



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114286671 A

(43) 申请公布日 2022. 04. 05

(21) 申请号 202080056429.6

(74) 专利代理机构 隆天知识产权代理有限公司
72003

(22) 申请日 2020.06.12

代理人 吴小瑛

(30) 优先权数据

62/861,852 2019.06.14 US

62/948,095 2019.12.13 US

(51) Int.Cl.

A61K 9/127 (2006.01)

A61K 47/28 (2006.01)

A61K 47/24 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.02.07

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2020/037579 2020.06.12

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/252375 EN 2020.12.17

(71) 申请人 DNALite治疗学公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 马布西吉·艾哈迈德 蒂莫西·戴

伊斯梅尔·哈菲兹 J·梅利特

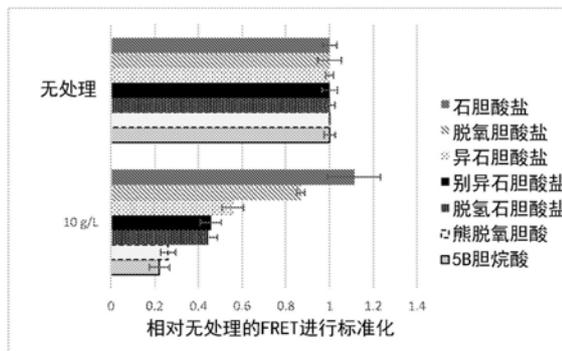
权利要求书7页 说明书53页 附图13页

(54) 发明名称

用于生物递送媒介物的组合物和方法

(57) 摘要

本申请提供了用于施用治疗剂的包含脂质纳米颗粒的递送媒介物,以及制备和使用所述递送媒介物用于将治疗剂递送至上皮细胞,例如在含有粘液的环境中的上皮细胞的方法。提供的纳米颗粒包含可离子化脂质和/或阳离子脂质,例如MVL5、MC2、CL1H6或DODMA、磷脂和胆汁盐。还提供了使用所述递送媒介物将治疗剂,尤其是核酸治疗剂递送至胃肠道中的上皮细胞的方法。



1. 一种递送媒介物,其包含(i)负载物和(ii)脂质纳米颗粒,其中所述脂质纳米颗粒包含至少一种饱和脂质和胆汁盐,并且其中所述至少一种饱和脂质是饱和阳离子脂质或所述脂质纳米颗粒进一步包含至少一种阳离子脂质。
2. 如权利要求1所述的递送媒介物,其中所述脂质纳米颗粒进一步包含至少一种不饱和阳离子脂质或不饱和非阳离子脂质,并且任选地,其中所述脂质纳米颗粒中所述至少一种不饱和阳离子脂质或不饱和非阳离子脂质的浓度小于所述脂质纳米颗粒的总脂质浓度的50摩尔%。
3. 如权利要求1或权利要求2所述的递送媒介物,其中所述饱和阳离子脂质的相变温度为至少约37°C。
4. 如权利要求1或权利要求2所述的递送媒介物,其中所述饱和脂质包含相变温度为至少约37°C的饱和非阳离子脂质。
5. 如权利要求1-4中任一项所述的递送媒介物,其中所述脂质纳米颗粒进一步包含以下的至少一种:非阳离子脂质、多价阳离子脂质、永久带电的阳离子脂质或其任意组合。
6. 如权利要求4所述的递送媒介物,其中所述多价阳离子脂质包含以下的至少一种:MVL5、TMVLBG2、TMVLG3、TMVLBG1、GL67或其任意组合。
7. 如权利要求6所述的递送媒介物,其中所述多价阳离子脂质包含MVL5。
8. 如权利要求6或7所述的递送媒介物,其中所述多价阳离子脂质是总脂质浓度的约25摩尔%或更少。
9. 如权利要求5所述的递送媒介物,其中所述永久带电的阳离子脂质包含1,2-二油酰基-3-三甲基铵基-丙烷(DOTAP)、3β-[N-(N',N'-二甲基氨基乙烷)-氨基甲酰基]胆固醇盐酸盐(DC-Cholesterol·HCl)或其任意组合。
10. 如权利要求1-9中任一项所述的递送媒介物,其中所述饱和阳离子脂质包含以下的至少一种:1,2-硬脂酰基-3-三甲基铵基-丙烷、1,2-二棕榈酰基-3-三甲基铵基-丙烷、1,2-二硬脂酰基-3-二甲基铵基-丙烷、二甲基双十八烷基铵、1,2-二烷基-sn-甘油-3-乙基磷酸胆碱、1,2-二烷基-3-二甲基铵基-丙烷、1,2-二烷基-3-三甲基铵基-丙烷、1,2-二-O-烷基-3-三甲基铵基丙烷、1,2-二烷基氧基-3-二甲基氨基丙烷、N,N-二烷基-N,N-二甲基铵、N-(4-羧基苄基)-N,N-二甲基-2,3-双(烷基氧基)丙烷-1-铵、1,2-二烷基-sn-甘油-3-[(N-(5-氨基-1-羧基戊基)亚氨基二乙酸)琥珀酰基]、N1-[2-((1S)-1-[(3-氨基丙基)氨基]-4-[二(3-氨基-丙基)氨基]丁基酰胺基)乙基]-3,4-二[烷基]-苯甲酰胺、1,2-二油酰基-3-三甲基铵基-丙烷(DSTAP)、1,2-二棕榈酰基-3-三甲基铵基-丙烷(DPTAP)、1,2-二硬脂酰基-3-二甲基铵基-丙烷(DSDAP)或其任意组合。
11. 如权利要求4-9所述的递送媒介物,其中所述饱和非阳离子脂质包含以下的至少一种:1,2-二烷基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-二烷基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二烷基-sn-甘油-3-磷酸甘油、1,2-二烷基-sn-甘油-3-磷脂酰丝氨酸、1,2-二烷基-sn-甘油-3-磷酸酯、单甘油烷基酯、甘油羟基烷基酯、山梨糖醇酐单烷基酯、1,2-二烷基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-甲基、1,2-二烷基-sn-甘油-3-磷酸甲醇、1,2-二烷基-sn-甘油-3-磷酸乙醇、1,2-二烷基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N,N-二甲基、1,2-二烷基-sn-甘油-3-磷酸丙醇、1,2-二烷基-sn-甘油-3-磷酸丁醇或其任意组合。

12. 如权利要求2-11中任一项所述的递送媒介物,其中所述不饱和阳离子脂质包含以下的至少一种:二甲基双十八烷基铵、1,2-二烷基-sn-甘油-3-乙基磷酸胆碱、1,2-二烷基-3-二甲基铵基-丙烷、1,2-二烷基-3-三甲基铵基-丙烷、1,2-二-0-烷基-3-三甲基铵基丙烷、1,2-二烷基氧基-3-二甲基氨基丙烷、N,N-二烷基-N,N-二甲基铵、N-(4-羧基苄基)-N,N-二甲基-2,3-双(烷基氧基)丙烷-1-铵、1,2-二烷基-sn-甘油-3-[(N-(5-氨基-1-羧基戊基)亚氨基二乙酸)琥珀酰基]、N1-[2-((1S)-1-[(3-氨基丙基)氨基]-4-[二(3-氨基-丙基)氨基]丁基酰胺基)乙基]-3,4-二[烷基]-苯甲酰胺、1,2-二烷基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷、4-(2,2-二辛基-9,12-二烯基-[1,3]二氧戊环-4-基甲基)-二甲胺、0-烷基乙基磷酸胆碱、MC3、MC2、MC4、3β-[N-(N',N'-二甲基氨基乙烷)-氨基甲酰基]胆固醇、N4-胆固醇-精胺、7-(4-(二甲基氨基)丁基)-7-羟基十三烷-1,13-二基二油酸酯(CL1H6),或其任意组合。

13. 如权利要求12所述的递送媒介物,其中所述不饱和阳离子脂质包含至少MC2或CL1H6。

14. 如权利要求2-13中任一项所述的递送媒介物,其中所述不饱和非阳离子脂质包含以下的至少一种:1,2-二烷基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-二烷基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二烷基-sn-甘油-3-磷酸甘油、1,2-二烷基-sn-甘油-3-磷脂酰丝氨酸、1,2-二烷基-sn-甘油-3-磷酸酯、单甘油烷基酯、甘油羟基烷基酯、山梨糖醇酐单烷基酯、1,2-二烷基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-甲基、1,2-二烷基-sn-甘油-3-磷酸甲醇、1,2-二烷基-sn-甘油-3-磷酸乙醇、1,2-二烷基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N,N-二甲基、1,2-二烷基-sn-甘油-3-磷酸丙醇、1,2-二烷基-sn-甘油-3-磷酸丁醇或其任意组合。

15. 如权利要求1所述的递送媒介物,其中所述至少一种饱和脂质或阳离子脂质是多价阳离子脂质。

16. 如权利要求15所述的递送媒介物,其进一步包含非阳离子脂质。

17. 如权利要求16所述的递送媒介物,其中所述多价阳离子脂质、所述非阳离子脂质或所述多价阳离子脂质和所述非阳离子脂质的相变温度为至少约37°C。

18. 如权利要求17所述的递送媒介物,其中所述多价阳离子脂质包含以下的至少一种:MVL5、TMVLBG2、TMVLG3、TMVLBG1和GL67,或其任意组合。

19. 如权利要求17或权利要求18所述的递送媒介物,其中所述非阳离子脂质包括饱和和非阳离子脂质。

20. 如权利要求19所述的递送媒介物,其中所述饱和非阳离子脂质包含以下的至少一种:1,2-二烷基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-二烷基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二烷基-sn-甘油-3-磷酸甘油、1,2-二烷基-sn-甘油-3-磷脂酰丝氨酸、1,2-二烷基-sn-甘油-3-磷酸酯、单甘油烷基酯、甘油羟基烷基酯、烷基酯山梨糖醇酐单烷基酯、1,2-二烷基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-甲基、1,2-二烷基-sn-甘油-3-磷酸甲醇、1,2-二烷基-sn-甘油-3-磷酸乙醇、1,2-二烷基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N,N-二甲基、1,2-二烷基-sn-甘油-3-磷酸丙醇、1,2-二烷基-sn-甘油-3-磷酸丁醇或其任意组合。

21. 如权利要求1-20中任一项所述的递送媒介物,其中与不含所述胆汁盐外其他相同的递送媒介物相比,所述递送媒介物在高胆汁盐环境中是稳定的。

22. 如权利要求21所述的递送媒介物,其中所述高胆汁盐环境包括胃肠道环境。

23. 如权利要求21或22所述的递送媒介物,其中与(i)不含所述胆汁盐外其他相同的递

送媒介物相比,所述递送媒介物在含有至少约5g/L胆汁盐的溶液中表现出增加的稳定性,其中所述稳定性是在福斯特共振能量转移(FRET)测定中,通过并入荧光脂质的所述脂质纳米颗粒的相对荧光强度来测量。

24.如权利要求23所述的递送媒介物,其中与(i)不包含所述胆汁盐外其他相同的递送媒介物相比,所述递送媒介物在含有至少约5g/L的约50%胆酸和约50%脱氧胆酸盐的混合物的溶液中表现出增加的稳定性,其中所述稳定性是在福斯特共振能量转移(FRET)测定中,通过并入所述脂质纳米颗粒中的荧光脂质的相对荧光强度来测量。

25.如权利要求1-24中任一项所述的递送媒介物,其包含以下的至少一种:N,N-二油烯基-N,N-二甲基氯化铵(DODAC);N-(2,3二油烯基氧基)丙基)-N,N,N三甲基氯化铵(DOTMA);N,N二硬脂酰基N,N-二甲基溴化铵(DDAB);N-(2,3二油酰基氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵(DODAP);N-(1,2-双十四烷基氧基丙-3-基)-N,N-二甲基-N-羟乙基溴化铵(DMRIE);1,2-二油酰基-sn-3-磷酸乙醇胺(DOPE);N-(1-(2,3二油烯基氧基)丙基)N-(2-(精胺酰胺基)乙基)-N,N-二甲基铵基三氟乙酸酯(DOSPA);双十八烷基酰氨基甘氨酸基羧基精胺(DOGS);1,2-二油酰基-3-二甲基铵基-丙烷(DODAP);DMDMA;1,2-二亚油烯基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLinDMA);4-(2,2-二辛基-9,12-二烯基-[1,3]二氧戊环-4-基甲基)-二甲胺;DLin-K-C2-DMA;DLin-M-C3-DMA;2-{4-[(3 β)-胆甾-5-烯-3-基氧基]丁氧基}-N,N-二甲基-3-[(9Z,12Z)-十八烷-9,12-二烯基氧基]丙-1-胺(CLinDMA)、MC4,0-烷基乙基磷酸胆碱、双十二烷基二甲基溴化铵(DDAB)、N-(4-羧基苄基)-N,N-二甲基-2,3-双(油酰基氧基)丙-1-胺(DOBAQ)或其任意组合。

26.如权利要求1-25中任一项所述的递送媒介物,其包含以下的至少一种:二酰基磷脂酰胆碱、二酰基磷脂酰乙醇胺、神经酰胺、鞘磷脂、脑磷脂、脑苷脂、二酰基甘油或其任意组合。

27.如权利要求1-26中任一项所述的递送媒介物,其包含以下的至少一种:磷脂酰甘油、心磷脂、二酰基磷脂酰丝氨酸、二酰基磷脂酸、N-十二酰基磷脂酰乙醇胺、N-琥珀酰基磷脂酰乙醇胺、N-戊二酰基磷脂酰乙醇胺、赖氨酸基磷脂酰甘油、棕榈酰基油酰基磷脂酰甘油(POPG)或其任意组合。

28.如权利要求1-27中任一项所述的递送媒介物,其包含以下的至少一种:二硬脂酰基磷脂酰胆碱(DSPC)、磷脂酰胆碱1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DMPC)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸-L-丝氨酸(DSPS)、二油酰基磷脂酰胆碱(DOPC)、二棕榈酰基磷脂酰胆碱(OPEC)、二油酰基磷脂酰甘油(DOPG)、二棕榈酰基磷脂酰甘油(DPPG)、二油酰基-磷脂酰乙醇胺(DOPE)、棕榈酰基油酰基磷脂酰胆碱(POPC)、棕榈酰基油酰基-磷脂酰乙醇胺(POPE)和二油酰基-磷脂酰乙醇胺4-(4-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸酯(DOPE-teal)、二棕榈酰基磷脂酰乙醇胺(DPPE)、二肉豆蔻酰基磷酸乙醇胺(DMPE)、二硬脂酰基-磷脂酰乙醇胺(DSPE)、16-0-单甲基PE、16-0-二甲基PE、18-1-反式PE、1-硬脂酰基-2-油酰基-磷脂酰乙醇胺(SOPS)、1,2-二反油酸氧基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(反式DOPE)或其任意组合。

29.如权利要求28所述的递送媒介物,其中所述递送媒介物包含至少DSPC或DMPC。

30.如权利要求1-29中任一项所述的递送媒介物,其进一步包含缀合脂质,其中所述缀合脂质包含与稳化组分缀合的脂质。

31. 如权利要求30所述的递送媒介物,其中所述稳化组分包含亲水聚合物。
32. 如权利要求31所述的递送媒介物,其中所述亲水聚合物包含聚乙二醇、聚(2-烷基-2-噁唑啉)、聚乙烯醇或其任意组合。
33. 如权利要求32所述的递送媒介物,其中所述亲水聚合物包含约50kDa至约500kDa的分子量。
34. 如权利要求32或33所述的递送媒介物,其中所述亲水聚合物包含聚乙二醇(PEG),并且其中所述缀合脂质包含聚乙二醇化脂质。
35. 如权利要求34所述的递送媒介物,其中所述聚乙二醇化脂质包含DSPE-PEG、DSG-PEG、DMG-PEG或DPPE-PEG。
36. 如权利要求35所述的递送媒介物,其中所述聚乙二醇化脂质包含DSPE-PEG或DMG-PEG。
37. 如权利要求30至36中任一项所述的递送媒介物,其中所述缀合脂质的浓度小于25摩尔%。
38. 如权利要求30至36中任一项所述的递送媒介物,其中所述缀合脂质的浓度小于5摩尔%。
39. 如权利要求30至36中任一项所述的递送媒介物,其中所述缀合脂质的浓度为约0.5摩尔%至约20摩尔%。
40. 如权利要求5至39中任一项所述的递送媒介物,其包含所述非阳离子脂质,其中所述非阳离子脂质的浓度为约5摩尔%至约75摩尔%。
41. 如权利要求1至40中任一项所述的递送媒介物,其中所述脂质纳米颗粒包含正的或接近中性的净电荷。
42. 如权利要求1至41中任一项所述的递送媒介物,其进一步包含胆固醇。
43. 一种包含负载物和纳米颗粒的递送媒介物,其中所述纳米颗粒包含在约5.5到8.0的pH值带正电荷的第一位点和在约5.5到8.0的pH值带负电荷的第二位点,其中所述第一和第二位点分离,使得所述正电荷和负电荷不散布,并且其中所述纳米颗粒能够穿过粘液屏障并到达上皮细胞。
44. 如权利要求43所述的递送媒介物,其中到达上皮细胞包括递送媒介物在细胞表面20微米的临近范围内,与上皮细胞表面结合或被上皮细胞内化。
45. 如权利要求43或44所述的递送媒介物,其中所述纳米颗粒包含脂质、聚合物或其组合。
46. 如权利要求43至45中任一项所述的递送媒介物,其中所述第一位点包含在第一相中,所述第二位点包含在第二相中,并且其中所述第一相和所述第二相彼此物理分离。
47. 如权利要求46所述的递送媒介物,其中所述第一相是液体。
48. 如权利要求47所述的递送媒介物,其中所述第二相是凝胶。
49. 如权利要求46所述的递送媒介物,其中所述第一相是凝胶。
50. 如权利要求49所述的递送媒介物,其中所述第二相是液体。
51. 如权利要求43至50中任一项所述的递送媒介物,其进一步包含稳定性组分。
52. 如权利要求51所述的递送媒介物,其中所述稳定性组分是聚乙二醇(PEG)。
53. 如权利要求47所述的递送媒介物,其中所述第一位点包含不饱和脂质或短尾脂质。

54. 如权利要求53所述的递送媒介物,其中所述不饱和脂质包含阳离子脂质或可离子化的阳离子脂质。

55. 如权利要求54所述的递送媒介物,其中所述阳离子脂质包含多价阳离子脂质或单价阳离子脂质。

56. 如权利要求55所述的递送媒介物,其中所述阳离子脂质选自以下:N1-[2-((1S)-1-[(3-氨基丙基)氨基]-4-[二(3-氨基-丙基)氨基]丁基酰胺基)乙基]-3,4-二[油基氧基]-苯甲酰胺(MVL5)、1,2-二油酰基-3-三甲基铵基-丙烷(DOTAP)、N4-胆固醇-精胺盐酸(GL67),这些物质的盐,及其任意组合。

57. 如权利要求56所述的递送媒介物,其中所述第一相中的一种或多种脂质被聚乙二醇化。

58. 如权利要求43至57中任一项所述的递送媒介物,其中所述第一位点进一步包含以下的至少一种:1,2-二油烯基氧基-3-(二甲基氨基)丙烷(DODMA)、6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七烷-6,9,28,31-四烯-19-基3-(二甲基氨基)丙酸酯(MC2)或其任意组合。

59. 如权利要求43至58中任一项所述的递送媒介物,其中所述第二位点包含以下的至少一种:1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸-L-丝氨酸(DSPS)、1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸-L-丝氨酸(DPPS)、Depot醋酸甲羟孕酮(DMPA)、二苯基磷酰基叠氮化物(DPPA)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷脂酸钠(DSPA)、1,2-二棕榈酰基磷脂酰甘油(DPPG)或2,4-二乙酰基间苯三酚(DAPG)。

60. 如权利要求59所述的递送媒介物,其中所述第二位点进一步包含以下的至少一种:2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DSPC)、1,2-双(二甲基膦基)乙烷(DMPE)、1,2-双(二苯基膦基)乙烷(DPPE)、1,2-二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺(DSPE)、二棕榈酰基磷脂酰胆碱(DPPC)、1,2-二花生酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱20:0PC(DAPC)或1,2-二取代基-3-磷脂酰乙醇胺20:0PE(DAPE)。

61. 如权利要求43至58中任一项所述的递送媒介物,其中所述第二位点包含脱氧胆酸盐以及以下的至少一种:2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DSPC)、1,2-双(二甲基膦基)乙烷(DMPE)、1,2-双(二苯基膦基)乙烷(DPPE)、1,2-二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺(DSPE)、二棕榈酰基磷脂酰胆碱(DPPC)、1,2-二花生酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱20:0PC(DAPC)或1,2-二取代基-3-磷脂酰乙醇胺20:0PE(DAPE)。

62. 如权利要求47所述的递送媒介物,其中所述第一相的转变温度低于37°C,所述第二相的转变温度高于37°C。

63. 如权利要求49所述的递送媒介物,其中所述第一相的转变温度高于37°C,所述第二相的转变温度低于37°C。

64. 如权利要求62或权利要求63所述的递送媒介物,其中所述转变温度低于37°C的相包含DODMA、MVL5、MC2、阳离子脂质或可离子化的阳离子脂质。

65. 如权利要求62或权利要求63所述的递送媒介物,其中所述转变温度高于37°C的相包含DSPC。

66. 如权利要求43至65中任一项所述的递送媒介物,其中在pH 7.4下,所述第一位点中的阳离子电荷与所述第二位点中的阴离子电荷的比率在约0.25和约3.0之间。

67. 如权利要求66所述的递送媒介物,其中所述比率在约0.75至约1.25之间。

68. 如权利要求66或67所述的递送媒介物,其中所述第一相包含MVL5和可离子的化阳离子脂质。

69. 如权利要求68所述的递送媒介物,其中所述可离子化的阳离子脂质选自由DODMA、MC2、MC3和KC2组成的组。

70. 如权利要求69所述的递送媒介物,其中所述可离子化的阳离子脂质是DODMA或MC2,并且所述递送媒介物中MVL5:可离子化的阳离子脂质的摩尔%比为约6.25%:18.75%、12.5%:12.5%或18.75%:6.25%。

71. 如权利要求70所述的递送媒介物,其中所述递送媒介物中MVL5:可离子化的阳离子脂质的比率为约12.5%:12.5%。

72. 如权利要求61至69中任一项所述的递送媒介物,其中所述第二相包含脱氧胆酸盐。

73. 如权利要求72所述的递送媒介物,其进一步包含2-二肉豆蔻酰基-rac-甘油-3-甲氧基聚乙二醇(DMG-PEG)或其盐。

74. 如权利要求72所述的递送媒介物,进一步包含DMPE-PEG或其盐。

75. 如权利要求43所述的递送媒介物,其中所述第一位点包含阳离子脂质,所述第二位点包含阴离子化合物。

76. 如权利要求75所述的递送媒介物,其中所述阳离子脂质是MVL5。

77. 如权利要求75或权利要求76所述的递送媒介物,其中所述阴离子化合物包含胆汁盐。

78. 如权利要求1至32或77中任一项所述的递送媒介物,其中所述胆汁盐选自:胆酸、胆酸盐、脱氧胆酸、脱氧胆酸盐、猪脱氧胆酸、猪脱氧胆酸盐、甘氨酸、甘氨酸盐、牛磺胆酸、牛磺胆酸盐、鹅脱氧胆酸、鹅脱氧胆酸盐、异石胆酸、异石胆酸盐、石胆酸和石胆酸盐。

79. 如权利要求78所述的递送媒介物,其中所述胆汁盐选自石胆酸盐、脱氧胆酸盐和异石胆酸盐。

80. 如权利要求78所述的递送媒介物,其中所述胆汁盐是脱氧胆酸盐。

81. 如权利要求78所述的递送媒介物,其中所述胆汁盐是异石胆酸盐。

82. 如权利要求1至42或78至81中任一项所述的递送媒介物,其中所述胆汁盐的浓度为约10摩尔%至约80摩尔%。

83. 如权利要求1至82中任一项所述的递送媒介物,其中所述负载物至少部分包含在所述脂质纳米颗粒中。

84. 如权利要求1至83中任一项所述的递送媒介物,其中所述负载物包括治疗剂。

85. 如权利要求1至84中任一项所述的递送媒介物,其中所述负载物包括核酸、蛋白、抗体、肽、小分子、生物制品或其任意组合。

86. 如权利要求85所述的递送媒介物,其中所述负载物是核酸并且所述核酸包括DNA、修饰的DNA、RNA、修饰的RNA、miRNA、siRNA、反义RNA或其任意组合。

87. 如权利要求1至86中任一项所述的递送媒介物,其进一步包含用于细胞内化的组分。

88. 如权利要求87所述的递送媒介物,其中所述组分是肽、碳水化合物或配体。

89. 如权利要求1至88中任一项所述的递送媒介物,其进一步包含细胞穿透肽、配体、粘液穿透聚合物、粘液穿透肽、非粘液粘附细胞穿透肽或其任意组合。

90. 药物组合物,其包含如权利要求1至89中任一项所述的递送媒介物。
91. 一种将负载物递送至胃肠道的方法,其包括施用如权利要求1至89中任一项所述的递送媒介物或如权利要求90所述的药物组合物,其中所述递送媒介物到达胃肠道,并且其中所述递送媒介物保护所述负载物免受存在于胃肠道中的胆汁盐。
92. 如权利要求91所述的方法,其中所述递送媒介物促进穿过粘液屏障。
93. 如权利要求91或权利要求92所述的方法,其中所述递送媒介物能够到达胃肠道内的上皮细胞。
94. 如权利要求93所述的方法,其中到达上皮细胞包括所述递送媒介物在所述细胞表面20微米的临近范围内。
95. 如权利要求93所述的方法,其中所述递送媒介物接触上皮细胞的表面。
96. 如权利要求95所述的方法,其中在所述递送媒介物接触所述上皮细胞之后,所述负载物被所述上皮细胞内化。
97. 如权利要求91至96中任一项所述的方法,其中将所述递送媒介物或药物组合物经口或胃肠道外施用给有此需要的受试者。
98. 如权利要求91至97中任一项所述的方法,其中所述负载物包括核酸、蛋白、抗体、肽、小分子或生物制品。
99. 如权利要求98所述的方法,其中所述核酸编码治疗剂,并且其中所述上皮细胞在所述负载物内化之后表达所述治疗剂。
100. 如权利要求99所述的方法,其中所述治疗剂由所述上皮细胞分泌。

用于生物递送媒介物的组合物和方法

[0001] 交叉引用

[0002] 本申请要求2019年6月14日提交的美国临时专利申请号62/861,852和2019年12月13日提交的美国临时专利申请号62/948,095的优先权,其各自通过引用以其全文并入本文用于所有目的。

[0003] 关于联邦资助研究的声明

[0004] 本发明是在美国政府的支持下完成的,国家科学基金会合同号1846078。

背景技术

[0005] 尽管基因治疗在过去50年中取得了进展,但仍然存在许多用常规方法难以对付的疾病,尤其是在基因治疗的靶位点可能为递送带来挑战的情况下,例如在胃肠道中。本公开满足了这种需要并且还提供了许多优点。

发明内容

[0006] 本文提供了一种递送媒介物(vehicle),其包含(i)负载物(cargo)和(ii)脂质纳米颗粒,其中脂质纳米颗粒包含至少一种饱和脂质和胆汁盐,并且其中所述至少一种饱和脂质是饱和阳离子脂质,或者脂质纳米颗粒进一步包含至少一种阳离子脂质。在一些情况下,脂质纳米颗粒进一步包含至少一种不饱和阳离子脂质或不饱和非阳离子脂质,并且任选地其中脂质纳米颗粒中所述至少一种不饱和阳离子脂质或不饱和非阳离子脂质的浓度小于脂质纳米颗粒总脂质浓度的50摩尔%。在一些情况下,饱和阳离子脂质的相变温度(phase transition temperature)为至少约37°C。在一些情况下,饱和脂质包含相变温度为至少约37°C的饱和非阳离子脂质。在一些情况下,脂质纳米颗粒进一步包含以下的至少一种:非阳离子脂质、多价阳离子脂质、永久带电的阳离子脂质或其任意组合。在一些情况下,多价阳离子脂质包含以下的至少一种:MVL5、TMVLBG2、TMVLG3、TMVLBG1、GL67或其任意组合。在一些情况下,多价阳离子脂质包含MVL5。在一个方面,多价阳离子脂质为总脂质浓度的约25摩尔%或更少。在一些情况下,永久带电的阳离子脂质包含1,2-二油酰基-3-三甲基铵基-丙烷(1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane, DOTAP)、3β-[N-(N',N'-二甲基氨基乙烷)-氨基甲酰基]胆固醇盐酸盐(3β-[N-(N',N'-dimethylaminoethane)-carbamoyl]cholesterol hydrochloride, DC-Cholesterol • HCl)或其任意组合。在一些情况下,饱和阳离子脂质包含以下的至少一种:1,2-硬脂酰基-3-三甲基铵基-丙烷(1,2-stearoyl-3-trimethylammonium-propane)、1,2-二棕榈酰基-3-三甲基铵基-丙烷(1,2-dipalmitoyl-3-trimethylammonium-propane)、1,2-二硬脂酰基-3-二甲基铵基-丙烷(1,2-Distearoyl-3-Dimethylammonium-Propane)、二甲基双十八烷基铵(Dimethyldioctadecylammonium)、1,2-二烷基-sn-甘油-3-乙基磷酸胆碱(1,2-dialkyl-sn-glycero-3-ethylphosphocholine)、1,2-二烷基-3-二甲基铵基-丙烷(1,2-dialkyl-3-dimethylammonium-propane)、1,2-二烷基-3-三甲基铵基-丙烷(1,2-dialkyl-3-trimethylammonium-propane)、1,2-二-O-烷基-3-三甲基铵基丙烷(1,2-di-O-alkyl-3-

trimethylammonium propane)、1,2-二烷基氧基-3-二甲基氨基丙烷(1,2-dialkyloxy-3-dimethylaminopropane)、N,N-二烷基-N,N-二甲基铵(N,N-dialkyl-N,N-dimethylammonium)、N-(4-羧基苄基)-N,N-二甲基-2,3-双(烷基氧基)丙烷-1-铵(N-(4-carboxybenzyl)-N,N-dimethyl-2,3-bis(alkyloxy)propan-1-aminium)、1,2-二烷基-sn-甘油-3-[N-(5-氨基-1-羧基戊基)亚氨基二乙酸]琥珀酰基(1,2-dialkyl-sn-glycero-3-[N-(5-amino-1-carboxypentyl)iminodiaceticacid)succinyl])、N1-[2-((1S)-1-[(3-氨基丙基)氨基]-4-[二(3-氨基-丙基)氨基]丁基酰胺基)乙基]-3,4-二[烷基]-苯甲酰胺(N1-[2-((1S)-1-[(3-aminopropyl)amino]-4-[di(3-amino-propyl)amino]butylcarboxamido)ethyl]-3,4-di[alkyl]-benzamide)、1,2-二油酰基-3-三甲基铵基-丙烷(1,2-stearoyl-3-trimethylammonium-propane,DSTAP)、1,2-二棕榈酰基-3-三甲基铵基-丙烷(1,2-dipalmitoyl-3-trimethylammonium-propane,DPTAP)、1,2-二硬脂酰基-3-二甲基铵基-丙烷(1,2-Distearoyl-3-Dimethylammonium-Propane,DSDAP)或其任意组合。在一些情况下,饱和非阳离子脂质包含以下的至少一种:1,2-二烷基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(1,2-Dialkyl-sn-glycero-3-phosphocholine)、1,2-二烷基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(1,2-dialkyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine)、1,2-二烷基-sn-甘油-3-磷酸甘油(1,2-Diaklyl-sn-glycero-3-phosphorylglycerol)、1,2-二烷基-sn-甘油-3-磷脂酰丝氨酸(1,2-dialkyl-sn-glycero-3-phosphatidylserine)、1,2-二烷基-sn-甘油-3-磷酸酯(1,2-dialkyl-sn-glycero-3-phosphate)、单甘油烷基酯(Monoglycerolalkylate)、甘油羟基烷基酯(Glyceryl hydroxyalkylate)、山梨糖醇酐单烷基酯(Sorbitan monoalkylate)、1,2-二烷基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-甲基(1,2-dialkyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-methyl)、1,2-二烷基-sn-甘油-3-磷酸甲醇(1,2-dialkyl-sn-glycero-3-phosphomethanol)、1,2-二烷基-sn-甘油-3-磷酸乙醇(1,2-dialkyl-sn-glycero-3-phosphoethanol)、1,2-二烷基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N,N-二甲基(1,2-dialkyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N,N-dimethyl)、1,2-二烷基-sn-甘油-3-磷酸丙醇(1,2-dialkyl-sn-glycero-3-phosphopropanol)、1,2-二烷基-sn-甘油-3-磷酸丁醇(1,2-dialkyl-sn-glycero-3-phosphobutanol)或其任意组合。在一些情况下,不饱和阳离子脂质包含以下的至少一种:二甲基双十八烷基铵(dimethyldioctadecylammonium)、1,2-二烷基-sn-甘油-3-乙基磷酸胆碱(1,2-dialkyl-sn-glycero-3-ethylphosphocholine)、1,2-二烷基-3-二甲基铵基-丙烷(1,2-dialkyl-3-dimethylammonium-propane)、1,2-二烷基-3-三甲基铵基-丙烷(1,2-dialkyl-3-trimethylammonium-propane)、1,2-二-0-烷基-3-三甲基铵基丙烷(1,2-di-0-alkyl-3-trimethylammonium propane)、1,2-二烷基氧基-3-二甲基氨基丙烷(1,2-dialkyloxy-3-dimethylaminopropane)、N,N-二烷基-N,N-二甲基铵(N,N-dialkyl-N,N-dimethylammonium)、N-(4-羧基苄基)-N,N-二甲基-2,3-双(烷基氧基)丙烷-1-铵(N-(4-carboxybenzyl)-N,N-dimethyl-2,3-bis(alkyloxy)propan-1-aminium)、1,2-二烷基-sn-甘油-3-[N-(5-氨基-1-羧基戊基)亚氨基二乙酸]琥珀酰基(1,2-dialkyl-sn-glycero-3-[N-(5-amino-1-carboxypentyl)iminodiaceticacid)succinyl])、N1-[2-((1S)-1-[(3-氨基丙基)氨基]-4-[二(3-氨基-丙基)氨基]丁基酰胺基)乙基]-3,4-二[烷基]-苯甲酰胺(N1-[2-((1S)-1-[(3-aminopropyl)amino]-4-[di(3-amino-propyl)amino]

butylcarboxamido) ethyl]-3,4-di[alkyl]-benzamide)、1,2-二烷基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(1,2-Dialkyloxy-N,N-dimethylaminopropane)、4-(2,2-二辛基-9,12-二烯基-[1,3]二氧戊环-4-基甲基)-二甲胺(4-(2,2-diocta-9,12-dienyl-[1,3]dioxolan-4-ylmethyl)-dimethylamine)、0-烷基乙基磷酸胆碱(0-alkyl ethylphosphocholines)、MC3、MC2、MC4、3 β -[N-(N',N'-二甲基氨基乙烷)-氨基甲酰基]胆固醇(3 β -[N-(N',N'-dimethylaminoethane)-carbamoyl]cholesterol)、N4-胆固醇-精胺(N4-cholesteryl-spermine)、7-(4-(二甲基氨基)丁基)-7-羟基十三烷-1,13-二基二油酸酯(7-(4-(dimethylamino)butyl)-7-hydroxytridecane-1,13-diyl dioleate, CL1H6),或其任意组合。在一些情况下,不饱和阳离子脂质包含至少MC2或CL1H6。在一些情况下,不饱和非阳离子脂质包含以下的至少一种:1,2-二烷基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(1,2-dialkyl-sn-glycero-3-phosphocholine)、1,2-二烷基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(1,2-dialkyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine)、1,2-二烷基-sn-甘油-3-磷酸甘油(1,2-dialkyl-sn-glycero-3-phosphorylglycerol)、1,2-二烷基-sn-甘油-3-磷脂酰丝氨酸(1,2-dialkyl-sn-glycero-3-Phosphatidylserine)、1,2-二烷基-sn-甘油-3-磷酸酯(1,2-dialkyl-sn-glycero-3-Phosphate)、单甘油烷基酯(Monoglycerol alkylate)、甘油羟基烷基酯(Glycerol hydroxyalkylate)、山梨糖醇酐单烷基酯(Sorbitan monoalkylate)、1,2-二烷基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-甲基(1,2-dialkyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-methyl)、1,2-二烷基-sn-甘油-3-磷酸甲醇(1,2-dialkyl-sn-glycero-3-phosphomethanol)、1,2-二烷基-sn-甘油-3-磷酸乙醇(1,2-dialkyl-sn-glycero-3-phosphoethanol)、1,2-二烷基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N,N-二甲基(1,2-dialkyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N,N-dimethyl)、1,2-二烷基-sn-甘油-3-磷酸丙醇(1,2-dialkyl-sn-glycero-3-phosphopropanol)、1,2-二烷基-sn-甘油-3-磷酸丁醇(1,2-dialkyl-sn-glycero-3-phosphobutanol)或其任意组合。在一些情况下,至少一种饱和脂质或阳离子脂质是多价阳离子脂质。

[0007] 在一个实施方案中,递送媒介物进一步包含非阳离子脂质。在一些情况下,多价阳离子脂质、非阳离子脂质或多价阳离子脂质和非阳离子脂质的相变温度为至少约37 $^{\circ}$ C。在一些情况下,多价阳离子脂质包含以下的至少一种:MVL5、TMVLBG2、TMVLG3、TMVLBG1和GL67或其任意组合。在一些情况下,非阳离子脂质包括饱和和非阳离子脂质。在一些情况下,饱和的非阳离子脂质包含以下的至少一种:1,2-二烷基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-二烷基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二烷基-sn-甘油-3-磷酸甘油、1,2-二烷基-sn-甘油-3-磷脂酰丝氨酸、1,2-二烷基-sn-甘油-3-磷酸酯、单甘油烷基酯、甘油羟基烷基酯、山梨糖醇酐单烷基酯、1,2-二烷基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-甲基、1,2-二烷基-sn-甘油-3-磷酸甲醇、1,2-二烷基-sn-甘油-3-磷酸乙醇、1,2-二烷基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N,N-二甲基、1,2-二烷基-sn-甘油-3-磷酸丙醇、1,2-二烷基-sn-甘油-3-磷酸丁醇或其任意组合。在一些情况下,与除不包含胆汁盐外其他相同的递送媒介物相比,所述递送媒介物在高胆汁盐环境中是稳定的。在一些情况下,高胆汁盐环境包括胃肠道环境。在一些情况下,与除(i)不包含所述胆汁盐外其他相同的递送媒介物相比,所述递送媒介物在含有至少约5g/L胆汁盐的溶液中表现出增加的稳定性,其中稳定性是在福斯特共振能量转移(Forster resonance energy transfer, FRET)测定中通过并入所述脂质纳米颗粒中的荧光脂质的相对荧光强度来测量。

在一些情况下,与除(i)不包含胆汁盐外其他相同的递送媒介物相比,所述递送媒介物在含有至少约5g/L的约50%胆酸和约50%脱氧胆酸盐的混合物的溶液中,表现出增加的稳定性,其中稳定性是在福斯特共振能量转移(FRET)测定中通过并入所述脂质纳米颗粒中的荧光脂质的相对荧光强度来测量。

[0008] 在一个实施方案中,递送媒介物包含以下的至少一种:N,N-二油烯基-N,N-二甲基氯化铵(N,N-dioleoyl-N,N-dimethylammonium chloride,DODAC);N-(2,3二油烯基氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵(N-(2,3dioleoyloxy)propyl)-N,N,N-trimethylammonium chloride,DOTMA);N,N-二硬脂酰基N,N-二甲基溴化铵(N,N-distearoyl-N,N-dimethylammonium bromide,DDAB);N-(2,3二油酰基氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵(N-(2,3dioleoyloxy)propyl)-N,N,N-trimethylammonium chloride,DODAP);N-(1,2-双十四烷基氧基丙-3-基)-N,N-二甲基-N-羟乙基溴化铵(N-(1,2-dimyristyloxyprop-3-yl)-N,N-dimethyl-N-hydroxyethyl ammonium bromide,DMRIE);1,2二油酰基-sn-3-磷酸乙醇胺(1,2dioleoyl-sn-3-phosphoethanolamine,DOPE);N-(1-(2,3二油烯基氧基)丙基)N-(2-(精胺酰胺基)乙基)-N,N-二甲基铵基三氟乙酸酯(N-(1-(2,3dioleoyloxy)propyl)N-(2-(spermincarboxamido)ethyl)-N,N-dimethylammonium trifluoroacetate,DOSPA);双十八烷基酰氨基甘氨酸基精胺(diocmdecylamidoglycyl carboxyspermine,DOGS);1,2-二油酰基-3-二甲基铵-丙烷(1,2-dioleoyl-3-dimethylammonium-propane,DODAP);DMDMA;1,2-二亚油烯基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(1,2-DiLinoleoyloxy-N,N-dimethylaminopropane,DLinDMA);4-(2,2-二辛基-9,12-二烯基-[1,3]二氧戊环-4-基甲基)-二甲胺(4-(2,2-diocta-9,12-dienyl-[1,3]dioxolan-4-ylmethyl)-dimethylamine);DLin-K-C2-DMA;DLin-M-C3-DMA;2-{4-[(3 β)-胆甾-5-烯-3-基氧基]丁氧基}-N,N-二甲基-3-[(9Z,12Z)-十八烷-9,12-二烯基氧基]丙-1-胺(2-{4-[(3 β)-cholest-5-en-3-yloxy]butoxy}-N,N-dimethyl-3-[(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienlyloxy]propan-1-amine),CLinDMA)、MC4,0-烷基乙基磷酸胆碱(0-alkyl ethylphosphocholines)、双十二烷基二甲基溴化铵(Didodecyldimethylammonium bromide,DDAB)、N-(4-羧基苄基)-N,N-二甲基-2,3-双(油酰基氧基)丙-1-胺(N-(4-carboxybenzyl)-N,N-dimethyl-2,3-bis(oleoyloxy)propan-1-aminium,DOBAQ)或其任意组合。

[0009] 在一个实施方案中,递送媒介物包含以下的至少一种:二酰基磷脂酰胆碱、二酰基磷脂酰乙醇胺、神经酰胺、鞘磷脂、脑磷脂、脑苷脂、二酰基甘油或其任意组合。

[0010] 在一个实施方案中,递送媒介物包含以下的至少一种:磷脂酰甘油、心磷脂、二酰基磷脂酰丝氨酸、二酰基磷脂酸、N-十二酰基磷脂酰乙醇胺、N-琥珀酰基磷脂酰乙醇胺、N-戊二酰基磷脂酰乙醇胺、赖氨酸基磷脂酰甘油、棕榈酰基油酰基磷脂酰甘油(palmitoyl oleylphosphatidylglycerol,POPG)或其任意组合。

[0011] 在一个实施方案中,递送媒介物包含以下的至少一种:二硬脂酰基磷脂酰胆碱(distearoylphosphatidylcholine,DSPC)、磷脂酰胆碱1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(phosphatidylcholinel,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine,DMPC)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸-L-丝氨酸(1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine,DSPS)、二油酰基磷脂酰胆碱(dioleoylphosphatidylcholine,DOPC)、二棕榈酰基

磷脂酰胆碱(dipalmitoylphosphatidylcholine,OPEC)、二油酰基磷脂酰甘油(dioleoylphosphatidylglycerol,DOPG)、二棕榈酰基磷脂酰甘油(dipalmitoylphosphatidylglycerol,DPPG)、二油酰基-磷脂酰乙醇胺(dioleoylphosphatidylethanolamine,DOPE)、棕榈酰基油酰基-磷脂酰胆碱(palmitoyloleoylphosphatidylcholine,POPC)、棕榈酰基油酰基-磷脂酰乙醇胺(palmitoylolmylphosphatidylethanolamine,POPE)和二油酰基-磷脂酰乙醇胺4-(4-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸酯(dioleoyl-phosphatidylethanolamine4-(4-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate,DOPE-teal)、二棕榈酰基磷脂酰乙醇胺(dipalmitoylphosphatidylethanolamine,DPPE)、二肉豆蔻酰基磷酸乙醇胺(dimyristoylphosphoethanolamine,DMPE)、二硬脂酰基-磷脂酰乙醇胺(distearoylphosphatidylethanolamine,DSPE)、16-0-单甲基PE、16-0-二甲基PE、18-1-反式PE、1-硬脂酰基-2-油酰基-磷脂酰乙醇胺(SOPS)、1,2-二反油酸氧基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(1,2-dilaidoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine,反式DOPE)或其任意组合。

[0012] 在一个实施方案中,递送媒介物包含至少DSPC或DMPC。

[0013] 在一个实施方案中,递送媒介物进一步包含缀合脂质(conjugated lipid),其中所述缀合脂质包含与稳化组分(stabilizing component)缀合的脂质。在一些情况下,稳化组分包含亲水聚合物。在一些情况下,亲水聚合物包含聚乙二醇、聚(2-烷基-2-噁唑啉)、聚乙烯醇或其任意组合。在一些情况下,亲水聚合物包含约50kDa至约500kDa的分子量。在一些情况下,亲水聚合物包含聚乙二醇(PEG),并且其中缀合脂质包含聚乙二醇化脂质。在一些情况下,聚乙二醇化脂质包含DSPE-PEG、DSG-PEG、DMG-PEG或DPPE-PEG。

[0014] 在一些情况下,聚乙二醇化脂质包含DSPE-PEG或DMG-PEG。在一些情况下,缀合脂质的浓度小于25摩尔%。在一些情况下,缀合脂质的浓度小于5摩尔%。在一些情况下,缀合脂质的浓度为约0.5摩尔%至约20摩尔%。在一些情况下,递送媒介物包含非阳离子脂质,并且非阳离子脂质的浓度为约5摩尔%至约75摩尔%。在一些情况下,脂质纳米颗粒包含正的或接近中性的净电荷。

[0015] 在一个方面,递送媒介物进一步包含胆固醇。

[0016] 本文提供了一种包含负载物和纳米颗粒的递送媒介物,其中纳米颗粒包含在约5.5至8.0之间的pH下带正电荷的第一位点(first locus)和在约5.5至8.0之间的pH下带负电荷的第二位点(second locus),其中第一和第二位点分离,使得正电荷和负电荷不是散布的,并且其中纳米颗粒能够穿过粘液屏障并到达上皮细胞。在一个方面,到达上皮细胞包括递送媒介物在细胞表面20微米的临近范围内,与上皮细胞表面结合或被上皮细胞内化。在一个方面,纳米颗粒包含脂质、聚合物或其组合。在一个方面,第一位点包含在第一相中,第二位点包含在第二相中,并且其中第一相和第二相彼此物理分离。在一个方面,第一相是液体。在一个方面,第二相是凝胶。在一个方面,第一相是凝胶。在一个方面,第二相是液体。在一些情况下,递送媒介物进一步包含稳定性组分(stability component)。在一些情况下,稳定性组分是聚乙二醇(PEG)。在一些情况下,第一位点包含不饱和脂质或短尾脂质(short-tail lipid)。在一些情况下,不饱和脂质包含阳离子脂质或可离子化的阳离子脂质。在一些情况下,阳离子脂质包含多价阳离子脂质或单价阳离子脂质。在一些情况下,阳离子脂质选自以下组成的组:N1-[2-((1S)-1-[(3-氨基丙基)氨基]-4-[二(3-氨基-丙

基)氨基]丁基酰胺基)乙基]-3,4-二[油基氧基]-苯甲酰胺(N1-[2-((1S)-1-[3-aminopropyl)amino]-4-[di(3-amino-propyl)amino]butylcarbox amido)ethyl]-3,4-di[oleyloxy]-benzamide,MVL5)、1,2-二油酰基-3-三甲基铵基-丙烷(DOTAP)、N4-胆固醇-精胺盐酸(N4-Cholesteryl-Spermine HCl,GL67),任意这些的盐,及其任意组合。在一个方面,第一相中的一种或多种脂质被聚乙二醇化。在一个方面,第一位点进一步包含以下的至少一种:1,2-二油烯基氧基-3-(二甲基氨基)丙烷(1,2-Dioleyloxy-3-(dimethylamino)propane,DODMA)、6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七烷-6,9,28,31-四烯-19-基3-(二甲基氨基)丙酸酯(6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-yl3-(dimethylamino)propanoate,MC2)或其任意组合。在一个方面,第二位点包含以下的至少一种:1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸-L-丝氨酸(DSPS)、1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸-L-丝氨酸(1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine,DPPS)、Depot醋酸甲羟孕酮(Depot medroxyprogesterone acetate,DMPA)、二苯基磷酰基叠氮化物(Diphenylphosphoryl azide,DPPA)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷脂酸钠(1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphatidic acid sodium,DSPA)、1,2-二棕榈酰基磷脂酰甘油(1,2-Dipalmitoylphosphatidylglycerol,Dipalmitoylphosphatidylglycerol,DPPG)或2,4-二乙酰基间苯三酚(2,4-Diacetylphloroglucinol,DAPG)。在一个方面,第二位点进一步包含以下的至少一种:2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine,DSPC)、1,2-双(二甲基膦基)乙烷(1,2-Bis(dimethylphosphino)ethane,DMPE)、1,2-双(二苯基膦基)乙烷(1,2-Bis(diphenylphosphino)ethane,DPPE)、1,2-二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺(1,2-Distearoylphosphatidylethanolamine,DSPE)、二棕榈酰基磷脂酰胆碱(Dipalmitoylphosphatidylcholine,DPPC)、1,2-二花生酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱20:0PC(1,2-Diarachidoyl-sn-glycero-3-phosphocholine 20:0PC,DAPC)或1,2-二取代基-3-磷脂酰乙醇胺20:0PE(1,2-Diradyl-3-phosphatidylethanolamine20:0PE,DAPE)。在一个方面,第二位点包含脱氧胆酸盐,以及以下的至少一种:2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine,DSPC)、1,2-双(二甲基膦基)乙烷(1,2-Bis(dimethylphosphino)ethane,DMPE)、1,2-双(二苯基膦基)乙烷(1,2-Bis(diphenylphosphino)ethane,DPPE)、1,2-二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺(1,2-Distearoylphosphatidylethanolamine,DSPE)、二棕榈酰基磷脂酰胆碱(Dipalmitoylphosphatidylcholine,DPPC)、1,2-二花生酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱20:0PC(1,2-Diarachidoyl-sn-glycero-3-phosphocholine 20:0PC,DAPC)或1,2-二取代基-3-磷脂酰乙醇胺20:0PE(1,2-Diradyl-3-phosphatidylethanolamine20:0PE,DAPE)。在一个方面,第一相的转变温度低于37℃,第二相的转变温度高于37℃。在一个方面,第一相的转变温度高于37℃,第二相的转变温度低于37℃。在一个方面,转变温度低于37℃的相包含DODMA、MVL5、MC2、阳离子脂质或可离子化的阳离子脂质。在一个方面,转变温度高于37℃的相包含DSPC。在一些情况下,在pH 7.4下,第一位点中的阳离子电荷与第二位点中的阴离子电荷的比率在约0.25至约3.0之间。在一些情况下,所述比率在约0.75至约1.25之间。在一些情况下,第一相包含MVL5和可离子化的阳离子脂质。在一些情况下,可离子化的阳离子脂质选自由DODMA、MC2、MC3和KC2组成的组。在一些情况下,可离子化的阳离子脂质是DODMA或MC2,并且递送媒介物中MVL5:可离子化的阳离子脂质的摩尔%比为约6.25%:18.75%、

12.5%:12.5%或18.75%:6.25%。在一些情况下,递送媒介物中MVL5:可离子化的阳离子脂质的比率为约12.5%:12.5%。在一些情况下,第二相包含脱氧胆酸盐。

[0017] 在一个方面,递送媒介物进一步包含2-二肉豆蔻酰基-rac-甘油-3-甲氧基聚乙二醇(DMG-PEG)或其盐。在一些情况下,递送媒介物进一步包含DMPE-PEG或其盐。在一些情况下,第一位点包含阳离子脂质,第二位点包含阴离子化合物。在一些情况下,阳离子脂质是MVL5。在一些情况下,阴离子化合物包括胆汁盐。在一些情况下,胆汁盐选自由以下组成的组:胆酸(cholic acid)、胆酸盐(cholate)、脱氧胆酸(deoxycholic acid)、脱氧胆酸盐(deoxycholate)、猪脱氧胆酸(hyodeoxycholic acid)、猪脱氧胆酸盐(hyodeoxycholate)、甘氨酸(glycocholic acid)、甘氨酸盐(glycocholate)、牛磺胆酸(taurocholic acid)、牛磺胆酸盐(taurocholate)、鹅脱氧胆酸(chenodeoxycholic acid)、鹅脱氧胆酸盐(chenodeoxycholate)、异石胆酸(isolithocholic acid)、异石胆酸盐(isolithocolate)、石胆酸(lithocholic acid)和石胆酸盐(lithocolate)。在一些情况下,胆汁盐选自由石胆酸盐、脱氧胆酸盐和异石胆酸盐组成的组。在一些情况下,胆汁盐是脱氧胆酸盐。在一些情况下,胆汁盐是异石胆酸盐。在一些情况下,胆汁盐的浓度为约10摩尔%至约80摩尔%。在一些情况下,负载物至少部分包含在脂质纳米颗粒中。在一些情况下,负载物包括治疗剂。在一些情况下,负载物包括核酸、蛋白、抗体、肽、小分子、生物制品或其任意组合。在一些情况下,负载物是核酸并且所述核酸包括DNA、修饰的DNA、RNA、修饰的RNA、miRNA、siRNA、反义RNA或其任意组合。在一些情况下,递送媒介物进一步包含用于细胞内化的组分。在一个方面,所述组分是肽、碳水化合物(carbohydrate)或配体。

[0018] 在一个方面,递送媒介物进一步包含细胞穿透肽、配体、粘液穿透聚合物、粘液穿透肽、非粘液粘附细胞穿透肽或其任意组合。

[0019] 本文提供了包含递送媒介物的药物组合物。

[0020] 本文提供了一种将负载物递送至胃肠道的方法,包括施用递送媒介物或药物组合物,其中递送媒介物到达胃肠道并且其中递送媒介物保护负载物免受存在于胃肠道中的胆汁盐。在一些情况下,递送媒介物促进穿过粘液屏障。在一些情况下,递送媒介物能够到达胃肠道内的上皮细胞。在一些情况下,到达上皮细胞包括递送媒介物在细胞表面20微米的临近范围内。在一些情况下,递送媒介物接触上皮细胞的表面。在一个方面,在递送媒介物接触上皮细胞之后,负载物被上皮细胞内化。在一些情况下,将递送媒介物或药物组合物经口或胃肠道外施用给有此需要的受试者。在一些情况下,负载物包括核酸、蛋白、抗体、肽、小分子或生物制品。在一些情况下,核酸编码治疗剂并且其中上皮细胞在负载物内化之后表达治疗剂。在一些情况下,治疗剂由上皮细胞分泌。

[0021] 参考文献的并入

[0022] 本文中的所有出版物、专利和专利申请均通过引用以其整体并入,就好像每个单独的出版物、专利或专利申请被具体地和单独地指出通过引用并入。如果本文中的术语与并入的参考文献中的术语之间出现冲突,则以本文中的术语为准。

[0023] 附图简要说明

[0024] 本公开的新特征在所附的权利要求书中具体阐述。通过参考以下对可利用本公开原理的说明性实施方案加以阐述的详细描述以及附图,将会获得对本公开的特征和优点的更好的理解,在这些附图中:

[0025] 图1显示了在HEK细胞中测量携带DNA作为负载物的本公开的示例性递送媒介物的转染效率的示例性测定的结果。

[0026] 图2显示了用于测量本公开的示例性递送媒介物的稳定性的示例性测定的结果。

[0027] 图3显示了用于测量本公开的示例性递送媒介物的稳定性的示例性测定的结果。

[0028] 图4显示了用于测量本公开的示例性递送媒介物的稳定性的示例性测定的结果。

[0029] 图5显示了本公开的示例性递送媒介物(表1中的制剂No.5)的琼脂糖凝胶电泳。泳道从左至右如下:泳道1显示梯带;泳道2显示未经处理的递送媒介物;泳道3显示了用7% Triton-X 100处理的递送媒介物;泳道4显示了用7% Triton-X和热(70°C 30min)处理的递送媒介物。

[0030] 图6显示了用30微克包封在DiI和DiO标记的递送媒介物中的DNA给药的小鼠的小鼠结肠切片。所观察的是DiI和DiO标记的含有1% PEG的媒介物(表3的颗粒5)的分布,如将DiI的荧光成像叠加到明场上所示。参见实施例5、表3中对颗粒5和图中其他所指颗粒的描述。

[0031] 图7显示了用30微克包封在DiI和DiO标记的递送媒介物中的DNA给药的小鼠的小鼠结肠切片。所观察的是DiI和DiO标记的含有2% PEG的媒介物(表3的颗粒6)的分布,如将DiI的荧光成像叠加到明场上所示。

[0032] 图8显示了用30微克包封在DiI和DiO标记的递送媒介物(表3的颗粒7)中的DNA给药的小鼠的小鼠结肠切片。所观察的是DiI和DiO标记的含有3% PEG的媒介物的分布,如将DiI的荧光成像叠加到明场上所示。

[0033] 图9显示了用30微克包封在DiI和DiO标记的递送媒介物中的DNA给药的小鼠的小鼠结肠切片。所观察的是DiI和DiO标记的含有5% PEG的媒介物(表3的颗粒8)的分布,如将DiI的荧光成像叠加到明场上所示。

[0034] 图10显示了用30微克包封在DiI和DiO标记的递送媒介物中的DNA给药的小鼠的小鼠结肠切片。所观察的是DiI和DiO标记的含有10% PEG的媒介物(表3的颗粒9)的分布,如将DiI的荧光成像叠加到明场上所示。

[0035] 图11A和图11B显示了在来自施用0%/25% MVL5/DODMA百分比摩尔的比率的颗粒(表3的颗粒1)的小鼠的代表性结肠切片中的递送媒介物分布。

[0036] 图12A和图12B显示了在来自施用6.25%/18.75% (MVL5/DODMA) 百分比摩尔的比率的颗粒(表3的颗粒2)的小鼠的代表性结肠切片中的递送媒介物分布。

[0037] 图13A和图13B显示了在来自施用12.5%/12.5% (MVL5/DODMA) 百分比摩尔的比率的颗粒(表3的颗粒3)的小鼠的代表性结肠切片中的递送媒介物分布。

[0038] 图14A和图14B显示了在来自施用18.75%/6.25% (MVL5/DODMA) 百分比摩尔的比率的颗粒(颗粒4)的小鼠的代表性结肠切片中的递送媒介物分布。

[0039] 图15A和图15B显示了在来自施用25%/0% MVL5/DODMA百分比摩尔的比率的颗粒(表3的颗粒10)的小鼠的代表性结肠切片中的递送媒介物分布。

[0040] 图16A和图16B显示了第一只小鼠的切片的结肠的瑞士卷(swiss roll)图像,并且图16C和图16D显示了第二只小鼠的一个切片的结肠的瑞士卷图像,对每只小鼠施用具有DiI和DiO的MVL5/DODMA/DOPC/脱氧胆酸盐/DMG-PEG(表3的颗粒11),使用BioTek Cytation软件。图16A和图16C显示了DiI通道,并且图16B和图16D显示了叠加到明场上的DiI通道。

[0041] 图17A和图17B显示了施用具有DiI和DiO的MVL5/DODMA/GMO/脱氧胆酸盐/DMG-PEG (表3的颗粒12) 的第一只小鼠和第二只小鼠 (图17C和图17D) 的切片的结肠的瑞士卷图像, 使用BioTek Cytation软件。图17A和图17C显示了DiI通道, 并且图17B和图17D显示了叠加到明场上的DiI通道。

[0042] 图18A和图18B显示了施用具有DiI和DiO的MVL5/DODMA/DSPC/脱氧胆酸盐/DMG-PEG (表3的颗粒5) 的第一只小鼠和第二只小鼠 (图18C和图18D) 的切片的结肠的瑞士卷图像, 使用BioTek Cytation软件。图18A和图18C显示了DiI通道, 并且图18B和图18D显示了叠加到明场上的DiI通道。

[0043] 图19A和图19B显示了第一只小鼠的切片的结肠的瑞士卷图像, 并且图19C和图19D显示了第二只小鼠的切片的结肠的瑞士卷图像, 对每只小鼠施用具有DiI和DiO的PBS, 使用BioTek Cytation软件。图19A和图19C显示了DiI通道, 并且图19B和图19D显示了叠加到明场上的DiI通道。

[0044] 图20显示了通过使用DiI和DiO之间的FRET测量脂质结构中的扰动, 比较在10g/L胆汁盐 (胆酸盐:脱氧胆酸盐混合物) 中并入了脂质结构的不同胆汁盐的稳定性的条形图。将FRET值相对于无处理进行标准化。

具体实施方式

[0045] 以下描述和示例详细阐述了本公开的实施方案。应当理解, 本公开不限于本文所述的具体实施方案并且因此可以进行改变。本领域技术人员将认识到, 本公开有多种变化和修改, 这些变化和修改都包含在其范围内。

[0046] 概述

[0047] 将药剂例如治疗剂递送至上皮组织和细胞, 例如胃肠 (GI) 道、阴道和肺中, 面临着一些挑战。在这些组织中, 上皮细胞被粘膜层覆盖, 因此治疗剂必须进入并穿过粘液层才能到达上皮细胞。另外, 治疗剂一旦进入或穿过粘液层, 就必须接近预期的靶细胞, 并且在某些情况下, 与细胞膜相互作用和/或进入细胞。因此, 药剂 (agent) (在本文中也称为“负载物”) 的递送通过不仅进入并穿过粘液层而且到达预期的靶上皮细胞的范围内的递送媒介物而得到改善。此外, 对于GI道和其他组织, 恶劣的环境, 例如天然存在的GI胆酸, 可能对递送的稳定性和负载物到预期靶细胞的成功递送带来挑战。

[0048] 本文提供了用于递送负载物的组合物 (“递送媒介物”) 和使用本文提供的递送媒介物递送负载物的方法。在一些方面, 可以进一步修饰递送媒介物, 以在具有挑战性的环境中提供稳定性和/或到达靶上皮细胞。在多个实施方案中, 本文提供的递送媒介物 (在本文中也称为“到达粘膜上皮的 (mucosal epithelial reaching)” 和“电荷分离的 (charge-separated)” 递送媒介物) 包其中正电荷和负电荷分离到媒介物内的独立位点的那些递送媒介物, 使得带正电荷和带负电荷的分子彼此分离 (separated), 而不是散布 (interspersed)。本文中电荷分离的递送媒介物实现了穿过粘液从而减少或防止递送媒介物被困住在上皮粘液中, 并且使上皮实现功能性, 该功能性将媒介物递送到上皮细胞临近 (例如20微米或更小的距离以内)。

[0049] 本文还公开了递送媒介物, 包括基于脂质的递送媒介物, 其包含脂质结构 (例如脂质纳米颗粒) 和负载物, 在高胆汁盐环境例如胃肠道中具有改善的稳定性。在一些实施方案

中,递送媒介物可以在GI道的恶劣环境中提供稳定性,并且可以进行调适而用于粘液环境。因此,递送媒介物可适用于将负载物(例如,核酸)递送至粘膜上皮细胞,例如肠上皮细胞、肺上皮细胞、宫颈上皮细胞、直肠上皮细胞、子宫内膜细胞等。此外,递送媒介物还可适用于递送至器官,例如皮肤。

[0050] 在一些情况下,本文提供的递送媒介物可包含附加的粘液穿透特征,这可有助于递送媒介物进入和穿过上皮细胞周围的粘液。此类附加特征包括将聚合物例如聚乙二醇(PEG)、具有甲基的聚噁唑啉聚合物(PMOZ)、具有乙基的聚噁唑啉聚合物(PEOZ)并入递送媒介物表面和/或通过包括连接至递送媒介物表面的粘液穿透肽(MPP)。在其他情况下,媒介物不含PEG包衣或含有低密度PEG包衣(或另一种低密度聚合物包衣)。

[0051] 定义

[0052] 如本文所用,单数形式“一(a)”、“一个(an)”和“所述(the)”旨在还包括复数形式,除非上下文另有明确指示。此外,如果在具体实施方式和/或权利要求中使用了术语“包括(including)”、“具有(having)”、“带有(with)”或其变体,则此类术语旨在是包含的,方式类似于术语“包含(comprising)”。术语“约(about)”或“大约(approximately)”可以意指在由本领域普通技术人员确定的特定值的可接受误差范围内,这将部分取决于如何测量或确定该值,例如,测量系统的限制。例如,“约”可以意指在给定值的 $\pm 10\%$ 内。在本申请和权利要求中描述特定值时,除非另有说明,否则术语“约”应被认为是意指特定值的可接受误差范围。

[0053] 如本文所用,与参考数值相关的术语“约”及其语法等同语以及本文中所用的语法等同语可以包括该值的正负10%的数值范围。例如,量“约10”包括从9至11的量。与参考数值相关的术语“约”还可以包括该值的正负10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或1%的数值范围。

[0054] 术语“施用”及其语法等同语可以指将本文所述的结构提供给受试者的任何方法。此类方法是本领域技术人员公知的,并且包括但不限于经口施用、经皮施用、通过吸入施用、经鼻施用、局部(topical)施用、阴道内施用、经眼施用、耳内施用、脑内施用、经直肠施用和胃肠道外施用,包括可注射施用,例如静脉内施用、动脉内施用、肌肉内施用和皮下施用。施用可以是连续的或间歇的。在多个方面,可以治疗性地施用本文所公开的结构。在一些情况下,可以施用结构来治疗存在的疾病或病况。在进一步的多个方面,可以预防性施用结构以预防疾病或病况。

[0055] 术语“可生物降解的(biodegradable)”及其语法等同语可以指旨在在使用过程中降解的聚合物、组合物和制剂,例如本文所述的那些。术语“可生物降解的”旨在涵盖也称为“可生物蚀解的(bioerodible)”的材料和过程。

[0056] 如本文所用,术语“癌症(cancer)”及其语法等同语可以指细胞的过度增殖,该细胞的独特性质(丧失正常控制时)导致不受调控的生长、缺少分化、侵入局部组织和转移。对于本发明的方法,癌症可以是任何癌症,包括以下任一种:急性淋巴细胞癌、急性髓性白血病、肺泡横纹肌肉瘤、膀胱癌(bladder cancer)、骨癌、脑癌、乳腺癌、肛门癌、肛管癌、直肠癌、眼癌、肝内胆管癌、关节癌、颈癌、胆囊癌或胸膜癌、鼻癌、鼻腔癌或中耳癌、口腔癌、外阴癌、慢性淋巴细胞白血病、慢性粒细胞癌、结肠癌、食道癌、宫颈癌、纤维肉瘤、胃肠道类癌瘤(gastrointestinal carcinoid tumor)、霍奇金淋巴瘤、下咽癌、肾癌、喉癌、白血病、液体

肿瘤(liquid tumor)、肝癌、肺癌、淋巴瘤、恶性间皮瘤、肥大细胞瘤、黑色素瘤、多发性骨髓瘤、鼻咽癌、非霍奇金淋巴瘤、卵巢癌、胰腺癌、腹膜癌、网膜癌和肠系膜癌、咽癌、前列腺癌、直肠癌、肾癌、皮肤癌、小肠癌、软组织癌、实体瘤、胃癌、睾丸癌、甲状腺癌、尿管癌和/或尿道膀胱癌(urinary bladder cancer)。如本文所用,术语“肿瘤”是指细胞或组织的异常生长,例如恶性类型或良性类型的异常生长。

[0057] 如本文所用,术语“负载物”可指递送媒介物中所包含的用于递送至细胞或组织或递送进入细胞或组织内的一种或多种分子或结构。负载物的非限制性示例可包括核酸、染料、药物、蛋白、脂质体、小化学分子、大生物分子及其任意组合。

[0058] 如本文所用,术语“细胞”及其语法等同语可以指生物体的结构和功能单元。细胞可以是微小的尺寸,并且可以由封闭在膜中的细胞质和细胞核组成。细胞可以指肠隐窝细胞(intestinal crypt cell)。隐窝细胞可以指利贝昆(Lieberkühn)隐窝,其是围绕肠道绒毛基部的洼状结构。细胞可以是人来源的或非人来源的。

[0059] 如本文所用,“缀合物(conjugate)”可以指两个或更多个分子或结构的共价或非共价结合,包括但不限于肽如粘液穿透肽(MPP)与递送媒介物、聚合物、表面修饰的缔合,或其任意组合。

[0060] 如本文所用,术语“功能”及其语法等同语可以指执行、具有或服务于预期目的的能力。功能性的(functional)可以包含预期目的的从基线到100%的任意百分比。例如,功能性的可以包含或包含预期目的的约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或最多约100%。在一些情况下,术语功能性的可意指超过正常功能的100%或超过正常功能的约100%,例如预期目的的125%、150%、175%、200%、250%、300%、400%、500%、600%、700%或最多约1000%。

[0061] 如本文所用,术语“胃肠道疾病”可以指涉及胃肠道的疾病,所述胃肠道包括但不限于食道、胃、小肠、大肠和直肠,以及附属消化器官、肝脏、胆囊和胰腺,及其任意组合。

[0062] 如本文所用,术语“亲水的”及其语法等同语是指具有易于与水相互作用的极性基团的物质或结构。

[0063] 如本文所用,术语“疏水的”及其语法等同语是指具有不易与水相互作用的极性基团的物质或结构。

[0064] 如本文所用,术语“粘液”及其语法等同语可以指主要包含粘蛋白糖蛋白和其他物质的粘弹性天然物质,其保护多种器官/组织的上皮表面,所述器官/组织包括但不限于呼吸系统、鼻系统、宫颈阴道系统、胃肠系统、直肠系统、视觉系统和听觉系统。

[0065] 如本文所用,术语“脂质结构”是指用于递送至细胞或组织,例如递送治疗性产品如核酸的脂质组合物。如本文所用,术语“脂质结构”及其语法等同语可以指纳米颗粒或递送媒介物。结构可以是脂质体(liposomal)结构。脂质结构也可以指颗粒。脂质结构或颗粒可以是纳米颗粒或递送媒介物。脂质颗粒或脂质结构可以是直径为约1nm至约1 μ m的任意形状。纳米颗粒或纳米结构可以是或可以是约100至200nm。纳米颗粒或纳米结构也可以达到500nm。具有球形形状的纳米颗粒或纳米结构可被称为“纳米球(nanosphere)”。

[0066] 如本文所用的术语“结构”及其语法等同语可以指纳米颗粒或递送媒介物。结构可以是脂质体结构。结构还可以指颗粒。结构或颗粒可以是纳米颗粒或递送媒介物。颗粒或结构可以是直径为约1nm至约1 μ m的任何形状。纳米颗粒或纳米结构可以是100至200nm或可以

是约100至200nm。纳米颗粒或纳米结构还可以是最多500nm。具有球形形状的纳米颗粒或纳米结构可被称为“纳米球”。

[0067] 术语“核酸”、“多核苷酸”和“寡核苷酸”及其语法等同语可互换使用,并且可指呈线性或环状构象且为单链或双链形式的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸聚合物。对本公开而言,这些术语不应被解释为对长度的限制。这些术语还可涵盖天然核苷酸的已知类似物,以及在碱基、糖和/或磷酸部分(例如,硫代磷酸骨架)中修饰的核苷酸。通常,特定核苷酸的类似物可具有相同的碱基配对特异性,即,腺嘌呤“A”的类似物可与胸腺嘧啶“T”发生碱基配对。

[0068] 术语“药学上可接受的载体”及其语法等同语可指无菌的水性或非水性溶液、分散液、悬浮液或乳剂,以及在临使用前重构为无菌可注射溶液或分散体的无菌粉末。例如,可以通过使用包衣材料,例如卵磷脂,在分散体的情况下通过维持所需粒径,以及通过使用表面活性剂,来保持合适的流动性。这些溶液、分散体、悬浮液或乳液还可以含有辅剂,例如防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂。可通过包含各种抗细菌剂和抗真菌剂如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸等,来确保防止微生物的作用。还可能希望包含等渗剂,例如糖、氯化钠等。可注射药物形式的延长吸收可通过包含延迟吸收的试剂如单硬脂酸铝和明胶来实现。可注射的贮库(depot)形式通过在可生物降解的聚合物如聚丙交酯-聚乙交酯、聚(原酸酯)和聚(酸酐)中形成药物的微囊基质(microencapsule matrice)来制备。

[0069] 如本文所用的术语“易感的(predisposed)”可理解为意指受试者将会患上疾病或病况的概率增加(例如,概率增加至少1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%或更多)。

[0070] 术语“个体”、“患者”或“受试者”可互换使用。这些术语均不要求或不限于以卫生保健工作者(例如,医生、注册护士、执业护士、医师助理、医护人员或临终关怀工作者)的监督(例如,持续性或间歇性)为特征的情况。受试者可以是哺乳动物。受试者可以是男人或女人。受试者可以是任何年龄。受试者可以是胚胎。受试者可以是新生儿或高达约100岁。受试者可以是有此需要的。受试者可以患有疾病,例如癌症。

[0071] 如本文所用,术语“序列”及其语法等同语可指核苷酸序列,其可以是DNA和/或RNA;其可以是线性的、环状的或分支的;并且其可以是单链的或双链的。序列可以是任何长度,例如,2至1,000,000个或更多个核苷酸的长度(或在其之间或在其以上的任何整数值),例如,约100个至约10,000个核苷酸,或约200个至约500个核苷酸。在一些情况下,如本文所用,所指示的“序列”可以指氨基酸序列,例如蛋白、多肽和/或肽的序列。

[0072] 如本文所用的术语“干细胞”可以指多细胞生物体的未分化细胞,其能够产生无限多的相同类型的细胞。干细胞还可通过分化产生其他种类的细胞。干细胞可见于隐窝中。干细胞可以是见于肠绒毛表面上的上皮细胞的祖细胞。干细胞可以是癌性的。干细胞可以是全能的(totipotent)、单能的(unipotent)或多能的(pluripotent)。干细胞可以是诱导的干细胞。

[0073] 术语“治疗”(treatment)及其语法等同语可指受试者的医学处置,其旨在治愈、改善、稳定或者预防疾病、病况或病症。治疗可包括主动治疗,即特别针对改善疾病、病况或病症的治疗。治疗可包括病因治疗,即针对去除相关疾病、病况或病症的病因的治疗。另外,该治疗还可包括姑息治疗,即为了缓解症状而不是治愈疾病、病况或病症而设计的治疗。治疗

可包括预防性治疗,即针对最小化或者部分或完全抑制疾病、病况或病症的發生的治疗。治疗可包括支持性治疗(supportive treatment),即用来补充针对疾病、病况或病症的改善的另一特定疗法的治疗。在一些情况下,病况可以是病理性的。在一些情况下,治疗可能无法完全治愈、改善、稳定或者预防疾病、病况或病症。

[0074] 当在化学基团的上下文中使用时,“氢”意指—H;“羟基”意指—OH;“卤素”单独意指—F、—Cl、—Br或—I。

[0075] 对于本文中提供的结构,以下插入性下标进一步将基团定义如下:“(C_n)”定义了基团中碳原子的确切数目(n)。例如,“(C₂₋₁₀)烷基”表示具有2至10个碳原子(例如,2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个,或其中可衍生自的任何范围(例如,3至10个碳原子))的那些烷基。

[0076] “烷基”基团可以指脂肪烃基团。烷基部分可以是“饱和烷基”基团,这意味着它不包含任何烯炔或炔炔部分。烷基部分也可以是“不饱和烷基”部分,这意味着它包含至少一个烯炔或炔炔部分。“烯炔”部分是指由至少两个碳原子和至少一个碳-碳双键组成的基团,“炔炔”部分是指由至少两个碳原子和至少一个碳-碳三键组成的基团。烷基部分,无论是饱和的还是不饱和的,均可以是支链的、直链的或环状的。此外,烷基部分,无论是饱和的还是不饱和的,均可以包含支链、直链和/或环状部分。根据结构,烷基可以是单价基团或双价基团(即亚烷基)。“杂烷基”基团,如针对“烷基”所述,只是至少一个C原子被N、S或O原子取代。“杂烷基”基团可包含直链、支链和/或环状部分。在某些实施方案中,“低级烷基(lower alkyl)”是具有1-6个碳原子的烷基(即,C₁-C₆烷基)。在具体情况下,“低级烷基”可以是直链或支链的。

[0077] “芳基”是指通过从环碳原子上去除氢原子而衍生自芳族单环或芳族多环烃环系统的基团。芳族单环或芳族多环烃环系统仅包含氢和碳以及5至18个碳原子,其中环系统中的至少一个环是芳族的,即它包含符合Hückel理论的环状、离域(4n+2)π-电子系统。芳基由此衍生的环系统包括但不限于苯、茛、茛满、茛、茛满和茛等基团。在一些实施方案中,术语“芳基”可指其中形成环的每个原子均为碳原子的芳环。芳环可以由五个、六个、七个、八个、九个或多于九个碳原子形成。芳基可以任选地被取代。芳基的示例包括但不限于苯基、茛基、菲基、蒽基、茛基和茛基。根据结构,芳基可以是单价基团或双价基团(即亚芳基)。

[0078] “杂芳基”是指衍生自包含2至11个碳原子和至少一个杂原子(其中每个杂原子可选自N、O和S)的3至12元芳环基团的基团。如本文所用,杂芳环可以选自单环或双环和稠合或桥式环系统,其中环系统中的至少一个环是芳族的,即它包含符合Hückel理论的环状、离域(4n+2)π-电子系统。杂芳基中的杂原子可以任选地被氧化。一个或多个氮原子(如果存在)任选地被季铵化。若价数允许,杂芳基可以通过杂芳基的任何原子连接到分子的其余部分,例如杂芳基的碳或氮原子。杂芳基的示例包括但不限于氮杂基(azepinyl)、吡啶基(acridinyl)、苯并咪唑基(benzimidazolyl)、苯并吡啶基(benzindolyl)、1,3-苯并二氧杂环戊烯基(1,3-benzodioxolyl)、苯并呋喃基(benzofuranyl)、苯并噁唑基(benzooxazolyl)、苯并[d]噻唑基(benzo[d]thiazolyl)、苯并噻二唑基(benzothiadiazolyl)、苯并[b][1,4]二氧杂环庚三烯基(benzo[b][1,4]dioxepinyl)、苯并[b][1,4]噁嗪基(benzo[b][1,4]oxazinyl)、1,4-苯并二氧六环基(1,4-benzodioxanyl)、苯并萘并呋喃基(benzonaphthofuranyl)、苯并噁唑基(benzoxazolyl)、

苯并二氧杂环戊烯基 (benzodioxolyl)、苯并二噁英基 (benzodioxinyl)、苯并吡喃基 (benzopyranyl)、苯并吡喃酮基 (benzopyranonyl)、苯并呋喃基 (benzofuranyl)、苯并呋喃酮基 (benzofuranonyl)、苯并噻吩基 (苯并噻吩) (benzothienyl (benzothiophenyl))、苯并噻吩并[3,2-d]嘧啶基 (benzothieno[3,2-d]pyrimidinyl)、苯并三唑基 (benzotriazolyl)、苯并[4,6]咪唑并[1,2-a]吡啶基 (benzo[4,6]imidazo[1,2-a]pyridinyl)、咪唑基 (carbazolyl)、噌啉基 (cinnolinyl)、环戊并[d]嘧啶基 (cyclopenta[d]pyrimidinyl)、6,7-二氢-5H-环戊并[4,5]噻吩并[2,3-d]嘧啶基 (6,7-dihydro-5H-cyclopenta[4,5]thieno[2,3-d]pyrimidinyl)、5,6-二氢苯并[h]喹啉基 (5,6-dihydrobenzo[h]quinazolinylyl)、5,6-二氢苯并[h]噌啉基 (5,6-dihydrobenzo[h]cinnolinyl)、6,7-二氢-5H-苯并[6,7]环庚并[1,2-c]哒嗪基 (6,7-dihydro-5H-benzo[6,7]cyclohepta[1,2-c]pyridazinyl)、二苯并呋喃基 (dibenzofuranyl)、二苯并噻吩基 (dibenzothiophenyl)、呋喃基 (furanyl)、呋喃酮基 (furanonyl)、呋喃并[3,2c]吡啶基 (furo[3,2-c]pyridinyl)、5,6,7,8,9,10-六氢环辛并[d]嘧啶基 (5,6,7,8,9,10-hexahydrocycloocta[d]pyrimidinyl)、5,6,7,8,9,10-六氢环辛并[d]哒嗪基 (5,6,7,8,9,10-hexahydrocycloocta[d]pyridazinyl)、5,6,7,8,9,10-六氢环辛并[d]吡啶基 (5,6,7,8,9,10-hexahydrocycloocta[d]pyridinyl)、异噻唑基 (isothiazolyl)、咪唑基 (imidazolyl)、吲唑基 (indazolyl)、吲哚基 (indolyl)、吲唑基 (indazolyl)、异吲哚基 (isoindolyl)、吲哚基 (indolyl)、异吲哚基 (isoindolinylyl)、异喹啉基 (isoquinolyl)、吲哚基 (indolizinylyl)、异噁唑基 (isoxazolyl)、5,8-桥亚甲基-5,6,7,8-四氢喹啉基 (5,8-methano-5,6,7,8-tetrahydroquinazolinylyl)、萘啶基 (naphthyridinyl)、1,6-萘啶酮基 (1,6-naphthyridinonyl)、噁二唑基 (oxadiazolyl)、2-氧代吡啶基 (2-oxoazepinylyl)、噁唑基 (oxazolyl)、环氧乙烷基 (oxiranyl)、5,6,6a,7,8,9,10,10a-八氢苯并[h]喹啉基 (5,6,6a,7,8,9,10,10a-octahydrobenzo[h]quinazolinylyl)、1-苯基-1H-吡咯基 (1-phenyl-1H-pyrrolyl)、吩嗪基 (phenazinyl)、吩噻嗪基 (phenothiazinyl)、吩噁嗪基 (phenoxazinyl)、酞嗪基 (phthalazinyl)、蝶啶基 (pteridinyl)、嘌呤基 (purinyl)、吡咯基 (pyrrolyl)、吡唑基 (pyrazolyl)、吡唑并[3,4-d]嘧啶基 (pyrazolo[3,4-d]pyrimidinyl)、吡啶基 (pyridinyl)、吡啶并[3,2-d]嘧啶基 (pyrido[3,2-d]pyrimidinyl)、吡啶并[3,4-d]嘧啶基 (pyrido[3,4-d]pyrimidinyl)、吡嗪基 (pyrazinyl)、嘧啶基 (pyrimidinyl)、哒嗪基 (pyridazinyl)、吡咯基 (pyrrolyl)、喹啉基 (quinazolinylyl)、喹啉基 (quinolinylyl)、异喹啉基 (isoquinolinylyl)、四氢喹啉基 (tetrahydroquinolinylyl)、5,6,7,8-四氢喹啉基 (5,6,7,8-tetrahydroquinazolinylyl)、5,6,7,8-四氢苯并[4,5]噻吩并[2,3-d]嘧啶基 (5,6,7,8-tetrahydrobenzo[4,5]thieno[2,3-d]pyrimidinyl)、6,7,8,9-四氢-5H-环庚并[4,5]噻吩并[2,3-d]嘧啶基 (6,7,8,9-tetrahydro-5H-cyclohepta[4,5]thieno[2,3-d]pyrimidinyl)、5,6,7,8-四氢吡啶并[4,5-c]哒嗪基 (5,6,7,8-tetrahydropyrido[4,5-c]pyridazinyl)、噻唑基 (thiazolyl)、噻二唑基 (thiadiazolyl)、三唑基 (triazolyl)、四唑基 (tetrazolyl)、三嗪基 (triazinyl)、噻吩并[2,3-d]嘧啶基 (thieno[2,3-d]pyrimidinyl)、噻吩并[2,3-c]吡啶基 (thieno[2,3-c]pyridinyl) 和噻吩基 (thiophenyl) (即,噻吩基 (thioenyl))。“X-元杂芳

基”是指环中的环内原子数,即X。例如,5元杂芳环或5元芳族杂环具有5个环内原子,例如三唑、噁唑、噻吩等。

[0079] 在一些实施方案中,当在没有“取代的”修饰物的情况下使用时,术语“杂芳基”是指具有芳族碳原子或氮原子作为连接点的单价基团,所述碳原子或氮原子形成芳环结构的一部分,其中至少一个环原子是氮、氧或硫,并且其中所述单价基团只由原子碳、氢、芳族氮、芳族氧和芳族硫组成。杂芳基基团的非限制性示例包括吡啶基、咪唑基、咪唑并咪唑基(imidazoimidazolyl)、咪唑并吡唑基(imidazopyrazolyl)、咪唑并吡啶基(imidazopyridinyl)、咪唑并嘧啶基(imidazopyrimidinyl)、吲哚基、吲唑啉基(indazolyl)、甲基吡啶基(methylpyridyl)、噁唑基(oxazolyl)、苯基咪唑基(phenylimidazolyl)、吡啶基(pyridyl)、吡咯基、嘧啶基(pyrimidyl)、吡嗪基、喹啉基(quinolyl)、喹唑啉基(quinazolyl)、喹喔啉基、四氢喹啉基、噻吩基(thienyl)、三嗪基、吡咯并吡啶基(pyrrolopyridinyl)、吡咯并嘧啶基(pyrrolopyrimidinyl)、吡咯并吡嗪基(pyrrolopyrazinyl)、吡咯并三嗪基(pyrrolotriazinyl)、吡咯并咪唑基(pyrroloimidazolyl)、苯并吡啶基(chromenyl,其中连接点是芳族原子之一)和苯并二氢吡啶基(chromenyl,其中连接点是芳族原子之一)。取代的杂芳基是指具有芳族碳原子或氮原子作为连接点的单价基团,所述碳原子或氮原子形成芳环结构的一部分,其中至少一个环原子是氮、氧或硫,并且其中所述单价基团进一步具有至少一个独立地选自非芳族氮、非芳族氧、非芳族硫、F、Cl、Br、I、Si和P组成的组的原子。

[0080] 术语“取代的”是指具有取代一个或多个碳上的氢或可取代的杂原子上的氢(例如NH)的取代基的基团(或部分)。应当理解,“取代”或“用……取代”包括以下隐含条件,即此类取代与被取代原子和取代基的允许价相一致,并且所述取代产生稳定的化合物,即不自发地经历例如通过重排、环化、消除等的转化的化合物。在某些实施方案中,“取代的”是指具有取代同一碳原子上的两个氢原子的取代基的部分,例如取代单个碳上的两个氢原子而具有氧代基团(oxo)、亚氨基(imino)或硫代基团(thioxo)。如本文所用,术语“取代的”预期包括有机化合物的所有允许的取代基。在广泛的方面,允许的取代基包括有机化合物的无环和环状、支链和非支链、碳环和杂环、芳族和非芳族取代基。对于合适的有机化合物,允许的取代基可以是一个或多个并且相同或不同。出于本公开的目的,杂原子例如氮可以具有氢取代基和/或满足杂原子价态的本文所述的有机化合物的任何允许的取代基。

[0081] 在一些实施方案中,取代基可包括本文所述的任何取代基,例如:卤素、羟基、氧代(=O)、硫代(=S)、氰基(-CN)、硝基(-NO₂)、亚氨基(=N-H)、胍基(=N-OH)、胍基(=N-NH₂)、-R^b-OR^a、-R^b-OC(O)-R^a、-R^b-OC(O)-OR^a、-R^b-OC(O)-N(R^a)₂、-R^b-N(R^a)₂、-R^b-C(O)R^a、-R^b-C(O)OR^a、-R^b-C(O)N(R^a)₂、-R^b-O-R^c-C(O)N(R^a)₂、-R^b-N(R^a)C(O)OR^a、-R^b-N(R^a)C(O)R^a、-R^b-N(R^a)S(O)_tR^a(其中t是1或2)、-R^b-S(O)_tR^a(其中t是1或2)、-R^b-S(O)_tOR^a(其中t是1或2)和-R^b-S(O)_tN(R^a)₂(其中t是1或2);和烷基、烯基、炔基、芳基、芳烷基、芳烯基、芳炔基、环烷基、环烷基烷基、杂环烷基、杂环烷基烷基、杂芳基和杂芳基烷基,其任何一个都可以任选地被烷基、烯基、炔基、卤素、卤代烷基、卤代烯基、卤代炔基、氧代(=O)、硫代(=S)、氰基(-CN)、硝基(-NO₂)、亚氨基(=N-H)、胍基(=N-OH)、胍基(=N-NH₂)、-R^b-OR^a、-R^b-OC(O)-R^a、-R^b-OC(O)-OR^a、-R^b-OC(O)-N(R^a)₂、-R^b-N(R^a)₂、-R^b-C(O)R^a、-R^b-C(O)OR^a、-R^b-C(O)N(R^a)₂、-R^b-O-R^c-C(O)N(R^a)₂、-R^b-N(R^a)C(O)OR^a、-R^b-N(R^a)C(O)R^a、-R^b-N(R^a)S(O)_tR^a(其中t是1或

2)、 $-R^b-S(O)_tR^a$ (其中 t 是1或2)、 $-R^b-S(O)_tOR^a$ (其中 t 是1或2)和 $-R^b-S(O)_tN(R^a)_2$ (其中 t 是1或2)所取代;其中每个 R^a 独立地选自氢、烷基、环烷基、环烷基烷基、芳基、芳烷基、杂环烷基、杂环烷基烷基、杂芳基或杂芳基烷基,其中每个 R^a 在价态允许的情况下可以任选地被烷基、烯基、炔基、卤素、卤代烷基、卤代烯基、卤代炔基、氧代(=O)、硫代(=S)、氰基(-CN)、硝基(-NO₂)、亚氨基(=N-H)、胍基(=N-OH)、胍基(=N-NH₂)、 $-R^b-OR^a$ 、 $-R^b-OC(O)-R^a$ 、 $-R^b-OC(O)-OR^a$ 、 $-R^b-OC(O)-N(R^a)_2$ 、 $-R^b-N(R^a)_2$ 、 $-R^b-C(O)R^a$ 、 $-R^b-C(O)OR^a$ 、 $-R^b-C(O)N(R^a)_2$ 、 $-R^b-O-R^c-C(O)N(R^a)_2$ 、 $-R^b-N(R^a)C(O)OR^a$ 、 $-R^b-N(R^a)C(O)R^a$ 、 $-R^b-N(R^a)S(O)_tR^a$ (其中 t 是1或2)、 $-R^b-S(O)_tR^a$ (其中 t 是1或2)、 $-R^b-S(O)_tOR^a$ (其中 t 是1或2)和 $-R^b-S(O)_tN(R^a)_2$ (其中 t 是1或2)所取代;并且其中每个 R^b 独立地选自键或直链或支链亚烷基、亚烯基或亚炔基链,并且每个 R^c 是直链或支链亚烷基、亚烯基或亚炔基链。

[0082] 具有电荷分离的递送媒介物

[0083] 在一些情况下,本文提供的递送媒介物含有被分成颗粒内的不同位点的正电荷和负电荷,其中每个位点包含不同的聚合物(将电荷赋予位点)。在一些情况下,本文提供的递送媒介物包含带正电荷和带负电荷的脂质,其中所述位点通过相分离,例如分成液相和凝胶相。在一些情况下,递送媒介物可包含带正电荷的液相和带负电荷的凝胶相;或者,带正电荷的凝胶相和带负电荷的液相。

[0084] 本文提供的递送媒介物可以有效地将负载物,例如核酸、蛋白、肽和/或小分子递送至粘膜组织内的上皮细胞。本文的递送媒介物可用于治疗影响和/或源自粘膜组织(例如胃肠道中的粘膜组织)的疾病和病况。非限制性示例包括家族性腺瘤性息肉病(FAP)、减毒FAP、结直肠癌、慢性炎性肠病、慢性炎性肠病、微绒毛包涵体病和先天性腹泻病。本文的递送媒介物还可用于提供治疗剂和/或核酸以在粘膜组织中表达治疗剂,并且此类药剂可保留在靶向的上皮细胞中和/或被转运至受试者中其他受疾病影响的细胞和组织。在一些情况下,递送媒介物提供与上皮细胞的临近距离。在一些方面,这样的临近距离小于约50、40、30、25、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1微米。在一些情况下,本文的递送媒介物与上皮细胞接触。在一些情况下,递送媒介物被内化到细胞中并且递送媒介物携带的负载物在细胞内释放。在一些情况下,递送媒介物接触上皮细胞并且来自递送媒介物的负载物在细胞外释放。

[0085] 本文提供的递送媒介物可以是脂质结构。脂质结构可用于将负载物递送至细胞或组织。在一些情况下,负载物可以包括治疗产品,例如核酸。脂质结构包括但不限于脂质颗粒、脂质纳米颗粒、脂质体或囊泡,例如其中水性体积被两亲脂质双层(例如,单个;单层或多个;多层)包封的囊泡,或其中脂质至少部分包被包含治疗产品的内部,或脂质聚集体或胶束,其中脂质包封的治疗产品包含在相对无序的脂质混合物中。

[0086] 本文的递送媒介物(例如,脂质纳米颗粒、脂质体和胶束样结构)具有至少两个位点,并且包含不散布而是位于分离的位点的正电荷和负电荷。例如,在约5.5至8.0之间的pH下,例如在约7.4的pH下,负电荷和正电荷可以存在于本文提供的脂质结构的相对位点(opposite loci)上。

[0087] 在一个方面,正电荷和负电荷在两个独立的位点中,其中每个位点是脂质结构的不同相,例如液相或固(凝胶)相。在一个方面,正电荷可以在液相上而负电荷可以在固相上,例如凝胶相,反之亦然。电荷分离可以允许吸引力和排斥力两者。在一些情况下,正脂质

可因其高负电位而被吸引向靶细胞。在另一个方面,负面(negative face)上的排斥力可以防止正面(positive face)在动力学上被困在粘液中。在一些情况下,阳离子电荷,例如在递送媒介物上的脂质上,可能在前往靶细胞的途中被吸引至粘液,并且可能在动力学上被捕获在粘液中,从而捕获递送媒介物。粘液最终会放弃而离开递送媒介物。在另一个方面,阴离子递送媒介物可被粘液排斥而可能无法穿过粘液。两性离子颗粒可以像没有合力(net force)的中性颗粒一样起作用。两性离子颗粒可以像聚乙二醇化系统一样跟随水的流动,而可能不会被困在粘液中,但可能不会到达上皮细胞。

[0088] 在具体的实施方案中,脂质结构可以包括选择用以减少脂质颗粒形成过程中的聚集的阴离子脂质或阳离子脂质、中性脂质、甾醇和脂质中的一种或多种。聚集可能是由脂质结构的空位稳定化(其可以阻止形成过程中电荷诱导的聚集)所引起的。脂质结构可以包括两种或更多种阳离子脂质。一方面,阳离子脂质可以在第一相上而阴离子脂质可以在第二相上,使得脂质结构包含具有不同荷电的脂质的两个相。可以选择脂质以促成不同的有利特性。例如,可以在脂质结构中使用在特性例如胺 pK_a 、化学稳定性、循环中的半衰期、组织中的半衰期、组织中的净积累或毒性方面不同的阳离子脂质。具体地,可以选择阳离子脂质使得混合脂质的脂质结构的特性相比于单独脂质的单一脂质结构的特性更合乎需要。通过选择给定制剂中的阳离子脂质的混合物而不是选择单一阳离子脂质,可以以有利的方式调节来自阳离子脂质的净组织积累和长期毒性(如果有的话)。这样的混合物还可以提供更好的负载物例如核酸的包封和/或释放。与制剂中的单个实体(entity)相比,阳离子脂质的组合也可影响系统稳定性。

[0089] 在一些情况下,阳离子脂质可通过极性头基中存在的一个或多个胺来获得正电荷。在一些情况下,脂质结构可以是阳离子脂质体。在一些情况下,脂质体可以是用于携带带负电荷的多核酸(例如DNA)的阳离子脂质体。带正电荷的胺的存在可以促进与阴离子(例如在DNA中发现的那些)的结合。如此形成的脂质体可能是范德华力的能量贡献和与DNA负载物的静电结合(可部分有助于脂质体形状)的结果。在一些情况下,阳离子(和中性)脂质可用于基因递送。在其他情况下,阴离子脂质体可用于递送其他治疗剂。

[0090] 在一些实施方案中,本文提供的递送媒介物进一步包含负载物。在一些情况下,负载物包括治疗剂。在一些情况下,负载物包括核酸、蛋白、抗体、肽、小分子、生物制品或其任意组合。在一些实施方案中,本文的递送媒介物包含用于细胞内化的组分。在一些情况下,所述组分是肽、碳水化合物或配体。在一些实施方案中,本文提供的递送媒介物还包含稳定性组分(stability component)。在一些情况下,所述稳定性成分是聚乙二醇(PEG)。

[0091] 在递送媒介物的一些实施方案中,第一位点包含不饱和或短尾脂质。在一些情况下,不饱和脂质包含阳离子或可离子化的阳离子脂质。在一些实施方案中,阳离子脂质包含多价阳离子脂质或单价阳离子脂质。

[0092] 在一些情况下,电荷分离(charge separation)可导致受试者递送媒介物的优异和/或出乎意料的性能。例如,使用PEG被认为会增加向靶细胞,例如肠上皮细胞的运输,如 Maisel K et al., Effect of surface chemistry on nanoparticle interaction with gastrointestinal mucus and distribution in the gastrointestinal tract following oral and rectal administration in the mouse. J Control Release 所述,其通过引用并入本文。在一些情况下,增加聚乙二醇化导致肠组织内或肠组织处的分布减

少,从而为利用与常规媒介物相比聚乙二醇化减少的递送媒介物提供了支持。减少聚乙二醇化可以改善向靶细胞及其附近的运输和/或分布的一种机制是,通过降低聚乙二醇化的屏蔽特性来增加受试媒介物表面正电荷的暴露。

[0093] 在一些情况下,与缺乏电荷分离的相当的递送媒介物相比,本文提供的包含电荷分离的递送媒介物可具有改善的运输、靶细胞转染、上皮到达或其组合。在一些情况下,所述改善是与缺乏电荷分离的相当的递送媒介物相比,从约1倍、50倍、99倍、148倍、197倍、246倍、295倍、344倍、393倍、442倍、491倍、540倍、589倍、638倍、687倍、736倍、785倍、834倍、883倍、932倍、981倍或高至约1000倍。

[0094] 在一些情况下,递送媒介物可以包含以下的任何一种:

[0095] MVL5/MC2/DSPC/脱氧胆酸盐/DMG-PEG;

[0096] MVL5/MC2/DSPC/脱氧胆酸盐/DMPE-PEG;

[0097] MVL5/CL1H6/DSPC/脱氧胆酸盐/DMG-PEG;

[0098] MVL5/CL4H6/DSPC/脱氧胆酸盐/DMG-PEG;

[0099] MVL5/MC2/DSPC/鹅脱氧胆酸盐(Chenodeoxycholate)/DMG-PEG;

[0100] MVL5/MC2/DMPC/脱氧胆酸盐/DMG-PEG;

[0101] MVL5/MC2/DMPC/脱氧胆酸盐/DMPE-PEG;

[0102] MVL5/CL1H6/DMPC/脱氧胆酸盐/DMG-PEG;

[0103] MVL5/MC2/DSPC/脱氧胆酸盐/石胆酸盐/DMG-PEG;

[0104] MVL5/CL1H6/DSPC/脱氧胆酸盐/石胆酸盐/DMG-PEG;

[0105] MVL5/MC2/DSPC/别异石胆酸盐/DMG-PEG;或

[0106] MVL5/MC2/DSPC/脱水石胆酸盐/DMG-PEG。

[0107] 可以使用多种摩尔比产生递送媒介物。在一些情况下,药物制剂包含摩尔比为约0.96:0.96:2.592:3.168:0.0768:0.0384:0.0384的MVL5、MC2、脱氧胆酸盐、DSPC和DMG-PEG。在一些情况下,在pH 7.4时,第一位点中的阳离子电荷与第二位点中的阴离子电荷的比率为从约0.25、0.45、0.65、0.85、1.05、1.25、1.45、1.65、1.85、2.05、2.25、2.45、2.65或2.85。在一些情况下,在pH 7.4时,第一位点中的阳离子电荷与第二位点中的阴离子电荷的比率为从约0.25至约1.05、0.75至约1.25、1.05至约1.45或0.85至约1.85。在另一个方面,递送媒介物中多价脂质与可离子化的阳离子脂质的比率为从约(6%、6.25%、6.5%、6.75%、7%、7.25%、7.5%、7.75%或8%)至(8%、8.25%、8.5%、8.75%、9%、9.25%、9.5%、9.75%、10%)、(12%、12.25%、12.5%、12.75%或13%)至(12%、12.25%、12.5%、12.75%或13%)或(18%、18.25%、18.5%、18.75%、19%、19.25%、19.5%、19.75%、20%)至(6%、6.25%、6.5%、6.75%、7%、7.25%、7.5%、7.75%或8%)。在一些方面,胆汁盐的浓度为从约10摩尔%、15摩尔%、20摩尔%、25摩尔%、30摩尔%、35摩尔%、40摩尔%、45摩尔%、50摩尔%、55摩尔%、60摩尔%、65摩尔%、70摩尔%、75摩尔%或约80摩尔%。在一些情况下,胆汁盐为从约10摩尔%至30摩尔%、20摩尔%至50摩尔%、30摩尔%至60摩尔%或40摩尔%至80摩尔%。合适的可选制剂可包含摩尔比为从约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%更多或更少至本文提供的那些摩尔比的多价脂质、可离子化的阳离子脂质、胆汁盐、结构性脂质和/或脂质-PEG。

[0108] 递送媒介物稳定性

[0109] 在一些实施方案中,递送媒介物稳定性可以随着胆酸或胆汁盐的并入而增加。除非另有说明,否则术语“胆酸”、“胆汁盐”、“胆酸/盐”在本文中可互换使用。本文中使用的对胆酸的任何提及可包括对胆酸或其盐的提及。如本文所用,术语“胆酸”(和“胆汁盐”、“胆酸/盐”)可包括类固醇酸(及其阴离子)及其盐,发现于动物(例如,人)的胆汁中,作为非限制性示例包括,胆酸、胆酸盐、脱氧胆酸、脱氧胆酸盐、猪脱氧胆酸、猪脱氧胆酸盐、甘氨酸胆酸、甘氨酸胆酸盐、牛磺胆酸、牛磺胆酸盐、鹅脱氧胆酸、鹅脱氧胆酸盐、石胆酸、石胆酸盐等,或其盐。在一些实施方案中,胆酸是熊脱氧胆酸(ursodiol)、异石胆酸盐、别异石胆酸盐、脱水石胆酸盐或5- β -胆烷酸(5- β -cholanolic acid)。牛磺胆酸和牛磺胆酸盐在本文中称为TCA。本文使用的对胆酸的任何提及可包括对胆酸、一种且仅一种胆酸、一种或多种胆酸或至少一种胆酸的提及。此外,药学上可接受的胆酸酯可用作本文所述的“胆酸”,例如与氨基酸(例如,甘氨酸或牛磺酸)缀合的胆酸。其他胆酸酯可包括例如取代或未取代的烷基酯、取代或未取代的杂烷基酯、取代或未取代的芳基酯、取代或未取代的杂芳基酯等。例如,术语“胆酸”可包括与甘氨酸或牛磺酸缀合的胆酸:分别为甘氨酸胆酸盐(glycocholate)和牛磺胆酸盐(taurocholate)(及其盐)。对本文所用的胆酸的任何提及可包括对天然或合成制备的相同化合物的提及。此外,应当理解,对本文使用的组分(胆酸或其他)的任何单数形式的提及都可包括对一旦仅一、一或多、或至少一个此类组分的提及。类似地,除非另有说明,否则对本文中使用的组分的任何复数形式的提及可包括对一旦仅一、一或多、或至少一个此类组分的提及。

[0110] 在本文的递送媒介物的一些实施方案中,胆汁盐可以是胆酸。在一些实施方案中,胆汁盐可以是脱氧胆酸盐。在一些实施方案中,胆汁盐的并入可以是胆酸和脱氧胆酸盐。在一些实施方案中,胆汁盐可包含胆酸盐、脱氧胆酸盐、它们的缀合物和衍生物,或其组合。在进一步的实施方案中,胆汁盐可以是鹅脱氧胆酸、石胆酸、牛磺脱氧胆酸或其组合。

[0111] 在一些实施方案中,递送媒介物的脂质纳米颗粒中(或包含脂质纳米颗粒的组合物中)的胆汁盐浓度可包含约80摩尔%至约10摩尔%,例如约80摩尔%至约70摩尔%、约65摩尔%至约55摩尔%、约60摩尔%至约50%、约55摩尔%至约45摩尔%、约50摩尔%至约40摩尔%、约45摩尔%至约35摩尔%、约40摩尔%至约30摩尔%、约35摩尔%至约25摩尔%、约30摩尔%至约20摩尔%、约25摩尔%至约15摩尔%、约20摩尔%至约10摩尔%、约15摩尔%至约10摩尔%、约60摩尔%至约20摩尔%、从约25.9摩尔%、从约30.4摩尔%、约34.9摩尔%、从约39.4摩尔%、从约37.1摩尔%、从约43.9摩尔%或约45摩尔%。在一些情况下,递送媒介物的脂质纳米颗粒中(或包含脂质纳米颗粒的组合物中)的胆汁盐浓度可包含约5摩尔%、10摩尔%、15摩尔%、20摩尔%、25摩尔%、30摩尔%、35摩尔%、40摩尔%、45摩尔%、50摩尔%、55摩尔%、60摩尔%、65摩尔%、70摩尔%、75摩尔%、80摩尔%或85摩尔%。

[0112] 利用递送媒介物的结构,例如本文所述的具有包含在脂质纳米颗粒中的胆汁盐的组合物,细胞摄取效率可允许有效穿透并通过粘液层转运至靶细胞,并由此具有有效的靶细胞摄取,例如,摄取可以是或约是接触的细胞总数的20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.9%或超过99.9%。在一些实施方案中,与包含胆汁盐的

相当递送媒介物相比,所述组合物可具有更高百分比的细胞摄取。改善可以从约10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%或高至约80%更好。在一些情况下,通过如本文所述的递送媒介物组合物递送至细胞的多核酸负载物的转染或整合效率可以比不含胆汁盐和附加特征(例如MPP和/或特定脂质组合物)的相当递送媒介物好从约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%或高至65%。在一些情况下,通过如本文所述的递送媒介物组合物递送至细胞的多核酸负载物的转染或整合效率可以比不含胆汁盐的相当的递送媒介物好从约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%或高至65%。

[0113] 在一些实施方案中,递送媒介物的稳定性可以通过胆汁盐稳定性测定法在高胆汁盐模拟环境中测量。例如,胆汁盐稳定性可以通过荧光光谱法测量,例如在福斯特共振能量转移(FRET)测定法中,包含不同浓度胆汁盐的递送媒介物的相对荧光。在一些实施方案中,并入的胆汁盐(一种或多种)可将递送媒介物的稳定性提高约80%至约10%,例如约80%至约70%、约65%至约55%、约60%至约50%、约55%至约45%、约50%至约40%、约45%至约35%、约40%至约30%、约35%至约25%、约30%至约20%、约25%至约15%、约20%至约10%、约15%至约10%、约60%至约20%、约25.9%、约30.4%、约34.9%、约39.4%、约37.1%、约43.9%或约45%。在一些实施方案中,与缺乏胆汁盐的相当的递送媒介物相比,并入的胆汁盐可以增加递送媒介物的稳定性。在一些情况下,与缺乏胆汁盐的相当的递送媒介物相比,本文提供的包含胆汁盐的递送媒介物可具有改善的运输、靶细胞转染、上皮到达或其组合。在一些情况下,与缺乏胆汁盐的相当递送媒介物相比,所述改善是从约1倍、50倍、99倍、148倍、197倍、246倍、295倍、344倍、393倍、442倍、491倍、540倍、589倍、638倍、687倍、736倍、785倍、834倍、883倍、932倍、981倍或高至约1000倍。在一些示例中,稳定性增加的百分比可以通过体内或离体测定(例如FRET)中增加的相对荧光单位或相对发光单位来测量。

[0114] 在一些实施方案中,本公开的递送媒介物可包含阳离子脂质和胆汁盐,其中脂质可以是饱和阳离子脂质或不饱和阳离子脂质,其中饱和阳离子脂质可具有至少约20°C的相变温度。在一些实施方案中,本公开的递送媒介物可包含至少一种饱和阳离子脂质和至少一种胆汁盐,其中所述至少一种饱和阳离子脂质可具有至少约37°C的相变温度。在一些实施方案中,饱和阳离子脂质具有至少约20°C、22°C、24°C、26°C、28°C、30°C、32°C、34°C、36°C、38°C、40°C、42°C、44°C、46°C、48°C、50°C、52°C、54°C、56°C、58°C和/或高达约60°C的相变温度。例如,饱和阳离子脂质的相变温度可以是30°C-60°C、35°C-60°C、37°C-60°C、37°C-55°C、37°C-50°C、37°C-45°C或37°C-40°C。在一些实施方案中,本公开的递送媒介物可包含至少一种饱和阳离子脂质和至少一种胆汁盐,其中所述至少一种饱和阳离子脂质可具有至少约37°C的相变温度。脂质递送媒介物可进一步包含饱和非阳离子脂质。饱和非阳离子脂质的相变温度可以是至少约20°C、22°C、24°C、26°C、28°C、30°C、32°C、34°C、36°C、38°C、40°C、42°C、44°C、46°C、48°C、50°C、52°C、54°C、56°C、58°C和/或高达约60°C。例如,饱和非阳离子脂质的相变温度可以是约30°C-60°C、35°C-60°C、37°C-60°C、37°C-55°C、37°C-50°C、37°C-45°C或37°C-40°C。在一些情况下,脂质递送媒介物可进一步包含与亲水聚合物例如聚乙二醇(PEG)缀合的脂质。在一些情况下,递送媒介物可与以下的至少一种缀合:细胞穿透肽、配体、粘液穿透聚合物、能够实现穿透粘液的肽、基本上不具有粘液粘附性的细胞穿

透肽,或其任意组合。

[0115] 在一些实施方案中,提供了在脂质结构例如脂质纳米颗粒中包含负载物的递送媒介物,并且其中脂质纳米颗粒包含胆汁盐和以下至少一者:(a)相变温度为至少约37°C的饱和阳离子脂质,和非阳离子脂质;(b)饱和阳离子脂质、不饱和阳离子脂质、非阳离子脂质,其中不饱和阳离子脂质、非阳离子脂质或不饱和阳离子脂质和非阳离子脂质的相变温度为至少约37°C;或(c)多价阳离子脂质、非阳离子脂质,其中多价阳离子脂质、非阳离子脂质或多价阳离子脂质和非阳离子脂质的相变温度为至少约37°C,其中与在其他方面相同而(i)不包含含有胆汁盐和(a)、(b)或(c)中的至少一者,(ii)包含含有(a)、(b)或(c)中的至少一者但不含胆汁盐;或(iii)包含胆汁盐但不包含(a)、(b)或(c)中的至少一者的递送媒介物相比,所述递送媒介物在高胆汁盐环境中是稳定的。饱和阳离子脂质、不饱和阳离子脂质、非阳离子脂质和/或多价阳离子脂质的相变温度可以是至少约20°C、22°C、24°C、26°C、28°C、30°C、32°C、34°C、36°C、38°C、40°C、42°C、44°C、46°C、48°C、50°C、52°C、54°C、56°C、58°C和/或高达约60°C。例如,饱和阳离子脂质、不饱和阳离子脂质、非阳离子脂质和/或多价阳离子脂质的相变温度可以是约30°C-60°C、35°C-60°C、37°C-60°C、37°C-55°C、37°C-50°C、37°C-45°C或37°C-40°C。

[0116] 在一些实施方案中,提供了包含负载物和脂质结构例如脂质纳米颗粒的递送媒介物,其中脂质纳米颗粒包含胆汁盐和以下的至少一者:(a)相变温度为至少约37°C的饱和阳离子脂质;(b)饱和阳离子脂质、不饱和阳离子脂质、非阳离子脂质,其中不饱和阳离子脂质、非阳离子脂质或不饱和阳离子脂质和非阳离子脂质的相变温度为至少约37°C;或(c)多价阳离子脂质和非阳离子脂质,其中多价阳离子脂质、非阳离子脂质或多价阳离子脂质和非阳离子脂质的相变温度为至少约37°C,其中与在其他方面相同但(i)不包含含有胆汁盐和(a)、(b)或(c)中的至少一者,(ii)包含含有(a)、(b)或(c)中的至少一者但不含胆汁盐,或(iii)包含胆汁盐但不包含(a)、(b)或(c)中的至少一者的递送媒介物相比,所述递送媒介物在含有至少约5g/L的胆酸和脱氧胆酸盐的溶液中表现出增加的稳定性,其中稳定性是在福斯特共振能量转移(FRET)测定中,通过并入脂质纳米颗粒的荧光脂质的相对荧光强度来测量的。在一些情况下,与其他相同但(i)不包含胆汁盐的递送媒介物相比,所述递送媒介物在含有至少约0.5g/L、1g/L、5g/L、7g/L、9g/L、11g/L、13g/L、15g/L、17g/L、19g/L、21g/L、23g/L或高达约25g/L的胆酸,例如约40%、45%、50%或高达约55%的胆酸和约40%、45%、50%、55%或高达约60%的脱氧胆酸盐的溶液中表现出增加的稳定性,其中稳定性是在福斯特共振能量转移(FRET)测定中,通过并入脂质纳米颗粒的荧光脂质的相对荧光强度来测量的。

[0117] 在一些实施方案中,提供了包含(i)负载物和(ii)脂质结构例如脂质纳米颗粒的递送媒介物,其中脂质纳米颗粒包含至少一种饱和阳离子脂质和胆汁盐,其中所述至少一种饱和阳离子脂质的相变温度为至少约37°C。在一些实施方案中,提供了包含(i)负载物和(ii)脂质纳米颗粒的递送媒介物,其中脂质纳米颗粒包含至少一种饱和脂质、至少一种不饱和阳离子脂质和胆汁盐,其中脂质纳米颗粒中所述至少一种不饱和阳离子脂质的浓度小于50摩尔%。

[0118] 示例性递送媒介物在本文中描述并提供在例如表1、表2、表3和表4中。表1-表4中示例的递送媒介物中的任一种可以进行进一步修饰。例如,可以进行额外的脂质、负载物、

对其修饰、对其添加、对其删减。在一些情况下,表1中递送媒介物的任何一种可进一步包含脂质-PEG。

[0119] 表1:用于递送负载物的示例性递送媒介物。缩写:BS:胆汁盐,SC:饱和阳离子,UC:不饱和阳离子,SN:饱和非阳离子,UN:不饱和非阳离子,MV:多价阳离子,SMV:多价阳离子的饱和的,UMV:多价阳离子的不饱和的。如果公式中出现“x”,则表示至少一个(即,x等于或大于1)。

[0120]	SN:UC:BS
	SN:SMV:BS
	SN:UMV:BS
	SN:[(UC) _x + (MV) _x + (UN) _x +(SN) _x]:BS
	SC:BS
[0121]	SC:UN:BS
	SC:UC:BS
	SC:UMV:BS
	SC:SN:BS
	SC:[(UC) _x + (MV) _x + (SN) _x + (SC) _x]:BS
	SMV:BS
	SMV:UN:BS
	SMV:SN:BS
	SMV:[(UC) _x + (MV) _x + (SN) _x + (SC) _x]:BS
	UMV:UN:BS

[0122] 用于递送媒介物中的脂质

[0123] 本文的递送媒介物,包括带有负载物的那些递送媒介物,包含一种或多种脂质,例如在脂质纳米颗粒中。在一些实施方案中,脂质纳米颗粒包含至少一种饱和脂质,不饱和阳离子脂质或不饱和非阳离子脂质的至少一种,和胆汁盐。在一些实施方案中,脂质纳米颗粒包含至少一种饱和脂质,其中所述饱和脂质包括相变温度为至少约37℃的饱和阳离子脂质或相变温度为至少约37℃的饱和非阳离子脂质。在一些方面,脂质纳米颗粒进一步包含以下的至少一种:非阳离子脂质、多价阳离子脂质、永久带电的阳离子脂质或其任意组合。在一些实施方案中,脂质纳米颗粒包含胆汁盐和多价阳离子脂质和非阳离子脂质,其中多价阳离子脂质、非阳离子脂质或多价阳离子脂质和非阳离子脂质的相变温度为至少约37℃。在一些实施方案中,脂质纳米颗粒包含胆汁盐,和相变温度为至少约37℃的饱和阳离子脂质,和非阳离子脂质。在一些实施方案中,脂质纳米颗粒包含胆汁盐和饱和阳离子脂质,不饱和阳离子脂质,和非阳离子脂质,其中不饱和阳离子脂质、非阳离子脂质或不饱和阳离子

脂质和非阳离子脂质的相变温度为至少约37℃。在一些实施方案中,递送媒介物具有在约5.5至8.0之间的pH下带正电荷的第一位点,和在约5.5至8.0之间的pH下带负电荷的第二位点,其中第一和第二位点是分离的,使得正电荷和负电荷不散布,并且其中的一个或两个位点含有脂质。在一些实施方案中,第一位点包含饱和或短尾脂质,例如阳离子脂质或可离子化的阳离子脂质,例如多价阳离子脂质或单价阳离子脂质。

[0124] 在一个方面,用于本文的递送媒介物的脂质纳米颗粒中的阳离子脂质可包括N-(2,3-二油烯基氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTMA)、[1,2-双(油酰基氧基)-3-(三甲基氨基)丙烷](DOTAP)、二甲基双十八烷基铵(dimethyldioctadecylammonium,DDA)、3β-[N-(N',N'-二甲基氨基乙烷)-氨基甲酰基]胆固醇(3β[N-(N',N'-dimethylaminoethane)-carbamoyl]cholesterol,DC-Chol)和双十八烷基酰氨基甘氨酸羧基精胺(DOGS)。二油酰基磷脂酰乙醇胺(DOPE)、聚乙烯亚胺(polyethyleneimines,PEI)、中性脂质,由于其在低pH下的膜去稳定效应(可以帮助内溶酶体逃逸),而通常可与阳离子脂质缀合使用。在一些实施方案中,饱和阳离子脂质可用于本文提供的递送媒介物中。饱和阳离子脂质可在pH 4或大于pH 4的pH下带正电荷。在一些实施方案中,饱和阳离子脂质可包含以下的至少一种:1,2-二烷基-sn-甘油-3-乙基磷酸胆碱、1,2-二烷基-3-二甲基铵基-丙烷、1,2-二烷基-3-三甲基铵基-丙烷、1,2-二-0-烷基-3-三甲基铵基丙烷、1,2-二烷基氧基-3-二甲基氨基丙烷、N,N-二烷基-N,N-二甲基铵、N-(4-羧基苄基)-N,N-二甲基-2,3-双(烷基氧基)丙烷-1-铵、1,2-二烷基-sn-甘油-3-[(N-(5-氨基-1-羧基戊基)亚氨基二乙酸)琥珀酰基]、N1-[2-((1S)-1-[(3-氨基丙基)氨基]-4-[二(3-氨基-丙基)氨基]丁基酰胺基)乙基]-3,4-二[烷基]-苯甲酰胺或其任意组合。在饱和阳离子脂质包含烷基的示例中,烷基可以是以下至少一种的缀合衍生物:肉豆蔻酰基(myristoyl)、十五烷酰基(pentadecanoyl)、棕榈酰基(palmitoyl)、十七烷酰基(heptadecanoyl)、硬脂酰基(stearoyl)、月桂酰基(lauroyl)、十三烷酰基(tridecanoyl)、十九烷酰基(nonadecanoyl)、花生酰基(arachidoyl)、二十一烷酰基(heneicasnoyl)、山萮酰基(behenoyl)、二十三烷酰基(tricosanoyl)、二十四烷酰基(lignoceroyl)或其任意组合。在一些实施方案中,饱和阳离子脂质可包含以下的至少一种:相变温度为至少约37℃的饱和阳离子脂质包含以下至少一种:1,2-硬脂酰基-3-三甲基铵基-丙烷(DSTAP)、1,2-二棕榈酰基-3-三甲基铵基-丙烷(DPTAP)、1,2-二硬脂酰基-3-二甲基铵基-丙烷(DSDAP)或其任意组合。在一个方面,阳离子脂质可以在脂质结构的凝胶相中而阴离子脂质可以在液相中。

[0125] 在一些实施方案中,递送媒介物的脂质纳米颗粒可包含至少一种不饱和阳离子脂质。在一些实施方案中,不饱和阳离子脂质可以在约pH 4或在大于约pH 4且小于约pH 8的pH下具有正电荷。在一些实施方案中,不饱和阳离子脂质可包含以下的至少一种:1,2-二烷基-sn-甘油-3-乙基磷酸胆碱、1,2-二烷基-3-二甲基铵基-丙烷、1,2-二烷基-3-三甲基铵基-丙烷、1,2-二-0-烷基-3-三甲基铵基丙烷、1,2-二烷基氧基-3-二甲基氨基丙烷、N,N-二烷基-N,N-二甲基铵、N-(4-羧基苄基)-N,N-二甲基-2,3-双(烷基氧基)丙烷-1-铵、1,2-二烷基-sn-甘油-3-[(N-(5-氨基-1-羧基戊基)亚氨基二乙酸)琥珀酰基]、N1-[2-((1S)-1-[(3-氨基丙基)氨基]-4-[二(3-氨基-丙基)氨基]丁基酰胺基)乙基]-3,4-二[烷基]-苯甲酰胺、1,2-二烷基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷、4-(2,2-二辛基-9,12-二烯基-[1,3]二氧戊环-4-基甲基)-二甲胺、0-烷基乙基磷酸胆碱、MC3、MC2、MC4、3β-[N-(N',N'-二甲基氨基乙

烷)-氨基甲酰基]胆固醇、N4-胆固醇-精胺或其盐,或其任意组合。在不饱和阳离子脂质包含烷基的示例中,所述烷基可以是以下至少一种的缀合衍生物:油酸(oleic acid)、反油酸(elaidic acid)、巨头鲸鱼酸(gondoic acid)、芥酸(erucic acid)、神经酸(nervonic acid)、米德酸(mead acid)、二十烯酸(pauillinic acid)、异油酸(vaccenic acid)、棕榈烯酸(palmitoleic acid)、二十二碳四烯酸(Docosatetraenoic acid)、花生四烯酸(Arachidonic acid)、二高- γ -亚麻酸(Dihomo- γ -linolenic acid)、 γ -亚麻酸(γ -Linolenic acid)、反亚油酸(linolelaidic acid)、亚油酸(linoleic acid)、二十二碳六烯酸(Docosahexaenoic acid)、二十碳五烯酸(Eicosapentaenoic acid)、十八碳四烯酸(Stearidonic acid)、 α -亚麻酸(α -Linolenic acid)或其任意组合。在一些实施方案中,不饱和阳离子脂质可包含以下的至少一种:1,2-二烷基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷、4-(2,2-二辛基-9,12-二烯基-[1,3]二氧戊环-4-基甲基)-二甲胺、0-烷基乙基磷酸胆碱、MC3、MC2、MC4、3 β -[N-(N',N'-二甲基氨基乙烷)-氨基甲酰基]胆固醇、N4-胆固醇-精胺或其盐,或其任意组合。在一些情况下,脂质可以包含或可以是7-(4-(二甲基氨基)丁基)-7-羟基十三烷-1,13-二基二油酸酯(CL1H6)、CL1A6、CL1A6、CL3A6、CL4A6、CL5A6、CL6A6、CL7A6、CL8A6、CL9A6、CL10A6、CL11A6、CL12A6、CL13A6、CL14A6、CL15A6、YSK12-C4,如US20200129431A1和 Sato Y et al. Understanding structure-activity relationships of pH-sensitive cationic lipids facilitates the rational identification of promising lipid nanoparticles for delivering siRNAs in vivo. J Control Release. 2019;295:140-152中所述,两者均通过引用并入本文。在一个方面,阳离子脂质可以在脂质结构的液相中而阴离子脂质可以在脂质结构的凝胶相或固相中。

[0126] 在一些情况下,递送媒介物的脂质纳米颗粒可包含多价阳离子脂质。多价阳离子脂质可以选自:N1-[2-((1S)-1-[(3-氨基丙基)氨基]-4-[二(3-氨基-丙基)氨基]丁基酰胺基)乙基]-3,4-二[油基氧基]-苯甲酰胺(MVL5)、其盐及其任意组合。在一个方面,本文提供的递送媒介物可以使用MVL5产生。在一个方面,MVL5、GL67或其组合在递送媒介物的液相中。本文提供的任意多价阳离子脂质可以以小于约50摩尔%、48摩尔%、46摩尔%、44摩尔%、42摩尔%、40摩尔%、38摩尔%、36摩尔%、34摩尔%、32摩尔%、30摩尔%、28摩尔%、26摩尔%、24摩尔%、22摩尔%、20摩尔%、18摩尔%、16摩尔%、14摩尔%、12摩尔%、10摩尔%、8摩尔%、6摩尔%、4摩尔%、2摩尔%或0摩尔%并入提供的媒介物或颗粒中。本文提供的任意多价阳离子脂质可以以约50摩尔%、48摩尔%、46摩尔%、44摩尔%、42摩尔%、40摩尔%、38摩尔%、36摩尔%、34摩尔%、32摩尔%、30摩尔%、28摩尔%、26摩尔%、24摩尔%、22摩尔%、20摩尔%、18摩尔%、16摩尔%、14摩尔%、12摩尔%、10摩尔%、8摩尔%、6摩尔%、4摩尔%、2摩尔%或0摩尔%并入提供的媒介物或颗粒中。在一些实施方案中,本文提供的多价阳离子脂质可以以5-50摩尔%、5-40摩尔%、5-30摩尔%、5-25摩尔%、5-20摩尔%、5-15摩尔%、10-50摩尔%、10-40摩尔%、10-30摩尔%、10-25摩尔%、15-50摩尔%、15-40摩尔%、15-30摩尔%和15-25摩尔%的浓度并入提供的媒介物或颗粒中。

[0127] 在一些实施方案中,本文提供的递送媒介物的脂质纳米颗粒还可包含阴离子脂质。阴离子脂质可在疏水区包含任何广泛范围的脂肪酸链。并入的特定脂肪酸负责脂质结构在相行为和弹性方面的流体特性。在一些情况下,二价阳离子可以并入阴离子脂质结构以在被阴离子脂质包裹之前使核酸浓缩。数种二价阳离子可用于阴离子脂质复合物,例如

Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 和 Ba^{2+} 。在一些情况下， Ca^{2+} 可用于阴离子脂质结构。合适的阴离子脂质包括但不限于：磷脂酰甘油、心磷脂、二酰基磷脂酰丝氨酸、二酰基磷脂酸、N-十二酰基磷脂酰乙醇胺、N-琥珀酰基磷脂酰乙醇胺、N-戊二酰基磷脂酰乙醇胺、赖氨酰基磷脂酰甘油、棕榈酰基油酰基磷脂酰甘油(POPG)或其任意组合。

[0128] 在一些实施方案中，脂质纳米颗粒中的阴离子脂质包含以下的至少一种：磷脂酰甘油、心磷脂、二烷基磷脂酰丝氨酸、二烷基磷脂酸、N-十二烷基酰基磷脂酰乙醇胺、N-琥珀酰基磷脂酰乙醇胺、N-戊二酰基磷脂酰乙醇胺、赖氨酰基磷脂酰甘油、棕榈酰基油酰基磷脂酰甘油(POPG)、甘油磷酸肌醇单磷酸酯、甘油磷酸肌醇二磷酸酯、甘油磷酸肌醇三磷酸酯、甘油磷酸酯、甘油焦磷酸酯、甘油磷酸甘油磷酸甘油、胞苷-5'-二磷酸-甘油、糖基甘油磷脂、甘油磷酸肌醇聚糖、1,2-二烷基-sn-甘油-3-磷酸酯、1,2-二烷基-sn-甘油-3-磷酸甲醇、1,2-二烷基-sn-甘油-3-磷酸乙醇、1,2-二烷基-sn-甘油-3-磷酸丙醇和/或1,2-二烷基-sn-甘油-3-磷酸丁醇。在阴离子脂质与烷基缀合且阴离子脂质存在于液相的一些方面中，烷基是以下至少一种的缀合衍生物：油酸、反油酸、巨头鲸鱼酸、芥酸、神经酸、米德酸、二十烯酸、异油酸、棕榈烯酸、二十二碳四烯酸、花生四烯酸、二高- γ -亚麻酸、 γ -亚麻酸、反亚油酸、亚油酸、二十二碳六烯酸、二十碳五烯酸、十八碳四烯酸、 α -亚麻酸或其盐，或其任意组合。在其他情况下，烷基是以下至少一种的缀合衍生物：肉豆蔻酸、十五烷酸、棕榈酸、十七烷酸、硬脂酸、月桂酸、十三烷酸、十九烷酸、花生酸、二十一烷酸、山萘酸、二十三烷酸、二十四烷酸和/或其盐，或其任意组合。在上文中，如果烷基的相变温度 $>37^{\circ}\text{C}$ ，则认为其在凝胶相中，否则其存在于液相中。

[0129] 在一个方面，阴离子脂质可以是相变温度高于 37°C 的饱和脂质，这样的脂质可用于固相而阳离子脂质在液相中。在阴离子脂质是转变温度低于 37°C 的不饱和或短链脂质的情况下，它可以应用于液相中，阳离子脂质可用于凝胶相或固相中。

[0130] 在一个方面，脂质纳米颗粒中至少一种不饱和阳离子脂质和/或不饱和非阳离子脂质的浓度可以是脂质纳米颗粒的总脂质浓度的小于50摩尔%、45摩尔%、40摩尔%、35摩尔%、30摩尔%、25摩尔%、20摩尔%、15摩尔%、10摩尔%、5摩尔%或2摩尔%。在一些实施方案中，脂质纳米颗粒中至少一种不饱和阳离子脂质和/或不饱和非阳离子脂质的浓度可以是脂质纳米颗粒的总脂质浓度的约50摩尔%、45摩尔%、40摩尔%、35摩尔%、30摩尔%、25摩尔%、20摩尔%、15摩尔%、10摩尔%、5摩尔%或2摩尔%。在一些实施方案中，脂质纳米颗粒中至少一种不饱和阳离子脂质和/或不饱和非阳离子脂质的浓度可以是5-50摩尔%、5-40摩尔%、5-30摩尔%、5-25摩尔%、5-20摩尔%、5-15摩尔%、10-50摩尔%、10-40摩尔%、10-30摩尔%、10-25摩尔%、15-50摩尔%、15-40摩尔%、15-30摩尔%和15-25摩尔%。

[0131] 在一些情况下，递送媒介物可包含高温相变脂质，例如高温相变中性脂质如DSPC，和胆汁盐如脱氧胆酸盐、胆酸或其缀合物。脱氧胆酸盐可用作固相(凝胶相)，在此脱氧胆酸盐提供负电荷。在相同的递送媒介物上，阳离子脂质可以作为不饱和或短尾脂质存在并且可以存在于液相中。多价阳离子脂质，例如MVL5，可用于产生足够的正负电荷比，以为系统提供吸引和排斥的平衡，从而产生含电荷分离的递送媒介物。

[0132] 在一些实施方案中，递送媒介物可进一步包含缀合脂质，其中所述缀合脂质可包含与稳化组分缀合的脂质。在一些实施方案中，稳化组分可包含亲水聚合物。在一些实施方

案中,亲水聚合物可包含聚乙二醇、聚(2-烷基-2-噁唑啉)、聚乙烯醇或其任意组合。在一些实施方案中,亲水聚合物可包含至少约500Da至约500kDa、至少约的分子量。在一些实施方案中,亲水聚合物可包含聚乙二醇(PEG),并且其中缀合脂质包含聚乙二醇化的脂质。在一些实施方案中,聚乙二醇化脂质可包含DSPE-PEG、DSG-PEG、DPG-PEG、DAG-PEG、DMG-PEG、DPPE-PEG、DMPE-PEG或其任意组合。

[0133] 在一些情况下,缀合脂质的浓度可以小于约或大于约以下:0摩尔%、0.5摩尔%、1摩尔%、1.5摩尔%、2摩尔%、2.5摩尔%、3摩尔%、3.5摩尔%、4摩尔%、4.5摩尔%、5摩尔%、5.5摩尔%、6摩尔%、6.5摩尔%、7摩尔%、7.5摩尔%、8摩尔%、8.5摩尔%、9摩尔%、9.5摩尔%、10摩尔%、10.5摩尔%、11摩尔%、11.5摩尔%、12摩尔%、12.5摩尔%、13摩尔%、13.5摩尔%、14摩尔%、14.5摩尔%、15摩尔%、15.5摩尔%、16摩尔%、16.5摩尔%、17摩尔%、17.5摩尔%、18摩尔%、18.5摩尔%、19摩尔%、19.5摩尔%、20摩尔%、20.5摩尔%、21摩尔%、21.5摩尔%、22摩尔%、22.5摩尔%、23摩尔%、23.5摩尔%、24摩尔%、24.5摩尔%、25摩尔%、25.5摩尔%、26摩尔%、26.5摩尔%、27摩尔%、27.5摩尔%、28摩尔%、28.5摩尔%、29摩尔%、29.5摩尔%或30摩尔%。在一些情况下,缀合脂质的浓度为约0.5摩尔%至约20摩尔%、0.5摩尔%至约5摩尔%、0.5摩尔%至约10摩尔%、5摩尔%至约10摩尔%或10摩尔%至约20摩尔%。

[0134] 在一些情况下,胆汁盐可用作递送媒介物中的阴离子组分。在其他情况下,非胆汁盐可用作阴离子组分。在一些实施方案中,递送媒介物稳定性可以随着胆汁盐(本文也称为胆酸)的并入(incorporation)而增加,所述胆汁盐例如胆酸、胆酸盐、脱氧胆酸、脱氧胆酸盐、猪脱氧胆酸、猪脱氧胆酸盐、甘氨酸胆酸、甘氨酸胆酸盐、牛磺胆酸、牛磺胆酸盐、鹅脱氧胆酸、鹅脱氧胆酸盐、石胆酸和石胆酸盐。在一些实施方案中,胆汁盐可以是胆酸。在进一步的实施方案中,胆汁盐可以是脱氧胆酸盐。在一些实施方案中,胆汁盐的并入可以是胆酸和脱氧胆酸盐。在一些实施方案中,递送媒介物的稳定性可以在高胆汁盐模拟环境中通过胆汁盐稳定性测定来测量。例如,胆汁盐稳定性可以通过荧光光谱法测量,例如测量在福斯特共振能量转移(FRET)测定中含不同浓度胆汁盐的递送媒介物的相对荧光。在一些实施方案中,并入的胆汁盐可将递送媒介物的稳定性提高约80%至约10%,例如约80%至约70%、约65%至约55%、约60%至约50%、约55%至约45%、约50%至约40%、约45%至约35%、约40%至约30%、约35%至约25%、约30%至约20%、约25%至约15%、约20%至约10%、约15摩尔%至约10%、约60%至约20%、约25.9%、约30.4%、约34.9%、约39.4%、约37.1%、约43.9%或约45%。在一些示例中,稳定性增加的百分比可以通过测定(例如FRET)中增加的相对荧光单位或相对发光单位来测量。

[0135] 在一些情况下,本文提供的递送媒介物可包含多价脂质、阳离子脂质、结构脂质、胆汁盐或脂质-PEG的至少一种。本文提供的任何或所有脂质可以以任何摩尔%配制,例如,包括但不限于:0摩尔%、0.5摩尔%、1摩尔%、1.5摩尔%、2摩尔%、2.5摩尔%、3摩尔%、3.5摩尔%、4摩尔%、4.5摩尔%、5摩尔%、5.5摩尔%、6摩尔%、6.5摩尔%、7摩尔%、7.5摩尔%、8摩尔%、8.5摩尔%、9摩尔%、9.5摩尔%、10摩尔%、10.5摩尔%、11摩尔%、11.5摩尔%、12摩尔%、12.5摩尔%、13摩尔%、13.5摩尔%、14摩尔%、14.5摩尔%、15摩尔%、15.5摩尔%、16摩尔%、16.5摩尔%、17摩尔%、17.5摩尔%、18摩尔%、18.5摩尔%、19摩尔%、19.5摩尔%、20摩尔%、20.5摩尔%、21摩尔%、21.5摩尔%、22摩尔%、22.5摩尔%、

23摩尔%、23.5摩尔%、24摩尔%、24.5摩尔%、25摩尔%、25.5摩尔%、26摩尔%、26.5摩尔%、27摩尔%、27.5摩尔%、28摩尔%、28.5摩尔%、29摩尔%、29.5摩尔%、30摩尔%、30.5摩尔%、31摩尔%、31.5摩尔%、32摩尔%、32.5摩尔%、33摩尔%、33.5摩尔%、34摩尔%、34.5摩尔%、35摩尔%、35.5摩尔%、36摩尔%、36.5摩尔%、37摩尔%、37.5摩尔%、38摩尔%、38.5摩尔%、39摩尔%、39.5摩尔%、40摩尔%、40.5摩尔%、41摩尔%、41.5摩尔%、42摩尔%、42.5摩尔%、43摩尔%、43.5摩尔%、44摩尔%、44.5摩尔%、45摩尔%、45.5摩尔%、46摩尔%、46.5摩尔%、47摩尔%、47.5摩尔%、48摩尔%、48.5摩尔%、49摩尔%、49.5摩尔%、50摩尔%、50.5摩尔%、51摩尔%、51.5摩尔%、52摩尔%、52.5摩尔%、53摩尔%、53.5摩尔%、54摩尔%、54.5摩尔%、55摩尔%、55.5摩尔%、56摩尔%、56.5摩尔%、57摩尔%、57.5摩尔%、58摩尔%、58.5摩尔%、59摩尔%、59.5摩尔%、60摩尔%、60.5摩尔%、61摩尔%、61.5摩尔%、62摩尔%、62.5摩尔%、63摩尔%、63.5摩尔%、64摩尔%、64.5摩尔%、65摩尔%、65.5摩尔%、66摩尔%、66.5摩尔%、67摩尔%、67.5摩尔%、68摩尔%、68.5摩尔%、69摩尔%、69.5摩尔%、70摩尔%、70.5摩尔%、71摩尔%、71.5摩尔%、72摩尔%、72.5摩尔%、73摩尔%、73.5摩尔%、74摩尔%、74.5摩尔%、75摩尔%、75.5摩尔%、76摩尔%、76.5摩尔%、77摩尔%、77.5摩尔%、78摩尔%、78.5摩尔%、79摩尔%、79.5摩尔%或80摩尔%。

[0136] 在一些实施方案中,本文的递送媒介物可包括额外的组分。例如,用于递送媒介物的脂质结构可包括脂质双层。在某些情况下,脂质双层可以由一种或多种选自以下组成的组的组合物产生:磷脂、磷脂酰-胆碱、磷脂酰-丝氨酸、磷脂酰-二乙醇胺、磷脂酰肌醇、鞘脂和乙氧基化甾醇或其混合物。在此类实施方案的说明性示例中,磷脂可以是卵磷脂;磷脂酰肌醇可以衍生自大豆、油菜(rape)、棉籽、蛋及其混合物;鞘脂可以是神经酰胺、脑苷脂、鞘氨醇和鞘磷脂,及其混合物;乙氧基化甾醇可以是植物甾醇、PEG-(聚乙二醇)-5油菜籽甾醇。在某些实施方案中,植物甾醇包含以下组合物中的至少两种的混合物:谷甾醇(sitosterol)、菜油甾醇(camposterol)和豆甾醇(stigmasterol)。在其他实施方案中,脂质层可以包含一种或多种选自包含以下的组的磷脂酰基团:磷脂酰胆碱、磷脂酰-乙醇胺、磷脂酰-丝氨酸、磷脂酰-肌醇、溶血-磷脂酰-胆碱、溶血-磷脂酰-乙醇胺、溶血-磷脂酰-肌醇或溶血-磷脂酰-肌醇。在其他情况下,脂质双层可以包含选自单酰基或二酰基磷酸甘油脂的磷脂。在其他情况下,脂质双层可以包含一种或多种选自包含以下的组的磷酸肌醇:磷脂酰-肌醇-3-磷酸酯(PI-3-P)、磷脂酰-肌醇-4-磷酸酯(PI-4-P)、磷脂酰-肌醇-5-磷酸酯(PI-5-P)、磷脂酰-肌醇-3,4-二磷酸酯(PI-3,4-P2)、磷脂酰-肌醇-3,5-二磷酸酯(PI-3,5-P2)、磷脂酰-肌醇-4,5-二磷酸酯(PI-4,5-P2)、磷脂酰-肌醇-3,4,5-三磷酸酯(PI-3,4,5-P3)、溶血磷脂酰-肌醇-3-磷酸酯(LPI-3-P)、溶血磷脂酰-肌醇-4-磷酸酯(LPI-4-P)、溶血磷脂酰-肌醇-5-磷酸酯(LPI-5-P)、溶血磷脂酰-肌醇-3,4-二磷酸酯(LPI-3,4-P2)、溶血磷脂酰-肌醇-3,5-二磷酸酯(LPI-3,5-P2)、溶血磷脂酰-肌醇-4,5-二磷酸酯(LPI-4,5-P2)和溶血磷脂酰-肌醇-3,4,5-三磷酸酯(LPI-3,4,5-P3)、磷脂酰-肌醇(PI)或溶血磷脂酰-肌醇(LPI)。

[0137] 用作递送媒介物的脂质结构可以被修饰。修饰可以是表面修饰。与相当的脂质结构相比,表面修饰可以提高脂质结构在粘液中移动的平均速率。相当的脂质结构可能未经过表面修饰,或者相当的脂质结构可以用聚乙二醇(PEG)聚合物进行修饰。修饰可以促进防

止体内降解。修饰还可以有助于脂质结构的运输。例如,由于pH敏感性修饰,修饰可允许脂质结构在具有酸性pH的胃肠(GI)通道内运输。表面修饰还可以提高脂质结构在粘液中移动的平均速率。例如,当与没有修饰的相当的脂质结构或具有包含PEG的修饰的脂质结构相比时,修饰可以将速率提高1X、2X、3X、4X、5X、6X、7X、8X、9X、10X、20X、30X、40X、50X、60X、70X、80X、90X、100X、300X、500X、700X、900X或高达约1000X。在一些情况下,对脂质结构的修饰通过键发生。键可以是共价键、非共价键、极性键、离子键、氢键或其任意组合。键可以被认为是两个基团或基团的部分的缔合(association)。例如,脂质结构可以通过包含共价键的接头与PEG键合。在一些情况下,键合可以在两个相邻基团之间发生。键可以是动态的。当一个基团临时与另一个基团缔合时,就会产生动态键。例如,在脂质体内部悬浮的多核酸可以在其悬浮期间与脂质双层的部分键合。

[0138] 在一些情况下,修饰可以是聚乙二醇(PEG)添加。用PEG修饰脂质结构表面的方法可包括其物理吸附在脂质结构表面上、其共价连接在脂质结构上、其包被在脂质结构上,或以上任意组合。在一些情况下,PEG可以在脂质结构形成之前与脂质颗粒共价连接。可以使用多种分子量的PEG。PEG可以是约10至约100个乙烯PEG组分单元,其可通过胺基与磷脂缀合,包含或包含约脂质结构中包含的脂质重量的约1%至约20%、优选约5%至约15%、约10%。

[0139] 在一些情况下,脂质结构可包含磷脂酰胆碱。示例性的磷脂酰胆碱包括但不限于二月桂基磷脂酰胆碱、二肉豆蔻酰基磷脂酰胆碱、二棕榈酰基磷脂酰胆碱、二硬脂酰基磷脂酰胆碱、二花生酰基磷脂酰胆碱、二油酰基磷脂酰胆碱、二亚油酰基磷脂酰胆碱、二芥酰基磷脂酰胆碱、棕榈酰基-油酰基-磷脂酰胆碱、蛋磷脂酰胆碱、肉豆蔻酰基-棕榈酰基磷脂酰胆碱、棕榈酰基-肉豆蔻酰基-磷脂酰胆碱、肉豆蔻酰基-硬脂酰基磷脂酰胆碱、棕榈酰基-硬脂酰基-磷脂酰胆碱、硬脂酰基-棕榈酰基磷脂酰胆碱、硬脂酰基-油酰基-磷脂酰胆碱、硬脂酰基-亚油酰基磷脂酰胆碱和棕榈酰基-亚油酰基-磷脂酰胆碱。不对称的磷脂酰胆碱可称为1-酰基-2-酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱,其中酰基彼此不同。对称的磷脂酰胆碱可以称为1,2-二酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱。如本文所用,缩写“PC”是指磷脂酰胆碱。磷脂酰胆碱1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱在本文中可缩写为“DMPC”。磷脂酰胆碱1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱在本文中可缩写为“DOPC”。磷脂酰胆碱1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱在本文中可缩写为“DPPC”。通常来说,在各种脂质中发现的饱和酰基包括具有以下名称的基团:丙酰基、丁酰基、戊酰基、己酰基、庚酰基、辛酰基、壬酰基、癸酰基、十一烷酰基、月桂酰基、十三烷酰基、肉豆蔻酰基、十五烷酰基、棕榈酰基、植烷酰基(phytanoyl)、十七烷酰基、硬脂酰基、十九烷酰基、花生酰基、二十一烷酰基、山萘酰基、二十三烷酰基和二十四烷酰基。饱和酰基的相应IUPAC名称为三酸、四酸、戊酸、己酸、庚酸、辛酸、壬酸、癸酸、十一烷酸、十二烷酸、十三烷酸、十四烷酸、十五烷酸、十六烷酸、3,7,11,15-四甲基十六烷酸、十七烷酸、十八烷酸、十九烷酸、二十烷酸、二十一烷酸、二十二烷酸、二十三烷酸根和二十四烷酸根。在对称和不对称的磷脂酰胆碱中发现的不饱和酰基包括肉豆蔻酰基、棕榈油酰基、油酰基、反油酰基、亚油酰基、亚麻油酰基、二十烷酰基和花生四烯酰基。不饱和酰基基团的对应IUPAC名称为9-顺式-十四烷酸、9-顺式-十六烷酸、9-顺式-十八烷酸、9-反式-十八烷酸、9-顺式-12-顺式-十八碳二烯酸、9-顺式-12-顺式-15-顺式十八碳三烯酸、11-顺式-二十碳烯酸根和5-顺式-8-顺式-11-顺式-14-顺式-二十碳四烯酸根。示例性的磷

脂酰乙醇胺包括二肉豆蔻酰基-磷脂酰乙醇胺、二棕榈酰基-磷脂酰乙醇胺、二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺、二油酰基-磷脂酰乙醇胺和蛋磷脂酰乙醇胺。磷脂酰乙醇胺在IUPAC命名系统下也可称为1,2-二酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺或1-酰基-2-酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺,这取决于它们是对称的还是不对称的脂质。示例性的磷脂酸包括二肉豆蔻酰基磷脂酸、二棕榈酰基磷脂酸和二油酰基磷脂酸。磷脂酸在IUPAC命名系统下也可称为1,2-二酰基-sn-甘油-3-磷酸酯或1-酰基-2-酰基-sn-甘油-3-磷酸酯,这取决于它们是对称的还是不对称的脂质。示例性的磷脂酰丝氨酸包括二肉豆蔻酰基磷脂酰丝氨酸、二棕榈酰基磷脂酰丝氨酸、二油酰基磷脂酰丝氨酸、二硬脂酰基磷脂酰丝氨酸、棕榈酰基-油基磷脂酰丝氨酸和脑磷脂酰丝氨酸。磷脂酰丝氨酸在IUPAC命名系统下也可称为1,2-二酰基-sn-甘油-3-[磷酸-L-丝氨酸]或1-酰基-2-酰基-sn-甘油-3-[磷酸-L-丝氨酸],这取决于它们是对称的还是不对称的脂质。如本文所用,缩写“PS”是指磷脂酰丝氨酸。示例性的磷脂酰甘油包括二月桂酰基磷脂酰甘油、二棕榈酰基磷脂酰甘油、二硬脂酰基磷脂酰甘油、二油酰基磷脂酰甘油、二肉豆蔻酰基磷脂酰甘油、棕榈酰基-油酰基-磷脂酰甘油和蛋磷脂酰甘油。磷脂酰甘油在IUPAC命名系统下也可称为1,2-二酰基-sn-甘油-3-[磷酸-外消旋-(1-甘油)]或1-酰基-2-酰基-sn-甘油-3-[磷酸-外消旋-(1-甘油)],这取决于它们是对称的还是不对称的脂质。磷脂酰甘油1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-3-[磷酸-外消旋-(1-甘油)]在本文中缩写为“DMPG”。磷脂酰甘油1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-(磷酸-外消旋-1-甘油)(钠盐)在本文中缩写为“DPPG”。合适的鞘磷脂可包括脑鞘磷脂、卵鞘磷脂、二棕榈酰基鞘磷脂和二硬脂酰基鞘磷脂。其他合适的脂质包括糖脂、鞘脂、醚脂、糖脂如脑苷脂和神经节苷脂,以及甾醇如胆固醇或麦角甾醇。

[0140] 在一些情况下,脂质结构可包含胆固醇或其衍生物,磷脂,磷脂和胆固醇或其衍生物的混合物,或组合。胆固醇衍生物的示例包括但不限于胆甾烷醇、胆甾烷酮、胆甾烯酮、粪甾醇、胆固醇基-2'-羟基乙基醚、胆固醇基-4'-羟基丁基醚及其混合物。当脂质结构包含磷脂和胆固醇或胆固醇衍生物的混合物时,所述脂质结构可占脂质结构中存在的总脂质的高达约40、50或60mol%。一种或多种磷脂和/或胆固醇可占脂质结构中存在的总脂质的约10mol%至约60mol%、约15mol%至约60mol%、约20mol%至约60mol%、约25mol%至约60mol%、约30mol%至约60mol%、约10mol%至约55mol%、约15mol%至约55mol%、约20mol%至约55mol%、约25mol%至约55mol%、约30mol%至约55mol%、约13mol%至约50mol%、约15mol%至约50mol%或约20mol%至约50mol%。

[0141] 在一些实施方案中,本文中的递送媒介物被设计成内化在上皮细胞中,例如胃肠道内的上皮细胞。肽,尤其是细胞穿透肽(CPP)和具有粘液穿透功能性的细胞穿透肽(MPP)提供了向细胞中的内化。本文的递送媒介物,例如本文描述的用于此类目的的脂质结构进一步包含粘液穿透肽(MPP)、细胞穿透肽(CPP)或两者。在一些实施方案中,细胞穿透肽(CPP)可以是短多肽,其可以增加递送媒介物和/或负载物向细胞内的摄取。细胞穿透肽(CPP)可以是促进有效穿过细胞质膜的肽序列。示例性的CPP和MPP包括PCT/US17/61111和PCT/US2019/032484(其通过引用并入本文)中公开的那些。

[0142] 在一些实施方案中,粘液穿透性的细胞穿透肽(MPP)与本文所述的递送媒介物结合使用。MPP具有细胞穿透特性,并且此外还允许穿透通过粘液层,例如结肠、肺、眼和子宫颈中天然存在的粘液层。MPP可进一步用于将结构靶向细胞的细胞内组分。它们还可以被设

计为特异性针对某些细胞类型。MPP可以与递送媒介物缀合以允许颗粒穿透通过粘液层,并且也可以与细胞相互作用,从而提高穿透或细胞靶向。在一些实施方案中,与不含MPP的相当的颗粒相比,具有MPP的脂质结构可以以至少约20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或高达约100%的效率内化到细胞中。在一些实施方案中,递送媒介物可包含粘液穿透肽(MPP)。MPP可以与脂质结构缀合,例如与脂质纳米颗粒、脂质纳米颗粒或负载物的修饰表面缀合,从而使MPP暴露,从而其可以全部或部分地与粘液层、含粘液的组织、器官或细胞外表面接触。MPP的存在可以改善递送媒介物穿过粘液(扩散和/或移动通过)。在一些实施方案中,与没有MPP的递送媒介物和/或负载物的递送相比,穿透可以提高2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、25倍、30倍、50倍、100倍或更多倍。在一些实施方案中,MPP可具有具有约3至100个氨基酸的氨基酸序列,包括但不限于约3至5个、5至10个、10至20个、20至40个、30至60个或80至100个氨基酸。MPP可具有从约3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个、35个、36个、37个、38个、39个、40个或高至约100个氨基酸。在一些实施方案中,MPP可以具有穿透覆盖或围绕靶细胞或组织的粘液层的能力。MPP可用于穿透靶组织如哺乳动物的肠上皮、结肠、肺、眼或子宫颈的粘液层。MPP可以与包括纳米颗粒在内的递送媒介物缀合,以允许递送媒介物穿透通过粘液层,也可以与细胞相互作用,从而提高穿透或细胞靶向。在一些实施方案中,与不含MPP的相当的颗粒相比,具有MPP的颗粒以至少约20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或高达约100%的效率穿透粘液层。许多确定粘液层穿透性的方法可用于评估MPP或与递送媒介物直接或间接缀合的MPP的穿透性。

[0143] 在一个方面,脂质结构可以是如本文所用的粘液穿透颗粒或MPP,可以指已经用粘膜穿透增强包衣进行包被的颗粒。在一些情况下,颗粒可以是或可以递送活性剂的颗粒,例如可以用粘膜穿透增强包衣进行包被的治疗剂、诊断剂、预防剂和/或营养剂(即,药物颗粒)。在其他情况下,颗粒可由基质材料如聚合物材料形成,治疗剂、诊断剂、预防剂和/或营养剂可在其中包封、分散和/或缔合。

[0144] 在某些情况下,递送媒介物可进一步包含至少一种靶向剂。术语靶向剂可指与特定类型或类别的细胞和/或其他特定类型化合物特异性结合的部分、化合物、抗体等(例如,靶向特定细胞或细胞类型的部分)。靶向剂可对某些靶细胞的表面、靶细胞表面抗原、靶细胞受体或其组合特异(例如,具有亲和力)。在一些情况下,靶向剂可以指当暴露于特定类型或类别的物质和/或细胞时具有特定作用(例如,裂解)的药剂,并且这种作用可驱动递送媒介物靶向特定类型或类别的细胞。因此,术语靶向剂可指可以是递送媒介物的一部分并且在递送媒介物的靶向机制中起作用的药剂,尽管该药剂本身可对特定类型或类别的细胞本身具有或不具有特异性。在某些情况下,通过将靶向剂并入本发明的递送媒介物中,可增强由递送媒介物递送的多核酸的细胞摄取效率和/或使其更具特异性。在某些实施方案中,本文所述的递送媒介物可包含一种或多种小分子靶向剂(例如,碳水化合物部分)。作为非限制性示例,合适的靶向剂还包括抗体,抗体样分子,或肽,例如整联蛋白结合肽,例如含RGD的肽,或小分子,例如维生素,例如叶酸,糖,例如乳糖和半乳糖,或其他小分子。细胞表面抗原包括细胞表面分子,例如细胞表面上的蛋白、糖、脂质或其他抗原。在具体的实施方

案中,细胞表面抗原经历内化。由本发明的递送媒介物的实施方案的靶向剂靶向的细胞表面抗原的示例包括但不限于1型和2型转铁蛋白受体、EGF受体、HER2/Neu、VEGF受体、整联蛋白、NGF、CD2、CD3、CD4、CDS、CDI9、CD20、CD22、CD33、CD43、CD56、CD69和含有富含亮氨酸的重复序列的G蛋白偶联受体5 (LGR5)。靶向剂还可包含人工亲和分子,例如拟肽或适体。拟肽可指其中肽如治疗性肽的至少一部分被修饰的化合物,并且拟肽的三维结构保持与肽的三维结构基本上相同。拟肽(肽和非肽基的类似物)可具有改善的性质(例如,减少的蛋白水解、增加的保留性或增加的生物利用度)。拟肽通常具有改善的口服利用度,这使得它们特别适合于治疗人或动物中的病症。应当注意,拟肽可具有或不具有相似的二维化学结构,但共有共同的三维结构特征和几何结构。

[0145] 在一些实施方案中,靶向剂可以是蛋白性质的靶向剂(例如,肽和抗体、抗体片段)。在一些具体的实施方案中,递送媒介物可包含多种不同的靶向剂。在多个实施方案中,脂质结构修饰可以提供生物相容性并且可以被修饰以拥有靶向物质,所述靶向物质包括例如靶向肽,包括抗体、适体、聚乙烯或其组合。靶向剂是受体。在一些情况下,T细胞受体(TCR)、B细胞受体(BCR)、单链可变片段(scFv)、嵌合抗原受体(CAR)或其组合用作靶向剂。

[0146] 在一些实施方案中,一种或多种靶向剂可与形成递送媒介物的聚合物偶联。在一些情况下,靶向剂可与包衣递送媒介物的聚合物结合。在一些情况下,靶向剂可与聚合物共价偶联。在一些情况下,靶向剂可与聚合物结合,使得靶向剂可基本上在所得递送媒介物的表面或其附近。在某些实施方案中,可使包含靶向剂残基的单体(例如,靶向剂的可聚合衍生物,例如肽的(烷基)丙烯酸衍生物)共聚,以形成共聚物进而形成本文提供的递送媒介物。在某些实施方案中,一种或多种靶向剂可通过连接部分与本发明递送媒介物的聚合物偶联。在一些实施方案中,将靶向剂偶联至膜去稳定化聚合物的连接部分可以是可裂解的连接部分(例如,包含可裂解的键)。在一些实施方案中,所述连接部分可以是可裂解的,和/或包含可在内体条件下可裂解的键。在一些实施方案中,连接部分可以是可裂解的,和/或包含可被特定酶(例如,磷酸酶或蛋白酶)裂解的键。在一些实施方案中,连接部分可以是可裂解的,和/或包含可在细胞内参数(例如,pH、氧化还原电势)改变时可裂解的键,在一些实施方案中,连接部分可以是可裂解的,和/或包含在暴露于基质金属蛋白酶(MMP)时可裂解的键(例如,MMP可裂解的肽连接部分)。

[0147] 在某些情况下,递送媒介物的靶向机制可取决于聚合物中可裂解区段的裂解。例如,本发明的聚合物可包含可裂解区段,其在裂解时暴露递送媒介物和/或递送媒介物的核心。在一些实施方案中,可裂解区段可位于本发明的聚合物的任一个或两个末端处。在一些实施方案中,可裂解区段沿聚合物的长度定位,并且任选地可位于聚合物的嵌段之间。例如,在某些实施方案中,可裂解区段可位于聚合物的第一嵌段与第二嵌段之间,并且当递送媒介物可暴露于特定裂解物质时,第一嵌段可从第二嵌段上裂解下来。在具体的实施方案中,可裂解区段可以是MMP可裂解肽,其可在暴露于MMP时被裂解。

[0148] 可以以任何合适的方式实现靶向剂如抗体或肽与聚合物或脂质的结合,例如,通过许多缀合化学方法中的任一种,包括但不限于胺-羧基连接体、胺-巯基连接体、胺-碳水化合物连接体、胺-羟基连接体、胺-胺连接体、羧基-巯基连接体、羧基-碳水化合物连接体、羧基-羟基连接体、羧基-胺基连接体、巯基-碳水化合物连接体、巯基-羟基连接体、巯基-巯基连接体、碳水化合物-羟基连接体、碳水化合物-碳水化合物连接体和羟基-羟基连接体。

在具体的实施方案中,可利用“点击”化学将靶向剂结合至本文提供的递送媒介物的聚合物。任选地利用多种缀合化学,在一些实施方案中,靶向剂可结合至单体,然后所得化合物可在本文所述的递送媒介物中使用的聚合物(例如,共聚物)的聚合合成中使用。在一些实施方案中,靶向剂可结合至与递送媒介物的聚合物结合的siRNA的有义链或反义链。在某些实施方案中,靶向剂可结合至有义链或反义链的5'端或3'端。

[0149] 用于连接化合物的方法可包括但不限于蛋白、标记物和其他化学实体与核苷酸连接。交联剂如n-马来酰亚胺基丁酰基氧基-琥珀酰亚胺酯(GMBS)和磺基-GMBS具有降低的免疫原性。使用亚酰胺化物(amidite)或H-磷酸酯化学将取代基结合至预先构建的寡核苷酸的5'端。取代基还可结合至寡聚物的3'端。这最后一种方法利用与固体支持物连接的2,2'-二巯基乙醇以从携带吡啶部分的3'磷酸酯中置换二异丙胺,并且随后在磷的氧化后删除。或者,寡核苷酸可包含一个或多个修饰的核苷酸,该修饰的核苷酸具有经由连接臂与碱基结合的基团。例如,可采用通过烯丙胺连接臂将生物素与dUTP的C-5位结合。还可进行经由连接臂将生物素和其他基团与嘧啶的5位结合。

[0150] 化学交联可包括使用间隔臂(spacer arm),即连接体(linker)或系着物(tether)。间隔臂提供了分子内柔性或调节了缀合的部分之间的分子内距离,从而可帮助保持生物活性。间隔臂可以是包含间隔氨基酸的肽部分的形式。或者,间隔臂可以是交联剂的一部分,例如在“长链SPDP”中。

[0151] 多种偶联剂或交联剂,例如蛋白A、碳二亚胺、二马来酰亚胺、二巯基-双-硝基苯甲酸(DTNB)、N-琥珀酰亚胺基-5-乙酰基-硫代乙酸酯(SATA)和N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)、6-胍基烟酰胺(HYNIC)、 N_3S 和 N_2S_2 ,可在公知的程序中用来合成靶向构建体。例如,可以使用双环酸酐法,经由DTPA将生物素与寡核苷酸缀合。另外,磺基琥珀酰亚胺基6-(生物素酰胺基)己酸酯(NHS-LC-生物素,其可购自Pierce Chemical Co.Rockford, Ill.),“生物胞素(biocytin)”,一种生物素的赖氨酸缀合物,由于对伯胺的可用性而可用于制备生物素化合物。另外,相应的生物素酸氯化物或酸前体可通过已知方法与治疗剂的氨基衍生物偶联。通过将生物素部分与颗粒表面偶联,另一部分可与亲合素偶联,然后通过强的亲合素-生物素亲和力偶联至颗粒,或反之亦然。在聚合物颗粒在颗粒表面上包含PEG部分的某些实施方案中,PEG的游离羟基可用于将另外的分子或部分连接或结合(例如,共价连接)至颗粒。

[0152] 在一个方面,本文的脂质结构(递送媒介物)的大小可落入纳米至微米范围内,例如20-200nm、200nm-1 μ m。在一些情况下,多核酸可以浓缩以被脂质结构合适地包封。DNA的浓缩(condensation)可以通过二价金属离子如 Mn^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Co^{2+} 和 Cu^{2+} 进行,所述二价金属离子可以通过中和DNA骨架的磷酸基团和通过与碱基的氢键键合使B-DNA结构变形,允许DNA的局部弯曲和螺旋间结合两者,来浓缩DNA。在一些情况下,用于浓缩的金属离子浓度可取决于用于浓缩的介质的介电常数。添加乙醇或甲醇也可以降低浓缩所需的金属离子浓度。在一些情况下,乙醇可以约0.5%至约60%(体积)的浓度用于浓缩DNA。在一些情况下,乙醇可以约0.5%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%或高达60%(体积)的浓度用于浓缩DNA。在一些情况下,钙也可用于浓缩。钙不仅与DNA磷酸结合,还可以与鸟嘌呤的氮和氧形成复合物,破坏碱基配对。

[0153] 在一些情况下,多核酸可以被完全包封在脂质结构中。完全包封可以表示,脂质结

构中的多核酸在暴露于将显著降解游离DNA、RNA或蛋白的血清或核酸酶或蛋白酶测定后可能不显著降解。在完全包封的系统中,在通常将会降解100%的游离多核酸的处理中,脂质结构中优选少于约25%的多核酸可被降解,脂质结构中更优选少于约10%,且最优选少于约5%的多核酸可被降解。在多核酸的情况下,可通过Oligreen®测定来确定完全包封。

Oligreen®是一种超灵敏的荧光核酸染色剂,用于定量溶液中的寡核苷酸和单链DNA或RNA(可从Invitrogen Corporation;Carlsbad, Calif.获得)。“完全包封的”还可表示,脂质结构可以是血清稳定的,即,它们在体内施用后不会快速分解成其组成部分。

[0154] 在某些应用中,一旦药物如多核酸进入细胞,就可能期望释放部分。部分可用来鉴定已接收多核酸的细胞的数目。举例来说,部分可以是抗体、染料、scFv、肽、糖蛋白、碳水化合物、配体、聚合物。部分可与连接体接触。连接体可以是不可裂解的。因此,在一些情况下,连接体可以是可裂解的连接体。这可使得一旦与靶细胞接触,部分就从脂质结构中释放。当部分在与脂质结构分离时具有更大的治疗效果时,这可能是期望的。在一些情况下,当与脂质结构分离时,部分可具有更好的被细胞如肠隐窝细胞或肠隐窝干细胞的细胞内组分吸收的能力。在一些情况下,连接体可包含二硫键、酰基脲、乙烯基醚、原酸酯或N-PO₃。

[0155] 因此,可能必需或期望将部分与脂质结构分离,使得部分可进入细胞内区室。连接体裂解从而释放出部分可能是由于与外部细胞相比细胞内的条件发生改变,例如,由于细胞内pH发生改变。由于细胞内存在裂解连接体的酶,因此一旦药物如多核酸进入细胞就可发生连接体的裂解。或者,可以响应于施加到细胞的能量或化学物质而发生连接体的裂解。可用来实现连接体裂解的能量类型的示例包括但不限于光、超声、微波和射频能量。在一些情况下,连接体可以是光不稳定的连接体。用来连接复合物的连接体还可以是酸不稳定的连接体。酸不稳定的连接体的示例包括通过使用顺式乌头酸、顺式羧基三烯烃、聚马来酸酐形成的连接体和其他酸不稳定的连接体。

[0156] 在一些情况下,脂质结构如脂质体可以是生物相容的和可生物降解的。例如,在一些情况下,脂质体在引入受试者后可能会生物降解。在一些情况下,生物降解可以在引入后立即开始。生物降解可发生在已接受脂质体或脂质体结构施用的受试者的粘膜内。生物降解可导致脂质体负载物例如多核酸的释放。在其他情况下,生物降解可包括脂质体结构的组分例如聚合物的分解。生物降解可在标准身体条件下发生,例如约97.6°F至约99°F。在其他情况下,生物降解可在约95°F至约106°F的温度下发生。生物降解可在约95°F、96°F、97°F、98°F、99°F、100°F、101°F、102°F、103°F、104°F、105°F或高达106°F下发生。在其他方面,生物降解可在约50°F至约150°F下发生。

[0157] 在其他情况下,可能不会发生生物降解。当发生生物降解时,其在向受试者施用脂质体或结构后可需要约1分钟至约100年。生物降解可需要从约1分钟、5分钟、30分钟、1小时、3小时、7小时、10小时、15小时、20小时、25小时、2天、4天、8天、12天、20天、30天、1.5个月、3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、12个月、1.5年、3年、5年、8年、10年、15年、20年、30年、40年、50年、60年、70年、80年、90年或至少约100年。诸如脂质体的结构的脂质可以是或可以包含:脂肪酸、甘油酯、甘油磷脂、鞘脂、糖脂、聚酮化合物(衍生自酮酰基亚单位的缩合);甾醇脂类异戊烯醇(prenol)脂类(衍生自异戊二烯亚单位的缩合)或其任意组合。

[0158] 负载物

[0159] 具有本文提供的电荷分离和上皮到达功能的本文的递送媒介物可用于将任何类型的负载物递送至靶标,例如靶细胞。在一些情况下,负载物可包含治疗剂。示例性的治疗剂可以包括:核酸、蛋白、抗体、肽、小分子、生物制品、反义寡核苷酸、肽模拟物、核酶、化学试剂例如化疗分子,或任何大分子,包括但不限于病毒颗粒、生长因子细胞因子、免疫调节剂、小分子药物、荧光染料,包括可以由并入脂质体的DNA表达的荧光染料肽,或其任意组合。

[0160] 在一个方面,负载物可以是核酸。核酸可以是基于DNA或RNA的。核酸可以是载体。基于DNA的载体可以是非病毒的,并且包括例如质粒、小环、纳米质粒、闭合线性DNA (doggybone)、线性DNA和单链DNA等分子。可存在于脂质-核酸颗粒中的核酸包括已知的任何形式的核酸。本文使用的核酸可以是单链DNA或RNA,或者双链DNA或RNA,或者DNA-RNA杂合体。双链DNA的示例包括结构基因、包含控制区和终止区的基因以及自我复制系统如病毒或质粒DNA。双链RNA的示例包括siRNA和其他RNA干扰试剂。单链核酸包括反义寡核苷酸、核酶、microRNA和形成三链体的寡核苷酸。存在于脂质-核酸颗粒中的核酸可包括一种或多种以下所述的寡核苷酸修饰。核酸可具有各种长度,通常取决于核酸的特定形式。例如,在特定的实施方案中,质粒或基因的长度可以是约1,000至100,000个核苷酸残基。在特定的实施方案中,寡核苷酸的长度范围可以是约10至100个核苷酸。在多个相关实施方案中,单链、双链和三链寡核苷酸的长度范围可以是约10至约50个核苷酸、约20至约50个核苷酸、约15至约30个核苷酸、约20至约30个核苷酸的长度。在特定的实施方案中,寡核苷酸的长度范围可以是约2个核苷酸至10个核苷酸。

[0161] 基于DNA的载体还可以是病毒载体,并且包括腺相关病毒、慢病毒、腺病毒等。载体还可以是RNA。RNA载体可以是未修饰的RNA的线性或环状形式。它们还可包括被设计为延长半衰期、降低免疫原性和/或提高翻译水平的各种核苷酸修饰。如本文所用的载体可包含DNA或RNA。在一些实施方案中,载体可包含DNA。载体可以能够在用于生长的原核生物如E.coli中自主复制。在一些实施方案中,载体可以稳定地整合到生物体的基因组中。在其他情况下,载体可在细胞质或细胞核中保持分离。在一些实施方案中,载体可含有靶向序列。在一些实施方案中,载体可含有抗生素抗性基因。载体可含有用于调控基因表达的调控元件。在一些情况下,可将小环封闭在递送媒介物内。

[0162] 在一个方面,小环(MC)DNA可以通过本文提供的媒介物被作为负载物递送。MC可类似于质粒DNA,因为两者都可含有可允许在递送后不久以高水平生成转基因产物的表达盒。在一些情况下,MC的不同之处可在于MC DNA可以缺乏原核序列元件(例如,细菌复制起点和抗生素抗性基因)。在附加型DNA分离之前,可经由大肠杆菌(*Escherichia coli*)中的位点特异性重组实现原核序列元件从骨架质粒DNA中的去除。原核序列元件的缺乏可减小MC相对于其亲本全长(FL)质粒DNA的大小,这可导致增强的转染效率。结果可能是,当与它们的FL质粒DNA对应物相比时,MC可转染更多细胞,并且可允许在递送后持续的高水平转基因表达。在一些情况下,小环DNA可以不含细菌复制起点。例如,小环DNA或闭合线性DNA可从约50%的细菌复制起点序列或高至100%的细菌复制起点水平上缺乏细菌复制起点。在一些情况下,细菌复制起点是截短的或无活性的。多核酸可衍生自最初编码细菌复制起点的载体。可利用方法去除整个细菌复制起点或其部分,从而留下不含细菌复制起点的多核酸。在

一些情况下,细菌复制起点可通过其高腺嘌呤和胸腺嘧啶含量来鉴定。小环DNA载体可以是超螺旋的最小表达盒,通过在大肠杆菌中的体内位点特异性重组衍生自常规质粒DNA,以供非病毒基因疗法和疫苗接种使用。小环DNA可缺乏或具有减少的细菌骨架序列,例如抗生素抗性基因、复制起点和/或细菌DNA固有的炎性序列。除了其改善的安全性性能外,小环还可大大提高转基因表达的效率。

[0163] 在一些情况下,基因的一部分可以通过多核酸负载物递送。基因的一部分可以是三个核苷酸到整个全基因组序列。例如,基因的一部分可以是内源基因组序列的约1%至约100%。基因的一部分可以是基因的全基因组序列的从约1%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或高至约100%。

[0164] 多种蛋白和多肽可以通过本文所述的媒介物被作为负载物递送,包括但不限于用于治疗代谢病症和内分泌病症的蛋白。蛋白的示例是苯丙氨酸羟化酶、胰岛素、抗利尿激素和生长激素。病症包括苯丙酮尿症、糖尿病、有机酸尿症、酪氨酸血症、尿素循环障碍、家族性高胆固醇血症。可将能够纠正苯丙酮尿症、糖尿病、有机酸尿症、酪氨酸血症、尿素循环障碍、家族性高胆固醇血症中的缺陷的任何蛋白或肽的基因引入干细胞中,使得蛋白或肽产物由肠上皮表达。同样,可在肠上皮中产生凝血因子,例如抗血友病因子(因子8)、Christmas因子(因子9)和因子7。可用来治疗循环蛋白缺陷的蛋白也可以在肠上皮中表达。可用来治疗循环蛋白缺陷的蛋白可以是,例如,用于治疗白蛋白血症的白蛋白、 α -1-抗胰蛋白酶、激素结合蛋白。另外,可通过将正常囊性纤维化跨膜传导调节蛋白的基因插入至肠上皮的干细胞中,治疗囊性纤维化的肠症状。可通过插入载脂蛋白B来治疗无 β 脂蛋白血症(abetalipoproteinemia)。可通过插入蔗糖酶-异麦芽糖(sucrase-isomaltose)、乳糖酶-根皮昔水解酶(lactase-phlorizin hydrolase)和麦芽糖酶-葡糖淀粉酶(maltase-glucoamylase)来治疗二糖酶不耐受。可将用于吸收维生素B₁₂的内在因子(intrinsic factor)的插入物或用于吸收维生素B₁₂的内在因子/钴胺素复合物的受体以及胆酸的转运蛋白插入到肠上皮中。此外,可由核酸编码的任何药物都可插入到肠上皮的干细胞中,从而以局部高浓度进行分泌,用于治疗癌症。在这个方面,本领域技术人员将容易地认识到,反义RNA可被编码到干细胞中,在产生反义后,其可并入癌细胞中以治疗癌症。

[0165] 治疗剂或药物可以是小分子、蛋白、多糖或糖类、核酸分子、脂质、肽模拟物或其组合。递送媒介物可包括能够对细胞、组织、器官或受试者发挥所需作用的任何分子或化合物。例如,此类效果可以是生物的、生理的或美容的效果。分子或化合物可包括例如核酸、肽和多肽,包括例如抗体,例如多克隆抗体、单克隆抗体、抗体片段;人源化抗体、重组抗体、重组人抗体和Primatized™抗体、细胞因子、生长因子、凋亡因子、分化诱导因子、细胞表面受体及其配体;激素;和小分子,包括有机小分子或化合物。在一个实施方案中,分子或化合物可以是治疗剂,或其盐或衍生物。治疗剂衍生物本身可以具有治疗活性,或者它们可以是前药,其在进一步修饰后变得有活性。因此,在一个实施方案中,与未修饰的药剂相比,分子或化合物衍生物可保留一些或全部的治疗活性,而在另一个实施方案中,治疗衍生物缺乏治疗活性。

[0166] 在各个实施方案中,治疗剂包括任何治疗上有效的药剂或药物,例如抗炎化合物、抗抑郁药、兴奋剂、镇痛药、抗生素、生育控制药(birth control medication)、解热药、血管舒张药、抗血管生成药、细胞血管药(cytovascular agent)、信号转导抑制剂、心血管药

物例如抗心律失常剂、血管收缩药、激素和类固醇。在某些实施方案中、分子或化合物可以是肿瘤学药物,其还可被称为抗肿瘤药(anti-tumor drug)、抗癌药、肿瘤药、抗癌性剂(antineoplastic agent)等。可使用的肿瘤学药物的示例包括但不限于阿霉素(adriamycin)、马法兰(alkeran)、别嘌醇(allopurinol)、六甲蜜胺(altretamine)、氨磷汀(amifostine)、阿那曲唑(anastrozole)、araC、三氧化二砷、硫唑嘌呤(azathioprine)、贝沙罗汀(bexarotene)、biCNU、博来霉素、静脉白消安(busulfan intravenous)、口服白消安(busulfan oral)、卡培他滨(Xeloda)、卡铂、卡莫司汀、CCNU、塞来昔布(celecoxib)、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、顺铂、克拉屈滨(cladribine)、环孢菌素A(cyclosporin A)、阿糖胞苷(cytarabine)、胞嘧啶阿拉伯糖苷(cytosine arabinoside)、柔红霉素、环磷酰胺、柔红霉素、地塞米松、右雷佐生(dexrazoxane)、多西他赛()、多柔比星、多柔比星、DTIC、表柔比星、雌莫司汀、磷酸依托泊苷(etoposide phosphate)、依托泊苷和VP-16、依西美坦(exemestane)、FK506、氟达拉滨、氟尿嘧啶、5-FU、吉西他滨(Gemzar)、吉妥珠单抗-奥佐米星(gemtuzumab-ozogamicin)、醋酸戈舍瑞林(goserelin acetate)、羟基脲(hydra)、羟基脲(hydroxyurea)、伊达比星(idarubicin)、异环磷酰胺(ifosfamide)、甲磺酸伊马替尼、干扰素、伊立替康(Camptostar、CPT-111)、来曲唑(letrozole)、亚叶酸(leucovorin)、禄斯得停(leustatin)、亮丙瑞林(leuprolide)、左旋咪唑(levamisole)、阿利维A酸(litretinoin)、甲地孕酮(megastrol)、美法仑(melphalan)、L-PAM、美司钠(mesna)、甲氨蝶呤、甲氧沙林、光神霉素(mithramycin)、丝裂霉素、米托蒽醌、氮芥、紫杉醇、帕米膦酸(pamidronate)、培加酶(Pegademase)、喷司他丁、吡吩姆钠(porfimer sodium)、泼尼松、利妥昔单抗(rituxan)、链佐星(streptozocin)、STI-571、他莫昔芬、泰索帝(taxotere)、替莫唑胺(temozolamide)、替尼泊苷(teniposide)、VM-26、拓扑替康(Hycarntin)、托瑞米芬(toremifene)、维A酸(tretinoin)、ATRA、戊柔比星(valrubicin)、长春花碱(velban)、长春碱(vinblastine)、长春新碱(vincristine)、VP16和长春瑞滨(vinorelbine)。可使用的肿瘤学药物的其他示例是玫瑰树碱(ellipticin)和玫瑰树碱类似物或衍生物、埃博霉素、细胞内激酶抑制剂和喜树碱。

[0167] 在一些方面,用作通过本文的递送媒介物递送的负载物的多核酸包括编码肿瘤抑制基因的核酸。肿瘤抑制基因通常可编码可以以一种方式或另一种方式抑制细胞增殖的蛋白。这些“制动器(brake)”中的一个或多个的缺失可能有助于癌症进展。五个广泛类别的蛋白通常被认为是由肿瘤抑制基因编码的:细胞内蛋白,例如可以调控或抑制细胞周期特定阶段的进展的p16细胞周期蛋白激酶抑制物、可发挥作用抑制细胞增殖的分泌激素(例如,肿瘤衍生的生长因子 β)的受体、在DNA可能受损或染色体异常时阻滞细胞周期的检查点控制蛋白、可促进细胞凋亡的蛋白、参与DNA修复的酶,或其组合。尽管DNA修复酶可能不直接发挥抑制细胞增殖的功能,但已丧失修复DNA中错误、缺口或断裂末端的能力的细胞会在许多基因中积累突变,包括那些对控制细胞生长和增殖至关重要的基因。因此,编码DNA修复酶的基因中的功能丧失突变可能会促进其他肿瘤抑制基因的失活以及致癌基因的激活。由于肿瘤抑制基因的一个拷贝通常足以控制细胞增殖,因此肿瘤抑制基因的两个等位基因必须丧失或失活以促进肿瘤进展。在一个方面,肿瘤抑制基因中的致癌性功能丧失突变隐性地起作用。许多癌症中的肿瘤抑制基因都具有阻止任何蛋白产生或导致无功能蛋白产生的缺失或点突变。在一些情况下,引入编码蛋白的肿瘤抑制基因可以改善受试者的疾病、预防

受试者的疾病或治疗受试者的疾病。

[0168] 可以通过本文的递送媒介物递送的肿瘤抑制基因包括,例如,APC、ARHGEF12、ATM、BCL11B、BLM、BMPR1A、BRCA1、BRCA2、CARS、CBFA2T3、CDH1、CDH11、CDK6、CDKN2C、CEBPA、CHEK2、CREB1、CREBBP、CYLD、DDX5、EXT1、EXT2、FBXW7、FH、FLT3、FOXP1、GPC3、IDH1、IL2、JAK2、MAP2K4、MDM4、MEN1、MLH1、MSH2、NF1、NF2、NOTCH1、NPM1、NR4A3、NUP98、PALB2、PML、PTEN、RB1、RUNX1、SDHB、SDHD、SMARCA4、SMARCB1、SOCS1、STK11、SUFU、SUZ12、SYK、TCF3、TNFAIP3、TP53、TSC1、TSC2、VHL、WRN、WT1及其任意组合。

[0169] 在某些实施方案中,载体可以包含显像剂,其可以进一步结合有可检测标记物(例如,标记物可以是放射性同位素、荧光化合物、酶或酶辅因子)。活性部分可以是放射性剂,例如:放射性重金属,例如铁螯合物,钆或锰的放射性螯合物,氧、氮、铁、碳或镓的正电子发射体,⁴³K、⁵²Fe、⁵⁷Co、⁶⁷Cu、⁶⁷Ga、⁶⁸Ga、¹²³I、¹²⁵I、¹³¹I、¹³²I或⁹⁹Tc。包含此类部分的递送媒介物可用作成像剂,并且以对于哺乳动物如人类的诊断用途有效的量施用。以这种方式,可检测成像剂的定位和积累。可通过放射性闪烁摄影术、核磁共振成像、计算机断层扫描或正电子发射断层扫描来检测成像剂的定位和积累。技术人员将会明白,待施用的放射性同位素的量取决于放射性同位素。本领域普通技术人员基于用作活性部分的给定放射性核素的特定活性和能量,可以容易地制定待施用的成像剂的量。通常,可以施用每剂成像剂0.1-100毫居里、1-10毫居里和2-5毫居里。因此,可用作成像剂的组合物可包含与放射性部分缀合的靶向部分,所述放射性部分可包含0.1-100毫居里,在一些实施方案中优选1-10毫居里,在一些实施方案中优选2-5毫居里,在一些实施方案中更优选1-5毫居里。用来检测标记物的检测手段取决于所用标记物的性质和所用生物样品的性质,并且还可包括荧光偏振、高效液相色谱法、抗体捕获、凝胶电泳、示差沉淀、有机萃取、尺寸排阻色谱法、荧光显微术或荧光激活细胞分选(FACS)测定。靶向部分还可指蛋白、核酸、核酸类似物、碳水化合物或小分子。实体可以是,例如,治疗性化合物,例如小分子,或诊断实体,例如可检测标记物。场所可以是组织、特定细胞类型或亚细胞区室。在一个实施方案中,靶向部分可指引活性实体的定位。活性实体可以是小分子、蛋白、聚合物或金属。活性实体如包含核酸的脂质体可用于治疗、预防或诊断目的。在一些情况下,部分可允许递送媒介物穿透血脑屏障。

[0170] 负载物可以是药物。药物可以是当施用时可以引起受试者的生理变化的物质。药物可以是用于治疗疾病(例如癌症)的药物。在一些情况下,药物可以完全包埋在脂质体脂质双层中、在水性区室中或在脂质体脂质双层和水性隔室两者中。强亲脂性药物几乎可以完全包埋在脂质双层中。强亲水性药物可仅位于水性区室中。具有中间logP的药物可以很容易地在脂质和水相之间分配,无论是在双层中还是在水核中。示例性药物可包括例如阿达木单抗、抗TNF、胰岛素样生长因子、白细胞介素、美沙拉嗪、GLP-1类似物、GLP-2类似物及其组合的药物。

[0171] 在一些情况下,多核酸可编码异源序列。异源序列可提供亚细胞定位(例如,用于靶向细胞核的核定位信号(NLS);用于靶向线粒体的线粒体定位信号;用于靶向叶绿体的叶绿体定位信号;ER保留信号;等等)。在一些情况下,多核酸,例如小环DNA或闭合线性DNA可包含核定位序列(NLS)。

[0172] 负载物可包含一个或多个核定位序列(NLS)。NLS序列的数量可以是约1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个或更多个NLS。在一些实施方案中,载体包含在氨基末

端处或氨基末端附近的约或多于约1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个或更多个NLS,在羧基末端处或羧基末端附近的约或多于约1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个或更多个NLS,或这些的组合(例如,在氨基末端处的一个或多个NLS和在羧基末端处的一个或多个NLS)。当存在多于一个NLS时,彼此可独立地进行选择,使得单个NLS可以以多于一个拷贝存在,和/或与以一个或多个拷贝存在的一个或多个其他NLS组合存在。NLS的非限制性示例可包括衍生自以下的NLS序列:SV40病毒大T抗原的NLS,其具有氨基酸序列PKKKRKV (SEQ ID NO:1);来自核质蛋白(nucleoplasmin)的NLS(例如,具有序列KRPAATKKAGQAKKKK (SEQ ID NO:2)的核质蛋白二分体NLS);c-myc NLS,其具有氨基酸序列PAAKRVKLD (SEQ ID NO:3)或RQRRNELKRSP (SEQ ID NO:4);hRNPA1 M9 NLS,其具有序列NQS SNFGPMKGGNFGGRSSGPYGGGGQYFAKPRNQGGY (SEQ ID NO:5);来自输入蛋白- α 的IBB结构域的序列RMRIZFKNKKGKDTAELRRRVEVSVELRKAKKDEQILKRRNV (SEQ ID NO:6);肌瘤(myoma) T蛋白的序列VSRKRPRP (SEQ ID NO:7)和PPKKARED (SEQ ID NO:8);人p53的序列POPKKKPL (SEQ ID NO:9);小鼠c-ab1 IV的序列SALIKKKKKMAP (SEQ ID NO:10);流感病毒NS1的序列DRLRR (SEQ ID NO:11)和PKQKKRK (SEQ ID NO:11);肝炎病毒 δ 抗原的序列RKLKKKIKKL (SEQ ID NO:12);小鼠Mx1蛋白的序列REKKKFLKRR (SEQ ID NO:13);人聚(ADP-核糖)聚合酶的序列KRKGDEVDGVDEVAKKSKK (SEQ ID NO:14);以及类固醇激素受体(人)糖皮质激素的序列RKCLQAGMNLEARKTKK (SEQ ID NO:15)。通常,所述一个或多个NLS可具有足够的强度,足以驱动小环DNA载体或短线性DNA载体以可检测的量在真核细胞的细胞核中积累。真核细胞可以是人肠隐窝细胞。

[0173] 在一些情况下,颗粒可含有DNase抑制剂。DNase抑制剂可定位在颗粒内或颗粒上。在其他情况下,编码抑制剂的多核酸可以封闭在颗粒内。在其他情况下,抑制剂可以是DNA甲基转移酶抑制剂,例如DNA甲基转移酶抑制剂-2(DMI-2)。DMI-2可由链霉菌(*Streptomyces* sp.)菌株560号产生。DMI-2的结构可以是4''R,6aR,10S,10aS-8-乙酰基-6a,10a-二羟基-2-甲氧基-12-甲基-10-[4'-[3''-羟基-3'',5''-二甲基-4''(Z-2'',4''-二甲基-2''-庚烯酰基氧基)四氢吡喃-1''-基氧基]-5'-甲基环己烷-1'-基氧基]-1,4,6,7,9-五氧代-1,4,6,6a,7,8,9,10,10a,11-十氢并四苯(4''R,6aR,10S,10aS-8-acetyl-6a,10a-dihydroxy-2-methoxy-12-methyl-10-[4'-[3''-hydroxy-3'',5''-dimethyl-4''(Z-2'',4''-dimethyl-2''-heptenoyloxy) tetrahydropyran-1''-yloxy]-5'-methylcyclohexan-1'-yloxy]

[0174] -1,4,6,7,9-pentaoxo-1,4,6,6a,7,8,9,10,10a,11-decahydronaphthacene)。其他抑制剂,例如氯喹,也可包封在颗粒内或颗粒上,例如颗粒的表面上。

[0175] 可通过任何合适的技术对细胞核中的累积进行检测。例如,可检测标记物可与载体融合,使得细胞内的位置可被可视化,例如与用于检测细胞核位置的手段(例如,细胞核特异性染色剂,例如DAPI)组合。还可从细胞中分离细胞核,然后可通过任何合适的用于检测蛋白的方法,例如免疫组织化学、蛋白质印迹法或酶活性测定法来分析其内容物。本文的实施方案可展现出负载物向靶位点内的时间依赖性的pH触发的释放。本文的实施方案可包含复杂的多种负载物并提供其细胞递送。另外的负载物可以是小分子、抗体、抑制剂如DNase抑制剂或RNase抑制剂。

[0176] 脂质结构可以承载超过100%的重量:定义为(负载物重量/脂质结构的重量) x

100。负载物的最佳载量可以是或可以约是脂质结构的约1%至100%重量。例如，脂质结构可含有多核酸负载物，其是结构重量的约1%至约10%、约10%至约20%、约20%至约30%、约30%至约40%、约40%至约50%、约50%至约60%、约60%至约70%、约70%至约80%、约80%至约90%、约90%至约100%、约100%至约200%、约200%至约300%、约300%至约400%、约400%至约500%或更大。

[0177] 多核酸可被递送至肠道细胞。例如，多核酸可以通过本文的递送媒介物递送至肠隐窝干细胞。例如，递送的多核酸可以是：(1) 通常不发现于肠上皮干细胞中；(2) 通常发现于肠上皮干细胞中，但不以生理显著性水平表达；(3) 通常发现于肠上皮干细胞中，并且通常在干细胞或其后代中以生理上所需的水平表达；(4) 可以被修饰以在肠上皮干细胞中表达的任何其他DNA；和(5) 以上任意组合。

[0178] 在一些情况下，可测量并定量由包含在脂质结构内的多核酸编码的蛋白。在一些情况下，修饰的细胞是可分离的，并对修饰的细胞进行蛋白质印迹分析，以确定与未修饰的细胞相比蛋白生产的存在和相对量。在其他情况下，可利用流式细胞术进行蛋白的细胞内染色，以确定蛋白生产的存在和相对量。还可进行另外的测定，以确定蛋白例如APC是否是功能性的。例如，可测量表达APC转基因的修饰的细胞的胞质 β -连环蛋白表达，并与未修饰的细胞进行比较。与未修饰的细胞相比，修饰的细胞的胞质中 β -连环蛋白的表达降低可指示功能性APC转基因。在其他情况下，可利用FAP的鼠模型来确定编码APC蛋白的转基因的功能性。例如，患有FAP的小鼠可以用编码APC的修饰的细胞处理，并且相对于未处理的小鼠，测得FAP疾病减轻。

[0179] 本文还可以提供可以在接受受试者递送媒介物的受试者上进行的附加程序。受试者可以接受程序，例如输血、抽血、计算机断层扫描(CT)、磁共振成像(MRI)、X射线、放射治疗、器官移植及其任意组合。在一些情况下，可以对病变例如癌性病变进行评估。

[0180] 在一些情况下，可评价非靶标病变。非靶标病变的完全应答可能是肿瘤标志物水平的消失和正常化。所有淋巴结在大小上必须是非病理性的(短轴小于10mm)。如果肿瘤标志物最初高于正常值上限，则必须将它们相对被认为是完全临床应答的患者进行归一化。非CR/非PD是一个或多个非靶标病变持续存在和/或肿瘤标志物水平维持高于正常限值。进展性疾病可以是一个或多个新病变的出现和/或现有非靶标病变的明确进展。明确进展通常不应超过靶标病变状态。在一些情况下，最佳总体应答可以从治疗开始直至疾病进展/复发所记录的最佳应答。

[0181] 负载物的递送

[0182] 本文提供的递送媒介物可用于将负载物递送至靶细胞。在一些情况下，靶细胞存在于胃肠道、生殖道、循环系统、呼吸系统、肌肉骨骼系统、排泄系统、神经系统、眼系统及其组合。在一些情况下，合适的靶细胞可以存在于身体的任何主要器官，包括但不限于皮肤、肺、心脏、肝、胃、泌尿系统、生殖系统、肠、胰腺、肾、胸腺、甲状腺、和/或脑。在一些情况下，靶细胞是胃肠道的一部分，并且在肛门、直肠、大肠、小肠、肝、胃、食道或口腔中。在一些情况下，靶细胞是肠内分泌细胞、肥大细胞、肠上皮细胞、刷状细胞、潘氏细胞(Paneth cell)或杯状细胞(goblet cell)。在一些情况下，靶细胞是肠内分泌细胞并且是EC细胞、D细胞、CCK细胞、L细胞、P/D1细胞或G细胞。在一些情况下，靶细胞在肠上皮中并且选自肠干细胞、潘氏细胞、杯状细胞、肠上皮细胞、转运放大细胞、肠内分泌细胞或其任意组合。在一些情况

下,靶细胞是肠干细胞。在一些情况下,靶细胞是隐窝细胞。

[0183] 递送媒介物可用于将负载物引入靶细胞。在一些情况下,引入包括使靶细胞与负载物接触。在其他情况下,引入包括用负载物转染或转导靶细胞。在某些情况下,负载物可以修饰细胞的基因组或以基因组外形式存在于细胞内。

[0184] 在一些实施方案中,所采用的递送媒介物可包含递送至靶细胞的负载物,例如用于在细胞中表达和/或遗传性修饰靶细胞。使用负载物例如本文所述的多核酸的此类递送(例如转染)的效率例如可以是或可以约是接触(体内或离体)和/或存在于组织或位置中的细胞总数的20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.9%或超过99.9%。使用负载物例如本文所述的多核酸的此类递送(例如转染)的效率例如可以是或可以约是接触(体内或离体)和/或存在于组织或位置中的细胞总数的1倍、10倍、20倍、40倍、60倍、80倍、100倍、120倍、140倍、160倍、180倍、200倍、300倍、400倍、500倍或超过1000倍。

[0185] 使用受试者递送媒介物,例如本文所述的组合物(包括具有电荷分离的用于到达上皮细胞、具有胆汁盐用于在恶劣环境中的稳定性,以及任选地包括其他特征如MPP或其他粘液穿透特征的递送媒介物)的细胞摄取效率可以允许有效穿透和转运(例如通过粘液层)至靶细胞,从而具有靶细胞的有效摄取,例如,摄取可以是或可以约是被接触细胞总数的20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.9%或超过99.9%。在一些实施方案中,与不包含胆汁盐和/或电荷分离的相当的递送媒介物相比,或与缺失一种或多种组分的递送媒介物相比,所述组合物可具有更高百分比的细胞摄取。所述改善可以是提高从约10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%或高至约80%。在一些情况下,通过如本文所述的递送媒介物组合物递送至细胞的负载物的转染或递送(例如来自多核酸的整合或蛋白表达)效率与不包含胆汁盐和/或电荷分离的相当的递送媒介物或与缺失一种或多种组分的递送媒介物相比可以是提高约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%或高至65%。在一些情况下,通过如本文所述的递送媒介物组合物递送至细胞的多核酸负载物的转染或整合或表达效率与不包含胆汁盐和/或电荷分离的相当的递送媒介物或与缺失一种或多种组分的递送媒介物相比可以是提高约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%或高至65%。

[0186] 在一些实施方案中,本文提供的用于递送负载物的组合物可以在引入有此需要的受试者后仍具有功能性至少或至少约1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、22天、23天、24天、25天、6天、27天、28天、29天、30天、40天、50天、60天、70天、80天、90天或100天。结构在引入受试者后仍具有功能性至少或至少约1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月或12个月。如本文所提供的递送媒介物在引入受试者后仍具有功能性至少或至少约1年、2年、3年、4年、5年、6年、7年、8年、9年、10年、15年、20年、25年或30年。在一些实施方案中,递送媒介物可在接收者的一生中具有功能性。此外,递送媒介物也可以以100%的其正常预期操作(normal intended operation)起作用。递送媒介物也可以以1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、

19%、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%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的其正常预期操作起作用。递送媒介物的功能可以指递送效率、脂质纳米颗粒的持久性、脂质纳米颗粒的稳定性或其任意组合。

[0187] 在一些实施方案中,本文提供的递送媒介物可以将负载物例如核酸递送至靶细胞(例如RNA、DNA(例如,小环DNA))。在一些情况下,功能可以包括接收来自递送媒介组合物的核酸的细胞的百分比。在其他情况下,功能可以指从核酸产生蛋白的频率或效率。例如,递送媒介组合物可将核酸递送至编码基因的至少一部分(例如APC)的细胞,并且效率频率可将功能性完整基因描述为负载物递送所恢复或产生的。

[0188] 递送媒介组合物(delivery vehicle composition)中的核酸负载物浓度可以是0.5纳克至50微克。这样的浓度可以从约0.5ng、1ng、2ng、5ng、10ng、50ng、100ng、150ng、200ng、300ng、400ng、500ng、600ng、700ng、800ng、900ng、1000ng、1 μ g、2 μ g、5 μ g、10 μ g、20 μ g、30 μ g、40 μ g、50 μ g、60 μ g、或高至50 μ g或更高。在一些情况下,可以改变可通过递送媒介物引入至细胞的核酸(例如,ssDNA、dsDNA、RNA)的量以优化转染效率和/或细胞活力。在一些情况下,可以将少于约100皮克的核酸引入受试者。在一些情况下,可以将至少约100皮克、至少约200皮克、至少约300皮克、至少约400皮克、至少约500皮克、至少约600皮克、至少约700皮克、至少约800皮克、至少约900皮克、至少约1微克、至少约1.5微克、至少约2微克、至少约2.5微克、至少约3微克、至少约3.5微克、至少约4微克、至少约4.5微克、至少约5微克、至少约5.5微克、至少约6微克、至少约6.5微克、至少约7微克、至少约7.5微克、至少约8微克、至少约8.5微克、至少约9微克、至少约9.5微克、至少约10微克、至少约11微克、至少约12微克、至少约13微克、至少约14微克、至少约15微克、至少约20微克、至少约25微克、至少约30微克、至少约35微克、至少约40微克、至少约45微克或至少约50微克的核酸添加到每个细胞样品中(例如,经电穿孔或以其他方式靶向而用于负载物递送的一个或多个细胞)。在一些情况下,最佳转染效率和/或细胞活力所需的核酸(例如,dsDNA、RNA)的量可特异于细胞类型。

[0189] 在一些情况下,结构的有效量可意指足以提高可在治疗之前在受试者中降低的至少一种基因的表达水平的量,或者足以缓解癌症的一种或多种症状的量。例如,有效量可以是与参考值或未经任何化合物治疗的表达水平相比,足以将选自由胃肠分化基因、细胞周期抑制基因和肿瘤抑制基因组成的组的至少一种基因的表达水平提高至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、200%、300%、400%、500%、1000%、1500%或更多的量。

[0190] 在一些实施方案中,有效量可意指足以降低可在治疗之前在受试者中增加的至少一种基因的表达水平的量,或者足以缓解癌症的一种或多种症状的量。例如,有效量可以是与参考值或未经任何化合物治疗的表达水平相比,足以将一种基因的表达水平降低至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、200%、300%、400%、500%、1000%、1500%或更多的量。

[0191] 在一些实施方案中,与未经历施用的相当的受试者相比,治疗包括将有此需要的

受试者中的疾病减少至少约1倍、5倍、10倍、20倍、40倍、80倍、100倍、300倍、600倍或1000倍,如通过体外或体内测定法测量。在一个方面,疾病的减轻可以是受试者中至少一种基因表达水平增加或减少的结果。可以利用各种基因表达测定法,包括但不限于测序、PCR、RT-PCR、蛋白质印迹、northern印迹、ELISA、蛋白定量、mRNA定量、FISH、RNA-Seq、SAGE或其组合。可以使用的其他测定法包括显微镜检查、组织学、体内动物实验、人体实验或其任意组合。

[0192] 使用方法

[0193] 本文的递送媒介组合物向粘膜组织内(例如胃肠道(GI道)的粘膜组织内)的上皮细胞提供递送,并且发现了在其他粘膜组织例如肺、阴道和眼中的用途。本文的递送媒介物提供穿透通过粘液层以及到达上皮细胞。在一些实施方案中,递送媒介物将负载物递送至GI道的上皮细胞并递送负载物(例如本文所述的那些)用于治疗、诊断或治疗诊断目的。

[0194] 可以用本文提供的受试者递送媒介物,尤其是具有治疗性负载物的此类递送媒介物治疗的示例性疾病,可以是癌性的或非癌性的。此类疾病可以是心血管疾病、神经退行性疾病、眼部疾病、生殖疾病、胃肠疾病、脑疾病、皮肤疾病、骨骼疾病、肌肉骨骼疾病、肺疾病、胸部疾病等等。疾病可以是遗传疾病,例如囊性纤维化、泰-萨克斯(tay-sachs)病、脆性X、亨廷顿病、神经纤维瘤病、镰状细胞、地中海贫血、迪谢内(Duchenne)肌营养不良或其组合。

[0195] 在一些方面,疾病是胃肠疾病。在一些情况下,胃肠疾病是单基因GI疾病。在一些方面,胃肠疾病是遗传的。在一些情况下,胃肠疾病是上皮的疾病。合适的胃肠道疾病可以是:家族性腺瘤性息肉病(FAP)、衰减性FAP、微绒毛包涵体病(MVID)、慢性炎性肠病、慢性炎性肠病、回肠克罗恩病、幼年性息肉病、遗传性弥漫性胃癌综合征(HDGC)、Peutz-Jeghers综合征、林奇(lynch)综合征、胃腺癌和近端胃息肉病(GAPPS)、李-佛美尼(Li-Fraumeni)综合征、家族性胃癌或其组合。GI疾病可在胃肠道中产生息肉。在一些情况下,疾病是FAP。FAP可发展为癌症。胃肠疾病可是遗传性的。例如,遗传性胃肠疾病可以是吉尔伯特综合征(Gilbert's syndrome)、毛细血管扩张症(telangiectasia)、粘多糖病(mucopolysaccharide)、Osler-Weber-Rendu综合征、胰腺炎、角化棘皮瘤、胆道闭锁、莫尔基奥氏综合征(Morquio's syndrome)、赫尔勒氏综合征(Hurler's syndrome)、亨特氏综合征(Hunter's syndrome)、克里格勒-纳贾二氏(Crigler-Najjar)、罗特尔氏(Rotor's)、Peutz-Jeghers综合征、杜宾强森(Dubin-Johnson)、骨软骨病(Osteochondroses)、骨软骨发育不良(Osteochondrodysplasias)、息肉病(polyposis)或其组合。

[0196] 在一些方面,可以筛查受试者是否存在疾病。筛查可用于识别合适的受试者。在一些情况下,可以通过遗传、表型、分子或染色体筛查来识别疾病。在一个方面,合适的受试者对本文提供的疾病呈阳性。例如,遗传筛查可以识别APC基因中可能导致FAP的突变。在一些情况下,筛查可包括分析基因,例如CDH1、STK11、SMAD4、MLH1、MSH2、EPCAM、MSH6、PMS2、MYO5B、APC、TP53、其部分、其启动子及其组合。

[0197] 在一些情况下,本文的递送媒介物携带治疗性负载物(例如核酸、蛋白或药物)用于治疗影响GI道的疾病,例如家族性息肉病(FAP)、衰减性FAP、结直肠癌、慢性炎性肠病、回肠克罗恩病、微绒毛包涵体病和先天性腹泻。

[0198] 在其他情况下,可以将通过脂质体递送的基因施用给受试者作为预防措施。例如,受试者可未被诊断出疾病以及可显示易患疾病,例如癌症。在一些情况下,癌症可以是结肠

癌。

[0199] 在一些情况下,本文的递送媒介物携带诊断性负载物并且用于可视化或诊断细胞或组织的状态或者诊断或监测受试者的状况或疾病。例如,对受试者施用有效量的递送媒介物,并且FAP的诊断方法包括确定并入细胞基因组的APC水平,从而患者在治疗开始前和治疗期间和/或治疗后的APC水平的差异将证明治疗对患者的有效性,包括患者是否已完成治疗或疾病状态是否已被抑制或消除。

[0200] 在一些情况下,可以长期施用含有递送媒介物及其负载物的药物组合物。施用可包括向受试者每小时、每日、每月或每年施用结构。例如,在一些情况下,可在受试者的整个生命期间向受试者每日施用药物组合物。在其他情况下,可在受试者中疾病存在的持续时间内每日施用药物组合物。可向受试者施用例如具有递送媒介物和多核酸负载物的药物组合物以治疗疾病或病症,直至疾病或病症得以减少、控制或消除。疾病控制可包括使疾病稳定。例如,受控制的癌症可具有停止的生长或扩散,如通过CT扫描所测量。癌症可以是结肠癌。在其他情况下,可预防性地施用药物组合物。在一些情况下,受试者可已经历了遗传筛查,这将受试者鉴定为易患癌症,例如结肠癌。在这种情况下,易感受试者可通过接受包含递送媒介物和多核酸负载物的药物组合物开始预防性治疗。在受试者包含使受试者易患结肠癌的遗传突变的情况下,该受试者可用此类药物组合物开始预防性治疗。

[0201] 在一些情况下,预防性治疗可预防疾病,例如癌症。当预防可针对病况如局部复发(例如,疼痛)、疾病如癌症、复合征(syndrome complex)如心力衰竭或任何其他医学病况而使用时,预防可包括施用组合物,相对于未接受该组合物的受试者,该组合物减少受试者中的医学病况的症状的频率或延迟其发作。因此,预防癌症包括,例如,相对于未经治疗的对照群体,减少接受预防性治疗的患者群体的可检测的癌性生长的数目,和/或相比于未经治疗的对照群体,延迟经治疗的群体的可检测的癌性生长的出现,例如以统计学上和/或临床上显著的量。预防感染包括,例如,相比于未经治疗的对照群体,减少经治疗的群体的感染诊断的数目,和/或相比于未经治疗的对照群体,延迟经治疗的群体的感染症状的发作。预防疼痛包括,例如,相比于未经治疗的对照群体,减少经治疗的群体中的受试者经历的疼痛感的量级,或者延迟该疼痛感。

[0202] 可使用测定来确定本文提供的递送媒介物的治疗效果。在一些情况下,可以在施用受试者递送媒介物之前、期间和/或之后进行测定。例如,可以在施用前或施用后的-30天、-15天、-7天、-3天、0天、3天、5天、7天、10天、14天、18天、20天、24天、30天、35天、40天、50天、55天、60天、80天、100天、150天、250天、360天、2年、5年、或10年进行测定。合适的测定可以是体内或离体的。在一些情况下,测定包括扫描。合适的扫描可包括CT、PET、MRI或其组合。在一些情况下,测定包括体外测定,例如组织学、血清学、测序、ELISA、显微镜检查等。

[0203] 药物组合物和制剂

[0204] 本文描述的组合物可以配制成药物并用于治疗有此需要的人或哺乳动物。药物可以与任何其他治疗共同施用。

[0205] 对于经口施用,赋形剂可包括药物级的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠(sodium saccharine)、滑石、纤维素、葡萄糖、明胶、蔗糖、碳酸镁等。如果需要,递送媒介物还可含有少量无毒辅助物质,例如润湿剂、乳化剂或缓冲液。

[0206] 组合物可经口、通过皮下或其他注射、静脉内、大脑内、肌肉内、肠胃外、经皮、经鼻

或直肠施用。化合物或组合物施用的形式至少部分取决于施用化合物的途径。在一些情况下,组合物可以以固体制备物的形式使用以供经口施用;制备物可以是片剂、颗粒、粉末、胶囊等。在片剂制剂中,组合物通常与添加剂一起配制,所述添加剂是例如,赋形剂如糖或纤维素制备物、粘合剂如淀粉糊或甲基纤维素、填充剂、崩解剂和通常用于制造医学制备物的其他添加剂。待施用的组合物可含有一定量的药学上有效量的递送媒介物,以供在生物系统(包括患者或受试者)中的治疗用途。药物组合物可每日施用或根据需要施用。

[0207] 本文的递送媒介物包括配制为用于施用的药物组合物的那些。合适的制剂可包括水性和非水性无菌注射溶液,其可含有抗氧化剂、缓冲液、抑菌剂、杀细菌抗生素以及使制剂与预期接受者的体液等渗的溶质;以及水性和非水性无菌悬浮液,其可包含悬浮剂和增稠剂。合适的惰性载体可包括糖,例如乳糖。在一些情况下,组合物可采取例如油性或水性媒介物中的悬浮液、溶液或乳液的形式,并且可含有配方剂,例如悬浮剂、稳定剂和/或分散剂。或者,活性成分可以是粉末形式,以供在使用前用合适的媒介物例如无菌无热原水配制。

[0208] 载体(carrier)可以是溶剂或分散介质,其包含例如水、乙醇、一种或多种多元醇(例如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇)、油如植物油(例如,花生油、玉米油、芝麻油等)及其组合。例如,通过使用包衣如卵磷脂、通过在分散体的情况下维持所需的粒径和/或通过使用表面活性剂,可维持合适的流动性。在许多情况下,将优选包含等渗剂,例如糖或氯化钠。作为活性化合物的游离酸或碱或者其药理学上可接受的盐的所述活性化合物的溶液和分散体可在水或其他溶剂或分散介质中与一种或多种药学上可接受的赋形剂合适地混合来制备,所述赋形剂包括但不限于表面活性剂、分散剂、乳化剂、pH调节剂及其组合。合适的表面活性剂可以是阴离子表面活性剂、阳离子表面活性剂、两性表面活性剂或非离子表面活性剂。合适的阴离子表面活性剂包括但不限于含有羧酸、磺酸和硫酸离子的阴离子表面活性剂。阴离子表面活性剂的示例包括钠型、钾型、铵型的长链烷基磺酸盐和烷基芳基磺酸盐,例如十二烷基苯磺酸钠;二烷基磺基琥珀酸钠,例如十二烷基苯磺酸钠;二烷基磺基琥珀酸钠,例如双-(2-乙基硫代氧)-磺基琥珀酸钠(sodium bis-(2-ethylthioxy)-sulfosuccinate);以及烷基硫酸盐,例如月桂基硫酸钠。阳离子表面活性剂包括但不限于季铵化合物,例如苯扎氯铵、苄索氯铵、西曲溴铵、硬脂酰二甲基苄基氯化铵、聚氧乙烯和椰油胺(coconut amine)。非离子表面活性剂的示例包括单硬脂酸乙二醇酯、肉豆蔻酸丙二醇酯、单硬脂酸甘油酯、硬脂酸甘油酯、聚甘油基-4-油酸酯、脱水山梨糖醇酰化物(sorbitan acylate)、蔗糖酰化物(sucrose acylate)、PEG-150月桂酸酯、PEG-400单月桂酸酯、聚氧乙烯单月桂酸酯、聚山梨醇酯、聚氧乙烯辛基苯基醚、PEG-1000十六烷基醚、聚氧乙烯十三烷基醚、聚丙二醇丁基醚、泊洛沙姆®401、硬脂酰基单异丙醇酰胺和聚氧乙烯氢化牛油基酰胺。两性表面活性剂的示例包括N-十二烷基-β-丙氨酸钠、N-月桂基-β-亚氨基二丙酸钠、肉豆蔻酰两性乙酸酯(myristoamphoacetate)、月桂基甜菜碱和月桂基磺基甜菜碱。制剂可含有防腐剂以防止微生物的生长。合适的防腐剂包括但不限于对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸和硫柳汞。制剂还可含有抗氧化剂以防止活性剂降解。通常将制剂缓冲至pH为3-8以在配制后供肠胃外施用。合适的缓冲液包括但不限于磷酸盐缓冲液、乙酸盐缓冲液和柠檬酸盐缓冲液。水溶性聚合物通常可用于制剂中供肠胃外施用。合适的水溶性聚合物包括但不限于聚乙烯吡咯烷酮、葡聚糖、羧甲基纤维素和聚乙二醇。

[0209] 无菌可注射溶液可通过将所需量的活性化合物根据需要与上文所列的一种或多种赋形剂一起并入合适的溶剂或分散介质中,然后进行过滤灭菌来制备。通常,可通过将各种灭菌的活性成分并入无菌媒介物中来制备分散体,所述无菌媒介物含有基础分散介质和来自上文所列的所需其他成分。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下,制备方法可以是真空干燥和冷冻干燥技术,其从先前无菌过滤的溶液产生活性成分加任何另外期望成分的粉末。粉末的制备方式可以使得颗粒实质上是多孔的,这可增加颗粒的溶解。用于制备多孔颗粒的方法是本领域公知的。

[0210] 制剂可以是眼部制剂或局部(topical)形式。用于眼部施用的药物制剂可以是由一种或多种聚合物-药物缀合物形成的无菌水溶液或颗粒悬浮液的形式。可接受的溶剂包括例如水、林格氏溶液、磷酸缓冲盐水(PBS)和等渗氯化钠溶液。制剂还可以是无毒的肠胃外可接受的稀释剂或溶剂如1,3-丁二醇中的无菌溶液、悬浮液或乳液。在其他实施方案中,脂质体可被配制用于局部施用至粘膜。用于局部施用的合适剂型包括乳膏(cream)、软膏(ointment)、油膏(salve)、喷雾剂、凝胶、洗液(lotion)、乳液(emulsion)、液体(liquid)和经皮贴剂(transdermal patch)。制剂可被配制用于经粘膜、经上皮(transepithelial)、经内皮(transendothelial)或经皮(transdermal)施用。组合物含有一种或多种化学穿透促进剂、膜渗透剂、膜转运剂、润肤剂(emollient)、表面活性剂、稳定剂及其组合。在一些实施方案中,脂质体可作为液体制剂如溶液或悬浮液、半固体制剂如洗液或软膏或者固体制剂来施用。在一些实施方案中,脂质体可被配制成液体,包括溶液和悬浮液,例如滴眼剂,或者配制成半固体制剂,例如软膏或洗液,以供局部施加至粘膜,例如眼或阴道或直肠。制剂可含有一种或多种赋形剂,例如润肤剂、表面活性剂、乳化剂和穿透促进剂。

[0211] 组合物中活性剂的合适剂量(“治疗有效量”)可取决于例如病况的严重程度和病程、施用模式、特定药剂的生物利用度、受试者的年龄和体重、受试者的临床病史和对活性剂的反应、医师的判断或其任意组合。待施用给受试者的组合物中的活性剂的治疗有效量可以是约100 μ g/kg体重/天至约1000mg/kg体重/天的范围,无论是通过一次施用还是多次施用。在一些实施方案中,每日施用的每种活性剂的范围可以是约100 μ g/kg体重/天至约50mg/kg体重/天、100 μ g/kg体重/天至约10mg/kg体重/天、100 μ g/kg体重/天至约1mg/kg体重/天、100 μ g/kg体重/天至约10mg/kg体重/天、500 μ g/kg体重/天至约100mg/kg体重/天、500 μ g/kg体重/天至约50mg/kg体重/天、500 μ g/kg体重/天至约5mg/kg体重/天、1mg/kg体重/天至约100mg/kg体重/天、1mg/kg体重/天至约50mg/kg体重/天、1mg/kg体重/天至约10mg/kg体重/天、5mg/kg体重/剂量至约100mg/kg体重/天、5mg/kg体重/剂量至约50mg/kg体重/天、10mg/kg体重/天至约100mg/kg体重/天和10mg/kg体重/天至约50mg/kg体重/天。

[0212] 如本文所用,“药学上可接受的载体”包括任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗和吸收延迟剂、甜味剂、盐、缓冲液等。药学上可接受的载体可由多种材料制备,包括但不限于香味剂(flavoring agent)、甜味剂(sweetening agent)和混杂材料(miscellaneous material),例如为了制备特定治疗组合物可能需要的缓冲液和吸收剂。

[0213] 在一些情况下,可以在施用前的合理时间内在无菌条件下配制包含递送媒介物的组合物。例如,包含递送媒介物的组合物可以在施用给受试者之前约1个月、2周、1周、5天、3天、2天、1天、10小时、5小时或立即配制。在一个方面,递送媒介物可以在施用前冷冻和解冻。提供的递送媒介物可以与二级治疗(secondary therapy)组合使用。例如,二级治疗如

化学治疗或放射治疗可以在施用递送媒介物之前或之后施用,例如在12小时至7天内。除了施用递送媒介物外,还可以采用组合治疗,例如化学治疗和放射治疗两者。

[0214] 在一些情况下,所提供的递送媒介物可包括包衣。包衣可以是肠溶包衣。肠溶包衣可用于防止在胃中的溶解或使其最小化,但允许在小肠中溶解。在一些实施方案中,包衣可包括肠溶包衣。肠溶包衣可以是应用于口服药物的屏障,其防止药物在到达小肠之前释放。延释制剂(delayed release formulation),例如肠溶包衣,可防止施用的药物溶解在胃中而对胃产生刺激作用。此类包衣还用于保护酸不稳定性药物免于暴露胃的酸性,而是将它们递送至碱性pH环境(肠道的pH 5.5及以上),在那里它们不会降解。

[0215] 溶解可发生在器官中。例如,溶解可发生在十二指肠、空肠、髂骨(ilium)和/或结肠,或其任意组合内。在一些情况下,溶解可发生在十二指肠、空肠、髂骨和/或结肠附近。一些肠溶包衣通过呈现在胃中高度酸性pH下稳定但在较低酸性(相对更为碱性)的pH下快速分解的表面而起作用。因此,肠溶包衣药丸在胃的酸性环境中可不溶解,但在小肠中存在的碱性环境中可溶解。肠溶包衣材料的示例包括但不限于丙烯酸甲酯-甲基丙烯酸共聚物(methyl acrylate-methacrylic acid copolymers)、纤维素乙酸酯琥珀酸酯(cellulose acetate succinate)、羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸酯(hydroxy propyl methyl cellulose phthalate)、羟丙基甲基纤维素乙酸酯琥珀酸酯(hydroxy propyl methyl cellulose acetate succinate, hypromellose acetate succinate)、聚乙烯醋酸酯邻苯二甲酸酯(polyvinyl acetate phthalate, PVAP)、甲基丙烯酸甲酯-甲基丙烯酸共聚物、藻酸钠和硬脂酸。

[0216] 可以以功能浓度施加肠溶包衣。肠溶包衣可以是纤维素乙酸酯邻苯二甲酸酯、聚乙烯乙酸酯邻苯二甲酸酯、羟丙基甲基纤维素乙酸酯琥珀酸酯、聚(甲基丙烯酸-共-丙烯酸乙酯)1:1、聚(甲基丙烯酸-共-丙烯酸乙酯)1:1、聚(甲基丙烯酸-共-甲基丙烯酸甲酯)1:1、聚(甲基丙烯酸-共-甲基丙烯酸甲酯)1:1、聚(甲基丙烯酸-共-甲基丙烯酸甲酯)1:2、聚(甲基丙烯酸-共-甲基丙烯酸甲酯)1:2、聚(丙烯酸甲酯-共-甲基丙烯酸甲酯-共-甲基丙烯酸)7:3:1或其任意组合。可施加约 $6\text{mg}/(\text{cm}^2)$ 至约 $12\text{mg}/(\text{cm}^2)$ 的肠溶包衣。肠溶包衣还可以以从约 $1\text{mg}/(\text{cm}^2)$ 、 $2\text{mg}/(\text{cm}^2)$ 、 $3\text{mg}/(\text{cm}^2)$ 、 $4\text{mg}/(\text{cm}^2)$ 、 $5\text{mg}/(\text{cm}^2)$ 、 $6\text{mg}/(\text{cm}^2)$ 、 $7\text{mg}/(\text{cm}^2)$ 、 $8\text{mg}/(\text{cm}^2)$ 、 $9\text{mg}/(\text{cm}^2)$ 、 $10\text{mg}/(\text{cm}^2)$ 、 $11\text{mg}/(\text{cm}^2)$ 、 $12\text{mg}/(\text{cm}^2)$ 、 $13\text{mg}/(\text{cm}^2)$ 、 $14\text{mg}/(\text{cm}^2)$ 、 $15\text{mg}/(\text{cm}^2)$ 、 $16\text{mg}/(\text{cm}^2)$ 、 $17\text{mg}/(\text{cm}^2)$ 、 $18\text{mg}/(\text{cm}^2)$ 、 $19\text{mg}/(\text{cm}^2)$ 至约 $20\text{mg}/(\text{cm}^2)$ 施加给结构。

[0217] 在一些实施方案中,包含受试者递送媒介物的药物组合物可由被设计用于提供延释的多种药物制剂口服施用。延释口服剂型包括例如片剂、胶囊、囊片(caplet),并且还可包括多种可包封或可不包封的颗粒、珠子、粉末或丸剂。片剂和胶囊可代表口服剂型,在这种情况下可使用固体药物载体。在延释制剂中,可将一种或多种屏障包衣施加给丸剂、片剂或胶囊,以促进将药物缓慢溶解并伴随的释放到肠内。通常,屏障包衣可含有一种或多种聚合物,所述聚合物包裹、包围治疗组合物或活性核心或者形成围绕治疗组合物或活性核心的层或膜。在一些实施方案中,活性剂如多核酸可在制剂中递送,以在施用后的预定时间提供延释。延迟的长度可长达约10分钟、约20分钟、约30分钟、约1小时、约2小时、约3小时、约4小时、约5小时、约6小时或最长1周。在一些情况下,肠溶包衣可不用于包衣颗粒。

[0218] 在一些情况下,可用于实现肠释放的聚合物或包衣可以是阴离子聚甲基丙烯酸酯(甲基丙烯酸和甲基丙烯酸甲酯或丙烯酸乙酯的共聚物(Eudragit®)),基于纤维素的聚合

物,例如纤维素乙酸酯邻苯二甲酸酯(Aquateric®),或聚乙烯基衍生物,例如聚乙酸乙烯酯邻苯二甲酸酯(Coateric®)。

[0219] 在一些情况下,制剂可以存在于单位剂量或多剂量容器中,例如密封的安瓿和小瓶,并且可以以冷冻或冷冻干燥(冻干)条件储存,仅需要在使用前即刻添加无菌液体载体。对于经口施用,组合物可采取例如通过常规技术利用以下制备的片剂或胶囊的形式:药学上可接受的赋形剂,例如粘合剂(例如,预糊化玉米淀粉、聚乙烯吡咯烷酮或羟丙基甲基纤维素);填充剂(例如,乳糖、微晶纤维素或磷酸氢钙);润滑剂(例如,硬脂酸镁、滑石或二氧化硅);崩解剂(例如,马铃薯淀粉或羟基乙酸淀粉钠);或润湿剂(例如,月桂基硫酸钠)。在一些情况下可对片剂进行包衣。用于经口施用的液体制备物可采用例如溶液、糖浆或悬浮液的形式,或者它们可作为干燥产品呈现,以供在使用前用水或其他合适的媒介物配制。此类液体制备物可通过常规技术利用以下制备:药学上可接受的添加剂,例如悬浮剂(例如,山梨醇糖浆、纤维素衍生物或氢化食用脂肪);乳化剂(例如,卵磷脂或阿拉伯胶);非水性媒介物(例如,杏仁油、油性酯、乙醇或分级植物油);以及防腐剂(例如,对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯或山梨酸)。制备物还可视情况含有缓冲盐、香味剂、着色剂和甜味剂。用于经口施用的制备物可适当配制,以产生活性化合物的控释。对于经颊施用,组合物可采用以常规方式配制的片剂或锭剂的形式。在一些情况下,组合物还可被配制成用于植入或注射的制备物。因此,例如,结构可用合适的聚合材料、水性材料和/或亲水材料或树脂配制,或者被配制成难溶(sparingly soluble)衍生物(例如,配制成难溶盐)。化合物还可被配制成在直肠组合物、乳膏或洗液或经皮贴剂中。

[0220] 在一些情况下,药物组合物可包含盐。盐可以是相对无毒的。药学上可接受的盐的示例包括衍生自无机酸如盐酸和硫酸的盐,以及衍生自有机酸如乙磺酸、苯磺酸、对甲苯磺酸等的盐。用于形成盐的合适无机碱的示例包括铵、钠、锂、钾、钙、镁、铝、锌等的氢氧化物、碳酸盐和碳酸氢盐。盐还可用合适的有机碱形成,包括那些无毒且足够强以形成此类盐的有机碱。出于说明目的,此类有机碱的种类可包括单烷基胺、二烷基胺和三烷基胺,例如甲胺、二甲胺和三乙胺;单羟基烷基胺、二羟基烷基胺或三羟基烷基胺,例如单乙醇胺、二乙醇胺和三乙醇胺;氨基酸,例如精氨酸和赖氨酸;胍;N-甲基葡萄糖胺;N-甲基葡糖胺;L-谷氨酰胺;N-甲基哌嗪;吗啉;乙二胺;N-苄基苯乙胺;(三羟基甲基)氨基乙烷;等等。

[0221] 尽管本文中已经显示和描述了本公开的优选实施方案,但是对于本领域技术人员来说,此类实施方案仅作为示例提供是显而易见的。在不脱离本公开的情况下,本领域技术人员将想到许多变化、改变和替换。应当理解,可以采用本文描述的本公开的实施方案的各种替代方案。以下权利要求旨在限定本公开的范围,并且由此涵盖了这些权利要求的范围内的方法和结构及其等价物。

[0222] 实施例

[0223] 实施例1:本公开的示例性递送媒介物的制备

[0224] 这个实施例提供了制备本公开的递送媒介物的示例性方法。将递送媒介物DODMA (Sigma Aldrich)、脱氧胆酸盐(Sigma Aldrich)、MVL5 (Avanti Polar Lipids)、DSPC (Avanti Polar Lipids)、DMG-PEG 2000 (Avanti Polar Lipids)、DOPC (Avanti Polar Lipids)、DiI (ThermoFisher Scientific)、DiO (ThermoFisher Scientific)的脂质组分溶解在乙醇中并加热至其相变温度以上,例如相变温度高于37°C。例如,当使用DSPC时,将脂

质和水相加热至70℃。当使用DOPC时,不加热脂质和水相并在室温下使用。将核酸溶解在加热至脂质相变温度以上的水性缓冲液中。

[0225] 将水性缓冲液的pH设定为低于胆汁盐和阳离子脂质的pKa。这样,当与核酸一起配制时,脂质是强阳离子的。为了形成带有负载物的递送媒介物,使用微流体通道将脂质和核酸混合,然后通过透析去除乙醇。其他合适的方法也可用于这个步骤。例如,脂质结构例如脂质体可以通过薄膜水合作用形成,其中脂质可以溶解在有机相中并使用旋转蒸发器(rotovap)在旋转下干燥。形成的薄膜可以在水中水合。可以将水合脂质加热至70℃,例如对于DSPC,或可以在室温下使用水合脂质,例如对于DOPC,并通过合适的挤出机孔径挤出。可以将核酸负载物与脂质混合以形成脂质复合物。

[0226] 用于制备示例性递送媒介物的另一种合适的替代方法是使用薄膜水合。将脂质溶解并混合在有机溶剂中。去除溶剂,并使形成的薄膜在水溶液中水合。使用超声处理或挤出适当调整脂质大小。可以通过将脂质混合物和核酸混合在一起来复合核酸。

[0227] 示例性递送媒介物的配制

[0228] 为了制备包含包封核酸的示例性递送媒介物,将编码在巨细胞病毒(CMV)启动子下的Gaussia荧光素酶的300μg质粒DNA溶解在最终体积为3mL的50mM醋酸钠缓冲液(pH 4.8)中。将合适摩尔的MVL5、DODMA、脱氧胆酸盐、MVL5、DSPC、DMG-PEG2000和/或DOPC根据它们的摩尔以及阳离子脂质:核酸比率混合在乙醇中(参见表2中的制备的各种制剂中的脂质的摩尔%)。阳离子脂质:核苷酸摩尔比保持在约16。荧光标记的脂质,例如DiI和DiO,在使用时以总脂质摩尔的0.5%添加到混合物中。将乙醇体积升至1mL。

[0229] 核酸在3mL注射器中的水性醋酸钠缓冲相中。脂质在1mL注射器中的乙醇中。将两个注射器安装在NanoAssemblr(Precision Nanosystems)上,然后使用NanoAssemblr上的微流体芯片将两个样品混合。

[0230] 对于本研究,将样品装入NanoAssemblr Benchtop上的注射器(如上所述,3mL注射器中的核酸和1mL注射器中的脂质)并预热至65℃用于DSPC制剂或在室温(约25℃)下用于DOPC制剂。使用NanoAssemblr Benchtop微流体芯片系统以6mL/min的流速混合样品。用pH 7.5的300mM HEPES缓冲液中和pH。使用过夜透析去除乙醇。使用截留分子量为100kDa的Amicon Ultra-4浓缩样品。

[0231] 表2:制备的制剂示例

	脂质组分	制剂编号	脂质比率(摩尔%)
[0232]	DODMA/DSPC/脱氧胆酸盐/PEG-DMG	1	40/31.6/25.9/2.5
		2	30/37.1/30.4/2.5
		3	20/42.6/34.9/2.5
		4	10/48.1/39.4/2.5
		5	25/37.1/30.4/7.5
	MVL5/DODMA/DSPC/脱氧胆酸盐/DMG-PEG	6	6.25/18.75/37.1/30.4/7.5
		7	12.5/12.5/37.1/30.4/7.5
		8	18.75/6.25/37.1/30.4/7.5
	MVL5/DSPC/脱氧胆酸盐/DMG-PEG	9	25/37.1/30.4/7.5
[0233]	DSPC/脱氧胆酸盐	10	55/45
	DOPC/脱氧胆酸盐	11	55/45
	DSPC/脱氧胆酸盐/DMG-PEG	12	53.6/43.9/2.5
	DSPC/Chol	13	55/45
	MVL5/DODMA/DSPC/DMG-PEG	14	17.3/17.3/58.1/7.1
	MVL5/DODMA/脱氧胆酸盐/DMG-PEG	15	19.5/19.5/52.8/8
	MVL5/DODMA/DSPC/脱氧胆酸盐	16	12.5/12.5/41.3/33.7

[0234] 实施例2:本公开的示例性递送媒介物的转染

[0235] 在这个研究中,评估了示例性递送媒介物(如使用上述实施例1中描述的方法制备)的转染效率。将培养至50-80%之间的汇合度的HEK细胞用于转染。在24孔板中每孔使用1 μ g包封在脂质纳米颗粒(如上表2中所列)中的表达Gaussia荧光素酶的质粒DNA。通过在24h后取30 μ l培养基并进行快速荧光素酶测定(Pierce Gaussia荧光素酶测定试剂盒)来评估转染效率。相对光单位(RLU)值的增加对应于更高的转染效率。

[0236] 观察到,多价阳离子脂质MVL5的存在显著增加了转染,这可能是通过在胆汁盐稳定系统上发挥积极或中性特征。这可能是由于增加的内体逃逸。由于稳定所需的其多价性(在生理pH下为+3,在溶酶体pH下为+5)以及带负电荷的胆汁盐的高摩尔比,MVL5和其他多价脂质可以最为适合这个系统。数据如图1所示。

[0237] 实施例3:本公开的示例性递送媒介物的稳定性

[0238] 在这个研究中,评估了示例性递送媒介物在高胆汁盐环境中的稳定性。为了测定递送媒介物的稳定性,本测定中使用的递送媒介物并入了DiI和DiO各0.5mol%。DiI和DiO是荧光染料,它们是FRET对。通过使用所示浓度的胆酸和脱氧胆酸盐的等量混合物,来模拟胆汁盐(在图2-4中)。预期如果递送媒介物容易被胆汁盐破坏,将导致FRET强度降低。通过在465nm处激发并在501nm和570nm处读取发射来确定相对荧光单位(RFU)。将570nm处的RFU读数除以501nm处的读数。将读数相对于无任何处理的系统的FRET强度进行标准化。数据如

图2、图3和图4所示。

[0239] 这个研究表明,DSPC/脱氧胆酸盐(如在制剂编号10号)而不是DOPC/脱氧胆酸盐(如在制剂编号11中)对胆汁盐稳定。应该指出的是,DOPC/脱氧胆酸盐类似于弹性脂质体,其被发现对胆汁盐高度敏感。相比之下,发现DSPC/脱氧胆酸盐对胆汁盐攻击高度耐受。此外,还发现DSPC/胆固醇(如制剂编号13中)对胆汁盐不耐受。这表明,饱和脂质尾的存在不足以提供针对胆汁盐的稳定性,并且胆汁盐(例如,脱氧胆酸盐)必须并入脂质纳米颗粒中以提供稳定性。

[0240] 此外,如图4所示,观察到聚乙二醇化(如制剂编号16中)不是稳定性所必需的,但省去了高相变温度脂质(如制剂编号15中),或省去了胆汁盐(如制剂编号14中),导致了递送媒介物的胆汁盐稳定性丧失。

[0241] 实施例4:核酸在本公开的示例性递送媒介物中的包封

[0242] 对于这个研究,将含有1 μ g由脂质纳米颗粒(表2中的制剂编号5)包封的DNA的递送媒介物上样至琼脂糖凝胶的泳道中,其或者未经处理(图5中的泳道2),或者(ii)用7% Triton-X 100(图5中的泳道3)处理,或者(iii)处理是7% Triton-X 100加70 $^{\circ}$ C 30分钟(图5中的泳道4),然后进行电泳。使用SYBR Safe通过UV光检测DNA。对于含有阳离子脂质的胆汁盐稳定系统(泳道2,未处理)没有发现DNA条带,表明有包封并且DNA没有从递送媒介物中释放出来;然而,当使用清洁剂和加热破坏系统时,会看到DNA条带(泳道3和4),表明媒介物在这种环境中不稳定,且DNA在处理后会释放。数据如图5所示。这证明了将负载物(例如DNA)包封在在胆汁盐环境中稳定的益处,尤其对于在高胆汁盐环境(例如胃肠道)中的有效保护。

[0243] 实施例5:具有负载物的递送媒介物的制备

[0244] 核酸负载物的包封如下进行:将脂质溶解在乙醇中并加热至其相变温度以上。将核酸溶解在水性缓冲液中,加热至脂质的相变温度以上。将水性缓冲液的pH设定为低于胆汁盐和阳离子脂质的pKa。这样,当与核酸一起配制时,脂质是强阳离子的。使用微流体通道混合脂质和核酸。将pH升至中性并浓缩样品,并使用透析去除乙醇。

[0245] 材料:DODMA(Sigma Aldrich)、脱氧胆酸盐(Sigma Aldrich)、MVL5(Avanti Polar Lipids)、DSPC(Avanti Polar Lipids)、DMG-PEG 2000(Avanti Polar Lipids)、DOPC(Avanti Polar Lipids)、DiI(ThermoFisher Scientific)、DiO(ThermoFisher Scientific)和GMO(MP Biomedicals)

[0246] 制剂

[0247] 将编码在CMV启动子下的gaussia荧光素酶的质粒DNA 375 μ g溶解在最终体积为3mL的50mM醋酸钠缓冲液(pH 4.8)中。将合适摩尔的MVL5、DODMA、脱氧胆酸盐、MVL5、DSPC、GMO、DMG-PEG2000和/或DOPC根据它们的摩尔和阳离子脂质:核酸比率混合在乙醇中。阳离子脂质:核苷酸摩尔比率保持恒定为16。当脂质用DiI和DiO荧光标记时,将每种DiI和DiO以总脂质摩尔的0.5%mol添加到混合物中。将乙醇体积升至1mL。将样品装入Nanoassemblr Benchtop(Precision NanoSystems,CA)上的注射器中,并对于DSPC制剂预热至65 $^{\circ}$ C或对于DOPC制剂在室温。使用NanoAssemblr Benchtop微流体芯片系统以6mL/min的流速混合样品。中和pH值,并然后使用过夜透析去除乙醇。使用截断值为100kDa的Amicon Ultra-4(Merck Millipore Ltd,Ireland)浓缩样品。

[0248] 如表3所示制备以下制剂。

[0249] 表3:制备的示例制剂

	制剂	颗粒#	摩尔比率
	DODMA/DSPC/脱氧胆酸盐	1	25/41.25/33.75
	MVL5/DODMA/DSPC/脱氧胆酸盐	2	6.25/18.75/41.25/33.75
	MVL5/DODMA/DSPC/脱氧胆酸盐	3	12.5/12.5/41.25/33.75
	MVL5/DODMA/DSPC/脱氧胆酸盐	4	18.75/6.25/41.25/33.75
[0250]	MVL5/DODMA/DSPC/脱氧胆酸盐 /DMG-PEG	5	12.4/12.4/40.8/33.4/1
	MVL5/DODMA/DSPC/脱氧胆酸盐 /DMG-PEG	6	12.25/12.25/40.4/33.1/2
	MVL5/DODMA/DSPC/脱氧胆酸盐 /DMG-PEG	7	12.1/12.1/40.0/32.7/3
	MVL5/DODMA/DSPC/脱氧胆酸盐 /DMG-PEG	8	11.9/11.9/39.2/32.1/5
	MVL5/DODMA/DSPC/脱氧胆酸盐 /DMG-PEG	9	11.25/11.25/37.1/30.4/10
	MVL5/DSPC/脱氧胆酸盐	10	25/41.25/33.75
	MVL5/DODMA/DOPC/脱氧胆酸盐 /DMG-PEG	11	12.4/12.4/40.8/33.4/1
[0251]	MVL5/DODMA/GMO/脱氧胆酸盐 /DMG-PEG	12	12.4/12.4/40.8/33.4/1
	MVL5/DODMA/DSPC/脱氧胆酸盐 /DSG-PEG	13	12.4/12.4/40.8/33.4/1
	MVL5/DODMA/DSPC/脱氧胆酸盐 /DSG-PEG	14	12.25/12.25/40.4/33.1/2
	MVL5/DODMA/DSPC/脱氧胆酸盐 /DSG-PEG	15	12.1/12.1/40.0/32.7/3

[0252] 总之,具有DMG-PEG的颗粒即使在1%DMG-PEG下也很稳定,并且不会形成聚集体。DSG具有硬脂酸脂质尾部,其在37°C时存在于凝胶相中。DMG具有肉豆蔻酸脂质尾部,其在37°C时处于液相中。DMG-PEG存在于媒介物的液相部分中,并因此使阳离子脂质稳定,防止聚集,而DSG-PEG在凝胶相部分中,并且无法提供相同的稳定作用。

[0253] 实施例6:递送媒介物的体内施用

[0254] 向小鼠直肠内施用约30微克包封在DiI和DiO标记的纳米颗粒中的DNA。给药4小时

后,处死小鼠,将肠包埋在OCT中并在干冰中冷冻并储存于-80℃。将组织冷冻切片成30微米的切片,并使用BioTek Cytation 1进行成像。在RFP通道中测量DiI荧光。

[0255] 聚乙二醇化颗粒无法到达肠上皮细胞

[0256] MVL5/DODMA/DSPC/脱氧胆酸盐/DMG-PEG (颗粒5-9) 颗粒利用增加的多个量的DMG-PEG形成,并在体内研究了颗粒的行为。增加量的DMG-PEG导致肠道组织的分布减少。这与当前的增加聚乙二醇化以增加肠上皮到达的这一观点相矛盾。我们认为,增加的聚乙二醇化通过其屏蔽特性减少了表面上正电荷的暴露。这减少了颗粒的双重性质,如图6(颗粒5)、图7(颗粒6)、图8(颗粒7)、图9(颗粒8)和图10(颗粒9)所示。

[0257] 实施例7:递送媒介物体内测试

[0258] 如图11A、图11B、图12A、图12B、图13A、图13B、图14A和图14B所示,MVL5/DODMA的比率在具有DiI和DiO的DSPC/脱氧胆酸盐/DMG-PEG中改变,以研究增加正电荷的影响。形成颗粒中的以下MVL5/DODMA比率:(0%/25%)、(6.25%/18.75%)、(12.5%/12.5%)、(18.75%、6.25%)、(25%/0%)。由于DODMA在中性pH值下大部分是中性的并且是单价的,因此脱氧胆酸盐的负电荷和MVL5的多价电荷主导了颗粒的行为。增加MVL5,从而增加电荷。

[0259] 数据显示,12.5%/12.5%MVL5/DODMA比率对于体内颗粒的肠上皮分布是最佳的。太多的MVL5会提供太强的阳离子特性,导致粘附在带负电荷的粘液上。MVL5太少会导致带负电荷的颗粒,其可能排斥粘液或不具有相互作用。此外,制备了MVL5/DODMA/DSPC/Chol/DMG-PEG颗粒,并发现它们不能到达肠上皮细胞。总之,需要双重电荷来以仔细平衡的电荷到达肠上皮细胞,如图11A、图11B、图12A、图12B、图13A、图13B、图14A和图14B所示。

[0260] 实施例8:两性离子递送媒介物与双相递送媒介物

[0261] 如实施例1所述地产生递送媒介物,并如实施例7所述地在体内进行测试。两性离子性先前已显示在不存在PEG的情况下增加粘液穿透。为了研究两性离子性而不是双相性质是否足够,在将颗粒设计为单相的情况下制备颗粒。为了制造单相颗粒,低相变温度脂质(即,含有DOPC或GMO)被代替,而非DSPC。颗粒上的电荷保持相同。发现仅为液相的颗粒(含有DOPC或GMO而非DSPC)具有显著减少或极少的肠上皮细胞到达。

[0262] 总之,数据显示,仅存在两性离子性不足以实现肠上皮细胞到达,如图16A、图16B、图16C和图16D所示。

[0263] 实施例9:具有胆汁盐的递送媒介物的稳定性

[0264] 使用先前在实施例1中描述的方法制备以下制剂:MVL5:MC2 (Biofine International LLC, Vancouver BC Canada):胆汁盐:DSPC:DMG-PEG2000:DiI:DiO的摩尔比率为0.96:0.96:2.592:3.168:0.0768:0.0384:0.0384,其中胆汁盐组分是熊脱氧胆酸(ursodiol)、脱氧胆酸盐(deoxycholate)、石胆酸盐(lithocholate)、异石胆酸盐(isolithocholate)、别异石胆酸盐(alloisolithocholate)、脱氢石胆酸盐(dehydrolithocholate)或5 β -胆烷酸()。不将核酸并入脂质纳米颗粒中。

[0265] 也可以产生替代制剂,例如表4中提供的制剂。

[0266] 表4:合适的可选胆汁盐制剂

	制剂	摩尔比率
	MVL5/MC2/DSPC/脱氧胆酸盐/DMPE-PEG	2.4/2.4/7.9/6.48/0.192
	MVL5/CL1H6/DSPC/脱氧胆酸盐/DMG-PEG	2.4/2.4/7.9/6.48/0.192
	MVL5/CL4H6/DSPC/脱氧胆酸盐/DMG-PEG	2.4/2.4/7.9/6.48/0.192
	MVL5/MC2/DSPC/Cheno 脱氧胆酸盐/DMG-PEG	2.4/2.4/7.9/6.48/0.192
	MVL5/MC2/DMPC/脱氧胆酸盐/DMG-PEG	2.4/2.4/7.9/6.48/0.192
[0267]	MVL5/MC2/DMPC/脱氧胆酸盐/DMPE-PEG	2.4/2.4/7.9/6.48/0.192
	MVL5/CL1H6/DMPC/脱氧胆酸盐/DMG-PEG	2.4/2.4/7.9/6.48/0.192
	MVL5/MC2/DSPC/脱氧胆酸盐/石胆酸盐 /DMG-PEG	2.4/2.4/7.9/5.2/1.3/0.192
	MVL5/CL1H6/DSPC/脱氧胆酸盐/石胆酸盐 /DMG-PEG	2.4/2.4/7.9/5.2/1.3/0.192
	MVL5/MC2/DSPC/别异石胆酸盐/DMG-PEG	2.4/2.4/7.92/6.48/0.192
	MVL5/MC2/DSPC/脱氢石胆酸盐/DMG-PEG	2.4/2.4/7.92/6.48/0.192

[0268] 如前所述地测量胆汁盐中脂质纳米颗粒的稳定性,高至10g/L。将来自DiI和DiO的FRET信号相对于无处理进行标准化。盐形式的媒介物的稳定性水平如图20所示。

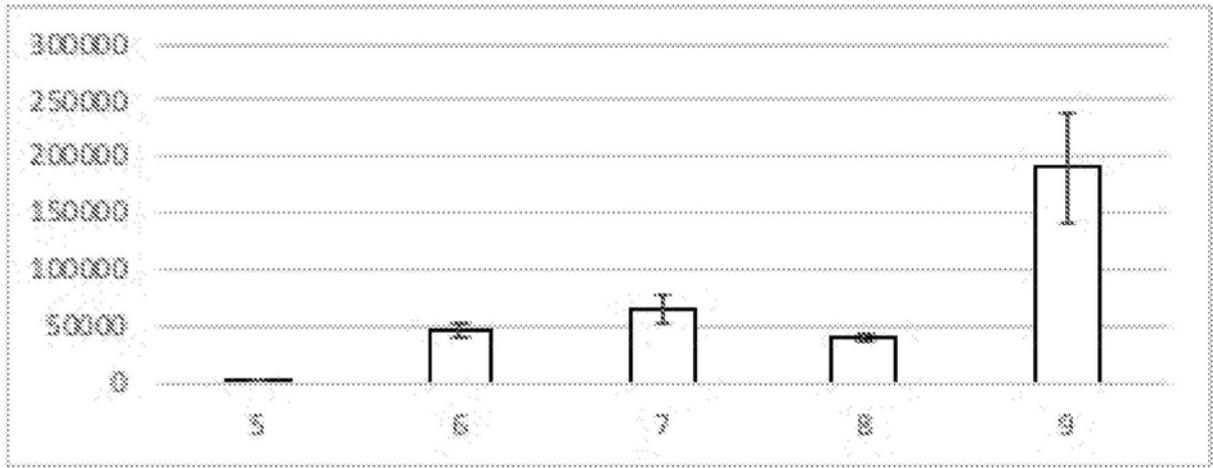


图1

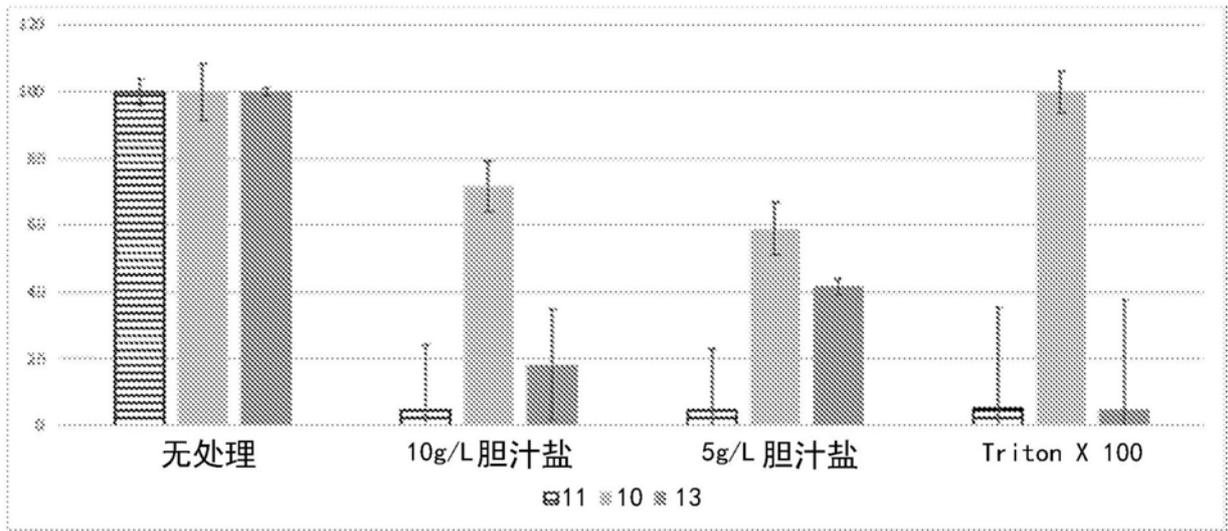


图2

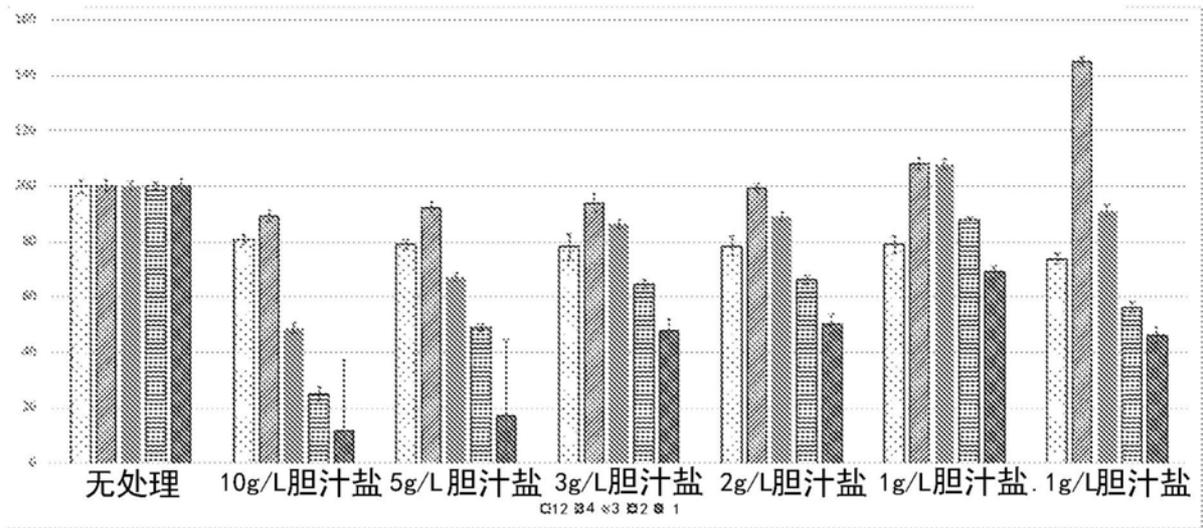


图3

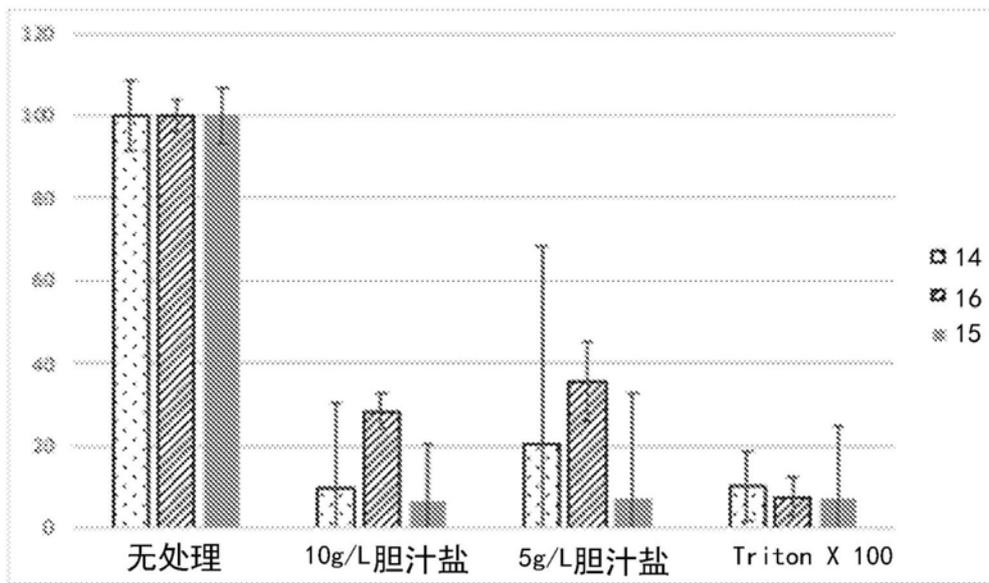


图4

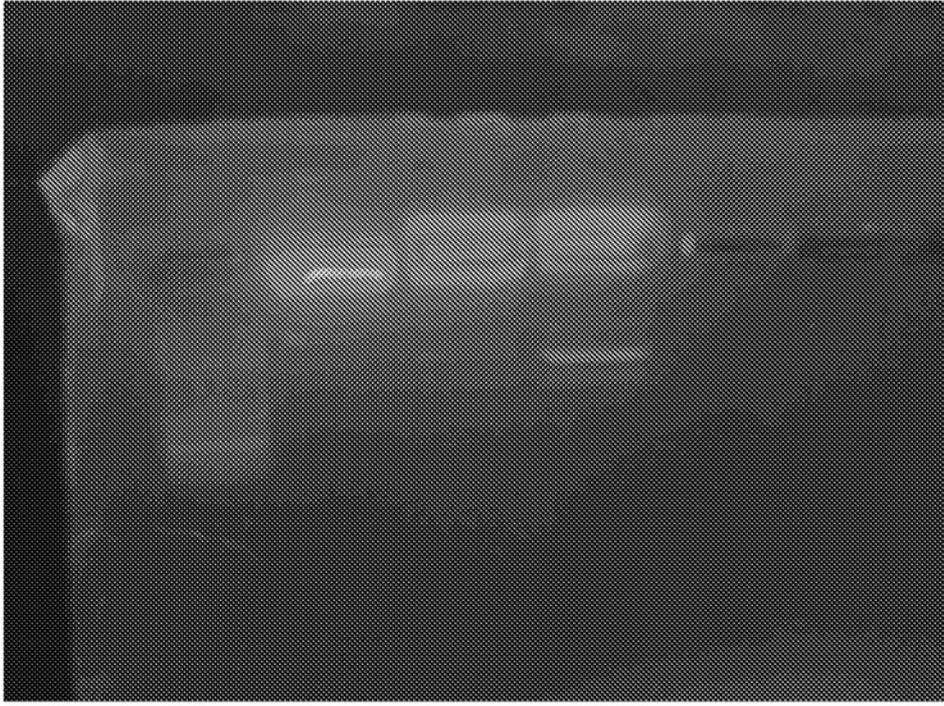


图5



图6

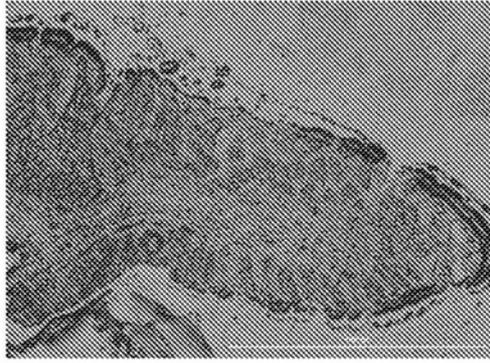


图7

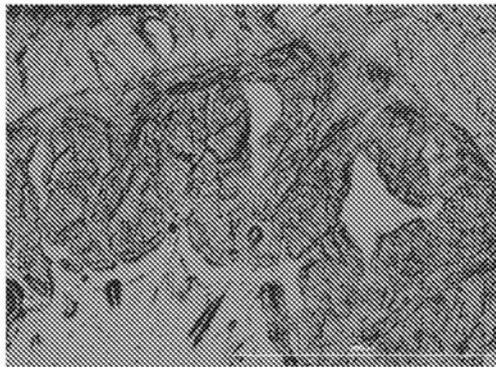


图8

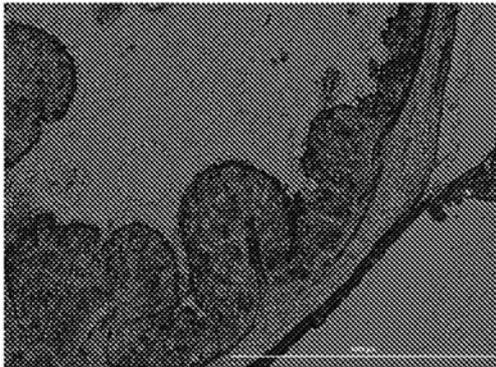


图9



图10

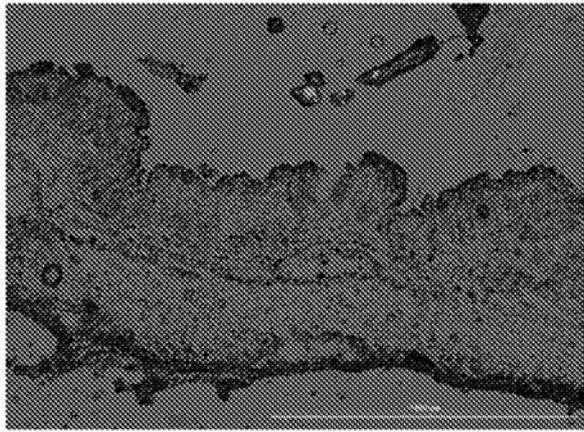


图11A

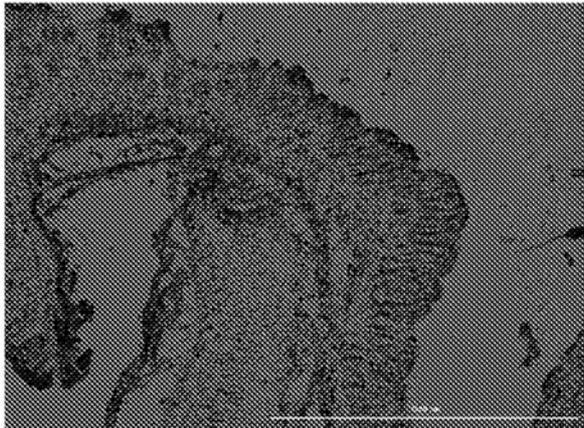


图11B

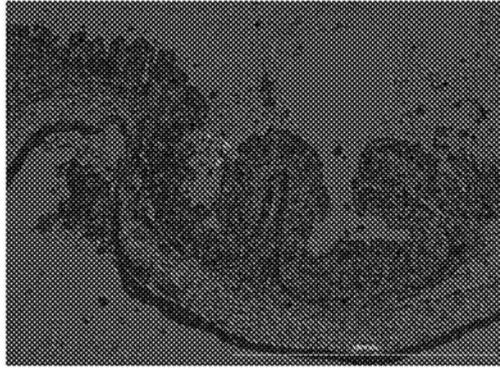


图12A

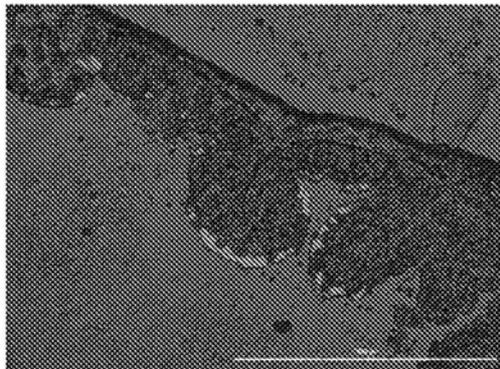


图12B

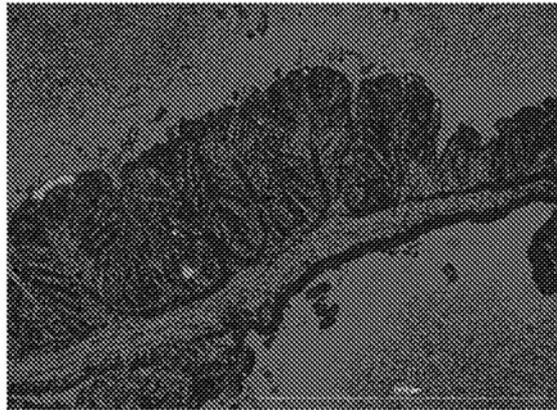


图13A

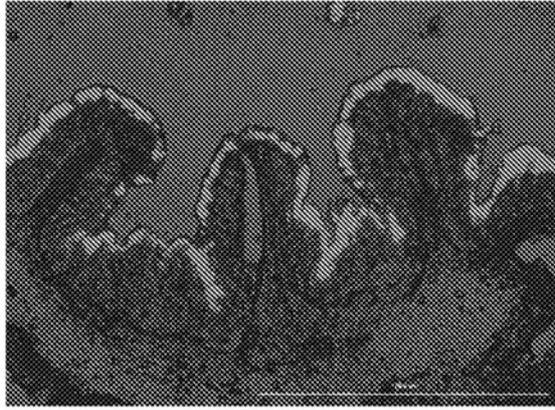


图13B

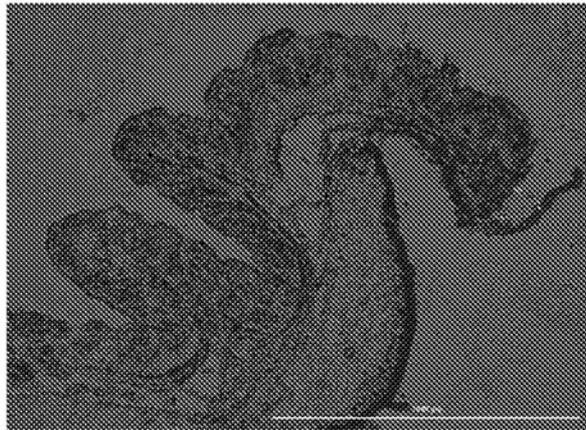


图14A

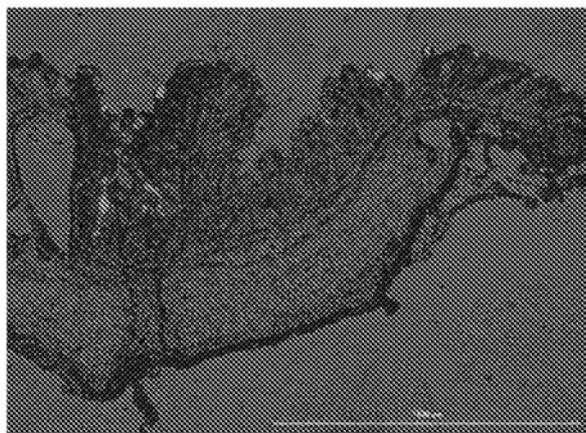


图14B

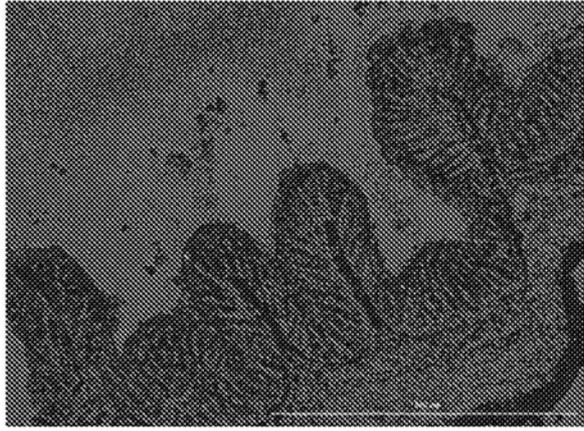


图15A

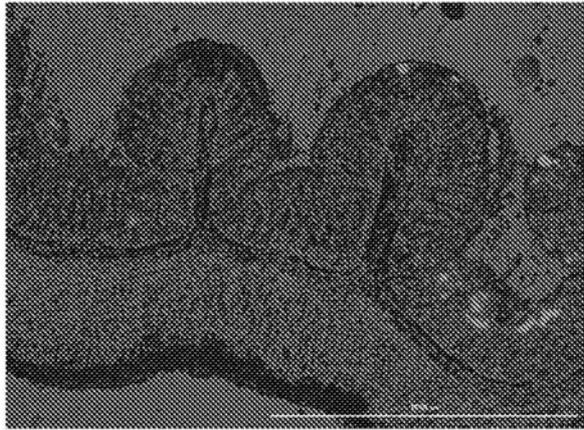


图15B

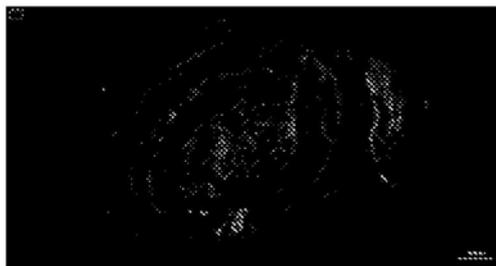


图16A

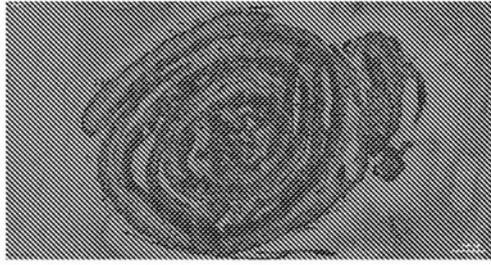


图16B

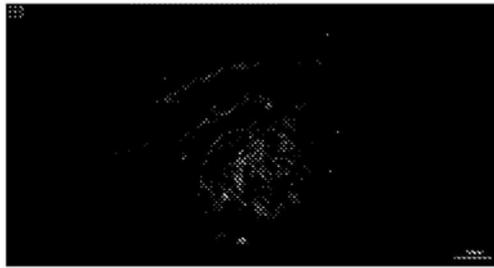


图16C

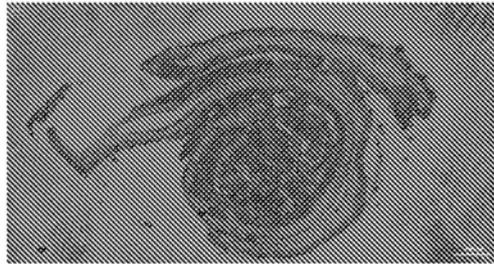


图16D



图17A

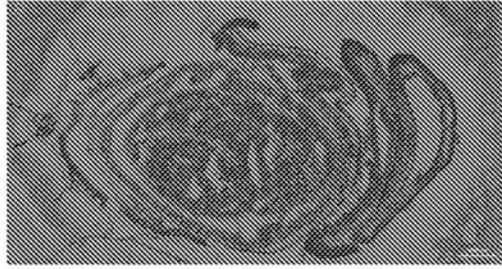


图17B

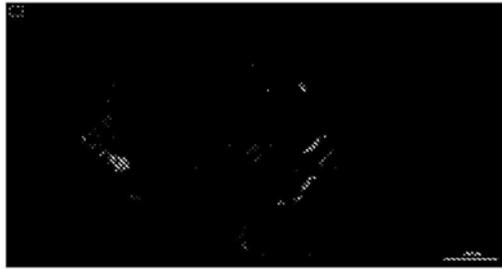


图17C

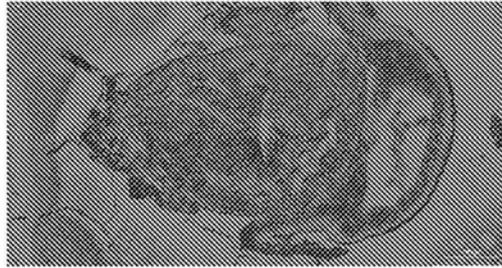


图17D



图18A

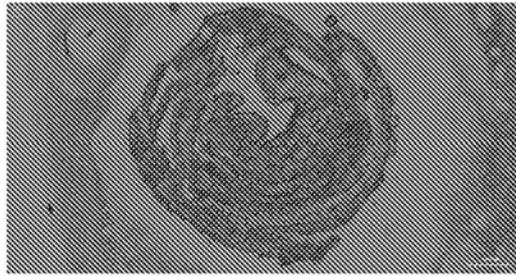


图18B

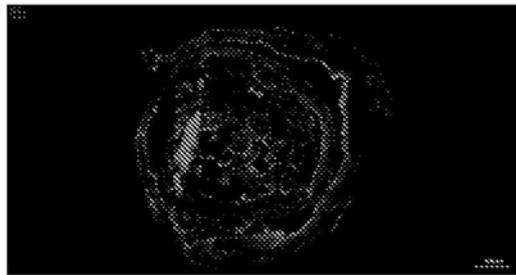


图18C



图18D

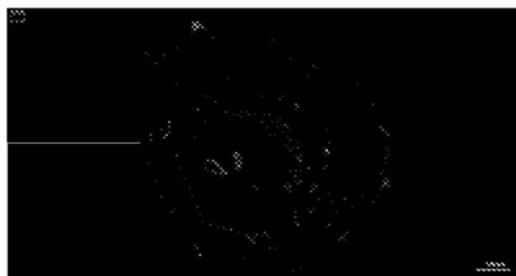


图19A

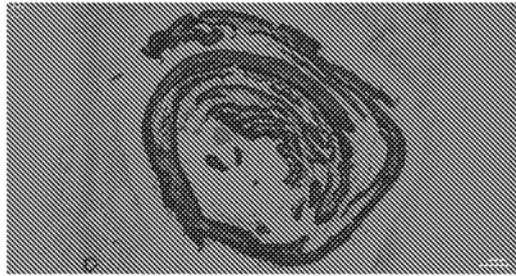


图19B



图19C

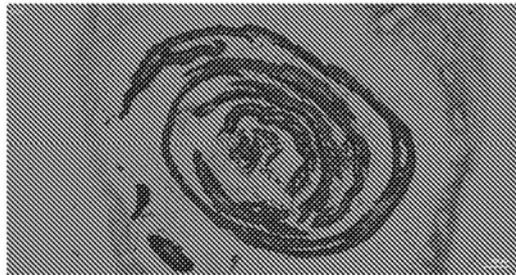


图19D

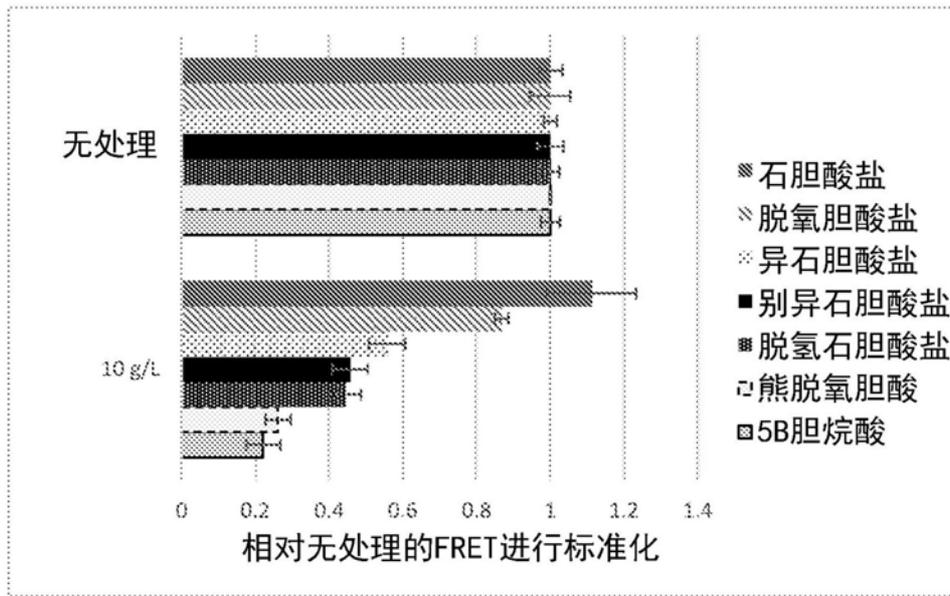


图20