



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111386105 B

(45) 授权公告日 2023.09.15

(21) 申请号 201880071515.7  
 (22) 申请日 2018.11.06  
 (65) 同一申请的已公布的文献号  
 申请公布号 CN 111386105 A  
 (43) 申请公布日 2020.07.07  
 (30) 优先权数据  
 62/582,252 2017.11.06 US  
 (85) PCT国际申请进入国家阶段日  
 2020.04.30  
 (86) PCT国际申请的申请数据  
 PCT/US2018/059504 2018.11.06  
 (87) PCT国际申请的公布数据  
 W02019/090359 EN 2019.05.09  
 (73) 专利权人 日东电工株式会社  
 地址 日本大阪府  
 (72) 发明人 应文斌 曾国贤 B·马杰蒂  
 葛爹约翰 R·亚达米 白浩  
 (74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所  
 11256  
 专利代理师 杨宏军 唐峥

(51) Int.Cl.  
 A61K 31/16 (2006.01)  
 C07K 14/47 (2006.01)  
 C12N 15/12 (2006.01)  
 (56) 对比文件  
 US 2003176641 A1, 2003.09.18  
 US 2011223257 A1, 2011.09.15  
 CN 103857654 A, 2014.06.11  
 CN 1433478 A, 2003.07.30  
 CN 107108686 A, 2017.08.29  
 EP 2069500 A2, 2009.06.17  
 WO 9606097 A1, 1996.02.29  
 WO 2013063468 A1, 2013.05.02  
 WO 2005026372 A1, 2005.03.24  
 EP 2998289 A1, 2016.03.23

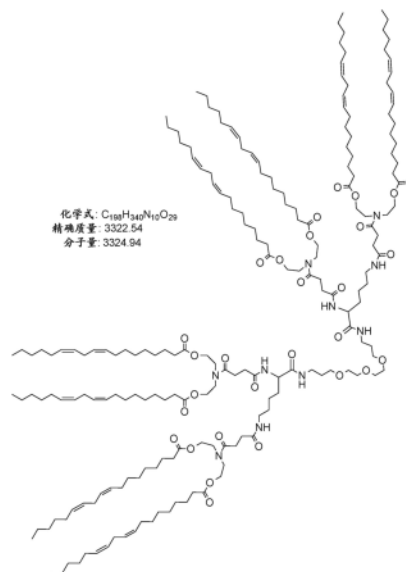
李强等. 膜融合脂质体作为疫苗载体的研究进展. 《中国药学杂志》. 2003, 第38卷(第10期), 第734-737页. (续)

审查员 毛晓静

权利要求书25页 说明书64页 附图66页

(54) 发明名称  
 用于递送生物活性分子的膜融合化合物

(57) 摘要  
 本发明包括膜融合化合物、及其组合物和使用方法。膜融合化合物可用于制造在生物药和治疗剂中使用的纳米颗粒组合物。更特别地，本发明涉及用于提供纳米颗粒的化合物、组合物和方法，所述纳米颗粒掺入或封装活性剂以将所述活性剂递送及分配至细胞、组织、器官和对象。



CN 111386105 B

[接上页]

(56) 对比文件

Baoxiang Gao et al..Amphiphilic dendritic peptides: Synthesis and

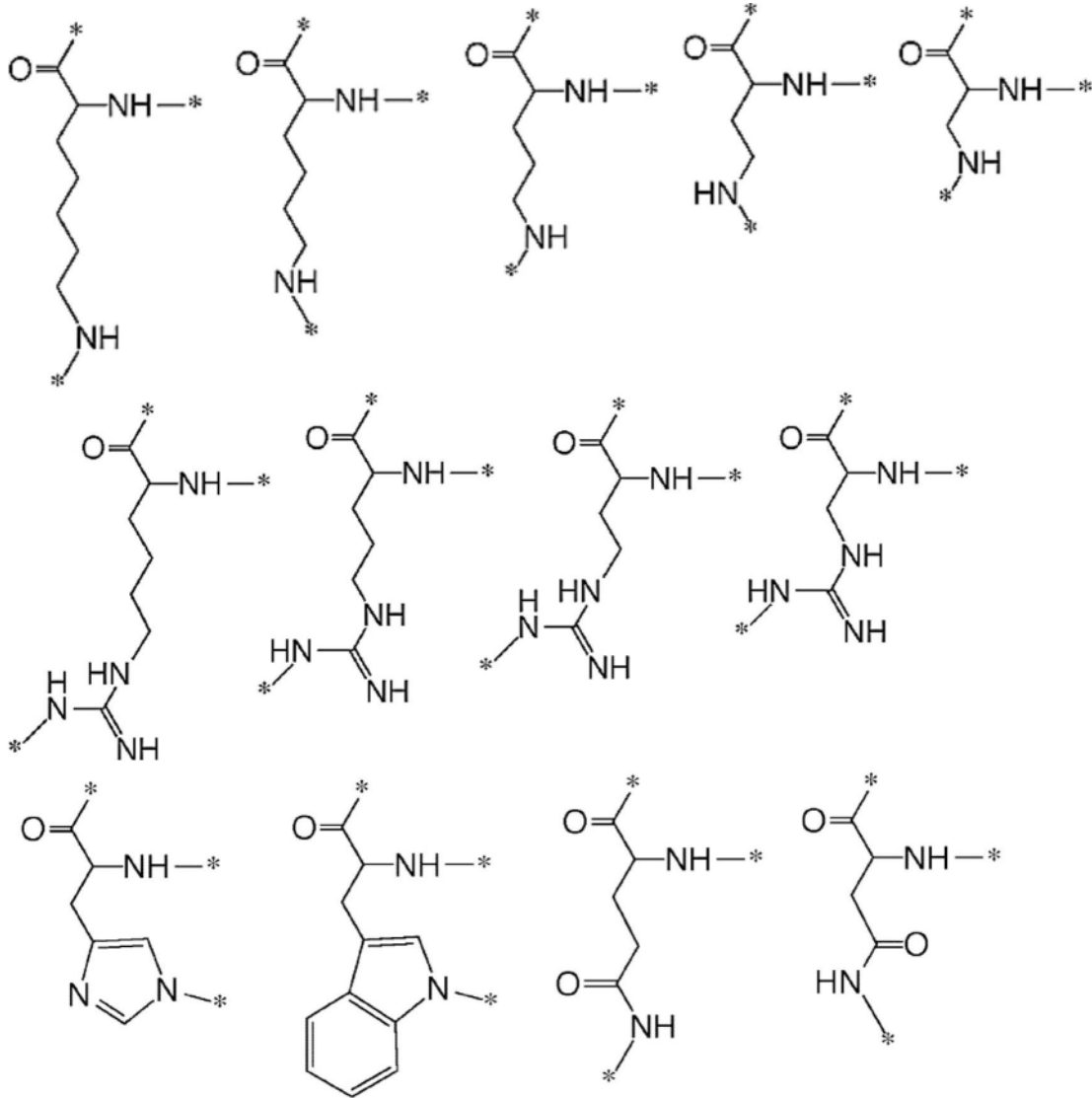
behavior as an organogelator and liquid crystal.《Beilstein J. Org. Chem.》.2011,第7卷第198-203页.

1. 具有化学式I的膜融合化合物，

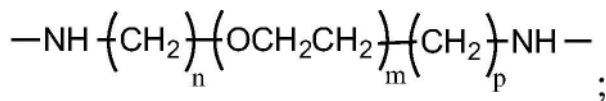


化学式 I

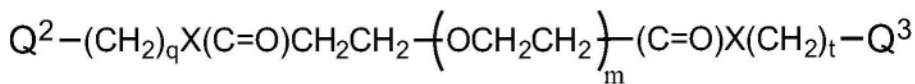
其中每个AA独立地为选自以下结构的氨基酸，其中氨基酸以其每个氨基与两亲分子连接，且以其C端与接头连接；



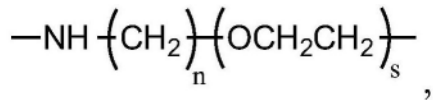
其中接头具有下述结构：



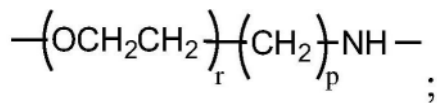
或者



其中Q<sup>2</sup>是



其中Q<sup>3</sup>是



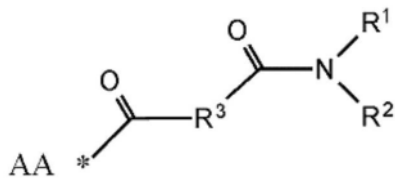
其中X是-O-、-S-、或-NH-；

其中n、p、q和t各自独立地存在、为1至3；

其中m独立地为1至10；

其中r和s各自独立地存在、为1至5；

其中每个两亲分子独立地选自化学式 (II)、化学式 (IV)、化学式 (V) 和化学式 (VI)，如下所示：



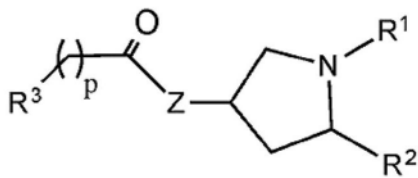
化学式 (II)

其中化学式 (II) 中R<sup>1</sup>为CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>(C=O)R<sup>4</sup>、CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH(C=O)R<sup>4</sup>、CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>(C=O)OR<sup>4</sup>或CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>(C=O)NHR<sup>4</sup>；

其中化学式 (II) 中R<sup>2</sup>为CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>(C=O)R<sup>5</sup>、CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>NH(C=O)R<sup>5</sup>、CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>(C=O)OR<sup>5</sup>或CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>(C=O)NHR<sup>5</sup>；

其中化学式 (II) 中n和m各自独立地为1至2；R<sup>4</sup>和R<sup>5</sup>各自独立地存在、为C(12-20)烷基或C(12-20)烯基；

其中化学式 (II) 中R<sup>3</sup>为分支或未分支的C(1-8)链烷二基；



化学式 (IV)

其中化学式 (IV) 中R<sup>1</sup>为(C=O)R<sup>4</sup>；

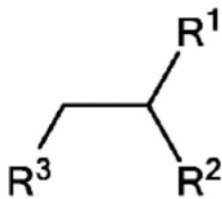
其中化学式 (IV) 中R<sup>2</sup>为(C=O)OR<sup>5</sup>；

其中化学式 (IV) 中R<sup>4</sup>和R<sup>5</sup>各自独立地存在、为C(12-20)烷基或C(12-20)烯基；

其中化学式 (IV) 中Z为NH；

其中化学式 (IV) 中p为1至4；

其中化学式 (IV) 中R<sup>3</sup>为被与AA连接的-(C=O)-取代的C(1-12)烷基；



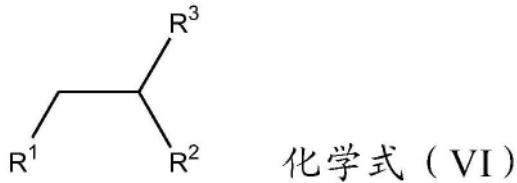
化学式 (V)

其中化学式 (V) 中R<sup>1</sup>为(C=O)OR<sup>4</sup>；

其中化学式(V)中 $R^2$ 为 $NH(C=O)R^5$ ;

其中化学式(V)中 $R^4$ 和 $R^5$ 各自独立地存在、为C(12-20)烷基或C(12-20)烯基;

其中化学式(V)中 $R^3$ 为被与AA连接的分支或未分支的-O(C=O)-C(1-8)链烷二基-(C=O)-;

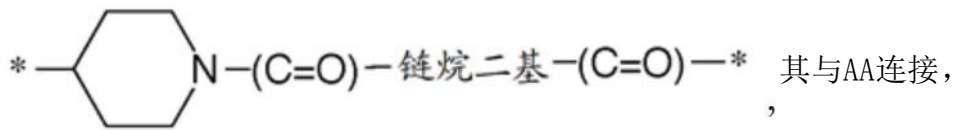


其中化学式(VI)中 $R^1$ 为 $O(C=O)R^4$ ;

其中化学式(VI)中 $R^2$ 为 $O(C=O)R^5$ ;

其中化学式(VI)中 $R^4$ 和 $R^5$ 各自独立地存在、为C(12-20)烷基或C(12-20)烯基;

其中化学式(VI)中 $R^3$ 为



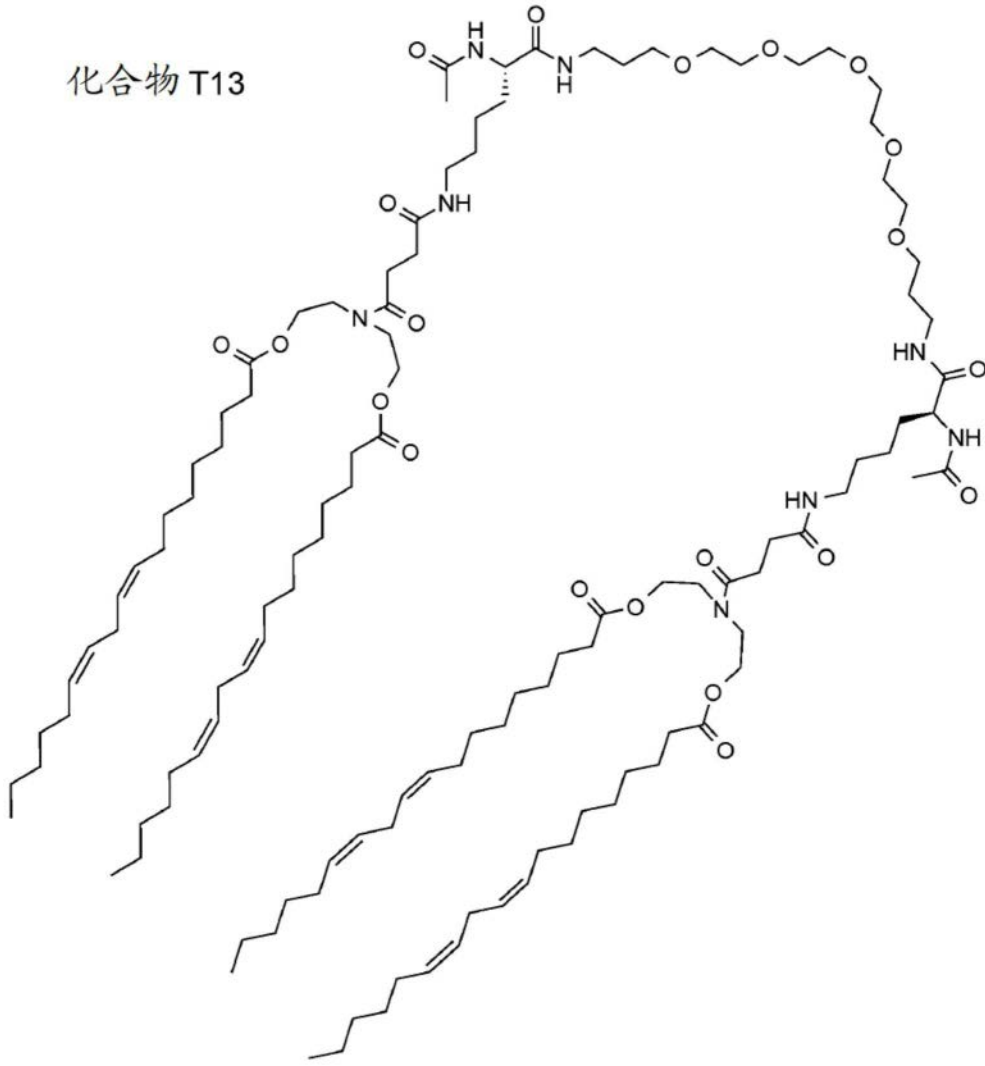
其中一个或两个两亲分子可任选地缺失而被具有1-400个原子的、选自烷基、烯基、炔基、乙酰基、Boc、Fmoc、TFA和CBZ的药学上可接受的有机化学基团替代,所述原子选自碳、氧、氮、硫、氟和氢。

2. 如权利要求1所述的膜融合化合物,其中一个或两个两亲分子缺失而被所述药学上可接受的有机化学基团替代。

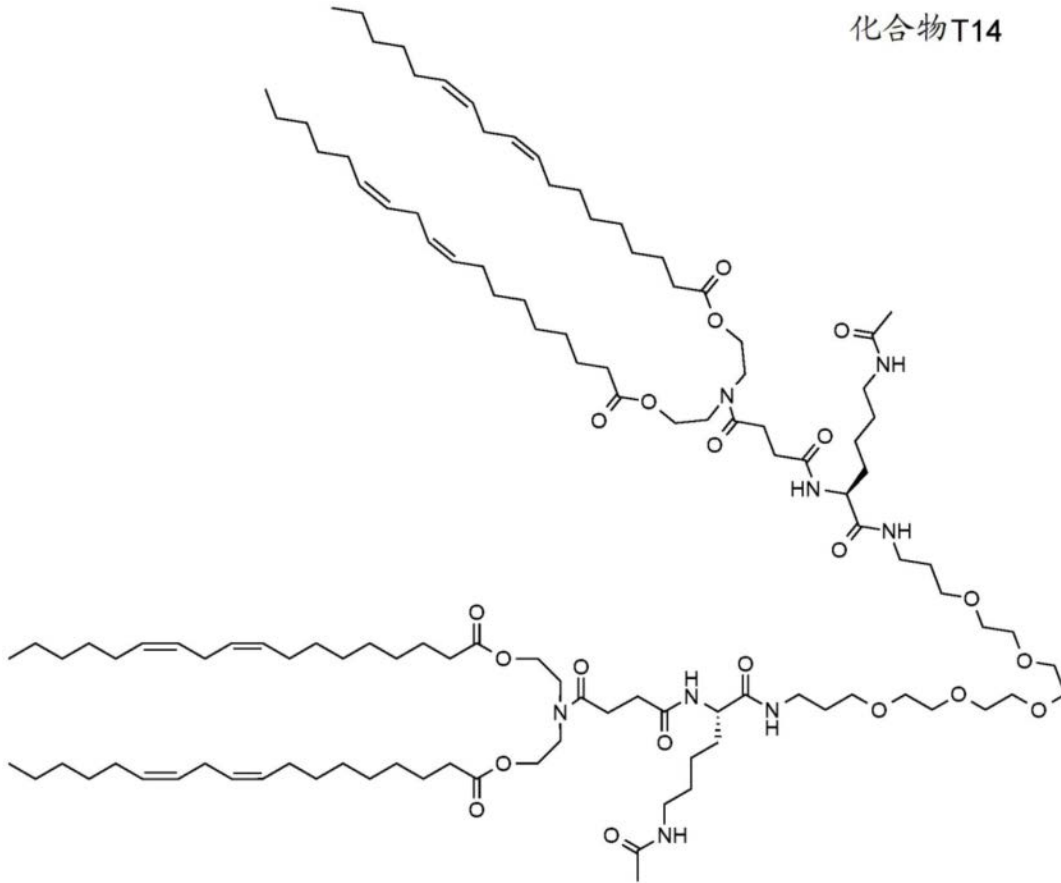
3. 如权利要求2所述的膜融合化合物,其中药学上可接受的有机化学基团是烷基、烯基、炔基、乙酰基、Boc、Fmoc、TFA、或CBZ。

4. 如权利要求2所述的膜融合化合物,其中化合物选自以下:

化合物 T13



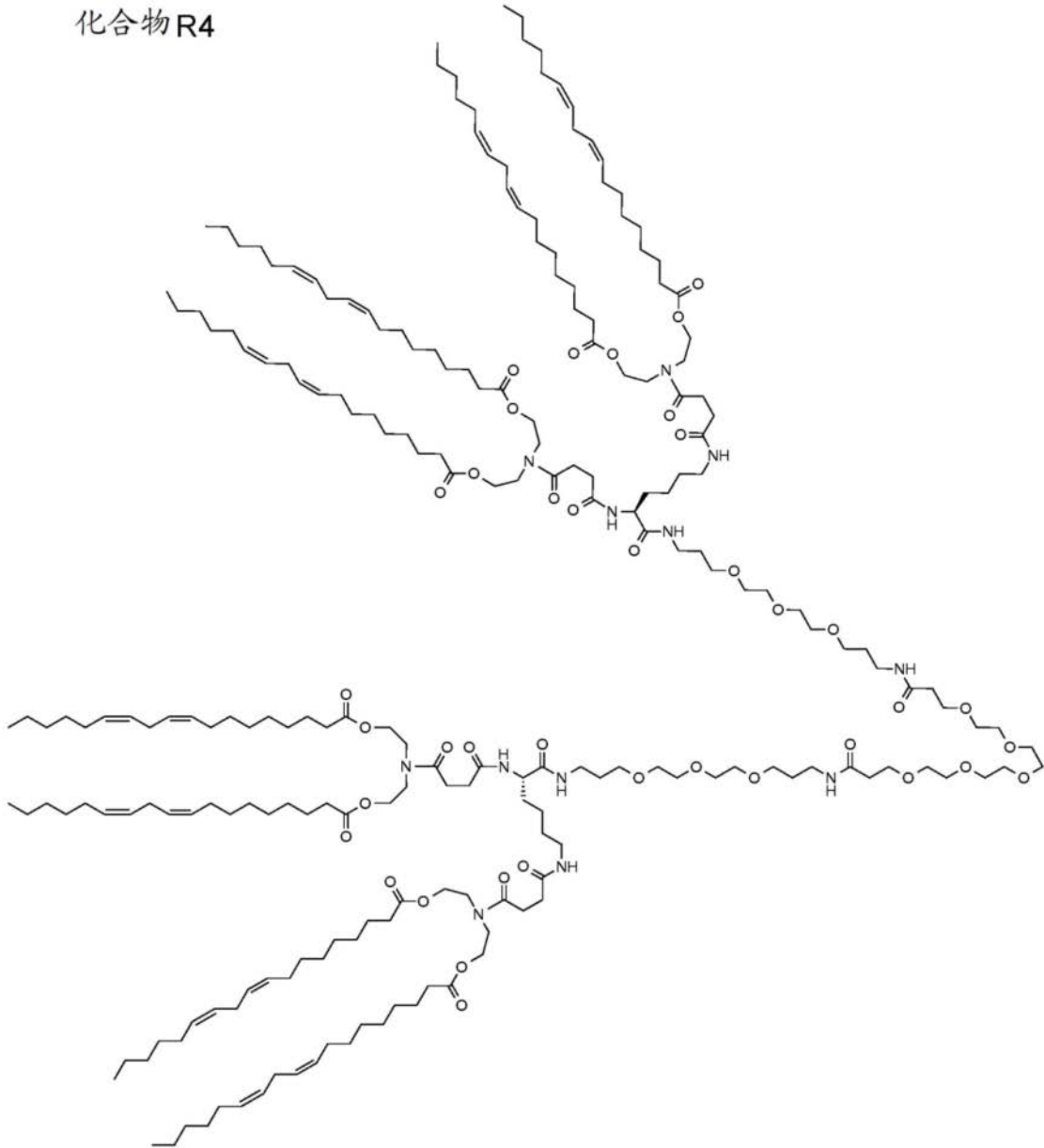
化合物T14



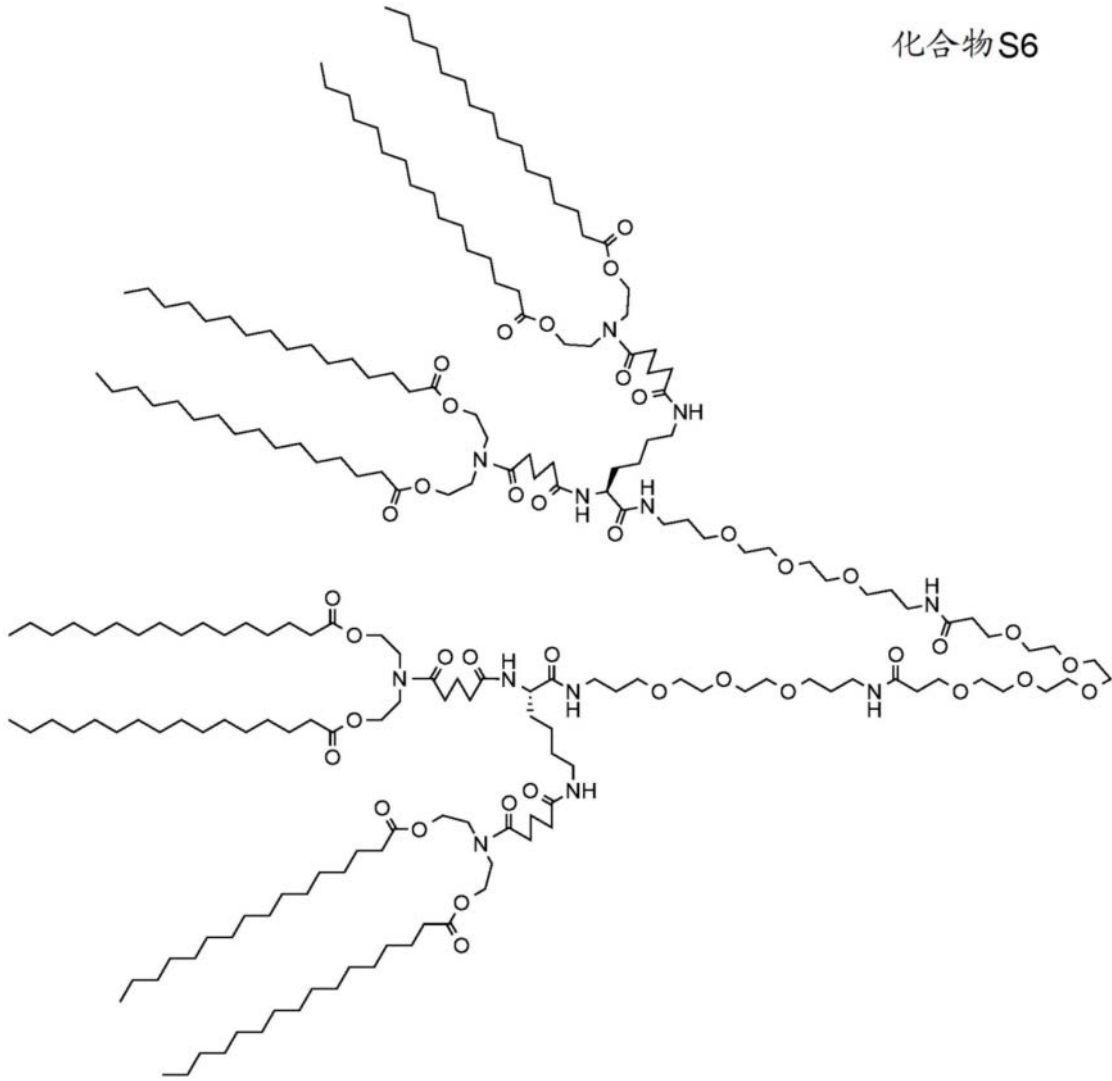
5. 如权利要求1所述的膜融合化合物,其中化学式(II)中 $R^3$ 为分支或未分支的C(2-8)链烷二基。

6. 如权利要求1所述的膜融合化合物,其中化合物选自以下:

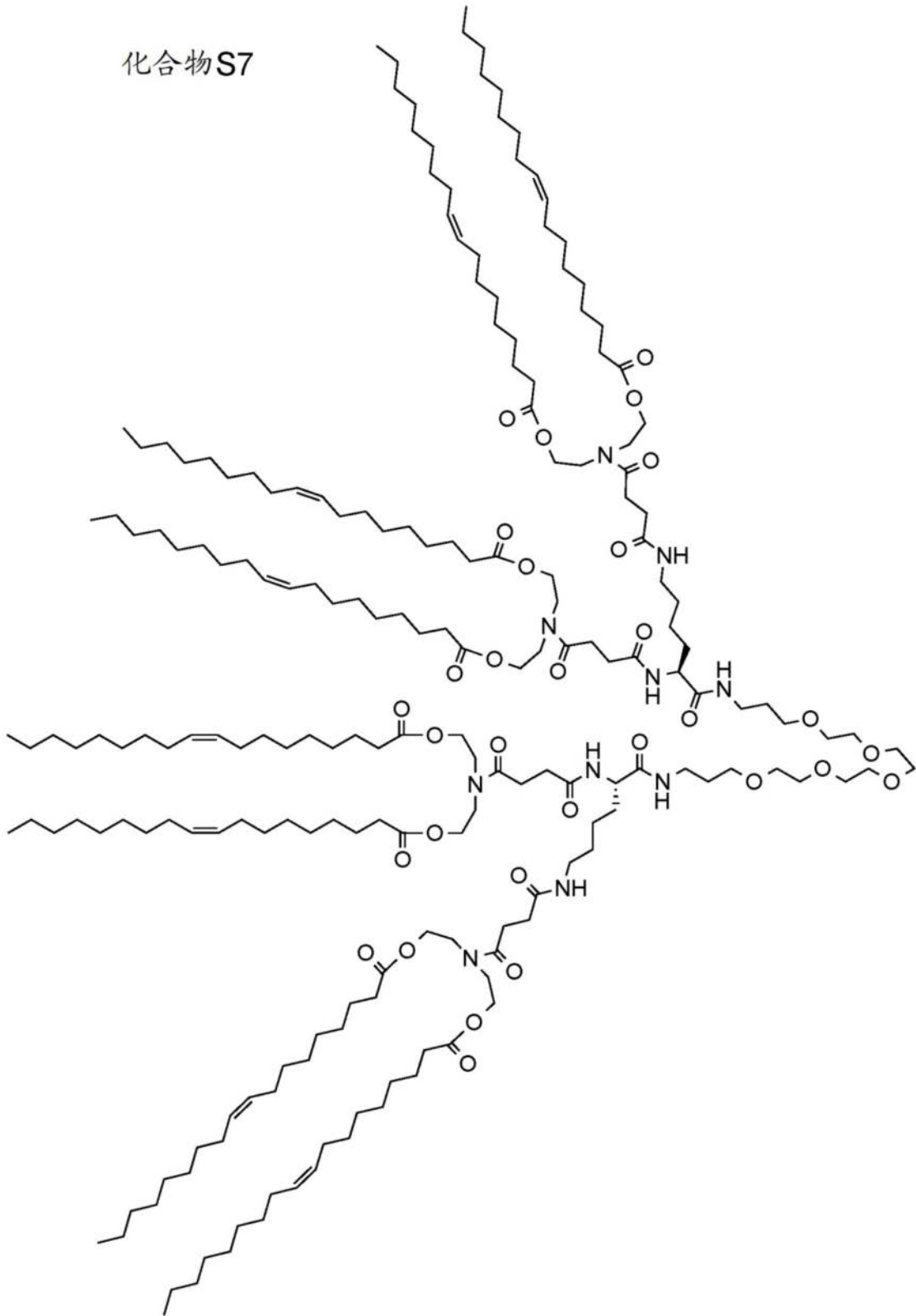
化合物 R4



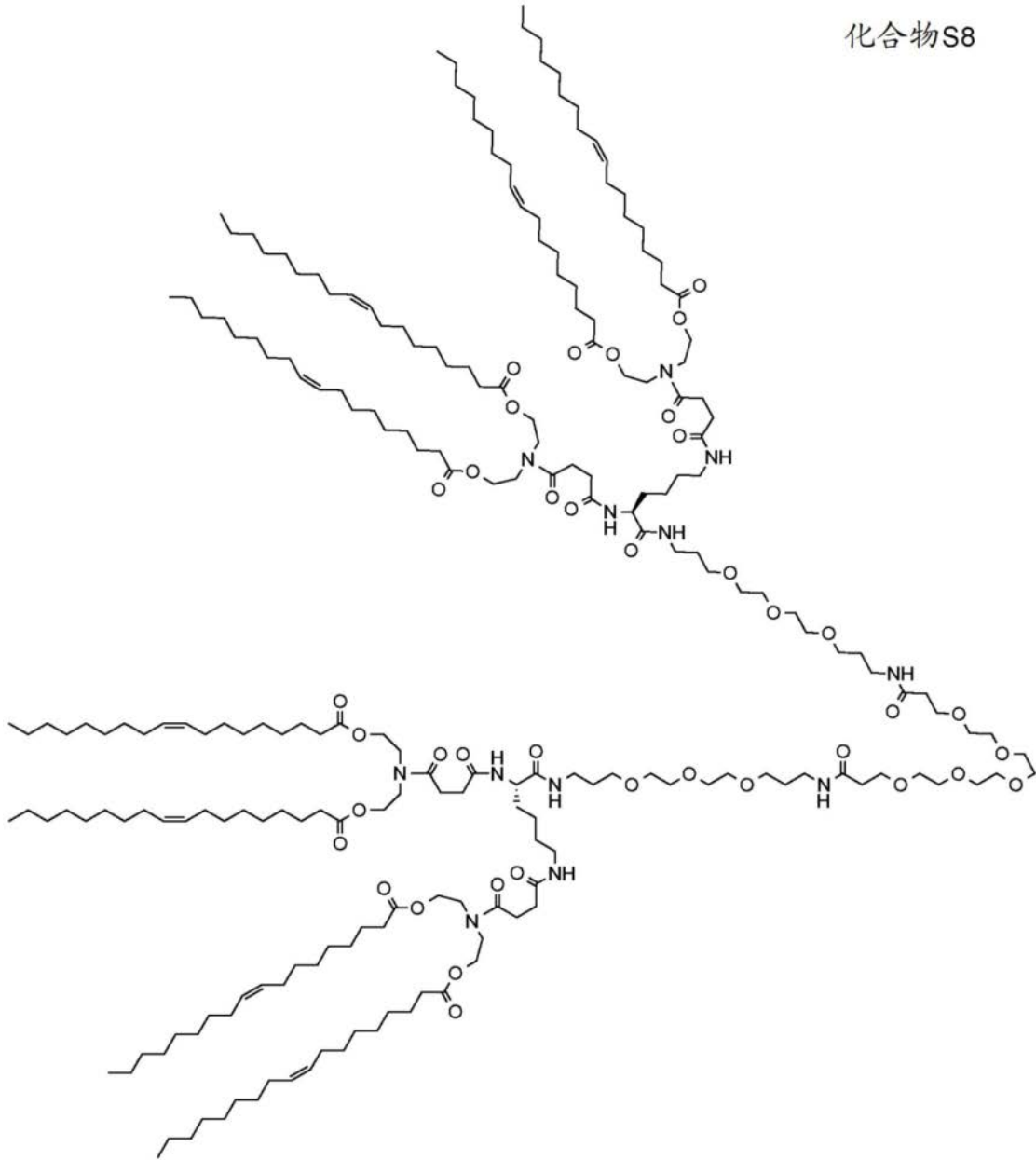
化合物S6



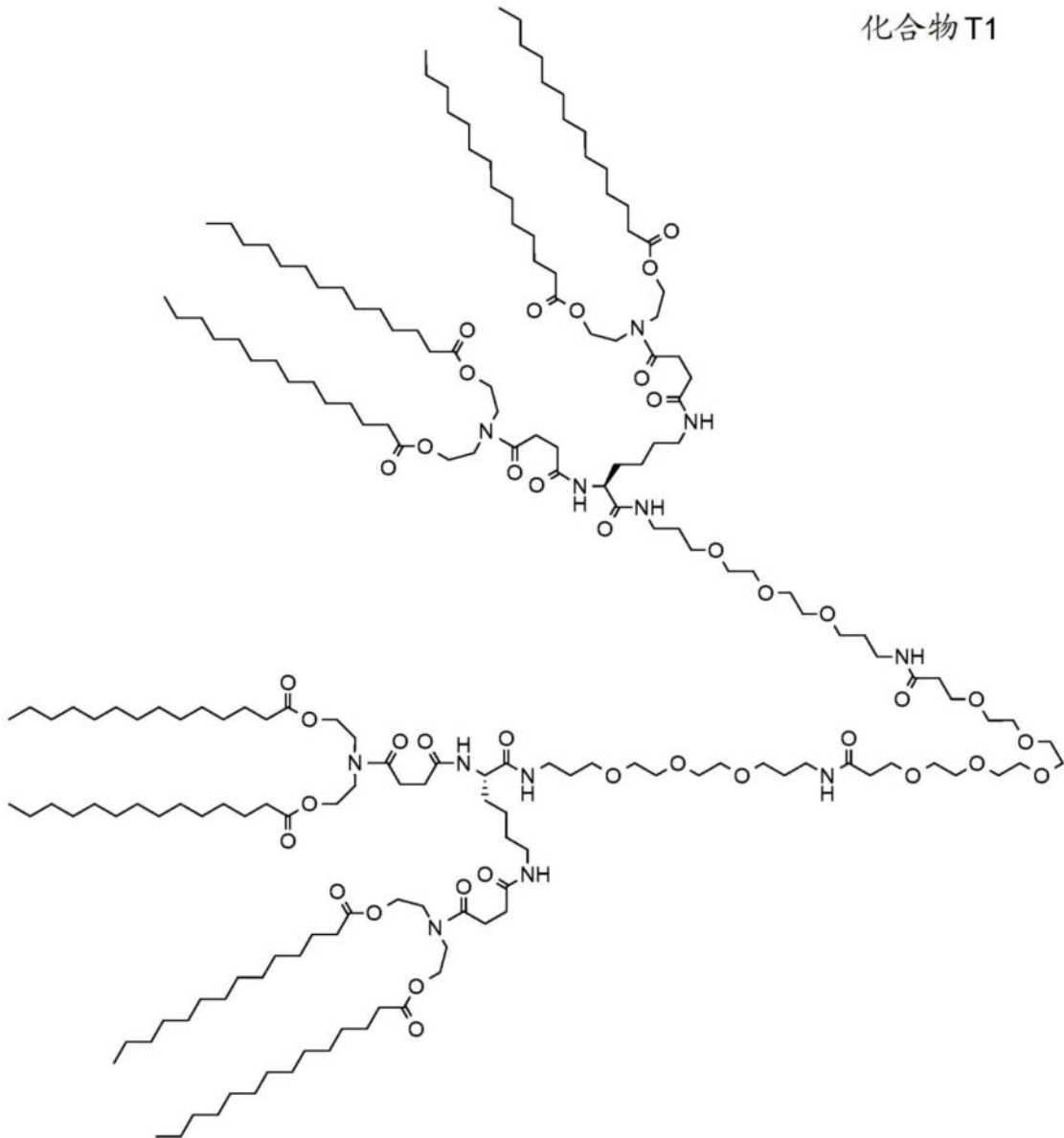
化合物S7



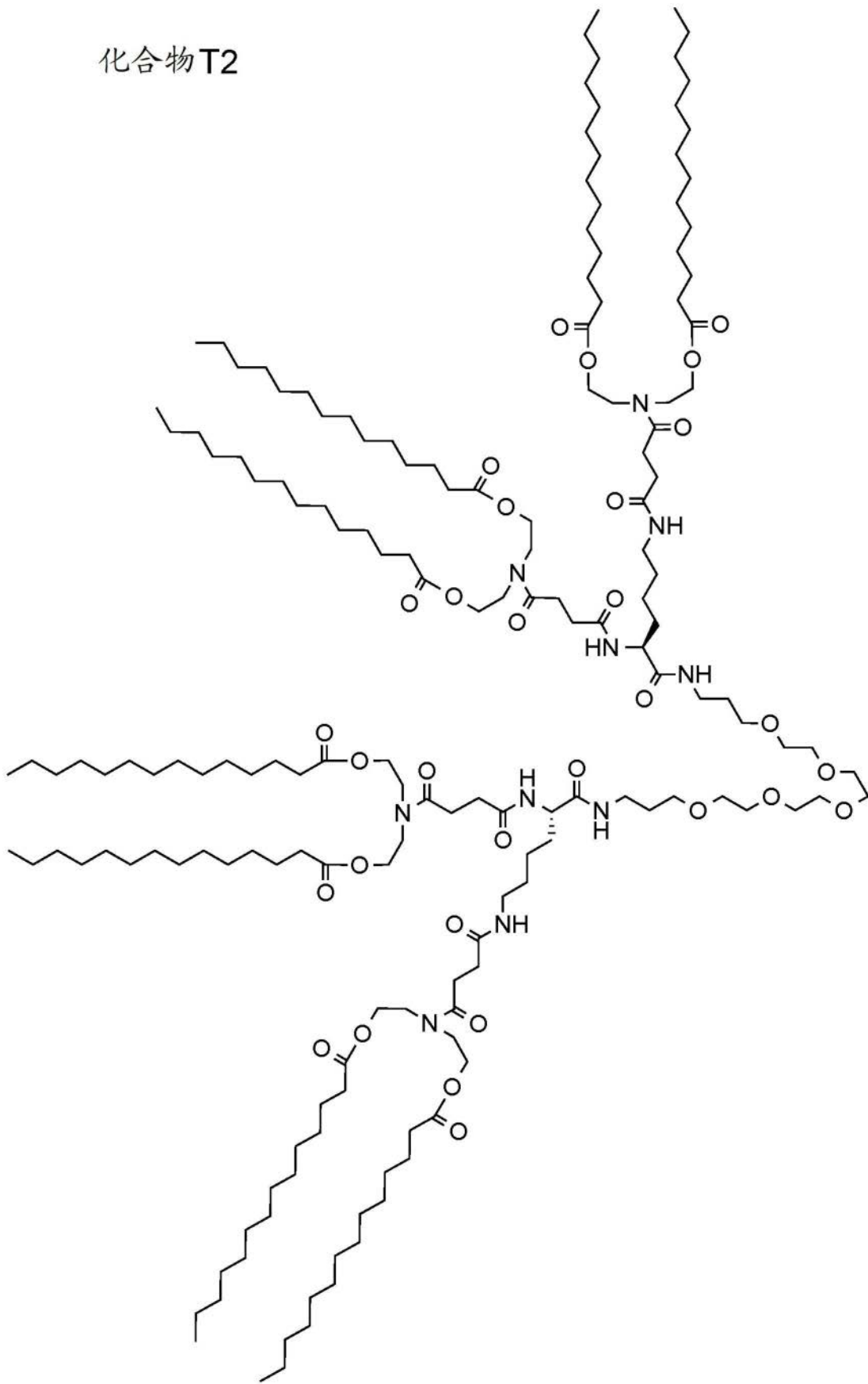
化合物S8



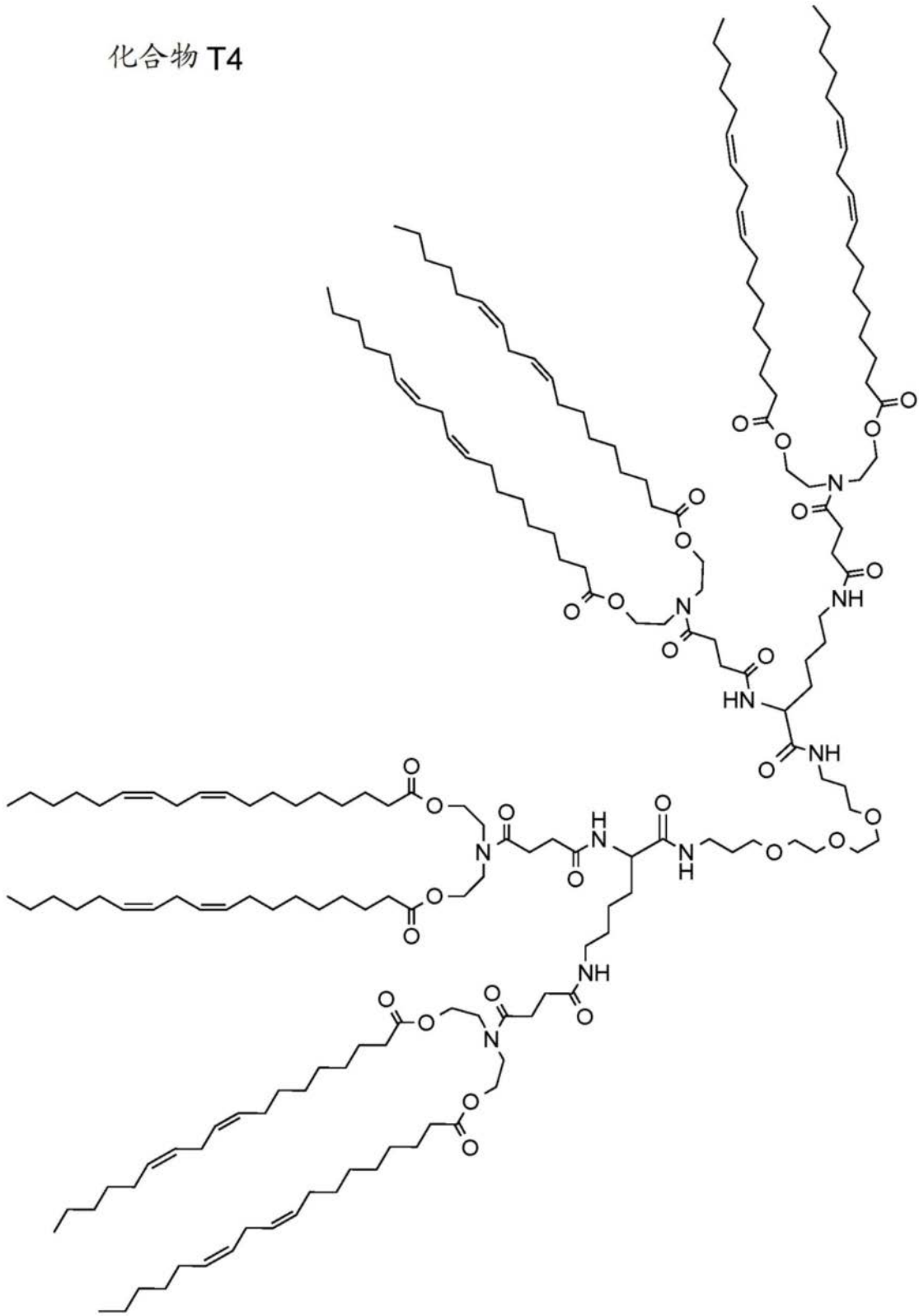
化合物T1



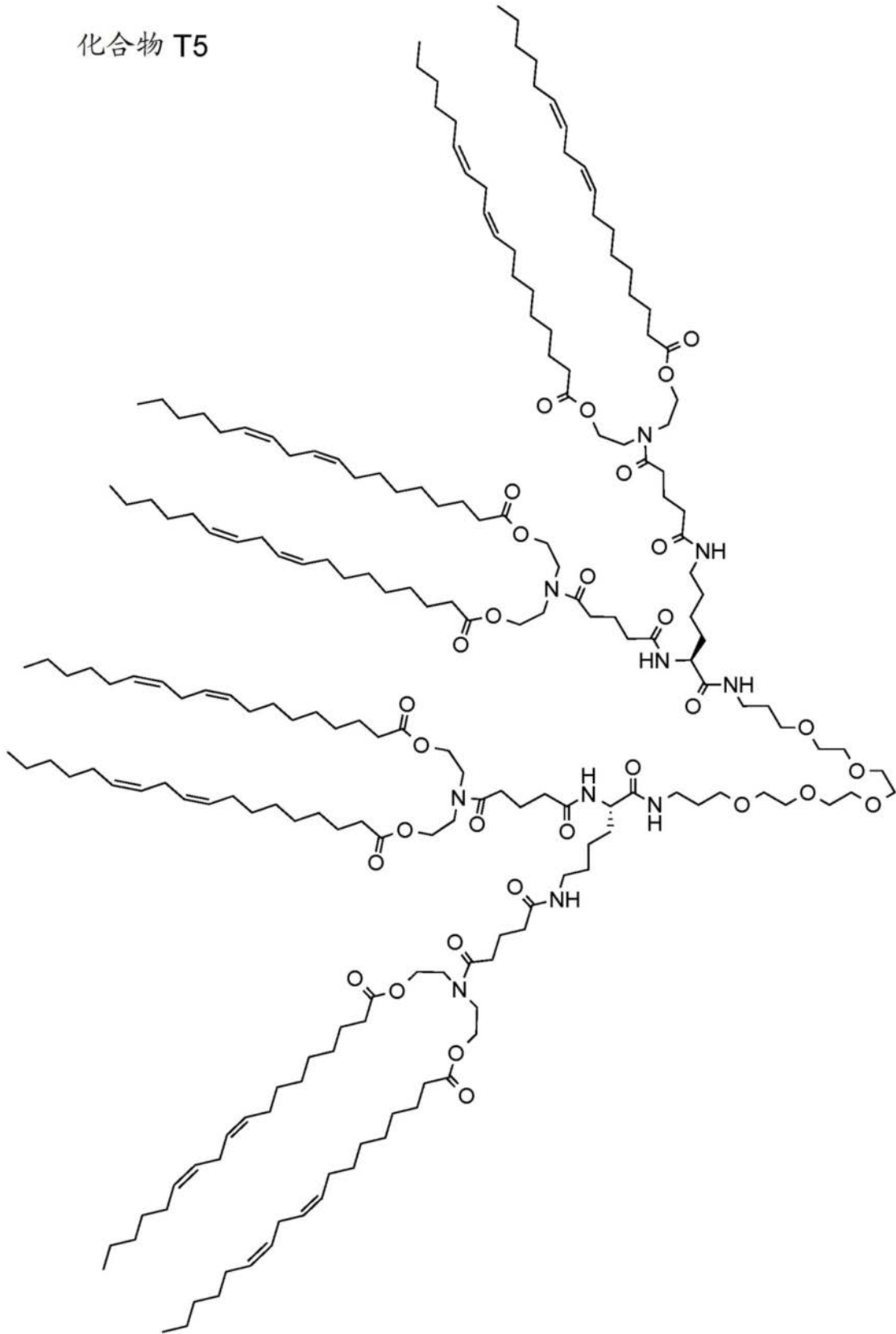
化合物T2



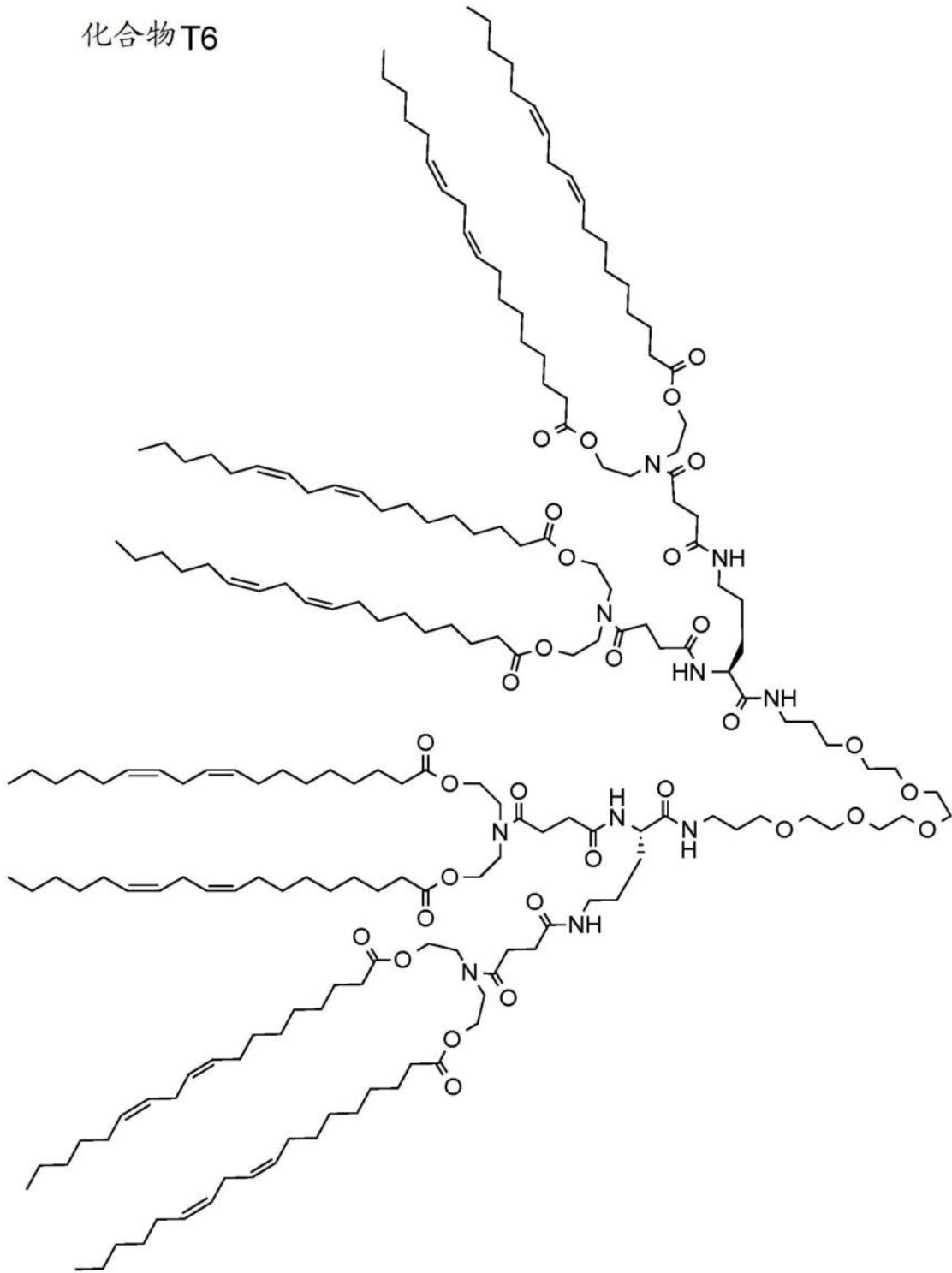
化合物 T4



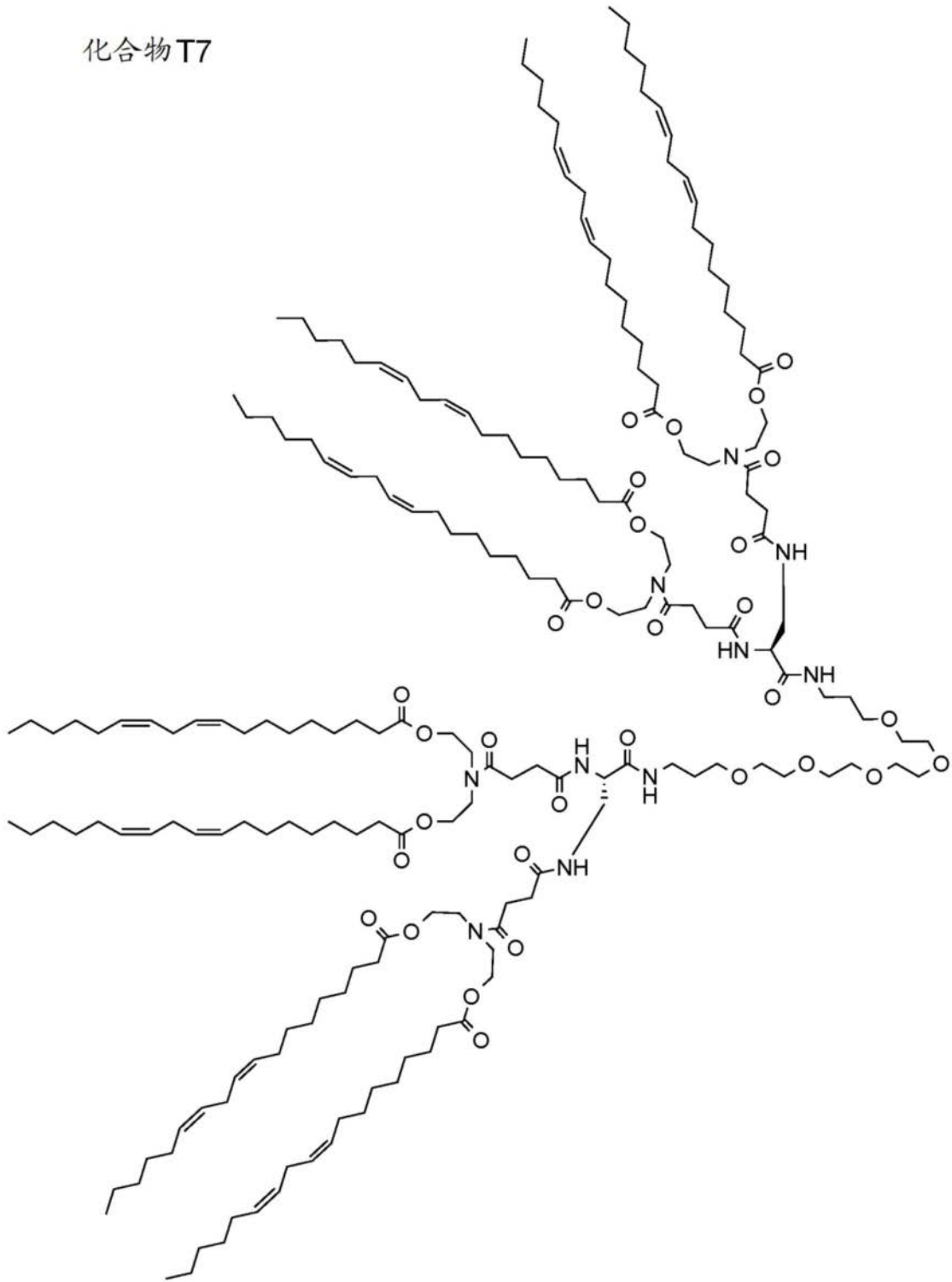
化合物 T5



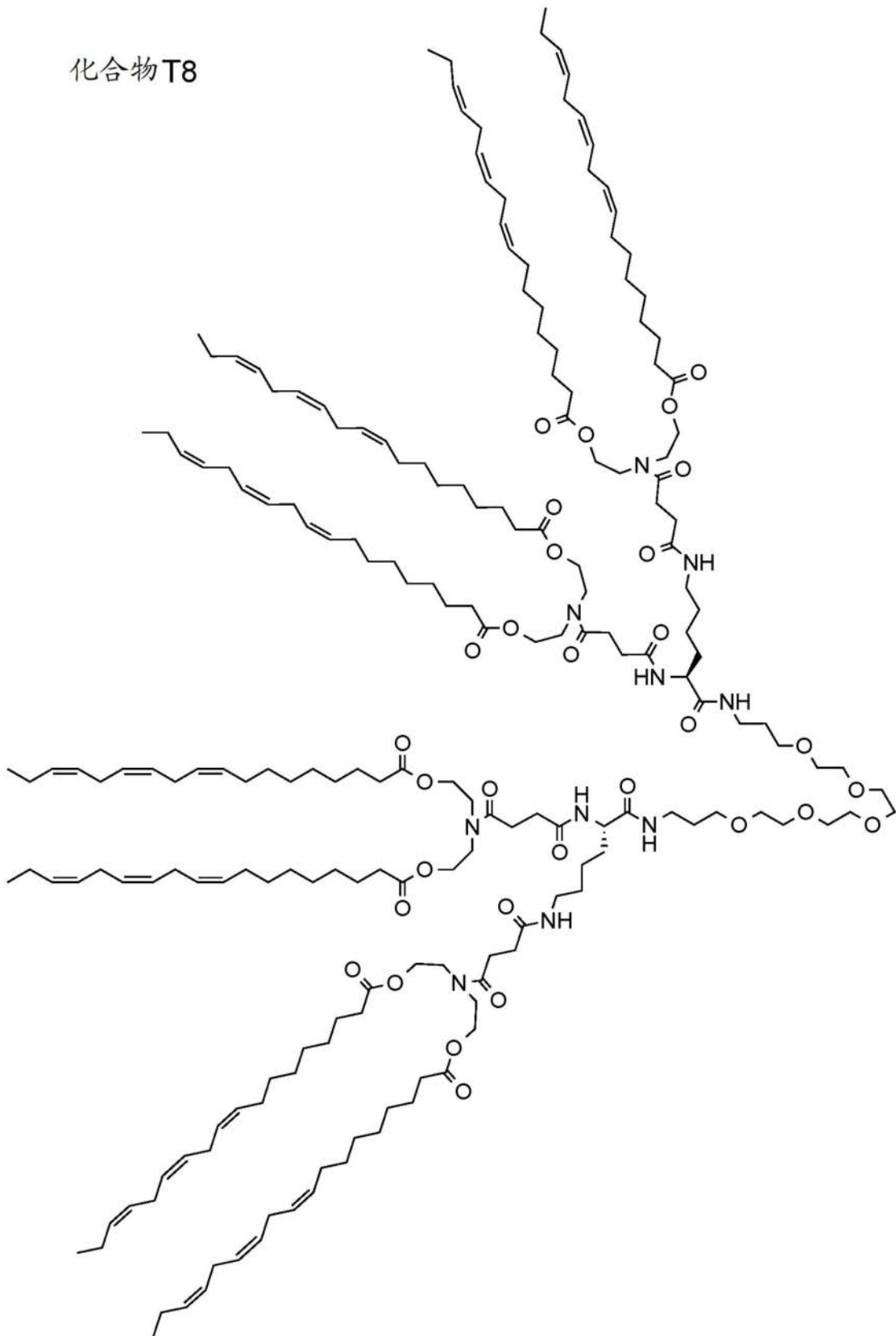
化合物 T6



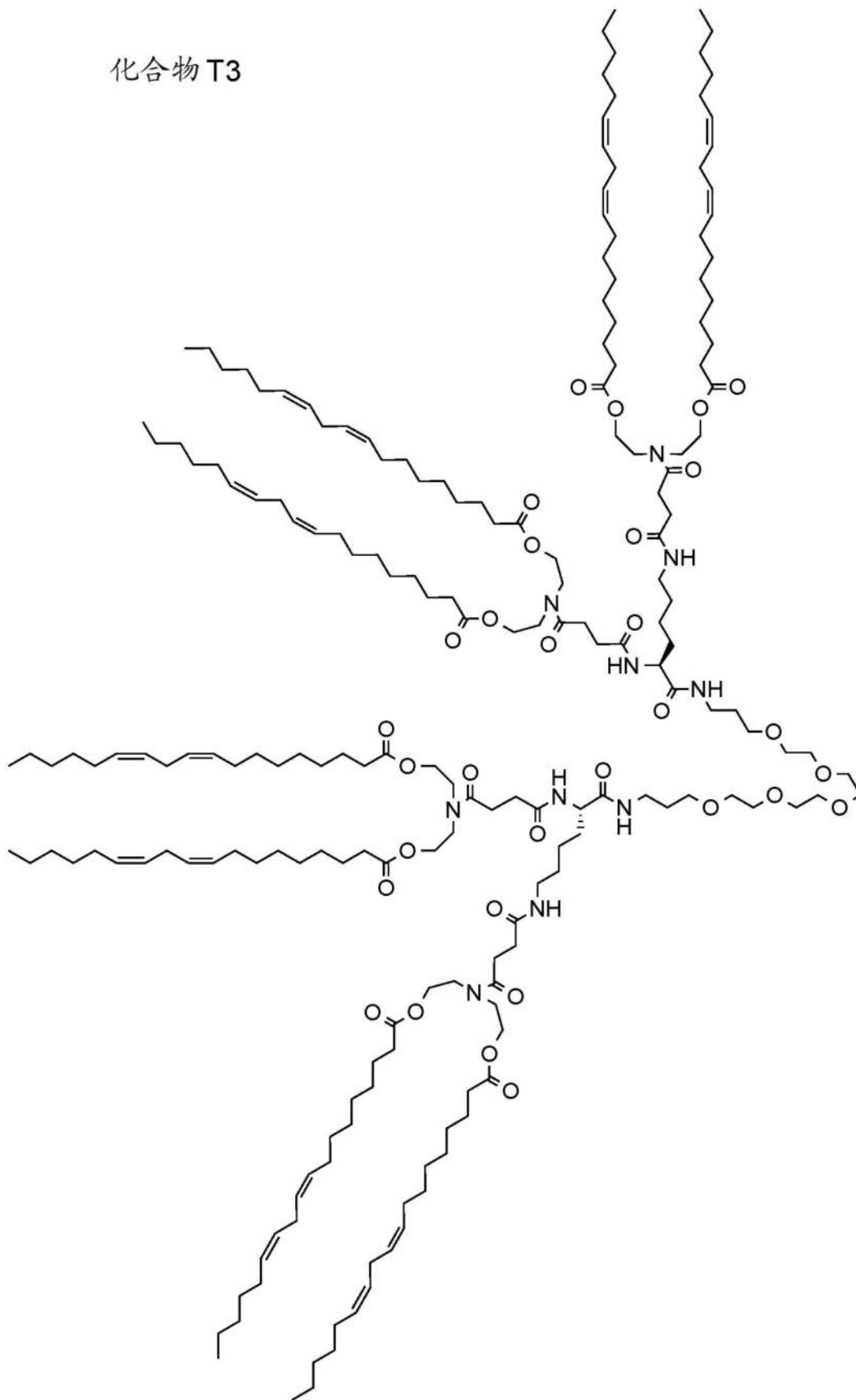
化合物T7



化合物T8

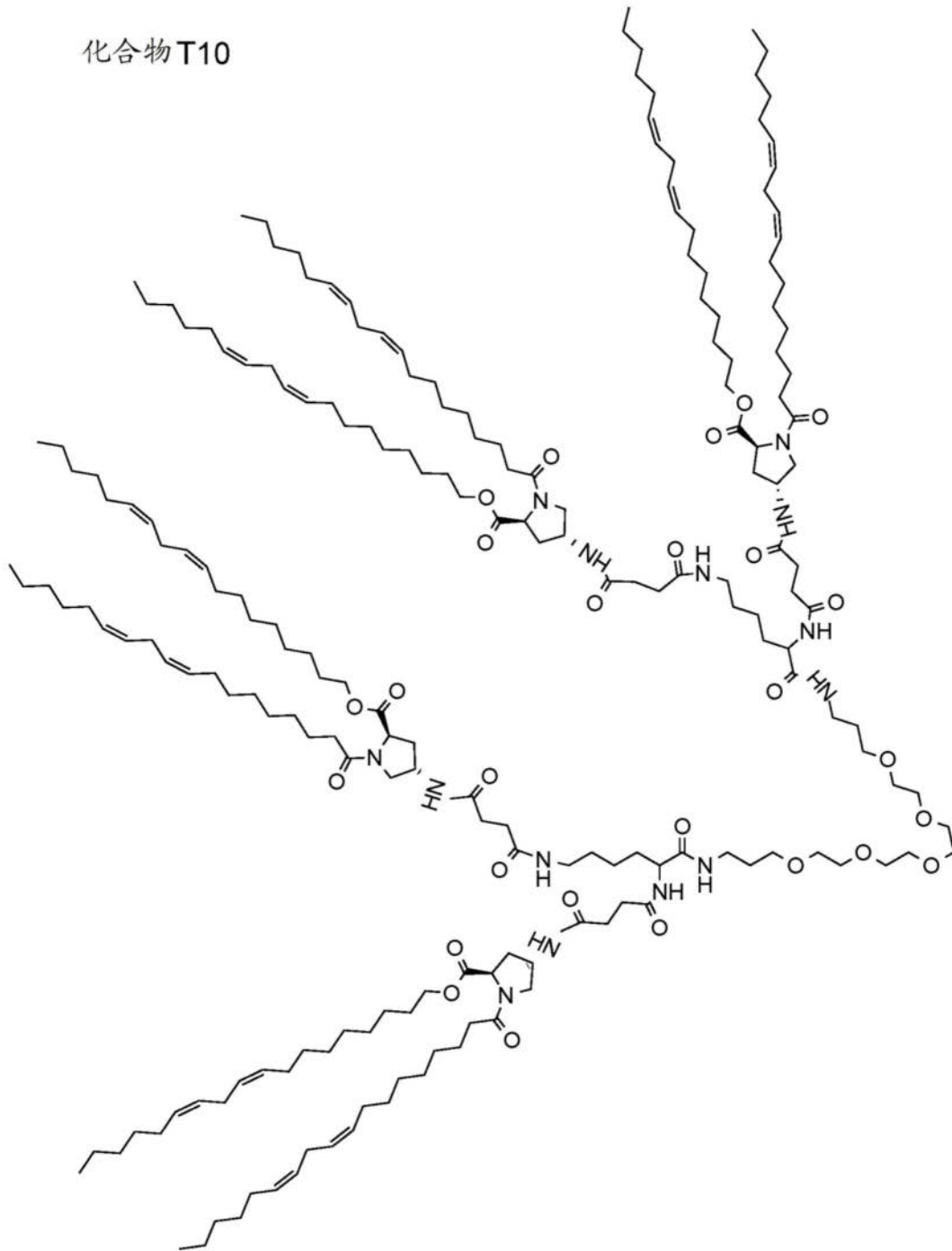


化合物 T3



7. 如权利要求1所述的膜融合化合物,其中化学式(IV)中 $R^4$ 和 $R^5$ 各自独立地存在、为C(14-18)烷基或C(14-18)烯基。

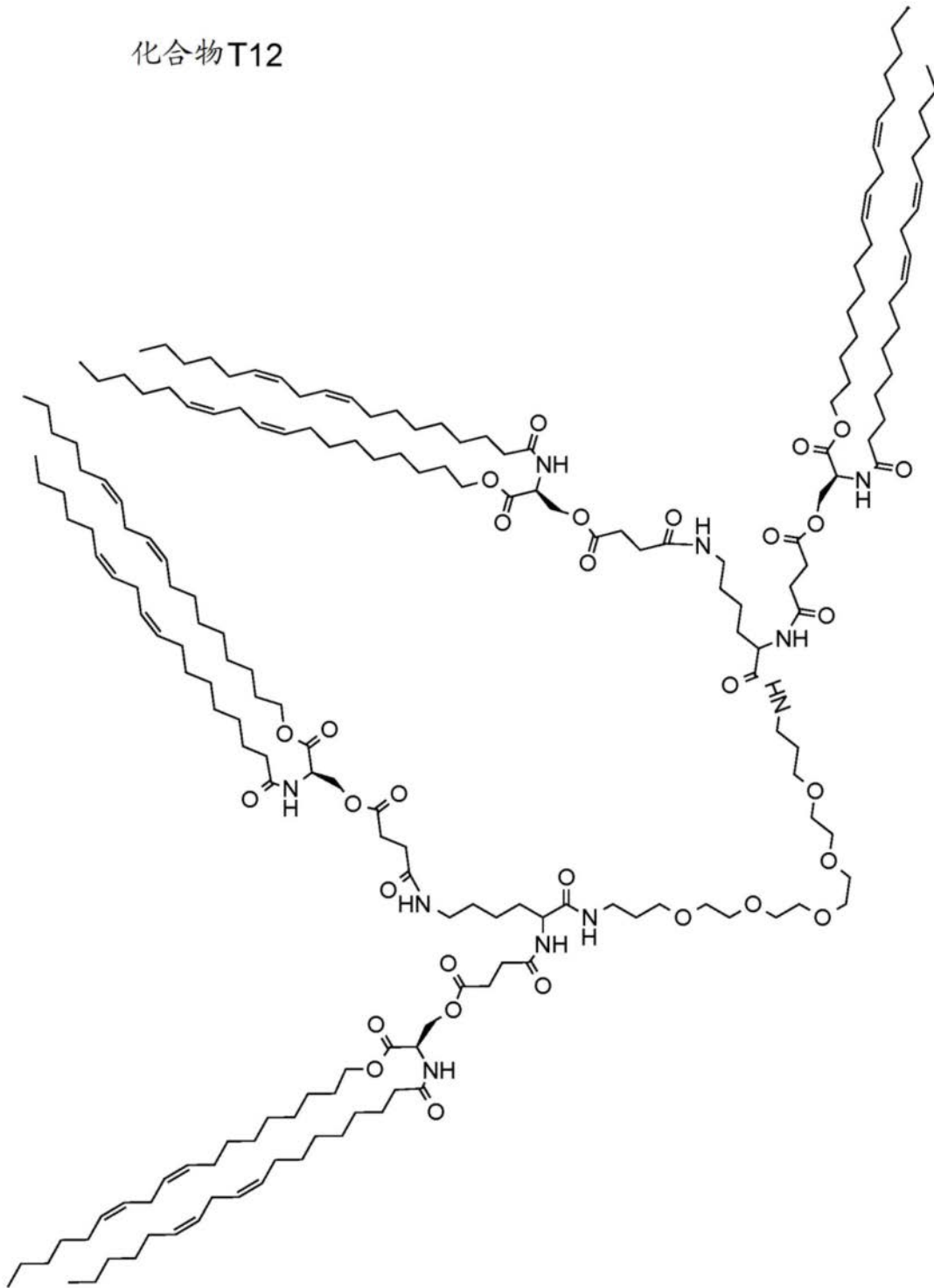
8. 如权利要求1所述的膜融合化合物,其中化合物是化合物T10:



9. 如权利要求1所述的膜融合化合物,其中化学式(V)中 $R^4$ 和 $R^5$ 各自独立地存在、为C(14-18)烷基或C(14-18)烯基。

10. 如权利要求1所述的膜融合化合物,其中化合物是化合物T12:

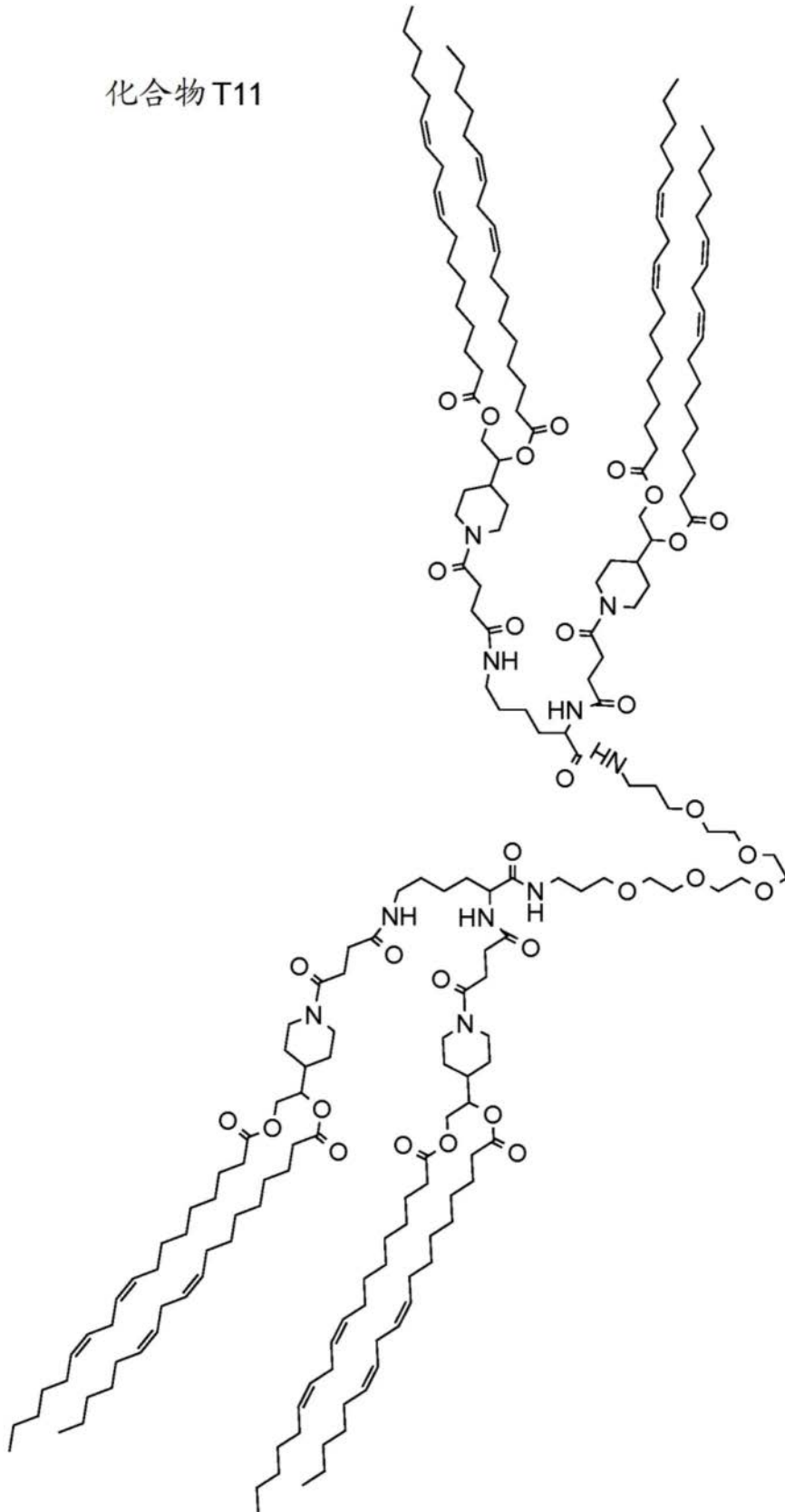
化合物T12



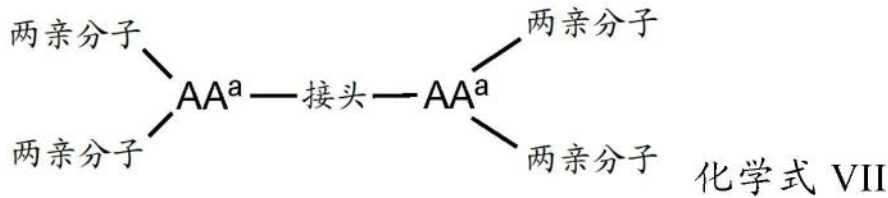
11. 如权利要求1所述的膜融合化合物,其中化学式(VI)中 $R^4$ 和 $R^5$ 各自独立地存在、为C(14-18)烷基或C(14-18)烯基。

12. 如权利要求1所述的膜融合化合物,其中化合物是化合物T11:

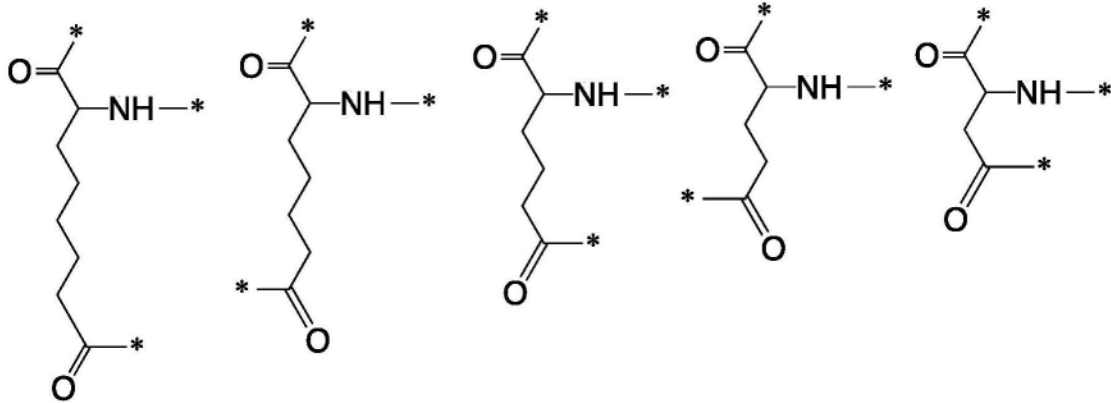
化合物T11



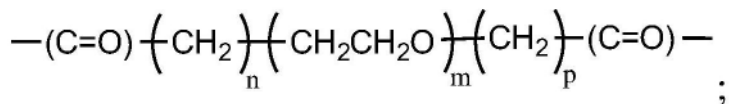
13. 具有化学式VII的膜融合化合物，



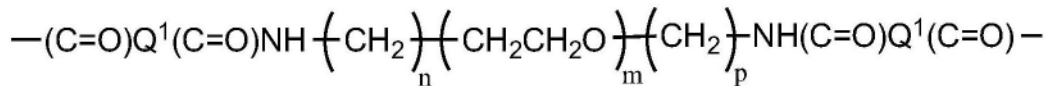
其中每个AA<sup>a</sup>独立地为选自以下结构的氨基酸，



其中氨基酸以其每个羧基与两亲分子连接，且以其N端与接头连接；  
其中接头具有下述结构：

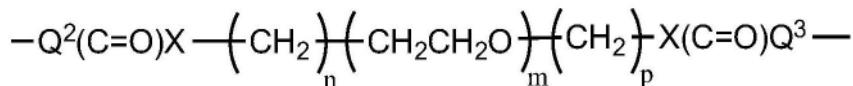


或者

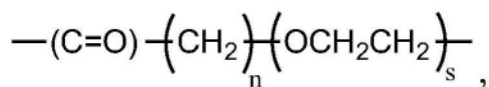


其中Q<sup>1</sup>是分支或未分支的C(2-8)链烷二基；

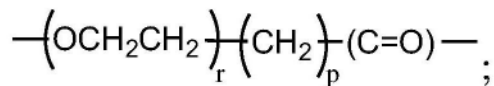
或者



其中Q<sup>2</sup>是



其中Q<sup>3</sup>是



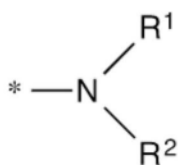
其中X是-O-、-S-、或-NH-；

n和p各自独立地存在、为1至3；

m独立地为1至10；

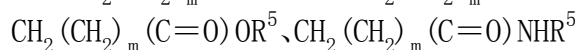
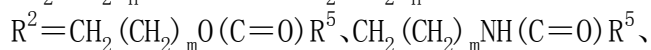
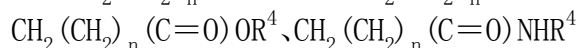
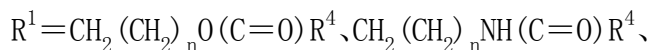
r和s各自独立地存在、为1至5；

其中每个两亲分子独立地选自化学式(VIII)、化学式(IX)、化学式(XI)和化学式(V)，如下所示：



化学式 VIII

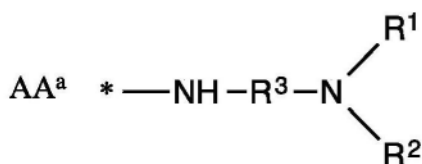
其中R<sup>1</sup>和R<sup>2</sup>为



其中

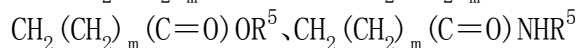
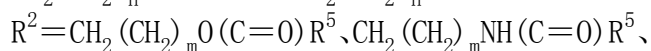
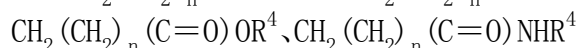
n和m各自独立地为1至2;

R<sup>4</sup>和R<sup>5</sup>各自独立地存在、为C(12-20)烷基或C(12-20)烯基;



化学式 IX

其中R<sup>1</sup>和R<sup>2</sup>为

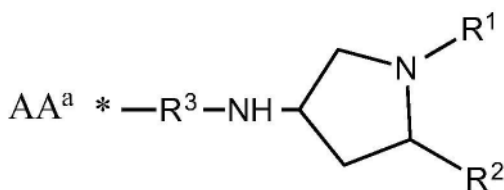


其中

n和m各自独立地为1至2;

R<sup>4</sup>和R<sup>5</sup>各自独立地存在、为C(12-20)烷基或C(12-20)烯基;

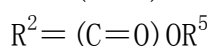
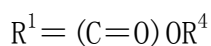
其中R<sup>3</sup>为分支或未分支的C(1-8)链烷二基;



化学式 XI

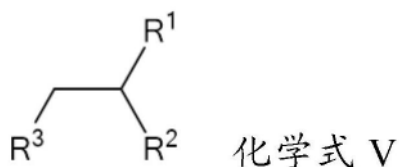
其中

R<sup>1</sup>和R<sup>2</sup>为



R<sup>4</sup>和R<sup>5</sup>各自独立地存在、为C(12-20)烷基或C(12-20)烯基;

其中R<sup>3</sup>为分支或未分支的\*-NH-C(1-8)链烷二基-(C=O)-, 其中\*表示与AA<sup>a</sup>连接的末端;



其中 $R^1$ 和 $R^2$ 为

$$R^1 = (C=O)OR^4$$

$$R^2 = (C=O)OR^5$$

其中 $R^4$ 和 $R^5$ 各自独立地存在、为C(12-20)烷基或C(12-20)烯基；

其中

$R^3$ 为分支或未分支的\*-NH-C(1-8)链烷二基-(C=O)-, 其中\*表示与AA<sup>a</sup>连接的末端；

其中一个或两个两亲分子可任选地缺失而被具有1-400个原子的、选自烷基、烯基、炔基、乙酰基、Boc、Fmoc、TFA和CBZ的药学上可接受的有机化学基团替代, 所述原子选自碳、氧、氮、硫、氟和氢。

14. 如权利要求13所述的膜融合化合物, 其中一个或两个两亲分子缺失而被所述药学上可接受的有机化学基团替代。

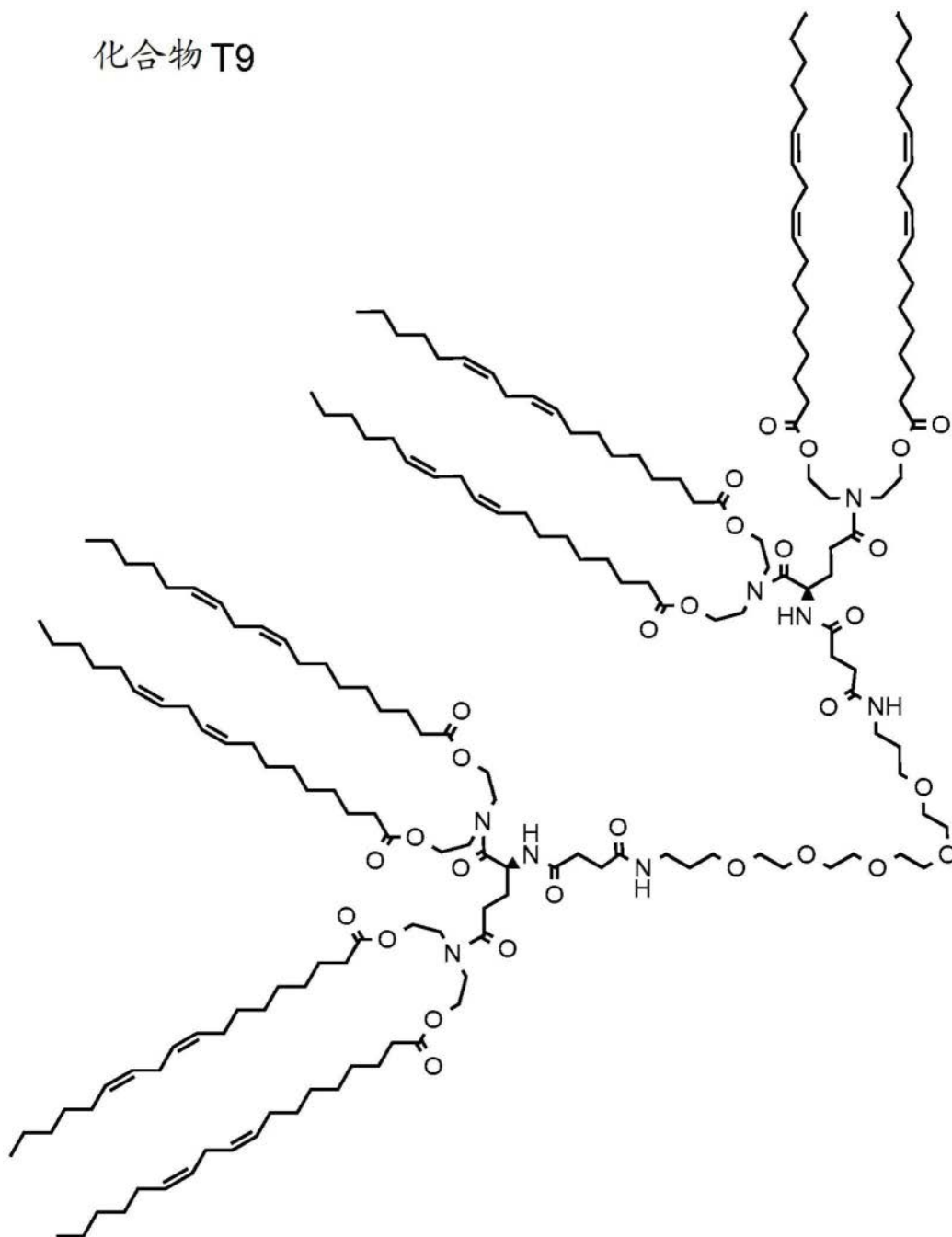
15. 如权利要求14所述的膜融合化合物, 其中药学上可接受的有机化学基团选自烷基、烯基、炔基、烷基醚基、芳基醚基、烷氧基、和烷氧基烷氧基。

16. 如权利要求14所述的膜融合化合物, 其中药学上可接受的有机化学基团选自甲氧基、乙氧基、叔丁基醚基、和苄氧基。

17. 如权利要求13所述的膜融合化合物, 其中化学式IX中 $R^4$ 和 $R^5$ 各自独立地存在、为C(14-18)烷基或C(14-18)烯基。

18. 如权利要求13所述的膜融合化合物, 其中化合物是化合物T9:

化合物 T9



19. 组合物,其包含权利要求1-18中任一项所述的膜融合化合物和药学上可接受的载体。

20. 如权利要求19所述的组合物,其中组合物包含纳米颗粒或脂质体。

21. 药物组合物,其包含权利要求1-18中任一项所述的膜融合化合物、活性剂、和药学上可接受的载体。

22. 如权利要求21所述的组合物,其中膜融合化合物是组合物的脂质的0.01mol%至20mol%。

23. 如权利要求21所述的组合物,其中组合物包含纳米颗粒或脂质体。

24. 如权利要求21所述的组合物,其中活性剂是一种或多种核酸。

25. 如权利要求21所述的组合物,其中活性剂是一种或多种DNA、RNA、mRNA、siRNA、或

microRNA。

26. 如权利要求21所述的组合物,其中活性剂是一种或多种RNA分子。

27. 如权利要求21所述的组合物,其中活性剂选自一种或多种RNAi分子、一种或多种mRNA分子、及其修饰形式。

28. 如权利要求21所述的组合物,其用于治疗人或动物体。

29. 组合物,其用于在对象中分配活性剂以治疗病症或疾病,所述组合物包含活性剂、权利要求1-18中任一项所述的膜融合化合物、可离子化的脂质、结构性脂质、稳定剂脂质、和用于降低组合物的免疫原性的脂质。

30. 如权利要求29所述的组合物,其中活性剂是一种或多种核酸。

## 用于递送生物活性分子的膜融合化合物

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物药和治疗剂的领域。更特别地，本发明涉及包含用于提供纳米颗粒的膜融合分子的化合物、组合物和方法，所述纳米颗粒用于向细胞、组织、器官和对象递送及分配活性剂或药物化合物。

### 背景技术

[0002] 治疗剂如药物化合物、核酸分子和其他活性剂通过摄入到对象的细胞、组织和器官内来发挥作用。试剂和分子向细胞内的转染通常是治疗行为中的限制步骤。

[0003] 当活性剂分子对血清或其他生物环境中的攻击或降解敏感时，为了实现其医药效果，必须保护所述分子。

[0004] 例如，执行核酸转染的一种方式是将活性分子掺入或封装到纳米颗粒中。这类方法的一个缺陷在于细胞渗透率低。

[0005] 对于具有膜融合特性的分子存在长期的需求，所述分子用于提供具有有利的转染特性的纳米颗粒，以提高细胞渗透率并将活性剂递送给细胞。

[0006] 所需要的是用以形成用于活性剂的纳米颗粒的组合物和化合物。对用于将核酸分子和其他试剂有效地转染及分配到细胞和对象中的分子和组合物存在持续的需求。

### 发明内容

[0007] 本发明涉及用于生物药和治疗剂的分子及其组合物。更特别地，本发明涉及用于提供纳米颗粒的化合物、组合物和方法，所述纳米颗粒用于将活性剂或药物化合物递送及分配至细胞、组织、器官和对象。

[0008] 本发明提供了一系列的膜融合化合物。本发明的膜融合化合物可用于形成纳米颗粒，以递送及分配活性剂。

[0009] 本公开内容中的活性剂的例子包括生物活性分子、核酸、DNA、RNA、mRNA、siRNA和microRNA等等。

[0010] 本发明的实施方式包括以下：

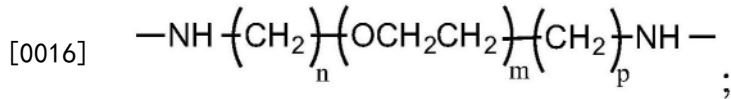
[0011] 具有化学式I的膜融合化合物，



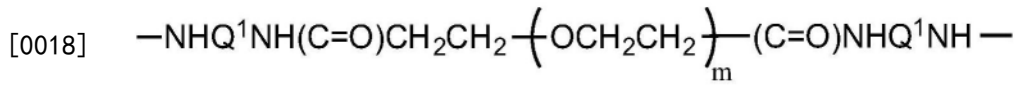
[0013] 其中每个两亲分子独立地包含一至两条亲脂链，其中所述亲脂链各自独立地包含8至22个碳原子；

[0014] 其中每个AA独立地为包含具有氨基的侧链的氨基酸，其中氨基酸以其每个氨基与两亲分子连接，且以其C端与接头连接；

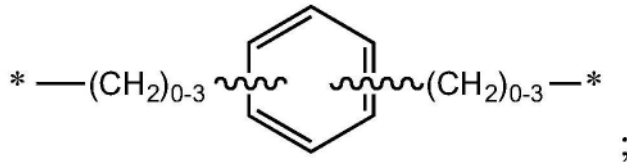
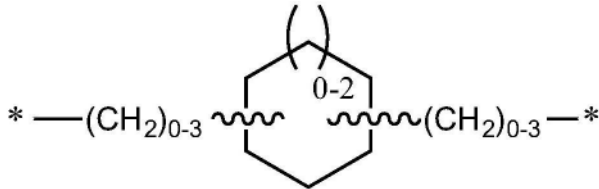
[0015] 其中接头具有下述结构：



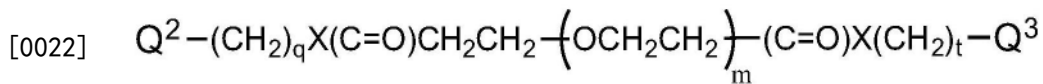
[0017] 或者



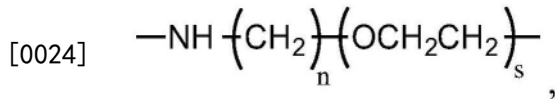
[0019] 其中Q<sup>1</sup>是分支或未分支的C(2-8)链烷二基、分支或未分支的C(2-8)烯二基、分支或未分支的C(2-8)炔二基、或



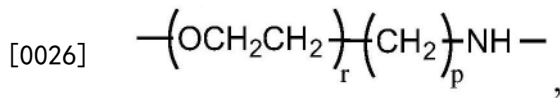
[0021] 或者



[0023] 其中Q<sup>2</sup>是



[0025] 其中Q<sup>3</sup>是



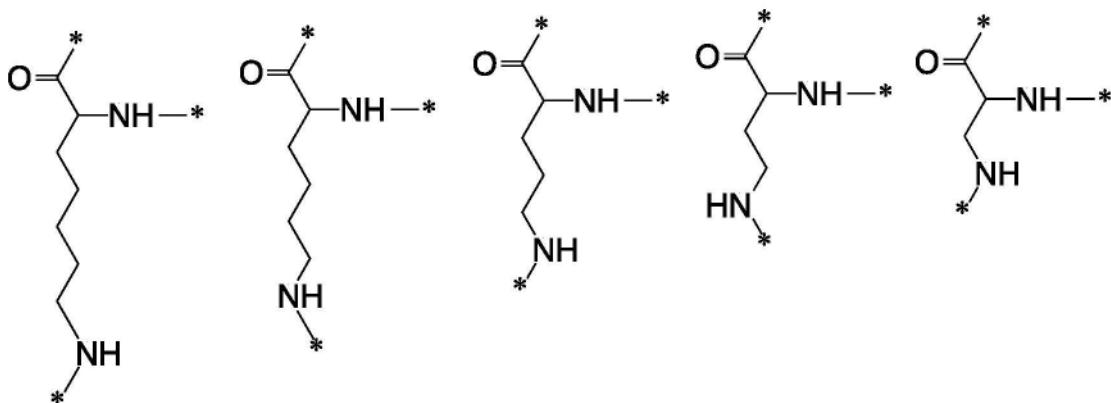
[0027] 其中X是-O-、-S-、或-NH-;

[0028] n、p、q和t各自独立地存在、为1至3;

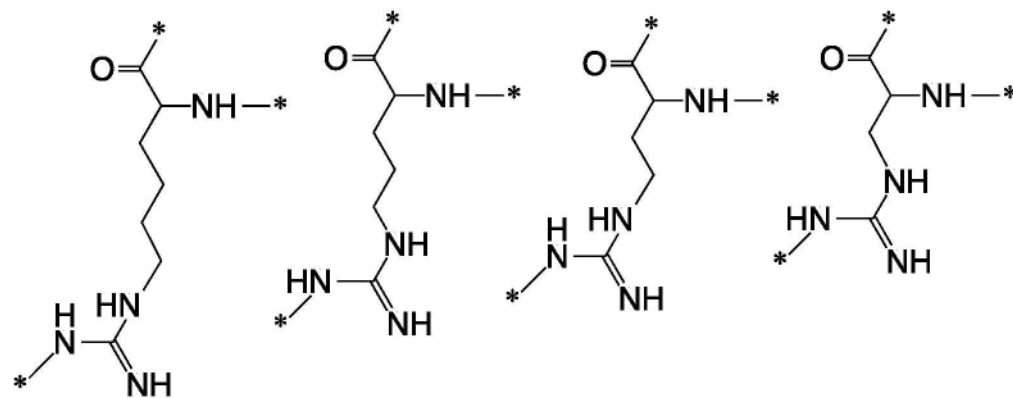
[0029] m独立地为1至10;

[0030] r和s各自独立地存在、为1至5。

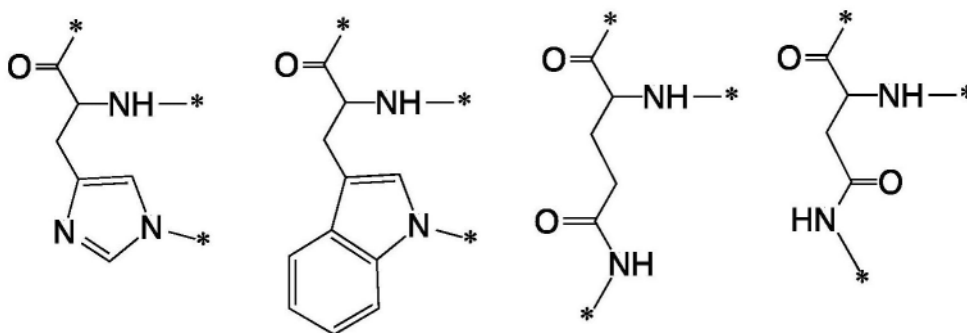
[0031] 上述膜融合化合物,其中AA选自以下结构、及其任意的立体异构体:



[0032]



[0033]



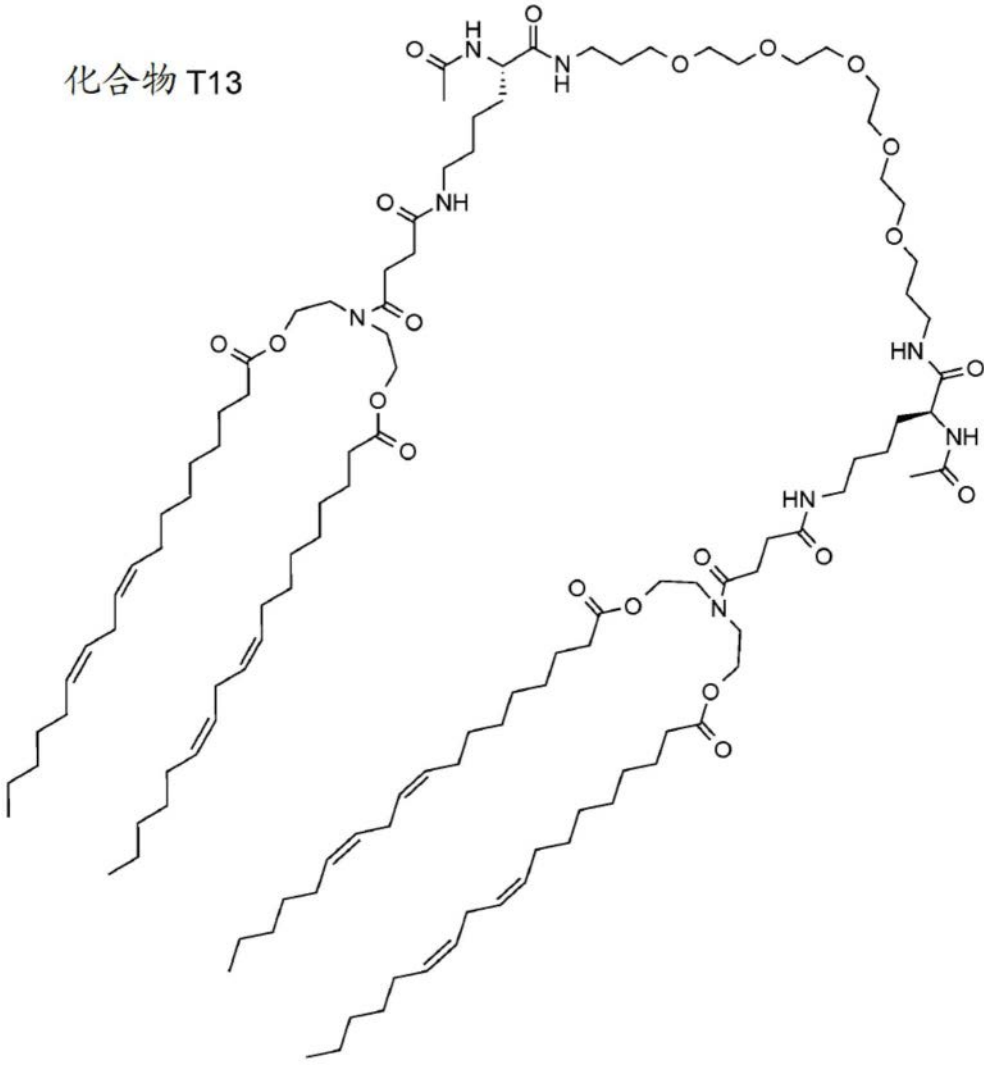
[0034] 上述膜融合化合物, 其中一个或两个两亲分子缺失而被烷基、或具有1-400个原子的药学上可接受的有机化学基团替代, 所述原子选自碳、氧、氮、硫、氟和氢。

[0035] 上述膜融合化合物, 其中药学上可接受的有机化学基团是烷基、烯基、炔基、乙酰基、Boc、Fmoc、TFA、或CBZ, 优选是烷基、乙酰基, 更优选是乙酰基。

[0036] 上述膜融合化合物, 其中化合物选自以下:

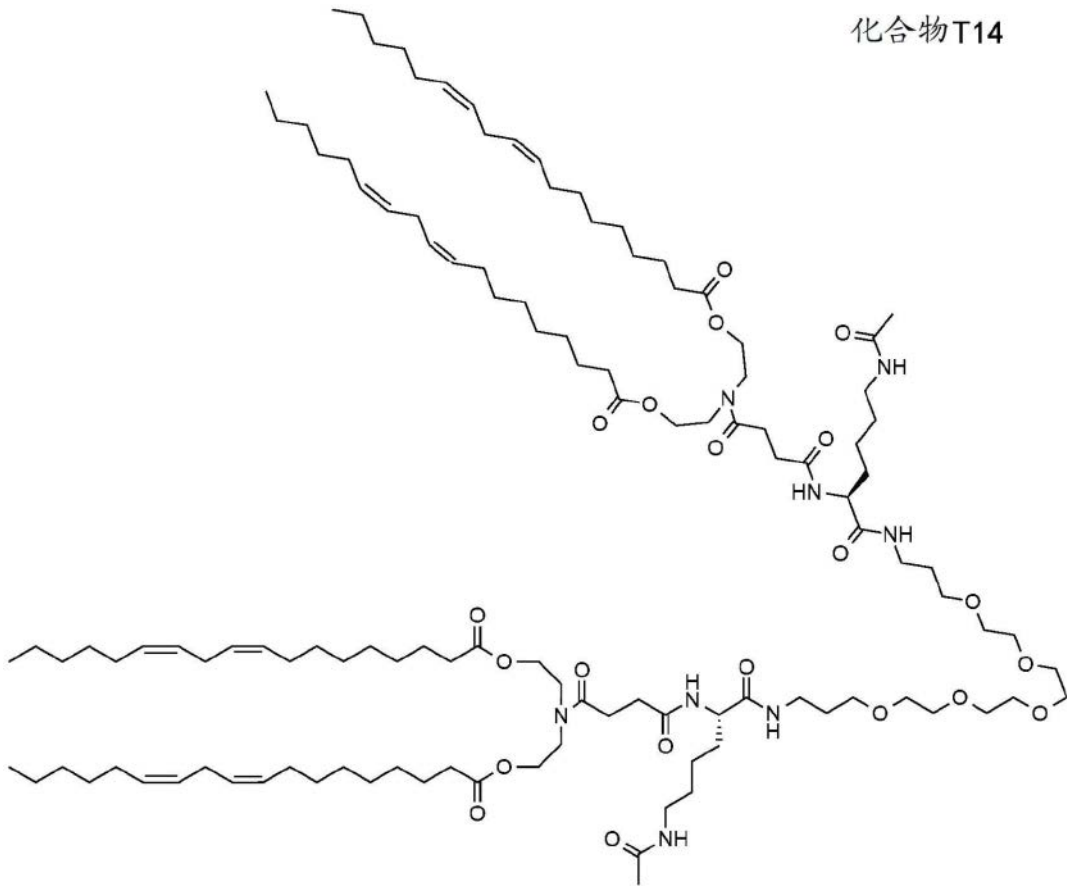
化合物 T13

[0037]



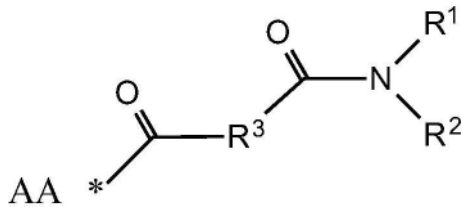
化合物T14

[0038]



[0039] 上述膜融合化合物,其中一个或多个两亲分子具有化学式II所示的结构:

[0040]



化学式 II

[0041] 其中R<sup>1</sup>和R<sup>2</sup>为:[0042] R<sup>1</sup>=CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>O(C=O)R<sup>4</sup>、CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH(C=O)R<sup>4</sup>、[0043] CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>(C=O)OR<sup>4</sup>、CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>(C=O)NHR<sup>4</sup>[0044] R<sup>2</sup>=CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>O(C=O)R<sup>5</sup>、CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>NH(C=O)R<sup>5</sup>、[0045] CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>(C=O)OR<sup>5</sup>、CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>(C=O)NHR<sup>5</sup>[0046] 其中n和m各自独立地为1至2;R<sup>4</sup>和R<sup>5</sup>各自独立地存在、为C(12-20)烷基或C(12-20)烯基;[0047] 其中R<sup>3</sup>选自分支或未分支的C(1-8)链烷二基、取代或未取代的C(2-8)烯二基、取代或未取代的C(2-8)炔二基、取代或未取代的C(3-8)环烷二基、取代或未取代的亚芳基、取代或未取代的C(4-8)亚杂芳基、和取代或未取代的杂环烷二基、及其组合;其中R<sup>3</sup>任选地被一个或多个-O-、-S-、-SO-、-SO<sub>2</sub>-、-NH-、-NR<sup>6</sup>-、-NH(C=O)-、-O(C=O)-中断,其中R<sup>6</sup>是C(1-6)烷基-、C(1-6)烷氧基-、或C(1-6)烷氧基-C(1-6)烷氧基-。[0048] R<sup>3</sup>优选的是分支或未分支的C(2-8)链烷二基、取代或未取代的C(2-8)烯二基、取

代或未取代的C(2-8)炔二基、C(3-8)环烷二基、取代或未取代的C(4-8)亚芳基,甚至更优选的是分支或未分支的C(2-8)链烷二基、取代或未取代的C(3-8)环烷二基。

[0049] 如本文中使用的,化学式涉及的术语“及其组合”表示在组合所列举的基团基础上的其他结构变化。例如,C(1-8)链烷二基和C(4-8)亚杂芳基的组合指C(1-8)链烷二基-C(4-8)亚杂芳基、以及C(1-8)链烷二基-C(4-8)亚杂芳基-C(1-8)链烷二基。

[0050] 上述膜融合化合物,其中R<sup>3</sup>选自:

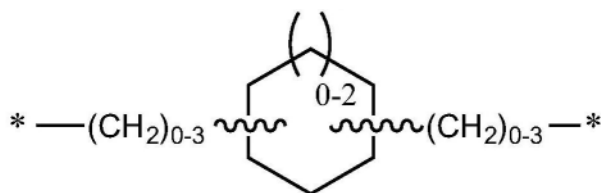
[0051] 分支或未分支的C(2-8)链烷二基、

[0052] 取代或未取代的C(2-8)烯二基、

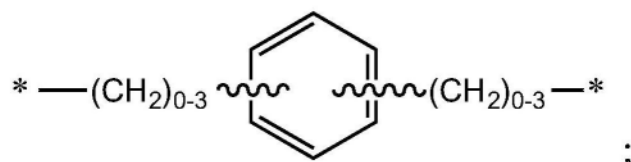
[0053] 取代或未取代的C(2-8)炔二基、

[0054] 取代或未取代的C(3-8)环烷二基、

[0055] 取代或未取代的C(4-8)亚杂芳基、

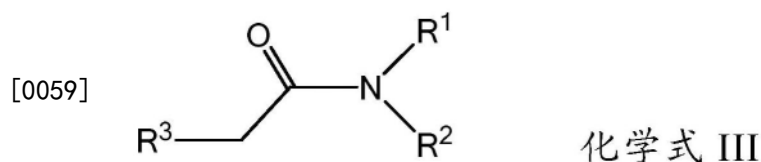


[0056]



[0057] 优选分支或未分支的C(2-8)链烷二基、取代或未取代的C(3-8)环烷二基。

[0058] 上述膜融合化合物,其中一个或多个两亲分子具有化学式III所示的结构:



[0060] 其中R<sup>1</sup>和R<sup>2</sup>为:

[0061] R<sup>1</sup>=CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>O(C=O)R<sup>4</sup>、CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH(C=O)R<sup>4</sup>、

[0062] CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>(C=O)OR<sup>4</sup>、CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>(C=O)NHR<sup>4</sup>

[0063] R<sup>2</sup>=CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>O(C=O)R<sup>5</sup>、CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>NH(C=O)R<sup>5</sup>、

[0064] CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>(C=O)OR<sup>5</sup>、CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>(C=O)NHR<sup>5</sup>

[0065] 其中n和m各自独立地为1至2;R<sup>4</sup>和R<sup>5</sup>各自独立地存在、为C(12-20)烷基或C(12-20)烯基;

[0066] 其中R<sup>3</sup>选自:

[0067] -烷基-(C=O)-,其与AA连接;

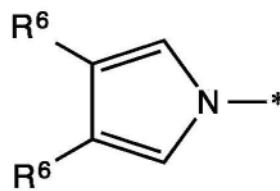
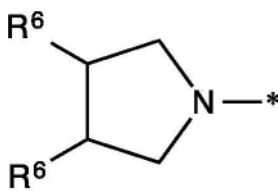
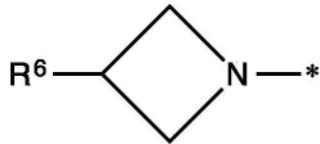
[0068] -烷基-O(C=O)-,其与AA连接;

[0069] -烷基-NH(C=O)-,其与AA连接;

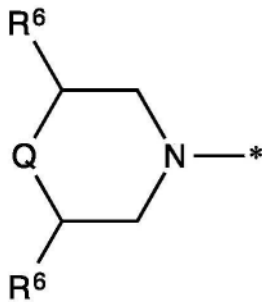
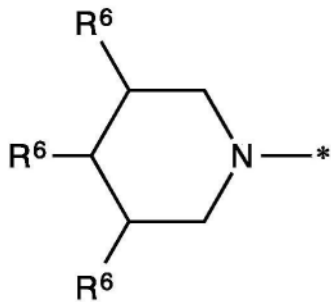
[0070] -烷基-(C=O)-烷基-(C=O)-,其与AA连接;

[0071] -烷基-O(C=O)-烷基-(C=O)-,其与AA连接;

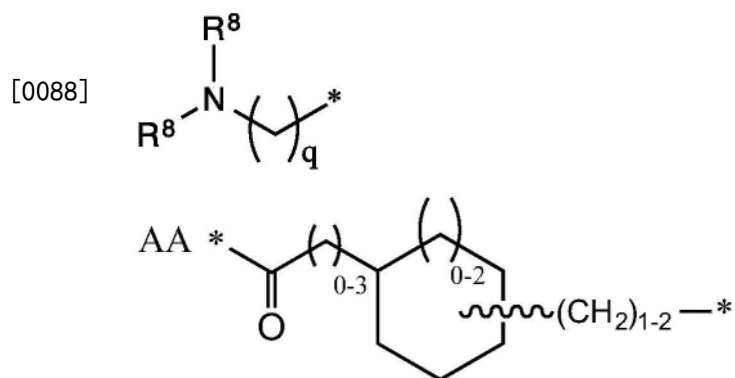
- [0072] -烷基-NH(C=O)-烷基-(C=O)-, 其与AA连接;
- [0073] -烯基-(C=O)-, 其与AA连接;
- [0074] -烯基-O(C=O)-, 其与AA连接;
- [0075] -烯基-NH(C=O)-, 其与AA连接;
- [0076] -烯基-(C=O)-烯基-(C=O)-, 其与AA连接;
- [0077] -烯基-O(C=O)-烯基-(C=O)-, 其与AA连接;
- [0078] -烯基-NH(C=O)-烯基-(C=O)-, 其与AA连接;
- [0079] -炔基-(C=O)-, 其与AA连接;
- [0080] -炔基-O(C=O)-, 其与AA连接;
- [0081] -炔基-NH(C=O)-, 其与AA连接;
- [0082] -炔基-(C=O)-炔基-(C=O)-, 其与AA连接;
- [0083] -炔基-O(C=O)-炔基-(C=O)-, 其与AA连接;
- [0084] -炔基-NH(C=O)-炔基-(C=O)-, 其与AA连接;
- [0085] 其中R<sup>3</sup>的任意烷基均是分支或未分支的C(1-6)烷基, R<sup>3</sup>的任意烯基均是分支或未分支的C(2-6)烯基, R<sup>3</sup>的任意炔基均是分支或未分支的C(2-6)炔基;



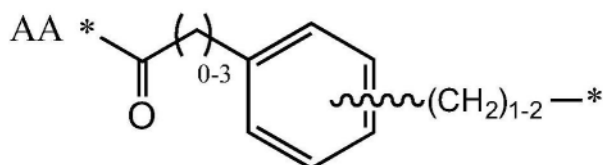
[0086]



[0087] 及其位置异构体;



[0089]



[0090] 其中,

[0091] 每个 $R^6$ 独立地选自H、烷基、烷氧基和烷氧基烷氧基,前提是一个 $R^6$ 为与AA连接的-(C=O)-或-烷基-(C=O)-;

[0092] 每个 $R^8$ 独立地选自H、烷基,前提是一个 $R^8$ 为与AA连接的-(C=O)-或-烷基-(C=O)-;

[0093]  $q$ 是0至4;

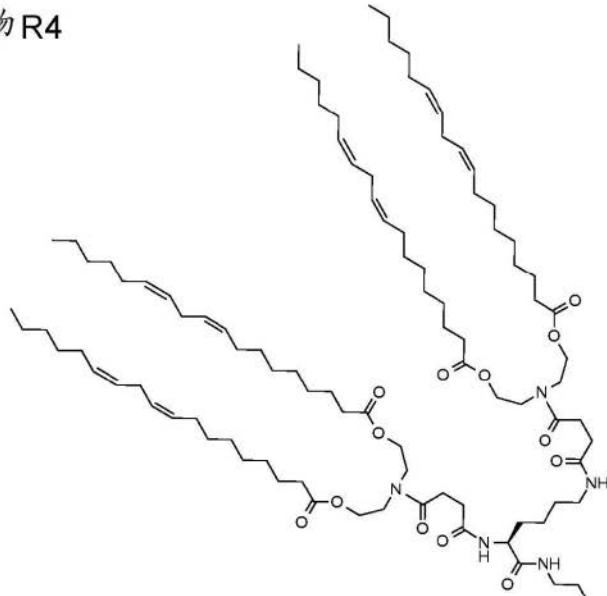
[0094]  $Q$ 是0或N。

[0095] 上述膜融合化合物,其中 $R^6$ 和 $R^8$ 的烷基各自独立地为分支或未分支的C(1-6)烷基, $R^6$ 的烷氧基是C(1-6)烷氧基, $R^6$ 的烷氧基烷氧基是C(1-6)烷氧基C(1-6)烷氧基。

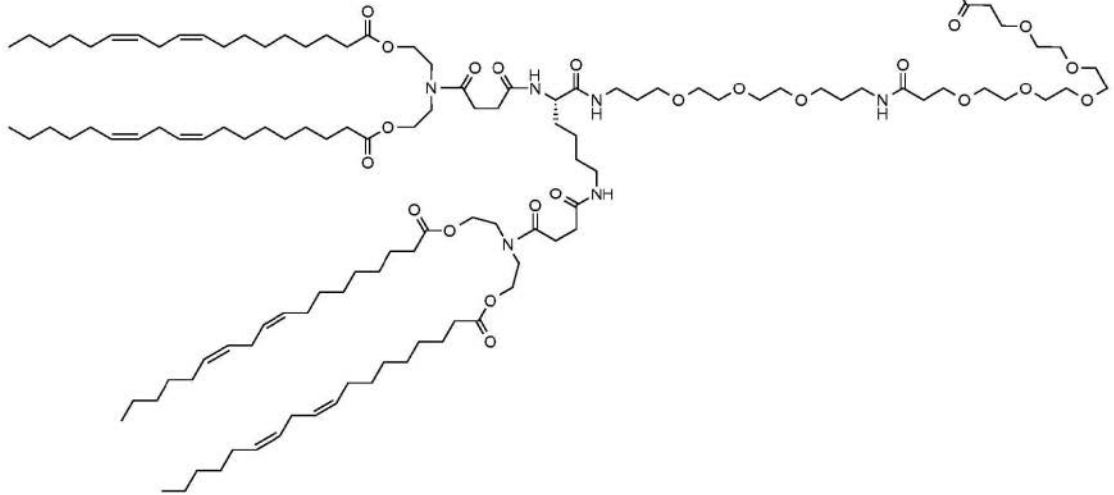
[0096] 上述膜融合化合物,其中 $R^4$ 和 $R^5$ 各自独立地存在、为C(14-18)烷基或C(14-18)烯基,优选是具有2至4个双键的C(14-18)烯基。

[0097] 上述膜融合化合物,其中化合物选自以下:

化合物R4

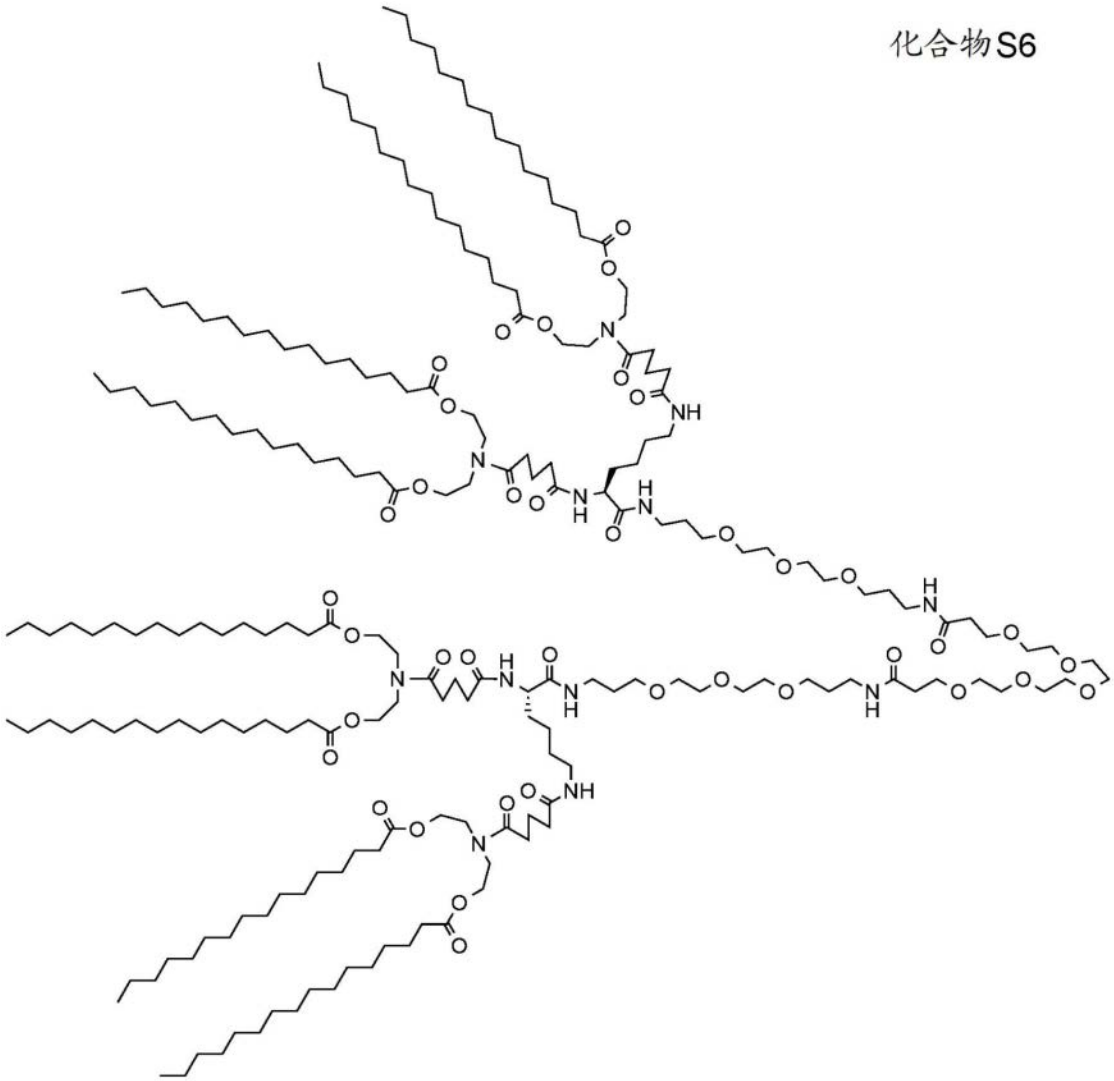


[0098]



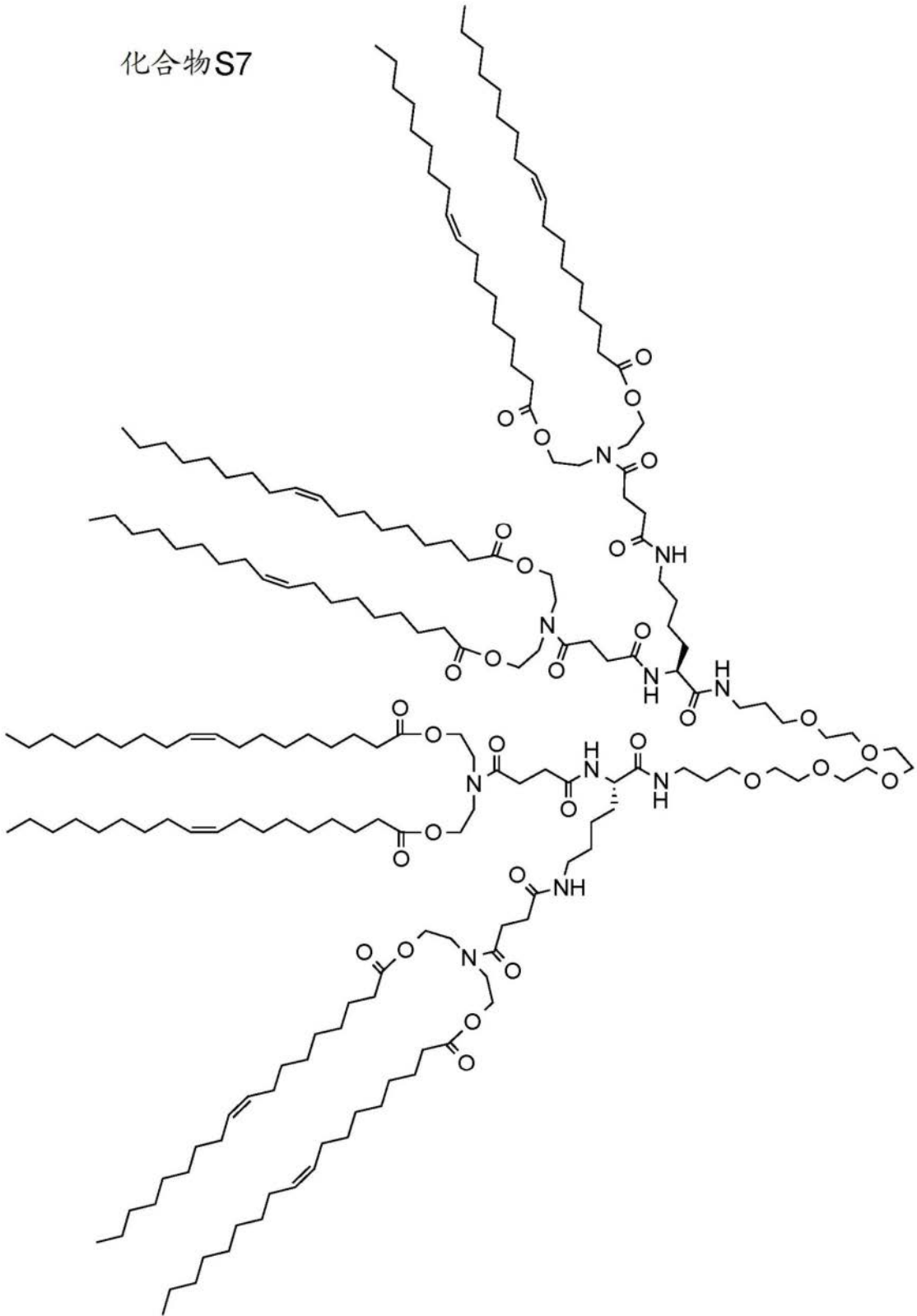
化合物S6

[0099]



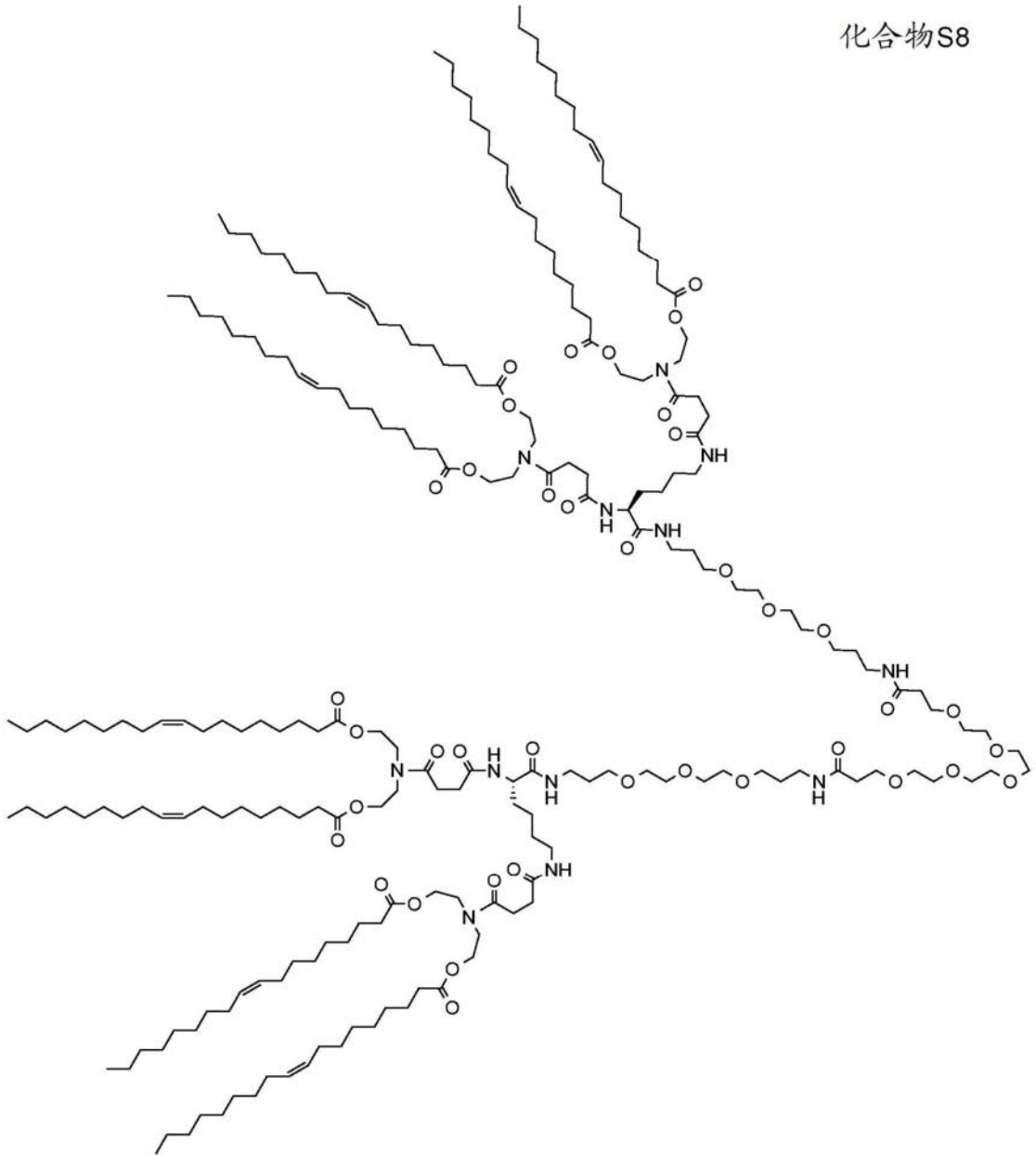
化合物S7

[0100]



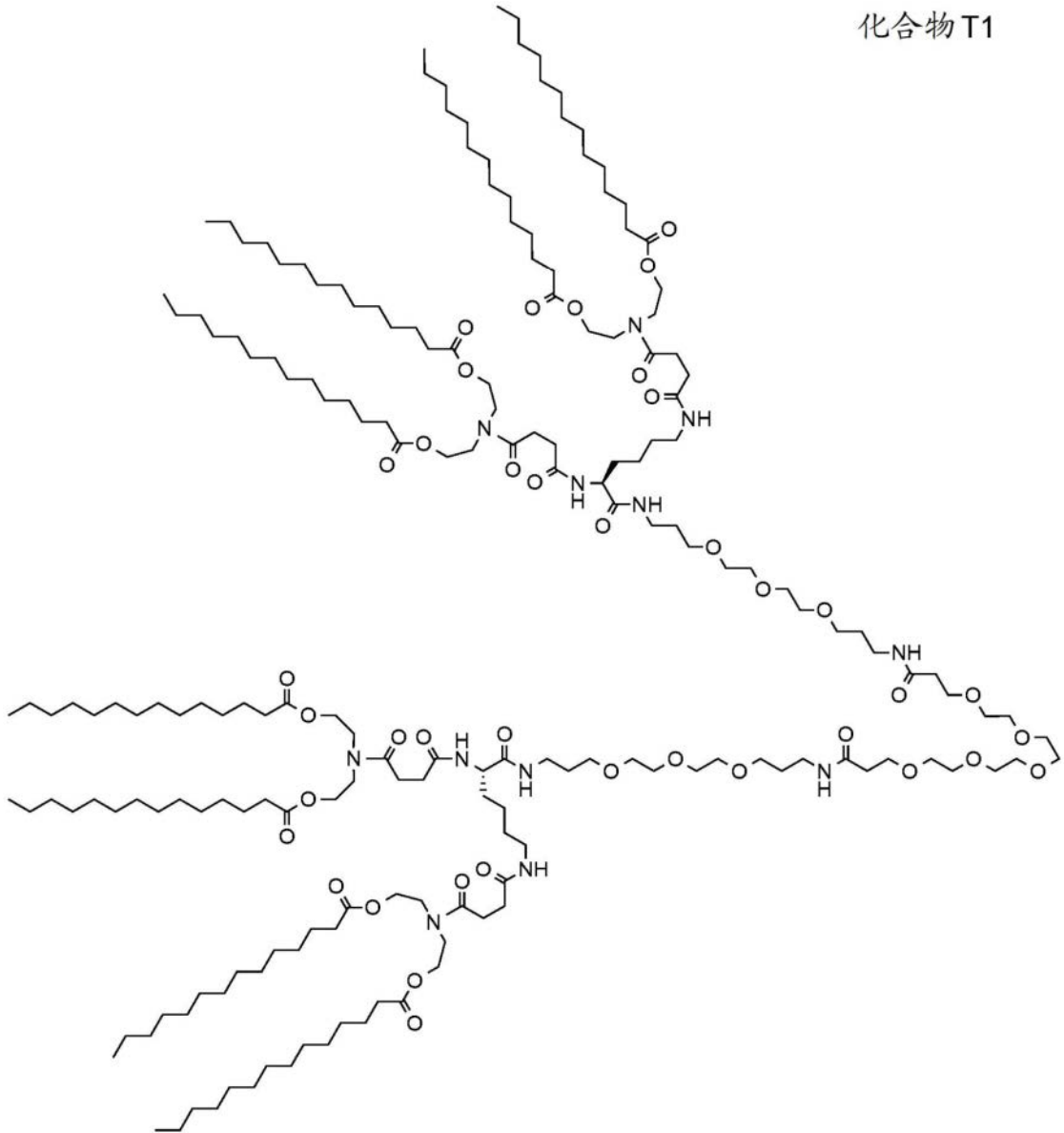
化合物S8

[0101]



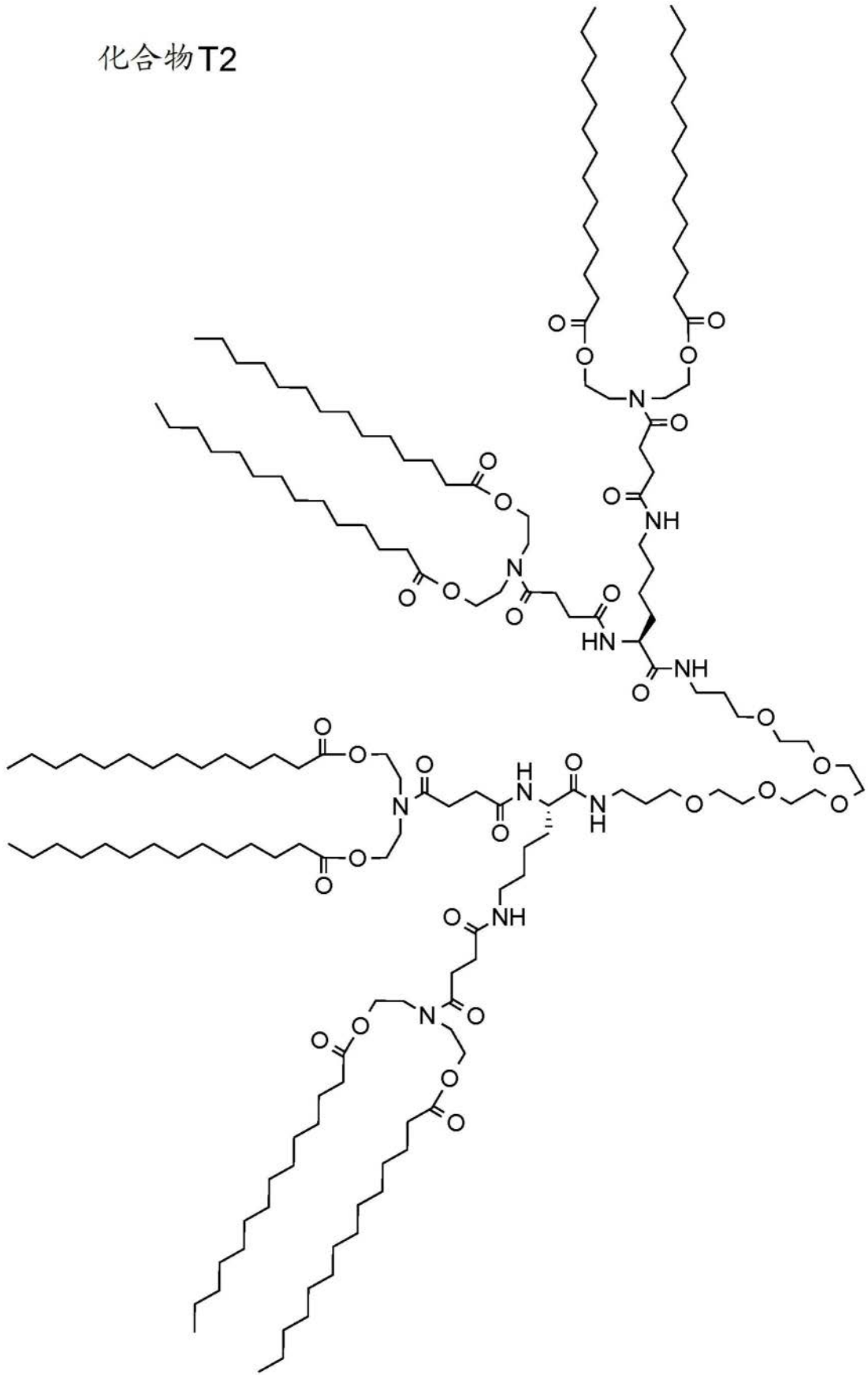
化合物T1

[0102]



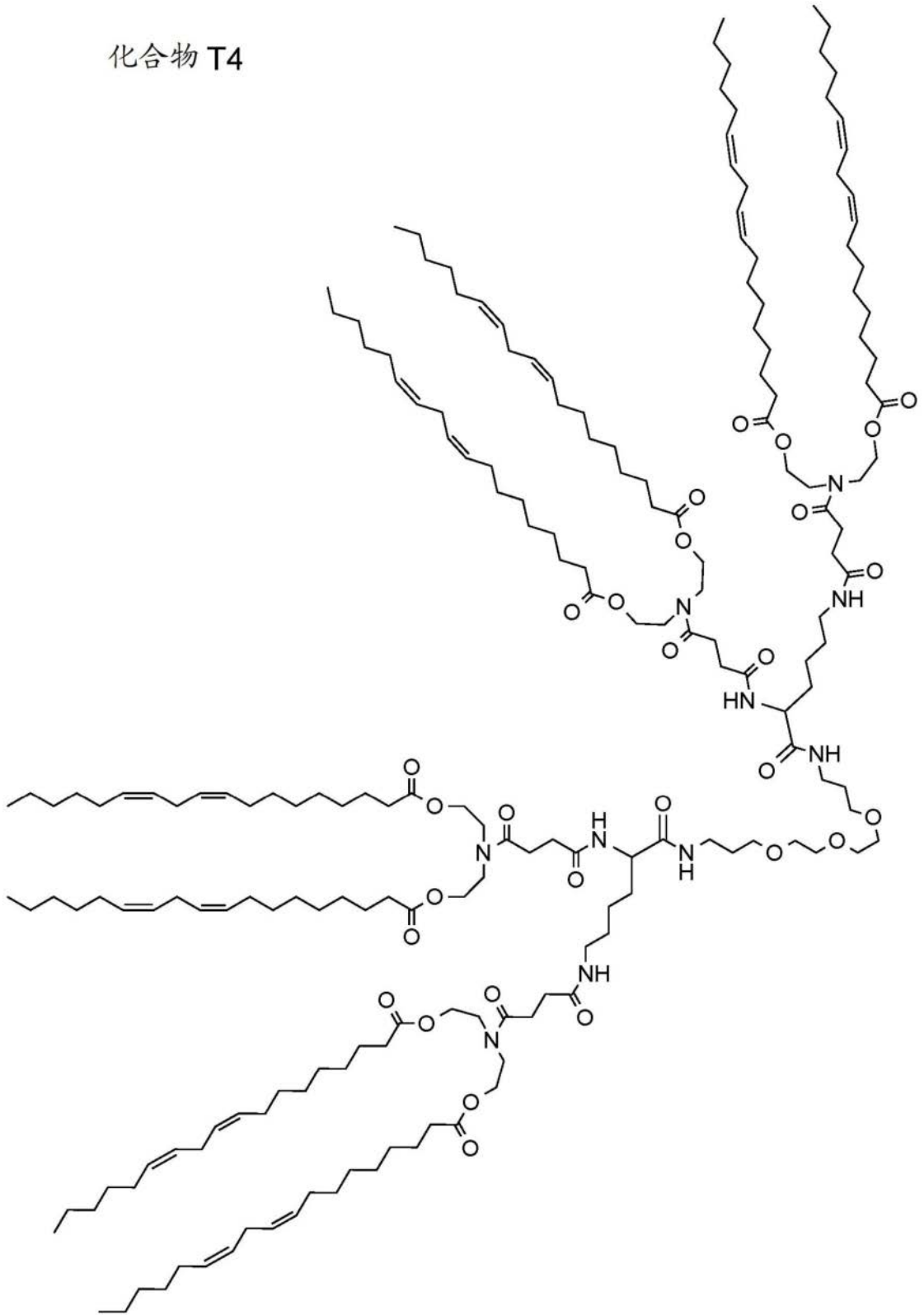
化合物T2

[0103]



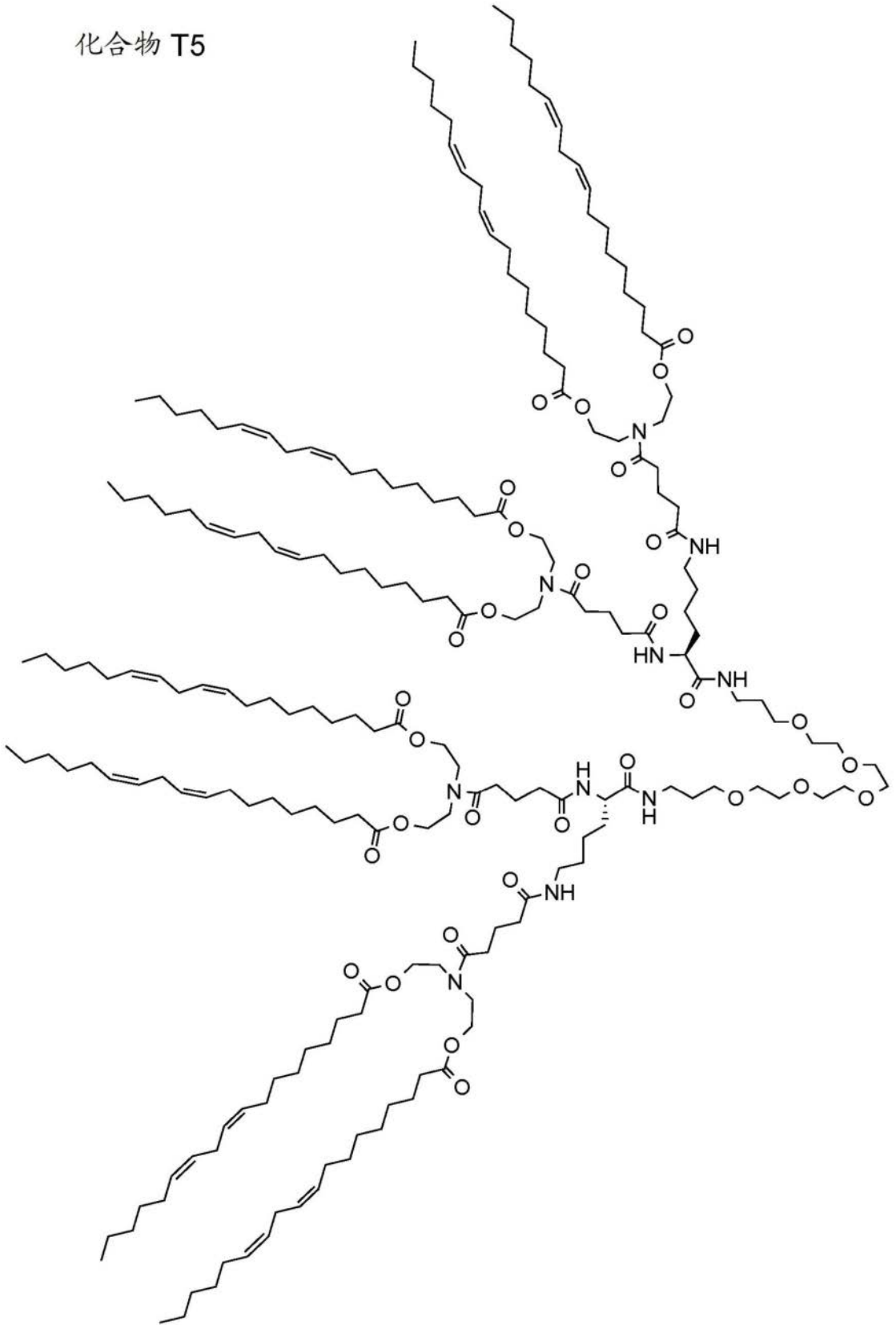
化合物 T4

[0104]



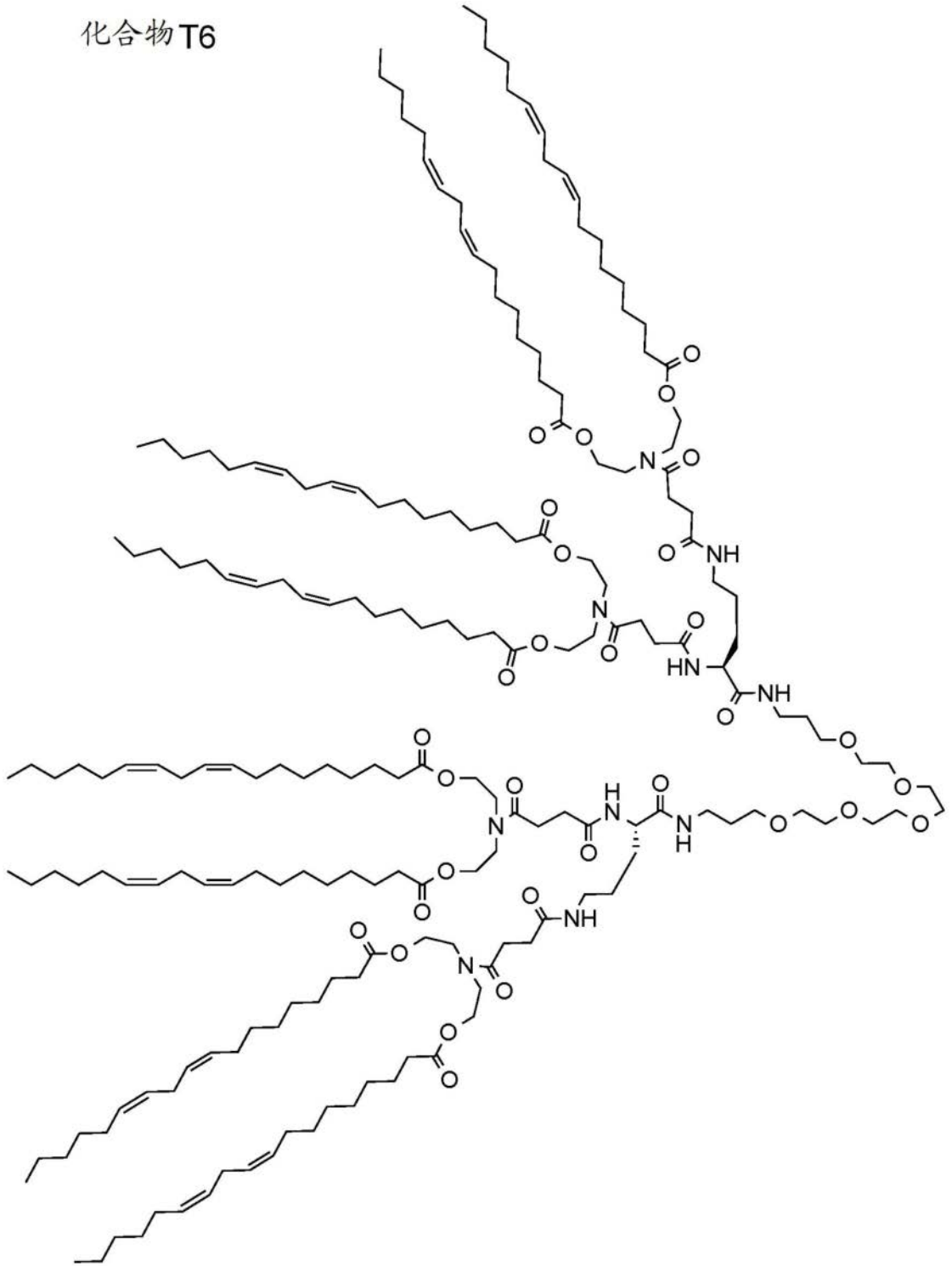
化合物 T5

[0105]



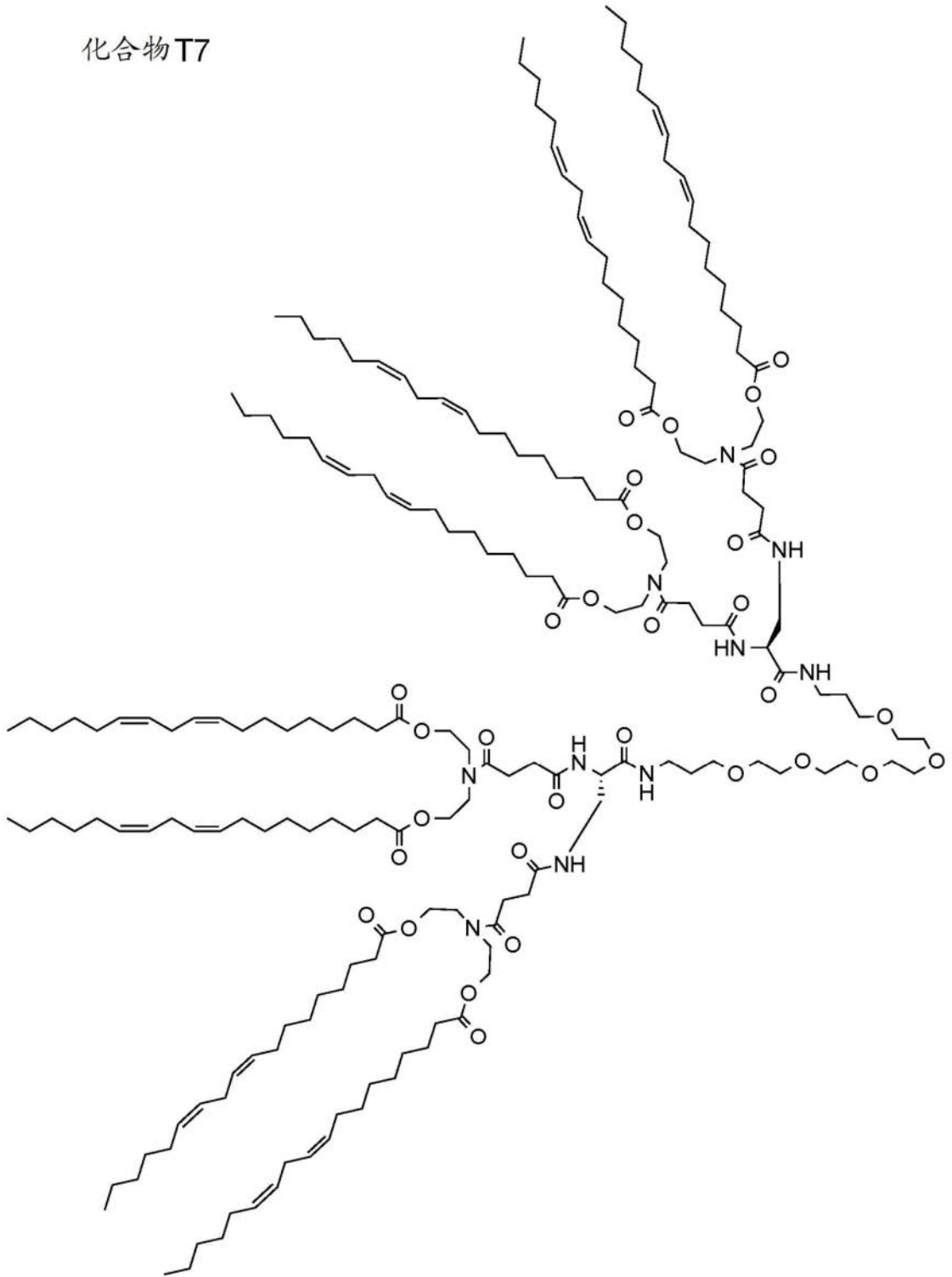
化合物T6

[0106]



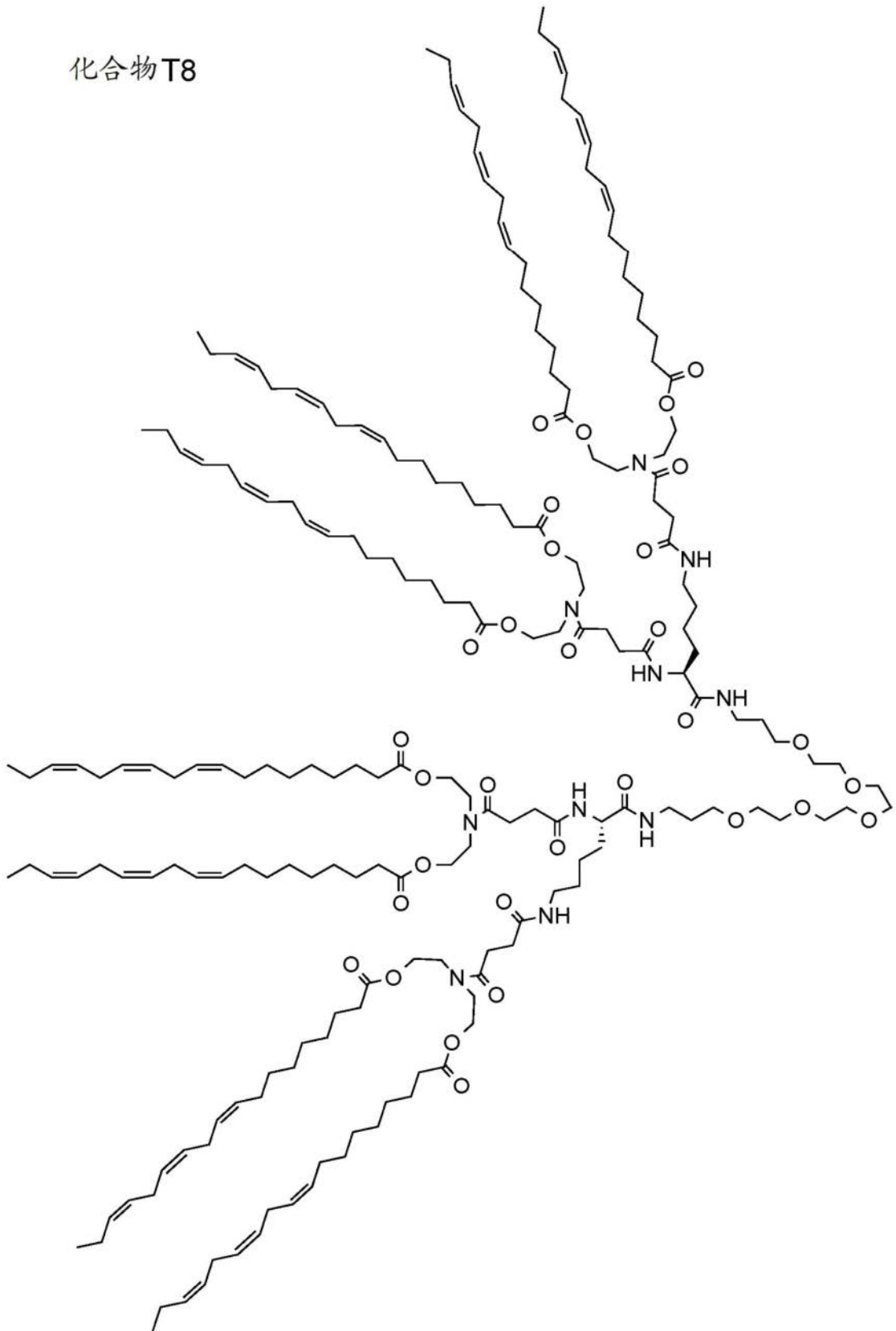
化合物 T7

[0107]



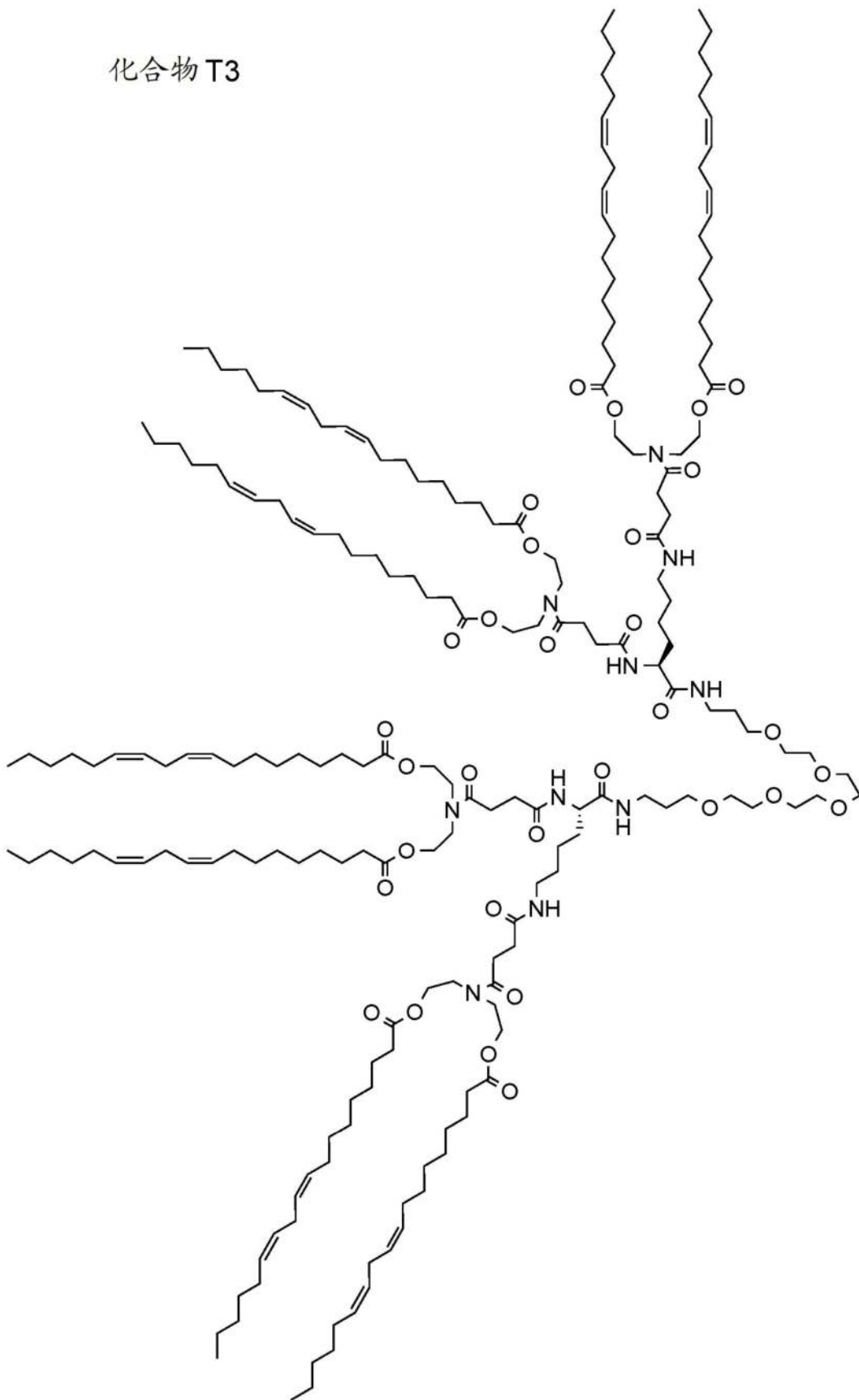
化合物T8

[0108]

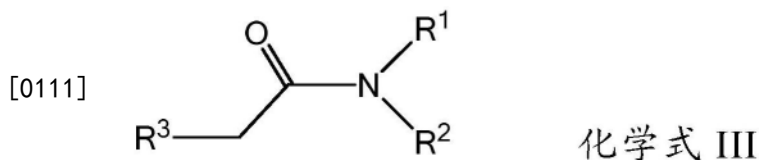


化合物 T3

[0109]



[0110] 上述膜融合化合物, 其中一个或多个两亲分子具有化学式III所示的结构:



[0112] 其中R<sup>1</sup>和R<sup>2</sup>为:

[0113] R<sup>1</sup>=CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>O(C=O)R<sup>4</sup>、CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH(C=O)R<sup>4</sup>、

[0114] CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>(C=O)OR<sup>4</sup>、CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>(C=O)NHR<sup>4</sup>

[0115] R<sup>2</sup>=CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>O(C=O)R<sup>5</sup>、CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>NH(C=O)R<sup>5</sup>、

[0116] CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>(C=O)OR<sup>5</sup>、CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>(C=O)NHR<sup>5</sup>

[0117] 其中

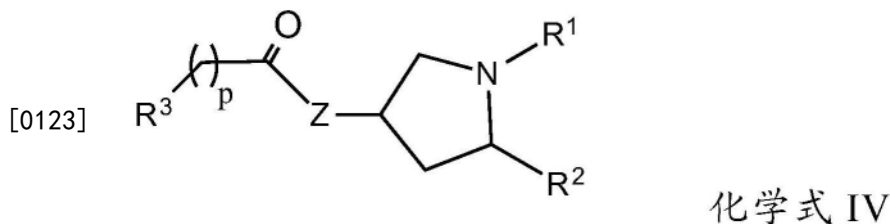
[0118] n和m各自独立地为1至2;

[0119] R<sup>4</sup>和R<sup>5</sup>各自独立地存在、为C(12-20)烷基或C(12-20)烯基;

[0120] R<sup>3</sup>是被与AA连接的-(C=O)-或-烷基-(C=O)-取代的C(1-12)烷基或C(4-12)烯基。

[0121] 上述膜融合化合物,其中R<sup>4</sup>和R<sup>5</sup>各自独立地存在、为C(14-18)烷基或C(14-18)烯基,优选是具有2至4个双键的C(14-18)烯基。

[0122] 上述膜融合化合物,其中一个或多个两亲分子具有化学式IV所示的结构:



[0124] 其中R<sup>1</sup>和R<sup>2</sup>为:

[0125] R<sup>1</sup>=(C=O)OR<sup>4</sup>、(C=O)NHR<sup>4</sup>、O(C=O)R<sup>4</sup>、(C=O)R<sup>4</sup>

[0126] R<sup>2</sup>=(C=O)OR<sup>5</sup>、(C=O)NHR<sup>5</sup>、O(C=O)R<sup>5</sup>、NH(C=O)R<sup>5</sup>

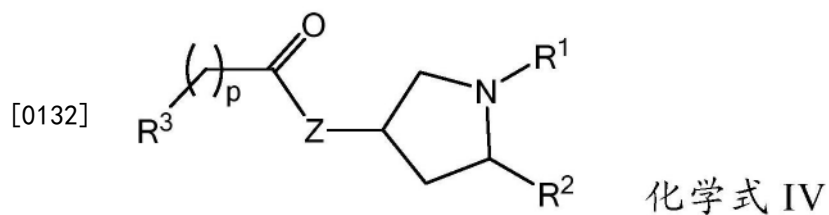
[0127] 其中R<sup>4</sup>和R<sup>5</sup>各自独立地存在、为C(12-20)烷基或C(12-20)烯基;

[0128] Z是O或NH;p是0至5;

[0129] 其中R<sup>3</sup>选自与AA连接的分支或未分支的C(1-8)链烷二基-(C=O)-、与AA连接的取代或未取代的C(2-8)烯二基-(C=O)-、与AA连接的取代或未取代的C(2-8)炔二基-(C=O)-、与AA连接的取代或未取代的C(3-8)环烷二基-(C=O)-、与AA连接的取代或未取代的亚芳基-(C=O)-、与AA连接的取代或未取代的C(4-8)亚杂芳基-(C=O)-、和与AA连接的取代或未取代的杂环烷二基-(C=O)-;其中R<sup>3</sup>任选地被一个或多个-O-、-S-、-SO-、-SO<sub>2</sub>-、-NH-、-NR<sup>6</sup>-、-NH(C=O)-、-O(C=O)-中断,其中R<sup>6</sup>是C(1-6)烷基-、C(1-6)烷氧基-、或C(1-6)烷氧基-C(1-6)烷氧基-。

[0130] R<sup>3</sup>优选的是分支或未分支的C(2-8)链烷二基-、取代或未取代的C(2-8)烯二基-、取代或未取代的C(2-8)炔二基-、C(3-8)环烷二基-、取代或未取代的C(4-8)亚芳基-,甚至更优选的是分支或未分支的C(2-8)链烷二基-、取代或未取代的C(3-8)环烷二基-。

[0131] 上述膜融合化合物,其中一个或多个两亲分子具有化学式IV所示的结构:



[0133] 其中R<sup>1</sup>和R<sup>2</sup>为:

[0134] R<sup>1</sup> = (C=O)OR<sup>4</sup>、(C=O)NHR<sup>4</sup>、O(C=O)R<sup>4</sup>、(C=O)R<sup>4</sup>

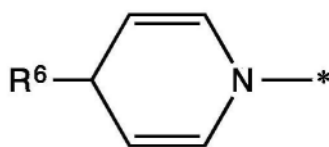
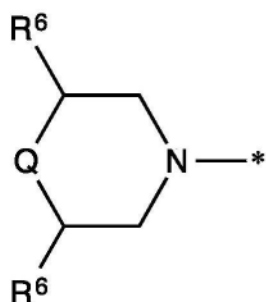
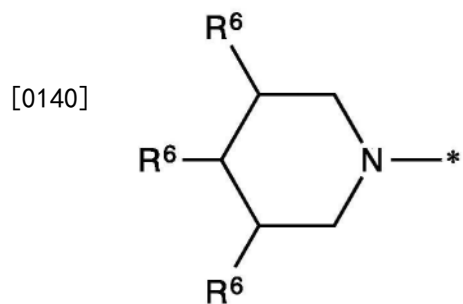
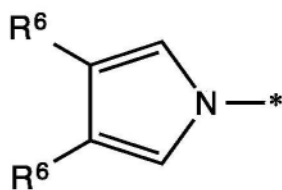
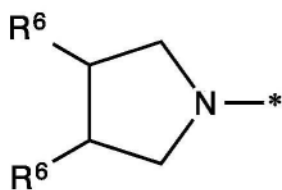
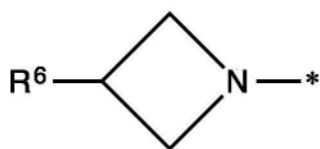
[0135] R<sup>2</sup> = (C=O)OR<sup>5</sup>、(C=O)NHR<sup>5</sup>、O(C=O)R<sup>5</sup>、NH(C=O)R<sup>5</sup>

[0136] 其中R<sup>4</sup>和R<sup>5</sup>各自独立地存在、为C(12-20)烷基或C(12-20)烯基;

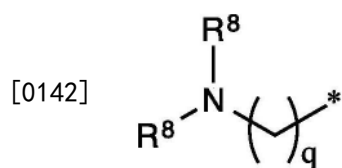
[0137] Z是O或NH;p是0至5;

[0138] 其中R<sup>3</sup>选自:

[0139] 被与AA连接的-(C=O)-取代的C(1-12)烷基或C(2-12)烯基;



[0141] 及其位置异构体;



[0143] 其中，

[0144] 每个 $R^6$ 独立地选自H、烷基、烷氧基、和烷氧基烷氧基，前提是一个 $R^6$ 为与AA连接的-(C=O)-或-烷基-(C=O)-；

[0145] 每个 $R^8$ 独立地选自H、烷基，前提是一个 $R^8$ 为与AA连接的-(C=O)-或-烷基-(C=O)-；

[0146] q是0至4；

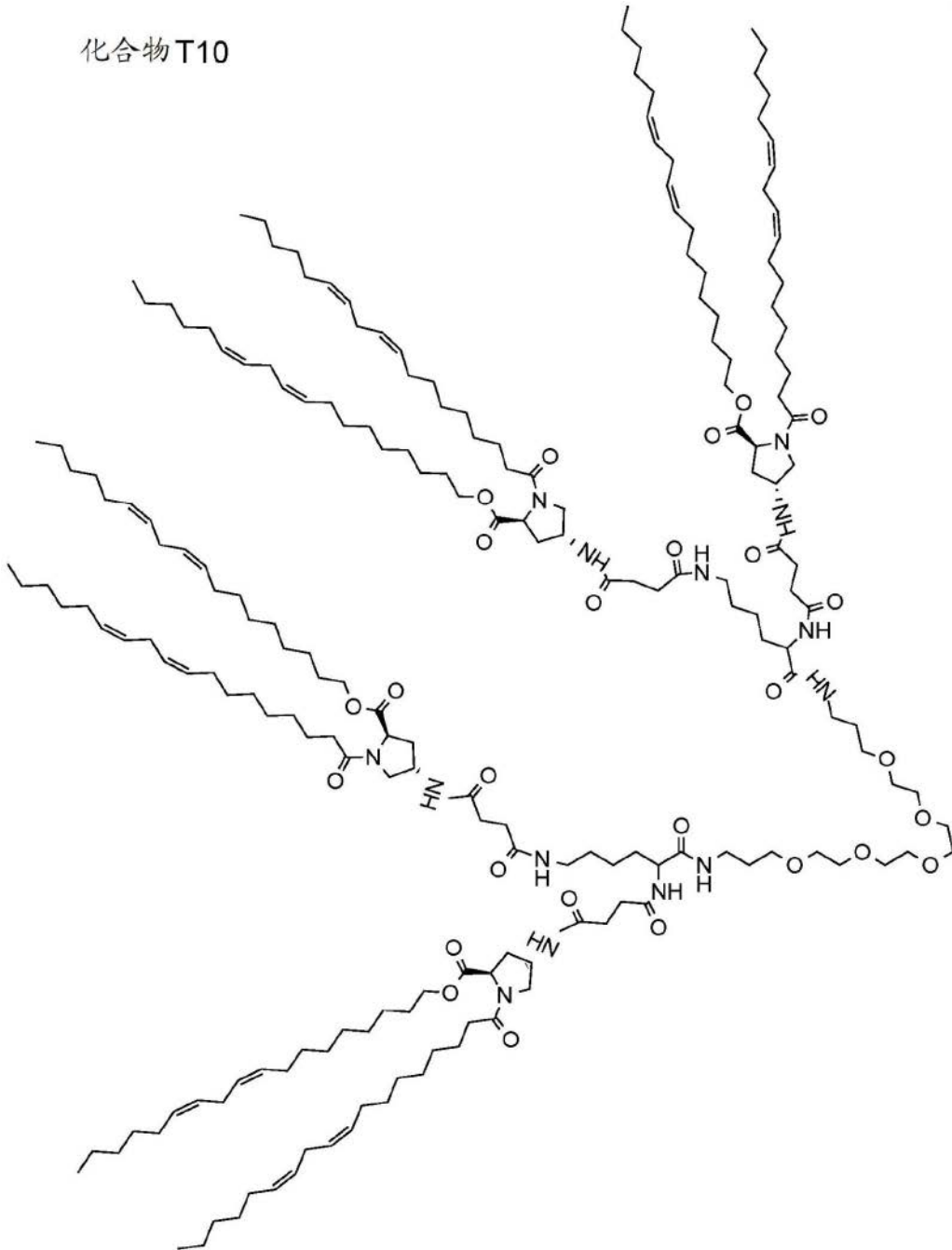
[0147] Q是0或N。

[0148] 上述膜融合化合物，其中 $R^4$ 和 $R^5$ 各自独立地存在、为C(14-18)烷基或C(14-18)烯基，优选是具有2至4个双键的C(14-18)烯基。

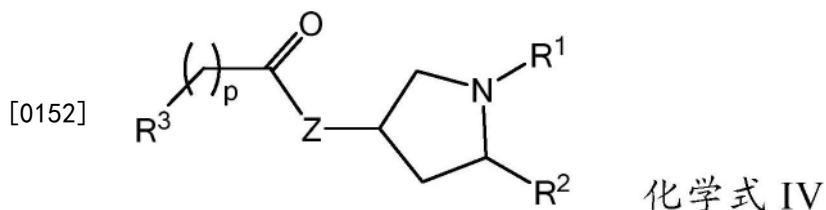
[0149] 上述膜融合化合物，其中化合物是化合物T10：

化合物T10

[0150]



[0151] 上述膜融合化合物,其中一个或多个两亲分子具有化学式IV所示的结构:



[0153] 其中R<sup>1</sup>和R<sup>2</sup>为:

[0154] R<sup>1</sup>是C(12-20)烷基、或C(12-20)烯基;

[0155] R<sup>2</sup>是(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>XR<sup>4</sup>,其中n是0至3,X是O、S、SO、SO<sub>2</sub>、NH;

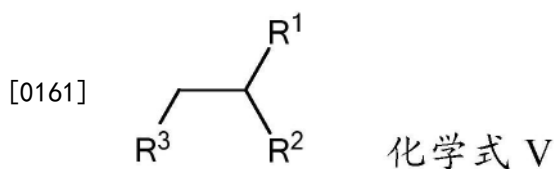
[0156] 其中R<sup>4</sup>是C(12-20)烷基、或C(12-20)烯基;

[0157] 其中Z是O或NH;

[0158] 其中p是1;

[0159] 其中R<sup>3</sup>选自被与AA连接的-(C=O)-取代的C(1-12)烷基或C(2-12)烯基。

[0160] 上述膜融合化合物,其中一个或多个两亲分子具有化学式V所示的结构:



[0162] 其中R<sup>1</sup>和R<sup>2</sup>是

[0163] R<sup>1</sup> = (C=O)OR<sup>4</sup>、(C=O)NHR<sup>4</sup>、O(C=O)R<sup>4</sup>、NH(C=O)R<sup>4</sup>

[0164] R<sup>2</sup> = (C=O)OR<sup>5</sup>、(C=O)NHR<sup>5</sup>、O(C=O)R<sup>5</sup>、NH(C=O)R<sup>5</sup>

[0165] 其中R<sup>4</sup>和R<sup>5</sup>各自独立地存在、为C(12-20)烷基或C(12-20)烯基;

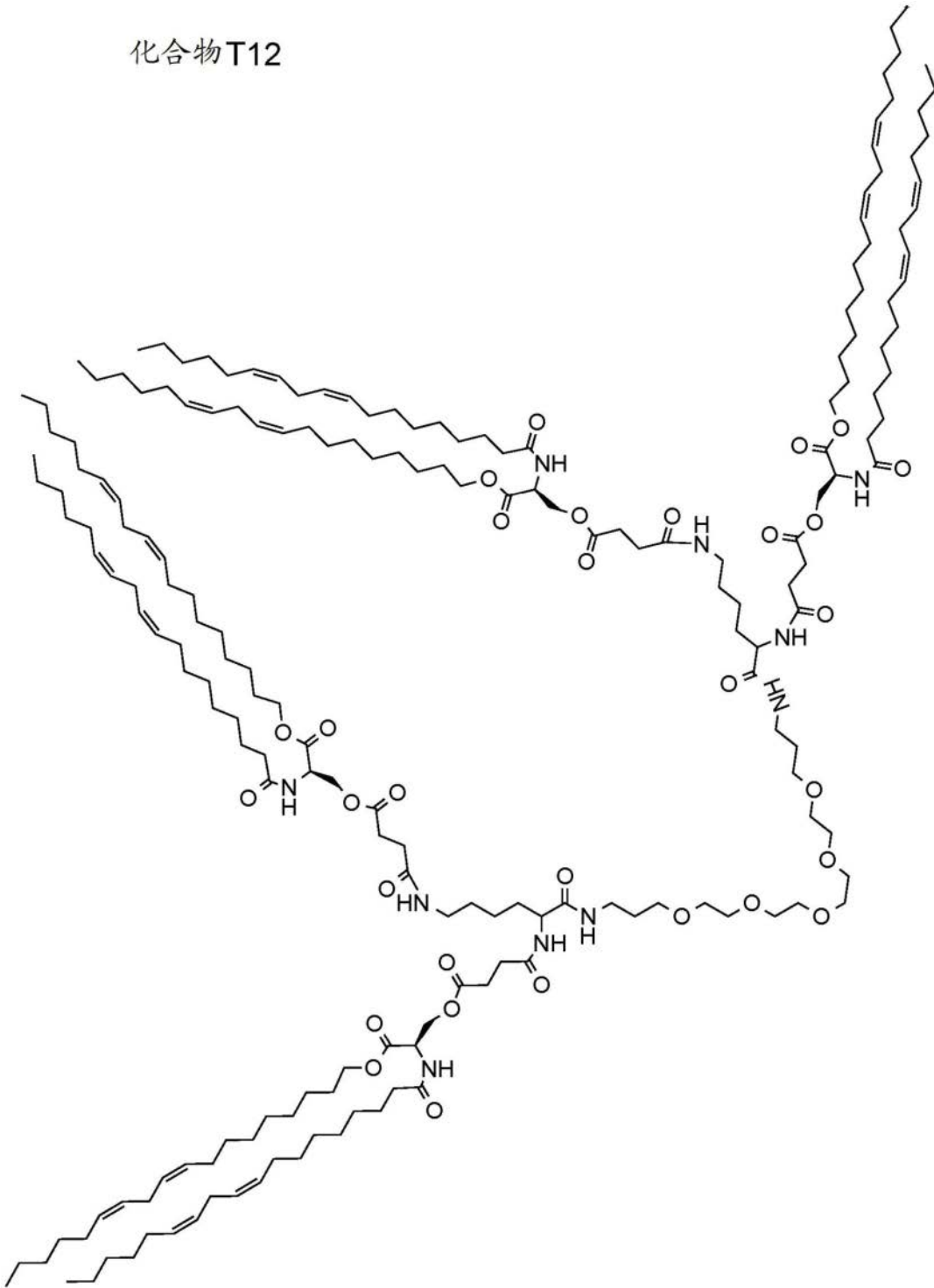
[0166] 其中R<sup>3</sup>选自与AA连接的分支或未分支的-O(C=O)-C(1-8)链烷二基-(C=O)-、与AA连接的取代或未取代的-O(C=O)-C(2-8)烯二基-(C=O)-、与AA连接的取代或未取代的-O(C=O)-C(2-8)炔二基-(C=O)-、与AA连接的取代或未取代的-O(C=O)-C(3-8)环烷二基-(C=O)-、与AA连接的取代或未取代的-O(C=O)-亚芳基-(C=O)-、与AA连接的取代或未取代的-O(C=O)-C(4-8)亚杂芳基-(C=O)-、和与AA连接的取代或未取代的-O(C=O)-杂环烷二基-(C=O)-;其中R<sup>3</sup>任选地被一个或多个-O-、-S-、-SO-、-SO<sub>2</sub>-、-NH-、-NR<sup>6</sup>-、-NH(C=O)-、-O(C=O)-中断,其中R<sup>6</sup>是C(1-6)烷基-、C(1-6)烷氧基-、或C(1-6)烷氧基-C(1-6)烷氧基-。

[0167] R<sup>3</sup>优选的是分支或未分支的C(2-8)链烷二基、取代或未取代的C(2-8)烯二基、取代或未取代的C(2-8)炔二基、C(3-8)环烷二基、取代或未取代的C(4-8)亚芳基,甚至更优选的是分支或未分支的C(2-8)链烷二基、取代或未取代的C(3-8)环烷二基。

[0168] 上述膜融合化合物,其中R<sup>4</sup>和R<sup>5</sup>各自独立地存在、为C(14-18)烷基或C(14-18)烯基,优选是具有2至4个双键的C(14-18)烯基。

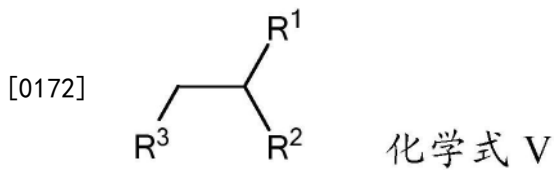
[0169] 上述膜融合化合物,其中化合物是化合物T12:

化合物T12



[0170]

[0171] 上述膜融合化合物,其中一个或多个两亲分子具有化学式V所示的结构:

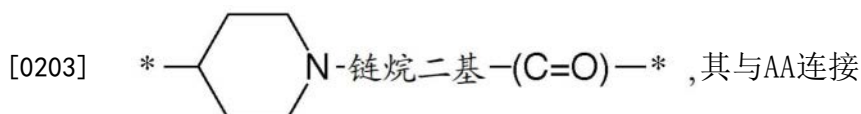
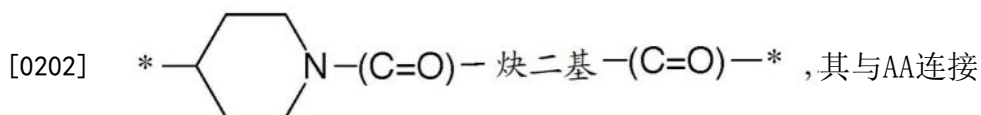
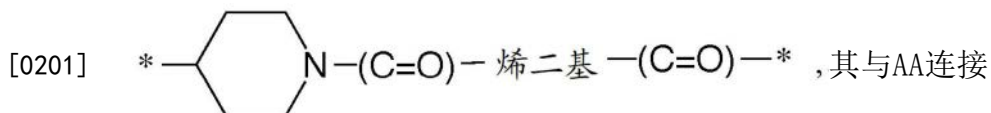
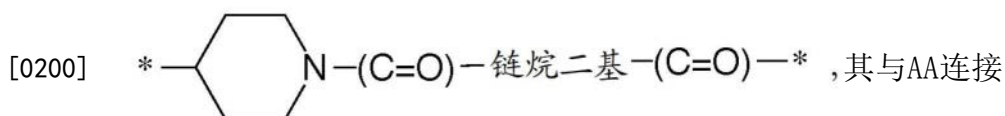
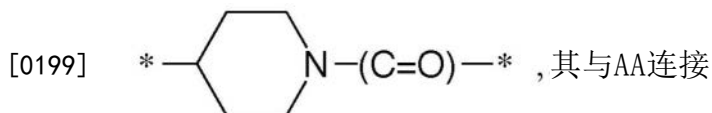


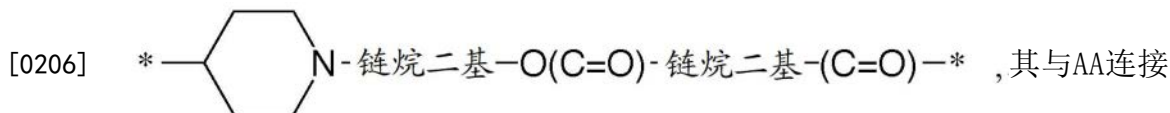
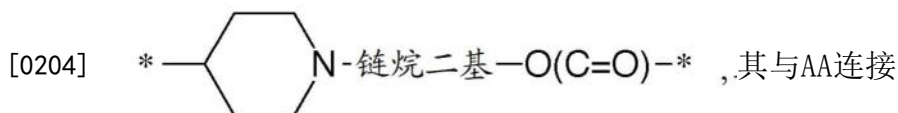
[0173] 其中R<sup>1</sup>和R<sup>2</sup>为:

[0174] R<sup>1</sup> = (C=O)OR<sup>4</sup>、(C=O)NHR<sup>4</sup>、O(C=O)R<sup>4</sup>、NH(C=O)R<sup>4</sup>

[0175] R<sup>2</sup> = (C=O)OR<sup>5</sup>、(C=O)NHR<sup>5</sup>、O(C=O)R<sup>5</sup>、NH(C=O)R<sup>5</sup>

- [0176] 其中R<sup>4</sup>和R<sup>5</sup>各自独立地存在、为C(12-20)烷基或C(12-20)烯基；
- [0177] 其中R<sup>3</sup>选自：
- [0178] - (C=O) - 或 - 烷基 - (C=O) - , 其与AA连接；
- [0179] - O(C=O) - 或 - 烷基 - O(C=O) - , 其与AA连接；
- [0180] - O(C=O) - 链烷二基 - (C=O) - , 其与AA连接；
- [0181] - O(C=O) - 烯二基 - (C=O) - , 其与AA连接；
- [0182] - O(C=O) - 炔二基 - (C=O) - , 其与AA连接；
- [0183] - NH(C=O) - 或 - 烷基 - NH(C=O) - , 其与AA连接；
- [0184] - 烷基 - (C=O) - 烷基 - (C=O) - , 其与AA连接；
- [0185] - 烷基 - O(C=O) - 烷基 - (C=O) - , 其与AA连接；
- [0186] - 烷基 - NH(C=O) - 烷基 - (C=O) - , 其与AA连接；
- [0187] - 烯基 - (C=O) - , 其与AA连接；
- [0188] - 烯基 - O(C=O) - , 其与AA连接；
- [0189] - 烯基 - NH(C=O) - , 其与AA连接；
- [0190] - 烯基 - (C=O) - 烯二基 - (C=O) - , 其与AA连接；
- [0191] - 烯基 - O(C=O) - 烯二基 - (C=O) - , 其与AA连接；
- [0192] - 烯基 - NH(C=O) - 烯二基 - (C=O) - , 其与AA连接；
- [0193] - 炔基 - (C=O) - , 其与AA连接；
- [0194] - 炔基 - O(C=O) - , 其与AA连接；
- [0195] - 炔基 - NH(C=O) - , 其与AA连接；
- [0196] - 炔基 - (C=O) - 炔二基 - (C=O) - , 其与AA连接；
- [0197] - 炔基 - O(C=O) - 炔二基 - (C=O) - , 其与AA连接；
- [0198] - 炔基 - NH(C=O) - 炔二基 - (C=O) - , 其与AA连接；

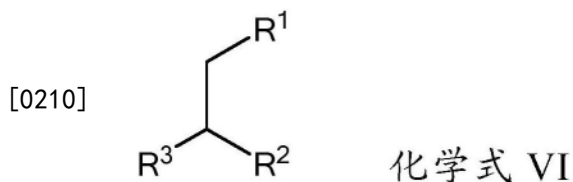




[0207] 及其位置异构体;

[0208] 其中R<sup>3</sup>的任意烷基均是分支或未分支的C(1-6)烷基,R<sup>3</sup>的任意烯基均是分支或未分支的C(2-6)烯基,R<sup>3</sup>的任意炔基均是分支或未分支的C(2-6)炔基。

[0209] 上述膜融合化合物,其中一个或多个两亲分子具有化学式VI所示的结构:



[0211] 其中R<sup>1</sup>和R<sup>2</sup>为:

[0212] R<sup>1</sup> = (C=O)OR<sup>4</sup>、(C=O)NHR<sup>4</sup>、O(C=O)R<sup>4</sup>、NH(C=O)R<sup>4</sup>

[0213] R<sup>2</sup> = (C=O)OR<sup>5</sup>、(C=O)NHR<sup>5</sup>、O(C=O)R<sup>5</sup>、NH(C=O)R<sup>5</sup>

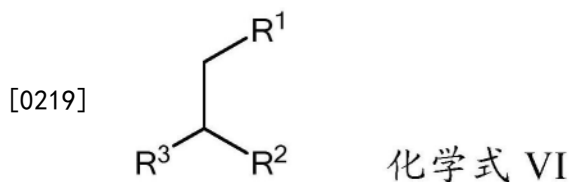
[0214] 其中,

[0215] R<sup>4</sup>和R<sup>5</sup>各自独立地存在、为C(12-20)烷基或C(12-20)烯基;

[0216] 其中R<sup>3</sup>选自与AA连接的分支或未分支的C(1-8)链烷二基-(C=O)-、与AA连接的取代或未取代的C(2-8)烯二基-(C=O)-、与AA连接的取代或未取代的C(2-8)炔二基-(C=O)-、与AA连接的取代或未取代的C(3-8)环烷二基-(C=O)-、与AA连接的取代或未取代的亚芳基-(C=O)-、与AA连接的取代或未取代的C(4-8)亚杂芳基-(C=O)-、和与AA连接的取代或未取代的杂环烷二基-(C=O)-;其中R<sup>3</sup>任选地被一个或多个-O-、-S-、-SO-、-SO<sub>2</sub>-、-NH-、-NR<sup>6</sup>-、-NH(C=O)-、-O(C=O)-中断,其中R<sup>6</sup>是C(1-6)烷基-、C(1-6)烷氧基-、或C(1-6)烷氧基-C(1-6)烷氧基-。

[0217] R<sup>3</sup>优选的是分支或未分支的C(2-8)链烷二基、取代或未取代的C(2-8)烯二基、取代或未取代的C(2-8)炔二基、C(3-8)环烷二基、取代或未取代的C(4-8)亚芳基,甚至更优选的是分支或未分支的C(2-8)链烷二基、取代或未取代的C(3-8)环烷二基。

[0218] 上述膜融合化合物,其中一个或多个两亲分子具有化学式VI所示的结构:



[0220] 其中R<sup>1</sup>和R<sup>2</sup>为:

[0221] R<sup>1</sup> = (C=O)OR<sup>4</sup>、(C=O)NHR<sup>4</sup>、O(C=O)R<sup>4</sup>、NH(C=O)R<sup>4</sup>

[0222]  $R^2 = (C=O)OR^5$ 、 $(C=O)NHR^5$ 、 $O(C=O)R^5$ 、 $NH(C=O)R^5$

[0223] 其中,

[0224]  $R^4$ 和 $R^5$ 各自独立地存在、为C(12-20)烷基或C(12-20)烯基;

[0225]  $R^3$ 选自:

[0226] -烷基-(C=O)-, 其与AA连接;

[0227] -烷基-O(C=O)-, 其与AA连接;

[0228] -烷基-NH(C=O)-, 其与AA连接;

[0229] -烷基-(C=O)-烷基-(C=O)-, 其与AA连接;

[0230] -烷基-O(C=O)-烷基-(C=O)-, 其与AA连接;

[0231] -烷基-NH(C=O)-烷基-(C=O)-, 其与AA连接;

[0232] -烯基-(C=O)-, 其与AA连接;

[0233] -烯基-O(C=O)-, 其与AA连接;

[0234] -烯基-NH(C=O)-, 其与AA连接;

[0235] -烯基-(C=O)-烯基-(C=O)-, 其与AA连接;

[0236] -烯基-O(C=O)-烯基-(C=O)-, 其与AA连接;

[0237] -烯基-NH(C=O)-烯基-(C=O)-, 其与AA连接;

[0238] -炔基-(C=O)-, 其与AA连接;


[0239] -炔基-O(C=O)-, 其与AA连接;


[0240] -炔基-NH(C=O)-, 其与AA连接;


[0241] -炔基-(C=O)-炔基-(C=O)-, 其与AA连接;

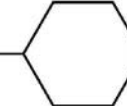
[0242] -炔基-O(C=O)-炔基-(C=O)-, 其与AA连接;

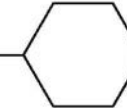
[0243] -炔基-NH(C=O)-炔基-(C=O)-, 其与AA连接;


[0244] \*—N-(C=O)—\* , 其与AA连接

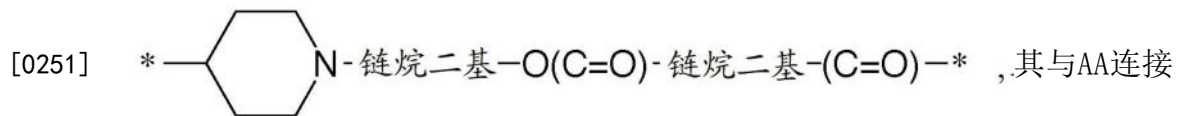
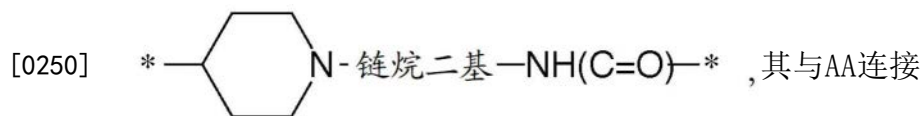
[0245] \*—N-(C=O)—链烷二基-(C=O)—\* , 其与AA连接

[0246] \*—N-(C=O)—烯二基-(C=O)—\* , 其与AA连接

[0247] \*—N-(C=O)—炔二基-(C=O)—\* , 其与AA连接

[0248] \*—N-链烷二基-(C=O)—\* , 其与AA连接

[0249] \*—N-链烷二基—O(C=O)—\* , 其与AA连接



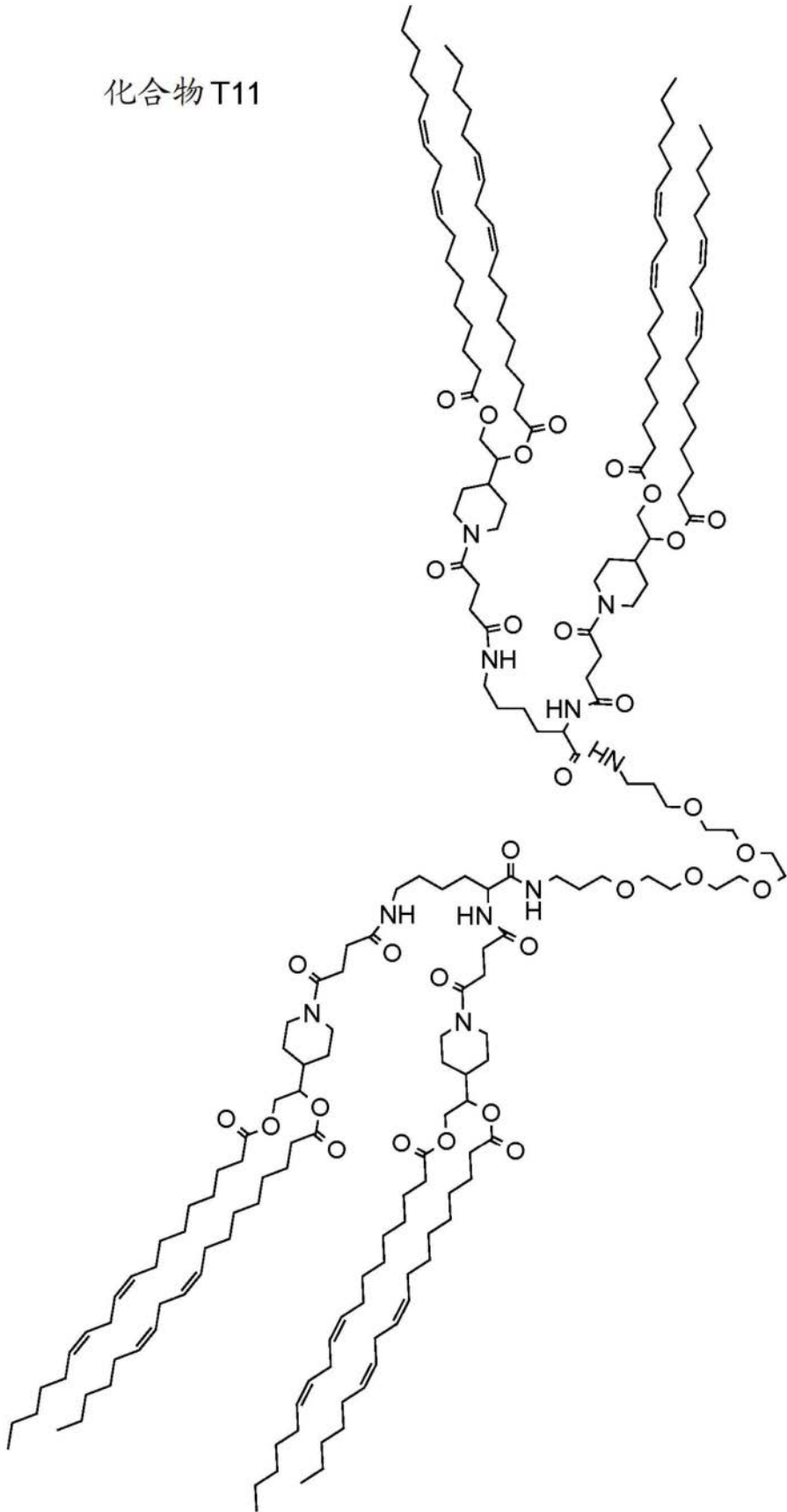
[0252] 及其位置异构体;

[0253] 其中R<sup>3</sup>的任意烷基均是分支或未分支的C(1-6)烷基, R<sup>3</sup>的任意烯基均是分支或未分支的C(2-6)烯基, R<sup>3</sup>的任意炔基均是分支或未分支的C(2-6)炔基。

[0254] 上述膜融合化合物, 其中R<sup>4</sup>和R<sup>5</sup>各自独立地存在、为C(14-18)烷基或C(14-18)烯基, 优选是具有2至4个双键的C(14-18)烯基。

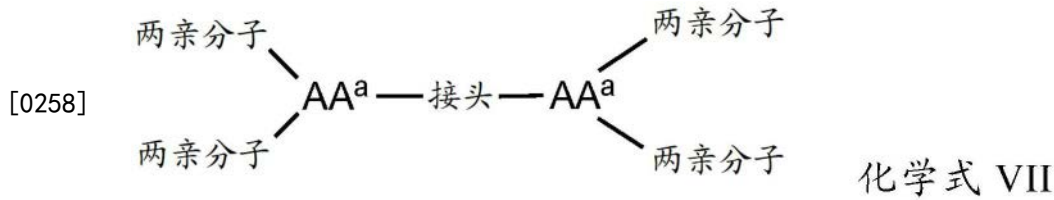
[0255] 上述膜融合化合物, 其中化合物是化合物T11:

化合物 T11



[0256]

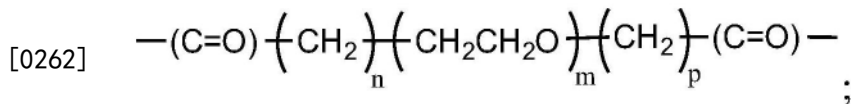
[0257] 具有化学式VII的膜融合化合物，



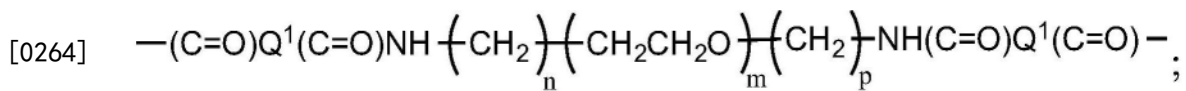
[0259] 其中每个两亲分子独立地包含一至两条亲脂链,其中所述亲脂链各自独立地包含8至22个碳原子;

[0260] 其中每个AA<sup>a</sup>独立地为包含具有酰基的侧链的氨基酸,其中氨基酸以其每个酰基与两亲分子连接,且以其N端与接头连接;

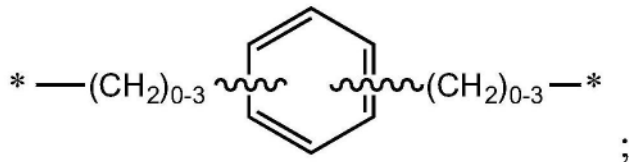
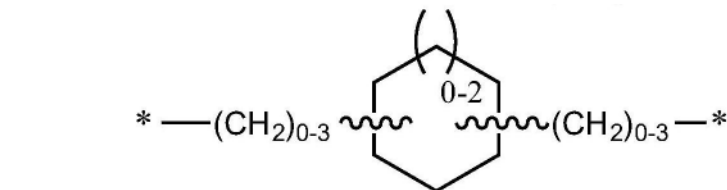
[0261] 其中接头具有下述结构:



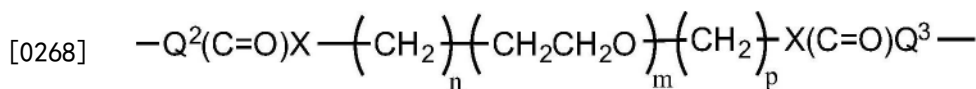
[0263] 或者



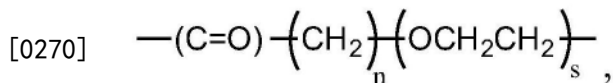
[0265] 其中Q<sup>1</sup>是分支或未分支的C(2-8)链烷二基、分支或未分支的C(2-8)烯二基、分支或未分支的C(2-8)炔二基、或



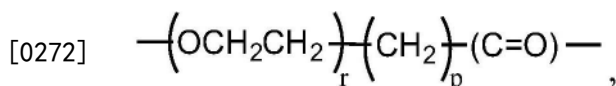
[0267] 或者



[0269] 其中Q<sup>2</sup>是



[0271] 其中Q<sup>3</sup>是



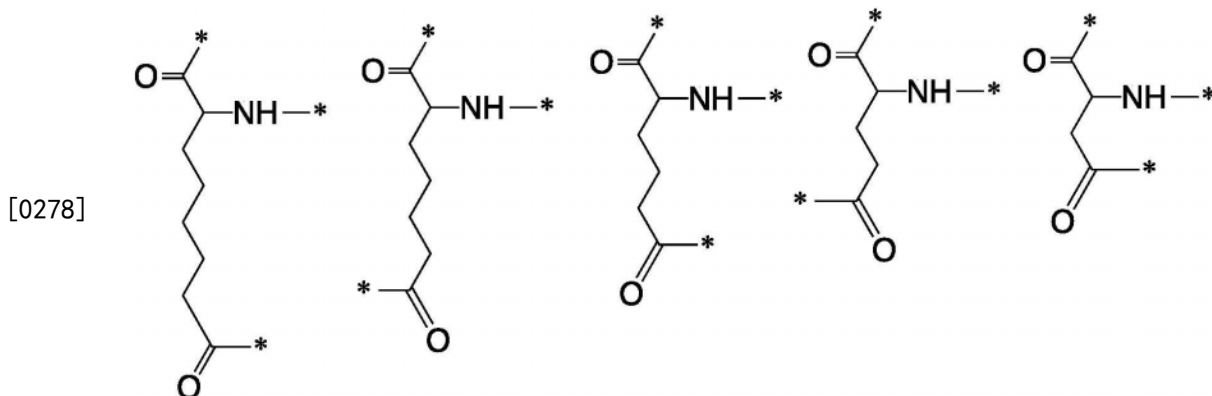
[0273] 其中X是-O-、-S-、或-NH-;

[0274] n和p各自独立地存在、为1至3;

[0275] m独立地为1至10;

[0276] r和s各自独立地存在、为1至5。

[0277] 上述膜融合化合物,其中AA<sup>a</sup>选自以下结构、及其任意的立体异构体:

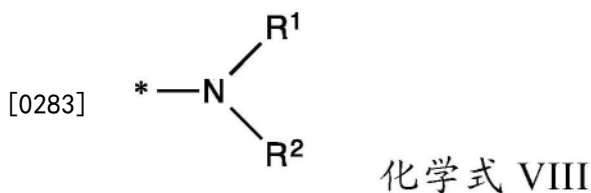


[0279] 上述膜融合化合物,其中一个或两个两亲分子缺失而被烷基、或具有1-400个原子的药学上可接受的有机化学基团替代,所述原子选自碳、氧、氮、硫、氟和氢。

[0280] 上述膜融合化合物,其中药学上可接受的有机化学基团选自烷基、烯基、炔基、烷基醚基、芳基醚基、烷氧基、和烷氧基烷氧基。

[0281] 上述膜融合化合物,其中药学上可接受的有机化学基团选自甲氧基、乙氧基、叔丁基醚基、和苄氧基。

[0282] 上述膜融合化合物,其中一个或多个两亲分子具有化学式VIII所示的结构:



[0284] 其中R<sup>1</sup>和R<sup>2</sup>为:

[0285] R<sup>1</sup>=CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>O(C=O)R<sup>4</sup>、CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH(C=O)R<sup>4</sup>、

[0286] CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>(C=O)OR<sup>4</sup>、CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>(C=O)NHR<sup>4</sup>

[0287] R<sup>2</sup>=CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>O(C=O)R<sup>5</sup>、CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>NH(C=O)R<sup>5</sup>、

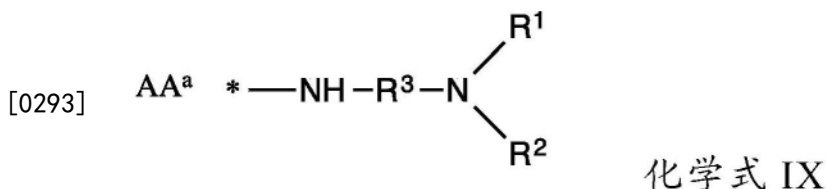
[0288] CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>(C=O)OR<sup>5</sup>、CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>(C=O)NHR<sup>5</sup>

[0289] 其中,

[0290] n和m各自独立地为1至2;

[0291] R<sup>4</sup>和R<sup>5</sup>各自独立地存在、为C(12-20)烷基或C(12-20)烯基。

[0292] 上述膜融合化合物,其中一个或多个两亲分子具有化学式IX所示的结构:



[0294] 其中R<sup>1</sup>和R<sup>2</sup>为:

[0295] R<sup>1</sup>=CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>O(C=O)R<sup>4</sup>、CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH(C=O)R<sup>4</sup>、

[0296] CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>(C=O)OR<sup>4</sup>、CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>(C=O)NHR<sup>4</sup>

[0297]  $R^2 = \text{CH}_2(\text{CH}_2)_m\text{O}(\text{C}=\text{O})R^5$ 、 $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_m\text{NH}(\text{C}=\text{O})R^5$ 、

[0298]  $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_m(\text{C}=\text{O})\text{OR}^5$ 、 $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_m(\text{C}=\text{O})\text{NHR}^5$

[0299] 其中，

[0300] n和m各自独立地为1至2；

[0301]  $R^4$ 和 $R^5$ 各自独立地存在、为C(12-20)烷基或C(12-20)烯基；

[0302] 其中 $R^3$ 选自分支或未分支的C(1-8)链烷二基、取代或未取代的C(2-8)烯二基、取代或未取代的C(2-8)炔二基、取代或未取代的C(3-8)环烷二基、取代或未取代的亚芳基、取代或未取代的C(4-8)亚杂芳基、和取代或未取代的杂环烷二基；其中 $R^3$ 任选地被一个或多个-O-、-S-、-SO-、-SO<sub>2</sub>-、-NH-、-NR<sup>6</sup>-、-NH(C=O)-、-O(C=O)-中断，其中 $R^6$ 是C(1-6)烷基-、C(1-6)烷氧基-、或C(1-6)烷氧基-C(1-6)烷氧基-。

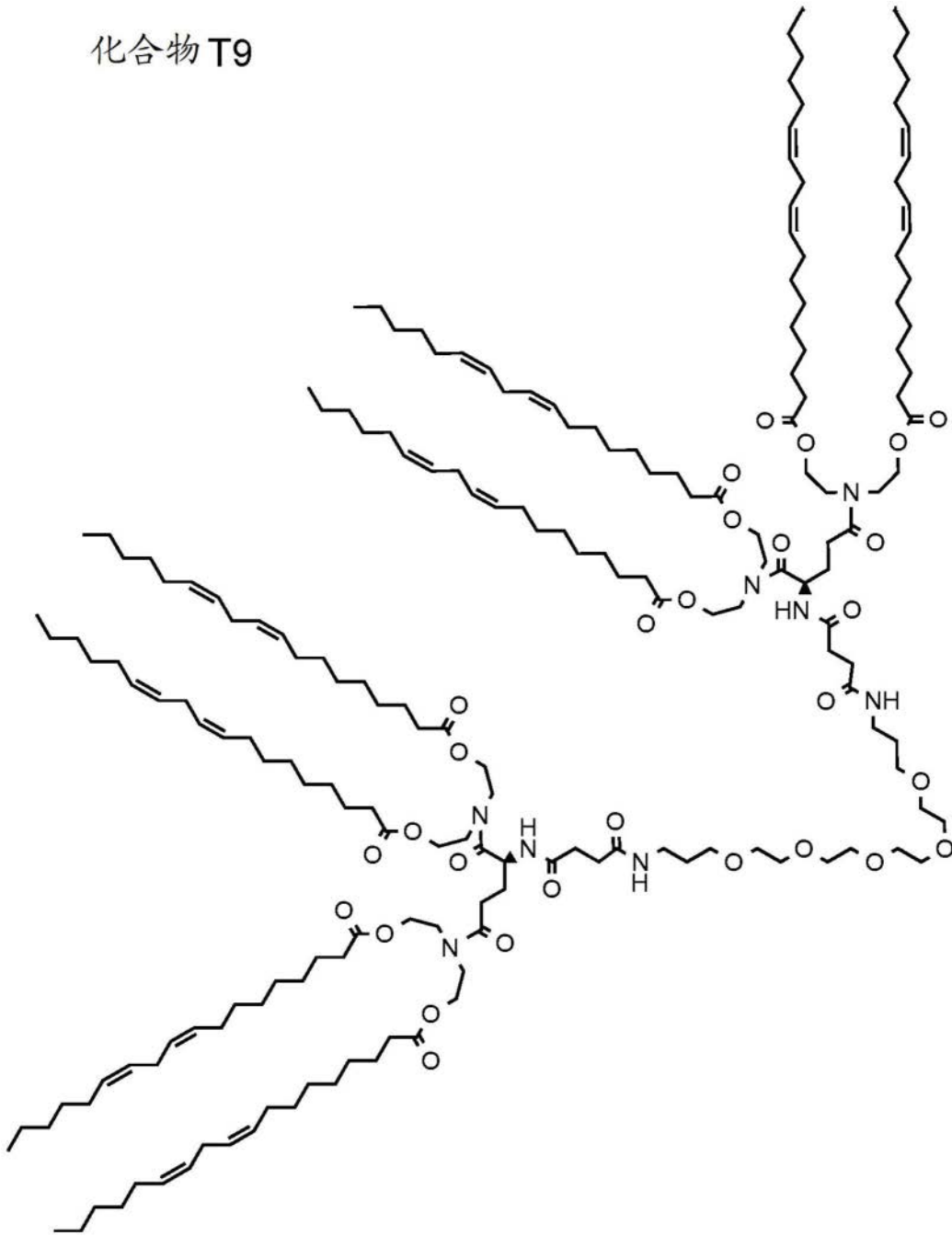
[0303]  $R^3$ 优选的是分支或未分支的C(2-8)链烷二基、取代或未取代的C(2-8)烯二基、取代或未取代的C(2-8)炔二基、C(3-8)环烷二基、取代或未取代的C(4-8)亚芳基，甚至更优选的是分支或未分支的C(2-8)链烷二基、取代或未取代的C(3-8)环烷二基。

[0304] 上述膜融合化合物，其中 $R^4$ 和 $R^5$ 各自独立地存在、为C(14-18)烷基或C(14-18)烯基，优选是具有2至4个双键的C(14-18)烯基。

[0305] 上述膜融合化合物，其中化合物是化合物T9：

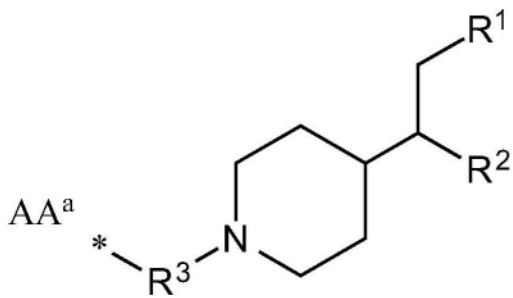
化合物 T9

[0306]



[0307] 上述膜融合化合物, 其中一个或多个两亲分子具有化学式X所示的结构:

[0308]



化学式 X

[0309] 其中,

[0310] R<sup>1</sup>和R<sup>2</sup>为:

[0311]  $R^1 = \text{CH}_2(\text{CH}_2)_n\text{O}(\text{C}=\text{O})R^4, \text{CH}_2(\text{CH}_2)_n\text{NH}(\text{C}=\text{O})R^4,$

[0312]  $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_n(\text{C}=\text{O})\text{OR}^4, \text{CH}_2(\text{CH}_2)_n(\text{C}=\text{O})\text{NHR}^4$

[0313]  $R^2 = \text{CH}_2(\text{CH}_2)_m\text{O}(\text{C}=\text{O})R^5, \text{CH}_2(\text{CH}_2)_m\text{NH}(\text{C}=\text{O})R^5,$

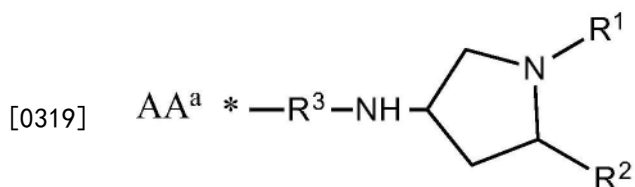
[0314]  $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_m(\text{C}=\text{O})\text{OR}^5, \text{CH}_2(\text{CH}_2)_m(\text{C}=\text{O})\text{NHR}^5$

[0315]  $R^4$ 和 $R^5$ 各自独立地存在、为C(12-20)烷基或C(12-20)烯基；

[0316] 其中 $R^3$ 是缺失的或者选自分支或未分支的\*-NH-C(1-8)链烷二基-(C=O)-、取代或未取代的\*-NH-C(2-8)烯二基-(C=O)-、取代或未取代的\*-NH-C(2-8)炔二基-(C=O)-、取代或未取代的\*-NH-C(3-8)环烷二基-(C=O)-、取代或未取代的\*-NH-亚芳基-(C=O)-、取代或未取代的\*-NH-C(4-8)亚杂芳基-(C=O)-、和取代或未取代的\*-NH-杂环烷二基-(C=O)-,其中\*表示与 $\text{AA}^a$ 连接的末端；其中 $R^3$ 任选地被一个或多个-O-、-S-、-SO-、-SO<sub>2</sub>-、-NH-、-NR<sup>6</sup>-、-NH(C=O)-、-O(C=O)-中断,其中 $R^6$ 是C(1-6)烷基-、C(1-6)烷氧基-、或C(1-6)烷氧基-C(1-6)烷氧基-。

[0317]  $R^3$ 优选的是分支或未分支的C(2-8)链烷二基、取代或未取代的C(2-8)烯二基、取代或未取代的C(2-8)炔二基、C(3-8)环烷二基、取代或未取代的C(4-8)亚芳基,甚至更优选的是分支或未分支的C(2-8)链烷二基、取代或未取代的C(3-8)环烷二基。

[0318] 上述膜融合化合物,其中一个或多个两亲分子具有化学式XI所示的结构:



化学式 XI

[0320] 其中,

[0321]  $R^1$ 和 $R^2$ 为:

[0322]  $R^1 = (\text{C}=\text{O})\text{OR}^4, (\text{C}=\text{O})\text{NHR}^4, \text{O}(\text{C}=\text{O})R^4, \text{NH}(\text{C}=\text{O})R^4$

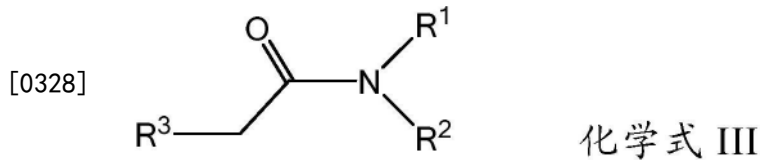
[0323]  $R^2 = (\text{C}=\text{O})\text{OR}^5, (\text{C}=\text{O})\text{NHR}^5, \text{O}(\text{C}=\text{O})R^5, \text{NH}(\text{C}=\text{O})R^5$

[0324]  $R^4$ 和 $R^5$ 各自独立地存在、为C(12-20)烷基或C(12-20)烯基；

[0325] 其中 $R^3$ 是缺失的或者选自分支或未分支的\*-NH-C(1-8)链烷二基-(C=O)-、取代或未取代的\*-NH-C(2-8)烯二基-(C=O)-、取代或未取代的\*-NH-C(2-8)炔二基-(C=O)-、取代或未取代的\*-NH-C(3-8)环烷二基-(C=O)-、取代或未取代的\*-NH-亚芳基-(C=O)-、取代或未取代的\*-NH-C(4-8)亚杂芳基-(C=O)-、和取代或未取代的\*-NH-杂环烷二基-(C=O)-,其中\*表示与 $\text{AA}^a$ 连接的末端；其中 $R^3$ 任选地被一个或多个-O-、-S-、-SO-、-SO<sub>2</sub>-、-NH-、-NR<sup>6</sup>-、-NH(C=O)-、-O(C=O)-中断,其中 $R^6$ 是C(1-6)烷基-、C(1-6)烷氧基-、或C(1-6)烷氧基-C(1-6)烷氧基-。

[0326]  $R^3$ 优选的是分支或未分支的C(2-8)链烷二基、取代或未取代的C(2-8)烯二基、取代或未取代的C(2-8)炔二基、C(3-8)环烷二基、取代或未取代的C(4-8)亚芳基,甚至更优选的是分支或未分支的C(2-8)链烷二基、取代或未取代的C(3-8)环烷二基。

[0327] 上述膜融合化合物,其中一个或多个两亲分子具有化学式III所示的结构:



[0329] 其中R<sup>1</sup>和R<sup>2</sup>为:

[0330] R<sup>1</sup>=CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>O(C=O)R<sup>4</sup>、CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH(C=O)R<sup>4</sup>、

[0331] CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>(C=O)OR<sup>4</sup>、CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>(C=O)NHR<sup>4</sup>

[0332] R<sup>2</sup>=CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>O(C=O)R<sup>5</sup>、CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>NH(C=O)R<sup>5</sup>、

[0333] CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>(C=O)OR<sup>5</sup>、CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>(C=O)NHR<sup>5</sup>

[0334] 其中n和m各自独立地为1至2;R<sup>4</sup>和R<sup>5</sup>各自独立地存在、为C(12-20)烷基或C(12-20)烯基;

[0335] 其中

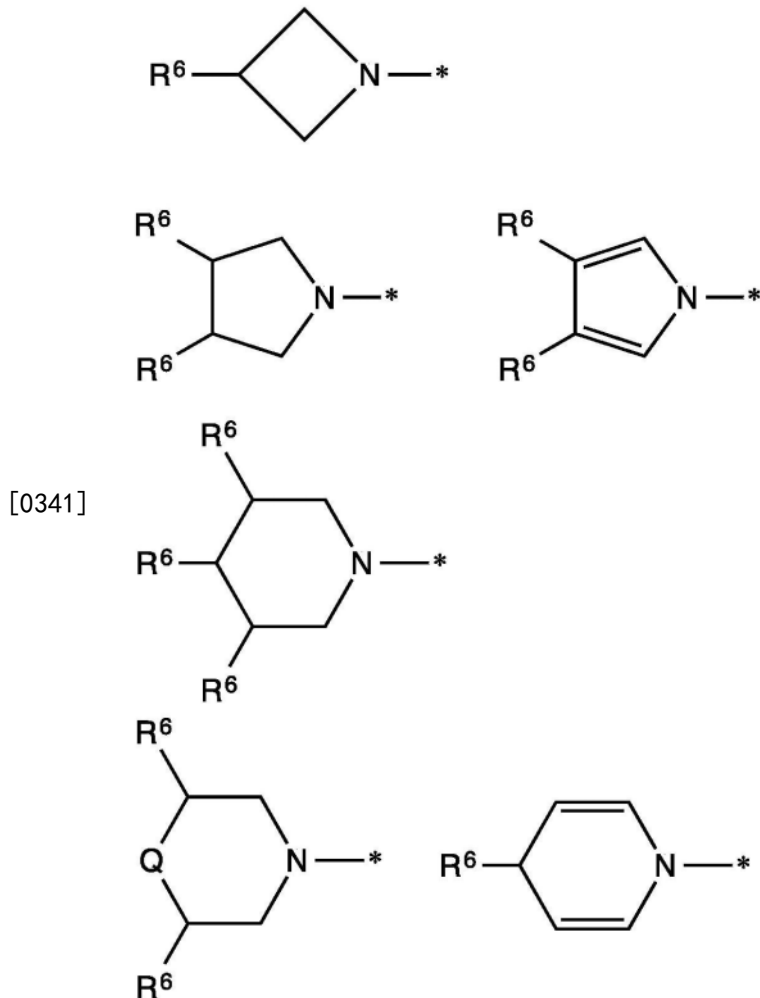
[0336] R<sup>3</sup>选自:

[0337] -(C=O)-烷基-NH-, 其与AA<sup>a</sup>连接;

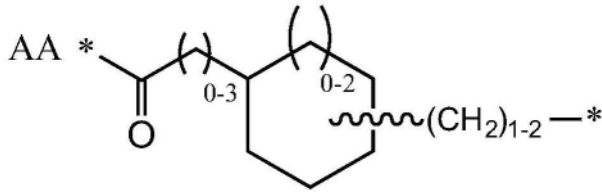
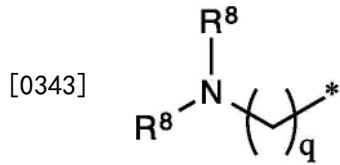
[0338] -(C=O)-烯基-NH-, 其与AA<sup>a</sup>连接;

[0339] -(C=O)-炔基-NH-, 其与AA<sup>a</sup>连接;

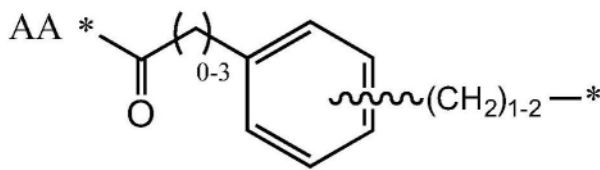
[0340] 其中R<sup>3</sup>的任意烷基均是分支或未分支的C(1-6)烷基,R<sup>3</sup>的任意烯基均是分支或未分支的C(2-6)烯基,R<sup>3</sup>的任意炔基均是分支或未分支的C(2-6)炔基;



[0342] 及其位置异构体;



[0344]



[0345] 其中,

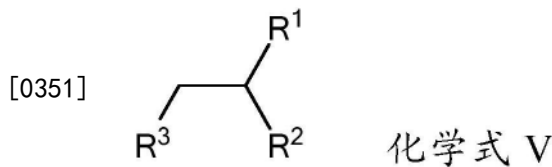
[0346] 每个 $R^6$ 独立地选自H、烷基、烷氧基、和烷氧基烷氧基,前提是一个 $R^6$ 为-(C=O)-烷基-NH-,其中NH与 $AA^a$ 连接;

[0347] 每个 $R^8$ 独立地选自H、烷基,前提是一个 $R^8$ 为-(C=O)-烷基-NH-,其中NH与 $AA^a$ 连接;

[0348] q是0至4;

[0349] Q是0或N。

[0350] 上述膜融合化合物,其中一个或多个两亲分子具有化学式V所示的结构:



[0352] 其中 $R^1$ 和 $R^2$ 为:

[0353]  $R^1 = (C=O)OR^4, (C=O)NHR^4, O(C=O)R^4, NH(C=O)R^4$

[0354]  $R^2 = (C=O)OR^5, (C=O)NHR^5, O(C=O)R^5, NH(C=O)R^5$

[0355] 其中 $R^4$ 和 $R^5$ 各自独立地存在、为C(12-20)烷基或C(12-20)烯基;

[0356] 其中,

[0357] 其中 $R^3$ 是缺失的或者选自分支或未分支的\*-NH-C(1-8)链烷二基-(C=O)-、取代或未取代的\*-NH-C(2-8)烯二基-(C=O)-、取代或未取代的\*-NH-C(2-8)炔二基-(C=O)-、取代或未取代的\*-NH-C(3-8)环烷二基-(C=O)-、取代或未取代的\*-NH-亚芳基-(C=O)-、取代或未取代的\*-NH-C(4-8)亚杂芳基-(C=O)-、和取代或未取代的\*-NH-杂环烷二基-(C=O)-,其中\*表示与 $AA^a$ 连接的末端;其中 $R^3$ 任选地被一个或多个-O-、-S-、-SO-、-SO<sub>2</sub>-、-NH-、-NR<sup>6</sup>-、-NH(C=O)-、-O(C=O)-中断,其中 $R^6$ 是C(1-6)烷基-、C(1-6)烷氧基-、或C(1-6)烷氧基-C(1-6)烷氧基-。

[0358]  $R^3$ 如上所述,优选是分支或未分支的C(2-8)链烷二基、取代或未取代的C(2-8)烯

二基、取代或未取代的C(2-8)炔二基、C(3-8)环烷二基、取代或未取代的C(4-8)亚芳基,甚至更优选的是分支或未分支的C(2-8)链烷二基、取代或未取代的C(3-8)环烷二基。

[0359] 本发明的实施方式还涉及组合物,其包含上述膜融合化合物和药学上可接受的载体。组合物可包含纳米颗粒或脂质体。

[0360] 本发明的药物组合物可包含膜融合化合物、活性剂和药学上可接受的载体。在组合物中,膜融合化合物可以是组合物的脂质的0.01mol%至20mol%。组合物可包含纳米颗粒或脂质体。

[0361] 本发明的膜融合分子和制剂(formulation)可用于活性剂的递送。

[0362] 在一些实施方式中,活性剂是一种或多种核酸。

[0363] 在某些实施方式中,活性剂是一种或多种DNA、RNA、mRNA、siRNA、或microRNA。活性剂可以是一种或多种RNA分子。

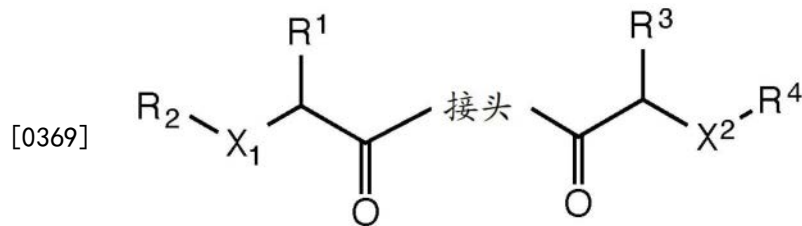
[0364] 活性剂可以是一种或多种RNAi分子、一种或多种mRNA分子、及其修饰形式。

[0365] 本发明的实施方式包括组合物,其用于在对象中分配活性剂以治疗病症或疾病。组合物可含有活性剂、膜融合化合物、可离子化的脂质、结构性脂质、稳定剂脂质、和用于降低组合物的免疫原性的脂质。

[0366] 本发明包括用于在有需要的对象中预防、减轻或治疗疾病或病症的方法,其包括向对象施予上述组合物。本发明的组合物可用于治疗人或动物体。

[0367] 本发明的实施方式还包括以下:

[0368] 化学式(A)的化合物,

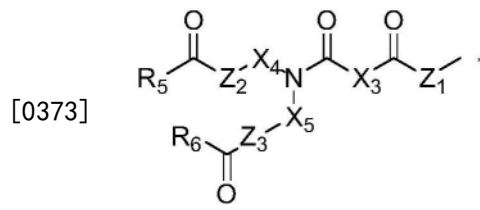


化学式 A

[0370] 其中接头是包含PEG部分的二价基团,

[0371]  $X_1$ 和 $X_2$ 独立地为C1-C5链烷二基,

[0372]  $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 和 $R_4$ 独立地为



[0374]  $X_3$ 是单键、C1-C5链烷二基或C2-C5烯二基,

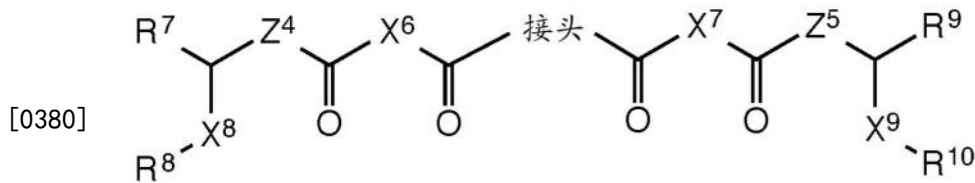
[0375]  $X_4$ 和 $X_5$ 独立地为C2-5链烷二基,

[0376]  $Z_1$ 、 $Z_2$ 和 $Z_3$ 独立地为-O-、-S-或-NH-,并且

[0377]  $R_5$ 和 $R_6$ 独立地为C11-23烷基或C11-23烯基。

[0378] 本发明的实施方式还包括以下:

[0379] 化学式(B)的化合物,



化学式 B

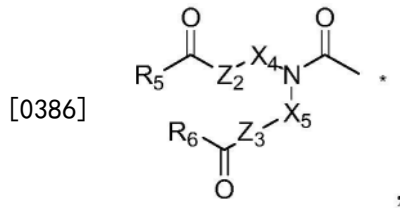
[0381] 其中接头是包含PEG部分的二价基团，

[0382]  $X_6$ 和 $X_7$ 独立地为C1-C5链烷二基，

[0383]  $X_8$ 和 $X_9$ 独立地为C1-C5链烷二基，

[0384]  $Z_4$ 和 $Z_5$ 独立地为-O-、-S-或-NH-，

[0385]  $R_7$ 、 $R_8$ 、 $R_9$ 和 $R_{10}$ 独立地为

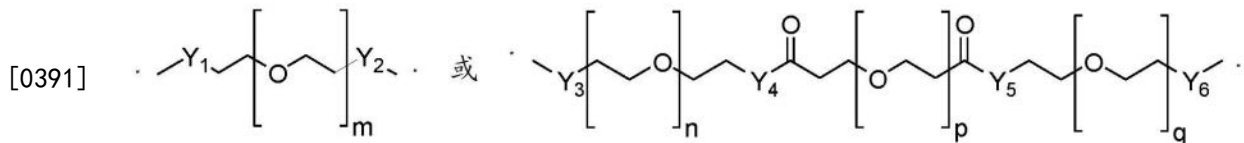


[0387]  $X_4$ 和 $X_5$ 独立地为C2-5链烷二基，

[0388]  $Z_2$ 和 $Z_3$ 独立地为-O-、-S-或-NH-，并且

[0389]  $R_5$ 和 $R_6$ 独立地为C11-23烷基或C11-23烯基。

[0390] 上述化合物，其中接头是



[0392] 其中m是1-12的整数，

[0393]  $Y_1$ 是-O-、-NH-或-NHCH<sub>2</sub>-，

[0394]  $Y_2$ 是-O-、-NH-或-CH<sub>2</sub>NH-，

[0395] n和q独立地为1-5的整数，

[0396] p是0-5的整数，

[0397]  $Y_3$ 和 $Y_5$ 独立地为-O-、-NH-或-NHCH<sub>2</sub>-，并且

[0398]  $Y_4$ 和 $Y_6$ 独立地为-O-、-NH-或-CH<sub>2</sub>NH-。

[0399] 上述化合物，其中 $X_1$ 和 $X_2$ 独立地为C1-C5直链烷二基，优选是C2-C4直链烷二基，更优选是C4直链烷二基。

[0400] 上述化合物，其中 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 和 $R_4$ 是相同的基团。

[0401] 上述化合物，其中 $X_3$ 是单键或C1-C5直链烷二基， $X_3$ 优选是C2-C4直链烷二基，更优选是亚乙基(ethylene)，即乙烷二基(ethanediyl group)。

[0402] 上述化合物，其中 $X_4$ 和 $X_5$ 独立地为C2-5直链烷二基， $X_4$ 和 $X_5$ 优选是C2-4直链烷二基，更优选是亚乙基，即乙烷二基。

[0403] 上述化合物，其中 $Z_1$ 是-NH-。

[0404] 上述化合物，其中 $Z_2$ 和 $Z_3$ 是-O-。

[0405] 上述化合物，其中 $R_5$ 和 $R_6$ 独立地为C11-23直链烯基。

- [0406] 上述化合物,其中R<sub>5</sub>和R<sub>6</sub>独立地为含1-6个双键的C11-23直链烯基,其中双键的数量优选的是1-3,更优选是2-3,更进一步优选是2。
- [0407] 上述化合物,其中R<sub>5</sub>和R<sub>6</sub>独立地为含2个双键的C11-23直链烯基。
- [0408] 上述化合物,其中R<sub>5</sub>和R<sub>6</sub>独立地为C13-17直链烯基,R<sub>5</sub>和R<sub>6</sub>优选是C15-17直链烯基,更优选是C17直链烯基。
- [0409] 上述化合物,其中R<sub>5</sub>和R<sub>6</sub>独立地为C17直链烯基。
- [0410] 上述化合物,其中R<sub>5</sub>和R<sub>6</sub>是十七碳-8,11-二烯基。
- [0411] 组合物,其在包含双层脂质分子的脂质纳米颗粒中包含阳离子脂质、可离子化脂质和上述化合物的脂质。
- [0412] 上述组合物,其还包含核酸。
- [0413] 上述组合物,其中核酸是siRNA、mRNA或microRNA。
- [0414] 上述组合物,其中组合物是药物组合物。
- [0415] 附图简述
- [0416] 图1显示了化合物R1的制备方案。
- [0417] 图2显示了化合物R2的制备方案。
- [0418] 图3A显示了化合物R3的制备方案。
- [0419] 图3B显示了化合物R3的结构。
- [0420] 图4A显示了化合物R4的制备方案。
- [0421] 图4B显示了化合物R4的结构。
- [0422] 图5显示了化合物R5的制备方案。
- [0423] 图6显示了化合物R6的制备方案。
- [0424] 图7显示了化合物R6的可选的制备方案。
- [0425] 图8显示了化合物S2的制备方案。
- [0426] 图9显示了化合物S3的制备方案。
- [0427] 图10A显示了化合物S4的制备方案。
- [0428] 图10B显示了化合物S4的结构。
- [0429] 图11显示了化合物S5的制备方案。
- [0430] 图12A显示了化合物S6的制备方案。
- [0431] 图12B显示了化合物S6的结构。
- [0432] 图13A显示了化合物S7的制备方案。
- [0433] 图13B显示了化合物S7的结构。
- [0434] 图14A显示了化合物S8的制备方案。
- [0435] 图14B显示了化合物S8的结构。
- [0436] 图15A显示了化合物T1的制备方案。
- [0437] 图15B显示了化合物T1的结构。
- [0438] 图16A显示了化合物T2的制备方案。
- [0439] 图16B显示了化合物T2的结构。
- [0440] 图17A显示了化合物T4的制备方案。
- [0441] 图17B显示了化合物T4的结构。

- [0442] 图18A显示了化合物T5的制备方案。
- [0443] 图18B显示了化合物T5的结构。
- [0444] 图19A显示了化合物T6的制备方案。
- [0445] 图19B显示了化合物T6的结构。
- [0446] 图20A显示了化合物T7的制备方案。
- [0447] 图20B显示了化合物T7的结构。
- [0448] 图21A显示了化合物T8的制备方案。
- [0449] 图21B显示了化合物T8的结构。
- [0450] 图22A显示了化合物T9的制备方案。
- [0451] 图22B显示了化合物T9的结构。
- [0452] 图23A显示了化合物T3的制备方案。
- [0453] 图23B显示了化合物T3的结构。
- [0454] 图24显示了使用本发明的膜融合分子在体外递送生物活性分子的结果。如图24所示,与不含有本发明的膜融合化合物的对照制剂#1相比,含有2%(总脂质的)的本发明的膜融合化合物R4的脂质体递送制剂#5提供了靶向HSP47的示例siRNA在星状细胞中出人意料地增加的基因表达敲低活性。
- [0455] 图25显示了使用本发明的膜融合分子在体外递送生物活性分子的结果。测量了一些siRNA脂质体递送制剂的HSP47基因表达敲低活性。制剂提供了在星状细胞中高的基因表达敲低活性。制剂含有2%(总脂质的)的本发明的膜融合化合物,提供了高活性的靶向HSP47的siRNA。
- [0456] 图26显示了使用本发明的膜融合分子,在体内递送生物活性分子的结果。使用靶向HSP47的siRNA的脂质体递送制剂显示了在体内(小鼠)的基因表达敲低活性。活性制剂#2-#8含有2%(总脂质的)的本发明的规定膜融合化合物。
- [0457] 图27显示了化合物T10结构的左半部分。
- [0458] 图28显示了化合物T10结构的右半部分。
- [0459] 图29显示了化合物T10的制备方案。
- [0460] 图30显示了化合物T10的制备方案。
- [0461] 图31显示了化合物T11结构的左半部分。
- [0462] 图32显示了化合物T11结构的右半部分。
- [0463] 图33显示了化合物T11的制备方案。
- [0464] 图34显示了化合物T11的制备方案。
- [0465] 图35显示了化合物T12结构的左半部分。
- [0466] 图36显示了化合物T12结构的右半部分。
- [0467] 图37显示了化合物T12的制备方案。
- [0468] 图38显示了化合物T12的制备方案。
- [0469] 图39显示了化合物T13结构的左半部分。
- [0470] 图40显示了化合物T13结构的右半部分。
- [0471] 图41显示了化合物T13的制备方案。
- [0472] 图42显示了化合物T13的制备方案。

[0473] 图43显示了化合物T14结构的左半部分和右半部分。

[0474] 图44显示了化合物T14的制备方案。

[0475] 图45显示了化合物T14的制备方案。

[0476] 图46显示了对于含有本发明的膜融合化合物的脂质体制剂而言,在大鼠星状细胞中使用示例siRNA的基因表达敲低的体外活性。(1)包含脂质HEDC和S104的脂质体制剂的结果,其不含有本发明的膜融合化合物。(2)与(1)相似的脂质体制剂的结果,除了含有2%(总脂质的)的膜融合化合物R4。(3)与(1)相似的脂质体制剂的结果,除了含有10%(总脂质的)膜融合化合物R4。制剂中膜融合化合物的存在极大地增加了示例siRNA的递送活性,而增加的活性直接归因于膜融合化合物R4的存在。

[0477] 图47显示了对于含有本发明的膜融合化合物的脂质体制剂而言,在大鼠星状细胞中使用示例siRNA的基因表达敲低的体外活性。(1)包含脂质HEDC和S104的脂质体制剂的结果,其不含有本发明的膜融合化合物。(2)与(1)相似的脂质体制剂的结果,除了含有2%(总脂质的)的膜融合化合物R4。(3)与(1)相似的脂质体制剂的结果,除了含有2%(总脂质的)的膜融合化合物T3。膜融合化合物R4和T3在制剂中的分别存在极大地增加了示例siRNA的递送活性,而增加的活性直接归因于膜融合化合物R4和T3的存在。

[0478] 图48显示了用具有组合物HEDC:S104:CH:DOPE:DMPE-PEG2000:化合物T3的本发明的LNP纳米颗粒,在体外以5nM(上图)和2nM(下图)将GFP mRNA递送和转染至A549细胞中的结果。GFP表达的荧光图像(左图)是在转染后48小时用荧光显微镜获得的。荧光和明视野(BF)图像的重叠图像(右图)证实接近100%的细胞都被转染并表达GFP。

[0479] 图49显示了使用本发明的膜融合脂质样分子在体内递送GFP mRNA的结果。用具有组合物HEDC:S104:CH:DOPE:DMPE-PEG2000:化合物T3的本发明的LNP纳米颗粒将GFP mRNA转染到Balb/c小鼠中。如图49所示,用MAXDISCOVER GFP ELISA确定了mRNA向各种组织和细胞中的递送。令人惊讶的是,GFP mRNA在肺中被选择性地转染和/或翻译,而在肌肉、肝脏、心脏和肾脏中的转染和/或翻译较低。

[0480] 图50显示了使用本发明的膜融合脂质样分子在体内递送荧光素酶(Luciferase) mRNA的结果。用具有组合物HEDC:S104:CH:DOP E:DMPE-PEG2000:化合物T3的本发明的LNP纳米颗粒将荧光素酶mRNA转染到Balb/c小鼠中。如图50所示,用Promega E4510检测试剂盒确定了mRNA在各种组织和细胞中的相对递送、转染和/或翻译。令人惊讶的是,Fluc mRNA在肺和脾脏中被选择性地递送、转染和/或翻译,而在肝脏、心脏、肾脏和肌肉中的递送、转染和/或翻译较低。

[0481] 图51显示了使用本发明的膜融合脂质样分子在体内递送荧光素酶mRNA的结果。用具有组合物:(-01)HE2DC:S104:CH:DOPE:D MPE-PEG2000:化合物T3、或(-02)HEDC:S104:CH:DOPE:DMPE-PE G2000:化合物T3的本发明的LNP纳米颗粒将荧光素酶mRNA转染到Balb/c小鼠中,注射2mpk。如图51所示,用Promega E4510检测试剂盒确定了mRNA在各种组织和细胞中的相对递送、转染和/或翻译。Fluc mRNA在肺和脾脏中被选择性地递送、转染和/或翻译,而在胰腺、肾脏、肝脏、睾丸和小肠中的递送、转染和/或翻译较低。

[0482] 图52显示了使用本发明的膜融合脂质样分子在小鼠体内递送荧光素酶mRNA的生物自发荧光结果。如图52所示,在注射后7小时,用自发荧光成像确定了mRNA在各种组织中的相对递送、转染和/或翻译。

[0483] 图53显示了使用本发明的膜融合脂质样分子在小鼠体内递送荧光素酶mRNA的结果。如图53所示,在含有本发明的膜融合分子的制剂(2035-03-03)中的mRNA的相对递送远大于不含膜融合分子的相同制剂(2035-13-01)。

#### [0484] 发明详述

[0485] 本发明提供了一系列的膜融合分子。本发明的膜融合化合物可被用于递送治疗剂给细胞、组织或器官、生物体、和对象。

[0486] 在一些方面,本发明提供了用于形成膜融合分子的平台化合物。膜融合分子可以通过连接一个或复数个中性分子与平台结构来形成,所述中性分子如烃分子、脂肪族分子、饱和脂肪酸分子、不饱和脂肪酸分子、单不饱和脂肪酸分子或多不饱和脂肪酸分子。

[0487] 本发明的膜融合化合物的例子包括但不限于图4B所示的化合物R4;图12B所示的化合物S6;图13B所示的化合物S7;图14B所示的化合物S8;图15B所示的化合物T1;图16B所示的化合物T2;图17B所示的化合物T4;图18B所示的化合物T5;图19B所示的化合物T6;图20B所示的化合物T7;图21B所示的化合物T8;图22B所示的化合物T9;图23B所示的化合物T3;图27和28所示的化合物T10;图31和32所示的化合物T11;图35和36所示的化合物T12;图39和40所示的化合物T13;图43所示的化合物T14。

[0488] 出于说明合成化合物的方法的目的,显示图1、2、3A、3B和6-11所示的化合物。

[0489] 在一些方面,本发明提供了一系列的膜融合分子,其可在用以形成并利用用于递送活性剂至细胞和对象的脂质纳米颗粒的制剂中使用。

[0490] 本发明的膜融合化合物可具有一个或两个与氨基酸基团连接的两亲分子,所述氨基酸基团通过接头与携带一个或两个其他两亲分子的分开的氨基酸基团连接。

[0491] 两亲分子的亲脂链可以各自独立地含有8至22个碳原子。

[0492] 两亲分子基团可以是脂质样基团,具有与有机化学基团连接的一条或两条亲脂链。有机化学基团可具有多达400个原子、或20-400个原子、或10-400个原子、或4-400个原子、或3-400个原子、或2-400个原子、或1-400个原子,所述原子选自碳、氧、氮、硫、氟和氢,且可具有任何适用于连接一条或两条亲脂链的结构,并与氨基酸基团连接。有机化学基团可以是中性的,或两性离子的,或者可以提供亲水的性质。在某些实施方式中,有机化学基团可以是可离子化的。有机化学基团的例子包括烷基、烯基、炔基和乙酰基,以及保护性基团如Boc、Fmoc、TFA和CBZ(苄氧羰基)。

[0493] 不希望被任何特定理论所约束,两亲分子可具有脂质样结构,使得两亲分子可以类似于双层中的脂质分子的定向进入脂质双层,同时维持与较大的膜融合化合物连接。本发明的膜融合化合物可破坏双层的动态结构以增强与细胞的膜融合。

[0494] 膜融合化合物的氨基酸基团(命名为AA或AA<sup>a</sup>)可以用取代基修饰。膜融合化合物的氨基酸基团可以是任何具有化学式-NR<sup>N</sup>-CR<sup>1</sup>R<sup>2</sup>-(C=O)-的D或L型氨基酸基团,其中R<sup>1</sup>是某些天然氨基酸的取代或未取代的侧链。R<sup>2</sup>和R<sup>N</sup>可以各自独立地为氢、或由碳、氧、氮、硫和氢原子构成的有机基团,并具有1至20个碳原子,或者可以是C(1-6)烷基、环烷基、环烷基烷基、C(2-6)烯基、C(2-6)炔基、C(1-6)烷酰基、C(1-6)烷酰氧基、C(1-6)烷氧基、C(1-6)烷氧基-C(1-6)烷基、C(1-6)烷氧基-C(1-6)烷氧基。

[0495] 如本文中使用的,术语“其与AA连接”被用于表示基团与AA的连接点。例如,术语“-烷基-(C=O)-,其与AA连接”指通过(C=O)-基团与AA连接,从而形成-烷基-(C=O)-AA。除

非另外指出,其意在表示紧邻词组“其与AA连接”出现的最后一个基团是与AA连接的基团。

[0496] 本发明可以提供用于在细胞、组织或器官、生物体和对象中分配活性剂的组合物,其中组合物包括一种或多种本发明的膜融合分子。

[0497] 本发明的膜融合化合物可以有利地提供用于递送治疗剂至细胞、组织和对象的组合物和制剂,而不发生组合物组分的显著凝聚。

[0498] 本发明的膜融合化合物可以有利地提供用于递送治疗剂至细胞、组织和对象的脂质体制剂,而不发生组合物的脂质体的显著凝聚。

[0499] 本发明的组合物可包含一种或多种膜融合分子、以及结构性脂质、和一种或多种用于降低组合物的免疫原性的脂质。

[0500] 在一些方面,本发明提供了促进递送生物活性分子至细胞的新型膜融合脂质。膜融合脂质可以被掺入制剂中、如纳米颗粒或脂质体,来递送包括核酸或寡核苷酸在内的治疗性分子至细胞、包括肿瘤。在某些实施方式中,含有膜融合脂质的纳米颗粒或脂质体可以与细胞的细胞质膜或细胞的胞内膜融合,促进治疗性分子的释放,以及增加转染效率。

[0501] 在其他实施方式中,一系列的新型膜融合脂质可以被合成和掺入到纳米颗粒或脂质体中。纳米颗粒或脂质体可以掺入或封装治疗性分子,包括基于核酸的分子如siRNA、miRNA或mRNA,以及小分子药物和任何可以用纳米颗粒或脂质体递送的活性治疗剂。

[0502] 纳米颗粒或脂质体的颗粒大小可以在50-200nm的范围,其多分散性小于0.2。相对于缺少一个或多个新型膜融合脂质的纳米颗粒或脂质体,纳米颗粒或脂质体在多种细胞系中的转染效率可以被增强。

[0503] 在其他实施方式中,通过内吞途径或微胞饮机制等,细胞摄入本发明的纳米颗粒或脂质体可以被增强。

[0504] 本发明的纳米颗粒或脂质体还可以降低治疗性分子在递送中的溶酶体降解。

[0505] 在一些实施方式中,本发明包括组合物,其含有一种或多种膜融合分子、以及其他用于形成纳米颗粒的脂质分子。在某些实施方式中,膜融合分子可包含组合物的脂质的0.1至40mol%。在其他实施方式中,膜融合化合物可包含组合物的脂质的1至20mol%。在其他实施方式中,膜融合化合物可包含组合物的脂质的1至10mol%、或2至10mol%。在其他实施方式中,膜融合分子可包含组合物的脂质的2mol%。

[0506] 在一些实施方式中,膜融合化合物可包含组合物的脂质的第四或第五组分,或膜融合分子可以替代组合物的脂质的组分之一。

[0507] 本发明的膜融合分子可以包含平台结构、和用合适的化学键从一至四个两亲分子基团与平台结构连接。

[0508] 本发明的组合物可以包括本公开内容的膜融合分子。膜融合分子可以是组合物的1-10mol%,或更多。组合物可以形成纳米颗粒或脂质体。

[0509] 在一些实施方式中,本发明的组合物可包含阳离子型脂质、可离子化的脂质和膜融合脂质分子,可以组合形成脂质纳米颗粒。在某些实施方式中,脂质纳米颗粒可具有双层的脂质分子。

[0510] 在某些实施方式中,一个或两个两亲分子可以是缺失的,当缺失时,可以被保护性基团R<sup>P</sup>替代。

[0511] 在其他实施方式中,一个或两个两亲分子可以是缺失的,当缺失时,可以被烷基、

烯基或炔基、或者具有多达400个原子、或20-400个原子、或10-400个原子、或4-400个原子、或3-400个原子、或2-400个原子、或1-400个原子的有机化学基团替代,所述原子选自碳、氧、氮、硫、氟和氢。

[0512] 制备各种有机基团和保护性基团的方法是本领域已知的,其使用和修饰一般落入本领域技术人员的能力范围之内。参见例如Stanley R.Sandler和Wolf Karo,Organic Functional Group Preparations(1989);Greg T.Hermanson,Bioconjugate Techniques(1996);Leroy G.Wade,Compendium Of Organic Synthetic Methods(1980);保护性基团的一些例子可见于T.W.Greene和P.G.M.Wuts,Protective Groups In Organic Synthesis(3rd ed.1991)。参见例如Helmut Vorbrüggen,Handbook of Nucleoside Synthesis(2001)。

[0513] 保护性基团R<sup>P</sup>的例子包括Fmoc(芴基甲氧羰基)。

[0514] 保护性基团R<sup>P</sup>的例子包括Boc(叔丁氧羰基)。

[0515] 保护性基团R<sup>P</sup>的例子包括OTrt(邻三苯甲基)。

[0516] 氨基保护性基团R<sup>P</sup>的例子包括Ac(乙酰胺(C=O)CH<sub>3</sub>)。

[0517] 氨基保护性基团的例子包括Fmoc、Boc、Trt、Dde和Alloc。

[0518] 保护性烷氧基基团的例子包括OTrt、OClt、OMmt、OMtt、ODpm和OtBu。

[0519] 保护性基团的例子包括叔丁基醚。

[0520] 羧酸保护性基团的例子包括苄酯。

[0521] 阳离子型脂质和可离子化脂质

[0522] 本公开内容的阳离子型脂质和可离子化脂质的例子给出于US20130022665A和US20130330401A中。

[0523] HEDC的结构记载于US2013/0022665A的[0146]段。

[0524] S104的结构记载于US 2013/0115274A1的[0046]段。

[0525] 含三种或多种组分的组合物

[0526] 如本文中使用的,制剂的组分,如“脂质”,可以是一种化合物,或者可以是一种或多种合适的脂质化合物的组合。例如,“稳定剂脂质”可指一种稳定剂脂质,或指一种或多种合适的稳定剂脂质的组合。本领域技术人员可以方便地理解本文所述化合物的某些组合可以在无需过度实验的条件下使用,且化合物的各种组合都被涵盖在制剂组分的描述中。

[0527] 本发明的组合物的可离子化化合物可以是组合物的脂质组分的20mol%至80mol%。在某些实施方式中,组合物的可离子化分子可以是组合物的脂质组分的55mol%至65mol%。在其他实施方式中,组合物的可离子化分子可以是组合物的脂质组分的约60mol%。

[0528] 本发明的组合物的结构性脂质可以是组合物的脂质组分的20mol%至50mol%。在某些实施方式中,组合物的结构性脂质可以是组合物的脂质组分的35mol%至45mol%。

[0529] 用于降低组合物的免疫原性的一种或多种脂质可以是组合物的脂质组分的总计1mol%至8mol%。在某些实施方式中,用于降低组合物的免疫原性的一种或多种脂质可以是组合物的脂质组分的总计1mol%至5mol%。

[0530] 在其他方面,本发明的组合物还可以包括阳离子型脂质,其可以是组合物的脂质组分的5mol%至25mol%。在某些实施方式中,本发明的组合物还可以包括阳离子型脂质,

其可以是组合物的脂质组分的5mol%至15mol%。在这些方面中,本发明的组合物的阳离子型脂质与可离子化分子的浓度的摩尔比可以是5:80至25:50。

[0531] 在本发明的组合物中,全部脂质组分可包含一种或多种可离子化化合物分子组分、结构性脂质和一种或多种用于降低组合物的免疫原性的脂质。

[0532] 除了上述组分外,本发明的组合物还可以包括本公开内容的膜融合分子。膜融合分子可以是组合物的1-10mol%。

[0533] 含四种或多种组分的组合物

[0534] 本发明的组合物的可离子化分子可以是组合物的脂质组分的15mol%至40mol%。在某些实施方式中,组合物的可离子化分子可以是组合物的脂质组分的20mol%至35mol%。在其他实施方式中,组合物的可离子化分子可以是组合物的脂质组分的25mol%至30mol%。

[0535] 本发明的组合物的结构性脂质可以是组合物的脂质组分的25mol%至40mol%。在某些实施方式中,组合物的结构性脂质可以是组合物的脂质组分的30mol%至35mol%。

[0536] 本发明的组合物的稳定剂脂质的总和可以是组合物的脂质组分的25mol%至40mol%。在某些实施方式中,组合物的稳定剂脂质的总和可以是组合物的脂质组分的30mol%至40mol%。

[0537] 在一些实施方式中,本发明的组合物可包含两种或多种稳定剂脂质,其中每种稳定剂脂质可以单独是组合物的脂质组分的5mol%至35mol%。在某些实施方式中,本发明的组合物可包含两种或多种稳定剂脂质,其中每种稳定剂脂质可以单独是组合物的脂质组分的10mol%至30mol%。

[0538] 在某些实施方式中,一种或多种稳定剂脂质的总和可以是组合物的脂质的25mol%至40mol%,其中每种稳定剂脂质可以单独是5mol%至35mol%。

[0539] 在某些实施方式中,一种或多种稳定剂脂质的总和可以是组合物的脂质的30mol%至40mol%,其中每种稳定剂脂质可以单独是10mol%至30mol%。

[0540] 用于降低组合物的免疫原性的一种或多种脂质可以是组合物的脂质组分的总计1mol%至8mol%。在某些实施方式中,用于降低组合物的免疫原性的一种或多种脂质可以是组合物的脂质组分的总计1mol%至5mol%。

[0541] 在其他方面,本发明的组合物还可以包括阳离子型脂质,其可以是组合物的脂质组分的5mol%至25mol%。在某些实施方式中,本发明的组合物还可以包括阳离子型脂质,其可以是组合物的脂质组分的5mol%至15mol%。在这些方面中,本发明的组合物的阳离子型脂质与可离子化分子的浓度的摩尔比可以是5:35至25:15。

[0542] 在某些实施方式中,组合物的全部脂质组分可包含一种或多种可离子化化合物分子组分、结构性脂质、一种或多种用于降低组合物的免疫原性的脂质、和一种或多种稳定剂脂质。

[0543] 除了上述组分外,本发明的组合物还可以包括本公开内容的膜融合分子。膜融合分子可以是组合物的1-10mol%。

[0544] 脂质组合物的例子

[0545] 在一些实施方式中,组合物可含有一种或多种可离子化分子、结构性脂质、一种或多种用于降低组合物的免疫原性的脂质、和本发明的膜融合分子,其将代表组合物的100%

的脂质组分。在某些实施方式中,可以包括阳离子型脂质。

[0546] 本发明的组合物的例子示于表1中。

[0547] 表1:脂质组分的组成(各自占总量的mol%)

	可离子化	阳离子型	结构性	降低免疫原性	膜融合
	60	0	30	8	2
	60	0	33	5	2
	55	0	42	1	2
	65	0	31	3	1
[0548]	60	0	33	4	3
	65	0	28	3	4
	70	0	20	5	5
	66	0	20	6	8
	73	0	15	2	10
	50	10	33	5	2
	55	15	23	5	2
	55	19	19	5	2

[0549] 本发明的组合物的例子示于表2中。

[0550] 表2:脂质组分的组成(各自占总量的mol%)

	可离子化	阳离子型	结构性	稳定剂	降低免疫原性	膜融合
	17	0	35	38	8	2
	20	0	32	40	5	3
	25	0	35	37	1	2
	25	0	34	34	5	2
[0551]	25	0	28	38	5	4
	25	0	40	27	5	3
	30	0	25	38	5	2
	35	0	24	34	5	2
	40	0	29	24	5	2
	25	5	30	32	5	3
	25	10	28	28	5	4
	25	15	25	30	3	2

[0552] 结构性脂质

[0553] 结构性脂质的例子包括胆固醇、甾醇和类固醇。

[0554] 结构性脂质的例子包括胆烷、胆甾烷、麦角甾烷、菜油甾烷 (campestanes)、多孔甾烷 (poriferastanes)、豆甾烷 (stigmastanes)、珊瑚甾烷 (gorgostanes)、羊毛甾烷、腺甾烷 (gonanes)、雌甾烷、雄甾烷、孕甾烷和环菠萝烷。

[0555] 结构性脂质的例子包括甾醇和动物甾醇, 如胆固醇、羊毛甾醇、酵母甾醇 (zymosterol)、酵母甾烯醇 (zymostenol)、链甾醇 (desmosterol)、豆甾烷醇、二氢羊毛甾醇和7-脱氢胆固醇。

[0556] 结构性脂质的例子包括PEG化胆固醇和胆甾烷-3-酮-(C1-22) 酰基化合物, 例如胆固醇乙酸酯、胆固醇花生四烯酸酯、胆固醇丁酸酯、胆固醇己酸酯、胆固醇肉豆蔻酸酯、胆固醇棕榈酸酯、胆固醇山嵛酸酯、胆固醇硬脂酸酯、胆固醇辛酸酯、胆固醇正癸酸酯、胆固醇十二酸酯、胆固醇神经酸酯、胆固醇壬酸酯、胆固醇正戊酸酯、胆固醇油酸酯、胆固醇反油酸酯、胆固醇芥酸酯、胆固醇庚酸酯、胆固醇反亚油酸酯和胆固醇亚油酸酯。

[0557] 结构性脂质的例子包括甾醇如植物甾醇、 $\beta$ -谷甾醇、菜油甾醇、麦角甾醇、菜籽甾醇 (brassicasterol)、 $\delta$ -7-豆甾醇和 $\delta$ -7-燕麦甾醇。

[0558] 稳定剂脂质

[0559] 稳定剂脂质的例子包括两性离子型脂质。

[0560] 稳定剂脂质的例子包括化合物如磷脂。

[0561] 磷脂的例子包括磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、磷脂酸、棕榈酰油酰磷脂酰胆碱、溶血磷脂酰胆碱、溶血磷脂酰乙醇胺、二棕榈酰卵磷脂、二油酰磷脂酰胆碱和二亚油酰磷脂酰胆碱。

[0562] 稳定剂脂质的例子包括磷脂酰乙醇胺化合物和磷脂酰胆碱化合物。

[0563] 稳定剂脂质的例子包括1,2-二油酰-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱(DOPC)。

[0564] 稳定剂脂质的例子包括二植烷酰磷脂酰乙醇胺(DPhPE)和1,2-二植烷酰-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱(DPhPC)。

[0565] 稳定剂脂质的例子包括1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DSPC)、1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DPPC)、1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DPPE)和1,2-二油酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)。

[0566] 稳定剂脂质的例子包括1,2-二月桂酰-sn-甘油(DLG);1,2-二肉豆蔻酰-sn-甘油(DMG);1,2-二棕榈酰-sn-甘油(DPG);1,2-二硬脂酰-sn-甘油(DSG);1,2-二花生四烯酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DAPC);1,2-二月桂酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DLPC);1,2-二肉豆蔻酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DMPC);1,2-二棕榈酰-sn-甘油-0-ethyl-3-磷酸胆碱(DPePC);1,2-二月桂酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DLPE);1,2-二肉豆蔻酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DMPE);1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DSPE);1-棕榈酰-2-亚油酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱;1-棕榈酰-2-油酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱(POPC);1-棕榈酰-2-溶血-sn-甘油-3-磷酸胆碱(P-Lyso-PC);和1-硬脂酰-2-溶血-sn-甘油-3-磷酸胆碱(S-Lyso-PC)。

[0567] 用于降低免疫原性的脂质

[0568] 用于降低免疫原性的脂质的例子包括多聚化合物和聚合物-脂质缀合物。

[0569] 用于降低免疫原性的脂质的例子包括具有聚乙二醇(PEG)区域的PEG化脂质。PEG区域可以是任何分子量。在一些实施方式中,PEG区域可具有200、300、350、400、500、550、750、1000、1500、2000、3000、3500、4000或5000Da的分子量。

[0570] 用于降低免疫原性的脂质的例子包括具有甲氧基聚乙二醇区域的化合物。

[0571] 用于降低免疫原性的脂质的例子包括具有羰基-甲氧基聚乙二醇区域的化合物。

[0572] 用于降低免疫原性的脂质的例子包括具有多分支的PEG区域的化合物。

[0573] 用于降低免疫原性的脂质的例子包括具有聚甘油区域的化合物。

[0574] 用于降低免疫原性的脂质的例子包括聚合脂质,如DSPE-mPEG、DMPE-mPEG、DPPE-mPEG和DOPE-mPEG。

[0575] 用于降低免疫原性的脂质的例子包括PEG-磷脂和PEG-神经酰胺。

[0576] 阳离子型脂质

[0577] 阳离子型脂质的例子包括阳离子型HEDC(2-(双(2-(十四酰氧基)乙基)氨基)-N-(2-羟乙基)-N,N-二甲基-2-氧代乙铵溴化物,2-(bis(2-(tetradecanoyloxy)ethyl)amino)-N-(2-hydroxyethyl)-N,N-dimethyl-2-oxoethan-aminium bromide)化合物,如US 2013/0330401 A1中所述。阳离子型脂质的一些例子给出US 2013/0115274 A1中。

[0578] 脂质组合物

[0579] 在一些实施方式中,组合物可以含有膜融合分子、可离子化化合物、胆固醇、脂质DOPC和DOPE、和DPPE-mPEG。在某些实施方式中,膜融合分子可以是组合物的1-20mol%,可离子化分子可以是组合物的15至25mol%;胆固醇、DOPC和DOPE组合起来可以是组合物的75至85mol%;DPPE-mPEG可以是组合物的2-5mol%。

[0580] 在一个实施方式中,膜融合分子可以是组合物的2mol%,可离子化分子可以是组合物的24mol%;胆固醇可以是组合物的29mol%,DOPC可以是组合物的20mol%,DOPE可以

是组合物的20mol%；DPPE-mPEG(2000)可以是组合物的5mol%。

#### [0581] 纳米颗粒

[0582] 本发明的实施方式可以提供脂质体纳米颗粒组合物。本发明的膜融合分子可用于形成脂质体组合物,其可以具有一种或多种脂质样分子的双层结构。

[0583] 纳米颗粒组合物可以在脂质体结构、双层结构、微囊(micelle)、分层结构、或其混合物中具有一种或多种本发明的膜融合分子。

[0584] 在一些实施方式中,组合物可包含一种或多种液体载剂组分。适用于递送本发明的活性剂的液体载剂(liquid vehicle)可以是药学上可接受的液体载剂。液体载剂可包含有机溶剂、或水与有机溶剂的组合。

[0585] 本发明的实施方式可以提供具有10至1000nm的大小的脂质纳米颗粒。在一些实施方式中,脂质体纳米颗粒可具有10至150nm的大小。

#### [0586] 药物组合物

[0587] 本发明还涉及用于将活性剂分配至对象的器官以治疗纤维化的方法,其中向对象施予本发明的组合物。可被治疗的器官包括肺、肝脏、胰腺、肾脏、结肠、心脏、骨髓、皮肤、肠、大脑和眼。

[0588] 在一些实施方式中,本发明提供了用于治疗肺纤维化疾病的方法,其中向对象施予本发明的组合物。

[0589] 纤维化疾病的例子包括特发性肺纤维化和肝硬化。

[0590] 在其他方面,本发明提供了一系列的药物制剂。

[0591] 本文中的药物制剂可包含活性剂、以及药物载体、或本发明的脂质、和药学上可接受的载体或稀释剂。

[0592] 一般而言,本说明书的活性剂包括siRNA、用于纤维化的活性剂、以及任何小分子药物。活性剂可以是核酸、siRNA、mRNA或microRNA。

[0593] 本文中的药物制剂可含有以下的一种或多种:表面活性剂、稀释剂、赋形剂、防腐剂、稳定剂、染料和悬浮剂。

[0594] 一些用于药物制剂的药物载体、稀释剂和组分、以及用于配制和施予本发明的化合物和组合物的方法记载于Remington's Pharmaceutical Sciences,18th Ed.,Mack Publishing Co.,Easton,Penn.(1990)中。

[0595] 防腐剂的例子包括苯甲酸钠、抗坏血酸和对羟基苯甲酸的酯。

[0596] 表面活性剂的例子包括醇、酯、硫酸化脂肪醇。

[0597] 赋形剂的例子包括蔗糖、葡萄糖、乳糖、淀粉、结晶纤维素、甘露醇、轻质无水硅酸、铝酸镁、硅酸铝镁、合成的硅酸铝、碳酸钙、酸式碳酸钠、磷酸氢钙和羧甲基纤维素钙。

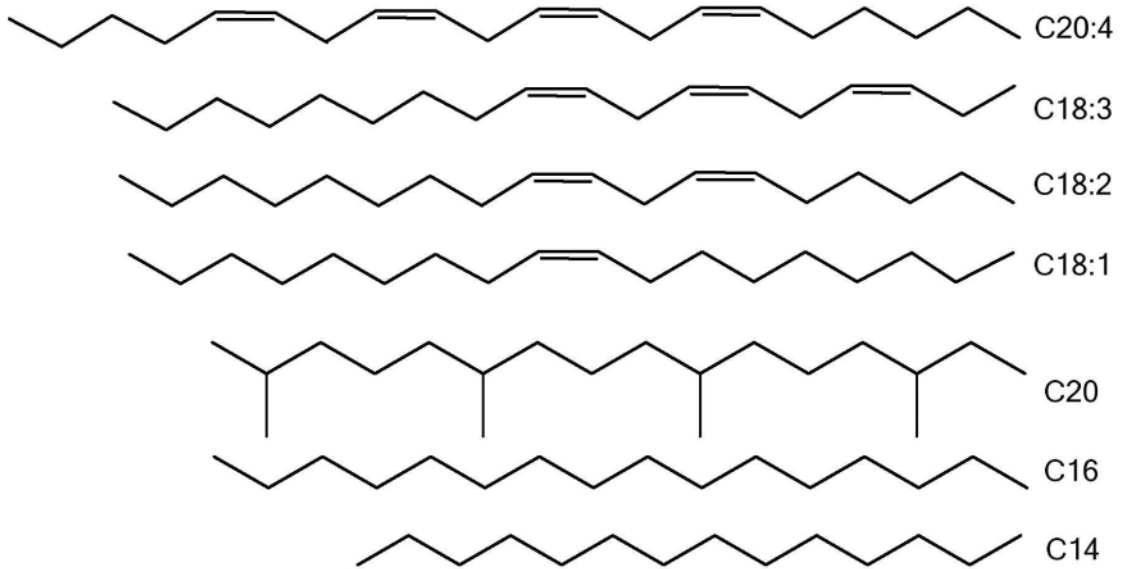
[0598] 悬浮剂的例子包括椰子油、橄榄油、芝麻油、花生油、大豆油、乙酸邻苯二甲酸纤维素、乙酸甲酯-甲基丙烯酸酯共聚物、和邻苯二甲酸酯。

#### [0599] 分子尾部的结构

[0600] 本发明的化合物可具有一条或多条含有一个或多个烷基或烯基的亲脂性尾部。具有烯基的亲脂性尾部的例子包括C(14:1(5))烯基、C(14:1(9))烯基、C(16:1(7))烯基、C(16:1(9))烯基、C(18:1(3))烯基、C(18:1(5))烯基、C(18:1(7))烯基、C(18:1(9))烯基、C(18:1(11))烯基、C(18:1(12))烯基、C(18:2(9,12))烯基、C(18:2(9,11))烯基、C(18:3(9,

12,15)) 烯基、C(18:3(6,9,12)) 烯基、C(18:3(9,11,13)) 烯基、C(18:4(6,9,12,15)) 烯基、C(18:4(9,11,13,15)) 烯基、C(20:1(9)) 烯基、C(20:1(11)) 烯基、C(20:2(8,11)) 烯基、C(20:2(5,8)) 烯基、C(20:2(11,14)) 烯基、C(20:3(5,8,11)) 烯基、C(20:4(5,8,11,14)) 烯基、C(20:4(7,10,13,16)) 烯基、C(20:5(5,8,11,14,17)) 烯基、C(20:6(4,7,10,13,16,19)) 烯基、C(22:1(9)) 烯基、C(22:1(13)) 烯基、和C(24:1(9)) 烯基。尾部结构的一些例子可见于 Donald Voet和Judith Voet,Biochemistry,第三版(2005),p.383中。

[0601] 亲脂性尾部的一些例子包括以下结构：

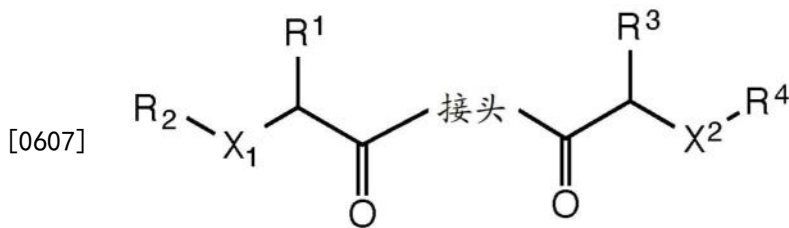


[0603] 亲脂性尾部的任何这些示例结构可具有一个或多个其他的化学分支。

[0604] 其他实施方式

[0605] 本发明的实施方式还包括：

[0606] 化学式(A)的化合物，

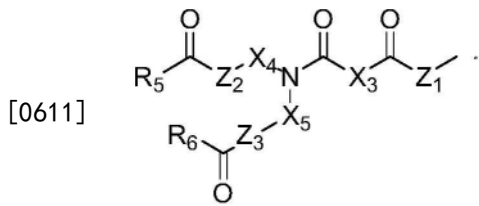


化学式(A)

[0608] 其中接头是包含PEG部分的二价基团，

[0609]  $X_1$ 和 $X_2$ 独立地为C1-C5链烷二基，

[0610]  $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 和 $R_4$ 独立地为



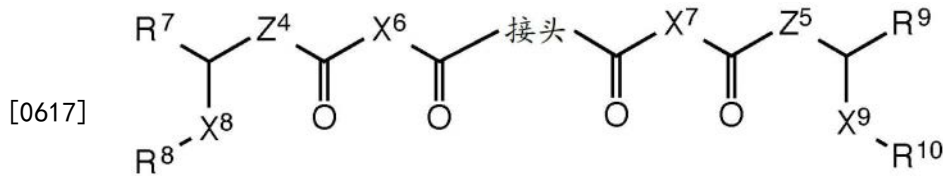
[0612]  $X_3$ 是单键、C1-C5链烷二基或C2-C5烯二基，

[0613]  $X_4$ 和 $X_5$ 独立地为C2-5链烷二基，

[0614]  $Z_1$ 、 $Z_2$ 和 $Z_3$ 独立地为-O-、-S-或-NH-，并且

[0615]  $R_5$ 和 $R_6$ 独立地为C11-23烷基或C11-23烯基。

[0616] 化学式(B)的化合物，



化学式(B)

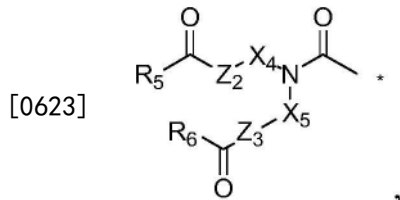
[0618] 其中接头是包含PEG部分的二价基团，

[0619]  $X_6$ 和 $X_7$ 独立地为C1-C5链烷二基，

[0620]  $X_8$ 和 $X_9$ 独立地为C1-C5链烷二基，

[0621]  $Z_4$ 和 $Z_5$ 独立地为-O-、-S-或-NH-，

[0622]  $R_7$ 、 $R_8$ 、 $R_9$ 和 $R_{10}$ 独立地为

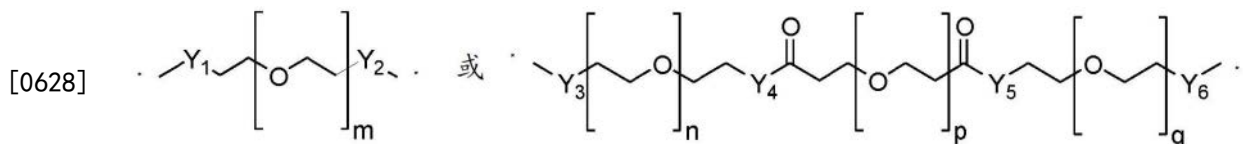


[0624]  $X_4$ 和 $X_5$ 独立地为C2-5链烷二基，

[0625]  $Z_2$ 和 $Z_3$ 独立地为-O-、-S-或-NH-，并且

[0626]  $R_5$ 和 $R_6$ 独立地为C11-23烷基或C11-23烯基。

[0627] 上述化合物，其中接头是



[0629] 其中m是1-12的整数，

[0630]  $Y_1$ 是-O-、-NH-或-NHCH<sub>2</sub>-，

[0631]  $Y_2$ 是-O-、-NH-或-CH<sub>2</sub>NH-，

[0632] n和q独立地为1-5的整数，

[0633] p是0-5的整数，

[0634]  $Y_3$ 和 $Y_5$ 独立地为-O-、-NH-或-NHCH<sub>2</sub>-，并且

[0635]  $Y_4$ 和 $Y_6$ 独立地为-O-、-NH-或-CH<sub>2</sub>NH-。

[0636] 上述化合物，其中 $X_1$ 和 $X_2$ 独立地为C1-C5直链烷二基，优选是C2-C4直链烷二基，更优选是C4直链烷二基。

[0637] 上述化合物，其中 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 和 $R_4$ 是相同的基团。

[0638] 上述化合物，其中 $X_3$ 是单键或C1-C5直链烷二基， $X_3$ 优选的是C2-C4直链烷二基，更优选是亚乙基，即乙烷二基。

[0639] 上述化合物，其中 $X_4$ 和 $X_5$ 独立地为C2-5直链烷二基， $X_4$ 和 $X_5$ 优选是C2-4直链烷二基，更优选是亚乙基，即乙烷二基。

- [0640] 上述化合物,其中 $Z_1$ 是-NH-。
- [0641] 上述化合物,其中 $Z_2$ 和 $Z_3$ 是-O-。
- [0642] 上述化合物,其中 $R_5$ 和 $R_6$ 独立地为C11-23直链烯基。
- [0643] 上述化合物,其中 $R_5$ 和 $R_6$ 独立地为含1-6个双键的C11-23直链烯基,其中双键的数量优选是1-3,更优选是2-3,更进一步优选是2。
- [0644] 上述化合物,其中 $R_5$ 和 $R_6$ 独立地为含2个双键的C11-23直链烯基。
- [0645] 上述化合物,其中 $R_5$ 和 $R_6$ 独立地为C13-17直链烯基, $R_5$ 和 $R_6$ 优选是C15-17直链烯基,更优选是C17直链烯基。
- [0646] 上述化合物,其中 $R_5$ 和 $R_6$ 独立地为C17直链烯基。
- [0647] 上述化合物,其中 $R_5$ 和 $R_6$ 是十七碳-8,11-二烯基。
- [0648] 组合物,其在包含双层脂质分子的脂质纳米颗粒中包含阳离子型脂质、可离子化脂质和上述化合物的脂质。
- [0649] 上述组合物,其还包含核酸。
- [0650] 上述组合物,其中核酸是siRNA、mRNA或microRNA。
- [0651] 上述组合物,其中组合物是药物组合物。
- [0652] 化学定义
- [0653] 本文中使用的术语“烷基”指饱和脂肪族基团的烃基,除非另外说明,其可以是任何长度。烷基基团可以是含有1至22个碳原子的分支的或未分支的、取代或未取代的脂肪族基团。该定义还应用于其他基团的烷基部分,例如环烷基、烷氧基、烷酰基和芳烷基。
- [0654] 如本文中使用的,例如,术语如“C(1-5)烷基”包括C(1)烷基、C(2)烷基、C(3)烷基、C(4)烷基和C(5)烷基。同样地,例如,术语“C(3-22)烷基”包括C(1)烷基、C(2)烷基、C(3)烷基、C(4)烷基、C(5)烷基、C(6)烷基、C(7)烷基、C(8)烷基、C(9)烷基、C(10)烷基、C(11)烷基、C(12)烷基、C(13)烷基、C(14)烷基、C(15)烷基、C(16)烷基、C(17)烷基、C(18)烷基、C(19)烷基、C(20)烷基、C(21)烷基和C(22)烷基。
- [0655] 如本文中使用的,烷基可以通过术语命名,如Me(甲基, -CH<sub>3</sub>)、Et(乙基, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)、Pr(任意的丙基)、<sup>n</sup>Pr(n-Pr, 正丙基)、<sup>i</sup>Pr(i-Pr, 异丙基)、Bu(任意的丁基)、<sup>n</sup>Bu(n-Bu, 正丁基)、<sup>i</sup>Bu(i-Bu, 异丁基)、<sup>s</sup>Bu(s-Bu, 仲丁基)和<sup>t</sup>Bu(t-Bu, 叔丁基)。
- [0656] 如本文中使用的,术语“烯基”指具有至少一个碳碳双键的烃基。烯基可以是具有2至22个碳原子和至少一个碳碳双键的分支的或未分支的、取代或未取代的烃基。“烯基”基团具有一个或多个碳碳双键。
- [0657] 如本文中使用的,术语“取代的”指具有一个或多个取代或取代基的原子,其可以是相同或不同的,可包括氢取代基。因此,例如,术语烷基、环烷基、烯基、烷氧基、烷酰基和芳基指可包括被取代的变化的基团。被取代的变化包括线性的、分支的和环状的变化、和基团具有替代一个或多个与基团的任意碳原子连接的氢的取代基。
- [0658] 一般而言,化合物可以含有一个或多个手性中心。含有一个或多个手性中心的化合物可包括描述为“异构体”、“立体异构体”、“非对映异构体”、“对映异构体”、“光学异构体”或“外消旋混合物”的。立体化学命名的惯例(例如Cahn, Ingold和Prelog的立体异构体命名规则)、以及用于确定立体化学和分离立体异构体的方法是本领域已知的。参见例如Michael B. Smith和Jerry March, March's Advanced Organic Chemistry, 5th edition,

2001。本公开内容的化合物和结构(包括化学附图)意在涵盖所有可能的、对于具体化合物或结构被理解为存在的异构体、化学上合理的位置异构体、立体异构体、非对映异构体、对映异构体和/或光学异构体,包括其任意的化合物、外消旋或其他。

[0659] 本发明涵盖了本文公开的化合物和组合物的任意的和所有的互变异构、溶剂化或非溶剂化、水合或非水合的形式,以及任意的原子同位素形式。

[0660] 本发明涵盖了本文公开的化合物和组合物的任意的和所有的晶体多态性或不同的晶型。

[0661] 使用的缩写:

[0662] DMAP-4-N,N-二甲基氨基吡啶

[0663] DCM-二氯甲烷

[0664] TEA-三乙胺

[0665] EDC-1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐

[0666] Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-硫酸钠

[0667] EtOAc-乙酸乙酯

[0668] DMF-N,N-二甲基甲酰胺

[0669] ELSD-蒸发光散射检测仪

[0670] NaCl-氯化钠

[0671] K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-碳酸钾

[0672] MeOH-甲醇

[0673] TFA-三氟乙酸

[0674] DIEA-N,N-二异丙基乙胺

[0675] PEG-聚乙二醇,也称为聚氧化乙烯

[0676] MgSO<sub>4</sub>-硫酸镁

[0677] LCMS-液相色谱-质谱

[0678] NaHCO<sub>3</sub>-碳酸氢钠

[0679] H<sub>2</sub>O-水

[0680] HCl-盐酸

[0681] KI-碘化钾

[0682] DMSO-二甲基亚砷

[0683] TBAF-四正丁基氟化铵

[0684] NaBH<sub>4</sub>-硼氢化钠

[0685] THF-四氢呋喃

[0686] TBDMS-叔丁基二甲基硅烷基

[0687] LiOH-氢氧化锂

[0688] MeI-碘甲烷

[0689] BOC-叔丁氧羰基

[0690] Fmoc-芴甲氧羰基

## 实施例

[0691] 实施例1:本发明的膜融合分子可用于递送一种或多种生物活性剂至细胞内。在该实施例中显示,本发明的膜融合分子为靶向HSP47的示例siRNA的基因表达敲低提供了惊人的活性递送。示例siRNA是在含有膜融合分子的脂质体制剂中递送的。本发明的膜融合分子在递送制剂中的存在令人惊讶地提供了用于通过示例siRNA实现基因表达敲低的制剂的高活性。

[0692] 根据下述实验规程,在DMEM培养基中使用大鼠星状细胞测量使用siRNA的基因表达敲低的体外活性:在转染前一天,用100 $\mu$ l含有10%FBS的培养基按以星状细胞计每孔 $3 \times 10^3$ 个细胞的量将细胞接种至96孔板中,在含有5%CO<sub>2</sub>的湿润气氛的37 $^{\circ}$ C恒温箱中培养。在转染前,将培养基更换为90 $\mu$ l不含抗生素的培养基。在PBS溶液中制备从管收集的溶液的适当稀释液,使得向每孔添加10 $\mu$ l足以达到所期望的浓度。在转染48小时后,用冰冷的PBS清洗细胞一次。在室温下,用50 $\mu$ l Cell-to-Ct裂解缓冲液裂解细胞5-30分钟。添加5 $\mu$ l终止溶液,在室温孵育2分钟。立即用TAQMAN通过qPCR测量mRNA水平。或者,可以将样品于-80 $^{\circ}$ C冷冻,并在之后测定。对于qRT-PCR测定:将所有试剂在冰上解冻。在0.2ml PCR管中将已合并的试剂进行混合。将备好的混合物分配到384孔板中,10 $\mu$ l/孔 $\times$ 3。用薄膜密封平板,将混合物下旋至孔底部。实施qRT-PCR测定。

[0693] 在该实施例中,使用HSP47 siRNA来敲低HSP47基因。对于TaqMan基因表达检测,使用HSP47基因特异性的TaqMan探针。

[0694] 在大鼠星状细胞中的体外基因沉默活性的实验结果示于表3和4中。

[0695] 表3:大鼠星状细胞中的体外活性

样品	剂量 (nM) 下的表达%			剂量 (nM) 下的表达%		
	50 nM	200 nM		18 nM	75 nM	300 nM
对照 (PBS)	110	92		80	80	36
化合物 R4	44	15		16	10	6
化合物 S6				97	80	33
[0696] 化合物 S7				57	48	27
化合物 S8				74	64	42
化合物 T1				76	68	44
化合物 T2				82	70	44
化合物 T3				10	8	5
化合物 T4				82	70	44

[0697] 表4:大鼠星状细胞中的体外活性

样品	剂量 (nM) 下的表达%		
	18 nM	75 nM	300 nM
对照 (PBS)	88	88	88
化合物 T3	36	15	3
化合物 T4	27	10	8
化合物 T5	29	13	11
化合物 T6	30	12	5
化合物 T7	51	20	8
化合物 T8	29	9	8
化合物 T9	100	65	36

[0699] 这些数据显示,含有本发明的膜融合分子的siRNA制剂对于递送活性siRNA试剂至细胞内是惊人地有效的。表明本发明的膜融合分子为靶向HSP47的示例siRNA的基因表达敲低提供了惊人的活性递送。

[0700] 实施例2:一系列的本发明的膜融合分子表现出可用于递送活性剂至细胞中。在该实施例中显示,一系列的本发明的膜融合分子为靶向HSP47的示例siRNA的基因表达敲低提供了惊人的活性递送。示例siRNA是在含有膜融合分子的脂质体制剂中递送的。

[0701] 在星状细胞中测量到的基因表达敲低的体外活性示于表5中,其使用的是在含有各种本发明的膜融合分子的脂质体制剂中的示例siRNA。

[0702] 表5:星状细胞中的HSP47表达%

样品	siRNA 浓度		
	18 nM	75 nM	300 nM
仅细胞	108	108	108
细胞+ PBS	100	100	100
化合物 T10	11.1	4.2	1.9
化合物 T11	11.1	4.5	1.8
化合物 T12	40.2	8.4	2.7
化合物 T13	21.8	6.4	3.1
化合物 T14	103.3	59.1	5.2
化合物 T3	13.2	4.5	2.3

[0704] 如表5所示,本发明的膜融合分子在脂质体递送制剂中的存在令人惊讶地提供了

用于通过示例siRNA实现基因表达敲低的制剂的高活性。

[0705] 实施例3:本发明的膜融合分子对于增加活性剂在细胞内的递送活性是惊人的有效的。与不含有本发明的膜融合分子的脂质体制剂的活性相比,在含有本发明的膜融合分子的脂质体制剂中递送的试剂的活性被极大地增加。

[0706] 在该实施例中,使用包括本发明的化合物R4的存在的脂质体递送制剂,令人惊讶地增加了靶向HSP47的示例siRNA的基因表达敲低活性。

[0707] 根据以下规程制备脂质体递送制剂:将HEDC(2-(双(2-(十四酰氧基)乙基)氨基)-N-(2-羟乙基)-N,N-二甲基-2-氧代乙铵溴化物)和S104(((2-((2-(二甲基氨基)乙基)硫基)乙酰基)脲二基)双(乙烷-2,1-二基)双十四烷酸酯)以摩尔比1:1溶解在无水EtOH(200proof)中。将HSP47 siRNA溶解在50mM柠檬酸缓冲液中,将温度调节至35-40°C。然后,将乙醇/脂质混合物添加到含有siRNA的缓冲液中,并进行搅拌使其自发形成负载有siRNA的脂质体。将脂质与siRNA组合达到最终总脂质与siRNA的比例为5:1至15:1(wt:wt)。相对10×体积的PBS(pH7.2)透析负载有siRNA的脂质体,去除乙醇并更换缓冲液。终产物通过0.22μm灭菌级PES滤器过滤,以减少生物负荷。

[0708] 在该实施例中,关于在大鼠星状细胞中使用示例siRNA的基因表达敲低的体外活性,按与实施例1相同的方式执行。结果示于图46中。脂质体制剂包含脂质HEDC和S104、以及膜融合化合物。

[0709] 在图46中,包含脂质HEDC和S104、不含有膜融合化合物的脂质体制剂的结果被标示为(1)。该对照制剂的HSP47基因表达敲低仅在300nm的最高浓度下是充分的。

[0710] 在图46中,包含脂质HEDC和S104、且含有膜融合化合物R4的脂质体制剂的结果被标示为(2)。该制剂中的膜融合化合物R4的量是总脂质的2%。与不含有膜融合化合物R4的对照制剂相比,该制剂的HSP47基因表达敲低在所有的siRNA浓度下均大幅且惊人地增加。因此,制剂中膜融合化合物R4的存在极大地增加了示例siRNA的递送活性,而增加的活性直接归因于膜融合化合物R4的存在。

[0711] 在图46中,包含脂质HEDC和S104、且含有膜融合化合物R4的脂质体制剂的结果被标示为(3)。该制剂中的膜融合化合物R4的量是总脂质的10%。与不含有膜融合化合物R4的对照制剂相比,该制剂的HSP47基因表达敲低在所有的siRNA浓度下均大幅且惊人地增加。因此,制剂中膜融合化合物R4的存在极大地增加了示例siRNA的递送活性,而增加的活性直接归因于膜融合化合物R4的存在。

[0712] 如图46所示,对于包含脂质HEDC和S104的脂质体递送制剂,靶向HSP47的示例siRNA在星状细胞中的基因表达敲低活性在含有2-10%(总脂质的)膜融合化合物R4的制剂中惊人地增加。

[0713] 实施例4:本发明的膜融合分子使得活性核酸试剂在细胞内的活性惊人地增加。与不含有本发明的膜融合分子的脂质体制剂的活性相比,在含有本发明的膜融合分子的脂质体制剂中递送的核酸试剂的活性被极大地增加。

[0714] 在该实施例中,关于在大鼠星状细胞中使用示例siRNA的基因表达敲低的体外活性,按与实施例1相似的方式执行。结果示于图47中。脂质体制剂包含脂质HEDC和S104、以及膜融合化合物。

[0715] 在图47中,包含脂质HEDC和S104、不含有本发明的任何膜融合化合物的脂质体制

剂的结果被标示为(1)。该对照制剂的HSP47基因表达敲低仅在300nm siRNA的最高浓度下是充分的。

[0716] 在图47中,包含脂质HEDC和S104、且含有膜融合化合物R4的脂质体制剂的结果被标示为(2)。该制剂中的膜融合化合物R4的量是总脂质的2%。与不含有膜融合化合物R4的对照制剂相比,该制剂的HSP47基因表达敲低在所有的siRNA浓度下均大幅且惊人地增加。因此,制剂中膜融合化合物R4的存在极大地增加了示例siRNA的递送活性,而增加的活性直接归因于膜融合化合物R4的存在。

[0717] 在图47中,包含脂质HEDC和S104、且含有膜融合化合物T3的脂质体制剂的结果被标示为(3)。该制剂中的膜融合化合物T3的量是总脂质的2%。与不含有膜融合化合物T3的对照制剂相比,该制剂的HSP47基因表达敲低在所有的siRNA浓度下均大幅且惊人地增加。因此,制剂中膜融合化合物T3的存在极大地增加了示例siRNA的递送活性,而增加的活性直接归因于膜融合化合物T3的存在。

[0718] 实施例5:本发明的膜融合分子对于在体外递送一种或多种生物活性分子是有效的。例如,由于在脂质体递送制剂中存在本发明的膜融合化合物,使用siRNA(HSP47 siRNA,参见实施例1)进行基因表达敲低的活性惊人地增加。

[0719] 在该实施例中,制备了比较性化合物以及膜融合化合物R4的脂质体递送制剂。脂质体递送制剂是按与实施例1相同的方式制备的,组合物示于表6中(CH指胆固醇)。

[0720] 表6:膜融合脂质体制剂

[0721]

编号	制剂	描述	类型	siRNA 终浓度 (nM)
1	HEDC:S104:DOPE:CH:DMPE-PEG	大量	对照	2000
2	HEDC:S104:DOPE:CH:DMPE-PEG:R1	大量	实验	2000
3	HEDC:S104:DOPE:CH:DMPE-PEG:R2	大量	实验	2000
4	HEDC:S104:DOPE:CH:DMPE-PEG:R3	大量	实验	2000
5	HEDC:S104:DOPE:CH:DMPE-PEG:R4	大量	实验	2000
6	HEDC:S104:DOPE:CH:DMPE-PEG:R5	大量	实验	2000
7	HEDC:S104:DOPE:CH:DMPE-PEG:S1	大量	实验	2000
8	HEDC:S104:DOPE:CH:DMPE-PEG:S2	大量	实验	2000
9	HEDC:S104:DOPE:CH:DMPE-PEG:S3	大量	实验	2000
10	HEDC:S104:DOPE:CH:DMPE-PEG:S4	大量	实验	2000

[0722] 如图24所示,对于表6的脂质体递送制剂,与不含有本发明的膜融合化合物的对照制剂相比,在含有2%(总脂质的)的本发明的膜融合化合物R4的制剂中,靶向HSP47的示例siRNA在星状细胞中的基因表达敲低活性惊人地增加。本发明的膜融合化合物R4的结构为示例siRNA在星状细胞中的基因表达敲低提供了惊人的递送活性。

[0723] 实施例6:本发明的膜融合脂质分子对于递送一种或多种生物活性分子至细胞内是有效的。在该实施例中,含有示例siRNA(HSP47siRNA,参见实施例1)、以及本发明的膜融合化合物的脂质体递送制剂为基因表达敲低提供了活性。在该实施例中,如表7所示,制备了含有各种化合物T3至T9(No.1至No.7)的siRNA的脂质体递送制剂,各含有2%(总脂质的)的本发明的膜融合化合物。脂质体递送制剂是按与实施例1相同的方式制备的。

[0724] 表7:膜融合脂质体制剂

[0725]	编号	制剂
	1	HEDC:S104:DOPE:CH:DMPE-PEG:T4
	2	HEDC:S104:DOPE:CH:DMPE-PEG:T5
	3	HEDC:S104:DOPE:CH:DMPE-PEG:T6
	4	HEDC:S104:DOPE:CH:DMPE-PEG:T7
	5	HEDC:S104:DOPE:CH:DMPE-PEG:T8
	6	HEDC:S104:DOPE:CH:DMPE-PEG:T9
	7	HEDC:S104:DOPE:CH:DMPE-PEG:T3

[0726] 如图25所示,在该对表7的siRNA的脂质体递送制剂的活性的测量中,制剂为星状细胞中的基因表达敲低提供了高活性。因此,含有2% (总脂质的)的本发明的膜融合化合物的制剂提供了靶向HSP47的siRNA的高活性。

[0727] 实施例7:膜融合制剂的体内活性。本发明的膜融合分子可用于体内递送活性剂。例如,由于存在本发明的膜融合化合物,用于使用靶向HSP47的示例siRNA进行基因表达敲低的脂质体递送制剂是有效的。

[0728] 如图26所示,使用靶向HSP47的siRNA,脂质体递送制剂表现出在体内(小鼠)的基因表达敲低活性。制剂含有2% (总脂质的)的本发明的规定膜融合化合物。制剂通过快速浓注(infusion bolus)进行递送。递送的参数示于表8中。

[0729] 表8:在体内的膜融合脂质体制剂

组号	制剂	剂量	浓度 (mg/ml)
#1	载剂生理盐水 10 mpk@第 0-2 天		
#2	HEDC:S104:DOPE:CH:DMPE-PEG:T4	0.5 mg/kg	0.17
#3	HEDC:S104:DOPE:CH:DMPE-PEG:T5	0.5 mg/kg	0.17
[0730] #4	HEDC:S104:DOPE:CH:DMPE-PEG:T6	0.5 mg/kg	0.17
#5	HEDC:S104:DOPE:CH:DMPE-PEG:T7	0.5 mg/kg	0.17
#6	HEDC:S104:DOPE:CH:DMPE-PEG:T8	0.5 mg/kg	0.17
#7	HEDC:S104:DOPE:CH:DMPE-PEG:T9	0.5 mg/kg	0.17
#8	HEDC:S104:DOPE:CH:DMPE-PEG:T3	0.5 mg/kg	0.17
#9	空白对照生理盐水		

[0731] 用于上述结果的规程示例如下。

### [0732] 1.1. 动物

[0733] 80只~49日龄的雄性Sprague-Dawley大鼠购自Charles River Laboratories,并运送至试验机构。在接收时,动物的平均体重是约200-210克。动物被饲养在标准的笼养系统中,每笼2只,处于交替的12小时昼/夜循环中。室温维持在64-79°F(18-26°C),湿度为30-70%,每小时至少用100%新鲜空气进行10次换气,而不重复循环。提供经辐射杀菌处理的合格标准新鲜的鼠粮和自来水,供动物随意食用。

[0734] 自0-5天,取72只动物进行DMN处理,然后基于其体重随机分为9组,每组8只大鼠,使得在siRNA处理前,组之间的体重没有显著差异。利用单边ANOVA分析进行了验证。如预期的那样,这些DMN-处理过的动物表现出显著低于未处理动物的体重。

### [0735] 1.2. DMN处理

[0736] DMN获得自Wako(批号DSP2369),通过以5mg/mL溶解化合物于磷酸盐缓冲生理盐水(PBS)中,制备用于腹腔内(IP)注射的制剂。从第0天至第2天,按2mL/kg的给药体积,每日给药10mg/kg DMN至72只大鼠,然后,从第3天至第5天,按1mL/kg的给药体积,每日给药5mg/kg。没有用DMN处理的8只动物被用作该工序的空白对照(sham)。每日称重动物,并相应地调整DMN剂量。

#### [0737] 1.3. siRNA处理

[0738] 在实验的第5天,将动物分配成不同的处理组,并用适当的给药方案给药。实验物质被分别用于处理组2至8(#1至#8);而组1(#1)的动物只通过尾侧静脉的单个静脉内注射接受3mL/kg载剂(生理盐水)。组9(原始组,#9)的动物不接受任何处理。

#### [0739] 1.4. 安乐死和尸检

[0740] 在实验的第6天,于处理后24小时,通过过量吸入二氧化碳使动物安乐死。立即用pH 7.4的PBS(40mL,流速20mL/分钟),通过肝门静脉冲洗肝脏,去除残留的血液和血液相关的制剂。从左外叶采集一片2mm厚的肝脏横切片,并立即浸泡在微量离心管中的2mL RNAlater中。样品储存于4°C下,直至用于RNA分离的进一步处置。

#### [0741] 1.6. RNA分析

[0742] 评估了肝脏样品中的HSP47 mRNA丰度。根据生产商的说明,使用RNeasy柱(Qiagen)提取总RNA。使用Nanodrop分光光度计定量每个样品的RNA浓度,然后用无核酸酶的水稀释至10ng/ $\mu$ l。每个PCR反应使用20ng的总RNA。简而言之,根据生产商的说明,使用RNeasy柱(Qiagen),从肝组织左叶切片提取总RNA。使用Nanodrop分光光度计进行RNA定量。用无核酸酶的水将RNA调节至10ng/ $\mu$ l。按96孔制式,在ViiA7系统中实施实时PCR。使用TaqMan Gene Expression Master Mix,对每个样品重复测量三次。循环程序设为48°C下15min、95°C下10min,再进行40个循环的95°C下15sec和60°C下1min。使用管家基因MRP119的平均循环阈值将原始循环阈值数据和 $\Delta$ Ct计算值归一化。通过从靶样品的每个目的基因(GOI)的 $\Delta$ Ct中减去对照样品的GOI的平均 $\Delta$ Ct,计算出每个目的基因(GOI)的 $\Delta$  $\Delta$ Ct。每只动物的数据既表述为平均载剂处理组的百分比,又表述为相对于原始组(naive group)的倍数变化。使用单边ANOVA,再用Dunnett事后多重比较,来分析siRNA处理组和载剂处理组之间的差异。对于所有的分析,小于0.05的p值被认为是显著的。

[0743] 实施例8:制备mRNA纳米颗粒。将阳离子型脂质如HEDC或HE2DC(2-(双(2-(棕榈酰氧基)乙基)氨基)-N,N-双(2-羟乙基)-N-甲基-2-氧代乙烷-1-铵溴化物)、可离子化脂质如S104或TU104 Dlin((9Z,9'Z,12Z,12'Z)-((2-((2-(二甲基氨基)乙基)硫基)乙酰基)脲二基)双(乙烷-2,1-二基)双(十八碳-9,12-二烯酸酯))、和辅助脂质胆固醇、DOPE溶解于乙醇中。将mRNA溶解于50mM柠檬酸缓冲液(pH 3.5)中。于37°C,以25mL/min的流速将适当量的脂质的乙醇溶液注射到含有mRNA的柠檬酸缓冲液中,由此制备脂质纳米颗粒(LNPs)。LNP组合物的摩尔百分比是20%HEDC、20%S104、30%DOPE(1,2-二油酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺)(Avanti Polar Lipid)、25%胆固醇(超纯级)(Wilshire Technologies)、5%DMPE-Peg(1,2-二肉豆蔻酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000])(铵盐)、和2%本发明的膜融合分子(例如化合物T3)。

[0744] 高速注射产生了mRNA的高度封装以及受控的颗粒大小分布。然后,用比例为1:1的20mM HEPES缓冲液和9%蔗糖(w/v)稀释混合的LNP溶液,从而将LNP溶液中的乙醇含量从

35%降低至17.5%。将稀释的LNP溶液转移到切向流过滤(TFF)工序进行超滤,并用9%蔗糖(w/v)中的20mM HEPES缓冲液透析。为了从LNP溶液中去除乙醇,使用总计10倍透析体积的9%蔗糖中的HEPES缓冲液。将从TFF浓缩的LNP溶液等分至离心过滤瓶(EMD Millipore)中进一步离心,然而,该步骤仅仅是小规模批次时需要的。在最终的浓缩后,通过0.2 $\mu$ m滤器过滤LNP。使用RiboGreen方法,计算封装效率和mRNA的产率。

[0745] 实施例9:体外转染递送mRNA至细胞。在3个不同的细胞系中用mRNA实施体外转染细胞:Hek-293、A549和肺成纤维细胞。使用JET MESSENGER (Polyplus Transfection Company)作为阳性转染对照。使用封装在本发明的LNP纳米颗粒中的、或与JET MESSENGER对照混合的GFP mRNA(TriLink),在不同浓度下转染细胞。在转染24、48和72小时后,在共聚焦显微镜下观察细胞,然后检测和捕捉从细胞中表达的GFP所产生的荧光。使用本发明的LNP纳米颗粒时,GFP mRNA被良好地转染到全部三个细胞系中,且mRNA被翻译。

[0746] 实施例10:体内转染递送mRNA至细胞。用本发明的LNP纳米颗粒在体内将mRNA转染到组织和细胞中。具有不同大小的两种不同的mRNA、GFP mRNA和荧光素酶mRNA(TriLink)被递送和转染到Balb/c小鼠中。在一些荧光素酶mRNA的递送研究中,还使用Viomer体内mRNA转染试剂作为阳性对照来递送mRNA。用封装在本发明的LNP纳米颗粒或阳性对照颗粒中的mRNA对动物静脉内给予单次注射,剂量为1.0、2.0或4.0mg/kg。在mRNA注射6-8小时后,麻醉小鼠,用IVIS系统检测和分析全身荧光,进行荧光素酶mRNA递送研究。然后,立即处死动物,收获不同的器官,并保存于-80 $^{\circ}$ C直到进一步分析。在GFP mRNA递送研究中,用MAXDISCOVER GFP ELISA试剂盒确定mRNA向各种组织和细胞的递送,以分析组织中的GFP蛋白质水平。对于荧光素酶mRNA递送研究,将组织在CCLR裂解缓冲液中均质化并离心。所获得的上清液用于使用Promega E4510检测试剂的荧光素酶活性检测。令人惊讶的是,GFP mRNA和荧光素酶mRNA都主要在肺和脾脏中转染和/或翻译,而在其他组织中的转染和/或翻译则低得多。

[0747] 实施例11:体外转染递送mRNA至细胞。

[0748] 根据上述实施例9和10所述的方法,用具有组合物HEDC:S104:CH:DOPE:DMPE-PEG2000:化合物T3的本发明的LNP纳米颗粒在体外将GFP mRNA(CleanCap EGF P mRNA, 5moU)转染至A549细胞。转染48小时后的结果示于图48中。在共聚焦显微镜下观察细胞,然后检测从细胞中表达的GFP所产生的荧光。结果显示GFP mRNA被转染到A549细胞中,并在其中翻译。

[0749] 实施例12:体内转染递送mRNA至细胞。

[0750] 根据上述实施例9和10所述的方法,用具有组合物HEDC:S104:CH:DOPE:DMPE-PEG2000:化合物T3的本发明的LNP纳米颗粒将GFP mRNA(CleanCap EGFP mRNA, 5moU)转染到Balb/c小鼠中,如表9所示:

[0751] 表9:Balb/c小鼠体内转染

组	动物数	处理	剂量	终点	
[0752]	1	4	iv, QD	1mpk	处理 8 小时后, IVIS 成像, 采集组织 (肌肉、肝脏、心脏、肺和肾脏), 通过 ELISA 测量 GFP 蛋白质
	2	4	iv, QD	4mpk	
	3	3	N/A	N/A	

[0753] 如图49所示,用MAXDISCOVER GFP ELISA确定mRNA在各种组织和细胞中的递送。令人惊讶的是,GFP mRNA在肺中被选择性地转染和/或翻译,而在肌肉、肝脏、心脏和肾脏中的转染和/或翻译较低。

[0754] 实施例13:体内转染递送mRNA至细胞。

[0755] 根据上述实施例9和10所述的方法,用具有组合物HEDC:S104:CH:DOPE:DMPE-PEG2000:化合物T3的本发明的LNP纳米颗粒将荧光素酶mRNA (Fluc mRNA (5meC)) 转染到Balb/c小鼠中,如表10所示。

[0756] 表10:Balb/c小鼠体内转染

组	动物数	剂量	终点	
[0757]	1	3	IVIS 成像 组织荧光素酶分析	
	2	3		1mpk (20ug/只)
	3	3		2mpk (40ug/只)
	4	1		10ug
	5	1		30ug
	6	3		40ug

[0758] 如图50所示,用Promega E4510检测试剂盒确定mRNA在各种组织和细胞中的相对递送、转染和/或翻译。令人惊讶的是,Fluc mRNA在肺和脾脏中被选择性地递送、转染和/或翻译,而在肝脏、心脏、肾脏和肌肉中的递送、转染和/或翻译较低。

[0759] 实施例14:体内转染递送mRNA至细胞。

[0760] 根据上述实施例9和10所述的方法,用具有以下组成的本发明的LNP纳米颗粒将荧光素酶mRNA (Fluc mRNA (5meC)) 转染到Balb/c小鼠中:

[0761] (-01)HE2DC:S104:CH:DOPE:DMPE-PEG2000:化合物T3,或

[0762] (-02)HEDC:S104:CH:DOPE:DMPE-PEG2000:化合物T3,

[0763] 注射2mpk,在注射7小时后用自发荧光成像。

[0764] 如图51所示,用Promega E4510检测确定mRNA在各种组织和细胞中的相对递送、转染和/或翻译。令人惊讶的是,Fluc mRNA在肺和脾脏中被选择性地递送、转染和/或翻译,而在胰腺、肾脏、肝脏、睾丸和小肠中的递送、转染和/或翻译较低。

[0765] 如图52所示,在注射7小时后用自发荧光成像确定mRNA在各种组织中的相对递送、

转染和/或翻译。在图52中,上一栏的照片表示用(-01)的LNP纳米颗粒转染的Ba1b/c小鼠。下一栏的照片表示用(-02)的LNP纳米颗粒转染的Ba1b/c小鼠。

[0766] 实施例15:用膜融合化合物在体内递送mRNA至细胞。本发明的膜融合化合物极大地增强了活性剂在体内向细胞、器官和组织的递送。

[0767] 在该实施例中,用于在体内递送mRNA的制剂是用膜融合化合物T3制备的,并与不含膜融合化合物的相同制剂进行比较,如表11所示。

[0768] 表11:在小鼠体内递送的制剂

mRNA	制剂	PS nm	PDI	EE %
[0769] 2035-03-03	HEDC:S104:DOPE:CH:DMPE-PEG2K:化合物 T3 (20:20:30:25:5:5)	81	0.10	93
2035-13-01	HEDC:S104:DOPE:CH:DMPE-PEG2K (20:20:30:25:5)	83	0.148	78

[0770] 图53显示了使用本发明的膜融合脂质样分子在小鼠体内递送荧光素酶mRNA的结果。如图53所示,在含有本发明的膜融合分子的制剂(2035-03-03)中,mRNA的相对递送远高于不含膜融合分子的相同制剂(2035-13-01)。在所有被观察的器官(包括胰腺、脾脏、肝脏、肾脏、肺、睾丸和肠)中,含有膜融合化合物T3的制剂的递送均有利且惊人地更高。

[0771] 本文所述的实施方式不是限制性的,本领域技术人员可以方便地理解本文所述的修饰的具体组合可以在无需过度实验的条件下测试,从而鉴别具有改善的RNAi活性的核酸分子。

[0772] 本文具体提及的所有出版物、专利和文献都出于所有目的通过引用而全文整合于本文中。

[0773] 可以理解,本发明不限于所述的特定方法、规程、材料和试剂,其都可改变。还可理解,本文使用的术语仅仅是描述特定实施方式的目的,而不是意图限制本发明的范围。对本领域技术人员显而易见的是,可以在不脱离说明书的范围和精神的条件下,对本文公开的说明进行取代和修饰的改变,而这些实施方式也落入本说明书和所附权利要求的范围内。

[0774] 必须注意的是,如本文和所附权利要求中使用的,除非上下位另外明确指出,否则单数形式“一”、“一个”和“这个”包括了复数的指代。同样地,术语“一”(或“一个”)、“一个或多个/一种或多种”和“至少一个”在本文中可以互换地使用。还应注意的是,术语“包含”、“包含了”、“含有”、“包括”和“具有”可以互换地使用,且应作扩大解释而不加限制。

[0775] 除非本文中另外指出,本文对数值范围的提及仅仅是意图作为单个指出落入范围内的每个独立值的快捷方法,且每个独立值都整合到说明书中,如同其被本文单独提及。对于马库什基团,本领域技术人员将认识到,本说明书包括了马库什基团的单个成员、以及成员的亚群。

[0776] 本发明的化合物、分子或组合物可具有没有显示出相应的平衡离子的离子形式。

本领域技术人员将立即理解,在必要时,平衡离子是存在的。平衡离子的例子包括碱金属例子、 $\text{Cl}^-$ 和药学上可接受的平衡离子。

[0777] 例如,当给出了适用于本发明的实施例或组分的名单时,例如化合物、分子或组合物的名单,对本领域技术人员显而易见的是,所列举的化合物、分子或组合物的混合物也可以是合适的。

[0778] 在不做进一步阐述的条件下,认为本领域技术人员可以基于上述描述,最大程度地利用本发明。因此,下列具体的实施方式仅被视为示例,而无论如何不是对本文其余公开内容的限制。

[0779] 本说明书公开的所有特征都可以任何组合的方式组合。本说明书公开的每个特征都可以被服务于相同、等价或相似目的的可选特征替代。

[0780] 所附权利要求中的图片是经调整适合页面大小的,图片中的分子的外观并不必然反映所述化合物的任何明显形状或特性。



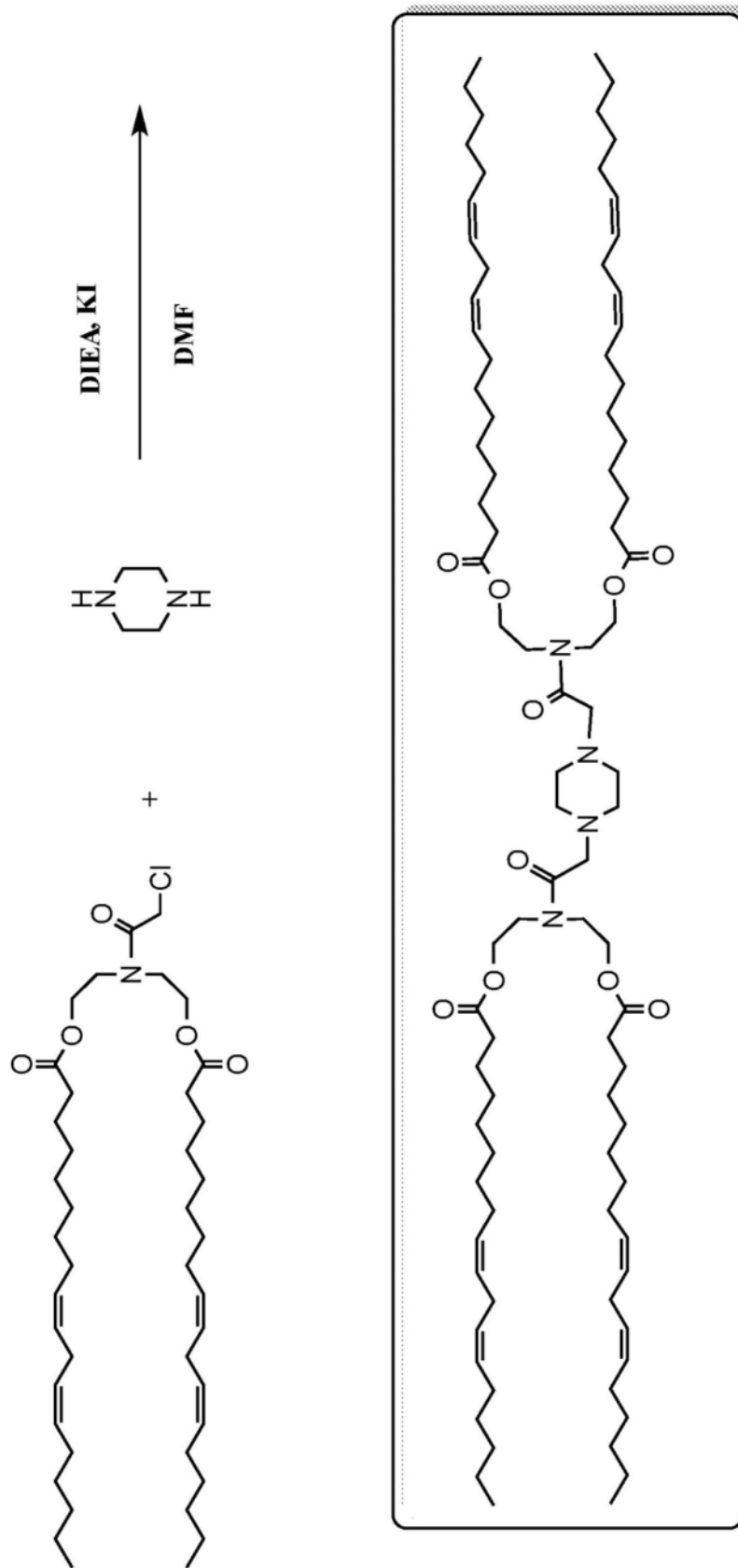


图2

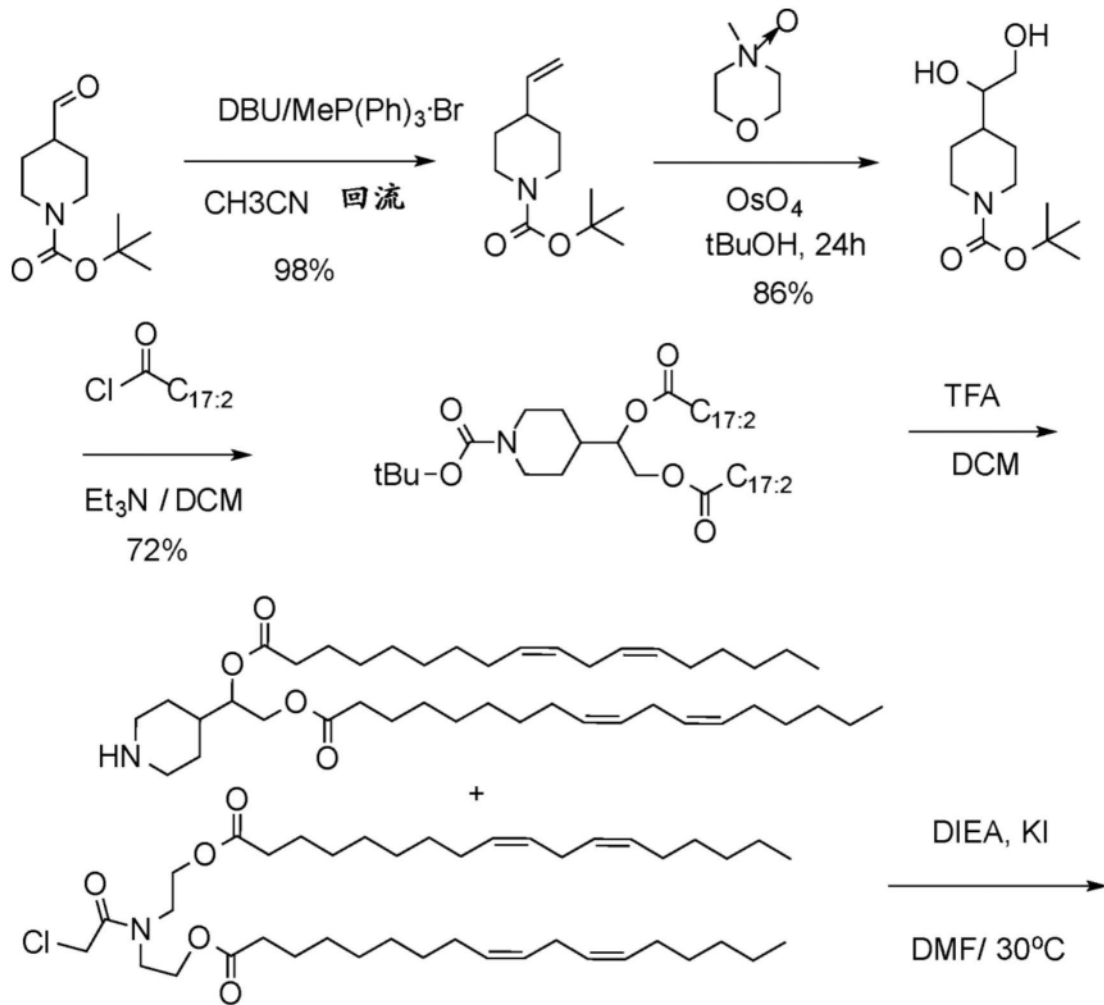


图3A

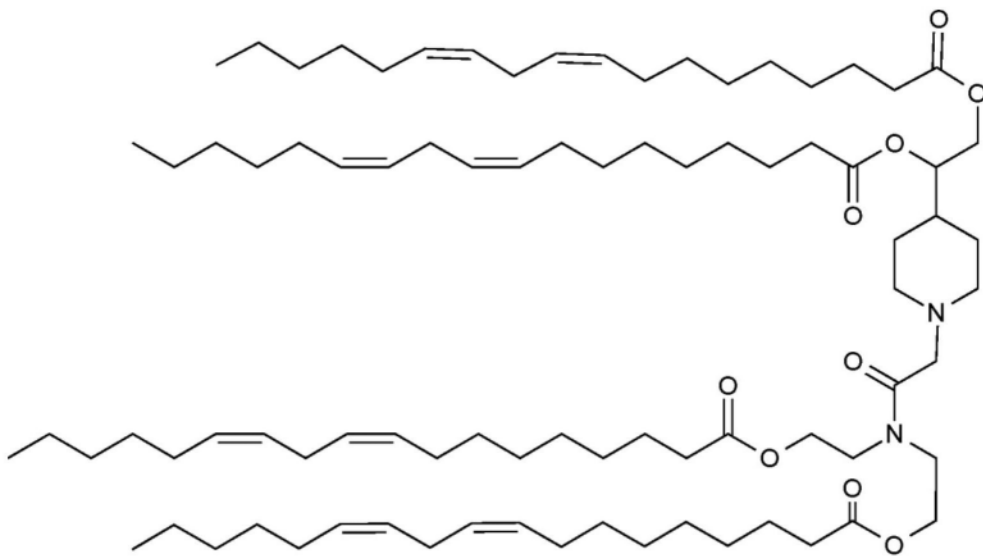


图3B



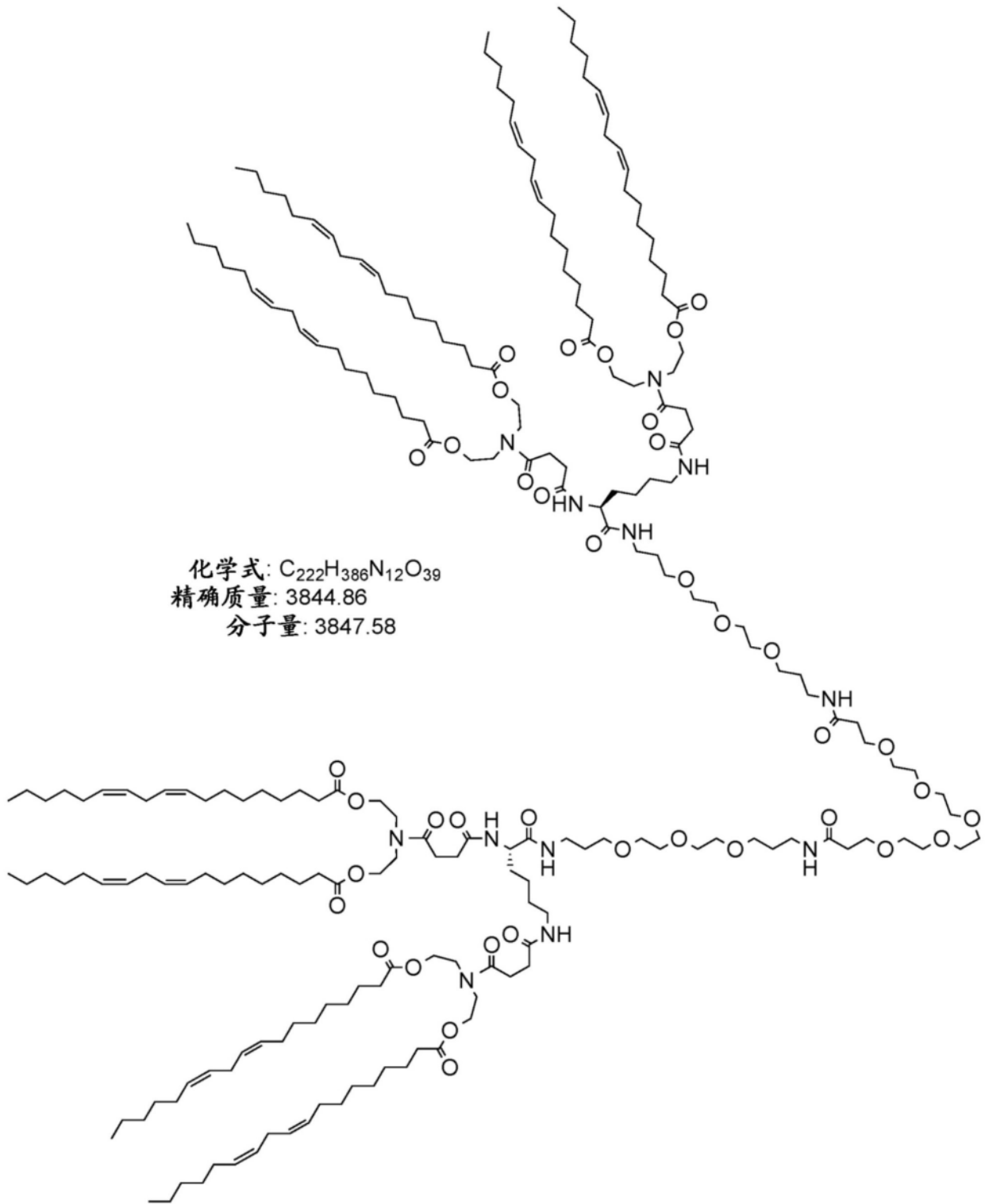


图4B



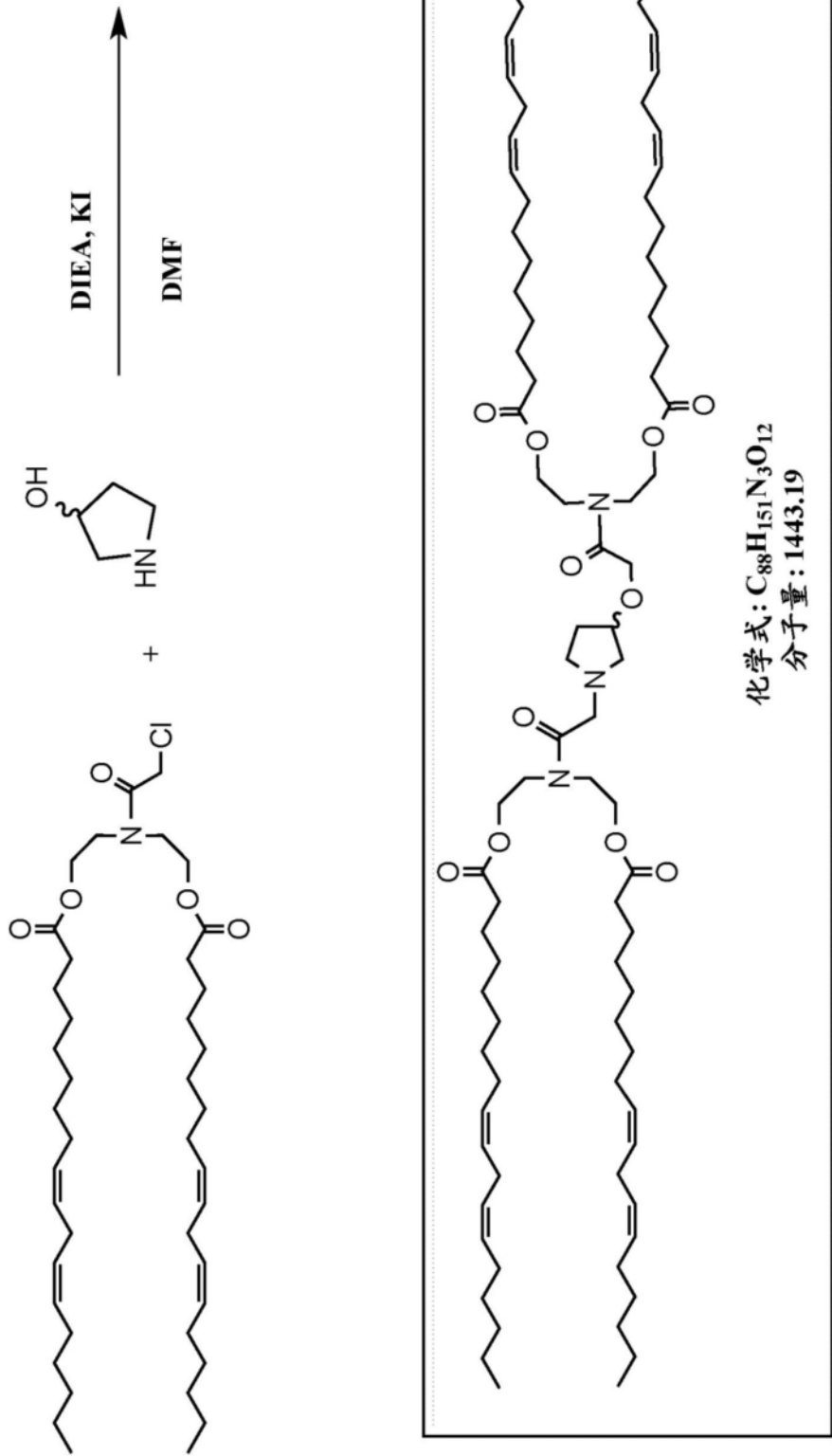


图6

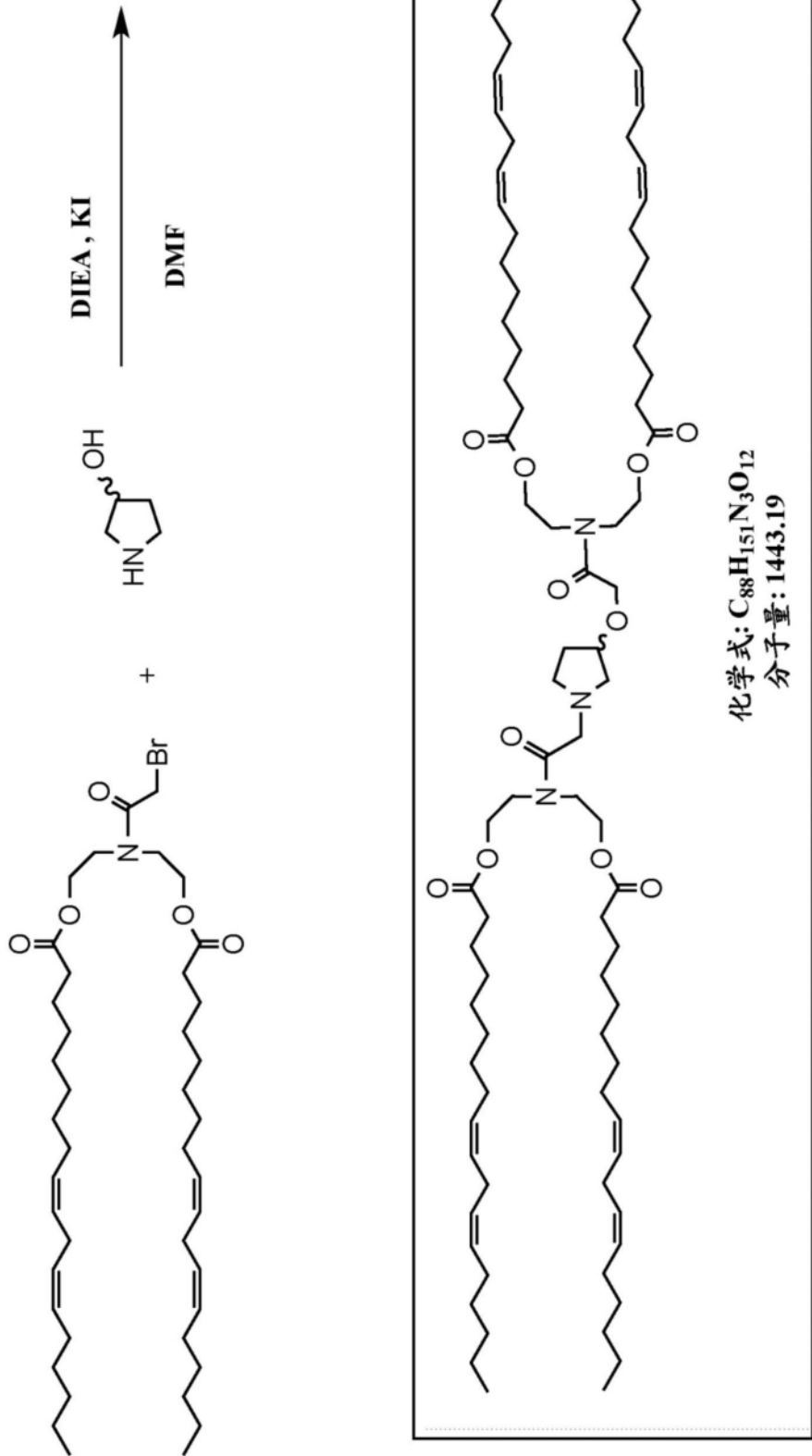


图7

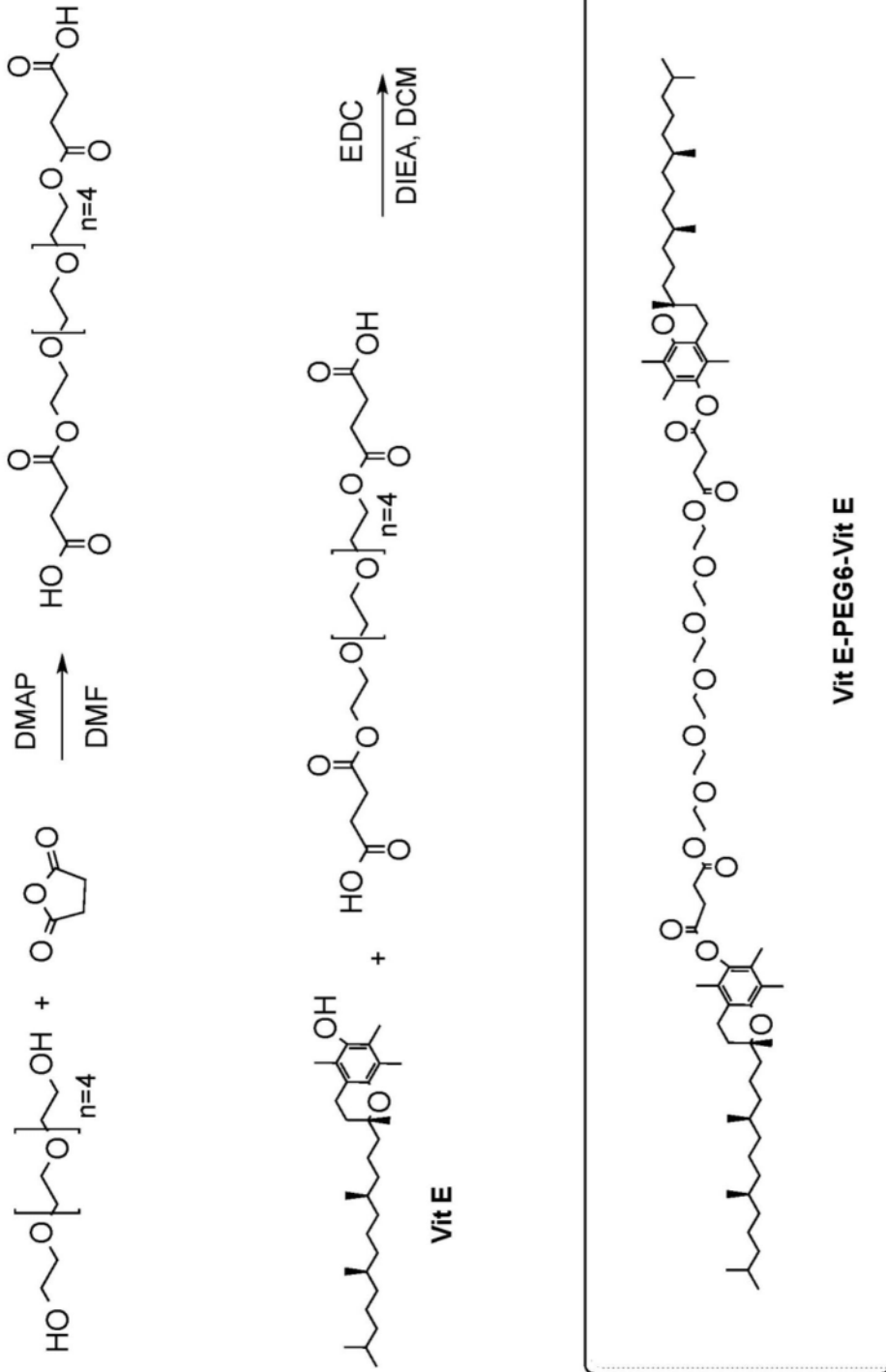


图8

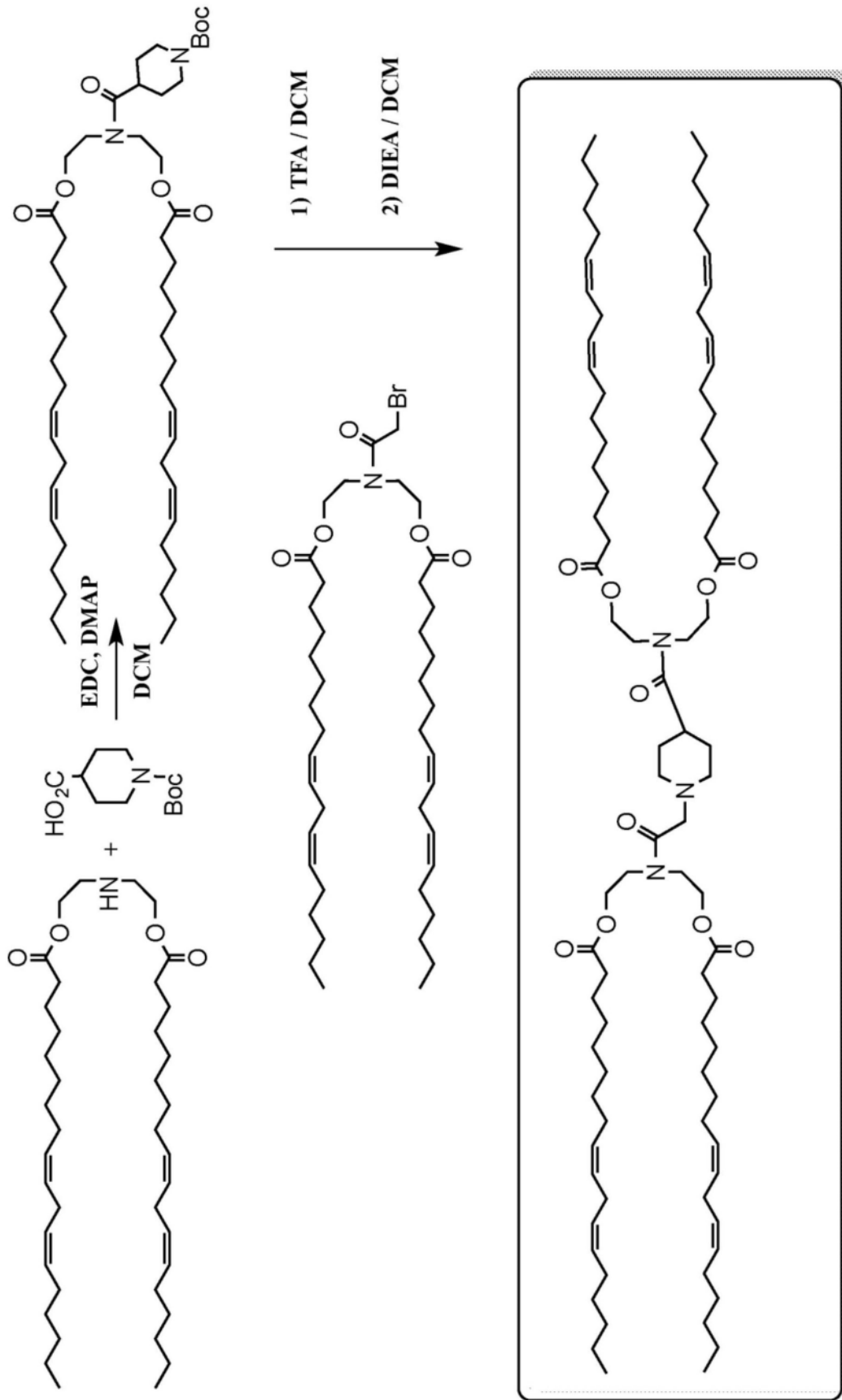


图9



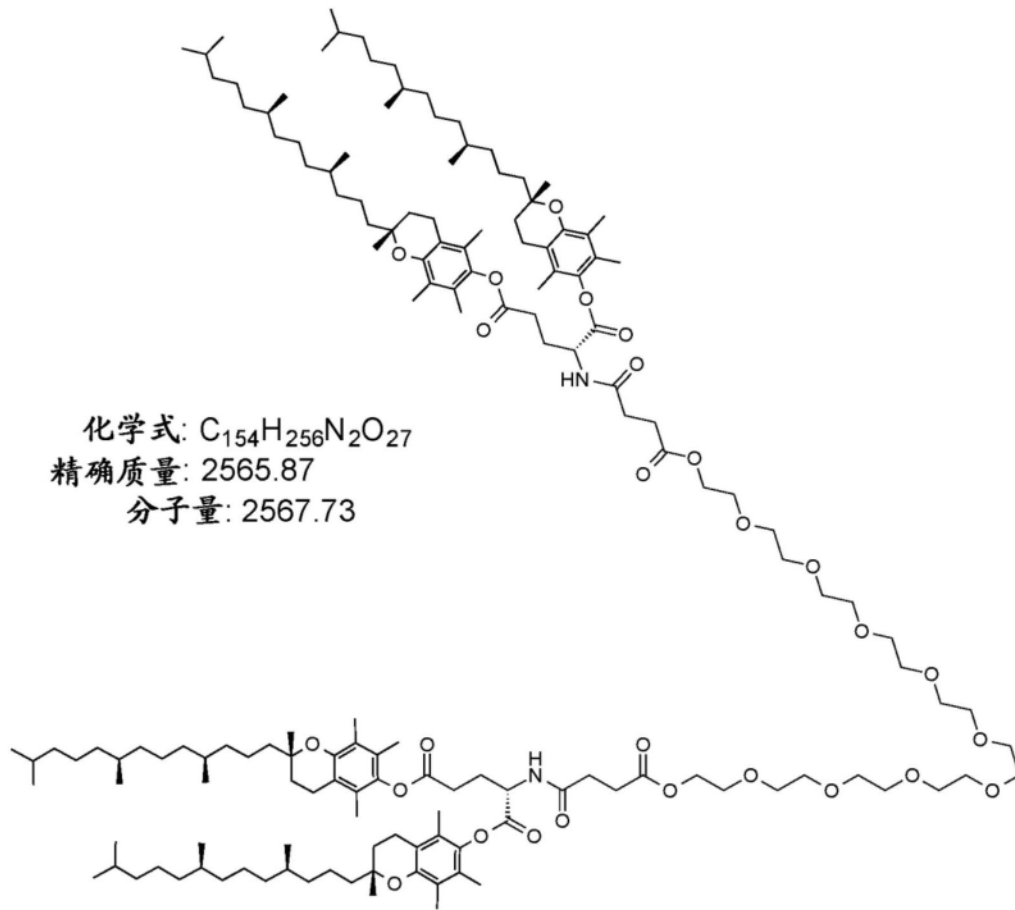


图10B

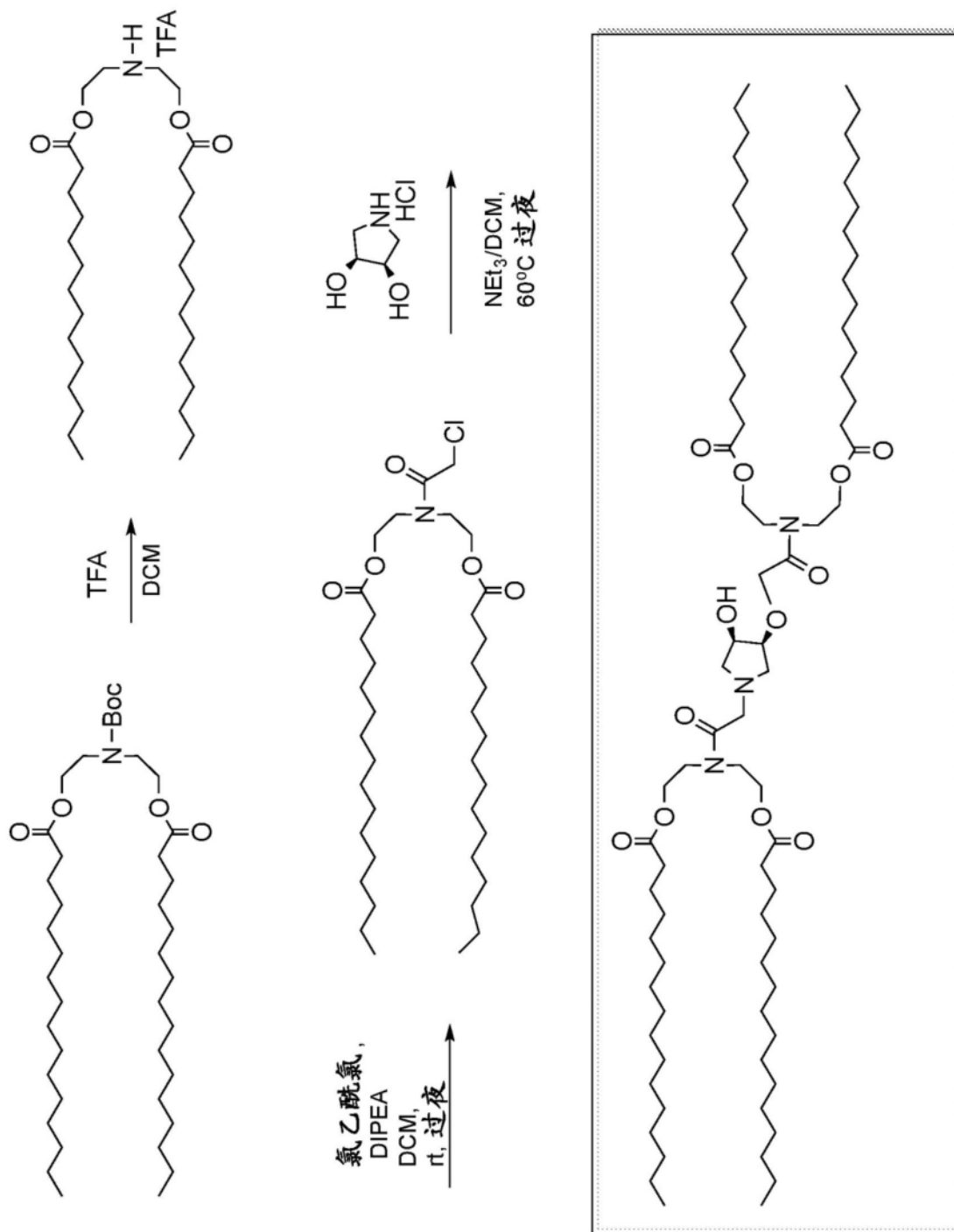


图11

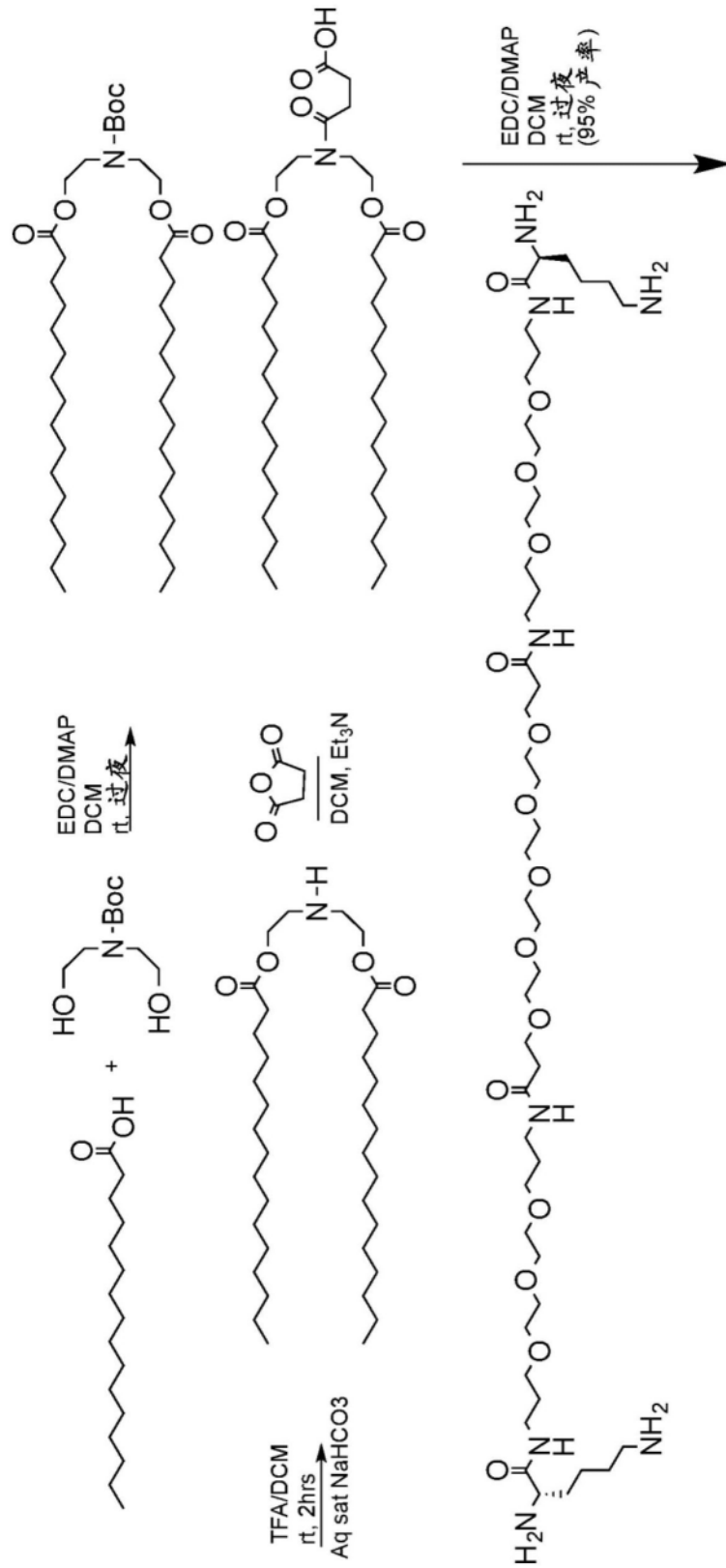


图12A

化学式:  $C_{210}H_{394}N_{12}O_{39}$   
精确质量: 3708.92  
分子量: 3711.51

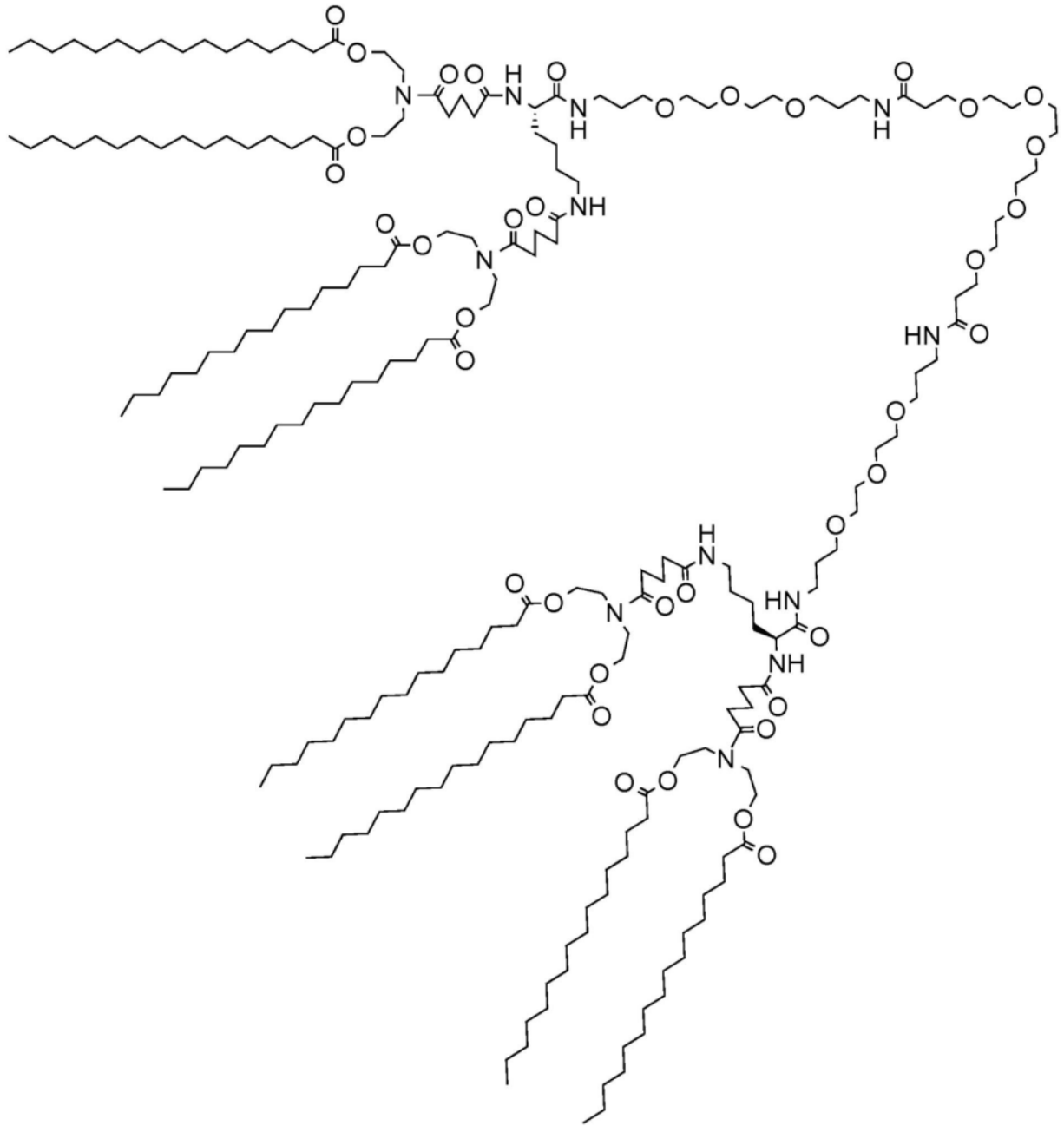


图12B

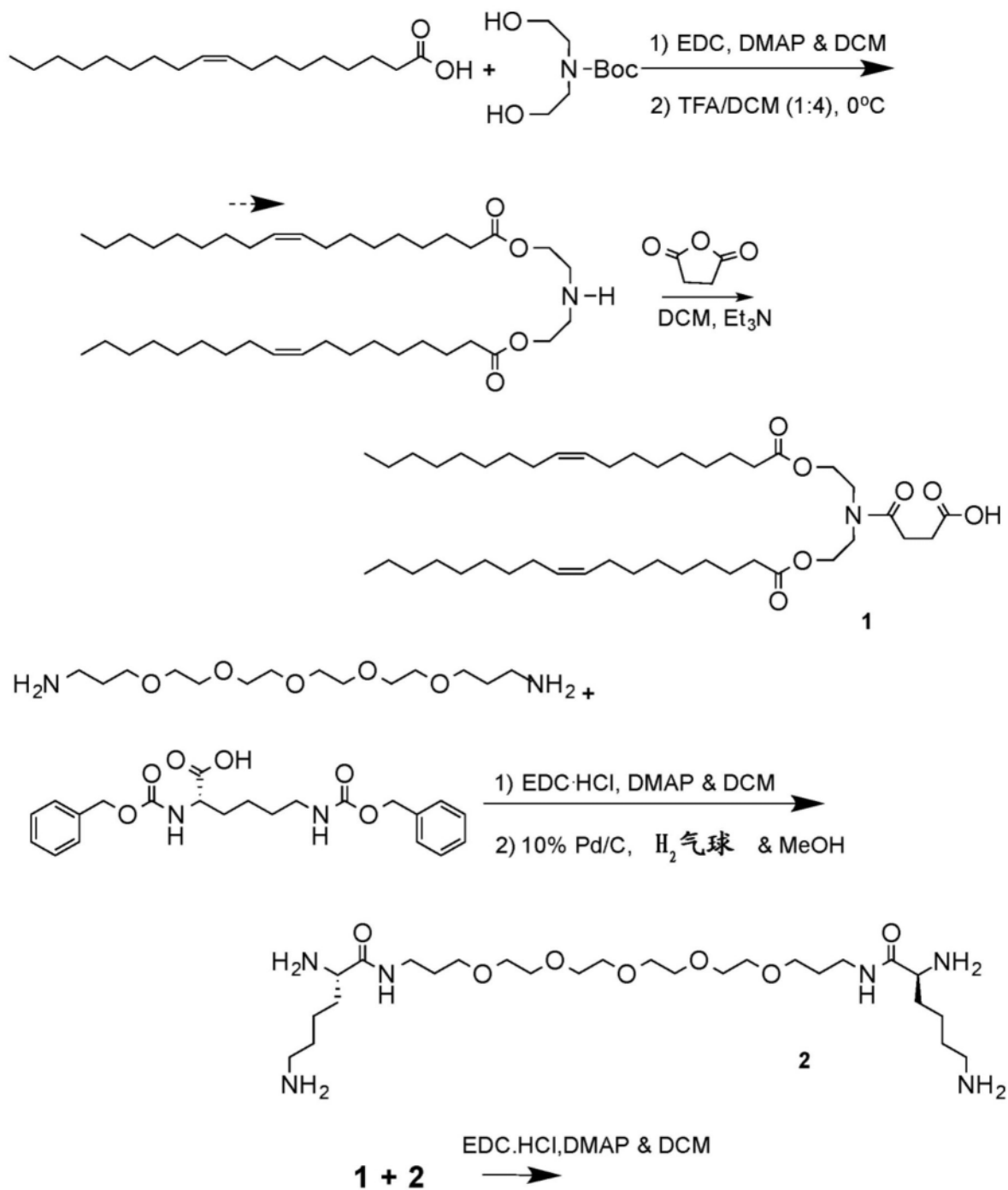


图13A



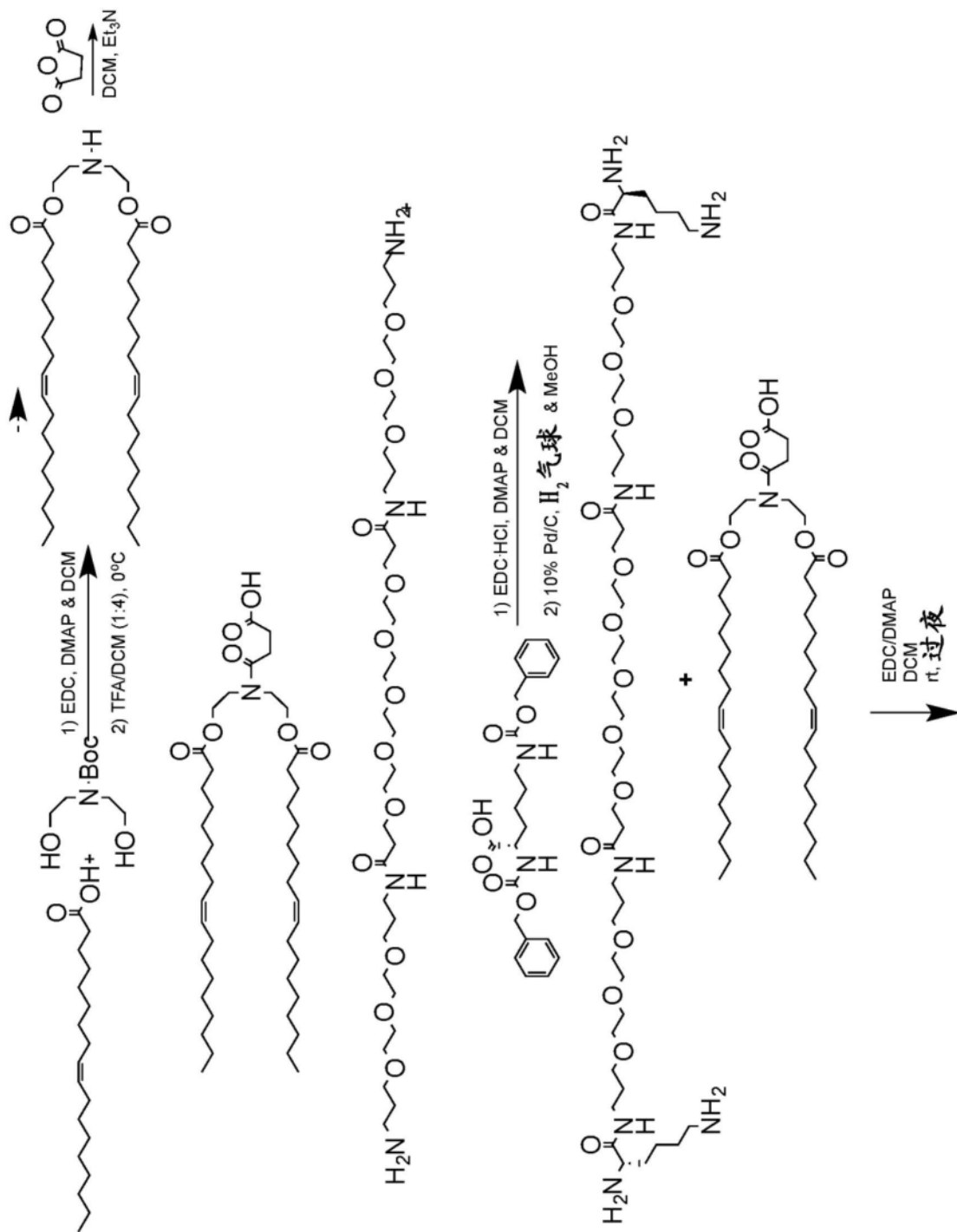


图14A

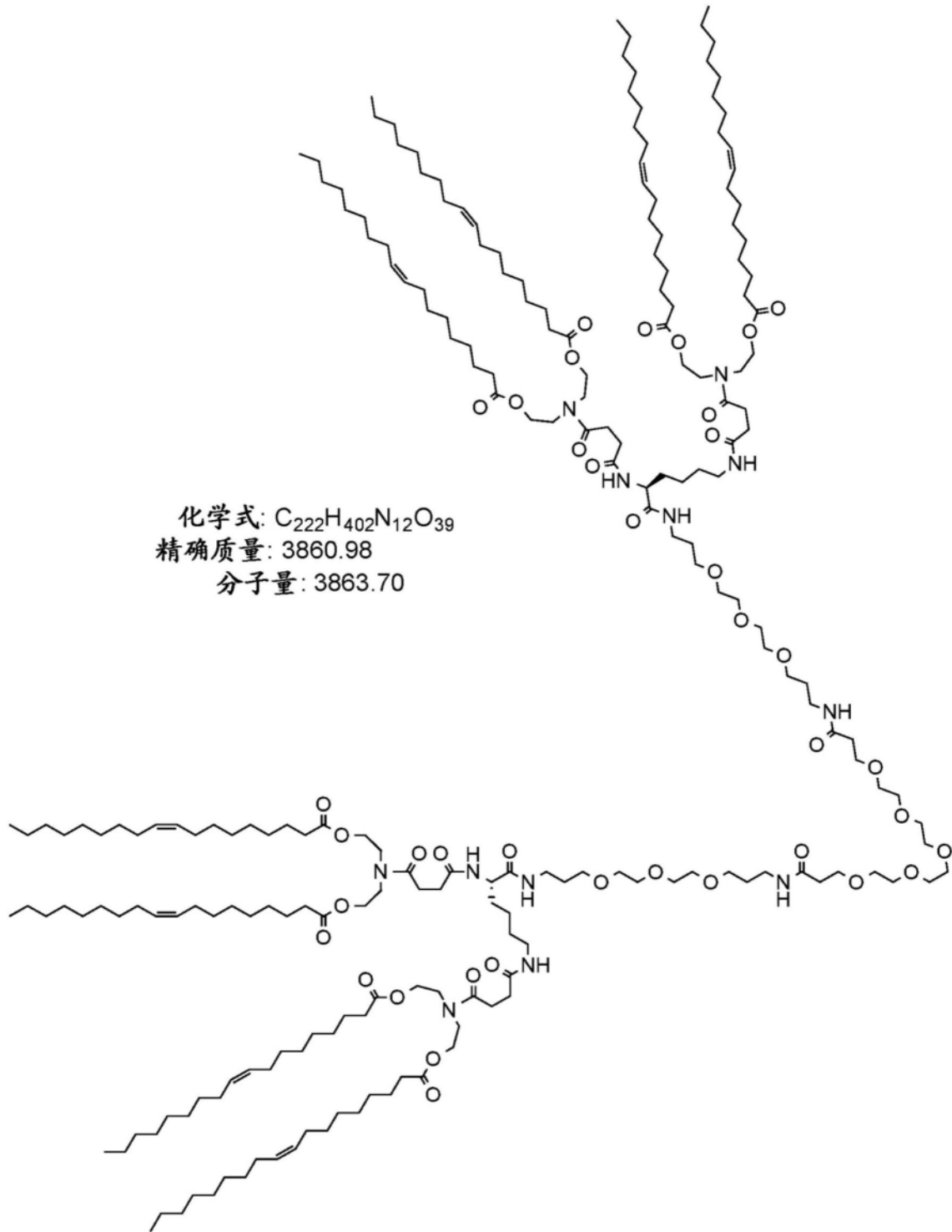


图14B

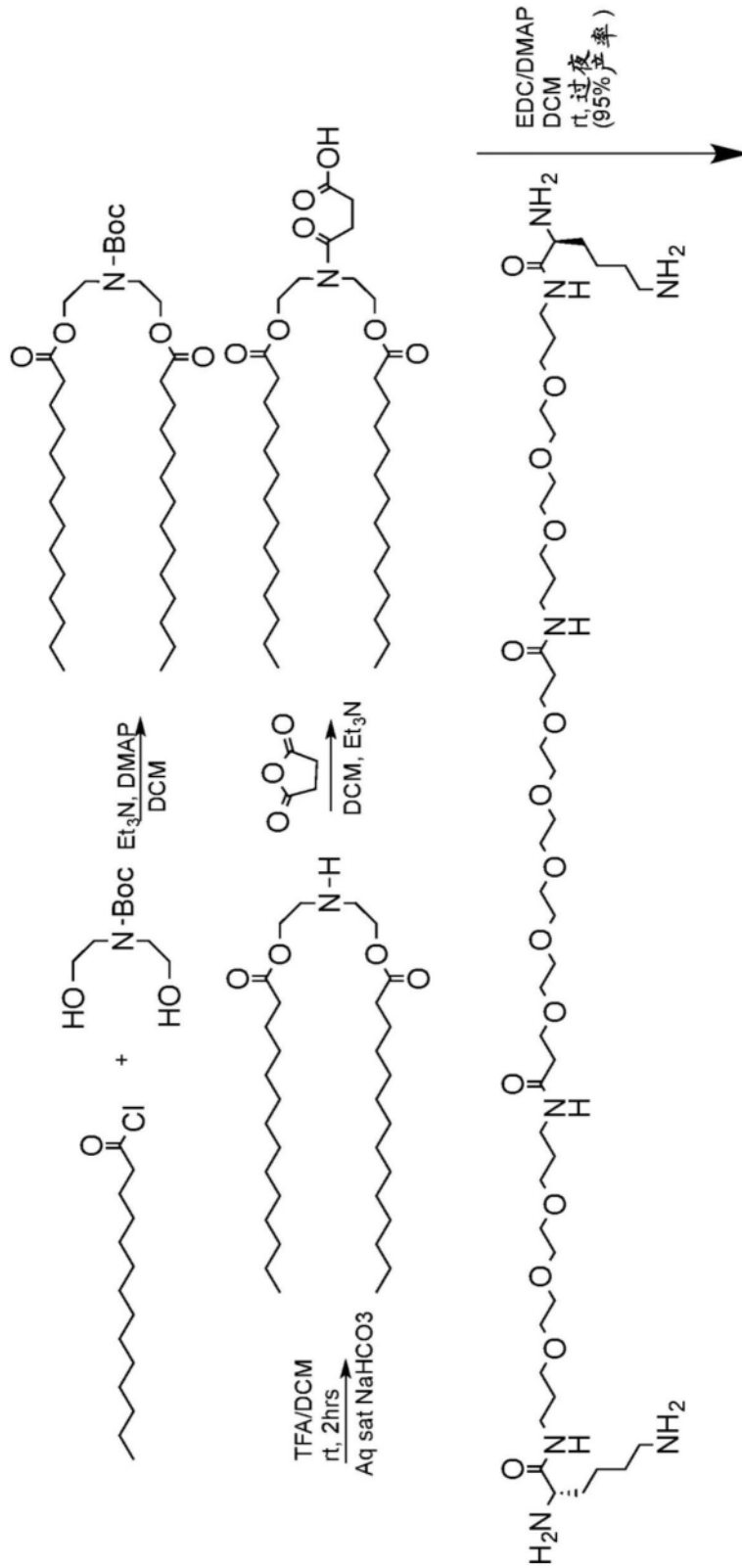


图15A

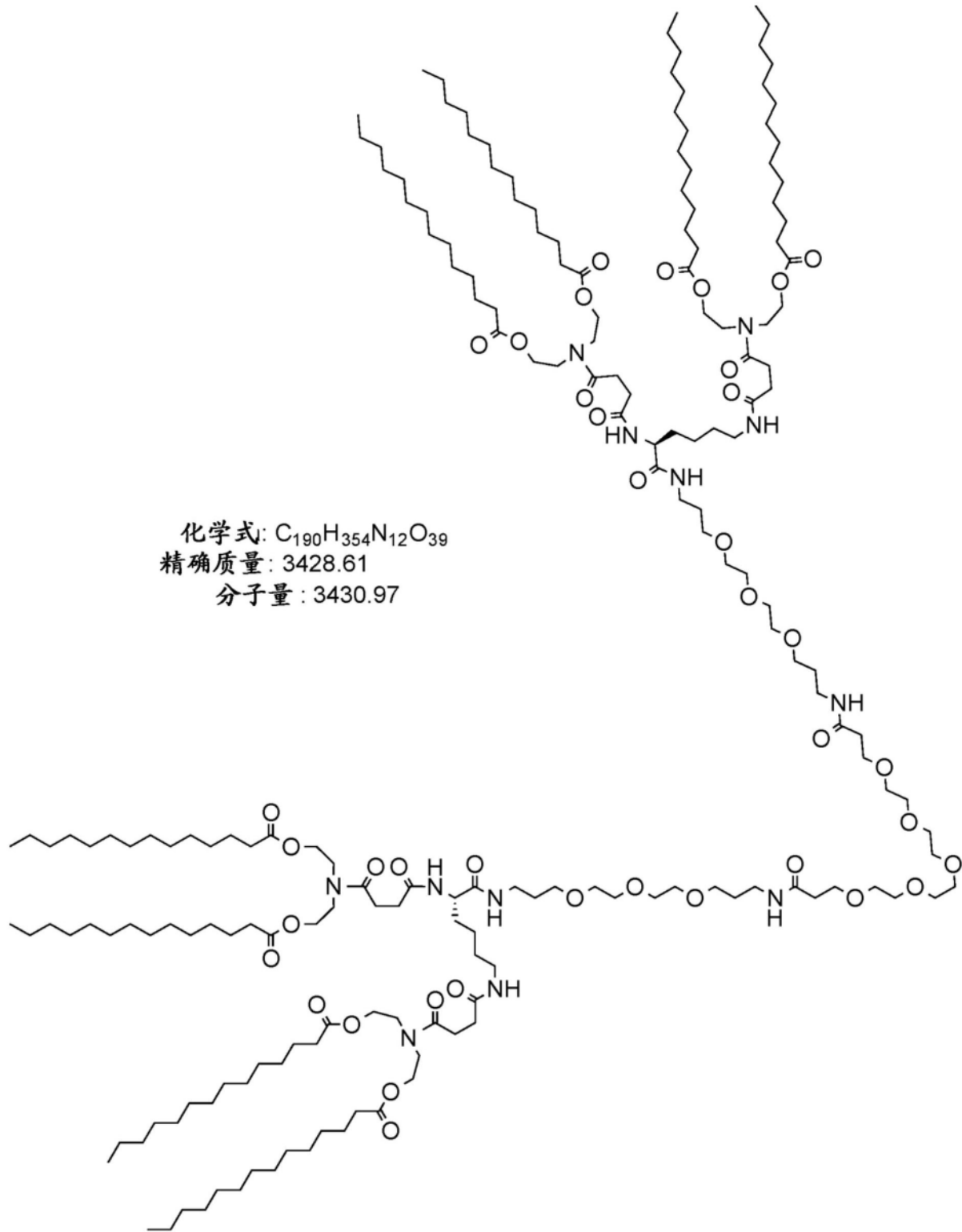


图15B

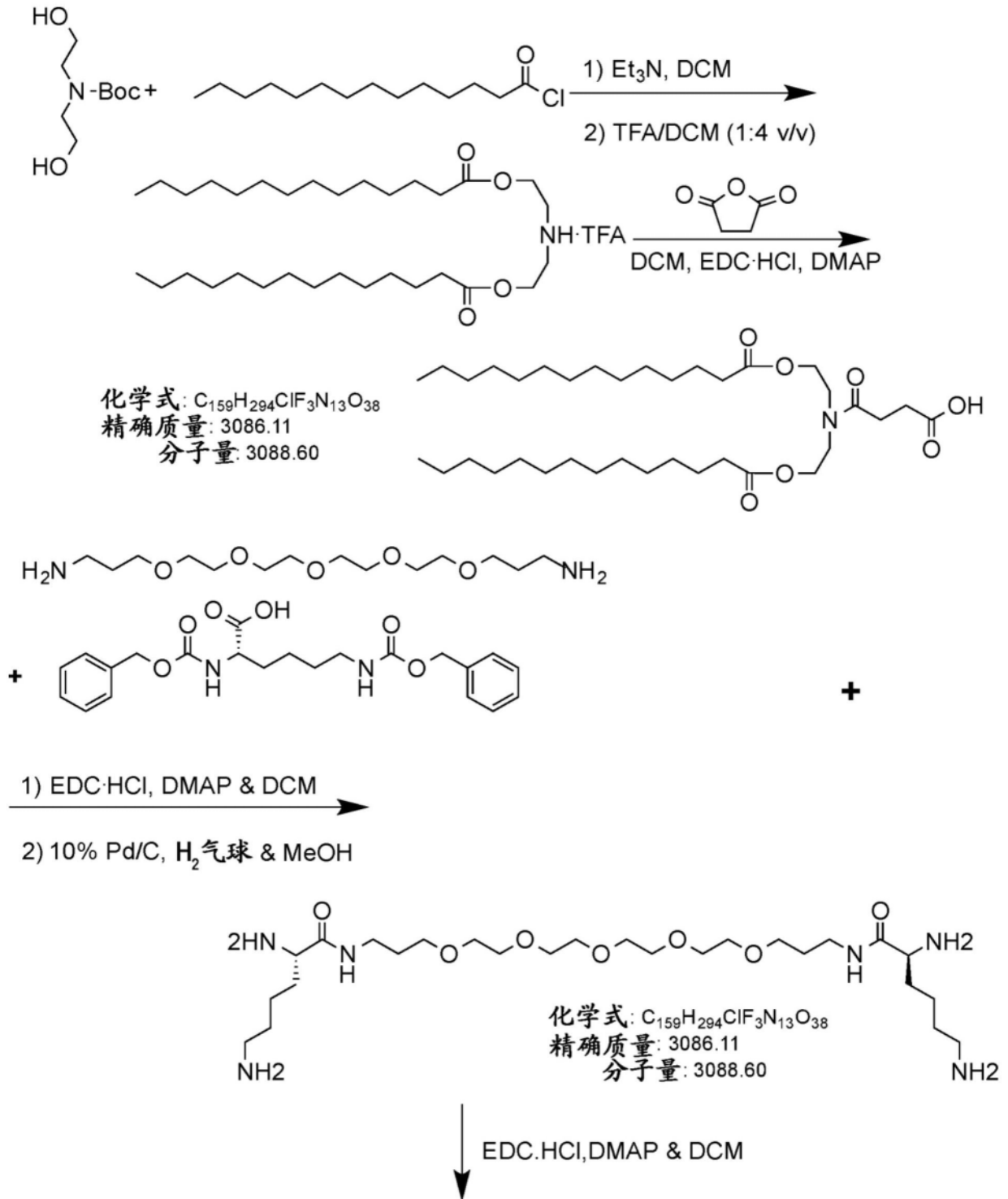


图16A

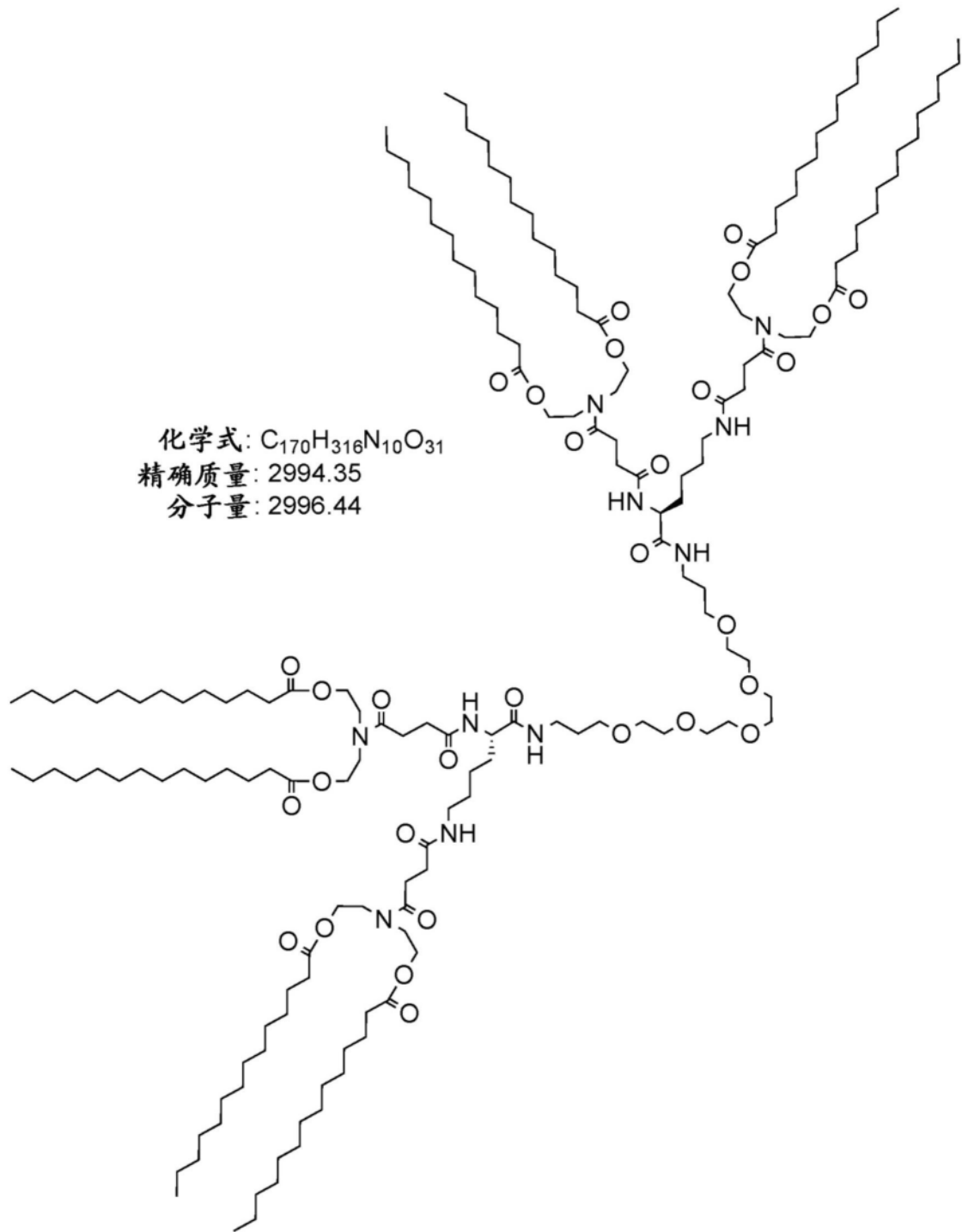


图16B

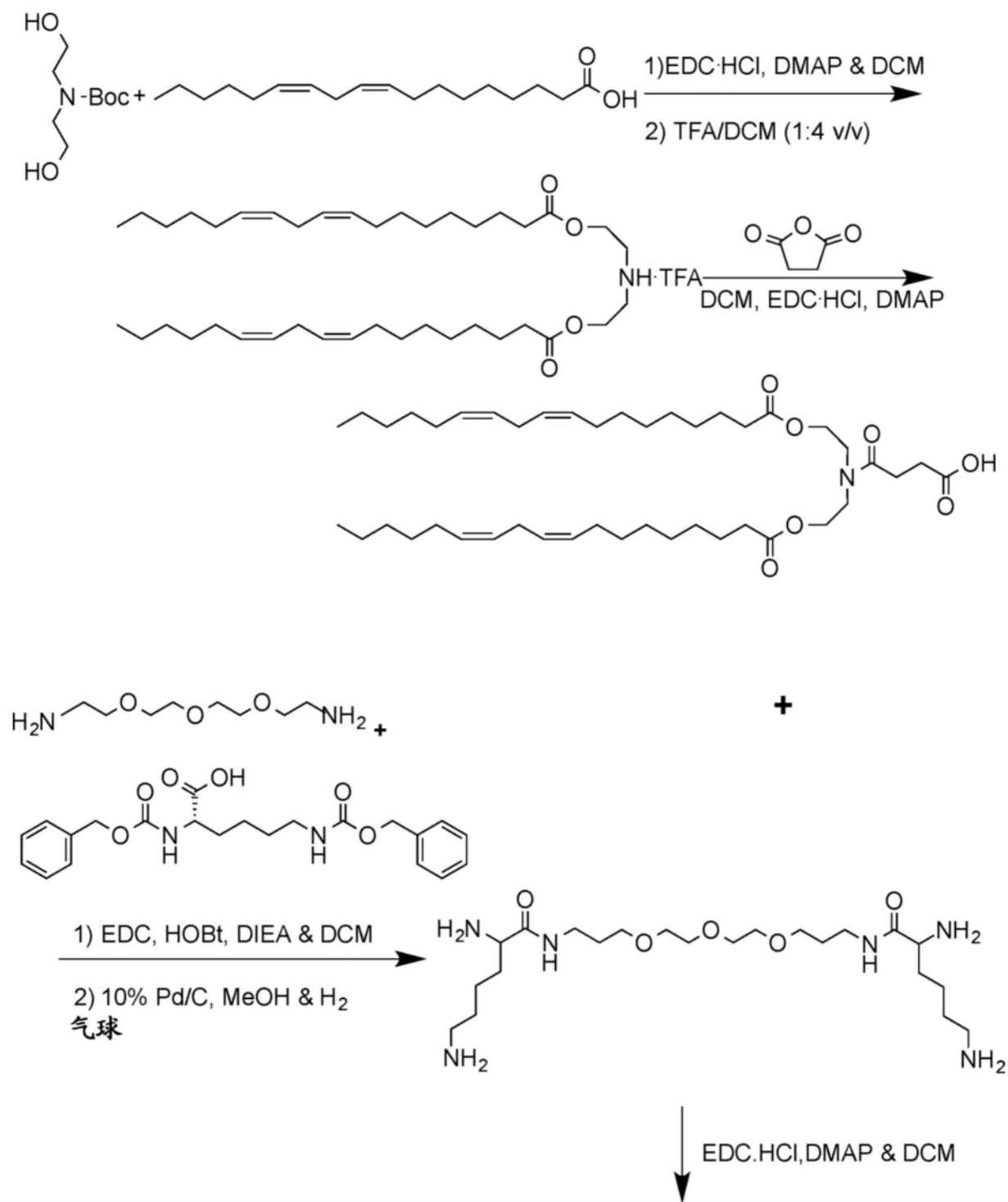


图17A

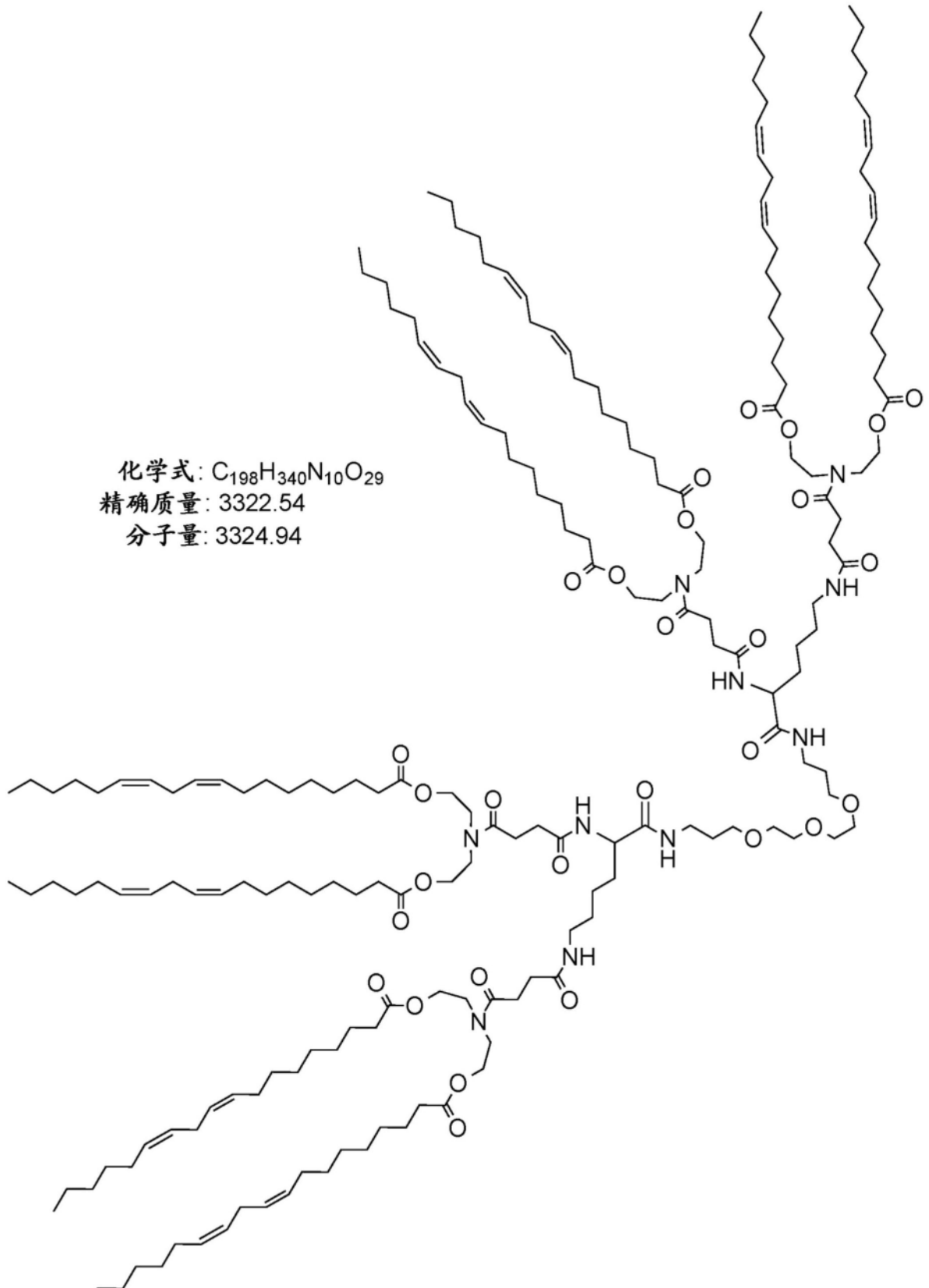


图17B

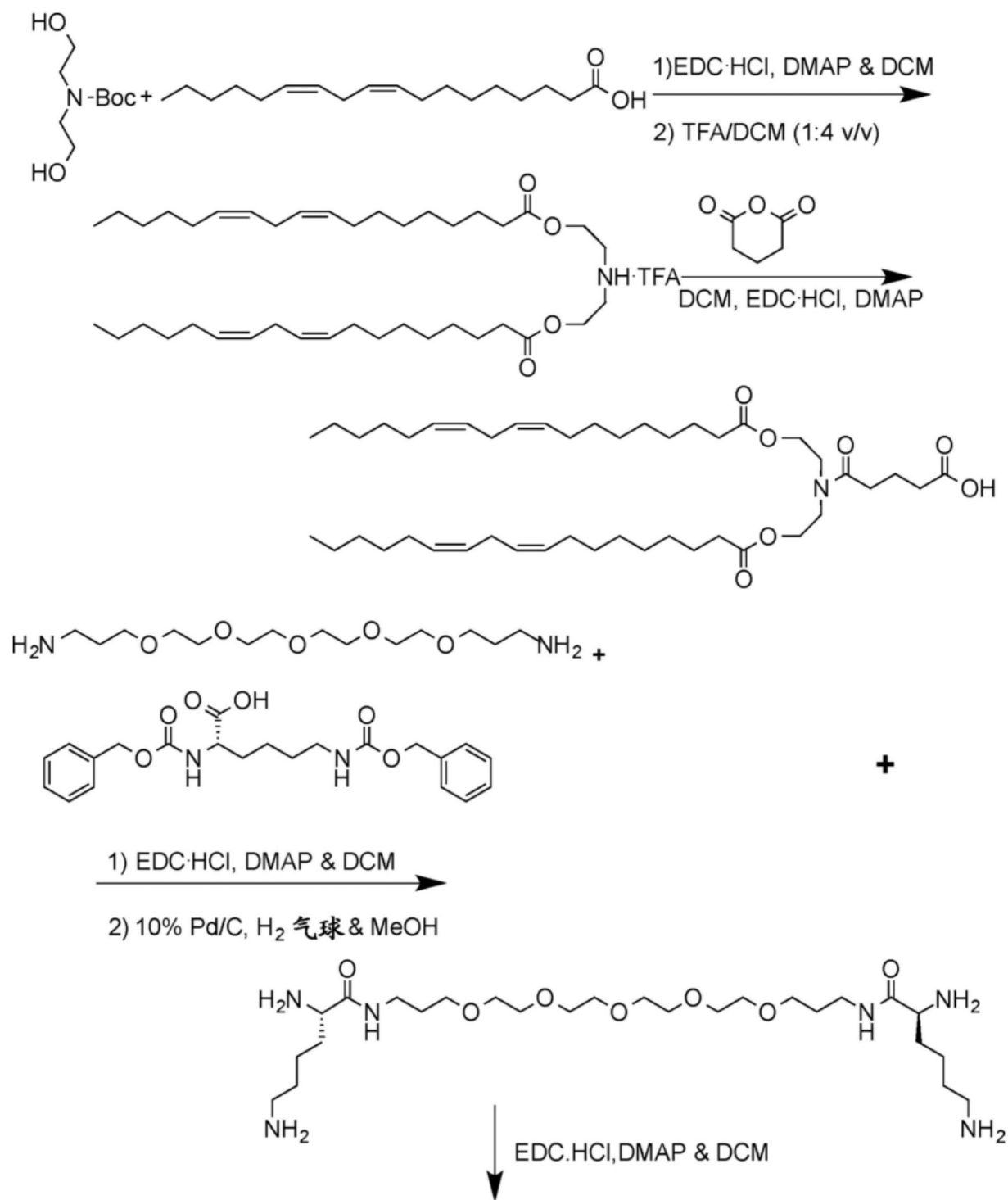


图18A

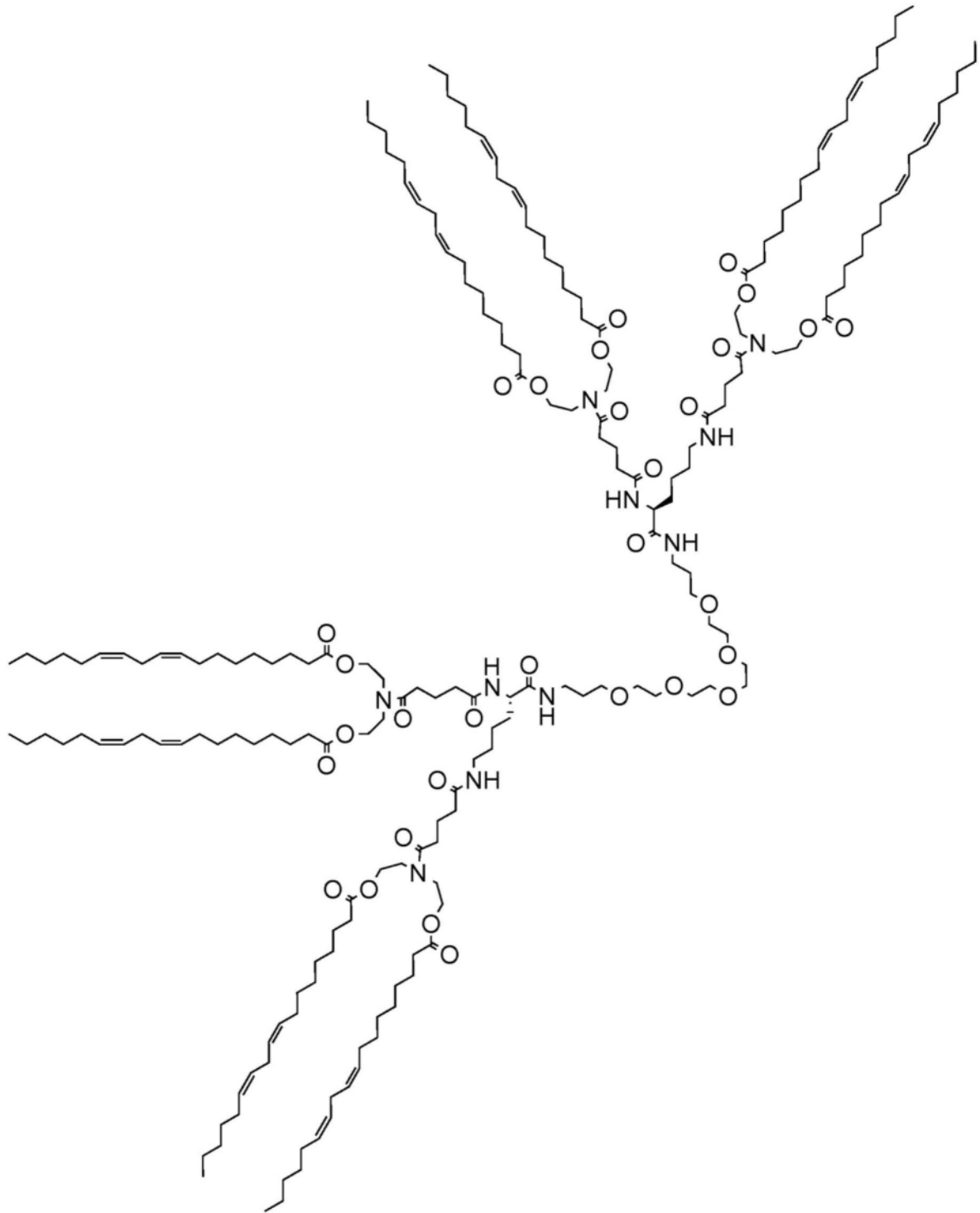


图18B

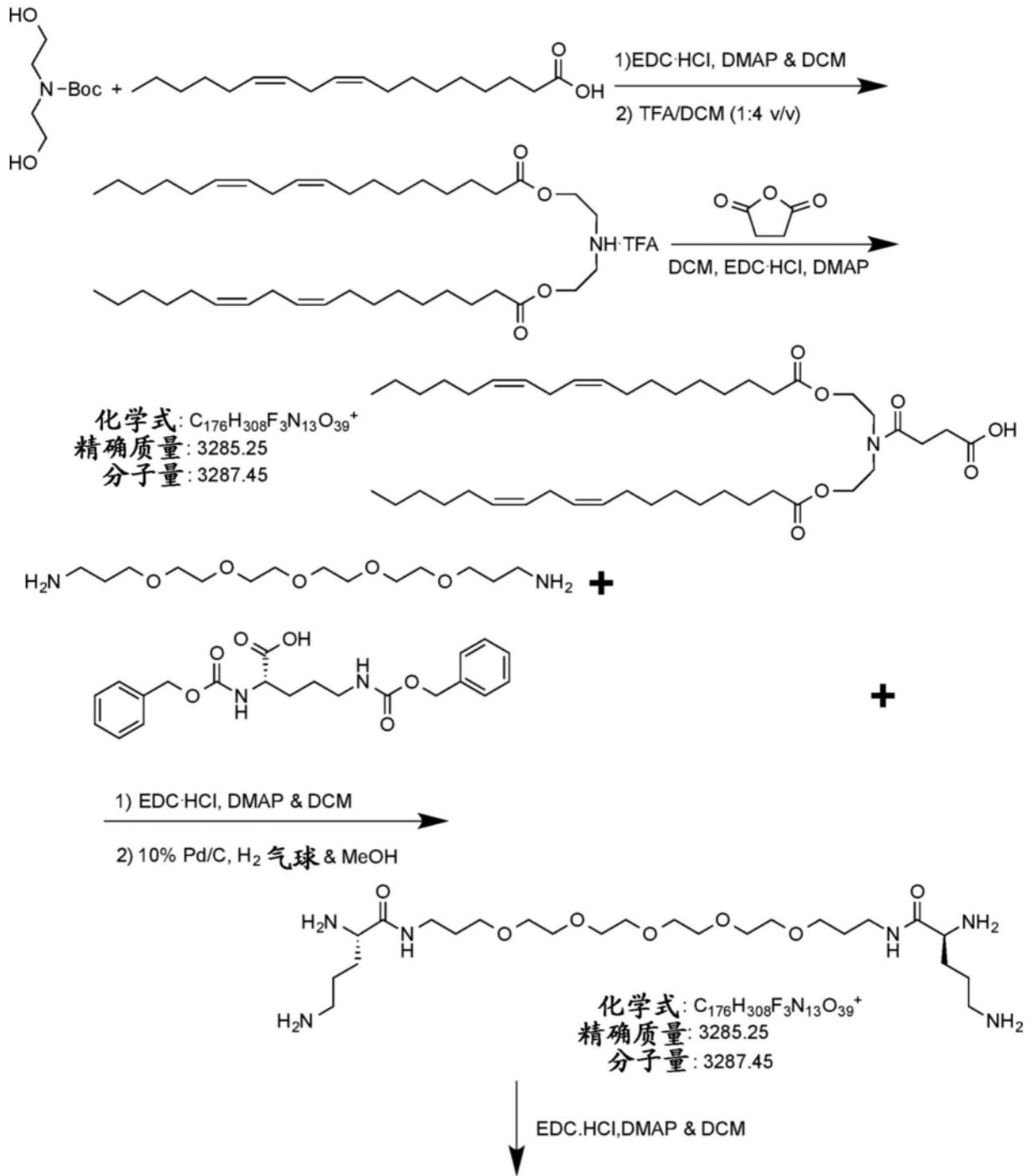


图19A

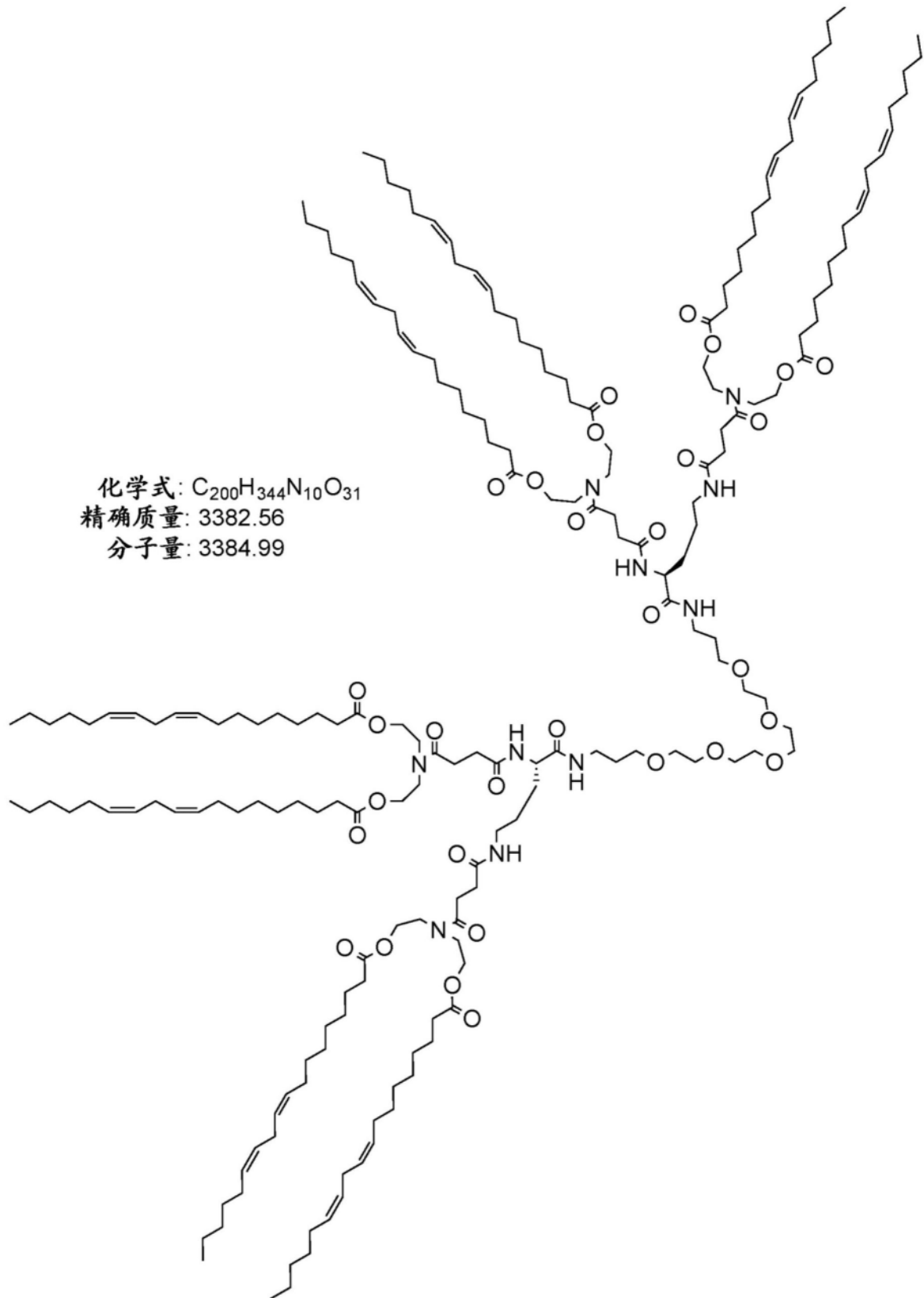


图19B

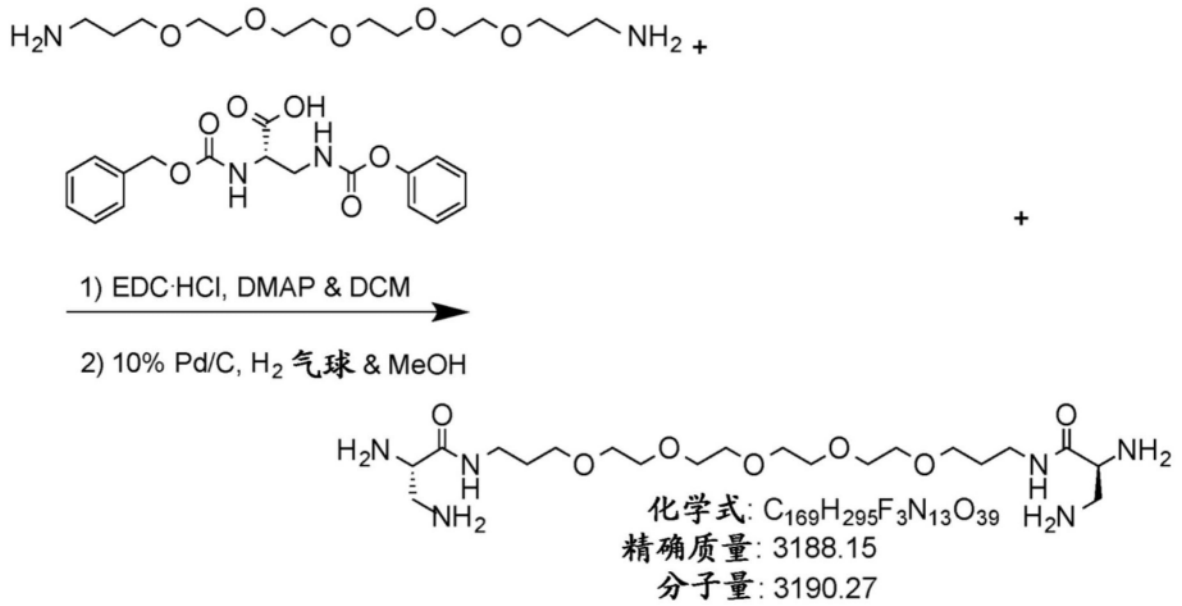
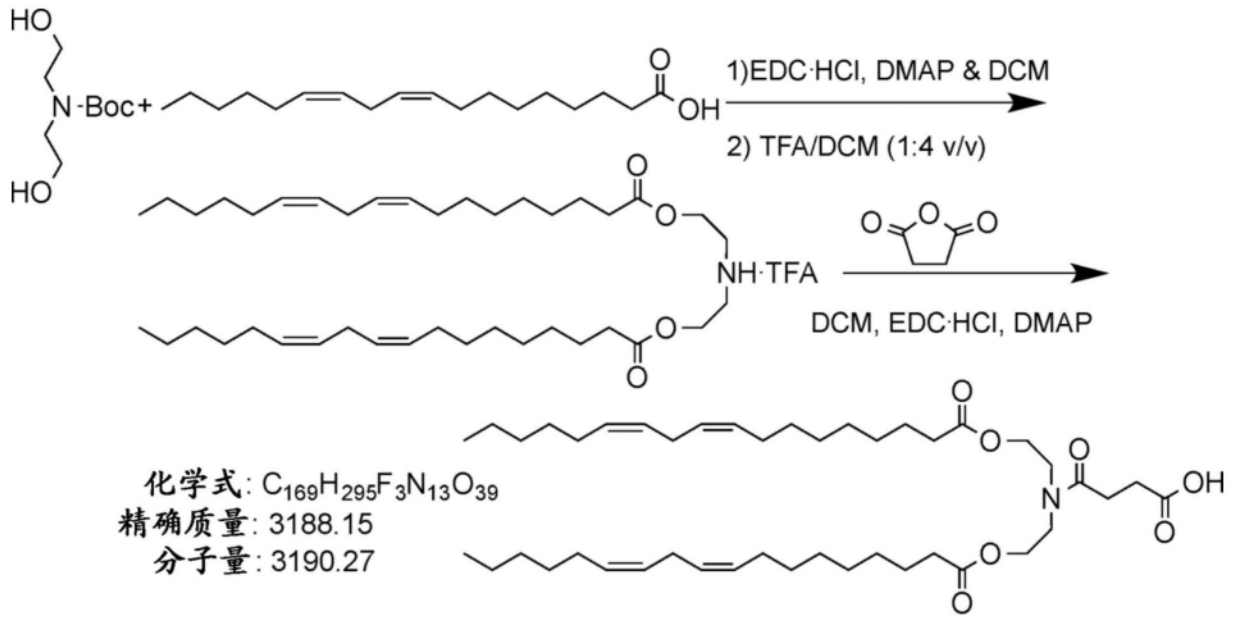


图20A

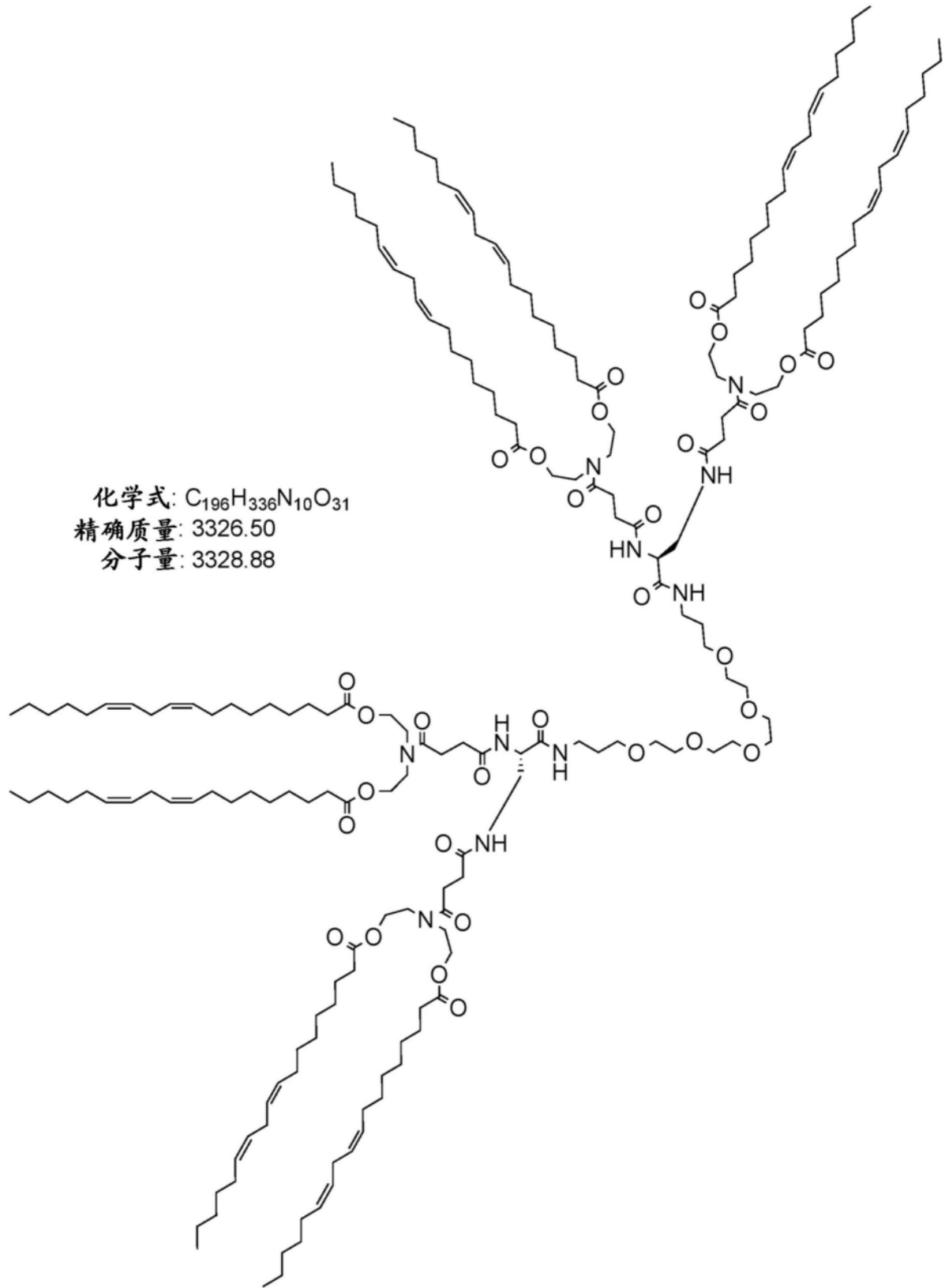


图20B

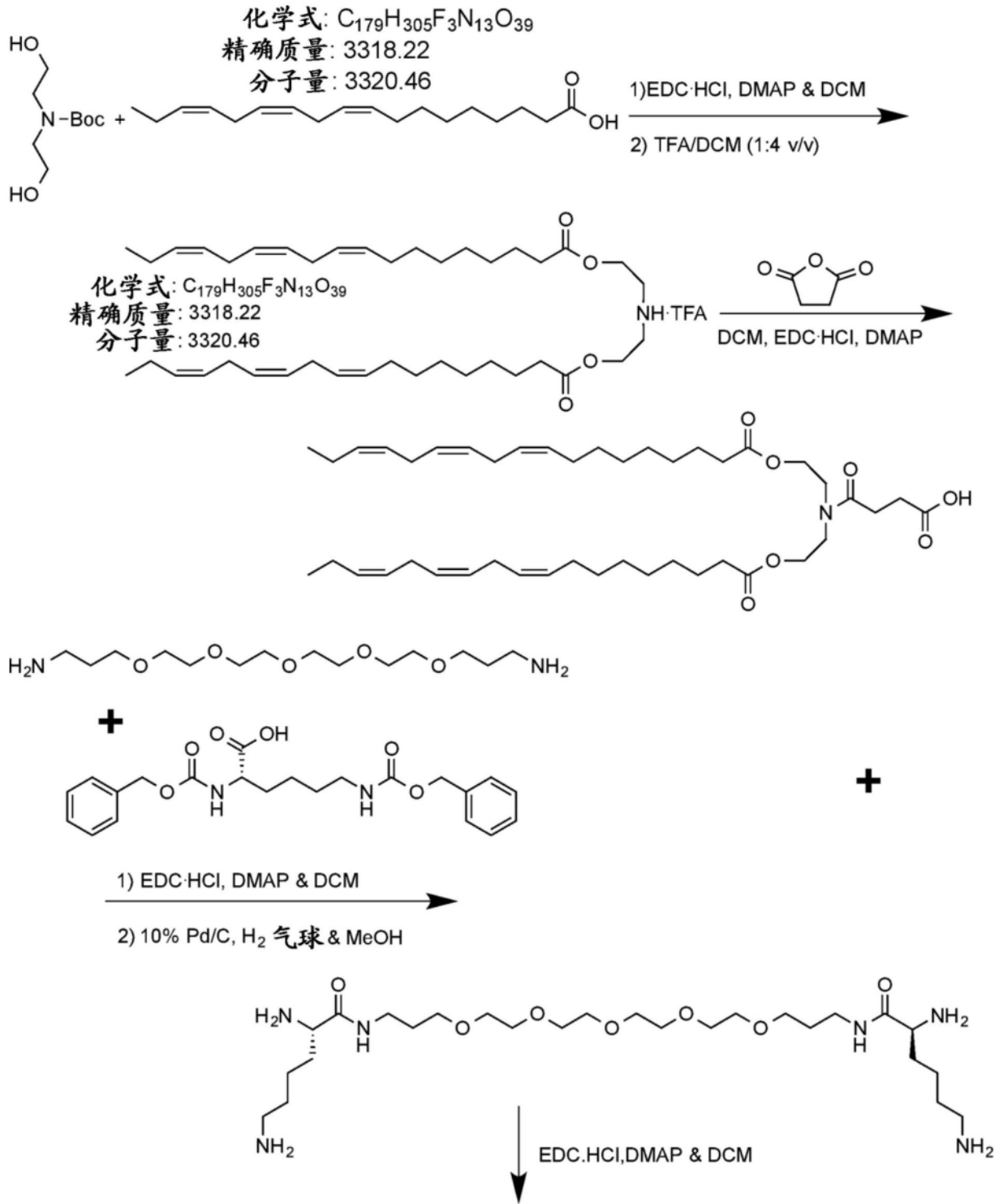


图21A

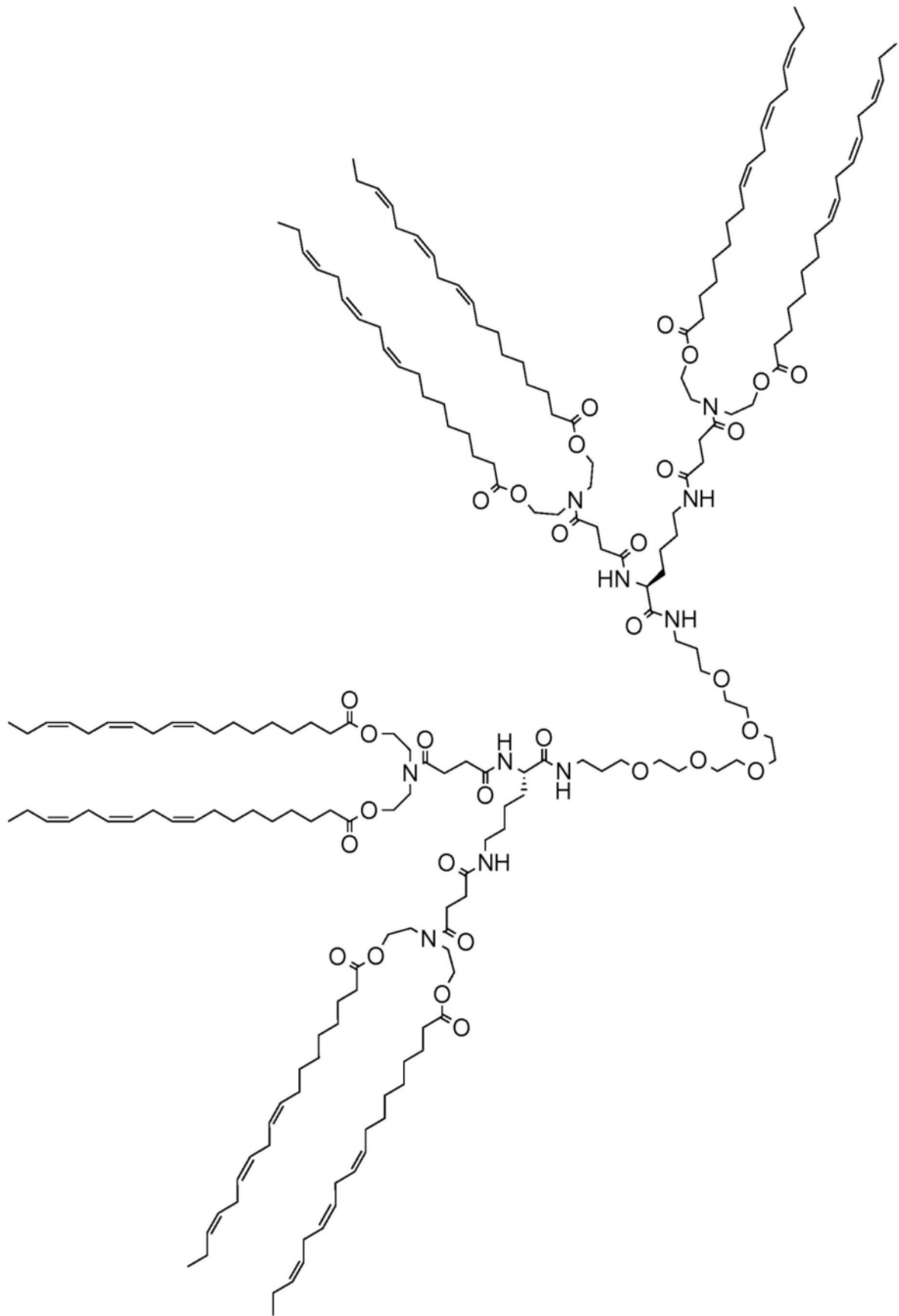


图21B

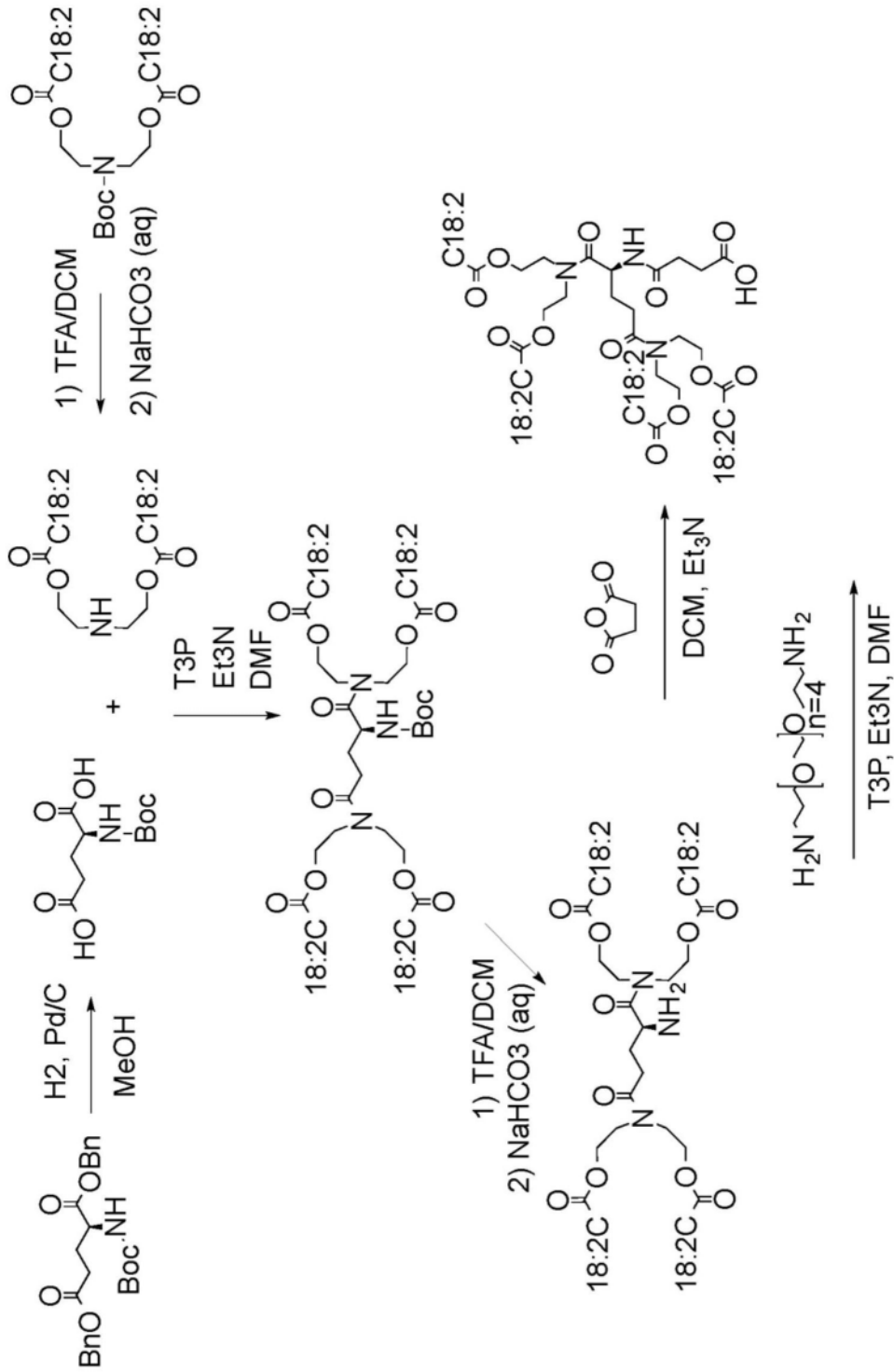


图22A

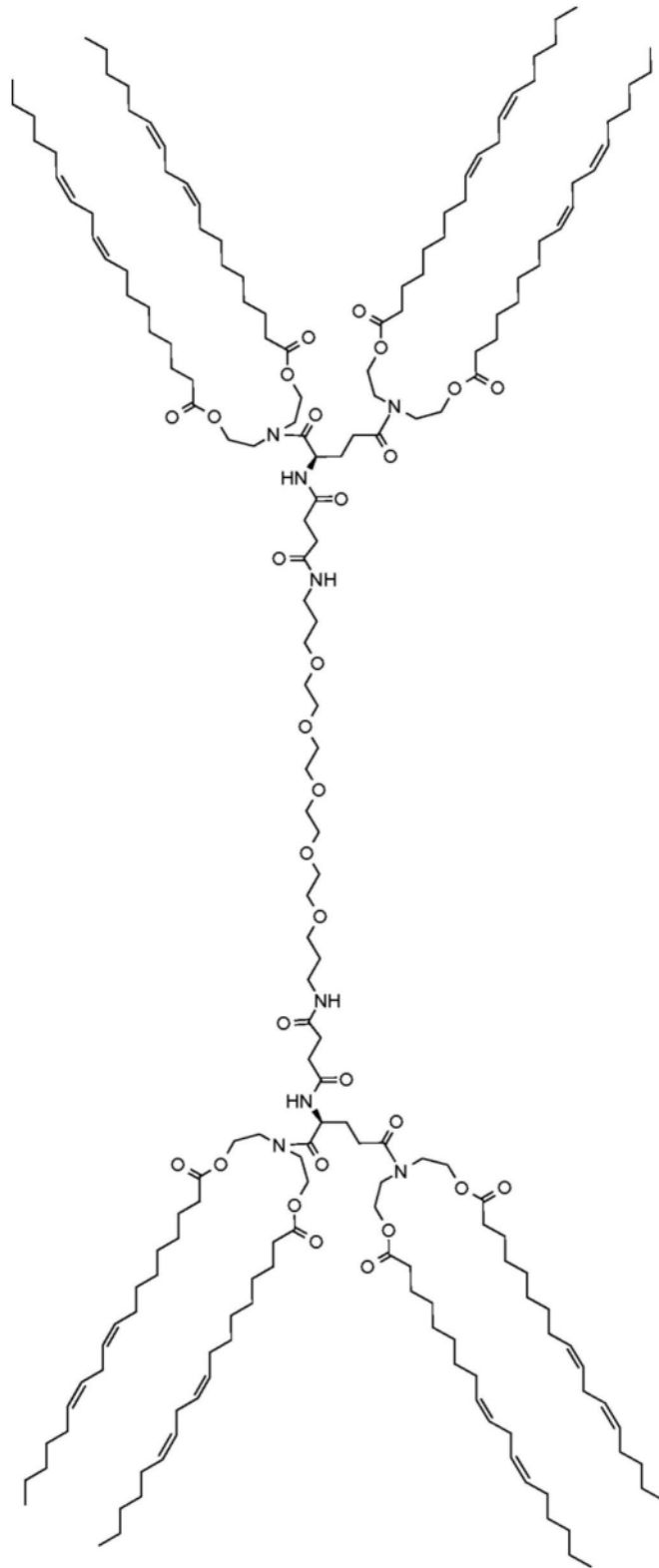


图22B

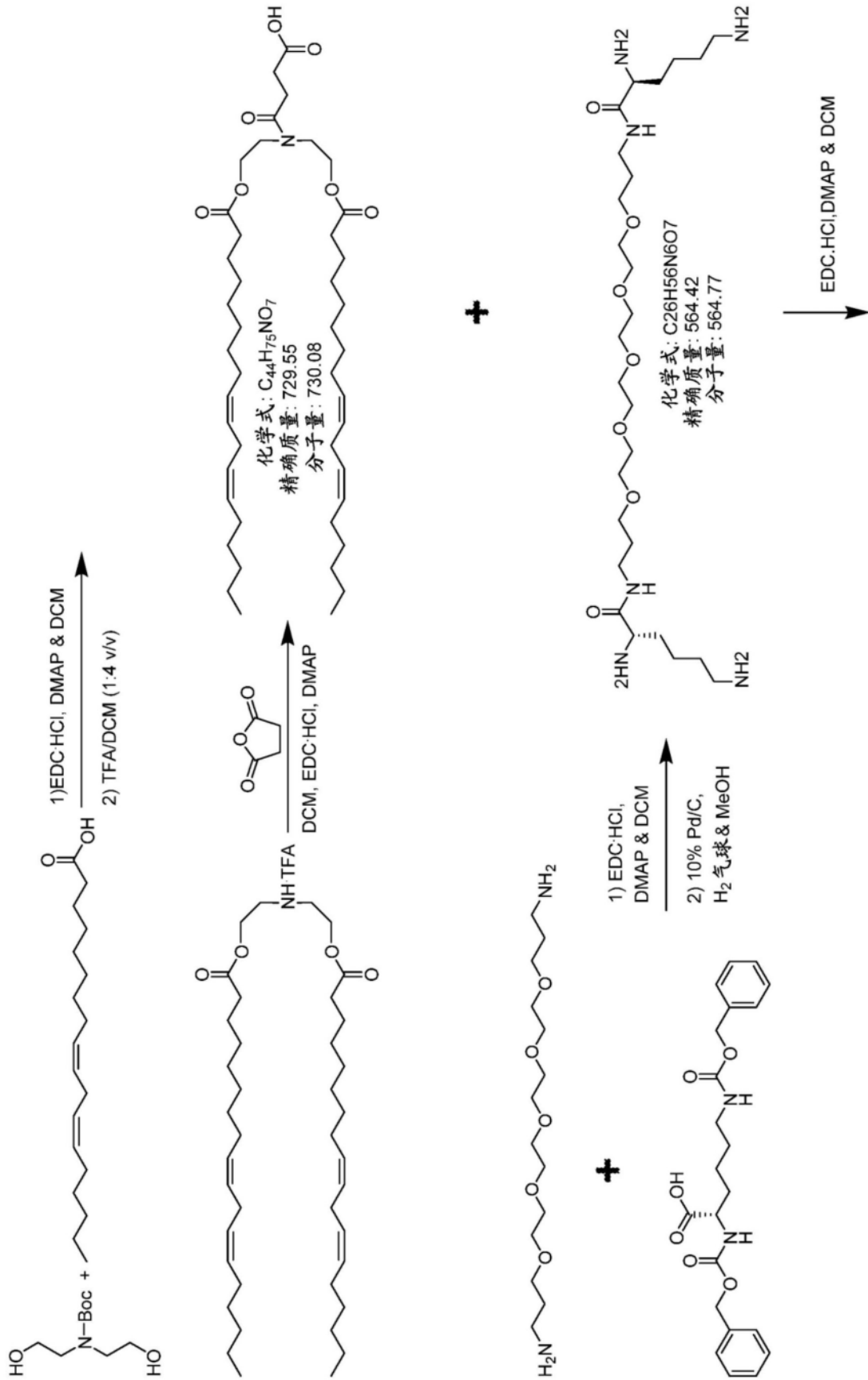


图23A

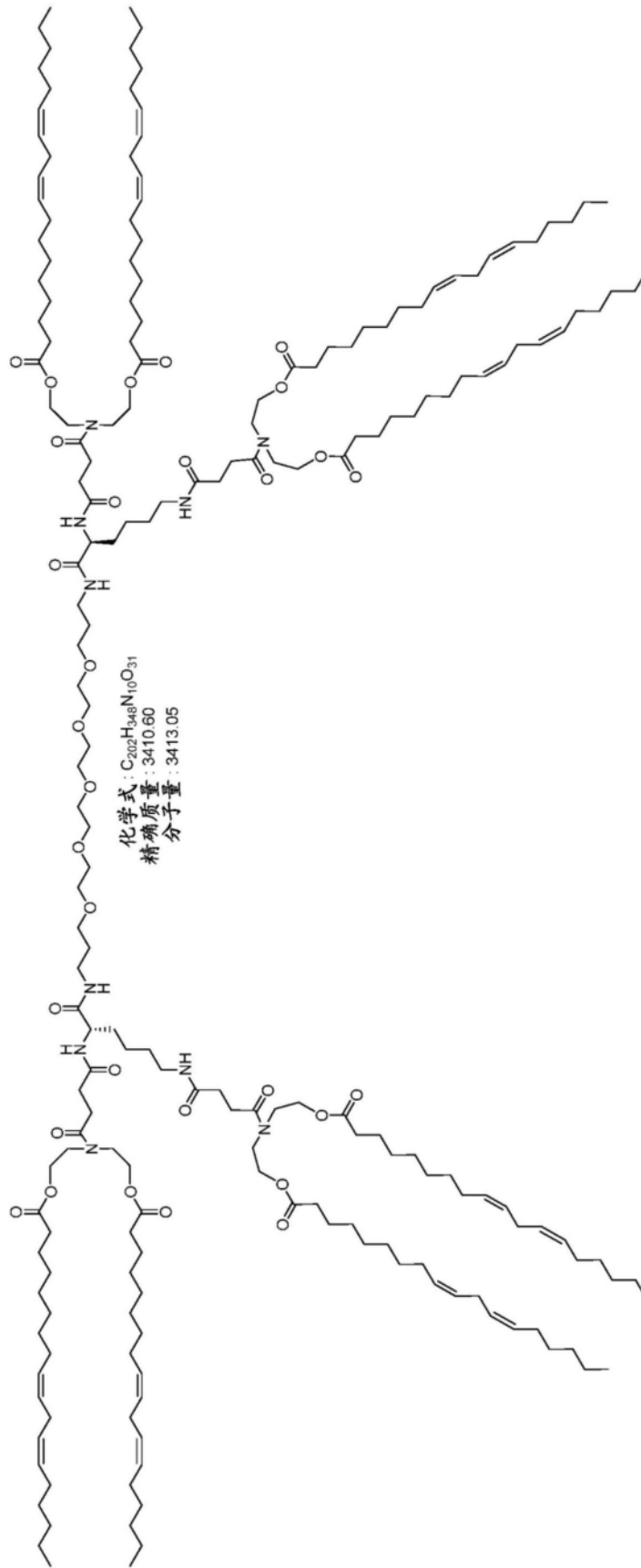


图23B

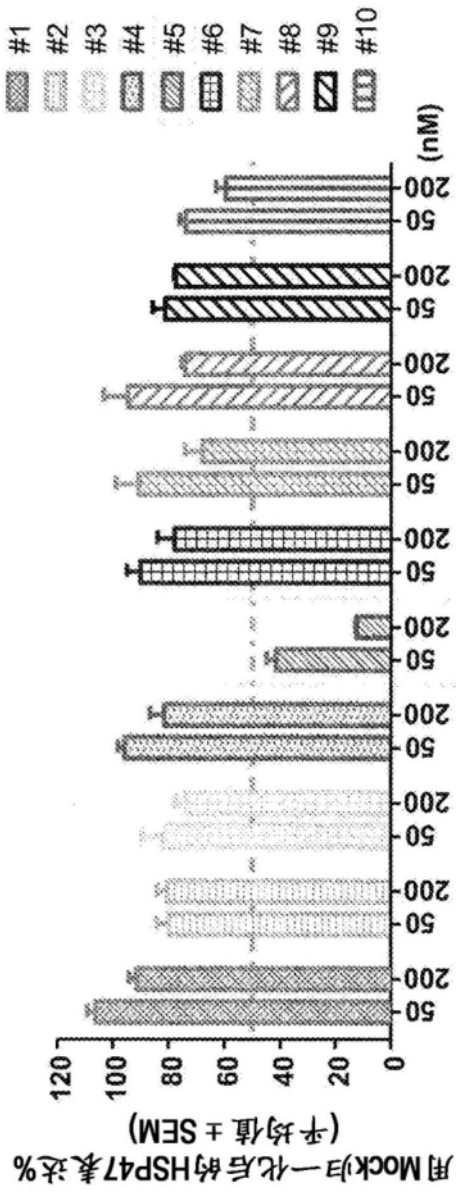


图24

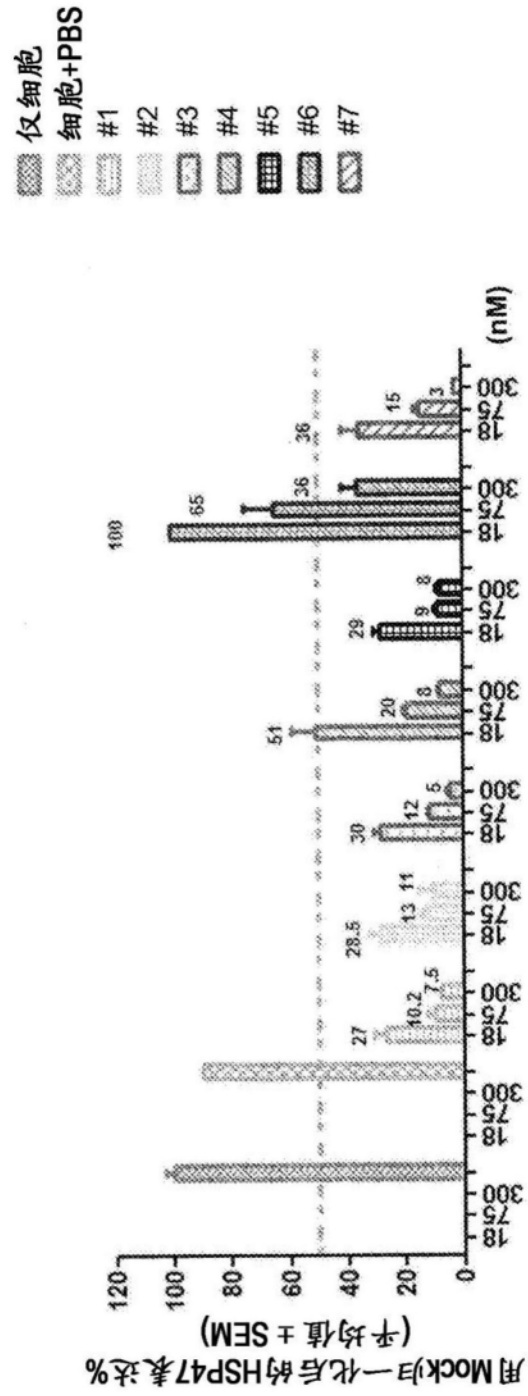


图25

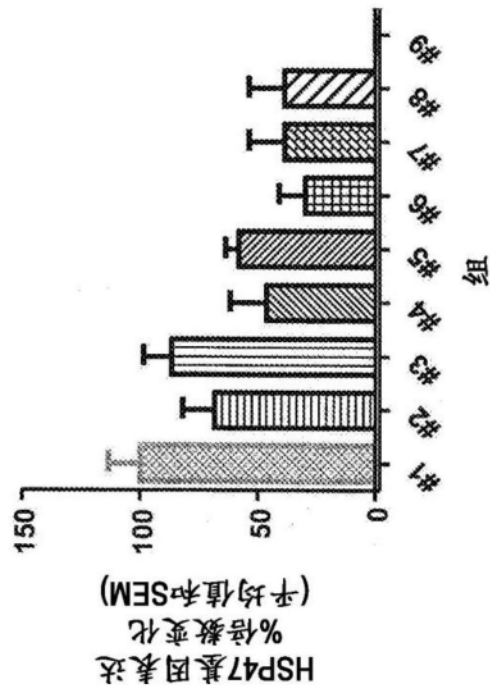


图26

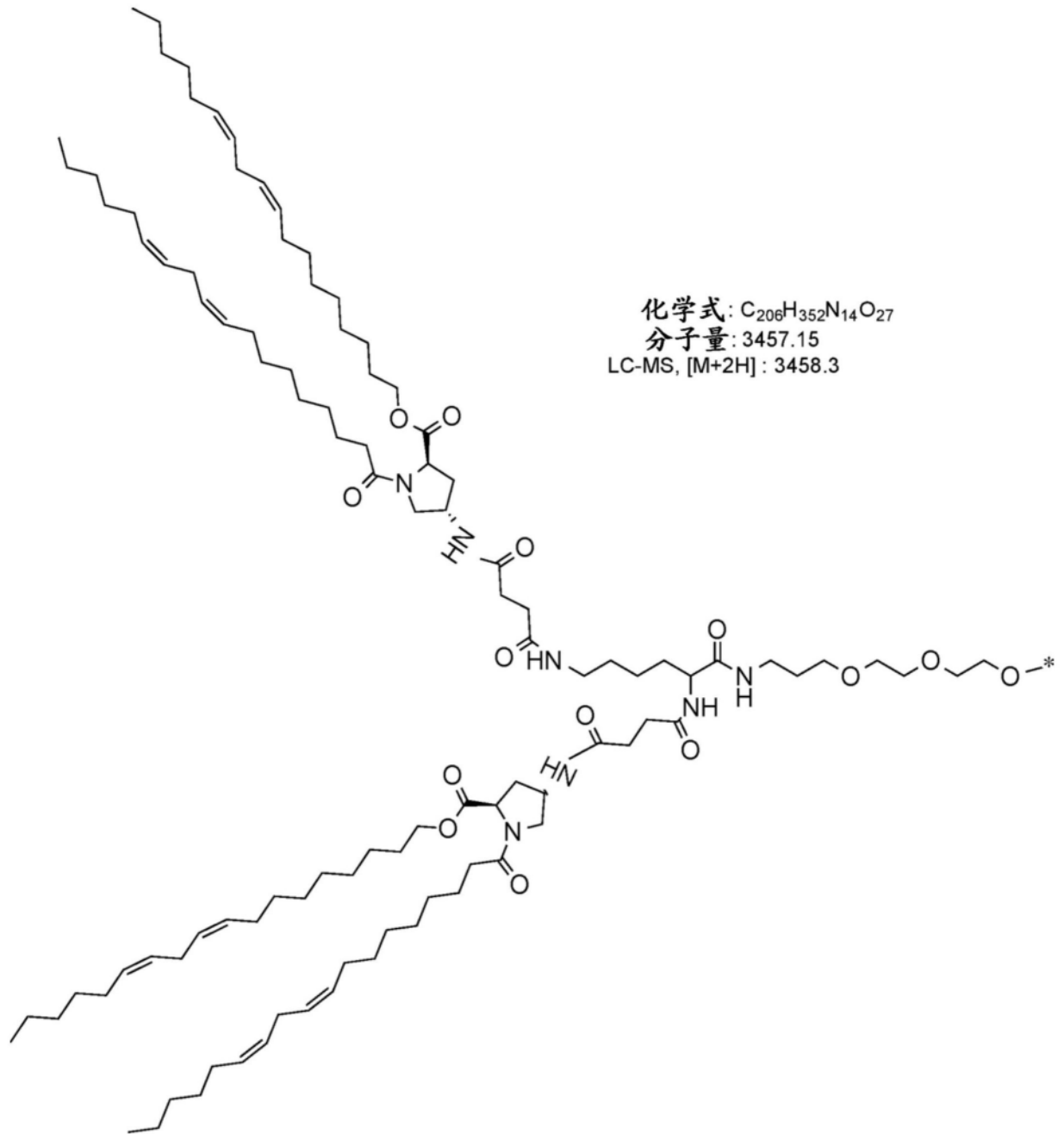


图27

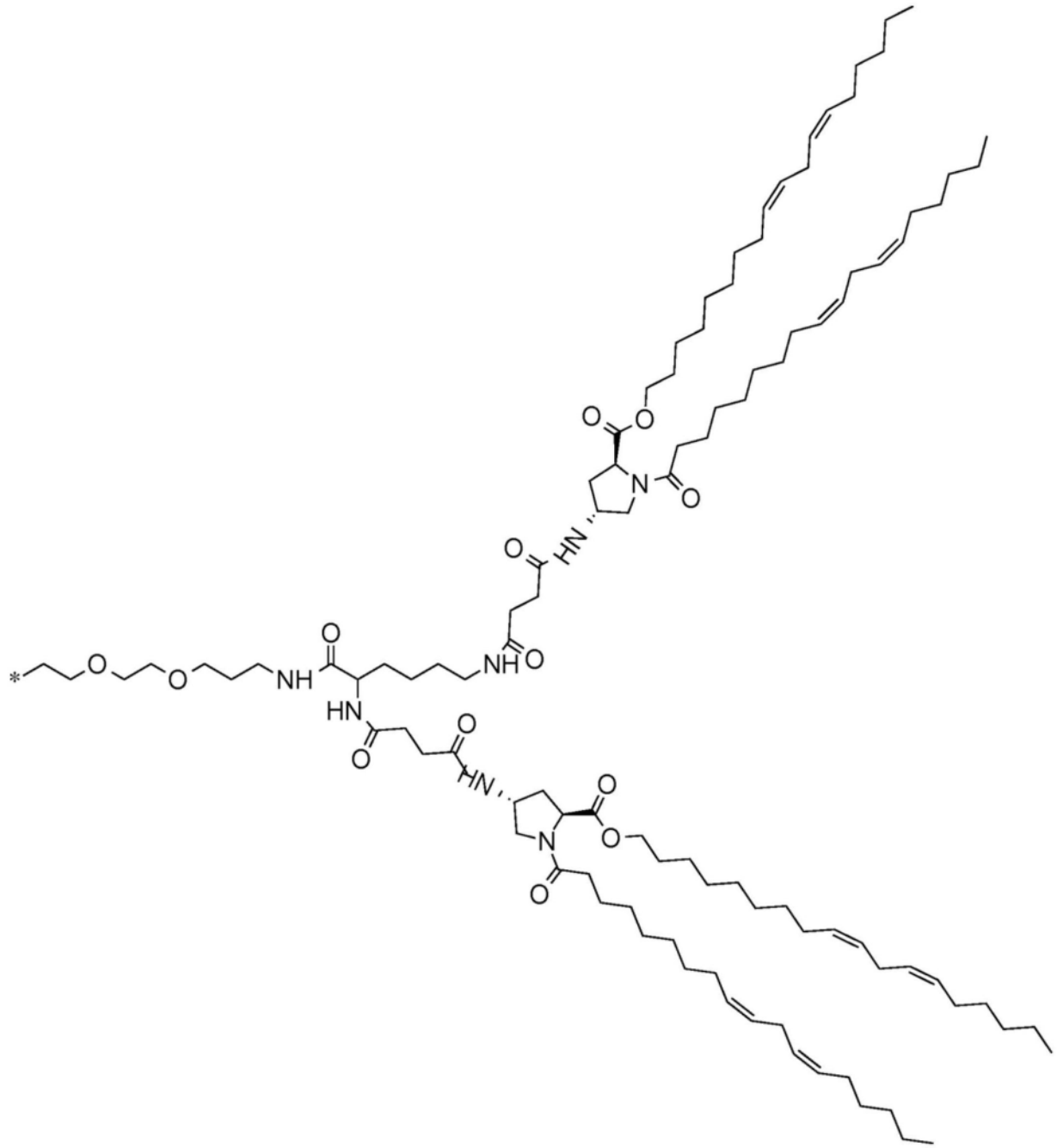


图28

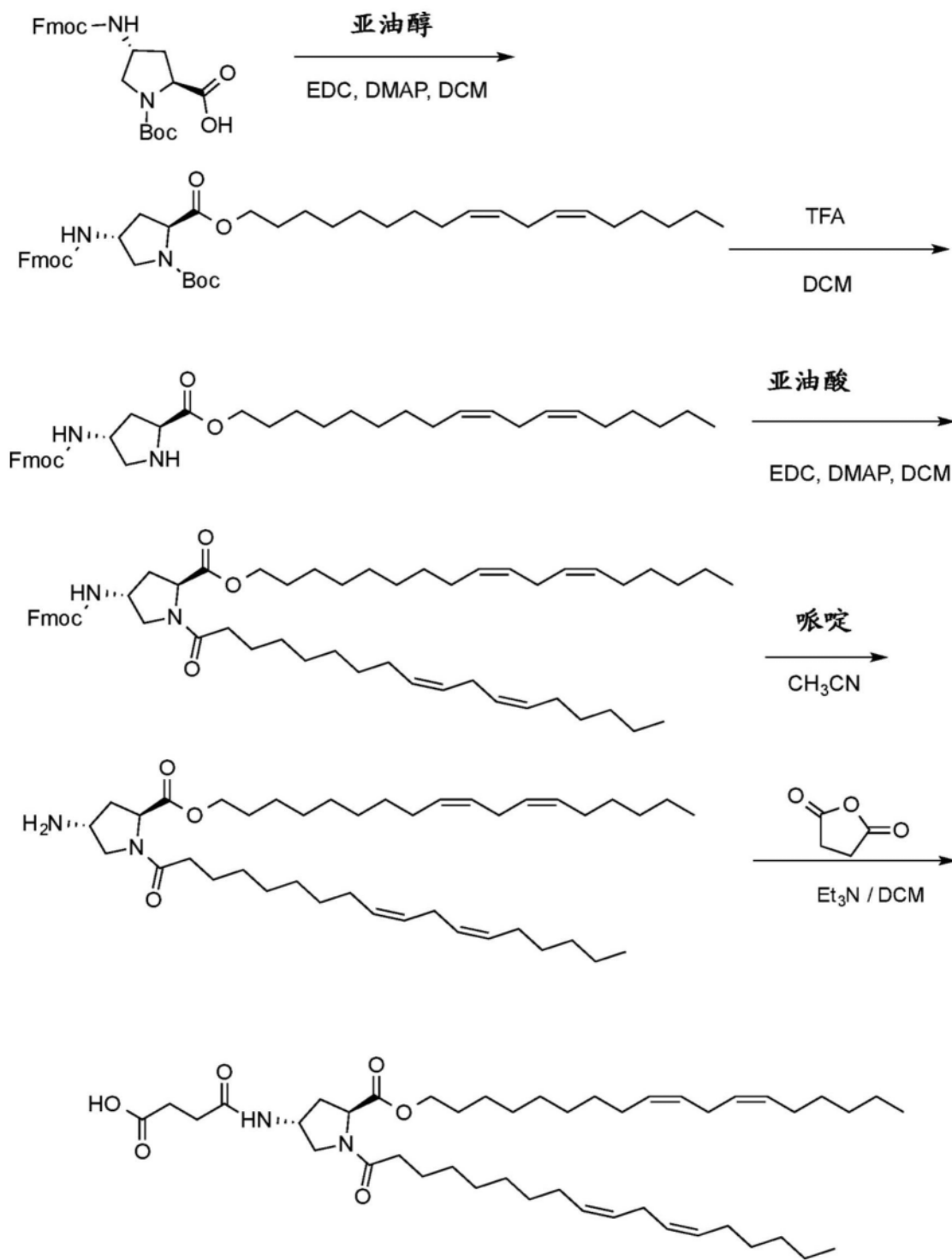


图29

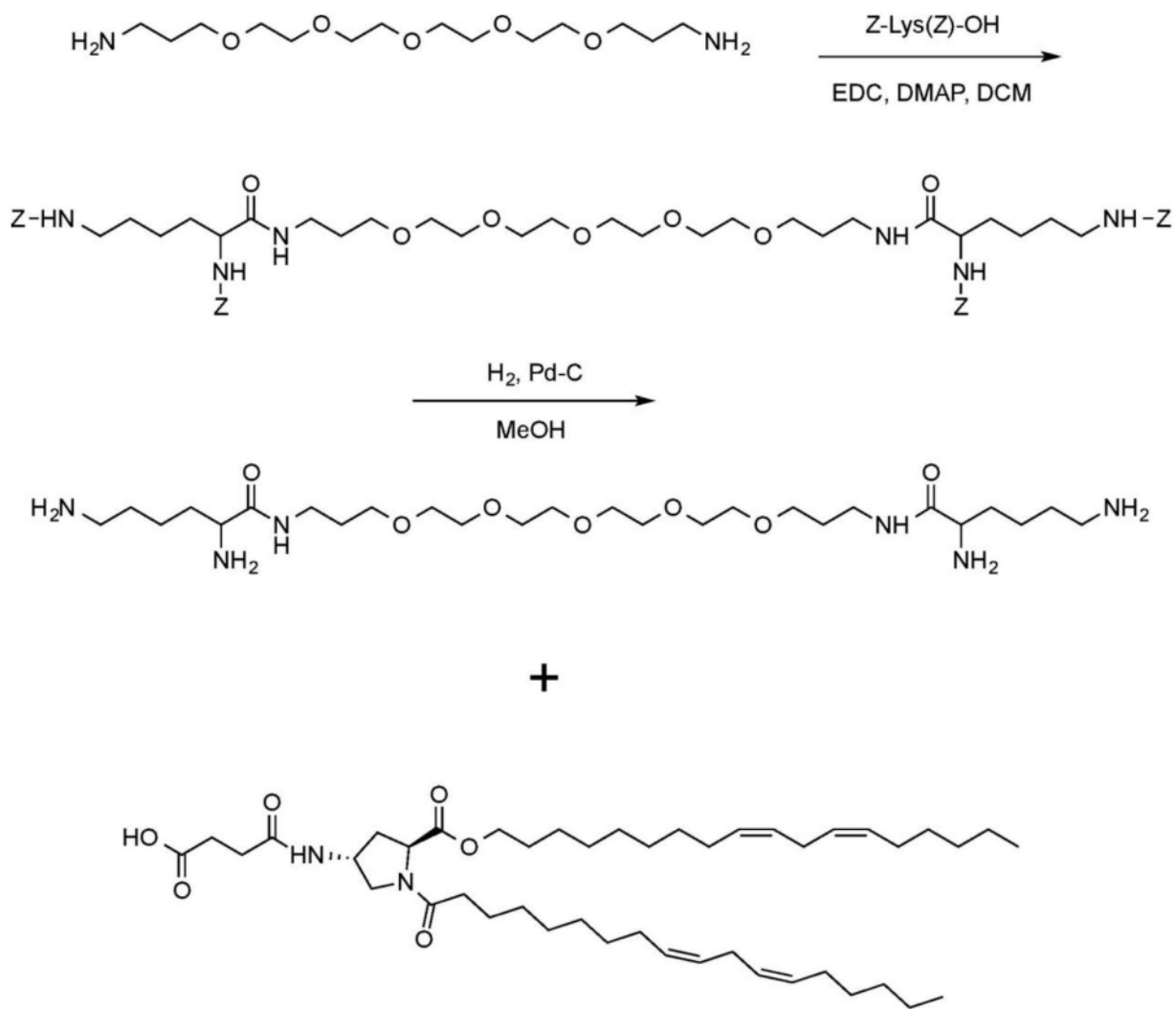


图30

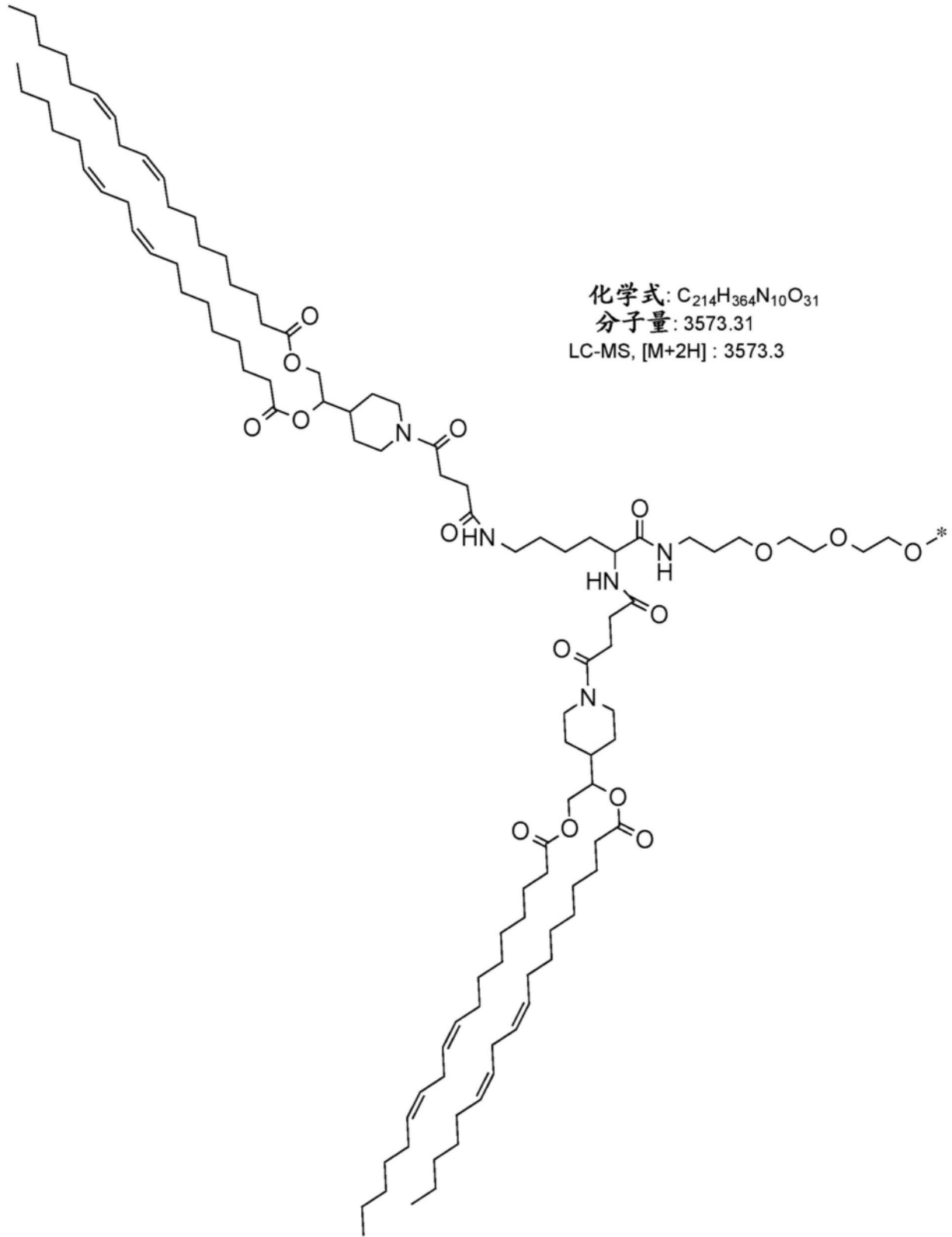


图31

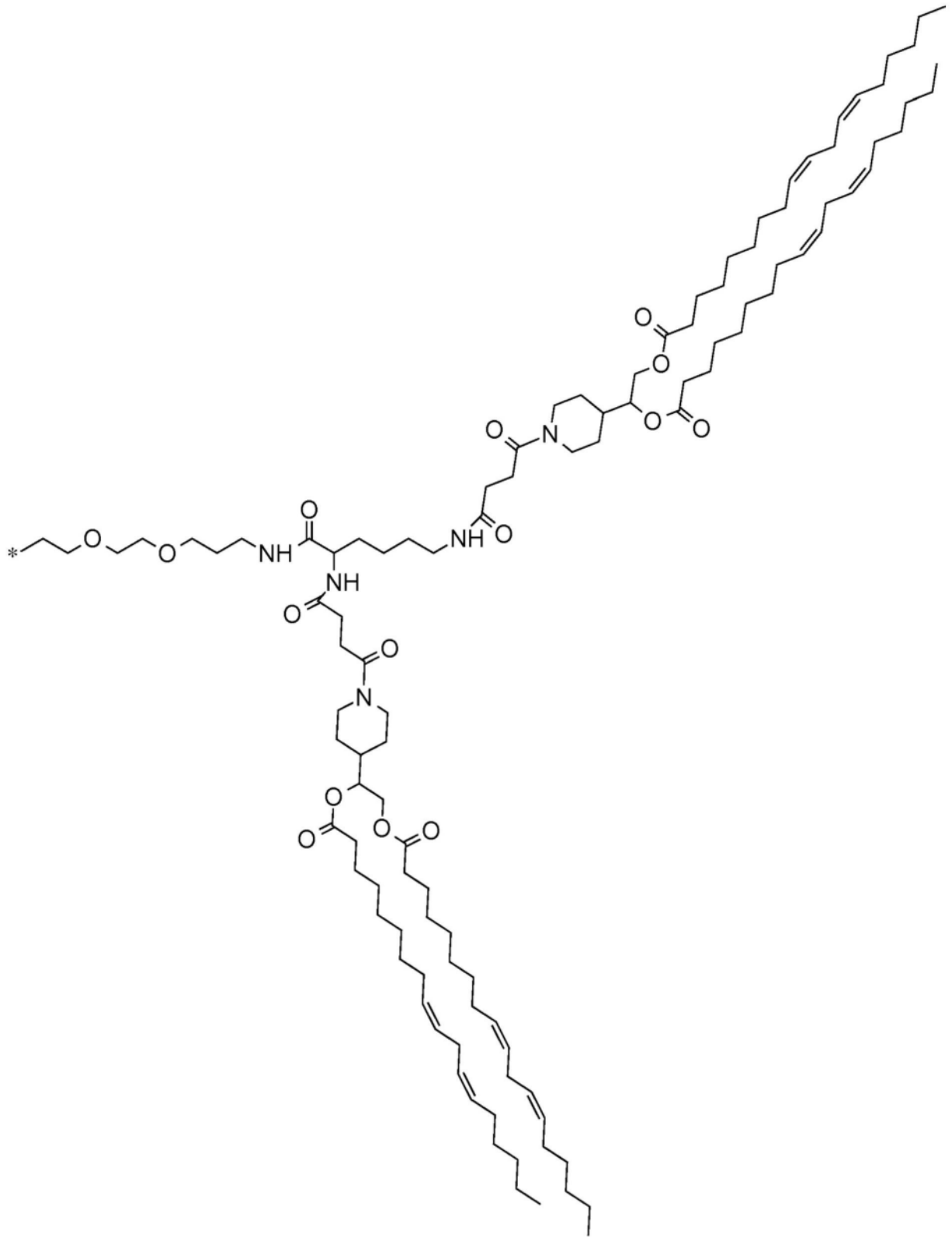


图32

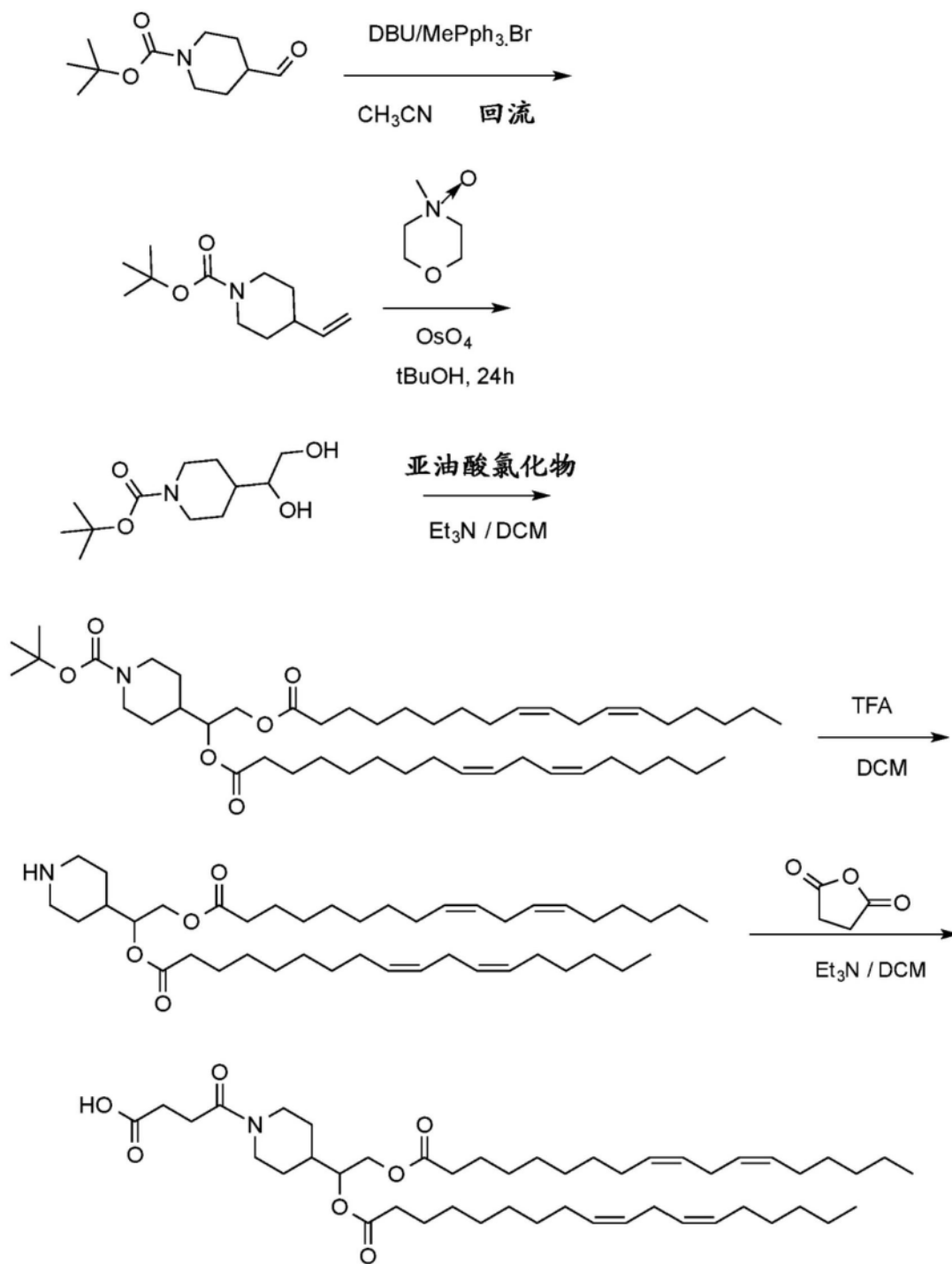


图33

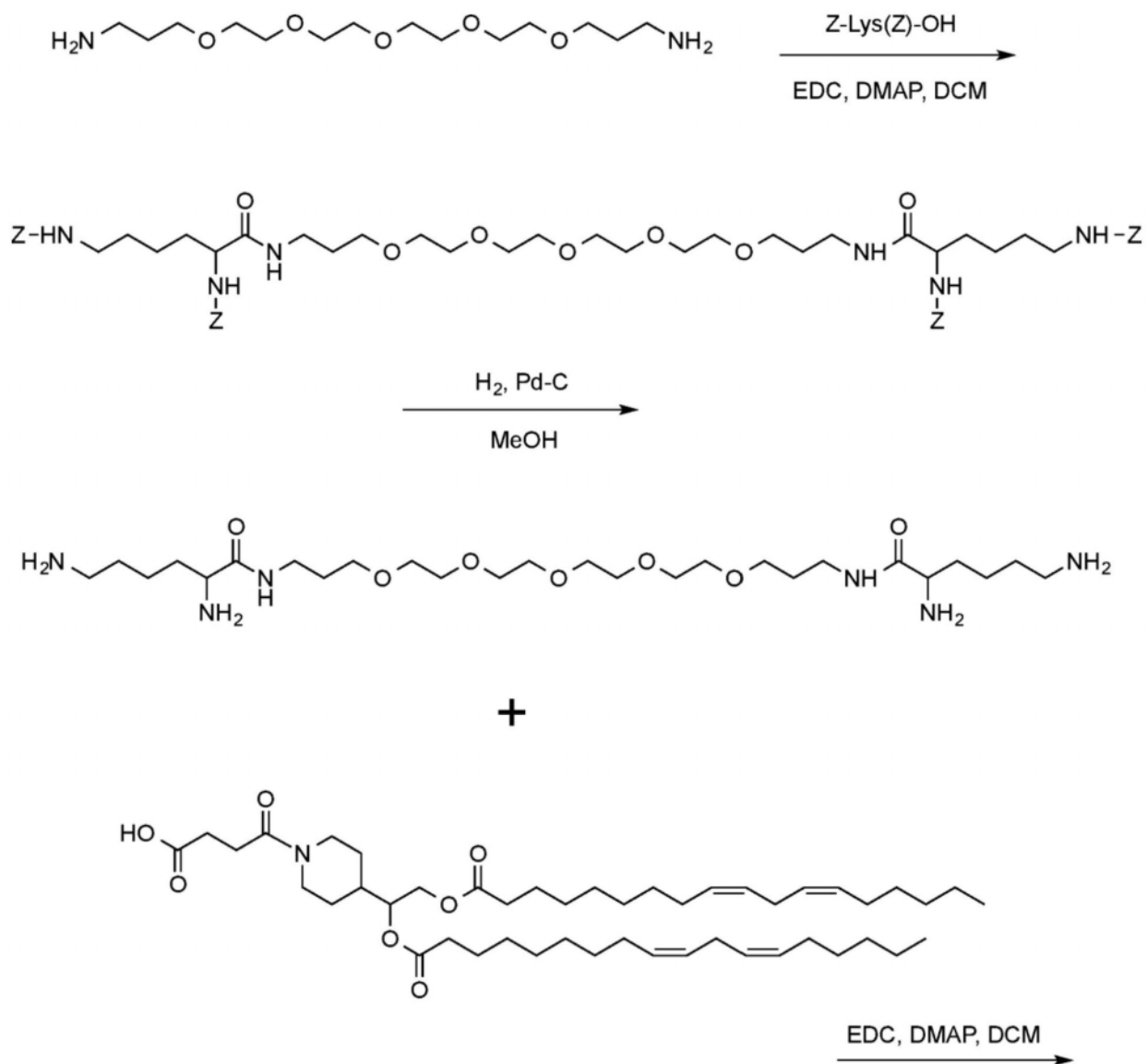


图34

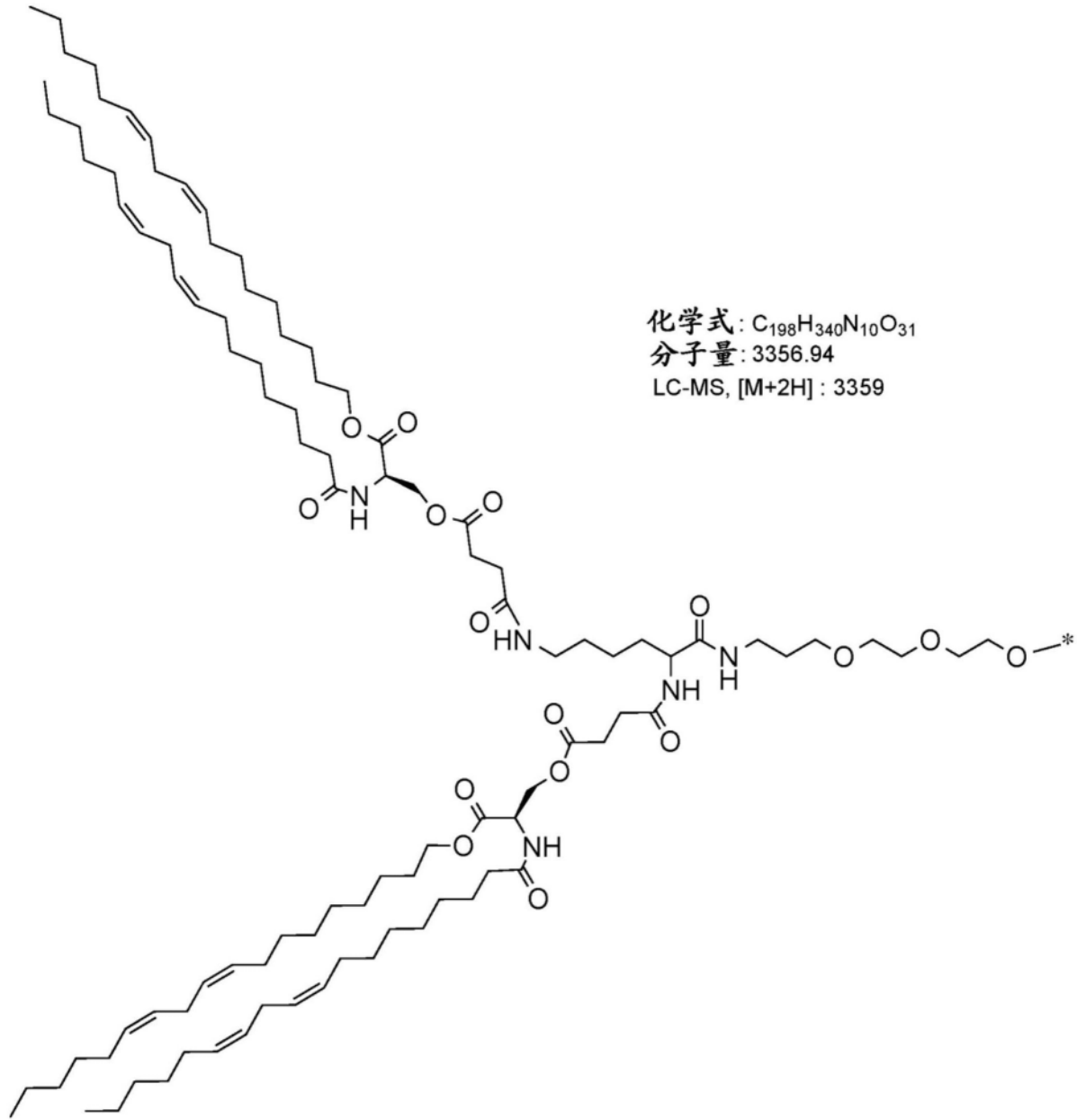


图35

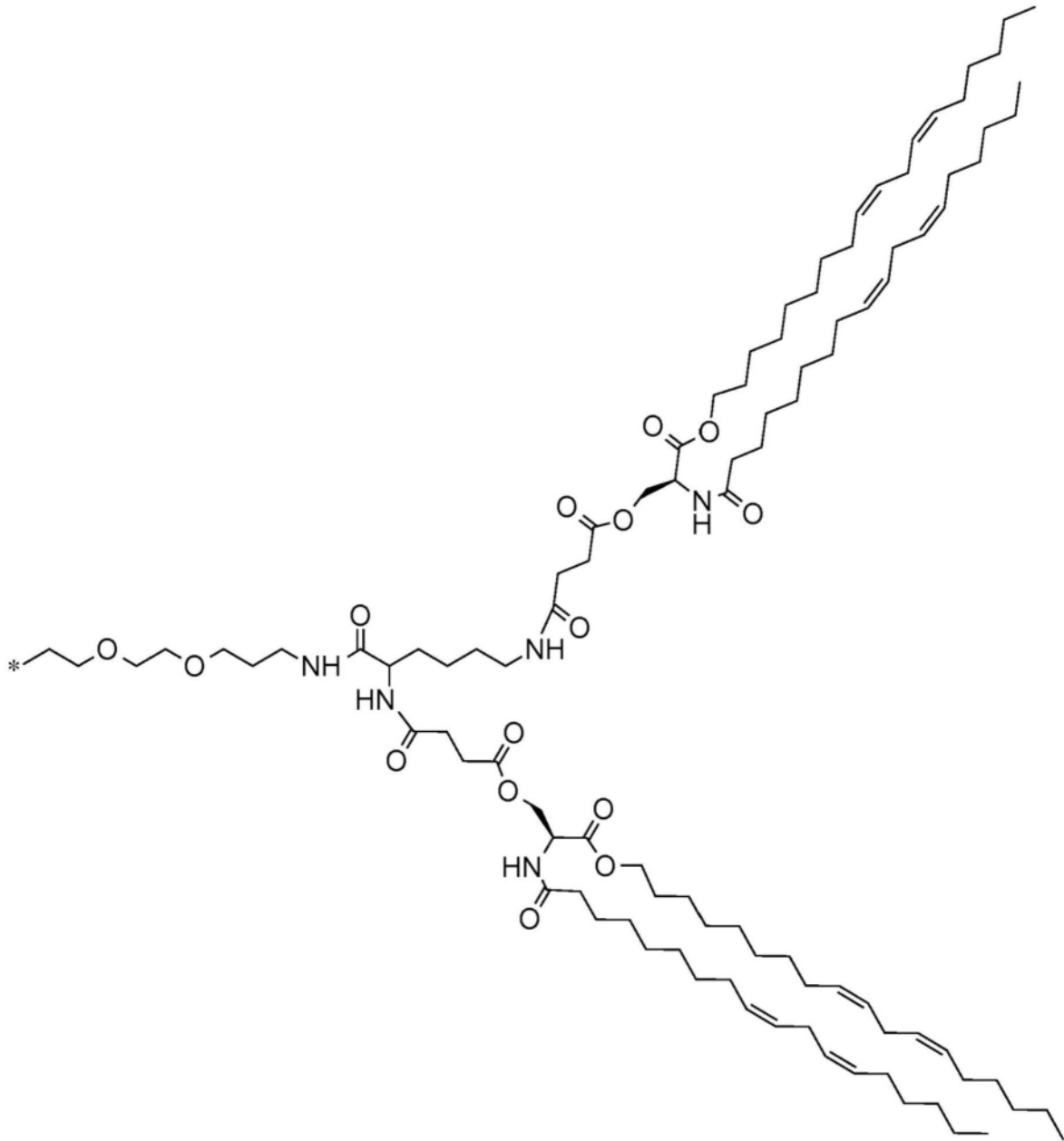


图36

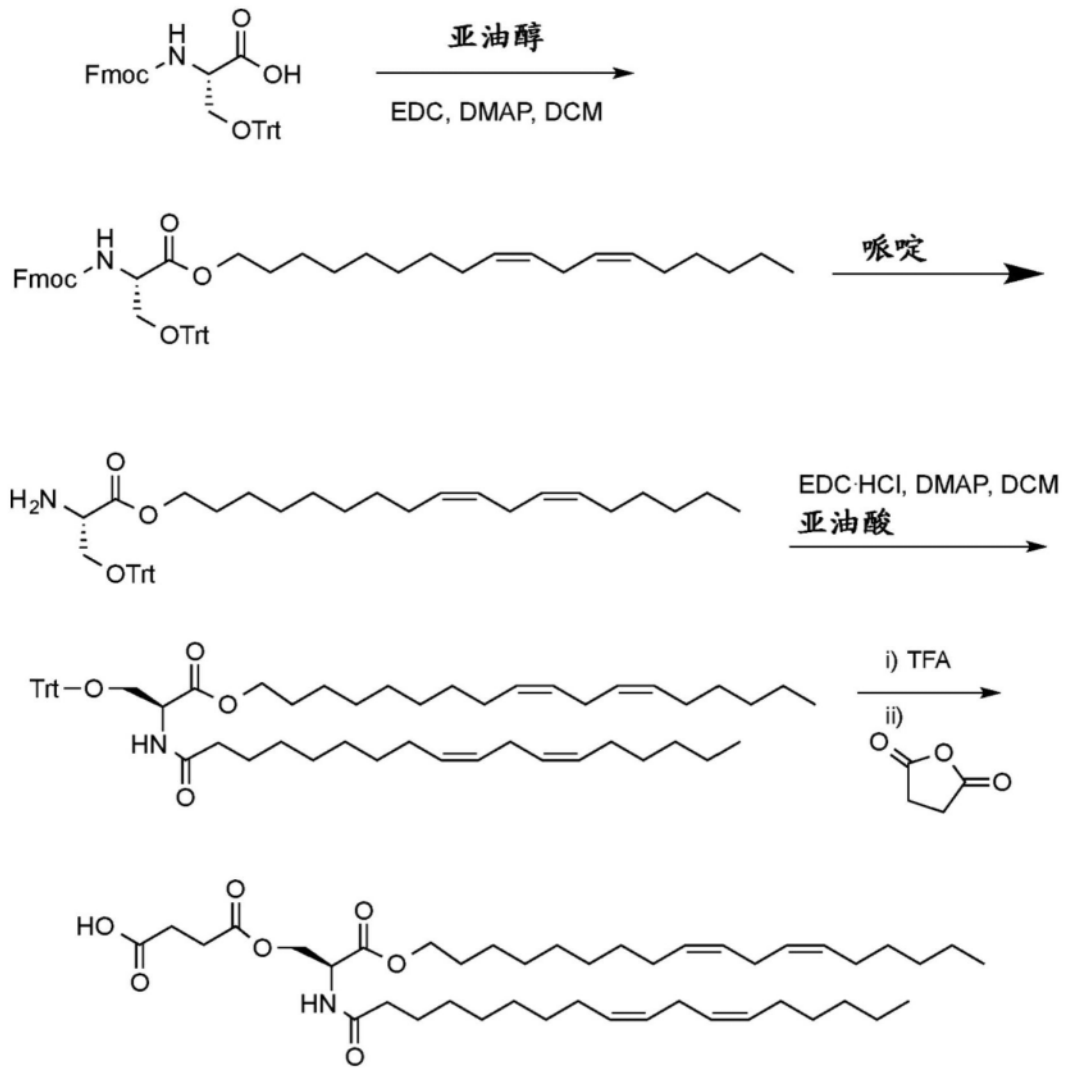


图37

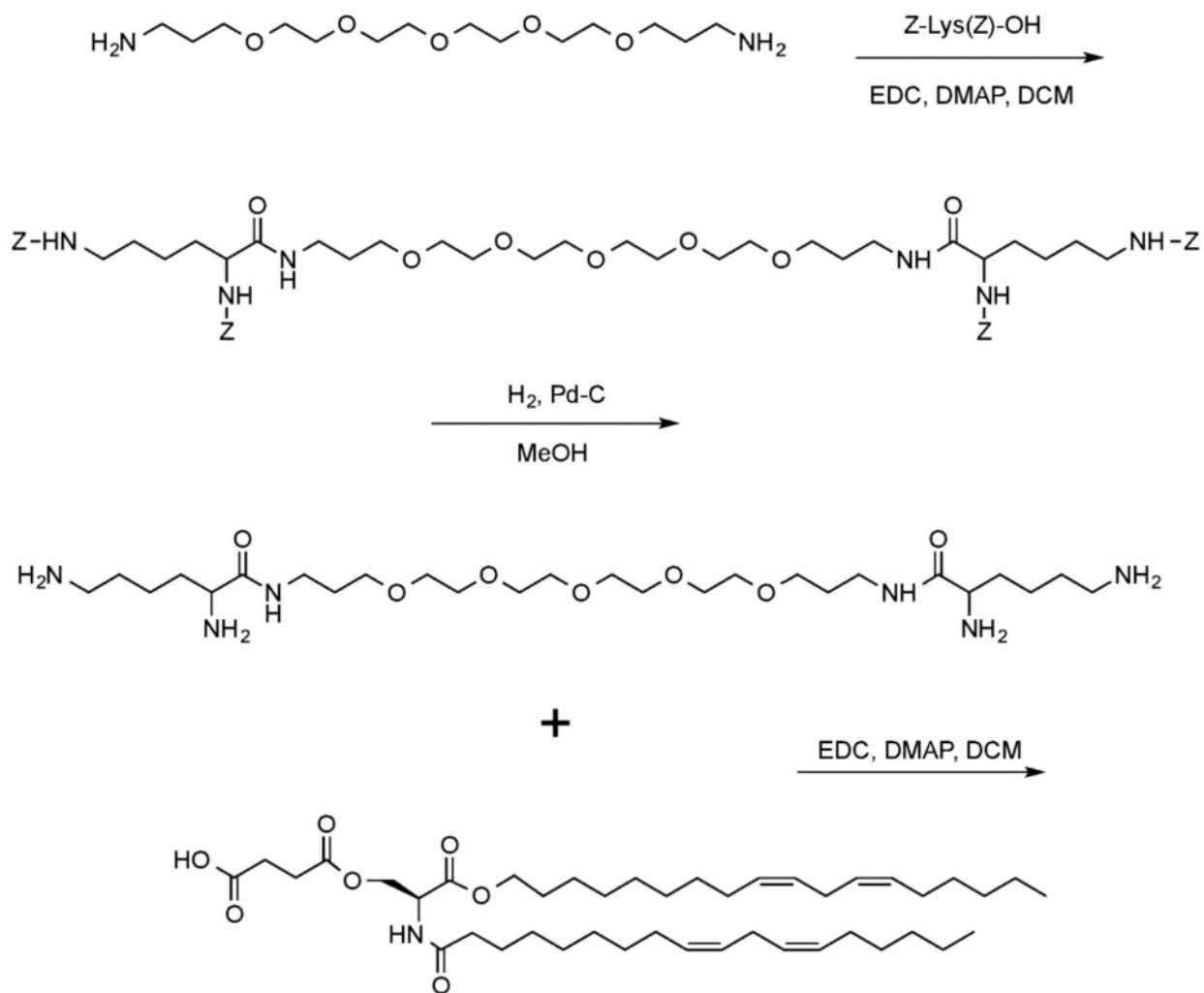
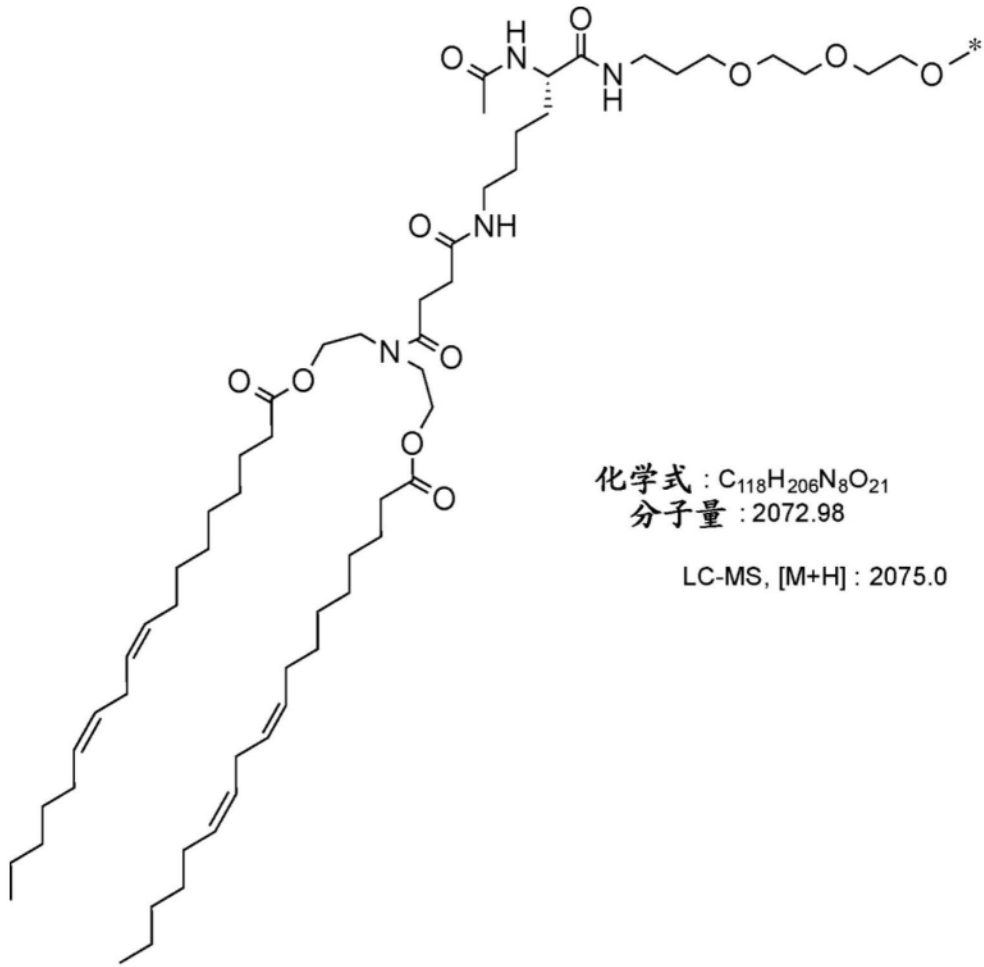


图38



化学式 : C<sub>118</sub>H<sub>206</sub>N<sub>8</sub>O<sub>21</sub>  
分子量 : 2072.98

LC-MS, [M+H]<sup>+</sup> : 2075.0

图39

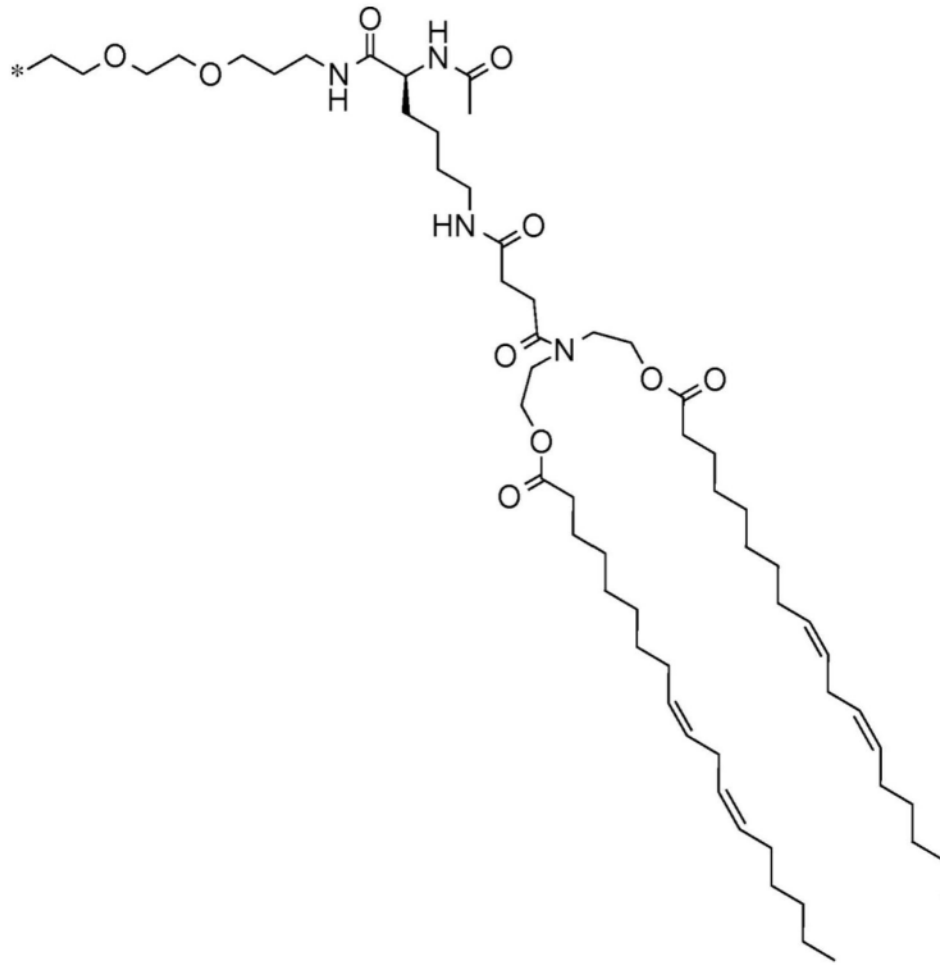


图40

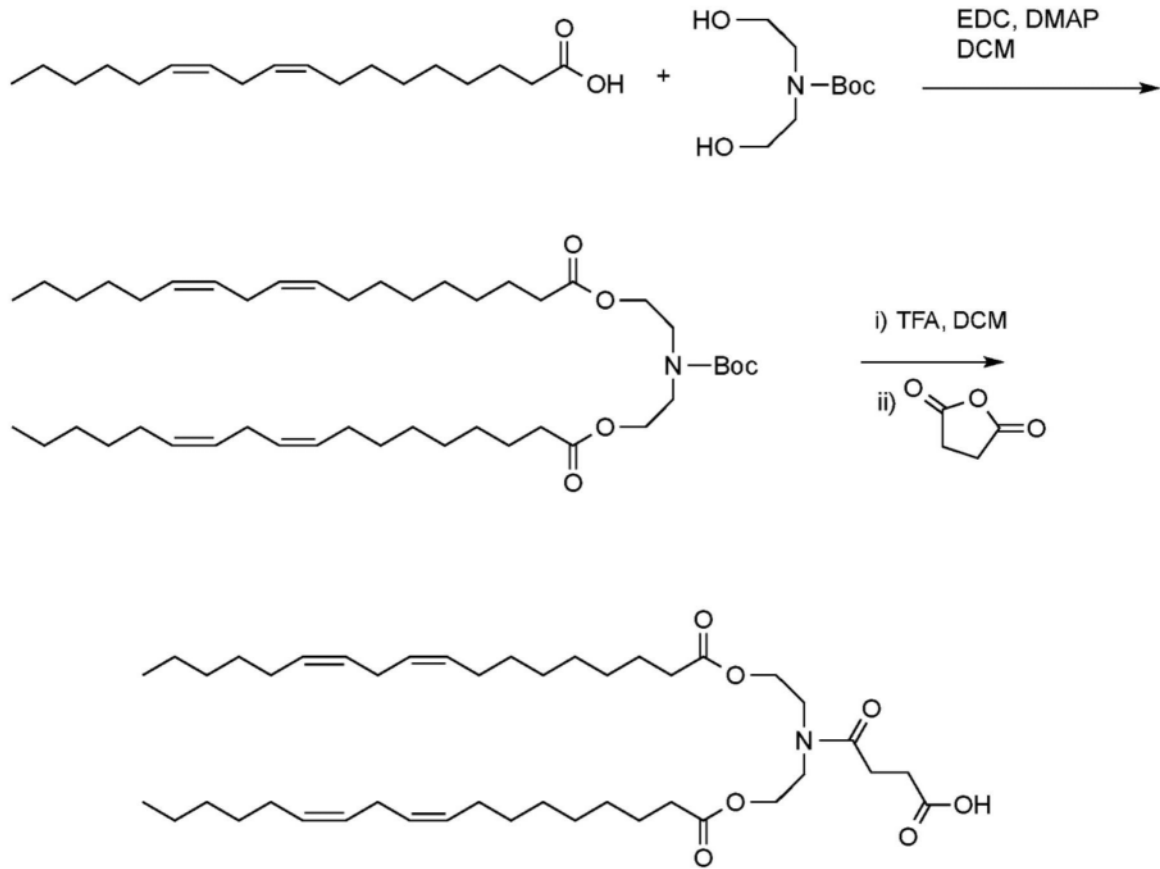


图41





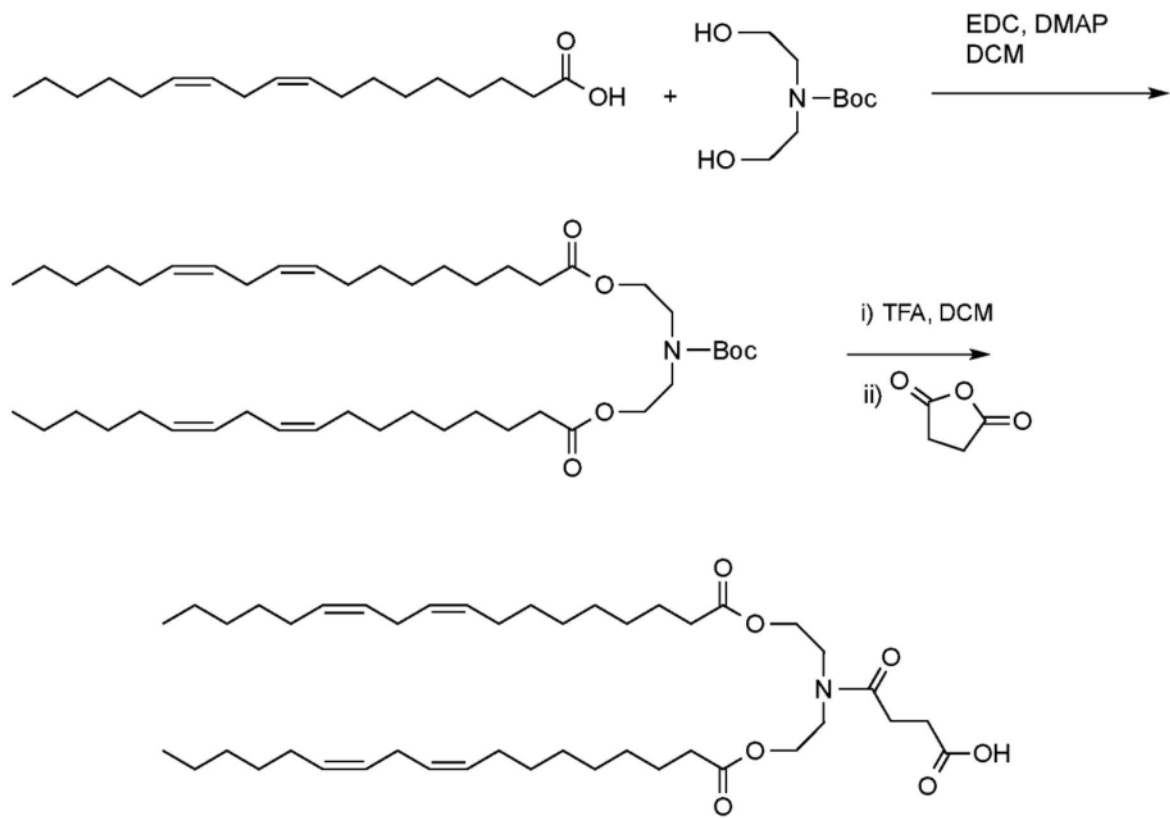


图44

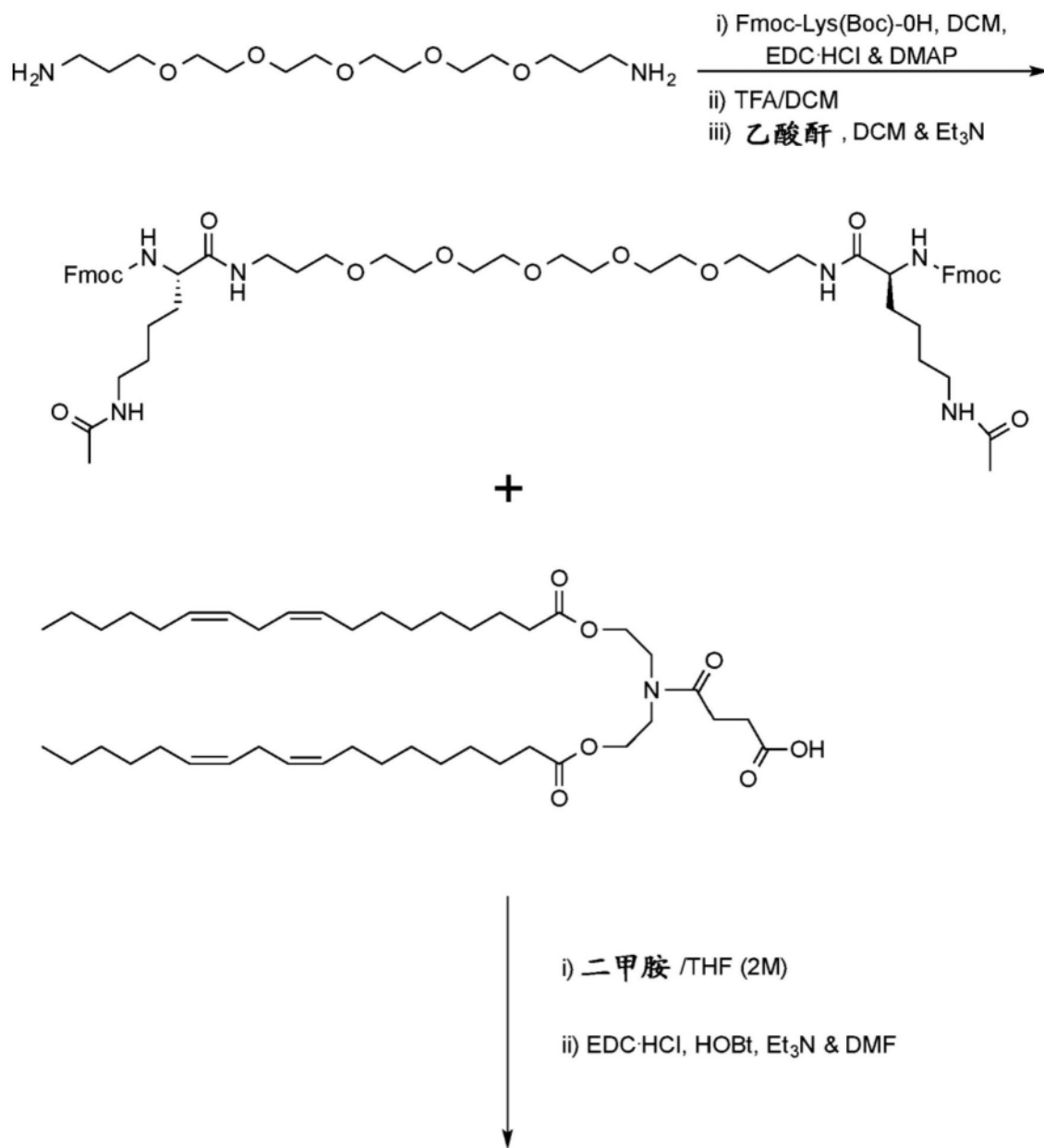


图45

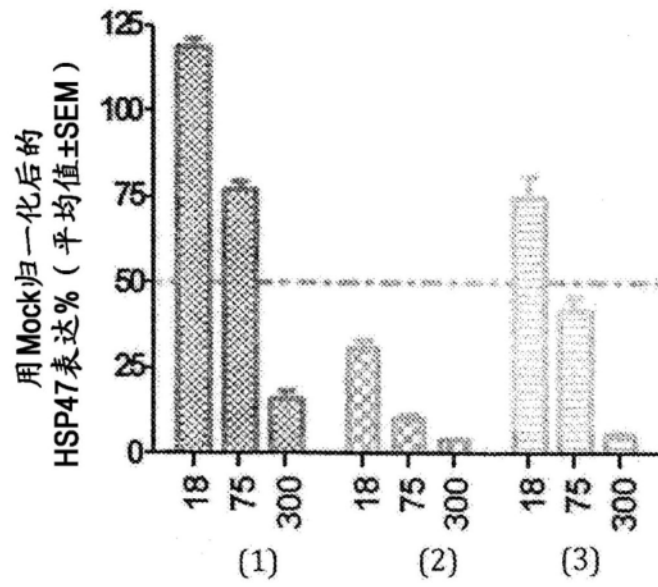


图46

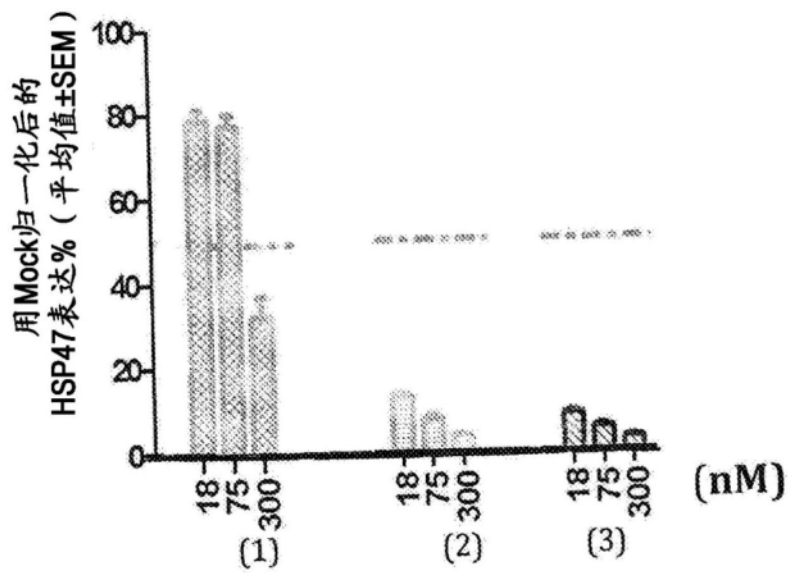


图47

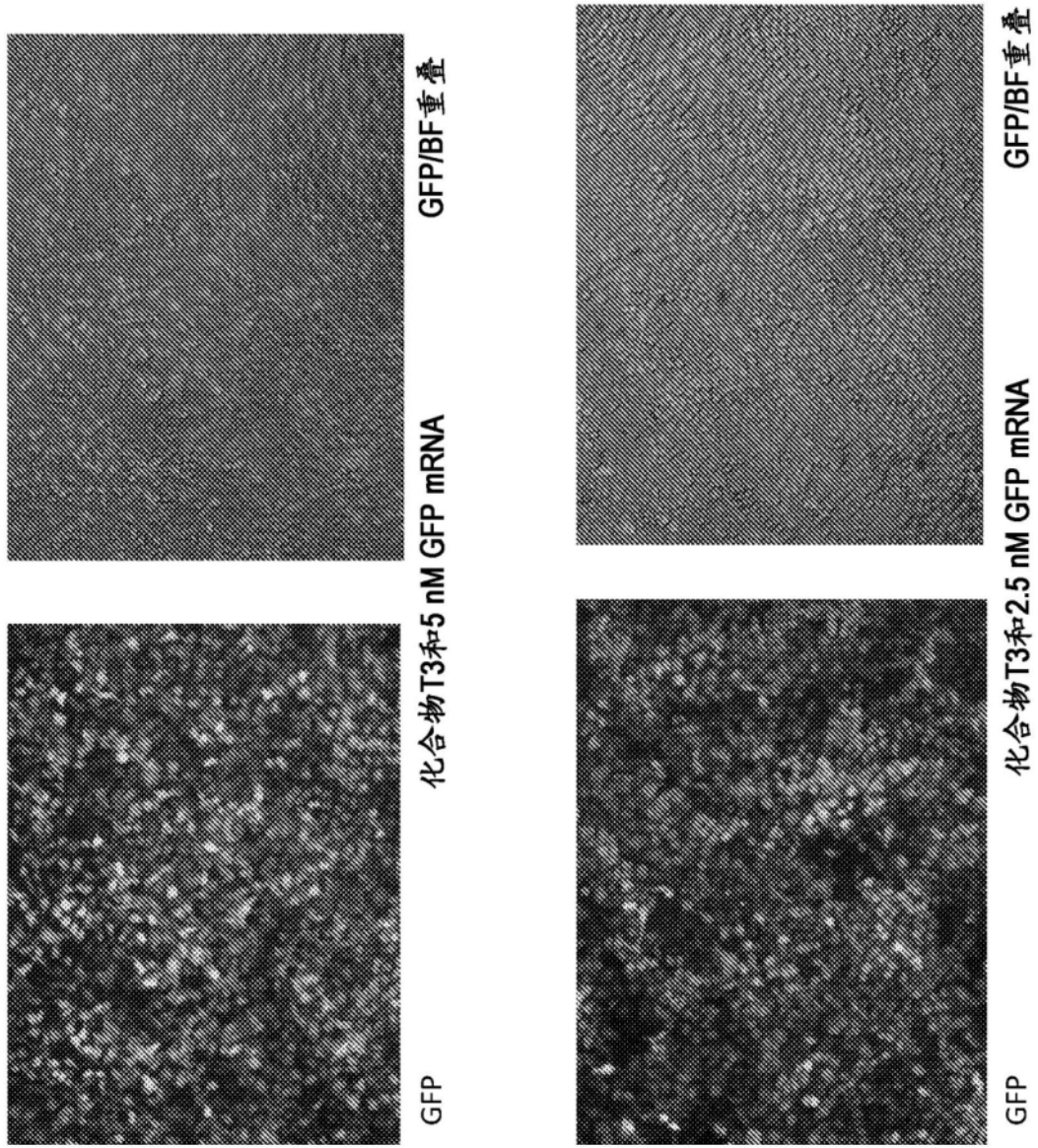


图48

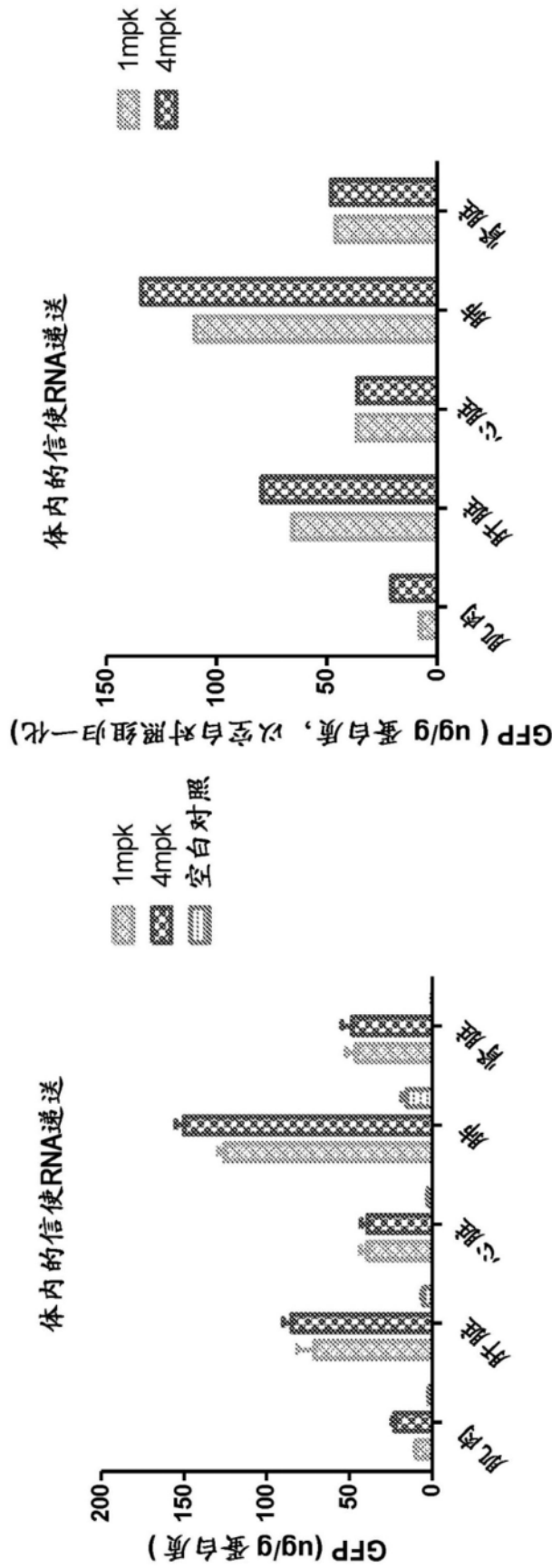


图49

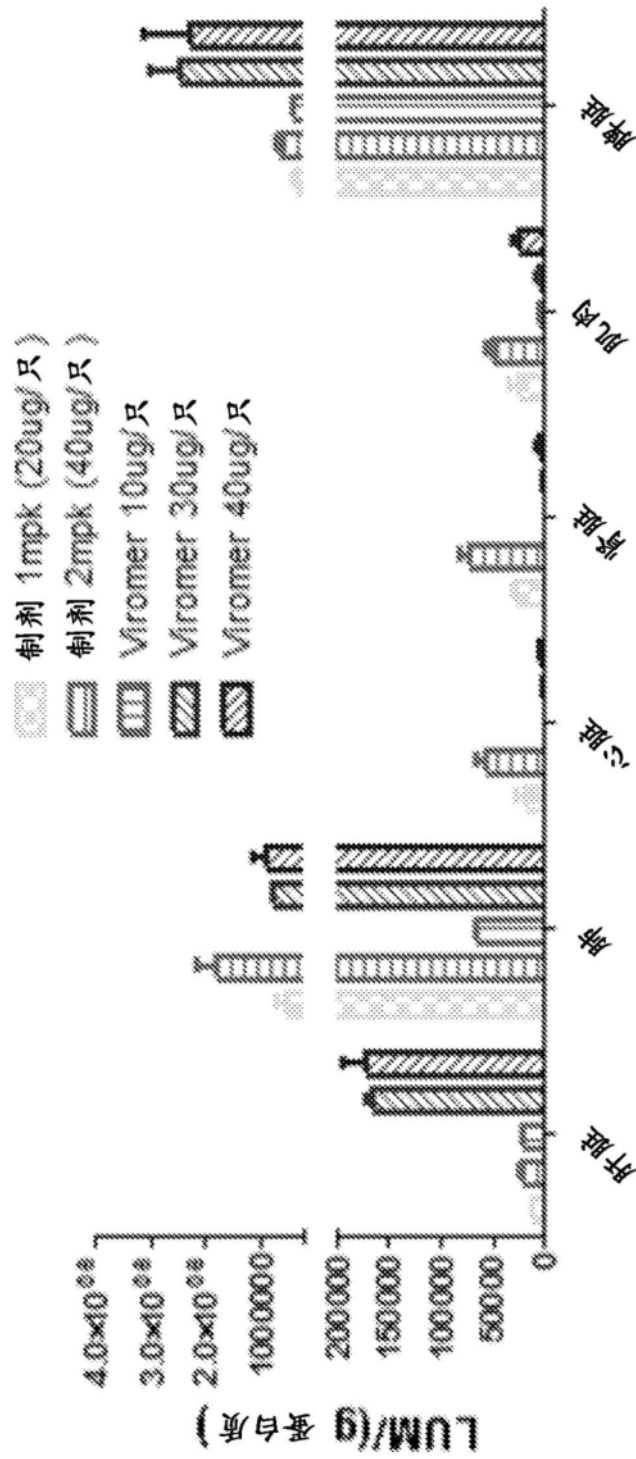


图50

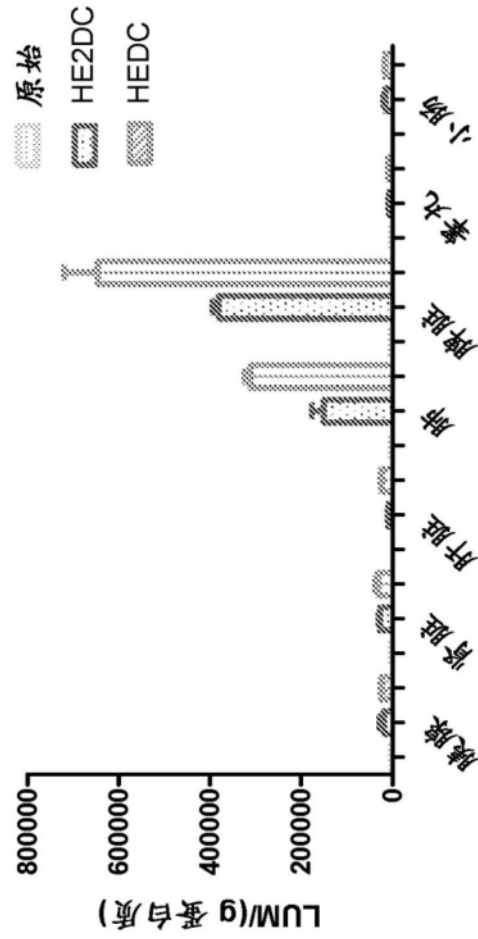


图51

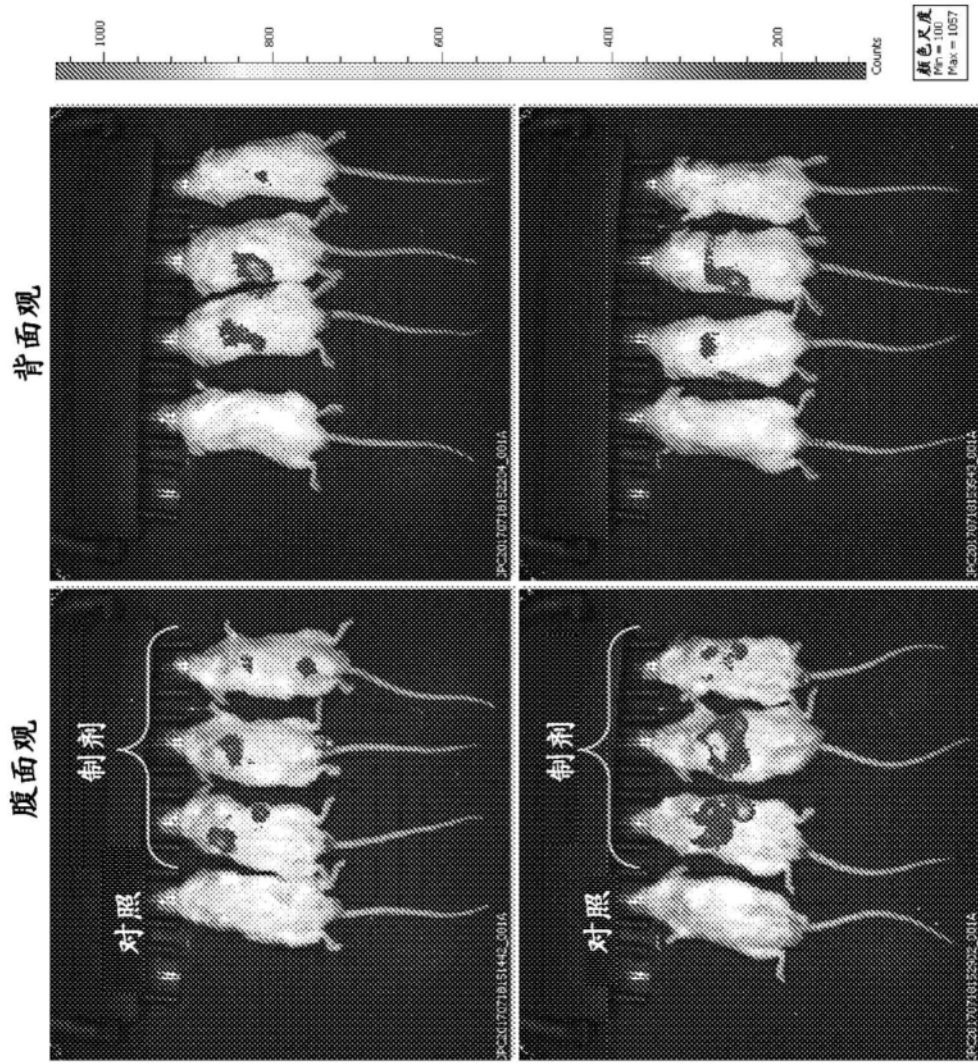


图52

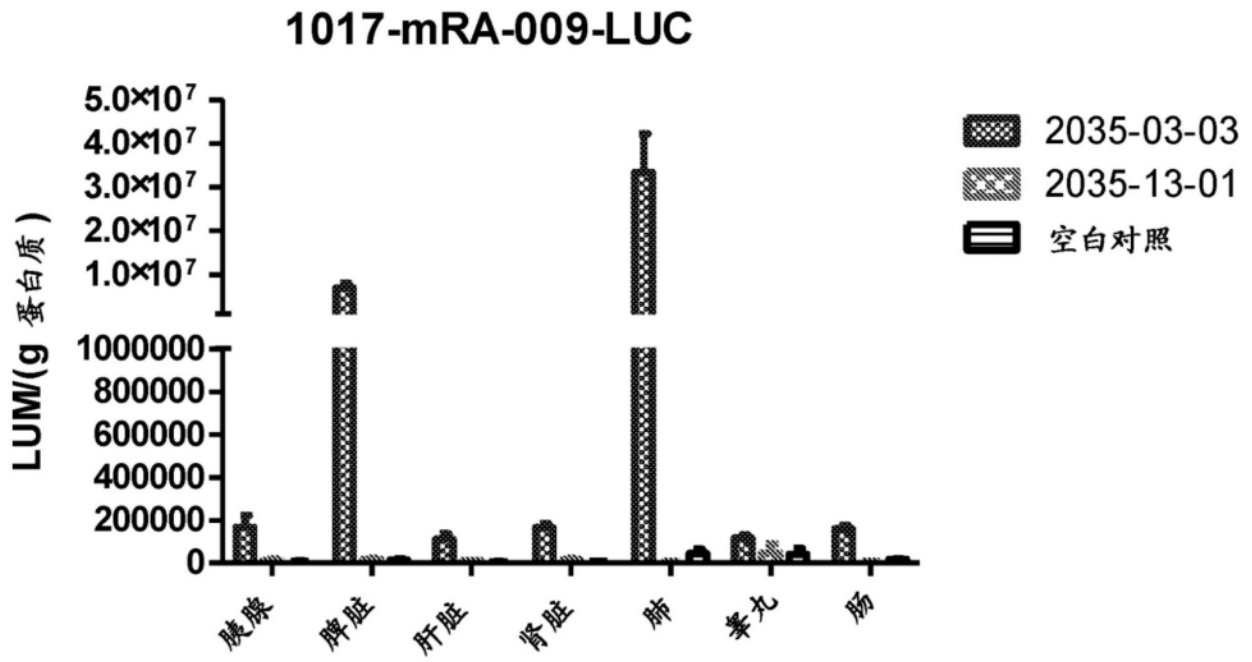


图53