



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111065377 A

(43)申请公布日 2020.04.24

(21)申请号 201880056879.8

(22)申请日 2018.07.17

(30)优先权数据

62/552,783 2017.08.31 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2020.03.02

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/042555 2018.07.17

(87)PCT国际申请的公布数据

W02019/045897 EN 2019.03.07

(71)申请人 生命技术公司

地址 美国加利福尼亚

(72)发明人 S·米什拉 X·德莫勒拉特杜热

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所 11038

代理人 李程达

(51)Int.Cl.

A61K 9/127(2006.01)

A61K 48/00(2006.01)

A61K 31/7105(2006.01)

C12N 15/88(2006.01)

A61K 9/00(2006.01)

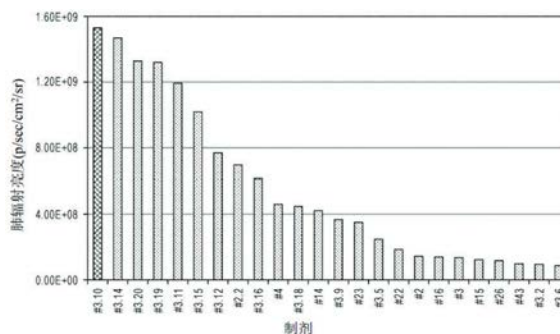
权利要求书9页 说明书39页 附图72页

(54)发明名称

用于组织特异性递送的阳离子脂质组合物

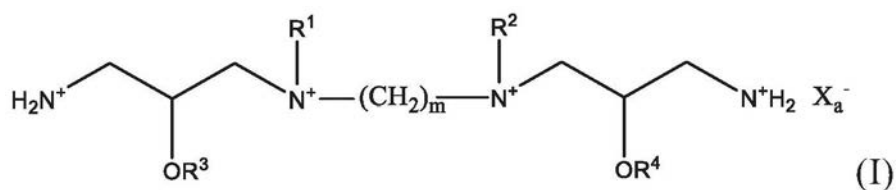
(57)摘要

本文尤其提供了可用于体内递送生物活性剂(例如治疗剂或诊断剂)的组合物和方法。本文提供的组合物包含阳离子脂质、辅助脂质和生物稳定性增强剂,它们与所述生物活性剂一起形成脂质聚集体并允许将所述生物活性剂全身递送至例如肺组织而无需生物分子靶向。



1. 一种组合物,其包含:

(i) 第一阳离子脂质,其组成摩尔比为约0.18至约0.32并且具有式:



其中

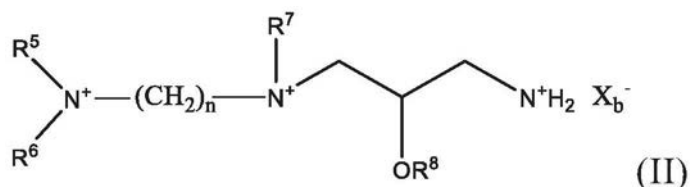
R^1 和 R^2 独立地是取代或未取代的烷基,取代或未取代的杂烷基,取代或未取代的环烷基,取代或未取代的杂环烷基,取代或未取代的芳基,或取代或未取代的杂芳基;

R^3 和 R^4 独立地是氢,取代或未取代的烷基,取代或未取代的杂烷基,取代或未取代的环烷基,取代或未取代的杂环烷基,取代或未取代的芳基,或取代或未取代的杂芳基;

m 是1至6的整数;

X_a^- 是阴离子;

(ii) 第二阳离子脂质,其组成摩尔比为约0.24至约0.51并且具有式:



其中

R^5 和 R^8 独立地是氢,取代或未取代的烷基,取代或未取代的杂烷基,取代或未取代的环烷基,取代或未取代的杂环烷基,取代或未取代的芳基,或取代或未取代的杂芳基;

R^6 和 R^7 独立地是取代或未取代的烷基,取代或未取代的杂烷基,取代或未取代的环烷基,取代或未取代的杂环烷基,取代或未取代的芳基,或取代或未取代的杂芳基;

n 是1至6的整数;并且

X_b^- 是阴离子;

(iii) 第一辅助脂质,其组成摩尔比为约0.20至约0.32;

(iv) 第二辅助脂质,其组成摩尔比为约0.01至约0.14;以及

(v) 生物稳定性增强剂,其组成摩尔比为约0.01至约0.02。

2. 如权利要求1所述的组合物,其中 m 是约1至5的整数。

3. 如权利要求1-2中的一项所述的组合物,其中 m 是约1至4的整数。

4. 如权利要求1-3中的一项所述的组合物,其中 m 是约1至3的整数。

5. 如权利要求1-4中的一项所述的组合物,其中 m 是1。

6. 如权利要求1-4中的一项所述的组合物,其中 m 是2。

7. 如权利要求1-4中的一项所述的组合物,其中 m 是3。

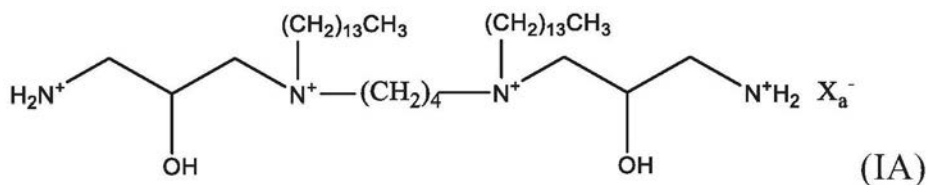
8. 如权利要求1-3中的一项所述的组合物,其中 m 是4。

9. 如权利要求1-2中的一项所述的组合物,其中 m 是5。

10. 如权利要求1所述的组合物,其中 m 是6。

11. 如权利要求1-10中的一项所述的组合物,其中 n 是约1至5的整数。

12. 如权利要求1-11中的一项所述的组合物,其中n是约1至4的整数。
13. 如权利要求1-11中的一项所述的组合物,其中n是约1至3的整数。
14. 如权利要求1-13中的一项所述的组合物,其中n是1。
15. 如权利要求1-13中的一项所述的组合物,其中n是2。
16. 如权利要求1-13中的一项所述的组合物,其中n是3。
17. 如权利要求1-12中的一项所述的组合物,其中n是4。
18. 如权利要求1-11中的一项所述的组合物,其中n是5。
19. 如权利要求1-10中的一项所述的组合物,其中n是6。
20. 如权利要求1-19中的任一项所述的组合物,其中所述第一阳离子脂质以约0.18的组成摩尔比存在。
21. 如权利要求1-19中的任一项所述的组合物,其中所述第一阳离子脂质以约0.23的组成摩尔比存在。
22. 如权利要求1-19中的任一项所述的组合物,其中所述第一阳离子脂质以约0.24的组成摩尔比存在。
23. 如权利要求1-19中的任一项所述的组合物,其中所述第一阳离子脂质以约0.25的组成摩尔比存在。
24. 如权利要求1-19中的任一项所述的组合物,其中所述第一阳离子脂质以约0.27的组成摩尔比存在。
25. 如权利要求1-19中的任一项所述的组合物,其中所述第一阳离子脂质以约0.28的组成摩尔比存在。
26. 如权利要求1-19中的任一项所述的组合物,其中所述第一阳离子脂质以约0.32的组成摩尔比存在。
27. 如权利要求1-26中的任一项所述的组合物,其中所述第一阳离子脂质具有式:



其中

X_a^- 是 Cl^- 或 CH_3COO^- 。

28. 如权利要求1-27中的任一项所述的组合物,其中 X_a^- 是 CH_3COO^- 。
29. 如权利要求28所述的组合物,其中所述第一阳离子脂质是二羟基二肉豆蔻酰基亚精胺。
30. 如权利要求1-29中的任一项所述的组合物,其中所述第二阳离子脂质以约0.24的组成摩尔比存在。
31. 如权利要求1-29中的任一项所述的组合物,其中所述第二阳离子脂质以约0.38的组成摩尔比存在。
32. 如权利要求1-29中的任一项所述的组合物,其中所述第二阳离子脂质以约0.39的组成摩尔比存在。
33. 如权利要求1-29中的任一项所述的组合物,其中所述第二阳离子脂质以约0.40的组成摩尔比存在。

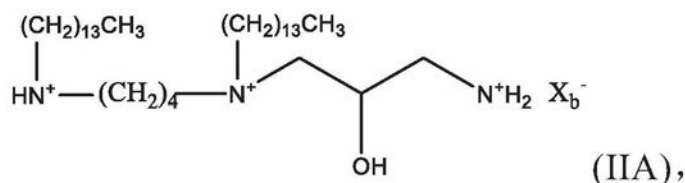
组成摩尔比存在。

34. 如权利要求1-29中的任一项所述的组合物,其中所述第二阳离子脂质以约0.45的组成摩尔比存在。

35. 如权利要求1-29中的任一项所述的组合物,其中所述第二阳离子脂质以约0.47的组成摩尔比存在。

36. 如权利要求1-29中的任一项所述的组合物,其中所述第二阳离子脂质以约0.51的组成摩尔比存在。

37. 如权利要求1-29中的任一项所述的组合物,其中所述第二阳离子脂质具有式:



其中

X_b^- 是 Cl^- 或 CH_3COO^- 。

38. 如权利要求1-37中的任一项所述的组合物,其中 X_b^- 是 CH_3COO^- 。

39. 如权利要求38所述的组合物,其中所述第二阳离子脂质是羟基二肉豆蔻酰基亚精胺。

40. 如权利要求1-39中的任一项所述的组合物,其中所述第一辅助脂质以约0.20的组成摩尔比存在。

41. 如权利要求1-39中的任一项所述的组合物,其中所述第一辅助脂质以约0.24的组成摩尔比存在。

42. 如权利要求1-39中的任一项所述的组合物,其中所述第一辅助脂质以约0.26的组成摩尔比存在。

43. 如权利要求1-39中的任一项所述的组合物,其中所述第一辅助脂质以约0.32的组成摩尔比存在。

44. 如权利要求1-43中的任一项所述的组合物,其中所述第一辅助脂质是二油酰磷脂酰乙醇胺(DOPE)。

45. 如权利要求1-44中的任一项所述的组合物,其中所述第二辅助脂质以约0.01的组成摩尔比存在。

46. 如权利要求1-44中的任一项所述的组合物,其中所述第二辅助脂质以约0.05的组成摩尔比存在。

47. 如权利要求1-44中的任一项所述的组合物,其中所述第二辅助脂质以约0.08的组成摩尔比存在。

48. 如权利要求1-44中的任一项所述的组合物,其中所述第二辅助脂质以约0.10的组成摩尔比存在。

49. 如权利要求1-44中的任一项所述的组合物,其中所述第二辅助脂质以约0.14的组成摩尔比存在。

50. 如权利要求1-49中的任一项所述的组合物,其中所述第二辅助脂质是胆固醇。

51. 如权利要求1-50中的任一项所述的组合物,其中所述生物稳定性增强剂以约0.01

的组成摩尔比存在。

52. 如权利要求1-50中的任一项所述的组合物,其中所述生物稳定性增强剂以约0.02的组成摩尔比存在。

53. 如权利要求1-52中的任一项所述的组合物,其中所述生物稳定性增强剂是聚醚化合物。

54. 如权利要求1-52中的任一项所述的组合物,其中所述生物稳定性增强剂是聚乙二醇化的磷脂。

55. 如权利要求1-53中的任一项所述的组合物,其中所述生物稳定性增强剂是聚乙二醇。

56. 如权利要求1-53中的任一项所述的组合物,其中所述生物稳定性增强剂具有约750g/mol的分子量。

57. 如权利要求1-53中的任一项所述的组合物,其中所述生物稳定性增强剂具有约2000g/mol的分子量。

58. 如权利要求1-53中的任一项所述的组合物,其中所述生物稳定性增强剂具有约5000g/mol的分子量。

59. 如权利要求1-53中的任一项所述的组合物,其中所述生物稳定性增强剂是C14聚乙二醇750。

60. 如权利要求1-53中的任一项所述的组合物,其中所述生物稳定性增强剂是C14聚乙二醇2000。

61. 如权利要求1-53中的任一项所述的组合物,其中所述生物稳定性增强剂是C14聚乙二醇5000。

62. 一种组合物,其包含:

(i) 第一阳离子脂质,其组成摩尔比为约0.24,其中所述第一阳离子脂质是二羟基二肉豆蔻酰基亚精胺;

(ii) 第二阳离子脂质,其组成摩尔比为约0.38,其中所述第二阳离子脂质是羟基二肉豆蔻酰基亚精胺;

(iii) 第一辅助脂质,其组成摩尔比为约0.32,其中所述第一辅助脂质是二油酰磷脂酰乙醇胺;

(iv) 第二辅助脂质,其组成摩尔比为约0.05,其中所述第二辅助脂质是胆固醇;和

(v) 生物稳定性增强剂,其组成摩尔比为约0.01,其中所述生物稳定性增强剂是C14聚乙二醇5000。

63. 一种组合物,其包含:

(i) 第一阳离子脂质,其组成摩尔比为约0.32,其中所述第一阳离子脂质是二羟基二肉豆蔻酰基亚精胺;

(ii) 第二阳离子脂质,其组成摩尔比为约0.39,其中所述第二阳离子脂质是羟基二肉豆蔻酰基亚精胺;

(iii) 第一辅助脂质,其组成摩尔比为约0.26,其中所述第一辅助脂质是二油酰磷脂酰乙醇胺;

(iv) 第二辅助脂质,其组成摩尔比为约0.01,其中所述第二辅助脂质是胆固醇;和

(v) 生物稳定性增强剂,其组成摩尔比为约0.02,其中所述生物稳定性增强剂是C14聚乙二醇5000。

64. 一种组合物,其包含:

(i) 第一阳离子脂质,其组成摩尔比为约0.18,其中所述第一阳离子脂质是二羟基二肉豆蔻酰基亚精胺;

(ii) 第二阳离子脂质,其组成摩尔比为约0.38,其中所述第二阳离子脂质是羟基二肉豆蔻酰基亚精胺;

(iii) 第一辅助脂质,其组成摩尔比为约0.32,其中所述第一辅助脂质是二油酰磷脂酰乙醇胺;

(iv) 第二辅助脂质,其组成摩尔比为约0.10,其中所述第二辅助脂质是胆固醇;和

(v) 生物稳定性增强剂,其组成摩尔比为约0.02,其中所述生物稳定性增强剂是C14聚乙二醇5000。

65. 一种组合物,其包含:

(i) 第一阳离子脂质,其组成摩尔比为约0.23,其中所述第一阳离子脂质是二羟基二肉豆蔻酰基亚精胺;

(ii) 第二阳离子脂质,其组成摩尔比为约0.45,其中所述第二阳离子脂质是羟基二肉豆蔻酰基亚精胺;

(iii) 第一辅助脂质,其组成摩尔比为约0.20,其中所述第一辅助脂质是二油酰磷脂酰乙醇胺;

(iv) 第二辅助脂质,其组成摩尔比为约0.10,其中所述第二辅助脂质是胆固醇;和

(v) 生物稳定性增强剂,其组成摩尔比为约0.02,其中所述生物稳定性增强剂是C14聚乙二醇5000。

66. 一种组合物,其包含:

(i) 第一阳离子脂质,其组成摩尔比为约0.18,其中所述第一阳离子脂质是二羟基二肉豆蔻酰基亚精胺;

(ii) 第二阳离子脂质,其组成摩尔比为约0.51,其中所述第二阳离子脂质是羟基二肉豆蔻酰基亚精胺;

(iii) 第一辅助脂质,其组成摩尔比为约0.20,其中所述第一辅助脂质是二油酰磷脂酰乙醇胺;

(iv) 第二辅助脂质,其组成摩尔比为约0.10,其中所述第二辅助脂质是胆固醇;和

(v) 生物稳定性增强剂,其组成摩尔比为约0.01,其中所述生物稳定性增强剂是C14聚乙二醇5000。

67. 一种组合物,其包含:

(i) 第一阳离子脂质,其组成摩尔比为约0.27,其中所述第一阳离子脂质是二羟基二肉豆蔻酰基亚精胺;

(ii) 第二阳离子脂质,其组成摩尔比为约0.38,其中所述第二阳离子脂质是羟基二肉豆蔻酰基亚精胺;

(iii) 第一辅助脂质,其组成摩尔比为约0.32,其中所述第一辅助脂质是二油酰磷脂酰乙醇胺;

(iv) 第二辅助脂质,其组成摩尔比为约0.01,其中所述第二辅助脂质是胆固醇;和

(v) 生物稳定性增强剂,其组成摩尔比为约0.02,其中所述生物稳定性增强剂是C14聚乙二醇5000。

68. 一种组合物,其包含:

(i) 第一阳离子脂质,其组成摩尔比为约0.25,其中所述第一阳离子脂质是二羟基二肉豆蔻酰基亚精胺;

(ii) 第二阳离子脂质,其组成摩尔比为约0.38,其中所述第二阳离子脂质是羟基二肉豆蔻酰基亚精胺;

(iii) 第一辅助脂质,其组成摩尔比为约0.26,其中所述第一辅助脂质是二油酰磷脂酰乙醇胺;

(iv) 第二辅助脂质,其组成摩尔比为约0.10,其中所述第二辅助脂质是胆固醇;和

(v) 生物稳定性增强剂,其组成摩尔比为约0.01,其中所述生物稳定性增强剂是C14聚乙二醇5000。

69. 一种组合物,其包含:

(i) 第一阳离子脂质,其组成摩尔比为约0.28,其中所述第一阳离子脂质是二羟基二肉豆蔻酰基亚精胺;

(ii) 第二阳离子脂质,其组成摩尔比为约0.24,其中所述第二阳离子脂质是羟基二肉豆蔻酰基亚精胺;

(iii) 第一辅助脂质,其组成摩尔比为约0.32,其中所述第一辅助脂质是二油酰磷脂酰乙醇胺;

(iv) 第二辅助脂质,其组成摩尔比为约0.14,其中所述第二辅助脂质是胆固醇;和

(v) 生物稳定性增强剂,其组成摩尔比为约0.02,其中所述生物稳定性增强剂是C14聚乙二醇750。

70. 一种组合物,其包含:

(i) 第一阳离子脂质,其组成摩尔比为约0.18,其中所述第一阳离子脂质是二羟基二肉豆蔻酰基亚精胺;

(ii) 第二阳离子脂质,其组成摩尔比为约0.47,其中所述第二阳离子脂质是羟基二肉豆蔻酰基亚精胺;

(iii) 第一辅助脂质,其组成摩尔比为约0.32,其中所述第一辅助脂质是二油酰磷脂酰乙醇胺;

(iv) 第二辅助脂质,其组成摩尔比为约0.01,其中所述第二辅助脂质是胆固醇;和

(v) 生物稳定性增强剂,其组成摩尔比为约0.02,其中所述生物稳定性增强剂是C14聚乙二醇5000。

71. 一种组合物,其包含:

(i) 第一阳离子脂质,其组成摩尔比为约0.24,其中所述第一阳离子脂质是二羟基二肉豆蔻酰基亚精胺;

(ii) 第二阳离子脂质,其组成摩尔比为约0.40,其中所述第二阳离子脂质是羟基二肉豆蔻酰基亚精胺;

(iii) 第一辅助脂质,其组成摩尔比为约0.24,其中所述第一辅助脂质是二油酰磷脂酰

乙醇胺；

(iv) 第二辅助脂质，其组成摩尔比为约0.10，其中所述第二辅助脂质是胆固醇；和

(v) 生物稳定性增强剂，其组成摩尔比为约0.02，其中所述生物稳定性增强剂是C14聚乙二醇2000。

72. 一种组合物，其包含：

(i) 第一阳离子脂质，其组成摩尔比为约0.32，其中所述第一阳离子脂质是二羟基二肉豆蔻酰基亚精胺；

(ii) 第二阳离子脂质，其组成摩尔比为约0.38，其中所述第二阳离子脂质是羟基二肉豆蔻酰基亚精胺；

(iii) 第一辅助脂质，其组成摩尔比为约0.20，其中所述第一辅助脂质是二油酰磷脂酰乙醇胺；

(iv) 第二辅助脂质，其组成摩尔比为约0.08，其中所述第二辅助脂质是胆固醇；和

(v) 生物稳定性增强剂，其组成摩尔比为约0.02，其中所述生物稳定性增强剂是C14聚乙二醇5000。

73. 如权利要求1至72中的一项所述的组合物，其还包含生物活性剂。

74. 如权利要求73所述的组合物，其中所述生物活性剂是治疗剂或诊断剂。

75. 如权利要求73或74所述的组合物，其中所述生物活性剂包括核酸、核糖核蛋白或小分子。

76. 如权利要求75所述的组合物，其中所述核酸是mRNA、siRNA、miRNA或向导RNA。

77. 如权利要求76所述的组合物，其中所述生物活性剂包括核酸和核糖核蛋白。

78. 如权利要求77所述的组合物，其中所述核糖核蛋白是CRISPR相关蛋白9 (Cas9)。

79. 一种药物组合物，其包含如权利要求1-78中的一项所述的组合物和药学上可接受的赋形剂。

80. 一种细胞，其包含如权利要求1-78中的一项所述的组合物。

81. 如权利要求80所述的细胞，其中所述细胞是哺乳动物细胞。

82. 如权利要求80所述的细胞，其中所述细胞是啮齿动物细胞。

83. 如权利要求80所述的细胞，其中所述细胞是小鼠细胞。

84. 如权利要求80所述的细胞，其中所述细胞是大鼠细胞。

85. 如权利要求80所述的细胞，其中所述细胞是猪细胞。

86. 如权利要求80所述的细胞，其中所述细胞是犬细胞。

87. 如权利要求80所述的细胞，其中所述细胞是灵长类动物细胞。

88. 如权利要求80-87中的一项所述的细胞，其中所述细胞是上皮细胞。

89. 如权利要求80-87中的一项所述的细胞，其中所述细胞是上皮肺细胞。

90. 如权利要求80-87中的一项所述的细胞，其中所述细胞是内皮细胞。

91. 如权利要求80-87中的一项所述的细胞，其中所述细胞是内皮肺细胞。

92. 如权利要求80-91中的一项所述的细胞，其中所述细胞构成生物体的一部分。

93. 如权利要求92所述的细胞，其中所述生物体是人类。

94. 一种将生物活性剂递送至细胞的方法，所述方法包括：

(i) 将生物活性剂与如权利要求1-72中的一项所述的组合物混合，从而形成生物活性

剂-脂质复合物；

(ii) 使细胞与所述生物活性剂-脂质复合物接触，从而将所述生物活性剂-脂质复合物递送至细胞。

95. 如权利要求94所述的方法，其进一步包括使所述生物活性剂-脂质复合物进入所述细胞。

96. 如权利要求94或95所述的方法，其中所述生物活性剂是治疗剂或诊断剂。

97. 如权利要求94-96中的一项所述的方法，其中所述生物活性剂包括核酸、核糖核蛋白或小分子。

98. 如权利要求97所述的方法，其中所述核酸是mRNA、siRNA、miRNA或向导RNA。

99. 如权利要求98所述的方法，其中所述生物活性剂包括向导RNA和核糖核蛋白。

100. 如权利要求99所述的方法，其中所述核糖核蛋白是CRISPR相关蛋白9 (Cas9)。

101. 如权利要求99所述的方法，其中所述核糖核蛋白与所述向导RNA结合。

102. 如权利要求94所述的方法，其中所述细胞是哺乳动物细胞。

103. 如权利要求94所述的方法，其中所述细胞是啮齿动物细胞。

104. 如权利要求94所述的方法，其中所述细胞是小鼠细胞。

105. 如权利要求94所述的方法，其中所述细胞是大鼠细胞。

106. 如权利要求94所述的方法，其中所述细胞是猪细胞。

107. 如权利要求94所述的方法，其中所述细胞是犬细胞。

108. 如权利要求94所述的方法，其中所述细胞是灵长类动物细胞。

109. 如权利要求94-108中的一项所述的方法，其中所述细胞是上皮细胞。

110. 如权利要求94-108中的一项所述的方法，其中所述细胞是上皮肺细胞。

111. 如权利要求94-108中的一项所述的方法，其中所述细胞是内皮细胞。

112. 如权利要求94-108中的一项所述的方法，其中所述细胞是内皮肺细胞。

113. 一种将生物活性剂递送至受试者的肺组织的方法，所述方法包括：

(i) 将生物活性剂与如权利要求1-72中的一项所述的组合物混合，从而形成生物活性剂-脂质复合物；

(ii) 向受试者全身施用有效量的所述生物活性剂-脂质复合物，从而将所述生物活性剂-脂质复合物递送至受试者的肺组织。

114. 一种在受试者的肺组织中表达蛋白质的方法，所述方法包括：

(i) 将mRNA与如权利要求1-72中的一项所述的组合物混合，从而形成mRNA-脂质复合物；

(ii) 向受试者施用有效量的所述mRNA-脂质复合物；以及

(iii) 使所述mRNA-脂质复合物的所述mRNA在所述受试者的肺组织中表达，从而在受试者的肺组织中表达蛋白质。

115. 一种在有需要的受试者中治疗肺部疾病的方法，所述方法包括向受试者施用治疗有效量的生物活性剂和如权利要求1-72中的一项所述的组合物，从而治疗所述受试者中的肺部疾病。

116. 如权利要求115所述的方法，其中在所述施用之前将所述组合物和所述生物活性剂混合。

117. 如权利要求115或116所述的方法,其中所述生物活性剂包括核酸、核糖核蛋白或小分子。

118. 如权利要求117所述的方法,其中所述核酸是mRNA、siRNA、miRNA或向导RNA。

119. 如权利要求115-118中的一项所述的方法,其中所述肺部疾病是哮喘、慢性阻塞性肺病(COPD)、肺癌或囊性纤维化。

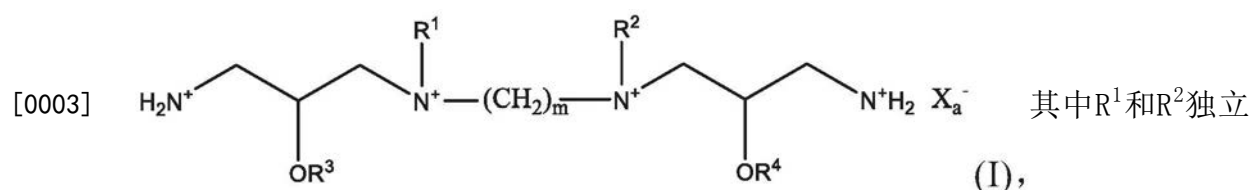
用于组织特异性递送的阳离子脂质组合物

背景技术

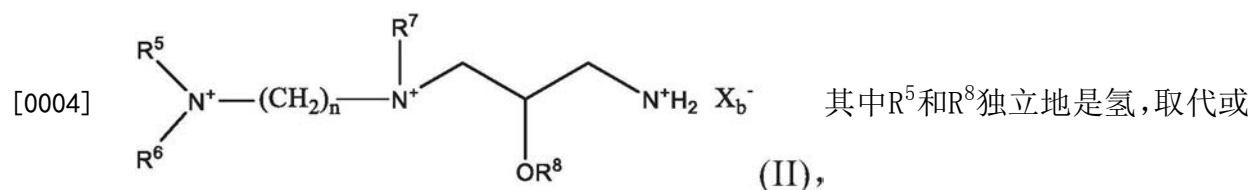
[0001] 传统上已经使用生物分子靶向经由在用作递送媒介物的脂质纳米颗粒的表面的配体或受体表达来实现诸如治疗性核酸的有效负载递送至特定组织。在不使用规范生物分子靶向技术的情况下,设计能够靶向特定器官、组织或细胞类型的脂质纳米颗粒已成为一项重大挑战。对脂质纳米颗粒固有特性的操纵提供了一种实现器官、组织和细胞类型特异性靶向的手段。本文提供了可解决该需求和本领域中的其它需求的组合物和方法。

发明内容

[0002] 在一个方面,提供了一种组合物,其包含:(i) 第一阳离子脂质,其组成摩尔比为约0.18至约0.32并且具有式:

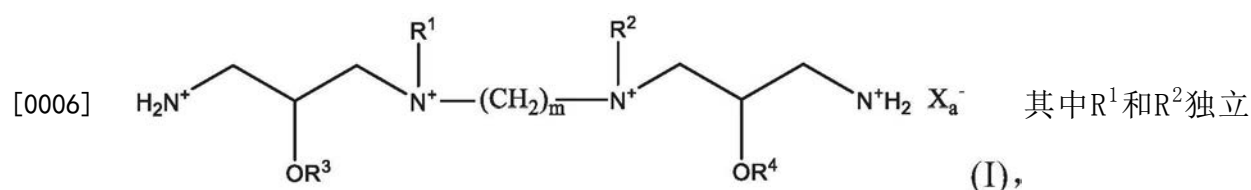


地是取代或未取代的烷基,取代或未取代的杂烷基,取代或未取代的环烷基,取代或未取代的杂环烷基,取代或未取代的芳基,或取代或未取代的杂芳基; R^3 和 R^4 独立地是氢,取代或未取代的烷基,取代或未取代的杂烷基,取代或未取代的环烷基,取代或未取代的杂环烷基,取代或未取代的芳基,或取代或未取代的杂芳基; m 是1至6的整数; X_a^- 是阴离子;(ii) 第二阳离子脂质,其组成摩尔比为约0.24至约0.51并且具有式:



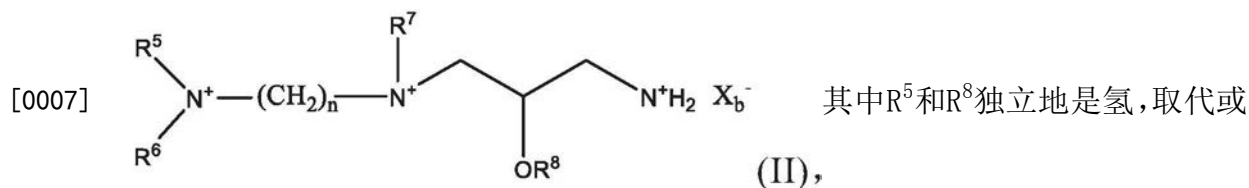
未取代的烷基,取代或未取代的杂烷基,取代或未取代的环烷基,取代或未取代的杂环烷基,取代或未取代的芳基,或取代或未取代的杂芳基; R^6 和 R^7 独立地是取代或未取代的烷基,取代或未取代的杂烷基,取代或未取代的环烷基,取代或未取代的杂环烷基,取代或未取代的芳基,或取代或未取代的杂芳基; n 是1至6的整数;并且 X_b^- 是阴离子;(iii) 第一辅助脂质;(iv) 第二辅助脂质;和(v) 生物稳定性增强剂。

[0005] 在一个方面,提供了一种组合物,其包含:(i) 第一阳离子脂质,其组成摩尔比为约0.18至约0.32并且具有式:



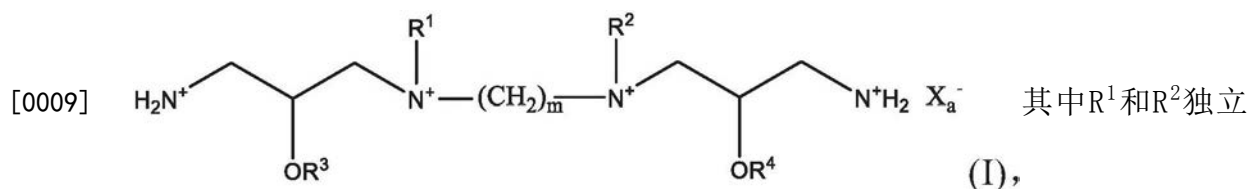
地是取代或未取代的烷基,取代或未取代的杂烷基,取代或未取代的环烷基,取代或未取代的杂环烷基,取代或未取代的芳基,或取代或未取代的杂芳基; R^3 和 R^4 独立地是氢,取代或未

取代的烷基,取代或未取代的杂烷基,取代或未取代的环烷基,取代或未取代的杂环烷基,取代或未取代的芳基,或取代或未取代的杂芳基;m是1至6的整数; X_a^- 是阴离子;(ii)第二阳离子脂质,其组成摩尔比为约0.24至约0.51并且具有式:

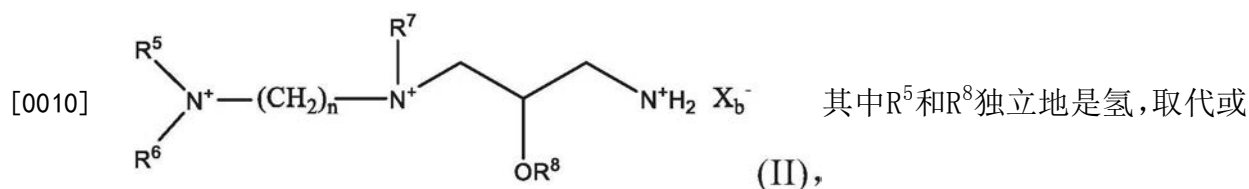


未取代的烷基,取代或未取代的杂烷基,取代或未取代的环烷基,取代或未取代的杂环烷基,取代或未取代的芳基,或取代或未取代的杂芳基; R^6 和 R^7 独立地是取代或未取代的烷基,取代或未取代的杂烷基,取代或未取代的环烷基,取代或未取代的杂环烷基,取代或未取代的芳基,或取代或未取代的杂芳基;n是1至6的整数;并且 X_b^- 是阴离子;(iii)第一辅助脂质,其组成摩尔比为约0.20至约0.32;(iv)第二辅助脂质;和(v)生物稳定性增强剂。

[0008] 在一个方面,提供了一种组合物,其包含:(i)第一阳离子脂质,其组成摩尔比为约0.18至约0.32并且具有式:

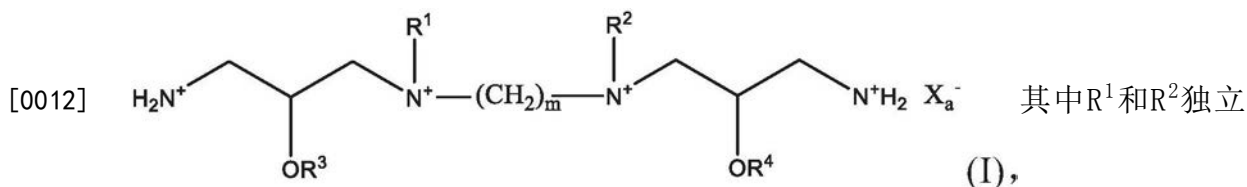


地是取代或未取代的烷基,取代或未取代的杂烷基,取代或未取代的环烷基,取代或未取代的杂环烷基,取代或未取代的芳基,或取代或未取代的杂芳基; R^3 和 R^4 独立地是氢,取代或未取代的烷基,取代或未取代的杂烷基,取代或未取代的环烷基,取代或未取代的杂环烷基,取代或未取代的芳基,或取代或未取代的杂芳基;m是1至6的整数; X_a^- 是阴离子;(ii)第二阳离子脂质,其组成摩尔比为约0.24至约0.51并且具有式:

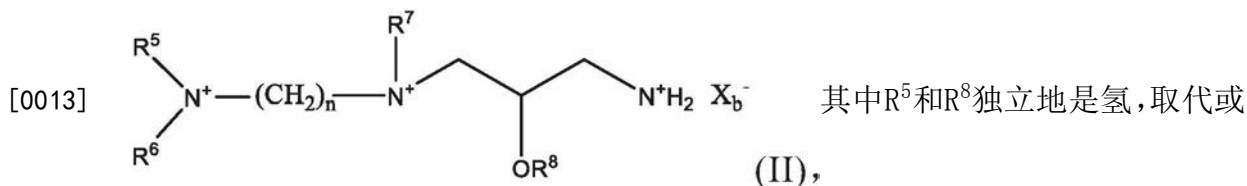


未取代的烷基,取代或未取代的杂烷基,取代或未取代的环烷基,取代或未取代的杂环烷基,取代或未取代的芳基,或取代或未取代的杂芳基; R^6 和 R^7 独立地是取代或未取代的烷基,取代或未取代的杂烷基,取代或未取代的环烷基,取代或未取代的杂环烷基,取代或未取代的芳基,或取代或未取代的杂芳基;n是1至6的整数;并且 X_b^- 是阴离子;(iii)第一辅助脂质,其组成摩尔比为约0.20至约0.32;(iv)第二辅助脂质,其组成摩尔比为约0.01至约0.14;和(v)生物稳定性增强剂。

[0011] 在一个方面,提供了一种组合物,其包含:(i)第一阳离子脂质,其组成摩尔比为约0.18至约0.32并且具有式:



地是取代或未取代的烷基,取代或未取代的杂烷基,取代或未取代的环烷基,取代或未取代的杂环烷基,取代或未取代的芳基,或取代或未取代的杂芳基;R³和R⁴独立地是氢,取代或未取代的烷基,取代或未取代的杂烷基,取代或未取代的环烷基,取代或未取代的杂环烷基,取代或未取代的芳基,或取代或未取代的杂芳基;m是1至6的整数;X_a⁻是阴离子;(ii) 第二阳离子脂质,其组成摩尔比为约0.24至约0.51并且具有式:



未取代的烷基,取代或未取代的杂烷基,取代或未取代的环烷基,取代或未取代的杂环烷基,取代或未取代的芳基,或取代或未取代的杂芳基;R⁶和R⁷独立地是取代或未取代的烷基,取代或未取代的杂烷基,取代或未取代的环烷基,取代或未取代的杂环烷基,取代或未取代的芳基,或取代或未取代的杂芳基;n是1至6的整数;并且X_b⁻是阴离子;(iii) 第一辅助脂质,其组成摩尔比为约0.20至约0.32;(iv) 第二辅助脂质,其组成摩尔比为约0.01至约0.14;和(v) 生物稳定性增强剂,其组成摩尔比为约0.01至约0.02。

[0014] 在一个方面,提供了一种组合物,其包含:(i) 第一阳离子脂质,其组成摩尔比为约0.24,其中所述第一阳离子脂质是二羟基二肉豆蔻酰基亚精胺;(ii) 第二阳离子脂质,其组成摩尔比为约0.38,其中所述第二阳离子脂质是羟基二肉豆蔻酰基亚精胺;(iii) 第一辅助脂质,其组成摩尔比为约0.32,其中所述第一辅助脂质是二油酰磷脂酰乙醇胺;(iv) 第二辅助脂质,其组成摩尔比为约0.05,其中所述第二辅助脂质是胆固醇;和(v) 生物稳定性增强剂,其组成摩尔比为约0.01,其中所述生物稳定性增强剂是C14聚乙二醇5000。

[0015] 在一个方面,提供了一种组合物,其包含:(i) 第一阳离子脂质,其组成摩尔比为约0.32,其中所述第一阳离子脂质是二羟基二肉豆蔻酰基亚精胺;(ii) 第二阳离子脂质,其组成摩尔比为约0.39,其中所述第二阳离子脂质是羟基二肉豆蔻酰基亚精胺;(iii) 第一辅助脂质,其组成摩尔比为约0.26,其中所述第一辅助脂质是二油酰磷脂酰乙醇胺;(iv) 第二辅助脂质,其组成摩尔比为约0.01,其中所述第二辅助脂质是胆固醇;和(v) 生物稳定性增强剂,其组成摩尔比为约0.02,其中所述生物稳定性增强剂是C14聚乙二醇5000。

[0016] 在一个方面,提供了一种组合物,其包含:(i) 第一阳离子脂质,其组成摩尔比为约0.18,其中所述第一阳离子脂质是二羟基二肉豆蔻酰基亚精胺;(ii) 第二阳离子脂质,其组成摩尔比为约0.38,其中所述第二阳离子脂质是羟基二肉豆蔻酰基亚精胺;(iii) 第一辅助脂质,其组成摩尔比为约0.32,其中所述第一辅助脂质是二油酰磷脂酰乙醇胺;(iv) 第二辅助脂质,其组成摩尔比为约0.10,其中所述第二辅助脂质是胆固醇;和(v) 生物稳定性增强剂,其组成摩尔比为约0.02,其中所述生物稳定性增强剂是C14聚乙二醇5000。

[0017] 在一个方面,提供了一种组合物,其包含:(i) 第一阳离子脂质,其组成摩尔比为约0.23,其中所述第一阳离子脂质是二羟基二肉豆蔻酰基亚精胺;(ii) 第二阳离子脂质,其组

成摩尔比为约0.45,其中所述第二阳离子脂质是羟基二肉豆蔻酰基亚精胺;(iii)第一辅助脂质,其组成摩尔比为约0.20,其中所述第一辅助脂质是二油酰磷脂酰乙醇胺;(iv)第二辅助脂质,其组成摩尔比为约0.10,其中所述第二辅助脂质是胆固醇;和(v)生物稳定性增强剂,其组成摩尔比为约0.02,其中所述生物稳定性增强剂是C14聚乙二醇5000。

[0018] 在一个方面,提供了一种组合物,其包含:(i)第一阳离子脂质,其组成摩尔比为约0.18,其中所述第一阳离子脂质是二羟基二肉豆蔻酰基亚精胺;(ii)第二阳离子脂质,其组成摩尔比为约0.51,其中所述第二阳离子脂质是羟基二肉豆蔻酰基亚精胺;(iii)第一辅助脂质,其组成摩尔比为约0.20,其中所述第一辅助脂质是二油酰磷脂酰乙醇胺;(iv)第二辅助脂质,其组成摩尔比为约0.10,其中所述第二辅助脂质是胆固醇;和(v)生物稳定性增强剂,其组成摩尔比为约0.01,其中所述生物稳定性增强剂是C14聚乙二醇5000。

[0019] 在一个方面,提供了一种组合物,其包含:(i)第一阳离子脂质,其组成摩尔比为约0.27,其中所述第一阳离子脂质是二羟基二肉豆蔻酰基亚精胺;(ii)第二阳离子脂质,其组成摩尔比为约0.38,其中所述第二阳离子脂质是羟基二肉豆蔻酰基亚精胺;(iii)第一辅助脂质,其组成摩尔比为约0.32,其中所述第一辅助脂质是二油酰磷脂酰乙醇胺;(iv)第二辅助脂质,其组成摩尔比为约0.01,其中所述第二辅助脂质是胆固醇;和(v)生物稳定性增强剂,其组成摩尔比为约0.02,其中所述生物稳定性增强剂是C14聚乙二醇5000。

[0020] 在一个方面,提供了一种组合物,其包含:(i)第一阳离子脂质,其组成摩尔比为约0.25,其中所述第一阳离子脂质是二羟基二肉豆蔻酰基亚精胺;(ii)第二阳离子脂质,其组成摩尔比为约0.38,其中所述第二阳离子脂质是羟基二肉豆蔻酰基亚精胺;(iii)第一辅助脂质,其组成摩尔比为约0.26,其中所述第一辅助脂质是二油酰磷脂酰乙醇胺;(iv)第二辅助脂质,其组成摩尔比为约0.10,其中所述第二辅助脂质是胆固醇;和(v)生物稳定性增强剂,其组成摩尔比为约0.01,其中所述生物稳定性增强剂是C14聚乙二醇5000。

[0021] 在一个方面,提供了一种组合物,其包含:(i)第一阳离子脂质,其组成摩尔比为约0.28,其中所述第一阳离子脂质是二羟基二肉豆蔻酰基亚精胺;(ii)第二阳离子脂质,其组成摩尔比为约0.24,其中所述第二阳离子脂质是羟基二肉豆蔻酰基亚精胺;(iii)第一辅助脂质,其组成摩尔比为约0.32,其中所述第一辅助脂质是二油酰磷脂酰乙醇胺;(iv)第二辅助脂质,其组成摩尔比为约0.14,其中所述第二辅助脂质是胆固醇;和(v)生物稳定性增强剂,其组成摩尔比为约0.02,其中所述生物稳定性增强剂是C14聚乙二醇750。

[0022] 在一个方面,提供了一种组合物,其包含:(i)第一阳离子脂质,其组成摩尔比为约0.18,其中所述第一阳离子脂质是二羟基二肉豆蔻酰基亚精胺;(ii)第二阳离子脂质,其组成摩尔比为约0.47,其中所述第二阳离子脂质是羟基二肉豆蔻酰基亚精胺;(iii)第一辅助脂质,其组成摩尔比为约0.32,其中所述第一辅助脂质是二油酰磷脂酰乙醇胺;(iv)第二辅助脂质,其组成摩尔比为约0.01,其中所述第二辅助脂质是胆固醇;和(v)生物稳定性增强剂,其组成摩尔比为约0.02,其中所述生物稳定性增强剂是C14聚乙二醇5000。

[0023] 在一个方面,提供了一种组合物,其包含:(i)第一阳离子脂质,其组成摩尔比为约0.24,其中所述第一阳离子脂质是二羟基二肉豆蔻酰基亚精胺;(ii)第二阳离子脂质,其组成摩尔比为约0.40,其中所述第二阳离子脂质是羟基二肉豆蔻酰基亚精胺;(iii)第一辅助脂质,其组成摩尔比为约0.24,其中所述第一辅助脂质是二油酰磷脂酰乙醇胺;(iv)第二辅助脂质,其组成摩尔比为约0.10,其中所述第二辅助脂质是胆固醇;和(v)生物稳定性增强

剂,其组成摩尔比为约0.02,其中所述生物稳定性增强剂是C14聚乙二醇2000。

[0024] 在一个方面,提供了一种组合物,其包含:(i) 第一阳离子脂质,其组成摩尔比为约0.32,其中所述第一阳离子脂质是二羟基二肉豆蔻酰基亚精胺;(ii) 第二阳离子脂质,其组成摩尔比为约0.38,其中所述第二阳离子脂质是羟基二肉豆蔻酰基亚精胺;(iii) 第一辅助脂质,其组成摩尔比为约0.20,其中所述第一辅助脂质是二油酰磷脂酰乙醇胺;(iv) 第二辅助脂质,其组成摩尔比为约0.08,其中所述第二辅助脂质是胆固醇;和(v) 生物稳定性增强剂,其组成摩尔比为约0.02,其中所述生物稳定性增强剂是C14聚乙二醇5000。

[0025] 在一个方面,提供了一种药物组合物,其包含如本文提供的组合物(包括其实施方案)和药学上可接受的赋形剂。

[0026] 在一个方面,提供了一种细胞,其包含如本文提供的组合物(包括其实施方案)。在实施方案中,所述细胞是哺乳动物细胞。在实施方案中,所述细胞是啮齿动物细胞。在实施方案中,所述细胞是小鼠细胞。在实施方案中,所述细胞是大鼠细胞。在实施方案中,所述细胞是猪细胞。在实施方案中,所述细胞是犬细胞。在实施方案中,所述细胞是灵长类动物细胞。在实施方案中,所述细胞是上皮细胞。在实施方案中,所述细胞是上皮肺细胞。在实施方案中,所述细胞是内皮细胞。在实施方案中,所述细胞是内皮肺细胞。

[0027] 在一个方面,提供了将生物活性剂递送至细胞的方法,所述方法包括:(i) 将生物活性剂与如本文所提供的组合物(包括其实施方案)混合,从而形成生物活性剂-脂质复合物;(ii) 使细胞与所述生物活性剂-脂质复合物接触,从而将所述生物活性剂-脂质复合物递送至细胞。

[0028] 在另一方面,提供了一种向受试者的肺组织中递送生物活性剂的方法,所述方法包括:(i) 将生物活性剂与如本文所述的组合物(包括其实施方案)混合,从而形成生物活性剂-脂质复合物;(ii) 向受试者全身施用有效量的所述生物活性剂-脂质复合物,从而将所述生物活性剂-脂质复合物递送至受试者的肺组织。

[0029] 在另一方面,提供了一种在受试者的肺组织中表达蛋白质的方法,所述方法包括:(i) 将mRNA与如本文所述的组合物(包括其实施方案)混合,从而形成mRNA-脂质复合物;(ii) 对受试者施用有效量的所述mRNA-脂质复合物;以及(iii) 使所述mRNA-脂质复合物的mRNA在受试者的肺组织中表达,从而在受试者的肺组织中表达蛋白质。

[0030] 在一个方面,提供了一种在有需要的受试者中治疗肺部疾病的方法,所述方法包括向受试者施用治疗有效量的如本文所述的生物活性剂和组合物(包括其实施方案),从而在所述受试者中治疗肺部疾病。

附图说明

[0031] 图1A-1C. 基于混合物实验优化设计,使用先前开发的方案(图1A-1C)制备了与mRNA复合的新型LNP制剂,并使用荧光素酶读数对后续LNP的体内递送进行筛选。然后将性能最佳的制剂用于建模和预测第二代制剂,以优化组织特异性表达。然后对这些新型制剂进行体内测试,以鉴定最佳的LNP制剂。图1A. 生成新型脂质纳米颗粒(LNP)制剂、体内测试和优化的方法的卡通表示。图1B. 涉及将LNP制剂与mRNA复合并进行体内测试的步骤的卡通表示。图1C. 涉及将LNP制剂与mRNA复合并进行体内测试的步骤的书面程序。

[0032] 图2. 用于LNP测试的体内荧光素酶测定工作流程。

[0033] 图3A-3E. LNP的全身递送导致改变的生物分布模式。全动物体内成像揭示器官特异性生物分布模式。图3A通过全动物成像显示LNP在脾脏中分布。图3B通过全动物成像显示LNP在肺中分布。图3C-3E显示从离体分离器官组织成像确定的LNP的生物分布模式。

[0034] 图4A-4B. 性能优化筛选。图4A. 肺定向递送: 离体定量。图4B. 脾脏定向递送: 离体定量。

[0035] 图5A-5C. 剂量依赖性蛋白质表达。图5A. 肺递送体内萤光素酶表达。图5B. 注射后4小时(4h) 定量的肺辐射亮度随着mRNA剂量滴定(3mg/kg、1mg/kg、0.5mg/kg) 的变化。图5C. 肺定向递送: 体内定量。每种剂量滴定(3mg/kg、1mg/kg、0.5mg/kg) 定量的随时间(小时) 的体内辐射亮度。

[0036] 图6A-6C. 蛋白质表达的时程。图6A. 离体肺生物发光信号。图6B. 体内生物发光信号。图6C. 离体肺萤光素酶信号的定量。

[0037] 图7A-7J. 毒性-细胞因子小组。注射后2小时、4小时、24小时和48小时, 在两种mRNA剂量条件(低(1mg/kg) 和高(3mg/kg)) 下定量小鼠血清中循环细胞因子的水平。图7A. IL5的水平。图7B. IL4的水平。图7C. IL2的水平。图7D. IL10的水平。图7E. IL1b的水平。图7F. IL6的水平。图7G. IFNg水平。图7H. GMCSF的水平。图7I. IL12的水平。图7J. TNFa的水平。

[0038] 图8A-8B. N/P比变化允许调整mRNA递送和表达, 从而产生排他性的组织表达模式。体内全动物和离体分离器官成像表明变化的N/P比可导致排除某些器官的蛋白质表达, 从而导致在肺(图8A) 或脾脏(图8B) 中特异性表达。

[0039] 图9. 肺递送定量测定: 萤光素酶测定。

[0040] 图10A-10B. 低性能制剂。以最佳制剂作为比较基准(图10B) 和不以最佳制剂作为比较基准(图10A) 的低性能制剂的萤光素酶活性。

[0041] 图11A-11F. Jet **PEI®** 相对于Bruce#3.14. 体内全动物成像显示, 与Jet **PEI®** (图11B) 相比, Bruce#3.14脂质纳米颗粒制剂具有特异性生物分布模式(图11A)。离体分离器官组织成像还表明, 与Jet **PEI®** (图11D) 相比, Bruce#3.14脂质纳米颗粒制剂具有特异性生物分布模式(图11C)。图11E显示了Bruce#3.14脂质纳米颗粒制剂和Jet **PEI®** 通量。Jet **PEI®** 组中的两只动物死亡。图11F显示了用Bruce#3.14脂质纳米颗粒制剂或Jet **PEI®** 处理后的肺通量。

[0042] 图12A-12C. 制剂#3.10处理。图12A显示了跨器官的器官通量萤光素酶活性。图12B显示了体内全动物发光。图12C显示了离体分离器官组织发光。

[0043] 图13A-13C. 制剂#3.14处理。图13A显示了跨器官的器官通量萤光素酶活性。图13B显示了体内全动物发光。图13C显示了离体分离器官组织发光。

[0044] 图14A-14C. 制剂#3.19处理。图14A显示了跨器官的器官通量萤光素酶活性。图14B显示了体内全动物发光。图14C显示了离体分离器官组织发光。

[0045] 图15A-15C. 制剂#3.20处理。图15A显示了跨器官的器官通量萤光素酶活性。图15B显示了体内全动物发光。图15C显示了离体分离器官组织发光。

[0046] 图16A-16C. 制剂#2.2处理。图16A显示了跨器官的器官通量萤光素酶活性。图16B显示了体内全动物发光。图16C显示了离体分离器官组织发光。

[0047] 图17A-17K. Bruce#3.14体内/离体时程(3mg/kg)。在4小时(图17A)、24小时(图17B)、48小时(图17C)、72小时(图17D) 和96小时(图17E) 的体内全动物发光。在4小时(图

17F)、24小时(图17G)、48小时(图17H)、72小时(图17I)和96小时(图17J)的离体分离器官组织发光。图17K显示了平均值(总通量(p/s))与第1列随时间变化的关系。

[0048] 图18A-18C.mRNA剂量变化和时程3.14(3、1、0.5mg/kg)。每种剂量变化在4小时(图18A)、24小时(图18B)和48小时(图18C)的体内全动物发光。

[0049] 图19. 工作流程图。

[0050] 图20A-20B. 试剂对比分析。实验设计-试剂: 四种不同制剂(IVF®肺、DOTMA:DOPE、DOTAP:DOPE、JetPEI®), 递送途径: 静脉内(全身), 有效负载: Trilink®萤火虫萤光素酶mRNA。图20A显示了描绘每种制剂的肺辐射亮度的条形图。图20B显示了每种制剂的体内全动物辐射亮度。

[0051] 图21. 体内筛选编码萤火虫萤光素酶的不同mRNA。mRNA表达动力学可以基于mRNA的优化而有所不同。实验设计-试剂: Invivofectamine®肺, 递送途径: 静脉内(全身), 有效负载: 2种不同的编码萤火虫萤光素酶的mRNA(Trilink®和内部)。图显示了所用每种有效负载的肺辐射亮度。

[0052] 图22. 肺中的siRNA敲低。酪氨酸激酶受体Tie2, 也称为Tek, 在胚胎脉管系统中起重要作用并持续存在于成人内皮细胞中。它几乎仅在内皮细胞中表达。静脉内递送LNP(IVF Rx肺+siRNA)后48小时, 对分离的肺组织进行基因敲低分析(N=4)。图显示了剩余Tie2的百分比。

[0053] 图23. lacZ Cre报告基因株的卡通表示, 以及使用IVF®肺递送Cre mRNA的结果。

[0054] 图24A-24D. 野生型小鼠中的lacZ mRNA递送。图24A和24C显示了经由β-gal染色的lacZ表达。图24B和24D分别是在24A和24C中圈出区域的高放大倍数图像。

[0055] 图25A-25B. lacZ报告基因小鼠中的Cre mRNA递送。Invivofectamine®肺体内递送-用于检测lacZ表达的免疫荧光染色揭示了整个肺组织的表达, 并且在细支气管结构中清晰可见。图25A显示了10倍的染色视图。图25B显示了25倍的染色视图。

[0056] 图26. 描述N/P比的卡通图示。N/P比是指阳离子脂质上的氮残基贡献的正电荷相对于核酸骨架上的磷酸根贡献的负电荷。高N/P=与mRNA相比, 脂质含量更高。低N/P=与mRNA相比, 脂质含量更低。N/P比极大地影响脂质纳米颗粒的表面电荷, 该表面电荷强烈控制转染效率并影响生物分布。

[0057] 图27A-27K. N/P比影响生物分布模式。体内全动物成像和离体分离器官组织成像显示N/P比(10、8、6、4、2)对生物分布的影响。图27A和27B显示N/P比为10。图27C和27D显示N/P比为8。图27E和27F显示N/P比为6。图27G和27H显示N/P比为4。图27I和27J显示N/P比为2。图27K显示N/P比为4的侧视图。

[0058] 图28. 制剂: 具有N/P比变化的DHDMS/DOPE。未见肺部递送并且改变的N/P比不会影响肺部分布。离体分离器官组织图像。

具体实施方式

[0059] 定义

[0060] 本文使用的缩写具有其在化学和生物学领域内的常规含义。本文阐述的化学结构和式是根据化学领域已知的化学价的标准规则理解的。

[0061] 当取代基基团由其从左至右书写的常规化学式指定时,它们同样涵盖从右至左书写结构所得到的化学上相同的取代基,例如, $-\text{CH}_2\text{O}-$ 等同于 $-\text{OCH}_2-$ 。

[0062] 除非另有说明,否则术语“烷基”本身或作为另一取代基的一部分是指直链(即无支链)或支链或其组合,其可以是完全饱和的,单不饱和的或多不饱和的,并且可包括具有指定碳原子数的二价和多价基团(即, $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ 表示1至10个碳)。烷基是未环化的链。饱和烷基的实例包括但不限于诸如以下基团:甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、叔丁基、异丁基、仲丁基、(环己基)甲基,例如正戊基、正己基、正庚基、正辛基等的同系物和异构体。不饱和烷基基团是具有一个或多个双键或三键的烷基。不饱和烷基基团的实例包括但不限于乙烯基、2-丙烯基、巴豆基、2-异戊烯基、2-(丁二烯基)、2,4-戊二烯基、3-(1,4-戊二烯基)、乙炔基、1-丙炔基和3-丙炔基、3-丁炔基,以及更高的同系物和异构体。烷氧基是经由氧连接基($-\text{O}-$)连接至分子其余部分的烷基。

[0063] 除非另有说明,否则术语“亚烷基”本身或作为另一取代基的一部分是指衍生自烷基的二价基团,例如但不限于 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 。通常,烷基(或亚烷基)基团将具有1至24个碳原子,其中那些具有10个以下碳原子的基团是优选的。“低级烷基”或“低级亚烷基”是 $\text{C}_1\text{-C}_8$ 烷基或亚烷基基团。

[0064] 除非另有说明,否则术语“杂烷基”本身或与另一术语组合是指由至少一个碳原子和至少一个选自O、N、P、Si和S的杂原子组成的稳定的直链或支链或其组合,并且其中氮和硫原子可以任选地被氧化,并且氮杂原子可以任选地被季铵化。杂原子O、N、P、S和Si可位于杂烷基基团的任何内部位置或者烷基基团与分子其余部分连接的位置。杂烷基是未环化的链。实例包括但不限于: $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N(CH}_3\text{)-CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{-S-CH}_2\text{-CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-S(O)-CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-S(O)}_2\text{-CH}_3$ 、 $-\text{CH=CH-O-CH}_3$ 、 $-\text{Si(CH}_3\text{)}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{-CH=N-OCH}_3$ 、 $-\text{CH=CH-N(CH}_3\text{)-CH}_3$ 、 $-\text{O-CH}_3$ 、 $-\text{O-CH}_2\text{-CH}_3$ 和 $-\text{CN}$ 。至多两个杂原子可以是连续的,例如 $-\text{CH}_2\text{-NH-OCH}_3$ 。

[0065] 类似地,除非另有说明,否则术语“亚杂烷基”本身或作为另一取代基的一部分是指衍生自杂烷基的二价基团,例如但不限于 $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-S-CH}_2\text{-CH}_2-$ 和 $-\text{CH}_2\text{-S-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-CH}_2-$ 。对于亚杂烷基基团,杂原子也可以占据链末端中的任一个或两个(例如,亚烷基氧基、亚烷基二氧基、亚烷基氨基、亚烷基二氨基等)。更进一步地,对于亚烷基和亚杂烷基连接基团,所述连接基团的化学式的书写方向不暗示所述连接基团的取向。例如,式 $-\text{C(O)}_2\text{R}'$ 代表 $-\text{C(O)}_2\text{R}'$ 和 $-\text{R}'\text{C(O)}_2$ 。如上所述,如本文所用的杂烷基基团包括通过杂原子连接至分子其余部分的那些基团,例如 $-\text{C(O)}\text{R}'$ 、 $-\text{C(O)}\text{NR}'$ 、 $-\text{NR}'\text{R}''$ 、 $-\text{OR}'$ 、 $-\text{SR}'$ 和/或 $-\text{SO}_2\text{R}'$ 。在列举“杂烷基”,接着列举特定的杂烷基基团,例如 $-\text{NR}'\text{R}''$ 等时,应理解,术语杂烷基和 $-\text{NR}'\text{R}''$ 不是多余的或互斥的。相反,列举特定的杂烷基基团以增加清晰性。因此,术语“杂烷基”在本文中不应解释为排除特定的杂烷基基团,例如 $-\text{NR}'\text{R}''$ 等。

[0066] 除非另有说明,否则术语“环烷基”和“杂环烷基”本身或与其它术语组合分别是指“烷基”和“杂烷基”的环状形式。环烷基和杂烷基不是芳族的。另外,对于杂环烷基,杂原子可以占据杂环与分子其余部分连接的位置。环烷基的实例包括但不限于环丙基、环丁基、环戊基、环己基、1-环己烯基、3-环己烯基、环庚基等。杂环烷基的实例包括但不限于1-(1,2,5,6-四氢吡啶基)、1-哌啶基、2-哌啶基、3-哌啶基、4-吗啉基、3-吗啉基、四氢呋喃-2-基、四氢呋喃-3-基、四氢噻吩-2-基、四氢噻吩-3-基、1-哌嗪基、2-哌嗪基等。单独或作为另一取

代基的一部分的“亚环烷基”和“亚杂环烷基”是指分别衍生自环烷基和杂环烷基的二价基团。

[0067] 除非另有说明,否则术语“卤基”或“卤素”本身或作为另一取代基的一部分是指氟、氯、溴或碘原子。另外,诸如“卤代烷基”的术语旨在包括单卤代烷基和多卤代烷基。例如,术语“卤代(C₁-C₄)烷基”包括但不限于氟甲基、二氟甲基、三氟甲基、2,2,2-三氟乙基、4-氯丁基、3-溴丙基等。

[0068] 除非另有说明,否则术语“酰基”是指-C(O)R,其中R是取代或未取代的烷基,取代或未取代的环烷基,取代或未取代的杂烷基,取代或未取代的杂环烷基,取代或未取代的芳基,或取代或未取代的杂芳基。

[0069] 除非另有说明,否则术语“芳基”是指多不饱和的芳族烃取代基,其可以是单环或稠合在一起(即稠环芳基)或共价连接的多个环(优选1至3个环)。稠环芳基是指稠合在一起的多个环,其中至少一个稠环是芳基环。术语“杂芳基”是指包含选自N、O和S的1至4个杂原子的芳基基团(或环),其中氮和硫原子任选地被氧化,并且一个或多个氮原子任选地被季铵化。因此,术语“杂芳基”包括稠环杂芳基基团(即,稠合在一起的多个环,其中至少一个稠环是杂芳族环)。5,6-稠环亚杂芳基是指稠合在一起的两个环,其中一个环具有5个成员而另一个环具有6个成员,并且其中至少一个环是杂芳基环。同样,6,6-稠环亚杂芳基是指稠合在一起的两个环,其中一个环具有6个成员而另一个环具有6个成员,并且其中至少一个环是杂芳基环。并且6,5-稠环亚杂芳基是指稠合在一起的两个环,其中一个环具有6个成员而另一个环具有5个成员,并且其中至少一个环是杂芳基环。杂芳基基团可以通过碳或杂原子连接至分子的其余部分。芳基和杂芳基基团的非限制性实例包括苯基,1-萘基,2-萘基,4-联苯基,1-吡咯基,2-吡咯基,3-吡咯基,3-吡唑基,2-咪唑基,4-咪唑基,吡嗪基,2-噁唑基,4-噁唑基,2-苯基-4-噁唑基,5-噁唑基,3-异噁唑基,4-异噁唑基,5-异噁唑基,2-噻唑基,4-噻唑基,5-噻唑基,2-呋喃基,3-呋喃基,2-噻吩基,3-噻吩基,2-吡啶基,3-吡啶基,4-吡啶基,2-嘧啶基,4-嘧啶基,5-苯并噻唑基,嘌呤基,2-苯并咪唑基,5-吡啶基,1-异喹啉基,5-异喹啉基,2-喹啉基,5-喹啉基,3-喹啉基和6-喹啉基。每个上述芳基和杂芳基环系的取代基选自下述可接受的取代基。单独或作为另一取代基的一部分的“亚芳基”和“亚杂芳基”分别是指衍生自芳基和杂芳基的二价基团。

[0070] 为简洁起见,术语“芳基”当与其它术语(例如,芳氧基、芳基硫氧基、芳基烷基)组合使用时,包括如上文所定义的芳基和杂芳基环。因此,术语“芳基烷基”旨在包括其中芳基基团与烷基基团连接的那些基团(例如苄基、苯乙基、吡啶基甲基等),包括其中碳原子(例如亚甲基基团)已被例如氧原子代替的那些烷基基团(例如苯氧基甲基、2-吡啶基氧基甲基、3-(1-萘氧基)丙基等)。

[0071] 如本文所用,术语“氧代”是指与碳原子双键键合的氧。

[0072] 如本文所用,术语“烷基磺酰基”是指具有式-S(O₂)-R'的部分,其中R'是如上文所定义的烷基基团。R'可以具有指定数目的碳(例如,“C₁-C₄烷基磺酰基”)。

[0073] 上述术语中的每一个(例如,“烷基”、“杂烷基”、“芳基”和“杂芳基”)包括所示基团的取代和未取代形式。

[0074] 烷基和杂烷基基团(包括通常称为亚烷基、烯基、亚杂烷基、杂烯基、炔基、环烷基、杂环烷基、环烯基和杂环烯基的那些基团)的取代基可以是多种基团中的一个或多个,所述

基团选自但不限于： $-OR'$ 、 $=O$ 、 $=NR'$ 、 $=N-OR'$ 、 $-NR'R''$ 、 $-SR'$ 、-卤素、 $-SiR'R''R'''$ 、 $-OC(O)R'$ 、 $-C(O)R'$ 、 $-CO_2R'$ 、 $-CONR'R''$ 、 $-OC(O)NR'R''$ 、 $-NR''C(O)R'$ 、 $-NR'-C(O)NR''R'''$ 、 $-NR''C(O)_2R'$ 、 $-NR-C(NR'R''R''')=NR'''$ 、 $-NR-C(NR'R'')=NR'''$ 、 $-S(O)R'$ 、 $-S(O)_2R'$ 、 $-S(O)_2NR'R''$ 、 $-NRSO_2R'$ 、 $-CN$ 和 $-NO_2$ ，其数目范围为零至 $(2m'+1)$ ，其中 m' 是这样的基团中的碳原子总数。 R' 、 R'' 、 R''' 和 R'''' 各自优选独立地指氢，取代或未取代的杂烷基，取代或未取代的环烷基，取代或未取代的杂环烷基，取代或未取代的芳基（例如被1-3个卤素取代的芳基），取代或未取代的烷基、烷氧基或硫代烷氧基基团，或芳基烷基基团。当本文公开的化合物包括一个以上的R基团时，例如，每个R基团独立地被选择，当存在多于一个的这些基团时，每个 R' 、 R'' 、 R''' 和 R'''' 基团也独立地被选择。当 R' 和 R'' 连接到同一氮原子时，它们可以与氮原子组合形成4、5、6或7元环。例如， $-NR'R''$ 包括但不限于1-吡咯烷基和4-吗啉基。根据对取代基的上述讨论，本领域技术人员将理解，术语“烷基”旨在包括包含与除氢基团以外的基团结合的碳原子的基团，例如卤代烷基（例如 $-CF_3$ 和 $-CH_2CF_3$ ）和酰基（例如 $-C(O)CH_3$ 、 $-C(O)CF_3$ 、 $-C(O)CH_2OCH_3$ 等）。

[0075] 与关于烷基基团所述的取代基类似，芳基和杂芳基基团的取代基是变化的，并且选自例如： $-OR'$ 、 $-NR'R''$ 、 $-SR'$ 、-卤素、 $-SiR'R''R'''$ 、 $-OC(O)R'$ 、 $-C(O)R'$ 、 $-CO_2R'$ 、 $-CONR'R''$ 、 $-OC(O)NR'R''$ 、 $-NR''C(O)R'$ 、 $-NR'-C(O)NR''R'''$ 、 $-NR''C(O)_2R'$ 、 $-NR-C(NR'R''R''')=NR'''$ 、 $-NR-C(NR'R'')=NR'''$ 、 $-S(O)R'$ 、 $-S(O)_2R'$ 、 $-S(O)_2NR'R''$ 、 $-NRSO_2R'$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-R'$ 、 $-N_3$ 、 $-CH(Ph)_2$ 、氟（ C_1 - C_4 ）烷氧基和氟（ C_1 - C_4 ）烷基，其数目范围为零至芳族环系上的开放价总数；并且其中 R' 、 R'' 、 R''' 和 R'''' 优选独立地选自氢，取代或未取代的烷基，取代或未取代的杂烷基，取代或未取代的环烷基，取代或未取代的杂环烷基，取代或未取代的芳基和取代或未取代的杂芳基。当本文公开的化合物包括一个以上的R基团时，例如，每个R基团独立地被选择，当存在多于一个的这些基团时，每个 R' 、 R'' 、 R''' 和 R'''' 基团也独立地被选择。

[0076] 两个或更多个取代基可以任选地连接形成芳基、杂芳基、环烷基或杂环烷基基团。尽管不是必须的，但是通常发现这种所谓的成环取代基连接至环状基础结构。在实施方案中，成环取代基连接至基础结构的相邻成员。例如，连接至环状基础结构的相邻成员的两个成环取代基产生稠环结构。在另一个实施方案中，成环取代基连接至基础结构的单个成员。例如，连接至环状基础结构的单个成员的两个成环取代基产生螺环结构。在另一个实施方案中，成环取代基连接至基础结构的非相邻成员。

[0077] 芳基或杂芳基环的相邻原子上的两个取代基可任选地形成式 $-T-C(O)-(CRR')_q-U$ 的环，其中T和U独立地是 $-NR-$ 、 $-O-$ 、 $-CRR'-$ 或单键，并且q是0至3的整数。或者，芳基或杂芳基环的相邻原子上的两个取代基可以任选地用式 $-A-(CH_2)_r-B-$ 的取代基代替，其中A和B独立地是 $-CRR'-$ 、 $-O-$ 、 $-NR-$ 、 $-S-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)_2NR'-$ 或单键，并且r是1至4的整数。如此形成的新环的单键之一可以任选地被双键代替。或者，芳基或杂芳基环的相邻原子上的两个取代基可以任选地被式 $-(CRR')_s-X'-(C''R'')_d-$ 的取代基代替，其中s和d独立地是0至3的整数，并且 X' 是 $-O-$ 、 $-NR-$ 、 $-S-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 或 $-S(O)_2NR'-$ 。取代基R、 R' 、 R'' 和 R''' 优选独立地选自氢，取代或未取代的烷基，取代或未取代的环烷基，取代或未取代的杂环烷基，取代或未取代的芳基以及取代或未取代的杂芳基。

[0078] 如本文所用，术语“杂原子”或“环杂原子”旨在包括氧(O)、氮(N)、硫(S)、磷(P)和硅(Si)。

[0079] 如本文所用,“取代基基团”是指选自以下部分的基团:

[0080] (A) -OH、-NH₂、-SH、-CN、-CF₃、-NO₂、氧代基、卤素、未取代的烷基、未取代的杂烷基、未取代的环烷基、未取代的杂环烷基、未取代的芳基、未取代的杂芳基,和

[0081] (B) 烷基、杂烷基、环烷基、杂环烷基、芳基和杂芳基,其被至少一个选自以下的取代基取代:

[0082] (i) 氧代基、-OH、-NH₂、-SH、-CN、-CF₃、-NO₂、卤素、未取代的烷基、未取代的杂烷基、未取代的环烷基、未取代的杂环烷基、未取代的芳基、未取代的杂芳基,和

[0083] (ii) 烷基、杂烷基、环烷基、杂环烷基、芳基和杂芳基,其被至少一个选自以下的取代基取代:

[0084] (a) 氧代基、-OH、-NH₂、-SH、-CN、-CF₃、-NO₂、卤素、未取代的烷基、未取代的杂烷基、未取代的环烷基、未取代的杂环烷基、未取代的芳基、未取代的杂芳基,和

[0085] (b) 烷基、杂烷基、环烷基、杂环烷基、芳基或杂芳基,其被至少一个选自以下的取代基取代:氧代基、-OH、-NH₂、-SH、-CN、-CF₃、-NO₂、卤素、未取代的烷基、未取代的杂烷基、未取代的环烷基、未取代的杂环烷基、未取代的芳基和未取代的杂芳基。

[0086] 如本文所用,“尺寸受限的取代基”或“尺寸受限的取代基基团”是指选自上文关于“取代基基团”所述的所有取代基的基团,其中每个取代或未取代的烷基是取代或未取代的C₁-C₂₀烷基,每个取代或未取代的杂烷基是取代或未取代的2至20元杂烷基,每个取代或未取代的环烷基是取代或未取代的C₄-C₈环烷基,并且每个取代或未取代的杂环烷基是取代或未取代的4至8元杂环烷基。

[0087] 如本文所用,“低级取代基”或“低级取代基基团”是指选自上文关于“取代基基团”所述的所有取代基的基团,其中每个取代或未取代的烷基是取代或未取代的C₁-C₈烷基,每个取代或未取代的杂烷基是取代或未取代的2至8元杂烷基,每个取代或未取代的环烷基是取代或未取代的C₅-C₇环烷基,并且每个取代或未取代的杂环烷基是取代或未取代的5至7元杂环烷基。

[0088] 在一些实施方案中,本文化合物中描述的每个取代基基团被至少一个取代基基团取代。更具体地,在一些实施方案中,本文化合物中描述的每个取代的烷基、取代的杂烷基、取代的环烷基、取代的杂环烷基、取代的芳基、取代的杂芳基、取代的亚烷基、取代的亚杂烷基、取代的亚环烷基、取代的亚杂环烷基、取代的亚芳基和/或取代的亚杂芳基被至少一个取代基基团取代。在其它实施方案中,这些基团中的至少一个或全部被至少一个尺寸受限的取代基基团取代。在其它实施方案中,这些基团中的至少一个或全部被至少一个低级取代基基团取代。

[0089] 在本文化合物的其它实施方案中,每个取代或未取代的烷基可以是取代或未取代的C₁-C₂₀烷基,每个取代或未取代的杂烷基是取代或未取代的2至20元杂烷基,每个取代或未取代的环烷基是取代或未取代的C₃-C₈环烷基,每个取代或未取代的杂环烷基是取代或未取代的3至8元杂环烷基,每个取代或未取代的芳基是取代或未取代的C₆-C₁₀芳基,和/或每个取代或未取代的杂芳基是取代或未取代的5至10元杂芳基。在本文化合物的一些实施方案中,每个取代或未取代的亚烷基是取代或未取代的C₁-C₂₀亚烷基,每个取代或未取代的亚杂烷基是取代或未取代的2至20元亚杂烷基,每个取代或未取代的亚环烷基是取代或未取代的C₃-C₈亚环烷基,每个取代或未取代的亚杂环烷基是取代或未取代的3至8元亚杂环烷

基,每个取代或未取代的亚芳基是取代或未取代的C₆-C₁₀亚芳基,和/或每个取代或未取代的亚杂芳基是取代或未取代的5至10元亚杂芳基。

[0090] 在一些实施方案中,每个取代或未取代的烷基是取代或未取代的C₁-C₈烷基,每个取代或未取代的杂烷基是取代或未取代的2至8元杂烷基,每个取代或未取代的环烷基是取代或未取代的C₃-C₇环烷基,每个取代或未取代的杂环烷基是取代或未取代的3至7元杂环烷基,每个取代或未取代的芳基是取代或未取代的C₆-C₁₀芳基,和/或每个取代或未取代的杂芳基是取代或未取代的5至9元杂芳基。在一些实施方案中,每个取代或未取代的亚烷基是取代或未取代的C₁-C₈亚烷基,每个取代或未取代的亚杂烷基是取代或未取代的2至8元亚杂烷基,每个取代或未取代的亚环烷基是取代或未取代的C₃-C₇亚环烷基,每个取代或未取代的亚杂环烷基是取代或未取代的3至7元亚杂环烷基,每个取代或未取代的亚芳基是取代或未取代的C₆-C₁₀亚芳基,和/或每个取代或未取代的亚杂芳基是取代或未取代的5至9元亚杂芳基。在一些实施方案中,所述化合物是本文阐述的化学物质。

[0091] 如本文所用,术语“一个”或“一种”是指一个或多个/一种或多种。另外,如本文所用的短语“被a[n]取代”是指指定的基团可以被任何或所有所述取代基中的一个或多个取代。举例来说,当诸如烷基或杂芳基基团的基团“被未取代的C₁-C₂₀烷基或未取代的2至20元杂烷基取代”时,所述基团可含有一个或多个未取代的C₁-C₂₀烷基,和/或一个或多个未取代的2至20元杂烷基。此外,当一个部分被R取代基取代时,所述基团可以被称为“R取代的”。当一个部分被R取代时,所述部分被至少一个R取代基取代并且每个R取代基任选地是不同的。

[0092] 本发明化合物的描述受到本领域技术人员已知的化学键合原理的限制。因此,当一个基团可以被多个取代基中的一个或多个取代时,选择这样的取代基以符合化学键合的原理,并产生固有地非不稳定的和/或本领域普通技术人员已知在环境条件下(例如在水性、中性和几种已知的生理条件下)可能不稳定的化合物。例如,根据本领域技术人员已知的化学键合原理,杂环烷基或杂芳基经由环杂原子连接至分子的其余部分,从而避免了固有地不稳定的化合物。

[0093] 除非另有定义,否则本文使用的技术和科学术语具有与本领域普通技术人员通常理解的相同的含义。参见例如Singleton等,《微生物学和分子生物学词典》(DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY),第2版,J.Wiley&Sons (New York, NY 1994); Sambrook等,《分子克隆:实验室手册》(MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL), Cold Springs Harbor Press (Cold Springs Harbor, NY 1989)。类似于或等同于本文描述那些的任何方法、装置和材料都可以用于本发明的实践中。提供以下定义以促进对本文中经常使用的某些术语的理解,并且不意味着限制本公开的范围。

[0094] “核酸”是指单链、双链或多链形式的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸及其聚合物,或其补体。术语“多核苷酸”是指核苷酸的线性序列。术语“核苷酸”通常是指多核苷酸的单个单元,即单体。核苷酸可以是核糖核苷酸、脱氧核糖核苷酸或其修饰形式。本文考虑的多核苷酸的实例包括单链和双链DNA,单链和双链RNA(包括siRNA和mRNA),以及具有单链和双链DNA和RNA的混合物的杂合分子。核酸可以是直链或支链的。例如,核酸可以是核苷酸的线性链,或者核酸可以是分支的,例如使得核酸包含核苷酸的一个或多个臂或分支。任选地,将分支的核酸重复分支以形成更高序的结构,例如树枝状聚合物等。

[0095] 核酸,包括具有硫代磷酸酯骨架的核酸,可包括一个或多个反应性部分。如本文所

用,术语反应性部分包括能够通过共价、非共价或其它相互作用与另一分子(例如核酸或多肽)反应的任何基团。举例来说,核酸可包括氨基酸反应性部分,其通过共价、非共价或其它相互作用与蛋白质或多肽上的氨基酸反应。

[0096] 所述术语还涵盖含有已知核苷酸类似物或修饰的骨架残基或键联的核酸,它们是合成的,天然存在的和非天然存在的,其具有与参考核酸相似的结合特性,并且以与参考核苷酸类似的方式代谢。这样的类似物的实例包括但不限于磷酸二酯衍生物,包括例如氨基磷酸酯,二氨基磷酸酯,硫代磷酸酯(phosphorothioate)(也称为硫代磷酸酯(phosphothioate)),二硫代磷酸酯,膦酰基羧酸,膦酰基羧酸酯,膦酰基乙酸,膦酰基甲酸,膦酸甲酯,膦酸硼或O-甲基亚磷酰胺键联(参见Eckstein,《寡核苷酸和类似物:实用方法》(Oligonucleotides and Analogues:A Practical Approach),Oxford University Press);以及肽核酸骨架和键联。其它类似物核酸包括具有以下的那些:正骨架;非离子骨架、修饰糖和非核糖骨架(例如二氨基磷酸吗啉基寡核苷酸或锁核酸(LNA)),包括以下文献中所述的那些:美国专利第5,235,033号和第5,034,506号,以及第6章和第7章,ASC研讨会系列580,《反义研究中的碳水化合物修饰》(Carbohydrate Modifications in Antisense Research),Sanghui和Cook编辑。含有一种或多种碳环糖的核酸也包括在核酸的一种定义内。出于多种原因可以进行核糖-磷酸酯骨架的修饰,例如,以增加这些分子在生理环境中或作为生物芯片上的探针的稳定性和半衰期。可以制备天然存在的核酸和类似物的混合物;或者,可以制备不同核酸类似物的混合物,以及天然存在的核酸和类似物的混合物。在实施方案中,DNA中的核苷酸间键是磷酸二酯、磷酸二酯衍生物或两者的组合。

[0097] 如本文所用,术语“约”是指包括指定值的数值范围,本领域普通技术人员会认为该范围合理地类似于指定值。在实施方案中,术语“约”是指使用本领域通常可接受的测量在标准偏差内。在实施方案中,约是指扩展到指定值的 $\pm 10\%$ 的范围。在实施方案中,约是指指定值。

[0098] 术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用,是指氨基酸残基的聚合物,其中所述聚合物可以缀合至不由氨基酸组成的部分。所述术语适用于其中一个或多个氨基酸残基是相应天然存在氨基酸的人工化学模拟物的氨基酸聚合物,以及适用于天然存在的氨基酸聚合物和非天然存在的氨基酸聚合物。所述术语适用于大环肽,已用非肽官能团修饰的肽,拟肽,聚酰胺和大环内酰胺。“融合蛋白”是指编码两个或更多个分开的蛋白质序列的嵌合蛋白,所述两个或更多个分开的蛋白质序列重组表达为单个部分。

[0099] 术语“肽基”和“肽基部分”是指单价肽。

[0100] 术语“氨基酸”是指天然存在的和合成的氨基酸,以及以类似于天然存在的氨基酸的方式起作用的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然存在的氨基酸是由遗传密码编码的那些氨基酸,以及后来被修饰的那些氨基酸,例如羟脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸和O-磷酸丝氨酸。氨基酸类似物是指具有与天然存在氨基酸相同的基本化学结构,即与氢、羧基基团、氨基基团和R基团结合的 α 碳的化合物,例如高丝氨酸、正亮氨酸、甲硫氨酸亚砷、甲硫氨酸甲基砷。这样的类似物具有修饰的R基团(例如正亮氨酸)或修饰的肽骨架,但是保留了与天然存在氨基酸相同的基本化学结构。氨基酸模拟物是指具有与氨基酸的一般化学结构不同的结构但以与天然存在氨基酸相似的方式起作用的化合物。术语“非天然存在的氨基酸”和“非天然氨基酸”是指在自然界中未发现的氨基酸类似物、合成氨基酸和氨基酸模拟物。

[0101] 氨基酸在本文中可以由它们众所周知的三字母符号或由IUPAC-IUB生化命名委员会推荐的单字母符号来指代。同样,核苷酸可以由它们公认的单字母代码来指代。

[0102] 氨基酸或核苷酸碱基“位置”由一个数字表示,该数字基于其相对于N末端(或5'端)的位置依序识别参考序列中的每个氨基酸(或核苷酸碱基)。由于在确定最佳比对时必须考虑的缺失、插入、截短、融合等,因此通常通过简单地从N末端开始计数确定的测试序列中的氨基酸残基数目不一定与参考序列中其相应位置的数目相同。例如,在变体相对于比对的参考序列具有缺失的情况下,变体中将不存在与参考序列中缺失位点的位置相对应的氨基酸。在比对的参考序列中存在插入的情况下,该插入将不对应于参考序列中的编号的氨基酸位置。在截短或融合的情况下,参考或比对序列中可能存在不对应于相应序列中任何氨基酸的氨基酸段。

[0103] 当在给定氨基酸或多核苷酸序列编号的上下文中使用时,术语“相对于……进行编号”或“对应于”是指当给定氨基酸或多核苷酸序列与参考序列进行比较时,指定参考序列的残基的编号。

[0104] “保守修饰的变体”适用于氨基酸和核酸序列。关于特定的核酸序列,保守修饰的变体是指编码相同或基本上相同的氨基酸序列的那些核酸,或者在核酸不编码氨基酸序列时是指基本上相同的序列。由于遗传密码的简并性,大量功能上相同的核酸编码任何给定的蛋白质。例如,密码子GCA、GCC、GCG和GCU都编码氨基酸丙氨酸。因此,在由密码子指定丙氨酸的每个位置,可以将密码子改变为所描述的任何相应密码子,而无需改变编码的多肽。这样的核酸变异是“沉默变异”,其是保守修饰变异的一种。本文中编码多肽的每个核酸序列也描述了核酸的每个可能的沉默变异。本领域技术人员将认识到,可以修饰核酸中的每个密码子(AUG和TGG除外,AUG通常是甲硫氨酸的唯一密码子,TGG通常是色氨酸的唯一密码子)以产生功能上相同的分子。因此,相对于表达产物,而不是相对于实际探针序列,编码多肽的核酸的每个沉默变异都隐含在每个所述序列中。

[0105] 关于氨基酸序列,本领域技术人员将认识到,改变、添加或缺失编码序列中的单个氨基酸或小百分比的氨基酸的对核酸、肽、多肽或蛋白质序列的个别取代、缺失或添加是“保守修饰的变体”,其中该变异导致氨基酸被化学上相似的氨基酸取代。提供功能上相似的氨基酸的保守取代表是本领域众所周知的。这些保守修饰的变体是本发明的多态变体、种间同源物和等位基因的补充,并且不排除它们。

[0106] 以下八个组各自包含彼此保守取代的氨基酸:1) 丙氨酸(A)、甘氨酸(G);2) 天冬氨酸(D)、谷氨酸(E);3) 天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q);4) 精氨酸(R)、赖氨酸(K);5) 异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、甲硫氨酸(M)、缬氨酸(V);6) 苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、色氨酸(W);7) 丝氨酸(S)、苏氨酸(T);和8) 半胱氨酸(C)、甲硫氨酸(M)。

[0107] 通过在比较窗口中比较两个最佳比对的序列来确定“序列同一性的百分比”,其中与参考序列(其不包含添加或缺失)相比,比较窗口中的多核苷酸或多肽序列的部分可以包括添加或缺失(即空位),以实现两个序列的最佳比对。通过确定两个序列中出现相同核酸碱基或氨基酸残基的位置数以产生匹配位置数,将匹配位置数除以比较窗口中的位置总数,并且将结果乘以100以得出序列同一性百分比,来计算百分比。

[0108] 在两个或更多个核酸或多肽序列的上下文中,术语“相同”或“同一性”百分比是指当在比较窗口上比较和比对以获得最大对应性或者指定区域为使用以下序列比较算法之

一或通过手动比对和目视检查测量时,两个或更多个序列或子序列相同或具有指定百分比的相同的氨基酸残基或核苷酸(即,在例如本发明的整个多肽序列或本发明多肽的单个结构域的指定区域上具有60%同一性,任选地65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%同一性)。这样的序列然后被称为“基本上相同”。该定义也指测试序列的补充序列。任选地,同一性存在于长度为至少约50个核苷酸的区域上,或者更优选存在于长度为100至500或1000或更多个核苷酸的区域上。

[0109] 对于序列比较,通常将一个序列用作参考序列,将其与测试序列进行比较。当使用序列比较算法时,将测试序列和参考序列输入计算机,必要时指定子序列坐标,并指定序列算法程序参数。可以使用默认程序参数,或者可以指定替代参数。然后,序列比较算法根据程序参数来计算测试序列相对于参考序列的序列同一性百分比。

[0110] 如本文所用,“比较窗口”包括对选自例如全长序列或20至600个、约50至约200个、或约100至约150个氨基酸或核苷酸的多个连续位置中的任一个的区段的提及,其中在将两个序列最佳比对后,可以将序列与相同数目的连续位置的参考序列进行比较。用于比较的序列比对方法是本领域众所周知的。用于比较的序列的最佳比对可以例如通过以下进行:Smith和Waterman(1970) *Adv. Appl. Math.* 2:482c的局部同源性算法;Needleman和Wunsch(1970) *J. Mol. Biol.* 48:443的同源性比对算法;Pearson和Lipman(1988) *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 85:2444的相似性方法搜寻;这些算法(威斯康星州遗传学软件包(Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI)中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA)的计算机化实现;或手动比对和目视检查(参见例如Ausubel等, *Current Protocols in Molecular Biology* (1995年增刊))。

[0111] 适用于确定序列百分比同一性和序列相似性的算法的一个实例是BLAST和BLAST 2.0算法,这些算法分别在以下描述:Altschul等, (1977) *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402;和Altschul等, (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410。可通过国家生物技术信息中心(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)公开获得进行BLAST分析的软件。该算法涉及首先通过识别查询序列中长度为W的短字组(word)来识别高得分序列对(HSP),这些短字组在与数据库序列中相同长度的字组比对时匹配或满足一些正值阈值得分T。T被称为邻近字组得分阈值(Altschul等,同上)。这些初始邻近字组命中充当启动搜索以查找包含它们的较长HSP的种子。字组命中沿着每个序列在两个方向上延伸,直到累积比对得分可以增加为止。对于核苷酸序列,使用参数M(一对匹配残基的奖励分;始终>0)和N(错配残基的罚分;始终<0)来计算累积得分。对于氨基酸序列,使用评分矩阵来计算累积得分。在以下情况下停止字组命中在每个方向上的扩展:累积比对得分相比于其最大实现值减少数量X;由于一个或多个负得分残基比对的累积,累积得分变为零或更低;或到达任一序列的末端。BLAST算法参数W、T和X确定比对的灵敏度和速度。BLASTN程序(用于核苷酸序列)使用以下作为默认值:字长(W)为11,期望值(E)为10, M=5, N=-4以及两条链的比较。对于氨基酸序列, BLASTP程序使用以下作为默认值:字长为3,期望值(E)为10,以及BLOSUM62评分矩阵(参见Henikoff和Henikoff(1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915), 比对(B)为50,期望值(E)为10, M=5, N=-4,以及两条链的比较。

[0112] BLAST算法还对两个序列之间的相似性进行统计分析(参见例如Karlin和Altschul(1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5787)。BLAST算法提供一种相似性

量度是最小总和概率($P(N)$),它提供了两个核苷酸或氨基酸序列之间偶然发生匹配的概率的指示。例如,如果在测试核酸与参考核酸的比较中的最小总和概率小于约0.2,更优选小于约0.01并且最优选小于约0.001,则认为核酸与参考序列相似。

[0113] 如下所述,两个核酸序列或多肽基本上相同的指示是由第一核酸编码的多肽与针对由第二核酸编码的多肽产生的抗体发生免疫交叉反应。因此,多肽通常与第二多肽基本上相同,例如,其中两个肽仅通过保守取代而不同。如下所述,两个核酸序列基本上相同的另一个指示是两个分子或其互补序列在严格条件下彼此杂交。两个核酸序列基本上相同的另一个指示是可以使用相同的引物来扩增所述序列。

[0114] “接触”是根据其平常的普通含义使用的,并且是指使至少两种不同的物质(例如构成生物分子或细胞的化合物)变得足够近以反应、相互作用或物理接触的过程。然而,应当理解,所得反应产物可以直接由外加试剂之间的反应产生,或者由一种或多种可以在反应混合物中产生的外加试剂的中间体产生。在实施方案中,接触包括例如允许如本文所述的核糖核酸与内切核酸酶和增强子元件相互作用。

[0115] “对照”样品或值是指用作参考的样品,通常是已知的参考,用于与测试样品进行比较。例如,可以从测试条件下,例如在存在测试化合物的情况下获取测试样品,并与已知条件下的样品进行比较,例如在不存在测试化合物的情况下(阴性对照)或在存在已知化合物的情况下(阳性对照)。对照也可以代表从多个测试或结果中收集的平均值。本领域技术人员将认识到,可以将对照设计为用于评估任何数目的参数。例如,可以设计一种对照,以基于药理学数据(例如半衰期)或治疗措施(例如比较副作用)来比较治疗益处。本领域技术人员将理解哪种标准对照在给定情况下最合适,并且能够基于与标准对照值的比较来分析数据。标准对照对于确定数据的显著性(例如统计显著性)也很有价值。例如,如果给定参数的值在标准对照中变化很大,则测试样品中的变化将不被认为是显著的。

[0116] “标记”或“可检测部分”是可通过光谱、光化学、生物化学、免疫化学、化学或其它物理手段检测的组合物。例如,可用的标记包括 ^{32}P ,荧光染料,电子致密试剂,酶(例如,如ELISA中常用),生物素,洋地黄毒苷(digoxigenin)或半抗原和蛋白质或其它可以例如通过在与目标肽特异性反应的肽或抗体中并入放射性标记而可检测的实体。例如,使用在Hermanson, Bioconjugate Techniques 1996, Academic Press, Inc., San Diego中描述的方法,可以采用本领域已知的用于将抗体与标记缀合的任何适当方法。

[0117] “标记的蛋白质或多肽”是通过连接子或化学键共价结合,或通过离子、范德华力、静电或氢键非共价结合至标记以使得可以通过检测与被标记的蛋白质或多肽结合的标记的存在来检测被标记的蛋白质或多肽的存在者。或者,使用高亲和力相互作用的方法可以实现相同的结果,其中一对结合搭配物中的一个与另一个例如生物素、链霉亲和素(streptavidin)结合。

[0118] “生物样品”或“样品”是指获自或衍生自受试者或患者的材料。生物样品包括组织切片,例如活检和尸检样品,以及用于组织学目的的冷冻切片。这样的样品包括体液,例如血液和血液级分或产品(例如血清、血浆、血小板、红细胞等),痰液,组织,培养细胞(例如原代培养物、外植体和转化细胞),粪便,尿液,滑液,关节组织,滑膜组织,滑膜细胞,成纤维细胞样滑膜细胞,巨噬细胞样滑膜细胞,免疫细胞,造血细胞,成纤维细胞,巨噬细胞,T细胞等。生物学样品通常是从真核生物中获得的,例如哺乳动物如灵长类动物,例如黑猩猩或人

类;牛;狗;猫;啮齿动物,例如豚鼠、大鼠、小鼠;兔;或鸟类;爬行动物;或鱼类。

[0119] 如本文所用,“细胞”是指执行足以保存或复制其基因组DNA的代谢或其它功能的细胞。可以通过本领域熟知的方法来鉴定细胞,包括例如完整膜的存在,特定染料的染色,产生子代的能力,或者在配子的情况下与第二配子结合以产生能存活后代的能力。细胞可以包括原核和真核细胞。原核细胞包括但不限于细菌。真核细胞包括但不限于酵母细胞和源自植物和动物的细胞,例如哺乳动物、昆虫(例如斜纹夜蛾(*spodoptera*))和人类细胞。

[0120] 如本文关于基因所用的词语“表达”或“表达的”是指该基因的转录和/或翻译产物。DNA分子在细胞中的表达水平可根据细胞内存在的相应mRNA的量或细胞产生的DNA编码的蛋白质的量来确定(Sambrook等,1989,《分子克隆:实验室手册》(Molecular Cloning:A Laboratory Manual),18.1-18.88)。

[0121] 转染基因的表达可以在细胞中瞬时或稳定地发生。在“瞬时表达”期间,转染基因在细胞分裂过程中不转移至子细胞。由于其表达限于转染的细胞,因此所述基因的表达会随着时间的流逝而丧失。相反,当所述基因与赋予转染细胞以选择优势的另一个基因共转染时,可以发生转染基因的稳定表达。这样的选择优势可以是对呈现给细胞的某种毒素的抗性。

[0122] 术语“外源的”是指源自给定细胞或生物体外部的分子或物质(例如,核酸或蛋白质)。相反,术语“内源的”是指给定细胞或生物体天然的或起源于给定细胞或生物体的分子或物质。

[0123] “细胞培养物”是存在于生物体外部的细胞的体外群体。可以从分离自细胞库或动物的原代细胞,或衍生自这些来源之一并永生以用于长期体外培养的次生细胞建立细胞培养物。

[0124] 本发明的药剂通常以药物组合物的形式施用,所述药物组合物包含活性治疗剂即和多种其它药学上可接受的组分。参见《雷明顿药物科学》(Remington's Pharmaceutical Science)(第15版,Mack Publishing Company,Easton,Pennsylvania,1980)。优选的形式取决于预期的施用模式和治疗应用。取决于所需的制剂,所述组合物还可以包含药学上可接受的无毒载体或稀释剂,其被定义为通常用于配制用于动物或人类施用的药物组合物的媒介物。选择稀释剂以不影响组合的生物活性。这样的稀释剂的实例是蒸馏水、生理磷酸盐缓冲盐水、林格氏溶液(Ringer's solution)、右旋糖溶液和汉克溶液(Hank's solution)。另外,药物组合物或制剂还可包含其它载体,佐剂,或无毒、无治疗性、无免疫原性的稳定剂等。

[0125] 可以施用所述组合物用于治疗性或预防性治疗。在治疗应用中,将组合物以“治疗有效剂量”施用于患有疾病(例如肺部疾病)的患者。对于这种用途有效的量将取决于疾病的严重程度和患者健康的总体状况。可以根据患者所需和耐受的剂量和频率来单次或多次施用所述组合物。为了本发明的目的,“患者”或“受试者”包括人类和其它动物,特别是哺乳动物。因此,所述方法可应用于人类治疗、兽医应用以及在研究用途设置,例如在包括啮齿动物、犬和灵长类动物模型的实验动物模型中。在某些实施方案中,受试者或患者是哺乳动物,优选灵长类动物,并且在最优选的实施方案中,患者是人类。在其它实施方案中,受试者或患者是哺乳动物,优选是啮齿动物,并且在最优选的实施方案中是小鼠或大鼠。

[0126] 药物组合物还可以包含大的缓慢代谢的大分子,例如蛋白质,多糖如壳聚糖,聚乳

酸,聚乙醇酸和共聚物(例如乳胶官能化的琼脂糖凝胶(TM)、琼脂糖、纤维素等),聚合氨基酸,氨基酸共聚物和脂质聚集体(例如油滴或脂质体)。另外,这些载体可以用作免疫刺激剂(即佐剂)。

[0127] 单独或与其它合适的组分组合的本文提供的组合物可以制成气雾剂制剂(即,它们可以被“雾化”)以经由吸入施用。可以将气雾剂制剂放入加压的可接受的推进剂例如二氯二氟甲烷、丙烷、氮气等中。

[0128] 适用于肠胃外施用的制剂,例如通过关节内(在关节内)、静脉内、肌肉内、肿瘤内、皮内、腹膜内和皮下途径施用的制剂,包括水性和非水性等渗无菌注射溶液,其可以含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和使制剂与预期接受者的血液等渗的溶质;以及水性和非水性无菌混悬液,其可以包括悬浮剂、增溶剂、增稠剂、稳定剂和防腐剂。在本发明的实践中,组合物可以例如通过静脉内输注,腹膜内,膀胱内或鞘内施用。肠胃外施用和静脉内施用是优选的施用方法。化合物的制剂可以存在于单位剂量或多剂量密封的容器如安瓿和小瓶中。

[0129] 注射溶液和混悬液可以由先前所述种类的无菌粉剂、颗粒剂和片剂制备。

[0130] 药物制剂优选为单位剂型。以这种形式,将制剂细分为含有适当量的活性组分的单位剂量。单位剂型可以是包装的制剂,该包装含有离散量的制剂,例如于小瓶或安瓿中的粉末。如果需要,所述组合物还可含有其它相容性治疗剂。

[0131] 联合施用考虑使用分开的制剂或单一药物制剂共同施用,并以任一顺序连续施用,其中优选存在两种(或所有)活性剂同时发挥其生物活性的时段。

[0132] 本文提供的组合物的有效剂量取决于许多不同因素而变化,这些因素包括施用方式,目标位点,患者的生理状态,患者是人类还是动物,所施用的其它药物,以及治疗是预防性还是治疗性的。然而,通过查看用于治疗 and 预防肺/肺部病症的批准组合物的剂量以进行指导,本领域普通技术人员将立即认识到适当和/或等效剂量。

[0133] 术语“疾病”或“病状”是指能够用本文提供的化合物、药物组合物或方法治疗的患者或受试者的存在状态或健康状况。在实施方案中,所述疾病是肺部疾病(例如,肺癌、哮喘、慢性阻塞性肺病(COPD)、囊性纤维化)。

[0134] 在与疾病(例如,肺病、肺癌、哮喘、慢性阻塞性肺病(COPD)、囊性纤维化)相关的物质或物质活性或功能的上下文中,术语“相关”或“与.....相关”是(全部或部分)由物质或物质活性或功能引起的,或疾病症状是(全部或部分)由物质或物质活性或功能引起的。

[0135] 术语“转染”或“转导”可以互换使用,并且定义为将核酸分子和/或蛋白质和/或核糖核蛋白引入培养物中或体内组织中的细胞的过程。核酸分子可以是编码完整蛋白质、核糖核蛋白或其功能部分的序列。通常,编码蛋白质、核糖核蛋白或其功能部分的核酸包含表达该蛋白质或其功能部分所必需的元件(例如启动子、转录起始位点等)。非病毒转染方法包括不使用病毒DNA或病毒颗粒作为递送系统以将核酸分子引入细胞中的任何适当方法。示例性的非病毒转染方法包括脂质体转染。术语“转染”或“转导”还指从外部环境将核酸和/或蛋白质引入细胞中。通过转染,核酸分子和/或蛋白质和/或核糖核蛋白被递送至构成组织的一个或多个细胞的内部。为了修饰细胞的生物学功能,可以将核酸分子和/或蛋白质和/或核糖核蛋白转染到细胞或组织中。或者,可以进行核酸分子和/或蛋白质和/或核糖核蛋白的转染,以将可检测的标记递送至细胞或组织以促进细胞或组织的鉴定。例如,可以由脂质介导的递送(例如脂质体转染)将核酸(例如DNA、RNA、mRNA、siRNA、miRNA、向导RNA)

和/或核糖核蛋白(例如CAS 9)引入细胞或组织中。核酸分子可替代地可以是mRNA、siRNA、miRNA或向导RNA。在某些情况下,核酸分子可以结合至核糖核蛋白(例如,Cas9结合至向导RNA)。

[0136] 对于本文所述的特定蛋白质,所提及的蛋白质包括任何蛋白质的天然存在形式,或保持蛋白质转录因子活性的变体或同源物(例如,与天然蛋白质相比,在至少50%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%活性内)。在一些实施方案中,与天然存在形式相比,变体或同源物在整个序列或部分序列中具有至少90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%氨基酸序列同一性(例如50、100、150或200个连续氨基酸部分)。在其它实施方案中,蛋白质是通过其NCBI序列参考鉴定的蛋白质。在其它实施方案中,蛋白质是通过其NCBI序列参考或其功能片段或同源物鉴定的蛋白质。

[0137] 因此,如本文所提及的“CRISPR相关蛋白9”、“Cas9”或“Cas9蛋白”包括Cas9核酸内切酶或其保持Cas9核酸内切酶活性(例如,与Cas9相比,在至少50%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%活性内)的变体或同源物的任何重组或天然存在形式。在一些方面,与天然存在的Cas9蛋白相比,所述变体或同源物在整个序列或部分序列中具有至少90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%氨基酸序列同一性(例如50、100、150或200个连续氨基酸部分)。在实施方案中,Cas9蛋白与由UniProt参考编号Q99ZW2鉴定的蛋白质或与其具有实质同一性的变体或同源物基本上相同。Cas9是指在本领域中也称为“切口酶”的蛋白质。在实施方案中,Cas9结合CRISPR(规律成簇间隔短回文重复)核酸序列。在实施方案中,CRISPR核酸序列是原核核酸序列。

[0138] 如本文所用,术语“脂质”是指可以包括脂肪、蜡、类固醇、胆固醇、脂溶性维生素、单酸甘油酯、二酸甘油酯、磷脂、鞘脂、糖脂、阳离子或阴离子脂质、衍生脂质等的脂质分子,如下文详细描述。

[0139] 合适的磷脂包括但不限于磷脂酰胆碱(PC)、磷脂酸(PA)、磷脂酰乙醇胺(PE)、磷脂酰甘油(PG)、磷脂酰丝氨酸(PS)和磷脂酰肌醇(PI)、二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱(DMPC)、二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)、二油酰磷脂酰胆碱(DOPC)、二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)、二肉豆蔻酰磷脂酰甘油(DMPG)、二硬脂酰磷脂酰甘油(DSPG)、二油酰磷脂酰甘油(DOPG)、二棕榈酰磷脂酰甘油(DPPG)、二肉豆蔻酰磷脂酰丝氨酸(DMPS)、二硬脂酰磷脂酰丝氨酸(DSPS)、二油酰磷脂酰丝氨酸(DOPS)、二棕榈酰磷脂酰丝氨酸(DPPS)、二油酰磷脂酰乙醇胺(DOPE)、棕榈酰油酰磷脂酰胆碱(POPC)、棕榈酰油酰磷脂酰乙醇胺(POPE)和二油酰磷脂酰乙醇胺4-(N-马来酰亚胺基甲基)-环己烷-1-甲酸酯(DOPE-mal)、二棕榈酰磷脂酰乙醇胺(DPPE)、二肉豆蔻酰磷酸乙醇胺(DMPE)、二硬脂酰-磷脂酰-乙醇胺(DSPE)、16-0-单甲基PE、16-0-二甲基PE、18-1-反式PE、1-硬脂酰基-2-油酰基-磷脂酰乙醇胺(SOPE)、1,2-双十八碳烯酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(反式DOPE)和心磷脂。在一些实施方案中,磷脂是DOPE。在其它实施方案中,磷脂是DSPC。脂质提取物如卵PC、心脏提取物、脑提取物、肝提取物和大豆PC也可用于本发明。在一些实施方案中,大豆PC可以包括氢化大豆PC(HSPC)。在某些实施方案中,脂质可以包括衍生的脂质,例如聚乙二醇化脂质。衍生的脂质可以包括例如DSPE-PEG2000、胆固醇-PEG2000、DSPE-聚甘油或本领域通常已知的其它衍生物。

[0140] 在通常和习惯意义上,如本文所提供的“阳离子脂质”是指带净正电荷的脂质,其可以促进脂质聚集体的形成。阳离子脂质在生理条件下含有带正电的官能团。阳离子脂质

包括但不限于N,N-二油酰基-N,N-二甲基氯化铵 (DODAC), N,N-二硬脂酰基-N,N-二甲基氯化铵 (DDAB), N-(1-(2,3-二油酰氧基) 丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵 (DOTAP), N-(1-(2,3-二油酰氧基) 丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵 (DOTMA), N-[1-(2,3-双十四烷基氧基) 丙基]-N,N-二甲基-N-羟乙基氯化铵 (DMRIE), N-[1-(2,3-二油酰氧基) 丙基]-N,N-二甲基-N-羟基乙基氯化铵 (DORIE), 3β -[N-(N',N'-二甲基氨基乙烷) 氨基甲酰基]胆固醇 (DC-Chol), 二甲基双十八烷基铵 (DDAB) 和N,N-二甲基-2,3-二油酰氧基) 丙胺 (DODMA)。在实施方案中, 阳离子脂质 (例如, 第一阳离子脂质、第二阳离子脂质) 是式 (I) 或 (II) 的化合物。在实施方案中, 第一阳离子脂质是二羟基二肉豆蔻酰基亚精胺 (DHDMS)。在实施方案中, 第二阳离子脂质是羟基二肉豆蔻酰基亚精胺 (HDMS)。

[0141] 脂质可以形成胶束, 单层和双层膜。脂质可以自组装成脂质体或脂质聚集体。

[0142] 术语“脂质聚集体”是指包括多个脂质或多种类型的脂质的脂质结构, 其形成更高级的结构 (例如, 二级、三级或四级结构)。脂质聚集体的非限制性实例包括脂质体、单层囊泡、多层囊泡、胶束、无定形聚集体等。本发明的脂质聚集体可以含有任何合适的脂质, 包括阳离子脂质、两性离子脂质、中性脂质或阴离子脂质。在实施方案中, 脂质聚集体包括阳离子脂质或阳离子脂质类型。在实施方案中, 脂质聚集体包括与非阳离子 (例如中性) 脂质或非阳离子脂质类型组合的阳离子脂质或阳离子脂质类型。在实施方案中, 脂质聚集体具有净正电荷。在实施方案中, 脂质聚集体包括阳离子脂质和中性脂质。在实施方案中, 阳离子脂质是如美国专利第8,785,200号中所述的阳离子脂质, 所述专利通过引用并出于所有目的并入本文。

[0143] 在实施方案中, 脂质聚集体包括单一脂质。在实施方案中, 脂质聚集体包括多种不同的脂质 (例如, 第一阳离子脂质、第二阳离子脂质、辅助脂质)。当脂质聚集体包括多种不同的脂质时, 脂质聚集体可以包括脂质共混物。如本文所提供的“脂质共混物”是多种脂质类型的混合物。在实施方案中, 脂质共混物包括第一脂质类型、第二脂质类型或第三脂质类型。第一、第二和第三脂质类型可以独立地不同 (例如, 阳离子脂质和非阳离子脂质)。因此, 本领域普通技术人员将立即认识到术语“脂质”和“脂质类型”具有相同的含义并且可以互换使用。

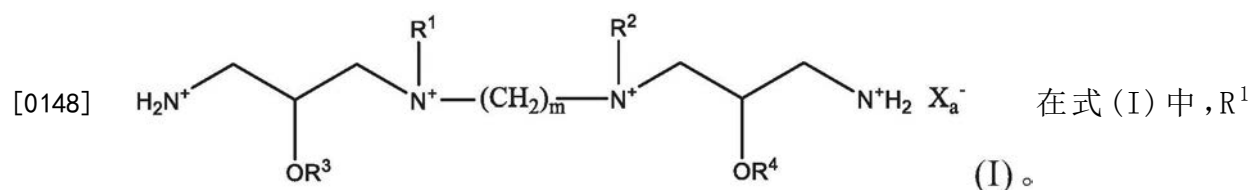
[0144] 在实施方案中, 本文提供的脂质聚集体是脂质体。如本文所用, 术语“脂质体”涵盖由脂质双层包围的任何隔室。术语脂质体包括单层囊泡, 其由单个脂质双层构成并且通常具有在约20至约400nm范围内的直径。脂质体也可以是多层的, 其直径在约1 μ m至约10 μ m的范围内。多层脂质体可能由数个 (从两个到数百个不等) 单层囊泡组成, 以递减尺寸将一个形成在另一个中, 产生由水层分隔的同心磷脂球的多层结构。或者, 多层脂质体可以由大脂质体内的许多较小的非同心脂质球组成。在实施方案中, 脂质体包括多层囊泡 (MLV)、大单层囊泡 (LUV) 和小单层囊泡 (SUV)。本发明的脂质体可含有任何合适的脂质, 包括阳离子脂质、两性离子脂质、中性脂质或阴离子脂质。

[0145] 组合物

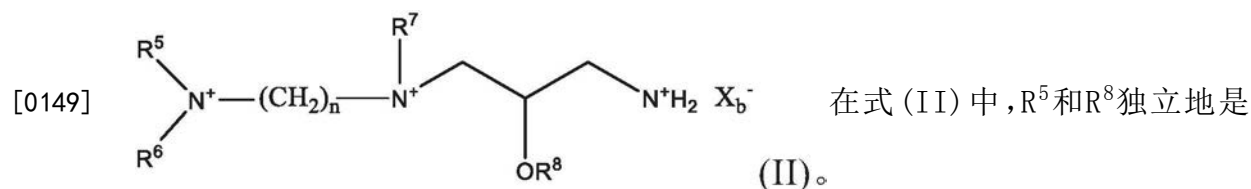
[0146] 本文尤其提供了可用于体内递送生物活性剂 (例如, 治疗剂、生物活性剂或诊断剂) 的组合物和方法。本文提供的组合物和方法 (包括其实施方案) 尤其可以用于将生物活性剂 (例如, 核酸分子、核糖核蛋白、小分子或其组合) 递送到受试者的肺部 (例如包括但不限于内皮肺细胞、上皮肺细胞)。本文提供的组合物包括阳离子脂质、辅助脂质和生物稳定

性增强剂,它们与生物活性剂一起形成脂质聚集体并允许将生物活性剂全身递送至例如肺组织而无需生物分子靶向。

[0147] 在一个方面,提供了一种组合物,其包含:(i) 第一阳离子脂质,其组成摩尔比为约0.18至约0.32并且具有式:



(ii) 第二阳离子脂质,其组成摩尔比为约0.24至约0.51并且具有式:



氢,取代或未取代的烷基,取代或未取代的杂烷基,取代或未取代的环烷基,取代或未取代的杂环烷基,取代或未取代的芳基,或取代或未取代的杂芳基。 R^6 和 R^7 独立地是取代或未取代的烷基,取代或未取代的杂烷基,取代或未取代的环烷基,取代或未取代的杂环烷基,取代或未取代的芳基,或取代或未取代的杂芳基。 n 是1至6的整数。 X_b^- 是阴离子。(iii) 第一辅助脂质,其组成摩尔比为约0.20至约0.32。(iv) 第二辅助脂质,其组成摩尔比为约0.01至约0.14;和(v) 生物稳定性增强剂,其组成摩尔比为约0.01至约0.02。

[0150] 在实施方案中, R^1 和 R^2 独立地是取代或未取代的烷基。在实施方案中, R^1 和 R^2 独立地是未取代的烷基。 R^1 和 R^2 独立地是未取代的 C_1 - C_{20} 烷基。在实施方案中, R^1 和 R^2 独立地是未取代的 C_5 - C_{20} 烷基。在实施方案中, R^1 和 R^2 独立地是未取代的 C_{10} - C_{20} 烷基。在实施方案中, R^1 和 R^2 独立地是未取代的 C_{12} - C_{18} 烷基。在实施方案中, R^1 和 R^2 独立地是未取代的 C_{14} - C_{16} 烷基。在实施方案中, R^1 是未取代的 C_{14} 烷基。在实施方案中, R^2 是未取代的 C_{14} 烷基。在实施方案中, R^1 是未取代的 C_{15} 烷基。在实施方案中, R^2 是未取代的 C_{15} 烷基。在实施方案中, R^1 是未取代的 C_{16} 烷基。在实施方案中, R^2 是未取代的 C_{16} 烷基。在实施方案中, R^1 是 $-(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3$ 。在实施方案中, R^2 是 $-(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3$ 。

[0151] 在实施方案中, R^3 和 R^4 独立地是氢或取代或未取代的烷基。在实施方案中, R^3 和 R^4 独立地是氢。

[0152] 在实施方案中, R^5 、 R^6 和 R^7 独立地是氢,取代或未取代的烷基。在实施方案中, R^5 、 R^6 和 R^7 独立地是氢或未取代的烷基。在实施方案中, R^5 、 R^6 和 R^7 独立地是氢或未取代的 C_1 - C_{20} 烷基。在实施方案中, R^5 、 R^6 和 R^7 独立地是氢或未取代的 C_5 - C_{20} 烷基。在实施方案中, R^5 、 R^6 和 R^7 独立地是氢或未取代的 C_{10} - C_{20} 烷基。在实施方案中, R^5 、 R^6 和 R^7 独立地是氢或未取代的 C_{12} - C_{18} 烷基。在实施方案中, R^5 、 R^6 和 R^7 独立地是氢或未取代的 C_{14} - C_{16} 烷基。在实施方案中, R^5 、 R^6 和 R^7 独立地是氢或未取代的 C_{14} 烷基。在实施方案中, R^5 、 R^6 和 R^7 独立地是氢或未取代的 C_{15} 烷基。

在实施方案中, R^5 、 R^6 和 R^7 独立地是氢或未取代的 C_{16} 烷基。在实施方案中, R^5 是未取代的 C_{14} 烷基。在实施方案中, R^7 是未取代的 C_{14} 烷基。在实施方案中, R^5 是 $-(CH_2)_{13}CH_3$ 。在实施方案中, R^6 是氢。在实施方案中, R^7 是 $-(CH_2)_{13}CH_3$ 。

[0153] 在实施方案中, R^8 是氢或取代或未取代的烷基。在实施方案中, R^8 是氢。

[0154] 在实施方案中, m 是约1至6的整数。在实施方案中, m 是约1至5的整数。在实施方案中, m 是约1至4的整数。在实施方案中, m 是约1至3的整数。在实施方案中, m 是1至6的整数。在实施方案中, m 是1至5的整数。在实施方案中, m 是1至4的整数。在实施方案中, m 是1至3的整数。在实施方案中, m 是1。在实施方案中, m 是2。在实施方案中, m 是3。在实施方案中, m 是4。在实施方案中, m 是5。在实施方案中, m 是6。

[0155] 在实施方案中, n 是约1至6的整数。在实施方案中, n 是约1至5的整数。在实施方案中, n 是约1至4的整数。在实施方案中, n 是约1至3的整数。在实施方案中, n 是1至6的整数。在实施方案中, n 是1至5的整数。在实施方案中, n 是1至4的整数。在实施方案中, n 是1至3的整数。在实施方案中, n 是1。在实施方案中, n 是2。在实施方案中, n 是3。在实施方案中, n 是4。在实施方案中, n 是5。在实施方案中, n 是6。

[0156] 在一个实施方案中, R^1 是 $-(CH_2)_{13}CH_3$, R^2 是 $-(CH_2)_{13}CH_3$, R^3 是氢, R^4 是氢, m 是4并且 X_a^- 是 CH_3COO^- 。

[0157] 在一个实施方案中, R^5 是 $-(CH_2)_{13}CH_3$, R^6 是氢, R^7 是 $-(CH_2)_{13}CH_3$, R^8 是氢, n 是4并且 K_b^- 是 CH_3COO^- 。

[0158] 化合物(例如阳离子脂质、辅助脂质、生物稳定性增强剂)的术语“组成摩尔比”是指溶液中个别化合物的溶质摩尔数与所有化合物的溶质摩尔总数的比值。例如, 溶质摩尔总数可以是33.8并且个别化合物(例如第一阳离子脂质)的溶质摩尔数可以是8.1, 导致个别化合物的组成比为0.24。在实施方案中, 溶质摩尔总数是33.8并且单个化合物的溶质摩尔数是10.8摩尔, 导致单个化合物的组成比为0.32。

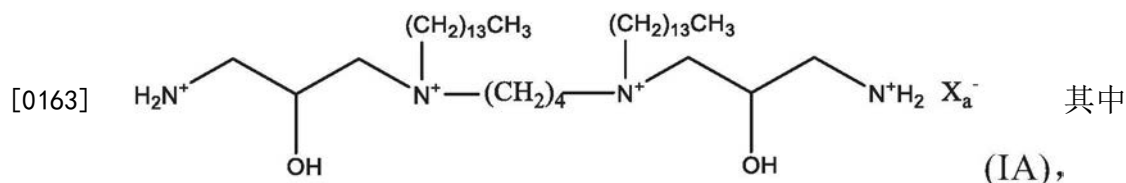
[0159] 本文提供的组合物包含两种或更多种辅助脂质(例如, 第一辅助脂质、第二辅助脂质)。如本文所提供的“辅助脂质”是指相对于不存在辅助脂质的情况下能够增加生物活性剂向细胞递送的脂质。因此, 相对于不存在辅助脂质的情况下的递送效率, 在存在所述辅助脂质的情况下, 生物活性剂向细胞的递送效率更高。生物活性剂向细胞内的递送包括例如生物活性剂在细胞内的吸收(穿透细胞膜), 生物活性剂在细胞中的内体释放, 增强生物活性剂和/或化合物的稳定性, 从而在递送过程中形成脂质聚集体。可用于本发明的辅助脂质包括但不限于: 卵磷脂; 磷脂酰乙醇胺; 磷脂酰乙醇胺类, 例如DOPE(二油酰磷脂酰乙醇胺)、DPhPE(二植烷酰磷脂酰乙醇胺)、DPPE(二棕榈酰磷脂酰乙醇胺)、二棕榈酰磷脂酰乙醇胺、POPE(棕榈酰油酰磷脂酰乙醇胺)和二硬脂酰磷脂酰乙醇胺; 磷脂酰胆碱; 磷脂酰胆碱类, 例如DOPC(二油酰磷脂酰胆碱)、DPPC(二棕榈酰磷脂酰胆碱)、POPC(棕榈酰油酰磷脂酰胆碱)和二硬脂酰磷脂酰胆碱; 磷脂酰甘油; 磷脂酰甘油类, 例如DOPG(二油酰磷脂酰甘油)、DPPG(二棕榈酰磷脂酰甘油)和二硬脂酰磷脂酰甘油; 磷脂酰丝氨酸; 磷脂酰丝氨酸类, 例如二油酰磷脂酰丝氨酸或二棕榈酰磷脂酰丝氨酸; 二磷脂酰甘油; 脂肪酸酯; 甘油酯; 鞘脂; 心磷脂; 脑苷; 和神经酰胺; 及其混合物。辅助脂质还包括胆固醇和其它 3β OH-固醇。

[0160] 如本文所提供的“生物稳定性增强剂”是相对于不存在化合物的情况下能够增加本文提供的组合物(例如, 包括生物活性剂的脂质聚集体)的物理和化学稳定性的化合物。

施用给受试者后,生物稳定性增强剂可增加本文提供的化合物的生物分布。在实施方案中,生物稳定性增强剂是聚醚化合物。在实施方案中,生物稳定性增强剂是聚乙二醇化的磷脂。在实施方案中,生物稳定性增强剂是聚乙二醇。

[0161] 在实施方案中,第一阳离子脂质以约0.18的组成摩尔比存在。在实施方案中,第一阳离子脂质以0.18的组成摩尔比存在。在实施方案中,第一阳离子脂质以约0.23的组成摩尔比存在。在实施方案中,第一阳离子脂质以0.23的组成摩尔比存在。在实施方案中,第一阳离子脂质以约0.24的组成摩尔比存在。在实施方案中,第一阳离子脂质以0.24的组成摩尔比存在。在实施方案中,第一阳离子脂质以约0.25的组成摩尔比存在。在实施方案中,第一阳离子脂质以0.25的组成摩尔比存在。在实施方案中,第一阳离子脂质以约0.27的组成摩尔比存在。在实施方案中,第一阳离子脂质以0.27的组成摩尔比存在。在实施方案中,第一阳离子脂质以约0.28的组成摩尔比存在。在实施方案中,第一阳离子脂质以0.28的组成摩尔比存在。在实施方案中,第一阳离子脂质以约0.32的组成摩尔比存在。在实施方案中,第一阳离子脂质以0.32的组成摩尔比存在。

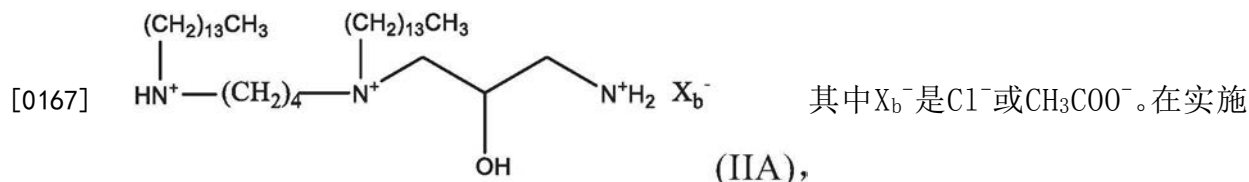
[0162] 在实施方案中,第一阳离子脂质具有式:



[0164] X_a^- 是 Cl^- 或 CH_3COO^- 。在实施方案中, X_a^- 是 CH_3COO^- 。在实施方案中,第一阳离子脂质是二羟基二肉豆蔻酰基亚精胺。

[0165] 在实施方案中,第二阳离子脂质以约0.24的组成摩尔比存在。在实施方案中,第二阳离子脂质以0.24的组成摩尔比存在。在实施方案中,第二阳离子脂质以约0.38的组成摩尔比存在。在实施方案中,第二阳离子脂质以0.38的组成摩尔比存在。在实施方案中,第二阳离子脂质以约0.39的组成摩尔比存在。在实施方案中,第二阳离子脂质以0.39的组成摩尔比存在。在实施方案中,第二阳离子脂质以约0.40的组成摩尔比存在。在实施方案中,第二阳离子脂质以0.40的组成摩尔比存在。在实施方案中,第二阳离子脂质以约0.45的组成摩尔比存在。在实施方案中,第二阳离子脂质以0.45的组成摩尔比存在。在实施方案中,第二阳离子脂质以约0.47的组成摩尔比存在。在实施方案中,第二阳离子脂质以0.47的组成摩尔比存在。在实施方案中,第二阳离子脂质以约0.51的组成摩尔比存在。在实施方案中,第二阳离子脂质以0.51的组成摩尔比存在。

[0166] 在实施方案中,第二阳离子脂质具有式:



方案中, X_b^- 是 CH_3COO^- 。在实施方案中,第二阳离子脂质是羟基二肉豆蔻酰基亚精胺。

[0168] 在实施方案中,第一辅助脂质以约0.20的组成摩尔比存在。在实施方案中,第一辅助脂质以0.20的组成摩尔比存在。在实施方案中,第一辅助脂质以约0.24的组成摩尔比存在。在实施方案中,第一辅助脂质以0.24的组成摩尔比存在。在实施方案中,第一辅助脂质以约0.24的组成摩尔比存在。在实施方案中,第一辅助脂质以0.24的组成摩尔比存在。

以约0.26的组成摩尔比存在。在实施方案中,第一辅助脂质以0.26的组成摩尔比存在。在实施方案中,第一辅助脂质以约0.32的组成摩尔比存在。在实施方案中,第一辅助脂质以0.32的组成摩尔比存在。在实施方案中,第一辅助脂质是二油酰磷脂酰乙醇胺(DOPE)。

[0169] 在实施方案中,第二辅助脂质以约0.01的组成摩尔比存在。在实施方案中,第二辅助脂质以0.01的组成摩尔比存在。在实施方案中,第二辅助脂质以约0.05的组成摩尔比存在。在实施方案中,第二辅助脂质以0.05的组成摩尔比存在。在实施方案中,第二辅助脂质以约0.08的组成摩尔比存在。在实施方案中,第二辅助脂质以0.08的组成摩尔比存在。在实施方案中,第二辅助脂质以约0.10的组成摩尔比存在。在实施方案中,第二辅助脂质以0.10的组成摩尔比存在。在实施方案中,第二辅助脂质以约0.14的组成摩尔比存在。在实施方案中,第二辅助脂质以0.14的组成摩尔比存在。在实施方案中,第二辅助脂质是胆固醇。

[0170] 在实施方案中,生物稳定性增强剂以约0.01的组成摩尔比存在。在实施方案中,生物稳定性增强剂以0.01的组成摩尔比存在。在实施方案中,生物稳定性增强剂以约0.02的组成摩尔比存在。在实施方案中,生物稳定性增强剂以0.02的组成摩尔比存在。在实施方案中,生物稳定性增强剂是聚醚化合物。在实施方案中,生物稳定性增强剂是聚乙二醇化的磷脂。在实施方案中,生物稳定性增强剂是聚乙二醇。

[0171] 在实施方案中,生物稳定性增强剂的分子量为约750g/mol至约5000g/mol。在实施方案中,生物稳定性增强剂的分子量为约800g/mol至约5000g/mol。在实施方案中,生物稳定性增强剂的分子量为约850g/mol至约5000g/mol。在实施方案中,生物稳定性增强剂的分子量为约900g/mol至约5000g/mol。在实施方案中,生物稳定性增强剂的分子量为约950g/mol至约5000g/mol。在实施方案中,生物稳定性增强剂的分子量为约1000g/mol至约5000g/mol。在实施方案中,生物稳定性增强剂的分子量为约1500g/mol至约5000g/mol。在实施方案中,生物稳定性增强剂的分子量为约2000g/mol至约5000g/mol。在实施方案中,生物稳定性增强剂的分子量为约2500g/mol至约5000g/mol。在实施方案中,生物稳定性增强剂的分子量为约3000g/mol至约5000g/mol。在实施方案中,生物稳定性增强剂的分子量为约3500g/mol至约5000g/mol。在实施方案中,生物稳定性增强剂的分子量为约4000g/mol至约5000g/mol。在实施方案中,生物稳定性增强剂的分子量为约4500g/mol至约5000g/mol。

[0172] 在实施方案中,生物稳定性增强剂的分子量为约750g/mol。在实施方案中,生物稳定性增强剂的分子量为750g/mol。在实施方案中,生物稳定性增强剂的分子量为约2000g/mol。在实施方案中,生物稳定性增强剂的分子量为2000g/mol。在实施方案中,生物稳定性增强剂的分子量为约5000g/mol。在实施方案中,生物稳定性增强剂的分子量为5000g/mol。

[0173] 在实施方案中,生物稳定性增强剂是C14聚乙二醇750。在实施方案中,生物稳定性增强剂是C14聚乙二醇2000。在实施方案中,生物稳定性增强剂是C14聚乙二醇5000。

[0174] 在实施方案中,第一阳离子脂质以约0.18至约0.32、约0.19至约0.32、约0.20至约0.32、约0.21至约0.32、约0.22至约0.32、约0.23至约0.32、约0.24至约0.32、约0.25至约0.32、约0.26至约0.32、约0.27至约0.32、约0.28至约0.32、约0.29至约0.32或约0.30至约0.32的组成摩尔比存在。在实施方案中,第一阳离子脂质以0.18至0.32、0.19至0.32、0.20至0.32、0.21至0.32、0.22至0.32、0.23至0.32、0.24至0.32、0.25至0.32、0.26至0.32、0.27至0.32、0.28至0.32、0.29至0.32或0.30至0.32的组成摩尔比存在。

[0175] 在实施方案中,第一阳离子脂质以0.18至0.32的组成摩尔比存在。在实施方案中,

第一阳离子脂质以0.19至0.32的组成摩尔比存在。在实施方案中,第一阳离子脂质以0.20至0.32的组成摩尔比存在。在实施方案中,第一阳离子脂质以0.21至0.32的组成摩尔比存在。在实施方案中,第一阳离子脂质以0.22至0.32的组成摩尔比存在。在实施方案中,第一阳离子脂质以0.23至0.32的组成摩尔比存在。在实施方案中,第一阳离子脂质以0.24至0.32的组成摩尔比存在。在实施方案中,第一阳离子脂质以0.25至0.32的组成摩尔比存在。在实施方案中,第一阳离子脂质以0.26至0.32的组成摩尔比存在。在实施方案中,第一阳离子脂质以0.27至0.32的组成摩尔比存在。在实施方案中,第一阳离子脂质以0.28至0.32的组成摩尔比存在。在实施方案中,第一阳离子脂质以0.29至0.32的组成摩尔比存在。在实施方案中,第一阳离子脂质以0.30至0.32的组成摩尔比存在。

[0176] 在实施方案中,第一阳离子脂质以0.18至0.31的组成摩尔比存在。在实施方案中,第一阳离子脂质以0.18至0.30的组成摩尔比存在。在实施方案中,第一阳离子脂质以0.18至0.29的组成摩尔比存在。在实施方案中,第一阳离子脂质以0.18至0.28的组成摩尔比存在。在实施方案中,第一阳离子脂质以0.18至0.27的组成摩尔比存在。在实施方案中,第一阳离子脂质以0.18至0.26的组成摩尔比存在。在实施方案中,第一阳离子脂质以0.18至0.25的组成摩尔比存在。在实施方案中,第一阳离子脂质以0.18至0.24的组成摩尔比存在。在实施方案中,第一阳离子脂质以0.18至0.23的组成摩尔比存在。在实施方案中,第一阳离子脂质以0.18至0.22的组成摩尔比存在。在实施方案中,第一阳离子脂质以0.18至0.21的组成摩尔比存在。在实施方案中,第一阳离子脂质以0.18至0.20的组成摩尔比存在。

[0177] 在实施方案中,第一阳离子脂质以0.18、0.19、0.20、0.21、0.22、0.23、0.24、0.25、0.26、0.27、0.28、0.29、0.30、0.31或0.32的组成摩尔比存在。在实施方案中,第一阳离子脂质以约0.18、0.19、0.20、0.21、0.22、0.23、0.24、0.25、0.26、0.27、0.28、0.29、0.30、0.31或0.32的组成摩尔比存在。在进一步的实施方案中,第二阳离子脂质以约0.24至约0.51的组成摩尔比存在,第一辅助脂质以约0.20至约0.32的组成摩尔比存在,第二辅助脂质以约0.01至约0.14的组成摩尔比存在并且生物稳定性增强剂以约0.01至约0.02的组成摩尔比存在。

[0178] 在实施方案中,第二阳离子脂质以约0.24至约0.51、约0.25至约0.51、约0.26至约0.51、约0.27至约0.51、约0.28至约0.51、约0.29至约0.51、约0.30至约0.51、约0.31至约0.51、约0.32至约0.51、约0.33至约0.51、约0.34至约0.51、约0.35至约0.51、约0.36至约0.51、约0.37至约0.51、约0.38至约0.51、约0.39至约0.51、约0.40至约0.51、约0.41至约0.51、约0.42至约0.51、约0.43至约0.51、约0.44至约0.51、约0.45至约0.51、约0.46至约0.51、约0.47至约0.51、约0.48至约0.51或约0.49至约0.51的组成摩尔比存在。

[0179] 在实施方案中,第二阳离子脂质以0.24至0.51、0.25至0.51、0.26至0.51、0.27至0.51、0.28至0.51、0.29至0.51、0.30至0.51、0.31至0.51、0.32至0.51、0.33至0.51、0.34至0.51、0.35至0.51、0.36至0.51、0.37至0.51、0.38至0.51、0.39至0.51、0.40至0.51、0.41至0.51、0.42至0.51、0.43至0.51、0.44至0.51、0.45至0.51、0.46至0.51、0.47至0.51、0.48至0.51或0.49至0.51的组成摩尔比存在。

[0180] 在实施方案中,第二阳离子脂质以约0.24至约0.51、约0.24至约0.50、约0.24至约0.49、约0.24至约0.48、约0.24至约0.47、约0.24至约0.46、约0.24至约0.45、约0.24至约0.44、约0.24至约0.43、约0.24至约0.42、约0.24至约0.41、约0.24至约0.40、约0.24至约

0.39、约0.24至约0.38、约0.24至约0.37、约0.24至约0.36、约0.24至约0.35、约0.24至约0.34、约0.24至约0.33、约0.24至约0.32、约0.24至约0.31、约0.24至约0.30、约0.24至约0.29、约0.24至约0.28、约0.24至约0.27或约0.24至约0.26的组成摩尔比存在。

[0181] 在实施方案中,第二阳离子脂质以0.24至0.51、0.24至0.50、0.24至0.49、0.24至0.48、0.24至0.47、0.24至0.46、0.24至0.45、0.24至0.44、0.24至0.43、0.24至0.42、0.24至0.41、0.24至0.40、0.24至0.39、0.24至0.38、0.24至0.37、0.24至0.36、0.24至0.35、0.24至0.34、0.24至0.33、0.24至0.32、0.24至0.31、0.24至0.30、0.24至0.29、0.24至0.28、0.24至0.27或0.24至0.26的组成摩尔比存在。

[0182] 在实施方案中,第二阳离子脂质以0.24至0.51的组成摩尔比存在。在实施方案中,第二阳离子脂质以0.25至0.51的组成摩尔比存在。在实施方案中,第二阳离子脂质以0.26至0.51的组成摩尔比存在。在实施方案中,第二阳离子脂质以0.27至0.51的组成摩尔比存在。在实施方案中,第二阳离子脂质以0.28至0.51的组成摩尔比存在。在实施方案中,第二阳离子脂质以0.29至0.51的组成摩尔比存在。在实施方案中,第二阳离子脂质以0.30至0.51的组成摩尔比存在。在实施方案中,第二阳离子脂质以0.31至0.51的组成摩尔比存在。在实施方案中,第二阳离子脂质以0.32至0.51的组成摩尔比存在。在实施方案中,第二阳离子脂质以0.33至0.51的组成摩尔比存在。在实施方案中,第二阳离子脂质以0.34至0.51的组成摩尔比存在。在实施方案中,第二阳离子脂质以0.35至0.51的组成摩尔比存在。在实施方案中,第二阳离子脂质以0.36至0.51的组成摩尔比存在。在实施方案中,第二阳离子脂质以0.37至0.51的组成摩尔比存在。在实施方案中,第二阳离子脂质以0.38至0.51的组成摩尔比存在。在实施方案中,第二阳离子脂质以0.39至0.51的组成摩尔比存在。在实施方案中,第二阳离子脂质以0.40至0.51的组成摩尔比存在。在实施方案中,第二阳离子脂质以0.41至0.51的组成摩尔比存在。在实施方案中,第二阳离子脂质以0.42至0.51的组成摩尔比存在。在实施方案中,第二阳离子脂质以0.43至0.51的组成摩尔比存在。在实施方案中,第二阳离子脂质以0.44至0.51的组成摩尔比存在。在实施方案中,第二阳离子脂质以0.45至0.51的组成摩尔比存在。在实施方案中,第二阳离子脂质以0.46至0.51的组成摩尔比存在。在实施方案中,第二阳离子脂质以0.47至0.51的组成摩尔比存在。在实施方案中,第二阳离子脂质以0.48至0.51的组成摩尔比存在。在实施方案中,第二阳离子脂质以0.49至0.51的组成摩尔比存在。

[0183] 在实施方案中,第二阳离子脂质以0.24、0.25、0.26、0.27、0.28、0.29、0.30、0.31、0.32、0.33、0.34、0.35、0.36、0.37、0.38、0.39、0.40、0.41、0.42、0.43、0.44、0.45、0.46、0.47、0.48、0.49、0.50或0.51的组成摩尔比存在。在实施方案中,第二阳离子脂质以约0.24、0.25、0.26、0.27、0.28、0.29、0.30、0.31、0.32、0.33、0.34、0.35、0.36、0.37、0.38、0.39、0.40、0.41、0.42、0.43、0.44、0.45、0.46、0.47、0.48、0.49、0.50或0.51的组成摩尔比存在。在进一步的实施方案中,第一阳离子脂质以约0.18至约0.32的组成摩尔比存在,第一辅助脂质以约0.20至约0.32的组成摩尔比存在,第二辅助脂质以约0.01至约0.14的组成摩尔比存在并且生物稳定性增强剂以约0.01至约0.02的组成摩尔比存在。

[0184] 在实施方案中,第一辅助脂质以0.20至0.32、0.21至0.32、0.22至0.32、0.23至0.32、0.24至0.32、0.25至0.32、0.26至0.32、0.27至0.32、0.28至0.32、0.29至0.32或0.30至0.32的组成摩尔比存在。在实施方案中,第一辅助脂质以约0.20至约0.32、约0.21至约

0.32、约0.22至约0.32、约0.23至约0.32、约0.24至约0.32、约0.25至约0.32、约0.26至约0.32、约0.27至约0.32、约0.28至约0.32、约0.29至约0.32或约0.30至约0.32的组成摩尔比存在。

[0185] 在实施方案中,第一辅助脂质以0.20至0.31、0.20至0.30、0.20至0.29、0.20至0.28、0.20至0.27、0.20至0.26、0.20至0.25、0.20至0.24、0.20至0.23或0.20至0.22的组成摩尔比存在。在实施方案中,第一辅助脂质以约0.20至约0.31、约0.20至约0.30、约0.20至约0.29、约0.20至约0.28、约0.20至约0.27、约0.20至约0.26、约0.20至约0.25、约0.20至约0.24、约0.20至约0.23或约0.20至约0.22的组成摩尔比存在。

[0186] 在实施方案中,第一辅助脂质以0.20至0.31的组成摩尔比存在。在实施方案中,第一辅助脂质以0.20至0.30的组成摩尔比存在。在实施方案中,第一辅助脂质以0.20至0.29的组成摩尔比存在。在实施方案中,第一辅助脂质以0.20至0.28的组成摩尔比存在。在实施方案中,第一辅助脂质以0.20至0.27的组成摩尔比存在。在实施方案中,第一辅助脂质以0.20至0.26的组成摩尔比存在。在实施方案中,第一辅助脂质以0.20至0.25的组成摩尔比存在。在实施方案中,第一辅助脂质以0.20至0.24的组成摩尔比存在。在实施方案中,第一辅助脂质以0.20至0.23的组成摩尔比存在。在实施方案中,第一辅助脂质以0.20至0.22的组成摩尔比存在。

[0187] 在实施方案中,第一辅助脂质以0.20、0.21、0.22、0.23、0.24、0.25、0.26、0.27、0.28、0.29、0.30、0.31或0.32的组成摩尔比存在。在实施方案中,第一辅助脂质以约0.20、0.21、0.22、0.23、0.24、0.25、0.26、0.27、0.28、0.29、0.30、0.31或0.32的组成摩尔比存在。在进一步的实施方案中,第一阳离子脂质以约0.18至约0.32的组成摩尔比存在,第二阳离子脂质以约0.24至约0.51的组成摩尔比存在,第二辅助脂质以约0.01至约0.14的组成摩尔比存在并且生物稳定性增强剂以约0.01至约0.02的组成摩尔比存在。

[0188] 在实施方案中,第二辅助脂质以0.01至0.14、0.01至0.13、0.01至0.12、0.01至0.11、0.01至0.10、0.01至0.9、0.01至0.8、0.01至0.7、0.01至0.6、0.01至0.5、0.01至0.4、0.01至0.3、0.01至0.2、0.01至0.1、0.01至0.09、0.01至0.08、0.01至0.07、0.01至0.06、0.01至0.05、0.01至0.04或0.01至0.03的组成摩尔比存在。在实施方案中,第二辅助脂质以约0.01至约0.14、约0.01至约0.13、约0.01至约0.12、约0.01至约0.11、约0.01至约0.10、约0.01至约0.9、约0.01至约0.8、约0.01至约0.7、约0.01至约0.6、约0.01至约0.5、约0.01至约0.4、约0.01至约0.3、约0.01至约0.2、约0.01至约0.1、约0.01至约0.09、约0.01至约0.08、约0.01至约0.07、约0.01至约0.06、约0.01至约0.05、约0.01至约0.04或约0.01至约0.03的组成摩尔比存在。

[0189] 在实施方案中,第二辅助脂质以0.02至0.14的组成摩尔比存在。在实施方案中,第二辅助脂质以0.03至0.14的组成摩尔比存在。在实施方案中,第二辅助脂质以0.04至0.14的组成摩尔比存在。在实施方案中,第二辅助脂质以0.05至0.14的组成摩尔比存在。在实施方案中,第二辅助脂质以0.06至0.14的组成摩尔比存在。在实施方案中,第二辅助脂质以0.07至0.14的组成摩尔比存在。在实施方案中,第二辅助脂质以0.08至0.14的组成摩尔比存在。在实施方案中,第二辅助脂质以0.09至0.14的组成摩尔比存在。在实施方案中,第二辅助脂质以0.1至0.14的组成摩尔比存在。在实施方案中,第二辅助脂质以0.2至0.14的组成摩尔比存在。在实施方案中,第二辅助脂质以0.3至0.14的组成摩尔比存在。在实施方案

中,第二辅助脂质以0.4至0.14的组成摩尔比存在。在实施方案中,第二辅助脂质以0.5至0.14的组成摩尔比存在。在实施方案中,第二辅助脂质以0.6至0.14的组成摩尔比存在。在实施方案中,第二辅助脂质以0.7至0.14的组成摩尔比存在。在实施方案中,第二辅助脂质以0.8至0.14的组成摩尔比存在。在实施方案中,第二辅助脂质以0.9至0.14的组成摩尔比存在。在实施方案中,第二辅助脂质以0.1至0.14的组成摩尔比存在。在实施方案中,第二辅助脂质以0.11至0.14的组成摩尔比存在。在实施方案中,第二辅助脂质以0.12至0.14的组成摩尔比存在。

[0190] 在实施方案中,第二辅助脂质以0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.10、0.11、0.12、0.13或0.14的组成摩尔比存在。在实施方案中,第二辅助脂质以约0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.10、0.11、0.12、0.13或0.14的组成摩尔比存在。在进一步的实施方案中,第一阳离子脂质以约0.18至约0.32的组成摩尔比存在,第二阳离子脂质以约0.24至约0.51的组成摩尔比存在,第一辅助脂质以约0.20至约0.32的组成摩尔比存在并且生物稳定性增强剂以约0.01至约0.02的组成摩尔比存在。

[0191] 在实施方案中,生物稳定性增强剂以0.01至0.02的组成摩尔比存在。在实施方案中,生物稳定性增强剂以0.011至0.02的组成摩尔比存在。在实施方案中,生物稳定性增强剂以0.012至0.02的组成摩尔比存在。在实施方案中,生物稳定性增强剂以0.013至0.02的组成摩尔比存在。在实施方案中,生物稳定性增强剂以0.014至0.02的组成摩尔比存在。在实施方案中,生物稳定性增强剂以0.015至0.02的组成摩尔比存在。在实施方案中,生物稳定性增强剂以0.016至0.02的组成摩尔比存在。在实施方案中,生物稳定性增强剂以0.017至0.02的组成摩尔比存在。在实施方案中,生物稳定性增强剂以0.018至0.02的组成摩尔比存在。

[0192] 在实施方案中,生物稳定性增强剂以约0.01至约0.02的组成摩尔比存在。在实施方案中,生物稳定性增强剂以约0.011至约0.02的组成摩尔比存在。在实施方案中,生物稳定性增强剂以约0.012至约0.02的组成摩尔比存在。在实施方案中,生物稳定性增强剂以约0.013至约0.02的组成摩尔比存在。在实施方案中,生物稳定性增强剂以约0.014至约0.02的组成摩尔比存在。在实施方案中,生物稳定性增强剂以约0.015至约0.02的组成摩尔比存在。在实施方案中,生物稳定性增强剂以约0.016至约0.02的组成摩尔比存在。在实施方案中,生物稳定性增强剂以约0.017至约0.02的组成摩尔比存在。在实施方案中,生物稳定性增强剂以约0.018至约0.02的组成摩尔比存在。

[0193] 在实施方案中,生物稳定性增强剂以约0.01至约0.019的组成摩尔比存在。在实施方案中,生物稳定性增强剂以约0.01至约0.018的组成摩尔比存在。在实施方案中,生物稳定性增强剂以约0.01至约0.017的组成摩尔比存在。在实施方案中,生物稳定性增强剂以约0.01至约0.016的组成摩尔比存在。在实施方案中,生物稳定性增强剂以约0.01至约0.015的组成摩尔比存在。在实施方案中,生物稳定性增强剂以约0.01至约0.014的组成摩尔比存在。在实施方案中,生物稳定性增强剂以约0.01至约0.013的组成摩尔比存在。在实施方案中,生物稳定性增强剂以约0.01至约0.012的组成摩尔比存在。

[0194] 在实施方案中,生物稳定性增强剂以0.01、0.011、0.012、0.013、0.014、0.015、0.016、0.017、0.018、0.019或0.020的组成摩尔比存在。在实施方案中,生物稳定性增强剂以约0.01、0.011、0.012、0.013、0.014、0.015、0.016、0.017、0.018、0.019或0.020的组成摩

尔比存在。在进一步的实施方案中,第一阳离子脂质以约0.18至约0.32的组成摩尔比存在,第二阳离子脂质以约0.24至约0.51的组成摩尔比存在,第一辅助脂质以约0.20至约0.32的组成摩尔比存在并且第二辅助脂质以约0.01至约0.14的组成摩尔比存在。

[0195] 在一个方面,提供了一种组合物,其包含:(i) 第一阳离子脂质,其组成摩尔比为约0.24,其中所述第一阳离子脂质是二羟基二肉豆蔻酰基亚精胺;(ii) 第二阳离子脂质,其组成摩尔比为约0.38,其中所述第二阳离子脂质是羟基二肉豆蔻酰基亚精胺;(iii) 第一辅助脂质,其组成摩尔比为约0.32,其中所述第一辅助脂质是二油酰磷脂酰乙醇胺;(iv) 第二辅助脂质,其组成摩尔比为约0.05,其中所述第二辅助脂质是胆固醇;和(v) 生物稳定性增强剂,其组成摩尔比为约0.01,其中所述生物稳定性增强剂是C14聚乙二醇5000。

[0196] 在一个方面,提供了一种组合物,其包含:(i) 第一阳离子脂质,其组成摩尔比为约0.32,其中所述第一阳离子脂质是二羟基二肉豆蔻酰基亚精胺;(ii) 第二阳离子脂质,其组成摩尔比为约0.39,其中所述第二阳离子脂质是羟基二肉豆蔻酰基亚精胺;(iii) 第一辅助脂质,其组成摩尔比为约0.26,其中所述第一辅助脂质是二油酰磷脂酰乙醇胺;(iv) 第二辅助脂质,其组成摩尔比为约0.01,其中所述第二辅助脂质是胆固醇;和(v) 生物稳定性增强剂,其组成摩尔比为约0.02,其中所述生物稳定性增强剂是C14聚乙二醇5000。

[0197] 在一个方面,提供了一种组合物,其包含:(i) 第一阳离子脂质,其组成摩尔比为约0.18,其中所述第一阳离子脂质是二羟基二肉豆蔻酰基亚精胺;(ii) 第二阳离子脂质,其组成摩尔比为约0.38,其中所述第二阳离子脂质是羟基二肉豆蔻酰基亚精胺;(iii) 第一辅助脂质,其组成摩尔比为约0.32,其中所述第一辅助脂质是二油酰磷脂酰乙醇胺;(iv) 第二辅助脂质,其组成摩尔比为约0.10,其中所述第二辅助脂质是胆固醇;和(v) 生物稳定性增强剂,其组成摩尔比为约0.02,其中所述生物稳定性增强剂是C14聚乙二醇5000。

[0198] 在一个方面,提供了一种组合物,其包含:(i) 第一阳离子脂质,其组成摩尔比为约0.23,其中所述第一阳离子脂质是二羟基二肉豆蔻酰基亚精胺;(ii) 第二阳离子脂质,其组成摩尔比为约0.45,其中所述第二阳离子脂质是羟基二肉豆蔻酰基亚精胺;(iii) 第一辅助脂质,其组成摩尔比为约0.20,其中所述第一辅助脂质是二油酰磷脂酰乙醇胺;(iv) 第二辅助脂质,其组成摩尔比为约0.10,其中所述第二辅助脂质是胆固醇;和(v) 生物稳定性增强剂,其组成摩尔比为约0.02,其中所述生物稳定性增强剂是C14聚乙二醇5000。

[0199] 在一个方面,提供了一种组合物,其包含:(i) 第一阳离子脂质,其组成摩尔比为约0.18,其中所述第一阳离子脂质是二羟基二肉豆蔻酰基亚精胺;(ii) 第二阳离子脂质,其组成摩尔比为约0.51,其中所述第二阳离子脂质是羟基二肉豆蔻酰基亚精胺;(iii) 第一辅助脂质,其组成摩尔比为约0.20,其中所述第一辅助脂质是二油酰磷脂酰乙醇胺;(iv) 第二辅助脂质,其组成摩尔比为约0.10,其中所述第二辅助脂质是胆固醇;和(v) 生物稳定性增强剂,其组成摩尔比为约0.01,其中所述生物稳定性增强剂是C14聚乙二醇5000。

[0200] 在一个方面,提供了一种组合物,其包含:(i) 第一阳离子脂质,其组成摩尔比为约0.27,其中所述第一阳离子脂质是二羟基二肉豆蔻酰基亚精胺;(ii) 第二阳离子脂质,其组成摩尔比为约0.38,其中所述第二阳离子脂质是羟基二肉豆蔻酰基亚精胺;(iii) 第一辅助脂质,其组成摩尔比为约0.32,其中所述第一辅助脂质是二油酰磷脂酰乙醇胺;(iv) 第二辅助脂质,其组成摩尔比为约0.01,其中所述第二辅助脂质是胆固醇;和(v) 生物稳定性增强剂,其组成摩尔比为约0.02,其中所述生物稳定性增强剂是C14聚乙二醇5000。

[0201] 在一个方面,提供了一种组合物,其包含:(i)第一阳离子脂质,其组成摩尔比为约0.25,其中所述第一阳离子脂质是二羟基二肉豆蔻酰基亚精胺;(ii)第二阳离子脂质,其组成摩尔比为约0.38,其中所述第二阳离子脂质是羟基二肉豆蔻酰基亚精胺;(iii)第一辅助脂质,其组成摩尔比为约0.26,其中所述第一辅助脂质是二油酰磷脂酰乙醇胺;(iv)第二辅助脂质,其组成摩尔比为约0.10,其中所述第二辅助脂质是胆固醇;和(v)生物稳定性增强剂,其组成摩尔比为约0.01,其中所述生物稳定性增强剂是C14聚乙二醇5000。

[0202] 在一个方面,提供了一种组合物,其包含:(i)第一阳离子脂质,其组成摩尔比为约0.28,其中所述第一阳离子脂质是二羟基二肉豆蔻酰基亚精胺;(ii)第二阳离子脂质,其组成摩尔比为约0.24,其中所述第二阳离子脂质是羟基二肉豆蔻酰基亚精胺;(iii)第一辅助脂质,其组成摩尔比为约0.32,其中所述第一辅助脂质是二油酰磷脂酰乙醇胺;(iv)第二辅助脂质,其组成摩尔比为约0.14,其中所述第二辅助脂质是胆固醇;和(v)生物稳定性增强剂,其组成摩尔比为约0.02,其中所述生物稳定性增强剂是C14聚乙二醇750。

[0203] 在一个方面,提供了一种组合物,其包含:(i)第一阳离子脂质,其组成摩尔比为约0.18,其中所述第一阳离子脂质是二羟基二肉豆蔻酰基亚精胺;(ii)第二阳离子脂质,其组成摩尔比为约0.47,其中所述第二阳离子脂质是羟基二肉豆蔻酰基亚精胺;(iii)第一辅助脂质,其组成摩尔比为约0.32,其中所述第一辅助脂质是二油酰磷脂酰乙醇胺;(iv)第二辅助脂质,其组成摩尔比为约0.10,其中所述第二辅助脂质是胆固醇;和(v)生物稳定性增强剂,其组成摩尔比为约0.02,其中所述生物稳定性增强剂是C14聚乙二醇5000。

[0204] 在一个方面,提供了一种组合物,其包含:(i)第一阳离子脂质,其组成摩尔比为约0.24,其中所述第一阳离子脂质是二羟基二肉豆蔻酰基亚精胺;(ii)第二阳离子脂质,其组成摩尔比为约0.40,其中所述第二阳离子脂质是羟基二肉豆蔻酰基亚精胺;(iii)第一辅助脂质,其组成摩尔比为约0.24,其中所述第一辅助脂质是二油酰磷脂酰乙醇胺;(iv)第二辅助脂质,其组成摩尔比为约0.10,其中所述第二辅助脂质是胆固醇;和(v)生物稳定性增强剂,其组成摩尔比为约0.02,其中所述生物稳定性增强剂是C14聚乙二醇2000。

[0205] 在一个方面,提供了一种组合物,其包含:(i)第一阳离子脂质,其组成摩尔比为约0.32,其中所述第一阳离子脂质是二羟基二肉豆蔻酰基亚精胺;(ii)第二阳离子脂质,其组成摩尔比为约0.38,其中所述第二阳离子脂质是羟基二肉豆蔻酰基亚精胺;(iii)第一辅助脂质,其组成摩尔比为约0.20,其中所述第一辅助脂质是二油酰磷脂酰乙醇胺;(iv)第二辅助脂质,其组成摩尔比为约0.08,其中所述第二辅助脂质是胆固醇;和(v)生物稳定性增强剂,其组成摩尔比为约0.02,其中所述生物稳定性增强剂是C14聚乙二醇5000。

[0206] 在实施方案中,如本文所提供的组合物(包括其实施方案)还包含生物活性剂。如本文所提供的“生物活性剂”是指在施用于细胞、组织或生物体时对所述细胞、组织或生物体的生物学功能具有可检测的作用的化合物。在实施方案中,可检测的作用是生物学作用。在实施方案中,可检测的作用是治疗作用。在实施方案中,可检测的作用是诊断作用。生物活性剂能够与本文提供的组合物(包括其实施方案)形成脂质聚集体。在实施方案中,生物活性剂是测试化合物。如本文所提供的“测试化合物”是相对于对照化合物确定其对生物学功能的影响的化合物。如本文所提供的“对照化合物”是指对生物学功能具有已知作用的化合物。在实施方案中,生物活性剂是对照化合物。在实施方案中,生物活性剂是治疗剂或诊断剂。在实施方案中,生物活性剂是治疗剂或诊断剂。在实施方案中,生物活性剂是治疗剂。

在实施方案中,生物活性剂是诊断剂。在实施方案中,生物活性剂包括核酸、核糖核蛋白或小分子。在实施方案中,生物活性剂包括核酸。在实施方案中,生物活性剂包括核糖核蛋白。在实施方案中,生物活性剂包括小分子。在实施方案中,核酸是mRNA、siRNA、miRNA或向导RNA。在实施方案中,核酸是mRNA。在实施方案中,核酸是siRNA。在实施方案中,核酸是miRNA。在实施方案中,核酸是向导RNA。在实施方案中,生物活性剂包括核酸和核糖核蛋白。在实施方案中,核糖核蛋白是CRISPR相关蛋白9 (Cas9)。如本文所提供的“mRNA”是指核糖核酸分子,其包括编码一种或多种蛋白质或多肽的一种或一种以上的可表达的核酸序列,或其它DNA分子。

[0207] 药物组合物

[0208] 在一个方面,提供了一种药物组合物,其包含如本文所提供的组合物(包括其实施方案)和药学上可接受的赋形剂。

[0209] 如本文所提供的治疗有效量是指有效实现其预期目的的量。对于特定应用有效的实际量将尤其取决于所治疗的病状。当以治疗疾病的方法施用,本文所述的药物组合物将含有一定量的活性生物活性剂,所述活性生物活性剂可有效实现期望的结果,例如,调节靶分子的活性和/或降低、消除或减慢疾病症状(例如肺部疾病)的进展。用本文提供的组合物确定形成脂质聚集体的生物活性剂的治疗有效量完全在本领域技术人员的能力范围内,尤其是根据本文的详细公开内容。

[0210] 可接受的载体、赋形剂或稳定剂在所采用的剂量和浓度下对接受者无毒,并且包括pH通常为5.0至8.0、最通常为6.0至7.0的缓冲剂如磷酸盐、柠檬酸盐或乙酸盐;使得等渗的盐如氯化钠、氯化钾等;抗氧化剂,防腐剂,低分子量多肽,蛋白质,亲水性聚合物如聚山梨酸酯80,氨基酸如甘氨酸,碳水化合物,螯合剂,糖和本领域技术人员已知的其它标准成分(《雷明顿药物科学》(Remington's Pharmaceutical Science),第16版,Osol, A.编,1980)。

[0211] 可以通过本领域已知的多种方法来施用包含本文提供的组合物(包括其实施方案)的药物组合物(例如,与生物活性剂复合的脂质聚集体)。施用途和/或模式根据所需结果而变化。在实施方案中,施用是静脉内、肌内、腹膜内或皮下施用,或者在目标部位附近施用。药学上可接受的赋形剂可以适合于静脉内、肌内、皮下、肠胃外、脊柱或表皮施用(例如通过注射或输注)。

[0212] 本文提供的组合物(包括其实施方案)的药物组合物(例如,与生物活性剂复合的脂质聚集体)可以根据本领域众所周知且常规实践的方法来制备。参见例如《雷明顿:药学的科学与实践》(Remington: The Science and Practice of Pharmacy), Mack Publishing Co., 第20版, 2000; 和《持续和控制释放药物递送系统》(Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems), J.R. Robinson编, Marcel Dekker, Inc., New York, 1978。药物组合物优选在GMP条件下制造。通常,在本发明的药物组合物中采用治疗有效剂量或有效剂量的本文提供的组合物(包括其实施方案)(例如,与生物活性剂复合的脂质聚集体)。本文提供的组合物(包括其实施方案)(例如,与生物活性剂复合的脂质聚集体)可以通过本领域技术人员已知的常规方法配制成药学上可接受的剂型。调整剂量方案以提供最佳的所需反应(例如治疗反应)。例如,可以施用单次推注,可以随时间施用数个分开的剂量,或者可以根据治疗情况的紧急程度按比例减少或增加剂量。与其它疗法或药剂组合配

制本文提供的组合物(包括其实施方案)(例如,与生物活性剂复合的脂质聚集体)可能是有利的。为了易于施用和剂量均匀性,以剂量单位形式配制肠胃外组合物可能是有利的。如本文所用的剂量单位形式是指适合作为待治疗受试者的单位剂量的物理上离散的单元;每个单元包含预定量的本文提供的组合物(包括其实施方案)(例如,与生物活性剂复合的脂质聚集体),其经计算以与所需的药物赋形剂一起产生所需的治疗效果。

[0213] 可以改变本发明药物组合物中生物活性剂的实际剂量水平,以便获得有效达到特定患者、组合物和施用模式所需的治疗反应而对患者无毒的活性成分量。所选择的剂量水平取决于多种药代动力学因素,包括所用本发明的特定组合物的活性,施用途径,施用时间,所用特定抗体的排泄速率,治疗持续时间,与所用的特定组合物结合使用的其它药物、化合物和/或材料,所治疗患者的年龄、性别、体重、病状、一般健康状况和既往病史,以及类似因素。

[0214] 医师或兽医可以较低水平开始以药物组合物使用的本文提供的组合物(包括其实施方案)(例如,与生物活性剂复合的脂质聚集体)的剂量,所述水平低于达到期望治疗效果所需的水平,并逐渐增加剂量直至达到期望效果。通常,本发明的组合物的有效剂量根据许多不同因素而变化,包括待治疗的具体疾病或病状,施用方式,目标位点,患者的生理状态,患者是人类还是动物,所施用的其它药物,以及治疗是预防性还是治疗性的。需要滴定治疗剂量以优化安全性和功效。

[0215] 本文提供的组合物(包括其实施方案)(例如,与生物活性剂复合的脂质聚集体)可以多次施用。单个剂量之间的间隔可以是每周、每月或每年。如通过测量患者中组合物的血液水平所指示,间隔也可以是不规则的。剂量和频率根据组合物在患者体内的半衰期而变化。施用的剂量和频率可以根据治疗是预防性还是治疗性的而变化。在预防应用中,在很长一段时间内以相对不频繁的间隔施用相对低的剂量。一些患者余生继续接受治疗。在治疗应用中,有时需要以相对短的间隔施用相对高的剂量,直到疾病的进展降低或终止,并且优选直到患者显示出疾病症状的部分或完全改善。其后,可以对患者施用预防性方案。

[0216] 细胞组合物

[0217] 在一个方面,提供了一种细胞,其包括如本文所提供的组合物(包括其实施方案)。在实施方案中,细胞是哺乳动物细胞。在实施方案中,细胞是啮齿动物细胞。在实施方案中,细胞是小鼠细胞。在实施方案中,细胞是大鼠细胞。在实施方案中,细胞是猪细胞。在实施方案中,细胞是犬细胞。在实施方案中,细胞是灵长类动物细胞。在实施方案中,细胞是人类细胞。在实施方案中,细胞是上皮细胞。在实施方案中,细胞是上皮肺细胞。在实施方案中,细胞是内皮细胞。在实施方案中,细胞是内皮肺细胞。在实施方案中,细胞构成生物体的一部分。在实施方案中,生物体是人类。在实施方案中,生物体是大鼠。在实施方案中,生物体是小鼠。

[0218] 递送方法

[0219] 在一个方面,提供了将生物活性剂递送至细胞的方法,所述方法包括:(i)将生物活性剂与如本文提供的组合物(包括其实施方案)混合,从而形成生物活性剂-脂质复合物;(ii)使细胞与所述生物活性剂-脂质复合物接触,从而将所述生物活性剂-脂质复合物递送至细胞。生物活性剂可以是如本文所述的任何生物活性剂(例如核酸)。如本文所提供的生物活性剂-脂质复合物是如本文所述的脂质聚集体。

[0220] 在实施方案中,如本文所述的方法(包括其实施方案)进一步包括使生物活性剂-脂质复合物进入细胞。在实施方案中,生物活性剂是治疗剂或诊断剂。在实施方案中,生物活性剂包括核酸、核糖核蛋白或小分子。在实施方案中,核酸是mRNA、siRNA、miRNA或向导RNA。在实施方案中,生物活性剂包括向导RNA和核糖核蛋白。在实施方案中,核糖核蛋白是CRISPR相关蛋白9(Cas9)。在实施方案中,核糖核蛋白结合至向导RNA。

[0221] 在实施方案中,细胞是哺乳动物细胞。在实施方案中,细胞是啮齿动物细胞。在实施方案中,细胞是小鼠细胞。在实施方案中,细胞是大鼠细胞。在实施方案中,细胞是猪细胞。在实施方案中,细胞是犬细胞。在实施方案中,细胞是灵长类动物细胞。在实施方案中,细胞是上皮细胞。在实施方案中,细胞是上皮肺细胞。在实施方案中,细胞是内皮细胞。在实施方案中,细胞是内皮肺细胞。

[0222] 在另一方面,提供了一种向受试者的肺组织中递送生物活性剂的方法,所述方法包括:(i)将生物活性剂与如本文所述的组合物(包括其实施方案)混合,从而形成生物活性剂-脂质复合物;(ii)向受试者全身施用有效量的所述生物活性剂-脂质复合物,从而将所述生物活性剂-脂质复合物递送至受试者的肺组织。

[0223] 在另一方面,提供了一种在受试者的肺组织中表达蛋白质的方法,所述方法包括:(i)将mRNA与如本文所述的组合物(包括其实施方案)混合,从而形成mRNA-脂质复合物;(ii)对受试者施用有效量的所述mRNA-脂质复合物;以及(iii)使所述mRNA-脂质复合物的mRNA在受试者的肺组织中表达,从而在受试者的肺组织中表达蛋白质。

[0224] 治疗方法

[0225] 在一个方面,提供了一种在有需要的受试者中治疗肺部疾病的方法,所述方法包括向受试者施用治疗有效量的如本文所述的生物活性剂和组合物(包括其实施方案),从而在所述受试者中治疗肺部疾病。

[0226] 在实施方案中,在施用之前将组合物和生物活性剂混合。在实施方案中,生物活性剂包括核酸、核糖核蛋白或小分子。在实施方案中,核酸是mRNA、siRNA、miRNA或向导RNA。

[0227] 在实施方案中,肺部疾病是哮喘、慢性阻塞性肺病(COPD)、肺癌或囊性纤维化。在实施方案中,肺部疾病是哮喘。在实施方案中,肺部疾病是慢性阻塞性肺病(COPD)。在实施方案中,肺部疾病是肺癌。在实施方案中,肺部疾病是或囊性纤维化。

[0228] 术语“肺部疾病”、“肺部病症”、“肺疾病”等在本文可互换使用。所述术语广泛地用于指以呼吸困难、咳嗽、气道不适和炎症、粘液增加和/或肺纤维化为特征的肺部病症。

[0229] 术语“用量(dose)”和“剂量(dosage)”在本文可互换使用。剂量是指在每次施用时给予个体的活性分量。对于本发明,剂量将通常是指肺部疾病治疗量。剂量将根据多种因素而变化,所述因素包括给定疗法的正常剂量范围,施用频率;个体的体型和耐受性;病状的严重程度;副作用的风险;以及施用途径。本领域技术人员将认识到,可以根据上述因素或根据治疗进展来调整剂量。术语“剂型”是指药物的特定形式,并取决于施用途径。例如,剂型可以是用于喷雾的液体形式,例如用于吸入剂,或者可以是盐水溶液,例如用于注射。

[0230] 如本文所用,术语“治疗”和“预防”不旨在是绝对术语。治疗可以指发病的任何延迟,症状频率或严重程度的降低,症状的改善,患者舒适度和/或呼吸功能的改善等。治疗效果可以与未接受给定治疗的个体或个体库进行比较,或与停止治疗之前或之后的同一患者进行比较。

[0231] 如本文所用(以及本领域中众所周知),“治疗”还广泛地包括用于在受试者的病状中获得有益的或期望的结果(包括临床结果)的任何方法。有益的或期望的临床结果可以包括但不限于减轻或改善一种或多种症状或病状,减轻疾病程度,稳定化(即不恶化)疾病状态,预防疾病传播或蔓延,延缓或减缓疾病进展,改善或减轻疾病状态,减少疾病复发以及缓解(无论是部分还是全部以及无论是可检测的还是不可检测的)。换句话说,如本文所用的“治疗”包括疾病的任何治愈、改善或预防。治疗可以预防疾病的发生;抑制疾病的传播;减轻疾病的症状(例如眼痛、看到光晕、红眼、眼内压极高),完全或部分消除疾病的根本原因,缩短疾病的持续时间或这些情况的组合。

[0232] 如本文所用的“治疗”包括预防性治疗。治疗方法包括向受试者施用治疗有效量的活性剂。施用步骤可以由单次施用组成,或者可以包括一系列施用。治疗期的长度取决于多种因素,例如病状的严重程度,患者的年龄,活性剂的浓度,用于治疗的组合物的活性,或其组合。还应理解,用于治疗或预防的药剂的有效剂量可以在特定治疗或预防方案的过程中增加或减少。剂量的变化可以通过本领域已知的标准诊断测定法导致并且变得显而易见。在某些情况下,可能需要长期施用。例如,将组合物以足以治疗患者的量和持续时间施用于受试者。

[0233] 术语“预防”是指减少患者肺部疾病症状的发生。如上所述,预防可以是完全的(没有可检测到的症状)或部分的预防,因此所观测到的症状少于没有治疗时可能发生的症状。

[0234] 如本文所用,术语“治疗有效量”是指如上所述的足以改善病症的治疗剂的量。例如,对于给定参数,治疗有效量将显示出至少5%、10%、15%、20%、25%、40%、50%、60%、75%、80%、90%或至少100%的增加或减少。治疗功效也可以表示为“倍数”增加或减少。例如,治疗有效量相比于对照可以具有至少1.2倍、1.5倍、2倍、5倍或更大的作用。

[0235] 术语“诊断”是指受试者中存在肺部疾病的相对概率。类似地,术语“预后”是指受试者中可能发生某些未来结果的相对概率。例如,在本发明的上下文中,预后可以指个体将发展为肺部疾病的可能性,或该疾病的可能严重程度(例如,症状的严重程度、功能下降率、存活率等)。如医学诊断领域的任何技术人员所理解的,所述术语并非意图是绝对的。

[0236] 实施例

[0237] 实施例1:用于体内肺靶向mRNA和siRNA递送的新型脂质纳米颗粒。

[0238] 核酸作为治疗工具的迅速扩展利用已经向该领域提出了优化和创新递送方法的任务。脂质纳米颗粒由于其促进细胞摄取并同时保护有效负载免受细胞外酶降解的能力而成为常见的递送媒介物。敏感性有效负载如mRNA的器官和组织特异性递送在调整治疗功能性方面非常重要。这通常使用生物分子靶向经由在纳米颗粒表面上的配体或受体表达来实现。然而,对纳米颗粒固有性质的操纵提供了调整递送至相关特定器官的位置的机会。

[0239] 申请人已经开发了新型脂质纳米颗粒,其专门为体内使用而优化,并经过工程改造以固有地靶向核酸有效负载(mRNA和siRNA)并将其递送至鼠类肺和脾脏,而无需使用生物分子靶向。使用多变量实验设计建模进行脂质纳米颗粒的开发,这使申请人能够了解和优化脂质制剂的组分和组成。脂质纳米颗粒的表征显示出均匀的尺寸和高的包封效率。在多次设计迭代后,用于评估生物分布的体内功能测试鉴定了一种新型制剂,该制剂能够专门靶向肺组织并实现高效的mRNA转染。在体内全身递送编码mRNA的化学修饰的荧光素酶后,测量转染效率。使用IVIS成像系统进行定量以测量体内和离体生物发光测量。

[0240] 实施例2:用于体内肺靶向mRNA递送的新型脂质纳米颗粒的开发。

[0241] 摘要.

[0242] mRNA作为治疗工具的迅速扩展利用已经向该领域提出了优化和创新递送方法的任务。随着基于RNA的疗法的应用不断增长,改进和开发新技术的并行新兴需求已成为最前沿。脂质纳米颗粒由于具有促进细胞摄取并同时保护mRNA免受细胞外酶降解的能力,因此是mRNA的常用递送媒介物。mRNA的器官和组织特异性递送在调整治疗功能性方面非常重要。这通常使用生物分子靶向经由在纳米颗粒表面上的配体或受体表达来实现。

[0243] 申请人已经开发了新型脂质纳米颗粒,其专门为体内使用而优化,并经过工程改造以固有地靶向mRNA并将其递送至鼠类肺和脾脏而无需使用生物分子靶向。使用多变量实验设计建模进行脂质纳米颗粒的开发,这使得申请人能够了解和优化脂质制剂的组分和组成。脂质纳米颗粒的表征显示出均匀的尺寸和高的包封效率。在多次设计迭代后,用于评估生物分布的体内功能测试鉴定了一种新型制剂,该制剂能够专门靶向肺组织并实现高效的mRNA转染。在体内全身递送编码mRNA的化学修饰的荧光素酶后,测量转染效率。使用IVIS成像系统进行定量以测量体内和离体生物发光测量。可以通过改变mRNA的剂量来调节肺的特异性表达水平,并且在单次施用后48小时的过程内维持显著的蛋白质表达。这种新型脂质纳米颗粒在体内充分耐受,没有定性的总毒性,并通过对鼠类血清样品进行的全面细胞因子谱进行了定量分析。目前正在生物分布的进一步优化以实现肺的排他性靶向,并且初步数据表明电荷比的变化会增强仅向肺的递送和表达,并减少在其它器官中的表达。

[0244] 引言.

[0245] 由于mRNA的不稳定性质,在递送阶段防止其降解是mRNA治疗领域需要克服的严峻挑战。申请人已经开发了有效的脂质纳米颗粒(LNP)系统,该系统封装并保护mRNA免于在血液中降解和清除;因此转化为体内功效提高和毒性降低。申请人的LNP系统的优化通过器官特异性摄取模式(例如肺和脾脏经由静脉内递送)使递送效率最大化。

[0246] 材料和方法.

[0247] 根据混合物实验优化设计,使用图1A-1C中所示的先前开发的方案,制备了与mRNA复合的新型LNP制剂,并且使用荧光素酶读数筛选后续LNP的体内递送。然后将性能最佳的制剂用于建模和预测第二代制剂,以优化组织特异性表达。然后对这些新制剂进行体内测试,以鉴定最佳LNP制剂。

[0248] 将萤火虫荧光素酶mRNA与每种LNP制剂复合并静脉内注射(图2)。温育4小时后,IP注射荧光素底物,并经由IVIS Lumina LT在体内和离体测量荧光素酶表达。用Living Image®软件定量生物发光(p/sec/cm²/sr)(图2)。

[0249] 结果.

[0250] 对LNP的第一遍筛选揭示了基于制剂组成或N/P比变化的器官特异性递送模式。全动物体内成像指示器官特异性模式(图3A-3B),并且离体分析允许对生物分布模式进行广泛评估(图3C-3E)。使用第一代LNP的性能数据,使用DoE设计优化表达以最大化组织特异性性能,主要集中在脾脏和肺中表达的增强。

[0251] 筛选了跨越3代优化的100多种新LNP制剂的性能。为了筛选,将编码萤火虫荧光素酶的mRNA与每种新设计的制剂复合并静脉内注射。IV注射后4小时,在来自BALB/c小鼠的分离的肺组织(图4A)或分离的脾组织(图4B)中生物发光信号的离体定量总结于图中。使用

Living Image® 软件对生物发光 (p/sec/cm²/sr) 进行定量。

[0252] 进行mRNA的剂量滴定,并使用荧光素酶表达作为读数来测量蛋白质表达。小鼠在时间0h注射,并在120小时(5天)的过程中成像。体内图像以及在4小时时的相应定量显示在图5A-5B中。在同一只小鼠的实验持续时间内,重复进行持续的荧光素酶活性测量;使用全身体内成像技术进行测量,这通过与离体测量相比的较低起始信号值反映出来。生物发光 (p/sec/cm²/sr) 使用Living Image® 软件进行定量并总结在图5C的图中。

[0253] 在优化mRNA剂量后,进行荧光素酶表达水平的时程,并且在去除肺组织并在96小时过程内进行离体测量后测量性能(图6A-6C)。向小鼠静脉内注射LNP,在每个指定时间点进行全身成像,然后在分离的肺组织上获得离体测量。

[0254] 注射后2小时、4小时、24小时和48小时,在两种mRNA剂量条件(低(1mg/kg)和高(3mg/kg))下对小鼠血清中循环细胞因子水平进行定量(图7A-7J)。

[0255] 初步结果表明,LNP的N/P比变化可能会导致排除某些器官的蛋白质表达,从而导致mRNA的组织特异性生物分布(图8A-8B)。

[0256] 结论。

[0257] 使用基于实验设计的测试对LNP制剂进行广泛优化,以用于靶向肺递送。通过体内全身递送,在肺组织中实现了高保真荧光素酶表达。转染后持续瞬时表达48小时。通过改变mRNA的剂量实现表达的调节。

[0258] 还实现了在脾组织中的表达,并且目前正在通过改变N/P比来优化递送的特异性。正在进行和未来的研究包括:确定相关靶向器官内特定细胞类型群体的转染效率;全身递送后增加单器官特异性;LNP制剂在mRNA复合之前和之后的稳定性。

[0259] 实施例3:制备和复合。

[0260] 制剂制备。

[0261] 根据个别脂质溶解度,以适当的浓度在100%乙醇(EtOH)中制备个别脂质组分的储备溶液。加热至50℃以将脂质完全溶解在EtOH中。在玻璃小瓶中,使用移液管将所有5种脂质组分合并在一起,其体积根据表1中列出的摩尔比来计算。使用200mM乙酸钠按体积计以1:4的稀释比稀释合并的脂质。用石蜡密封盖。储存在4℃。

[0262] 复合制备。

[0263] 脂质的浓度以3mg/kg浓度递送。mRNA的浓度是10:1稀释,因此施用.3mg/mL总mRNA。将2个旋盖塑料样品管标记为‘脂质’和‘mRNA’。将100μL所制备的脂质制剂转移到标记有“脂质”的管中。计算总体积为200μL的复合物所需的mRNA量(.6mg/mL)。由于脂质制剂是在用乙酸钠1:4稀释后的25%EtOH溶液,因此mRNA需要在25%EtOH溶液中稀释。向标记有‘mRNA’的管中加入25μL的100%EtOH。根据计算,将适当体积的mRNA加入到‘mRNA’管中。使用无菌过滤水使样品量达到100μL。将mRNA管的内容物加入到脂质管中,充分混合。短暂涡旋。将复合物在50℃加热30分钟。将复合物转移到截留分子量为8-10kD的渗析柱上,并在100%PBS中渗析2小时。将样品转移到气密的旋盖样品管中,并且立即使用或在-20℃下储存直至使用。

[0264] 复合物施用。

[0265] 如果使用冷冻复合物,则在使用前解冻至室温。根据实验动物护理和使用的机构指南,经由尾静脉注射将复合物施用于小鼠。

[0266] 制剂的制备如下进行。将个别粉末脂质组分重悬于100%乙醇(EtOH)中。储备溶液被制成以下浓度:DHDMS为50mg/mL,HDMS为15mg/mL,胆固醇为25mg/mL,DOPE为50mg/mL和C14 PEG 5000(Avanti Polar Lipids,#880210)为100mg/mL。使用加热块将脂质溶液加热至50℃,以在制剂制备过程中实现完全溶解。

[0267] 使用移液管将5种制剂组分合并并在玻璃旋盖小瓶中,其体积在表1中列出并基于所需的摩尔比和脂质的储备浓度计算。一旦将所有五种组分以适当的体积加入到玻璃小瓶,就使用100%EtOH使体积达到100μL。然后使用200mM乙酸钠溶液以1:4的比率稀释该体积。将所得溶液用作转染试剂,并储存在4℃下。

[0268] 脂质/mRNA复合物的制备如下进行。选择最终目标浓度为.3mg/mL的mRNA作为所需递送浓度,并作为样品制备计算的基础。2个旋盖塑料样品管分别标记为‘脂质’和‘mRNA’。将100μL所制备的脂质制剂转移至标记有‘脂质’的管中。

[0269] 对于mRNA溶液制备:基于所需的.3mg/mL最终浓度,总复合物体积为200μL所需的mRNA量为.6mg/mL。根据mRNA溶液的浓度,使用公式 $(C1)(V1) = (C2)(V2)$ 计算所需的体积,其中C1=mRNA储备液浓度,V1=变量,C2=.6mg/mL最终mRNA浓度,并且V2=100μL溶液体积。储备mRNA在冰上解冻,并在冰上制备mRNA溶液。对于实验,购买浓度为2mg/mL的萤火虫荧光素酶mRNA(Trilink®#L-6107)。为了达到所需浓度,申请人使用30μL的mRNA储备溶液。为了维持25%EtOH的浓度(脂质制剂为25%EtOH),在25%EtOH的溶液中制备mRNA。将30μL未稀释的mRNA、25μL的100%EtOH和45μL的不含Ultrapure DNA酶/RNA酶的蒸馏水(Thermofisher#10977-015)合并到标记有mRNA的管中。

[0270] 一旦准备好两个管,就将mRNA管加入到脂质管中并充分混合。将管短暂涡旋,然后在50℃加热30分钟。复合后,将复合物转移至截留分子量为8-10kD的渗析柱(Spectrum labs,Float-a-Lyzer渗析装置#G235031),并在100%PBS(Gibco PBS#10010023)中渗析2小时。渗析后,将样品转移到旋盖塑料样品管中,立即使用或在-20℃下储存直至使用。

[0271] 体内复合物的施用如下进行:如果使用冷冻复合物,则在使用前解冻至室温,如果使用新鲜渗析的样品,则立即进行。200μL进样量是根据20克小鼠的用量。相应调整差不多体重的小鼠的量。要进行尾静脉注射,使用约束装置约束动物。可以使用温水浴或加热灯来帮助扩张和可视化静脉。使用酒精对尾巴消毒。将针头插入静脉并缓慢地将溶液注入静脉中(20-40μL/秒)。成功插入针头并注射将导致血液从静脉清除。如果未发生这种情况,并且注射时感觉有阻力,请拔下针头并在初次注射部位附近重复。完全注射复合物溶液后,抽出针头并在注射部位轻轻按压以止血。

[0272] 荧光素酶mRNA注射后3小时,将50μL的荧光素底物经腹膜内注射到小鼠中,并使其温育15分钟。立即收集组织用于荧光素酶活性测定。对于实验,申请人利用IVIS Lumina LT临床前体内成像系统(Perkin-Elmer#IVISLMLT)来测量个别器官中的荧光素酶活性。使用LivingImage®软件,对代表来自相关指定区域的生物发光的信号通量进行测量和定量。

[0273] 表1. 储备溶液的体积(μL)

[0274]

	DHDMS	HDMS	DoPE	胆固醇	PEG	EtOH
3.10	62.7	568	160.9	26.1	19.2	163
3.14	83.6	582.9	130.8	5.2	38.5	159
3.19	60.1	672.6	100.6	52.3	38.5	76

38.53.20	47	568	160.9	52.3	38.5	133.3
2.2	146.3	358.7	160.9	73.2	9.6	251.3

[0275] 表2:产量最高的脂质纳米颗粒制剂。

[0276]

制剂	PEG链长	PEG分子量	DHDMS	HDMS	DOPE	胆固醇	PEG
Bruce#3.10	14	5000	0.24	0.38	0.32	0.05	0.01
Bruce#3.14	14	5000	0.32	0.39	0.26	0.01	0.02
Bruce#3.20	14	5000	0.18	0.38	0.32	0.10	0.02
Bruce#3.19	14	5000	0.23	0.45	0.20	0.10	0.02
Bruce#3.11	14	5000	0.18	0.51	0.20	0.10	0.01
Bruce#3.15	14	5000	0.27	0.38	0.32	0.01	0.02
Bruce#3.12	14	5000	0.25	0.38	0.26	0.10	0.01
Bruce#2.2	18	750	0.28	0.24	0.32	0.14	0.02
Bruce#3.16	14	5000	0.18	0.47	0.32	0.01	0.02
Bruce#4	14	2000	0.24	0.40	0.24	0.10	0.02
Bruce#3.18	14	5000	0.32	0.38	0.20	0.08	0.02
摩尔范围			0.18-0.32	0.24-0.51	0.20-0.32	0.01-0.14	0.01-0.02

[0277] 表3:非靶向的低性能脂质纳米颗粒制剂。

[0278]

制剂	PEG链长	PEG分子量	DHDMS	HDMS	DOPE	胆固醇	PEG
Bruce#23	14	5000	0.10	0.40	0.10	0.38	0.02
Bruce#64	14	5000	0.10	0.10	0.40	0.30	0.10
Bruce#24	14	5000	0.10	0.10	0.40	0.38	0.02
Bruce#52	18	750	0.22	0.10	0.22	0.40	0.06
Bruce#61	14	2000	0.22	0.22	0.22	0.24	0.10
Bruce#27	14	5000	0.10	0.38	0.10	0.40	0.02
工作摩尔范围			0.18-0.32	0.24-0.51	0.20-0.32	0.01-0.14	0.01-0.02

[0279] 实施例4:用于肺递送的新型体内平台。

[0280] 图19显示了Invivofectamine®肺(IVF®肺)的研究和开发流程。

[0281] 使用四种不同的制剂(IVF®肺、DOTMA:DOPE、DOTAP:DOPE和JetPEI®)进行试剂对比分析。动物通过静脉注射接受制剂的全身递送。所有制剂均以有效负载递送Trilink®萤火虫荧光素酶mRNA。图20A-20B显示了实验结果。

[0282] 使用IVF®肺测试多个mRNA序列以确定mRNA向器官(即肺)的递送。为了确定从Trilink®获得或内部开发的萤火虫荧光素酶的递送,使用器官和小鼠的生物发光成像。为了确定lacZ(从Trilink®获得)的递送,通过用β-gal染色来完成肺组织的组织学。为了确定在lacZ Cre报告基因株中Cre(从Trilink®获得)的递送,使用免疫荧光染色来检测蛋白质表达。

[0283] mRNA表达动力学可以基于mRNA的优化而有所不同。图21显示了全身(静脉内)递送Invivofectamine®肺(包括Trilink®萤火虫荧光素酶或内部优化的萤火虫荧光素酶)后的肺辐射亮度。

[0284] 为了评估lacZ mRNA的IVF®肺递送和Cre mRNA的IVF®肺递送,向动物静脉内注射复合的LNP。递送后4小时采集组织并立即冷冻保存。随后,对分离的肺组织的冷冻切片进行β-gal染色,并对组织的解剖特征进行反染色(图24A-24D),或将其用于lacZ蛋白表达的免疫荧光检测(图25A-25B),这取决于实验。通过阳性β-gal染色和免疫荧光染色证实

mRNA的递送。使用报告基因株,通过荧光染色可以看到向气道的特异性递送。

[0285] 图22证实IVF®肺不仅能够将siRNA递送至肺,而且能够递送至内皮细胞,如通过Tie2敲低和内皮细胞特异性标志物所证实。

[0286] 图27A-27K显示N/P比(参见图26)影响生物分布模式。但是,使用由DOPE配制的核心脂质(DHDMS)不会导致肺部递送,并且N/P比的变化不会影响肺部分布(图28)。

[0287] 参考文献

[0288] 1.Kranz LM,Diken M,Haas H,Kreiter S et al.Systemic RNA delivery to dendritic cells exploits antiviral defense for cancer immunotherapy.Nature.2016Jun1;534(7607):396-401

[0289] 2.Azarmi S,Roa WH,Lobenber R,Targeted delivery of nanoparticles for the treatment of lung diseases Adv Drug Deliv Rev,2008 May 22;60(8):863-75

[0290] 3.Scott McIvor,R.Therapeutic Delivery of mRNA:The Medium Is the Message.Molecular Therapy 19.5(2011):822 823.PMC.Web.8 Nov.2015.

[0291] 4.Sahin,Ugur,Katalin Karikó,and Ozlem Türeci."mRNA-based therapeutics [mdash]developing a new class of drugs."Nature Reviews Drug Discovery(2014).

[0292] 5.Kauffman,Kevin John,et al."Optimization of Lipid Nanoparticle Formulations for mRNA Delivery in vivo with Fractional Factorial and Definitive Screening Designs."Nano Letters(2015).

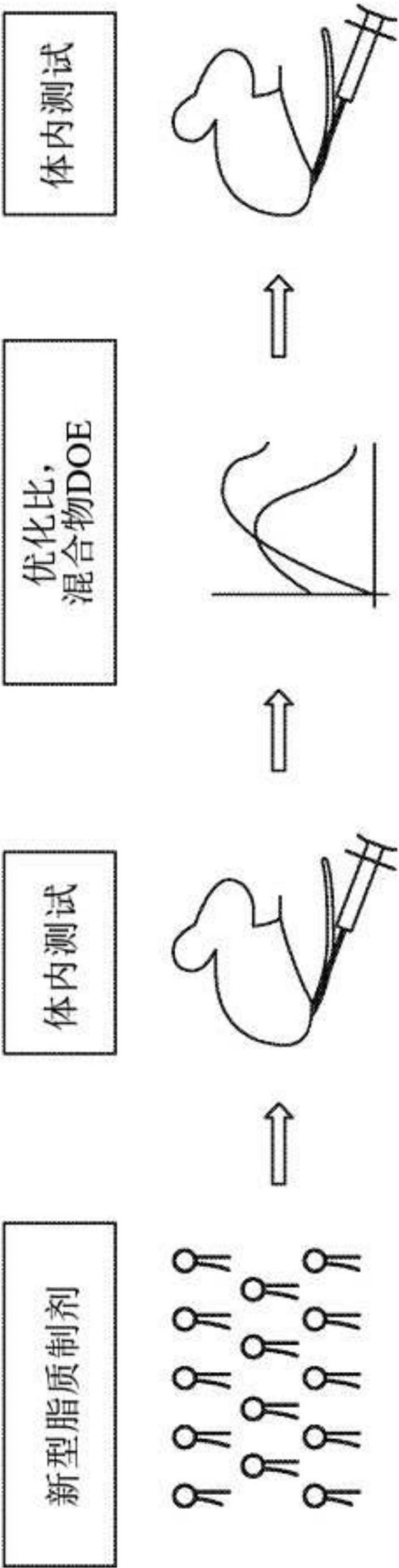


图1A

InvivoFectamine™肺试剂方案

步骤

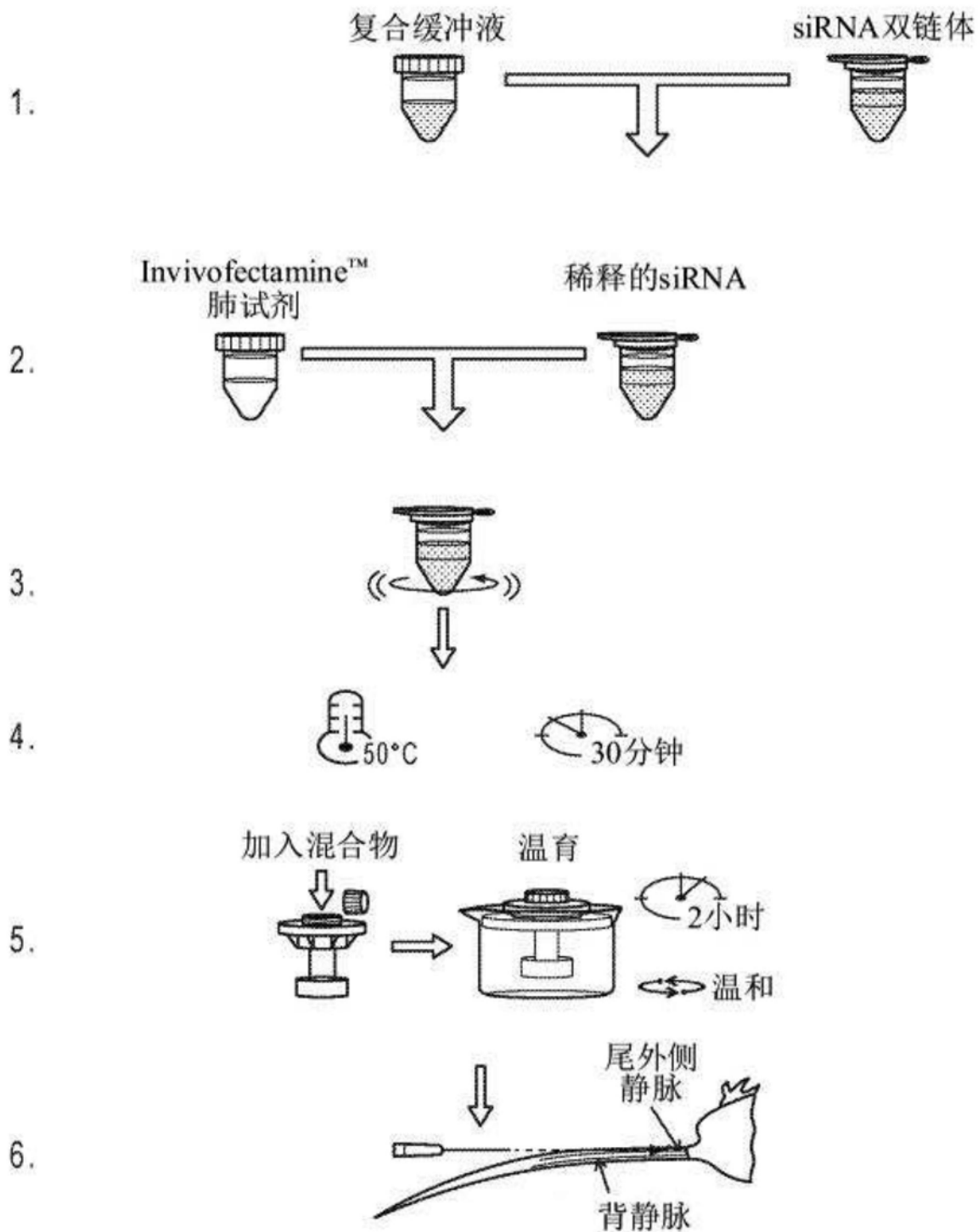


图1B

Invivofectamine™肺试剂方案

程序			
将核酸有效负载与复合缓冲液混合	1.	通过以1:1比率混合以下组分来制备100 μL的0.69 mg/mL siRNA溶液:	1. 通过以1:1比率混合以下组分来制备100 μL的0.6 mg/mL mRNA溶液:
		组分	组分
		siRNA双链体溶液 (1.38-mg/mL) 复合缓冲液	mRNA溶液 (1.2-mg/mL) 复合缓冲液
		体积	体积
		50 μL	50 μL
		50 μL	50 μL
将稀释的siRNA或mRNA与Invivofectamine™肺试剂剂混合	2.	使Invivofectamine™肺试剂达到室温并向1.5 mL管中加入100 μL。立即将稀释的siRNA或mRNA溶液加入到管中的Invivofectamine™肺试剂中。将剩余试剂放回4℃进行储存。	
涡旋	3.	立即涡旋以确保Invivofectamine™肺有效负载复合。	
温育	4.	将Invivofectamine™肺有效负载混合物在50℃温育30分钟。将管短暂离心以收集样品。	
渗析复合物	5.	将Invivofectamine™肺有效负载混合物加入到渗析装置中并在室温下在温和搅拌下于1L的PBS pH 7.4中温育1.5-2小时。渗析后，收集样品并稀释至所需浓度。	
注入小鼠	6.	继续体内递送Invivofectamine™肺有效负载复合物，或在注射前将复合物在-20℃下储存长达一周。	

图1C

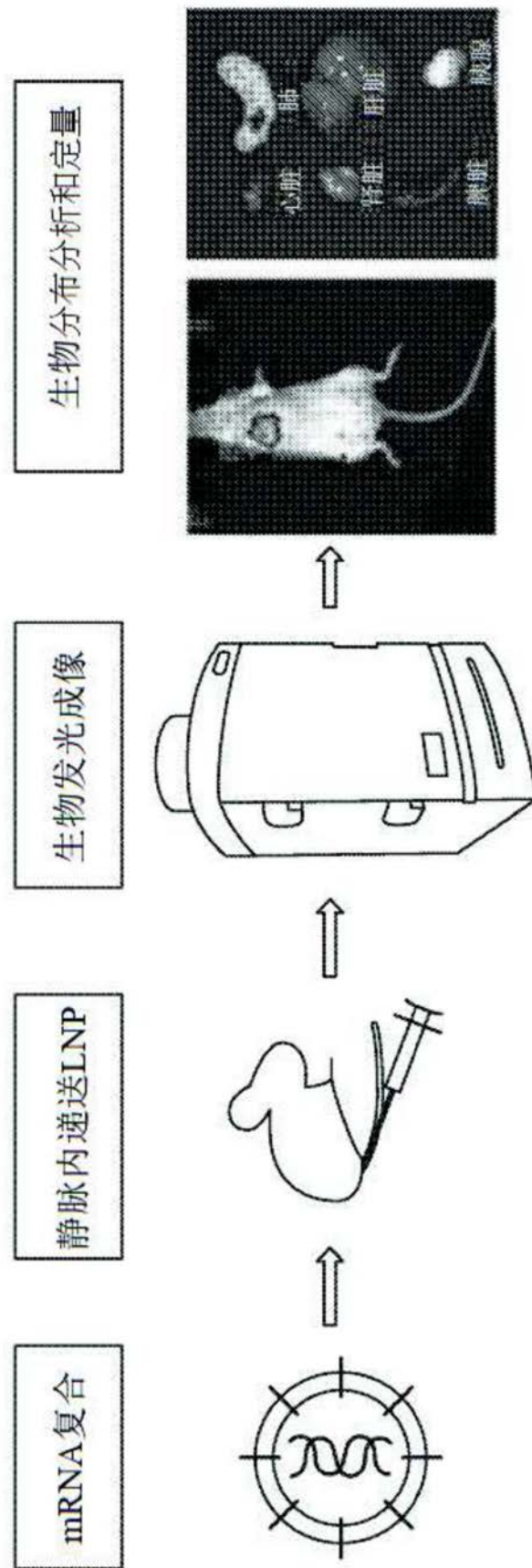


图2

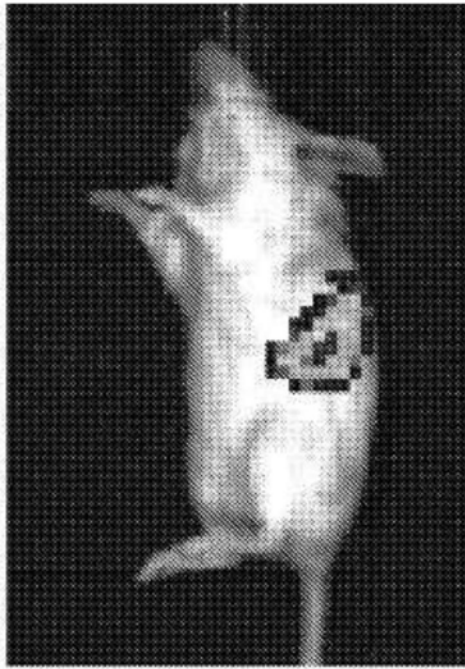


图3A

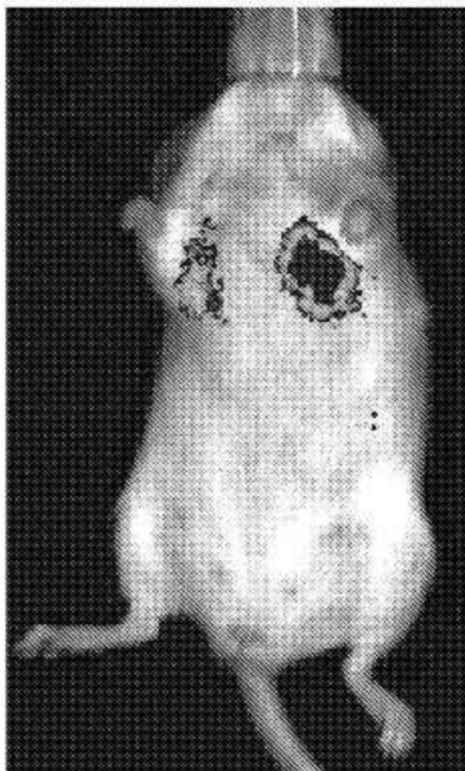


图3B

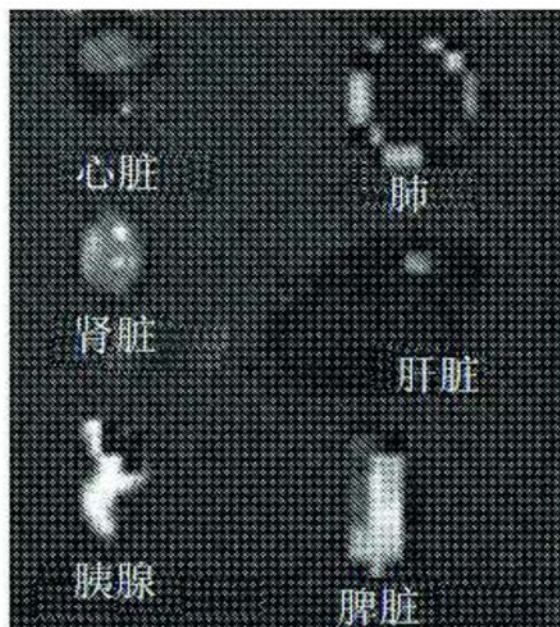


图3C

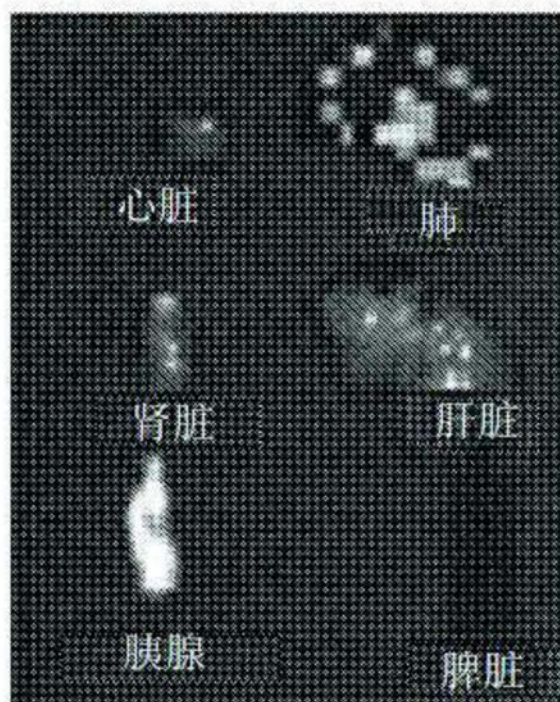


图3D

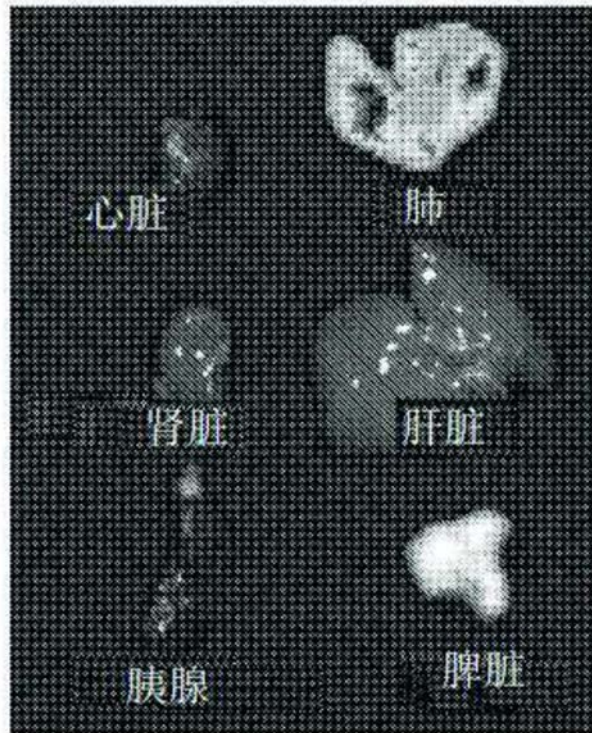


图3E

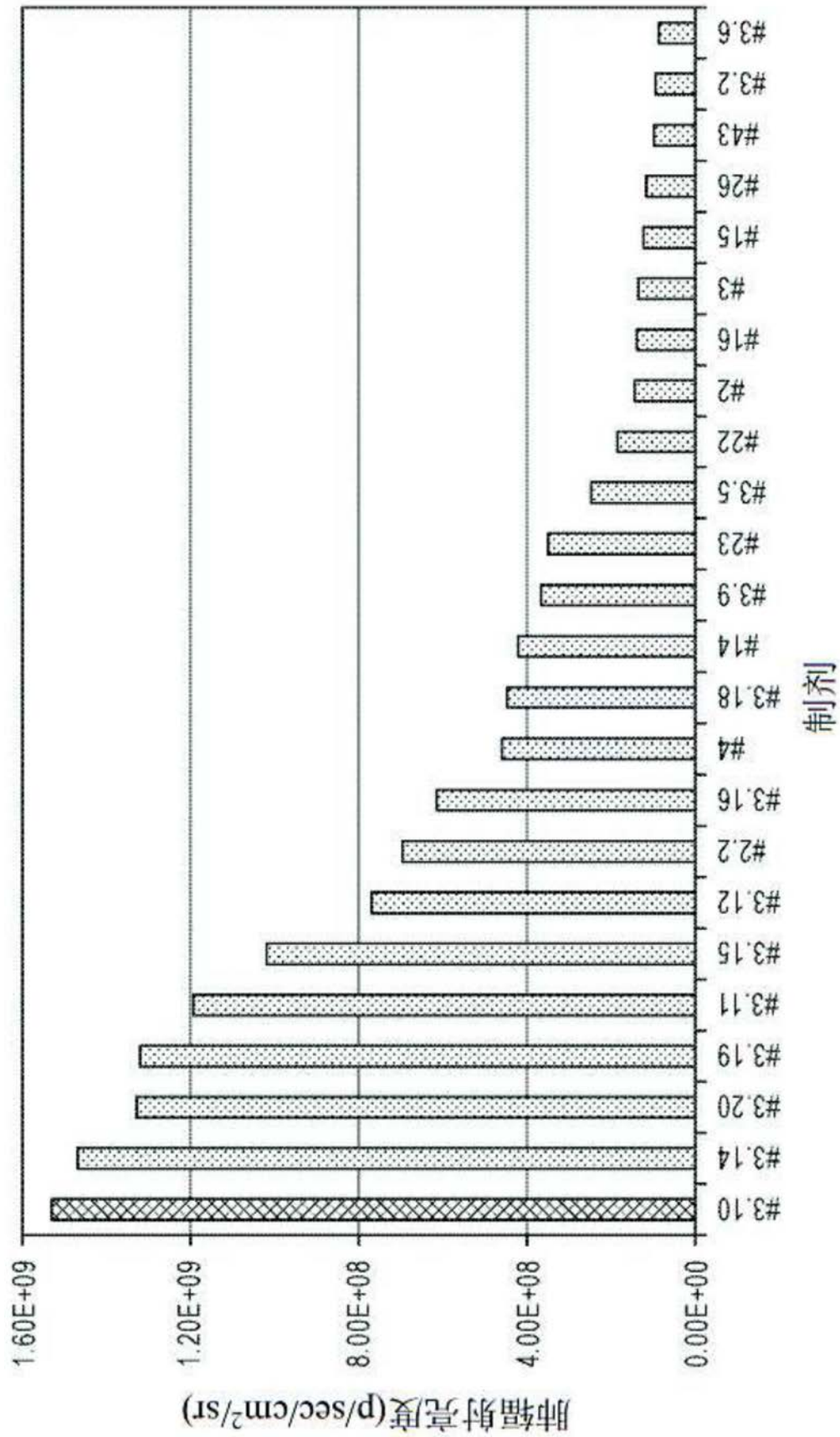


图4A

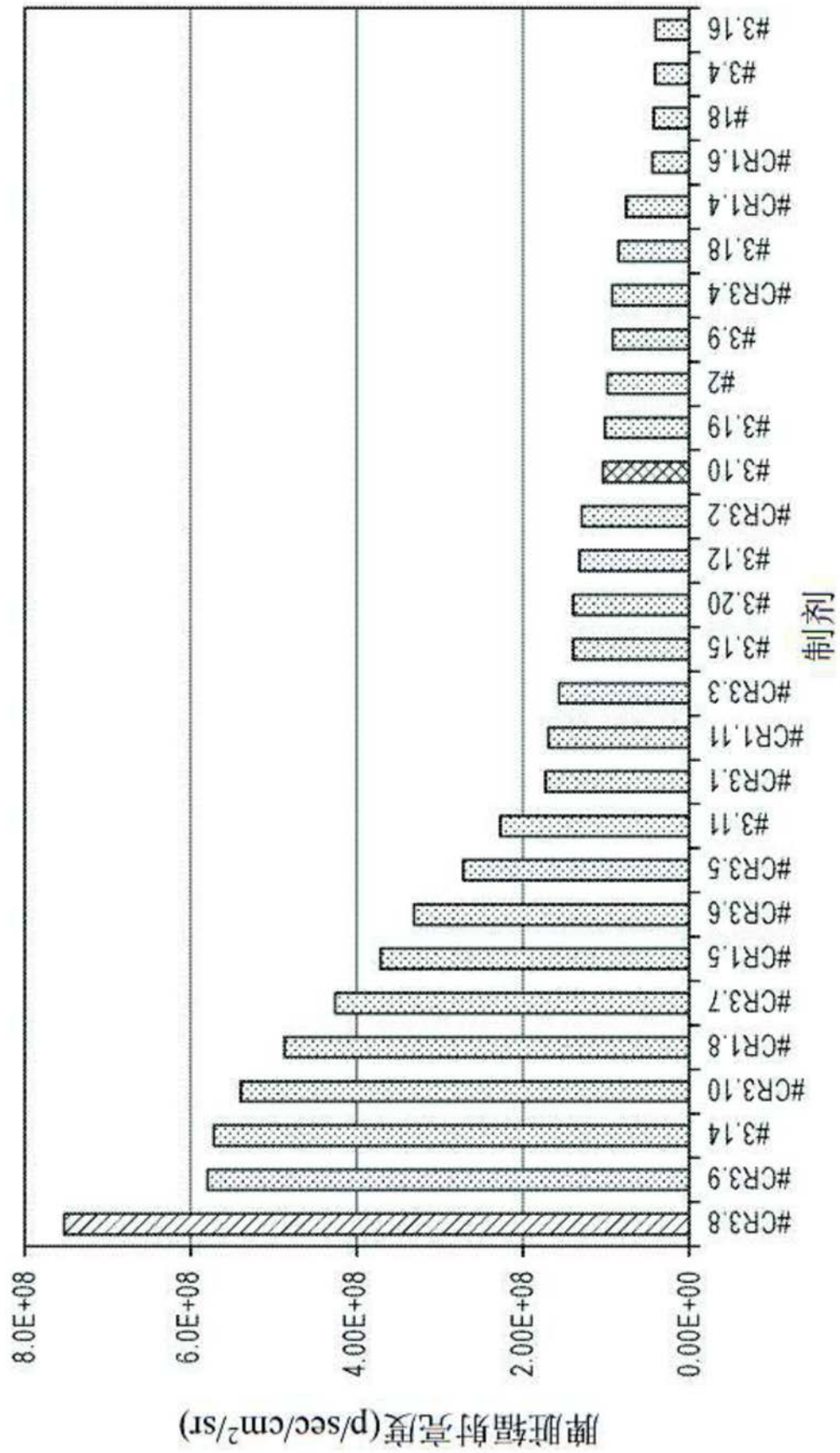


图4B

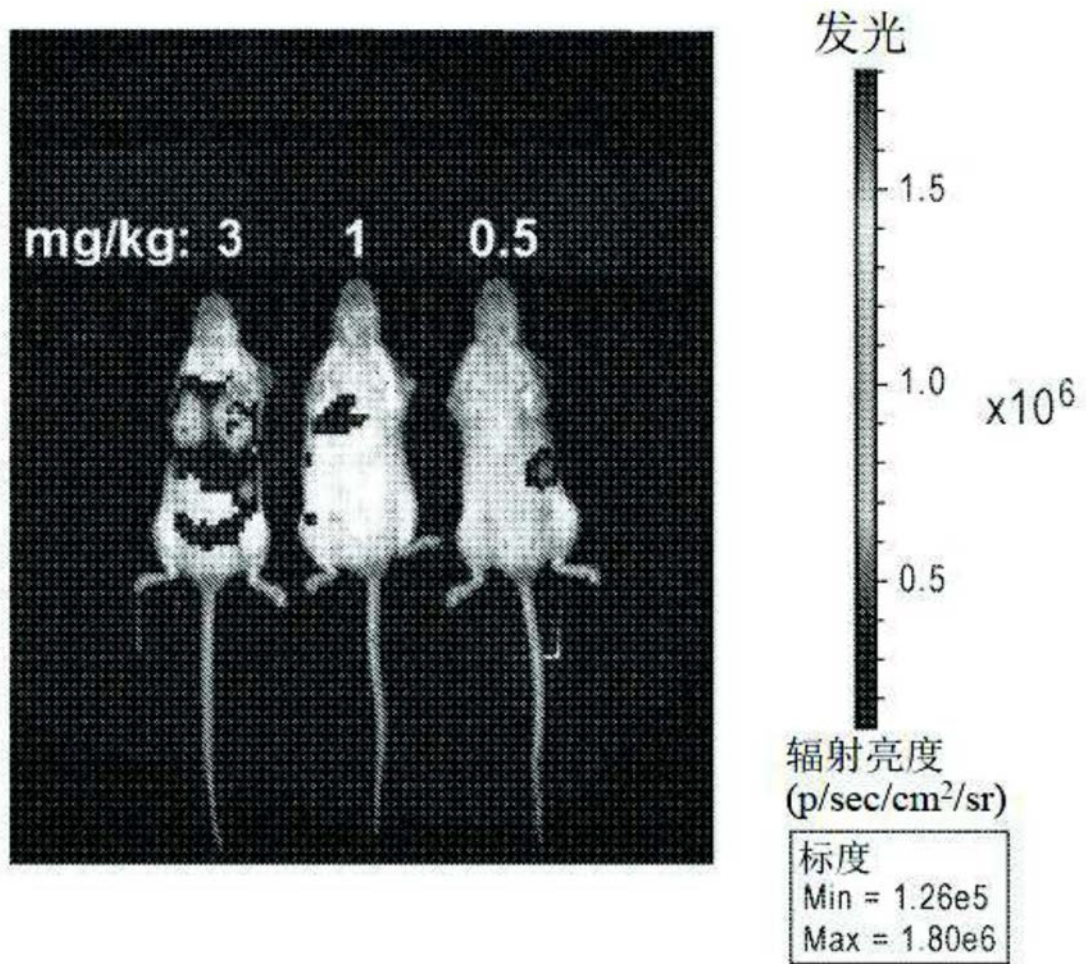


图5A

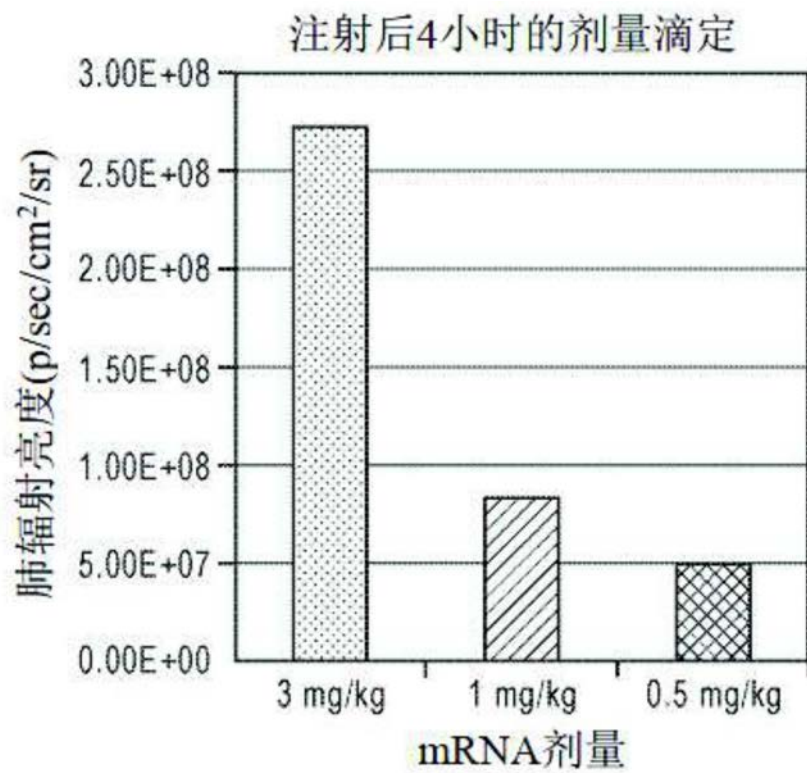


图5B

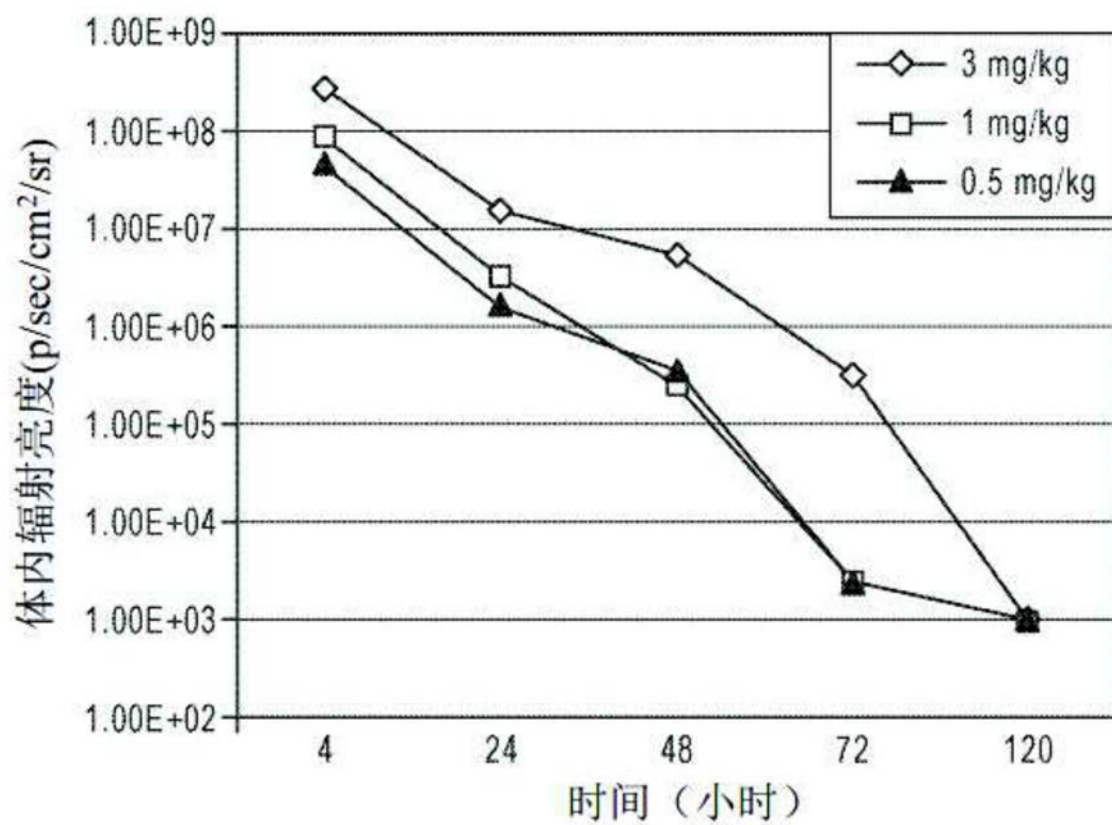


图5C

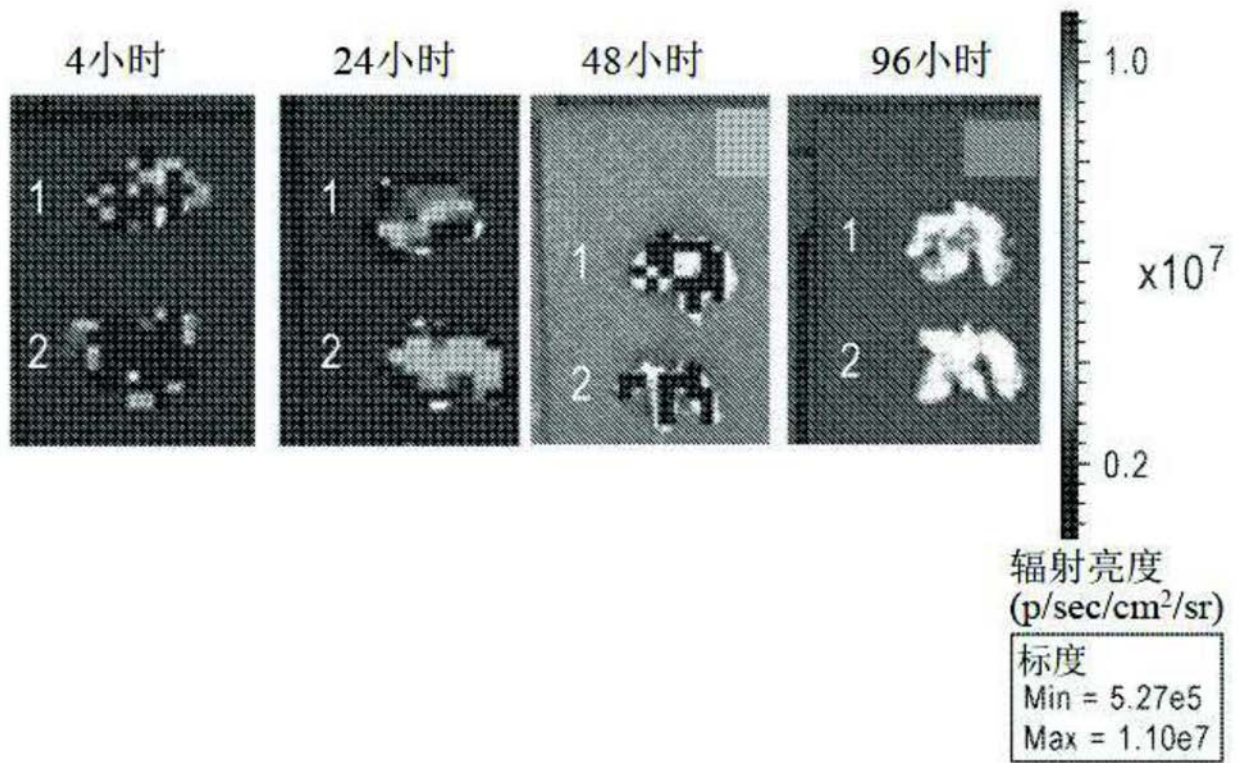


图6A

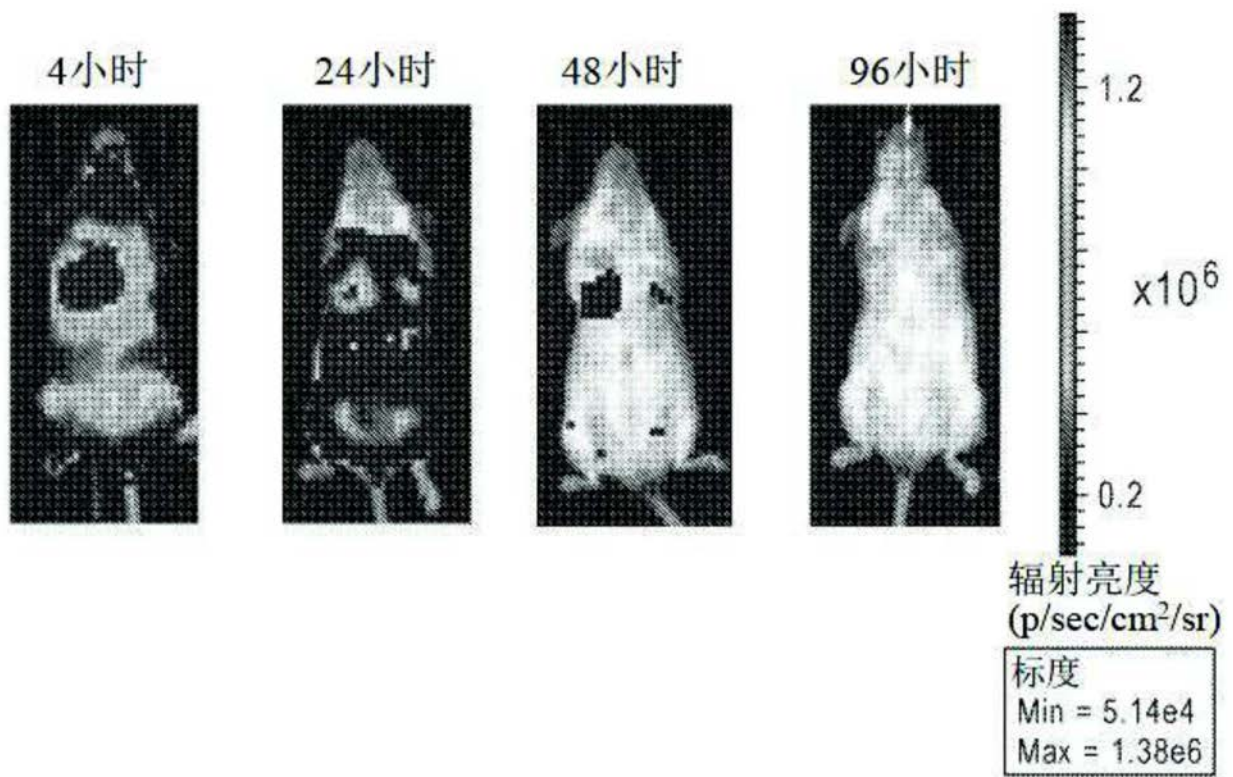


图6B

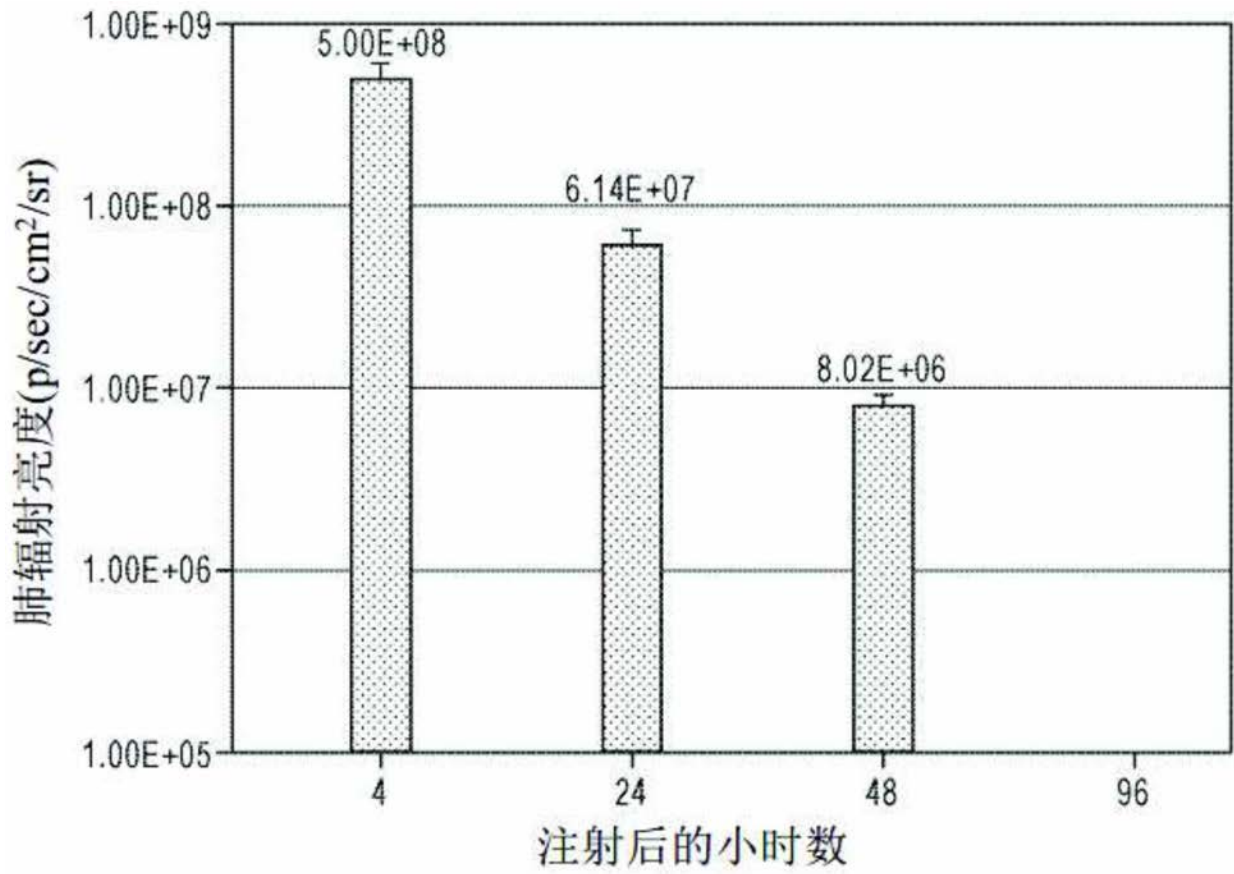


图6C

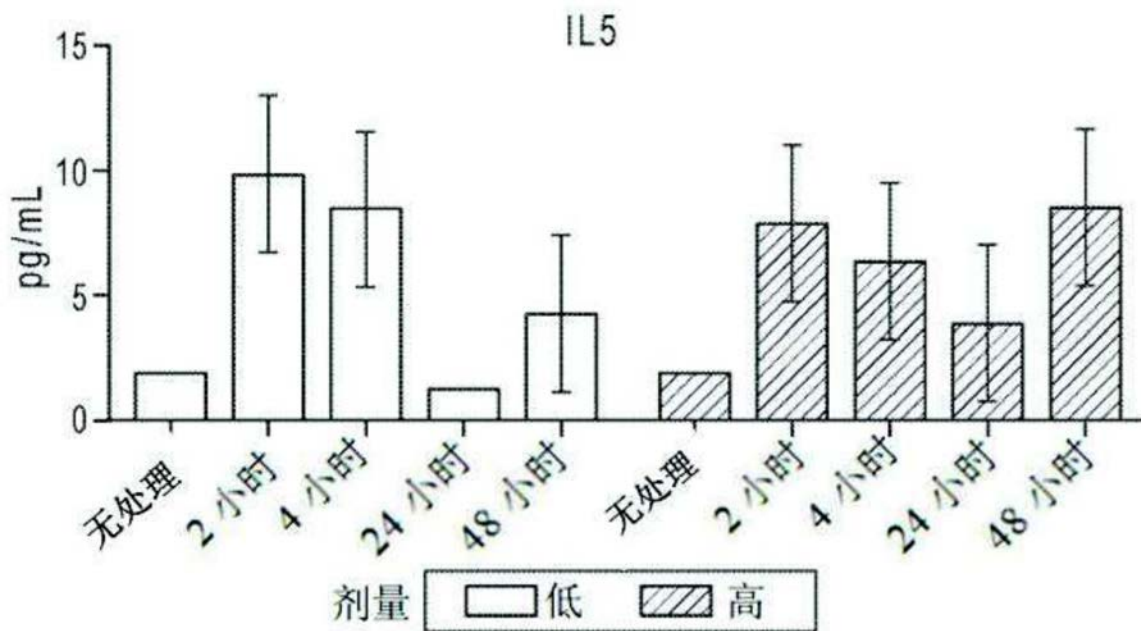


图7A

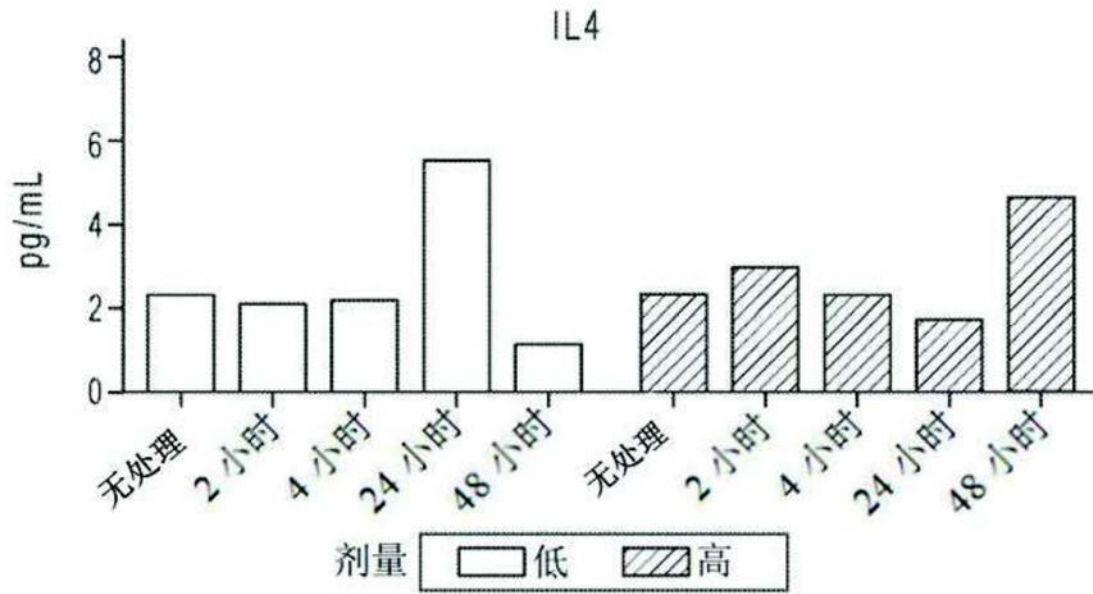


图7B

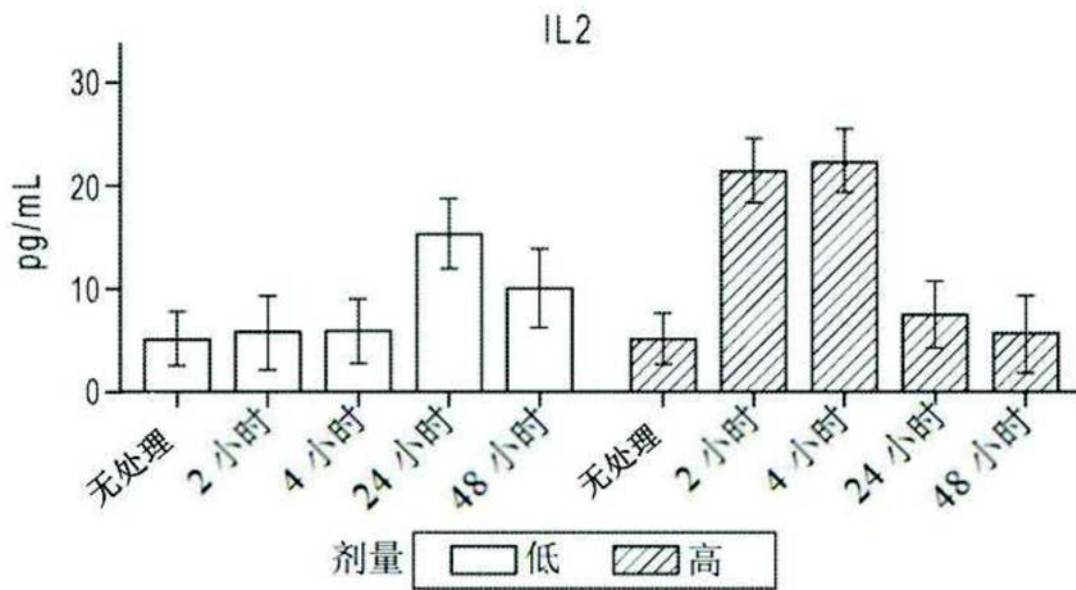


图7C

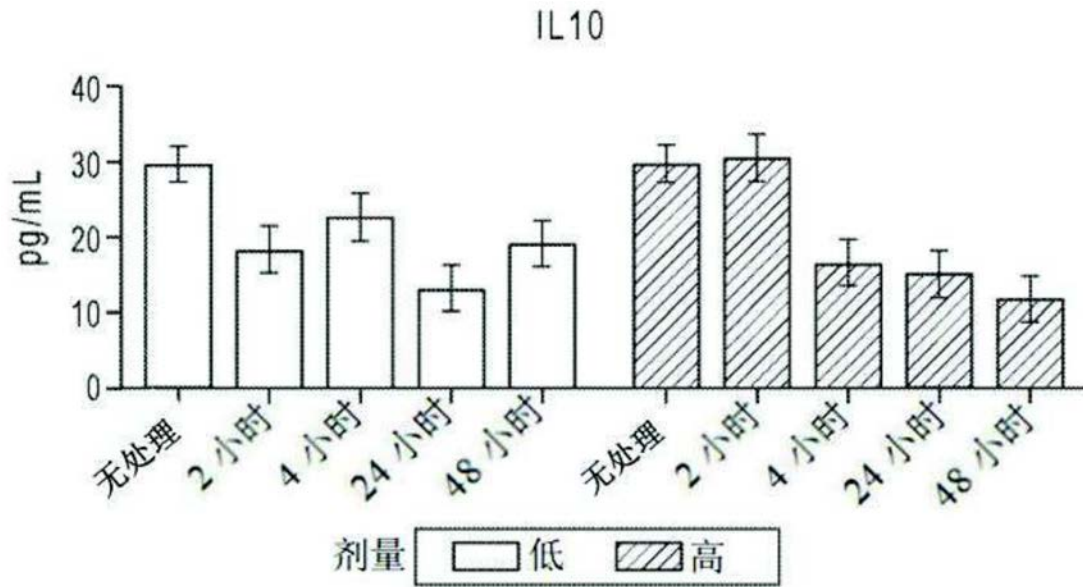


图7D

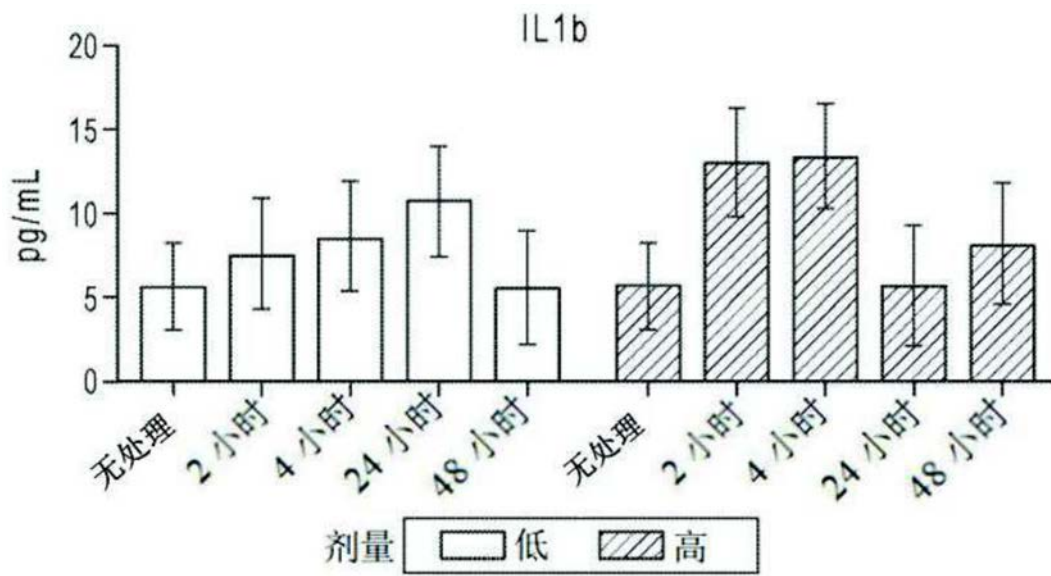


图7E

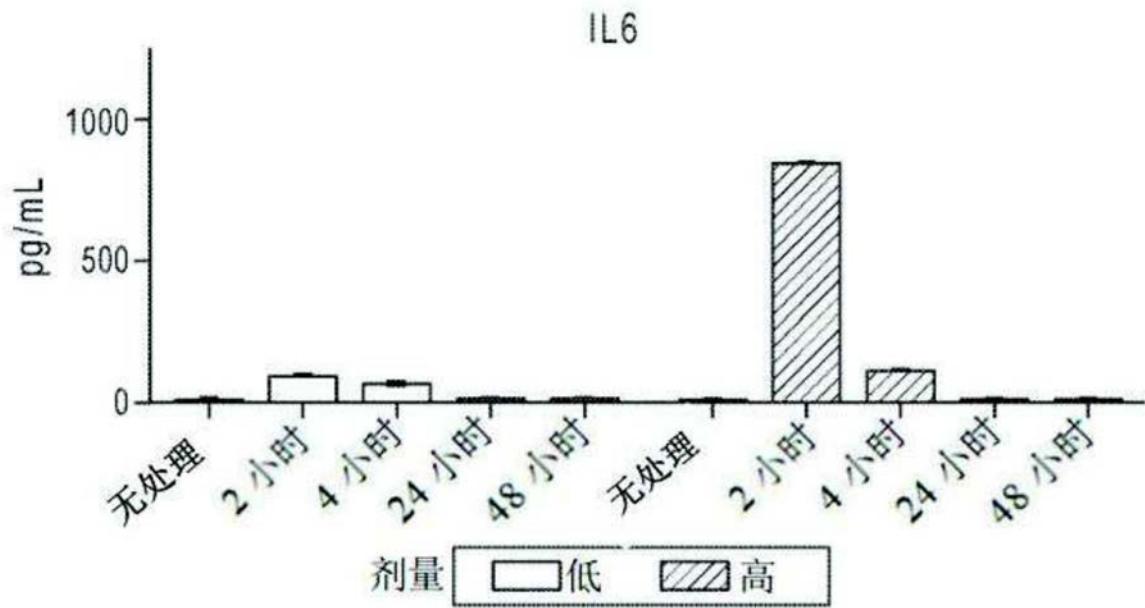


图7F

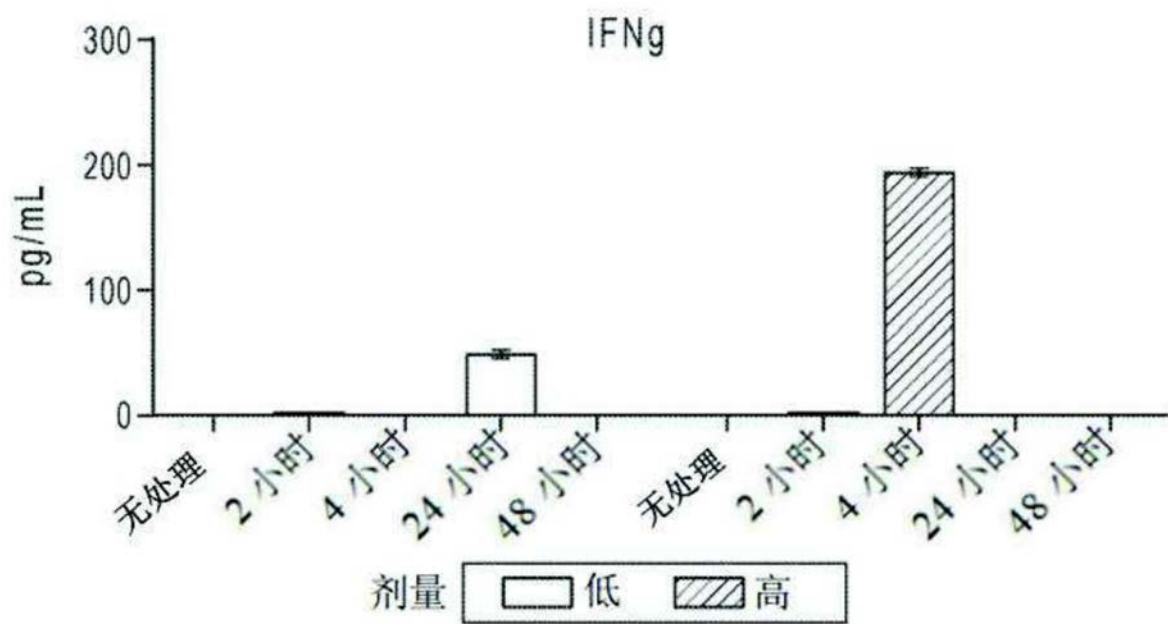


图7G

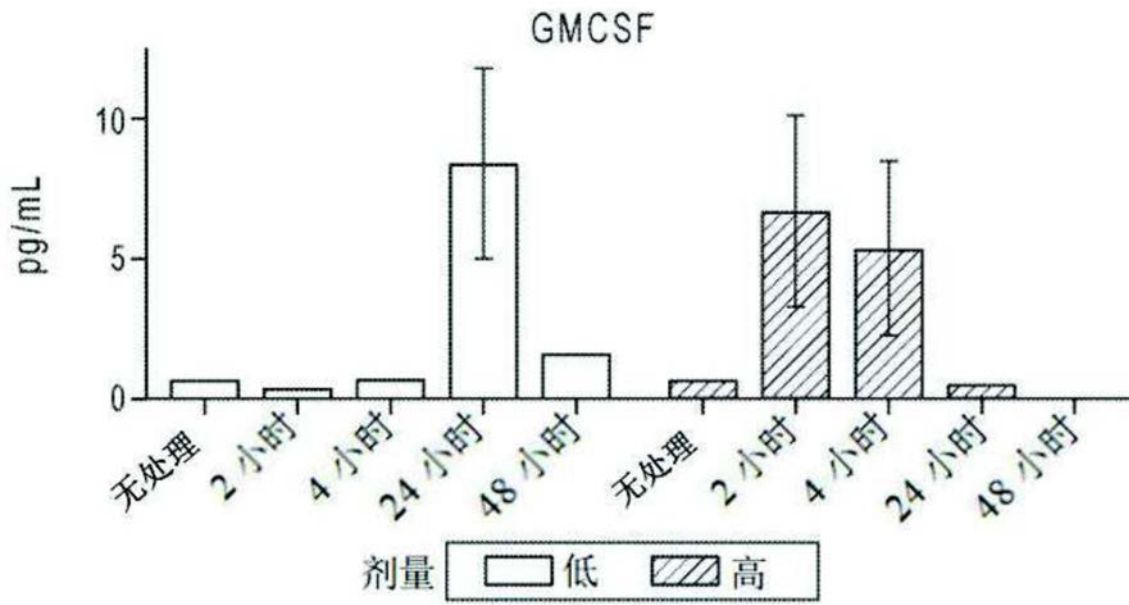


图7H

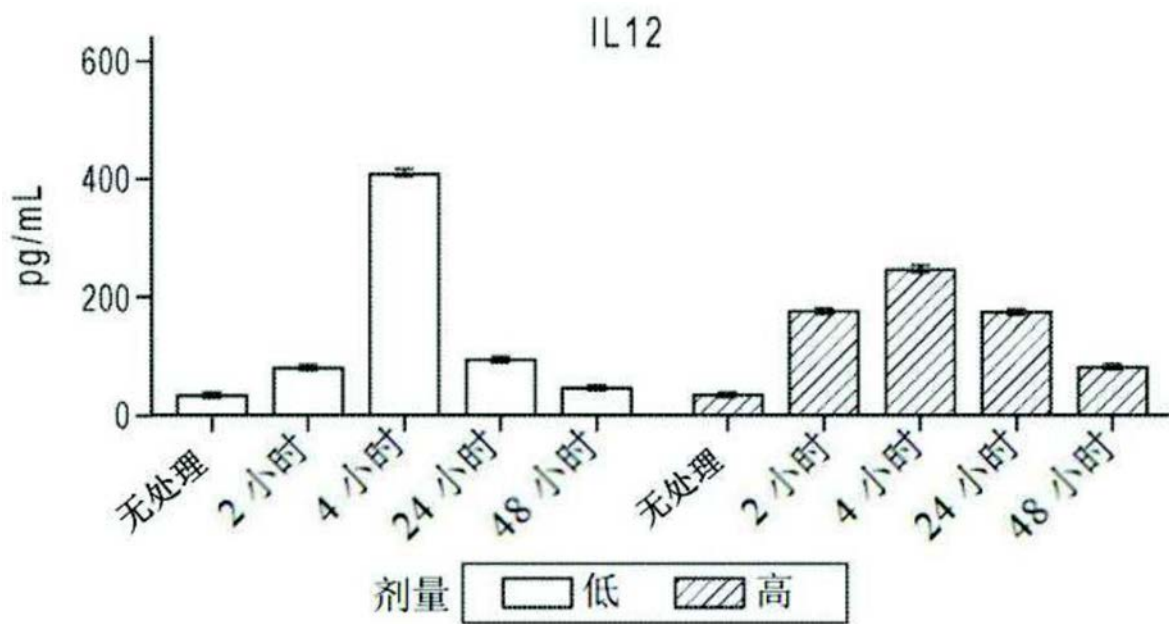


图7I

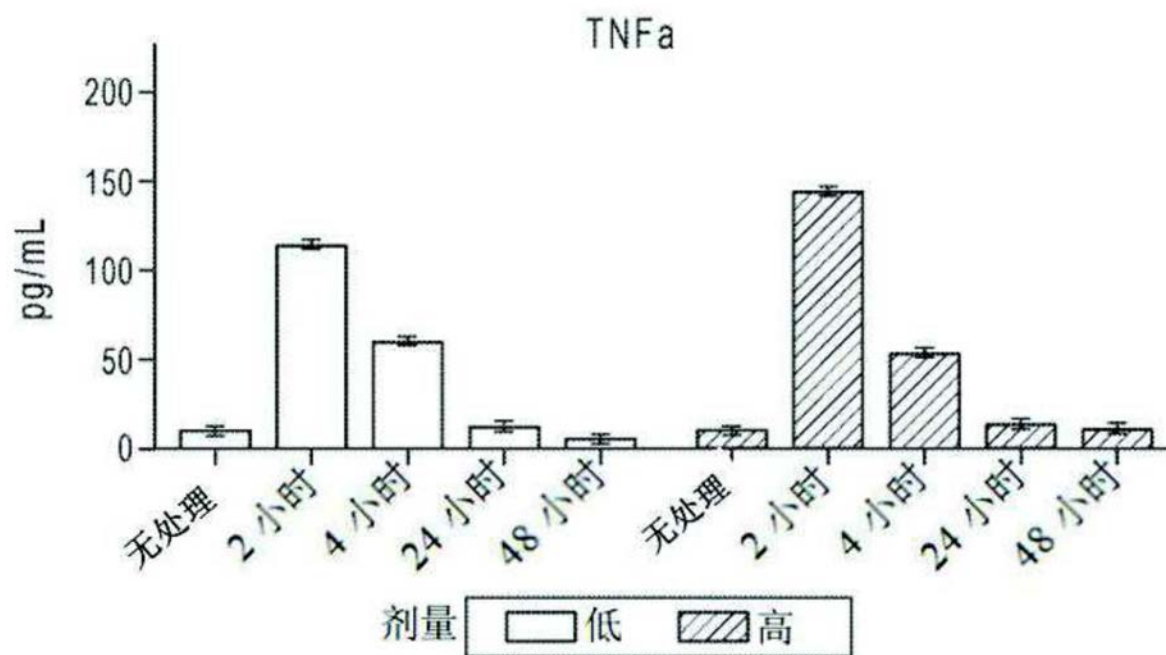


图7J

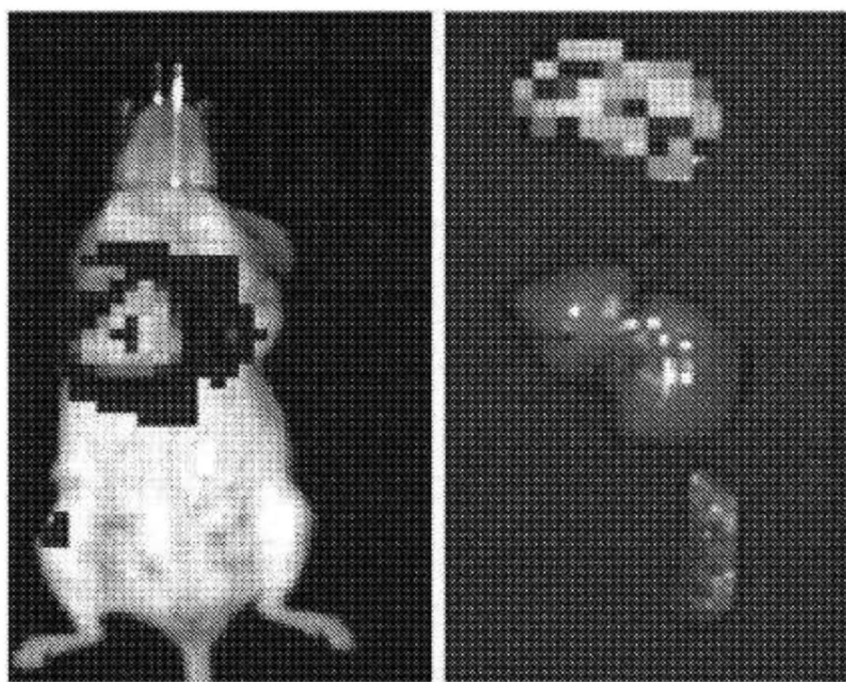


图8A

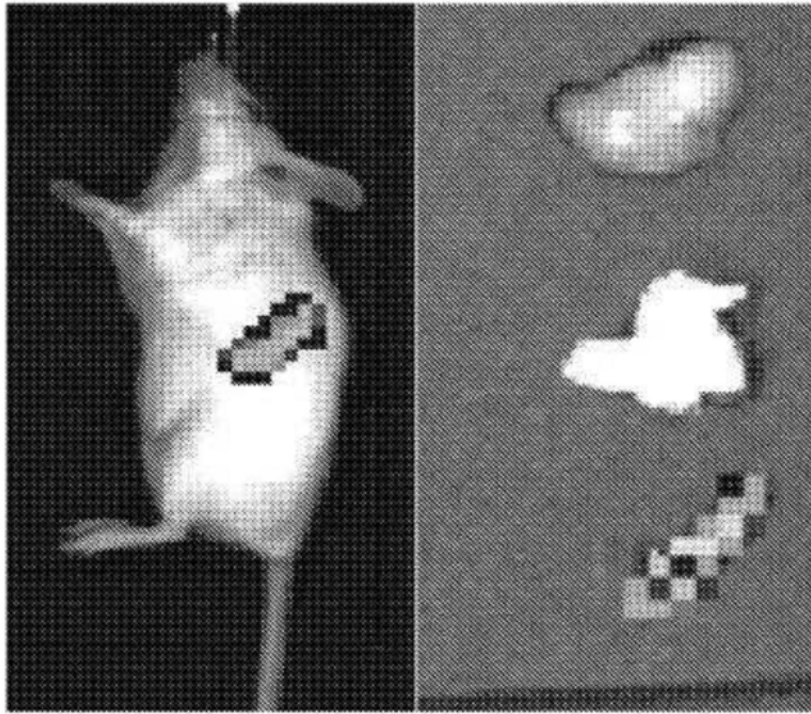


图8B

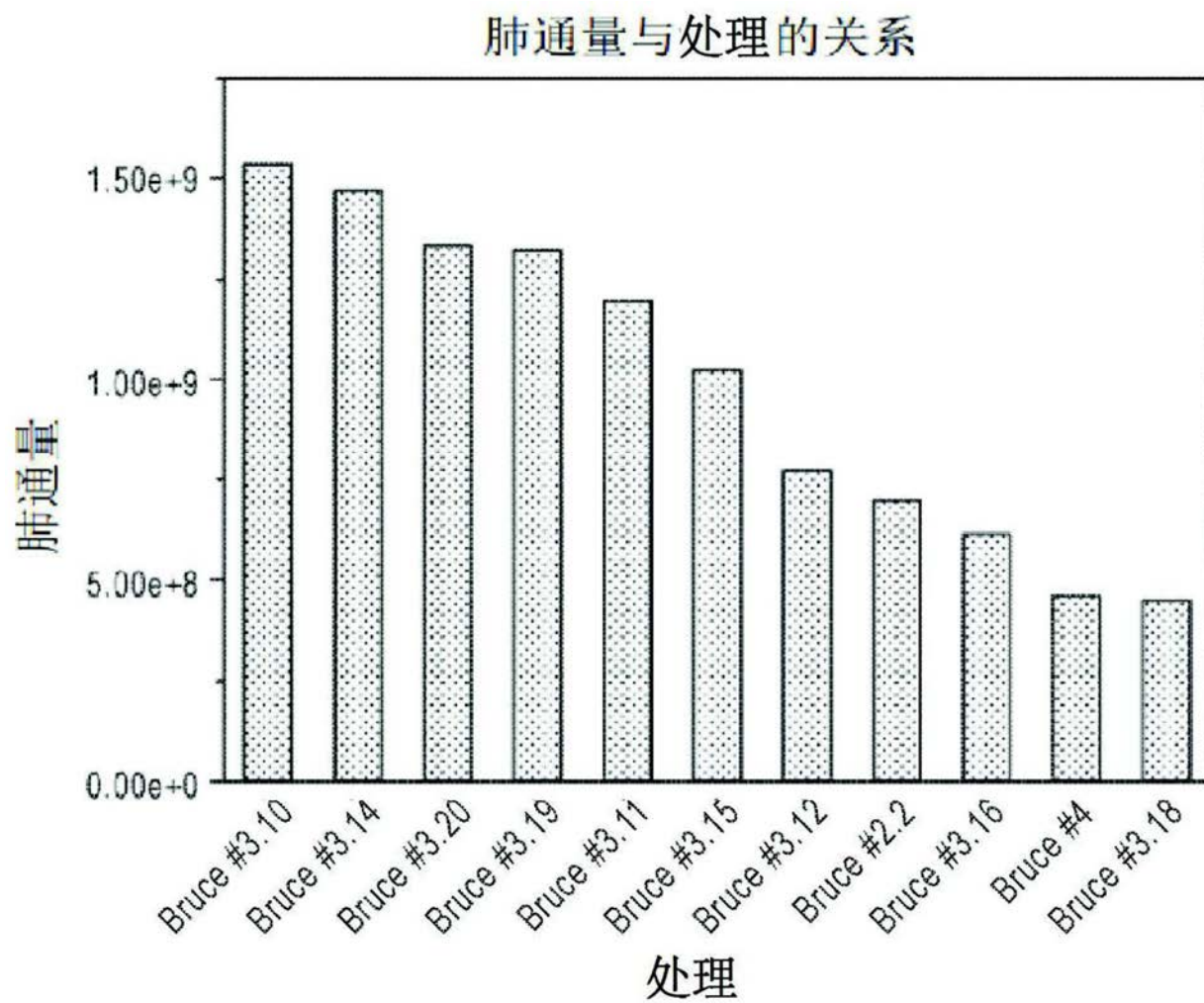


图9

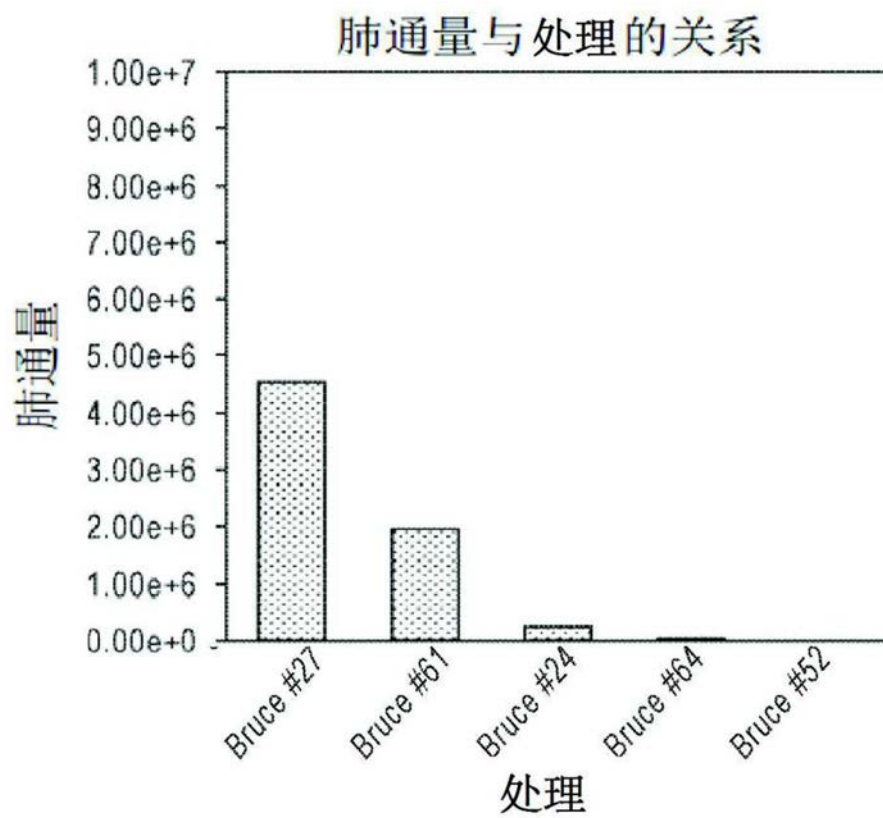


图10A

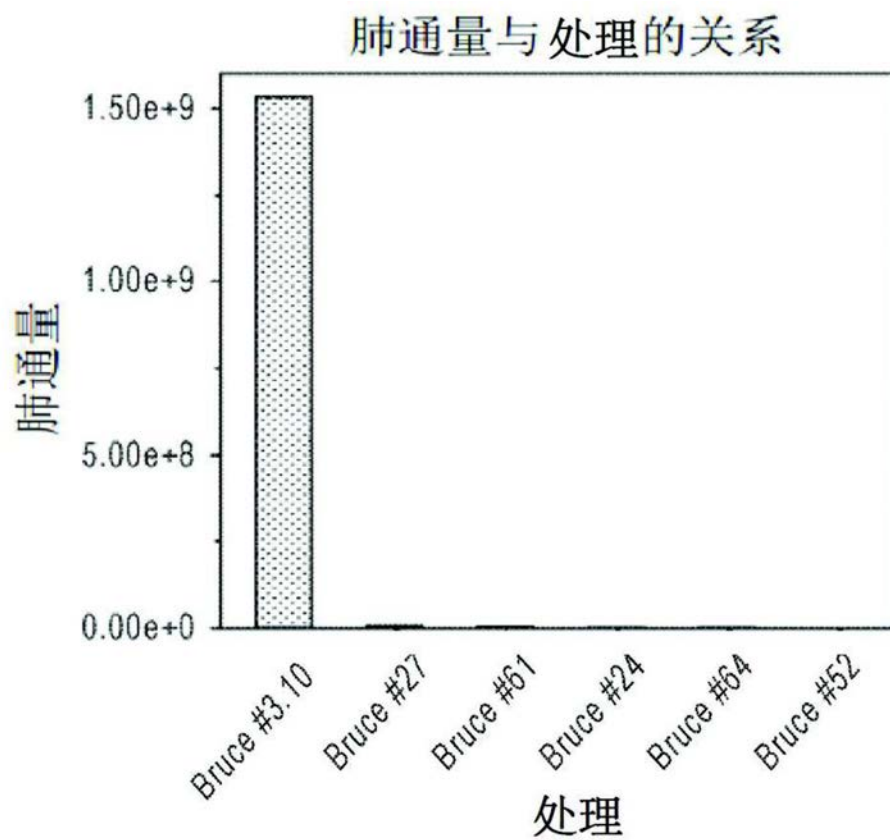


图10B



图11A

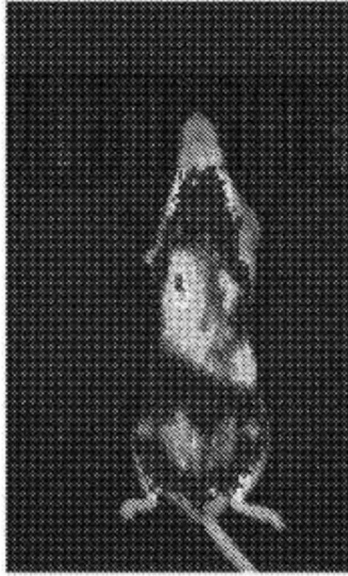


图11B

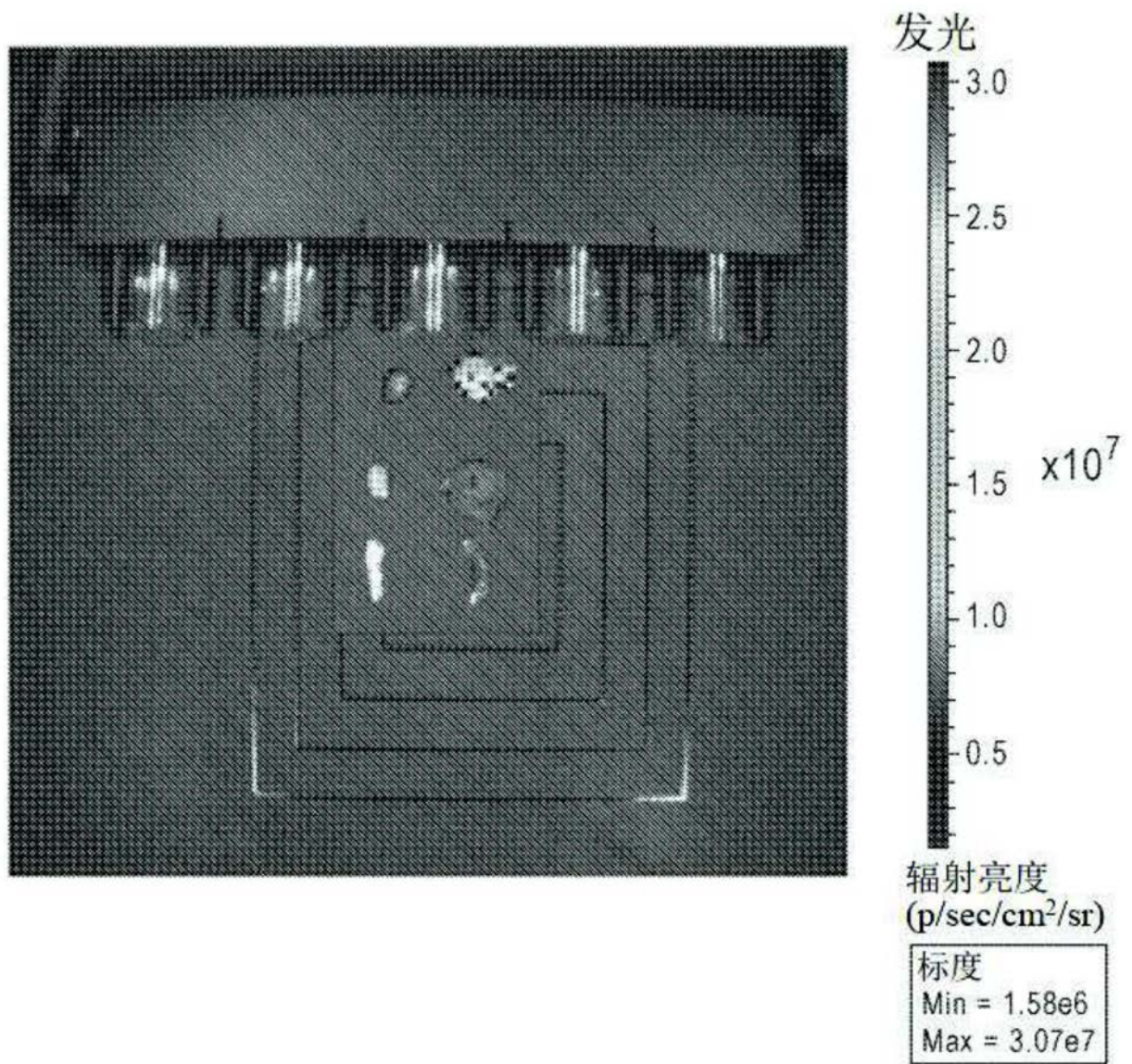


图11C

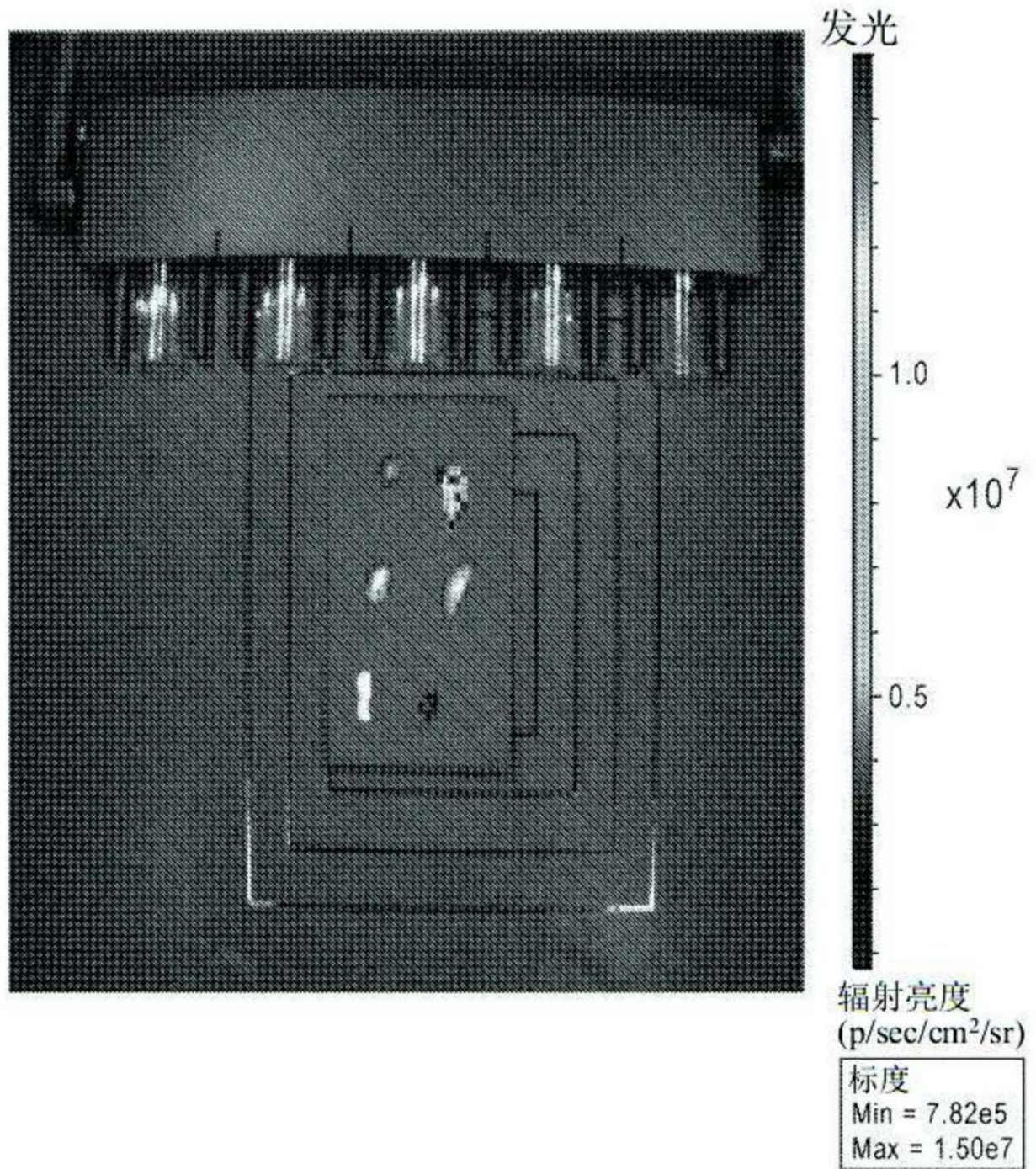


图11D

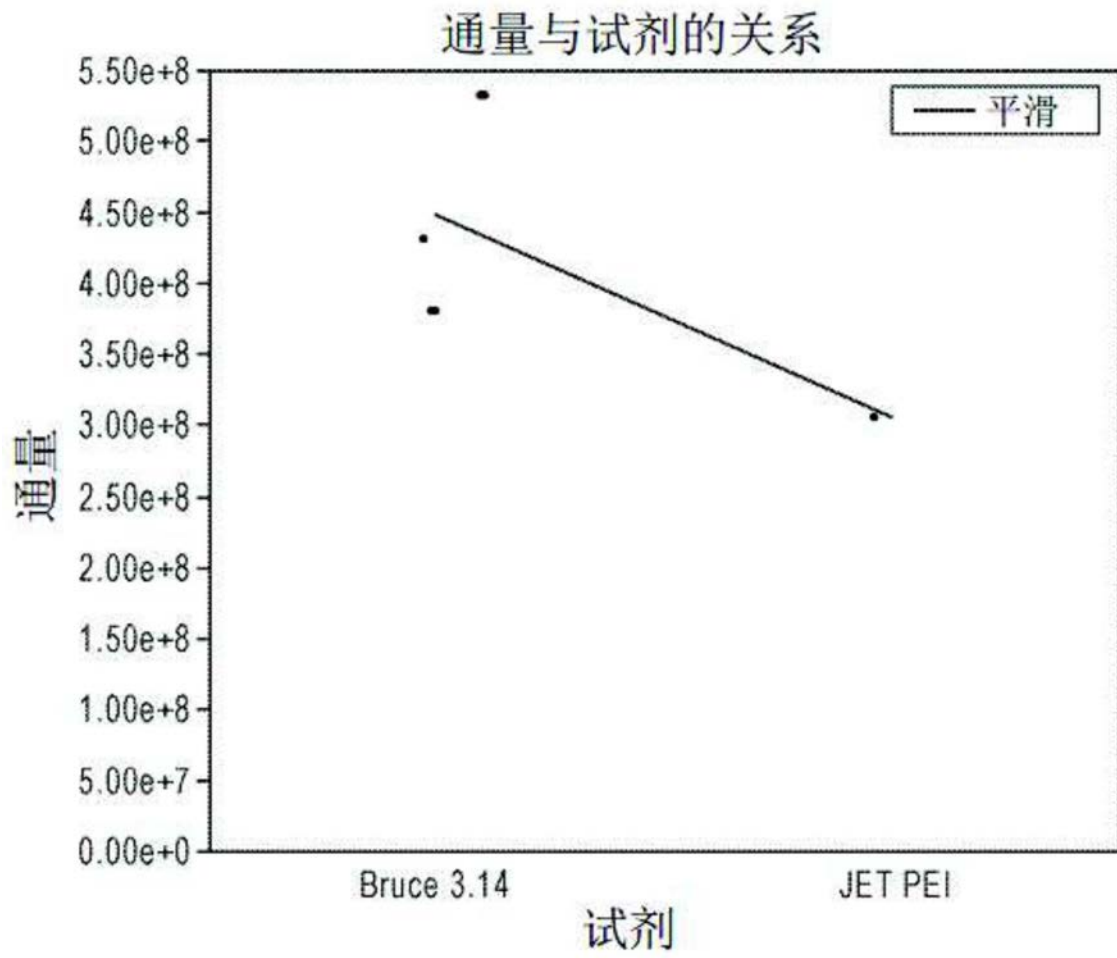


图11E

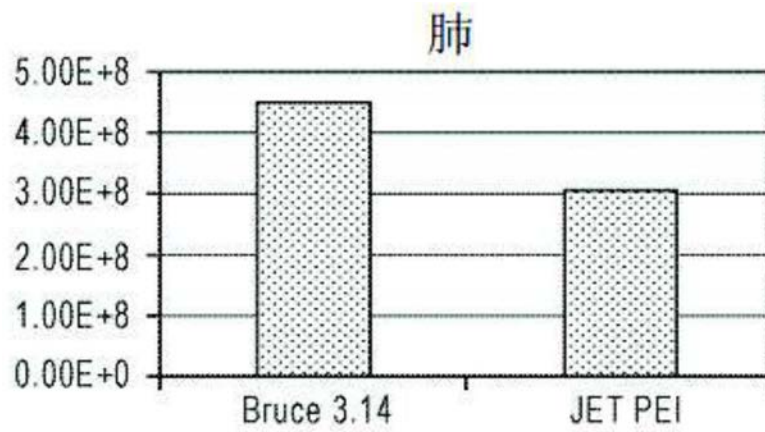


图11F

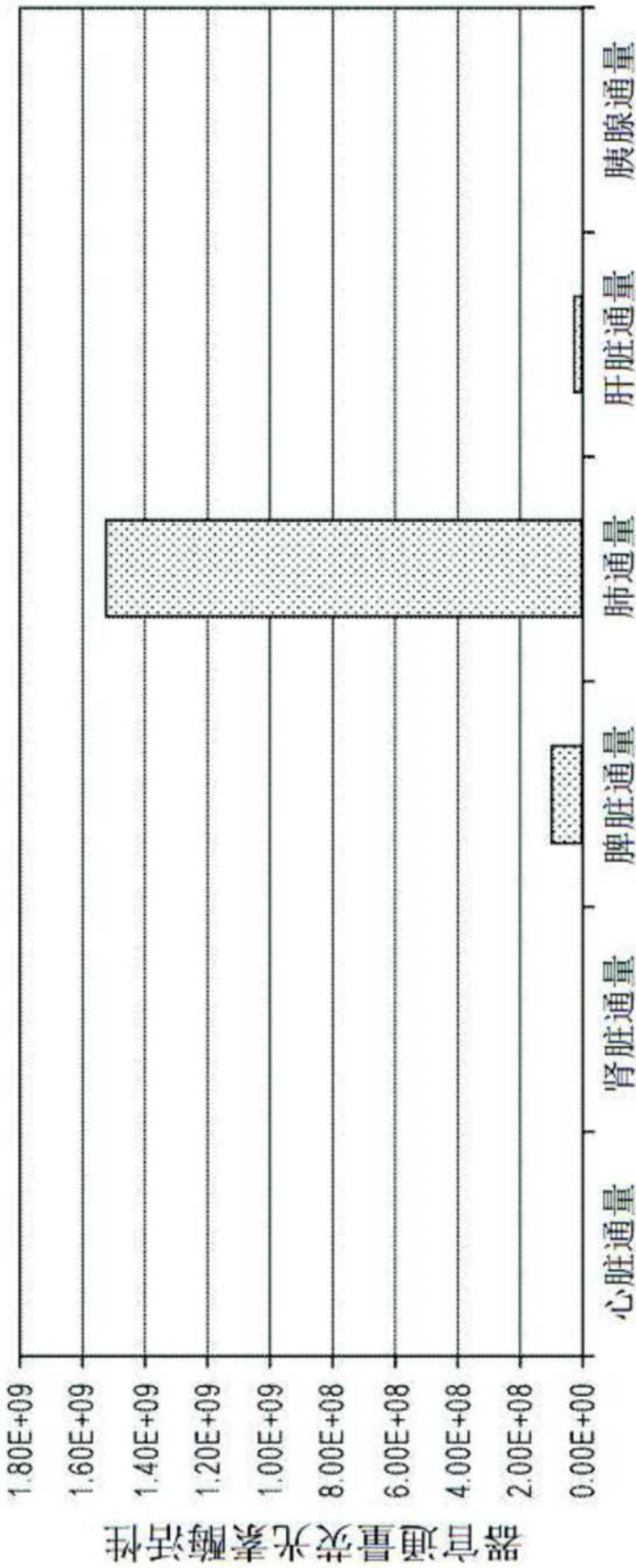


图12A

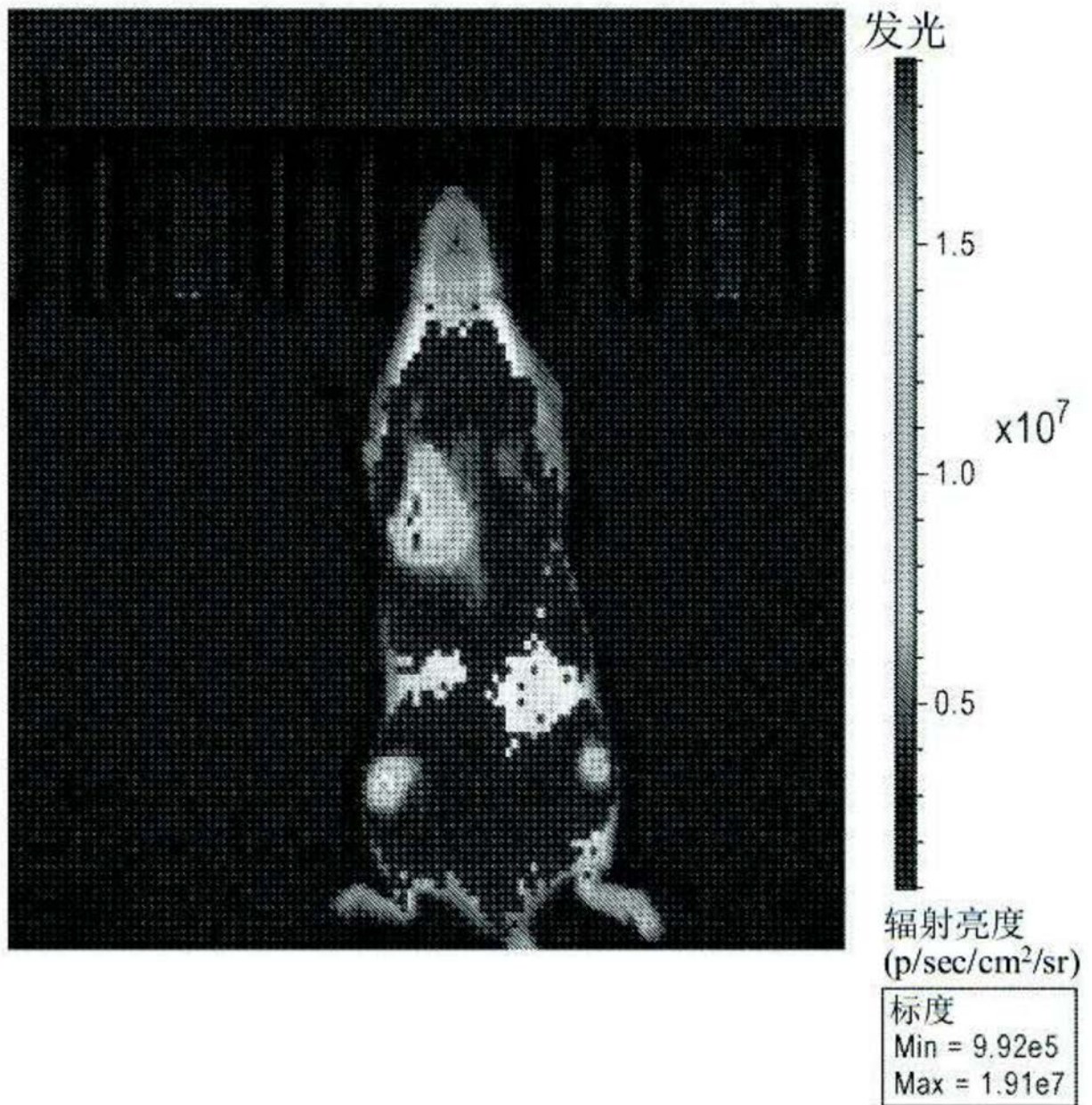


图12B

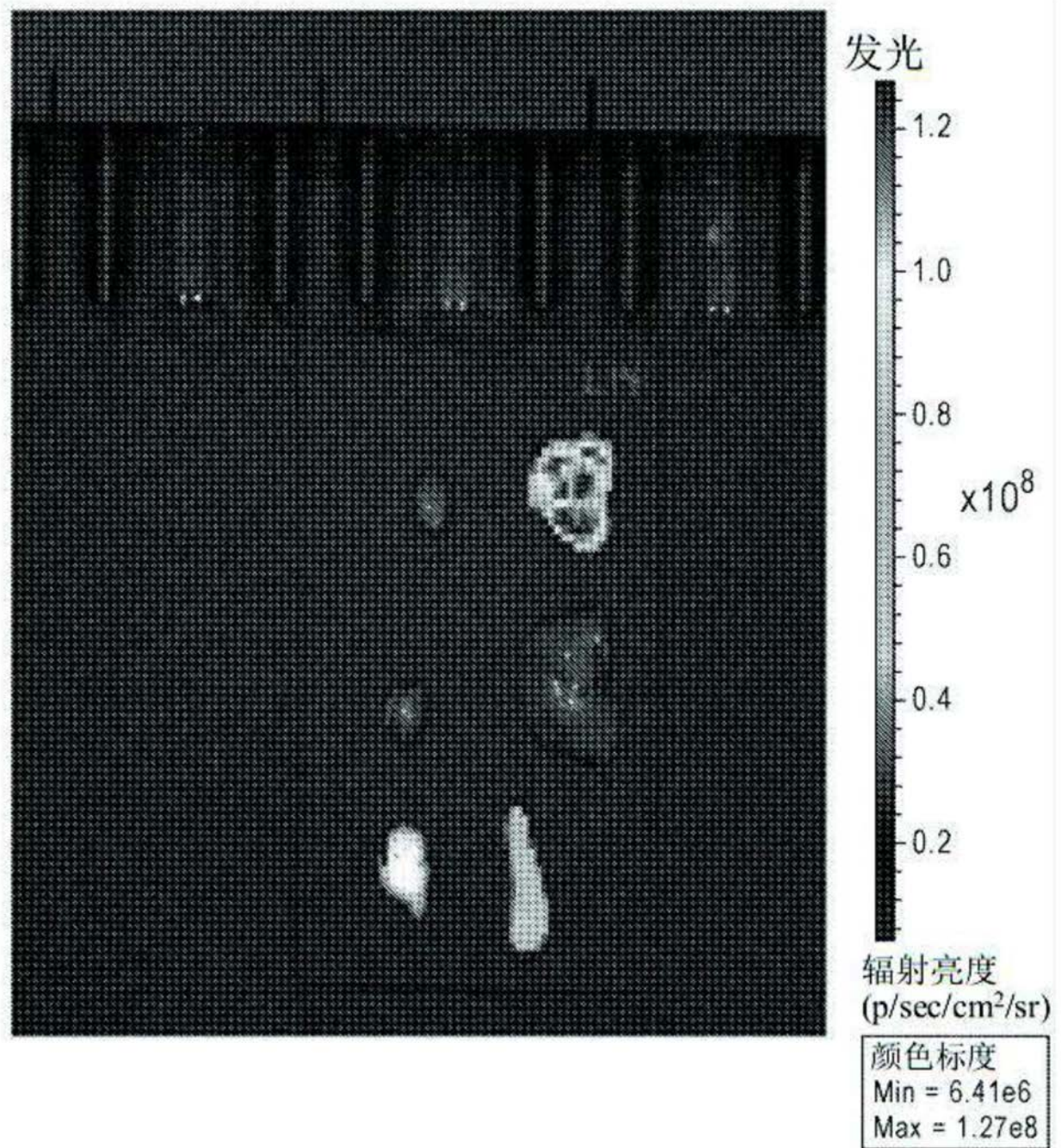


图12C

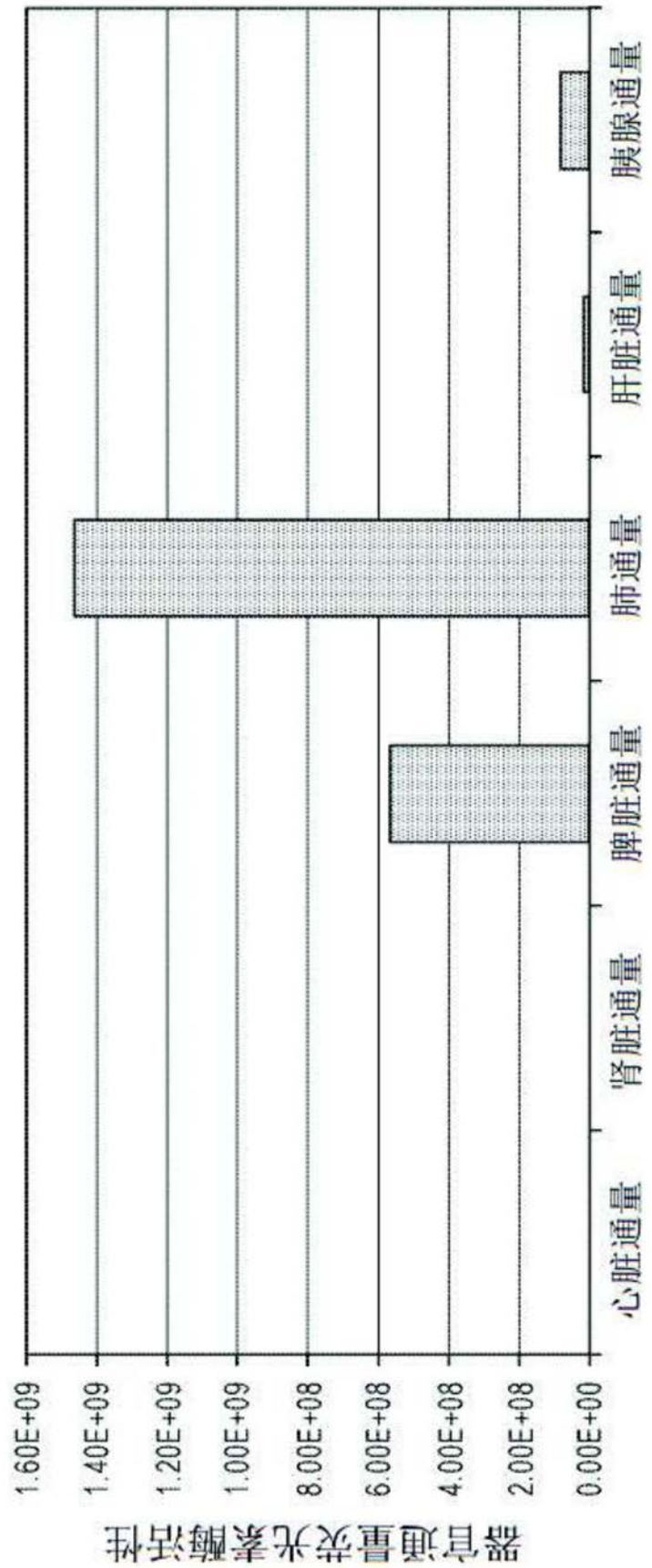


图13A

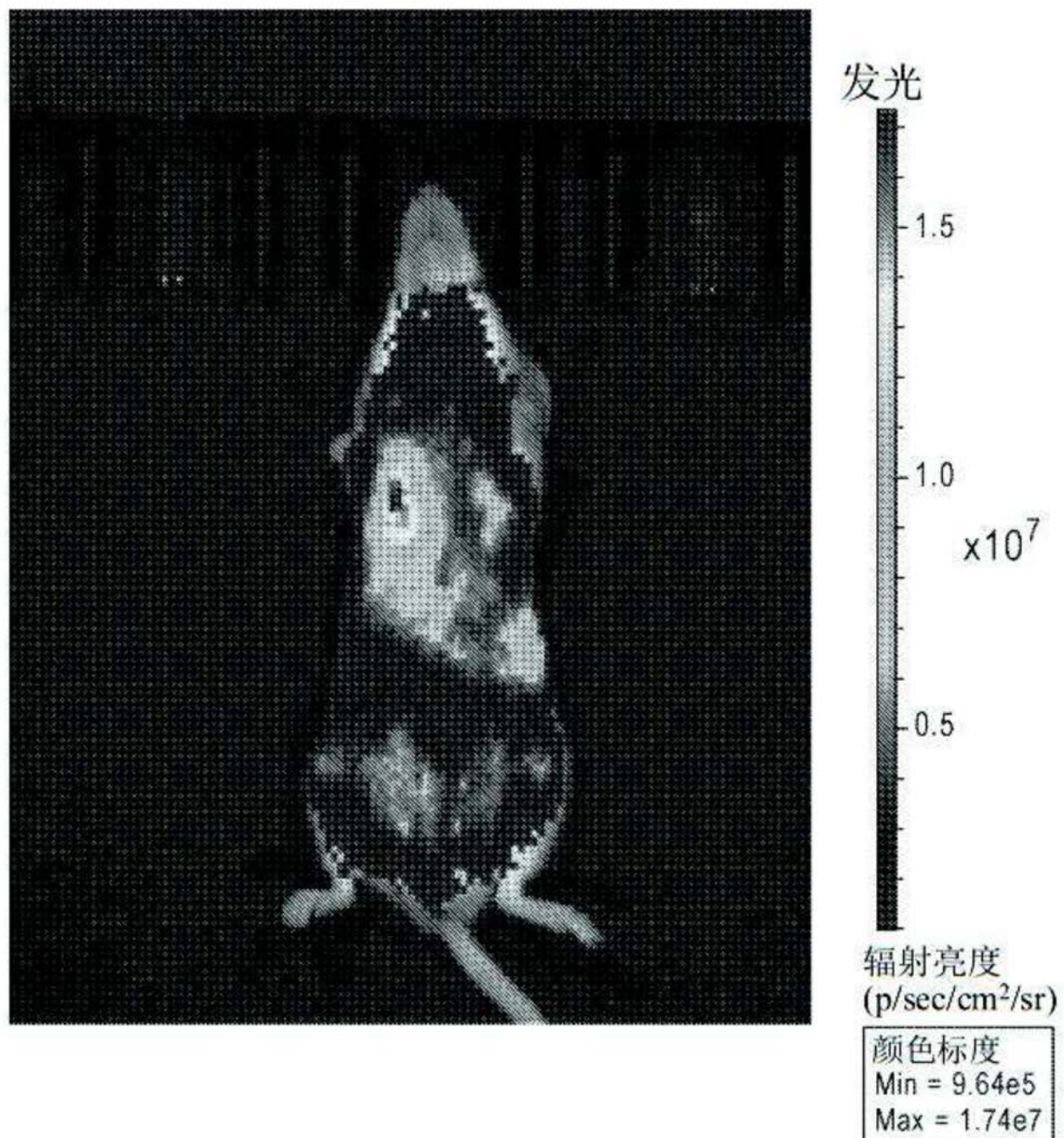


图13B

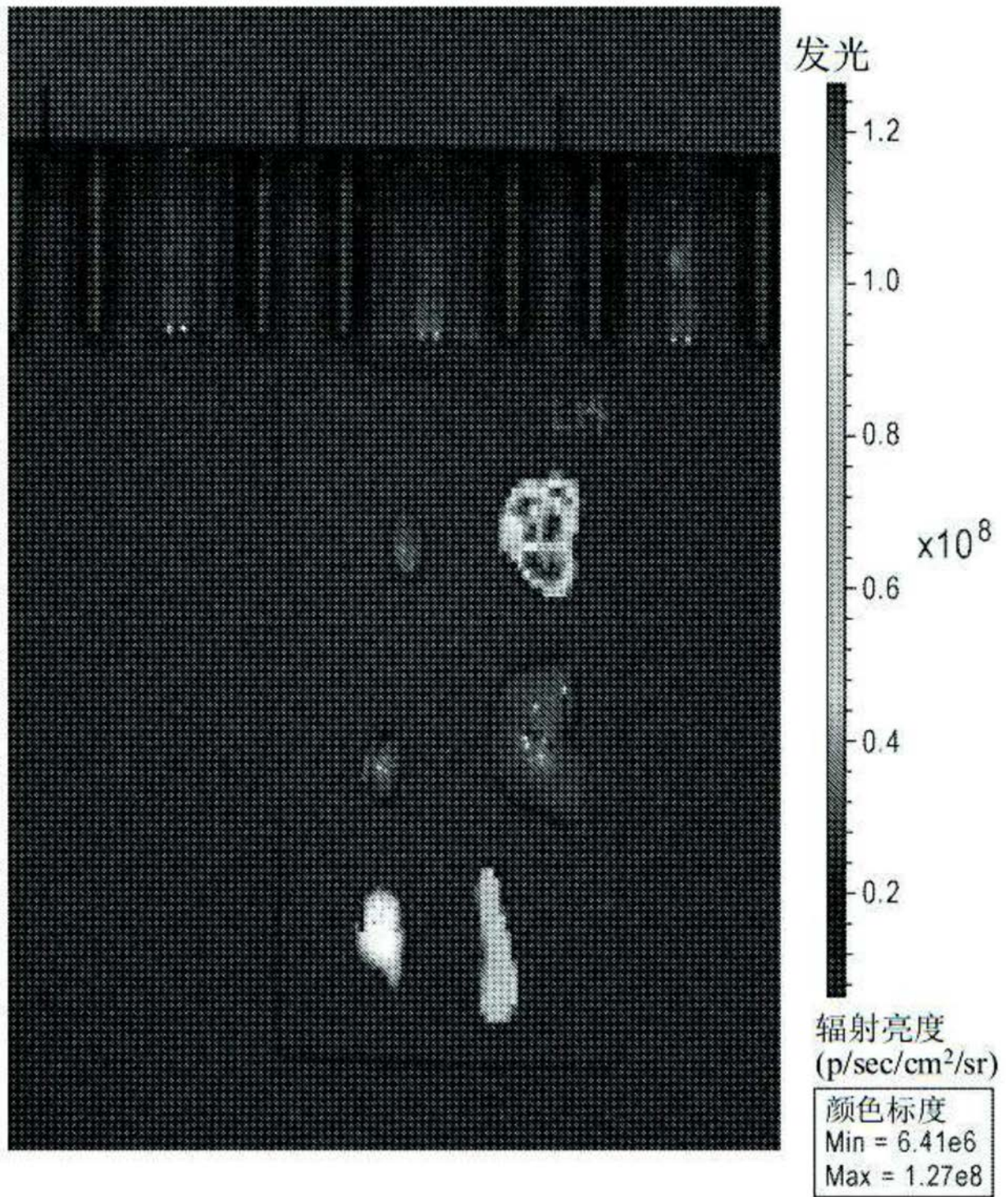


图13C

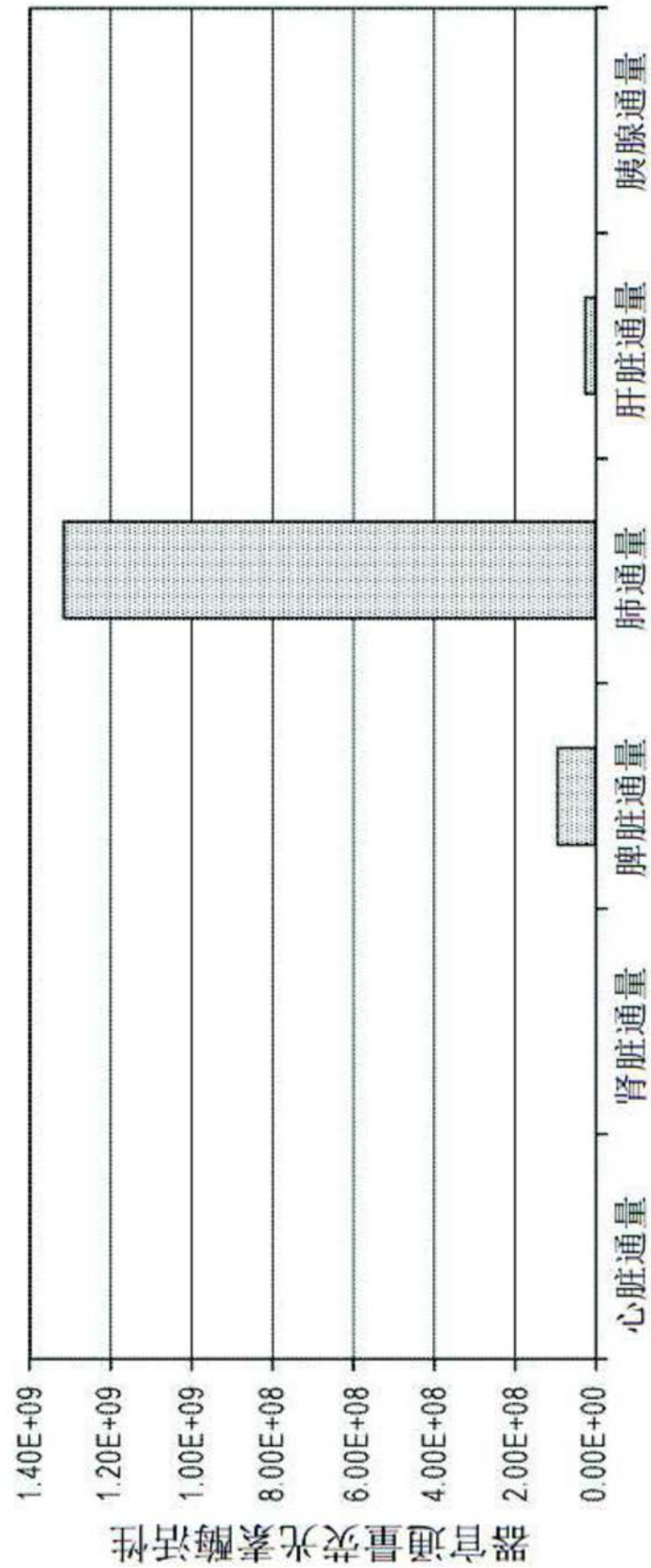


图14A

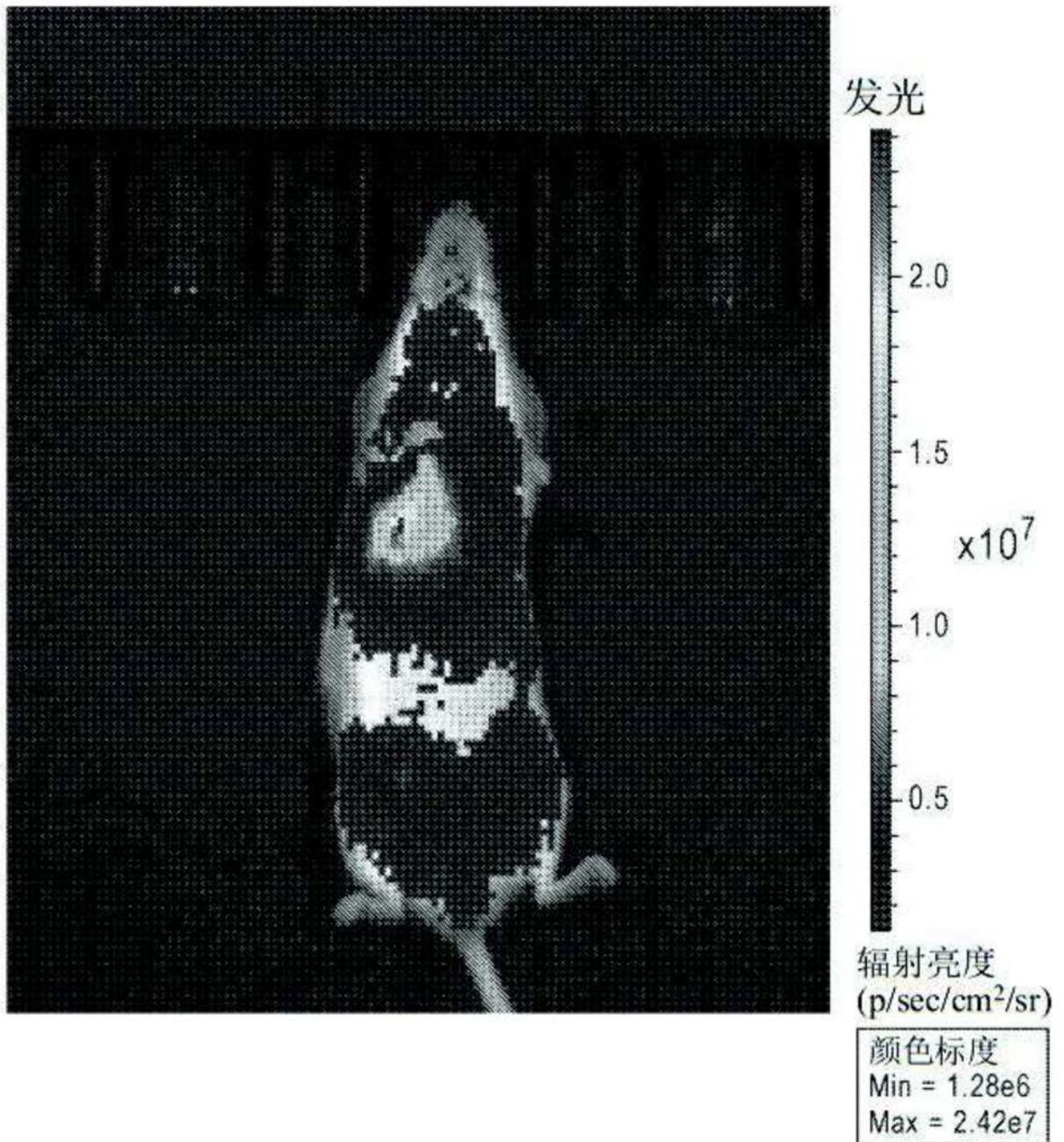


图14B

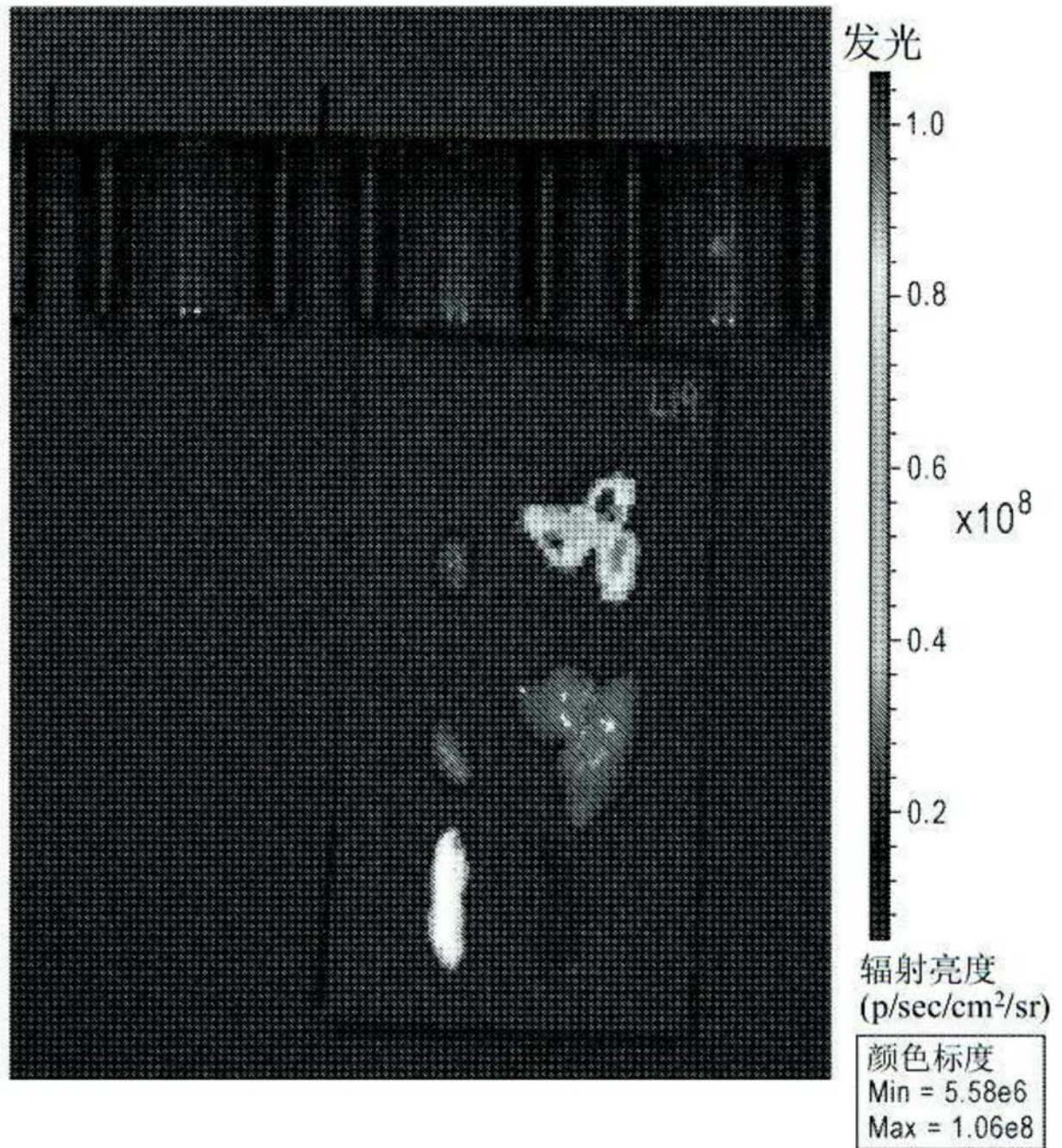


图14C

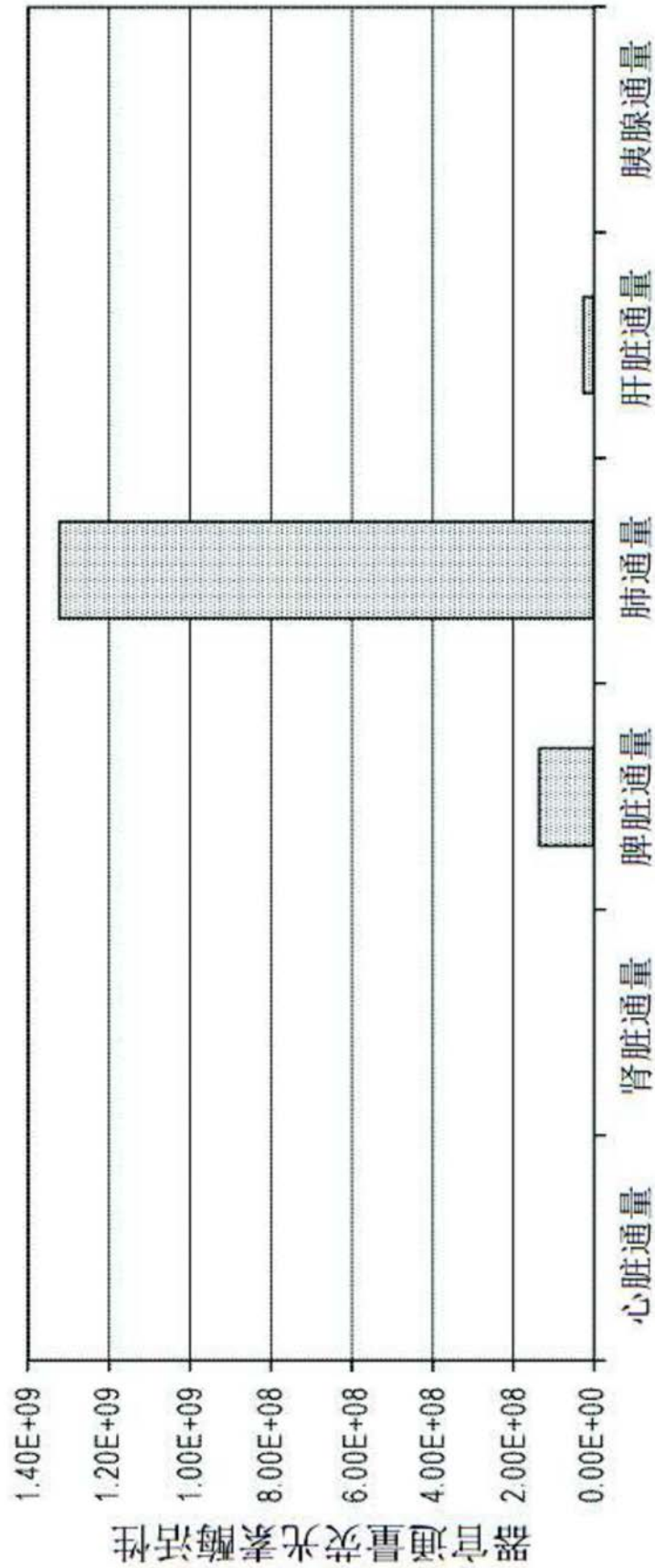


图15A

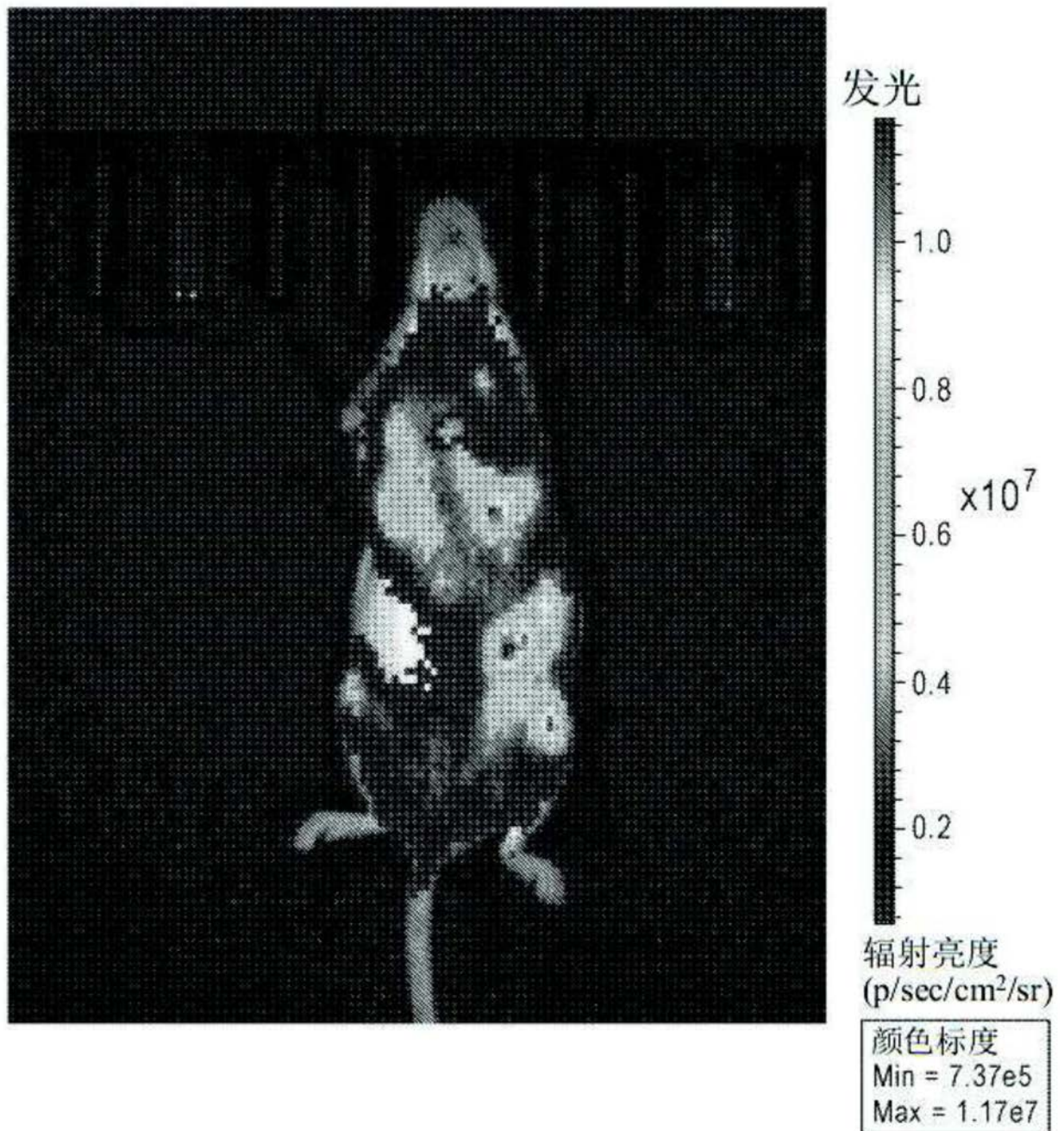


图15B

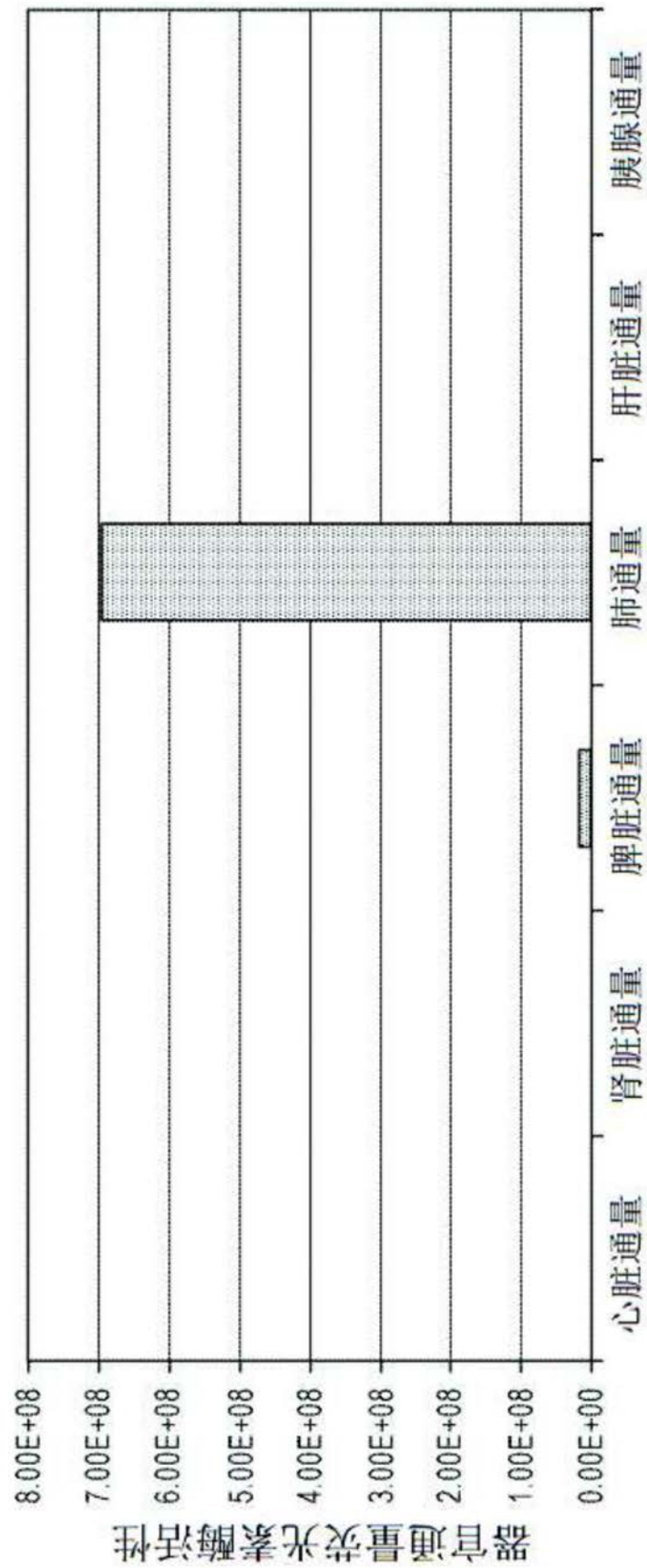


图16A

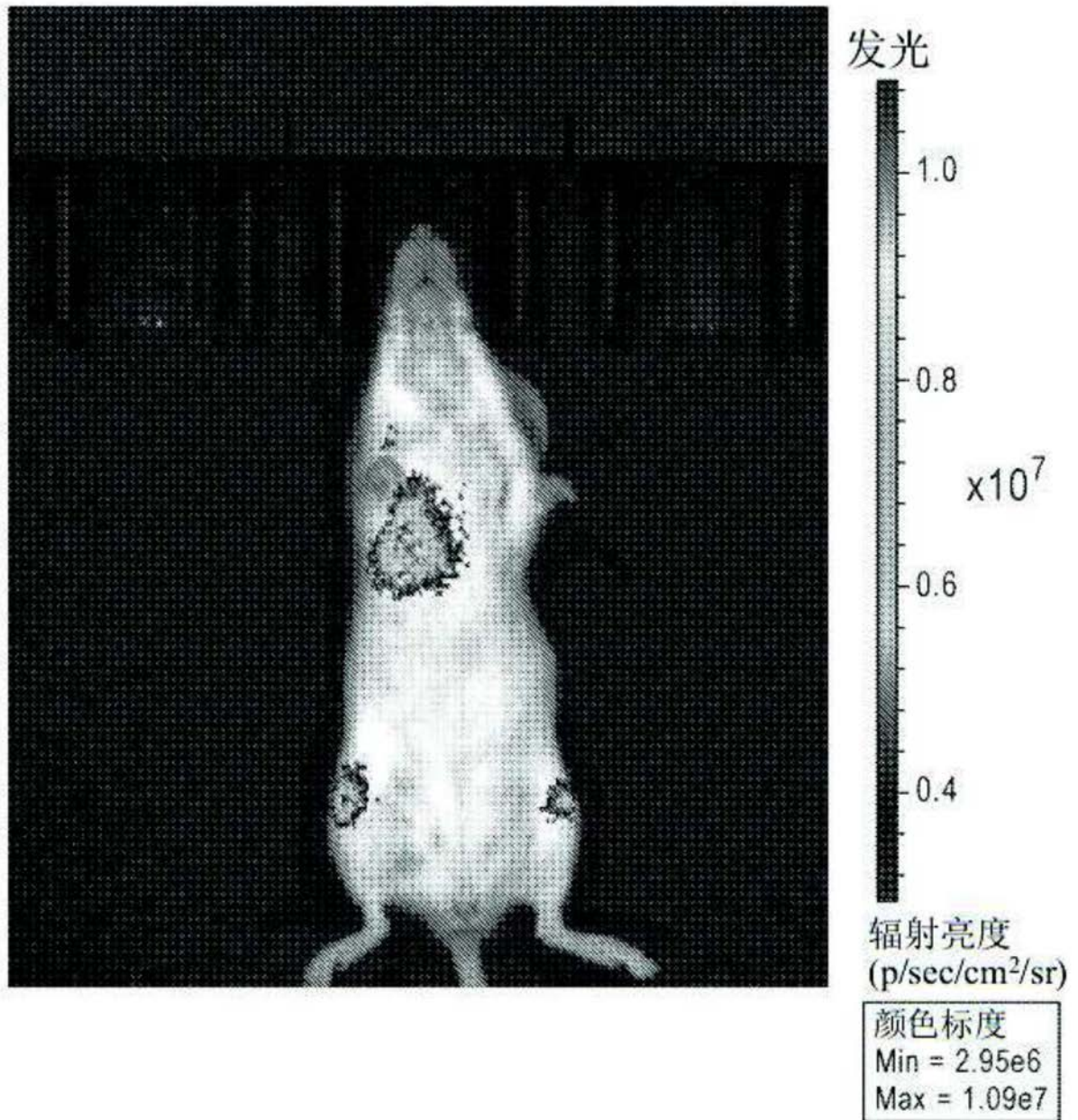


图16B

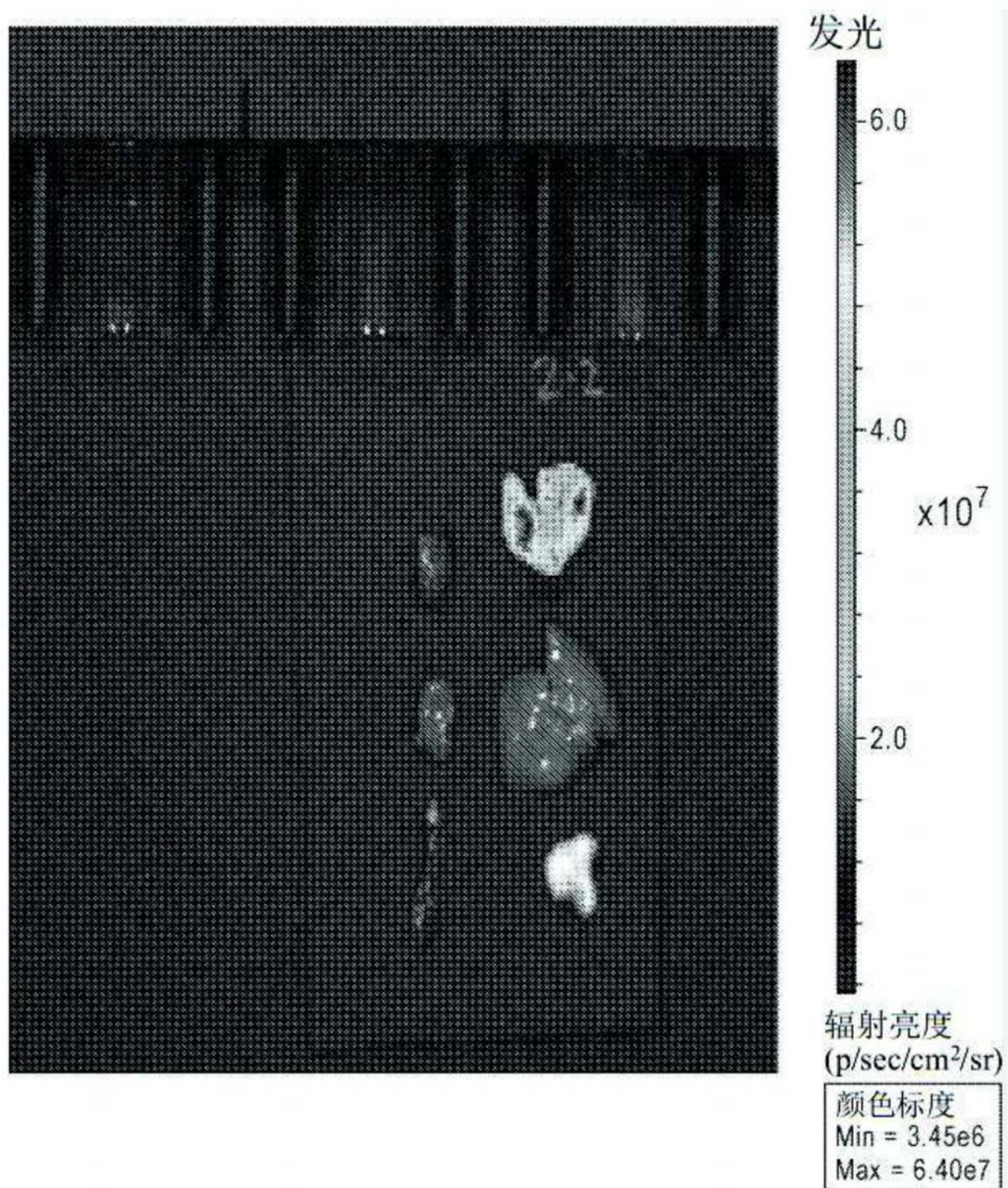


图16C

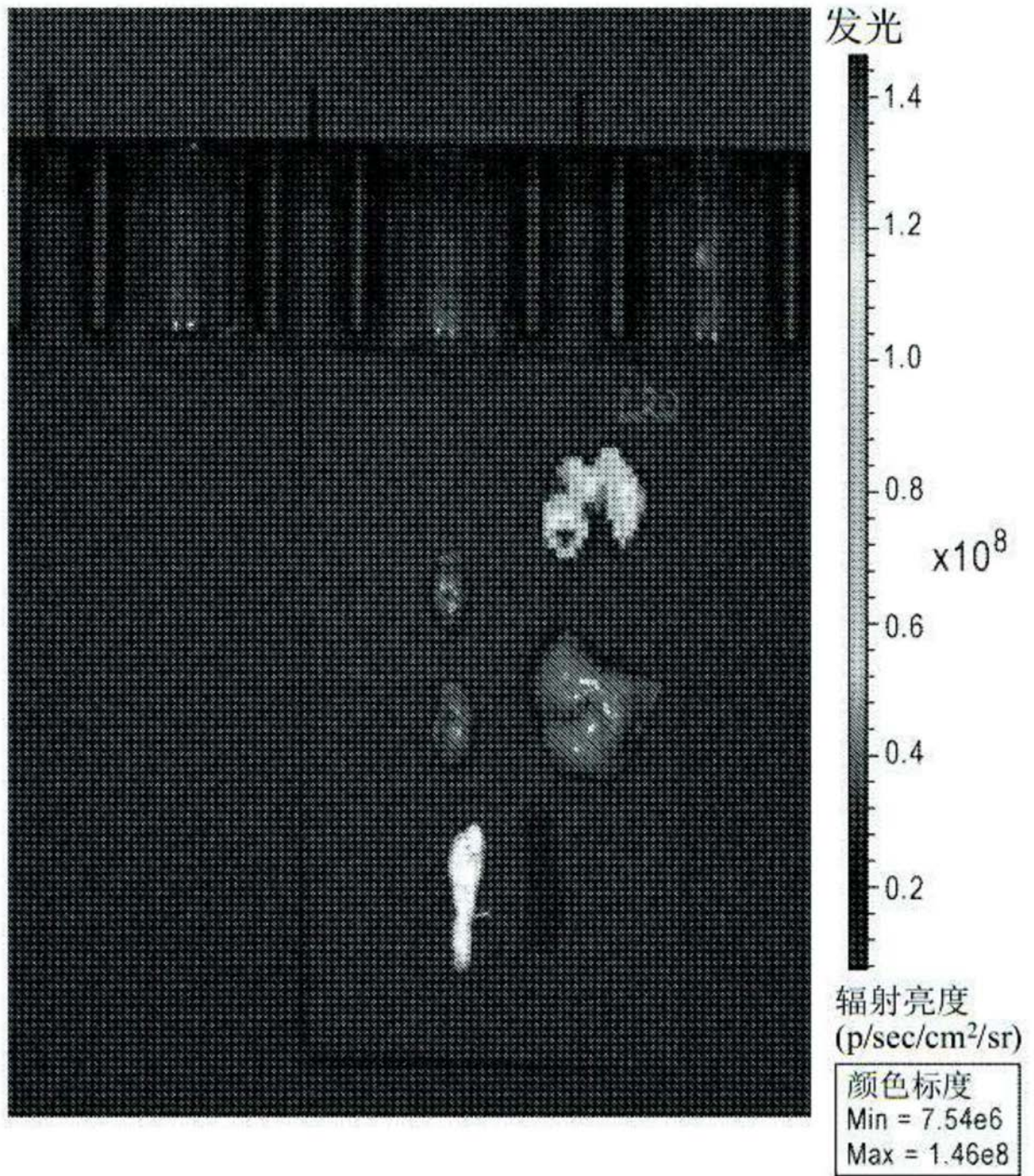


图15C

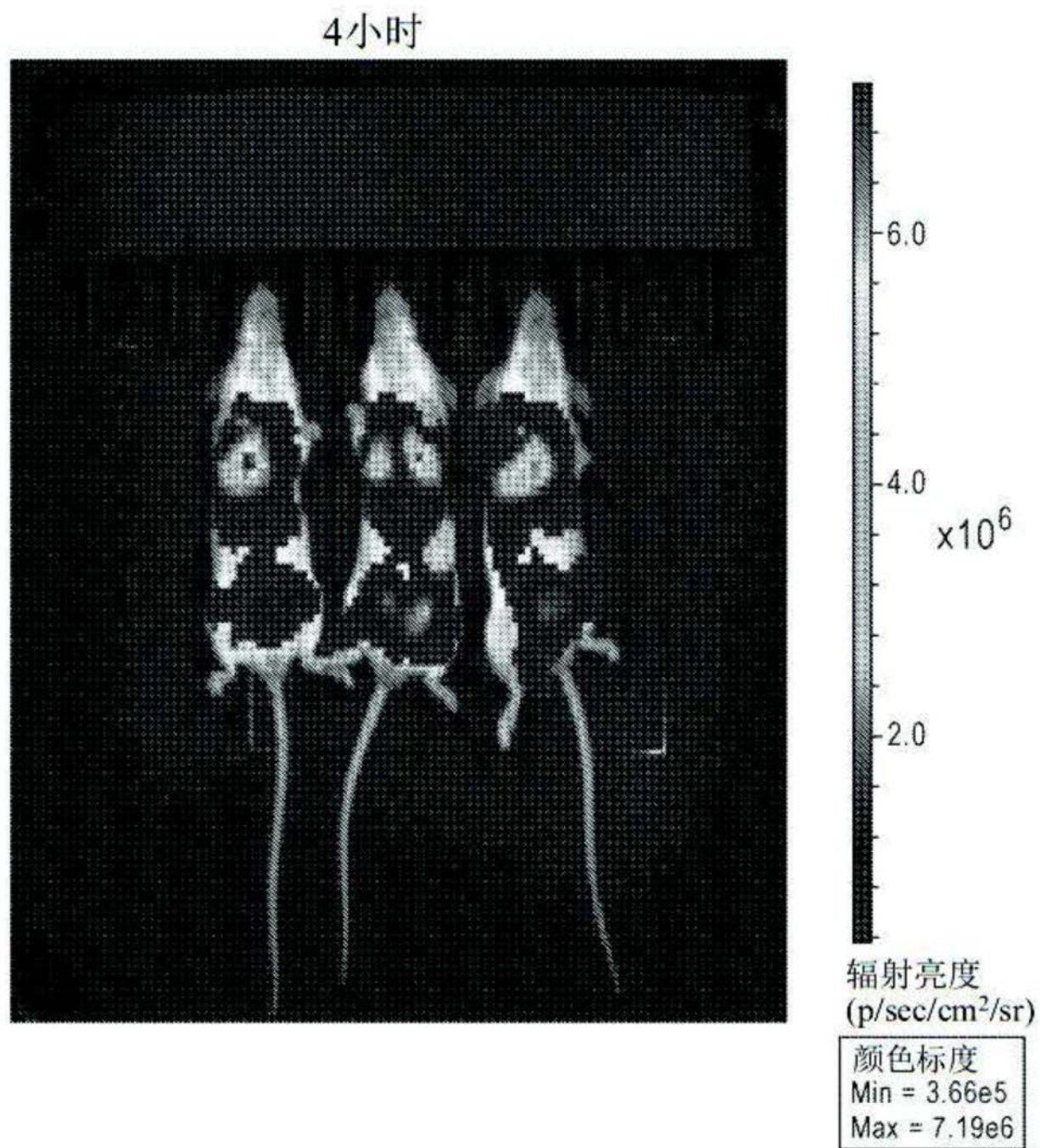


图17A

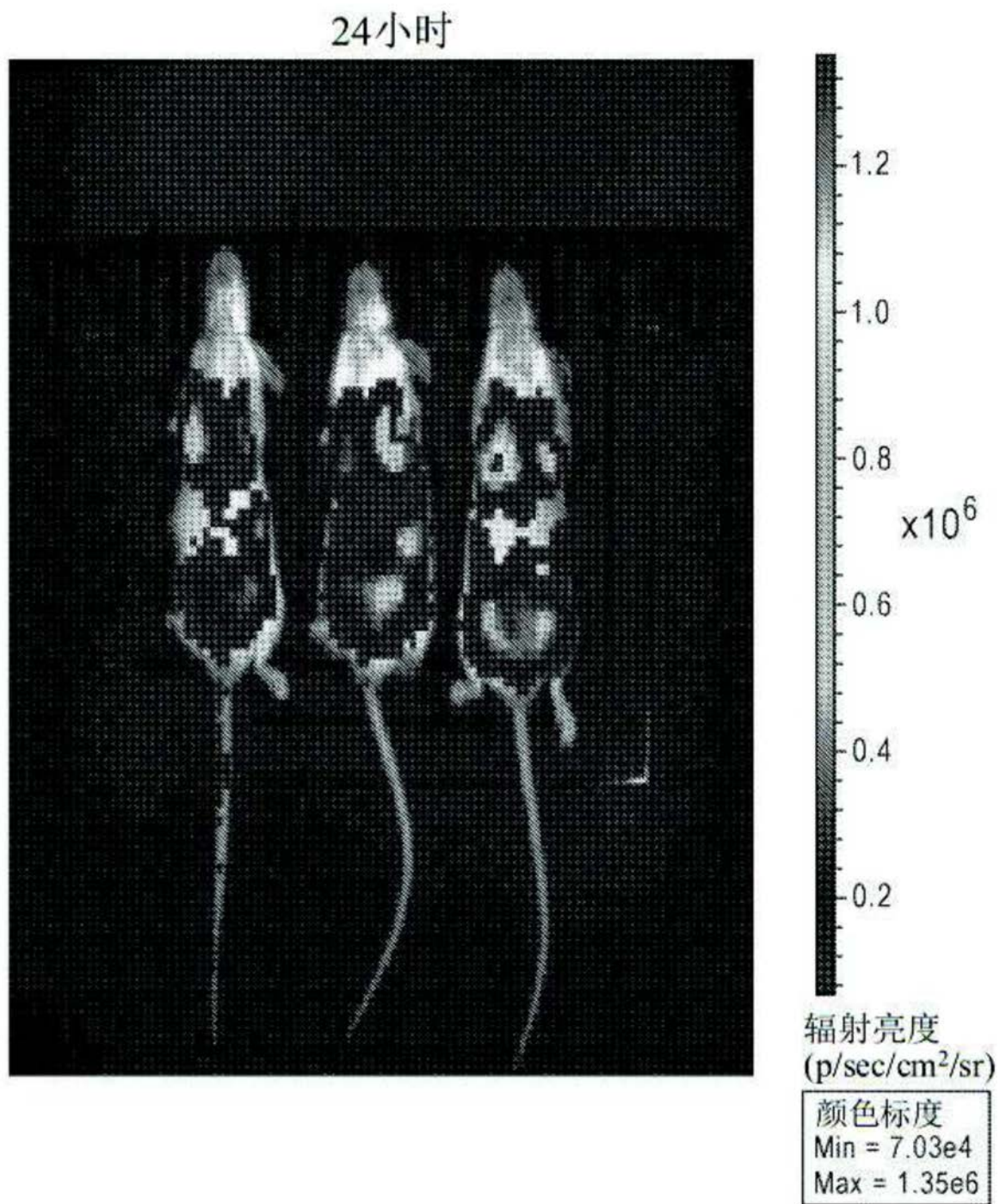


图17B

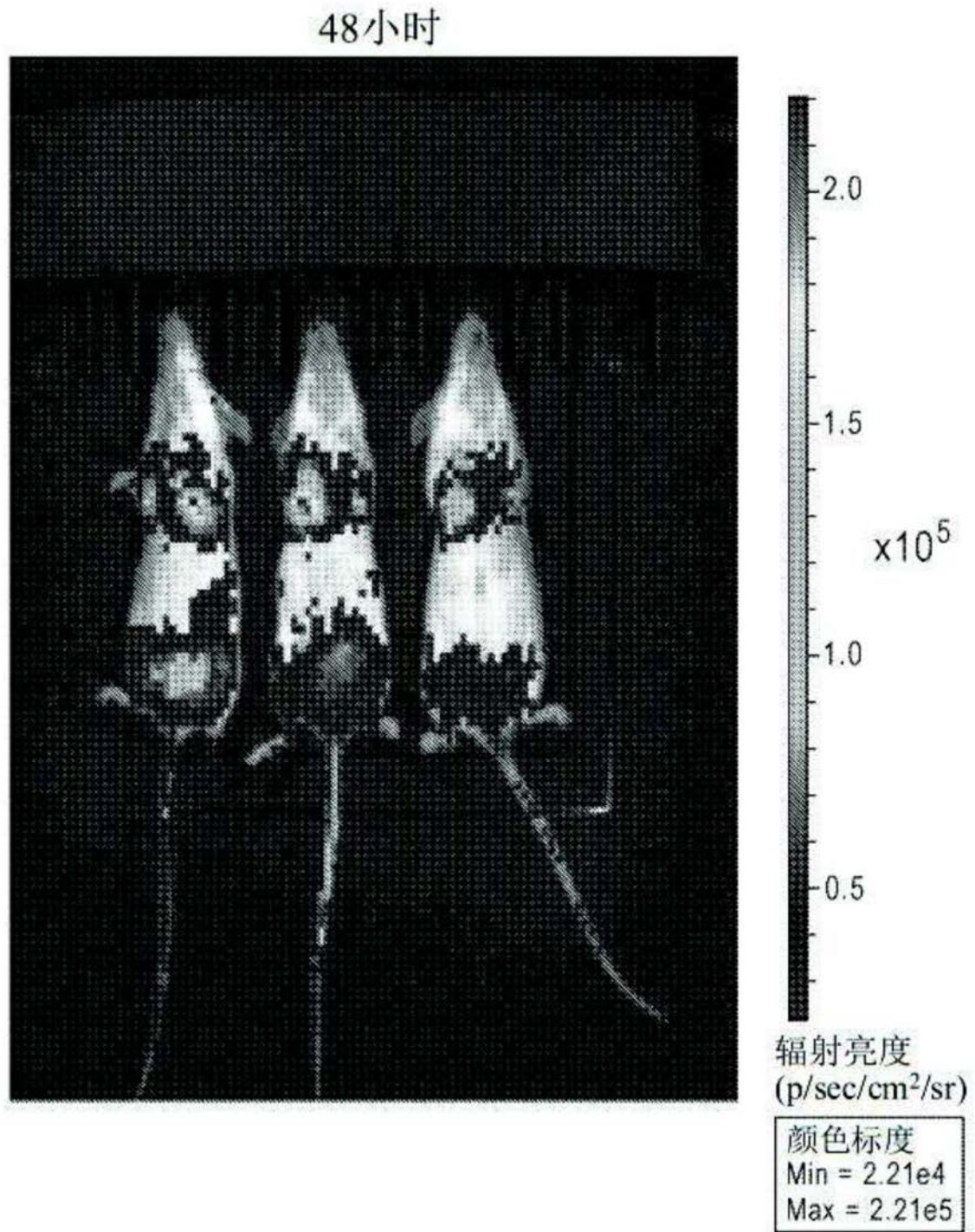


图17C

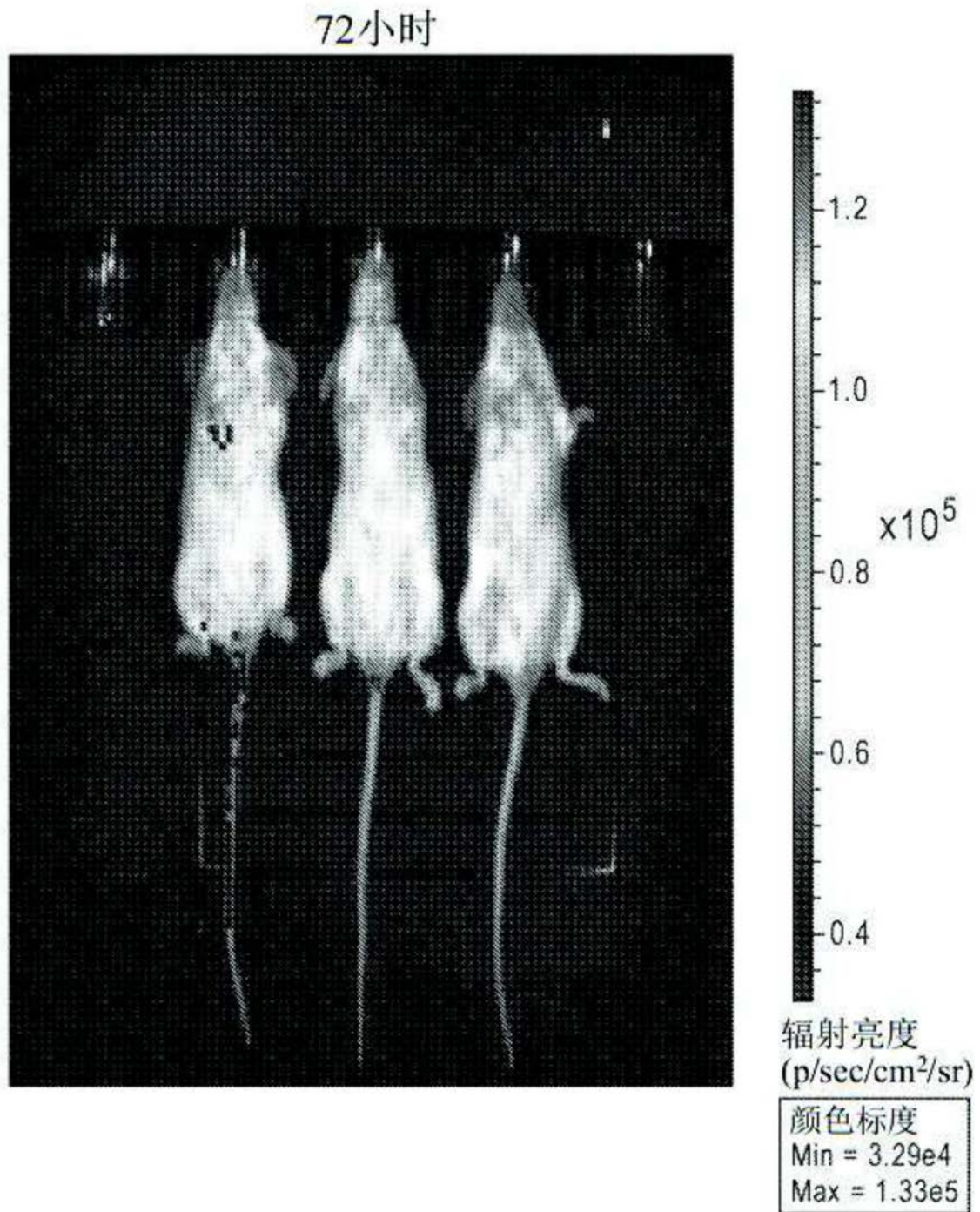


图17D

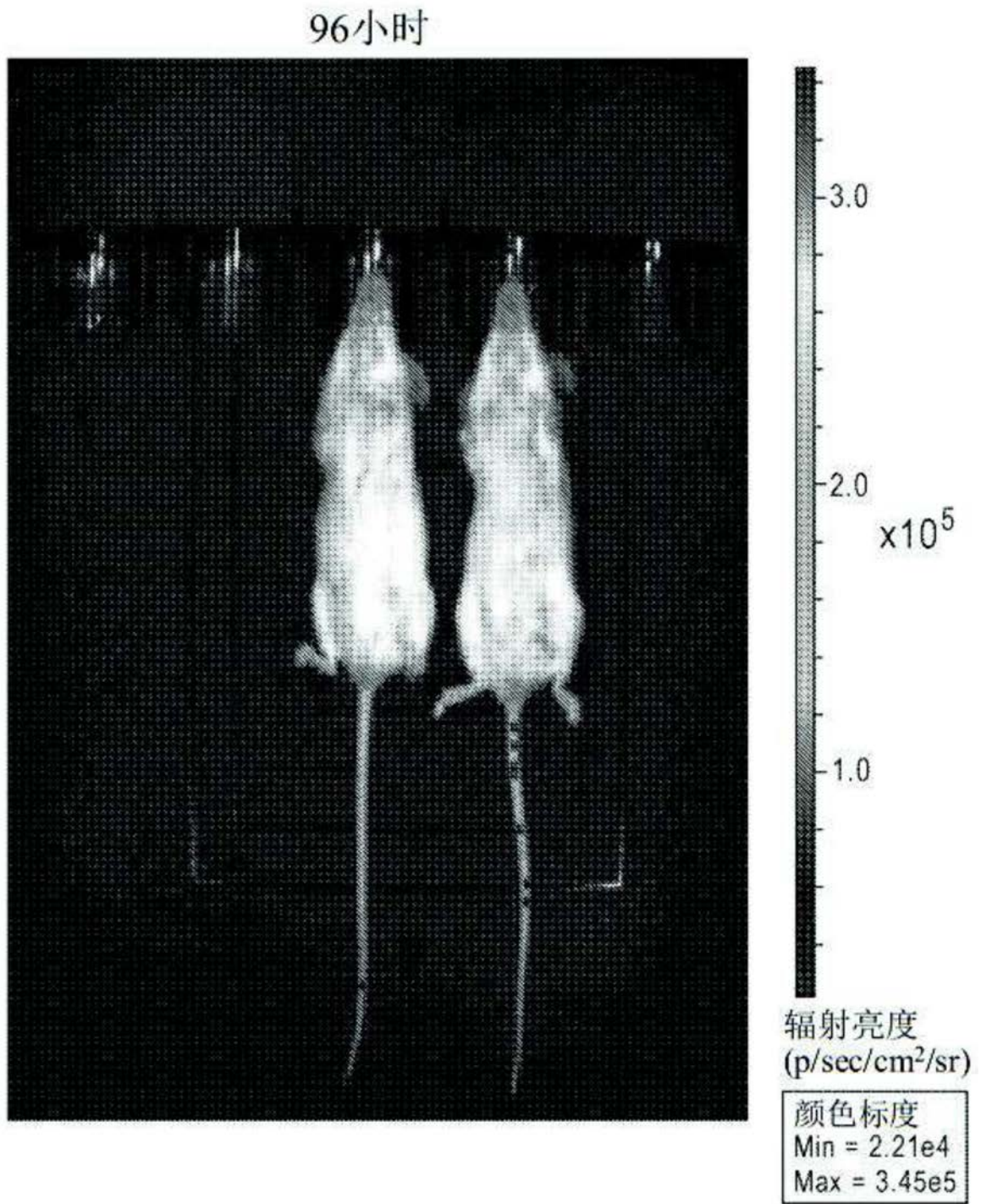


图17E

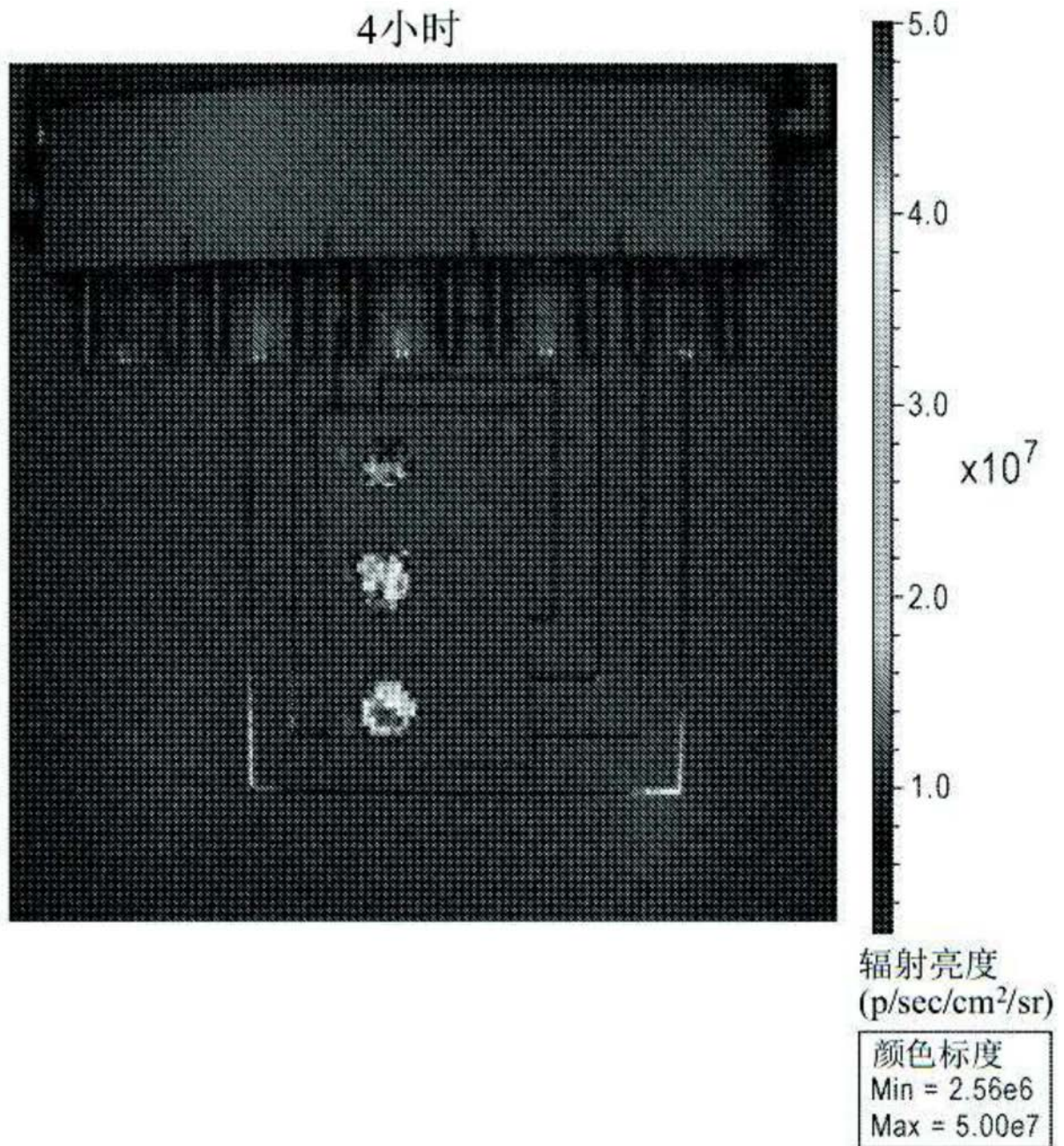


图17F

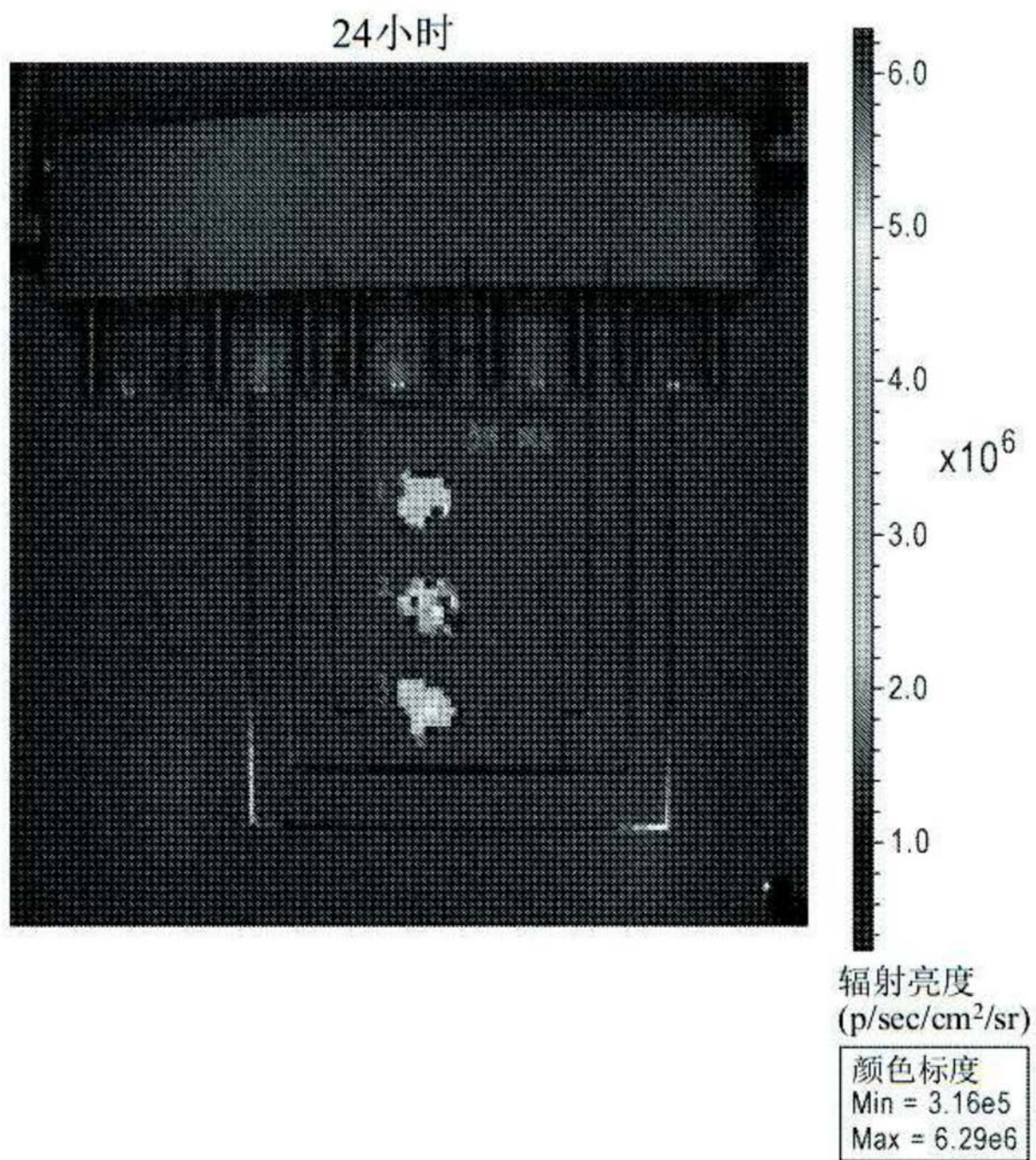


图17G

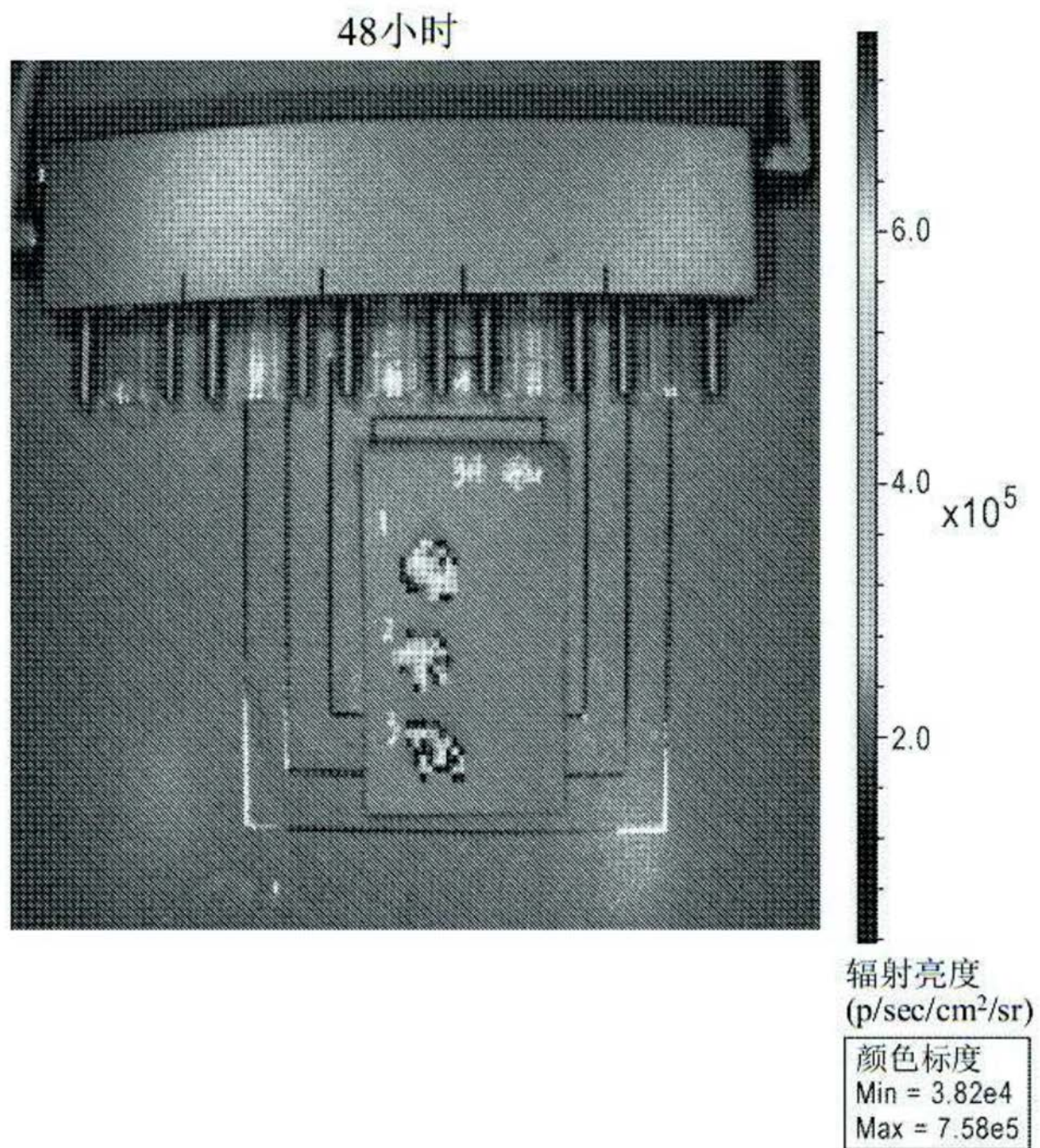


图17H

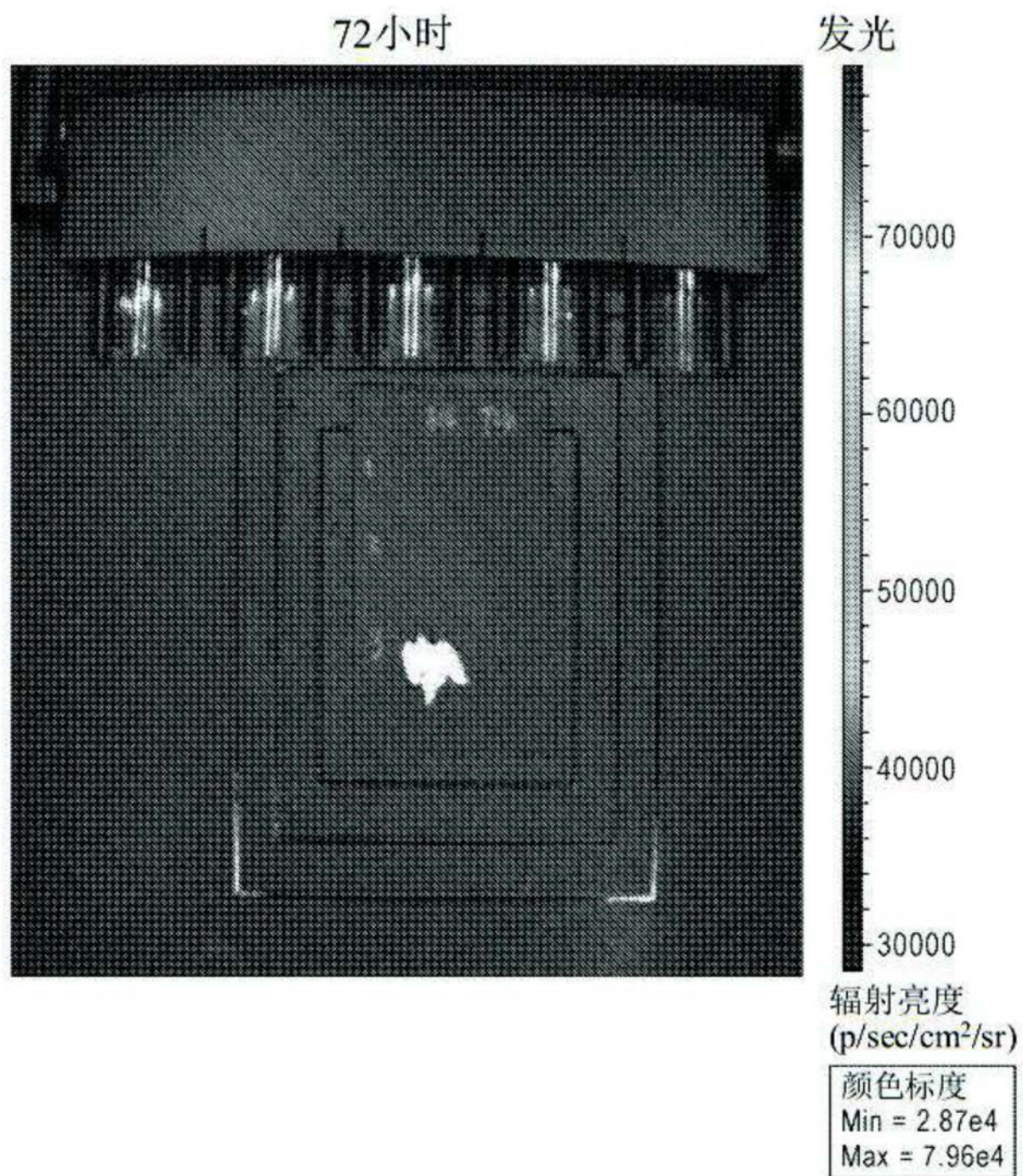


图17I

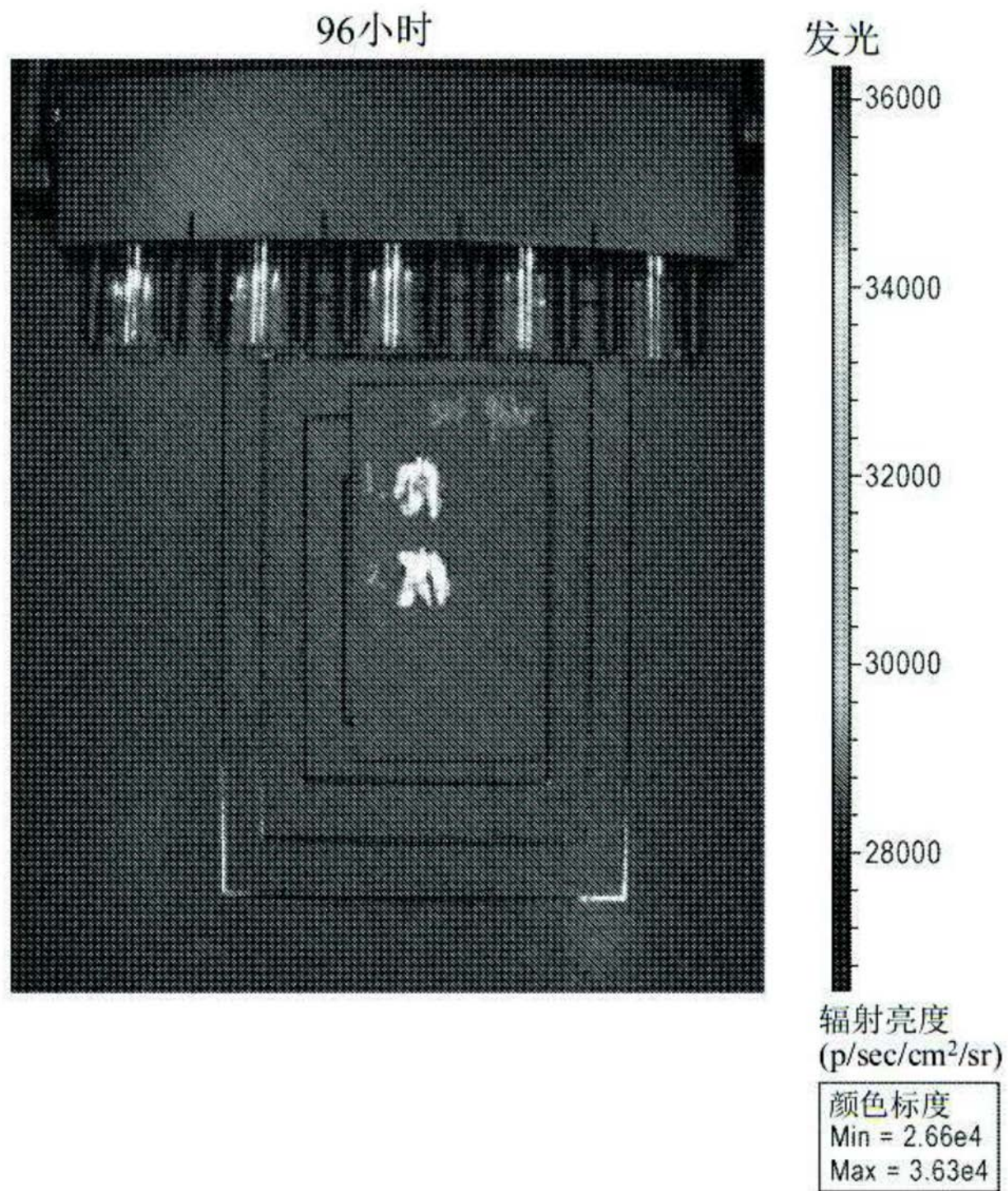


图17J

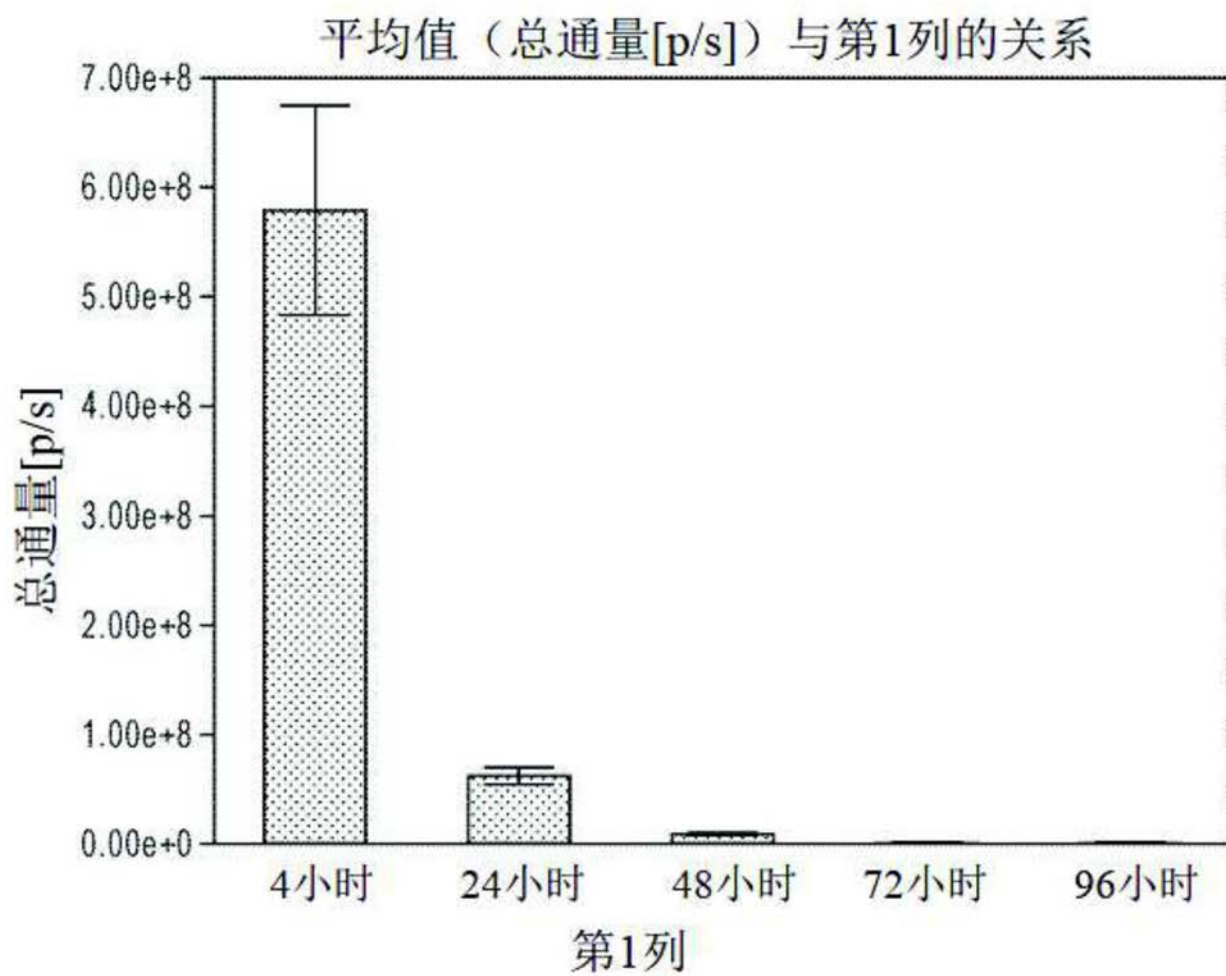


图17K

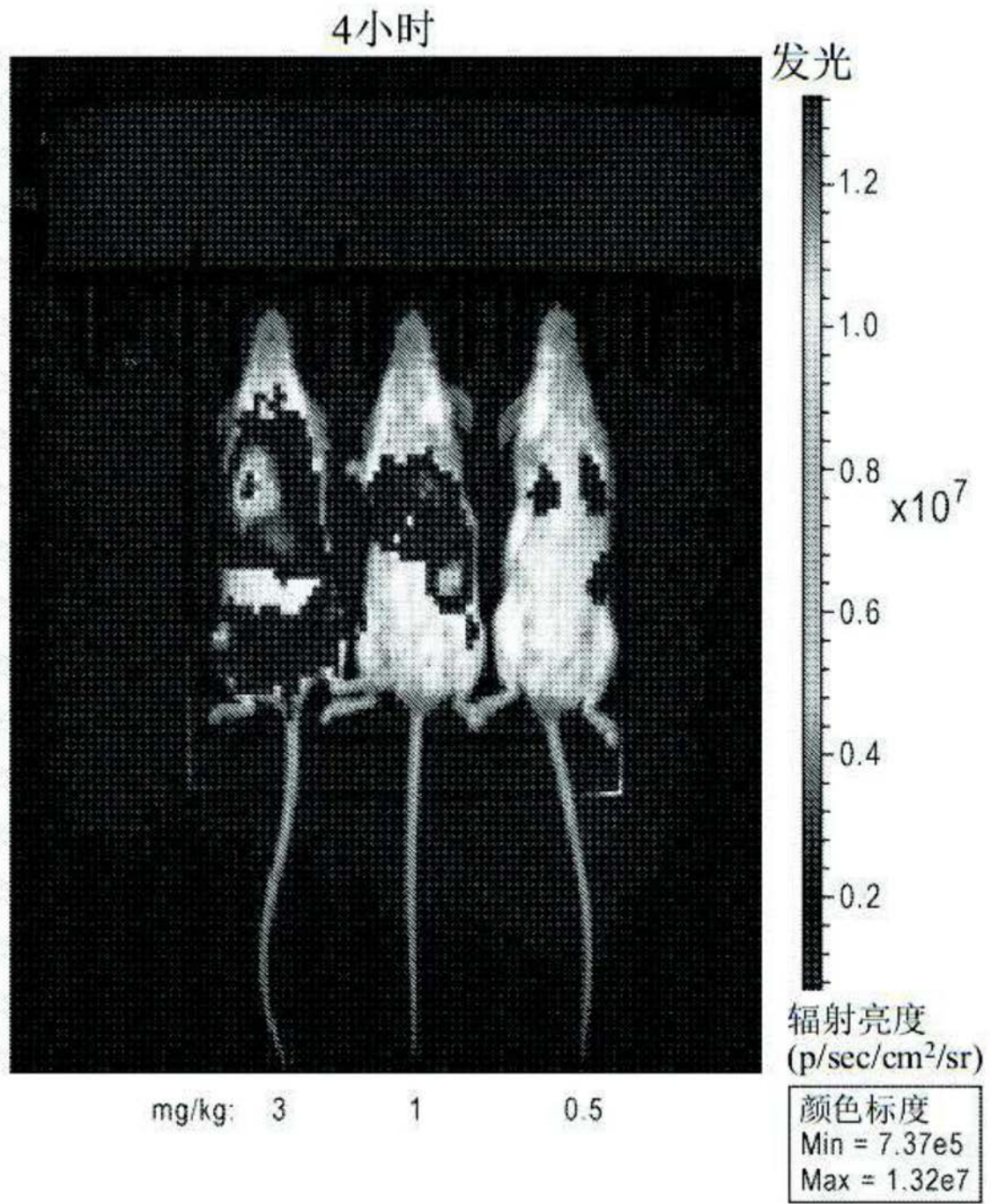


图18A

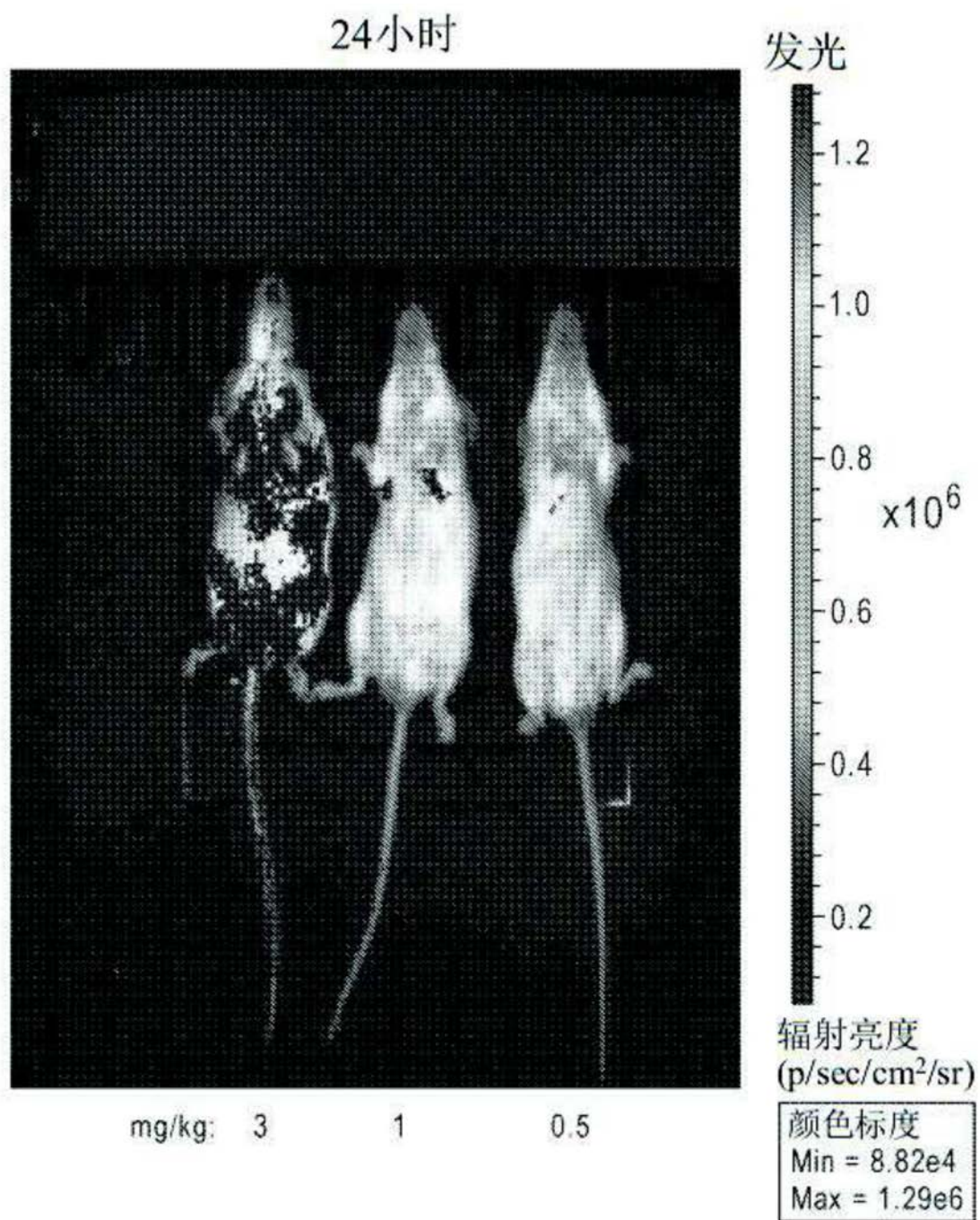


图18B

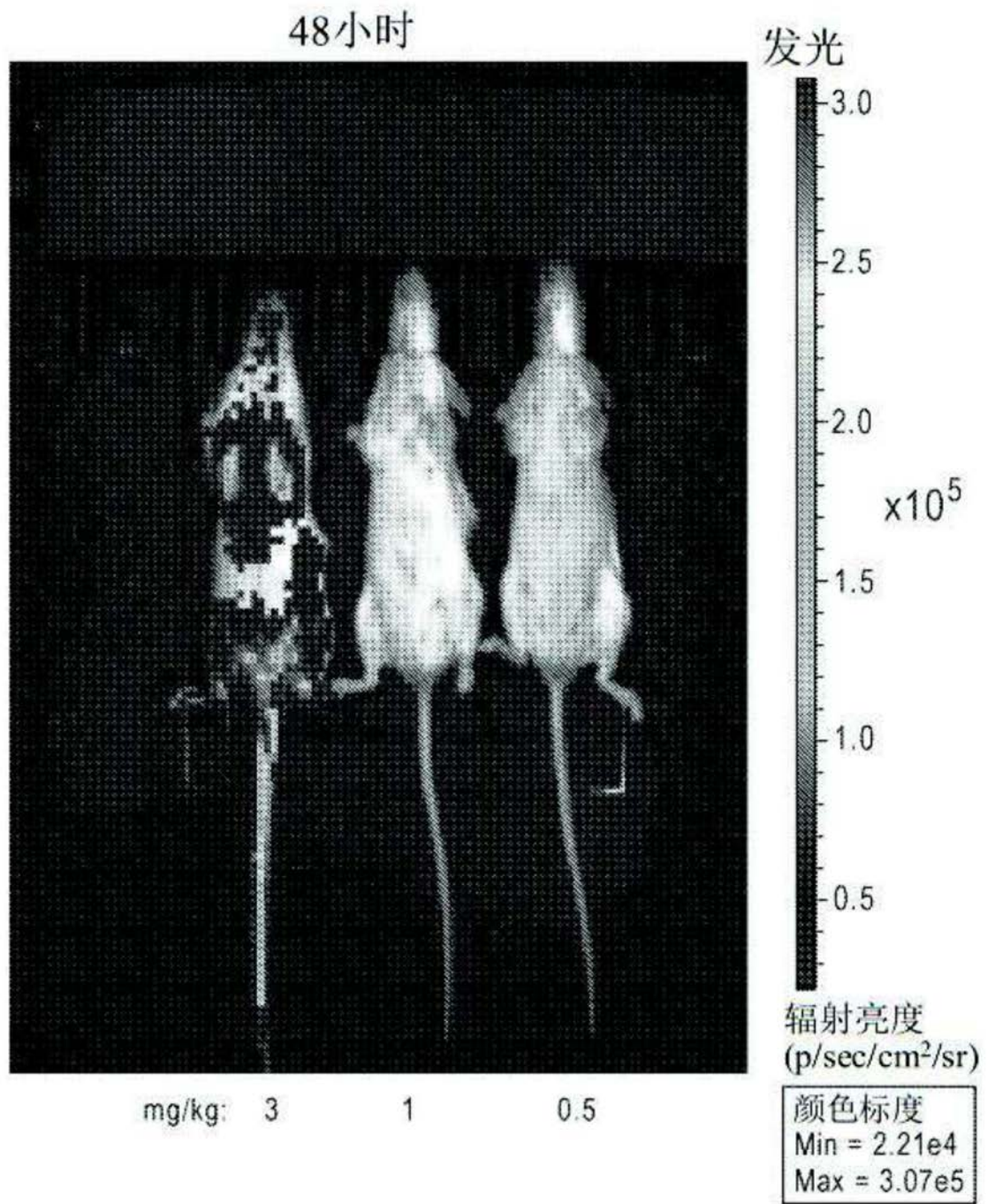


图18C

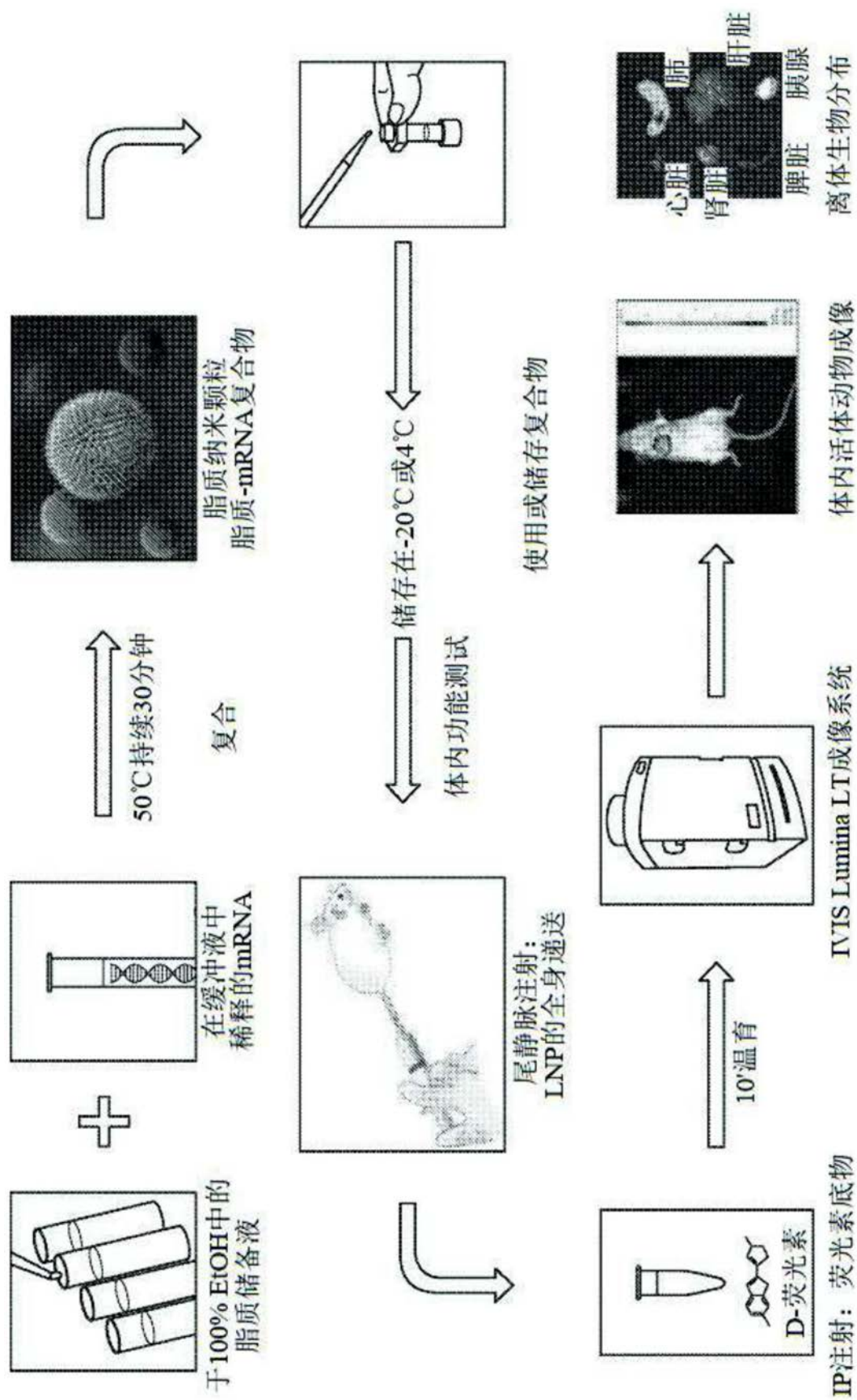


图19

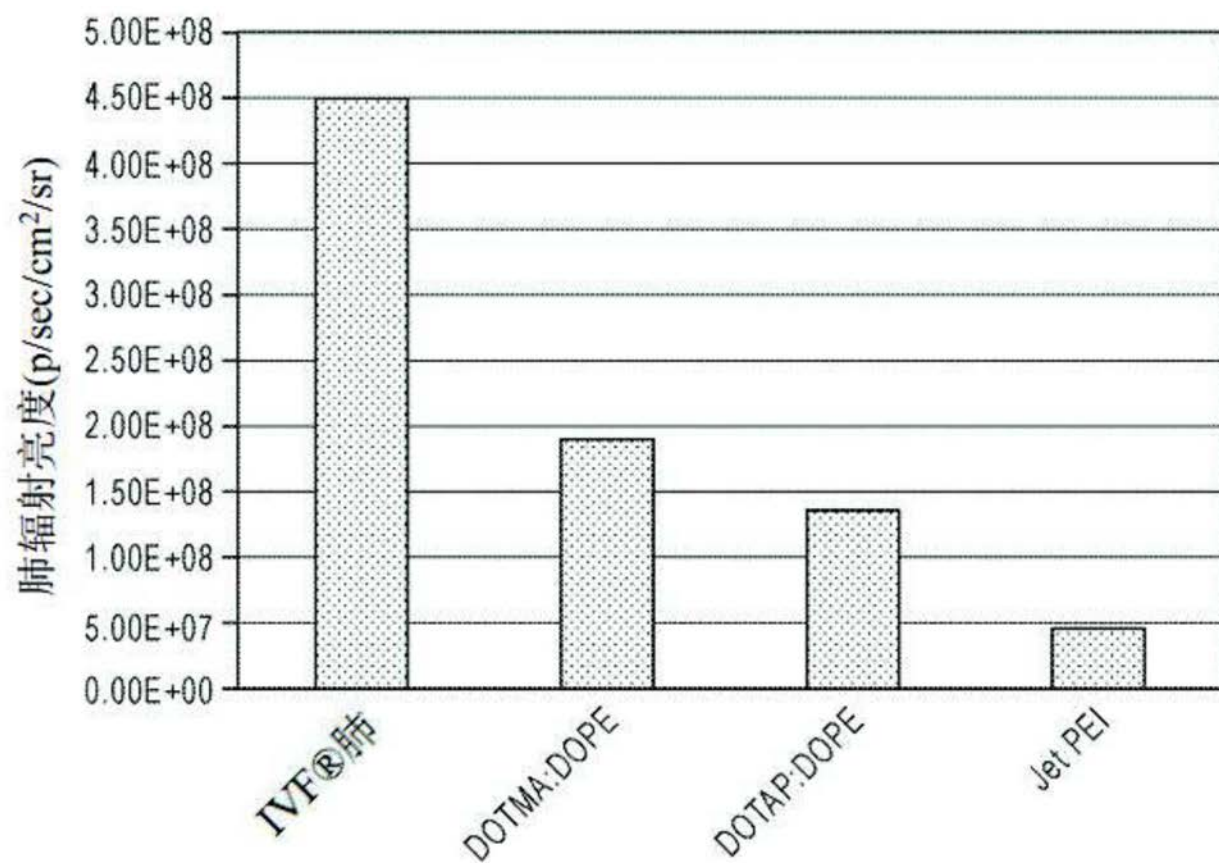


图20A

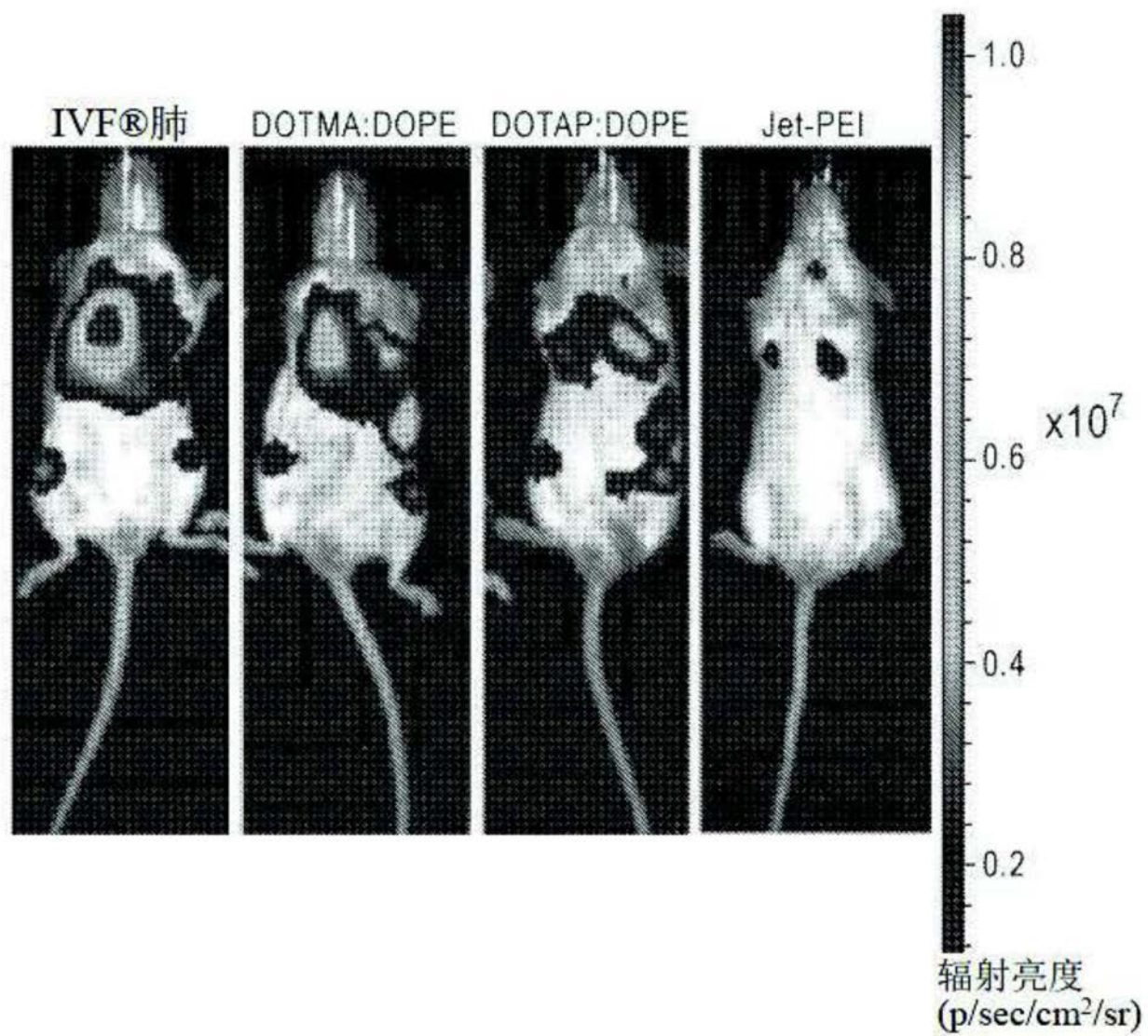


图20B

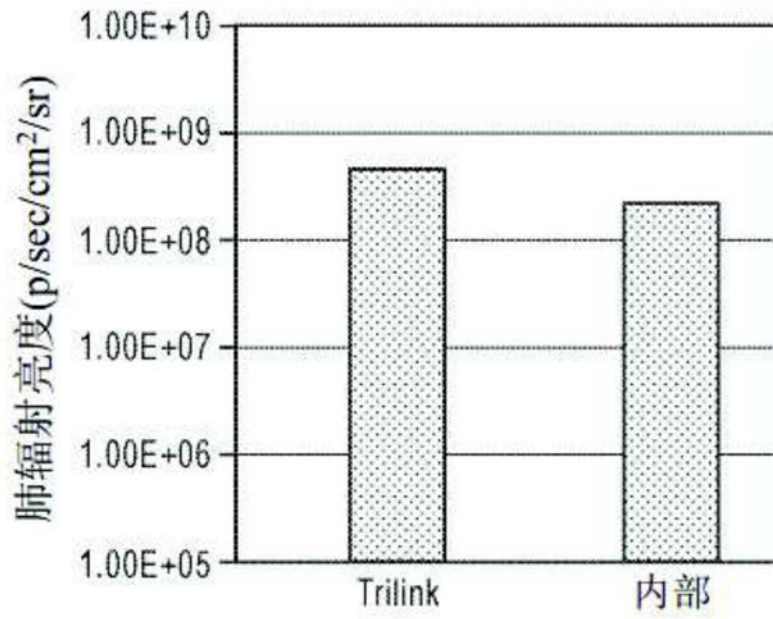


图21

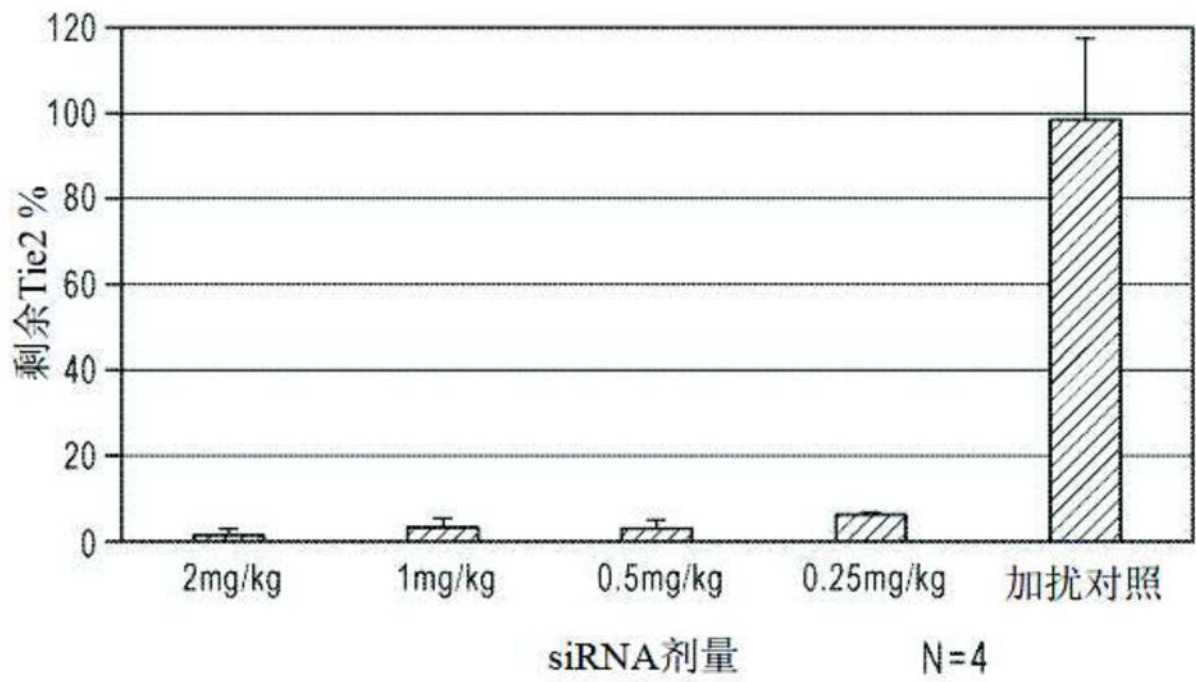


图22

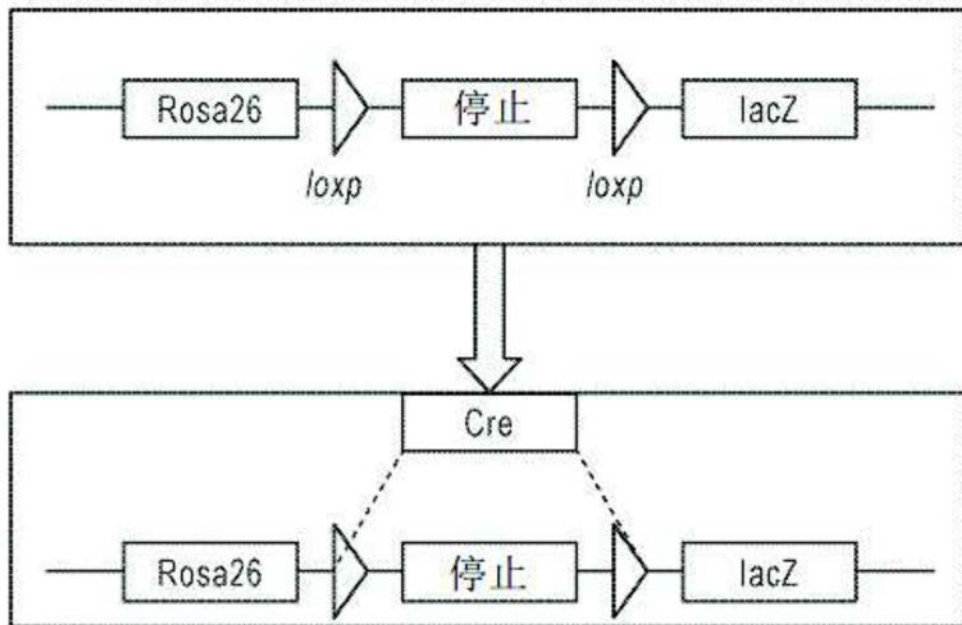


图23

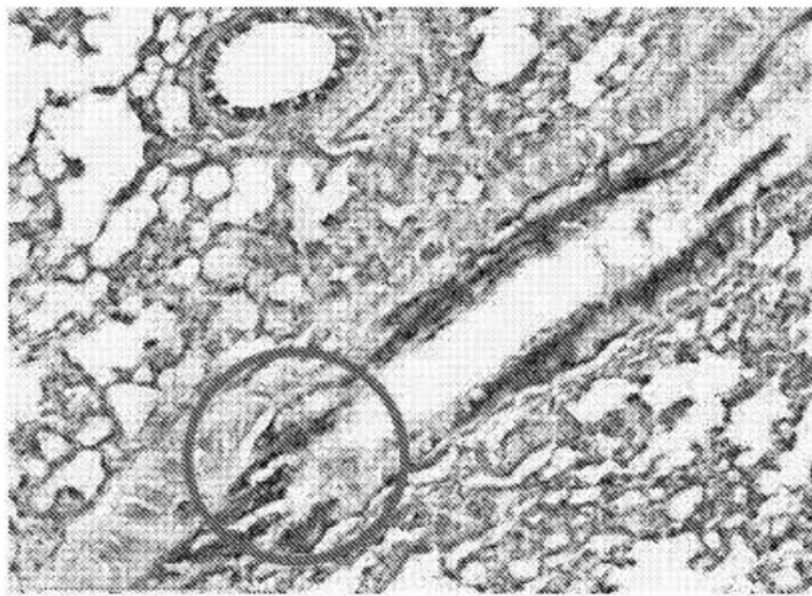


图24A



图24B

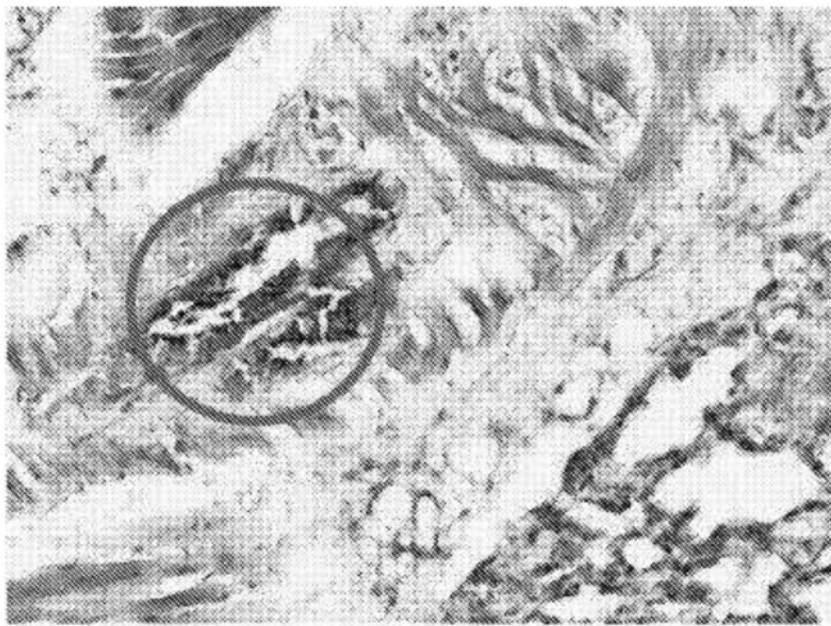


图24C

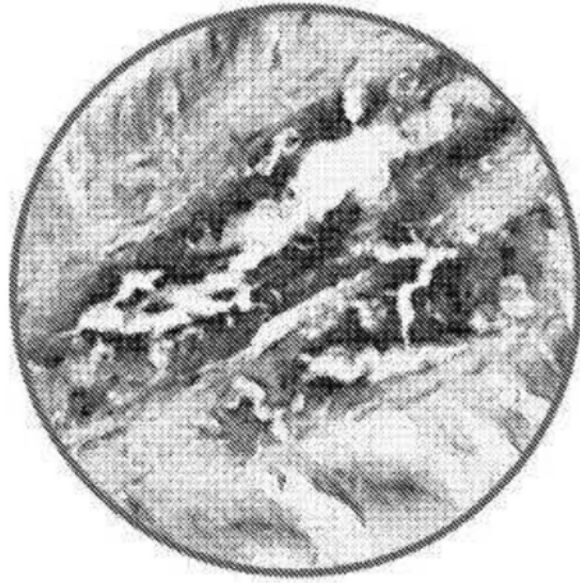


图24D

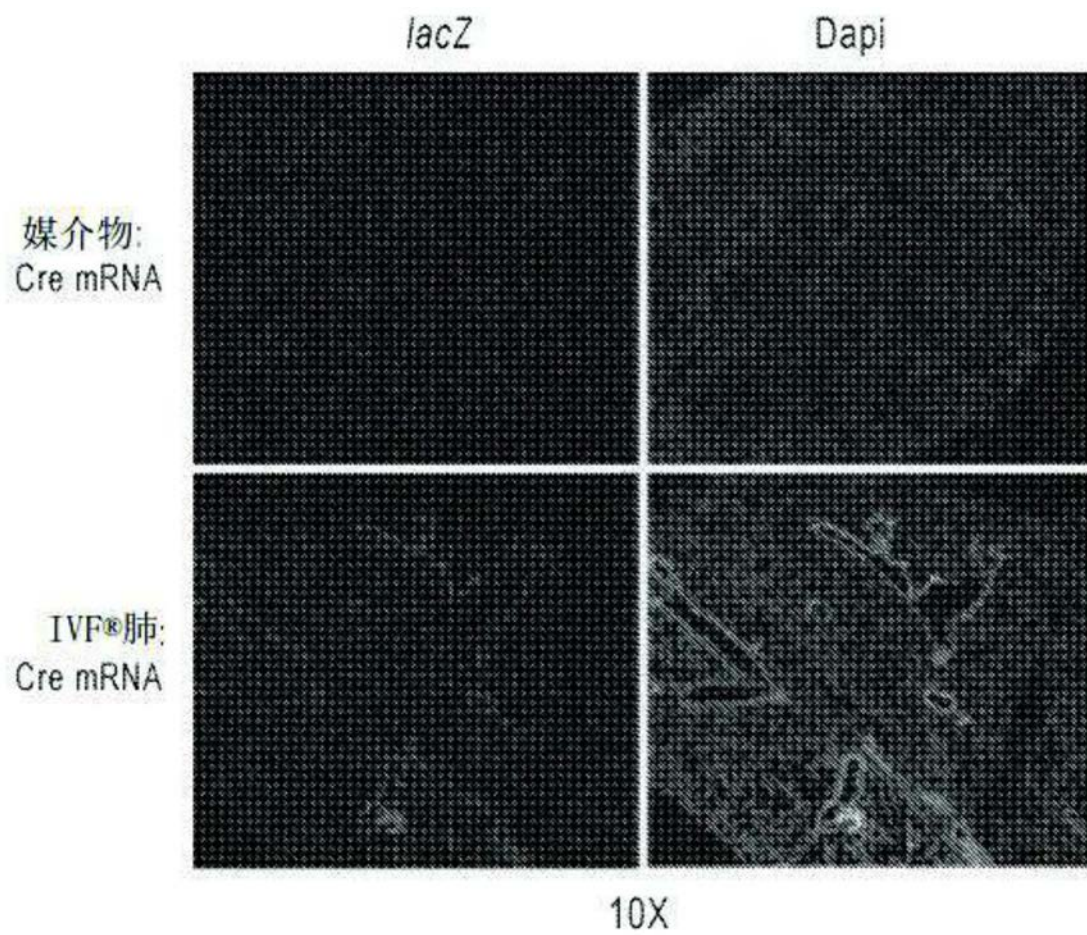


图25A

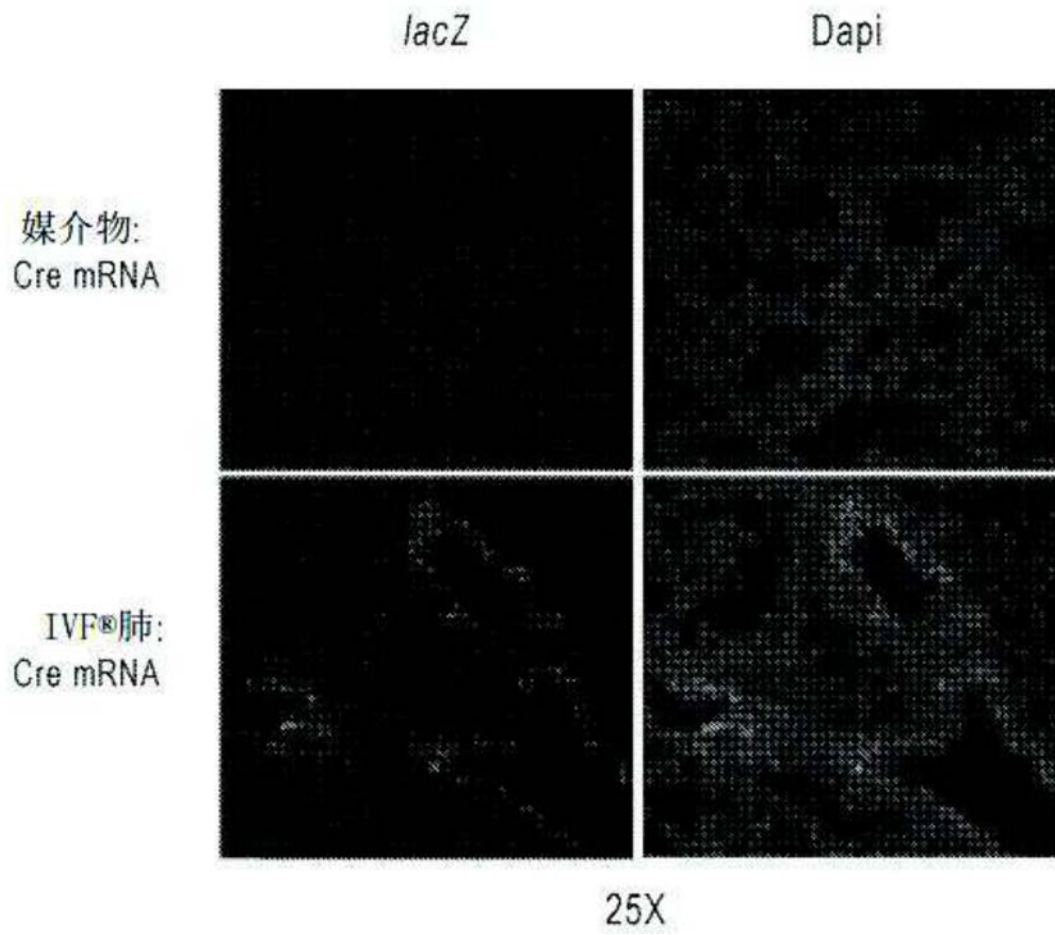


图25B

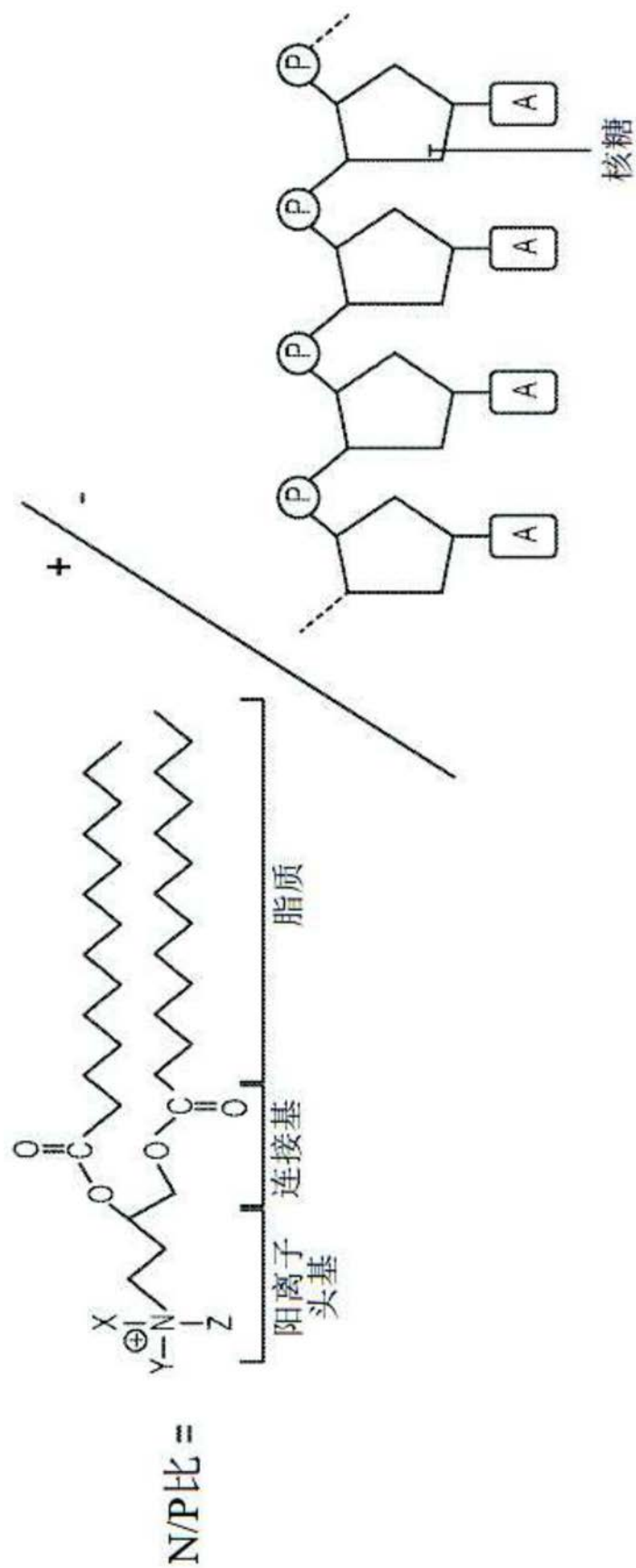


图26

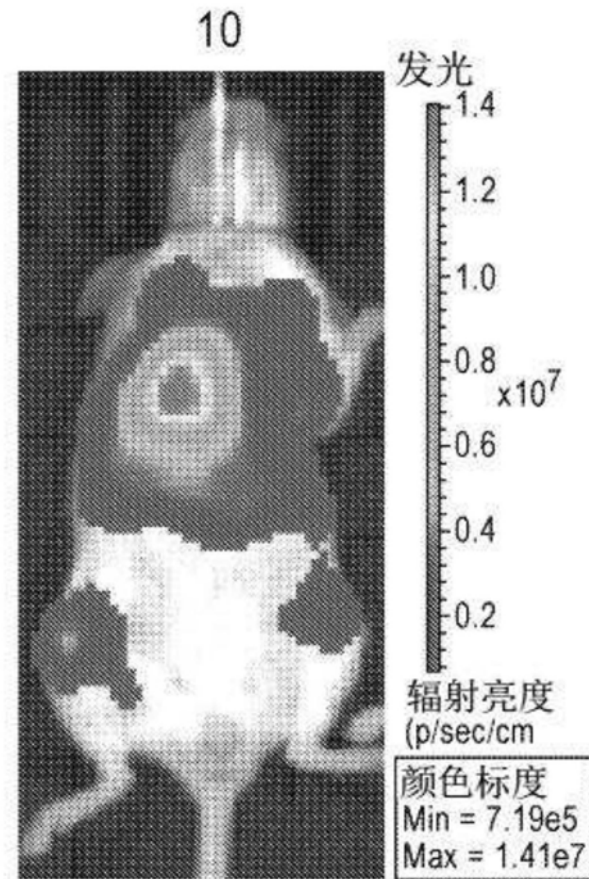


图27A

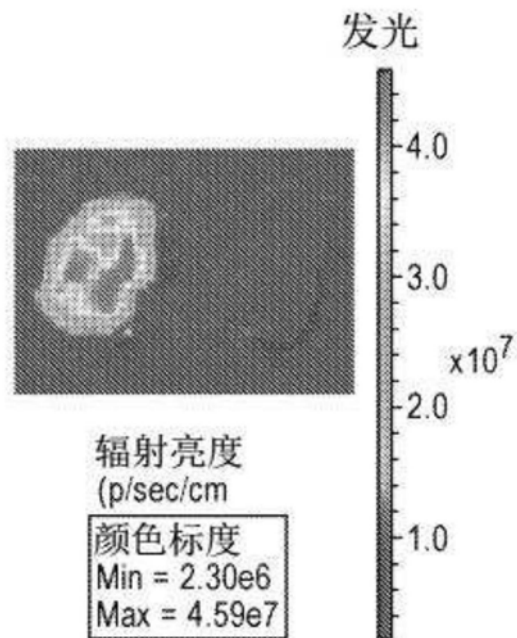


图27B

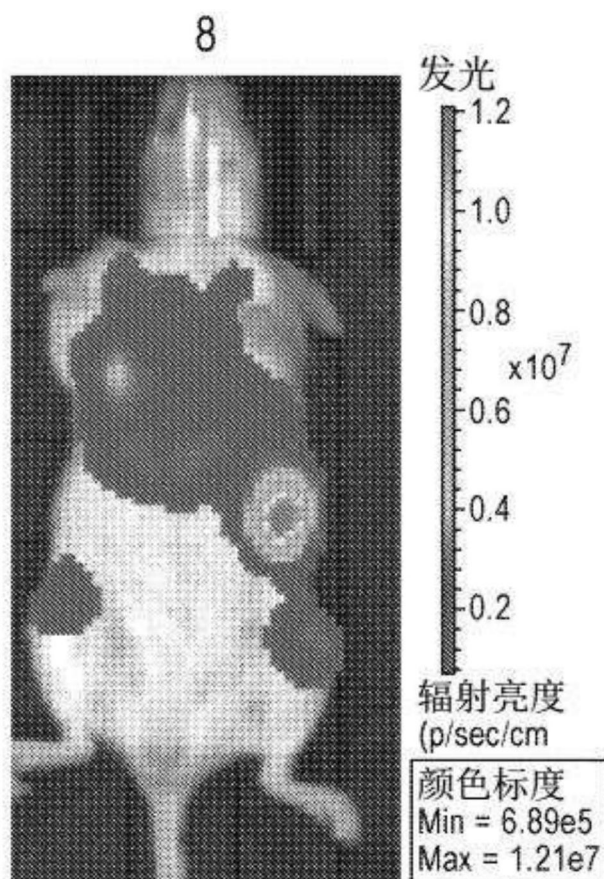


图27C

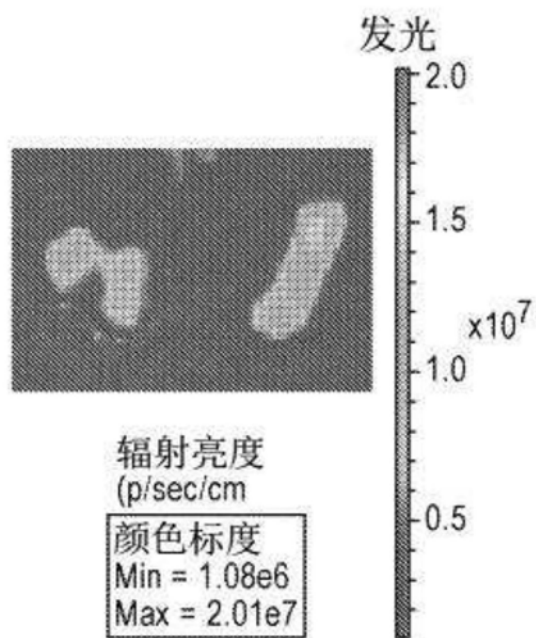


图27D

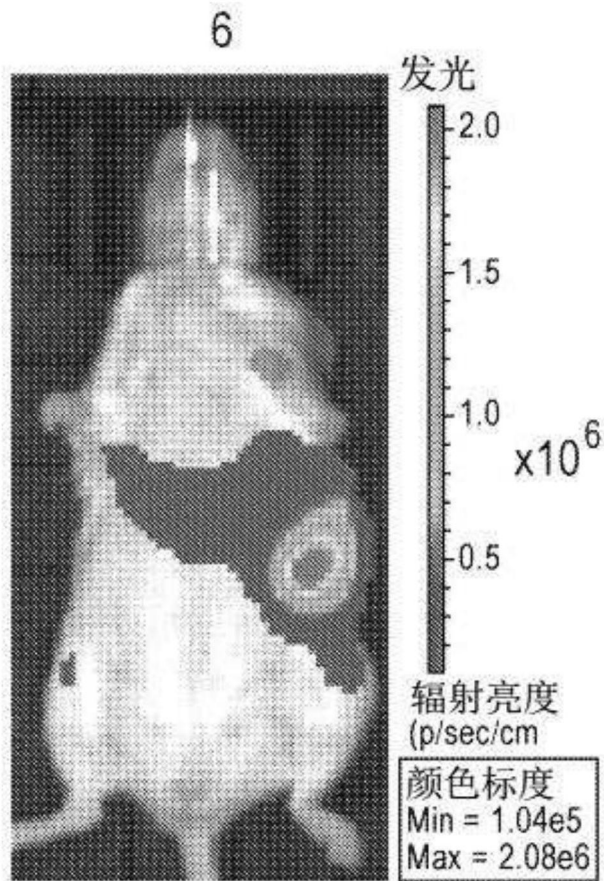


图27E

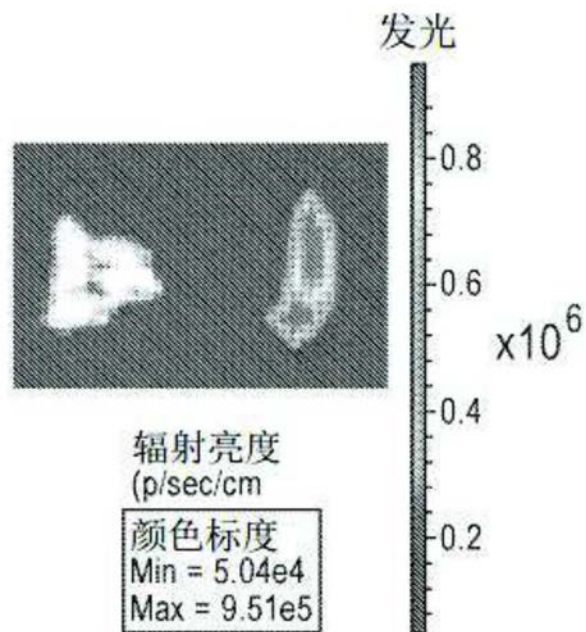


图27F

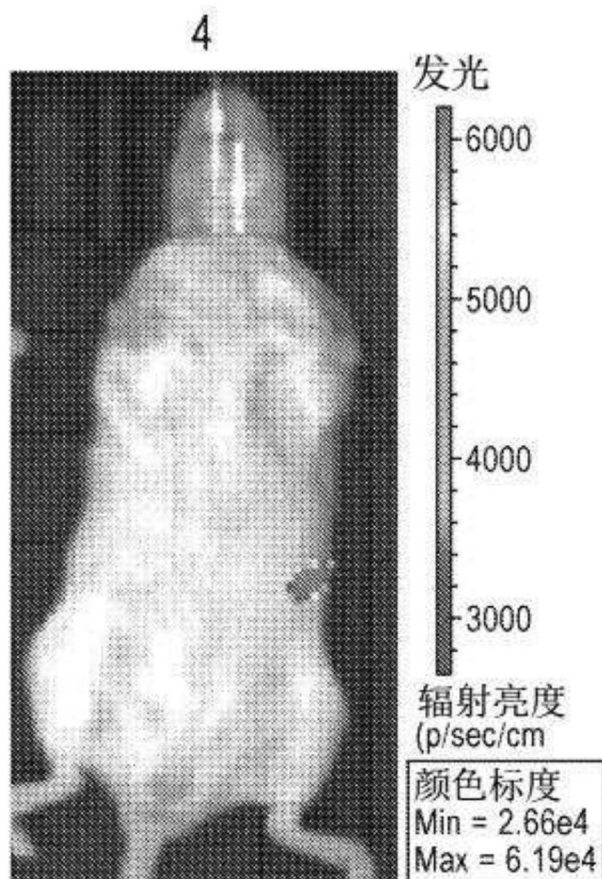


图27G

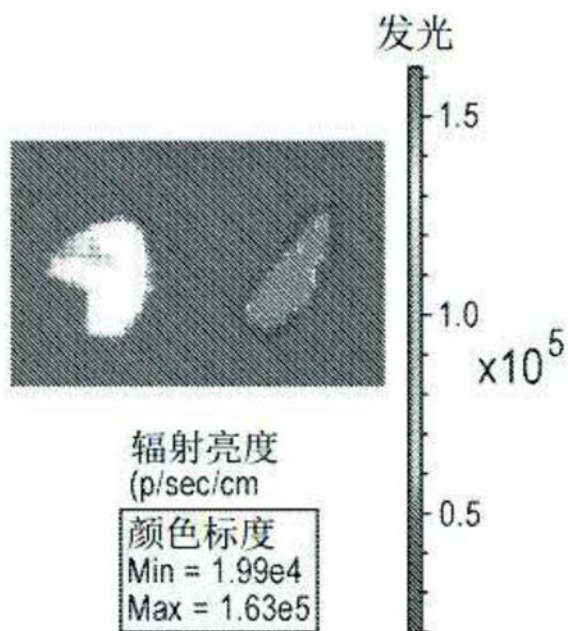


图27H

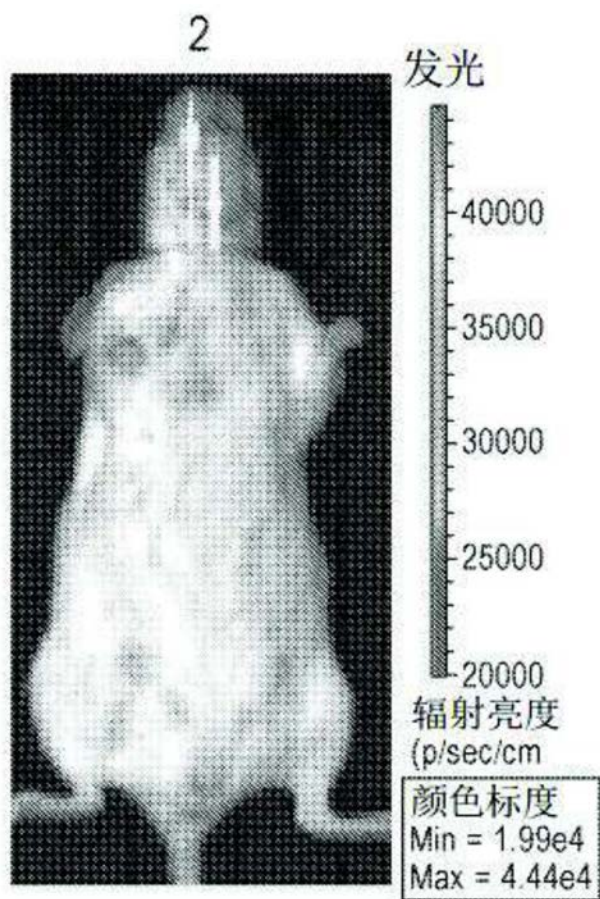


图27I

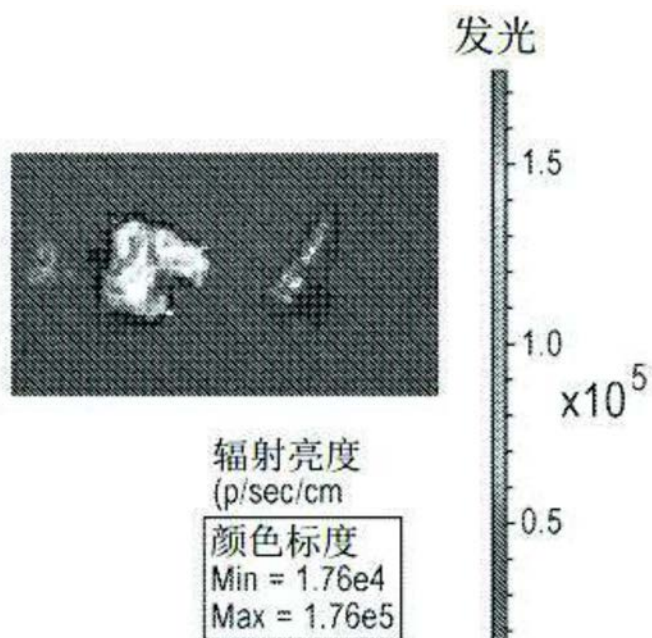


图27J

4 (侧视图)



图27K

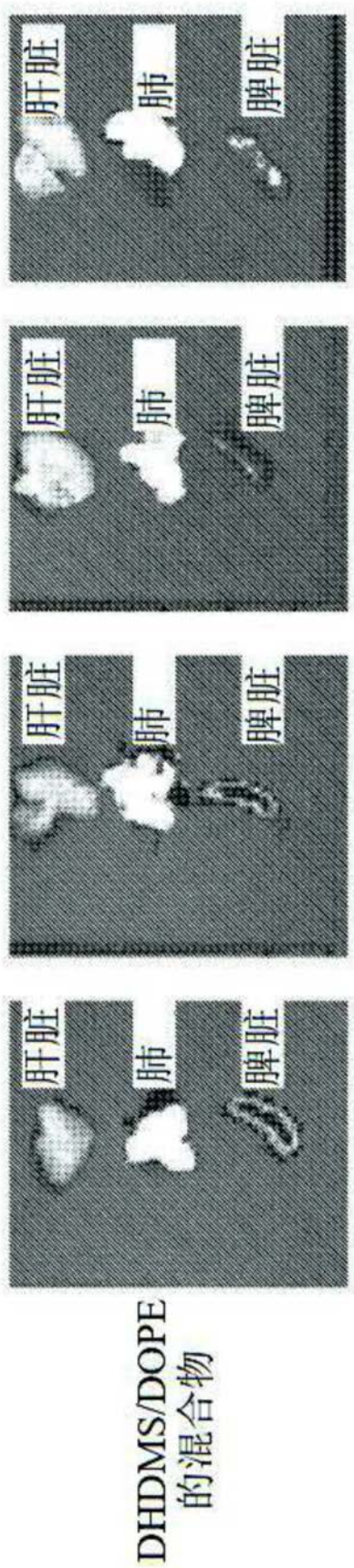


图28