



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118647599 A

(43) 申请公布日 2024. 09. 13

(21) 申请号 202280090898.9

(22) 申请日 2022.12.15

(30) 优先权数据

63/290,396 2021.12.16 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.08.02

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2022/081704 2022.12.15

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/114937 EN 2023.06.22

(71) 申请人 爱康泰生治疗公司

地址 加拿大不列颠哥伦比亚省

(72) 发明人 朱莉娅·加滕约

杰森·塞缪尔·坦

史蒂文·阿恩斯

(74) 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理  
有限责任公司 11204

专利代理师 王达佐 何可

(51) Int.Cl.

C07C 229/12 (2006.01)

C07C 237/06 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

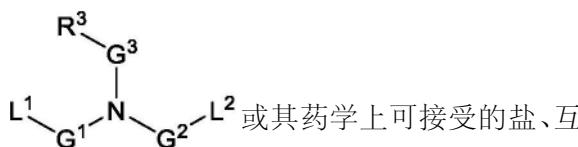
权利要求书6页 说明书38页

(54) 发明名称

用于脂质纳米颗粒的氟代阳离子脂质

(57) 摘要

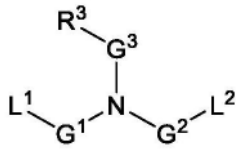
提供了具有以下结构的化合物：



(I)

变异构体或立体异构体,其中R<sup>3</sup>、L<sup>1</sup>、L<sup>2</sup>、G<sup>1</sup>、G<sup>2</sup>、G<sup>3</sup>和G<sup>3</sup>如本文所定义。还提供了前述化合物作为用于递送治疗剂的脂质纳米颗粒制剂的组分的用途、包含前述化合物的组合物及其使用和制备方法。

1. 具有以下结构(I)的化合物:



(I)

或其药学上可接受的盐或立体异构体,其中:

$L^1$ 是 $-O(C=O)R^{1a}$ 、 $-(C=O)OR^{1a}$ 、 $-C(=O)R^{1a}$ 、 $-OR^{1a}$ 、 $-S(O)_xR^{1a}$ 、 $-S-SR^{1a}$ 、 $-C(=O)SR^{1a}$ 、 $-SC(=O)R^{1a}$ 、 $-NR^aC(=O)R^{1a}$ 、 $-C(=O)NR^aR^{1a}$ 、 $-NR^aC(=O)NR^aR^{1a}$ 、 $-OC(=O)NR^aR^{1a}$ 、 $-NR^aC(=O)OR^{1a}$ 或 $R^{1b}$ ;

$L^2$ 是 $-O(C=O)R^{2a}$ 、 $-(C=O)OR^{2a}$ 、 $-C(=O)R^{2a}$ 、 $-OR^{2a}$ 、 $-S(O)_xR^{2a}$ 、 $-S-SR^{2a}$ 、 $-C(=O)SR^{2a}$ 、 $-SC(=O)R^{2a}$ 、 $-NR^aC(=O)R^{2a}$ 、 $-C(=O)NR^aR^{2a}$ 、 $-NR^aC(=O)NR^aR^{2a}$ 、 $-OC(=O)NR^aR^{2a}$ 、 $-NR^aC(=O)OR^{2a}$ 或 $R^{2b}$ ;

$G^1$ 和 $G^2$ 各自独立地是直链或支链 $C_1-C_{12}$ 亚烷基或直链或支链 $C_1-C_{12}$ 氟代亚烷基;

$G^3$ 是直链或支链 $C_1-C_{12}$ 亚烷基或直链或支链 $C_1-C_{12}$ 氟代亚烷基;

每个 $R^a$ 独立地是H或 $C_1-C_{12}$ 烷基;

$R^{1a}$ 和 $R^{2a}$ 各自独立地是支链 $C_6-C_{24}$ 烷基、支链 $C_6-C_{24}$ 烯基、支链 $C_6-C_{24}$ 氟代烷基、支链 $C_6-C_{24}$ 氟代烯基、 $C_6-C_{24}$ 烷基缩醛或 $C_6-C_{24}$ 氟代烷基缩醛;

$R^{1b}$ 和 $R^{2b}$ 各自独立地是 $-CH(OR)(OR)$ ,其中每个R独立地是直链或支链 $C_6-C_{18}$ 烷基、直链或支链 $C_6-C_{18}$ 烯基、直链或支链 $C_6-C_{18}$ 氟代烷基、或直链或支链 $C_6-C_{18}$ 氟代烯基;

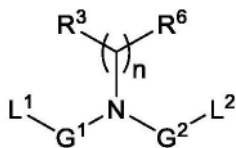
$R^3$ 是H、 $-OR^5$ 、 $-CN$ 、 $-C(=O)OR^4$ 、 $-OC(=O)R^4$ 、 $-N(R^5)N^4$ 、

$C(=O)N(R^4)R^5$ 或 $-NR^5C(=O)R^4$ ;以及

$R^4$ 是H、 $C_1-C_{12}$ 烷基或芳基,且 $R^5$ 是H或 $C_1-C_6$ 烷基;或者 $R^4$ 和 $R^5$ 与它们所连接的氮原子一起形成5元、6元或7元杂环,并且

其中 $G^1$ 和 $G^2$ 中的至少一个是直链或支链 $C_1-C_{12}$ 氟代亚烷基; $G^3$ 是直链或支链 $C_1-C_{12}$ 氟代亚烷基; $R^{1a}$ 和 $R^{2a}$ 中的至少一个存在并且选自支链 $C_6-C_{24}$ 氟代烷基、支链 $C_6-C_{24}$ 氟代烯基和 $C_6-C_{24}$ 氟代烷基缩醛;和/或 $R^{1b}$ 和 $R^{2b}$ 中的至少一个存在并且选自直链或支链 $C_6-C_{18}$ 氟代烷基和直链或支链 $C_6-C_{18}$ 氟代烯基。

2. 根据权利要求1所述的化合物,其具有以下结构(IA):



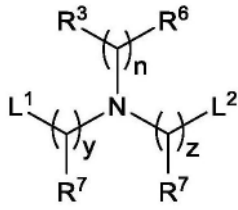
(IA)

其中:

$R^6$ 在每次出现时独立地是H、F、OH或 $C_1-C_{24}$ 烷基;并且

n是1至15的整数。

3. 根据权利要求2所述的化合物,其具有以下结构(IB):



(IB)

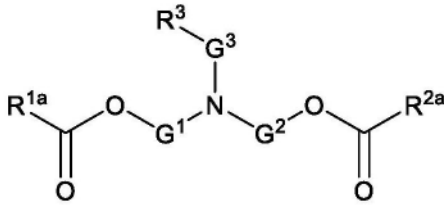
其中:

y和z各自独立地是1至12的整数;并且

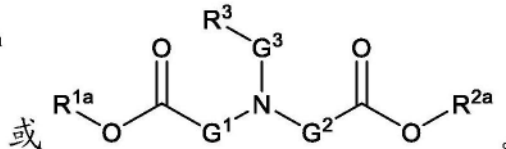
R<sup>7</sup>在每次出现时独立地是H或F。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的化合物,其中L<sup>1</sup>是-O(C=O)R<sup>1a</sup>或-(C=O)OR<sup>1a</sup>,并且L<sup>2</sup>是-O(C=O)R<sup>2a</sup>或-(C=O)OR<sup>2a</sup>。

5. 根据权利要求4所述的化合物,其具有以下结构(IC)或(ID)之一:

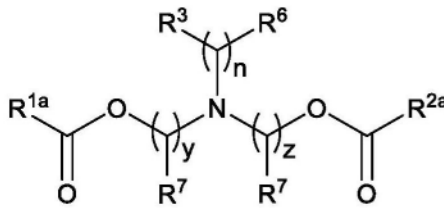


(IC)

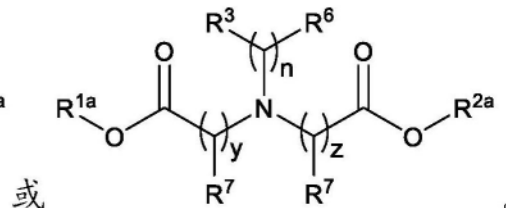


(ID)

6. 根据权利要求2至5中任一项所述的化合物,其具有以下结构(IE)或(IF)之一:



(IE)



(IF)

7. 根据权利要求2至6中任一项所述的化合物,其中n为2至12的整数。

8. 根据权利要求7所述的化合物,其中n是2、3、4或5。

9. 根据权利要求3至8中任一项所述的化合物,其中y和z各自独立地是2至10的整数。

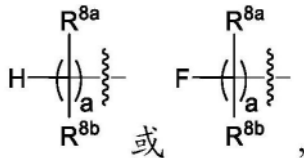
10. 根据权利要求3至8中任一项所述的化合物,其中y和z各自独立地是4至9的整数。

11. 根据权利要求2至10中任一项所述的化合物,其中R<sup>6</sup>是H。

12. 根据权利要求1至3中任一项所述的化合物,其中L<sup>1</sup>是-NR<sup>a</sup>C(=O)R<sup>1a</sup>或-C(=O)NR<sup>a</sup>R<sup>1a</sup>,并且L<sup>2</sup>是-NR<sup>a</sup>C(=O)R<sup>2a</sup>或-C(=O)NR<sup>a</sup>R<sup>2a</sup>。

13. 根据权利要求12所述的化合物,其中每个R<sup>a</sup>是C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>烷基。

14. 根据权利要求1至13中任一项所述的化合物,其中R<sup>1a</sup>和R<sup>2a</sup>各自独立地具有以下结构:



其中:

$\text{R}^{8a}$ 和 $\text{R}^{8b}$ 在每次出现时独立地是H、F、 $\text{C}_2$ - $\text{C}_{16}$ 烷基或 $\text{C}_2$ - $\text{C}_{16}$ 氟代烷基;

a是1至16的整数;并且

$\text{R}^{8a}$ 、 $\text{R}^{8b}$ 和a各自选择为使得 $\text{R}^1$ 和 $\text{R}^2$ 各自独立地包含支链 $\text{C}_6$ - $\text{C}_{18}$ 烷基或支链 $\text{C}_6$ - $\text{C}_{18}$ 氟代烷基。

15. 根据权利要求14所述的化合物,其中 $\text{R}^{8a}$ 的至少一次出现是H。

16. 根据权利要求14至15中任一项所述的化合物,其中 $\text{R}^{8a}$ 在每次出现时是H。

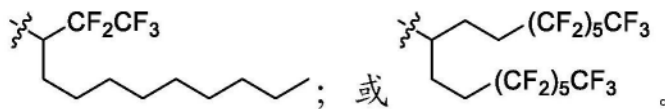
17. 根据权利要求14至16中任一项所述的化合物,其中 $\text{R}^{8a}$ 或 $\text{R}^{8b}$ 中的至少一次出现是F。

18. 根据权利要求14至17中任一项所述的化合物,其中 $\text{R}^{8a}$ 在每次出现时是F。

19. 根据权利要求1至13中任一项所述的化合物,其中 $\text{R}^{1a}$ 、 $\text{R}^{2a}$ 或两者是支链 $\text{C}_6$ - $\text{C}_{18}$ 氟代烷基。

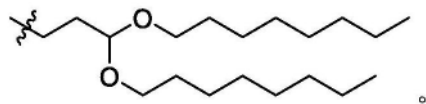
20. 根据权利要求19所述的化合物,其中 $\text{R}^{1a}$ 、 $\text{R}^{2a}$ 或两者是支链 $\text{C}_{10}$ - $\text{C}_{18}$ 氟代烷基。

21. 根据权利要求1至20中任一项所述的化合物,其中 $\text{R}^{1a}$ 或 $\text{R}^{2a}$ 或两者具有以下结构之一:



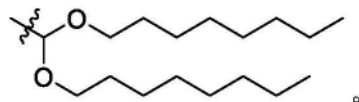
22. 根据权利要求1至13中任一项所述的化合物,其中 $\text{R}^{1a}$ 和 $\text{R}^{2a}$ 中的至少一个是 $\text{C}_6$ - $\text{C}_{24}$ 烷基缩醛或 $\text{C}_6$ - $\text{C}_{24}$ 氟代烷基缩醛。

23. 根据权利要求22所述的化合物,其中 $\text{R}^{1a}$ 和 $\text{R}^{2a}$ 中的至少一个具有以下结构:



24. 根据权利要求1至3中任一项所述的化合物,其中 $\text{L}^1$ 和 $\text{L}^2$ 中的至少一个分别是 $\text{R}^{1b}$ 或 $\text{R}^{2b}$ 。

25. 根据权利要求24所述的化合物,其中 $\text{R}^{1b}$ 或 $\text{R}^{2b}$ 或两者具有以下结构:



26. 根据权利要求1至25中任一项所述的化合物,其中 $\text{R}^3$ 是OH。

27. 根据权利要求1至25中任一项所述的化合物,其中 $\text{R}^3$ 是CN。

28. 根据权利要求1至25中任一项所述的化合物,其中 $\text{R}^3$ 是 $-\text{C}(=\text{O})\text{OR}^4$ 、 $-\text{OC}(=\text{O})\text{R}^4$ 或 $-\text{NHC}(=\text{O})\text{R}^4$ 。

29. 根据权利要求28所述的化合物,其中 $\text{R}^4$ 是甲基或乙基。

30. 根据权利要求1至29中任一项所述的化合物,其中 $\text{R}^3$ 是 $-\text{C}(=\text{O})\text{OR}^4$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{R}^4)\text{R}^5$ 或 $-\text{NR}^5\text{C}(=\text{O})\text{R}^4$ 。





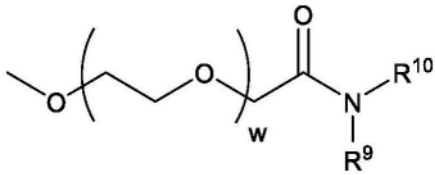
比为5:1至1:1或2:1至1:1。

51. 根据权利要求44至50中任一项所述的脂质纳米颗粒或组合物,其中所述聚合物缀合的脂质是PEG化脂质。

52. 根据权利要求51所述的脂质纳米颗粒或组合物,其中所述化合物与PEG化脂质的摩尔比为约100:1至约20:1或100:1至10:1。

53. 根据权利要求51或52中任一项所述的脂质纳米颗粒或组合物,其中所述PEG化脂质是PEG-DAG、PEG-PE、PEG-S-DAG、PEG-cer或PEG二烷氧基丙基氨基甲酸酯。

54. 根据权利要求51或52中任一项所述的脂质纳米颗粒或组合物,其中所述PEG化脂质具有以下结构(II):



(II)

或其药学上可接受的盐、互变异构体或立体异构体,其中:

$R^9$ 和 $R^{10}$ 各自独立地是含有10个至30个碳原子的直链或支链的饱和或不饱和的烃基链,其中所述烃基链任选地被一个或多个酯键间断;并且

w具有范围在30至60的平均值。

55. 根据权利要求54所述的脂质纳米颗粒或组合物,其中 $R^9$ 和 $R^{10}$ 各自独立地是含有12个至16个碳原子的直链的饱和的烃基链。

56. 根据权利要求54或55中任一项所述的脂质纳米颗粒或组合物,其中所述w平均为约49。

57. 根据权利要求44至56中任一项所述的脂质纳米颗粒或组合物,其中所述治疗剂包含核酸。

58. 根据权利要求57所述的脂质纳米颗粒或组合物,其中所述核酸选自反义RNA和信使RNA。

59. 向有需要的患者施用治疗剂的方法,所述方法包括制备或提供权利要求43至57中任一项所述的脂质纳米颗粒或组合物,并向所述患者施用所述组合物。

60. 药物组合物,其包含权利要求43所述的脂质纳米颗粒和药学上可接受的稀释剂或赋形剂。

## 用于脂质纳米颗粒的氟代阳离子脂质

### 技术领域

[0001] 本发明总体上涉及新型氟代阳离子脂质,其可以与其它脂质组分(例如中性脂质、胆固醇和聚合物缀合的脂质)组合使用,以与寡核苷酸形成脂质纳米颗粒,从而促进治疗性核酸(例如寡核苷酸、信使RNA)在体外和体内的细胞内递送。

### 背景技术

[0002] 存在许多与核酸递送相关以影响生物系统中所需的应答的挑战。基于核酸的疗法具有巨大的潜力,但是仍然需要更有效地将核酸递送到细胞或生物体内的适当位点以实现这种潜力。治疗性核酸包括例如信使RNA(mRNA)、反义寡核苷酸、核酶、DNA酶、质粒、免疫刺激核酸、antagomir、antimir、mimic、supermir和适配体。一些核酸(例如mRNA或质粒)可以用于实现特定细胞产物的表达,将有助于例如与蛋白质或酶缺乏相关的疾病的治疗。可翻译核苷酸递送的治疗应用是非常广泛的,因为可以合成构建体以产生任何选择的蛋白质序列,无论是否是系统固有的。核酸的表达产物可以增加蛋白质的现有水平、替代缺失或非功能性形式的蛋白质,或在细胞或生物体中引入新的蛋白质和相关的功能性。

[0003] 一些核酸(例如miRNA抑制剂)可以用于实现由miRNA调控的特定细胞产物的表达,将有助于例如与蛋白质或酶缺乏相关的疾病的治疗。miRNA抑制的治疗应用是非常广泛的,因为可以合成构建体以抑制一种或多种miRNA,所述miRNA又将调控mRNA产物的表达。内源性miRNA的抑制可增强其下游靶内源性蛋白质表达并恢复细胞或生物体中的适当功能,作为治疗与特定miRNA或一组miRNA相关的疾病的手段。

[0004] 其它核酸可以下调特定mRNA的细胞内水平,结果是,通过例如RNA干扰(RNAi)或反义RNA的互补结合的过程下调相应蛋白质的合成。反义寡核苷酸和RNAi的治疗应用也非常广泛,因为寡核苷酸构建体可以与针对靶mRNA的任何核苷酸序列合成。靶标可以包含来自正常细胞的mRNA、与疾病状态(例如癌症)相关的mRNA和传染性病原体(例如病毒)的mRNA。迄今为止,反义寡核苷酸构建体已经显示出通过在体外和体内模型中降解同源mRNA特异性来下调靶蛋白的能力。此外,反义寡核苷酸构建体目前正在临床研究中进行评估。

[0005] 然而,目前在治疗环境中寡核苷酸的应用面临两个问题。首先,游离的RNA对血浆中核酸酶消化敏感。第二,游离的RNA进入相关翻译机制所在的细胞内区室的能力有限。由阳离子脂质与其它脂质组分(例如中性脂质、胆固醇、PEG、PEG化脂质)以及寡核苷酸形成的脂质纳米颗粒已经用于阻断血浆中RNA的降解并促进寡核苷酸的细胞摄取。

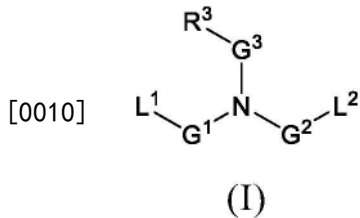
[0006] 仍然需要用于递送寡核苷酸的改进的阳离子脂质和脂质纳米颗粒。优选地,这些脂质纳米颗粒将提供最佳的药物:脂质比,保护核酸免于在血清中降解和清除,适于全身性的或局部的递送,并提供核酸的细胞内递送。此外,这些脂质-核酸颗粒应该是耐受良好的并提供足够的治疗指数,使得以有效剂量的核酸对患者的治疗不会对患者产生不可接受的毒性和/或风险。本发明提供了这些优点和相关的优点。

[0007] 发明概述

[0008] 简言之,本发明提供了氟代脂质化合物,包括其立体异构体、药学上可接受的盐或

互变异构体,所述脂质化合物可以单独使用或与其它脂质组分(例如中性脂质、带电脂质、类固醇(包括例如所有的固醇)和/或其类似物和/或聚合物缀合的脂质)组合使用以形成用于递送治疗剂的脂质纳米颗粒。在一些情况下,脂质纳米颗粒用于递送核酸,例如反义RNA和/或信使RNA。还提供了使用这样的脂质纳米颗粒治疗各种疾病或症状(例如由传染性实体和/或蛋白质不足引起的那些疾病或症状)的方法。

[0009] 在一个实施方案中,提供了具有以下结构(I)的化合物:



[0011] 或其药学上可接受的盐、互变异构体或立体异构体,其中R<sup>3</sup>、L<sup>1</sup>、L<sup>2</sup>、G<sup>1</sup>、G<sup>2</sup>和G<sup>3</sup>如本文所定义。

[0012] 还提供了包含一种或多种上述结构(I)的化合物和治疗剂的药物组合物。在一些实施方案中,药物组合物进一步包含一种或多种选自中性脂质、带电脂质、类固醇和聚合物缀合的脂质的组分。这样的组合物可用于形成用于递送治疗剂的脂质纳米颗粒。

[0013] 在其它实施方案中,本发明提供了用于向有需要的患者施用治疗剂的方法,所述方法包括制备包含结构(I)的化合物和治疗剂的脂质纳米颗粒的组合物,并将所述组合物递送至患者。

[0014] 参考以下详细描述,本发明的这些和其它方面是明确的。

[0015] 详细说明

[0016] 在以下描述中,阐述了某些具体细节以提供对本发明的各种实施方案的透彻理解。然而,本领域的技术人员会理解本发明可以在没有这些细节的情况下被实践。

[0017] 本发明部分地基于新型阳离子(氨基)脂质的发现,所述新型阳离子(氨基)脂质在用于将活性剂或治疗剂(例如核酸)体内递送至哺乳动物细胞的脂质纳米颗粒时提供优势。特别地,本发明的实施方案提供了包含一种或多种本文所述的新型阳离子脂质的核酸-脂质纳米颗粒组合物,所述组合物提供了增加的核酸活性和改善的组合物的体内耐受性,导致与先前描述的核酸-脂质纳米颗粒组合物相比治疗指数显著增加。

[0018] 在具体的实施方案中,本发明提供了新型阳离子脂质,其使得配制用于mRNA和/或其它寡核苷酸的体外和体内递送得以改进的组合物成为可能。在一些实施方案中,这些改进的脂质纳米颗粒组合物可用于表达由mRNA编码的蛋白质。在其它实施方案中,这些改进的脂质纳米颗粒组合物可用于通过将靶向一种特定miRNA或一组的调节一种靶标mRNA或几种mRNA的miRNA的miRNA抑制剂进行递送来上调内源性蛋白质的表达。在其它实施方案中,这些改进的脂质纳米颗粒组合物可用于下调(例如,沉默)靶基因的蛋白质水平和/或mRNA水平。在一些其它实施方案中,脂质纳米颗粒也可用于递送用于表达转基因的mRNA和质粒。在此外的其它实施方案中,脂质纳米颗粒组合物可用于诱导由蛋白质表达引起的药理学效应,例如通过递送合适的促红细胞生成素mRNA增加红细胞的产生,或通过递送编码合适的抗原或抗体的mRNA来防止感染。

[0019] 本发明的脂质纳米颗粒和组合物可以用于多种目的,包括在体外和体内将包封的

或缔合的(例如,复合的)治疗剂(例如核酸)递送至细胞。因此,本发明的实施方案提供了通过使受试者与包封了合适的治疗剂或与合适的治疗剂缔合的脂质纳米颗粒接触来治疗或预防有需要的受试者的疾病或症状的方法,其中所述脂质纳米颗粒包含一种或多种本文所述的新型阳离子脂质。

[0020] 如本文所述,本发明的脂质纳米颗粒的实施方案特别可用于递送核酸,包括例如 mRNA、反义寡核苷酸、质粒DNA、微RNA(miRNA)、miRNA抑制剂(antagomirs/antimirs)、信使-RNA-干扰互补RNA(micRNA)、DNA、多价RNA、dicer底物RNA、互补DNA(cDNA)。等。因此,本发明的脂质纳米颗粒和组合物可用于通过使细胞与包含一种或多种本文所述的新型阳离子脂质的脂质纳米颗粒接触而在体外和体内诱导所需蛋白质的表达,其中所述脂质纳米颗粒包封核酸或与核酸缔合,所述核酸被表达以产生所需蛋白质(例如,编码所需蛋白质的信使RNA或质粒)或抑制终止mRNA表达的过程(例如,miRNA抑制剂)。或者,本发明的脂质纳米颗粒和组合物可以用于通过使细胞与包含一种或多种本文所述的新型阳离子脂质的脂质纳米颗粒接触而在体外和体内降低靶基因和蛋白质的表达,其中所述脂质纳米颗粒封装或缔合降低靶基因表达的核酸(例如,反义寡核苷酸或小干扰RNA(siRNA))。本发明的脂质纳米颗粒和组合物也可以用于单独或联合共递送不同的核酸(例如,mRNA和质粒DNA),例如可以用于提供需要不同核酸(例如编码合适的基因修饰酶的mRNA和用于整合进宿主基因组的DNA片段)共定位的效果。

[0021] 用于本发明的核酸可以根据任何可用的技术制备。对于mRNA,制备的主要方法但不限于酶促合成(也称为体外转录),其目前代表生产长序列特异性mRNA的最有效的方法。体外转录描述了从工程DNA模板合成RNA分子的过程,所述工程DNA模板包含与编码目的基因的下游序列连接的上游噬菌体启动子序列(例如,包括但不限于来自T7、T3和SP6大肠杆菌噬菌体的序列)。模板DNA可以用本领域众所周知的适当技术从多种来源制备而用于体外转录,所述技术包括但不限于质粒DNA和聚合酶链反应扩增(参见Linpinsel, J.L. and Conn, G.L., *General protocols for preparation of plasmid DNA template* 以及 Bowman, J.C., Azizi, B., Lenz, T.K., Ray, P., and Williams, L.D. in *RNA in vitro transcription and RNA purification by denaturing PAGE in Recombinant and in vitro RNA syntheses Methods v.941* Conn G.L. (ed), New York, N.Y. Humana Press, 2012)。

[0022] 使用线性化DNA模板,在相应的RNA聚合酶以及腺苷、鸟苷、尿苷和胞苷核糖核苷三磷酸(rNTP)存在下,在支持聚合酶活性同时使所得mRNA转录物潜在的降解最小化的条件下,在体外发生RNA转录。体外转录可以使用多种市场上可买到的试剂盒进行,包括但不限于Ribomax大规模RNA生产系统(Promega)、MEGAscript转录试剂盒(Life Technologies)、以及包含RNA聚合酶和rNTP的市场上可买到的试剂。mRNA体外转录的方法在本领域中是众所周知的。(参见,例如Losick, R., 1972, *In vitro transcription*, *Ann Rev Biochem v.41* 409-46; Kamakaka, R.T. and Kraus, W.L. 2001. *In Vitro Transcription. Current Protocols in Cell Biology.2:11.6:11.6.1-11.6.17*; Beckert, B. And Masquida, B., (2010) *Synthesis of RNA by In Vitro Transcription in RNA in Methods in Molecular Biology v.703* (Neilson, H. Ed), New York, N.Y. Humana Press, 2010; Brunelle, J.L. and Green, R., 2013, Chapter Five-*In vitro transcription from*

plasmid or PCR-amplified DNA, *Methods in Enzymology* v.530,101-114;其全部通过引用并入本文)。

[0023] 然后从转录或相关反应的不期望的组分(包括未掺入的rNTP、蛋白酶、盐、短RNA寡聚物等)中纯化期望的体外转录的mRNA。mRNA转录物的分离技术是本领域众所周知的。众所周知的程序包括用在一价阳离子的存在下的醇(乙醇、异丙醇)或氯化锂的苯酚/氯仿萃取或沉淀。可以使用的纯化方法的另外的非限制性示例包括尺寸排阻色谱法(Lukavsky, P.J. and Puglisi, J.D., 2004, Large-scale preparation and purification of polyacrylamide-free RNA oligonucleotides, *RNA* v.10, 889-893)、基于二氧化硅的亲色谱法和聚丙烯酰胺凝胶电泳(Bowman, J.C., Azizi, B., Lenz, T.K., Ray, P., and Williams, L.D. in *RNA in vitro transcription and RNA purification by denaturing PAGE in Recombinant and in vitro RNA syntheses* *Methods* v.941 Conn G.L. (ed), New York, N.Y. Humana Press, 2012)。可以使用多种市场上可买到的试剂盒进行纯化,所述试剂盒包括但不限于SV总分离系统(Promega)以及体外转录清洁和浓缩试剂盒(Norgen Biotek)。

[0024] 此外,虽然逆转录可产生大量的mRNA,但产物可以含有大量与不期望的聚合酶活性相关的异常RNA杂质,所述杂质可能需从全长mRNA制备物中除去。这些杂质包含由未成功转录起始导致的短RNA以及由RNA依赖性RNA聚合酶活性、来自RNA模板的RNA引发的转录和自互补的3'延伸产生的双链RNA(dsRNA)。已经证明,这些具有dsRNA结构的污染物可以通过与真核细胞中的各种先天免疫传感器相互作用而导致不期望的免疫刺激活性,所述先天免疫传感器的作用为识别特定的核酸结构并诱导强效的免疫应答。这反过来可以显著减少mRNA翻译,因为在先天细胞免疫应答期间蛋白质合成减少。因此,已经开发了除去这些dsRNA污染物的另外的技术,并且是本领域已知的,包括但不限于可调比例的HPLC纯化(参见,例如Kariko, K., Muramatsu, H., Ludwig, J. And Weissman, D., 2011, Generating the optimal mRNA for therapy: HPLC purification eliminates immune activation and improves translation of nucleoside-modified, protein-encoding mRNA, *Nucl Acid Res*, v.39 e142; Weissman, D., Pardi, N., Muramatsu, H., and Kariko, K., HPLC Purification of in vitro transcribed long RNA in Synthetic Messenger RNA and Cell Metabolism Modulation in *Methods in Molecular Biology* v.969 (Rabinovich, P.H. Ed), 2013)。已报道经HPLC纯化的mRNA的翻译水平高得多,特别是在原代细胞和体内。

[0025] 在本领域中已经描述了大量的用于改变体外转录的mRNA的特定特性并提高其实用性的修饰。这些修饰包括但不限于对mRNA的5'末端和3'末端的修饰。内源性真核mRNA通常在成熟分子的5'端上有帽结构,其在介导mRNA帽结合蛋白(CBP)的结合中发挥重要作用,所述CBP进一步负责增强细胞中的mRNA稳定性和mRNA翻译的效率。因此,用加帽的mRNA转录物实现最高水平的蛋白质表达。5'帽含有在多数5'-核苷酸与鸟嘌呤核苷酸之间的5'-5'-三磷酸连接。缀合的鸟嘌呤核苷酸在N7位置被甲基化。其它的修饰包括在2'-羟基基团上的末端的和倒数第二个5'-核苷酸的甲基化。

[0026] 可以使用多种不同的帽结构来产生体外转录的合成的mRNA的5'帽。合成的mRNA的5'加帽可以与化学帽类似物进行共转录(即,在体外转录期间加帽)。例如,抗反向帽类似物(ARCA)帽含有5'-5'-三磷酸鸟嘌呤-鸟嘌呤连接,其中一个鸟嘌呤含有N7甲基以及3'-O-甲

基。然而,多达20%的转录物在该共转录过程中保持未加帽,并且合成的帽类似物与真实细胞mRNA的5'帽结构不同,潜在地降低了可译性和细胞稳定性。可选择地,合成的mRNA分子也可以在转录后被酶促加帽。这些可以产生更真实的5'帽结构,其在结构或功能上更接近地模拟内源性5'帽,所述内源性5'帽具有增强的帽结合蛋白质的结合、增加的半衰期、对5'内切核酸酶的降低的敏感性和/或降低的5'脱帽。已经开发了许多合成的5'帽类似物,并且是本领域已知的用以增强mRNA稳定性和可译性(参见,例如Grudzien-Nogalska, E., Kowalska, J., Su, W., Kuhn, A. N., Slepnev, S. V., Darynkiewicz, E., Sahin, U., Jemielity, J., and Rhoads, R. E., Synthetic mRNAs with superior translation and stability properties in Synthetic Messenger RNA and Cell Metabolism Modulation in *Methods in Molecular Biology* v.969 (Rabinovich, P. H. Ed), 2013)。

[0027] 在3'-末端,通常在RNA加工期间将腺嘌呤核苷酸的长链(poly-A尾)加入到mRNA分子中。转录后立即切割转录物的3'末端以释放3'羟基,其中poly-A聚合酶在被称为多聚腺苷酸化的过程中将腺嘌呤核苷酸链添加到RNA中。已经广泛地显示了poly-A尾增强翻译效率和mRNA的稳定性(参见Bernstein, P. and Ross, J., 1989, Poly(A), poly(A) binding protein and the regulation of mRNA stability, *Trends Bio Sci* v.14 373-377; Guhaniyogi, J. and Brewer, G., 2001, Regulation of mRNA stability in mammalian cells, *Gene*, v.265, 11-23; Dreyfus, M. and Regnier, P., 2002, The poly(A) tail of mRNAs: Bodyguard in eukaryotes, scavenger in bacteria, *Cell*, v.111, 611-613)。

[0028] 体外转录的mRNA的poly(A)加尾可以使用各种方法实现,包括但不限于将poly(T)片段克隆到DNA模板中或通过使用Poly(A)聚合酶转录后添加。第一种情况,根据poly(T)片段的大小,允许具有限定长度的poly(A)尾的mRNA的体外转录,但是需要模板的额外操作。后一种情况涉及使用poly(A)聚合酶将poly(A)尾酶促加入到体外转录的mRNA中,所述poly(A)聚合酶催化腺嘌呤残基掺入到RNA的3'末端上,不需要DNA模板的额外操作,但是产生具有不同长度的poly(A)尾的mRNA。5'加帽和3'-poly(A)加尾可使用多种市场上可买到的试剂盒进行,所述试剂盒包括但不限于Poly(A)聚合酶加尾试剂盒(EpiCenter)、mMESSAGE mMACHINE T7 Ultra试剂盒和Poly(A)加尾试剂盒(Life Technologies)以及市场上可买到的试剂、多种ARCA帽、Poly(A)聚合酶等。

[0029] 除了5'帽和3'多聚腺苷酸化之外,已经报道了体外转录物的其它修饰提供了与翻译效率和稳定性有关的益处。本领域众所周知致病性DNA和RNA可以被真核生物内的多种传感器识别并引发有效的先天免疫应答。已经表明区分致病性和自身DNA和RNA的能力至少部分地基于结构和核苷修饰,因为来自天然来源的大多数核酸含有修饰核苷。相反,如上所述,体外合成的RNA缺乏这些修饰,从而使其产生免疫刺激,这反过来可以抑制有效的mRNA翻译。将修饰核苷引入到体外转录的mRNA中可以用于防止RNA传感器的识别和激活,从而减轻这种不期望的免疫刺激活性并增强翻译能力(参见,例如Kariko, K. and Weissman, D. 2007, Naturally occurring nucleoside modifications suppress the immunostimulatory activity of RNA: implication for therapeutic RNA development, *Curr Opin Drug Discov Devel*, v.10 523-532; Pardi, N., Muramatsu, H., Weissman, D., Kariko, K., In vitro transcription of long RNA containing modified nucleosides in Synthetic Messenger RNA and Cell Metabolism Modulation in *Methods in*

Molecular Biology v.969 (Rabinovich, P.H. Ed), 2013; Kariko, K., Muramatsu, H., Welsh, F.A., Ludwig, J., Kato, H., Akira, S., Weissman, D., 2008, Incorporation of Pseudouridine Into mRNA Yields Superior Nonimmunogenic Vector With Increased Translational Capacity and Biological Stability, Mol Ther v.16, 1833-1840)。用于合成修饰RNA的修饰核苷和核苷酸可以使用本领域已知的通用方法和程序进行监测和利用。可以获得各种各样的核苷修饰,其可以单独或与其它修饰核苷组合一定程度地结合到体外转录的mRNA中(参见例如US2012/0251618)。已经报道了核苷修饰的mRNA的体外合成降低了激活免疫传感器的能力,同时增强了翻译能力。

[0030] 可以被修饰以在可译性和稳定性方面提供益处的mRNA的其它组分包括5'和3'非翻译区(UTR)。已经显示,两者一起或独立的UTR的优化(有利的5'和3'UTR可以从细胞或病毒RNA获得)增加体外转录mRNA的mRNA稳定性和翻译效率(参见,例如, Pardi, N., Muramatsu, H., Weissman, D., Kariko, K., In vitro transcription of long RNA containing modified nucleosides in Synthetic Messenger RNA and Cell Metabolism Modulation in Methods in Molecular Biology v.969 (Rabinovich, P.H. Ed), 2013)。

[0031] 除mRNA外,本发明还可以使用其它核酸有效载荷。对于寡核苷酸,制备方法包括但不限于化学合成和酶促、较长前体的化学切割、如上所述的体外转录等。合成DNA和RNA核苷酸的方法被广泛使用并且是本领域众所周知的(参见,例如, Gait, M. J. (ed.) Oligonucleotide synthesis: a practical approach, Oxford [Oxfordshire], Washington, D.C.: IRL Press, 1984; 以及 Herdewijn, P. (ed.) Oligonucleotide synthesis: methods and applications, Methods in Molecular Biology, v.288 (Clifton, N.J.) Totowa, N.J.: Humana Press, 2005; 这两者都通过引用并入本文)。

[0032] 对于质粒DNA,与本发明一起使用的制备通常利用但不限于在含有目的质粒的细菌的液态培养物中体外扩增和分离质粒DNA。目的质粒中编码对特定抗生素(青霉素、卡那霉素等)的抗性的基因的存在允许含有目的质粒的那些细菌在含有抗生素的培养物中选择性地生长。分离质粒DNA的方法被广泛使用并且是本领域众所周知的(参见,例如 Heilig, J., Elbing, K.L. and Brent, R (2001), Large-Scale Preparation of Plasmid DNA, Current Protocols in Molecular Biology, 41:II:1.7:1.7.1-1.7.16; Rozkov, A., Larsson, B., Gillström, S., Björnstedt, R. and Schmidt, S.R. (2008), Large-scale production of endotoxin-free plasmids for transient expression in mammalian cell culture, Biotechnol. Bioeng., 99:557-566; 和 US6197553B1)。可以使用多种市场上可买到的试剂盒进行质粒分离,所述试剂盒包括但不限于 Plasmid Plus (Qiagen)、GenJET plasmid maxiprep (Thermo) 和 PureYield maxiprep (Promega) 试剂盒以及市场上可买到的试剂。

[0033] 下文进一步详细描述了本发明的阳离子脂质、脂质纳米颗粒和包含阳离子脂质、脂质纳米颗粒的组合物的各种示例性实施方案,以及它们用于递送活性物质(例如治疗剂)如核酸以调节基因和蛋白表达的用途。

[0034] 如本文所用,除非另有说明,否则以下术语具有赋予它们的含义。

[0035] 除非上下文另有要求,否则在整个说明书和权利要求书中,词语“包含

(comprise)”及其变体,例如“包含(comprises)”和“包含(comprising)”应被解释为开放和包容的含义,即,被解释为“包括但不限于”。

[0036] 在整个说明书中引用“一个实施方案”或“实施方案”意味着结合该实施方案描述的特定特征、结构或特性被包括在本发明的至少一个实施方案中。因此,在整个说明书的各个地方出现的短语“在一个实施方案中”或“在实施方案中”不一定都指相同的实施方案。此外,在一个或多个实施方案中,特定特征、结构或特性可以以任何合适的方式组合。

[0037] 除非另有定义,本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的技术人员通常理解的相同的含义。如说明书和权利要求书中所使用的,单数形式“一个(a)”、“一个(an)”和“所述(the)”包括复数引用,除非上下文另有明确规定。

[0038] 短语“诱导所需蛋白质的表达”是指核酸增加所需蛋白质表达的能力。为了检查蛋白质表达的程度,将测试样品(例如表达所需蛋白质的培养物中的细胞样品)或测试哺乳动物(例如哺乳动物,例如人或动物)模型(例如啮齿动物(例如小鼠)或非人灵长类动物(例如,猴)模型)与核酸(例如,与本发明的脂质组合的核酸)接触。将所需蛋白质在测试样品或测试动物中的表达与所需蛋白质在未与核酸接触或未施用核酸的对照样品(例如表达所需蛋白质的培养物中的细胞样品)或对照哺乳动物(例如,哺乳动物,例如人或动物模型(例如啮齿类(例如,小鼠)或非人灵长类(例如,猴)模型))中的表达进行比较。当对照样品或对照哺乳动物中存在所需蛋白质时,对照样品或对照哺乳动物中所需蛋白质的表达可以赋予1.0的值。在特定的实施方案中,当测试样品或测试哺乳动物中的所需蛋白质表达与对照样品或对照哺乳动物中的所需蛋白质表达水平的比率大于1,例如为约1.1、1.5、2.0、5.0或10.0时,实现诱导所需蛋白质的表达。当在对照样品或对照哺乳动物中不存在所需蛋白质时,当检测到测试样品或测试哺乳动物中的任何可测量水平的所需蛋白质时,实现诱导所需蛋白质的表达。本领域普通技术人员将理解确定样品中蛋白质表达水平的适当测定,例如斑点印迹、northern印迹、原位杂交、ELISA、免疫沉淀、酶功能和表型测定,或基于在适当条件下可产生荧光或发光的报告蛋白的测定。

[0039] 短语“抑制靶基因的表达”是指核酸沉默、降低或抑制靶基因表达的能力。为了检测基因沉默的程度,将测试样品(例如表达靶基因的培养物中的细胞样品)或测试哺乳动物(例如哺乳动物,例如人或动物模型(例如啮齿动物(例如小鼠)或非人灵长类动物(例如猴)模型))与沉默、降低或抑制靶基因表达的核酸接触。将靶基因在测试样品或测试动物中的表达与靶基因在未与核酸接触或未施用核酸的对照样品(例如表达靶基因的培养物中的细胞样品)或对照哺乳动物(例如哺乳动物,如人或动物模型(例如啮齿动物(例如小鼠)或非人灵长类动物(例如猴)模型))中的表达进行比较。靶基因在对照样品或对照哺乳动物中的表达可赋予100%的值。在具体的实施方案中,当测试样品或测试哺乳动物中的靶基因表达水平相对于对照样品或对照哺乳动物中的靶基因表达水平为约95%、90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、5%或0%时,实现靶基因表达的沉默、抑制或降低。换句话说,核酸能够在测试样本或测试哺乳动物中相对于未与核酸接触或未施用核酸的对照样本或对照哺乳动物,使靶基因的表达沉默、降低或抑制至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%。用于确定靶基因表达水平的合适测定包括但不限于使用本领域技术人员已知的技术来检查蛋白质或mRNA水平,例如,斑点印

迹、northern印迹、原位杂交、ELISA、免疫沉淀、酶功能以及本领域技术人员已知的表型测定。

[0040] 活性剂或治疗剂(例如治疗性核酸)的“有效量”或“治疗有效量”是足以产生期望效果的量,例如与在核酸不存在下检测到的正常表达水平相比,靶序列表达的增加或抑制。当表达产物在没有核酸的情况下不存在时,检测到任何可测量的水平,实现靶序列表达增加。在表达产物在与核酸接触之前以某种水平存在的情况下,当用核酸(例如mRNA)获得的值相对于对照的增加倍数为约1.05、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.75、2、2.5、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50、75、100、250、500、750、1000、5000、10000或更大时,实现表达增加。当用核酸(例如反义寡核苷酸)获得的值相对于对照为约95%、90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、5%或0%时,实现靶基因或靶序列表达的抑制。用于测量靶基因或靶序列的表达的合适的测定包括,例如,使用本领域技术人员已知的技术来检查蛋白质或RNA水平,例如斑点印迹、northern印迹、原位杂交、ELISA、免疫沉淀、酶功能、荧光或合适的报告蛋白的发光、以及本领域技术人员已知的表型测定。

[0041] 如本文所用,术语“核酸”是指含有至少两个单链或双链形式的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸的聚合物,包括DNA、RNA及其杂合体。DNA的形式可以是反义分子、质粒DNA、cDNA、PCR产物或载体。RNA的形式可以是小发夹RNA(shRNA)、信使RNA(mRNA)、反义RNA、miRNA、micRNA、多价RNA、dicer底物RNA或病毒RNA(vRNA)及其组合。核酸包括含有已知的核苷酸类似物或修饰的主链残基或键的核酸,它们是合成的、天然存在的和非天然存在的,并且具有与参考核酸相似的结合特性。这种类似物的示例包括但不限于硫代磷酸酯、氨基磷酸酯、甲基磷酸酯、手性甲基磷酸酯、2'-O-甲基核糖核苷酸和肽-核酸(PNA)。除非特别限定,术语包括含有天然核苷酸的已知类似物的核酸,其具有与参考核酸相似的结合特性。除非另有说明,特定的核酸序列也隐含地包括其保守修饰变体(例如,简并密码子取代)、等位基因、直系同源物、单核苷酸多态性和互补序列以及明确指出的序列。具体地,简并密码子取代可以通过生成其中一个或多个选定的(或全部)密码子的第三位被混合碱基和/或脱氧肌苷残基取代的序列来实现(Batzer等人,Nucleic Acid Res.,19:5081(1991);Ohtsuka等人,J.Biol.Chem.,260:2605-2608(1985);Rossolini等人,Mol.Cell.Probes,8:91-98(1994))。“核苷酸”包含脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)、碱基和磷酸基团。核苷酸通过磷酸基团连接在一起。“碱基”包括嘌呤和嘧啶,所述嘌呤和嘧啶进一步包括天然化合物腺嘌呤、胸腺嘧啶、鸟嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶、肌苷和天然类似物,以及嘌呤和嘧啶的合成衍生物,所述衍生物包括但不限于放置新反应性基团(例如但不限于胺、醇、硫醇、羧酸酯和烷基卤化物)的修饰。

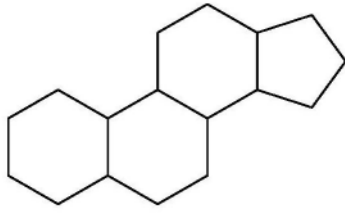
[0042] 术语“基因”是指包含产生多肽或前体多肽所必需的部分长度或全部长度编码序列的核酸(例如,DNA或RNA)序列。

[0043] 如本文所用,“基因产物”是指基因(例如RNA转录物或多肽)的产物。

[0044] 术语“脂质”是指一组有机化合物,其包括但不限于脂肪酸的酯,并且通常其特征在于在水中的溶解性差,但在许多有机溶剂中是可溶的。它们通常被分成至少三类:(1)“简单脂质”,其包括脂肪和油以及蜡;(2)“复合脂质”,其包括磷脂和糖脂;和(3)“衍生的脂质”,例如类固醇。

[0045] “类固醇”是包含以下碳骨架的化合物：

[0046]



[0047] 类固醇的非限制性示例包括胆固醇等。

[0048] “阳离子脂质”是指能够带正电荷的脂质。示例性的阳离子脂质包含一个或多个带有正电荷的胺基团。优选的阳离子脂质是可电离的,使得它们可以根据pH以带正电的或中性的形式存在。阳离子脂质的离子化在不同pH条件下影响脂质纳米颗粒的表面电荷。该荷电状态可以影响血浆蛋白吸收、血液清除率和组织分布(Semple, S.C. 等人, *Adv. Drug Deliv Rev* 32:3-17 (1998))以及形成内溶非双分子层结构的能力(Hafez, I.M. 等人, *Gene Ther* 8:1188-1196 (2001)),对核酸的细胞内递送至关重要。

[0049] 术语“聚合物缀合的脂质”是指包含脂质部分和聚合物部分的分子。聚合物缀合的脂质的示例是PEG化脂质。术语“PEG化脂质”是指包含脂质部分和聚乙二醇部分的分子。PEG化脂质是本领域已知的,包括1-(单甲氧基-聚乙二醇)-2,3-二肉豆蔻酰甘油(PEG-DMG)等。

[0050] 术语“中性脂质”是指在选定pH下以不带电或中性两性离子形式存在的许多脂质种类中的任一种。在生理pH下,这样的脂质包括但不限于磷脂酰胆碱(例如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)、1,2-二肉豆蔻酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DMPC)、1-棕榈酰-2-油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(POPC)、1,2-二油酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DOPC))、磷脂酰乙醇胺(例如1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE))、鞘磷脂(SM)、神经酰胺、类固醇如固醇及其衍生物。中性脂质可以是合成的或天然衍生的。

[0051] 术语“带电脂质”是指以带正电或带负电的形式存在的许多脂质种类中的任一种,其独立于有用生理范围内的pH,例如pH约3至pH约9。带电脂质可以是合成的或天然衍生的。带电脂质的示例包括磷脂酰丝氨酸、磷脂酸、磷脂酰甘油、磷脂酰肌醇、甾醇半琥珀酸酯、二烷基三甲基铵-丙烷(例如DOTAP、DOTMA)、二烷基二甲基氨基丙烷、乙基磷胆碱、二甲基氨基乙烷氨基甲酰基甾醇(例如DC-Chol)。

[0052] 术语“脂质纳米颗粒”是指具有至少一个纳米级(例如,1nm至1,000nm)的尺寸的颗粒,其包含一种或多种结构(I)的化合物或其它特定的阳离子脂质。在一些实施方案中,脂质纳米颗粒包含在可用于将活性剂或治疗剂(例如核酸(例如,mRNA))递送至感兴趣的靶位点(例如,细胞、组织、器官、肿瘤等)的制剂中。在一些实施方案中,本发明的脂质纳米颗粒包含核酸。这样的脂质纳米颗粒通常包含结构(I)的化合物和一种或多种赋形剂,所述赋形剂选自:中性脂质、带电脂质、类固醇和聚合物缀合的脂质。在一些实施方案中,活性剂或治疗剂(例如核酸)可以被包封在脂质纳米颗粒的脂质部分或被脂质纳米颗粒的一些或全部脂质部分包封的水性空间中,从而保护其免于酶促降解或由宿主生物体或细胞的机制诱导的其它不期望的效应,例如不良免疫应答。

[0053] 在各种实施方案中,脂质纳米颗粒的平均直径为从约30nm至约150nm、从约40nm至约150nm、从约50nm至约150nm、从约60nm至约130nm、从约70nm至约110nm、从约70nm至约

100nm、从约80nm至约100nm、从约90nm至约100nm、从约70nm至约90nm、从约80nm至约90nm、从约70nm至约80nm、或约30nm、35nm、40nm、45nm、50nm、55nm、60nm、65nm、70nm、75nm、80nm、85nm、90nm、95nm、100nm、105nm、110nm、115nm、120nm、125nm、130nm、135nm、140nm、145nm或150nm,并且脂质纳米颗粒基本上是无毒的。在某些实施方案中,当核酸存在于脂质纳米颗粒中时,核酸在水溶液中抵抗核酸酶降解。包含核酸的脂质纳米颗粒和它们的制备方法公开于例如美国专利公开号2004/0142025、2007/0042031和PCT公开号W02013/016058和W02013/086373,其全部公开内容出于所有目的以引用的方式整体并入本文。

[0054] 如本文所用,“脂质包封”是指提供活性剂或治疗剂(例如核酸(例如,mRNA))的具有完全包封、部分包封或两者的脂质纳米颗粒。在一个实施方案中,核酸(例如,mRNA)完全包封在脂质纳米颗粒中。

[0055] 如本文所用,术语“水溶液”是指包含水的组合物。

[0056] 与核酸-脂质纳米颗粒有关的“血清稳定的”是指核苷酸在暴露于血清或核酸酶测定后不会显著降解,所述血清或核酸酶测定会显著降解游离DNA或RNA。合适的测定包括,例如,标准血清测定、DNA酶测定或RNA酶测定。

[0057] 如本文所用,“全身递送”是指可导致活性剂在生物体内广泛暴露的治疗产品的递送。一些施用技术可导致某些药剂的全身递送,但不能导致其它药剂的全身递送。全身递送是指将有效的、优选治疗量的药剂暴露于身体的大部分部位。脂质纳米颗粒的全身递送可以通过本领域已知的任何方式进行,包括例如静脉内、动脉内、皮下和腹膜内递送。在一些实施方案中,脂质纳米颗粒的全身递送是通过静脉内递送。

[0058] 如本文所用,“局部递送”是指将活性剂直接递送至生物体内的靶部位。例如,药剂可通过直接注射到疾病部位(例如肿瘤)、其它靶部位(例如炎症部位)、或靶器官(如肝、心脏、胰腺、肾等)而局部递送。局部递送还可以包括局部应用或局部注射技术,例如肌内、皮下或皮内注射。局部递送不排除全身药理学作用。

[0059] “烷基”是指仅由碳和氢原子组成的直链或支链烃链基团,其是饱和的,并且具有,例如,从一个至二十四个碳原子( $C_1$ - $C_{24}$ 烷基)、六个至二十四个碳原子( $C_6$ - $C_{24}$ 烷基)、四个至二十个碳原子( $C_4$ - $C_{20}$ 烷基)、六个至十六个碳原子( $C_6$ - $C_{16}$ 烷基)、六个至九个碳原子( $C_6$ - $C_9$ 烷基)、一个至十五个碳原子( $C_1$ - $C_{15}$ 烷基)、一个至十二个碳原子( $C_1$ - $C_{12}$ 烷基)、一个至八个碳原子( $C_1$ - $C_8$ 烷基)或一个至六个碳原子( $C_1$ - $C_6$ 烷基),或上述范围内的任何范围或具体值,并且其通过单键连接到分子的其余部分,例如,甲基、乙基、正丙基、1-甲基乙基(异丙基)、正丁基、正戊基、1,1-二甲基乙基(叔丁基)、3-甲基己基、2-甲基己基等。除非在说明书中另有具体说明,否则烷基基团是取代的或未取代的。

[0060] “烯基”是指仅由碳和氢原子组成的直链或支链烃链基团,其是不饱和的(即,包含至少一个碳-碳双键),并且具有,例如,从二个至二十四个碳原子( $C_2$ - $C_{24}$ 烯基)、六个至二十四个碳原子( $C_6$ - $C_{24}$ 烯基)、四个至二十个碳原子( $C_4$ - $C_{20}$ 烯基)、六个至十六个碳原子( $C_6$ - $C_{16}$ 烯基)、六个至九个碳原子( $C_6$ - $C_9$ 烯基)、二个至十五个碳原子( $C_2$ - $C_{15}$ 烯基)、二个至十二个碳原子( $C_2$ - $C_{12}$ 烯基)、二个至八个碳原子( $C_2$ - $C_8$ 烯基)或二个至六个碳原子( $C_2$ - $C_6$ 烯基),或上述范围内的任何范围或具体值,并且其通过单键与分子的其余部分连接,例如,乙烯基、正丙烯基、1-甲基乙烯基、正丁烯基、正戊烯基、1,1-二甲基乙烯基、3-甲基己烯基、2-甲基己烯基等。除非在说明书中另有具体说明,否则烯基基团是取代的或未取代的。

[0061] “氟代烷基”是指其中一个或多个氟原子(F)已经取代氢原子(H)的烷基基团。氟代烷基包括由1)碳、氢和氟原子,或2)碳和氟原子组成的直链或支链基团。氟代烷基可以具有,例如,从一个至二十四个碳原子( $C_1$ - $C_{24}$ 氟代烷基)、六个至二十四个碳原子( $C_6$ - $C_{24}$ 氟代烷基)、四个至二十个碳原子( $C_4$ - $C_{20}$ 氟代烷基)、六个至十六个碳原子( $C_6$ - $C_{16}$ 氟代烷基)、六个至九个碳原子( $C_6$ - $C_9$ 氟代烷基)、一个至十五个碳原子( $C_1$ - $C_{15}$ 氟代烷基),一个至十二个碳原子( $C_1$ - $C_{12}$ 氟代烷基)、一个至八个碳原子( $C_1$ - $C_8$ 氟代烷基)或一个至六个碳原子( $C_1$ - $C_6$ 氟代烷基),或上述范围内的任何范围或具体值,并且其通过单键连接到分子的其余部分,例如,三氟代甲基( $-CF_3$ )、全氟代乙基( $-CF_2CF_3$ )、全氟代正丙基( $-(CF_2)_2CF_3$ )、全氟代异丙基( $-CF(CF_3)_2$ )、全氟代正丁基( $-(CF_2)_3CF_3$ )、全氟代异丁基( $-CF_2CF(CF_3)_2$ )、全氟代叔丁基( $-C(CF_3)_3$ )、全氟代正己基( $-(CF_2)_5CF_3$ )、全氟代正辛基( $-(CF_2)_7CF_3$ )、2,2,2-三氟代乙基( $-CH_2CF_3$ )、4,4,4-三氟代正丁基( $-(CH_2)_3CF_3$ )、7,7,7-三氟代正庚基( $-(CH_2)_6CF_3$ )或全氟代正庚基( $-(CF_2)_6CF_3$ )等。例如, $C_{12}$ 氟代烷基包括1,1,1,2,2,五氟代-3-十二烷( $-CH(CF_2CF_3)(CH_2)_8CH_3$ )。在另一示例中, $C_{17}$ 氟代烷基包括1,1,1,2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,12,12,13,13,14,14,15,15,16,16,17,17,17-二十六氟代-9-十七烷( $-CH((CH_2)_2(CF_2)_5CF_3)_2$ )。除非在说明书中另有具体说明,否则氟代烷基基团是取代的或未取代的。

[0062] “氟代烯基”是指其中一个或多个氟原子(F)已经取代氢原子(H)的烯基基团。氟代烯基包括由1)碳、氢和氟原子,或2)碳和氟原子组成的直链或支链基团。氟代烯基可以具有,例如,从二个至二十四个碳原子( $C_2$ - $C_{24}$ 氟代烯基)、六个至二十四个碳原子( $C_6$ - $C_{24}$ 氟代烯基)、四个至二十个碳原子( $C_4$ - $C_{20}$ 氟代烯基)、六个至十六个碳原子( $C_6$ - $C_{16}$ 氟代烯基)、六个至九个碳原子( $C_6$ - $C_9$ 氟代烯基)、二个至十五个碳原子( $C_2$ - $C_{15}$ 氟代烯基)、二个至十二个碳原子( $C_2$ - $C_{12}$ 氟代烯基)、二个至八个碳原子( $C_2$ - $C_8$ 氟代烯基)或二个至六个碳原子( $C_2$ - $C_6$ 氟代烯基)或上述范围内的任何范围或具体值,并且其通过单键连接到分子的其余部分,例如,全氟乙基( $-CF_2CF_3$ )、全氟正丙基( $-(CF_2)_2CF_3$ )、全氟异丙基( $-CF(CF_3)_2$ )、全氟正丁基( $-(CF_2)_3CF_3$ )、全氟异丁基( $-CF_2CF(CF_3)_2$ )、全氟叔丁基( $-C(CF_3)_3$ )、全氟正己基( $-(CF_2)_5CF_3$ )、全氟正辛基( $-(CF_2)_7CF_3$ )、2,2,2-三氟乙基( $-CH_2CF_3$ )、4,4,4-三氟正丁基( $-(CH_2)_3CF_3$ )、7,7,7-三氟正庚基( $-(CH_2)_6CF_3$ )或全氟正庚基( $-(CF_2)_6CF_3$ )等。例如, $C_{12}$ 氟代烷基包括1,1,1,2,2,五氟-3-十二烷( $-CH(CF_2CF_3)(CH_2)_8CH_3$ )。在另一示例中, $C_{17}$ 氟代烷基包括1,1,1,2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,12,12,13,13,14,14,15,15,16,16,17,17,17-二十六氟-9-十七烷( $-CH((CH_2)_2(CF_2)_5CF_3)_2$ )。除非在说明书中另有具体说明,否则氟代烷基基团是取代的或未取代的。

[0063] “全氟代取代基”或“全氟代化合物”是指其中每个C-H键已经被C-F键替代的直链或支链取代基或化合物。全氟代取代基或化合物通常仅含有碳-氟(C-F)和碳-碳键(C-C),然而,在一些实施方案中,全氟代取代基或化合物包含杂原子和/或功能团,例如OH、 $CO_2H$ 、卤化物、O和 $SO_3H$ ,条件是全氟代取代基或化合物不含有C-H键并含有至少一个C-F键。全氟代取代基或化合物可以是饱和的,并且具有,例如,从一个至二十四个碳原子( $C_1$ - $C_{24}$ 全氟代烷基)、四个至二十个碳原子( $C_4$ - $C_{20}$ 全氟代烷基)、六个至十六个碳原子( $C_6$ - $C_{16}$ 全氟代烷基)、六个至九个碳原子( $C_6$ - $C_9$ 全氟代烷基)、一个至十五个碳原子( $C_1$ - $C_{15}$ 全氟代烷基)、一个至十二个碳原子( $C_1$ - $C_{12}$ 全氟代烷基)、一个至八个碳原子( $C_1$ - $C_8$ 全氟代烷基)或一个至六个碳原子( $C_1$ - $C_6$ 全氟代烷基),并且其通过单键连接到分子的其余部分,例如,三氟代甲基( $-$

CF<sub>3</sub>)、全氟代乙基(-CF<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>)、全氟代正丙基(-(CF<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>)、全氟代异丙基(-CF(CF<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)、全氟代正丁基(-(CF<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CF<sub>3</sub>)、全氟代异丁基(-CF<sub>2</sub>CF(CF<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)、全氟代叔丁基(-C(CF<sub>3</sub>)<sub>3</sub>)、全氟代正己基(-(CF<sub>2</sub>)<sub>5</sub>CF<sub>3</sub>)、全氟代正辛基(-(CF<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CF<sub>3</sub>)、全氟代正庚基(-(CF<sub>2</sub>)<sub>6</sub>CF<sub>3</sub>)等。

[0064] “亚烷基”是指将分子的其余部分与基团连接的直链或支链二价烃链,其仅由碳和氢组成,其是饱和的,并且具有,例如,从一个至二十四个碳原子(C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub>亚烷基)、一个至十五个碳原子(C<sub>1</sub>-C<sub>15</sub>亚烷基)、一个至十二个碳原子(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>亚烷基)、一个至八个碳原子(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>亚烷基)、一个至六个碳原子(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>亚烷基)、二个至四个碳原子(C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>亚烷基)、一个至两个碳原子(C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>亚烷基),或上述范围内的任何范围或具体值,例如,亚甲基、亚乙基、亚丙基、正亚丁基等。亚烷基链通过单键连接到分子的其余部分并且通过单键连接到基团。亚烷基链与分子的其余部分以及与基团的连接点可以通过链内的一个碳或任何两个碳。除非在说明书中另有具体说明,亚烷基链是取代的或未取代的。

[0065] “氟代亚烷基”是指如上所定义的亚烷基,其中至少一个C-H键被C-F键替代。氟代亚烷基具有,例如,从一个至二十四个碳原子(C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub>氟代亚烷基)、一个至十五个碳原子(C<sub>1</sub>-C<sub>15</sub>氟代亚烷基)、一个至十二个碳原子(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>氟代亚烷基)、一个至八个碳原子(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>氟代亚烷基)、一个至六个碳原子(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>氟代亚烷基)、二个至四个碳原子(C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>氟代亚烷基),一个至两个碳原子(C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>氟代亚烷基),或上述范围内的任何范围或具体值,例如,氟代亚甲基、氟代亚乙基、氟代亚丙基、正氟代亚丁基等。氟代亚烷基链通过单键连接到分子的其余部分并且通过单键连接到基团。氟代亚烷基链与分子的其余部分以及与基团的连接点可以通过链内的一个碳或任何两个碳。除非在说明书中另有具体说明,氟代亚烷基链是取代的或未取代的。

[0066] “芳基”是指包含氢、6个至18个碳原子和至少一个芳香环的碳环系统基团。为了本发明的目的,芳基基团为单环、双环、三环或四环系统,其可以包括稠环系统或桥环系统。芳基基团包括但不限于衍生自以下的芳基基团:醋蒎烯、蒾烯、醋菲烯、蒽、萘、苯、蒽、茈、茈、as-引达省、s-引达省、二氢化茈、茈、萘、非那烯、菲、七曜烯、茈和三亚苯。除非在说明书中另有具体说明,否则术语“芳基”或前缀“ar-”(例如在“芳烷基(aralkyl)”中)意指包括任选地被取代的芳基基团。

[0067] “烷基缩醛”是指式-R<sup>a</sup>CH(OR<sup>b</sup>)(OR<sup>c</sup>)的基团,其中R<sup>a</sup>是如上所定义的亚烷基,并且R<sup>b</sup>和R<sup>c</sup>各自独立地是如上所定义的烷基或烯基。烷基缩醛基团包含,例如,从一个至二十四个碳原子(C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub>烷基缩醛)、六个至二十四个碳原子(C<sub>6</sub>-C<sub>24</sub>烷基缩醛)、四个至二十个碳原子(C<sub>4</sub>-C<sub>20</sub>烷基缩醛)、六个至十六个碳原子(C<sub>6</sub>-C<sub>16</sub>烷基缩醛)、六个至二十四个碳原子(C<sub>6</sub>-C<sub>24</sub>烷基缩醛)、六个至九个碳原子(C<sub>6</sub>-C<sub>9</sub>烷基缩醛)、一个至十五个碳原子(C<sub>1</sub>-C<sub>15</sub>烷基缩醛)、一个至十二个碳原子(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>烷基缩醛)、一个至八个碳原子(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基缩醛)或一个至六个碳原子(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基缩醛)。除非在说明书中另有具体说明,否则烷基缩醛基团可以任选地被取代。

[0068] “氟代烷基缩醛”是指如上所定义的烷基缩醛,其中R<sup>a</sup>、R<sup>b</sup>和/或R<sup>c</sup>中的至少一个C-H键被C-F键替代,示例性的氟代烷基缩醛具有,例如,从一个至二十四个碳原子(C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub>氟代烷基缩醛)、六个至二十四个碳原子(C<sub>6</sub>-C<sub>24</sub>氟代烷基缩醛)、四个至二十个碳原子(C<sub>4</sub>-C<sub>20</sub>氟代烷基缩醛)、六个至十六个碳原子(C<sub>6</sub>-C<sub>16</sub>氟代烷基缩醛)、六个至二十四个碳原子(C<sub>6</sub>-C<sub>24</sub>氟代烷基缩醛)、六个至九个碳原子(C<sub>6</sub>-C<sub>9</sub>氟代烷基缩醛)、一个至十五个碳原子(C<sub>1</sub>-C<sub>15</sub>氟代烷基

缩醛)、一个至十二个碳原子(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>氟代烷基缩醛)、一个至八个碳原子(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基缩醛)或一个至六个碳原子(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>氟代烷基缩醛)。除非在说明书中另有具体说明,否则氟代烷基缩醛基团可以任选地被取代。

[0069] “杂环”是指稳定的3元至18元非芳香族环基团,所述非芳香族环基团由二个至十二个碳原子和从一个至六个选自氮、氧和硫的杂原子组成。除非在说明书中另有具体说明,否则杂环基团可以是单环、双环、三环或四环系统,其可以包括稠环系统或桥环系统;并且杂环基团中的氮、碳或硫原子可以任选地氧化;氮原子可以任选地季铵化;并且杂环基团可以是部分或完全饱和的。这样的杂环基团的示例包括但不限于二氧戊环基、噻吩基[1,3]二噻烷基、十氢异喹啉基、咪唑基、咪唑烷基、异噻唑烷基、异噻唑烷基、吗啉基、八氢吡啶基、八氢异吡啶基、2-氧代哌嗪基、2-氧代哌啶基、2-氧代吡咯烷基、噁唑烷基、哌啶基、哌嗪基、4-哌啶酮基、吡咯烷基、吡唑烷基、奎宁环基、噻唑烷基、四氢呋喃基、三噻烷基、四氢吡喃基、硫代吗啉基、硫代吗啉基、1-氧代-硫代吗啉基和1,1-二氧化-硫代吗啉基。除非在说明书中另有具体说明,否则杂环基团可以任选地被取代。

[0070] 本文所用的术语“取代的”意味着任何上述基团(例如,烷基、烯基、氟代烷基、氟代烯基、全氟代取代基、全氟代化合物、亚烷基、氟代亚烷基、烷基缩醛、芳基、氟代烷基缩醛和/或杂环),其中至少一个氢原子被与非氢原子连接的键替代,所述非氢原子例如但不限于:卤素原子,例如F、Cl、Br或I;氧代基团(=O);羟基基团(-OH);羧基基团(-CO<sub>2</sub>H);C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>烷基基团;-C(=O)OR';-O(C=O)R';-C(=O)R';-OR';-S(O)<sub>x</sub>R';-S-SR';-C(=O)SR';-SC(=O)R';-NR'R';-NR'C(=O)R';-C(=O)NR'R';-NR'C(=O)NR'R';-OC(=O)NR'R';-NR'C(=O)OR';-NR'S(O)<sub>x</sub>NR'R';-NR'S(O)<sub>x</sub>R';和-S(O)<sub>x</sub>NR'R',其中:R'在每次出现时独立地是H或C<sub>1</sub>-C<sub>15</sub>烷基,并且x是0、1或2。在一些实施方案中,取代基是C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>烷基基团。在其它实施方案中,取代基是卤素基团,例如氟。在其它实施方案中,取代基是氧代基团。在其它实施方案中,取代基是羟基基团。在其它实施方案中,取代基是烷氧基基团(-OR')。在其它实施方案中,取代基是羧基基团。在其它实施方案中,取代基是胺基基团(-NR'R')。

[0071] “任选的”或“任选地”(例如,任选地取代的)意味着随后描述的情况的事件可能发生或可能不发生,并且该描述包括所述事件或情况发生的情况和所述事件或情况不发生的情况。例如,“任选地取代的烷基”是指烷基基团可以取代或可以不取代,并且本说明书包括取代的烷基基团和未取代的烷基基团。

[0072] “前药”意味着可以在生理条件下或通过溶剂分解转化为本发明的生物活性化合物的化合物。因此,术语“前药”是指药学上可接受的本发明化合物的代谢前体。当给予有需要的受试者时,前药可以是无活性的,但在体内转化为本发明的活性化合物。前药通常在体内快速转化以产生本发明的母体化合物,例如通过在血液中的水解。前药化合物通常在哺乳动物生物体中提供溶解性、组织相容性或延迟释放的优点(参见Bundgard,H.,Design of Prodrugs(1985),pp.7-9,21-24(Elsevier,Amsterdam))。在Higuchi,T.等人,A.C.S.Symposium Series,Vol.14,and in Bioreversible Carriers in Drug Design,Ed.Edward B.Roche,American Pharmaceutical Association and Pergamon Press,1987的文献中提供了前药的讨论。

[0073] 术语“前药”还指包括任何共价键合的载体,当这样的前药施用于哺乳动物受试者时,所述前药在体内释放本发明的活性化合物。本发明化合物的前药可以通过修饰存在于

本发明化合物中的功能团来制备,这样的方式使得修饰在常规操作中或在体内被裂解成本发明的母体化合物。前药包括本发明的化合物,其中羟基、氨基或巯基与任何基团键合,当本发明的化合物的前药施用于哺乳动物受试者时,所述基团裂解以分别形成游离的羟基、游离的氨基或游离的巯基。前药的示例包括但不限于本发明化合物中醇的乙酸酯、甲酸酯和苯甲酸酯衍生物或胺功能团的酰胺衍生物等。

[0074] 本文公开的本发明的内容还包括结构(I)的化合物的所有药学上可接受的化合物,其通过使一个或多个原子被具有不同原子质量或质量数的原子替代而被同位素标记。可并入所公开的化合物中的同位素的示例包括氢、碳、氮、氧、磷、氟、氯和碘的同位素,例如分别为<sup>2</sup>H、<sup>3</sup>H、<sup>11</sup>C、<sup>13</sup>C、<sup>14</sup>C、<sup>13</sup>N、<sup>15</sup>N、<sup>15</sup>O、<sup>17</sup>O、<sup>18</sup>O、<sup>31</sup>P、<sup>32</sup>P、<sup>35</sup>S、<sup>18</sup>F、<sup>36</sup>Cl、<sup>123</sup>I和<sup>125</sup>I。这些放射性标记的化合物可以用于通过表征(例如,作用位点或作用模式或与药理学上重要的作用位点的结合亲和力)来帮助确定或测量化合物的有效性。结构(I)或(II)的某些同位素标记的化合物(例如,掺入放射性同位素的那些)可用于药物和/或底物组织分布研究。放射性同位素氚(即<sup>3</sup>H)和碳-14(即<sup>14</sup>C)由于其易于掺入和现成的检测手段而对此目的特别有用。

[0075] 用较重的同位素(例如氘,即<sup>2</sup>H)取代可以提供由更大的代谢稳定性引起的某些治疗优势(例如,增加的体内半衰期或降低的剂量需求),并且因此在一些情况下可以是优选的。

[0076] 用正电子发射同位素(例如<sup>11</sup>C、<sup>18</sup>F、<sup>15</sup>O和<sup>13</sup>N)取代可以用于正电子发射断层扫描(PET)研究以检查底物受体占有率。同位素标记的结构(I)的化合物通常可以通过本领域技术人员已知的常规技术或通过类似于下文所述的制备例和实施例中所述的方法,使用适当的同位素标记的试剂代替先前使用的未标记的试剂来制备。

[0077] 本文公开的本发明还旨在涵盖所公开的化合物的体内代谢产物。这样的产物可以由例如所施用的化合物的氧化、还原、水解、酰胺化、酯化等产生,主要是由于酶促过程产生。因此,本发明包括通过包括将本发明的化合物施用于哺乳动物足以产生其代谢产物的一段时间的方法产生的化合物。这样的产物通常通过将可检测剂量的放射性标记的本发明化合物施用于动物(例如大鼠、小鼠、豚鼠、猴或人),允许足够的时间发生代谢,并从尿、血液或其它生物样品中分离其转化产物来鉴定。

[0078] “稳定的化合物”和“稳定的结构”意味着足够稳固以经受得住从反应混合物分离至有用纯度并配制成有效治疗剂的化合物。

[0079] “哺乳动物”包括人和家畜,例如实验动物和家养宠物(例如,猫、狗、猪、牛、绵羊、山羊、马、兔)和非家畜例如野生动物等。

[0080] “药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂”包括但不限于任何佐剂、载体、赋形剂、助流剂、甜味剂、稀释剂、防腐剂、染料/着色剂、增味剂、表面活性剂、润湿剂、分散剂、悬浮剂、稳定剂、等渗剂、溶剂或乳化剂,其已经被美国食品和药物管理局批准为可接受用于人或家畜。

[0081] “药学上可接受的盐”包括酸加成盐和碱加成盐。

[0082] “药学上可接受的酸加成盐”是指保留游离碱的生物有效性和性质的那些盐,其不是生物学上或其它方面不期望的,并且其由无机酸和有机酸形成,所述无机酸例如但不限于盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸等,所述有机酸例如但不限于乙酸、2,2-二氯乙酸、己二酸、藻酸、抗坏血酸、天冬氨酸、苯磺酸、苯甲酸、4-乙酰氨基苯甲酸、樟脑酸、樟脑-10-磺酸、

癸酸、己酸、辛酸、碳酸、肉桂酸、柠檬酸,环己烷氨基磺酸、十二烷基硫酸、乙烷-1,2-二磺酸、乙烷磺酸、2-羟基乙烷磺酸、甲酸、富马酸、半乳糖二酸、龙胆酸、葡庚糖酸、葡萄糖酸、葡萄糖醛酸、谷氨酸、戊二酸、2-氧代-戊二酸、甘油磷酸、乙醇酸、马尿酸、异丁酸、乳酸、乳糖酸、月桂酸、马来酸、苹果酸、丙二酸、扁桃酸、甲磺酸、粘酸、萘-1,5-二磺酸、萘-2-磺酸、1-羟基-2-萘甲酸、烟酸、油酸、乳清酸、草酸、棕榈酸、扑酸、丙酸、焦谷氨酸、丙酮酸、水杨酸、4-氨基水杨酸、癸二酸、硬脂酸、琥珀酸、酒石酸、硫氰酸、对甲苯磺酸、三氟乙酸、十一碳烯酸等。

[0083] “药学上可接受的碱加成盐”是指保留游离酸的生物有效性和性质的那些盐,其并不是生物学上或其它方面不期望的。这些盐通过向游离酸中加入无机碱或有机碱来制备。衍生自无机碱的盐包括但不限于钠盐、钾盐、锂盐、铵盐、钙盐、镁盐、铁盐、锌盐、铜盐、锰盐、铝盐等。优选的无机盐是铵盐、钠盐、钾盐、钙盐和镁盐。衍生自有机碱的盐包括但不限于伯胺、仲胺和叔胺的盐,取代胺包括天然存在的取代胺、环胺和碱性离子交换树脂(例如氨、异丙胺、三甲胺、二乙胺、三乙胺、三丙胺、二乙醇胺、乙醇胺、地阿诺、2-二甲基氨基乙醇、2-二乙基氨基乙醇、二环己胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、咖啡因、普鲁卡因、海巴明、胆碱、甜菜碱、苄乙苄胺、苜星、乙二胺、葡萄糖胺、甲基葡萄糖胺、可可碱、三乙醇胺、氨丁三醇、嘌呤、哌嗪、哌啶、N-乙基哌啶、聚胺树脂等。特别优选的有机碱是异丙胺、二乙胺、乙醇胺、三甲胺、二环己胺、胆碱和咖啡因。

[0084] 通常结晶产生本发明的化合物的溶剂化物。如本文所用,术语“溶剂化物”是指包含一个或多个本发明化合物分子与一个或多个溶剂分子的聚集体。溶剂可以是水,在这种情况下溶剂化物可以是水合物。或者,溶剂可以是有机溶剂。因此,本发明的化合物可以作为水合物存在,包括一水合物、二水合物、半水合物、倍半水合物、三水合物、四水合物等,以及相应的溶剂化形式。本发明的化合物可以是真正的溶剂化物,而在其它情况下,本发明的化合物可以仅保留外来的水或为水加上一些外来溶剂的混合物。

[0085] “药物组合物”是指本发明的化合物和本领域通常接受的用于将生物活性化合物递送至哺乳动物(例如,人)的介质的制剂。这样的介质包括所有药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

[0086] “有效量”或“治疗有效量”是指当向哺乳动物(优选人)施用时足以在哺乳动物(优选人)中实现治疗的本发明的化合物的量。构成“治疗有效量”的本发明的脂质纳米颗粒的量将根据化合物、症状和其严重程度、施用方式和待治疗的哺乳动物的年龄而变化,但是可以由本领域普通技术人员根据其自身的知识和本公开来常规地确定。

[0087] 本文所用“治疗(treating)”或“治疗(treatment)”涵盖对患有所关注的疾病或症状的哺乳动物(优选人)的所关注的疾病或症状的治疗,并且包括:

[0088] (i) 预防所述疾病或症状在哺乳动物中发生,特别是当这样的哺乳动物易患所属症状但尚未被诊断为患有该症状时;

[0089] (ii) 抑制疾病或症状,即,阻止其发展;

[0090] (iii) 缓解疾病或症状,即,引起疾病或症状消退;或

[0091] (iv) 缓解由疾病或症状引起的症状,即,缓解疼痛而不解决潜在的疾病或症状。如本文所用,术语“疾病”和“症状”可以互换使用或可以是不同的,因为特定的疾病或症状可能不具有已知的致病因子(因此尚未确定病因),因此其尚未被认为是疾病,而仅被认为是

不期望的症状或综合征,其中或多或少的特定症状组已经被临床医生鉴定。

[0092] 本发明的化合物或其药学上可接受的盐可以含有一个或多个不对称中心,并且因此可以产生对映异构体、非对映异构体和其它立体异构形式,其可以根据绝对立体化学定义为氨基酸的(R)-或(S)-或(D)-或(L)-。本发明旨在包括所有这种可能的异构体以及它们的外消旋和光学上纯的形式。光学活性的(+)和(-)、(R)-和(S)-或(D)-和(L)-异构体可以使用手性合成子或手性试剂制备,或使用常规技术(例如色谱法和分级结晶)分离。用于制备/分离单个对映异构体的常规技术包括由合适的光学纯前体手性合成或使用例如手性高压液相色谱(HPLC)拆分外消旋体(或盐的或衍生物的外消旋体)。当本文所述的化合物含有烯烃双键或其它几何不对称中心时,并且除非另有说明,否则化合物旨在包括E和Z几何异构体两者。同样,也旨在包括所有互变异构形式。

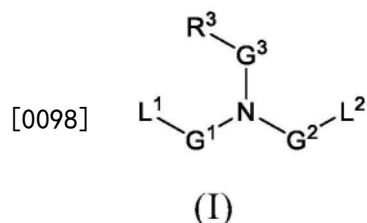
[0093] “立体异构体”是指由通过相同键连接的相同原子组成但具有不可互换的不同三维结构的化合物。本发明考虑了各种立体异构体及其混合物,并且包括“对映异构体”,其是指其分子是彼此不可重叠的镜像的两种立体异构体。

[0094] “互变异构体”是指从分子的一个原子到同一分子的另一个原子的质子转移。本发明包括任何所述化合物的互变异构体。

[0095] 化合物

[0096] 一方面,本发明提供了新型脂质化合物,其能够与其它脂质组分(例如中性脂质、带电脂质、类固醇和/或聚合物缀合的脂质)结合以与寡核苷酸形成脂质纳米颗粒。不希望受理论的束缚,认为这些脂质纳米颗粒保护寡核苷酸不在血清中降解,并在体外和体内有效地将寡核苷酸递送至细胞。

[0097] 在一个实施方案中,所述化合物具有以下结构(I):



[0099] 或其药学上可接受的盐、互变异构体或立体异构体,其中:

[0100]  $L^1$ 是 $-O(C=O)R^{1a}$ 、 $-(C=O)OR^{1a}$ 、 $-C(=O)R^{1a}$ 、 $-OR^{1a}$ 、 $-S(O)_xR^{1a}$ 、 $-S-SR^{1a}$ 、 $-C(=O)SR^{1a}$ 、 $-SC(=O)R^{1a}$ 、 $-NR^aC(=O)R^{1a}$ 、 $-C(=O)NR^aR^{1a}$ 、 $-NR^aC(=O)NR^aR^{1a}$ 、 $-OC(=O)NR^aR^{1a}$ 、 $-NR^aC(=O)OR^{1a}$ 或 $R^{1b}$ ;

[0101]  $L^2$ 是 $-O(C=O)R^{2a}$ 、 $-(C=O)OR^{2a}$ 、 $-C(=O)R^{2a}$ 、 $-OR^{2a}$ 、 $-S(O)_xR^{2a}$ 、 $-S-SR^{2a}$ 、 $-C(=O)SR^{2a}$ 、 $-SC(=O)R^{2a}$ 、 $-NR^aC(=O)R^{2a}$ 、 $-C(=O)NR^aR^{2a}$ 、 $-NR^aC(=O)NR^aR^{2a}$ 、 $-OC(=O)NR^aR^{2a}$ 、 $-NR^aC(=O)OR^{2a}$ ,或 $R^{2b}$ ;

[0102]  $G^1$ 和 $G^2$ 各自独立地是直链或支链 $C_1-C_{12}$ 亚烷基或直链或支链 $C_1-C_{12}$ 氟代亚烷基;

[0103]  $G^3$ 是直链或支链 $C_1-C_{12}$ 亚烷基或直链或支链 $C_1-C_{12}$ 氟代亚烷基;

[0104] 每个 $R^a$ 独立地是H或 $C_1-C_{12}$ 烷基;

[0105]  $R^{1a}$ 和 $R^{2a}$ 各自独立地是支链 $C_6-C_{24}$ 烷基、支链 $C_6-C_{24}$ 烯基、支链 $C_6-C_{24}$ 氟代烷基、支链 $C_6-C_{24}$ 氟代烯基、 $C_6-C_{24}$ 烷基缩醛或 $C_6-C_{24}$ 氟代烷基缩醛;

[0106]  $R^{1b}$ 和 $R^{2b}$ 各自独立地是 $-CH(OR)(OR)$ ,其中每个R独立地是直链或支链 $C_6-C_{18}$ 烷基、

直链或支链 $C_6-C_{18}$ 烯基、直链或支链 $C_6-C_{18}$ 氟代烷基或直链或支链 $C_6-C_{18}$ 氟代烯基；

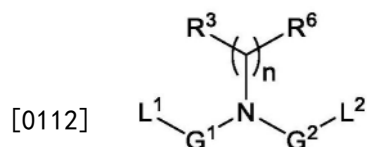
[0107]  $R^3$ 是H、 $-OR^5$ 、 $-CN$ 、 $-C(=O)OR^4$ 、 $-OC(=O)R^4$ 、 $-N(R^5)N^4$ 、 $-C(=O)N(R^4)R^5$ 或 $-NR^5C(=O)R^4$ ；并且

[0108]  $R^4$ 是H、 $C_1-C_{12}$ 烷基或芳基，并且 $R^5$ 是H或 $C_1-C_6$ 烷基；或者 $R^4$ 和 $R^5$ 与它们所连接的氮原子一起形成5元、6元或7元杂环；并且

[0109] 其中 $G^1$ 和 $G^2$ 中的至少一个是直链或支链 $C_1-C_{12}$ 氟代亚烷基； $G^3$ 是直链或支链 $C_1-C_{12}$ 氟代亚烷基； $R^{1a}$ 和 $R^{2a}$ 中的至少一个存在并且选自支链 $C_6-C_{24}$ 氟代烷基、支链 $C_6-C_{24}$ 氟代烯基和 $C_6-C_{24}$ 氟代烷基缩醛；和/或 $R^{1b}$ 和 $R^{2b}$ 中的至少一个存在并且选自直链或支链 $C_6-C_{18}$ 氟代烷基和直链或支链 $C_6-C_{18}$ 氟代烯基。

[0110] 在化合物(I)的各种实施方案中，每个 $R^a$ 是 $C_1-C_{12}$ 烷基。

[0111] 在一些实施方案中，化合物具有以下结构(IA)：



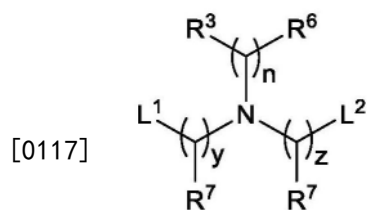
(IA)

[0113] 其中：

[0114]  $R^6$ 在每次出现时独立地是H、F、OH或 $C_1-C_{24}$ 烷基；

[0115]  $n$ 是1至15的整数。

[0116] 在一些实施方案中，化合物具有以下结构(IB)：



(IB)

[0118] 其中：

[0119]  $y$ 和 $z$ 各自独立地是1至12的整数；并且

[0120]  $R^7$ 在每次出现时独立地是H或F。

[0121] 在前述实施方案的任一方案中， $L^1$ 是 $-O(C=O)R^{1a}$ 或 $-(C=O)OR^{1a}$ ，并且 $L^2$ 是 $-O(C=O)R^{2a}$ 或 $-(C=O)OR^{2a}$ 。例如，在一些实施方案中， $L^1$ 是 $-O(C=O)R^{1a}$ ， $L^2$ 是 $-O(C=O)R^{2a}$ 。在另一示例中， $L^1$ 是 $-O(C=O)R^{1a}$ 并且 $L^2$ 是 $-(C=O)OR^{2a}$ 。在又一示例中，其中 $L^1$ 是 $-(C=O)OR^{1a}$ ，并且 $L^2$ 是 $-O(C=O)R^{2a}$ 。在又进一步的示例中，其中 $L^1$ 是 $-(C=O)OR^{1a}$ ，并且 $L^2$ 是 $-(C=O)OR^{2a}$ 。

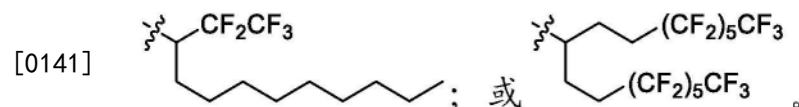
[0122] 在一些实施方案中，化合物具有以下结构(IC)或(ID)之一：



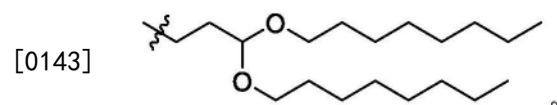
[0138] 在一些实施方案中,  $R^{8a}$  是  $C_2$  氟代烷基、 $R^{8b}$  是  $C_9$  烷基, 并且  $a$  是 1。在一些实施方案中,  $R^{8a}$  在一次出现时是  $C_2$  氟代烷基、 $R^{8b}$  在每次出现时是 H, 并且  $a$  是 10。在一些实施方案中,  $R^{8a}$  在一次出现时是  $C_9$  烷基、 $R^{8b}$  在两次出现时是 F, 并且  $a$  是 3。

[0139] 在一些实施方案中,  $R^{8a}$  是  $C_8$  氟代烷基、 $R^{8b}$  是  $C_8$  氟代烷基, 并且  $a$  是 1。在一些实施方案中,  $R^{8a}$  在一次出现时是  $C_8$  氟代烷基、 $R^{8b}$  在五次出现时是 F, 并且  $a$  是 9。

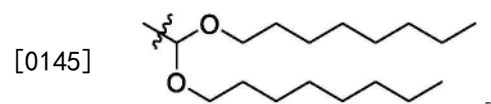
[0140] 在一些实施方案中,  $R^1$ 、 $R^2$  或两者是支链  $C_6$ - $C_{18}$  氟代烷基。例如, 在一些实施方案中,  $R_1$ 、 $R_2$  或两者是支链  $C_{10}$ - $C_{18}$  氟代烷基。在一些实施方案中,  $R_1$  或  $R_2$  或两者具有以下结构之一:



[0142] 在一些实施方案中,  $R^{1a}$  和  $R^{2a}$  中的至少一个是  $C_6$ - $C_{24}$  烷基缩醛或  $C_6$ - $C_{24}$  氟代烷基缩醛。例如, 在一些实施方案中,  $R^{1a}$  和  $R^{2a}$  中的至少一个具有以下结构:



[0144] 在一些实施方案中,  $L^1$  和  $L^2$  中的至少一个分别是  $R^{1b}$  或  $R^{2b}$ 。例如, 在一些实施方案中,  $R^{1b}$  或  $R^{2b}$  或两者具有以下结构:

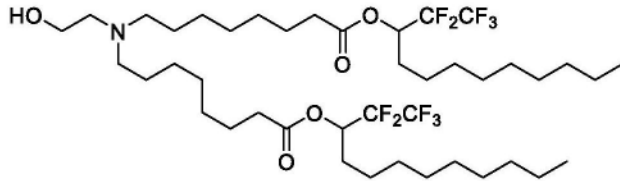
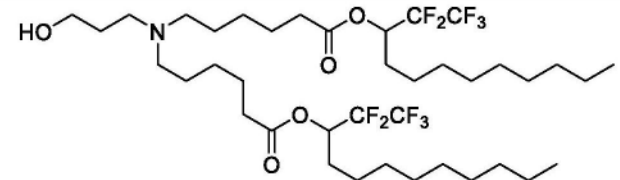
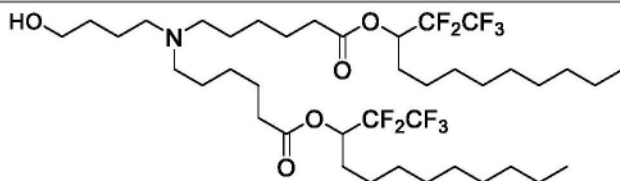
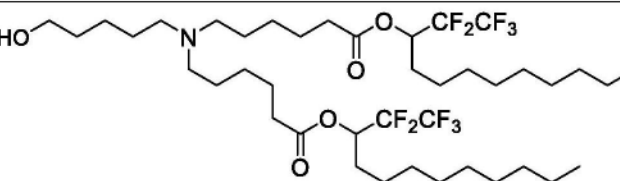
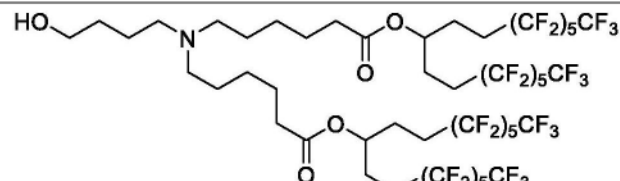
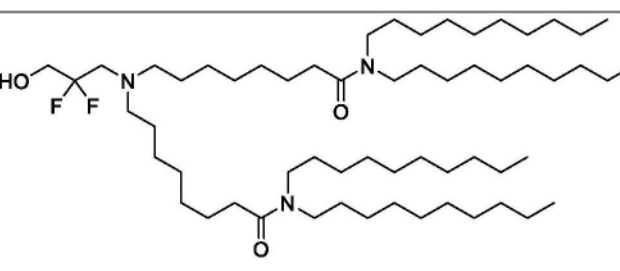


[0146] 在一些实施方案中,  $R^3$  是 OH。在一些实施方案中,  $R^3$  是 CN。在一些实施方案中,  $R^3$  是  $-C(=O)OR^4$ 、 $-OC(=O)R^4$  或  $-NHC(=O)R^4$ 。例如, 在一些实施方案中,  $R^4$  是甲基或乙基。

[0147] 在一些实施方案中,  $R^3$  是  $-C(=O)OR^4$ 、 $-C(=O)N(R^4)R^5$  或  $-NR^5C(=O)R^4$ , 其中  $R^4$  和/或  $R^5$  任选地被羟基、芳基、 $OR^{4a}$ 、 $O(C=O)R^{4a}$ 、 $NH(C=O)R^{4a}$  取代, 其中  $R^{4a}$  是任选地被羟基取代的  $C_1$ - $C_6$  烷基。例如, 在一些实施方案中,  $R^3$  具有以下结构之一:

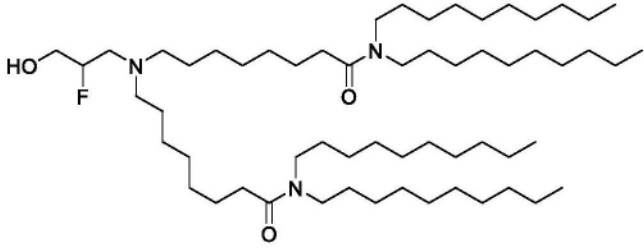
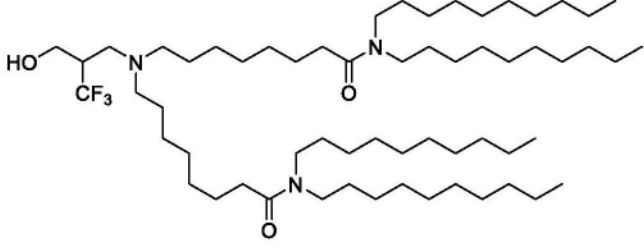
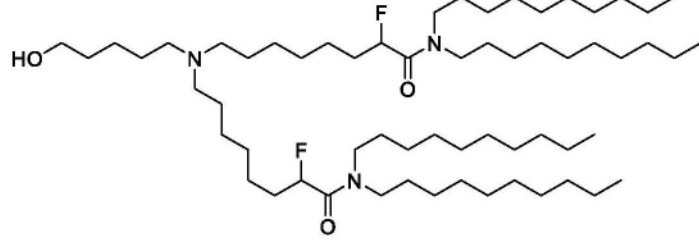
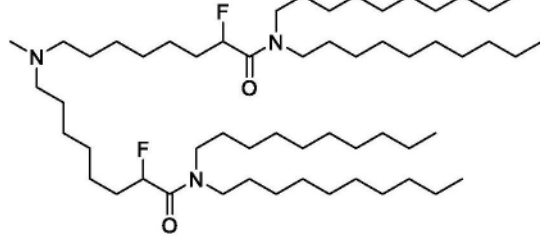




编号	结构
I-1	
I-2	
I-3	
I-4	
I-5	
I-6	

[0159]

[0160]

编号	结构
I-7	
I-8	
I-9	
1-10	

[0161] 应理解,如上所述的结构(I)的化合物的任何实施方案和如上所述的结构(I)的化合物中的任何具体取代基和/或变量可以独立地与结构(I)的化合物的其它实施方案和/或取代基和/或变量组合以形成本公开的上文未具体阐述的实施方案。此外,在任何特定R基团、G基团、L基团或变量a、y、z或n列出取代基和/或变量的列表的情况下,在特定实施方案和/或权利要求中,应理解,每个单独的取代基和/或变量可以从特定实施方案和/或权利要求中删除,并且剩余的取代基和/或变量的列表将被认为在本公开的范围之内。

[0162] 应当理解,在本说明书中,只要式的取代基和/或变量的组合的贡献产生稳定的化合物,所描绘的式的取代基和/或变量的组合就是允许的。

[0163] 在一些实施方案中,提供了包含结构(I)的化合物的组合物。在一些实施方案中,提供了包含结构(I)的化合物的脂质纳米颗粒的组合物。脂质纳米颗粒任选地包含选自中性脂质、类固醇和聚合物缀合的脂质的赋形剂。

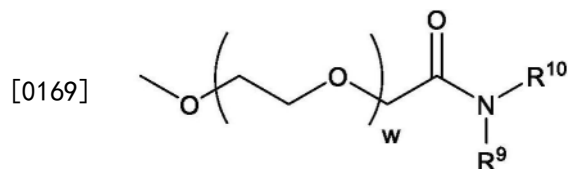
[0164] 在一些实施方案中,提供了包含结构(I)的化合物中的任一种或多种和治疗剂的脂质纳米颗粒。例如,在一些实施方案中,脂质纳米颗粒包含任何结构(I)的化合物和治疗剂以及一种或多种选自中性脂质、类固醇和聚合物缀合的脂质的赋形剂。其它药学上可接受的赋形剂和/或载体也包括在脂质纳米颗粒的各种实施方案中。

[0165] 在一些实施方案中,中性脂质选自:DSPC、DPPC、DMPC、DOPC、POPC、DOPE和SM。在一些实施方案中,中性脂质是DSPC。在各种实施方案中,化合物与中性脂质的摩尔比为约2:1至约8:1。

[0166] 在各种实施方案中,脂质纳米颗粒还包含类固醇或类固醇类似物。在某些实施方案中,类固醇或类固醇类似物是胆固醇。在其中一些实施方案中,化合物与胆固醇的摩尔比为约5:1至1:1或2:1至5:1。

[0167] 在各种实施方案中,聚合物缀合的脂质是PEG化脂质。例如,一些实施方案包括PEG化二酰基甘油(PEG-DAG)(例如1-(单甲氧基-聚乙二醇)-2,3-二肉豆蔻酰甘油(PEG-DMG))、PEG化磷脂酰乙醇胺(PEG-PE)、PEG琥珀酸二酰基甘油(PEG-S-DAG)(例如4-0-(2',3')-二(十四烷酰氧基)丙基-1-0-( $\omega$ -甲氧基(聚乙氧基)乙基)丁二酸酯(PEG-S-DMG))、PEG化神经酰胺(PEG-cer)或PEG二烷氧基丙基氨基甲酸酯(例如 $\omega$ -甲氧基(聚乙氧基)乙基-N-(2,3-二(十四烷氧基)丙基)氨基甲酸酯或2,3-二(十四烷氧基)丙基-N-( $\omega$ -甲氧基(聚乙氧基)氨基甲酸酯)。在各种实施方案中,化合物与PEG化脂质的摩尔比为约100:1至约20:1或约100:1至约10:1。

[0168] 在一些实施方案中,脂质纳米颗粒包含具有以下结构(II)的PEG化脂质:



(II)

[0170]

[0171] 或其药学上可接受的盐、互变异构体或立体异构体,其中:

[0172]  $R^9$ 和 $R^{10}$ 各自独立地是含有10个至30个碳原子的直链或支链、饱和或不饱和的烃基链,其中烃基链任选地被一个或多个酯键间断;并且

[0173]  $w$ 具有30至60的平均值。

[0174] 在一些实施方案中, $R^9$ 和 $R^{10}$ 各自独立地是含有12个至16个碳原子的直链的、饱和的烃基链。在其它实施方案中, $w$ 平均在约42至55的范围内,例如约49。

[0175] 在上述脂质纳米颗粒的一些实施方案中,治疗剂包含核酸。例如,在一些实施方案中,核酸选自反义RNA和信使RNA。

[0176] 在其它不同的实施方案中,本公开涉及用于向有需要的患者施用治疗剂的方法,方法包括制备或提供任何上述组合物,以及向所述患者施用组合物

[0177] 为了施用的目的,本公开的化合物的实施方案(通常以与治疗剂组合的脂质纳米粒子的形式)可以作为原始化学品施用或可以配制为药物组合物。本公开的实施方案的药物组合物包含结构(I)的化合物和一种或多种药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。在一些实施方案中,结构(I)的化合物以有效形成脂质纳米颗粒并递送治疗剂(例如用于治疗所关注的特定的疾病或症状)的量存在于组合物中。合适的浓度和剂量可以由本领域技术人员容易地确定。

[0178] 本公开的实施方案的组合物施用可以通过用于提供类似效用的药剂的任何可接受的施用模式来进行。本公开的实施方案的药物组合物可以配制成固态、半固态、液态或气体形式的制剂,例如片剂、胶囊剂、散剂、颗粒剂、软膏剂、溶液剂、混悬剂、栓剂、注射剂、

吸入剂、凝胶剂、微球剂和气雾剂。施用这种药物组合物的典型途径包括但不限于口服、外用、经皮、吸入、肠胃外、舌下、口腔、直肠、阴道和鼻内。如本文所用的术语肠胃外包括皮下注射、静脉内、肌内、皮内、胸骨内注射或输液技术。配制本公开的实施方案的药物组合物，以允许其中包含的活性成分在向患者施用组合物时是生物可利用的。在一些实施方案中，将施用于受试者或患者的组合物采取一个或多个剂量单位的形式，其中例如片剂可以是单一剂量单位，并且气雾剂形式的本公开的实施方案的化合物的容器可以包含多个剂量单位。制备这样的剂型的实际方法是本领域技术人员已知的或将是明确的；例如，参见 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Edition (Philadelphia College of Pharmacy and Science, 2000)。在一些实施方案中，待施用的组合物将在任何情况下含有治疗有效量的本公开的化合物或其药学上可接受的盐，用于根据本公开的教导治疗所关注的疾病或症状。

[0179] 本公开的实施方案的药物组合物可以是固态或液态的形式。在一方面，载体是颗粒，使得组合物是例如片剂或粉末形式。载体可以是液态，同时组合物是例如口服糖浆、可注射液体或气雾剂，所述气雾剂可用于例如吸入施用。

[0180] 当用于口服施用时，某些实施方案的药物组合物优选为固态或液态形式，其中半固态、半液态、混悬剂和凝胶形式包括在本文认为是固态或液态的形式中。

[0181] 作为用于口服施用的固态组合物，一些实施方案的药物组合物可以配制成散剂、颗粒剂、压制片剂、丸剂、胶囊剂、咀嚼剂、糯米纸囊剂等形式。这样的固态组合物通常含有一种或多种惰性稀释剂或可食用载体。此外，可以存在一种或多种以下物质：粘合剂，例如羧甲基纤维素、乙基纤维素、微晶纤维素、黄蓍胶或明胶；赋形剂，例如淀粉、乳糖或糊精；崩解剂，例如海藻酸、海藻酸钠、Primogel、玉米淀粉等；润滑剂，例如硬脂酸镁或Sterotex；助流剂，例如胶体二氧化硅；甜味剂，例如蔗糖或糖精；调味剂，例如薄荷、水杨酸甲酯或橙调味剂；以及着色剂。

[0182] 当一些实施方案的药物组合物为胶囊（例如，明胶胶囊）形式时，除了上述类型的材料之外，其可以含有液态载体，例如聚乙二醇或油。

[0183] 一些实施方案的药物组合物可以是液态形式，例如酏剂、糖浆剂、溶液剂、乳液剂或混悬剂。作为两个示例，液态可以用于口服施用或通过注射递送。当用于口服施用时，优选的组合物除了含有结构(I)的化合物之外，还含有一种或多种甜味剂、防腐剂、染料/着色剂和增香剂。在打算通过注射施用的组合物中，可以包含表面活性剂、防腐剂、润湿剂、分散剂、悬浮剂、缓冲剂、稳定剂和等渗剂中的一种或多种。

[0184] 本公开的实施方案的液态药物组合物，无论它们是溶液剂、混悬剂或其它类似形式，可以包含一种或多种以下佐剂：无菌稀释剂，例如注射用水、盐水溶液，优选生理盐水、林格氏溶液、等渗氯化钠、非挥发性油（例如可以用作溶剂或悬浮介质的合成的甘油单酯或甘油二酯）、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其它溶剂；抗菌剂，例如苄醇或对羟基苯甲酸甲酯；抗氧化剂，例如抗坏血酸或亚硫酸氢钠；螯合剂，例如乙二胺四乙酸；缓冲剂，例如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐，以及用于调节张力的试剂，例如氯化钠或右旋糖；用作冷冻保护剂的试剂，例如蔗糖或海藻糖。肠胃外制剂可以封装在安瓿、一次性注射器或由玻璃或塑料制成的多剂量小瓶中。生理盐水是优选的佐剂。可注射的药物组合物优选是无菌的。

[0185] 本公开实施方案的药物组合物可用于局部施用，在这种情况下，载体可适当地包

含溶液、乳液、软膏或凝胶基质。例如,基质可包含一种或多种以下物质:凡士林、羊毛脂、聚乙二醇、蜂蜡、矿物油、稀释剂(例如水和醇)、以及乳化剂和稳定剂。增稠剂可以存在于局部施用的药物组合物中。如果打算用于经皮施用,组合物可以包括经皮贴剂或离子电渗装置。

[0186] 本公开实施方案的药物组合物可以包含改变固态或液态剂量单位的物理形式的各种材料。例如,组合物可以包含在活性成分周围形成包衣壳的材料。形成包衣壳的材料通常是惰性的,并且可以选自例如糖、虫胶和其它肠溶包衣剂。或者,可以将活性成分包装在明胶胶囊中。

[0187] 呈固态或液态形式的本公开的实施方案的药物组合物可以包含与本公开的化合物结合并由此帮助递送LNP的试剂。可以发挥这种作用的合适试剂包括单克隆或多克隆抗体,或蛋白质。

[0188] 本公开的实施方案的药物组合物可以由可以作为气雾剂施用的剂量单位组成。术语气雾剂用于表示从胶体性质的那些系统到由加压包装组成的系统的多种系统。递送可以通过液化或压缩气体或通过分配活性成分的合适的泵系统进行。本公开的实施方案的LNP的气雾剂可以在单相、双相或三相系统中递送,以递送活性成分。气雾剂的递送包括必需的容器、抛射剂、阀门、子容器等,它们一起可以形成套件。本领域技术人员无需过多的实验就可以确定优选的气雾剂。

[0189] 本公开实施方案的药物组合物可以通过制药领域众所周知的方法制备。例如,打算通过注射施用的药物组合物可以通过将本公开的脂质纳米颗粒与无菌蒸馏水或其它载体组合以形成溶液来制备。可以添加表面活性剂以促进均匀溶液或混悬液的形成。表面活性剂是与本公开的化合物非共价相互作用以便促进化合物在水性递送系统中的溶解或均匀悬浮的化合物。

[0190] 本公开的实施方案的组合物或其药学上可接受的盐以治疗有效量施用,所述治疗有效量将取决于多种因素,包括所使用的具体治疗剂的活性;治疗剂的代谢稳定性和作用时间;患者的年龄、体重、一般身体状况、性别和饮食;施用方式和施用时间;代谢速率;药物联用;特定症状或状况的严重性;和接受治疗的受试者。

[0191] 本公开的实施方案的组合物还可以与一种或多种其它治疗剂的施用同时、之前或之后施用。这样的组合疗法包括施用本公开的实施方案的组合物和一种或多种另外的活性剂的单一药物剂量制剂,以及施用本公开的实施方案的组合物和在其自身单独的药物剂量制剂中的每种活性剂。例如,本公开的实施方案的组合物和其它活性剂可以在单一口服剂量组合物(例如片剂或胶囊剂)中一起施用于患者,或者在单独的口服剂量制剂中施用每种活性剂。当使用单独的剂量制剂时,本公开的实施方案的化合物和一种或多种另外的活性剂可以在基本上相同的时间施用,即同时施用,或分别交错施用,即顺序施用;联合治疗应理解为包括所有这些方案。

[0192] 上述化合物和组合物的制备方法在下文和/或本领域中已知中描述。

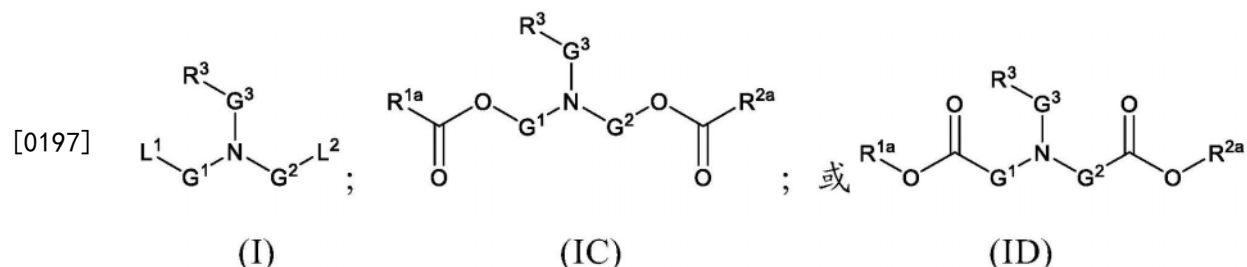
[0193] 本领域技术人员将理解,在本文所述的方法中,中间体化合物的功能团可能需要通过合适的保护基团保护。这样的功能团包括羟基、氨基、巯基和羧酸。羟基的合适保护基团包括三烷基甲硅烷基或二芳基烷基甲硅烷基(例如,叔丁基二甲基甲硅烷基、叔丁基二苯基甲硅烷基或三甲基甲硅烷基)、四氢吡喃基、苄基等。氨基、脒基和胍基的合适保护基团包括叔丁氧羰基、苄氧羰基等。巯基的合适保护基团包括-C(O)-R”(其中R”是烷基、芳基或

芳基烷基)、对甲氧基苄基、三苯甲基等。羧酸的合适保护基团包括烷基、芳基或芳烷基酯。保护基团可以根据本领域技术人员已知的和如本文所述的标准技术加入或除去。在Green, T.W.and P.G.M.Wutz, *Protective Groups in Organic Synthesis* (1999), 3<sup>rd</sup> Ed., Wiley 中详细描述了保护基团的使用。如本领域技术人员将理解的, 保护基团也可以是聚合物树脂, 例如王氏树脂、Rink树脂或2-氯三苯甲基-氯化物树脂。

[0194] 本领域技术人员还将理解, 尽管本公开的化合物的这样的受保护的衍生物可能不具有这样的药理学活性, 但是它们可以被施用至哺乳动物并且随后在体内代谢以形成具有药理学活性的本公开的化合物。这样的衍生物因此可以被描述为“前药”。本公开的化合物的所有前药都包括在本公开的范围之内。

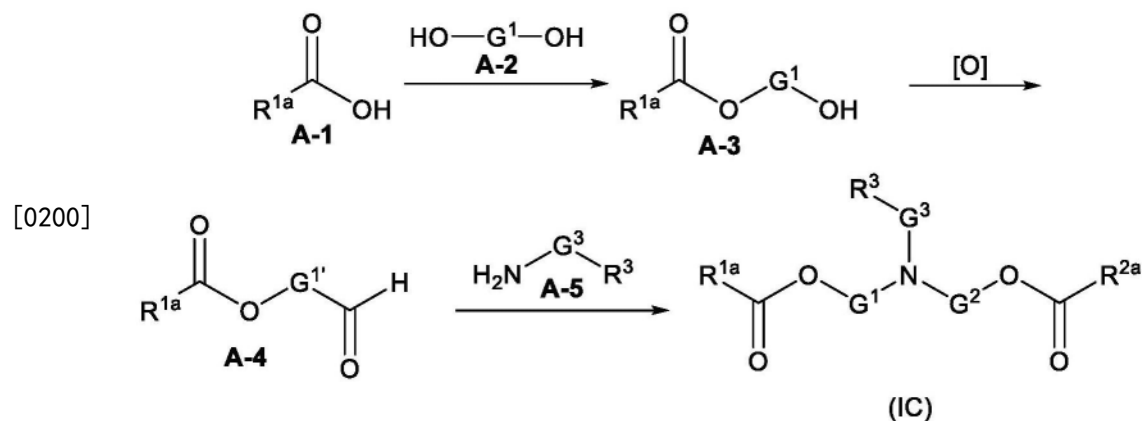
[0195] 此外, 以游离碱或酸形式存在的本公开实施方案的化合物可以通过本领域技术人员已知的方法用适当的无机或有机碱或酸处理而转化成其药学上可接受的盐。本公开的实施方案的化合物的盐可以通过标准技术转化成它们的游离碱或酸形式。

[0196] 以下通用反应方案1和2说明了制备本发明化合物, 即结构(I)、结构(IC)或结构(ID)的化合物的方法:



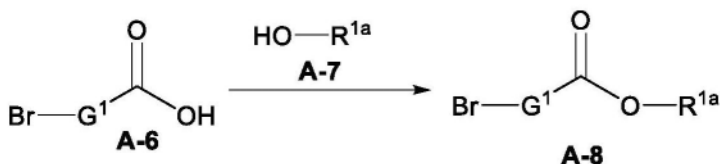
[0198] 或其药学上可接受的盐、互变异构体或立体异构体, 其中 $R^{1a}$ 、 $R^{2a}$ 、 $R^3$ 、 $L^1$ 、 $L^2$ 、 $G^1$ 、 $G^2$ 和 $G^3$ 如本文所定义。应理解, 本领域技术人员能够通过类似方法或通过组合本领域技术人员已知的其它方法制备这些化合物。还应理解, 本领域技术人员将能够以如下所述的类似方式通过使用适当的起始组分并根据需要修改合成参数来制备下文未具体说明的结构(I)、(IC)或(ID)的其它化合物。通常, 起始组分可以从例如Sigma Aldrich、Lancaster Synthesis、Inc.、Maybridge、Matrix Scientific、TCI和Fluorochem USA等的来源获得, 或根据本领域技术人员已知的来源合成(参见, 例如, *Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure*, 5th edition (Wiley, December 2000)) 或如本发明所述制备。

[0199] 通用反应方案1

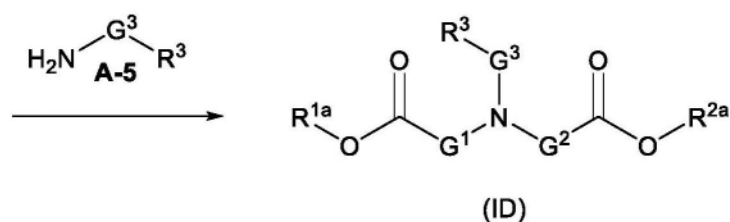


[0201] 通用反应方案1提供了用于制备结构 (IC) 的化合物的示例性方法,其中结构 (I) 的  $L^1$  和  $L^2$  分别是  $-O(C=O)R^{1a}$  和  $-O(C=O)R^{2a}$ 。通用反应方案1中的  $G^1$ 、 $G^3$ 、 $R^{1a}$ 、 $R^{2a}$  和  $R^3$  如本文所定义,并且  $G^1$  是指  $G^1$  的短一个碳的同系物。结构 A-1 的化合物是购买的或根据本领域已知的方法制备的。A-1 与二醇 A-2 在适当的缩合条件 (例如, DCC) 下反应,产生酯/醇 A-3,然后可以将所述 A-3 氧化 (例如, PCC) 成醛 A-4。A-4 与胺 A-4 在还原胺化条件下反应,产生结构 (IC) 的化合物。

[0202] 通用反应方案2



[0203]



[0204] 通用反应方案2提供了制备结构 (ID) 的化合物的示例性方法,其中结构 (I) 的  $L^1$  和  $L^2$  分别是  $-(C=O)OR^{1a}$  和  $-(C=O)OR^{2a}$ 。通用反应方案2中的  $G^1$ 、 $G^3$ 、 $R^{1a}$ 、 $R^{2a}$  和  $R^3$  如本文所定义。结构 A-6 的化合物是购买的或根据本领域已知的方法制备的。A-6 可以是其它离去基团,例如碘化物、氯化物、甲苯磺酸酯、三氟甲磺酸酯等。A-6 与醇 A-7 在适当的酯化条件下在酸性条件下反应,产生酯 A-8。A-8 与胺 A-5 在还原胺化条件下反应,产生结构 (ID) 的化合物。

[0205] 应当注意,用于制备结构 (IC) 或 (ID) 的化合物的各种替代策略是本领域普通技术人员可获得的。例如,结构 (IC) 或 (ID) 的其它化合物 (其中  $L^1$  和  $L^2$  不是酯) 可以根据类似的方法使用适当的原料制备。此外,通用反应方案1和2描述了结构 (IC) 和 (ID) 的化合物的制备,其中  $G^1$  和  $G^2$  是相同的;然而,这不是本发明的必需方面,并且对上述反应方案的修改可能产生  $G^1$  和  $G^2$  不同的化合物。此外,通用反应方案1和2描述了结构 (IC) 和 (ID) 的化合物的制备,其中  $R^{1a}$  和  $R^{2a}$  是相同的;然而,这不是本发明的必需方面,并且对上述反应方案的修改可以得到  $R^{1a}$  和  $R^{2a}$  不同的化合物。根据需要使用保护基团和对上述通用反应方案的其它修改对本领域普通技术人员来说是明确的。提供以下示例是为了说明而不是限制。

[0206] 实施例1

[0207] 使用脂质纳米颗粒组合物的荧光素酶 mRNA 体内评估

[0208] 根据 PCT 公开号 WO 2015/199952 和 WO 2017/004143 中描述的通用方法制备和测试脂质纳米颗粒,其全部公开内容通过引用并入本文。简言之,阳离子脂质、DSPC、胆固醇和 PEG-脂质以约 50:10:38.5:1.5 或约 47.5:10:40.7:1.8 的摩尔比溶解在乙醇中。制备总脂质与 mRNA 重量比为约 10:1 至 40:1 的脂质纳米颗粒 (LNP)。在 10mM 至 50mM 柠檬酸盐或醋酸盐缓冲液 (pH4) 中将 mRNA 稀释至 0.2mg/mL。使用注射泵将乙醇脂质溶液与 mRNA 水溶液以约 1:5 至 1:3 (vol/vol) 的比例混合,总流速超过 15mL/min。然后除去乙醇,并通过透析用 PBS 替换外部缓冲液。最后,通过 0.2 $\mu$ m 孔无菌过滤器过滤脂质纳米颗粒。使用 Malvern Zetasizer

Nano ZS (Malvern, UK) 通过准弹性光散射测定, 脂质纳米颗粒的粒径为约55nm至95nm直径, 在一些情况下为约70nm至90nm直径。

[0209] 根据机构动物护理委员会 (ACC) 和加拿大动物护理委员会 (CCAC) 制定的指南, 在6至8周龄雌性C57BL/6小鼠 (Charles River) 或8至10周龄CD-1 (Harlan) 小鼠 (Charles River) 中进行研究。通过尾静脉注射全身性施用不同剂量的mRNA-脂质纳米颗粒, 并且在施用后的特定时间点 (例如, 4小时) 将动物安乐死。将肝和脾收集在预先称重的管中, 测定重量, 立即在液氮中快速冷冻并储存在-80°C直至处理用于分析。

[0210] 对于肝, 在2mL FastPrep试管 (MP Biomedicals, Solon OH) 中切出约50mg用于分析。将1/4"陶瓷球 (MP Biomedicals) 加入到每个管中, 并将平衡至室温的500 $\mu$ L的Glo裂解缓冲液—GLB (Promega, Madison WI) 加入到肝组织中。肝组织用FastPrep24仪器 (MP Biomedicals) 以2 $\times$ 6.0m/s匀化15秒。将匀浆于室温孵育5分钟, 然后在GLB中按1:4稀释, 并使用SteadyGlo萤光素酶测定系统 (Promega) 评估。具体地, 使50 $\mu$ L稀释的组织匀浆与50 $\mu$ L的SteadyGlo底物反应, 振荡10秒, 然后孵育5分钟, 然后使用CentroXS-LB 960光度计 (Berthold Technologies, 德国) 定量。通过使用BCA蛋白质测定试剂盒 (Pierce, Rockford IL) 确定所测定的蛋白质的量。然后将相对发光单位 (RLU) 归一化至所测定的总 $\mu$ g蛋白质。为了将RLU转化为ng萤光素酶, 用QuantiLum重组萤光素酶 (Promega) 制作标准曲线。

[0211] 来自Trilink Biotechnologies的FLuc mRNA (L-6107或L-7202) 将表达最初分离自萤火虫 (*Photinus pyralis*) 的萤光素酶蛋白。Fluc通常用于哺乳动物细胞培养以测量基因表达和细胞活力。它在底物萤光素存在下发出生物发光。这种加帽的和多聚腺苷酸化的mRNA相对于尿苷和/或胞苷核苷被完全取代。

[0212] 实施例2

[0213] 使用脂质纳米颗粒组合物的免疫球蛋白G (IgG) mRNA体内评估

[0214] 将结构 (I) 的脂质、DSPC、胆固醇和PEG-脂质以50:10:38.5:1.5或47.5:10:40.7:1.8的摩尔比溶解在乙醇中。脂质纳米颗粒 (LNP) 以总脂质与mRNA重量比为约10:1至40:1制备。简言之, 将mRNA在10mM至50mM柠檬酸盐缓冲液 (pH 4) 或10mM至25mM乙酸盐缓冲液 (pH 4) 中稀释至0.2mg/mL。使用注射泵以约1:5至1:3 (vol/vol) 的比率将乙醇脂质溶液与mRNA水溶液混合, 总流速高于15mL/min。然后除去乙醇, 并通过透析用PBS替换外部缓冲液。最后, 通过0.2 $\mu$ m孔无菌过滤器过滤脂质纳米颗粒。

[0215] 根据机构动物护理委员会 (ACC) 和加拿大动物护理委员会 (CCAC) 制定的指南, 在6至8周龄CD-1/ICR小鼠 (Envigo) 中进行研究。通过尾静脉注射全身性施用不同剂量的mRNA-脂质纳米颗粒, 并且在施用后的特定时间点 (例如, 24小时) 将动物安乐死。收集全血, 随后通过于4°C以2000x g离心全血10分钟来分离血清, 并于-80°C储存直至用于分析。

[0216] 对于免疫球蛋白G (IgG) ELISA (Life Diagnostics人IgG ELISA试剂盒), 血清样品用1x稀释液稀释100至15000倍。将100 $\mu$ L稀释的血清以及人IgG标准品分装到抗人IgG包被的96孔板中, 一式两份, 并在板振荡器中以150rpm在25°C孵育45分钟。使用洗板器 (400 $\mu$ L/孔) 用1x洗涤溶液将孔洗涤5次。向每个孔中加入100 $\mu$ L的HRP缀合物, 并在板振荡器中在与上述相同的条件下孵育。使用洗板器 (400 $\mu$ L/孔) 将孔再次用1x洗涤溶液洗涤5次。向每个孔中加入100 $\mu$ L的TMB试剂, 并在板振荡器中在上述相同条件下孵育。通过向每个孔中添加100 $\mu$ L的终止溶液来终止反应。用酶标仪于450nm (A450) 读取吸光度。小鼠血清中人IgG的量通

过将测定标准的A450值对人IgG浓度作图来确定。

[0217] 实施例3

[0218] 配制的脂质的pK<sub>a</sub>的测定

[0219] 如其它地方所述,配制的阳离子脂质的pK<sub>a</sub>与LNP递送核酸的有效性相关(参见Jayaraman等人,Angewandte Chemie,国际版(2012),51(34),8529-8533;Semple等人,Nature Biotechnology 28,172-176(2010))。pK<sub>a</sub>的优选范围为约5至约7。使用基于2-(对甲苯胺基)-6-萘磺酸(TNS)的荧光的测定,在脂质纳米颗粒中测定每种阳离子脂质的pK<sub>a</sub>。使用如实施例1中所述的在线方法制备在PBS中以0.4mM总脂质浓度包含阳离子脂质/DSPC/胆固醇/PEG-脂质(47.5mol%/10mol%/40.7mol%/1.8mol%)的脂质纳米颗粒。将TNS制备成蒸馏水中的100μM储备溶液。将囊泡在含有10mM HEPES、10mM MES、10mM乙酸铵、130mM NaCl的2mL缓冲溶液中稀释至24μM脂质,其中pH为2.5至11。加入TNS溶液的等分试样以得到1μM的最终浓度,并在涡旋混合之后,于室温在SLM AMINCO Series 2发光分光光度计中使用321nm和445nm的激发和发射波长测量荧光强度。对荧光数据应用S形最佳拟合分析,并且pK<sub>a</sub>被测量为产生半数最大荧光强度的pH值。

[0220] 实施例4

[0221] 使用体内荧光素酶/IgG mRNA表达啮齿动物模型测定含有各种阳离子脂质的脂质纳米颗粒制剂的功效

[0222] 使用以下摩尔比配制表2中所示的本公开的代表性化合物:50%阳离子脂质/10%二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)/38.5%胆固醇/1.5%PEG脂质2-[2-(ω-甲氧基(聚乙二醇<sub>2000</sub>)乙氧基)-N,N-双十四烷基乙酰胺]或47.5%阳离子脂质/10% DSPC/40.7%胆固醇/1.8%PEG脂质。就相对活性而言,如实施例1所示通过在尾静脉注射给药后4小时测量肝中的荧光素酶表达来确定,或如实施例2所示通过测量小鼠血清中的人IgG含量的方法来确定。活性对比在1.0mg mRNA/kg或0.5mg mRNA/kg或0.3mg mRNA/kg剂量下进行,并表示为如实施例1中所示在施用后4小时测量的ng荧光素酶/g肝,或如实施例2中所示在施用后24小时测量的μg IgG/mL血清。表2中的化合物编号指的是表1中的化合物编号。

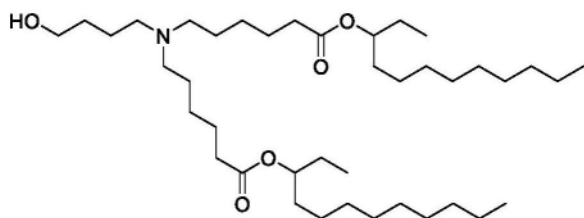
[0223] 表2. 阳离子脂质和相关活性

化合物 编号	pKa	0.5 mg/kg 下肝荧 光酶素(ng luc 素 /g)	0.3 mg/kg 下血 清 IgG (ug/mL)	1.0 mg/kg 下血 清 IgG (ug/mL)
I-1	5.88	1233 ± 305	-	-
I-2	5.92	511 ± 79	-	-

[0224]

化合物 编号	pKa	0.5 mg/kg 下肝荧 光酶素 (ng luc 素 /g)	0.3 mg/kg 下血 清 IgG (ug/mL)	1.0 mg/kg 下血 清 IgG (ug/mL)
I-3	6.03	3633 ± 1416	-	-
I-3 类似物	6.62	462 ± 425	-	-
[0225] I-4	5.88	1336 ± 329* *在 0.3 mg/kg 下测 定 14888 ± 2009** **在 1.0 mg/kg 下 测定	-	-
I-9	6.47	-	24.36 ± 4.39	239.26 ± 39.80
I-10	6.12	-	12.94 ± 2.03	142.26 ± 26.31

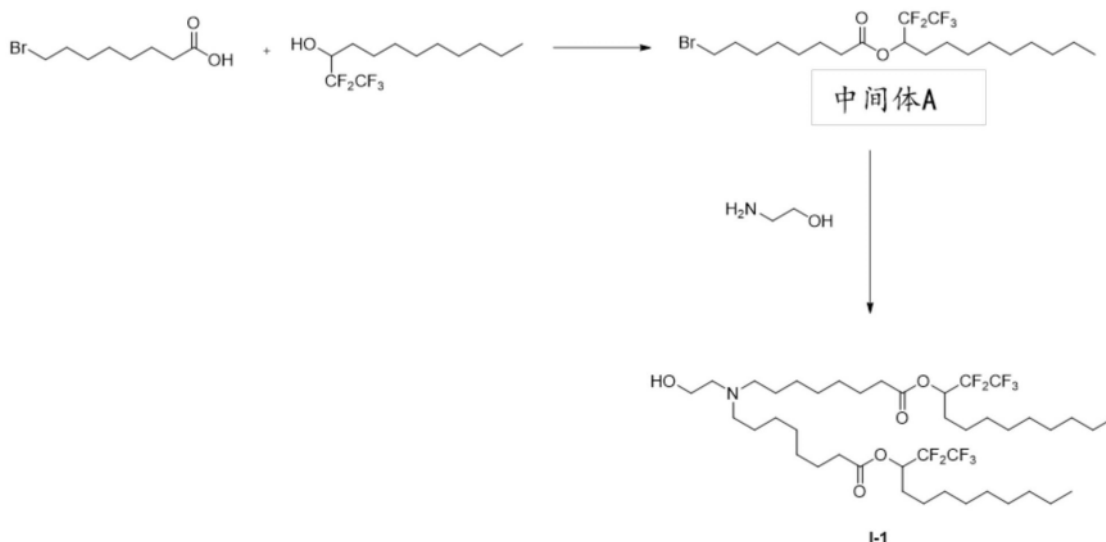
[0226] I-3类似物是化合物I-3的非氟代类似物,具有以下结构:



[0228] 实施例5

[0229] 8,8' - ((2-羟基乙基)氮烷二基)二辛酸双(1,1,1,2,2-五氟十二烷-3-基)酯

[0230] (化合物I-1)



[0232] 8-溴辛酸1,1,1,2,2-五氟十二烷-3-基酯(中间体A)的合成

[0233] 向装有有无水DCM中的1,1,1,2,2-五氟十二烷-3-醇(0.70g,2.53mmol)、8-溴辛酸(1.13g,5.06mmol)和4-二甲基氨基吡啶(DMAP)(60mg)的圆底烧瓶中加入二环己基碳二亚胺(DCC)(1.1g,5.33mmol)。通过过滤弃去沉淀。浓缩滤液,并且所得残余物通过硅胶柱色谱纯化,用乙酸乙酯在己烷中的梯度混合物(0%至3%)洗脱。这得到8-溴辛酸1,1,1,2,2-五氟十二烷-3-基酯的无色油状物(1.00g,2.08mmol,82%)。

[0234] I-1的合成

[0235] 向2-氨基乙醇(33mg,0.55mmol)在15mL无水THF中的溶液中加入8-溴辛酸1,1,1,2,2-五氟十二烷-3-基酯(0.50g,1.04mmol)、碳酸钾(0.14g,1.04mmol)、碳酸铯(53mg,0.16mmol)和碘化钠(10mg)。将混合物在 $N_2$ 下加热回流7天。减压蒸发溶剂,将残余物溶于己烷/EtOAc(9:1)的混合物中,用水和盐水洗涤。分离有机层,用无水硫酸钠干燥,过滤,减压蒸发,得到无色油状物。粗产物通过硅胶柱色谱(DCM中0%至5% MeOH的梯度)纯化若干次,得到无色油状物的I-1(50mg,0.06mmol,11%)。 $^1H$ NMR(400MHz, $CDCl_3$ ) $\delta$ :5.51-5.37(m,2H),3.53(t,5.4Hz,2H),2.58(t,5.4Hz,2H),2.45(t,7.4Hz,4H),2.37(t,7.4Hz,4H),1.81-1.54(m,8H),1.48-1.38(m,7.4Hz,4H),1.37-1.19(m,40H),0.88(t,7.0Hz,6H)。ESI-MS: $C_{42}H_{73}F_{10}NO_5$ [M+H] $^+$ 的MW。计算值862.5;实测值862.7。

[0236] 实施例6

[0237] 6,6'-((3-羟基丙基)氮烷二基)二己酸双(1,1,1,2,2-五氟十二烷-3-基)酯

[0238] (化合物I-2)

[0239] 根据实施例5的通用程序制备化合物I-2,得到0.16g无色油状物,0.19mmol,18%。 $^1H$ NMR(400MHz, $CDCl_3$ ) $\delta$ :5.53-5.38(m,2H),3.80(t,5.2Hz,2H),2.64(t,5.2Hz,2H),2.45-2.35(m,8H),1.83-1.72(m,4H),1.72-1.62(m,6H),1.55-1.45(m,2H),1.83-1.72(m,4H),1.39-1.20(m,32H),0.89(t,7.2Hz,6H)。ESI-MS: $C_{39}H_{67}F_{10}NO_5$ [M+H] $^+$ 的MW。计算值820.5;实测值820.6。

[0240] 实施例7

[0241] 6,6'-((4-羟基丁基)氮烷二基)二己酸双(1,1,1,2,2-五氟十二烷-3-基)酯

[0242] (化合物I-3)

[0243] 根据实施例5的通用程序制备化合物I-3,得到0.18g无色油状物,0.21mmol,16%。<sup>1</sup>HNMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 5.50-5.37 (m, 2H), 3.57-3.50 (m, 2H), 2.48-2.33 (m, 10H), 1.84-1.56 (m, 12H), 1.55-1.44 (m, 4H), 1.39-1.18 (m, 32H), 0.88 (t, 7.0Hz, 6H)。ESI-MS: C<sub>40</sub>H<sub>69</sub>F<sub>10</sub>NO<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup>的MW。计算值834.5;实测值834.7。

[0244] 实施例8

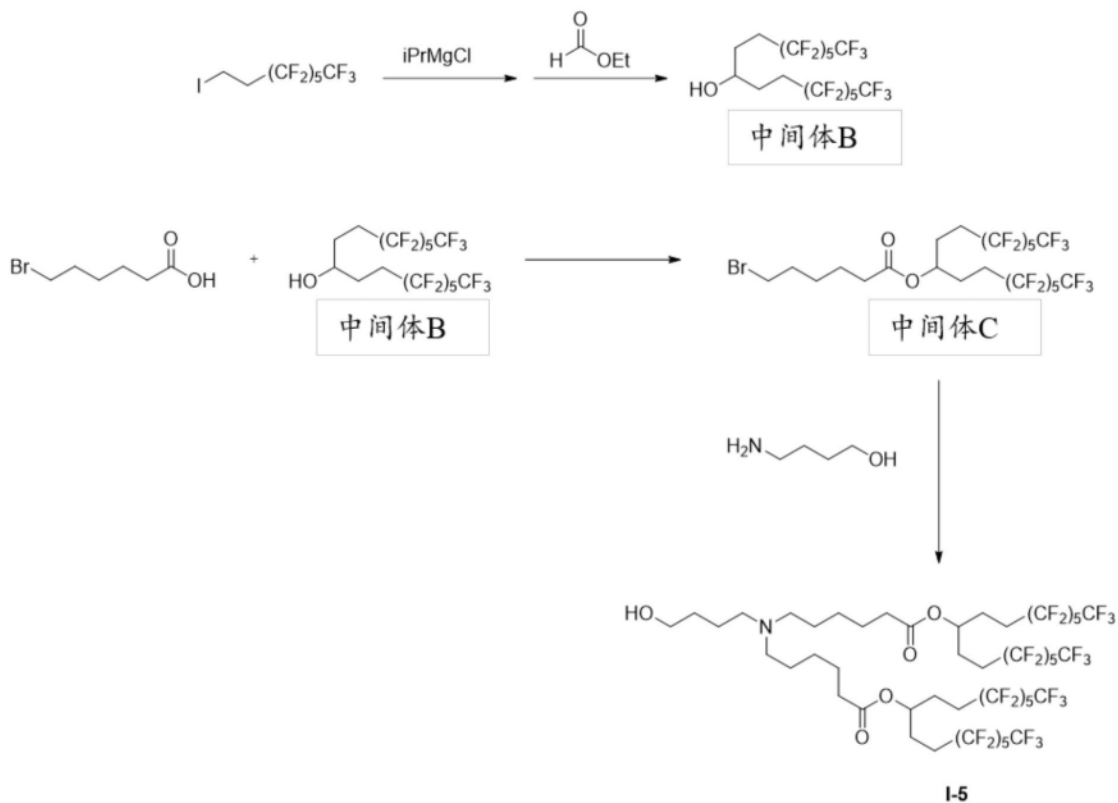
[0245] 6,6' - ((5-羟基戊基)氮烷二基)二己酸双(1,1,1,2,2-五氟十二烷-3-基)酯

[0246] (化合物I-4)

[0247] 根据实施例5的通用程序制备化合物I-4,得到85mg无色油状物,0.10mmol,12%。<sup>1</sup>HNMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 5.50-5.37 (m, 2H), 3.65 (t, 6.4Hz, 2H), 2.61-2.42 (m, 6H), 2.38 (t, 7.1Hz, 4H), 1.84-1.45 (m, 14H), 1.43-1.19 (m, 36H), 0.88 (t, 3H), 1.84-1.45 (m, 14H), 1.43-1.19 (m, 36H), 0.88 (t, 7.0Hz, 6H)。ESI-MS: C<sub>41</sub>H<sub>71</sub>F<sub>10</sub>NO<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup>的MW。计算值848.5;实测值848.7。

[0248] 实施例9

[0249] 6,6' - ((4-羟基丁基)氮烷二基)二己酸双(1,1,1,2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,12,12,13,13,14,14,15,15,16,16,17,17,17-二十六氟十七烷-9-基)酯(化合物I-5)



[0250]

[0251] 1,1,1,2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,12,12,13,13,14,14,15,15,16,16,17,17,17-二十六氟十七烷-9-醇(中间体B)的合成

[0252] 将1H,1H,2H,2H-全氟辛基碘(5g,10.55mmol)缓慢加入到冰冷却的异丙基氯化镁(2.0M于THF溶液中,4.5ml)和无水THF(10mL)的溶液中,使内部温度保持在15℃以下。20min后,经5min的时间加入甲酸乙酯(0.35mL,4.36mmol)。除去冰水浴,并将反应混合物搅拌半小时。将反应烧瓶再次在冰水上冷却,并缓慢加入HCl的冷溶液(1N,20mL)。将其用Et<sub>2</sub>O萃取,将有机层用Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>水溶液洗涤,用MgSO<sub>4</sub>干燥,过滤并减压蒸发,得到白色固体。从二氯甲

烷中重结晶得到纯1,1,1,2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,12,12,13,13,14,14,15,15,16,16,17,17,17-二十六氟十七烷-9-醇(3.5g,4.83mmol,91%)。

[0253] 6-溴己酸1,1,1,2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,12,12,13,13,14,14,15,15,16,16,17,17,17-二十六氟十七烷-9-基酯(中间体C)

[0254] 向装有在水THF中的中间体B(1.09g,1.50mmol)、6-溴辛酸(0.59g,3.00mmol)和4-二甲基氨基吡啶(DMAP)(0.28g)的圆底烧瓶中加入二环己基碳二亚胺(DCC)(0.65g,3.15mmol)。将混合物于室温搅拌过夜。然后将固体过滤并用Et<sub>2</sub>O洗涤。浓缩滤液。将残余物通过二氧化硅垫过滤,用Et<sub>2</sub>O洗涤并浓缩,得到白色固体(1.20g,1.33mmol),将其不经进一步纯化即用于下一步骤。

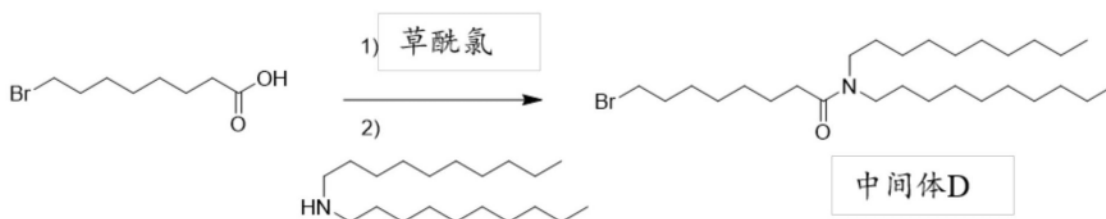
[0255] I-5的合成

[0256] 向4-氨基丁-1-醇(74mg,0.83mmol)在水THF中的溶液中加入中间体C(1.20g,1.33mmol)、碳酸钾(0.22g,1.57mmol)、碳酸铯(81mg,0.25mmol)和碘化钠(10mg)。将混合物在N<sub>2</sub>下加热回流7天。减压蒸发溶剂,将残余物溶于DCM,用饱和NaHCO<sub>3</sub>溶液、水和盐水洗涤。分离有机层,用无水硫酸钠干燥,过滤,减压蒸发。将粗产物通过硅胶柱色谱(DCM中0%至5% MeOH的梯度)纯化若干次,得到呈无色油状物的I-5(40mg,0.02mmol,3.0%)。<sup>1</sup>HNMR(400MHz,CDCl<sub>3</sub>) $\delta$ :5.00(五重峰,6.1Hz,2H),3.56-3.50(m,2H),2.44-2.37(m,6H),2.34(t,7.4Hz,4H),2.20-2.02(m,8H),1.97-1.81(m,8H),1.70-1.43(m,12H),1.35-1.23(m,4H)。

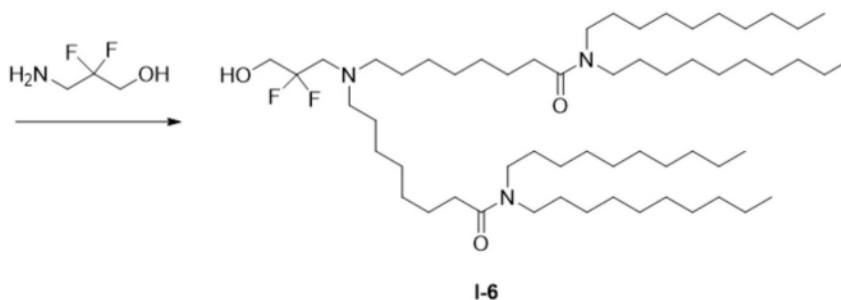
[0257] 实施例10

[0258] 8,8'-(2,2-二氟-3-羟基丙基)氮烷二基)双(N,N-二癸基辛酰胺)

[0259] (化合物I-6)



[0260]



[0261] 8-溴-N,N-二癸基辛酰胺(中间体D)的合成

[0262] 于室温在Ar下向8-溴辛酸(1当量,10.78mmol,2.41g)在DCM(20mL)和DMF(d 0.944;0.1mL)的溶液中添加草酰氯(2.5当量,27mmol,3.42g,2.35mL)。将所得混合物于室温搅拌过夜。接着,将混合物在减压下浓缩。将残余物溶解于15mL DCM中并于室温缓慢添加至二癸基胺(1.1当量,3.53g,11.86mmol)和三乙胺(53.9mmol,7.5mL)和DMAP(10mg)在DCM(20mL)中的溶液中。当添加完成时,将混合物于室温搅拌过夜,然后浓缩。将残余物溶解在

己烷(100mL)中并在减压下装载到硅胶柱上。然后在减压下用己烷和乙酸乙酯(100:0至90:10)的混合物洗涤柱。得到所需产物,为黄色油状物,4.81g,9.6mmol,89%。

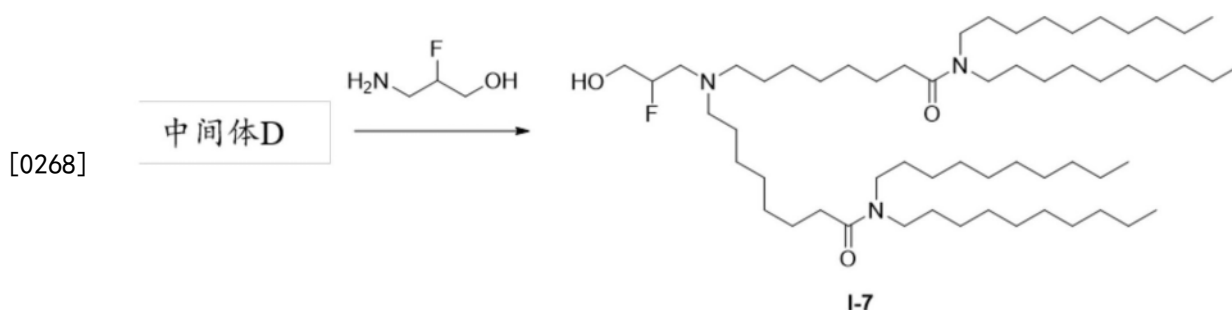
[0263] I-6的合成

[0264] 将中间体D(1.0mmol,500mg)、3-氨基-2,2-二氟丙-1-醇(0.62mmol,69mg)和DIEA(3.0mmol,0.43mL)在ACN(6mL)中的混合物在72°C加热48小时。将反应混合物浓缩并将粗物质通过自动快速色谱纯化(含有1% Et<sub>3</sub>N的己烷中5%至60% EtOAc),得到化合物I-6(55mg,12%)。<sup>1</sup>HNMR(600MHz,CDCl<sub>3</sub>) δ4.87(s,1H),3.88(t,J=12.1Hz,2H),3.33-3.27(m,4H),3.24-3.18(m,4H),2.96(t,J=12.7Hz,2H),2.56-2.51(m,4H),2.32-2.26(m,4H),1.68-1.61(m,6H),1.59-1.42(m,12H),1.39-1.23(m,70H),0.93-0.87(m,12H)。ESI-MS: C<sub>59</sub>H<sub>117</sub>F<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>[M+H]<sup>+</sup>的MW。计算值954.9;实测值955.1。

[0265] 实施例11

[0266] 8,8' - ((2-氟-3-羟基丙基)氮烷二基)双(N,N-二癸基辛酰胺)

[0267] (化合物I-7)



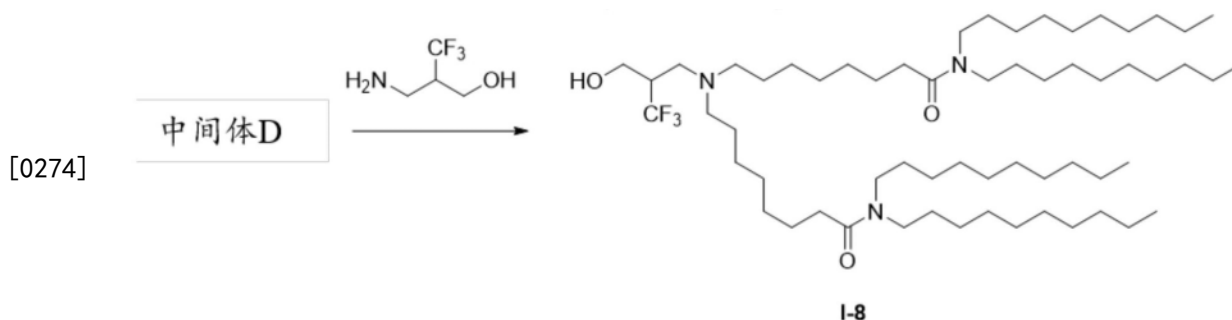
[0269] I-7的合成

[0270] 将中间体D(1.0mmol,500mg)、3-氨基-2-氟丙-1-醇盐酸盐(0.62mmol,80mg)和DIEA(3.1mmol,0.54mL)在ACN(6mL)中的混合物在72°C加热24h,然后在55°C加热72h。将反应混合物浓缩并将粗物质通过自动快速色谱纯化(含有1% Et<sub>3</sub>N的己烷中5%至60% EtOAc),得到化合物I-7(45mg,10%)。<sup>1</sup>HNMR(400MHz,CDCl<sub>3</sub>) δ4.60(dt,J=46.8,4.8Hz,1H),3.92-3.80(m,2H),3.35-3.24(m,4H),3.24-3.12(m,4H),2.85-2.72(m,2H),2.53-2.37(m,4H),2.31-2.23(m,2H),4H),1.67-1.40(m,20H),1.38-1.19(m,66H),0.94-0.82(m,12H)。ESI-MS: C<sub>59</sub>H<sub>118</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>3</sub>[M+H]<sup>+</sup>的MW。计算值936.9;实测值937.0。

[0271] 实施例12

[0272] 8,8' - ((3,3,3-三氟-2-(羟基甲基)丙基)氮烷二基)双(N,N-二癸基辛酰胺)

[0273] (化合物I-8)



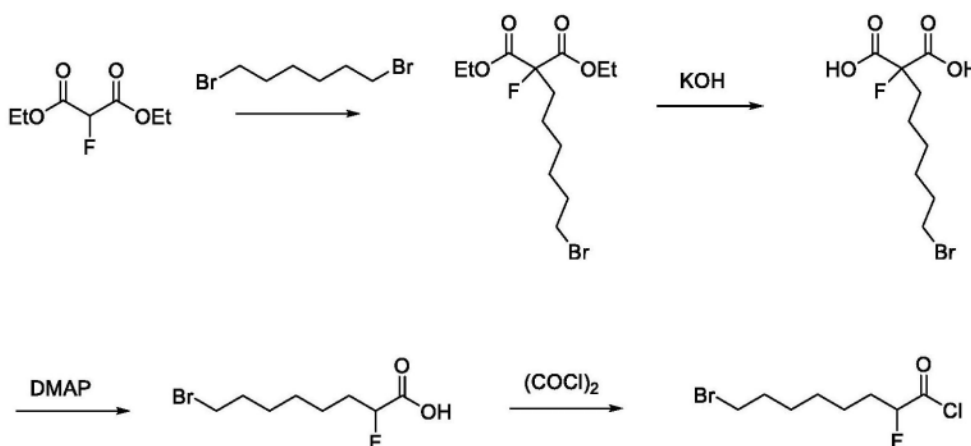
[0275] I-8的合成

[0276] 将中间体D (1.0mmol, 500mg)、2-(氨基甲基)-3,3,3-三氟丙-1-醇 (0.62mmol, 111mg) 和DIEA (2.4mmol, 0.43mL) 在ACN (6mL) 中的混合物在72°C加热24h, 然后在55°C加热72h。将反应混合物浓缩并将粗物质通过自动快速色谱纯化 (含有1% Et<sub>3</sub>N的己烷中5%至60% EtOAc), 得到化合物I-8 (100mg, 20%)。<sup>1</sup>HNMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5.88 (s, 1H), 4.01-3.92 (m, 1H), 3.89-3.78 (m, 1H), 3.33-3.24 (m, 4H), 3.23-3.15 (m, 4H), 2.91-2.73 (m, 2H), 2.69-2.50 (m, 3H), 2.34-2.21 (m, 6H), 1.69-1.39 (m, 20H), 1.38-1.21 (m, 68H), 0.95-0.84 (m, 12H)。ESI-MS: C<sub>60</sub>H<sub>118</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>的MW。计算值986.9; 实测值987.0。

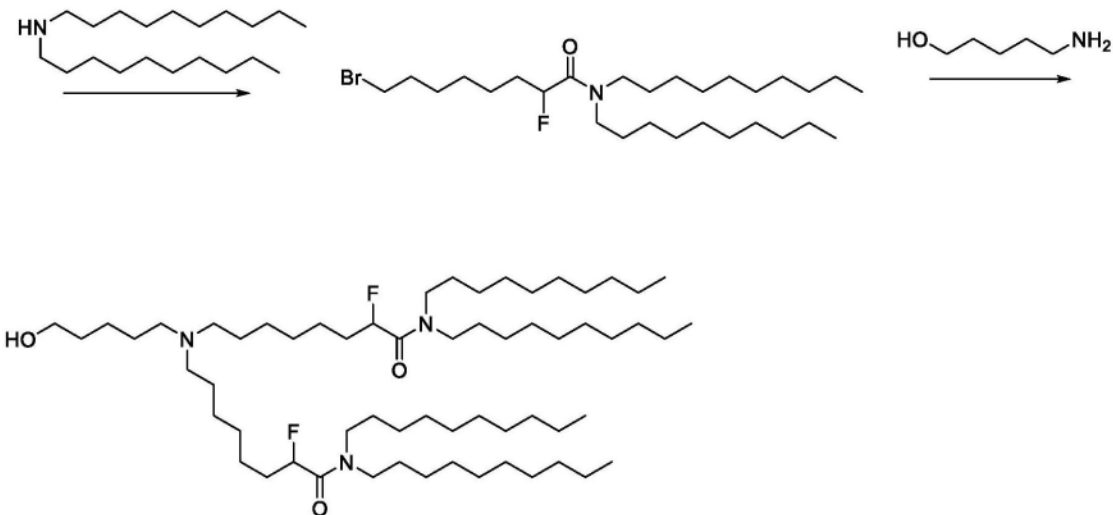
[0277] 实施例13

[0278] 8,8' - ((5-羟基戊基) 氮烷二基) 双(N,N-二癸基-2-氟辛酰胺)

[0279] (化合物I-9)



[0280]



I-9

[0281] 2-(6-溴己基)-2-氟丙二酸二乙酯的合成

[0282] 将2-氟丙二酸二乙酯 (56.1mmol, 10.0g)、1,6-二溴己烷 (168mmol, 26mL) 和甲醇钠 (61.7mmol, 3.3g) 在EtOH (110mL, L) 中的混合物于室温搅拌24h。将反应混合物浓缩并使粗物质在DCM和水之间分配。分离有机层, 经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥, 过滤并浓缩。通过自动快速色谱 (己烷中0%至25% EtOAc) 纯化, 得到2-(6-溴己基)-2-氟丙二酸二乙酯 (11.7g, 61%)。

[0283] 2-(6-溴己基)-2-氟丙二酸的合成

[0284] 将2-(6-溴己基)-2-氟丙二酸二乙酯(5.9mmol, 2.0g)和KOH(11.8mmol, 660mg)在MeOH(20mL)、THF(2mL)和水(4mL)中的混合物于室温搅拌3h。将反应混合物浓缩,并将粗物质用0.1M NaOH(20mL)稀释。将水层用DCM(3x 10mL)洗涤,用1M HCl酸化,然后用EtOAc(2x 20mL)萃取。将合并的EtOAc层用Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤并浓缩,得到2-(6-溴己基)-2-氟丙二酸(1.57g, 94%),将其不经进一步纯化即用于下一步骤。

[0285] 8-溴-2-氟辛酸的合成

[0286] 将2-(6-溴己基)-2-氟丙二酸(4.1mmol, 1.2g)和DMAP(催化剂)在DMF(3mL)中混合物于180℃加热12min。使反应混合物在EtOAc和1M HCl之间分配。分离有机层,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤并浓缩,得到8-溴-2-氟辛酸(960mg, 98%),其不经进一步纯化即用于下一步骤。

[0287] 8-溴-2-氟辛酰氯的合成

[0288] 将8-溴-2-氟辛酸(4.0mmol, 960mg)、草酰氯(12mmol, 1.0mL)和DMF(催化剂)在DCM(10mL)中的混合物于室温搅拌20min。浓缩反应混合物,得到8-溴-2-氟辛酰氯,其不经进一步纯化即用于下一步骤。

[0289] 8-溴-N,N-二癸基-2-氟辛酰胺的合成

[0290] 向二癸基胺(4.0mmol, 1.2g)、三乙胺(24mmol, 3.4mL)和DMAP(催化剂)在DCM(10mL)中的混合物中,加入粗8-溴-2-氟辛酰氯(4.0mmol)在DCM(5mL)中溶液。将反应混合物于室温搅拌1h。将反应物浓缩并通过自动快速色谱(己烷中5%至25% EtOAc)纯化,得到8-溴-N,N-二癸基-2-氟辛酰胺(1.2g, 58%, 经2步)。

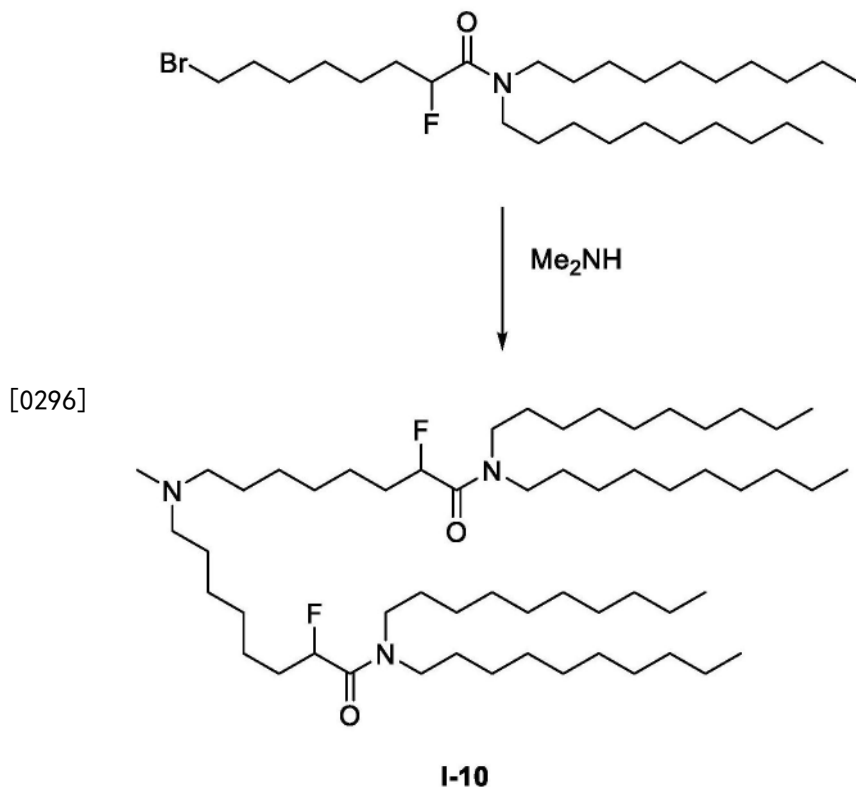
[0291] I-9的合成

[0292] 将8-溴-N,N-二癸基-2-氟辛酰胺(0.56mmol, 290mg)、5-氨基戊醇(0.34mmol, 35mg)和DIEA(1.0mmol, 0.18mL)、碘化钾(0.56mmol, 93mg)在ACN(4mL)中的混合物在75℃加热19h。将反应混合物浓缩并将粗物质经由自动快速色谱(己烷中5%至100% EtOAc)纯化以得到化合物I-9(158mg, 57%)。<sup>1</sup>HNMR(400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ5.03(ddd, J=49.4, 8.5, 4.3Hz, 2H), 3.64(t, J=6.5Hz, 2H), 3.37-3.25(m, 6H), 3.25-3.12(m, 2H), 2.43-2.33(m, 6H), 1.97-1.68(m, 6H), 1.64-1.34(m, 26H), 1.33-1.22(m, 62H), 0.93-0.83(m, 12H)。ESI-MS: C<sub>61</sub>H<sub>121</sub>F<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>[M+H]<sup>+</sup>的MW。计算值982.9;实测值983.0。

[0293] 实施例14

[0294] 8,8'-(甲基氮烷二基)双(N,N-二癸基-2-氟辛酰胺)

[0295] (化合物I-10)



[0297] I-10的合成

[0298] 将8-溴-N,N'-二癸基-2-氟辛酰胺(根据实施例13的通用程序制备,0.58mmol,300mg)、EtOH中的8M甲胺(0.36mmol,0.045mL)和ACN(4mL)中的DIEA(1.1mmol,0.19mL)的混合物在75℃加热48h。将反应混合物浓缩并将粗物质经由自动快速色谱(己烷中的5%至65%EtOAc)纯化以得到化合物I-10(160mg,61%)。<sup>1</sup>HNMR(400MHz,CDCl<sub>3</sub>) δ5.14-4.93(m,2H),3.40-3.24(m,6H),3.24-3.10(m,2H),2.33-2.25(m,4H),2.19(s,3H),1.99-1.71(m,4H),1.62-1.17(m,80H),0.92-0.84(m,12H)。ESI-MS:C<sub>57</sub>H<sub>113</sub>F<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>[M+H]<sup>+</sup>的MW。计算值910.9;实测值911.0。

[0299] 可以组合上述各种实施方案以提供另外的实施方案。本说明书中涉及的所有美国专利、美国专利申请公开、美国专利申请、外国专利、外国专利申请和非专利出版物,包括2021年12月16日提交的美国临时专利申请序号63/290,396,通过引用整体并入本文。如果需要,可以修改实施方案的各方面,以采用各种专利、申请和出版物的概念来提供进一步的实施方案。根据以上详细描述,可以对实施方案进行这些和其它改变。通常,在权利要求中,所使用的术语不应被解释为将权利要求限制于说明书和权利要求中所公开的具体实施方案,而应被解释为包括所有可能的实施方案以及这些权利要求所授权的等同物的全部范围。因此,权利要求不受本公开的限制。