



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103987847 B

(45)授权公告日 2017.06.16

(21)申请号 201280061076.4

(22)申请日 2012.10.18

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 103987847 A

(43)申请公布日 2014.08.13

(30)优先权数据  
61/548,598 2011.10.18 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日  
2014.06.11

(86)PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2012/060875 2012.10.18

(87)PCT国际申请的公布数据  
W02013/059496 EN 2013.04.25

(73)专利权人 迪克纳制药公司  
地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 鲍勃·达勒·布朗  
苏伊特·库马尔·巴苏  
大卫·施瓦茨 阿利斯特·弗雷泽

(74)专利代理机构 中原信达知识产权代理有限  
责任公司 11219

代理人 刘慧 杨青

(51)Int.Cl.  
C12N 15/11(2006.01)  
A61K 9/127(2006.01)  
A61K 38/54(2006.01)

(56)对比文件  
WO 2010/054405 A1,2010.05.14,说明书第  
135页,权利要求3-13,摘要.

WO 2008/004058 A2,2008.01.10,说明书第  
21页第1-5行、第31页末段,摘要.

WO 2011/141705 A1,2011.11.17,说明书第  
89页第15-20行、第121页第15-20行,权利要求1、  
32、50-58,实施例16、43.

WO 2011/022460 A1,2011.02.24,全文.

审查员 马俊凯

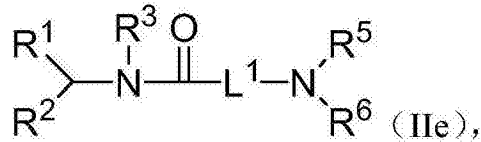
权利要求书2页 说明书67页  
序列表2页 附图25页

(54)发明名称  
胺阳离子脂质及其用途

(57)摘要

本发明涉及脂质化合物及其用途。具体地，所述化合物包括具有胺部分、例如氨基-胺或氨基-酰胺部分的一类阳离子脂质。所述脂质化合物用于在体内或体外递送一种或多种剂(例如，聚阳离子有效载荷或反义有效载荷，例如RNAi剂)。

1. 一种具有下式的化合物或其药学可接受的盐：



其中

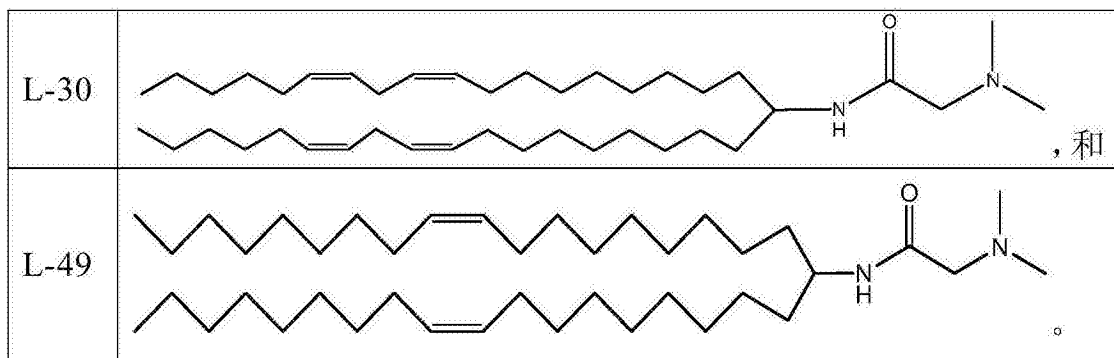
每个 $\text{R}^1$ 和 $\text{R}^2$ 独立地为取代的或未取代的 $\text{C}_{11-24}$ 烷基、或者取代的或未取代的 $\text{C}_{11-24}$ 烯基、或者取代的或未取代的 $\text{C}_{11-24}$ 炔基；

$\text{R}^3$ 是H；

$\text{L}^1$ 是取代的或未取代的 $\text{C}_{1-2}$ 亚烷基；并且

每个 $\text{R}^5$ 和 $\text{R}^6$ 是甲基。

2. 一种化合物或其药学可接受的盐，所述化合物选自由以下组成的组：



3. 一种制剂，其包含权利要求2所述的化合物或其药学可接受的盐，所述制剂还包含阳离子脂质、中性脂质、甾醇衍生物和dsRNA。

4. 一种药物组合物，其包含权利要求1或2的化合物或其药学可接受的盐；和药学可接受的赋形剂。

5. 权利要求1或2的化合物在制备药物中的应用，所述药物用于治疗疾病，其中所述疾病是癌症，并且

其中所述癌症选自肝细胞癌、肺癌、前列腺癌或成神经细胞瘤。

6. 权利要求1或2的化合物在制备药物中的应用，所述药物通过以下方法用于调节受试者中靶核酸的表达，所述方法包括施用足以减少所述受试者中所述靶基因表达的量的权利要求1或2的化合物或其药学可接受的盐，

其中所述方法包括减少所述受试者中所述靶基因的表达，

其中所述靶基因选自由以下组成的组：ABL1、AR、 $\beta$ -连环蛋白、BCL1、BCL2、BCL6、CBFA2、CBL、CSF1R、ERBA1、ERBA2、ERBB1、ERBB2、ERBB3、ERBB4、ETS1、ETS2、ETV6、FGR、FOS、FYN、HCR、HRAS、JUN、KRAS、LCK、LYN、MET、MDM2、MLL1、MLL2、MLL3、MYB、MYC、MYCL1、MYCN、NRAS、PIM1、PML、RET、SRC、TAL1、TAL2、TCL3、TCL5、YES、BRCA1、BRCA2、MADH4、MCC、NF1、NF2、RB1、TP53、WT1、ApoB100、CSN5、CDK6、ITGB1、TGF $\beta$ 1、细胞周期蛋白D1、PLK1和KIF1-结合蛋白。

7. 权利要求3的制剂在制备药物中的应用，所述药物通过以下方法用于调节受试者中靶核酸的表达，所述方法包括施用足以减少所述受试者中所述靶基因表达的量的权利要求3的制剂，

其中所述方法包括减少所述受试者中所述靶基因的表达，

其中所述靶基因选自由以下组成的组：ABL1、AR、 $\beta$ -连环蛋白、BCL1、BCL2、BCL6、CBFA2、CBL、CSF1R、ERBA1、ERBA2、ERBB1、ERBB2、ERBB3、ERBB4、ETS 1、ETS2、ETV6、FGR、FOS、FYN、HCR、HRAS、JUN、KRAS、LCK、LYN、MET、MDM2、MLL1、MLL2、MLL3、MYB、MYC、MYCL1、MYCN、NRAS、PIM1、PML、RET、SRC、TAL1、TAL2、TCL3、TCL5、YES、BRCA1、BRCA2、MADH4、MCC、NF1、NF2、RB1、TP53、WT1、ApoB100、CSN5、CDK6、ITGB1、TGF $\beta$ 1、细胞周期蛋白D1、PLK1和KIF1-结合蛋白。

## 胺阳离子脂质及其用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2011年10月18日提交的美国临时申请号61/548,598的权益,其公开内容通过引用整体并入本文。

[0003] 发明背景

[0004] 本发明部分涉及胺阳离子脂质化合物及其制剂,以及其递送治疗剂、例如核酸分子至细胞的用途。

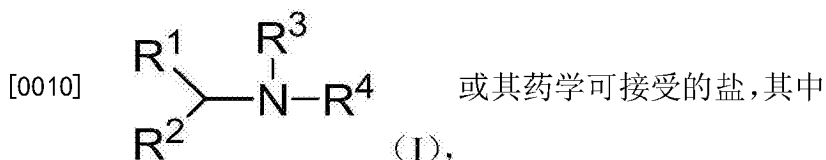
[0005] 核酸分子因为其尺寸和亲水性而不能容易地穿过细胞膜。因此,递送已经成为核酸治疗、例如反义有效载荷和RNAi技术的主要挑战中的一个。为了在系统施用之后触发RNA酶H活性或RNAi活性,含有核酸分子的制剂不仅必须(1)防止载荷的酶促和非酶促降解并(2)提供制剂的适当生物分布,而且必须(3)允许制剂的细胞摄取或内化并(4)促进核酸有效载荷递送至细胞的细胞质。在上述标准1和2方面优异的许多制剂在标准3和4方面有缺陷,因此许多核酸制剂显示了优良的生物分布,但是由于缺乏系统递送和局部递送而未能敲除靶基因。

[0006] 因此,需要用于递送治疗剂、例如RNAi剂的新化合物。具体地,可以在脂质颗粒制剂中使用能够发挥阳离子脂质作用的化合物以递送核酸有效载荷至细胞。

[0007] 发明概述

[0008] 我们已经开发了用于递送一种或多种治疗剂的新的基于胺的脂质化合物,包括氨基-胺和氨基酰胺阳离子脂质,及其制剂。具体地,本发明的化合物(例如,式(I)或II(a)-II(k)的化合物)可以用于递送聚阳离子有效载荷或反义有效载荷(例如,核酸分子或RNAi剂)至细胞并沉默靶基因。

[0009] 一方面,本发明特征为具有下式的化合物:



[0011] 每个R<sup>1</sup>和R<sup>2</sup>独立地为任选取代的C<sub>11-24</sub>烷基、任选取代的C<sub>11-24</sub>烯基、任选取代的C<sub>11-24</sub>炔基、任选取代的C<sub>11-24</sub>杂烷基、任选取代的C<sub>11-24</sub>杂烯基或任选取代的C<sub>11-24</sub>杂炔基,其中R<sup>1</sup>和R<sup>2</sup>在相邻>CHNR<sup>3</sup>R<sup>4</sup>的碳上未经氧取代;

[0012] R<sup>3</sup>是H或任选取代的C<sub>1-6</sub>烷基;并且

[0013] R<sup>4</sup>是经-NR<sup>4a</sup>R<sup>4b</sup>取代的未取代的C<sub>1-6</sub>烷基、经-NR<sup>4a</sup>R<sup>4b</sup>进一步取代的取代的C<sub>1-6</sub>烷基、或任选取代的C<sub>3-7</sub>杂环基,其中每个R<sup>4a</sup>和R<sup>4b</sup>独立地为H、C(=NH)NH<sub>2</sub>或任选取代的C<sub>1-6</sub>烷基,或者其中R<sup>4a</sup>和R<sup>4b</sup>结合在一起形成任选取代的C<sub>3-7</sub>杂环基;并且其中R<sup>3</sup>和R<sup>4</sup>可以结合在一起形成任选取代的C<sub>3-7</sub>杂环基,

[0014] 其中R<sup>3</sup>和R<sup>4</sup>不结合在一起形成任选取代的咪唑基或任选取代的苯并咪唑基或任选取代的琥珀酰亚胺基;其中一个且仅一个伯胺可以存在于R<sup>3</sup>或R<sup>4</sup>上,或者没有伯胺存在于R<sup>3</sup>或R<sup>4</sup>上;并且其中R<sup>3</sup>或R<sup>4</sup>都不是任选取代的酰胺;并且

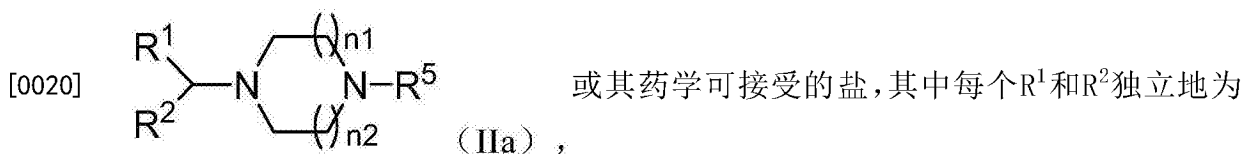
[0015] 其中当R<sup>1</sup>或R<sup>2</sup>是饱和C<sub>11</sub>烷基或饱和C<sub>15</sub>烷基时，R<sup>3</sup>不是H；其中当R<sup>1</sup>或R<sup>2</sup>是饱和C<sub>16</sub>烷基或饱和C<sub>17</sub>烷基时，R<sup>1</sup>和R<sup>2</sup>未经羟基取代；其中当R<sup>1</sup>或R<sup>2</sup>是饱和C<sub>17</sub>烷基时，R<sup>3</sup>或R<sup>4</sup>未经羟基取代；并且其中当R<sup>1</sup>或R<sup>2</sup>是饱和C<sub>18</sub>烷基时，R<sup>4</sup>未经任选取代的咪唑基取代。

[0016] 在一些实施方案中，R<sup>3</sup>是经-NR<sup>3a</sup>R<sup>3b</sup>取代的C<sub>1-6</sub>烷基并且其中每个R<sup>3a</sup>和R<sup>3b</sup>独立地为H或任选取代的C<sub>1-6</sub>烷基。在特定实施方案中，每个R<sup>3a</sup>和R<sup>3b</sup>独立地为H或C<sub>1-6</sub>烷基。

[0017] 在一些实施方案中，R<sup>4</sup>是经-NR<sup>4a</sup>R<sup>4b</sup>取代的未取代的C<sub>1-6</sub>烷基。在特定实施方案中，R<sup>4</sup>是经-NR<sup>4a</sup>R<sup>4b</sup>进一步取代的取代的C<sub>1-6</sub>烷基（例如，取代的C<sub>1-3</sub>烷基、取代的C<sub>1-2</sub>烷基、取代的C<sub>1</sub>烷基、取代的C<sub>2</sub>烷基或取代的C<sub>3</sub>烷基）或C<sub>1-6</sub>氨基烷基。在一些实施方案中，R<sup>4</sup>是经氧取代并且经-NR<sup>4a</sup>R<sup>4b</sup>进一步取代的C<sub>1-6</sub>烷基。在一些实施方案中，R<sup>4a</sup>和R<sup>4b</sup>结合在一起形成任选取代的C<sub>3-7</sub>杂环基（例如，任选取代的吡咯烷基、任选取代的咪唑烷基、任选取代的吡啶烷基、任选取代的哌啶基、任选取代的哌嗪基、任选取代的氮杂环庚烷基、任选取代的吡咯基、任选取代的咪唑基或任选取代的吡啶基）。在一些实施方案中，每个R<sup>4a</sup>和R<sup>4b</sup>独立地为任选取代的C<sub>1-6</sub>烷基。在一些实施方案中，R<sup>4</sup>是经任选取代的C<sub>3-7</sub>杂环基（例如，本文描述的任何一）取代的未取代的C<sub>1-6</sub>烷基。在一些实施方案中，R<sup>4</sup>是经任选取代的C<sub>3-7</sub>杂环基（例如，任选取代的吡咯烷基、任选取代的咪唑烷基、任选取代的吡啶烷基、任选取代的哌啶基、任选取代的哌嗪基、任选取代的氮杂环庚烷基、任选取代的吡咯基、任选取代的咪唑基、任选取代的吡啶基、任选取代的吡啶基、任选取代的吡嗪基、任选取代的噻啶基或任选取代的哒嗪基）进一步取代的取代的C<sub>1-6</sub>烷基（例如，经氧取代）或C<sub>1-6</sub>氨基烷基。

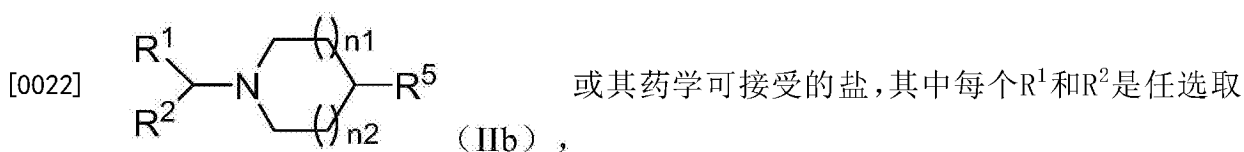
[0018] 在一些实施方案中，R<sup>3</sup>和R<sup>4</sup>结合在一起形成任选取代的C<sub>3-7</sub>杂环基（例如，任选取代的吡咯烷基、任选取代的咪唑烷基、任选取代的吡啶烷基、任选取代的哌啶基、任选取代的哌嗪基、任选取代的氮杂环庚烷基、任选取代的吡咯基、任选取代的咪唑基、任选取代的吡啶基、任选取代的吡啶基、任选取代的吡嗪基、任选取代的噻啶基或任选取代的哒嗪基）。

[0019] 在一些实施方案中，所述化合物具有下式：



任选取代的C<sub>11-24</sub>烷基、任选取代的C<sub>11-24</sub>烯基、任选取代的C<sub>11-24</sub>炔基、任选取代的C<sub>11-24</sub>杂烷基、任选取代的C<sub>11-24</sub>杂烯基或任选取代的C<sub>11-24</sub>杂炔基；每个n<sub>1</sub>和n<sub>2</sub>独立地为从0至2的整数（例如，n<sub>1</sub>和n<sub>2</sub>同时为1，或者n<sub>1</sub>为1并且n<sub>2</sub>为2）；并且R<sup>5</sup>选自由以下组成的组：H、任选取代的C<sub>1-6</sub>烷基和任选取代的杂环基（例如，未取代的C<sub>1-6</sub>烷基或经任选取代的吡咯基、任选取代的咪唑基、任选取代的吡啶基、任选取代的吡嗪基、任选取代的噻啶基或任选取代的哒嗪基取代的C<sub>1-6</sub>烷基）。在一些实施方案中，所述化合物选自由以下组成的组：L-2、L-5、L-6、L-22、L-23、L-24、L-25、L-26、L-28、L-29、L-45和L-48或其药学可接受的盐。

[0021] 在一些实施方案中，所述化合物具有下式：

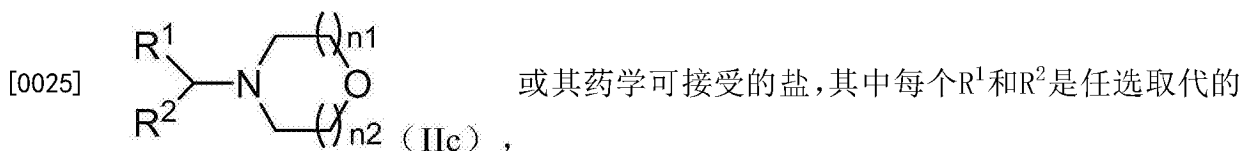


代的C<sub>11-24</sub>烷基、任选取代的C<sub>11-24</sub>烯基、任选取代的C<sub>11-24</sub>炔基、任选取代的C<sub>11-24</sub>杂烷基、任选

取代的C<sub>11-24</sub>杂烯基、任选取代的C<sub>11-24</sub>杂炔基；每个n<sub>1</sub>和n<sub>2</sub>独立地为从0至2的整数（例如，n<sub>1</sub>和n<sub>2</sub>同时为1，或者n<sub>1</sub>为1并且n<sub>2</sub>为2）；并且R<sup>5</sup>选自由以下组成的组：H、任选取代的C<sub>1-6</sub>烷基和任选取代的杂环基（例如，未取代的C<sub>1-6</sub>烷基或经任选取代的吡咯基、任选取代的咪唑基、任选取代的吡啶基、任选取代的吡啶基、任选取代的吡嗪基、任选取代的嘧啶基或任选取代的哒嗪基取代的C<sub>1-6</sub>烷基）。在一些实施方案中，所述化合物选自由以下组成的组：L-27和L-47或其药学可接受的盐。

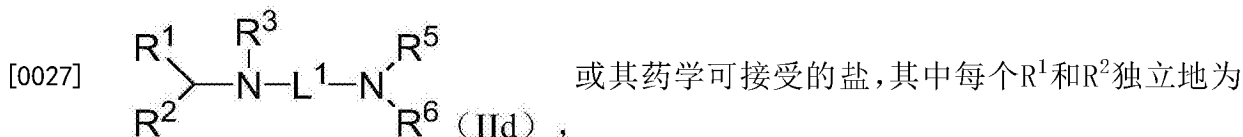
[0023] 在本文描述的任何一个式（例如，式(I)、(IIa)和(IIb)）的一些实施方案中，R<sup>5</sup>是经NR<sup>5a</sup>R<sup>5b</sup>取代的C<sub>1-6</sub>烷基，其中每个R<sup>5a</sup>和R<sup>5b</sup>独立地为H、任选取代的C<sub>1-6</sub>烷基（例如，任选取代的C<sub>1-6</sub>烷基），并且其中R<sup>5a</sup>和R<sup>5b</sup>可以结合在一起形成任选取代的C<sub>3-7</sub>杂环基。在一些实施方案中，R<sup>5</sup>是任选取代的杂环基（例如，任选取代的吡咯烷基、任选取代的咪唑烷基、任选取代的吡啶烷基、任选取代的哌啶基、任选取代的哌嗪基、任选取代的氮杂环庚烷基、任选取代的吡咯基、任选取代的咪唑基、任选取代的吡啶基、任选取代的吡啶基、任选取代的吡嗪基、任选取代的嘧啶基或任选取代的哒嗪基）。

[0024] 在一些实施方案中，所述化合物具有下式：



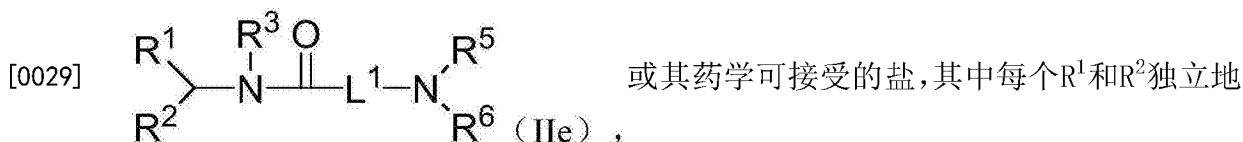
C<sub>11-24</sub>烷基、任选取代的C<sub>11-24</sub>烯基、任选取代的C<sub>11-24</sub>炔基、任选取代的C<sub>11-24</sub>杂烷基、任选取代的C<sub>11-24</sub>杂烯基、任选取代的C<sub>11-24</sub>杂炔基；并且每个n<sub>1</sub>和n<sub>2</sub>独立地为从0至2的整数（例如，n<sub>1</sub>和n<sub>2</sub>同时为1，或者n<sub>1</sub>为1并且n<sub>2</sub>为2）。在一些实施方案中，所述化合物为L-46或其药学可接受的盐。

[0026] 在一些实施方案中，所述化合物具有下式：



任选取代的C<sub>11-24</sub>烷基、任选取代的C<sub>11-24</sub>烯基、任选取代的C<sub>11-24</sub>炔基、任选取代的C<sub>11-24</sub>杂烷基、任选取代的C<sub>11-24</sub>杂烯基或任选取代的C<sub>11-24</sub>杂炔基；R<sup>3</sup>是H或任选取代的C<sub>1-6</sub>烷基；L<sup>1</sup>是任选取代的C<sub>1-6</sub>亚烷基；并且每个R<sup>5</sup>和R<sup>6</sup>独立地为H或任选取代的C<sub>1-6</sub>烷基，或者其中R<sup>5</sup>和R<sup>6</sup>结合形成任选取代的C<sub>3-7</sub>杂环基。

[0028] 在一些实施方案中，所述化合物具有下式：



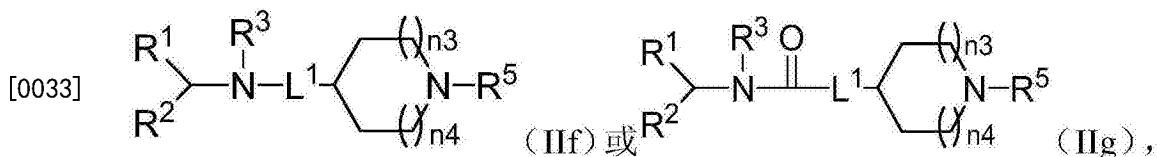
为任选取代的C<sub>11-24</sub>烷基、任选取代的C<sub>11-24</sub>烯基、任选取代的C<sub>11-24</sub>炔基、任选取代的C<sub>11-24</sub>杂烷基、任选取代的C<sub>11-24</sub>杂烯基或任选取代的C<sub>11-24</sub>杂炔基；R<sup>3</sup>是H或任选取代的C<sub>1-6</sub>烷基；L<sup>1</sup>是任选取代的C<sub>1-6</sub>亚烷基；并且每个R<sup>5</sup>和R<sup>6</sup>独立地为H或任选取代的C<sub>1-6</sub>烷基，或者其中R<sup>5</sup>和R<sup>6</sup>结合形成任选取代的C<sub>3-7</sub>杂环基。

[0030] 在式(II d)或(II e)的一些实施方案中，R<sup>5</sup>和R<sup>6</sup>结合形成任选取代的吡咯烷基、任选

取代的咪唑烷基、任选取代的吡唑烷基、任选取代的哌啶基、任选取代的哌嗪基或任选取代的氮杂环庚烷基。

[0031] 在一些实施方案中,所述化合物选自由以下组成的组:L-1、L-3、L-4、L-7、L-9、L-10、L-11、L-12、L-15、L-16、L-17、L-18、L-19、L-30、L-31、L-32、L-33、L-34、L-42、L-43和L-49或其药学可接受的盐。

[0032] 在一些实施方案中,所述化合物具有下式:



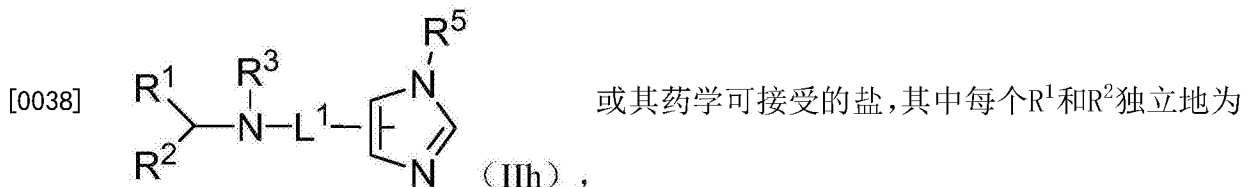
或其药学可接受的盐,其中每个 $R^1$ 和 $R^2$ 独立地为任选取代的 $C_{11-24}$ 烷基、任选取代的 $C_{11-24}$ 烯基、任选取代的 $C_{11-24}$ 炔基、任选取代的 $C_{11-24}$ 杂烷基、任选取代的 $C_{11-24}$ 杂烯基或任选取代的 $C_{11-24}$ 杂炔基; $R^3$ 是H或任选取代的 $C_{1-6}$ 烷基; $L^1$ 是任选取代的 $C_{1-6}$ 亚烷基;每个 $n_3$ 和 $n_4$ 独立地为从0至2的整数;并且 $R^5$ 是H或任选取代的 $C_{1-6}$ 烷基。

[0034] 在一些实施方案中,所述化合物选自由以下组成的组:L-14、L-21和L-36或其药学可接受的盐。

[0035] 在本文描述的任何一个式(例如,式(II d)-(II j),例如式(II d)-(II g))的一些实施方案中, $R^3$ 是经 $-NR^{3a}R^{3b}$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基,并且其中每个 $R^{3a}$ 和 $R^{3b}$ 独立地为H或任选取代的 $C_{1-6}$ 烷基。在一些实施方案中, $R^3$ 是未取代的 $C_{1-6}$ 烷基。

[0036] 在本文描述的任何一个式(例如,式(II d)-(II j),例如式(II d)-(II g))的一些实施方案中, $L^1$ 是经甲基、乙基、丙基或 $-NR^{La}R^{Lb}$ 取代的 $C_{1-6}$ 亚烷基,其中每个 $R^{La}$ 和 $R^{Lb}$ 独立地为H或任选取代的 $C_{1-6}$ 烷基。

[0037] 在一些实施方案中,所述化合物具有下式:

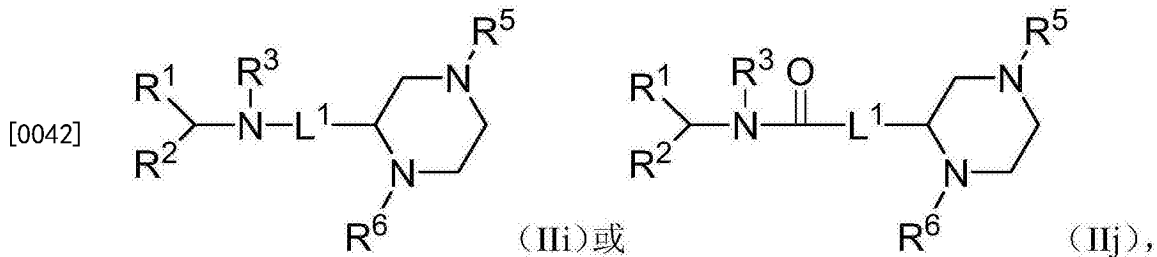


任选取代的 $C_{11-24}$ 烷基、任选取代的 $C_{11-24}$ 烯基、任选取代的 $C_{11-24}$ 炔基、任选取代的 $C_{11-24}$ 杂烷基、任选取代的 $C_{11-24}$ 杂烯基或任选取代的 $C_{11-24}$ 杂炔基; $R^3$ 是H或任选取代的 $C_{1-6}$ 烷基; $L^1$ 是任选取代的 $C_{1-6}$ 亚烷基;并且 $R^5$ 是H或任选取代的 $C_{1-6}$ 烷基。

[0039] 在一些实施方案中, $L^1$ 在4-位置连接至咪唑基。

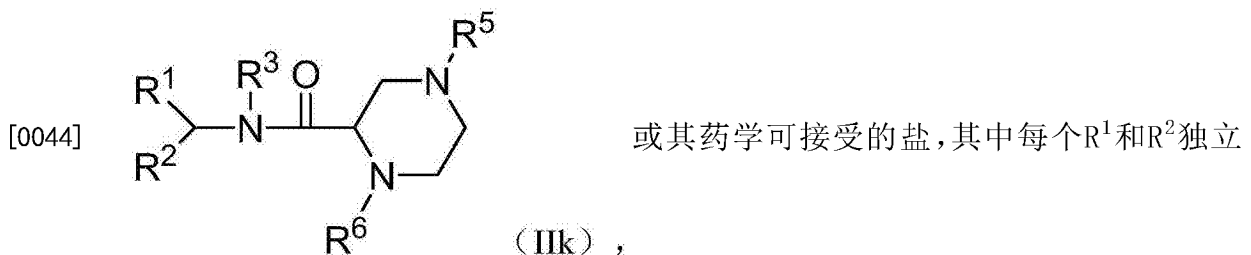
[0040] 在一些实施方案中,所述化合物选自由以下组成的组:L-8、L-13、L-20、L-35和L-44或其药学可接受的盐。

[0041] 在一些实施方案中,所述化合物具有下式:



或其药学可接受的盐,其中每个 $R^1$ 和 $R^2$ 独立地为任选取代的 $C_{11-24}$ 烷基、任选取代的 $C_{11-24}$ 烯基、任选取代的 $C_{11-24}$ 炔基、任选取代的 $C_{11-24}$ 杂烷基、任选取代的 $C_{11-24}$ 杂烯基或任选取代的 $C_{11-24}$ 杂炔基; $R^3$ 是H或任选取代的 $C_{1-6}$ 烷基; $L^1$ 是任选取代的 $C_{1-6}$ 亚烷基;并且每个 $R^5$ 和 $R^6$ 独立地为H或任选取代的 $C_{1-6}$ 烷基。

[0043] 在一些实施方案中,所述化合物具有下式:



地为任选取代的 $C_{11-24}$ 烷基、任选取代的 $C_{11-24}$ 烯基、任选取代的 $C_{11-24}$ 炔基、任选取代的 $C_{11-24}$ 杂烷基、任选取代的 $C_{11-24}$ 杂烯基或任选取代的 $C_{11-24}$ 杂炔基; $R^3$ 是H或任选取代的 $C_{1-6}$ 烷基;并且每个 $R^5$ 和 $R^6$ 独立地为H或任选取代的 $C_{1-6}$ 烷基。

[0045] 在本文描述的任何一个式(例如,式(II d)-(II k),例如式(II i)-(II k))的一些实施方案中,每个 $R^5$ 和 $R^6$ 独立地为经 $-NR^{5a}R^{5b}$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基,并且其中每个 $R^{5a}$ 和 $R^{5b}$ 独立地为H或任选取代的 $C_{1-6}$ 烷基。

[0046] 在一些实施方案中,所述化合物选自由以下组成的组:L-37、L-38、L-39、L-40和L-41或其药学可接受的盐。

[0047] 在本文描述的任何一个式(例如,式(II d)-(II k))的一些实施方案中, $L^1$ 是任选取代的 $C_{1-6}$ 亚烷基。

[0048] 在本文描述的任何一个式(例如,式(I)或(II a)-(II k))的一些实施方案中, $R^3$ 是任选取代的 $C_{1-6}$ 烷基。在一些实施方案中,每个 $R^1$ 和 $R^2$ 独立地为包括直链和支链形式的未取代的 $C_{11-24}$ 烯基或未取代的 $C_{11-24}$ 杂烯基(例如,每个 $R^1$ 和 $R^2$ 独立地为包含一个或多个双键的未取代的 $C_{11-24}$ 烯基或未取代的 $C_{11-24}$ 杂烯基)。在一些实施方案中, $R^1$ 或 $R^2$ 中的一个不是饱和的 $C_{11-24}$ 烷基。在一些实施方案中, $R^1$ 和 $R^2$ 都不是饱和的 $C_{11-24}$ 烷基。在一些实施方案中,每个 $R^1$ 和 $R^2$ 独立地选自由以下组成的组:亚麻烯基(C18:3)、亚麻烯基氧基(C18:3)、亚麻酰基(C18:3)、亚油烯基(C18:2)、亚油烯基氧基(C18:2)、亚油酰基(C18:2)、油烯基(C18:1)、油烯基氧基(C18:1)、油烯基氧基亚甲基(C18:1)、油酰基(C18:1)、油酰基亚甲基(C18:1)、硬脂基(C18:0)、硬脂基氧基(C18:0)、硬脂酰基(C18:0)、棕榈基(C16:0)、棕榈基氧基(C16:0)、棕榈酰基(C16:0)、棕榈酰基亚甲基(C16:0)、肉豆蔻基(C14:0)、肉豆蔻基氧基(C14:0)、肉豆蔻酰基(C14:0)、月桂基(C12:0)、月桂基氧基(C12:0)和月桂酰基(C12:0),例如亚油烯基(C18:2)或油烯基(C18:1)。在一些实施方案中, $R^1$ 和 $R^2$ 相同或不同。



[0049] 在本文描述的任何一个式(例如,式(I)或(IIa)-(IIk))的一些实施方案中, $R^3$ 或 $R^4$ 但不是 $R^3$ 和 $R^4$ 两者同时经伯胺取代。在一些实施方案中, $R^3$ 和 $R^4$ 不同时经伯胺取代。

[0050] 在本文描述的任何一个式(例如,式(I)或(IIa)-(IIk))的一些实施方案中, $R^3$ 和 $R^4$ 与它们连接的N一起包含来自表2和3的H-1至H-52中的一个的头基。在一些实施方案中,每个 $R^1$ 和 $R^2$ 独立地选自由以下组成的组:亚麻烯基(C18:3)、亚麻烯基氧基(C18:3)、亚麻酰基(C18:3)、亚油烯基(C18:2)、亚油烯基氧基(C18:2)、亚油酰基(C18:2)、油烯基(C18:1)、油烯基氧基(C18:1)、油烯基氧基亚甲基(C18:1)、油酰基(C18:1)、油酰基亚甲基(C18:1)、硬脂基(C18:0)、硬脂基氧基(C18:0)、硬脂酰基(C18:0)、棕榈基(C16:0)、棕榈基氧基(C16:0)、棕榈酰基(C16:0)、棕榈酰基亚甲基(C16:0)、肉豆蔻基(C14:0)、肉豆蔻基氧基(C14:0)、肉豆蔻酰基(C14:0)、月桂基(C12:0)、月桂基氧基(C12:0)和月桂酰基(C12:0),例如每个 $R^1$ 和 $R^2$ 独立地为亚油烯基(C18:2)或油烯基(C18:1)。

[0051] 另一方面,本发明的化合物包括 $R^1R^2-CH-A$ ,其中 $R^1$ 和 $R^2$ 是尾基(例如,本文、例如表4中描述的任何),并且A是头基(例如,本文、例如表2和3中描述的任何)。在一些实施方案中,头基是H-1至H-52中的一个,例如H-2、H-5、H-6、H-19、H-26或H-43(例如,H-5或H-43)。

[0052] 另一方面,本发明化合物是表1提供的任何化合物或其药学可接受的盐。

[0053] 一方面,本发明特征是包括本文描述的任何化合物(例如,表1提供的一种或多种化合物)或其药学可接受的盐的制剂。

[0054] 在一些实施方案中,所述制剂包括两种或多种所述化合物,例如2、3、4、5、6、7或更多种所述化合物。

[0055] 在一些实施方案中,制剂包括约10%至约80%的所述化合物,例如约10%至约15%、约10%至约20%、约10%至约25%、约10%至约30%、约10%至约35%、约15%至约20%、约15%至约25%、约15%至约30%、约15%至约35%、约15%至约40%、约20%至约25%、约20%至约30%、约20%至约35%、约20%至约40%、约25%至约30%、约25%至约35%、约25%至约40%、约30%至约35%、约30%至约40%、或约35%至约40%的一种或多种本发明化合物。

[0056] 在一些实施方案中,制剂还包括阳离子脂质(例如,DODMA、DOTMA、DPePC、DODAP或DOTAP)、中性脂质(例如,DSPC、POPC、DOPE或SM)和任选的甾醇衍生物(例如,胆固醇;胆甾烷酮;胆甾烯酮;粪甾醇;3 $\beta$ -[(N-(N',N'-二甲基氨基乙烷)-氨基甲酰基]胆固醇(DC-胆固醇);双胍-三氨基乙基胺-胆固醇(BGTC);(2S,3S)-2-(((3S,10R,13R,17R)-10,13-二甲基-17-((R)-6-甲基庚-2-基)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-十四氢-1H-环戊二烯并[a]菲-3-基氧基)羰基氨基)乙基2,3,4,4-四羟基丁酸酯(DPC-1);(2S,3S)-((3S,10R,13R,17R)-10,13-二甲基-17-((R)-6-甲基庚-2-基)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-十四氢-1H-环戊二烯并[a]菲-3-基)2,3,4,4-四羟基丁酸酯(DPC-2);双((3S,10R,13R,17R)-10,13-二甲基-17-((R)-6-甲基庚-2-基)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-十四氢-1H-环戊二烯并[a]菲-3-基)2,3,4-三羟基戊二酸酯(DPC-3);或6-(((3S,10R,13R,17R)-10,13-二甲基-17-((R)-6-甲基庚-2-基)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-十四氢-1H-环戊二烯并[a]菲-3-基氧基)氧代磷酰基氧基)-2,3,4,5-四羟基己酸酯(DPC-4))。在一些实施方案中,制剂还包括PEG-脂质轭合物(例如,PEG-DMG、PEG-DMPE、

PEG-DPPE、PEG-DPG、PEG-DOPE或PEG-DOG)。

[0057] 在一些实施方案中,制剂包括约10mol%至约40mol%的一种或多种本发明化合物(例如,一种或多种本文描述、例如表1中的任意化合物)、约10mol%至约40mol%的一种或多种阳离子脂质或一种或多种本发明化合物(例如,一种或多种本文描述、例如表1中的任意化合物)、约1mol%至约20mol%的一种或多种PEG-脂质轭合物、约5mol%至约20mol%的一种或多种中性脂质和约20mol%至约40mol%的一种或多种甾醇衍生物。

[0058] 在特定实施方案中,制剂包括约10mol%至约80mol%(例如,约40mol%至约55mol%,例如约48mol%)的一种或多种阳离子脂质(例如,如本文描述的本发明化合物和/或其他阳离子脂质)、约1mol%至约20mol%的一种或多种PEG-脂质轭合物、约5mol%至约20mol%的一种或多种中性脂质、和约20mol%至约40mol%的一种或多种甾醇衍生物。在一些实施方案中,制剂包括约10mol%至约30mol%(例如,约22mol%)的一种或多种本发明化合物(例如,L-6、L-30和/或本文描述的任何一个)、约15mol%至约35mol%(例如,约26mol%)的一种或多种阳离子脂质(例如,DODMA或本文描述的任何一个)、约3mol%至约9mol%(例如,约6mol%)的一种或多种PEG-脂质轭合物(例如,PEG-DSPE、PEG-DMPE、和/或本文描述的任何一个)、约10mol%至约20mol%(例如,约14mol%)的一种或多种中性脂质(例如,DSPC或本文描述的任何一个)和约20mol%至约40mol%(例如,约29mol%至约33mol%,例如约33mol%)的一种或多种甾醇衍生物(例如,胆固醇、其衍生物或本文描述的任何一个)。

[0059] 在一些实施方案中,一种或多种本发明化合物以约10mol%至约40mol%的量存在,例如,约10mol%至约15mol%、约10mol%至约20mol%、约10mol%至约25mol%、约10mol%至约30mol%、约10mol%至约35mol%、约15mol%至约20mol%、约15mol%至约25mol%、约15mol%至约30mol%、约15mol%至约35mol%、约15mol%至约40mol%、约20mol%至约25mol%、约20mol%至约30mol%、约20mol%至约35mol%、约20mol%至约40mol%、约25mol%至约30mol%、约25mol%至约35mol%、约25mol%至约40mol%、约30mol%至约35mol%、约30mol%至约40mol%、或约35mol%至约40mol%(例如,约21.0mol%、21.2mol%、21.4mol%、21.6mol%、21.8mol%、22mol%、25mol%、26mol%、26mol%、30mol%、35mol%或40mol%)的一种或多种本发明化合物。在一些实施方案中,一种或多种本发明化合物以约10mol%至约80mol%的量存在,例如,约10mol%至约15mol%、约10mol%至约20mol%、约10mol%至约25mol%、约10mol%至约30mol%、约10mol%至约35mol%、约10mol%至约40mol%、约10mol%至约45mol%、约10mol%至约50mol%、约10mol%至约55mol%、约10mol%至约60mol%、约10mol%至约65mol%、约10mol%至约70mol%、约10mol%至约75mol%、约15mol%至约20mol%、约15mol%至约25mol%、约15mol%至约30mol%、约15mol%至约35mol%、约15mol%至约40mol%、约15mol%至约45mol%、约15mol%至约50mol%、约15mol%至约55mol%、约15mol%至约60mol%、约15mol%至约65mol%、约15mol%至约70mol%、约15mol%至约75mol%、约15mol%至约80mol%、约20mol%至约25mol%、约20mol%至约30mol%、约20mol%至约35mol%、约20mol%至约40mol%、约20mol%至约45mol%、约20mol%至约50mol%、约20mol%至约55mol%、约20mol%至约60mol%、约20mol%至约65mol%、约20mol%至约70mol%、约20mol%至约75mol%、约20mol%至约80mol%、约25mol%至约30mol%、约25mol%至约

35mol%、约25mol%至约40mol%、约25mol%至约45mol%、约25mol%至约50mol%、约25mol%至约55mol%、约25mol%至约60mol%、约25mol%至约65mol%、约25mol%至约70mol%、约25mol%至约75mol%、约25mol%至约80mol%、约30mol%至约35mol%、约30mol%至约40mol%、约30mol%至约45mol%、约30mol%至约50mol%、约30mol%至约55mol%、约30mol%至约60mol%、约30mol%至约65mol%、约30mol%至约70mol%、约30mol%至约75mol%、约30mol%至约80mol%、约35mol%至约40mol%、约35mol%至约45mol%、约35mol%至约50mol%、约35mol%至约55mol%、约35mol%至约60mol%、约35mol%至约65mol%、约35mol%至约70mol%、约35mol%至约75mol%、或约35mol%至约80mol%、约40mol%至约45mol%、约40mol%至约50mol%、约40mol%至约55mol%、约40mol%至约60mol%、约40mol%至约65mol%、约40mol%至约70mol%、约40mol%至约75mol%、约40mol%至约80mol%、约45mol%至约50mol%、约45mol%至约55mol%、约45mol%至约60mol%、约45mol%至约65mol%、约45mol%至约70mol%、约45mol%至约75mol%、或约45mol%至约80mol%、约50mol%至约55mol%、约50mol%至约60mol%、约50mol%至约65mol%、约50mol%至约70mol%、约50mol%至约75mol%、或约50mol%至约80mol% (例如,约21.0mol%、21.2mol%、21.4mol%、21.6mol%、21.8mol%、22mol%、25mol%、26mol%、26mol%、30mol%、35mol%、40mol%、45mol%、48mol%、49mol%、50mol%、55mol%、60mol%、65mol%、70mol%或75mol%)的一种或多种本发明化合物。

[0060] 在一些实施方案中,一种或多种阳离子脂质以约10mol%至约40mol%的量存在,例如,约10mol%至约15mol%、约10mol%至约20mol%、约10mol%至约25mol%、约10mol%至约30mol%、约10mol%至约35mol%、约15mol%至约20mol%、约15mol%至约25mol%、约15mol%至约30mol%、约15mol%至约35mol%、约15mol%至约40mol%、约20mol%至约25mol%、约20mol%至约30mol%、约20mol%至约35mol%、约20mol%至约40mol%、约25mol%至约30mol%、约25mol%至约35mol%、约25mol%至约40mol%、约30mol%至约35mol%、约30mol%至约40mol%、或约35mol%至约40mol% (例如,约25.1mol%、25.2mol%、25.3mol%、25.4mol%、25.5mol%、25.6mol%、25.7mol%、25.8mol%、25.9mol%、26.0mol%、26.2mol%、26.4mol%、26.6mol%、26.8mol%或27mol%)的一种或多种阳离子脂质(例如,DODMA或本文描述、例如表1中的任何一个)。

[0061] 在一些实施方案中,一种或多种PEG-脂质轭合物以约1mol%至约20mol%的量存在,例如,约1mol%至约5mol%、约1mol%至约10mol%、约1mol%至约15mol%、约2mol%至约5mol%、约2mol%至约10mol%、约2mol%至约15mol%、约2mol%至约20mol%、约5mol%至约10mol%、约5mol%至约15mol%、约5mol%至约20mol%、约10mol%至约15mol%、约10mol%至约20mol%、约15mol%至约20mol% (例如,约2.5mol%、2.6mol%、2.7mol%、2.8mol%、2.9mol%、3mol%、3.5mol%、4mol%、4.3mol%、4.5mol%、4.7mol%、5mol%、5.3mol%、5.5mol%、5.7mol%、6mol%、6.5mol%、6.7mol%、7mol%、7.5mol%、8mol%、8.5mol%或9mol%)的一种或多种PEG-脂质轭合物(例如,PEG-DSPE、PEG-DMPE和/或本文描述的任何一种)。

[0062] 在一些实施方案中,一种或多种中性脂质以约5mol%至约20mol%的量存在,例如,约5mol%至约10mol%、约5mol%至约15mol%、约5mol%至约20mol%、约7mol%至约10mol%、约7mol%至约15mol%、约7mol%至约20mol%、约10mol%至约15mol%、约

10mol%至约20mol%、约15mol%至约20mol% (例如,约13.0mol%、13.2mol%、13.4mol%、13.6mol%、13.8mol%、14mol%、14.1mol%、14.3mol%、14.5mol%、14.7mol%或14.9mol%)的一种或多种中性脂质(例如,DSPC或本文描述的任何一个)。

[0063] 在一些实施方案中,一种或多种甾醇衍生物以约20mol%至约40mol%的量存在,例如,约20mol%至约25mol%、约20mol%至约30mol%、约20mol%至约35mol%、约25mol%至约30mol%、约25mol%至约35mol%、约25mol%至约40mol%、约30mol%至约35mol%、约30mol%至约40mol%、或约35mol%至约40mol% (例如,约28.4mol%、28.6mol%、28.8mol%、29.0mol%、30mol%、31mol%、32mol%、33mol%、33.2mol%、33.4mol%、33.6mol%、33.8mol%、34mol%、34.4mol%、34.7mol%或34.9mol%)的一种或多种甾醇衍生物(例如,胆固醇或本文描述的任何一个)。

[0064] 在一些实施方案中,制剂包括一种或多种脂质颗粒,包含一种或多种RNA结合剂和一种或多种转染脂质,其中所述一种或多种RNA结合剂包括约10mol%至约40mol%的一种或多种阳离子脂质或一种或多种本发明化合物和约0.5mol%至约10mol%的一种或多种PEG-脂质;并且其中所述一种或多种转染脂质包括约10mol%至约40mol%的一种或多种本发明化合物、约5mol%至约20mol%的一种或多种中性脂质、约0.5mol%至约10mol%的一种或多种PEG-脂质轭合物、和约20mol%至约40mol%的一种或多种甾醇衍生物。其他制剂和百分比如本文描述。

[0065] 在一些实施方案中,制剂还包括聚阳离子有效载荷或反义有效载荷。在一些实施方案中,聚阳离子有效载荷是RNAi剂(例如,dsRNA、siRNA、miRNA、shRNA、ptgsRNA或DsiRNA,例如DsiRNA)。在一些实施方案中,在一些实施方案中,RNAi剂具有10至40个核苷酸的长度,例如10至15个核苷酸、10至20个核苷酸、10至25个核苷酸、10至30个核苷酸、10至35个核苷酸、15至20个核苷酸、15至25个核苷酸、15至30个核苷酸、15至35个核苷酸、15至40个核苷酸、16至20个核苷酸、16至25个核苷酸、16至30个核苷酸、16至35个核苷酸、16至40个核苷酸、20至25个核苷酸、18至20个核苷酸、18至25个核苷酸、18至30个核苷酸、18至35个核苷酸、18至40个核苷酸、19至20个核苷酸、19至25个核苷酸、19至30个核苷酸、19至35个核苷酸、19至40个核苷酸、20至30个核苷酸、20至35个核苷酸、20至40个核苷酸、25至35个核苷酸、25至40个核苷酸、30至35个核苷酸、30至40个核苷酸、或35至40个核苷酸的长度,例如25至35个核苷酸的长度,例如16至30个核苷酸的长度,例如19至19个核苷酸的长度。在一些实施方案中,反义有效载荷具有8至50个核苷酸的长度(例如,8至10个核苷酸、8至15个核苷酸、8至20个核苷酸、8至25个核苷酸、8至30个核苷酸、8至35个核苷酸、8至40个核苷酸、或8至45个核苷酸的长度),例如,14至35个核苷酸的长度(例如,14至15个核苷酸、14至20个核苷酸、14至25个核苷酸、14至30个核苷酸的长度),例如,17至24个核苷酸的长度,例如17至20个核苷酸的长度)。

[0066] 在一些实施方案中,制剂包括约1:10 (w/w) 至约1:100 (w/w) 比率的所述聚阳离子有效载荷与所述制剂中存在的总脂质,例如约1:10 (w/w) 至约1:15 (w/w) 比率、约1:10 (w/w) 至约1:20 (w/w) 比率、约1:10 (w/w) 至约1:40 (w/w) 比率、约1:10 (w/w) 至约1:50 (w/w) 比率、约1:10 (w/w) 至约1:60 (w/w) 比率、约1:10 (w/w) 至约1:70 (w/w) 比率、约1:10 (w/w) 至约1:80 (w/w) 比率、约1:10 (w/w) 至约1:90 (w/w) 比率、约1:10 (w/w) 至约1:95 (w/w) 比率、约1:20 (w/w) 至约1:40 (w/w) 比率、约1:20 (w/w) 至约1:50 (w/w) 比率、约1:20 (w/w) 至约1:60 (w/w) 比

率、约1:20 (w/w) 至约1:70 (w/w) 比率、约1:20 (w/w) 至约1:80 (w/w) 比率、约1:20 (w/w) 至约1:90 (w/w) 比率、约1:20 (w/w) 至约1:95 (w/w) 比率、约1:20 (w/w) 至约1:100 (w/w) 比率、约1:40 (w/w) 至约1:50 (w/w) 比率、约1:40 (w/w) 至约1:60 (w/w) 比率、约1:40 (w/w) 至约1:70 (w/w) 比率、约1:40 (w/w) 至约1:80 (w/w) 比率、约1:40 (w/w) 至约1:90 (w/w) 比率、约1:40 (w/w) 至约1:95 (w/w) 比率、约1:40 (w/w) 至约1:100 (w/w) 比率、约1:50 (w/w) 至约1:60 (w/w) 比率、约1:50 (w/w) 至约1:70 (w/w) 比率、约1:50 (w/w) 至约1:80 (w/w) 比率、约1:50 (w/w) 至约1:90 (w/w) 比率、约1:50 (w/w) 至约1:95 (w/w) 比率、约1:50 (w/w) 至约1:100 (w/w) 比率、约1:60 (w/w) 至约1:70 (w/w) 比率、约1:60 (w/w) 至约1:80 (w/w) 比率、约1:60 (w/w) 至约1:90 (w/w) 比率、约1:60 (w/w) 至约1:95 (w/w) 比率、约1:60 (w/w) 至约1:100 (w/w) 比率、约1:80 (w/w) 至约1:90 (w/w) 比率、约1:80 (w/w) 至约1:95 (w/w) 比率、或约1:80 (w/w) 至约1:100 (w/w) 比率的聚阳离子有效载荷与所述制剂中存在的总脂质。

[0067] 在一些实施方案中,制剂包括脂质体(例如,脂质纳米颗粒)、脂质体复合物(lipoplex)或胶团。

[0068] 一方面,本发明特征为药物组合物,包含本文描述的任何化合物(例如,一种或多种表1提供的化合物)或其药学可接受的盐、或本文描述的任何制剂;和药学可接受的赋形剂。

[0069] 另一方面,本发明特征为治疗或预防性治疗受试者疾病的方法,所述方法包括给所述受试者施用足以治疗所述疾病(例如,肝癌(例如,肝细胞癌、肝母细胞瘤、胆管癌(cholangiocarcinoma)、血管肉瘤或恶性血管瘤)、肺癌(例如,小细胞肺癌、非小细胞肺癌)、前列腺癌或成神经细胞瘤)的量的本文描述的任何化合物(例如,一种或多种表1提供的化合物)或其药学可接受的盐、本文描述的任何制剂、或本文描述的任何组合物。本发明进一步特征为治疗或预防性治疗肿瘤疾病和相关并发症的方法,包括但不限于癌(例如,肺、乳腺、胰腺、结肠、肝细胞、肾、女性生殖道、前列腺、鳞状细胞原位癌)、淋巴瘤(例如,组织细胞淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤)、MEN2综合征、多发性神经纤维瘤(包括Schwann细胞瘤)、骨髓增生异常综合征、白血病、肿瘤血管生成、甲状腺癌、肝、骨、皮肤、脑、中枢神经系统、胰腺、肺(例如,小细胞肺癌、非小细胞肺癌)、乳腺、结肠、膀胱、前列腺、胃肠道、子宫内膜、输卵管、睾丸和卵巢、胃肠道间质肿瘤(GIST)、前列腺肿瘤、肥大细胞肿瘤(包括犬肥大细胞肿瘤)、急性髓性骨髓纤维化、白血病、急性淋巴细胞白血病、慢性髓性白血病、慢性淋巴细胞白血病、多发性骨髓瘤、黑素瘤、肥大细胞增多症、神经胶质瘤、成胶质细胞瘤、星形细胞瘤、成神经细胞瘤、肉瘤(例如,神经外胚层起源的肉瘤或平滑肌肉瘤)、肿瘤向其他组织的转移和化疗引起的缺氧。

[0070] 另一方面,本发明特征为调节受试者中靶核酸表达的方法,所述方法包括施用足以减少所述受试者中所述靶基因(例如,本文描述的任何一个,例如,一种或多种选自以下组成的组的靶基因:ABL1、AR、 $\beta$ -连环蛋白(CTNNB1)、BCL1、BCL2、BCL6、CBFA2、CBL、CSF1R、ERBA1、ERBA2、ERBB1、ERBB2、ERBB3、ERBB4、ETS1、ETS2、ETV6、FGR、FOS、FYN、HCR、HRAS、JUN、KRAS、LCK、LYN、MET、MDM2、MLL1、MLL2、MLL3、MYB、MYC、MYCL1、MYCN、NRAS、PIM1、PML、RET、SRC、TAL1、TAL2、TCL3、TCL5、YES、BRCA1、BRCA2、MADH4、MCC、NF1、NF2、RB1、TP53、WT1、ApoB100、CSN5、CDK6、ITGB1、TGF $\beta$ 1、细胞周期蛋白D1、hepcidin、PCSK9、TTR、PLK1和KIF1-结合蛋白)表达的量的本文描述的任何化合物(例如,一种或多种表1提供的化合物)或其药学

可接受的盐、本文描述的任何制剂、或本文描述的任何组合物(例如,其中所述方法包括减少受试者中靶基因的表达)。

[0071] 在另一实施方案中,本发明特征为每天一次或多次(例如,每天1、2、3或4次)、每周一次或多次(例如,每周2、3、4、5、6或7次)或每月一次或多次(例如,每周2、3、4、5、6、7或10次)给受试者施用一定剂量的本发明的聚阳离子有效载荷或反义有效载荷。受试者可以任何给药方案(例如,每天一次或多次(例如,每天1、2、3或4次)、每周一次或多次(例如,每周2、3、4、5、6或7次)或每月一次或多次(例如,每周2、3、4、5、6、7或10次))接受约0.0001至约10mg/kg、例如,约0.0001至约1mg/kg、约0.0001至约5mg/kg、约0.001至约1mg/kg、约0.001至约5mg/kg、约0.001至约10mg/kg、约0.01至约1mg/kg、约0.01至约5mg/kg、约0.01至约10mg/kg、约1至约5mg/kg、或约1至约10mg/kg范围内的聚阳离子有效载荷或反义有效载荷剂量。

[0072] 在一些实施方案中,本发明特征为每天一次或多次(例如,每天1、2、3或4次)、每周一次或多次(例如,每周2、3、4、5、6或7次)或每月一次或多次(例如,每周2、3、4、5、6、7或10次)给受试者施用本发明制剂。受试者可以任何给药方案(例如,每天一次或多次(例如,每天1、2、3或4次)、每周一次或多次(例如,每周2、3、4、5、6或7次)或每月一次或多次(例如,每周2、3、4、5、6、7或10次))接受约0.001至约200mg/kg、例如,约0.001至约1mg/kg、约0.001至约10mg/kg、约0.001至约20mg/kg、约0.001至约50mg/kg、约0.001至约100mg/kg、约0.01至约1mg/kg、约0.01至约10mg/kg、约0.01至约20mg/kg、约0.01至约50mg/kg、约0.01至约100mg/kg、约0.01至约200mg/kg、约0.1至约1mg/kg、约0.1至约10mg/kg、约0.1至约20mg/kg、约0.1至约50mg/kg、约0.1至约100mg/kg、约0.1至约200mg/kg、约1至约10mg/kg、约1至约20mg/kg、约1至约50mg/kg、约1至约100mg/kg、约1至约200mg/kg、约10至约20mg/kg、约10至约50mg/kg、约10至约100mg/kg、约10至约200mg/kg、约20至约50mg/kg、约20至约100mg/kg、或约20至约200mg/kg范围内的制剂剂量。

[0073] 另一方面,本发明特征为将聚阳离子有效载荷或反义有效载荷递送至特定组织类型的方法。可以向其递送所述有效载荷的特定组织类型的实例包括但不限于肝、胰腺、肺、前列腺、肾、骨髓、脾、胸腺、淋巴结、脑、脊髓、心、骨骼肌、皮肤、口腔黏膜、食道、胃、回肠、小肠、结肠、膀胱、子宫颈、卵巢、睾丸、乳腺、肾上腺、脂肪组织(白色和/或棕色)、血液(例如,造血细胞,例如人类造血祖细胞、人类造血干细胞、CD34+细胞、CD4+细胞)、淋巴细胞和其他血细胞谱系。

[0074] 在上述方面的任何一个,本发明化合物包括两个不饱和的脂质尾基(例如,每个R<sup>1</sup>和R<sup>2</sup>独立地为任选取代的C<sub>11-24</sub>烯基、任选取代的C<sub>11-24</sub>炔基、任选取代的C<sub>11-24</sub>杂烯基或任选取代的C<sub>11-24</sub>杂炔基)。

[0075] 在上述方面的任何一个,本发明化合物包括脂质尾基,其中这些基团不包括与-CHR<sup>3</sup>R<sup>4</sup>相邻的氧(例如,每个R<sup>1</sup>和R<sup>2</sup>独立地为任选取代的C<sub>11-24</sub>烷基、任选取代的C<sub>11-24</sub>烯基或任选取代的C<sub>11-24</sub>炔基)。

[0076] 在上述方面的任何一个,本发明化合物包括脂质尾基,其中这些基团不包括一种或多种生物可降解基团(例如,一种或多种酯基团)。

[0077] 在上述方面的任何一个,本发明化合物包括两个具有超过11、12、13、14、15、16或18个碳的脂质尾基(例如,每个R<sup>1</sup>和R<sup>2</sup>独立地为任选取代的C<sub>17-24</sub>烯基、任选取代的C<sub>15-24</sub>炔

基、任选取代的C<sub>15-24</sub>杂烯基或任选取代的C<sub>15-24</sub>杂炔基；每个R<sup>1</sup>和R<sup>2</sup>独立地为任选取代的C<sub>16-24</sub>烯基、任选取代的C<sub>16-24</sub>炔基、任选取代的C<sub>16-24</sub>杂烯基、或任选取代的C<sub>16-24</sub>杂炔基；每个R<sup>1</sup>和R<sup>2</sup>独立地为任选取代的C<sub>17-24</sub>烯基、任选取代的C<sub>17-24</sub>炔基、任选取代的C<sub>17-24</sub>杂烯基、或任选取代的C<sub>17-24</sub>杂炔基；或者每个R<sup>1</sup>和R<sup>2</sup>独立地为任选取代的C<sub>18-24</sub>烯基、任选取代的C<sub>18-24</sub>炔基、任选取代的C<sub>18-24</sub>杂烯基、或任选取代的C<sub>18-24</sub>杂炔基)。

[0078] 在上述方面的任何一个，本发明化合物不含有脲基(例如，R<sup>3</sup>或R<sup>4</sup>都不是任选取代的酰胺)。在一些实施方案中，所述化合物不含有氨甲酰基。在一些实施方案中，所述化合物不含有超过一种伯胺基团(例如，在R<sup>1</sup>-R<sup>6</sup>的一个或多个中，例如在R<sup>3</sup>或R<sup>4</sup>中不含有两个伯胺基团或不含有任何伯胺基团)。在特定实施方案中，所述化合物包括仅一个伯胺或没有伯胺(例如，在R<sup>1</sup>-R<sup>6</sup>的一个或多个中，例如在R<sup>3</sup>或R<sup>4</sup>中存在仅一个伯胺或没有伯胺)。

[0079] 在上述方面的任何一个，本发明化合物不含有羟基(例如，R<sup>1</sup>或R<sup>2</sup>都没有经1、2或3个羟基取代；或者R<sup>3</sup>或R<sup>4</sup>都没有经1、2或3个羟基取代)。在一些实施方案中，当R<sup>1</sup>或R<sup>2</sup>是饱和C<sub>11-24</sub>烷基(例如，饱和C<sub>15</sub>烷基、饱和C<sub>16</sub>烷基、饱和C<sub>17</sub>烷基或饱和C<sub>18</sub>烷基)时，R<sup>1</sup>和/或R<sup>2</sup>未经1、2或3个羟基取代。在一些实施方案中，当R<sup>1</sup>或R<sup>2</sup>是饱和C<sub>11-24</sub>烷基(例如，饱和C<sub>15</sub>烷基、饱和C<sub>16</sub>烷基、饱和C<sub>17</sub>烷基或饱和C<sub>18</sub>烷基)时，R<sup>3</sup>和/或R<sup>4</sup>未经1、2或3个羟基取代。

[0080] 在上述方面的任何一个，本发明化合物包括不超过两个酰胺基团(例如，化合物的头基中不超过两个或一个酰胺基团)。在其他实施方案中，化合物在R<sup>1</sup>-R<sup>6</sup>的一个或多个中包括0、1或2个酰胺基团(例如，R<sup>3</sup>或R<sup>4</sup>中0、1或2个酰胺基团)。而在其他实施方案中，化合物可以包括一个且仅一个酰胺基团(例如，可以在R<sup>3</sup>或R<sup>4</sup>中包括一个且仅一个酰胺基团)。在其他实施方案中，化合物包括一个且仅一个酰胺基团或没有酰胺基团(例如，在R<sup>3</sup>或R<sup>4</sup>中包括一个且仅一个酰胺基团或没有酰胺基团)。

[0081] 在上述方面的任何一个，本发明化合物排除了N-(4-N', N'-二甲基氨基)丁酰基-(6Z, 9Z, 28Z, 31Z)-三十五烷-6, 9, 28, 31-四烯-19-胺或N-(3-N', N'-二甲基氨基)丙酰基-(6Z, 9Z, 28Z, 31Z)-三十五烷-6, 9, 28, 31-四烯-19-胺或其盐。在一些实施方案中，本发明化合物排除了N-甲基-N-(4-N', N'-二甲基氨基)丁酰基-(6Z, 9Z, 28Z, 31Z)-三十五烷-6, 9, 28, 31-四烯-19-胺或N-甲基-N-(3-N', N'-二甲基氨基)丙酰基-(6Z, 9Z, 28Z, 31Z)-三十五烷-6, 9, 28, 31-四烯-19-胺或其盐。

[0082] 在上述方面的任何一个，本发明化合物排除了N-(4-N', N'-二甲基氨基)丁酰基-(6Z, 9Z, 28Z)-三十五烷-6, 9, 28-三烯-19-胺、N-甲基-N-(4-N', N'-二甲基氨基)丁酰基-(6Z, 9Z, 28Z)-三十五烷-6, 9, 28-三烯-19-胺、N-(4-N', N'-二甲基氨基)丁酰基-(6Z, 9Z, 28Z, 31Z, 34Z)-三十五烷-6, 9, 28, 31, 34-五烯-19-胺、N-甲基-N-(4-N', N'-二甲基氨基)丁酰基-(6Z, 9Z, 28Z, 31Z, 34Z)-三十五烷-6, 9, 28, 31, 34-五烯-19-胺、N-(3-N', N'-二甲基氨基)丙酰基-(6Z, 9Z, 28Z)-三十五烷-6, 9, 28-三烯-19-胺、N-甲基-N-(3-N', N'-二甲基氨基)丙酰基-(6Z, 9Z, 28Z)-三十五烷-6, 9, 28-三烯-19-胺、N-(3-N', N'-二甲基氨基)丙酰基-(6Z, 9Z, 28Z, 31Z, 34Z)-三十五烷-6, 9, 28, 31, 34-五烯-19-胺、N-甲基-N-(3-N', N'-二甲基氨基)丙酰基-(6Z, 9Z, 28Z, 31Z, 34Z)-三十五烷-6, 9, 28, 31, 34-五烯-19-胺或其盐。

[0083] 在上述方面的任何一个，本发明化合物排除了二((Z)-壬-2-烯-1-基)9-((3-(二甲基氨基)丙酰基)氨基)十七烷二酸酯、二((Z)-壬-2-烯-1-基)9-((4-(二甲基氨基)丁酰基)氨基)十七烷二酸酯、二((Z)-壬-2-烯-1-基)9-((5-(二甲基氨基)新戊酰基)氨基)十七

烷二酸酯或其盐。

[0084] 在上述方面的任何一个,本发明化合物具有小于6.2和大于6.5的pKa值(例如,如下的pKa值:4.0至6.2,例如4.0至5.2、4.0至5.6、或4.0至5.8;或6.5至8.5,例如,6.5至7.0、6.5至7.5、或6.5至8.0)。在特定实施方案中,pKa值是约5.0至约6.0(例如,5.0至5.5、5.0至5.6、5.0至5.7、5.0至5.8、5.0至5.9、5.0至6.0、5.2至5.5、5.2至5.6、5.2至5.7、5.2至5.8、5.2至5.9、5.2至6.0、5.4至5.5、5.4至5.6、5.4至5.7、5.4至5.8、5.4至5.9、5.4至6.0、5.6至5.7、5.6至5.8、5.6至5.9、或5.6至6.0)。pKa值可以通过任何有用的方法测定,例如,测量2-(对-甲苯氨基)-6-萘磺酸(TNS)的荧光、 $\zeta$ 电势测量值等。在特定实施方案中,pKa值是带电阳离子脂质的浓度和未带电脂质的浓度之比(例如,通过原位TNS荧光滴定测定的,其中pKa测定为在半数最大荧光强度处的pH)。

[0085] 定义

[0086] 如本文使用的,术语“约”表示引用值的平均值 $\pm 10\%$ 。

[0087] 除非另外指明,“烯基”表示含有一个或多个碳-碳双键的2至24个碳原子的单价直链或支链基团。烯基的实例有乙烯基、1-丙烯基、2-丙烯基、2-甲基-1-丙烯基、1-丁烯基、2-丁烯基、油烯基、亚油烯基、亚麻烯基等。术语“C<sub>x-y</sub>烯基”代表具有x至y个碳的烯基。x的示例性值是2、3、4、5和11;y的示例性值是3、4、5、6和24;并且x至y的示例性值是2至10、2至9、2至8、2至7、2至6、2至5、2至4、10至24、11至24、12至24、14至24、16至24、18至24、10至22、11至22、12至22、14至22、16至22、18至22、10至20、11至20、12至20、14至20、16至20、或18至20。在一些实施方案中,烯基可以经1、2、3或4个本文针对烷基所定义的取代基进一步取代。

[0088] 除非另外指明,“烷基”表示1至24个碳原子的单价直链或支链饱和基团。烷基的实例有甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、仲丁基、异丁基、叔丁基、新戊基、月桂基、肉豆蔻基、棕榈基、硬脂基等,并且可以任选地经1、2、3或在两个碳或更多碳的烷基情况下经4个取代基取代,所述取代基独立地选自由以下组成的组:(1) 烷氧基;(2) 如本文定义的氨基;(3) 卤素,例如F、Cl、Br或I;(4) (杂环基)氧基;(5) 杂环基;(6) 烷基;(7) 烯基;(9) 炔基;(10) 环烷基;(11) 羟基;(12) 硝基;或(13) 氧(例如,醛或酰基)。在一些实施方案中,这些基团的每一个可以如本文描述的进一步取代。术语“C<sub>x-y</sub>烷基”代表具有x至y个碳的烷基。x的示例性值是1、2、3、4、5和11;y的示例性值是2、3、4、5、6和24;并且x至y的示例性值是1至10、1至9、1至8、1至7、1至6、1至5、1至4、10至24、11至24、12至24、14至24、16至24、18至24、10至22、11至22、12至22、14至22、16至22、18至22、10至20、11至20、12至20、14至20、16至20、或18至20。

[0089] 如本文使用的,术语“亚烷基”和前缀“烷-”代表通过去除两个氢原子而从直链或支链烃衍生的多价(例如,二价)烃基。亚烷基的实例有甲撑、乙撑、异丙撑等。术语“C<sub>x-y</sub>亚烷基”代表具有x至y个碳的亚烷基基团。x的示例性值是1、2、3、4和5,并且y的示例性值是2、3、4、5和6。在一些实施方案中,亚烷基可以经1、2、3或4个如本文针对烷基定义的取代基进一步取代。

[0090] 除非另外指明,“炔基”表示含有一个或多个碳-碳三键的2至24个碳原子的单价直链或支链基团。炔基实例有乙炔、1-丙炔等。术语“C<sub>x-y</sub>炔基”代表具有x至y个碳的炔基。x的示例性值是2、3、4、5和11;y的示例性值是3、4、5、6和24;并且x至y的示例性值是2至10、2至9、2至8、2至7、2至6、2至5、2至4、10至24、11至24、12至24、14至24、16至24、18至24、10至22、11至22、12至22、14至22、16至22、18至22、10至20、11至20、12至20、14至20、16至20、或18至



20. 在一些实施方案中, 炔基可以经1、2、3或4个本文针对烷基所定义的取代基进一步取代。

[0091] “酰胺”表示通过羰基与母分子基团连接的如本文定义的胺基。

[0092] 如本文使用的, “氨基”表示 $-N(R^{N1})_2$ , 其中每个 $R^{N1}$ 独立地为H、OH、 $NO_2$ 、 $N(R^{N2})_2$ 、 $SO_2OR^{N2}$ 、 $SO_2R^{N2}$ 、 $SOR^{N2}$ 、N-保护基、烷基、烯基、炔基、烷氧基、芳基、烷芳基、环烷基、烷环烷基、杂环基(例如, 杂芳基)、烷杂环基(例如, 烷杂芳基), 或者两个 $R^{N1}$ 结合形成杂环基或N-保护基, 并且其中每个 $R^{N2}$ 独立地为H、烷基或芳基。在一个优选的实施方案中, 氨基是 $-NH_2$ 或 $-NHR^{N1}$ , 其中 $R^{N1}$ 独立地为OH、 $NO_2$ 、 $NH_2$ 、 $NR^{N2}_2$ 、 $SO_2OR^{N2}$ 、 $SO_2R^{N2}$ 、 $SOR^{N2}$ 、烷基或芳基, 并且每个 $R^{N2}$ 可以是H、烷基或芳基。“伯胺”表示具有结构 $-NH_2$ 的基团。

[0093] 如本文使用的, 术语“氨基烷基”代表经本文定义的氨基取代的如本文定义的烷基。烷基和氨基各自可以经1、2、3或4个本文针对各个基团描述的取代基进一步取代。

[0094] 如本文使用的, 术语“氨基酰基”指具有结构 $-NR^{N1}C(=O)OR$ 或 $-OC(=O)N(R^{N1})_2$ 的氨基甲酸酯基团, 其中每个 $R^{N1}$ 的含义参见本文提供的“氨基”的定义, 并且R是如本文定义的烷基、环烷基、烷环烷基、芳基、烷芳基、杂环基(例如, 杂芳基)或烷杂环基(例如, 烷杂芳基)。

[0095] 如本文使用的, 术语“羰基”代表C(O)基团, 其还可以表示为 $C=O$ 。

[0096] “环烷基”表示单价饱和或部分不饱和的3-至10-元单环或多环(例如, 双环或三环)烃环系统。实例包括环丙基、环丁基、环戊基、环己基和环庚基。

[0097] 如本文使用的, 术语“卤素”表示选自溴、氯、碘或氟的卤素。

[0098] “杂烯基”表示如本文定义的烯基, 其中一个或多个组成的碳原子已经各自被O、N或S所替代。示例性的杂烯基包括经氧基取代和/或通过氧原子与母分子基团连接的如本文描述的烯基。在一些实施方案中, 杂烯基可以经1、2、3或4个本文针对烷基描述的取代基进一步取代。

[0099] “杂烷基”表示如本文定义的烷基, 其中一个或多个组成碳原子已经各自被O、N或S替代。示例性的杂烷基包括经氧基取代和/或通过氧原子与母分子基团连接的如本文描述的烷基。在一些实施方案中, 杂烷基可以经1、2、3或4个本文针对烷基描述的取代基进一步取代。

[0100] 如本文使用的, 术语“杂亚烷基”指如本文定义的亚烷基基团, 其中1或2个组成碳原子各自己已经被O、N或S替代。在一些实施方案中, 杂亚烷基基团可以经1、2、3或4个本文针对亚烷基基团描述的取代基进一步取代。术语“ $C_{x-y}$ 杂亚烷基”代表具有x至y个碳的杂亚烷基基团。x的示例性值是1、2、3、4、5和11; y的示例性值是2、3、4、5、6和24; 并且x至y的示例性值是1至10、1至9、1至8、1至7、1至6、1至5、1至4、10至24、11至24、12至24、14至24、16至24、18至24、10至22、11至22、12至22、14至22、16至22、18至22、10至20、11至20、12至20、14至20、16至20或18至20。

[0101] “杂炔基”表示如本文定义的炔基, 其中一个或多个组成碳原子已经各自被O、N或S替代。示例性的杂炔基包括经氧基取代和/或通过氧原子与母分子基团连接的如本文描述的炔基。在一些实施方案中, 杂炔基可以经1、2、3或4个本文针对烷基描述的取代基进一步取代。

[0102] 如本文使用的, 术语“杂芳基”表示作为芳香族的如本文定义的杂环基子集: 即, 它们含有单环或多环系统内的 $4n+2pi$ 电子。在一些实施方案中, 杂芳基经1、2、3或4个本文针对杂环基描述的取代基取代。

[0103] 除非另外指明,如本文使用的术语“杂环基”表示含有1、2、3或4个杂原子的3-、4-、5-、6-、7-或8-元环,所述杂原子独立地选自氮、氧和硫组成的组。杂环基可以是饱和的或不饱和的,并且含有0至3个不饱和键。例如,5-元环具有0至2个双键,并且6-和7-元环具有0至3个双键。某些杂环基包括2至9个碳原子,例如3至7个碳原子。其他此类基团可以包括最多12个碳原子。术语“杂环基”还表示具有桥接多环结构的杂环化合物,其中一个或多个碳和/或杂原子桥接单环、例如奎宁环基的两个非相邻成员。杂环基的实例包括氮丙啶基、吡啶基、吡咯基、吡咯烷基、吡啶基、吡啶啉基、吡啶烷基、咪唑基、咪唑啉基、咪唑烷基、吡啶基、嘧啶基、哌啶基、氮杂环庚烷基、吡嗪基、哌嗪基、二氮杂环庚烷基、吗啉基、四氢呋喃基、二氢呋喃基等。

[0104] 如本文使用的,术语“(杂环基)氧基”表示通过氧原子与母分子基团连接的如本文定义的杂环基。在一些实施方案中,杂环基可以经1、2、3或4个如本文定义的取代基取代。

[0105] 如本文使用的,术语“(杂环基)酰基”表示通过羰基连接至母分子基团的如本文定义的杂环基。在一些实施方案中,杂环基可以经1、2、3或4个如本文定义的取代基取代。

[0106] 如本文使用的,术语“羟基”表示-OH基团。

[0107] “连接体”表示含有一个或多个原子的任选取代的多价(例如,二价)基团。连接体的实例包括任选取代的如本文定义的亚烷基和杂亚烷基基团。

[0108] 如本文使用的,术语“N-保护基”表示预期保护氨基在合成过程中免受不希望的那些基团。常用的N-保护基公开于Greene,“Protective Groups in Organic Synthesis,”第3版(John Wiley&Sons,New York,1999),其通过引用并入本文。N-保护基包括酰基、芳基酰基或氨基酰基,例如甲酰基、乙酰基、丙酰基、新戊酰基、叔丁基乙酰基、2-氯乙酰基、2-溴乙酰基、三氟乙酰基、三氯乙酰基、邻苯二甲酰基、邻硝基苯氧基乙酰基、 $\alpha$ -氯丁酰基、苯甲酰基、4-氯苯甲酰基、4-溴苯甲酰基、4-硝基苯甲酰基,和手性助剂,例如保护或未保护的D、L或D,L-氨基酸,例如丙氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸等;含磺酰基的基团,例如苯磺酰基、对甲苯磺酰基等;氨基甲酸酯形成基团,例如苄基氧基羰基、对-氯苄基氧基羰基、对-甲氧基苄基氧基羰基、对-硝基苄基氧基羰基、2-硝基苄基氧基羰基、对-溴苄基氧基羰基、3,4-二甲氧基苄基氧基羰基、3,5-二甲氧基苄基氧基羰基、2,4-二甲氧基苄基氧基羰基、4-甲氧基苄基氧基羰基、2-硝基-4,5-二甲氧基苄基氧基羰基、3,4,5-三甲氧基苄基氧基羰基、1-(对-联苯基)-1-甲基乙氧基羰基、 $\alpha,\alpha$ -二甲基-3,5-二甲氧基苄基氧基羰基、二苯甲基氧基羰基、叔丁基氧基羰基、二异丙基甲氧基羰基、异丙基氧基羰基、乙氧基羰基、甲氧基羰基、烯丙基氧基羰基、2,2,2,-三氯乙氧基羰基、苯氧基羰基、4-硝基苯氧基羰基、苄基-9-甲氧基羰基、环戊基氧基羰基、金刚烷基氧基羰基、环己基氧基羰基、苯基硫代羰基等,烷芳基,例如苄基、三苯基甲基、苄基氧基甲基等,和甲硅烷基,例如三甲基甲硅烷基等。优选的N-保护基是甲酰基、乙酰基、苯甲酰基、新戊酰基、叔丁基乙酰基、丙氨酰基、苯磺酰基、苄基、叔丁基氧基羰基(Boc)和苄基氧基羰基(Cbz)。

[0109] 如本文使用的,术语“氧代”表示=O。

[0110] 术语“脲”指具有结构 $\text{NR}^{\text{N}1}\text{C}(=\text{O})\text{NR}^{\text{N}1}$ 的基团,其中每个 $\text{R}^{\text{N}1}$ 的含义参见本文提供的“氨基”的定义。

[0111] 剂的“足量”表示足以实现有益或想要结果、例如临床结果的剂的量,因此,足量取决于其应用的上下文。例如,在施用降低靶基因表达水平的制剂的上下文中,制剂的足量是

足以实现靶基因表达水平与不施用制剂时获得的反应相比减少的量。

[0112] “阴离子脂质”表示在生理pH下具有净负电荷的任何脂质分子。

[0113] 如本文使用的,术语“反义化合物”或“反义有效载荷”特别涵盖单链反义寡核苷酸(DNA、DNA样、RNA、RNA样)或包含反义定向寡核苷酸、反义PNA、核酶和外部指导序列(募集RNA酶P的序列,如例如Guerrier-Takada等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA94:8468,1997中所描述的)的某些双链或自杂交构建体。反义化合物可以通过许多方式发挥其作用。一种方式是反义介导定向真核生物中的内源性核酸酶、例如RNA酶H或原核生物中的RNA酶P (Chiang等人,J.Biol.Chem.1266:18162,1991;Forster等人,Science,249:783,1990)。

[0114] “阳离子脂质”表示在生理pH下具有净正电荷的任何脂质分子。示例性阳离子脂质包括本文描述的、例如表1中的任何一个。

[0115] “Dicer-底物RNA”或“DsiRNA”表示能够基因沉默的一类25-35 (例如,25-27,例如27)核苷酸双链分子。由于其与其他RNAi剂相比更长的长度,DsiRNA很可能是Dicer的底物。

[0116] “双链分子”表示可用于通过RNA干扰沉默基因产物的双链RNA:RNA或RNA:DNA分子。

[0117] “表达”表示通过本领域已知的方法检测基因或多肽。例如,经常通过Southern印迹或聚合酶链式反应(PCR)检测DNA表达,并且经常通过Northern印迹、RT-PCR、基因芯片技术或RNA酶保护测定来检测RNA表达。测量蛋白质表达水平的方法一般包括但不限于Western印迹、免疫印迹、酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射性免疫测定(RIA)、免疫沉淀、免疫荧光、表面等离子共振、化学发光、荧光偏振、磷光、免疫组织化学分析、基质辅助激光解吸/电离飞行时间(MALDI-TOF)质谱、显微细胞计量术(microcytometry)、显微镜检查法、荧光激活的细胞分选(FACS)和流式细胞仪以及基于蛋白质性质的测定,包括但不限于酶活性或与其他蛋白配偶体的相互作用。

[0118] “杂交”表示如本文定义的足够互补的多核苷酸或其部分在各种严格度条件下配对形成双链分子。(参见例如,Wahl等人,Methods Enzymol.152:399(1987);Kimmel,Methods Enzymol.152:507(1987))。例如,高严格度盐浓度通常小于约750mM NaCl和75mM柠檬酸三钠、小于约500mM NaCl和50mM柠檬酸三钠或小于约250mM NaCl和25mM柠檬酸三钠。低严格度杂交可以在有机溶剂、例如甲酰胺缺乏下获得,而高严格度杂交可以在至少约35%甲酰胺或至少约50%甲酰胺存在下获得。高严格度温度条件通常将包括至少约30°C、37°C或42°C的温度。各种其他参数,例如杂交时间、去污剂例如十二烷基硫酸钠(SDS)的浓度和加入或排除载体DNA是本领域技术人员公知的。通过按需要组合这些各种条件来实现各种严格度水平。在一个实施方案中,杂交将在750mM NaCl、75mM柠檬酸三钠和1%SDS中30°C下进行。在一个可选实施方案中,杂交在pH6.4下、在50°C或70°C下、在400mM NaCl、40mM PIPES和1mM EDTA中进行,杂交持续12-16小时之后,进行洗涤。额外的优选杂交条件包括在70°C在1xSSC中或在50°C在1xSSC、50%甲酰胺中杂交,随后在70°C在0.3xSSC中洗涤,或者在70°C在4xSSC或在50°C在4xSSC、50%甲酰胺中杂交,随后在67°C在1xSSC中洗涤。针对这些条件的有用变化对于本领域技术人员而言是特别明显的。一种这样的示例性变化包括评估设计以模拟生理细胞内条件的条件下的杂交,其中阳离子和阴离子以如下比例配合:对于阳离子,钠:钾:钙:镁为10:160:2:26;并且对于阴离子,氯离子:碳酸氢根:磷酸根:硫酸根:葡萄糖酸根为3:10:100:20:65。

[0119] “脂质载体”表示脂质体、脂质体复合物(lipoplex)、胶团、脂质纳米颗粒、基于核心的颗粒、与转染脂质结合的包含RNA结合剂-RNA聚集物的颗粒、或包含一种或多种本发明化合物的基于囊的颗粒。

[0120] “微RNA”(miRNA)表示可用来通过RNA干扰沉默基因产物的单链RNA分子。

[0121] “调节”表示基因表达、或者编码一种或多种蛋白或蛋白亚基的RNA分子或等同RNA分子的水平、或者一种或多种蛋白或蛋白亚基的活性被上调或下调,使得表达、水平或活性大于或小于在缺乏调节剂时所观察到的。例如,术语调节可以包括抑制或基因沉默,并且基因表达水平或RNA分子水平或其等同物与对照相比降低至少10%(例如,15%、20%、25%、30%、35%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%)。

[0122] “中性脂质”表示在生理pH下以不带电或中性两性离子形式存在的任何脂质分子。

[0123] “聚阳离子有效载荷”表示包含多个带负电荷原子的化学部分,其可加入制剂。聚阳离子有效载荷的实例包括核酸、RNAi剂、siRNA、dsRNA、miRNA、shRNA、DsiRNA和反义有效载荷。

[0124] “RNA结合剂”表示能够结合或杂交核酸、例如治疗制剂的核酸有效载荷的任何剂或剂组合。RNA结合剂包括本文描述的任何脂质(例如,一种或多种阳离子脂质,一种或多种阳离子脂质的组合、例如本文描述或表1中的那些,以及一种或多种阳离子脂质和任何其他脂质的组合、例如中性脂质或PEG-脂质轭合物)。RNA结合剂可以在制剂内形成任何有用的结构,例如内部聚集体。

[0125] “RNAi剂”表示通过杂交靶核酸而发挥基因沉默作用任何剂或化合物。RNAi剂包括能够介导序列特异性RNAi(例如,在严格条件下)的任何核酸分子,例如,短干扰RNA(siRNA)、双链RNA(dsRNA)、微RNA(miRNA)、短发夹RNA(shRNA)、短干扰寡核苷酸、短干扰核酸、短干扰修饰的寡核苷酸、化学修饰的siRNA、转录后基因沉默RNA(ptgsRNA)和Dicer-底物RNA(DsiRNA)。

[0126] “短发夹RNA”或“shRNA”表示形成紧密发夹环并且能够基因沉默的RNA序列。

[0127] “有义区”表示与另一核酸的反义区具有足够互补性的本发明核酸的核苷酸序列。此外,本发明核酸的有义区可以包括与靶基因核苷酸序列具有同源性的核苷酸序列。“反义区”表示与靶基因核苷酸序列具有足够互补性的本发明核酸的核苷酸序列。

[0128] “沉默”或“基因沉默”表示基因表达或者编码一种或多种蛋白的RNA分子的水平在RNAi剂存在下减少至低于对照条件下所观察到的(例如,在缺乏RNAi剂或者存在失活或减弱分子、例如具有错乱序列或错配的RNAi分子下)。基因沉默可以使基因产物表达减少1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%(即,完全抑制)。

[0129] “小抑制RNA”、“短干扰RNA”或“siRNA”表示能够基因沉默的一类10-40(例如,15-25,例如21)核苷酸双链分子。最值得注意的,siRNA通常参与RNA干扰(RNAi)途径,siRNA借助该途径干扰特定基因产物的表达。

[0130] “基本同一性”或“基本上同一的”表示多肽或多核苷酸序列,其分别与参考序列具有相同的多肽或多核苷酸序列,或者分别具有指定百分比的在两条序列最佳比对时在参考序列内的相应位置相同的氨基酸残基或核苷酸。例如,与参考序列“基本上同一的”氨基酸序列具有与参考氨基酸序列至少50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、

97%、98%、99%或100%的同一性。对于多肽,对比序列的长度一般是至少5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个连续氨基酸,更优选至少25、50、75、90、100、150、200、250、300或350个连续氨基酸,并且最优选是全长氨基酸序列。对于核酸,对比序列的长度一般是至少5个连续核苷酸,优选至少10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个连续核苷酸,并且最优选是全长核苷酸序列。可以使用序列分析软件基于默认设置来测量序列同一性(例如,Sequence Analysis Software Package of the Genetics Computer Group,University of Wisconsin Biotechnology Center,1710University Avenue,Madison,WI53705)。这种软件可以通过给各种取代、缺失和其他修饰分配同源性度来匹配相似序列。

[0131] “足够互补的”表示多核苷酸序列,其与靶核酸具有精确互补多核苷酸序列,或者具有指定百分比的在两条序列最佳比对时在靶核酸内的相应位置精确互补的核苷酸。例如,与靶核酸序列“基本上互补的”多核苷酸序列与靶核酸序列具有至少50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%互补性。对于具有10至40个核苷酸长度的RNAi剂,足够互补的序列包括具有1、2、3、4或5个非互补核苷酸的那些。实际上,在包括例如DsiRNA剂的某些实施方案中,活性双链RNAi剂可以具有少达15至19个连续核苷酸的与靶核酸足够互补的指导链,而不要求指导链的其余部分具有与靶核酸任何程度的互补性(尽管在某些实施方案中,指导链的其余部分可以部分或完全地与靶向的核酸(例如,mRNA)互补。

[0132] “靶核酸”表示其表达或活性待调节的任何核酸序列。靶核酸可以是DNA或RNA。在某些实施方案中,靶核酸是靶mRNA。

[0133] “转染脂质”表示能够递送核酸、例如核酸有效载荷的任何脂质或脂质组合(任选地,核酸有效载荷与RNA结合剂、例如一种或多种阳离子脂质结合)。转染脂质包括本文描述的任何脂质(例如,一种或多种阳离子脂质,一种或多种阳离子脂质的组合、例如本文描述或表1中的那些,以及一种或多种阳离子脂质和任何其他脂质或剂的组合、例如中性脂质、阴离子脂质、PEG-脂质轭合物或甾醇衍生物)。转染脂质或包括这种转染脂质的组合可以在制剂内形成任何有用的结构,例如外部聚集体表面。

[0134] “药物组合物”表示含有本文描述的化合物的组合物,其药理学可接受赋形剂配制并经政府监管机构批准作为用于治疗哺乳动物疾病的治疗方案的部分而生产或销售。药物组合物可以被配制用于例如以单位剂量形式(例如,片剂、胶囊、薄膜衣片(caplet)、囊形片(gelcap)或糖浆)的口服施用;用于局部施用(例如,作为乳霜、凝胶、洗剂或软膏);用于静脉内施用(例如,作为不含栓子粒子的无菌溶液和在适合静脉内使用的溶剂系统中);或者以本文描述的任何其他制剂。

[0135] “药学可接受的赋形剂”表示不同于本文描述的化合物并且在患者中具有非毒性和非炎性性质的任何成分(例如,能够悬浮或溶解活性化合物的媒介物)。赋形剂可以包括例如:防粘剂、抗氧化剂、粘合剂、包衣、压缩助剂、崩解剂、染料(着色剂)、软化剂、乳化剂、填充剂(稀释剂)、成膜剂或包衣、调味剂、香味剂、助流剂(流动增强剂)、润滑剂、防腐剂、印墨、吸收剂、悬浮或分散剂、增添剂和水合水。示例性的赋形剂包括但不限于:丁基化羟甲基苯(BHT)、碳酸钙、磷酸钙(二碱式)、硬脂酸钙、交联羧甲基纤维素、交联聚乙烯吡咯烷酮、柠檬酸、交聚维酮、半胱氨酸、乙基纤维素、明胶、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、乳糖、硬

脂酸镁、麦芽糖醇、甘露糖醇、蛋氨酸、甲基纤维素、伯尼金甲酯、微晶纤维素、聚乙二醇、聚乙烯比咯烷酮、聚维酮、预胶化淀粉、伯尼金丙酯、棕榈酸视黄酯、紫胶、二氧化硅、羧甲基纤维素钠、柠檬酸钠、羟乙酸淀粉钠、山梨糖醇、淀粉(玉米)、硬脂酸、蔗糖、滑石、二氧化钛、维生素A、维生素E、维生素C和木糖醇。

[0136] “药学可接受的盐”表示在合理医疗判断范围内适合用于与人和动物组织接触而无过度毒性、刺激、变应性反应等并且与合理益处/风险比相称的那些盐。药学可接受的盐是本领域公知的。例如,药学可接受的盐描述于:Berge等人,J.Pharm.Sci.66(1):1,1977和Pharmaceutical Salts:Properties,Selection,and Use,P.H.Stahl和C.G.Wermuth(编辑),Wiley-VCH,2008。盐可以在本发明化合物的最后分离和纯化期间原位制备或者单独地通过使游离碱基于适合的有机酸反应来制备。代表性的酸加成盐包括醋酸盐、己二酸盐、藻酸盐、抗坏血酸盐、天冬氨酸盐、苯磺酸盐、苯甲酸盐、硫酸氢盐、硼酸盐、丁酸盐、樟脑酸盐、樟脑磺酸盐、柠檬酸盐、环戊烷丙酸盐、二葡萄糖酸盐、十二烷基硫酸盐、乙烷磺酸盐、富马酸盐、葡庚糖酸盐、甘油磷酸盐、半硫酸盐、庚糖酸盐、己酸盐、氢溴酸盐、盐酸盐、氢碘酸盐、2-羟基-乙烷磺酸盐、乳糖酸盐、乳酸盐、月桂酸盐、月桂基硫酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、丙二酸盐、甲烷磺酸盐、2-萘磺酸盐、烟酸盐、硝酸盐、油酸盐、草酸盐、棕榈酸盐、帕莫酸盐、果胶酸盐、过硫酸盐、3-苯基丙酸盐、磷酸盐、苦味酸盐、新戊酸盐、丙酸盐、硬脂酸盐、琥珀酸盐、硫酸盐、酒石酸盐、硫氰酸盐、甲苯磺酸盐、十一烷酸盐、戊酸盐等。代表性的碱金属或碱土金属盐包括钠、锂、钾、钙、镁等,以及无毒的铵、季铵和胺阳离子,包括但不限于铵、四甲基铵、四乙基铵等。

[0137] “受试者”表示人或非人动物(例如,哺乳动物)。

[0138] 如本文使用以及如本领域公知的,“治疗”是用于获得有益或想要结果、例如临床结果的方法。有益或想要的结果可以包括但不限于缓解或减轻一种或多种症状或病状;降低疾病、病症或病状的程度;疾病、病症或病状状态的稳定(即,不恶化);防止疾病、病症或病状的传播;延迟或减缓疾病、病症或病状的进展;缓解或减轻疾病、病症或病状;和消除(部分或完全),无论是可检测的还是不可检测的。“减轻”疾病、病症或病状表示与缺乏治疗的程度或时间进程相比,疾病、病症或病状的程度和/或不想要的临床表现被减少和/或时间进程被减缓或延长。“治疗癌症”、“预防癌症”或“抑制癌症”表示引起肿瘤尺寸或癌细胞数量的减少,减缓或抑制肿瘤尺寸或癌细胞增殖的增加,增加肿瘤或其他癌症的消失与其再现之间的无疾病存活时间,预防或减少肿瘤或其他癌症的初始或随后出现的可能性,或减少与肿瘤或其他癌症相关的不良症状。在一个想要的实施方案中,如使用任何标准测定测量的,治疗后幸存的肿瘤或癌细胞的百分比比肿瘤或癌细胞的初始数目低至少20、40、60、80或100%。希望地,通过施用本发明化合物而诱导的肿瘤或癌细胞数目的减少是非肿瘤或非癌细胞数目降低的至少2、5、10、20或50倍。希望地,如使用标准方法测定的,本发明方法导致肿瘤尺寸或癌细胞数目的20、40、60、80或100%的减少。希望地,至少20、40、60、80、90或95%的受治疗的受试者具有其中肿瘤或癌症的所有证据消失的完全消除。希望地,肿瘤或癌症没有重新出现,或者在不少于5、10、15或20年之后重新出现。“预防性治疗”受试者疾病或病状(例如,癌症)表示减少疾病症状出现之前疾病或病状的发生(即,发病率)或减少其严重度。预防性治疗可以完全预防或减少疾病或其症状的出现,和/或可以在部分或完全治愈疾病和/或归因于疾病的不良作用方面是治疗性的。预防性治疗可以包括减少或

预防疾病或病状(例如,预防癌症)在可能易患该病但还没有被诊断患有该病的个体中出现。

[0139] 附图简述

[0140] 图1显示了氨基-酰胺(标记的“酰胺”)和氨基-胺(标记的“胺”)的示例性实施方案。对于这些化合物, $R^1$ 和 $R^2$ 可以是本文描述的任何尾基,例如任选取代的 $C_{11-24}$ 烷基、烯基、炔基、杂烷基、杂烯基或杂炔基。

[0141] 图2A-2B显示了示例性化合物L-1至L-14。

[0142] 图3显示了具有叔胺的示例性化合物L-15至L-21。

[0143] 图4显示了L-2的示例性类似物,包括化合物L-5、L-6、L-22和L-23。

[0144] 图5显示了L-6的示例性类似物,包括化合物L-24至L-29。

[0145] 图6显示了L-9的示例性酰胺类似物,包括化合物L-30至L-36。

[0146] 图7显示了具有哌嗪基的化合物L-37至L-41,其中每个 $R^1$ 和 $R^2$ 独立地为本文描述的任何尾基,例如任选取代的 $C_{11-24}$ 烷基、烯基、炔基、杂烷基、杂烯基或杂炔基。

[0147] 图8显示了其他示例性氨基胺阳离子脂质结构L-42、L-43和L-44。

[0148] 图9显示了本发明L-6、L-45、L-46和L-47的其他示例性阳离子脂质结构。

[0149] 图10是显示含有化合物L-1或L-2的脂质颗粒与未治疗的对照相比的体外敲除的图。

[0150] 图11是显示使用包含L-1、L-2、L-5、L-6、L-7、L-8、L-22或L-30和5mg/kg的DsiRNA的单剂脂质颗粒体内敲除小鼠肝中HPRT1mRNA、随后在48小时之后收集组织的图。

[0151] 图12是显示使用包含L-2、L-5、L-6或L-30和1mg/kg或5mg/kg的DsiRNA的单剂脂质颗粒体内敲除小鼠肝中HPRT1mRNA、随后在48小时之后收集组织的图。

[0152] 图13是显示使用用L-6或L-30和5mg/kg的DsiRNA配制的两剂脂质颗粒体内敲除小鼠肝和原位Hep3B肿瘤中HPRT1mRNA、随后在48小时之后收集组织的图。

[0153] 图14是显示使用用L-6或L-30和5mg/kg的DsiRNA配制的两剂脂质颗粒体内敲除小鼠肝和原位HepG2肿瘤中HPRT1mRNA、随后在48小时之后收集组织的图。

[0154] 图15是显示具有活性DsiRNA的脂质颗粒制剂L-6和L-30(“L-6活性”和“L-30活性”)在体内Hep3B模型中对血清 $\alpha$ -甲胎蛋白(AFP)水平的影响。提供了没有DsiRNA的制剂(“L-6对照”和“L-30对照”)和缓冲液(“PBS”)的对照。

[0155] 图16是显示具有活性DsiRNA的脂质颗粒制剂L-6和L-30(“L-6活性”和“L-30活性”)在体内Hep3B模型中对肿瘤重量的影响的图。提供了没有DsiRNA的制剂(“L-6对照”和“L-30对照”)和缓冲液(“PBS”)的对照。

[0156] 图17显示具有二油烯基尾基的示例性化合物L-48和L-49。

[0157] 图18是显示使用包含L-30和1、3或10mg/kg的DsiRNA的单IV剂脂质颗粒体内敲除小鼠肝和原位Hep3B肿瘤( $0.5g \pm 0.1$ )中HPRT1mRNA、随后在48小时之后收集组织的图。 $N=7$ /组肝和肿瘤(具有SEM的平均值)。测试了两个制剂:如本文描述的L-30 [1] 和L-30 [2]。

[0158] 图19是显示使用包含L-30 [1] 制剂和DsiRNA的单剂脂质颗粒体内敲除多个原位肝癌模型中HPRT1mRNA的图。Hep3B和HepG2模型作为细胞悬液植入;并且HuH1、HuH7和MHCC97H作为套管片段(trocar fragment)植入。 $N=5-7$ /组,以5mg/kg IV, Q2Dx1。所有组中的靶敲除相对于PBS而言是显著的( $p < 0.05$ )。

[0159] 图20是显示使用包含L-30 [1] 制剂和各种独立地DsiRNA的单剂脂质颗粒体内敲除原位Hep3B HCC肿瘤模型中各种mRNA的图。N=6-7/组,以5mg/kg IV, TIWx2;全部以10mg/kg通过口服施用给予索拉非尼, QDx14。\*\*=p<0.01, \*=p<0.05。

[0160] 图21是显示使用在L-30的七种不同的制剂([A]至[G])中包含5mg/kg的DsiRNA的单剂脂质颗粒体内敲除Hep3B HCC肿瘤组织中HPRT1mRNA、随后在72小时之后收集组织的图。带有误差的条形图值代表平均值+SEM(N=7/组)。

[0161] 图22是显示在第1天和第3天使用两种制剂L-6 [2] 和L-30 [2] 中包含10mg/kg的DsiRNA的脂质颗粒剂体内敲除H1975NSCLC SC异种移植肺肿瘤组织中HPRT1mRNA、随后在第5天收集组织的图。带有误差的条形图值代表平均值+SEM(N=7/组)。

[0162] 图23是显示在第1天和第3天使用两种制剂L-6 [2] 和L-30 [2] 中包含10mg/kg的DsiRNA的脂质颗粒剂体内敲除22Rv1前列腺癌SC异种移植中HPRT1mRNA、随后在第5天收集组织的图。带有误差的条形图值代表平均值+SEM(N=7/组)。

[0163] 图24是显示在第1天和第3天使用三种制剂L-6 [1]、L-30 [A] 和L-30 [E] 中包含10mg/kg的DsiRNA的脂质颗粒剂体内敲除植入肝中的22Rv1前列腺癌中HPRT1mRNA、随后在第5天收集组织的图。带有误差的条形图值代表平均值+SEM(N=7/组)。

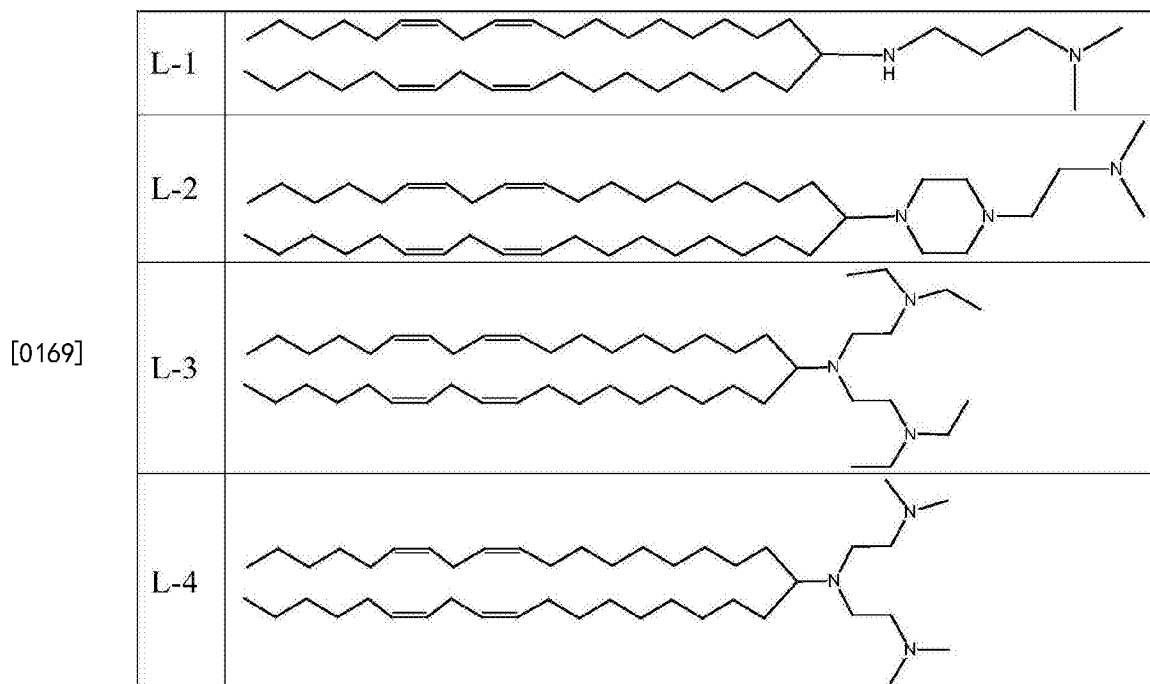
[0164] 详细描述

[0165] 我们现在已经开发了可以配制成脂质颗粒的氨基-胺和氨基-酰胺阳离子脂质。本发明的制剂可以用于递送聚阳离子有效载荷(例如,核酸分子或RNAi剂)至细胞(例如,在受试者体外或体内)。聚阳离子有效载荷的递送可以实现细胞内序列特异性的基因沉默。

[0166] 氨基-胺和氨基-酰胺脂质

[0167] 本发明化合物包括任何式(I)化合物。在特定实施方案中,所述化合物选自表1。

[0168] 表1。

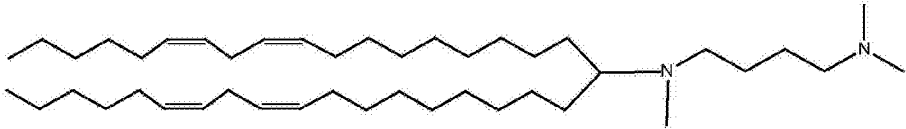
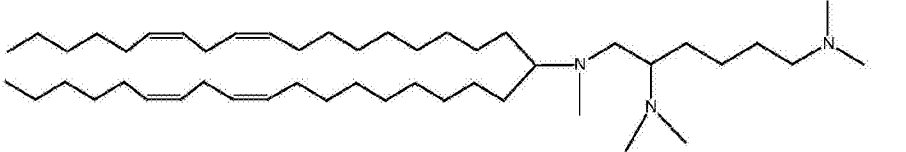
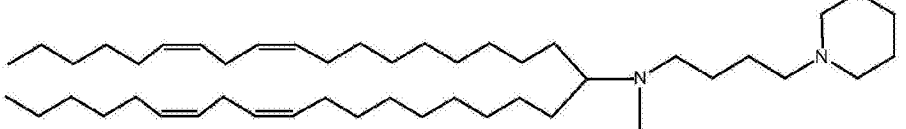
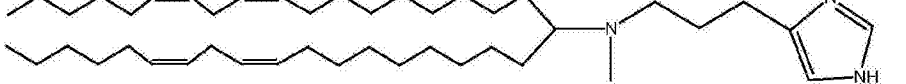
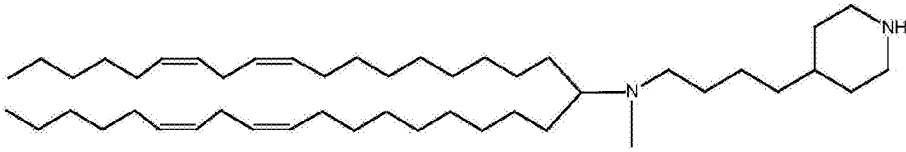
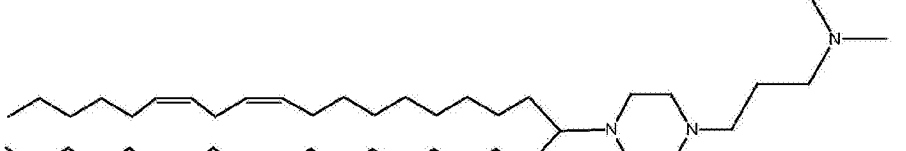
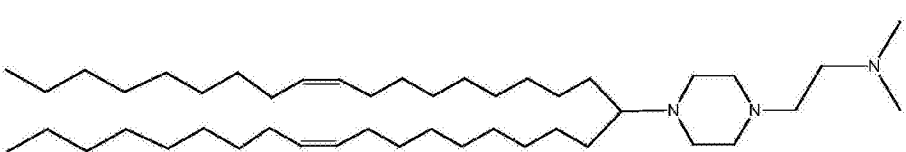
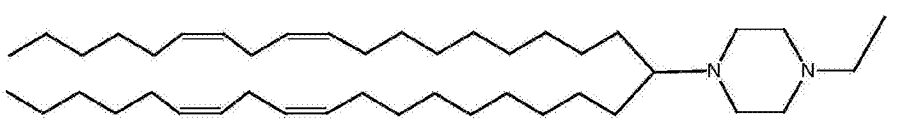
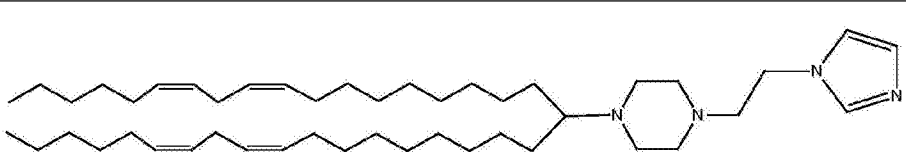
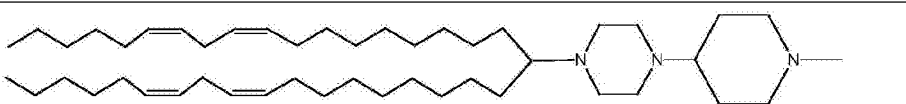




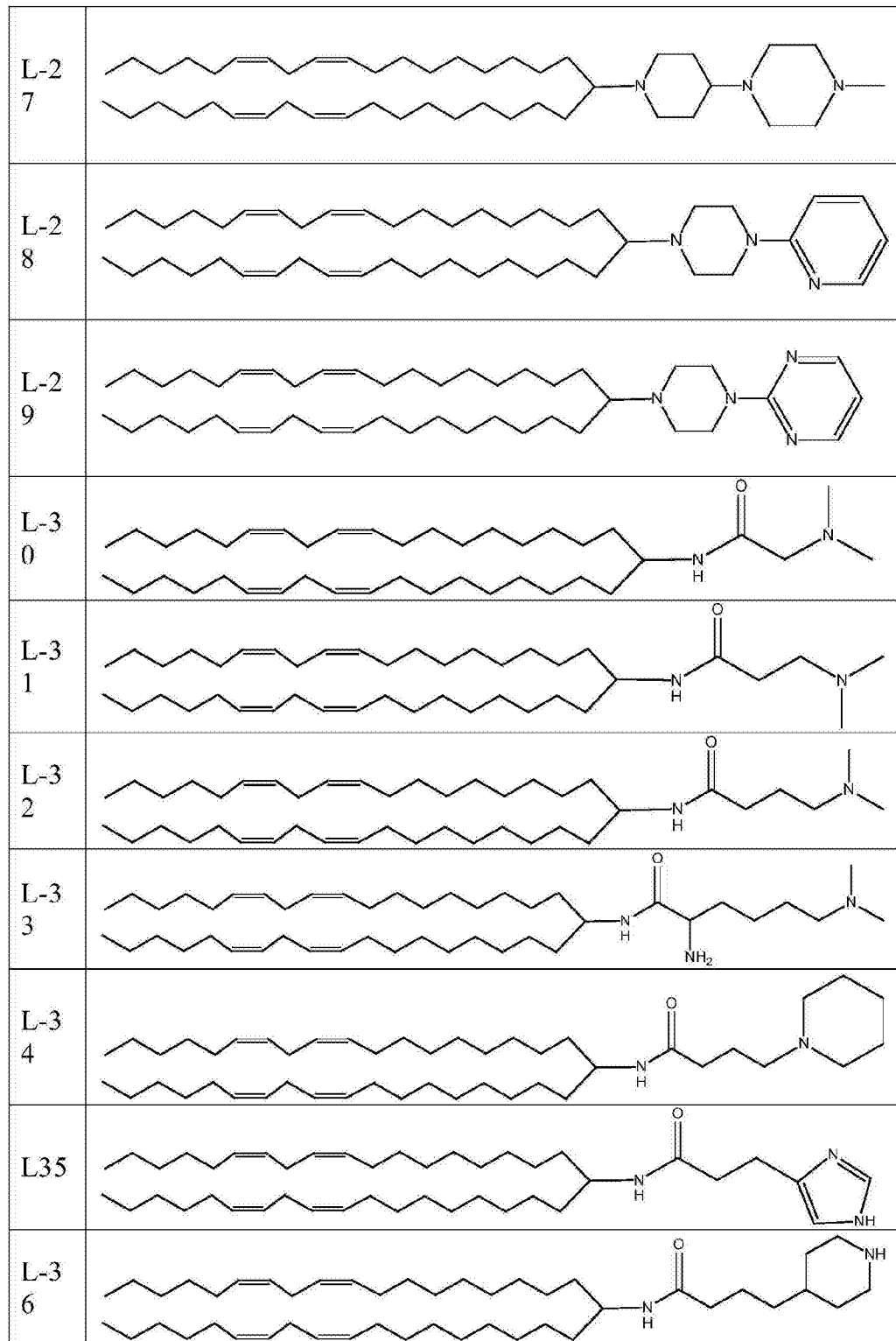
[0170]

L-5	
L-6	
L-7	
L-8	
L-9	
L-10	
L-11	
L-12	
L-13	
L-14	
L-15	
L-16	

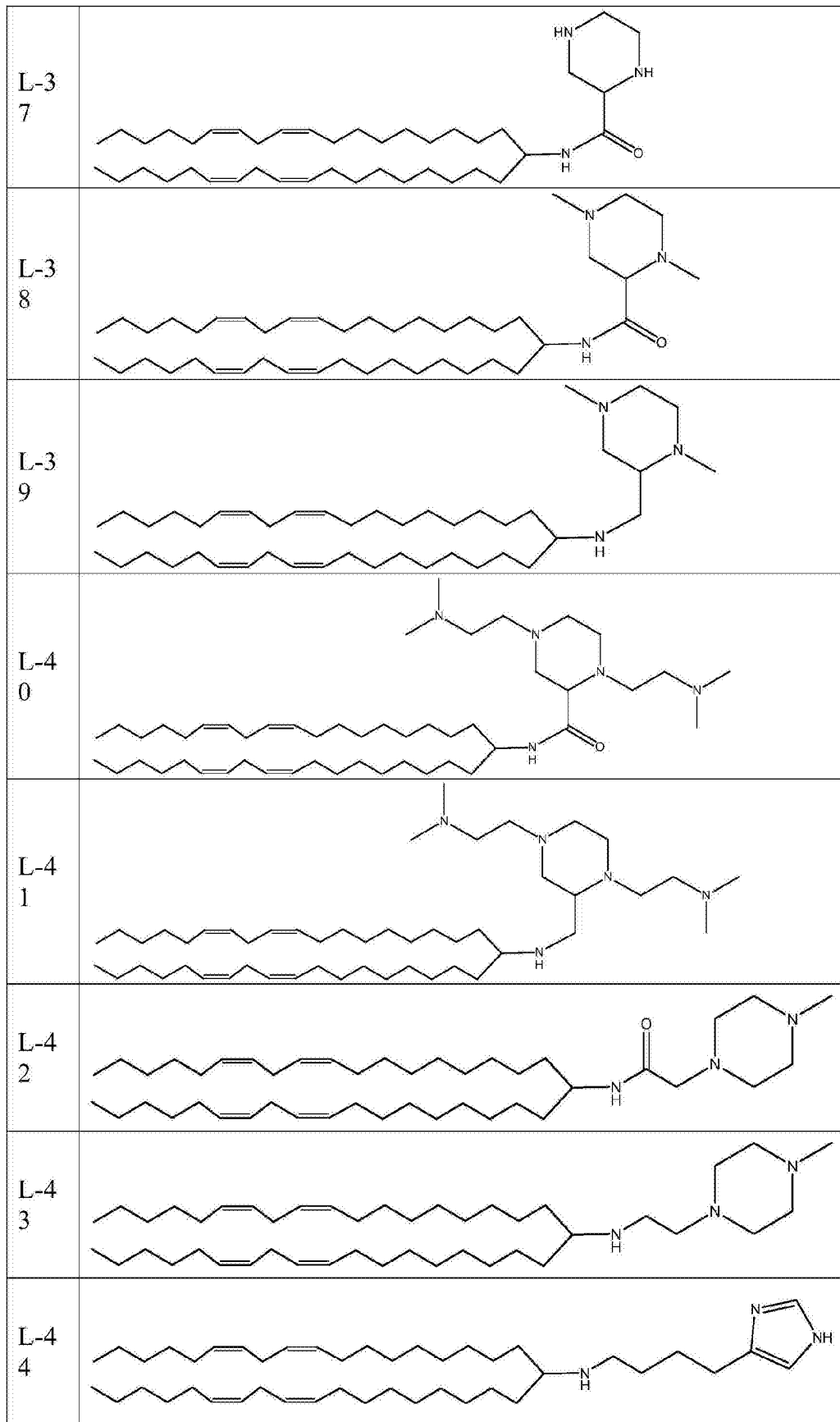
[0171]

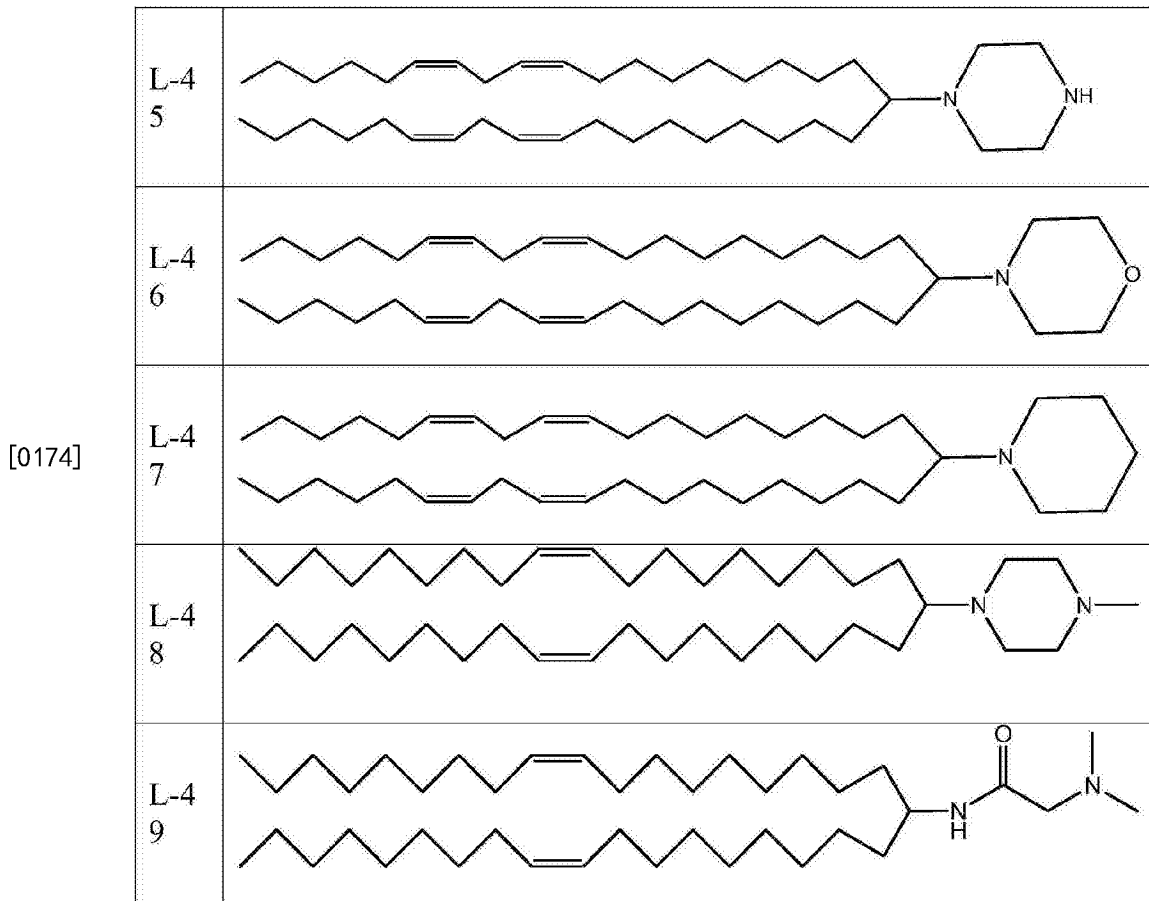
L-1 7	
L-1 8	
L-1 9	
L-2 0	
L-2 1	
L-2 2	
L-2 3	
L-2 4	
L-2 5	
L-2 6	

[0172]



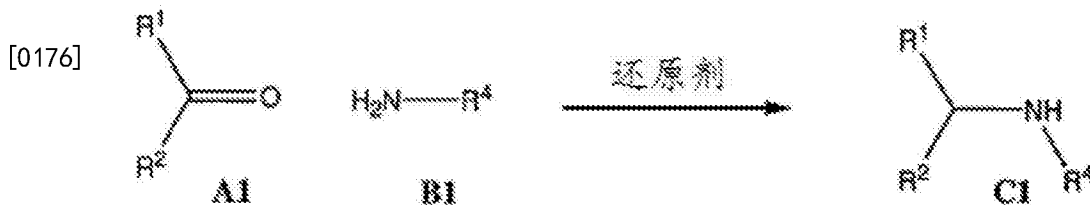
[0173]





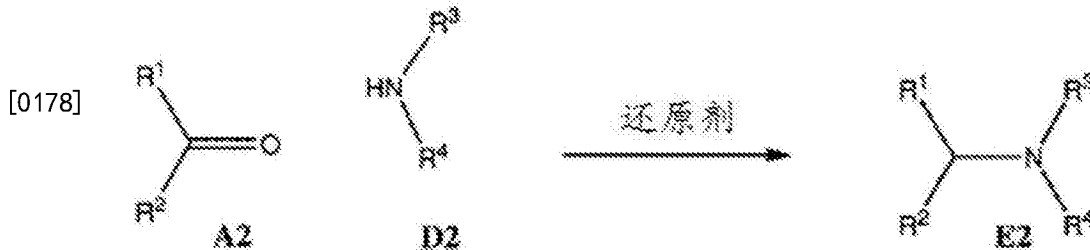
[0175] 本发明化合物(例如,如表1中提供的)可以通过类似于本领域建立的那些方法来制备,例如,通过方案1-4所示的反应序列。这些反应序列或其调整产生的示例性脂质提供于图1-9和图17。

### 方案 1



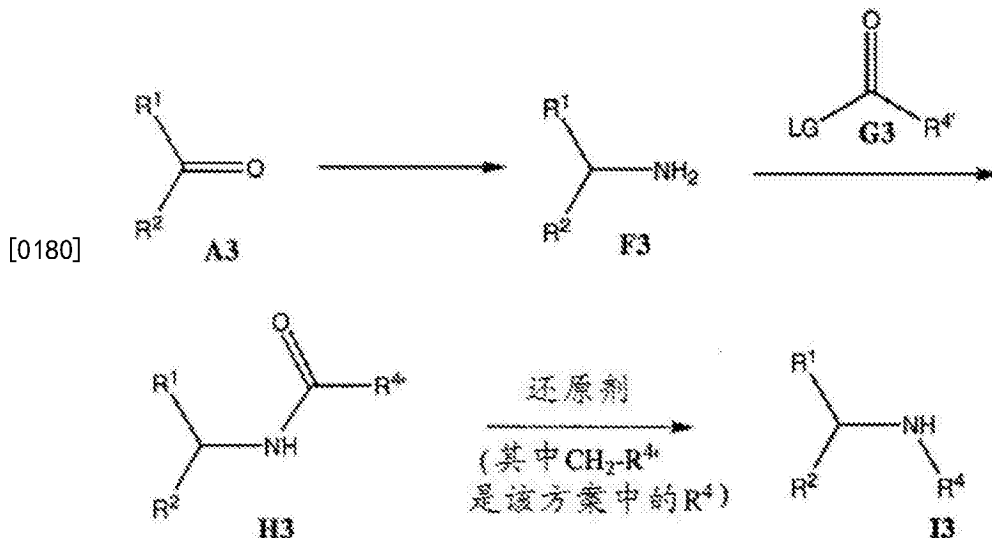
[0177] 可以通过在还原胺化条件下用其中 $R^4$ 如本文所述的伯胺B1处理其中 $R^1$ 和 $R^2$ 是如本文所述的脂质尾基的酮A1,来制备式C1的仲胺。还原胺化条件包括将酮A1和伯胺B1与还原剂、例如氰基硼氢化钠或三乙酰氧基硼氢化钠在适当溶剂中混合。在特定实施方案中,C1的氨基-胺脂质被进一步氧化以形成在 $R^3$ 中相邻氮的碳上具有氧基的相应的氨基-酰胺脂质。在其他实施方案中,C1的氨基-胺脂质在氮或 $R^4$ 的任何碳上进一步经历烷基化。可以使用该方案产生的示例性化合物提供于图1。

方案 2

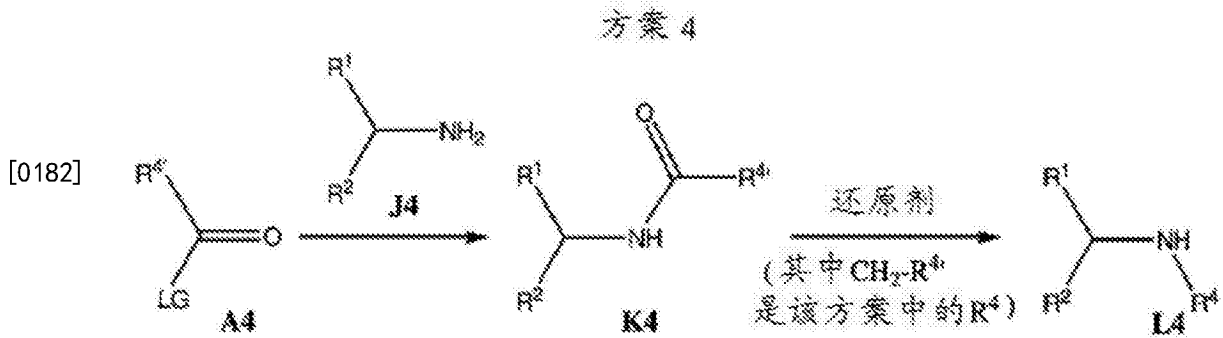


[0179] 可以通过在还原胺化条件下用其中R<sup>3</sup>和R<sup>4</sup>如本文所述的仲胺D2处理其中R<sup>1</sup>和R<sup>2</sup>是如本文所述的脂质尾基的酮A2,来制备式E2的叔胺。还原胺化条件包括将酮A2和伯胺D2与还原剂、例如氰基硼氢化钠或三乙酰氧基硼氢化钠在适当溶剂中混合。在D2的一些实施方案中,R<sup>3</sup>和R<sup>4</sup>结合形成含有一个或多个杂原子的杂环,并且得到的叔胺E2包括这种R<sup>3</sup>和R<sup>4</sup>基团。在特定实施方案中,E2的氨基-胺脂质被进一步氧化以形成在R<sup>3</sup>或R<sup>4</sup>中相邻氮的碳上具有氧基的相应的氨基-酰胺脂质。在其他实施方案中,E2的氨基-胺脂质在R<sup>3</sup>和/或R<sup>4</sup>的任何碳上进一步经历烷基化。

方案 3



[0181] 可以通过在适当溶剂中、任选高压下混合酮A3、氨水、二氢和催化剂来制备式F3的胺。可以通过在适当溶剂中混合胺F3与活化的羧酸G3来制备式H3的氨基-酰胺脂质,其中LG是离去基团并且R<sup>4</sup>如本文所述。示例性的LG包括卤素(例如,氯、溴或碘)、甲苯磺酸盐和三氟甲磺酸盐。可以通过混合酰胺H3与还原剂(例如,氢化铝锂、硼烷-四氢吡喃或硼烷-二甲基硫醚)来制备I3的氨基-胺脂质。在特定实施方案中,H3的氨基-酰胺脂质在氮或R<sup>4</sup>的任何碳上进一步经历烷基化。在其他实施方案中,I3的氨基-胺脂质在氮或R<sup>4</sup>的任何碳上进一步经历烷基化。



[0183] 可以通过在适当溶剂中混合酮A4和胺J4来制备式K4的氨基-酰胺脂质,其中LG是离去基团并且R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>和R<sup>4</sup>如本文所述。示例性的LG包括卤素(例如,氯、溴或碘)、甲苯磺酸盐和三氟甲磺酸盐。可以通过混合酰胺K4与还原剂(例如,氢化铝锂、硼烷-四氢吡喃或硼烷-二甲基硫醚)来制备L4的氨基-胺脂质。在其他实施方案中,K4的氨基-酰胺脂质在氮或R<sup>1</sup>的任何碳上进一步经历烷基化。在其他实施方案中,L4的氨基-胺脂质在氮或R<sup>4</sup>的任何碳上进一步经历烷基化。由该方法制备的示例性化合物提供于图7。

[0184] 在上述方案的任何一个中,R<sup>4</sup>可以是如本文描述的任选取代的杂环基、任选取代的-L<sup>1</sup>-NR<sup>5</sup>R<sup>6</sup>、任选取代的-C(O)-L<sup>1</sup>-NR<sup>5</sup>R<sup>6</sup>或任选取代的-L<sup>1</sup>-杂环基。

[0185] 在上述方案的任何一个中,化合物可以被进一步烷基化以在N上引入任选取代的C<sub>1-6</sub>烷基(即,R<sup>3</sup>是任选取代的C<sub>1-6</sub>烷基)以形成叔胺。具有叔胺的示例性化合物提供于图3。

[0186] 通过应用上文或实施例1-5中提供的合成方案并且在需要时通过做出本领域技术人员已知的调整,可以制备本文所述、例如图1-9和图17中的脂质的任何一个。

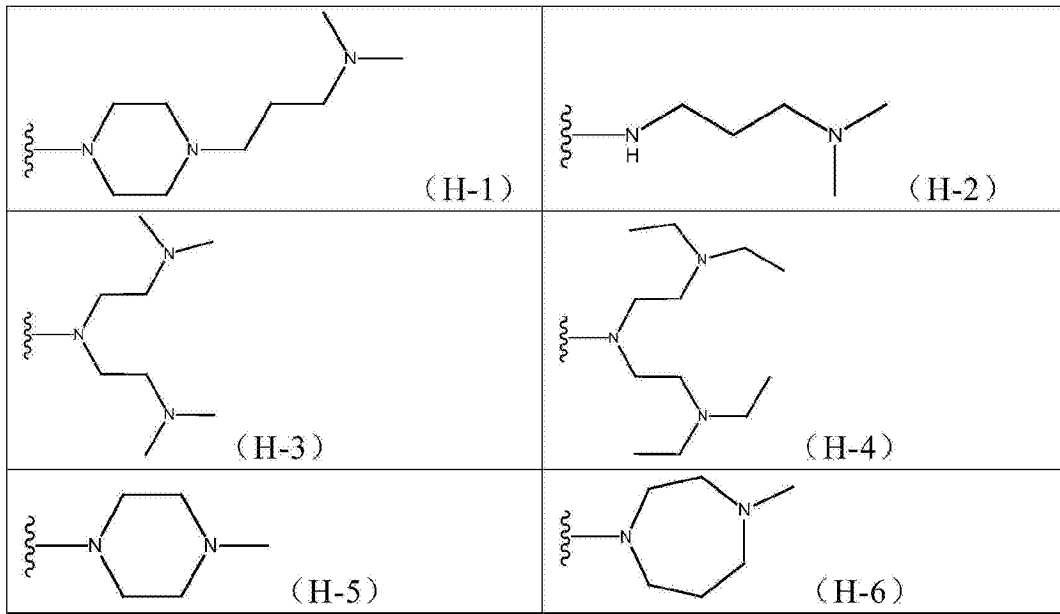
#### [0187] 脂质头基

[0188] 本发明化合物一般包括一个脂质头基、一个头段(headpiece)和一个或多个脂质尾基。头段例如>CH-连接头基与尾基。在特定实施方案中,头基包括两个或多个氮原子。本文描述的、例如表2或3中的头基的任何一个可以任选地经一个或多个取代基(例如,一个或多个本文针对烷基描述的取代基)取代。

[0189] 表2提供了具有胺基的头基的非限制性清单。本文描述的头基、例如表2中的头基H-1至H-39的任何一个可以与本文描述的、例如表4中的尾基的任何一个通过头段>CH-组合形成发明化合物。

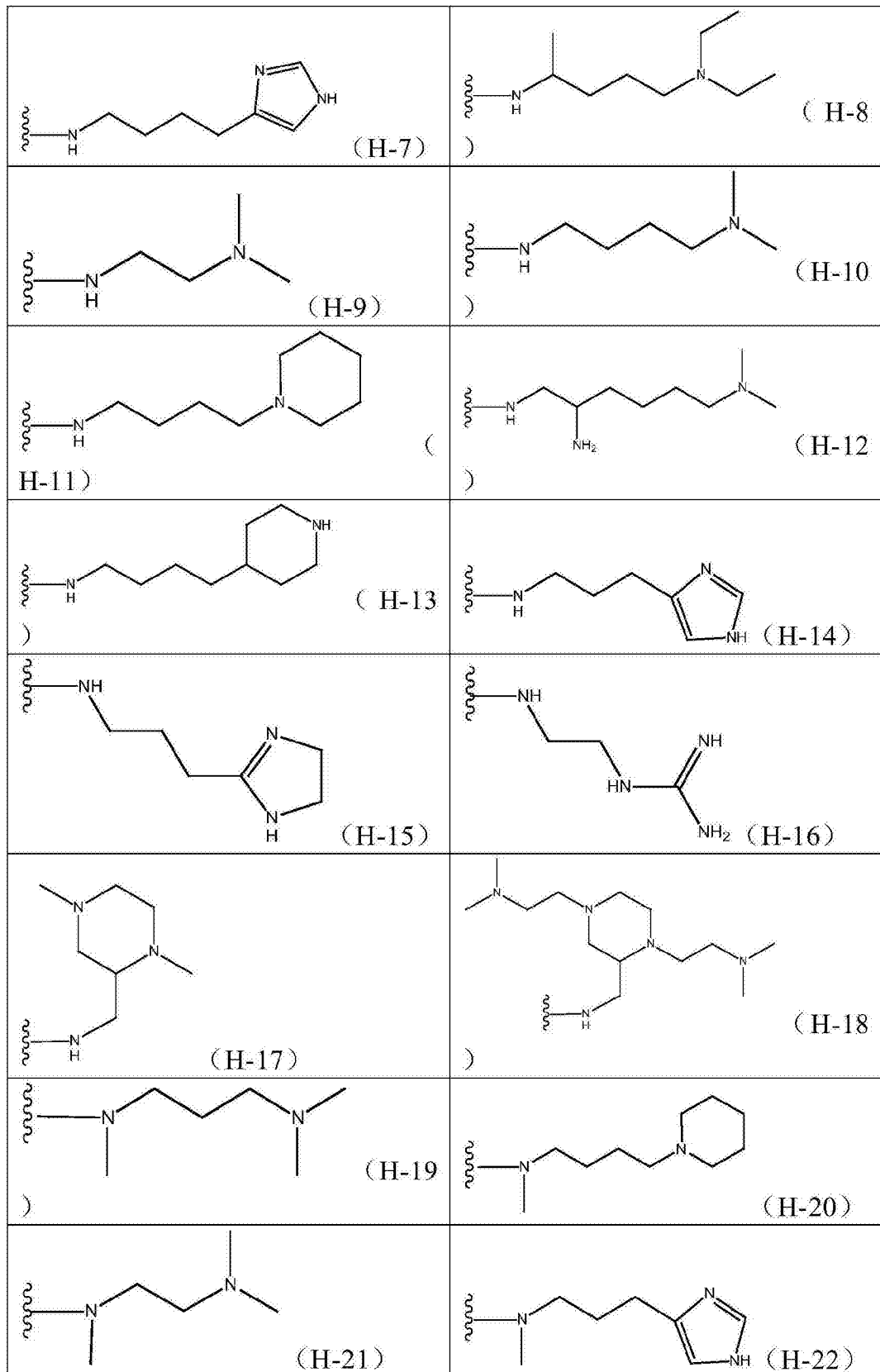
#### [0190] 表2:脂质头基的实例

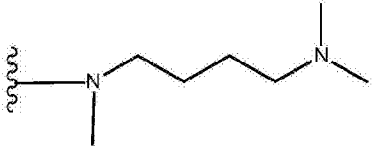
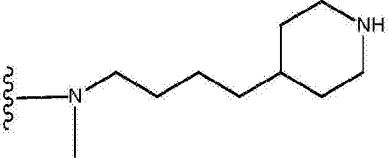
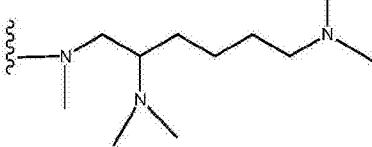
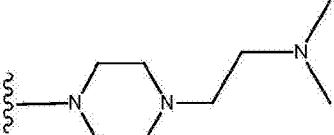
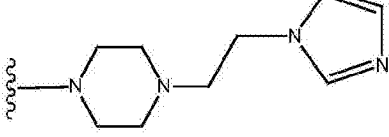

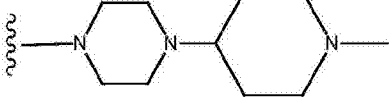
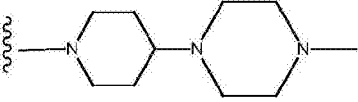
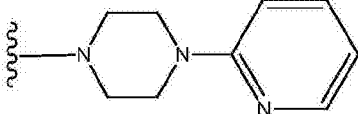
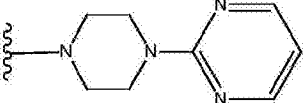
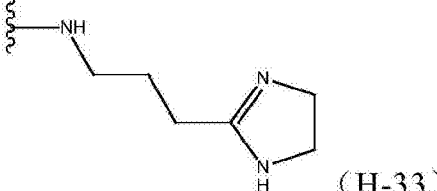
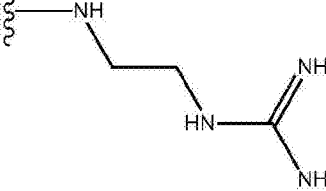
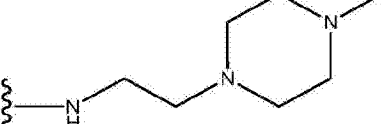
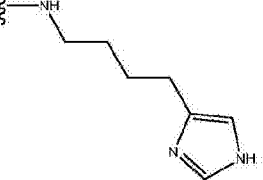
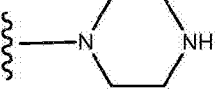
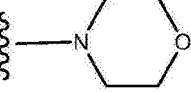
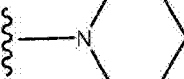
[0191]





[0192]

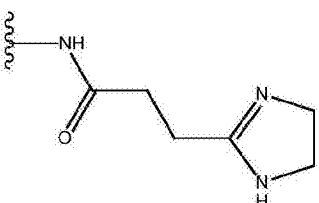
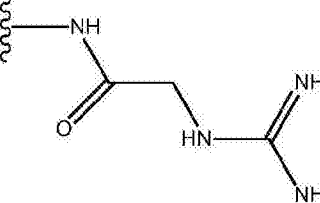
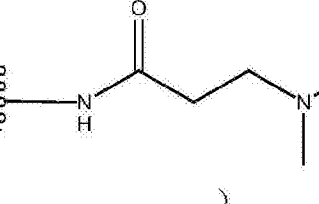
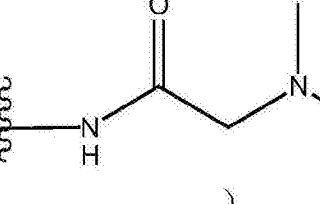
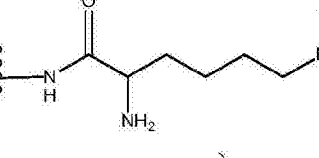
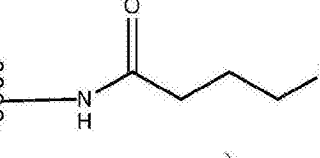
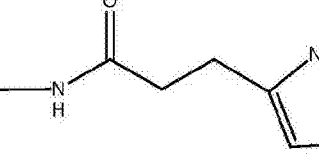
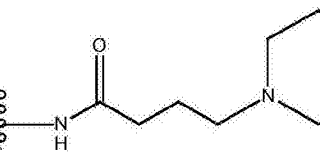
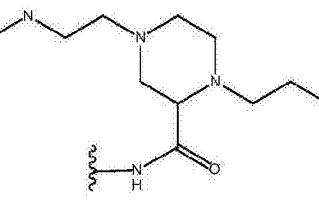
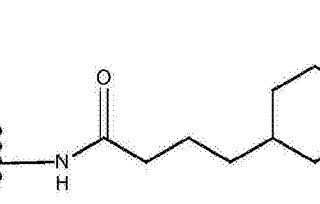
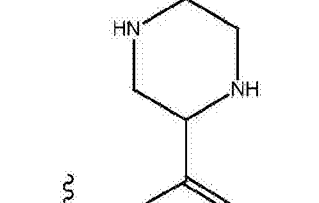
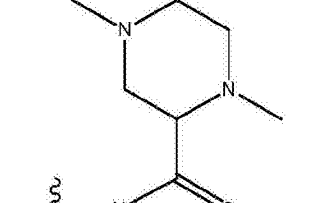
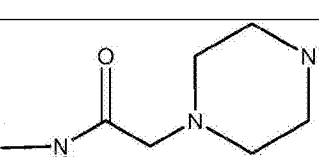


 (H-23)	 (H-24)
 (H-25)	 (H-26)
 (H-27)	 (H-28)
 (H-29)	 (H-30)
<p>[0193]</p>  (H-31)	 (H-32)
 (H-33)	 (H-34)
 (H-35)	 (H-36)
 (H-37)	 (H-38)
 (H-39)	

[0194] 表3提供了具有酰胺基团的头基的非限制性清单。本文描述的头基、例如表3中的头基H-40至H-52的任何一个可以与本文描述的、例如表4中的尾基的任何一个通过头段>

CH-组合形成发明化合物。

[0195] 表3: 含有酰胺的脂质头基的实例

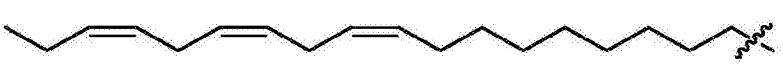
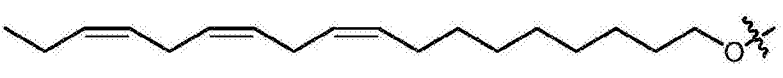
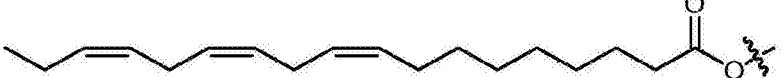
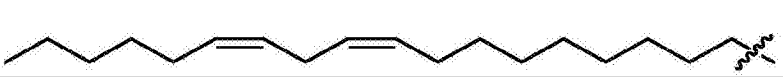
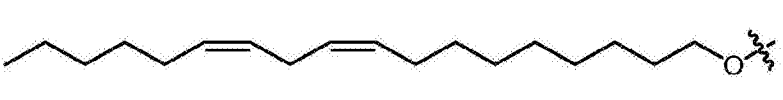
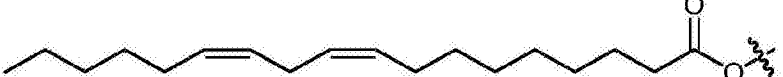
 <p>(H-40)</p>	 <p>(H-41)</p>
 <p>(H-42)</p>	 <p>(H-43)</p>
 <p>(H-44)</p>	 <p>(H-45)</p>
<p>[0196]</p>  <p>(H-46)</p>	 <p>(H-47)</p>
 <p>(H-48)</p>	 <p>(H-49)</p>
 <p>(H-50)</p>	 <p>(H-51)</p>
<p>[0197]</p>  <p>(H-52)</p>	

[0198] 脂质尾基

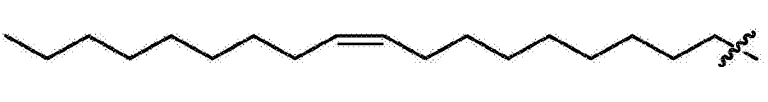
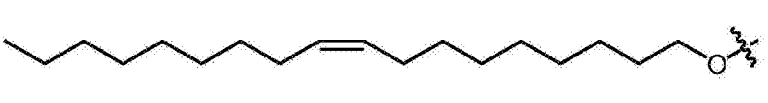
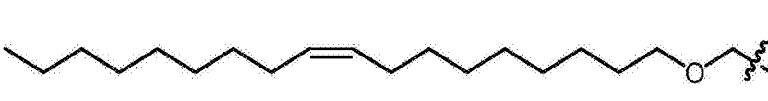
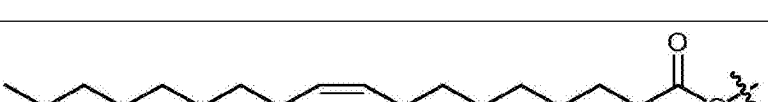
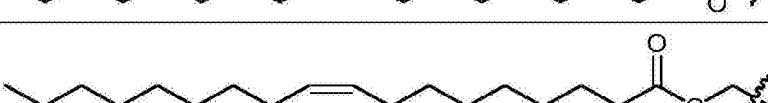
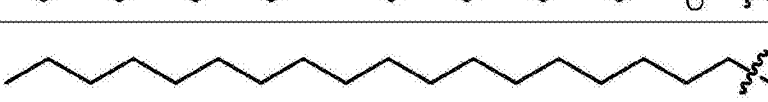
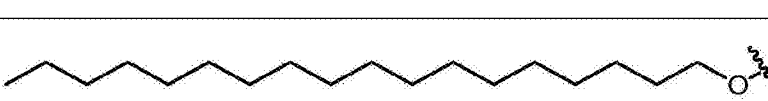
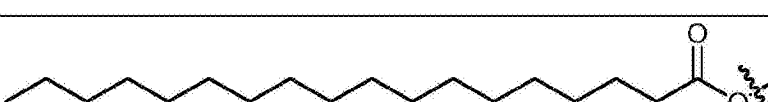
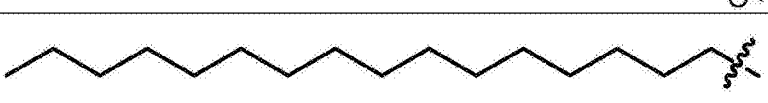
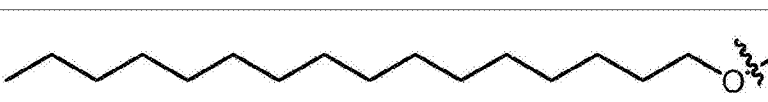


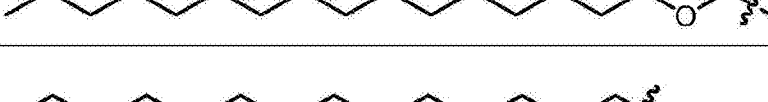


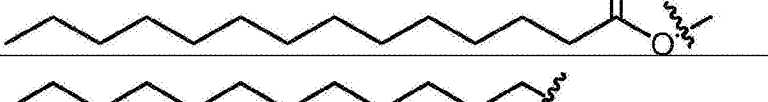
[0199] 如本文描述的,本发明化合物一般包括一个或多个尾基,所述尾基可以任选地包括一个或多个杂原子。对于每种化合物,尾基可以相同或不同。本文描述的、例如表4中的尾基的任何一个可以任选地经一个或多个取代基(例如,一个或多个本文针对烷基描述的取代基)取代。

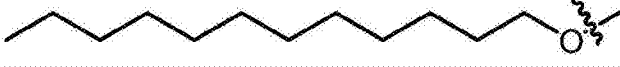
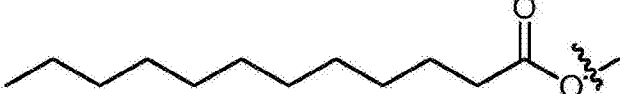
[0200] 示例性尾基包括具有碳或一个或多个杂原子(例如,O)的饱和和不饱和基团,例如亚麻烯基(C18:3)、亚麻烯基氧基(C18:3)、亚麻酰基(C18:3)、亚油烯基(C18:2)、亚油烯基氧基(C18:2)和亚油酰基(C18:2);和本文描述的通过亚甲基连接至头段的任何杂原子尾基,例如选自由亚麻烯基氧基亚甲基(C18:3)、亚麻酰基亚甲基(C18:3)和亚油烯基氧基亚甲基(C18:2)或亚油酰基亚甲基(C18:2)组成的组的尾基。表4提供了脂质尾基的其他非限制性清单。

[0201] 表4:脂质尾基的实例

亚麻烯基 (C18:3)	
亚麻烯基氧基 (C18:3)	
亚麻酰基 (C18:3)	
[0202] 亚油烯基 (C18:2)	
亚油烯基氧基 (C18:2)	
亚油酰基 (C18:2)	

[0203]

油烯基 (C18: 1)	
油烯基氧基 (18: 1)	
油烯基氧基 亚甲基 (18: 1)	
油酰基 (C18: 1)	
油酰基亚甲 基 (C18: 1)	
硬脂基 (18: 0)	
硬脂基氧基 (C18: 0)	
硬脂酰基 (C18: 0)	
棕榈基 (16: 0)	
棕榈基氧基 (C16: 0)	
棕榈酰基 (C16: 0)	
棕榈酰基亚 甲基 (C16: 0)	
肉豆蔻基 (14: 0)	
肉豆蔻基氧 基 (C14: 0)	
肉豆蔻酰基 (C14: 0)	
月桂基 (12: 0)	

[0204]	月桂基氧基 (12: 0)	
	月桂酰基 (12: 0)	

## [0205] 制剂

[0206] 本发明化合物可以与一种或多种脂质分子(例如,阳离子、阴离子或中性脂质)组合产生制剂。制剂还可以包括一种或多种组分(例如,甾醇衍生物、PEG-脂质轭合物、聚酰胺-脂质轭合物、神经节苷脂、抗氧化剂、表面活性剂、两亲剂或盐)和/或一种或多种聚阳离子有效载荷(例如,一种或多种核酸或RNAi剂)。已经描述了配制脂质以加入核酸有效载荷的方法,参见例如Judge等人,J.Clin.Invest.119(3):661,2009;Noble等人,Cancer Chemother.Pharmacol.64(4):741,2009;Abrams等人,Mol.Ther.18(1):171,2009;Yagi等人,Cancer Res.69(16):6531,2009;Ko等人,J.Control.Release133(2):132,2009;Mangala等人,Methods Mol.Biol.555:29,2009,其在此通过引用并入。

## [0207] 具有超过一个脂质分子的制剂

[0208] 本发明制剂可以包括任何有用的脂质分子组合(例如,本发明化合物、阳离子脂质(任选包括一种或多种阳离子脂质,例如,一种或多种如本文描述的本发明阳离子脂质和/或任选包括一种或多种本领域已知的阳离子脂质)、中性脂质、阴离子脂质和PEG-脂质轭合物),包括多肽-脂质轭合物和辅助如本文描述的脂质载体的形成或稳定性的其他组分。本领域技术人员知道如何优化有利于特定剂的包封、脂质制剂的稳定性、放大反应条件或任何其他相关因素的组合。本发明制剂可以包括辅助形成或稳定性的其他组分。

[0209] 可以平衡制剂中每种组分的百分比以产生能够包封RNAi剂并将该剂转染进入细胞的脂质载体。示例性制剂包括约10mol%至约40mol%的一种或多种本发明化合物、约10mol%至约40mol%的一种或多种阳离子脂质、约1mol%至约20mol%的一种或多种PEG-脂质轭合物、约5mol%至约20mol%的一种或多种中性脂质和约20mol%至约40mol%的一种或多种甾醇衍生物。在特定实施方案中,制剂包括约20mol%至约25mol%(例如,约21.0mol%、21.2mol%、21.4mol%、21.6mol%、21.8mol%或22mol%)的一种或多种本发明化合物、约25mol%至约30mol%(例如,约25.1mol%、25.2mol%、25.3mol%、25.4mol%、25.5mol%、25.6mol%、25.7mol%、25.8mol%、25.9mol%、26.0mol%、26.2mol%、26.4mol%、26.6mol%、26.8mol%或27mol%)的一种或多种阳离子脂质(例如,DODMA)、约10mol%至约15mol%(例如,约13.0mol%、13.2mol%、13.4mol%、13.6mol%、13.8mol%、14mol%、14.1mol%、14.3mol%、14.5mol%、14.7mol%或14.9mol%)的一种或多种中性脂质(例如,DSPC)、约2.5mol%至约10mol%(例如,约2.5mol%、2.6mol%、2.7mol%、2.8mol%、2.9mol%、3mol%、3.5mol%、4mol%、4.3mol%、4.5mol%、4.7mol%、5mol%、5.3mol%、5.5mol%、5.7mol%、6mol%、6.5mol%、6.7mol%、7mol%、7.5mol%、8mol%、8.5mol%或9mol%)的一种或多种PEG-脂质轭合物(例如,约2.8mol%、2.9mol%、3.0mol%、3.5mol%、3.7mol%、3.9mol%、4mol%、4.1mol%、4.3mol%、4.5mol%、4.7mol%、4.9mol%、5mol%、5.1mol%、5.3mol%、5.5mol%、5.7mol%、5.9mol%、6mol%、6.3mol%、6.5mol%、6.7mol%或7mol%的PEG2000-DSPE和/或PEG2000-DMPE和/或3mol%、

3.5mol%、3.7mol%、3.9mol%、4mol%、4.1mol%、4.3mol%、4.5mol%、4.7mol%、4.9mol%、5mol%、5.1mol%、5.3mol%、5.5mol%、5.7mol%、5.9mol%、6mol%、6.3mol%、6.5mol%、6.7mol%或7mol%的PEG2000-DMG)和约25mol%至约35mol%(例如,约28.4mol%、28.6mol%、28.8mol%、29.0mol%、30mol%、31mol%、32mol%、33mol%、33.2mol%、33.4mol%、33.6mol%、33.8mol%、34mol%、34.4mol%、34.7mol%或34.9mol%)的甾醇衍生物(例如,胆固醇)。

[0210] 制剂可以包括任何有用量的一种或多种阳离子脂质。在一些实施方案中,制剂中阳离子脂质的含量是约10mol%至约40mol%(例如,约10mol%至15mol%、约15mol%至20mol%、约20mol%至25mol%、约25mol%至30mol%、约30mol%至35mol%、和约35mol%至40mol%)。在特定实施方案中,使用了混合的阳离子脂质(例如,10.8mol%的L-1和10.8mol%的L-2)。

[0211] 在一些实施方案中,制剂包括具有一种或多种RNA结合剂和一种或多种转染脂质的脂质颗粒,其中所述一种或多种RNA结合剂包括约10mol%至约40mol%的一种或多种阳离子脂质(例如,DODMA)和约0.5mol%至约10mol%的一种或多种PEG-脂质轭合物(例如,PEG-DSPE,例如PEG2000-DSPE,和/或PEG-DMPE,例如PEG2000-DMPE);并且其中所述一种或多种转染脂质包括约10mol%至约40mol%的一种或多种本发明化合物(例如,L-6、L-30或表1中的任何一个)、约5mol%至约20mol%的一种或多种中性脂质(例如,DSPC)、约0.5mol%至约10mol%的一种或多种PEG-脂质轭合物(例如,PEG-DSPE,例如PEG2000-DSPE和/或PEG-DMPE,例如PEG2000-DMPE)和约20mol%至约40mol%的一种或多种甾醇衍生物(例如,胆固醇)。

[0212] 脂质颗粒的RNA结合剂可以包括任何有用的脂质和轭合物的组合。在特定实施方案中,阳离子脂质(例如,DODMA)的含量是约10mol%至约40mol%(例如,约20mol%至40mol%、20mol%至35mol%、20mol%至30mol%、15mol%至40mol%、15mol%至35mol%、15mol%至25mol%、或15mol%至20mol%)。在一些实施方案中,PEG-脂质轭合物(例如,PEG-DSPE,例如PEG2000-DSPE,和/或PEG-DMPE,例如PEG2000-DMPE)是约0.5mol%至约10mol%(例如,约0.5mol%至1mol%、0.5mol%至5mol%、0.5mol%至10mol%、1mol%至5mol%、或1mol%至10mol%)。

[0213] 脂质颗粒的转染脂质可以包括任何有用的脂质和轭合物的组合。在特定实施方案中,一种或多种本发明化合物(例如,L-6、L-30或表1中的任何一个)的含量是约10mol%至约40mol%(例如,约10mol%至20mol%、10mol%至30mol%、10mol%至35mol%、15mol%至20mol%、15mol%至25mol%、15mol%至30mol%、15mol%至35mol%、15mol%至40mol%、20mol%至25mol%、20mol%至30mol%、20mol%至35mol%、20mol%至40mol%、25mol%至30mol%、25mol%至35mol%、或25mol%至40mol%)。在一些实施方案中,一种或多种中性脂质(例如,DSPC)的含量是约5mol%至约20mol%(例如,约5mol%至10mol%、5mol%至15mol%、7mol%至10mol%、7mol%至15mol%、7mol%至20mol%、10mol%至15mol%、或10mol%至20mol%)。在一些实施方案中,一种或多种PEG-脂质轭合物(例如,PEG-DSPE,例如PEG2000-DSPE,和/或PEG-DMPE,例如PEG2000-DMPE)的含量是约0.5mol%至约10mol%(例如,约0.5mol%至1mol%、0.5mol%至5mol%、0.5mol%至10mol%、1mol%至5mol%、或1mol%至10mol%)。在一些实施方案中,一种或多种甾醇衍生物(例如,胆固醇)的含量是约

20mol%至约40mol% (例如,约20mol%至25mol%、20mol%至30mol%、20mol%至35mol%、20mol%至40mol%、25mol%至30mol%、25mol%至35mol%、或25mol%至40mol%)。

[0214] 在其他实施方案中,本发明化合物用于RNA结合剂的制剂(例如,约25.9mol%的L-6、L-30、L-48或L-49)。在特定实施方案中,RNA结合剂制剂中使用的本发明化合物不同于转染脂质制剂中使用的本发明化合物(例如,25.9mol%L-48作为RNA结合剂,并且21.6mol%L-30作为转染脂质)。在制剂的一些实施方案中,一种或多种RNA结合剂形成内部聚集体,并且一种或多种转染脂质形成外部聚集体表面。在特定实施方案中,外部聚集体表面不是膜、脂质双层和/或多层。

[0215] 制剂还可以包括任何有用量的一种或多种PEG-脂质轭合物。在一些实施方案中,制剂中PEG-脂质轭合物的含量是约1mol%至约20mol% (例如,约1mol%至约2mol%、约2mol%至约4mol%、约2mol%至约7mol%、约4mol%至约8mol%、约8mol%至约12mol%、约12mol%至约16mol%、或约16mol%至约20mol%)。在其他实施方案中,PEG-脂质轭合物的含量是约7mol%、6mol%、3.0mol%、或2.5mol%。而且,PEG-脂质含量可以通过适当调整DSPC或胆固醇或两者的含量而变化,约1mol%至约20mol%。通过使用C14:0 (如表4中,例如,PEG-DSPE或PEG-DMPE等)、C16 (PEG-DPPE、PEG-DPG等)、C18:0 (PEG-DSPE、PEG-DSG等)、或C18:1 (PEG-DOPE、PEG-DOG等),可以改变PEG-脂质。而且,可以使用不同分子量的PEG部分(PEG2000、PEG3400、PEG5000等)。在特定实施方案中,如本文使用的,使用混合的PEG-轭合物。在特定实施方案中,使用PEG2000-DSPE。在特定实施方案中,使用PEG2000-DMPE。

[0216] 含有RNAi剂的制剂

[0217] 可以通过本文描述的任何方法用氨基-胺阳离子脂质和/或氨基-酰胺脂质与RNAi剂配制本发明的制剂。例如,参见:Judge等人,J.Clin.Invest.119(3):661,2009;Noble等人,Cancer Chemother.Pharmacol.64(4):741,2009;Abrams等人,Mol.Ther.18(1):171,2009;Yagi等人,Cancer Res.69(16):6531,2009;Ko等人,J.Control.Release133(2):132,2009;Mangala等人,Methods Mol.Biol.555:29,2009,其在此通过引用并入。

[0218] 制剂可以包括任何有用比率的RNAi剂和脂质分子和/或一种或多种组分。示例性比率包括约1:10至约1:100 (w/w) (例如,约1:10至约1:50,例如约1:20)的RNAi剂:总脂质比率的(w/w)比率,其中总脂质比率是一种或多种脂质分子(例如,阳离子、阴离子或中性脂质)和一种或多种组分(例如,甾醇衍生物、PEG-脂质轭合物、聚酰胺-脂质轭合物、神经节苷脂、抗氧化剂、表面活性剂、两亲剂或盐)的组分的重量。

[0219] 制剂可以包括范围约1mg/kg至约10mg/kg的本文描述的任何RNAi剂的剂量的RNAi剂。示例性剂量包括在制剂中1mg/kg、2mg/kg、3mg/kg、4mg/kg、5mg/kg、6mg/kg、7mg/kg、8mg/kg、9mg/kg和10mg/kg的RNAi剂。

[0220] 制备制剂的方法

[0221] 可以使用任何有用的方法来制备本发明制剂。在一个示例性程序中,制剂的组分(例如,一种或多种RNA结合剂、转染脂质或本文描述的任何脂质)溶解于溶剂(例如,水性溶剂、非水性溶剂或其溶剂混合物)。得到的脂质悬液可以任选地被过滤、混合(例如,批混合、在线混合和/或涡旋)、蒸发(例如,使用氮或氩流)、重悬(例如,在水性溶剂、非水性溶剂或其溶剂混合物中)、冻融、挤出和/或超声。而且,可以任选地通过添加任何想要的组分(例如,一种或多种RNAi剂、RNA结合剂、转染脂质和/或本文描述的任何脂质)来处理脂质悬液



以产生最终悬液。可以悬液形式在相同或不同溶剂中提供一种或多种想要的组分。例如,脂质悬液可以提供于第一溶剂或溶剂系统(例如,一种或多种水性或非水性溶剂,例如水、水-HCl、水-乙醇、缓冲液(例如,磷酸盐缓冲盐水(PBS)、Hank平衡盐溶液(HBSS)、Dulbecco磷酸盐缓冲盐水(DPBS)、Earle平衡盐溶液(EBSS)、碳酸盐、乳酸盐、抗坏血酸盐和柠檬酸盐,例如5mM、10mM、50mM、75mM、100mM或150mM)、生理渗透压溶液(290mOsm/kg,例如0.9%盐水、5%右旋糖和10%蔗糖)、盐水、甲醇、乙醇、正丙醇、异丙醇、正丁醇、异丁醇、叔丁醇、甘油、乙二醇、丙二醇、聚乙二醇、氯仿、二氯甲烷、己烷、环己烷、丙酮、乙醚、二乙醚、二噁烷、异丙醚、四氢呋喃或其组合),并且RNAi剂可以提供于第二溶剂或溶剂系统,例如,一种或多种水性或非水性溶剂,例如水、水-HCl、水-乙醇、缓冲液(例如,磷酸盐缓冲盐水(PBS)、Hank平衡盐溶液(HBSS)、Dulbecco磷酸盐缓冲盐水(DPBS)、Earle平衡盐溶液(EBSS)、碳酸盐、乳酸盐、抗坏血酸盐和柠檬酸盐,例如5mM、10mM、50mM、75mM、100mM或150mM)、生理渗透压溶液(290mOsm/kg,例如0.9%盐水、5%右旋糖和10%蔗糖)、盐水、甲醇、乙醇、正丙醇、异丙醇、正丁醇、异丁醇、叔丁醇、甘油、乙二醇、丙二醇、聚乙二醇、氯仿、二氯甲烷、己烷、环己烷、丙酮、乙醚、二乙醚、二噁烷、异丙醚、四氢呋喃或其组合)。水性溶剂和/或缓冲液的示例性浓度包括约4%至约8%乙醇(例如,约4%至5%、5%至6%、6%至7%、或7%至8%)、约10mM至约100mM柠檬酸盐(例如,约10mM至30mM、30mM至50mM、50mM至70mM、70mM至90mM、或90mM至100mM)。任何溶剂或溶剂系统可以包括一种或多种稳定剂,例如抗氧化剂、盐(例如,氯化钠)、柠檬酸、抗坏血酸、甘氨酸、半胱氨酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、甘露醇、乳糖、海藻糖、麦芽糖、甘油、和/或葡萄糖。在其他实例中,使用第一溶剂或溶剂系统将一种或多种RNA结合剂引入脂质悬液,然后在第二溶剂或溶剂系统中添加一种或多种转染脂质,其中第一和第二溶剂或溶剂系统相同或不同(例如,第一溶剂或溶剂系统是本文描述的任何一个;并且第二溶剂或溶剂系统是本文描述的任何一个)。在特定实施方案中,第二溶剂或溶剂系统包括一种或多种选自由盐水、缓冲液(例如,柠檬酸盐或PBS)、水和乙醇组成的组的水性或非水性溶剂。最终悬液可以任选地被分离(例如,通过超速离心)、混合(例如,批混合、在线混合和/或涡旋)、重悬、调节(例如,用一种或多种溶剂或缓冲液系统)、超声、冻融、挤出和/或纯化。

#### [0222] 阳离子脂质

[0223] 一种或多种阳离子脂质可以包括在制剂中。除了本发明化合物外,其他阳离子脂质包括但不限于:N,N-二油烯基-N,N-二甲基氯化铵(DODAC)、1,2-二-0-十八烯基-3-三甲基铵丙烷(DOTMA)、N,N-二硬脂基-N,N-二甲基铵(DDAB)、1,2-二油酰基-3-三甲基铵-丙烷(DOTAP),包括手性形式R-DOTAP和S-DOTAP)、N-(1-(2,3-二油烯基氧基)丙基)-N-2-(精胺羧酰胺基)乙基)-N,N-二甲基铵(DOSPA)、二十八烷基酰氨基甘氨酸羧基精胺(DOGS)、1,2-二油酰基-3-二甲基铵丙烷(DODAP)、N,N-二甲基-(2,3-二油烯基氧基)丙基胺(DODMA)、N-(1,2-二肉豆蔻基氧基丙-3-基)-N,N-二甲基-N-羟基乙基铵(DMRIE)、1,2-二亚油烯基氧基-3-二甲基氨基丙烷(DLinDMA)、1,2-二亚麻烯基氧基-3-二甲基氨基丙烷(DLenDMA)、1,2-二亚油酰基-3-二甲基氨基丙烷(DLinDAP)、1-亚油酰基-2-亚油烯基氧基-3-二甲基氨基丙烷(DLin-2-DMAP)、1,2-二亚油烯基氨基甲酰基氧基-3-二甲基氨基丙烷(DLin-C-DAP)、1,2-二亚油烯基硫代-3-二甲基氨基丙烷(DLin-S-DMA)、2,2-二亚油烯基-4-二甲基氨基甲基-[1,3]-二氧戊环(DLin-K-DMA)、2,2-二亚油烯基-4-(2-二甲基氨基乙基)-[1,3]-二氧

戊环 (DLin-KC2-DMA)、1,2-二棕榈酰基-sn-甘油基-0-乙基-3-胆碱磷酸 (DPePC)、二硬脂基二甲基氯化铵 (DSDMA)、1,2-二月桂酰基-sn-甘油基-3-乙基胆碱磷酸 (12:0EPC, 例如, 或其氯盐)、1,2-二棕榈酰基-sn-甘油基-3-乙基胆碱磷酸 (16:0EPC, 例如, 或其氯盐)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-乙基胆碱磷酸 (18:0EPC, 例如, 或其氯盐)、1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-乙基胆碱磷酸 (18:1EPC, 例如, 或其氯盐)、二棕榈酰基磷脂酰乙醇酰氨基精胺 (DPPEs)、二棕榈酰基磷脂酰乙醇酰氨基L-赖氨酸 (DPPEL)、1-[2-二油酰基氧基]乙基]-2-油烯基-3-(2-羟基乙基)氯化咪唑啉 (DOTIM)、(1-甲基-4-(顺-9-二油烯基)甲基-氯化吡啶)) (SAINT) 和 C12-200, 如在 Love 等人, Proc Natl Acad Sci USA, 107 (5): 1864-1869 (2010) 中描述的, 其通过引用并入本文。

[0224] 阳离子脂质包括不同手性形式 (例如, 本文描述的任何阳离子脂质的 R 或 S 形式) 或任何盐形式 (例如, 本文描述的任何阳离子脂质的氯盐、溴盐、三氟乙酸盐或甲磺酸盐) 的那些。

[0225] 此外, 阳离子脂质的许多商业化制品可以包括在制剂中。这种商业化制品包括但不限于: 来自 Invitrogen Corp. 的 Lipofectamine™ (DOSPA 和 DOPE 的组合) 和 Lipofectin® (DOTMA 和 DOPE 的组合); 和来自 Promega Corp. 的 Transfectam® (包括 DOGS 的组合物) 和 Transfast™。

#### [0226] 阴离子脂质

[0227] 一种或多种阴离子脂质可以包括在制剂中。这种阴离子脂质包括但不限于: 磷脂酰甘油 (PG)、心磷脂 (CL)、二酰基磷脂酰丝氨酸 (PS)、二酰基磷脂酸 (PA)、磷脂酰肌醇 (PI)、N-酰基磷脂酰乙醇胺 (NAPE)、N-琥珀酰磷脂酰乙醇胺、N-戊二酰磷脂酰乙醇胺、赖氨酰磷脂酰甘油和棕榈酰基油酰基磷脂酰甘油 (POPG) 以及不同手性形式 (例如, R 或 S 形式)、盐形式 (例如, 氯盐、溴盐、三氟乙酸盐或甲磺酸盐) 及其混合物。

#### [0228] 中性脂质

[0229] 一种或多种中性脂质可以包括在制剂中。这种中性脂质包括但不限于: 神经酰胺、鞘磷脂 (SM)、二酰基甘油 (DAG)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-胆碱磷酸 (DSPC, 包括手性形式 R-DSPC 和 S-DSPC)、1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-胆碱磷酸 (DOPC)、1,2-二棕榈酰基-sn-甘油基-3-胆碱磷酸 (DPPC)、1,2-二油酰基-甘油基-sn-3-磷酸乙醇胺 (DOPE)、1-棕榈酰基-2-油酰基-sn-甘油基-3-胆碱磷酸 (POPC)、1-棕榈酰基-2-油酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺 (POPE)、1,2-二棕榈酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺 (DPPE)、1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺 (DMPE)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺 (DSPE)、1,2-二反油酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺 (DEPE)、1-硬脂酰基-2-油酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺 (SOPE)、1,2-二亚油酰基-sn-甘油基-3-胆碱磷酸 (DLPC) 以及不同的手性形式 (例如, R 或 S 形式)、盐形式 (例如, 氯盐、溴盐、三氟乙酸盐或甲磺酸盐) 及其混合物。其他的二酰基-sn-甘油基-3-胆碱磷酸和二酰基-甘油基-sn-3-磷酸乙醇胺脂质也可以用于本发明的脂质颗粒。

[0230] 在一些实施方案中, 制剂中存在的中性脂质组分包括一种或多种磷脂。在其他实施方案中, 中性脂质组分包括一种或多种磷脂和胆固醇的混合物。在一些实施方案中, 考虑药代动力学和/或药效动力学性质, 例如脂质颗粒尺寸和在血流中的稳定性, 来指导用于制

剂的中性脂质的选择。

#### [0231] 甾醇衍生物

[0232] 一种或多种甾醇衍生物可以包括在制剂中。不希望受理论束缚,甾醇衍生物可用于稳定制剂和/或增加转染。示例性的甾醇衍生物包括胆固醇、胆固醇衍生物(例如,胆甾烷酮、胆甾烯酮或粪甾醇); $3\beta$ -[(N-(N',N'-二甲基氨基乙烷)-氨基甲酰基]胆固醇(DC-胆固醇,例如,其盐酸盐);双胍-三氮乙基胺-胆固醇(BGTC);(2S,3S)-2-(((3S,10R,13R,17R)-10,13-二甲基-17-((R)-6-甲基庚-2-基)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-十四氢-1H-环戊二烯并[a]菲-3-基氧基)羰基氨基)乙基-2,3,4,4-四羟基丁酸酯(DPC-1);(2S,3S)-((3S,10R,13R,17R)-10,13-二甲基-17-((R)-6-甲基庚-2-基)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-十四氢-1H-环戊二烯并[a]菲-3-基)-2,3,4,4-四羟基丁酸酯(DPC-2);双((3S,10R,13R,17R)-10,13-二甲基-17-((R)-6-甲基庚-2-基)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-十四氢-1H-环戊二烯并[a]菲-3-基)-2,3,4-三羟基戊二酸酯(DPC-3);和6-(((3S,10R,13R,17R)-10,13-二甲基-17-((R)-6-甲基庚-2-基)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-十四氢-1H-环戊二烯并[a]菲-3-基氧基)氧代磷酰基氧基)-2,3,4,5-四羟基己酸酯(DPC-4)。

#### [0233] PEG-脂质轭合物

[0234] 一种或多种PEG-脂质轭合物可以包括在制剂中。不希望受理论束缚,PEG-脂质轭合物可以减少脂质载体的聚集。PEG-脂质轭合物描述于美国专利号5,885,613和美国专利公布号2003/0077829,其通过引用并入本文。

[0235] 可以包括在制剂中的PEG-脂质轭合物包括但不限于:1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-(羰基-甲氧基-聚乙二醇)(PEG-DMPE)(例如,1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-(羰基-甲氧基-聚乙二醇-2000)(PEG-2000-DMPE))、1,2-二棕榈酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-(羰基-甲氧基-聚乙二醇)(PEG-DPPE)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-(羰基-甲氧基-聚乙二醇)(PEG-DSPE)、1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-(羰基-甲氧基-聚乙二醇)(PEG-DOPE)、1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油基-3-(甲氧基-聚乙二醇)(PEG-DMG)(例如,1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油基-3-(甲氧基-聚乙二醇)(PEG-2000-DMG))、1,2-二棕榈酰基-sn-甘油基-3-(甲氧基-聚乙二醇)(PEG-DPG)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-(甲氧基-聚乙二醇)(PEG-DSG)、1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-(甲氧基-聚乙二醇)(PEG-DOG)、3-N-[( $\omega$ -甲氧基聚(乙二醇)2000)氨基甲酰基]-1,2-二肉豆蔻基氧基-丙基胺(PEG-C-DMA)、R-3-[( $\omega$ -甲氧基聚(乙二醇)2000)氨基甲酰基]-1,2-二肉豆蔻基氧基-丙基-3-胺(PEG-2000-C-DOMG)和PEG-神经酰胺轭合物(例如,PEG-CerC14或PEG-CerC20,其描述于通过引用并入本文的美国专利号5,820,873)。其他PEG-脂质轭合物包括与本文描述的任何脂质、例如磷脂酰乙醇胺或神经酰胺轭合的PEG(参见,美国专利号5,820,873;5,534,499;和5,885,613,其通过引用并入本文),以及本文描述的任何PEG-脂质轭合物的盐形式(例如,钠、铵或三甲基铵盐)。

[0236] PEG-脂质轭合物可以包括一种或多种不同的修饰,例如用本文描述的任何脂质分子或不同分子量(例如,300至5,000道尔顿)的PEG部分取代。示例性取代包括与聚乙二醇部分(例如,PEG2000、PEG3400、PEG5000等)组合使用一种或多种C14:0(如表4中)、C16(PEG-DPPE、PEG-DPG等)、C18:0(PEG-DSPE、PEG-DSG等)或C18:1(PEG-DOPE、PEG-DOG等)来形成

PEG-脂质轭合物(例如,mPEG2000-DMG)。具有不同分子量的PEG部分的实例包括PEG350、PEG550、PEG750、PEG1000、PEG2000、PEG3000、PEG3400、PEG4000和PEG5000。

#### [0237] 其他组分

[0238] 制剂可以包括任何其他组分以帮助稳定脂质载体,减少脂质载体的聚集,和/或递送治疗剂(例如,RNAi剂)。示例性组分包括基于 $\omega$ -氨基(寡聚乙二醇)链烷酸单体的聚酰胺-脂质轭合物(ATTA-脂质),例如美国专利号6,320,017和6,586,559中描述的那些,其通过引用并入本文;神经节苷脂(例如,无唾液酸神经节苷脂GM1或GM2;双唾液酸神经节苷脂GD1a、GD1a-NacGal、GD1-b、GD2或GD3;红细胞糖苷、单唾液酸神经节苷脂GM1、GM2或GM3、四唾液酸神经节苷脂GQ1b和三唾液酸神经节苷脂GT1a或GT1b);抗氧化剂(例如, $\alpha$ -生育酚或 $\beta$ -羟基甲苯胺);一种或多种表面活性剂(例如,失水山梨糖醇单棕榈酸酯或失水山梨糖醇单棕榈酸酯,油性蔗糖酯、聚氧乙烯失水山梨糖醇脂肪酸酯、聚氧乙烯山梨糖醇脂肪酸酯、氧乙烯脂肪酸酯、聚氧乙烯烷基醚、聚氧乙烯甾醇醚、聚氧乙烯-聚丙氧基烷基醚、嵌段聚合物和鲸蜡基醚以及聚氧乙烯蓖麻油或氢化蓖麻油衍生物和聚甘油脂肪酸酯,例如Pluronic®、Poloxamer®、Span®、Tween®、Polysorbate®、Tyloxapol®、Emulphor®或Cremophor®(例如具有甘油-聚乙二醇蓖麻醇酸酯与聚乙二醇脂肪酸酯的主要组分的Cremophor®EL);一种或多种两亲剂(例如植物油,例如大豆油、红花油、橄榄油、麻油、玻璃苣油、蓖麻油和棉籽油;矿物油和海洋油、来自此类来源的氢化和/或分馏的甘油三酸酯;中链三酸甘油酯(MCT-油、例如、Miglyol®)和各种合成或半合成的单-、二-或三酸甘油酯,例如W092/05571中公开的定义的非极性脂质,以及乙酰化单酸甘油酯或脂肪酸的烷基酯,例如豆蔻酸异丙酯、油酸乙酯(参见EP0353267)或脂肪酸醇,例如油烯基醇、鲸蜡醇);和一种或多种盐,例如本文描述的任何盐。通常,被选择减少聚集的脂质组分的浓度是约1mol%至15mol%。

#### [0239] 脂质载体

[0240] 本发明制剂可以包括一种或多种本发明化合物(例如,式(I)或选自表1的化合物)和能够运输治疗剂(例如,RNAi剂)的任何基于脂质的组合物。示例性的基于脂质的组合物包括一种或多种脂质分子(例如,本发明化合物、阳离子脂质、阴离子脂质或中性脂质)和/或一种或多种组分(例如,甾醇衍生物和/或PEG-脂质轭合物)。

[0241] 可以使用任何生物相容性脂质或能够形成脂质载体(例如,脂质体、脂质体复合物和胶团)的脂质组合形成脂质载体。将治疗剂包封入脂质载体可以保护治疗剂免受损害或降解,或者促进其进入细胞。脂质载体由于电荷相互作用(例如,阳离子脂质载体和阴离子细胞膜)而与细胞膜相互作用并融合,从而将治疗剂释放进入细胞质。脂质体是包含一种或多种本发明化合物、脂质分子和/或组分的双层囊。脂质纳米颗粒是尺寸范围从约1nm至约1,000nm的脂质体。脂质体复合物是与阳离子脂质分子形成的脂质体,以赋予脂质体总体上正的电荷。胶团是具有单层脂质分子的囊。

#### [0242] 脂质体

[0243] 在某些实施方案中,脂质载体是脂质体。通常,使用的脂质能够形成双层并且是阳离子的。适合的脂质分子的类别包括磷脂(例如,磷脂酰胆碱)、脂肪酸、糖脂、神经酰胺、甘油酯和胆固醇或其任意组合。可选地或附加地,脂质载体可以包括中性脂质(例如,二油酰

基磷脂酰乙醇胺(DOPE))。可以形成脂质载体的其他脂质是本领域已知的并且在本文描述。

[0244] 如本文使用的,“脂质分子”是具有疏水性头部分和亲水性尾部分的分子,并且能够形成脂质体,包括本发明化合物或本文描述的任何阳离子、中性或阴离子脂质。脂质分子可以任选地被修饰以包括亲水性聚合物基团。此类脂质分子的实例包括1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000](PEG2000-DSPE),例如其铵盐和1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-[羧基(聚乙二醇)-2000](PEG2000-DSPE羧基)。

[0245] 脂质分子的实例包括天然脂质,例如心磷脂(CL)、磷脂酸(PA)、磷脂酰胆碱(PC)、溶血卵磷脂(LPC)、磷脂酰乙醇胺(PE)、磷脂酰甘油(PG)、磷脂酰肌醇(PI)和磷脂酰丝氨酸(PS);脂质混合物,例如卵磷脂(lecithin);鞘脂,例如鞘氨醇、神经酰胺、鞘磷脂、脑苷脂、硫肝脂、神经节苷脂和植物鞘氨醇;阳离子脂质,例如1,2-二油酰基-3-三甲基铵-丙烷(DOTAP)、1,2-二油酰基-3-二甲基铵-丙烷(DODAP)、二甲基双十八烷基溴化铵(DDAB)、3-β-[N-(N',N'-二甲基氨基乙烷)氨甲酰基]胆固醇(DC-Chol)、N-[1-(2,3,-双十四烷基氧基)丙基]-N,N-二甲基-N-羟基乙基溴化铵(DMRIE)、N-[1-(2,3,-二油烯基氧基)丙基]-N,N-二甲基-N-羟基乙基溴化铵(DORIE)和1,2-二-0-十八烯基-3-三甲基铵丙烷(DOTMA);磷脂酰胆碱,例如1,2-二月桂酰基-sn-甘油基-3-乙基胆碱磷酸、1,2-二月桂酰基-sn-甘油基-3-胆碱磷酸(DLPC)、1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油基-3-胆碱磷酸(DMPC)、1,2-二棕榈酰基-sn-甘油基-3-胆碱磷酸(DPPC)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-胆碱磷酸(DSPC)、1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-胆碱磷酸(DOPC)和1-棕榈酰基-2-油酰基-sn-甘油基-3-胆碱磷酸(POPC);磷酸乙醇胺,例如1,2-二丁酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DSPE)、1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DMPE)、1,2-二棕榈酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DPPE)、1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DOPE)、1-棕榈酰基-2-油酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(POPE)和1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-(戊二酰);磷脂酸,例如双十六烷基磷酸酯(DCP)、1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油基-3-磷酸酯、1,2-二棕榈酰基-sn-甘油基-3-磷酸酯和1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸酯;磷脂酰甘油,例如二棕榈酰基磷脂酰甘油(DPPG)、二油酰基磷脂酰甘油(DOPG)、1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油基-3-磷-(1'-外消旋-甘油)和1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷-(1'-外消旋-甘油);磷脂酰丝氨酸,例如1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油基-3-磷-L-丝氨酸、1,2-二棕榈酰基-sn-甘油基-3-磷-L-丝氨酸和1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷-L-丝氨酸;心磷脂,例如1',3'-双[1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油基-3-磷]-sn-甘油;和PEG-脂质轭合物,例如1,2-二棕榈酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-750]、1,2-二棕榈酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000]、1,2-二棕榈酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-5000]、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000]和1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-[羧基(聚乙二醇)-2000]。

[0246] 本发明化合物可以与任何有用的脂质组合物组合,所述脂质组合物包括商业途径可获得的脂质组合物。此类组合物的实例包括来自Invitrogen Corp.的Lipofectamine™(DOSPA和DOPE的组合)和Lipofectin®(DOTMA和DOPE的组合);来自Promega Corp.的Transfectam®(包括DOGS的组合物)和Transfast™;来自Sigma-Aldrich Co.的

NeuroPORTER™和Escort™;来自Roche的FuGENE®6;和来自Stratagene的LipoTAXI®。已知的脂质组合物包括Trojan Horse脂质体技术,如描述于Boado, Pharm. Res. 24:1772-1787 (2007)。

[0247] 脂质体还可以包括辅助脂质体形成或稳定性的其他组分。组分的实例包括胆固醇、抗氧化剂(例如, $\alpha$ -生育酚或 $\beta$ -羟基甲苯胺)、表面活性剂和盐。

[0248] 脂质体可以是包含脂质分子的任何有用的组合物,包括一种或多种本发明化合物和辅助脂质体形成或稳定性的其他脂质组分。本领域技术人员将知道如何优化有助于特定剂包封、脂质体稳定性、放大反应条件或任何其他相关因素的组合。示例性的组合描述于Boado, Pharm. Res. 24:1772-1787 (2007)。

[0249] 制备脂质体通常通过一般的两步骤过程来进行。在第一步中,在挥发性有机溶剂或溶剂混合物中混合脂质和脂质组分以保证均匀的脂质混合物。溶剂的实例包括氯仿、甲醇、环己烷和正丁醇。然后去除溶剂以形成膜、粉末或片形式的干脂质混合物。还可以通过使用任何已知的分析技术,例如通过使用氮、旋转蒸发、喷雾干燥、冻干和真空干燥,来去除溶剂。

[0250] 在第二步骤中,将干脂质混合物用水溶液水合以形成脂质体。可以将剂添加至水溶液,这导致具有包封的剂的脂质体的形成。可选地,脂质体首先用第一水溶液形成,然后暴露于含有所述剂的另一水溶液。可以通过任何已知技术,例如通过重复的冻融循环、超声或混合来促进剂的包封。该方法的其他实例描述于Boado, Pharm. Res. 24:1772-1787 (2007)。可选地,剂与疏水部分(例如,胆固醇)偶联以产生亲脂衍生物,并且所述亲脂衍生物与其他脂质分子一起使用以形成脂质体。

[0251] 在第二步骤期间,干脂质混合物可以或不含有多肽-脂质轭合物。该过程可以任选地包括各种其他步骤,包括在将其加入干脂质混合物之前加热水溶液超过脂质分子的相转变温度,其中特定的温度范围包括约40°C至约70°C;孵育干脂质混合物和水溶液的组合,其中特定的时间范围包括约30分钟至约2小时;在孵育期间混合干脂质混合物和水溶液,例如通过涡旋混合、摇动、搅拌或搅动;向水溶液添加非电解质以保证生理渗透压,例如0.9%盐水、5%右旋糖和10%蔗糖的溶液;破坏大的多层囊,例如通过挤出或超声;并与多肽-脂质轭合物一起额外孵育预形成的脂质体,其中干脂质混合物不含有脂质分子。本领域技术人员能够鉴定该氢化步骤中的特定温度和孵育时间,以确保衍生的脂质分子加入脂质体或获得稳定的脂质体。

[0252] 可以在形成脂质体的过程中的任一点添加本发明化合物。在一个实例中,在干脂质混合物形成期间向脂质和脂质组分添加所述化合物。在另一实例中,将化合物添加至用含有脂质和脂质组分的干脂质混合物预形成的脂质体。而在另一实例中,用化合物形成胶团,用含有脂质和脂质组分的干脂质混合物形成脂质体,然后将胶团和脂质体一起孵育。水溶液可以包括其他组分以稳定剂或脂质体,例如缓冲液、盐、螯合剂、盐水、右旋糖、蔗糖等。

[0253] 在该程序的一个实例中,由脂质混合物构成的干膜用含有剂的水溶液水合。首先将该混合物加热至50°C持续30分钟,然后冷却至室温。接下来,将混合物转移至含有多肽-脂质轭合物的干膜上。然后在37°C孵育混合物2小时以将多肽-脂质轭合物加入含有剂的脂质体。参见例如,Zhang等人, J. Control. Release 112:229-239 (2006)。

[0254] 具有囊结构的脂质颗粒

[0255] 在某些实施方案中,脂质颗粒包括阳离子脂质(例如,DODMA、DOTMA和/或氨基-胺脂质、氨基-酰胺脂质或本发明的其他脂质)和RNAi剂,以及中性或两性离子脂质、PEG-脂质轭合物和任选的胆固醇。

[0256] 具有一种或多种RNA结合剂和一种或多种转染脂质的脂质颗粒

[0257] 脂质颗粒还包括具有一种或多种RNA结合剂和一种或多种转染脂质的那些。在一个实施方案中,一种或多种RNA结合剂形成内部聚集体,并且一种或多种转染脂质形成外部聚集体表面。在特定实施方案中,外部聚集体表面不是膜、脂质双层和/或多层。在某些实施方案中,一种或多种RNA结合剂(例如,脂质)代表总脂质的约10-90%。在其他实施方案中,一种或多种RNA结合剂(例如,脂质)代表总脂质的约50%。在其他实施方案中,一种或多种RNA结合剂(例如,脂质)代表总脂质的约30%。在某些实施方案中,核酸有效载荷与脂质颗粒的一种或多种RNA结合剂的复合体/聚集体包括阳离子脂质(例如,DODMA、DOTMA和/或本发明的氨基-胺脂质或氨基-酰胺)和RNAi剂;并且脂质颗粒的一种或多种转染脂质包括中性或两性离子脂质、PEG-脂质轭合物和任选的胆固醇。在其他实施方案中,颗粒的一种或多种转染脂质包括阳离子脂质(例如,DODMA、DOTMA、氨基-胺脂质和/或氨基-酰胺脂质)、中性脂质、PEG-脂质轭合物和任选的胆固醇。

[0258] RNAi剂

[0259] RNA干扰(RNAi)是通过引起特定RNA分子降解或阻碍特定基因转录而抑制基因表达的机制。性质上,RNAi靶通常是来自病毒和转座子的RNA分子(一种先天免疫应答的形式),尽管它也起着调节发育和基因组维护的作用。RNAi机理的关键是小干扰RNA链(siRNA),其具有与靶信使RNA(mRNA)分子足够互补的核苷酸序列。siRNA将RNAi途经内的蛋白导向靶mRNA并降解它们,将它们分解成不再能被翻译成蛋白的更小部分。

[0260] RNAi途经由酶Dicer引发,其将长的双链RNA(dsRNA)分子裂解成siRNA分子,其通常约21至约23个核苷酸长度并且含有约19个碱基对双链体。然后将每个片段的两个链中被称为引导链的一条链并入RNA诱导的沉默复合体(RISC)并与互补序列配对。RISC介导了具有与siRNA双链体的反义链互补的序列的单链RNA的裂解。靶RNA的裂解发生在与siRNA双链体的反义链互补的区域的中间。该识别事件的结果是转录后的基因沉默。这在引导链特异性配对mRNA分子并诱导通过Argonate(RISC复合体的催化组分)的降解时发生。

[0261] 本发明化合物可用于在体外或体内(例如,受试者中)递送一种或多种RNAi剂至细胞。RNAi剂可以包括不同类型的双链分子,其包括RNA:RNA或RNA:DNA链。这些剂可以各种结构被引入细胞,包括双链体(例如,在3'末端有或没有悬突部分)、发夹环或表达能够形成单独或与另一多核苷酸组合的双链多核苷酸的一种或多种多核苷酸的表达载体。示例性的RNAi剂包括本文描述的siRNA、shRNA、DsiRNA和miRNA剂。一般而言,这些剂的长度是约10至约40个核苷酸,并且下文针对特定RNAi剂描述了优选的长度。

[0262] RNAi剂的功能性基因沉默不一定包括靶基因产物的完全抑制。在一些情况下,由RNAi剂引起的基因产物表达的边际下降可以转化为宿主细胞、组织、器官或动物中显著的功能或表型变化。因此,理解基因沉默是功能性等同的,并且实现沉默的基因产物降解程度可以在基因靶或宿主细胞类型间有差别。

[0263] siRNA

[0264] 小干扰RNA(siRNA)一般是长度为16至30个核苷酸(例如,18至25个核苷酸,例如21

个核苷酸)的双链RNA分子,在3'末端有一个或两个核苷酸悬突或者没有任何悬突。技术人员可以改变该序列长度(例如,增加或减少基因沉默的总体水平)。在某些实施方案中,悬突是在3'末端的UU或dTdT。一般而言,siRNA分子与靶DNA分子的一条链完全互补,因为甚至单个碱基对错配已经显示减少沉默。在其他实施方案中,siRNA可以具有修饰的骨架组成,例如2'-脱氧-或2'-O-甲基修饰,或本文描述的任何修饰。

[0265] siRNA指能够以序列特异性方式抑制或下调基因表达的核酸分子;参见例如Zamore等人,Cell1101:2533(2000);Bass,Nature411:428-429(2001);Elbashir等人,Nature411:494-498(2001);和PCT公布号W000/44895、W001/36646、W099/32619、W000/01846、W001/29058、W099/07409和W000/44914。制备用于基因沉默的siRNA分子的方法描述于美国专利号7,078,196,其通过引用并入本文。

[0266] shRNA

[0267] 短发夹RNA(shRNA)是其中存在发夹环结构的单链RNA分子,发夹环结构允许同一链中的互补核苷酸形成分子间键。shRNA可以表现出与siRNA相比降低的对核酸酶降解的灵敏度。在某些实施方案中,shRNA具有长度为19至29个核苷酸(例如,19至21个核苷酸或25至29个核苷酸)的茎长。在一些实施方案中,环尺寸是4至23个核苷酸长度。shRNA一般可以含有一个或多个错配,例如,shRNA茎的两条链之间的G-U错配,而不降低效价。

[0268] DsiRNA

[0269] Dicer-底物RNA(DsiRNA)是25至35个核苷酸的双链RNA剂。认为这种长度的剂被RNA干扰(RNAi)途径的Dicer酶加工,而短于25个核苷酸的剂一般模拟Dicer产物并逃避Dicer加工。在一些实施方案中,DsiRNA在1至4个核苷酸(例如,1或2个核苷酸)的反义或有义链的3'末端具有单链核苷酸悬突。

[0270] DsiRNA剂的某些修饰结构之前如在美国专利公布号2007/0265220中描述,其通过引用并入本文。适合用于本发明制剂的其他DsiRNA结构和特定组合物描述于美国专利申请号12/586,283;美国专利公布号2005/0244858、2005/0277610、2007/0265220、2011/0021604、2010/0173974、2010/0184841、2010/0249214、2010/0331389、2011/0003881、2011/0059187、2011/0111056;和PCT公布号W02010/080129、W02010/093788、W02010/115202、W02010/115206、W02010/141718、W02010/141724、W02010/141933、W02011/072292、W02011/075188,其通过引用并入本文。一般而言,使用如针对19-23mer siRNA描述的固相寡核苷酸合成方法来合成DsiRNA构建体(参见美国专利号5,804,683;5,831,071;5,998,203;6,117,657;6,353,098;6,362,323;6,437,117;6,469,158;6,111,086;6,008,400;和6,111,086)。

[0271] miRNA

[0272] 微RNA(miRNA)是长度为17至25个核苷酸(例如,21至23个核苷酸)的单链RNA分子。技术人员可以改变该序列长度以增加或降低基因沉默的总体水平。这些剂通过结合靶信使RNA上的互补序列来沉默靶基因。如本文使用的,使用术语“miRNA前体”来涵盖但不限于初级RNA转录物,pri-miRNA和pre-miRNA。本发明的“miRNA有效载荷”可以包括pri-miRNA、pre-miRNA和/或miRNA(或成熟miRNA)。在某些实施方案中,本发明的siRNA(例如,DsiRNA)可以提供并入了miRNA序列或者与miRNA序列足够同源以发挥所述miRNA功能的引导链(使这种siRNA成为“miRNA模拟物”)。



**[0273] 反义化合物**

[0274] 示例性的反义化合物包括连续的核苷酸长度范围,其中该范围的上限是50个核苷酸,并且其中该范围的下限是8个核苷酸。在某些实施方案中,该范围的上限是35个核苷酸,并且该范围的下限是14个核苷酸。在其他实施方案中,该范围的上限是24个核苷酸,并且该范围的下限是17个核苷酸。在其他实施方案中,反义化合物是20个连续的核苷酸。本领域技术人员容易理解,如本文公开的该范围的上限包括20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或50个连续的核苷酸,并且该范围的上限包括8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个连续的核苷酸。

[0275] 示例性的反义化合物包括一段至少8、任选至少12、任选至少15个连续核苷酸,其与靶序列足够互补以干扰靶序列的转录、翻译、促进靶序列降解(任选的核酸酶介导的降解)和/或以其他方式破坏靶序列功能(例如,干扰其他功能性靶序列的功能,例如,通过反义化合物介导的机理破坏启动子、增强子或其他功能性核酸靶序列)。

[0276] 修饰可以对反义化合物进行,并且可以包括与选自核碱基位置、糖位置的末端中的一个或核苷酸键合中的一个连接的轭合基团。可能的修饰包括但不限于2'-氟代(2'-F)、2'-O甲基(2'-OMe)、2'-O-(2-甲氧基乙基)(2'-MOE)高亲和力糖修饰、倒脱碱基帽、脱氧核碱基和双环核碱基类似物,例如锁核酸(LNA)和乙烯桥接的核酸(ENA)。

**[0277] 制备RNAi剂的方法**

[0278] RNAi剂包括导向靶核酸(例如,靶基因)的至少一个反义核苷酸序列。反义核苷酸是与选定靶序列互补的单链DNA或RNA。在反义RNA的情况下,它们通过结合它而防止互补RNA链的翻译。反义DNA可用于靶向特异性互补的(编码或非编码)RNA。在一个特定的实施方案中,反义核苷酸含有约10至约40个核苷酸、更优选约15至约30个核苷酸。反义核苷酸可以具有与预期的靶基因达80%、85%、90%、95%、99%或甚至100%互补性。

[0279] 制备反义和有义核苷酸以及相应的双链体或发夹环的方法是本领域已知的,并且可以容易地适于制备靶向任何靶核酸序列的反义寡核苷酸。可以选择反义核苷酸序列以优化靶特异性,例如通过分析靶序列并测定二级结构、 $T_m$ 、结合能和相对稳定性;和/或减少二级结构、例如二聚体、发夹或将减少或阻止对宿主细胞中靶mRNA特异性结合的其他二级结构的形成。在一些实施方案中,mRNA的高度优选的靶区域包括处于或靠近AUG翻译起始密码子的那些区域和与mRNA的5'区域基本上互补的那些序列。可以进行这些二级结构分析和靶位点选择考量,例如使用第4版OLIGO引物分析软件(Molecular Biology Insights)和/或BLASTN2.0.5算法软件(Altschul等人,Nucleic Acids Res.25(17):3389-3402,1997)。制备RNAi剂的非限制性方法描述于美国专利号5,804,683;5,831,071;5,998,203;6,117,657;6,353,098;6,362,323;6,437,117;6,469,158;6,111,086;6,008,400;和6,111,086,其通过引用并入本文。

[0280] RNAi剂可以具有任何有用的形式,例如单链、双链、线性、环状(例如,质粒)、切口环状、螺旋、超螺旋、连接的(concatemered)或带电荷的。此外,核苷酸可以含有5'和3'有义和反义链末端修饰,并且可以具有平端或悬突末端核苷酸(例如,在3'末端的UU或TT)或其组合。

[0281] 修饰的核酸包括修饰的DNA或RNA分子,可以用于替代本文描述的多核苷酸(例如, RNAi剂)中天然存在的核酸。修饰的核酸可以提高本文描述的多核苷酸的半衰期、稳定性、

特异性、递送、溶解度和核酸酶抗性。例如, siRNA剂可以是部分或完全由赋予上述有益性质的核苷酸类似物构成。如Elmén等人 (Nucleic Acids Res. 33:439-447 (2005)) 中描述的, 可以使用合成的RNA样核苷酸类似物 (例如, 锁核酸 (LNA)) 来构建表现出抗靶基因产物的沉默活性的siRNA分子。

[0282] 其中磷酸二酯键中的非桥氧被硫替代的硫代磷酸酯 (PS) 骨架修饰是最早且最常见的用于稳定核酸药物抗核酸酶降解的方式中的一个。一般而言, 似乎PS修饰可以广泛针对两个siRNA链进行而不过多影响活性 (Kurreck, Eur. J. Biochem. 270:1628-44 (2003))。在特定实施方案中, PS修饰通常限于3' 和5' 末端的一或两个碱基。硼烷磷酸酯连接体可用于增强siRNA活性, 同时具有低毒性 (Hall等人, Nucleic Acids Res. 32:5991-6000 (2004))。对寡核苷酸骨架的其他示例性修饰包括磷酸甲酯、二硫代磷酸酯、磷酸三酯、氨基烷基磷酸三酯、烷基磷酸酯 (例如, 3'-亚烷基磷酸酯)、手性磷酸酯、亚磷酸酯、磷酰胺酯 (例如, 3'-氨基磷酰胺酯)、氨基烷基磷酰胺酯、硫羰基磷酰胺酯、硫羰基烷基磷酸酯、硫羰基烷基磷酸三酯和具有通过肽键连接的重复N-(2-氨基乙基)-甘氨酸单元的蛋白核苷酸 (PNA) 骨架, 其中代表性的PNA化合物包括但不限于以下中描述的那些: 美国专利号5,539,082、5,714,331和5,719,262, 以及Nielsen等人, Science 254:1497-1500 (1991)。

[0283] 对骨架的其他修饰包括用短链烷基或环烷基核苷酸间键、混合杂原子和烷基或环烷基核苷酸间键、或一个或多个短链杂原子或杂环核苷酸间键 (例如, 吗啉代键; 硅氧烷骨架; 硫化物、亚砷和砷骨架; 乙酰基和硫代乙酰基骨架; 亚甲基乙酰基和硫代乙酰基骨架; 含烯骨架; 氨基磺酸酯骨架; 亚甲基亚氨基和亚甲基胍基骨架; 磺酸酯和磺酰胺骨架; 酰胺骨架; 和具有混合的N、O、S和CH<sub>2</sub>组成部分的其他) 替代磷原子的那些。

[0284] 某些修饰的核碱基特别用于增加本发明寡聚体化合物的结合亲和力, 例如5-取代的嘧啶、6-氮杂嘧啶和N-2、N-6和O-6取代的嘌呤 (例如, 2-氨基丙基腺嘌呤、5-丙炔基尿嘧啶、5-丙炔基胞嘧啶和5-甲基胞嘧啶)。示例性的修饰核碱基包括5-甲基胞嘧啶 (5-me-C或m5c); 5-羟基甲基胞嘧啶、黄嘌呤和次黄嘌呤; 2-氨基腺嘌呤、腺嘌呤和鸟嘌呤的6-甲基和其他烷基衍生物; 腺嘌呤和鸟嘌呤的2-丙基和其他烷基衍生物; 2-硫尿嘧啶; 2-硫代胸腺嘧啶; 2-硫代胞嘧啶; 5-卤代尿嘧啶和胞嘧啶; 5-丙炔基尿嘧啶和胞嘧啶; 6-偶氮尿嘧啶、胞嘧啶和胸腺嘧啶; 5-尿嘧啶 (假尿嘧啶); 4-硫尿嘧啶; 8-卤代、8-氨基、8-硫醇、8-硫代烷基、8-羟基和其他8-取代的腺嘌呤和鸟嘌呤; 5-卤代, 特别是5-溴代、5-三氟甲基和其他5-取代的尿嘧啶和胞嘧啶; 7-甲基鸟嘌呤; 7-甲基腺嘌呤; 8-氮杂鸟嘌呤; 8-氮杂腺嘌呤; 7-去氮杂鸟嘌呤; 7-去氮杂腺嘌呤; 3-去氮杂鸟嘌呤; 和3-去氮杂腺嘌呤。在特定实施方案中, 这些修饰的核碱基可以与其他修饰、例如本文描述的任何糖修饰组合。

[0285] 修饰的寡核苷酸还可以含有一个或多个取代的糖部分, 其中修饰可以在核糖环的任何活性位点 (例如, 核糖环的2' -OH) 或一个或多个通用碱基上进行。示例性修饰包括2' -卤代, 例如F、Br或Cl; 2' -O-烷基、2' -S-烷基或2' -N-烷基, 例如2' -OMe; 2' -O-(烷基-O)<sub>n</sub>烷基, 例如2' -O-甲氧基乙基 (2' -O-MOE)、2' -O[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>O]<sub>m</sub>CH<sub>3</sub>、2' -O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OCH<sub>3</sub>、2' -O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>ON(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH<sub>2</sub>、O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>、2' -O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>ONH<sub>2</sub>和2' -O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>ON[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>]<sub>2</sub>, 其中n和m是1至约10; 2' -O-烯基、2' -S-烯基或2' -N-烯基; 2' -O-炔基、2' -S-炔基或2' -N-炔基, 其中烷基、烯基和炔基可以是取代的或未取代的C<sub>1-10</sub>烷基或C<sub>2-10</sub>烯基和炔基, 以及核糖的2' 和4' 位置之间的桥接修饰以形成锁核酸 (LNA)。示例性的通用碱基包括位于修饰核苷酸的核苷酸糖

部分的1'位置或者核苷酸糖部分取代中的等同位置的杂环部分,例如1-β-D-核糖呋喃基-5-硝基吡咯和1-β-D-核糖呋喃基-3-硝基吡咯。

[0286] 在某些实施方案中,可以采用具有所述的修饰形式和/或修饰模式的核酸。关于核酸的示例性修饰和修饰模式的其他细节可以参见例如至少以下参考文献:US2010/0240734;W02010/080129;W02010/033225;US2011/0021604;W02011/075188;W02011/072292;W02010/141724;W02010/141726;W02010/141933;W02010/115202;W02008/136902;W0/2011/109294;W0/2011/075188;PCT/US11/42810;PCT/US11/42820;美国序列号61/435,304;美国序列号61/478,093;美国序列号61/497,387;美国序列号61/529,422;美国专利号7,893,245;W02007/051303;和US2010/0184209。前述文件的每一个通过引用整体并入本文。

[0287] RNAi基因靶

[0288] 本发明特征为通过用化合物或制剂结合RNAi剂治疗而沉默患病组织或器官中的靶基因。本发明的治疗潜力在已知或认为参与建立或维持病态(例如癌症)的特定的靶向基因的mRNA分子被RNAi剂降解时得到实现。

[0289] 用于本发明的RNAi靶的实例包括发育蛋白,例如粘附分子、细胞周期蛋白激酶抑制剂、Wnt家族成员、Pax家族成员、Winged helix家族成员、Hox家族成员、细胞因子/淋巴因子及其受体、生长/分化因子及其受体、神经递质及其受体;癌基因编码的蛋白(例如,ABL1(UniProt登录号P00519、NCBI Gene ID:25)、AR(UniProt登录号P10275、NCBI Gene ID:3647)、β-连环蛋白(CTNNB1、UniProt登录号P35222、NCBI Gene ID:1499)、BCL1(UniProt登录号P24385、NCBI Gene ID:595)、BCL2(UniProt登录号P10415、NCBI Gene ID:596)、BCL6(UniProt登录号P41182)、CBFA2(UniProt登录号Q01196、NCBI Gene ID:861)、CBL(UniProt登录号P22681、NCBI Gene ID:687)、CSF1R(UniProt登录号P07333、NCBI Gene ID:1436)、ERBA1(UniProt登录号P10827、NCBI Gene ID:7067)、ERBA2(UniProt登录号P10828、NCBI Gene ID:7068)、ERBB(UniProt登录号P00533、NCBI Gene ID:1956)、ERBB2(UniProt登录号P04626、NCBI Gene ID:2064)、ERBB3(UniProt登录号P21860、NCBI Gene ID:190151)、ERBB4(UniProt登录号Q15303、NCBI Gene ID:600543)、ETS1(UniProt登录号P14921、NCBI Gene ID:2113)、ETS2(UniProt登录号P15036、NCBI Gene ID:2114)、ETV6(UniProt登录号41212、NCBI Gene ID:2120)、FGR(UniProt登录号P09769、NCBI Gene ID:2268)、FOS(UniProt登录号P0110、NCBI Gene ID:2353)、FYN(UniProt登录号P06241、NCBI Gene ID:2534)、HCR(UniProt登录号Q8TD31、NCBI Gene ID:54535)、HRAS(UniProt登录号P01112、NCBI Gene ID:3265)、JUN(UniProt登录号P05412、NCBI Gene ID:3725)、KRAS(UniProt登录号P01116、NCBI Gene ID:3845)、LCK(UniProt登录号P06239、NCBI Gene ID:3932)、LYN(UniProt登录号P07948、NCBI Gene ID:4067)、MDM2(UniProt登录号Q00987、NCBI Gene ID:4193)、MLL1(UniProt登录号Q03164、NCBI Gene ID:4297)、MLL2(UniProt登录号014686、NCBI Gene ID:8085)、MLL3(UniProt登录号Q8NEZ4、NCBI Gene ID:58508)、MYB(UniProt登录号P10242、NCBI Gene ID:4602)、MYC(UniProt登录号P01106、NCBI Gene ID:4609)、MYCL1(UniProt登录号P12524、NCBI Gene ID:4610)、MYCN(UniProt登录号P04198、NCBI Gene ID:4613)、NRAS(UniProt登录号P01111、NCBI Gene ID:4893)、PIM1(UniProt登录号P11309、NCBI Gene ID:5292)、PML(UniProt登录号P29890、NCBI Gene ID:5371)、RET

(UniProt登录号P07949、NCBI Gene ID:5979)、SRC (UniProt登录号P12931、NCBI Gene ID:6714)、TAL1 (UniProt登录号P17542、NCBI Gene ID:6886)、TAL2 (UniProt登录号Q16559、NCBI Gene ID:6887)、TCL3 (UniProt登录号P31314、NCBI Gene ID:3195)、TCL5 (UniProt登录号P17542、NCBI Gene ID:6886) 和YES (UniProt登录号P07947、NCBI Gene ID:7525)); 肿瘤抑制蛋白 (例如、BRCA1 (UniProt登录号P38398、NCBI Gene ID:672)、BRCA2 (UniProt登录号P51587、NCBI Gene ID:675)、MADH4 (UniProt登录号Q13485、NCBI Gene ID:4089)、MCC (UniProt登录号P23508、NCBI Gene ID:4163)、NF1 (UniProt登录号P21359、NCBI Gene ID:4763)、NF2 (UniProt登录号P35240、NCBI Gene ID:4771)、RB1 (UniProt登录号P06400、NCBI Gene ID:5925)、TP53 (UniProt登录号P04637、NCBI Gene ID:7157)、PLK1 (UniProt登录号P53350、NCBI Gene ID:9606)、KIF1-结合蛋白 (UniProt登录号Q96EK5、NCBI Gene ID:9606) 和WT1 (UniProt登录号P19544、NCBI Gene ID:4790)); 脂蛋白 (例如、载脂蛋白B (ApoB100、UniProt登录号P04114、NCBI Gene ID:338)); 酶 (例如、ACC合成酶和氧化酶、ACP脱氢酶和羟化酶、ADP-葡萄糖焦磷酸化酶、ATP酶、醇脱氢酶、淀粉酶、淀粉葡萄糖苷酶、过氧化氢酶、纤维素酶、查耳酮合成酶、壳多糖酶、环加氧酶、脱羧酶、糊精酶、DNA和RNA聚合酶、半乳糖苷酶、葡聚糖酶、葡萄糖氧化酶、颗粒结合的淀粉合成酶、GTP酶、解旋酶、半纤维素酶、整合酶、菊粉酶、转化酶、异构酶、激酶 (例如、PLK1 (UniProt登录号P53350、NCBI Gene ID:9606))、乳糖酶、连接酶 (例如,含有环指-和WD重复序列的蛋白2 (RFWD2),还称为COP1)、脂肪酶、脂肪氧合酶、溶菌酶、胭脂氨酸合成酶、章鱼氨酸合成酶、果胶甲酯酶、过氧化物酶、磷酸酶、磷脂酶、磷酸化酶、植酸酶、植物生长调节剂合成酶、多聚半乳糖醛酸酶、蛋白酶和肽酶、普鲁兰酶、重组酶、逆转录酶、核酮酶-1,5-二磷酸羧化酶加氧酶 (RuBisCos)、拓扑异构酶、转移酶,例如次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶1 (HPRT1) 和木聚糖酶)。

[0290] 考虑其在代谢 (例如,在各种高胆固醇血症中的脂蛋白代谢) 和循环蛋白 (例如,血友病中的凝血因子) 分泌中的重要作用,肝是核酸疗法的最重要的靶组织中的一个。此外,获得性病症,例如慢性肝炎和硬化是常见的,并且也可能通过基于多核苷酸的肝疗法来治疗。影响肝或受肝影响的许多疾病或病状可能通过肝中基因表达的敲除 (抑制) 来治疗。示例性的肝病和病状可以选自包括以下的清单:肝癌 (包括肝细胞癌、HCC)、病毒感染 (包括肝炎)、代谢病症 (包括高脂血症和糖尿病)、纤维化和急性肝损伤。肝治疗剂 (例如,包括特别是靶向HCC的治疗剂) 的示例性分子靶-和任选解决其他靶、疾病和/或病症 (包括其他癌症) 的治疗剂的示例性分子靶-包括CSN5 (UniProt登录号Q92905、NCBI Gene ID:10987)、CDK6 (UniProt登录号Q00534、NCBI Gene ID:1021)、ITGB1 (UniProt登录号P05556、NCBI Gene ID:3688)、MYC (UniProt登录号P01106、NCBI Gene ID:4609)、TGFB1 (UniProt登录号P01137、NCBI Gene ID:7040)、细胞周期蛋白D1 (UniProt登录号Q9H014、NCBI Gene ID:595)、铁调素 (hepcidin) (UniProt登录号P81172、NCBI Gene ID:57817)、PCSK9 (UniProt登录号Q8NBP7、NCBI Gene ID:255738) 和运甲状腺素蛋白 (TTR、UniProt登录号P02766、NCBI Gene ID:7276) 等。

[0291] 本发明制剂任选地可以靶向正常组织 (例如,正常肝组织) 以及各种模型 (例如,原位肝模型、皮下肝模型等)。

[0292] 本发明制剂的一个示例性靶是载脂蛋白B (ApoB),其存在于不同类别的脂蛋白:乳糜微粒、极低密度脂蛋白 (VLDL)、中间密度脂蛋白 (IDL) 和低密度脂蛋白 (LDL)。ApoB作用为

通过ApoB/E受体对LDL颗粒的细胞结合和内化的识别信号。含有载脂蛋白B的脂蛋白的累积或过剩可以导致脂质相关的病症,例如动脉粥样硬化。减少ApoB的定制疗法可用于治疗脂质相关的病症。以反义疗法形式的一种基于核酸的疗法已经显示减少小鼠体内的ApoB水平,并且治疗随后减少了血清胆固醇和三酸甘油酯水平(美国公布号2003/0215943)。这些结果说明了ApoB的适度下调及其作为治疗脂质相关病症的靶的用途。

[0293] 本发明制剂的另一个示例性靶是蛋白C,其可以靶向例如血友病的治疗。

[0294] 治疗剂的递送

[0295] 本发明制剂可用于递送治疗剂(例如,聚阴离子剂、核酸或RNAi剂)至细胞。通过所述制剂递送的剂可用于基因沉默(例如,在体外或受试者体内)或治疗或预防性治疗受试者疾病(例如,癌症)。

[0296] 可以通过使用任何有用的方法来评估治疗剂的递送。例如,可以通过以下评估使用含有本发明化合物的制剂的递送:1)靶基因的敲除或2)与等同剂量对照相比的毒性或耐受性。这些评估可以使用制剂中任何有用的脂质组合来确定,例如与本发明化合物(例如,式(I)或表1中的任何化合物)组合的本文描述的任何阳离子脂质(例如,DOTAP、DODMA、DLinDMA和/或DLin-KC2-DMA)。在特定实施方案中,当使用本发明化合物时观察到治疗剂递送的改善,其中所述改善与对照相比超过25%(例如,超过2倍、5倍、10倍、100倍或1000倍的递送改善)。

[0297] RNAi剂的递送

[0298] RNAi沉默可用于许多种细胞,其中HeLa S3、COS7、293、NIH/3T3、A549、HT-29、CHO-K1和MCF-7细胞系易受一定水平的siRNA沉默。而且,可以在对靶向基因具有特异性的RNA水平下发生哺乳动物细胞中的抑制,其中已经观察到了RNA与蛋白抑制之间的强关联。相应地,本发明化合物及其制剂可用于递送RNAi剂至一种或多种细胞(例如,体外或体内)。示例性RNAi剂包括如本文描述的siRNA、shRNA、dsRNA、miRNA和DsiRNA剂。

[0299] 体外靶敲除

[0300] 可以通过任何有用的方法评估RNAi剂的递送。例如,可以在细胞培养模型(例如,HeLa细胞)中体外转染包含治疗剂的制剂,其中终点测量包括但不限于以下的一种或多种:(i)使用qPCR的mRNA定量;(ii)使用Western印迹的蛋白定量;(iii)剂和/或本发明的氨基-胺或氨基-酰胺阳离子脂质的标记的细胞内化。可以针对上述终点的程度和持续时间评价摄取或递送。在递送之前,可以在室温下细胞培养液中稀释制剂约30分钟,并且最终浓度可以在剂量-响应实验中变化0至50nM治疗剂或氨基-胺或氨基-酰胺阳离子脂质。对于时程实验,可以针对各种孵育时间、例如30分钟至7天来研究剂量实验的最佳浓度。

[0301] 还可以通过用荧光标签差异标记脂质化合物和治疗剂并进行荧光共定位研究来测试聚阳离子有效载荷和脂质制剂的功能。可以通过测量细胞内的总荧光并通过测量与内涵体或溶酶体室不稳定结合的荧光(为了发挥功能,要求触发RNAi的治疗剂不仅到达细胞内部,而且要到达细胞的细胞质)来评估本发明化合物递送聚阳离子有效载荷和/或连接的荧光标记的能力。现有技术已经描述了荧光定位和细胞运输研究的性能(Lu,等人,Mol.Pharm.6(3):763,2009;McNaughton等人,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.106(15):6111,2009)。

[0302] 递送至特定靶细胞类型和靶组织

[0303] 本发明化合物可用于递送治疗剂至各种器官和组织以治疗各种疾病。示例性的靶向组织或器官包括但不限于肝、胰腺、肺、前列腺、肾、骨髓、脾、胸腺、淋巴结、脑、脊髓、心、骨骼肌、皮肤、口腔黏膜、食道、胃、回肠、小肠、结肠、膀胱、子宫颈、卵巢、睾丸、乳腺、肾上腺、脂肪组织(白色和/或棕色)、血液(例如造血干细胞,例如人类造血祖细胞、人类造血干细胞、CD34+细胞、CD4+细胞)、淋巴细胞和其他血液谱系细胞。

[0304] 癌症疗法

[0305] 本发明化合物可用于递送一种或多种治疗剂(例如, RNAi 剂)至具有癌症或处于发展癌症风险(例如, 至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%的增加的风险)的受试者。示例性癌症包括肝癌(例如, 肝细胞癌、肝母细胞瘤、胆管癌、血管肉瘤或恶性血管瘤)或成神经细胞瘤。示例性肿瘤疾病和相关并发症包括但不限于癌(例如, 原位的肺、乳腺、胰腺、结肠、肝细胞、肾、女性生殖道、鳞状细胞癌)、淋巴瘤(例如, 组织细胞淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤)、MEN2综合征、多发性神经纤维瘤(包括Schwann细胞瘤)、骨髓增生异常综合征、白血病、肿瘤血管生成、甲状腺癌、肝、骨、皮肤、脑、中枢神经系统、胰腺、肺(例如, 小细胞肺癌、非小细胞肺癌(NSCLC))、乳腺、结肠、膀胱、前列腺、胃肠道、子宫内膜、输卵管、睾丸和卵巢、胃肠道间质瘤(GIST)、前列腺肿瘤、肥大细胞瘤(包括犬肥大细胞瘤)、急性髓性骨髓纤维化、白血病、急性淋巴细胞白血病、慢性髓性白血病、慢性淋巴细胞白血病、多发性骨髓瘤、黑素瘤、肥大细胞增多症、神经胶质瘤、成胶质细胞瘤、星形细胞瘤、成神经细胞瘤、肉瘤(例如, 神经外胚层起源的肉瘤或平滑肌肉瘤)、肿瘤转移至其他组织和化疗引起的缺氧。

[0306] 施用和剂量

[0307] 本发明还涉及含有化合物或治疗有效量的组合物的药物组合物, 例如包含治疗剂(例如, RNAi 剂)的制剂。所述组合物可以被配制用于许多药物递送系统。一种或多种生理上可接受的赋形剂或载体还可以包含在适当制剂的组合物中。用于本发明的适当制剂参见 Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Philadelphia, PA, 第17版, 1985。有关药物递送方法的简要综述, 参见例如 Langer, Science 249:1527-1533, 1990。

[0308] 药物组合物预期用于胃肠外、鼻内、表面、口服或局部施用, 例如通过透皮方式, 用于预防性和/或治疗性治疗。药物组合物可以胃肠外施用(例如, 通过静脉内、肌肉内或皮下注射), 或通过口服, 或通过受血管或癌症病状影响的区域的表面施用或关节内注射。其他施用途径包括血管内、动脉内、肿瘤内、腹膜内、心室内、硬膜内以及鼻、眼、巩膜内、眼窝内、直肠、表面或气溶胶吸入施用。持续释放施用也特别包括在本发明中, 通过诸如长效注射剂或可侵蚀的植入物或组分的方式。因此, 本发明提供了用于胃肠外施用的组合物, 其包含溶解或悬浮于可接受载体、优选水性载体、例如水、缓冲水、盐水、PBS等中的上述剂。组合物可以含有适当生理条件所需的药学可接受的辅助物质, 例如pH调节剂和缓冲剂、渗透压调节剂、润湿剂、去污剂等。本发明还提供了用于口服递送的组合物, 其可以含有惰性成分, 例如用于片剂、胶囊等制剂的粘合剂或填充剂。而且, 本发明提供了用于局部施用的组合物, 其可以含有惰性成分, 例如用于乳霜、软膏等制剂的溶剂或乳化剂。

[0309] 这些组合物可以通过常规灭菌技术来灭菌, 或者可以无菌过滤。得到的水溶液可以包装原样使用或者冻干, 冻干的制品在施用之前与无菌水性载体组合。制品的pH通常在3

至11,更优选5至9或6至8,并且最优选7至8,例如7至7.5。得到的固体形式的组合物可以多个单剂单位包装,每个含有固定量的上述剂或多种剂,例如在密封包装的片剂或胶囊中。固体形式的组合物还可以包装在灵活数量的容器中,例如在设计用于表面应用的乳霜或软膏的可挤压管中。

[0310] 含有有效量的组合物可以被施用用于预防性或治疗性治疗。在预防性应用中,可以将组合物施用给具有临床确定的易感性或增加的发展肿瘤或癌症的易感性的患者。可以给患者(例如,人)施用足以延迟、减少或优选预防临床疾病发生或肿瘤发生的量的本发明化合物。在治疗应用中,给已经罹患癌症的患者(例如,人)施用足以治愈或至少部分停止病状及其并发症的症状量的组合物。足以实现该目的的量被定义为“治疗有效剂量”,是足以实质改善与疾病或医学病状相关的一些症状的化合物的量。例如,在癌症治疗中,减少、预防、延迟、抑制或停止疾病或病状的任何症状的剂或化合物将是治疗上有效的。治疗有效量的剂或化合物不是治愈疾病或病症所必需的,但是将提供对疾病或病状的治疗以使个体中疾病或病状的发生被延迟、阻碍或预防,或者疾病或病状症状被缓解,或者疾病或病状的期限被改变,或者例如较不严重或者加速恢复。

[0311] 该用途的有效量可根据疾病或病状的严重度和患者的体重和一般状态,但是一般范围从每患者每剂约0.5mg至约3000mg的所述剂或多种剂。适合初次施用和加强施用的方案典型为:初次施用,随后以每小时、每日、每周或每月的间隔通过后续施用重复剂量一次或多次。本发明组合物中存在的剂的总有效量可以在相对短的时期以单剂(作为快速浓注或输注)施用给哺乳动物,或者可以使用分次治疗方案施用,其中在更长的时期施用多剂(例如,每4-6、8-12、14-16或18-24小时或每2-4天、1-2周、每月一剂)。可选地,考虑足以维持血液中治疗有效浓度的连续静脉内输注。

[0312] 本发明组合物中存在的并且在本发明方法中应用给哺乳动物(例如,人)的一种或多种剂的治疗有效量可以由本领域普通技术人员考虑哺乳动物年龄、体重和病状的个体差异来确定。本发明的剂以有效量施用给受试者(例如哺乳动物,例如人),所述有效量是在受治疗的受试者中产生希望结果(例如,减缓或消除癌症或神经变性病症)的量。这种治疗有效量可以由本领域技术人员经验确定。

[0313] 患者还可以接收每周一次或多次(例如,每周2、3、4、5、6或7或更多次)的每剂约0.1至3,000mg、每周0.1至2,500(例如,2,000、1,500、1,000、500、100、10、1、0.5或0.1)mg剂量范围的剂。患者还可以接收每两周或每三周一剂的每剂0.1至3,000mg范围的组合物的剂。

[0314] 待施用的制剂和有效载荷(例如,DsiRNA)的量(剂量)可以经验确定。在某些实施方案中,使用0.0001-10mg/kg动物体重的核酸有效载荷和0.001-200mg/kg动物体重的递送制剂观察到基因表达的有效敲除。小鼠中的示例性量是0.1-5mg/kg核酸有效载荷和0.7-100mg/kg递送制剂。任选地,施用约1-50mg/kg递送制剂。因为它通常在较大剂量时是没有毒性的,所以有效载荷(例如,DsiRNA)的量容易增加。

[0315] 在某些实施方案中,根据例如急性与慢性适应症等,可以经数日、数周或更长时间(例如,1至28天或更长)每日、或仅一次或以其他间隔施用剂。

[0316] 可以使用治疗医师选择的剂量水平和模式进行包含有效量的本发明组合物的单次或多次施用。可以基于患者疾病或病状的严重度来确定并调整剂量和施用时间表,疾病

或病状的严重程度可以在整个治疗过程中根据医师常用的方法或本文描述的方法来监测。

[0317] 本发明化合物和制剂可以与常规治疗方法或疗法组合使用,或者可以与常规治疗方法或疗法分开使用。当本发明的化合物和制剂以与其他剂的组合疗法施用,它们可以连续或共时施用给个体。可选地,根据本发明的药物组合物包括如本文所述与药学可接受的赋形剂结合的本发明化合物或制剂和本领域已知的另一治疗剂或预防剂的组合。

[0318] 配制的剂可以包装在一起作为药盒。非限制性实例包括含有例如两种丸剂、一种丸剂和一种粉剂、一种栓剂和一种管形瓶中的液体、两种表面乳霜等。药盒可以包括辅助单位剂量施用给患者的任选组成部分,例如用于重构粉剂形式的管形瓶、用于注射的注射器、定制的IV递送系统、吸入器等。此外,单位剂量药盒可以含有用于准备和施用组合物的说明书。药盒可以被生产为供一个患者单次使用单位剂量、供特定患者多次使用(以恒定剂量,或者其中个体化合物可以在效价上随治疗进展而变化);或者药盒可以含有适合施用给多个患者的多个剂(“成批包装”)。药盒组分可以组装在硬纸盒、泡罩包装、瓶、管和类似物中。

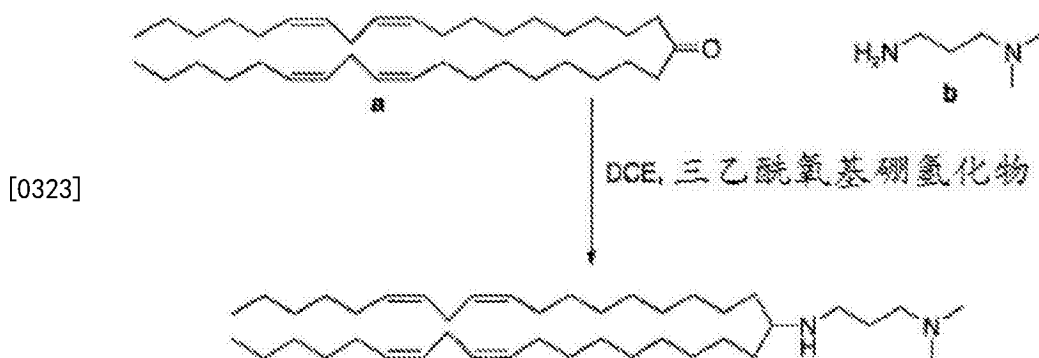
[0319] 组装的纳米颗粒中脂质的pKa值的测量

[0320] 当存在于不同环境中时,脂质的不同的生理化学性质极大地决定脂质的行为。一个这种重要的性质是脂质的电离常数(Ka)。当存在于组装的纳米颗粒中时,脂质的固有pKa可能不是其行为的正确表示。当存在于水性环境中时,脂质经历了具有高介电常数的环境,而存在于组装的纳米颗粒/囊中时,其被提供低介电常数的脂质包围。此外,周围脂质、胆固醇和PEG化的脂质都影响制剂的表观pKa。阳离子脂质和核酸之间的相互作用性质是静电的,制剂的表观pKa决定纳米颗粒中核酸的包封以及其随后的细胞内释放。

[0321] TNS荧光方法可用于确定制剂中脂质的表观pKa。TNS(2-(对甲苯氨基)-6-萘磺酸)是带负电荷的荧光染料,其荧光在水存在下猝灭。TNS分配进入带正电荷的膜,并且这导致归因于水去除的荧光增加。因此,荧光增加可以用于估计阳离子脂质存在于不同pH环境中的电离。使用TNS确定pKa的方法是本领域已知的,例如,如实施例中所描述的。

## 实施例

[0322] 实施例1:从酮和伯胺合成氨基-胺脂质L-1



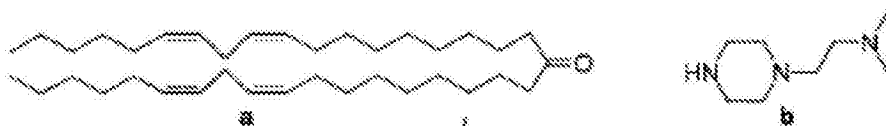
[0324] 完全在 $N_2$ 气氛下将酮a(1当量)和胺b(1.1当量)溶解于干燥烧瓶中的二氯乙烷中,并在室温(RT)下搅拌30分钟。添加三乙胺(1.5当量),并在室温搅拌混合物过夜。用1N NaOH猝灭反应。用DCM稀释猝灭的反应并用水萃取一次、用盐水萃取一次,并且经 $Na_2SO_4$ 干燥有机相。过滤干燥的溶液并在旋转蒸发仪上浓缩。通过二氧化硅柱纯化残余物(步骤梯度开始于1%MeOH/DCM至5%MeOH/DCM,产率变化从60%至90%)以产生化合物L-1。



$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 5.41–5.30 (m, 8H), 3.12 (t, 2H), 2.91 (m, 1H), 2.77 (t, 6H), 2.48 (bs, 6H), 2.20 (m, 2H), 2.05 (q, 8H), 1.80–1.69 (m, 4H), 1.38–1.25 (m, 40H), 0.89 (t, 3H); MS: 电喷:  $[\text{M}+1]$  理论: 613, 实测: 613。

[0325] 通过调整该实施例的合成步骤, 制备了其他氨基-胺脂质, 例如图2A、2B和3中提供的那些

[0326] 实施例2: 从酮和仲胺合成氨基-胺脂质L-2



[0327] 干 MeOH/AcOH/三乙酰氧基硼氢化物



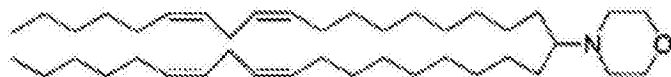
[0328] 完全在 $\text{N}_2$ 气氛下将酮a (1当量) 溶解于干燥烧瓶中的干MeOH中。添加胺b (1.1当量), 随后添加三乙酰氧基硼氢化物 (1.5当量) 和AcOH (1当量), 并在室温搅拌反应过夜。用DCM稀释反应并用水萃取一次、用盐水萃取一次, 并且经 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 干燥有机相。过滤干燥的溶液并在旋转蒸发仪上浓缩。通过二氧化硅柱纯化残余物 (步骤梯度开始于1% MeOH/DCM至5% MeOH/DCM, 产率变化从60%至90%) 以产生化合物L-2。 $^1\text{H NMR}$ : ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) 5.39–5.30 (m, 8H), 2.78 (t, 4H), 2.59–2.52 (m, 10H), 2.33 (bs, 8H), 2.07 (q, 8H), 1.25 (m, 2H), 1.40–1.26 (m, 40H), 0.914 (t, 6H); MS: 电喷pos.  $[\text{M}+1]$  理论668, 实测668。

[0329] 通过调整该实施例的合成步骤, 制备了其他氨基-胺脂质, 例如图4和5中提供的L-2和L-6类似物。

[0330] 实施例3: 从酮和吗啉合成脂质L-46

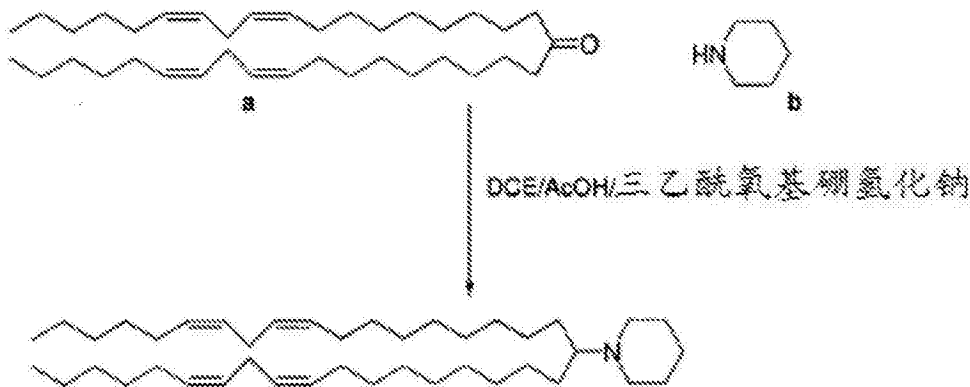


[0331] DCE/AcOH/三乙酰氧基硼氢化钠



[0332] 向酮a (2.66g; 5.05mmol)、吗啉b (1.34ml; 15mmol) 和AcOH (1.77ml; 30mmol) 在DCE (12ml) 中的混合物添加 $\text{NaBH}(\text{AcO})_3$  (1.6g; 7.5mmol)。在室温搅拌反应混合物72小时。TLC测试 (二氧化硅凝胶; 用己烷:EtAc-Et<sub>3</sub>N 95:5洗脱) 指示大约45%转化。用5%  $\text{K}_2\text{CO}_3$  水溶液稀释反应混合物并用DCM萃取。经 $\text{K}_2\text{CO}_3$  干燥溶剂并在旋转蒸发仪上蒸发。通过在二氧化硅凝胶上的LC分离残余物 (用己烷:EtAc 90:10洗脱)。以39%产率 (1.18g) 获得想要的产物L-46并通过NMR检测是纯的。

[0333] 实施例4:从酮和哌啶合成脂质L-47



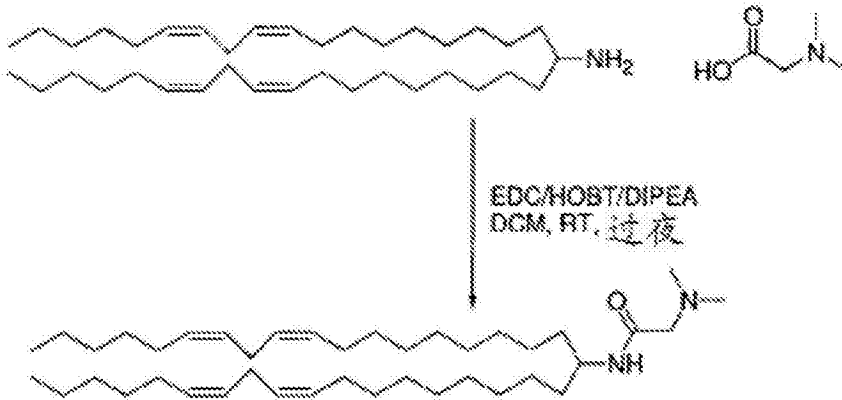
[0335] 向二亚油烯基酮a (3.99g; 7.58mmol)、哌啶b (2.25ml; 22mmol) 和AcOH (1.33ml; 23mmol) 在DCE (24ml) 中的混合物添加NaBH(AcO)<sub>3</sub> (2.4g; 11.3mmol)。在室温搅拌反应混合物96小时。TLC测试(二氧化硅凝胶;用己烷:EtAc-Et<sub>3</sub>N95:5洗脱)指示大约35%转化。用5% K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>水溶液稀释反应混合物并用DCM萃取。经K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>干燥溶剂并在旋转蒸发仪上蒸发。通过在二氧化硅凝胶上的LC分离残余物(用己烷:EtAc90:10洗脱)。以29%产率(1.30g)获得想要的产物L-47并通过NMR检测是纯的。

[0336] 通过使用本实施例以及实施例3中提供的方法,可以制备具有各种头基的阳离子脂质,例如图9中提供的那些。

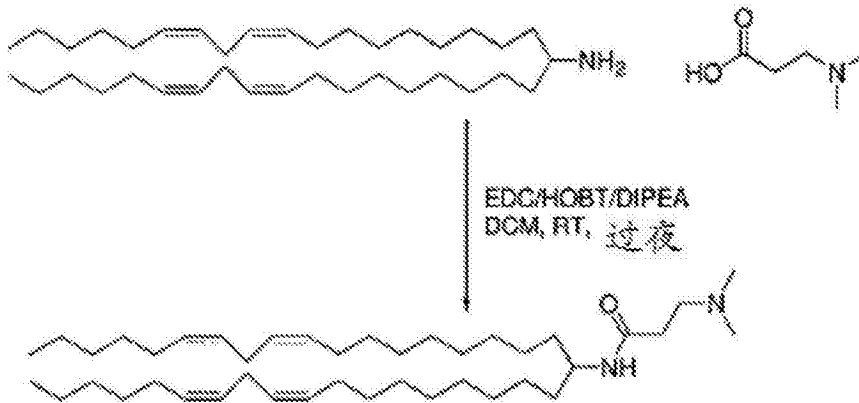
[0337] 实施例5:从伯胺和羧酸合成酰胺阳离子脂质

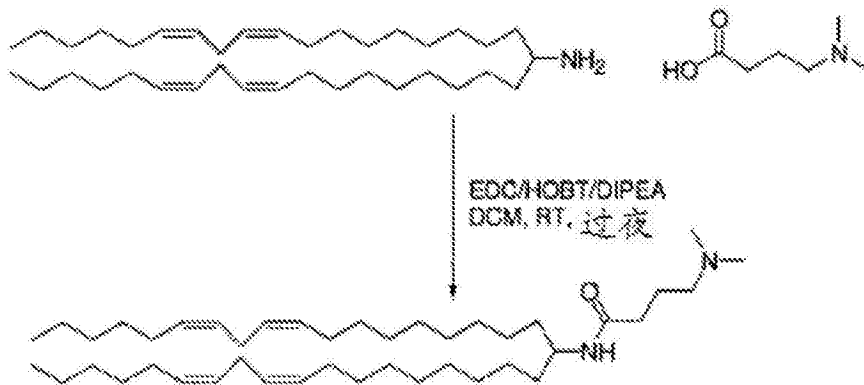
[0338] 使用以下一般程序制备以下二亚油烯基酰胺衍生物。向二亚油烯基胺 (338mg; 0.64mmol)、HOBt (65mg; 0.5mmol)、氨基酸 (1mmol) 和DIPEA (1当量) 在DCM (15g/mL) 中的溶液组合,随后添加EDC (1.2mmol)。在室温搅拌反应混合物过夜。TLC指示反应完全。用0.5% K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>水溶液稀释反应混合物并用DCM萃取。在旋转蒸发仪上浓缩之后,通过二氧化硅凝胶色谱纯化粗产物(梯度从己烷:Et<sub>3</sub>N95:5至己烷:CHCl<sub>3</sub>:Et<sub>3</sub>N46:44:5)。获得产率为80-85%。

[0339] 基于以下提供的方案还制备了二油烯基衍生物:

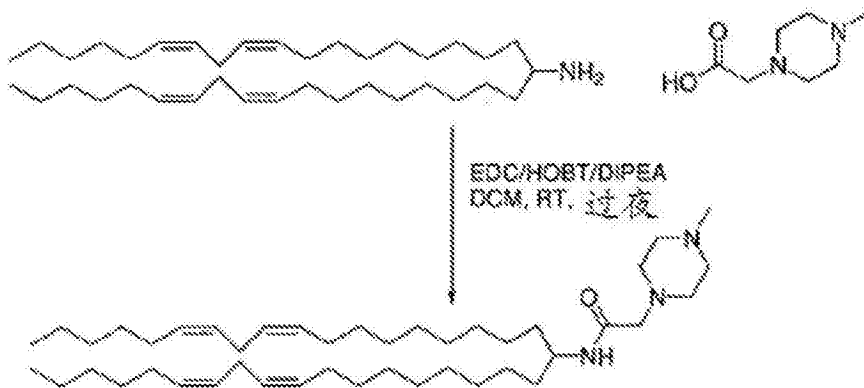
从伯胺和羧酸合成脂质L-30

[0340]

从伯胺和羧酸合成脂质L-31

从伯胺和羧酸合成脂质L-32

[0341]

从伯胺和羧酸合成脂质L-42

[0342] 通过调整本实施例的合成步骤,制备了其他酰胺-胺脂质,例如图6-8中提供的那些。

[0343] 实施例6:胺脂质制剂的制备

[0344] 为了测试脂质L-1和L-2的效力,使用阳离子脂质(DODMA)、中性脂质(DSPC)、PEG-脂质轭合物(PEG-DMPE和PEG-DMG)和胆固醇与具有以下结构的RNAi剂(对HPRT1而言是DsiRNA)制备制剂:

[0345] 5'-GCCAGACUUUGUUGGAUUUGAAA<sup>tt</sup>(SEQ ID NO:1)

[0346] 3'-UUCGGUCUGAAACAACCUAAACUUUA(SEQ ID NO:2),

[0347] 其中大写字母表示RNA核苷酸,下划线的大写字母表示2'-O-甲基-RNA核苷酸,并且小写字母表示DNA核苷酸。

[0348] DsiRNA链的制备:寡核苷酸合成和纯化

[0349] 合成了个体RNA链并根据标准方法(Integrated DNA Technologies, Coralville, Iowa) HPLC纯化。例如,使用固相亚磷酰胺化学合成RNA寡核苷酸,脱保护并使用标准技术(Damha和Olgivie, Methods Mol. Biol. 20:81, 1993; Wincott等人, Nucleic Acids Res. 23: 2677, 1995)在NAP-5柱(Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, N.J.)上脱盐。使用Amersham Source15Q柱(1.0cm x25cm; Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, N.J.)上离子交换高效液相色谱(IE-HPLC)纯化寡聚体,使用15分钟逐步线性梯度。梯度从90:10缓冲液A:B至52:48缓冲液A:B,其中缓冲液A是100mM Tris pH8.5,并且缓冲液B是100mM

Tris pH8.5, 1M NaCl。在260nm监测样品, 并且收集相应于全长寡核苷酸物类的峰, 汇集, 并在NAP-5柱上脱盐, 并冻干。

[0350] 通过在Beckman PACE5000 (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, Calif.) 上毛细管电泳 (CE) 来测定每个寡聚体的纯度。CE毛细管具有100 $\mu$ m内径并且含有ssDNA100R Gel (Beckman-Coulter)。通常, 将约0.6纳摩尔的寡核苷酸注射进入毛细管, 在444V/cm的电场中运行并通过在260nm的UV吸光度检测。变性Tris-Borate-7M-尿素运行缓冲液购自Beckman-Coulter。获得如通过CE评估的至少90%纯的寡核糖核苷酸用于下述实验。根据生产商推荐方案, 通过Voyager DETM Biospectrometry Workstation (Applied Biosystems, Foster City, Calif.) 上基质辅助的激光解吸电离飞行时间 (MALDI-TOF) 质谱, 确认了化合物身份。获得所有寡聚体的相对分子量, 通常在0.2%的预期分子量内。

[0351] DsiRNA双链体的制备

[0352] 将单链RNA (ssRNA) 寡聚体以例如100 $\mu$ M浓度重悬于由100mM醋酸钾、30mM HEPES, pH7.5组成的缓冲液。以等摩尔量混合互补的有义和反义链, 以产生例如50 $\mu$ M双链体的最终溶液。在RNA缓冲液 (IDT) 中加热样品至100 $^{\circ}$ C持续5分钟并允许在使用之前冷却至室温。在-20 $^{\circ}$ C下储存双链RNA (dsRNA) 寡聚体。将单链RNA寡聚体冻干储存或者储存在-80 $^{\circ}$ C无核酸酶的水中。

[0353] 基于囊的脂质制剂的制备

[0354] 用表5中提供的mol%制备脂质颗粒。总脂质与DsiRNA比率为约1:7。

[0355] 表5

制剂	组成			
L-1v	L-1 (57.2%)	PEG-DMPE (3%)	DSPC (7.1%)	胆固醇 (32.7%)
L-2v	L-2 (57.2%)	PEG-DMPE (3%)	DSPC (7.1%)	胆固醇 (32.7%)
[0356] L-5v	L-5 (57.2%)	PEG-DMPE (3%)	DSPC (7.1%)	胆固醇 (32.7%)
L-6v	L-6 (57.2%)	PEG-DMPE (3%)	DSPC (7.1%)	胆固醇 (32.7%)
L-30v	L-30 (57.2%)	PEG-DMPE (3%)	DSPC (7.1%)	胆固醇 (32.7%)

[0357] RNA结合剂和转染脂质制剂的制备

[0358] 用表6中提供的mol%制备脂质颗粒。总脂质与DsiRNA比率为约1:20。

[0359] 表6

制剂	RNA 结合剂		转染脂质			
	L-1	DODMA (25.9%)	PEG-DMPE (2.9%)	L-1 (21.6%)	PEG-DMG (2.8%)	DSPC (13.8%)
L-2	DODMA (25.9%)	PEG-DMPE (2.9%)	L-2 (21.6%)	PEG-DMG (2.8%)	DSPC (13.8%)	胆固醇 (33.0%)
DLinDMA	DODMA (25.9%)	PEG-DMPE (2.9%)	DLinDMA (21.6%)	PEG-DMG (2.8%)	DSPC (13.8%)	胆固醇 (33.0%)
DLin-KC2 -DMA	DLinDMA (25.9%)	PEG-DMPE (2.9%)	DLin-KC2- DMA (21.6%)	PEG-DMG (2.8%)	DSPC (13.8%)	胆固醇 (33.0%)

[0361] 在表5和6中,PEG-DMPE是1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000],并且PEG-DMG是(R)-3-[( $\omega$ -甲氧基-PEG2000-氨基甲酰基)]-1,2-二-0-十四烷基-sn-甘油酯。

[0362] 实施例7:胺脂质制剂的体外性能

[0363] 为了评估各种脂质制剂的效力,使用靶向HPRT1的DsiRNA分子进行体外测定。如以上实施例6中所述,使用针对HPRT1的DsiRNA制备脂质制剂。

[0364] 细胞培养和RNA转染

[0365] HeLa细胞获自ATCC并在37°C、5%CO<sub>2</sub>下维持于补充有10%胎牛血清(HyClone)的Dulbecco改良的Eagle培养基(HyClone)。通过与终浓度为1nM、5nM或25nM的本发明制剂孵育而将本发明的dsRNA-阳离子脂质制剂转染进入HeLa细胞。使用0.1nM或1nM的Lipofectamine™ RNAiMAX (Invitrogen) dsRNA作为阳性对照。简言之,每种dsRNA的2.5 $\mu$ L的0.2 $\mu$ M或0.02 $\mu$ M储液与47.5 $\mu$ L Opti-MEM I (Invitrogen)混合。对于Lipofectamine™对照,每种dsRNA的2.5 $\mu$ L的0.2 $\mu$ M或0.02 $\mu$ M储液与46.5 $\mu$ L Opti-MEM I (Invitrogen)和1 $\mu$ L Lipofectamine™ RNAiMAX混合。将得到的50 $\mu$ L混合物加入12孔板的单个孔,并在室温孵育20分钟以允许形成dsRNA:Lipofectamine™RNAiMAX复合体。

[0366] 同时,使HeLa细胞胰蛋白酶化并以约367细胞/ $\mu$ L的终浓度重悬于培养基中。最后,将450 $\mu$ L细胞悬液加至每个孔(终体积500 $\mu$ L)并将板放入孵育器持续24小时。对于剂量响应研究,dsRNA的浓度变化从最初10pM至100nM。对于时程研究,研究了约4小时至约72小时的孵育时间。

[0367] 抑制的评估

[0368] 通过qRT-PCR测定靶基因敲除,值被标准化为HPRT表达对照治疗,包括单独Lipofectamine™ RNAiMAX(媒介物对照)或未治疗的。

[0369] RNA分离和分析

[0370] 用2mL PBS洗涤细胞一次,并使用RNeasy Mini Kit™ (Qiagen) 萃取总RNA并以30 $\mu$ L总体积洗脱。使用Transcriptor 1<sup>st</sup> Strand cDNA Kit™ (Roche) 和随机六聚体根据生产商

说明书反转录1 $\mu$ g总RNA。将得到的cDNA的三十分之一(0.66 $\mu$ L)与5 $\mu$ L IQ Multiplex Powermix (Bio-Rad)、3.33 $\mu$ L H<sub>2</sub>O和1 $\mu$ L含有特异性针对人类基因HPRT-1(登录号NM\_000194)靶序列的引物和探针的3 $\mu$ M混合物混合在一起。

[0371] 定量RT-PCR

[0372] 具有C1000热循环仪(Bio-Rad)的CFX96实时系统用于扩增反应。PCR条件是:95 $^{\circ}$ C持续3分钟;然后以95 $^{\circ}$ C、10秒钟循环;并以55 $^{\circ}$ C、1分钟进行40个循环。每个样品三次重复测试。将相对的HPRT mRNA水平标准化为靶mRNA水平并与用单独转染剂治疗或未治疗的对照样品中获得的mRNA水平对比。使用Bio-Rad CFX Manager版本1.0软件分析数据。表达数据表示为dsRNA的氨基-胺阳离子脂质制剂与没有氨基-胺阳离子脂质的dsRNA制剂治疗下的表达对比。

[0373] 结果

[0374] 图10提供了使用含有氨基-胺脂质L-1或L-2的脂质颗粒的体外敲除的结果。总体上,当施用至HeLa细胞时,L-1和L-2有效抑制了靶mRNA水平。具体地,L-1在最低浓度1nM下提供了约70%的剩余mRNA水平。相应地,当通过转染施用至HeLa细胞时,氨基-胺脂质提供了RNAi剂的有效递送。因此,本发明化合物的任何一个,例如其任何脂质或制剂,将用于递送聚阳离子有效载荷,例如RNAi剂或反义有效载荷。

[0375] 实施例8:胺脂质制剂的体内性能

[0376] 为了进一步评估脂质的性能,使用具有针对HPRT1的DsiRNA的制剂进行体内实验。

[0377] 使用以下适当百分比制备制剂:20mol%的L-1、L-2、L-5、L-6、L-7、L-8、L-22或L-30中的一个;26mol%的DODMA;3mol%的PEG2000-DMPE;3mol%的PEG2000-DMG;13mol%的DSPC;和33mol%的胆固醇。制剂还包括比率约1:20(w/w)的DsiRNA:总脂质。

[0378] 通过经由尾静脉的静脉内施用给大约4周大的CD1雌性小鼠施用单剂(1mg/kg或5mg/kg)脂质颗粒制剂,给药体积为10 $\mu$ L/g体重。48小时(给药后)后,在RNALater(Qiagen)中收集组织。在终点分析中,从小鼠肝分离总RNA来进行RT-qPCR。室温之前,在70 $^{\circ}$ C加热RNA样品与Oligo(dT)引物持续5分钟。在PCR反应中,用RPL23(管家基因,在这里用作对照)标准化mHPRT表达。图11和12显示了具有误差棒的数据,n=5只动物/组的平均值 $\pm$ SD。

[0379] 在第一组实验中,脂质制剂的剂量时单剂5mg/kg(图11)。以该剂量,化合物L-1和L-7提供了约80%至约90%的剩余mRNA水平。如约15%的剩余mRNA水平所证明的,头基中、例如L-30中氧基团的添加提供了基因沉默的明显增加。此外,头基中具有杂环基的化合物(例如,L-2、L-5、L-6、L-8和L-22)提供了具有约15%至约45%的剩余mRNA水平的化合物。各种制剂的% mRNA敲除示于表7。表7还显示了每种脂质的pKa值,如通过TNS荧光方法所测量的。

[0380] 为了测定本发明阳离子脂质的pKa值,在不同pH值的磷酸盐缓冲液中孵育制剂(浓度为1mM),向其中添加溶解于DMSO的TNS(得到的终浓度为6 $\mu$ M TNS)。在SpectraMax<sup>®</sup>M3荧光读板上测量得到的溶液的荧光,激发波长为325nm并且发射波长为435nm。测量的TNS荧光用方程式1所示的三参数S型函数拟合。

$$[0381] \quad \text{函数}(f) = \frac{a}{\left(1 + \exp\left(\frac{pH - pKa}{b}\right)\right)}$$

(方程式1)

[0382] 达到最大荧光一半时的pH被报告为制剂的表观pKa,其中a和b是分别反映观察到的最大荧光和S型函数斜率的无因次参数。

[0383] 表7

[0384]

脂质制剂	TNS pKa值	%mRNA敲除
L-1	7.6	18.7
L-2	6.7	75.6
L-5	6.4	88.5
L-6	5.6	88.2
L-7	7.1	8.9
L-8	6.7	54.6
L-22	7.0	66.3
L-24	5.7	74.1
L-25	6.5	76.8

[0385]

L-26	7.1	63.6
L-30	5.8	86.4
L-31	6.9	83.6
L-32	7.0	41.0
L-35	6.5	26.1
L-42	6.7	66.6

[0386] 在第二组实验中,以1mg/kg或5mg/kg的单剂剂量评估化合物L-2、L-5、L-6和L-30(图12)。具体地,L-5,L-6和L-30以1mg/kg的较低剂量提供了有效的基因沉默。总体而言,这些数据提供了在体内模型中作为靶RNA水平的有效抑制剂的各种脂质化合物和剂量。

[0387] 为了评估含有本发明的氨基-胺或氨基-酰胺阳离子脂质和dsRNA的脂质制剂的耐受性,用L-6和L-30制剂注射雌性CD-1小鼠[以10mg/kg DsiRNA剂量的2剂施用(qod),各自约200mg/kg总脂质剂量],并在第二剂之后48小时收集血清样品。测试血清样品的一组临床化学评估,包括通过测量酶丙氨酸转氨酶(ALT)和天冬氨酸转氨酶(AST)的肝功能测试(LFT)。使用磷酸盐缓冲盐水(PBS)作为媒介物对照组。制剂L-6和L-30的ALT和AST升高是PBS组的<3x。对于L-6和L-30制剂,也没有观察到体重或肝的变化。因此,L-6和L-30制剂是良好耐受的。因此,本文描述的任何脂质及其制剂可用于递送一种或多种剂,例如聚阴离子或反义有效载荷。

[0388] 实施例9:使用含有dsRNA的脂质制剂来减少皮下动物肿瘤模型中靶基因的表达

[0389] 为了评估含有氨基-胺或氨基-酰胺阳离子脂质和dsRNA的脂质制剂的递送效率和后续功能,使用了具有某些调整的皮下(s.c.)肿瘤模型(Judge等人,J.Clin.Invest.119:



661, 2009)。通过s.c.注射50 $\mu$ L PBS中的 $3 \times 10^6$ 细胞进入左后侧而在雄性nu/nu小鼠中建立了Hep3B肿瘤。在肿瘤播种变得可触诊之后10-17天,将小鼠随机分成治疗组。通过经由外侧尾静脉的标准静脉内(i.v.)注射来施用dsRNA或媒介物对照的脂质制剂,基于根据个体动物体重的mg dsRNA/kg体重基础来计算。使用数字卡尺以2个尺度(宽 $\times$ 长)测量肿瘤以评估肿瘤生长。使用方程式 $x*y*y/2$ 计算肿瘤体积,其中x=最大直径并且y=最小直径,并且表示为组平均值 $\pm$ SD。还从不同治疗组的动物取出肿瘤组织并证实基因敲除。肿瘤体积、存活和RNA表达数据表示为dsRNA脂质制剂的治疗与没有氨基-22氨基-酰胺阳离子脂质的dsRNA制剂的治疗之间的对比。

[0390] 实施例10:使用含有dsRNA的脂质制剂减少Hep3B原位肝肿瘤模型中靶基因的表达

[0391] 为了评估dsRNA的氨基-胺或氨基-酰胺阳离子脂质制剂的靶向效率和后续功能,使用了具有某些调整的肝内肿瘤模型(Judge等人,J.Clin.Invest.119:661,2009)。通过直接肝内注射Hep3B肿瘤细胞而在小鼠中建立了肝肿瘤。使用雄性nu/nu小鼠作为Hep3B肿瘤的宿主。使用2,2,2-三溴乙醇(Sigma)使小鼠维持麻醉,在胸骨之下做出跨中线的单个1-cm切口,并且取出左肝外叶。使用Hamilton注射器和30号针头将悬浮于40 $\mu$ L50%PBS/50%Matrigel™(BD)的大约 $2 \times 10^6$ Hep3B细胞以浅角度缓慢注射进入所述叶。然后在缝合之前将拭子应用于刺伤以停止任何出血。允许小鼠在无菌笼中从麻醉中恢复,并在返回常规圈舍之前严密监视2-4小时。肿瘤植入之后约三周,将小鼠随机分成治疗组。小鼠(n=7每组)接收了:(1)dsRNA的氨基-胺或氨基-酰胺脂质制剂;(2)没有氨基-胺或氨基-酰胺阳离子脂质的dsRNA制剂;或(3)媒介物对照,如通过经由外侧尾静脉的标准静脉内(i.v.)注射来施用。基于根据个体动物体重的mg dsRNA/kg体重基础来计算剂量。

[0392] 对于产生了图13所示结果的实验,动物被给予含有L-6-或L-30-配制的脂质颗粒的5mg/kg DsiRNA。表8提供了本研究中使用的包含L-6和L-30脂质的脂质制剂的具体组成。

[0393] 表8

制 剂	RNA结合剂		转染脂质			
	L-6	DODMA (25.9%)	PEG-DMPE (2.9%)	L-6 (21.6%)	PEG-DSPE (2.8%)	DSPC (13.8%)
L-30	DODMA (25.9%)	PEG-DMPE (2.9%)	L-30 (21.6%)	PEG-DSPE (2.8%)	DSPC (13.8%)	胆固醇 (33.0%)

[0395] 在整个研究期间监测体重,作为发生肿瘤负荷和治疗耐受性的指标。对于效力研究,测定定义的人性化终点作为存活的替代。根据临床体征、体重减轻和腹胀的组合进行评估,以确定由于肿瘤负荷的安乐死日期。从不同治疗组的动物取出肿瘤组织并确认基因敲除。

[0396] 如图13所示,测试的L-6和L-30制剂在递送配制的抗HPRT1DsiRNA有效载荷至肝和原位Hep3B肿瘤组织方面都非常有效。具体地,与PBS对照相比,在肝和原位Hep3B肿瘤组织中观察到了大于50%敲除(和在某些情况下,60-80%敲除)的HPRT1靶mRNA。因此,任何脂质或其制剂将用于减少靶基因的表达(例如,与癌症相关的靶基因)。

[0397] 实施例11:使用含有dsRNA的脂质制剂减少HepG2原位肝肿瘤模型中靶基因的表达

[0398] 为了评估dsRNA的氨基-胺或氨基-酰胺阳离子脂质制剂的靶向效率和后续功能,使用了第二肝内肿瘤模型。通过HepG2肿瘤细胞的直接肝内注射在小鼠中建立了肝肿瘤。使用雌性nu/nu小鼠作为HepG2肿瘤的宿主。使用Avertin (Sigma) 使小鼠维持麻醉,在胸骨之下做出跨中线的单个1-cm切口,并且取出左肝外叶。使用Hamilton注射器和30号针头将悬浮于60 $\mu$ L50%PBS/50%Matrigel™ (BD) 的大约 $3 \times 10^6$  HepG2细胞以浅角度缓慢注射进入所述叶。然后在缝合之前将拭子应用于刺伤以停止任何出血。允许小鼠在无菌笼中从麻醉中恢复,并在返回常规圈舍之前严密监视2-4小时。肿瘤植入之后约三周,将小鼠随机分成治疗组。小鼠(n=7每组)接收了:(1) dsRNA的氨基-胺或氨基-酰胺脂质制剂;(2) 没有氨基-胺或氨基-酰胺阳离子脂质的dsRNA制剂;或(3) 媒介物对照,如通过经由外侧尾静脉的标准静脉内(i.v.)注射来施用。基于根据个体动物体重的mg dsRNA/kg体重基础来计算剂量。产生了图14所示结果的实验给予L-6-或L-30-配制的脂质颗粒中的5mg/kg DsiRNA。表8提供了本研究中使用的包含L-6和L-30脂质的脂质制剂的具体组成。在整个研究期间监测体重,作为发生肿瘤负荷和治疗耐受性的指标。对于效率研究,测定定义的人性化终点作为存活的替代。根据临床体征、体重减轻和腹胀的组合进行评估,以确定由于肿瘤负荷的安乐死日期。从不同治疗组的动物取出肿瘤组织并确认基因敲除。

[0399] 如图14所示,测试的L-6和L-30制剂在递送配制的抗HPRT1DsiRNA有效载荷至肝组织方面都非常有效。同时,在原位HepG2肿瘤组织中观察到两个制剂的20-50%水平的HPRT1靶mRNA敲除。以上结果确认这里检验的L-6和L-30制剂为有效的dsRNA递送媒介物,用于递送至正常肝和至少某些肿瘤组织(例如,原位Hep3B肿瘤,和其次原位HepG2肿瘤)。因此,任何脂质或其制剂将用于减少靶基因的表达(例如,与癌症相关的靶基因)。

[0400] 还可以通过用荧光标签标记脂质和/或dsRNA并使用活动物成像系统(Xenogen或BioRad)进行荧光生物分布研究来测试dsRNA的脂质制剂供肿瘤细胞摄取的功能(Eguchi等人,Nat.Biotechnol.27:567,2009)。使用该方法,并通过与单独dsRNA制剂的对比,证实了氨基-胺或氨基-酰胺阳离子脂质促进肿瘤细胞对dsRNA内化的能力。相反,在本研究中用作对照的单独的dsRNA制剂不能被相同程度地摄取并递送至肿瘤表面。效力终点、RNA表达和生物分布数据被表示为dsRNA脂质制剂的治疗与没有氨基-胺或氨基-酰胺阳离子脂质的dsRNA制剂的治疗之间的对比。

[0401] 实施例12:脂质制剂的肝细胞癌抗肿瘤效力

[0402] 通过如实施例10所述直接肝内注射Hep3B肿瘤细胞而在小鼠中建立了肝肿瘤。在肿瘤植入后约2周,将小鼠随机分入治疗组。小鼠(n=6每组)接收了:(1) 对照dsRNA的氨基-胺或氨基-酰胺脂质制剂;(2) 活性dsRNA的氨基-胺或氨基-酰胺脂质制剂;或(3) 媒介物对照,如通过经由外侧尾静脉的标准静脉内(i.v.)注射来施用。基于根据个体动物体重的mg dsRNA/kg体重基础来计算剂量。在产生了图15和16所示结果的实验中,给予动物含有L-6-或L-30-配制的脂质颗粒的5mg/kg DsiRNA。上表8提供了本研究中使用的包含L-6和L-30脂质的脂质制剂的具体组成。

[0403] 在整个研究期间监测体重,作为发生肿瘤负荷和治疗耐受性的指标。对于效率研究,测定定义的人性化终点作为存活的替代。根据临床体征、体重减轻和腹胀的组合进行评估,以确定由于肿瘤负荷的安乐死日期。从不同治疗组的动物取出肿瘤组织并测量肿瘤重

量以确定不同治疗组的效力。还测量了血清 $\alpha$ -甲胎蛋白 (AFP) 水平,作为肿瘤负荷的生物标识。

[0404] 与具有对照有效载荷的L-6和L-30制剂和PBS对照相比,具有活性有效载荷的L-6和L-30制剂在减少血清AFP (图15) 和肿瘤重量 (图16) 方面非常有效。

[0405] 实施例13:使用具有dsRNA的不同的L-30脂质制剂来减少多个原位肝癌模型中各种靶基因的表达

[0406] 为了评估不同的L-30制剂是否可以调节肿瘤中HPRT1相对于肝的敲除,调整了PEG-脂质含量。表9提供了本研究中使用的包含L-30脂质的脂质制剂的具体组成。产生了图18所示结果的实验给予L-30 [1] 配制的脂质颗粒中的1、3和10mg/kg DsiRNA和L-30 [2] 配制的脂质颗粒中的10mg/kg DsiRNA。可以使用任何有用的溶剂或溶剂系统来将RNA结合剂和DsiRNA引入制剂,包括与用于转染脂质的溶剂相同或不同的溶剂和溶剂系统 (例如,水性和/或非水性溶剂)。

[0407] 如图18所示,L-30 [1] 和L-30 [2] 制剂在递送配制的抗HPRT1DsiRNA有效载荷至肝组织以及原位Hep3B肿瘤组织中都有效。同时,含有10mg/kg DsiRNA的L-30 [2] 与L-30 [1] 制剂相比,肝敲除显著减少而对肿瘤敲除无不利影响。这些结果指示,增加脂质制剂中的PEG-脂质含量可以影响脂质颗粒至某些组织的递送和随后靶基因的敲除。

[0408] 在各种原位肝癌模型中使用不同的dsRNA测试了L-30 [1] 制剂作为dsRNA递送媒介物的效力。图19显示了从使用不同肝癌模型的实验产生的结果,显示L-30 [1] 与对照相比在递送配制的抗HPRT1DsiRNA有效载荷至所有测试癌症模型方面是有效的。图20显示了从使用含有多个独立DsiRNA的L-30 [1] 制剂的实验产生的结果和相应基因在原位Hep3B HCC肿瘤模型中的敲除。相应地,本文描述的任何脂质可用于替代表9中脂质制剂的具体组成中的L-30,并且任何dsRNA可用于减少靶基因 (例如,与本文描述的癌症或疾病相关的靶基因) 的表达。

[0409] 表9

	脂质	L-30[1] <sup>2</sup>	L-30[2] <sup>2</sup>
RNA结合剂	DODMA	25.9	25.9
	PEG <sub>2000</sub> -DMPE	2.9	2.9
转染脂质	L-30	21.6	21.6
	DSPC	13.8	13.8
	胆固醇	33.0	28.8
	PEG <sub>2000</sub> -DSPE	2.8	7.0
混合		分批	分批
乙醇% <sup>1</sup>		4%	4%
LNP缓冲液		盐水	盐水

[0411] <sup>1</sup>纯化之前;<sup>2</sup>脂质摩尔百分比

[0412] 实施例14:使用具有dsRNA的不同L-30脂质制剂减少Hep3BHCC肿瘤组织中的靶基因表达

[0413] 为了评估dsRNA的L-30制剂的靶向效率和后续功能,测试了脂质摩尔百分比变化的L-30制剂。表10提供了包含L-30作为转染脂质的脂质制剂的具体组成。具体地,L-30 [E]和L-30 [G] 制剂含有替代DODMA的L-48作为RNA结合剂。L-48包括H-5头基和二油烯基尾基(图17)。任何有用的溶剂或溶剂系统可用于将RNA结合剂和DsiRNA引入制剂,包括与用于转染脂质的溶剂相同或不同的溶剂和溶剂系统(例如,水性和/或非水性溶剂)。

[0414] Hep3B HCC肿瘤组织中hHPRT1敲除的结果显示于图21。所有L-30制剂(即,[A]至[G])导致与PBS对照相比,肿瘤组织中的hHPRT1表达下降。具体地,L-30 [A] 提供了hHPRT1表达的最大下降,随后是L-30 [D]、L-30 [G] 和L-30 [E]。

[0415] 表10

	脂质	L-30 [A] <sup>2</sup>	L-30 [B] <sup>2</sup>	L-30 [C] <sup>2</sup>	L-30 [D] <sup>2</sup>	L-30 [E] <sup>2</sup>	L-30 [F] <sup>2</sup>	L-30 [G] <sup>2</sup>
RNA结合剂	DODMA	25.9	25.9	25.7	25.9	-	25.9	-
	L-48	-	-	-	-	25.9	-	25.9
	PEG <sub>2000</sub> -DMPE	2.9	2.9	2.3	2.9	2.9	2.9	2.9
转染脂质	L-30	21.6	21.0	21.2	21.6	21.6	21.6	21.6
	DSPC	13.8	13.8	14.0	13.8	13.8	13.8	13.8
	胆固醇	33.0	34.0	34.3	33.0	33.0	33.0	33.0
	PEG <sub>2000</sub> -DSPE	2.8	2.4	2.4	2.8	2.8	2.8	2.8
混合		分批	分批	分批	分批	分批	在线	分批
乙醇% <sup>1</sup>		4%	4%	4%	4%	4%	4% <sup>3</sup>	4%
LNP缓冲液		PBS	PBS	PBS	盐水	PBS	PBS	盐水

[0417] <sup>1</sup>纯化之前;<sup>2</sup>脂质摩尔百分比;<sup>3</sup>还成功制备了含有8%乙醇的相同制剂

[0418] 实施例15:使用具有dsRNA的不同的L-6和L-30脂质制剂减少肺和前列腺肿瘤组织中的靶基因表达

[0419] 为了评估不同的L-6和L-30制剂的靶向效率和后续功能,测试了不同肿瘤组织中的HPRT1mRNA敲除。表9、10和11提供了本研究中使用的包含L-6和L-30脂质的脂质制剂的具体组成。可以使用任何有用的溶剂或溶剂系统来将RNA结合剂和核酸有效载荷(例如,DsiRNA)引入制剂,包括与用于转染脂质的溶剂相同或不同的溶剂和溶剂系统(例如,水性和/或非水性溶剂)。

[0420] 产生图22的实验给予L-6 [2] 和L-30 [2] 配制的脂质颗粒中10mg/kgDsiRNA并在实验第1天和第3天施用。在第5天收获肿瘤。测量H1975NSCLC肺肿瘤组织中hHPRT1mRNA的敲除。观察到L-30 [2] 制剂与L-6 [2] 制剂相比,更大水平的HPRT1靶mRNA敲除。

[0421] 产生图23的实验给予L-6 [2] 和L-30 [3] 配制的脂质颗粒中10mg/kgDsiRNA并在实验第1天和第3天施用。在第5天收获肿瘤。测量22Rv1前列腺癌SC异种移植肿瘤组织中hHPRT1mRNA的敲除。观察到L-30 [3] 制剂与L-6 [2] 制剂相比,更大水平的HPRT1靶mRNA敲除。图24显示了肝中植入的22Rv1前列腺癌中hHPRT1敲除的结果。建立与图23中进行的实验类似的实验。在图24的具体实验中,观察到L-6 [1] 制剂与L-30 [A] 和L-30 [E] 制剂两者相比,更

大水平的HPRT1靶mRNA敲除。相应地,本文描述的任何脂质可用于替代表9中脂质制剂具体组成中的L-6或L-30,并且任何dsRNA可用于减少癌症(例如,本文描述的任何癌症)相关靶基因的表达。

[0422] 表11

[0423]

	脂质	L-6[1] <sup>2</sup>	L-6[2] <sup>2</sup>	L-30[3] <sup>2</sup>
RNA结合剂	DODMA	25.9	25.9	25.9
	PEG <sub>2000</sub> -DMPE	2.9	2.9	2.9
转染脂质	L-6/L-30	21.6	21.6	21.6
	DSPC	13.8	13.8	13.8
	胆固醇	33.0	28.8	28.8
	PEG <sub>2000</sub> -DSPE	2.8	7.0	7.0
混合		分批	分批	分批
乙醇% <sup>1</sup>		4%	4%	4%
LNP缓冲液		PBS	PBS	PBS

[0424] <sup>1</sup>纯化之前;<sup>2</sup>脂质摩尔百分比

[0425] 实施例16:含有L-30与dsRNA的脂质制剂

[0426] 表12提供了包含L-30作为转染脂质的脂质制剂的具体组分。可以使用任何有用的溶剂或溶剂系统来将RNA结合剂和DsiRNA引入制剂,包括与用于转染脂质的溶剂相同或不同的溶剂和溶剂系统(例如,水性和/或非水性溶剂)。而且,本文描述的任何脂质可用于替代表12中作为转染脂质的L-30(例如,本文描述、例如表1中的任何一个),并且任何dsRNA可用于减少靶基因(例如,与本文描述的癌症或疾病相关的靶基因)的表达。

[0427] 表12

	组分	MW (g/mol)	量 (mg)	量 (mmol)	mol%
RNA结合剂	DsiRNA	17000	1.00	0.00006	-
	DODMA	620.09	4.43	0.0071	25.9
	PEG-DMPE	2693.3	2.12	0.0008	2.9
	总计		6.55	0.0079	28.7
转染脂质	L-30	613.05	3.65	0.0060	21.6
	PEG-DSPE	2805.5	2.14	0.0008	2.8
	DSPC	790.16	3.01	0.0038	13.8
	胆固醇	386.65	3.53	0.0091	33.1
	总计		12.33	0.020	71.3
转染脂质: DsiRNA			12	334	-
总脂质			18.88	0.028	100.0
总脂质: DsiRNA			19	469	-
总阳离子脂质 <sup>1</sup>			8.08	0.0131	47.5
阳离子脂质: DsiRNA			8	223	-

[0429] <sup>1</sup>DODMA和L-30的组合

[0430] 其他实施方案

[0431] 虽然已经结合其具体实施方案描述了本发明,但要理解,其能够做出进一步调整,并且该适用预期涵盖总体遵循本发明原理并且包括落入本发明所属领域已知或惯例内的此类与本公开内容的偏离的本发明的任何变化、用途或适应,并且可适用于前文提出的基本特征。

[0432] 所有出版物、专利和专利申请通过引用整体并入本文,程度如同每个出版物、专利或专利申请明确且单独地被指明通过引用整体并入。

<110> 迪克纳制药公司 (DICERNA PHARMACEUTICALS, INC.)

<120> 胺阳离子脂质及其用途

<130> SCT141974-60

<140> PCT/US2012/060875

<141> 2012-10-18

<150> US 61/548,598

<151> 2011-10-18

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

[0001]

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 1

gccagacuuu guuggauuug aaatt

25

<210> 2

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<220>

<221> misc\_feature

<222> (11).. (11)

<223> n 是 2'-O-甲基-C

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (13).. (13)  
 <223> n 是 2'-O-甲基-A

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (15).. (15)  
 <223> n 是 2'-O-甲基-C

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (17).. (17)  
 <223> n 是 2'-O-甲基-A

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (19).. (19)  
 <223> n 是 2'-O-甲基-G

[0002] <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (21).. (21)  
 <223> n 是 2'-O-甲基-C

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (23).. (23)  
 <223> n 是 2'-O-甲基-G

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (25).. (25)  
 <223> n 是 2'-O-甲基-C

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (26).. (27)  
 <223> n 是 2'-O-甲基-U

<400> 2  
 aaiuucaaaui ncnanananu nungnnn

27



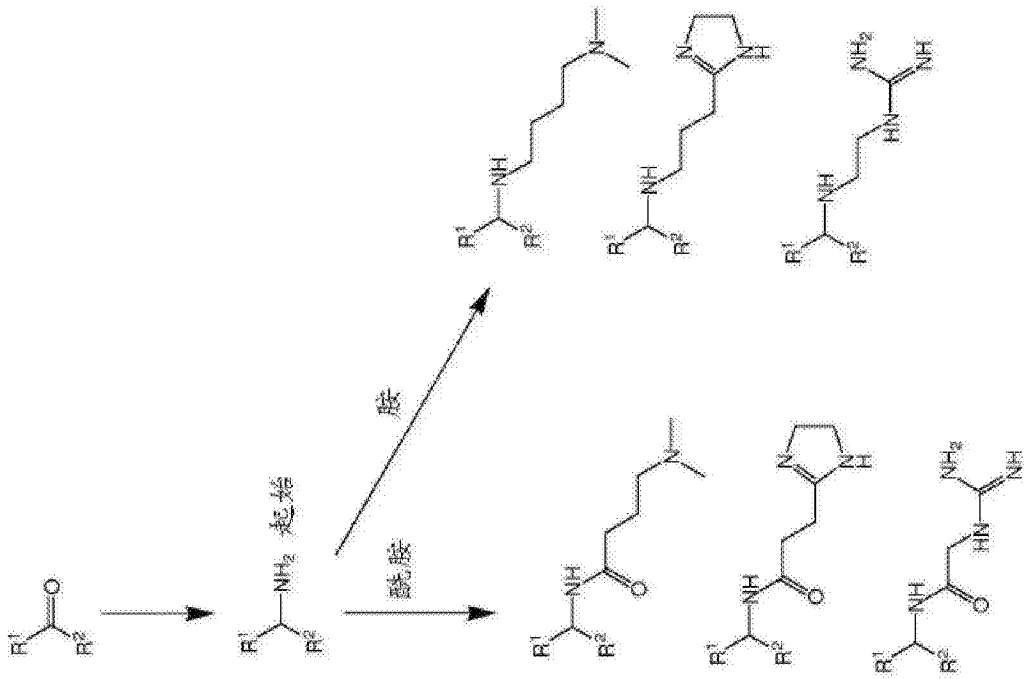


图1

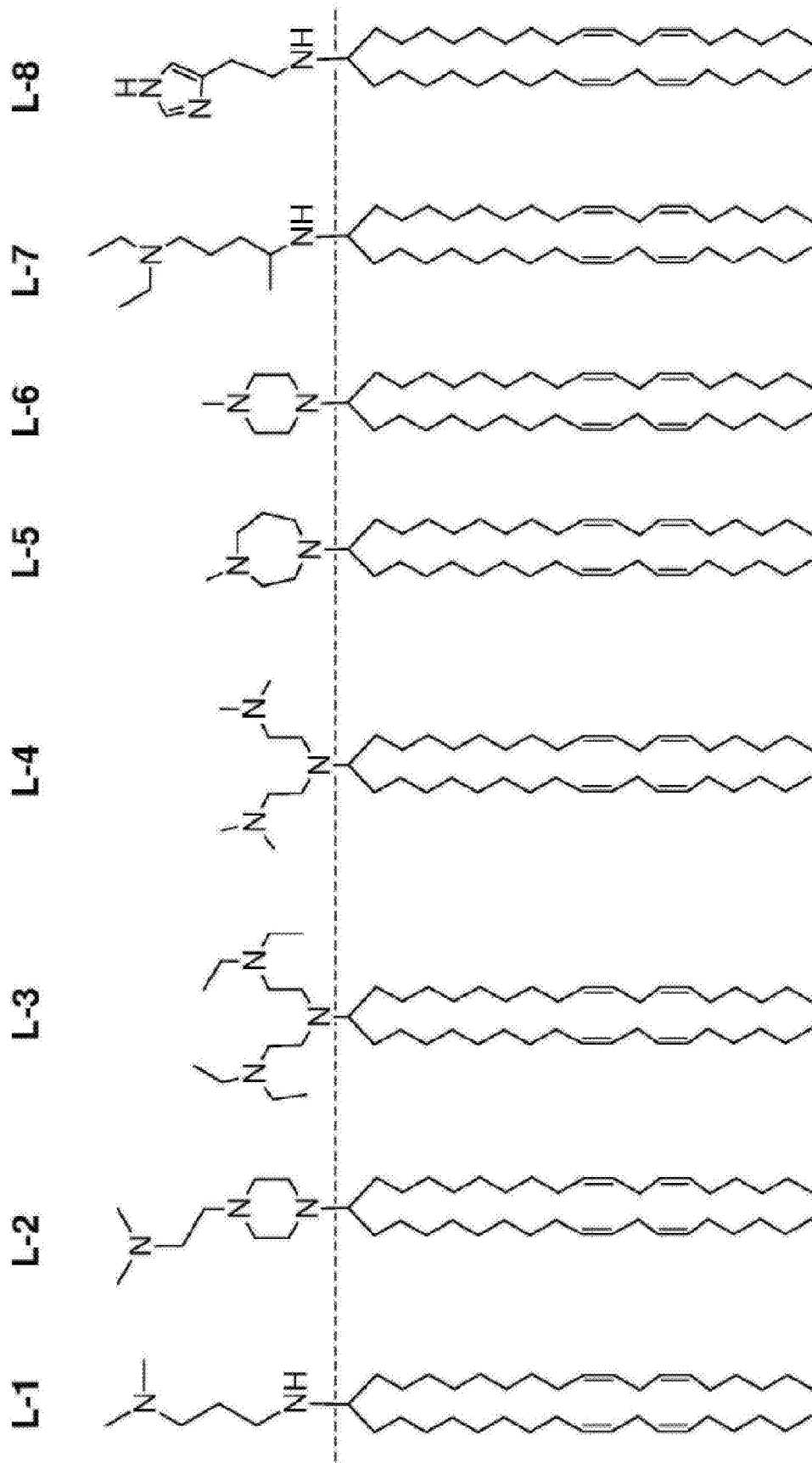


图2A

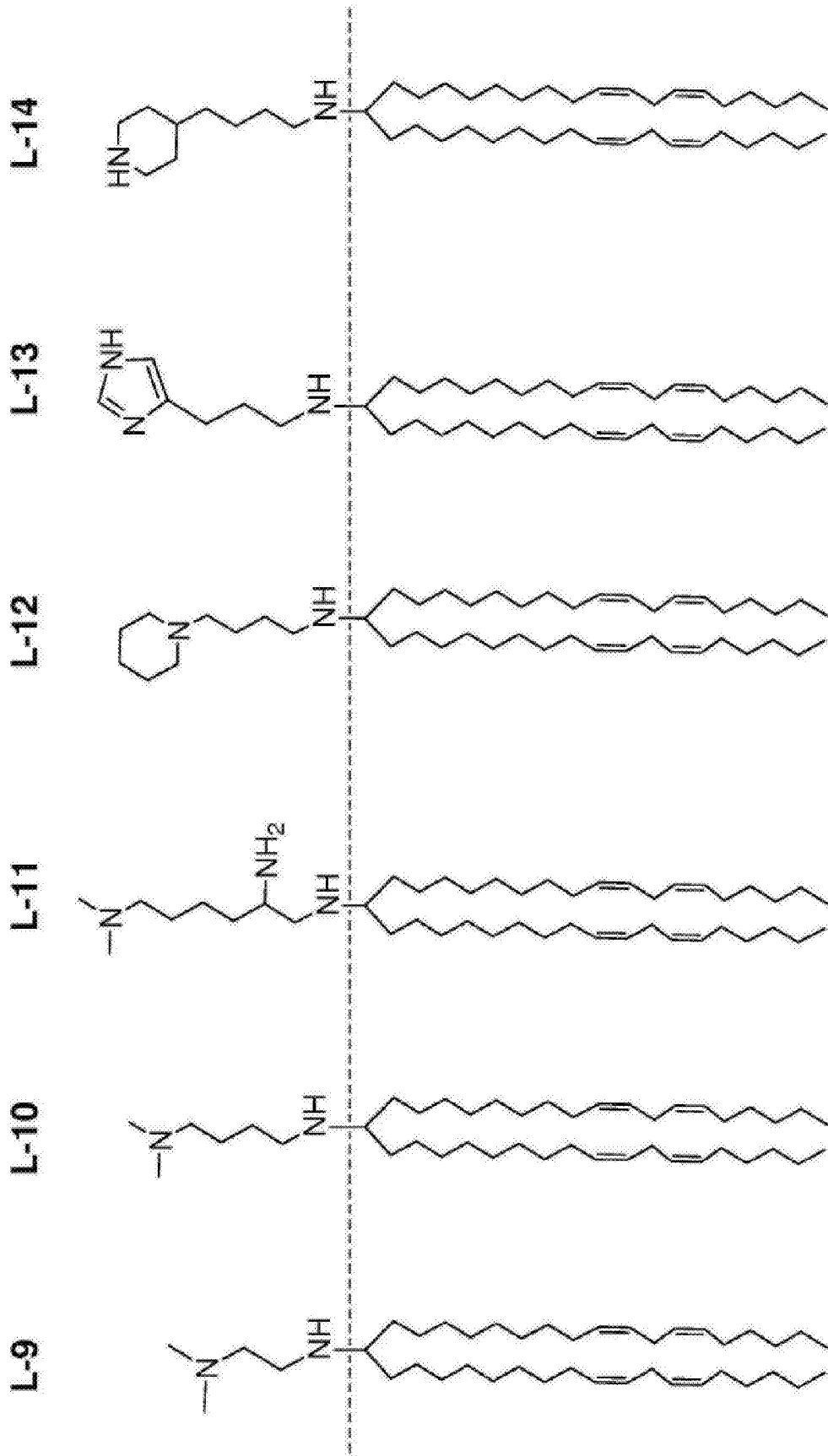


图2B

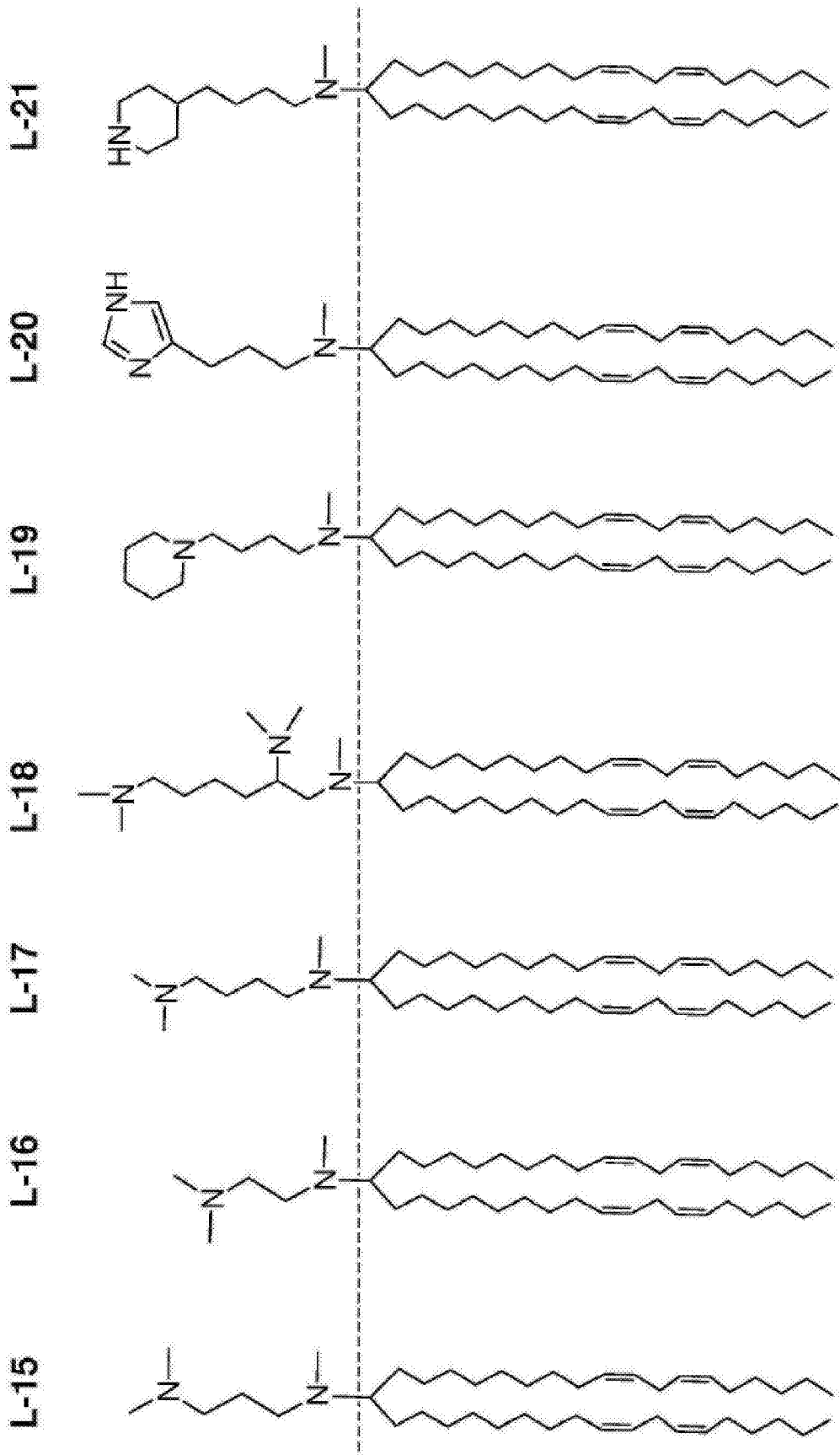


图3

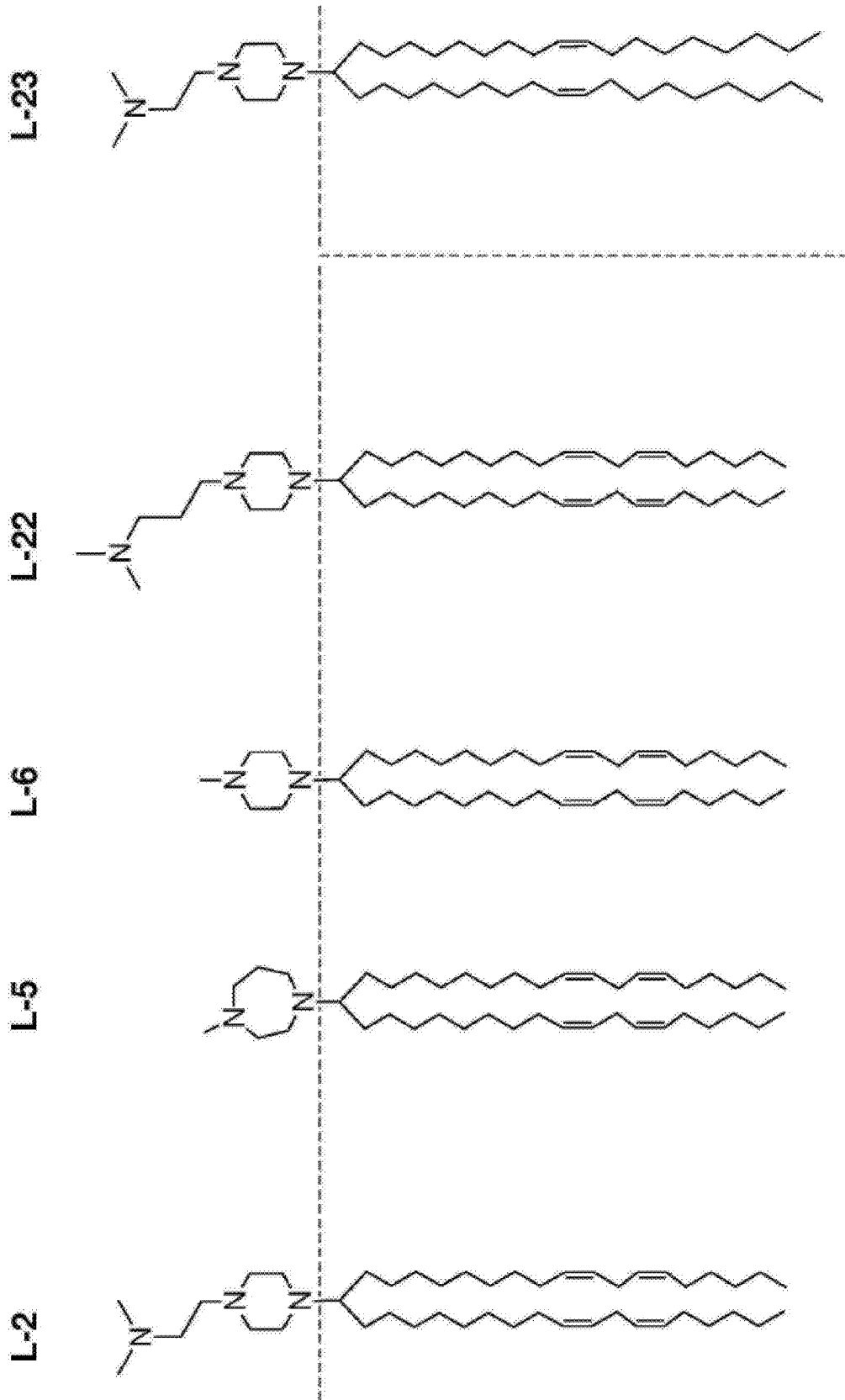


图4

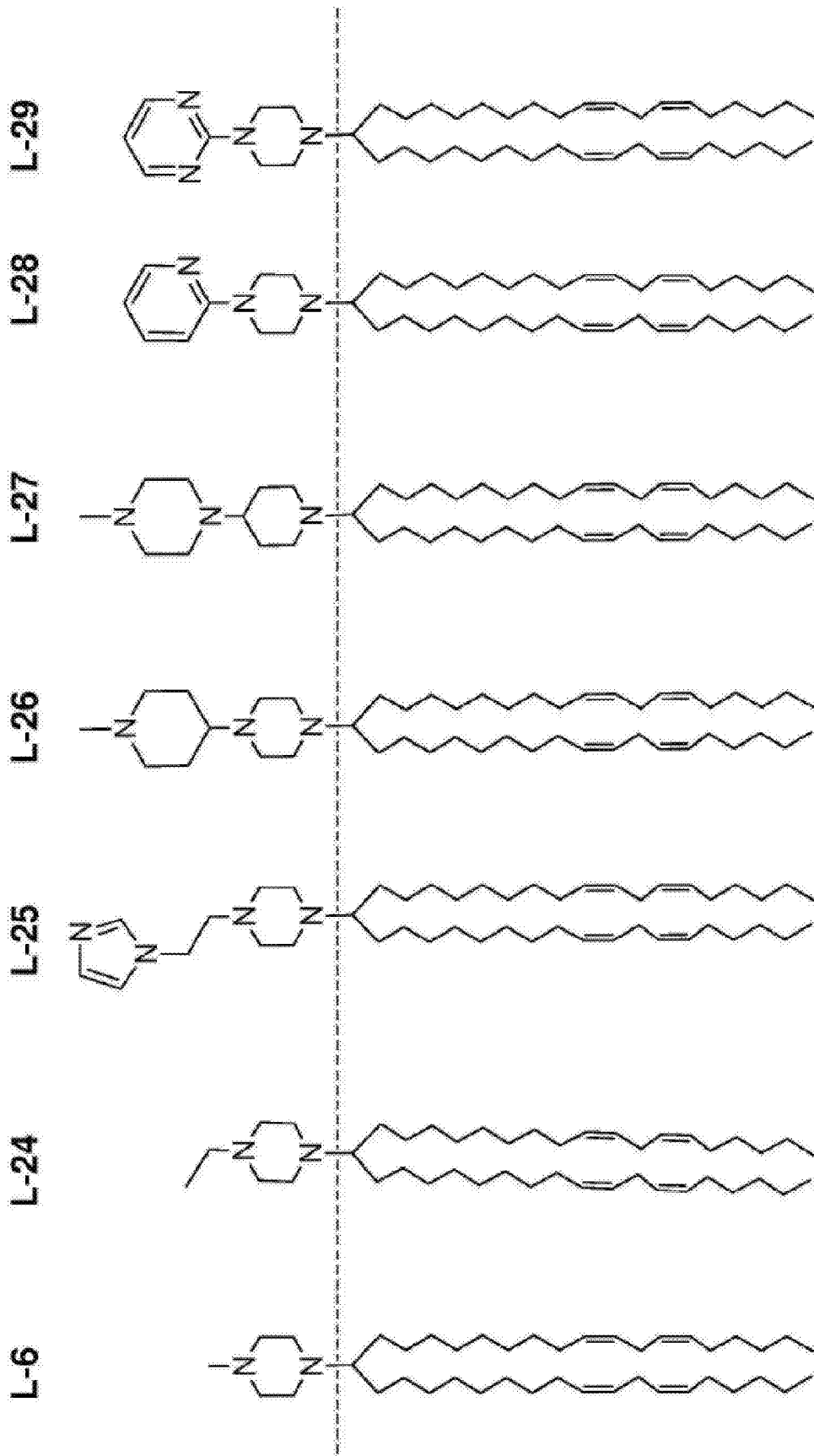


图5

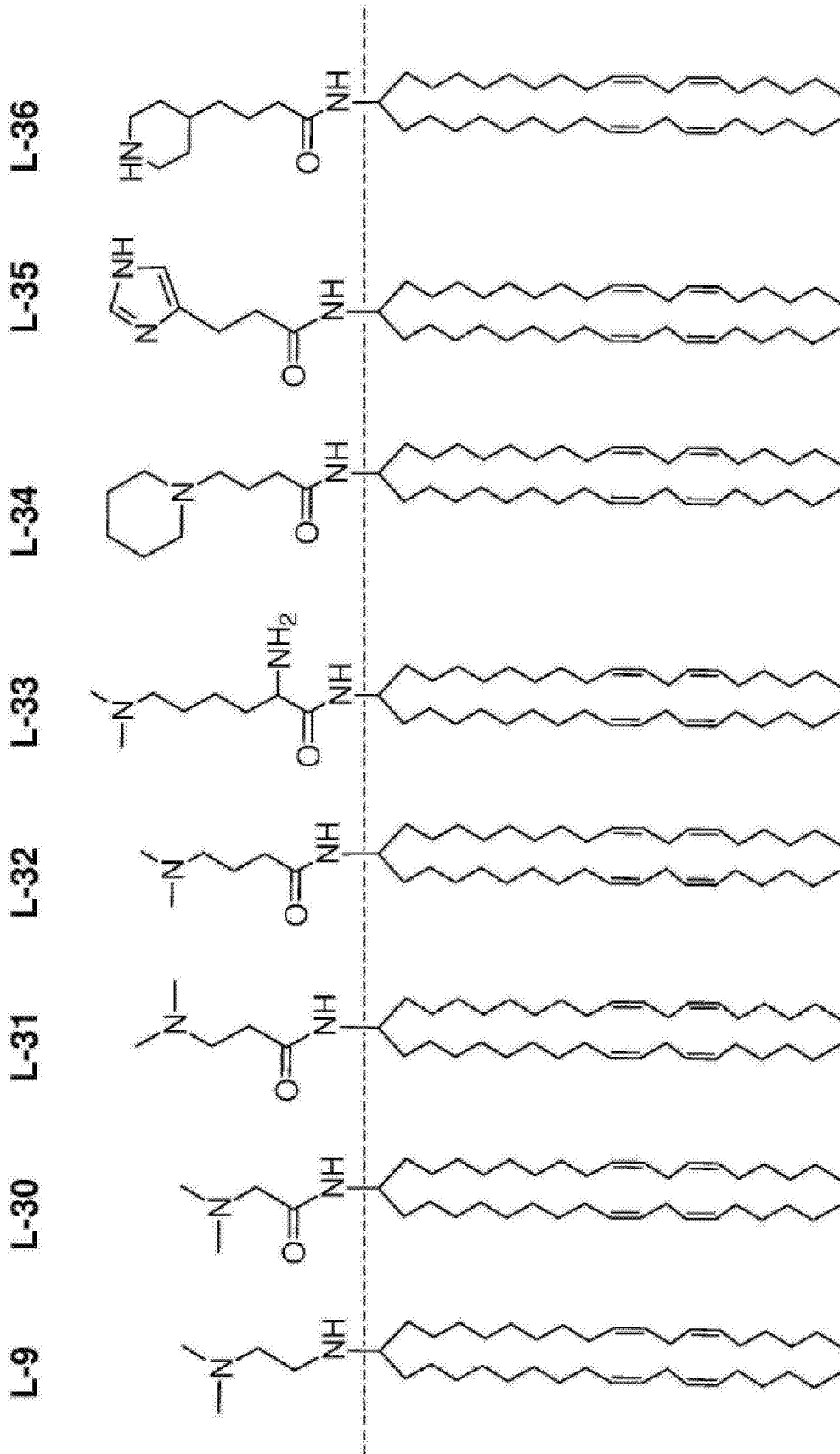


图6

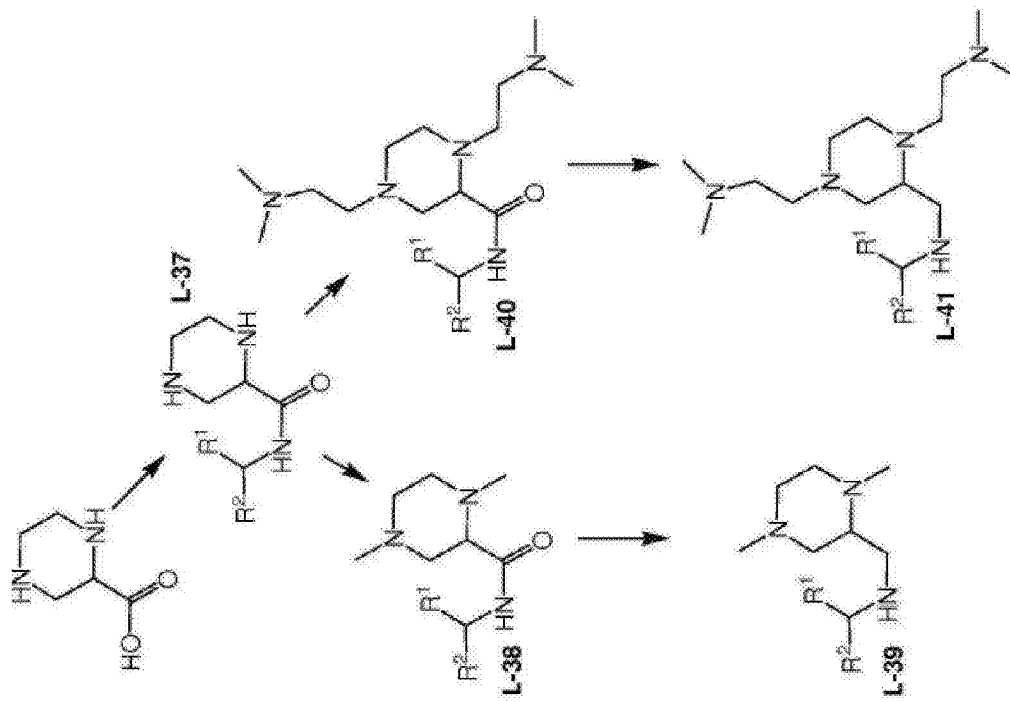


图7



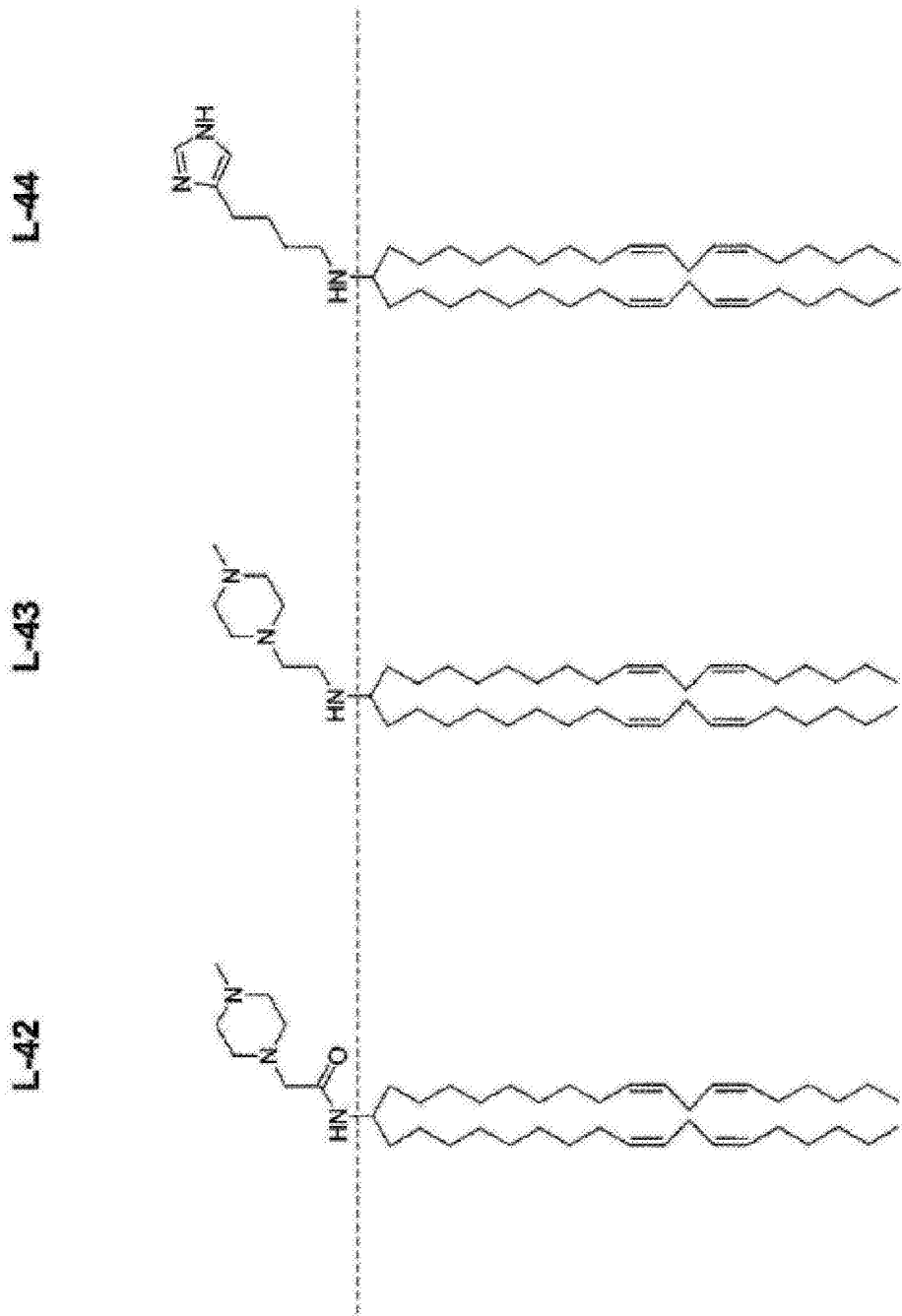


图8

L-47



L-46



L-45



L-6



图9

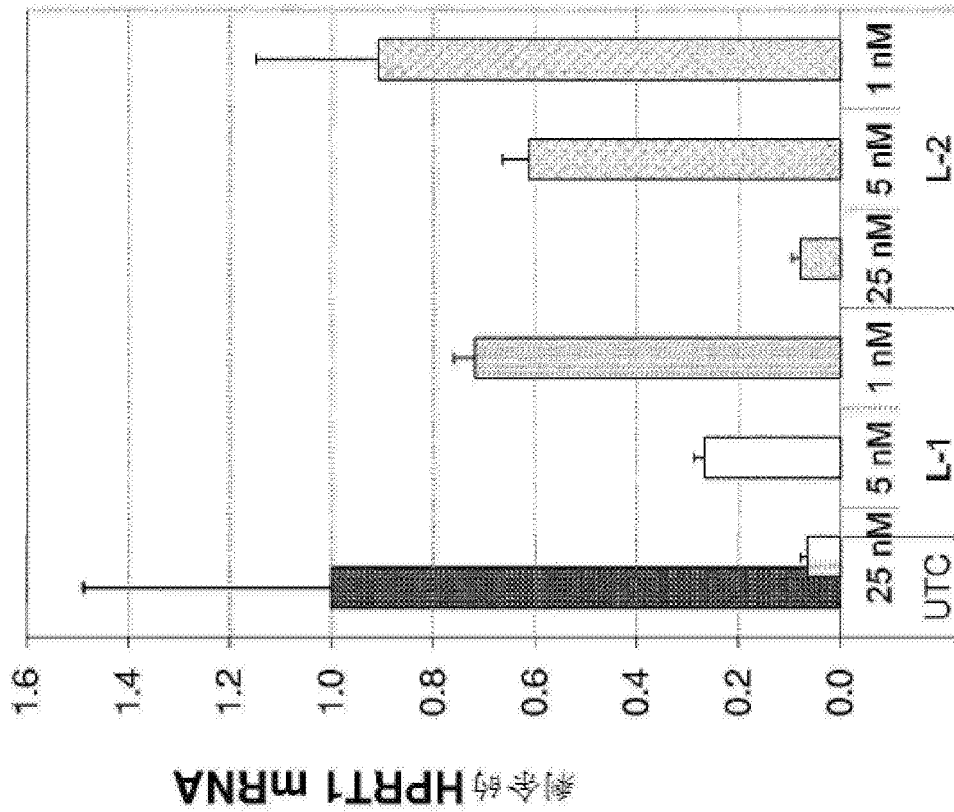


图10

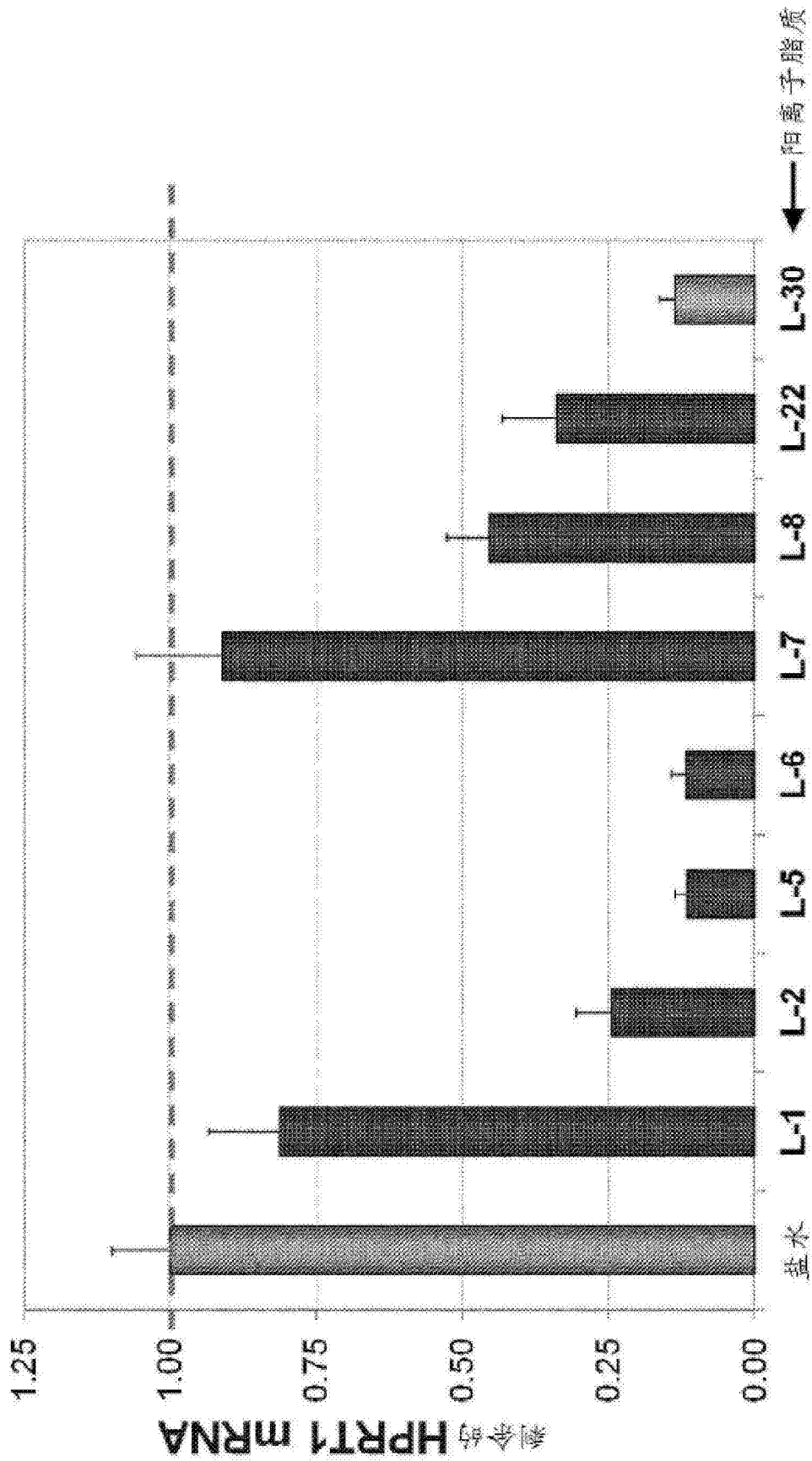


图11

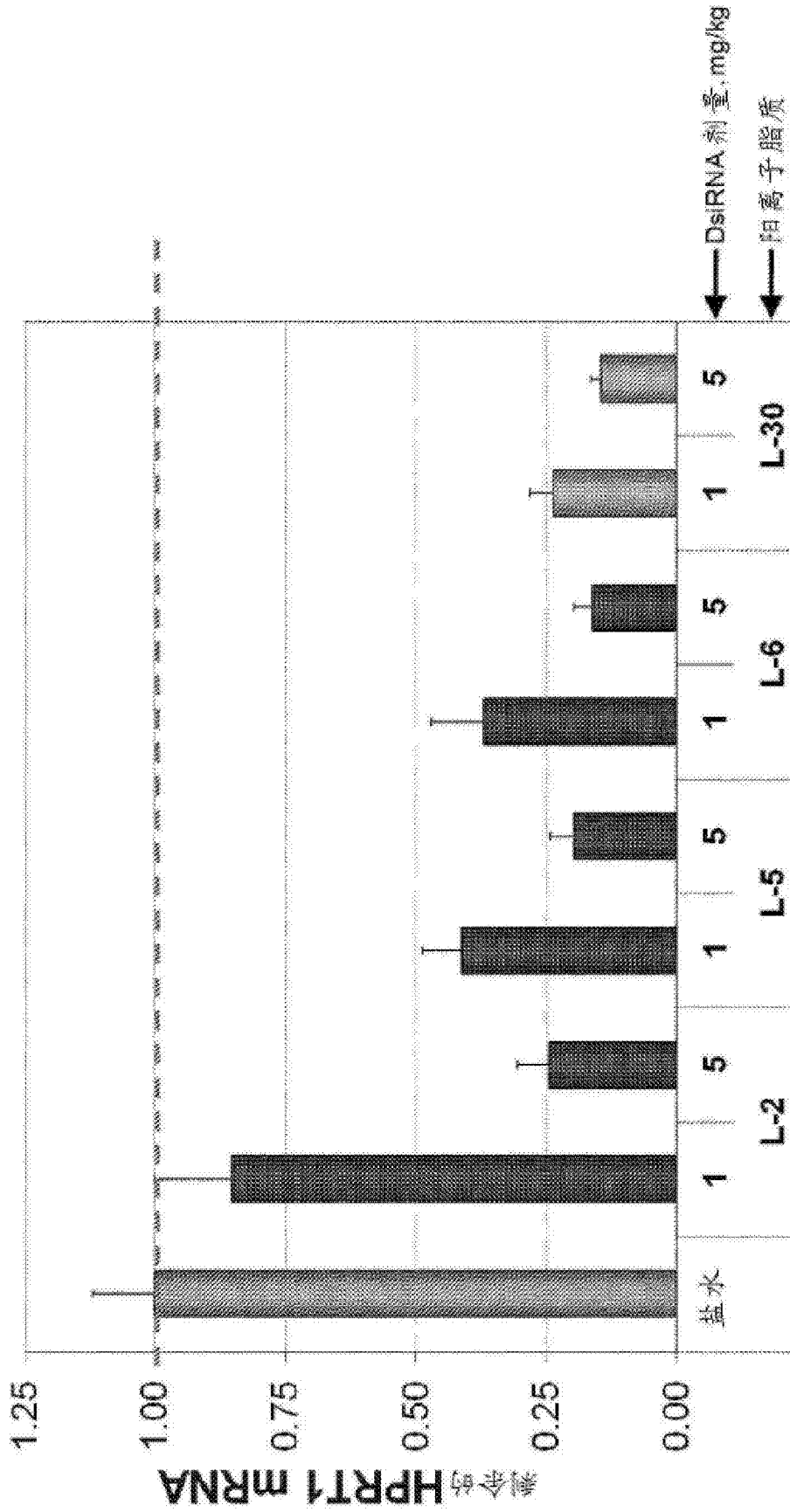


图12

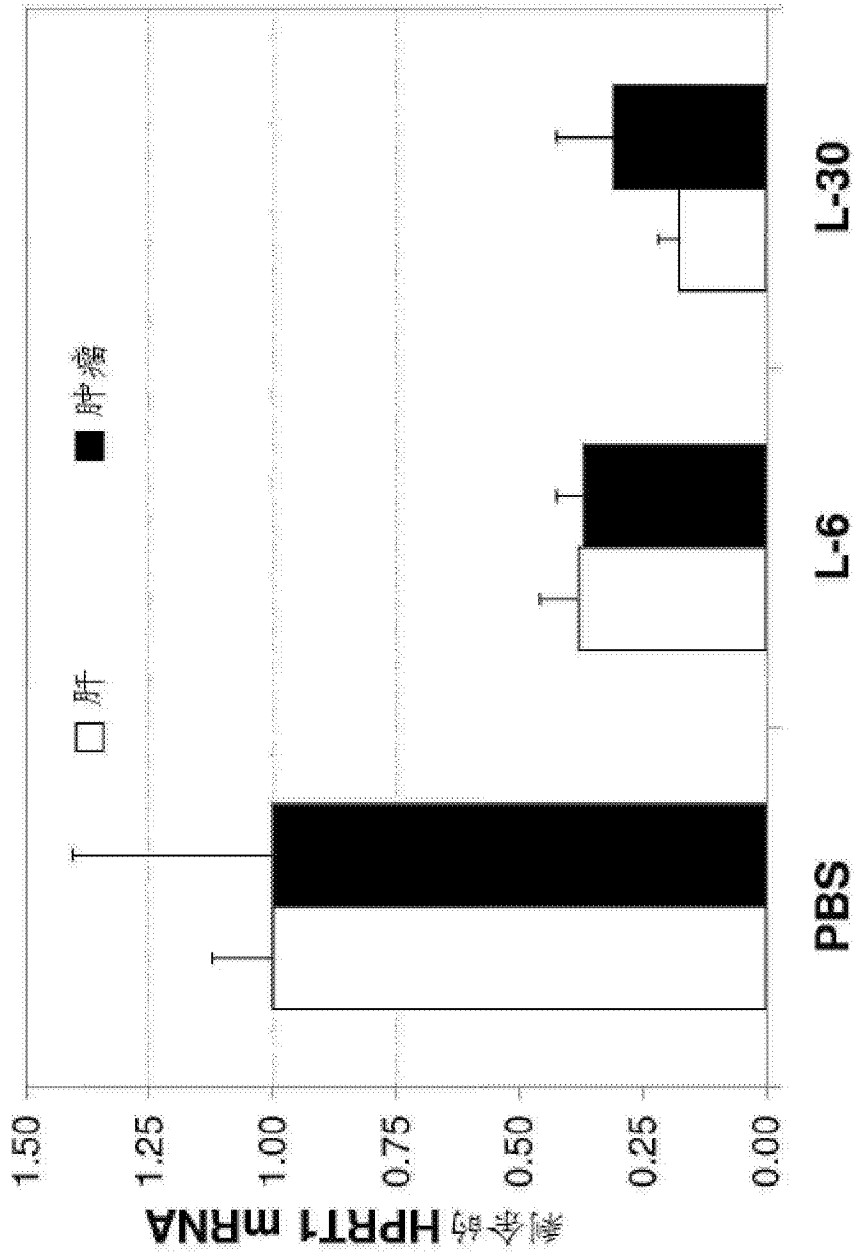


图13

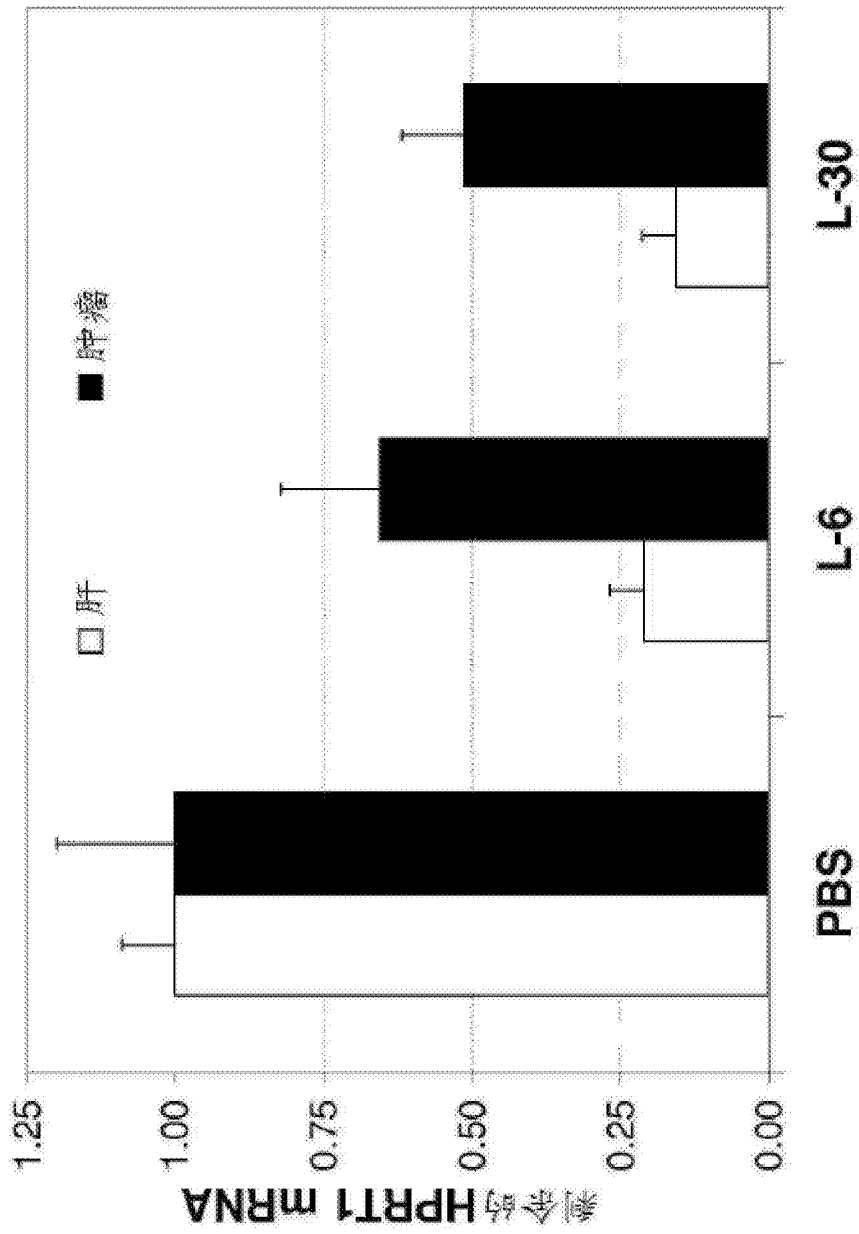


图14

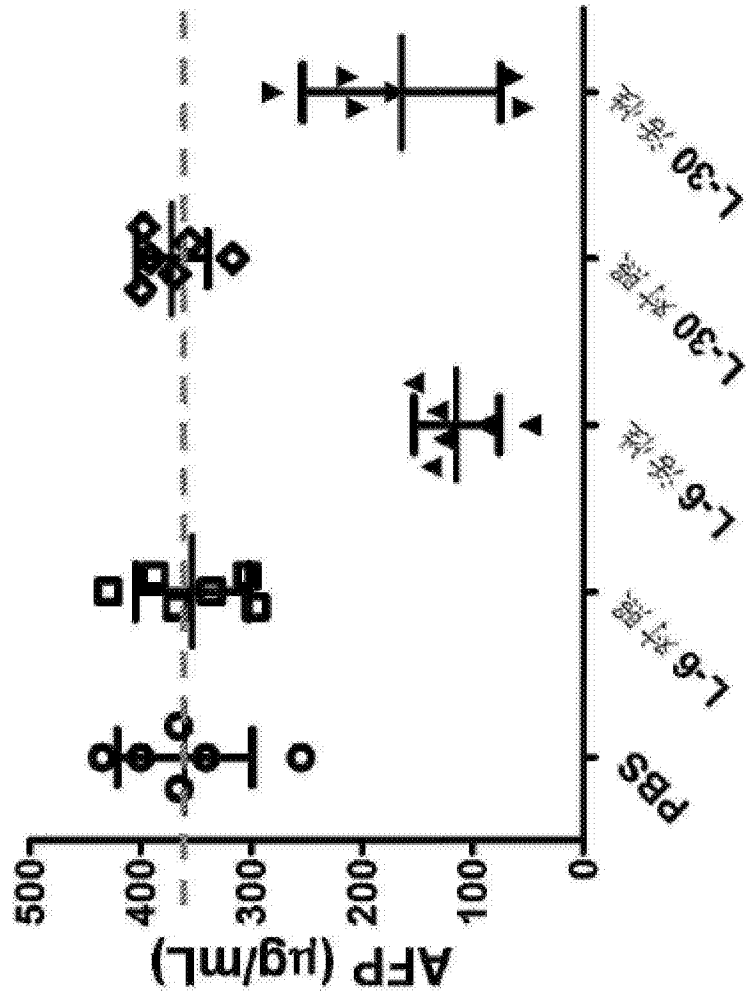


图15



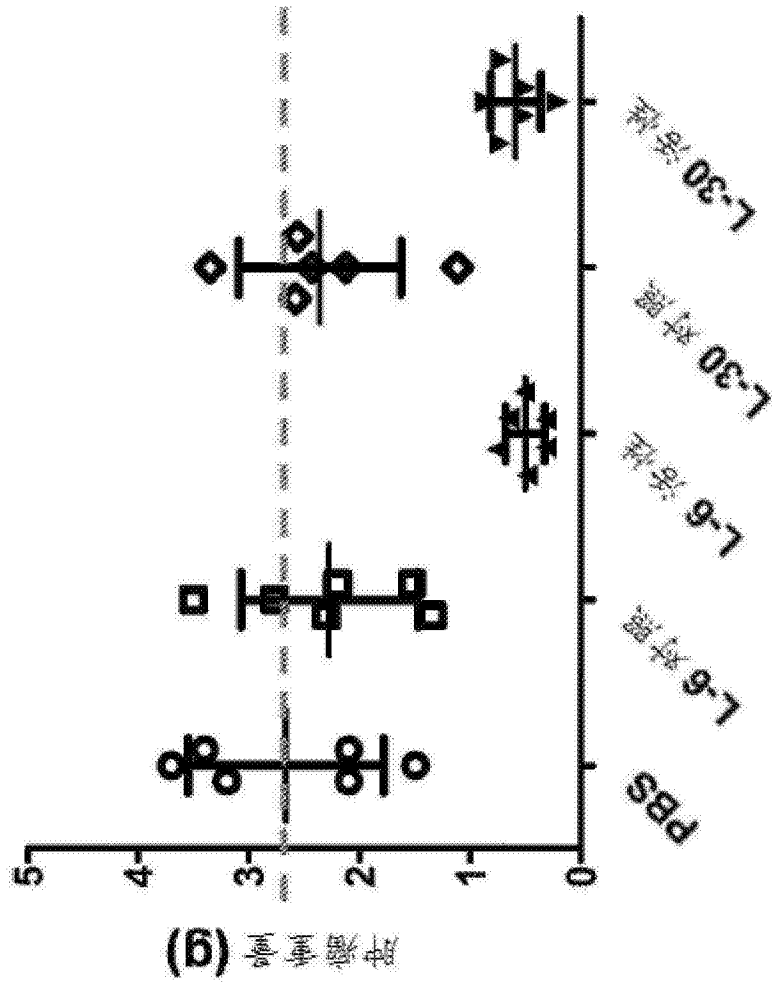


图16

**L-48**

**L-49**

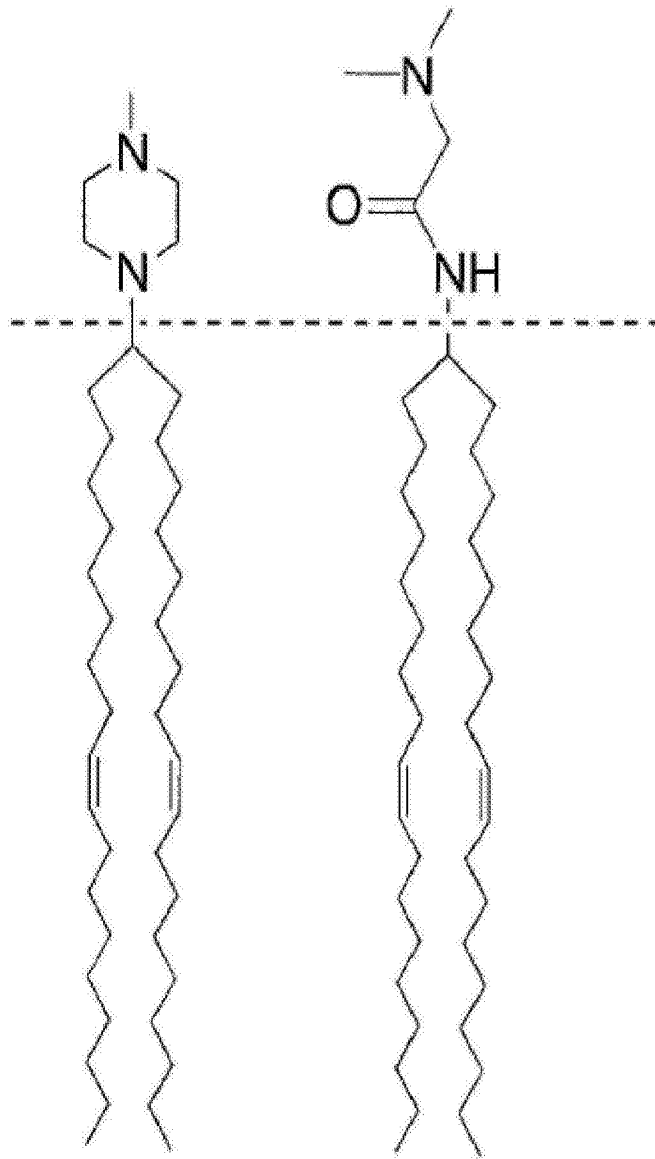


图17

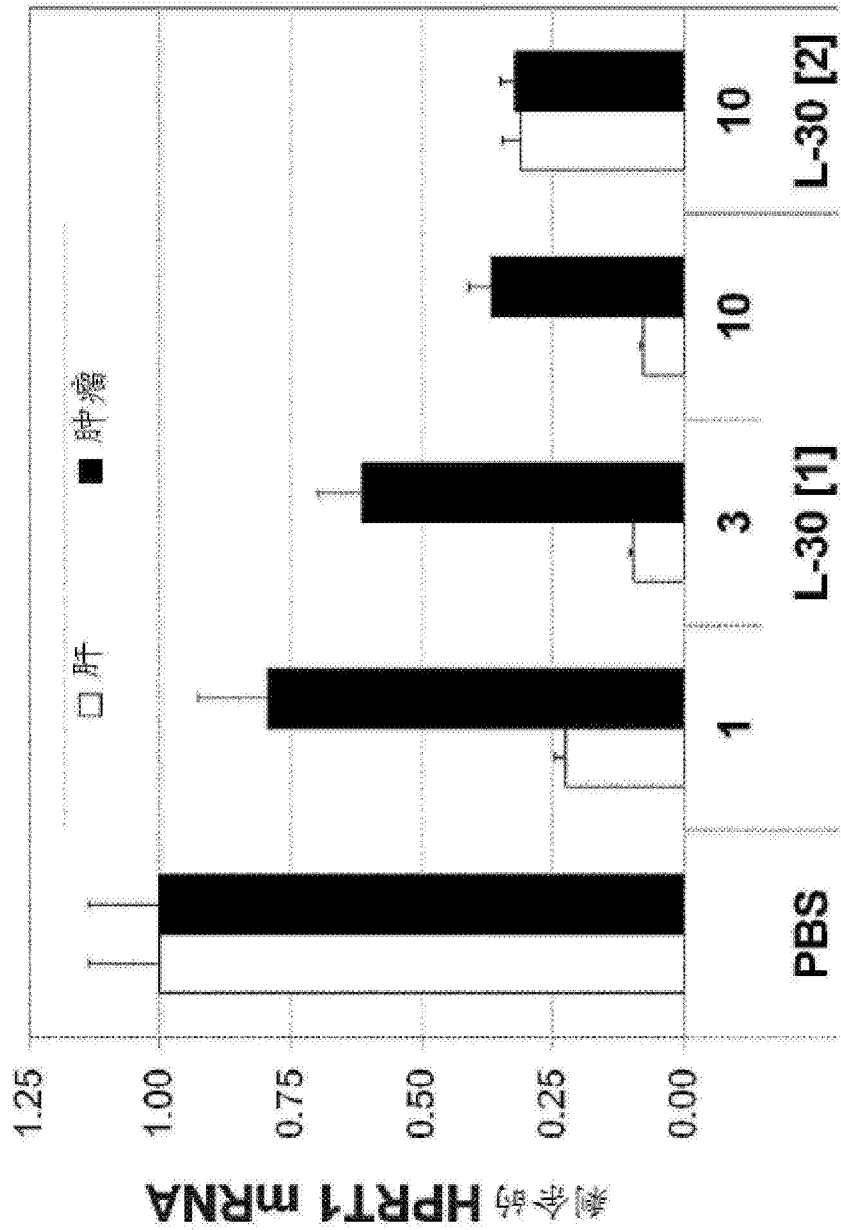


图18

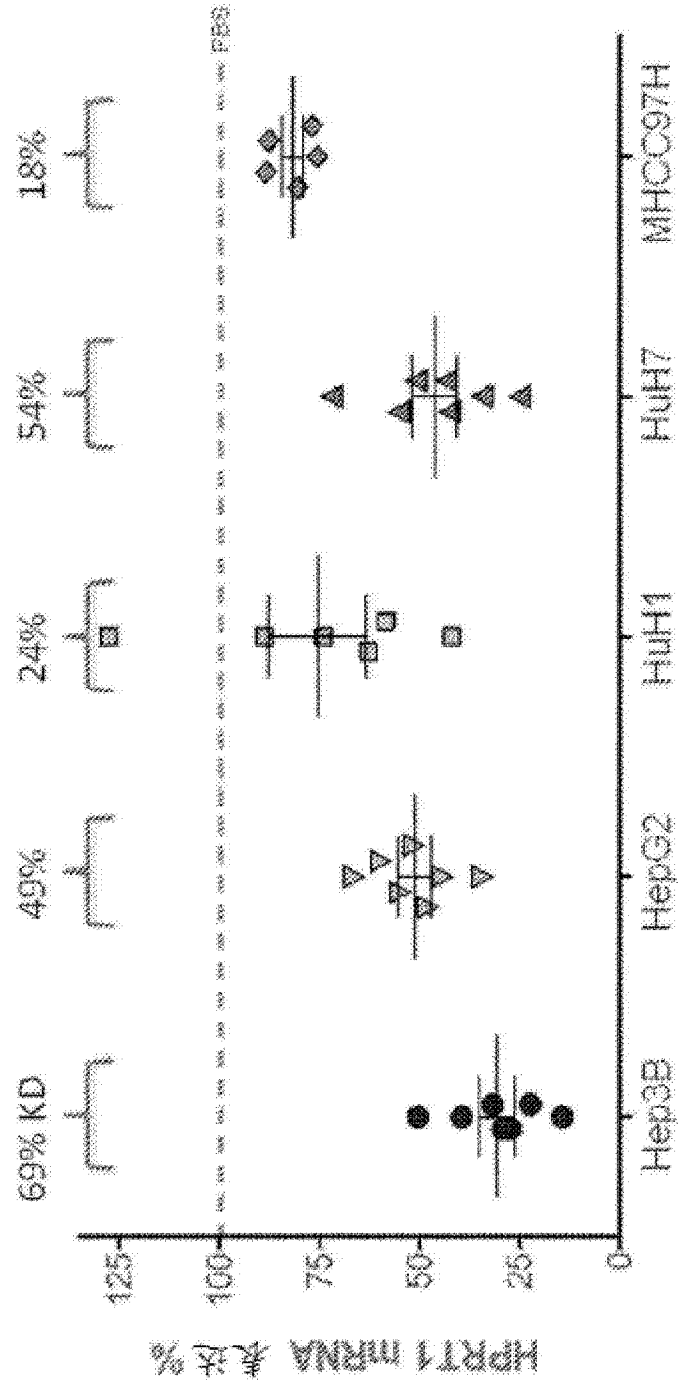


图19

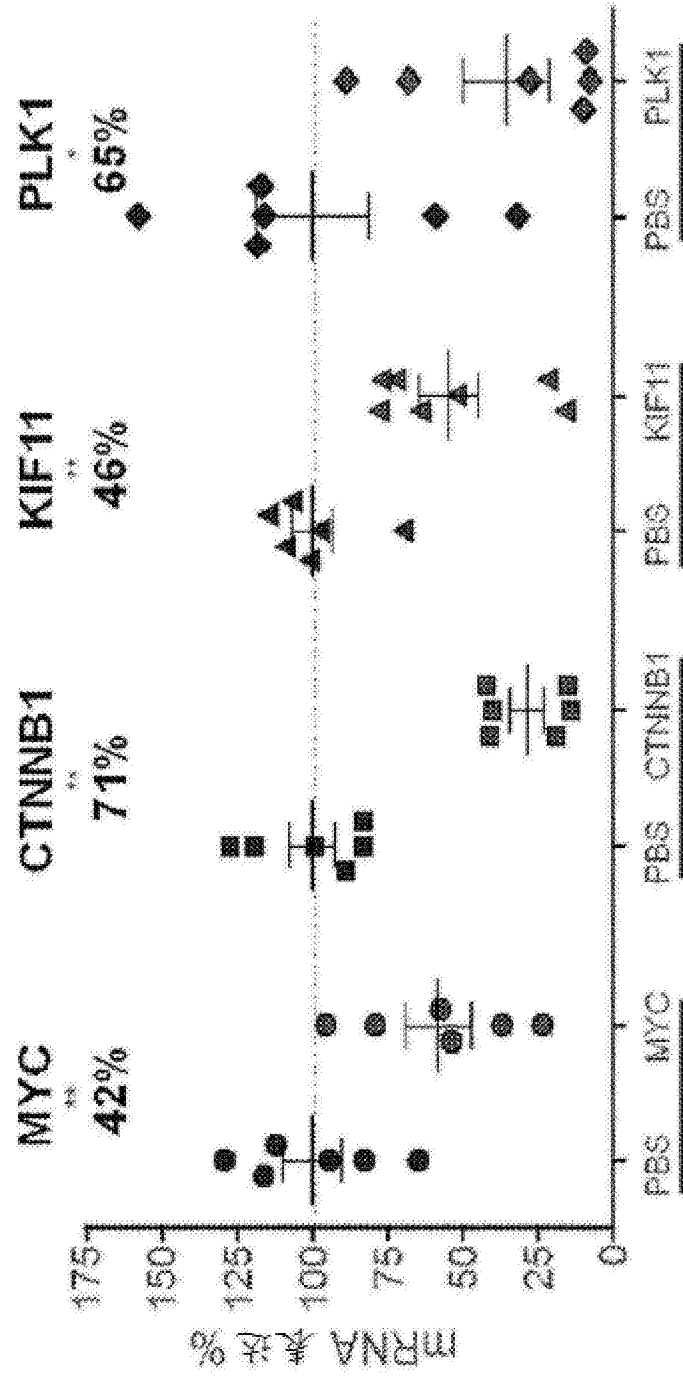


图20

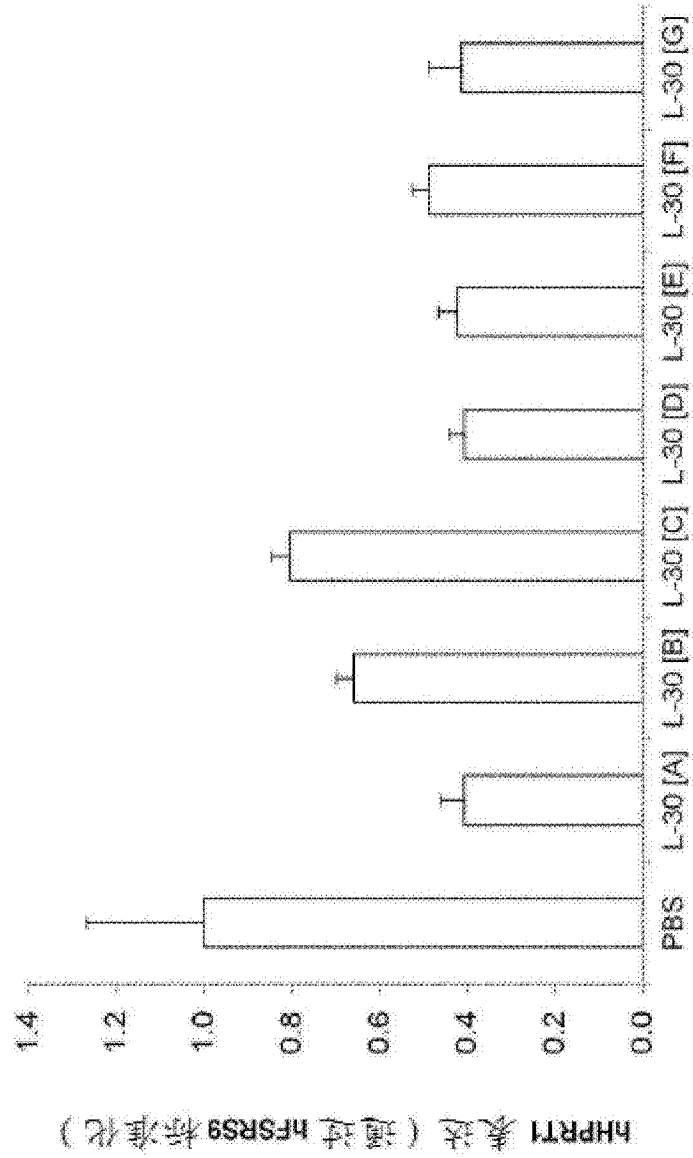


图21

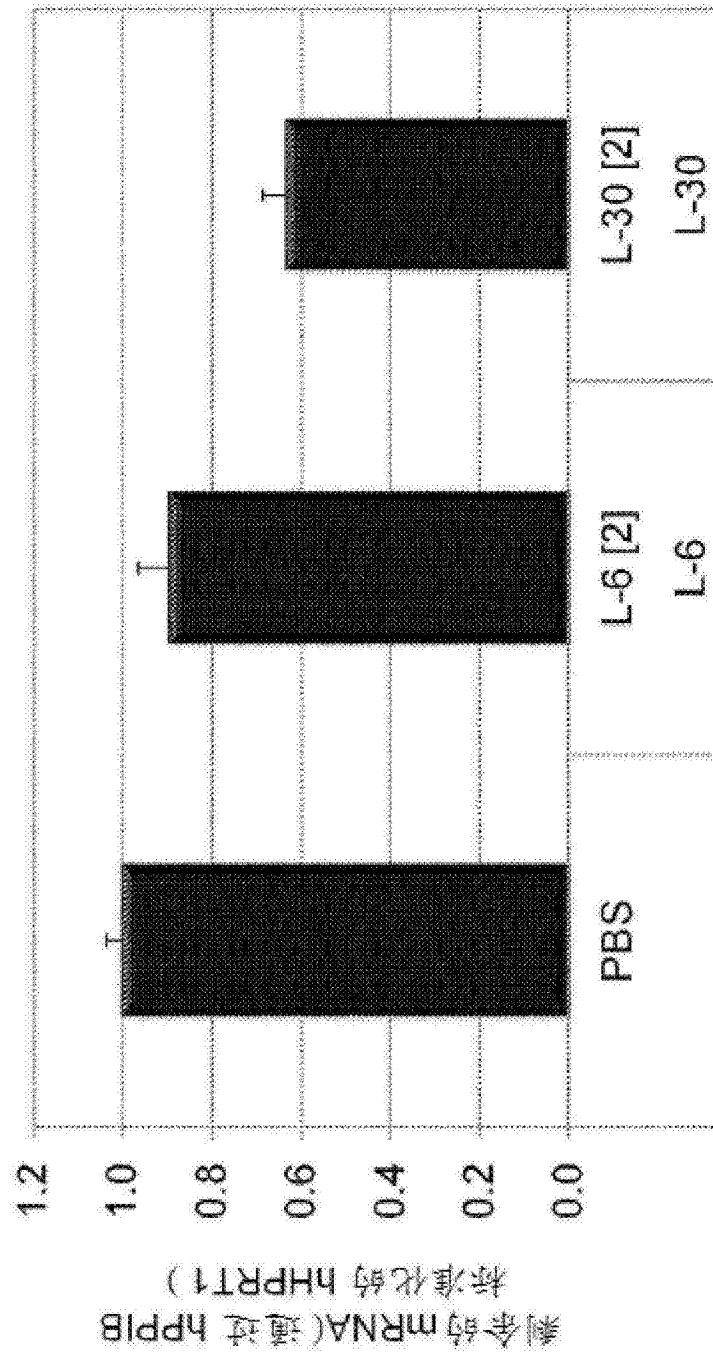


图22

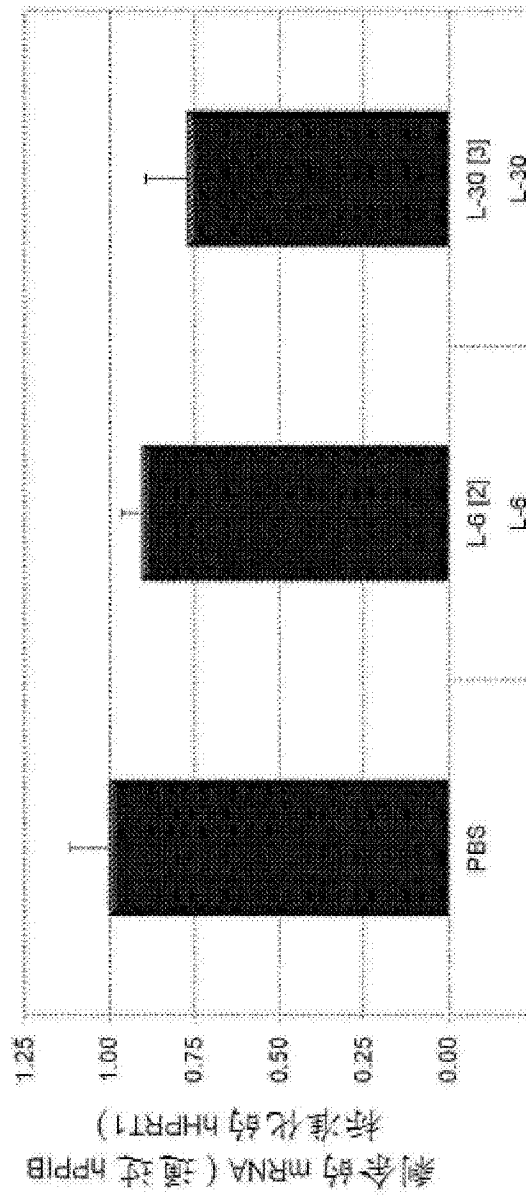


图23



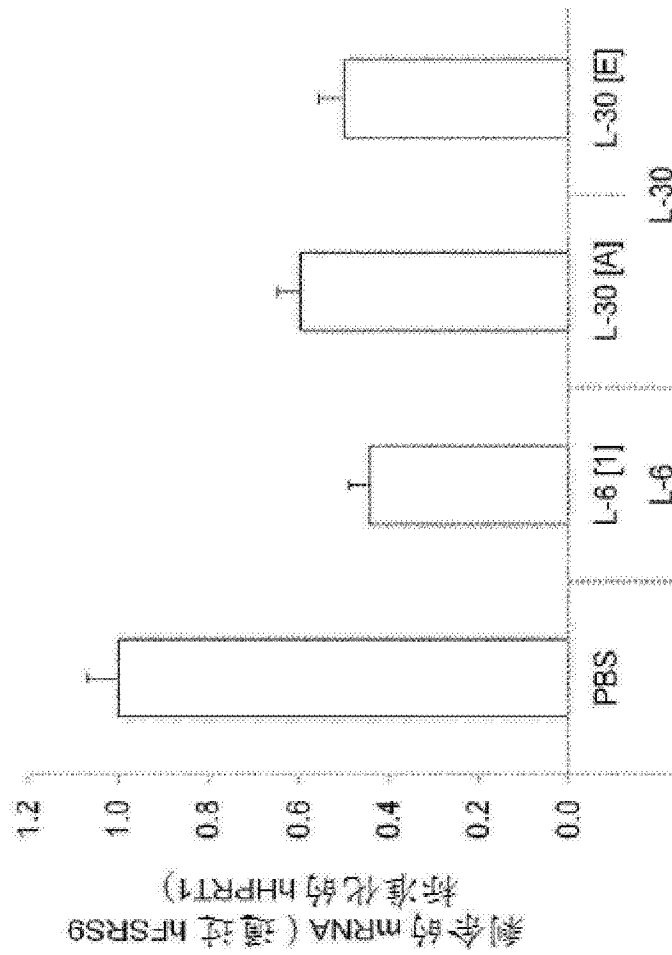


图24