



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102216462 A

(43) 申请公布日 2011. 10. 12

(21) 申请号 200980145887. 0

C07J 9/00 (2006. 01)

(22) 申请日 2009. 07. 31

(30) 优先权数据

61/115, 307 2008. 11. 17 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 05. 17

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2009/052462 2009. 07. 31

(87) PCT申请的公布数据

W02010/056403 EN 2010. 05. 20

(71) 申请人 安龙制药公司

地址 美国新泽西州

(72) 发明人 赵洪 彦魏丽 史连军 乌德春

(74) 专利代理机构 北京市兰台律师事务所

11354

代理人 张峰

(51) Int. Cl.

C12N 15/88 (2006. 01)

权利要求书 14 页 说明书 54 页

序列表 5 页 附图 3 页

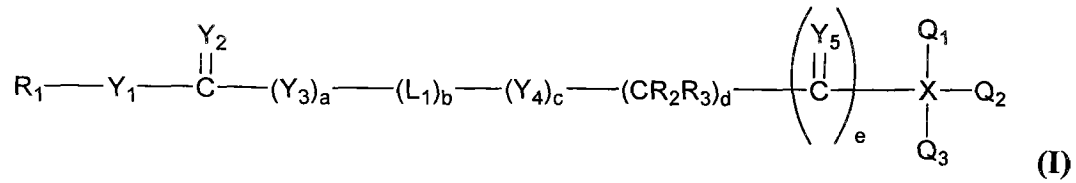
(54) 发明名称

用于核酸递送系统的支化阳离子脂质

(57) 摘要

本发明涉及用于寡核苷酸递送的阳离子脂质和使用纳米颗粒组合物调控靶基因表达的方法。特别地, 本发明涉及通过支化间隔基而具有多个带正电荷的部分的胆固醇及其衍生物, 以及包封在阳离子脂质、促融合脂质和 PEG 脂质的混合物中的寡核苷酸的纳米颗粒组合物。

1. 一种式 (I) 的阳离子脂质：



其中

R_1 是胆固醇或其类似物；

Y_1 、 Y_2 和 Y_5 独立地是 O、S 或 NR_4 ；

Y_3 和 Y_4 独立地是 O、S 或 NR_5 ；

L_1 是具有取代的饱和或不饱和、支链或线性的 C_{3-50} 烷基的间隔基团，其中一个或多个碳被 NR_6 、O、S 或 $\text{C}(=\text{Y})$ 替代，其中 Y 是 O、S 或 NR_4 ；

(a)、(c) 和 (e) 独立地是 0 或 1；

(b) 是 0 或正整数，条件是当 (b) 为 0 时，(a) 和 (c) 不同时为正整数；

(d) 是 0 或正整数；

X 是 C 或 P；

Q_1 是 H、 C_{1-6} 烷基、 NH_2 或 $-(L_{11})_{d1}-R_{11}$ ；

Q_2 是 H、 C_{1-6} 烷基、 NH_2 或 $-(L_{12})_{d2}-R_{12}$ ；

Q_3 是 (=O)、H、 C_{1-6} 烷基、 NH_2 或 $-(L_{13})_{d3}-R_{13}$ ，

条件是

(i) 当 X 是 C 时， Q_3 不是 (=O)；和

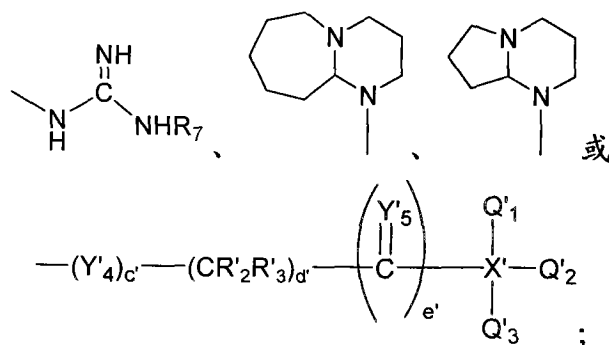
(ii) 当 X 是 P 时，(e) 为 0，

其中

L_{11} 、 L_{12} 和 L_{13} 独立地选自双官能间隔基；

(d1)、(d2) 和 (d3) 独立地是 0 或正整数；

R_{11} 、 R_{12} 和 R_{13} 独立地是氢、 NH_2 、



其中

Y'_4 是 O、S 或 NR'_5 ；

Y'_5 独立地是 O、S 或 NR'_4 ；

(c') 和 (e') 独立地是 0 或 1；

(d') 是 0 或正整数；

X' 是 C 或 P；

Q'_1 是 H、 C_{1-6} 烷基、 NH_2 或 $-(L'_{11})_{d'_1}-R'_{11}$ ；

Q'_2 是 H、 C_{1-6} 烷基、 NH_2 或 $-(L'_{12})_{d'_2}-R'_{12}$ ；

Q'_3 是 $(=O)$ 、H、 C_{1-6} 烷基、 NH_2 或 $-(L'_{13})_{d'_3}-R'_{13}$ ；

条件是

(i) 当 X' 是 C 时, Q'_3 不是 $(=O)$ ；和

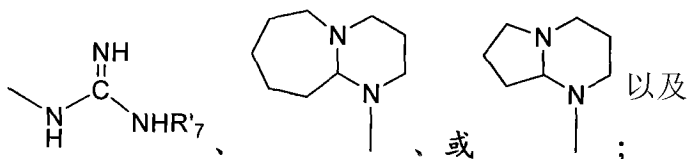
(ii) 当 X' 是 P 时, (e') 为 0,

其中

L'_{11} 、 L'_{12} 和 L'_{13} 独立地选自双官能间隔基；

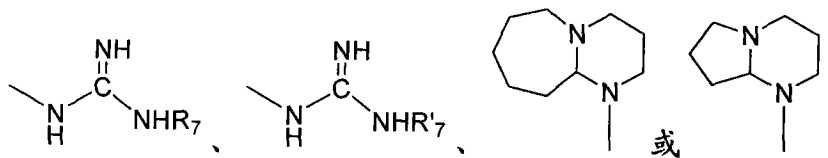
(d'_1) 、 (d'_2) 和 (d'_3) 独立地是 0 或正整数；

R'_{11} 、 R'_{12} 和 R'_{13} 独立地是氢、 NH_2 、

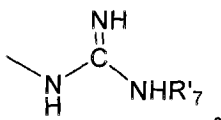


R_{2-7} 、 R'_{2-5} 和 R'_7 独立地选自氢、氨基、取代的氨基、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基、 C_{3-19} 支链烷基、 C_{3-8} 环烷基、 C_{1-6} 取代的烷基、 C_{2-6} 取代的烯基、 C_{2-6} 取代的炔基、 C_{3-8} 取代的环烷基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、 C_{1-6} 杂烷基和取代的 C_{1-6} 杂烷基，

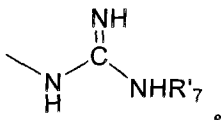
条件是 Q_{1-3} 和 Q'_{1-3} 中的至少一个或多个包括



2. 权利要求 1 的化合物, 其中 Q_1 和 Q_2 包括



3. 权利要求 1 的化合物, 其中 Q'_1 和 Q'_2 包括



4. 权利要求 1 的化合物, 其中 Y_1 为 O。

5. 权利要求 1 的化合物, 其中 Y_2 为 0；且 Y_5 为 0。

6. 权利要求 1 的阳离子脂质, 其中 L_1 , 当与 $(Y_4)_c-(CR_2R_3)_d-C(=Y_5)_e$ 部分组合时, 独立地选自:

$-(CR_{21}R_{22})_{t1}-[C(=Y_6)]_{e1}-(Y_4)_c-(CR_2R_3)_d-C(=Y_5)_e^-$ ；

$-(CR_{21}R_{22})_{t1}Y_7-(CR_{23}R_{24})_{t2}-(Y_8)_{e2}-[C(=Y_6)]_{e1}-(Y_4)_c-(CR_2R_3)_d-C(=Y_5)_e^-$,

$-(CR_{21}R_{22}CR_{23}R_{24}Y_7)_{t3}-[C(=Y_6)]_{e1}-(Y_4)_c-(CR_2R_3)_d-C(=Y_5)_e^-$,

$-(CR_{21}R_{22}CR_{23}R_{24}Y_7)_{t3}(CR_{25}R_{26})_{t4}-(Y_8)_{e2}-[C(=Y_6)]_{e1}-(Y_4)_c-(CR_2R_3)_d-C(=Y_5)_e^-$,

$-(CR_{21}R_{22}CR_{23}R_{24}Y_7)_{t3}(CR_{25}R_{26})_{t4}-(Y_8)_{e2}-[C(=Y_6)]_{e1}-(CR_{27}R_{28})_{t1}-(Y_4)_c-(CR_2R_3)_d-C(=Y_5)_e^-$,

e^- ,

$-[(CR_{21}R_{22}CR_{23}R_{24})_{t5}Y_7]_{t6}(CR_{25}R_{26})_{t4}-(Y_8)_{e2}-[C(=Y_6)]_{e1}-(Y_4)_c-(CR_2R_3)_d-C(=Y_5)_e^-$,

$-(\text{CR}_{21}\text{R}_{22})_{t1}-[(\text{CR}_{23}\text{R}_{24})_{t2}\text{Y}_7]_{t7}(\text{CR}_{25}\text{R}_{26})_{t4}-(\text{Y}_4)_c-(\text{CR}_2\text{R}_3)_d-\text{C}(=\text{Y}_5)_e-$ 和
 $-(\text{CR}_{21}\text{R}_{22})_{t1}-[(\text{CR}_{23}\text{R}_{24})_{t2}\text{Y}_7]_{t7}(\text{CR}_{25}\text{R}_{26})_{t4}-(\text{Y}_8)_{e2}-[\text{C}(=\text{Y}_6)]_{e1}-(\text{Y}_4)_c-(\text{CR}_2\text{R}_3)_d-\text{C}(=\text{Y}_5)_e-$,
 其中:

Y_6 为 O、 NR_{29} 或 S, ;

Y_{7-8} 独立地是 O、 NR_{29} 或 S ;

R_{21-29} 独立地选自氢、 C_{1-6} 烷基、 C_{3-12} 支链烷基、 C_{3-8} 环烷基、 C_{1-6} 取代的烷基、 C_{3-8} 取代的环烷基、芳基、取代的芳基、芳烷基、 C_{1-6} 杂烷基、取代的 C_{1-6} 杂烷基、 C_{1-6} 烷氧基、苯氧基和 C_{1-6} 杂烷氧基 ;

(t1)、(t2)、(t3)、(t4)、(t5)、(t6) 和 (t7) 中的每一个独立地是 0 或正整数 ;

每个 (c)、(e)、(e1) 和 (e2) 独立地是 0 或 1 ;并且

所有其它变量如上所定义。

7. 权利要求 1 的阳离子脂质, 其中 L_1 , 当与 $(\text{Y}_4)_c-(\text{CR}_2\text{R}_3)_d-\text{C}(=\text{Y}_5)_e$ 的部分组合时独立地选自:

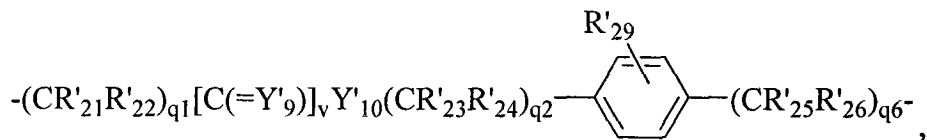
$-(\text{CH}_2)_4-\text{C}(=\text{O})-$,
 $-(\text{CH}_2)_5-\text{C}(=\text{O})-$,
 $-(\text{CH}_2)_6-\text{C}(=\text{O})-$,
 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{O}-\text{C}(=\text{O})-$,
 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2-\text{CH}_2\text{O}-\text{C}(=\text{O})-$,
 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_3-\text{CH}_2\text{O}-\text{C}(=\text{O})-$,
 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2-\text{C}(=\text{O})-$,
 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-$,
 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-$,
 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{NHC}(=\text{O})-$,
 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{C}(=\text{O})-$,
 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-$,
 $-\text{CH}_2-\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-$,
 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-$,
 $-\text{CH}_2-\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2-\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-$,
 $-(\text{CH}_2)_4-\text{C}(=\text{O})\text{NH}-$,
 $-(\text{CH}_2)_5-\text{C}(=\text{O})\text{NH}-$,
 $-(\text{CH}_2)_6-\text{C}(=\text{O})\text{NH}-$,
 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-$,
 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2-\text{CH}_2\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-$,
 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_3-\text{CH}_2\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-$,
 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-$,
 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2-\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-$,
 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-$,
 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-$,
 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-$,

$-\text{CH}_2\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-$,
 $-\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-$,
 $-\text{CH}_2\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2-\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-$,
 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2-$,
 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_3-$,
 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{O}-$,
 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$,
 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_3-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$,
 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$,
 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$,
 $-\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$,
 $-\text{CH}_2\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$,
 $-\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ 和
 $-\text{CH}_2\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2-$ 。

8. 权利要求 1 的阳离子脂质, 其中 L_{11-13} 和 L'_{11-13} 独立地选自:

$-(\text{CR}'_{21}\text{R}'_{22})_{q1}(\text{Y}'_8)_{v'}[\text{C}(=\text{Y}'_9)]_v(\text{CR}'_{23}\text{R}'_{24})_{q2}-$,
 $-(\text{CR}'_{21}\text{R}'_{22})_{q1}(\text{Y}'_8)_{v'}[\text{C}(=\text{Y}'_9)]_v\text{Y}'_{10}(\text{CR}'_{23}\text{R}'_{24})_{q2}-$,
 $-(\text{CR}'_{21}\text{R}'_{22})_{q1}(\text{Y}'_8)_{v'}[\text{C}(=\text{Y}'_9)]_v(\text{CR}'_{23}\text{R}'_{24})_{q2}-\text{Y}'_{11}-(\text{CR}'_{23}\text{R}'_{24})_{q3}-$,
 $-(\text{CR}'_{21}\text{R}'_{22})_{q1}(\text{Y}'_8)_{v'}[\text{C}(=\text{Y}'_9)]_v\text{Y}'_{10}(\text{CR}'_{23}\text{R}'_{24})_{q2}-\text{Y}'_{11}-(\text{CR}'_{23}\text{R}'_{24})_{q3}-$,
 $-\text{CR}'_{21}\text{R}'_{22})_{q1}(\text{Y}'_8)_{v'}[\text{C}(=\text{Y}'_9)]_v(\text{CR}'_{23}\text{R}'_{24}\text{CR}'_{25}\text{R}'_{26}\text{Y}'_{12})_{q4}(\text{CR}'_{27}\text{CR}'_{28})_{q5}-$,
 $-(\text{CR}'_{21}\text{R}'_{22})_{q1}(\text{Y}'_8)_{v'}[\text{C}(=\text{Y}'_9)]_v\text{Y}'_{10}(\text{CR}'_{23}\text{R}'_{24}\text{CR}'_{25}\text{R}'_{26}\text{Y}'_{12})_{q4}(\text{CR}'_{27}\text{CR}'_{28})_{q5}-$,

和



其中:

Y'_8 和 Y'_{10-12} 独立地是 O、 NR'_{30} 或 S;

Y'_9 独立地是 O、 NR'_{31} 或 S;

R'_{21-31} 在每种情形中独立地选自氢、 C_{1-6} 烷基、 C_{3-12} 支链烷基、 C_{3-8} 环烷基、 C_{1-6} 取代的烷基、 C_{3-8} 取代的环烷基、芳基、取代的芳基、芳烷基、 C_{1-6} 杂烷基、取代的 C_{1-6} 杂烷基、 C_{1-6} 烷氧基、苯氧基和 C_{1-6} 杂烷氧基;

(q1)、(q2)、(q3)、(q4)、(q5) 和 (q6) 独立地是 0 或约 1- 约 10 的正整数; 并且

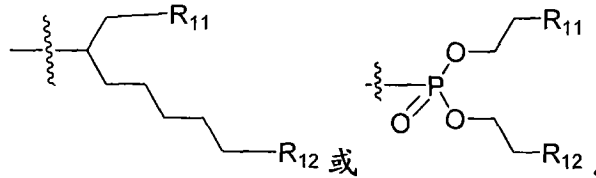
(v) 和 (v') 独立地是 0 或 1。

9. 权利要求 1 的阳离子脂质, 其中 L_{11-13} 和 L'_{11-13} 独立地选自以下:

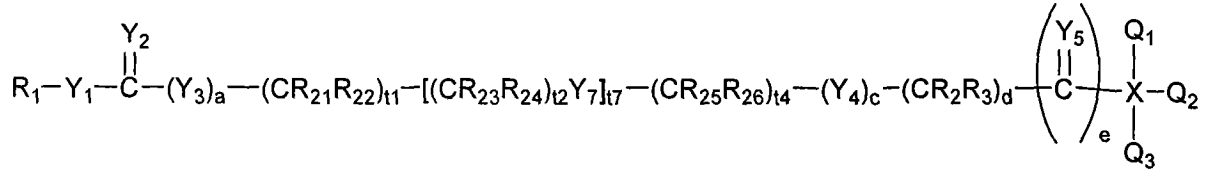
$-(\text{CH}_2)_4-$,
 $-(\text{CH}_2)_3-$,
 $-\text{O}(\text{CH}_2)_2-$
 $-\text{C}(=\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_3-$,
 $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_3-$,

- C(=O)(CH₂)₂-,
 -C(=O)(CH₂)₃-,
 -CH₂-C(=O)-O(CH₂)₃-,
 -CH₂-C(=O)-NH(CH₂)₃-,
 -CH₂-OC(=O)-O(CH₂)₃-,
 -CH₂-OC(=O)-NH(CH₂)₃-,
 -(CH₂)₂-C(=O)-O(CH₂)₃-,
 -(CH₂)₂-C(=O)-NH(CH₂)₃-,
 -CH₂C(=O)O(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-,
 -CH₂C(=O)NH(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-,
 -(CH₂)₂C(=O)O(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-,
 -(CH₂)₂C(=O)NH(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-,
 -CH₂C(=O)O(CH₂CH₂O)₂CH₂CH₂- 和
 -(CH₂)₂C(=O)O(CH₂CH₂O)₂CH₂CH₂-。

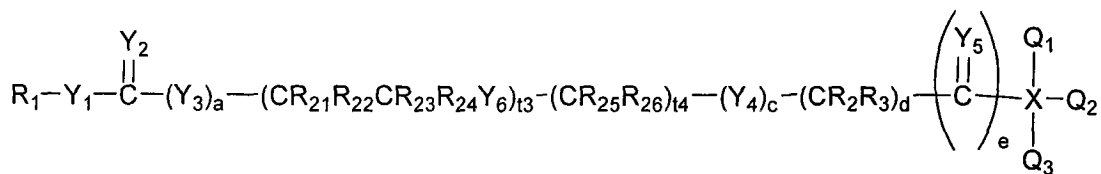
10. 权利要求 1 的化合物, 其中 X(Q₁)(Q₂)(Q₃) 部分是:



11. 权利要求 1 的阳离子脂质, 该阳离子脂质具有式 (Ia):



或



其中

Y₆ 和 Y₇ 独立地是 O、S 或 NR₂₉, 优选 O 或 NH;

R₂₁₋₂₆ 和 R₂₉ 独立地选自氢、C₁₋₆ 烷基、C₃₋₁₂ 支链烷基、C₃₋₈ 环烷基、C₁₋₆ 取代的烷基、C₃₋₈ 取代的环烷基、芳基、取代的芳基、芳烷基、C₁₋₆ 杂烷基、取代的 C₁₋₆ 杂烷基、C₁₋₆ 烷氧基、苯氧基和 C₁₋₆ 杂烷氧基;

(t1)、(t2)、(t3)、(t4) 和 (t7) 独立地是 0 或正整数,

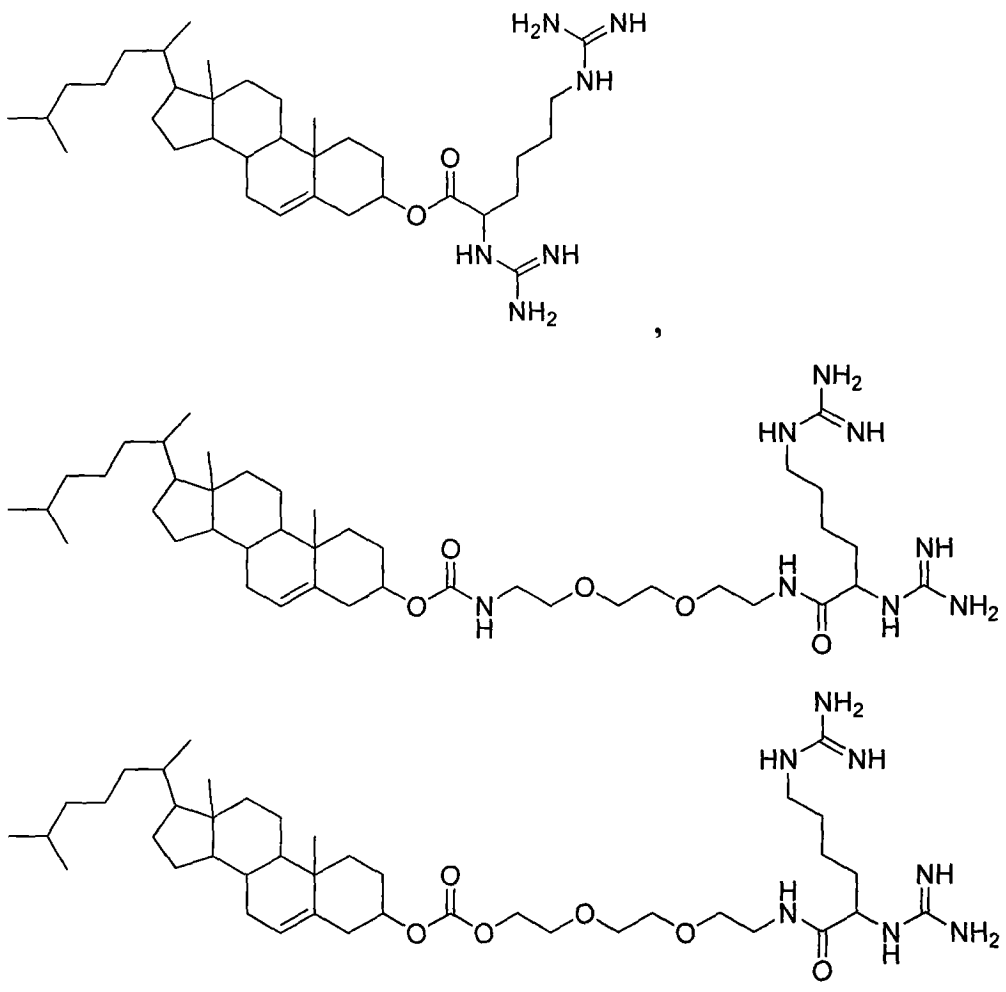
其中当 (t1) 等于或大于 2 时, R₂₁ 和 R₂₂ 在每种情形中独立地相同或不同;

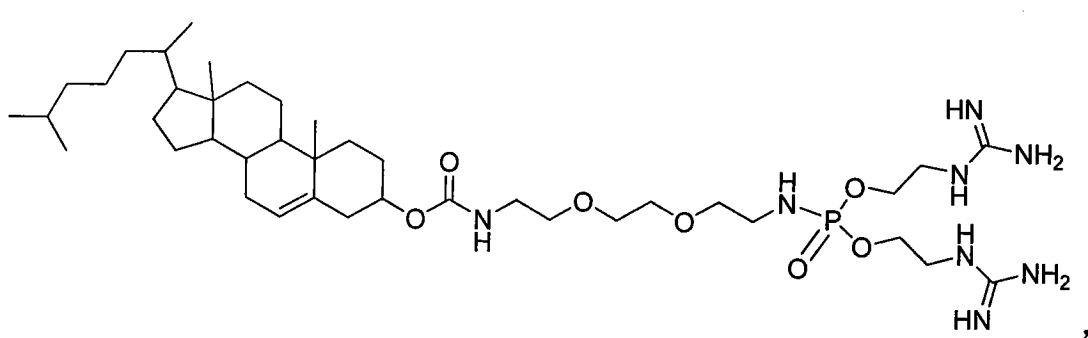
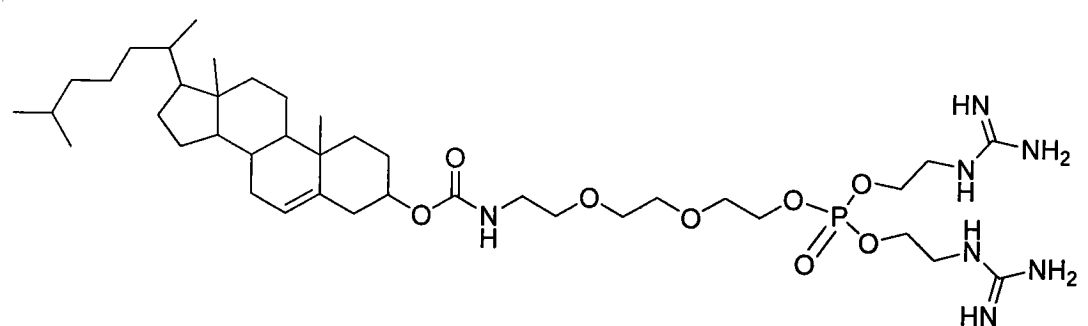
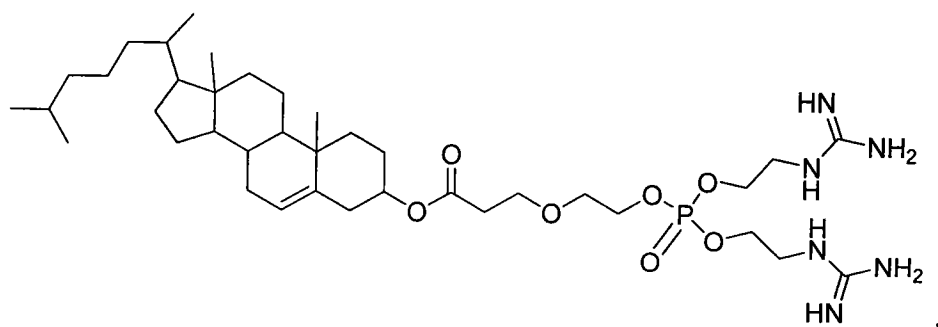
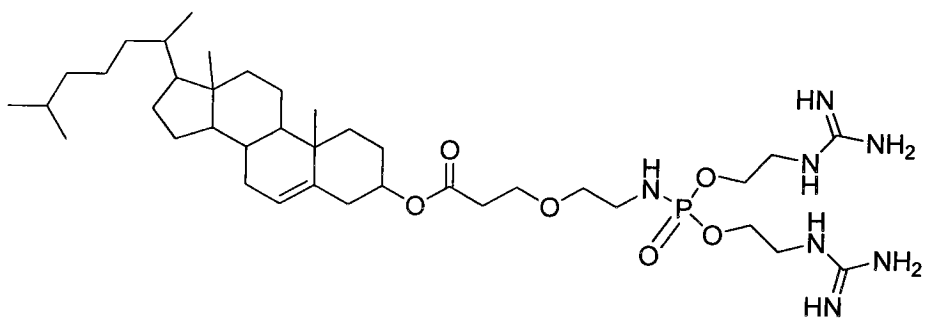
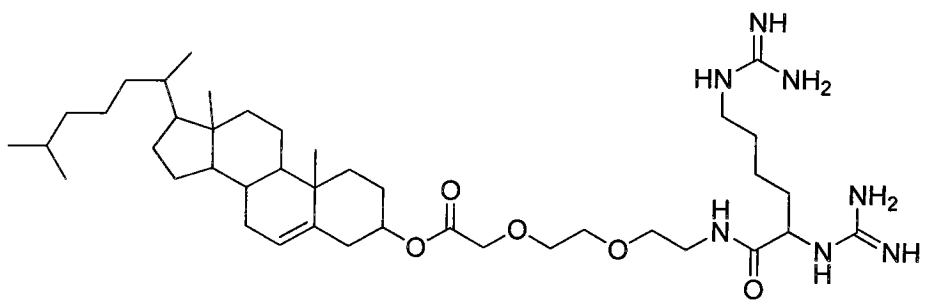
其中当 (t2) 和 (t7) 独立地等于或大于 2 时, R₂₃、R₂₄ 和 Y₇ 在每种情形中独立地相同或不同,

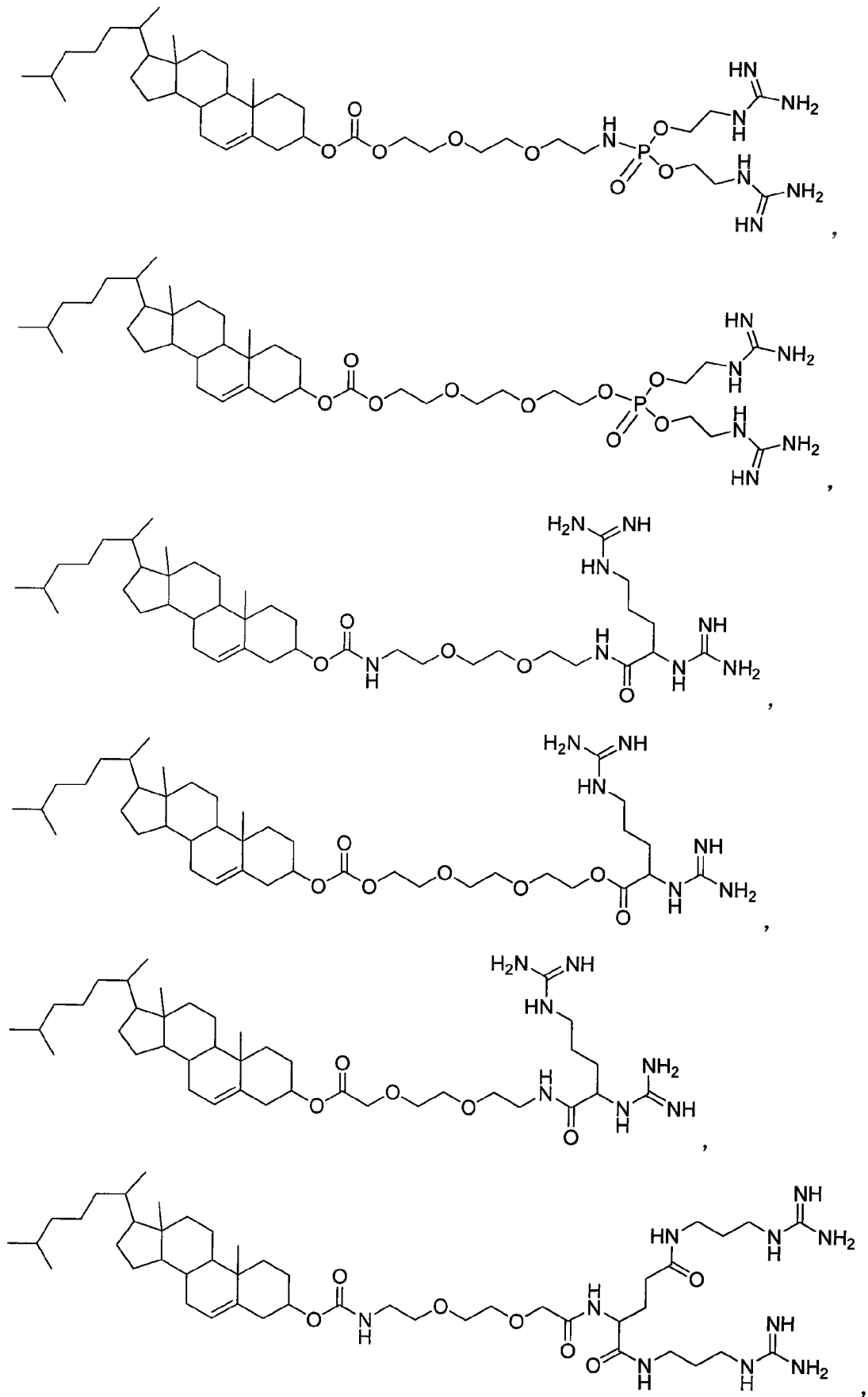
其中当 (t3) 等于或大于 2 时, R₂₁、R₂₂、R₂₃、R₂₄ 和 Y₆ 在每种情形中独立地相同或不同,

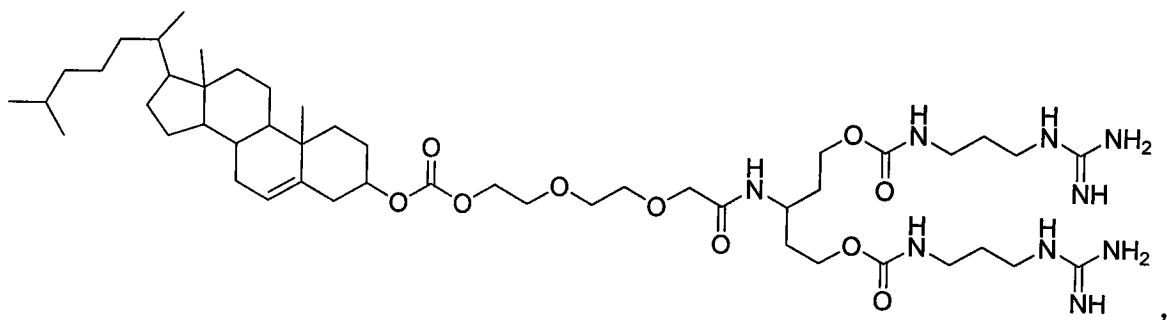
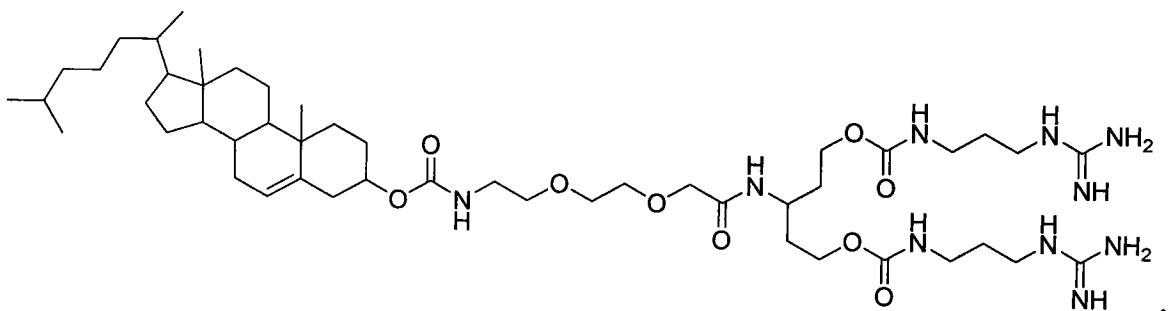
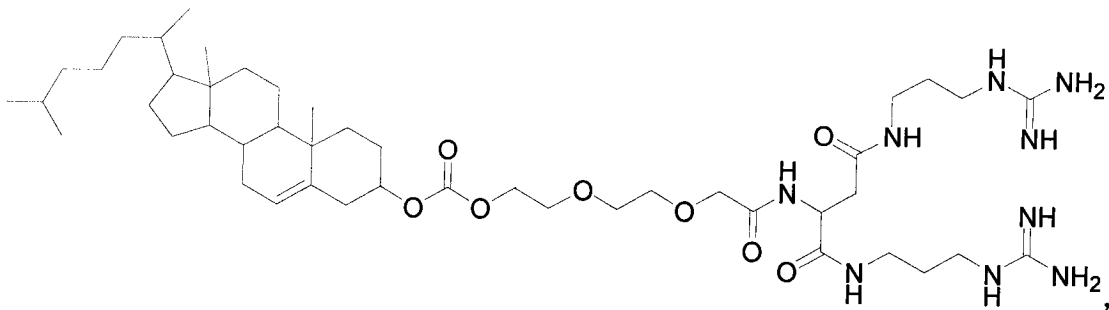
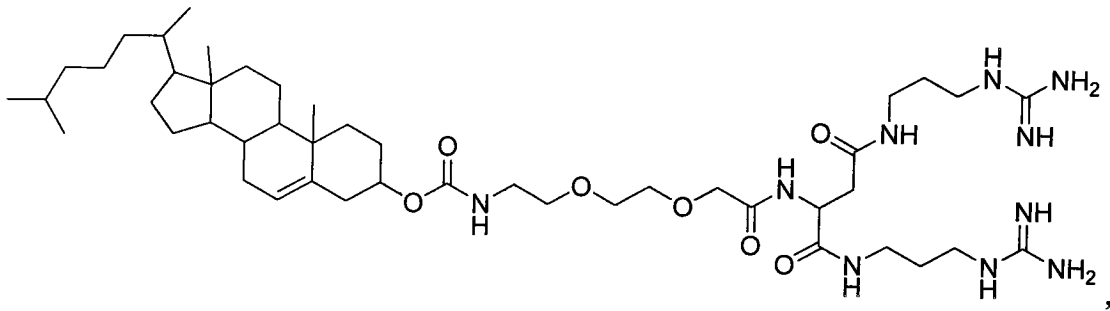
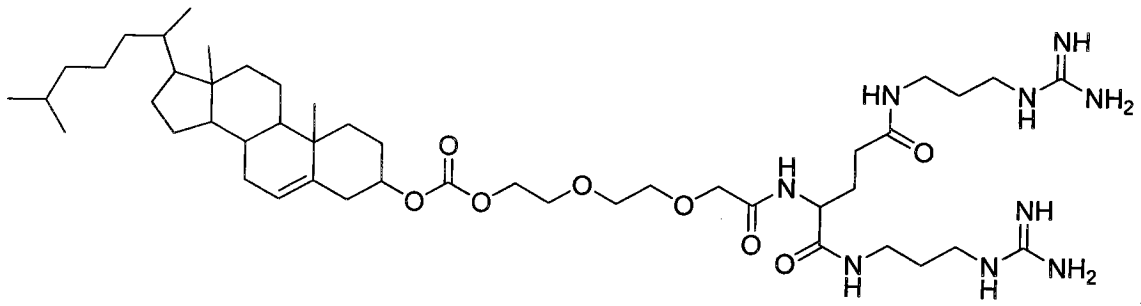
其中当 (t4) 等于或大于 2 时, R_{25} 和 R_{26} 在每种情形中独立地相同或不同; 并且所有其它变量如上所定义。

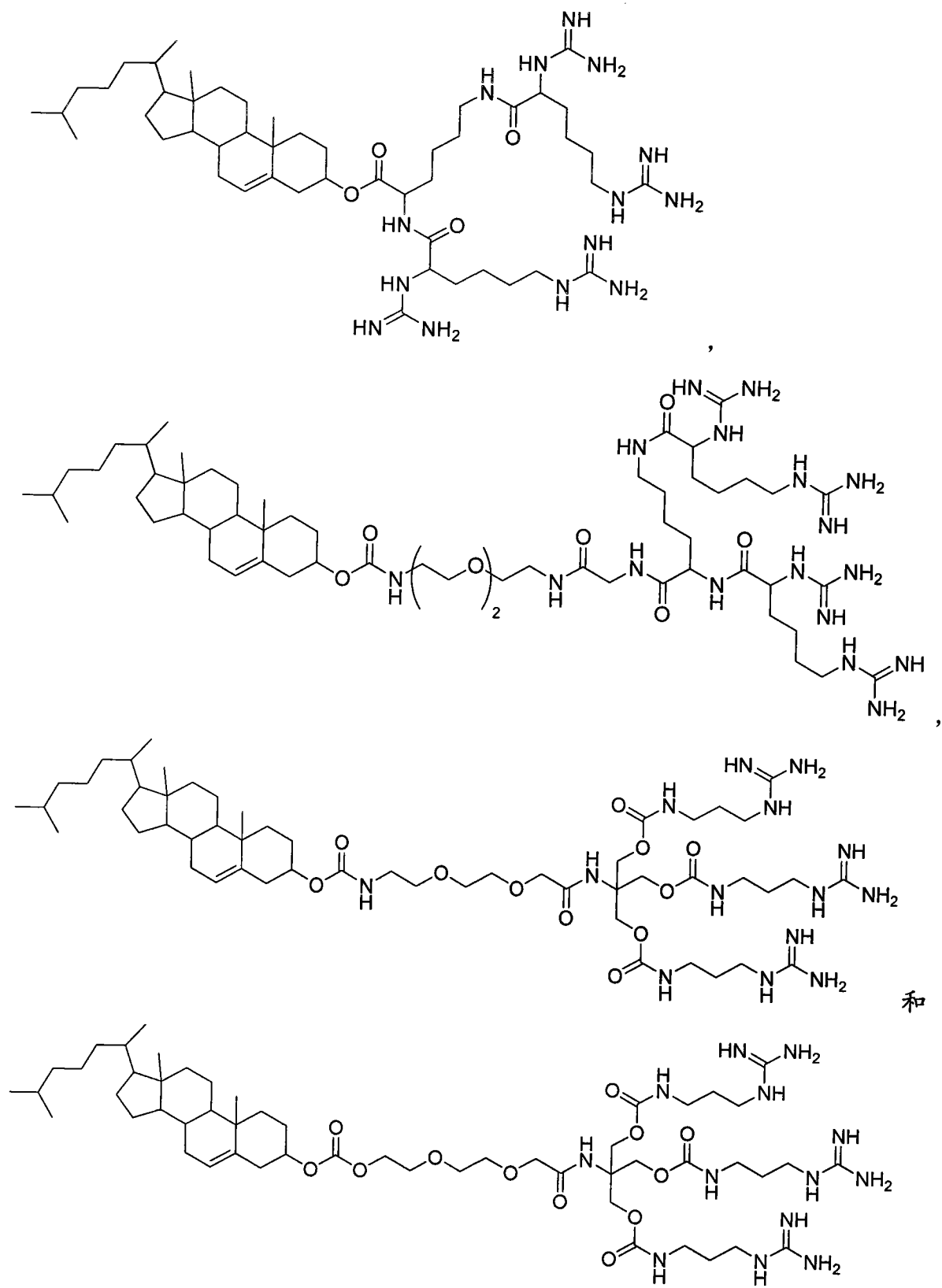
12. 权利要求 1 的阳离子脂质, 该阳离子脂质选自:



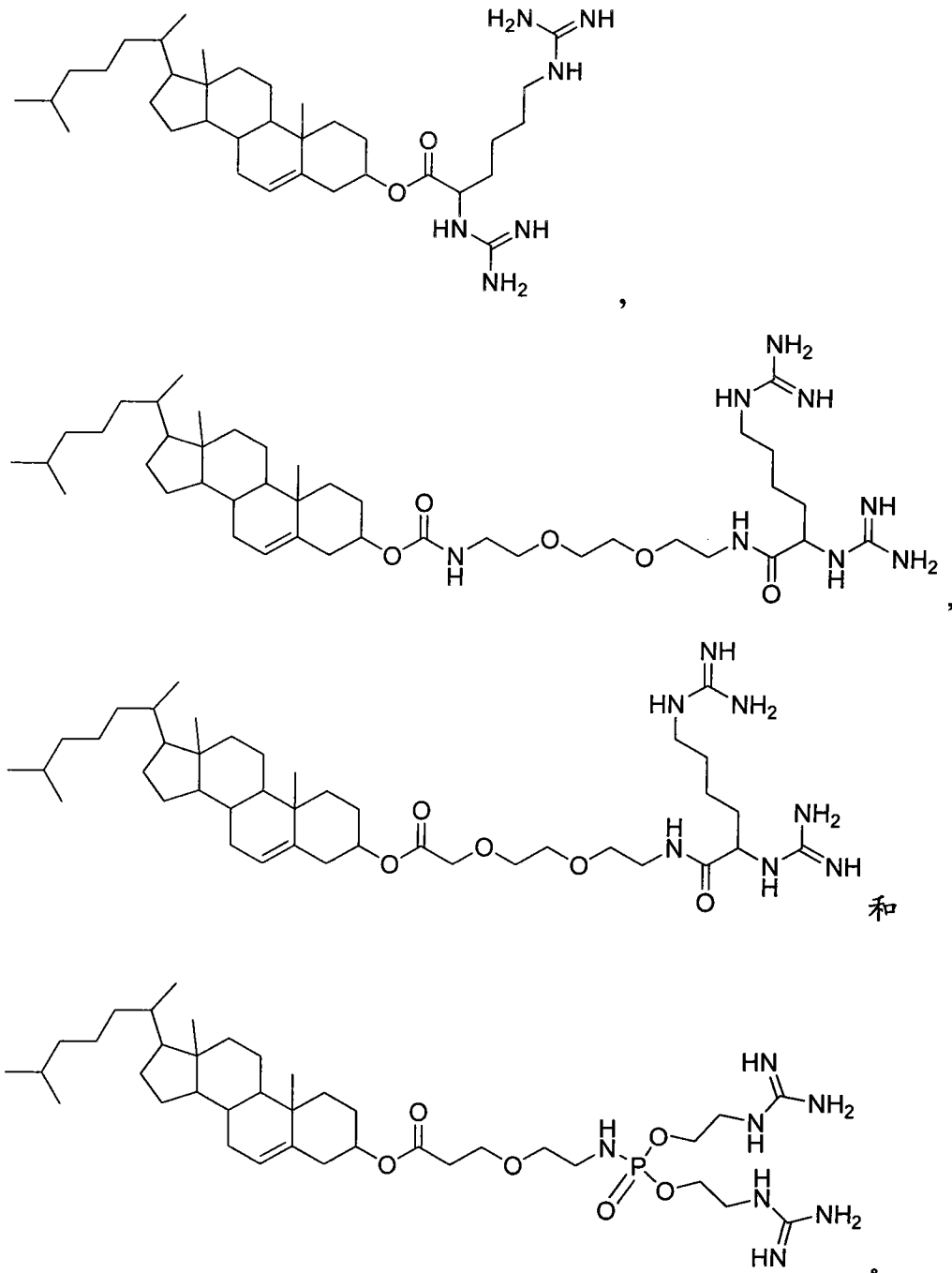








13. 一种包含权利要求 1 的式 (I) 的阳离子脂质的纳米颗粒组合物。
14. 权利要求 13 的纳米颗粒组合物, 其还包含促融合脂质和 PEG 脂质。
15. 权利要求 14 的纳米颗粒组合物, 其中所述阳离子脂质选自:



16. 权利要求 14 的纳米颗粒组合物, 其中所述促融合脂质选自 DOPE、DOGP、POPC、DSPC、EPC 和它们的混合物。

17. 权利要求 14 的纳米颗粒组合物, 其中所述 PEG 脂质选自 PEG-DSPE、PEG-二棕榈酰甘油酰胺、C16mPEG-神经酰胺和它们的混合物。

18. 权利要求 14 的纳米颗粒组合物, 纳米颗粒组合物还包含胆固醇。

19. 权利要求 14 的纳米颗粒组合物, 该纳米颗粒组合物选自以下的混合物:

式 (I) 的阳离子脂质、二酰基磷脂酰乙醇胺、缀合到磷脂酰乙醇胺 (PEG-PE) 的 PEG、和胆固醇;

式 (I) 的阳离子脂质、二酰基卵磷脂、缀合到磷脂酰乙醇胺 (PEG-PE) 的 PEG、和胆固醇;

式 (I) 的阳离子脂质、二酰基磷脂酰乙醇胺、二酰基磷脂酰-胆碱、缀合到磷脂酰乙醇

胺 (PEG-PE) 的 PEG、和胆固醇；

式 (I) 的阳离子脂质、二酰基磷脂酰乙醇胺、缀合到神经酰胺 (PEG-Cer) 的 PEG、和胆固醇；或

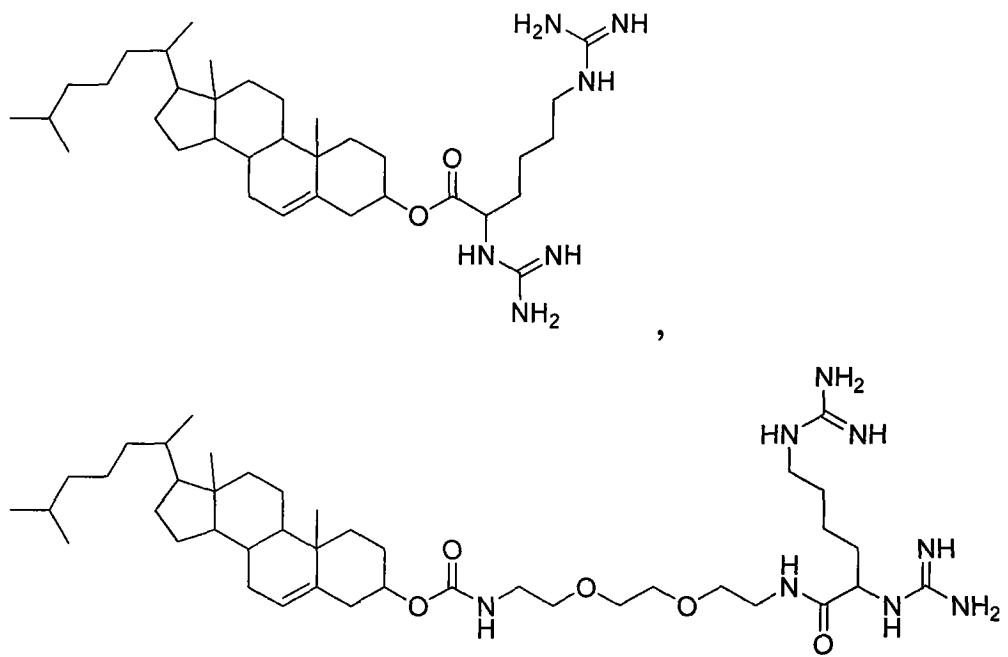
式 (I) 的阳离子脂质、二酰基磷脂酰乙醇胺、缀合到磷脂酰乙醇胺 (PEG-PE) 的 PEG、缀合到神经酰胺 (PEG-Cer) 的 PEG、和胆固醇。

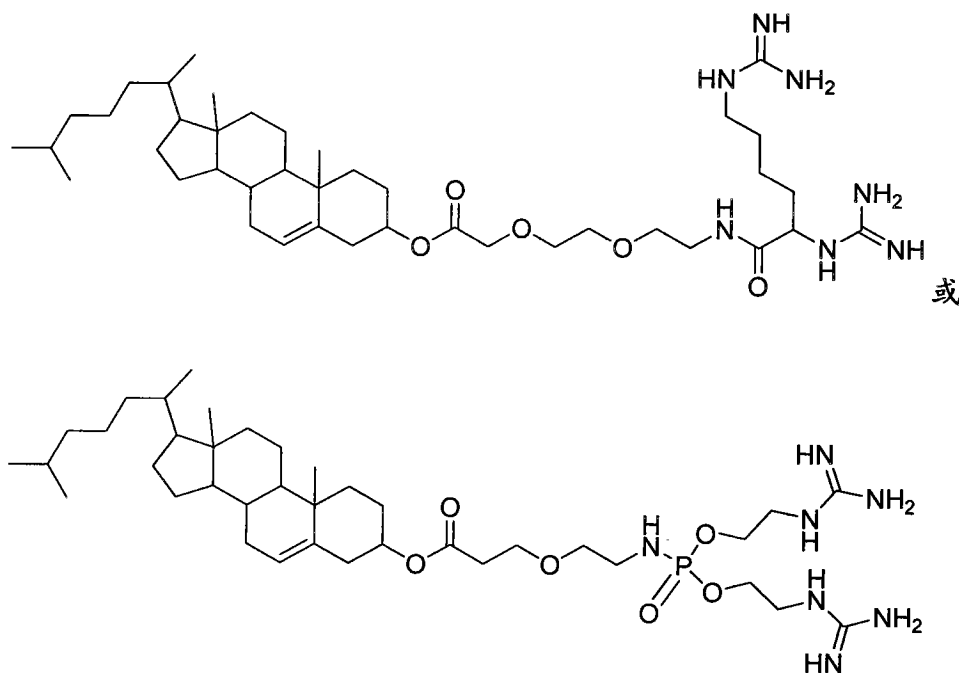
20. 权利要求 18 的纳米颗粒组合物, 其中所述阳离子脂质与纳米颗粒组合物中存在的总脂质的摩尔比为约 10% - 约 99.9%。

21. 权利要求 18 的纳米颗粒组合物, 其中所述阳离子脂质与纳米颗粒组合物中存在的总脂质的摩尔比为约 15% - 约 25%。

22. 权利要求 18 的纳米颗粒组合物, 其中阳离子脂质、基于非胆固醇的促融合脂质、PEG 脂质和胆固醇与纳米颗粒组合物中存在的总脂质的摩尔比为约 15-25% : 20-78% : 0-50% : 2-10%。

23. 权利要求 18 的纳米颗粒组合物, 其中包括以纳米颗粒组合物中存在的总脂质的约 17% : 60% : 20% : 3% 的摩尔比的所述阳离子脂质、DOPE、胆固醇和 C16mPEG-神经酰胺, 其中所述阳离子脂质为





24. 一种包含用权利要求 18 的纳米颗粒组合物包封的核酸的纳米颗粒。
25. 权利要求 24 的纳米颗粒,其中所述核酸是单链或双链的寡核苷酸。
26. 权利要求 24 的纳米颗粒,其中所述核酸选自脱氧核苷、核糖核苷酸、锁核酸(LNA)、短干扰 RNA(siRNA)、微 RNA(miRNA)、适体、肽核酸(PNA)、磷酸二胺吗啉代寡核苷酸(PMO)、三环-DNA、双链寡核苷酸(诱捕 ODN)、催化 RNA(RNAi)、适体、镜相异构物、CpG 低聚物以及它们的组合。
27. 权利要求 25 的纳米颗粒,其中所述寡核苷酸为反义寡核苷酸。
28. 权利要求 25 的纳米颗粒,其中所述寡核苷酸具有硫代磷酸酯连接键。
29. 权利要求 25 的纳米颗粒,其中所述寡核苷酸包括 LNA。
30. 权利要求 25 的纳米颗粒,其中所述寡核苷酸具有约 8- 约 50 个核苷酸。
31. 权利要求 25 的纳米颗粒,其中所述寡核苷酸抑制以下基因的表达:致癌基因、促血管生成途径基因、促细胞增殖途径基因、病毒致病原基因和促炎途径基因。
32. 权利要求 25 的纳米颗粒,其中所述寡核苷酸选自反义 HIF-1 α 寡核苷酸、反义存活蛋白寡核苷酸、反义 ErbB3 寡核苷酸、反义 β - 联蛋白寡核苷酸和反义 Bcl-2 寡核苷酸。
33. 权利要求 25 的化合物,其中所述寡核苷酸包含以 SEQ ID NO :1, SEQ ID NOs 2 和 3, SEQ ID NO :3, SEQ ID NO :4, SEQ ID NO :5, SEQ ID NO :5, 和 SEQ ID NO :6 给出的 8 个或更多个连续的核苷酸。
34. 权利要求 24 的纳米颗粒,其中阳离子脂质和核酸的电荷比为约 1 : 1- 约 20 : 1。
35. 权利要求 24 的纳米颗粒,其中所述纳米颗粒具有约 50nm- 约 150nm 的大小。
36. 一种治疗哺乳动物的疾病的方法,该方法包括将权利要求 24 的纳米颗粒组合物给药到需要其的哺乳动物。
37. 一种将寡核苷酸引入到细胞中的方法,该方法包括:
使所述细胞与权利要求 24 的纳米颗粒接触。

38. 一种抑制人体细胞或组织的基因表达的方法,该方法包括:
使所述人体细胞或组织与权利要求 24 的纳米颗粒接触。

39. 权利要求 38 的方法,其中所述细胞或组织为癌细胞或组织。

40. 一种下调哺乳动物的基因表达的方法,该方法包括:
将有效量的权利要求 24 的纳米颗粒给药到需要其的哺乳动物。

41. 一种抑制癌细胞生长或增殖的方法,该方法包括:
使所述癌细胞与权利要求 24 的纳米颗粒接触。

41. 权利要求 40 的方法,该方法还包括将化疗剂进行给药。

42. 一种治疗哺乳动物的癌症的方法,该方法包括:
将有效量的权利要求 15 的纳米颗粒给药到需要其的哺乳动物。

43. 权利要求 42 的方法,其中所述癌症具有向肝脏的转移性。

用于核酸递送系统的支化阳离子脂质

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2008 年 11 月 17 日提交的美国临时专利申请序列 No. 61/115, 307 的优先权权益, 通过引用将其内容并入本文。

发明领域

[0003] 本发明涉及用于寡核苷酸递送的阳离子脂质和含有该阳离子脂质的纳米颗粒组合物, 以及使用该纳米颗粒组合物调控基因表达的方法。

[0004] 发明背景

[0005] 在过去数年间已提出将使用核酸的疗法作为治疗各种疾病的努力尝试。例如反义疗法的疗法是疾病治疗中的有力手段, 这是因为治疗性基因可选择性地调控与疾病有关的基因表达并且使得在使用其它治疗方法时所发生的副作用最小。

[0006] 然而, 使用核酸的疗法由于基因的较差稳定性和无效递送而受到限制。提出了若干基因递送系统以克服所述障碍并且将治疗性基因有效地引入靶区域, 例如体外和体内的癌细胞或组织内。为改进递送和增强治疗性基因的细胞吸收的这类尝试涉及利用脂质体。

[0007] 目前可用的脂质体未有效地将寡核苷酸递送到体内, 尽管在质粒的递送方法已取得一些进展。在寡核苷酸的递送中, 期望的递送系统应包含足以中和寡核苷酸的负电荷的正电荷。最近, Stuart, D. D 等在 *Biochim. Biophys. Acta*, 2000, 1463 :219-229 和 Semple, S. C. 等在 *Biochim. Biophys. Acta*, 2001, 1510 :152-166 分别描述的涂覆阳离子脂质体 (CCL) 和稳定的核酸-脂质颗粒 (SNALP) 配制剂, 报导了提供具有小的尺寸、高的核酸包封率、良好的血清稳定性以及长的循环时间的纳米颗粒。然而, 与使用裸寡核苷酸相比, 它们没有显示出显著改善的体内活性 (特别是在除肝脏外的器官中)。

[0008] 期望提供允许获得寡核苷酸在细胞例如癌细胞中增强的细胞吸收度和提高的生物利用度的核酸递送系统。如果核酸递送系统贮存稳定且临床使用安全, 则这也是期望的。

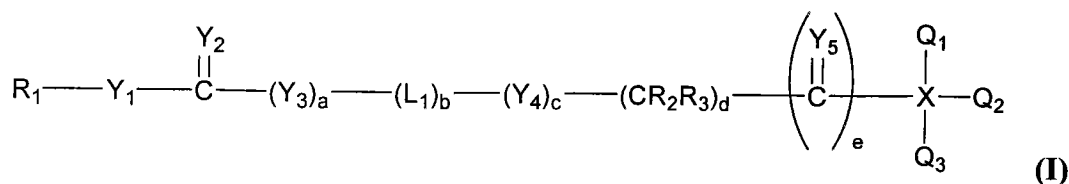
[0009] 虽然具有所述尝试和进展, 但是仍需要提供改进的核酸递送系统。本发明解决了这种需要。

[0010] 发明概述

[0011] 本发明提供了用于核酸递送的阳离子脂质和含有其的纳米颗粒组合物。多核酸例如寡核苷酸包封在纳米颗粒复合物内, 所述纳米颗粒复合物含有阳离子脂质、促融合脂质和 PEG 脂质的混合物。

[0012] 根据本发明的该方面, 所述用于核酸 (即寡核苷酸) 递送的阳离子脂质具有式 (I) :

[0013]



[0014] 其中

[0015] R_1 是胆固醇或其类似物；

[0016] Y_1 、 Y_2 和 Y_5 独立地是 O、S 或 NR_4 ；

[0017] Y_3 和 Y_4 独立地是 O、S 或 NR_5 ；

[0018] L_1 是具有取代的饱和或不饱和、支链或线性的 C_{3-50} 烷基的间隔基团，其中一个或多个碳被 NR_6 、O、S 或 $C(=Y)$ 替代，其中 Y 是 O、S 或 NR_4 ；

[0019] (a)、(c) 和 (e) 独立地是 0 或 1；

[0020] (b) 是 0 或正整数；

[0021] (d) 是 0 或正整数；

[0022] X 是 C 或 P；

[0023] Q_1 是 H、 C_{1-6} 烷基、 NH_2 或 $-(L_{11})_{d1}-R_{11}$ ；

[0024] Q_2 是 H、 C_{1-6} 烷基、 NH_2 或 $-(L_{12})_{d2}-R_{12}$ ；

[0025] Q_3 是 (=O)、H、 C_{1-6} 烷基、 NH_2 或 $-(L_{13})_{d3}-R_{13}$ ，

[0026] 条件是

[0027] (i) 当 X 是 C 时， Q_3 不是 (=O)；和

[0028] (ii) 当 X 是 P 时，(e) 为 0，

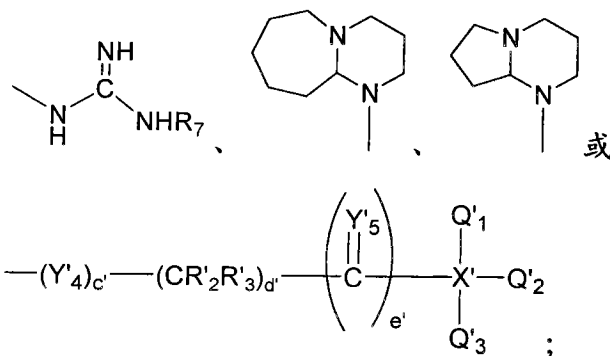
[0029] 其中

[0030] L_{11} 、 L_{12} 和 L_{13} 独立地选自双官能间隔基；

[0031] (d1)、(d2) 和 (d3) 独立地是 0 或正整数；

[0032] R_{11} 、 R_{12} 和 R_{13} 独立地是氢、 NH_2 、

[0033]



[0034] 其中

[0035] Y'_4 是 O、S 或 NR'_5 ；

[0036] Y'_5 独立地是 O、S 或 NR'_4 ；

[0037] (c') 和 (e') 独立地是 0 或 1；

[0038] (d') 是 0 或正整数；

[0039] X' 是 C 或 P；

[0040] Q'_1 是 H、 C_{1-6} 烷基、 NH_2 或 $-(L'_{11})_{d'1}-R'_{11}$ ；

[0041] Q'_2 是 H、 C_{1-6} 烷基、 NH_2 或 $-(L'_{12})_{d'2}-R'_{12}$ ；

[0042] Q'_3 是孤电子对、(=O)、H、 C_{1-6} 烷基、 NH_2 或 $-(L'_{13})_{d'3}-R'_{13}$ ；

[0043] 条件是

[0044] (i) 当 X' 是 C 时， Q'_3 不是 (=O)；和

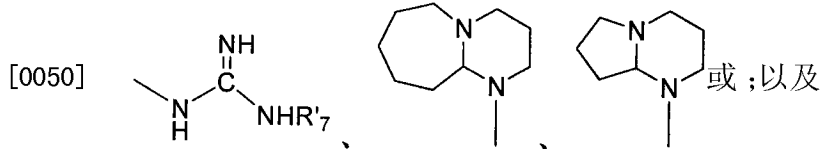
[0045] (ii) 当 X' 是 P 时, (e') 为 0,

[0046] 其中

[0047] L'_{11} 、 L'_{12} 和 L'_{13} 独立地选自双官能间隔基;

[0048] (d'_{11}) 、 (d'_{12}) 和 (d'_{13}) 独立地是 0 或正整数;

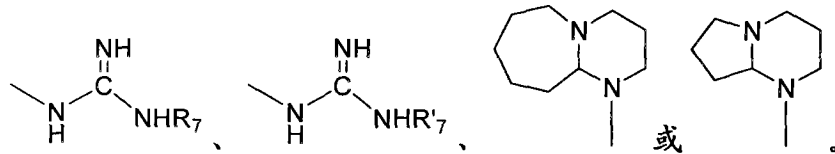
[0049] R'_{11} 、 R'_{12} 和 R'_{13} 独立地是氢、 NH_2 、



[0051] R'_{2-7} 、 R'_{2-5} 和 R'_{7} 独立地选自氢、氨基、取代的氨基、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基、 C_{3-19} 支链烷基、 C_{3-8} 环烷基、 C_{1-6} 取代的烷基、 C_{2-6} 取代的烯基、 C_{2-6} 取代的炔基、 C_{3-8} 取代的环烷基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、 C_{1-6} 杂烷基和取代的 C_{1-6} 杂烷基,

[0052] 条件是 Q_{1-3} 和 Q'_{1-3} 中的至少一个或多个包括

[0053]



[0054] 本发明还提供了用于核酸递送的纳米颗粒组合物。核酸例如寡核苷酸包封在纳米颗粒复合物内,所述纳米颗粒复合物含有阳离子脂质、促融合脂质和 PEG 脂质的混合物。

[0055] 根据本发明的该方面,用于核酸递送(即寡核苷酸)的纳米颗粒组合物包括:

[0056] (i) 式 (I) 的阳离子脂质;

[0057] (ii) 促融合脂质;和

[0058] (iii) PEG 脂质。

[0059] 本发明还提供了用于将核酸(优选寡核苷酸)递送到体内和体外的细胞或组织的方法。通过本文所描述的方法引入的寡核苷酸可调控靶基因的表达。

[0060] 本发明的一方面提供了抑制靶基因,即致癌基因和与哺乳动物,优选人体疾病有关的基因的表达式的方法。该方法包括使细胞,例如癌细胞或组织与由本文所述的纳米颗粒组合物制备的纳米颗粒/纳米颗粒复合物接触。释放包封在纳米颗粒内的寡核苷酸,然后其调解要处理的细胞或组织中的 mRNA 或蛋白质的下调。用纳米颗粒的处理允许调控在恶性疾病,例如抑制癌细胞生长的处理中的靶基因表达(和与其有关的附带益处)。这类疗法可作为单一治疗或作为与一种或多种有效和/或核准治疗的组合疗法的一部分进行。

[0061] 其它方面包括制备式 (I) 的阳离子脂质以及含有其的纳米颗粒的方法。

[0062] 本文所述纳米颗粒具有含 LNA- 的寡核苷酸 (LNA-ON) 在人体癌细胞中改进的体外细胞吸收度和 LNA-ON 在哺乳动物中对肿瘤增强的递送。

[0063] 本文所描述的阳离子脂质中和核酸的负电荷并且促进对其中含有核酸的纳米颗粒的细胞吸收。本文的阳离子脂质还提供多个阳离子部分/胆固醇部分的单元,从而提供在 (i) 中和核酸的负电荷和 (ii) 与核酸形成较紧密的离子复合物方面的较高效率。使用包括 LNA 以及基于 siRNA、微 RNA 和 MOE 反义体的那些的治疗性寡核苷酸,该技术有利于治疗性寡核苷酸的递送和哺乳动物,即人体的治疗。

[0064] 本文所描述的阳离子脂质的另一个优势是它们通过与核酸形成多种离子复合物而提供控制纳米颗粒尺寸的方法。

[0065] 本文所描述的阳离子脂质使生物学流体中的纳米颗粒复合物和其中的核酸稳定。不意欲受任何理论束缚,认为纳米颗粒复合物至少部分通过将分子与核酸酶屏蔽开来提高包封核酸的稳定性,从而防止劣化。基于本文所描述的式(I)的阳离子脂质的纳米颗粒使包封的核酸稳定。

[0066] 与本领域已知中性或带负电荷的纳米颗粒相比,本文所描述的阳离子脂质允许高效率(例如高于70%,优选高于80%)的核酸(寡核苷酸)装量,其典型地具有约或小于10%的装量。不意欲受任何理论束缚,通过具有高pKa(13-14)的本文所描述的式(I)的阳离子脂质的胍鎓基与核酸的磷酸酯基基本上形成紧密的两性离子氢键,从而能够使更多核酸有效地装入到纳米颗粒的内部隔室中的事实来部分实现高的装量。

[0067] 本文所述纳米颗粒提供了关于中性或带负电荷的纳米颗粒的另外的优势,其原因在于纳米颗粒的聚结或沉淀较小可能发生。不意欲受任何理论束缚,所需性能部分归因于与核酸形成氢键或静电相互作用的阳离子脂质包封在纳米颗粒内,并且非阳离子/促融合脂质和PEG脂质包围阳离子脂质和核酸事实。

[0068] 本文所述纳米颗粒提供另一个优势,例如高的转染效率。本文所述纳米颗粒允许体外和体内的细胞转染而不需转染剂的帮助。纳米颗粒是安全的,因为它们不具有与本领域已知的需要转染剂的纳米颗粒相同的毒性。纳米颗粒的高转染效率还提供了将治疗性核酸递送到核内的方法。

[0069] 本文所述纳米颗粒还在纳米颗粒的制备中提供了有利的稳定性和灵活性。可在宽pH范围例如约2-12中制备纳米颗粒。本文所述纳米颗粒还可在需要的生理学的pH,例如约7.2-7.6下临床使用。

[0070] 本文所述纳米颗粒递送系统还允许通过EPR(增强的渗透和滞留)效应在所需靶区域,例如癌细胞可选择性地获得足够量的治疗性寡核苷酸。因此本文所述的纳米颗粒组合物改进了癌细胞或组织中的具体mRNA下调。

[0071] 另一个优势是本文所描述的阳离子脂质允许制备大小均匀的纳米颗粒并且使纳米颗粒在贮存期间稳定。含有本文所描述的阳离子脂质的纳米颗粒复合物在缓冲条件下是稳定的。这对于现有技术而言是明显的优势,因为该特征给临床医生提供了可靠和柔性的治疗方案。

[0072] 另一个优点是本文所述纳米颗粒允许递送一种或多种、相同或不同的反义靶寡核苷酸,从而在疾病治疗方面达到协同效应。

[0073] 在基因水平下治疗人体疾病逐渐受到人们关注。包括锁核酸和siRNA的寡核苷酸具有阻止不希望的基因表达的潜力。本发明允许细胞吸收度的增强以及核酸例如LNA-ON在靶区域、细胞或组织中的积聚。此外,与病毒递送系统相比,本文所描述的阳离子基于脂质的纳米颗粒安全递送体内寡核苷酸从而改善它们的药代动力学曲线,细胞渗透和具体肿瘤靶向。

[0074] 本发明的另一个优势是本文所述纳米颗粒能够有效向下调控人体肿瘤细胞中的靶mRNA而不需转染剂的帮助并且改进了核酸在具有肿瘤的哺乳动物中的细胞递送。

[0075] 其它及另外的优势可从以下描述中显而易见。

[0076] 就本发明而言,术语“残基”应理解是指化合物的部分,其涉及,例如胆固醇等,其在经历被另一化合物取代的反应后保留。

[0077] 就本发明而言,术语“烷基”是指饱和脂肪烃,包括直链、支链和环状烷基。术语“烷基”还包括烷基-硫基-烷基、烷氧基烷基、环烷基烷基、杂环烷基和 C₁₋₆ 烷基羰基烷基。优选地,该烷基具有 1-12 个碳。更优选地,其为约 1-7 个碳的低级烷基,还更优选约 1-4 个碳。该烷基可为取代的或未取代的。当为取代的时,取代的基团优选包括卤素、氧基、叠氮基、硝基、氰基、烷基、烷氧基、烷基-硫基、烷基-硫基-烷基、烷氧基烷基、烷基氨基、三卤代甲基、羟基、巯基、羧基、氰基、烷基甲硅烷基、环烷基、环烷基烷基、杂环烷基、杂芳基、烯基、炔基、C₁₋₆ 烃基、芳基和氨基。

[0078] 就本发明而言,术语“取代”是指添加选自以下的一个基团或用选自以下的一个基团替换官能团或化合物中包含的一个或多个原子:卤素、氧基、叠氮基、硝基、氰基、烷基、烷氧基、烷基-硫基、烷基-硫基-烷基、烷氧基烷基、烷基氨基、三卤代甲基、羟基、巯基、羧基、氰基、烷基甲硅烷基、环烷基、环烷基烷基、杂环烷基、杂芳基、烯基、炔基、C₁₋₆ 烷基羰基烷基、芳基和氨基。

[0079] 就本发明而言,术语“烯基”是指含至少一个碳-碳双键的基团,包括直链、支链和环状基团。优选地,该烯基具有约 2-12 个碳。更优选地,其为约 2-7 个碳的低级烯基,还更优选约 2-4 个碳。该烯基可为取代的或未取代的。当为取代的时,取代的基团优选包括卤素、氧基、叠氮基、硝基、氰基、烷基、烷氧基、烷基-硫基、烷基-硫基-烷基、烷氧基烷基、烷基氨基、三卤代甲基、羟基、巯基、羧基、氰基、烷基甲硅烷基、环烷基、环烷基烷基、杂环烷基、杂芳基、烯基、炔基、C₁₋₆ 烃基、芳基和氨基。

[0080] 就本发明而言,术语“炔基”是指含至少一个碳-碳三键的基团,包括直链、支链和环状基团。优选地,该炔基具有约 2-12 个碳。更优选地,其为约 2-7 个碳的低级炔基,还更优选约 2-4 个碳。该炔基可为取代的或未取代的。当为取代的时,取代的基团优选包括卤素、氧基、叠氮基、硝基、氰基、烷基、烷氧基、烷基-硫基、烷基-硫基-烷基、烷氧基烷基、烷基氨基、三卤代甲基、羟基、巯基、羧基、氰基、烷基甲硅烷基、环烷基、环烷基烷基、杂环烷基、杂芳基、烯基、炔基、C₁₋₆ 烃基、芳基和氨基。“炔基”的实例包括炔丙基、丙炔和 3-己炔。

[0081] 就本发明而言,术语“芳基”是指含有至少一个芳环的芳香烃环体系。该芳环可任选与其它芳香烃环或非芳香烃环稠合或连接。芳基的实例包括,苯基、萘基、1,2,3,4-四氢萘和联苯基。芳基的优选实例包括苯基和萘基。

[0082] 就本发明而言,术语“环烷基”指 C₃₋₈ 环烃。环烷基的实例包括环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基和环辛基。

[0083] 就本发明而言,术语“环烯基”是指含有至少一个碳-碳双键的 C₃₋₈ 环烃。环烯基的实例包括环戊烯基、环戊二烯基、环己烯基、1,3-环己二烯基、环庚烯基、环庚三烯基和环辛烯基。

[0084] 就本发明而言,术语“环烷基烷基”是指被 C₃₋₈ 环烷基取代的烷基。环烷基烷基的实例包括环丙基甲基和环戊基乙基。

[0085] 就本发明而言,术语“烷氧基”是指通过氧桥连接至母体分子部分的指定碳原子数的烷基。烷氧基的实例包括甲氧基、乙氧基、丙氧基和异丙氧基。

[0086] 就本发明而言,“烷基芳基”是指被烷基取代的芳基。

- [0087] 就本发明而言，“芳烷基”是指被芳基取代的烷基。
- [0088] 就本发明而言，术语“烷氧基烷基”是指被烷氧基取代的烷基。
- [0089] 就本发明而言，术语“烷基-硫基-烷基”是指烷基-S-烷基硫醚，例如甲基硫基甲基或甲基硫基乙基。
- [0090] 就本发明而言，术语“氨基”是指本领域已知的从氨衍生的含氮基团，其通过用有机基团替代一个或多个氢基而得到。例如，术语“酰基氨基”和“烷基氨基”分别是指具有酰基和烷基取代基的特定的N-取代的有机基团。
- [0091] 就本发明而言，术语“烷基羰基”是指被烷基取代的羰基。
- [0092] 就本发明而言，术语“卤”或“卤素”是指氟、氯、溴和碘。
- [0093] 就本发明而言，术语“杂环烷基”是指含有至少一个选自氮、氧和硫的杂原子的非芳环体系。该杂环烷基环可任选与其它杂环烷基环和/或非芳香烃环稠合或以其它方式连接。优选的杂环烷基具有3-7元。杂环烷基的实例包括哌嗪、吗啉、哌啶、四氢呋喃、吡咯烷和吡唑。优选的杂环烷基包括哌啶基、哌嗪基、吗啉基和吡咯烷基。
- [0094] 就本发明而言，术语“杂芳基”是指含有至少一个选自氮、氧和硫的杂原子的芳环体系。该杂芳基环可与一个或多个杂芳基环、芳香或非芳香烃环或杂环烷基环稠合或以其它方式连接。杂芳基的实例包括吡啶、呋喃、噻吩、5,6,7,8-四氢异喹啉和嘧啶。杂芳基的优选实例包括噻吩基、苯并噻吩基、吡啶基、喹啉基、吡嗪基、嘧啶基、咪唑基、苯并咪唑基、呋喃基、苯并呋喃基、噻唑基、苯并噻唑基、异噻唑基、噁二唑基、异噻唑基、苯并异噻唑基、三唑基、四唑基、吡咯基、吡唑基、吡啶基和苯并吡啶基。
- [0095] 就本发明而言，术语“杂原子”指氮、氧和硫。
- [0096] 在一些实施方案中，取代的烷基包括羧基烷基、氨基烷基、二烷基氨基、羟基烷基和巯基烷基；取代的烯基包括羧基烯基、氨基烯基、二烯基氨基、羟基烯基和巯基烯基；取代的炔基包括羧基炔基、氨基炔基、二炔基氨基、羟基炔基和巯基炔基；取代的环烷基包括基团例如4-氯环己基；芳基包括基团例如萘基；取代的芳基包括基团例如3-溴苯基；芳烷基包括基团例如甲苯基；杂烷基包括基团例如乙基噻吩；取代的杂烷基包括基团例如3-甲氧基-噻吩；烷氧基包括基团例如甲氧基；且苯氧基包括基团例如3-硝基苯氧基。卤素应理解为包括氟、氯、碘和溴。
- [0097] 就本发明而言，“正整数”应理解为包括等于或大于1的整数，且本领域技术人员应理解在合理的范围内。
- [0098] 就本发明而言，术语“连接”应理解为包括共价（优选）或非共价连接一个基团至另一个基团上，即由于化学反应的结果。
- [0099] 术语“有效量”和“足够量”就本发明而言应是指达到所需效果或治疗效果的量，该效果是本领域普通技术人员所理解的。
- [0100] 使用本文所述的纳米颗粒组合物形成的术语“纳米颗粒”和/或“纳米颗粒复合物”是指基于脂质的纳米复合物。该纳米颗粒含有包封在阳离子脂质、促融合脂质和PEG脂质的混合物中核酸例如寡核苷酸。或者，可形成该纳米颗粒而没有核酸。
- [0101] 就本发明而言，术语“治疗性寡核苷酸”是指用作药物或诊断的寡核苷酸。
- [0102] 就本发明而言，“基因表达的调控”应广义地理解为包括任何类型的基因（优选与癌症和炎症有关）与在没有用本文所述纳米颗粒治疗的情况下观察的基因表达相比进行

下调或上调,而与给药的途径无关。

[0103] 就本发明而言,“靶基因表达的抑制”应理解为是指当与在没有用本文所述纳米颗粒治疗的情况下所观察到的相比时,降低或削弱 mRNA 表达或所转录的蛋白质的量。这种抑制的合适分析包括例如使用本领域普通技术人员已知的技术例如斑点印迹、Northern 印迹、原位杂交、ELISA、免疫沉淀反应、酶功能、以及本领域普通技术人员已知的表型分析进行蛋白质或 mRNA 水平的实验。治疗条件可以通过例如细胞,优选癌细胞或组织中 mRNA 水平的降低加以确认。

[0104] 广义上说,应认为成功的抑制或治疗在获得所需响应时发生。例如,成功抑制或治疗可以通过获得例如 10% 以上(即 20%、30%、40%)的与肿瘤生长抑制有关的基因的下调而定义。或者,成功的治疗可以在与没有用本文所述纳米颗粒处理的情况下观察到的相比时,通过获得至少 20%,优选 30% 或更优选 40% 以上(即 50% 或 80%)的癌细胞或组织中的致癌基因 mRNA 水平的降低而定义,包括本领域技术人员考虑的其它临床标志物。

[0105] 而且,单数术语在说明书中的方便使用决不是为了限制。因此,例如,包含寡核苷酸、胆固醇类似物、阳离子脂质、促融合脂质、PEG 脂质等的组合物是指所述寡核苷酸、胆固醇类似物、阳离子脂质、促融合脂质、PEG 脂质等的一个或多个分子。还预期的是寡核苷酸可以是相同或不同的基因种类。还应理解本发明不限于本文公开的具体构型、方法步骤和材料,这些构型、方法步骤和材料可稍加修改。

[0106] 还应理解本文使用的术语仅是用于描述具体实施方案的目的,不是为了限制,因为本发明的范围将由所附权利要求和其等价物而限定。

[0107] 附图简要描述

[0108] 图 1 示意性地描述了制备如实施例 3-8 中所描述的化合物 6 的反应图。

[0109] 图 2 示意性地描述了制备如实施例 9-13 中所描述的化合物 11 的反应图。

[0110] 图 3 示意性地描述了制备如实施例 14-16 中所描述的化合物 14 的反应图。

[0111] 发明详述

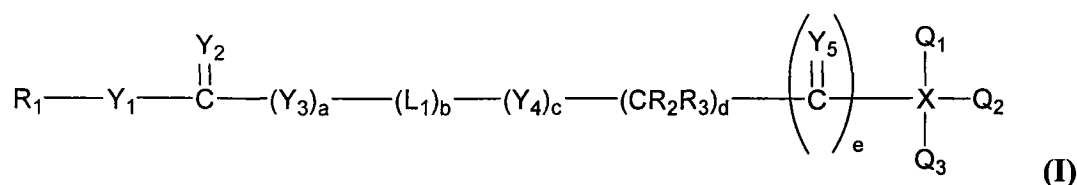
[0112] 在本发明的一方面中,提供了含有多个阳离子部分的阳离子脂质。在本发明的另一方面中,提供了用于核酸递送的含有该阳离子脂质的纳米颗粒组合物。该纳米颗粒组合物可以含有 (i) 式 (I) 的阳离子脂质;(ii) 促融合脂质;和 (iii) PEG 脂质。所预期的核酸包括寡核苷酸或质粒,优选寡核苷酸。通过使用本文所述的纳米颗粒组合物制备的纳米颗粒包括包封在脂质载体内的核酸。

[0113] A. 式 (I) 的阳离子脂质

[0114] 1. 概述

[0115] 本文所描述的阳离子脂质具有式 (i) :

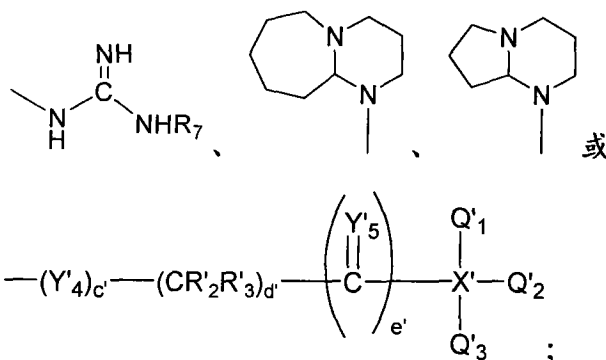
[0116]



[0117] 其中

[0118] R_1 是胆固醇或其类似物;

- [0119] Y_1 、 Y_2 和 Y_5 独立地是 O、S 或 NR_4 ，优选 O；
- [0120] Y_3 和 Y_4 独立地是 O、S 或 NR_5 ，优选 O 或 NR_5 ；
- [0121] L_1 是具有取代的饱和或不饱和、支链或线性的 C_{3-50} 烷基（即 C_{3-40} 烷基、 C_{3-20} 烷基、 C_{3-15} 烷基、 C_{3-10} 烷基等）的间隔基团，其中一个或多个碳被 NR_6 、O、S 或 $C(=Y)$ ，优选 O 替代，其中 Y 是 O、S 或 NR_4 ，优选 O；
- [0122] (a)、(c) 和 (e) 独立地是 0 或 1；
- [0123] (b) 是 0 或正整数，优选 0 或约 1-约 5 的正整数（例如 0、1、2、3、4、5），更优选 0 或约 1-约 3 的整数（例如 0、1、2、3），条件是当 (b) 为 0 时，(a) 和 (c) 不同时为正整数；
- [0124] (d) 是 0 或正整数，优选 0 或约 1-约 5 的正整数（例如 0、1、2、3、4、5）；
- [0125] X 是 C 或 P；
- [0126] Q_1 是 H、 C_{1-6} 烷基、 NH_2 或 $-(L_{11})_{d1}-R_{11}$ ；
- [0127] Q_2 是 H、 C_{1-6} 烷基、 NH_2 或 $-(L_{12})_{d2}-R_{12}$ ；
- [0128] Q_3 是 (=O)、H、 C_{1-6} 烷基、 NH_2 或 $-(L_{13})_{d3}-R_{13}$ ，
- [0129] 条件是
- [0130] (i) 当 X 是 C 时， Q_3 不是 (=O)；和
- [0131] (ii) 当 X 是 P 时，(e) 为 0，
- [0132] 其中
- [0133] L_{11} 、 L_{12} 和 L_{13} 独立地选自双官能间隔基；
- [0134] (d1)、(d2) 和 (d3) 独立地是 0 或正整数，优选 0 或约 1-约 9 的整数（例如 1、2、3、4、5、6），更优选 0 或约 1-约 3 的正整数（例如 1、2、3、4）；
- [0135] R_{11} 、 R_{12} 和 R_{13} 独立地是氢、 NH_2 、
- [0136]



- [0137] 其中
- [0138] Y'_4 是 O、S 或 NR'_5 ，优选 O 或 NR'_5 ；
- [0139] Y'_5 独立地是 O、S 或 NR'_4 ，优选 O；
- [0140] (c') 和 (e') 独立地是 0 或 1；
- [0141] (d') 是 0 或正整数，优选 0 或约 1-约 10 的正整数（例如 1、2、3、4、5、6），更优选 0 或约 1-约 4 的正整数（例如 1、2、3）；
- [0142] X' 是 C 或 P；
- [0143] Q'_1 是 H、 C_{1-6} 烷基、 NH_2 或 $-(L'_{11})_{d'1}-R'_{11}$ ；
- [0144] Q'_2 是 H、 C_{1-6} 烷基、 NH_2 或 $-(L'_{12})_{d'2}-R'_{12}$ ；

[0145] Q'_{1-3} 是 ($=O$)、 H 、 C_{1-6} 烷基、 NH_2 或 $-(L'_{13})_{d'_{1-3}}-R'_{1-3}$,

[0146] 条件是

[0147] (i) 当 X' 是 C 时, Q'_{1-3} 不是 ($=O$); 和

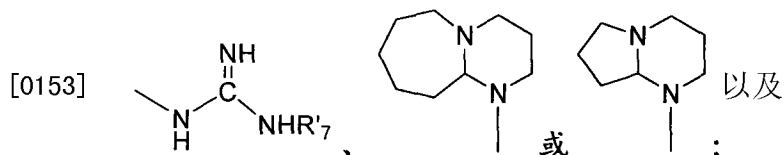
[0148] (ii) 当 X' 是 P 时, (e') 为 0,

[0149] 其中

[0150] L'_{11} 、 L'_{12} 和 L'_{13} 独立地选自双官能间隔基;

[0151] (d'_{1-3})、(d'_{2-5}) 和 (d'_{7-9}) 独立地是 0 或正整数, 优选 0、1、2、3、4;

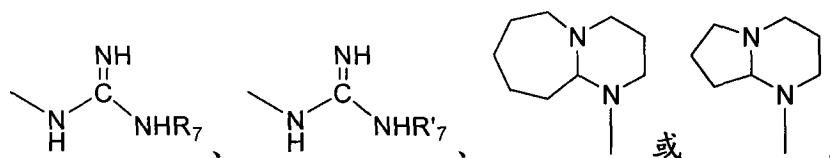
[0152] R'_{11} 、 R'_{12} 和 R'_{13} 独立地是氢、 NH_2 、



[0154] R_{2-7} 、 R'_{2-5} 和 R'_{7-9} 独立地选自氢、氨基、取代的氨基、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基、 C_{3-19} 支链烷基、 C_{3-8} 环烷基、 C_{1-6} 取代的烷基、 C_{2-6} 取代的烯基、 C_{2-6} 取代的炔基、 C_{3-8} 取代的环烷基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、 C_{1-6} 杂烷基和取代的 C_{1-6} 杂烷基, 优选 H 、甲基、乙基和丙基, 更优选 H ,

[0155] 条件是 Q_{1-3} 和 Q'_{1-3} 中的至少一个或多个 (例如一个、二个、三个) 包括

[0156]



[0157] 就本发明而言, 当 (b) 等于或大于 2 时, 每个 L_1 相同或不同。

[0158] 就本发明而言, 当每个 (d_1)、(d_2) 和 (d_3) 分别等于或大于 2 时, 每个 L_{11} 、 L_{12} 和 L_{13} 相同或不同。

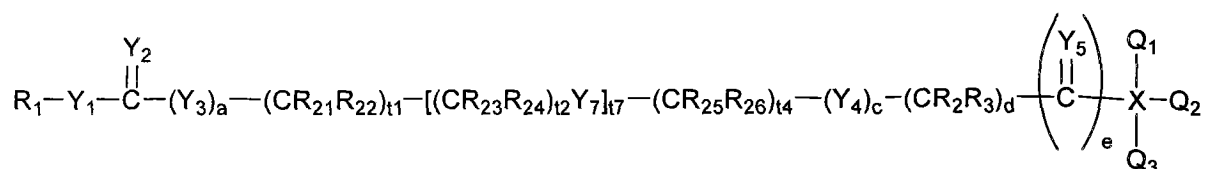
[0159] 就本发明而言, 当每个 (d'_{1-3})、(d'_{2-5}) 和 (d'_{7-9}) 分别等于或大于 2 时, 每个 L'_{11} 、 L'_{12} 和 L'_{13} 相同或不同。

[0160] 在一个优选的方面中, (d_1) 和 (d_2) 不为 0。在另一个优选的方面中, (d_1)、(d_2)、(d_3)、(d'_{1-3})、(d'_{2-5}) 和 (d'_{7-9}) 不同时为 0。

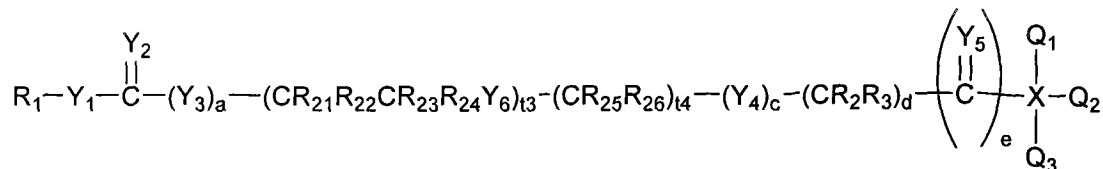
[0161] 在本发明的某些方面, (a)、(b)、(c)、(d) 和 (e) 都为 0。

[0162] 在一个实施方案中, 阳离子脂质具有式 (Ia):

[0163]



或



[0164] 其中

[0165] Y_6 和 Y_7 独立地是 O、S 或 NR_{29} ，优选 O 或 NH；

[0166] R_{21-26} 和 R_{29} 独立地选自氢、 C_{1-6} 烷基、 C_{3-12} 支链烷基、 C_{3-8} 环烷基、 C_{1-6} 取代的烷基、 C_{3-8} 取代的环烷基、芳基、取代的芳基、芳烷基、 C_{1-6} 杂烷基、取代的 C_{1-6} 杂烷基、 C_{1-6} 烷氧基、苯氧基和 C_{1-6} 杂烷氧基，优选氢、甲基、乙基和丙基；

[0167] $(t1)$ 、 $(t2)$ 、 $(t3)$ 、 $(t4)$ 和 $(t7)$ 独立地是 0 或正整数，优选约 1- 约 10（例如 1、2、3、4、5），更优选 1、2、3，

[0168] 其中当 $(t1)$ 等于或大于 2 时， R_{21} 和 R_{22} 在每种情形中独立地相同或不同；

[0169] 其中当 $(t2)$ 和 $(t7)$ 独立地等于或大于 2 时， R_{23} 、 R_{24} 和 Y_7 在每种情形中独立地相同或不同，

[0170] 其中当 $(t3)$ 等于或大于 2 时， R_{21} 、 R_{22} 、 R_{23} 、 R_{24} 和 Y_6 在每种情形中独立地相同或不同，

[0171] 其中当 $(t4)$ 等于或大于 2 时， R_{25} 和 R_{26} 在每种情形中独立地相同或不同；并且

[0172] 所有其它变量如上所定义。

[0173] 本文所描述的式 (I) 的阳离子脂质在选择 pH，例如 $pH < 13$ （例如 $pH 6-12$ 、 $pH 6-8$ ）下可带净正电荷。

[0174] 2. 间隔基团 L_1

[0175] 在本发明的一方面中，间隔基团 L_1 是具有取代的饱和或不饱和、支链或线性的 C_{3-50} 烷基（即 C_{3-40} 烷基、 C_{3-20} 烷基、 C_{3-15} 烷基、 C_{3-10} 烷基等）的双官能连接基，其中任选地一个或多个碳被 NR_6 、O、S 或 $C(=Y)$ ，（优选 O 或 NH）替代，但不超过 70%（即小于 60%、50%、40%、30%、20%、10%）的碳被替代。

[0176] L_1 的一些说明性实例，当与 $(Y_4)_c-(CR_2R_3)_d-C(=Y_5)_e$ 部分组合时，独立地选自：

[0177] $-(CR_{21}R_{22})_{t1}-[C(=Y_6)]_{e1}-(Y_4)_c-(CR_2R_3)_d-C(=Y_5)_e-$ ；

[0178] $-(CR_{21}R_{22})_{t1}Y_7-(CR_{23}R_{24})_{t2}-(Y_8)_{e2}-[C(=Y_6)]_{e1}-(Y_4)_c-(CR_2R_3)_d-C(=Y_5)_e-$ ，

[0179] $-(CR_{21}R_{22}CR_{23}R_{24}Y_7)_{t3}-[C(=Y_6)]_{e1}-(Y_4)_c-(CR_2R_3)_d-C(=Y_5)_e-$ ，

[0180] $-(CR_{21}R_{22}CR_{23}R_{24}Y_7)_{t3}(CR_{25}R_{26})_{t4}-(Y_8)_{e2}-[C(=Y_6)]_{e1}-(Y_4)_c-(CR_2R_3)_d-C(=Y_5)_e-$ ，

[0181] $-(CR_{21}R_{22}CR_{23}R_{24}Y_7)_{t3}(CR_{25}R_{26})_{t4}-(Y_8)_{e2}-[C(=Y_6)]_{e1}-(CR_{27}R_{28})_{t1}-(Y_4)_c-(CR_2R_3)_d-C(=Y_5)_e-$ ，

[0182] $-[(CR_{21}R_{22}CR_{23}R_{24})_{t5}Y_7]_{t6}(CR_{25}R_{26})_{t4}-(Y_8)_{e2}-[C(=Y_6)]_{e1}-(Y_4)_c-(CR_2R_3)_d-C(=Y_5)_e-$ ，

[0183] $-(CR_{21}R_{22})_{t1}-[(CR_{23}R_{24})_{t2}Y_7]_{t7}(CR_{25}R_{26})_{t4}-(Y_4)_c-(CR_2R_3)_d-C(=Y_5)_e-$ 和

[0184] $-(\text{CR}_{21}\text{R}_{22})_{t1}-[(\text{CR}_{23}\text{R}_{24})_{t2}\text{Y}_7]_{t7}(\text{CR}_{25}\text{R}_{26})_{t4}-(\text{Y}_8)_{e2}-[\text{C}(=\text{Y}_6)]_{e1}-(\text{Y}_4)_c-(\text{CR}_2\text{R}_3)_d-\text{C}(=\text{Y}_5)_e-$,

[0185] 其中：

[0186] Y_6 独立地是 O、 NR_{29} 或 S，优选 O；

[0187] Y_{7-8} 独立地是 O、 NR_{29} 或 S，优选 O 或 NR_{29} ；

[0188] R_{21-29} 独立地选自氢、 C_{1-6} 烷基、 C_{3-12} 支链烷基、 C_{3-8} 环烷基、 C_{1-6} 取代的烷基、 C_{3-8} 取代的环烷基、芳基、取代的芳基、芳烷基、 C_{1-6} 杂烷基、取代的 C_{1-6} 杂烷基、 C_{1-6} 烷氧基、苯氧基和 C_{1-6} 杂烷氧基，优选氢、甲基、乙基和丙基，更优选 H；

[0189] (t1)、(t2)、(t3)、(t4)、(t5)、(t6) 和 (t7) 中的每一个独立地是 0 或正整数（例如 1、2、3、4）；

[0190] 每个 (c)、(e)、(e1) 和 (e2) 独立地是 0 或 1；并且

[0191] 所有其它变量如上所定义。

[0192] 在本发明范围内所预期的双官能 L_1 连接基包括允许其中取代基和变量组合使得这样的组合产生稳定的化合物（式 (I) 的阳离子脂质）的那些。

[0193] 就本发明而言，当 (t1)、(t2)、(t3)、(t4)、(t5)、(t6) 和 (t7) 中的每一个独立地等于或大于 2 时， R_{21} 、 R_{22} 、 R_{23} 、 R_{24} 、 R_{25} 、 R_{26} 、 R_{27} 和 R_{28} 在每种情形中独立地相同或不同。

[0194] 在一个优选的实施方案中， R_{21-29} 为氢或甲基。

[0195] 在另一个优选的实施方案中， Y_{7-8} 为 O 或 NH， R_{21-29} 为氢或甲基。

[0196] 在其它的实施方案和 / 或可供选择的实施方案中， L_1 基团在与 $(\text{Y}_4)_c-(\text{CR}_2\text{R}_3)_d-\text{C}(=\text{Y}_5)_e$ 的部分组合时的说明性实例选自如下：

[0197] $-(\text{CH}_2)_4-\text{C}(=\text{O})-$,

[0198] $-(\text{CH}_2)_5-\text{C}(=\text{O})-$,

[0199] $-(\text{CH}_2)_6-\text{C}(=\text{O})-$,

[0200] $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{O}-\text{C}(=\text{O})-$,

[0201] $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2-\text{CH}_2\text{O}-\text{C}(=\text{O})-$,

[0202] $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_3-\text{CH}_2\text{O}-\text{C}(=\text{O})-$,

[0203] $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2-\text{C}(=\text{O})-$,

[0204] $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-$,

[0205] $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-$,

[0206] $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{NHC}(=\text{O})-$,

[0207] $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{C}(=\text{O})-$,

[0208] $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-$,

[0209] $-\text{CH}_2-\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-$,

[0210] $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-$,

[0211] $-\text{CH}_2-\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2-\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-$,

[0212] $-(\text{CH}_2)_4-\text{C}(=\text{O})\text{NH}-$,

[0213] $-(\text{CH}_2)_5-\text{C}(=\text{O})\text{NH}-$,

[0214] $-(\text{CH}_2)_6-\text{C}(=\text{O})\text{NH}-$,

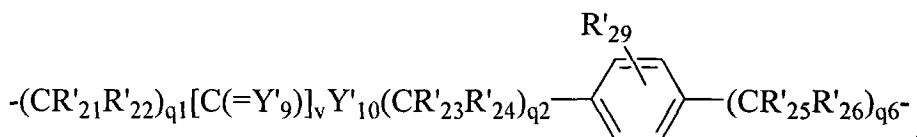
[0215] $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-$,

- [0216] $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2-\text{CH}_2\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-$,
 [0217] $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_3-\text{CH}_2\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-$,
 [0218] $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-$,
 [0219] $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2-\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-$,
 [0220] $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-$,
 [0221] $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-$,
 [0222] $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-$,
 [0223] $-\text{CH}_2-\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-$,
 [0224] $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-$,
 [0225] $-\text{CH}_2-\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2-\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-$,
 [0226] $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2-$,
 [0227] $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_3-$,
 [0228] $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{O}-$,
 [0229] $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$,
 [0230] $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_3-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$,
 [0231] $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$,
 [0232] $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$,
 [0233] $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$,
 [0234] $-\text{CH}_2-\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$,
 [0235] $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ 和
 [0236] $-\text{CH}_2-\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2-$.

[0237] 3. 双官能间隔基 L_{11-13} 和 L'_{11-13}

[0238] 在另一个实施方案中,双官能间隔基 L_{11-13} 和 L'_{11-13} 是可连接到阳离子部分,例如胍鎓、DBU、DBN 等的末端双官能连接基。双官能连接基 L_{11-13} 和 L'_{11-13} 独立地选自:

- [0239] $-(\text{CR}'_{21}\text{R}'_{22})_{q1}(\text{Y}'_8)_{v'}[\text{C}(=\text{Y}'_9)]_v(\text{CR}'_{23}\text{R}'_{24})_{q2}-$,
 [0240] $-(\text{CR}'_{21}\text{R}'_{22})_{q1}(\text{Y}'_8)_{v'}[\text{C}(=\text{Y}'_9)]_v\text{Y}'_{10}(\text{CR}'_{23}\text{R}'_{24})_{q2}-$,
 [0241] $-(\text{CR}'_{21}\text{R}'_{22})_{q1}(\text{Y}'_8)_{v'}[\text{C}(=\text{Y}'_9)]_v(\text{CR}'_{23}\text{R}'_{24})_{q2}-\text{Y}'_{11}-(\text{CR}'_{23}\text{R}'_{24})_{q3}-$,
 [0242] $-(\text{CR}'_{21}\text{R}'_{22})_{q1}(\text{Y}'_8)_{v'}[\text{C}(=\text{Y}'_9)]_v\text{Y}'_{10}(\text{CR}'_{23}\text{R}'_{24})_{q2}-\text{Y}'_{11}-(\text{CR}'_{23}\text{R}'_{24})_{q3}-$,
 [0243] $-\text{CR}'_{21}\text{R}'_{22})_{q1}(\text{Y}'_8)_{v'}[\text{C}(=\text{Y}'_9)]_v(\text{CR}'_{23}\text{R}'_{24}\text{CR}'_{25}\text{R}'_{26}\text{Y}'_{12})_{q4}(\text{CR}'_{27}\text{CR}'_{28})_{q5}-$,
 [0244] $-(\text{CR}'_{21}\text{R}'_{22})_{q1}(\text{Y}'_8)_{v'}[\text{C}(=\text{Y}'_9)]_v\text{Y}'_{10}(\text{CR}'_{23}\text{R}'_{24}\text{CR}'_{25}\text{R}'_{26}\text{Y}'_{12})_{q4}(\text{CR}'_{27}\text{CR}'_{28})_{q5}-$, 和
 [0245]



[0246] 其中:

[0247] Y'_8 和 Y'_{10-12} 独立地是 O、 NR'_{30} 或 S, 优选 O 或 NR'_{30} ;

[0248] Y'_9 独立地是 O、 NR'_{31} 或 S, 优选 O;

[0249] R'_{21-31} 在每种情形中独立地选自氢、 C_{1-6} 烷基、 C_{3-12} 支链烷基、 C_{3-8} 环烷基、 C_{1-6} 取代

的烷基、C₃₋₈ 取代的环烷基、芳基、取代的芳基、芳烷基、C₁₋₆ 杂烷基、取代的 C₁₋₆ 杂烷基、C₁₋₆ 烷氧基、苯氧基和 C₁₋₆ 杂烷氧基, 优选氢、甲基、乙基和丙基;

[0250] (q1)、(q2)、(q3)、(q4)、(q5) 和 (q6) 独立地是 0 或约 1- 约 10 的正整数, 优选 1、2、3、4、5、6; 并且

[0251] (v) 和 (v') 独立地是 0 或 1。

[0252] 在本发明范围内所预期的双官能间隔基包括其中允许取代基和变量组合使得这样的组合产生稳定的化合物的那些。

[0253] 就本发明而言, 当 (q1) 等于或大于 2 时, R'₂₁ 和 R'₂₂ 在每种情形中独立地相同或不同。

[0254] 就本发明而言, 当 (q2) 和 / 或 (q3) 等于或大于 2 时, R'₂₃ 和 R'₂₄ 在每种情形中独立地相同或不同。

[0255] 就本发明而言, 当 (q4) 等于或大于 2 时, R'₂₃、R'₂₄、R'₂₅ 和 R'₂₆ 在每种情形中独立地相同或不同。

[0256] 就本发明而言, 当 (q6) 等于或大于 2 时, R'₂₅ 和 R'₂₅ 在每种情形中独立地相同或不同。

[0257] 就本发明而言, 当 (q5) 等于或大于 2 时, R'₂₇ 和 R'₂₈ 在每种情形中独立地相同或不同。

[0258] 在优选的实施方案中, R'₂₁₋₃₁ 为氢或甲基。

[0259] 在另一个优选的实施方案中, L₁₁₋₁₃ 和 L'₁₁₋₁₃ 独立地选自以下:

[0260] -CH₂-,

[0261] -(CH₂)₂-,

[0262] -(CH₂)₄-,

[0263] -(CH₂)₃-,

[0264] -O(CH₂)₂-

[0265] -C(=O)O(CH₂)₃-,

[0266] -C(=O)NH(CH₂)₃-,

[0267] -C(=O)(CH₂)₂-,

[0268] -C(=O)(CH₂)₃-,

[0269] -CH₂-C(=O)-O(CH₂)₃-,

[0270] -CH₂-C(=O)-NH(CH₂)₃-,

[0271] -CH₂-OC(=O)-O(CH₂)₃-,

[0272] -CH₂-OC(=O)-NH(CH₂)₃-,

[0273] -(CH₂)₂-C(=O)-O(CH₂)₃-,

[0274] -(CH₂)₂-C(=O)-NH(CH₂)₃-,

[0275] -CH₂C(=O)O(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-,

[0276] -CH₂C(=O)NH(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-,

[0277] -(CH₂)₂C(=O)O(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-,

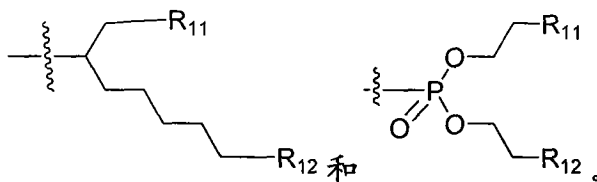
[0278] -(CH₂)₂C(=O)NH(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-,

[0279] -CH₂C(=O)O(CH₂CH₂O)₂CH₂CH₂- 和

[0280] $-(\text{CH}_2)_2\text{C}(=\text{O})\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 。

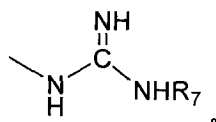
[0281] 在某些实施方案中, X(Q₁)(Q₂)(Q₃) 部分的一些实例包括:

[0282]



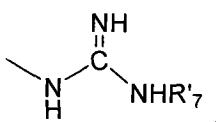
[0283] 在优选的实施方案中, R₁₁ 和 R₁₂ 包括:

[0284]



[0285] 在另一个优选的实施方案中, R'₁₁ 和 R'₁₂ 包括:

[0286]



[0287] B. 式 (I) 的阳离子脂质的制备

[0288] 制备本文所描述的式 (I) 的阳离子脂质的方法包括将胺-官能团化的胆固醇(官能团化胆固醇)与 1H-吡唑-1-甲脒反应以提供胍鎓部分。连接到胆固醇的胺可以是伯胺和/或仲胺, 1H-吡唑-1-甲脒中的胺可以是未取代或取代的。

[0289] 图 1 中显示了制备胆固醇基阳离子脂质的一个说明性实例。将活化的胆固醇碳酸盐例如氯甲酸胆固醇酯、胆固醇基 NHS 碳酸盐、或胆固醇基 PNP 碳酸盐, 与亲核胺反应, 接着进行 Boc 基团的去保护以制备化合物 3(具有带封端胺的双官能连接基的胆固醇)。将封端的胺进一步与赖氨酸反应以制备具有支链部分的胆固醇(化合物 4)。通过在酸性条件中化合物 4 的 Boc 部分的去保护, 制得化合物 5。将化合物 5 的胺与 1H-吡唑-1-甲脒反应从而提供含有双-胍鎓部分的化合物 6。

[0290] 可使用本领域普通技术人员已知的偶联剂例如 1,3-二异丙基碳二亚胺(DIPC)、二烷基碳二亚胺、2-卤素-1-烷基吡啶鎓卤化物、1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDC)、丙烷膦酸环状酸酐(PPACA)和苯基二氯代磷酸酯, 通过在碱存在下使用标准有机合成技术将含胺化合物连接到胆固醇。

[0291] 在其它实施方案中, 当用离去基团例如 NHS、PNP 或氯甲酸酯活化胆固醇或含胺化合物时, 可在碱存在下而没有偶联剂存在下进行反应。

[0292] 通常地, 本文所描述式 (I) 的阳离子脂质在碱例如 DMAP 或 DIEA 存在下通过将活化的胆固醇与含胺的亲核试剂例如化合物 1 反应进行制备。优选地, 在惰性溶剂例如二氯甲烷、氯仿、甲苯、DMF 或它们的混合物中进行该反应。还优选在碱例如 DMAP、DIEA、吡啶、三乙胺等存在下于约 -4°C - 约 70°C (例如约 -4°C - 约 50°C) 的温度下进行该反应。在一个优选的实施方案中, 在约 0°C - 约 25°C 或 0°C - 约室温的温度下进行该反应。

[0293] 可用强酸例如三氟乙酸(TFA)、HCl、硫酸等, 或通过催化氢化、自由基反应等进行从含胺化合物, 例如化合物 2 或 4 上的保护基的去除, 在一个实施方案中, 用二氧六环中的

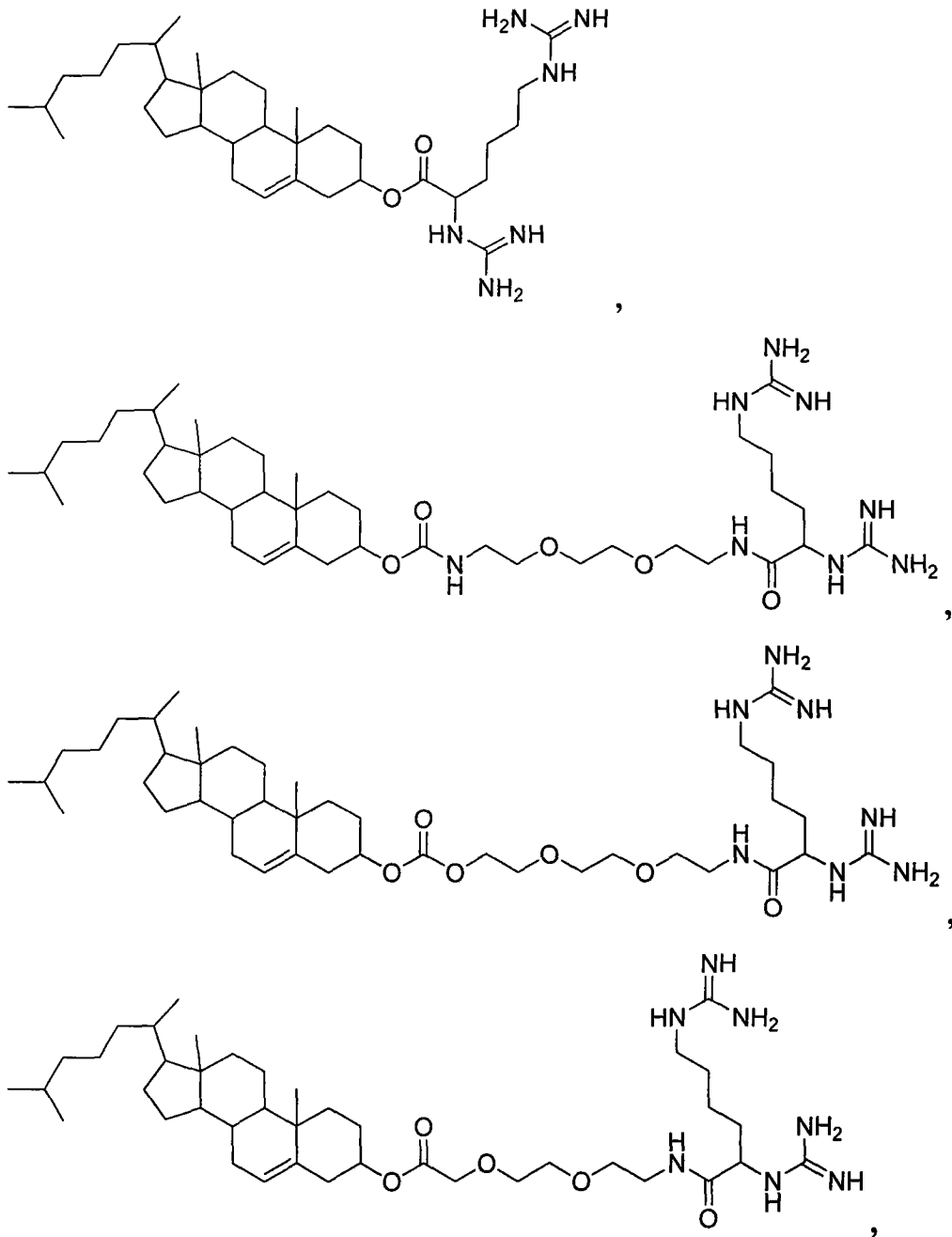
HCl 溶液进行 Boc 基团的去保护。可在约 -4°C - 约 50°C 的温度下进行去保护反应。优选地,在约 0°C - 约 25°C 或 - 室温的温度下进行反应。在另一个实施方案中,在室温下进行 Boc 基团的去保护。

[0294] 在惰性溶剂例如二氯甲烷、氯仿、DMF 或它们的混合物中通过将连接到胆固醇的胺 (例如化合物 5 的胺) 与 1H- 吡唑 -1- 甲脒反应进行胺向胍部分的转化。还可使用其它试剂,例如 N-BOC-1H- 吡唑 -1- 甲脒或 N,N' - 二 - (叔 - 丁氧羰基) 硫脒和偶联试剂将胺转化为胍部分。

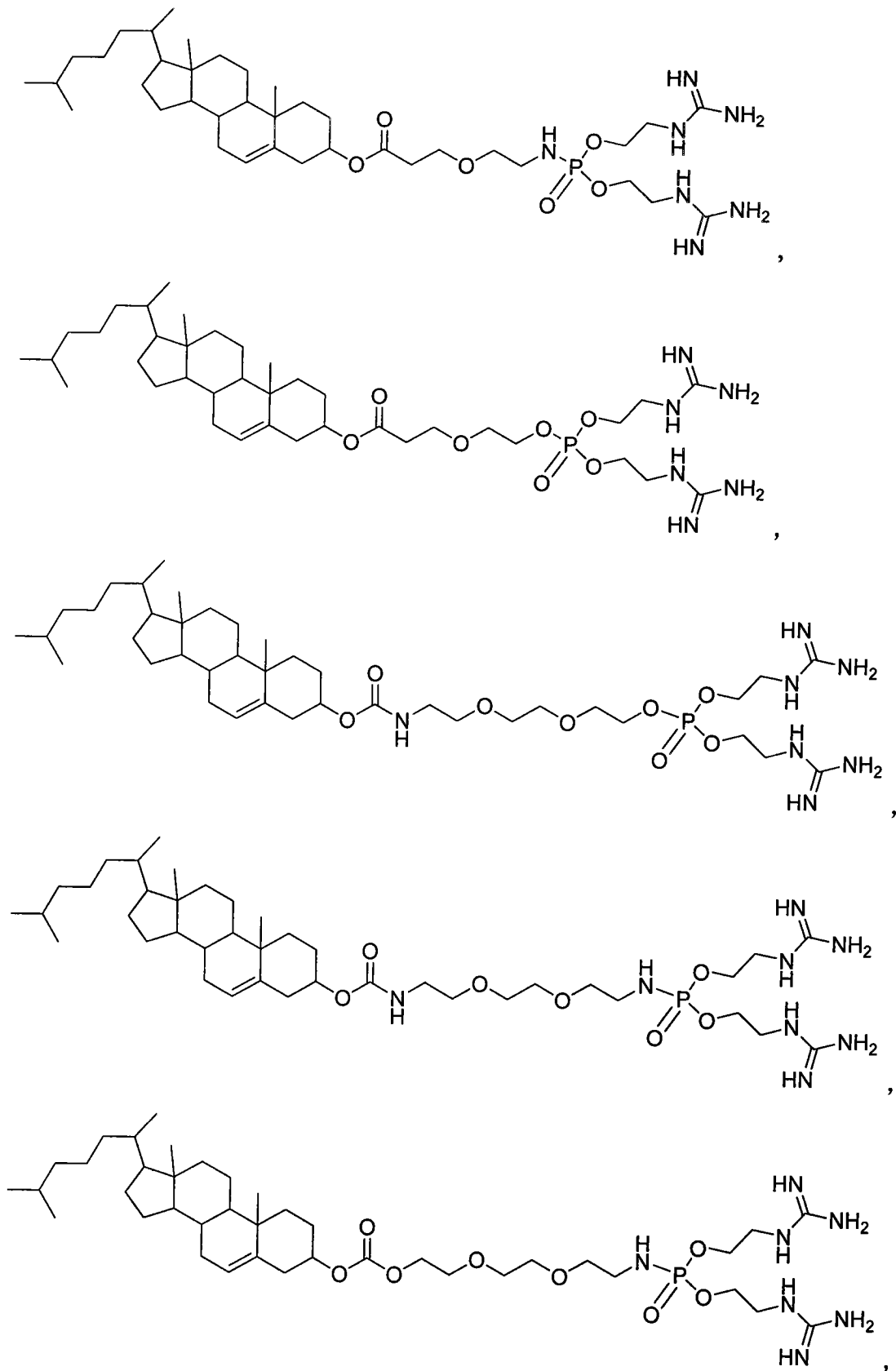
[0295] 本领域普通技术人员已知的偶联剂,例如 1,3- 二异丙基碳二亚胺 (DIPC)、二烷基碳二亚胺、2- 卤素 -1- 烷基吡啶鎓卤化物、1-(3- 二甲基氨基丙基)-3- 乙基碳二亚胺 (EDC)、丙烷膦酸环状酸酐 (PPACA) 和苯基二氯代磷酸酯,可用于制备本文所描述的阳离子脂质。优选在碱,例如 DMAP、DIEA、吡啶、三乙胺等存在下于约 -4°C - 约 50°C 的温度下进行该反应。在一个优选的实施方案中,在约 0°C - 约 25°C 或 - 室温的温度下进行反应。

[0296] 通过本文所描述的方法制备的一些代表性的实施方案包括但不限于:

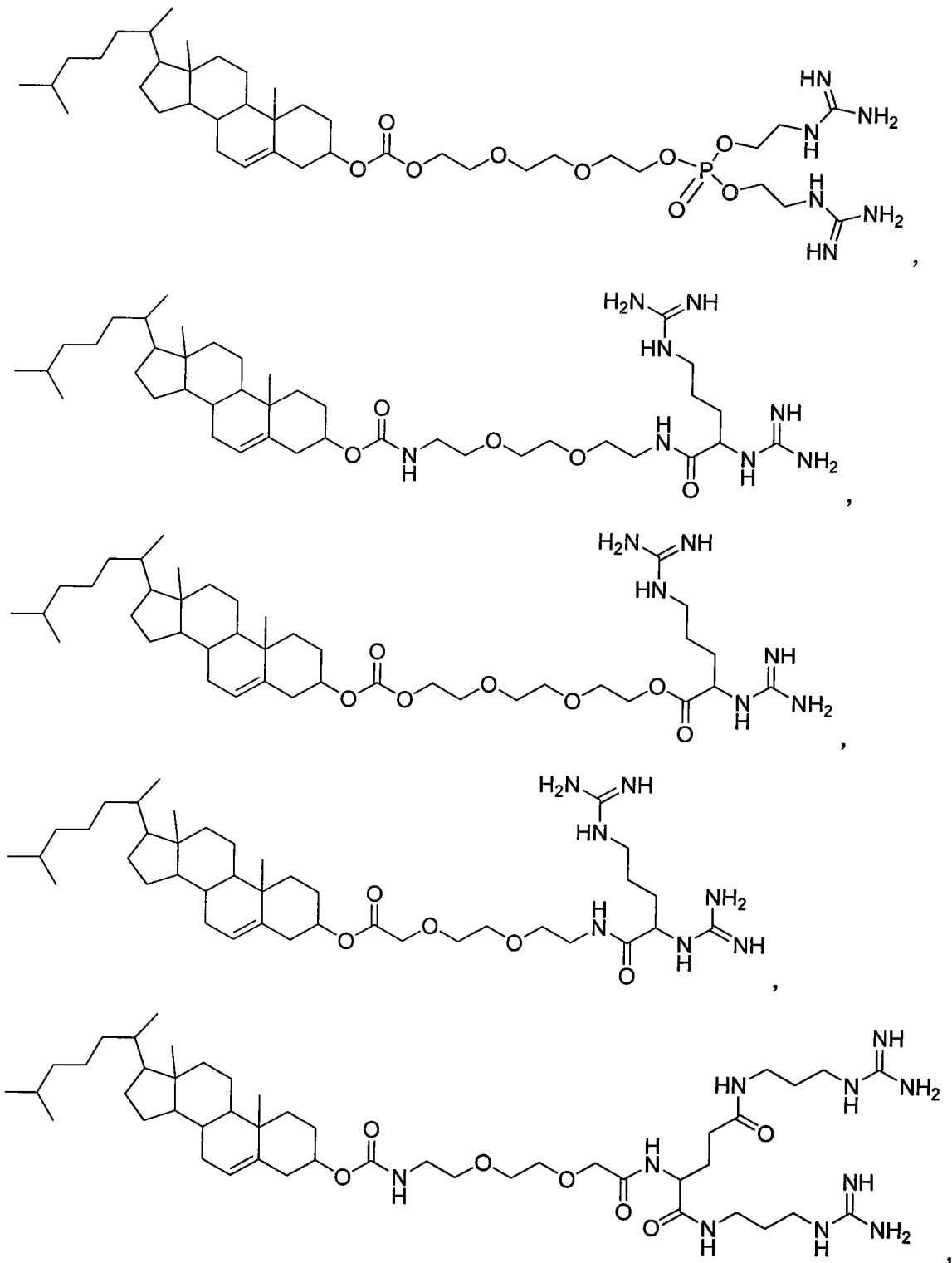
[0297]



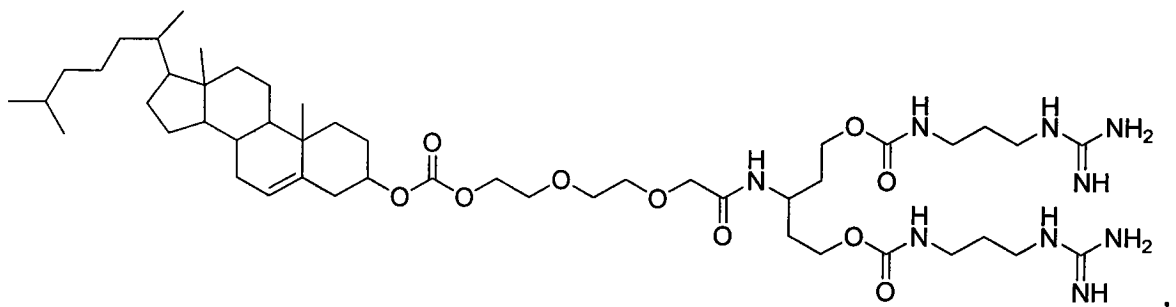
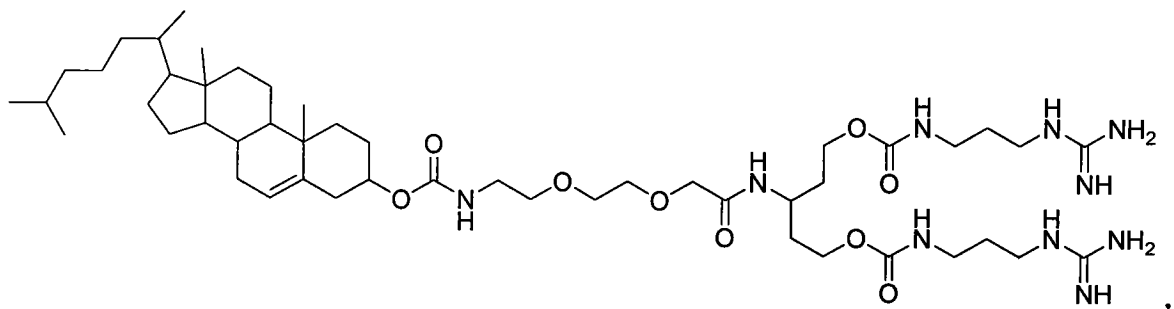
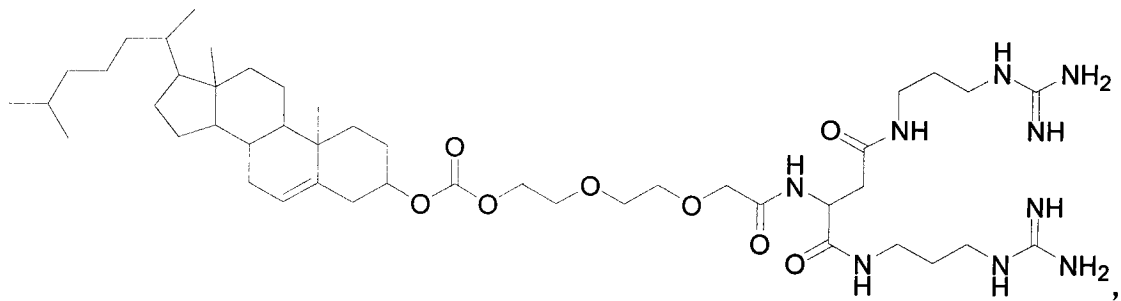
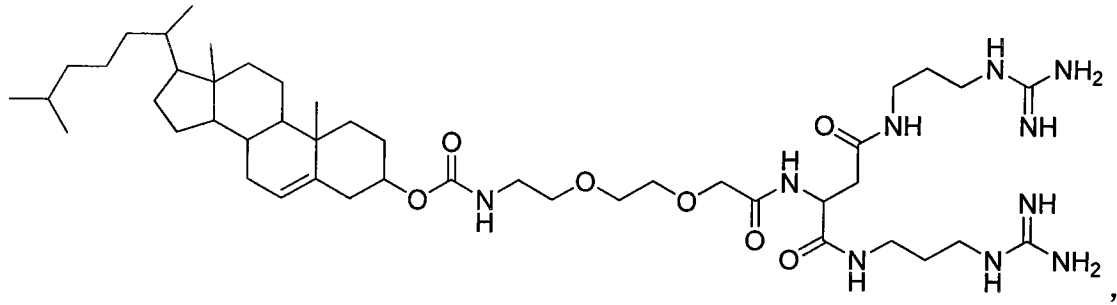
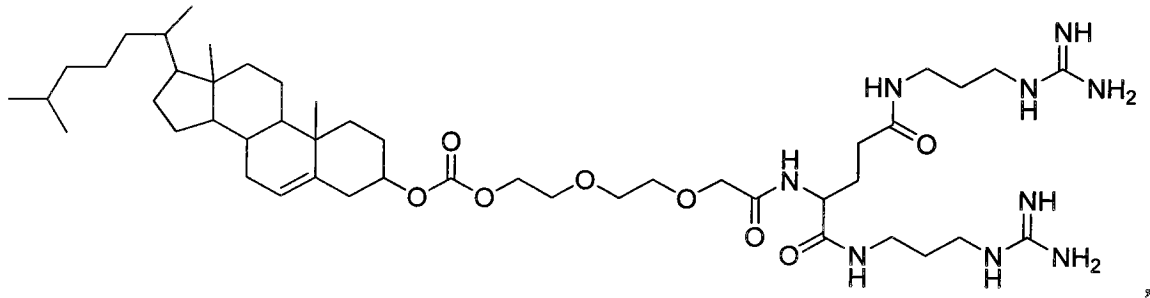
[0298]



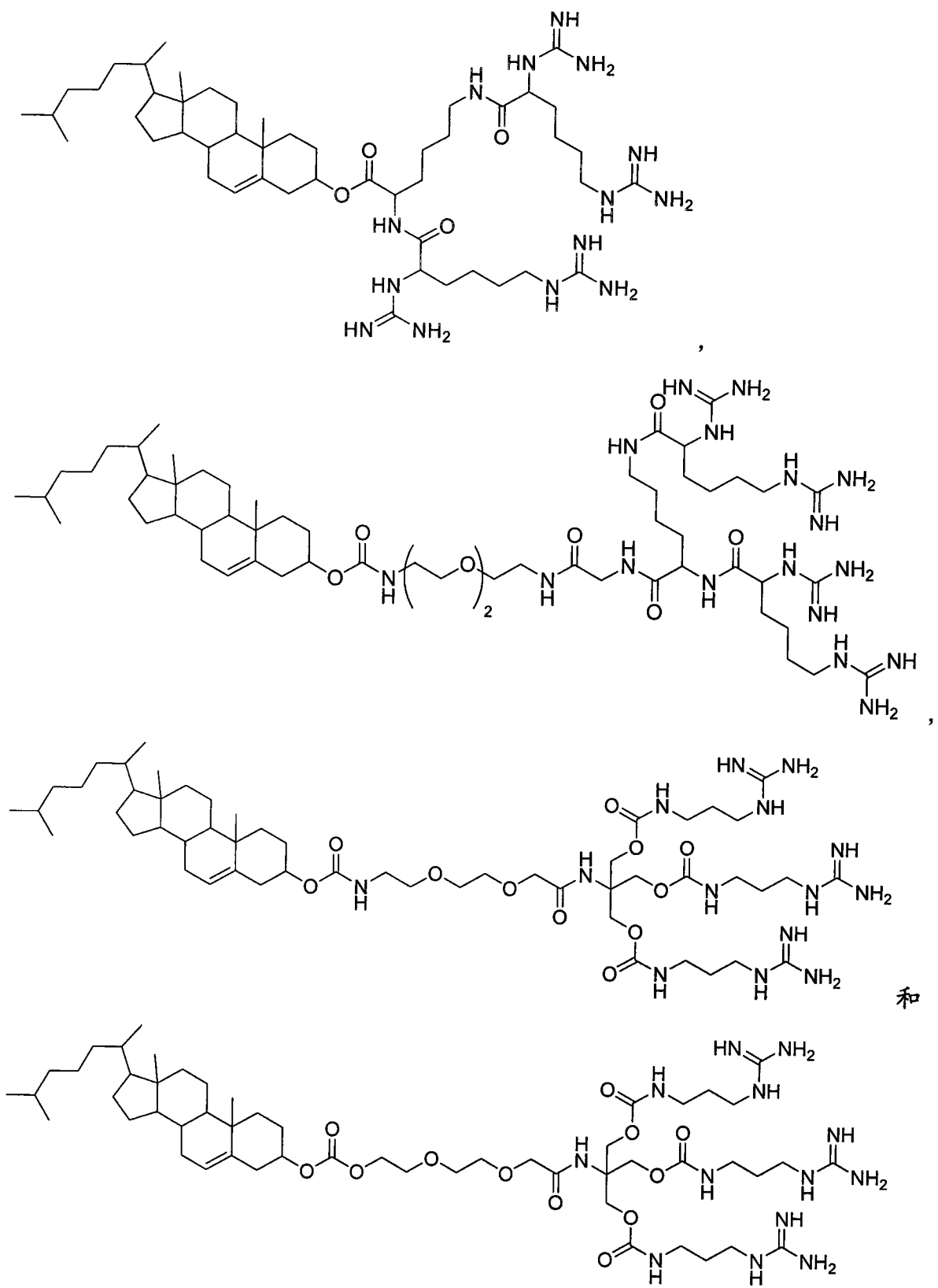
[0299]



[0300]

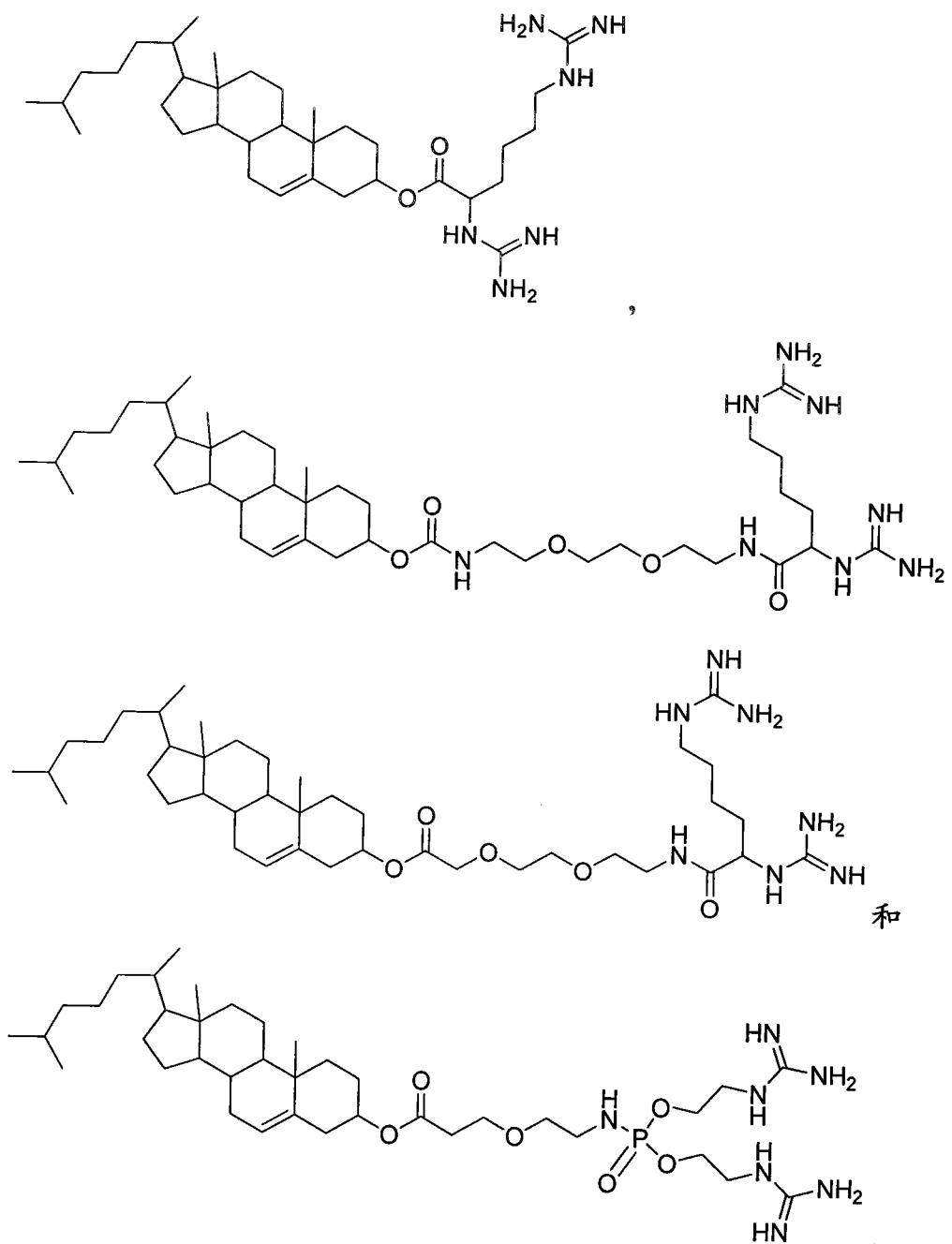


[0301]



[0302] 一个优选的实施方案包括：

[0303]



[0304] C. 纳米颗粒组合物 / 配制剂

[0305] 1. 概述

[0306] 在本发明的一方面中, 纳米颗粒组合物含有式 (I) 的阳离子脂质。

[0307] 在优选的方面中, 纳米颗粒组合物含有式 (I) 的阳离子脂质、促融合脂质和 PEG- 脂质。

[0308] 在更优选的方面中, 纳米颗粒组合物包括胆固醇。

[0309] 在本发明的其它方面中, 本文所述的纳米颗粒组合物可以含有另外的本领域已知的阳离子脂质。还预期纳米颗粒组合物含有不同的促融合脂质 (非阳离子脂质) 的混合物和 / 或不同的 PEG- 脂质的混合物。

[0310] 在另一方面, 纳米颗粒组合物含有摩尔比为该纳米颗粒组合物中存在的总脂质 (药物载体) 的约 10% - 约 99.9% 的本文所描述的式 (I) 的阳离子脂质。

[0311] 阳离子脂质组分可以为纳米颗粒组合中存在的总脂质的约 2% - 约 60%，约 5% - 约 50%，约 10% - 约 45%，约 15% - 约 25% 或约 30% - 约 40%。

[0312] 在一个特殊实施方案中，阳离子脂质以纳米颗粒组合中存在的总脂质的约 15- 约 25%（即 15、16、17、18、19、20、21、22、23、24 或 25%）的量存在。

[0313] 在本文所述的纳米颗粒组合物的另一个优选的方面中，该组合物含有摩尔比为纳米颗粒组合中存在的总脂质的约 20% - 约 85%，约 25% - 约 85%，约 60% - 约 80%（例如 65、75、78、或 80%）的总的促融合 / 非阳离子脂质，包括胆固醇和 / 或基于非胆固醇的促融合脂质。在一个特殊实施方案中，总的促融合 / 非阳离子脂质为纳米颗粒组合中存在的总脂质的约 80%。

[0314] 在又一个优选的实施方案中，基于非胆固醇的促融合 / 非阳离子脂质以纳米颗粒组合中存在的总脂质的约 25- 约 78%（25、35、47、60、或 78%），或约 60- 约 78% 的摩尔比存在。在一个特殊实施方案中，基于非胆固醇的促融合 / 非阳离子脂质为纳米颗粒组合中存在的总脂质的约 60%。

[0315] 在又一个优选的方面中，纳米颗粒组合物包括除非胆固醇促融合脂质外的以纳米颗粒组合中存在的总脂质的约 0% - 约 60%，约 10% - 约 60%，或约 20% - 约 50%（例如 20、30、40 或 50%）的摩尔比的胆固醇。在一个实施方案中，胆固醇为纳米颗粒组合中存在的总脂质的约 20%。

[0316] 在本发明的又一个方面中，包含在纳米颗粒组合物中的 PEG- 脂质在纳米颗粒组合物中存在的总脂质的约 0.5% - 约 20%，约 1.5% - 约 18% 的摩尔比范围内变化。在纳米颗粒组合物的一个实施方案中，PEG 脂质以总脂质的约 2% - 约 10%（例如 2、3、4、5、6、7、8、9 或 10%）的摩尔比包括在内。例如，总 PEG 脂质为纳米颗粒组合中存在的总脂质的约 2%。

[0317] 2. 阳离子脂质

[0318] 在本发明的一个优选的方面中，式 (I) 的阳离子脂质包括在纳米颗粒组合物内。根据本发明的该方面，用于核酸（即寡核苷酸）递送的纳米颗粒组合物还可以包括促融合脂质和 PEG 脂质。

[0319] 在本发明的其它方面中，本文所述的纳米颗粒组合物可包括另外的本领域已知的阳离子脂质。所预期的另外合适的脂质包括例如：

[0320] N-[1-(2,3-二油酰氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵 (DOTMA)；

[0321] 1,2-双(油酰氧基)-3-3-(三甲铵)丙烷或 N-(2,3-二油酰氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵 (DOTAP)；

[0322] 1,2-双(二肉豆蔻酰氧基)-3-3-(三甲基氨)丙烷 (DMTAP)；

[0323] 1,2-二肉豆蔻基氧丙基-3-二甲基羟乙基溴化铵或 N-(1,2-二肉豆蔻基氧丙-3-基)-N,N-二甲基-N-羟乙基溴化铵 (DMRIE)；

[0324] 二甲基二(十八烷基)溴化铵或 N,N-双十八烷基-N,N-二甲基溴化铵 (DDAB)；

[0325] 3-(N-(N',N'-二甲基氨基乙烷)氨基甲酰)胆固醇 (DC-胆固醇)；

[0326] 3 β -[N',N'-二胍基乙基-氨基乙烷)氨基甲酰]胆固醇 (BGTC)；

[0327] 2-(2-(3-(双(3-氨丙基)氨基)丙氨基)乙酰氨基)-N,N-二(十四烷基)乙酰胺 (RPR209120)；

[0328] 1,2-二烯氧基 (dialkenoyl)-sn-甘油基-3-乙基胆碱磷酸 (即 1,2-二油酰-sn-甘油基-3-乙基胆碱磷酸、1,2-二硬脂酰-sn-甘油基-3-乙基胆碱磷酸和 1,2-二棕榈酰-sn-甘油基-3-乙基胆碱磷酸) ;

[0329] 四甲基四棕榈酰基精胺 (TMTPS) ;

[0330] 四甲基四油基精胺 (TMTOS) ;

[0331] 四甲基四月桂基精胺 (TMTLS) ;

[0332] 四甲基四肉豆蔻基精胺 (TMTMS) ;

[0333] 四甲基二油基精胺 (TMDOS) ;

[0334] 2,5-双(3-氨基丙基氨基)-N-(2-(二(十八烷基)氨基)-2-氧代乙基)戊酰胺 (DOGS) ;

[0335] 2,5-双(3-氨基丙基氨基)-N-(2-(二(Z)-十八-9-二烯基氨基)-2-氧代乙基)戊酰胺 (DOGS-9-en) ;

[0336] 2,5-双(3-氨基丙基氨基)-N-(2-(二(9Z,12Z)-十八-9,12-二烯基氨基)-2-氧代乙基)戊酰胺 (DLinGS) ;

[0337] N4-精胺胆固醇基氨基甲酸酯 (GL-67) ;

[0338] (9Z,9' Z)-2-(2,5-双(3-氨基丙基氨基)戊酰胺基)丙烷-1,3-二基-二(十八)-9-烯酸酯 (DOSPER) ;

[0339] 2,3-二油基氧基-N-[2(精胺酰胺基)乙基]-N,N-二甲基-1-丙铵三氟乙酸酯 (DOSPA) ;

[0340] 1,2-二肉豆蔻酰-3-三甲铵-丙烷;1,2-二硬脂酰-3-三甲铵-丙烷;

[0341] 二(十八烷基)二甲基铵 (DODMA) ;

[0342] 二硬脂酰二甲基铵 (DSDMA) ;

[0343] N,N-二油基-N,N-二甲基氯化铵 (DODAC) ;药学可接受的盐及其混合物。

[0344] 还在 US2007/0293449 和美国专利 No. 4,897,355 ;5,279,833 ;6,733,777 ;6,376,248 ;5,736,392 ;5,686,958 ;5,334,761 ;5,459,127 ;2005/0064595 ;5,208,036 ;5,264,618 ;5,279,833 ;5,283,185 ;5,753,613 ;和 5,785,992 中描述了阳离子脂质的详细资料。

[0345] 另外,可使用包括阳离子脂质的商购制剂:例如 LIPOFECTIN® (含有 DOTMA 和 DOPE 的阳离子脂质体,来自 GIBCO/BRL, Grand Island, New York, USA) ;LIPOFECTAMINE® (含有 DOSPA 和 DOPE 的阳离子脂质体,来自 GIBCO/BRL, Grand Island, New York, USA) ;和 TRANSFECTAM® (含有 DOGS 的阳离子脂质体,来自 Promega Corp., Madison, Wisconsin, USA)。

[0346] 3. 促融合 / 非阳离子脂质

[0347] 在本发明的另一方面,纳米颗粒组合物含有促融合脂质。该促融合脂质包括非阳离子脂质例如中性不带电荷的、两性离子和阴离子脂质。就本发明而言,术语“促融合脂质”和“非阳离子脂质”是可互换的。

[0348] 包括存在于不带电荷的或中性两性离子中的脂质的中性脂质在选择的 pH 下,优选在生理学的 pH 下形成。这类脂质的实例包括二酰基卵磷脂、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。

[0349] 阴离子脂质包括在生理学的 pH 下带负电荷的脂质。这些脂质包括但不限于磷脂酰甘油、心磷脂、二酰基磷脂酰丝氨酸、二酰基磷脂酸、N- 十二烷酰磷脂酰乙醇胺、N- 琥珀酰磷脂酰乙醇胺、N- 戊二酰基磷脂酰乙醇胺、赖氨酰磷脂酰甘油、棕榈酰油酰磷脂酰甘油 (POPG) 和用阴离子改性基团改性的中性脂质。

[0350] 许多促融合脂质包括通常具有疏水性部分和极性头部基团的两亲脂质, 并且可在水溶液中形成囊泡。

[0351] 所预期的促融合脂质包括自然存在和合成的磷脂以及相关的脂质。

[0352] 非阳离子脂质的非限制性列举选自以下磷脂和基于非磷脂质的物质, 例如蛋黄素; 溶血卵磷脂; 二酰基卵磷脂; 溶血磷脂酰胆碱; 磷脂酰乙醇胺; 溶血磷脂酰乙醇胺; 磷脂酰丝氨酸; 磷脂酰肌醇; 鞘磷脂; 脑磷脂; 神经酰胺; 心磷脂; 磷脂酸; 磷脂酰甘油; 脑苷脂; 磷酸二(十六烷基)酯;

[0353] 1,2- 二月桂酰 -sn- 甘油 (DLG);

[0354] 1,2- 二肉豆蔻酰 -sn- 甘油 (DMG);

[0355] 1,2- 二棕榈酰 -sn- 甘油 (DPG);

[0356] 1,2- 二硬脂酰 -sn- 甘油 (DSG);

[0357] 1,2- 二月桂酰 -sn- 甘油基 -3- 磷脂酸 (DLPA);

[0358] 1,2- 二肉豆蔻酰 -sn- 甘油基 -3- 磷脂酸 (DMPA);

[0359] 1,2- 二棕榈酰 -sn- 甘油基 -3- 磷脂酸 (DPPA);

[0360] 1,2- 二硬脂酰 -sn- 甘油基 -3- 磷脂酸 (DSPA);

[0361] 1,2- 二花生四烯酰 -sn- 甘油基 -3- 胆碱磷酸 (DAPC);

[0362] 1,2- 二月桂酰 -sn- 甘油基 -3- 胆碱磷酸 (DLPC);

[0363] 1,2- 二肉豆蔻酰 -sn- 甘油基 -3- 胆碱磷酸 (DMPC);

[0364] 1,2- 二棕榈酰 -sn- 甘油基 -3- 乙基胆碱磷酸 (DPePC);

[0365] 1,2- 二棕榈酰 -sn- 甘油基 -3- 胆碱磷酸或二棕榈酰卵磷脂 (DPPC);

[0366] 1,2- 二硬脂酰 -sn- 甘油基 -3- 胆碱磷酸或二硬脂酰卵磷脂 (DSPC);

[0367] 1,2- 二月桂酰 -sn- 甘油基 -3- 磷酸乙醇胺 (DLPE);

[0368] 1,2- 二肉豆蔻酰 -sn- 甘油基 -3- 磷酸乙醇胺或二肉豆蔻酰磷酸乙醇胺 (DMPE);

[0369] 1,2- 二棕榈酰 -sn- 甘油基 -3- 磷酸乙醇胺或二棕榈酰磷脂酰 - 乙醇胺 (DPPE);

[0370] 1,2- 二硬脂酰 -sn- 甘油基 -3- 磷酸乙醇胺或二硬脂酰磷脂酰 - 乙醇胺 (DSPE);

[0371] 1,2- 二油酰 -sn- 甘油基 -3- 磷酸乙醇胺或二油酰磷脂酰乙醇胺 (DOPE);

[0372] 1,2- 二月桂酰 -sn- 甘油基 -3- 磷酸甘油 (DLPG);

[0373] 1,2- 二肉豆蔻酰 -sn- 甘油基 -3- 磷酸甘油 (DMPG) 或 1,2- 二肉豆蔻酰 -sn- 甘油基 -3- 磷酸 -sn-1- 甘油 (DMP-sn-1-G);

[0374] 1,2- 二棕榈酰 -sn- 甘油基 -3- 磷酸甘油或二棕榈酰磷脂酰甘油 (DPPG);

[0375] 1,2- 二硬脂酰 -sn- 甘油基 -3- 磷酸甘油 (DSPG) 或 1,2- 二硬脂酰 -sn- 甘油基 -3- 磷酸 -sn-1- 甘油 (DSP-sn-1-G);

[0376] 1,2- 二棕榈酰 -sn- 甘油基 -3- 磷酸 -L- 丝氨酸 (DPPS);

[0377] 1- 棕榈酰 -2- 亚油酰 -sn- 甘油基 -3- 胆碱磷酸 (PLinoPC);

[0378] 1- 棕榈酰 -2- 油酰 -sn- 甘油基 -3- 胆碱磷酸或棕榈酰油酰卵磷脂 (POPC);

- [0379] 1-棕榈酰-2-油酰-sn-甘油基-3-磷酸甘油 (POPG) ;
- [0380] 1-棕榈酰-2-溶血-sn-甘油基-3-胆碱磷酸 (P-lyso-PC) ;
- [0381] 1-硬脂酰-2-溶血-sn-甘油基-3-胆碱磷酸 (S-lyso-PC) ;
- [0382] 二植烷酰磷脂酰乙醇胺 (DPhPE) ;
- [0383] 1,2-二油酰-sn-甘油基-3-胆碱磷酸或二油酰卵磷脂 (DOPC) ;
- [0384] 1,2-二植烷酰-sn-甘油基-3-胆碱磷酸 (DPhPC),
- [0385] 二油酰磷脂酰甘油 (DOPG) ;
- [0386] 棕榈酰油酰磷脂酰乙醇胺 (POPE) ;
- [0387] 二油酰-磷脂酰乙醇胺 4-(N-马来酰亚胺基甲基)-环己烷-1-羧酸盐 (DOPE-mal) ;
- [0388] 16-0-单甲基 PE ;
- [0389] 16-0-二甲基 PE ;
- [0390] 18-1-反 PE ;1-硬脂酰-2-油酰-磷脂酰乙醇胺 (SOPE) ;
- [0391] 1,2-二反式油酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺 (反式 DOPE) ;和
- [0392] 其药理学可接受的盐及混合物。在美国专利公开 No. 2007/0293449 和 2006/0051405 中描述了促融合脂质的详细资料。
- [0393] 非阳离子脂质包括甾醇或类固醇例如胆固醇。
- [0394] 另外的非阳离子脂质为例如硬脂胺、十二烷胺、十六烷胺、棕榈酸乙酰酯、蓖麻醇酸甘油酯、硬脂酸十六烷基酯、豆蔻酸异丙酯、两性的丙烯酸系聚合物、三乙醇胺月桂基硫酸酯、烷基芳基硫酸酯聚乙氧基化的脂肪酸酰胺和二(十八烷基)二甲基溴化铵。
- [0395] 所预期的阴离子脂质包括磷脂酰丝氨酸、磷脂酸、卵磷脂、血小板活化因子 (PAF)、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰-DL-甘油、磷脂酰肌醇、磷脂酰肌醇、心磷脂、溶血磷脂、氢化磷脂、鞘脂质、神经节苷脂、植物鞘氨醇、二氢神经鞘氨醇、药理学可接受的盐及其混合物。
- [0396] 用于制备本文所述的纳米颗粒组合物的合适的非阳离子脂质包括二酰基卵磷脂 (例如二硬脂酰卵磷脂、二油酰卵磷脂、二棕榈酰卵磷脂和二亚油酰磷脂酰-胆碱), 二酰基磷脂酰乙醇胺 (例如二油酰磷脂酰乙醇胺和棕榈酰油酰磷脂酰乙醇胺), 神经酰胺或鞘磷脂。这些脂质中的酰基优选具有饱和的和饱和的碳链例如亚油酰、异硬脂基、油基、反式油基 (elaidyl)、岩芹基 (petroselinyl)、亚麻基 (linolenyl)、桐油基 (elaeostearyl)、花生基 (arachidyl)、肉豆蔻酰、棕榈酰和月桂酰基的脂肪酸。更优选地, 酰基为月桂酰基、肉豆蔻酰、棕榈酰、硬脂酰或油酰。可替代地和 / 优选地, 所述脂肪酸具有饱和的和饱和的 C₈-C₃₀ (优选 C₁₀-C₂₄) 碳链。
- [0397] 用于本文所述的纳米颗粒组合物的各种卵磷脂包括 :
- [0398] 1,2-二癸酰基-sn-甘油基-3-胆碱磷酸 (DDPC, C10:0, C10:0) ;
- [0399] 1,2-二月桂酰基-sn-甘油基-3-胆碱磷酸 (DLPC, C12:0, C12:0) ;
- [0400] 1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油基-3-胆碱磷酸 (DMPC, C14:0, C14:0) ;
- [0401] 1,2-二棕榈酰基-sn-甘油基-3-胆碱磷酸 (DPPC, C16:0, C16:0) ;
- [0402] 1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-胆碱磷酸 (DSPC, C18:0, C18:0) ;
- [0403] 1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-胆碱磷酸 (DOPC, C18:1, C18:1) ;
- [0404] 1,2-二芥酰基-sn-甘油基-3-胆碱磷酸 (DEPC, C22:1, C22:1) ;

- [0405] 1,2-二(二十碳五烯酰基)-sn-甘油基-3-胆碱磷酸(EPA-PC, C20:5, C20:5);
- [0406] 1,2-二(二十二碳六烯酰基)-sn-甘油基-3-胆碱磷酸(DHA-PC, C22:6, C22:6);
- [0407] 1-肉豆蔻酰-2-棕榈酰-sn-甘油基-3-胆碱磷酸(MPPC, C14:0, C16:0);
- [0408] 1-肉豆蔻酰-2-硬脂酰-sn-甘油基-3-胆碱磷酸(MSPC, C14:0, C18:0);
- [0409] 1-棕榈酰-2-硬脂酰-sn-甘油基-3-胆碱磷酸(PMPC, C16:0, C14:0);
- [0410] 1-棕榈酰-2-硬脂酰-sn-甘油基-3-胆碱磷酸(PSPC, C16:0, C18:0);
- [0411] 1-硬脂酰-2-肉豆蔻酰-sn-甘油基-3-胆碱磷酸(SMPC, C18:0, C14:0);
- [0412] 1-硬脂酰-2-棕榈酰-sn-甘油基-3-胆碱磷酸(SPPC, C18:0, C16:0);
- [0413] 1,2-肉豆蔻酰-油酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(MOPC, C14:0, C18:0);
- [0414] 1,2-棕榈酰-油酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(POPC, C16:0, C18:1);
- [0415] 1,2-硬脂酰-油酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(POPC, C18:0, C18:1),和其药学可接受的盐及它们的混合物。
- [0416] 用于本文所述的纳米颗粒组合物的各种溶血磷脂酰胆碱包括:
- [0417] 1-肉豆蔻酰-2-溶血-sn-甘油基-3-胆碱磷酸(M-LysoPC, C14:0);
- [0418] 1-马来酰(malmitoyl)-2-溶血-sn-甘油基-3-胆碱磷酸(P-LysoPC, C16:0);
- [0419] 1-硬脂酰-2-溶血-sn-甘油基-3-胆碱磷酸(S-LysoPC, C18:0),和
- [0420] 其药学可接受的盐及它们的混合物。
- [0421] 用于本文所述的纳米颗粒组合物的各种磷脂酰甘油选自以下:
- [0422] 氢化大豆磷脂酰甘油(HSPG);
- [0423] 非氢化蛋磷脂酰甘油(EPG);
- [0424] 1,2-二肉豆蔻酰-sn-甘油基-3-磷酸甘油(DMPG, C14:0, C14:0);
- [0425] 1,2-二棕榈酰-sn-甘油基-3-磷酸甘油(DPPG, C16:0, C16:0);
- [0426] 1,2-二硬脂酰-sn-甘油基-3-磷酸甘油(DSPG, C18:0, C18:0);
- [0427] 1,2-二油酰-sn-甘油基-3-磷酸甘油(DOPG, C18:1, C18:1);
- [0428] 1,2-二芥酰基-sn-甘油基-3-磷酸甘油(DEPG, C22:1, C22:1);
- [0429] 1-棕榈酰-2-油酰-sn-甘油基-3-磷酸甘油(POPG, C16:0, C18:1),和其药学可接受的盐及它们的混合物。
- [0430] 用于本文所述的纳米颗粒组合物的各种磷脂酸包括:
- [0431] 1,2-二肉豆蔻酰-sn-甘油基-3-磷脂酸(DMPA, C14:0, C14:0);
- [0432] 1,2-二棕榈酰-sn-甘油基-3-磷脂酸(DPPA, C16:0, C16:0);
- [0433] 1,2-二硬脂酰-sn-甘油基-3-磷脂酸(DSPA, C18:0, C18:0),和
- [0434] 药学可接受的盐及其混合物。
- [0435] 用于本文所述的纳米颗粒组合物的各种磷脂酰乙醇胺包括:
- [0436] 氢化大豆磷脂酰乙醇胺(HSPE);
- [0437] 非氢化蛋磷脂酰乙醇胺(EPE);
- [0438] 1,2-二肉豆蔻酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DMPE, C14:0, C14:0);
- [0439] 1,2-二棕榈酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DPPE, C16:0, C16:0);
- [0440] 1,2-二硬脂酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DSPE, C18:0, C18:0);
- [0441] 1,2-二油酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DOPE, C18:1, C18:1);

- [0442] 1,2-二油酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺 (DEPE, C22:1, C22:1) ;
- [0443] 1,2-二芥酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺 (POPE, C16:0, C18:1), 和其药学可接受的盐及它们的混合物。
- [0444] 用于本文所述的纳米颗粒组合物的各种磷脂酰丝氨酸包括 :
- [0445] 1,2-二肉豆蔻酰-sn-甘油基-3-磷酸-L-丝氨酸 (DMPS, C14:0, C14:0) ;
- [0446] 1,2-二棕榈酰-sn-甘油基-3-磷酸-L-丝氨酸 (DPPS, C16:0, C16:0) ;
- [0447] 1,2-二硬脂酰-sn-甘油基-3-磷酸-L-丝氨酸 (DSPS, C18:0, C18:0) ;
- [0448] 1,2-二油酰-sn-甘油基-3-磷酸-L-丝氨酸 (DOPS, C18:1, C18:1) ;
- [0449] 1-棕榈酰-2-油酰-sn-3-磷酸-L-丝氨酸 (POPS, C16:0, C18:1), 和
- [0450] 药学可接受的盐及其混合物
- [0451] 在一个优选的实施方案中, 用于制备本文所述的纳米颗粒组合物的合适的中性脂质包括例如
- [0452] 二油酰磷脂酰乙醇胺 (DOPE),
- [0453] 二硬脂酰磷脂酰乙醇胺 (DSPE),
- [0454] 棕榈酰油酰磷脂酰乙醇胺 (POPE),
- [0455] 蛋卵磷脂 (EPC),
- [0456] 二棕榈酰卵磷脂 (DPPC),
- [0457] 二硬脂酰卵磷脂 (DSPC),
- [0458] 二油酰卵磷脂 (DOPC),
- [0459] 棕榈酰油酰卵磷脂 (POPC),
- [0460] 二棕榈酰磷脂酰甘油 (DPPG),
- [0461] 二油酰磷脂酰甘油 (DOPG),
- [0462] 二油酰-磷脂酰乙醇胺 4-(N-马来酰亚胺基甲基)-环己烷-1-羧酸盐 (DOPE-mal), 胆固醇, 药学可接受的盐及其混合物。
- [0463] 在某些优选的实施方案中, 本文所述的纳米颗粒组合物包括 DSPC、EPC、DOPE 等以及它们的混合物。
- [0464] 在本发明的其它方面中, 纳米颗粒组合物含有非阳离子脂质例如甾醇。该纳米颗粒组合物优选含有胆固醇或其类似物, 更优选胆固醇。
- [0465] 4. PEG 脂质
- [0466] 在本发明的另一方面中, 本文所述的纳米颗粒组合物含有 PEG 脂质。该 PEG 脂质延长了本文所述纳米颗粒的循环并且防止该纳米颗粒从人体过早排泄。PEG 脂质降低免疫原性并且增强纳米颗粒的稳定性。
- [0467] 用于纳米颗粒组合物的 PEG 脂质包括促融合 / 非阳离子脂质的 PEG 化形式。PEG 脂质包括例如缀合到二酰基甘油的 PEG (PEG-DAG), 缀合到二酰基甘油酰胺 (diacylglycamide) 的 PEG, 缀合到二烷氧基丙基的 PEG (PEG-DAA), 缀合到磷脂的 PEG 例如连接到磷脂酰乙醇胺的 PEG (PEG-PE), 缀合到神经酰胺的 PEG (PEG-Cer), 缀合到胆固醇衍生物的 PEG (PEG-Chol) 或它们的混合物。参见美国专利 No. 5, 885, 613 和 5, 820, 873, 以及美国专利公开 No. 2006/051405, 通过引用将它们各自的内容并入本文。
- [0468] PEG 通常由以下结构表示 :

[0469] $-O-(CH_2CH_2O)_n-$

[0470] 其中 (n) 为约 5- 约 2300, 优选约 5- 约 460 的正整数从而使得 PEG 脂质的聚合物部分具有约 200- 约 100,000 道尔顿, 优选约 200- 约 20,000 道尔顿的数均分子量。(n) 代表聚合物的聚合度, 并且取决于聚合物的分子量。

[0471] 在一个优选的方面中, PEG 是数均分子量为约 200- 约 20,000 道尔顿, 更优选约 500- 约 10,000 道尔顿, 又更优选约 1,000- 约 5,000 道尔顿 (即约 1,500- 约 3,000 道尔顿) 的聚乙二醇。在一个特殊实施方案中, PEG 具有约 2,000 道尔顿的分子量。在另一个特殊实施方案中, PEG 具有约 750 道尔顿的分子量。

[0472] 或者, 聚乙二醇 (PEG) 残基部分可由下列结构表示:

[0473] $-Y_{71}-(CH_2CH_2O)_n-CH_2CH_2Y_{71}-$,

[0474] $-Y_{71}-(CH_2CH_2O)_n-CH_2C(=Y_{72})-Y_{71}-$,

[0475] $-Y_{71}-C(=Y_{72})-(CH_2)_{a2}-Y_{73}-(CH_2CH_2O)_n-CH_2CH_2-Y_{73}-(CH_2)_{a2}-C(=Y_{72})-Y_{71}-$ 和

[0476] $-Y_{71}-(CR_{71}R_{72})_{a2}-Y_{73}-(CH_2)_{b2}-O-(CH_2CH_2O)_n-(CH_2)_{b2}-Y_{73}-(CR_{71}R_{72})_{a2}-Y_{71}-$,

[0477] 其中:

[0478] Y_{71} 和 Y_{73} 独立地是 O、S、SO、SO₂、NR₇₃ 或化学键;

[0479] Y_{72} 为 O、S 或 NR₇₄;

[0480] R_{71-74} 独立地选自氢、C₁₋₆ 烷基、C₂₋₆ 烯基、C₂₋₆ 炔基、C₃₋₁₉ 支链烷基、C₃₋₈ 环烷基、C₁₋₆ 取代的烷基、C₂₋₆ 取代的烯基、C₂₋₆ 取代的炔基、C₃₋₈ 取代的环烷基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、C₁₋₆ 杂烷基、取代的 C₁₋₆ 杂烷基、C₁₋₆ 烷氧基、芳氧基、C₁₋₆ 杂烷氧基、杂芳氧基、C₂₋₆ 烷酰基、芳基羰基、C₂₋₆ 烷氧基羰基、芳基氧基羰基、C₂₋₆ 烷酰基氧基、芳基羰基氧基、C₂₋₆ 取代的烷酰基、取代的芳基羰基、C₂₋₆ 取代的烷酰基氧基、取代的芳氧基羰基、C₂₋₆ 取代的烷酰基氧基和取代的芳基羰基氧基, 优选氢、甲基、乙基或丙基;

[0481] (a2) 和 (b2) 独立地 0 或正整数, 优选 0 或约 1- 约 6 的整数 (即 1、2、3、4、5、6), 更优选 1 或 2; 以及

[0482] (n) 为约 5- 约 2300, 优选约 5- 约 460 的整数。

[0483] PEG 的末端可用 H、NH₂、OH、CO₂H、C₁₋₆ 烷基 (例如甲基、乙基、丙基)、C₁₋₆ 烷氧基、酰基或芳基结束。在优选的实施方案中, PEG 的末端羟基被甲氧基或甲基取代。在一个优选的实施方案中, 用于 PEG 脂质的 PEG 为甲氧基 PEG。

[0484] 可以直接将 PEG 缀合到脂质或通过连接基部分缀合到脂质。使用美国专利 No. 5, 122, 614 和 5, 808, 096 中描述的活化技术以及本领域已知的其它技术将用于缀合到脂质结构的聚合物转化为合适活化的聚合物而无需过多实验。

[0485] 用于制备 PEG 脂质的活化的 PEG 的实例包括例如甲氧基聚乙二醇-丁二酸酯、mPEG-NHS、甲氧基聚乙二醇-琥珀酰亚胺基丁二酸酯、甲氧基聚乙二醇-乙酸 (mPEG-CH₂COOH)、甲氧基聚乙二醇-胺 (mPEG-NH₂) 和甲氧基聚乙二醇-三氟乙基磺酸酯 (mPEG-TRES)。

[0486] 在某些方面中, 具有末端羧酸基的聚合物可在本文所描述的 PEG 脂质中使用。美国专利申请 No. 11/328, 662 中描述了制备高纯度的具有末端羧酸的聚合物的方法, 通过引用将其内容并入本文。

[0487] 在可供选择的方面中, 具有末端胺基的聚合物可用于制备本文所描述的 PEG-脂

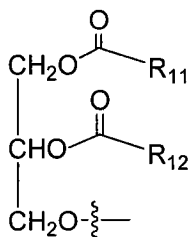
质。美国专利申请 No. 11/508, 507 和 11/537, 172 中描述了制备高纯度的含有末端胺的聚合物的方法, 通过引用将它们各自的内容并入本文。

[0488] PEG 和脂质可通过连接键, 即含非酯连接基部分或含酯的连接基部分进行键合。合适的含非酯的连接基包括但不限于酰氨基连接基部分、氨基连接基部分、羰基连接基部分、氨基甲酸酯连接基部分、碳酸酯 (OC(=O)O) 连接基部分、脲连接基部分、醚连接基部分、琥珀酰连接基部分以及它们的组合。合适的酯连接基部分包括例如琥珀酰氧基、磷酸酯 (-O-P(=O)(OH)-O-)、磺酸酯以及它们的组合。

[0489] 在一个实施方案中, 本文所述的纳米颗粒组合物包括聚乙二醇-二酰基甘油 (PEG-DAG) 或聚乙烯-二酰基甘油酰胺。合适的聚乙二醇-二酰基甘油或聚乙二醇-二酰基甘油酰胺缀合物包括烷基链长度独立地含有约 C₄-约 C₃₀ (优选约 C₈-约 C₂₄) 饱和或不饱和的碳原子的二烷基甘油或二烷基甘油酰胺基团。二烷基甘油或二烷基甘油酰胺基团还可包括一个或多个取代的烷基。

[0490] 本文所使用的术语“二酰基甘油”(DAG) 是指具有两个脂肪酰基链即 R₁₁ 和 R₁₂ 的化合物。R₁₁ 和 R₁₂ 具有长度为约 4-约 30 个碳 (优选约 8-约 24) 的相同或不同的碳链并且通过酯键键合到甘油。这些酰基可以是具有各种不饱和度的饱和或不饱和的酰基。DAG 具有以下通式:

[0491]



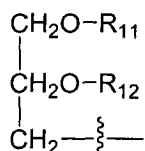
[0492] 在优选的实施方案中, PEG-二酰基甘油缀合物为 PEG-二月桂基甘油 (C12)、PEG-二肉豆蔻基甘油 (C14, DMG)、PEG-二棕榈酰基甘油 (C16, DPG) 或 PEG-二硬脂基甘油 (C18, DSG)。本领域技术人员将容易地意识到, 还可在 PEG-二酰基甘油缀合物中预期其它二酰基甘油。美国专利公开 No. 2003/0077829 和 PCT 专利申请 No. CA 02/00669 中描述了用于本发明的合适的 PEG-二酰基甘油缀合物, 以及制备和使用它们的方法, 通过引用将它们各自的内容并入本文。

[0493] PEG-二酰基甘油缀合物的实例可选自以下 PEG-二月桂基甘油 (C12)、PEG-二肉豆蔻基甘油 (C14)、PEG-二棕榈基甘油 (C16)、PEG-二硬脂基甘油 (C18)。PEG-二酰基甘油酰胺缀合物的实例包括 PEG-二月桂基甘油酰胺 (C12)、PEG-二肉豆蔻基甘油酰胺 (C14)、PEG-二棕榈酰-甘油酰胺 (C16) 和 PEG-二甾基甘油酰胺 (C18)。

[0494] 在另一个实施方案中, 本文所述的纳米颗粒组合物包括聚乙二醇-二烷氧基丙基缀合物 (PEG-DAA)。

[0495] 术语“二烷氧基丙基”是指化合物具有两个烷基链即 R₁₁ 和 R₁₂。R₁₁ 和 R₁₂ 烷基包括长度为约 4-约 30 碳 (优选约 8-约 24) 的相同或不同的碳链。这些烷基可以是饱和的或具有不同的不饱和度。二烷氧基丙基具有以下通式:

[0496]



[0497] 其中 R_{11} 和 R_{12} 烷基是具有约 4- 约 30 碳 (优选约 8- 约 24) 的相同或不同的烷基。这些烷基可以是饱和或不饱和的。合适的烷基包括但不限于十二烷基 (C12)、十四烷基 (C14)、棕榈基 (C16)、硬脂基 (C18)、油基 (C18) 和二十烷基 (C20)。

[0498] 在一个实施方案中, R_{11} 和 R_{12} 相同, 即 R_{11} 和 R_{12} 均为十四烷基 (C14)、均为硬脂基 (C18) 或者均为油基 (C18) 等。在另一个实施方案中, R_{11} 和 R_{12} 不同, 即 R_{11} 为十四烷基 (C14) 而 R_{12} 为硬脂基 (C18)。在优选的实施方案中, PEG- 二烷基丙基缀合物包括相同的 R_{11} 和 R_{12} 。

[0499] 在又一个实施方案中, 本文所述的纳米颗粒组合物包括缀合到磷脂酰乙醇胺的 PEG (PEG-PE)。用于 PEG 脂质缀合的磷脂酰乙醇胺可含有碳链长度为约 4- 约 30 碳 (优选约 8- 约 24) 的饱和或不饱和的脂肪酸。合适的磷脂酰乙醇胺包括但不限于: 二肉豆蔻酰磷脂酰乙醇胺 (DMPE)、二棕榈酰磷脂酰乙醇胺 (DPPE)、二油酰磷脂酰乙醇胺 (DPOE) 和二硬脂酰磷脂酰乙醇胺 (DSPE)。

[0500] 在又一个实施方案中, 本文所述的纳米颗粒组合物包括缀合到神经酰胺的 PEG (PEG-Cer)。神经酰胺仅具有一个酰基。神经酰胺可具有碳链长度为约 4- 约 30 碳 (优选约 8- 约 24) 的饱和或不饱和的脂肪酸。

[0501] 在备选实施方案中, 本文所述的纳米颗粒组合物包括缀合到胆固醇衍生物的 PEG。术语“胆固醇衍生物”是指含有胆固醇结构的任何胆固醇类似物, 所述胆固醇结构具有改性, 即其取代和 / 或删除。本文中的术语胆固醇衍生物还包括甾类荷尔蒙和胆汁酸。

[0502] PEG 脂质的说明性实例包括 N-(羰基 - 甲氧基聚乙二醇)-1, 2- 二肉豆蔻酰 -sn- 甘油基 -3- 磷酸乙醇胺 ($^{2\text{kDa}}$ mPEG-DMPE 或 $^{5\text{kDa}}$ mPEG-DMPE); N-(羰基 - 甲氧基聚乙二醇)-1, 2- 二棕榈酰 -sn- 甘油基 -3- 磷酸乙醇胺 ($^{2\text{kDa}}$ mPEG-DPPE 或 $^{5\text{kDa}}$ mPEG-DPPE); N-(羰基 - 甲氧基聚乙二醇)-1, 2- 二硬脂酰 -sn- 甘油基 -3- 磷酸乙醇胺 ($^{750\text{Da}}$ mPEG-DSPE、 $^{2\text{kDa}}$ mPEG-DSPE、 $^{5\text{kDa}}$ mPEG-DSPE); 和药学可接受的其盐 (即钠盐) 及其混合物。

[0503] 在某些优选的实施方案中, 本文所述的纳米颗粒组合物包括具有 PEG-DAG 或 PEG- 神经酰胺的 PEG 脂质, 其中 PEG 具有约 200- 约 20, 000, 优选约 500- 约 10, 000, 更优选约 1, 000- 约 5, 000 的分子量。

[0504] 表 1 中提供了 PEG-DAG 和 PEG- 神经酰胺的几个说明性实施方案。

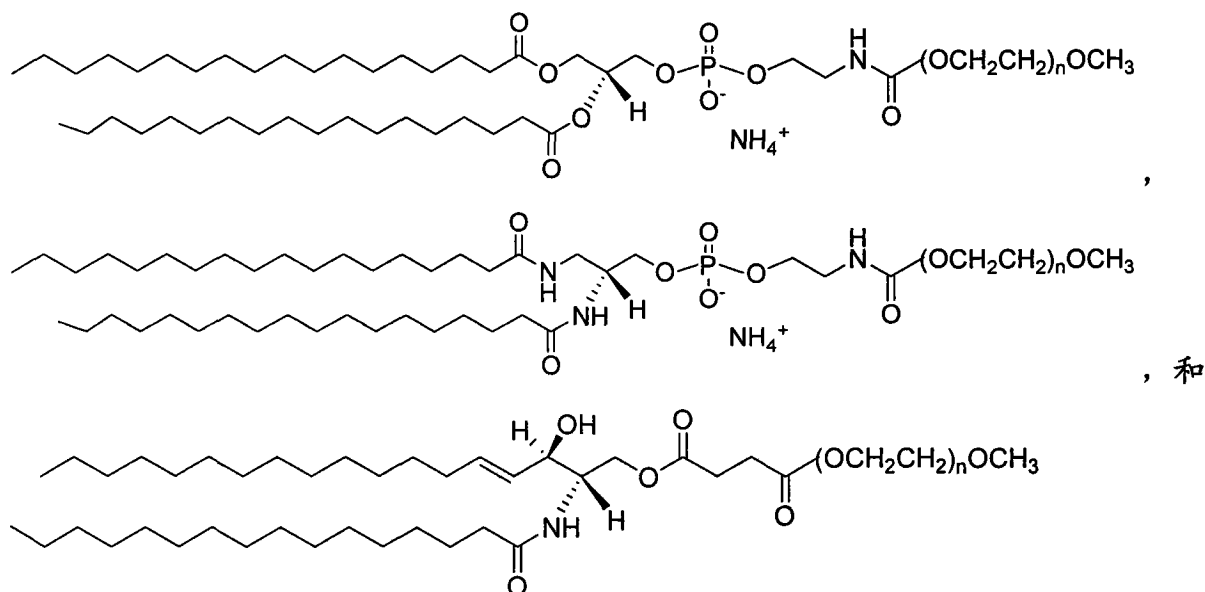
[0505] 表 1.

[0506]

PEG-脂质	
PEG-DAG	mPEG-二肉豆蔻酰甘油
	mPEG-二棕榈酰基甘油
	mPEG-二硬脂酰甘油
PEG-神经酰胺	mPEG-CerC8
	mPEG-CerC14
	mPEG-CerC16
	mPEG-CerC20

[0507] 优选地, 本文所述的纳米颗粒组合物包括选自以下 PEG-DSPE、PEG- 二棕榈酰甘油酰胺 (C16)、PEG- 神经酰胺 (C16) 等以及它们的混合物的 PEG 脂质。mPEG-DSPE、mPEG- 二棕榈酰甘油酰胺 (C16) 和 mPEG- 神经酰胺 (C16) 的结构如下:

[0508]



[0509] 其中, (n) 为约 5- 约 2300, 优选约 5- 约 460 的整数。

[0510] 在一个优选的实施方案中, (n) 为约 45。

[0511] 在其它实施方案中, 且作为 PAO- 基聚合物例如 PEG 的可选方案, 可使用一种或多种有效地非抗原性物质例如葡聚糖、聚乙烯醇、基于糖类的聚合物、羟丙基甲基丙烯酰胺 (HPMA)、聚环氧烷和 / 或它们的共聚物。可用于替代 PEG 的合适聚合物的实例包括但不限于聚乙烯吡咯烷酮、聚甲基噁唑啉、聚乙基噁唑啉、聚羟丙基甲基丙烯酰胺、聚甲基丙烯酸胺和聚二甲基丙烯酰胺、聚乳酸、聚乙醇酸以及衍生的纤维素, 例如羟甲基纤维素或羟乙基纤维素。还参见共同受让的美国专利 No. 6, 153, 655, 通过引用将其内容并入本文。本领域技术人员应当理解, 可使用与本文中所描述的关于 PAO 例如 PEG 活化相同类型的活化。本领域普通技术人员可应了解, 前述列举仅是说明性的并且具有本文所描述性质的所有聚合物物质均在考虑范围之内。就本发明而言, “基本上或有效地非抗原性” 是指本领域理解为无毒的并且不引起哺乳动物可察觉的免疫原应答的所有物质。

[0512] 5. 核酸 / 寡核苷酸

[0513] 本文所述的纳米颗粒组合物可用于将各种核酸递送到细胞或组织中。所述核酸包括质粒和寡核苷酸。优选地, 本文所述的纳米颗粒组合物用于寡核苷酸的递送。

[0514] 以便更加充分地理解本发明的范围, 定义下面术语。本领域技术人员可理解, 除非另有说明, “核酸” 或 “核苷” 适用于脱氧核糖核酸 (“DNA”), 核糖核酸 (“RNA”), 及其任何化学修饰或其类似物, 例如锁核酸 (LNA), 无论其为单链或是双链的。本领域技术人员可易于理解, 术语 “核酸” 包括多核酸、其衍生物、修饰物和类似物。 “寡核苷酸” 通常为相对短的多核苷酸, 例如长度大小为约 2- 约 200 个核苷酸, 优选约 8- 约 50 个核苷酸, 更优选约 8- 约 30 个核苷酸, 还更优选约 8- 约 20 或约 15- 约 28 个核苷酸。根据本发明的寡核苷酸通常为合成的核酸, 并且为单链的, 除非另有说明。术语 “多核苷酸” 和 “多核酸” 在本文中也可以同义使用。

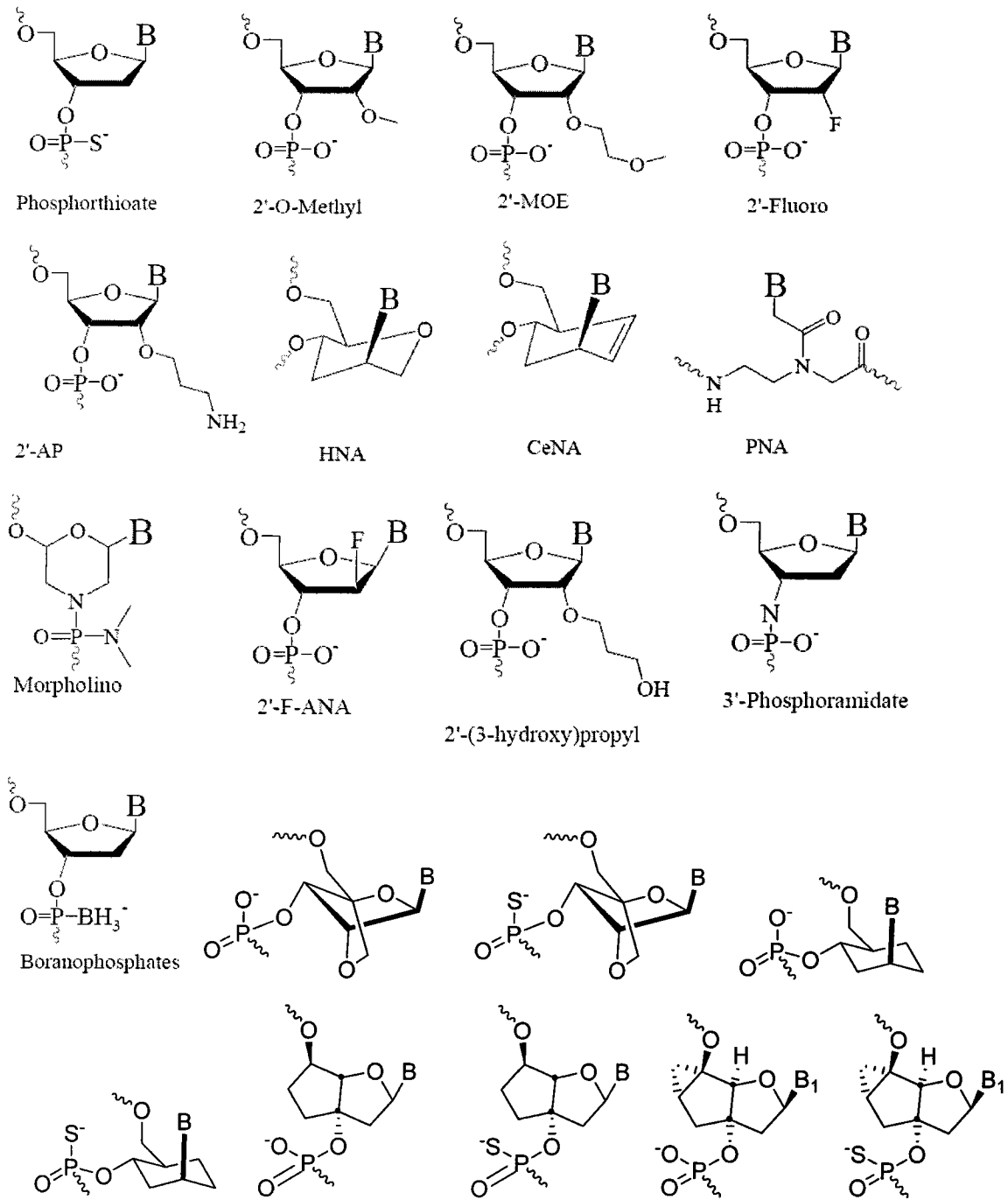
[0515] 寡核苷酸（类似物）不限于寡核苷酸的单一物质，而是可设计为与许多这类部分一同起作用，应理解连接基可以连接到一个或多个 3' - 或 5' - 端基，通常是核苷的 PO₄ 或 SO₄ 基团。所预期的核酸分子可包括硫代磷酸酯核酸间连接修饰，糖修饰，核酸碱基修饰和 / 或磷酸酯主链修饰。寡核苷酸可含有天然的磷酸二酯主链或硫代磷酸酯主链或任何其它改性主链类似物例如 LNA（锁核酸），PNA（具有肽主链的核酸），CpG 低聚物等，例如在 Tides2002, Oligonucleotide and Peptide Technology Conferences, 6-8 月, 2002, Las Vegas, NV and Oligonucleotide & Peptide Technologies, 18th & 19th 2003 年 11 月, Hamburg, Germany 公开的那些，通过引用将其内容并入本文。

[0516] 本发明所预期的寡核苷酸的修饰包括，例如，向寡核苷酸中引入另外的电荷、极化度、氢键、静电相互作用和官能团的官能部分的加成或者取代。这种修饰包括但不限于 2' - 位糖修饰，5- 位嘧啶修饰，8- 位嘌呤修饰，环外胺的修饰，4- 硫代尿苷的取代，5- 溴或 5- 碘尿嘧啶的取代，主链修饰，甲基化，碱基配对组合如异碱基（isobase）异胞苷（isocytidine）和异胍（isoguanidine），及类似组合。本发明范围内预期的寡核苷酸修饰还可包括 3' 和 / 或 5' 帽子结构。

[0517] 就本发明而言，“帽子结构”将理解为表示化学改性部分，其引入在寡核苷酸的任一末端。所述帽子可以存在于 5' - 末端（5' - 帽子）或 3' - 末端（3' - 帽子）或可存在于这两个末端。5' - 帽子的非限制性实施例包括反转的无碱基残基（部分），4' , 5' - 亚甲基核苷；1-(β-D-赤型呋喃糖基)核苷，4' - 硫代核苷，碳环核苷；1,5-失水己糖醇核苷；L-核苷；α-核苷；改性的碱基核苷；二硫代磷酸酯连接；苏型-戊呋喃糖基核苷；无环 3' , 4' - 开环核苷；无环 3,4-二羟基丁基核苷；无环 3,5-二羟基戊基核苷；3' -3' - 反转核苷部分；3' -3' - 反转无碱基部分；3' -2' - 反转核苷部分；3' -2' - 反转无碱基部分；1,4-丁二醇磷酸盐；3' -氨基磷酸酯；磷酸己酯；磷酸氨基己基酯；3' -磷酸酯；3' -硫代磷酸酯；二硫代磷酸酯；或者桥接或非桥接甲基磷酸酯部分。描述在 WO 97/26270 进行了详细描述，通过引用将其内容并入本文。3' -帽子可包括例如 4' , 5' - 亚甲基核苷；1-(β-D-赤型呋喃糖基)核苷；4' - 硫代核苷，碳环核苷；5' - 氨基烷基磷酸酯；1,3-二氨基-2-丙基磷酸酯；3-氨丙基磷酸酯；6-氨基己基磷酸酯；1,2-氨基十二烷基磷酸酯；羟基丙基磷酸酯；1,5-失水己糖醇核苷；L-核苷；α-核苷；改性的碱基核苷；二硫代磷酸酯；苏型-戊呋喃糖基核苷；无环 3' , 4' - 开环核苷；3,4-二羟基丁基核苷；3,5-二羟基戊基核苷；5' -5' - 反转核苷部分；5' -5' - 反转无碱基部分；5' -氨基磷酸酯；5' -硫代磷酸酯；1,4-丁二醇磷酸盐；5' -氨基；桥接和 / 或非桥接 5' -氨基磷酸酯，硫代磷酸酯和 / 或二硫代磷酸酯，桥接或非桥接甲基磷酸酯和 5' -巯基部分。还参见 Beaucage and Iyer, 1993, Tetrahedron 49, 1925；通过引用将其内容并入本文。

[0518] 核苷类似物的非限制性序列具有以下结构：

[0519]



[0520] 核苷类似物的更多实例参见 Freier & Altmann; Nucl. Acid Res., 1997, 25, 4429-4443 知 Uhlmann; Curr. Opinion in Drug Development, 2000, 3(2), 293-213, 其各自的内容通过引用并入本文。

[0521] 如本文中所使用的, 术语“反义”是指与编码基因产物或者编码控制序列的特定 DNA 或 RNA 序列互补的核苷酸序列。术语“反义链”用于指与“有义链”互补的核酸链。在细胞代谢的正常运转中, DNA 分子的有义链是编码多肽和 / 或其它基因产物的链。有义链充当合成信使 RNA (“mRNA”) 转录物 (反义链) 的模板, 后者进而指导合成任何编码的基因产物。反义核酸分子可通过本领域任何已知的方法制备, 包括按病毒启动子的反向连接感兴趣的基因而进行的合成, 这允许合成互补链。一旦引入到细胞中, 该转录的链即与细胞产生的天然序列结合形成双链体。这些双链体随后阻断 mRNA 的进一步转录或其翻译。在本

领域还已知的是,标识“负”或者(-)是指反义链,而“正”或者(+)是指有义链。

[0522] 就本发明而言,“互补”将理解为表示与另一个核酸序列形成氢键的核酸序列。互补百分数表示相邻残基在可与第二核酸序列形成氢键即 Watson-Crick 碱基对的核酸分子中的百分数,即 10 分之 5,6,7,8,9,10 为 50%,60%,70%,80%,90%和 100%互补。“完全互补”表示核酸序列的所有相邻残基与第二核酸序列中相同数目的相邻残基形成氢键。

[0523] 用于本文所述纳米颗粒的核酸(例如一种或多种相同或不同的寡核苷酸或寡核苷酸衍生物)可包括约 5- 约 1000 核酸,优选相对短的多核苷酸,例如,长度大小优选为约 8- 约 50 个核苷(例如约 8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 或 30)。

[0524] 在包封在本文所述纳米颗粒内的有效核酸的一方面,具有天然的磷酸二酯主链或硫代磷酸酯主链或任何其它改性主链类似物的寡核苷酸和寡脱氧核苷包括:

[0525] LNA(锁核酸);

[0526] PNA(具有肽主链的核酸);

[0527] 短干扰 RNA(siRNA);

[0528] 微 RNA(miRNA);

[0529] 具有肽主链的核酸(PNA);

[0530] 磷酰二胺吗啉代寡核苷酸(PMO);

[0531] 三环-DNA;

[0532] 诱捕 ODN(双链寡核苷酸);

[0533] 催化 RNA 序列(RNAi);

[0534] 核酶;

[0535] 适体;

[0536] 镜相异构物(spiegelmer)L-构象寡核苷酸);

[0537] CpG 寡聚物等,如下列文献中所公开的那些:

[0538] Tides 2002, Oligonucleotide and Peptide Technology Conferences,2002 年 5 月 6-8 日,Las Vegas,NV;和 Oligonucleotide&Peptide Technologies,18th&19th 2003 年 11 月,Hamburg,Germany,通过引用将它们的内容并入本文。

[0539] 在包封于纳米颗粒内的核酸的另一方面,寡核苷酸可任选包括任何合适的本领域已知核苷类似物和衍生物,包括下表 2 中列出的那些:

[0540] 表 2. 代表性的核苷类似物和衍生物

[0541]

4-乙酰基胞苷	5-甲氧基氨基甲基-2-硫代尿苷
5-(羧基羟基甲基)尿苷	β , 甘露糖基腺苷
2'-O-甲基胞苷	5-甲氧基羰基甲基-2-硫代尿苷
5-甲氧基羰基甲基尿苷	5-羧基甲基氨基甲基-2-硫代尿苷
5-甲氧基尿苷	5-羧基甲基氨基甲基尿苷
二氢尿苷	2-甲硫基-N6-异戊烯基腺苷
2'-O-甲基假尿苷	N-[(9- β -D-呋喃核糖基-2-甲硫基嘌呤-6-基)氨基甲酰基]苏氨酸
D-半乳糖基腺苷	N-[(9- β -D-呋喃核糖基嘌呤-6-基)N-甲基氨基甲酰基]苏氨酸
2'-O-甲基尿苷	尿苷-5-羟乙酸-甲基酯
2'-卤代-腺苷	2'-卤代-胞苷
2'-卤代-尿苷	2'-卤代-胸腺嘧啶
2'-卤代-尿苷	2'-卤代-甲基胞苷
2'-氨基-腺苷	2'-氨基-胞苷
2'-氨基-尿苷	2'-氨基-胸腺嘧啶
2'-氨基-尿苷	2'-氨基-甲基胞苷
肌酐	尿苷-5-羟乙酸
N6-异戊烯基腺苷	Wybutoxosine
1-甲基腺苷	假尿苷

[0542]

1-甲基假尿苷	癸苷(Queuosine)
1-甲基尿苷	2-硫代胞苷
1-甲基肌甙	5-甲基-2-硫代尿苷
2,2-二甲基尿苷	2-硫代尿苷
2-甲基腺苷	4-硫代尿苷
2-甲基尿苷	5-甲基尿苷
3-甲基胞苷	N-[(9-β-D-呋喃核糖基嘌呤-6-基)-氨甲酰基]苏氨酸
5-甲基胞苷	2'-O-甲基-5-甲基尿苷
N6-甲基腺苷	2'-O-甲基尿苷
7-甲基尿苷	Wybutosine
5-甲基氨基甲基尿苷	3-(3-氨基-3-羧基-丙基)尿苷
锁-腺苷	锁-胞苷
锁-尿苷	锁-胸腺嘧啶
锁-尿苷	锁-甲基胞苷

[0543] 在一个优选的方面中,包封在纳米颗粒中的靶寡核苷酸包括例如、但不限于致癌基因,促血管生成途径基因,促细胞增殖途径基因,病毒传染剂基因和促炎途径基因。

[0544] 在一个优选的实施方案中,包封在本文所述纳米颗粒内的寡核苷酸涉及靶肿瘤细胞或下调与肿瘤细胞有关的基因或蛋白质表达和 / 或抵抗抗癌治疗中所涉及的蛋白。对于本发明,可以使用用于向下调节与癌症有关的本领域已知任何细胞蛋白质的反义寡核苷酸,例如 BCL-2。参见 2004 年 4 月 9 日提交的美国专利申请 No. 10/822205,通过引用将其内容并入本文。优选的治疗性寡核苷酸的非限制性举例包括反义 HIF-1 α 寡核苷酸,反义存活蛋白寡核苷酸,反义 ErbB3 寡核苷酸,反义 β - 联蛋白寡核苷酸和反义 Bcl-2 寡核苷酸。

[0545] 更优选地,本文所述的根据本发明的寡核苷酸包括硫代磷酸酯主链和 LNA。

[0546] 在一个优选的实施方案中,所述寡核苷酸可以是例如反义存活蛋白 LNA,反义 ErbB3LNA,或反义 HIF-1 α LNA。

[0547] 在另一个优选的实施方案中,寡核苷酸可以是例如具有与 Genasense[®] (a/k/a 奥利默森钠 (oblimersen sodium), Genta Inc., Berkeley Heights, NJ) 相同或基本上类似的核苷酸序列的寡核苷酸。Genasense[®] 为 18- 聚体硫代磷酸反义寡核苷酸 (SEQ ID NO :4), 其与人 bcl-2mRNA (人 bcl-2mRNA 是本领域已知的,并且例如在美国专利 No. 6414134 中描述为 SEQ ID NO :19,该专利引用并入本文) 的起始序列的最初六个密码子互补。

[0548] 所预期的优选实施方案包括:

[0549] (i) 反义存活蛋白 LNA, Oligo-1 (SEQ ID NO :1)

[0550] ${}^m\text{C}_s\text{-T}_s\text{-}{}^m\text{C}_s\text{-A}_s\text{-a}_s\text{-t}_s\text{-c}_s\text{-c}_s\text{-a}_s\text{-t}_s\text{-gs-g}_s\text{-}{}^m\text{C}_s\text{-A}_s\text{-G}_s\text{-c}$;

[0551] 其中大写字母代表 LNA,“s”代表硫代磷酸酯主链;

[0552] (ii) 反义 Bcl2 siRNA :

[0553] 有义 5' -gcaugcgccucuguuugadTdT-3' (SEQ ID NO :2)

[0554] 反义 3' -dTdTcguacgccggagacaaacu-5' (SEQ ID NO :3)

[0555] 其中 dT 代表 DNA ;

[0556] (iii) Genasense (硫代磷酸酯反义寡核苷酸) : (SEQ ID NO :4)

[0557] $t_s-c_s-t_s-c_s-c_s-c_s-a_s-g_s-c_s-g_s-t_s-g_s-c_s-g_s-c_s-c_s-c_s-a_s-t$

[0558] 其中小写字母代表 DNA, 且“s”代表硫代磷酸酯主链 ;

[0559] (iv) 反义 HIF1 α LNA (SEQ ID NO :5)

[0560] 5' - $t_sT_sG_sG_sC_sA_sA_sG_sC_sA_sT_sC_sC_sT_sG_sT_sA$ -3'

[0561] 其中大写字母代表 LNA, 且“s”代表硫代磷酸酯主链。

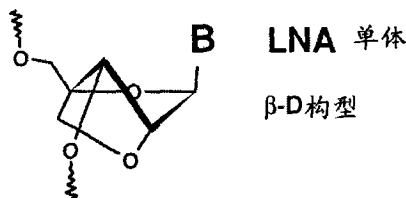
[0562] (v) 反义 ErbB3LNA, Oligo-2 (SEQ ID NO :6)

[0563] 5' - $T_sA_sG_sC_sC_sT_sG_sT_sC_sA_sC_sT_sT_sC_sT_sC_s$ -3'

[0564] 其中大写字母代表 LNA, 且“s”代表硫代磷酸酯主链。

[0565] LNA 包括如下面所示的 2' -O, 4' -C 亚甲基二环核苷酸 :

[0566]



[0567] 乱序反义 ErbB3 LNA, Oligo-3 (SEQ ID NO :7) 具有以下序列 :

[0568] 5' -TAGettgtcccatt^mCT^mC-3'

[0569] 其中大写字母代表 LNA, ^mC 代表甲基化的胞核嘧啶, 核苷内连接基是硫代磷酸酯。

[0570] 有关存活蛋白 LNA 的详细说明参见美国专利申请公开 No. 2006/0154888 (题为“LNA Oligonucleotides and the Treatment of Cancer”)和 2005/0014712 (题为“Oligomeric Compounds for the Modulation Survivin Expression”), 它们各自的内容通过引用并入本文。还可参见美国专利申请公开 No. 2004/0096848 (题为“Oligomeric Compounds for the Modulation HIF-1 Alpha Expression”)和 2006/0252721 (题为“Potent LNA Oligonucleotides for Inhibition of HIF-1A Expression”), 它们的内容通过引用并入本文。还参见, 其内容通过引用并入本文。

[0571] 合适靶基因的实例描述于 PCT 公开 No. WO 03/74654, PCT/US03/05028 和美国专利申请序列 No. 2007/0042983, 它们的内容通过引用并入本文。

[0572] 6. 靶基团

[0573] 任选地 / 优选地, 本文所述的纳米颗粒组合物还包括针对特定细胞或组织类型的靶配体。可以使用连接分子将靶基团连接到纳米颗粒组合物的任何组分 (优选地, 促融合脂质和 PEG- 脂质), 所述连接分子例如酰胺、酰氨基、羰基、酯、肽、二硫化物、硅烷、核苷、无碱基核苷、聚醚、聚胺、聚酰胺、肽、糖类、脂质、聚炔、磷酸酯、氨基磷酸酯、硫代磷酸酯、磷酸烷基酯、马来酰亚胺连接基或对光不稳定的连接基。可使用本领域任何已知的技术将靶基团缀合到纳米颗粒组合物的任何组分而无需过多实验。

[0574] 例如, 可将靶向剂连接到 PEG 脂质的聚合物部分以将纳米颗粒指引到体内靶区域

中。本文所述纳米颗粒的靶向递送提高了包封治疗性核酸的纳米颗粒的细胞吸收度,从而改善治疗效果。在某些方面方面,一些细胞穿膜肽可以被多种靶向递送至肿瘤部位的靶向肽所代替。

[0575] 在本发明的一个优选方面中,靶向部分如单链抗体 (SCA) 或单链抗原结合的抗体,单克隆抗体,细胞粘附肽如 RGD 肽和选择蛋白 (Selectin),细胞穿膜肽 (cell penetrating peptide) (CPP) 如 TAT,穿膜肽 (penetratin) 和 (Arg)₉,受体配体,靶向糖分子或凝集素 (lectin) 允许纳米颗粒特异性地导入靶区。参见 J Pharm Sci. 2006 年 9 月; 95(9):1856-72, Cell adhesion molecules for targeted drug delivery, 通过引用将其内容并入本文。

[0576] 优选的靶向部分为单链抗体 (SCA) 或者抗体的单链可变区片段 (sFv)。SCA 包含可以结合或者识别靶向肿瘤细胞的特异性分子的抗体区域。除了保留抗原结合位点之外,缀合到 PEG-脂质的 SCA 可以降低抗原性并增加 SCA 在血流中的半衰期。

[0577] 术语“单链抗体 (SCA)”、“单链抗原结合的分子或抗体”或者“单链 Fv” (sFv) 可以互换使用。单链抗体对抗原具有结合亲和性。单链抗体 (SCA) 或者单链 Fv 可以并且以若干方式构建。单链抗原结合的蛋白质的理论和制备的说明参见共同受让的美国专利申请 No. 10/915069 和美国专利 6824782, 它们各自的内容通过引用并入本文。

[0578] 典型地, SCA 或者 Fv 区域可在单克隆抗体中选取, 所述单克隆抗体在文献中的简称为 26-10, MOPC 315, 741F8, 520C9, McPC 603, D1.3, 鼠 ph0x, 人 ph0x, RFL3.8 sTCR, 1A6, Se155-4, 18-2-3, 4-4-20, 7A4-1, B6.2, CC49, 3C2, 2c, MA-15C5/K₁₂G0, 0x, 等 (参见, Huston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883(1988); Huston, J. S. et al., SIM News 38(4) (Supp):11(1988); McCartney, J. 等, ICSU Short Reports 10:114(1990); McCartney, J. E. 等, 未公布的结果 (1990); Nedelman, M. A. 等, J. Nuclear Med. 32(Supp.):1005(1991); Huston, J. S. 等, In: Molecular Design and Modeling: Concepts and Applications, Part B, edited by J. J. Langone, Methods in Enzymology 203:46-88(1991); Huston, J. S. 等, In: Advances in the Applications of Monoclonal Antibodies in Clinical Oncology, Epenetos, A. A. (Ed.), London, Chapman & Hall (1993); Bird, R. E. 等, Science 242:423-426(1988); Bedzyk, W. D. 等, J. Biol. Chem. 265:18615-18620(1990); Colcher, D. 等, J. Nat. Cancer Inst. 82:1191-1197(1990); Gibbs, R. A. 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:4001-4004(1991); Milenic, D. E. 等, Cancer Research 51:6363-6371(1991); Pantoliano, M. W. 等, Biochemistry 30:10117-10125(1991); Chaudhary, V. K. 等, Nature 339:394-397(1989); Chaudhary, V. K. 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1066-1070(1990); Batra, J. K. 等, Biochem. Biophys. Res. Comm. 171:1-6(1990); Batra, J. K. 等, J. Biol. Chem. 265:15198-15202(1990); Chaudhary, V. K. 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:9491-9494(1990); Batra, J. K. 等, Mol. Cell. Biol. 11:2200-2205(1991); Brinkmann, U. 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8616-8620(1991); Seetharam, S. 等, J. Biol. Chem. 266:17376-17381(1991); Brinkmann, U. 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:3075-3079(1992); Glockshuber, R. 等, Biochemistry 29:1362-1367(1990); Skerra, A. 等, Bio/Technol. 9:273-278(1991); Pack, P. 等, Biochemistry 31:1579-1534(1992);

Clackson, T. 等, Nature 352 :624-628(1991) ;Marks, J. D. 等, J. Mol. Biol. 222 : 581-597(1991) ;Iverson, B. L. 等, Science 249 :659-662(1990) ;Roberts, V. A. 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 :6654-6658(1990) ;Condra, J. H. 等, J. Biol. Chem. 265 : 2292-2295(1990) ;Laroche, Y. 等, J. Biol. Chem. 266 :16343-16349(1991) ;Holvoet, P. 等, J. Biol. Chem. 266 :19717-19724(1991) ;Anand, N. N. 等, J. Biol. Chem. 266 : 21874-21879(1991) ;Fuchs, P. 等, Biol Technol. 9 :1369-1372(1991) ;Breitling, F. 等, Gene 104 :104-153(1991) ;Seehaus, T. 等, Gene 114 :235-237(1992) ;Takkinen, K. 等, Protein Engng. 4 :837-841(1991) ;Dreher, M. L. 等, J. Immunol. Methods 139 : 197-205(1991) ;Mottez, E. 等, Eur. J. Immunol. 21 :467-471(1991) ;Traunecker, A. 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 :8646-8650(1991) ;Traunecker, A. 等, EMBO J. 10 : 3655-3659(1991) ;Hoo, W. F. S. 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 :4759-4763(1993)。每个前述出版物通过引用并入本文。

[0579] 靶向基团的非限制性列举包括血管内皮细胞生长因子, FGF2, 生长抑素和生长抑素类似物, 转铁蛋白, 促黑激素, ApoE 和 ApoE 肽, 冯维勒布兰德氏因子 (von Willebrand's Factor) 和冯维勒布兰德氏因子肽, 腺病毒纤维蛋白和腺病毒纤维蛋白肽, PD1 和 PD1 肽, EGF 和 EGF 肽, RGD 肽, 叶酸, 等等。在本文所述纳米颗粒中还可以采用本领域的技术人员理解的其它任选靶向剂。

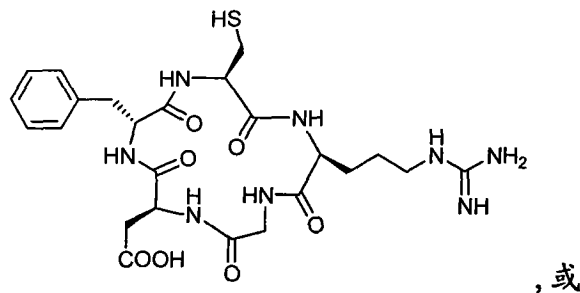
[0580] 在一个优选的实施方案中, 用于本文所述纳米颗粒的靶向剂包括单链抗体 (SCA), RGD 肽, 选择蛋白, TAT, 穿膜肽, (Arg)₉, 叶酸等, 这些试剂的一些优选结构为 :

[0581] C-TAT : (SEQ ID NO :8) CYGRKKRRQRRR ;

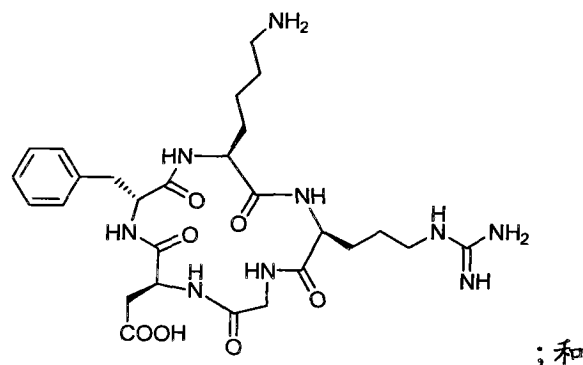
[0582] C-(Arg)₉ : (SEQ ID NO :9) CRRRRRRRRR ;

[0583] RGD 可以是线性或环状的 :

[0584]

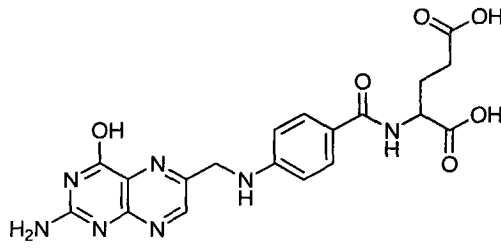


[0585]



[0586] 叶酸是如下的残基 :

[0587]



[0588] (Arg)₉ 可包括用于缀合的半胱氨酸, 如 CRRRRRRRRR, 且 TAT 可以在肽末端添加另外的半胱氨酸, 如 CYGRKKRRQRRRC (SEQ ID NO :10)。

[0589] 就本发明而言, 说明书和附图使用的缩写表示下面结构:

[0590] (i) C-diTAT (SEQ ID NO :11) = CYGRKKRRQRRRYGRKKRRQRRR-NH₂;

[0591] (ii) 线性 RGD (SEQ ID NO :12) = RGDC;

[0592] (iii) 环状 RGD (SEQ ID NO :13) = c-RGDFC;

[0593] (iv) RGD-TAT (SEQ ID NO :14) = CYGRKKRRQRRRGGGRGDS-NH₂; and

[0594] (v) Arg₉ (SEQ ID NO :15).

[0595] 或者, 所述靶向基团包括糖类和碳水化合物例如半乳糖, 半乳糖胺, 和 N-乙酰基半乳糖胺; 荷尔蒙例如雌激素, 睾丸激素, 孕酮, 葡萄糖可的松 (glucocortisone), 肾上腺素, 胰岛素, 胰高血糖素, 皮质醇, 维生素 D, 甲状腺激素, 视黄酸 (维生素 A 酸), 和生长荷尔蒙; 生长因子例如 VEGF, EGF, NGF 和 PDGF; 神经递质例如 GABA, 谷氨酸盐, 乙酰胆碱; NOGO; 肌醇三磷酸酯; 肾上腺素; 去甲肾上腺素; 氧化一氮, 肽, 维生素例如叶酸和维生素 B6, 药物, 抗体和可与体内或体外受体相互作用的任何其它分子。

[0596] D. 纳米颗粒的制备

[0597] 本文所述纳米颗粒可通过本领域已知的任何方法进行制备而无需过多实验。

[0598] 例如, 所述纳米颗粒可通过以下制备: 在第一储器以水溶液提供 (用于对比研究而不具有核酸的水溶液) 核酸例如寡核苷酸, 在第二储器中提供含有本文所述纳米颗粒组合物的有机脂质溶液, 和将所述水溶液与有机脂质溶液混合使得有机脂质溶液与水溶液混合产生包封核酸的纳米颗粒。该方法的细节描述于美国专利公开 No. 2004/0142025, 通过引用将其内容并入本文。

[0599] 或者, 本文所述纳米颗粒可通过使用本领域已知的任何方法制备, 所述方法包括例如清洁剂渗析方法或改进的反相方法 (该方法在所述组分混合期间利用有机溶剂来提供单一相)。在清洁剂渗析方法中, 使核酸 (即 siRNA) 与阳离子脂质的清洁剂溶液接触形成涂覆核酸复合物。

[0600] 在本发明的一个实施方案中, 将阳离子脂质和核酸例如寡核苷酸合并以产生约 1 : 20- 约 20 : 1 的电荷比, 优选约 1 : 5- 约 5 : 1 的比率, 更优选约 1 : 2- 约 2 : 1 的比率。

[0601] 在本发明的一个实施方案中, 将阳离子脂质和核酸例如寡核苷酸合并以产生约 1 : 1- 约 20 : 1, 约 1 : 1- 约 12 : 1 的电荷比, 更优选约 2 : 1- 约 6 : 1 的比率。或者, 该纳米颗粒组合物的氮与磷 (N/P) 比率为约 2 : 1- 约 5 : 1 (即 2.5 : 1)。

[0602] 在另一个实施方案中, 可通过使用复式泵系统制备本文所述纳米颗粒。通常地, 该方法包括在第一储器提供含有核酸的水溶液和在第二储器中提供含有所述纳米颗粒组合

物的脂质溶液。使用复式泵系统将这两种溶液混合以提供纳米颗粒。所得混合溶液随后用水洗缓冲液稀释并且可通过渗析纯化和 / 或分离所形成的纳米颗粒。所述纳米颗粒还可通过滤过 0.22 μm 过滤器进行灭菌处理。

[0603] 含有核酸的纳米颗粒的直径为约 5- 约 300nm。优选地, 纳米颗粒具有通过使用动态光散射技术 (DLS) 测量的小于约 150nm (例如约 50-150nm) 的中值直径, 更优选小于约 100nm 的直径。大部分纳米颗粒具有约 30-100nm (例如 59.5、66、68、76、80、93、96nm), 优选约 60- 约 95nm 的中值直径。与 DLS 技术相比, 本领域技术人员可意识到使用其它本领域已知技术例如 TEM 的测量可以提供减少了一半的中值直径数。正如多分散性所示, 本发明的纳米颗粒在大小基本一致。

[0604] 任选地, 纳米颗粒可通过本领域已知的任何方法来测定大小。所述大小可按技术人员所需进行控制。可以进行尺寸调节以获得所需的尺寸范围和相对窄的纳米粒径分布。可利用若干技术对纳米颗粒尺寸调节以获得所需尺寸。参见例如美国专利 No. 4, 737, 323, 通过引用将其内容并入本文。

[0605] 本发明提供了用于制备血清稳定性纳米颗粒的方法从而使核酸 (例如 LNA 或 siRNA) 包封在脂质多层结构 (即脂质双层) 内并且保护不遭受劣化。本文所述纳米颗粒在水溶液中稳定。包括保护纳米颗粒中的核酸不遭受体液中存在的核酸酶。

[0606] 另外, 根据本发明制备的纳米颗粒优选在生理学的 pH 下为中性或带正电荷。

[0607] 使用本文所述的纳米颗粒组合物制备的纳米颗粒或纳米颗粒复合物包括: (i) 式 (I) 的阳离子脂质; (ii) 中性脂质 / 促融合脂质; (iii) PEG- 脂质和 (iv) 核酸例如寡核苷酸。

[0608] 在一个实施方案中, 纳米颗粒组合物包括以下的混合物:

[0609] 式 (I) 的阳离子脂质、二酰基磷脂酰乙醇胺、缀合到磷脂酰乙醇胺 (PEG-PE) 的 PEG、和胆固醇;

[0610] 式 (I) 的阳离子脂质、二酰基卵磷脂、缀合到磷脂酰乙醇胺 (PEG-PE) 的 PEG、和胆固醇;

[0611] 式 (I) 的阳离子脂质、二酰基磷脂酰乙醇胺、二酰基磷脂酰 - 胆碱、缀合到磷脂酰乙醇胺 (PEG-PE) 的 PEG、和胆固醇;

[0612] 式 (I) 的阳离子脂质、二酰基磷脂酰乙醇胺、缀合到神经酰胺 (PEG-Cer) 的 PEG、和胆固醇; 或

[0613] 式 (I) 的阳离子脂质、二酰基磷脂酰乙醇胺、缀合到磷脂酰乙醇胺 (PEG-PE) 的 PEG、缀合到神经酰胺 (PEG-Cer) 的 PEG、和胆固醇。

[0614] 另外的纳米颗粒组合物可通过将含有本领域已知的阳离子脂质的组合物进行改性来制备。含有本领域已知的阳离子脂质的纳米颗粒组合物可通过用式 (I) 的阳离子脂质替代本领域已知的阳离子脂质和 / 或加入式 (I) 的阳离子脂质进行改性。参见在美国专利申请公开 No. 2008/0020058 的表 IV 中所描述的本领域已知的组合物, 通过引用将其内容并入本文。

[0615] 表 3 中给出用于制备纳米颗粒的纳米颗粒组合物的非限制性列举。

[0616] 表 3

[0617]

样品 No.	纳米颗粒组合物	摩尔比	Oligo
1	化合物 6: DOPE: DSPC: Chol: DSPE-PEG	15:15:20:40:10	Oligo-1
2	化合物 6: DOPE: DSPC: Chol: DSPE-PEG	15:5:20:50:10	Oligo-1

[0618]

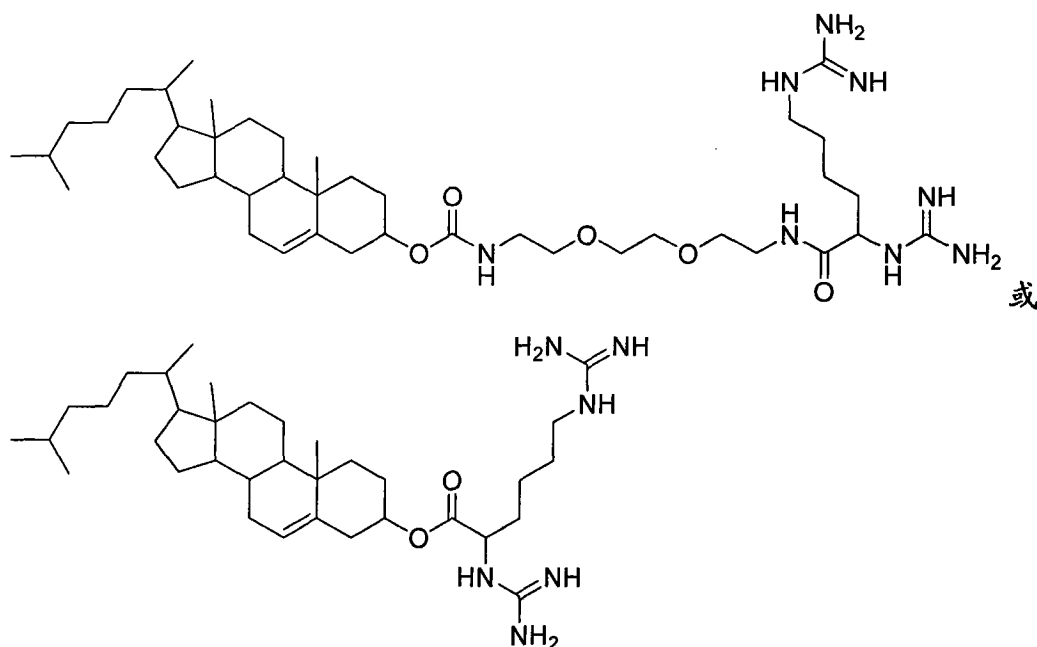
样品 No.	纳米颗粒组合物	摩尔比	Oligo
3	化合物 6: DOPE: DSPC: Chol: DSPE-PEG	25:15:20:30:10	Oligo-1
4	化合物 6: EPC: Chol: DSPE-PEG	20:47:30: 3	Oligo-1
5	化合物 6: DOPE: Chol: DSPE-PEG	17:60:20:3	Oligo-1
6	化合物 6: DOPE: DSPE-PEG	20:78: 2	Oligo-1
7	化合物 6: DOPE: Chol:C16mPEG-神经酰胺	17:60:20:3	Oligo-2
8	化合物 6: DOPE: Chol: DSPE-PEG: C16mPEG-神经酰胺	18:60:20:1:1	Oligo-2

[0619] 在一个实施方案中, 纳米颗粒中的阳离子脂质(化合物 6): DOPE: 胆固醇: PEG-DSPE: C16mPEG-神经酰胺的摩尔比基于纳米颗粒组合物(样品 No. 8)中存在的总脂质分别为约 18%: 60%: 20%: 1%: 1%的摩尔比。

[0620] 在另一个实施方案中, 纳米颗粒含有摩尔比为纳米颗粒组合物(样品 No. 7)中存在的总脂质的约 17%: 60%: 20%: 3%的阳离子脂质(化合物 6)、DOPE、胆固醇和 C16mPEG-神经酰胺。

[0621] 这些纳米颗粒组合物优选含有具有以下结构的阳离子脂质:

[0622]



[0623] 如本文所使用的摩尔比是指相对于纳米颗粒组合物中存在的总脂质的量。

[0624] E. 治疗方法

[0625] 在治疗中可单独地或与其它疗法组合使用本文所述的纳米颗粒, 用以防止、抑制、

减少或治疗关于或响应细胞或组织中靶基因表达水平的任何遗传特征、疾病或状况。所述方法包括将本文所述的纳米颗粒给予到需要其的哺乳动物中。

[0626] 本发明的一方面提供了将治疗性核酸例如寡核苷酸引入或递送到哺乳动物细胞体内和 / 或体外的方法。

[0627] 根据本发明的方法包括使细胞与本文所述的纳米颗粒接触。所述递送可在体内作为合适药物组合物的一部分进行或者直接递送到离体环境的细胞中。

[0628] 在另一方面,本发明用于将寡核苷酸引入到哺乳动物中。可将本文所述的纳米颗粒给予到哺乳动物,优选人体。

[0629] 在又一方面,本发明优选提供了抑制或下调(调控)哺乳动物细胞或组织中的基因表达的方法。基因表达的下调或抑制可在体内、离体和 / 或体外实现。所述方法包括使人体细胞或组织与本文所述的纳米颗粒包封的核酸接触或者在需要其的哺乳动物中给予该纳米颗粒。一旦发生接触,在与不存在本文所述的纳米颗粒所观测到的相比时,当在体内、离体或体外实现至少约 10%, 优选至少约 20% 或更高(例如至少约 25%、30%、40%、50%、60%) 时将认为例如在 mRNA 或蛋白质水平中产生了基因表达的有效抑制或下调。

[0630] 就本发明而言,“抑制”或“下调”应理解为表示编码一种或多种蛋白质亚单元的靶基因表达或 RNA 水平或等效 RNA、或者一种或多种蛋白质亚单元的(例如 ErbB3、HIF-1 α 、存活蛋白和 BCL2) 活性当与不存在本文所述纳米颗粒所观测到的相比时受到降低。

[0631] 在一个优选实施方案中,靶基因包括例如、但不限于致癌基因,促血管生成途径基因,促细胞增殖途径基因,病毒致病原基因和促炎途径基因。

[0632] 优选地,靶基因的基因表达在癌细胞或组织中受到抑制,所述癌细胞或组织例如脑、胸、大肠、胃、肺、口腔、胰腺、前列腺、皮肤或子宫颈癌细胞。癌细胞或组织可以为下面中的一种或多种: 固体肿瘤、淋巴瘤、小细胞肺癌、急性淋巴细胞性白血病(ALL)、胰脏癌、胶质母细胞瘤、卵巢癌、胃癌、乳腺癌、大肠癌、前列腺癌、宫颈癌、脑肿瘤、KB 癌症、肺癌、结肠癌、表皮癌等。

[0633] 在一个特定实施方案中,根据本文描述的方法的纳米颗粒包括例如反义 bcl-2 寡核苷酸,反义 HIF-1 α 寡核苷酸,反义存活蛋白寡核苷酸和反义 ErbB3 寡核苷酸。

[0634] 本文所预期的疗法使用包封在上述纳米颗粒中的核酸。在一个实施方案中,治疗性核苷酸含有 8 个或更多个可用于所述治疗的连续反义核苷酸。

[0635] 在一个特定治疗中,可使用包括寡核苷酸的纳米颗粒 (SEQ ID NO. 1, SEQ ID NOs : 2&3, SEQ ID NO :4, SEQ ID NO :5, and SEQ ID NO :6)。

[0636] 或者,还提供了治疗哺乳动物的方法。该方法包括将有效量的含有本文所述的纳米颗粒的药物组合物给予到需要其的患者。该方法的功效可取决于核酸就所进行处理的情况而言的功效。本发明提供了哺乳动物中各种医学状况的治疗方法。该方法包括将有效量的含有包封的治疗性核酸的纳米颗粒给予到需要这种处理的哺乳动物。本文所述的纳米颗粒特别对于治疗疾病例如(但不限于)癌症、发炎性疾病和自身免疫性疾病是有效的。

[0637] 在一个实施方案中,还提供了治疗具有恶性肿瘤或癌症的患者的方法,包括将有效量的含有本文所述的纳米颗粒的药物组合物给予到需要其的患者。所治疗的癌症可以是下面中的一种或多种: 固体肿瘤、淋巴瘤、小细胞肺癌、急性淋巴细胞白血病(ALL)、胰脏癌、胶质母细胞瘤、卵巢癌、胃癌、大肠癌、前列腺癌、宫颈癌、脑肿瘤、KB 癌症、肺癌、结肠癌、

表皮肿瘤等。所述纳米颗粒可用于在哺乳动物中通过下调靶基因的基因表达来治疗肿瘤性疾病，降低瘤负荷，防止肿瘤的转移并且防止瘤 / 肿瘤生长的复发。

[0638] 所述纳米颗粒可用于在哺乳动物中通过下调靶基因的基因表达来治疗肿瘤性疾病，降低瘤负荷，防止肿瘤的转移并且防止瘤 / 肿瘤生长的复发。例如，所述纳米颗粒可用于治疗转移性疾病（即具有到肝脏中的转移性的癌症）。

[0639] 在又一方面，本发明提供了抑制体内或体外癌细胞的生长或增殖的方法。该方法包括使癌细胞与本文所述的纳米颗粒接触。在一个实施方案中，本发明提供了抑制体内或体外癌的生长方法，其中细胞表达 ErbB3 基因。在另一个实施方案中，本发明提供了将反义寡核苷酸例如反义 ErbB3 LNA 寡核苷酸递送到癌细胞内部的方法，其中所述反义寡核苷酸可进入核中并且与 ErbB3 mRNA 结合。其结果是，靶基因表达例如 ErbB3 表达受到抑制，这抑制了癌细胞的生长。或者，本发明提供了调控癌细胞的凋亡的方法。该方法包括使细胞与本文所述的纳米颗粒接触。

[0640] 在又一方面，还提供了提高癌细胞或组织对体内或体外化疗剂的灵敏度的方法。在一个特定方面，该方法包括将包封在本文所述的纳米颗粒中的寡核苷酸（例如反义寡核苷酸包括 LNA）引入到癌细胞中以减少癌细胞或组织中的基因（例如，存活蛋白，HIF-1 α 或 ErbB3）表达，其中所述反义寡核苷酸与 mRNA 结合并且降低基因表达。

[0641] 在又一方面，提供了杀死体内或体外肿瘤细胞的方法。该方法包括将本文所述的纳米颗粒引入到肿瘤细胞以减少基因表达例如 ErbB3 基因并且使肿瘤细胞与足以杀死部分所述肿瘤细胞的量的至少一种化疗剂接触。因此，被杀死的肿瘤细胞的部分可大于不存在本文所述的纳米颗粒时相同化疗剂量所可杀死的部分。

[0642] 在本发明的其它方面，化疗剂可以与使用本文所述的纳米颗粒的方法组合使用，同时使用或相继使用。本文所述的纳米颗粒可以在化疗剂给药之前或同时进行给药，或者在化疗剂给药之后进行给药。

[0643] 仍其它方面包括将本文所述的本发明的化合物与其它抗癌疗法组合用于获得协同或额外益处。

[0644] 或者，本文所述的纳米颗粒组合物可用于将药物活性剂（优选具有负电荷或中性电荷）递送到哺乳动物。可将包封药物活性剂 / 化合物的纳米颗粒给予到需要其的哺乳动物。所述药物活性剂 / 化合物包括小分子量分子。典型地，所述药物活性剂具有小于约 1,500 道尔顿（即小于 1,000 道尔顿）的分子量。

[0645] 在其它实施方案中，本文所述的化合物可用于递送核酸、药物活性剂或其组合。

[0646] 在仍其它实施方案中，与治疗有关的纳米颗粒可含有一种或多种治疗性核酸（相同或不同，例如相同或不同的含有 LNA 的寡核苷酸）与药物活性剂的混合物用于协同应用。

[0647] F. 纳米颗粒的药物组合物 / 制剂

[0648] 包括本文所述纳米颗粒的药物组合物 / 制剂可以与一种或多种生理学上可接受的载体组合进行配制，所述载体包含可有助于将活性化合物加工成药学上可用的制剂的赋形剂和辅料。合适的制剂取决于所选给药途径，即进行局部或全身治疗。

[0649] 合适的形式至少部分取决于用途或进入途径，例如口服、透皮或注射。关于制备合适制剂的本领域已知考虑因素包括、但不限于毒性和会阻碍组合物或制剂发挥其作用的任何缺点。

[0650] 本文所述的纳米颗粒的药物组合物的给药可以是口服,肺,局部(例如表皮、透皮、眼部和黏液膜,包括阴道、直肠递送)或肠外,包括静脉内、动脉内、皮下、腹腔内或肌肉注射或输液。

[0651] 在一个优选实施方案中,含有治疗性寡核苷酸的纳米颗粒以静脉方式(i. v.),腹腔内方式(i. p.)或者推注进行给药。优选在本发明的许多方面中肠外途径是优选的。

[0652] 对于注射,包括、但不限于静脉内注射,肌肉注射和皮下注射,可以将本发明的纳米颗粒在水溶液中,优选在生理性相容的缓冲液中进行配制,所述缓冲液例如生理盐水缓冲液或极性溶剂(包括、但不限于吡咯烷酮或二甲亚砜)。

[0653] 还可以就推注或者就连续输液对纳米颗粒进行配制。用于注射的制剂可以为单位剂量形式,例如,在安瓿瓶中或者在多剂量容器中。有效的组合物包括、但不限于在油性或水性载体中的悬浮液,溶液或乳液,并且可以含有辅料例如悬浮剂、稳定剂和/或分散剂。用于肠外给药的药物组合物包括水溶性形式的水溶液。水性注射悬浮液可以含有调节悬浮液粘度的物质,例如羧甲基纤维素钠、山梨醇、或葡聚糖。任选地,悬浮液还可以含有合适的稳定剂和/或提高纳米颗粒在溶液中的浓度的试剂。或者,纳米颗粒可以为粉末形式用以利用合适的载体例如无菌、无热源的水在使用之前进行配制。

[0654] 对于口服给药,本文所述的纳米颗粒可通过将该纳米颗粒与本领域已知的药学可接受的载体组合配制。这些载体能使本发明化合物配制为片剂、丸剂、锭剂(lozenges)、糖衣丸(dragees)、胶囊、液体、凝胶剂、糖浆、糊剂、浆液、溶液、悬浮剂、浓溶液和用于稀释在患者饮用水中的悬浮剂、用于稀释在患者食物中的预混合剂等,用于患者口服摄取。用于口服的药物制剂可以使用固体赋形剂、可选地研磨所得混合物,和将混合物制粒,随后如果需要加入其它适宜辅料得到片剂或糖衣芯而制备。特别的,有用的赋形剂是,填充剂如糖(例如乳糖、蔗糖、甘露糖醇或山梨糖醇),纤维素制品例如玉米淀粉、小麦淀粉、米淀粉和马铃薯淀粉及其它原料例如明胶、黄蓍胶、甲基纤维素、羟丙基-甲基纤维素、羧基-甲基纤维素钠、和/或聚乙烯吡咯烷酮(PVP)。如果需要,还可加入崩解剂,例如交联的聚乙烯吡咯烷酮、琼脂、或者海藻酸。还可使用盐,例如海藻酸钠盐。

[0655] 对于吸入给药,本发明的纳米颗粒可以使用加压包装或喷雾器和适宜的推进剂,以气雾剂喷雾形式方便地递送。

[0656] 所述纳米颗粒还可以使用例如常规栓剂基质如可可脂或其它甘油酯,配制为直肠组合物例如栓剂或灌肠剂。

[0657] 除了前述制剂,所述纳米颗粒还可以配制为储库制剂(depotpreparation)。这样的长效制剂可以通过植入(例如皮下或肌内)或肌肉注射给药。对于这一给药途径,本发明的纳米颗粒可以与适宜的聚合或疏水材料(例如在乳剂中与药理学上可接受的油)、与离子交换树脂配制或作为微溶衍生物如非限制性的微溶盐。

[0658] 另外,所述纳米颗粒可使用持续释放(sustained-release)系统,例如包含所述纳米颗粒的固体疏水聚合物的半渗透基质。已经制备出多种持续释放材料,且为本领域技术人员所熟知。

[0659] 此外,抗氧化剂和悬浮剂可用于本文所述的纳米颗粒的药物组合物。

[0660] G. 剂量

[0661] 确定足以抑制预选基因的一种或多种表达的剂量,例如临床环境中的治疗有效

量,确定是本领域技术人员所具有的能力,尤其是在本文所公开内容的基础上。

[0662] 对于本发明的方法使用的任何治疗性核酸,治疗有效量可以由体外分析开始推定。随后可以配制供动物模型使用的剂量以实现包括有效剂量的循环浓度范围。这样的信息随后可用于更加精确地确定用于患者的剂量。

[0663] 进行给药的药物组合物的量将取决于其中包含的核酸的能效。通常,用于治疗含有核酸的纳米颗粒的量是在哺乳动物中有效获得所需治疗性效果的量。自然地,各种纳米颗粒的剂量可取决于包封于其中的核酸(寡核苷酸例如反义 LNA 分子)(或药物活性剂)而稍微变动。此外,所述剂量当然可取决于剂型和给药途径而变动。一般而言,然而,包封在本文所述的纳米颗粒中的核酸可按约 0.1mg/kg/剂至约 1g/kg/剂,优选约 1 至约 500mg/kg/剂和更优选 1 至约 100mg/kg/剂(即约 2 至约 60mg/kg/剂)的量进行给药。治疗中给予的反义寡核苷酸的量可以为约 4 至约 25mg/kg/剂。例如,治疗方案包括给予反义寡核苷酸约 0.1mg/kg/周至约 1g/kg/周,优选约 1 至约 500mg/kg/周和更优选 1 至约 100mg/kg/周(即约 2 至约 60mg/kg/周)。

[0664] 在一个实施方案中,所述方案包括每周给予约 4 至约 18mg/kg/剂,或每周约 4 至约 9.5mg/kg/剂的量的反义寡核苷酸。

[0665] 在一个特定实施方案中,所述治疗方案包括在 6 周的周期中每周约 4-约 18mg/kg/剂的量并持续 3 周的反义寡核苷酸(即约 8mg/kg/剂)。另一个特定实施方案包括约 4 至约 9.5mg/kg/剂每周(即约 8 或 4.1mg/kg/剂)。

[0666] 上文给出的范围是说明性的并且本领域技术人员可根据临床经验和治疗指示确定最佳用量。此外,可由个体医师考虑到患者的状况来选择准确的制剂、给药途径和剂量。另外,可使用本领域公知的方法通过标准药物操作在细胞培养基或实验动物中测定本文所述化合物的毒性和治疗功效。

[0667] 或者,在治疗中取决于核酸的能效可使用约 0.1mg 至约 140mg/kg/day (0.1 至 100mg/kg/天)的量。剂量单位通常为约 1mg-约 500mg 的活性剂即寡核苷酸。

[0668] 在一个实施方案中,本发明的治疗包括将包封在本文所述纳米颗粒内的寡核苷酸以约 0.1 至约 50mg/kg/剂,例如约 0.5-约 45mg/kg/剂(例如以单剂量或多剂量状态)的量给予到哺乳动物。

[0669] 或者,包封在本文所述的纳米颗粒内的寡核苷酸的递送包括使浓度为约 0.1-约 1000nm,优选约 10-约 1500nm(例如约 30-约 1000nm)的寡核苷酸与体内、离体或体外的肿瘤细胞或组织接触。

[0670] 可以将所述组合物每天给药一次或者分成多剂量给药,其可以作为多周治疗方案的一部分。精确的剂量将依赖于病况的阶段和严重程度,肿瘤对核酸的敏感性,和所治疗的患者的个体特征,这是本领域技术人员理解的。

[0671] 在本发明所有方面,当将给药纳米颗粒时,所提及的剂量是基于寡核苷酸分子的量而不是给予的纳米颗粒的量。

[0672] 设想给予 1 天或多天的治疗直到得到所需临床结果。当然,包封治疗性核酸的纳米颗粒(或药物活性剂)的精确量、频率和给药时间将根据患者的性别、年龄和医药状况以及主治医师确定的疾病的严重程度而变化。

[0673] 本发明的仍其它方面包括将本文所述的纳米颗粒与其它抗癌疗法组合,实现协同

作用或额外益处。

实施例

[0674] 提供下述实施例用于进一步理解本发明,但不是为了以任何方式限制本发明的有效范围。

[0675] 在实施例中,所有合成反应在干燥氮气或氩气的气氛中进行。N-(3-氨基丙基)-1,3-丙烷二胺,BOC-ON,环氧乙烷,LiOCl₄,胆固醇和 1H-吡啶-1-甲脒·HCl 购自 Aldrich。所有其它试剂和溶剂在没有进一步纯化的情况下使用。含有 LNA 的寡核苷酸例如 Oligo-1 靶存活蛋白基因,Oligo-2 靶 ErbB3 基因和 Oligo-3(乱序的 Oligo-2) 在室内(in house)制备并且它们的序列描述于表 4 中。寡核苷酸中的核苷间连接体包括硫代磷酸酯,^mC 表示甲基化的胞嘧啶,并且上面的大写字母表示 LNA。

[0676] 表 4.

[0677]

LNA Oligo	序列
Oligo-1(SEQ ID NO:1)	5' - ^m CT ^m CAatccatgg ^m CAGc-3'
Oligo-2(SEQ ID NO:6)	5' -TAGcctgtcactt ^m CT ^m C-3'
Oligo-3(SEQ ID NO:7)	5' -TAGcttgtcccat ^m CT ^m C-3'

[0678] 整个实施例中使用缩写,例如 LNA(锁核酸寡核苷酸),BACC(2-[N,N'-二(2-胍鎓丙基)]氨基胆固醇基碳酸酯),2-(Boc-氧亚氨基)-2-苯基乙腈(BOC-ON),Chol(胆固醇),DIEA(二异丙基乙胺),DMAP(4-N,N-二甲基氨基-吡啶),DOPE(1- α -二油酰磷脂酰乙醇胺,Avanti 极性脂质,USA 或 NOF, Japan),DLS(动态光散射),DSPC(1,2-二硬脂酰-sn-甘油基-3-胆碱磷酸)(NOF, Japan),DSPE-PEG(1,2-二硬脂酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-n-(聚乙二醇)2000 铵盐或钠盐,Avanti 极性脂质,USA 和 NOF, Japan),KD(Knowndown),EPC(卵磷脂,Avanti 极性脂质,USA)和 C16mPEG-神经酰胺(N-棕榈酰-鞘氨醇-1-[琥珀酰(甲氧基聚乙二醇)2000,Avanti 极性脂质,USA)。还使用其它缩写例如 FAMily(6-羧基荧光素),FBS(胎牛血清),GAPDH(甘油醛-3-磷酸酯脱氢酶),DMEM(Dulbecco 的改性 Eagle 的介质),MEM(改性的 Eagle 的介质),TEAA(四乙基乙酸铵),TFA(三氟乙酸),RT-qPCR(反转录-定量聚合酶链式反应)。

[0679] 实施例 1. 一般 NMR 方法。

[0680] 除非另有所述,使用 Varian Mercury 300NMR 光谱仪,以 300MHz 获得 ¹H NMR 谱,以 75.46MHz 获得 ¹³C NMR 谱,并使用氘代氯仿作为溶剂。化学位移(δ)以距四甲基硅烷(TMS)的低场百万分率(ppm)记录。

[0681] 实施例 2. 一般 mRNA 下调操作。

[0682] 将细胞保持在完全培养基中(F-12K 或 DMEM,补充有 10% FBS)。将每个孔含有 2.5×10^5 个细胞的 12 孔板在 37°C 下培育过夜。用 Opti-MEM[®]将所述细胞洗涤一次并且将 400 μ L Opti-MEM[®]加入到每个孔中。然后,用包封核酸的纳米颗粒溶液或没有纳米颗粒的游离核酸(裸寡核苷酸)的溶液(作为对照)处理所述细胞。将细胞培育 4 小时,接着每个

孔加入 600 μ L 介质,并培育 24 小时。在处理 24 小时后,通过 RT-qPCR 测量靶基因例如人体 ErbB3 和持家基因例如 GAPDH 的细胞内 mRNA 水平。将 mRNA 的表达水平针对 GAPDH 的表达水平进行归一化。

[0683] 实施例 3. 化合物 1 的制备。

[0684] 在 0 $^{\circ}$ C 下将 2,2'-(乙烷-1,2-二基双(氧基))二乙胺(101.2g,683mmol)在 250mL 无水二氯甲烷(DCM)和 200mL THF 中的溶液经 1.5 小时的时间缓慢加入到二叔丁基碳酸氢酯(59.6g,273mmol)在 150mL 无水 DCM 的溶液中。在室温下搅拌该混合物 16 小时。除去溶剂并将残余物吸收到 300mL 水中且萃取到 DCM(2x 300mL)中。合并有机层并且用 0.5N HCl(2x250mL)萃取。然后用 4N 氢氧化钠溶液将含水层碱化至 pH 8 并用 DCM 萃取(2x300mL)。合并有机层并将其在无水硫酸镁上干燥,过滤,浓缩并且在 40 $^{\circ}$ C 减压干燥从而获得 28.5g(收率为 42%)产物: 13 C NMR δ 155.43,78.42,73.05,69.74,41.37,39.92,28.06。

[0685] 实施例 4. 化合物 2 的制备。

[0686] 向化合物 1(3.52g,14.2mmol)在 70mL 无水 DCM 中的溶液加入 DIEA(2.48mL,14.2mmol),接着加入胆固醇基氯甲酸酯(5.8g,12.9mmol)。将反应混合物在室温下搅拌 2.5 小时,接着加入 0.5N HCl(60mL)。将产物萃取到 DCM(2x60mL)中。合并有机层并将其在无水硫酸镁上干燥,过滤,浓缩。将得到的固体在 35 $^{\circ}$ C 下减压干燥从而获得 8.05g(收率为%)产物: 13 C NMR δ 155.99,155.80,139.71,122.36,79.26,76.57,74.35,70.29,70.2,56.71,56.16,50.04,42.35,40.74,40.42,39.78,39.57,38.62,37.05,36.61,36.22,35.85,31.94,28.48,28.29,28.23,28.07,24.35,23.91,22.88,22.63,21.12,19.43,18.80,11.95。

[0687] 实施例 5. 化合物 3 的制备。

[0688] 在 0 $^{\circ}$ C 下向化合物 2(8.05g,12.2mmol)在 55mL 无水 DCM 中的溶液加入 24mL TFA。将反应混合物在室温下搅拌 1 小时。在反应完成后,除去溶剂至干从而以 TFA 盐获得 9.15g(收率定量(quant.))。该化合物在没有进一步纯化的情况下使用: 13 C NMR δ 161.31,160.77,160.24,159.72,157.90,139.17,122.82,120.84,117.04,113.24,109.45,70.05,69.97,66.14,66.08,56.72,56.22,50.06,42.36,40.79,40.09,39.80,39.60,38.33,36.90,36.56,36.27,35.88,31.92,28.31,28.07,27.98,24.35,23.95,22.84,22.59,21.11,19.25,18.78,14.51,11.92。

[0689] 实施例 6. 化合物 4 的制备。

[0690] 在 0 $^{\circ}$ C 下向化合物 3(9.15g,13.6mmol)在 100mL 无水 DCM 中的溶液加入 Boc-Lys(Boc)-OH(10.7g,20.4mmol),接着加入 DMAP(2.5g,20.4mmol)和 EDC(3.92g,20.4mmol)。将混合物在室温下搅拌过夜。用 100mL DCM 稀释反应物,用 0.5N NaHCO₃(2x70mL)和 0.1N HCl(2x70mL)洗涤。将有机层在无水硫酸镁上干燥、过滤和浓缩。使用 DCM/甲醇(9:1, v/v)混合物通过硅胶柱层析纯化粗产物,从而获得 5.1g(收率为 42%)产物: 13 C NMR δ 171.90,156.04,155.84,155.43,139.54,122.30,79.76,78.89,74.25,70.23,70.09,69.59,56.59,56.05,54.37,53.36,49.94,42.25,40.63,40.01,39.67,39.46,39.19,38.53,36.94,36.50,36.13,35.74,32.31,31.83,29.64,28.44,28.33,28.19,28.15,27.96,24.26,23.80,22.81,22.65,22.55,21.02,19.31,18.70,11.86。

[0691] 实施例 7. 化合物 5 的制备。

[0692] 在 0℃ 下向化合物 4 (5.1g, 5.7mmol) 在 35mL 无水 DCM 中的溶液加入 15mL TFA。将反应混合物在室温下搅拌 1.5 小时。用 50mL DCM 稀释该混合物并且缓慢加入饱和 NaHCO₃ 溶液直到含水层获得 pH 为 ~ 5。分离有机层并将其在无水 MgSO₄ 上干燥、过滤、浓缩和干燥从而以 TFA 盐获得 3.8g (73%) 产物：¹³C NMR δ 169.29, 156.33, 139.70, 122.40, 76.57, 74.35, 70.06, 56.72, 56.24, 50.03, 42.37, 39.79, 39.56, 38.69, 37.03, 36.61, 36.28, 35.90, 31.94, 28.29, 28.08, 24.38, 24.02, 22.90, 22.64, 21.17, 19.47, 18.83, 11.98。

[0693] 实施例 8. 化合物 6 的制备。

[0694] 在室温下向化合物 5 (1.3g, 1.88) 在 13mL 无水氯仿中的溶液加入 1H-吡唑-1-甲脒 HCl (1.10g, 7.5mmol), 接着加入 DIEA (1.31mL, 7.5mmol, d 0.74)。使反应回流 16 小时。将该溶液冷却至室温并且通过加入 15mL 乙腈进行沉淀。用离心分离机分离出固体。将分离出的固体溶解在 14mL 水/ACN (1 : 1, v/v) 中。在溶解后, 加入 14mL ACN 以使固体沉淀。将固体离心分离并干燥从而获得 950mg (66%) 产物：¹³C NMR δ 171.06, 157.05, 156.43, 139.62, 122.39, 74.42, 70.03, 56.69, 56.24, 49.99, 42.32, 40.64, 39.76, 39.53, 38.63, 37.05, 36.57, 36.25, 35.87, 31.92, 28.26, 28.04, 24.35, 23.99, 22.87, 22.61, 21.13, 19.44, 18.80, 11.97。

[0695] 实施例 9. 化合物 7 的制备。

[0696] 在 0℃ 下向胆固醇 (14.2g, 36.8mmol) 在 140mL 无水 DCM 中的溶液加入 2-(2-(2-Boc-氨基乙氧基)乙氧基)乙酸 (5.1g, 18.4mmol), 接着加入 DMAP (6.7g, 54.8mmol) 和 EDC (7.1g, 36.8mmol)。将该混合物在室温下搅拌 18 小时。用 50mL DCM 稀释反应混合物, 并用 0.5N NaHCO₃ (2x80mL) 和 0.1N HCl (2x80mL) 洗涤。合并有机层并将其在无水硫酸镁上干燥, 过滤, 浓缩。使用 25% EtOAc/己烷的混合物通过硅胶柱层析纯化粗产物, 从而获得 8.5g (72%) 产物：¹³C NMR δ 169.57, 155.78, 139.16, 122.75, 79.05, 74.62, 70.76, 70.29, 70.24, 68.73, 56.64, 56.11, 49.99, 42.31, 40.39, 39.72, 39.52, 38.07, 36.92, 36.56, 36.19, 35.78, 31.91, 31.86, 28.43, 28.23, 28.02, 27.76, 24.30, 23.86, 22.85, 22.59, 21.05, 19.33, 18.75, 11.90。

[0697] 实施例 10. 化合物 8 的制备。

[0698] 在 0℃ 下向化合物 7 (8.05g, 13.4mmol) 在 80mL 无水 DCM 中的溶液加入 24mL TFA。在室温下搅拌反应 1.5 小时。在反应完成后, 除去溶剂至干从而以 TFA 盐获得 10g (收率定量 (quant.)) 产物。该化合物在没有进一步纯化的情况下使用：¹³C NMR δ 171.10, 160.78, 160.24, 138.74, 123.22, 116.93, 113.14, 77.42, 76.23, 70.54, 69.80, 68.21, 66.62, 56.66, 56.15, 49.98, 42.35, 40.10, 39.74, 39.56, 37.85, 36.78, 36.54, 36.23, 35.85, 31.88, 28.29, 28.07, 27.57, 24.34, 23.91, 22.87, 22.61, 21.08, 19.28, 18.78, 11.93。

[0699] 实施例 11. 化合物 9 的制备。

[0700] 在 0℃ 下向化合物 8 (10g, 15.5mmol) 在 100mL 无水 DCM 中的溶液加入 Boc-Lys(Boc)-OH (20.4g, 38.8mmol), 接着加入 DMAP (5.6g, 38.8mmol) 和 EDC (7.27g, 38.8mmol)。将该混合物在室温下搅拌过夜。用 100mL DCM 稀释反应混合物, 并用 0.5N NaHCO₃ (2x80mL) 和 0.1N HCl (2x80mL) 洗涤。合并有机层并将其在无水硫酸镁上干燥, 过滤, 浓缩。使用 DCM/甲醇 (9 : 1, v/v) 的混合物通过硅胶柱层析纯化粗产物, 从而

获得 6.2g (47%) 产物：¹³C NMR: δ 172.00, 169.82, 155.93, 139.15, 122.88, 78.98, 77.42, 74.92, 74.85, 70.90, 70.20, 70.10, 69.69, 68.78, 68.64, 68.53, 56.67, 56.12, 54.35, 49.99, 42.34, 40.16, 39.85, 39.75, 39.55, 39.27, 38.08, 36.94, 36.60, 36.21, 35.83, 32.64, 31.94, 31.89, 29.68, 28.51, 28.42, 28.26, 28.07, 27.99, 27.91, 27.82, 24.33, 23.99, 23.87, 22.88, 22.68, 22.62, 21.08, 19.36, 18.78, 11.93。

[0701] 实施例 12. 化合物 10 的制备。

[0702] 在 0°C 下向化合物 9 (6.2g, 7.2mmol) 在 50mL 无水 DCM 中的溶液加入 20mL TFA。将反应混合物在室温下搅拌 1.5 小时。用 50mL DCM 稀释该混合物并且缓慢加入饱和 NaHCO₃ 溶液直到含水层获得 pH 为 ~5。分离有机层并将其在无水 MgSO₄ 上干燥、过滤、浓缩和干燥从而以 TFA 盐获得 4.8g (86%) 产物：¹³C NMR δ 176.88, 171.39, 162.97, 140.68, 123.68, 116.13, 75.85, 71.82, 71.21, 71.03, 70.40, 69.67, 69.35, 64.65, 58.10, 57.69, 55.66, 51.54, 43.57, 41.17, 40.79, 40.62, 40.17, 39.16, 38.28, 37.77, 37.54, 37.25, 35.35, 33.21, 33.12, 29.48, 29.22, 28.84, 28.76, 25.47, 25.33, 25.25, 23.52, 23.44, 23.21, 22.28, 19.96, 19.58, 12.66。

[0703] 实施例 13. 化合物 11 的制备。

[0704] 在室温下向化合物 10 (1g, 1.48mmol) 在 12mL 无水氯仿中的溶液加入 1H-吡啶-1-甲脒 HCl (0.87g, 5.9mmol), 接着加入 DIEA (1.03mL, 5.9mmol, d 0.74)。使反应回流 16 小时。将该溶液冷却至室温。通过加入 15mL ACN 进行沉淀, 并且用离心分离机分离出固体。将分离出的固体溶解在 14mL 水/ACN (1 : 1, v/v) 中。在溶解后, 加入 14mL ACN 以使固体沉淀。将固体离心分离并干燥从而获得 400mg (36%) 产物：¹³C NMR δ 171.18, 170.05, 157.01, 139.15, 122.85, 74.91, 70.60, 69.73, 69.10, 68.42, 56.66, 56.24, 55.03, 49.98, 42.36, 41.34, 39.75, 39.55, 38.06, 36.93, 36.61, 36.27, 35.91, 31.91, 28.30, 28.09, 27.80, 24.36, 24.04, 22.90, 22.65, 21.13, 19.40, 18.82, 11.99。

[0705] 实施例 14. 化合物 12 即胆固醇-Lys(Boc)₂ 的制备

[0706] 在 0 °C 下向胆固醇 (6.0g, 15.5mmol) 在 100mL 无水 DCM 中的溶液加入 Boc-Lys(Boc)-OH (20.4g, 38.8mmol), 接着加入 DMAP (5.6g, 38.8mmol) 和 EDC (7.27g, 38.8mmol)。将该混合物在室温下搅拌过夜。用 100mL DCM 稀释反应, 并用 0.5N NaHCO₃ (2x80mL) 和 0.1N HCl (2x80mL) 洗涤。合并有机层并将其在无水硫酸镁上干燥, 过滤, 浓缩。使用 DCM/ 甲醇 (9 : 1, v/v) 的混合物通过硅胶柱层析纯化粗产物, 从而获得产物。

[0707] 实施例 15. 化合物 13 即胆固醇-Lys(Boc)₂ 的制备

[0708] 在 0°C 下向化合物 12 (9.6g, 13.4mmol) 在 80mL 无水 DCM 中的溶液加入 24mL TFA。在室温下搅拌反应 1.5 小时。在反应完成后, 除去溶剂至干从而以 TFA 盐获得产物。该化合物在没有进一步纯化的情况下使用

[0709] 实施例 16. 化合物 14 即胆固醇-Lys[NH-C(=NH)(NH₂)₂] 的制备

[0710] 在室温下向化合物 13 (762mg, 1.48mmol) 在 12mL 无水氯仿中的溶液加入 1H-吡啶-1-甲脒 HCl (0.87g, 5.9mmol), 接着加入 DIEA (1.03mL, 5.9mmol, d 0.74)。使反应回流 16 小时。将该溶液冷却至室温。通过加入 15mL ACN 进行沉淀, 并且用离心分离机分离出固体。将分离出的固体溶解在 14mL 水/ACN (1 : 1, v/v) 中。在溶解后, 加入 14mL ACN 以使固体沉淀。将固体离心分离并干燥从而获得产物。

[0711] 实施例 17. 纳米颗粒的制备

[0712] 在该实施例中,制备包封各种核酸例如含 LNA 的寡核苷酸的纳米颗粒组合物。例如,将化合物 6、DOPE、Chol、DSPE-PEG 和 C₁₆mPEG-神经酰胺以 18 : 60 : 20 : 1 : 1 的摩尔比在 10mL 90%乙醇中混合(总脂质 30mmole)。将 NA 寡核苷酸(0.4mmole)溶解在 10mL 的 20mM Tris 缓冲液(pH 7.4-7.6)中。在加热到 37°C 后,通过复式(duel)注射泵将这两种溶液混合在一起,随后用 20mL 的 20mM Tris 缓冲液(300mM NaCl, pH 7.4-7.6)稀释该混合溶液。将该混合物在 37°C 下培育 30 分钟并在 10mM PBS 缓冲液(138mM NaCl, 2.7mM KCl, pH 7.4)中进行渗析。在通过渗析从该混合物除去乙醇后获得稳定的颗粒。通过离心分离将该纳米颗粒溶液进行浓缩。将该纳米颗粒溶液转移到 15mL 离心过滤器装置(Amicon Ultra-15, Millipore, USA)中。在离心分离期间离心分离机速度为 3,000rpm 和温度为 4°C。在给定的时间后收集浓缩的悬浮液并通过滤过 0.22 μm 注射过滤器(Millex-GV, Millipore, USA) 将其进行灭菌。

[0713] 在 Plus 90 粒径分析仪动态光散射装置(Brookhaven, New York)上于作为介质的水(Sigma)中以 25° 测量纳米颗粒的直径和分散性。

[0714] 通过 UV-VIS(Agilent 8453)测定 LNA 寡核苷酸的包封效率。通过扫描溶液获得背景 UV-VIS 光谱,所述溶液是由 PBS 缓冲盐水(250mL)、甲醇(625mL)和氯仿(250mL)组成的混合溶液。为了确定包封的核酸浓度,将甲醇(625mL)和氯仿(250mL)加入到 PBS 缓冲盐水纳米颗粒悬浮液(250mL)中。在混合后,获得透明溶液并且将该溶液超声处理 2 分钟,然后测量在 260nm 的吸收度。包封的核酸浓度和装载效率根据下面方程式(1)和(2)计算:

[0715] $C_{\text{最终}}(\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times OD_{260} \text{ 单位}(\mu\text{g/mL}) \times \text{稀释因子}(\mu\text{L}/\mu\text{L})$ ----- (1) 其中所述稀释因子通过将分析物体积(μL)除以样品原体积(μL)给出。

[0716] $\text{包封效率}(\%) = [C_{\text{最终}}/C_{\text{初始}}] \times 100$ ----- (2)

[0717] 其中 C_{最终}是纯化后包封在纳米颗粒悬浮液中的核酸(即 LNA 寡核苷酸)浓度, C_{初始}是形成纳米颗粒悬浮液之前的初始核酸(LNA 寡核苷酸)浓度。各种纳米颗粒组合物的实例汇总于表 5 和 6 中。

[0718] 表 5.

[0719]

样品 No.	纳米颗粒组合物	摩尔比	Oligo
1	化合物 6: DOPE: DSPC : Chol : PEG-DSPE	15:15:20:40:10	Oligo-1
2	化合物 6: DOPE: DSPC: Chol: PEG-DSPE	15:5:20:50:10	Oligo-1

[0720]

样品 No.	纳米颗粒组合物	摩尔比	Oligo
3	化合物 6: DOPE: DSPC: Chol: PEG-DSPE	25:15:20:30:10	Oligo-1
4	化合物 6: EPC: Chol: PEG-DSPE	20:47:30:3	Oligo-1
5	化合物 6: DOPE: Chol: PEG-DSPE	17:60:20:3	Oligo-1
6	化合物 6: DOPE: PEG-DSPE	20:78:2	Oligo-1
7	化合物 6: DOPE: Chol: C16mPEG-神经酰胺	17:60:20:3	Oligo-2
8	化合物 6: DOPE: Chol: PEG-DSPE: C16mPEG-神经酰胺	18:60:20:1:1	Oligo-2

[0721] 表 6.

[0722]

样品 No.	纳米颗粒组合物	摩尔比	Oligo
NP1	化合物 6: DOPE: Chol: PEG-DSPE: C16mPEG-神经酰胺	18:60:20:1:1	Oligo-2
NP2	化合物 6: DOPE: Chol: PEG-DSPE: C16mPEG-神经酰胺	18:60:20:1:1	乱序 Oligo-2 (=Oligo-3)
NP3	化合物 6: DOPE: Chol: PEG-DSPE: C16mPEG-神经酰胺	18:60:20:1:1	FAM-Oligo-2
NP4	化合物 6: DOPE: Chol: PEG-DSPE: C16mPEG-神经酰胺	18:60:20:1:1	无

[0723] 实施例 18. 纳米颗粒稳定性

[0724] 纳米颗粒稳定性定义为它们在 4°C 的 PBS 缓冲液随时间保持结构完整性的能力。纳米颗粒的胶体稳定性通过监测平均直径随时间的变化进行评价。将由表 6 中的样品 No. NP1 制备的纳米颗粒分散在 10mM PBS 缓冲液 (138mM NaCl, 2.7mM KCl, pH 7.4) 中并且在 4°C 下贮藏。在给定的时间点, 取出约 20-50 μ L 的纳米颗粒悬浮液并用纯水稀释至 2mL。纳米颗粒的尺寸通过 DLS 在 25°C 下进行测量。

[0725] 实施例 19. 体外纳米颗粒细胞吸收度

[0726] 包封在本文所述纳米颗粒中的核酸 (LNA 寡核苷酸 Oligo-2) 的细胞吸收效率在人体癌细胞例如前列腺癌细胞 (15PC3 细胞线) 中进行评价。使用实施例 16 中所述的方法制备样品 NP3 的纳米颗粒。用 FAM 将 LNA 寡核苷酸 (Oligo-2) 进行标记用于荧光显微镜法研究。

[0727] 纳米颗粒在 15PC3 细胞线中进行评价。将细胞保持在完全培养基 (DMEM, 补充有 10% FBS)。将每个孔含有 2.5×10^5 个细胞的 12 孔板在 37°C 下进行培育。用 Opti-MEM® 将所述细胞洗涤一次并且将 400mL Opti-MEM® 加入到每个孔中。然后, 用包封核酸 (FAM 改性 Oligo 2) 的样品 No. NP3 (200nm) 的纳米颗粒溶液或作为对照的没有纳米颗粒的游离核酸 (裸 FAM 改性 Oligo 2) 溶液处理细胞。将细胞在 37°C 下培育 24 小时。用 PBS 洗涤细胞 5 次, 然后每个孔用 300mL Hoechst 溶液 (2mg/mL) 着色 30 分钟, 接着洗涤用 PBS 洗涤 5 次。

在 -20℃ 下用预冷却 (-20℃) 的 70% EtOH 固定细胞 20 分钟。在荧光显微镜下检查细胞以评价包封在本文所述的纳米颗粒内的核酸的细胞吸收效率。

[0728] 实施例 20. 纳米颗粒关于人体表皮癌细胞中 mRNA 下调的体外功效

[0729] 本文所述纳米颗粒的功效在人体表皮癌细胞 (A431 细胞线) 中进行评价。A431 细胞过量表达表皮生长因子受体 (EGFR)。将细胞用包封反义 ErbB3 寡核苷酸的纳米颗粒 (样品 NP5) 进行处理。所述细胞还用包封具有打乱序列的寡核苷酸的纳米颗粒 (样品 No. NP6) 或作为对照物的空的无效对照纳米颗粒 (样品 No. NP7) 进行处理。使用实施例 17 (表 7) 中描述的方法制备所述纳米颗粒。每种纳米颗粒关于下调 ErbB3 表达的体外功效通过实施例 2 中描述的操作进行测量。

[0730] 表 7.

[0731]

样品 No.	纳米颗粒组合物	摩尔比	Oligo
NP5	化合物 6: DOPE: Chol: PEG-DSPE: C16mPEG-神经酰胺	18:60:20:1:1	Oligo-2
NP6	化合物 6: DOPE: Chol: PEG-DSPE: C16mPEG-神经酰胺	18: 60: 20:1:1	Oligo-3
NP7	化合物 6: DOPE: Chol: PEG-DSPE: C16mPEG-神经酰胺	18: 60: 20:1:1	none

[0732] 实施例 21. 纳米颗粒关于如下各种人体癌细胞中 mRNA 下调的体外功效: 胃癌、肺癌、前列腺癌、乳癌和 KB 癌

[0733] 在各种癌细胞中评价本文所述的纳米颗粒的功效, 所述癌细胞例如人体胃癌癌细胞 (N87 细胞线), 人体肺癌细胞 (A549 细胞线), 人体前列腺癌细胞 (15PC3 细胞线或 DU145 细胞线), 人体乳癌细胞 (MCF7 细胞线), 人体 KB 癌细胞 (KB 细胞线)。所述细胞用下面物质中之一进行处理: 包封反义 ErbB3 寡核苷酸 (样品 NP5) 的纳米颗粒, 包封具有打乱序列的寡核苷酸的纳米颗粒 (样品 No. NP6) 或空的无效对照纳米颗粒 (样品 No. NP7)。通过实施例 2 中描述的操作测量每种纳米颗粒关于下调 ErbB3 表达的体外功效。

[0734] 实施例 22. 纳米颗粒关于在人体前列腺癌异种移植的鼠模型的肿瘤和肝脏中 mRNA 下调的体内功效

[0735] 本文所述的纳米颗粒的体内功效在人体前列腺癌异种移植的鼠中进行评价。通过将 5×10^6 细胞 / 鼠皮下注射到右侧腹中使 15PC3 人体前列腺肿瘤位于裸鼠中。当肿瘤达到 100mm^3 的平均体积中时, 将所属鼠进行分组, 每组 5 只鼠。将每组鼠用包封反义 ErbB3 寡核苷酸的纳米颗粒 (样品 NP5) 或相应的裸寡核苷酸 (Oligo 2) 进行处理。所述纳米颗粒按 q3d x 4 以如下剂量静脉给药: 15mg/kg/ 剂 (i. v.), 5mg/kg/ 剂, 1mg/kg/ 剂, 或 0.5mg/kg/ 剂, 并持续 12 天。所述剂量是基于纳米颗粒中寡核苷酸的量。所述裸寡核苷酸按 q3d x 4 以 30mg/kg/ 剂腹腔内给药 (i. p.) 或者以 25mg/kg/ 剂或 45mg/kg/ 剂静脉给药并持续 12 天。在最终剂量后的 24 小时使所述鼠牺牲掉。从所述鼠采集血浆样品并将其贮存在 -20℃ 下。还从所述鼠采集肿瘤和肝脏样品。就肿瘤和肝脏中的 mRNA KD 对样品进行分析。

[0736] 实施例 23. 纳米颗粒关于在人体结肠癌异种移植的鼠模型中 mRNA 下调的体内功

效

[0737] 本文所述纳米颗粒的体内功效在人体结肠癌异种移植的鼠中进行评价。通过肿瘤内部注射按 q3dx4 将本文所述的纳米颗粒（样品 NP5）给药到具有人体 DLD-1 肿瘤的鼠中并持续 12 天。还将裸寡核苷酸 (Oligo 2)、乱序的裸寡核苷酸 (Oligo 3) 和含有乱序寡核苷酸的纳米颗粒（样品 NP6）给药到鼠中。从每个试验组的鼠采集肿瘤样品并且使用 qRT-PCR 就 mRNA 下调对其进行分析。

[0738] 实施例 24. 纳米颗粒关于在肝脏内具有转移的模型中 mRNA 下调的体内功效

[0739] 本文所述纳米颗粒的体内功效在人体癌异种移植的鼠中进行评价,所述人体癌异种移植的鼠具有到往肝脏的转移。在脾脏内注射 A549 癌细胞,接着切除脾体以建立转移肝脏疾病。在脾切除后两天,将每组鼠以静脉方式按 q3d x 10 以 0.5mg/kg/剂给药包封反义 ErbB3 寡核苷酸的纳米颗粒（样品 NP5）或乱序的寡核苷酸（样品 NP6）。裸反义 ErbB3 寡核苷酸 (Oligo 2) 按 q3d x 4 以 35mg/kg/剂静脉给药。观测动物的存活。

[0740] 如本文所使用的术语“包括”、“含有”和“包含”以及其替代词语形式不排除存在其它组分的可能性。无论术语“包括”、“含有”和“包含”以及其替代词语形式用于本发明各实施方案描述的内容的任何部分,应理解这种公开还教导了相应的实施方案,在这些实施方案中一个或多个所述术语限于表示“基本上由... 构成”或“由... 构成”等。

[0001]

序列表

<110> 安龙制药股份有限公司 (ENZON PHARMACEUTICALS, INC.)

<120> 用于核酸递送系统的支化阳离子脂质

<130> 213.1307-PCT

<150> 61/115,307

<151> 2008-11-17

<160> 15

<170> PatentIn Ver. 3.3

<210> 1

<211> 16

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：
合成寡核苷酸

<400> 1

ctcaatccat ggcagc

16

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 组合的 DNA/RNA 分子的描述：
合成寡核苷酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (1) (19)

<223> RNA

<400> 2

gcaugcggcc ucuguuugat t

21

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 组合的 DNA/RNA 分子的描述：
合成寡核苷酸

[0002]

<220>
<221> misc_feature
<222> (1) (19)
<223> RNA

<400> 3
ucaaacagag gccgcaugct t 21

<210> 4
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：
合成寡核苷酸

<400> 4
tctcccagcg tgcgcccat 19

<210> 5
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：
合成寡核苷酸

<400> 5
tggcaagcat cctgta 16

<210> 6
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：
合成寡核苷酸

<400> 6
tagcctgtca cttctc 16

<210> 7
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：

[0003]

合成寡核苷酸

<400> 7
tagcttgtccc attctc

16

<210> 8
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：
合成肽

<400> 8
Cys Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
1 5 10

<210> 9
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：
合成肽

<400> 9
Cys Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5 10

<210> 10
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：
合成肽

<400> 10
Cys Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Cys
1 5 10

<210> 11
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：

[0004]

合成肽

<400> 11

Arg	Arg	Arg	Gln	Arg	Arg	Lys	Lys	Arg	Gly	Tyr	Arg	Arg	Arg	Gln	Arg
1				5					10					15	

Arg	Lys	Lys	Arg	Gly	Tyr	Cys
			20			

<210> 12

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：
合成肽

<400> 12

Arg Gly Asp Cys

<210> 13

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：
合成肽

<400> 13

Arg	Gly	Asp	Phe	Cys
			5	

<210> 14

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：
合成肽

<400> 14

Ser	Asp	Gly	Arg	Gly	Gly	Gly	Arg	Arg	Arg	Gln	Arg	Arg	Lys	Lys	Arg
1				5					10					15	

Gly Tyr Cys

<210> 15

<211> 9

[0005]

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：
合成肽

<400> 15

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5

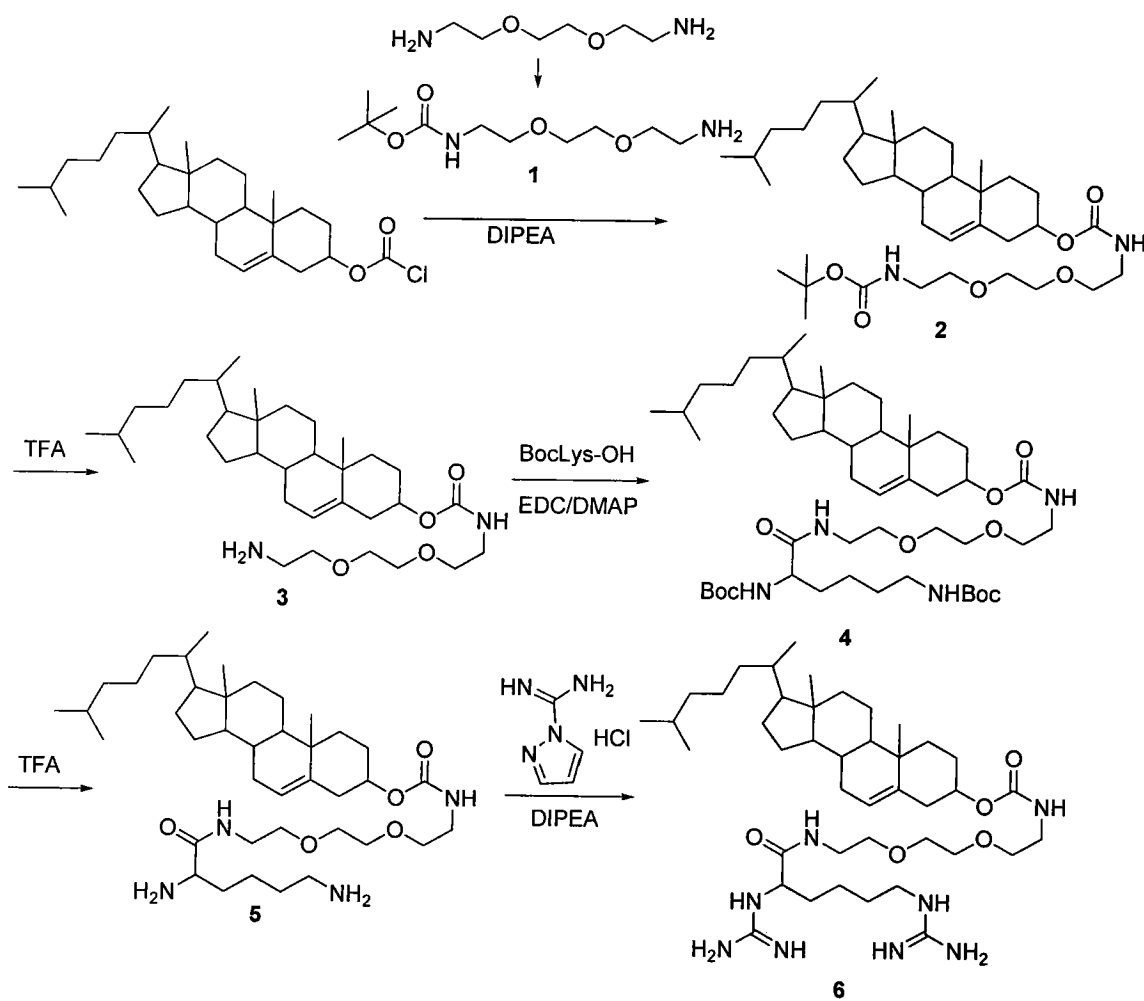


图 1

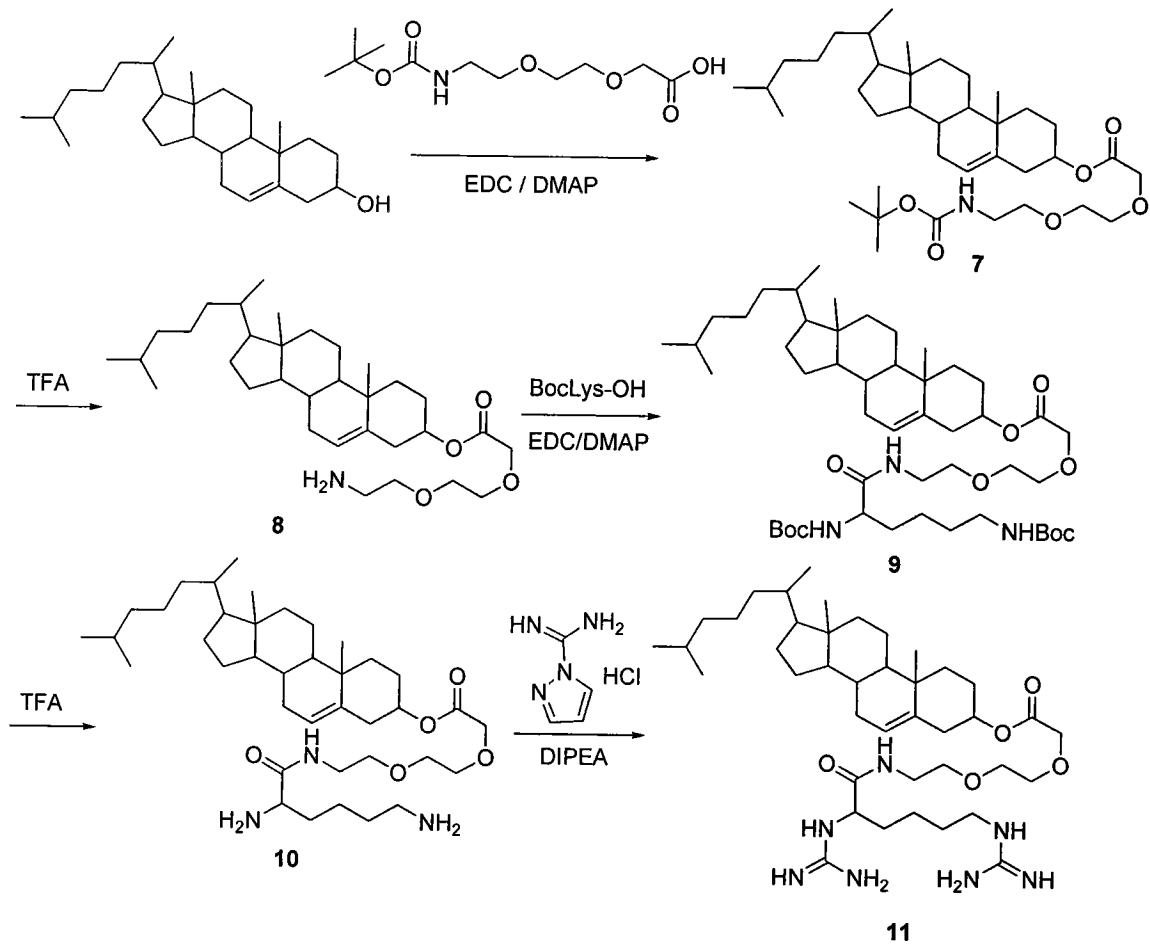


图 2

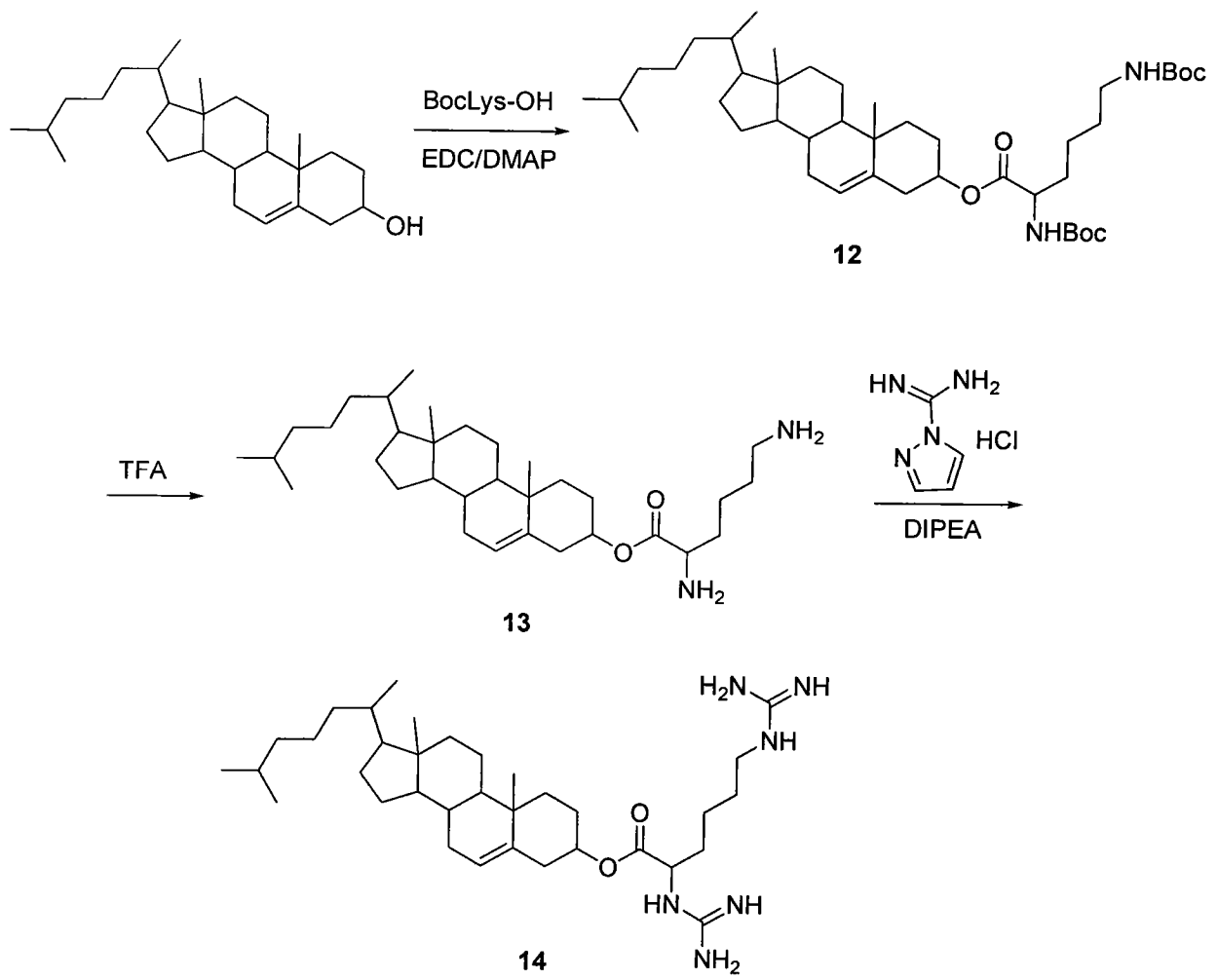


图 3