



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115916163 A

(43) 申请公布日 2023. 04. 04

(21) 申请号 202180037847.5

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所
11256

(22) 申请日 2021.03.26

专利代理师 陈文平 袁泉

(30) 优先权数据

63/000,990 2020.03.27 US

(51) Int.Cl.

A61K 9/51(2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.11.24

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2021/024413 2021.03.26

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2021/195529 EN 2021.09.30

(71) 申请人 世代生物公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 M·G·斯坦顿 B·诺尔廷

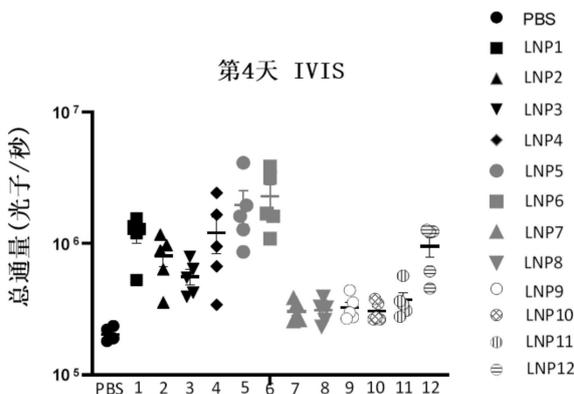
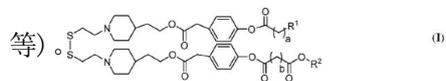
权利要求书7页 说明书77页
序列表1页 附图5页

(54) 发明名称

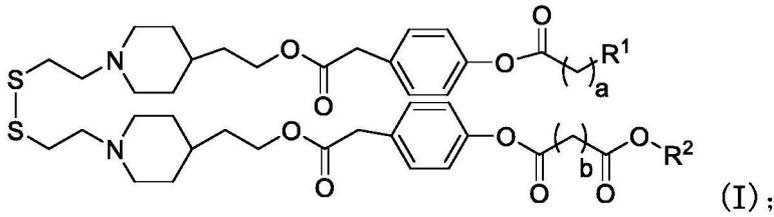
新型脂质及其纳米颗粒组合物

(57) 摘要

本文提供的脂质具有式(I)及其药学上可接受的盐,其中R¹、R²、a和b如本文所定义。本文还提供脂质纳米颗粒(LNP)组合物,其包含具有式(I)的脂质和无衣壳的非病毒载体(例如,ceDNA)。在本文任何方面或实施方式的一个方面中,这些LNP可用于将无衣壳的非病毒DNA载体递送至所关注的靶位点(例如,细胞、组织、器官



1. 一种具有式 (I) 的脂质:



或其药学上可接受的盐, 其中:

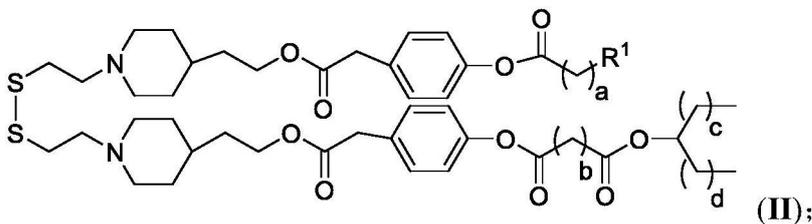
a 为 1 至 20 范围内的整数;

b 为 2 至 10 范围内的整数;

R¹ 不存在或选自 (C₂-C₂₀) 烯基、-C(O)O(C₂-C₂₀) 烷基和被 (C₂-C₂₀) 烷基取代的环丙基; 和

R² 是 (C₂-C₂₀) 烷基。

2. 根据权利要求 1 所述的脂质, 其中所述脂质具有式 (II):



或其药学上可接受的盐, 其中 c 和 d 各自独立地为 1 至 8 范围内的整数。

3. 根据权利要求 2 所述的脂质, 或其药学上可接受的盐, 其中 c 和 d 各自独立地为 2 至 8 范围内的整数。

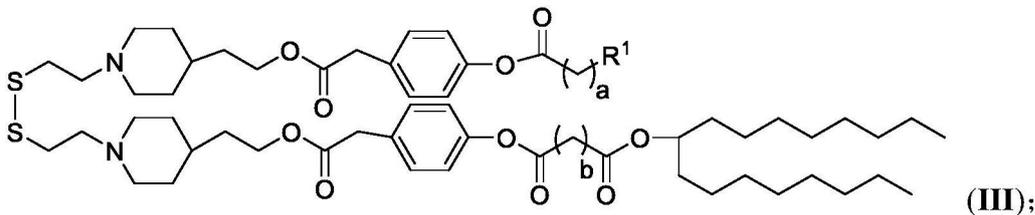
4. 根据权利要求 2 或 3 所述的脂质, 或其药学上可接受的盐, 其中 c 和 d 各自独立地为 4 至 8 范围内的整数。

5. 根据权利要求 2 至 4 中任一项所述的脂质, 或其药学上可接受的盐, 其中 c 和 d 各自独立地为 6 至 8 范围内的整数。

6. 根据权利要求 2 所述的脂质, 或其药学上可接受的盐, 其中 c 和 d 各自独立地为 1、3、5 或 7。

7. 根据权利要求 2 至 6 中任一项所述的脂质, 或其药学上可接受的盐, 其中 c 和 d 中的至少一个为 7。

8. 根据权利要求 1 至 7 中任一项所述的脂质, 其中所述化合物具有式 (III):



或其药学上可接受的盐。

9. 根据权利要求 1 至 8 中任一项所述的脂质, 或其药学上可接受的盐, 其中 b 为 3 至 9 范围内的整数。

10. 根据权利要求 1 至 9 中任一项所述的脂质, 或其药学上可接受的盐, 其中 b 为 5 至 7 范围内的整数。

11. 根据权利要求1至10中任一项所述的脂质,或其药学上可接受的盐,其中b为5或7。
12. 根据权利要求1至11中任一项所述的脂质,或其药学上可接受的盐,其中a为2至18范围内的整数。
13. 根据权利要求1至12中任一项所述的脂质,或其药学上可接受的盐,其中a为3至17范围内的整数。
14. 根据权利要求1至12中任一项所述的脂质,或其药学上可接受的盐,其中a为6至18范围内的整数。
15. 根据权利要求1至12中任一项所述的脂质,或其药学上可接受的盐,其中a为4至12范围内的整数。
16. 根据权利要求1至12中任一项所述的脂质,或其药学上可接受的盐,其中a为2至5范围内的整数。
17. 根据权利要求16所述的脂质,或其药学上可接受的盐,其中a为3。
18. 根据权利要求1至12中任一项所述的脂质,或其药学上可接受的盐,其中a为6至8范围内的整数。
19. 根据权利要求18所述的脂质,或其药学上可接受的盐,其中a为7。
20. 根据权利要求18所述的脂质,或其药学上可接受的盐,其中a为8。
21. 根据权利要求1至12中任一项所述的脂质,或其药学上可接受的盐,其中a为16至18范围内的整数。
22. 根据权利要求21所述的脂质,或其药学上可接受的盐,其中a为17。
23. 根据权利要求1至12中任一项所述的脂质,或其药学上可接受的盐,其中a为9至11范围内的整数。
24. 根据权利要求23所述的脂质,或其药学上可接受的盐,其中a为10。
25. 根据权利要求1至24中任一项所述的脂质,或其药学上可接受的盐,其中R¹不存在或选自(C₅-C₁₅)烯基、-C(O)O(C₄-C₁₈)烷基,和被(C₄-C₁₆)烷基取代的环丙基。
26. 根据权利要求1至25中任一项所述的脂质,或其药学上可接受的盐,其中R¹不存在或选自(C₅-C₁₂)烯基、-C(O)O(C₄-C₁₂)烷基,和被(C₄-C₁₂)烷基取代的环丙基。
27. 根据权利要求1至26中任一项所述的脂质,或其药学上可接受的盐,其中R¹不存在或选自(C₅-C₁₀)烯基、-C(O)O(C₄-C₁₀)烷基,和被(C₄-C₁₀)烷基取代的环丙基。
28. 根据权利要求1至27中任一项所述的脂质,或其药学上可接受的盐,其中R¹为C₁₀烯基。
29. 根据权利要求1至27中任一项所述的脂质,或其药学上可接受的盐,其中R¹的-C(O)O(C₂-C₂₀)烷基、-C(O)O(C₄-C₁₈)、-C(O)O(C₄-C₁₂)烷基或-C(O)O(C₄-C₁₀)烷基是无支链烷基。
30. 根据权利要求29所述的脂质,或其药学上可接受的盐,其中R¹是-C(O)O(C₉烷基)。
31. 根据权利要求25至27中任一项所述的脂质,或其药学上可接受的盐,其中-C(O)O(C₄-C₁₈)烷基、-C(O)O(C₄-C₁₂)烷基或-C(O)O(C₄-C₁₀)烷基是支链烷基。
32. 根据权利要求31所述的脂质,或其药学上可接受的盐,其中R¹是-C(O)O(C₁₇烷基)。
33. 根据权利要求1至24中任一项所述的脂质,或其药学上可接受的盐,其中R¹选自表1中列出的任何组。
34. 根据权利要求1所述的脂质,或其药学上可接受的盐,其中R²选自表2中所列的任何

组。

35. 根据权利要求1所述的脂质,其中所述脂质选自表3中列出的任何脂质,或其药学上可接受的盐。

36. 一种脂质纳米颗粒(LNP),其包含根据权利要求1至35中任一项所述的脂质,或其药学上可接受的盐;以及核酸。

37. 根据权利要求36所述的脂质纳米颗粒,其中所述核酸被包封在所述脂质中。

38. 根据权利要求36或37所述的脂质纳米颗粒,其中所述核酸选自由以下组成的组:小基因、质粒、小环、小干扰RNA(siRNA)、微小RNA(miRNA)、反义寡核苷酸(ASO)、核酶、ceDNA、线性共价封闭DNA、doggyboneTM、前端粒封闭端DNA或哑铃状线性DNA、切丁酶-底物dsRNA、小发夹RNA(shRNA)、不对称干扰RNA(aiRNA)、微RNA(miRNA)、mRNA、tRNA、rRNA、DNA病毒载体、病毒RNA载体、非病毒载体及它们的任意组合。

39. 根据权利要求38所述的脂质纳米颗粒,其中所述核酸是封闭端DNA(ceDNA)。

40. 根据权利要求36至39中任一项所述的脂质纳米颗粒,其进一步包含甾醇。

41. 根据权利要求40所述的脂质纳米颗粒,其中所述甾醇是胆固醇或 β -谷甾醇。

42. 根据权利要求36至41中任一项所述的脂质纳米颗粒,其进一步包括PEG-脂质缀合物。

43. 根据权利要求42所述的脂质纳米颗粒,其中所述PEG-脂质缀合物是1-(单甲氧基-聚乙二醇)-2,3-二肉豆蔻酰基甘油(PEG-DMG)。

44. 根据权利要求36至43中任一项所述的脂质纳米颗粒,其进一步包括非阳离子脂质。

45. 根据权利要求44所述的脂质纳米颗粒,其中所述非阳离子脂质选自由以下组成的组:二硬脂酰基-sn-甘油-磷酸乙醇胺、二硬脂酰基磷脂酰胆碱(DSPC)、二油酰基磷脂酰胆碱(DOPC)、二棕榈酰基磷脂酰胆碱(DPPC)、二油酰基磷脂酰甘油(DOPG)、二棕榈酰基磷脂酰甘油(DPPG)、二油酰基磷脂酰-乙醇胺(DOPE)、棕榈酰基油酰基磷脂酰胆碱(POPC)、棕榈酰基油酰基磷脂酰乙醇胺(POPE)、二油酰基-磷脂酰乙醇胺4-(N-马来酰亚胺甲基)-环己烷-1-羧酸酯(DOPE-mal)、二棕榈酰基磷脂酰乙醇胺(DPPE)、二肉豆蔻酰基磷酸乙醇胺(DMPE)、二硬脂酰基-磷脂酰-乙醇胺(DSPE)、单甲基-磷脂酰乙醇胺(例如16-0-单甲基PE)、二甲基-磷脂酰乙醇胺(例如16-0-二甲基PE)、18-1-反式PE、1-硬脂酰基-2-油酰基-磷脂酰乙醇胺(SOPE)、氢化大豆磷脂酰胆碱(HSPC)、卵磷脂酰胆碱(EPC)、二油酰基磷脂酰丝氨酸(DOPS)、鞘磷脂(SM)、二肉豆蔻酰基磷脂酰胆碱(DMPC)、二肉豆蔻酰基磷脂酰甘油(DMPG)、二硬脂酰基磷脂酰甘油(DSPG)、二芥子酰基磷脂酰胆碱(DEPC)、棕榈酰基油酰基磷脂酰甘油(POPG)、二反式油酰基-磷脂酰乙醇胺(DEPE)、1,2-二月桂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DLPE);1,2-二植烷酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DPHyPE);卵磷脂、磷脂酰乙醇胺、溶血卵磷脂、溶血磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、鞘磷脂、卵鞘磷脂(ESM)、脑磷脂、心磷脂、磷脂酸、脑苷脂、二十六烷基磷酸酯、溶血磷脂酰胆碱、二亚油酰基磷脂酰胆碱或其混合物。

46. 根据权利要求45所述的脂质纳米颗粒,其中所述非阳离子脂质选自由以下组成的组:二油酰基磷脂酰胆碱(DOPC)、二硬脂酰基磷脂酰胆碱(DSPC)和二油酰基-磷脂酰乙醇胺(DOPE)。

47. 根据权利要求46所述的脂质纳米颗粒,其中所述PEG-脂质缀合物以约1.5%至约4%的摩尔百分比存在。

48. 根据权利要求47所述的脂质纳米颗粒,其中所述PEG-脂质缀合物以约2%至约3%的摩尔百分比存在。

49. 根据权利要求48所述的脂质纳米颗粒,其中所述PEG-脂质缀合物以约2.5至约3%的摩尔百分比存在。

50. 根据权利要求49所述的脂质纳米颗粒,其中所述PEG-脂质缀合物以约3%的摩尔百分比存在。

51. 根据权利要求42至50中任一项所述的脂质纳米颗粒,其中所述PEG-脂质缀合物是DMG-PEG。

52. 根据权利要求36和51中任一项所述的脂质纳米颗粒,其中所述胆固醇或 β -谷甾醇以约20%至约40%的摩尔百分比存在,并且其中所述脂质以约80%至约60%的摩尔百分比存在。

53. 根据权利要求52所述的脂质纳米颗粒,其中所述胆固醇或 β -谷甾醇以约40%的摩尔百分比存在,并且其中所述脂质以约50%的摩尔百分比存在。

54. 根据权利要求36至39中任一项所述的脂质纳米颗粒,其进一步包括胆固醇、PEG-脂质缀合物和非阳离子脂质。

55. 根据权利要求54所述的脂质纳米颗粒,其中所述PEG-脂质缀合物以约1.5%至约4%存在。

56. 根据权利要求55所述的脂质纳米颗粒,其中所述PEG-脂质缀合物以约2%至约3%存在。

57. 根据权利要求56所述的脂质纳米颗粒,其中所述PEG-脂质缀合物以约2.5至约3%存在。

58. 根据权利要求57所述的脂质纳米颗粒,其中所述PEG-脂质缀合物以约3%存在。

59. 根据权利要求42至47中任一项所述的脂质纳米颗粒,其中所述胆固醇以约30%至约50%的摩尔百分比存在。

60. 根据权利要求54至60中任一项所述的脂质纳米颗粒,其中所述PEG-脂质缀合物是DMG-PEG2000。

61. 根据权利要求53至60中任一项所述的脂质纳米颗粒,其中所述脂质以约42.5%至约62.5%的摩尔百分比存在。

62. 根据权利要求53至60中任一项所述的脂质纳米颗粒,其中所述非阳离子脂质以约2.5%至约12.5%的摩尔百分比存在。

63. 根据权利要求53至60中任一项所述的脂质纳米颗粒,其中所述胆固醇以约40%的摩尔百分比存在,所述脂质以约52.5%的摩尔百分比存在,所述非阳离子脂质以约7.5%的摩尔百分比存在,并且其中所述PEG-脂质缀合物以约3%存在。

64. 根据权利要求36至63中任一项所述的脂质纳米颗粒,其进一步包括地塞米松棕榈酸酯。

65. 根据权利要求36至64中任一项所述的脂质纳米颗粒,其中所述纳米颗粒的直径范围为约50nm至约110nm。

66. 根据权利要求36至64中任一项所述的脂质纳米颗粒,其中所述纳米颗粒的尺寸小于约100nm。

67. 根据权利要求66所述的脂质纳米颗粒,其中所述颗粒的尺寸小于约70nm。
68. 根据权利要求67所述的脂质纳米颗粒,其中所述颗粒的尺寸小于约60nm。
69. 根据权利要求39所述的脂质纳米颗粒,其中所述颗粒的总脂质与ceDNA比率为约10:1。
70. 根据权利要求39所述的脂质纳米颗粒,其中所述颗粒的总脂质与ceDNA比率为约20:1。
71. 根据权利要求39所述的脂质纳米颗粒,其中所述颗粒的总脂质与ceDNA比率为约30:1。
72. 根据权利要求39所述的脂质纳米颗粒,其中所述颗粒的总脂质与ceDNA比率为约40:1。
73. 根据权利要求36至72中任一项所述的脂质纳米颗粒,其进一步包括组织特异性靶向部分。
74. 根据权利要求73所述的脂质纳米颗粒,其中所述组织特异性靶向部分是N-乙酰半乳糖胺(GalNAc);其中,GalNAc连接到所述PEG-脂质缀合物;以及所述GalNAc-连接的PEG-脂质缀合物以约1.5%、约1.4%、约1.3%、约1.2%、约1.1%、约1.0%、约0.9%、约0.8%、约0.7%、约0.6%、约0.5%、约0.4%、约0.3%、约0.2%或约0.1%的摩尔百分比存在于所述颗粒中。
75. 根据权利要求74所述的脂质纳米颗粒,其中所述GalNAc-连接的PEG-脂质缀合物以约0.5%的摩尔百分比存在于所述颗粒中。
76. 根据权利要求36至75中任一项所述的脂质纳米颗粒,其进一步包括约10mM至约30mM的苹果酸。
77. 根据权利要求76所述的脂质纳米颗粒,包括约20mM苹果酸。
78. 根据权利要求36至77中任一项所述的脂质纳米颗粒,其进一步包括约30mM至约50mM的NaCl。
79. 根据权利要求78所述的脂质纳米颗粒,其进一步包括约40mM的NaCl。
80. 根据权利要求36至79中任一项所述的脂质纳米颗粒,其进一步包括约20mM至约100mM的MgCl₂。
81. 根据权利要求39所述的脂质纳米颗粒,其中所述ceDNA是封闭端的线性双链体DNA。
82. 根据权利要求39所述的脂质纳米颗粒,其中所述ceDNA包括表达盒,并且其中所述表达盒包含启动子序列和转基因。
83. 根据权利要求82所述的脂质纳米颗粒,其中所述表达盒包括多聚腺苷酸化序列。
84. 根据权利要求81至83中任一项所述的脂质纳米颗粒,其中所述ceDNA包括至少一个反向末端重复序列(ITR),其侧接所述表达盒的5'或3'端。
85. 根据权利要求84所述的脂质纳米颗粒,其中所述表达盒侧接两个ITR,其中所述两个ITR包含一个5' ITR和一个3' ITR。
86. 根据权利要求84所述的脂质纳米颗粒,其中所述表达盒在3'端(3' ITR)连接至ITR。
87. 根据权利要求84所述的脂质纳米颗粒,其中所述表达盒在5'端(5' ITR)连接至ITR。
88. 根据权利要求84所述的脂质纳米颗粒,其中5' ITR和3' ITR中的至少一个是野生型AAV ITR。

89. 根据权利要求84所述的脂质纳米颗粒,其中5' ITR和3' ITR中的至少一个是经修饰的ITR。

90. 根据权利要求84所述的脂质纳米颗粒,其中所述ceDNA进一步包括在5' ITR和所述表达盒之间的间隔序列。

91. 根据权利要求84所述的脂质纳米颗粒,其中所述ceDNA进一步包括在3' ITR和所述表达盒之间的间隔序列。

92. 根据权利要求90或91所述的脂质纳米颗粒,其中所述间隔序列的长度为至少5个碱基对。

93. 根据权利要求92所述的脂质纳米颗粒,其中所述间隔序列的长度为5至100个碱基对。

94. 根据权利要求92所述的脂质纳米颗粒,其中所述间隔序列的长度为5至500个碱基对。

95. 根据权利要求38至94中任一项所述的脂质纳米颗粒,其中所述ceDNA具有茎区或间隔区。

96. 根据权利要求84所述的脂质纳米颗粒,其中所述ITR是源自AAV血清型的ITR、源自鹅病毒的ITR、源自B19病毒的ITR、源自细小病毒的野生型ITR。

97. 根据权利要求96所述的脂质纳米颗粒,其中所述AAV血清型选自由以下组成的组: AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11和AAV12。

98. 根据权利要求84所述的脂质纳米颗粒,其中所述ITR是突变体ITR,并且所述ceDNA可选地包括不同于所述第一ITR的额外ITR。

99. 根据权利要求84所述的脂质纳米颗粒,其中所述ceDNA包括在所述表达盒的5' 和3' 端的两个突变体ITR,可选地,其中所述两个突变体ITR是对称突变体。

100. 根据权利要求39所述的脂质纳米颗粒,其中所述ceDNA是CELiD、基于DNA的小环、MIDGE、辅助DNA、在表达盒的5' 和3' 端包含两个ITR发夹结构的哑铃形线性双链体封闭端DNA或doggyboneTMDNA。

101. 一种药物组合物,其包含权利要求36至100中任一项所述的脂质纳米颗粒和药学上可接受的赋形剂。

102. 一种药物组合物,其包含根据权利要求1至25中任一项所述的脂质或其药学上可接受的盐;和药学上可接受的赋形剂。

103. 一种治疗受试者基因病症的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的根据权利要求36至100中任一项所述的脂质纳米颗粒,或有效量的根据权利要求101所述的药物组合物。

104. 根据权利要求103所述的方法,其中所述受试者是人类。

105. 根据权利要求103或104所述的方法,其中,所述基因病症选自由以下组成的组: 镰状细胞性贫血,黑色素瘤,血友病A(凝血因子VIII (FVIII) 缺乏症) 和血友病B(凝血因子IX (FIX) 缺乏症),囊性纤维化(CFTR),家族性高胆固醇血症(LDL受体缺陷),肝母细胞瘤,威尔逊病,苯丙酮尿症(PKU),先天性肝卟啉症,遗传性肝代谢疾病,莱施尼汉综合征,镰状细胞性贫血,地中海贫血,色素性干皮病,范可尼贫血,色素性视网膜炎,共济失调毛细血管扩张症,布鲁姆综合征,视网膜母细胞瘤,粘多糖贮积病(例如,赫勒氏综合征(MPSI型),席耶氏

综合征 (MPSIS型), 胡-射综合征 (MPSIH-S型), 亨特综合征 (MPSII型), 圣菲利柏氏症A、B、C和D型 (MPSIIIA、B、C和D型), 莫尔奎A和B型 (MPSIVA和MPS IVB), 马-拉综合征 (MPS VI型), 史莱氏综合征 (MPS VII型), 透明质酸酶缺乏症 (MPSIX型), 尼曼-皮克病A/B、C1和C2型, 法布里病, 辛德勒 (Schindler) 病, GM2-神经节苷脂沉积症II型 (桑德霍夫病), 泰-萨病, 异染性脑白质营养不良, 克拉伯病, 粘脂沉积症I、II/III和IV型, 唾液酸贮积症I和II型, 糖原贮积病I和II型 (庞贝病), 戈谢病I、II和III型, 法布里病, 胱氨酸病, 巴顿病, 天冬氨酰氨基葡萄糖尿症, 萨拉病, 达农病 (LAMP-2缺乏症), 溶酶体酸性脂肪酶 (LAL) 缺乏症, 神经元蜡样脂褐质沉积症 (CLN1-8、INCL和LINCL), 鞘脂症, 半乳糖唾液酸中毒, 肌萎缩侧索硬化症 (ALS), 帕金森病, 阿尔茨海默病, 亨廷顿病, 脊髓小脑共济失调, 脊髓性肌萎缩症, 弗里德赖希共济失调, 杜氏肌营养不良症 (DMD), 贝克尔肌营养不良症 (BMD), 营养不良性大疱性表皮松解症 (DEB), 外核苷酸焦磷酸酶1缺乏症, 婴儿全身性动脉钙化 (GACI), 利伯先天性黑矇 (Leber Congenital Amaurosis), 塔加特黄斑变性病 (ABCA4), 鸟氨酸转氨甲酰酶 (OTC) 缺乏症, Usher综合征, α -1抗胰蛋白酶缺乏症, 进行性家族性肝内胆汁淤积症 (PFIC) I型 (ATP8B1缺乏症)、II型 (ABCB11)、III型 (ABCB4) 或IV型 (TJP2) 和组织蛋白酶A缺乏症。

106. 根据权利要求105所述的方法, 其中所述基因病症是利伯先天性黑矇 (LCA)。

107. 根据权利要求106所述的方法, 其中所述LCA是LCA10。

108. 根据权利要求105所述的方法, 其中所述基因病症是尼曼-皮克病。

109. 根据权利要求105所述的方法, 其中所述基因病症是塔加特黄斑变性病。

110. 根据权利要求105所述的方法, 其中所述基因病症是葡萄糖-6-磷酸酶 (G6Pase) 缺乏症 (糖原贮积病I型) 或庞贝病 (糖原贮积病II型)。

111. 根据权利要求105所述的方法, 其中所述基因病症是血友病A (因子VIII缺乏症)。

112. 根据权利要求105所述的方法, 其中所述基因病症是血友病B (因子IX缺乏症)。

113. 根据权利要求105所述的方法, 其中所述基因病症是亨特综合征 (粘多糖贮积症II)。

114. 根据权利要求105所述的方法, 其中所述基因病症是囊性纤维化。

115. 根据权利要求105所述的方法, 其中所述基因病症是营养不良性大疱性表皮松解症 (DEB)。

116. 根据权利要求105所述的方法, 其中所述基因病症是苯丙酮尿症 (PKU)。

117. 根据权利要求105所述的方法, 其中所述基因病症是进行性家族性肝内胆汁淤积症 (PFIC)。

118. 根据权利要求105所述的方法, 其中所述基因病症是威尔逊病。

119. 根据权利要求105所述的方法, 其中所述基因病症是戈谢病I、II或III型。

新型脂质及其纳米颗粒组合物

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求于2020年3月27日提交的美国临时申请第63/000,990号的优先权的权益,所述美国临时专利申请的内容通过引用并入本文。

[0003] 序列表

[0004] 本申请含有序列表,其已经以ASCII格式以电子形式提交并在此通过全文引用的方式并入。所述ASCII副本创建于2021年3月18日,被命名为131698_07720_SL.txt,大小为417字节。

背景技术

[0005] 基因治疗旨在改善因基因表达谱异常引起的基因病症或获得性疾病的患者的临床结果。迄今为止,已经开发出各种类型的基因治疗,它们将治疗性核酸作为治疗疾病的药物递送到患者的细胞中。

[0006] 矫正基因在患者靶细胞中的递送和表达可以通过多种方法进行,这些方法包括使用工程化病毒基因递送载体,以及潜在质粒、小基因、寡核苷酸、小环或各种封闭端DNA。在许多可用的病毒衍生载体(例如,重组逆转录病毒、重组慢病毒、重组腺病毒等)中,重组腺相关病毒(rAAV)作为基因治疗中一种多功能且相对可靠的载体而获得认可。然而,特别是在重复给药方面,病毒载体(如腺相关载体)可以是高度免疫原性的,并引发体液和细胞介导的免疫,从而影响疗效。

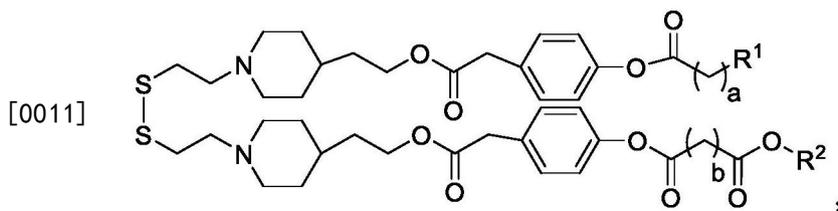
[0007] 非病毒基因递送规避了与病毒转导相关的某些缺点,特别是由于对形成载体颗粒的病毒结构蛋白的体液和细胞免疫应答以及任何从头病毒基因表达所致的缺点。在非病毒基因递送技术中,使用阳离子脂质作为载体。

[0008] 可电离脂质大致由胺部分和脂质部分组成,阳离子胺部分和聚阴离子核酸的静电相互作用以形成带正电荷的脂质或脂质膜结构。因此,促进细胞摄取,并将核酸递送到细胞中。

[0009] 一些广泛使用的可电离脂质是CLinDMA、DLinDMA(也称为DODAP)和阳离子脂质,例如DOTAP。值得注意的是,这些脂质已被用于将siRNA递送至肝脏,但在较高剂量下递送效率并非最佳并且产生肝毒性。鉴于目前阳离子脂质的缺点,该领域需要提供不仅能提高疗效和降低毒性,而且能改善药代动力学和细胞内动力学(如细胞摄取和脂质载体的核酸释放)的脂质支架。

发明内容

[0010] 在一个方面,本文提供了具有式(I)的可电离脂质:



[0012] 及其药学上可接受的盐,其中 R^1 、 R^2 、 a 和 b 如本文所定义。

[0013] 还提供了包含公开的可电离脂质或其药学上可接受的盐的药物组合物;和药学上可接受的载体。

[0014] 本公开的另一方面涉及脂质纳米颗粒(LNP)的组合物,该脂质纳米颗粒(LNP)包含本文所述的可电离脂质或其药学上可接受的盐和核酸。在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,核酸被包封在可电离脂质中。在具体实施方式中,所述核酸是封闭端DNA(ceDNA)。

[0015] 根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式,所述LNP进一步包括甾醇。根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式,甾醇可以是胆固醇或 β -谷甾醇。

[0016] 根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式,所述胆固醇以约20%至约40%,例如约20%至约35%、约20%至约30%、约20%至约25%、约25%至约35%、约25%至约30%或约30%至约35%的摩尔百分比存在,并且所述可电离脂质以约80%至约60%,例如约80%至约65%、约80%至约70%、约80%至约75%、约75%至约60%、约75%至约65%、约75%至约70%、约70%至约60%或约70%至约60%的摩尔百分比存在。根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式,所述胆固醇以约20%至约40%,例如约20%、约21%、约22%、约23%、约24%、约25%、约26%、约27%、约28%、约29%、约30%、约31%、约32%、约33%、约34%、约35%、约36%、约37%、约38%、约39%或约40%的摩尔百分比存在,并且其中所述可电离脂质以约80%至约60%,例如约80%、约79%、约78%、约77%、约76%、约75%、约74%、约73%、约72%、约71%、约70%、约69%、约68%、约67%、约66%、约65%、约64%、约63%、约62%、约61%或约60%的摩尔百分比存在。根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式,所述胆固醇以约40%的摩尔百分比存在,并且其中所述可电离脂质以约50%的摩尔百分比存在。

[0017] 根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式,所述组合物进一步包括胆固醇、PEG-脂质缀合物和非阳离子脂质。根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式,所述PEG-脂质缀合物以约1.5%至约3%,例如约1.5%至约2.75%、约1.5%至约2.5%、约1.5%至约2.25%、约1.5%至约2%、约2%至约3%、约2%至约2.75%、约2%至约2.5%、约2%至约2.25%、约2.25%至约3%、约2.25%至约2.75%或约2.25%至约2.5%存在。根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式,所述PEG-脂质缀合物以1.5%、约1.6%、约1.7%、约1.8%、约1.9%、约2%、约2.1%、约2.2%、约2.3%、约2.4%、约2.5%、约2.6%、约2.7%、约2.8%、约2.9%或约3%存在。根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式,所述胆固醇以约30%至约50%、例如约30%至约45%、约30%至约40%、约30%至约35%、约35%至约50%、约35%至约45%、约35%至约40%、约20%至约40%、约40%至约50%或约45%至约50%的摩尔百分比存在。根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式,所述胆固醇以约30%、约31%、约32%、约33%、约34%、约35%、约36%、约37%、约

38%、约39%、约40%、约41%、约42%、约43%、约44%、约45%、约46%、约47%、约48%、约49%或约50%的摩尔百分比存在。

[0018] 根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式,所述LNP进一步包括聚乙二醇(PEG)脂质。根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式,所述PEG脂质是1-(单甲氧基聚乙二醇)-2,3-二甲基甘油(PEG-DMG)。根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式,所述LNP进一步包括非阳离子脂质。根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式,所述非阳离子脂质选自由以下组成的组:二硬脂酰基-sn-甘油-磷酸乙醇胺、二硬脂酰基磷脂酰胆碱(DSPC)、二油酰基磷脂酰胆碱(DOPC)、二棕榈酰基磷脂酰胆碱(DPPC)、二油酰基磷脂酰甘油(DOPG)、二棕榈酰基磷脂酰甘油(DPPG)、二油酰基-磷脂酰乙醇胺(DOPE)、棕榈酰基油酰基磷脂酰胆碱(POPC)、棕榈酰基油酰基磷脂酰乙醇胺(POPE)、二油酰基-磷脂酰乙醇胺4-(N-马来酰亚胺甲基)-环己烷-1-羧酸酯(DOPE-mal)、二棕榈酰基磷脂酰乙醇胺(DPPE)、二肉豆蔻酰基磷脂酰乙醇胺(DMPE)、二硬脂酰基-磷脂酰-乙醇胺(DSPE)、单甲基-磷脂酰乙醇胺(例如16-0-单甲基PE)、二甲基-磷脂酰乙醇胺(例如16-0-二甲基PE)、18-1-反式PE、1-硬脂酰基-2-油酰基-磷脂酰乙醇胺(SOPE)、氢化大豆磷脂酰胆碱(HSPC)、卵磷脂酰胆碱(EPC)、二油酰基磷脂酰丝氨酸(DOPS)、鞘磷脂(SM)、二肉豆蔻酰基磷脂酰胆碱(DMPC)、二肉豆蔻酰基磷脂酰甘油(DMPG)、二硬脂酰基磷脂酰甘油(DSPG)、二芥子酰基磷脂酰胆碱(DEPC)、棕榈酰基油酰基磷脂酰甘油(POPG)、二反式油酰基-磷脂酰乙醇胺(DEPE)、1,2-二月桂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DLPE)、1,2-二植烷酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DPHyPE)、卵磷脂、磷脂酰乙醇胺、溶血卵磷脂、溶血磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、鞘磷脂、卵鞘磷脂(ESM)、脑磷脂、心磷脂、磷脂酸、脑苷脂、二十六烷基磷酸酯、溶血磷脂酰胆碱、二亚油酰基磷脂酰胆碱或它们的混合物。根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式,所述非阳离子脂质选自由以下组成的组:二油酰基磷脂酰胆碱(DOPC)、二硬脂酰基磷脂酰胆碱(DSPC)和二油酰基-磷脂酰乙醇胺(DOPE)。

[0019] 根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式,所述PEG-脂质缀合物以约1.5%至约4%、例如约1.5%至约3%、约2%至约3%、约2.5%至约3%、约1.5%至约2.75%、约1.5%至约2.5%、约1.5%至约2.25%、约1.5%至约2%、约1.5%至约1.75%、约2%至约3%、约2%至约2.75%、约2%至约2.5%、约2%至约2.25%存在。根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式,所述PEG-脂质缀合物以1.5%、约1.6%、约1.7%、约1.8%、约1.9%、约2%、约2.1%、约2.2%、约2.3%、约2.4%、约2.5%、约2.6%、约2.7%、约2.8%、约2.9%或约3%存在。根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式,所述可电离脂质以约42.5%至约62.5%的摩尔百分比存在。根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式,所述可电离脂质以约42.5%、约43%、约43.5%、约44%、约44.5%、约45%、约45.5%、约46%、约46.5%、约47%、约47.5%、约48%、约48.5%、约49%、约49.5%、约50%、约50.5%、约51%、约51.5%、约52%、约52.5%、约53%、约53.5%、约54%、约54.5%、约55%、约55.5%、约56%、约56.5%、约57%、57.5%、约58%、约58.5%、约59%、约59.5%、约60%、约60.5%、约61%、约61.5%、约62%或约62.5%的摩尔百分比存在。根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式,所述非阳离子脂质以约2.5%至约12.5%的摩尔百分比存在。根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式,所述胆固醇以约40%的摩尔百分比存在,所述可电离脂质以约52.5%的摩尔百分比存在,所述非

阳离子脂质以约7.5%的摩尔百分比存在,其中所述PEG-脂质以约3%存在。

[0020] 根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式,所述LNP组合物进一步包括地塞米松棕榈酸酯。

[0021] 根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式,所述LNP的直径尺寸范围为约50nm至约110nm,例如约50nm至约100nm、约50nm至约95nm、约50nm至约90nm、约50nm至约85nm、约50nm至约80nm、约50nm至约75nm、约50nm至约70nm、约50nm至约65nm、约50nm至约60nm、约50nm至约55nm、约60nm至约110nm、约60nm至约100nm、约60nm至约95nm、约60nm至约90nm、约60nm至约85nm、约60nm至约80nm、约60nm至约75nm、约60nm至约70nm、约60nm至约65nm、约70nm至约110nm、约70nm至约100nm、约70nm至约95nm、约70nm至约90nm、约70nm至约85nm、约70nm至约80nm、约70nm至约75nm、约80nm至约110nm、约80nm至约100nm、约80nm至约95nm、约80nm至约90nm、约80nm至约85nm、约90nm至约110nm或约90nm至约100nm。根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式,所述LNP的尺寸小于约100nm,例如小于约105nm、小于约100nm、小于约95nm、小于约90nm、小于约85nm、小于约80nm、小于约75nm、小于约70nm、小于约65nm、小于约60nm、小于约55nm、小于约50nm、小于约45nm、小于约40nm、小于约35nm、小于约30nm、小于约25nm、小于约20nm、小于约15nm,或小于约10nm。根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式,所述LNP的尺寸小于约70nm,例如小于约65nm、小于约60nm、小于约55nm、小于约50nm、小于约45nm、小于约40nm、小于约35nm、小于约30nm、小于约25nm、小于约20nm、小于约15nm,或小于约10nm。根据一些实施方式,所述LNP的尺寸小于约60nm,例如小于约55nm、小于约50nm、小于约45nm、小于约40nm、小于约35nm、小于约30nm、小于约25nm、小于约20nm、小于约15nm,或小于约10nm。

[0022] 根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式,所述LNP组合物的总脂质与核酸的比为约10:1。根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式,所述LNP组合物的总脂质与核酸的比为约20:1。根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式,所述组合物的总脂质与核酸的比为约30:1。根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式,所述组合物的总脂质与核酸的比为约40:1。根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式,所述组合物的总脂质与核酸的比为约50:1。

[0023] 根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式,所述LNP进一步包括组织靶向部分。组织靶向部分可以是肽、寡糖等,其可用于将所述LNP递送至一种或更多种特定组织,例如癌、肝脏、CNS或肌肉。根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式,所述组织靶向部分与PEG-脂质缀合物连接。根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式,所述组织靶向部分是肝脏特异性受体的配体。根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式,用于肝脏靶向的肝脏特异性受体的配体是寡糖,例如N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)。

[0024] 根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式,所述GalNAc连接的GalNAc连接的PEG-脂质缀合物以总脂质的1.5%、1.4%、1.3%、1.2%、1.1%、1.0%、0.9%、0.8%、0.7%、0.6%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%,或0.1%的摩尔百分比存在于所述脂质纳米颗粒中。根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式,GalNAc连接的PEG-脂质缀合物以0.2%的摩尔百分比存在于LNP中。根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式,GalNAc连接的PEG-脂质缀合物以0.3%的摩尔百分比存在于LNP中。根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式,GalNAc连接的PEG-脂质缀合物以0.4%的摩尔百分比存在于

LNP中。根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式, GalNAc连接的PEG-脂质缀合物以0.5%的摩尔百分比存在于LNP中。根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式, GalNAc-连接的PEG-脂质缀合物以0.6%的摩尔百分比存在于LNP中。根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式, GalNAc连接的PEG-脂质缀合物以0.7%的摩尔百分比存在于LNP中。根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式, GalNAc连接的PEG-脂质缀合物以0.8%的摩尔百分比存在于LNP中。根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式, GalNAc连接的PEG-脂质缀合物以0.9%的摩尔百分比存在于LNP中。根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式, GalNAc连接的PEG-脂质缀合物以1.0%的摩尔百分比存在于LNP中。根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式, GalNAc连接的PEG-脂质缀合物以约1.5%的摩尔百分比存在于LNP中。根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式, GalNAc连接的PEG-脂质缀合物以2.0%的摩尔百分比存在于LNP中。

[0025] 根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式, 所述LNP组合物在缓冲液(例如苹果酸)中制备。在本文的任何方面和实施方式中的一些实施方式中, 所述组合物是在约10mM至约30mM苹果酸中制备的, 例如约10mM至约25mM、约10mM至约20mM、约10mM至约15mM、约15mM至约25mM、约15mM至约20mM、约20mM至约25mM苹果酸中制备。根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式, 所述组合物在约10mM苹果酸、约11mM苹果酸、约12mM苹果酸、约13mM苹果酸、约14mM苹果酸、约15mM苹果酸、约16mM苹果酸、约17mM苹果酸、约18mM苹果酸、约19mM苹果酸、约20mM苹果酸、约21mM苹果酸、约22mM苹果酸、约23mM苹果酸、约24mM苹果酸、约25mM苹果酸、约26mM苹果酸、约27mM苹果酸、约28mM苹果酸、约29mM苹果酸或约30mM苹果酸中制备。根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式, 所述组合物包括约20mM苹果酸。

[0026] 根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式, 所述LNP组合物在具有约30mM至约50mM的NaCl, 例如约30mM至约45mM的NaCl、约30mM至约40mM的NaCl、约30mM至约35mM的NaCl、约35mM至约45mM的NaCl、约35mM至约40mM的NaCl或约40mM至约45mM的NaCl的溶液中制备。根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式, 所述LNP组合物在具有约30mM的NaCl、约35mM的NaCl、约40mM的NaCl或约45mM的NaCl的溶液中制备。根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式, 所述LNP组合物在具有约40mM的NaCl的溶液中制备。

[0027] 根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式, 所述LNP组合物在具有约20mM至约100mM的MgCl₂, 例如约20mM至约90mM的MgCl₂、约20mM至约80mM的MgCl₂、约20mM至约70mM的MgCl₂、约20mM至约60mM的MgCl₂、约20mM至约50mM的MgCl₂、约20mM至约40mM的MgCl₂、约20mM至约30mM的MgCl₂、约30mM至约90mM的MgCl₂、约30mM至约80mM的MgCl₂、约30mM至约70mM的MgCl₂、约30mM至约60mM的MgCl₂、约30mM至约50mM的MgCl₂、约30mM至约40mM的MgCl₂、约40mM至约90mM的MgCl₂、约40mM至约80mM的MgCl₂、约40mM至约70mM的MgCl₂、约40mM至约60mM的MgCl₂、约40mM至约50mM的MgCl₂、约50mM至约90mM的MgCl₂、约50mM至约80mM的MgCl₂、约50mM至约70mM的MgCl₂、约50mM至约60mM的MgCl₂、约60mM至约90mM的MgCl₂、约60mM至约80mM的MgCl₂、约60mM至约70mM的MgCl₂、约70mM至约90mM的MgCl₂、约70mM至约80mM的MgCl₂或约80mM至约90mM的MgCl₂的溶液中制备。

[0028] 根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式, 所述ceDNA是封闭端的线性双链DNA。根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式, 所述ceDNA包括表达盒, 该表

达盒包括启动子序列和转基因。

[0029] 根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式,所述ceDNA包含表达盒,该表达盒包括多聚腺苷酸化序列。

[0030] 根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式,所述ceDNA包括至少一个反向末端重复序列(ITR),其侧接所述表达盒的5'或3'端。根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式,所述表达盒侧接两个ITR,其中所述两个ITR包括一个5' ITR和一个3' ITR。根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式,所述表达盒在3'端连接至ITR(3' ITR)。根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式,所述表达盒在5'端连接至ITR(5' ITR)。根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式,5' ITR和3' ITR中的至少一个是野生型AAV ITR。根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式,5' ITR和3' ITR中的至少一个是经修饰的ITR。根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式,所述ceDNA进一步包括5' ITR与所述表达盒之间的间隔序列。

[0031] 根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式,所述ceDNA进一步包括3' ITR与所述表达盒之间的间隔序列。根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式,所述间隔序列的长度为至少5个碱基对。根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式,所述间隔序列的长度为5至100个碱基对。根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式,所述间隔序列的长度是5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95或100个碱基对。根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式,所述间隔序列的长度为5至500个碱基对。根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式,所述间隔序列的长度是5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、205、210、215、220、225、230、235、240、245、250、255、260、265、270、275、280、285、290、295、300、305、310、315、320、325、330、335、340、345、350、355、360、365、370、375、380、385、390、395、400、405、410、415、420、425、430、435、440、445、450、455、460、465、470、475、480、485、490或495个碱基对。

[0032] 根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式,所述ceDNA具有茎区或间隔区。

[0033] 根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式,所述ITR是源自AAV血清型的ITR、源自鹅病毒的ITR、源自B19病毒ITR、源自细小病毒的野生型ITR。根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式,所述AAV血清型选自由以下组成的组:AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11和AAV12。

[0034] 根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式,所述ITR是突变体ITR,并且所述ceDNA可选地包括不同于第一ITR的额外ITR。根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式,所述ceDNA在表达盒的5'和3'端包括两个突变体ITR,可选地,其中所述两个突变ITR是对称突变体。根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式,所述ceDNA是CELiD、基于DNA的小环、MIDGE、辅助DNA、哑铃形线性双链体封闭端DNA(在所述表达盒的5'和3'端包含两个ITR发夹结构)或doggyboneTMDNA。根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式,所述药物组合物进一步包括药学上可接受的赋形剂。

[0035] 根据一些方面,本公开提供了治疗受试者基因病症的方法,该方法包括向受试者

施用有效量的根据本文任何方面或实施方式所述的药物组合物。根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式,主体是人。根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式,所述基因病症选自由以下组成的组:镰状细胞性贫血,黑色素瘤,血友病A(凝血因子VIII(FVIII)缺乏症)和血友病B(凝血因子IX(FIX)缺乏症),囊性纤维化(CFTR),家族性高胆固醇血症(LDL受体缺陷),肝母细胞瘤,威尔逊病,苯丙酮尿症(PKU),先天性肝卟啉症,遗传性肝代谢疾病,莱施尼汉综合征,镰状细胞性贫血,地中海贫血,色素性干皮病,范可尼贫血,色素性视网膜炎,共济失调毛细血管扩张症,布鲁姆综合征,视网膜母细胞瘤,粘多糖贮积病(例如,赫勒氏综合征(MPS I型),席耶氏综合征(MPS I S型),胡-射综合征(MPS I H-S型),亨特综合征(MPS II型),圣菲利柏氏症A、B、C和D型(MPS III A、B、C和D型),莫尔奎A和B型(MPS IVA和MPS IVB),马-拉综合征(MPS VI型),史莱氏综合征(MPS VII型),透明质酸酶缺乏症(MPS IX型),尼曼-皮克病A/B、C1和C2型,法布里病,辛德勒(Schindler)病,GM2-神经节苷脂沉积症II型(桑德霍夫病),泰-萨病,异染性脑白质营养不良,克拉伯病,粘脂沉积症I、II/III和IV型,唾液酸贮积症I和II型,糖原贮积病I和II型(庞贝病),戈谢病I、II和III型,法布里病,胱氨酸病,巴顿病,天冬氨酰氨基葡萄糖尿症,萨拉病,达农病(LAMP-2缺乏症),溶酶体酸性脂肪酶(LAL)缺乏症,神经元蜡样脂褐质沉积症(CLN1-8、INCL和LINCL),鞘脂症,半乳糖唾液酸中毒,肌萎缩侧索硬化症(ALS),帕金森病,阿尔茨海默病,亨廷顿病,脊髓小脑共济失调,脊髓性肌萎缩症,弗里德赖希共济失调,杜氏肌营养不良症(DMD),贝克尔肌营养不良症(BMD),营养不良性大疱性表皮松解症(DEB),外核苷酸焦磷酸酶1缺乏症,婴儿全身性动脉钙化(GACI),利伯先天性黑矇(Leber Congenital Amaurosis),塔加特黄斑变性病(ABCA4),鸟氨酸转氨甲酰酶(OTC)缺乏症,Usher综合征, α -1抗胰蛋白酶缺乏症,进行性家族性肝内胆汁淤积症(PFIC) I型(ATP8B1缺乏症)、II型(ABCB11)、III型(ABCB4)或IV型(TJP2)和组织蛋白酶A缺乏症。根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式,基因病症是莱伯先天性黑蒙症(LCA)。根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式,所述LCA为LCA10。根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式,基因病症是尼曼-皮克病。根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式,基因病症是斯塔加特黄斑变性病。根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式,基因病症是葡萄糖-6-磷酸酶(G6Pase)缺乏症(糖原贮积病I型)或庞贝病(糖原贮积病II型)。根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式,基因病症是血友病A(因子VIII缺乏症)。根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式,基因病症是血友病B(因子IX缺乏症)。根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式,基因病症是亨特综合征(粘多糖贮积症II)。根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式,基因病症是囊肿性纤维化。根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式,基因病症是营养不良性大疱性表皮松解症(DEB)。根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式,基因病症是苯丙酮尿症(PKU)。根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式,基因病症是进行性家族性肝内胆汁淤积症(PFIC)。根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式,基因病症是威尔逊病。根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式,基因病症是戈谢病I、II或III型。根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式,基因病症是年龄相关性黄斑变性。根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式,基因病症是鸟氨酸转氨甲酰基转移酶缺乏症。根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式,基因病症是视网膜色素变性(RP1)。根据

本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式,基因病症是厄舍氏综合征。根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式,基因病症是溶酶体酸性脂肪酶(LAL)缺乏症。

附图说明

[0036] 通过参考在附图中描绘的本公开的说明性实施方式,可以理解上文简要概述并且在下文更详细论述的本公开的实施方式。但是,附图仅示出了本公开的典型实施方式,因此不应视为对范围的限制,因为本公开可以允许其它等效的实施方式。

[0037] 图1显示了与研究A中观察到的SS-OP(例如,LNP1、2和7-12)相比,通过使用所公开的脂质纳米颗粒(例如,包含脂质1的LNP5和包含脂质3的LNP6)实现的ceDNA-luc表达的改善。

[0038] 图2显示了如在研究B中观察到的与SS-OP(即,LNP13)相比,通过使用所公开的脂质纳米颗粒(例如,包含脂质2的LNP16、包含脂质1的LNP17和包含脂质3的LNP18)实现的ceDNA-luc表达的改善。

[0039] 图3显示了对增加剂量水平的反应性的改善,即与SS-OP(即LNP19)相比,通过使用所公开的脂质纳米颗粒(例如,包含脂质1的LNP20),实现了给小鼠施用增加的剂量导致ceDNA-luc表达的更大增加,如在研究C中观察到的。

[0040] 图4A显示了与SS-OP(即,LNP23)相比,通过使用所公开的脂质纳米颗粒(例如,包含脂质6的LNP24、包含脂质7的LNP25和包含脂质8的LNP26)实现的ceDNA-luc表达的改善,如在研究D中观察到。图4B显示了与用作对照的可电离脂质A(即,LNP22)相比,通过使用所公开的脂质纳米颗粒(例如,包含脂质6的LNP24、包含脂质7的LNP25和包含脂质8的LNP26)对小鼠耐受性的改善(通过体重变化测量)。

[0041] 图5A显示与SS-OP(即,LNP27)相比,通过使用所公开的脂质纳米颗粒(例如,包含脂质9的LNP28和包含脂质10的LNP29)实现的ceDNA-luc表达的改善。图5B显示了如图5A中描绘的ceDNA-luc表达的改善不会损害所公开的脂质纳米颗粒在小鼠中的耐受性。

具体实施方式

[0042] 本公开提供了一种用于递送治疗性核酸(TNA)的基于脂质的平台,例如病毒载体或非病毒载体(例如,封闭端DNA),其可以从细胞的细胞质移动到核中,并保持高水平的表达。例如,与基于病毒载体的基因治疗相关的免疫原性限制了由于预先存在的背景免疫而可以治疗的患者数量,并且阻止了对患者重新给药以滴定到每个患者的有效水平,或长期维持效果。此外,由于触发级联免疫应答的先天DNA或RNA传感机制,其他核酸模式极大地受到免疫原性的影响。由于缺乏预先存在的免疫性,目前所述的TNA脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)能够根据需要额外添加TNA,例如mRNA、siRNA或ceDNA,并进一步扩大患者的可及性,包括在组织生长时可能需要后续剂量的儿科群体。此外,本公开发现了TNA脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒),具体包含一个或更多个叔氨基和二硫键的脂质组合物,更有效地递送TNA(例如,ceDNA),耐受性更好并且安全性得以改善。因为目前所述的TNA脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)没有病毒衣壳内空间所施加的封装限制,理论上,TNA脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)的唯一尺寸限制在于宿主细胞的表达(例如,DNA复制或RNA翻译)效率。

[0043] 特别是在罕见疾病中,治疗学发展的最大障碍之一是大量的个别病状。地球上约

有3.5亿人患有罕见病症,根据美国国立卫生研究院(National Institutes of Health)的定义为诊断患有疾病或病状的人数不到200,000人。这些罕见病症中约有80%是基因起源的,其中约95%没有经过由FDA批准的治疗(rarediseases.info.nih.gov/diseases/pages/31/faqs-about-rare-diseases)。本文所述的TNA脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)的优点之一在于提供了一种可以快速适应多种疾病(可用特定的TNA方式治疗),特别是罕见的单基因疾病的方法,可以有意义地改变许多基因病症或疾病的治疗现状。

[0044] I. 定义

[0045] 术语“烷基”是指一价饱和的直链(即无支链)或支链烃基。示例性烷基团包括但不限于乙基、丙基、异丙基、2-甲基-1-丁基、3-甲基-2-丁基、2-甲基-1-戊基、3-甲基-1-戊基、4-甲基-1-戊基、2-甲基-2-戊基、3-甲基-2-戊基、4-甲基-2-戊基、2,2-二甲基-1-丁基、3,3-二甲基-1-丁基、2-乙基-1-丁基、丁基、异丁基、叔丁基、戊基、异戊基、新戊基、己基、庚基、辛基、壬基、癸基、十一烷基、十二烷基、十三烷基、十四烷基、十五烷基、十六烷基、十七烷基、十八烷基、十九烷基、二十烷基等。

[0046] 术语“烯基”是指具有一个或更多个(例如,一个或两个)碳-碳双键的直链或支链脂族烃基,其中烯基包括具有“顺式”和“反式”取向的基团,或者通过替代命名法“E”和“Z”取向。

[0047] 如本文所用,术语“药学上可接受的盐”是指本发明的可电离脂质的药学上可接受的有机盐或无机盐。示例性的盐包括但不限于硫酸盐、柠檬酸盐、醋酸盐、草酸盐、氯化物、溴化物、碘化物、硝酸盐、硫酸氢盐、磷酸盐、酸性磷酸盐、异烟酸盐、乳酸盐、水杨酸盐、酸性柠檬酸盐、酒石酸盐、油酸盐、鞣酸盐、泛酸盐、酒石酸氢盐、抗坏血酸盐、琥珀酸盐、马来酸盐、龙胆酸盐、富马酸盐、葡萄糖酸盐、葡糖醛酸盐、蔗糖酸盐、甲酸盐、苯甲酸盐、谷氨酸盐、甲基磺酸盐“甲磺酸盐”、乙基磺酸盐、苯基磺酸盐、对甲苯磺酸盐、双羟萘酸盐(即1,1'-亚甲基-双-(2-羟基-3-萘甲酸盐))盐、碱金属(例如钠和钾)盐、碱土金属(例如,镁)盐和铵盐。药学上可接受的盐可涉及包含另一种分子,例如醋酸根离子、琥珀酸根离子或其他抗衡离子。所述抗衡离子可以是稳定母体化合物电荷的任何有机部分或无机部分。此外,药学上可接受的盐在其结构中可以有多个的带电原子。多个带电原子是药学上可接受的盐一部分的情况可以有多个抗衡离子。因此,药学上可接受的盐可以具有一个或更多个带电原子和/或一个或更多个抗衡离子。

[0048] 如在本说明书和所附权利要求中使用的,术语“约”在指代诸如量、持续时间等的可测量值时,意在包括偏离指定值 $\pm 20\%$ 或 $\pm 10\%$,更优选 $\pm 5\%$,甚至更优选 $\pm 1\%$,甚至更优选 $\pm 0.5\%$ 和更加优选 $\pm 0.1\%$ 的偏差,因为此类偏差适合于执行所公开的方法。

[0049] 如本文所用,“包含(comprise)”、“包含(comprising)”和“包含(comprises)”和“由……组成(comprised of)”意在与“包括(include)”、“包括(including)”、“包括(includes)”或“含有(contain)”、“含有(containing)”、“含有(contains)”同义,并且是包含性或开放式术语,其指定以下内容的存在,例如组分,并且不排除或排除本领域已知或其中公开的附加的、未列举的组分、特征、元件、成员、步骤的存在。

[0050] 术语“由……组成”是指如本文所述的组合物、方法、过程和其相应组分,其排除在实施方式的描述中未叙述的任何元件。

[0051] 如本文所用,术语“基本上由……组成”是指给定实施方式所需要的那些元件。该

术语允许存在不实质上影响本发明的那个实施方式的基本和新颖或功能特征的额外元件。

[0052] 如本文所用,术语“施用(administration/administering)”和其变体是指将组合物或药剂(例如,核酸,尤其ceDNA)引入受试者中并且包括同时和依序引入一种或更多种组合物或药剂。“施用”可以指例如,治疗、药物动力学、诊断、研究、安慰剂以及实验方法。“施用”还涵盖体外和离体治疗。将组合物或药剂引入受试者中是通过任何适合的途径,包括经口、经肺、经鼻、肠胃外(静脉内、肌肉内、腹膜内或皮下)、经直肠、淋巴内、瘤内或局部。施用包含自我施用和由另一个人施用。可以通过任何适合的途径进行施用。适合的施用途径使得组合物或药剂执行其预期功能。例如,如果合适的途径是静脉内,则通过将组合物或药剂引入受试者的静脉中来施用组合物。在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,“施用”是指治疗性施用。

[0053] 如本文所用,短语“抗治疗性核酸免疫应答”、“抗转移载体免疫应答”、“针对治疗性核酸的免疫应答”、“针对转移载体的免疫应答”等意指针对治疗性核酸、病毒或非病毒来源的任何不期望的免疫应答。在本文的任何方面和实施方式中的一些实施方式中,不期望的免疫应答是针对病毒转移载体本身的抗原特异性免疫应答。在本文的任何方面和实施方式中的一些实施方式中,免疫应答对可以是双链DNA、单链RNA或双链RNA的转移载体是特异性的。在其它实施方式中,免疫应答对转移载体的序列是特异性的。在其它实施方式中,免疫应答对转移载体的CpG含量是特异性的。

[0054] 如本文所用,术语“载体”和“赋形剂”旨在包括任何和所有溶剂、分散介质、媒介物、涂层、稀释剂、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂、缓冲剂、载体溶液、悬液、胶体等。此类介质和药剂用于药学上活性物质的用途是所属领域熟知的。补充性活性成分也可以并入组合物中。短语“药学上可接受的”是指当施用于宿主时不会产生毒性、过敏性或类似的不良反应的分子实体和组合物。

[0055] 如本文所用,术语“ceDNA”意指用于非病毒基因转移、合成或其它形式的无衣壳封闭端的线性双链(ds)双链体DNA。ceDNA的详细描述描述于2017年3月3日提交的PCT/US2017/020828的国际申请中,所述申请的全部内容以引用的方式明确地并入本文中。使用基于细胞的方法产生包括各种反向末端重复(ITR)序列和构型的ceDNA的某些方法描述于2018年9月7日提交的国际申请PCT/US18/49996和2018年12月6日提交的PCT/US2018/064242的实施例1中,所述申请中的每一个以全文引用的方式并入本文中。用于产生包括各种ITR序列和构型的合成ceDNA载体的某些方法描述例如,于2019年1月18日提交的国际申请PCT/US2019/14122中,所述国际申请的全部内容以引用的方式并入本文中。如本文所用,术语“ceDNA载体”和“ceDNA”可互换地使用。根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式,所述ceDNA是封闭端的线性双链(CELiD) CELiD DNA。根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式,所述ceDNA是一个基于DNA的小环。根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式,所述ceDNA是一种最低免疫学定义的基因表达(MIDGE)载体。根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式,所述ceDNA是一种辅助DNA。根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式,所述ceDNA为哑铃形线性双链体封闭端DNA,在表达盒的5'和3'端包含两个发夹结构的ITR。根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式,所述ceDNA是一种狗骨头TMDNA。

[0056] 如本文所用,术语“ceDNA-杆粒”意指一种包括作为分子间双链体的ceDNA基因组

的感染性杆状病毒基因组,其能够作为质粒在大肠杆菌中增殖,因此可以作为杆状病毒的穿梭载体操作。

[0057] 如本文所用,术语“ceDNA-杆状病毒”意指一种在杆状病毒基因组内包括作为分子间双链体的ceDNA基因组的杆状病毒。

[0058] 如本文所用,术语“ceDNA-杆状病毒感染的昆虫细胞”和“ceDNA-BIIC”可互换使用,意指被ceDNA-杆状病毒感染的无脊椎动物宿主细胞(包括但不限于昆虫细胞(例如,Sf9细胞))。

[0059] 如本文所用,术语“ceDNA基因组”意指进一步并入了至少一个反向末端重复区域的表达盒。ceDNA基因组可以进一步包括一个或更多个间隔区。在本文的任何方面和实施方式中的一些实施方式中,所述ceDNA基因组作为DNA的分子间双链体多核苷酸并入质粒或病毒基因组中。

[0060] 如本文所用,术语“DNA调控序列”、“控制元件”和“调控元件”在本文可互换使用,并且意指提供和/或调节非编码序列(例如,靶向DNA的RNA)或编码序列(例如定点修饰多肽或Cas9/Csn1多肽)的转录和/或调节所编码多肽的翻译的转录和翻译控制序列,诸如启动子、增强子、多聚腺苷酸化信号、终止子、蛋白质降解信号等。

[0061] 如本文所用,术语“外源”意指存在于除其原生来源以外的细胞中的物质。当在本文中使用时,术语“外源”可以指已经通过涉及人手的过程被引入如细胞或生物体的生物系统中的核酸(例如,编码多肽的核酸)或多肽,通常在所述细胞或生物体中未发现所述核酸或多肽,并且希望将核酸或多肽引入此类细胞或生物体中。可替代地,“外源”可以指已经通过涉及人手的过程被引入如细胞或生物体的生物系统中的核酸或多肽,在所述细胞或生物体中发现核酸或多肽的量相对较低,并且希望增加细胞或生物体中核酸或多肽的量,例如以产生异位表达或水平。相比之下,如本文所用,术语“内源”是指对生物系统或细胞天然物质。

[0062] 如本文所用,术语“表达”意指涉及产生RNA和蛋白质以及适当时分泌蛋白质的细胞过程,在适用时包括但不限于例如转录、转录物加工、翻译和蛋白质折叠、修饰和加工。如本文所用,短语“表达产物”包括从基因(例如,转基因)转录的RNA和通过翻译从基因转录的mRNA所获得的多肽。

[0063] 如本文所用,术语“表达载体”意指指导RNA或多肽从与载体上的转录调控序列连接的序列的表达的载体。表达的序列通常但不一定与宿主细胞异源。表达载体可以包含其它元件,例如,表达载体可以具有两个复制系统,从而使其可以在两种生物体中维持,例如在人类细胞中进行表达,以及在原核宿主中进行克隆和扩增。表达载体可以是重组载体。

[0064] 如本文所用,术语“表达盒”和“表达单元”可互换使用,意指与启动子或足以指导DNA载体(例如合成AAV载体)的转基因转录的其他DNA调控序列可操作连接的异源DNA序列。合适的启动子包括例如组织特异性启动子。启动子也可以是AAV起源的。

[0065] 如本文所用,术语“侧接”是指一个核酸序列相对于另一核酸序列的相对位置。通常,在序列ABC中,B侧接A和C。对于A×B×C排列,情况也是如此。因此,侧接序列在所侧接的序列之前或之后,但不必与所侧接的序列相邻或紧邻。在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,术语侧接是指在线性单链合成AAV载体的每个末端处的末端重复序列。

[0066] 如本文所用,术语“基因”广泛用于指与给定RNA或蛋白质在体外或体内的表达相

关的任何核酸片段。因此,基因包括编码所表达的RNA的区域(其通常包括多肽编码序列)和通常其表达所需的调控序列。基因可以从多种来源获得,包括从所关注的来源克隆或从已知或预测的序列信息合成,并且可以包括设计成具有所需参数的序列。

[0067] 如本文所用,短语“基因疾病”或“基因病症”是指部分或完全、直接或间接地由基因组中的一种或更多种异常引起的疾病,包括并且尤其是从出生起出现的病状。异常可以是基因中的突变、插入或缺失。异常可能影响基因的编码序列或其调控序列。

[0068] 如本文所用,术语“异源”意指分别在天然核酸或蛋白质中未发现的核苷酸或多肽序列。异源核酸序列可以与天然存在的核酸序列(或其变体)连接(例如通过基因工程)以产生编码嵌合多肽的嵌合核苷酸序列。异源核酸序列可以连接到变异多肽(例如通过基因工程)以产生编码融合变异多肽的核苷酸序列。

[0069] 如本文所用,术语“宿主细胞”是指易于被本公开的核酸治疗剂转化、转染、转导等的任何细胞类型。作为非限制性实例,宿主细胞可以是分离的原代细胞、多能干细胞、CD34⁺细胞、诱导的多能干细胞或许多永生化细胞系(例如,HepG2细胞)中的任一种。可替代地,宿主细胞可以是组织、器官或生物体中的原位或体内细胞。此外,宿主细胞可以是例如哺乳动物受试者(例如,需要基因治疗的人类患者)的目标细胞。

[0070] 如本文所用,“诱导型启动子”意指特征在于,当存在诱导物或诱导剂或受其影响或被其接触时,启动或增强转录活性的启动子。如本文所用的“诱导物”或“诱导剂”可以是内源性的,或是以能够从诱导型启动子诱导转录活性的方式施用的通常外源的化合物或蛋白质。在本文的任何方面和实施方式中的一些实施方式中,诱导物或诱导剂,即化学物质、化合物或蛋白质,本身可以是核酸序列转录或表达的结果(即,诱导物可以由另一组分或模块表达的诱导蛋白),转录或表达本身可以在诱导型启动子的控制下。在本文的任何方面和实施方式中的一些实施方式中,诱导型启动子是在不存在某些药剂,如阻遏子的情况下被诱导的。诱导型启动子的实施例包含(但不限于):四环素、金属硫蛋白、蜕皮激素、哺乳动物病毒(例如,腺病毒晚期启动子;以及小鼠乳腺肿瘤病毒长末端重复序列(MMTV-LTR))和其它类固醇应答启动子、雷帕霉应答启动子等。

[0071] 如本文所用,术语“体外”意指不需要存在具有完整膜的细胞(例如细胞提取物)的测定和方法,并且可以指在非细胞系统(例如不包含细胞的介质)或细胞系统(例如细胞提取物)中引入可编程的合成生物回路。

[0072] 如本文所用,术语“体内”意指在生物体(例如多细胞动物)中或内部进行的测定或过程。在本文描述的一些方面中,当使用单细胞生物例如细菌时,可以说方法或用途是在“体内”发生的。术语“离体”是指使用具有完整膜的活细胞进行的方法和用途,所述活细胞在多细胞动物或植物体之外,例如外植体、培养细胞,包含原代细胞和细胞系、转化的细胞系,以及提取的组织或细胞,包含血细胞,等等。

[0073] 如本文所用,术语“脂质”意指一组有机化合物,包括但不限于脂肪酸的酯,并且其特征不在于不溶于水,但是可溶于许多有机溶剂中。它们通常分为至少三类:(1)“简单脂质”,包括脂肪和油以及蜡;(2)“化合物脂质”,包括磷脂和糖脂;以及(3)“衍生脂质”,诸如类固醇。

[0074] 磷脂的代表性实例包括但不限于磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、磷脂酸、棕榈酰基油酰基磷脂酰胆碱、溶血磷脂酰胆碱、溶血磷脂酰乙醇胺、二棕榈

酰基磷脂酰胆碱、二油酰基磷脂酰胆碱、二硬脂酰基磷脂酰胆碱和二亚油酰基磷脂酰胆碱。缺少磷的其他化合物,诸如鞘脂、鞘糖脂家族、二酰基甘油和 β -酰氧基酸,也在被称为两亲性脂质的组内。此外,上述两亲性脂质可与其他脂质(包括甘油三酸酯和甾醇)混合。

[0075] 在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,脂质组合物包含一个或更多个叔氨基、一个或更多个苯基酯键和二硫键。

[0076] 如本文所用,术语“脂质缀合物”意指抑制脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)聚集的缀合脂质。此类脂质缀合物包括但不限于PEG-脂质缀合物,例如,偶联至二烷氧基丙基的PEG(例如,PEG-DAA缀合物)、偶联至二酰基甘油的PEG(例如,PEG-DAG缀合物)、偶联至胆固醇的PEG、与磷脂酰乙醇胺偶联的PEG和与神经酰胺缀合的PEG(参见例如,美国专利号5,885,613)、可电离的PEG脂质、聚噁唑啉(POZ)-脂质缀合物(例如,POZ-DAA缀合物;参见例如,2010年1月13日提交的美国临时申请号61/294,828和2010年1月14日提交的美国临时申请号61/295,140)、聚酰胺寡聚物(例如,ATTA-脂质缀合物)及其混合物。POZ-脂质缀合物的其他实施例在PCT公开号WO 2010/006282中有描述。PEG或POZ可以直接与脂质缀合,或者可以经由接头部分与脂质连接。可以使用适合将PEG或POZ与脂质偶联的任何接头部分,例如,包括不含酯的接头部分和含酯的接头部分。在某些优选的实施方式中,使用不含酯的接头部分,诸如酰胺或氨基甲酸酯。出于所有目的,将每个上述专利文件的公开内容以全文引用的方式并入本文。本文所述的脂质缀合物(例如,PEG脂质或PEG化脂质)可以进一步共价连接到本领域已知的有用的组织靶向部分(例如,N-乙酰半乳糖胺(GalNAc;单、二、三或四触角GalNAc)。

[0077] 如本文所用,术语“脂质包封的”是指通过完全包封、部分包封或两者提供活性剂或治疗剂(例如核酸(例如,ASO、mRNA、siRNA、ceDNA、病毒载体))的脂质颗粒。在优选的实施方式中,核酸被完全包封在脂质颗粒中(例如,以形成含有核酸的脂质颗粒)。

[0078] 如本文所用,术语“脂质颗粒”或“脂质纳米颗粒”意指可用于将治疗剂如核酸治疗剂(TNA)递送至所关注的靶位点(例如,细胞、组织、器官等)的脂质制剂(称为“TNA脂质颗粒”、“TNA脂质纳米颗粒”或“TNA LNP”)。在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,本发明的脂质颗粒是含有治疗性核酸的脂质颗粒,其通常由可电离脂质、非阳离子脂质和可选地防止颗粒聚集的缀合脂质形成。在其他优选的实施方式中,可以将治疗剂诸如治疗性核酸包封于颗粒的脂质部分中,从而保护其免于酶促降解。在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,脂质颗粒包括核酸(例如,ceDNA)和脂质,该脂质包含一个或更多个叔氨基、一个或更多个苯基酯键和二硫键。

[0079] 本发明脂质颗粒的平均直径通常为约20nm至约120nm、约30nm至约150nm、约40nm至约150nm、约50nm至约150nm、约60nm至约130nm、约70nm至约110nm、约70nm至约100nm、约80nm至约100nm、约90nm至约100nm、约70至约90nm、约80nm至约90nm、约70nm至约80nm或约30nm、约35nm、约40nm、约45nm、约50nm、约55nm、约60nm、约65nm、约70nm、约75nm、约80nm、约85nm、约90nm、约95nm、约100nm、约105nm、约110nm、约115nm、约120nm、约125nm、约130nm、约135nm、约140nm、约145nm或约150nm。

[0080] 如本文所用,术语“疏水性脂质”是指具有非极性基团的化合物,所述非极性基团包括但不限于长链饱和和不饱和脂族烃基、以及可选地被一个或更多个芳族、环脂族或杂环基团取代的此类基团。合适的实例包括但不限于二酰基甘油、二烷基甘油、N-N-二烷基氨

基、1,2-二酰氧基-3-氨基丙烷和1,2-二烷基-3-氨基丙烷。

[0081] 如本文所用,术语“可电离脂质”意指具有至少一个可质子化或可去质子化基团的脂质,例如阳离子脂质,使得该脂质在等于或低于生理pH(例如,pH7.4)的pH下带正电荷,并且在第二pH(优选等于生理pH或高于生理pH)为中性。本领域普通技术人员将理解,根据pH值添加或去除质子是一种平衡过程,并且提到带电脂质或中性脂质是指主要物质的性质,并不要求所有脂质都以带电或中性形式存在。通常,可电离脂质的可质子化基团的pKa在约4至约7的范围内。在本文的任何方面和实施方式中的一些实施方式中,可电离脂质可包括“可切割脂质”或“SS-可裂解脂质”。因此,本文所用的术语“可电离脂质”包括本发明脂质的电离(或带电)形式和中性形式。

[0082] 如本文所用,术语“中性脂质”意指在所选pH下以不带电或中性两性离子形式存在的多种脂质种类中的任一种。在生理pH下,此类脂质包括例如二酰基磷脂酰胆碱、二酰基磷脂酰乙醇胺、神经酰胺、鞘磷脂、脑磷脂、胆固醇、脑苷脂和二酰基甘油。

[0083] 如本文所用,术语“阴离子脂质”是指在生理pH下带负电荷的任何脂质。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-十二烷酰基磷脂酰乙醇胺、N-琥珀酰基磷脂酰乙醇胺、N-戊二酰基磷脂酰乙醇胺、赖氨酰基磷脂酰甘油、棕榈酰基油酰基磷脂酰甘油(POPG)、和加入其他阴离子改性基团的中性脂质。

[0084] 如本文所用,术语“非阳离子脂质”意指任何两亲性脂质以及任何其他中性脂质或阴离子脂质。

[0085] 如本文所用,术语“可裂解脂质”或“SS-可裂解脂质”是指包含二硫键可裂解单元的脂质。在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,可裂解脂质包含响应酸性区室(例如用于膜去稳定化的内体或溶酶体)的叔胺以及可在还原环境(例如细胞质)中切割的二硫键。在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,可裂解脂质是可电离脂质。在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,可裂解脂质是阳离子脂质。在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,可裂解脂质是可电离的阳离子脂质。本文更详细地描述了可裂解脂质。

[0086] 如本文所用,术语“有机脂质溶液”意指全部或部分包含具有脂质的有机溶剂的组合物。

[0087] 如本文所用,术语“脂质体”意指组装成球形构造的脂质分子,该球形构造包封与水性外部隔离的内部水性体积。脂质体是具有至少一个脂质双层的囊泡。在医药研发的背景下,脂质体通常用作药物/治疗剂递送的载剂。其通过与细胞膜融合并重新定位其脂质结构以递送药物或活性药物成分来起作用。用于此类递送的脂质体组合物通常由磷脂,尤其具有磷脂酰胆碱基团的化合物构成,然而这些组合物还可以包含其它脂质。

[0088] 如本文所用,术语“局部递送”意指将如干扰RNA(例如,siRNA)的活性剂直接递送到生物体内的靶位点。举例来说,药剂可以通过直接注射到疾病部位(如肿瘤或其他目标部位,如发炎部位或目标器官,如肝脏、心脏、胰腺、肾脏等)中来局部递送。

[0089] 如本文所用,术语“neDNA”或“带切口的ceDNA”意指在开放阅读框架(例如,待表达的启动子和转基因)上游的茎区或间隔区5'中具有2-100个碱基对的茎区或间隔区的封闭端DNA。

[0090] 如本文所用,术语“核酸”意指含有呈单链或双链形式的至少两种核苷酸(即,脱氧

核糖核苷酸或核糖核苷酸)并且包括DNA、RNA和其杂合物的聚合物。DNA可以呈例如反义分子、质粒DNA、DNA-DNA双链体、预缩合DNA、PCR产物、载体(P1、PAC、BAC、YAC、人工染色体)、表达盒、嵌合序列、染色体DNA或这些组的衍生物和组合的形式。DNA的形式可以是小环、质粒、杆粒、小基因、辅助DNA(线性共价封闭DNA载体)、封闭端的线性双链体DNA(CELiD或ceDNA)、doggybone™DNA、哑铃形DNA、最低免疫学定义的基因表达(MIDGE)-载体、病毒载体或非病毒载体。RNA可以呈小干扰RNA(siRNA)、切丁酶-底物dsRNA、小发夹RNA(shRNA)、不对称干扰RNA(aiRNA)、微RNA(miRNA)、mRNA、rRNA、tRNA、病毒RNA(vRNA)和其组合的形式。核酸包括含有已知核苷酸类似物或经修饰主链残基或键的核酸,它们是合成的、天然存在的和非天然存在的,并且具有与参考核酸相似的结合特性。此类类似物和/或经修饰残基的实施例包含(但不限于):硫代磷酸酯、磷酰二胺吗啉代寡聚体(吗啉代)、氨基磷酸酯、膦酸甲酯、手性膦酸甲酯、2'-O-甲基核糖核苷酸、锁核酸(LNA™)和肽核酸(PNA)。除非特别限定,否则该术语涵盖含有天然核苷酸已知类似物的核酸,其具有与参考核酸相似的结合特性。除非另有说明,特定核酸序列还隐含地涵盖其保守修饰的变体(例如,简并密码子取代)、等位基因、直系同源基因、SNP和互补序列以及明确指出的序列。

[0091] 如本文所用,短语“核酸治疗剂”、“治疗性核酸”和“TNA”可互换地使用,并且是指使用核酸作为治疗疾病或病症的治疗剂的活性组分的治疗的任何模式。如本文所用,这些短语是指基于RNA的治疗剂和基于DNA的治疗剂。基于RNA的治疗剂的非限制性实施例包含mRNA、反义RNA和寡核苷酸、核酶、适体、干扰RNA(RNAi)、切丁酶-底物dsRNA、小发夹RNA(shRNA)、不对称干扰RNA(aiRNA)和微RNA(miRNA)。基于DNA的治疗剂的非限制性实施例包括小环DNA、小基因、病毒DNA(例如,慢病毒或AAV基因组)或非病毒DNA载体、封闭端的线性双链体DNA(ceDNA/CELiD)、质粒、杆粒、doggybone™DNA载体、最低免疫学定义的基因表达(MIDGE)-载体、非病毒辅助DNA载体(线性-共价封闭的DNA载体)以及哑铃形DNA最小载体(“哑铃DNA”)。如本文所用,术语“TNA LNP”是指含有上述TNA至少一种的脂质颗粒。

[0092] 如本文所用,“核苷酸”含有糖脱氧核苷(DNA)或核糖(RNA)、碱基和磷酸酯基团。核苷酸通过磷酸酯基团连接在一起。

[0093] 如本文所用,“可操作地连接”意指一种并置,其中如此描述的组分处于允许其以预期方式起作用的关系中。例如,如果启动子影响编码序列的转录或表达,那么所述启动子可操作地连接到所述编码序列。启动子可以被说成驱动其调节的核酸序列的表达或驱动其转录。短语“操作性地连接”、“操作性定位”、“操作性连接”,“在控制下”和“在转录控制下”指示启动子相对于其调节的核酸序列处于正确的功能位置和/或取向,以控制该序列的转录启动和/或表达。如本文所使用的,“反向启动子”是指核酸序列处于相反的取向,使得编码链现在成为非编码链的启动子,并且反之亦然。反向启动子序列可以在各种实施方式中用于调控开关的状态。另外,在各种实施方式中,启动子可以与增强子结合使用。

[0094] 如本文所用,术语“启动子”意指通过驱动核酸序列的转录来调节另一核酸序列表达的任何核酸序列,其可以是编码蛋白质或RNA的异源靶基因。启动子可以是组成型的、诱导型的、阻遏型的、组织特异性的或其任何组合。启动子是核酸序列的控制区域,在所述核酸序列的其余部分的引发和转录速率是受控的。启动子还可以含有可以结合调节蛋白和分子的遗传元件,例如RNA聚合酶和其他转录因子。在启动子序列内将发现转录起始位点,以及负责RNA聚合酶结合的蛋白质结合域。真核启动子将经常但并非总是含有“TATA”框和

“CAT”框。各种启动子,包括诱导型启动子,可用于驱动本文公开的合成AAV载体中转基因的表达。启动子序列可以在其3'末端以转录起始位点为界并且向上游延伸(5'方向)以包括为了在高于背景的可检测水平上引发转录所必需的最少数目个碱基或元件。

[0095] 启动子可以是与基因或序列天然结合的启动子,如可以通过分离位于编码区段上游的5'非编码序列和/或给定基因或序列的外显子来获得。此类启动子可以称为“内源性的”。类似地,在本文的任何方面和实施方式中的一些实施方式中,增强子可以是与核酸序列天然相关的增强子,位于所述序列的下游或上游。在本文的任何方面和实施方式中的一些实施方式中,编码核酸区段定位在“重组启动子”或“异源启动子”的控制下,所述启动子均指在其天然环境中通常不与其可操作地连接的编码核酸序列关联的启动子。类似地,“重组或异源增强子”是指在其天然环境中通常不与给定核酸序列关联的增强子。此类启动子或增强子可以包含其它基因的启动子或增强子;从任何其它原核、病毒或真核细胞分离的启动子或增强子;以及非“天然存在”的合成启动子或增强子,即包括不同转录调节区的不同元件和/或通过所属领域已知的基因工程方法来改变表达的突变。除了合成产生启动子和增强子的核酸序列以外,还可以结合本文公开的合成生物回路和模块,使用重组克隆和/或核酸扩增技术,包含PCR,来产生启动子序列(参见例如,美国专利第4,683,202号、美国专利第5,928,906号,各自以全文引用的方式并入本文中)。此外,经考虑也可以采用指导序列在例如线粒体、叶绿体等非核细胞器内的转录和/或表达的控制序列。

[0096] 如本文所用,术语“Rep结合位点”(“RBS”)和“Rep结合元件”(“RBE”)可互换使用,并且意指Rep蛋白(例如AAV Rep 78或AAV Rep 68)的结合位点,其在Rep蛋白结合后允许Rep蛋白在并入了RBS的序列上发挥其位点特异性核酸内切酶活性。RBS序列和其反向互补序列一起形成单个RBS。RBS序列本领域中是已知的,并且包括例如5'-GCGCGCTCGCTCGCTC-3',AAV2中所鉴定的RBS序列。

[0097] 如本文所用,短语“重组载体”意指包括能够在体内表达的异源核酸序列或“转基因”的载体。应理解,在本文的任何方面和实施方式中的一些实施方式中,本文所描述的载体可以与其它适合的组合物和疗法组合。在本文的任何方面和实施方式中的一些实施方式中,载体是附加型的。合适的附加型载体的使用提供了一种以高拷贝数的染色体外DNA维持受试者中的所关注核苷酸,从而消除染色体整合的潜在影响的方式。

[0098] 如本文所用,术语“报道子”意指可以用于提供可检测读数的蛋白质。报道子通常产生可测量的信号,例如荧光、颜色或冷光。报告蛋白编码序列编码在细胞或生物体中的存在易于观察到的蛋白质。

[0099] 如本文所用,术语“正义”和“反义”意指多核苷酸上结构元件的取向。元件的正义型和反义型式彼此反向互补。

[0100] 如本文所用,术语“序列一致性”意指两个核苷酸序列之间的相关性。出于本公开的目的,使用如在EMBOSS软件包的Needle程序(EMBOSS:欧洲分子生物学开放软件套件,Rice等人,2000,同上),优选版本3.0.0或更高版本中执行的Needleman-Wunsch算法(Needleman和Wunsch,1970,同上)确定两个脱氧核糖核苷酸序列之间的序列一致性程度。使用的可选参数是空位开放罚分为10,空位延伸罚分为0.5和EDNAFULL(NCBI NUC4.4的EMBOSS版本)替换矩阵。标记为“最长一致性”的Needle的输出(使用-nobrief选项获得)用作一致性百分比,并按以下计算:(相同的脱氧核糖核苷酸乘以100)/(比对长度-比对空位

总数)。比对的长度优选为至少10个核苷酸、优选为至少25个核苷酸、更优选为至少50个核苷酸并且最优选为至少100个核苷酸。

[0101] 如本文所用,术语“间隔区”意指分离载体或基因组中的功能元件的中间序列。在本文的任何方面和实施方式中的一些实施方式中,AAV间隔区将两个功能元件保持在对于最佳功能性来说所期望的距离上。在本文的任何方面和实施方式中的一些实施方式中,间隔区提供或增加了载体或基因组的基因稳定性。在本文的任何方面和实施方式中的一些实施方式中,间隔区通过提供克隆位点的适宜位置和设计数目的碱基对的间隙而促进基因组的就绪基因操作。举例来说,在某些方面,含有若干限制性核酸内切酶位点的寡核苷酸“多酶切点接头”或“聚克隆位点”,或设计成不具有已知蛋白质(例如,转录因子)结合位点的非开放阅读框架序列可以位于载体或基因组中以分离顺式作用因子,例如插入6聚体、12聚体、18聚体、24聚体、48聚体、86聚体、176聚体等。

[0102] 如本文所用,术语“受试者”是指人或动物,向其提供根据本发明的治疗性核酸的治疗,包括预防性治疗。通常,动物是脊椎动物,如(但不限于):灵长类动物、啮齿动物、家养动物或野生动物。灵长类动物包含但不限于:黑猩猩、食蟹猴、蜘蛛猴和猕猴,例如恒河猴。啮齿动物包括小鼠、大鼠、旱獭、雪貂、兔和仓鼠。家养和野生动物包含但不限于:牛、马、猪、鹿、野牛、水牛、猫科物种(例如,家猫)、犬科物种(例如,狗、狐狸、狼)、禽类物种(例如,鸡、鹌鹑、鸵鸟),以及鱼(例如,鳟鱼、鲈鱼和鲑鱼)。在本文所描述方面的某些实施方式中,受试者是哺乳动物,例如灵长类动物或人。受试者可以是雄性或雌性。另外,受试者可以是婴儿或儿童。在本文的任何方面和实施方式中的一些实施方式中,受试者可以是新生儿或未出生受试者,例如,受试者还在子宫内。优选地,受试者是哺乳动物。哺乳动物可以是人、非人灵长类动物、小鼠、大鼠、狗、猫、马或牛,但不限于这些实施例。人以外的哺乳动物可以有利地用作代表疾病和病症的动物模型的受试者。另外,本文所描述的方法和组合物可以用于家养动物和/或宠物。人受试者可以具有任何年龄、性别、种族或族群,例如,高加索人(白人)、亚洲人、非洲人、黑人、非裔美洲人、非裔欧洲人、西班牙人、中东人等。在本文的任何方面和实施方式中的一些实施方式中,受试者可以是临床环境中的患者或其它受试者。在本文的任何方面和实施方式中的一些实施方式中,受试者已在接受治疗。在本文的任何方面和实施方式中的一些实施方式中,受试者是胚胎、胎儿、新生儿、婴儿、儿童、青少年或成人。在本文的任何方面和实施方式中的一些实施方式中,受试者是人类胎儿、人类新生儿、人类婴儿、人类儿童、人类青少年或人类成人。在本文的任何方面和实施方式中的一些实施方式中,受试者是动物胚胎,或非人类胚胎或非人类灵长类动物胚胎。在本文的任何方面和实施方式中的一些实施方式中,受试者是人胚胎。

[0103] 如本文所用,短语“有需要的受试者”是指(i)将施用根据所述发明的TNA脂质颗粒(或包含TNA脂质颗粒的药物组合物),(ii)正在接受根据所述发明的TNA脂质颗粒(或包含TNA脂质颗粒的药物组合物);(iii)已接受根据所述发明的TNA脂质颗粒(或包含TNA脂质颗粒的药物组合物)的受试者,除非该短语的上下文和用法另有说明。

[0104] 如本文所用,术语“遏制”、“减少”、“干扰”、“抑制”和/或“降低”(以及类似术语)通常是指直接或间接地降低相对于自然条件、预期条件或平均条件,或相对控制条件的浓度、水平、功能、活动或行为的行为。

[0105] 如本文所用,术语“合成AAV载体”和“AAV载体的合成产生”意指在完全无细胞环境

中的AAV载体和其合成产生方法。

[0106] 如本文所用,术语“全身递送”意指脂质颗粒的递送,使得活性剂诸如干扰RNA(例如,siRNA)在生物体内的广泛生物分布。一些施用技术可导致某些药剂而非其他药剂的全身递送。全身递送意指使有用量(优选治疗量)的药剂暴露于身体的大部分部位。为了获得广泛的生物分布,通常需要血液寿命,以使药剂在到达施用位点远端的疾病位点之前不会迅速地降解或清除(诸如通过首过器官(肝、肺等)或通过快速、非特异性细胞结合)。脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)的全身递送可以通过本领域已知的任何手段进行,包括例如静脉内、皮下和腹膜内。在优选的实施方式中,脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)的全身递送是通过静脉内递送进行的。

[0107] 如本文所用,术语“末端解链位点”和“TRS”在本文可互换使用,意指一个区域,在此Rep与5' 胸苷形成酪氨酸-磷酸二酯键,产生3' -OH,充当通过细胞DNA聚合酶,例如DNA pol δ 或DNA pol ϵ 进行DNA延伸的底物。可替代地,Rep-胸苷复合物可以参与配位连接反应。

[0108] 如本文所用,术语活性剂(例如,如本文所描述的TNA脂质颗粒)的“治疗量”、“治疗有效量”、“有效量”或“药学上有效量”可互换地使用以指代足以提供治疗的预期益处(例如,相比于在不存在治疗性核酸的情况下检测到的表达水平抑制目标序列的表达)的量。用于测量目标基因或目标序列的表达的适合的分析包括例如使用所属领域的技术人员已知的技术检查蛋白质或RNA水平,所述技术如斑点印迹、北方印迹法、原位杂合、ELISA、免疫沉淀、酶功能以及所属领域的技术人员已知的表型分析。剂量水平基于多种因素,包含损伤类型、年龄、体重、性别、患者的医学病状、病状的严重程度、施用途径和所采用的特定活性剂。因此,剂量方案可以在很大范围内变化,但可以由医生使用标准方法常规地确定。另外,术语“治疗量”、“治疗有效量”和“药学上有效量”包括所描述的本发明的组合物的防治或预防量。在所描述的本发明的防治性或预防性应用中,以足以消除或降低疾病、病症或病状的风险、减轻严重程度或延迟发病的量向易患有疾病、病症或病状或以其他方式处于疾病、病症或病状风险下的患者施用药物组合物或药剂,所述疾病、病症或病状包括疾病、病症或病状的生物化学、组织学和/或行为症状,其并发症和在疾病、病症或病状的发展期间呈现的中间病理学表型。通常优选使用最大剂量,即,根据一些医学判断的最高安全剂量。术语“剂量(dose/dosage)”在本文中可互换地使用。在本文的任何方面或实施方式的一个方面中,“治疗量”、“治疗有效量”和“药学有效量”是指非预防性或非预防性应用。

[0109] 如本文所用,术语“治疗效果”是指治疗的结果,其结果被判定为合乎需要并且有益的。治疗效果可以直接或间接地包括疾病表现的遏制、减少或消除。治疗效果还可以直接或间接地包括疾病表现的进展的遏制减少或消除。

[0110] 对于本文所描述的任何治疗剂,治疗有效量可以初始地根据初步的体外研究和/或动物模型来确定。治疗有效剂量也可以根据人数据来确定。可以基于相对生物利用度和施用的化合物的效力调节施用剂量。基于上述方法和其他熟知的方法调整剂量以实现最大功效在普通技术人员的能力内。下文总结了用于测定治疗有效性的一般原理,其可以在《古德曼和吉尔曼的治疗学的药理学基础(Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics)》,第10版,麦格劳-希尔专业出版公司(McGraw-Hill)(纽约)(2001)的第1章中找到,所述文献以引用的方式并入本文中。

[0111] 药代动力学原理为修饰量方案以获得期望程度的治疗功效并且具有最小的不可

接受的副作用提供了基础。在可以测量药物的血浆浓度并且与治疗窗口有关的情况下,可以获得针对剂量修饰的另外的指导。

[0112] 如本文所用,术语“治疗(treat/treating/treatment)”包括减轻、大体上抑制、减缓或逆转病状的进展,改善病状的临床症状或预防病状的临床症状的出现、获得有益或所需的临床结果。治疗进一步指代实现以下中的一个或多个:(a)降低病症的严重程度;(b)限制所治疗的一种或更多种病症的症状特征的发展;(c)限制所治疗的一种或更多种病症的症状特征的恶化;(d)限制先前患有病症的患者中的一种或更多种病症的复发;以及(e)限制先前对于一种或更多种病症无症状的患者中的症状的复发。在本文的任何方面或实施方式的一个方面中,术语“治疗”、“治疗”和/或“治疗”包括消除、抑制、减缓或逆转病症的进展,或改善病症的临床症状。

[0113] 有益或所需的临床结果,如药理学和/或生理学作用,包括(但不限于):预防可能易患有疾病、病症或病状但尚未经历或展现疾病的症状的受试者出现所述疾病、病症或病状(防治性治疗);缓解所述疾病、病症或病状的症状;减轻所述疾病、病症或病状的程度;稳定所述疾病、病症或病状(即,不恶化);预防所述疾病、病症或病状的扩散;延迟或减缓所述疾病、病症或病状进展;改善或缓和所述疾病、病症或病状;以及其组合,以及与如果不接受治疗所预期的存活期相比,延长存活期。

[0114] 如本文所用,术语“载体”或“表现载体”意指复制子,如质粒、杆粒、噬菌体、病毒、病毒粒子或粘粒,可以附接另一个DNA区段,即“插入物”“转基因”或“表达盒”,以便实现所附接区段(“表达盒”)在细胞中的表达或复制。载体可以是设计用于递送到宿主细胞或用于在不同宿主细胞之间转移的核酸构建体。如本文所用,载体可以以最终形式起源于病毒或非病毒。然而,出于本公开的目的,“载体”通常是指合成AAV载体或带切口的ceDNA载体。因此,术语“载体”涵盖与适当的控制元件缔合时能够复制并且可以将基因序列转移到细胞的任何基因元件。在本文的任何方面和实施方式中的一些实施方式中,载体可以是重组载体或表达载体。

[0115] 本文公开的本发明的替代要素或实施方式的分组不应解释为限制。每个组成员可以单独提及和要求,或呈与该组的其他成员或本文找到的其他要素的任何组合提及和要求。出于方便和/或可专利性的原因,一个组中的一个或多个成员可以包括在一个组中或从中删除。当发生任何这样的包括或删除时,在本文中认为说明书含有修改的组,从而满足所附权利要求书中使用的所有马库什组(Markush group)的书面描述。

[0116] 在任何方面的一些实施方式中,本文描述的公开内容不涉及克隆人的方法、用于修饰人的种系遗传身份的方法、用于工业或商业目的的人胚胎的使用、或用于修饰动物的基因身份,可能导致其遭受痛苦而对人或动物没有任何实质性医学益处的方法,以及由这类方法产生的动物。

[0117] 本文在本发明的各个方面的描述内定义了其它术语。

[0118] 本申请全文中引用的所有专利和其它出版物,包括参考文献、授权专利、已发布的专利申请和共同待决的专利申请,以引用的方式明确地并入本文中,以描述和公开例如在这些出版物中描述的可以与本文所述的技术结合使用的方法。提供这些出版物仅仅是出于其在本申请的提交日期之前的公开内容而提供。关于这一点,任何内容都不应被解释为承认发明者由于在先发明或任何其他原因而无权早于这种公开内容。关于这些文件的日期的

所有声明或关于内容的陈述都是基于申请人可获得的信息,并且不等同于承认这些文件的日期或内容的正确性。

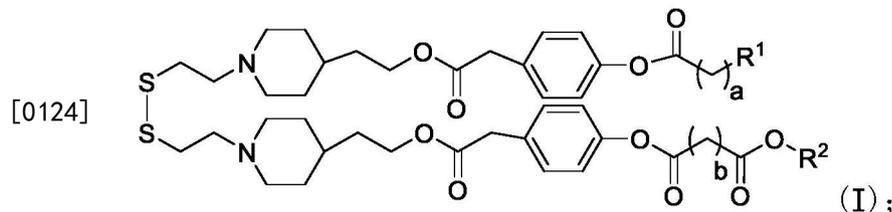
[0119] 本公开的実施方式的描述并非旨在穷举或将本公开限制于所公开的精确形式。尽管本文出于说明性目的描述了本公开的特定实施方式 and 实施例,但是如相关领域的技术人员将认识到的,在本公开的范围内可以进行各种等效修改。例如,虽然方法步骤或功能以给定的顺序呈现,但是替代实施方式可以以不同的顺序执行功能,或者功能可以基本上同时执行。本文提供的本公开的教导可以适当地应用于其他程序或方法。本文描述的各种实施方式可以进行组合以提供其他实施方式。如果需要,可以修改本公开的各方面以采用上述参考文献和申请的组合物、功能和概念来提供本公开的又一实施方式。而且,由于生物学功能等效性的考虑,可以在不影响生物学或化学作用的种类或数量的情况下对蛋白质结构进行一些改变。可以根据详细描述对本公开进行这些和其他改变。意图所有这些修改包括在所附权利要求书的范围内。

[0120] 任何前述实施方式的特定要素都可以进行组合或替代其他实施方式中的要素。此外,尽管已经在这些实施方式的上下文中描述了与本公开的某些实施方式相关联的优点,但是其他实施方式也可以表现出这样的优点,并且并非所有实施方式都需要为了落入本公开的范围内而表现出这样的优点。

[0121] 通过以下实施例进一步说明本文所述的技术,这些实施例决不应解释为进一步限制。应当理解,本发明不以任何方式限制于本文所述的特定方法、方案和试剂等,因此可以变化。本文中所用的术语仅是出于描述特定实施方式的目的,而无意于限制本发明的范围,本发明的范围仅仅由权利要求限定。

[0122] II. 脂质

[0123] 在第一化学实施方式中,提供了式(I)的可电离脂质:



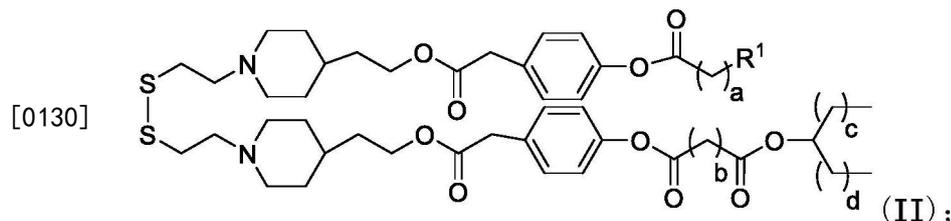
[0125] 或其药学上可接受的盐,其中:

[0126] a为1至20范围内的整数(例如,a为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20);

[0127] b为2至10范围内的整数(例如,b为2、3、4、5、6、7、8、9或10);

[0128] R¹不存在或选自(C₂-C₂₀)烯基、-C(O)O(C₂-C₂₀)烷基和被(C₂-C₂₀)烷基取代的环丙基;和R²是(C₂-C₂₀)烷基;

[0129] 在第二化学实施方式中,式(I)的可电离脂质具有式(II):



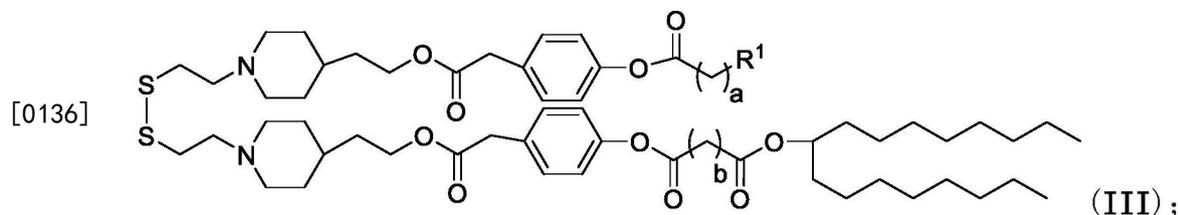
[0131] 或其药学上可接受的盐,其中c和d各自独立地为1至8(例如,1、2、3、4、5、6、7或8)范围内的整数,并且其中剩余变量如式(I)所述。

[0132] 在第三化学实施方式中,式(I)或(II)的可电离脂质或其药学上可接受的盐中的c和d各自独立地为2至8、3至8、3至7、3至6、3至5、4至8、4至7、4至6、5至8、5至7或6至8范围内的整数,其中剩余变量如式(I)或(II)所述。

[0133] 在第四化学实施方式中,式(I)或(II)的可电离脂质中的c为2、3、4、5、6、7或8,其中剩余变量如式(I)或第二或第三化学实施方式所述。可替代地,作为第四化学实施方式的一部分,式(I)或(II)的可电离脂质或其药学上可接受的盐中的c和d各自独立地为1、3、5或7,其中剩余变量如式(I)或第二或第三化学实施方式所述。

[0134] 在第五化学实施方式中,式(I)或(II)的可电离脂质中的d为2、3、4、5、6、7或8,其中剩余变量如式(I)或第二或第三或第四化学实施方式所述。可替代地,作为第五化学实施方式的一部分,式(I)或(II)的可电离脂质或其药学上可接受的盐中的c和d中的至少一个为7,其中剩余变量如式(I)或第二或第三或第四化学实施方式所述。

[0135] 在第六化学实施方式中,式(I)的可电离脂质具有式(III):



[0137] 或其药学上可接受的盐,其中剩余变量如式(I)所述。

[0138] 在第七化学实施方式中,式(I)、(II)或(III)的可电离脂质或其药学上可接受的盐中的b为3至9范围内的整数,其中剩余变量如式(I)或第二、第三、第四或第五化学实施方式所述。可替代地,作为第七化学实施方式的一部分,式(I)、(II)或(III)的可电离脂质或其药学上可接受的盐中的b为3至8、3至7、3至6、3至5、4至9、4至8、4至7、4至6、5至9、5至8、5至7、6至9、6至8或7至9范围内的整数,其中剩余变量如式(I)或第二、第三、第四或第五化学实施方式所述。在另一替代方式中,作为第七化学实施方式的一部分,式(I)、(II)或(III)的可电离脂质或其药学上可接受的盐中的b为3、4、5、6、7、8或9,其中剩余变量如式(I)或第二、第三、第四或第五化学实施方式所述。

[0139] 在第八化学实施方式中,式(I)、(II)或(III)的可电离脂质或其药学上可接受的盐中的a为2至18范围内的整数,其中剩余变量如式(I)或第二、第三、第四、第五或第七化学实施方式所述。可替代地,作为第八实施方式的一部分,式(I)、(II)或(III)的可电离脂质或其药学上可接受的盐中的a为2至18、2至17、2至16、2至15、2至14、2至13、2至12、2至11、2至10、2至9、2至8、2至7、2至6、2至5、2至4、3至18、3至17、3至16、3至15、3至14、3至13、3至12、3至11、3至10、3至9、3至8、3至7、3至6、3至5、4至18、4至17、4至16、4至15、4至14、4至13、4至12、4至11、4至10、4至9、4至8、4至7、4至6、5至18、5至17、5至16、5至15、5至14、5至13、5至12、5至11、5至10、5至9、5至8、5至7、6至18、6至17、6至16、6至15、6至14、6至13、6至12、6至11、6至10、6至9、6至8、7至18、7至17、7至16、7至15、7至14、7至13、7至12、7至11、7至10、7至9、8至18、8至17、8至16、8至15、8至14、8至13、8至12、8至11、8至10、9至18、9至17、9至16、9至15、9至14、9至13、9至12、9至11、10至18、10至17、10至16、10至15、10至14、10至13、11至18、11至

17、11至16、11至15、11至14、11至13、12至18、12至17、12至16、12至15、12至14、13至18、13至17、13至16、13至15、14至18、14至17、14至16、15至18、15至17或16至18范围内的整数,其中剩余变量如式(I)或第二、第三、第四、第五或第七化学实施方式所述。在另一替代方式中,作为第八实施方式的一部分,式(I)、(II)或(III)的可电离脂质中的a为2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17或18,其中剩余变量如式(I)或第二、第三、第四、第五或第七化学实施方式所述。

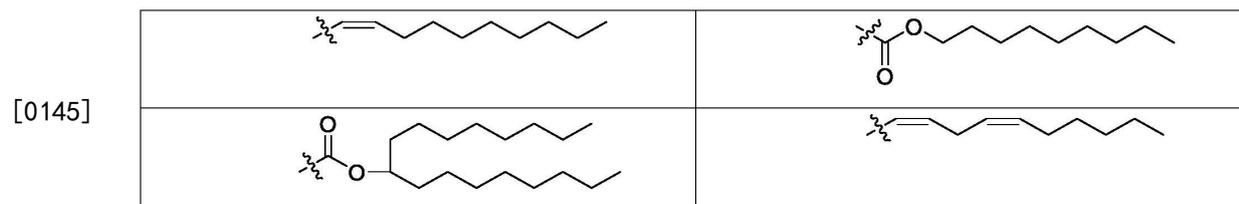
[0140] 在第九化学实施方式中,式(I)、(II)或(III)的可电离脂质或其药学上可接受的盐中的 R^1 不存在或选自 (C_5-C_{15}) 烯基、 $-C(O)O(C_4-C_{18})$ 烷基和被 (C_4-C_{16}) 烷基取代的环丙基,其中剩余变量如式(I)或第二、第三、第四、第五、第七或第八化学实施方式所述。可替代地,作为第九化学实施方式的一部分,式(I)、(II)或(III)的可电离脂质或其药学上可接受的盐中的 R^1 不存在或选自 (C_5-C_{15}) 烯基、 $-C(O)O(C_4-C_{16})$ 烷基和被 (C_4-C_{16}) 烷基取代的环丙基,其中剩余变量如式(I)或第二、第三、第四、第五、第七或第八化学实施方式。可替代地,作为第九化学实施方式的一部分,式(I)、(II)或(III)的可电离脂质或其药学上可接受的盐中的 R^1 不存在或选自 (C_5-C_{12}) 烯基、 $-C(O)O(C_4-C_{12})$ 烷基和被 (C_4-C_{12}) 烷基取代的环丙基,其中剩余变量如式(I)或第二、第三、第四、第五、第七或第八化学实施方式所述。在另一替代方式中,作为第九化学实施方式的一部分,式(I)、(II)或(III)的可电离脂质或其药学上可接受的盐中的 R^1 不存在或选自 (C_5-C_{10}) 烯基、 $-C(O)O(C_4-C_{10})$ 烷基和被 (C_4-C_{10}) 烷基取代的环丙基,其中剩余变量如式(I)或第二、第三、第四、第五、第七或第八化学实施方式所述。

[0141] 在第十化学实施方式中, R^1 为 C_{10} 烯基,其中剩余变量如前述实施方式中任一项所述。

[0142] 在第十一化学实施方式中,式(I)、(II)或(III)的可电离脂质中 R^1 的 $C(O)O(C_2-C_{20})$ 烷基、 $-C(O)O(C_4-C_{18})$ 烷基、 $-C(O)O(C_4-C_{12})$ 烷基或 $-C(O)O(C_4-C_{10})$ 烷基或其药学上可接受的盐是无支链烷基,其中剩余变量如前述任一实施方式所述。在一个化学实施方式中, R^1 是 $-C(O)O(C_9$ 烷基)。可替代地,在第十一化学实施方式中,式(I)、(II)或(III)的可电离脂质中 R^1 的 $-C(O)O(C_4-C_{18})$ 烷基、 $-C(O)O(C_4-C_{12})$ 烷基或 $-C(O)O(C_4-C_{10})$ 烷基或其药学上可接受的盐中是支链烷基,其中剩余变量如前述化学实施方式中的任一项所述。在一个化学实施方式中, R^1 是 $-C(O)O(C_{17}$ 烷基),其中剩余变量如前述化学实施方式中任一项所述。

[0143] 在第十二化学实施方式中,式(I)、(II)或(III)的可电离脂质或其药学上可接受的盐中的 R^1 选自下表1中列出的任何基团,其中每个基团中的波浪键表示基团与脂质分子的其余部分的连接点,其中剩余变量如式(I)或第二、第三、第四、第五、第七或第八化学实施方式所述。本公开进一步考虑表1中的 R^1 基团中的任一者与表2中的 R^2 基团中的任一者的组合,其中剩余变量如式(I)或第二、第三、第四、第五、第七或第八化学实施方式所述。

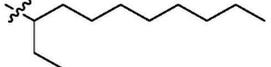
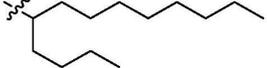
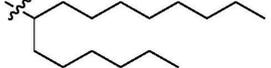
[0144] 表1. 示例性 R^1 基团





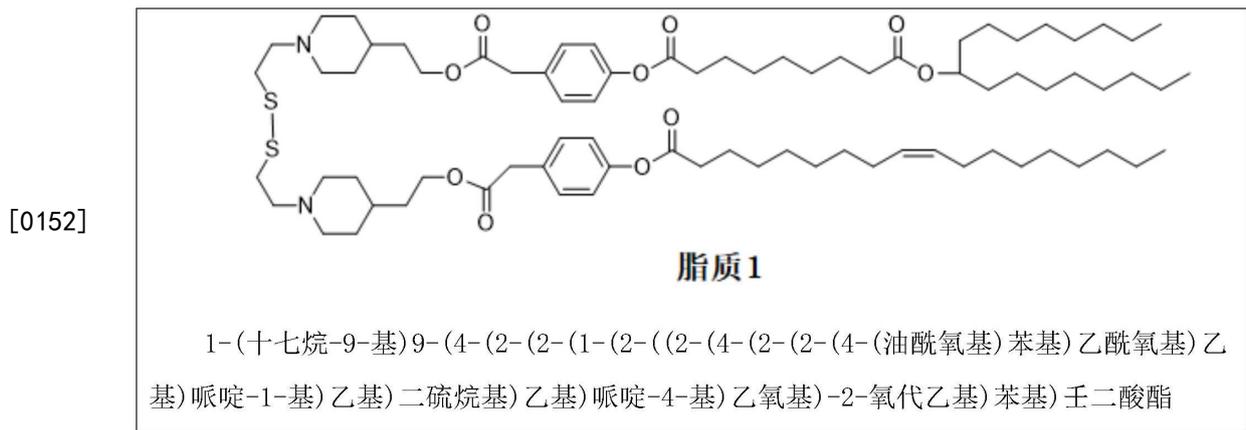
[0147] 在第十三化学实施方式中,式(I)的可电离脂质或其药学上可接受的盐中的R²选自下表2中列出的任何基团,其中每个基团中的波浪键表示基团与脂质分子的其余部分的连接点,并且其中剩余变量如式(I)或第七、第八、第九、第十或第十一化学实施方式所述。

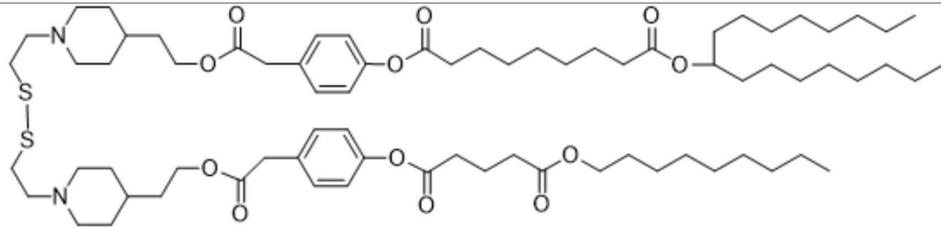
[0148] 表2. 示例性R²基团

[0149] 	
	
	

[0150] 具体实施例例在下面的示例部分的表3中提供,并且作为本文式(I)的可电离脂质的第十四化学实施方式的一部分包括在内。还包括药学上可接受的盐以及电离和中性形式。

[0151] 表3. 本公开的示例性可电离脂质

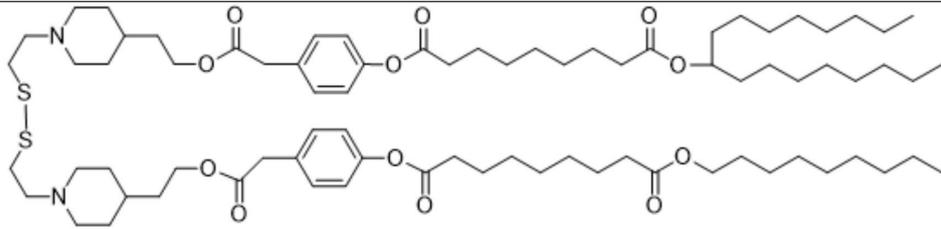




脂质2

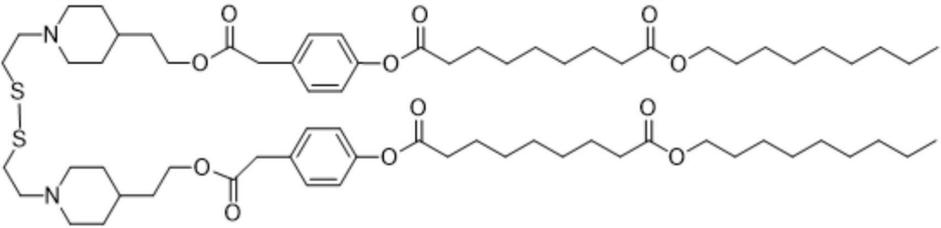
1-(十七烷-9-基)9-(4-(2-(2-(1-(2-((2-(4-(2-(2-(4-((5-(壬氧基)-5-氧代戊酰基)氧基)苯基)乙酰氧基)乙基)哌啶-1-基)乙基)二硫烷基)乙基)哌啶-4-基)乙氧基)-2-氧代乙基)苯基)壬二酸酯

[0153]



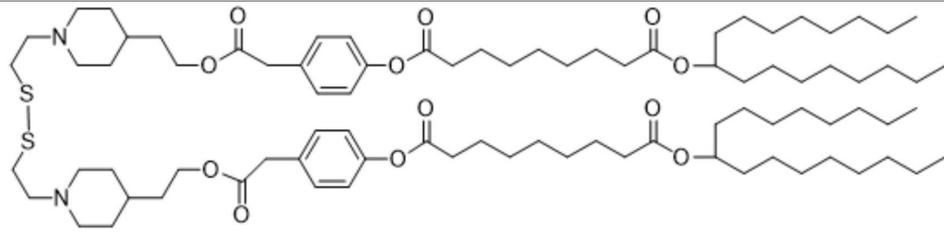
脂质3

1-(十七烷-9-基)9-(4-(2-(2-(1-(2-((2-(4-(2-(2-(4-((9-(壬氧基)-9-氧代壬酰基)氧基)苯基)乙酰氧基)乙基)哌啶-1-基)乙基)二硫烷基)乙基)哌啶-4-基)乙氧基)-2-氧代乙基)苯基)壬二酸酯



脂质4

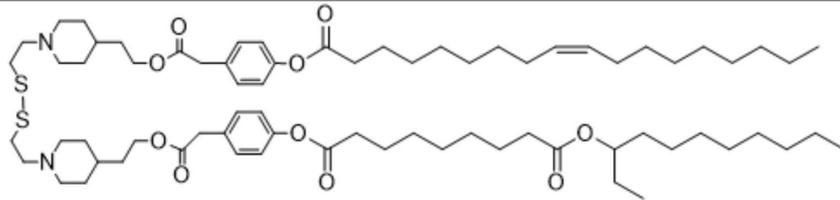
1-(十七烷-9-基)9-(4-(2-(2-(1-(2-((2-(4-(2-(2-(4-((5-(壬氧基)-5-氧代戊酰基)氧基)苯基)乙酰氧基)乙基)哌啶-1-基)乙基)二硫烷基)乙基)哌啶-4-基)乙氧基)-2-氧代乙基)苯基)壬二酸酯



脂质5

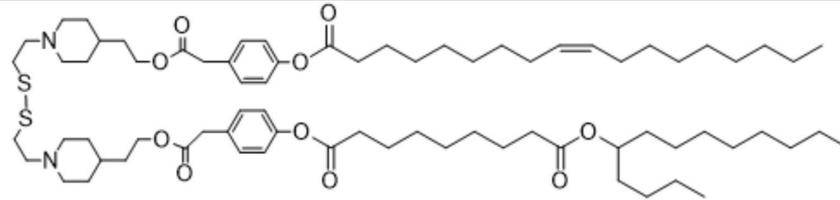
0' 1, 01-二硫烷二基双((((((乙烷-2, 1-二基))双(哌啶-1, 4-二基))双(乙烷-2, 1-二基))双(氧基))双(2-氧代乙烷-2, 1-二基))双(4, 1-伸苯基))9, 9'-二(十七烷-9-基)二(壬二酸酯)

[0154]



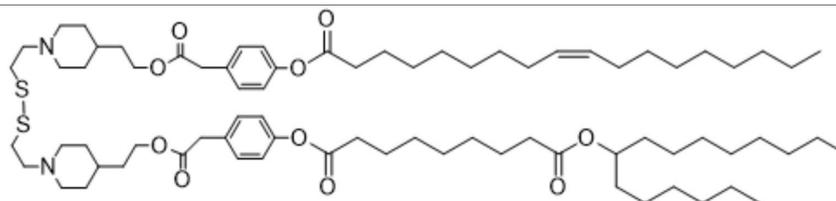
脂质6

1-(4-(2-(2-(1-(2-((2-(4-(2-(2-(4-(油酰氧基)苯基)乙酰氧基)乙基)哌啶-1-基)乙基)二硫烷基)乙基)哌啶-4-基)乙氧基)-2-氧代乙基)苯基)9-(十一烷-3-基)壬二酸酯



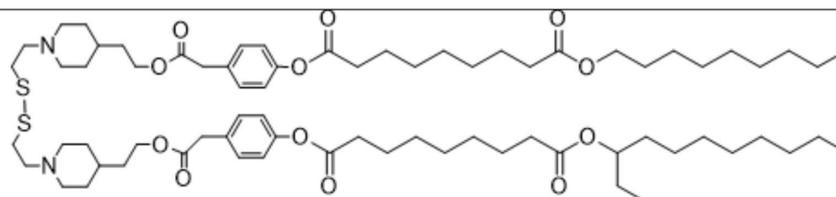
脂质7

1-(4-(2-(2-(1-(2-((2-(4-(2-(2-(4-(油酰氧基)苯基)乙酰氧基)乙基)哌啶-1-基)乙基))二硫烷基)乙基)哌啶-4-基)乙氧基)-2-氧代乙基)苯基)9-(十三烷-5-基)壬二酸酯



脂质8

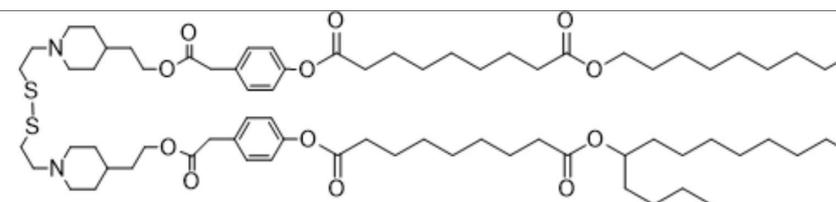
1-(4-(2-(2-(1-(2-((2-(4-(2-(2-(4-(油酰氧基)苯基)乙酰氧基)乙基)哌啶-1-基)乙基)二硫烷基)乙基)哌啶-4-基)乙氧基)-2-氧代乙基)苯基)9-(十五烷-7-基)壬二酸酯



脂质9

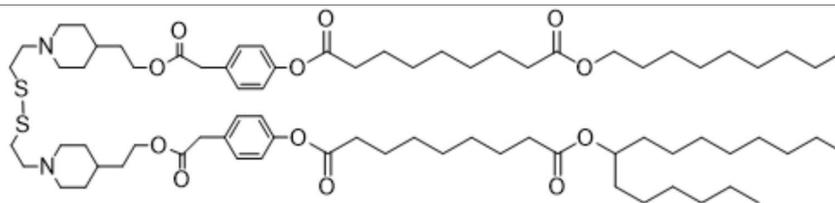
[0155]

1-壬基 9-(4-(2-氧代-2-(2-(1-(2-((2-(4-(2-(2-(4-(9-氧代-9-(十一烷-3-基氧基)壬酰基)氧基)苯基)乙酰氧基)乙基)哌啶-1-基)乙基)二硫烷基)乙基)哌啶-4-基)乙氧基)乙基)苯基)壬二酸酯



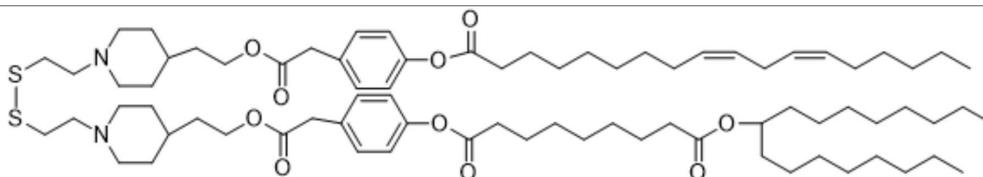
脂质10

1-壬基 9-(4-(2-氧代-2-(2-(1-(2-((2-(4-(2-(2-(4-(9-氧代-9-(十三烷-5-基氧基)壬酰基)氧基)苯基)乙酰氧基)乙基)哌啶-1-基)乙基)二硫烷基)乙基)哌啶-4-基)乙氧基)乙基)苯基)壬二酸酯



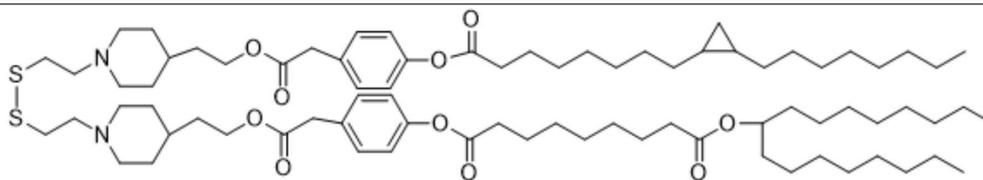
脂质11

1-壬基 9-(4-(2-氧代-2-(2-(1-(2-((2-(4-(2-(2-(4-((9-氧代-9-(十五烷-7-基氧基) 壬酰基) 氧基) 苯基) 乙酰氧基) 乙基) 哌啶-1-基) 乙基) 二硫烷基) 乙基) 哌啶-4-基) 乙氧基) 乙基) 苯基) 壬二酸酯



脂质12

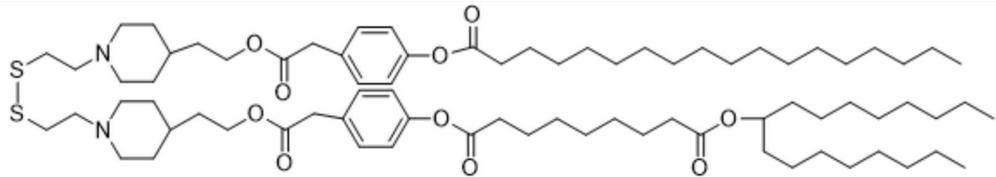
1-(十七烷-9-基) 9-(4-(2-(2-(1-(2-((2-(4-(2-(2-(4-(((9Z, 12Z) 十八烷-9, 12-二烯酰基) 氧基) 苯基) 乙酰氧基) 乙基) 哌啶-1-基) 乙基) 二硫烷基) 乙基) 哌啶-4-基) 乙氧基)-2-氧代乙基) 苯基) 壬二酸酯



脂质13

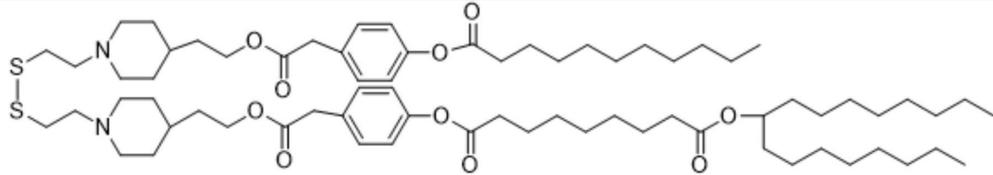
1-(十七烷-9-基) 9-(4-(2-(2-(1-(2-((2-(4-(2-(2-(4-((8-(2-辛基环丙基) 辛酰基) 氧基) 苯基) 乙酰氧基) 乙基) 哌啶-1-基) 乙基) 二硫烷基) 乙基) 哌啶-4-基) 乙氧基)-2-氧代乙基) 苯基) 壬二酸酯

[0156]



脂质14

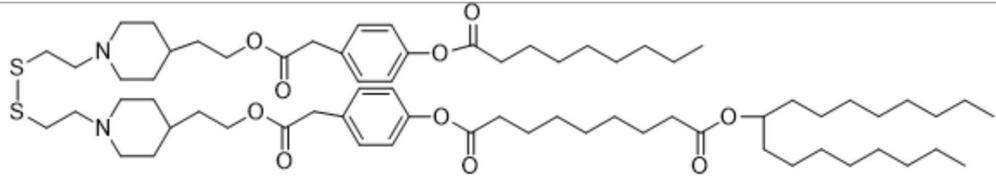
1-(十七烷-9-基)9-(4-(2-氧代-2-(2-(1-(2-((2-(4-(2-(2-(4-(硬脂酰氧基)苯基)乙酰氧基)乙基)哌啶-1-基)乙基)二硫烷基)乙基)哌啶-4-基)乙氧基)乙基)苯基)壬二酸酯



脂质15

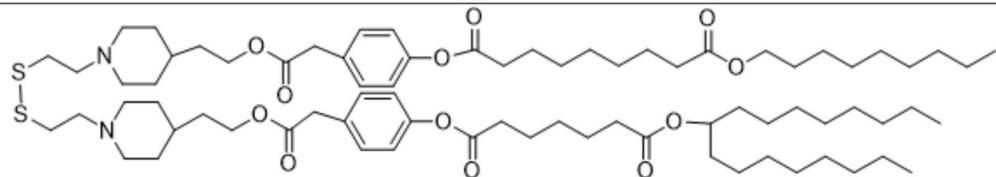
[0157]

1-(十七烷-9-基)9-(4-(2-氧代-2-(2-(1-(2-((2-(4-(2-(2-(4-(十一烷酰氧基)苯基)乙酰氧基)乙基)哌啶-1-基)乙基)二硫烷基)乙基)哌啶-4-基)乙氧基)乙基)苯基)壬二酸酯



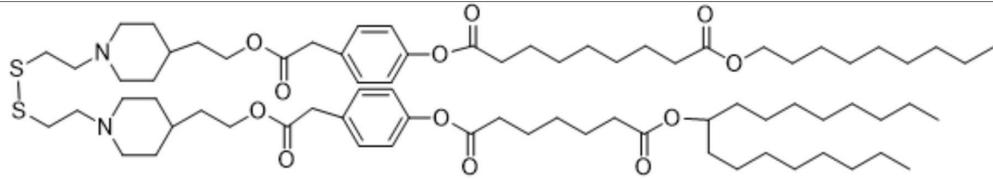
脂质16

1-(十七烷-9-基)9-(4-(2-(2-(1-(2-((2-(4-(2-(2-(4-(壬酰氧基)苯基)乙酰氧基)乙基)哌啶-1-基)乙基)二硫烷基)乙基)哌啶-4-基)乙氧基)-2-氧代乙基)苯基)壬二酸酯



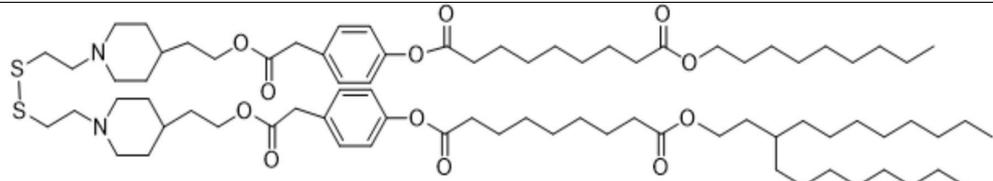
脂质17

1-壬基 9-(4-(2-(2-(1-(2-((2-(4-(2-(2-(4-((9-((3-辛基十一烷基)氧基)-9-氧代壬酰基)氧基)苯基)乙酰氧基)乙基)哌啶-1-基)乙基)二硫烷基)乙基)哌啶-4-基)乙氧基)-2-氧代乙基)苯基)壬二酸酯



脂质18

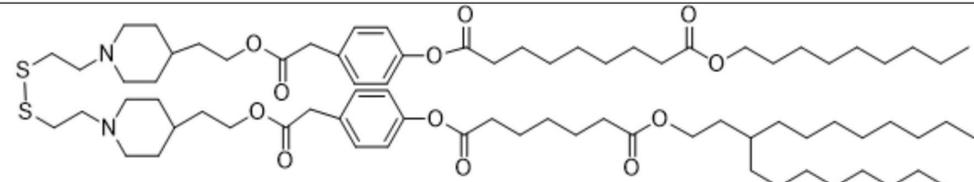
1-(4-(2-(2-(1-(2-((2-(4-(2-(2-(4-((7-(十七烷-9-基氧基)-7-氧代庚酰基)氧基)苯基)乙酰氧基)乙基)哌啶-1-基)乙基)二硫烷基)乙基)哌啶-4-基)乙氧基)-2-氧代乙基)苯基)9-壬基壬二酸酯



脂质19

[0158]

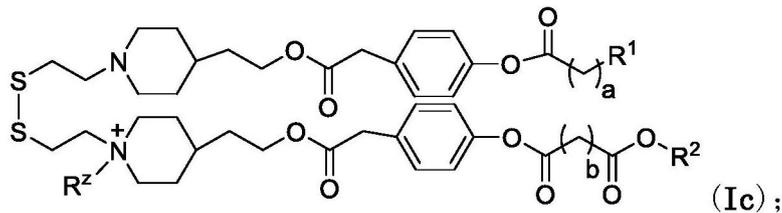
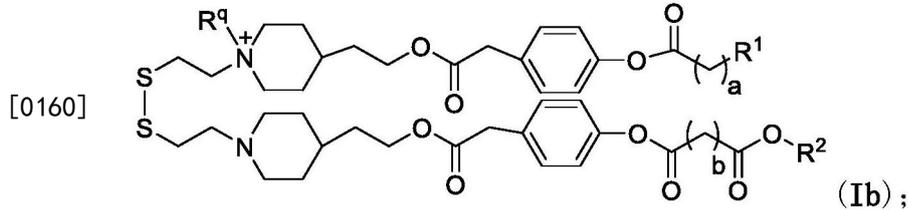
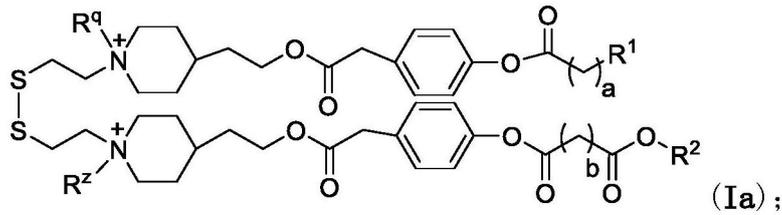
1-壬基 9-(4-(2-(2-(1-(2-((2-(4-(2-(2-(4-((9-((3-辛基十一烷基)氧基)-9-氧代壬酰基)氧基)苯基)乙酰氧基)乙基)哌啶-1-基)乙基)二硫烷基)乙基)哌啶-4-基)乙氧基)-2-氧代乙基)苯基)壬二酸酯



脂质20

1-壬基 9-(4-(2-(2-(1-(2-((2-(4-(2-(2-(4-((7-((3-辛基十一烷基)氧基)-7-氧代庚酰基)氧基)苯基)乙酰氧基)乙基)哌啶-1-基)乙基)二硫烷基)乙基)哌啶-4-基)乙氧基)-2-氧代乙基)苯基)壬二酸酯

[0159] 在另一方面,本文所考虑的是式(Ia)、(Ib)或(Ic)的脂质:



[0161] 或其药学上可接受的盐,其中 R^q 和 R^z 各自独立地为脂肪族基团(包括烷基、烯基、炔基、环烷基、杂环基)或芳基,其中剩余变量如上述任一化学实施方式所述。在一个实施方式中, R^q 和 R^z 各自独立地为氢或 C_1 - C_6 烷基,其中剩余变量如上述任一化学实施方式所述。所公开的LNP、组合物、使用方法等也适用于式(Ia)、(Ib)或(Ic)的脂质。式(Ia)、(Ib)或(Ic)的脂质,例如,可以通过在乙腈(CH_3CN)和氯仿($CHCl_3$)中用氯甲烷(CH_3Cl)处理来制备式(I)的脂质。

[0162] 此外,式(II)或(III)的脂质或本文公开的任何示例性脂质,可以通过在乙腈(CH_3CN)和氯仿($CHCl_3$)中用氯甲烷(CH_3Cl)处理而转化为相应的四价脂质(均在本公开中考虑),例如,式(I)的脂质。

[0163] 脂质纳米颗粒(LNP)或其药物组合物,包括本文所述的可电离脂质和无衣壳的非病毒载体(例如,ceDNA),可以用于将无衣壳、非病毒DNA载体递送至感兴趣的靶位点(例如,细胞、组织、器官等)。

[0164] 在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,制备脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)制剂并负载有TNA。在一个实施方式中,制备脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)制剂并用通过如2018年9月7日提交的国际申请PCT/US2018/050042中公开的方法获得的ceDNA负载,所述申请通过引用整体并入本文。这可以通过在低pH下将乙醇脂质与诸如ceDNA水性TNA高能混合,使脂质质子化并为ceDNA/脂质缔合和颗粒成核提供有利的能量来实现。通过水稀释和去除有机溶剂可以进一步稳定颗粒。能够将颗粒浓缩至所需水平。

[0165] 通常,脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)以约10:1至60:1的总脂质与核酸(质量或重量)比率制备。在本文的任何方面和实施方式中的一些实施方式中,脂质与核酸的比率(质量/质量比;重量/重量比)的范围可以是约1:1至约60:1、约1:1至约55:1、约1:1至约50:1、约1:1至约45:1、约1:1至约40:1、约1:1至约35:1、约1:1至约30:1、约1:1至约25:1、约10:1至约14:1、约3:1至约15:1、约4:1至约10:1、约5:1至约9:1、约6:1至约9:1、约30:1至约60:1。根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式,所述脂质颗粒(例如,脂质纳米颗

粒)以约60:1的核酸(质量或重量)与总脂质的比率制备。根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式,所述脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)以约30:1的核酸(质量或重量)与总脂质的比率制备。能够调节脂质和核酸的量以提供所需的N/P比率,例如N/P比率为3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或更高。通常,脂质颗粒制剂的总脂质含量能够在约5mg/mL至约30mg/mL的范围内。

[0166] 在本文的任何方面和实施方式中的一些实施方式中,所述脂质纳米颗粒包括用于缩合和/或包封核酸货物(例如,ceDNA)的试剂。这种试剂在本文中也称为缩合剂或包封剂。没有限制,可以使用本领域已知的用于缩合和/或包封核酸的任何化合物,只要它是非融合的。换言之,能够缩合和/或包封核酸货物(例如,ceDNA)的试剂,但几乎没有或没有融合活性。不希望受理论束缚,缩合剂在不缩合/包封核酸(例如,ceDNA)时可能具有一些融合活性,但是用所述缩合剂形成的包封核酸的脂质纳米颗粒可以是非融合的。

[0167] 通常,可电离脂质或阳离子脂质通常用于在低pH下缩合核酸货物(例如,ceDNA)并驱动膜缔合和融合。通常,阳离子脂质是包含至少一个氨基的脂质,所述氨基在酸性条件下(例如在pH 6.5或更低的条件下)带正电或质子化。阳离子脂质还可以是可电离脂质,例如,可电离的阳离子脂质。“非融合的可电离脂质”是指可以缩合和/或包封核酸货物(例如,ceDNA),但没有或很少有融合活性的可电离脂质。

[0168] 在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,可电离脂质可以占存在于脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)中的总脂质的20-90% (mol)。例如,可电离脂质摩尔含量可以是存在于所述脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)中总脂质的20-70% (mol)、30-60% (mol)、40-60% (mol)、40-55% (mol)或45-55% (mol)。在本文的任何方面和实施方式中的一些实施方式中,可电离脂质占存在于脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)中总脂质的约50mol%至约90mol%。

[0169] 在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)可以进一步包括非阳离子脂质。所述非阳离子脂质可以用于增强融合性并且还可以增强LNP在形成过程中的稳定性。非阳离子脂质包括两亲性脂质、中性脂质和阴离子脂质。因此,非阳离子脂质可以是中性不带电的、两性离子或阴离子脂质。非阳离子脂质通常用于增强融合性。

[0170] 示例性的非阳离子脂质包括但不限于二硬脂酰基-sn-甘油-磷酸乙醇胺、二硬脂酰基磷脂酰胆碱(DSPC)、二油酰基磷脂酰胆碱(DOPC)、二棕榈酰基磷脂酰胆碱(DPPC)、二油酰基磷脂酰甘油(DOPG)、二棕榈酰基磷脂酰甘油(DPPG)、二油酰基-磷脂酰乙醇胺(DOPE)、棕榈酰基油酰基磷脂酰胆碱(POPC)、棕榈酰基油酰基磷脂酰乙醇胺(POPE)、二油酰基-磷脂酰乙醇胺4-(N-马来酰亚胺甲基)-环己烷-1-羧酸酯(DOPE-mal)、二棕榈酰基磷脂酰乙醇胺(DPPE)、二肉豆蔻酰基磷脂酰乙醇胺(DMPE)、二硬脂酰基-磷脂酰-乙醇胺(DSPE)、单甲基-磷脂酰乙醇胺(例如16-0-单甲基PE)、二甲基-磷脂酰乙醇胺(例如16-0-二甲基PE)、18-1-反式PE、1-硬脂酰基-2-油酰基-磷脂酰乙醇胺(SOPE)、氢化大豆磷脂酰胆碱(HSPC)、卵磷脂酰胆碱(EPC)、二油酰基磷脂酰丝氨酸(DOPS)、鞘磷脂(SM)、二肉豆蔻酰基磷脂酰胆碱(DMPC)、二肉豆蔻酰基磷脂酰甘油(DMPG)、二硬脂酰基磷脂酰甘油(DSPG)、二芥子酰基磷脂酰胆碱(DEPC)、棕榈酰基油酰基磷脂酰甘油(POPG)、二反式油酰基-磷脂酰乙醇胺(DEPE)、1,2-二月桂酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DLPE)、1,2-二植烷酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺

(DPHyPE)、卵磷脂、磷脂酰乙醇胺、溶血卵磷脂、溶血磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、鞘磷脂、卵鞘磷脂(ESM)、脑磷脂、心磷脂、磷脂酸、脑苷、磷酸二鲸蜡酯、溶血磷脂酰胆碱、二亚油酰基磷脂酰胆碱或它们的混合物。应当理解,也可以使用其他二酰基磷脂酰胆碱和二酰基磷脂酰乙醇胺磷脂。这些脂质中的酰基优选为衍生自具有 C_{10} - C_{24} 碳链的脂肪酸的酰基,例如月桂酰基、肉豆蔻酰基、棕榈酰基、硬脂酰基或油酰基。

[0171] 适用于脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)的非阳离子脂质的其他实施例包括非磷脂质,例如,硬脂胺、十二烷基胺、十六烷基胺、乙酰基棕榈酸酯、甘油蓖麻酸酯、硬脂酸十六烷基酯、肉豆蔻酸异丙酯、两性丙烯酸聚合物、三乙醇胺-月桂基硫酸酯、烷基-芳基硫酸酯聚乙氧基化脂肪酸酰胺、双十八烷基二甲基溴化铵、神经酰胺、鞘磷脂等。

[0172] 在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,非阳离子脂质是磷脂。在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,非阳离子脂质选自自由以下组成的组:DSPC、DPPC、DMPC、DOPC、POPC、DOPE和SM。在本文的任何方面和实施方式中的一些实施方式中,非阳离子脂质是DSPC。在其他实施方式中,非阳离子脂质是DOPC。在其他实施方式中,非阳离子脂质是DOPE。

[0173] 在本文的任何方面和实施方式中的一些实施方式中,非阳离子脂质可以占脂质纳米颗粒中存在的总脂质的0至约20% (mol)。在本文的任何方面和实施方式中的一些实施方式中,非阳离子脂质含量为存在于脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)中总脂质的0.5-15% (mol)。在本文的任何方面和实施方式中的一些实施方式中,非阳离子脂质含量为存在于脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)中总脂质的5-12% (mol)。在本文的任何方面和实施方式中的一些实施方式中,非阳离子脂质含量为存在于脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)中总脂质的5-10% (mol)。在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,非阳离子脂质含量为存在于脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)中总脂质的约6% (mol)。在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,非阳离子脂质含量为存在于脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)中总脂质的约7.0% (mol)。在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,非阳离子脂质含量为存在于脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)中总脂质的约7.5% (mol)。在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,非阳离子脂质含量为存在于脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)中总脂质的约8.0% (mol)。在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,非阳离子脂质含量为存在于脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)中总脂质的约9.0% (mol)。在本文的任何方面和实施方式中的一些实施方式中,非阳离子脂质含量为存在于脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)中总脂质的约10% (mol)。在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,非阳离子脂质含量为存在于脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)中总脂质的约11% (mol)。

[0174] 示例性非阳离子脂质在PCT公开案W02017/099823和美国专利公开案US2018/0028664中描述,所述公开案的内容以全文引用的方式并入本文中。

[0175] 在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)可以进一步包含一种组分,例如甾醇,以提供脂质颗粒的膜完整性且稳定性。在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,可用于所述脂质颗粒的示例性甾醇是胆固醇或其衍生物。非限制性胆固醇衍生物的实施例包括:极性类似物,如5 α -胆甾烷醇、5 β -粪醇、胆固醇基-(2'-羟基)-乙基醚、胆固醇基-(4'-羟基)-丁基醚和6-酮胆甾烷醇;非极性类似物,如5 α -胆甾烷、胆甾烯酮、5 α -胆甾酮、5 β -胆甾酮和胆固醇癸酸酯;以及其混合物。在本文的任

何方面和实施方式中的一些实施方式中,所述胆固醇衍生物是极性类似物,如胆固醇基-(4'-羟基)-丁基醚。在本文的任何方面和实施方式中的一些实施方式中,胆固醇衍生物是半琥珀酸胆甾醇酯(CHEMS)。

[0176] 示例性胆固醇衍生物描述于PCT公开案W02009/127060和美国专利公开案US2010/0130588中,所述公开案的内容以全文引用的方式并入本文中。

[0177] 在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,提供膜完整性的组分,例如甾醇,可以占存在于脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)中总脂质的0-50% (mol)。在本文的任何方面和实施方式中的一些实施方式中,此类组分是脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)总脂质含量的20-50% (mol)。在本文的任何方面和实施方式中的一些实施方式中,此类组分是脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)总脂质含量的30-40% (mol)。在本文的任何方面和实施方式中的一些实施方式中,此类组分是脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)总脂质含量的35-45% (mol)。在本文的任何方面和实施方式中的一些实施方式中,此类组分是脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)总脂质含量的38-42% (mol)。

[0178] 在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)进一步可包含聚乙二醇(PEG)或缀合的脂质分子。通常,这些物质用于抑制脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)的聚集和/或使得空间稳定。示例性的缀合脂质包括但不限于PEG-脂质缀合物、聚噁唑啉(POZ)-脂质缀合物、聚酰胺-脂质缀合物(如ATTA-脂质缀合物)、阳离子聚合物脂质(CPL)缀合物以及其混合物。在本文的任何方面和实施方式中的一些实施方式中,缀合的脂质分子是PEG-脂质缀合物,例如,(甲氧基聚乙二醇)-缀合的脂质。在一些其他实施方式中,缀合的脂质分子是PEG-脂质缀合物,例如PEG₂₀₀₀-DMG(二肉豆蔻酰基甘油)。

[0179] 示例性PEG-脂质缀合物包括(但不限于):PEG-二酰基甘油(DAG)(如1-(单甲氧基-聚乙二醇)-2,3-二肉豆蔻酰甘油(PEG-DMG))、PEG-二烷氧基丙基(DAA)、PEG-磷脂、PEG-神经酰胺(Cer)、聚乙二醇化磷脂酰乙醇胺(PEG-PE)、PEG丁二酸酯二酰基甘油(PEGS-DAG)(如4-0-(2',3'-二(十四烷酰氧基)丙基-1-0-(w-甲氧基(聚乙氧基)乙基)丁二酸酯(PEG-S-DMG))、PEG二烷氧基丙基氨基甲酸酯、N-(羰基-甲氧基聚乙二醇2000)-1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺钠盐,或它们的混合物。另外的示例性PEG-脂质缀合物描述于例如US5,885,613、US6,287,591、US2003/0077829、US2003/0077829、US2005/0175682、US2008/0020058、US2011/0117125、US2010/0130588、US2016/0376224和US2017/0119904中,所有这些文献的内容以全文引用的方式并入本文中。

[0180] 在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,所述PEG-DAA缀合物可以是例如PEG-二月桂酰氧基丙基、PEG-二肉豆蔻酰氧基丙基、PEG-二棕榈酰氧基丙基或PEG-二硬脂酰基氧基丙基。PEG-脂质可以是以下中的一种或更多种:PEG-DMG、PEG-二月桂基甘油、PEG-二棕榈酰基甘油、PEG-二硬脂基甘油、PEG-二月桂基甘油酰胺、PEG-二肉豆蔻基甘油酰胺、PEG-二棕榈酰基甘油酰胺、PEG-二硬脂基甘油酰胺、PEG-胆固醇(1-[8'-(胆甾-5-烯-3[β]-氧基)甲酰胺基-3',6'-二氧杂辛基]氮甲酰基-[ω]-甲基-聚(乙二醇)、PEG-DMB(3,4-二(十四烷氧基)苯甲基-[ω]-甲基-聚(乙二醇)醚),以及1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000]。在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,PEG-脂质可以选自由以下组成的组:PEG-DMG、1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000]。

[0181] 在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,还能够使用与除PEG之外的分子缀合的脂质替代PEG-脂质。举例来说,代替PEG-脂质或除PEG-脂质以外,还可以使用聚噁唑啉(POZ)-脂质缀合物、聚酰胺-脂质缀合物(如ATTA-脂质缀合物)和阳离子聚合物脂质(CPL)缀合物。在以下中描述了示例性缀合的脂质,即PEG-脂质、(POZ)-脂质偶联物、ATTA-脂质偶联物和阳离子聚合物-脂质:PCT专利申请公开案W01996/010392、W01998/051278、W02002/087541、W02005/026372、W02008/147438、W02009/086558、W02012/000104、W02017/117528、W02017/099823、W02015/199952、W02017/004143、W02015/095346、W02012/000104、W02012/000104和W02010/006282;美国专利申请公开案US2003/0077829、US2005/0175682、US2008/0020058、US2011/0117125、US2013/0303587、US2018/0028664、US2015/0376115、US2016/0376224、US2016/0317458、US2013/0303587、US2013/0303587和US20110123453;以及美国专利US5,885,613、US6,287,591、US6,320,017和US6,586,559,所有文献的内容以全文引用的方式并入本文中。

[0182] 在本文的任何方面和实施方式中的一些实施方式中,PEG-脂质缀合物在脂质纳米颗粒中以约0%至约20%的摩尔比存在。在本文的任何方面和实施方式中的一些实施方式中,脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)中PEG-脂质缀合物的含量为0.5-10%(mol)。在本文的任何方面和实施方式中的一些实施方式中,脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)中PEG-脂质缀合物的含量为1-5%(mol)。在本文的任何方面和实施方式中的一些实施方式中,脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)中PEG-脂质缀合物的含量为1-3%(mol)。在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,PEG-脂质缀合物含量为存在于脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)中的总脂质的约1.5%(mol)。在本文的任何方面和实施方式中的一些实施方式中,脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)中PEG-脂质缀合物的含量为约2%(mol)。在本文的任何方面和实施方式中的一些实施方式中,脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)中PEG-脂质缀合物的含量为约2.5%(mol)。在本文的任何方面和实施方式中的一些实施方式中,PEG-脂质缀合物含量为存在于脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)中的总脂质的约3%(mol)。在本文的任何方面和实施方式中的一些实施方式中,脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)中PEG-脂质缀合物的含量为约3%(mol)。在本文的任何方面和实施方式中的一些实施方式中,脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)中PEG-脂质缀合物的含量为约3.5%(mol)。

[0183] 在本文的任何方面和实施方式的一些实施方式中,缀合脂质,例如PEG-脂质缀合物或PEG-聚乙二醇化的脂质,以大于脂质纳米颗粒中总脂质的约2.0%的摩尔百分比存在,例如,约2.1%,或2.2%,或2.3%,或2.4%,或约2.5%至约10%;或约2.1%、或2.2%、或2.3%、或2.4%、或约2.5%至约7.5%;约2.1%、或2.2%、或2.3%、或2.4%、或约2.5%至约5%;约3%至约5%;约3%至约4.5%;约3%至约4%;约3.5%至约5%;约3.5%至约4.5%、约2.5%至约4%;约2.5%至约3.5%,或约2.5%至约3%。

[0184] 应当理解,所公开的可电离脂质与非阳离子脂质、甾醇和PEG-缀合脂质的摩尔比可以根据需要变化。例如,脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)可以包括按摩尔或按组合物总重量计30-70%的脂质、按摩尔或按组合物总重量计0-60%的胆固醇、按摩尔或按组合物总重量计0-30%的非阳离子脂质以及按摩尔或按组合物总重量计1-10%的PEG-缀合脂质。在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,组合物包括按摩尔或按组合物的总重量计40-60%的可电离脂质、按摩尔或按组合物的总重量计30-50%的胆固醇和按摩尔或按组合

物的总重量计5-15%的非阳离子脂质和按摩尔或按组合物的总重量计1-5%的PEG-缀合脂质。在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,组合物是按摩尔或按组合物的总重量计40-60%的可电离脂质、按摩尔或按组合物的总重量计30-40%的胆固醇和按摩尔或按组合物的总重量计5-10%的非阳离子脂质和按摩尔或按组合物的总重量计1-5%的PEG-缀合脂质。组合物包括按摩尔或按组合物的总重量计60-70%的可电离脂质、按摩尔或按组合物的总重量计25-35%的胆固醇和按摩尔或按组合物的总重量计5-10%的非阳离子脂质和按摩尔或按组合物的总重量计0-5%的PEG-缀合脂质。组合物包括按摩尔或按组合物的总重量计至多45-55%的可电离脂质、按摩尔或按组合物的总重量计35-45%的胆固醇和按摩尔或按组合物的总重量计2-15%的非阳离子脂质和按摩尔或按组合物的总重量计1-5%的PEG-缀合脂质。制剂还可以是脂质纳米颗粒制剂,例如包含按摩尔或按组合物的总重量计8-30%的可电离脂质、按摩尔或按组合物的总重量计5-15%的非阳离子脂质和按摩尔或按组合物的总重量计0-40%的胆固醇;按摩尔或按组合物的总重量计4-25%的可电离脂质、按摩尔或按组合物的总重量计4-25%的非阳离子脂质、按摩尔或按组合物的总重量计2-25%的胆固醇、按摩尔或按组合物的总重量计10-35%的缀合脂质和按摩尔或按组合物的总重量计5%的胆固醇;或按摩尔或按组合物的总重量计2-30%的可电离脂质、按摩尔或按组合物的总重量计2-30%的非阳离子脂质、按摩尔或按组合物的总重量计1-15%的胆固醇、按摩尔或按组合物的总重量计2-35%的PEG-缀合脂质和按摩尔或按组合物的总重量计1-20%的胆固醇;或按摩尔或按组合物的总重量计甚至高达90%的可电离脂质和按摩尔或按组合物的总重量计2-10%的非阳离子脂质,或按摩尔或按组合物的总重量计甚至100%的可电离脂质。在本文的任何方面和实施方式中的一些实施方式中,脂质颗粒制剂包括摩尔比约为50:10:38.5:1.5的可电离脂质、非阳离子磷脂、胆固醇和PEG化脂质(缀合脂质)。在本文的任何方面和实施方式中的一些实施方式中,脂质颗粒制剂包括摩尔比约为50:10:38:2的可电离脂质、非阳离子磷脂、胆固醇和PEG化脂质(缀合脂质)。在本文的任何方面和实施方式中的一些实施方式中,脂质颗粒制剂包括摩尔比约为50:10:37:3的可电离脂质、非阳离子磷脂、胆固醇和PEG化脂质(缀合脂质)。在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)制剂包括摩尔比约为50:7:40:3的可电离脂质、非阳离子磷脂、胆固醇和PEG化脂质(缀合脂质)。在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)制剂包括摩尔比约为50:8:40:2的可电离脂质、非阳离子磷脂、胆固醇和PEG化脂质(缀合脂质)。在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)制剂包括摩尔比约为50:9:39:2的可电离脂质、非阳离子磷脂、胆固醇和PEG化脂质(缀合脂质)。在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)制剂包括摩尔比约为50:9:38:3的可电离脂质、非阳离子磷脂、胆固醇和PEG化脂质(缀合脂质)。

[0185] 在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)包括可电离脂质、非阳离子脂质(例如,磷脂)、甾醇(例如,胆固醇)和PEG化脂质(缀合脂质),其中可电离脂质的脂质摩尔比在20到70%摩尔范围内,其目标为30-60,非阳离子脂质的摩尔百分比在0到30范围内,其目标为0到15,甾醇的摩尔百分比在20到70范围内,其目标为30到50,并且PEG化脂质(缀合脂质)的摩尔百分比在1到6范围内,其目标为2到5。

[0186] 包含ceDNA的脂质纳米颗粒(LNP)在2018年9月7日提交的国际申请PCT/US2018/

050042中公开,其以全文引用的方式并入本文中并设想用于本文所公开的方法和组合物中。

[0187] 可以使用Malvern Zetasizer Nano ZS(英国莫尔文(Malvern,UK))通过准弹性光散射来测定脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)的粒径,其直径约为50-150nm,直径约为55-95nm,或直径约为70-90nm。

[0188] 配制的可电离脂质的pKa可能与LNP递送核酸的有效性相关(参见Jayaraman et al.,*Angewandte Chemie, International Edition*(2012),51(34),8529-8533;Semple et al.,*Nature Biotechnology* 28,172-176(2010),两个文献的内容都以全文引用的方式并入本文中)。在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,使用基于2-(对甲苯胺基)-6-萘磺酸(TNS)荧光的分析测定脂质纳米颗粒中每种可电离脂质的pKa。可以使用如本文和别处所描述的在线生产来制备在PBS中0.4mM总脂质的浓度的由可电离脂质/DSPC/胆固醇/PEG-脂质(50/10/38.5/1.5mol%)构成的脂质纳米颗粒。TNS可以在蒸馏水中制备成100mM的储备溶液。可以在2mL缓冲溶液中将囊泡稀释到24mM脂质,所述缓冲液含有10mM HEPES、10mM MES、10mM醋酸铵、130mM的NaCl,其中pH在2.5到11范围内。可以添加等分试样的TNS溶液,使最终浓度为1mM,并在涡旋混合后,在室温下,使用321nm和445nm的激发和发射波长,在SLM Aminco系列2发光分光光度计中测量荧光强度。可以将S型最佳拟合分析应用于荧光数据,并测量pKa,其为达到半最大荧光强度的pH值。

[0189] 在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,相对活性可以通过在经由尾静脉注射施用后4小时测量肝脏中的荧光素酶表达来确定。在0.3和1.0mg ceDNA/kg的剂量下比较活性,并以施用后4小时测得的ng荧光素酶/g肝脏表示。

[0190] 不受限制地,本公开的脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)包括可以用于递送无衣壳非病毒的DNA载体到所关注的靶位点(例如,细胞、组织、器官等)的脂质制剂。通常,脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)包括无衣壳非病毒的DNA载体和可电离脂质或其盐。

[0191] 在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)包括摩尔比为50:10:38.5:1.5的可电离脂质/非阳离子脂质/甾醇/缀合脂质。

[0192] 在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,本公开提供了一种包含磷脂、卵磷脂、磷脂酰胆碱和磷脂酰乙醇胺的脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)制剂。

[0193] III. 治疗性核酸(TNA)

[0194] 本公开提供了一种用于递送治疗性核酸(TNA)的基于脂质的平台。基于RNA的治疗剂的非限制性实施例包含mRNA、反义RNA和寡核苷酸、核酶、适体、干扰RNA(RNAi)、切丁酶-底物dsRNA、小发夹RNA(shRNA)、不对称干扰RNA(aiRNA)、微RNA(miRNA)。基于DNA的治疗剂的非限制性实例包括小环DNA、小基因、病毒DNA(例如,慢病毒或AAV基因组)或非病毒合成DNA载体、封闭端的线性双链体DNA(ceDNA/CELiD)、质粒、杆粒、doggybone™DNA载体、最低免疫学定义的基因表达(MIDGE)-载体、非病毒辅助DNA载体(线性-共价封闭的DNA载体)或哑铃形DNA最小载体(“哑铃DNA”)。因此,本公开的方面一般提供包含TNA的可电离脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)。

[0195] 治疗性核酸

[0196] 本公开的说明性治疗性核酸可以包括(但不限于):小基因、质粒、小环、小干扰RNA(siRNA)、微RNA(miRNA)、反义寡核苷酸(ASO)、核酶、封闭端的双链DNA(例如,ceDNA、CELiD、

线性共价封闭DNA (“辅助”)、doggyboneTM、前端粒封闭端DNA或哑铃状线性DNA)、切丁酶-底物RNA、小发夹RNA (shRNA)、不对称干扰RNA (aiRNA)、微RNA (miRNA)、mRNA、tRNA、rRNA和DNA病毒载体、病毒RNA载体以及其任何组合。

[0197] 本发明还预期可以通过称作RNA干扰 (RNAi) 的过程下调特定蛋白质的细胞内水平的siRNA或miRNA为核酸治疗剂。在将siRNA或miRNA引入宿主细胞的胞质中之后,这些双链RNA构建体可以结合到称为RISC的蛋白质。siRNA或miRNA的正义链通过RISC复合物去除。RISC复合物当与互补mRNA组合时,切割mRNA并且释放切割的链。RNAi是通过诱导mRNA的特异性破坏而导致相应蛋白质的下调。

[0198] 抑制mRNA翻译到蛋白质中的反义寡核苷酸 (ASO) 和核酶可以是核酸治疗剂。对于反义构建体,这些单链脱氧核酸具有与靶蛋白mRNA序列互补的序列,并且能够通过沃森-克里克 (Watson-Crick) 碱基配对与mRNA结合。这一结合阻止目标mRNA的翻译,和/或触发mRNA转录物的RNaseH降解。因此,反义寡核苷酸具有增加的作用特异性 (即,特定疾病相关蛋白的下调)。

[0199] 在本文所提供的任何方法和组合物中,治疗性核酸 (TNA) 可以是治疗性RNA。所述治疗性RNA可以是mRNA翻译的抑制剂、RNA干扰的药剂 (RNAi)、催化活性RNA分子 (核酶)、转移RNA (tRNA) 或结合mRNA转录物 (ASO) 的RNA、蛋白质或其它分子配体 (适体)。在本文提供的任何方法中,RNAi的药剂可以是双链RNA、单链RNA、微RNA、短干扰RNA、短发夹RNA或三链体形成寡核苷酸。

[0200] 在本文提供的任何方法组合物中,治疗性核酸 (TNA) 可以是治疗性DNA,例如封闭端双链DNA (例如,ceDNA、CELiD、线性共价封闭DNA (“ministring”)、doggyboneTM、前端粒封闭端DNA、哑铃状线性DNA、质粒、小环等)。本公开的一些实施方式基于包含可表达转基因 (例如,治疗性核酸) 的封闭端的线性双链体 (ceDNA) 的方法和组合物。如本文所描述的ceDNA载体不存在由病毒衣壳内的有限空间所强加的封装局限。ceDNA载体是活的真核生物产生的,其代表着原核生物产生的质粒DNA载体的替代方案。

[0201] ceDNA载体优选地具有线性和连续结构而不是非连续结构。相信线性和连续结构在受到细胞核酸内切酶攻击时更稳定,并且不太可能重组并引起诱变。因此,线性和连续结构的ceDNA载体是优选的实施方式。连续、线性、单链的分子内双链体ceDNA载体可以具有共价结合的末端,而不具有编码AAV衣壳蛋白的序列。这些ceDNA载体在结构上不同于质粒 (包含本文所描述的ceDNA质粒),所述质粒是细菌来源的环状双链体核酸分子。质粒的互补链在变性后可以分离,从而产生两个核酸分子,而相比之下,ceDNA载体虽具有互补链,却是单个DNA分子,并且因此即使变性,也仍保持是单个分子。在本文的任何方面和实施方式中的一些实施方式中,与质粒不同,ceDNA载体的产生可以没有原核类型的DNA碱基甲基化。因此,在结构方面 (特别是线性对比环形) 以及还根据用于产生和提纯这些不同物体的方法方面,以及还根据它们的DNA甲基化方面,即ceDNA-质粒属于原核类型而ceDNA载体属于真核类型,ceDNA载体和ceDNA质粒是不同的。

[0202] 本文提供了具有共价封闭端的非病毒无衣壳的ceDNA分子 (ceDNA)。这些非病毒无衣壳的ceDNA分子可以在许可宿主细胞中由含有定位在两个不同的反向末端重复 (ITR) 序列之间的异源基因 (例如,转基因,尤其是治疗性转基因) 的表达构建体 (例如,ceDNA质粒、ceDNA-杆粒、ceDNA-杆状病毒或整合细胞系) 产生,其中所述ITR彼此不同。在本文的任何方

面和实施方式中的一些实施方式中,与野生型ITR序列(例如,AAV ITR)相比,ITR之一通过缺失、插入和/或取代而被修饰;并且ITR中的至少一个包括功能性末端解链位点(TRS)和Rep结合位点。ceDNA载体优选地是双链体,例如,相对于分子的至少一部分是自互补的,例如表达盒(例如,ceDNA不是双链环状分子)。ceDNA载体具有共价封闭端,并且因此抵抗核酸外切酶消化(例如,核酸外切酶I或核酸外切酶III),例如在37°C下维持超过一小时。

[0203] 在本文的任何方面或实施方式的一个方面中,ceDNA载体在5'到3'方向上包括:第一腺相关病毒(AAV)反向末端重复序列(ITR)、所关注的核苷酸序列(例如如本文所描述的表达盒)和第二AAV ITR。在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,第一ITR(5' ITR)和第二ITR(3' ITR)相对于彼此不对称,也就是说,其彼此具有不同的3D空间构型。作为示例性实施方式,第一ITR可以是野生型ITR,并且第二ITR可以是突变或修饰ITR,或反过来,其中第一ITR可以是突变或修饰ITR,第二ITR可以是野生型ITR。在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,第一ITR和第二ITR都经修饰但为不同的序列,或具有不同的修饰,或不是相同的经修饰的ITR并且具有不同的3D空间构型。换句话说,具有不对称ITR的ceDNA载体具有如下ITR:其中一个ITR相对于WT-ITR的任何变化均未反映于另一个ITR中;或可替代地,其中不对称ITR具有经修饰的不对称ITR对,可以具有相对于彼此不同的序列和不同的三维形状。

[0204] 在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,ceDNA载体按照5'到3'方向包括:第一腺相关病毒(AAV)反向末端重复序列(ITR)、所关注的核苷酸序列(例如如本文所述的表达盒)和第二AAV ITR,其中第一ITR(5' ITR)和第二ITR(3' ITR)相对于彼此是对称的或基本对称的,也就是说,ceDNA载体能够包括具有对称三维空间组构的ITR序列,使得其结构在几何空间中具有相同形状,或在3D空间中具有相同的A-C-C'和B-B'环。在这样的实施方式中,对称的ITR对或基本上对称的ITR对可以是修饰的ITR(例如,mod-ITR),它不是野生型ITR。一个mod-ITR对可以具有相同的相对于野生型ITR具有一个或多个修饰的序列,并且彼此反向互补(反向)。在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,经修饰的ITR对如本文所定义是大体上对称的,也就是说,经修饰的ITR对可以具有不同的序列,但具有对应或相同的对称三维形状。在本文的任何方面和实施方式中的一些实施方式中,对称的ITR或基本上对称的ITR可以是如本文所述的野生型(WT-ITR)。也就是说,两个ITR都具有野生型序列,但不一定必须是来自同一AAV血清型的WT-ITR。在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,一个WT-ITR可以来自一种AAV血清型,而另一个WT-ITR可以来自不同的AAV血清型。在这样的实施方式中,WT-ITR对如本文所定义是基本上对称的,即,它们可以具有一个或多个保守核苷酸修饰,同时仍然保留对称的三维空间组构。

[0205] 本文提供的野生型或突变的或以其它方式修饰的ITR序列代表了用于产生ceDNA载体的表达构建体(例如,ceDNA-质粒、ceDNA-杆粒、ceDNA-杆状病毒)中包括的DNA序列。因此,从ceDNA-质粒或其它表达构建体产生的ceDNA载体中实际含有的ITR序列与由于在产生过程期间发生天然发生的变化(例如,复制误差)而产生的本文中提供的ITR序列可能相同或可能不同。

[0206] 在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,本文所述的包含具有作为治疗性核酸序列的转基因的表达盒ceDNA载体可以可操作地连接到允许或控制转基因的表达的一或多个调控序列。在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,多核苷酸包括第一

ITR序列和第二ITR序列,其中所关注核苷酸序列侧接第一和第二ITR序列,并且第一和第二ITR序列彼此不对称,或彼此对称。

[0207] 在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,表达盒位于两个ITR之间,所述ITR按以下次序包含以下中的一个或多个:可操作地连接到转基因的启动子、转录后调控元件以及多聚腺苷酸化和终止信号。在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,启动子是可调控的-可诱导的或可抑制的。启动子可以是促进转基因转录的任何序列。在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,启动子是CAG启动子或其变体。转录后调控元件是调节转基因表达的序列,作为非限制性实例,是产生增强作为治疗性核酸序列的转基因的表达的三级结构的任何序列。

[0208] 在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,转录后调控元件包括WPRE。在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,多聚腺苷酸化和终止信号包括BGHpolyA。可以另外使用本领域已知的任何顺式调控元件或其组合,例如SV40晚期多聚腺苷酸化信号上游增强子序列(USE)或其它转录后加工元件,包括但不限于单纯疱疹病毒或乙型肝炎病毒(HBV)的胸苷激酶基因。在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,表达盒在5'到3'方向上的长度大于已知在AAV病毒粒子中被衣壳化的最大长度。在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,长度大于4.6kb、或大于5kb、或大于6kb、或大于7kb。本文中举例说明了各种表达盒。

[0209] 在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,所述表达盒能够包含超过4000个核苷酸、5000个核苷酸、10,000个核苷酸或20,000个核苷酸,或30,000个核苷酸,或40,000个核苷酸,或50,000个核苷酸,或在约4000-10,000个核苷酸或10,000-50,000个核苷酸之间的任何范围,或超过50,000个核苷酸。

[0210] 在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,表达盒还可包含内部核糖体进入位点(IRES)和/或2A元件。顺式调控元件包括(但不限于):启动子、核糖开关、隔离子、mir可调控元件、转录后调控元件、组织和细胞类型特异性启动子以及增强子。在本文的任何方面和实施方式中的一些实施方式中,ITR可以充当转基因的启动子。在本文的任何方面和实施方式中的一些实施方式中,所述ceDNA载体包含其它组分来调控转基因的表达,例如调控开关,用于控制和调控转基因的表达,并且如果需要,可以包括作为杀灭开关的调控开关,从而能够使包含ceDNA载体的细胞实现可控的细胞死亡。

[0211] 在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,ceDNA载体无衣壳,并且可以由依次对第一ITR、可表达的转基因盒和第二ITR进行编码的质粒获得,其中第一和/或第二ITR序列中的至少一个相对于对应的野生型AAV2 ITR序列突变。

[0212] 在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,本文所公开的ceDNA载体用于治疗目的(例如,用于医学、诊断或兽医学用途)或免疫原性多肽。

[0213] 表达盒可以包含作为治疗性核酸序列的任何转基因。在某些实施方式中,ceDNA载体包括受试者所关注的任何基因,包括一种或更多种多肽、肽、核酶、肽核酸、siRNA、RNAi、反义寡核苷酸、反义多核苷酸、抗体、抗原结合片段、或其任何组合。

[0214] 在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,本文所述的ceDNA载体的表达盒、表达构建体或供体序列中提供的序列可以针对宿主细胞进行密码子优化。如本文所用,术语“进行密码子优化”或“密码子优化”是指修饰核酸序列以增强目标脊椎动物(例如,小

鼠或人)细胞中表达的过程,通过用在该脊椎动物的基因中更频繁或最频繁使用的密码子替换天然序列(例如,原核序列)的至少一个、多于一个或大量数量的密码子。各种物种对特定氨基酸的某些密码子表现出特定的偏好。

[0215] 通常,密码子优化不会改变原始翻译蛋白质的氨基酸序列。能够使用例如Aptagen的Gene Forge®密码子优化和定制基因合成平台(Aptagen公司,2190Fox Mill Rd.Suite 300,Herndon,Va.20171)或其它公共数据库确定优化密码子。

[0216] 许多生物体偏向于使用特定密码子编码以便特定氨基酸插入生长的肽链中。密码子偏好或密码子偏向(密码子使用在生物体之间的差异)是由遗传密码的简并性提供的,并且在许多生物体中都有据可查。密码子偏向通常与信使RNA(mRNA)的翻译效率相关,而信使RNA的翻译效率又被认为除其他外取决于被翻译密码子的特性和特定转移RNA(tRNA)分子的可用性。所选tRNA在细胞中的优势大体上反映了在肽合成中最常使用的密码子。因此,能够基于密码子优化来定制基因以使指定生物体中的基因表达最优。

[0217] 考虑到可用于多种动物、植物和微生物物种的基因序列数量庞大,因此能计算出密码子使用的相对频率(Nakamura,Y.等人,《来自国际DNA序列数据库的密码子使用表:2000年状况(Codon usage tabulated from the international DNA sequence databases:status for the year 2000)》《核酸研究(Nucl.Acids Res.)》28:292(2000))。

[0218] 反向末端重复序列(ITR)

[0219] 如本文所描述,ceDNA载体为无衣壳的线性双链体DNA分子,其由具有共价封闭端的互补DNA(线性、连续和非衣壳化结构)的连续链形成,其包含不同的或相对于彼此不对称的5'反向末端重复(ITR)序列和3' ITR序列。至少一个ITR包括功能性末端解链位点和复制蛋白结合位点(RPS)(有时称为复制性蛋白结合位点),例如,Rep结合位点。通常,ceDNA载体包含至少一个修饰的AAV反向末端重复序列(ITR),即相对于另一个ITR的缺失、插入和/或取代,以及可表达的转基因。

[0220] 在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,ITR中的至少一个是AAV ITR,例如,野生型AAV ITR。在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,ITR中的至少一个ITR相对于另一个ITR是经修饰的ITR——也就是说,ceDNA包括相对于彼此不对称的ITR。在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,至少一个ITR是非功能性ITR。

[0221] 在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,ceDNA载体包括:(1)表达盒,其包含顺式调控元件、启动子和至少一种转基因;或(2)启动子,其可操作地连接到至少一种转基因;以及(3)侧接所述表达盒的两个自互补序列,例如,ITR,其中ceDNA载体不与衣壳蛋白相关。在本文的任何方面和实施方式中的一些实施方式中,ceDNA载体包括在AAV基因组中发现的两个自互补序列,其中至少一个包括AAV的操作性Rep结合元件(RBE)和末端解链位点(TRS)或RBE的功能性变体,以及与转基因操作性地连接的一个或多个顺式调控元件。在本文的任何方面和实施方式中的一些实施方式中,ceDNA载体包括调控转基因表达的额外组分,例如用于控制和调控转基因的表达的调控开关,并且可以包括调控开关,它是能够使包含ceDNA载体的细胞受控死亡的杀伤开关。

[0222] 在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,两个自互补序列可以是来自任何已知的细小病毒、例如依赖病毒如AAV(例如,AAV1-AAV12)的ITR序列。可以使用任何AAV血清型,包括(但不限于)经修饰的AAV2 ITR序列,其除了允许发夹二级结构形成的可变回

文序列外,还保留了Rep结合位点(RBS),如5'-GCGCGCTCGCTCGCTC-3'和末端解链位点(TRS)。在本文的任何方面和实施方式中的一些实施方式中,ITR可以是合成的。在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,合成ITR是基于来自超过一种AAV血清型的ITR序列。在另一个实施方式中,合成ITR不包括基于AAV的序列。在又一个实施方式中,合成的ITR保留了上述ITR结构,尽管其仅具有一些或不具有源自AAV的序列。在一些方面,合成ITR可以优先与野生型Rep或特定血清型的Rep相互作用,或在一些情况下,将不由野生型Rep识别并且仅由突变的Rep识别。在本文的任何方面和实施方式中的一些实施方式中,ITR为保留功能性Rep结合位点(RBS)的合成ITR序列,所述功能性Rep结合位点如除允许发夹二级结构化成的可变回文序列以外的5'-GCGCGCTCGCTCGCTC-3'和末端解链位点(TRS)。在一些实施例中,经修饰的ITR序列从野生型AAV2 ITR的对应序列中保留RBS、TRS的序列以及Rep结合元件的结构和位置,形成ITR发夹二级结构中的一个的末端环部分。用于所述ceDNA载体的示例性ITR序列公开于表2-9、10A和10B中,SEQ ID NO:2、52、101-449和545-547以及部分ITR序列展示于2018年9月7日提交的PCT申请第PCT/US 18/49996号的图26A-26B中。在本文的任何方面和实施方式中的一些实施方式中,ceDNA载体可以包含ITR,其具有对应于2018年9月7日提交的PCT申请第PCT/US18/49996号的表2、3、4、5、6、7、8、9、10A和10B中的一个或多个中所示的ITR序列或ITR部分序列中的修饰中的任一个的ITR中的修饰。

[0223] 在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,ceDNA载体可以由进一步包括顺式调控元件的特定组合的表达构建体产生。顺式调控元件包括(但不限于):启动子、核糖开关、隔离子、mir可调控元件、转录后调控元件、组织和细胞类型特异性启动子以及增强子。在本文的任何方面和实施方式中的一些实施方式中,ITR可以充当转基因的启动子。在本文的任何方面和实施方式中的一些实施方式中,ceDNA载体包括调控转基因表达的额外组分,例如,如2018年9月7日提交的PCT申请号PCT/US 18/49996中描述的调控开关,用于调控转基因或杀伤开关的表达,该杀伤开关可以杀死包括ceDNA载体的细胞。

[0224] 在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,表达盒还可以包含转录后元件以增强转基因的表达。在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,土拨鼠肝炎病毒(WHP)转录后调控元件(WPRE)用于增强转基因的表达。可以使用其它转录后加工元件,如来自单纯疱疹病毒的胸苷激酶基因或乙型肝炎病毒(HBV)的转录后元件。分泌序列可以连接到转基因,例如,VH-02和VK-A26序列。表达盒可以包括本领域中已知的多聚腺苷酸化序列或其变体,如,从牛BGHpA或病毒SV40pA分离的天然存在的序列,或合成序列。一些表达盒还可以包含SV40晚期多聚腺苷酸化信号上游增强子(USE)序列。USE可以与SV40pA或异源poly-A信号组合使用。

[0225] 2018年9月7日提交的并且以全文引用的方式并入本文中的国际申请第PCT/US2018/050042号的图1A-1C展示非限制性的示例性ceDNA载体或ceDNA质粒的相应序列的示意图。ceDNA载体无衣壳,并且可以从按以下次序编码的质粒获得:第一ITR、可表达的转基因盒和第二ITR,其中第一和/或第二ITR序列中的至少一个相对于相应的野生型AAV2 ITR序列突变。可表达的转基因盒优选依次包含以下中的一个或多个:增强子/启动子、ORF报道子(转基因)、转录后调控元件(例如,WPRE)以及多聚腺苷酸化和终止信号(例如,BGH多聚腺苷酸)。

[0226] 启动子

[0227] 适合的启动子,包含上文所描述的那些启动子,可以来源于病毒并因此可以称为病毒启动子,或其可以来源于任何生物体,包含原核或真核生物体。适合的启动子可以用于通过任何RNA聚合酶(例如,pol I、pol II、pol III)来驱动表达。示例性启动子包含但不限于:SV40早期启动子、小鼠乳腺肿瘤病毒长末端重复(LTR)启动子;腺病毒主要晚期启动子(Ad MLP);单纯疱疹病毒(HSV)启动子;巨细胞病毒(CMV)启动子,如CMV即刻早期启动子区域(CMVTE);劳氏肉瘤病毒(RSV)启动子;人U6小核启动子(U6,例如(Miyagishi等人,《自然生物技术》20,497-500(2002));增强的U6启动子(例如,Xia等人,《核酸研究》2003年9月1日;31(17))、人H1启动子(H1)、CAG启动子、人 α 1-抗胰蛋白酶(HAAT)启动子(例如,等等)。在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,这些启动子在其下游内含子的末端处被改变以包括一个或更多个核酸酶切割位点。在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,含有核酸酶切割位点的DNA与启动子DNA是无关系的。

[0228] 在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,启动子可以包括一个或更多个特异性转录调控序列以进一步增强表达和/或更改其空间表达和/或暂时表达。启动子还可以包括末端增强子或阻遏子元件,其可以位于来自转录起始位点的多达几千个碱基对。启动子可以来源于包含病毒、细菌、真菌、植物、昆虫和动物的来源。启动子可以相对于发生表达的细胞、组织或器官或相对于发生表达的发育阶段,或响应于外部刺激(如生理学压力、病原体、金属离子或诱导剂)组成性或有差异地调控基因组分的表达。启动子的代表性实施例包括噬菌体T7启动子、噬菌体T3启动子、SP6启动子、lac操纵子-启动子、tac启动子、SV40晚期启动子、SV40早期启动子、RSV-LTR启动子、CMV IE启动子、SV40早期启动子或SV40晚期启动子和CMV IE启动子,以及下文所列的启动子。此类启动子和/或增强子可以用于表达任何所关注基因,(例如,治疗性蛋白)。例如,载体可以包括操作性地连接到编码治疗性蛋白的核酸序列的启动子。在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,操作性地连接到编码序列的治疗性蛋白的所述启动子可以是来自猴病毒40(SV40)的启动子、小鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)启动子、人免疫缺陷病毒(HIV)启动子(如牛免疫缺陷病毒(BIV)长末端重复(LTR)启动子)、莫洛尼病毒(Moloney virus)启动子、禽白血病毒(ALV)启动子、巨细胞病毒(CMV)启动子(如CMV即刻早期启动子)、埃-巴二氏病毒(Epstein Barr virus;EBV)启动子或劳氏肉瘤病毒(RSV)启动子。在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,所述启动子还可以是来自人基因的启动子,例如人泛素C(hUbC)、人肌动蛋白、人肌凝蛋白、人血红素、人肌肉肌酸或人金属硫蛋白。所述启动子还可以是组织特异性启动子,例如肝脏特异性启动子,例如人 α -1-抗胰蛋白酶(HAAT)或转甲状腺素(TTR),天然或合成的。在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,使用内源性ApoE、经由存在于肝细胞表面上的低密度脂蛋白(LDL)受体将包括ceDNA载体的组合物特异性靶向肝细胞能够实现向肝脏的递送。

[0229] 在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,所用的启动子是编码治疗蛋白的基因的天然启动子。编码治疗性蛋白的相应基因的启动子和其他调控序列是已知的并且已被表征。所用的启动子区域可以进一步包括一个或更多个额外的调控序列(例如,天然的),例如本领域已知的增强子(例如,Serpin增强子)。

[0230] 根据本发明所使用的适当的启动子的非限制性实施例包括例如HAAT启动子、人EF1- α 启动子或EF1- α 启动子和大鼠EF1- α 启动子的片段的CAG启动子。

[0231] 多聚腺苷酸化序列

[0232] ceDNA载体中可以包括编码多聚腺苷酸化序列的序列,以稳定由ceDNA载体表达的mRNA,并有助于核输出和翻译。在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,ceDNA载体不包括多聚腺苷酸化序列。在其它实施方式中,所述载体包括至少1个、至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少10个、至少15个、至少20个、至少25个、至少30个、至少40个、至少45个、至少50个或更多个腺嘌呤二核苷酸。在本文的任何方面和实施方式中的一些实施方式中,多聚腺苷酸化序列包括约43个核苷酸、约40-50个核苷酸、约40-55个核苷酸、约45-50个核苷酸、约35-50个核苷酸或它们之间的任何范围。

[0233] 在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,可以从载体多核苷酸获得ceDNA,该载体多核苷酸编码可操作地定位在两个不同的反向末端重复序列(ITR)(例如AAV ITR)之间的异源核酸,其中至少一个ITR包含末端解链位点和复制蛋白结合位点(RPS),例如Rep结合位点(例如wt AAV ITR),并且其中一个ITR包括相对于另一个ITR(例如功能性ITR)的缺失、插入和/或取代。

[0234] 在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,宿主细胞并不表达病毒衣壳蛋白并且多核苷酸载体模板不含任何病毒衣壳编码序列。在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,多核苷酸载体模板不含AAV衣壳基因,而且不含其它病毒的衣壳基因)。在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,核酸分子还不含AAV ReP蛋白编码序列。因此,在本文的任何方面和实施方式中的一些实施方式中,本发明的核酸分子不含功能性AAV盖和AAV rep基因二者。

[0235] 在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,ceDNA载体不具有修饰的ITR。

[0236] 在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,ceDNA载体包括如本文所公开的调控开关(或在2018年9月7日提交的PCT申请号PCT/US 18/49996中)。

[0237] IV.ceDNA载体的产生

[0238] 2018年9月7日提交的PCT/US 18/49996的第IV部分描述了,用于产生如本文所述的包含如本文定义的不对称ITR对或对称ITR对的ceDNA载体的方法,该专利通过引用整体并入本文。如本文所描述,ceDNA载体可以由例如包含以下步骤的方法获得:a)在Rep蛋白存在下,在有效并且持续足以诱导宿主细胞内ceDNA载体产生的时间的条件下培育携带多核苷酸表达构建体的模板(例如,ceDNA-质粒、ceDNA-杆粒和/或ceDNA-杆状病毒)的宿主细胞(例如,昆虫细胞)群体,该模板不含病毒衣壳编码序列,并且其中所述宿主细胞并不包含病毒衣壳编码序列;以及b)从宿主细胞中收获并分离ceDNA载体。Rep蛋白的存在诱导具有经修饰的ITR的载体多核苷酸复制,从而在宿主细胞中产生ceDNA载体。

[0239] 然而,没有表达病毒颗粒(例如AAV病毒颗粒)。因此,没有大小限制,如在AAV或其它基于病毒的载体中天然强加的大小限制。

[0240] 可以通过以下来确认从宿主细胞分离的ceDNA载体的存在:用在ceDNA载体上具有单一识别位点的限制酶来消化从宿主细胞分离的DNA,并在非变性凝胶上分析消化的DNA材料,以与线性和非连续DNA相比确认线性和连续DNA的特征带的存在。

[0241] 在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,本发明提供了将DNA载体多核苷酸表达模板(ceDNA模板)稳定地整合至其自身基因组中的宿主细胞系的用途,所述细胞系用于产生非病毒DNA载体,例如,如Lee, L. 等人(2013)《公共科学图书馆综合(Plos One)》8(8):e69879中所描述的。优选地,Rep以约3的MOI加入宿主细胞中。当宿主细胞系是哺乳动

物细胞系,例如,HEK293细胞时,所述细胞系可以具有稳定整合的多核苷酸载体模板,并且可以使用第二载体,如疱疹病毒将Rep蛋白引入细胞中,使得在Rep和辅助病毒存在下切除和扩增ceDNA。

[0242] 在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,用于制备本文所描述的ceDNA载体的宿主细胞是昆虫细胞,并使用杆状病毒递送编码Rep蛋白的多核苷酸和用于ceDNA的非病毒DNA载体多核苷酸表达构建体模板。在本文的任何方面和实施方式中的一些实施方式中,宿主细胞经工程化改造以表达Rep蛋白。

[0243] 然后从宿主细胞中收获和分离ceDNA载体。可以选择和优化本文所描述的收获和收集ceDNA载体的时间,以实现高产率地产生ceDNA载体。例如,可以根据细胞活力、细胞形态、细胞生长等选择收获时间。在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,细胞在足以产生ceDNA载体的条件下生长,并在杆状病毒感染后足以产生ceDNA载体但在大多数细胞开始因杆状病毒的毒性而死亡之前的时间收获。可以使用质粒纯化试剂盒,例如Qiagen Endo-Free Plasmid试剂盒分离DNA载体。为分离质粒而开发的其它方法也适用于DNA载体。通常,可以采用任何核酸纯化方法。

[0244] DNA载体可以通过所属领域的技术人员已知用于纯化DNA的任何手段来纯化。在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,ceDNA载体被纯化为DNA分子。在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,ceDNA载体被纯化为外泌体或微粒。ceDNA载体的存在可以如下证实:使用对DNA载体具有单一识别位点的限制酶消化从细胞中分离出的载体DNA,并且使用凝胶电泳术分析已消化和未消化的DNA物质,从而相较于线性和非连续DNA来证实线性和连续DNA的特征带的存在。

[0245] V. 脂质颗粒的制备

[0246] 脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)可以在TNA(例如,ceDNA)和脂质混合时自发形成。根据所需的粒度分布,可以使用例如热熔挤出机,例如Lipex Extruder(北方脂质公司),将所得纳米颗粒混合物挤出通过膜(例如,100nm截留值)。在一些情况下,可以省略挤出步骤。例如,可以通过透析或切向流过滤实现乙醇去除并同时的缓冲液交换。

[0247] 通常,脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)可以通过本领域已知的任何方法形成。例如,脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)可以通过例如US2013/0037977、US2010/0015218、US2013/0156845、US2013/0164400、US2012/0225129和US2010/0130588中描述的方法制备,其中每件专利的全部内容通过引用并入本文。在本文的任何方面和实施方式中的一些实施方式中,可以使用连续混合方法、直接稀释法或在线稀释法来制备脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)。US2007/0042031中描述了用于使用直接稀释法和在线稀释法制备脂质纳米颗粒的装置的方法和装置,其内容通过引用整体并入本文。US2004/0142025中描述了使用逐步稀释法制备脂质纳米颗粒的方法和装置,其内容通过引用整体并入本文。

[0248] 在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)可以通过冲击射流方法制备。通常,颗粒是通过将溶解在酒精(例如,乙醇)中的脂质与溶解在缓冲液(例如,柠檬酸盐缓冲液、醋酸钠缓冲液、醋酸钠和氯化镁缓冲液、苹果酸缓冲液、苹果酸和氯化钠缓冲液或柠檬酸钠和氯化钠缓冲液)中的ceDNA混合形成的。脂质与ceDNA的混合比率可以是约45-55%的脂质和约65-45%的ceDNA。

[0249] 脂质溶液可以含有可电离脂质、非阳离子脂质(例如,磷脂,如DSPC、DOPE和DOPC)、

PEG-脂质缀合分子(例如,PEG-脂质)以及甾醇(例如,胆固醇),其在醇(例如,乙醇)中的总脂质浓度为5-30mg/mL、更可能为5-15mg/mL、最可能为9-12mg/mL。在脂质溶液中,脂质的摩尔比范围,对于阳离子脂质可以为:约25-98%,优选约35-65%;对于非离子脂质,可以是约0-15%,优选约0-12%;对于PEG-脂质缀合分子,可以是约0-15%,优选约1-6%;对于甾醇,可以是约0-75%,优选约30-50%。

[0250] ceDNA溶液可以包含浓度范围为0.3-1.0mg/mL,优选0.3-0.9mg/mL的ceDNA缓冲液,pH范围为3.5-5。

[0251] 为了形成LNP,在一个示例性但非限制性实施方式中,将两种液体加热到约15-40°C,优选约30-40°C的温度,然后例如在冲击射流混合器中混合,立即形成LNP。混合流速范围为10-600mL/min。管内径的范围为0.25至1.0mm,总流速为10-600mL/min。流速和管道内径的组合可以具有将LNP的粒度控制在30到200nm之间的效果。然后可以将溶液与较高pH的缓冲液混合,混合比在1:1至1:3vol:vol范围内,优选约1:2vol:vol。如果需要,这种缓冲液的温度可以在15-40°C或30-40°C范围内。然后混合的LNP可以进行阴离子交换过滤步骤。在阴离子交换之前,可以将混合的LNP培养一段时间,例如30分钟至2小时。培养期间的温度可以在15-40°C或30-40°C的范围内。培养后,通过过滤器(如0.8μm过滤器)过滤溶液,该过滤器包含阴离子交换分离步骤。该过程可以使用1mm到5mm的管内径和10到2000mL/min的流速。

[0252] 在形成之后,可以通过超滤过程浓缩和渗滤LNP,其中除去醇并将缓冲液交换为最终缓冲液,例如约pH 7(例如,约pH 6.9、约pH 7.0、约pH 7.1、约pH 7.2、约pH 7.3或约pH 7.4)的磷酸盐缓冲盐水(PBS)。

[0253] 超滤过程可以使用切向流过滤形式(TFF),使用30-500kD的膜标称分子量截留范围。膜形式是中空纤维或平板盒式。具有适当截留分子量的TFF过程可以将LNP保留在滞留物中,而滤液或渗透液中含有醇、柠檬酸盐缓冲液废液和最终缓冲液废液。TFF过程是多步骤过程,初始浓度为1-3mg/mL的ceDNA浓度。浓缩后,将LNP溶液对最终缓冲液进行10-20体积的渗滤,以去除醇并进行缓冲液交换。然后可以将材料再浓缩1-3倍。浓缩的LNP溶液可以无菌过滤。

[0254] VI. 药物组合物和制剂

[0255] 本文还提供了包含TNA脂质颗粒和药学上可接受的载体或赋形剂的药物组合物。

[0256] 在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,TNA脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)具有完全包封、部分包封的治疗性核酸。在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,核酸治疗剂完全包封在脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)中以形成含有核酸的脂质颗粒。在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,核酸可以包封在颗粒的脂质部分中,从而保护它免于酶促降解。

[0257] 在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,脂质颗粒的平均直径为约20nm至约100nm、30nm至约150nm、约40nm至约150nm、约50nm至约150nm、约60nm至约130nm、约70nm至约110nm、约70nm至约100nm、约80nm至约100nm、约90nm至约100nm、约70至约90nm、约80nm至约90nm、约70nm至约80nm或约30nm、35nm、40nm、45nm、50nm、55nm、60nm、65nm、70nm、75nm、80nm、85nm、90nm、95nm、100nm、105nm、110nm、115nm、120nm、125nm、130nm、135nm、140nm、145nm,或150nm以确保有效递送。含核酸的脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)及其制备

方法公开在例如,PCT/US18/50042、美国专利公开号20040142025和20070042031中,所述文献的公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文。在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)的尺寸可以使用例如Malvern Zetasizer Nano ZS(英国莫尔文(Malvern,UK))系统通过准弹性光散射来确定。

[0258] 通常,选择本发明的所述脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)的平均直径以实现预期的治疗效果。

[0259] 取决于所述脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)的预期用途,可以改变组分的比例,并且可以使用例如内体释放参数(ERP)测定法来测量特定制剂的递送效率。

[0260] 在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,可以将脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)与其他部分缀合以防止聚集。此类脂质缀合物包括但不限于PEG-脂质缀合物,例如,偶联至二烷氧基丙基的PEG(例如,PEG-DAA缀合物)、偶联至二酰基甘油的PEG(例如,PEG-DAG缀合物)、偶联至胆固醇的PEG、与磷脂酰乙醇胺偶联的PEG和与神经酰胺缀合的PEG(参见例如,美国专利号5,885,613)、阳离子PEG脂质、聚噁唑啉(POZ)-脂质缀合物(例如,POZ-DAA缀合物;参见例如,2010年1月13日提交的美国临时申请号61/294,828和2010年1月14日提交的美国临时申请号61/295,140)、聚酰胺寡聚物(例如,ATTA-脂质缀合物)及其混合物。POZ-脂质缀合物的其他实施例在PCT公开号WO 2010/006282中有描述。PEG或POZ可以直接与脂质缀合,或者可以经由接头部分与脂质连接。可以使用适合将PEG或POZ与脂质偶联的任何接头部分,例如,包括不含酯的接头部分和含酯的接头部分。在某些优选的实施方式中,使用不含酯的接头部分,诸如酰胺或氨基甲酸酯。出于所有目的,将每个上述专利文件的公开内容以全文引用的方式并入本文。

[0261] 在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,ceDNA可以与颗粒的脂质部分复合或包封在脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)的脂质位置。在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,ceDNA可以完全包封在脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)的脂质位置,从而保护它免于被核酸酶降解,例如,在水溶液中。在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)中的ceDNA在脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)于37℃暴露于核酸酶至少约20分钟、30分钟、45分钟或60分钟后基本上没有降解。在本文的任何方面和实施方式中的一些实施方式中,脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)中ceDNA在该颗粒于血清在37℃下培养至少约30分钟、45分钟或60分钟或至少约2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、12小时、14小时、16小时、18小时、20小时、22小时、24小时、26小时、28小时、30小时、32小时、34小时或36小时后基本上不降解。

[0262] 在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)对受试者,例如,对哺乳动物,如对人类基本上是无毒的。

[0263] 在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,包含本公开治疗性核酸的药物组合物可以配制在脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)中。在本文的任何方面和实施方式中的一些实施方式中,包含治疗性核酸的脂质颗粒可以由所公开的可电离脂质形成。在一些其他实施方式中,包含治疗性核酸的脂质颗粒可以由非阳离子脂质形成。在优选的实施方式中,本发明的脂质颗粒是含有核酸的脂质颗粒,其由已公开的可电离脂质形成,所述可电离脂质包括选自以下组成的组的治疗性核酸:mRNA、反义RNA和寡核苷酸、核酶、适体、干扰RNA(RNAi)、切丁酶-底物dsRNA、小发夹RNA(shRNA)、非对称干扰RNA(aiRNA)、微RNA

(miRNA)、小环DNA、小基因、病毒DNA(例如,慢病毒或AAV基因组)或非病毒合成DNA载体、封闭端线性双螺旋DNA(ceDNA/CELiD)、质粒、杆粒、doggyboneTM DNA载体、最低免疫学定义的基因表达(MIDGE)-载体、非病毒迷你串DNA载体(线性-共价封闭的DNA载体)或哑铃形DNA最小载体(“哑铃DNA”)。

[0264] 在另一个优选的实施方式中,本发明的脂质颗粒是含有核酸的脂质颗粒,其由非阳离子脂质和可选地防止颗粒聚集的缀合脂质形成。

[0265] 在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,脂质颗粒制剂是水溶液。在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)制剂是冻干粉末。

[0266] 根据一些方面,本公开提供了进一步包括一种或更多种药物赋形剂的脂质颗粒制剂。在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)制剂进一步包括蔗糖、氨丁三醇(tris)、海藻糖和/或甘氨酸。

[0267] 在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,本文公开的脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)可掺入适合施用于受试者的药物组合物中,用于体内递送至受试者的细胞、组织或器官。通常,所述药物组合物包括本文公开的所述TNA脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)和药学上可接受的载体。在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,本公开所述的TNA脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)可以掺入适合于治疗性施用的期望途径(例如,肠胃外施用)的药物组合物中。还设想通过高压静脉内或动脉内输注以及细胞内注射(例如核内微量注射或胞浆内注射)进行被动组织转导。用于治疗目的的药物组合物能够配制成溶液、微乳液、分散液、脂质体或其它适合高ceDNA载体浓度的有序结构。无菌注射溶液可以通过将所需量的ceDNA载体化合物根据需要与上文列举的成分中的一种或组合一起掺入适当的缓冲液中,接着进行过滤灭菌来制备。

[0268] 如本文所公开的脂质颗粒可以并入适合于局部、全身、羊膜内、鞘内、颅内、动脉内、静脉内、淋巴内、腹膜内、皮下、气管、组织内(例如,肌肉内、心内、肝内、肾内、脑内)、鞘内、膀胱内、结膜(例如,眼眶外、眼眶内、眼眶后、视网膜内、视网膜下、脉络膜、脉络膜下、基质内、前房内和玻璃体内)、耳蜗内和粘膜(例如,口腔、直肠、鼻)施用的药物组合物。还设想通过高压静脉内或动脉内输注以及细胞内注射(例如核内微量注射或胞浆内注射)进行被动组织转导。

[0269] 包含TNA脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)的药物活性组合物可以被配制成将核酸中的转基因递送到接受者的细胞,从而引起该转基因在其中进行治疗性表达。该组合物还可以包含药学上可接受的载体。

[0270] 用于治疗目的的药物组合物在制造和存储条件下通常是无菌的和稳定的。组合物可以配制成溶液、微乳液、分散液、脂质体或其它适合于高ceDNA载体浓度的有序结构。无菌注射溶液可以通过将所需量的ceDNA载体化合物根据需要与上文列举的成分中的一种或组合一起掺入适当的缓冲液中,接着进行过滤灭菌来制备。

[0271] 在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)是具有至少一个脂质双层的固体核心颗粒。在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)具有非双层结构,即非层状(即非双层)形态。不受限制地,所述非双层形态可以包括例如三维管、棒、立方对称等。脂质颗粒(例如,脂质纳米

颗粒)的非层状形态(即非双层结构)可以使本领域的技术人员已知并使用的分析技术来确定。此类技术包括(但不限于):低温透射电子显微镜(“Cryo-TEM”)、差示扫描量热法(“DSC”)、X射线衍射等。举例来说,脂质颗粒的形态(层状相对于非层状)可以很容易地进行评估,并使用例如,Cryo-TEM分析如内容US2010/0130588中所描述来表征,所述文献的内容以全文引用的方式并入本文中。

[0272] 在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,具有非片层形态的脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)是电子致密的。

[0273] 在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,本公开提供了结构上为单层或多层的脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)。在一些方面,本公开提供了包括多囊泡颗粒和/或基于泡沫的颗粒的脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)制剂。通过控制脂质组分的组成和浓度,可以控制脂质缀合物从脂质颗粒中交换出来的速率,进而可以控制脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)融合的速率。此外,包括例如pH、温度或离子强度的其他变量可用于改变和/或控制脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)融合的速率。基于本公开,本领域普通技术人员将清楚可以用于控制脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)融合速率的其他方法。同样显而易见,通过控制所述脂质缀合物的组成和浓度,可以控制脂质颗粒的尺寸。

[0274] 在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,配制的可电离脂质的pKa可能与LNP递送核酸的有效性相关(参见Jayaraman et al., *Angewandte Chemie, International Edition* (2012), 51(34), 8529-8533; Semple et al., *Nature Biotechnology* 28, 172-176 (2010), 两个文献的内容都以全文引用的方式并入本文中)。在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,pKa的优选范围是约5至约8。在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,pKa的优选范围为约6至约7。在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,优选的pKa为约6.5。在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,可电离脂质的pKa可以使用基于2-(对甲苯胺基)-6-萘磺酸(TNS)的荧光的测定法在脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)中测定。

[0275] 在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,ceDNA在脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)中的包封可以通过进行膜不可渗透的荧光染料排除测定法来确定,例如Oligreen®测定法或PicoGreen®测定法,该测定法使用与核酸缔合时荧光增强的染料。通常,通过将染料添加到脂质颗粒制剂中,测量所得的荧光,并与添加少量非离子清洁剂后观察到的荧光进行比较来确定包封。去污剂介导的对脂质双层的破坏释放了被包封的ceDNA,使其与不可渗透膜的染料相互作用。ceDNA的包封可以计算为 $E = (I_o - I) / I_o$,其中I和I_o是指添加去污剂之前和之后的荧光强度。

[0276] 单位剂量

[0277] 在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,药物组合物可以以单位剂型存在。单位剂型通常适用于药物组合物的一种或更多种特定的施用途径。在本文的任何方面和实施方式中的一些实施方式中,单位剂型适于通过吸入施用。在本文的任何方面和实施方式中的一些实施方式中,单位剂型适于通过汽化器施用。在本文的任何方面和实施方式中的一些实施方式中,单位剂型适于通过喷雾器施用。在本文的任何方面和实施方式中的一些实施方式中,单位剂型适于通过气雾器施用。在本文的任何方面和实施方式中的一些实施方式中,单位剂型适于口服施用、经颊施用或舌下施用。在本文的任何方面和实施方式

中的一些实施方式中,单位剂型适于静脉内、肌肉内或皮下施用。在本文的任何方面和实施方式中的一些实施方式中,单位剂型适于鞘内或脑室内施用。在本文的任何方面和实施方式中的一些实施方式中,药物组合物被配制用于局部施用。可以与载剂材料组合以产生单个剂型的活性成分的量将通常是化合物产生治疗效果的量。

[0278] VII. 治疗方法

[0279] 本文所述的可电离脂质组合物和方法(例如,本文所述的TNA脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒))可用于将核酸序列(例如,治疗性核酸序列)引入宿主细胞。在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,可以用来自治疗患者的适当生物标志物监测使用TNA LNP(例如,本文所述的ceDNA载体脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒))将核酸序列引入宿主细胞以评估基因表达。

[0280] 本文提供的LNP组合物可以用于递送转基因(核酸序列)以用于各种目的。在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,ceDNA载体(例如,本文所述的ceDNA载体脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒))可以多种方式使用,包括,例如,非原位、体外和体内应用、方法、诊断程序和/或基因治疗方案。

[0281] 本文提供了治疗受试者的疾病或病症的方法,所述方法包括将治疗有效量的TNA LNP(例如,本文所述的ceDNA载体脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)),可选地与药学上可接受的载体,引入受试者有需要的靶细胞(例如,肝细胞、肌肉细胞、肾细胞、神经元细胞或其他受影响的细胞类型)。实施的TNA LNP(例如,本文所述的ceDNA载体脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒))包括用于治疗疾病所关注的核苷酸序列。特别是,TNA可以包括与控制元件可操作地连接的期望的外源DNA序列,当引入受试者中时,所述控制元件能够指导由外源DNA序列编码的期望的多肽、蛋白质或寡核苷酸的转录。该TNA LNP(例如,本文所述的ceDNA载体脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒))可以通过本文所述和本领域已知的任何合适的途径施用。在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,靶细胞在人受试者中。

[0282] 本文提供了用于向有需要的受试者提供诊断或治疗有效量的TNA LNP(例如,本文所述的ceDNA载体脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒))的方法,所述方法包括向有需要的受试者的细胞、组织或器官提供一定量的TNA LNP(例如,本文所述的ceDNA载体脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒));并持续有效的时间以使TNA LNP的转基因能够表达,从而为所述受试者提供诊断或治疗有效量的由TNA LNP(例如,本文所述的ceDNA载体脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒))表达的蛋白质、肽、核酸。在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,受试者是人。

[0283] 本文提供了用于诊断、预防、治疗或改善受试者的疾病、病症、功能障碍、损伤、异常状况或创伤的至少一种或更多种症状的方法。通常,该方法至少包括向有需要的受试者施用TNA LNP(例如,本文所述的ceDNA载体脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒))的步骤,其量和时间足以诊断、预防、治疗或改善该受试者的疾病、病症、功能障碍、损伤、异常状况或创伤的一种或更多种症状。在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,受试者是人。

[0284] 本文提供了包括使用TNA LNP作为用于治疗或减轻疾病的一种或更多种症状或疾病状态的工具的方法。有许多遗传疾病中的缺陷基因是已知的,并且通常分为两类:缺陷状态,通常是酶,一般以隐性方式遗传;和不平衡状态,其可以涉及调控蛋白或结构蛋白,并且通常但不总是以显性方式遗传。对于缺陷状态疾病,TNA LNP(例如,本文所述的ceDNA载体

脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒))可用于递送转基因以将正常基因引入受影响的组织中进行替代疗法,以及在一些实施方式中,使用反义突变建立动物疾病模型。对于不平衡的疾病状态而言,TNA LNP(例如,ceDNA载体脂质颗粒)可用于在模型系统中创建疾病状态,然后可尝试用于抵消疾病状态。因此,本文公开的TNA LNP(例如,ceDNA载体脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒))和方法能够治疗遗传疾病。如本文所用,通过部分或完全拯救导致疾病或使其更严重的缺陷或不平衡,可以治疗疾病状态。

[0285] 一般而言,TNA LNP(例如,本文所述的ceDNA载体脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒))可用于递送根据上文描述的任何转基因,以治疗、预防或改善与涉及基因表达的任何病症相关的症状。说明性疾病状态包括但不限于:囊性纤维化(和肺的其它疾病)、A型血友病、B型血友病、地中海贫血、贫血和其它血液病症、AIDS、阿尔茨海默氏病、帕金森氏病、亨廷顿氏病、肌萎缩性侧索硬化、癫痫症和其它神经病症、癌症、糖尿病、肌营养不良症(例如,杜兴氏、贝克尔)、赫勒氏病(Hurler's disease)、腺苷脱氨酶缺陷、代谢障碍、视网膜变性疾病(和眼部的其它疾病)、线粒体病(例如,莱博氏遗传性视神经病变(Leber's hereditary optic neuropathy; LHON)、雷氏综合征(Leigh syndrome)和亚急性硬化性脑病变)、肌病(例如,面肩胛肱骨型肌病(FSHD)和心肌病)、实体器官(例如,脑、肝脏、肾脏、心脏)的疾病等等。在本文的任何方面和实施方式中的一些实施方式中,如本文公开的ceDNA载体可以有利地用于治疗患有代谢病症(例如,鸟氨酸氨甲酰基转移酶缺乏症)的个体。

[0286] 在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,本文所描述的TNA LNP可以用于治疗、改善和/或预防由基因或基因产物突变引起的疾病或病症。可以用TNA LNP(例如,本文所描述的ceDNA载体脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒))治疗的示例性疾病或病症包括但不限于:代谢性疾病或病症(例如,法布里病(Fabry disease)、戈谢病(Gaucher disease)、苯丙酮尿症(PKU)、糖原贮积病);尿素循环疾病或病症(例如,鸟氨酸氨甲酰基转移酶(OTC)缺乏症);溶酶体贮积疾病或病症(例如,异染性脑白质营养不良(MLD)、粘多糖贮积症II型(MPSII;亨特综合征(Hunter syndrome));肝脏疾病或病症(例如,进行性家族性肝内胆汁淤积症(PFIC));血液疾病或病症(例如,血友病A型和B型)、地中海贫血和贫血);癌症和肿瘤以及遗传疾病或病症(例如,囊性纤维化)。

[0287] 在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,TNA LNP(例如,ceDNA载体脂质颗粒)可用于在需要调控转基因表达水平(例如,编码激素或生长因子的转基因)的情况下递送异源核苷酸序列。

[0288] 在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,TNA LNP(例如,ceDNA载体脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒))可用于校正导致疾病或症状的基因产物的异常水平和/或功能(例如,蛋白质的缺失或缺陷)。TNA LNP(例如,ceDNA载体脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒))可以产生功能性蛋白质和/或修饰蛋白质的水平,用以减轻或减少由蛋白质缺乏或缺陷造成的特定疾病或病症引起的症状或赋予其益处。例如,可以通过产生功能性OTC酶来实现OTC缺乏症的治疗;可以通过调节因子VIII、因子IX和因子X的水平来实现A型和B型血友病的治疗;可以通过调节苯丙氨酸羟化酶的水平来实现PKU的治疗;可以分别通过产生功能性 α 半乳糖苷酶或 β 葡糖脑苷脂酶来实现法布里病或戈谢病的治疗;可以分别通过产生功能性芳基硫酸酯酶A或艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶来实现MFD或MPSII的治疗;可以通过产生功能性囊性纤维化跨膜传导调控因子来实现囊性纤维化的治疗;可以通过恢复功能性G6Pase酶功

能来实现糖原贮积病的治疗；并且可以通过产生功能性ATP8B1、ABCB11、ABCB4或TJP2基因来实现PFIC的治疗。

[0289] 在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中，TNA LNP (例如，ceDNA载体脂质颗粒 (例如，脂质纳米颗粒)) 可用于在体外或体内向细胞提供基于RNA的治疗剂。基于RNA的疗法的实施例包括但不限于mRNA、反义RNA和寡核苷酸、核酶、适体、干扰RNA (RNAi)、切丁酶-底物dsRNA、小发夹RNA (shRNA)、不对称干扰RNA (aiRNA)、微RNA (miRNA)。例如，TNA LNP (例如，ceDNA载体脂质颗粒 (例如，脂质纳米颗粒)) 可用于在体外或体内向细胞提供反义核酸。例如，在转基因是RNAi分子的情况下，靶细胞中反义核酸或RNAi的表达会削弱细胞对特定蛋白质的表达。因此，为了减少特定蛋白质在需要其的受试者中的表达，可以施用作为RNAi分子或反义核酸的转基因。反义核酸还可以在体外施用于细胞以调控细胞生理，例如，优化细胞或组织培养系统。

[0290] 在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中，TNA LNP (例如，ceDNA载体脂质颗粒 (例如，脂质纳米颗粒)) 可用于在体外或体内向细胞提供基于DNA的治疗剂。基于DNA的治疗剂的实施例包括但不限于小环DNA、小基因、病毒DNA (例如，慢病毒或AAV基因组) 或非病毒合成DNA载体、封闭端的线性双链体DNA (ceDNA/CELiD)、质粒、杆粒、doggybone™DNA载体、最低免疫学定义的基因表达 (MIDGE) -载体、非病毒辅助DNA载体 (线性-共价封闭的DNA载体) 或哑铃形DNA最小载体 (“哑铃DNA”)。例如，在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中，ceDNA载体 (例如，ceDNA载体脂质颗粒 (例如，脂质纳米颗粒)) 可用于在体外或体内向细胞提供小环。例如，在转基因是小环DNA的情况下，靶细胞中小环DNA的表达会削弱细胞对特定蛋白质的表达。因此，为了减少特定蛋白质在有需要的受试者中的表达，可以施用作为小环DNA的转基因。小环DNA也可以在体外施用于细胞以调控细胞生理，例如，优化细胞或组织培养系统。

[0291] 在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中，由包含表达盒的TNA载体编码的示例性转基因包括但不限于：X、溶酶体酶 (例如，与泰-萨氏病 (Tay-Sachs disease) 相关的己糖胺酶A或与亨特综合征/MPS II相关的艾杜糖醛酸硫酸酯酶)、促红细胞生成素、血管抑素、内皮抑素、超氧化物歧化酶、球蛋白、瘦蛋白、过氧化氢酶、酪氨酸羟化酶以及细胞因子 (例如，干扰素、 β -干扰素、干扰素- γ 、白介素-2、白介素-4、白介素12、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子、淋巴毒素等)、肽生长因子和激素 (例如，生长激素、胰岛素、胰岛素样生长因子1和2、血小板衍生生长因子 (PDGF)、表皮生长因子 (EGF)、成纤维细胞生长因子 (FGF)、神经生长因子 (NGF)、神经营养因子-3和4、脑源性神经营养因子 (BDNF)、神经胶质衍生生长因子 (GDNF)、转化生长因子-a和-b等)、受体 (例如，肿瘤坏死因子受体)。在一些示例性实施方式中，转基因编码对一个或多个期望的目标具有特异性的单克隆抗体。在一些示例性实施方式中，ceDNA载体编码超过一种转基因。在一些示例性实施方式中，转基因编码包括两种不同的所关注多肽的融合蛋白。在本文的任何方面和实施方式中的一些实施方式中，转基因编码如本文所定义的抗体，包含全长抗体或抗体片段。在本文的任何方面和实施方式中的一些实施方式中，抗体是如本文所定义的抗原结合域或免疫球蛋白可变域序列。其它说明性的转基因序列编码自杀基因产物 (胸苷激酶、胞嘧啶脱氨酶、白喉毒素、细胞色素P450、脱氧胞苷激酶和肿瘤坏死因子)、将抗性赋予癌症疗法中所用的药物的蛋白质，以及肿瘤抑制基因产物。

[0292] 施用

[0293] 在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,可以将TNA LNP(例如,如本文所述的ceDNA载体脂质颗粒)施用于生物体以在体内转导细胞。在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,可以将TNA LNP(例如,ceDNA载体脂质颗粒)施用于生物体用以离体转导细胞。

[0294] 通常,施用是通过通常用于使分子最终与血液或组织细胞接触的任何途径进行。合适的施用此类核酸的方法是可获得的并且是本领域的技术人员公知的,并且虽然可以使用超过一种途径来施用特定的组合物,但特定的途径通常可以提供比另一途径更直接和更有效的反应。TNA LNP(例如,ceDNA载体脂质颗粒)的示例性施用模式包含口服、经直肠、经粘膜、鼻内、吸入(例如,通过气溶胶)、经颊(例如,舌下)、经阴道、鞘内、眼内、经皮、内皮内、子宫内(或,卵内)、肠胃外(例如,静脉内、皮下、皮内、颅内、肌肉内[包含施用骨骼肌、膈膜肌和/或心肌]、胸膜内、大脑内和关节内)、表面(例如,皮肤和粘膜表面二者,包含气道表面和经皮施用)、淋巴管内等,以及直接组织或器官注射(例如,对肝脏、眼睛、骨骼肌、心肌、膈膜肌或脑)。

[0295] 可以向受试者的任何部位施用TNA LNP,如ceDNA载体(例如,ceDNA LNP),包含(但不限于)选自由以下组成的组的部位:脑、骨骼肌、平滑肌、心脏、膈膜、气道上皮、肝脏、肾脏、脾脏、胰腺、皮肤和眼睛。在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,ceDNA LNP的施用也可以用于肿瘤(例如,肿瘤或淋巴结内或附近)。在任何给定情况下最适合的途径将取决于所治疗、改善和/或预防的病状的性质和严重程度,以及所使用的特定ceDNA LNP的性质。另外,ceDNA允许通过单个载体或多个ceDNA载体(例如ceDNA混合物)施用多个转基因。

[0296] 在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,向骨骼肌施用ceDNA LNP包含但不限于向四肢(例如,上臂、下臂、大腿和/或小腿)、背部、颈部、头部(例如,舌头)、胸部、腹部、骨盆/会阴和/或手指中的骨骼肌施用。ceDNA载体(例如,ceDNA载体脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒))可以通过静脉内施用、动脉内施用、腹膜内施用、肢体灌注(可选地,腿和/或手臂的隔离肢体灌注;参见例如Arruda等人,(2005)《血液(Blood)》105:3458-3464)和/或直接肌肉内注射而递送到骨骼肌。在特定实施方式中,ceDNA LNP载体通过肢体灌注、可选地隔离肢体灌注(例如,静脉内或关节内施用)向受试者(例如,患有如DMD的肌营养不良症的受试者)的肢体(臂和/或腿)施用。在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,可以在不采用“流体动力学”技术的情况下施用ceDNA LNP。

[0297] 对心肌施用TNA LNP(例如,ceDNA LNP),包括施用于左心房、右心房、左心室、右心室和/或隔膜。TNA LNP(例如,ceDNA LNP)可以通过静脉内施用、动脉内施用(例如,主动脉内施用)、直接心脏注射(例如,进入左心房递送至心肌、右心房、左心室、右心室)和/或冠状动脉灌注递送至心肌。施用膈膜肌可以采用任何适合的方法,包括静脉内施用、动脉内施用和/或腹膜内施用。对平滑肌的施用可以通过任何适合的方法,包括静脉内施用、动脉内施用和/或腹膜内施用。在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,可以施用存在于平滑肌内、附近和/或平滑肌上的内皮细胞。

[0298] 在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中,将TNA LNP(例如,ceDNA LNP)施用于骨骼肌、膈肌和/或心肌(例如,以治疗、改善和/或预防肌营养不良症或心脏病(例

如, PAD或充血性心力衰竭)。

[0299] TNA LNP (例如, ceDNA LNP) 可以施用于CNS (例如, 施用于脑或眼睛)。可以将TNA LNP (例如, ceDNA) 引入脊髓、脑干(延髓、脑桥)、中脑(下丘脑、丘脑、上丘脑、垂体腺、黑质、松果腺)、小脑、端脑(纹状体、包括枕骨、颞叶、顶叶和额叶的大脑、皮质、基底神经节、海马和杏仁核(portaamygdala))、边缘系统、新皮质、纹状体、大脑和下丘。也可以将TNA LNPs (例如, ceDNA LNP) 施用于眼睛的不同区域, 如视网膜、角膜和/或视神经。可以将TNA LNP (例如, ceDNA LNP) 递送到脑脊髓液中(例如, 通过腰椎穿刺)。在血脑屏障受到干扰(例如, 脑瘤或大脑梗塞)的情况下, TNA LNP (例如, ceDNA载体脂质颗粒) 可以进一步通过血管内施用至CNS。

[0300] 在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中, TNA LNP (例如, ceDNA LNP) 可以通过本领域中已知的任何途径施用至CNS的期望区域, 包括但不限于: 鞘内、眼内、大脑内、脑室内、静脉内(例如, 在如甘露糖醇的糖的存在下)、鼻内、耳内、眼内(例如, 玻璃体内、视网膜下、前房) 和眼周(例如, 眼球筋膜囊下区(sub-Tenon's region)) 递送以及肌内递送, 逆行递送至运动神经元。

[0301] 根据本文中任何方面或实施方式中的一些实施方式, TNA LNP (例如, ceDNA LNP) 以液体制剂形式通过直接注射(例如, 立体定向注射) 施用至CNS中的期望区域或隔室。根据其他实施方式, TNA LNP (例如, ceDNA LNP) 可以通过局部施用至期望区域或通过鼻内施用气溶胶制剂来提供。可以通过局部施用液滴来对眼睛给药。作为另一替代方案, ceDNA载体可以作为固体、缓释型制剂施用(参见, 例如, 美国专利第7, 201, 898号, 其通过引用整体并入本文)。在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中, TNA LNP (例如, ceDNA LNP) 可以用于逆转运, 以治疗、改善和/或预防涉及运动神经元的疾病和病症(例如, 肌萎缩性侧索硬化(ALS); 脊髓性肌萎缩(SMA) 等)。例如, 可以将TNA LNPs (例如, ceDNA LNP) 递送至肌肉组织, 其可以从肌肉组织迁移至神经元中。

[0302] 在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中, 可以重复施用治疗产品, 直到达到适当的表达水平。因此, 在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中, 可以多次施用和重复给药治疗性核酸。例如, 治疗性核酸可以在第0天施用。在第0天进行初始治疗后, 可以在用治疗性核酸进行初始治疗之后约1周、约2周、约3周、约4周、约5周、约6周、约7周、约8周、或约3月、约4月、约5月、约6月、约7月、约8月、约9月、约10月、约11月、或约1年、约2年、约3年、约4年、约5年、约6年、约7年、约8年、约9年、约10年、约11年、约12年、约13年、约14年、约15年、约16年、约17年、约18年、约19年、约20年、约21年、约22年、约23年、约24年、约25年、约26年、约27年、约28年、约29年、约30年、约31年、约32年、约33年、约34年、约35年、约36年、约37年、约38年、约39年、约40年、约41年、约42年、约43年、约44年、约45年、约46年、约47年、约48年、约49年或约50年内进行第二次给药(重复给药)。

[0303] 在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中, 还可以包括一种或更多种附加的化合物。这些化合物可以单独施用, 或附加的化合物可以包括在本发明的脂质颗粒(例如, 脂质纳米颗粒) 中。换句话说, 脂质颗粒(例如, 脂质纳米颗粒) 可以包含除TNA或至少第二TNA之外的其它化合物, 其不同于第一种化合物。不受限制地, 其它附加的化合物可以选自自由以下组成的组: 有机或无机的小分子或大分子、单糖、二糖、三糖、寡糖、多糖、肽、蛋白质、肽类似物和其衍生物、拟肽、核酸、核酸类似物和衍生物、由生物材料制成的提取物或其

任何组合。

[0304] 在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中，一种或更多种附加的化合物可以是治疗剂。治疗剂可以选自适合于治疗目的的任何类别。因此，可以从适合于治疗目的的任何类别中选择治疗剂。治疗剂可以根据治疗目的和所需的生物作用进行选择。例如，在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中，如果LNP内的TNA可用于治疗癌症，那么另外的化合物可以是抗癌剂（例如，化学治疗剂、靶向癌症治疗物（包括但不限于小分子、抗体或抗体-药物缀合物）。在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中，如果含有TNA的LNP可用于治疗感染，则另外的化合物可为抗菌剂（例如，抗生素化合物或抗病毒化合物）。在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中，如果含有TNA的LNP可用于治疗免疫疾病或病症，则附加的化合物可为调节免疫应答的化合物（例如，免疫抑制剂、免疫刺激化合物或调节一种或更多种特定免疫途径的化合物）。在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中，含有例如编码不同蛋白质的TNA或例如治疗剂的不同化合物的不同化合物的不同脂质颗粒的不同混合物可以用于本发明的组合物和方法中。在本文的任何方面或实施方式的一个实施方式中，附加的化合物是免疫调节剂。例如，附加的化合物是免疫抑制剂。在本文的任何方面和实施方式中的一些实施方式中，附加化合物是免疫刺激性的。

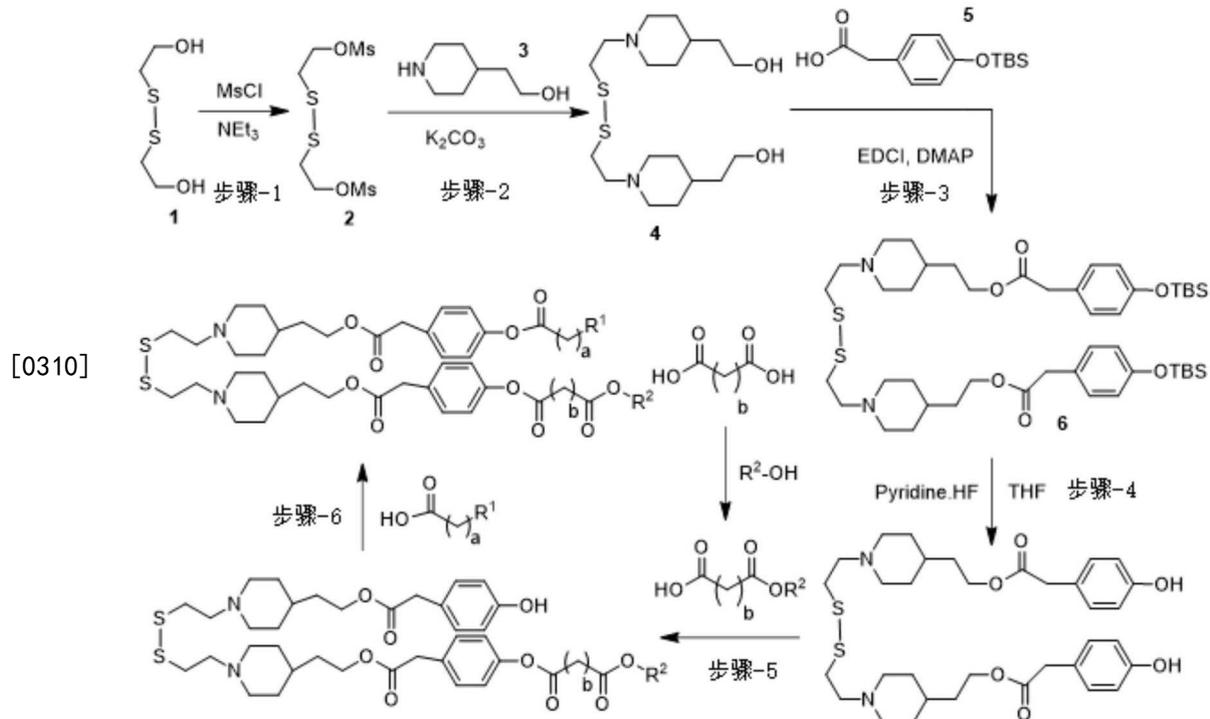
[0305] 实施例

[0306] 以下实施例以说明而非限制的方式提供。本领域普通技术人员将理解，可使用下文描述的通用合成方法设计和合成可电离脂质。

[0307] 通用合成

[0308] 式I的可电离脂质是使用以下方案1中描述的类似合成方法设计和合成的。

[0309] 方案1



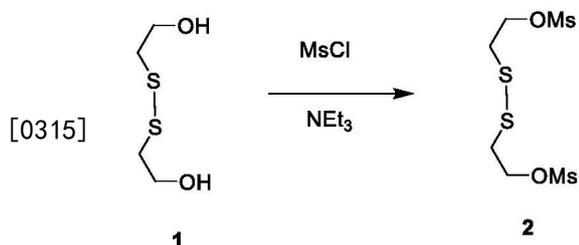
[0311] 实施例1：

[0312] 1-(十七烷-9-基)9-(4-(2-(2-(1-(2-((2-(4-(2-(2-(4-(油酰氧基)苯基)乙酰氧

基)乙基)哌啶-1-基)乙基)二硫烷基)乙基)哌啶-4-基)乙氧基)-2-氧代乙基)苯基)壬二酸酯(脂质1)的合成

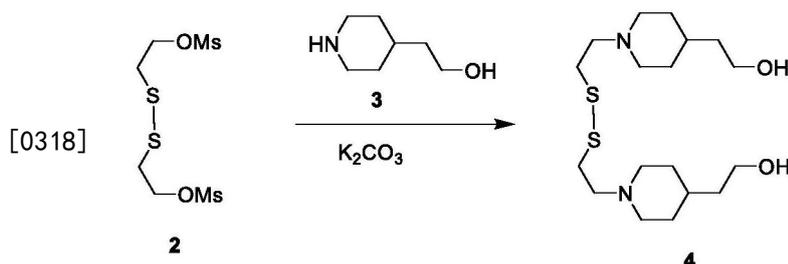
[0313] 可裂解、可电离的头部基团((二硫烷二基双(乙烷-2,1-二基))双(哌啶-1,4-二基))双(乙烷-2,1-二基)双(2-(4-羟基苯基)醋酸盐)(7)的合成

[0314] 步骤-1



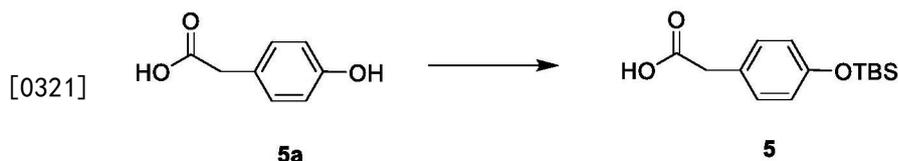
[0316] 二硫烷二基双(乙烷-2,1-二基)二甲基磺酸盐(2)的合成。将市售的2,2'-二硫烷二基双(乙烷-1-醇)(1)(15g,97.2mmol)溶解在乙腈(143ml)中,然后加入三乙胺(NEt_3)(33.3g,328mmol)。在 0°C 下在反应混合物中滴加甲磺酰氯(MsCl)(34.5g,300mmol)。将所得反应混合物在室温下搅拌3小时。向反应混合物中加入乙醇(EtOH)(39ml)以淬灭反应,并且通过过滤除去不溶物。将滤液在二氯甲烷(DCM)(150ml)和10%碳酸氢钠/水(150ml)之间分配。将有机层用100ml水洗涤四次,用硫酸镁(MgSO_4)干燥,蒸发得到呈棕色油状物的2(25g,81%),其在静置时固化。 $^1\text{H-NMR}$ (300MHz,d-氯仿): δ 4.43-4.48(t,4H),3.00-3.10(m,10H)。

[0317] 步骤-2



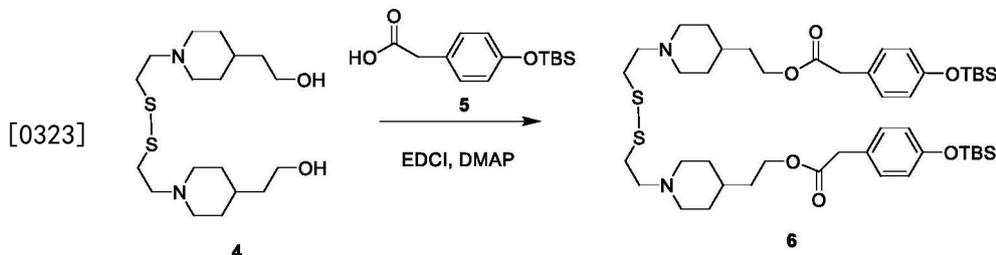
[0319] 2,2'((二硫二烷基双(乙烷-2,1-二基))双(哌啶-1,4-二基))双(乙烷-1-醇)(4)的合成。向2(12g,38.7mmol)在乙腈(310ml)中的溶液中加入碳酸钾(K_2CO_3)(13.4g,96.6mmol),然后加入2-(哌啶-4-基)乙烷-1-醇(3)(20g,155mmol)。将所得混合物在室温下搅拌过夜,然后过滤除去不溶物。滤液蒸发至干得到粗产物,将其溶解在 DCM (100ml)中,用水洗涤两次(50ml),用 MgSO_4 干燥,蒸发得到黄色油状的4(11.8g,79%)。 $^1\text{H-NMR}$ (300MHz,d-氯仿): δ 3.63-3.68(t,4H),2.78-2.90(m,8H),2.62-2.65(t,4H),1.94-2.02(t,4H),1.70(s,2H),1.65-1.70(d,4H),1.27-1.48(t,4H),1.40-1.50(m,2H),1.23-1.27(m,4H)。

[0320] 步骤-3



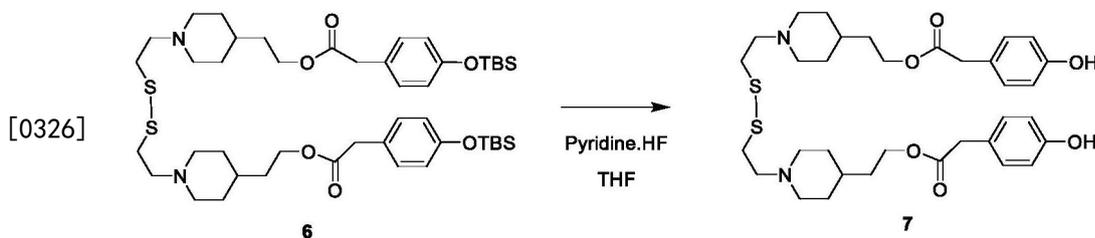
[0322] 2-(4-((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)苯基)乙酸(5)的合成。在 0°C 下,向4-羟基苯乙酸(5a)(10g,65mmol)在二甲基甲酰胺(DMF)(40ml)中的搅拌溶液中加入 NEt_3 (10g,100mmol),然后加入叔丁基二甲基氯硅烷(TBSCl)(15g,100mmol)。将所得反应混合物在室

温下搅拌过夜,然后用水(200ml)和DCM(150ml)处理。分离有机相。水相用DCM(100ml)萃取。合并的有机相用饱和碳酸氢钠溶液、盐水洗涤,并用硫酸钠(Na_2SO_4)干燥。减压除去溶剂并将残余物通过硅胶柱色谱法纯化,使用DCM中的0-10%甲醇(MeOH)作为洗脱液。将含有所需化合物的馏分混合并蒸发,得到5(4.8g,27%)和二叔丁基二甲基甲硅烷基醚(二-TBS)副产物(10.5g,42%)。5的 $^1\text{H-NMR}$ (300MHz,d-氯仿): δ 7.12(d,2H),6.78(d,2H),3.56(s,2H),0.97(s,9H),0.18(s,6H)。



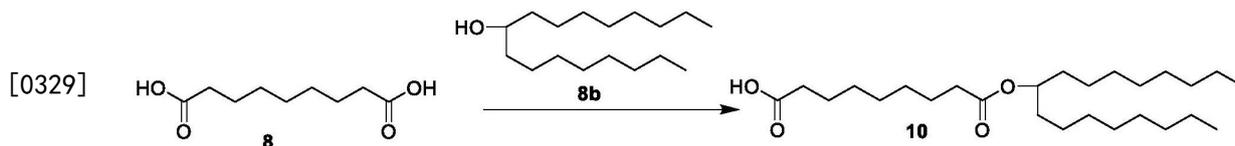
[0324] ((二硫烷二基双(乙烷-2,1-二基))双(哌啶-1,4-二基))双(乙烷-2,1-二基)双(2-(4-((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)苯基)醋酸盐)(6)的合成。向步骤-2产生的二硫化物4(1.92g,5mmol)和苯醋酸5(3.4g,12.8mmol)在DCM(100ml)中的搅拌溶液中加入4-二甲氨基吡啶(DMAP)(1.5g,12.5mmol),然后加入1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺(EDCI)(2.4g,12.5mmol)。将所得混合物在室温下搅拌过夜,然后用饱和碳酸氢钠溶液(200ml)、盐水(150ml)洗涤并用 Na_2SO_4 干燥。减压除去溶剂并将残余物通过硅胶柱色谱法纯化,使用DCM中的0-10%MeOH作为洗脱液。蒸发含有所需化合物的馏分,得到6(4.1g,92%)。6的 $^1\text{H-NMR}$ (300MHz,d-氯仿): δ 7.12(d,4H),6.75(d,4H),4.1(t,4H),3.5(s,4H),2.82(m,8H),2.62(m,4H),1.93(t,4H),1.61-1.45(m,8H),1.26(m,6H),0.97(s,18H),0.17(s,4H)。

[0325] 步骤-4



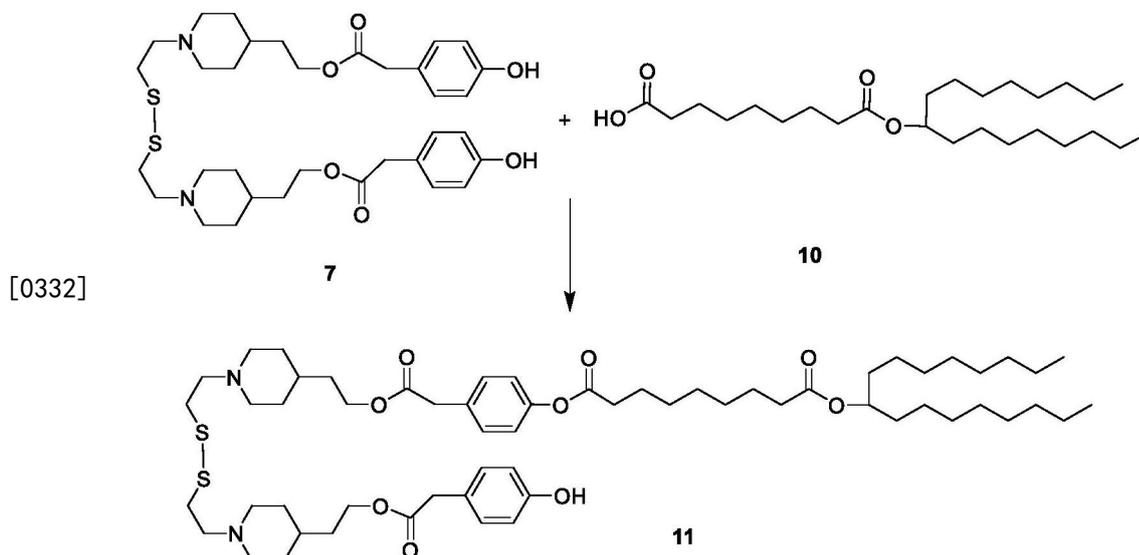
[0327] ((二硫烷二基双(乙烷-2,1-二基))双(哌啶-1,4-二基))双(乙烷-2,1-二基)双(2-(4-羟基苯基)醋酸盐)(7)的合成。在 0°C 下,向四氢呋喃(THF)(40ml)中的二硫化物6(3.1g,3.6mmol)的搅拌溶液中加入氟化氢吡啶(1ml,3.8mmol)。将所得混合物在 0°C 下搅拌2小时,然后在室温下再搅拌2小时。用饱和碳酸氢钠溶液(200ml)处理反应混合物,并用醋酸乙酯($2 \times 150\text{ml}$)萃取。合并的有机相用盐水(100ml)洗涤,用 Na_2SO_4 干燥并浓缩。残余物通过硅胶柱色谱法纯化,使用DCM中的0-10%MeOH作为洗脱液,得到所需产物7(1.92g,82%)。 $^1\text{H-NMR}$ (300MHz,d-氯仿): δ 7.13(d,4H),6.70(d,4H),4.1(t,4H),3.5(s,4H),2.89(m,8H),2.70(m,4H),1.95(t,4H),1.48(m,8H),1.17(m,6H)。

[0328] 9-(十七烷-9-基氧基)-9-氧代壬酸乙酯(10)的合成



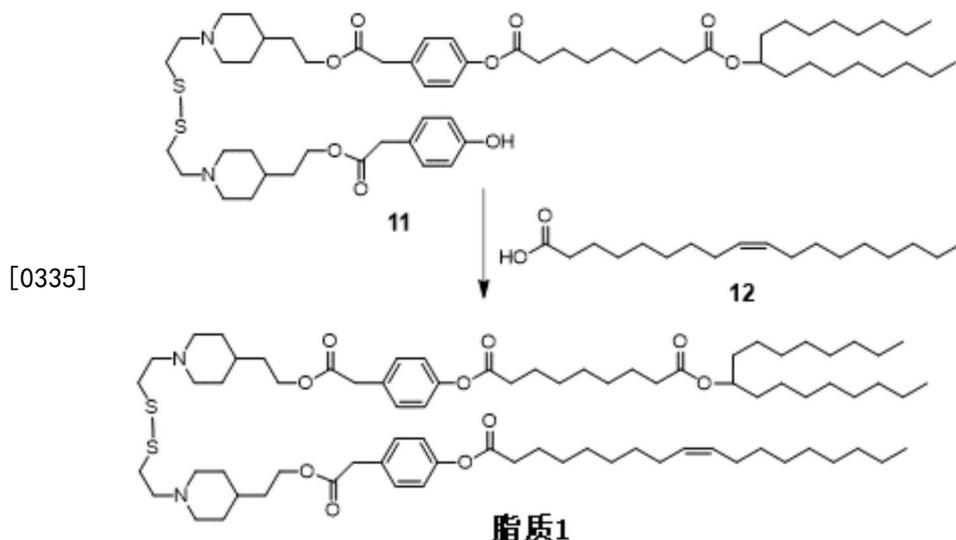
[0330] 9-(十七烷-9-基氧基)-9-氧代壬酸乙酯(10)的合成。向壬二酸(8)(7.34g, 39mmol)和十七烷-9-醇(8b)(5g, 19mmol)在二氯甲烷(1000ml)中的搅拌溶液中加入DMAP(2.37g, 19mmol), 然后加入EDCI(3g, 19mmol)。将所得混合物在室温下搅拌过夜, 然后用250ml 1N HCl和250ml水洗涤。有机层用MgSO₄干燥, 蒸发至干并通过硅胶柱色谱法纯化, 使用DCM中的0-10%MeOH作为洗脱液。合并含有所需化合物的馏分混合并蒸发, 得到呈白色固体状的10(6.2g, 75%)。¹H-NMR(300MHz, d-氯仿): δ4.80-4.90(m, 1H), 2.25-2.34(m, 4H), 1.55-1.70(m, 4H), 1.40-1.50(m, 4H), 1.20-1.40(m, 30H), 0.84-0.90(t, 3H)。

[0331] 1-(十七烷-9-基)9-(4-(2-(2-(1-(2-((2-(4-(2-(2-(4-羟基苯基)乙酰氧基)乙基)哌啶-1-基)乙基)二硫烷基)乙基)哌啶-4-基)乙氧基)-2-氧代乙基)苯基)壬二酸酯的合成



[0333] 1-(十七烷-9-基)9-(4-(2-(2-(1-(2-((2-(4-(2-(2-(4-羟基苯基)乙酰氧基)乙基)哌啶-1-基)乙基)二硫烷基)乙基)哌啶-4-基)乙氧基)-2-氧代乙基)苯基)壬二酸酯(11)的合成。向步骤-4中产生的二硫化物7(580mg, 0.9mmol)和酸10(422mg, 0.99mmol)在DMF(20ml)中的搅拌溶液中添加DMAP(165mg, 1.35mmol), 然后加入EDCI(258mg, 1.35mmol)。将所得混合物在室温下搅拌过夜, 然后加入饱和碳酸氢钠溶液(50ml)。用二氯甲烷(2×50mL)萃取反应混合物。合并的有机相用盐水(30ml)洗涤, 用Na₂SO₄干燥并浓缩。残余物通过硅胶柱色谱法纯化, 使用DCM中的0-10%MeOH作为洗脱液, 得到所需产物11(427mg, 45%)。¹H-NMR(300MHz, d-氯仿): δ7.27(d, 2H), 7.11(d, 2H), 7.03(d, 2H), 6.69(d, 2H), 4.85(m, 1H), 4.1(m, 4H), 3.56(s, 2H), 3.48(s, 2H), 2.92(d, 2H), 2.85-2.69(m, 12H), 2.71(t, 2H), 2.28(t, 2H), 1.95(t, 2H), 1.52-1.01(m, 53H), 0.85(m, 6H)。

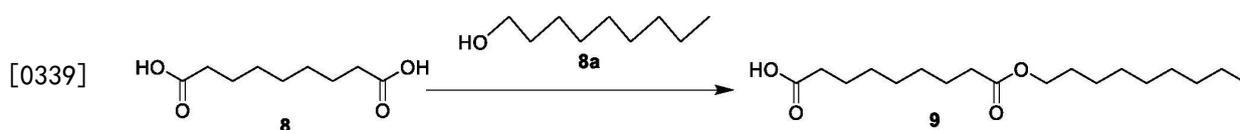
[0334] 脂质1的合成



[0336] 1-(十七烷-9-基)-9-(4-(2-(2-(1-(2-((2-(4-(2-(2-(4-(油酰氧基)苯基)乙酰氧基)乙基)哌啶-1-基)乙基)二硫烷基)乙基)哌啶-4-基)乙氧基)-2-氧代乙基)苯基)壬二酸酯(脂质1)的合成。向二硫化物11 (151mg, 0.14mmol) 和油酸12 (61mg, 0.22mmol) 在二氯甲烷 (10ml) 中的搅拌溶液中加入DMAP (28mg, 0.22mmol), 然后加入EDCI (42mg, 0.22mmol)。将所得混合物在室温下搅拌过夜, 然后用饱和碳酸氢钠溶液 (20ml)、盐水 (20ml) 洗涤并用 Na_2SO_4 干燥。减压除去溶剂并将残余物通过硅胶柱色谱法纯化, 使用DCM中的0-10% MeOH作为洗脱液。蒸发含有所需化合物的馏分, 得到脂质1 (126mg, 68%)。脂质1的 $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, d-氯仿): δ 7.25 (d, 4H), 7.01 (d, 4H), 5.34 (m, 2H), 4.86 (m, 1H), 4.11 (t, 4H), 3.58 (s, 4H), 2.91-2.70 (m, 8H), 2.62 (m, 4H), 2.53 (t, 4H), 2.28 (t, 2H), 2.05-1.87 (m, 8H), 1.78-1.46 (m, 22H), 1.48-1.23 (m, 54H), 0.86 (t, 9H)。MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1318。

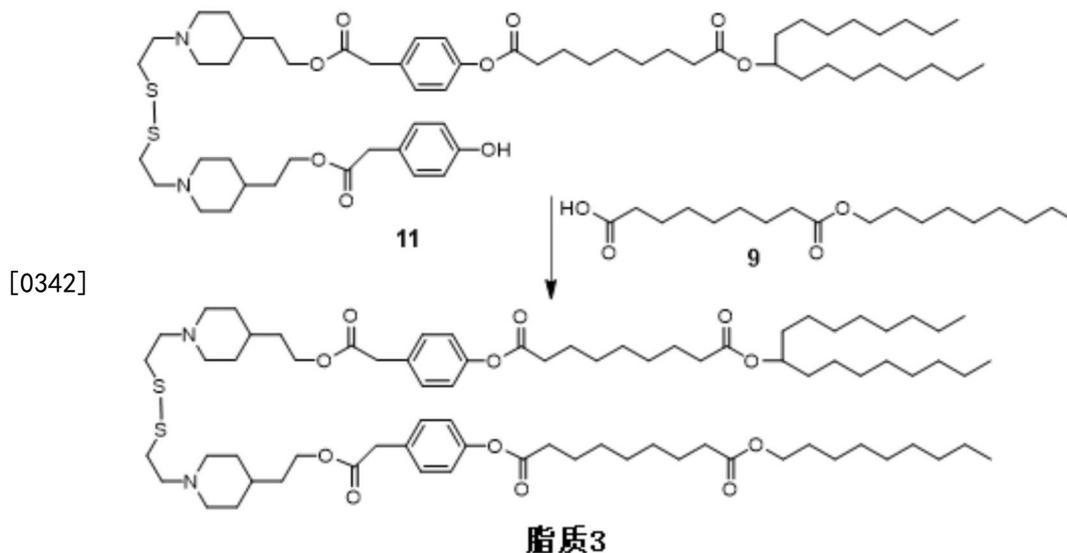
[0337] 实施例2: 1-(十七烷-9-基)-9-(4-(2-(2-(1-(2-((2-(4-(2-(2-(4-((9-(壬氧基)-9-氧代壬酰基)氧基)苯基)乙酰氧基)乙基)哌啶-1-基)乙基)二硫烷基)乙基)哌啶-4-基)乙氧基)-2-氧代乙基)苯基)壬二酸酯(脂质3)的合成

[0338] 9-(壬氧基)-9-氧代壬酸乙酯(9)的合成



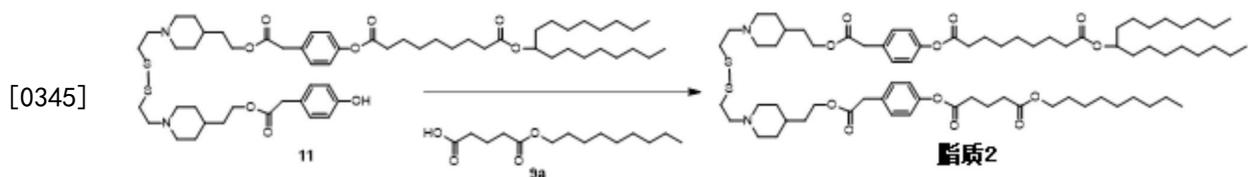
[0340] 9-(壬氧基)-9-氧代壬酸乙酯(9)的合成。向壬二酸(8) (13.2g, 0.1mol) 和壬醇-1-醇(8a) (7.2g, 0.05mol) 在DCM(1000ml) 中的搅拌溶液中加入DMAP (6.1g, 0.05mol), 然后加入EDCI (7.7g, 0.05mol)。将所得混合物在室温下搅拌过夜, 然后用1N盐酸(HCl)溶液 (500ml) 和水 (500ml) 洗涤。有机层用 MgSO_4 干燥, 蒸发至干并通过硅胶柱色谱法纯化, 使用DCM中的0-10% MeOH作为洗脱液。合并含有所需化合物的馏分混合并蒸发, 得到呈白色固体状的9 (12.6g, 81%)。 $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, d-氯仿): δ 4.03-4.07 (t, 2H), 2.28-2.34 (m, 4H), 1.58-1.63 (m, 6H), 1.26-1.32 (m, 18H), 0.85-0.87 (t, 3H)。

[0341] 脂质3的合成



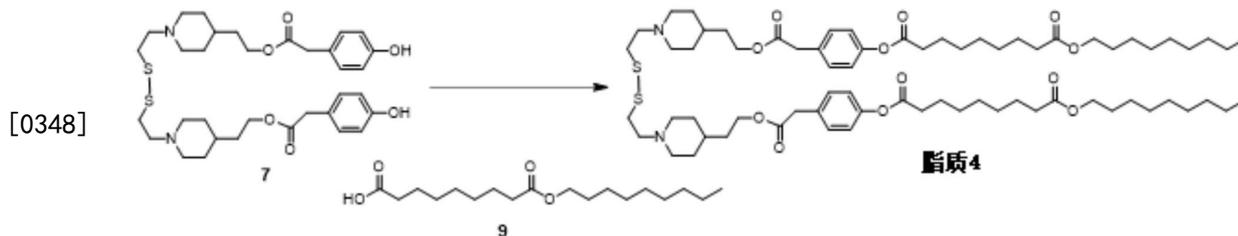
[0343] 1-(十七烷-9-基)9-(4-(2-(2-(1-(2-((2-(4-(2-(2-(4-((9-(壬氧基)-9-氧代壬酰基)氧基)苯基)乙酰氧基)乙基)哌啶-1-基)乙基)二硫烷基)乙基)哌啶-4-基)乙氧基)-2-氧代乙基)苯基)壬二酸酯(脂质3)的合成。向二硫化物11(实施例1中所述的分步合成)(150mg,0.14mmol)和酸9(62mg,0.22mmol)在二氯甲烷(10ml)中的搅拌溶液中加入DMAP(28mg,0.22mmol),然后加入EDCI(42mg,0.22mmol)。将所得混合物在室温下搅拌过夜,然后用饱和碳酸氢钠溶液(20ml)、盐水(20ml)洗涤并用 Na_2SO_4 干燥。减压除去溶剂并将残余物通过硅胶柱色谱法纯化,使用DCM中的0-10%MeOH作为洗脱液。蒸发含有所需化合物的馏分,得到脂质3(114mg,60%)。脂质3的 $^1\text{H-NMR}$ (300MHz,d-氯仿): δ 7.28(d,4H),7.02(d,4H),4.86(m,1H),4.11(t,4H),4.04(t,2H),3.58(s,4H),2.93-2.77(m,8H),2.63(m,4H),2.53(t,4H),2.28(m,4H),1.95(t,4H),1.85-1.47(m,24H),1.45-1.16(m,54H),0.86(t,9H)。MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1350。

[0344] 实施例3:1-(十七烷-9-基)9-(4-(2-(2-(1-(2-((2-(4-(2-(2-(4-((5-(壬氧基)-5-氧代戊酰基)氧基)苯基)乙酰氧基)乙基)哌啶-1-基)乙基)二硫烷基)乙基)哌啶-4-基)乙氧基)-2-氧代乙基)苯基)壬二酸酯(脂质2)的合成



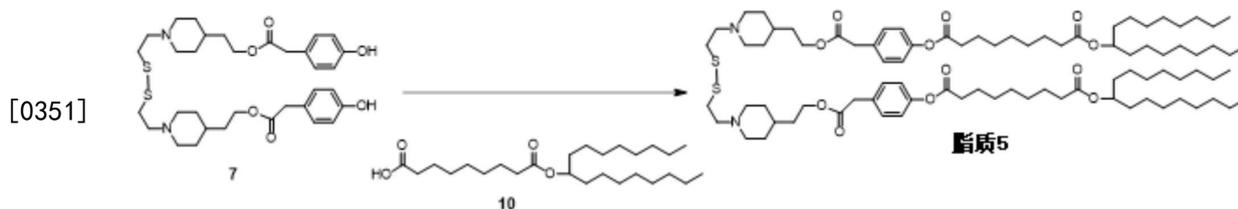
[0346] 向二硫化物11(实施例1中所述的分步合成)(150mg,0.14mmol)和酸9a(参见实施例1中对酸9所述的合成,其中壬二酸(8)被市售戊二酸替代作为起始材料与壬烷-1-醇(8a)反应以产生9a)(57mg,0.22mmol)在DCM(10ml)中的搅拌溶液中加入DMAP(28mg,0.22mmol),然后加入EDCI(42mg,0.22mmol)。将所得混合物在室温下搅拌过夜,然后用饱和碳酸氢钠溶液(20ml)、盐水(20ml)洗涤并用 Na_2SO_4 干燥。减压除去溶剂并将残余物通过硅胶柱色谱法纯化,使用DCM中的0-10%MeOH作为洗脱液。蒸发含有所需化合物的馏分,得到脂质2(151mg,81%)。脂质2的 $^1\text{H-NMR}$ (300MHz,d-氯仿): δ 7.26(d,4H),7.01(d,4H),4.86(m,1H),4.10-4.02(t,6H),3.57(s,4H),3.01(d,4H),2.83-2.72(m,4H),2.34-2.21(m,14H),2.15-1.91(m,6H),1.74-1.41(m,12H),1.39-1.16(m,52H),0.86(t,9H)。MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1293。

[0347] 实施例4:1-(十七烷-9-基)9-(4-(2-(2-(1-(2-((2-(4-(2-(2-(4-(5-(壬氧基)-5-氧代戊酰基)氧基)苯基)乙酰氧基)乙基)哌啶-1-基)乙基)二硫烷基)乙基)哌啶-4-基)乙氧基)-2-氧代乙基)苯基)壬二酸酯(脂质4)的合成



[0349] 向二硫化物7(实施例1中所述的分步合成)(150mg,0.23mmol)和化合物9(实施例2中所述的合成)(146mg,0.46mmol)在二氯甲烷(5ml)和DMF(3ml)混合物中的搅拌溶液中加入DMAP(70mg,0.57mmol),然后在0℃下加入EDCI(109mg,0.57mmol)。将所得混合物在0℃搅拌15分钟,然后在室温下搅拌过夜。加入DCM(20ml),将反应混合物用饱和碳酸氢钠溶液(20ml)、盐水(20ml)洗涤,用Na₂SO₄干燥。减压除去溶剂并将残余物通过硅胶柱色谱法纯化,使用DCM中的0-10%MeOH作为洗脱液。蒸发含有所需化合物的馏分,得到脂质4(180mg,63%)。脂质4的¹H-NMR(300MHz,d-氯仿):δ7.28(d,4H),7.02(d,4H),4.11(t,4H),4.04(t,4H),3.58(s,4H),2.93-2.67(m,8H),2.63-2.55(m,4H),2.53(t,4H),2.29(t,4H),1.94(t,4H),1.85-1.47(m,20H),1.45-1.16(m,42),0.87(t,6H)。MS[M+H]⁺1237。

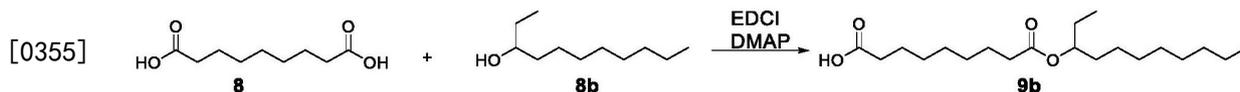
[0350] 实施例5:0',01-((((((二硫烷二基双(乙烷-2,1-二基))双(哌啶-1,4-二基))双(乙烷-2,1-二基))双(氧基))双(2-氧代乙烷-2,1-二基))双(4,1-伸苯基))9,9'-二(十七烷-9-基)二(壬二酸酯)(脂质5)



[0352] 向二硫化物7(实施例1中所述的分步合成)(580mg,0.9mmol)和酸10(实施例1所述的合成)(422mg,0.99mmol)在DMF(20ml)中的搅拌溶液中加入DMAP(164mg,1.35mmol),然后在0℃下加入EDCI(257mg,1.35mmol)。将所得混合物在0℃搅拌15分钟,然后在室温下搅拌过夜。加入DCM(60ml),将反应混合物用饱和碳酸氢钠溶液(20ml)、盐水(20ml)洗涤,用Na₂SO₄干燥。减压除去溶剂并将残余物通过硅胶柱色谱法纯化,使用DCM中的0-10%MeOH作为洗脱液。蒸发含有所需化合物的馏分,得到脂质5(280mg,38%)。脂质5的¹H-NMR(300MHz,d-氯仿):δ7.26(d,4H),7.02(d,4H),4.85(m,2H),4.11(t,4H),3.58(s,4H),2.86-2.77(m,8H),2.63(m,4H),2.53(t,4H),2.27(t,4H),1.92(t,4H),1.75-1.47(m,26H),1.45-1.16(m,64H),0.86(t,12H)。MS[M+H]⁺1462。

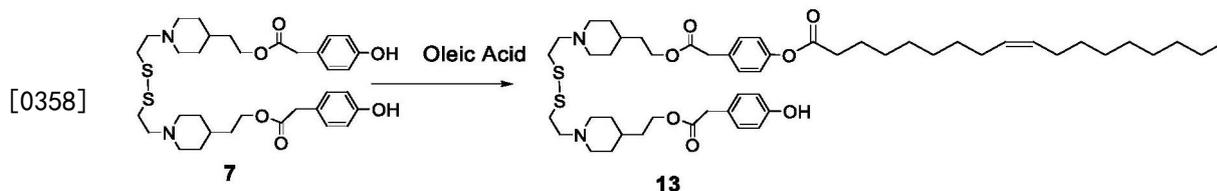
[0353] 实施例6:1-(4-(2-(2-(1-(2-((2-(4-(2-(2-(4-(油酰氧基)苯基)乙酰氧基)乙基)哌啶-1-基)乙基)二硫烷基)乙基)哌啶-4-基)乙氧基)-2-氧代乙基)苯基)9-(十一烷-3-基)壬二酸酯(脂质6)的合成

[0354] 9-氧代-9-(十一烷-3-基氧基)壬酸(9b)的合成



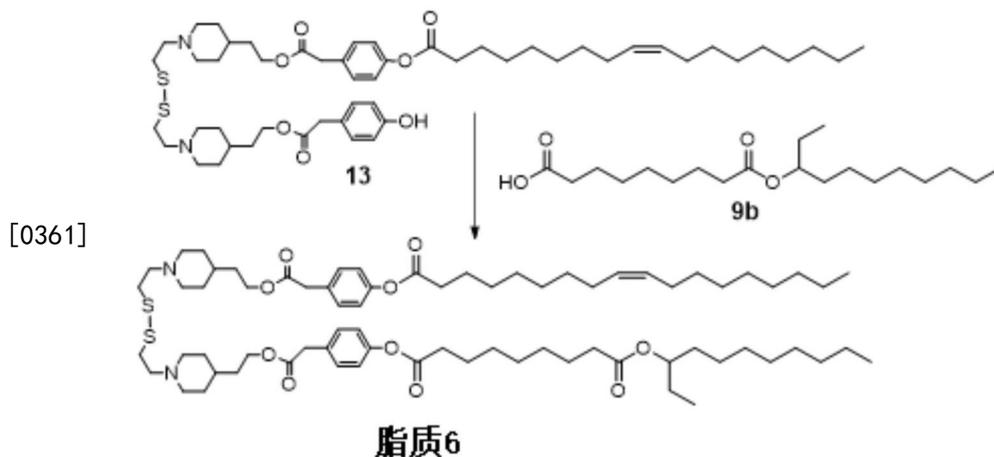
[0356] 9-氧代-9-(十一烷-3-基氧基)壬酸(9b)的合成。向搅拌下的壬二酸(8)(10.9g, 0.058mol)和十一烷-3-醇(8b)(5g, 0.029mol)在DCM(500ml)中的搅拌溶液中加入DMAP(3.5g, 0.03mol), 然后加入EDCI(4.5g, 0.03mol)。将所得混合物在室温下搅拌过夜, 然后用1N HCl溶液(500ml)和水(500ml)洗涤。有机层用MgSO₄干燥, 蒸发至干并通过硅胶柱色谱法纯化, 使用DCM中的0-10%MeOH作为洗脱液。合并含有所需化合物的馏分混合并蒸发, 得到呈白色固体状的9b(6.5g, 66%)。¹H-NMR(300MHz, d-氯仿): δ4.79-4.83(t, 1H), 2.28-2.34(m, 4H), 1.25-1.33(m, 8H), 1.26-1.32(m, 18H), 0.85-0.87(t, 6H)。

[0357] 4-(2-(2-(1-(2-((2-(4-(2-(2-(4-羟基苯基)乙酰氧基)乙基)哌啶-1-基)乙基)二硫烷基)乙基)哌啶-4-基)乙氧基)-2-氧代乙基)油酸苯酯(13)的合成



[0359] 4-(2-(2-(1-(2-((2-(4-(2-(2-(4-羟基苯基)乙酰氧基)乙基)哌啶-1-基)乙基)二硫烷基)乙基)哌啶-4-基)乙氧基)-2-氧代乙基)油酸苯酯(13)的合成。向二硫化物7(实施例1中所述的分步合成)(2.0g, 3mmol)和油酸(或实施例1中所述的酸12)(0.79g, 2.8mmol)在DCM(200ml)中的搅拌溶液中加入DMAP(340mg, 2.8mmol), 然后加入EDCI(440mg, 2.8mmol)。将所得混合物在室温下搅拌过夜, 然后加入饱和碳酸氢钠溶液(20ml)。用二氯甲烷(2×50mL)萃取反应混合物。合并的有机相用盐水(30ml)洗涤, 用Na₂SO₄干燥并浓缩。残余物通过硅胶柱色谱法纯化, 使用二氯甲烷中的0-5%甲醇作为洗脱液, 得到白色固体状的13(1.6g, 57%)。所得产物不经进一步表征, 直接用于下一步骤。

[0360] 脂质6的合成

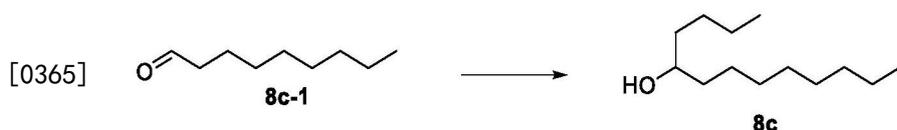


[0362] 1-(4-(2-(2-(1-(2-((2-(4-(2-(2-(4-(油酰氧基)苯基)乙酰氧基)乙基)哌啶-1-基)乙基)二硫烷基)乙基)哌啶-4-基)乙氧基)-2-氧代乙基)苯基)9-(十一烷-3-基)壬二酸酯(脂质6)的合成。向二硫化物13(250mg, 0.27mmol)和酸9b(113mg, 0.33mmol)在DCM(20ml)中的搅拌溶液中加入DMAP(40mg, 0.33mmol), 然后加入EDCI(51mg, 0.33mmol)。将所得混合

物在室温下搅拌过夜,然后用饱和碳酸氢钠溶液(20ml)、盐水(20ml)洗涤并用 Na_2SO_4 干燥。减压除去溶剂并将残余物通过硅胶柱色谱法纯化,使用DCM中的0-5%MeOH作为洗脱液。蒸发含有所需化合物的馏分,得到脂质6(120mg,36%)。 $^1\text{H-NMR}$ (300MHz,d-氯仿): δ 7.31(d,4H),7.05(d,4H),5.36-5.40(m,2H),4.86(m,1H),4.11(t,4H),3.62(t,4H),2.77-2.90(m,8H),2.55-2.71(m,8H),2.30-2.34(m,2H),1.96-2.05(m,8H),1.77(m,4H),1.58-1.67(m,18H),1.30-1.58(m,40H),0.89(t,9H)。

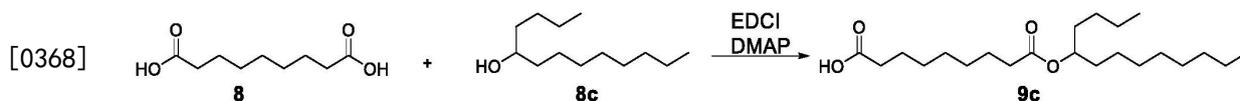
[0363] 实施例7:1-(4-(2-(2-(1-(2-((2-(4-(2-(2-(4-(油酰氧基)苯基)乙酰氧基)乙基)哌啶-1-基)乙基))二硫烷基)乙基)哌啶-4-基)乙氧基)-2-氧代乙基)苯基)9-(十三烷-5-基)壬二酸酯(脂质7)的合成

[0364] 十三烷-5-醇(8c)的合成



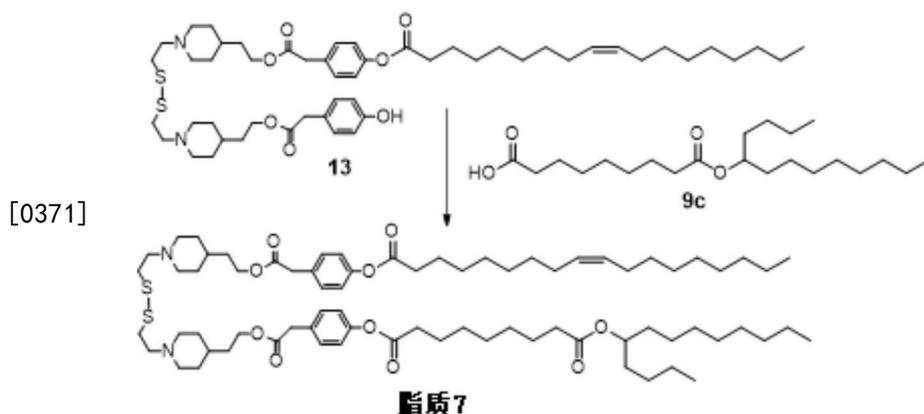
[0366] 十三烷-5-醇(8c)的合成。在 -78°C 下,向100ml无水THF中的醛8c-1(7.1g,0.05mol)溶液中逐滴加入2M丁基锂(BuLi)(27ml)的THF溶液。将所得混合物在 -78°C 搅拌2小时,然后在室温下搅拌2小时。通过加入水淬灭反应并在1N HCl和乙醚之间分配。收集有机层,用 MgSO_4 干燥,并蒸发得到黄色油状粗品8c(10g,100%),其不经进一步纯化直接用于下一步。

[0367] 9-氧代-9-(十三烷-5-基氧基)壬酸(9c)的合成



[0369] 9-氧代-9-(十三烷-5-基氧基)壬酸(9c)的合成。向壬二酸(8)(9.4g,0.05mol)和8c(5g,0.025mol)在DCM(500ml)中的搅拌溶液中加入DMAP(3.05g,0.025mol),然后加入EDCI(3.88g,0.025mol)。将所得混合物在室温下搅拌过夜,然后用1N HCl溶液(500ml)和水(500ml)洗涤。有机层用 MgSO_4 干燥,蒸发至干并通过硅胶柱色谱法纯化,使用DCM中的0-10%MeOH作为洗脱液。合并含有所需化合物的馏分混合并蒸发,得到呈白色固体状的9c(2.5g,27%)。 $^1\text{H-NMR}$ (300MHz,d-氯仿): δ 4.84-4.87(t,1H),2.28-2.34(m,4H),1.58-1.63(m,7H),1.26-1.32(m,23H),0.85-0.87(t,6H)。

[0370] 脂质7的合成

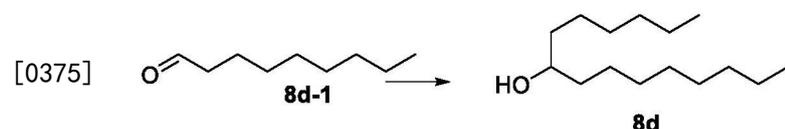


[0372] 1-(4-(2-(2-(1-(2-((2-(4-(2-(2-(4-(油酰氧基)苯基)乙酰氧基)乙基)哌啶-1-

基)乙基)二硫烷基)乙基)哌啶-4-基)乙氧基)-2-氧代乙基)苯基)9-(十三烷-5-基)壬二酸酯(脂质7)的合成。向二硫化物13(实施例6所述的合成)(250mg,0.27mmol)和酸9c(116mg,0.33mmol)在DCM(20ml)中的搅拌溶液中加入DMAP(40mg,0.33mmol),然后加入EDCI(51mg,0.33mmol)。将所得混合物在室温下搅拌过夜,然后用饱和碳酸氢钠溶液(20ml)、盐水(20ml)洗涤并用 Na_2SO_4 干燥。减压除去溶剂并将残余物通过硅胶柱色谱法纯化,使用DCM中的0-5%MeOH作为洗脱液。蒸发含有所需化合物的馏分,得到脂质7(160mg,40%)。 $^1\text{H-NMR}$ (300MHz,d-氯仿): δ 7.29(d,4H),7.04(d,4H),5.29-5.34(m,2H),4.86(m,1H),4.11(t,4H),3.58(t,4H),2.77-2.90(m,8H),2.51-2.79(m,8H),2.28(m,2H),1.94-2.05(m,8H),1.70-1.80(m,4H),1.49-1.67(m,18H),1.10-1.40(m,46H),0.88(t,9H)。

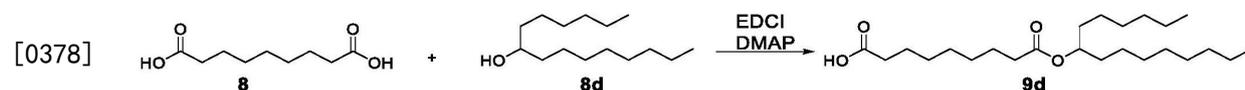
[0373] 实施例8:1-(4-(2-(2-(1-(2-((2-(4-(2-(2-(4-(油酰氧基)苯基)乙酰氧基)乙基)哌啶-1-基)乙基)二硫烷基)乙基)哌啶-4-基)乙氧基)-2-氧代乙基)苯基)9-(十五烷-7-基)壬二酸酯(脂质8)的合成

[0374] 十七烷-7-醇(8d)的合成



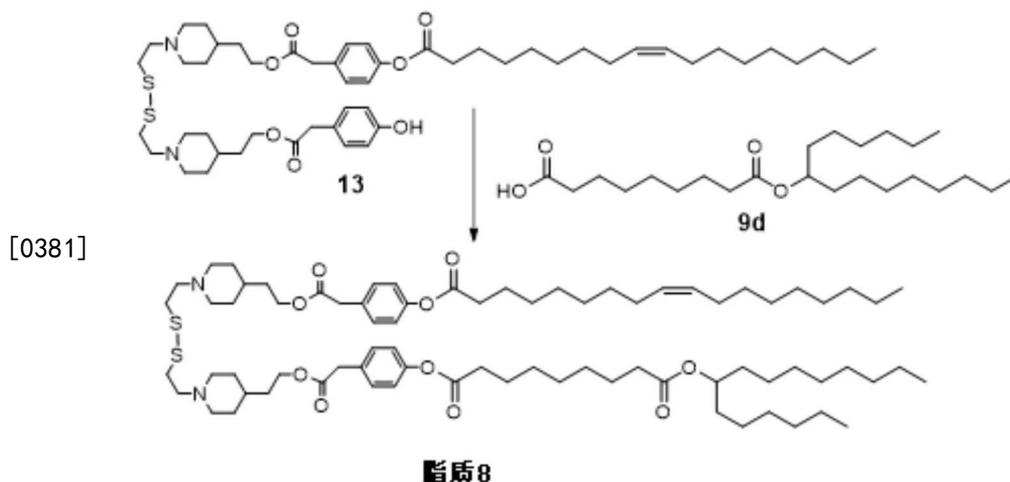
[0376] 十七烷-7-醇(8d)的合成。在 -78°C 下,向100ml无水THF中的醛8d-1(7.1g,0.05mol)溶液中加入2M己基溴化镁的THF(27ml)溶液。将所得混合物在 -78°C 下搅拌2小时,然后在室温下过夜。通过加入水淬灭反应并在1NHC1和乙醚之间分配。收集有机层,用 MgSO_4 干燥,并蒸发得到呈白色固体状的粗品8d(11g,100%),其不经进一步纯化直接用于下一步。

[0377] 9-氧代-9-(十五烷-7-基氧基)壬酸(9d)的合成



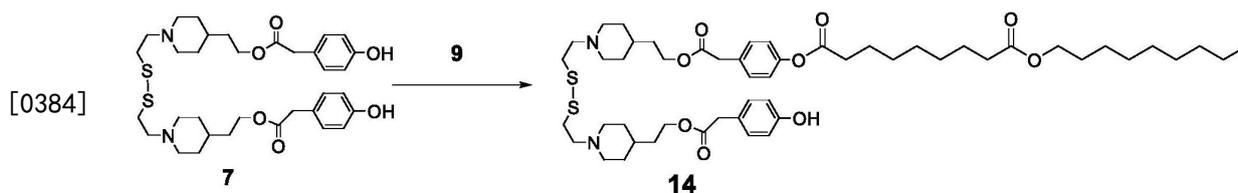
[0379] 9-氧代-9-(十五烷-7-基氧基)壬酸(9d)的合成。向壬二酸(8)(9.4g,0.05mol)和十五烷-7-醇(8d)(5.7g,0.025mol)在DCM(1000ml)中的搅拌溶液中加入DMAP(3.05g,0.025mol),然后加入EDCI(3.88g,0.025mol)。将所得混合物在室温下搅拌过夜,然后用1NHC1溶液(500ml)和水(500ml)洗涤。有机层用 MgSO_4 干燥,蒸发至干,并通过硅胶柱色谱法纯化,使用DCM中的0-10%MeOH作为洗脱液。合并含有所需化合物的馏分混合并蒸发,得到呈白色固体状的9d(6.2g,62%)。 $^1\text{H-NMR}$ (300MHz,d-氯仿): δ 4.86(t,1H),2.28-2.34(m,4H),1.58-1.63(m,8H),1.26-1.32(m,27H),0.85-0.87(t,6H)。

[0380] 脂质8的合成



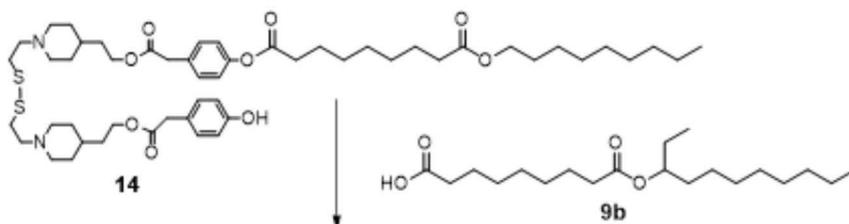
[0382] 1-(4-(2-(2-(1-(2-((2-(4-(2-(2-(4-(油酰氧基)苯基)乙酰氧基)乙基)哌啶-1-基)乙基)二硫烷基)乙基)哌啶-4-基)乙氧基)-2-氧代乙基)苯基)9-(十五烷-7-基)壬二酸酯(脂质8)的合成。向二硫化物13(实施例6所述的合成)(250mg,0.27mmol)和酸9d(120mg,0.33mmol)在DCM(20ml)中的搅拌溶液中加入DMAP(40mg,0.33mmol),然后加入EDCI(51mg,0.33mmol)。将所得混合物在室温下搅拌过夜,然后用饱和碳酸氢钠溶液(20ml)、盐水(20ml)洗涤并用 Na_2SO_4 干燥。减压除去溶剂并将残余物通过硅胶柱色谱法纯化,使用DCM中的0-5% MeOH作为洗脱液。蒸发含有所需化合物的馏分,得到脂质8(170mg,40%)。 $^1\text{H-NMR}$ (300MHz,d-氯仿): δ 7.29(d,4H),7.04(d,4H),5.29-5.34(m,2H),4.86(m,1H),4.11(t,4H),3.58(t,4H),2.80-2.93(m,8H),2.51-2.68(m,8H),2.28(m,2H),1.97-2.05(m,8H),1.70-1.80(m,4H),1.50-1.70(m,18H),1.10-1.40(m,58H),0.87(t,9H)。实施例9:1-壬基9-(4-(2-氧代-2-(2-(1-(2-((2-(4-(2-(2-(4-((9-氧代-9-(十一烷-3-基氧基)壬酰基)氧基)苯基)乙酰氧基)乙基)哌啶-1-基)乙基)二硫烷基)乙基)哌啶-4-基)乙氧基)乙基)苯基)壬二酸酯(脂质9)的合成

[0383] 1-(4-(2-(2-(1-(2-((2-(4-(2-(2-(4-羟基苯基)乙酰氧基)乙基)哌啶-1-基)乙基)二硫烷基)乙基)哌啶-4-基)乙氧基)-2-氧代乙基)苯基)9-壬基壬二酸酯(14)的合成。

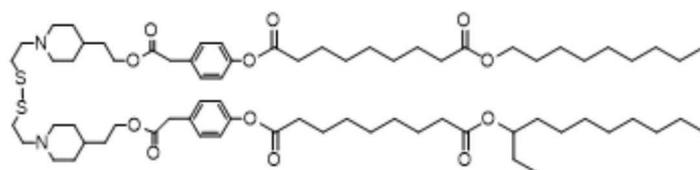


[0385] 1-(4-(2-(2-(1-(2-((2-(4-(2-(2-(4-羟基苯基)乙酰氧基)乙基)哌啶-1-基)乙基)二硫烷基)乙基)哌啶-4-基)乙氧基)-2-氧代乙基)苯基)9-壬基壬二酸酯(14)的合成。向二硫化物7(实施例1中所述的分步合成)(3.1g,4.8mmol)和9-(壬氧基)-9-氧代壬酸乙酯(9)(实施例1中所述的合成)(1.51g,4.8mmol)在二氯甲烷(200ml)中的搅拌溶液中加入DMAP(587mg,4.8mmol),然后加入EDCI(746mg,4.8mmol)。将所得混合物在室温下搅拌过夜,然后加入饱和碳酸氢钠溶液(50ml)。用二氯甲烷($2 \times 50\text{mL}$)萃取反应混合物。合并的有机相用盐水(30ml)洗涤,用 Na_2SO_4 干燥并浓缩。残余物通过硅胶柱色谱法纯化,使用DCM中的0-5% MeOH作为洗脱液,得到所需产物14(2.47g,55%)。所得产物不经进一步表征,直接用于下一步骤。

[0386] 脂质9的合成



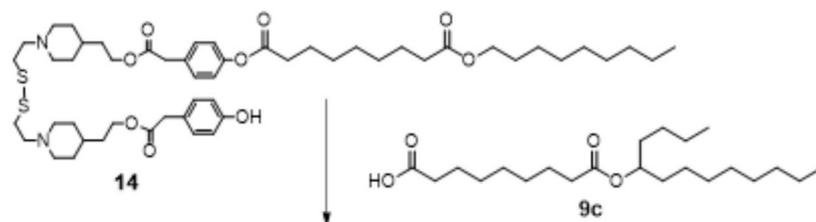
[0387]



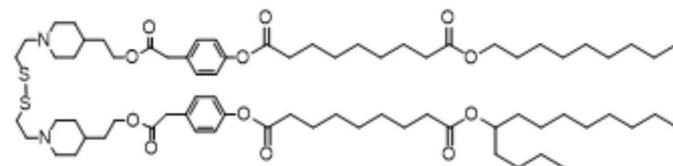
脂质9

[0388] 1-壬基9-(4-(2-氧代-2-(2-(1-(2-((2-(4-(2-(2-(4-((9-氧代-9-(十一烷-3-基氧基)壬酰基)氧基)苯基)乙酰氧基)乙基)哌啶-1-基)乙基)二硫烷基)乙基)哌啶-4-基)乙氧基)乙基)苯基)壬二酸酯(脂质9)的合成。向二硫化物14(250mg,0.26mmol)和酸9b(实施例6中所述的合成)(110mg,0.32mmol)在二氯甲烷(20ml)中的搅拌溶液中加入DMAP(46mg,0.37mmol),然后加入EDCI(50mg,0.32mmol)。将所得混合物在室温下搅拌过夜,然后用饱和碳酸氢钠溶液(20ml)、盐水(20ml)洗涤并用 Na_2SO_4 干燥。减压除去溶剂并将残余物通过硅胶柱色谱法纯化,使用DCM中的0-5%MeOH作为洗脱液。蒸发含有所需化合物的馏分,得到脂质9(230mg,68%)。 $^1\text{H-NMR}$ (300MHz,d-氯仿): δ 7.28(d,4H),7.04(d,4H),4.86(m,1H),4.06-4.12(t,4H),4.04(t,2H),3.59(s,4H),2.60-2.90(m,8H),2.27-2.60(m,10H),1.97(t,3H),1.52-1.80(m,18H),1.10-1.40(m,40H),0.88(t,9H)。

[0389] 实施例10:1-壬基9-(4-(2-氧代-2-(2-(1-(2-((2-(4-(2-(2-(4-((9-氧代-9-(十三烷-5-基氧基)壬酰基)氧基)苯基)乙酰氧基)乙基)哌啶-1-基)乙基)二硫烷基)乙基)哌啶-4-基)乙氧基)乙基)苯基)壬二酸酯(脂质10)的合成



[0390]

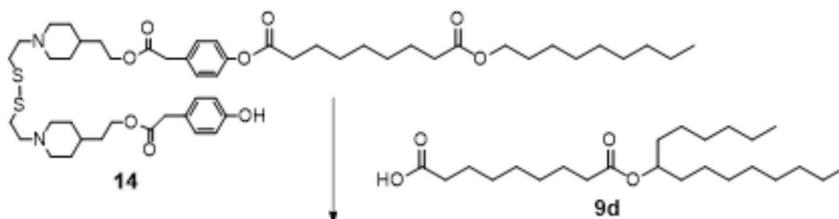


脂质10

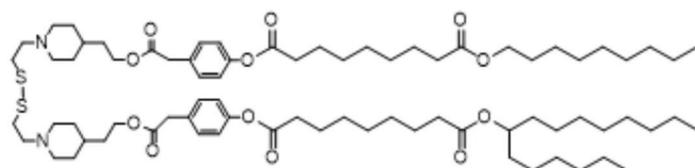
[0391] 1-壬基9-(4-(2-氧代-2-(2-(1-(2-((2-(4-(2-(2-(4-((9-氧代-9-(十三烷-5-基氧基)壬酰基)氧基)苯基)乙酰氧基)乙基)哌啶-1-基)乙基)二硫烷基)乙基)哌啶-4-基)乙氧基)乙基)苯基)壬二酸酯(脂质10)的合成。向二硫化物14(实施例9中所述的合成)(330mg,0.35mmol)和酸9c(实施例7中所述的合成)(143mg,0.39mmol)在二氯甲烷(20ml)中的搅拌溶液中加入DMAP(47mg,0.39mmol),然后加入EDCI(60mg,0.39mmol)。将所得混合物在

室温下搅拌过夜,然后用饱和碳酸氢钠溶液(20ml)、盐水(20ml)洗涤并用 Na_2SO_4 干燥。减压除去溶剂并将残余物通过硅胶柱色谱法纯化,使用二氯甲烷中的0-5%甲醇作为洗脱液。蒸发含有所需化合物的馏分,得到脂质10(150mg,33%)。 $^1\text{H-NMR}$ (300MHz,d-氯仿): δ 7.26(d,4H),7.03(d,4H),4.86(m,1H),4.05-4.11(t,6H),3.58(s,4H),2.80-2.90(m,8H),2.50-2.70(m,8H),2.26-2.29(m,4H),1.92-1.99(m,4H),1.50-1.80(m,24H),1.16-1.40(m,46H),0.87(t,9H)。

[0392] 实施例11:1-壬基9-(4-(2-氧代-2-(2-(1-(2-((2-(4-(2-(2-(4-((9-氧代-9-(十五烷-7-基氧基)壬酰基)氧基)苯基)乙酰氧基)乙基)哌啶-1-基)乙基)二硫烷基)乙基)哌啶-4-基)乙氧基)乙基)苯基)壬二酸酯(脂质11)的合成



[0393]

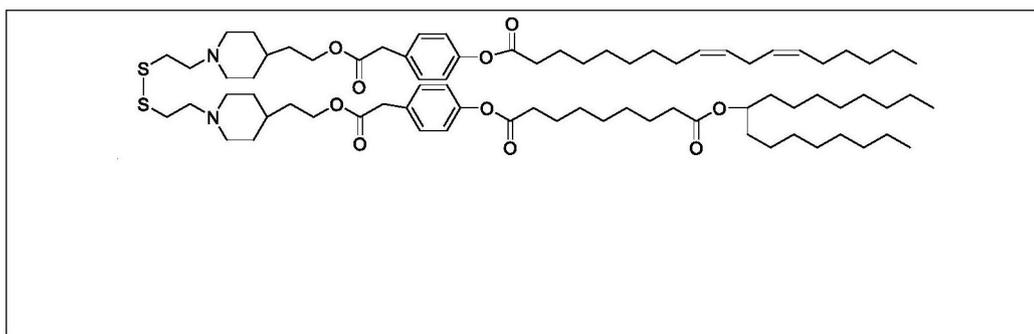


脂质11

[0394] 1-壬基9-(4-(2-氧代-2-(2-(1-(2-((2-(4-(2-(2-(4-((9-氧代-9-(十五烷-7-基氧基)壬酰基)氧基)苯基)乙酰氧基)乙基)哌啶-1-基)乙基)二硫烷基)乙基)哌啶-4-基)乙氧基)乙基)苯基)壬二酸酯(脂质11)的合成。向二硫化物14(实施例9中所述的合成)(260mg,0.28mmol)和酸9d(实施例8中所述的合成)(122mg,0.3mmol)在DCM(20ml)中的搅拌溶液中加入DMAP(37mg,0.3mmol),然后加入EDCI(47mg,0.3mmol)。将所得混合物在室温下搅拌过夜,然后用饱和碳酸氢钠溶液(20ml)、盐水(20ml)洗涤并用 Na_2SO_4 干燥。减压除去溶剂并将残余物通过硅胶柱色谱法纯化,使用DCM中的0-5%MeOH作为洗脱液。蒸发含有所需化合物的馏分,得到脂质11(110mg,30%)。脂质11的 $^1\text{H-NMR}$ (300MHz,d-氯仿): δ 7.26(d,4H),7.02(d,4H),4.86(m,1H),4.05-4.11(t,6H),3.59(s,4H),2.80-2.90(m,8H),2.50-2.70(m,8H),2.27-2.29(m,4H),1.90-2.20(t,4H),1.50-1.82(m,24H),1.10-1.40(m,50H),0.87(t,9H)。

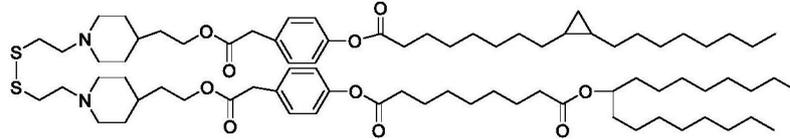
[0395] 表4中的下列脂质12-20是按照类似的程序用合适的起始材料和本领域普通技术人员知识范围内的其他修饰制备的。

[0396] 表4.

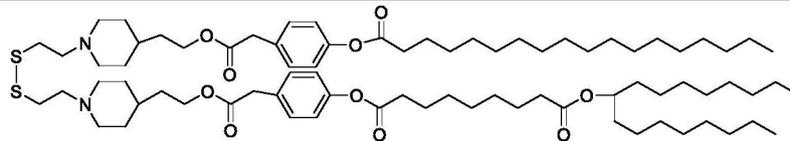


[0397]

1-(十七烷-9-基)9-(4-(2-(2-(1-(2-((2-(4-(2-(2-(4-(((9Z, 12Z) 十八烷-9, 12-二烯酰基)氧基)苯基)乙酰氧基)乙基)哌啶-1-基)乙基)二硫烷基)乙基)哌啶-4-基)乙氧基)-2-氧代乙基)苯基)壬二酸酯(脂质 12)

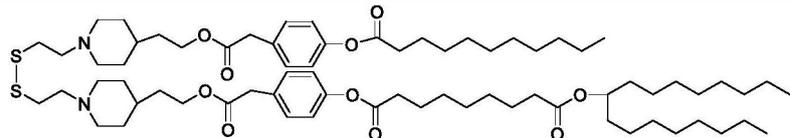


1-(十七烷-9-基)9-(4-(2-(2-(1-(2-((2-(4-(2-(2-(4-((8-(2-辛基环丙基)辛酰基)氧基)苯基)乙酰氧基)乙基)哌啶-1-基)乙基)二硫烷基)乙基)哌啶-4-基)乙氧基)-2-氧代乙基)苯基)壬二酸酯(脂质 13)

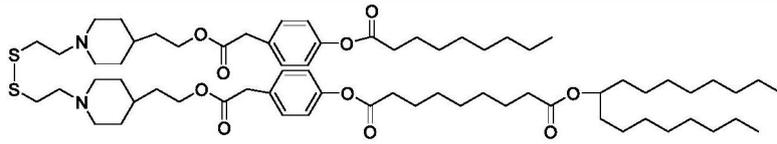


[0398]

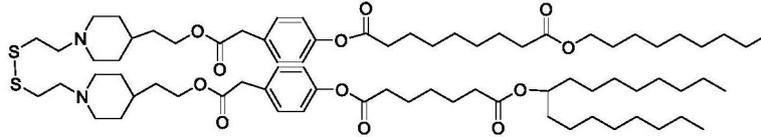
1-(十七烷-9-基)9-(4-(2-氧代-2-(2-(1-(2-((2-(4-(2-(2-(4-(硬脂酰氧基)苯基)乙酰氧基)乙基)哌啶-1-基)乙基)二硫烷基)乙基)哌啶-4-基)乙氧基)乙基)苯基)壬二酸酯(脂质 14)



1-(十七烷-9-基)9-(4-(2-氧代-2-(2-(1-(2-((2-(4-(2-(2-(4-(十一烷酰氧基)苯基)乙酰氧基)乙基)哌啶-1-基)乙基)二硫烷基)乙基)哌啶-4-基)乙氧基)乙基)苯基)壬二酸酯(脂质 15)

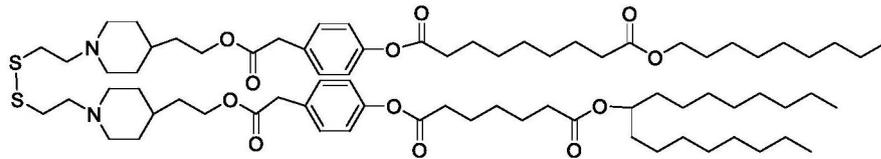


1-(十七烷-9-基)9-(4-(2-(2-(1-(2-((2-(4-(2-(2-(4-(壬酰氧基)苯基)乙酰氧基)乙基)哌啶-1-基)乙基)二硫烷基)乙基)哌啶-4-基)乙氧基)-2-氧代乙基)苯基)壬二酸酯(脂质 16)

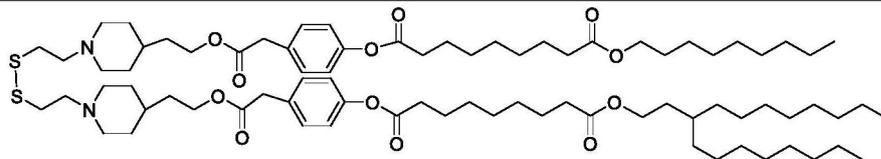


1-壬基 9-(4-(2-(2-(1-(2-((2-(4-(2-(2-(4-((9-((3-辛基十二烷基)氧基)-9-氧代壬酰基)氧基)苯基)乙酰氧基)乙基)哌啶-1-基)乙基)二硫烷基)乙基)哌啶-4-基)乙氧基)-2-氧代乙基)苯基)壬二酸酯(脂质 17)

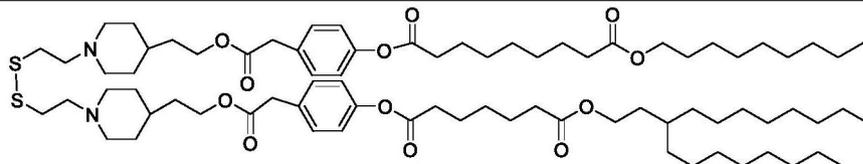
[0399]



1-(4-(2-(2-(1-(2-((2-(4-(2-(2-(4-((7-(十七烷-9-基氧基)-7-氧代庚酰基)氧基)苯基)乙酰氧基)乙基)哌啶-1-基)乙基)二硫烷基)乙基)哌啶-4-基)乙氧基)-2-氧代乙基)苯基)9-壬基壬二酸酯(脂质 18)



1-壬基 9-(4-(2-(2-(1-(2-((2-(4-(2-(2-(4-((9-((3-辛基十二烷基)氧基)-9-氧代壬酰基)氧基)苯基)乙酰氧基)乙基)哌啶-1-基)乙基)二硫烷基)乙基)哌啶-4-基)乙氧基)-2-氧代乙基)苯基)壬二酸酯(脂质 19)



[0400]

1-壬基 9-(4-(2-(2-(1-(2-((2-(4-(2-(2-(4-((7-((3-辛基十一烷基)氧基)-7-氧代庚酰基)氧基)苯基)乙酰氧基)乙基)哌啶-1-基)乙基)二硫烷基)乙基)哌啶-4-基)乙氧基)-2-氧代乙基)苯基)壬二酸酯(脂质 20)

[0401] 实施例2:脂质纳米颗粒的制备

[0402] 以大约10:1到30:1的总脂质与ceDNA重量比制备脂质纳米颗粒(LNP)。简而言之,本发明的可电离脂质、非阳离子脂质(例如二硬脂酰基磷脂酰胆碱(DSPC))、提供膜完整性的成分(诸如甾醇,例如,胆固醇)和缀合的脂质分子(诸如PEG-脂质,例如,平均PEG分子量为2000的1-(单甲氧基-聚乙二醇)-2,3-二肉豆蔻酰甘油(“PEG-DMG”))以例如,50:10:37:3或20:40:38:2的摩尔比溶解于醇(例如,乙醇)中。将ceDNA在缓冲溶液中稀释至所需浓度。例如,将包括醋酸钠、醋酸钠和氯化镁、柠檬酸盐、苹果酸或苹果酸和氯化钠的缓冲溶液,将ceDNA稀释至0.1mg/mL到0.25mg/mL的浓度。在一个实施例中,将ceDNA在pH为4的10至50mM柠檬酸盐缓冲液中稀释至0.2mg/mL。使用例如注射泵或冲击射流混合器,以约1:5到1:3(vol/vol)的比率将醇类脂质溶液与ceDNA水溶液混合,总流速高于10ml/min。在一些实施例中,以约1:3(vol/vol)的比率将醇类脂质溶液与ceDNA水溶液混合,流速为12ml/min。去除醇并通过透析将缓冲液替换为PBS。或者,使用离心管将缓冲液更换为PBS。通过例如透析或切向流过滤实现醇去除和同时交换缓冲液。将获得的脂质纳米颗粒通过0.2 μ m孔径无菌过滤器过滤。

[0403] 在一项研究中,使用包含SS-OP、DSPC、胆固醇和DMG-PEG2000(摩尔比50:10:37:3)的脂质溶液作为对照,来制备包含示例性ceDNA的脂质纳米颗粒。在一些实施例中,包括组织靶向部分,如N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)。GalNAc部分例如三触角GalNAc(GalNAc3)或四触角GalNAc(GalNAc4)可以如本领域已知的那样合成(参见W02017/084987和W02013/166121),并且如众所周知的那样与脂质或PEG化学缀合本领域技术人员(参见Resen等人, J.Biol.Chem.(2001)“Determination of the Upper Size Limit for Uptake and Processing of Ligands by the Asialoglycoprotein Receptor on Hepatocytes in Vitro and in Vivo”276:375577-37584)。制备缓冲溶液中的ceDNA水溶液。使用纳米药物制造系统(NanoAssembler)上的内部程序,将脂质溶液和ceDNA溶液混合,总流速为12mL/min,脂质与ceDNA的比率为1:3(vol/vol)。

[0404] 表2A:研究A中的试验材料管理

[0405]

组编号	每组动物	LNP 处理	剂量水平 (mg/kg)	剂量体积 (mL/kg)	治疗方案	终末时间点
1	5	PBS	0.25	5	一次 第 0 天, IV	第 7 天
2	5	LNP1				
3	5	LNP2				
4	5	LNP3				
5	5	LNP4				
6	5	LNP5				
7	5	LNP6				
8	5	LNP7				
9	5	LNP8				
10	5	LNP9				
11	5	LNP10				
12	5	LNP11				
13	5	LNP12				

[0406] No. = 编号; IV = 静脉内; ROA = 施用途径; LNP = 脂质纳米颗粒

[0407] 表2B: 研究B中的试验材料管理

[0408]

组编号	每组动物	LNP 处理	剂量水平 (mg/kg)	剂量体积 (mL/kg)	治疗方案	终末时间点
14	5	PBS	0.25	5	一次 第 0 天, IV	第 7 天
15	5	LNP13				
16	5	LNP14				
17	5	LNP15				
18	5	LNP16				
19	5	LNP17				
20	5	LNP18				

[0409] No. = 编号; IV = 静脉内; ROA = 施用途径; LNP = 脂质纳米颗粒

[0410] 表2C: 研究C中的试验材料管理

组编号	每组动物	LNP 处理	剂量水平 (mg/kg)	剂量体 积 (mL/kg)	治疗方案	终末时间 点
[0411]	21	PBS	0.25	5	一次 第 0 天, IV	第 7 天
	22	LNP19	0.25			
	23	LNP19	1			
	24	LNP20	0.25			
	25	LNP20	1			
	26	LNP21	0.25			
	27	LNP21	1			

[0412] No. = 编号; IV = 静脉内; ROA = 施用途径; LNP = 脂质纳米颗粒

[0413] 表2D: 研究D中的试验材料管理

组编号	每组动物	LNP 处理	剂量水 平 (mg/kg)	剂量体 积 (mL/kg)	治疗方案	终末时间 点
[0414]	28	PBS	0.25	5	一次 第 0 天, IV	第 7 天
	29	LNP22				
	30	LNP23				
	31	LNP24				
	32	LNP25				
	33	LNP26				

[0415] No. = 编号; IV = 静脉内; ROA = 施用途径; LNP = 脂质纳米颗粒

[0416] 表2E: 研究E中的试验材料管理

组编号	每组动物	LNP 处理	剂量水 平 (mg/kg)	剂量体 积 (mL/kg)	治疗方案	终末时间 点
[0417]	34	PBS	0.25	5	一次 第 0 天, IV	第 7 天
	35	LNP27				
	36	LNP28				
	37	LNP29				
	38	LNP30				

[0418] No. = 编号; IV = 静脉内; ROA = 施用途径; LNP = 脂质纳米颗粒

[0419] 表3A: 研究A中LNP组分的描述

LNP	LNP 的组分(摩尔比)
PBS	不适用
*LNP1	SS-OP: DOPC:Chol:DMG-PEG2000:DSPE-PEG2000-GalNAc4 (50.7:7.2:38.6:2.9:0.48) 在苹果酸中
*LNP2	SS-OP: DOPC:Chol:DMG-PEG2000:DSPE-PEG2000-GalNAc4 (50.7:7.2:38.6:2.9:0.48) 在苹果酸中
LNP3	脂质 5: DOPC:Chol:DMG-PEG2000:DSPE-PEG2000-GalNAc4 (50.7:7.2:38.6:2.9:0.48)
LNP4	脂质 2: DOPC:Chol:DMG-PEG2000:DSPE-PEG2000-GalNAc4 (50.7:7.2:38.6:2.9:0.48)
LNP5	脂质 1: DOPC:Chol:DMG-PEG2000:DSPE-PEG2000-GalNAc4 (50.7:7.2:38.6:2.9:0.48)
[0420] LNP6	脂质 3: DOPC:Chol:DMG-PEG2000:DSPE-PEG2000-GalNAc4 (50.7:7.2:38.6:2.9:0.48)
LNP7	SS-OP: DOPC:Chol:DSPE-PCB1-5:DSPE-PEG2000-GalNAc4 (47.0:6.7:35.8:10.0:0.50)
LNP8	SS-OP: DOPC:Chol:DSPE-PCB1-10:DSPE-PEG2000-GalNAc4 (47.0:6.7:35.8:10.0:0.50)
LNP9	SS-OP: DOPC:Chol:DSPE-PCB1-30:DSPE-PEG2000-GalNAc4 (47.0:6.7:35.8:10.0:0.50)
LNP10	SS-OP: DOPC:Chol:DSPE-PCB1-5:DSPE-PEG2000-GalNAc4 (50.7:7.3:38.6:2.9:0.50)
LNP11	SS-OP: DOPC:Chol:DSPE-PCB1-10:DSPE-PEG2000-GalNAc4 (50.7:7.3:38.6:2.9:0.50)
LNP12	SS-OP: DOPC:Chol:DSPE-PCB1-30:DSPE-PEG2000-GalNAc4 (50.7:7.3:38.6:2.9:0.50)

[0421] DOPC = 二油酰基磷脂酰胆碱; Chol = 胆固醇; DSPE = 二硬脂酰磷脂酰乙醇胺; DMG-PEG2000 = 1-(单甲氧基聚乙二醇)-2,3-二甲基甘油 (PEG₂₀₀₀-DMG); SS-OP = COATSOME®SS-OP (NOF);

[0422] GalNAc = N-乙酰氨基半乳糖; GalNAc4 = 四触角GalNAc *LNP1和LNP2含有相同的组

分和组分的摩尔比,但在不同批次中制备并用作对照。

[0423] 表3B:研究B中LNP组分的描述

LNP	LNP 的组分(摩尔比)
PBS	不适用
LNP13	SS-OP:DOPC:Chol:DMG-PEG2000:DSPE-PEG2000-GaINAc4 (50.7:7.3:38.6:2.9:0.5)
LNP14	脂质 4: DOPC:Chol:DMG-PEG2000:DSPE-PEG2000-GaINAc4 (50.7:7.3:38.6:2.9:0.5)
[0424] LNP15	脂质 5: DOPC:Chol:DMG-PEG2000:DSPE-PEG2000-GaINAc4 (50.7:7.3:38.6:2.9:0.5)
LNP16	脂质 2: DOPC:Chol:DMG-PEG2000:DSPE-PEG2000-GaINAc4 (50.7:7.3:38.6:2.9:0.5)
LNP17	脂质 1: DOPC:Chol:DMG-PEG2000:DSPE-PEG2000-GaINAc4 (50.7:7.3:38.6:2.9:0.5)
LNP18	脂质 3: DOPC:Chol:DMG-PEG2000:DSPE-PEG2000-GaINAc4 (50.7:7.3:38.6:2.9:0.5)

[0425] DOPC=二油酰基磷脂酰胆碱;Chol=胆固醇;DSPE=二硬脂酰磷脂酰乙醇胺;DMG-PEG2000=1-(单甲氧基聚乙二醇)-2,3-二甲基甘油(PEG₂₀₀₀-DMG);SS-OP=COATSOME®SS-OP(NOF);

[0426] GaINAc=N-乙酰氨基半乳糖;GaINAc4=四触角GaINAc

[0427] 表3C:研究C中LNP组分的描述

LNP	LNP 的组分(摩尔比)
PBS	不适用
LNP19	SS-OP:DOPC:Chol:DMG-PEG2000:DSPE-PEG2000-GaINAc4 (50.7:7.3:38.6:2.9:0.5)
[0428] LNP20	脂质 1: DOPC:Chol:DMG-PEG2000:DSPE-PEG2000-GaINAc4 (50.7:7.3:38.6:2.9:0.5)
LNP21	脂质 3: DOPC:Chol:DMG-PEG2000:DSPE-PEG2000-GaINAc4 (50.7:7.3:38.6:2.9:0.5)

[0429] DOPC=二油酰基磷脂酰胆碱;Chol=胆固醇;DSPE=二硬脂酰磷脂酰乙醇胺;DMG-PEG2000=1-(单甲氧基聚乙二醇)-2,3-二甲基甘油(PEG₂₀₀₀-DMG);SS-OP=COATSOME®SS-

OP (NOF) ;

[0430] GalNAc=N-乙酰氨基半乳糖;GalNAc4=四触角GalNAc

[0431] 表3D:研究D中LNP组分的描述

LNP	LNP 的组分(摩尔比)
PBS	不适用
LNP22	可电离脂质 A: DOPC:Chol:DMG-PEG2000:DSPE-PEG2000-GalNAc4 (50.7:7.3:38.6:2.9:0.5)
LNP23	SS-OP: DOPC:Chol:DMG-PEG2000:DSPE-PEG2000-GalNAc4 (50.7:7.3:38.6:2.9:0.5)
LNP24	脂质 6: DOPC:Chol:DMG-PEG2000:DSPE-PEG2000-GalNAc4 (50.7:7.3:38.6:2.9:0.5)
LNP25	脂质 7: DOPC:Chol:DMG-PEG2000:DSPE-PEG2000-GalNAc4 (50.7:7.3:38.6:2.9:0.5)
LNP26	脂质 8: DOPC:Chol:DMG-PEG2000:DSPE-PEG2000-GalNAc4 (50.7:7.3:38.6:2.9:0.5)

[0433] DOPC=二油酰基磷脂酰胆碱;Chol=胆固醇;DSPE=二硬脂酰磷脂酰乙醇胺;DMG-PEG2000=1-(单甲氧基聚乙二醇)-2,3-二甲基甘油(PEG₂₀₀₀-DMG);SS-OP=COATSOME®SS-OP (NOF) ;

[0434] GalNAc=N-乙酰氨基半乳糖;GalNAc4=四触角GalNAc

[0435] 表3E:研究E中LNP组分的描述

LNP	LNP 的组分(摩尔比)
PBS	不适用
LNP27	SS-OP: DOPC:Chol:DMG-PEG2000:DSPE-PEG2000-GalNAc4 (50.7:7.3:38.6:2.9:0.5)
LNP28	脂质 9: DOPC:Chol:DMG-PEG2000:DSPE-PEG2000-GalNAc4 (50.7:7.3:38.6:2.9:0.5)
LNP29	脂质 10: DOPC:Chol:DMG-PEG2000:DSPE-PEG2000-GalNAc4 (50.7:7.3:38.6:2.9:0.5)
LNP30	脂质 11: DOPC:Chol:DMG-PEG2000:DSPE-PEG2000-GalNAc4 (50.7:7.3:38.6:2.9:0.5)

[0437] DOPC=二油酰基磷脂酰胆碱;Chol=胆固醇;DSPE=二硬脂酰磷脂酰乙醇胺;DMG-

PEG2000=1-(单甲氧基聚乙二醇)-2,3-二甲基甘油(PEG₂₀₀₀-DMG);SS-OP=COATSOME®SS-OP(NOF);

[0438] GalNAc=N-乙酰氨基半乳糖;GalNAc4=四触角GalNAc

[0439] 表4:采血

组编号	样品收集时间
	全血 (尾、隐静脉或眼眶)
	血清 ^a
[0440] 1-11	第0天 试验材料给药后约5-6小时 (不少于5.0小时,不多于6.5小时)
体积/部分	约150 μL全血
处理/储存	1个等分试样在 标称-70°C下冷冻

[0441] ^a将全血收集到带有促凝剂的血清分离管中

[0442] 物种(数量、性别、年龄):CD-1小鼠(N=65,5只备用,雄性,到达时约4周龄)。

[0443] 笼侧观察:每天进行笼侧观察。

[0444] 临床观察:在第0天试验材料给药后约1、约5至约6和约24小时进行临床观察。针对每个例外情况进行了额外观察。如适用,在第0、1、2、3、4和7天(安乐死前)记录所有动物的体重。根据需要记录额外的体重。

[0445] 剂量给药:第1组至第38组的供试品(LNPs:ceDNA-Luc)在第0天以5mL/kg的剂量通过静脉注射给药至侧尾静脉。

[0446] 活体成像:在第4天,通过腹膜内注射(IP),以2.5mL/kg的剂量向所有动物给药150mg/kg(60mg/mL)的荧光素。每次荧光素给药后≤15分钟;所有动物都根据下文所述的体内成像方案进行了IVIS成像。

[0447] 麻醉恢复:在麻醉期间、恢复期间和移动之前,持续监测动物。

[0448] 临时采血:所有动物在第0天进行临时采血;试验材料给药后5-6小时(不少于5.0小时,不超过6.5小时)。

[0449] 采血后,动物接受0.5-1.0mL乳酸林格氏液;皮下注射。

[0450] 通过尾静脉切口、大隐静脉或眶窦穿刺(在吸入异氟醚下)采集用于血清的全血。将全血收集到带有促凝剂管的血清分离器中,并处理成(1)份血清。

[0451] 体内成像协议

[0452] • 荧光素储备粉末储存在标称-20°C下。

[0453] • 将配制的荧光素于2-8°C下避光储存在1mL等分试样中。

[0454] • 配制的荧光素在2-8°C下避光可稳定长达3周,并且在室温(RT)下可稳定约12小

时。

[0455] • 将荧光素溶解在PBS中,以足够的体积达到60mg/mL的目标浓度,并根据需要用5-M NaOH(约0.5 μ l/mg荧光素)和HCl(约0.5 μ L/mg荧光素)将其调节至pH=7.4。

[0456] • 根据方案制备适当的量,包括至少超过约50%的量。

[0457] 注射和成像(注意:一次最多可对5只动物进行成像)

[0458] • 剃掉动物的毛发(根据需要)。

[0459] • 根据方案,通过IP以60mg/mL的速度在PBS中注射150mg/kg荧光素。

[0460] • 在给药后即刻或至多15分钟进行成像。

[0461] • 将异氟醚蒸发器设置为1-3%(通常为@2.5%),以便在成像期间麻醉动物。

[0462] • 用于成像阶段的异氟醚麻醉:

[0463] o将动物放入异氟醚室,等待异氟醚生效,大约2-3分钟。

[0464] o确保IVIS机器侧面的麻醉级别位于“开启(on)”位置。

[0465] o将动物放入IVIS机器

[0466] 使用最高灵敏度的设置执行所需的采集协议。

[0467] 结果

[0468] 研究A

[0469] 如图1所示,在第4天,与研究A中使用的阳性对照ceDNA LNP治疗组相比(LNP1、2和7-12,每个LNP都是用SS-OP脂质配制的ceDNA-1uc),用脂质1、脂质2、脂质3或脂质5(分别为图1的LNP5、4、6和3)配制的ceDNA荧光素酶(ceDNA-1uc)治疗的小鼠组显示出同等或更高的荧光素酶表达和/或活性,表明本文所述的可电离脂质作为脂质纳米颗粒递送载体具有优越的物理属性。

[0470] 研究B

[0471] 如图2所示,并且与上述研究A的图1中的观察结果一致,在第4天,与研究B中使用的阳性对照ceDNA LNP组相比(用SS-OP脂质配制的ceDNA-1uc的LNP13),用脂质1、脂质2、脂质3或脂质5(分别为图2的LNP分别为17、16、18和15)配制的ceDNA-1uc治疗的小鼠组显示出同等或更高的荧光素酶活性,表明本文所述的可电离脂质作为脂质纳米颗粒递送载体具有优越的物理属性。

[0472] 研究C

[0473] 研究A和B中显示出最高荧光素酶表达和/或活性的脂质1和3在研究C中进一步研究了剂量反应。如图3所示,并且与研究A和B的图1和图2的观察结果一致,在第4天,与研究C中使用的阳性对照ceDNA LNP(LNP19,它是用SS-OP脂质配制的ceDNA-1uc)组相比,用脂质1或脂质3(分别为图1的LNP20和21)配制的ceDNA 1uc治疗的小鼠组在25mg/kg和1mg/kg剂量下表现出更高的荧光素酶表达和/或活性,表明本文所述的可电离脂质作为脂质纳米颗粒递送载体具有优越的物理属性。此外,图3中的结果表明,当LNP20的剂量从0.25mg/kg增加到1mg/kg时,与在相同两个剂量水平下测试的LNP19相比,荧光素酶的表达和/或活性表现出更高的增加。这些结果表明,用本发明的可电离脂质配制的LNPs对不同剂量水平的响应性更强,并且用本发明的可电离脂质配制的LNPs包封的ceDNA中的转基因插入片段的表达水平可以更容易地调整到发挥其对特定疾病的治疗效果所需的水平,从而证明了这些可电离脂质作为脂质纳米颗粒递送载体所具有的另一个理想的技术特征。

[0474] 研究D

[0475] 在研究D中,评估了用脂质6、脂质7、脂质8(分别为图4A和4B的24、25和26)和ceDNA-luc配制的LNP在小鼠中的荧光素酶表达和/或活性,以及耐受性,并与用可电离脂质A和SS-OP脂质(图4A和4B中的LNP22和23)和ceDNA-luc配制的LNPs进行比较。如图4A所示,在第4天,与用SS-OP脂质(即LNP23)配制的ceDNA-luc组相比,用脂质6、脂质7和脂质8配制的ceDNA-luc治疗的小鼠组显示出同等或更高的荧光素酶表达和/或活性。图4B表明用脂质6、脂质7和脂质8配制的ce-DNA-luc构建体在小鼠中也具有良好的耐受性,因为该治疗在第1天没有引起小鼠体重的变化。相比之下,如图4B所示,用可电离脂质A(即LNP22)配制的ceDNA-luc治疗的小鼠在第1天体重明显减轻,由此表明动物对脂质的耐受性不好。

[0476] 研究E

[0477] 在研究E中,评估了用脂质9、脂质10、脂质11(分别为图5A和5B的28、29和30)和ceDNA-luc配制的LNP在小鼠中的荧光素酶表达和/或活性,以及耐受性,并与用SS-OP脂质(图5A和5B中的LNP27)和ceDNA-luc配制的LNPs进行比较。如图5A所示,在第4天,与用SS-OP脂质(即LNP27)配制的ceDNA-luc组相比,用脂质9、脂质10和脂质11配制的ceDNA-luc治疗的小鼠组显示出同等或更高的荧光素酶表达和/或活性。图5B表明,除了LNP30中的异常数据点外,用脂质9、脂质10和脂质11配制的ce-DNA-luc构建体通常在小鼠中具有较好的耐受性,因为治疗在第1天没有引起小鼠体重的显著变化。

[0478] 因此,研究A-E总体表明,用本公开的可电离脂质配制的LNP:(i)具有优异的ceDNA转基因插入物的体内表达水平;(ii)对不同的剂量水平有反应,从而使ceDNA的转基因插入物的体内表达水平能够根据需要进行调整;(iii)在体内具有良好的耐受性。

[0479] 参考文献

[0480] 在本说明书和本文的实施例中引用的所有出版物和参考文献,包括但不限于专利和专利申请,都以全文引用的方式并入本文中,如同每个单独的出版物或参考文献被明确且单独地指出像充分阐述一样,以引用的方式并入本文中一般。本申请要求优先权的任何专利申请也以上述针对出版物和参考文献的方式通过引用并入本文中。

<110> 世代生物公司 (GENERATION BIO CO.)

<120> 新型脂质及其纳米颗粒组合物

<130> 131698-07720

<140>

<141>

<150> 63/000,990

<151> 2020-03-27

[0001]

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 16

<212> DNA

<213> 腺相关病毒-2

<400> 1

gcgcgctcgc tcgctc

16

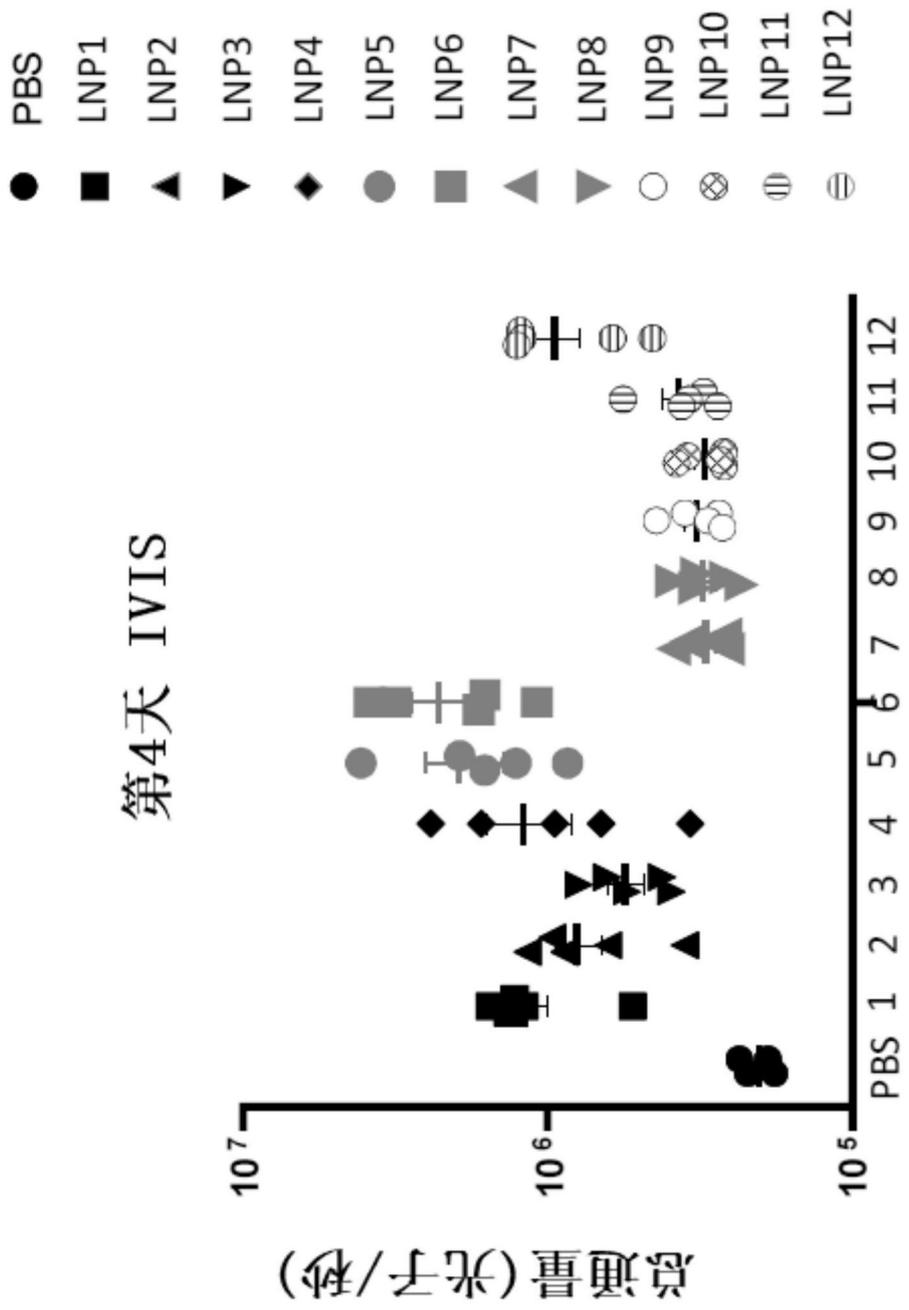


图1

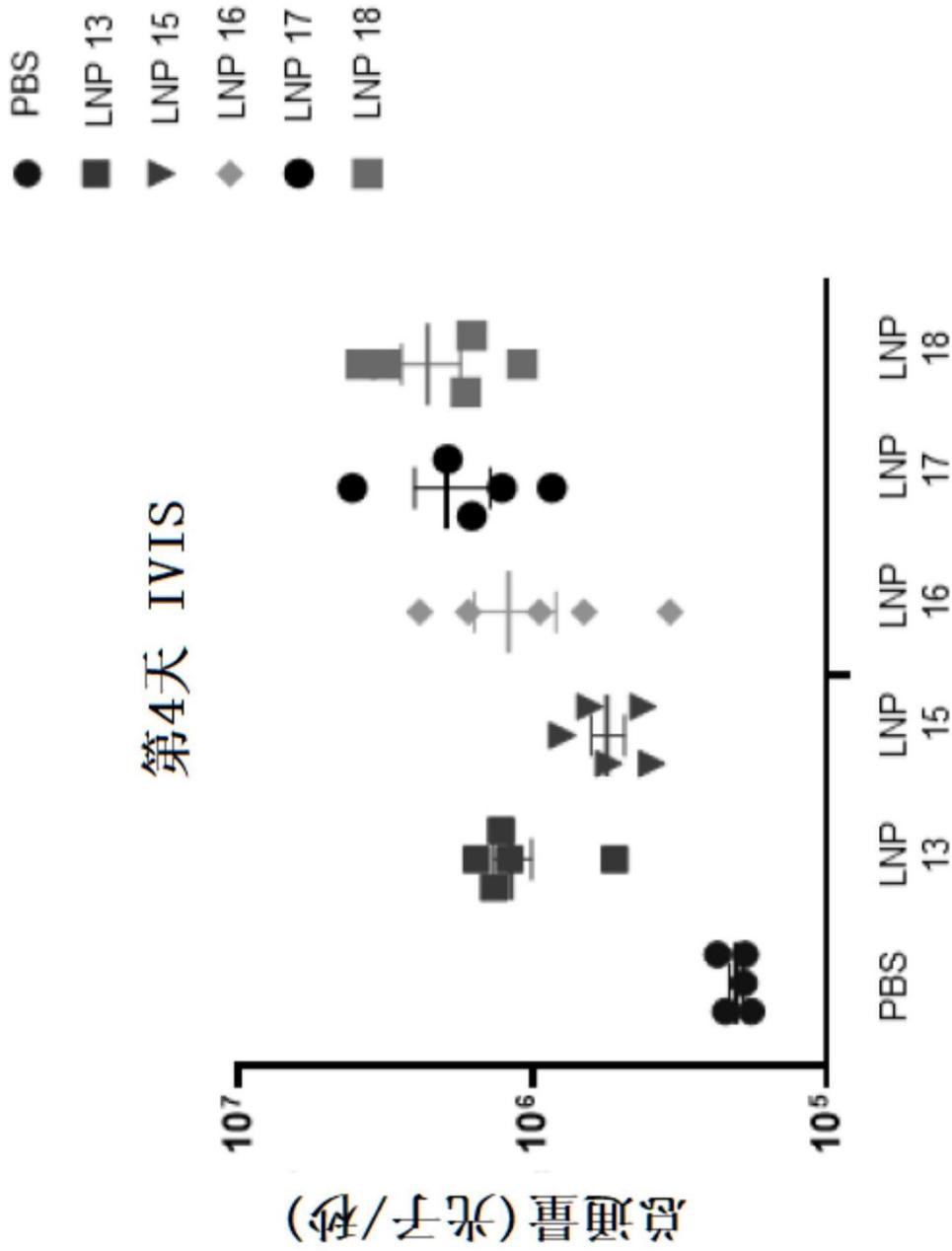


图2

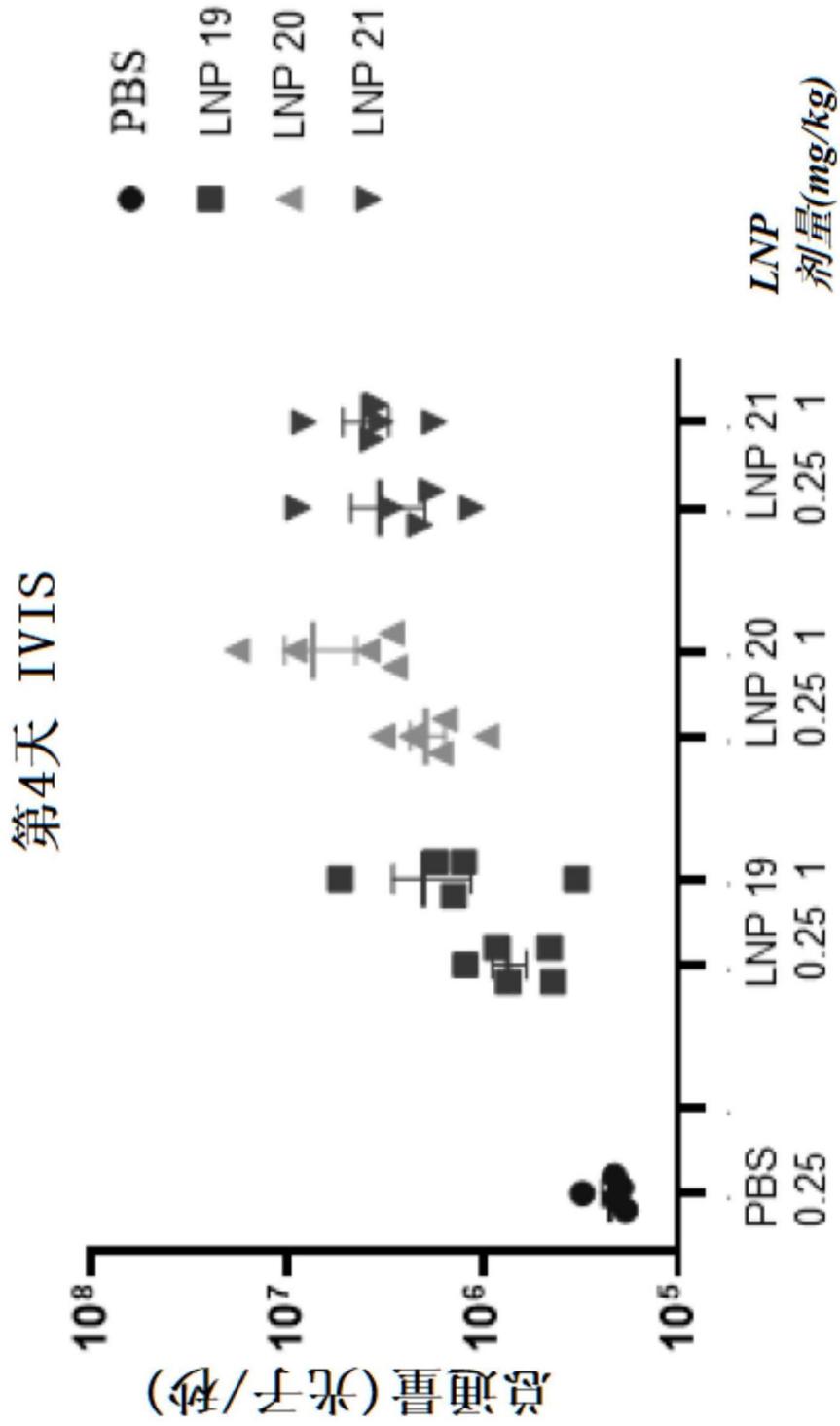


图3

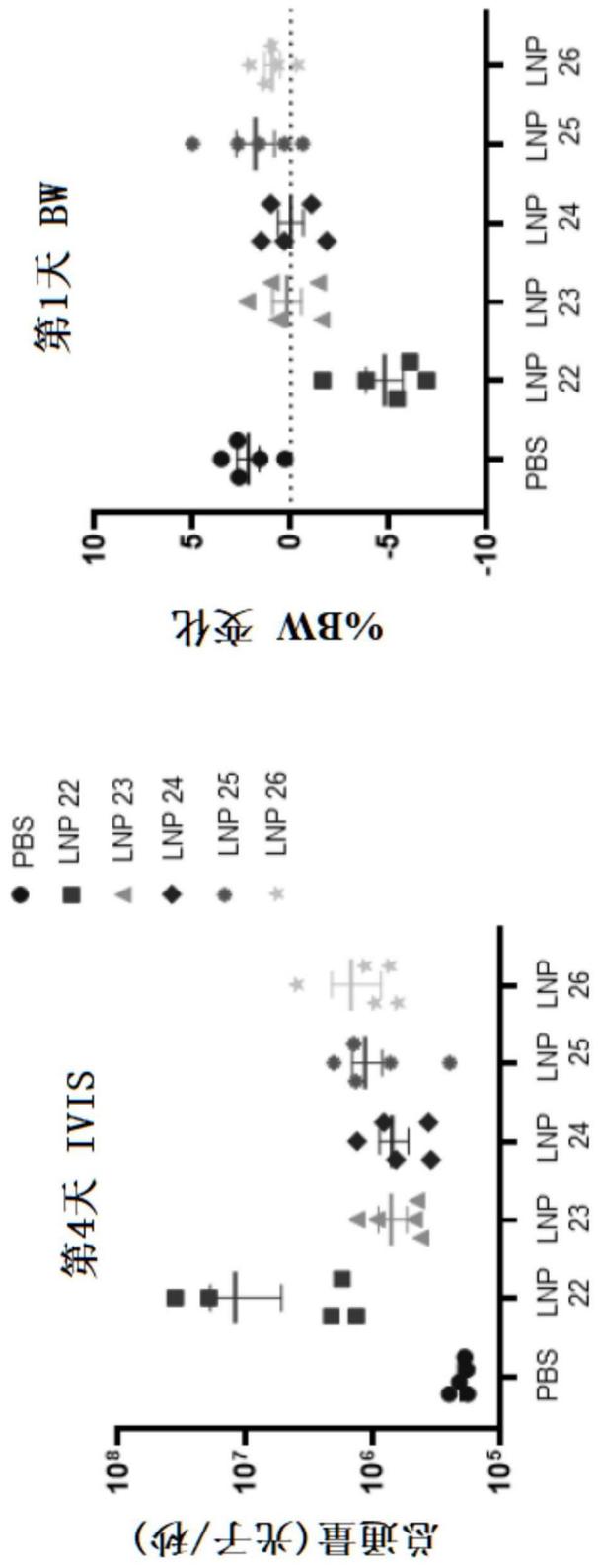


图 4B

图 4A

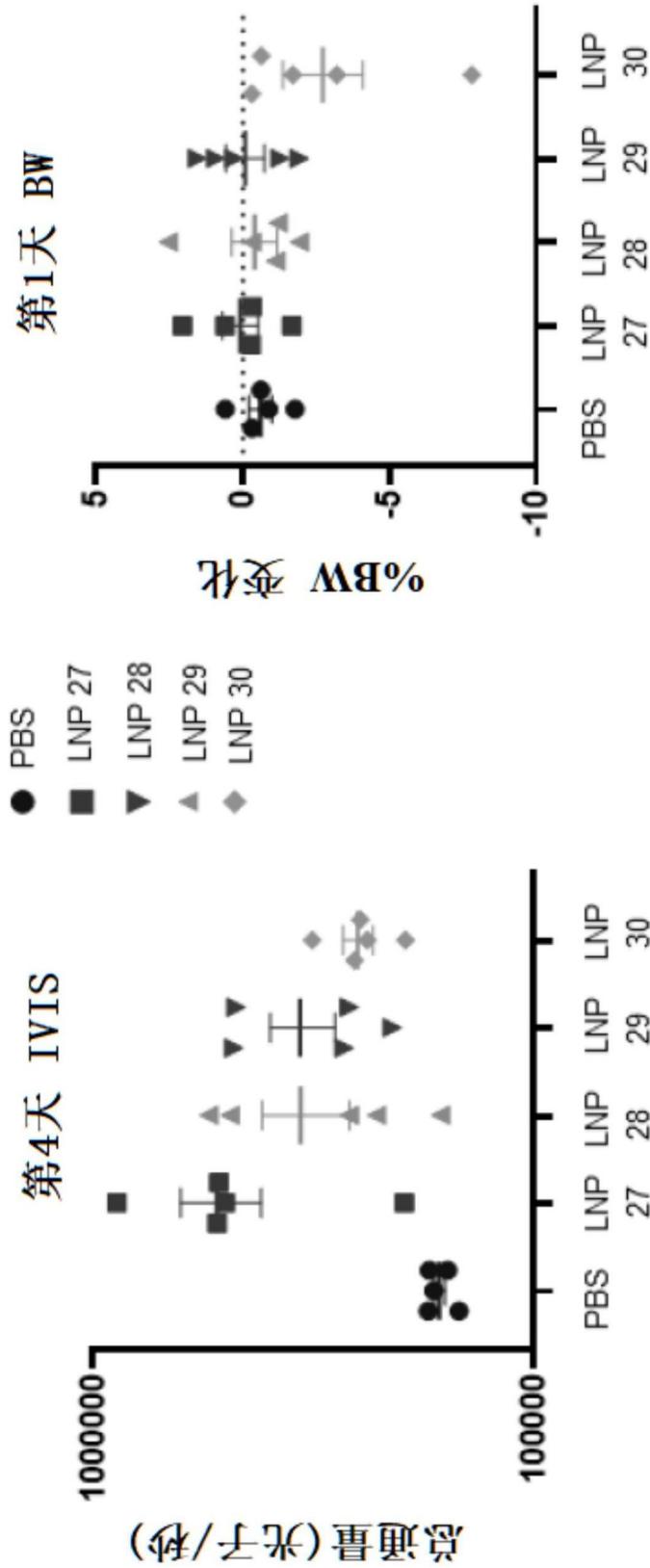


图 5B

图 5A