



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118201639 A

(43) 申请公布日 2024.06.14

(21) 申请号 202280044059.3

帕德玛纳·奇福库拉

(22) 申请日 2022.05.05

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

(30) 优先权数据

63/184,568 2021.05.05 US

专利代理师 王玮玮 郑霞

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.12.20

(51) Int. Cl.

A61K 47/54 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2022/027857 2022.05.05

C07K 5/10 (2006.01)

A61K 47/69 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/235923 EN 2022.11.10

A61K 47/62 (2006.01)

(71) 申请人 阿克丘勒斯治疗公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 库马尔·拉贾潘 史蒂文·塔尼斯

拉杰什·穆塔瓦拉 阿米特·萨吉

普里亚·普拉卡什·卡马利

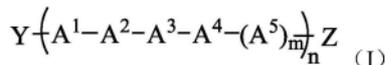
权利要求书10页 说明书93页 附图3页

(54) 发明名称

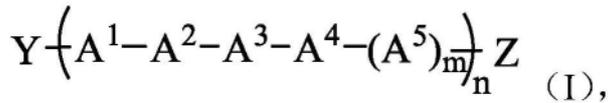
肽-脂质缀合物

(57) 摘要

提供了肽和肽-脂质缀合物,其中所述肽具有通式(I),其中,A<sup>1</sup>选自丝氨酸、苏氨酸、O-C<sub>1-6</sub>烷基丝氨酸和O-C<sub>1-6</sub>烷基苏氨酸;A<sup>2</sup>选自丝氨酸、苏氨酸、O-C<sub>1-6</sub>烷基丝氨酸和O-C<sub>1-6</sub>烷基苏氨酸;A<sup>3</sup>选自谷氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺和天冬氨酸;A<sup>4</sup>是脯氨酸;每个A<sup>5</sup>独立地选自天然或经修饰的氨基酸;所述肽-脂质缀合物可以用于脂质调配物中以递送核酸。



1. 一种肽-脂质缀合物或其药学上可接受的盐,其包括通过连接部分与式(I)的肽缀合的脂质:



其中,

$A^1$ 选自丝氨酸、苏氨酸、 $O$ - $C_{1-6}$ 烷基丝氨酸和 $O$ - $C_{1-6}$ 烷基苏氨酸;

$A^2$ 选自丝氨酸、苏氨酸、 $O$ - $C_{1-6}$ 烷基丝氨酸和 $O$ - $C_{1-6}$ 烷基苏氨酸;

$A^3$ 选自谷氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺和天冬氨酸;

$A^4$ 是脯氨酸;

每个 $A^5$ 独立地选自天然或经修饰的氨基酸;

$Y$ 不存在或选自以下: $A^2 - A^3 - A^4 - (A^5)_m$ 、 $A^3 - A^4 - (A^5)_m$ 、 $A^4 - (A^5)_m$ 和 $(A^5)_m$ ;

$Z$ 不存在或选自以下: $-A^1 - A^2 - A^3 - A^4$ 、 $-A^1 - A^2 - A^3$ 、 $-A^1 - A^2$ 和 $-A^1$ ;

$m$ 是0至5;

$n$ 是1至12;

其中所述脂质与所述式(I)的肽的N-末端、C-末端或氨基酸侧链缀合;并且

其中所述式(I)的肽在其N-末端或氨基酸侧链处缀合时任意地被在其C-末端处选自酰胺和 $C_{1-6}$ 烷基酯的中性基团保护。

2. 根据权利要求1所述的肽-脂质缀合物,其中 $A^1$ 是丝氨酸或 $O$ - $C_{1-6}$ 烷基丝氨酸。

3. 根据权利要求1所述的肽-脂质缀合物,其中 $A^1$ 是苏氨酸或 $O$ - $C_{1-6}$ 烷基苏氨酸。

4. 根据权利要求1所述的肽-脂质缀合物,其中 $A^2$ 是丝氨酸或 $O$ - $C_{1-6}$ 烷基丝氨酸。

5. 根据权利要求1所述的肽-脂质缀合物,其中 $A^2$ 是苏氨酸或 $O$ - $C_{1-6}$ 烷基苏氨酸。

6. 根据权利要求1所述的肽-脂质缀合物,其中 $A^3$ 是谷氨酸。

7. 根据权利要求1所述的肽-脂质缀合物,其中 $A^3$ 是谷氨酰胺。

8. 根据权利要求1所述的肽-脂质缀合物,其中 $A^3$ 是天冬氨酸。

9. 根据权利要求1所述的肽-脂质缀合物,其中 $A^3$ 是天冬酰胺。

10. 根据权利要求1所述的肽-脂质缀合物,其中每个 $A^5$ 独立地是天然氨基酸。

11. 根据权利要求10所述的肽-脂质缀合物,其中每个 $A^5$ 是脯氨酸。

12. 根据权利要求1所述的肽-脂质缀合物,其中每个 $A^5$ 选自以下:丝氨酸、苏氨酸、 $O$ - $C_{1-6}$ 烷基丝氨酸、 $O$ - $C_{1-6}$ 烷基苏氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺和天冬氨酸。

13. 根据权利要求1所述的肽-脂质缀合物,其中

$A^1$ 是丝氨酸或 $O$ - $C_{1-6}$ 烷基丝氨酸;

$A^2$ 是苏氨酸或 $O$ - $C_{1-6}$ 烷基苏氨酸;并且

$A^3$ 是谷氨酸或谷氨酰胺。

14. 根据权利要求13所述的肽-脂质缀合物,其中 $A^3$ 是谷氨酸。

15. 根据权利要求13所述的肽-脂质缀合物,其中 $A^3$ 是谷氨酰胺。

16. 根据权利要求1所述的肽-脂质缀合物,其中所述式(I)的肽的甘氨酸含量小于所述式(I)的肽中的氨基酸的约20%。

17. 根据权利要求1所述的肽-脂质缀合物,其中所述式(I)的肽不包括甘氨酸。

18. 根据权利要求1所述的肽-脂质缀合物,其中所述式(I)的肽中的所有氨基酸是L-氨基酸。

19. 根据权利要求1所述的肽-脂质缀合物,其中所述式(I)的肽中的所有氨基酸是D-氨基酸。

20. 根据权利要求1所述的肽-脂质缀合物,其中所述式(I)的肽中的所述氨基酸是L-氨基酸和D-氨基酸的混合物。

21. 根据权利要求1所述的肽-脂质缀合物,其中m是0。

22. 根据权利要求1所述的肽-脂质缀合物,其中m是1。

23. 根据权利要求1所述的肽-脂质缀合物,其中m是2。

24. 根据权利要求1所述的肽-脂质缀合物,其中n是1。

25. 根据权利要求1所述的肽-脂质缀合物,其中n是2。

26. 根据权利要求1所述的肽-脂质缀合物,其中n是3。

27. 根据权利要求1所述的肽-脂质缀合物,其中n是4。

28. 根据权利要求1所述的肽-脂质缀合物,其中n是5。

29. 根据权利要求1所述的肽-脂质缀合物,其中n是6。

30. 根据权利要求1所述的肽-脂质缀合物,其中n是7。

31. 根据权利要求1所述的肽-脂质缀合物,其中n是8。

32. 根据权利要求1所述的肽-脂质缀合物,其中n是9。

33. 根据权利要求1所述的肽-脂质缀合物,其中n是10。

34. 根据权利要求1所述的肽-脂质缀合物,其中n是11。

35. 根据权利要求1所述的肽-脂质缀合物,其中Y不存在。

36. 根据权利要求1所述的肽-脂质缀合物,其中Y是 $-A^2-A^3-A^4-(A^5)_m^-$ 。

37. 根据权利要求1所述的肽-脂质缀合物,其中Y是 $-A^3-A^4-(A^5)-A_m^-$ 。

38. 根据权利要求1所述的肽-脂质缀合物,其中Y是 $-A^4-(A^5)_m^-$ 。

39. 根据权利要求1所述的肽-脂质缀合物,其中Y是 $-(A^5)_m^-$ 。

40. 根据权利要求1所述的肽-脂质缀合物,其中Z不存在。

41. 根据权利要求1所述的肽-脂质缀合物,其中Z是 $-A^1-A^2-A^3-A^4$ 。

42. 根据权利要求1所述的肽-脂质缀合物,其中Z是 $-A^1-A^2-A^3$ 。

43. 根据权利要求1所述的肽-脂质缀合物,其中Z是 $-A^1-A^2$ 。

44. 根据权利要求1所述的肽-脂质缀合物,其中Z是 $-A^1$ 。

45. 根据权利要求1所述的肽-脂质缀合物,其中所述脂质通过所述连接部分与所述式(I)的肽的所述N-末端缀合。

46. 根据权利要求1所述的肽-脂质缀合物,其中所述脂质通过所述连接部分与所述式(I)的肽的所述C-末端缀合。

47. 根据权利要求1所述的肽-脂质缀合物,其中所述连接部分包括选自以下的基团:酰胺基(-C(O)NH-)、氨基(-NR<sup>N</sup>-),其中R<sup>N</sup>选自以下:H、C<sub>1-6</sub>烷基、羰基(-C(O)-)、氨基甲酸酯(-NHC(O)O-)、尿素(-NHC(O)NH-)、二硫化物(-S-S-)、醚(-O-)、琥珀酰基(succinyl)(-(O)CCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)-)、琥珀酰亚胺基(-NHC(O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)NH-)、醚、碳酸酯(-OC(O)O-)、琥珀酰基(succinoyl)、磷酸酯(-O-(O)POH-O-)、-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>j</sub>-,其中j是1至12,磺酰胺(-S(O)<sub>2</sub>NH-)

和磺酸酯。

48. 根据权利要求1所述的肽-脂质缀合物,其中所述肽的长度为约四个氨基酸至约60个氨基酸。

49. 根据权利要求48所述的肽-脂质缀合物,其中所述肽由12个氨基酸组成。

50. 根据权利要求48所述的肽-脂质缀合物,其中所述肽由16个氨基酸组成。

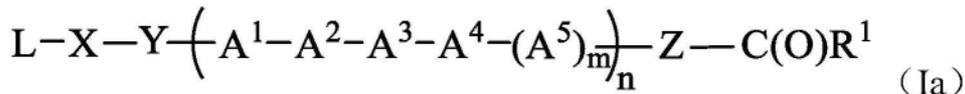
51. 根据权利要求48所述的肽-脂质缀合物,其中所述肽由20个氨基酸组成。

52. 根据权利要求48所述的肽-脂质缀合物,其中所述肽由24个氨基酸组成。

53. 根据权利要求48所述的肽-脂质缀合物,其中所述肽由28个氨基酸组成。

54. 根据权利要求48所述的肽-脂质缀合物,其中所述肽由32个氨基酸组成。

55. 根据权利要求1所述的肽-脂质缀合物,其中所述式(I)的肽具有式(Ia)的结构:



其中,

L是肽脂质缀合物的脂质;

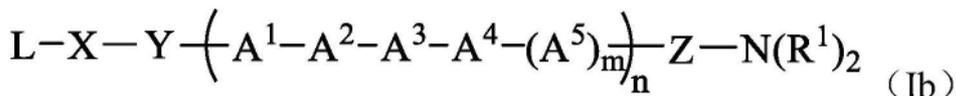
X是连接部分;

C(O)R<sup>1</sup>是所述式(I)的肽的C-末端;并且

R<sup>1</sup>选自以下: -OH、-O-C<sub>1-6</sub>烷基和N(R<sup>2</sup>)<sub>2</sub>,其中每个R<sup>2</sup>独立地是H或C<sub>1-6</sub>烷基。

56. 根据权利要求55所述的肽-脂质缀合物,其中X选自以下:酰胺基(-C(O)NH-)、氨基(-NR<sup>N</sup>-),其中R<sup>N</sup>选自以下:H、C<sub>1-6</sub>烷基、羰基(-C(O)-)、氨基甲酸酯(-NHC(O)O-)、尿素(-NHC(O)NH-)、二硫化物(-S-S-)、醚(-O-)、琥珀酰基(succinyl)(-(O)CCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)-)、琥珀酰亚胺基(-NHC(O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)NH-)、醚、碳酸酯(-OC(O)O-)、琥珀酰基(succinoyl)、磷酸酯(-O-(O)POH-O-)、-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>j</sub>-,其中j是1至12,磺酰胺(-S(O)<sub>2</sub>NH-)和磺酸酯。

57. 根据权利要求1所述的肽-脂质缀合物,其中所述式(I)的肽具有式(Ib)的结构:



其中,

L是肽脂质缀合物的脂质;

X是连接部分;

N(R<sup>1</sup>)<sub>2</sub>是式(Ia)的所述肽的N-末端;并且

每个R<sup>1</sup>独立地选自H和C<sub>1-6</sub>烷基。

58. 根据权利要求57所述的肽-脂质缀合物,其中X选自以下:酰胺基(-C(O)NH-)、氨基(-NR<sup>N</sup>-),其中R<sup>N</sup>选自以下:H、C<sub>1-6</sub>烷基、羰基(-C(O)-)、氨基甲酸酯(-NHC(O)O-)、尿素(-NHC(O)NH-)、二硫化物(-S-S-)、醚(-O-)、琥珀酰基(-(O)CCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)-)、琥珀酰亚胺基(-NHC(O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)NH-)、醚、碳酸酯(-OC(O)O-)、琥珀酰基(succinoyl)、磷酸酯(-O-(O)POH-O-)、-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>j</sub>-,其中j是1至12,磺酰胺(-S(O)<sub>2</sub>NH-)和磺酸酯。

59. 根据权利要求1所述的肽-脂质缀合物,其中所述肽-脂质缀合物中的所述脂质选自以下:二烷氧基丙基、磷脂酰乙醇胺、磷脂、磷脂酸、神经酰胺、二烷基胺、二酰基甘油、固醇和二烷基甘油。

60. 根据权利要求59所述的肽-脂质缀合物,其中所述肽-脂质缀合物中的所述脂质选自以下:二癸氧基丙基(C<sub>10</sub>)、二月桂氧基丙基(C<sub>12</sub>)、二肉豆蔻酰氧基丙基(C<sub>14</sub>)、二棕榈酰氧基丙基(C<sub>16</sub>)或二硬脂酰氧基丙基(C<sub>18</sub>)、1,2-二肉豆蔻酰氧基丙基-3-胺(DOMG)、1,2-二肉豆蔻酰氧基丙基胺(DMG)、1,2-二月桂酰基-sn-甘油-3-磷脂酰乙醇胺(DLPE)、二肉豆蔻酰基-磷脂酰乙醇胺(DMPE)、二棕榈酰基-磷脂酰乙醇胺(DPPE)、二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)、二油酰基-磷脂酰乙醇胺(DOPE)、二硬脂酰基-磷脂酰乙醇胺(DSPE)和胆固醇或胆固醇衍生物。

61. 根据权利要求1所述的肽脂质缀合物,其中所述肽-脂质缀合物中的所述脂质包括长度为12个至20个碳的亲脂性尾部。

62. 根据权利要求1所述的肽-脂质缀合物,其中所述式(I)的肽的分子量在约500道尔顿至约6000道尔顿的范围内。

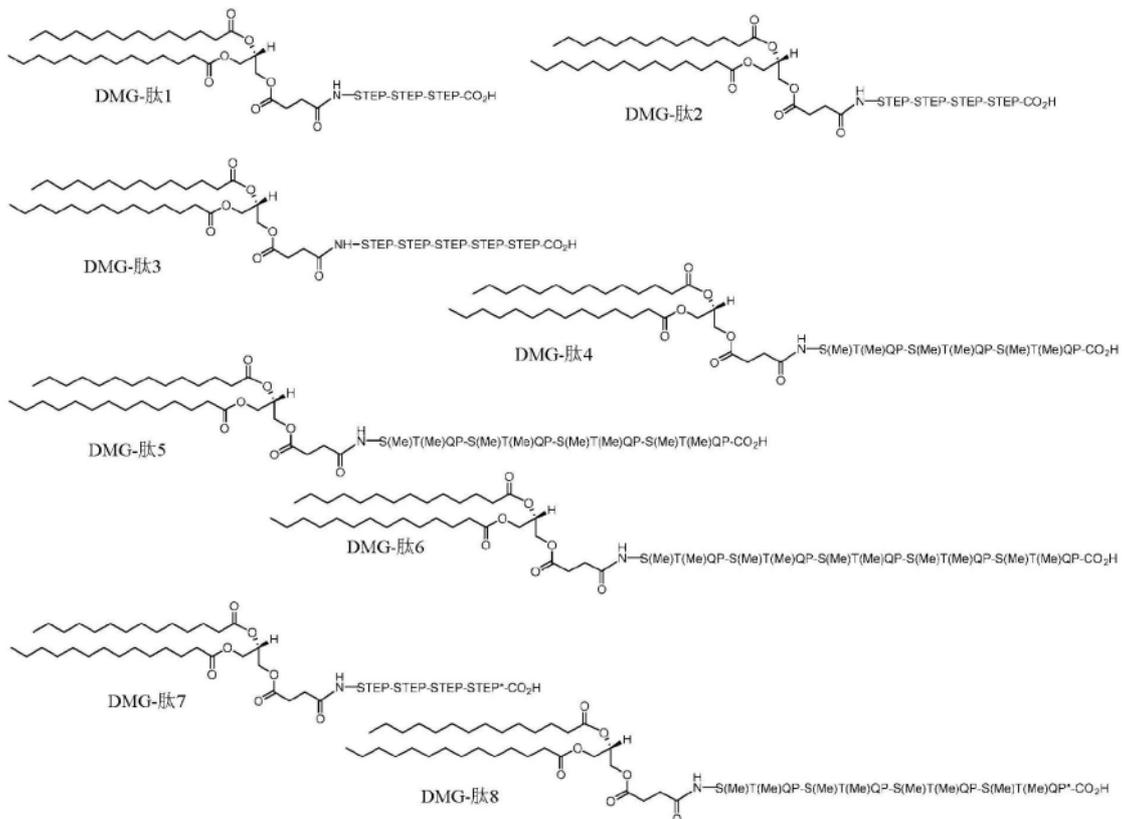
63. 根据权利要求2所述的肽-脂质缀合物,其中所述式(I)的肽的分子量在约1000道尔顿至约5000道尔顿的范围内。

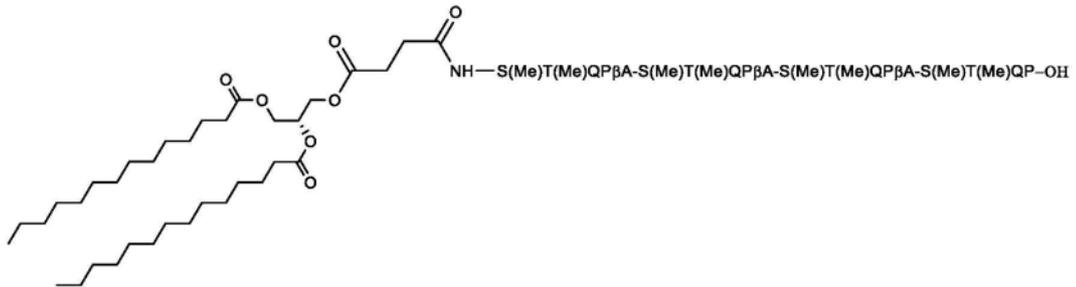
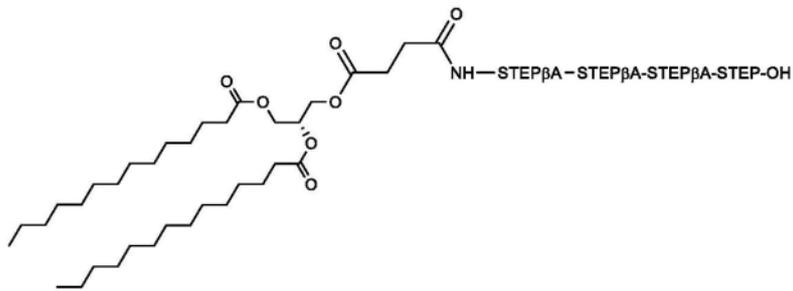
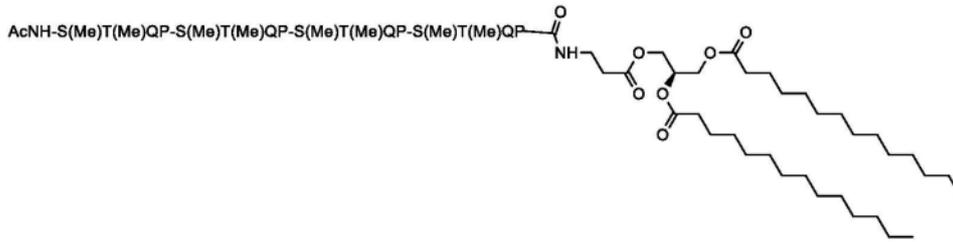
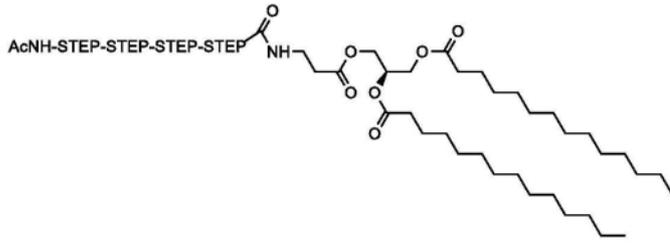
64. 根据权利要求2所述的肽-脂质缀合物,其中所述式(I)的肽的分子量在约1500道尔顿至约4000道尔顿的范围内。

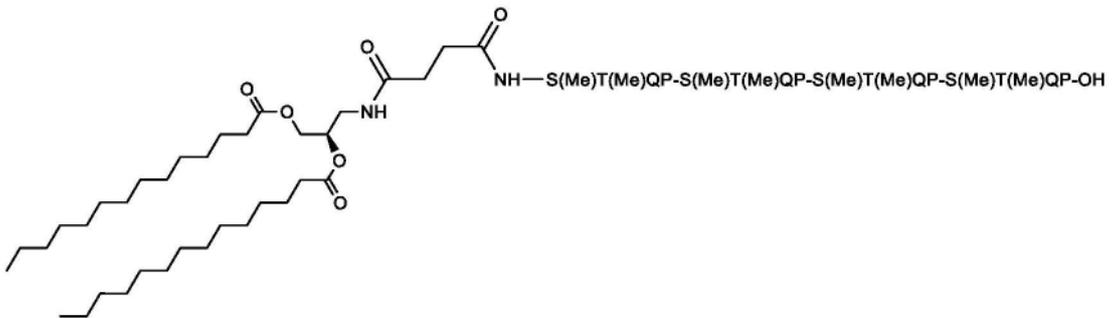
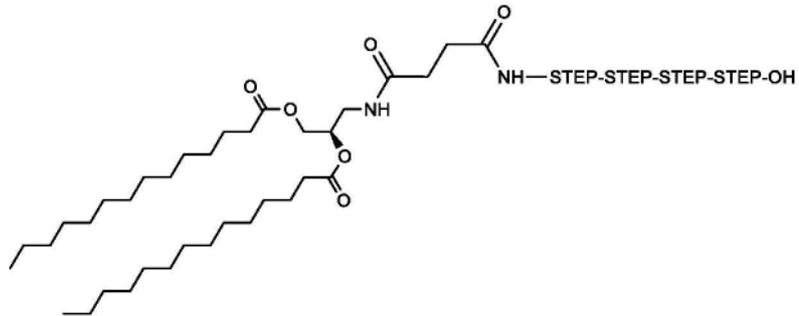
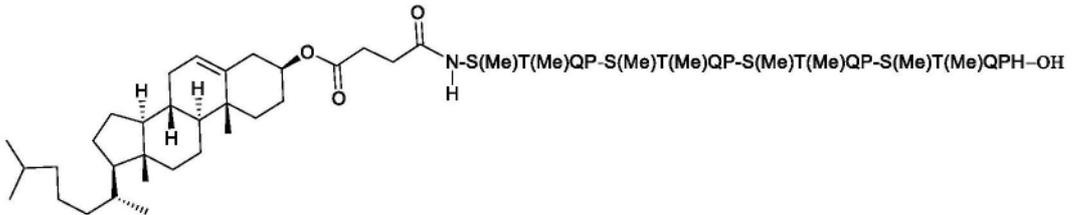
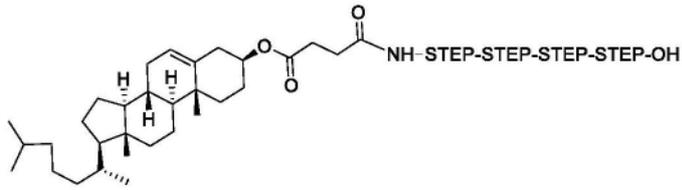
65. 根据权利要求2所述的肽-脂质缀合物,其中所述式(I)的肽的分子量在约1500道尔顿至约3000道尔顿的范围内。

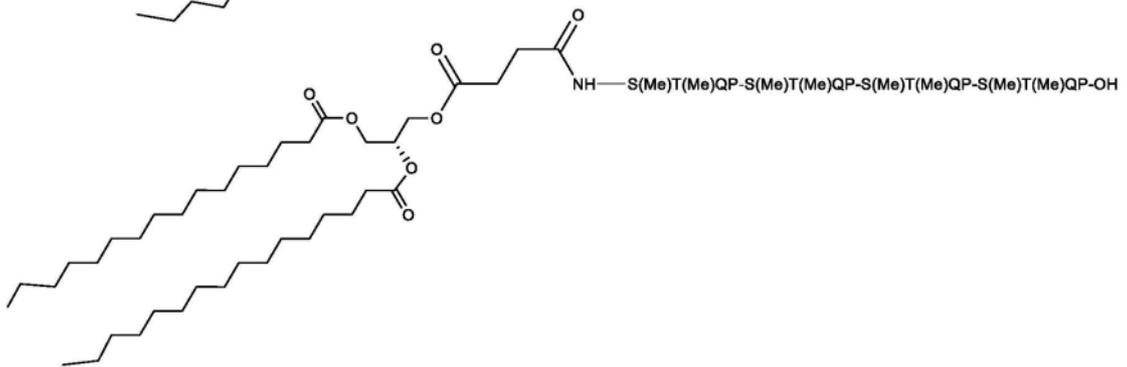
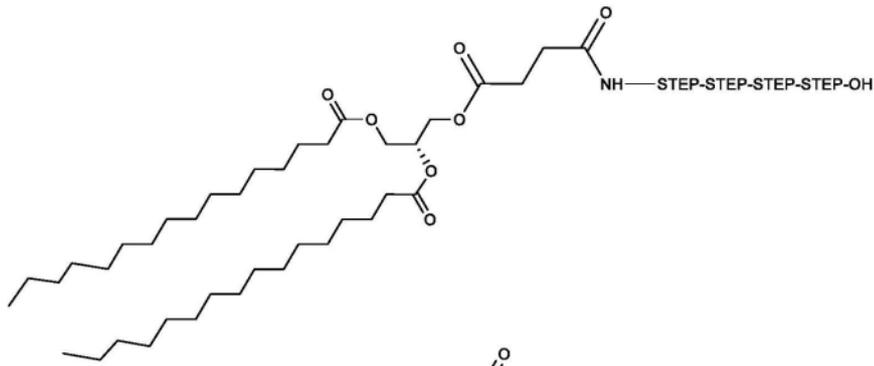
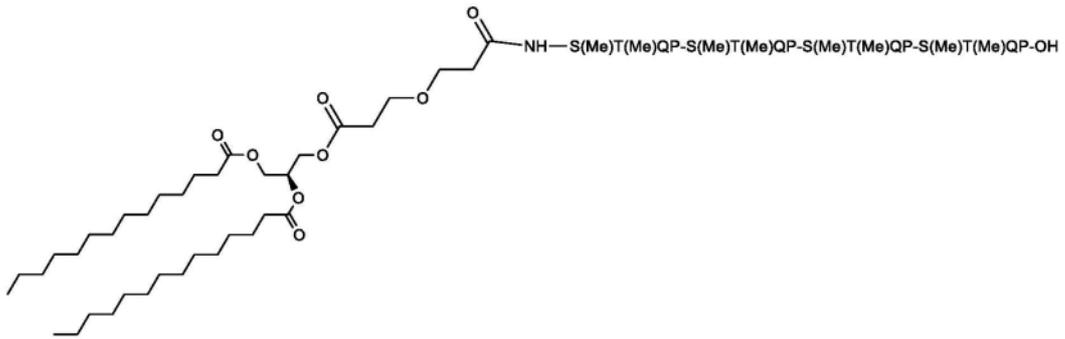
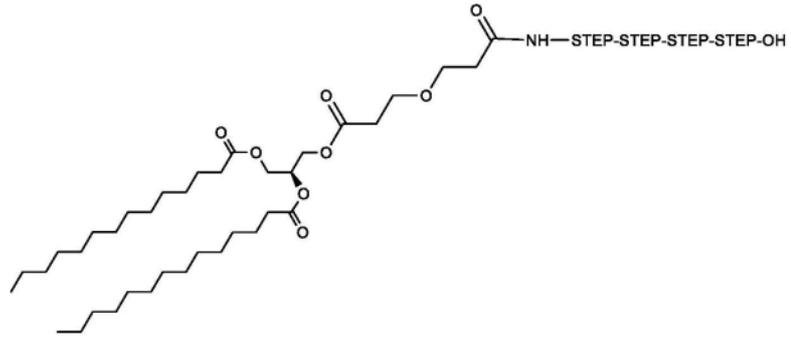
66. 根据权利要求2所述的肽-脂质缀合物,其中所述式(I)的肽的分子量在约1500道尔顿至约2500道尔顿的范围内。

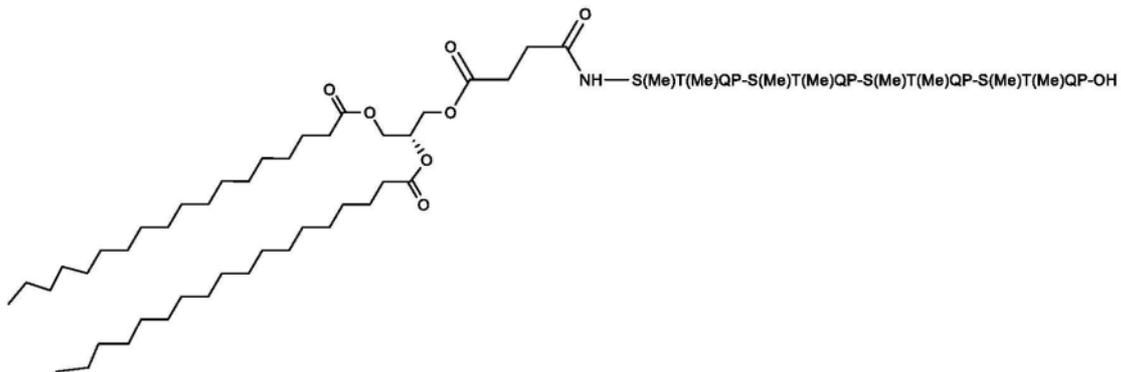
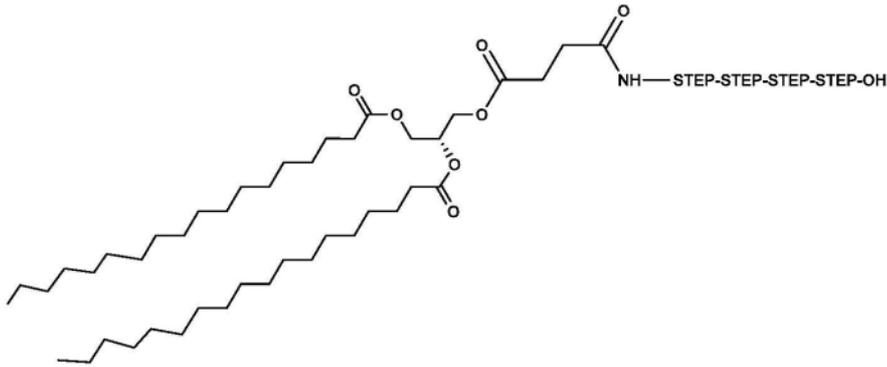
67. 根据权利要求1所述的肽-脂质缀合物,其选自以下:











68. 一种脂质组合物,其包括根据权利要求1所述的肽-脂质缀合物。

69. 根据权利要求68所述的脂质组合物,其中所述脂质组合物包括脂质体或脂质纳米颗粒。

70. 根据权利要求69所述的脂质组合物,其中所述脂质体或脂质纳米颗粒包封核酸。

71. 根据权利要求70所述的脂质组合物,其中所述核酸选自以下:信使RNA、siRNA、转运RNA、微小RNA、RNAi或DNA。

72. 根据权利要求68所述的脂质组合物,其中所述脂质-肽缀合物占所述脂质组合物中的所有脂质的0.5mol%至5mol%。

73. 根据权利要求68所述的脂质组合物,其进一步包括阳离子脂质。

74. 根据权利要求73所述的脂质组合物,其中所述阳离子脂质是可电离阳离子脂质。

75. 根据权利要求68所述的脂质组合物,其进一步包括固醇。

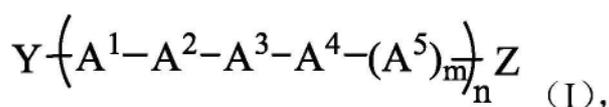
76. 根据权利要求68所述的脂质组合物,其进一步包括辅助脂质。

77. 根据权利要求76所述的脂质组合物,其中所述辅助脂质是磷脂。

78. 一种治疗有需要的受试者的疾病的方法,所述方法包括向所述受试者施用根据权利要求68所述的脂质组合物。

79. 根据权利要求78所述的方法,其中所述脂质组合物静脉内或肌内施用。

80. 一种肽,其由式(I)的肽组成:



其中,

$A^1$ 选自丝氨酸、苏氨酸、 $O-C_{1-6}$ 烷基丝氨酸和 $O-C_{1-6}$ 烷基苏氨酸；

$A^2$ 选自丝氨酸、苏氨酸、 $O-C_{1-6}$ 烷基丝氨酸和 $O-C_{1-6}$ 烷基苏氨酸；

$A^3$ 选自谷氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺和天冬氨酸；

$A^4$ 是脯氨酸；

每个 $A^5$ 独立地选自天然或经修饰的氨基酸；

Y不存在或选自以下： $A^2-A^3-A^4-(A^5)_m-$ 、 $A^3-A^4-(A^5)_m-$ 、 $A^4-(A^5)_m-$ 和 $(A^5)_m-$ ；

Z不存在或选自以下： $-A^1-A^2-A^3-A^4$ 、 $-A^1-A^2-A^3$ 、 $-A^1-A^2$ 和 $-A^1$ ；

m是0至5；

n是1至12；并且

其中所述式(I)的肽任选地在其C-末端用选自酰胺和 $C_{1-6}$ 烷基酯的中性基团进行保护；并且

其中所述式(I)的肽在N-末端至C-末端方向上或在C-末端至N-末端方向上。

81. 根据权利要求80所述的肽，其由约4个氨基酸至约六十个氨基酸组成。

82. 根据权利要求80所述的肽，其由12个氨基酸组成。

83. 根据权利要求80所述的肽，其由16个氨基酸组成。

84. 根据权利要求80所述的肽，其由20个氨基酸组成。

85. 根据权利要求80所述的肽，其由24个氨基酸组成。

86. 根据权利要求80所述的肽，其由28个氨基酸组成。

87. 根据权利要求80所述的肽，其由32个氨基酸组成。

88. 根据权利要求80所述的肽，其通过包括以下的方法制备：

a) 使n个数量的 $A^1-A^2-A^3-A^4-(A^5)_m$ 接触，由此形成 $(A^1-A^2-A^3-A^4-(A^5)_m)_n$ ；以及

b) 使 $(A^1-A^2-A^3-A^4-(A^5)_m)_n$ 与Y和Z接触，由此形成 $Y-(A^1-A^2-A^3-A^4-(A^5)_m)_n-Z$ 。

89. 根据权利要求80所述的肽，其通过包括以下的方法制备：

a) 使 $A^1$ 、 $A^2$ 、 $A^3$ 、 $A^4$ 以及m个数量的 $A^5$ 按顺序接触，由此形成 $A^1-A^2-A^3-A^4-(A^5)_m$ ；

b) 使n个数量的 $A^1-A^2-A^3-A^4-(A^5)_m$ 接触，由此形成 $(A^1-A^2-A^3-A^4-(A^5)_m)_n$ ；以及

c) 使 $(A^1-A^2-A^3-A^4-(A^5)_m)_n$ 与Y和Z接触，由此形成 $Y-(A^1-A^2-A^3-A^4-(A^5)_m)_n-Z$ 。

90. 根据权利要求1所述的肽-脂质缀合物，其通过包括以下的方法制备：

a) 使n个数量的 $A^1-A^2-A^3-A^4-(A^5)_m$ 接触，由此形成 $(A^1-A^2-A^3-A^4-(A^5)_m)_n$ ；

b) 使 $(A^1-A^2-A^3-A^4-(A^5)_m)_n$ 与Y和Z接触，由此形成 $Y-(A^1-A^2-A^3-A^4-(A^5)_m)_n-Z$ ；

c) 使所述连接部分与所述脂质接触，由此形成脂质-连接部分缀合物；以及

d) 使步骤b)的所述 $Y-(A^1-A^2-A^3-A^4-(A^5)_m)_n-Z$ 与步骤c)的所述脂质连接部分缀合物接触，

由此形成肽-脂质缀合物。

91. 根据权利要求1所述的肽-脂质缀合物，其通过包括以下的方法制备：

f) 使 $A^1$ 、 $A^2$ 、 $A^3$ 、 $A^4$ 以及m个数量的 $A^5$ 按顺序接触，由此形成 $A^1-A^2-A^3-A^4-(A^5)_m$ ；

g) 使n个数量的 $A^1-A^2-A^3-A^4-(A^5)_m$ 接触，由此形成 $(A^1-A^2-A^3-A^4-(A^5)_m)_n$ ；

h) 使 $(A^1-A^2-A^3-A^4-(A^5)_m)_n$ 与Y和Z接触，由此形成 $Y-(A^1-A^2-A^3-A^4-(A^5)_m)_n-Z$ ；

i) 使所述连接部分与所述脂质接触，由此形成脂质-连接部分缀合物；以及

j) 使步骤c)的所述 $Y-(A^1-A^2-A^3-A^4-(A^5)_m)_n-Z$ 与步骤d)的所述脂质连接部分缀合物接触，

由此形成肽-脂质缀合物。

92. 一种制备根据权利要求1所述的肽-脂质缀合物的方法,所述方法包括:

- a) 使n个数量的 $A^1-A^2-A^3-A^4(A^5)_m$ 接触,由此形成 $(A^1-A^2-A^3-A^4-(A^5)_m)_n$ ;
- b) 使 $(A^1-A^2-A^3-A^4(A^5)_m)_n$ 与Y和Z接触,由此形成 $Y-(A^1-A^2-A^3-A^4(A^5)_m)_n-Z$ ;
- c) 使所述连接部分与所述脂质接触,由此形成脂质-连接部分缀合物;以及
- d) 使步骤b)的所述 $Y-(A^1-A^2-A^3-A^4(A^5)_m)_n-Z$ 与步骤c)的所述脂质连接部分缀合物接触,由此形成肽-脂质缀合物。

93. 一种制备根据权利要求1所述的肽-脂质缀合物的方法,所述方法包括:

- a) 使 $A^1, A^2, A^3, A^4$ 以及m个数量的 $A^5$ 按顺序接触,由此形成 $A^1-A^2-A^3-A^4-(A^5)_m$ ;
- b) 使n个数量的 $(A^1-A^2-A^3-A^4(A^5)_m)$ 接触,由此形成由此形成 $(A^1-A^2-A^3-A^4-(A^5)_m)_n$ ;
- c) 使 $(A^1-A^2-A^3-A^4(A^5)_m)_n$ 与Y和Z接触,由此形成 $Y-(A^1-A^2-A^3-A^4(A^5)_m)_n-Z$ ;
- d) 使所述连接部分与所述脂质接触,由此形成脂质-连接部分缀合物;以及
- e) 使步骤c)的所述 $Y-(A^1-A^2-A^3-A^4(A^5)_m)_n-Z$ 与步骤d)的所述脂质连接部分缀合物接触,由此形成肽-脂质缀合物。

94. 一种制备根据权利要求80所述的肽的方法,所述方法包括:

- a) 使n个数量的 $-A^1-A^2-A^3-A^4(A^5)_m-$ 接触,由此形成 $(A^1-A^2-A^3-A^4-(A^5)_m)_n$ ;以及
- b) 使 $(A^1-A^2-A^3-A^4(A^5)_m)_n$ 与Y和Z接触,由此形成 $Y-(A^1-A^2-A^3-A^4(A^5)_m)_n-Z$ 。

95. 一种制备根据权利要求80所述的肽的方法,所述方法包括:

- a) 使 $A^1, A^2, A^3, A^4$ 以及m个数量的 $A^5$ 按顺序接触,由此形成 $A^1-A^2-A^3-A^4-(A^5)_m$ ;
- b) 使n个数量的 $(A^1-A^2-A^3-A^4(A^5)_m)$ 接触,由此形成由此形成 $(A^1-A^2-A^3-A^4-(A^5)_m)_n$ ;以及
- c) 使 $(A^1-A^2-A^3-A^4(A^5)_m)_n$ 与Y和Z接触,由此形成 $Y-(A^1-A^2-A^3-A^4(A^5)_m)_n-Z$ 。

## 肽-脂质缀合物

[0001] 相关申请交叉引用

[0002] 本申请要求于2021年5月5日提交的美国临时申请第63/184,568号的优先权,所述美国临时申请特此通过引用以其整体并出于所有目的并入。

### 技术领域

[0003] 本公开涉及脂质缀合物。更具体地,本公开涉及可用于脂质递送技术的肽-脂质缀合物。

### 背景技术

[0004] 将治疗剂递送到人类受试者的细胞或组织中对于其治疗效果是重要的,并且通常受到化合物到达靶细胞和组织的有限能力的阻碍。许多大分子和具有净离子电荷的分子在进入细胞时面临多重障碍,并且当此类药物必须输送到所关注的特定细胞类型时,问题变得更加复杂。与小分子药物不同,这些类型的分子不会被动扩散穿过细胞膜。生物活性蛋白质,如免疫球蛋白和多核苷酸类的潜在治疗剂,如基因组DNA、cDNA、mRNA和siRNA、反义寡核苷酸,以及甚至某些低分子量肽、肽激素和抗生素,是生物活性分子的一些实例,对于这些生物活性分子,通常不能实现对患者组织的有效靶向。

[0005] 虽然若干种基因疗法已经能够成功利用病毒递送载体(例如,AAV),但基于脂质的调配物由于其生物相容性和易于大规模生产而越来越被认为是RNA和其它核酸化合物最有前途的递送系统之一。基于脂质的核酸疗法最重要的进展之一发生在2018年8月,当时Patisiran(ALN-TTR02)是美国食品药品监督管理局(FDA)和欧盟委员会(EC)批准的第一种siRNA治疗剂。ALN-TTR02是基于所谓的稳定核酸脂质颗粒(SNALP)转染技术的siRNA调配物。尽管Patisiran取得了成功,但通过脂质调配物递送核酸治疗剂仍在发展中。

[0006] 基于脂质的调配物通常具有基于聚乙二醇(PEG)的化合物作为组分之一。PEG可以与脂质、胆固醇、阳离子聚合物或其它化合物缀合,以促进整合到基于脂质的调配物中。通常,PEG作为涂层或表面配体包含在脂质调配物中,这是一种称为PEG化的技术,有助于防止脂质颗粒、脂质体、胶束等的聚集,并保护基于脂质的调配物免受免疫系统的影响及其从网状内皮(RES)摄取中逸出(《纳米医学(Nanomedicine)》(伦敦(Lond))。2011年6月;6(4):715-28)。PEG化已被广泛用于通过物理、化学和生物机制稳定脂质调配物及其有效载荷。洗涤剂类PEG脂质(例如,PEG-DSPE)可以进入脂质调配物以在表面形成水合层和空间屏障。基于PEG化程度,表面层通常可以分为刷状层和蘑菇状层两种类型。已经表明增加PEG化导致脂质调配物的循环半衰期显著增加(《生物医学工程年评(Annu.Rev.Biomed.Eng.)》2011年8月15日;13:507-30;《控释杂志(J.Control Release)》。2010年8月3日;145(3):178-81)。

[0007] 尽管PEG缀合物在基于脂质的调配物中具有益处和用途,但PEG的用途也与若干问题相关。例如,Song等人对核酸的细胞内递送的研究发现,PEG脂质严重抑制活性核酸转移和反义寡核苷酸的内体释放到细胞质中(Song,L.Y.等人《生物化学与生物物理学报(BBA)-生物膜(Biochimica et Biophysica Acta(BBA)-Biomembranes)》。2002 1558(1):1-13)。

此外,PEG作为一种在生命系统中未天然发现的分子,与不希望的免疫原性应答有关(Garay和Labaune.《公开会议论文集杂志(The Open Conference Proceedings Journal)》.第2卷.第1期.2011)。经过几十年在人类治疗剂中使用PEG化药物,已经观察到用PEG化药物治疗患者可以形成特异性识别和与PEG结合的抗体(抗PEG抗体)。在从未用PEG化药物治疗但食用过含有PEG的产品的患者身上也发现了抗PEG抗体(Hoang Thi等人《聚合物(Polymers)》12(2):298.2020)。因此,用PEG化药物治疗产生抗PEG抗体的患者会导致血液清除加速、药物疗效低下、超敏反应,并且在一些情况下还会产生危及生命的副作用。

[0008] 已经研究了几种替代性聚合物作为药物组合物中PEG化的潜在替代物。其中一些包含亲水性聚合物的研究,如聚噁唑啉、聚(N-乙烯基吡咯烷酮)、聚(甘油)和聚丙烯酰胺;天然聚合物,如脂质、碳水化合物和蛋白质(例如,血清白蛋白),以及聚氨基酸;或两性离子聚合物,如聚(羧基甜菜碱)、聚(磺基甜菜碱)和基于磷酸酯甜菜碱的聚合物(Hoang Thi等人2011)。这些聚合物中的许多存在于日常产品或其它药物组合物中,并存在产生免疫原性应答的风险。一种引起一些关注的蛋白质是XTEN肽技术,该技术已被用于长度为144个、288个、432个、576个和864个氨基酸残基的肽大小,以与治疗肽和蛋白质融合,从而增加体内半衰期(Podust等人《控释杂志(Journal of Controlled Release)》240(2016):52-66)。虽然在寻找PEG化组合物的替代物方面取得了重大进展,但XTEN和其它测试的聚合物的主要特征在于其增加体内半衰期的能力,并且对于核酸脂质递送应用来说往往太大。此外,用于核酸脂质递送的任何PEG化替代物必须能够与合适的脂质缀合,该脂质不仅可以实现所需的体内半衰期,还可以靶向细胞摄取和脂质调配物的可接受脱落率。因此,需要特别适合核酸脂质递送组合物的独特需要的新的PEG替代物。

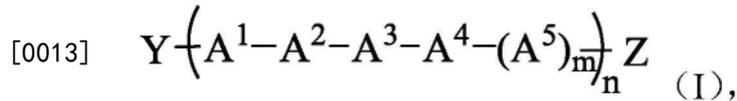
## 发明内容

[0009] 本发明技术的另外的特征和优点将在下文的说明中予以阐明,并且部分地根据描述将是显而易见的,或者可以通过主题技术的实践来了解。本主题技术的优点将通过书面描述及其实施例以及附图中特别指出的结构来实现和获得。

[0010] 应当理解,上述总体描述以及以下详细描述两者均是示例性的和解释性的,并且旨在提供对本主题技术的进一步解释。

[0011] 本公开提供了肽、肽模拟物及其缀合物的组合物,所述组合物可以用于制备包封药物分子的脂质调配物,所述药物分子包含寡核苷酸药物,如核糖核酸和脱氧核糖核酸。这些肽、肽模拟物及其缀合物在体内递送核酸治疗剂方面可以显示出优于PEG缀合物的能力。肽可以包括丝氨酸、苏氨酸、谷氨酸和脯氨酸的重复单元作为四肽(STEP肽)。此类STEP聚合物可以通过与氨基酸侧链的氢键相互作用,而围绕颗粒形成“水笼”。此类水层可以作为防止LNP与血液组分相互作用的空间屏障,并在LNP循环时防止调理、补体激活和过早清除。另外地,通过这种肽缀合和调配技术的方法,可以将具有可调特性的各种肽掺入LNP基质中,从而可以调节和优化其功能、细胞和组织特异性以及药代动力学和毒理学特性。

[0012] 在一些实施例中,提供了肽-脂质缀合物或其药学上可接受的盐,其包括通过连接部分与式(I)的肽缀合的脂质:



[0014] 其中,

[0015]  $A^1$ 可以是丝氨酸、苏氨酸、0- $C_{1-6}$ 烷基丝氨酸和0- $C_{1-6}$ 烷基苏氨酸;

[0016]  $A^2$ 可以来自丝氨酸、苏氨酸、0- $C_{1-6}$ 烷基丝氨酸和0- $C_{1-6}$ 烷基苏氨酸;

[0017]  $A^3$ 可以是谷氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺和天冬氨酸;

[0018]  $A^4$ 是脯氨酸;

[0019] 每个 $A^5$ 独立地选自天然或经修饰的氨基酸;

[0020] Y不存在或选自以下: $A^2 - A^3 - A^4 - (A^5)_m -$ 、 $A^3 - A^4 - (A^5)_m -$ 、 $A^4 - (A^5)_m -$ 和 $(A^5)_m -$ ;

[0021] Z不存在或选自以下: $-A^1 - A^2 - A^3 - A^4 -$ 、 $-A^1 - A^2 - A^3 -$ 、 $-A^1 - A^2$ 和 $-A^1$ ;

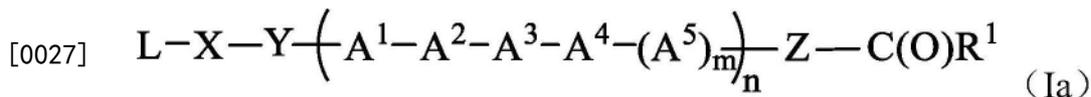
[0022] m是0至5;

[0023] n是1至12;

[0024] 其中所述脂质与所述式(I)的肽的N-末端、C-末端或氨基酸侧链缀合;并且

[0025] 其中所述式(I)的肽在其N-末端或氨基酸侧链处缀合时任意地被在其C-末端处选自酰胺和 $C_{1-6}$ 烷基酯的中性基团保护。

[0026] 在一些实施例中,所述式(I)的肽具有式(Ia)的结构:



[0028] 其中,

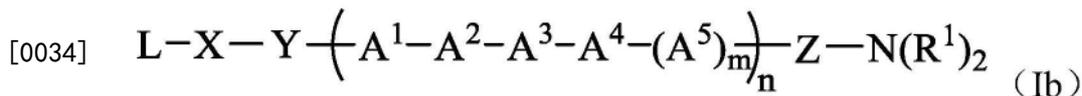
[0029] L是肽脂质缀合物的脂质;

[0030] X是连接部分;

[0031]  $C(O)R^1$ 是所述式(I)的肽的C-末端;并且

[0032]  $R^1$ 选自以下: $-OH$ 、 $-O - C_{1-6}$ 烷基和 $N(R^2)_2$ ,其中每个 $R^2$ 独立地是H或 $C_{1-6}$ 烷基。

[0033] 在一些实施例中,所述式(I)的肽具有式(Ib)的结构:



[0035] 其中,

[0036] L是肽脂质缀合物的脂质;

[0037] X是连接部分;

[0038]  $N(R^1)_2$ 是式(Ia)的所述肽的N-末端;并且

[0039] 每个 $R^1$ 独立地选自H和 $C_{1-6}$ 烷基。

[0040] 在一些实施例中,提供了式(I)的肽。所述肽可以通过其C-末端、N-末端、氨基酸侧链或前述任何组合缀合以形成融合分子。

[0041] 在一些实施例中,提供了包括式(I)、(Ia)或(Ib)的化合物和核酸的脂质组合物。

[0042] 在一些实施例中,提供了将核酸递送至细胞的方法,所述方法包括施用包括式(I)、(Ia)或(Ib)的化合物和核酸的药物组合物。

[0043] 在一些实施例中,提供了制备本文提供的肽-脂质缀合物的方法,包含其实例。所述方法包括:a)使n个数量的 $A^1 - A^2 - A^3 - A^4 - (A^5)_m$ 接触,由此形成 $(A^1 - A^2 - A^3 - A^4 - (A^5)_m)_n$ ;b)使

$(A^1-A^2-A^3-A^4(A^5))_m)_n$ 与Y和Z接触,由此形成Y- $(A^1-A^2-A^3-A^4(A^5))_m)_n$ -Z;c)使所述连接部分与所述脂质接触,由此形成脂质-连接部分缀合物;以及d)使步骤b)的Y- $(A^1-A^2-A^3-A^4(A^5))_m)_n$ -Z与步骤c)的脂质-连接部分缀合物接触,由此形成肽-脂质缀合物。

[0044] 在一些实施例中,提供了制备本文提供的肽-脂质缀合物的方法,包含其实施例。所述方法包括:a)使 $A^1$ 、 $A^2$ 、 $A^3$ 、 $A^4$ 和m个数量的 $A^5$ 按顺序接触,由此形成 $A^1-A^2-A^3-A^4-(A^5)_m$ ;b)使n个数量的 $(A^1-A^2-A^3-A^4(A^5))_m$ 接触,由此形成由此形成 $(A^1-A^2-A^3-A^4-(A^5))_m)_n$ ;c)使 $(A^1-A^2-A^3-A^4(A^5))_m)_n$ 与Y和Z接触,由此形成Y- $(A^1-A^2-A^3-A^4(A^5))_m)_n$ -Z;d)使所述连接部分与所述脂质接触,由此形成脂质-连接部分缀合物;以及e)使步骤c)的Y- $(A^1-A^2-A^3-A^4(A^5))_m)_n$ -Z与步骤d)的脂质-连接部分缀合物接触,由此形成肽-脂质缀合物。

[0045] 在一些实施例中,提供了制备本文提供的肽的方法,包含其实施例。所述方法包括:a)使n个数量的 $A^1-A^2-A^3-A^4(A^5)_m$ 接触,由此形成 $(A^1-A^2-A^3-A^4-(A^5))_m)_n$ ;以及b)使 $(A^1-A^2-A^3-A^4(A^5))_m)_n$ 与Y和Z接触,由此形成Y- $(A^1-A^2-A^3-A^4-(A^5))_m)_n$ -Z。

[0046] 在一些实施例中,提供了制备本文提供的肽的方法,包含其实施例。所述方法包括:a)使 $A^1$ 、 $A^2$ 、 $A^3$ 、 $A^4$ 和m个数量的 $A^5$ 按顺序接触,由此形成 $A^1-A^2-A^3-A^4-(A^5)_m$ ;b)使n个数量的 $(A^1-A^2-A^3-A^4(A^5))_m$ 接触,由此形成由此形成 $(A^1-A^2-A^3-A^4-(A^5))_m)_n$ ;c)使 $(A^1-A^2-A^3-A^4(A^5))_m)_n$ 与Y和Z接触,由此形成Y- $(A^1-A^2-A^3-A^4(A^5))_m)_n$ -Z。

## 附图说明

[0047] 下面参考附图描述本发明的说明性实施例的各种特征。所展示的实施例旨在说明而非限制本发明。附图包含以下图:

[0048] 图1示出了与PEG相比,在脂质纳米颗粒调配物中使用本文所述的肽-脂质缀合物对实例7中所述的人红细胞生成素(hEPO)表达水平(ng/ml)的体内表达的影响。

[0049] 图2示出了与PEG相比,在脂质纳米颗粒调配物中使用本文所述的肽-脂质缀合物对如实例8中所述的相对于磷酸盐缓冲盐水(PBS)基线归一化的因子VII(FVII)的体内敲低的影响。

[0050] 图3示出了肝脏和脾脏切片的代表性图像,其被染色用于检测tdTomato蛋白表达。如实例5中所述,通过注射包含肽7或DMG-PEG缀合物的脂质纳米颗粒(LNP)调配物将允许tdTomato表达的mRNA递送至器官。

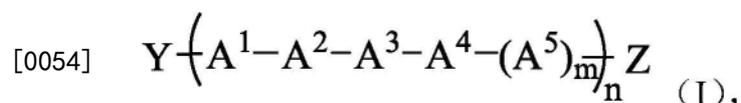
## 具体实施方式

[0051] 应当理解,本领域技术人员将容易根据本公开明白本发明技术的各种配置,其中通过图示的方式示出并描述本发明技术的各种配置。如将认识到的,本主题技术能够具有其它和不同的配置,并且其若干细节能够在各种其它方面进行修改,所有这些都脱离本主题技术的范围。因此,发明内容、附图和具体实施方式本质上应被认为是说明性的而不是限制性的。

[0052] 下文阐述的详细描述旨在作为对本主题技术的各种配置的描述,并且不旨在表示可以实践本主题技术的唯一配置。附图并入本文并构成详细描述的一部分。出于提供对本主题技术的透彻理解的目的,详细描述包含具体细节。然而,对于本领域的技术人员来说显而易见的是,可以在没有这些具体细节的情况下实践本主题技术。在一些实例中,以框图形

式示出了众所周知的结构和组分以避免模糊本主题技术的概念。为了便于理解,相同的组分标有相同的元件编号。

[0053] 在一些实施例中,提供了肽-脂质缀合物或其药学上可接受的盐,其包括通过连接部分与式(I)的肽缀合的脂质:



[0055] 其中,

[0056]  $A^1$ 可以是丝氨酸、苏氨酸、 $O-C_{1-6}$ 烷基丝氨酸和 $O-C_{1-6}$ 烷基苏氨酸;

[0057]  $A^2$ 可以来自丝氨酸、苏氨酸、 $O-C_{1-6}$ 烷基丝氨酸和 $O-C_{1-6}$ 烷基苏氨酸;

[0058]  $A^3$ 可以是谷氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺和天冬氨酸;

[0059]  $A^4$ 是脯氨酸;

[0060] 每个 $A^5$ 独立地选自天然或经修饰的氨基酸;

[0061] Y不存在或选自以下: $A^2 - A^3 - A^4 - (A^5)_m$ 、 $A^3 - A^4 - (A^5)_m$ 、 $A^4 - (A^5)_m$ 和 $(A^5)_m$ ;

[0062] Z不存在或选自以下: $-A^1 - A^2 - A^3 - A^4$ 、 $-A^1 - A^2 - A^3$ 、 $-A^1 - A^2$ 和 $-A^1$ ;

[0063] m是0至5;

[0064] n是1至12;

[0065] 其中所述脂质与所述式(I)的肽的N-末端、C-末端或氨基酸侧链缀合;并且

[0066] 其中所述式(I)的肽在其N-末端或氨基酸侧链处缀合时任意地被在其C-末端处选自酰胺和 $C_{1-6}$ 烷基酯的中性基团保护。

[0067] 在一些实施例中, $A^1$ 是丝氨酸或 $O-C_{1-6}$ 烷基丝氨酸。在一些实施例中, $A^1$ 是苏氨酸或 $O-C_{1-6}$ 烷基苏氨酸。在一些实施例中, $A^1$ 是丝氨酸。在一些实施例中, $A^1$ 是 $O-C_1$ 烷基丝氨酸。在一些实施例中, $A^1$ 是 $O-C_2$ 烷基丝氨酸。在一些实施例中, $A^1$ 是 $O-C_3$ 烷基丝氨酸。在一些实施例中, $A^1$ 是 $O-C_4$ 烷基丝氨酸。在一些实施例中, $A^1$ 是 $O-C_5$ 烷基丝氨酸。在一些实施例中, $A^1$ 是 $O-C_6$ 烷基丝氨酸。在一些实施例中, $A^1$ 是苏氨酸。在一些实施例中, $A^1$ 是 $O-C_1$ 烷基苏氨酸。在一些实施例中, $A^1$ 是 $O-C_2$ 烷基苏氨酸。在一些实施例中, $A^1$ 是 $O-C_3$ 烷基苏氨酸。在一些实施例中, $A^1$ 是 $O-C_4$ 烷基苏氨酸。在一些实施例中, $A^1$ 是 $O-C_5$ 烷基苏氨酸。在一些实施例中, $A^1$ 是 $O-C_6$ 烷基苏氨酸。

[0068] 在一些实施例中, $A^2$ 是丝氨酸或 $O-C_{1-6}$ 烷基丝氨酸。在一些实施例中, $A^2$ 是苏氨酸或 $O-C_{1-6}$ 烷基苏氨酸。在一些实施例中, $A^2$ 是丝氨酸。在一些实施例中, $A^2$ 是 $O-C_1$ 烷基丝氨酸。在一些实施例中, $A^2$ 是 $O-C_2$ 烷基丝氨酸。在一些实施例中, $A^2$ 是 $O-C_3$ 烷基丝氨酸。在一些实施例中, $A^2$ 是 $O-C_4$ 烷基丝氨酸。在一些实施例中, $A^2$ 是 $O-C_5$ 烷基丝氨酸。在一些实施例中, $A^2$ 是 $O-C_6$ 烷基丝氨酸。在一些实施例中, $A^2$ 是苏氨酸。在一些实施例中, $A^2$ 是 $O-C_1$ 烷基苏氨酸。在一些实施例中, $A^2$ 是 $O-C_2$ 烷基苏氨酸。在一些实施例中, $A^2$ 是 $O-C_3$ 烷基苏氨酸。在一些实施例中, $A^2$ 是 $O-C_4$ 烷基苏氨酸。在一些实施例中, $A^2$ 是 $O-C_5$ 烷基苏氨酸。在一些实施例中, $A^2$ 是 $O-C_6$ 烷基苏氨酸。

[0069] 在一些实施例中, $A^3$ 是谷氨酸。在一些实施例中, $A^3$ 是谷氨酰胺。在一些实施例中, $A^3$ 是天冬氨酸。在一些实施例中, $A^3$ 是天冬酰胺。

[0070] 在一些实施例中,每个 $A^5$ 独立地是天然氨基酸。在一些实施例中,每个 $A^5$ 是脯氨酸。

在一些实施例中,每个 $A^5$ 选自以下:丝氨酸、苏氨酸、 $O-C_{1-6}$ 烷基丝氨酸、 $O-C_{1-6}$ 烷基苏氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺和天冬氨酸。

[0071] 在一些实施例中, $A^5$ 是丝氨酸。在一些实施例中, $A^5$ 是苏氨酸。在一些实施例中, $A^5$ 是 $O-C_{1-6}$ 烷基丝氨酸。在一些实施例中, $A^5$ 是 $O-C_{1-6}$ 烷基苏氨酸。在一些实施例中, $A^5$ 是谷氨酸。在一些实施例中, $A^5$ 是谷氨酰胺。在一些实施例中, $A^5$ 是天冬酰胺。在一些实施例中, $A^5$ 是天冬氨酸。在一些实施例中, $A^5$ 是 $O-C_1$ 烷基丝氨酸。在一些实施例中,所述 $A^5$ 是 $O-C_2$ 烷基丝氨酸。在一些实施例中, $A^5$ 是 $O-C_3$ 烷基丝氨酸。在一些实施例中, $A^5$ 是 $O-C_4$ 烷基丝氨酸。在一些实施例中, $A^5$ 是 $O-C_5$ 烷基丝氨酸。在一些实施例中, $A^5$ 是 $O-C_6$ 烷基丝氨酸。在一些实施例中, $A^5$ 是 $O-C_1$ 烷基苏氨酸。在一些实施例中, $A^5$ 是 $O-C_2$ 烷基苏氨酸。在一些实施例中, $A^5$ 是 $O-C_3$ 烷基苏氨酸。在一些实施例中, $A^5$ 是 $O-C_4$ 烷基苏氨酸。在一些实施例中, $A^5$ 是 $O-C_5$ 烷基苏氨酸。在一些实施例中, $A^5$ 是 $O-C_6$ 烷基苏氨酸。

[0072] 在一些实施例中, $A^1$ 是丝氨酸或 $O-C_{1-6}$ 烷基丝氨酸; $A^2$ 是苏氨酸或 $O-C_{1-6}$ 烷基苏氨酸;并且 $A^3$ 是谷氨酸或谷氨酰胺。在该实施例的一个方面, $A^3$ 是谷氨酸。在该实施例的另一个方面, $A^3$ 是谷氨酰胺。

[0073] 在一些实施例中,所述式(I)的肽的甘氨酸含量小于所述式(I)的肽中氨基酸的约20%。在一些实施例中,所述式(I)的肽的甘氨酸含量小于所述式(I)的肽中氨基酸的约10%。在一些实施例中,所述式(I)的肽的甘氨酸含量小于所述式(I)的肽中氨基酸的约5%。在一些实施例中,所述式(I)的肽的甘氨酸含量小于所述式(I)的肽中氨基酸的约4%。在一些实施例中,所述式(I)的肽的甘氨酸含量小于所述式(I)的肽中氨基酸的约2%。在一些实施例中,所述式(I)的肽不具有任何甘氨酸。

[0074] 在一些实施例中,所述式(I)的肽中的所有氨基酸是L-氨基酸。在一些实施例中,所述式(I)的肽中的所有氨基酸是D-氨基酸。在一些实施例中,所述式(I)的肽中的所述氨基酸是L-氨基酸和D-氨基酸的混合物。

[0075] 在一些实施例中,m是0。在一些实施例中,m是1。在一些实施例中,m是2。

[0076] 在一些实施例中,n是1。在一些实施例中,n是2。在一些实施例中,n是3。在一些实施例中,n是4。在一些实施例中,其中n是5。在一些实施例中,n是6。在一些实施例中,n是7。在一些实施例中,n是8。在一些实施例中,n是9。在一些实施例中,n是10。在一些实施例中,n是11。

[0077] 在一些实施例中,Y不存在。在一些实施例中,Y是 $-A^2-A^3-A^4-(A^5)_m-$ 。在一些实施例中,Y是 $-A^3-A^4-(A^5)_m-$ 。在一些实施例中,Y是 $-A^4-(A^5)_m-$ 。在一些实施例中,Y是 $-(A^5)_m-$ 。

[0078] 在一些实施例中,Z不存在。在一些实施例中,Z是 $-A^1-A^2-A^3-A^4$ 。在一些实施例中,Z是 $-A^1-A^2-A^3$ 。在一些实施例中,Z是 $-A^1-A^2$ 。在一些实施例中,Z是 $-A^1$ 。

[0079] 在一些实施例中,所述脂质通过所述连接部分与所述式(I)的肽的所述N-末端缀合。在一些实施例中,所述脂质通过所述连接部分与所述式(I)的肽的所述C-末端缀合。

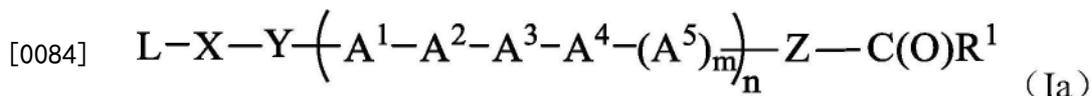
[0080] 对于本文提供的肽,在一些实施例中,所述连接部分是键、经取代的或未经取代的烷基、经取代的或未经取代的杂烷基、经取代的或未经取代的环烷基、经取代的或未经取代的杂环烷基、经取代的或未经取代的杂芳基。在实施例中,所述连接部分是经取代的或未经取代的烷基(例如, $C_1-C_8$ 、 $C_1-C_6$ 或 $C_1-C_4$ )、经取代的或未经取代的杂烷基、经取代的或未经取代的环烷基(例如,2至8元、2至6元或2至4元)、经取代的或未经取代的杂环烷基(例如,3至8

元、3至6元或5至6元)、经取代的或未经取代的芳基(例如, C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>或苯基)或经取代的或未经取代的杂芳基(例如, 5至10元、5至9元或5至6元)。在一些实施例中, 所述连接部分是经取代的或未经取代的烷基。在一些实施例中, 所述连接部分是经取代的或未经取代的杂烷基。在一些实施例中, 所述连接部分是经取代的或未经取代的环烷基。在一些实施例中, 所述连接部分是经取代的或未经取代的杂环烷基。在一些实施例中, 所述连接部分是经取代的或未经取代的芳基。在一些实施例中, 所述连接部分是经取代的或未经取代的杂芳基。

[0081] 在一些实施例中, 所述连接部分包括选自以下的基团: -S-、-C(O)O-、酰胺基(-C(O)NH-)、氨基(-NR<sup>N</sup>-), 其中R<sup>N</sup>选自H和C<sub>1-6</sub>烷基、羰基(-C(O)-)、氨基甲酸酯(-NHC(O)O-)、尿素(-NHC(O)NH-)、二硫化物(-S-S-)、醚(-O-)、琥珀酰基(succinyl)(- (O)CCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)-)、琥珀酰亚胺基(-NHC(O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)NH-)、醚、碳酸酯(-OC(O)O-)、琥珀酰基(succinoyl)、磷酸酯(-O-(O)POH-O-)、-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>j</sub>-, 其中j是1至12, 磺酰胺(-S(O)<sub>2</sub>NH-)和磺酸酯。在一些实施例中, 所述连接部分是-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>j</sub>-, 其中j是1至6。

[0082] 在一些实施例中, 所述连接部分包括-S-。在一些实施例中, 所述连接部分包括-C(O)O-。在一些实施例中, 所述连接部分包括酰胺基(-C(O)NH-)。在一些实施例中, 所述连接部分包括氨基(-NR<sup>N</sup>-), 其中R<sup>N</sup>选自以下: H、C<sub>1-6</sub>烷基、羰基(-C(O)-)、氨基甲酸酯(-NHC(O)O-)、尿素(-NHC(O)NH-)、二硫化物(-S-S-)、醚(-O-)、琥珀酰基(- (O)CCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)-)、琥珀酰亚胺基(-NHC(O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)NH-)、醚、碳酸酯(-OC(O)O-)、琥珀酰基、磷酸酯(-O-(O)POH-O-)和磺酸酯。在一些实施例中, R<sup>N</sup>是H。在一些实施例中, R<sup>N</sup>是C<sub>1-6</sub>烷基。在一些实施例中, R<sup>N</sup>是C<sub>1</sub>烷基。在一些实施例中, R<sup>N</sup>是C<sub>2</sub>烷基。在一些实施例中, R<sup>N</sup>是C<sub>3</sub>烷基。在一些实施例中, R<sup>N</sup>是C<sub>4</sub>烷基。在一些实施例中, R<sup>N</sup>是C<sub>5</sub>烷基。在一些实施例中, R<sup>N</sup>是C<sub>6</sub>烷基。在一些实施例中, R<sup>N</sup>是羰基(-C(O)-)。在一些实施例中, R<sup>N</sup>是氨基甲酸酯(-NHC(O)O-)。在一些实施例中, R<sup>N</sup>是尿素(-NHC(O)NH-)。在一些实施例中, R<sup>N</sup>是二硫化物(-S-S-)。在一些实施例中, R<sup>N</sup>是乙醚(-O-)。在一些实施例中, R<sup>N</sup>是琥珀酰基(- (O)CCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)-)。在一些实施例中, R<sup>N</sup>是琥珀酰亚胺基(-NHC(O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)NH-)。在一些实施例中, R<sup>N</sup>是醚。在一些实施例中, R<sup>N</sup>是碳酸盐(-OC(O)O-)。在一些实施例中, R<sup>N</sup>是琥珀酰。在一些实施例中, R<sup>N</sup>是磷酸酯(-O-(O)POH-O-)。在一些实施例中, R<sup>N</sup>是磺酸酯。

[0083] 在一些实施例中, 所述式(I)的肽具有式(Ia)的结构:



[0085] 其中,

[0086] L是肽脂质缀合物的脂质;

[0087] X是连接部分;

[0088] C(O)R<sup>1</sup>是所述式(I)的肽的C-末端; 并且

[0089] R<sup>1</sup>选自以下: -OH、-O-C<sub>1-6</sub>烷基和N(R<sup>2</sup>)<sub>2</sub>, 其中每个R<sup>2</sup>独立地是H或C<sub>1-6</sub>烷基。

[0090] 在一些实施例中, 所述X是键、经取代的或未经取代的烷基、经取代的或未经取代的杂烷基、经取代的或未经取代的环烷基、经取代的或未经取代的杂环烷基、经取代的或未经取代的杂芳基。在一些实施例中, 所述X是经取代的或未经取代的烷基(例如, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>或C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)、经取代的或未经取代的杂烷基、经取代的或未经取代的环烷基(例如, 2至8元、2至6元或2至4元)、经取代的或未经取代的杂环烷基(例如, 3至8元、3至6元或5至6元)、经取代

的或未经取代的芳基(例如,  $C_6-C_{10}$ 或苯基)或经取代的或未经取代的杂芳基(例如, 5至10元、5至9元或5至6元)。在一些实施例中, X是经取代的或未经取代的烷基。在一些实施例中, X是经取代的或未经取代的杂烷基。在一些实施例中, X是经取代的或未经取代的环烷基。在一些实施例中, X是经取代的或未经取代的杂环烷基。在一些实施例中, X是经取代的或未经取代的芳基。在一些实施例中, X是经取代的或未经取代的杂芳基。

[0091] 在一些实施例中, X选自以下:  $-S-$ 、 $-C(O)O-$ 、酰胺基( $-C(O)NH-$ )、氨基( $-NR^N-$ ), 其中 $R^N$ 选自H、 $C_{1-6}$ 烷基、羰基( $-C(O)-$ )、氨基甲酸酯( $-NHC(O)O-$ )、尿素( $-NHC(O)NH-$ )、二硫化物( $-S-S-$ )、醚( $-O-$ )、琥珀酰基( $-(O)CCH_2CH_2C(O)-$ )、琥珀酰胺基( $-NHC(O)CH_2CH_2C(O)NH-$ )、醚、碳酸酯( $-OC(O)O-$ )、琥珀酰基、磷酸酯( $-O-(O)POH-O-$ )、 $-(CH_2-CH_2-O)_j-$ , 其中j是1至12, 磺酰胺( $-S(O)_2NH-$ )和磺酸酯。在一些实施例中, X是 $-(CH_2-CH_2-O)_j-$ , 其中j是1至6。

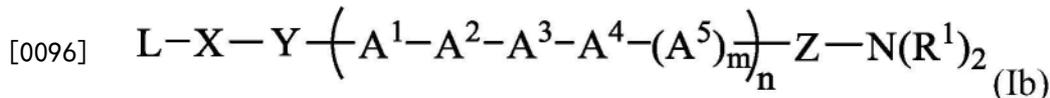
[0092] 在一些实施例中, 所述连接部分是 $-S-$ 。在一些实施例中, 所述连接部分是 $-C(O)O-$ 。在一些实施例中, X是酰胺基( $-C(O)NH-$ )。在一些实施例中, X是氨基( $-NR^N-$ ), 其中 $R^N$ 选自H、 $C_{1-6}$ 烷基、羰基( $-C(O)-$ )、氨基甲酸酯( $-NHC(O)O-$ )、尿素( $-NHC(O)NH-$ )、二硫化物( $-S-S-$ )、醚( $-O-$ )、琥珀酰基( $-(O)CCH_2CH_2C(O)-$ )、琥珀酰亚胺基( $-NHC(O)CH_2CH_2C(O)NH-$ )、醚、碳酸酯( $-OC(O)O-$ )、琥珀酰基、磷酸酯( $-O-(O)POH-O-$ )、 $-(CH_2-CH_2-O)_j-$ , 其中j是1至12, 磺酰胺( $-S(O)_2NH-$ )和磺酸酯。在一些实施例中,  $R^N$ 是H。在一些实施例中,  $R^N$ 是 $C_{1-6}$ 烷基。在一些实施例中,  $R^N$ 是 $C_1$ 烷基。在一些实施例中,  $R^N$ 是 $C_2$ 烷基。在一些实施例中,  $R^N$ 是 $C_3$ 烷基。在一些实施例中,  $R^N$ 是 $C_4$ 烷基。在一些实施例中,  $R^N$ 是 $C_5$ 烷基。在一些实施例中,  $R^N$ 是 $C_6$ 烷基。在一些实施例中,  $R^N$ 是羰基( $-C(O)-$ )。在一些实施例中,  $R^N$ 是氨基甲酸酯( $-NHC(O)O-$ )。在一些实施例中,  $R^N$ 是尿素( $-NHC(O)NH-$ )。在一些实施例中,  $R^N$ 是二硫化物( $-S-S-$ )。在一些实施例中,  $R^N$ 是乙醚( $-O-$ )。在一些实施例中,  $R^N$ 是琥珀酰基( $-(O)CCH_2CH_2C(O)-$ )。在一些实施例中,  $R^N$ 是琥珀酰亚胺基( $-NHC(O)CH_2CH_2C(O)NH-$ )、醚。在一些实施例中,  $R^N$ 是醚。在一些实施例中,  $R^N$ 是碳酸盐( $-OC(O)O-$ )。在一些实施例中,  $R^N$ 是琥珀酰基。在一些实施例中,  $R^N$ 是磷酸酯( $-O-(O)POH-O-$ )。在一些实施例中,  $R^N$ 是 $-(CH_2-CH_2-O)_j-$ , 其中j是1至12。在一些实施例中,  $R^N$ 是 $-(CH_2-CH_2-O)-$ 。在一些实施例中,  $R^N$ 是 $-(CH_2-CH_2-O)_2-$ 。在一些实施例中,  $R^N$ 是 $-(CH_2-CH_2-O)_3-$ 。在一些实施例中,  $R^N$ 是 $-(CH_2-CH_2-O)_4-$ 。在一些实施例中,  $R^N$ 是 $-(CH_2-CH_2-O)_5-$ 。在一些实施例中,  $R^N$ 是 $-(CH_2-CH_2-O)_6-$ 。在一些实施例中,  $R^N$ 是 $-(CH_2-CH_2-O)_7-$ 。在一些实施例中,  $R^N$ 是 $-(CH_2-CH_2-O)_8-$ 。在一些实施例中,  $R^N$ 是 $-(CH_2-CH_2-O)_9-$ 。在一些实施例中,  $R^N$ 是 $-(CH_2-CH_2-O)_{10}-$ 。在一些实施例中,  $R^N$ 是 $-(CH_2-CH_2-O)_{11}-$ 。在一些实施例中,  $R^N$ 是 $-(CH_2-CH_2-O)_{12}-$ 。在一些实施例中,  $R^N$ 是磺胺( $-S(O)_2NH-$ )。在一些实施例中,  $R^N$ 是磺酸酯。

[0093] 在一些实施例中, X是 $-(CH_2-CH_2-O)-$ 。在一些实施例中, X是 $-(CH_2-CH_2-O)_2-$ 。在一些实施例中, X是 $-(CH_2-CH_2-O)_3-$ 。在一些实施例中, X是 $-(CH_2-CH_2-O)_4-$ 。在一些实施例中, X是 $-(CH_2-CH_2-O)_5-$ 。在一些实施例中, X是 $-(CH_2-CH_2-O)_6-$ 。

[0094] 在一些实施例中,  $R^1$ 是 $-OH$ 。在一些实施例中,  $R^1$ 是 $-O-C_{1-6}$ 烷基。在一些实施例中,  $R^1$ 是 $-O-C_1$ 烷基。在一些实施例中,  $R^1$ 是 $-O-C_2$ 烷基。在一些实施例中,  $R^1$ 是 $-O-C_3$ 烷基。在一些实施例中,  $R^1$ 是 $-O-C_4$ 烷基。在一些实施例中,  $R^1$ 是 $-O-C_5$ 烷基。在一些实施例中,  $R^1$ 是 $-O-C_6$ 烷基。在一些实施例中,  $R^1$ 是 $N(R^2)_2$ , 其中每个 $R^2$ 独立地是H或 $C_{1-6}$ 烷基。在一些实施例中,  $R^1$ 是 $N(R^2)_2$ , 其中每个 $R^2$ 独立地是H或 $C_1$ 烷基。在一些实施例中,  $R^1$ 是 $N(R^2)_2$ , 其中每个 $R^2$ 独立地是H或 $C_2$ 烷基。在一些实施例中,  $R^1$ 是 $N(R^2)_2$ , 其中每个 $R^2$ 独立地是H或 $C_3$ 烷基。在一些实施例中,

$R^1$ 是 $N(R^2)_2$ ,其中每个 $R^2$ 独立地是H或 $C_4$ 烷基。在一些实施例中, $R^1$ 是 $N(R^2)_2$ ,其中每个 $R^2$ 独立地是H或 $C_5$ 烷基。在一些实施例中, $R^1$ 是 $N(R^2)_2$ ,其中每个 $R^2$ 独立地是H或 $C_6$ 烷基。

[0095] 在一些实施例中,所述式(I)的肽具有式(Ib)的结构:



[0097] 其中,

[0098] L是肽脂质缀合物的脂质;

[0099] X是连接部分;

[0100]  $N(R^1)_2$ 是式(Ia)的所述肽的N-末端;并且

[0101] 每个 $R^1$ 独立地选自H和 $C_{1-6}$ 烷基。

[0102] 在一些实施例中,所述X是键、经取代的或未经取代的烷基、经取代的或未经取代的杂烷基、经取代的或未经取代的环烷基、经取代的或未经取代的杂环烷基、经取代的或未经取代的杂芳基。在一些实施例中,所述X是经取代的或未经取代的烷基(例如, $C_1-C_8$ 、 $C_1-C_6$ 或 $C_1-C_4$ )、经取代的或未经取代的杂烷基、经取代的或未经取代的环烷基(例如,2至8元、2至6元或2至4元)、经取代的或未经取代的杂环烷基(例如,3至8元、3至6元或5至6元)、经取代的或未经取代的芳基(例如, $C_6-C_{10}$ 或苯基)或经取代的或未经取代的杂芳基(例如,5至10元、5至9元或5至6元)。在一些实施例中,X是经取代的或未经取代的烷基。在一些实施例中,X是经取代的或未经取代的杂烷基。在一些实施例中,X是经取代的或未经取代的环烷基。在一些实施例中,X是经取代的或未经取代的杂环烷基。在一些实施例中,X是经取代的或未经取代的芳基。在一些实施例中,X是经取代的或未经取代的杂芳基。

[0103] 在一些实施例中,X选自以下: $-S-$ 、 $-C(O)O-$ 、酰胺基( $-C(O)NH-$ )、氨基( $-NR^N-$ ),其中 $R^N$ 选自H、 $C_{1-6}$ 烷基、羰基( $-C(O)-$ )、氨基甲酸酯( $-NHC(O)O-$ )、尿素( $-NHC(O)NH-$ )、二硫化物( $-S-S-$ )、醚( $-O-$ )、琥珀酰基( $-(O)CCH_2CH_2C(O)-$ )、琥珀酰亚胺基( $-NHC(O)CH_2CH_2C(O)NH-$ )、醚、碳酸酯( $-OC(O)O-$ )、琥珀酰基、磷酸酯( $-O-(O)POH-O-$ )、 $-(CH_2-CH_2-O)_j-$ ,其中j是1至12,磺酰胺( $-S(O)_2NH-$ )和磺酸酯。在一些实施例中,X是 $-(CH_2-CH_2-O)_j-$ ,其中j是1至6。

[0104] 在一些实施例中,X是 $-S-$ 。在一些实施例中,X是 $-C(O)O-$ 。在一些实施例中,X是酰胺基( $-C(O)NH-$ )。在一些实施例中,X是氨基( $-NR^N-$ ),其中 $R^N$ 选自H、 $C_{1-6}$ 烷基、羰基( $-C(O)-$ )、氨基甲酸酯( $-NHC(O)O-$ )、尿素( $-NHC(O)NH-$ )、二硫化物( $-S-S-$ )、醚( $-O-$ )、琥珀酰基( $-(O)CCH_2CH_2C(O)-$ )、琥珀酰亚胺基( $-NHC(O)CH_2CH_2C(O)NH-$ )、醚、碳酸酯( $-OC(O)O-$ )、琥珀酰基、磷酸酯( $-O-(O)POH-O-$ )、 $-(CH_2-CH_2-O)_j-$ ,其中j是1至12,磺酰胺( $-S(O)_2NH-$ )和磺酸酯。在一些实施例中, $R^N$ 是H。在一些实施例中, $R^N$ 是 $C_{1-6}$ 烷基。在一些实施例中, $R^N$ 是 $C_1$ 烷基。在一些实施例中, $R^N$ 是 $C_2$ 烷基。在一些实施例中, $R^N$ 是 $C_3$ 烷基。在一些实施例中, $R^N$ 是 $C_4$ 烷基。在一些实施例中, $R^N$ 是 $C_5$ 烷基。在一些实施例中, $R^N$ 是 $C_6$ 烷基。在一些实施例中, $R^N$ 是羰基( $-C(O)-$ )。在一些实施例中, $R^N$ 是氨基甲酸酯( $-NHC(O)O-$ )。在一些实施例中, $R^N$ 是尿素( $-NHC(O)NH-$ )。在一些实施例中, $R^N$ 是二硫化物( $-S-S-$ )。在一些实施例中, $R^N$ 是乙醚( $-O-$ )。在一些实施例中, $R^N$ 是琥珀酰基( $-(O)CCH_2CH_2C(O)-$ )。在一些实施例中, $R^N$ 是琥珀酰亚胺基( $-NHC(O)CH_2CH_2C(O)NH-$ )、醚。在一些实施例中, $R^N$ 是醚。在一些实施例中, $R^N$ 是碳酸盐( $-OC(O)O-$ )。在一些实施例中, $R^N$ 是琥珀酰。在一些实施例中, $R^N$ 是磷酸酯( $-O-(O)POH-O-$ )。在一些实施例中, $R^N$ 是 $-(CH_2-CH_2-O)_j-$ ,其中j是1至12。在一些实施例中, $R^N$ 是 $-(CH_2-CH_2-O)-$ 。在一些实施

例中,  $R^N$  是  $-(CH_2-CH_2-O)_2^-$ 。在一些实施例中,  $R^N$  是  $-(CH_2-CH_2-O)_3^-$ 。在一些实施例中,  $R^N$  是  $-(CH_2-CH_2-O)_4^-$ 。在一些实施例中,  $R^N$  是  $-(CH_2-CH_2-O)_5^-$ 。在一些实施例中,  $R^N$  是  $-(CH_2-CH_2-O)_6^-$ 。在一些实施例中,  $R^N$  是  $-(CH_2-CH_2-O)_7^-$ 。在一些实施例中,  $R^N$  是  $-(CH_2-CH_2-O)_8^-$ 。在一些实施例中,  $R^N$  是  $-(CH_2-CH_2-O)_9^-$ 。在一些实施例中,  $R^N$  是  $-(CH_2-CH_2-O)_{10}^-$ 。在一些实施例中,  $R^N$  是  $-(CH_2-CH_2-O)_{11}^-$ 。在一些实施例中,  $R^N$  是  $-(CH_2-CH_2-O)_{12}^-$ 。在一些实施例中,  $R^N$  是磺胺  $(-S(O)_2NH-)$ 。在一些实施例中,  $R^N$  是磺酸酯。

[0105] 在一些实施例中,  $X$  是  $-(CH_2-CH_2-O)-$ 。在一些实施例中,  $X$  是  $-(CH_2-CH_2-O)_2^-$ 。在一些实施例中,  $X$  是  $-(CH_2-CH_2-O)_3^-$ 。在一些实施例中,  $X$  是  $-(CH_2-CH_2-O)_4^-$ 。在一些实施例中,  $X$  是  $-(CH_2-CH_2-O)_5^-$ 。在一些实施例中,  $X$  是  $-(CH_2-CH_2-O)_6^-$ 。

[0106] 在一些实施例中, 所述肽-脂质缀合物的所述脂质选自以下: 二烷氧基丙基、磷脂酰乙醇胺、磷脂、磷脂酸、神经酰胺、二烷基胺、二酰基甘油、固醇和二烷基甘油。在一些实施例中, 所述肽-脂质缀合物的所述脂质选自以下: 二癸氧基丙基 ( $C_{10}$ )、二月桂氧基丙基 ( $C_{12}$ )、二肉豆蔻酰氧基丙基 ( $C_{14}$ )、二棕榈酰氧基丙基 ( $C_{16}$ ) 或二硬脂酰氧基丙基 ( $C_{18}$ )、1,2-二肉豆蔻酰氧基丙基-3-胺 (DOMG)、1,2-二肉豆蔻酰氧基丙基胺 (DMG)、1,2-二月桂酰基-sn-甘油-3-磷脂酰乙醇胺 (DLPE)、二肉豆蔻基-磷脂酰乙醇胺 (DMPE)、二棕榈酰基-磷脂酰乙醇胺 (DPPE)、二棕榈酰磷脂酰胆碱 (DPPC)、二油酰基-磷脂酰乙醇胺 (DOPE) 和二硬脂酰基-磷脂酰乙醇胺 (DSPE)。在一些实施例中, 所述肽-脂质缀合物的所述脂质是二癸氧基丙基 ( $C_{10}$ )。在一些实施例中, 所述肽-脂质缀合物的所述脂质是二月桂氧基丙基 ( $C_{12}$ )。在一些实施例中, 所述肽-脂质缀合物的所述脂质是二肉豆蔻酰氧基丙基 ( $C_{14}$ )。在一些实施例中, 所述肽-脂质缀合物的所述脂质是二棕榈酰氧基丙基 ( $C_{16}$ )。在一些实施例中, 所述肽-脂质缀合物的所述脂质是二硬脂酰氧基丙基 ( $C_{18}$ )。在一些实施例中, 所述肽-脂质缀合物的所述脂质是1,2-二肉豆蔻酰氧基丙基-3-胺 (DOMG)。在一些实施例中, 所述肽-脂质缀合物的所述脂质是1,2-二肉豆蔻酰氧基丙基胺 (DMG)。在一些实施例中, 所述肽-脂质缀合物的所述脂质是1,2-二月桂酰基-sn-甘油-3-磷脂酰乙醇胺 (DLPE)。在一些实施例中, 所述肽-脂质缀合物的所述脂质是二肉豆蔻基-磷脂酰乙醇胺 (DMPE)。在一些实施例中, 所述肽-脂质缀合物的所述脂质是二棕榈酰基-磷脂酰乙醇胺 (DPPE)。在一些实施例中, 所述肽-脂质缀合物的所述脂质是二棕榈酰磷脂酰胆碱 (DPPC)。在一些实施例中, 所述肽-脂质缀合物的所述脂质是二油酰基-磷脂酰乙醇胺 (DOPE)。在一些实施例中, 所述肽-脂质缀合物的所述脂质是二硬脂酰基-磷脂酰乙醇胺 (DSPE)。在一些实施例中, 所述肽-脂质缀合物的所述脂质是胆固醇或胆固醇衍生物。

[0107] 在一些实施例中, 所述肽-脂质缀合物的所述脂质包括长度为12个至20个碳的亲脂性尾部。在一些实施例中, 所述亲脂性尾部的长度为14个至20个碳。在一些实施例中, 所述亲脂性尾部的长度为16个至20个碳。在一些实施例中, 所述亲脂性尾部的长度为18个至20个碳。

[0108] 在一些实施例中, 所述亲脂性尾部的长度为12个至18个碳。在一些实施例中, 所述亲脂性尾部的长度为12个至16个碳。在一些实施例中, 所述亲脂性尾部的长度为12个至14个碳。在一些实施例中, 所述亲脂性尾部的长度为约12个、14个、16个、18个或20个碳。

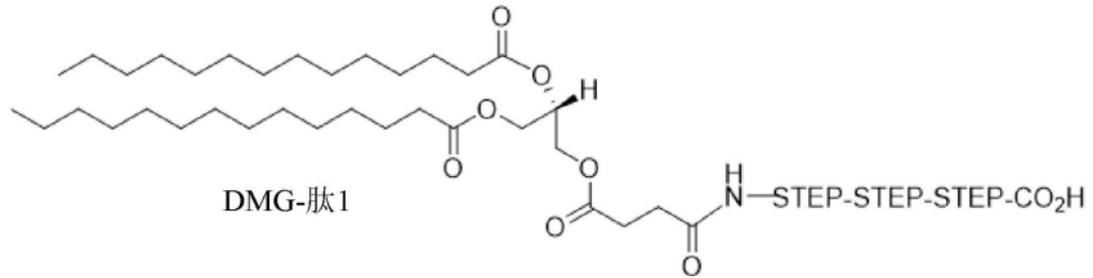
[0109] 在一些实施例中, 所述式 (I) 的肽的分子量在约500道尔顿至约6000道尔顿的范围内。在一些实施例中, 所述式 (I) 的肽的分子量在约750道尔顿至约6000道尔顿的范围内。在



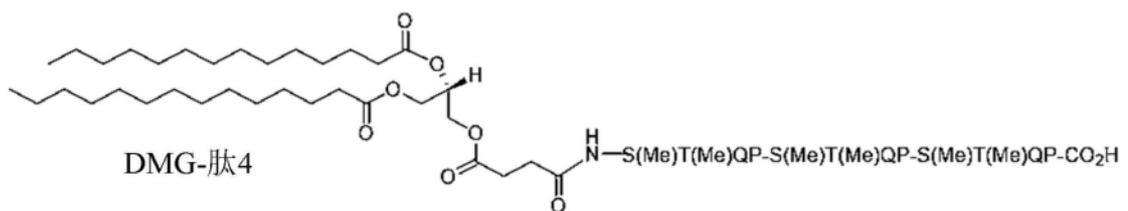
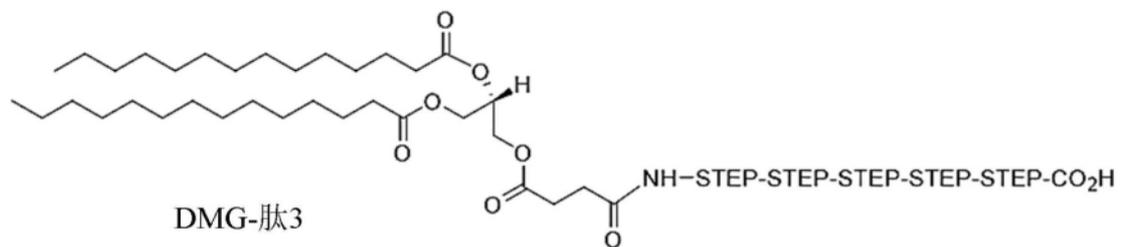
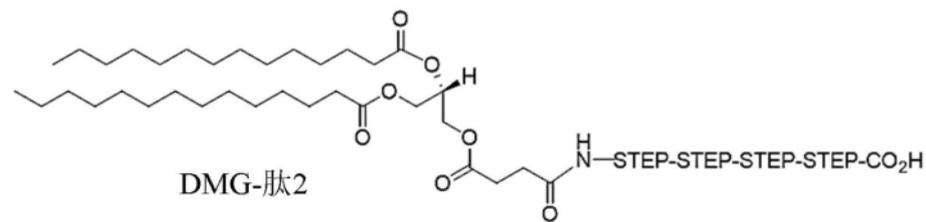
3250道尔顿、3500道尔顿、3750道尔顿、4000道尔顿、4250道尔顿、4500道尔顿、4750道尔顿或约5000道尔顿。

[0111] 在一些实施例中,所述式(I)的肽的分子量在约1000道尔顿至约5000道尔顿的范围内。在一些实施例中,所述式(I)的肽的分子量在约1500道尔顿至约4000道尔顿的范围内。在一些实施例中,所述式(I)的肽的分子量在约1500道尔顿至约3000道尔顿的范围内。在一些实施例中,所述式(I)的肽的分子量在约1500道尔顿至约2500道尔顿的范围内。

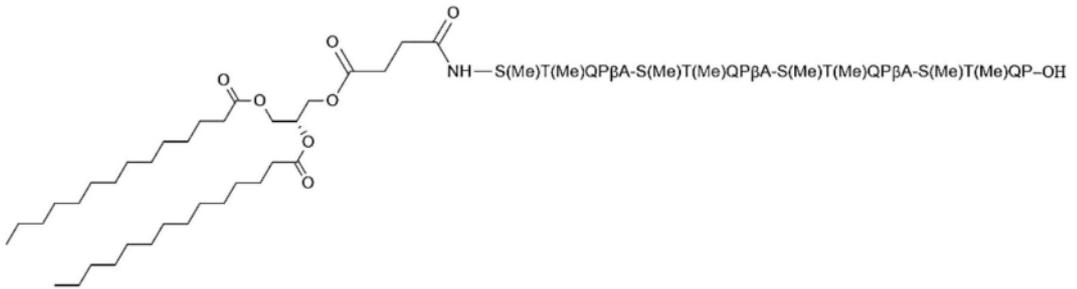
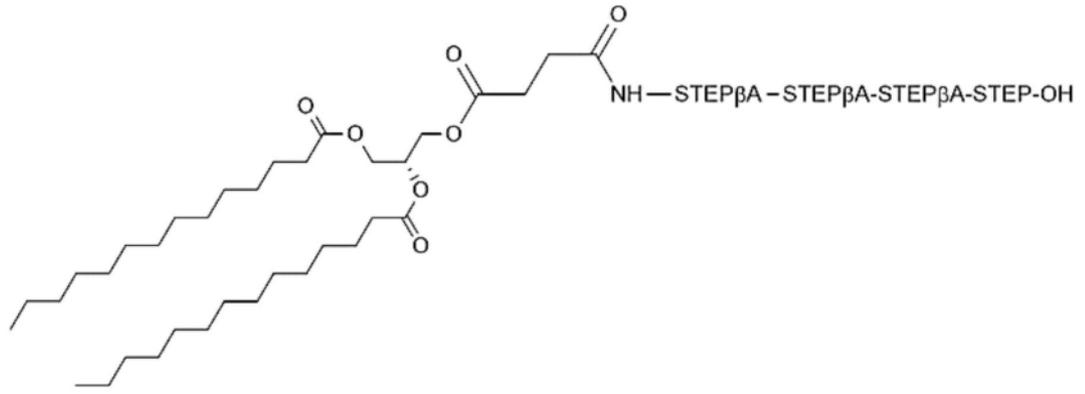
[0112] 在一些实施例中,所述肽-脂质缀合物选自以下:



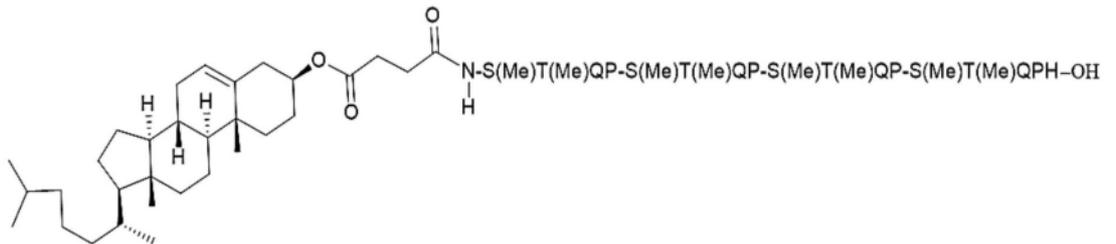
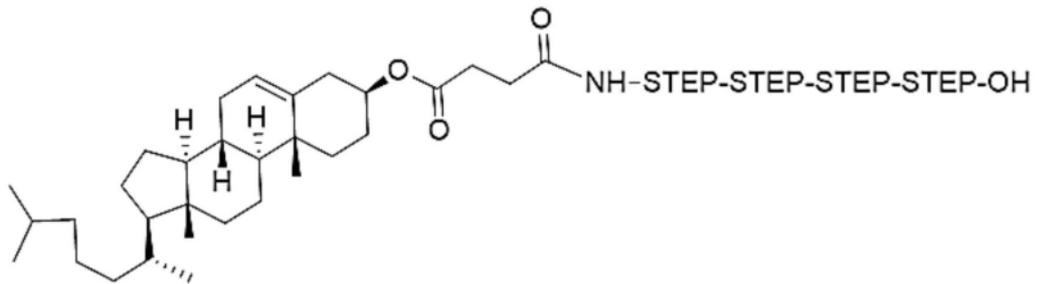
[0113]

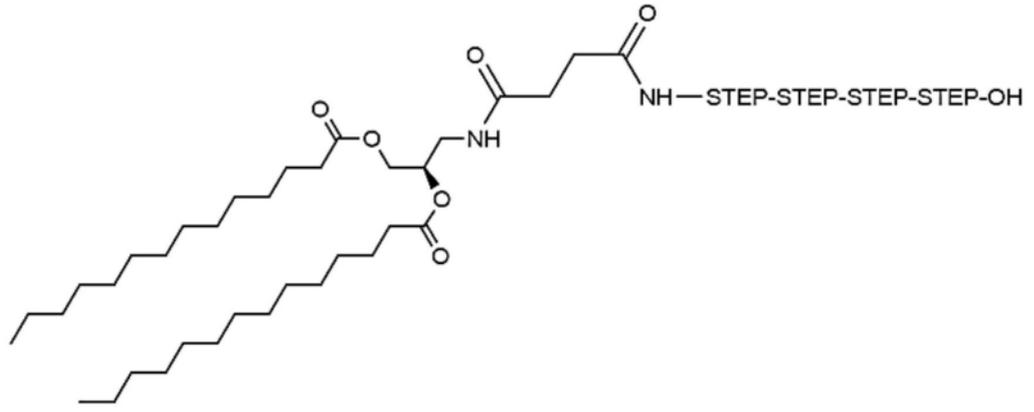




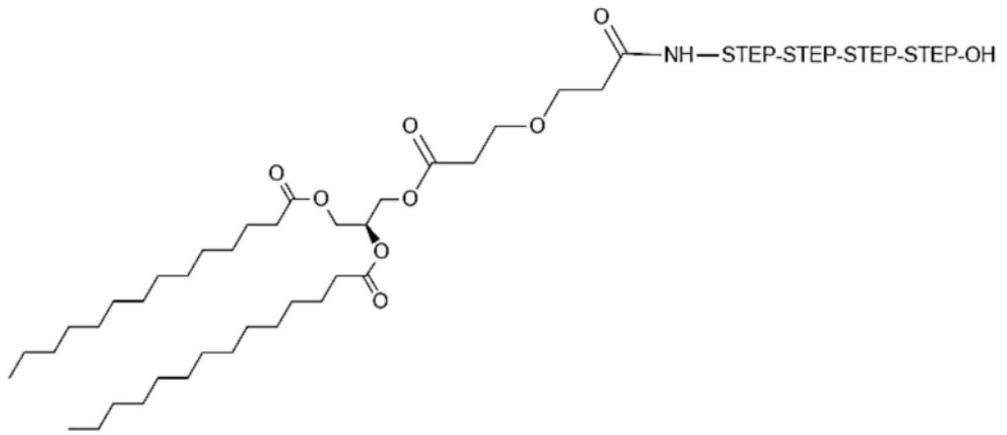
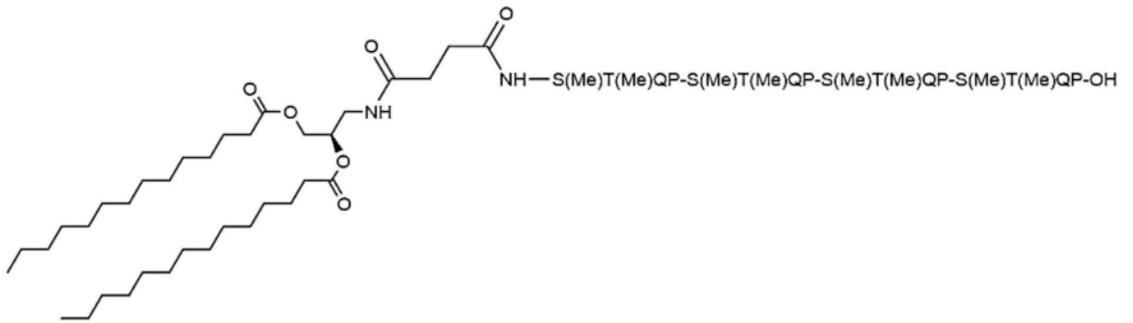


[0115]

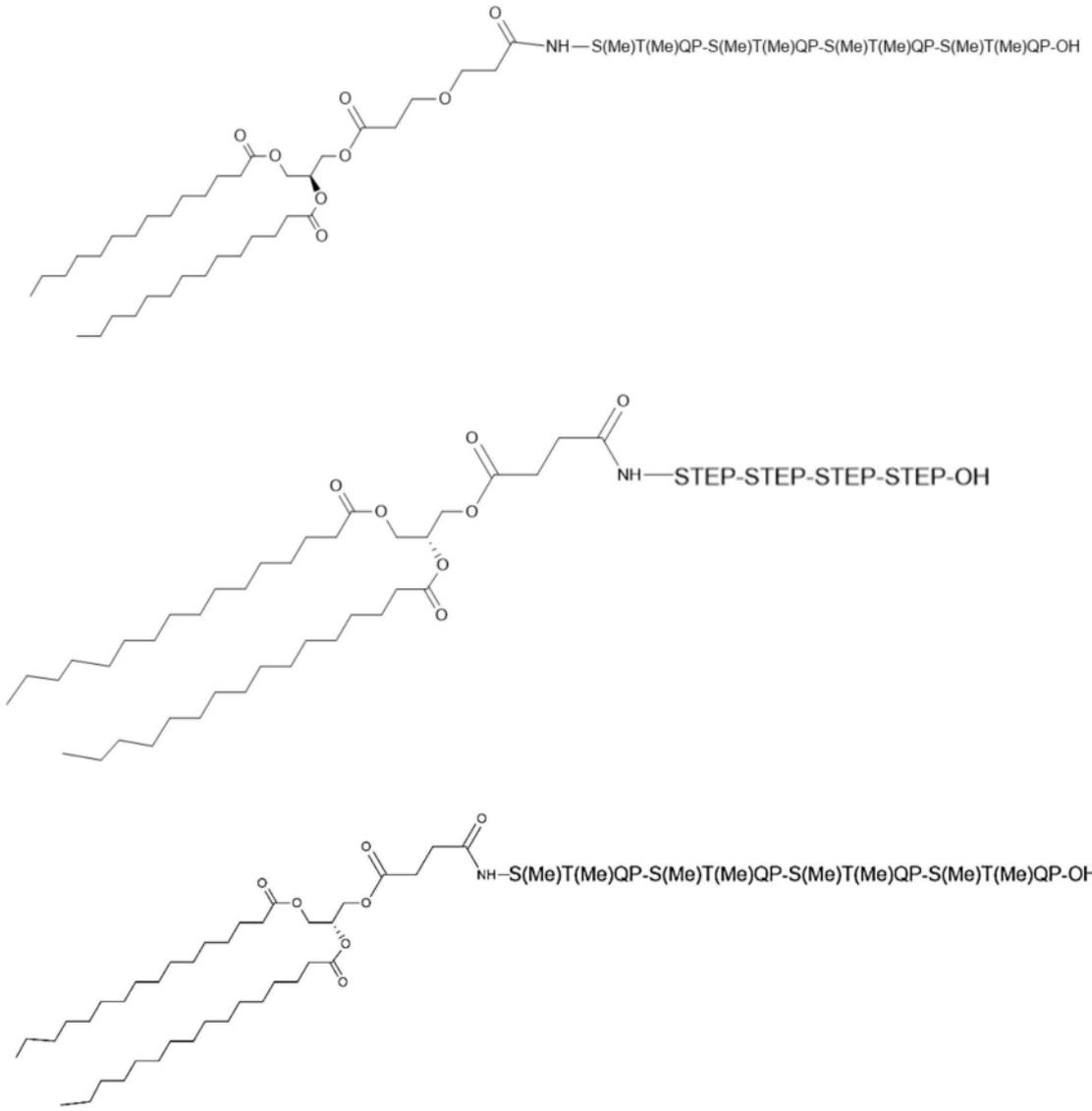


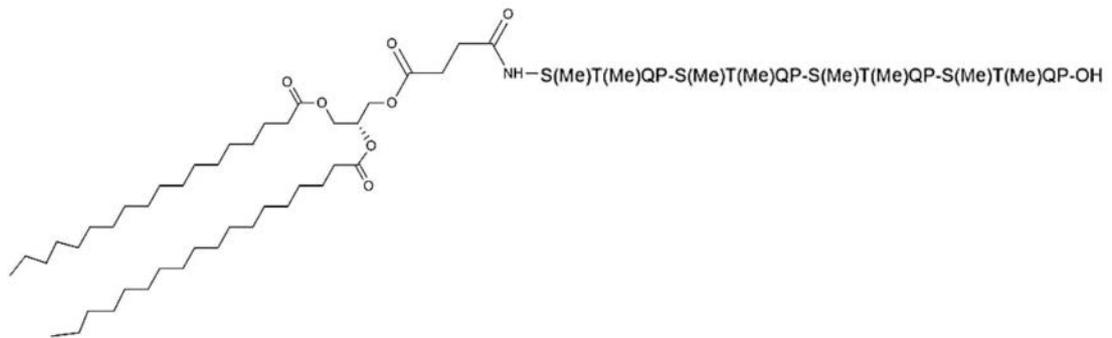
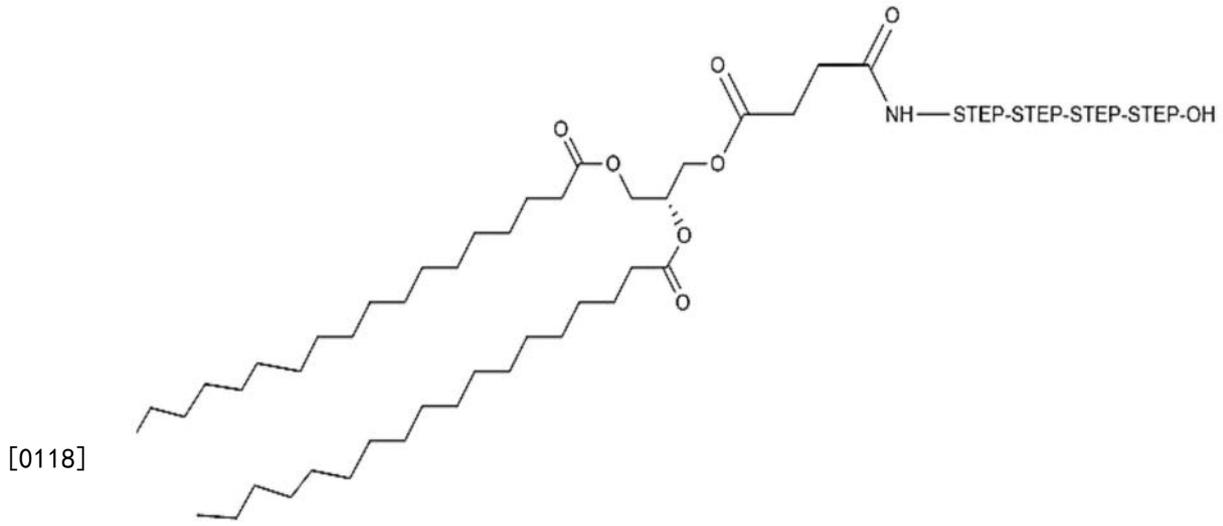


[0116]



[0117]





[0119] 在一些实施例中,提供了包括一种或多种本公开的肽-脂质缀合物的脂质组合物。在一些实施例中,所述脂质组合物包括脂质体或脂质纳米颗粒。在一些实施例中,所述脂质组合物包括脂质体。在一些实施例中,所述脂质组合物包括脂质纳米颗粒。在一些实施例中,所述脂质体或脂质纳米颗粒包封核酸。在一些实施例中,所述脂质体包封核酸。在一些实施例中,所述脂质纳米颗粒包封核酸。在一些实施例中,所述核酸选自以下:信使RNA、siRNA、转运RNA、微小RNA、RNAi或DNA。在一些实施例中,所述核酸是信使RNA。在一些实施例中,所述核酸是siRNA。在一些实施例中,所述核酸是转运RNA。在一些实施例中,所述核酸是微小RNA。在一些实施例中,所述核酸是RNAi。在一些实施例中,所述核酸是DNA。

[0120] 在一些实施例中,所述脂质-肽缀合物占所述脂质组合物中的所有脂质的约0.5mol%至约5mol%。在一些实施例中,所述脂质-肽缀合物占所述脂质组合物中的所有脂质的约1mol%至约5mol%。在一些实施例中,所述脂质-肽缀合物占所述脂质组合物中的所有脂质的约1.5mol%至约5mol%。在一些实施例中,所述脂质-肽缀合物占所述脂质组合物中的所有脂质的约2mol%至约5mol%。在一些实施例中,所述脂质-肽缀合物占所述脂质组合物中的所有脂质的约2.5mol%至约5mol%。在一些实施例中,所述脂质-肽缀合物占所述脂质组合物中的所有脂质的约3mol%至约5mol%。在一些实施例中,所述脂质-肽缀合物占所述脂质组合物中的所有脂质的约3.5mol%至约5mol%。在一些实施例中,所述脂质-肽缀合物占所述脂质组合物中的所有脂质的约4mol%至约5mol%。在一些实施例中,所述脂质-肽缀合物占所述脂质组合物中的所有脂质的约4.5mol%至约5mol%。

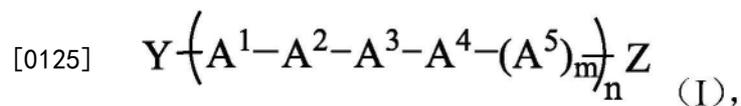
[0121] 在一些实施例中,所述脂质-肽缀合物占所述脂质组合物中的所有脂质的约

1mol% 至约4.5mol%。在一些实施例中,所述脂质-肽缀合物占所述脂质组合物中的所有脂质的约1mol% 至约4mol%。在一些实施例中,所述脂质-肽缀合物占所述脂质组合物中的所有脂质的约1mol% 至约3.5mol%。在一些实施例中,所述脂质-肽缀合物占所述脂质组合物中的所有脂质的约1mol% 至约3mol%。在一些实施例中,所述脂质-肽缀合物占所述脂质组合物中的所有脂质的约1mol% 至约2.5mol%。在一些实施例中,所述脂质-肽缀合物占所述脂质组合物中的所有脂质的约1mol% 至约2mol%。在一些实施例中,所述脂质-肽缀合物占所述脂质组合物中的所有脂质的约1mol% 至约1.5mol%。在一些实施例中,所述脂质-肽缀合物占所述脂质组合物中的所有脂质的约1mol%、1.5mol%、2mol%、2.5mol%、3mol%、3.5mol%、4mol%、4.5mol% 或5mol%。

[0122] 在一些实施例中,所述脂质组合物进一步包括阳离子脂质。在一些实施例中,所述阳离子脂质是可电离阳离子脂质。在一些实施例中,所述脂质组合物进一步包括胆固醇。在一些实施例中,所述脂质组合物进一步包括辅助脂质。在一些实施例中,所述辅助脂质是磷脂。

[0123] 在一些实施例中,提供了一种治疗有需要的受试者的疾病的方法,所述方法包括向所述受试者施用本文所述的脂质组合物。在一些实施例中,所述脂质组合物静脉内或肌肉内施用。在一些实施例中,所述脂质组合物静脉内施用。在一些实施例中,所述脂质组合物肌肉内施用。

[0124] 在一些实施例中,提供了由式(I)的肽组成的肽:



[0126] 其中,

[0127]  $A^1$ 选自丝氨酸、苏氨酸、0- $C_{1-6}$ 烷基丝氨酸和0- $C_{1-6}$ 烷基苏氨酸;

[0128]  $A^2$ 选自丝氨酸、苏氨酸、0- $C_{1-6}$ 烷基丝氨酸和0- $C_{1-6}$ 烷基苏氨酸;

[0129]  $A^3$ 选自谷氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺和天冬氨酸;

[0130]  $A^4$ 是脯氨酸;

[0131] 每个 $A^5$ 独立地选自天然或经修饰的氨基酸;

[0132] Y不存在或选自以下: $A^2 - A^3 - A^4 - (A^5)_m -$ 、 $A^3 - A^4 - (A^5)_m -$ 、 $A^4 - (A^5)_m -$ 和 $(A^5)_m -$ ;

[0133] Z不存在或选自以下: $-A^1 - A^2 - A^3 - A^4 -$ 、 $-A^1 - A^2 - A^3 -$ 、 $-A^1 - A^2$ 和 $-A^1$ ;

[0134] m是0至5;

[0135] n是1至12;并且

[0136] 其中所述式(I)的肽任选地在其C-末端用选自酰胺和C1-6烷基酯的中性基团进行保护;并且

[0137] 其中所述式(I)的肽在N-末端至C-末端方向上或在C-末端至N-末端方向上。

[0138] 在一些实施例中, $A^1$ 是丝氨酸。在一些实施例中, $A^1$ 是苏氨酸。在一些实施例中, $A^1$ 是0- $C_{1-6}$ 烷基丝氨酸。在一些实施例中, $A^1$ 是0- $C_{1-6}$ 烷基苏氨酸。在一些实施例中, $A^2$ 是丝氨酸。在一些实施例中, $A^2$ 是苏氨酸。在一些实施例中, $A^2$ 是0- $C_{1-6}$ 烷基苏氨酸。在一些实施例中, $A^2$ 是0- $C_{1-6}$ 烷基苏氨酸。在一些实施例中, $A^3$ 是谷氨酸。在一些实施例中, $A^3$ 是谷氨酰胺。在一些实施例中, $A^3$ 是天冬酰胺。在一些实施例中, $A^3$ 是天冬氨酸。

[0139] 在一些实施例中,Y不存在。在一些实施例中,Y是 $-A^2-A^3-A^4-(A^5)_m-$ 。在一些实施例中,Y是 $-A^3-A^4-(A^5)_m-$ 。在一些实施例中,Y是 $-A^4-(A^5)_m-$ 。在一些实施例中,Y是 $-(A^5)_m-$ 。在一些实施例中,Z不存在。在一些实施例中,Z是 $-A^1-A^2-A^3-A^4$ 。在一些实施例中,Z是 $-A^1-A^2-A^3$ 。在一些实施例中,Z是 $-A^1-A^2$ 。在一些实施例中,Z是 $-A^1$ 。

[0140] 在一些实施例中,m是0。在一些实施例中,m是1。在一些实施例中,m是2。在一些实施例中,m是3。在一些实施例中,m是4。在一些实施例中,m是5。在一些实施例中,n是1。在一些实施例中,n是2。在一些实施例中,n是3。在一些实施例中,n是4。在一些实施例中,n是5。在一些实施例中,n是6。在一些实施例中,n是7。在一些实施例中,n是8。在一些实施例中,n是9。在一些实施例中,n是10。在一些实施例中,n是11。在一些实施例中,n是12。在一些实施例中,n是13。在一些实施例中,n是14。在一些实施例中,n是15。

[0141] 在一些实施例中,所述式(I)的肽在其C-末端处被中性酰胺基保护。在一些实施例中,所述式(I)的肽在其C-末端用C1-6烷基酯进行保护。在一些实施例中,所述式(I)的肽在N-末端至C-末端方向上。在一些实施例中,所述式(I)的肽在C-末端至N-末端方向上。

[0142] 对于本文提供的肽,在一些实施例中,所述肽的长度为约4个氨基酸至约60个氨基酸。在一些实施例中,所述肽的长度为约8个氨基酸至约60个氨基酸。在一些实施例中,所述肽的长度为约12个氨基酸至约60个氨基酸。在一些实施例中,所述肽的长度为约16个氨基酸至约60个氨基酸。在一些实施例中,所述肽的长度为约20个氨基酸至约60个氨基酸。在一些实施例中,所述肽的长度为约24个氨基酸至约60个氨基酸。在一些实施例中,所述肽的长度为约28个氨基酸至约60个氨基酸。在一些实施例中,所述肽的长度为约32个氨基酸至约60个氨基酸。在一些实施例中,所述肽的长度为约36个氨基酸至约60个氨基酸。在一些实施例中,所述肽的长度为约40个氨基酸至约60个氨基酸。在一些实施例中,所述肽的长度为约44个氨基酸至约60个氨基酸。在一些实施例中,所述肽的长度为约48个氨基酸至约60个氨基酸。在一些实施例中,所述肽的长度为约52个氨基酸至约60个氨基酸。在一些实施例中,所述肽的长度为约56个氨基酸至约60个氨基酸。

[0143] 在一些实施例中,所述肽的长度为约4个氨基酸至约56个氨基酸。在一些实施例中,所述肽的长度为约4个氨基酸至约52个氨基酸。在一些实施例中,所述肽的长度为约4个氨基酸至约48个氨基酸。在一些实施例中,所述肽的长度为约4个氨基酸至约44个氨基酸。在一些实施例中,所述肽的长度为约4个氨基酸至约40个氨基酸。在一些实施例中,所述肽的长度为约4个氨基酸至约36个氨基酸。在一些实施例中,所述肽的长度为约4个氨基酸至约32个氨基酸。在一些实施例中,所述肽的长度为约4个氨基酸至约28个氨基酸。在一些实施例中,所述肽的长度为约4个氨基酸至约24个氨基酸。在一些实施例中,所述肽的长度为约4个氨基酸至约20个氨基酸。在一些实施例中,所述肽的长度为约4个氨基酸至约16个氨基酸。在一些实施例中,所述肽的长度为约4个氨基酸至约12个氨基酸。在一些实施例中,所述肽的长度为约4个氨基酸至约8个氨基酸。在一些实施例中,所述肽的长度为约4个氨基酸、8个氨基酸、12个氨基酸、16个氨基酸、20个氨基酸、24个氨基酸、28个氨基酸、32个氨基酸、36个氨基酸、40个氨基酸、44个氨基酸、48个氨基酸、52个氨基酸、56个氨基酸或60个氨基酸。

[0144] 在一些实施例中,所述肽的长度为约12个氨基酸。在一些实施例中,所述肽的长度为12个氨基酸。在一些实施例中,所述肽的长度为约16个氨基酸。在一些实施例中,所述肽

的长度为16个氨基酸。在一些实施例中,所述肽的长度为约20个氨基酸。在一些实施例中,所述肽的长度为20个氨基酸。在一些实施例中,所述肽的长度为约24个氨基酸。在一些实施例中,所述肽的长度为24个氨基酸。在一些实施例中,所述肽的长度为约28个氨基酸。在一些实施例中,所述肽的长度为28个氨基酸。在一些实施例中,所述肽的长度为约32个氨基酸。在一些实施例中,所述肽的长度为32个氨基酸。在一些实施例中,所述肽的长度为约36个氨基酸。在一些实施例中,所述肽的长度为36个氨基酸。在一些实施例中,所述肽的长度为约40个氨基酸。在一些实施例中,所述肽的长度为40个氨基酸。

[0145] 在一些实施例中,所述肽由以下方法制备,所述方法包括:a)使n个数量的 $-A^1-A^2-A^3-A^4(A^5)_m-$ 接触,由此形成 $(A^1-A^2-A^3-A^4-(A^5)_m)_n$ ;以及b)使 $(A^1-A^2-A^3-A^4(A^5)_m)_n$ 与Y和Z接触,由此形成 $Y-(A^1-A^2-A^3-A^4-(A^5)_m)_n-Z$ 。

[0146] 在一些实施例中,所述肽由以下方法制备,所述方法包括:a)使 $A^1, A^2, A^3, A^4$ 和m个数量的 $A^5$ 按顺序接触,由此形成 $A^1-A^2-A^3-A^4-(A^5)_m$ ;b)使n个数量的 $-A^1-A^2-A^3-A^4(A^5)_m-$ 接触,由此形成 $(A^1-A^2-A^3-A^4-(A^5)_m)_n$ ;以及c)使 $(A^1-A^2-A^3-A^4(A^5)_m)_n$ 与Y和Z接触,由此形成 $Y-(A^1-A^2-A^3-A^4(A^5)_m)_n-Z$ 。

[0147] 在一些实施例中,所述肽-脂质缀合物由以下方法制备,所述方法包括:a)使n个数量的 $A^1-A^2-A^3-A^4(A^5)_m$ 接触,由此形成 $(A^1-A^2-A^3-A^4-(A^5)_m)_n$ ;b)使 $(A^1-A^2-A^3-A^4(A^5)_m)_n$ 与Y和Z接触,由此形成 $Y-(A^1-A^2-A^3-A^4(A^5)_m)_n-Z$ ;c)使所述连接部分与所述脂质接触,由此形成脂质-连接部分缀合物;以及d)使步骤b)的 $Y-(A^1-A^2-A^3-A^4(A^5)_m)_n-Z$ 与步骤c)的脂质-连接部分缀合物接触,由此形成肽-脂质缀合物。

[0148] 在一些实施例中,本文提供的所述肽-脂质缀合物由以下方法制备,所述方法包括:a)使 $A^1, A^2, A^3, A^4$ 和m个数量的 $A^5$ 按顺序接触,由此形成 $A^1-A^2-A^3-A^4-(A^5)_m$ ;b)使n个数量的 $A^1-A^2-A^3-A^4(A^5)_m$ 接触,由此形成 $(A^1-A^2-A^3-A^4-(A^5)_m)_n$ ;c)使 $(A^1-A^2-A^3-A^4(A^5)_m)_n$ 与Y和Z接触,由此形成 $Y-(A^1-A^2-A^3-A^4(A^5)_m)_n-Z$ ;d)使所述连接部分与所述脂质接触,由此形成脂质-连接部分缀合物;以及d)使步骤c)的 $Y-(A^1-A^2-A^3-A^4(A^5)_m)_n-Z$ 与步骤d)的脂质-连接部分缀合物接触,由此形成肽-脂质缀合物。

#### [0149] 制备方法

[0150] 在一些实施例中,提供了制备本文提供的肽-脂质缀合物的方法,包含其实施例。所述方法包含:a)使n个数量的 $A^1-A^2-A^3-A^4(A^5)_m$ 接触,由此形成 $(A^1-A^2-A^3-A^4-(A^5)_m)_n$ ;b)使 $(A^1-A^2-A^3-A^4(A^5)_m)_n$ 与Y和Z接触,由此形成 $Y-(A^1-A^2-A^3-A^4(A^5)_m)_n-Z$ ;c)使所述连接部分与所述脂质接触,由此形成脂质-连接部分缀合物;以及d)使步骤b)的 $Y-(A^1-A^2-A^3-A^4(A^5)_m)_n-Z$ 与步骤c)的脂质-连接部分缀合物接触,由此形成肽-脂质缀合物。

[0151] 在一些实施例中,提供了制备本文提供的所述肽-脂质缀合物的方法,包含其实施例。所述方法包括:a)使 $A^1, A^2, A^3, A^4$ 和m个数量的 $A^5$ 按顺序接触,由此形成 $A^1-A^2-A^3-A^4-(A^5)_m$ ;b)使n个数量的 $(A^1-A^2-A^3-A^4-(A^5)_m)$ 接触,由此形成 $(A^1-A^2-A^3-A^4-(A^5)_m)_n$ ;c)使 $(A^1-A^2-A^3-A^4(A^5)_m)_n$ 与Y和Z接触,由此形成 $Y-(A^1-A^2-A^3-A^4(A^5)_m)_n-Z$ ;d)使所述连接部分与所述脂质接触,由此形成脂质-连接部分缀合物;以及

[0152] e)使步骤c)的所述 $Y-(A^1-A^2-A^3-A^4(A^5)_m)_n-Z$ 与步骤d)的所述脂质连接部分缀合物接触,由此形成肽-脂质缀合物。

[0153] 在一些实施例中,提供了制备本文提供的肽的方法,包含其实施例。所述方法包

括:a)使n个数量的 $A^1-A^2-A^3-A^4(A^5)_m$ 接触,由此形成 $(A^1-A^2-A^3-A^4(A^5)_m)_n$ ;以及b)使 $(A^1-A^2-A^3-A^4(A^5)_m)_n$ 与Y和Z接触,由此形成 $Y-(A^1-A^2-A^3-A^4(A^5)_m)_n-Z$ 。

[0154] 在一些实施例中,提供了制备本文提供的肽的方法,包含其实施例。所述方法包括:a)使 $A^1$ 、 $A^2$ 、 $A^3$ 、 $A^4$ 和m个数量的 $A^5$ 按顺序接触,由此形成 $A^1-A^2-A^3-A^4(A^5)_m$ ;b)使n个数量的 $(A^1-A^2-A^3-A^4(A^5)_m)_n$ 接触,由此形成 $(A^1-A^2-A^3-A^4(A^5)_m)_n$ ;c)使 $(A^1-A^2-A^3-A^4(A^5)_m)_n$ 与Y和Z接触,由此形成 $Y-(A^1-A^2-A^3-A^4(A^5)_m)_n-Z$ 。

#### [0155] 基于脂质的调配物

[0156] 基于核酸向靶细胞的细胞内递送的治疗面临细胞外和细胞内屏障两者。事实上,裸核酸材料由于其毒性、在血清中的低稳定性、快速肾脏清除、靶细胞摄取减少、吞噬细胞摄取及其激活免疫反应的能力而不能容易地全身施用,所有这些特征都阻碍了其临床发展。当外源性核酸材料(例如,mRNA)进入人类生物系统时,其被网状内皮系统(RES)识别为外来病原体,并在有机会遇到血管系统内或外的靶细胞之前从血液循环中清除。据报道,裸核酸在血流中的半衰期大约为若干分钟(Kawabata K,Takakura Y,Hashida M《药学研究(Pharm Res.)》1995年6月;12(6):825-30)。化学修饰和适当的递送方法可以减少RES的摄取,并保护核酸不被普遍存在的核酸酶降解,这提高了基于核酸的治疗的稳定性和功效。此外,RNA或DNA是不利于细胞摄取的阴离子亲水性聚合物,其在表面也是阴离子的。因此,基于核酸的治疗的成功在很大程度上取决于媒剂或载体的开发,所述媒剂或载体可以高效地将遗传物质递送到靶细胞,并在体内获得足够水平的表达和最小的毒性。

[0157] 此外,在内化到靶细胞中时,核酸递送载体受到细胞内屏障的挑战,包含内体包埋、溶酶体降解、核酸从载体上拆包、跨核膜的易位(对于DNA)和在细胞质处释放(对于RNA)。因此,成功的基于核酸的治疗取决于载体将核酸递送到细胞内的靶位点以获得足够水平的所需活性(如基因表达)的能力。

[0158] 虽然若干种基因疗法已经能够成功利用病毒递送载体(例如,AAV),但基于脂质的调配物由于其生物相容性和易于大规模生产而越来越被认为是RNA和其它核酸化合物最有前途的递送系统之一。基于脂质的核酸疗法最重要的进展之一发生在2018年8月,当时Patisiran(ALN-TTR02)是美国食品药品监督管理局(FDA)和欧盟委员会(EC)批准的第一种siRNA治疗剂。ALN-TTR02是基于所谓的稳定核酸脂质颗粒(SNALP)转染技术的siRNA调配物。尽管Patisiran取得了成功,但通过脂质调配物递送核酸治疗剂(包含mRNA)仍在发展中。

[0159] 根据各种实施例,一些本领域公认的用于核酸治疗剂的脂质调配的递送媒剂包含基于聚合物的载剂,如聚乙烯亚胺(PEI);脂质纳米颗粒和脂质体;纳米脂质体;含神经酰胺纳米脂质体;多囊泡脂质体;蛋白脂质体;天然和合成源性的外泌体两者;天然、合成和半合成板层体;纳米颗粒;胶束;和乳液。这些脂质调配物的结构和组成可以变化,并且正如在快速发展的领域中可以预期的那样,本领域中已经使用了若干个不同的术语来描述单一类型的递送媒剂。与此同时,在整个科学文献中,脂质调配物的术语在其预期含义方面各不相同,并且这种不一致的使用导致了对脂质调配物的几个术语的确切含义的混淆。出于本公开的目的,在若干种潜在的脂质调配物中,脂质体、阳离子脂质体和脂质纳米颗粒在本文中被特异性地详细描述和定义。

#### [0160] 脂质体

[0161] 传统脂质体是由至少一个双层和内部含水性隔室组成的囊泡。脂质体的双层膜通常由两亲性分子形成,如包含空间上分开的亲水性和疏水性结构域的合成或天然来源的脂质(Lasic,《生物技术趋势(Trends Biotechnol.)》,16:307-321,1998)。脂质体的双层膜也可以由两亲性聚合物和表面活性物质(例如,聚合物囊泡、类脂质体等)形成。脂质体通常呈现为球形囊泡,并且大小范围为20nm至几微米。脂质体调配物可以制备为胶体分散体,或其可以冻干以降低稳定性风险并改善基于脂质体的药物的保质期。制备脂质体组合物的方法是本领域已知的,并且在普通技术人员的技术范围内。

[0162] 只有一个双层的脂质体被称为单层的,并且具有一个以上双层的脂质体被称为多层的。最常见的脂质体类型是小的单层囊泡(SUV)、大的单层囊泡(LUV)和多层囊泡(MLV)。与脂质体相反,溶酶体、胶束和反胶束由脂质的单层构成。通常,脂质体被认为具有单个内部隔室,然而,一些调配物可以是多囊泡脂质体(MVL),其由若干个非中心脂质双层分隔的许多不连续的内部水性隔室组成。

[0163] 因为脂质体基本上是生物膜的类似物且可以由天然和合成的磷脂制备,所以脂质体因其优越的生物相容性而长期以来被视为药物递送媒介(《国际纳米医学杂志(Int.J.Nanomedicine.)》2014;9:1833-1843)。在用作药物递送媒介时,由于脂质体具有被疏水性膜包围的水溶液核心,溶解在所述核心中的亲水性溶质不能轻易穿过双层,并且疏水性化合物将与所述双层结合。因此,脂质体可以负载疏水性和/或亲水性分子。当脂质体用于携带核酸如RNA时,所述核酸以水相形式包含在脂质体隔室中。

#### [0164] 阳离子脂质体

[0165] 脂质体可以由阳离子、阴离子和/或中性脂质构成。作为脂质体的一个重要亚类,阳离子脂质体是全部或部分由带正电的脂质制备的脂质体,或者更具体地说,是包括阳离子基团和亲脂性部分两者的脂质。除了上述脂质体的一般特征外,阳离子脂质体中使用的阳离子脂质的带正电荷部分提供了若干个优点和一些独特的结构特征。例如,阳离子脂质的亲脂性部分是疏水性的,并且因此将其自身引导远离脂质体的含水内部,并与其它非极性和疏水性物质缔合。相反,阳离子部分将与水性介质缔合,并且更重要的是与极性分子和物种缔合,所述阳离子部分可以与其在阳离子脂质体的水性内部络合。由于这些原因,阳离子脂质体越来越多地被研究用于基因疗法,因为其通过静电相互作用对带负电的核酸有利,从而产生具有生物相容性、低毒性和体内临床应用所需大规模生产的可能性的复合物。下文列出了适用于阳离子脂质体的阳离子脂质。

#### [0166] 脂质纳米颗粒

[0167] 与脂质体和阳离子脂质体相比,脂质纳米颗粒(LNP)具有包含将化合物包封在固相中的单一单层或双层脂质的结构。因此,与脂质体不同,脂质纳米颗粒在其内部不具有水相或其它液相,而是来自双层或单层外壳的脂质直接与内部化合物络合,从而将其包封在固体核心中。脂质纳米颗粒通常是具有相对均匀分散的形状和大小的球形囊泡。虽然来源因脂质颗粒的大小可以作为脂质纳米颗粒而不同,但在脂质纳米颗粒的直径可以在10nm至1000nm的范围内这一点上存在一些重叠。然而,更常见的是,其被认为小于120nm或甚至100nm。

[0168] 对于脂质纳米颗粒核酸递送系统,脂质壳可以调配成包含可电离阳离子脂质,其可以与核酸核心的带负电荷的主链络合并缔合。表观pKa值低于约7的可电离阳离子脂质具

有提供阳离子脂质用于与核酸的带负电荷的主链络合并在于低于可电离脂质的pKa的pH值下装载到脂质纳米颗粒中的益处,其中所述可电离脂质带正电荷。然后,在生理pH值下,脂质纳米颗粒可以采用相对中性的外部,从而允许在静脉施用后显著增加所述颗粒的循环半衰期。在核酸递送的上下文中,脂质纳米颗粒与其它基于脂质的核酸递送系统相比具有许多优点,包含高核酸包封效率、有效转染、改善对组织的渗透以递送治疗剂以及低水平的细胞毒性和免疫原性。

[0169] 在开发用于核酸的脂质纳米颗粒递送系统之前,阳离子脂质作为递送核酸药物的合成材料被广泛研究。在这些早期工作中,在生理pH下混合在一起后,核酸被阳离子脂质缩合,形成称为阳离子脂质体的脂质-核酸复合物。然而,脂复合物被证明是不稳定的,并且其特征在于从亚微米量级到几微米的宽尺寸分布。脂复合物,如Lipofectamine®试剂,已发现在体外转染中具有相当大的实用性。然而,这些第一代阳离子脂质体尚未被证明在体内有用。大粒径和正电荷(由阳离子脂质赋予)导致血浆快速清除、溶血和其它毒性,以及免疫系统激活。

#### [0170] 脂质-核酸调配物

[0171] 核酸或其药学上可接受的盐可以掺入脂质调配物(即,基于脂质的递送媒剂)中。

[0172] 在本公开的上下文中,基于脂质的递送媒剂通常用于将所需核酸(siRNA、质粒DNA、mRNA、自我复制RNA等)运输到靶细胞或组织。基于脂质的递送媒剂可以是本领域已知的任何合适的基于脂质的递送媒剂。在一些实施例中,所述基于脂质的递送媒剂是脂质体、阳离子脂质体或含有核酸的脂质纳米颗粒。在一些实施例中,所述基于脂质的递送媒剂包括脂质分子和核酸的纳米颗粒或双层。在一些实施例中,优选地,所述脂质双层进一步包括中性脂质或聚合物。在一些实施例中,优选地,所述脂质调配物包括液体培养基。在一些实施例中,优选地,所述调配物进一步包封核酸。在一些实施例中,优选地,所述脂质调配物进一步包括核酸和中性脂质或聚合物。在一些实施例中,优选地,所述脂质调配物包封核酸。

[0173] 本说明书提供了脂质调配物,所述脂质调配物包括包封在脂质调配物内的一种或多种治疗性核酸分子。在一些实施例中,所述脂质调配物包括脂质体。在一些实施例中,所述脂质调配物包括阳离子脂质体。在一些实施例中,所述脂质调配物包括脂质纳米颗粒。

[0174] 在一些实施例中,所述核酸被完全包封在脂质调配物的脂质部分内,使得所述脂质调配物中的核酸在水溶液中抵抗核酸酶降解。在其它实施例中,本文所述的脂质调配物对哺乳动物如人类基本上无毒性。

[0175] 本公开的脂质调配物通常还具有以下总脂质:核酸比(质量/质量比):约1:1至约100:1、约1:1至约50:1、约2:1至约45:1、约3:1至约40:1、约5:1至约38:1、或约6:1至约40:1、或约7:1至约35:1、或约8:1至约30:1;或约10:1至约25:1;或约8:1至约12:1;或约13:1至约17:1;或约18:1至约24:1;或约20:1至约30:1。在一些优选实施例中,所述总脂质:核酸比(质量/质量比)为约10:1至约25:1。所述比率可以是所叙述范围内的任何值或子值,包含端点。

[0176] 本公开的脂质调配物通常具有约30nm至约150nm、约40nm至约150nm、约50nm至约150nm、约60nm至约130nm、约70nm至约110nm、约70nm至约100nm、约80nm至约100nm、约90nm至约100nm、约70至约90nm、约80nm至约90nm、约70nm至约80nm或约30nm、约35nm、约40nm、约45nm、约50nm、约55nm、约60nm、约65nm、约70nm、约75nm、约80nm、约85nm、约90nm、约95nm、约

100nm、约105nm、约110nm、约115nm、约120nm、约125nm、约130nm、约135nm、约140nm、约145nm或约150nm的平均直径,并且基本上是无毒性的。所述直径可以是所叙述范围内的任何值或子值,包含端点。另外,核酸当存在于本公开的脂质纳米颗粒中时在水溶液中抵抗核酸酶的降解。

[0177] 在优选实施例中,所述脂质调配物包括核酸、阳离子脂质(例如,本文所述的一种或多种阳离子脂质或其盐)、磷脂和抑制颗粒聚集的缀合脂质(例如,本公开的一种或多种PEG-脂质缀合物和/或肽-脂质缀合物)。所述脂质调配物还可以包含胆固醇。

[0178] 在所述核酸-脂质调配物中,所述核酸可以完全包封在所述调配物的脂质部分内,由此保护所述核酸免于核酸酶降解。在优选实施例中,脂质调配物包括完全包封在所述脂质调配物的脂质部分内的核酸,由此保护所述核酸免于核酸酶降解。在某些实例中,在颗粒暴露于37°C的核酸酶至少约20分钟、30分钟、45分钟或60分钟后,脂质调配物中的核酸基本上没有降解。在某些其它实例中,在将调配物在血清中于37°C下温育至少约30分钟、45分钟或60分钟或至少约2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、12小时、14小时、16小时、18小时、20小时、22小时、24小时、26小时、28小时、30小时、32小时、34小时或36小时后,脂质调配物中的核酸基本上没有降解。在其它实施例中,核酸与调配物的脂质部分络合。

[0179] 在核酸的上下文中,可以通过进行不可渗透膜荧光染料排除测定来确定完全包封,该测定使用与核酸缔合时具有增强荧光的染料。通过将染料添加到脂质调配物中,测量所得的荧光,并与添加少量非离子清洁剂后观察到的荧光进行比较来确定包封。清洁剂介导的对脂质层的破坏释放了封装的核酸,使其与不可渗透膜的染料相互作用。核酸包封可以计算为 $E = (I_0 - I) / I_0$ ,其中I和I<sub>0</sub>是指添加清洁剂前后的荧光强度。

[0180] 在其它实施例中,本公开提供了一种核酸脂质组合物,其包括多种核酸-脂质体、核酸-阳离子脂质体或核酸-脂质纳米颗粒。在一些实施例中,核酸-脂质组合物包括多种核酸-脂质体。在一些实施例中,核酸-脂质组合物包括多种核酸-阳离子脂质体。在一些实施例中,核酸-脂质组合物包括多种核酸-脂质纳米颗粒。

[0181] 在一些实施例中,脂质调配物包括完全包封在调配物的脂质部分内的核酸,使得约30%至约100%、约40%至约100%、约50%至约100%、约60%至约100%、约70%至约100%、约80%至约100%、约90%至约100%、约30%至约95%、约40%至约95%、约50%至约95%、约60%至约95%、约70%至约95%、约80%至约95%、约85%至约95%、约90%至约95%、约30%至约90%、约40%至约90%、约50%至约90%、约60%至约90%、约70%至约90%、约80%至约90%,或至少约30%、约35%、约40%、约45%、约50%、约55%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%(或其中的任何部分或范围)的颗粒具有包封在其中的核酸。所述量可以是所叙述范围内的任何值或子值,包含端点。

[0182] 根据脂质调配物的预期用途,可以改变组分的比例,并且可以使用本领域已知的测定法来测量特定调配物的递送效率。

[0183] 根据一些实施例,可表达的多核苷酸、核酸活性剂和mRNA构建体可以是脂质调配的。脂质调配物优选地选自但不限于脂质体、阳离子脂质体和脂质纳米颗粒。在一个优选实施例中,脂质调配物是阳离子脂质体或脂质纳米颗粒(LNP),其包括:

- [0184] (a) 核酸(mRNA、siRNA等)；  
[0185] (b) 阳离子脂质；  
[0186] (c) 本公开的肽-脂质缀合物；  
[0187] (d) 任选地,非阳离子脂质(如中性脂质)；以及  
[0188] (e) 任选地,固醇。

[0189] 在一个一些实施例中,所述阳离子脂质是可电离阳离子脂质。在一个实施例中,所述脂质纳米颗粒调配物由以下组成:(i)至少一个阳离子脂质;(ii)辅助脂质;(iii)固醇(例如,胆固醇);以及(iv)本公开的肽-脂质缀合物,其摩尔比为约20%至约40%的可电离阳离子脂质:约25%至约45%的辅助脂质:约25%至约45%的固醇;约0.5%至5%的肽-脂质缀合物。示例性阳离子脂质(包含可电离阳离子脂质)、辅助脂质(例如,中性脂质)和类固醇在下文中描述。

#### [0190] 阳离子脂质

[0191] 脂质调配物优选地包含适于形成阳离子脂质体或脂质纳米颗粒的阳离子脂质。阳离子脂质被广泛研究用于核酸递送,因为其可以与带负电的膜结合并诱导摄取。通常,阳离子脂质是含有正亲水性头部基团、两个(或更多个)亲脂性尾部或类固醇部分和这两个结构域之间的连接体的两亲物。优选地,所述阳离子脂质在接近生理pH值下携带净正电荷。阳离子脂质体传统上是寡核苷酸最常用的非病毒递送系统,包含质粒DNA、反义寡核苷酸和siRNA/小发夹RNA-shRNA。阳离子脂质,如DOTAP(1,2-二烯酰-3-三甲基丙烷)和DOTMA(N-[1-(2,3-二烯酰氧基)丙基]-N,N,N-三甲基硫酸铵)可以通过静电相互作用与带负电荷的核酸形成复合物或阳离子脂质体,从而提供较高的体外转染效率。

[0192] 在当前公开的脂质调配物中,例如,所述阳离子脂质可以为N,N-二油基-N,N-二甲基氯化铵(DODAC)、N,N-二硬脂基-N,N-二甲基溴化铵(DDAB)、1,2-二油基三甲基氯化铵(DOTAP)(也被称为N-(2,3-二油基氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵和1,2-二油酰氧基-3-三甲基氨基丙烷氯盐)、N-(1-(2,3-二油酰氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTMA)、N,N-(二甲基-2,3-二油酰氧基)丙基胺(DODMA)、1,2-二亚油酰氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLinDMA)、1,2-二氢亚油酰氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLenDMA)、1,2-二氢亚油酰氧基-N,N-二甲基氨基丙烷( $\gamma$ -DLenDMA)、1,2-二烷基氨基甲酰氨基甲酰氧基-3-二甲基氨基丙烷(DLin-C-DAP)、1,2-二烷基氨基甲酰氧基-3-(二甲基氨基)乙酰氧基丙烷(DLin-DAC)、1,2-二烷基氨基甲酰氧基-3-吗啉丙烷(DLin-MA)、1,2-二氢油酰基-3-二甲基氨基丙烷(DLinDAP)、1,2-二氢油酰基硫代-3-二甲基氨基丙烷(DLin-S-DMA)、1-亚油酰基-2-亚油酰基-3-二甲基氨基丙烷(DLin-2-DMAP)、1,2-二氢油酰氧基-3-三甲氨基丙烷氯盐(DLin-TMA.Cl)、1,2-二氢油酰-3-三甲氨基丙烷氯盐(DLin-TAP.Cl)、1,2-二氢油酰氧基-3-(N-甲基哌嗪)丙烷(DLin-MPZ)、或3-(N,N-二油基氨基)-1,2-丙二醇(DLinAP)、3-(N,N-二油基氨基)-1,2-丙二醇(DOAP)、1,2-二油基氧代-3-(2-N,N-二甲基氨基)乙氧基丙烷(DLin-EG-DMA)、2,2-二苯基-4-二甲基氨基甲基-[1,3]-二氧戊烷(DLin-K-DMA)或其类似物、(3aR,5s,6aS)-N,N-二甲基-2,2-二((9Z,12Z)-十八烷基-9,12-二烯基)四氢-3aH-环戊烯[d][1,3]二噁醇-5-胺、(6Z,9Z,28Z,31Z)-庚三烯-6,9,28,31-四烯-19-基4-(二甲基氨基)丁酸甲酯(MC3)、1,1'-(2-(4-(2-((2-(双(2-羟基十二烷基)氨基)乙基)(2-羟基十二烷基)氨基)乙基)哌嗪-1-基)乙基氮杂二基)二十二烷-2-醇(C12-200)、2,2-二氢吡啶基-4-(2-二甲基

氨基乙基)-[1,3]-二氧戊环(DLin-K-C2-DMA)、2,2-二氢吡啶基-4-二甲基氨基甲基-[1,3]-二氧戊环(DLin-K-DMA)、(6Z,9Z,28Z,31Z)-七三烯-6,9,28,31-四烯-19-基4-(二甲基氨基)丁酸(DLin-M-C3-DMA)、3-((6Z,9Z,28Z,31Z)-七三烯-6,9,28,31-四烯-19-基氧基)-N,N-二甲基丙-1-胺(MC3醚)、4-((6Z,9Z,28Z,31Z)-七三烯-6,9,28,31-四烯-19-基氧基)-N,N-二甲基丁-1-胺(MC4醚)或其任何组合。其它阳离子脂质包含但不限于N,N-二硬脂基-N,N-二甲基溴化铵(DDAB)、3P-(N-(N',N'-二甲基氨基乙烷)-氨基甲酰基)胆固醇(DC-Choi)、N-(1-(2,3-二油酰氧基)丙基)-N-2-(精胺)乙基)-N,N-二甲基三氟乙酸铵(DOSPA)、二十八烷基酰胺基糖基羧精胺(DOGS)、1,2-二亮氨酸-sn-3-磷酸乙醇胺(DOPE)、1,2-二油酰-3-二甲基氨基丙烷(DODAP)、N-(1,2-二异丙基-3-基)-N,N-二甲基-N-羟乙基溴化铵(DMRIE)和2,2-二苯基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环(XTC)。此外,还可以使用阳离子脂质的商业制剂,例如脂质体(LIPOFECTIN)(包含DOTMA和DOPE,可从GIBCO/BRL获得)和脂质体(Lipofectamine)(包括DOSPA和DOPE,可从GIBCO/BRL获得)。

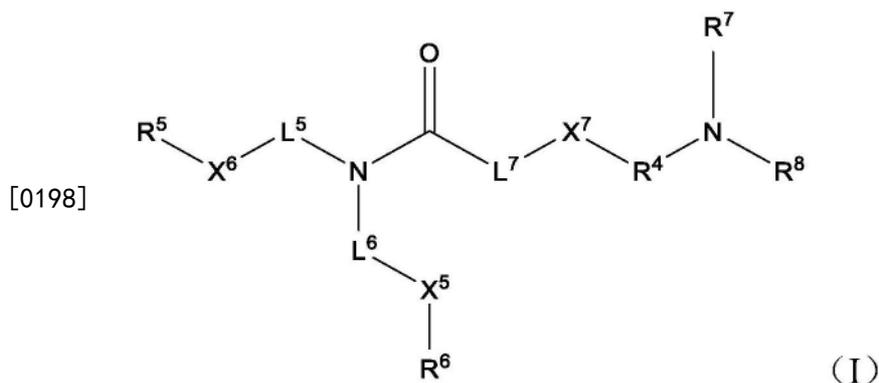
[0193] 其它合适的阳离子脂质公开于以下文献中:国际出版物第WO 09/086558、WO 09/127060、WO 10/048536、WO 10/054406、WO 10/088537、WO 10/129709和WO 2011/153493号;美国专利出版物第2011/0256175、2012/0128760和2012/0027803号;美国专利第8,158,601号;以及Love等人,《美国国家科学院院刊(PNAS)》,107(5),1864-69,2010,所述参考文献的内容通过引用并入本文。

[0194] 其它合适的阳离子脂质包含具有替代脂肪酸基团和其它二烷基氨基的脂质,包含烷基取代基不同的脂质(例如,N-乙基-N-甲基氨基和N-丙基-N-乙基氨基)。这些脂质是被称为氨基脂质的阳离子脂质的一个子类别的一部分。在本文所述的脂质调配物的一些实施例中,所述阳离子脂质为氨基脂质。通常,具有较少饱和烷基链的氨基脂质更易于调整大小,尤其是当出于过滤灭菌的目的,复合物的尺寸必须小于约0.3微米时。可以使用含有碳链长度在C<sub>14</sub>至C<sub>22</sub>范围内的不饱和脂肪酸的氨基脂质。也可以使用其它支架来分离氨基脂质的氨基和脂肪酸或脂肪烷基部分。

[0195] 在一些实施例中,根据专利申请PCT/EP2017/064066,脂质调配物包括具有式I的阳离子脂质。在此上下文中,PCT/EP2017/064066的公开内容也通过引用并入本文。

[0196] 在一些实施例中,本公开的氨基或阳离子脂质是可电离的并且具有至少一个可质子化或可去质子化基团,使得脂质在等于或低于生理pH值(例如,pH 7.4)的pH值下带正电荷,并且在第二pH值下为中性,所述第二pH值优选地等于或高于生理pH值。当然,应当理解的是,作为pH的函数的质子的添加或去除是平衡过程,并且对带电或中性脂质的提及是指占优势物种的性质,而不要求所有的脂质都以带电或中性形式存在。不排除在本公开中使用具有多个可质子化或可去质子化基团的脂质或两性离子脂质。在某些实施例中,可质子化脂质的可质子化基团的pKa在约4至约11的范围内。在一些实施例中,可电离阳离子脂质的pKa为约5至约7。在一些实施例中,可电离阳离子脂质的pKa为约6至约7。

[0197] 在一些实施例中,脂质调配物包括式I的可电离阳离子脂质:



[0199] 或其药学上可接受的盐或溶剂化物,其中 $R^5$ 和 $R^6$ 各自独立地选自由以下组成的组:直链或支链 $C_1$ - $C_{31}$ 烷基、 $C_2$ - $C_{31}$ 烯基或 $C_2$ - $C_{31}$ 炔基和胆固醇基; $L^5$ 和 $L^6$ 各自独立地选自由以下组成的组:直链 $C_1$ - $C_{20}$ 烷基和 $C_2$ - $C_{20}$ 烯基; $X^5$ 是 $-C(O)O-$ ,由此形成 $-C(O)O-R^6$ 或 $-OC(O)-$ ,由此形成 $-OC(O)-R^6$ ; $X^6$ 是 $-C(O)O-$ ,由此形成 $-C(O)O-R^5$ 或 $-OC(O)-$ ,由此形成 $-OC(O)-R^5$ ; $X^7$ 是S或O; $L^7$ 不存在或是低级烷基; $R^4$ 是直链或支链 $C_1$ - $C_6$ 烷基;并且 $R^7$ 和 $R^8$ 各自独立地选自由以下组成的组:氢和直链或支链 $C_1$ - $C_6$ 烷基。

[0200] 在一些实施例中, $X^7$ 是S。

[0201] 在一些实施例中, $X^5$ 是 $-C(O)O-$ ,由此形成 $-C(O)O-R^6$ ,并且 $X^6$ 是 $-C(O)O-$ ,由此形成 $-C(O)O-R^5$ 。

[0202] 在一些实施例中, $R^7$ 和 $R^8$ 各自独立地选自由以下组成的组:甲基、乙基和异丙基。

[0203] 在一些实施例中, $L^5$ 和 $L^6$ 各自独立地是 $C_1$ - $C_{10}$ 烷基。在一些实施例中, $L^5$ 是 $C_1$ - $C_3$ 烷基,并且 $L^6$ 是 $C_1$ - $C_5$ 烷基。在一些实施例中, $L^6$ 是 $C_1$ - $C_2$ 烷基。在一些实施例中, $L^5$ 和 $L^6$ 各自为直链 $C_7$ 烷基。在一些实施例中, $L^5$ 和 $L^6$ 各自为直链 $C_9$ 烷基。

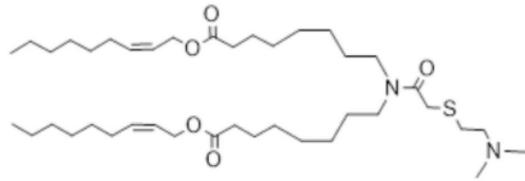
[0204] 在一些实施例中, $R^5$ 和 $R^6$ 各自独立地是烯基。在一些实施例中, $R^6$ 是烯基。在一些实施例中, $R^6$ 是 $C_2$ - $C_9$ 烯基。在一些实施例中,烯基包括单个双键。在一些实施例中, $R^5$ 和 $R^6$ 各自为烷基。在一些实施例中, $R^5$ 是支链烷基。在一些实施例中, $R^5$ 和 $R^6$ 各自独立地选自由以下组成的组: $C_9$ 烷基、 $C_9$ 烯基和 $C_9$ 炔基。在一些实施例中, $R^5$ 和 $R^6$ 各自独立地选自由以下组成的组: $C_{11}$ 烷基、 $C_{11}$ 烯基和 $C_{11}$ 炔基。在一些实施例中, $R^5$ 和 $R^6$ 各自独立地选自由以下组成的组: $C_7$ 烷基、 $C_7$ 烯基和 $C_7$ 炔基。在一些实施例中, $R^5$ 是 $-CH((CH_2)_pCH_3)_2$ 或 $-CH((CH_2)_pCH_3)((CH_2)_{p-1}CH_3)$ ,其中p是4至8。在一些实施例中,p是5并且 $L^5$ 是 $C_1$ - $C_3$ 烷基。在一些实施例中,p是6并且 $L^5$ 是 $C_3$ 烷基。在一些实施例中,p是7。在一些实施例中,p是8并且 $L^5$ 是 $C_1$ - $C_3$ 烷基。在一些实施例中, $R^5$ 由 $-CH((CH_2)_pCH_3)((CH_2)_{p-1}CH_3)$ 组成,其中p是7或8。

[0205] 在一些实施例中, $R^4$ 是乙烯或丙烯。在一些实施例中, $R^4$ 是正丙烯或异丁烯。

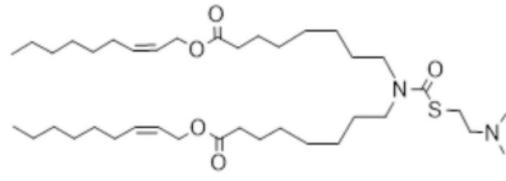
[0206] 在一些实施例中, $L^7$ 不存在, $R^4$ 是乙烯, $X^7$ 是S并且 $R^7$ 和 $R^8$ 各自为甲基。在一些实施例中, $L^7$ 不存在, $R^4$ 是正丙烯, $X^7$ 是S并且 $R^7$ 和 $R^8$ 各自为甲基。在一些实施例中, $L^7$ 不存在, $R^4$ 是乙烯, $X^7$ 是S并且 $R^7$ 和 $R^8$ 各自为乙基。

[0207] 在一些实施例中, $X^7$ 是S, $X^5$ 是 $-C(O)O-$ ,由此形成 $-C(O)O-R^6$ , $X^6$ 是 $-C(O)O-$ ,由此形成 $-C(O)O-R^5$ , $L^5$ 和 $L^6$ 各自独立地是直链 $C_3$ - $C_7$ 烷基, $L^7$ 不存在, $R^5$ 是 $-CH((CH_2)_pCH_3)_2$ ,并且 $R^6$ 是 $C_7$ - $C_{12}$ 烯基。在一些另外的实施例中,p是6并且 $R^6$ 是 $C_9$ 烯基。

[0208] 在一些实施例中,所述脂质调配物包括选自由以下组成的组的可电离阳离子脂质:

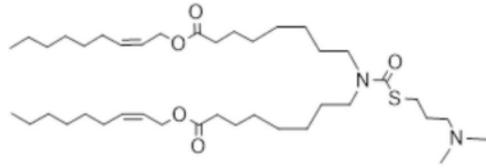


ATX-001

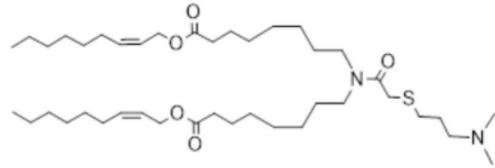


ATX-002

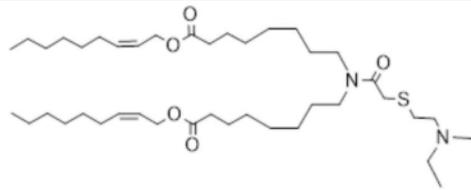
[0209]



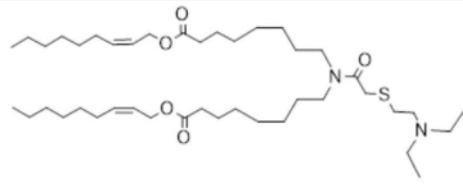
ATX-003



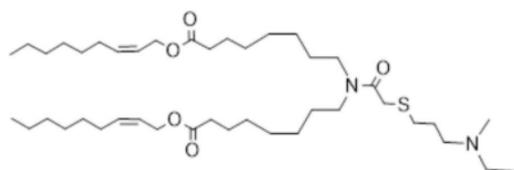
ATX-004



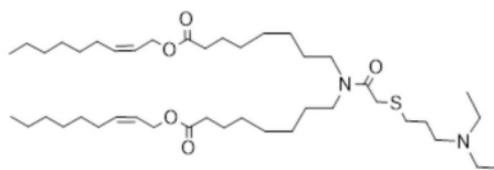
ATX-005



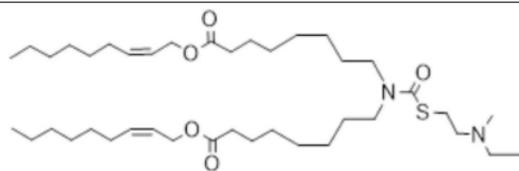
ATX-006



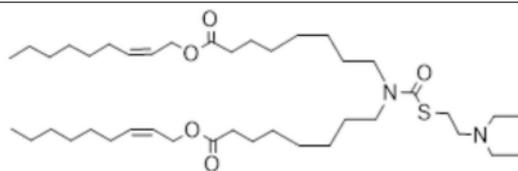
ATX-007



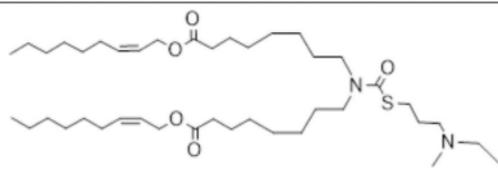
ATX-008



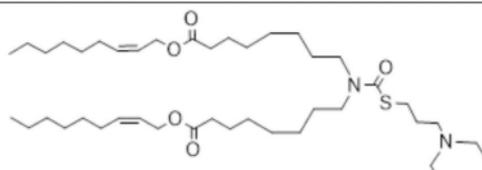
ATX-009



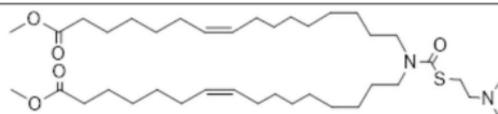
ATX-010



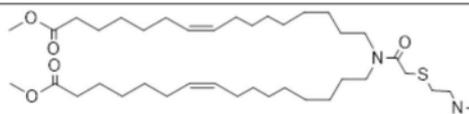
ATX-011



ATX-012

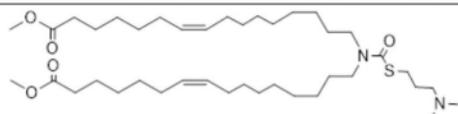


ATX-013

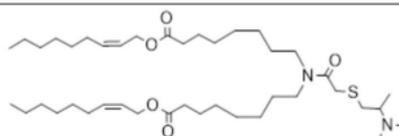


ATX-014

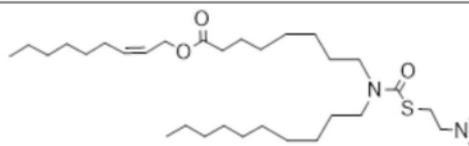
[0210]



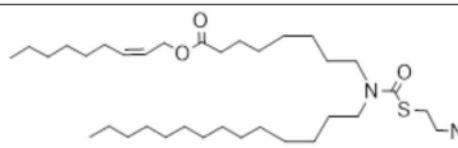
ATX-015



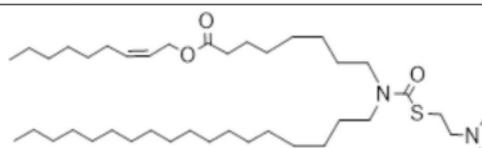
ATX-016



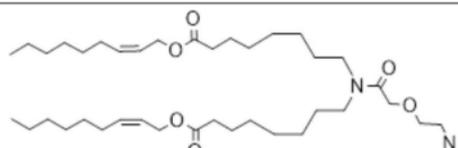
ATX-018



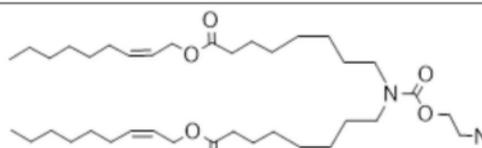
ATX-019



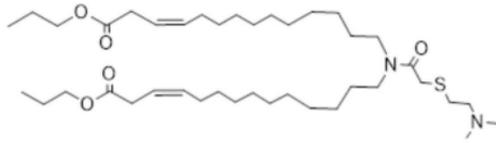
ATX-020



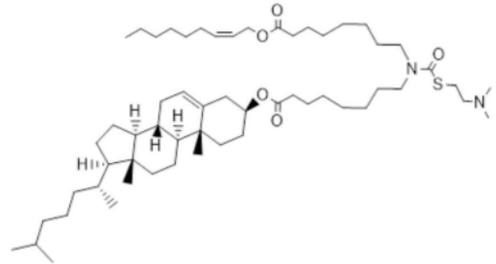
ATX-021



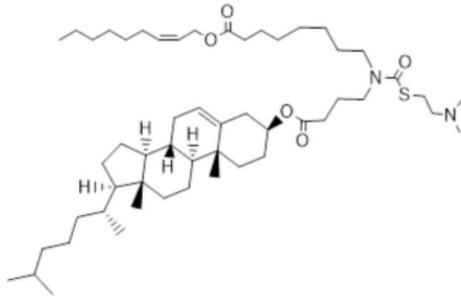
ATX-022



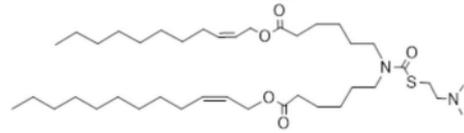
ATX-023



ATX-024

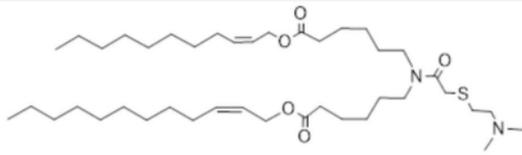


ATX-025

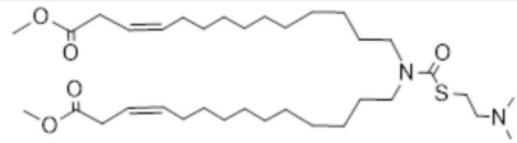


ATX-026

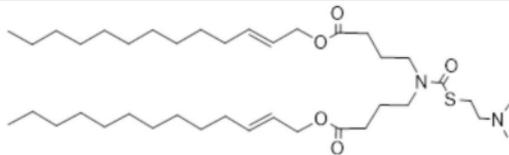
[0211]



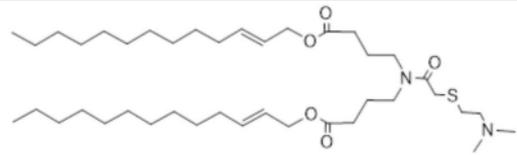
ATX-027



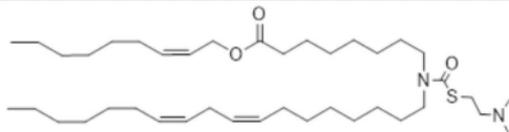
ATX-028



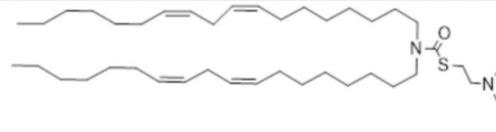
ATX-029



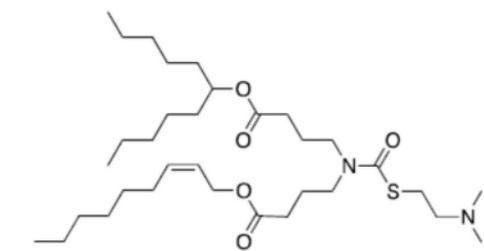
ATX-030



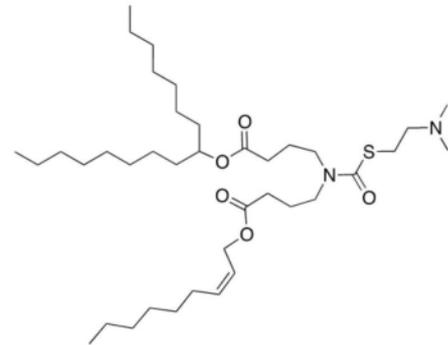
ATX-031



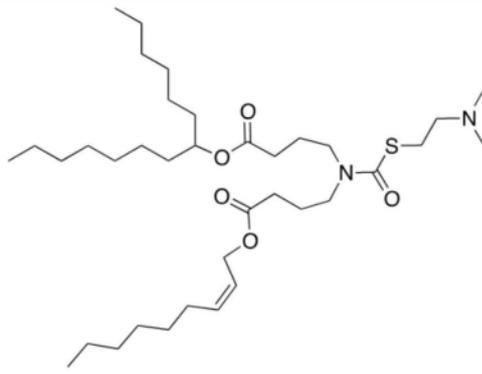
ATX-032



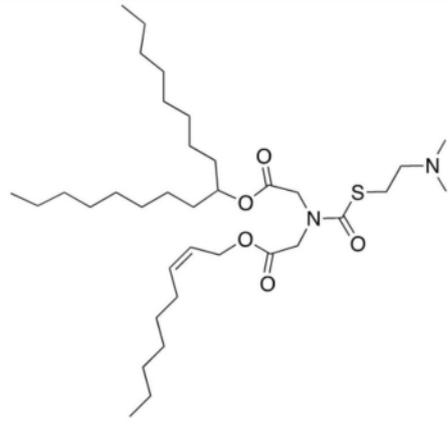
ATX-43



ATX-057

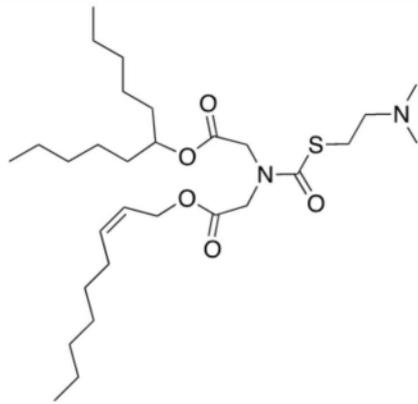


ATX-058

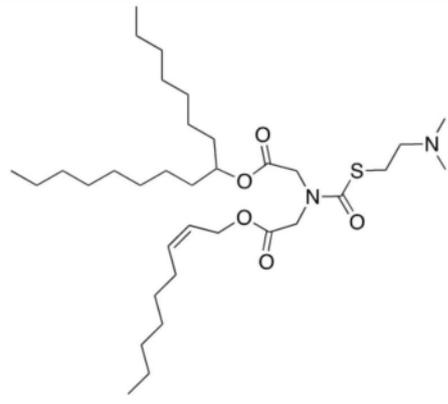


ATX-061

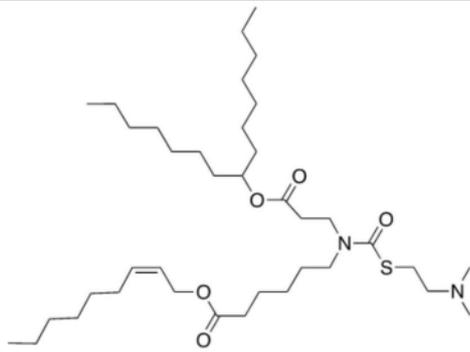
[0212]



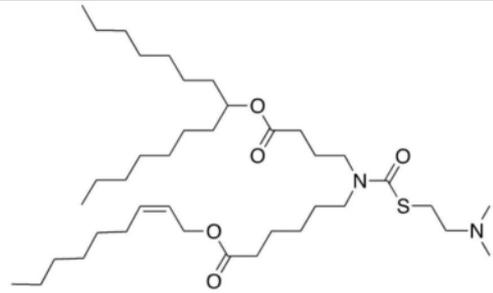
ATX-063



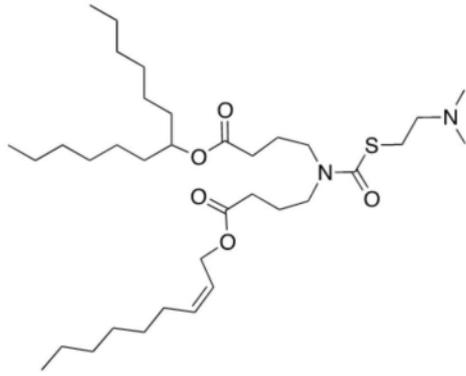
ATX-064



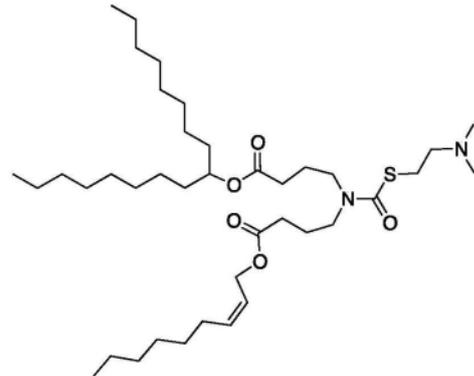
ATX-082



ATX-083

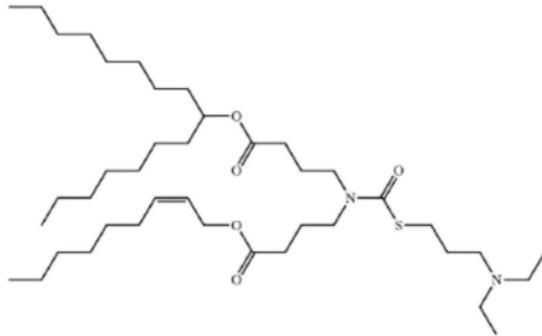


ATX-086

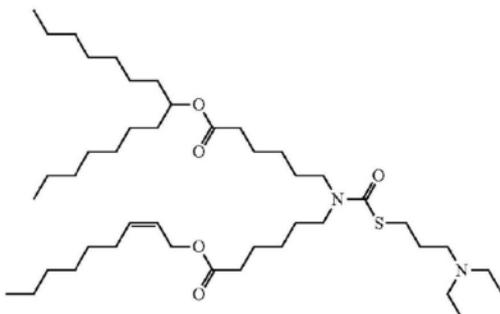


ATX-087

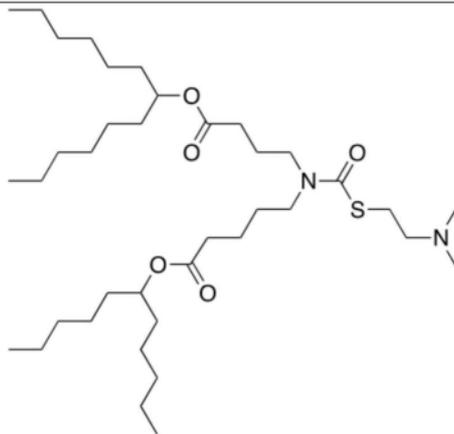
[0213]



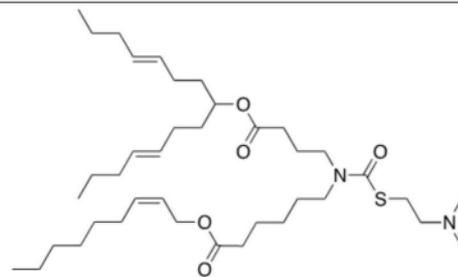
ATX-088



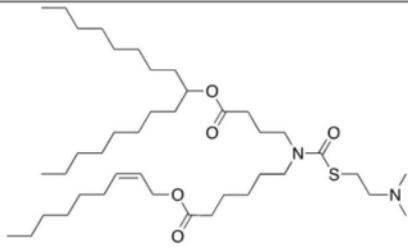
ATX-109



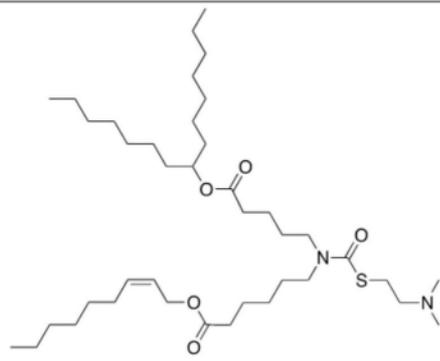
ATX-085



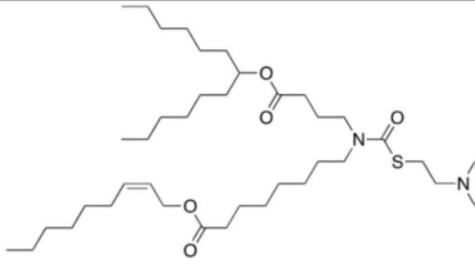
ATX-0121



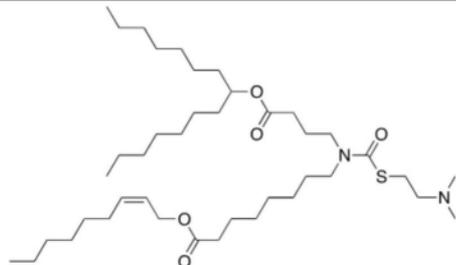
ATX-091



ATX-0102

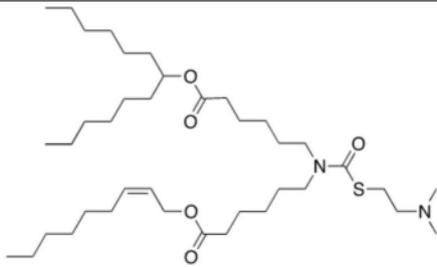


ATX-098

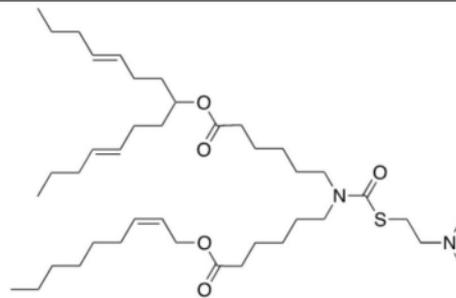


ATX-092

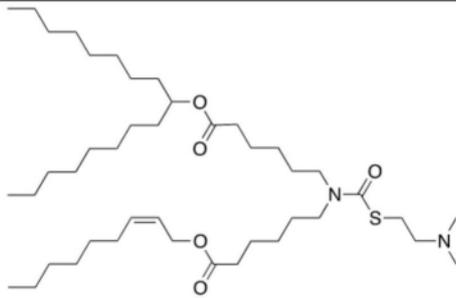
[0214]



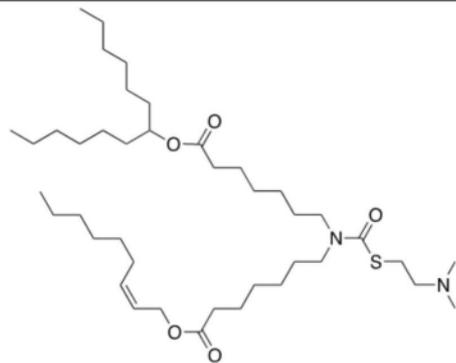
ATX-084



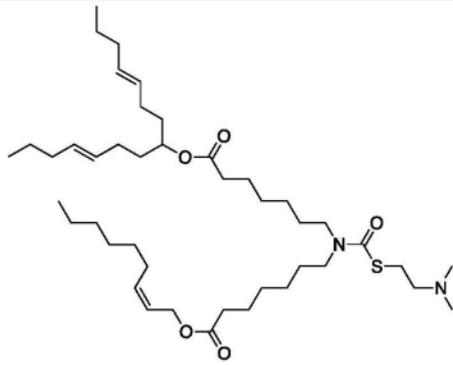
ATX-0125



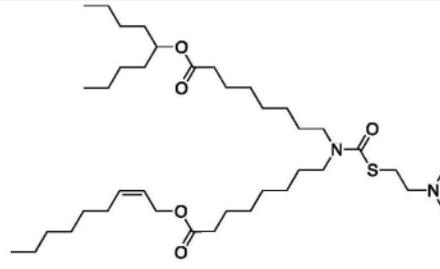
ATX-094



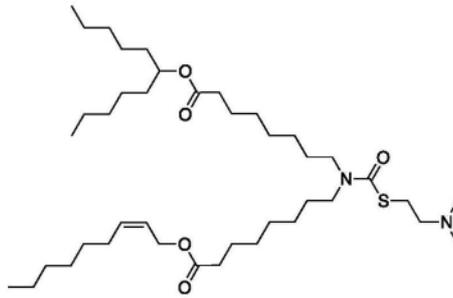
ATX-0110



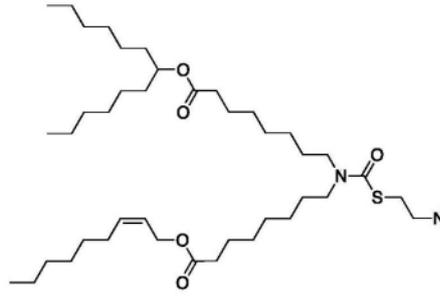
ATX-0118



ATX-0108

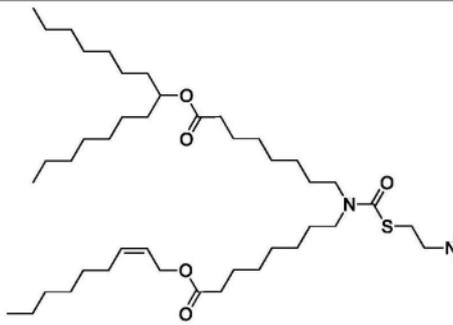


ATX-0107

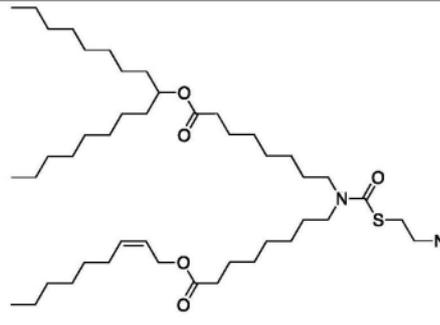


ATX-093

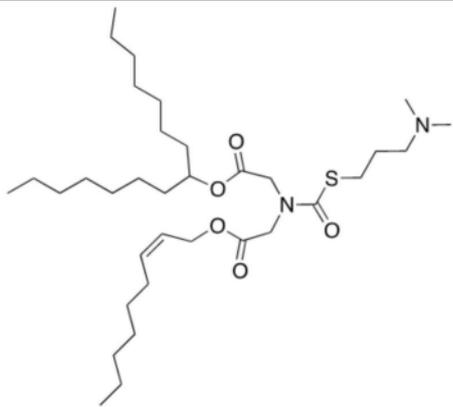
[0215]



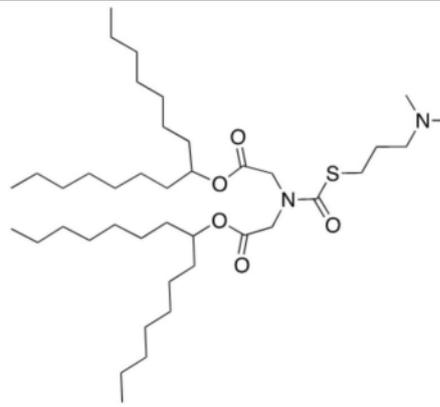
ATX-097



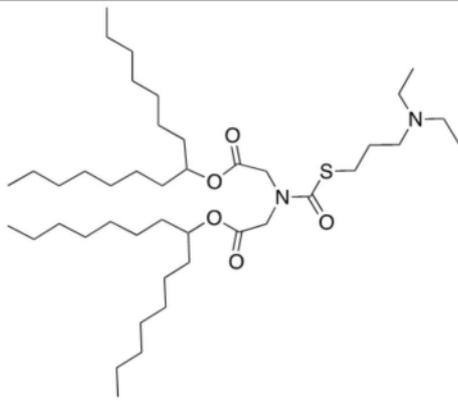
ATX-096



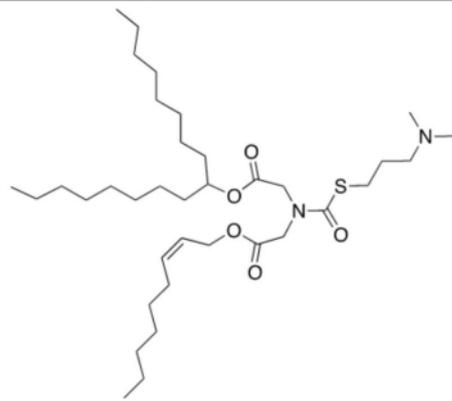
ATX-0111



ATX-0132

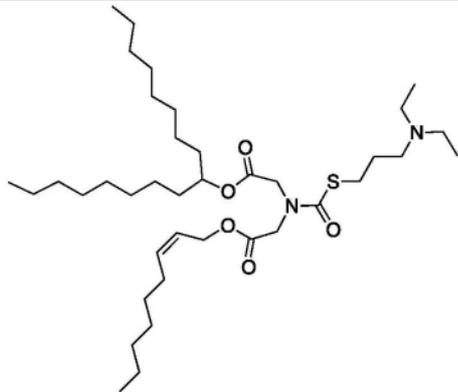


ATX-0134

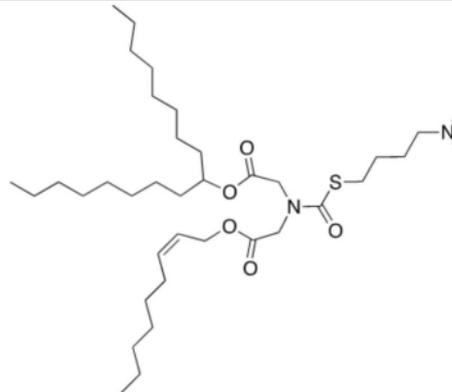


ATX-0100

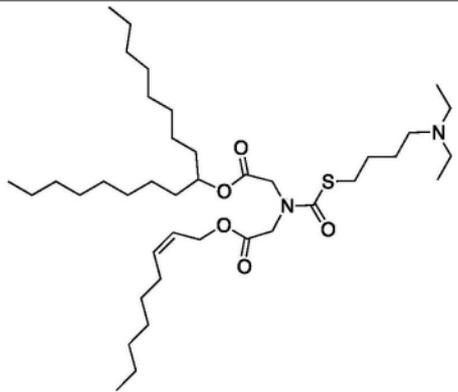
[0216]



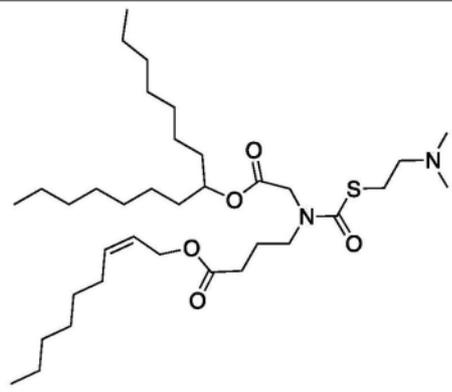
ATX-0117



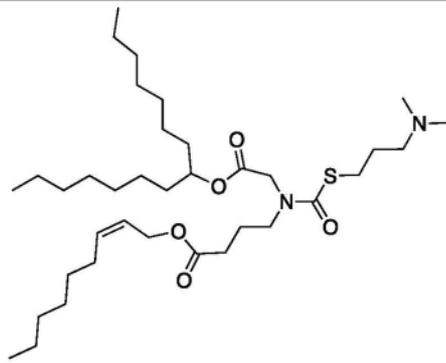
ATX-0114



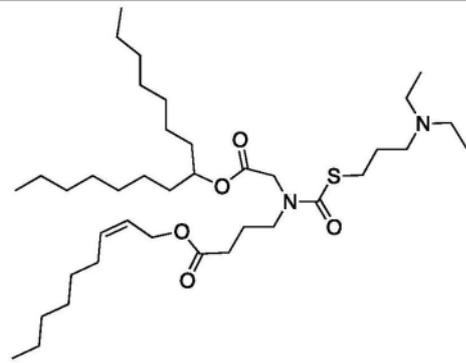
ATX-0115



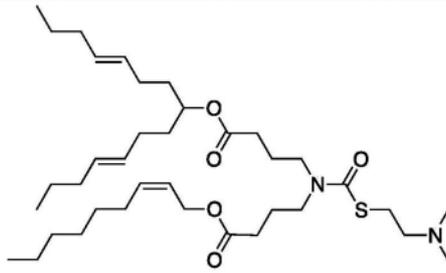
ATX-0101



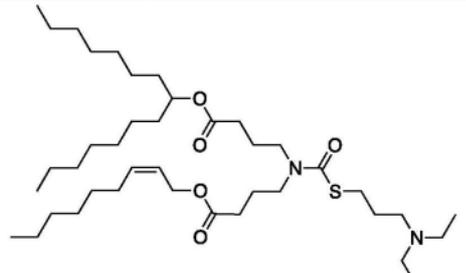
ATX-0106



ATX-0116

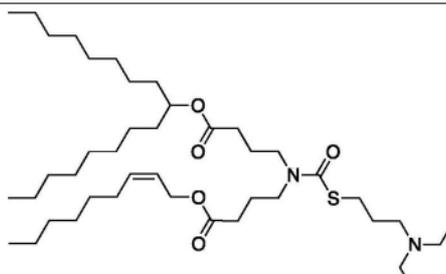


ATX-0123

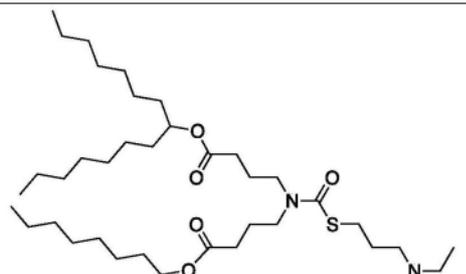


ATX-0122

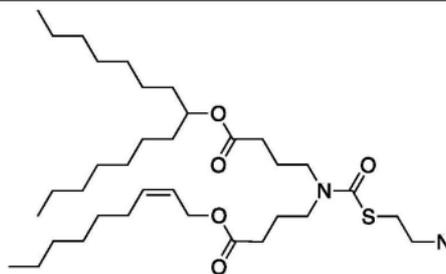
[0217]



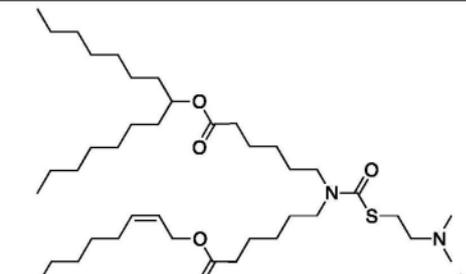
ATX-0124



ATX-0129



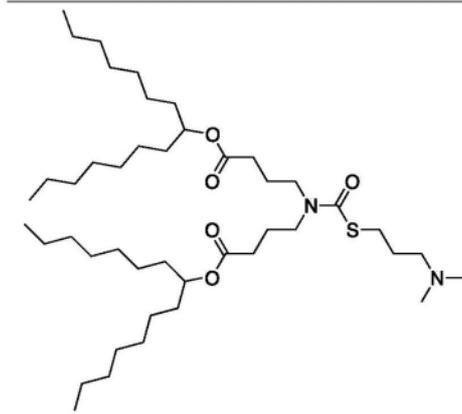
ATX-081



ATX-095

以及

[0218]



ATX-0126

[0219] 在一些实施例中,可以明确排除本文所述的任何一种或多种脂质。

[0220] 辅助脂质和固醇

[0221] 本公开的mRNA-脂质调配物可以包括辅助脂质,其可称为中性脂质、中性辅助脂质、非阳离子脂质、非阳离子辅助脂质、阴离子脂质、阴离子辅助脂质或两性离子脂质。已经发现,如果辅助脂质存在于调配物中,则脂质调配物,特别是阳离子脂质体和脂质纳米颗粒具有增加的细胞摄取。《当前药物代谢(Curr. Drug Metab.)》2014;15(9):882-92)。例如,一些研究已经指示中性和两性脂质,如1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱(DOPC)、二油酰基-磷脂酰乙醇胺(DOPE)和1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DSPC),比阳离子脂质更具有融合性(即,促进融合)可以影响脂质-核酸复合物的多态性特征,促进从层状向六方相的转变,并且因此诱导细胞膜的融合和破坏。《纳米医学》(伦敦).2014年1月;9(1):105-20)。此外,辅助脂质的使用有助于减少使用许多流行的阳离子脂质的任何潜在有害影响,如毒性和免疫原性。

[0222] 适用于本公开的脂质调配物的非阳离子脂质的非限制性实例包含磷脂,如卵磷脂、磷脂酰乙醇胺、溶血卵磷脂、溶血磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌糖、鞘磷脂、卵鞘磷脂(ESM)、脑磷脂、心磷脂、磷脂酸、脑苷脂、二十六烷基磷酸酯、二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)、二油酰磷脂酰胆碱(DOPC)、二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)、二油酰磷脂酰甘油(DOPG)、二棕榈酰磷脂酰甘油(DPPG)、二油酰磷脂酰乙醇胺(DOPE)、棕榈酰油酰磷脂酰胆碱(POPC)、棕榈酰油酰磷脂酰乙醇胺(POPE)、棕榈酰油酰磷脂酰甘油(POPG)、4-(N-马来酰亚胺甲基)-环己烷-1-羧酸二油酰磷脂酰乙醇胺(DOPE-mal)、二棕榈酰磷脂酰乙醇胺(DPPE)、二肉豆蔻酰磷脂酰乙醇胺(DMPE)、二硬脂酰磷脂酰乙醇胺(DSPE)、单甲基磷脂酰乙醇胺、二甲基磷脂酰乙醇胺、二月桂酰磷脂酰乙醇胺(DEPE)、硬脂酰油酰磷脂酰乙醇胺(SOPE)、溶血磷脂酰胆碱、二亚油酰基磷脂酰胆碱及其混合物。也可以使用其它二酰基磷脂酰胆碱和二酰基磷脂酰乙醇胺磷脂。这些脂质中的酰基优选地为源自具C10-C24碳链的脂肪酸的酰基,例如月桂酰基、肉豆蔻酰基、棕榈酰基、硬脂酰基或油酰基。

[0223] 非阳离子脂质的另外的实例包含固醇如胆固醇及其衍生物。一项研究得出结论,作为辅助脂质,胆固醇增加了与核酸交界的脂质层的电荷间距,使得电荷分布与核酸的电荷分布更紧密地匹配。《皇家学会期刊(J.R.Soc.Interface.)》2012年3月7日;9(68):548-561)。非限制性胆固醇衍生物的实施例包含:极性类似物,如5 $\alpha$ -胆甾烷醇、5 $\alpha$ -粪醇、胆固醇基-(2'-羟基)-乙基醚、胆固醇基-(4'-羟基)-丁基醚和6-酮胆甾烷醇;非极性类似物,如5

$\alpha$ -胆甾烷、胆甾烯酮、 $5\alpha$ -胆甾酮、 $5\alpha$ -胆甾酮和胆固醇癸酸酯；以及其混合物。在优选实施例中，胆固醇衍生物是极性类似物，如胆固醇基-(4'-羟基)-丁醚。

[0224] 在一些实施例中，存在于脂质调配物中的辅助脂质包括或由一种或多种磷脂和胆固醇或其衍生物的混合物组成。在其它实施例中，存在于脂质调配物中的辅助脂质包括或由一种或多种磷脂(例如，无胆固醇脂质调配物)组成。在又其它实施例中，存在于脂质调配物中的辅助脂质包括或由胆固醇或其衍生物(例如，无磷脂脂质调配物)组成。

[0225] 辅助脂质的其它实例包含不含磷的脂质，例如，硬脂胺、十二烷胺、十六烷胺、乙酰棕榈酸酯、甘油蓖麻酸酯、硬脂酸十六烷酯、肉豆蔻酸异丙酯、两性丙烯酸聚合物、三乙醇胺-月桂基硫酸盐、烷基-芳基硫酸盐聚乙氧基化脂肪酸酰胺、双十八烷基二甲基溴化铵、神经酰胺和鞘磷脂。

[0226] 在一些实施例中，辅助脂质包括脂质调配物中存在的总脂质(或其任何部分或其范围)的约20mol%至约50mol%、约22mol%至约48mol%、约24mol%至约46mol%、约25mol%至约44mol%、约26mol%至约42mol%、约27mol%至约41mol%、约28mol%至约40mol%、或约29mol%、约30mol%、约31mol%、约32mol%、约33mol%、约34mol%、约35mol%、约36mol%、约37mol%、约38mol%或约39mol%。

[0227] 在一些实施例中，调配物中的总辅助脂质包括两种或更多种辅助脂质，并且辅助脂质的总数量包括脂质调配物中存在的总脂质(或其任何部分或其范围)的约20mol%至约50mol%、约22mol%至约48mol%、约24mol%至约46mol%、约25mol%至约44mol%、约26mol%至约42mol%、约27mol%至约41mol%、约28mol%至约40mol%、或约29mol%、约30mol%、约31mol%、约32mol%、约33mol%、约34mol%、约35mol%、约36mol%、约37mol%、约38mol%或约39mol%。在一些实施例中，辅助脂质是DSPC和DOTAP的组合。在一些实施例中，辅助脂质是DSPC和DOTMA的组合。

[0228] 脂质调配物中的胆固醇或胆固醇衍生物可以包括脂质调配物中存在的总脂质的至多约40mol%、约45mol%、约50mol%、约55mol%或约60mol%。在一些实施例中，胆固醇或胆固醇衍生物包括脂质调配物中存在的总脂质的约15mol%至约45mol%、约20mol%至约40mol%、约30mol%至约40mol%，或约35mol%、约36mol%、约37mol%、约38mol%、约39mol%或约40mol%。

[0229] 存在于脂质调配物中的辅助脂质的百分比是目标量，并且存在于调配物中的辅助脂质的实际量可以变化，例如， $\pm 5\text{mol}\%$ 。

[0230] 含有阳离子脂质化合物或可电离阳离子脂质化合物的脂质调配物可以是以摩尔为基础的约20%至40%的阳离子脂质化合物、约25%至40%的胆固醇、约25%至50%的辅助脂质和约0.5%至5%的本公开的肽-脂质缀合物，其中所述百分比为所述调配物中存在的总脂质的百分比。在一些实施例中，所述组合物为约22%至30%的阳离子脂质化合物、约30%至40%的胆固醇、约30%至40%的辅助脂质和约0.5%至3%的本公开的肽-脂质缀合物，其中所述百分比为所述调配物中存在的总脂质的百分比。

#### [0231] 脂质缀合物

[0232] 在一些实施例中，本公开的一个或多个肽-脂质缀合物包括脂质调配物中存在的总脂质(或其任何部分或其范围)的约0.1mol%至约2mol%、约0.5mol%至约2mol%、约1mol%至约2mol%、约0.6mol%至约1.9mol%、约0.7mol%至约1.8mol%、约0.8mol%至约

1.7mol%、约0.9mol%至约1.6mol%、约0.9mol%至约1.8mol%、约1mol%至约1.8mol%、约1mol%至约1.7mol%、约1.2mol%至约1.8mol%、约1.2mol%至约1.7mol%、约1.3mol%至约1.6mol%或约1.4mol%至约1.6mol%。在其它实施例中,一种或多种肽-脂质缀合物包括脂质调配物中存在的总脂质(或其任何部分或范围)的约0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1.0%、1.2%、1.3%、1.4%、1.5%、1.6%、1.7%、1.8%、1.9%、2.0%、2.5%、3.0%、3.5%、4.0%、4.5%或5%。所述量可以是所叙述范围内的任何值或子值,包含端点。

[0233] 存在于本公开的脂质调配物中的肽-脂质缀合物的百分比是目标量,并且存在于调配物中的肽-脂质缀合物的实际量可以变化,例如,±0.5mol%。本领域普通技术人员将理解,脂质缀合物的浓度可以根据所使用的脂质缀合体和脂质调配物变得融合的速率而变化。

#### [0234] 用于脂质调配物的细胞摄取的作用机制

[0235] 用于细胞内递送核酸的脂质调配物,特别是脂质体、阳离子脂质体和脂质纳米颗粒,设计用于通过利用靶细胞的内吞机制穿透靶细胞进行细胞摄取,其中脂质递送媒介剂的内容物被递送到靶细胞的胞质溶胶。《核酸治疗剂(Nucleic Acid Therapeutics)》,28(3):146-157,2018)。具体而言,在本文所述的核酸-脂质调配物的情况下,所述脂质调配物通过受体介导的内吞作用进入细胞。在内吞作用之前,脂质递送媒介剂表面的功能化配体如本公开的肽-脂质缀合物可以从表面脱落,这触发到靶细胞的内化。在内吞作用期间中,细胞的质膜的某些部分包围载体,并将其吞噬成囊泡,然后囊泡从细胞膜上脱落,进入胞质溶胶,并最终经历内容物途径。对于可电离的含阳离子脂质的递送媒介剂,随着内体老化,酸度增加,导致媒介剂表面带强正电荷。递送媒介剂和内体膜之间的相互作用导致膜融合事件,从而导致有效载荷的胞质递送。对于mRNA或自我复制RNA有效载荷,细胞自身的内部翻译过程然后将RNA翻译成编码的蛋白质。编码的蛋白质可以进一步进行翻译后处理,包含运输到细胞内的靶细胞器或位置。

[0236] 通过控制脂质调配物的组成和浓度,可以控制脂质缀合物交换出脂质调配物的速率,并且进而控制脂质调配物融合的速率。另外,包含例如pH、温度或离子强度的其它变量可用于改变和/或控制脂质调配物融合的速率。可以用于控制脂质调配物融合的速率的其它方法对于本领域技术人员在阅读本公开后将变得显而易见。同样,通过控制脂质缀合物的组成和浓度,可以控制脂质体或脂质颗粒的大小。

#### [0237] 脂质调配物制造

[0238] 有许多不同的方法用于制备包括核酸的脂质调配物。《当前药物代谢》2014,15,882-892;《脂质化学与物理学(Chem.Phys.Lipids)》2014,177,8-18;《国际药学研究杂志(Int.J.Pharm.Stud.Res.)》2012,3,14-20)。本文简要描述了薄膜水合、双乳液、反相蒸发、微流体制备、双不对称离心、乙醇注射、洗涤剂透析、通过乙醇稀释自发形成囊泡和预成型脂质体包封的技术。

#### [0239] 薄膜水合

[0240] 在薄膜水合(TFH)或Bangham方法中,将脂质溶解在有机溶剂中,然后通过使用旋转蒸发器蒸发,从而形成薄的脂质层。在通过含有待负载化合物的水性缓冲液进行层水合之后,形成多层囊泡(MLV),其可通过膜挤出或通过起始MLV的超声处理而减小尺寸以产生小型或大型单层囊泡(LUV和SUV)。

[0241] 双乳液

[0242] 脂质调配物也可以通过双乳液技术制备,该技术涉及在水/有机溶剂混合物中的脂质溶解。将含有水滴的有机溶液与过量的水性介质混合,形成水包油包水(W/O/W)双乳液。在机械剧烈摇晃后,部分水滴坍塌,形成大的单层囊泡(LUV)。

[0243] 反相蒸发

[0244] 反相蒸发(REV)方法还允许实现负载有核酸的LUV。在该技术中,磷脂在有机溶剂和水性缓冲液中溶解形成两相系统。然后对所得悬浮液进行短暂的超声处理,直到混合物变成透明的单相分散体。脂质调配物是在减压下在有机溶剂蒸发后获得的。该技术已被用于封装包含核酸的不同大和小亲水性分子。

[0245] 微流体制备

[0246] 与其它本体技术不同,微流体方法提供了控制脂质水合过程的可能性。根据操纵流动的方式,该方法可以分为连续流动微流体和基于液滴的微流体。在以连续流模式操作的微流体流体动力学聚焦(MHF)方法中,脂质溶解在异丙醇中,所述异丙醇在两个水性缓冲液流之间的微通道交叉处进行流体动力学聚焦。囊泡大小可以通过调节流速来控制,从而控制脂质溶液/缓冲液稀释过程。该方法可以用于通过使用由三个入口和一个出口端口组成的微流体装置来生产寡核苷酸(ON)脂质调配物。

[0247] 双不对称离心

[0248] 双不对称离心(DAC)不同于更常见的离心,因为其使用绕其自身垂直轴的另外的旋转。由于产生了两个重叠的运动,实现了有效的均匀化:样品被向外推动,就像在普通离心机中一样,并且然后由于另外的旋转,其被推向小瓶的中心。通过将脂质和NaCl溶液混合,获得粘性囊泡磷脂凝胶(VPC),然后将其稀释以获得脂质调配物分散体。可以通过优化DAC速度、脂质浓度和均化时间来调节脂质调配物的大小。

[0249] 乙醇注射

[0250] 乙醇注射(EI)方法可以用于核酸包封。该方法提供了通过使用针头将溶解有脂质的乙醇溶液快速注射到含有待封装核酸的水性介质中。当磷脂分散在整个培养基中时,囊泡是自发形成的。

[0251] 洗涤剂透析

[0252] 洗涤剂透析方法可以用于包封核酸。简言之,将脂质和质粒溶解在具有适当离子强度的洗涤剂溶液中,在通过透析去除洗涤剂后,形成稳定的脂质调配物。然后通过离子交换色谱法去除未包封的核酸,并通过蔗糖密度梯度离心法清空囊泡。该技术对阳离子脂质含量和透析缓冲液的盐浓度高度敏感,并且该方法也难以规模化。

[0253] 通过乙醇稀释自发形成囊泡

[0254] 稳定的脂质调配物也可以通过乙醇稀释自发囊泡形成法生产,其中通过将溶解在乙醇中的脂质受控添加到含有核酸的快速混合的水性缓冲液中,逐步或逐滴的乙醇稀释提供了负载有核酸的囊泡的瞬时形成。

[0255] 药物组合物和递送方法

[0256] 为了促进体内核酸活性(例如,mRNA表达,或通过ASO或siRNA敲低),本文所述的核酸脂质调配物递送媒剂可以与一种或多种另外的核酸、载剂、靶向配体或稳定试剂组合,或在与合适的赋形剂混合的药理学组合中组合。用于调配和施用药物的技术可见于“《雷明

顿药物科学(Remington's Pharmaceutical Sciences)》,宾夕法尼亚州伊斯顿马克出版公司(Mack Publishing Co.,Easton,Pa.),最新版。

[0257] 本公开的脂质调配物和药物组合物可以根据当前的医学实践进行施用和给药,考虑受试者的临床病状、施用部位和方法、施用时间安排、受试者年龄、性别、体重和与本领域普通技术的临床医生相关的其它因素。出于本文目的的“有效量”可以通过实验临床研究、药理学、临床和医学领域的普通技术人员已知的相关考虑因素来确定。在一些实施例中,所施用的量对于实现症状和其它指标的至少一些稳定、改善或消除是有效的,这些指标被本领域技术人员选择为疾病进展、消退或改善的适当量度。例如,合适的量和给药方案是至少引起瞬时蛋白质(例如,酶)产生的方案。

[0258] 本文所述的药物组合物可以是可吸入组合物。合适的施用途径包含,例如,气管内、吸入或鼻内。在一些实施例中,施用导致核酸递送至肺上皮细胞。在一些实施例中,与其它类型的肺细胞和气道细胞相比,施用示出对肺上皮细胞的选择性。

[0259] 本文公开的药物组合物可以使用一种或多种赋形剂调配,以:(1)增加稳定性;(2)增加细胞转染;(3)允许持续或延迟释放(例如,来自核酸的储库调配物);(4)改变生物分布(例如,将核酸靶向特定的组织或细胞类型);(5)增加核酸或其体内表达的蛋白质的活性;和/或(6)改变核酸或编码蛋白在体内的释放特性。

[0260] 优选地,脂质调配物可以以局部方式而不是全身方式施用。根据待靶向组织,可以各种方式影响局部递送。例如,含有本公开的组合物的气溶胶可以被吸入(用于鼻腔、气管或支气管递送)。

[0261] 药物组合物可以施用于任何期望的组织。在一些实施例中,由本公开的脂质调配物或组合物递送的核酸在施用脂质调配物和/或组合物的组织中具有活性。在一些实施例中,核酸在不同于施用脂质调配物和/或组合物的组织的组织中具有活性。可以在其中递送核酸的示例性组织包含但不限于肺、气管和/或鼻腔、肌肉、肝脏、眼睛或中枢神经系统。

[0262] 本文描述的药物组合物可以通过药理学领域已知的或今后开发的任何方法来制备。通常,此类制备方法包含将活性成分(即,核酸)与赋形剂和/或一种或多种其它辅助成分缔合的步骤。根据本公开的药物组合物可以作为单次单位剂量和/或作为多个单次单位剂量批量制备、包装和/或出售。

[0263] 药物组合物可以另外地包括药学上可接受的赋形剂,如本文所使用的,所述赋形剂包含但不限于如适用于期望的特定剂型的任何和所有溶剂、分散介质、稀释剂或其它液体媒剂、分散或悬浮助剂、表面活性剂、等渗剂、增稠剂或乳化剂、防腐剂等等。

[0264] 除了传统赋形剂如任何和所有溶剂、分散介质、稀释剂或其它液体媒剂、分散体或悬浮助剂、表面活性剂、等渗剂、增稠剂或乳化剂、防腐剂之外,本公开的赋形剂可以包含但不限于脂质体、脂质纳米颗粒、聚合物、阳离子脂质体、核壳纳米颗粒,肽、蛋白质、用原代DNA构建体或mRNA转染的细胞(例如,用于移植到受试者体内)、透明质酸酶、纳米颗粒模拟物及其组合。

[0265] 因此,本文所述的调配物可以包含一种或多种赋形剂,每种赋形剂的量共同增加脂质调配物中核酸的稳定性,增加核酸(例如,mRNA或siRNA)的细胞转染,增加编码蛋白的表达,和/或改变编码蛋白的释放谱,或增加靶天然核酸的敲低。另外,可以使用自组装核酸纳米颗粒来调配核酸。

[0266] 用于调配药物组合物的各种赋形剂和用于制备该组合物的技术是本领域已知的(参见《雷明顿:药物科学与实践(Remington:The Science and Practice of Pharmacy)》,第21版,A.R.Gennaro ARA,利平科特·威廉斯·威尔金斯出版公司(Lippincott, Williams&Wilkins),马里兰州巴尔的摩(Baltimore,Md.),2006;所述文献通过引用以其整体并入本文)。除了任何常规赋形剂介质可能与物质或其衍生物不相容之外,常规赋形剂介质的使用也在本公开的实施例的范围内,如通过产生任何不期望的生物效应或以有害方式与药物组合物的任何其它组分相互作用。

[0267] 本公开的组合物的剂型可以是固体,其可以在施用前在液体中重构。该固体可以以粉末的形式施用。在一些实施例中,药物组合物包括已冻干的核酸脂质调配物。

[0268] 在优选实施例中,本文所述的药物组合物的剂型可以是本文所述是核酸-脂质纳米颗粒的液体悬浮液。在一些实施例中,液体悬浮液处于缓冲溶液中。在一些实施例中,缓冲溶液包括选自以下组成的组的缓冲液:HEPES、MOPS、TES和TRIS。在一些实施例中,缓冲液的pH为约7.4。在一些优选实施例中,缓冲液是HEPES。在一些另外的实施例中,缓冲溶液进一步包括冷冻保护剂。在一些实施例中,冷冻保护剂选自糖和甘油或糖和甘油的组合。在一些实施例中,所述糖是二聚糖。在一些实施例中,所述糖是蔗糖。在一些优选实施例中,缓冲液包括HEPES、蔗糖和pH为7.4的甘油。在一些实施例中,悬浮液在储存期间冷冻,并且在施用之前解冻。在一些实施例中,悬浮液在低于约-70°C的温度下冷冻。在一些实施例中,悬浮液在可吸入施用之前用无菌水稀释。在一些实施例中,可吸入施用包括用约1体积至约4体积的无菌水稀释悬浮液。在一些实施例中,冻干的核酸-脂质纳米颗粒调配物可以重新悬浮于本文所述的缓冲液中。

[0269] 本公开的组合物和方法可以通过多种粘膜施用模式(包含鼻内和/或肺内)施用于受试者。在本公开的一些方面,粘膜组织层包含上皮细胞层。上皮细胞可以是肺、气管、支气管、肺泡、鼻腔和/或口腔。本公开的组合物可以使用如机械喷雾装置的常规致动器以及加压的、电激活的或其它类型的致动器来施用。

[0270] 本公开的组合物可以在水溶液中以鼻喷雾剂或肺喷雾剂的形式施用,并且可以通过本领域技术人员已知的各种方法以喷雾形式分配。本公开的组合物的肺递送是通过以滴、颗粒或喷雾的形式施用组合物来实现的,所述滴、颗粒或喷雾是可以例如气溶胶化的(aerosolized)、雾化的(atomized)或雾化的(nebulized)。组合物、喷雾或气溶胶的颗粒可以是液体或固体形式,例如,冻干的脂质调配物。用于分配液体作为鼻喷雾剂的优选系统公开于美国专利第4,511,069号中。此类调配物可以通过将根据本公开的组合物溶解在水中以产生水溶液并使所述溶液无菌来方便地制备。调配物可以存在于多剂量容器中,例如在美国专利中公开的密封分配系统中。第4,511,069号中。其它合适的鼻喷雾递送系统描述于以下中:《透皮全身用药(TRANSDERMAL SYSTEMIC MEDICATION)》,Y.W.Chien编辑,爱思唯尔出版社(Elsevier Publishers),纽约(New Yor),1985;以及美国专利第4,778,810号。另外的气溶胶递送形式可以包含例如压缩空气、喷射、超声和压电喷雾器,其递送核酸-脂质调配物或悬浮在药物溶剂,例如水、乙醇或其混合物中。

[0271] 本公开的鼻腔和肺部喷雾溶液通常包括核酸,任选地用表面活性剂如非离子表面活性剂(例如,聚山梨醇酯-80)和一种或多种缓冲液调配,条件是表面活性剂的包含不破坏脂质调配物的结构。在本公开的一些实施例中,鼻喷雾剂溶液进一步包括推进剂。鼻喷雾溶

液的pH可以为pH 6.8至7.2。所使用的药物溶剂也可以是pH为4至6的微酸性水性缓冲液。可以添加其它组分,包含防腐剂、表面活性剂、分散剂或气体来增强或保持化学稳定性。

[0272] 在一些实施例中,本公开提供了一种药物产品,其包含含有本公开的组合物和用于肺、粘膜或鼻内喷雾或气雾剂的致动器的溶液。

[0273] 本公开的组合物的剂型可以是液体,以液滴或乳液的形式,或以气溶胶的形式。

[0274] 本公开的组合物的剂型可以是固体,其可以在施用前在液体中重构。该固体可以以粉末的形式施用。固体可以是胶囊、片剂或凝胶的形式。

[0275] 为了在本公开中调配用于肺部递送的组合物,核酸-脂质调配物可以与各种药学上可接受的添加剂以及用于分散核酸-脂质调配物的碱或载剂组合。添加剂的实例包含pH控制剂,如精氨酸、氢氧化钠、甘氨酸、盐酸、柠檬酸及其混合物。其它添加剂包含局部麻醉剂(例如,苄醇)、等渗剂(例如,氯化钠、甘露醇、山梨醇)、吸附抑制剂(例如,Tween 80)、溶解度增强剂(例如,环糊精及其衍生物)、稳定剂(例如,血清白蛋白)和还原剂(例如,谷胱甘肽)。当用于粘膜递送的组合物是液体时,调配物的张力(如参考0.9% (w/v)生理盐水溶液的张力作为整体测量的)通常被调整到将不在施用部位处的粘膜中诱导显著的、不可逆的组织损伤的值。通常,溶液的张力被调整到1/3至3的值,更典型地1/2至2,并且最通常地3/4至1.7。

[0276] 核酸-脂质调配物可以分散在碱或媒剂中,所述碱或媒剂可以包括具有分散核酸-脂质调配物的能力的亲水性化合物和任何期望的添加剂。碱可以选自多种合适的载剂,包含但不限于聚羧酸或其盐的共聚物、羧酸酐(例如马来酸酐)与其它单体(例如,甲基(甲)丙烯酸酯、丙烯酸等)的共聚物、亲水性乙烯基聚合物如聚乙酸乙烯酯、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、纤维素衍生物如羟甲基纤维素、羟丙基纤维素等,以及天然聚合物如壳聚糖、胶原蛋白、藻酸钠、明胶、透明质酸及其无毒金属盐。通常,可生物降解的聚合物被选择作为碱或载剂,例如,聚乳酸、聚(乳酸-乙醇酸)共聚物、聚羟基丁酸、聚(羟基丁酸-羟基乙醇酸)共聚物及其混合物。可替代地或另外地,合成脂肪酸酯如聚甘油脂肪酸酯、蔗糖脂肪酸酯等可以用作载剂。亲水性聚合物和其它载剂可以单独使用或组合使用,并且可以通过部分结晶、离子键合、交联等将增强的结构完整性赋予载剂。可以以多种形式提供载剂,包含流体或粘性溶液、凝胶、糊剂、粉末、微球和膜以直接应用于鼻粘膜。在这种情况下使用所选择的载剂可以促进核酸-脂质调配物的吸收。

[0277] 本公开的组合物可替代地可以含有接近生理条件所需的药学上可接受的载剂物质,如pH调节剂和缓冲剂、张力调节剂和润湿剂,例如,乙酸钠、乳酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、山梨醇单月桂酸酯、油酸三乙醇胺及其混合物。对于固体组合物,可以使用常规无毒药学上可接受的载剂,所述载剂包含例如医药级的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、滑石、纤维素、葡萄糖、蔗糖、碳酸镁等。

[0278] 在本公开的某些实施例中,核酸-脂质调配物可以以延时释放调配物的形式施用,例如,以包含缓释聚合物的组合物的形式施用。核酸-脂质调配物可以用防止快速释放的载剂制备,例如控释媒剂,如聚合物、微胶囊化递送系统或生物粘附凝胶。在本公开的各种组合物中,核酸-脂质调配物的延长递送可以通过在组合物中包含延迟吸收的试剂来实现,例如,单硬脂酸铝水凝胶和明胶。

[0279] 已经证明,可以通过气管内施用核酸组合物液体悬浮液和吸入由液体喷雾器产生

的气溶胶雾或使用干粉设备(如美国专利第5,780,014号中所描述的设备,所述美国专利通过引用并入本文)将核酸递送到肺。

[0280] 在某些实施例中,可以调配本公开的组合物,使得其可以在向受试者施用之前或之后作为颗粒液体或固体被雾化或以其它方式递送。此类组合物可以在用于施用此类固体或液体颗粒组合物(例如,雾化水性溶液或悬浮液)的一种或多种适合的装置的帮助下施用,以产生易于被受试者呼吸或吸入的颗粒。在一些实施例中,此类装置(例如,定量剂量吸入器、喷射雾化器、超声雾化器、干粉吸入器、基于推进剂的吸入器或吹入器)有助于向受试者施用预定质量、体积或剂量的组合物(例如,每剂量约0.010mg/kg至约0.5mg/kg的核酸)。例如,在某些实施例中,使用定量吸入器向受试者施用本公开的组合物,所述吸入器含有包括所述化合物和适合的推进剂的悬浮液或溶液。在某些实施例中,本公开的组合物可以调配成用于吸入的颗粒粉末(例如,可吸入的干颗粒)。在某些实例中,调配为可吸入的颗粒的本公开的组合物具有适当的尺寸,使得其可以由受试者呼吸或使用合适的装置递送(例如,平均D50或D90粒径小于约500 $\mu$ m、400 $\mu$ m、300 $\mu$ m、250 $\mu$ m、200 $\mu$ m、150 $\mu$ m、100 $\mu$ m、75 $\mu$ m、50 $\mu$ m、25 $\mu$ m、20 $\mu$ m、15 $\mu$ m、12.5 $\mu$ m、10 $\mu$ m、5 $\mu$ m、2.5 $\mu$ m或更小)。在又其它实施例中,本公开的组合物被调配成包含一种或多种肺部表面活性剂(例如,板层体)。在一些实施例中,向受试者施用本公开的组合物,使得在单剂量中施用的浓度为至少0.010mg/kg、至少0.015mg/kg、至少0.020mg/kg、至少0.025mg/kg、至少0.030mg/kg、至少0.035mg/kg、至少0.040mg/kg、至少0.045mg/kg、至少0.05mg/kg、至少0.1mg/kg、至少0.5mg/kg、至少1.0mg/kg、至少2.0mg/kg、至少3.0mg/kg、至少4.0mg/kg、至少5.0mg/kg、至少6.0mg/kg、至少7.0mg/kg、至少8.0mg/kg、至少9.0mg/kg、至少10mg/kg、至少15mg/kg、至少20mg/kg、至少25mg/kg、至少30mg/kg、至少35mg/kg、至少40mg/kg、至少45mg/kg、至少50mg/kg、至少55mg/kg、至少60mg/kg、至少65mg/kg、至少70mg/kg、至少75mg/kg、至少80mg/kg、至少85mg/kg、至少90mg/kg、至少95mg/kg或至少100mg/kg体重。在一些实施例中,向受试者施用本公开的组合物,使得在一个或多个剂量中施用总量至少0.1mg、至少0.5mg、至少1.0mg、至少2.0mg、至少3.0mg、至少4.0mg、至少5.0mg、至少6.0mg、至少7.0mg、至少8.0mg、至少9.0mg、至少10mg、至少15mg、至少20mg、至少25mg、至少30mg、至少35mg、至少40mg、至少45mg、至少50mg、至少55mg、至少60mg、至少65mg、至少70mg、至少75mg、至少80mg、至少85mg、至少90mg、至少95mg或至少100mg的核酸。

[0281] 在一些实施例中,本公开的药物组合物每月向受试者施用一次。在一些实施例中,本公开的药物组合物每月向受试者施用两次。在一些实施例中,本公开的药物组合物每月向受试者施用三次。在一些实施例中,本公开的药物组合物每月对受试者施用四次。

[0282] 根据本公开,当定期施用,所提供的组合物的治疗有效剂量导致受试者的核酸活性水平与治疗前的基线活性水平相比增加。通常,在从受试者获得的生物样品中测量活性水平,如血液、血浆或血清、尿液或固体组织提取物。基线水平可以在治疗前立即测量。在一些实施例中,施用本文所述的药物组合物导致生物样品(例如,血浆/血清或肺上皮拭子)中的核酸活性水平与治疗前的基线水平相比增加至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或95%。在一些实施例中,施用所提供的组合物导致生物样品(例如,血浆/血清或肺上皮拭子)中的核酸活性水平与治疗前的基线水平相比增加至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或95%,持续至少约24小时、至少约48小时、至少约72小时、至少约4天、至少约5天、至少约6天、至少约7天、至少约8天、至少约9天、至少

约10天、至少约11天、至少约12天、至少约13天、至少约14天或至少约15天。

[0283] 定义

[0284] 在本说明书的各个地方,本公开的化合物的取代基以组或范围公开。其具体意图是,本公开包含此类组和范围的成员的每一个单独的子组合。例如,术语“C<sub>1-6</sub>烷基”专门用于单独公开甲基、乙基、C<sub>3</sub>烷基、C<sub>4</sub>烷基、C<sub>5</sub>烷基和C<sub>6</sub>烷基。

[0285] 短语“组合施用(administered in combination/combined administration)”意指在同一时间或间隔内向受试者施用两种或更多种药剂,使得每种药剂对患者的作用可以重叠。在一些实施例中,所述药剂在彼此间隔约60分钟、30分钟、15分钟、10分钟、5分钟或1分钟内施用。在一些实施例中,药剂的施用间隔得足够紧密,使得实现组合(例如,协同)效果。

[0286] 如本文所使用的,术语“动物”是指动物界的任何成员。在一些实施例中,“动物”是指处于任何发育阶段的人类。在一些实施例中,“动物”是指处于任何发育阶段的非人类动物。在某些实施例中,非人类动物是哺乳动物(例如,啮齿动物、小鼠、大鼠、兔、猴、狗、猫、羊、牛、灵长类动物或猪)。在一些实施例中,动物包含但不限于:哺乳动物、鸟类、爬行动物、两栖动物、鱼类和蠕虫。在一些实施例中,动物是转基因动物、基因工程动物或克隆物。

[0287] 当应用于一个或多个目的值时,术语“大约”或“约”指类似于所述参考值的值。在某些实施例中,术语“大约”或“约”指在所述参考值的任一方向(大于或小于)上落入25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或更少内的一系列值,除非另有说明或从上下文另外显而易见(除非其中此类数目超过可能值的100%)。

[0288] 术语“缔合(associated with)”、“缀合的(conjugated)”、“连接的(linked)”、“附接的(attached)”和“拴系的(tethered)”当相对于两个或更多个部分使用时,意指所述部分通过充当连接剂的一个或多个另外的部分彼此直接连接,以形成足够稳定的结构,使得所述部分在使用所述结构的条件下(例如生理条件下)保持物理缔合。“缔合”不需要严格通过直接共价化学键合。其还可以表明离子或氢键合或基于杂交的连接足够稳定,使得“缔合的”实体保持物理缔合。

[0289] 在权利要求中,冠词如“一个(a)”、“一种(an)”和“所述(the)”可以意指一个或多个,除非指明与上下文相反或另外根据上下文是显而易见的。在组的一个或多个成员之间包含“或”的权利要求或描述应当被视为是满足以下情况,即组成员中的一个、多于一个或全部存在于、被应用于给定的产品或方法中,或以其它方式与给定的产品或方法相关,除非指出相反或根据上下文明显不同。本公开包含组中的恰好一个成员存在于、使用于或以其它方式相关于给定的产品或过程的实施例。本公开包含其中所述基团成员中的多于一个或所有存在于、使用于或以其它方式相关于给出的产品或流程的实施例。

[0290] 如本文所使用的,术语“酰基”表示氢或烷基(例如,卤代烷基),如本文所定义的,其通过本文所定义的羰基连接到母体分子基团上,并且以甲酰基(即,羧醛基)、乙酰基、三氟乙酰基、丙酰基、丁酰基等为例。示例性未经取代的酰基包含1个至7个、1个至11个或1个至21个碳。在一些实施例中,烷基进一步被本文所述的1个、2个、3个或4个取代基取代。

[0291] 如本文所使用的,除非另有规定,否则术语“烯基”表示含有一个或多个碳-碳双键的2个至20个碳(例如,2个至6个或2个至10个碳)的单价直链或支链基团,并且以乙烯基、1-

丙烯基、2-丙烯基、2-甲基-1-丙烯基、1-丁烯基、2-丁烯基等为例。烯基包含顺式和反式异构体两者。烯基可以任选地被1个、2个、3个或4个取代基取代,所述取代基独立地选自本文定义的氨基、芳基、环烷基或杂环基(例如,杂芳基),或本文所述的任何示例性烷基取代基。

[0292] 除非另外说明,否则术语“烷氧基(alkoxy)”表示式—OR的化学取代基,其中R是C<sub>1</sub>-20烷基(例如,C<sub>1-6</sub>或C<sub>1-10</sub>烷基)。示例烷氧基包含甲氧基、乙氧基、丙氧基(例如,正丙氧基和异丙氧基)、叔丁氧基等。在一些实施例中,烷基可以进一步被本文所定义的1个、2个、3个或4个取代基(例如,羟基或烷氧基)取代。

[0293] 术语“烷氧基烷基”表示被烷氧基取代的烷基。示例性未经取代的烷氧基烷基包含2个至40个碳(例如,2个至12个或2个至20个碳,如C<sub>1-6</sub>烷氧基-C<sub>1-6</sub>烷基、C<sub>1-10</sub>烷氧基-C<sub>1-10</sub>烷基或C<sub>1-20</sub>烷氧基-C<sub>1-20</sub>烷基)。在一些实施例中,烷基和烷氧基各自可以进一步被1个、2个、3个或4个取代基取代,如本文针对相应基团所定义的。

[0294] 如本文所使用的,术语“烷氧基羰基(alkoxycarbonyl),”表示本文中定义的通过羰基原子(例如,—C(O)—OR,其中R是H或任选地经取代的C<sub>1-6</sub>、C<sub>1-10</sub>或C<sub>1-20</sub>烷基)连接到母体分子基团上的烷氧基。示例性未经取代的酰烷氧基羰基包含1个至21个碳(例如,1个至11个或1个至7个碳)。在一些实施例中,烷氧基进一步被本文所述的1个、2个、3个或4个取代基取代。

[0295] 如本文所使用的术语,“烷氧基羰基烷基(alkoxycarbonylalkyl)”表示本文中定义的烷氧基羰基取代的本文定义的烷基(例如,—烷基-C(O)—OR,其中R是任选地经取代的C<sub>1-20</sub>、C<sub>1-10</sub>或C<sub>1-6</sub>烷基)。示例性未经取代的烷氧基羰基烷基包含3个至41个碳(例如,3个至10个、3个至13个、3个至17个、3个至21个或3个至31个碳,如C<sub>1-6</sub>烷氧基羰基-C<sub>1-6</sub>烷基、C<sub>1-10</sub>烷氧基羰基-C<sub>1-10</sub>烷基或C<sub>1-20</sub>烷氧基羰基-C<sub>1-20</sub>烷基)。在一些实施例中,烷基和烷氧基各自进一步独立地被本文所述的1个、2个、3个或4个取代基(例如,羟基)取代。

[0296] 如本文所使用的,术语“烷氧基羰基烯基(alkoxycarbonylalkenyl)”表示本文中定义的烷氧基羰基取代的本文定义的烯基(例如,—烯基-C(O)—OR,其中R是任选地经取代的C<sub>1-20</sub>、C<sub>1-10</sub>或C<sub>1-6</sub>烷基)。示例性未经取代的烷氧基羰基烯基包含4个至41个碳(例如,4个至10个、4个至13个、4个至17个、4个至21个或4个至31个碳,如C<sub>1-6</sub>烷氧基羰基-C<sub>2-6</sub>烯基、C<sub>1-10</sub>烷氧基羰基-C<sub>2-10</sub>烯基或C<sub>1-20</sub>烷氧基羰基-C<sub>2-20</sub>烯基)。在一些实施例中,烷基、烯基和烷氧基各自进一步独立地被本文所述的1个、2个、3个或4个取代基(例如,羟基)取代。

[0297] 如本文所使用的,“烷基”是指完全饱和(即,不包含双键和三键)的直链或支链烃链。烷基可以具有1个至20个碳原子(当本文中使用时,如“1至20”的数值范围是指给定范围内的每个整数;例如,“1个至20个碳原子”是指烷基可以由1个碳原子、2个碳原子、3个碳原子等组成,至多并包含20个碳原子,但是本定义也涵盖未指定数字范围的术语“烷基”的出现。烷基还可以是具有1到9个碳原子的中等大小烷基。烷基还可以是具有1到6个碳原子的低级烷基。烷基可以命名为“C<sub>1-4</sub>烷基”或类似名称。仅以举例的方式,“C<sub>1-4</sub>烷基”指示烷基链中存在一个至四个碳原子,即,烷基链选自由以下组成的组:甲基、乙基、丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基和叔丁基。典型的烷基包含但绝不限于甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、叔丁基、戊基、己基等。

[0298] 术语“低级烷基”意指在链中具有一个至六个碳的基团,该链可以是直链或支链的。合适的烷基的非限制性实例包含甲基、乙基、正丙基、异丙基、叔丁基、正戊基和己基。

[0299] 如本文所使用的,术语“烷基亚磺酰基”表示通过—S(O)—基团连接到母体分子基团上的烷基。示例性未经取代的烷基亚磺酰基是1个至6个、1个至10个或1个至20个碳。在一些实施例中,烷基可以进一步被本文所定义的1个、2个、3个或4个取代基取代。

[0300] 如本文所使用的,术语“烷基亚磺酰基烷基”表示本文中定义的被烷基亚磺酰基取代的烷基。示例性未经取代的烷基亚磺酰基烷基是2个至12个、2个至20个或2个至40个碳。在一些实施例中,每个烷基可以进一步被本文所定义的1个、2个、3个或4个取代基取代。

[0301] 如本文所使用的,术语“炔基”表示含有碳-碳三键的2个至20个碳原子(例如,2个至4个、2个至6个或2个至10个碳原子)的单价直链或支链基团,并且以乙炔基、1-丙炔基等为例。炔基可以任选地被1个、2个、3个或4个取代基取代,所述取代基独立地选自本文定义的芳基、环烷基或杂环基(例如,杂芳基),或本文所述的任何示例性烷基取代基。

[0302] 如本文所使用的,术语“脒(amidine)”表示—C(=NH)NH<sub>2</sub>基团。

[0303] 如本文所使用的,术语“氨基”表示—N(R<sup>N1</sup>)<sub>2</sub>,其中每个R<sup>N1</sup>独立地是H、OH、NO<sub>2</sub>、N(R<sup>N2</sup>)<sub>2</sub>、SO<sub>2</sub>OR<sup>N2</sup>、SO<sub>2</sub>R<sup>N2</sup>、SOR<sup>N2</sup>、N-保护基团、烷基、烯基、炔基、烷氧基、芳基、烷芳基、环烷基、烷基环烷基、羰基烷基(例如,任选地被O-保护基团取代,如任选地经取代的芳基烷氧基羰基或本文所述的任何基团)、磺基烷基、酰基(例如,乙酰基、三氟乙酰基或本文所述的其它酰基)、烷氧基羰基烷基(例如,任选地被O-保护基团取代,如任选地经取代的芳基烷氧基羰基或本文所述的任何烷氧基羰基烷基)、杂环基(例如,杂芳基)或烷基杂环基(例如,烷基杂芳基),其中这些所述R<sup>N1</sup>基团中的每一个可以任选地被取代,如本文中对每个基团所定义的;或者两个R<sup>N1</sup>组合形成杂环基或N-保护基团,并且其中每个R<sup>N2</sup>独立地是H、烷基或芳基。本公开的氨基可以是未经取代的氨基(即,—NH<sub>2</sub>)或经取代的氨基(即,—N(R')<sub>2</sub>)。在优选实施例中,氨基是—NH<sub>2</sub>或—NHR<sup>N1</sup>,其中R<sup>N1</sup>独立地是OH、NO<sub>2</sub>、NH<sub>2</sub>、NR<sup>N2</sup>、SO<sub>2</sub>OR<sup>N2</sup>、SO<sub>2</sub>R<sup>N2</sup>、SOR<sup>N2</sup>、烷基、羰基烷基、磺基烷基、酰基(例如,乙酰基、三氟乙酰基或本文所述的其它酰基)、烷氧基羰基烷基(例如,叔丁氧基羰基烷基)或芳基,并且每个R<sup>N2</sup>可以是H、C<sub>1-20</sub>烷基(例如,C<sub>1-6</sub>烷基)或C<sub>6-10</sub>芳基。

[0304] 如本文所描述的,术语“氨基酸,”是指具有侧链、氨基和酸基的分子(例如,—CO<sub>2</sub>H的羰基或—SO<sub>3</sub>H的磺基),其中所述氨基酸通过侧链、氨基或酸基(例如,侧链)连接到所述母体分子基团。在一些实施例中,氨基酸通过羰基连接到母体分子基团,其中侧链或氨基连接到羰基。示例性侧链包含任选地经取代的烷基、芳基、杂环基、烷基芳基、烷基杂环基、氨基烷基、氨基甲酰基烷基和羰基烷基。示例性氨基酸包含丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸、组氨酸、羟基正缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、正缬氨酸、鸟氨酸、苯基丙氨酸、脯氨酸、吡咯赖氨酸、硒代半胱氨酸、丝氨酸、牛磺酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸。氨基酸基团可以任选地被一个、两个、三个取代基取代,或者在两个或更多个碳的氨基酸基团的情况下,被四个独立地选自以下由以下组成的组的取代基取代:(1) C<sub>1-6</sub>烷氧基;(2) C<sub>1-6</sub>烷基亚磺酰基;(3) 氨基,如本文所定义的(例如,未经取代的氨基(即,—NH<sub>2</sub>)或经取代的氨基(即,—N(R<sup>N1</sup>)<sub>2</sub>,其中R<sup>N1</sup>如针对氨基所定义);(4) C<sub>6-10</sub>芳基-C<sub>1-6</sub>烷氧基;(5) 叠氮基;(6) 卤代;(7) (C<sub>2-9</sub>杂环基)氧基;(8) 羟基;(9) 硝基;(10) 氧代(例如,羧醛或酰基);(11) C<sub>1-7</sub>螺环基;(12) 硫代烷氧基;(13) 硫醇;(14) —CO<sub>2</sub>R<sup>A</sup>,其中R<sup>A</sup>选自由以下组成的组:(a) C<sub>1-20</sub>烷基(例如,C<sub>1-6</sub>烷基);(b) C<sub>2-20</sub>烯基(例如,C<sub>2-6</sub>烯基);(c) C<sub>6-10</sub>芳基;(d) 氢;(e) C<sub>1-6</sub>烷基-C<sub>6-10</sub>芳基;(f) 氨基-C<sub>1-20</sub>烷基;(g) —(CH<sub>2</sub>)<sub>s2</sub>

(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>s1</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>s3</sub>OR'的聚乙二醇,其中s1是1至10(例如,1至6或1至4)的整数,s2和s3各自独立地是0至10(例如,0至4、0至6、1至4、1至6或1至10)的整数,并且R'是H或C<sub>1-20</sub>烷基;

(h) —NR<sup>N1</sup>(CH<sub>2</sub>)<sub>s2</sub>(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>s1</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>s3</sub>NR<sup>N1</sup>的氨基-聚乙二醇,其中s1是1至10(例如,1至6或1至4)的整数,s2和s3各自独立地是0至10(例如,0至4、0至6、1至4、1至6或1至10)的整数,并且每个R<sup>N1</sup>独立地是氢或任选地经取代的C<sub>1-6</sub>烷基;

(15) —C(O)NR<sup>B'</sup>R<sup>C'</sup>,其中R<sup>B'</sup>和R<sup>C'</sup>各自独立地选自自由以下组成的组:(a)氢;(b)C<sub>1-6</sub>烷基;(c)C<sub>6-10</sub>芳基;以及(d)C<sub>1-6</sub>烷基-C<sub>6-10</sub>芳基;

(16) —SO<sub>2</sub>R<sup>D'</sup>,其中R<sup>D'</sup>选自自由以下组成的组:(a)C<sub>1-6</sub>烷基;(b)C<sub>6-10</sub>芳基;(c)C<sub>1-6</sub>烷基-C<sub>6-10</sub>芳基;以及(d)羟基;

(17) —SO<sub>2</sub>NR<sup>E'</sup>R<sup>F'</sup>,其中R<sup>E'</sup>和R<sup>F'</sup>各自独立地选自自由以下组成的组:(a)氢;(b)C<sub>1-6</sub>烷基;(c)C<sub>6-10</sub>芳基;以及(d)C<sub>1-6</sub>烷基-C<sub>6-10</sub>芳基;

(18) —C(O)R<sup>G'</sup>,其中R<sup>G'</sup>选自自由以下组成的组:(a)C<sub>1-20</sub>烷基(例如,C<sub>1-6</sub>烷基);(b)C<sub>2-20</sub>烯基(例如,C<sub>2-6</sub>烯基);(c)C<sub>6-10</sub>芳基;(d)氢;(e)C<sub>1-6</sub>烷基-C<sub>6-10</sub>芳基;(f)氨基-C<sub>1-20</sub>烷基;(g)—(CH<sub>2</sub>)<sub>s2</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>s1</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>s3</sub>OR'的聚乙二醇,其中s1是1至10(例如,1至6或1至4)的整数,s2和s3各自独立地是0至10(例如,0至4、0至6、1至4、1至6或1至10)的整数,并且R'是H或C<sub>1-20</sub>烷基;以及(h)—NR<sup>N1</sup>(CH<sub>2</sub>)<sub>s2</sub>(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>s1</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>s3</sub>NR<sup>N1</sup>的氨基-聚乙二醇,其中s1是1至10(例如,1至6或1至4)的整数,s2和s3各自独立地是0至10(例如,0至4、0至6、1至4、1至6或1至10)的整数,并且每个R<sup>N1</sup>独立地是氢或任选地经取代的C<sub>1-6</sub>烷基;

(19) —NR<sup>H'</sup>C(O)R<sup>I'</sup>,其中R<sup>H'</sup>选自自由以下组成的组:(a1)氢;以及(b1)C<sub>1-6</sub>烷基,并且R<sup>I'</sup>选自自由以下组成的组:(a2)C<sub>1-20</sub>烷基(例如,C<sub>1-6</sub>烷基);(b2)C<sub>2-20</sub>烯基(例如,C<sub>2-6</sub>烯基);(c2)C<sub>6-10</sub>芳基;(d2)氢;(e2)C<sub>1-6</sub>烷基-C<sub>6-10</sub>芳基;(f2)氨基-C<sub>1-20</sub>烷基;(g2)—(CH<sub>2</sub>)<sub>s2</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>s1</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>s3</sub>OR'的聚乙二醇,其中s1是1至10(例如,1至6或1至4)的整数,s2和s3各自独立地是0至10(例如,0至4、0至6、1至4、1至6或1至10)的整数,并且R'是H或C<sub>1-20</sub>烷基;以及(h2)—NR<sup>N1</sup>(CH<sub>2</sub>)<sub>s2</sub>(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>s1</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>s3</sub>NR<sup>N1</sup>的氨基-聚乙二醇,其中s1是1至10(例如,1至6或1至4)的整数,s2和s3各自独立地是0至10(例如,0至4、0至6、1至4、1至6或1至10)的整数,并且每个R<sup>N1</sup>独立地是氢或任选地经取代的C<sub>1-6</sub>烷基;

(20) —NR<sup>J'</sup>C(O)OR<sup>K'</sup>,其中R<sup>J'</sup>选自自由以下组成的组:(a1)氢;以及(b1)C<sub>1-6</sub>烷基,并且R<sup>K'</sup>选自自由以下组成的组:(a2)C<sub>1-20</sub>烷基(例如,C<sub>1-6</sub>烷基);(b2)C<sub>2-20</sub>烯基(例如,C<sub>2-6</sub>烯基);(c2)C<sub>6-10</sub>芳基;(d2)氢;(e2)C<sub>1-6</sub>烷基-C<sub>6-10</sub>芳基;(f2)氨基-C<sub>1-20</sub>烷基;(g2)—(CH<sub>2</sub>)<sub>s2</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>s1</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>s3</sub>OR'的聚乙二醇,其中s1是1至10(例如,1至6或1至4)的整数,s2和s3各自独立地是0至10(例如,0至4、0至6、1至4、1至6或1至10)的整数,并且R'是H或C<sub>1-20</sub>烷基;以及(h2)—NR<sup>N1</sup>(CH<sub>2</sub>)<sub>s2</sub>(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>s1</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>s3</sub>NR<sup>N1</sup>的氨基-聚乙二醇,其中s1是1至10(例如,1至6或1至4)的整数,s2和s3各自独立地是0至10(例如,0至4、0至6、1至4、1至6或1至10)的整数,并且每个R<sup>N1</sup>独立地是氢或任选地经取代的C<sub>1-6</sub>烷基;以及

(21) 脞。在一些实施例中,这些基团中的每一个基团都可以如本文所描述的进一步被取代。

[0305] 如本文所使用的,术语“氨基烷基”表示本文中定义的被氨基取代的烷基。烷基和氨基各自可以进一步被1个、2个、3个或4个取代基取代,如本文中对相应基团所述(例如,CO<sub>2</sub>R<sup>A'</sup>,其中R<sup>A'</sup>选自自由以下组成的组:(a)C<sub>1-6</sub>烷基;(b)C<sub>6-10</sub>芳基;(c)氢;以及(d)C<sub>1-6</sub>烷基-C<sub>6-10</sub>芳基,例如,羰基和/或N-保护基团)。

[0306] 如本文所使用的,术语“氨基烯基”表示本文中定义的被氨基取代的烯基。烯基和氨基各自可以进一步被1个、2个、3个或4个取代基取代,如本文中对相应基团所述(例如,CO<sub>2</sub>R<sup>A'</sup>,其中R<sup>A'</sup>选自自由以下组成的组:(a)C<sub>1-6</sub>烷基;(b)C<sub>6-10</sub>芳基;(c)氢;以及(d)C<sub>1-6</sub>烷基-

C<sub>6-10</sub>芳基,例如,羰基和/或N-保护基团)。

[0307] 术语“阴离子脂质”意指在生理pH下带负电的脂质。这些脂质包含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-十二烷酰基磷脂酰乙醇胺、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)和加入其它阴离子改性基团的中性脂质。

[0308] 在一系列项目之前的短语“…的至少一个”,用术语“和”或“或”分隔任何项目,修改列表作为一个整体,而不是列表的每个成员(即,每个项目)。短语“…的至少一个”不需要选择列出的每个项目中的至少一个;相反,所述短语允许的含义包含任何一个中的至少一个,和/或项的任意组合中的至少一个,和/或每个中的至少一个。例如,短语“A、B和C中的至少一个”或“A、B或C中的至少一个”各自仅指A、仅B或仅C;A、B和C的任意组合;和/或A、B和C中的至少一个。

[0309] 说明书或权利要求中使用术语“包含”、“具有”等,此类术语旨在以类似于术语“包括”的方式包含在内,因为“包括”在权利要求中在被采用时被解释为作为过渡词。

[0310] 除非特别说明,否则对单数元素的引用并不意味着“一个且只有一个”,而是“一个或多个”。男性代词(例如,他的(his))包含女性和中性性别(例如,她的(her)和它的(it)),反之亦然。术语“一些”是指一个或多个。带下划线和/或斜体的标题和副标题仅为方便起见,不限制主题技术,并且不与主题技术描述的解释相关联。贯穿本公开所描述的各种配置的元件的所有结构和功能等效物,其为本领域普通技术人员已知的或以后将知晓的,均通过引用明确地并入本文并且旨在被本主题技术所涵盖。此外,本文所公开的任何内容均不旨在为公众提供,无论该公开内容是否在上述描述中明确记载。

[0311] 术语“生物相容性”意指与免疫系统几乎没有损伤、毒性或排斥风险的活细胞、组织、器官或系统相容。

[0312] 术语“可生物降解”意指能够通过生物的作用分解成无害的产品。

[0313] 短语“生物活性”是指在生物系统和/或生物体中具有活性的任何物质的特性。例如,当施用于生物时,对该生物体具有生物效应的物质视为生物活性的。在特定实施例中,如果本公开的多核苷酸的甚至一部分具有生物活性或模拟被认为具有生物相关的活性,则可以认为本公开的多核苷酸具有生物活性。

[0314] 如本文所使用的,术语“碳环”和“碳环基”是指任选地经取代的C<sub>3-12</sub>单环、双环或三环结构,其中环可以是芳香族的或非芳香族的,由碳原子形成。碳环结构包含环烷基、环烯基和芳基。

[0315] 如本文所使用的,术语“氨基甲酰基”表示—C(O)—N(R<sup>N1</sup>)<sub>2</sub>,其中每个R<sup>N1</sup>的含义在本文提供的“氨基”的定义中找到。

[0316] 如本文所使用的,术语“氨基甲酰基烷基”表示本文中定义的被氨基甲酰基取代的烷基。烷基可以进一步被本文所述的1个、2个、3个或4个取代基取代。

[0317] 如本文所使用的,术语“氨基甲酰基”是指具有下列结构的氨基甲酸酯基团:—NR<sup>N1</sup>C(=O)OR或—OC(=O)N(R<sup>N1</sup>)<sub>2</sub>,其中每个R<sup>N1</sup>的含义在本文提供的“氨基”的定义中找到,并且R是烷基、环烷基、烷基环烷基、芳基、烷基芳基、杂环基(例如,杂芳基)或烷基杂环基(例如,烷基杂芳基),如本文所定义的。

[0318] 如本文所使用的,术语“羰基”表示C(O)基团,也可以表示为C=O。

[0319] 术语“羧醛”表示具有结构-C(O)H的酰基。

[0320] 如本文所使用的,术语“羧基”意指 $-CO_2H$ 。

[0321] 术语“阳离子脂质”意指具有正亲水性头部基团的两亲性脂质及其盐;一个、两个、三个或更多个疏水性脂肪酸或脂肪烷基链;以及这两个结构域之间的连接器。可电离或可质子化的阳离子脂质通常在低于其pKa的pH下被质子化(即,带正电),并且在高于所述pKa的pH下基本上是中性的。优选的可电离阳离子脂质是那些pKa小于生理pH(通常为约7.4)的脂质。本公开的阳离子脂质也可以称为可滴定的阳离子脂质。阳离子脂质可以是具有可质子化叔胺(例如,pH可滴定)头部基团的“氨基脂质”。一些氨基示例性氨基脂质可以包含C18烷基链,其中每个烷基链独立地具有0个至3个(例如,0个、1个、2个或3个)双键;以及头部基团和烷基链之间的醚、酯或缩酮键。此类阳离子脂质包括但不限于:DSDMA、DODMA、DLinDMA、DLenDMA、 $\gamma$ -DLenDMA、DLin-K-DMA、DLin-K-C2-DMA(也称为DLin-C2K-DMA、XTC2和C2K)、DLin-K-C3-DMA、DLin-K-C4-DMA、DLen-C2K-DMA、 $\gamma$ -DLen-C2K-DMA、DLin-M-C2-DMA(也称为MC2)、DLin-M-C3-DMA(也称为MC3)和(DLin-MP-DMA)(也称为1-B1 1)。

[0322] 术语“包括(comprising)”旨在是开放式的,并且允许但不需要包含另外的元素或步骤。因此,当在本文中使用时,还涵盖并且公开了术语“由...组成(consisting of)”。

[0323] 术语“组合物”意指包括指定量的指定组分的产品以及由指定量的指定成分的组合直接或间接产生的任何产品。

[0324] 术语“与...组合”意指在本公开的治疗方法中将本公开的脂质调配的mRNA与其它药物一起施用,意指本公开的脂质调配的mRNA和其它药物以单独的剂型顺序或同时施用,或者以相同的剂型同时施用。

[0325] 术语“可商购获得的化学品”和本文所示的实例中使用的化学品可以从标准商业来源获得,其中此类来源包含,例如,阿克洛斯有机公司(Acros Organics)(宾夕法尼亚州匹兹堡(Pittsburgh,Pa.))、西格玛-奥德里奇化学公司(Sigma-Adrich Chemical)(威斯康星州密尔沃基(Milwaukee,Wis.))、阿沃卡多研究公司(Avocado Research)(英国兰开夏郡(Lancashire,U.K.))、佰能公司(Bionet)(英国康沃尔(Cornwall,U.K.))、Boron分子公司(Boron Molecular)(北卡罗来纳州三角研究园(Research Triangle Park,N.C.))、Combi-Blocks公司(Combi-Blocks)(加利福尼亚州圣地亚哥(San Diego,Calif.))、伊士曼有机化学品公司(Eastman Organic Chemicals)、伊士曼柯达公司(Eastman Kodak Company)(纽约州罗彻斯特(Rochester,N.Y.))、飞世尔科技公司(Fisher Scientific Co.)(宾夕法尼亚州匹兹堡)、Frontier科学公司(Frontier Scientific)(犹他州洛根(Logan,Utah))、ICN生物化学公司(ICN Biomedicals,Inc.)(加利福尼亚州科斯塔梅萨市(Costa Mesa, Calif.))、兰开斯特合成公司(Lancaster Synthesis)(新罕布什尔州温德姆(Windham, NH))、美布里奇化学公司(Maybridge Chemical Co.)(英国康沃尔)、皮尔斯化学公司(Pierce Chemical Co.)(伊利诺伊州罗克福德市(Rockford,Ill.))、Riedel de Haen公司(Riedel de Haen)(德国汉诺威市(Hannover,Germany))、频谱质量产品公司(Spectrum Quality Product,Inc.)(新泽西州新布朗斯维克(New Brunswick,N.J.))、TCI美国公司(TCI America)(俄勒冈州波特兰(Portland,Oreg.))和和光化学品美国公司(Wako Chemicals USA,Inc)(弗吉尼亚州里士满(Richmond,Va.))。

[0326] 如本领域普通技术人员所知,短语“化学文献中描述的化合物”可以通过针对化合物和化学反应的参考书和数据库来鉴定。详述可用于制备本文公开的化合物的反应物的合成或向描述所述制备的本文公开的合成化合物的文章提供合适的参考书和论文包含例如《合成有机化学(Synthetic Organic Chemistry)》,纽约约翰威利父子公司(John Wiley and Sons, Inc. New York); S.R. Sandler等人,“有机官能团制备(Organic Functional Group Preparations)”,第2版,纽约学术出版社(Academic Press),1983; H.O. House,《当代合成反应(Modern Synthetic Reactions)》,第2版,加利福尼亚州门洛帕克W.A.本杰明公司(W.A. Benjamin, Inc.),1972; T.L. Gilchrist,《杂环化学(Heterocyclic Chemistry)》,第2版纽约约翰威利父子公司1992; J. March,“高等有机化学:反应、机理和结构(Advanced Organic Chemistry: reactions, Mechanisms and Structure)”,第5版,纽约威利国际科学出版公司(Wiley-Interscience),2001; 特定和类似的反应物也可以通过美国化学学会(American Chemical Society)化学摘要服务所制备的已知化学物质的索引以及在线数据库来鉴定,这些索引可在大多数公共和大学图书馆中获得(可以联系华盛顿哥伦比亚特区(Washington, D.C.)美国化学学会获取更多细节)。可以通过定制化学合成公司来制备目录中已知但不可商购获得的化学品,其中许多标准化学品供应公司(如上文列出的那些)提供定制合成服务。

[0327] 如本文所使用的,除非另有规定,否则术语“环烷基”表示三个至八个碳的单价饱和或不饱和非芳族环状烃基,并且以环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基、双环庚基等为例。当环烷基包含一个碳-碳双键时,环烷基可以称为“环烯基”。示例性环烯基包含环戊烯基、环己烯基等。本公开的环烷基可以任选地被以下取代:(1)  $C_{1-7}$ 酰基(例如,羧醛); (2)  $C_{1-20}$ 烷基(例如,  $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 烷氧基- $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 烷基亚磺酰基- $C_{1-6}$ 烷基、氨基- $C_{1-6}$ 烷基、叠氨基- $C_{1-6}$ 烷基、(羧醛)- $C_{1-6}$ 烷基、卤代- $C_{1-6}$ 烷基(例如,全氟烷基)、羟基- $C_{1-6}$ 烷基、硝基- $C_{1-6}$ 烷基或 $C_{1-6}$ 硫代烷氧基- $C_{1-6}$ 烷基); (3)  $C_{1-12}$ 烷氧基(例如,  $C_{1-6}$ 烷氧基,如全氟烷氧基); (4)  $C_{1-6}$ 烷基亚磺酰基; (5)  $C_{6-10}$ 芳基; (6) 氨基; (7)  $C_{1-6}$ 烷基- $C_{6-10}$ 芳基; (8) 叠氨基; (9)  $C_{3-8}$ 环烷基; (10)  $C_{1-6}$ 烷基- $C_{3-8}$ 环烷基; (11) 卤代; (12)  $C_{1-12}$ 杂环基(例如,  $C_{1-12}$ 杂芳基); (13) ( $C_{1-12}$ 杂环基)氧基; (14) 羟基; (15) 硝基; (16)  $C_{1-20}$ 硫代烷氧基(例如,  $C_{1-6}$ 硫代烷氧基); (17)  $-(CH_2)_q CO_2R^A$ , 其中q是零至四的整数,并且 $R^A$ 选自由以下组成的组:(a)  $C_{1-6}$ 烷基; (b)  $C_{6-10}$ 芳基; (c) 氢; 以及(d)  $C_{1-6}$ 烷基- $C_{6-10}$ 芳基; (18)  $-(CH_2)_q CONR^B R^C$ , 其中q是零至四的整数,并且其中 $R^B$ 和 $R^C$ 独立地选自由以下组成的组:(a) 氢; (b)  $C_{6-10}$ 烷基; (c)  $C_{6-10}$ 芳基; 以及(d)  $C_{1-6}$ 烷基- $C_{6-10}$ 芳基; (19)  $-(CH_2)_q SO_2R^D$ , 其中q是零至四的整数,并且其中 $R^D$ 选自由以下组成的组:(a)  $C_{6-10}$ 烷基; (b)  $C_{6-10}$ 芳基; 以及(c)  $C_{1-6}$ 烷基- $C_{6-10}$ 芳基; (20)  $-(CH_2)_q SO_2NR^E R^F$ , 其中q是零至四的整数,并且其中 $R^E$ 和 $R^F$ 各自独立地选自由以下组成的组:(a) 氢; (b)  $C_{6-10}$ 烷基; (c)  $C_{6-10}$ 芳基; 以及(d)  $C_{1-6}$ 烷基- $C_{1-10}$ 芳基; (21) 硫醇; (22)  $C_{6-10}$ 芳氧基; (23)  $C_{3-8}$ 环烷氧基; (24)  $C_{6-10}$ 芳基- $C_{1-6}$ 氧基; (25)  $C_{1-6}$ 烷基- $C_{1-12}$ 杂环基(例如,  $C_{1-6}$ 烷基- $C_{1-12}$ 杂芳基); (26) 氧代; (27)  $C_{2-20}$ 烯基; 以及(28)  $C_{2-20}$ 炔基。在一些实施例中,这些基团中的每一个基团都可以如本文所描述的进一步被取代。例如,  $C_1$ -烷芳基或 $C_1$ -烷基杂环基的烷基可以进一步被氧代基团取代以提供相应的芳酰基和(杂环基)酰基取代基。

[0328] 如本文所使用的,术语“非对映异构体”意指彼此不是镜像且彼此不可叠加的立体异构体。

[0329] 术语“二酰基甘油”或“DAG”包含具有2条脂肪酰基链的化合物、 $R^1$ 和 $R^2$ ，二者都独立地具有通过酯键连接到甘油的1-和2-位置上的2个至30个碳。酰基可以是饱和的或具有不同程度的不饱和度。合适的酰基包含但不限于月桂酰基(C12)、肉豆蔻酰基(C14)、棕榈酰基(C16)、硬脂酰基(C18)和二十烷基(C20)。在优选实施例中， $R^1$ 和 $R^2$ 是相同的，即， $R^1$ 和 $R^2$ 两者都是肉豆蔻酰基(即，二肉豆蔻酰基)， $R^1$ 和 $R^2$ 两者都是硬脂酰基(即，二硬脂酰基)。

[0330] 术语“二烷氧基丙基”或“DAA”包含具有2条烷基链R和R'的化合物，这两个烷基链独立地具有2个至30个碳。烷基可以是饱和的或具有不同程度的不饱和度。

[0331] 如本文使用的，药剂的术语“有效量”是足以产生有益或期望结果的量，例如临床结果，并且因此，“有效量”取决于其应用的环境。例如，在施用治疗癌症的药剂的情况下，与未施用药剂获得的反应相比，药剂的有效量例如是足以实现本文定义的癌症治疗的量。

[0332] 如本文所使用的，术语“对映异构体”意指本公开的化合物的每种单独的光学活性形式，其光学纯度或对映异构体过量(如通过本领域标准的方法所确定的)为至少80%(即，一种对映异构体的至少90%和另一种对映异构体的至多10%)，优选地至少90%，并且更优选地至少98%。

[0333] 术语“完全包封的”意指核酸-脂质颗粒中的核酸(例如，mRNA)在暴露于血清或核酸酶测定之后不会显著降解，所述核酸酶测定将显著降解游离RNA。当完全包封时，颗粒中优选地小于25%的核酸在通常降解100%的游离核酸、更优选地小于10%、并且最优选地小于5%的核酸的处理中降解。“完全包封的”还意指核酸-脂质颗粒在体内施用不会快速分解成其组分部分。

[0334] 如本文所使用的，术语“卤代”和“卤素”表示选自溴、氯、碘或氟的卤素。

[0335] 如本文所使用的，术语“卤代烷基”表示本文中定义的被卤素基团(即，F、Cl、Br或I)取代的烷基。卤代烷基可以被一个、两个、三个取代，或者在两个碳或更多个烷基的情况下被四个卤素取代。卤代烷基包含全氟烷基(例如， $-CF_3$ )、 $-CHF_2$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CCl_3$ 、 $-CH_2CH_2Br$ 、 $-CH_2CH(CH_2CH_2Br)CH_3$ 和 $-CHICH_3$ 。在一些实施例中，卤代烷基可以进一步被1个、2个、3个或4个取代基取代，如针对烷基所述。

[0336] 如本文所使用的，术语“杂烷基”是指如本文所定义的烷基，其中组成碳原子中的一个或两个各自被氮、氧或硫替换。在一些实施例中，杂烷基可以进一步被1个、2个、3个或4个取代基取代，如针对烷基所述。

[0337] 如本文所使用的，术语“烃”表示仅由碳原子和氢原子组成的基团。

[0338] 如本文所使用的，术语“羟基”表示 $-OH$ 基。在一些实施例中，羟基可以被1个、2个、3个或4个取代基(例如，O-保护基团)取代，如针对烷基所定义。

[0339] 如本文所使用的，术语“羟基烯基”表示如本文所定义的被一个至三个羟基取代的烯基，条件是不超过一个羟基可以附接到烷基的单个碳原子，并且以二羟基丙烯基、羟基异戊烯基等为例。在一些实施例中，羟基烯基可以被1个、2个、3个或4个取代基(例如，O-保护基团)取代，如针对烷基所定义。

[0340] 如本文所使用的，术语“羟基烷基”表示如本文所定义的被一个至三个羟基取代的烷基，条件是不超过一个羟基可以附接到烷基的单个碳原子，并且以羟基甲基、二羟基丙基等为例。在一些实施例中，羟基烷基可以被1个、2个、3个或4个取代基(例如，O-保护基团)取代，如针对烷基所定义。

[0341] 术语“水合物”意指溶剂化物,其中溶剂分子为 $H_2O$ 。

[0342] 如本文所使用的,术语“异构体”意指本公开的任何化合物的任何互变异构体、立体异构体、对映异构体或非对映异构体。应认识到,本公开的化合物可以具有一个或多个手性中心和/或双键,并且因此作为立体异构体,如双键异构体(即,几何E/Z异构体)或非对映异构体(例如,对映异构体(即,(+)或(-))或顺式/反式异构体)存在。根据本公开,本文所描绘的化学结构以及因此本公开的化合物涵盖所有对应的立体异构体,即立体异构纯形式(例如,几何纯、对映异构纯或非对映异构纯)以及对映异构和立体异构混合物(例如,外消旋体)两者。本公开的化合物的对映异构混合物及立体异构混合物通常可以通过如手性相气相色谱法、手性相高效液相色谱法、使化合物结晶为手性盐复合物或使化合物在手性溶剂中结晶等众所周知的方法解析为其组分对映异构体或立体异构体。对映异构体和立体异构体也可以通过众所周知的不对称合成方法从立体异构或对映异构纯中间体、试剂和催化剂中获得。

[0343] 如本文所使用的,术语“硝基(nitro)”表示 $-NO_2$ 基团。

[0344] 术语“核酸”意指呈单链或双链形式的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸及其聚合物。术语涵盖含有已知核苷酸类似物或经过修饰的主链残基或连接的核酸,所述核酸是合成的、天然存在的和非天然存在的,所述核酸具有与参考核酸类似的结合特性并且所述核酸以与参考核苷酸类似的方式代谢。此类类似物的实例包含但不限于硫代磷酸酯、磷酸胺酯、磷酸甲酯、手性磷酸甲酯、2'-O-甲基核糖核苷酸、肽-核酸(PNA)。

[0345] 如本文所使用的,术语“氧代”表示 $=O$ 。

[0346] 如本文所使用的,术语“立体异构体”是指化合物(例如,本文所述的任何式的化合物)可以拥有的所有可能的不同异构以及构象形式,特别是所有可能的立体化学和构象异构形式、所有非对映异构体、对映异构体和/或碱性分子结构的构象异构体。本公开的一些化合物可以以不同的互变异构体形式存在,所有这些化合物都包含在本公开的范围之内。

[0347] 如本文所使用的,术语“磺酰基”表示 $-S(O)_2-$ 基团。

[0348] 术语“化合物”旨在包含所描绘结构的所有立体异构体、几何异构体、互变异构体和同位素。

[0349] 术语“保守的”分别是指多核苷酸序列或多肽序列的核苷酸或氨基酸残基,所述核苷酸或氨基酸残基是在被比较的两个或更多个序列的相同位置中未改变的那些。相对保守的核苷酸或氨基酸是在比序列中其它地方出现的核苷酸或氨基酸更相关的序列中保守的核苷酸或氨基酸。

[0350] 术语“环状”是指连续环的存在。环状分子不需要是环形的,仅连接以形成亚基的未断裂链。环状分子如本公开的mRNA可以是单个单元或多聚体,或包括复杂或高阶结构的一种或多种组分。

[0351] 术语“细胞毒性”是指杀伤或引起对细胞(例如,哺乳动物细胞(例如,人细胞))、细菌、病毒、真菌、原生动物、寄生虫、朊病毒或其组合的有害、有毒或致命影响。

[0352] 术语“递送”是指递送化合物、物质、实体、部分、货物或有效载荷的行为或方式。

[0353] 术语“递送剂”是指至少部分地促进多核苷酸向靶细胞的体内递送的任何物质。

[0354] 核酸序列的术语“表达”是指以下事件中的一个或多个:(1)由DNA序列产生RNA模板(例如,通过转录);(2)RNA转录物的加工(例如,通过剪接、编辑、5'帽形成和/或3'末端加

工); (3) 将RNA翻译成多肽或蛋白质;以及(4)多肽或蛋白质的翻译后修饰。

[0355] 术语“特征”是指特征、特性或独特元件。

[0356] 如本文所使用的,术语“片段”是指一部分。例如,蛋白质片段可以包括通过消化从培养的细胞分离的全长蛋白质获得的多肽。

[0357] 术语“功能性”生物分子是其表现出表征其的特性和/或活性的形式的生物分子。

[0358] 术语“疏水性脂质”意指具有非极性基团的化合物,所述非极性基团包含但不限于长链饱和和不饱和脂肪族烃基以及任选地被一个或多个芳香族、环脂族或杂环基取代的此类基团。合适的实例包含但不限于二酰基甘油、二烷基甘油、N-N-二烷基氨基、1,2-二酰氧基-3-氨基丙烷和1,2-二烷基-3-氨基丙烷。

[0359] 术语“脂质”意指有机化合物,其包括脂肪酸酯并且特征在于不溶于水,但可溶于许多有机溶剂。脂质通常分为至少三类:(1)“简单脂质”,其包含脂肪和油以及蜡;(2)“化合物脂质”,其包含磷脂和糖脂;以及(3)“衍生脂质”,如类固醇。

[0360] 术语“脂质递送媒介”意指脂质调配物,所述脂质调配物可以用于将治疗性核酸(例如,mRNA)递送到所关注的靶位点(例如,细胞、组织、器官等)。脂质递送媒介可以是核酸-脂质颗粒,其可以由阳离子脂质、非阳离子脂质(例如,磷脂)、防止颗粒聚集的缀合脂质(例如,PEG-脂质)和任选地胆固醇形成。通常,治疗性核酸(例如,mRNA)可以包封在颗粒的脂质部分中,从而保护其免受酶降解。

[0361] 术语“包封的脂质”意指脂质颗粒,其提供治疗性核酸,如具有完全包封、部分包封或两者的mRNA。在优选实施例中,核酸(例如,mRNA)完全包封在脂质颗粒中。

[0362] 术语“两亲性脂质(amphipathic lipid/amphiphilic lipid)”意指脂质材料的疏水性部分定向成疏水相而亲水性部分朝向水相的材料。亲水特性来源于极性 or 带电基团的存在,如碳水化合物、磷酸盐、羰基、硫酸根合、氨基、巯基、硝基、羟基和其它类似基团。疏水性可以通过包含极性基团来赋予,所述极性基团包含但不限于长链饱和和不饱和脂肪族烃基以及被一个或多个(多个)芳香族、脂环族或杂环基取代的此类基团。两亲性化合物的实例包含但不限于磷脂、氨基脂质和鞘脂。

[0363] 术语“接头”或“连接部分”是指原子基团,例如10个至100个原子,并且可以由一个或多个原子或基团构成,如但不限于碳、氨基、烷基氨基、氧、硫、亚砷、磺酰基、羰基和亚胺。接头可以具有足以不干扰掺入氨基酸序列中的长度。可以掺入接头中的化学基团的实例包含但不限于烷基、烯基、炔基、酰胺基、氨基、醚、硫醚、酯、烷基、杂烷基、芳基或杂环基,其各自可任选地被取代,如本文所述。接头的实例包含但不限于:不饱和烷烃、聚乙二醇(例如,乙烯或丙二醇单体单元,例如,二乙二醇、二丙二醇、三乙二醇、三丙二醇、四乙二醇或四乙二醇)和葡聚糖聚合物。其它示例包含但不限于:所述接头内的可切割部分,例如,二硫键( $-S-S-$ )或偶氮键( $-N-N-$ ),其可以使用还原剂或光解切割。选择性可切割键的非限制性实例包含酰胺键,其可以例如通过使用三(2-羰基乙基)膦(TCEP)或其它还原剂和/或光解切割,以及酯键,其可以例如通过酸性或碱性水解切割。

[0364] 术语“哺乳动物”意指人或其它哺乳动物或意指人。

[0365] 术语“信使RNA”(mRNA)是指编码所关注的蛋白质或多肽并且能够被翻译以在体外、体内、原位或离体产生所关注的编码的蛋白质或多肽的任何多核苷酸。

[0366] 术语“经修饰的”是指本公开的分子的改变状态或结构。可以以许多方式,包含化

学上、结构上、和/或功能上对分子进行修饰。在一个实施例中,核酸活性成分通过引入非天然核苷和/或核苷酸来修饰,例如,因为其涉及天然核糖核苷酸A、U、G和C。非规范核苷酸如帽结构不被视为“经修饰的”,但其可以不同于A、C、G、U核糖核苷酸的化学结构。

[0367] 术语“天然存在的”意指在没有人帮助的情况下存在于自然界。

[0368] 术语“非人脊椎动物”包含除智人之外的所有脊椎动物,包含野生型和驯养物种。非人脊椎动物的实例包含但不限于哺乳动物,如羊驼、白臂野牛、野牛、骆驼、猫、牛、鹿、狗、驴、大额牛、山羊、豚鼠、马、美洲驼、骡子、猪、兔、驯鹿、绵羊、水牛和牦牛。

[0369] 术语“核苷酸”意指本领域众所周知的天然碱基(标准)和经修饰的碱基。这种碱基通常位于核苷酸糖部分的1'位置处。核苷酸通常包括碱、糖和磷酸基团。核苷酸可以在糖、磷酸酯和/或碱基部分处是未经修饰的或经修饰的(也称为核苷酸类似物、修饰的核苷酸、非天然核苷酸、非标准核苷酸和其它;参见例如Usman和McSwiggen,同上;Eckstein等人,国际PCT公开第W0 92/07065号;Usman等人,国际PCT公开第W0 93/15187号;Uhlman和Peyman,同上,所述文献全部提供引用特此并入本文)。存在本领域已知的经修饰的核酸碱基的若干实例,如Limbach等人,《核酸研究(Nucleic Acids Res)》22:2183,1994所概述。可以引入核酸分子中的碱基修饰的一些非限制性实例包含:肌苷、嘌呤、吡啶-4-酮、吡啶-2-酮、苯基、假尿嘧啶、2,4,6-三甲氧基苯、3-甲基尿嘧啶、二氢尿苷、萘基、氨基苯基、5-烷基胞苷(例如,5-甲基胞苷)、5-烷基尿苷(例如,核糖胸苷)、5-卤代尿苷(例如,5-溴尿苷)或6-氮杂嘧啶或6-烷基嘧啶(例如,6-甲基尿苷)、丙炔和其它(Burgin等人,《生物化学(Biochemistry)》35:14090,1996;Uhlman和Peyman,同上)。在这方面,“经修饰的碱基”意指除腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶和尿嘧啶之外的核苷酸碱基在1'位置处或其等效物。

[0370] 短语“可操作地连接”是指两个或更多个分子、构建体、转录物、实体、部分等之间的功能连接。

[0371] 术语“患者”是指可能寻求或需要治疗、需要治疗、正在接受治疗、将接受治疗的受试者,或由训练有素的专业人员护理特定疾病或病状的受试者。

[0372] 短语“任选地经取代的X”(例如,任选地经取代的烷基)旨在等同于“X,其中X是任选地经取代的”(例如,“烷基,其中所述烷基是任选地经取代的”)。这并不意味着特征“X”(例如烷基)本身是任选的。

[0373] 短语“药学上可接受的”在本文中用于指在正确医学判断的范围内适合于与人和动物的组织接触使用而不会产生过多毒性、刺激、过敏性应答或其它问题或并发症的、与合理的益处/风险比相称的那些化合物、材料、组合物和/或剂型。

[0374] 如本文所使用的,短语“药学上可接受的赋形剂”是指除本文所述的化合物之外的任何成分(例如,能够悬浮或溶解活性化合物的媒剂)并且具有对患者基本上无毒和无炎症的性质。赋形剂可以包含例如:抗粘剂、抗氧化剂、粘合剂、包衣、压缩助剂、崩解剂、染料(着色剂)、润肤剂、乳化剂、填充剂(稀释剂)、成膜剂或包衣、调味剂、香料、助流剂(流动增强剂)、润滑剂、防腐剂、印刷油墨、吸附剂、悬浮剂或分散剂、甜味剂和水合水。示例性赋形剂包含但不限于:丁基化羟基甲苯(BHT)、碳酸钙、磷酸钙(二元)、硬脂酸钙、交联羧甲基纤维素、交联聚乙烯吡咯烷酮、柠檬酸、交聚维酮、半胱氨酸、乙基纤维素、明胶、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、乳糖、硬脂酸镁、麦芽糖醇、甘露醇、甲硫氨酸、甲基纤维素、对羟基苯甲酸甲酯、微晶纤维素、聚乙二醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚维酮、预胶化淀粉、对羟基苯甲酸丙酯、

棕榈酸视黄酯、虫胶、二氧化硅、羧甲基纤维素钠、柠檬酸钠、羧基乙酸淀粉钠、山梨糖醇、淀粉(玉米)、硬脂酸、硬脂酸、蔗糖、滑石粉、二氧化钛、维生素A、维生素E、维生素C和木糖醇。

[0375] 短语“药学上可接受的盐”是指所公开化合物的衍生物,其中通过将现存的酸或碱部分转化为其盐形式(例如,通过使游离碱基与合适的有机酸反应)而对母体化合物进行修饰。药学上可接受的盐的实例包含但不限于:如胺等碱性残基的矿物盐或有机酸盐;如羧酸等酸性残基的碱盐或有机盐;等等。代表性的酸加成盐包含:乙酸盐、己二酸盐、藻酸盐、抗坏血酸盐、天冬氨酸盐、苯磺酸盐、苯甲酸盐、硫酸氢盐、硼酸盐、丁酸盐、樟脑酸盐、樟脑磺酸盐、柠檬酸盐、环戊烷丙酸盐、二葡萄糖酸盐、十二烷基硫酸盐、乙磺酸盐、富马酸盐、葡庚糖酸盐、甘油磷酸盐、半硫酸盐、庚酸盐、己酸盐、氢碘化物、2-羟基-乙磺酸盐、乳糖酸盐(lactobionate)、乳酸盐、月桂酸盐、月桂基硫酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、丙二酸盐、甲磺酸盐、2-萘磺酸盐、烟酸盐、硝酸盐、油酸盐、草酸盐、棕榈酸盐、扑酸盐、果胶酸盐、过硫酸盐、3-苯基丙酸盐、磷酸盐、苦味酸盐、新戊酸盐、丙酸盐、硬脂酸盐、琥珀酸盐、硫酸盐、酒石酸盐、硫氰酸盐、甲苯磺酸盐、十一酸盐、戊酸盐等。代表性的碱金属或碱土金属盐包含钠、锂、钾、钙、镁等,以及无毒铵、季铵和胺阳离子,包含但不限于铵、四甲基铵、四乙基铵、甲胺、二甲胺、三甲胺、三乙胺、乙胺等。本公开的药学上可接受的盐包含例如由无毒的无机酸或有机酸形成的母体化合物的常规无毒盐。本公开的药学上可接受的盐可以通过常规化学方法由含有碱性或酸性部分的母体化合物合成。通常,此类盐可以通过使这些化合物的游离酸或碱形式与化学计量量的适当碱或酸在水中或在有机溶剂中或在两者的混合物中反应来制备;通常,优选非水性介质,如醚、乙酸乙酯、乙醇、异丙醇或乙腈。适合的盐的列表可以见于以下:《雷明顿药物科学》,第17版,宾夕法尼亚州伊斯顿市的马克出版公司,1985,第1418页,《药用盐:性质、选择和用途(Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use)》,P.H. Stahl和C.G. Wermuth(编辑),Wiley-VCH出版社(Wiley-VCH),2008;以及B等人,《药物科学杂志(Journal of Pharmaceutical Science)》,66,1-19(1977),所述文献中的每一个通过引用以其整体并入本文。

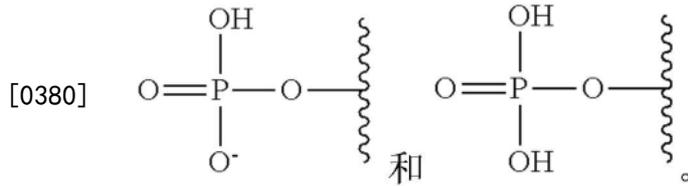
[0376] 术语“药代动力学”是指分子或化合物的任何一种或多种性质,因为其涉及施用于活生物体的物质的命运的确定。药代动力学被分成若干领域,包含吸收、分布、代谢和排泄的程度和速率。这通常被称为ADME,其中:(A)吸收是物质进入血液循环的过程;(D)分布是物质在整个身体的流体和组织中的分散或分布;(M)代谢(或生物转化)是母体化合物不可逆地转化为子代谢物;以及(E)排泄(或消除)是指物质从身体中消除。在罕见情况下,一些药物不可逆地累积在身体组织中。

[0377] 如本文所使用的,术语“药学上可接受的溶剂化物”意指本公开的化合物,其中合适的溶剂分子并入晶格中。合适的溶剂在所施用的剂量下是生理学上可耐受的。例如,溶剂化物可以通过从包含有机溶剂、水或其混合物的溶液中结晶、重结晶或沉淀来制备。合适的溶剂的实例是乙醇、水(例如,单水合物、二水合物和三水合物)、N-甲基吡咯烷酮(NMP)、二甲基亚砜(DMSO)、N,N'-二甲基甲酰胺(DMF)、N,N'-二甲基乙酰胺(DMAC)、1,3-二甲基-2-咪唑啉酮(DMEU)、1,3-二甲基-3,4,5,6-四氢-2-(1H)-嘧啶酮(DMPU)、乙腈(ACN)、丙二醇、乙酸乙酯、苯醇、2-吡咯烷酮、苯甲酸苄酯等。当水是溶剂时,溶剂化物被称为“水合物”。

[0378] 术语“物理化学”意指物理和/或化学性质或与物理和/或化学性质有关。

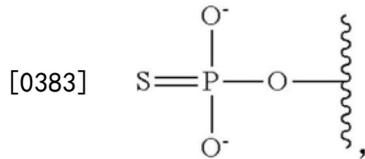
[0379] 术语“磷酸酯”以本领域技术人员所理解的普通含义使用,并且包含其质子化形

式,例如

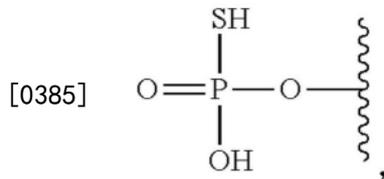


[0381] 如本文所使用的,术语“单磷酸”、“二磷酸”和“三磷酸”以本领域技术人员所理解的其普通含义使用,并且包含质子化形式。

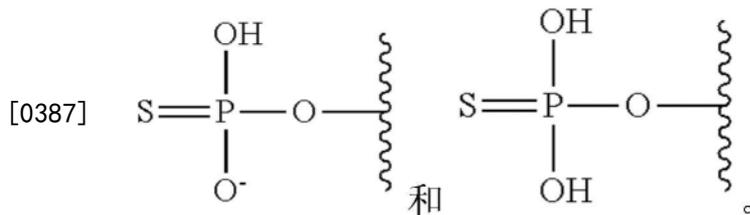
[0382] 术语“硫代磷酸酯”是指以下通式的化合物:



[0384] 其质子化形式,例如,



[0386] 以及其互变异构体,如



[0388] 术语“预防”是指部分或完全延迟感染、疾病、病症和/或病状的发作;部分或完全延迟特定感染、疾病、病症和/或病状的一种或多种症状、特征或临床表现的发作;部分或完全延迟特定感染、疾病、病症和/或病状的一种或多种症状、特征或表现的发作;部分或完全延迟感染、特定疾病、病症和/或病状的进展;和/或降低发展与感染、疾病、病症和/或病状相关的病理学的风险。

[0389] 术语“所关注的蛋白质”或“期望蛋白质”包含本文提供的那些及其片段、突变体、变体和改变。

[0390] 术语“纯化(purify/purified/purification)”意指使不需要的组分、材料污染、混合或不完美基本上纯净或清除。

[0391] 术语“RNA”意指包括至少一个核糖核苷酸残基的分子。“核糖核苷酸”意指在 $\beta$ -D-核糖-呋喃糖部分的2'位置处具有羟基的核苷酸。术语包含双链RNA、单链RNA、分离的RNA,如部分纯化的RNA、基本上纯的RNA、合成的RNA、重组产生的RNA以及改变的RNA,所述RNA通过添加、缺失、取代和/或改变一个或多个核苷酸而与天然存在的RNA不同。此类改变可以包含添加非核苷酸材料,如添加到干扰RNA的末端或内部,例如在RNA的一个或多个核苷酸处。本公开的RNA分子中的核苷酸还可以包括非标准核苷酸,如非天然存在的核苷酸或化学合成的核苷酸或脱氧核苷酸。这些改变的RNA可以被称作类似物或天然存在的RNA的类似物。

如本文所使用的,术语“核糖核酸”和“RNA”是指含有至少一个核糖核苷酸残基的分子,包含 siRNA、反义RNA、单链RNA、微小RNA、mRNA、非编码RNA和多价RNA。

[0392] 术语“样品”或“生物样品”是指其组织、细胞或组分部分(例如,体液,包括但不限于血液、粘液、淋巴液、滑液、脑脊液、唾液、羊水、羊膜脐带血、尿液、阴道液和精液)的子集。样品可以进一步包含由整个生物体或其组织、细胞或组分部分的子集或其级分或部分制备的均质物、裂解物或提取物,包括但不限于例如,血浆、血清、脊髓液、淋巴液、皮肤的外部切片、呼吸道、肠道和泌尿生殖道、泪液、唾液、乳汁、血细胞、肿瘤、器官。样品进一步指可以含有细胞组分如蛋白质或核酸分子的培养基,如营养肉汤或凝胶。

[0393] 术语“显著的”或“显著地”与术语“基本上”同义使用。

[0394] 短语“单个单位剂量”是以一个剂量/一次/单个途径/单个接触点即单一施用事件施用的任何治疗剂的剂量。

[0395] 术语“siRNA”或小干扰RNA,有时称为短干扰RNA或沉默RNA,是指一类双链RNA非编码RNA分子,长度通常为18个至27个碱基对,类似于miRNA,并且在RNA干扰(RNAi)途径内操作。siRNA通过在转录后降解mRNA来干扰具有互补核苷酸序列的特定基因的表达,由此阻止翻译。

[0396] 术语“溶剂化物”意指本公开的化合物与一种或多种溶剂分子的物理缔合。这种物理结合涉及不同程度的离子键合和共价键合,包含氢键合。在某些情况下,溶剂化物将能够例如当一种或多种溶剂分子掺入结晶固体的晶格中时分离。“溶剂化物”涵盖溶液相和可分离的溶剂化物两者。合适的溶剂化物的非限制性实例包含乙醇盐、甲醇盐等。

[0397] 术语“分剂量”是将单个单位剂量或总日剂量分成两个或更多个剂量。

[0398] 术语“稳定”是指足够稳健以经受来自反应混合物的可用纯度程度的隔离并且优选地能够调配成有效治疗剂的化合物。

[0399] 术语“稳定”、“稳定化的”、“稳定区域”意指使或变得稳定。

[0400] 术语“经取代的”意指用除氢以外的指定基团或用一个或多个基团、部分或自由基取代,所述基团、部分或自由基可以相同或不同,其中每个基团例如独立地选择。

[0401] 术语“基本上”是指表现出所关注的特征或性质的全部或接近全部的范围或程度的定性条件。生物学领域的普通技术人员将理解,生物学和化学现象很少(如果有的话)完成和/或进行至完成或达到或避免绝对结果。术语“基本上”因此在本文中用于捕获许多生物学和化学现象中固有的潜在的完全性缺失。

[0402] 短语“基本上相等”涉及剂量之间的时间差,术语意指加/减2%。

[0403] 短语“基本上同时”涉及多个剂量,术语意指在2秒内。

[0404] 短语“患有”涉及“患有”疾病、病症和/或病状的个体已经被诊断为患有或表现出疾病、病症和/或病状的一种或多种症状。

[0405] 短语“易感”涉及“易感”疾病、病症和/或病状尚未被诊断患有疾病、病症和/或病状和/或可能未表现出疾病、病症和/或病状的症状但具有发展疾病或其症状的倾向的个体。在一些实施例中,易患疾病、病症和/或病状(例如,癌症)的个体可以通过以下中的一种或多种来表征:(1)与疾病、病症和/或病状的发展相关联的基因突变;(2)与疾病、病症和/或病状的发展相关联的基因多态性;(3)与疾病、病症和/或病状相关联的蛋白质和/或核酸的表达和/或活性增加和/或降低;(4)与疾病、病症和/或病状的发展相关联的习惯和/或生

活方式；(5) 疾病、病症和/或病状的家族史；以及(6) 暴露于和/或感染有与疾病、病症和/或病状的发展相关联的微生物。在一些实施例中，易患疾病、病症和/或病状的个体将患上疾病、病症和/或病状。在一些实施例中，易患疾病、病症和/或病状的个体将不会患上疾病、病症和/或病状。

[0406] 术语“合成”意指由人工生产、制备和/或制造。本公开的多核苷酸或多肽或其它分子的合成可以是化学的或酶的。

[0407] 术语“靶细胞”是指任何一种或多种所关注的细胞。细胞可以在体外、体内、原位或生物体的组织或器官中发现。生物体可以是动物，优选地哺乳动物，更优选的人，并且最优选地患者。

[0408] 术语“治疗剂”是指在施用于受试者时具有治疗、诊断和/或预防作用和/或引发期望的生物作用和/或药理作用的任何药剂。

[0409] 术语“治疗有效量”意指当施用于患有或易患感染、疾病、病症和/或病状的受试者时足以治疗、改善感染、疾病、病症和/或病状的症状、诊断、预防和/或延迟感染、疾病、病症和/或病状的发作的待递送药剂(例如，核酸、药物、治疗剂、诊断剂、预防剂等)的量。

[0410] 术语“治疗有效结果”意指在患有或易患感染、疾病、病症和/或病状的受试者中足以治疗、改善感染、疾病、病症和/或病状的症状、诊断、预防和/或延迟感染、疾病、病症和/或病状的发作的结果。

[0411] 术语“总日剂量”是在24小时时段内给予或规定的量。其可以作为单个单位剂量施用。

[0412] 术语“治疗”是指特定感染、疾病、病症和/或病状的一种或多种症状或特征的部分或完全缓解、改善(ameliorating)、改善(improving)、减轻、延缓发作、抑制进展、降低严重程度和/或降低发病率。例如，“治疗”癌症可以指抑制肿瘤的存活、生长和/或扩散。出于降低发展与疾病、病症和/或状况相关的病理的风险的目的，可以将治疗施用于未展现出疾病、病症和/或病状的迹象的受试者和/或仅展现出疾病、病症和/或病状的早期迹象的受试者。

[0413] 术语“未经修饰的”是指以任何方式改变之前的任何物质、化合物或分子。未经修饰的可以但并不总是指生物分子的野生型或天然形式。分子可以经历一系列修饰，由此每个经修饰的分子可以充当用于后续修饰的“未经修饰的”起始分子。

[0414] 本文所描述的化合物可以是不对称的(例如，具有一个或多个立体中心)。除非另外指示，否则意指所有立体异构体(如对映异构体和非对映异构体)。含有不对称取代的碳原子的本公开的化合物可以以光学活性形式或外消旋形式被分离。关于如何由光学活性起始材料制备光学活性形式的方法在本领域是已知的，如通过外消旋混合物拆分或通过立体选择性合成。烯烃的许多几何异构体、C-N双键等也可以存在于本文所描述的化合物中，并且在本公开中考虑了所有此类稳定的异构体。描述了本公开的化合物的顺式和反式几何异构体，并且可以将其分离为异构体的混合物或单独的异构体形式。

[0415] 本公开的化合物还包含互变异构形式。互变异构形式起因于单键与相邻双键的交换和质子的伴随迁移。互变异构形式包含质子移变互变异构体，它们是具有相同经验式和总电荷的同分异构质子化态。示例质子互变异构体包含酮-烯醇对、酰胺-亚氨酸对、内酰胺-内酰亚胺对、烯胺对以及质子可以占据杂环系统的两个或更多个位置的环状形式，如

1H-和3H-咪唑、1H-、2H-和4H-1,2,4-三唑、1H-和2H-异吲哚以及1H-和2H-吡唑。互变异构体形式可以处于平衡状态,或者通过适当的取代,在空间上锁定为一种形式。

[0416] 本公开的化合物还包含存在于中间体或最终化合物中的原子的所有同位素。“同位素”是指原子序数相同但质量数不同的原子,由原子核中不同数量的中子引起。例如,氢的同位素包含氘和氚。

[0417] 本公开的化合物和盐可以通过常规方法与溶剂或水分子组合以形成溶剂化物和合物。

[0418] 术语“半衰期”是指如核酸或蛋白质的浓度或活性的量下降到在一个时间段开始时测量的其值的一半所需的时间。

[0419] 术语“体外”是指在人工环境中,例如在试管或反应容器中、在细胞培养物中、在培养皿中等而不是在生物体(例如,动物、植物或微生物)内发生的事件。

[0420] 术语“体内”是指在生物体(例如,动物、植物或微生物或其细胞或组织)内发生的事件。

[0421] 术语“单体”是指可以与相同或不同类型的另一种分子连接以形成低聚物的单个单元,例如单个核酸。在一些实施例中,单体可以是解锁核酸,即UNA单体。

[0422] 术语“中性脂质”意指在选定的pH下以不带电或中性两性离子形式存在的脂质物种。在生理pH下,此类脂质包含例如二酰基磷脂酰胆碱、二酰基磷脂酰乙醇胺、神经酰胺、鞘磷脂、脑磷脂、胆固醇、脑苷脂和二酰基甘油。

[0423] 术语“非阳离子脂质”意指两性亲脂性或中性脂质或阴离子脂质,并且在本文中描述。

[0424] 术语“受试者”或“患者”是指可以施用根据本公开的组合物中的任何生物体,例如用于实验、诊断、预防和/或治疗目的。典型的受试者包含动物(例如,如小鼠、大鼠、兔、非人灵长类动物和人等哺乳动物)和/或植物。

[0425] 术语“可翻译”可以与术语“可表达”可互换地使用并且是指多核苷酸或其一部分能够被宿主细胞转化为多肽。如本领域所理解的,翻译是细胞的细胞质中的核糖体产生多肽的过程。在翻译中,由核糖体复合物中的tRNA对信使RNA(mRNA)进行解码以产生特异性氨基酸链或多肽。此外,当在本说明书中关于低聚物使用时,术语“翻译”意指低聚物的至少一部分,例如,低聚物序列的编码区(也称为编码序列或CDS)能够转化为蛋白质或其片段。

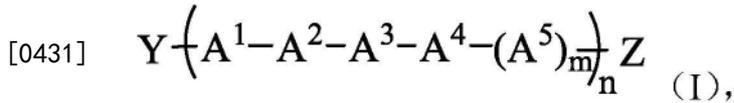
[0426] 治疗有效结果:如本文所使用的,术语“治疗有效结果”意指在患有或易患感染、疾病、病症和/或病状的受试者中足以治疗、改善感染、疾病、病症和/或病状的症状、诊断、预防和/或延迟感染、疾病、病症和/或病状的发作的结果。

[0427] 术语“单位剂量”是指包括预定量的活性成分的药物组合物的离散量。活性成分的量通常可以等于将被施用于受试者的活性成分的剂量和/或此类剂量的合宜部分包含但不限于此类剂量的一半或三分之一。

[0428] 虽然已经关于某些实施例描述了本公开,并且出于说明的目的阐述了许多细节,但对于本领域技术人员将显而易见的是,本公开包含另外的实施例,并且在不脱离本公开的情况下,本文所述的一些细节可以显著变化。本公开包含此类另外的实施例、修饰和等效物。特别地,本公开包含各种说明性组分和实例的特征、术语或元件的任何组合。

[0429] 实施例

[0430] 实施例1.一种肽-脂质缀合物或其药学上可接受的盐,其包括通过连接部分与式(I)的肽缀合的脂质:



[0432] 其中,

[0433]  $A^1$ 选自丝氨酸、苏氨酸、0- $C_{1-6}$ 烷基丝氨酸和0- $C_{1-6}$ 烷基苏氨酸;

[0434]  $A^2$ 选自丝氨酸、苏氨酸、0- $C_{1-6}$ 烷基丝氨酸和0- $C_{1-6}$ 烷基苏氨酸;

[0435]  $A^3$ 选自谷氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺和天冬氨酸;

[0436]  $A^4$ 是脯氨酸;

[0437] 每个 $A^5$ 独立地选自天然或经修饰的氨基酸;

[0438] Y不存在或选自以下: $A^2 - A^3 - A^4 - (A^5)_m$ 、 $A^3 - A^4 - (A^5)_m$ 、 $A^4 - (A^5)_m$ 和 $(A^5)_m$ ;

[0439] Z不存在或选自以下: $-A^1 - A^2 - A^3 - A^4$ 、 $-A^1 - A^2 - A^3$ 、 $-A^1 - A^2$ 和 $-A^1$ ;

[0440] m是0至5;

[0441] n是1至12;

[0442] 其中所述脂质与所述式(I)的肽的N-末端、C-末端或氨基酸侧链缀合;并且

[0443] 其中所述式(I)的肽在其N-末端或氨基酸侧链处缀合时任意地被在其C-末端处选自酰胺和 $C_{1-6}$ 烷基酯的中性基团保护。

[0444] 实施例2.根据实施例1所述的肽-脂质缀合物,其中 $A^1$ 是丝氨酸或0- $C_{1-6}$ 烷基丝氨酸。

[0445] 实施例3.根据实施例1所述的肽-脂质缀合物,其中 $A^1$ 是苏氨酸或0- $C_{1-6}$ 烷基苏氨酸。

[0446] 实施例4.根据前述实施例中任一项所述的肽-脂质缀合物,其中 $A^2$ 是丝氨酸或0- $C_{1-6}$ 烷基丝氨酸。

[0447] 实施例5.根据实施例1至3中任一项所述的肽-脂质缀合物,其中 $A^2$ 是苏氨酸或0- $C_{1-6}$ 烷基苏氨酸。

[0448] 实施例6.根据前述实施例中任一项所述的肽-脂质缀合物,其中 $A^3$ 是谷氨酸。

[0449] 实施例7.根据实施例1至5中任一项所述的肽-脂质缀合物,其中 $A^3$ 是谷氨酰胺。

[0450] 实施例8.根据实施例1至5中任一项所述的肽-脂质缀合物,其中 $A^3$ 是天冬氨酸。

[0451] 实施例9.根据实施例1至5中任一项所述的肽-脂质缀合物,其中 $A^3$ 是天冬酰胺。

[0452] 实施例10.根据前述实施例中任一项所述的肽-脂质缀合物,其中每个 $A^5$ 独立地是天然氨基酸。

[0453] 实施例11.根据实施例10所述的肽-脂质缀合物,其中每个 $A^5$ 是脯氨酸。

[0454] 实施例12.根据实施例1至9中任一项所述的肽-脂质缀合物,其中每个 $A^5$ 选自以下:丝氨酸、苏氨酸、0- $C_{1-6}$ 烷基丝氨酸、0- $C_{1-6}$ 烷基苏氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺和天冬氨酸。

[0455] 实施例13.根据实施例1所述的肽-脂质缀合物,其中

[0456]  $A^1$ 是丝氨酸或0- $C_{1-6}$ 烷基丝氨酸;

[0457]  $A^2$ 是苏氨酸或0- $C_{1-6}$ 烷基苏氨酸;并且

- [0458]  $A^3$ 是谷氨酸或谷氨酰胺。
- [0459] 实施例14.根据实施例13所述的肽-脂质缀合物,其中 $A^3$ 是谷氨酸。
- [0460] 实施例15.根据实施例13所述的肽-脂质缀合物,其中 $A^3$ 是谷氨酰胺。
- [0461] 实施例16.根据前述实施例中任一项所述的肽-脂质缀合物,其中所述式(I)的肽的甘氨酸含量小于所述式(I)的肽中氨基酸的约20%。
- [0462] 实施例17.根据前述实施例中任一项所述的肽-脂质缀合物,其中所述式(I)的肽不包括甘氨酸。
- [0463] 实施例18.根据前述实施例中任一项所述的肽-脂质缀合物,其中所述式(I)的肽中的所有氨基酸是L-氨基酸。
- [0464] 实施例19.根据实施例1至17中任一项所述的肽-脂质缀合物,其中所述式(I)的肽中的所有氨基酸是D-氨基酸。
- [0465] 实施例20.根据实施例1至17中任一项所述的肽-脂质缀合物,其中所述式(I)的肽中的所述氨基酸是L-氨基酸和D-氨基酸的混合物。
- [0466] 实施例21.根据前述实施例中任一项所述的肽-脂质缀合物,其中m是0。
- [0467] 实施例22.根据实施例1至20中任一项所述的肽-脂质缀合物,其中m是1。
- [0468] 实施例23.根据实施例1至20中任一项所述的肽-脂质缀合物,其中m是2。
- [0469] 实施例24.根据前述实施例中任一项所述的肽-脂质缀合物,其中n是1。
- [0470] 实施例25.根据实施例1至23中任一项所述的肽-脂质缀合物,其中n是2。
- [0471] 实施例26.根据实施例1至23中任一项所述的肽-脂质缀合物,其中n是3。
- [0472] 实施例27.根据实施例1至23中任一项所述的肽-脂质缀合物,其中n是4。
- [0473] 实施例28.根据实施例1至23中任一项所述的肽-脂质缀合物,其中n是5。
- [0474] 实施例29.根据实施例1至23中任一项所述的肽-脂质缀合物,其中n是6。
- [0475] 实施例30.根据实施例1至23中任一项所述的肽-脂质缀合物,其中n是7。
- [0476] 实施例31.根据实施例1至23中任一项所述的肽-脂质缀合物,其中n是8。
- [0477] 实施例32.根据实施例1至23中任一项所述的肽-脂质缀合物,其中n是9。
- [0478] 实施例33.根据实施例1至23中任一项所述的肽-脂质缀合物,其中n是10。
- [0479] 实施例34.根据实施例1至23中任一项所述的肽-脂质缀合物,其中n是11。
- [0480] 实施例35.根据实施例1至34中任一项所述的肽-脂质缀合物,其中Y不存在。
- [0481] 实施例36.根据实施例1至34中任一项所述的肽-脂质缀合物,其中Y是 $-A^2-A^3-A^4-(A^5)_m^-$ 。
- [0482] 实施例37.根据实施例1至34中任一项所述的肽-脂质缀合物,其中Y是 $-A^3-A^4-(A^5)_m^-$ 。
- [0483] 实施例38.根据实施例1至34中任一项所述的肽-脂质缀合物,其中Y是 $-A^4-(A^5)_m^-$ 。
- [0484] 实施例39.根据实施例1至34中任一项所述的肽-脂质缀合物,其中Y是 $-(A^5)_m^-$ 。
- [0485] 实施例40.根据实施例1至39中任一项所述的肽-脂质缀合物,其中Z不存在。
- [0486] 实施例41.根据实施例1至39中任一项所述的肽-脂质缀合物,其中Z是 $-A^1-A^2-A^3-A^4$ 。
- [0487] 实施例42.根据实施例1至39中任一项所述的肽-脂质缀合物,其中Z是 $-A^1-A^2-A^3$ 。
- [0488] 实施例43.根据实施例1至39中任一项所述的肽-脂质缀合物,其中Z是 $-A^1-A^2$ 。

[0489] 实施例44.根据实施例1至39中任一项所述的肽-脂质缀合物,其中Z是-A<sup>1</sup>。

[0490] 实施例45.根据前述实施例中任一项所述的肽-脂质缀合物,其中所述脂质通过所述连接部分与所述式(I)的肽的所述N-末端缀合。

[0491] 实施例46.根据实施例1至44中任一项所述的肽-脂质缀合物,其中所述脂质通过所述连接部分与所述式(I)的肽的所述C-末端缀合。

[0492] 实施例47.根据前述实施例中任一项所述的肽-脂质缀合物,其中所述连接部分包括选自以下的基团:酰胺基(-C(O)NH-)、氨基(-NR<sup>N</sup>-),其中R<sup>N</sup>选自以下:H、C<sub>1-6</sub>烷基、羰基(-C(O)-)、氨基甲酸酯(-NHC(O)O-)、尿素(-NHC(O)NH-)、二硫化物(-S-S-)、醚(-O-)、琥珀酰基(- (O)CCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)-)、琥珀酰亚胺基(-NHC(O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)NH-)、醚、碳酸酯(-OC(O)O-)、琥珀酰基、磷酸酯(-O-(O)POH-O-)、-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>j</sub>-,其中j是1至12,磺酰胺(-S(O)<sub>2</sub>NH-)和磺酸酯。

[0493] 实施例48.根据实施例1至20或35至47中任一项所述的肽-脂质缀合物,其中所述肽的长度为约四个氨基酸至约60个氨基酸。

[0494] 实施例49.根据实施例48所述的肽-脂质缀合物,其中所述肽由12个氨基酸组成。

[0495] 实施例50.根据实施例48所述的肽-脂质缀合物,其中所述肽由16个氨基酸组成。

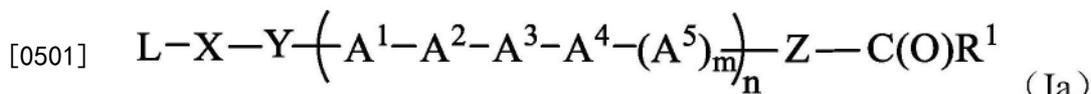
[0496] 实施例51.根据实施例48所述的肽-脂质缀合物,其中所述肽由20个氨基酸组成。

[0497] 实施例52.根据实施例48所述的肽-脂质缀合物,其中所述肽由24个氨基酸组成。

[0498] 实施例53.根据实施例48所述的肽-脂质缀合物,其中所述肽由28个氨基酸组成。

[0499] 实施例54.根据实施例48所述的肽-脂质缀合物,其中所述肽由32个氨基酸组成。

[0500] 实施例55.根据前述实施例中任一项所述的肽-脂质缀合物,其中所述式(I)的肽具有式(Ia)的结构:



[0502] 其中,

[0503] L是肽脂质缀合物的脂质;

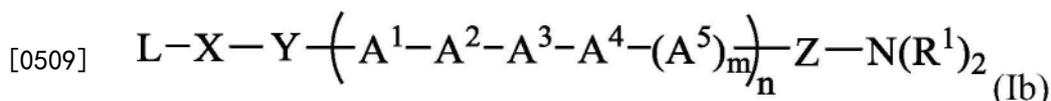
[0504] X是连接部分;

[0505] C(O)R<sup>1</sup>是所述式(I)的肽的C-末端;并且

[0506] R<sup>1</sup>选自以下:-OH、-O-C<sub>1-6</sub>烷基和N(R<sup>2</sup>)<sub>2</sub>,其中每个R<sup>2</sup>独立地是H或C<sub>1-6</sub>烷基。

[0507] 实施例56.根据实施例55所述的肽-脂质缀合物,其中X选自以下:酰胺基(-C(O)NH-)、氨基(-NR<sup>N</sup>-),其中R<sup>N</sup>选自以下:H、C<sub>1-6</sub>烷基、羰基(-C(O)-)、氨基甲酸酯(-NHC(O)O-)、尿素(-NHC(O)NH-)、二硫化物(-S-S-)、醚(-O-)、琥珀酰基(- (O)CCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)-)、琥珀酰亚胺基(-NHC(O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)NH-)、醚、碳酸酯(-OC(O)O-)、琥珀酰基、磷酸酯(-O-(O)POH-O-)、-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>j</sub>-,其中j是1至12,磺酰胺(-S(O)<sub>2</sub>NH-)和磺酸酯。

[0508] 实施例57.根据实施例1至56中任一项所述的肽-脂质缀合物,其中所述式(I)的肽具有式(Ib)的结构:



[0510] 其中,

[0511] L是肽脂质缀合物的脂质；

[0512] X是连接部分；

[0513]  $N(R^1)_2$ 是式(Ia)的所述肽的N-末端；并且

[0514] 每个 $R^1$ 独立地选自H和 $C_{1-6}$ 烷基。

[0515] 实施例58. 根据实施例57所述的肽-脂质缀合物, 其中X选自以下: 酰胺基(-C(O)NH-)、氨基(-NR<sup>N</sup>-), 其中R<sup>N</sup>选自以下: H、 $C_{1-6}$ 烷基、羰基(-C(O)-)、氨基甲酸酯(-NHC(O)O-)、尿素(-NHC(O)NH-)、二硫化物(-S-S-)、醚(-O-)、琥珀酰基(- (O)CCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)-)、琥珀酰亚胺基(-NHC(O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)NH-)、醚、碳酸酯(-OC(O)O-)、琥珀酰基、磷酸酯(-O-(O)POH-O-)、-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>j</sub>-, 其中j是1至12, 磺酰胺(-S(O)<sub>2</sub>NH-)和磺酸酯。

[0516] 实施例59. 根据前述实施例中任一项所述的肽-脂质缀合物, 其中所述肽-脂质缀合物的所述肽选自以下: 二烷氧基丙基、磷脂酰乙醇胺、磷脂、磷脂酸、神经酰胺、二烷基胺、二酰基甘油、固醇和二烷基甘油。

[0517] 实施例60. 根据实施例59所述的肽-脂质缀合物, 其中所述肽-脂质缀合物的所述肽选自以下: 二癸氧基丙基(C<sub>10</sub>)、二月桂氧基丙基(C<sub>12</sub>)、二肉豆蔻酰氧基丙基(C<sub>14</sub>)、二棕榈酰氧基丙基(C<sub>16</sub>)或二硬脂酰氧基丙基(C<sub>18</sub>)、1,2-二肉豆蔻酰氧基丙基-3-胺(DOMG)、1,2-二肉豆蔻酰氧基丙基胺(DMG)、1,2-二月桂酰基-sn-甘油-3-磷脂酰乙醇胺(DLPE)、二肉豆蔻基-磷脂酰乙醇胺(DMPE)、二棕榈酰基-磷脂酰乙醇胺(DPPE)、二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)、二油酰基-磷脂酰乙醇胺(DOPE)、二硬脂酰基-磷脂酰乙醇胺(DSPE)和胆固醇或胆固醇衍生物。

[0518] 实施例61. 根据实施例1至60中任一项所述的肽脂质缀合物, 其中所述肽-脂质缀合物的所述脂质包括长度为12个至20个碳的亲脂性尾部。

[0519] 实施例62. 根据前述实施例中任一项所述的肽-脂质缀合物, 其中所述式(I)的肽的分子量在约500道尔顿至约6000道尔顿的范围内。

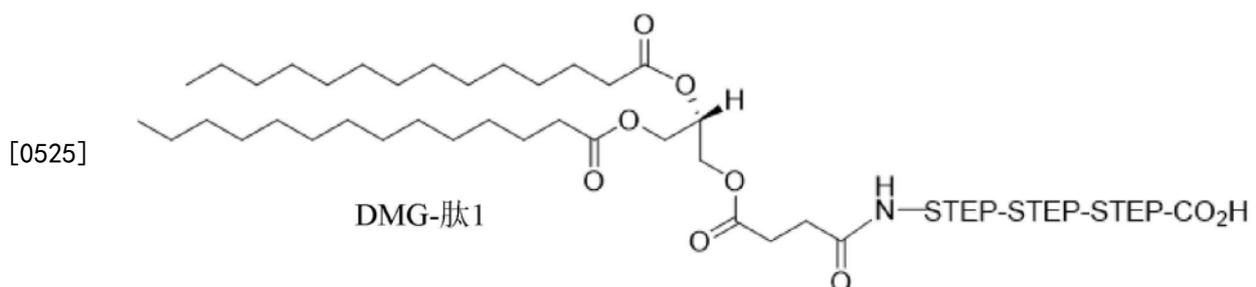
[0520] 实施例63. 根据实施例62所述的肽-脂质缀合物, 其中所述式(I)的肽的分子量在约1000道尔顿至约5000道尔顿的范围内。

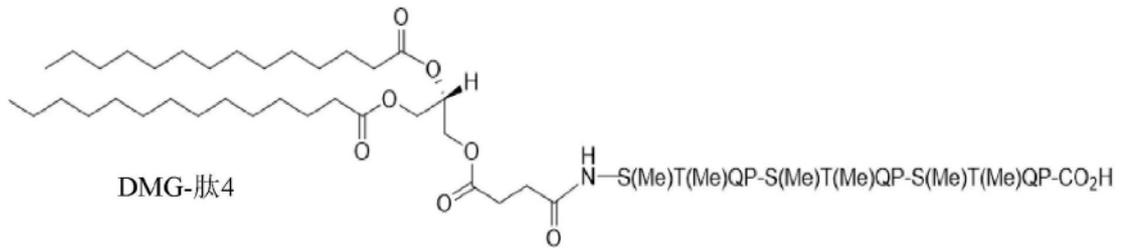
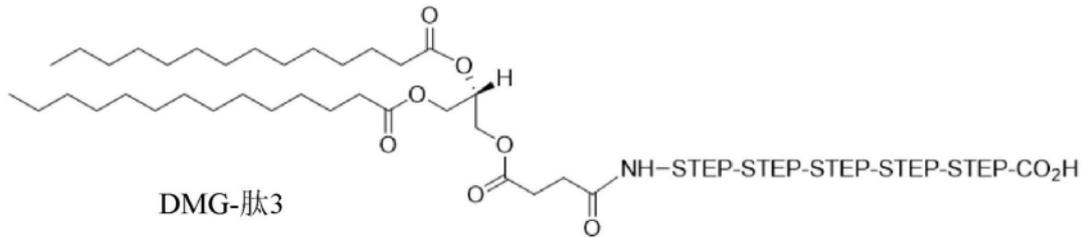
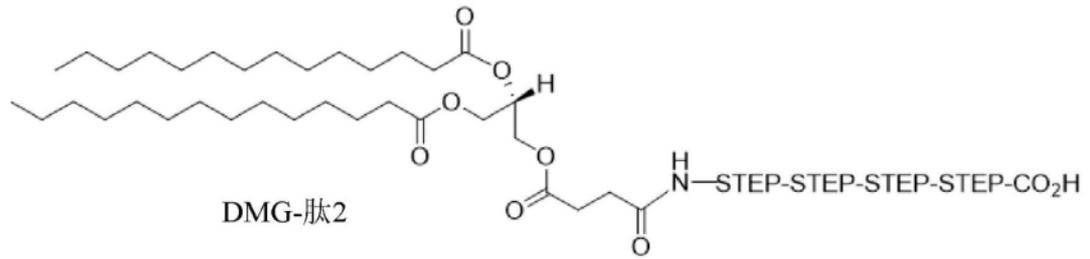
[0521] 实施例64. 根据实施例62所述的肽-脂质缀合物, 其中所述式(I)的肽的分子量在约1500道尔顿至约4000道尔顿的范围内。

[0522] 实施例65. 根据实施例62所述的肽-脂质缀合物, 其中所述式(I)的肽的分子量在约1500道尔顿至约3000道尔顿的范围内。

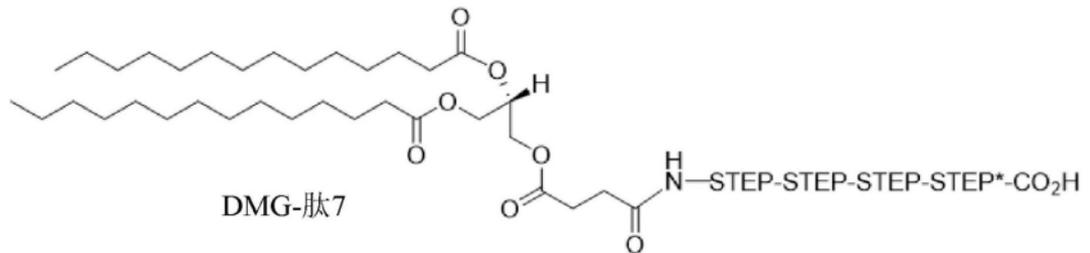
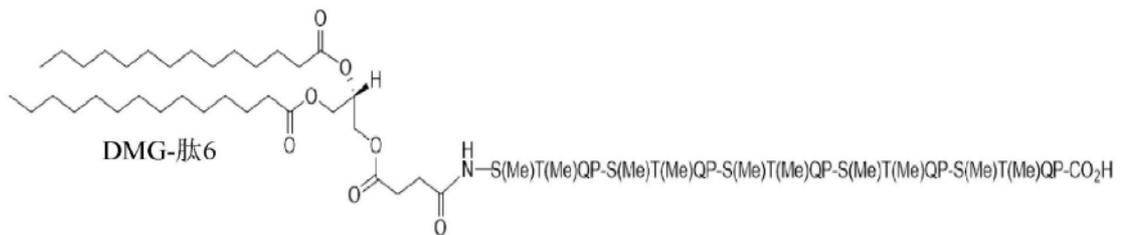
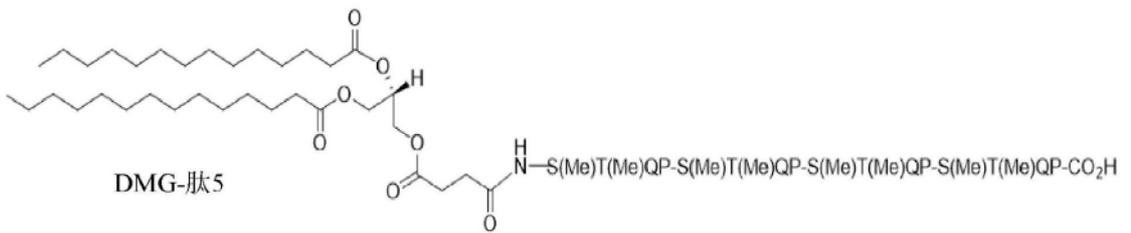
[0523] 实施例66. 根据实施例62所述的肽-脂质缀合物, 其中所述式(I)的肽的分子量的范围为约1500道尔顿至约2500道尔顿。

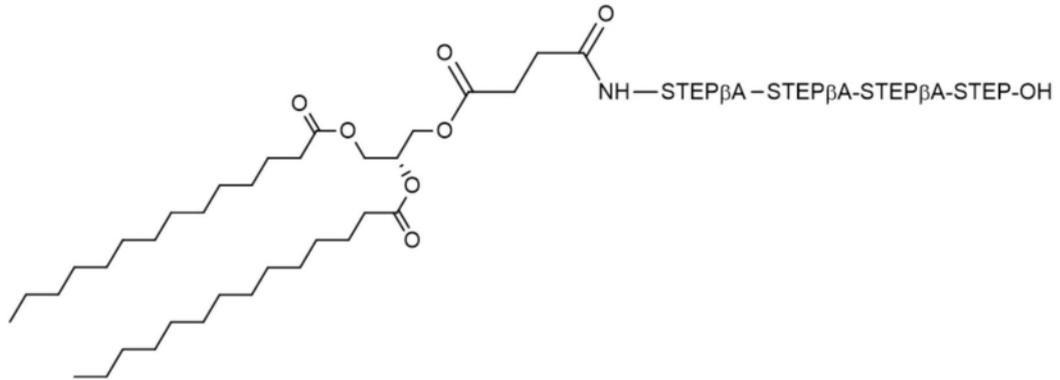
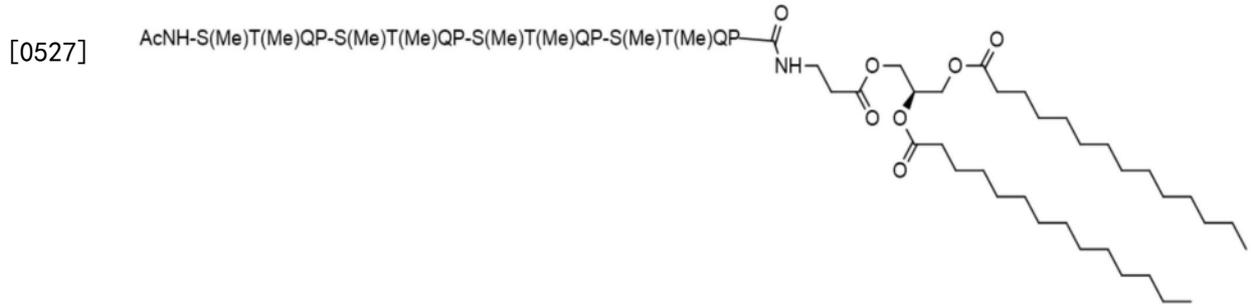
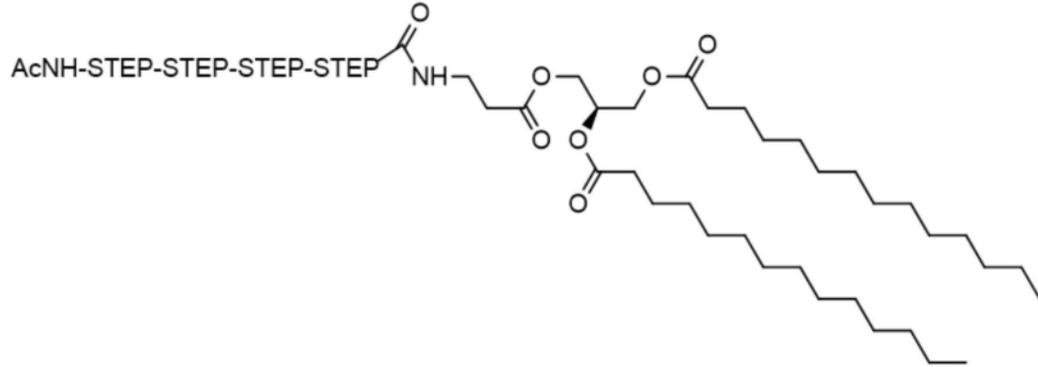
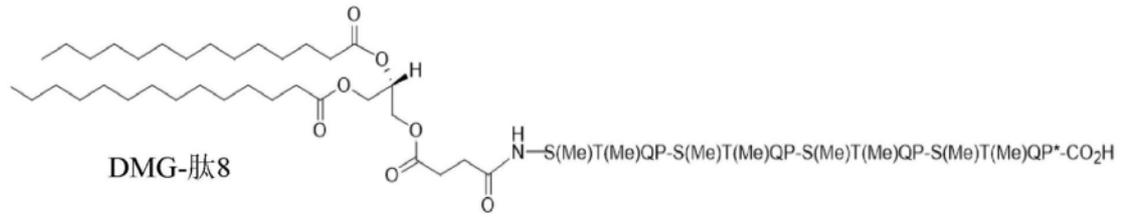
[0524] 实施例67. 根据实施例1所述的肽-脂质缀合物, 其选自以下:

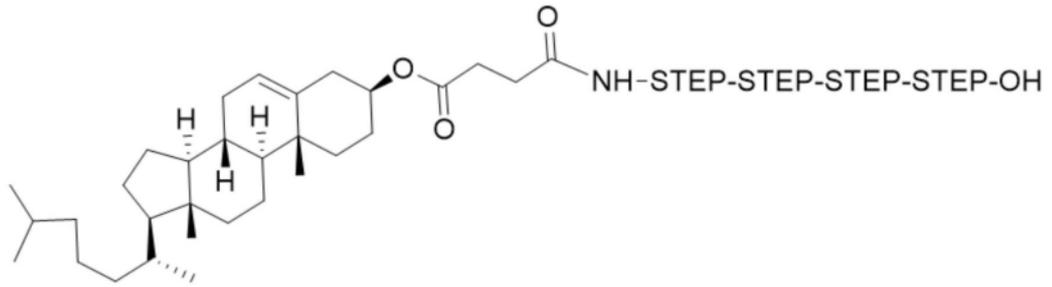
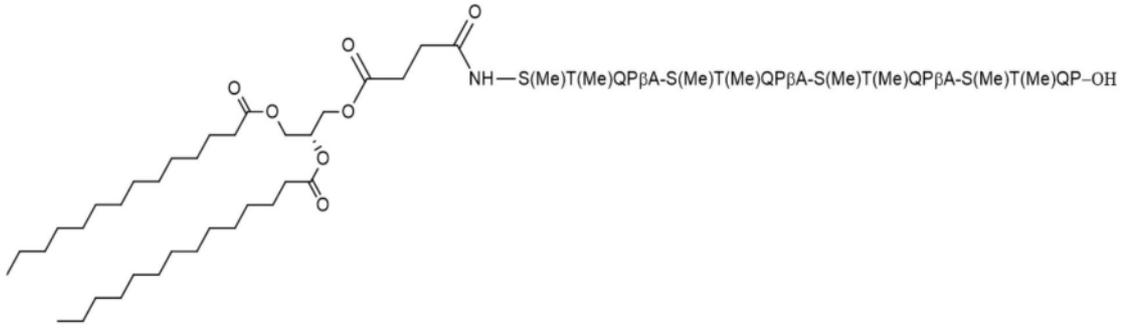




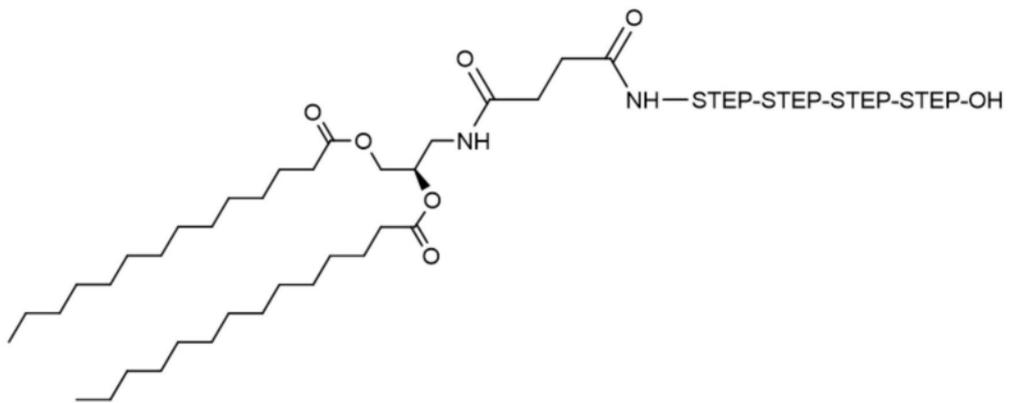
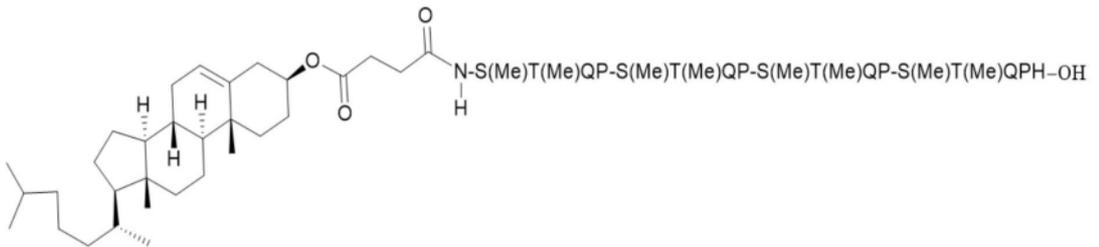
[0526]

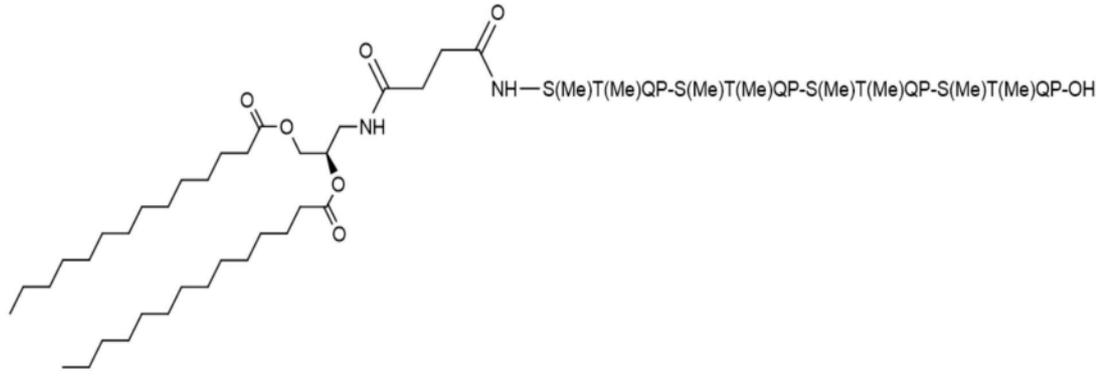




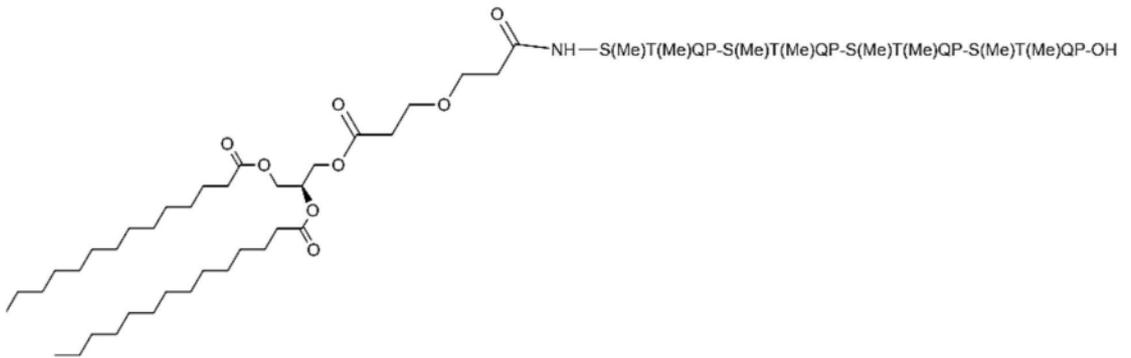
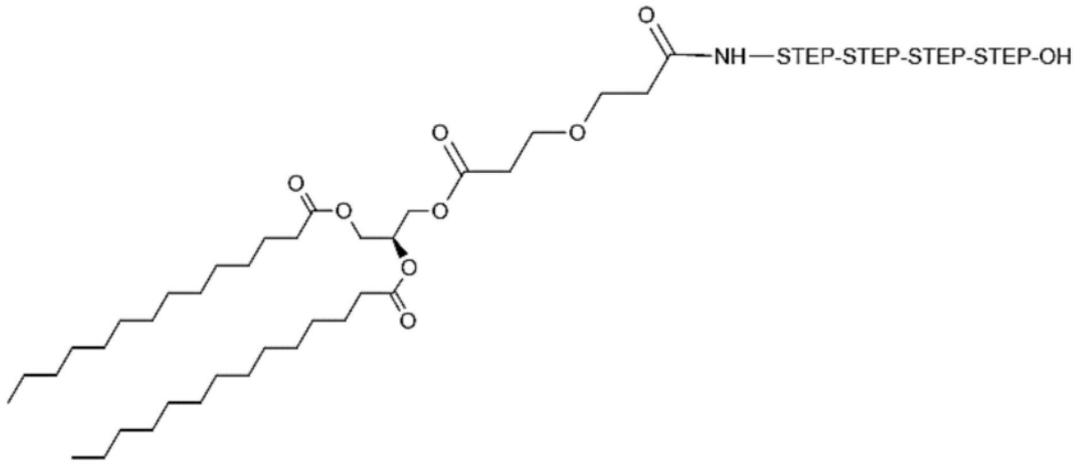


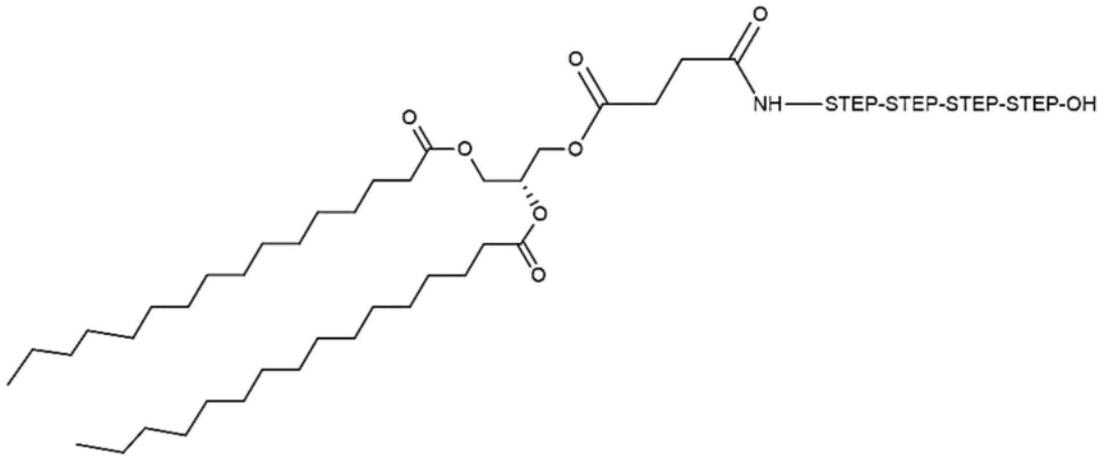
[0528]



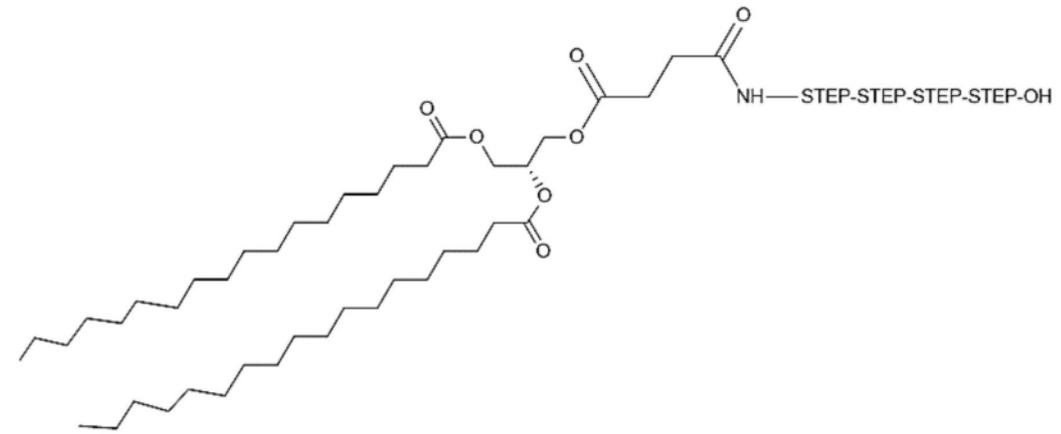
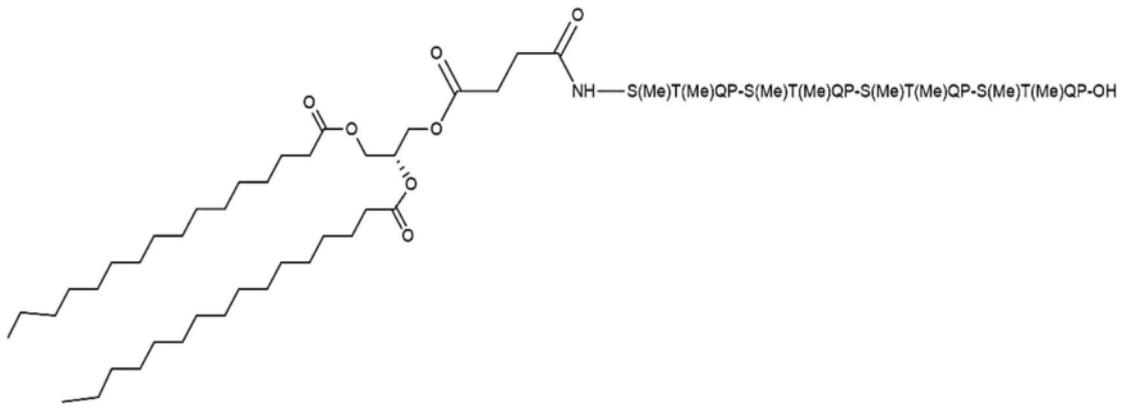


[0529]

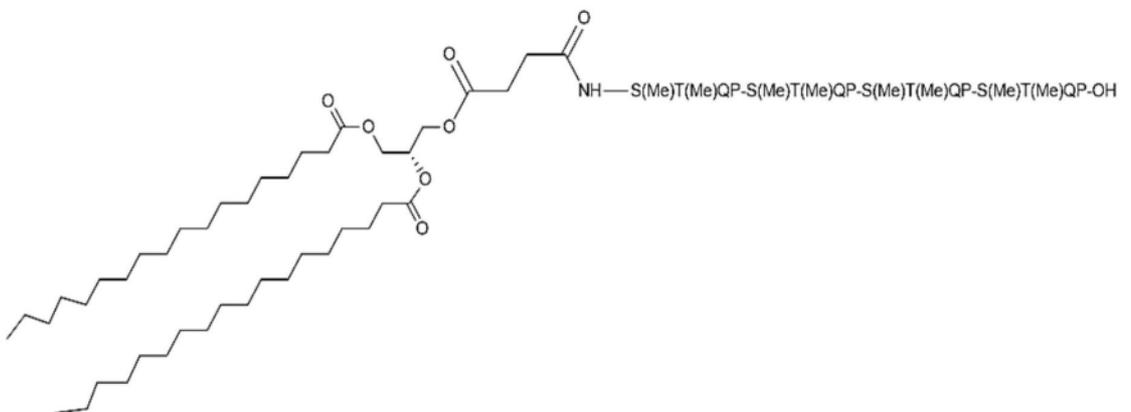




[0530]



[0531]



[0532] 实施例68.一种脂质组合物,其包括根据实施例1至67中任一项所述的肽-脂质缀

合物。

[0533] 实施例69.根据实施例68所述的脂质组合物,其中所述脂质组合物包括脂质体或脂质纳米颗粒。

[0534] 实施例70.根据实施例69所述的脂质组合物,其中所述脂质体或脂质纳米颗粒封装核酸。

[0535] 实施例71.根据实施例70所述的脂质组合物,其中所述核酸选自以下:信使RNA、siRNA、转运RNA、微小RNA、RNAi或DNA。

[0536] 实施例72.根据实施例68至71中任一项所述的脂质组合物,其中所述脂质-肽缀合物占所述脂质组合物中的所有脂质的0.5mol%至5mol%。

[0537] 实施例73.根据实施例68至72中任一项所述的脂质组合物,其进一步包括阳离子脂质。

[0538] 实施例74.根据实施例73所述的脂质组合物,其中所述阳离子脂质是可电离阳离子脂质。

[0539] 实施例75.根据实施例68至74中任一项所述的脂质组合物,其进一步包括固醇。

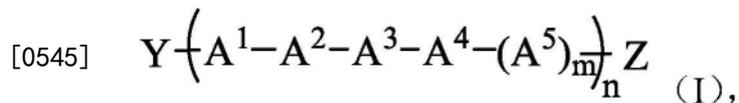
[0540] 实施例76.根据实施例68至75中任一项所述的脂质组合物,其进一步包括辅助脂质。

[0541] 实施例77.根据实施例76所述的脂质组合物,其中所述辅助脂质是磷脂。

[0542] 实施例78.一种治疗有需要的受试者的疾病的方法,所述方法包括向所述受试者施用根据实施例68至77中任一项所述的脂质组合物。

[0543] 实施例79.根据实施例78所述的方法,其中所述脂质组合物静脉内或肌内施用。

[0544] 1.实施例80.一种肽,其由式(I)的肽组成:



[0546] 其中,

[0547]  $A^1$ 选自丝氨酸、苏氨酸、0- $C_{1-6}$ 烷基丝氨酸和0- $C_{1-6}$ 烷基苏氨酸;

[0548]  $A^2$ 选自丝氨酸、苏氨酸、0- $C_{1-6}$ 烷基丝氨酸和0- $C_{1-6}$ 烷基苏氨酸;

[0549]  $A^3$ 选自谷氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺和天冬氨酸;

[0550]  $A^4$ 是脯氨酸;

[0551] 每个 $A^5$ 独立地选自天然或经修饰的氨基酸;

[0552] Y不存在或选自以下: $A^2 - A^3 - A^4 - (A^5)_m$ 、 $A^3 - A^4 - (A^5)_m$ 、 $A^4 - (A^5)_m$ 和 $(A^5)_m$ ;

[0553] Z不存在或选自以下: $-A^1 - A^2 - A^3 - A^4$ 、 $-A^1 - A^2 - A^3$ 、 $-A^1 - A^2$ 和 $-A^1$ ;

[0554] m是0至5;

[0555] n是1至12;并且

[0556] 其中所述式(I)的肽任选地在其C-末端用选自酰胺和C1-6烷基酯的中性基团进行保护;并且

[0557] 其中所述式(I)的肽在N-末端至C-末端方向上或在C-末端至N-末端方向上。

[0558] 实施例81.根据实施例80所述的肽由约4个氨基酸至约六十个氨基酸组成。

[0559] 实施例82.根据实施例80或81所述的肽由12个氨基酸组成。

- [0560] 实施例83.根据实施例80或81所述的肽由16个氨基酸组成。
- [0561] 实施例84.根据实施例80或81所述的肽由20个氨基酸组成。
- [0562] 实施例85.根据实施例80或81所述的肽由24个氨基酸组成。
- [0563] 实施例86.根据实施例80或81所述的肽由28个氨基酸组成。
- [0564] 实施例87.根据实施例80或81所述的肽由32个氨基酸组成。
- [0565] 实施例88.根据实施例80至87中任一项所述的肽由以下方法制备,所述方法包括:  
a)使n个数量的 $A^1-A^2-A^3-A^4(A^5)_m$ 接触,由此形成 $(A^1-A^2-A^3-A^4-(A^5)_m)_n$ ;以及b)使 $(A^1-A^2-A^3-A^4(A^5)_m)_n$ 与Y和Z接触,由此形成 $Y-(A^1-A^2-A^3-A^4-(A^5)_m)_n-Z$ 。
- [0566] 实施例89.根据实施例80至87中任一项所述的肽,其通过包括以下的方法制备:
- [0567] a)使 $A^1, A^2, A^3, A^4$ 和m个数量的 $A^5$ 按顺序接触,由此形成 $A^1-A^2-A^3-A^4-(A^5)_m$ ;b)使n个数量的 $(A^1-A^2-A^3-A^4(A^5)_m)$ 接触,由此形成 $(A^1-A^2-A^3-A^4-(A^5)_m)_n$ ;c)使 $(A^1-A^2-A^3-A^4(A^5)_m)_n$ 与Y和Z接触,由此形成 $Y-(A^1-A^2-A^3-A^4(A^5)_m)_n-Z$ 。
- [0568] 实施例90.根据实施例1至67中任一项所述的肽-脂质缀合物,其通过包括以下的方法制备:
- [0569] a)使n个数量的 $A^1-A^2-A^3-A^4(A^5)_m$ 接触,由此形成 $(A^1-A^2-A^3-A^4-(A^5)_m)_n$ ;
- [0570] b)使 $(A^1-A^2-A^3-A^4(A^5)_m)_n$ 与Y和Z接触,由此形成 $Y-(A^1-A^2-A^3-A^4(A^5)_m)_n-Z$ ;
- [0571] c)使所述连接部分与所述脂质接触,由此形成脂质-连接部分缀合物;以及
- [0572] d)使步骤b)的所述 $Y-(A^1-A^2-A^3-A^4(A^5)_m)_n-Z$ 与步骤c)的所述脂质连接部分缀合物接触,由此形成肽-脂质缀合物。
- [0573] 实施例91.根据实施例1至67中任一项所述的肽-脂质缀合物,其通过包括以下的方法制备:
- [0574] a)使 $A^1, A^2, A^3, A^4$ 以及m个数量的 $A^5$ 按顺序接触,由此形成 $A^1-A^2-A^3-A^4-(A^5)_m$ ;
- [0575] b)使n个数量的 $A^1-A^2-A^3-A^4(A^5)_m$ 接触,由此形成 $(A^1-A^2-A^3-A^4-(A^5)_m)_n$ ;
- [0576] c)使 $(A^1-A^2-A^3-A^4(A^5)_m)_n$ 与Y和Z接触,由此形成 $Y-(A^1-A^2-A^3-A^4(A^5)_m)_n-Z$ ;
- [0577] d)使所述连接部分与所述脂质接触,由此形成脂质-连接部分缀合物;以及
- [0578] e)使步骤c)的所述 $Y-(A^1-A^2-A^3-A^4(A^5)_m)_n-Z$ 与步骤d)的所述脂质连接部分缀合物接触,由此形成肽-脂质缀合物。
- [0579] 实施例92.一种制备根据实施例1至67中任一项所述的肽-脂质缀合物的方法,所述方法包括:
- [0580] a)使n个数量的 $A^1-A^2-A^3-A^4(A^5)_m$ 接触,由此形成 $(A^1-A^2-A^3-A^4-(A^5)_m)_n$ ;
- [0581] b)使 $(A^1-A^2-A^3-A^4(A^5)_m)_n$ 与Y和Z接触,由此形成 $Y-(A^1-A^2-A^3-A^4(A^5)_m)_n-Z$ ;
- [0582] c)使所述连接部分与所述脂质接触,由此形成脂质-连接部分缀合物;以及
- [0583] d)使步骤b)的所述 $Y-(A^1-A^2-A^3-A^4(A^5)_m)_n-Z$ 与步骤c)的所述脂质连接部分缀合物接触,由此形成肽-脂质缀合物。
- [0584] 实施例93.一种制备根据实施例1至67中任一项所述的肽-脂质缀合物的方法,所述方法包括:
- [0585] a)使 $A^1, A^2, A^3, A^4$ 以及m个数量的 $A^5$ 按顺序接触,由此形成 $A^1-A^2-A^3-A^4-(A^5)_m$ ;
- [0586] b)使n个数量的 $(A^1-A^2-A^3-A^4(A^5)_m)$ 接触,由此形成 $(A^1-A^2-A^3-A^4-(A^5)_m)_n$ ;
- [0587] c)使 $(A^1-A^2-A^3-A^4(A^5)_m)_n$ 与Y和Z接触,由此形成 $Y-(A^1-A^2-A^3-A^4(A^5)_m)_n-Z$ ;

[0588] d) 使所述连接部分与所述脂质接触,由此形成脂质-连接部分缀合物;以及  
 [0589] e) 使步骤c)的所述 $Y-(A^1-A^2-A^3-A^4(A^5)_m)_n-Z$ 与步骤d)的所述脂质连接部分缀合物接触,由此形成肽-脂质缀合物。

[0590] 实施例94.一种制备根据实施例80至87中任一项所述的肽的方法,所述方法包括:

[0591] a) 使n个数量的 $-A^1-A^2-A^3-A^4(A^5)_m-$ 接触,由此形成 $(A^1-A^2-A^3-A^4(A^5)_m)_n$ ;以及

[0592] b) 使 $(A^1-A^2-A^3-A^4(A^5)_m)_n$ 与Y和Z接触,由此形成 $Y-(A^1-A^2-A^3-A^4(A^5)_m)_n-Z$ 。

[0593] 实施例95.一种制备根据实施例1至67中任一项所述的肽的方法,所述方法包括:

[0594] a) 使 $A^1$ 、 $A^2$ 、 $A^3$ 、 $A^4$ 以及m个数量的 $A^5$ 按顺序接触,由此形成 $A^1-A^2-A^3-A^4-(A^5)_m$ ;

[0595] b) 使n个数量的 $(A^1-A^2-A^3-A^4(A^5)_m)$ 接触,由此形成 $(A^1-A^2-A^3-A^4(A^5)_m)_n$ ;

以及

[0596] c) 使 $(A^1-A^2-A^3-A^4(A^5)_m)_n$ 与Y和Z接触,由此形成 $Y-(A^1-A^2-A^3-A^4(A^5)_m)_n-Z$ 。

[0597] 实例

[0598] 本公开在以下实例中进一步描述,所述实例不限制权利要求中所描述的本公开的范围。

[0599] 实例1:肽和示例性肽-脂质缀合物的合成

[0600] 肽合成

[0601] 通常,使用标准N-(9-氟烯基甲氧基羰基氧基)(Fmoc)保护基团(B)化学在肽合成仪上合成肽,并且在C18柱上用HPLC纯化肽。简言之,肽合成在Prelude X肽合成仪(蛋白质科技公司(Protein Technologies, Inc.;亚利桑那州图森市(Tucson, Arizona)在固相肽合成方案之后以线性方式使用Fmoc保护的氨基酸、Fmoc-Glu(OtBu)-OH、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Ser(tBu)-OH、Fmoc-Thr(tBu)-OH、Fmoc-Ser(Me)-OH、FmocThr(Me)-OH作为构建块试剂,并且使用N,N-二甲基甲酰胺、乙腈、乙醚和二氯甲烷作为各种步骤的溶剂。首先,将Fmoc-Pro-OH装载到2-ClTrityl树脂上(相对于树脂为0.6当量,4当量N,N-二异丙基乙胺(DIEA))。然后,使用20%哌啶(2×5分钟)对Fmoc脱保护。然后偶联7.5当量的所需Fmoc-AA、HCT作为活化剂和15当量NNM作为基础。使用双偶联方法25分钟和20分钟以确保完全偶联。对所有氨基酸重复Fmoc脱保护和双偶联步骤,并且直到合成所需肽。将树脂上的每种肽干燥并在环境温度下使用90体积% TFA、5体积% 硫代苯甲醚、2.5体积% H<sub>2</sub>O、1.5体积% 乙二硫醇和1体积% 苯酚的混合物从树脂中切割2小时。此外,使用250×21.2mm大小的Jupiter 10u Proteo柱(加利福尼亚州托伦斯的飞诺美公司(Phenomenex, Torrance, California))在反相高效液相色谱法(RP-HPLC)上纯化每种肽。使用0.1% TFA于H<sub>2</sub>O中的溶剂A和0.1% TFA于80%乙腈中的溶剂B的流动相,流动相B在20分钟内的梯度为18%至38%。使用15毫升/分钟的流速和214nm的UV检测波长。分析主要含产物级分,合并并去除溶剂以得到纯肽。

[0602] 为了从肽形成肽-脂质缀合物,将每种肽在N-末端胺处与(R)-2,3-双(十四烷酰基氧基)丙基(2,5-二氧化吡咯烷-1-基)琥珀酸酯(下文化合物3)偶联以得到最终DMG-SA-肽缀合物。简言之,将上述获得的线性肽和DMG-SA-NHS(N-羟基琥珀酰亚胺)(当量1:1.2)在2当量DIEA存在下溶解在DMF(二甲基甲酰胺)中过夜。然后将形成的产物(DMG-SA肽)沉淀在冷醚中。这些缀合物在C8柱上进一步纯化,并在没有任何另外的添加剂的情况下在Labconco冻干机(密苏里州堪萨斯城(Kansas City, Missouri))上在-80°C下冻干,以得到呈白色粉末的纯产物。最终产率在约60%至80%的范围内。选择本实例中所述的偶联反应

和缀合的脂质以提供本公开的缀合肽的概念证明,并且本领域普通技术人员将认识到本领域已知的用于与本公开的肽缀合的其它合适的偶联反应和脂质。另外,用于在其C-末端或在氨基酸侧链之一处偶联肽的方法是本领域众所周知的。

[0603] 本研究制备的示例性肽在下表1中列出。

[0604] 表1:合成的示例性肽

肽-脂质缀合物参考文献	序列 (在 N-末端至 C-末端方向上)	分子量
肽 2	X-STEPSTEPSTEPSTEP-OH	2270.13
肽 3	X-STEPSTEPSTEPSTEPSTEP-OH	2684.55
肽 5	X-S(Me)T(Me)QPS(Me)T(Me)QPS(Me)T(Me)QPS(Me)T(Me)QP-OH	2378.21
肽 6	X-S(Me)T(Me)QPS(Me)T(Me)QPS(Me)T(Me)QPS(Me)T(Me)QPS(Me)T(Me)QP-OH	2819.65
肽 7	X-STEPSTEPSTEPSTEP-NH <sub>2</sub>	2269.14
肽 8	X-S(Me)T(Me)QPS(Me)T(Me)QPS(Me)T(Me)QPS(Me)T(Me)QP-NH <sub>2</sub>	2377.22

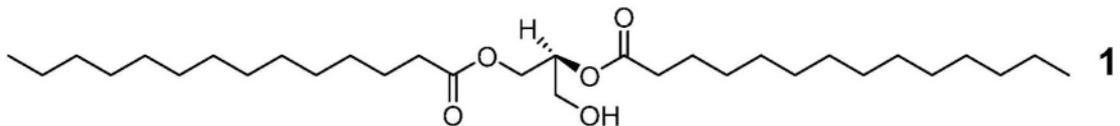
X =在下文方案 1 的化合物 3 偶联后的缀合脂质  
S =丝氨酸  
T =苏氨酸  
E =谷氨酸  
P =脯氨酸, 其中 P-OH 表示脯氨酸, 并且 P-NH<sub>2</sub> 表示脯酰胺, 其用于掩蔽 C-末端处的负电荷。  
S(Me) =甲基丝氨酸  
T(Me) =甲基苏氨酸  
Q =谷氨酰胺

[0606] DMG-肽缀合物的合成

[0607] 根据本文所述的合成方案1,使用与示例性脂质化合物(R)-2,3-双(十四烷酰基氧基)丙基(2,5-二氧代吡咯烷-1-基)琥珀酸(第3组)缀合的本文所述的肽制备示例性肽-脂质缀合物。

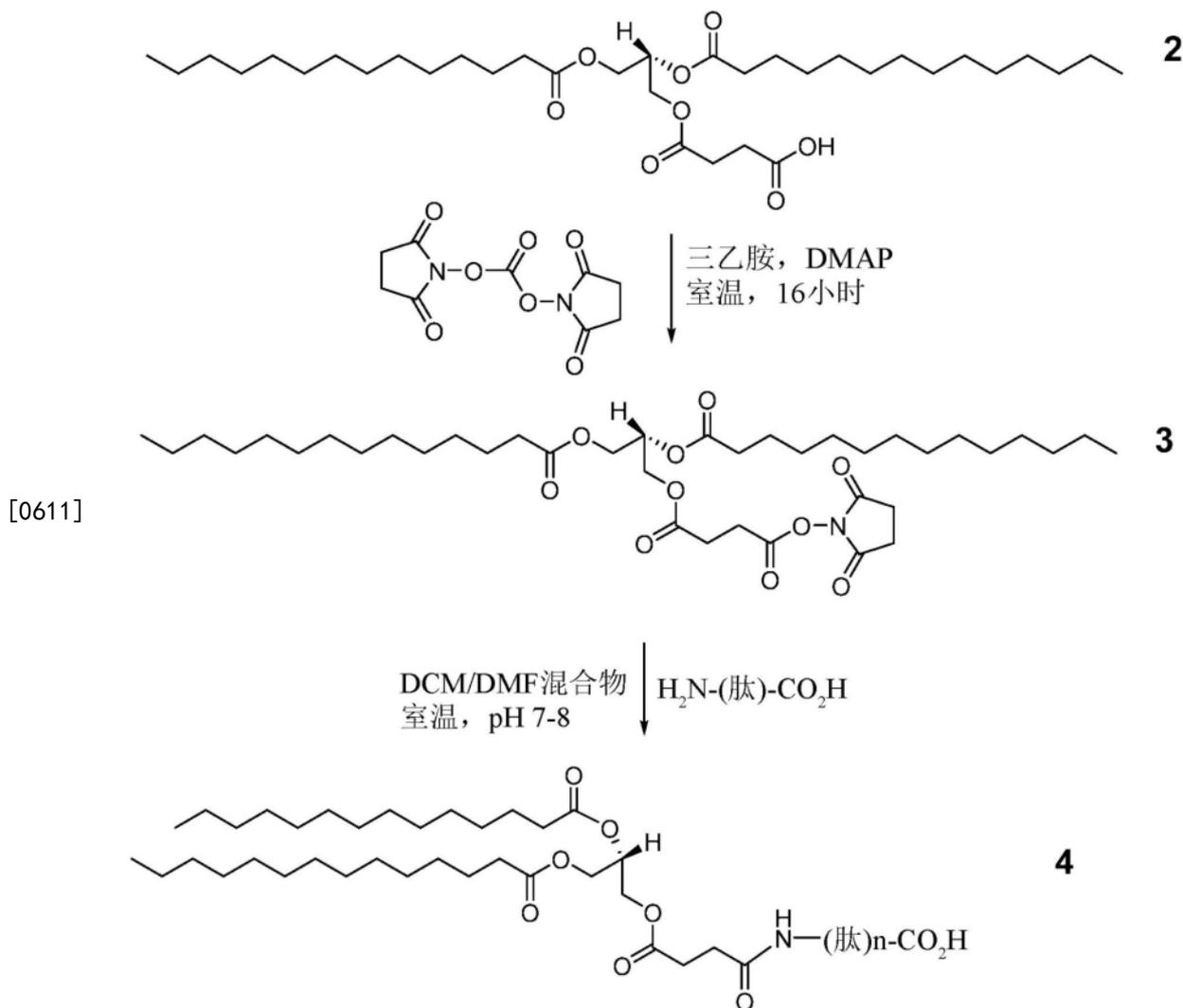
[0608] 方案1

[0609] DMG-肽缀合物的合成



[0610]





[0612] i. (R)-4-(2,3-双(十四烷酰基氧基)丙氧基)-4-氧代丁酸(方案1中的化合物2)

[0613] 在室温下,将琥珀酸酐(670mg,6.6mmol)和N,N-二甲基氨基吡啶(DMAP,1.0g,8.3mmol)添加到(S)-3-羟基丙烷-1,2-二基二(十四烷酸)酯(方案1中的化合物1,2.05g,4mmol)于40mL二氯甲烷中的溶液中。将此混合物在环境温度下搅拌16至18小时。添加1M水性盐酸等分试样(8.5mL)以淬灭反应。将混合物用20mL水稀释,并且分离有机层。将水层用另一40mL二氯甲烷萃取,并且将合并的有机溶液用1M水性HCl(1×100mL)洗涤,经无水硫酸钠干燥,并在减压下在转子蒸发器上浓缩。将所得半固体在高真空下经五氧化磷干燥,得到2.4g呈白色固体的产物。 $m/z$  612.46(计算值)M-H 611.7(观察值)。

[0614] ii. (R)-2,3-双(十四烷酰基氧基)丙基(2,5-二氧化吡咯烷-1-基)琥珀酸酯(方案1中的化合物3)

[0615] 向(R)-4-(2,3-双(十四烷酰基氧基)丙氧基)-4-氧代丁酸(8.8g,28.7mmol)、三乙胺(2.9g,19.6mmol)和80mg DMAP于160mL二氯甲烷中的混合物中添加碳酸琥珀酰亚胺酯(5.04g,19.6mmol),并将混合物在室温下搅拌16小时。添加两种当量的冰乙酸以淬灭反应。将混合物用另一100mL DCM稀释,并用冰冷水(2×300mL)洗涤,随后用盐水(1×300mL)洗涤。分离有机相,干燥(无水硫酸钠),并在减压下去除溶剂。将残余物在80g Teledyne ISCO 硅胶柱上使用二氯甲烷:乙酸乙酯梯度纯化。将以10%至12%乙酸乙酯浓度洗脱的级分合

并在减压下浓缩,得到9g呈白色固体的产物。 $m/z$  709.5 (计算值)M+Na 732.2 (观察值)。

[0616] iii.DMG-SA-(肽)肽合成(由方案1的化合物4说明)

[0617] 如本实例中所述的每种合成肽在N-末端胺处与(R)-2,3-双(十四烷酰基氧基)丙基(2,5-二氧代吡咯烷-1-基)琥珀酸酯偶联以得到最终DMG-SA-(肽)缀合物。这些缀合物在C8柱上进一步纯化并冻干以得到呈白色粉末的纯产物。

[0618] 实例2:脂质纳米颗粒制备方案

[0619] 在核酸-脂质调配物中测试本公开的肽-脂质缀合物。根据Ramawamy等人(《美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.U S A.)》2017年3月7日;114(10):E1941-E1950)描述的方法,通过将脂质的乙醇溶液与RNA的水溶液混合来制备包封FVII siRNA或人红细胞生成素(hEPO)mRNA的脂质纳米颗粒(LNP)。简言之,将脂质赋形剂(本公开的可电离脂质、DSPC、胆固醇和PEG2000-DMG或肽-脂质缀合物)以特定摩尔比溶解在乙醇中。RNA的水溶液在pH 3至4之间的柠檬酸盐缓冲液中制备。然后使用Nanoassembler微流体系统(加拿大不列颠哥伦比亚省温哥华的精密纳米系统公司(Precision NanoSystems,Vancouver,BC,Canada))以1:3(V/V)的流速比将脂质混合物与RNA溶液组合。由此形成的纳米颗粒通过切向流过滤(TFF)工艺纯化。然后使用100,000MWCO Amicon Ultra离心管(密理博西格玛公司(Millipore Sigma))将所得调配物的浓度调节至最终靶RNA浓度,随后通过0.2 $\mu$ m PES灭菌级过滤器过滤。过滤后,将散装调配物无菌填充到无菌艾本德(Eppendorf)管中,并在-70 $\pm$ 10 $^{\circ}$ C下冷冻。脂质纳米颗粒的分析表征包含使用动态光散射(ZEN3600,马尔文仪器公司(Malvern Instruments)测量粒径和多分散性,使用RiboGreen RNA试剂(赛默飞世尔科技公司(Thermo Fisher Scientific))通过荧光测定法测量RNA含量和包封效率。

[0620] 实例3:因子VII敲低评估的方案

[0621] 使用本实例的方案评价包括下文进一步描述的FVII siRNA的脂质调配物的敲低活性。在FVII评估中,七至八周龄的雌性Balb/C小鼠购自查尔斯河实验室(Charles River Laboratories)(加利福尼亚州霍利斯特(Hollister,CA))。将小鼠保持在无病原体的环境中,并且涉及小鼠的所有程序均根据机构动物护理和使用委员会(IACUC)建立的指南进行。含有因子VII siRNA的脂质纳米颗粒以10mL/kg和两个剂量水平(0.03mg/kg和0.01mg/kg)的给药体积静脉内施用。48小时后,用异氟烷麻醉小鼠,并且将血液逆轨道收集到涂覆有0.109M柠檬酸钠缓冲液(加利福尼亚州圣地亚哥的BD生物科学公司(BD Biosciences))的Microtainer<sup>®</sup>管中并处理成血浆。立即测试血浆样本的因子VII水平或储存在-80 $^{\circ}$ C下以供稍后分析。使用比色Biophen VII测定试剂盒(美国Aniara Diagnostica公司(Aniara Diagnostica,USA))测定血浆中FVII蛋白的测量。在405nm下测量吸光度,并且使用连续稀释的对照血浆生成校准曲线,以确定相对于盐水处理的对照动物,来自经处理的动物的血浆中因子VII的水平。

[0622] 实例4:hEPO mRNA表达评估的方案

[0623] 根据本实例的方案,评估包括以下hEPO mRNA的脂质调配物在体内表达hEPO的能力。所有动物实验均使用机构批准的方案(IACUC)进行。在本方案中,至少6至8周龄的雌性Balb/c小鼠购自查尔斯河实验室。通过尾静脉向小鼠静脉内注射具有两个剂量水平(0.1mg/kg和0.03mg/kg)之一的hEPO-LNP。6小时后,用血清分离管收集血液,并通过离心分离血清。然后使用ELISA测定法(马里兰州明尼阿波利斯的R&D系统公司(R&D Systems,

Minneapolis, MD) 人红细胞生成素Quantikine IVD ELISA试剂盒) 测量血清hEPO水平。

[0624] 实例5:生物分布和免疫染色方案

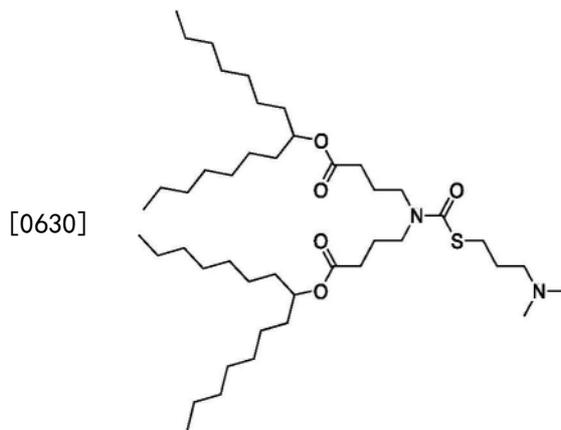
[0625] 评估本文所述的调配物的生物分布和免疫染色的研究按照本实例中所描述的方案进行。在本方案中,使用转基因floxed tdTomato小鼠。这些小鼠被工程化为具有编码tdTomato荧光报告基因蛋白的基因,但还包含基于CRE的终止盒(即,floxed盒),其防止tdTomato基因在不存在称为CRE重组酶(CRE)的蛋白质的情况下完全转录。floxed tdTomato小鼠进一步缺乏CRE基因。

[0626] 将总共六只floxed tdTomato小鼠分成三组,每组两只小鼠。对照组注射PBS,并且其余两个组注射含有CRE-tdTomato mRNA的LNP调配物。LNP调配物包含PEG-DMG或肽7。每组的一只小鼠接受静脉内(IV)注射,并且另一只小鼠接受肌肉(IM)注射。以1mg/kg mRNA和10mL/kg的体积向动物给药。在注射后72小时处死小鼠。对于通过IV注射给药的小鼠,移除包含肝脏、脾脏、肺、肾和心脏的器官。对于通过IM注射给药的小鼠,移除注射部位,包含左股骨直肌、右股骨直肌、肝脏和脾脏。将器官固定在10%中性缓冲福尔马林中,包埋到石蜡块中,并切割成5 $\mu$ m切片。使用tdTomato抗体对每个切片进行染色,并通过免疫组织化学进行二级检测。然后将切片与1:300稀释的生物素标记的抗兔(ab6801)一起温育,并使用抗生物素链球菌素-辣根过氧化物酶(HRP)(20774,密理博公司)和3,3'-二氨基联苯胺(DAB)底物(SK-4100,载体实验室(Vector Laboratories))染色。共聚焦免疫荧光显微镜用于收集样品的图像。

[0627] 用CRE mRNA-脂质调配物转染的小鼠的成功治疗程度由tdTomato蛋白的表达指示,因为此类小鼠能够生成切除floxed盒的CRE蛋白,从而允许tdTomato蛋白的表达。如图3所展示的,包含本文所述肽的LNP调配物能够有效地将mRNA递送到小鼠的器官。

[0628] 实例6:示例性脂质纳米颗粒调配物

[0629] 如上文实例2的方案所述制备包封FVII siRNA或hEPO mRNA的脂质纳米颗粒调配物。这些脂质纳米颗粒调配物包含可电离阳离子脂质(“Cat”)、辅助脂质(二硬脂酰基磷脂酰胆碱,“DSPC”)、胆固醇(“Chol”)和脂质-肽缀合物或PEG-脂质缀合物。选择这些调配物中使用的可电离阳离子脂质以提供可以用作比较的基础的共同脂质,然而本领域技术人员将认识到,本公开的脂质-肽缀合物可以与适用于脂质纳米颗粒调配物的任何阳离子脂质组合,以递送活性剂如核酸。这些调配物中使用的可电离阳离子脂质具有以下结构:



[0631] 如实例2中所述制备和表征示例性脂质纳米颗粒调配物,每种调配物的细节以及

所得特征在下表2中提供。在此表中，“N/P”是指从可电离阳离子脂质到包封的核酸的阴离子磷酸酯主链基团的阳离子氨基的比率。结果指示，本公开的肽-脂质缀合物很好地整合到脂质纳米颗粒调配物中，具有核酸的良好粒径、多分散性和包封百分比。

[0632] 表2: 示例性脂质纳米颗粒调配物

脂质组合物	核酸	直径 (nm)	多分散性	包封百分比
Cat:DSPC:Chol:肽 2-DMG (45:10:44:1), N/P 9	FVII siRNA	81.16	0.074	99.28
Cat:DSPC:Chol:肽 3-DMG (45:10:44:1), N/P 9	FVII siRNA	90.16	0.036	99.28
Cat:DSPC:Chol:肽 5-DMG (45:10:44:1), N/P 9	FVII siRNA	76.04	0.1	98.86
Cat:DSPC:Chol:肽 6-DMG (45:10:44:1), N/P 9	FVII siRNA	79.82	0.216	99.15
Cat:DSPC:Chol:肽 7-DMG (45:10:44:1), N/P 9	FVII siRNA	83.87	0.07	99.30
Cat:DSPC:Chol:肽 8-DMG (45:10:44:1), N/P 9	FVII siRNA	62.96	0.096	98.95
Cat:DSPC:Chol:肽 2-DMG (40:15:44:1), N/P 9	hEPO mRNA	74.01	0.127	98.9
Cat:DSPC:Chol:PEG200-DMG (40:15:44:1), N/P 9	FVII siRNA	70.71	0.3	98.8
Cat:DSPC:Chol:肽 3-DMG (40:15:44:1), N/P 9	hEPO mRNA	91.31	0.207	99
Cat:DSPC:Chol:肽 5-DMG (40:15:44:1), N/P 9	hEPO mRNA	85.11	0.131	93.8
Cat:DSPC:Chol:肽 6-DMG (40:15:44:1), N/P 9	hEPO mRNA	65.95	0.185	92.2

脂质组合物	核酸	直径 (nm)	多分散性	包封百分比
Cat:DSPC:Chol:肽 7-DMG (40:15:44:1), N/P 9	hEPO mRNA	73.21	0.15	95.2
Cat:DSPC:Chol:肽 8-DMG (40:15:44:1), N/P 9	hEPO mRNA	81.02	0.136	98.7
Cat:DSPC:Chol:PEG200-DMG (40:15:44:1), N/P 9	hEPO mRNA	77.77	0.26	96.3

[0635] 实例7: 体内EPO表达

[0636] 根据实例4中概述的方案,在0.1mg/kg和0.03mg/kg的mRNA浓度下评估肽-脂质缀合物中的每一个在递送hEPO mRNA用于体内表达方面的有效性。PEG2000-DMG调配物还在组合物的脂质部分的1%和1.5%的两个不同摩尔百分比下进行测试。此研究的结果在图1中示出。在0.1mg/kg水平下,肽2和肽5调配物与PEG2000-DMG调配物相当。肽6和肽7示出比PEG2000-DMG调配物显著更高的EPO表达,而肽3和肽8调配物示出比PEG2000-DMG调配物高得多的表达水平。这些结果表明,本公开的肽-脂质缀合物是脂质纳米颗粒中使用PEG缀合物的至少合适的替代方案,并且在一些实例中,在增强体内递送的mRNA的蛋白质表达水平

方面要优越得多。

[0637] 实例8:体内FVII敲低

[0638] 通过如上所述调配包封靶向敲低FVII的siRNA的脂质纳米颗粒,进一步评价肽-脂质缀合物在敲低因子VII (FVII敲低) 中的有效性。这些调配物在0.01mg/kg和0.03mg/kg的FVII siRNA剂量水平下进行测试。还测试了其它方面与脂质结构相同但使用1.0%或1.5% PEG2000-DMG以及磷酸盐缓冲盐水(PBS)阴性对照的比较调配物。相对于PBS表达归一化FVII表达水平的结果提供于图2中。可以看出,肽2示出与1% PEG-DMG调配物相当的表达水平。肽3、5、6、7和8均示出比1% PEG-DMG调配物更好的敲低活性,并且与1.5% PEG-DMG调配物相当。与1.5% PEG-DMG调配物相比,肽7在0.03mg/kg剂量水平下显示出特别改善的敲低。因此,本公开的肽-脂质缀合物是脂质纳米颗粒中使用PEG缀合物的至少合适的替代方案,并且在一些实例中,在增强体内递送和敲低活性方面要优越得多。

[0639] 实例9:另外的肽-脂质缀合物及其合成

[0640] 在该实例中设计和描述了另外的肽-脂质缀合物,如下表3和方案2至8中概述的。

[0641] 表3:另外的肽-脂质缀合物

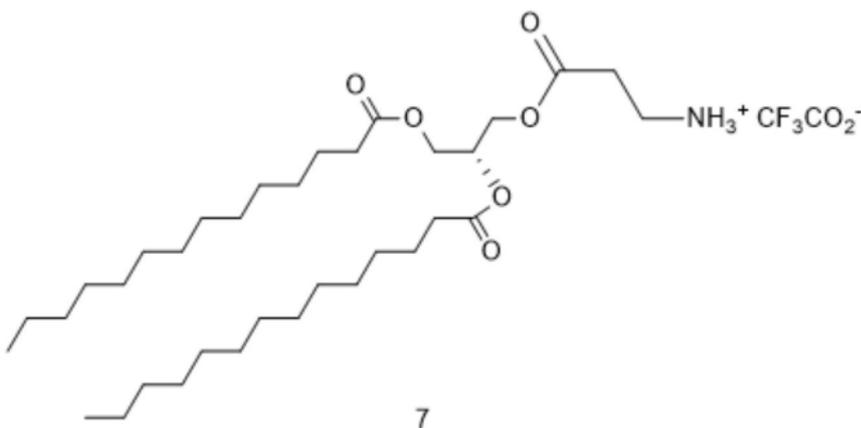
肽-脂质缀合物参考文献	序列（在 N-末端至 C-末端方向上）	分子量
肽 9	AcNH-STEPSTEPSTEPSTEP-X（化合物 X 在 C-末端处缀合，并且在 N-末端处用乙酰基封端）	2283.59
肽 10	AcNH-S(Me)T(Me)QPS(Me)T(Me)QPS(Me)T(Me)QPS(Me)T(Me)QP-X 化合物 X 在 C-末端处缀合，并且在 N-末端处用乙酰基封端）	2391.87
肽 11	X-STEP $\beta$ ASTEP $\beta$ ASTEP $\beta$ ASTEP-OH	2483,79
肽 12	X-S(Me)T(Me)QP $\beta$ AS(Me)T(Me)QP $\beta$ AS(Me)T(Me)QP $\beta$ AS(Me)T(Me)QP-OH	2592.07
肽 13	X-STEPSTEPSTEPSTEP-OH	2144.40
肽 14	X-S(Me)T(Me)QPS(Me)T(Me)QPS(Me)T(Me)QPS(Me)T(Me)QP-OH	2254.65
肽 15	X-STEPSTEPSTEPSTEP-OH	2269,57
肽 16	X-S(Me)T(Me)QPS(Me)T(Me)QPS(Me)T(Me)QPS(Me)T(Me)QP-OH	2377.85
肽 17	X-STEPSTEPSTEPSTEP-OH	2314.70
[0642] 肽 18	X-S(Me)T(Me)QPS(Me)T(Me)QPS(Me)T(Me)QPS(Me)T(Me)QP-OH	2422.70
肽 19	X-STEPSTEPSTEPSTEP-OH	2326.80
肽 20	X-S(Me)T(Me)QPS(Me)T(Me)QPS(Me)T(Me)QPS(Me)T(Me)QP-OH	2434.80
肽 21	X-STEPSTEPSTEPSTEP-OH	2382,90
肽 22	X-S(Me)T(Me)QPS(Me)T(Me)QPS(Me)T(Me)QPS(Me)T(Me)QP-OH	2490.90
<p>X = 如下文方案 2 至 8 中所提供的与肽缀合的化合物（例如，具有接头的脂质或具有接头的胆固醇等）。</p> <p>S = 丝氨酸 T = 苏氨酸 E = 谷氨酸 P = 脯氨酸，其中 P-OH 表示脯氨酸，并且 P-NH<sub>2</sub> 表示脯酰胺，其用于掩蔽 C-末端处的负电荷。</p> <p>S(Me) = 甲基丝氨酸 T(Me) = 甲基苏氨酸 Q = 谷氨酰胺 <math>\beta</math>A = <math>\beta</math>-丙氨酸</p>		

[0643] 方案2

[0644] 肽9和10的合成



[0648]



[0649] 方案2,步骤1: (R)-3-((3-((叔丁氧基羰基)氨基)丙酰基)氧基)丙烷-1,2-二基二(十四烷酸)酯(6)。

[0650] 将[(2R)-3-羟基-2-十四烷酰基氧基-丙基]十四烷酸酯(513mg, 1mmol)、3-(叔丁氧基羰基氨基)丙酸(227mg, 1.2mmol)、EDC·HCl(238mg, 1.3mmol)和三乙胺(0.21mL, 1.7mmol)混合在5mL二氯甲烷中并搅拌过夜。用另一5mL二氯甲烷稀释,并用1N HCl(1×10mL)洗涤,随后用水(1×10mL)洗涤,干燥(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>过滤并在减压下浓缩。将粗产物在硅胶柱(TELEDYNE ISCO金, 12g)上使用二氯甲烷/乙酸乙酯梯度(15分钟内0%至60%)纯化。收集以15%至20%乙酸乙酯浓度梯度洗脱的产物,分析并在减压下浓缩以得到540mg(79%)纯产物。m/z 684.0(计算值)M-H+Na 706.4(观察值)。

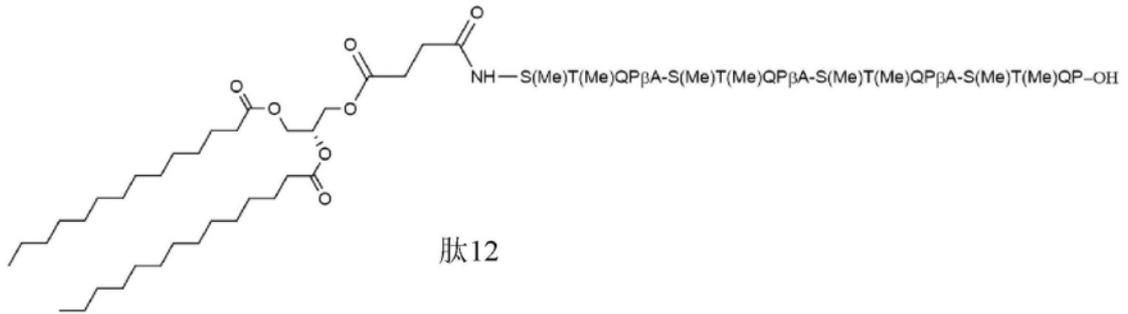
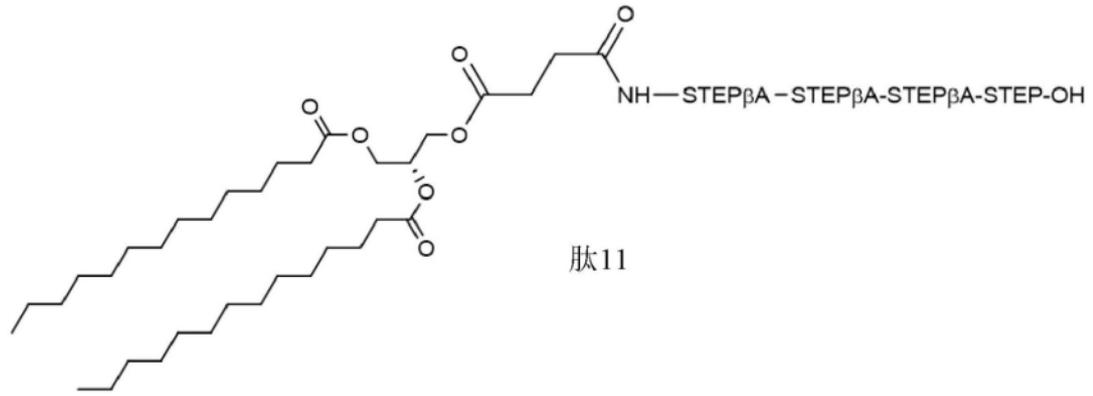
[0651] 方案2,步骤2: (R)-3-((3-氨基丙酰基)氧基)丙烷-1,2-二基二(十四烷酸)酯(7)。

[0652] 将Boc保护化合物[(2R)-3-[3-(叔丁氧基羰基氨基)丙酰基氧基]-2-十四烷酰基氧基-丙基]十四酸酯(500mg, 0.73mmol)在6mL二氯甲烷中获取,并添加4mL TFA。将混合物在室温下搅拌过夜。蒸发溶剂,并将残余物在硅胶柱上使用二氯甲烷/甲醇梯度(15分钟内0%至60%)纯化。收集以20%甲醇洗脱的产物,真空浓缩并干燥,得到用于与肽偶联的纯产物(360mg, 84%)。m/z 583.9(计算值)M 584.3(观察值)。

[0653] 化合物7可以使用标准偶联剂如二异丙基碳酰亚胺(DIC)和1-羟基苯并三唑(HOBt)试剂偶联至预先合成的STEP肽序列的C-末端,所述预先合成的STEP肽序列在N-末端处用乙酰基衍生,并且在谷氨酸侧链羧酸处用苄酯保护,如使用Boc-Glu(OBz)-OH的肽合成方案中已知的。如果在肽合成中使用Fmoc化学,则这些氨基酸侧链通常可以保护为叔丁基酯Fmoc-Glu(OtBu)-OH。最后,此类侧链保护基团可以在氢化条件下或使用甲酸或三氟乙酸去除,以获得粗肽9和10,所述粗肽可以在C4柱上纯化,如前所述。

[0654] 方案3

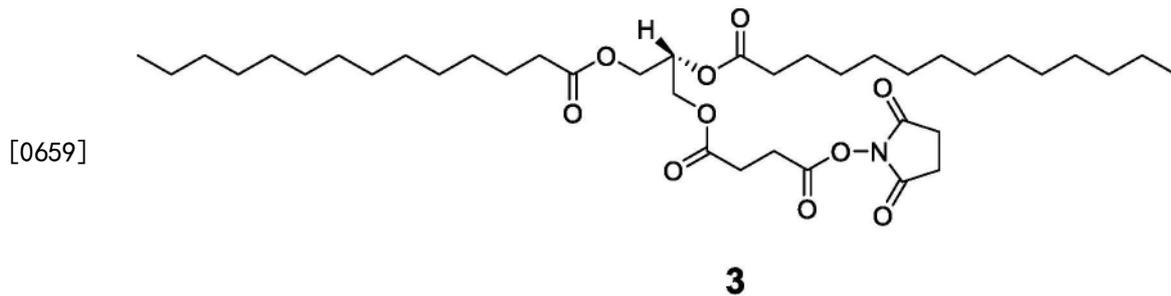
[0655] 肽11和12



$\beta$ A是 $\beta$ -丙氨酸- $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$

[0657] 肽11和12的中间体的合成

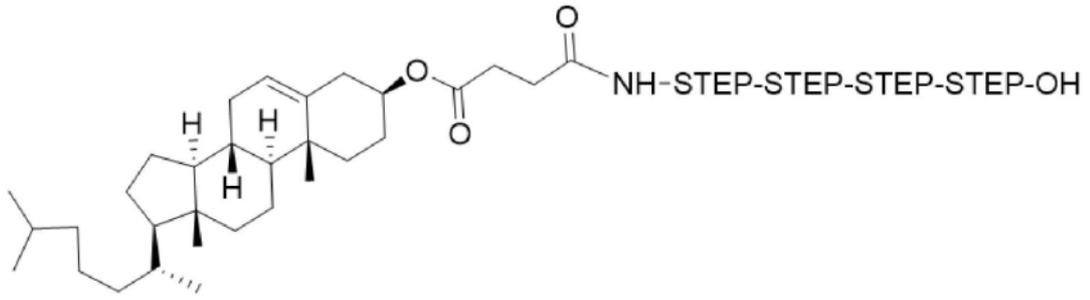
[0658] 肽11和12的中间体与实例1中提供的肽1-8相同,即如下所示的中间体3。



[0660] 可以合成在每个STEP或S(Me)T(Me)QP片段的C-末端处含有另外的 $\beta$ -丙氨酸的肽,如针对肽11和12所示,并且此类肽的N-末端可以按照针对实例1的肽1-8开发的方案偶联至3,以获得粗肽11和12,其可以在C4疏水相互作用柱上纯化,如前所述。

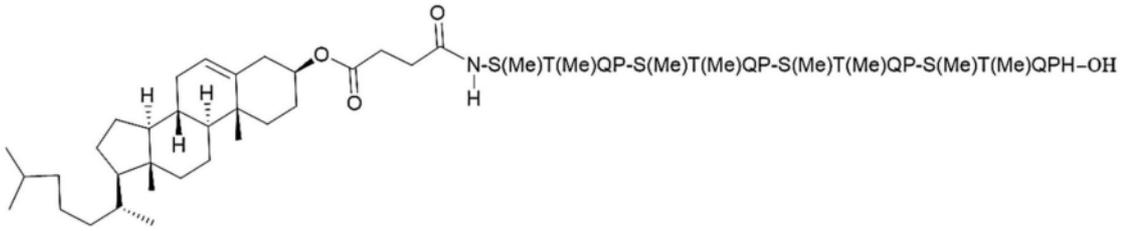
[0661] 方案4

[0662] 肽13和14(胆固醇缀合物)



[0663]

肽13



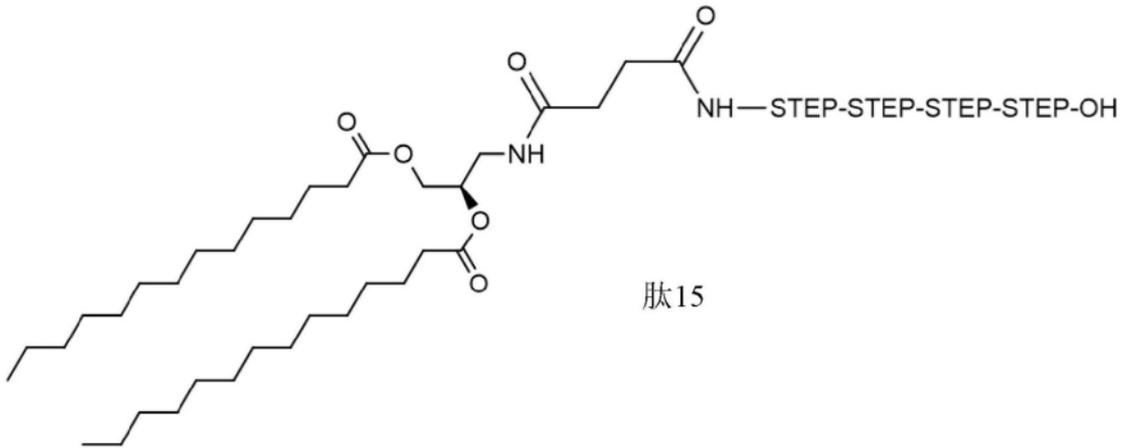
肽14

[0664] 可商购获得的胆固醇NHS半琥珀酸盐 (CAS#88848-79-7) 可以因此用于纯肽的偶联,以按照针对实例1的肽1-8建立的偶联方案获得肽13和肽14。

[0665] 方案5

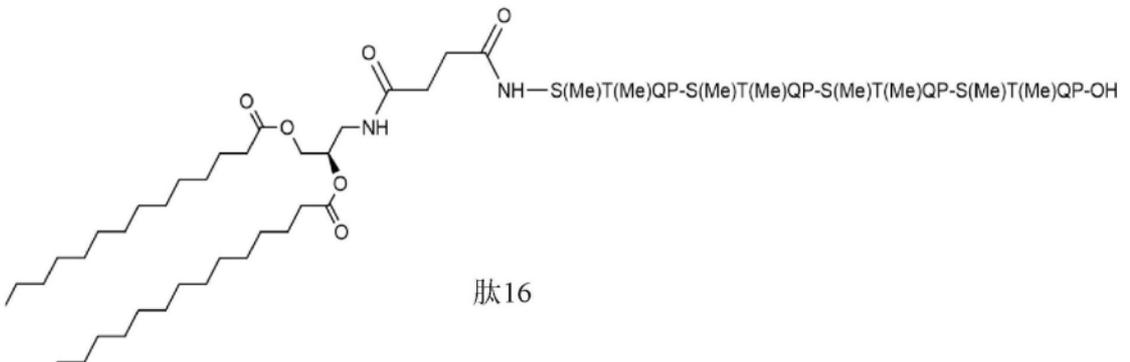
[0666] 肽15和16

[0667]



肽15

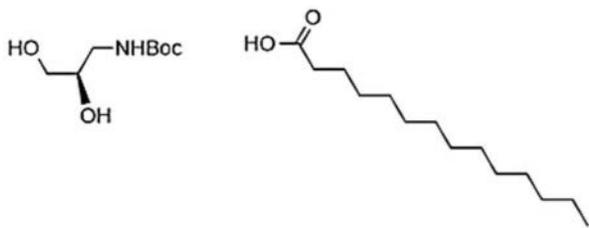
[0668]



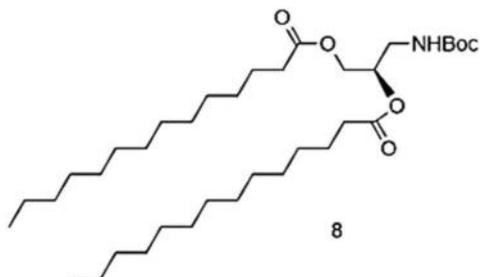
肽16

[0669] 肽15和16的中间体的合成

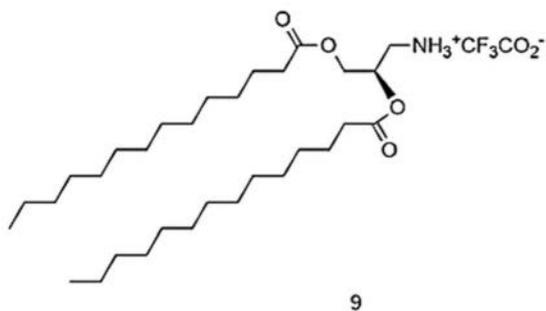
[0670]



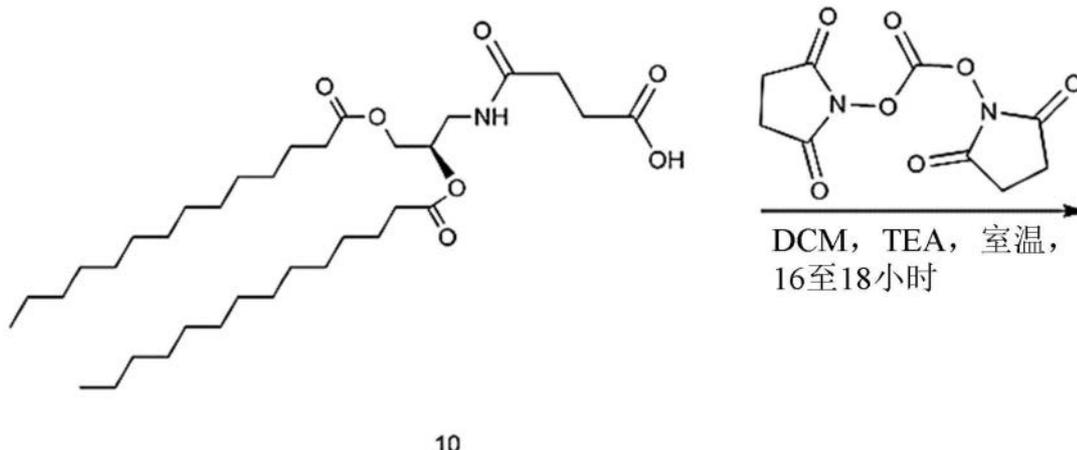
EDC.HCl/三乙胺  
16-18小时, 室温



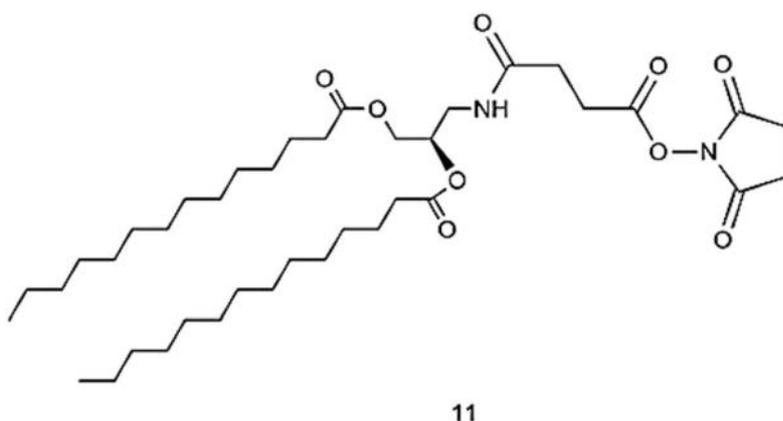
TFA:DCM (40:60 v/v)  
室温, 4小时



琥珀酸酐, 三乙胺,  
室温, 16至18小时



[0671]



[0672] 方案5,步骤1: (R)-3-((叔丁氧基羰基)氨基)丙烷-1,2-二基二(十四烷酸)酯 (8)。

[0673] 向N-[(2R)-2,3-二羟丙基]氨基甲酸叔丁酯 (0.5g, 2.6mmol) 于二氯甲烷 (12mL) 中的溶液中添加十四酸 (1.8g, 7.8mmol)、EDC (1.1g, 5.5mmol), 随后添加三乙胺 (0.82mL, 5.9mmol)。将混合物在室温下搅拌过夜。将溶液用二氯甲烷 (15mL) 稀释, 并用1N HCl (2×15mL)、水 (2×15mL) 洗涤, 干燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 过滤并在减压下蒸发。将残余物在硅胶柱上使用己烷/乙酸乙酯纯化。产物以30%乙酸乙酯洗脱。m/z 611.9 (计算值) M-H+Na634.4 (观察值)。

[0674] 方案5,步骤2: (R)-3-氨基丙烷-1,2-二基二(十四烷酸)酯 (9)。

[0675] 将IK473 (1.4g) 在40% TFA在二氯甲烷 (V/V) 中的溶液在室温下搅拌4小时。TLC分析显示反应完成。将溶剂在减压下蒸发, 并且将所获得的材料如此用于下一反应中, 无需进一步纯化。m/z 511.8 (计算值) M 512.4 (观察值)。

[0676] 方案5,步骤3: (R)-4-((2,3-双(十四烷酰基氧基)丙基)氨基)-4-氧代丁酸 (10)。

[0677] 向9在二氯甲烷中的溶液中添加[(2R)-3-氨基-2-十四烷酰基氧基-丙基]十四烷酸酯, 随后添加四氢呋喃-2,5-二酮和二异丙乙胺, 并将混合物在室温下搅拌过夜。TLC (10% 甲醇/二氯甲烷) 在碘/硅胶处理后显示出两个更快的移动斑点。蒸发并加载到TELEDYNE ISCO金硅胶柱上, 并在15分钟内用0%至60%甲醇梯度/二氯甲烷洗脱。分离洗脱的级分, 分析, 合并, 并在减压下蒸发。m/z 611.9 (计算值) M-H+Na 634.4 (观察值)。

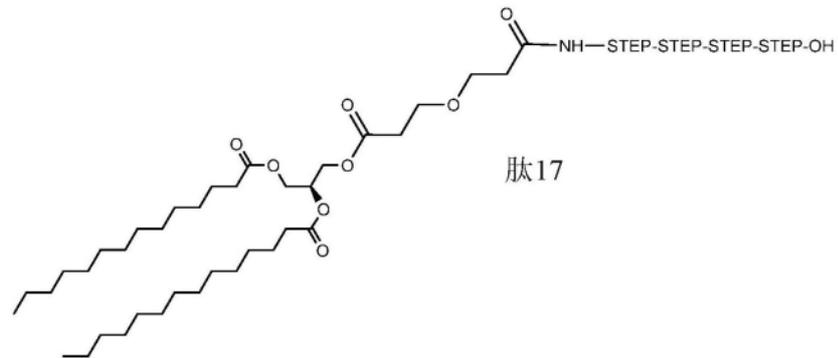
[0678] 方案5,步骤4: (R)-3-(4-((2,5-二氧代吡咯烷-1-基)氧基)-4-氧代丁酰胺基)丙烷-1,2-二基二(十四烷酸)酯 (11)。

[0679] 向4-[[ (2R) - 2,3-二(十四烷酰基氧基)丙基]氨基]-4-氧代-丁酸(404mg, 0.66mmol)于4ml二氯甲烷中的溶液中添加碳酸双(2,5-二氧代吡咯烷-1-基)酯(338mg, 1.3mmol),随后添加三乙胺(0.23mL,1.7mmol)。将混合物搅拌过夜并用二氯甲烷(4mL)稀释,用冰冷水(10mL)洗涤,分离二氯甲烷溶液并用 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 干燥,过滤,并在减压下蒸发。将粗产物装载到具有3mL二氯甲烷的12g Teledyne ISCO金柱上,并在15分钟内用0%至60% EtOAc/己烷梯度洗脱。将含有级分的产物合并,减压浓缩,并干燥,得到360mg(77%)呈白色固体的产物。 $m/z$  709(计算值)M-H 708.1(观察值)。

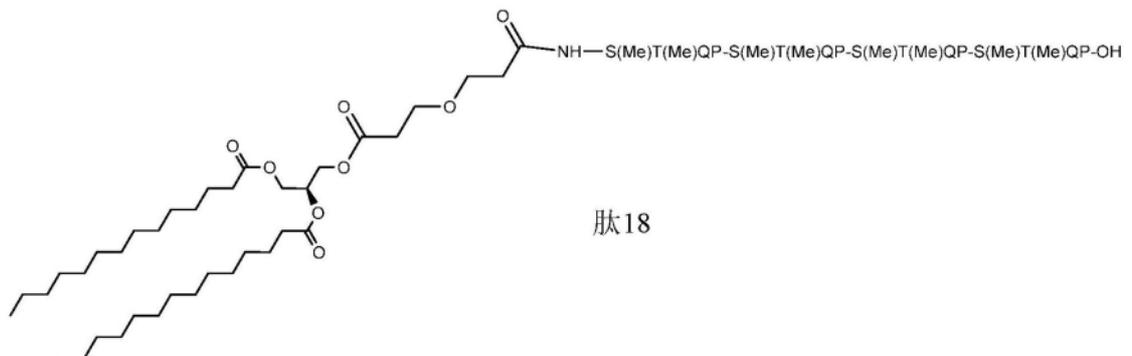
[0680] 中间体11可以用于在N-末端处的肽偶联,按照为肽1-8开发的方案以获得肽15和肽16。

[0681] 方案6

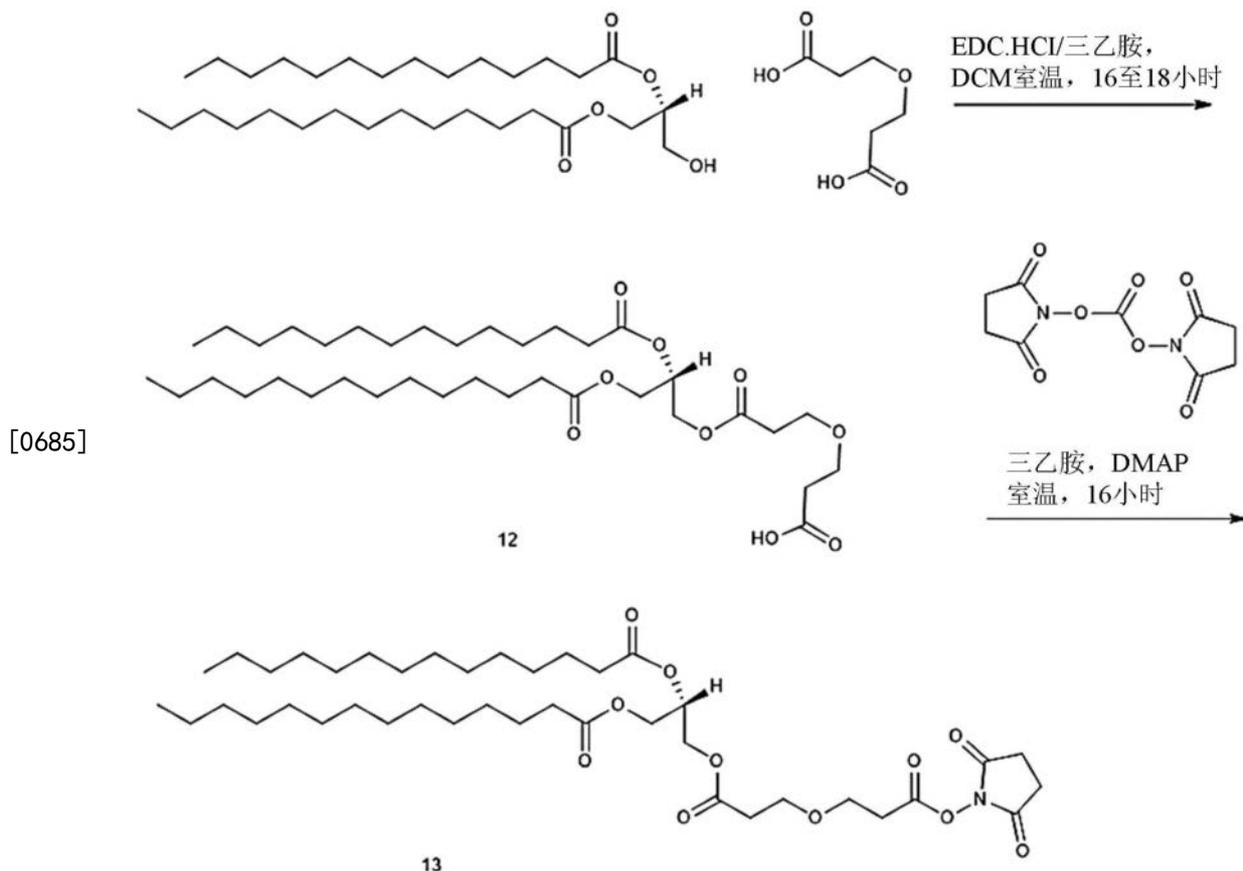
[0682] 肽17和18



[0683]



[0684] 肽17和18的中间体的合成



[0686] 方案6,步骤1:(S)-3-(3-(2,3-双(十四烷酰基氧基)丙氧基)-3-氧代丙氧基)丙酸(12)。

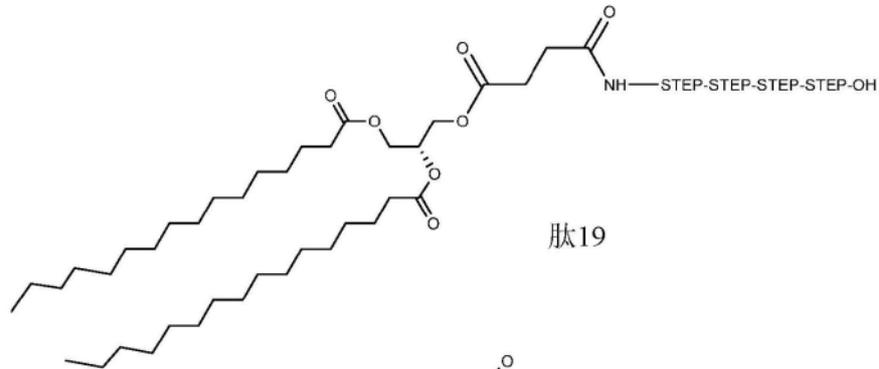
[0687] 将2g(3.9mmol)的[(2R)-3-羟基-2-十四烷酰基氧基-丙基]十四烷酸酯、561mg(2.9mmol)的EDC.HCl、0.82mL(1.5mmol)的三乙胺和474mg(0.75mmol)的3-(2-甲氧基乙氧基)丙酸于10mL二氯甲烷中的混合物在室温下搅拌过夜。将混合物用5mL二氯甲烷稀释,并用10mL水洗涤,随后用盐水(10mL)洗涤,经无水硫酸钠干燥,过滤,并在减压下浓缩。将粗产物在硅胶柱(Teledyne ISCO金12g)上用二氯甲烷/乙酸乙酯梯度(0%至100%乙酸乙酯)纯化,并且收集产物以40%乙酸乙酯洗脱并在减压下浓缩,得到1.2g(47%)产物。 $m/z$  656.4(计算值)M-H 655.2(观察值)。

[0688] 方案6,步骤2:(S)-3-((3-(3-((2,5-二氧代吡咯烷-1-基)氧基)-3-氧代丙氧基)丙酰基)氧基)丙烷-1,2-二基二(十四烷酸)酯(13)。

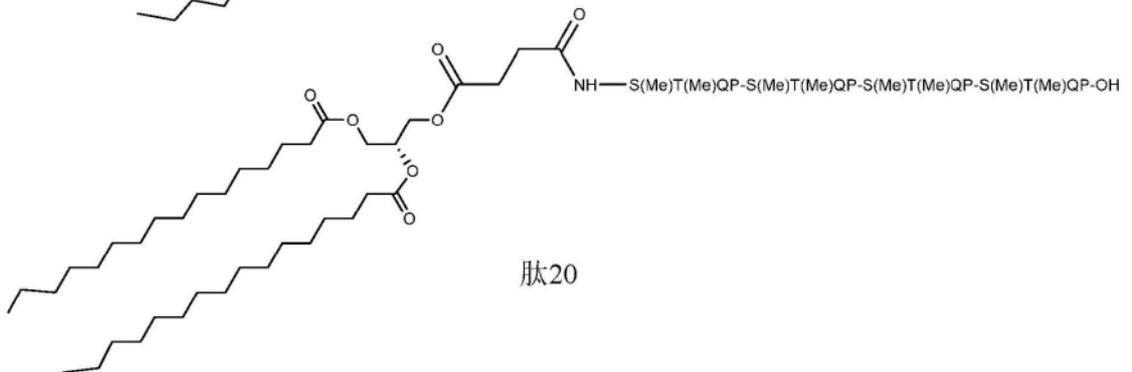
[0689] 将3-[3-[(2S)-2,3-二(十四烷酰基氧基)丙氧基]-3-氧代-丙氧基]丙酸(525mg, 0.80mmol)、碳酸双(2,5-二氧代吡咯烷-1-基)酯(409mg, 1.6mmol)和三乙胺(0.28mL, 2mmol)在4mL二氯甲烷中的混合物搅拌过夜。将反应混合物用二氯甲烷(4mL)稀释,并用冰冷水(10mL)洗涤,分离二氯甲烷溶液并用 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 干燥,过滤并蒸发。将粗产物装载到具有3mL二氯甲烷的12g Teledyne ISCO金柱上,并在15分钟内用0%至60%乙酸乙酯/己烷梯度洗脱。收集以20%至25%乙酸乙酯洗脱的产物,在减压下浓缩,并在真空下干燥,得到350mg(58%)纯产物。 $m/z$  754.0(计算值)M-H+Na 776.2(观察值)。

[0690] 中间体13用于制备肽17和肽18,按照如实例1中所述的用于肽1-8的偶联和纯化方案。

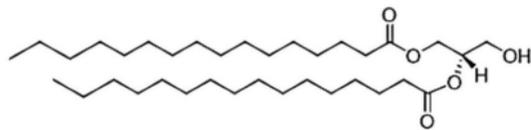
- [0691] 肽17:HPLC纯度92%。质量:2314.7(计算值),2314.8(观察值)。
- [0692] 肽18:HPLC纯度100%。质量:2422.7(计算值),2422.8(观察值)。
- [0693] 方案7
- [0694] 肽19和20



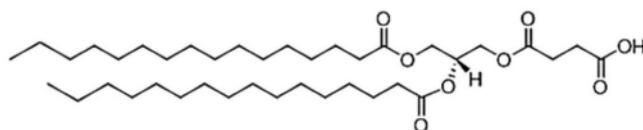
[0695]



[0696] 肽19和20的中间体的合成

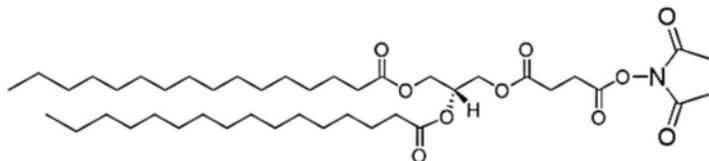


琥珀酸酐,  
DMAP, DCM,  
室温16至18小时



碳酸二琥珀酰亚胺三乙胺,  
DCM, 室温, 16至18小时

[0697]



[0698] 方案7,步骤1:(R)-4-(2,3-双(棕榈酰氧基)丙氧基)-4-氧代丁酸(15)。

[0699] 在保持在冰浴中的氩气下,向1,2-二棕榈酰-sn-甘油(2g,3.2mmol)于40mL无水二

氯甲烷于200mL RB烧瓶中的悬浮液中添加563mg (5.6mmol) 琥珀酸酐, 随后添加902mg (7.4mmol) DMAP。使混合物达到室温并在室温下搅拌过夜。TLC分析 (10% 甲醇/二氯甲烷) 显示较慢的移动斑点以及底部处的DMAP。将混合物用1N HCl (3×30mL)、水和盐水 (各100ml) 洗涤, 干燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 过滤并蒸发。用甲醇/二氯甲烷梯度以12% 至15% 甲醇洗脱产物进行柱纯化 (Teledyne ISCO 40g)。级分的浓度得到2g (85%) 呈白色固体的产物。m/z 668.5 (计算值) M-H 667.5 (观察值)。

[0700] 方案7, 步骤2: (R) -2,3-双(棕榈酰氧基)丙基(2,5-二氧代吡咯烷-1-基)琥珀酸酯(16)。

[0701] 向4-[(2R)-2,3-二(十六烷酰氧基)丙氧基]-4-氧代-丁酸(2g, 3mmol)、三乙胺(0.83mL, 6mmol)和DMAP(50mg, cat.)于40mL无水二氯甲烷中的混合物中添加碳酸双(2,5-二氧代吡咯烷-1-基)酯(1.15g, 4.5mmol)并将混合物在室温下搅拌过夜。添加两种当量的乙酸以淬灭反应。将混合物用二氯甲烷稀释,并用冰冷水(2×80mL)洗涤,随后用盐水(80mL)洗涤,干燥(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)并在减压下蒸发。将残余物在硅胶柱(Teledyne ISCO 40)上使用二氯甲烷:乙酸乙酯梯度(30分钟内0%至40%)纯化。产物洗脱出10%至12%乙酸乙酯。在旋转蒸发器下去除溶剂,并将获得的白色固体在真空下干燥,得到1.6g产物。m/z 765.5 (计算值) M+H 788.5 (观察值)。

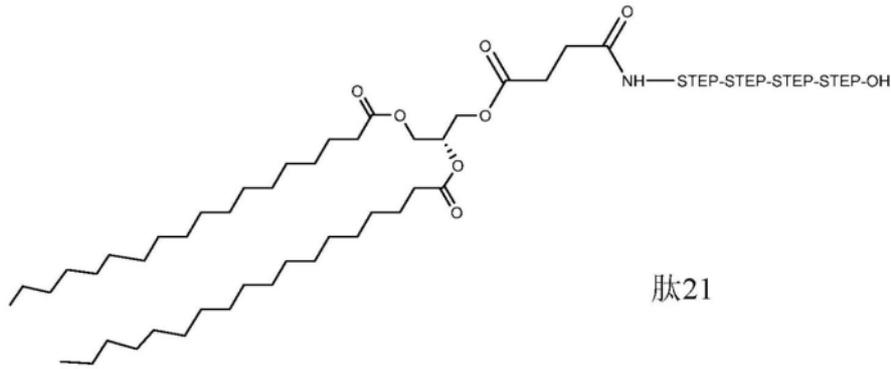
[0702] 中间体16用于制备肽19和肽20,按照如实例1中所述的用于肽1-8的偶联和纯化方案。

[0703] 肽19:质量:2326.8 (计算值), 2326.0 (观察值)。

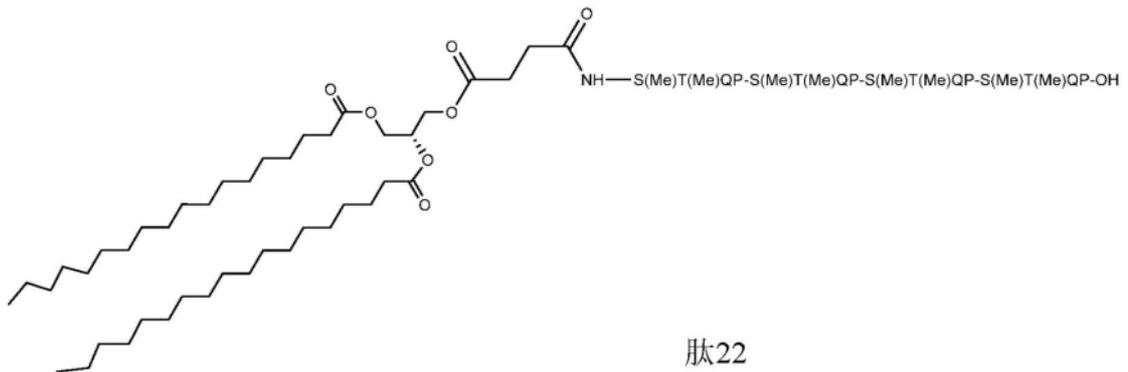
[0704] 肽20:质量:2434.8 (计算值), 2434.0 (观察值)。

[0705] 方案8

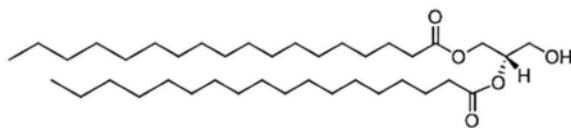
[0706] 肽21和22



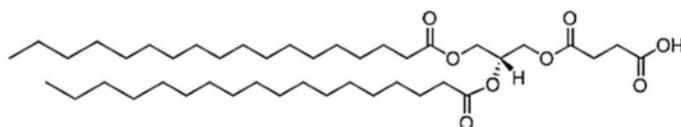
[0707]



[0708] 肽21和22的中间体的合成

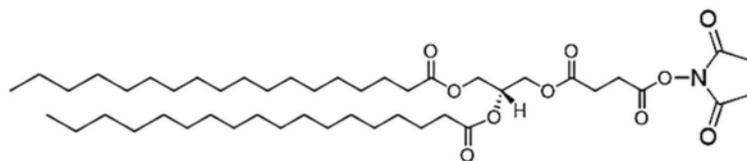


琥珀酸酐，  
DMAP，DCM，  
室温16至18小时



碳酸二琥珀酰亚胺三乙胺，  
DCM，室温，16至18小时

[0709]



[0710] 方案8,步骤1: (R) -4-(2,3-双(硬脂酰氧基)丙氧基)-4-氧代丁酸(18)。

[0711] 在保持在冰浴中的氩气下,向(S)-3-羟基丙烷-1,2-二基二硬脂酸酯(2g, 3.2mmol)于40mL无水二氯甲烷于200mL RB烧瓶中的悬浮液中添加512mg(5.6mmol)琥珀酸酐,随后添加821mg(7.4mmol)DMAP。使混合物达到室温并在室温下搅拌过夜。TLC分析(10%甲醇/二氯甲烷)显示较慢的移动斑点以及底部处的DMAP。将混合物用1N HCl(3×30mL)、水

和盐水(100ml乙酸乙酯)洗涤,干燥( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ),过滤并蒸发。用甲醇/二氯甲烷梯度以12%至15%甲醇洗脱产物进行柱纯化(Teledyne ISCO 80g)。级分的浓度得到2g(86%)呈白色固体的产物。 $m/z$  724.5(计算值)M-H 723.5(观察值)。

[0712] 步骤2: (R)-2,3-双(硬脂酰氧基)丙基(2,5-二氧代吡咯烷-1-基)琥珀酸酯(19)。

[0713] 向(R)-4-(2,3-双(硬脂酰氧基)丙氧基)-4-氧代丁酸(2g, 2.8mmol)、三乙胺(0.77mL, 5.5mmol)和DMAP(50mg, cat.)于30mL无水二氯甲烷中的混合物中添加碳酸双(2,5-二氧代吡咯烷-1-基)酯(1.1g, 4.1mmol),并将混合物在室温下搅拌过夜。添加两种当量的乙酸以淬灭反应。将混合物用二氯甲烷稀释,并用冰冷水( $2 \times 80\text{mL}$ )洗涤,随后用盐水(80mL)洗涤,干燥( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )并在减压下蒸发。将残余物在硅胶柱(Teledyne ISCO 40)上使用二氯甲烷:乙酸乙酯梯度(30分钟内0%至40%)纯化。产物洗脱出10%至12%乙酸乙酯。在旋转蒸发器下去除溶剂,并且干燥获得的白色固体,得到1.5g(66%)产物。 $m/z$  822.5(计算值)M+Na 845.5(观察值)。

[0714] 中间体19用于制备肽21和肽22,按照如实例1中所述的用于肽1-8的偶联和纯化方案。

[0715] 肽21:质量:2382.9(计算值),2382.0(观察值)。

[0716] 肽22:质量:2490.9(计算值),2491.0(观察值)。

[0717] 所使用的缩写

[0718] DCM:二氯甲烷

[0719] DMAP:N,N-二甲基吡啶

[0720] DMG:二肉豆蔻酰甘油

[0721] DPG:二棕榈酰基甘油

[0722] DSG:二硬脂酰甘油

[0723] EA:乙酸乙酯

[0724] EDC.HCl:1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐

[0725] HCl:盐酸

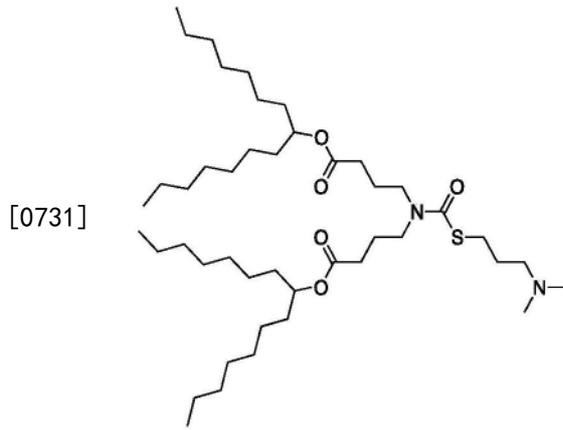
[0726] TEA:三乙胺

[0727] TFA:三氟乙酸

[0728] TLC:薄层色谱法

[0729] 实例10:另外的肽-脂质缀合物及其合成

[0730] 将来自实例9的所选肽-脂质缀合物调配成脂质纳米颗粒,并且按照实例2中描述的方法和方案进行表征。如下表4的数据所示,脂质纳米颗粒显示出良好的粒径、分散和包封。这些脂质纳米颗粒调配物包含可电离阳离子脂质(“Cat”)、辅助脂质(二硬脂酰基磷脂酰胆碱,“DSPC”)、胆固醇(“Chol”)和指示的脂质-肽缀合物或。选择这些调配物中使用的可电离阳离子脂质以提供可以用作比较的基础的共同脂质,然而本领域技术人员将认识到,本公开的脂质-肽缀合物可以与适用于脂质纳米颗粒调配物的任何阳离子脂质组合,以递送活性剂如核酸。这些调配物中使用的可电离阳离子脂质具有以下结构:



[0732] 如实例2中所述制备和表征脂质纳米颗粒调配物,每种调配物的细节以及所得特征在下表4中提供。在此表中,“N/P”是指从可电离阳离子脂质到包封的核酸的阴离子磷酸酯主链基团的阳离子氨基的比率。结果指示,本公开的肽-脂质缀合物很好地整合到脂质纳米颗粒调配物中,具有核酸的良好粒径、多分散性和包封百分比。

[0733] 根据实例7中概述的方案进一步测试调配物的hEPO表达的体内测量。

[0734] 表4:所选肽的调配数据

[0735]

脂质组合物	核酸	直径 (nm)	多分散性	包封百分比
Cat:DSPC:Chol:肽 17 摩尔比 40:15:44:1; N/P = 9	hEPO mRNA	60,19	0.194	94.6
Cat:DSPC:Chol:肽 18 摩尔比 40:15:44:1; N/P = 9	hEPO mRNA	54,26	0.25	93.5
Cat:DSPC:Chol:肽 19 摩尔比 40:15:44:1; N/P = 9	hEPO mRNA	67.22	0.179	94.8
Cat:DSPC:Chol:肽 20 摩尔比 40:15:44:1; N/P = 9	hEPO mRNA	55.37	0.211	84.4
Cat:DSPC:Chol:肽 21 摩尔比 40:15:44:1; N/P = 9	hEPO mRNA	88.29	0.174	91
Cat:DSPC:Chol:肽 22 摩尔比 40:15:44:1; N/P = 9	hEPO mRNA	55.31	0.22	89.4

[0736] 另外的考虑因素

[0737] 提供前述描述以使本领域技术人员能够实践本文所描述的各种配置。虽然已经参考各种附图和配置具体描述了本主题技术,但是应当理解,这些仅用于说明目的并且不应被视为限制本主题技术的范围。

[0738] 此外,就描述或权利要求中使用的术语“包含”、“具有”等而言,此类术语旨在以类似于术语“包括”的方式具有包容性,因为“包括”是在权利要求中用作过渡词时被解释。

[0739] 在一个或多个方面,术语“约”、“基本上”和“大约”可以针对其对应术语和/或物品之间的相对性提供行业可接受的公差,例如小于百分之一至5%。

[0740] 除非特别说明,否则对单数元素的引用并不意味着“一个且只有一个”,而是“一个或多个”。男性代词(例如,他的(his))包含女性和中性性别(例如,她的(her)和它的(it)),反之亦然。术语“一些”是指一个或多个。带下划线和/或斜体的标题和副标题仅为方便起见,不限制主题技术,并且不与主题技术描述的解释相关联。贯穿本公开所描述的各种配置

的元件的所有结构和功能等效物,其为本领域普通技术人员已知的或以后将知晓的,均通过引用明确地并入本文并且旨在被本主题技术所涵盖。此外,本文所公开的任何内容均不旨在为公众提供,无论该公开内容是否在上述描述中明确记载。

[0741] 尽管详细描述包含许多细节,但这些不应被解释为限制主题技术的范围,而仅仅是说明主题技术的不同实施例和方面。应当理解,本主题技术的范围包括以上未详细讨论的其它实施方式。在不脱离本公开的范围的情况下,可以在本文公开的主题技术的方法和设备的布置、操作和细节中进行各种其它修改、改变和变化。除非另外表达,否则单数中对元素的提及不旨在意指“一个且仅一个”,除非明确陈述,而是旨在意指“一个或多个”。另外,为了涵盖在本公开的范围,组合物或方法没有必要解决通过本公开的不同实施例可解决的每个问题(或拥有可实现的每个优点)。本文中“可以”及其派生词的使用应理解为“可能”或“任选地”的意思,与肯定的能力相反。

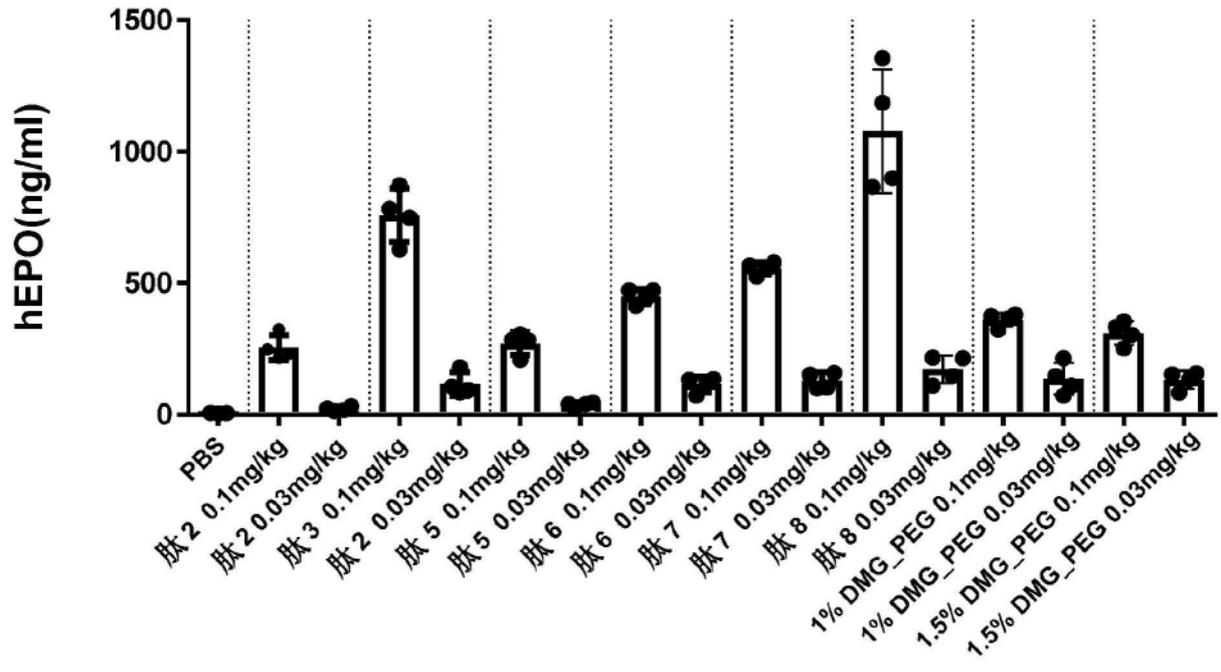


图1



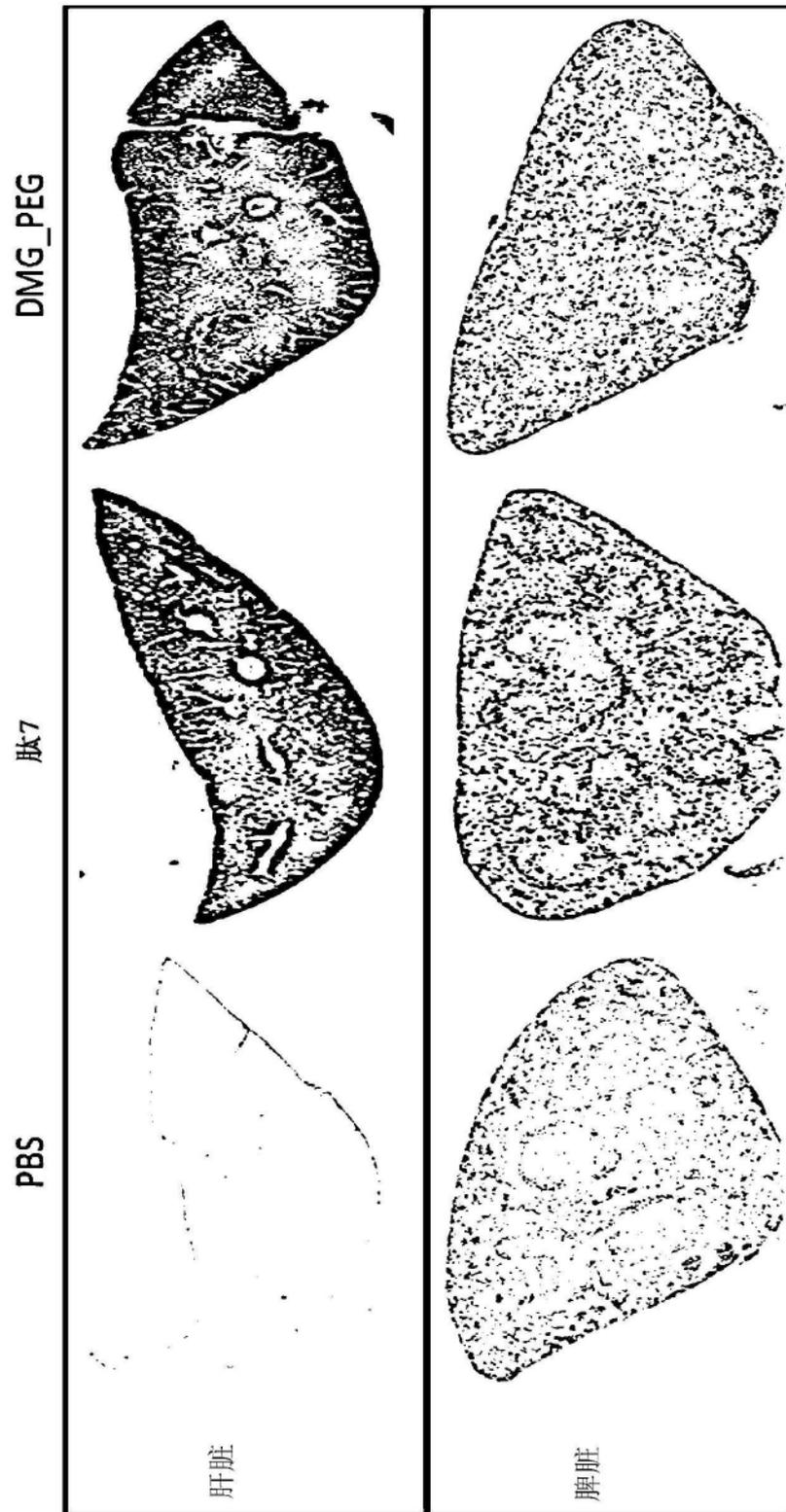


图3