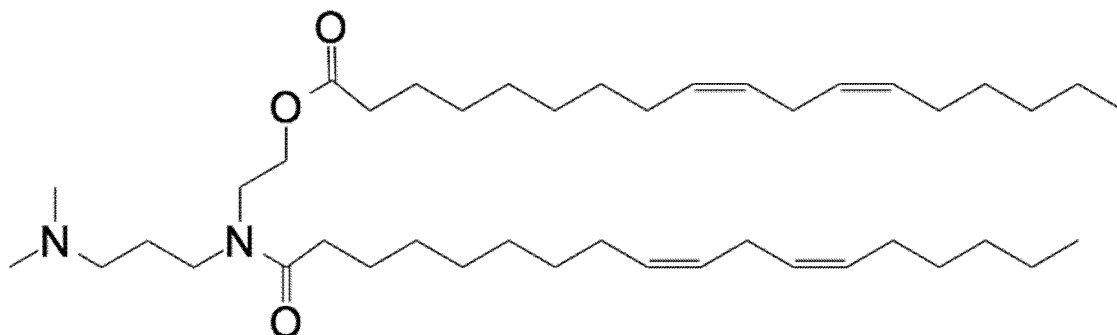
## Соединение С2



которое представляет собой 2-(((1-(((9Z,12Z)-гептадека-9,12-диен-1-ил)окси)-5-(((9Z,12Z)-октадека-9,12-диен-1-ил)окси)-1,5-диоксопентан-3-ил)амино)-N,N,N-триметил-2-оксоэтан-1-аминий.

Примеры ионизируемого липида включают следующее соединение:

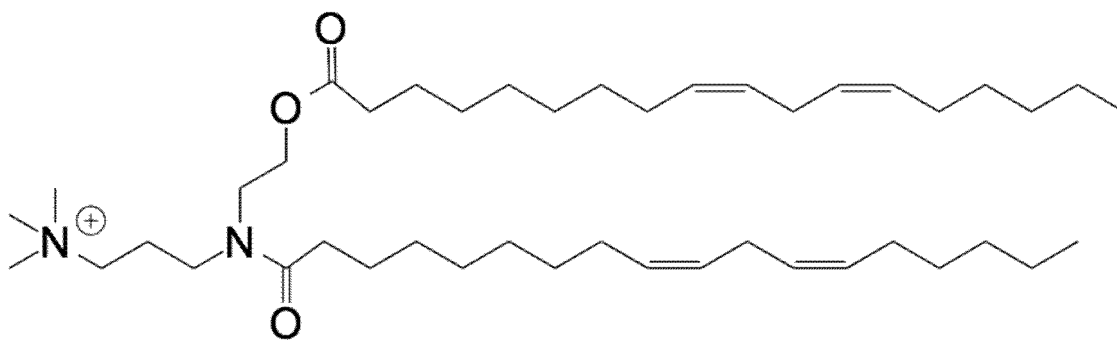
## Соединение F5



которое представляет собой 2-((9Z,12Z)-*N*-(3-(диметиламино)пропил)октадека-9,12-диенамидо)этил (9Z,12Z)-октадека-9,12-диеноат.

Примеры ионизируемого липида включают следующее соединение:

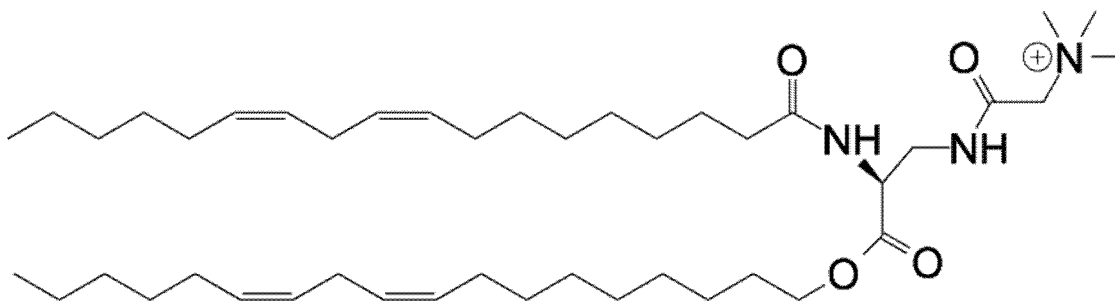
## Соединение F7



которое представляет собой *N,N,N*-триметил-3-((9Z,12Z)-*N*-(2-(((9Z,12Z)-октадека-9,12-диеноил)окси)этил)октадека-9,12-диенамидо)пропан-1-аминий.

Примеры ионизируемого липида включают следующее соединение:

## Соединение С24



которое представляет собой *N,N,N*-триметил-2-(((*S*)-3-(((9*Z*,12*Z*)-октадека-9,12-диен-1-ил)окси)-2-((9*Z*,12*Z*)-октадека-9,12-диенамидо)-3-оксопропил)амино)-2-оксоэтан-1-аминий.

### Структурные липиды

Примеры структурных липидов включают холестерины, стерины и стероиды.

Примеры структурных липидов включают холаны, холестаны, эргостаны, кампестаны, пориферастаны, стигмастаны, горгостаны, ланостаны, гонаны, эстраны, андростаны, прегнаны и циклоартаны.

Примеры структурных липидов включают стерины и зоостерины, такие как холестерин, ланостерин, зимостерин, зимостенол, десмостерол, стигмастанол, дигидроланостерин и 7-дегидрохолестерин.

Примеры структурных липидов включают ПЭГилированные холестерин и холестан 3-оксо-(C1-22)ацильные соединения, например, холестерил ацетат, холестерил арахидонат, холестерил бутират, холестерил гексаноат, холестерил мирилат, холестерил пальмитат, холестерил бегенат, холестерил стеарат, холестерил каприлат, холестерил *n*-деcanoат, холестерил додеcanoат, холестерил нервонат, холестерил



пеларгонат, холестерил н-валерат, холестерил олеат, холестерил элаидат, холестерил эрукат, холестерил гептаноат, холестерил линолелаидат и холестерил линолеат.

Примеры структурных липидов включают стерины, такие как фитостерины, бетаситостерин, кампестерин, эргостерин, брассикастерин, дельта-7-стигмастерин и дельта-7-авенастерин.

### Стабилизирующие липиды

Примеры стабилизирующих липидов включают цвиттерионные липиды.

Примеры стабилизирующих липидов включают соединения, такие как фосфолипиды.

Примеры фосфолипидов включают фосфатидилхолин, фосфатидилэтанолламин, фосфатидилсерин, фосфатидилинозитол, фосфатиновая кислота, пальмитоилолеоил фосфатидилхолин, лизофосфатидилхолин, лизофосфатидилэтанолламин, дипальмитоилфосфатидилхолин, диолеоилфосфатидилхолин, дистеароилфосфатидилхолин или дилинолеоилфосфатидилхолин.

Примеры стабилизирующих липидов включают фосфатидилэтанолламиновые соединения и фосфатидилхолиновые соединения.

Примеры стабилизирующих липидов включают 1,2-диолеоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (DOPC).

Примеры стабилизирующих липидов включают дифитаноилфосфатидилэтанолламин (DPhPE) и 1,2-дифитаноил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (DPhPC).

Примеры стабилизирующих липидов включают 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DSPC), 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DPPC), 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин(DPPE), и 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин(DOPE).

Примеры стабилизирующих липидов включают 1,2-дилауроил-sn-глицерин (DLG); 1,2-димиристоил-sn-глицерин (DMG); 1,2-дипальмитоил-sn-глицерин (DPG); 1,2-дистеароил-sn-глицерин (DSG); 1,2-диарахидоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DAPC); 1,2-дилауроил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DLPC); 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DMPC); 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-О-этил-3-фосфохолин (DPePC); 1,2-дилауроил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин(DLPE); 1,2- димиристоил -sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин(DMPE); 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин(DSPE); 1-пальмитоил-2-линолеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин; 1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (POPC); 1-пальмитоил-2-лизо-sn-глицеро-3-фосфохолин (P-Lyso-PC); и 1-стеароил-2-лизо-sn-глицеро-3-фосфохолин (S-Lyso-PC).

#### Липиды для уменьшения иммуногенности

Примеры липидов для уменьшения иммуногенности включают полимерные соединения и конъюгаты полимер-липид.

Примеры липидов для уменьшения иммуногенности включают ПЭГилированные липиды, имеющие полиэтиленгликолевые (ПЭГ) области. ПЭГ области могут иметь любую молекулярную массу. В некоторых вариантах выполнения настоящего изобретения, ПЭГ область может иметь молекулярную массу 200, 300, 350, 400, 500, 550, 750, 1000, 1500, 2000, 3000, 3500, 4000 или 5000 Да.

Примеры липидов для уменьшения иммуногенности включают соединения, имеющие метоксиполиэтиленгликолевую область.

Примеры липидов для уменьшения иммуногенности включают соединения, имеющие карбонил-метоксиполиэтиленгликолевую область.

Примеры липидов для уменьшения иммуногенности включают соединения, имеющие мультиразветвленную ПЭГ область.

Примеры липидов для уменьшения иммуногенности включают соединения, имеющие полиглицериновую область.

Примеры липидов для уменьшения иммуногенности включают полимерные липиды, такие как DSPE-мПЭГ, DMPE-мПЭГ, DPPE-мПЭГ, и DOPE-мПЭГ.

Примеры липидов для уменьшения иммуногенности включают ПЭГ-фосфолипиды и ПЭГ-церамиды.

#### Катионные липиды

Примеры катионных липидов включают HEDC соединения, описанные в US 2013/022665 A1, и другие соединения, описанные в US 2013/0330401 A1 и US 2013/0115274 A1. Дополнительные примеры катионных липидов известны в данной области техники.

#### Композиции на основе наночастиц

Варианты выполнения настоящего изобретения могут обеспечить композиции липосомальных наночастиц.

В некоторых вариантах выполнения настоящего изобретения, ионизируемая молекула согласно настоящему изобретению может применяться для образования липосомальных композиций, которые могут иметь бислои липид-подобных молекул.

Композиция на основе наночастиц может иметь одну или более ионизируемых молекул согласно настоящему изобретению в липосомальной структуре, структуре бислоя мицелле, ламеллярной структуре или их смеси.

В некоторых вариантах выполнения настоящего изобретения, композиция может включать один или более компонентов жидкого носителя. Жидкий носитель, подходящий для доставки активных агентов согласно настоящему изобретению, может представлять собой фармацевтически приемлемый жидкий носитель. Жидкий носитель может включать органический растворитель или комбинацию воды и органического растворителя.

Варианты выполнения настоящего изобретения могут обеспечить липидные наночастицы, имеющие размер от 10 до 1000 нм. В некоторых вариантах выполнения настоящего изобретения, липосомальные наночастицы могут иметь размер от 10 до 150 нм.

В некоторых вариантах выполнения настоящего изобретения, липосомальные наночастицы согласно настоящему изобретению могут инкапсулировать РНК<sub>i</sub> молекулу и удерживать по меньшей мере 80% инкапсулированных РНК<sub>i</sub> молекул после 1 часа воздействия сывороткой человека. Настоящее изобретение может обеспечить композицию для применения для распределения активного агента в клетках, тканях или органах, организмах и субъектах, где композиция включает одну или более ионизируемых липидных молекул согласно настоящему изобретению.

Композиции согласно настоящему изобретению может включать одну или более ионизируемых липидных молекул, наряду с структурным липидом, один или более стабилизирующих липидов, и один или более липидов для уменьшения иммуногенности композиции.

Ионизируемые липидные молекулы согласно настоящему изобретению могут составлять любые мол.% от композиции согласно настоящему изобретению.

Ионизируемые липидные молекулы композиции согласно настоящему изобретению могут составлять от 15 мол.% до 40 мол.% от липидных компонентов композиции. В некоторых вариантах выполнения настоящего изобретения, ионизируемые липидные молекулы композиции могут составлять от 20 мол.% до 35 мол.% от липидных компонентов композиции. В других вариантах выполнения настоящего изобретения, ионизируемые липидные молекулы композиции могут составлять от 25 мол.% до 30 мол.% от липидных компонентов композиции.

Структурный липид композиции согласно настоящему изобретению может составлять от 25 мол.% до 40 мол.% от липидных компонентов композиции. В некоторых вариантах выполнения настоящего изобретения, структурный липид композиции может составлять от 30 мол.% до 35 мол.% от липидных компонентов композиции.

Сумма стабилизирующих липидов композиции согласно настоящему изобретению может составлять от 25 мол.% до 40% мол.% от липидных компонентов композиции. В некоторых вариантах выполнения настоящего изобретения, сумма стабилизирующих липидов композиции может составлять от 30 мол.% до 40 мол.% от липидных компонентов композиции.

В некоторых вариантах выполнения настоящего изобретения, композиция согласно настоящему изобретению может включать два или более стабилизирующих липида, где каждый из стабилизирующих липидов по отдельности может составлять от 5 мол.% до 35 мол.% от липидных компонентов композиции. В некоторых вариантах выполнения настоящего изобретения, композиция согласно настоящему изобретению может включать два или более стабилизирующих липида, где каждый из стабилизирующих липидов по отдельности может составлять от 10 мол.% до 30 мол.% от липидных компонентов композиции.

В некоторых вариантах выполнения настоящего изобретения, сумма одного или более стабилизирующих липидов может составлять от 25 мол.% до 40 мол.% от липидов композиции, каждый из стабилизирующих липидов по отдельности может составлять от 5 мол.% до 35% мол.%.

В некоторых вариантах выполнения настоящего изобретения, сумма одного или более стабилизирующих липидов может составлять от 30 мол.% до 40 мол.% от липидов композиции, каждый из стабилизирующих липидов по отдельности может составлять от 10 мол.% до 30% мол.%.

Один или более липидов для уменьшения иммуногенности композиции могут составлять в общем от 1 мол.% до 8 мол.% от липидных компонентов композиции. В некоторых вариантах выполнения настоящего изобретения, один или более липидов для уменьшения иммуногенности композиции могут составлять в общем от 1 мол.% до 5 мол.% от липидных компонентов композиции.

В дополнительных вариантах выполнения, композиция согласно настоящему изобретению может дополнительно включать катионный липид, который может составлять от 5 мол.% до 25 мол.% от липидных компонентов композиции. В некоторых вариантах выполнения настоящего изобретения, композиция согласно настоящему изобретению может дополнительно включать катионный липид, который может составлять от 5 мол.% до 15 мол.% от липидных компонентов композиции. В этих вариантах выполнения, молярное соотношение концентраций молекул катионного липида и ионизируемого липида композиции согласно настоящему изобретению может составлять от 5:35 до 25:15.

В композициях согласно настоящему изобретению, совокупность липидных компонентов может включать один или более ионизируемых липидных молекулярных компонентов, один или более структурных липидов, один или более стабилизирующих липидов, и один или более липидов для уменьшения иммуногенности композиции.

В некоторых вариантах выполнения настоящего изобретения, композиция может содержать ионизируемый липид соединение А6, структурный липид холестерин, стабилизирующие липиды DOPC и DOPE, и липид для уменьшения иммуногенности DPPE-мПЭГ. В некоторых вариантах выполнения настоящего изобретения, соединение А6 может составлять от 15 до 25 мол.% от композиции; холестерин, DOPC, и DOPE в комбинации могут составлять от 75 до 85 мол.% от композиции; и DPPE-мПЭГ может составлять 5 мол.% от композиции.

В одном варианте выполнения настоящего изобретения, соединение А6 может составлять 25 мол.% от композиции; холестерин может составлять 30 мол.% от композиции, DOPC может составлять 20 мол.% от композиции, DOPE может составлять 20 мол.% от композиции; и DPPE-мПЭГ(2000) может составлять 5 мол.% от композиции.

#### Фармацевтические композиции

Настоящее изобретение также охватывает способы распределения активного агента в орган субъекта для лечения заболевания посредством введения субъекту композиции согласно настоящему изобретению. Органы, которые можно лечить, включают легкие, печень, поджелудочную железу, почки, толстую кишку, кости, кожу и кишечник.

В других вариантах выполнения настоящее изобретение обеспечивает диапазон фармацевтических композиций.

Фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может включать активный агент, а также носитель для лекарственного средства или липид согласно настоящему изобретению, наряду с фармацевтически приемлемым носителем или разбавителем. В общем, активные агенты согласно настоящему изобретению включают любые активные агенты для злокачественных опухолей, включая любые

ингибирующие молекулы нуклеиновых кислот и любые низкомолекулярные лекарственные средства. Примеры ингибирующих молекул нуклеиновых кислот включают рибозимы, антисмысловые нуклеиновые кислоты и РНК интерферирующие молекулы (РНКi молекулы).

Фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может содержать один или более каждого из следующего: поверхностно-активный агент, разбавитель, эксципиент, консервант, стабилизатор, краситель и суспендирующий агент.

Некоторые фармацевтические носители, разбавители и компоненты для фармацевтической композиции, а также способы получения и введения соединений и композиций согласно настоящему изобретению описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., Mack Publishing Co., Easton, Penn. (1990).

Примеры консервантов включают бензоат натрия, аскорбиновую кислоту и сложные эфиры п-гидроксibenзойной кислоты.

Примеры поверхностно-активных агентов включают спирты, сложные эфиры, сульфатированные алифатические спирты.

Примеры эксципиентов включают сахарозу, глюкозу, лактозу, крахмал, кристаллизованную целлюлозу, маннит, легкий безводный силикат, алюминат магния, алюминат метасиликат магния, синтетический силикат алюминия, карбонат кальция, кислый карбонат натрия, гидрофосфат кальция и кальция карбоксиметилцеллюлоза

Примеры суспендирующих агентов включают кокосовое масло, оливковое масло, кунжутное масло, арахисовое масло, сою, целлюлозы ацетат фталат, метилацетат-метакрилатный сополимер и сложные эфиры фталатов.



Терапевтическая композиция согласно настоящему изобретению для доставки одной или более молекул, активных для подавления активности гена, может вводиться млекопитающему, нуждающемуся в этом. Терапевтически эффективное количество композиции и активного агента, который может быть инкапсулирован в липосоме, может быть введено млекопитающему для профилактики или лечения злокачественной опухоли.

Путь введения может быть локальным или системным.

Терапевтически эффективная композиция согласно настоящему изобретению может вводиться различными путями, включая внутривенный, внутрибрюшинный, внутримышечный, подкожный и пероральный.

Пути введения могут включать, например, парентеральную доставку, включая внутримышечную, подкожную, внутривенную, интрамедуллярную инъекции, а также интратекальную, прямую внутрижелудочковую, внутрибрюшинную, интраназальную или внутриглазную инъекции.

Композиция может быть введена в виде лекарственных форм с замедленным или контролируемым высвобождением, включающих инъекции веществ замедленного всасывания, осмотические помпы и тому подобное для пролонгированного и/или рассчитанного по времени, импульсного введения с заданной скоростью.

Композиция согласно настоящему изобретению может вводиться различными способами, включая как пероральный, так и парентеральные способы, и примеры этого включают, но не ограничиваются этим: пероральный, внутривенный, внутримышечный, подкожный, местный, внутрилегочный, трахеобронхиальный, интратрахеальный, внутрибронхиальный, назальный, интаректальный, внутриартериальный, внутрипортальный, интравентрикулярный, интрамедуллярный, внутрь лимфатического узла, внутрилимфатический, внутрицеребральный,

интратекальный, интрацеребровентрикулярный, трансмукозальный, чрескожный, интраназальный, внутрибрюшинный и внутриматочный способы, и она может быть составлена в лекарственной форме, подходящей для каждого способа введения. Такая лекарственная форма и метод составления могут быть выбраны как соответствующие из любой известной лекарственной формы и способа (см., например, *Hyojun Yakuzaiigaku, Standard Pharmaceutics, Ed. by Yoshiteru Watanabe et al., Nankodo, 2003.*

Примеры лекарственных форм, подходящих для перорального введения, включают, но без ограничения к этому, следующие: порошок, гранула, таблетка, капсула, жидкость, суспензия, эмульсия, гель и сироп, и примеры лекарственных форм, подходящих для парентерального введения, включают инъекции, такие как раствор для инъекции, суспензия для инъекции, эмульсия для инъекции и инъекция, которая должна быть приготовлена непосредственно перед использованием. Композиции для парентерального введения могут быть в форме, такой как водный или неводный изотонический стерильный раствор или суспензия.

Фармацевтические составы для парентерального введения, например, путем болюсной инъекции или непрерывной инфузии, включают водные растворы активных композиций в водорастворимой форме. Суспензии активных соединений могут быть получены в виде подходящих масляных суспензий для инъекций. Водные суспензии для инъекций могут содержать вещества, повышающие вязкость суспензии, такие как натрий-карбоксиметилцеллюлоза, сорбит или декстран. Возможно, суспензия также может содержать подходящие стабилизаторы или агенты, повышающие растворимость соединений, что позволяет получать высококонцентрированные растворы

Составы для инъекции могут находиться в дозированной лекарственной форме, например в ампулах или в многодозовых контейнерах с добавленным консервантом. Композиции могут находиться в таких формах, как суспензии, растворы или эмульсии в масляных или водных растворителях, и могут содержать

вспомогательные вещества, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие агенты. В качестве альтернативы активный компонент может находиться в форме порошка для разбавления подходящим растворителем, например, стерильной апиrogenной водой перед применением.

В дополнение к составам, описанным ранее, композиции также могут быть изготовлены в виде депо-препарата. Указанные составы длительного действия могут быть введены путем внутримышечной инъекции. Таким образом, например, композиции могут быть изготовлены совместно с подходящими полимерными или гидрофобными веществами, например, в виде эмульсии в подходящем масле, или ионообменными смолами, или в виде умеренно растворимых производных, например, в виде умеренно растворимой соли.

Композиции и составы согласно настоящему изобретению могут также быть приготовлены для местной доставки и могут наноситься на кожу субъекта с применением с применением любых подходящих способов нанесения средства для местной доставки. Например, композиция может наноситься в ручную, с применением аппликатора или способом, который включает и то и другое. После нанесения композиция может вводиться в кожу субъекта, например, путем втирания. Нанесение может осуществляться множество раз каждый день или один раз каждый день. Например, композиция может наноситься на кожу субъекта один раз в день, дважды в день или множество раз в день или может наноситься один раз каждые два дня, один раз каждые три дня или около одного раза каждую неделю, один раз за каждые две недели или один раз за каждые несколько недель.

Композиции или фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению могут быть введены субъекту любыми подходящими способами. Неограничивающие примеры способов введения включают в том числе: (a) введение путем инъекции, подкожно, интраперитонеально, внутривенно, внутримышечно, внутрикожно, интраорбитально, интракапсулярно, интраспинально, интрастернально или тому подобное, включая доставку посредством инфузионной помпы; (b) локальное

введение, например, путем инъекции напрямую в область почки или сердца, например, путем имплантации депо; а также местное введение; по усмотрению специалиста в данной области для приведения активного соединения в контакт с живой тканью.

Точный состав, способ введения и дозировка фармацевтических композиций могут быть выбраны лечащим врачом с учетом состояния пациента. Смотрите, например, Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 12<sup>th</sup> Ed., Sec. 1, 2011. Как правило, диапазон доз композиции, вводимой пациенту, может составлять от примерно 0.5 до примерно 1000 мг/кг массы тела пациента. Доза может представлять собой однократную дозу или серию двух или более доз, вводимых в течение одного или более дней, в зависимости от того, что необходимо пациенту. В тех случаях, когда человеческие дозы соединений были определены по меньшей мере для какого-либо состояния, дозы будут приблизительно такими же или составлять от примерно 0.1% до примерно 500%, более предпочтительно от примерно 25% до примерно 250% от определенной человеческой дозы. В случае, когда человеческая доза не определена, как будет в случае вновь открываемых фармацевтических композиций, подходящая человеческая доза может быть получена из значений ED<sub>50</sub> или ID<sub>50</sub> или других подходящих значений, полученных в результате исследований *in vitro* или *in vivo*, определенных исследованиями токсичности и исследованиями эффективности у животных.

### Примеры

**Пример 1:** Получение siРНК композиций лекарственного средства на основе липидных наночастиц посредством лиофилизации и восстановления.

Липидные наночастицы были синтезированы высокоскоростным впрыскиванием раствора липид/этанол в буферный раствор siРНК в течение примерно 10 минут. После этого второй буфер, выбранный из цитратного буфера с рН 6,1, PBS с рН 7,0, Tris с рН 7,2 и HEPES с рН 7,4, подвергали диафильтрации и использовали в качестве

внешнего буфера через картриджи TFF для получения конечной водной суспензии продукта.

К водной суспензии конечного продукта добавляли различные количества защитных соединений с последующей фильтрацией 0,2/0,8 микрон. Липидные наночастицы готовили в партиях по 500 мл или 1000 мл.

Результаты: Неожиданно было обнаружено, что липидные наночастицы пережили процесс лиофилизации, и что лиофил обеспечил восстановленную суспензию липидных наночастиц со средним размером частиц, близким к размеру, который присутствовал в исходной суспензии.

**Пример 2:** Восстановленные лекарственные препараты siРНК в соответствии с настоящим изобретением демонстрируют стабильный размер частиц и инкапсуляцию siРНК, которые пригодны для использования в лекарственных препаратах. Удивительный уровень стабильности составов siРНК согласно настоящему изобретению вызван свойствами защищенной композиции для лиофилизации.

В этом исследовании siРНК, нацеленная на Hsp47, была получена в виде композиции с липосомальными наночастицами со следующим приблизительным составом: ионизируемые липиды, 40 мол.%, DOPE, 30 мол.%, холестерин, 25 мол.%, и ПЭГ-DMPE, 5.0 мол. %.

Композиции на основе наночастиц лиофилизировали с защитной композицией, содержащей сахарозу и (2-гидроксипропил)-β-циклодекстрин. Общее содержание защитной композиции составляло 10% (мас./об.). Применяемыми количествами были 6% сахарозы и 4% (2-гидроксипропил)-β-циклодекстрина. Таким образом, содержание (2-гидроксипропил)-β-циклодекстрина составляло 40% (мас./об.) от общего количества сахарозы плюс (2-гидроксипропил)-β-циклодекстрина.

Липидные наночастицы были синтезированы путем высокоскоростного впрыска раствора липид/этанол в буферный раствор siРНК, чтобы получить конечную водную суспензию продукта. Начальный объемный состав siРНК-содержащих наночастиц имел средний размер частиц наночастиц 99-101 нм.

Лиофилизированные восстановленные лекарственные композиции siРНК протестировали на стабильность размера частиц и инкапсулирование siРНК.

В целом, наиболее предпочтительно, чтобы композиции siРНК на основе наночастиц проявляли менее чем около 10% изменение среднего размера частиц между состоянием до лиофилизации и лиофилизированным восстановленным состоянием. Кроме того, наиболее предпочтительно, чтобы композиции siРНК на основе наночастиц демонстрировали по меньшей мере около 85% эффективности инкапсуляции siРНК лиофилизированного восстановленного состояния.

Стабильность восстановленных продуктов siРНК на основе наночастиц приведена в таблице 2. В таблице 2 показаны средний размер частиц и эффективность инкапсуляции siРНК после лиофилизации (AL) и восстановления, а также аналогичные результаты, полученные для замороженного, оттаиваемого раствора перед лиофилизацией (BL).

Таблица 2: Стабильность наночастиц перед лиофилизацией и после восстановления

Защитное соединение в общем % (мас./об.)	Z(средний) (ни)		PDI		Дзета потенциал (мВ)		% EE		[siРНК] мг/мл
	BL	AL	BL	AL	BL	AL	BL	AL	
10% (A)*	105	108	0.140	0.167	-1.4	-1.7	91	86	1.9
10% (B)	106	110	0.156	0.138	-1.8	-1.7	92	87	2.0
10% (C)	106	108	0.150	0.165	-2.0	-1.7	92	87	1.9

Защитное соединение в общем % (мас./об.)	Z(средний) (ни)		PDI		Дзета потенциал (мВ)		% EE		[siРНК] мг/мл
	BL	AL	BL	AL	BL	AL	BL	AL	
10% (D)	105	111	0.146	0.157	-1.7	-2.4	92	85	1.8
10% (A)	106	111	0.134	0.149	-1.5	-1.1	93	88	3.7
12.5% (A)	106	112	0.165	0.186	-1.7	-1.6	93	87	3.7
15% (A)	105	112	0.170	0.141	-1.3	-1.1	93	87	3.6
15% (A)	106	116	0.140	0.149	-1.3	-0.5	93	88	4.4
15% (B)	105	116	0.154	0.157	-1.3	-0.7	93	88	4.4
15% (C)	105	118	0.151	0.150	-1.1	-0.8	93	88	4.5

\* В Таблице 2, применяли (2-гидроксипропил)- $\beta$ -циклодекстрин) защитное соединение из четырех различных коммерческих источников А, В, С и D.

В Таблице 2 все защитные композиции демонстрируют подходящую стабильность конечных восстановленных лекарственных композиций siРНК. За исключением образцов с самыми высокими уровнями концентрации siРНК и защитным средством в общем (15%), композиции siРНК на основе наночастиц показали менее 10% изменение среднего размера частиц между состоянием до лиофилизации и лиофилизированным восстановленным состоянием, а также, по меньшей мере, 85% эффективности инкапсулирования siРНК лиофилизированного восстановленного состояния.

Результаты, приведенные в таблице 2, показывают, что восстановленные лекарственные композиции siРНК согласно настоящему изобретению, которые были получены из композиций на основе наночастиц путем лиофилизации из защитной композиции, содержащей 60% сахарозы и 40% (2-гидроксипропил)- $\beta$ -циклодекстрина, были преимущественно стабильны в отношении среднего размера частиц и эффективности инкапсуляции siРНК.

**Пример 3:** Модель фиброза печени крыс, индуцированного диметилнитрозамином (DMN).

Восстановленные лекарственные композиции siРНК согласно настоящему изобретению проявляли сильную и удивительную активность при подавлении активности генов *in vivo*. Наблюдался нокдаун *in vivo* с лиофилизированными и восстановленными композициями siРНК. siРНК, инкапсулированные в липосомальную композицию, использовались в модели фиброза печени крыс, индуцированного диметилнитрозамином (DMN).

siРНК, нацеленная на Hsp47 (GP46), была получена в виде композиции с липосомальными наночастицами со следующим приблизительным составом: ионизируемые липиды, 40 мол.%, DOPE, 30 мол.%, холестерин, 25 мол.%, и ПЭГ-DMPE, 5,0 мол.%.

Композиции на основе наночастиц были лиофилизированы с защитной композицией, содержащей сахарозу и (2-гидроксипропил)- $\beta$ -циклодекстрин. Общее содержание защитного соединения составляло 10% (мас./об.). Содержание (2-гидроксипропил)- $\beta$ -циклодекстрина варьировалось от 20% до 40% (мас./об.).

Образцы были получены в виде свежего лиофилизированного в тот же день кека, хранящегося при  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Образцы восстанавливали солевым раствором и дополнительно разбавляли солевым раствором до концентрации 0,17 мг/мл siРНК. Время восстановления составляло около 20 секунд при объеме 3 мл.

Конечные восстановленные растворы лекарственного продукта Hsp47 siРНК, протестировали на активность *in vivo*, что является строгим испытанием на жизнеспособность лиофилизированных восстановленных наночастиц, содержащих агент на основе нуклеиновых кислот.



В этом исследовании использовались крысы Naivve Sprague Dawley в десяти группах из 7-8 самцов с диапазоном массы 180-200 г. Использовали жидкую лекарственную форму с PBS при pH 7,4. В день дозирования перед введением композицию восстанавливали и разбавляли, используя солевой раствор, до концентраций по группам. Замороженную контрольную композицию оттаивали и разбавляли за один день до введения. Количество DMN для достижения 5 мг/мл прозрачного раствора для дозирования в день инъекции добавляли к PBS при pH 7,4. Введение осуществлялось путем внутрибрюшинной инъекции. Дозирование было QD, день 1-3, в течение 3 последовательных дней. Доза составляла 0,5-1,5 мг/кг (siРНК) с использованием диапазона концентраций композиции 0,17 - 0,5 мг/мл с вводимым объемом 3 мл/кг. Крыс взвешивали до введения DMN, и животным вводили на день 1-3 внутрибрюшинно 10 мг/кг DMN (раствор при 5 мг/мл) с объемом дозирования 2 мл/кг. На 4-6 день животных вводили DMN с объемом дозирования 1 мл/кг. В день 5 DMN-обработанные животные были рандомизированы в группы по массе тела (день 5) до введения лекарственного средства. Испытуемый образец вводили в день 6 (первым днем инъекции DMN был день 1). В день 7 получили крысиную печень и сразу же промыли PBS, pH 7,4 (40 мл со скоростью 20 мл/мин), через обрезанную печеночную портальную вену. Из левых боковых долек собирали одну поперечную секцию печени толщиной 2 мм.

Оценка нокдауна gp46 mРНК. Общую РНК из печени крыс экстрагировали с применением RNeasy колонок (Qiagen). РНК количественно оценивали с применением спектрофотометра Nanodrop.

Как показано на Фиг.1, восстановленная лекарственная композиция siРНК согласно настоящему изобретению, которая была защищена 40% (2-гидроксипропил)- $\beta$ -циклодекстрина, проявляла сильную и удивительную активность при подавлении активности гена Hsp47 (GP46) *in vivo*.

В частности, *in vivo* эффективность подавления гена Hsp47 (GP46) композиции, защищенной 40% (2-гидроксипропил)- $\beta$ -циклодекстрином, по существу составляла 100%.

Напротив, проявляемая эффективность *in vivo* композиций, содержащих от 20% до 30% (2-гидроксипропил)- $\beta$ -циклодекстрина, была неприемлемо низкой в отношении нокдауна гена, составляя только 47% и 32% соответственно.

Таким образом, неожиданно преимущественный результат показывает, что защитные композиции для лиофилизации липосомальных композиций siРНК согласно настоящему изобретению могут быть получены с по меньшей мере 40% (2-гидроксипропил)- $\beta$ -циклодекстрина в композиции, содержащей сахарозу и (2-гидроксипропил) - $\beta$ - циклодекстрин.

Физическая характеристика показала, что воссозданные лекарственные композиции siРНК согласно настоящему изобретению, которые были получены из наночастиц, путем лиофилизации из защитной композиции, содержащей от около 40% до около 70% (2-гидроксипропил)- $\beta$ -циклодекстрина и остальную сахарозу, были преимущественно стабильными в отношении среднего размера частиц. Ниже около 40% (2-гидроксипропил)- $\beta$ -циклодекстрина композиции имели тенденцию к аномально повышенным значениям инкапсуляции, что свидетельствует о нежелательных структурных изменениях. Таким образом, предпочтительный диапазон для (2-гидроксипропил)- $\beta$ -циклодекстрина составлял от около 40% до около 70%.

В заключение, восстановленная лекарственная композиция siРНК в соответствии с настоящим изобретением использует от 40% до 70% (2-гидроксипропил)- $\beta$ -циклодекстрина с удивительной эффективностью для лекарственного агента на основе нуклеиновых кислот *in vivo*.

**Пример 4:** Восстановленные лекарственные композиции siРНК согласно настоящему изобретению проявляли достаточную концентрацию в плазме для подавления активности гена *in vivo*. Фармакокинетика в плазме лиофилизированных и восстановленных siРНК композиций наблюдалась *in vivo*.

siРНК, нацеленная на Hsp47 (GP46), была получена в виде композиции с липосомальными наночастицами со следующим приблизительным составом: ионизируемые липиды, 40 мол.%, DOPE, 30 мол.%, холестерин, 25 мол.%, и ПЭГ-DMPE, 5.0 мол.%.

Композиции на основе наночастиц были лиофилизированы с защитной композицией, содержащей сахарозу и (2-гидроксипропил)- $\beta$ -циклодекстрин. Общее содержание защитного соединения составляло 12.5% (мас./об.). Содержание (2-гидроксипропил)- $\beta$ -циклодекстрина составляло 40% (мас./об.) защитного соединения в общем, остальное составляла сахароза.

PK профили в плазме оценивали на крысах Sprague Dawley после внутривенного введения при уровне однократной дозы лиофилизированной композиции по сравнению с замороженной композицией. Концентрации siРНК в образцах плазмы определяли методом ELISA на основе гибридизации. Крысам Sprague-Dawley вводили препарат с помощью двойного катетера яремную вену. Животным вводили однократную внутривенную инъекцию болюсной дозы через один катетер в яремной вене в течение 15 секунд на день 1. Приблизительно 0,30 мл цельной крови собирали из катетера яремной вены каждого животного в пробирки K2EDTA в каждый момент времени.

Как показано на Фиг.2, фармакокинетика концентрации в плазме лиофилизированной восстановленной лекарственной композиции siРНК по существу была такой же как и у сравнительной контрольной композиции, которая была только заморожена. Лيوфилизированная, восстановленная композиция лекарственного

средства на основе нуклеиновой кислоты siРНК обеспечивала удивительно эффективные уровни лекарственного средства в плазме.

Для этого эксперимента площадь под кривой концентрация-время (AUC) и пиковая концентрация в плазме (C<sub>max</sub>) после однократной дозы показаны в таблице 3.

Таблица 3: Фармакокинетика в плазме лиофилизированных восстановленных композиций на основе нуклеиновых кислот

	Восстановленная	Замороженная
AUC	2751	2683
C <sub>max</sub>	2922	3350

В заключение, этот эксперимент показывает, что фармакокинетика концентрации в плазме лиофилизированной восстановленной композиции лекарственного средства на основе нуклеиновой кислоты по существу такая же, как и у сравнительной положительной контрольной композиции, которая была только заморожена. Таким образом, лиофилизированная восстановленная композиция лекарственного средства на основе нуклеиновой кислоты siРНК обеспечивала удивительно эффективные уровни лекарственного средства в плазме и не деградировала относительно нелиофилизированной композиции.

**Пример 5:** Защита липидных наночастиц в 100 нм диапазоне размера.

Липидные наночастицы синтезировали с диспергированием раствора липид/этанол в буфер siРНК, чтобы получить водную суспензию конечного продукта. У наночастиц был средний размер 105-106 нм. Наночастицы синтезировали с использованием соединения HEDC в виде ионизируемого липида (смотрите, например, US 2013/022665 A1). Наночастицы инкапсулировали siРНК, нацеленную на Hsp47.

В таблице 4 показаны характеристики наночастиц перед лиофилизацией, где водная суспензия конечного продукта была просто заморожена, затем разморожена. В таблице 5 показаны характеристики наночастиц после лиофилизации.

Увеличение среднего размера частиц из Таблицы 4 в Таблицу 5 составляет лишь 6,7%.

Таблица 4: Характеристики наночастиц перед лиофилизацией (100 нм диапазон размера)

№	Сахароза/2HPBCD (мас.%/мас.%)	До лиофилизации (замороженная)					
		Z(среднее) (нм)	PDI	Дзета потенциал (мВ)	EE (%)	[siPHK] (мг/мл)	Выход (%)
1	6/4	105	0.14	-1.4	91	2.1	103
2	6/4	106	0.16	-1.8	92	2.1	105
3	6/4	106	0.15	-2.0	92	2.1	104
4	6/4	105	0.15	-1.7	92	2.1	104
5	6/4	106	0.14	-1.3	93	5.1	101
6	6/4	105	0.15	-1.3	93	4.9	99
7	6/4	105	0.15	-1.1	93	5.2	103
8	6/4	106	0.16	-0.9	93	5.2	104

Таблица 5: Характеристики наночастиц после лиофилизации (100 нм диапазон размера)

№	Сахароза/2HPBCD (мас.%/мас.%)	После лиофилизации (восстановленная)					
		Z(среднее) (нм)	PDI	Дзета потенциал (мВ)	EE (%)	[siPHK] (мг/мл)	Выход (%)
1	6/4	108	0.17	-1.7	86	1.9	94

№	Сахароза/2HPBCD (мас.%/мас.%)	После лиофилизации (восстановленная)					
		Z(среднее) (нм)	PDI	Дзета потенциал (мВ)	ЕЕ (%)	[siРНК] (мг/мл)	Выход (%)
2	6/4	110	0.14	-1.7	87	2.0	98
3	6/4	108	0.16	-1.7	87	1.9	95
4	6/4	111	0.16	-2.4	85	1.8	92
5	6/4	116	0.15	-0.5	88	4.4	88
6	6/4	116	0.16	-0.7	88	4.4	89
7	6/4	118	0.15	-0.8	88	4.5	90
8	6/4	114	0.12	-1.3	87	4.42	88

В дополнительном тесте девять растворов конечного продукта, содержащих 6% (мас./об.) сахарозы, 4% (мас./об.) (2-гидроксипропил)- $\beta$ -циклодекстрина, и концентрацию siРНК, нацеленной на Hsp47, равную 2 мг/мл, протестировали на увеличение среднего размера частиц при лиофилизации и восстановлении. После лиофилизации восстановленные лекарственные продукты показали удивительно небольшое увеличение среднего размера частиц менее 5%, от 102 нм до 107 нм, по сравнению с растворами конечного продукта перед лиофилизацией.

**Пример 6:** Защита липидных наночастиц в 50 нм диапазоне размера.

Липидные наночастицы синтезировали высокоскоростным впрыскиванием раствора липид/этанол в siРНК буфер, с получением водной суспензии конечного продукта. Наночастицы имели средний размер 48-50 нм. Наночастицы синтезировали с применением соединения А6 в качестве ионизируемого липида. Наночастицы инкапсулировали siРНК, нацеленную на Hsp47, при 2 мг/мл.

В Таблице 6 показаны характеристики наночастиц перед лиофилизацией (BL) и после лиофилизации (AL) наночастиц в 50 нм диапазоне.

Таблица 6: Характеристики наночастиц до и после лиофилизации наночастиц в 50 нм диапазоне

Сахароза/2HPBCD (мас.%/мас,%)	Z(среднее) (нм)		PDI		Дзета потенциал (мВ)		% EE	
	BL	AL	BL	AL	BL	AL	BL	AL
5/5	48	53	0.07	0.13	-2.3	-3.3	76	66
6/4	48	51	0.07	0.14	-2.8	-4.8	81	68
12/0	50	75	0.08	0.25	-4.9	-2.0	86	81

**Пример 7:** Защита siРНК липидных наночастиц для длительного хранения.

Восстановленные лекарственные композиции siРНК согласно настоящему изобретению проявляли длительную стабильность в отношении подавления активности гена *in vivo*.

siРНК, нацеленную на Hsp47 (GP46), получили в виде композиции с липосомальными наночастицами со следующим приблизительным составом: ионизируемые липиды, 40 мол.%, DOPE, 30 мол.%, холестерин, 25 мол.%, и ПЭГ-DMPE, 5.0 мол.%.

Композиции на основе наночастиц были лиофилизированы с защитной композицией, содержащей сахарозу и (2-гидроксипропил)- $\beta$ -циклодекстрин. Общее содержание защитного соединения составляло от 10% до 12.5%, до 15% (мас./об.). Содержание (2-гидроксипропил)- $\beta$ -циклодекстрина составляло 40% (мас./об.), сахарозы - 60%. Циклодекстрином был CAVITRON W7 HP5 PHARMA циклодекстрин.

Ампулы хранили при температуре, указанной в таблице 7, в течение 4 недель. После хранения и восстановления средний размер наночастиц (PS, Z-среднее) был неожиданно стабильным, как показано в таблице 7.

Как показано в Таблице 7, размер наночастиц siРНК находился в пределах 4% от их размера в первоначальной композиции.

Таблица 7: Характеристики наночастиц

Общее содержание защитного соединения в образце %	Температура -20С				Температура 5С			
	Начальный Z-средний		1 месяц Z-средний		Начальный Z-средний		1 месяц Z-средний	
	Z-средний	PDI	Z-средний	PDI	Z-средний	PDI	Z-средний	PDI
10	103	0.12	99	0.15	103	0.12	102	0.14
12.5	101	0.13	101	0.15	101	0.13	100	0.16
15	102	0.13	---	---	102	0.13	102	0.15
10	100	0.13	99	0.17	100	0.13	96	0.16
12.5	95	0.16	94	0.14	95	0.16	94	0.14
15	96	0.13	95	0.13	96	0.13	96	0.13
10	95	0.15	95	0.16	95	0.15	96	0.15
12.5	95	0.15	92	0.11	95	0.15	93	0.14
15	94	0.13	92	0.14	94	0.13	91	0.14

**Пример 8:** Защита siРНК липидных наночастиц для длительного хранения.

Восстановленные лекарственные композиции siРНК согласно настоящему изобретению проявляли длительную стабильность в отношении подавления активности гена *in vivo*.



siPHK, нацеленные на Hsp47 (GP46), были получены в виде композиции с липосомальными наночастицами со следующим приблизительным составом: ионизируемые липиды, 40 мол.%, DOPE, 30 мол.%, холестерин, 25 мол.%, и ПЭГ-DMPE, 5.0 мол.%.

Композиции на основе наночастиц были лиофилизированы с защитной композицией, содержащей сахарозу и (2-гидроксипропил)- $\beta$ -циклодекстрин. Общее содержание защитного соединения составляло от 10% до 12.5%, до 15% (мас./об.). Содержание (2-гидроксипропил)- $\beta$ -циклодекстрина составляло 40% (мас./об.), сахарозы - 60%. Циклодекстрином был CAVITRON W7 HP7 PHARMA циклодекстрин.

Ампулы хранили при температуре, указанной в таблице 8, в течение 4 недель. После хранения и восстановления средний размер наночастиц (PS, Z-среднее) был неожиданно стабильным, как показано в таблице 8.

Как показано в Таблице 8, размер наночастиц siPHK находился в пределах 5% от их размера в первоначальной композиции.

Таблица 8: Характеристики наночастиц

Общее содержание защитного соединения в образце %	Температура -20C				Температура 5C			
	Начальное Z-среднее		1 месяц Z-среднее		Начальное Z-среднее		1 месяц Z-среднее	
	Z-среднее	PDI	Z-среднее	PDI	Z-среднее	PDI	Z-среднее	PDI
10	103	0.11	99	0.14	103	0.11	99	0.15
12.5	101	0.14	99	0.15	101	0.14	98	0.15
15	102	0.15	---	---	102	0.15	97	0.14
10	96	0.13	95	0.13	96	0.13	93	0.13
12.5	94	0.12	91	0.12	94	0.12	91	0.13

Общее содержание защитного соединения в образце %	Температура -20С				Температура 5С			
	Начальное Z-среднее		1 месяц Z-среднее		Начальное Z-среднее		1 месяц Z-среднее	
	Z-среднее	PDI	Z-среднее	PDI	Z-среднее	PDI	Z-среднее	PDI
10	103	0.11	99	0.14	103	0.11	99	0.15
15	94	0.13	89	0.14	94	0.13	91	0.14
10	94	0.15	89	0.15	94	0.15	89	0.13
12.5	91	0.15	87	0.13	91	0.15	88	0.14
15	90	0.14	86	0.15	90	0.14	87	0.12

Все публикации, патенты и литература, упомянутые в настоящей заявке, включены в посредством ссылки во всей их полноте для всех целей.

1. Понятно, что настоящее изобретение не ограничивается конкретной методологией, протоколами, веществами и реагентами, поскольку они могут различаться. Следует также понимать, что используемая в настоящей заявке терминология предназначена только для описания конкретных вариантов выполнения изобретения и не предназначена для ограничения объема настоящего изобретения. Специалисту в данной области техники будет очевидно, что различные изменения и модификации могут быть сделаны для описания, раскрытого в настоящей заявке, без отклонения от объема и сущности описания, и что эти варианты выполнения изобретения находятся в пределах объема этого описания и прилагаемой формулы изобретения.
2. Следует отметить, что как используется в описании и в прилагаемой формуле изобретения, формы единственного числа включают множественное число, если из контекста явно не следует иное. Кроме того, в настоящей заявке могут быть взаимозаменяемы форма единственного числа, выражение «один или более» и выражение «по меньшей мере один». Следует также отметить, что

термины «содержит», «содержащий», «включающий», «включая» и «имеющий», могут использоваться взаимозаменяемо и должны читаться экспансивно и без ограничения.

3. Раскрытие диапазонов значений в настоящей заявке предназначено только для использования в качестве условного способа для индивидуальной ссылки на каждое отдельное значение, попадающее в диапазон, если не указано иное, и каждое отдельное значение включено в описание, как если бы оно было отдельно указано в настоящей заявке. В отношении групп Маркуша специалистам в данной области техники очевидно, что описание настоящей заявки включает в себя отдельные члены, а также подгруппы членов группы Маркуша.

Без дальнейшего уточнения полагают, что специалист в данной области может на основе вышеприведенного описания использовать настоящее изобретение в полной мере. Следовательно, следующие конкретные варианты осуществления должны толковаться как просто иллюстративные, а не ограничивающие объем настоящего изобретения каким-либо образом.

Все признаки, раскрытые в описании настоящей заявки, могут быть комбинированы в любой комбинации. Каждый признак, раскрытый в описании настоящего изобретения, может быть заменен альтернативным признаком, служащим той же, эквивалентной или аналогичной цели.

## Формула изобретения

1. Композиция для получения твердого лиофила липидных наночастиц, содержащая один или более активных агентов на основе нуклеиновых кислот, причем композиция содержит:

водную суспензию липидных наночастиц в фармацевтически приемлемом растворе, где липидные наночастицы инкапсулируют один или более активных агентов на основе нуклеиновых кислот;

соединение декстрина; и

сахаридное соединение сахара.

2. Композиция по п. 1, в которой общее количество соединений декстрина и сахара составляет от 2% до 20% (мас./об.) композиции.

3. Композиция по п. 1, в которой соединение декстрина составляет от 40 % до 70% (мас./об.) от общего количества соединений декстрина и сахара.

4. Композиция по п. 1, в которой соединение декстрина составляет от 40 % до 55% (мас./об.) от общего количества соединений декстрина и сахара.

5. Композиция по п. 1, в которой соединение декстрина составляет от 40% до 45% (мас./об.) от общего количества соединений декстрина и сахара.

6. Композиция по п. 1, где при лиофилизации и восстановлении композиции, средний размер наночастиц находится в пределах 10% от их размера в первоначальной композиции.

7. Композиция по п. 1, где при лиофилизации, хранении и восстановлении композиции, средний размер наночастиц находится в пределах 10% от их размера в первоначальной композиции.

8. Композиция по п. 7, где лиофилизированная композиция хранится при 5°C в течение по меньшей мере одного месяца.
9. Композиция по п. 7, где лиофилизированная композиция хранится при -20°C в течение по меньшей мере одного месяца.
10. Композиция по п. 1, в которой наночастицы имеют средний диаметр от 45 нм до 110 нм.
11. Композиция по п. 1, в которой концентрация активных агентов на основе нуклеиновых кислот составляет от 1 мг/мл до 10 мг/мл.
12. Композиция по п. 1, в которой липидные наночастицы содержат соединение, выбранное из соединения А6, соединения А9, соединения АА, соединения АВ, соединения С2, соединения F5, соединения F7, и соединения С24.
13. Композиция по п. 1, в которой одним или более активными агентами на основе нуклеиновых кислот являются РНКi молекулы, способные опосредовать РНК интерференцию.
14. Композиция по п. 13, в которой РНКi молекулами являются siРНК, shРНК, ddРНК, piРНК, или gasiРНК.
15. Композиция по п. 1, в которой одним или более активными агентами на основе нуклеиновых кислот являются miРНК, антисмысловые РНК, плазмиды, гибридные олигонуклеотиды или аптамеры.
16. Композиция по п. 1, в которой фармацевтически приемлемым раствором является HEPES буфер, фосфатный буфер, цитратный буфер или буфер, содержащий трис(гидроксиметил)аминометан.

17. Композиция по п. 1, в которой соединением декстрина является циклодекстрин.

18. Композиция по п. 17, в которой соединение циклодекстрина имеет одно или более из 2, 3 и 6 гидроксильных положений, замещенные сульфоалкильными, бензолсульфоалкильными, ацетоалкильными, гидроксиалкильными, гидроксиалкилсукцинатными, гидроксиалкилмалонатными, гидроксиалкилглутаратными, гидроксиалкиладипатными, гидроксиалкильными, гидроксиалкилмалеатными, гидроксиалкилоксалатными, гидроксиалкилфумаратными, гидроксиалкилцитратными, гидроксиалкилтартратными, гидроксиалкилмалатными или гидроксиалкилцитратонатными группами.

19. Композиция по п. 17, в которой соединением циклодекстрина является (2-гидроксипропил)- $\beta$ -циклодекстрин, 2-гидроксипропил- $\beta$ -циклодекстрин сукцинат, (2-гидроксипропил)- $\gamma$ -циклодекстрин, или 2-гидроксипропил- $\gamma$ -циклодекстрин сукцинат.

20. Композиция по п. 17, в которой соединением циклодекстрина является сульфобутиловый простой эфир  $\beta$ -циклодекстрина или сульфобутиловый простой эфир  $\gamma$ -циклодекстрина.

21. Композиция по п. 17, в которой соединением циклодекстрина является метил- $\beta$ -циклодекстрин или метил- $\gamma$ -циклодекстрин.

22. Композиция по п. 17, в которой соединение циклодекстрина присоединено к полимерной цепи или сети.

23. Композиция по п. 17, в которой соединение циклодекстрина включает адсорбируемое соединение.

24. Композиция по п. 23, в которой адсорбируемое соединение выбирают из холестерина, ланостерина, зимостерина, зимостенола, демостерола, стигмастанолола, дигидроланостерина, 7-дегидрохолестерина, пегилированного холестерина, холестерилацетата, холестериларахидоната, холестерилбутирата, холестерилгексаноата, холестерилмиристана, холестерилпальмитата, холестерилбегената, холестерилстеарата, холестерилкаприлата, холестерил н-деканата, холестерилдодеканата, холестерилнервоната, холестерилпеларгоната, холестерил н-валерата, холестерилолеата, холестерилэлаидата, холестерилэруката, холестерилгептаноата, холестериллинолеата, холестериллинолеата, бета-ситостерина, кампестерина, эргостерина, брассикастерина, дельта-7-стигмастерина, и дельта-7-авенастерина.

25. Композиция по п. 1, в которой сахаридное соединение сахара представляет собой моносахаридное или дисахаридное соединение сахара.

26. Композиция по п. 25, в которой соединение сахара выбирают из сахарозы, лактозы, лактулозы, мальтозы, трегалозы, целлобиозы, койбиозы, сакебиозы, изомальтозы, софорозы, ламинарибиозы, гентибиозы, туранозы, мальтулозы, изомальтулозы, генцибиулозы, маннобиозы, мелибиозы, мелибиулозы и ксилобиозы.

27. Способ получения твердого лиофила одного или более активных агентов на основе нуклеиновых кислот, причем способ включает лиофилизацию композиции по любому из п.п. 1-26.

28. Твердый лиофил, полученный способом по п. 27.

29. Способ получения лекарственного продукта, включающий восстановление твердого лиофила по п.28.

30. Лекарственный продукт, полученный способом по п. 29.

31. Способ получения лекарственного продукта на основе нуклеиновых кислот, причем способ включает:
- синтез липидных наночастиц, где липидные наночастицы инкапсулируют один или более активных агентов на основе нуклеиновых кислот;
  - обеспечение водной суспензии липидных наночастиц в фармацевтически приемлемом растворе;
  - добавление соединения декстрина в раствор, содержащий липидные наночастицы;
  - добавление сахаридного соединения сахара в раствор, содержащий липидные наночастицы;
  - лиофилизацию раствора, содержащего липидные наночастицы, с образованием таким образом твердого лиофила;
  - восстановление лиофила в фармацевтически приемлемом носителе, с образованием таким образом лекарственного продукта на основе нуклеиновых кислот.
32. Способ по п. 31, в котором общее количество соединений декстрина и сахара составляет от 2% до 20% (мас./об.) от раствора, содержащего липидные наночастицы.
33. Способ по п. 31, в котором соединение декстрина составляет от 40% до 70% (мас./об.) от общего количества соединений декстрина и сахара.
34. Способ по п. 31, в котором соединение декстрина составляет от 40% до 55% (мас./об.) от общего количества соединений декстрина и сахара.
35. Способ по п. 31, в котором соединение декстрина составляет от 40% до 45% (мас./об.) от общего количества соединений декстрина и сахара.
36. Способ по п. 31, в котором при восстановлении средний размер наночастиц находится в пределах 10% от их размера при синтезе.



37. Способ по п. 31, дополнительно содержащий хранение лиофила перед восстановлением.

38. Способ по п. 37, в котором при хранении и восстановлении лиофила средний размер наночастиц в пределах 10% от их размера при синтезе.

39. Способ по п. 37, в котором лиофил хранится при 5°C в течение по меньшей мере одного месяца.

40. Способ по п. 37, в котором лиофил хранится при -20°C в течение по меньшей мере одного месяца.

41. Способ по п. 31, в котором наночастицы имеют средний диаметр от 45 нм до 110 нм.

42. Способ по п. 31, в котором концентрация активных агентов на основе нуклеиновых кислот составляет от 1 мг/мл до 10 мг/мл.

43. Способ по п. 31, в котором одним или более активными агентами на основе нуклеиновых кислот являются РНК-молекулы, способные опосредовать РНК-интерференцию.

44. Способ по п. 31, в котором фармацевтически приемлемым раствором является HEPES-буфер, фосфатный буфер, цитратный буфер или буфер, содержащий трис(гидроксиэтил)аминометан.

45. Способ по п. 31, в котором соединением декстрина является циклодекстрин.

46. Способ по п. 45, в котором соединение циклодекстрина имеет одно или более из 2, 3 и 6 гидроксильных положений, замещенные сульфоалкильными,

бензолсульфоалкильными, ацетоалкильными, гидроксиалкильными, гидроксиалкилсукцинатными, гидроксиалкилмалонатными, гидроксиалкилглутаратными, гидроксиалкиладипатными, гидроксиалкильными, гидроксиалкилмалеатными, гидроксиалкилоксалатными, гидроксиалкилфумаратными, гидроксиалкилцитратными, гидроксиалкилтартратными, гидроксиалкилмалатными или гидроксиалкилцитратонатными группами.

47. Способ по п. 45, в котором соединением циклодекстрина является (2-гидроксипропил)- $\beta$ -циклодекстрин, 2-гидроксипропил- $\beta$ -циклодекстрин сукцинат, (2-гидроксипропил)- $\gamma$ -циклодекстрин, или 2-гидроксипропил- $\gamma$ -циклодекстрин сукцинат.

48. Способ по п. 45, в котором соединением циклодекстрина является сульфобутиловый простой эфир  $\beta$ -циклодекстрина или сульфобутиловый простой эфир  $\gamma$ -циклодекстрина.

49. Способ по п. 45, в котором соединением циклодекстрина является метил- $\beta$ -циклодекстрин или метил- $\gamma$ -циклодекстрин.

50. Способ по п. 45, в котором соединение циклодекстрина включает адсорбируемое соединение.

51. Способ по п. 31, в котором сахаридное соединение сахара представляет собой моносахаридное или дисахаридное соединение сахара.

52. Способ по п. 31, где фармацевтически приемлемым носителем является стерильная вода, вода для инъекции, стерильный нормальный соляной раствор, бактериостатическая вода для инъекции или раствор для распылителя.

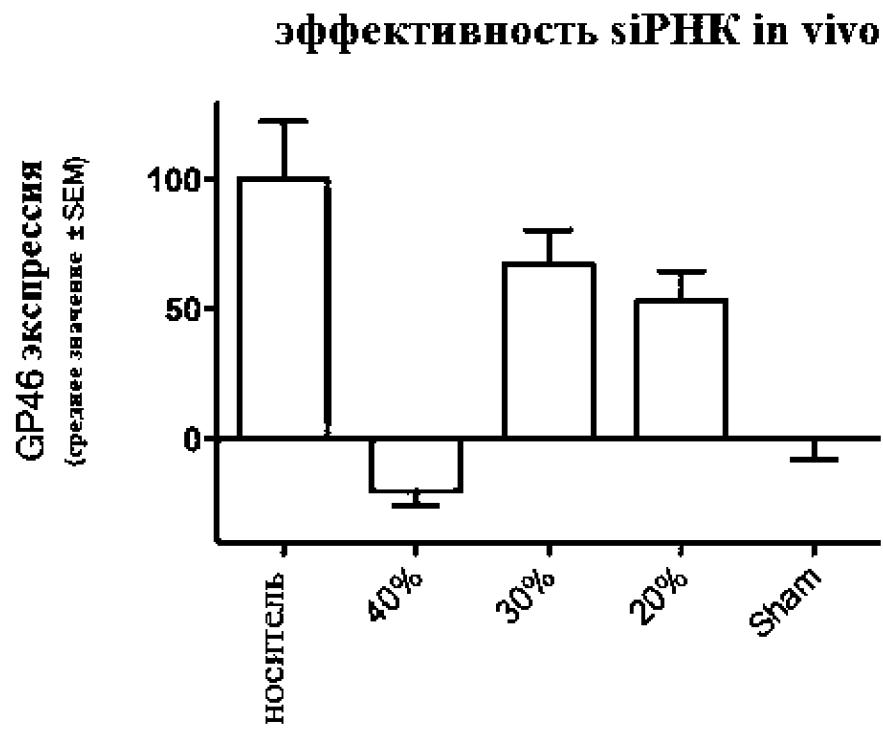
53. Способ по п. 31, где фармацевтически приемлемый носитель представляет собой фармацевтически приемлемый раствор.

54. Способ по п. 31, где восстановленный лекарственный продукт на основе нуклеиновых кислот имеет менее 0.001% (мас./об.) агрегированных частиц с размером более 0.2 мкм.

55. Способ по п. 31, где лекарственный продукт на основе нуклеиновой кислоты восстанавливается в течение периода времени от 3 до 30 секунд.

56. Способ по п. 31, где лекарственный продукт на основе нуклеиновой кислоты восстанавливается после периода хранения в течение шести месяцев и сохраняет 80% активности агентов на основе нуклеиновых кислот.

Фиг. 1



Фиг.2

