



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101674853 B

(45) 授权公告日 2013. 03. 27

(21) 申请号 200880014720. 6

(22) 申请日 2008. 05. 02

(30) 优先权数据

60/916, 131 2007. 05. 04 US

60/947, 282 2007. 06. 29 US

60/953, 667 2007. 08. 02 US

60/972, 590 2007. 09. 14 US

60/972, 653 2007. 09. 14 US

61/022, 571 2008. 01. 22 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2009. 11. 04

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2008/062526 2008. 05. 02

(87) PCT申请的公布数据

W02008/137758 EN 2008. 11. 13

(73) 专利权人 玛瑞纳生物技术有限公司

地址 美国华盛顿州

(72) 发明人 史蒂文·C·科伊

迈克尔·E·休斯顿 皮埃罗·哈维

罗格·C·阿达米 雷纳塔·法姆

玛丽·G·普利弗 凯茜·L·弗斯诺

沙古那·塞斯

(74) 专利代理机构 隆天国际知识产权代理有限公司

公司 72003

代理人 吴小瑛 吕俊清

(51) Int. Cl.

A61K 48/00 (2006. 01)

A61K 47/06 (2006. 01)

(56) 对比文件

EP 0320976 A1, 1989. 06. 21,

WO 99/33787 A1, 1999. 07. 08, 说明书第
17-19 页实施例 4-5.

WO 03/091276 A2, 2003. 11. 06, 第
52-53, 58, 67-68 页.

Claudio Cescato. Supramolecular
Transformations of Vesicles from Amino
Acid Based Double Chain Amphiphiles.
《Langmuir》. 1997, 第 13 卷 (第 16 期), 第
4480-4482 页.

Nico A. J. M. Sommerdijk. Boomerang
shaped aggregates from a histidine
surfactant. 《Chem. Commun.》. 1997, 第 455-456
页.

James A. Heyes et al. Synthesis of Novel
Cationic Lipids: Effect of Structural
Modification on the Efficiency of Gene
Transfer. 《J. Med. Chem.》. 2001, 第 45 卷 (第
1 期),

审查员 赵永江

权利要求书 2 页 说明书 96 页

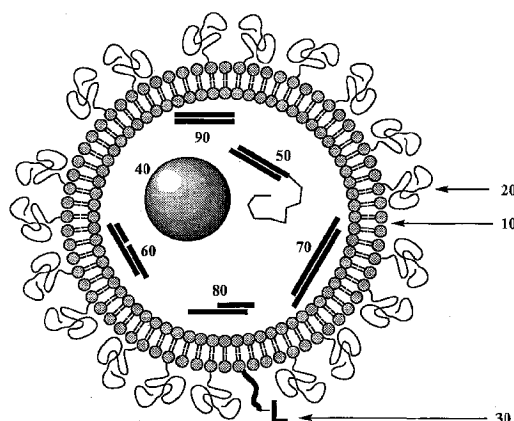
序列表 7 页 附图 4 页

(54) 发明名称

氨基酸脂质及其用途

(57) 摘要

本发明提供了可用于药物递送、治疗、和诊断
和治疗疾病和病症的一系列的氨基酸脂质化合物
和组合物。该氨基酸脂质化合物和组合物可用于
递送各种试剂如核酸治疗剂至细胞、组织、器官、
和患者。

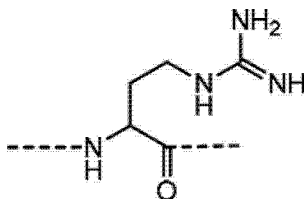


1. 含有如式 I 所示结构的化合物及其盐：

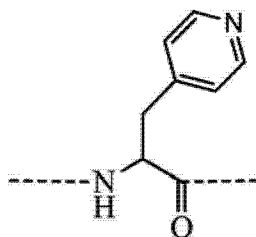


其中

Xaa 是正精氨酸残基 $(-NHCH(CH_2CH_2NHC(=NH)NH_2)C(=O)-)$



或吡啶基丙氨酸残基 $(-NHCH(CH_2C_5H_4N)C(=O)-)$



或其 N-甲基化变体, 其中

R^3 独立地是取代或未取代的 C(6-22) 烷基或 C(6-22) 烯基；

R^4 独立地是取代或未取代的 C(6-22) 烷基；

Z 是 NH 或 O。

2. 权利要求 1 所述的化合物及其盐, 其中 R^3 和 R^4 是 C(6-22) 烷基, R^3 和 R^4 相同或不同。

3. 权利要求 1 所述的化合物及其盐, 其中 R^4 是 C(6-22) 烷基且 R^3 是 C(6-22) 烯基。

4. 权利要求 1 所述的化合物及其盐, 其中 Z 是 NH。

5. 权利要求 1 所述的化合物及其盐, 其中 Z 是 O。

6. 权利要求 1 所述的化合物及其盐, 其中 Xaa 具有含 pKa 为 5 至 7.5 的官能团的侧链。

7. 权利要求 1 所述的化合物及其盐, 其选自 (C10 酰基)-正 Arg-NH-(C10 烷基)、(C12 酰基)-正 Arg-NH-(C12 烷基)、(C14 酰基)-正 Arg-NH-(C14 烷基)、(C16 酰基)-正 Arg-NH-(C16 烷基)、(C18 酰基)-正 Arg-NH-(C18 烷基)、(C16 酰基)-正 Arg-NH-(C12 烷基)、(C18 油酰)-正 Arg-NH-(C12 烷基)、(C18 油酰)-正 Arg-NH-(C16 烷基)、(C18 油酰)-正 Arg-NH-(C18 烷基)、(C10 酰基)-4-Pal-NH-(C10 烷基)、(C12 酰基)-4-Pal-NH-(C12 烷基)、(C14 酰基)-4-Pal-NH-(C14 烷基)、(C16 酰基)-4-Pal-NH-(C16 烷基)、(C18 酰基)-4-Pal-NH-(C18 烷基)、(C18 油酰)-4-Pal-NH-(C16 烷基)、(C10 酰基)-4-Pal(Me)-NH-(C10 烷基)、(C12 酰基)-4-Pal(Me)-NH-(C12 烷基)、(C14 酰基)-4-Pal(Me)-NH-(C14 烷基)、(C16 酰基)-4-Pal(Me)-NH-(C16 烷基)、和 (C18 酰基)-4-Pal(Me)-NH-(C18 烷基)。

8. 一种组合物, 其包括权利要求 1 所述化合物及其盐中的一种或多种和一种或多种治

疗性核酸。

9. 权利要求 8 所述的组合物,其中治疗性核酸是基因沉默剂。
10. 权利要求 8 所述的组合物,其中治疗性核酸是 RNAi 诱导剂。
11. 权利要求 8 所述的组合物,其中治疗性核酸是双链 RNA。
12. 权利要求 8 所述的组合物,其中治疗性核酸是 mdRNA。
13. 权利要求 8 所述的组合物,其中治疗性核酸包括修饰核苷酸。
14. 权利要求 8 所述的组合物,其进一步包括一种或多种非氨基酸非阳离子脂质或固醇。
15. 权利要求 8 所述的组合物,其进一步包括胆固醇琥珀酸单酯。
16. 权利要求 8 所述的组合物,其进一步包括一种或多种非氨基酸阳离子脂质。
17. 权利要求 8 所述的组合物,其进一步包括一种或多种聚乙二醇化脂质或聚乙二醇化固醇。
18. 权利要求 8 所述的组合物,其中所述核酸与权利要求 1 所述化合物及其盐中的一种或多种形成复合物。
19. 权利要求 8 所述的组合物,其中该组合物包括脂质体。
20. 权利要求 8 所述的组合物,其中该组合物是乳剂。
21. 权利要求 8 所述的组合物,其中该组合物是胶束分散体。
22. 一种药物组合物,其包括权利要求 1~7 中任一项所述化合物及其盐中的一种或多种和一种或多种药剂或生物活性试剂。
23. 一种将治疗性核酸递送至体外细胞的非治疗目的方法,包括制备权利要求 8 所述的组合物和用该组合物处理细胞。
24. 一种抑制基因在体外细胞中表达的非治疗目的方法,包括制备权利要求 8 所述的组合物和用该组合物处理细胞。
25. 权利要求 8 所述的组合物在制备用于治疗疾病的药物中的应用,其中所述疾病选自风湿性关节炎、肝病、脑炎、骨折、心脏病、病毒性疾病、败血症和癌症。
26. 如权利要求 25 所述的应用,其中所述病毒性疾病是肝炎或流感。

氨基酸脂质及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及新型药物递送增强剂,包括可用于将各种分子递送至细胞的脂质。本发明提供了一系列的化合物、组合物、制剂、方法、这些增强剂的用途,最终意在药物的递送、疗法以及疾病和病症的诊断和治疗,包括对受试者基因表达或活性调控产生响应的那些疾病和病症的诊断和治疗。更具体地说,本发明涉及化合物、脂质体、层状囊泡 (lamellar vesicles)、乳剂 (emulsions)、胶束 (micelles)、悬浮剂 (suspensions)、颗粒、溶液和其它形式的递送增强组合物和制剂,以及这些递送物质的治疗方法和用途。

背景技术

[0002] 治疗性化合物向患者的递送会因为受限于化合物到达靶细胞或组织的能力或受限于细胞内化合物的进入或通行而受到阻碍。治疗性物质的递送通常受限于细胞膜。针对递送的这些屏障和限制导致需要使用比实现预期结果更高的化合物浓度,这样就带来了毒性作用和副作用的风险。

[0003] 一种递送策略是利用脂质或聚合物载体分子来改善化合物向细胞内的运输。这些物质可以充分利用为选择性进入细胞而显现的机制,但不包括外源分子,如核酸和蛋白。例如,阳离子脂质可以与药物试剂相互作用,并与细胞膜接触。还可以将脂质分子并入作为药物试剂载体的脂质体或颗粒。脂质体药物载体可以保护药物分子免受降解,同时改善细胞对其的吸收。而且,脂质体药物载体通过静电和其它相互作用可以包裹或结合某些化合物,且可以与带负电荷的细胞膜相互作用以开始跨膜运输。

[0004] 其中,对调节性 RNA 的了解和 RNA 干扰 (RNAi)、RNAi 治疗、RNA 药物、反义治疗和基因治疗的开发已经加大了对将活性核酸试剂引入细胞的有效手段的需要。通常,核酸仅在有限的时间内在细胞或血浆内保持稳定。但是,基于核酸的试剂能够在组合物和制剂中保持稳定,其随后可以被分散以用于细胞递送。

[0005] 本发明提供了用于改善药物和生物活性分子全身和局部递送的化合物、组合物、方法和用途。其中,本发明提供了新型的化合物和组合物,其用于制备和利用能够增强生物活性分子递送效率的递送结构和载体。

发明内容

[0006] 本发明提供了用于细胞内和体内递送最终作为治疗剂的药物的新型化合物、组合物和制剂。本发明的化合物和组合物可用于递送药物至选定的细胞、组织、器官或隔室以改变疾病状态或表型。

[0007] 在一些方面中,本发明提供了递送 RNA 结构至细胞的化合物、组合物和方法以便产生 RNA 干扰应答、反义效应或调节基因组表达。

[0008] 本发明提供了一系列的氨基酸脂质,其是用于药剂的递送和给药并用于药物递送系统中的亲脂性化合物。本发明的氨基酸脂质是包含氨基酸残基和一个或多个亲脂性尾的分子。

[0009] 在一些方面中,本发明提供了如式 I 所示一系列的氨基酸脂质化合物及其盐:



[0011] 其中

[0012] Xaa 是具有式 $-NR^N-CR^1R^2-(C=O)-$ 的任意 D- 或 L- 氨基酸残基,或具有式 $- \{NR^N-CR^1R^2-(C=O)\}_n-$ 的 $n = 2-20$ 个氨基酸残基的肽,其中

[0013] R^1 各自独立地是非氢,取代或未取代的氨基酸侧链;

[0014] R^2 各自独立地是氢、或由碳、氧、氮、硫和氢原子组成且具有 1-20 个碳原子的有机基团、或 C(1-5) 烷基、环烷基、环烷基烷基、C(3-5) 烯基、C(3-5) 炔基、C(1-5) 烷酰基、C(1-5) 烷酰氧基、C(1-5) 烷氧基、C(1-5) 烷氧基-C(1-5) 烷基、C(1-5) 烷氧基-C(1-5) 烷氧基、C(1-5) 烷基-氨基-C(1-5) 烷基-、C(1-5) 二烷基-氨基-C(1-5) 烷基-、硝基-C(1-5) 烷基、氰基-C(1-5) 烷基、芳基-C(1-5) 烷基、4- 联苯-C(1-5) 烷基、羧基、或羟基;

[0015] R^N 各自独立地是氢、或由碳、氧、氮、硫和氢原子组成且具有 1-20 个碳原子的有机基团,或 C(1-5) 烷基、环烷基、环烷基烷基、C(3-5) 烯基、C(3-5) 炔基、C(1-5) 烷酰基、C(1-5) 烷酰氧基、C(1-5) 烷氧基、C(1-5) 烷氧基-C(1-5) 烷基、C(1-5) 烷氧基-C(1-5) 烷氧基、C(1-5) 烷基-氨基-C(1-5) 烷基-、C(1-5) 二烷基-氨基-C(1-5) 烷基-、硝基-C(1-5) 烷基、氰基-C(1-5) 烷基、芳基-C(1-5) 烷基、4- 联苯-C(1-5) 烷基、羧基、或羟基;

[0016] R^3 独立地是衍生自天然存在的或合成的脂质、磷脂、糖脂、三酰基甘油、甘油磷脂、鞘脂、神经酰胺、鞘磷脂、脑苷脂、或神经节苷脂的亲脂性尾,其中所述尾可以包含类固醇;或取代或未取代的 C(3-22) 烷基、C(6-12) 环烷基、C(6-12) 环烷基-C(3-22) 烷基、C(3-22) 烯基、C(3-22) 炔基、C(3-22) 烷氧基、或 C(6-12) 烷氧基-C(3-22) 烷基;

[0017] R^4 独立地是衍生自天然存在的或合成的脂质、磷脂、糖脂、三酰基甘油、甘油磷脂、鞘脂、神经酰胺、鞘磷脂、脑苷脂、或神经节苷脂的亲脂性尾,其中所述尾可以包含类固醇;或取代或未取代的 C(3-22) 烷基、C(6-12) 环烷基、C(6-12) 环烷基-C(3-22) 烷基、C(3-22) 烯基、C(3-22) 炔基、C(3-22) 烷氧基、或 C(6-12) 烷氧基-C(3-22) 烷基;

[0018] 其中 R^3 和 R^4 中任一是如上定义的亲脂性尾,而另一个是氨基酸末端基团、或 R^3 和 R^4 都是亲脂性尾;所述氨基酸末端基团是氢、羟基、氨基、或有机保护基团;

[0019] Z 是 NH、O、S、 $-CH_2S-$ 、 $-CH_2S(O)-$ 、或由选自氢、碳、氧、氮和硫原子的 1-40 个原子组成的有机接头。

[0020] 在一些方面,本发明提供了其如式 I 所示的一系列氨基酸脂质化合物及其盐:



[0022] 其中,

[0023] Xaa 是具有式 $-NR^N-CR^1R^2-(C=O)-$ 的 D- 或 L- 氨基酸残基,其中

[0024] R^1 是取代或未取代的氨基酸碱性侧链;

[0025] R^2 是氢,或 C(1-5) 烷基,

[0026] R^N 是氢,或 C(1-5) 烷基,

[0027] R^3 独立地是取代或未取代的 C(6-22) 烷基或 C(6-22) 烯基;

[0028] R^4 独立地是取代或未取代的 C(6-22) 烷基或 C(6-22) 烯基;

[0029] Z 是 NH、O、或由选自氢、碳、氧、氮和硫原子的 1-40 个原子组成的有机接头。

[0030] 在一些实施方式中,所述氨基酸脂质化合物可以含有选自下述的 Xaa:精氨酸、高

精氨酸、正精氨酸 (norarginine)、正 - 正精氨酸 (nor-norarginine)、鸟氨酸、赖氨酸、高赖氨酸、组氨酸、1- 甲基组氨酸、吡啶丙氨酸、天冬酰胺、N- 乙基天冬酰胺、谷氨酰胺、4- 氨基苯丙氨酸、其 N- 甲基化变体、和其侧链修饰性衍生物。在一些实施方式中,氨基酸脂质化合物可以包括选自半胱氨酸和丝氨酸的 Xaa。

[0031] 在一些实施方式中, R^3 和 R^4 可以是 C(6-22) 烷基,且可以相同或不同。在一些实施方式中, R^3 和 R^4 可以是 C(6-22) 烯基,且可以相同或不同。

[0032] 在一些实施方式中, Xaa 可以是 2-20 个氨基酸残基的肽。

[0033] 在一些实施方式中, Xaa 可以具有含 pKa 为 5-7.5 的官能团的侧链。

[0034] 在一些方面中,氨基酸脂质化合物可以是交联的两种或多种氨基酸脂质化合物的多聚体。

[0035] 在一些实施方式中,氨基酸脂质化合物可以是具有与氨基酸残基侧链缀合的肽的缀合物。

[0036] 在一些实施方式中,氨基酸脂质化合物可以与寡聚或聚合骨架结合。

[0037] 在一些实施方式中,氨基酸脂质化合物可以与药物化合物结合。

[0038] 在一些方面中,本发明提供了如式 I 所示的一系列氨基酸脂质化合物及其盐;

[0039] $R^3-(C=O)-Xaa-Z-R^4$ 式 I

[0040] 其中

[0041] Xaa 是具有式 $-NR^N-CR^1R^2-(C=O)-$ 的 D- 或 L- 氨基酸残基,其中

[0042] R^1 是取代或未取代的氨基酸的碱性侧链;

[0043] R^2 是氢,或 C(1-5) 烷基,

[0044] R^N 是氢,或 C(1-5) 烷基,

[0045] R^3 独立地是取代或未取代的 C(6-22) 烷基或 C(6-22) 烯基;

[0046] R^4 是氢;

[0047] Z 是 NH、O、或由选自氢、碳、氧、氮和硫原子的 1-40 个原子组成的有机接头。

[0048] 在一些方面中,本发明涵盖包含一种或多种氨基酸脂质化合物和一种或多种治疗性核酸的组合物。治疗性核酸可以是基因沉默剂、RNAi 诱导剂、双链 RNA 或 mdRNA,或可以包含修饰的核苷。

[0049] 在一些实施方式中,本发明涵盖包含一种或多种氨基酸脂质化合物和一种或多种其它非氨基酸脂质或聚合脂质的组合物。在一些实施方式中,组合物可以包括胆固醇琥珀酸单酯。

[0050] 在一些方面中,本发明涵盖包含一种或多种氨基酸脂质化合物和一种或多种能与氨基酸脂质形成复合物的核酸的组合物。

[0051] 在一些实施方式中,本发明涵盖包含一种或多种氨基酸脂质化合物的组合物,其形成脂质体。

[0052] 在一些方面中,本发明涵盖包含一种或多种氨基酸脂质化合物的组合物,其形成乳剂。

[0053] 在一些实施方式中,本发明涵盖包含一种或多种氨基酸脂质化合物,其形成胶束分散体。

[0054] 在一些方面中,本发明涵盖包含一种或多种氨基酸脂质化合物和一种或多种药剂

或生物活性试剂的组合物。

[0055] 在一些方面中,本发明涵盖通过制备包含一种或多种氨基酸脂质化合物的组合物和用所述组合物处理细胞来将治疗性核酸递送至细胞的方法。

[0056] 在一些实施方式中,本发明涵盖通过制备含一种或多种氨基酸脂质化合物的组合物和用该组合物处理细胞来抑制基因在细胞中表达的方法。

[0057] 在一些方面中,本发明涵盖抑制基因在哺乳动物中表达的方法,该方法包括制备含一种或多种氨基酸脂质化合物的组合物和给哺乳动物施用该组合物。

[0058] 在一些实施方式中,本发明涵盖治疗人类疾病的方法,所述疾病选自风湿性关节炎、肝病、脑炎、骨折、心脏病、包括肝炎和流感的病毒性疾病和癌症,该方法包括制备包含一种或多种氨基酸脂质化合物的组合物和给人类施用该组合物。

[0059] 在一些方面中,本发明涵盖包含一种或多种氨基酸脂质化合物的组合物在制备治疗包括风湿性关节炎、肝病、脑炎、骨折、心脏病、包括肝炎和流感的病毒性疾病和癌症的疾病的药物的用途。

[0060] 在一些实施方式中,本发明涵盖包含一种或多种氨基酸脂质化合物的组合物在治疗选自风湿性关节炎、肝病、脑炎、骨折、心脏病、包括肝炎和流感的病毒性疾病和癌症的疾病中的用途。

[0061] 本发明概述和本发明详述以及附图、实施例和权利要求书整体上都作为本发明的公开内容。

附图说明

[0062] 图 1:图示本发明的脂质体实施方式,其中氨基酸脂质与其它脂质一起形成双分子层状囊泡 10。在该实施方式中,脂质体外层用与一个脂质头基结合的聚乙二醇链 20 进行保护。脂质体外层还有用于特异性靶向细胞或组织的配体 30。在该实施方式中,脂质体囊泡包括活性干扰性 RNA 组分的负载,其包括浓缩的 RNA 纳米颗粒 40、双链 RNA 双螺旋肽缀合物 50、三链 mdRNA60、dicer 底物 RNA 70、具有长突出端 80 的 dsRNA、和具有平末端 90 的 siRNA,其合并入本实施方式中。

[0063] 图 2:在 JEOL 1230 TEM 上获得的本发明的脂质体实施方式的透射电子显微照片,显示用氨基酸脂质 C12- 正 Arg-C12 形成的球型脂质双分子层囊泡颗粒。显微照片的长度标记是 0.5 微米,样品用 3% 乙酸铀酰染色。脂质体制剂的脂质部分是 [C12- 正 Arg(NH₃⁺Cl⁻)-C12/DSPC/胆固醇/DSPE-PEG-2000],以总脂质的摩尔百分数表示的量分别为 [30% /20% /49% /1%]。脂质体包括抗流感-活性的 dicer 底物 dsRNA DX3030。

[0064] 图 3:图 3 显示了从 A549 细胞体外试验获得的 PPIB 基因敲除活性的实施例。将对干扰性 -RNA 的两种氨基酸脂质制剂在 25、10、1 和 0.1nM RNA 下的浓度应答的标准化 PPIB mRNA 表达值与 RNAiMAX 的标准化 PPIBmRNA 表达值进行比较。制剂 1 是 [C12- 正 Arg(NH₃Cl)-C12/DOPE/CHOL(50/32/18)] 和 制剂 2 是 [C12- 正 Arg(NH₃Cl)-C12/CHEMS/DLPE(50/32/18)]。通过在本发明的氨基酸脂质组合物中的干扰性 -RNA 获得的 PPIB 基因敲除可以超过用 RNAiMAX。

[0065] 图 4:图 4 显示了 9L/LacZ 细胞体外试验获得的 LacZ 基因敲除活性的实施例。将对干扰性 -RNA 的两种氨基酸脂质制剂在 25、10、1 和 0.1nM RNA 下的浓度应答的标准化

β -半乳糖苷酶表达值与 RNAIMAX 的标准化 β -半乳糖苷酶表达值进行比较。制剂 1 是 [C12- 正 Arg(NH₃Cl)-C12/DOPE/CHOL(50/32/18)] 和制剂 2 是 [C12- 正 Arg(NH₃Cl)-C12/CHEMS/DLPE(50/32/18)]。通过在本发明的氨基酸脂质组合物中的干扰 -RNA 获得的 LacZ 基因敲除可以超过用 RNAIMAX。

[0066] 图 5 :图 5 显示了 HepG2 细胞体外试验获得的 ApoB 基因敲除活性的实施例。显示了对干扰性 -RNA 的三种氨基酸脂质制剂在 25、2.5 和 0.25nM RNA 下的浓度应答的标准化 ApoB mRNA 表达值。制剂 1 是 [非氨基酸阳离子脂质 /DSPC/cho1./DMPE-PEG2k(40/10/48/2)]。制剂 2 和 3 都是 [C18:1- 正 Arg-C16/CHEMS/DLPE/DMPE-PEG2k(50/32/16/2)]。

[0067] 发明详述

[0068] 本发明一般地涉及用于递送药物试剂的新型化合物、组合物和其用途。本发明的化合物和组合物可用于将治疗剂递送至所选的细胞、组织、器官或患者。

[0069] 本发明一般地涉及脂质的化学和脂质样结构和物质的有效药物递送的用途。

[0070] 本发明的化合物和组合物可用于递送治疗剂、预防剂和诊断剂,如核酸、多核苷酸、肽、蛋白、和小分子化合物和药物。

[0071] 本发明的化合物和组合物可以下述形式用于递送治疗剂,如脂质体、层状囊泡、乳剂、胶束、悬浮剂、颗粒和溶液。这些形式可以包括各种直径的纳米颗粒。

[0072] 在一些方面中,本发明的化合物和组合物可用于递送脂质体中的治疗剂。在这些实施方式中,治疗剂可以称作负载。例如,图 1 显示了本发明的脂质体实施方式,其中氨基酸脂质与其它脂质一起形成双分子层囊泡 10。在该实施方式中,脂质体外层通过使一个脂质头基结合聚乙二醇链 20 而得到保护。脂质体外层还有特异性靶向细胞或组织的配体 30。在该实施方式中,脂质体囊泡包括负载分子活性干扰性 RNA 组分,其包括浓缩的 RNA 纳米颗粒 40、双链 RNA 双螺旋肽缀合物 50、三链 mdRNA 60、dicer 底物 RNA 70、具有长突出端 80 的 dsRNA 和具有平末端 90 的 siRNA,其合并入本实施方式中。其它形式的治疗剂负载可以包括微小 RNA 或发夹 RNA 形式。

[0073] 在一些方面中,本发明的化合物和组合物可以以可释放形式或组合物递送治疗剂。可释放形式和组合物包括结合并释放活性试剂的分子、结合活性试剂并能将帮助释放该试剂的部分放出的分子、结合活性试剂并随后在生物隔室内调节从而帮助该试剂释放的分子,和含有与释放中间介质化合物混合的活性试剂结合的分子。

[0074] 氨基酸脂质

[0075] 本发明提供了一系列的氨基酸脂质,其是用于药物试剂递送和给药以及用于药物递送系统的亲脂性化合物。本发明的氨基酸脂质是含有氨基酸残基和一种或多种亲脂性尾的分子。

[0076] 在一些实施方式中,氨基酸脂质是具有亲水性部分和亲脂性部分的分子。该亲水性部分可以由氨基酸残基来提供。亲脂性部分可以包含一种或多种亲脂性尾。

[0077] 在一些实施方式中,氨基酸脂质是含有疏水性氨基酸残基和一种或多种亲脂性尾的亲脂性分子。

[0078] 在一些实施方式中,氨基酸脂质提供了相对低的细胞毒性,和相应地相对某些其它脂质而言的细胞保护效应。在一些实施方式中,氨基酸脂质是药学上可接受的、生物可降解的或生物相容的脂质。

[0079] 氨基酸脂质可以通过在氨基酸的 N-端或 C-端或两端取代递送增强或脂质样尾来形成。在一些实施方式中,氨基酸核心可以包括一种或多种氨基酸,或可以是 2-20 个氨基酸残基的肽。

[0080] 氨基酸脂质可以是阳离子或非阳离子,其中非阳离子包括中性和阴离子。在本文中,物质的物理状态或离子性是针对 pH 约为 7 的环境,除非另有说明。

[0081] 本发明的氨基酸脂质可以显现低细胞毒性。在一些实施方式中,本发明的氨基酸脂质相对其它结构的脂质可以提供细胞保护效应。

[0082] 在一些方面中,本发明的氨基酸脂质可以可释放形式提供治疗剂的递送。设计的可释放形式和组合物能够提供细胞对试剂的充分摄取,从而提供治疗效力。

[0083] 可释放形式包括结合和释放活性试剂的氨基酸脂质。在一些实施方式中,活性试剂的释放可以由酸不稳定性接头来提供。

[0084] 酸不稳定性接头的实例包括含原酸酯基团、脎、顺式-乙酰甲基、缩醛、缩酮、甲硅烷基醚、硅氮烷、亚胺、柠檬酸酐、马来酸酐、冠醚、氮冠醚、硫代冠醚、二硫苯甲基、顺式-乌头酸、顺式-羧酸三烯炔、甲基丙烯酸、和其混合物的接头。

[0085] 酸不稳定性基团和接头的实例在美国专利号 7,098,032、6,897,196、6,426,086、7,138,382、5,563,250 和 5,505,931 中给出。

[0086] 本发明的化合物和组合物的可释放形式包括这样的分子,其结合活性试剂且能帮助该试剂释放的部分放出。在一些实施方式中,氨基酸脂质可以包括释放小分子(如帮助递送试剂至细胞的乙醇)的基团。氨基酸脂质可以结合活性试剂,且随后与细胞接触,或随后在具有低于生理 pH 的局部 pH 的生物隔室内运输,在酸性环境中水解以释放帮助递送试剂的乙醇。在一些实施方式中,小分子如帮助递送试剂的乙醇可以结合到脂质组分。

[0087] 在一些实施方式中,氨基酸脂质可以与释放小分子如帮助递送试剂至细胞的乙醇的化合物混合。

[0088] 本发明的化合物和组合物的可释放形式包括氨基酸脂质,其可以结合活性试剂,随后与细胞接触,或随后在具有低于生理 pH 的局部 pH 的生物隔室内运输,在酸性环境中调节成阳离子形式从而帮助释放试剂。

[0089] 在一些实施方式中,氨基酸脂质可以结合活性试剂,且可以与在酸性环境中可被调节成阳离子形式从而帮助释放活性试剂的分子混合。

[0090] 可水解和可调节的基团实例在美国专利号 6,849,272 ;6,200,599 ;以及 Z. H. Huang 和 F. C. Szoka, "Bioresponsive liposomes and their use for macromolecular delivery," in : G. Gregoriadis (ed.), Liposome Technology, 3rd ed. (CRC Press 2006) 中给出。

[0091] 在一些实施方式中,本发明的化合物和组合物的可释放形式包括能结合活性试剂的氨基酸脂质,且可以与在酸性环境中能调节为中性形式从而帮助释放活性试剂的脂质或化合物混合。可以随后进入酸性环境以与细胞接触,或随后在具有低于生理 pH 的局部 pH 的生物隔室内运输。

[0092] 可从阴离子调节至中性形式的脂质的实例包括胆固醇琥珀酸单酯 (CHEMS), 如美国专利号 6,897,196、6,426,086 和 7,108,863 中所述。

[0093] 在一些实施方式中,本发明的化合物和组合物的可释放形式包括能结合活性试剂

的氨基酸脂质,其可与 pH- 敏感性聚合材料混合。

[0094] pH- 敏感性聚合材料的实例在美国专利号 6,835,393 中给出。

[0095] 在一些实施方式中,活性试剂的释放可以通过酶可裂解肽来提供。

[0096] 在一些方面中,本发明提供了如式 I 所示的一系列的氨基酸脂质及其盐:

[0097] $R^3-(C=O)-Xaa-Z-R^4$ 式 I

[0098] 其中

[0099] Xaa 是具有式 $-NR^N-CR^1R^2-(C=O)-$ 的任意 D- 或 L- 氨基酸残基,或具有式 $-[NR^N-CR^1R^2-(C=O)]_n-$ 的 $n = 2-20$ 个氨基酸残基的肽,其中

[0100] R^1 各自独立地是非氢,取代或未取代的氨基酸侧链;

[0101] R^2 各自独立地是氢、或由碳、氧、氮、硫和氢原子组成且具有 1-20 个碳原子的有机基团、或 C(1-5) 烷基、环烷基、环烷基烷基、C(3-5) 烯基、C(3-5) 炔基、C(1-5) 烷酰基、C(1-5) 烷酰氧基、C(1-5) 烷氧基、C(1-5) 烷氧基-C(1-5) 烷基、C(1-5) 烷氧基-C(1-5) 烷氧基、C(1-5) 烷基-氨基-C(1-5) 烷基-、C(1-5) 二烷基-氨基-C(1-5) 烷基-、硝基-C(1-5) 烷基、氰基-C(1-5) 烷基、芳基-C(1-5) 烷基、4- 联苯-C(1-5) 烷基、羧基、或羟基;

[0102] R^N 各自独立地是氢、或由碳、氧、氮、硫和氢原子组成且具有 1-20 个碳原子的有机基团、或 C(1-5) 烷基、环烷基、环烷基烷基、C(3-5) 烯基、C(3-5) 炔基、C(1-5) 烷酰基、C(1-5) 烷酰氧基、C(1-5) 烷氧基、C(1-5) 烷氧基-C(1-5) 烷基、C(1-5) 烷氧基-C(1-5) 烷氧基、C(1-5) 烷基-氨基-C(1-5) 烷基-、C(1-5) 二烷基-氨基-C(1-5) 烷基-、硝基-C(1-5) 烷基、氰基-C(1-5) 烷基、芳基-C(1-5) 烷基、4- 联苯-C(1-5) 烷基、羧基、或羟基;

[0103] R^3 是衍生自天然存在的或合成的磷脂、糖脂、三酰基甘油、甘油磷脂、鞘脂、神经酰胺、鞘磷脂、脑苷脂、或神经节苷脂的亲脂性尾;或取代或未取代的 C(3-22) 烷基、C(6-12) 环烷基、C(6-12) 环烷基-C(3-22) 烷基、C(3-22) 烯基、C(3-22) 炔基、C(3-22) 烷氧基、或 C(6-12) 烷氧基-C(3-22) 烷基;或任意其它天然存在的或合成的脂质的亲脂性尾、或下文描述的任一的其它递送脂质的亲脂性尾,而且可以包括类固醇;

[0104] R^4 是衍生自天然存在的或合成的磷脂、糖脂、三酰基甘油、甘油磷脂、鞘脂、神经酰胺、鞘磷脂、脑苷脂、或神经节苷脂的亲脂性尾;或取代或未取代的 C(3-22) 烷基、C(6-12) 环烷基、C(6-12) 环烷基-C(3-22) 烷基、C(3-22) 烯基、C(3-22) 炔基、C(3-22) 烷氧基、或 C(6-12) 烷氧基-C(3-22) 烷基;或任意其它天然存在的或合成的脂质的亲脂性尾、或下文描述的任一的其它递送脂质的亲脂性尾,而且可以包括类固醇;

[0105] Z 是 NH、O、S、 $-CH_2S-$ 、 $-CH_2S(O)-$ 、或由选自氢、碳、氧、氮和硫原子的 1-40 个原子组成的有机接头。

[0106] 在一些实施方式中, R^3 独立地是取代或未取代的 C(6-22) 烷基或 C(6-22) 烯基; R^4 独立地是取代或未取代的 C(6-22) 烷基或 C(6-22) 烯基。

[0107] 残基 Xaa 可以是 D- 或 L- 立构中心。

[0108] 在一些实施方式中,氨基酸核心可以是在肽的 N- 末端和 C- 末端具有亲脂性尾的 2-20 个氨基酸残基的肽。

[0109] 在一些实施方式中, R^1 是非氢,取代或未取代的氨基酸侧链,其中侧链取代基是由选自氢、碳、氧、氮和硫原子的 1-40 个原子组成的有机基团。

[0110] 在一些实施方式中,Z 是烷基或有机接头合成聚合物,如聚乙二醇链 (PEG),或 PEG

共聚物,如 PEG- 聚氨酯或 PEG- 聚丙烯。参见如 J. Milton Harris, Poly(ethylene glycol) chemistry:biotechnical and biomedical applications(1992)。

[0111] 在一些实施方式中,本发明提供了如上式 I 所示的一系列氨基酸脂质,其中:

[0112] Xaa 是具有通式 $-\text{NR}^{\text{N}}-\text{CR}^1\text{R}^2-(\text{C}=\text{O})-$ 的任意 D- 或 L- 氨基酸,其中

[0113] R^1 是非氢,取代或未取代的氨基酸的碱性侧链;

[0114] R^2 是氢,或 C(1-5) 烷基,

[0115] R^{N} 是氢,或 C(1-5) 烷基,

[0116] R^3 是衍生自天然存在的或合成的磷脂、糖脂、三酰基甘油、甘油磷脂、鞘脂、神经酰胺、鞘磷脂、脑苷脂、或神经节苷脂的亲脂性尾;或取代或未取代的 C(3-22) 烷基、C(6-12) 环烷基、C(6-12) 环烷基 -C(3-22) 烷基、C(3-22) 烯基、C(3-22) 炔基、C(3-22) 烷氧基、或 C(6-12) 烷氧基 -C(3-22) 烷基;或任意其它的自然存在的或合成的脂质的亲脂性尾,或下文描述的任一的额外递送脂质的亲脂性尾,而且可以包括类固醇;

[0117] R^4 是衍生自天然存在的或合成的磷脂、糖脂、三酰基甘油、甘油磷脂、鞘脂、神经酰胺、鞘磷脂、脑苷脂、或神经节苷脂的亲脂性尾;或取代或未取代的 C(3-22) 烷基、C(6-12) 环烷基、C(6-12) 环烷基 -C(3-22) 烷基、C(3-22) 烯基、C(3-22) 炔基、C(3-22) 烷氧基、或 C(6-12) 烷氧基 -C(3-22) 烷基;或任意其它的自然存在的或合成的脂质的亲脂性尾,或下文描述的任一的额外递送脂质的亲脂性尾,而且可以包括类固醇;

[0118] Z 是 NH 、 O 、 S 、 $-\text{CH}_2\text{S}-$ 、 $-\text{CH}_2\text{S}(\text{O})-$ 、或由选自氢、碳、氧、氮和硫原子的 1-40 个原子组成的有机接头。

[0119] 在一些实施方式中,本发明提供了如上式 I 所示的一系列氨基酸脂质,其中:

[0120] Xaa 是具有通式 $-\text{NR}^{\text{N}}-\text{CR}^1\text{R}^2-(\text{C}=\text{O})-$ 的任意 D- 或 L- 氨基酸,其中

[0121] R^1 是非氢,取代或未取代的氨基酸的碱性侧链;

[0122] R^2 是氢,或 C(1-5) 烷基,

[0123] R^{N} 是氢,或 C(1-5) 烷基,

[0124] R^3 是取代或未取代的 C(3-22) 烷基、C(6-12) 环烷基、C(6-12) 环烷基 -C(3-22) 烷基、C(3-22) 烯基、C(3-22) 炔基、C(3-22) 烷氧基、或 C(6-12) 烷氧基 -C(3-22) 烷基;

[0125] R^4 是取代或未取代的 C(3-22) 烷基、C(6-12) 环烷基、C(6-12) 环烷基 -C(3-22) 烷基、C(3-22) 烯基、C(3-22) 炔基、C(3-22) 烷氧基、或 C(6-12) 烷氧基 -C(3-22) 烷基;

[0126] Z 是 NH 、 O 、 S 、 $-\text{CH}_2\text{S}-$ 、 $-\text{CH}_2\text{S}(\text{O})-$ 、或由选自氢、碳、氧、氮和硫原子的 1-40 个原子组成的有机接头。

[0127] 在一些实施方式中,本发明提供了如上式 I 所示的一系列氨基酸脂质,其中:

[0128] Xaa 是具有通式 $-\text{NR}^{\text{N}}-\text{CR}^1\text{R}^2-(\text{C}=\text{O})-$ 的任意的 D- 或 L- 氨基酸,其中

[0129] R^1 是非氢,取代或未取代的氨基酸的碱性侧链;

[0130] R^2 是氢,或 C(1-5) 烷基,

[0131] R^{N} 是氢,或 C(1-5) 烷基,

[0132] R^3 是取代或未取代的 C(3-22) 烷基、C(6-12) 环烷基、C(6-12) 环烷基 -C(3-22) 烷基、C(3-22) 烯基、C(3-22) 炔基、C(3-22) 烷氧基、或 C(6-12) 烷氧基 -C(3-22) 烷基;

[0133] R^4 是取代或未取代的 C(3-22) 烷基、C(6-12) 环烷基、C(6-12) 环烷基 -C(3-22) 烷基、C(3-22) 烯基、C(3-22) 炔基、C(3-22) 烷氧基、或 C(6-12) 烷氧基 -C(3-22) 烷基;

[0134] Z 是 NH。

[0135] 在一些实施方式中,本发明提供了如上式 I 所示的一系列氨基酸脂质,其中:

[0136] Xaa 是具有通式 $\text{-NR}^N\text{-CR}^1\text{R}^2\text{-(C=O)-}$ 的任意的 D- 或 L- 氨基酸,其中

[0137] R^1 是非氢,取代或未取代的氨基酸的碱性侧链;

[0138] R^2 是氢,或 C(1-5) 烷基,

[0139] R^N 是氢,或 C(1-5) 烷基,

[0140] R^3 是取代或未取代的 C(3-22) 烷基、C(6-12) 环烷基、C(6-12) 环烷基 -C(3-22) 烷基、C(3-22) 烯基、C(3-22) 炔基、C(3-22) 烷氧基、或 C(6-12) 烷氧基 -C(3-22) 烷基;

[0141] R^4 是取代或未取代的 C(3-22) 烷基、C(6-12) 环烷基、C(6-12) 环烷基 -C(3-22) 烷基、C(3-22) 烯基、C(3-22) 炔基、C(3-22) 烷氧基、或 C(6-12) 烷氧基 -C(3-22) 烷基;

[0142] Z 是 O。

[0143] 可以制备阳离子氨基酸脂质,其中例如 Xaa 具有碱性侧链。具有碱性侧链的氨基酸实例包括精氨酸(Arg)、高精氨酸(高 Arg)(侧链 $\text{-(CH}_2\text{)}_4\text{NH(C=NH)NH}_2$)、正精氨酸(正 Arg)(侧链 $\text{-(CH}_2\text{)}_2\text{NH(C=NH)NH}_2$)、正-正精氨酸(正正 Arg)(侧链 $\text{-(CH}_2\text{)NH(C=NH)NH}_2$)、鸟氨酸、赖氨酸、高赖氨酸、组氨酸、1-甲基组氨酸、吡啶基丙氨酸(Pa1)、天冬酰胺、N-乙基天冬酰胺、谷氨酰胺和 4-氨基苯丙氨酸、和其侧链修饰性衍生物。

[0144] 在本文中,术语“高”,当指氨基酸时,是指额外的碳添加到侧链,而术语“正”,当指氨基酸时,是指碳从侧链减去。因此,高赖氨酸是指侧链 $\text{-(CH}_2\text{)}_5\text{NH}_2$ 。

[0145] 可以制备阴离子氨基酸脂质,其中例如 Xaa 是谷氨酸或天冬氨酸。

[0146] 还可以制备阳离子和阴离子氨基酸脂质,其中氨基酸侧链含有电离基团或取代基。

[0147] 可以制备非-阳离子氨基酸脂质,其中例如 Xaa 是亮氨酸、缬氨酸、丙氨酸或丝氨酸。

[0148] 在一些实施方式中,Xaa 是 N^G - 甲基精氨酸、对称的或不对称的 N^G , N^G - 二甲基精氨酸、 N^G - 甲基-高精氨酸、对称的或不对称的 N^G , N^G - 二甲基-高精氨酸、 N^G - 甲基-正精氨酸、对称的或不对称的 N^G , N^G - 二甲基-正精氨酸、或 N^G - 甲基-正-正精氨酸、对称的或不对称的 N^G , N^G - 二甲基-正-正精氨酸。

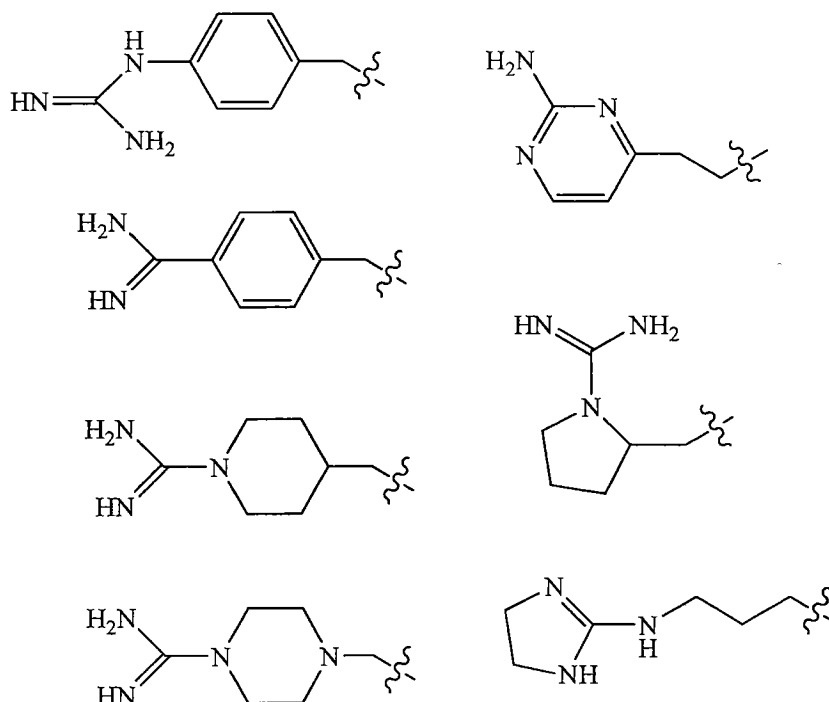
[0149] 在一些实施方式中,Xaa 是 N^G - 乙基精氨酸、对称的或不对称的 N^G , N^G - 二乙基精氨酸、 N^G - 乙基-高精氨酸、对称的或不对称的 N^G , N^G - 二乙基-高精氨酸、 N^G - 乙基-正精氨酸、对称的或不对称的 N^G , N^G - 二乙基-正精氨酸、或 N^G - 乙基-正-正精氨酸、对称的或不对称的 N^G , N^G - 二乙基-正-正精氨酸。

[0150] 在一些实施方式中,Xaa 是 N^G - 烷基精氨酸、对称的或不对称的 N^G , N^G - 二烷基精氨酸、 N^G - 烷基-高精氨酸、对称的或不对称的 N^G , N^G - 二烷基-高精氨酸、 N^G - 烷基-正精氨酸、对称的或不对称的 N^G , N^G - 二烷基-正精氨酸、或 N^G - 烷基-正-正精氨酸、对称的或不对称的 N^G , N^G - 二烷基-正-正精氨酸。

[0151] 在一些实施方式中,Xaa 是含胍-或含脒-侧链的氨基酸。例如,Xaa 残基的侧链可以包括如胍基、脒基、二氢咪唑、4-胍基-苯基、4-脒基-苯基、N-脒基-吡啶、N-脒基-嘧啶、4,5-二氢咪唑、2-(N-脒基)-吡咯烷基、或 4-[(2-氨基嘧啶基)] 乙基的基团。

[0152] Xaa 侧链的实例包括以下结构,及其盐的形式:

[0153]



[0154] 适合释放形式的氨基酸脂质的氨基酸的取代侧链的实例包括 pKa 为约 5 至约 7.5, 或约 6 至约 7 的释放官能团。通常,弱碱的释放官能团在局部 pH 高于 pKa 时可以表现出显著的中性形式,且在局部 pH 低于 pKa 时可以表现出显著的离子形式。弱酸的释放官能团在局部 pH 高于 pKa 时可以表现出显著的离子形式,且在局部 pH 低于 pKa 时可以表现出显著的中性形式。参见,如 P. Heinrich Stahl, Handbook of Pharmaceutical Salts, (2002)。

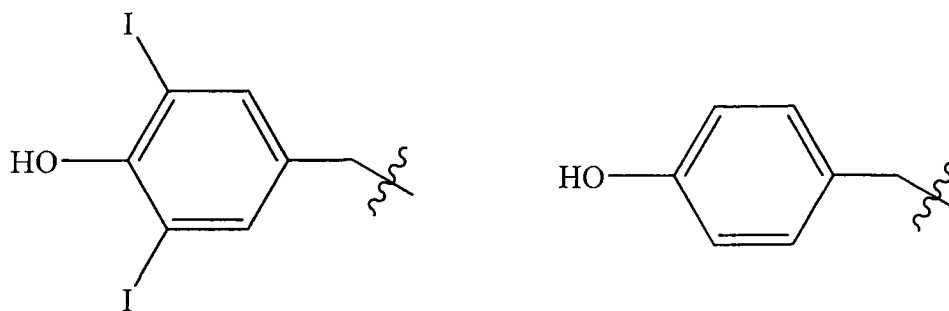
[0155] 在一些实施方式中, Xaa 可以具有含 pKa 为 5 至 7.5 的官能团的侧链。

[0156] 适合释放形式的氨基酸脂质的氨基酸的取代侧链的实例包括 1- 甲基组氨酸。

[0157] 适合释放形式的氨基酸脂质的氨基酸的取代侧链的实例包括 3,5- 二碘酪氨酸。

[0158] 适合释放形式的氨基酸脂质的氨基酸的取代侧链的实例包括以下结构：

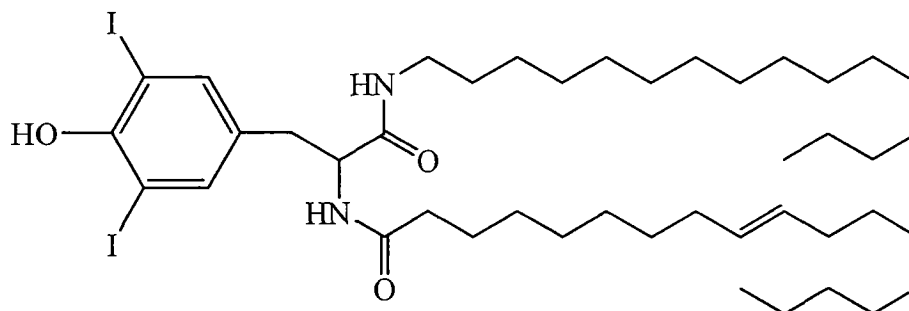
[0159]



[0160] 氨基酸脂质的实例包括以下结构：

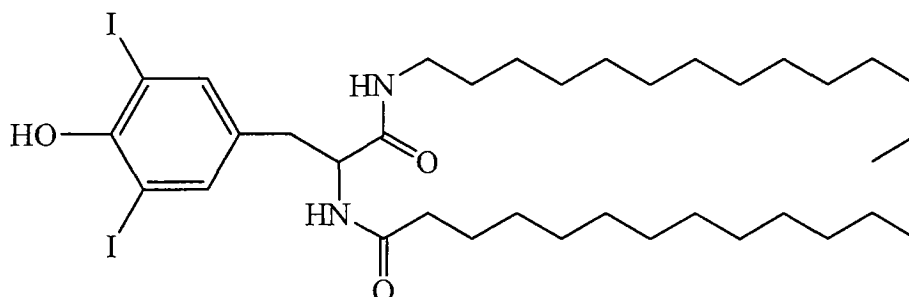
[0161] 化合物 1

[0162]



[0163] 化合物 2

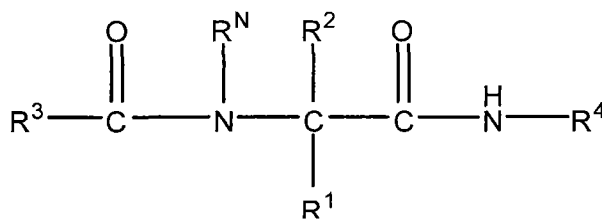
[0164]



[0165] 适合可释放形式的氨基酸脂质的氨基酸侧链上的取代基实例包括衍生自下述的释放官能团: 3,5-二碘-酪氨酸、1-甲基组氨酸、2-甲基丁酸、2-邻-茴香基丙酸、内消旋-酒石酸、4,6-二甲基嘧啶胺、对苯二甲酸、肌酸酐、丁酸、N,N-二甲基-1-萘胺、戊酸、4-甲基戊酸、N-甲基苯胺、1,10-邻二氮杂菲、3-吡啶羧酸、己酸、丙酸、4-氨基苯甲酸、2-甲基丙酸、庚酸、辛酸、环己烷羧酸、喹啉、3-氨基喹啉、2-氨基苯甲酸、4-吡啶羧酸、壬酸、三聚氰胺、8-羟基喹啉、三甲基乙酸、6-甲氧基喹啉、4-(甲基氨基)苯甲酸、对甲基苯胺、3-(甲基氨基)苯甲酸、苹果酸、N-乙基苯胺、2-苯甲基吡啶、3,6-二硝基苯酚、N,N-二甲基苯胺、2,5-二甲基哌嗪、对氨基苯乙醚、5-甲基喹啉、2-苯基苯并咪唑、吡啶、吡啶甲酸、3,5-二碘酪氨酸、对茴香胺、2-(甲基氨基)苯甲酸、2-氨基噻唑、戊二酸、己二酸、异喹啉、衣康酸、邻苯二甲酸、苯并咪唑、哌嗪、庚二酸、吡啶、菲啶、琥珀酸、甲基丁二酸、4-甲基喹啉、3-甲基吡啶、7-羟基异喹啉、丙二酸、甲基丙二酸、2-甲基喹啉、2-乙基吡啶、2-甲基吡啶、4-甲基吡啶、组胺、组氨酸、马来酸、顺式-1,2-环己烷二胺、3,5-二甲基吡啶、2-乙基苯并咪唑、2-甲基苯并咪唑、卡可基酸、伯啶、柠檬酸、异柠檬酸、2,5-二甲基吡啶、罂粟碱、6-羟基-4-甲基蝶啶、L-甲状腺素、3,4-二甲基吡啶、甲氧基吡啶、反式-1,2-环己烷二胺、2,5-吡啶二胺、1-1-甲基组氨酸、1-3-甲基组氨酸、2,3-二甲基吡啶、黄蝶呤、1,2-丙烷二胺、N,N-二乙基苯胺、阿脲酸、2,6-二甲基吡啶、L-肌肽、2-氨基吡啶、N-β-丙氨酰组氨酸、毛果芸香碱、1-甲基咪唑、1H-咪唑、2,4-二甲基吡啶、4-硝基苯酚、2-硝基苯酚、酪氨酸酰胺、5-羟基喹啉、1,1-环丙烷二羧酸、2,4,6-三甲基吡啶、佛罗那、2,3-二氯苯酚、1,2-乙二胺、1-氨基异喹啉、和其组合物。

[0166] 在一些实施方式中,对应式 I 的一系列氨基酸脂质的结构如下:

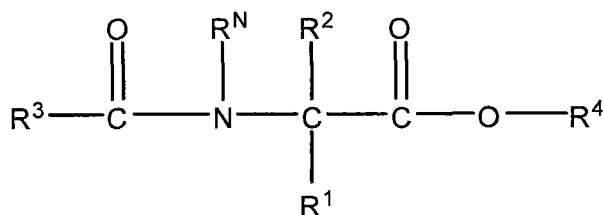
[0167]



[0168] 结构 1A

[0169] 和

[0170]



[0171] 结构 1B

[0172] 其中 R^1 、 R^2 、 R^{N} 、 R^3 、和 R^4 如上定义。

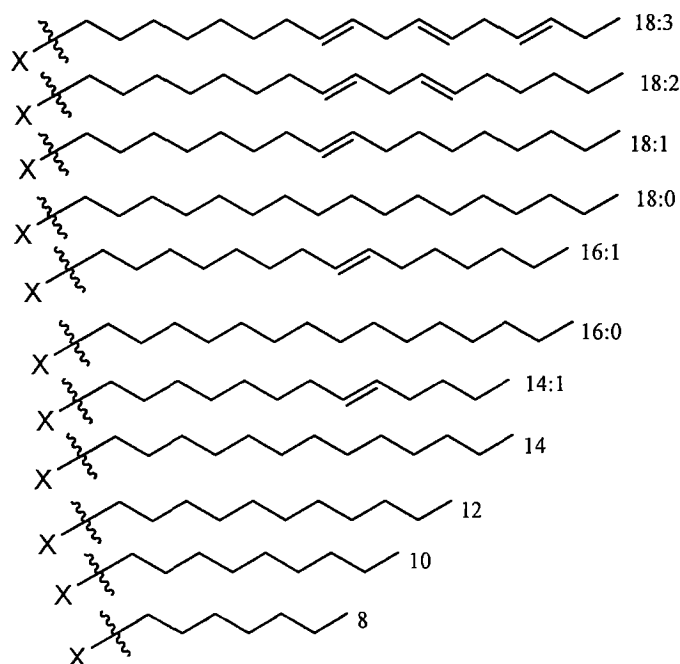
[0173] 在一些实施方式中， R^3 和 R^4 独立地选自脂质样尾，其赋予充分的亲脂特性或亲脂性，如被水 / 辛醇分隔开，从而递送通过膜或被细胞吸收。当用于氨基酸脂质结构中时，这些尾提供两性分子。脂质样尾可以衍生自磷脂、糖脂、三酰基甘油、甘油磷脂、鞘脂、神经酰胺、鞘磷脂、脑苷脂、或神经节苷脂等，且可以包括类固醇。

[0174] 在一些实施方式中， R^3 和 R^4 可以独立地是具有甘油骨架的脂质样尾。

[0175] 在一些实施方式中， R^3 和 R^4 可以独立地是 C3 烷基、C4 烷基、C5 烷基、C6 烷基、C7 烷基、C8 烷基、C9 烷基、C10 烷基、C11 烷基、C12 烷基、C13 烷基、C14 烷基、C15 烷基、C16 烷基、C17 烷基、C18 烷基、C19 烷基、C20 烷基、C21 烷基、或 C22 烷基。

[0176] 在一些实施方式中， R^3 和 R^4 可以独立地为具有下述一种结构的亲脂性尾：

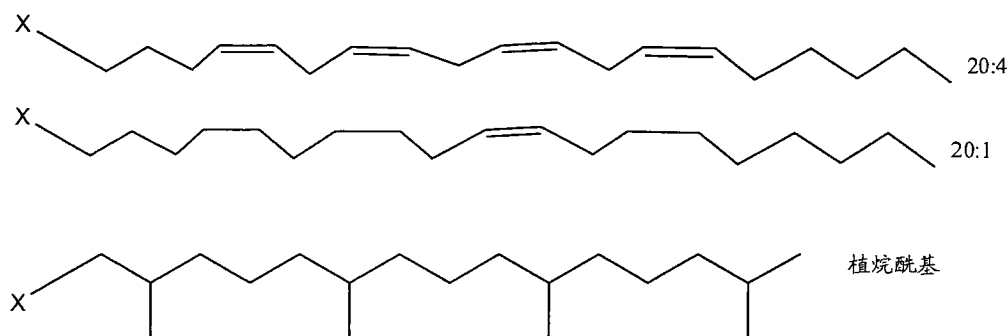
[0177]



[0178] 在上述结构中, X 代表直接结合到氨基酸残基端的尾原子, 且记作以数字指示的其一原子, 例如“18:3”。在一些实施方式中, X 可以是碳、氮或氧原子。

[0179] 在一些实施方式中, R^3 和 R^4 可以独立地是具有下述一种结构的亲脂性尾:

[0180]



[0181] 其中 X 如上定义。

[0182] 在一些实施方式中, R^3 和 R^4 可以独立地选自脂质样尾, 其可以包括胆固醇、固醇、或类固醇, 如甾烷、雌烷、雄烷、孕烷、胆烷、胆甾烷、麦角甾烷、菜油甾烷、多孔甾烷、豆甾烷、gorgostanes、羊毛甾烷、环波罗烷、以及前述的任何固醇或动物甾醇衍生物、和其生物中间体和前体, 其可以包括如胆固醇、羊毛固醇、豆甾烷醇、二氢羊毛甾醇、酵母甾醇、酵母甾烯醇、链甾醇、7-脱氢胆固醇、和其混合物和衍生物。

[0183] 在一些实施方式中, R^3 和 R^4 可以独立地选自衍生自脂肪酸样尾, 如衍生自肉豆蔻酸 (C14:0) 烯基、棕榈酸 (C16:0) 烯基、硬脂酸 (C18:0) 烯基、油酸 (C18:1, 碳双键在碳 9) 烯基、亚油酸 (C18:2, 碳双键在碳 9 或 12) 烯基、亚麻酸 (C18:3, 碳双键在碳 9、12 或 15) 烯基、花生四烯酸 (C20:4, 碳双键在碳 5、8、11 或 14) 烯基、和二十碳五烯酸 (C20:5, 碳双键在碳 5、8、11、14 或 17) 烯基的尾。其它的脂肪酸样尾的实例参见 Donald Voet 和 Judith Voet, Biochemistry, 3rd Edition (2005), p. 383。

[0184] 在一些实施方式中, R^3 和 R^4 可以独立地衍生自类异戊二烯。

[0185] 在本文中,术语“氨基酸”包括天然存在的和非天然存在的氨基酸。因此本发明的氨基酸脂质可以由遗传编码的氨基酸、天然存在的非遗传编码的氨基酸或合成氨基酸制成的。

[0186] 氨基酸的实例包括 Ala、Arg、Asn、Asp、Cys、Gln、Glu、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr 和 Val。

[0187] 氨基酸的实例包括吡啶、2-氨基十八烷酸、2-氨基己二酸、3-氨基己二酸、2,3-二氨基丙酸、2-氨基丁酸、4-氨基丁酸、2,3-二氨基丁酸、2,4-二氨基丁酸、2-氨基异丁酸、4-氨基异丁酸、2-氨基庚二酸、2,2'-二氨基庚二酸、6-氨基己酸、6-氨基己酸、2-氨基庚酸、锁链素、鸟氨酸、瓜氨酸、N-甲基异亮氨酸、正亮氨酸、叔亮氨酸、苯甘氨酸、叔丁基甘氨酸、N-甲基甘氨酸、肌氨酸、N-乙基甘氨酸、环己基甘氨酸、4-氧代-环己基甘氨酸、N-乙基天冬酰胺、环己基丙氨酸、叔丁基丙氨酸、萘基丙氨酸、吡啶基丙氨酸、3-氯丙氨酸、3-苯并噻吩基丙氨酸、4-卤代苯丙氨酸、4-氯苯丙氨酸、2-氟苯丙氨酸、3-氟苯丙氨酸、4-氟苯丙氨酸、青霉素、2-噻吩基丙氨酸、蛋氨酸、蛋氨酸亚砷、高精氨酸、正精氨酸、正-正精氨酸、N-乙酰基赖氨酸、4-氨基苯丙氨酸、N-甲基缬氨酸、高半胱氨酸、高丝氨酸、羟基赖氨酸、别-羟基赖氨酸、3-羟基脯氨酸、4-羟基脯氨酸、异锁链素、别-异亮氨酸、6-N-甲基赖氨酸、正缬氨酸、O-烯丙基-丝氨酸、O-烯丙基-苏氨酸、 α -氨基己酸、 α -氨基戊酸、焦谷氨酸、和其衍生物。

[0188] 在本文中,术语“氨基酸”包括 α -和 β -氨基酸。

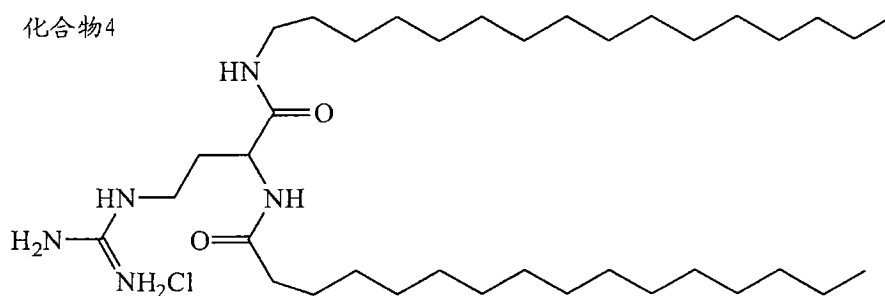
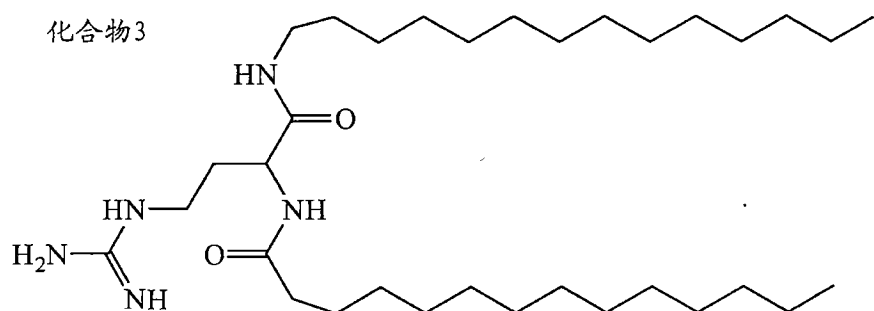
[0189] 氨基酸残基的实例可参见 Fasman, CRC Practical Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, CRC Press, Inc. (1989)。

[0190] 通常,化合物可以包括一种或多种手性中心。含一种或多种手性中心的化合物可以包括被称为“异构体”、“立体异构体”、“非对映异构体”、“对映异构体”、“光学异构体”、“外消旋混合物”的那些。立体化学命名公约,例如 Cahn, Ingold 和 Prelog 的立体异构体命名法,以及确定立体化学和分离立体异构体的方法是本领域已知的。参见,例如 Michael B. Smith 和 Jerry March, March's' Advanced Organic Chemistry, 5th edition, 2001。本发明的化合物和结构意欲包括所有可能的异构体、立体异构体、非对映异构体、对映异构体、和/或光学异构体,其应理解为以指定化合物或结构,包括其任何混合物、消旋或其它形式存在。

[0191] 氨基酸脂质的实例包括 $R^3-(C=O)-Arg-NH-R^4$, 其中 Arg 是 D-或 L-精氨酸,且 R^3 和 R^4 独立地是烷基或烯基。

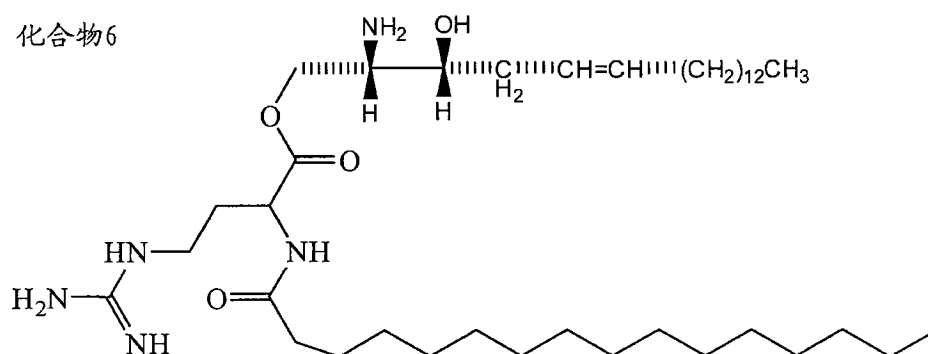
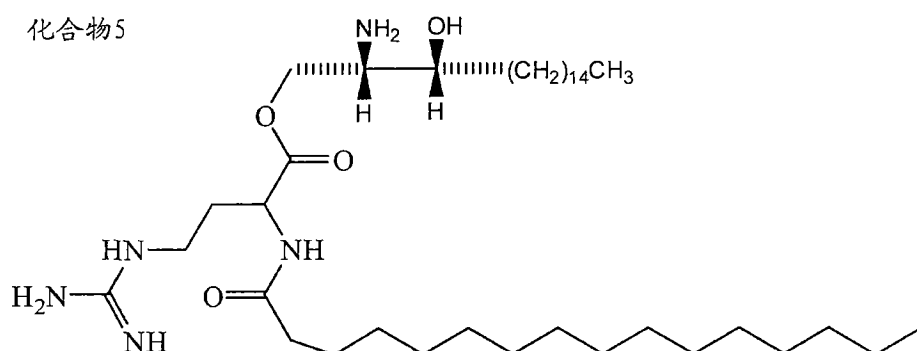
[0192] 氨基酸脂质的实例包括以下结构:

[0193]



[0194] 氨基酸脂质的实例包括以下结构：

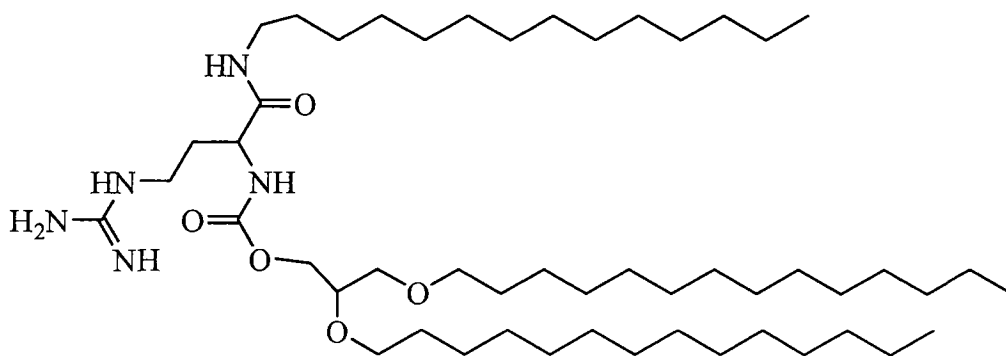
[0195]



[0196] 氨基酸脂质的实例包括以下结构：

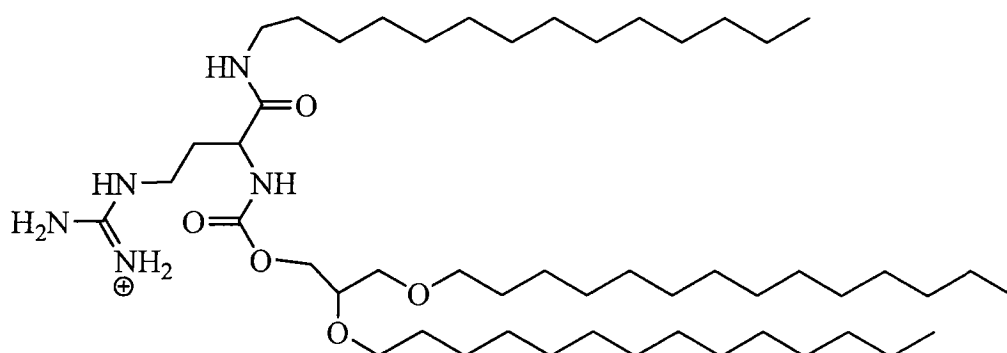
[0197] 化合物 7

[0198]



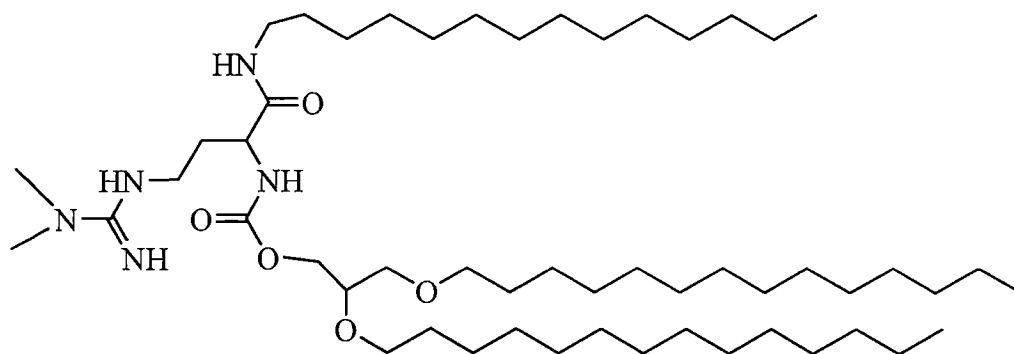
[0199] 化合物 8

[0200]



[0201] 化合物 9

[0202]

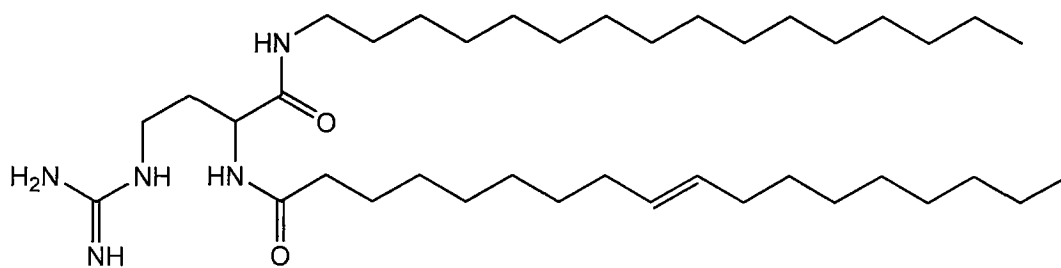


[0203] 氨基酸脂质的实例包括 $R^3-(C=O)-\text{正 Arg}-NH-R^4$, 其中正 Arg 是 D- 或 L- 正精氨酸, 且 R^3 和 R^4 独立地是烷基或烯基。

[0204] 氨基酸脂质的实例包括以下结构：

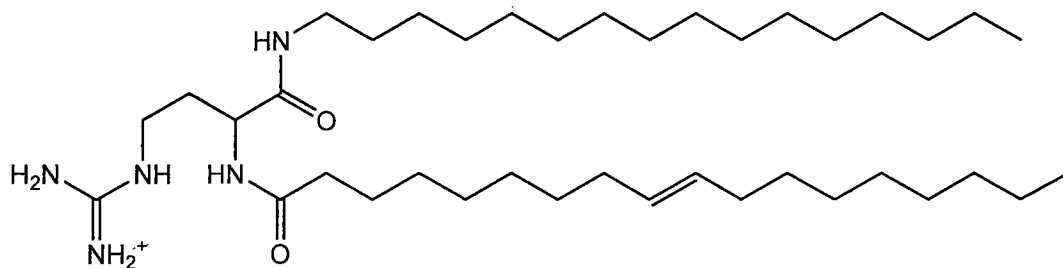
[0205] 化合物 10

[0206]



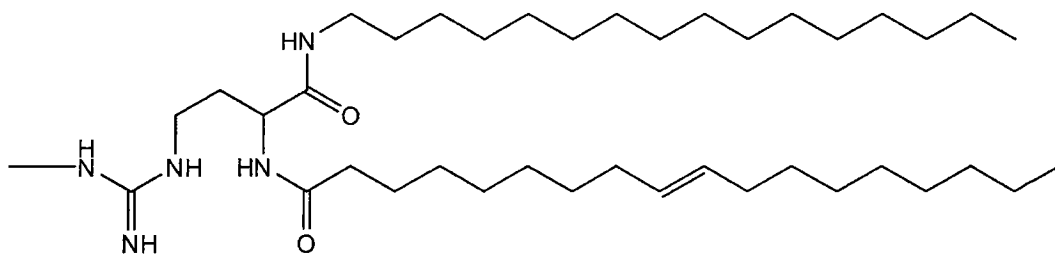
[0207] 化合物 11

[0208]



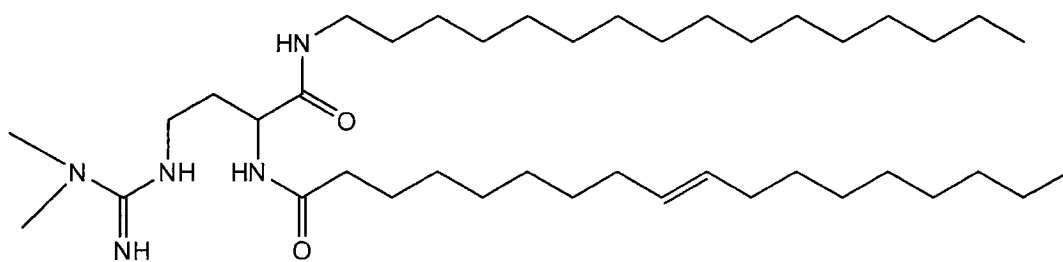
[0209] 化合物 12

[0210]



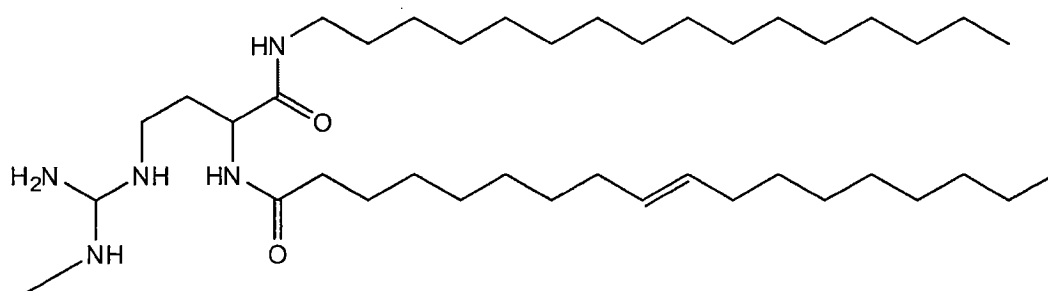
[0211] 化合物 13

[0212]



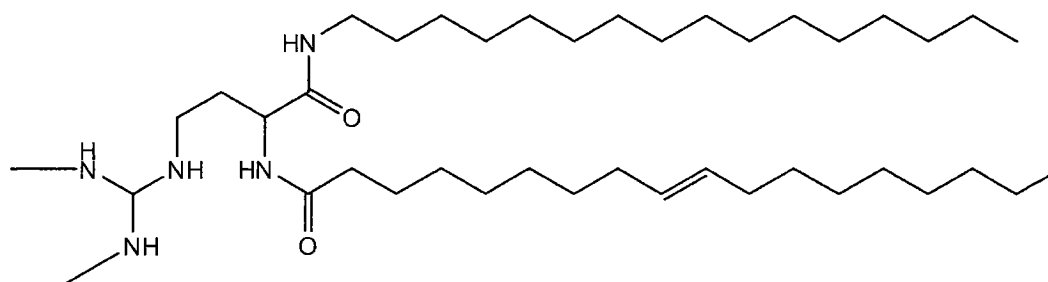
[0213] 化合物 14

[0214]



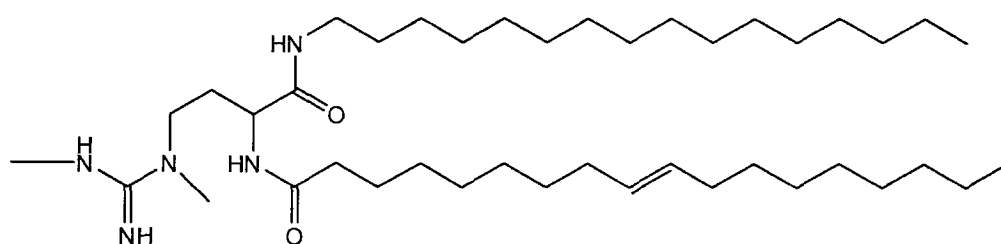
[0215] 化合物 15

[0216]



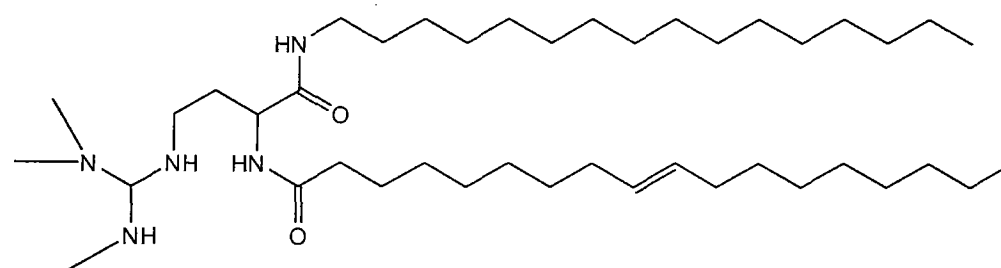
[0217] 化合物 16

[0218]



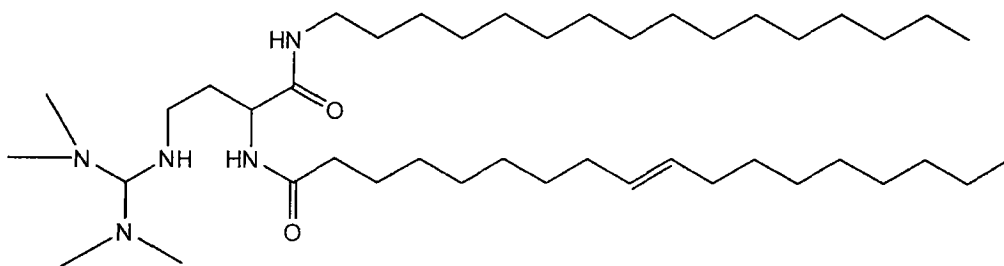
[0219] 化合物 17

[0220]



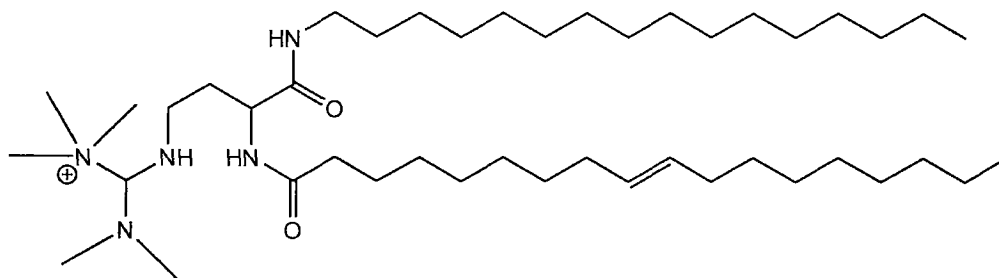
[0221] 化合物 18

[0222]



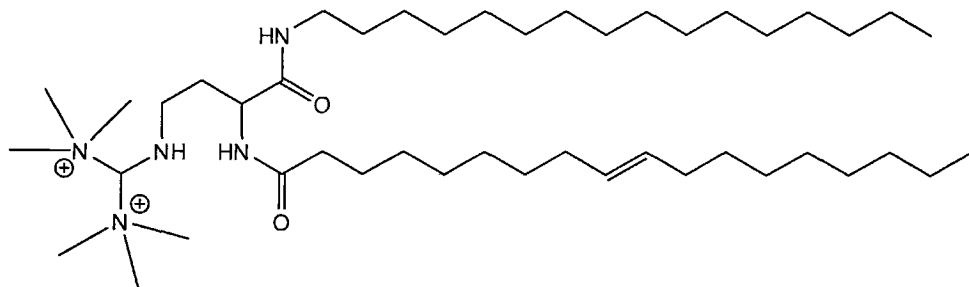
[0223] 化合物 19

[0224]



[0225] 化合物 20

[0226]

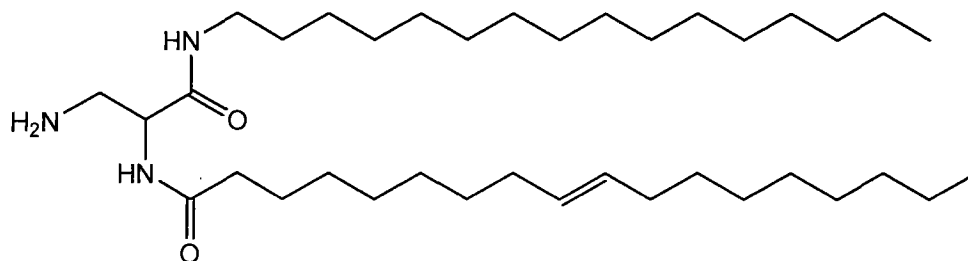


[0227] 氨基酸脂质的实例包括 $R^3-(C=O)-\text{正正 Arg-NH}-R^4$, 其中正正 Arg 是 D- 或 L- 正 - 正精氨酸, 且 R^3 和 R^4 独立地是烷基, 如庚基、辛基、壬基、癸基和十一烷基。

[0228] 氨基酸脂质的实例包括以下结构:

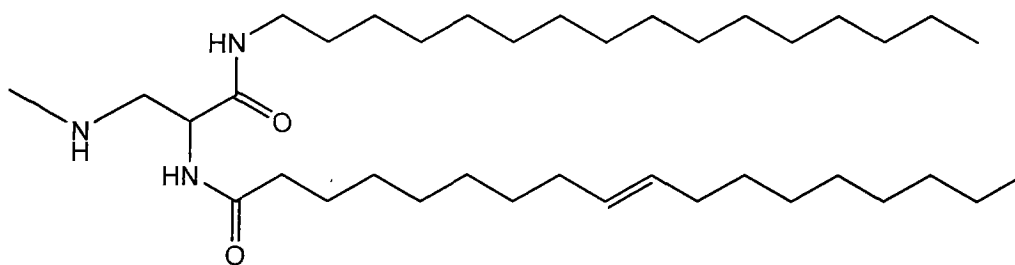
[0229] 化合物 21

[0230]



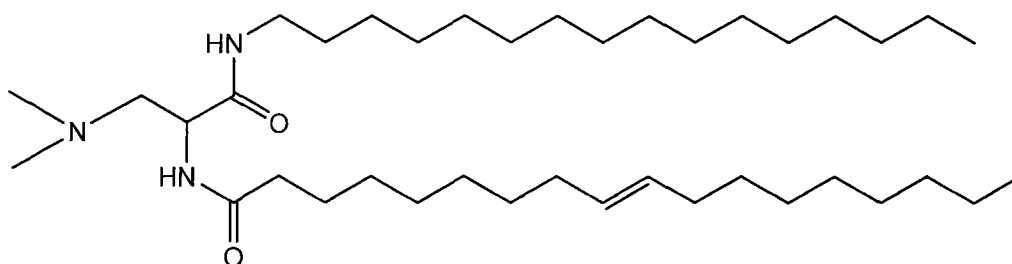
[0231] 化合物 22

[0232]



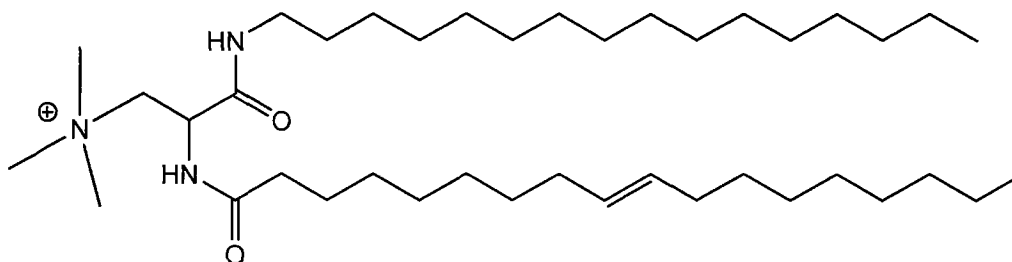
[0233] 化合物 23

[0234]



[0235] 化合物 24

[0236]

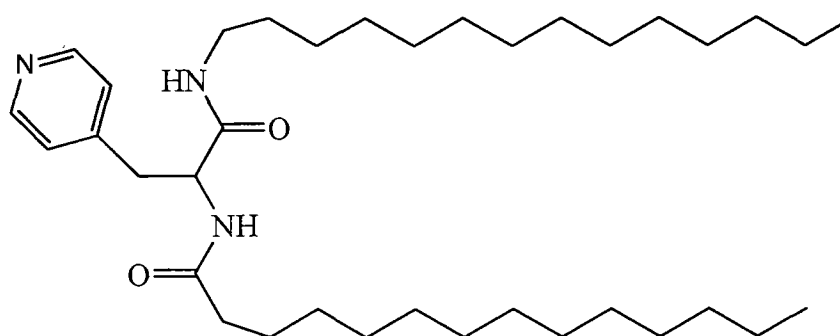


[0237] 氨基酸脂质的实例包括 $R^3-(C=O)-\text{高 Arg}-NH-R^4$, 其中高 Arg 是 D- 或 L- 高精氨酸, 且 R^3 和 R^4 独立地是烷基, 如庚基、辛基、壬基、癸基和十一烷基。

[0238] 氨基酸脂质的实例包括 $R^3-(C=O)-4\text{-吡啶基丙氨酸}-NH-R^4$, 其中吡啶基丙氨酸是 D- 或 L- 吡啶基丙氨酸, 且 R^3 和 R^4 独立地是烷基, 如庚基、辛基、壬基、癸基和十一烷基。 $R^3-(C=O)-4\text{-吡啶基丙氨酸}-NH-R^4$ 氨基酸脂质的实例包括药学上可接受的吡啶盐, 如 4-[N- 甲基吡啶基] 丙氨酸氯化物。吡啶基丙氨酸氨基酸脂质的实例包括以下结构:

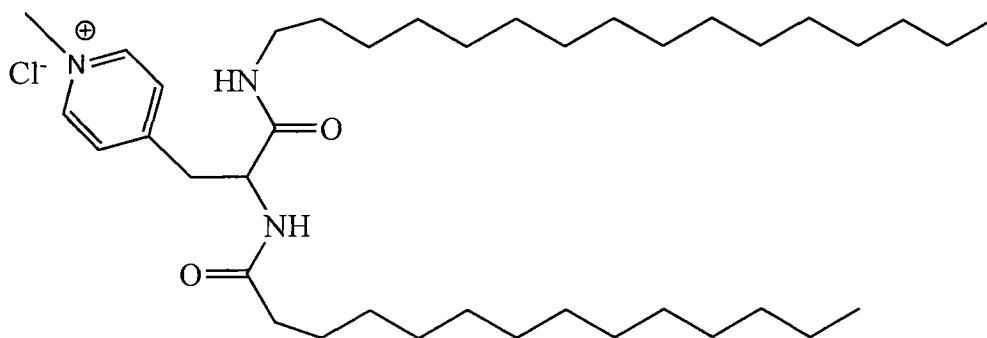
[0239] 化合物 25

[0240]



[0241] 化合物 26

[0242]

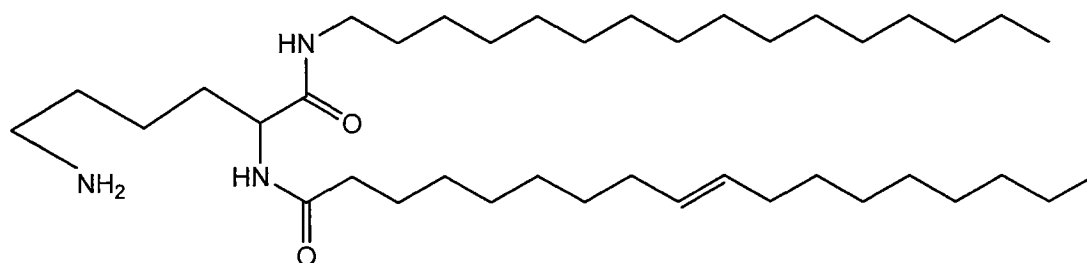


[0243] 氨基酸脂质的实例包括 $R^3-(C=O)-Lys-NH-R^4$, 其中 R^3 和 R^4 独立地是烷基或烯基。

[0244] 氨基酸脂质的实例包括以下结构：

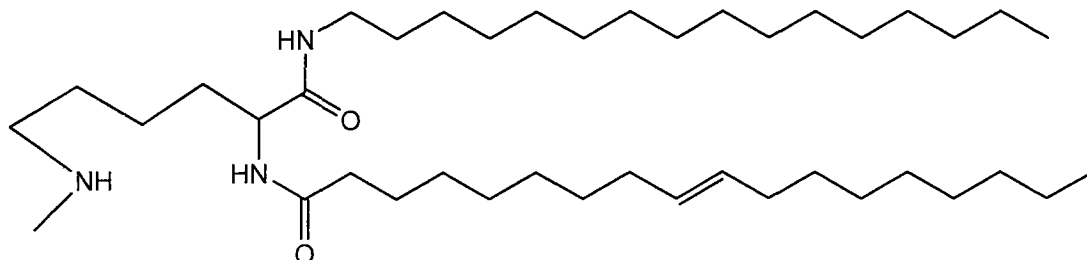
[0245] 化合物 27

[0246]



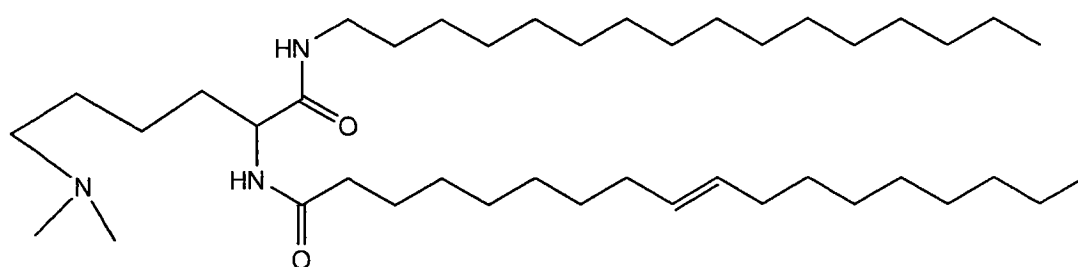
[0247] 化合物 28

[0248]



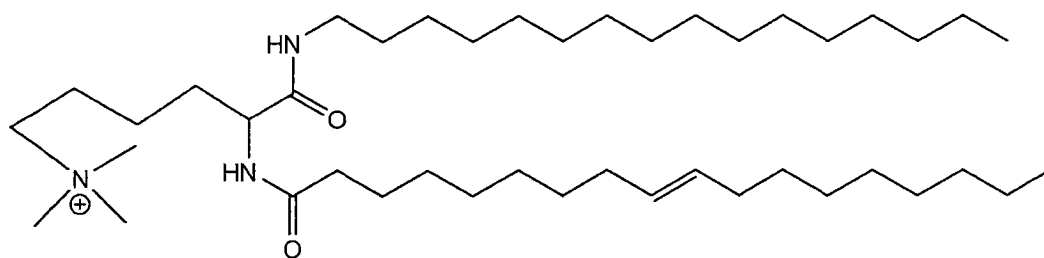
[0249] 化合物 29

[0250]



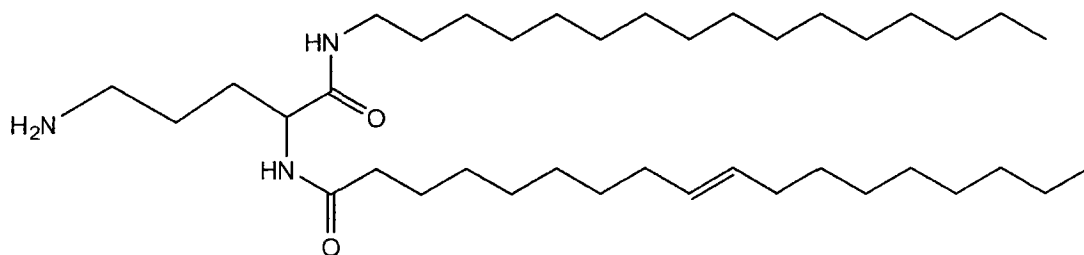
[0251] 化合物 30

[0252]



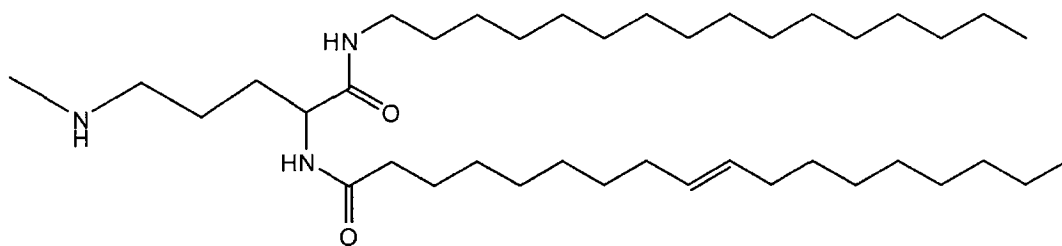
[0253] 化合物 31

[0254]



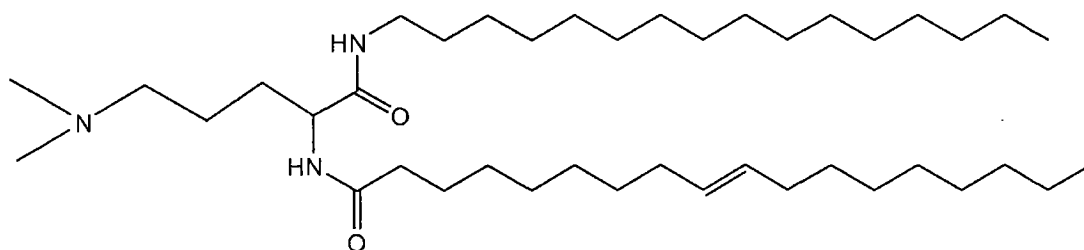
[0255] 化合物 32

[0256]



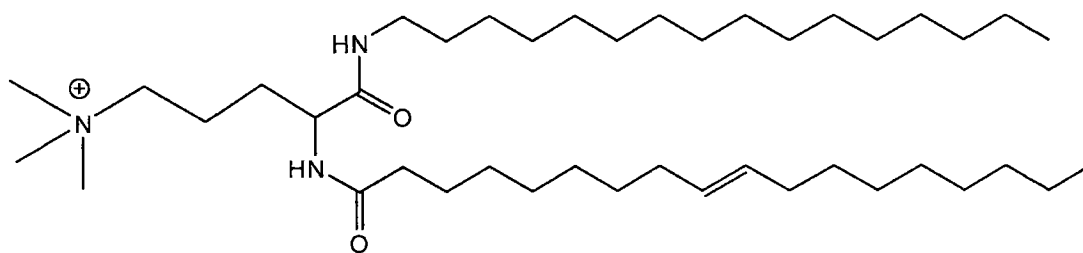
[0257] 化合物 33

[0258]



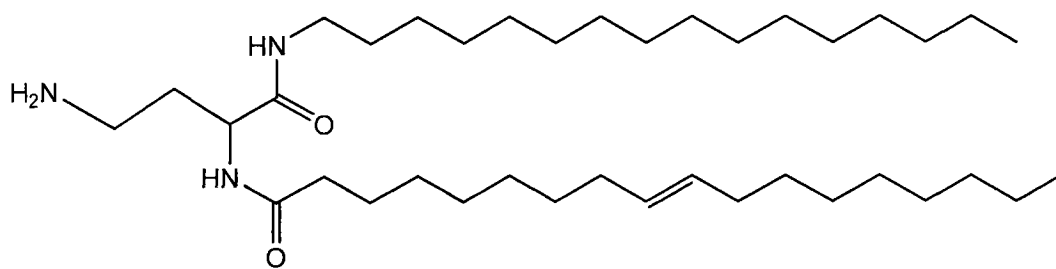
[0259] 化合物 34

[0260]



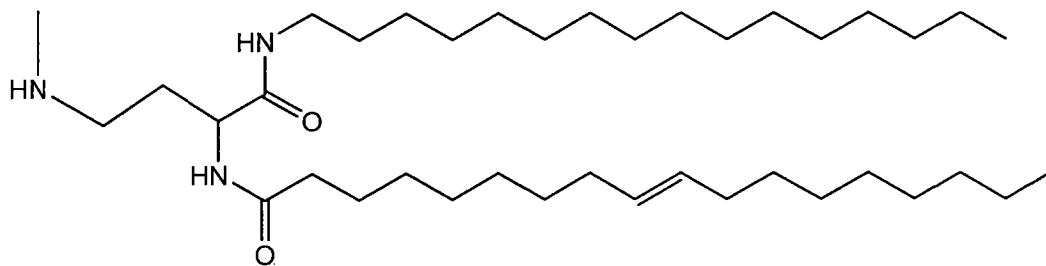
[0261] 化合物 35

[0262]



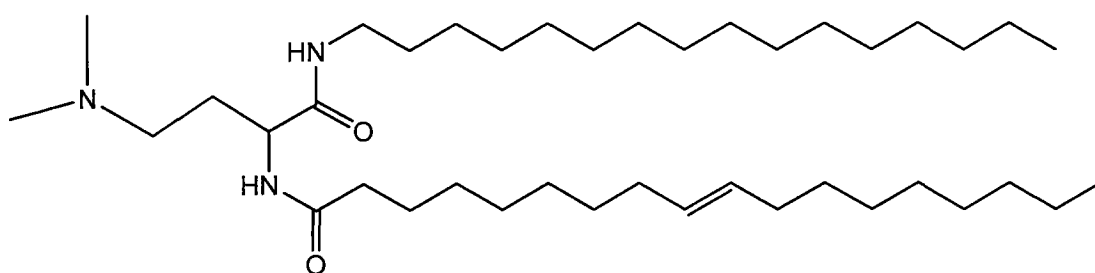
[0263] 化合物 36

[0264]



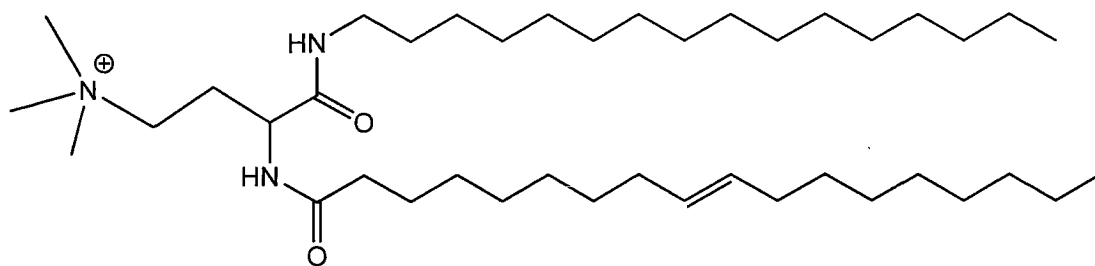
[0265] 化合物 37

[0266]



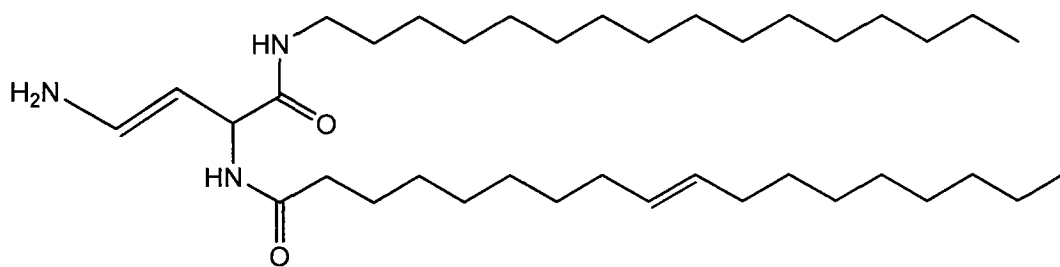
[0267] 化合物 38

[0268]



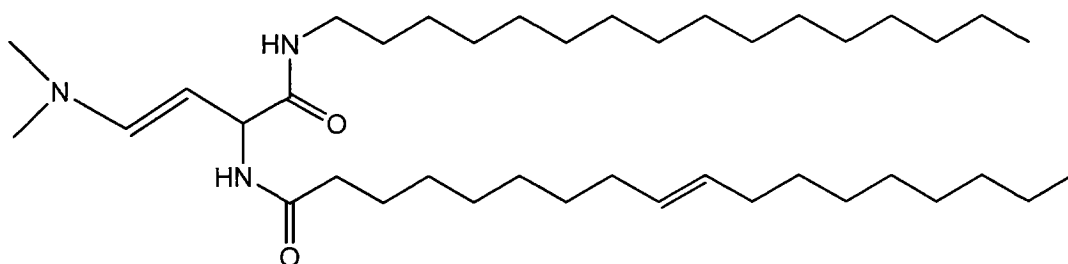
[0269] 化合物 39

[0270]



[0271] 化合物 40

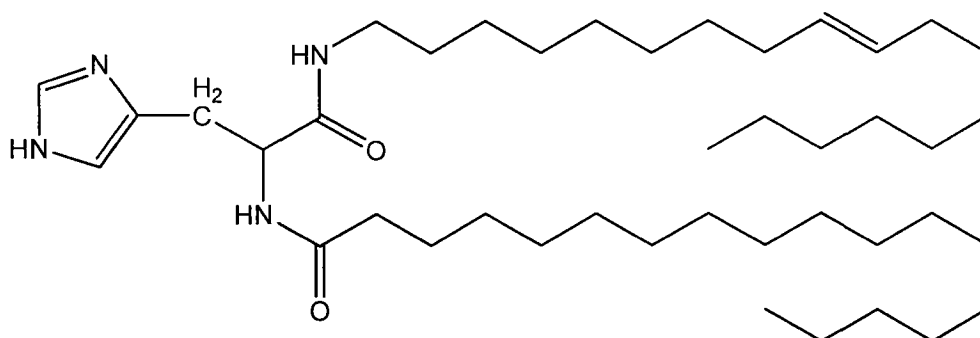
[0272]



[0273] 氨基酸脂质的实例包括 $R^3-(C=O)-His-NH-R^4$, 其中 R^3 和 R^4 独立地是烷基或烯基。
His 氨基酸脂质的实例包括以下结构：

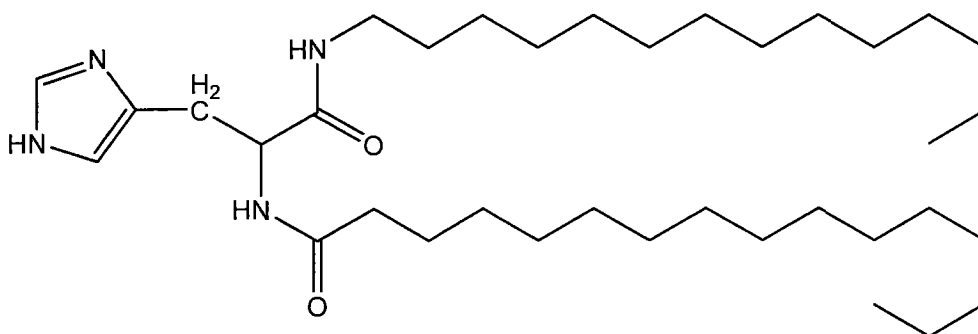
[0274] 化合物 41

[0275]



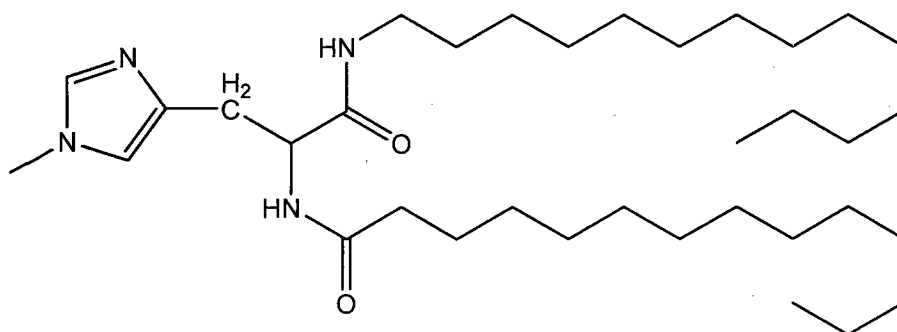
[0276] 化合物 42

[0277]



[0278] 化合物 43

[0279]

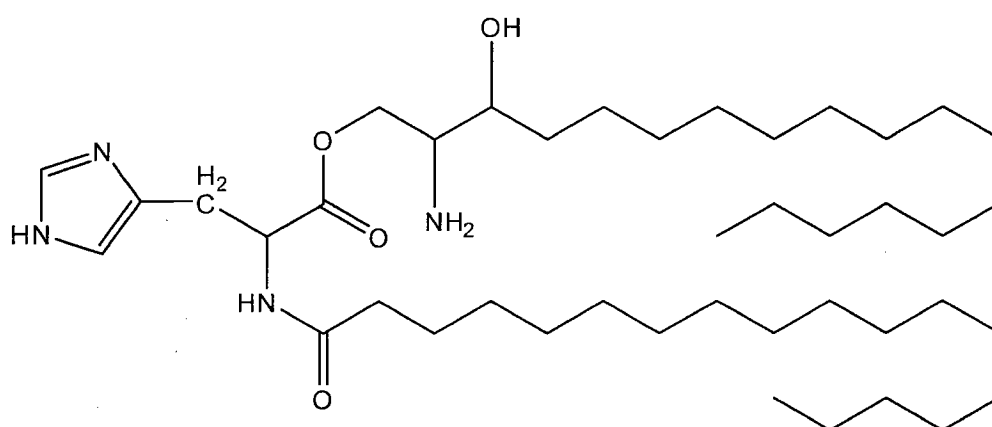


[0280] 氨基酸脂质的实例包括 $R^3-(C=O)-Xaa-O-R^4$, 其中 R^3 是烷基且 R^4 是鞘氨基醇。

[0281] 氨基酸脂质的实例包括以下结构：

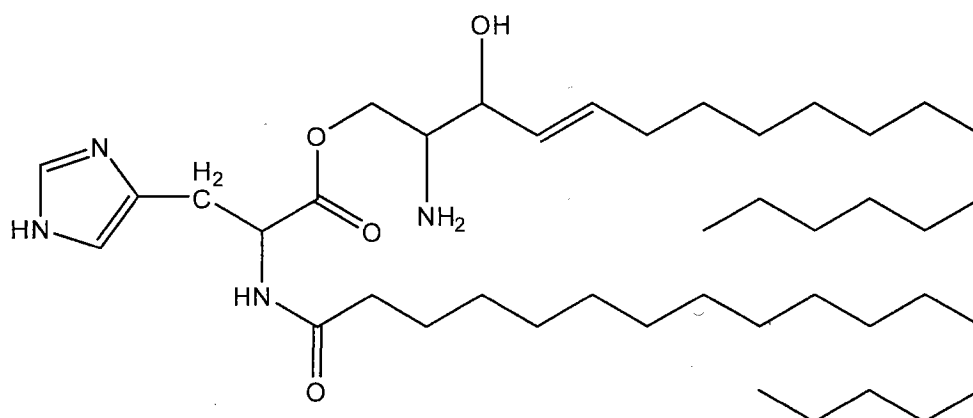
[0282] 化合物 44

[0283]



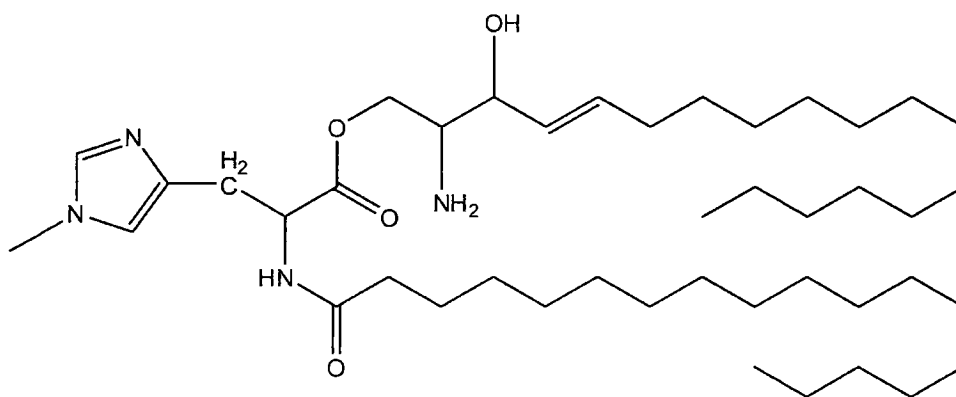
[0284] 化合物 45

[0285]

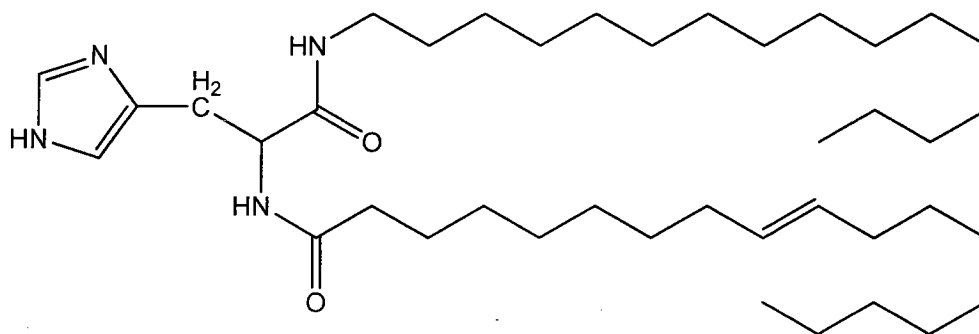


[0286] 化合物 46

[0287]



[0290]



[0293] 氨基酸脂质的实例包括(C10酰基)-D-Arg-L-Arg-NH-(C10烷基)、(C12酰基)-D-Arg-L-Arg-NH-(C12烷基)、(C14酰基)-D-Arg-L-Arg-NH-(C14烷基)、(C16酰

基)-D-Arg-L-Arg-NH-(C16 烷基)、(C18 酰基)-D-Arg-L-Arg-NH-(C18 烷基)、(C10 酰基)-D-高 Arg-L-高 Arg-NH-(C10 烷基)、(C12 酰基)-D-高 Arg-L-高 Arg-NH-(C12 烷基)、(C14 酰基)-D-高 Arg-L-高 Arg-NH-(C14 烷基)、(C16 酰基)-D-高 Arg-L-高 Arg-NH-(C16 烷基)、(C18 酰基)-D-高 Arg-L-高 Arg-NH-(C18 烷基)、(C10 酰基)-D-正 Arg-L-正 Arg-NH-(C10 烷基)、(C12 酰基)-D-正 Arg-L-正 Arg-NH-(C12 烷基)、(C14 酰基)-D-正 Arg-L-正 Arg-NH-(C14 烷基)、(C16 酰基)-D-正 Arg-L-正 Arg-NH-(C16 烷基)、(C18 酰基)-D-正 Arg-L-正 Arg-NH-(C18 烷基)、(C10 酰基)-D-正正 Arg-L-正正 Arg-NH-(C10 烷基)、(C12 酰基)-D-正正 Arg-L-正正 Arg-NH-(C12 烷基)、(C14 酰基)-D-正正 Arg-L-正正 Arg-NH-(C14 烷基)、(C16 酰基)-D-正正 Arg-L-正正 Arg-NH-(C16 烷基)、(C18 酰基)-D-正正 Arg-L-正正 Arg-NH-(C18 烷基)。

[0294] 氨基酸脂质的实例包括 (C10 酰基)-His-Arg-NH-(C10 烷基)、(C12 酰基)-His-Arg-NH-(C12 烷基)、(C14 酰基)-His-Arg-NH-(C14 烷基)、(C16 酰基)-His-Arg-NH-(C16 烷基)、(C18 酰基)-His-Arg-NH-(C18 烷基)、(C10 酰基)-His-Arg-NH-(C10 烷基)、(C12 酰基)-His-Arg-NH-(C12 烷基)、(C14 酰基)-His-Arg-NH-(C14 烷基)、(C16 酰基)-His-Arg-NH-(C16 烷基)、(C18 酰基)-His-Arg-NH-(C18 烷基)、(C10 酰基)-His-Arg-(C10 烷基)、(C12 酰基)-His-Arg-NH-(C12 烷基)、(C14 酰基)-His-Arg-NH-(C14 烷基)、(C16 酰基)-His-Arg-NH-(C16 烷基)、(C18 酰基)-His-Arg-NH-(C18 烷基)、(C10 酰基)-His-Arg-NH-(C10 烷基)、(C12 酰基)-His-Arg-NH-(C12 烷基)、(C14 酰基)-His-Arg-NH-(C14 烷基)、(C16 酰基)-His-Arg-NH-(C16 烷基)、(C18 酰基)-His-Arg-NH-(C18 烷基)。

[0295] 氨基酸脂质的实例包括 (C10 酰基)-His-Asp-NH-(C10 烷基)、(C12 酰基)-His-Asp-NH-(C12 烷基)、(C14 酰基)-His-Asp-NH-(C14 烷基)、(C16 酰基)-His-Asp-NH-(C16 烷基)、(C18 酰基)-His-Asp-NH-(C18 烷基)、(C10 酰基)-His-Asp-NH-(C10 烷基)、(C12 酰基)-His-Asp-NH-(C12 烷基)、(C14 酰基)-His-Asp-NH-(C14 烷基)、(C16 酰基)-His-Asp-NH-(C16 烷基)、(C18 酰基)-His-Asp-NH-(C18 烷基)、(C10 酰基)-His-Asp-(C10 烷基)、(C12 酰基)-His-Asp-NH-(C12 烷基)、(C14 酰基)-His-Asp-NH-(C14 烷基)、(C16 酰基)-His-Asp-NH-(C16 烷基)、(C18 酰基)-His-Asp-NH-(C18 烷基)、(C10 酰基)-His-Asp-NH-(C10 烷基)、(C12 酰基)-His-Asp-NH-(C12 烷基)、(C14 酰基)-His-Asp-NH-(C14 烷基)、(C16 酰基)-His-Asp-NH-(C16 烷基)、(C18 酰基)-His-Asp-NH-(C18 烷基)。

[0296] 氨基酸脂质的实例包括 (C10 酰基)-Pal-Arg-NH-(C10 烷基)、(C12 酰基)-Pal-Arg-NH-(C12 烷基)、(C14 酰基)-Pal-Arg-NH-(C14 烷基)、(C16 酰基)-Pal-Arg-NH-(C16 烷基)、(C18 酰基)-Pal-Arg-NH-(C18 烷基)、(C10 酰基)-Pal-Arg-NH-(C10 烷基)、(C12 酰基)-Pal-Arg-NH-(C12 烷基)、(C14 酰基)-Pal-Arg-NH-(C14 烷基)、(C16 酰基)-Pal-Arg-NH-(C16 烷基)、(C18 酰基)-Pal-Arg-NH-(C18 烷基)、(C10 酰基)-Pal-Arg-(C10 烷基)、(C12 酰基)-Pal-Arg-NH-(C12 烷基)、(C14 酰基)-Pal-Arg-NH-(C14 烷基)、(C16 酰基)-Pal-Arg-NH-(C16 烷基)、(C18 酰基)-Pal-Arg-NH-(C18 烷基)。

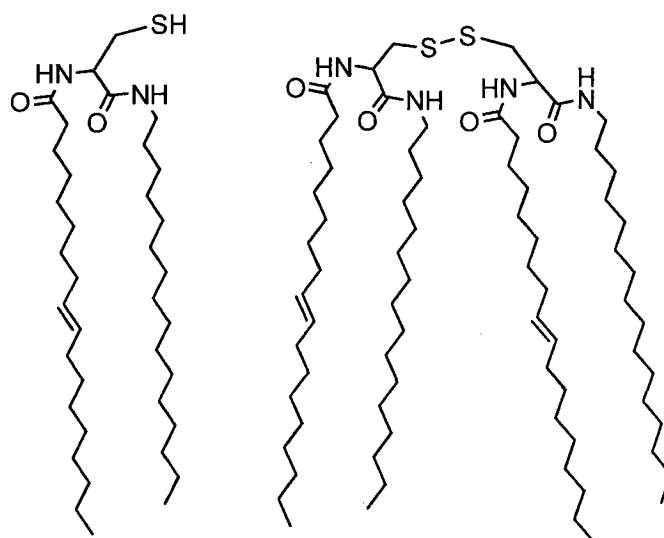
基)-Pal-Arg-NH-(C16 烷基)、(C18 酰基)-Pal-Arg-NH-(C18 烷基)、(C10 酰基)-Pal-Arg-NH-(C10 烷基)、(C12 酰基)-Pal-Arg-NH-(C12 烷基)、(C14 酰基)-Pal-Arg-NH-(C14 烷基)、(C16 酰基)-Pal-Arg-NH-(C16 烷基)、(C18 酰基)-Pal-Arg-NH-(C18 烷基)。

[0297] 可以将氨基酸脂质制备成聚合体或多聚体,如二聚体、三聚体或四聚体。聚合体或多聚体可以制备自一种或多于一种的氨基酸脂质。在一些实施方式中,聚合体或多聚体氨基酸脂类可以通过在氨基酸侧链上提供巯基或其它可交联基团,或提供连接的或锁链的(tethered)氨基酸结构如锁链素或瓜氨酸来制备。在其它的实施方式中,聚合体或多聚体氨基酸脂类可以用生物缀合接头化学方法来制备。

[0298] 氨基酸脂质的实例包括以下结构:

[0299] 化合物 48 化合物 49

[0300]



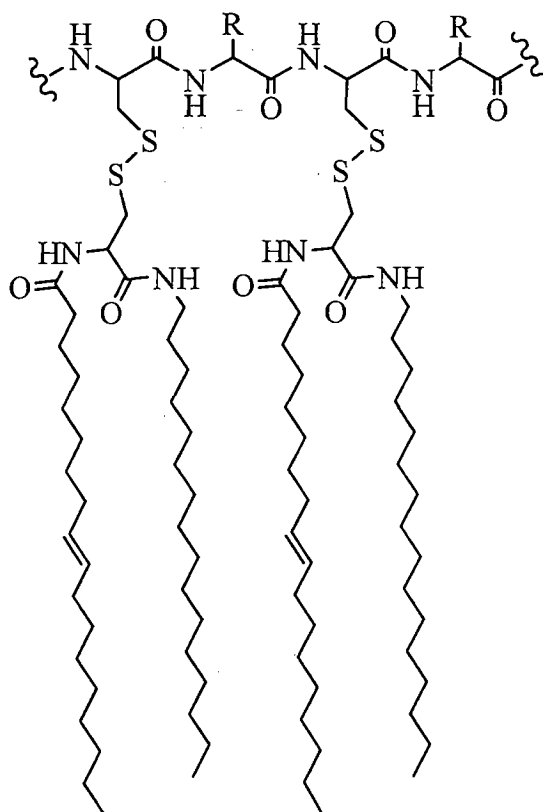
[0301] 氨基酸脂质可以制备成具有共价结合到氨基酸侧链的肽或聚合物链的缀合物。肽或聚合物链可以利用氨基酸侧链反应基团来结合,例如分别利用半胱氨酸或蛋氨酸的硫醇或甲基硫醇基团,或丝氨酸的醇基,或赖氨酸的氨基。肽或聚合物链可以利用取代或修饰的氨基酸侧链的任何反应基团来结合。各种接头基团,如 NHS、马来酰亚胺基、和生物缀合技术和接头都可以使用。

[0302] 氨基酸脂质可以制备成结合寡聚或聚合框架的结构物。例如,氨基酸脂质可以与聚乙二醇、聚丙二醇、寡核苷酸网状物或网格、聚(氨基酸)、碳水化合物、葡聚糖、水凝胶或淀粉结合。

[0303] 氨基酸脂质可以制备成结合药物化合物或组合物,或生物活性试剂的结构物。例如,氨基酸脂质可以与核酸药物如调节性或干扰性 RNA 缀合。

[0304] 氨基酸脂质的实例包括以下结构:

[0305]



[0306] 其中 R 是任意的氨基酸侧链。

[0307] 本发明的化合物和组合物可以引入包括聚合体结构的增溶或功能化基团或结构。参见,如 . R. L. Dunn 和 R. M. Ottenbrite, *Polymeric Drugs and DrugDelivery Systems*, ACS Symp. Ser. 469 (1991)。可以对氨基酸脂质进行衍生化以便提高溶解性例如以结合二醇,制备季铵或带电基团,结合羟基或胺基团如醇、多元醇或聚醚,或结合聚乙烯亚胺、聚乙二醇或聚丙二醇。结合的聚合体组分如聚乙二醇的分子量可以是任何值,例如 200、300、400、500、600、750、1000、1250、1500、2000、3000、4000、5000、7500、10,000、15,000、20,000、25,000 或 30,000Da 或更大。例如,聚乙二醇链可以通过氨基酸侧链的氨基或其它反应基团来结合。

[0308] 通常,在本文中,除非另外说明,常规的化学术语是指指定类型的所有基团,包括具有任何数量和类型的原子的基团。例如“烯基”广义上是指具有如下文定义的 2-22 个碳原子的烷基,其中 (C18:1) 烯基是指具有 18 个碳原子和一个双键的烯基。

[0309] 在本文中,术语“烷基”是指饱和的,支链的或无支链的,取代或未取代的含有 1-22 个碳原子的脂肪族基团。这些定义可以应用于其它基团的烷基部分,例如烷氧基、烷酰基、芳烷基和下文定义的其他基团。在本文中,术语“环烷基”是指饱和的,取代或未取代的含 3-12 个碳原子的环烷基环。在本文中,术语“C(1-5) 烷基”包括 C(1) 烷基、C(2) 烷基、C(3) 烷基、C(4) 烷基、和 C(5) 烷基。另外,术语“C(3-22) 烷基”包括 C(1) 烷基、C(2) 烷基、C(3) 烷基、C(4) 烷基、C(5) 烷基、C(6) 烷基、C(7) 烷基、C(8) 烷基、C(9) 烷基、C(10) 烷基、C(11) 烷基、C(12) 烷基、C(13) 烷基、C(14) 烷基、C(15) 烷基、C(16) 烷基、C(17) 烷基、C(18) 烷基、C(19) 烷基、C(20) 烷基、C(21) 烷基、和 C(22) 烷基。

[0310] 在本文中,术语“烯基”是指不饱和的,支链的或无支链的,取代或未取代的具有

2-22 个碳原子和至少一个碳碳双键的烷基或环烷基。在本文中,术语“炔基”是指不饱和的,支链的或无支链的,取代或未取代的具有 2-22 个碳原子和至少一个碳碳三键的烷基或环烷基。

[0311] 在本文中,术语“烷氧基”是指共价结合氧原子的烷基、环烷基、烯基或炔基。在本文中,术语“烷酰基”是指 $-C(=O)-$ 烷基,其还可称作“酰基”。在本文中,术语“烷酰氧基”是指 $-O-C(=O)-$ 烷基。在本文中,术语“烷基氨基”是指基团 $-NRR'$,其中 R 和 R' 是氢或烷基,且至少 R 和 R' 之一是烷基。烷基氨基包括如哌啶基的基团,其中 R 和 R' 形成环。术语“烷基氨基烷基”是指 $-$ 烷基 $-NRR'$ 。

[0312] 在本文中,术语“芳基”是指各环中有 4-12 个原子的任何稳定的单环、双环或多环碳环系统,其中至少一个环是芳香族化合物。芳基的一些实例包括苯基、萘基、四氢萘基、茚满基和联苯。其中芳基取代基是双环,且一个环是非芳香族化合物,应该理解结合的是芳环。芳基可以是取代或未取代的。

[0313] 在本文中,术语“杂芳基”是指任何稳定的各环有 4-12 个原子的单环的、双环的或多环的碳环系统,其中至少一个环是芳香族化合物,且含有 1-4 个选自氧、氮和硫的杂原子。杂芳基的一些实例包括吡啶基、喹啉基、吡唑基、咪唑基、苯并三唑基、呋喃基、噻吩基、苯并噻吩基、苯并呋喃基、喹啉基、异喹啉基、噁唑基、异噁唑基、吡嗪基、哒嗪基、吡啶基、嘧啶基、吡咯基和四氢喹啉基。杂芳基包括含氮杂芳基的 N-氧化物衍生物。

[0314] 在本文中,术语“杂环”或“杂环基”是指 5-22 个原子的芳香或非芳香环系统,其中 1-4 个环原子是选自氧、氮和硫的杂原子。因此,杂环可以是杂芳基或其二氢或四氢变体。

[0315] 在本文中,术语“芳酰基”是指衍生自芳香羧酸的芳基基团,如取代的苯甲酸。术语“芳烷基”在本文中是指结合烷基的芳基,例如苯基。

[0316] 在本文中,术语“羧基”表示式 $-C(=O)OH$ 或 $-C(=O)O^-$ 的基团。术语“羰基”和“酰基”在本文中是指氧原子与碳原子以双键结合的基团 $>C=O$ 。在本文中,术语“羟基”是指 $-OH$ 或 $-O^-$ 。在本文中,术语“腈”或“氰基”是指 $-CN$ 。术语“卤素”或“卤代”是指氟代 ($-F$)、氯代 ($-Cl$)、溴代 ($-Br$) 和碘代 ($-I$)。

[0317] 在本文中,术语“取代的”是指原子具有一种或多种取代或取代基,其可以相同或不同,且可以包括氢取代基。因此,术语烷基、环烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷酰基、烷酰氧基、烷基氨基、烷基氨基烷基、芳基、杂芳基、杂环、芳酰基和芳烷基在本文中是指包括取代变体的基团。取代的变体包括线性的、分支的和环状变体,和具有代替一个或多个结合到该基团上任意碳原子的氢的取代基的基团。可结合到基团上碳原子的取代基包括烷基、环烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷酰基、烷酰氧基、烷基氨基、烷基氨基烷基、芳基、杂芳基、杂环、芳酰基、芳烷基、酰基、羟基、氰基、卤代、卤代烷基、氨基、氨基酰基、烷基氨基酰基、酰氧基、芳氧基、芳氧基烷基、巯基、硝基、氨基甲酰、氨基甲酰和杂环。例如,术语乙基包括但不限于: $-CH_2CH_3$ 、 $-CHFCH_3$ 、 $-CF_2CH_3$ 、 $-CHFCH_2F$ 、 $-CHFCHF_2$ 、 $-CHFCHF_3$ 、 $-CF_2CH_2F$ 、 $-CF_2CHF_2$ 、 $-CF_2CF_3$ 、和如上所述的其它变体。通常,取代基可以进一步被任何原子或原子基团取代。

[0318] 本发明的氨基酸脂质或其变体可以通过本领域已知的方法来合成。

[0319] 制备各种有机基团和保护基团的方法是本领域已知的,且通常其应用和修饰也在本领域技术人员的能力范围内。参见如 Stanley R. Sandler 和 WolfKaro, Organic Functional Group Preparations(1989); Greg T. Hermanson, Bioconjugate

Techniques(1996); Leroy G. Wade, Compendium Of Organic Synthetic Methods(1980); examples of protective groups are found in T.W. Greene 和 P.G.M. Wuts, Protective Groups In Organic Synthesis(3rd ed. 1991)。

[0320] 具有足够碱性的本发明的肽或蛋白组合物的药学上可接受的盐可以是与例如无机或有机酸如盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸、氯磺酸、三氟乙酸、柠檬酸、马来酸、醋酸、丙酸、草酸、苹果酸、马来酸、丙二酸、富马酸或酒石酸, 和烷烃- 或芳烃磺酸如甲磺酸、乙磺酸、苯磺酸、氯苯磺酸、甲苯磺酸、萘磺酸、萘二磺酸和樟脑磺酸的酸加成盐。

[0321] 具有足够酸性的本发明的肽或蛋白组合物的药学上可接受的盐可以是碱金属盐例如钠或钾盐, 或碱土金属盐例如钙或镁盐, 或锌或锰盐, 或铵盐, 或可提供生理学上可接受阳离子的有机碱的盐, 例如甲基胺、二甲基胺、三甲基胺、三乙胺、乙醇胺、二乙醇胺、三乙醇胺、乙二胺、三乙醇胺、N- 甲基葡萄糖胺、哌啶、吗啉或三-(2- 羟基乙基) 胺的盐, 且包括氨基酸如精氨酸的盐, 和有机酸如葡萄糖醛酸或半乳糖醛酸的盐。参见如 Berge 等, J. Pharm. Sci. 66 :1-19, 1977。

[0322] 包含干扰性 RNA 制剂和脂质、肽或蛋白的本发明组合物的盐或药学上可接受的盐还可以包含干扰性 RNA 试剂和脂质、肽或蛋白的盐复合物。干扰性 RNA 试剂和脂质、肽或蛋白的盐复合物可以形成自干扰性 RNA 试剂的药学上可接受的盐, 或形成自脂质、肽或蛋白的药学上可接受的盐。

[0323] 本发明的某些化合物可以同时包括碱性和酸性官能团, 这样就能将化合物制成碱或酸加成盐。

[0324] 本发明的一些化合物、肽和 / 或蛋白组合物可以具有一个或多个手性中心和 / 或几何异构中心 (E- 和 Z- 异构体), 且应该理解本发明涵盖全部此类光学异构体、非对映异构体、几何异构体和其混合物。

[0325] 本发明涵盖本文公开的任何和全部互变异构体、溶剂化物或非溶剂化物、水合或非水合形式、以及化合物的任何原子同位素形式、肽和 / 或蛋白组合物。

[0326] 其它的递送脂质

[0327] 在本发明的一些方面中, 氨基酸脂质和其它的非氨基酸脂质可以用于递送和施用调节性 RNA 组分、RNA 拮抗剂、干扰性 RNA 或核酸。更优选地, 本发明的组合物可以包括一种或多种氨基酸脂质以及非氨基酸阳离子脂质和非氨基酸非阳离子脂质。

[0328] 非氨基酸阳离子脂质可以是单阳离子或聚阳离子。一些非氨基酸阳离子脂质包括中性脂质和在特定 pH 下大致具有零净电荷的脂质, 例如, 两性脂质。非氨基酸非阳离子脂质也包括阴离子脂质。

[0329] 在一些实施方式中, 组合物是 RNA 组分与氨基酸脂质和非氨基酸阳离子脂质的混合物或复合物。在一些实施方式中, 组合物可以是一种或多种调节性或干扰性 RNA 试剂与一种或多种氨基酸脂质和一种或多种非氨基酸阳离子脂质的混合物或复合物。

[0330] 本发明的化合物和组合物可以与各种用于递送活性试剂至有机体细胞、组织、器官或区域的靶标配体或试剂混合或结合。靶向试剂的实例包括抗体、受体配体、肽、蛋白、外源凝集素、(聚) 糖类、半乳糖、甘露糖、环糊精、核酸、DNA、RNA、核酸适配子和聚氨基酸。

[0331] 非氨基酸阳离子脂质的实例包括 N-[1-(2,3- 二油酰氧基) 丙基]-N, N, N- 三甲基氯化铵 (DOTMA); 1,2- 双(油酰氧基)-3-3-(三甲基铵) 丙烷 (DOTAP)、1,2- 双(二肉

豆蔻氧基)-3-3-(三甲基氨)丙烷(DMTAP);1,2-二肉豆蔻氧基丙基-3-二甲基羟基乙基溴化铵(DMRIE);二甲基二-十八烷基溴化铵(DDAB);3-(N-(N', N'-二甲基氨基乙烷)氨基甲酰)胆固醇(DC-Chol);3 β -(N', N'-二胍基乙基-氨基乙烷)氨基甲酰胆固醇(BGTC);2-(2-(3-(双(3-氨基丙基)氨基)丙基氨基)乙酰胺基)-N,N-二十四烷基乙酰胺(RPR209120);其药学上可接受的盐和其混合物。

[0332] 非氨基酸阳离子脂质的实例包括1,2-二烯酰基-sn-丙三基-3-乙基胆碱磷酸(EPCs),如1,2-二油酰-sn-丙三基-3-乙基胆碱磷酸、1,2-二硬脂酰-sn-丙三基-3-乙基胆碱磷酸、1,2-二棕榈酰-sn-丙三基-3-乙基胆碱磷酸、其药学上可接受的盐和其混合物。

[0333] 非氨基酸阳离子脂质的实例包括1,2-二硬脂酰氧基-N,N-二甲基-3-氨基丙烷(DSDMA)、1,2-二油酰氧基-N,N-二甲基-3-氨基丙烷(DODMA)、1,2-二亚油酰氧基-N,N-二甲基-3-氨基丙烷(DLinDMA)和1,2-二亚油酰氧基-N,N-二甲基-3-氨基丙烷(DLenDMA)。

[0334] 非氨基酸聚阳离子脂质的实例包括四甲基四棕榈酰精胺(TMTPS)、四甲基四油烯基精胺(TMTOS)、四甲基四月桂基精胺(TMTLS)、四甲基四肉豆蔻基精胺(TMTMS)、四甲基二油烯基精胺(TMDOS)、其药学上可接受的盐和其混合物。

[0335] 非氨基酸聚阳离子脂质的实例包括2,5-双(3-氨基丙基氨基)-N-(2-(二-十八烷基氨基)-2-氧乙基)戊酰胺(DOGS);2,5-双(3-氨基丙基氨基)-N-(2-(二(Z)-十八碳-9-二烯基氨基)-2-氧乙基)戊酰胺(DOGS-9-en);2,5-双(3-氨基丙基氨基)-N-(2-(二(9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯基氨基)-2-氧乙基)戊酰胺(DLinGS);3- β -(N⁴-(N¹,N⁸-二羰基苯酰氧基亚精胺)氨基甲酰)胆固醇(GL-67)、(9Z,9'Z)-2-(2,5-双(3-氨基丙基氨基)戊氨基)丙烷-1,3-二基-二-十八碳-9-烯酸酯(DOSPER);2,3-二油烯氧基-N-[2(精胺羰基)乙基]-N,N-二甲基-1-丙铵三氟乙酸酯(DOSPA);其药学上可接受的盐和其混合物。

[0336] 非氨基酸阳离子脂质的实例包括DS404-28 BGTC(CAS 182056-06-0)、DOSPER(CAS 178532-92-8)、GL-67(179075-30-0)、RPR209120(CAS433292-13-8)、DOGS(12050-77-7)、DOGS(9-en, C18:1)、DLinGS(C18:2)、和DOTMA(104162-48-3)。

[0337] 非氨基酸阳离子脂质的实例描述于美国专利号4,897,355;5,279,833;6,733,777;6,376,248;5,736,392;5,334,761;5,459,127;2005/0064595;5,208,036;5,264,618;5,279,833;5,283,185;5,753,613;和5,785,992中。

[0338] 在一些实施方式中,组合物是RNA组分和氨基酸脂质和非氨基酸非-阳离子脂质的混合物或复合物。在一些实施方式中,组合物是一种或多种RNA组分和一种或多种氨基酸脂质和一种或多种非氨基酸非阳离子脂质的混合物或复合物。

[0339] 非氨基酸非阳离子脂质包括中性、两性和阴离子脂质。因此,非-阳离子两性脂质可以包括阳离子头基。

[0340] 非氨基酸非阳离子脂质的实例包括1,2-二月桂酰-sn-甘油(DLG);1,2-二肉豆蔻酰-sn-甘油(DMG);1,2-二棕榈酰-sn-甘油(DPG);1,2-二硬脂酰-sn-甘油(DSG);1,2-二月桂酰-sn-丙三基-3-磷脂酸(钠盐;DLPA);1,2-二肉豆蔻酰-sn-丙三基-3-磷脂酸(钠盐;DMPA);1,2-二棕榈酰-sn-丙三基-3-磷脂酸(钠盐;DPPA);1,2-二硬脂酰-sn-丙三基-3-磷脂酸(钠盐;DSPA);1,2-二arachidoyl-sn-丙三基-3-胆碱磷

酸 (DAPC) ;1,2- 二月桂酰 -sn- 丙三基 -3- 胆碱磷酸 (DLPC) ;1,2- 二肉豆蔻酰 -sn- 丙三基 -3- 胆碱磷酸 (DMPC) ;1,2- 二棕榈酰 -sn- 丙三基 -0- 乙基 -3- 胆碱磷酸 (氯化物或三氟甲磺酸盐 ;DPePC) ;1,2- 二棕榈酰 -sn- 丙三基 -3- 胆碱磷酸 (DPPC) ;1,2- 二硬脂酰 -sn- 丙三基 -3- 胆碱磷酸 (DSPC) ;1,2- 二月桂酰 -sn- 丙三基 -3- 磷酸乙醇胺 (DLPE) ;1,2- 二肉豆蔻酰 -sn- 丙三基 -3- 磷酸乙醇胺 (DMPE) ;1,2- 二棕榈酰 -sn- 丙三基 -3- 磷酸乙醇胺 (DPPE) ;1,2- 二硬脂酰 -sn- 丙三基 -3- 磷酸乙醇胺 (DSPE) ;1,2- 二月桂酰 -sn- 丙三基 -3- 磷酸甘油 (钠盐 ;DLPG) ;1,2- 二肉豆蔻酰 -sn- 丙三基 -3- 磷酸甘油 (钠盐 ;DMPG) ;1,2- 二肉豆蔻酰 -sn- 丙三基 -3- 磷酸 -sn-1- 甘油 (铵盐 ;DMP-sn-1-G) ;1,2- 二棕榈酰 -sn- 丙三基 -3- 磷酸甘油 (钠盐 ;DPPG) ;1,2- 二硬脂酰 -sn- 丙三基 -3- 磷酸丙三基 (钠盐 ;DSPG) ;1,2- 二硬脂酰 -sn- 丙三基 -3- 磷酸 -sn-1- 甘油 (钠盐 ;DSP-sn-1-G) ;1,2- 二棕榈酰 -sn- 丙三基 -3- 磷酸 -L- 丝氨酸 (钠盐 ;DPPS) ;1- 棕榈酰 -2- 亚油酰 -sn- 丙三基 -3- 胆碱磷酸 (PLinoPC) ;1- 棕榈酰 -2- 油酰 -sn- 丙三基 -3- 胆碱磷酸 (POPC) ;1- 棕榈酰 -2- 油酰 -sn- 丙三基 -3- 磷酸甘油 (钠盐 ;POPG) ;1- 棕榈酰 -2- 油酰 -sn- 丙三基 -3- 磷酸甘油 (钠盐 ;POPG) ;1- 棕榈酰 -2- 油酰 -sn- 丙三基 -3- 磷酸甘油 (铵盐 ;POPG) ;1- 棕榈酰 -2-4o-sn- 丙三基 -3- 胆碱磷酸 (P-lyso-PC) ;1- 硬脂酰 -2-lyso-sn- 丙三基 -3- 胆碱磷酸 (S-lyso-PC) ;和其混合物。

[0341] 非氨基酸非阳离子脂质的实例包括聚合化合物和聚合物脂质缀合物或聚合脂质,如含有分子量为 300、500、1000、1500、2000、3500 或 5000 的 PEG 范围的聚乙二醇化的脂质,包括聚乙二醇、N-(羰基 - 甲氧基聚乙二醇 -2000)-1,2- 二肉豆蔻酰 -sn- 丙三基 -3- 磷酸乙醇胺 (钠盐 ;DMPE-MPEG-2000) ;N-(羰基 - 甲氧基聚乙二醇 -5000)-1,2- 二肉豆蔻酰 -sn- 丙三基 -3- 磷酸乙醇胺 (钠盐 ;DMPE-MPEG-5000) ;N-(羰基 - 甲氧基聚乙二醇 2000)-1,2- 二棕榈酰 -sn- 丙三基 -3- 磷酸乙醇胺 (钠盐 ;DPPE-MPEG-2000) ;N-(羰基 - 甲氧基聚乙二醇 5000)-1,2- 二棕榈酰 -sn- 丙三基 -3- 磷酸乙醇胺 (钠盐 ;DPPE-MPEG-5000) ;N-(羰基 - 甲氧基聚乙二醇 750)-1,2- 二硬脂酰 -sn- 丙三基 -3- 磷酸乙醇胺 (钠盐 ;DSPE-MPEG-750) ;N-(羰基 - 甲氧基聚乙二醇 2000)-1,2- 二硬脂酰 -sn- 丙三基 -3- 磷酸乙醇胺 (钠盐 ;DSPE-MPEG-2000) ;N-(羰基 - 甲氧基聚乙二醇 5000)-1,2- 二硬脂酰 -sn- 丙三基 -3- 磷酸乙醇胺 (钠盐 ;DSPE-MPEG-5000) ;胆固醇硫酸酯钠盐 (SCS) ;其药学上可接受的盐和其混合物。

[0342] 非氨基酸非阳离子脂质的实例包括聚合脂质,如 DOPE-PEG、DLPE-PEG、DDPE-PEG DlinPE-PEG、和二酰基甘油 -PEG-2000 或 -5000。

[0343] 非氨基酸非阳离子脂质的实例包括聚合脂质,如多支聚乙二醇化化合物,例如 DSPE-PTE020 和 DSPE-AM0530K。

[0344] 非氨基酸非阳离子脂质的实例包括聚合脂质,如 DSPE-PG8G 甘油聚合物脂质。

[0345] 非氨基酸非阳离子脂质的实例包括二油酰磷脂酰乙醇胺 (DOPE)、二植烷酰磷脂酰乙醇胺 (DPhPE)、1,2- 二油酰 -sn- 丙三基 -3- 胆碱磷酸 (DOPC)、和 1,2- 二植烷酰 -sn- 丙三基 -3- 胆碱磷酸 (DPhPC)。

[0346] 非氨基酸非阳离子脂质的实例包括胆固醇、固醇、和类固醇,如甾烷、雌烷、雄烷、孕烷、胆烷、胆甾烷、麦角甾烷、菜油甾烷、多孔甾烷、豆甾烷、gorgostanes、羊毛甾烷、环波罗烷、以及前述的任何固醇或动物甾醇衍生物、和其生物中间体和前体,其包括例如胆固醇

醇、羊毛固醇、豆甾烷醇、二氢羊毛甾醇、酵母甾醇、酵母甾烯醇、链甾醇、7-脱氢胆固醇、和其混合物和衍生物。

[0347] 非氨基酸非阳离子脂质的实例包括聚乙烯二醇化的胆固醇和胆甾烷 3-氧代(C1-22 酰基)衍生物,如胆固醇乙酸酯、胆固醇花生四烯酸酯、胆固醇丁酸酯、胆固醇己酸酯、胆固醇辛酸酯、胆固醇正癸酸酯、胆固醇十二烷酸酯、胆固醇肉豆蔻酸酯、胆固醇棕榈酸酯、胆固醇山萘酸酯、胆固醇硬脂酸酯、胆固醇二十四酸酯、胆固醇壬酸酯、胆固醇正戊酸酯、胆固醇油酸酯、胆固醇反油酸酯、胆固醇芥酸酯、胆固醇庚酸酯、胆固醇反亚油酸酯、胆固醇亚油酸酯、和其混合物和衍生物。

[0348] 非氨基酸非阳离子脂质的实例包括衍生自植物固醇的化合物,包括植物甾醇、 β -谷甾醇、菜油甾醇、麦角甾醇、菜子甾醇、 δ -7-豆甾醇、 δ -7-燕麦甾醇、和其混合物和衍生物。

[0349] 非氨基酸非阳离子脂质的实例包括胆汁酸、胆酸、鹅胆酸、甘氨酸胆酸、牛磺胆酸、脱氧胆酸、石胆酸、甲基石胆酸、和其混合物和衍生物。

[0350] 非氨基酸非阳离子脂质的实例包括衍生自类固醇的化合物,包括糖皮质激素、皮质醇、氢化可的松、皮质脂酮、 Δ^5 -孕烯醇酮、孕酮、去氧皮质酮、17-OH-孕烯醇酮、17-OH-孕酮、11-去氧皮质醇、脱氢表雄甾酮、硫酸脱氢表雄甾酮、雄烯二酮、醛甾酮、18-羟基皮质甾酮、四氢化可的松、四氢化可的松、可的松、强的松、6 α -甲基强的松、9 α -氟-16 α -羟基波尼松龙、9 α -氟-16 α -甲强龙、9 α -氟皮质醇、和其混合物和衍生物。

[0351] 非氨基酸非阳离子脂质的实例包括衍生自类固醇的化合物,包括雄激素、睾丸激素、二氢睾酮、雄(甾)烯二醇、雄(甾)烯二酮、雄(甾)烯二酮、3 α ,5 α -雄(甾)烷二醇、和其混合物和衍生物。

[0352] 非氨基酸非阳离子脂质的实例包括衍生自类固醇的化合物,包括雌激素、雌三醇、雌素酮、雌二醇、和其混合物和衍生物。

[0353] 非氨基酸非阳离子脂质的实例包括衍生自光甾醇和维生素 D 化合物的化合物。

[0354] 非氨基酸非阳离子脂质的实例包括范围从 C10:0 至 C22:6 的具有尾的脂质,例如 DDPE(C10:0)(CAS 253685-27-7)、DLPE(C12:0)(CAS 59752-57-7)、DSPE(C18:0)(CAS 1069-79-0)、DOPE(C18:1)(CAS 4004-05-1)、DLinPE(C18:2)(CAS 20707-71-5)、DLenPE(C18:3)(CAS 34813-40-6)、DARAPE(C20:4)(CAS 5634-86-6)、DDHAPE(C22:6)(CAS 123284-81-1)、DPhPE(16:0[(CH₃)₄])(CAS 201036-16-0)。

[0355] 非氨基酸阴离子脂质的实例包括磷脂酰丝氨酸、磷脂酸、磷脂酰胆碱、血小板活化因子(PAF)、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰-DL-甘油、磷脂酰肌醇、磷脂酰肌醇(pi(4)p、pi(4,5)p2)、心磷脂(钠盐)、溶血磷脂、氢化磷脂、鞘脂、神经节苷脂、植物鞘氨醇、鞘氨醇、其药学上可接受的盐和其混合物。

[0356] 调节性 RNA 和 RNA 干扰的应用

[0357] 在一些方面中,本发明一般地涉及调节性 RNA 和 RNA 干扰、反义治疗剂和 RNA 治疗剂的递送领域。更具体地说,本发明涉及核糖核酸的组合物和制剂,和其用作药剂和用于递送治疗剂的用途。本发明一般地涉及在 RNA 干扰中使用核糖核酸在细胞或在哺乳动物中进行基因表达的基因特异性抑制,从而改变疾病状态或表型的方法。

[0358] RNA 干扰是指通过称作短干扰性 RNA(siRNA) 的双链 RNA(dsRNA) 来进行调节的序

列特异性转录后基因沉默的方法。参见 Fire 等, Nature 391 :806, 1998, 和 Hamilton 等, Science 286 :950-951, 1999。RNAi 为不同菌群和门为共有, 而且确信是抵抗外来基因表达的进化保守性细胞防御机制。参见 Fire 等, Trends Genet. 15 :358, 1999。

[0359] 因此 RNAi 是普遍存在的内源机制, 其利用小型的非编码 RNAs 来沉默基因表达。参见 Dykxhoorn, D.M. 和 J.Lieberman, Annu. Rev. Biomed. Eng. 8 :377-402, 2006。RNAi 可以调节参与细胞死亡、分化和发育的重要基因。RNAi 还可以防止基因组免受由转座子和病毒编码的遗传元件侵袭。当将 siRNA 导入细胞中时, 它可以结合内源 RNAi 组织机构, 从而破坏含具高度特异性的互补序列的 mRNA 的表达。任何致病基因和任何细胞类型或组织都可以潜在地被标靶。该技术已经快速用于基因功能分析和药物靶的发现和确认。控制性 RNAi 也具有很大的治疗前途, 虽然将 siRNAs 导入体内细胞还存在着许多障碍。

[0360] 虽然 RNAi 的机制尚未完全表征, 但认为是通过切割靶 mRNA。RNAi 应答涉及称为 RNA-诱导的沉默复合物 (RISC) 的核酸内切酶复合物, 其调节互补于 siRNA 双螺旋反义链的单链 RNA 的切割。靶 RNA 的切割发生在 siRNA 双螺旋反义链的互补中间区域中 (Elbashir 等, Genes Dev. 15 :188, 2001)。

[0361] 完成 RNAi 的一个方法是将 siRNA 引入细胞或在细胞中表达 siRNA。另外一个方法是利用称作 dicer 的内源核糖核酸酶 III 酶。dicer 的一个活性是将长 dsRNA 加工成 siRNAs。参见 Hamilton 等, Science 286 :950-951, 1999; Bernstein 等, Nature 409 :363, 2001。衍生自 dicer 的 siRNA 通常是全长约 21-23 个核苷酸, 并有约 19 个碱基对双螺旋化。参见 Hamilton 等, 见上; Elbashir 等, Genes Dev. 15 :188, 2001。实质上, 可以将长 dsRNA 作为 siRNA 的前体导入细胞。

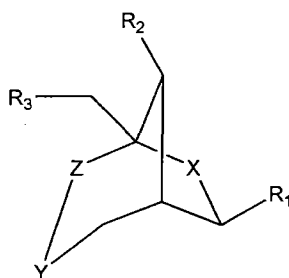
[0362] 本发明提供了一系列的组合物、制剂和方法, 其包括调节性 RNA、干扰性核酸或其前体与各种组分包括脂质、氨基酸脂质和天然或合成的聚合物的组合。

[0363] 在本文中, 术语“dsRNA”是指任何核酸分子, 其含有至少一个核糖核苷酸分子且能抑制或下调基因表达, 例如以序列特异性方式通过促进 RNA 干扰 (“RNAi”) 或基因沉默。本发明的 dsRNAs 可以是适合 Dicer 的底物, 或是适合与 RISC 结合以通过 RNAi 来调节基因沉默的底物。dsRNA 的一条或两条链可以进一步包括末端磷酸基团, 如 5'-磷酸或 5', 3'-二磷酸。在本文中, dsRNA 分子, 除了至少一个核糖核苷酸之外, 可以进一步包括取代、化学修饰的核苷酸、和非核苷酸。在一些实施方式中, dsRNA 分子包括高至约 100% 的核苷酸位置的核糖核苷酸。

[0364] dsRNA 分子的实例可参见例如美国专利申请号 11/681, 725、美国专利号 7, 022, 828 和 7, 034, 009、和 PCT 国际申请公开号 WO/2003/070897。

[0365] 修饰性核苷酸的实例参见美国专利号 6, 403, 566、6, 509, 320、6, 479, 463、6, 191, 266、6, 083, 482、5, 712, 378、和 5, 681, 940。修饰性核苷酸可以具有以下结构:

[0366]



[0367] 其中, X 是 O 或 CH_2 , Y 是 O, 且 Z 是 CH_2 ; R_1 选自基团: 腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤、次黄嘌呤、尿嘧啶、胸腺嘧啶和杂环, 其中杂环是选自基团: 取代的 1,3-二噻吩、未取代的 1,3-二噻吩和未取代的 7H 咪唑并 [4,5]1,3-二噻吩; 且 R_2 、 R_3 独立地选自基团 H、OH、DMTO、TBDMSO、BnO、THPO、AcO、BzO、OP(NiPr₂)O(CH₂)₂CN、OP(O₃H)、二磷酸盐和 triphosphate, 其中 R_2 和 R_3 同时可以是 PhCHO₂、TIPDSO₂ 或 DTBSO₂。在本文中, 缩写“Ac”是指乙酰基; 缩写“Bn”是指苯甲基; 缩写“Bz”是指苯甲酰基; 缩写“DMT”是指二甲氧基三苯甲基; 缩写“THP”是指四氢吡喃基; 缩写“TBDMS”是指叔丁基二甲基甲硅烷基; 缩写“TIPDS”是指四异丙基二甲硅烷基; 和缩写“DTBS”是指二(叔丁基)甲硅烷基。

[0368] 另外, 在本文中, 术语“dsRNA”、“RNAi 诱导剂”和“RNAi 制剂”与用于描述能调节序列特异性 RNAi 的核酸分子, 包括内消旋双螺旋 RNA (mdRNA)、带切口的 dsRNA (ndsRNA)、缺口的 dsRNA (gdsRNA)、短干扰性核酸 (siRNA)、siRNA、微小 RNA (miRNA)、单链 RNA、短发夹 RNA (shRNA)、短干扰性寡核苷酸、短干扰性取代的寡核苷酸、短干扰性修饰的寡核苷酸、化学修饰的 dsRNA、和转录后基因沉默型 RNA (ptgsRNA)、以及上述任一的前体是同义的。

[0369] 术语“大双链 (ds) RNA”是指大于约 40 个碱基对 (bp) 至约 100bp 或更大, 尤其是高至约 300bp 至约 500bp 的任意双链 RNA。大 dsRNA 序列可以代表 mRNA 片段或完整的 mRNA。双链结构可以通过自身互补的核酸分子形成或通过两种或多种明显的互补核酸分子链退火形成。

[0370] 在一些方面中, dsRNA 包括包含第一链 (反义) 和第二链 (正义) 的两个分离的寡核苷酸, 其中所述反义链和所述正义链是自身互补的 (即各链含有与另一个链核苷酸序列互补的核苷酸序列, 且两个分离的链形成双螺旋或双链结构, 例如, 其中双链区是约 15 至约 24 个碱基对, 或约 26 至约 40 个碱基对); 反义链包括互补于靶核酸分子 (如人 mRNA) 中的核苷酸序列的核苷酸序列或其部分; 且正义链包括对应于 (即同源于) 靶核酸序列 (如对应于靶核酸约 15 至约 25 个核苷酸或约 26 至约 40 个核苷酸的正义链或其部分) 中的核苷酸序列或其部分。

[0371] 在一些实施方式中, dsRNA 可以组装自单一寡核苷酸, 其中 dsRNA 的自身互补的正义和反义链一起通过核酸基接头或非核酸基接头相连接。在一些实施方式中, dsRNA 分子的第一 (反义) 链和第二 (正义) 链通过如本文描述的和本领域所已知的核苷酸或非核苷酸接头共价连接。在一些实施方式中, 第一 dsRNA 分子通过本领域已知的核苷酸或非核苷酸接头与至少一个第二 dsRNA 分子共价连接, 其中第一 dsRNA 分子可以与多个其它 dsRNA 分子 (相同或不同) 或其组合物连接。在一些实施方式中, 连接的 dsRNA 可以包括与连接的 dsRNA 形成内消旋双螺旋的第三链。

[0372] 在一些方面, 本文所述的 dsRNA 分子形成内消旋双螺旋 RNA (mdRNA), 其具有三个或更多的链, 例如 'A' (第一或反义) 链、'S1' (第二) 链和 'S2' (第三) 链, 其

中' S1' 和' S2' 链互补并形成具有' A' 链的非重叠区的碱基对 (bp) (如 mdRNA 可以具有 A:S1S2 形式)。S1、S2 或更多的链共同本质上含有' A' 链的正义链。通过' S1' 和' A' 链退火形成的双链区与通过' S2' 和' A' 链退火形成的双链区不相同且非重叠。mdRNA 分子是“缺口”分子,意思是范围为 0 个核苷酸到高至约 10 个核苷酸的“缺口”。在一些实施方式中,A:S1 双螺旋与 A:S2 双螺旋被从' A' 链的至少一个非配对核苷酸(高至约 10 个非配对核苷酸)获得的缺口分开,所述缺口位于 A:S1 双螺旋和 A:S2 双螺旋之间,而且不同于一种或多种' A'、' S1' 或' S2' 链的 3' - 端的任何一个或多个非配对核苷酸。在一些实施方式中,A:S1 双螺旋与 A:S2 双螺旋被在 A:S1 双螺旋和 A:S2 双螺旋间的零核苷酸缺口分开(即其中仅两个核苷酸间的磷酸二酯键是不完整的或缺失多核苷酸分子的缺口),其也称作带切口的 dsRNA (ndsRNA)。例如,A:S1S2 可以由具有结合总共约 14 个碱基对至约 40 个碱基对的至少两个双链区的 dsRNA 组成,且双链区被约 0 至约 10 个核苷酸的缺口分开,任选地具有平末端,或 A:S1S2 可以由被高至 10 个核苷酸的缺口分开的具有至少两个双链区的 dsRNA 组成,其中至少一个双链区含有约 5 个碱基对至 13 个碱基对。

[0373] 如本文所述,含有三条或更多条链的 dsRNA 可以被称作“内消旋双螺旋”RNA (mdRNA)。mdRNA 分子的实例可以参见美国临时专利申请 60/934,930 和 60/973,398。

[0374] dsRNA 或大 dsRNA 可以包括取代或修饰,其中所述取代或修饰可以在磷酸骨架键、糖、碱基或核苷中。所述核苷取代可以包括天然的非标准核苷(如 5- 甲基尿苷或 5- 甲基胞苷或 2- 硫代胸腺嘧啶核糖核苷),且所述骨架、糖或核苷修饰可以包括烷基或杂原子取代或添加,如甲基、烷氧基烷基、卤素、氮或硫、或本领域已知的其它修饰。

[0375] 另外,在本文中,术语“RNAi”的意思等同于用于描述序列特异性 RNA 干扰如转录后基因沉默、翻译抑制或表观遗传学的其它术语。例如,本发明的 dsRNA 分子可以用于在转录后水平或转录前水平或其组合上通过表观遗传学沉默基因。

[0376] 在一些方面中,本发明提供了包括靶向一种或多种基因或靶转录物的一种或多种 RNAi 诱导剂,以及一种或多种递送组分的组合物。递送组分的实例包括脂质、肽、聚合物、聚合脂质和其缀合物。

[0377] 本发明的组合物和制剂可以用于将 RNAi 诱导实体递送如 dsRNA、siRNA、mdRNA、miRNA、shRNA 或 RNAi 诱导载体递送至包括人在内的完整的哺乳动物患者的细胞内,而且可以用于将这些制剂递送至培养中的细胞内。

[0378] 本发明还提供了将一种或多种 RNAi 诱导剂或实体递送至哺乳动物体内的细胞、器官和组织的方法。在一些方面,可以通过不同的途径引入包含 RNAi 诱导实体以使其在体内转运并被一种或多种器官或组织内的细胞吸收,在此可以调控靶转录物的表达。

[0379] 通常,本发明包括 RNAi 诱导剂,其是预防和治疗以各种异常途径为特征的疾病或病症的有用治疗剂。例如,侵染哺乳动物的病毒可以通过控制宿主细胞的细胞机制来进行复制。参见如 Fields Virology (2001)。因此,dsRNAs 可用于破坏控制病毒产生或复制的病毒路径。

[0380] 本发明包括通过利用具有广谱抵抗靶病毒株效力的一种或多种治疗性 RNAi 诱导剂来治疗或预防患者病毒侵染的方法。本发明的 RNAi 诱导剂可以靶向已知的病毒变体株或病毒变体中的病毒基因序列,并且在这些变体内表现出靶病毒基因的序列特异性基因沉默。例如,RNAi 诱导剂可以靶向和表现出抵抗流感病毒季节菌株以及流感变体菌株的效力。

[0381] 本发明的组合物和制剂可以用于递送药物制剂或生物活性试剂至各种体外细胞。体外递送的细胞实例包括表皮细胞如 A549、永久细胞系如 HeLa、肝细胞瘤细胞如 HepG2、犬胶质肉瘤细胞如 9L/LacZ、人单核细胞如 THP-1、Madin-Darby 犬肾细胞 (MDCK)、各种纤维原细胞系、和在存在和缺失各种血清的培养基中的原代细胞等。

[0382] 本发明的组合物和制剂可用于递送药物试剂或生物活性试剂至各种体内细胞，组织或器官。体内递送试剂的方法包括局部、肠内和肠胃外途径。体内递送试剂的方法实例包括颗粒或液滴吸入、鼻或鼻咽滴剂、颗粒、或悬浮液递送、透皮和经黏膜途径、以及通过肌肉内、皮下、静脉内、动脉内、心脏内、脑脊髓膜内、骨内、腹膜内和硬膜外的注射或灌输途径。

[0383] 在一些实施方式中，试剂可以通过直接接触来源于哺乳动物患者的细胞，组织或器官离体给药。

[0384] 利用本发明的组合物或制剂来递送的药物试剂或生物活性试剂可以是任何形式，包括例如纯净形式、结晶形式、固体形式、纳米颗粒、浓缩形式、复合物形式、或缀合物形式。

[0385] 本发明还提供了递送一种或多种 RNAi 诱导实体至哺乳动物体内的器官和组织的方法。在一些实施方式中，可以通过不同的途径引入包含 RNAi 诱导实体、一种或多种氨基酸脂质、和一种或多种其它的脂质组分的组合物以使其在体内转运并被一种或多种器官或组织内的细胞吸收，在此可以调控靶转录物的表达。

[0386] 本发明提供了含有递送核酸和基因沉默 RNA 治疗剂的各种脂质的药学上可接受的核酸组合物。具体地说，本发明提供了用于体外和体内递送 dsRNAs 以降低、下调或沉默靶核酸序列翻译或基因表达的组合物和方法。这些组合物和方法可用于预防和 / 或治疗哺乳动物中的疾病。在本发明的示例性的方法中，将核糖核酸分子如 siRNA 或 shRNA 与氨基酸脂质接触以配制成能施用于细胞或患者如哺乳动物的组合物。在一些实施方式中，本发明提供了通过使含核酸的组合物与细胞接触来在细胞内递送 siRNA 或 shRNA 的方法。

[0387] 在示例性的实施方式中，本发明包括包含核酸分子如双链 RNA (dsRNA)、短干扰性 RNA (siRNA) 或短发夹 RNA (shRNA) 的组合物，所述核酸分子与氨基酸脂质和聚合脂质混合或复合以形成提高核酸分子细胞内递送的组合物。在一些实施方式中，本发明的递送组合物可以包括 dsRNA 和可以是阳离子或非阳离子的一种、两种或多种氨基酸脂质。在某些变例中，递送组合物可以包含 dsRNA、氨基酸脂质、和一种或多种聚合脂质。在一些实施方式中，递送组合物可以包括 dsRNA、氨基酸脂质、一种或多种其它脂质、和一种或多种聚合脂质。本发明的组合物可以形成稳定颗粒，其能引入作为干扰性 RNA 制剂的 dsRNA。本发明的组合物和制剂可以包括进一步的递送增强组分或赋形剂。

[0388] 在一些实施方式中，本发明的组合物包括直径约 5nm 至约 400nm 的稳定的 RNA 脂质颗粒。在一些实施方式中，颗粒可以具有约 10nm 至约 300nm 的均匀直径。在一些实施方式中，颗粒可以具有约 50nm 至约 150nm 的均匀直径。

[0389] 在本发明的示例性的组合物中，双链 RNA 可以与氨基酸脂质混合或复合，以形成相比于使靶细胞与裸 dsRNA 接触能提高 dsRNA 细胞内递送的组合物。

[0390] 在一些实施方式中，本发明的组合物可以包含占脂质总量约 0.5% 至约 70% (摩尔%) 的一种或多种氨基酸脂质，并包括任何聚合组分但不包括 RNA 组分的递送增强组分。在一些实施方式中，本发明的组合物可以包括约 10% 至约 55% 的一种或多种氨基酸脂质。在一些实施方式中，本发明的组合物可以包括约 15% 至约 35% 的一种或多种氨基酸脂质。

[0391] 在一些实施方式中,本发明的组合物可以包含占脂质总量约 2%至约 95% (摩尔%)的一种或多种非氨基酸非阳离子脂质,和包括任何聚合组分但不包括 RNA 组分的递送增强组分。递送在一些实施方式中,本发明的组合物可以包含约 20%至约 75%、或约 45%至约 75%、或约 45%至约 55%的一种或多种非阳离子脂质。在一些实施方式中,本发明的组合物可以包含约 10%至约 50%的一种或多种非阳离子脂质。

[0392] 在一些实施方式中,本发明的组合物可以包含占脂质总量约 0.2%至约 20% (摩尔%)的一种或多种聚合脂质,和包括任何聚合组分但不包括 RNA 组分的递送增强组分。递送在一些实施方式中,本发明的组合物可以包括约 0.5%至约 10%的一种或多种聚合脂质。在一些实施方式中,本发明的组合物可以包含占组合物约 1%至约 5%的一种或多种聚合脂质。

[0393] 核酸治疗剂组合物和应用

[0394] 在一些实施方式中,本发明提供了一种治疗哺乳动物患者疾病或病症的方法。可以递送向患有与能被该组合物降低、减少、下调或沉默的基因表达或过表达相关疾病或病症的患者施用包含干扰性 RNA、氨基酸脂质、非氨基酸非阳离子脂质、聚合脂质、和一种或多种递送增强组分或赋形剂的治疗有效量的本发明组合物。

[0395] 本发明包括通过向患者施用治疗有效量的组合物来治疗肺部疾病,如呼吸困难、哮喘、囊肿性纤维化、肺纤维化、慢性障碍性肺病、支气管炎或气肿的方法。

[0396] 本发明包括治疗风湿性关节炎、肝病、脑炎、骨折、心脏病、病毒性疾病 (包括肝炎和流感)、或癌症的方法。

[0397] 制备脂质体的方法参见例如 G.Gregoriadis, Liposome Technology (CRC Press 1984), M. J. Ostro, Liposomes (Marcel Dekker 1987); Subhash C. Basu 和 Manju Basu, Liposome Methods and Protocols (2002)。

[0398] 可以首先在适合的培养基如细胞培养基中将核酸组分、氨基酸脂质和任何其它组分混合在一起,然后添加一种或多种其它脂质或化合物至该混合物。可选地,可以首先在适合的培养基如细胞培养基中混合氨基酸脂质,然后添加核酸组分。

[0399] 在本发明的一些实施方式中,将 dsRNA 与一种或多种氨基酸脂质、或一种或多种氨基酸脂质和非氨基酸非阳离子脂质的组合物混合。

[0400] 在一些实施方式中,氨基酸脂质转染 / 递送制剂可以通过干燥制剂的再水合来制备。脂质可以溶解在 CHCl_3 中,氮气中干燥,并在如 pH 7.4 下在 10mM HEPES、5% 葡萄糖中再水合,且经声波处理形成脂质体。脂质体可以在 HEPES 葡萄糖中稀释。dsRNA 可以在 10mM HEPES、5% 葡萄糖 (pH 7.4) 中以 $0.0008 \mu\text{mol/mL}$ 稀释。1 体积的脂质体可以加入到 1 体积 dsRNA 中并涡旋 (自组装),以提供终 dsRNA 浓度为 100nM 至 6.25nM dsRNA。该混合物可以在存在细胞培养基时稀释 1-4 份。

[0401] 干扰性 RNA 试剂可以与氨基酸脂质或聚合脂质复合或缀合,并与一种或多种非氨基酸非阳离子脂质,或一种或多种非氨基酸非 - 阳离子和非氨基酸阳离子脂质的组合物混合。

[0402] 干扰性 RNA 试剂和氨基酸脂质可以首先混合在一起,然后加入一种或多种非氨基酸非阳离子脂质,或加入到适合培养基如细胞培养基中的非氨基酸非阳离子和非氨基酸阳离子脂质组合。可选地,可以首先混合氨基酸脂质和非氨基酸脂质组分,然后加入适合培养

基中的 RNA 试剂。

[0403] 在一些实施方式中,本发明包括胶束分散组合物,其含有与氨基酸脂质和分散剂混合和复合的药物或活性试剂,从而形成能提供细胞内递送药物或活性试剂组合物。

[0404] 在一些实施方式中,本发明的分散组合物可以包括一种或多种药物或活性试剂、一种或多种氨基酸脂质、和一种或多种分散剂。在某些变化中,递送组合物可以包括药物或活性试剂、分散剂、氨基酸脂质、和任选的聚合脂质。本发明的分散组合物可以形成能引入药物或活性试剂的稳定颗粒。

[0405] 在一些方面中,本发明的分散组合物可以包含直径约 5nm 至约 400nm 的稳定的核酸分散颗粒。在一些实施方式中,颗粒可以具有约 10nm 至约 300nm 的均匀直径。在一些实施方式中,颗粒可以具有约 50nm 至约 150nm 的均匀直径。

[0406] 胶束分散体可以用于配制和改进包括 RNAi 治疗剂的药物或活性试剂的生物利用率。而常规的脂质-药物复合物可以包括保持亲水性或水性核心的脂质双分子层或脂质体结构,胶束分散体可以提供具有疏水性油样核心的分散液滴或纳米颗粒。分散纳米颗粒可以悬浮在连续水相中。分散结构利用脂质体结构来递送活性试剂可以避免固有的某些弱势,而且因为亲脂性核心而可以提供递送优势。

[0407] 本发明提供了一系列的胶束分散组合物,其包含用于药物或药剂且用于递送和施用 RNA 制剂的脂质和分散剂。

[0408] 分散剂的实例包括合成化合物,包括聚氧甘油酯,如聚乙二醇化的癸酰基甘油酯、乙氧基二甘醇、聚乙二醇化的脂肪酸甘油酯、二甘醇单乙醚和其混合物。分散剂的实例包括 LABRAFIL、LABRASOL、ARLATONE、TRANSCUTOL 和其混合物。分散剂的实例包括合成的化合物,如烷基磷酸-N-甲基乙醇胺和烷氧基肌氨酸(alkoyl creatine)。分散剂的实例包括 FOS-MEA 和 CRODASINIC。

[0409] 在一些实施方式中,本发明的递送组合物可以包括药物或活性试剂、一种或多种油、一种或多种氨基酸脂质、和乳化剂和稳定剂脂质。在某些变化中,递送组合物可以包括药物或活性试剂、油、脂质乳化剂、氨基酸脂质、非阳离子脂质、和聚合脂质。

[0410] 本发明的组合物可以形成可以引入药物或活性试剂的稳定颗粒。在一些方面中,本发明的组合物包括直径为约 5nm 至约 400nm 的稳定的药物或活性试剂乳剂颗粒。在一些实施方式中,颗粒具有约 10nm 至约 300nm 的均匀直径。在一些实施方式中,颗粒具有约 50nm 至约 150nm 的均匀直径。

[0411] 在本发明的示例性的组合物中,药物或活性试剂可以与油、乳化剂、氨基酸脂质、和聚合体稳定化的脂质混合或复合,以形成能提高细胞内递送药物或活性试剂的组合物。

[0412] 水包油乳剂可以用于配制和提高包括 RNAi 治疗剂的药物或活性试剂的生物利用率。

[0413] 而常规的脂质-药物复合物可以包含保持亲水性或水性核心的脂质双分子层或脂质体结构,水包油乳剂可以提供具有围绕疏水性油核心的脂质层的乳剂液滴或纳米颗粒。乳剂液滴或纳米颗粒可以悬浮在连续水相中。利用脂质体结构来递送活性试剂,乳剂结构可以避免固有的某些弱势,并且因为亲脂性核心而能提供递送优势。

[0414] 本发明提供了一系列的新型乳剂组合物,包括新型组成和干扰性 RNA 试剂与油、乳化剂和脂质组分的使用。

[0415] 油的实例包括合成的油、丙二醇脂肪酸酯、乙二醇醚、甘油油、胆固醇油、植物油、花生油、精油、矿物油、脂质可溶性化合物如生育酚和维生素 E、和其混合物。油的实例包括合成油,如 CAPRYOL 90(丙二醇单酯)、CAPRYOL PGMC(丙二醇单酯)、LABRAFAC PC(丙二醇单酯)、LABRAFACPG(丙二醇二酯)、LAUROGLYCOL 90(丙二醇单酯)、LAUROGLYCOL FCC(丙二醇单酯)、PLUROL OLEIQUE CC 497(丙二醇单酯)、LABRAFACLIPOPHILE WL 1349(甘油三酯)、PECEOL(甘油单酯)、MAISINE 35-1(甘油单酯)、和其混合物。

[0416] RNA 治疗剂组合物和方法

[0417] 本发明提供了利用调节 RNA 如通过 RNA 干扰来调节基因表达的组合物和方法。本发明的组合物可以递送核糖核酸试剂至能产生 RNAi 应答的细胞。适合本发明的核酸试剂的实例包括双链核酸、修饰的或降解抗性的核酸、RNA、siRNA、siRNA、shRNA、miRNA、piRNA、RNA 拮抗剂、单链核酸、DNA-RNA 嵌合体、反义核酸和核酶。在本文中,术语 siRNA、siRNA 和 shRNA 分别包括 siRNA、siRNA 和 shRNA 的前体。例如,术语 siRNA 包括适合作为 dicer 酶底物的 RNA 或双链 RNA。

[0418] 可用于本发明的核糖核酸试剂可以靶向各种基因。适合作为靶标的人基因的实例包括 TNF、FLT1、VEGF 家族、ERBB 家族、PDGFR 家族、BCR-ABL、和 MAPK 家族等。适合作为靶标的人基因的实例和其核酸序列包括描述于 PCT/US08/55333、PCT/US08/55339、PCT/US08/55340、PCT/US08/55341、PCT/US08/55350、PCT/US08/55353、PCT/US08/55356、PCT/US08/55357、PCT/US08/55360、PCT/US08/55362、PCT/US08/55365、PCT/US08/55366、PCT/US08/55369、PCT/US08/55370、PCT/US08/55371、PCT/US08/55372、PCT/US08/55373、PCT/US08/55374、PCT/US08/55375、PCT/US08/55376、PCT/US08/55377、PCT/US08/55378、PCT/US08/55380、PCT/US08/55381、PCT/US08/55382、PCT/US08/55383、PCT/US08/55385、PCT/US08/55386、PCT/US08/55505、PCT/US08/55511、PCT/US08/55515、PCT/US08/55516、PCT/US08/55519、PCT/US08/55524、PCT/US08/55526、PCT/US08/55527、PCT/US08/55532、PCT/US08/55533、PCT/US08/55542、PCT/US08/55548、PCT/US08/55550、PCT/US08/55551、PCT/US08/55554、PCT/US08/55556、PCT/US08/55560、PCT/US08/55563、PCT/US08/55597、PCT/US08/55599、PCT/US08/55601、PCT/US08/55603、PCT/US08/55604、PCT/US08/55606、PCT/US08/55608、PCT/US08/55611、PCT/US08/55612、PCT/US08/55615、PCT/US08/55618、PCT/US08/55622、PCT/US08/55625、PCT/US08/55627、PCT/US08/55631、PCT/US08/55635、PCT/US08/55644、PCT/US08/55649、PCT/US08/55651、PCT/US08/55662、PCT/US08/55672、PCT/US08/55676、PCT/US08/55678、PCT/US08/55695、PCT/US08/55697、PCT/US08/55698、PCT/US08/55701、PCT/US08/55704、PCT/US08/55708、PCT/US08/55709 和 PCT/US08/55711 中的那些。

[0419] 本发明要递送的 RNA 可以具有互补于病毒基因区域的序列。例如,本发明的某些组合物和方法可以用于调节感冒病毒的病毒基因组的表达。在一些实施方式中,本发明提供了通过 RNA 干扰来调节流感的表达和传染活性的组合物和方法。流感的表达和 / 或活性可以通过递送例如具有互补于流感的 RNA 聚合酶亚单位区域的序列的短干扰性 RNA 分子至细胞来进行调节。靶向流感病毒的 RNA 实例参见美国专利申请号 20070213293 A1。

[0420] 在一些实施方式中,本发明提供了通过给患者施用含有效量的 RNAi 诱导化合物,如短干扰性寡核苷酸分子或其前体,来抑制患者内靶转录物表达的组合物和方法。RNAi 利

用小干扰性 RNAs (siRNAs) 来靶向信使 RNA (mRNA) 和削弱翻译。本发明使用的 siRNA 可以是 dicer 加工的前体, 例如加工成 siRNA 的长 dsRNA。本发明提供了治疗或预防与靶转录物或由靶转录物编码的肽或蛋白活性表达相关的疾病或病症的方法。

[0421] 基于 RNAi 的治疗策略可以通过切断病毒或微生物的生长或功能, 以及通过切断内源基因产物在疾病通道中的功能来治疗多种疾病。

[0422] 在一些实施方式中, 本发明提供了递送 RNAi 诱导实体如短干扰性寡核苷酸分子和其前体的新型组合物和方法。具体地, 本发明提供了包含靶向患者细胞、组织和 / 或器官的一种或多种转录物的 RNAi 诱导实体的组合物。

[0423] siRNA 可以是具有约 19 个核苷酸长度的互补性区域的两条 RNA 链。siRNA 任选包括一个或两个单链突出端或环。

[0424] shRNA 可以是具有自身互补区域的单一 RNA 链。单一 RNA 链可以形成具有茎和环和任选地在 RNA 的 5' 和 / 或 3' 部分的一种或多种非配对部分的发夹结构。

[0425] 活性治疗剂可以是具有体内核酸酶降解改良抗性和 / 或改善的细胞吸收的化学修饰的 RNA, 其保留 RNAi 活性。

[0426] 本发明的 siRNA 试剂可以是具有互补于靶基因区域的序列。本发明的 siRNA 可以具有 29-50 个碱基对, 例如具有互补于靶基因区序列的 dsRNA。另外, 双链核酸可以是 dsDNA。

[0427] 在一些实施方式中, 活性试剂可以是能够调控基因产物表达的短干扰性核酸 (siRNA)、短干扰性 RNA (siRNA)、双链 RNA (dsRNA)、微 RNA 或短发夹 RNA (shRNA)。

[0428] 提供了对比方法和组合物, 其靶向与患者特定疾病状况相关的一种或多种不同基因的表达, 包括已知由于与所选疾病状况相关的因果或起作用的因素使其表达异常增加的多种基因中的任意一个。

[0429] 本发明的 RNAi 诱导化合物可以与其它已知疗法联合来治疗疾病。

[0430] 在一些实施方式中, 本发明涉及包含与递送增强化合物混合或复合或缀合的小核酸分子, 如短干扰性核酸、短干扰性 RNA、双链 RNA、微 RNA 或短发夹 RNA 的组合物。

[0431] 在本文中, 术语“调节 RNA”、“短干扰性核酸”、“siRNA”、“短干扰性 RNA”、“短干扰性寡核苷酸分子”和“化学修饰的短干扰性核酸分子”是指通过以序列特异性方式介导 RNA 干扰 (RNAi) 或基因沉默来调节、抑制或下调基因表达或如病毒复制的任何核酸分子。调节性 RNA 包括单链 RNA 拮抗剂。

[0432] 在一些实施方式中, siRNA 是含有自身互补的正义和反义区域的双链多核苷酸分子, 其中反义区含有互补于用于下调表达的靶核糖核酸分子中的核苷酸序列的核苷酸序列或其部分, 且正义区包含对应于 (即其在序列上实质一致) 靶核糖核酸序列的核苷酸序列或其部分。

[0433] 在本文中, “siRNA”是指小干扰性核糖核苷酸, 即相对短长度的双链核酸或任选地其较长前体。在一些实施方式中, 本发明中可用 siRNA 的长度优选为约 20 至 50bp 的长度。但是, 在此对可用 siRNA 长度, 包括 siRNA 没有特殊限制。例如, siRNA 可以最初以前体形式存在于细胞中, 所述前体形式与递送时或递送至靶细胞后表现和发挥基因沉默活性的 siRNA 的最终或加工形式实质上不同。例如, siRNA 的前体形式可以包括前体序列元件, 所述元件在递送时或递送后就会被加工、降解、改变或切割, 以产生在细胞内有介导基因沉

默活性的 siRNA。在一些实施方式中,使用的 siRNA 具有的前体长度为例如约 100-200 个碱基对、或 50-100 个碱基对、或少于约 50 个碱基对,其在靶细胞内会产生有活性的,加工过的 siRNA。在其它实施方式中,可用的 siRNA 或 siRNA 前体长度约为 10 至 49bp、或 15 至 35bp、或约 21 至 30bp。

[0434] 在本发明的一些实施方式中,增强递送多核苷酸的多肽可以用于促进递送核酸分子包括 siRNA 的大核酸前体的递送。例如,本文的方法和组合物可用于提高递送代表期望 siRNA 的“前体”的较大核酸的递送,其中前体氨基酸可以在递送至靶细胞之前、期间或之后被切割或被加工,从而形成用于在靶细胞内调节基因表达的活性 siRNA。

[0435] 例如,选择的 dsRNA 前体多核苷酸可以是环状的单链多核苷酸,其具有两种或多种环结构和含有自身互补的正义和反义区的茎,其中所述反义区含有互补于靶核酸分子中的核苷酸序列的核苷酸序列或其部分,且所述正义区具有对应于靶核酸序列的核苷酸序列或其部分,且其中所述环状多核苷酸可以被在体内或体外加工,以产生能诱导 RNAi 的活性 dsRNA 分子。

[0436] 本发明的 siRNA 分子,特别是非前体形式,可以是少于 30 个碱基对、或约 17-19bp、或 19-21bp、或 21-23bp。

[0437] siRNA 可以在哺乳动物系统内调节选择性基因沉默。具有短环和茎内 19-27 个碱基对的发夹 RNA 也选择性地沉默与双链茎内序列同源的基因的表达。哺乳动物细胞可以将短发夹 RNA 转变为 siRNA 以调节选择性基因沉默。

[0438] RISC 调节具有互补于 siRNA 双螺旋反义链的序列的单链 RNA 切割。靶 RNA 的切割发生在互补于 siRNA 双螺旋反义链的区域内。21 个核苷酸的 siRNA 双螺旋通常在包含两个核苷酸 3' - 突出端时活性最高。

[0439] 用脱氧核糖核苷酸代替具有 2- 核苷酸 3' 突出端的 21-mer siRNA 双螺旋的 3' - 突出端片段可能对 RNAi 活性无副作用。将 siRNA 各末端的高至 4 个核苷酸用脱氧核糖核苷酸代替是可以接受的。

[0440] 可选地,siRNA 可以作为单个或多个转录产物来递送,所述转录产物由编码单个或多个 siRNA 且指向其在靶细胞内表达的多核苷酸载体所表达。在这些实施方式中,欲在靶细胞内表达的 siRNA 终转录产物的双链部分可以是如 15-49bp、15-35bp、或约 21-30bp 长。

[0441] 在本发明的一些实施方式中,两条链是配对的 siRNAs 的双链区可以包括凸起或错配的部分,或凸起和错配的部分。两条链是配对的 siRNA 的双链部分不限于完全配对的核苷酸片段,且可以包含由于如错配(相应的核苷酸不互补)、凸起(在一条链上缺失对应的互补核苷酸)或突出端引起的非配对部分。在不干扰 siRNA 形成的情况下可以包含非配对部分。在一些实施方式中,“凸起”可以包含 1 至 2 个非配对的核苷酸,且其中两条链配对的 siRNA 的双链区可以包括约 1-7、或约 1-5 个凸起。另外,包括在 siRNA 双链区内的“错配”部分可以存在的数量是约 1-7 或约 1-5 个。错配情况中最常见的是,一个核苷酸是鸟嘌呤,另一个是尿嘧啶。所述错配可以归因于如在编码正义 RNA 的对应 DNA 中 C 突变成 T、G 突变成 A、或其混合,但其它原因也是可以预料的。

[0442] 本发明的 siRNA 的末端结构可以是平末端或粘性(突出)末端,只要 siRNA 保持其沉默靶基因表达的活性。粘性(突出端)末端结构并不限于 3' 突出端,且包括 5' 突出结构,只要其保持诱导基因沉默的活性。另外,突出核苷酸的数量并不限于 2 个或 3 个核苷

酸,而可以是任意数量的核苷酸,只要其保持诱导基因沉默的活性。例如,突出端可以包含 1 至约 8 个核苷酸或 2 至 4 个核苷酸。

[0443] 具有突出端结构的 siRNA 的长度可以表述为配对的双螺旋部分和各末端的任意突出部分。例如,具有 2-bp 3' 反义突出端的 25/27-mer siRNA 双螺旋具有 25-mer 正义链和 27-mer 反义链,其中配对部分长度为 25bp。

[0444] 任意突出端序列都可以具有对靶基因的低特异性,而且可以与靶基因序列不互补(反义)或相同(正义)。只要 siRNA 保持基因沉默活性,其就可以在突出端部分包括低分子量结构,例如天然 RNA 分子如 tRNA、rRNA、病毒 RNA,或人工 RNA 分子。

[0445] siRNAs 的末端结构可以具有茎-环结构,其中双链核酸的一侧末端通过接头核酸例如接头 RNA 连接。双链区(茎部分)的长度可以是如 15 至 49bp、或 15 至 35bp、或约 21 至 30bp。可选地,作为靶细胞中表达的 siRNA 的最终转录产物的双链区长度可以是如约 15 至 49bp、或 15 至 35bp、或约 21 至 30bp。

[0446] siRNA 可以包含具有互补于靶核酸分子中的核苷酸序列的核苷酸序列的单链多核苷酸或其部分,其中单链多核苷酸可以包含末端磷酸基团如 5' - 磷酸(参见如 Martinez 等, Cell. 110 :563-574, 2002, 和 Schwarz 等, Molecular Cell 110 :537-568, 2002), 或 5' , 3' - 二磷酸。

[0447] 在本文中,术语 siRNA 不限于仅含天然存在的 RNA 或 DNA 的分子,但也包括化学修饰的核苷酸和非核苷酸。在一些实施方式中,本发明的短干扰性核酸分子缺少含 2' - 羟基(2' -OH)的核苷酸。在一些实施方式中,短干扰性核酸不需要存在用于调节 RNAi 等的具有 2' - 羟基的核苷酸,本发明的短干扰性核酸分子任选地不包括任何核糖核苷酸(如具有 2' -OH 基团的核苷酸)。然而,不需要在 siRNA 分子中存在核糖核苷酸来维持 RNAi 的 siRNA 分子可以具有结合的接头或其它的结合的或连接的基团、实体、或包含具有 2' -OH 基团的一种或多种核苷酸的链。siRNA 分子可以在至少约 5、10、20、30、40 或 50% 的核苷酸位置包含核糖核苷酸。

[0448] 在本文中,术语 siRNA 包括能调节序列特异性 RNAi 的核酸分子,例如,短干扰性 RNA(siRNA) 分子、双链 RNA(dsRNA) 分子、微 RNA 分子、短发夹 RNA(shRNA) 分子、短干扰性寡核苷酸分子、短干扰性核酸分子、短干扰性修饰的寡核苷酸分子、化学修饰的 siRNA 分子、和转录后基因沉默 RNA(ptgsRNA) 分子等。

[0449] 在一些实施方式中,siRNA 分子包括分离的正义和反义序列或区域,其中正义和反义区通过核苷酸或非核苷酸接头分子共价连接,或通过离子相互作用、氢键、范德华相互作用、疏水相互作用、和 / 或堆集相互作用非共价连接。

[0450] “反义 RNA”是具有互补于靶基因 mRNA 的序列的 RNA 链,其能通过结合靶基因 mRNA 来诱导 RNAi。

[0451] “正义 RNA”是具有互补于反义 RNA 的序列的 RNA 链,且与其互补的反义 RNA 退火而形成 siRNA。

[0452] 在本文中,术语“RNAi 结构”或“RNAi 前体”是指 RNAi 诱导化合物,如小干扰性 RNA(siRNA)、发夹 RNA、和其它 RNA 种类,其能在体内被切割而形成 siRNA。本文的 RNAi 前体还包括表达载体(也称作 RNAi 表达载体),其能产生在细胞内形成 dsRNA 或发夹 RNA 的转录物,和 / 或产生能在体内制备 siRNA 的转录物。

[0453] siHybrid 分子是具有与 siRNA 相似功能的双链核酸。除了是双链 RNA 分子之外, siHybrid 由 RNA 链和 DNA 链组成。优选地, 该 RNA 链是结合靶 mRNA 的反义链。通过将 DNA 和 RNA 链杂交而制成的 siHybrid 具有杂交互补部分, 且优选具有至少一个 3' 突出端。

[0454] 本发明所用的 siRNA 可以组装自两个分离的寡核苷酸, 其中一条链是正义链且另一条是反义链, 其中反义和正义链是自身互补的 (即各链含有互补于另一条链中的核苷酸序列的核苷酸序列; 如其中反义链和正义链形成双螺旋或双链结构, 例如, 其中双链区是约 19 个碱基对)。反义链可以包括互补于靶核酸分子中的核苷酸序列的核苷酸序列或其部分, 且正义链可以包含对应于靶核酸序列的核苷酸序列或其部分。可选地, siRNA 可以组装自单个寡核苷酸, 其中 siRNA 的自身互补的正义和反义区是通过基于核酸的或基于非核酸的接头而连接。

[0455] 在一些实施方式中, 用于细胞内递送的 siRNA 可以是具有双螺旋、不对称双螺旋、发夹或不对称的发夹二级结构的多核苷酸, 其具有自身互补的正义和反义区, 其中所述反义区含有互补于分离的靶核酸分子中的核苷酸序列的核苷酸序列或其部分, 且所述正义区含有对应于靶核酸序列的核苷酸序列或其部分。

[0456] 可在 siRNA 中制造的化学修饰的实例包括硫代磷酸核苷酸间连键、2' - 脱氧核糖核苷酸、2' - O- 甲基核糖核苷酸、2' - 脱氧-2' - 氟代核糖核苷酸、“通用碱基”核苷酸、“无环”核苷酸、5-C- 甲基核苷酸、和末端甘油基和 / 或反向脱氧无碱基残基。

[0457] siRNA 分子的反义区可以在所述反义区的 3' - 端上包括硫代磷酸核苷酸间连键。反义区可以在所述反义区的 5' - 端上包含约 1 至约 5 个硫代磷酸核苷酸间连键。siRNA 分子的 3' - 端核苷酸突出端可以包括在核糖、碱基或骨架上可进行化学修饰的核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸。3' - 端核苷酸突出端可以包括一种或多种通用碱基核糖核苷酸。3' - 端核苷酸突出端可以包括一种或多种无环核苷酸。

[0458] 例如, 化学修饰的 siRNA 可以在一个链内具有 1、2、3、4、5、6、7、8 或更多个硫代磷酸核苷酸间连键, 或可以在各链内具有 1 至 8 个或更多个硫代磷酸核苷酸间连键。硫代磷酸核苷酸间连键可以存在于 siRNA 双螺旋的一个或两个寡核苷酸链上, 例如在正义链、反义链、或两条链上。

[0459] siRNA 分子可以包括在正义链、反义链、或两条链上的 3' - 端、5' - 端、或 3' - 和 5' - 端的一个或多个硫代磷酸核苷酸间连键。例如, 示例性的 siRNA 分子可以包括在正义链、反义链、或两条链上的 5' - 端的 1、2、3、4、5 或更多个连续的硫代磷酸核苷酸间连键。

[0460] 在一些实施方式中, siRNA 分子包括在正义链、反义链、或两条链上的 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 或更多个嘧啶硫代磷酸核苷酸间连键。

[0461] 在一些实施方式中, siRNA 分子包括在正义链、反义链、或两条链上的 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 或更多个嘌呤硫代磷酸核苷酸间连键。

[0462] siRNA 分子可以包括环状核酸分子, 其中 siRNA 在长度上是约 38 至约 70 个核苷酸, 例如约 38、40、45、50、55、60、65 或 70 个核苷酸, 具有约 18 至约 23 个碱基对, 例如约 18、19、20、21、22 或 23 个碱基对, 其中环状寡核苷酸形成具有约 19 个碱基对和 2 个环的哑铃型结构。

[0463] 环状 siRNA 分子可以包括 2 个环基序, 其中 siRNA 分子的一个或两个环部分是生物可降解的。例如, 环状 siRNA 分子的环部分可以在体内转化以生成具有 3' - 端突出端的

双链 siRNA 分子,如包含约 2 个核苷酸的 3' - 端核苷酸突出端。

[0464] siRNA 分子中的修饰性核苷酸可以在反义链、正义链或两者上。例如,修饰性核苷酸可以具有 Northern 构型(如 Northern 假回转环;参见如 Saenger, Principles of Nucleic Acid Structure, Springer-Verlag ed., 1984)。具有 Northern 构型的核苷酸实例包括锁定核酸(LNA)核苷酸(如 2' -O, 4' -C- 亚甲基 -(D- 核糖呋喃糖基)核苷酸)、2' - 甲氧基乙氧基(MOE)核苷酸、2' - 甲基 - 硫代 - 乙基, 2' - 脱氧 - 2' - 氟代核苷酸、2' - 脱氧 - 2' - 氯代核苷酸、2' - 叠氮核苷酸和 2' -O- 甲基核苷酸。

[0465] 化学修饰性核苷酸可以对核酸酶降解具有抗性,且同时保持调节 RNAi 的能力。

[0466] 双链 siRNA 分子的正义链可以在正义链的 3' - 端、5' - 端、或 3' 和 5' - 端上具有端帽实体,如反向的脱氧无碱基实体。

[0467] 缀合物的实例包括描述于 2003 年 4 月 30 日提交的 Vargeese 等人的美国申请序列号 10/427,160 中的缀合物和配体,其包括附图整体引入本文作为参考。

[0468] 在本发明的一些实施方式中,缀合物可以通过生物可降解的接头共价结合化学修饰性 siRNA 分子。例如,缀合分子可以与化学修饰的 siRNA 分子的正义链、反义链、或两条链的 3' - 端结合。

[0469] 在一些实施方式中,缀合分子与化学修饰的 siRNA 分子的正义链、反义链、或两条链的 5' - 端结合。在一些实施方式中,缀合分子与化学修饰的 siRNA 分子的正义链、反义链、或两条链的 3' - 端和 5' - 端、或其任意组合结合。

[0470] 在一些实施方式中,缀合分子包括能递送促进化学修饰的 siRNA 分子递送至生物系统如细胞内的分子。

[0471] 在一些实施方式中,结合化学修饰的 siRNA 分子的缀合分子是聚乙二醇、人血清白蛋白、或调节细胞吸收的细胞受体的配体。本发明期望的能结合化学修饰的 siRNA 分子的特异性缀合分子的实例描述于 Vargeese 等,美国专利公开号 20030130186 和 20040110296 中。

[0472] siRNA 可以包含将 siRNA 的正义区和 siRNA 的反义区相连接的核苷酸、非核苷酸、或混合的核苷酸/非核苷酸接头。在一些实施方式中,核苷酸接头可以是 3、4、5、6、7、8、9 或 10 个核苷酸长。在一些实施方式中,核苷酸接头可以是核酸适配子。在本文中,术语“适配子”或“核酸适配子”包括特异性结合靶分子的核酸分子,其中核酸分子包含在其自然状态下被靶分子识别的序列。另外,适配子可以是结合非自然结合核酸的靶分子的核酸分子。

[0473] 例如,适配子可以用于结合蛋白的配体结合域,从而可以防止天然存在的配体与蛋白发生相互作用。参见例如 Gold 等, Annu. Rev. Biochem. 64 :763, 1995 ; Brody 和 Gold, J. Biotechnol. 74 :5, 2000 ; Sun, Curr. Opin. Mol. Ther. 2 :100, 2000 ; Kusser, J. Biotechnol. 74 :27, 2000 ; Hermann 和 Patel, Science 287 :820, 2000 ; 和 Jayasena, Clinical Chemistry 45 :1628, 1999。

[0474] 非核苷酸接头可以是无碱基核苷酸、聚醚、聚胺、聚酰胺、肽、碳水化合物、脂质、聚烃或其它聚合化合物(例如,如那些具有 2 至 100 个乙二醇单元的聚乙二醇)。具体的实例包括下述中描述的那些: Seela 和 Kaiser, Nucleic Acids Res. 18 :6353, 1990 和 Nucleic Acids Res. 15 :3113, 1987 ; Cload 和 Schepartz, J. Am. Chem. Soc. 113 : 6324, 1991 ; Richardson 和 Schepartz, J. Am. Chem. Soc. 113 :5109, 1991 ; Ma 等, Nucleic

Acids Res. 21:2585,1993 和 Biochemistry 32:1751,1993;Durand 等, Nucleic Acids Res. 18:6353,1990;McCurdy 等, Nucleosides & Nucleotides 10:287,1991;Jaschke 等, TetrahedronLett. 34:301-304,1993;Ono 等, Biochemistry 30:9914,1991;Arnold 等, 国际公开号 W089/02439;Usman 等, 国际公开号 W095/06731;Dudycz 等, 国际公开号 W095/11910;和 Ferentz 和 Verdine, J. Am. Chem. Soc. 113:4000,1991。

[0475] “非核苷酸接头”是指能引入核酸链内代替一个或多个核苷酸单元的基团或化合物,包括糖和/或磷酸取代,且使保留的碱基表现其酶活性。基团或化合物可以是无碱基的,因为其在如糖的 C1 位置上不含有常规公认的核苷酸碱基,如腺苷、鸟嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶。

[0476] 在一些实施方式中,修饰的 siRNA 分子可以具有磷酸骨架修饰,包括一种或多种硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、甲基膦酸酯、磷酸三酯、吗啉代、酰胺化氨基甲酸酯、羧甲基、乙酰酰胺化物、聚酰胺、磺酸酯、磺酰胺、氨基磺酸酯、缩甲醛(formacetal)、硫代缩甲醛(thioformacetal)、和/或烷基甲硅烷基取代。寡核苷酸骨架修饰的实例在 Hunziker 和 Leumann, Nucleic Acid Analogues: Synthesis and Properties, in Modern Synthetic Methods, VCH, pp. 331-417,1995 和 Mesmaeker 等, Novel Backbone Replacements for Oligonucleotides, in Carbohydrate Modifications in Antisense Research, ACS, pp. 24-39,1994 中给出。

[0477] 可以化学修饰的 siRNA 分子可以通过下述方法合成:(a) 合成 siRNA 分子的两条互补链;和 (b) 在适合获得双链 siRNA 分子的条件将两条互补链一起退火。在一些实施方式中,siRNA 分子互补部分的合成是通过固相寡核苷酸合成,或通过固相串联寡核苷酸合成来实现的。

[0478] 寡核苷酸(如某些修饰的寡核苷酸或缺失核糖核苷酸的寡核苷酸部分)是利用本领域熟知的方法来合成,例如, Caruthers 等, Methods in Enzymology 211:3-19,1992;Thompson 等, 国际 PCT 公开号 W099/54459;Wincott 等, Nucleic Acids Res. 23:2677-2684,1995;Wincott 等, Methods Mol. Bio. 74:59,1997;Brennan 等, Biotechnol Bioeng. 61:33-45,1998;和 Brennan, 美国专利号 6,001,311 中所描述的。RNA 的合成,包括本发明的某些 siRNA 分子,根据如下所述的方法进行,例如 Usman 等, J. Am. Chem. Soc. 109:7845,1987;Scaringe 等, Nucleic Acids Res. 18:5433,1990;和 Wincott 等, Nucleic Acids Res. 23:2677-2684,1995;Wincott 等, Methods Mol. Bio. 74:59,1997。

[0479] 在本文中,“不对称发夹”是线性 siRNA 分子,其含有反义区、可包含核苷酸或非核苷酸的环部分、和在正义区具有足够可与反义区碱基对互补的核苷酸且形成具有环的双螺旋的前提下,包含少于反义区的核苷酸的正义区。

[0480] 在本文中,“不对称的双螺旋”是具有两条分离的链的 siRNA 分子,其含有正义区和反义区,其中在正义区具有足够可与反义区碱基对互补的核苷酸且形成具有环的双螺旋的前提下,正义区包含少于反义区的核苷酸。

[0481] 在本文中,“调控基因表达”是指上调或下调靶基因的表达,其可以包括上调或下调细胞中存在的 mRNA 水平、或 mRNA 翻译、或由靶基因编码的蛋白或蛋白亚基的合成。

[0482] 术语“抑制”、“下调”或“减少表达”在本文中是指基因的表达,或编码一种或多种蛋白或蛋白亚单位的 RNA 分子或相当的 RNA 分子的表达的水平,或由靶基因编码的一种或

多种蛋白或蛋白亚单位的水平或活性,降低到低于在缺失本发明的核酸分子(如 siRNA)时观察到的水平。

[0483] 在本文中,“基因沉默”是指在细胞中部分的或完全的抑制基因表达,而且可以称作“基因敲除”。基因沉默的程度可以通过本领域已知的方法来确定,其中的一些总结在国际公开号 W099/32619。

[0484] 本文中,术语“核糖核酸”和“RNA”是指含有至少一个核糖核苷酸残基的分子。核糖核苷酸是在 β -D-核糖-呋喃糖部分的 2' 位置具有羟基的核苷酸。这些术语包括双链 RNA、单链 RNA、分离的 RNA,如部分纯化的 RNA、基本纯净的 RNA、合成的 RNA、重组产生的 RNA、以及通过添加、删除、取代、修饰和 / 或改变一个或多个核苷酸而不同于天然存在的 RNA 的修饰的和改变的 RNA。RNA 的改变可以包括例如向如 siRNA 的末端或如在 RNA 的一个或多个核苷酸内部添加非核苷酸材料。

[0485] RNA 分子中的核苷酸包括非标准的核苷酸,如非天然存在的核苷酸或化学合成的核苷酸或脱氧核苷酸。这些改变的 RNA 可以被称作类似物。

[0486] “高度保守序列区域”是指靶基因中一个或多个区域的核苷酸序列在从一代到另一代或从一个生物体系到另一个生物体系时没有显著变化。

[0487] “正义区”是指具有互补于 siRNA 分子的反义区的 siRNA 分子的核苷酸序列。另外, siRNA 分子的正义区可以包含与靶核酸序列具有同源性的核酸序列。

[0488] “反义区”是指具有互补于靶核酸序列的 siRNA 分子的核苷酸序列。另外, siRNA 分子的反义区可以包括具有互补于 siRNA 分子的正义区的核酸序列。

[0489] “靶核酸”是指表达或活性被调节的任何核酸序列。靶核酸可以是 DNA 或 RNA。

[0490] “互补”是指核酸通过常规 Watson-Crick 或通过其它的非常规结合模式可以与另一个核酸序列形成氢键。

[0491] 在本文中,术语“生物可降解接头”是指设计成作为生物可降解接头以将一个分子与另一个分子连接(例如,生物活性分子与 siRNA 分子或 siRNA 分子的正义和反义链连接)的核酸或非核酸接头分子。如此设计生物可降解接头,使得其稳定性可以为特定目的如递送至特定组织或细胞类型而发生调节。基于核酸的生物可降解接头分子的稳定性可以以不同的方式调节,例如,通过核糖核苷酸、脱氧核糖核苷酸、和化学修饰的核苷酸,如 2' -O- 甲基、2' - 氟代、2' - 氨基、2' -O- 氨基、2' -C- 烯丙基、2' -O- 烯丙基和其它的 2' - 修饰性或碱基修饰性核苷酸的组合。生物可降解的核酸接头分子可以是二聚体、三聚体、四聚体或较长的核酸分子,例如长度为约 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 个核苷酸的寡核苷酸,或可以包括具有磷基键例如氨基磷酸酯或磷酸二酯键的单核苷酸。生物可降解的核酸接头分子还可以包括核酸骨架、核酸糖、或核酸碱基修饰。

[0492] 对于如本文所述的 2' - 修饰的核苷酸,“氨基”是指 2' -NH₂ 或 2' -O-NH₂,其可以是修饰的或未修饰的。所述修饰的基团描述于例如,Eckstein 等,美国专利号 5,672,695 和 Matulic-Adamic 等,美国专利号 6,248,878 中。

[0493] 本发明使用的递送核酸分子的辅助或补充方法描述于,例如,Akhtar 等,Trends Cell Bio. 2:139,1992; " Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics, " ed. Akhtar,1995, Maurer 等, Mol. Membr. Biol. 16:

129-140, 1999 ;Hofland and Huang, Handb. Exp. Pharmacol. 137 :165-192, 1999 ;和 Lee 等, ACSymp. Ser. 752 :184-192, 2000. Sullivan 等, 国际 PCT 公开号 W094/02595 中进一步描述了递送酶的核酸分子的常规方法。

[0494] 核酸分子可以在制剂中施用, 所述制剂包括一种或多种其它组分, 如药学上可接受的载体、稀释剂、赋形剂、助剂、乳化剂、缓冲剂、稳定剂或防腐剂。

[0495] 在本文中, 术语“载体”是指药学上可接受的固体或液体稀释剂、溶剂、填充剂或包封材料。载体的实例包括盐水、生物学上和药学上的缓冲系统、和生物学上可接受的媒介剂。含水的液体载体可以包括药学上可接受的添加剂, 如酸化剂、碱化剂、抗菌防腐剂、抗氧化剂、缓冲剂、螯合剂、络合剂、溶解剂、湿润剂、溶剂、悬浮剂和 / 或粘度增强剂、张力剂、润湿剂或其他生物相容性材料。上述范畴的组分实例可参见 U. S. Pharmacopeia National Formulary, 1990, pp. 1857-1859, 以及 Raymond C. Rowe 等, Handbook of Pharmaceutical Excipients, 5th ed., 2006, 和 " Remington: The Science and Practice of Pharmacy, " 21st ed., 2006, editor David B. Troy。

[0496] 防腐剂的实例包括苯酚、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸酯、间甲酚、硫柳汞、苯扎氯铵和其混合物。

[0497] 表面活性剂的实例包括油酸、失水山梨醇油酸酯、聚山梨醇酯、卵磷脂、磷脂酰胆碱、各种长链甘油二酯和磷脂、和其混合物。

[0498] 磷脂的实例包括磷脂酰胆碱、卵磷脂、磷脂酰甘油、磷脂酰肌醇、磷脂酰丝氨酸、和磷脂酰乙醇胺、和其混合物。

[0499] 分散剂的实例包括乙二醇四乙酸。

[0500] 气体的实例包括氮气、氦气、氯氟烃 (CFC)、氢氟烃 (HFC)、二氧化碳、空气和其混合物。

[0501] 在一些实施方式中, siRNA 和 / 或多肽可以包封入脂质体、或存留在脂质体内部或外部、或存在于脂质体层内、或通过离子电渗疗法施用、或加入到其他载体, 如水凝胶、环糊精、生物可降解纳米胶囊、生物粘性微球、或蛋白质的载体。参见, 例如 O' Hare 和 Normand, PCT 国际公开号 W000/53722。可选地, 核酸组合物可以通过直接注射或通过利用输注泵来局部递送。本发明核酸分子的直接注射, 无论经皮下、经肌肉内、或经皮内, 都可以利用标准的针和注射器操作法, 或采用无针技术, 如 Conry 等, Clin. Cancer Res. 5 :2330-2337, 1999, 和 Barry 等, 国际 PCT 公开号 W099/31262 中所描述。

[0502] 本发明的组合物可以有效地用作药物制剂。药物制剂预防, 调节患者中疾病状态或其它不良状况的发生或严重程度, 或治疗 (减轻一种或多种症状至可检测或可测量的程度) 患者中疾病状态或其它不良状况的发生或严重程度。

[0503] 在一些实施方式中, 本发明提供了药物组合物和方法, 特征是存在或施用一种或多种多核酸, 所述多核酸通常是与脂质结合、复合或缀合的一种或多种 siRNA, 其可以进一步与药学上可接受的载体如稀释剂、稳定剂或缓冲剂配伍。

[0504] 通常地, siRNA 会靶向以高水平表达的基因, 该基因作为与患者疾病或不良状况相关的因果或起作用的因素。在这种情况下, siRNA 会有效地下调该基因的表达水平, 从而预防、减轻或降低一种或多种相关疾病症状的严重性或复发。可选地, 对于各种不同的疾病模型来说, 靶基因的表达不一定会随着疾病或其他不良症状的结果或结局而提高, 通过降低

基因表达（即降低选定的 mRNA 的水平和 / 或靶基因的蛋白产物的水平），下调靶基因将仍然会获得治疗结果。可选地，本发明的 siRNA 可以靶向较低表达的一个基因，这可以导致上调“下游”基因，该“下游”基因的表达被该靶基因的产物或活性负性调节。

[0505] 本发明的 siRNA 可以以任何形式给药，例如经透皮或通过局部注射（如在银屑病斑块位点上局部注射以治疗牛皮癣，或局部注射入患银屑病或 RA 患者关节内）。在更具体的实施方式中，本发明提供了制剂和施用治疗有效量的直接抵抗 TNF- α 的 mRNA 的 siRNA 的方法，该 siRNA 有效下调 TNF- α RNA，并因此降低或预防一种或多种 TNF- α 相关炎症。提供了对比方法和组合物，其针对与动物患者中所选疾病状况相关的一种或多种不同基因的表达，包括已知其表达随着与所选疾病状况相关的因果或起作用的因素会异常增加的大量基因中的任何一个。

[0506] 本发明的组合物还可以配制，并用作口服给药的片剂、胶囊或酏剂，直肠给药的栓剂，无菌溶液，注射给药的悬浮液，以及本领域已知的其他形式。

[0507] 药理学组合物或制剂是指适合给药的形式或制剂，例如全身给药至细胞或患者，包括如人类。适合的形式部分依赖于用途或进入途径，例如经口服、经透皮、经上皮、或通过注射。所述形式并不妨碍组合物或制剂到达靶细胞（即带负电的核酸希望递送到的细胞）。例如，注入到血液中的药理学组合物应该是可溶的。其它因素是本领域已知，且包括如毒性的考虑。

[0508] “全身给药”是指体内全身吸收或血液中药物的累积，随后分布到全身。会导致全身吸收的给药途径包括但不限于：经静脉、经皮下、经腹腔、吸入、口服、经肺内和经肌肉内。

[0509] 适合与本发明的核酸分子配制的试剂的实例包括：P-糖蛋白抑制剂（如 Pluronic P85），其能提高药物进入 CNS（Jolliet-Riant 和 Tillement, *Fundam. Clin. Pharmacol.* 13 : 16-26, 1999）；生物可降解的聚合物，如在脑内植入后用于缓释递送的聚（DL-丙交酯-乙交酯共聚物）微球（Emerich, D. F 等, *Cell Transplant* 8 : 47-58, 1999, Alkermes, Inc., Cambridge, Mass.）；和载药纳米颗粒，如由聚氰基丙烯酸丁酯制成的那些，其能递送药物穿过血脑屏障并能改变神经摄取机制（*Prog. Neuropsychopharmacol Biol. Psychiatry* 23 : 941-949, 1999）。用于本发明核酸分子递送方法的其它实例包括描述于 Boado 等, *J. Pharm. Sci.* 87 : 1308-1315, 1998 ; Tyler 等, *FEBS Lett.* 421 : 280-284, 1999 ; Pardridge 等, *PNAS USA* 92 : 5592-5596, 1995 ; Boado, *Adv. Drug Delivery Rev.* 15 : 73-107, 1995 ; Aldrian-Herrada 等, *Nucleic Acid Res.* 26 : 4910-4916, 1998 ; 和 Tyler 等, *PNAS USA* 96 : 7053-7058, 1999 中的材料。

[0510] 本发明还包括制备用于储存或给药的组合物，其包括在药学可接受的载体或稀释剂中的药学有效量的期望化合物。治疗使用的可接受的载体或稀释剂是药物领域所熟知的，且描述于，例如 Remington's *Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro ed. 1985) 中。例如，可以使用防腐剂、稳定剂、染料和增味剂。这些包括苯甲酸钠、山梨酸和对羟基苯甲酸酯。另外，抗氧化剂和悬浮剂也可以使用。

[0511] 药学有效剂量是预防，抑制疾病状态的发生，治疗或改善疾病状态的症状到一定程度所需的剂量。活性核酸的给药量应该是每日每千克体重 0.01mg 至 50mg。

[0512] 水悬浮液可以包括与适合制备水悬浮液的赋形剂混合的活性材料。所述赋形剂是悬浮剂，例如羧基甲基纤维素钠、甲基纤维素、羟丙甲基纤维素、海藻酸钠、聚乙烯吡咯烷

酮、黄芪树胶和阿拉伯树胶；分散剂或润湿剂可以是天然存在的磷脂，例如，卵磷脂，或环氧烷与脂肪酸的缩合产物，例如聚氧乙烯硬脂酸酯，或环氧乙烷与长链脂肪醇的缩合产物，例如十七烷基亚乙氧基鲸蜡醇 (heptadecaethyleneoxycetanol)，或环氧乙烷与衍生自脂肪酸和己糖醇的偏酯的缩合产物，如聚氧乙烯山梨糖醇单油酸酯，或环氧乙烷与衍生自脂肪酸和己糖醇酐的偏酯的缩合产物，例如聚乙烯山梨聚糖单油酸酯。水悬浮液还可以包括一种或多种防腐剂，例如对羟基苯甲酸乙酯或对羟基苯甲酸正丙酯、一种或多种着色剂、一种或多种增味剂、和一种或多种甜味剂，如蔗糖或糖精。

[0513] 油性悬浮剂可以通过在植物油如花生油、橄榄油、芝麻油或椰子油，或在矿物油如液体石蜡中悬浮活性成分来配制。油性悬浮剂可以包括增稠剂，例如蜂蜡、硬石蜡或十六醇。可添加甜味剂和增味剂以提供可口的口服制剂。这些组合物可以通过添加抗氧化剂如抗坏血酸来进行保存。

[0514] 适合通过加水制备水性悬浮剂的可分散粉剂和颗粒提供与分散剂或润湿剂、悬浮剂和一种或多种防腐剂混合的活性组分。也可以存在其它赋形剂，例如甜味剂、增味剂和着色剂。

[0515] 本发明的药物组合物还可以是水包油乳剂型。油相可以是植物油或矿物油或两者的混合物。合适的乳化剂可以是天然存在的橡胶，例如阿拉伯树胶或黄芪树胶，天然存在的磷脂，例如大豆、卵磷脂，和衍生自脂肪酸和己糖醇、酸酐的酯或偏酯，例如山梨聚糖单油酸酯，和所述偏酯与环氧乙烷的缩合产物，例如聚氧乙烯山梨聚糖单油酸酯。乳剂还可以包括增甜剂和增味剂。

[0516] 药物组合物可以是无菌注射的水性或含油的悬浮剂形式。该悬浮剂可以按照本领域已知的方法，利用上文所述的适合的分散剂或润湿剂和悬浮剂来配制。无菌注射制剂也可以是在无毒的双亲可接受的稀释剂或溶剂中的无菌注射溶液或悬浮液，例如在 1,3-丁二醇中的溶液。其中可以使用的可接受的载体和溶剂是水、Ringer 溶液和等渗氯化钠溶液。另外，通常，无菌的不挥发性油通常可用作溶剂或悬浮媒介物。为此，任何温和的不挥发性油都可以使用，包括合成的甘油单酯或甘油二酯。另外，发现脂肪酸如油酸可用于制备注射剂。

[0517] siRNA 可以以栓剂形式给药，例如用于药物的直肠给药。这些组合物可以通过将药物与适合的非刺激性赋形剂混合来制备，该赋形剂在常温下是固体但在直肠温度下是液体，因此其能在直肠中溶解而将药物释放。所述材料包括可可油和聚乙二醇。

[0518] siRNA 可以通过核酸酶抗性基团如 2' - 氨基、2' -C- 烯丙基、2' - 氟代、2' -O- 甲基、2' -H 的修饰来进行广泛地修饰，以提高稳定性。综述参见 Usman 和 Cedergren, TIBS 17 :34, 1992 ; Usman 等, Nucleic Acid Symp. Ser. 31 :163, 1994。siRNA 结构可以利用常规方法通过凝胶电泳来纯化，或通过高压液相层析和在水中重悬浮来纯化。

[0519] 包含修饰（碱基、糖和 / 或磷酸）的化学合成的核酸分子可以防止其被血清核糖核酸酶降解，这可以增加其效力。参见，例如 Eckstein 等，国际公开号 W092/07065 ; Perrault 等，Nature 344 :565, 1990 ; Pieken 等，Science 253, 314, 1991 ; Usman 和 Cedergren, Trends in Biochem. Sci. 17 :334, 1992 ; Usman 等，国际公开号 W093/15187 ; 和 Rossi 等，国际公开号 W091/03162 ; Sproat, 美国专利号 5, 334, 711 ; 和 Gold 等，美国专利号 6, 300, 074。全部上述参考文献都描述了能对本文描述的核酸分子的碱基、磷酸和 / 或糖实

体进行的各种化学修饰。

[0520] 在现有技术中有许多实例描述了能够引入核酸分子的糖、碱基和磷酸修饰,并且会显著提高其核酸酶稳定性和功效。例如,寡核苷酸通过用核酸酶抗性基团,例如,2'-氨基、2'-C-烯丙基、2'-氟代、2'-O-甲基、2'-O-烯丙基、2'-H 修饰,以提高稳定性和/或提高生物活性。综述参见 Usman 和 Cedergren, *TIBS* 17:34,1992;Usman 等, *Nucleic Acid Symp. Ser.* 31:163,1994;Burgin 等, *Biochemistry* 35:14090,1996。核酸分子的糖修饰已经被现有技术所广泛描述。参见 Eckstein 等,国际公开 PCT 号 W092/07065;Perrault 等, *Nature* 344:565-568,1990;Pieken 等, *Science* 253:314-317,1991;Usman 和 Cedergren, *Trends in Biochem. Sci.* 17:334-339,1992;Usman 等,国际公开 PCT 号 W093/15187;Sproat,美国专利号 5,334,711 和 Beigelman 等, *J. Biol. Chem.* 270:25702,1995;Beigelman 等,国际 PCT 公开号 W097/26270;Beigelman 等,美国专利号 5,716,824;Usman 等,美国专利号 5,627,053;Woolf 等,国际 PCT 公开号 W098/13526;Thompson 等, Karpeisky 等, *Tetrahedron Lett.* 39:1131,1998;Earnshaw 和 Gait, *Biopolymers (Nucleic Acid Sciences)* 48:39-55,1998;Verma and Eckstein, *Annu. Rev. Biochem.* 67:99-134,1998;和 Burlina 等, *Bioorg. Med. Chem.* 5:1999-2010,1997。这些出版物描述了确定将糖、碱基和/或磷酸修饰等引入核酸分子而不调节催化性的位点的常规方法和策略。在这些指导下,如本文所述,类似的修饰可用于修饰本发明的 siRNA 核酸分子,只要 siRNA 在细胞内促进 RNAi 的能力不被显著抑制。

[0521] 虽然包含硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯和/或 5'-甲基磷酸酯键的寡核苷酸核苷酸间连键的化学修饰会提高稳定性,但是过度的修饰会导致某些毒性或降低活性。因此,当设计核酸分子时,应该最小化这些间连键的量。这些键的浓度降低就会降低毒性,而使这些分子获得增加的效力和较高的特异性。

[0522] 在一些实施方式中,本发明涉及具有磷酸骨架修饰的修饰性 siRNA 分子,所述磷酸骨架修饰包括一种或多种硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、甲基磷酸酯、磷酸三酯、吗啉代、酰胺化氨基甲酸酯、羧甲基、乙酰酰胺化物、聚酰胺、磺酸酯、磺胺、氨基磺酸酯、缩甲醛 (formacetal)、硫代缩甲醛 (thioformacetal)、和/或烷基甲硅烷基取代。寡核苷酸骨架修饰的综述参见 Hunziker 和 Leumann, *Nucleic Acid Analogues: Synthesis and Properties*, in *Modern Synthetic Methods*, VCH,1995, pp. 331-417, 和 Mesmaeker 等, " Novel Backbone Replacements for Oligonucleotides, in *Carbohydrate Modifications in Antisense Research*, " ACS,1994, pp. 24-39。

[0523] 递送核酸分子的方法描述于 Akhtar 等, *Trends Cell Bio.* 2:139,1992;" Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics, " ed. Akhtar,1995;Maurer 等, *Mol. Membr. Biol.* 16:129-140,1999;Hofland 和 Huang, *Handb. Exp. Pharmacol.* 137:165-192,1999; 和 Lee 等, *ACS Symp. Ser.* 752:184-192,2000。Beigelman 等,美国专利号 6,395,713 和 Sullivan 等, PCT W094/02595 进一步描述了递送核酸分子的常规方法。这些指导方案可以用于递送几乎任何核酸分子。核酸分子可以通过本领域技术人员已知的各种方法来施用给细胞,包括但不限于通过脂质体内部或外部封装、通过离子电渗疗法、或通过引至其它载体,如生物可降解的聚合物、水凝胶、环糊精(参见如 Gonzalez 等, *Bioconjugate Chem.* 10:1068-1074,1999;Wang 等,国际 PCT 公开号

W003/47518 和 W003/46185)、乳酸-羟基乙酸共聚物 (PLGA) 和 PLCA 微球 (参见如美国专利号 6,447,796 和美国专利申请公开号 US2002130430)、生物可降解纳米胶囊、和生物粘性微球,或通过蛋白质载体 (O' Hare 和 Normand, 国际 PCT 公开号 W000/53722)。可选地,核酸/载体组合物可以通过直接注射或采用输注泵来局部递送。直接注射本发明核酸分子,无论经皮下、经肌肉内或经皮内,都可以利用常规针和注射器操作法,或采用无针技术,如 Conry 等, Clin. Cancer Res. 5:2330-2337, 1999 和 Barry 等, 国际 PCT 公开号 W099/31262 中所描述的进行。本发明的分子可以用作药物制剂。药物制剂预防,调节患者疾病状态的发生,或治疗患者疾病状态 (减轻症状至某种程度,优选全部症状)。

[0524] “RNA”是指含有至少一个核糖核酸残基的分子。“核糖核苷酸”意思是在 β -D-核糖-呋喃糖部分的 2' 位置具有羟基的核苷酸。该术语包括双链 RNA、单链 RNA、分离的 RNA,如部分纯化的 RNA、基本纯化的 RNA、合成的 RNA、重组产生的 RNA,以及通过添加、删除、取代和 / 或改变一种或多种核苷酸而不同于天然存在的 RNA 的改变的 RNA。所述改变可以包括例如在 RNA 的一个或多个核苷酸上添加非核苷酸物质如到 siRNA 末端或内部。在本发明的 RNA 分子中的核苷酸还包括非标准核苷酸,如非天然存在的核苷酸或化学合成的核苷酸或脱氧核苷酸。这些改变的 RNA 可以被称作天然存在的 RNA 的类似物或相似物。

[0525] “帽结构”是指在寡核苷酸的任一末端所引入的化学修饰 (参见,如 Adamic 等, 美国专利号 5,998,203, 引入本文作为参考)。这些末端修饰保护核酸分子免受外源核酸酶降解,并且帮助在细胞内的递送和 / 或定位。该帽可以存在在 5' - 端 (5' - 帽) 或 3' - 端 (3' - 帽) 或可以存在着两端。在非限制性实例中,5' - 帽包括但不限于甘油基、反向脱氧无碱基残基 (部分); 4', 5' - 亚甲基核苷酸; 1-(β -D-赤呋喃糖基) 核苷酸; 4' - 硫代核苷酸; 碳环核苷酸; 1,5-脱水己糖醇核苷酸; L-核苷酸; α -核苷酸; 修饰性碱核苷酸; 二硫代磷酸酯键; 苏型-戊呋喃糖基核苷酸; 无环 3', 4' - 开环核苷酸; 无环 3,4-二羟基丁基核苷酸; 无环 3,5-二羟基戊基核苷酸; 3' - 3' - 反向核苷酸部分; 3' - 3' - 反向无碱基部分; 3' - 2' - 反向核苷酸部分; 3' - 2' - 反向无碱基部分; 1,4-丁二醇磷酸酯; 3' - 氨基磷酸酯; 磷酸己酯; 磷酸氨基己酯; 3' - 磷酸酯; 3' - 硫代磷酸酯; 二硫代磷酸酯; 或桥连或非桥连甲基磷酸酯部分。

[0526] 3' - 帽的实例包括但不限于甘油基、反向脱氧无碱基残基 (部分)、4', 5' - 亚甲基核苷酸; 1-(β -D-赤呋喃糖基) 核苷酸; 4' - 硫代核苷酸、碳环核苷酸; 5' - 氨基-烷基磷酸酯; 1,3-二氨基-2-丙基磷酸酯; 3-氨基丙基磷酸酯; 6-氨基己基磷酸酯; 1,2-氨基十二烷基磷酸酯; 羟基丙基磷酸酯; 1,5-脱水己糖醇核苷酸; L-核苷酸; α -核苷酸; 修饰性碱性核苷酸; 二硫代磷酸酯; 苏型-戊呋喃糖基核苷酸; 无环 3', 4' - 开环核苷酸; 3,4-二羟基丁基核苷酸; 3,5-二羟基戊基核苷酸; 5' - 5' - 反向核苷酸部分; 5' - 5' - 反向无碱基部分; 5' - 氨基磷酸酯; 5' - 硫代磷酸酯; 1,4-丁二醇磷酸酯; 5' - 氨基; 桥连和 / 或非桥连 5' - 氨基磷酸酯、硫代磷酸酯和 / 或二硫代磷酸酯、桥连或非桥连甲基磷酸酯和 5' - 巯基部分 (详细描述参见 Beaucage 和 Lyer, Tetrahedron 49:1925, 1993; 其引入以供参考)。

[0527] 术语“非核苷酸”是指能引至核酸链代替一种或多种核苷酸单元的任何基团或化合物,包括糖和 / 或磷酸取代,且允许残留碱基表现其酶活性。基团或化合物是无碱基的,即不包括常规公认的核苷酸碱基,如腺苷、鸟嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶,因此在

1' - 位置缺失碱基。

[0528] 在本文中,“核苷酸”如本领域所公认的,包括天然碱基(标准)和本领域熟知的修饰性碱基。所述碱基通常位于核苷酸糖部分的1'位置。核苷酸通常包括碱基、糖和磷酸酯基团。核苷酸可以在糖、磷酸酯和/或碱基部分是未修饰的或修饰的,(还可互换地称为核苷酸类似物、修饰性核苷酸、非天然核苷酸、非标准核苷酸等;参见,如Usman和McSwiggen,见上;Eckstein等,国际PCT公开号W092/07065;Usman等,国际PCT公开号W093/15187;Uhlman & Peyman,见上,其全部引入以供参考)。本领域已知的修饰性核酸碱基的许多实例总结在Limbach等,Nucleic Acid Res. 22:2183,1994。可引入核酸分子的碱基修饰的某些非限制性实例包括肌苷、嘌呤、吡啶-4-酮、吡啶-2-酮、苯基、假尿嘧啶、2,4,6-三甲氧基苯、3-甲基尿嘧啶、二羟尿苷、萘基、氨基苯基、5-烷基胞苷(如5-甲基胞苷)、5-烷基尿苷(如核糖胸腺嘧啶)、5-卤代尿苷(如5-溴代尿苷)或6-氮杂嘧啶或6-烷基嘧啶(如6-甲基尿苷)、丙炔等(Burgin等,Biochemistry 35:14090,1996;Uhlman & Peyman,见上)。“修饰性碱基”意思是在1'位置上除腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶和尿嘧啶之外的核苷酸碱基或其类似物。

[0529] “靶位点”或“靶序列”或“靶定的序列”意思是靶核酸(如RNA)内部的序列,即通过siRNA构建体调节切割的“靶标”,所述siRNA结构含有互补于靶序列的反义区内的序列。

[0530] siRNA分子可以与阳离子脂质复合,封装在脂质体内,或以其它方式递送到靶细胞或组织。核酸或核酸复合物可以通过注射、输注泵或支架局部给药,将它们引至或不引至生物聚合物内。在另一个实施方式中,聚乙二醇(PEG)可以共价地结合本发明的siRNA化合物、或多肽、或两者。结合的PEG可以是任何分子量,优选约2,000至约50,000道尔顿(Da)。

[0531] 正义区可以通过接头分子,如多核苷酸接头或非核苷酸接头,与反义区相连。

[0532] “反向重复”是指含有正义和反义元件的核酸序列,当该重复被转录时,其位置能够让它们可以形成双链的siRNA。反向重复可以任选地包括接头或异源序列,如在两个重复元件间的自切割核酶。反向重复元件具有足够的长度,以便形成双链RNA。通常,反向重复的各元件为约15至约100个核苷酸长,优选约20-30个碱基核苷酸,优选约20-25个核苷酸长,如20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个核苷酸长。

[0533] “核酸”是指脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸和其单链-或双链型聚合物。该术语包括含已知核苷酸类似物或修饰性骨架残基或键的核酸,其是合成的、天然存在的、和非天然存在的,其具有与参照核酸相似的结合特性,且其以与参照核苷酸相似的方式发生代谢变化。所述类似物的实例包括但不限于硫代磷酸酯、氨基磷酸酯、磷酸甲酯、手性磷酸甲酯、2'-O-甲基核糖核苷酸、肽-核酸(PNA)。

[0534] “大双链RNA”是指具有大小大于约40bp的任何双链RNA,例如大于100bp或更优选大于300bp。大dsRNA的序列可以代表mRNA片段或完整mRNA。大dsRNA的最大大小不受本文的限制。双链RNA可以包括修饰性碱基,其中可以对磷酸糖骨架或核苷进行修饰。所述修饰可以包括氮或硫杂原子或本领域已知的任何其它修饰。

[0535] 双链结构可以由自身互补的RNA链来形成,如出现发夹或微小RNA,或通过两条不同的互补RNA链。

[0536] “重叠”是指两个RNA片段在一条链上具有重叠的多个核苷酸序列,例如其中多个核苷酸(nt)数量少到2-5个核苷酸或5-10个核苷酸或更多。

[0537] “一种或多种 dsRNA”是指在初级序列基础上相互不同的 dsRNA。“靶基因或 mRNA”是指任何感兴趣的基因或 mRNA。靶基因或 mRNA 可以包括发育基因和调节基因,以及代谢或结构基因或编码酶的基因。靶基因可以是内源或外源的。靶基因可以以直接或间接影响表型特征的方式在表型已经被研究的那些细胞中或生物体中表达。所述细胞包括成熟或胚胎动物或植物体内的任何细胞,包括配子或任何分离的细胞,如存在于永生细胞系或原代细胞培养基中。

[0538] 抗败血症效应的用途

[0539] 在一些方面中,本发明一般性地涉及败血症领域。更具体地说,本发明涉及氨基酸脂质组合物和制剂,和其用作药物和治疗剂的用途。本发明一般性地涉及利用氨基酸脂质来预防,治疗或改善败血症、败血性休克、炎性败血症、败血症、或全身炎性反应综合症的方法。

[0540] 当免疫系统损害或无法抵抗时,败血症可以由于感染导致,或由于某种化学疗法导致。例如,革兰氏阴性细菌内毒素可以诱导败血性休克。革兰氏阴性败血症中重症特别护理是最主要的死亡病因。单独的抗菌治疗并不能有效地防止败血症病例的死亡。败血症会伴有普遍的先天性免疫应答活性,从而导致不可控的产生各种炎性介质。不可控的全身性炎性应答会导致死亡。

[0541] 本发明的氨基酸脂质可以降低对某些内毒素如脂多糖的免疫应答。本发明的阳离子两性氨基酸脂质可以结合和中和内毒素,从而降低免疫应答。因此,本发明打算使用氨基酸脂质药物和方法来预防,治疗或改善败血症、败血性休克、炎性败血症、败血症、或全身炎性反应综合症。

[0542] 递送活性试剂的应用

[0543] 本发明的化合物和组合物可以用于递送任何生理学上的活性试剂以及活性试剂的任何组合物,如上所述或如本领域所知。活性试剂可以在本发明的组合物和用途中以足以提供期望的生理学上的或改善的效应的量存在。

[0544] 本发明的化合物和组合物能够定向地提高在哺乳动物患者内的一系列的药剂和生物学活性试剂的递送,包括小分子化合物和药物、肽、蛋白和疫苗试剂。

[0545] 活性试剂的实例包括肽、蛋白、核酸、双链 RNA、补血剂、抗感染药;抗痴呆药;抗病毒剂、抗肿瘤剂、解热药、止痛剂、消炎药、抗溃疡剂、抗变应性剂、抗抑郁剂、精神药物、强心剂、抗心律失常剂,血管扩张剂、抗高血压药、降压利尿剂、抗糖尿药、抗凝剂、降胆固醇剂、骨质疏松症治疗剂,激素、抗生素、疫苗、细胞因子、激素、生长因子、心血管因子、细胞粘附因子、中枢或周围神经系统因子、体液电解质因子,血液有机物质、骨生长因子、胃肠道因子、肾因子、结缔组织因子、感官因子、免疫系统因子、呼吸系统因子、生殖器官因子、雄激素、雌激素,前列腺素、生长激素、促性腺激素、白介素、类固醇、细菌性类毒素、抗体、单克隆抗体、多克隆抗体、人源化抗体、抗体片段、和免疫球蛋白。

[0546] 活性试剂的实例包括促红细胞生成素、粒细胞集落刺激因子、胰岛素、因子 VIII、因子 IX、干扰素、肝素、水蛭素原、水蛭素、和水蛭素。

[0547] 活性试剂的实例包括吗啡、氢吗啡酮、氧吗啡酮、羟甲左吗喃、烯丙左吗喃、可待因、纳美芬、纳洛芬、纳洛酮、纳屈酮、丁丙诺啡、布托啡诺、或纳布啡、可的松、氢化可的松、氟氢可的松、泼尼松、氢化泼尼松、甲泼尼龙、氟羟氢化泼尼松、地塞米松、倍他米松、帕拉米

松、氟轻松、秋水仙素、醋胺酚、非甾体抗炎剂 NSAID、阿昔洛韦、利巴韦林、三氟胸苷、阿糖呋喃糖腺嘌呤、酰基鸟苷、正脱氧鸟苷、叠氮胸腺嘧啶、二脱氧腺苷、二脱氧胞苷、安体舒通、睾酮、雌二醇、黄体酮、促性腺激素、雌激素、孕酮、罂粟碱、硝基甘油、舒血管肠肽、降钙素基因相关肽、赛庚啶、多虑平、丙米嗪、甲腈咪胺、右美沙芬、氯氮平、超氧化物歧化酶、神经脑啡肽酶、两性霉素 B、灰黄霉素、咪康唑、酮康唑、噻康唑、伊曲康唑、氟康唑、头孢菌素、四环素、氨基葡萄糖苷、红霉素、庆大霉素、多粘菌素 B、五氟尿嘧啶、博来霉素、氨甲喋呤、羟基脲、二脱氧肌苷、氟尿苷、6- 巯基嘌呤、阿霉素、道诺霉素、I- 去甲正定霉素、紫杉酚、紫杉醇、生育酚、奎尼丁、哌唑嗪、异搏定、硝苯吡啶、硫氮草酮、组织纤溶酶原激活物 TPA、表皮生长因子 EGF、酸性或碱性成纤维细胞生长因子 FGF、血小板衍生生长因子 PDGF、转化生长因子 TGF- α 或 β 、舒血管肠肽、肿瘤坏死因子 TNF、下丘脑释放因子、促乳素、促甲状腺激素 TSH、促肾上腺皮质激素 ACTH、甲状旁腺素 PTH、促卵泡激素 FSH、黄体生成素释放激素 LHRH、内啡肽、胰高血糖素、降钙素、催产素、卡贝缩宫素、aldosterone、脑啡肽、生长抑素、生长激素、生长调节素、 α - 黑色素细胞刺激素、利多卡因、舒芬太尼、特布他林、氟哌利多、东莨菪碱、性促放素、环匹罗司、丁螺环酮、色甘酸钠、咪达唑仑、环孢菌素、白血霉素、卡托普利、地拉普利、雷尼替丁、法莫替丁、超氧化物歧化酶、天门冬酰胺酶、精氨酸酶、精氨酸脱氨酶、腺苷脱氨酶核糖核酸酶、胰蛋白酶、化学胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、铃蟾肽、P 物质、加压素、 α - 球蛋白、转铁蛋白、血纤蛋白原、 β - 脂蛋白、 β - 球蛋白、凝血素、血浆铜蓝蛋白、 α 2- 糖蛋白 α 2- 球蛋白、胎球蛋白、 α 1- 脂蛋白、 α 1- 球蛋白、白蛋白、和前白蛋白。

[0548] 活性试剂的实例包括阿片样物质或阿片样物质拮抗剂、例如吗啡、氢吗啡酮、氧吗啡酮、羟甲左吗喃、烯丙左吗喃、可待因、纳美芬、纳洛芬、纳洛酮、纳屈酮、丁丙诺啡、布托啡诺、和纳布啡；皮质酮、例如可的松、氢化可的松、氟氢可的松、泼尼松、氢化泼尼松、甲泼尼龙、氟羟氢化泼尼松、地塞米松、倍他米松、帕拉米松、氟轻松；其它消炎药、例如秋水仙碱、布洛芬、萘甲新、和吡罗昔康；抗病毒药物例如阿昔洛韦、利巴韦林、三氟胸苷、阿糖呋喃糖腺嘌呤、酰基鸟苷、去甲脱氧鸟嘌呤核苷、叠氮胸苷、脱氧腺苷、脱氧胞苷；抗雄激素例如安体舒通；雄激素、例如睾酮；雌激素、例如雌二醇；孕酮；肌肉松弛剂、例如罂粟碱；血管扩张剂、例如硝基甘油、舒血管肠肽和降钙素基因相关肽；抗组胺、例如赛庚啶；具有组胺受体位阻断活性的试剂、例如多虑平、米帕明、和甲氰咪胍；止咳药、例如美沙芬；神经松弛剂例如氯氮平；抗心律失常药；镇痛剂；酶、例如超氧化物歧化酶和神经脑啡肽酶；抗真菌剂、例如两性霉素 B、灰黄霉素、咪康唑、酮康唑、噻康唑、伊曲康唑、和氟康唑；抗细菌剂、例如青霉素、头孢菌素、四环素、氨基葡萄糖苷、红霉素、庆大霉素、多粘菌素 B；抗癌剂、例如五氟尿嘧啶、博来霉素、氨甲喋呤、和羟基脲、双脱氧肌苷、氟尿苷、6- 巯基嘌呤、阿霉素、道诺霉素、I- 去甲正定霉素、紫杉酚、和紫杉醇；抗氧化剂、例如维生素 E、类维生素 A、类胡萝卜素、泛醌、金属螯合剂、和植酸；抗心律失常剂、例如奎尼丁；抗高血压剂例如哌唑嗪、维拉帕米、硝苯吡啶、和地尔硫卓；镇痛药例如醋氨酚、和阿斯匹林；单克隆和多克隆抗体、包括人源化抗体、和抗体片段；反义寡核苷酸；和 RNA、调节性 RNA、干扰性 RNA、DNA、和含有编码治疗肽和蛋白的基因的病毒载体。

[0549] 用于给药的组合物和制剂

[0550] 在本文中，术语“给药”包括直接和间接地递送化合物或组合物至作用位点的全部方法。本发明的化合物和组合物可以单独给药，或者与本文未公开的化合物、组合物、或治

疗剂组合给药。

[0551] 本发明的组合物和方法可以通过各种粘膜给药模式,包括经口、经直肠、经阴道、经鼻内、经肺内、或经透皮递送,或通过局部递送至眼、耳、皮肤或其它粘膜表面给药至患者。在本发明的一些方面,粘膜组织层包括上皮细胞层。上皮细胞可以是肺部的、气管的、支气管的、齿槽的、鼻的、口腔的、表皮的、或肠胃的。本发明的组合物可以使用常规推进器给药,如机械喷雾器,以及加压的、电动的、或其它类型的加载器。

[0552] 本发明的组合物可以作为鼻或肺喷雾以水溶液给药,而且可以采用本领域技术人员熟知的各种方法以喷雾形式分散。本发明组合物的肺部递送可以通过将组合物以液滴、颗粒、或喷雾的形式给药来实现,其可以是,例如、烟雾化的、雾化的、或成雾状的。肺部递送可以以液滴、颗粒、或喷雾形式,通过鼻或支气管通道来进行组合物给药。组合物颗粒、喷雾、或气溶胶可以是液体或固体形式。适合以鼻部喷雾分散液体的优选系统公开在美国专利号 4,511,069 中。所述制剂可以便利地通过将本发明的组合物溶解在水中以制备水溶液,并将所述溶液灭菌来制备。制剂可以存在于多剂容器中,例如美国专利号 4,511,069 公开的密封性悬浮系统中。其它适合的鼻部喷雾递送系统描述于 Transdermal Systemic Medication, Y.W.Chien ed., Elsevier Publishers, New York, 1985 中;和美国专利号 4,778,810 中。另外的气溶胶递送形式可以包括例如压缩空气-、喷射-、超声-、和压电喷雾器,其递送溶解或悬浮在药物溶剂例如水、乙醇或其混合物中的生物活性试剂。

[0553] 本发明的鼻部和肺部喷施溶液通常包括药物或要递送的药物,任选地与表面活性试剂如非离子表面活性试剂(如聚山梨醇酯-80)和一种或多种缓冲液配制。在本发明的某些实施方式中,鼻部喷施溶液进一步包括推进剂。鼻部喷施溶液的 pH 可以是约 pH 6.8 至 7.2。使用的药学溶剂还可以是 pH 4-6 的弱酸性水缓冲液。可以添加其它组分来增强或保持化学稳定性,包括防腐剂、表面活性试剂、分散剂或气体。

[0554] 在某些实施方式中,本发明是包括含有本发明组合物的溶液和用于肺部、粘膜或鼻内喷雾的推进剂或气溶胶的药品。

[0555] 本发明组合物的剂型可以是液滴或乳剂形式,或是喷雾剂形式的液体。

[0556] 本发明的组合物的剂型可以是固体,其可以在施用前在液体中重构。固体可以以粉末给药。固体可以是胶囊、片剂或凝胶形式。

[0557] 在本发明中为了配制适合肺部递送的组合物,可以将生物活性试剂与任何药学上可接受的添加剂或递送增强组分,以及适合分散活性试剂的碱或载体组合。添加剂或递送增强组分的实例包括 pH 控制剂,如精氨酸、氢氧化钠、甘氨酸、盐酸、柠檬酸和其混合物。其它添加剂或递送增强组分包括局部麻醉剂(如苄醇)、等渗剂(如氯化钠、甘露醇、山梨糖醇)、吸附抑制剂(如吐温 80)、溶解性增强剂(如环式糊精和其衍生物)、稳定剂(如血清白蛋白)和还原剂(如谷胱甘肽)。当用于粘膜递送的组合物是液态时,制剂的张性,参考将 0.9% (重量/体积) 生理盐溶液作为一个单位所测定,通常被调节到在给药位点的粘膜内不会引起实质上不可逆的组织损害的值。通常,将溶液的张性调节到约 1/3 至 3 的值,更通常是 1/2 至 2,最通常是 3/4 至 1.7。

[0558] 生物活性试剂可以分散在碱或媒介物内,其可以包含具有分散活性试剂和任何需要的添加剂能力的亲水性化合物。碱可以选自范围广泛的适合载体,包括但不限于聚羧酸或其盐、羧酸酐(如马来酸酐)与其它单体(如(甲基)丙烯酸甲酯、丙烯酸等)的共聚物,

亲水性乙烯基聚合物,如聚乙酸乙烯酯、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、纤维素衍生物,如羟甲基纤维素、羟丙纤维素等,和天然聚合物,如壳聚糖、胶原、海藻酸钠、明胶、透明质酸、和其无毒金属盐。生物可降解的聚合物可以选自碱或载体,例如聚乳酸、聚(乳酸-羟基乙酸)共聚物、聚羟基丁酸、聚(羟基丁酸-羟基乙酸)共聚物和其混合物。可选地或另外地,合成的脂肪酸酯,如聚甘油脂肪酸酯、蔗糖脂肪酸糖酯等可被用作载体。亲水性聚合物和其它载体可以单独使用或者组合使用,且可通过部分结晶化、离子键、交联等来赋予该载体提高的结构完整性。提供的载体可以是各种形式,包括用于直接施用至鼻粘膜的流体或粘性溶液、凝胶、贴剂、粉末、微球和膜剂。使用本发明所选的载体可以促进生物活性试剂的吸收。

[0559] 生物活性试剂可以按照各种方法与碱或载体组合,活性试剂的释放可以通过扩散、载体分解、或相关的水通道制剂。在某些情况下,活性试剂分散在微胶囊(微球体)或纳米胶囊(纳米球体)内,其制备自适合的聚合物,如2-氰基丙烯酸异丁酯(参见,如Michael等, J. Pharmacy Pharmacol. 43:1-5, 1991),和分散在施于鼻粘膜的生物相容性的分散介质内,其会在很长的时间内产生持续不断的递送和生物活性。

[0560] 用于粘膜、鼻或肺部递送的制剂可以包括亲水性低分子量化合物作为碱或赋形剂。所述亲水性低分子量化合物提供通道介质,水溶性活性试剂如生理性活性肽或蛋白通过该通道介质可以通过该基础扩散至吸收活性试剂的身体表面。亲水性低分子量化合物任选地从粘膜或给药环境吸收水分和溶解水溶性活性肽。亲水性低分子量化合物的分子量通常不大于10,000,且优选不大于3000。亲水性低分子量化合物的实例包括多元醇化合物,如寡糖、二糖和单糖,包括蔗糖、甘露醇、乳糖、L-阿拉伯糖、D-赤藓糖、D-核糖、D-木糖、D-甘露糖、D-半乳糖、乳果糖、纤维二糖、龙胆二糖、甘油、聚乙二醇、和其混合物。进一步的亲水性低分子量化合物的实例包括N-甲基吡咯烷酮,醇(如寡乙烯基醇、乙醇、乙二醇、丙二醇等)和其混合物。

[0561] 本发明的组合物可选地包括与所需生理条件近似的药学上可接受的载体物质,如pH调节剂和缓冲剂、张力调节剂、和润湿剂,例如乙酸钠、乳酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、失水山梨醇单月桂酸酯、油酸三乙醇胺、和其混合物。对于固体组合物,可以使用常规的无毒药学上可接受的载体,其包括例如药物梯度的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、滑石、纤维素、葡萄糖、蔗糖、碳酸镁等。

[0562] 在本发明的某些实施方式中,生物活性试剂可以以时间控制制剂的形式给药,例如,以在包括缓慢释放聚合物的组合物中的形式。活性试剂可以采用保护对抗快速释放的载体来制备,例如控释载体,如聚合物、微胶囊化的递送系统或生物粘性胶。在本发明的各种组合物中,活性试剂的延长递送可以大约通过包括在延迟吸收的组合物试剂中来获得,例如单硬脂酸铝水凝胶和明胶。

[0563] 在本发明的某些实施方式中,组合物可以包括一种或多种天然或合成表面活性试剂。某些天然的表面活性试剂可在人肺(肺表面活性试剂)中找到,而且是磷脂和蛋白的复合混合物,其在肺小泡的空气-液体表面形成单层,降低呼气时的表面张力接近于0,并防止肺小泡破裂。超过90%(重量)的肺表面活性试剂是由磷脂组成,其中大约40-80%是DPPC,且剩余的是不饱和的卵磷脂POPG、POPC和磷脂酰甘油。剩余的10%(重量)的表面活性试剂由血浆蛋白和脱辅基蛋白,如表面蛋白(SP)-A、SP-B、SP-C和SP-D组成。

[0564] 可用于本发明的天然的表面活性试剂的实例包括SURVANTA™(贝拉康坦)、

CUROSURF™(poractantalfa) 和 INFASURF™(calfactant)、和其混合物。

[0565] 合成的表面活性试剂的实例包括西那普肽 ;二棕榈酰卵磷脂、棕榈酰油酰磷脂酰甘油和棕榈酸的组合物 ;SURFAXIN™(lucinactant) ;和 EXOSURF™(colfosceril) ;组分可以包括四丁酚醛、DPPC、和十六醇 ;和其混合物。

[0566] 本发明的组合物可以采用本领域熟知的方法制备。制备脂质组合物的方法包括利用塞满规定孔大小的聚碳酸酯薄膜滤剂的Northern Lipids LipexExtruder 系统的乙醇注射法和挤压法。可以使用超声处理法,其利用探针针尖和浴超声波仪,来获得均匀大小的脂质颗粒。均质和单分散颗粒大小可以通过不添加核酸组分来获得。对于体外转染组合物来说,在转染剂制成并用其它的缓冲组分稳定后,可以添加核酸组分。对于体内递送组合物来说,核酸组分是制剂的一部分。

[0567] 本发明的组合物和制剂可以通过各种途径来给药,例如以经由静脉、肠胃外或腹膜内途径实现全身递送。在某些实施方式中,可以细胞内递送制剂,例如在靶组织如肺或肝的细胞中,或在炎性组织中。本发明包括通过移走患者细胞,将试剂递送至已移出的细胞内,并将细胞再引至患者内,来递送制剂的组合物和方法。在某些实施方式中,本发明提供了体内递送制剂的方法。可以将组合物经静脉、皮下或腹膜内给药至患者。在某些实施方式中,本发明提供了体内递送制剂至哺乳动物患者肺部的方法。

[0568] 其它实施方式

[0569] 本文所述的全部出版物、参考文献、专利、专利出版物和专利申请都明确地以其整体引入本文作为参考。

[0570] 虽然本发明描述了一些实施方式,且许多详细内容是为了进行说明,本领域的技术人员应该理解,本发明包括附加实施方式,且本文描述的某些详细内容可以适当地不脱离本发明地改变。本发明包括所述的附加实施方式、改变和相等物。特别是,本发明包括各种说明性的组分和实施例的特征、术语或要素的任意组合。

[0571] 本文使用的术语“一个”和本发明描述的和权利要求中的类似术语解释为包括单数和多数。

[0572] 术语“含有”、“具有”、“包括”和“包含”解释为开放式术语,其意思是例如“包括但不限于”。因此,术语如“包括”、“具有”、“包括”和“含有”解释为包括性的,而不是排他性的。

[0573] 本文一系列的数值叙述是指,单独的各值和如同其在本文单独叙述一样地落入该范围内的任何分散数值,而不论某些数值是否在确切表述的范围内。例如,范围“4 至 12”包括且并不限于数值 5、5.1、5.35 和大于或等于 4 且少于或等于 12 的任何其它整数、分数或有理数。应该理解,本文使用的特定值是示例性的,且并不限制本发明的范围。

[0574] 本文一系列碳原子数量的叙述是指,单独的各值和如同其在本文单独叙述一样地落入该范围内的任何分散数值,而不论某些数值是否在确切表述的范围内。例如,术语“C1-22”包括但不限于 C1、C2、C3、C4、C5、C6、C7、C8、C9、C10、C11、C12、C13、C14、C15、C16、C17、C18、C19、C20、C21、和 C22。

[0575] 本文提供的技术术语定义应该解释为包括没有说明的那些与本领域技术人员已知的术语相关的意思,且并不意欲限制本发明的范围。本文提供的技术术语定义应该解释为在本领域的可选定义中占支配地位,或通过参考某种程度上的可选定义而引入本文的定

义,会跟本文提供的定义发生冲突。

[0576] 本文所给的实施例,和本文所用的示例性语言仅仅是出于解释的目的,且并不意欲限制本发明的范围。

[0577] 当给出了实施例表列时,如适合本发明的化合物或分子表列,对于本领域的技术人员来说,很显然所列的化合物或分子的混合物也是适合的。

实施例

[0578] 实施例 1

[0579] 制备 C10-Arg-C10

[0580] N-(5-胍基-1-氧代-1-(癸氨基)戊-2-基)癸酰胺

[0581] Fmoc-Arg(Pbf)-树脂。向用于固相合成的 30ml 反应器中的含 3g 以 1.3mmol/g 取代 (Novabiochem,01-64-0114) 的 2-氯化三苯甲基氯化物树脂的 30ml 干 DCM 中,加入 5.06g(11.7mmol,3eq) 的 Fmoc-Arg(Pbf)-OH(Mw = 648.8, Novabiochem,04-12-1145) 和 2.23ml(12.87mmol,3.3eq) 的 DIPEA(Aldrich,Mw = 129.2, d = 0.74)。

[0582] Arg(Pbf)-树脂。2 小时后,用 DCM/MeOH/DIPEA(17 : 2 : 1) 洗涤该树脂三次,用 3XDCM、2XDMF、3XDCM 洗涤,且用 30ml 20%哌啶 /DMF 对 Fmoc 基团进行脱保护 30 分钟。

[0583] C10-Arg(Pbf)-树脂。Fmoc 脱保护后,用 3XDCM、2XMeOH 和 3XDCM 洗涤树脂,为了进行耦合反应,加入含 1.48g(11.7mmol) 癸酸 (Sigma, Mw = 127.27)、5.54g(11.7mmol) 的 HCTU(Mw = 473.7) 和 2.23ml(12.87mmol) 的 DIPEA(Mw = 129.2, d = 0.74) 的 30ml DMF。

[0584] 反应 1 小时后,用 3XDCM、2XMeOH 和 3XDCM 洗涤树脂,反应进程通过阴性的 Kaiser 试验 (无游离胺基存在) 检测。

[0585] 用 1% TFA/DCM(以 5X 30ml 进行 2 分钟,用 2ml 10%哌啶 /MeOH 过滤至烧瓶中) 从树脂上切下 C10-Arg(Pbf)-OH(Mw = 580.83),并将溶剂蒸发。

[0586] C10-Arg(Pbf)-C10(Mw = 720.13)。在溶液中进行二次耦联。向上述反应获得的油状残余物中添加含 2.32ml(11.7mmol) 的 C10-胺 (Sigma, Mw = 157.3, d = 0.792)、5.54g(11.7mmol) 的 HCTU(Mw = 473.7) 和 2.23ml(12.87mmol) 的 DIPEA(Mw = 129.2, d = 0.74) 的 50ml DMF。1 小时后,加入 100ml 的 AcOEt,并在分液漏斗中用 3X 0.5M HCl、3X 10% NaCO₃ 和 3X NaCl 洗涤有机层。AcOEt 层用无水 MgSO₄ 干燥并蒸发。

[0587] C10-Arg-C10(Mw = 467.8):向上述反应获得的油状残余物中添加 100ml 的 95% TFA/DCM 2.5% TIS,3 小时后,将溶剂蒸发。残余物溶解在 AcCN/0.5M HCl(1 : 1) 中,并用 C18 Phenomenex 柱上的 RP_Akta Explorer(PhenomenexRP,250X 21.2mm,序列号 234236-1,柱体积 83ml) 纯化,以 3CV 内的水作为流动相,用 0-100%乙腈进行梯度洗脱;λ = 215nm。将乙腈蒸发,并将产物冻干。

[0588] 实施例 2

[0589] 制备 C10-D-Arg-C10

[0590] N-(5-胍基-1-氧代-1-(癸烷基氨基)戊-2-基)癸酰胺

[0591] Fmoc-D-Arg(Pmc)-树脂。向用于固相合成的 30ml 反应器中的含 3g 以 1.3mmol/g 取代 (Novabiochem,01-64-0114) 的 2-氯化三苯甲基氯化物树脂的 30ml 干 DCM 中,加入 5.06g(11.7mmol,3eq) 的 Fmoc-D-Arg(Pmc)-OH(M_w = 662.8, Novabiochem,04-12-1145) 和

2.23ml (12.87mmol, 3.3eq) 的 DIPEA (Aldrich, $M_w = 129.2$, $d = 0.74$)。

[0592] D-Arg(Pmc)-树脂。2 小时后,用 DCM/MeOH/DIPEA (17 : 2 : 1) 洗涤该树脂三次,用 3×DCM、2×DMF、3×DCM 洗涤,且用 30ml 的 20% 哌啶 /DMF 对 Fmoc 基团进行脱保护 30 分钟。

[0593] C10-D-Arg(Pmc)-树脂。Fmoc 脱保护后,用 3×DCM、2×MeOH 和 3×DCM 洗涤树脂,为了进行耦合反应,加入含 1.48g (11.7mmol) 的癸酸 (Sigma, $M_w = 127.27$)、5.54g (11.7mmol) 的 HCTU ($M_w = 473.7$) 和 2.23ml (12.87mmol) 的 DIPEA ($M_w = 129.2$, $d = 0.74$) 的 30ml DMF。

[0594] 反应 1 小时后,用 3×DCM、2×MeOH 和 3×DCM 洗涤树脂,反应进程通过阴性的 Kaiser 试验 (无游离胺基存在) 检测。

[0595] 用 1% TFA/DCM (以 5×30ml 进行 2 分钟,用 2ml 10% 哌啶 /MeOH 过滤至烧瓶中) 从树脂上切下 C10-D-Arg(Pmc)-OH ($M_w = 591.84$),并将溶剂蒸发。

[0596] C10-D-Arg(Pmc)-C10 ($M_w = 732.14$)。在溶液中进行二次耦合。向上述反应获得的油状残余物中添加含 2.32ml (11.7mmol) 的 C10-胺 (Sigma, $M_w = 157.3$, $d = 0.792$)、5.54g (11.7mmol) 的 HCTU ($M_w = 473.7$) 和 2.23ml (12.87mmol) 的 DIPEA ($M_w = 129.2$, $d = 0.74$) 的 50ml DMF。1 小时后,加入 100ml 的 AcOEt,在分液漏斗中用 3X 0.5M HCl,3X 10% NaCO₃ 和 3X NaCl 洗涤有机层。AcOEt 层用无水 MgSO₄ 干燥并蒸发。

[0597] C10-D-Arg-C10 ($M_w = 467.8$) : 向上述反应获得的油状残余物中添加 100ml 的 95% TFA/DCM 2.5% TIS,3 小时后,将溶剂蒸发。残余物溶解在 AcCN/0.5M HCl (1 : 1) 中,并用 C18 Phenomenex 柱上的 RP_Akta Explorer (Phenomenex RP, 250×21.2mm, 序列号 234236-1, 柱体积 83ml) 纯化,以 3CV 内的水作为流动相,用 0-100% 乙腈进行梯度洗脱; $\lambda = 215\text{nm}$ 。将乙腈蒸发,并将产物冻干。

[0598] 实施例 3

[0599] 制备 C12-Arg-C12

[0600] N-(5-胍基-1-氧代-1-(十二烷基氨基)戊烷-2-基)十二酰胺

[0601] Fmoc-Arg(Pbf)-树脂。向用于固相合成的 200ml 反应器中的 5g 含以 1.3mmol/g 取代 (Novabiochem, 01-64-0114) 的 2-氯化三苯甲基氯化物树脂的 50ml 干 DCM 中,加入 8.434g (13mmol, 2eq) 的 Fmoc-Arg(Pbf)-OH ($M_w = 648.8$, Novabiochem, 04-12-1145) 和 2.26ml (13mmol, 2eq) 的 DIPEA (Aldrich, $M_w = 129.2$, $d = 0.74$)。

[0602] Arg(Pbf)-树脂。2 小时后,用 DCM/MeOH/DIPEA (17 : 2 : 1) 洗涤该树脂三次,用 3×DCM、2×DMF、3×DCM 洗涤,且用 50ml 的 20% 哌啶 /DMF 对 Fmoc 基团进行脱保护两次,每次 15 分钟。

[0603] C12-Arg(Pbf)-树脂。Fmoc 脱保护后,用 3×DCM、2×MeOH 和 3×DCM 洗涤,为了进行耦合反应,加入含 1.95g (9.75mmol) 的正十二烷酸 (Sigma, $M_w = 200.32$)、4.033g (9.75mmol) 的 HCTU ($M_w = 417.7$) 和 1.7ml (9.75mmol) 的 DIPEA ($M_w = 129.2$, $d = 0.74$) 的 50ml DMF。

[0604] 反应 1 小时后,用 3×DCM、2×MeOH 和 3×DCM 洗涤树脂,反应进程通过阴性的 Kaiser 试验 (无游离胺基存在) 检测。

[0605] 用 1% TFA/DCM (以 5X 30ml 进行 2 分钟,用 2ml 10% 哌啶 /MeOH 过滤至烧瓶中)

从树脂上切下 C12-Arg(Pbf)-OH($M_w = 608.9$), 并将溶剂蒸发。

[0606] C12-Arg(Pbf)-C12($M_w = 776.13$)。在溶液中进行二次偶联。向上述反应获得的油状残余物中添加含 1.246g(6.5mmol) 的 EDC*HCl($M_w = 191.7$)、1.06g(7.15mmol, 1.1eq) 的 HOBt*H₂O($M_w = 153$) 和 5.65ml(31.5mmol, 5eq) 的 DIPEA($M_w = 129.2$, $d = 0.74$) 的 50ml DCM, 从而预激活 -COOH, 随后在 20 分钟后加入 1.32g(7.15mmol) 的 C12-胺 (Sigma, $M_w = 185.36$)。1 小时后, 加入 100ml 的 AcOEt, 在分液漏斗中用 3X 0.5M HCl、3X 10% NaCO₃ 和 3X NaCl 洗涤有机层。AcOEt 层用无水 MgSO₄ 干燥并蒸发。在 TELEDYNE IscoCombiFlash R_f 仪器上纯化产物, 使用 40g 正相硅胶柱、5CV(柱体积) 的 100% DCM 和 10CV 的 0-5% MeOH, 检测波长 254nm, 流速 40ml/分钟。

[0607] C12-Arg-C12($M_w = 523.8$): 向上述反应获得的油状残余物中加入 50ml 的 85% TFA/DCM 2.5% TIS, 3 小时后, 将溶剂蒸发。用 0.5M HCl 沉淀产物。

[0608] 实施例 4

[0609] 制备 C12-Arg-C14

[0610] N-(5-胍基-1-氧代-1-(十四烷基氨基)戊-2-基)十二酰胺

[0611] Fmoc-Arg(Pbf)-树脂。向用于固相合成的 200ml 反应器中的含 5g 以 1.3mmol/g 取代 (Novabiochem, 01-64-0114) 的 2-氯化三苯甲基氯化物树脂的 50ml 干 DCM 中, 加入 8.434g(13mmol, 2eq) 的 Fmoc-Arg(Pbf)-OH($M_w = 648.8$, Novabiochem, 04-12-1145) 和 2.26ml(13mmol, 2eq) 的 DIPEA(Aldrich, $M_w = 129.2$, $d = 0.74$)。

[0612] Arg(Pbf)-树脂。2 小时后, 用 DCM/MeOH/DIPEA(17 : 2 : 1) 洗涤该树脂三次, 用 3×DCM、2×DMF、3×DCM 洗涤, 用 50ml 的 20% 哌啶 /DMF 对 Fmoc 基团进行脱保护 2 次, 每次 15 分钟。

[0613] C12-Arg(Pbf)-树脂。Fmoc 脱保护后, 用 3×DCM、2×MeOH 和 3×DCM 洗涤树脂, 为了进行耦合反应, 加入含 1.95g(9.75mmol) 的正十二烷酸 (Sigma, $M_w = 200.32$)、4.033(9.75mmol) 的 HCTU($M_w = 417.7$) 和 1.7ml(9.75mmol) 的 DIPEA($M_w = 129.2$, $d = 0.74$) 的 50ml DMF。

[0614] 反应 1 小时后, 用 3×DCM、2×MeOH 和 3×DCM 洗涤树脂, 反应进程通过阴性的 Kaiser 试验 (无游离胺基存在) 检测。

[0615] 用 1% TFA/DCM(以 5X 30ml 进行 2 分钟, 用 2ml 10% 哌啶 /MeOH 过滤至烧瓶中) 从树脂上切下 C 12-Arg(Pbf)-OH($M_w = 608.9$), 并将溶剂蒸发。

[0616] C12-Arg(Pbf)-C14($M_w = 804.13$)。在溶液中进行二次偶联。向上述反应获得的油状残余物中添加含 1.246g(6.5mmol) 的 EDC*HCl($M_w = 191.7$)、1.06g(7.15mmol, 1.1eq) 的 HOBt*H₂O($M_w = 153$) 和 5.65ml(31.5mmol, 5eq) 的 DIPEA($M_w = 129.2$, $d = 0.74$) 的 50ml DCM, 从而预激活 -COOH, 随后在 20 分钟后加入 1.52g(7.15mmol) 的 C14-胺 (Sigma, $M_w = 213.41$)。1 小时后, 加入 100ml 的 AcOEt, 在分液漏斗中用 3X 0.5M HCl、3X 10% NaCO₃ 和 3X NaCl 洗涤有机层。AcOEt 层用无水 MgSO₄ 干燥并蒸发。在 TELEDYNE IscoCombiFlash R_f 仪器上纯化产物, 使用 40g 正相硅胶柱、5CV(柱体积) 的 100% DCM 和 10CV 的 0-5% MeOH, 检测波长 254nm, 流速 40ml/分钟。

[0617] C12-Arg-C14($M_w = 551.8$): 向上述反应获得的油状残余物中加入 50ml 的 85% TFA/DCM 2.5% TIS, 3 小时后, 将溶剂蒸发。用 0.5M HCl 沉淀产物。

[0618] 实施例 5

[0619] 以与实施例 1-4 相同的方式来制备 C14-Arg-C14(产量:1.6g)、C16-Arg-C16 和 C18-Arg-C18。

[0620] 实施例 6

[0621] 制备 C18(油酰)-Arg-C16

[0622] N-(5-胍基-1-氧代-1-(十六烷基氨基)戊-2-基)十八-9-烯酰胺

[0623] Fmoc-Arg(Pbf)-树脂。向用于固相合成的 60ml 反应器中的 5g 含以 1.3mmol/g 取代 (Novabiochem, 01-64-0114) 的 2-氯化三苯甲基氯化物树脂的 50ml 干 DCM 中, 加入 8.4g(13mmol, 2eq) 的 Fmoc-Arg(Pbf)-OH($M_w = 648.8$, Novabiochem, 04-12-1145) 和 2.26ml(13mmol, 2eq) 的 DIPEA(Aldrich, $M_w = 129.2$, $d = 0.74$)。

[0624] Arg(Pbf)-树脂。2 小时后, 用 DCM/MeOH/DIPEA(17 : 2 : 1) 洗涤三次, 用 3×DCM、2×DMF、3×DCM 洗涤树脂, 且用 50ml 的 20% 哌啶 /DMF 对 Fmoc 基团进行脱保护 2 次, 每次 15 分钟。

[0625] C18_{油酰}-Arg(Pbf)-树脂。Fmoc 脱保护后, 用 3×DCM、2×MeOH 和 3×DCM 洗涤树脂, 为了进行耦合反应, 加入含 3.1ml(9.75mmol) 的油酸 (Sigma, $M_w = 282.47$; $d = 0.891$)、4g(9.75mmol) 的 HCTU($M_w = 413.7$) 和 1.7ml(9.75mmol) 的 DIPEA($M_w = 129.2$, $d = 0.74$) 的 50ml DMF。

[0626] 反应 1 小时后, 用 3×DCM、2×MeOH 和 3×DCM 洗涤树脂, 反应进程通过阴性的 Kaiser 试验 (无游离胺基存在) 检测。

[0627] 用 1% TFA/DCM(以 5×50ml 进行 2 分钟, 用 2ml 10% 哌啶 /MeOH 过滤至烧瓶中) 从树脂上切下 C18_{油酰}-Arg(Pbf)-OH($M_w = 690.83$), 并将溶剂蒸发。

[0628] C18_{油酰}-Arg(Pbf)-C16($M_w = 850.13$)。在溶液中进行二次耦合。向上述反应获得的油状残余物中添加含 1.437g(7.5mmol) 的 EDC·HCl($M_w = 191.7$)、1.178g(7.7mmol) 的 HOBt·H₂O($M_w = 153$) 和 6.5ml(37.5mmol, 5eq) 的 DIPEA($M_w = 129.2$, $d = 0.74$) 的 50ml DCM, 以预激活 -COOH, 随后在 20 分钟后加入 1.86g(7.7mmol) 的 C16-胺 (Sigma, $M_w = 241.46$)。反应过夜后, 在分液漏斗中用 3×0.5M HCl、3×10% NaCO₃ 和 3×NaCl 洗涤有机层。DCM 层用无水 MgSO₄ 干燥并蒸发。在 TELEDYNE Isco CombiFlash R_f 仪器上纯化产物, 使用 40g 正相硅胶柱、5CV(柱体积) 的 100% DCM 和 10CV 的 0-5% MeOH, 检测波长 215nm, 流速 40ml/分钟。

[0629] C18_{油酰}-Arg-C16($M_w = 661.8$): 向上述反应获得的油状残余物中加入 100ml 的 95% TFA/DCM 2.5% TIS, 3 小时后, 将溶剂蒸发。用 0.5M HCl 沉淀产物并再纯化。产量: 1.8g。

[0630] 实施例 7

[0631] 制备 C8-高 Arg-C8

[0632] N-(6-胍基-1-氧代-1-(辛基氨基)己-2-基)辛酰胺

[0633] Fmoc-hArg(diBoc)-树脂。向用于固相合成的 30ml 反应器中的含 3g 以 1.3mmol/g 取代 (Novabiochem, 01-64-0114) 的 2-氯化三苯甲基氯化物树脂的 30ml 干 DCM 中, 加入 3.57g(5.85mmol, 1.5eq) 的 Fmoc-hArg(diBoc)-OH($M_w = 610.69$, Novabiochem,) 和 2.04ml(11.7mmol, 3.0eq) 的 DIPEA(Aldrich, $M_w = 129.2$, $d = 0.74$)。

[0634] hArg(diBoc)-树脂。2 小时后,用 DCM/MeOH/DIPEA (17 : 2 : 1) 洗涤该树脂三次,用 3×DCM、2×DMF、3×DCM 洗涤,且用 30ml 的 20%哌啶 /DMF 对 Fmoc 基团进行脱保护 30 分钟。

[0635] C8-hArg(diBoc)-树脂。Fmoc 脱保护后,用 3×DCM、2×MeOH 和 3×DCM 洗涤树脂,为了进行耦合反应,加入含 1.854ml (11.7mmol) 的 C8 酸 (Sigma, $M_w = 144.22$, $d = 0.91$)、4.84g (11.7mmol) 的 HCTU ($M_w = 413.7$) 和 2.23ml (12.87mmol) 的 DIPEA ($M_w = 129.2$, $d = 0.74$) 的 30ml DMF。

[0636] 反应 1 小时后,用 3×DCM、2×MeOH 和 3×DCM 洗涤树脂,反应进程通过阴性的 Kaiser 试验 (无游离胺基存在) 检测。

[0637] 用 1% TFA/DCM (以 5X 30ml 进行 2 分钟,用 2ml 10%哌啶 /MeOH 过滤至烧瓶中) 从树脂上切下 C8-hArg(diBoc)-OH ($M_w = 514.68$),并将溶剂蒸发。

[0638] C8-hArg(diBoc)-C8 ($M_w = 625.93$)。在溶液中进行二次耦合。向上述反应获得的油状残余物中添加含 1.93ml (11.7mmol) 的 C8-胺 (Sigma, $M_w = 129.25$, $d = 0.782$)、4.84g (11.7mmol) 的 HCTU ($M_w = 473.7$) 和 2.23ml (12.87mmol) 的 DIPEA ($M_w = 129.2$, $d = 0.74$) 的 50ml DMF。1 小时后,加入 100ml 的 AcOEt,在分液漏斗中用 3X 0.5M HCl、3X 10% NaCO₃ 和 3X NaCl 洗涤有机层。AcOEt 层用无水 MgSO₄ 干燥并蒸发。

[0639] C8-hArg-C8 ($M_w = 426.8$) :向上述反应获得的油状残余物中加入 100ml 的 95% TFA/DCM 2.5% TIS,3 小时后,将溶剂蒸发。残余物溶解在 MeOH/AcCN/0.5M HCl (1 : 1 : 1) 中,并用 C18 Phenomenex 柱上的 RP_AktaExplorer (Phenomenex RP, 250×21.2mm, 序列号 234236-1,柱体积 83ml) 纯化,以 3CV 内水作为流动相,用 50-100% 乙腈梯度洗脱; $\lambda = 215\text{nm}$ 。将乙腈蒸发,并将产物冻干。

[0640] 实施例 8

[0641] 制备 C10-高 Arg-C10

[0642] N-(6-胍基-1-氧代-1-(癸烷基氨基)己-2-基)癸酰胺

[0643] Fmoc-hArg(diBoc)-树脂。向用于固相合成的 30ml 反应器中的 3g 含以 1.3mmol/g 取代 (Novabiochem, 01-64-0114) 的 2-氯化三苯甲基氯化物树脂的 30ml 干 DCM 中,加入 3.57g (5.85mmol, 1.5eq) 的 Fmoc-hArg(diBoc)-OH ($M_w = 610.69$, Novabiochem) 和 2.04ml (11.7mmol, 3.0eq) 的 DIPEA (Aldrich, $M_w = 129.2$, $d = 0.74$)。

[0644] hArg(diBoc)-树脂。2 小时后,用 DCM/MeOH/DIPEA (17 : 2 : 1) 洗涤该树脂三次,用 3×DCM、2×DMF、3×DCM 洗涤,且用 30ml 的 20%哌啶 /DMF 对 Fmoc 基团进行脱保护 30 分钟。

[0645] C10-hArg(diBoc)-树脂。Fmoc 脱保护后,用 3×DCM、2×MeOH 和 3×DCM 洗涤树脂,为了进行耦合反应,加入含 1.48g (11.7mmol) 的癸酸 (Sigma, $M_w = 127.27$)、5.54g (11.7mmol) 的 HCTU ($M_w = 473.7$) 和 2.23ml (12.87mmol) 的 DIPEA ($M_w = 129.2$, $d = 0.74$) 的 30ml DMF。

[0646] 反应 1 小时后,用 3×DCM、2×MeOH 和 3×DCM 洗涤树脂,反应进程通过阴性的 Kaiser 试验 (无游离胺基存在) 检测。

[0647] 用 1% TFA/DCM (以 5X 30ml 进行 2 分钟,用 2ml 10%哌啶 /MeOH 过滤至烧瓶中) 从树脂上切下 C10-hArg(diBoc)-OH ($M_w = 541.78$),并将溶剂蒸发。

[0648] C10-hArg(diBoc)-C10 ($M_w = 682.08$)。在溶液中进行二次偶联。向上述反应获得的油状残余物中添加含 2.32ml (11.7mmol) 的 C10-胺 (Sigma, $M_w = 157.3$, $d = 0.792$)、5.54g (11.7mmol) 的 HCTU ($M_w = 473.7$) 和 2.23ml (12.87mmol) 的 DIPEA ($M_w = 129.2$, $d = 0.74$) 的 50ml DMF。1 小时后,加入 100ml 的 AcOEt,在分液漏斗中用 3X 0.5M HCl、3X 10% NaCO_3 和 3X NaCl 洗涤有机层。AcOEt 层用无水 MgSO_4 干燥并蒸发。

[0649] C10-hArg-C10 ($M_w = 481.8$) :向上述反应获得的油状残余物中加入 100ml 的 95% TFA/DCM 2.5% TIS,1 小时后,将溶剂蒸发。将残余物溶解在 MeOH/0.5 M HCl (1 : 1) 中,并用 H_2O 沉淀。

[0650] 实施例 9

[0651] 制备 C12-高 Arg-C12

[0652] N-(6-胍基-1-氧代-1-(十二烷基氨基)己-2-基)十二酰胺

[0653] 以与实施例 8 相同的方式制备 C12-高 Arg-C12 (产量:1g)。

[0654] 实施例 10

[0655] 制备 C8-正-正 Arg-C8

[0656] N-(3-胍基-1-氧代-1-(辛烷基氨基)丙-2-基)辛酰胺

[0657] Fmoc-Dap(Boc)-树脂。向用于固相合成的 30ml 反应器中的 3g 含以 1.3mmol/g 取代 (Novabiochem, 01-64-0114) 的 2-氯化三苯甲基氯化物树脂的 30ml 干 DCM 中,加入 2.5g (5.85mmol, 1.5eq) 的 Fmoc-Dap(Boc)-OH ($M_w = 426.5$, (Fmoc-(N- β -Boc)-L- α , β -二氨基丙酸)、AnaSpec, 22140) 和 2.03ml (11.7mmol, 3.0eq) 的 DIPEA (Aldrich, $M_w = 129.2$, $d = 0.74$)。

[0658] Dap-(Boc)-树脂。2 小时后,用 DCM/MeOH/DIPEA (17 : 2 : 1) 洗涤该树脂三次,用 3X DCM、2X DMF、3X DCM 洗涤,且用 30ml 的 20% 哌啶 /DMF 对 Fmoc 基团进行脱保护 30 分钟。

[0659] C8-Dap(Boc)-树脂。Fmoc 脱保护后,用 3X DCM、2X MeOH 和 3X DCM 洗涤树脂,为了进行耦合反应,加入含 1.236ml (11.7mmol) 的 C8 酸 (Sigma, $M_w = 144.22$, $d = 0.910$)、4.84g (11.7mmol) 的 HCTU ($M_w = 413.7$) 和 2.23ml (12.87mmol) 的 DIPEA ($M_w = 129.2$, $d = 0.74$) 的 30ml DMF。

[0660] 反应 1 小时后,用 3X DCM、2X MeOH 和 3X DCM 洗涤树脂,反应进程通过阴性的 Kaiser 试验 (无游离胺基存在) 检测。

[0661] 用 1% TFA/DCM (以 5X 30ml 进行 2 分钟,用 2ml 10% 哌啶 /MeOH 过滤至烧瓶中) 从树脂上切下 C8-Dap(Boc)-OH ($M_w = 330.49$),并将溶剂蒸发。

[0662] C8-Dap(Boc)-C8 ($M_w = 441.74$)。在溶液中进行二次偶联。向上述反应获得的油状残余物中添加含 2.32ml (11.7mmol) 的 C8-胺 (Sigma, $M_w = 129.25$, $d = 0.782$)、4.84g (11.7mmol) 的 HCTU ($M_w = 473.7$) 和 2.23ml (12.87mmol) 的 DIPEA ($M_w = 129.2$, $d = 0.74$) 的 50ml DMF。1 小时后,加入 100ml 的 AcOEt,在分液漏斗中用 3X 0.5M HCl、3X 10% NaCO_3 和 3X NaCl 洗涤有机层。AcOEt 层用无水 MgSO_4 干燥并蒸发。

[0663] C8-Dap-C8 ($M_w = 341.74$) :向上述反应获得的油状残余物中加入 100ml 的 80% TFA/DCM 2.5% TIS,1 小时后,将溶剂蒸发。

[0664] C8-正-正 Arg(diBoc)-C8 ($M_w = 583.74$)。将残余物溶解在 50ml 的 DCM 中,用 TEA

将 pH 调到 9。加入 2.23g (5.85mM, 1.5eq) 的 1,3-二-Boc-2-(三氟甲基磺酰)胍 ($M_w = 391.36$, Aldrich 15033), 4 小时后将 DCM 蒸发。

[0665] C8-正-正 Arg-C8 ($M_w = 384.8$): 向上述反应获得的油状残余物中加入 100ml 的 95% TFA/DCM 2.5% TIS, 3 小时后, 将溶剂蒸发。将残余物溶解在 MeOH/AcCN/0.5M HCl (1 : 1 : 1) 中, 并用 C18 Phenomenex 柱上的 RP_AktaExplorer (Phenomenex RP, 250×21.2mm, 序列号 234236-1, 柱体积 83ml) 纯化, 以 3CV 内的水作为流动相, 用 50-100% 乙腈梯度洗脱; $\lambda = 215\text{nm}$ 下。将乙腈蒸发, 并将产物冻干。

[0666] 实施例 11

[0667] 制备 C10-正-正 Arg-C10

[0668] N-(3-胍基-1-氧代-1-(癸烷基氨基)丙-2-基)癸酰胺

[0669] Fmoc-Dap(Boc)-树脂。向用于固相合成的 30ml 反应器中的 3.0g 含以 1.3mmol/g 取代 (Novabiochem, 01-64-0114) 的 2-氯化三苯甲基氯化物树脂的 30ml 干 DCM 中, 加入 2.5g (5.85mmol, 1.5eq) 的 Fmoc-Dap(Boc)-OH ($M_w = 426.5$, (Fmoc-(N- β -Boc)-L- α , β -二氨基丙酸), AnaSpec 22140) 和 2.03ml (11.7mmol, 3.0eq) 的 DIPEA (Aldrich, $M_w = 129.2$, $d = 0.74$)。

[0670] Dap(Boc)-树脂。2 小时后, 用 DCM/MeOH/DIPEA (17 : 2 : 1) 洗涤该树脂三次, 用 3xDCM、2xDMF、3xDCM 洗涤, 用 30ml 的 20% 哌啶 /DMF 对 Fmoc 基团进行脱保护 30 分钟。

[0671] C10-Dap(Boc)-树脂。Fmoc 脱保护后, 用 3×DCM、2×MeOH 和 3×DCM 洗涤树脂, 为了进行耦合反应, 加入含 1.48g (11.7mmol) 的癸酸 (Sigma, $M_w = 172.27$)、4.83g (11.7mmol) 的 HCTU ($M_w = 413.7$) 和 2.23ml (12.87mmol) 的 DIPEA ($M_w = 129.2$, $d = 0.74$) 的 30ml DMF。

[0672] 反应 1 小时后, 用 3×DCM、2×MeOH 和 3×DCM 洗涤树脂, 反应进程通过阴性的 Kaiser 试验 (无游离胺基存在) 检测。

[0673] 用 1% TFA/DCM (以 5X 30ml 进行 2 分钟, 用 2ml 10% 哌啶 /MeOH 过滤至烧瓶中) 从树脂上切下 C10-Dap(Boc)-OH ($M_w = 357.54$), 并将溶剂蒸发。

[0674] C10-Dap(Boc)-C10 ($M_w = 496.84$)。在溶液中进行二次耦合。向上述反应获得的油状残余物中添加含 2.32ml (11.7mmol) 的 C10-胺 (Sigma, $M_w = 157.3$, $d = 0.792$)、4.83g (11.7mmol) 的 HCTU ($M_w = 473.7$) 和 2.23ml (12.87mmol) 的 DIPEA ($M_w = 129.2$, $d = 0.74$) 的 50ml DCM。2 小时后, 加入 100ml 的 AcOEt, 在分液漏斗中用 3X 0.5M HCl、3X 10% NaCO_3 和 3X NaCl 洗涤有机层。AcOEt 层用无水 MgSO_4 干燥并蒸发。

[0675] C10-Dap-C10 ($M_w = 397.8$)。向上述反应获得的油状残余物, 加入 100ml 的 80% TFA/DCM 2.5% TIS, 1 小时后, 将溶剂蒸发。

[0676] C10-正-正 Arg(diBoc)-C10 ($M_w = 640.8$)。将残余物溶解在 50ml 的 DCM 中, 用 TEA 将 pH 调到 9。加入 2.23g (5.85mM, 1.5eq) 的 1,3-二-Boc-2-(三氟甲基磺酰)胍 ($M_w = 391.36$, Aldrich 15033), 4 小时后将 DCM 蒸发。

[0677] C10-正-正 Arg-C10 ($M_w = 439.8$): 向上述反应获得的油状残余物中添加 100ml 的 80% TFA/DCM 2.5% TIS, 1 小时后, 将溶剂蒸发。将残余物溶解在 AcCN/MeOH/0.5M HCl (1 : 1 : 1) 中, 并用 C18 Phenomenex 柱上的 RP_AktaExplorer (Phenomenex RP, 250×21.2mm, 序列号 234236-1, 柱体积 83ml) 纯化, 以 3CV 内的水作为流动相, 用 50-100% 乙腈梯度洗脱; $\lambda = 215\text{nm}$ 。将乙腈蒸发, 并将产物冻干。产量: 1.6g。

[0678] 实施例 12**[0679] 制备 C12- 正 - 正 Arg-C12****[0680] N-(3- 胍基 -1- 氧代 -1-(十二烷基氨基) 丙 -2- 基) 十二酰胺**

[0681] Fmoc-Dap(Boc)- 树脂。向用于固相合成的 30ml 反应器中含 3.0g 以 1.3mmol/g 取代 (Novabiochem, 01-64-0114) 的 2- 氯化三苯甲基氯化物树脂的 30ml 干 DCM 中, 加入 2.5g (5.85mmol, 1.5eq) 的 Fmoc-Dap(Boc)-OH ($M_w = 426.5$, (Fmoc-(N- β -Boc)-L- α , β -二氨基丙酸), AnaSpec, 22140) 和 2.03ml (11.7mmol, 3.0eq) 的 DIPEA (Aldrich, $M_w = 129.2$, $d = 0.74$)。

[0682] Dap(Boc)- 树脂。2 小时后, 用 DCM/MeOH/DIPEA (17 : 2 : 1) 洗涤该树脂三次, 用 3 $\times$ DCM、2 $\times$ DMF、3 $\times$ DCM 洗涤, 且用 30ml 的 20% 哌啶 /DMF 对 Fmoc 基团进行脱保护 30 分钟。

[0683] C12-Dap(Boc)- 树脂。Fmoc 脱保护后, 用 3 $\times$ DCM、2 $\times$ MeOH 和 3 $\times$ DCM 洗涤树脂, 为了进行耦合反应, 加入含 2.34g (11.7mmol) 的 C12- 酸 (Sigma, $M_w = 200.32$)、4.48g (11.7mmol) 的 HCTU ($M_w = 473.7$) 和 2.23ml (12.87mmol) 的 DIPEA ($M_w = 129.2$, $d = 0.74$) 的 30ml DMF。

[0684] 反应 1 小时后, 用 3 $\times$ DCM、2 $\times$ MeOH 和 3 $\times$ DCM 洗涤树脂, 反应进程通过阴性的 Kaiser 试验 (无游离胺基存在) 检测。

[0685] 用 1% TFA/DCM (以 5X 30ml 进行 2 分钟, 用 2ml 10% 哌啶 /MeOH 过滤至烧瓶中) 从树脂上切下 C12-Dap(Boc)-OH ($M_w = 386.59$), 并将溶剂蒸发。

[0686] C12-Dap(Boc)-C12 ($M_w = 553.95$)。在溶液中进行二次耦合。向上述反应获得的油状残余物中添加含 2.168g (11.7mmol) 的 C12- 胺 (Sigma, $M_w = 185.36$)、4.48g (11.7mmol) 的 HCTU ($M_w = 473.7$) 和 2.23ml (12.87mmol) 的 DIPEA ($M_w = 129.2$, $d = 0.74$) 的 50ml DMF。1 小时后, 加入 100ml 的 AcOEt, 在分液漏斗中用 3X 0.5M HCl、3X 10% NaCO₃ 和 3X NaCl 洗涤有机层。AcOEt 层用无水 MgSO₄ 干燥并蒸发。

[0687] C12-Dap-C12 ($M_w = 453.9$)。向上述反应获得的油状残余物, 加入 100ml 的 80% TFA/DCM 2.5% TIS, 1 小时后, 将溶剂蒸发。

[0688] C12- 正 - 正 Arg(diBoc)-C12 ($M_w = 696.13$)。将残余物溶解在 50ml 的 DCM 中, 用 TEA 将 pH 调到 9。加入 2.23g (5.85mmol, 1.5eq) 的 1,3- 二 -Boc-2-(三氟甲基磺酰) 胍 ($M_w = 391.36$, Aldrich 15033), 4 小时后将 DCM 蒸发。

[0689] 实施例 13**[0690] 制备 C8- 正 Arg-C8****[0691] N-(4- 胍基 -1- 氧代 -1-(辛基氨基) 丁 -2- 基) 辛酰胺**

[0692] Fmoc-Dab(Boc)- 树脂。向用于固相合成的 30ml 反应器中的含 3.0g 以 1.3mmol/g 取代 (Novabiochem, 01-64-0114) 的 2- 氯化三苯甲基氯化物树脂的 30ml 干 DCM 中, 加入 2.577g (5.85mmol, 1.5eq) 的 Fmoc-Dab(diBoc)-OH ($M_w = 440.5$, (Fmoc-(N- γ -Boc)-L- α , γ -二氨基丁酸, AnaSpec, 28246) 和 2.23ml (12.87mmol, 3.3eq) 的 DIPEA (Aldrich, $M_w = 129.2$, $d = 0.74$)。

[0693] Arg-Dab(Boc)- 树脂。2 小时后, 用 DCM/MeOH/DIPEA (17 : 2 : 1) 洗涤该树脂三次, 用 3 $\times$ DCM、2 $\times$ DMF、3 $\times$ DCM 洗涤, 且用 30ml 的 20% 哌啶 /DMF 对 Fmoc 基团进行脱保护 30 分钟。

[0694] C8-Dab(Boc)-树脂。Fmoc 脱保护后,用 3×DCM、2×MeOH 和 3×DCM 洗涤树脂,为了进行耦合反应,加入含 1.48g(11.7mmol)的 C8 酸(Sigma, $M_w = 144.22$, $d = 0.910$)、4.84g(11.7mmol)的 HCTU($M_w = 413.7$)和 2.23ml(12.87mmol)的 DIPEA($M_w = 129.2$, $d = 0.74$)的 30ml DMF。

[0695] 反应 1 小时后,用 3×DCM、2×MeOH 和 3×DCM 洗涤树脂,反应进程通过阴性的 Kaiser 试验(无游离胺基存在)检测。

[0696] 用 1% TFA/DCM(以 5X 30ml 进行 2 分钟,用 2ml 10% 哌啶/MeOH 过滤至烧瓶中)从树脂上切下 C8-Dab(Boc)-OH($M_w = 344.49$),并将溶剂蒸发。

[0697] C8-Dab(Boc)-C8($M_w = 455.74$)。在溶液中进行二次耦合。向上述反应获得的油状残余物中添加含 2.32ml(11.7mmol)的 C8-胺(Sigma, $M_w = 129.25$, $d = 0.782$)、4.84g(11.7mmol)的 HCTU($M_w = 473.7$)和 2.23ml(12.87mmol)的 DIPEA($M_w = 129.2$, $d = 0.74$)的 50ml DMF。1 小时后,加入 100ml 的 AcOEt,在分液漏斗中用 3X 0.5M HCl、3X 10% NaCO₃ 和 3X NaCl 洗涤有机层。AcOEt 层用无水 MgSO₄ 干燥并蒸发。

[0698] C8-Dab-C8($M_w = 355.74$)。向上述反应获得的油状残余物,加入 100ml 的 80% TFA/DCM 2.5% TIS,1 小时后,将溶剂蒸发。

[0699] C8-正 Arg(diBoc)-C8($M_w = 597.74$)。将残余物溶解在 50ml 的 DCM 中,用 TEA 将 pH 调到 9。加入 2.23g(5.85mM, 1.5eq)的 1,3-二-Boc-2-(三氟甲基磺酰)胍($M_w = 391.36$, Aldrich 15033),4 小时后将 DCM 蒸发。

[0700] C8-正 Arg-C8($M_w = 398.8$):向上述反应获得的油状残余物中加入 100ml 的 95% TFA/DCM 2.5% TIS,3 小时后,将溶剂蒸发。将残余物溶解在 MeOH/AcCN/0.5M HCl(1 : 1 : 1)中,并用 C18 Phenomenex 柱上的 RP_AktaExplorer(Phenomenex RP, 250×21.2mm, 序列号 234236-1, 柱体积 83ml)纯化,以 3CV 内的水作为流动相,用 50-100% 乙腈梯度洗脱; $\lambda = 215\text{nm}$ 。将乙腈蒸发,并将产物冻干。产量:1.1g。

[0701] 实施例 14

[0702] 以与实施例 13 相同的方式制备 C10-正 Arg-C10(产量:1.2g)、C12-正 Arg-C12(产量:2.9g)、C14-正 Arg-C14(产量:630mg)和 C16-正 Arg-C16(产量:1.0g)。

[0703] 实施例 15

[0704] 制备 C12-正 Arg-C12

[0705] N-(4-胍基-1-氧代-1-(十二烷基氨基)丁-2-基)十二酰胺

[0706] Fmoc-Dab(Boc)-树脂。向用于固相合成的 500ml 反应器中的含 8g 以 1.3mmol/g 取代(Novabiochem, 01-64-0114)的 2-氯化三苯甲基氯化物树脂的 100ml 干 DCM,加入 5g(11.35mmol, 1.2eq)的 Fmoc-Dab(Boc)-OH($M_w = 440.5$, (Fmoc-(N- γ -Boc)-L- α , γ -二氨基丁酸, AnaSpec, 28246)和 4ml(22.7mmol, 2.0eq)的 DIPEA(Aldrich, $M_w = 129.2$, $d = 0.74$)。

[0707] Dab(Boc)-树脂。在混合器上振荡 2 小时后,用 DCM/MeOH/DIPEA(17 : 2 : 1)洗涤树脂三次,用 3×DCM、2×DMF、3×DCM 洗涤,且用 50ml 的 20% 哌啶/DMF 对 Fmoc 基团进行脱保护 2 次,每次 15 分钟。

[0708] C12-Dab(Boc)-树脂。Fmoc 脱保护后,用 3×DCM、2×MeOH 和 3×DCM 洗涤树脂,为了进行耦合反应,加入含 4.54g(22.7mmol)的 C12-酸(Sigma, $M_w = 200.32$)、

9.48g (22.7mmol) 的 HCTU ($M_w = 413.7$) 和 4.52ml (26mmol) 的 DIPEA ($M_w = 129.2$, $d = 0.74$) 的 100ml DMF。

[0709] 反应 1 小时后, 用 $3 \times \text{DCM}$ 、 $2 \times \text{MeOH}$ 和 $3 \times \text{DCM}$ 洗涤树脂, 反应进程通过阴性的 Kaiser 试验 (无游离胺基存在) 检测。

[0710] 用 1% TFA/DCM (以 $5 \times 50\text{ml}$ 进行 2 分钟, 用 2ml 10% 哌啶 /MeOH 过滤至烧瓶中) 从树脂上切下 C12-Dab(Boc)-OH ($M_w = 400.59$), 并将溶剂蒸发。

[0711] C12-Dab(Boc)-C12 ($M_w = 567.95$)。在溶液中进行二次偶联。向上述反应获得的油状残余物中添加含 2.168g (11.7mmol) 的 C12-胺 (Sigma, $M_w = 185.36$), 4.48g (11.7mmol) 的 HCTU ($M_w = 413.7$) 和 2.23ml (12.87mmol) 的 DIPEA ($M_w = 129.2$, $d = 0.74$) 的 50ml DMF。1 小时后, 加入 100ml 的 AcOEt, 在分液漏斗中用 $3 \times 0.1\text{M HCl}$ 、 $3 \times 5\% \text{NaCO}_3$ 和 $3 \times \text{NaCl}$ 洗涤有机层。AcOEt 层用无水 MgSO_4 干燥并蒸发。

[0712] C12-Dab-C12 ($M_w = 467.9$)。向上述反应获得的油状残余物中加入 150ml 的 80% TFA/DCM 2.5% TIS, 1 小时后, 将溶剂蒸发。

[0713] C12-正 Arg(diBoc)-C12 ($M_w = 710.13$)。将残余物溶解在 50ml 的 DCM 中, 用 TEA 将 pH 调到 9-10。加入 9g (23mM) 的 1,3-二-Boc-2-(三氟甲基磺酰) 胍 ($M_w = 391.36$, Aldrich 15033), 3 小时后将 DCM 蒸发。在 TELEDYNE IscoCombiFlash R_f 仪器上纯化产物, 并使用 120g 正相硅胶柱、5.4CV (柱体积) 的 100% DCM 和 6.3CV 的 0-5% MeOH, 检测波长 215nm, 流速 70ml/分钟。

[0714] C12-正 Arg-C12 ($M_w = 509.92$) : 向上述反应获得的油状残余物中加入 150ml 的 70% TFA/DCM 2.5% TIS, 1 小时后, 将溶剂蒸发。用 0.5M HCl 沉淀残余物。

[0715] 实施例 16

[0716] 制备 C18-正 Arg-C18

[0717] N-(4-胍基-1-氧代-1-(十八烷基氨基)丁-2-基)十八酰胺

[0718] Fmoc-Dab(Boc)-树脂。向用于固相合成的 30ml 反应器中的 3.0g 含以 1.3mmol/g 取代 (Novabiochem, 01-64-0114) 的 2-氯化三苯甲基氯化物树脂的 30ml 干 DCM 中, 加入 2.577g (5.85mmol, 1.5eq) 的 Fmoc-Dab(Boc)-OH ($M_w = 440.5$, (Fmoc-(N- γ -Boc)-L- α , γ -二氨基丁酸, AnaSpec, 28246) 和 2.03ml (11.7mmol, 3.0eq) 的 DIPEA (Aldrich, $M_w = 129.2$, $d = 0.74$)。

[0719] Dab(Boc)-树脂。2 小时后, 用 DCM/MeOH/DIPEA (17 : 2 : 1) 洗涤该树脂三次, 用 $3 \times \text{DCM}$ 、 $2 \times \text{DMF}$ 、 $3 \times \text{DCM}$ 洗涤, 且用 30ml 的 20% 哌啶 /DMF 对 Fmoc 基团进行脱保护 30 分钟。

[0720] C18-Dab(Boc)-树脂。Fmoc 脱保护后, 用 $3 \times \text{DCM}$ 、 $2 \times \text{MeOH}$ 和 $3 \times \text{DCM}$ 洗涤树脂三次, 为了进行耦合反应, 加入含 2.21g (7.8mmol) 的 C18 酸 (Sigma, $M_w = 284.48$)、3.32g (7.8mmol) 的 HCTU ($M_w = 473.7$) 和 1.49ml (8.58mmol) 的 DIPEA ($M_w = 129.2$, $d = 0.74$) 的 30ml DMF。

[0721] 反应 1 小时后, 用 $3 \times \text{DCM}$ 、 $2 \times \text{MeOH}$ 和 $3 \times \text{DCM}$ 洗涤树脂, 反应进程通过阴性的 Kaiser 试验 (无游离胺基存在) 检测。

[0722] 用 1% TFA/DCM (以 $5 \times 30\text{ml}$ 进行 2 分钟, 用 2ml 10% 哌啶 /MeOH 过滤至烧瓶中) 从树脂上切下 C18-Dab(Boc)-OH ($M_w = 568.56$), 并将溶剂蒸发。

[0723] C18-Dab(Boc)-C18 ($M_w = 735.95$)。在溶液中进行二次偶联。向上述反应获得的

油状残余物中添加含 2.1g (7.8mmol) 的 C18-胺 (Sigma, $M_w = 269.52$), 3.32g (7.8mmol) 的 HCTU ($M_w = 473.7$) 和 1.49ml (8.58mmol) 的 DIPEA ($M_w = 129.2$, $d = 0.74$) 的 50ml DMF。1 小时后, 加入 100ml 的 AcOEt, 在分液漏斗中用 3X 0.5M HCl、3X 10% NaCO₃ 和 3X NaCl 洗涤有机层。AcOEt 层用无水 MgSO₄ 干燥并蒸发。

[0724] C18-Dab-C18 ($M_w = 635.9$)。向上述反应获得的油状残余物中加入 100ml 的 80% TFA/DCM 2.5% TIS, 1 小时后, 将溶剂蒸发。

[0725] C18-正 Arg(diBoc)-C18 ($M_w = 872.13$)。将残余物溶解在 50ml 的 DCM 中, 用 TEA 将 pH 调到 9。加入 2.23g (5.85mM, 1.5eq) 的 1,3-二-Boc-2-(三氟甲基磺酰) 胍 ($M_w = 391.36$, Aldrich 15033), 4 小时后将 DCM 蒸发。

[0726] C18-正 Arg-C18 ($M_w = 677.92$) : 向上述反应获得的油状残余物中加入 100ml 的 95% TFA/DCM 2.5% TIS, 3 小时后, 将溶剂蒸发。用 AcCN/0.5M HCl (1 : 1) 混合物沉淀残余物。

[0727] 实施例 17

[0728] 制备 C18(油酰)-正 Arg-C8

[0729] N-(4-胍基-1-氧代-1-(辛烷基氨基)丁-2-基)十八-9-烯酰胺

[0730] Fmoc-Dab(Boc)-树脂。向用于固相合成的 50ml 反应器中的含 5g 以 1.3mmol/g 取代 (Novabiochem, 01-64-0114) 的 2-氯化三苯甲基氯化物树脂的 50ml 干 DCM, 加入 5.726g (13mmol, 2eq) 的 Fmoc-Dab(Boc)-OH ($M_w = 440.5$, (Fmoc-(N- γ -Boc)-L- α , γ -二氨基丁酸, AnaSpec, 28246) 和 2.26ml (13mmol, 2.0eq) 的 DIPEA (Aldrich, $M_w = 129.2$, $d = 0.74$)。

[0731] Dab(Boc)-树脂。2 小时后, 用 DCM/MeOH/DIPEA (17 : 2 : 1) 洗涤该树脂三次, 用 3X DCM、2X DMF、3X DCM 洗涤, 且用 40ml 的 20% 哌啶 /DMF 对 Fmoc 基团进行脱保护 2 次, 每次 30 分钟。

[0732] C18 油酰-Dab(Boc)-树脂。Fmoc 脱保护后, 用 3X DCM、2X MeOH 和 3X DCM 洗涤树脂, 为了进行耦合反应, 加入含 3.7g (13mmol) 的油酸 (Sigma, $M_w = 282.47$, $d = 0.891$)、5.37g (13mmol) 的 HCTU ($M_w = 413.7$) 和 2.62ml (13mmol) 的 DIPEA ($M_w = 129.2$, $d = 0.74$) 的 50ml DMF。

[0733] 反应 2 小时后, 树脂用 3X DCM、2X MeOH 和 3X DCM 洗涤, 反应进程通过阴性的 Kaiser 试验 (无游离胺基存在) 检测。

[0734] 用 1% TFA/DCM (以 5X 50ml 进行 2 分钟, 用 2ml 10% 哌啶 /MeOH 过滤至烧瓶中) 从树脂上切下 C18 油酰-Dab(Boc)-OH ($M_w = 538.56$), 并将溶剂蒸发。

[0735] C18 油基-Dab(Boc)-C8 ($M_w = 594.01$)。在溶液中进行二次耦合。向上述反应获得的油状残余物中添加含 1.227g (9.75mmol) 的 C8-胺 (Sigma, $M_w = 129.25$)、4.033g (9.75mmol) 的 HCTU ($M_w = 413.7$) 和 1.69ml (9.75mmol) 的 DIPEA ($M_w = 129.2$, $d = 0.74$) 的 50ml DMF。4 小时后, 加入 100ml 的 AcOEt, 在分液漏斗中用 3X 0.5M HCl、3X 10% NaCO₃ 和 3X NaCl 洗涤有机层。AcOEt 层用无水 MgSO₄ 干燥并蒸发。

[0736] C18 油基-Dab-C8 ($M_w = 493.92$)。向上述反应获得的油状残余物中加入 70ml 的 80% TFA/DCM 2.5% TIS, 20 分钟后减压除去溶剂。

[0737] C18 油基-正 Arg(diBoc)-C8 ($M_w = 735.95$)。将残余物溶解在 50ml 的 DCM 中, 用

TEA 将 pH 调到 9。加入 2.543g (6.5mM, 1eq) 的 1,3-二-Boc-2-(三氟甲基磺酰)胍 ($M_w = 391.36$, Aldrich 15033), 4 小时后将 DCM 蒸发。

[0738] C18 油基-正 Arg-C8 ($M_w = 535.89$): 向上述反应获得的油状残余物中加入 100ml 的 80% TFA/DCM 2.5% TIS, 20 分钟后将溶剂蒸发。将粗产物用在 TELEDYNE Isco CombiFlash R_f 仪器上纯化, 利用 40g 正相硅胶柱、3CV (柱体积) 的 100% DCM 和 7CV 的 0-15% MeOH, 检测波长 214nm, 流速 45ml/分钟, TLC: $R_f = 0.2$ (CH_2Cl_2 : MeOH = 9:1)。将 DCM/MeOH 蒸发和用 0.1M HCl 沉淀残余物。产量: 0.7g。

[0739] 实施例 18

[0740] 制备 C18 (油酰)-正 Arg-C12

[0741] N-(4-胍基-1-氧代-1-(十二烷基氨基)丁-2-基)十八-9-烯酰胺

[0742] Fmoc-Dab(Boc)-树脂。向用于固相合成的 50ml 反应器中的含 5g 以 1.3mmol/g 取代 (Novabiochem, 01-64-0114) 的 2-氯化三苯甲基氯化物树脂的 50ml 干 DCM, 加入 5.726g (13mmol, 2eq) 的 Fmoc-Dab(Boc)-OH ($M_w = 440.5$, (Fmoc-(N- γ -Boc)-L- α , γ -二氨基丁酸, AnaSpec, 28246) 和 2.26ml (13mmol, 2.0eq) 的 DIPEA (Aldrich, $M_w = 129.2$, $d = 0.74$)。

[0743] Dab(Boc)-树脂。2 小时后, 用 DCM/MeOH/DIPEA (17:2:1) 洗涤该树脂三次, 用 3 $\times$ DCM、2 $\times$ DMF、3 $\times$ DCM 洗涤, 且用 40ml 的 20% 哌啶/DMF 对 Fmoc 基团进行脱保护 2 次, 每次 30 分钟。

[0744] C18 油酰-Dab(Boc)-树脂。Fmoc 脱保护后, 用 3 $\times$ DCM、2 $\times$ MeOH 和 3 $\times$ DCM 洗涤树脂, 为了进行耦合反应, 加入含 3.7g (13mmol) 的油酸 (Sigma, $M_w = 282.47$, $d = 0.891$)、5.37g (13mmol) 的 HCTU ($M_w = 413.7$) 和 2.62ml (13mmol) 的 DIPEA ($M_w = 129.2$, $d = 0.74$) 的 50ml DMF。

[0745] 反应 2 小时后, 用 3 $\times$ DCM、2 $\times$ MeOH 和 3 $\times$ DCM 洗涤树脂, 反应进程通过阴性的 Kaiser 试验 (无游离胺基存在) 检测。

[0746] 用 1% TFA/DCM (以 5X 50ml 进行 2 分钟, 用 2ml 10% 哌啶/MeOH 过滤至烧瓶中) 从树脂上切下 C18 油基-Dab(Boc)-OH ($M_w = 538.56$), 并将溶剂蒸发。

[0747] C18 油酰-Dab(Boc)-C12 ($M_w = 650.03$)。在溶液中进行二次耦合。向上述反应获得的油状残余物添加含 1.76g (9.75mmol) 的 C12-胺 (Sigma, $M_w = 185.36$)、4.033g (9.75mmol) 的 HCTU ($M_w = 413.7$) 和 1.69ml (9.75mmol) 的 DIPEA ($M_w = 129.2$, $d = 0.74$) 的 50ml DMF。4 小时后, 加入 100ml 的 AcOEt, 在分液漏斗中用 3X 0.5M HCl、3X 10% $NaCO_3$ 和 3X NaCl 洗涤有机层。AcOEt 层用无水 $MgSO_4$ 干燥并蒸发。

[0748] C18 油酰-Dab-C12 ($M_w = 549.91$)。向上述反应获得的油状残余物中加入 70ml 的 80% TFA/DCM 2.5% TIS, 20 分钟后减压除去溶剂。

[0749] C18 油酰-正 Arg(diBoc)-C12 ($M_w = 792.5$)。将残余物溶解在 50ml 的 DCM 中, 用 TEA 将 pH 调到 9。加入 2.543g (6.5mM, 1eq) 的 1,3-二-Boc-2-(三氟甲基磺酰)胍 ($M_w = 391.36$, Aldrich 15033), 4 小时后将 DCM 蒸发。

[0750] C18 油基-正 Arg-C12 ($M_w = 591.55$): 向上述反应获得的油状残余物中加入 100ml 的 80% TFA/DCM 2.5% TIS, 20 分钟后将溶剂蒸发。将粗产物在 TELEDYNE Isco CombiFlash R_f 仪器上化, 利用 40g 正相硅胶柱、3CV (柱体积) 的 100% DCM 和 10CV 的 0-20% MeOH, 检

测波长 214nm, 流速 45ml/ 分钟。将 TLC :Rf = 0.2(CH₂Cl₂ : MeOH = 9 : 1)DCM/MeOH 蒸发, 用 0.1M HCl 沉淀残余物。

[0751] 实施例 19

[0752] 制备 C18(油酰)-正 Arg-C16

[0753] N-(4-胍基-1-氧代-1-(十六烷基氨基)丁-2-基)十八-9-烯酰胺

[0754] Fmoc-Dab(Boc)-树脂。向用于固相合成的 50ml 反应器中的含 5g 以 1.3mmol/g 取代 (Novabiochem, 01-64-0114) 的 2-氯化三苯甲基氯化物树脂的 50ml 干 DCM, 加入 5.726g (13mmol, 2eq) 的 Fmoc-Dab(Boc)-OH(M_w = 440.5, (Fmoc-(N-γ-Boc)-L-α, γ-二氨基丁酸, AnaSpec, 28246) 和 2.26ml (13mmol, 2.0eq) 的 DIPEA(Aldrich, M_w = 129.2, d = 0.74)。

[0755] Dab(Boc)-树脂。2 小时后, 用 DCM/MeOH/DIPEA(17 : 2 : 1) 洗涤该树脂三次, 用 3×DCM、2×DMF、3×DCM 洗涤, 且用 40ml 的 20% 哌啶 /DMF 对 Fmoc 基团进行脱保护 2 次, 每次 30 分钟。

[0756] C18 油酰-Dab(Boc)-树脂。Fmoc 脱保护后, 树脂用 3×DCM、2×MeOH 和 3×DCM 洗涤, 为了进行耦合反应, 加入含 3.7g (13mmol) 的油酸 (Sigma, M_w = 282.47, d = 0.891)、5.37g (13mmol) 的 HCTU(M_w = 413.7) 和 2.62ml (13mmol) 的 DIPEA(M_w = 129.2, d = 0.74) 的 50ml DMF。

[0757] 反应 2 小时后, 用 3×DCM、2×MeOH 和 3×DCM 洗涤树脂, 反应进程通过阴性的 Kaiser 试验 (无游离胺基存在) 检测。

[0758] 用 1% TFA/DCM(以 5X 50ml 进行 2 分钟, 用 2ml 10% 哌啶 /MeOH 过滤至烧瓶中) 从树脂上切下 C18 油基-Dab(Boc)-OH(M_w = 538.56), 并将溶剂蒸发。

[0759] C18 油酰-Dab(Boc)-C16(M_w = 705.95)。在溶液中进行二次耦联。向上述反应获得的油状残余物中添加含 2.354g (9.75mmol) 的 C16-胺 (Sigma, M_w = 241.46)、4.033g (9.75mmol) 的 HCTU(M_w = 413.7) 和 1.69ml (9.75mmol) 的 DIPEA(M_w = 129.2, d = 0.74) 的 50ml DMF。4 小时后, 加入 100ml 的 AcOEt, 在分液漏斗中用 3X 0.5M HCl、3X 10% NaCO₃ 和 3X NaCl 洗涤有机层。AcOEt 层用无水 MgSO₄ 干燥并蒸发。

[0760] C18 油酰-Dab-C16(M_w = 605.9)。向上述反应获得的油状残余物, 加入 70ml 的 80% TFA/DCM 2.5% TIS, 20 分钟后减压除去溶剂。

[0761] C18 油酰-正 Arg(diBoc)-C16(M_w = 842.13)。将残余物溶解在 50ml 的 DCM 中, 用 TEA 将 pH 调到 9。加入 2.543g (6.5mM, 1eq) 的 1,3-二-Boc-2-(三氟甲基磺酰)胍 (M_w = 391.36, Aldrich 15033), 4 小时后将 DCM 蒸发。

[0762] C18 油酰-正 Arg-C16(M_w = 647.92): 向上述反应获得的油状残余物中加入 100ml 的 80% TFA/DCM 2.5% TIS, 20 分钟后将溶剂蒸发。将粗产物在 TELEDYNE Isco CombiFlash R_f 仪器上纯化, 利用 48g 正相硅胶柱, 3CV(柱体积) 的 100% DCM 和 10CV 的 0-20% MeOH, 检测波长 214nm, 流速 45ml/ 分钟。将 DCM/MeOH 蒸发, 用 0.1M HCl 沉淀残余物。

[0763] 实施例 20

[0764] 制备 C18(油酰)-正 Arg-C18

[0765] N-(4-胍基-1-氧代-1-(十八烷基氨基)丁-2-基)十八-9-烯酰胺

[0766] Fmoc-Dab(Boc)-树脂。向用于固相合成的 60ml 反应器中的含 5g 以 1.3mmol/

g 取代 (Novabiochem, 01-64-0114) 的 2- 氯化三苯甲基氯化物树脂的 50ml 干 DCM, 加入 5.726g (13mmol, 2eq) 的 Fmoc-Dab(Boc)-OH ($M_w = 440.5$, (Fmoc-(N- γ -Boc)-L- α , γ -二氨基丁酸, AnaSpec, 28246) 和 2.26ml (13mmol, 2.0eq) 的 DIPEA (Aldrich, $M_w = 129.2$, $d = 0.74$)。

[0767] Dab(Boc)-树脂。2 小时后, 用 DCM/MeOH/DIPEA (17 : 2 : 1) 洗涤该树脂三次, 用 3×DCM、2×DMF、3×DCM 洗涤, 且用 50ml 的 20% 哌啶 /DMF 对 Fmoc 基进行脱保护 2 次, 每次 15 分钟。

[0768] C18:1-Dab(Boc)-树脂。Fmoc 脱保护后, 用 3×DCM、2×MeOH 和 3×DCM 洗涤树脂, 为了进行耦合反应, 加入含 3.7g (13mmol) 的油酸 (Sigma, $M_w = 282.47$, $d = 0.891$)、5.37g (13mmol) 的 HCTU ($M_w = 413.7$) 和 2.62ml (13mmol) 的 DIPEA ($M_w = 129.2$, $d = 0.74$) 的 50ml DMF。

[0769] 反应 1 小时后, 用 3×DCM、2×MeOH 和 3×DCM 洗涤树脂, 反应进程通过阴性的 Kaiser 试验 (无游离胺基存在) 检测。

[0770] 用 1% TFA/DCM (以 5X 50ml 进行 2 分钟, 用 2ml 10% 哌啶 /MeOH 过滤至烧瓶中) 从树脂上切下 C18:1-Dab(Boc)-OH ($M_w = 566.56$), 并将溶剂蒸发。

[0771] C18:1-Dab(Boc)-C18:1 ($M_w = 734.95$)。在溶液中进行二次耦联。向上述反应获得的油状残余物中添加含 3.725g (9.75mmol) 的油基胺 (Sigma, $M_w = 267.49$, 70%)、4.033g (9.75mmol) 的 HCTU ($M_w = 413.7$) 和 1.69ml (9.75mmol) 的 DIPEA ($M_w = 129.2$, $d = 0.74$) 的 50ml DMF。4 小时后, 加入 100ml 的 AcOEt, 在分液漏斗中用 3X 0.5M HCl、3X 10% NaCO₃ 和 3X NaCl 洗涤有机层。AcOEt 层用无水 MgSO₄ 干燥并蒸发。

[0772] C18:1-Dab-C18 ($M_w = 635.9$)。向上述反应获得的油状残余物中加入 100ml 的 80% TFA/DCM 2.5% TIS, 20 分钟后将溶剂蒸发。

[0773] C18:1-正 Arg(diBoc)-C18:1 ($M_w = 874.13$)。将残余物溶解在 50ml 的 DCM 中, 用 TEA 将 pH 调到 9。加入 2.348g (6mM, 1eq) 的 1,3-二-Boc-2-(三氟甲基磺酰) 胍 ($M_w = 391.36$, Aldrich 15033), 4 小时后将 DCM 蒸发。

[0774] C18:1-正 Arg-C18:1 ($M_w = 674.1$) : 向上述反应获得的油状残余物中加入 100ml 的 95% TFA/DCM 2.5% TIS, 3 小时后, 将溶剂蒸发。将粗产物在 TELEDYNE Isco CombiFlash R_f 仪器上纯化, 利用 48g 正相硅胶柱、3CV (柱体积) 的 100% DCM 和 10CV 的 0-20% MeOH, 检测波长 214nm, 流速 45ml/分钟。将 DCM/MeOH 蒸发, 用 0.1M HCl 沉淀残余物。产量: 3.2g。

[0775] 实施例 21

[0776] 制备 C10-[4-Pal(N-CH₃)]-C10

[0777] 4-(3-(癸烷基氨基)-3-氧代-2-癸酰胺丙基)-1-甲基吡啶氯化物

[0778] Fmoc-4-Pal-树脂。向用于固相合成的 30ml 反应器中的含 3g 以 1.3mmol/g 取代 (Novabiochem, 01-64-0114) 的 2-氯化三苯甲基氯化物树脂的 30ml 干 DCM, 加入 2.27g (5.85mmol, 1.5eq) 的 Fmoc-4-Pal-OH (Fmoc-4-吡啶丙氨酸, $M_w = 388.42$, Advanced ChemTech, FX4140) 和 2.03ml (11.7mmol, 3.0eq) 的 DIPEA (Aldrich, $M_w = 129.2$, $d = 0.74$)。

[0779] 4-Pal-树脂。2 小时后, 用 DCM/MeOH/DIPEA (17 : 2 : 1) 洗涤该树脂三次, 用 3×DCM、2×DMF、3×DCM 洗涤, 且用 30ml 的 20% 哌啶 /DMF 对 Fmoc 基团进行脱保护 30 分钟。

[0780] C10-4-Pal-树脂。Fmoc 脱保护后, 用 3×DCM、2×MeOH 和 3×DCM 洗涤树脂, 为了

进行耦合反应,加入含 1.48g(11.7mmol)的癸酸(Sigma, $M_w = 127.27$)、5.54g(11.7mmol)的 HCTU($M_w = 473.7$)和 2.23ml(12.87mmol)的 DIPEA($M_w = 129.2$, $d = 0.74$)的 30ml DMF。

[0781] 反应 1 小时后,用 3×DCM、2×MeOH 和 3×DCM 洗涤树脂,反应进程通过阴性的 Kaiser 试验(无游离胺基存在)检测。

[0782] 用 1% TFA/DCM(以 5X 30ml 进行 2 分钟,用 2ml 10% 嘧啶 /MeOH 过滤至烧瓶中)从树脂上切下 C10-4-Pal-OH($M_w = 320.46$),并将溶剂蒸发。

[0783] C10-4-Pal-C10($M_w = 459.76$)。在溶液中进行二次耦合。向上述反应获得的油状残余物中添加含 2.32ml(11.7mmol)的 C10-胺(Sigma, $M_w = 157.3$, $d = 0.792$)、5.54g(11.7mmol)的 HCTU($M_w = 473.7$)和 2.23ml(12.87mmol)的 DIPEA($M_w = 129.2$, $d = 0.74$)的 50ml DMF。1 小时后,加入 100ml 的 AcOEt,在分液漏斗中用 3X 0.5M HCl、3X 10% NaCO₃ 和 3X NaCl 洗涤有机层。AcOEt 层用无水 MgSO₄ 干燥并蒸发。将残余物溶解在 AcCN/0.5M HCl 1 : 1 中,用 C18 Phenomenex 柱上的 RP_Akta Explorer(Phenomenex RP, 250×21.2mm, 序列号 234236-1, 柱体积 83ml)纯化,以 3CV 内的水作为流动相,用 350-100% 乙腈梯度洗脱; $\lambda = 215\text{nm}$ 。将乙腈蒸发,并将产物冻干。

[0784] C10-4-Pal(Me)-C10($M_w = 474.76$)。在溶液中进行甲基化。向溶解在 20ml 的 THF 中的 0.4g(0.87mM)的 C10-4-Pal-C10($M_w = 459.76$)中加入 83 μl (0.87mmol)的二甲基硫酸盐(Sigma, $M_w = 126.13$, $d = 1.325$)。反应过夜后,加入等量的二甲基硫酸盐,1 小时后,用 0.5M HCl/AcCN 混合物沉淀产物。

[0785] 实施例 22

[0786] 制备 C12-[4-Pal(N-CH₃)]-C12

[0787] 4-(3-(十二烷基氨基)-3-氧代-2-十二烷基氨基丙基)-1-甲基吡啶氯化物

[0788] Fmoc-4-Pal-树脂。向用于固相合成的 200ml 反应器中的含 6.5g 以 1.3mmol/g 取代(Novabiochem,01-64-0114)的 2-氯化三苯甲基氯化物树脂的 70ml 干 DCM 中,加入 3.5g(9.01mmol,1.5eq)的 Fmoc-4-Pal-OH(Fmoc-4-吡啶丙氨酸, $M_w = 388.42$, Advanced ChemTech,FX4140)和 3.132ml(18mmol,2.2eq)的 DIPEA(Aldrich, $M_w = 129.2$, $d = 0.74$)。

[0789] 4-Pal-树脂。2 小时后,用 DCM/MeOH/DIPEA(17 : 2 : 1)洗涤该树脂三次,用 3×DCM、2×DMF、3×DCM 洗涤,且用 70ml 的 20% 哌啶 /DMF 对 Fmoc 基团进行脱保护 2 次,每次 15 分钟。

[0790] C12-4-Pal-树脂。Fmoc 脱保护后,用 3×DCM、2×MeOH 和 3×DCM 洗涤树脂,为了进行耦合反应,加入含 2.549g(12.675mmol,1.5eq)的月桂酸(Sigma, $M_w = 200.32$)、5.3g(12.675mmol)的 HCTU($M_w = 417.7$)和 2.2ml(12.675mmol)的 DIPEA($M_w = 129.2$, $d = 0.74$)的 70ml DMF。

[0791] 反应 1 小时后,用 3×DCM、2×MeOH 和 3×DCM 洗涤树脂,反应进程通过阴性的 Kaiser 试验(无游离胺基存在)检测。

[0792] 用 1% TFA/DCM(以 5X 30ml 进行 2 分钟,用 2ml 10% 嘧啶 /MeOH 过滤至烧瓶中)从树脂上切下 C12-4-Pal-OH($M_w = 346.7$),并将溶剂蒸发。

[0793] C12-4-Pal-C12($M_w = 515.7$)。在溶液中进行二次耦合。向上述反应获得的油状残余物中添加含 2.3g(12mmol)的 EDC·HCl($M_w = 191.7$)、1.86g(12mmol)的 HOBt·H₂O($M_w = 153.1$)和 10.44ml(60mmol,5eq)的 DIPEA($M_w = 129.2$, $d = 0.74$)的 70ml DCM。预反应步

骤进行 20 分钟,然后加入 2.22g(12mmol) 的 C12-胺 (Sigma, $M_w = 185.36$)。反应过夜后,在分液漏斗中用 $3 \times 0.5M$ HCl、 $3 \times 10\%$ $NaCO_3$ 和 $3 \times NaCl$ 洗涤有机层。DCM 用无水 $MgSO_4$ 干燥,并蒸发。在 TELEDYNE Isco CombiFlash R_f 仪器上纯化产物,并使用 40g 正相硅胶柱、5CV(柱体积)的 100% DCM 和 10CV 的 0-5% MeOH,检测波长 254nm,流速 40ml/分钟。

[0794] C12-4-Pal(Me)-C12($M_w = 530.8$)。甲基化在溶液中进行。向溶解在 50ml 的 THF 中的 4g(7.75mmol) 的 C12-4-Pal-C12($M_w = 415.7$) 中加入 1.1ml(11.625mmol) 的二甲基硫酸盐 (Sigma, $M_w = 126.13$, $d = 1.325$)。反应过夜后,加入 0.5ml 的二甲基硫酸盐,1 小时后,将溶剂蒸发,产物用 0.5M HCl 沉淀。

[0795] 实施例 23

[0796] 制备 C18 油酰-[4-Pal]-C16

[0797] N-(1-氧代-3-(吡啶-4-基)-1-(十六烷基氨基)丙-2-基)十八-9-烯酰胺

[0798] Fmoc-4-Pal-树脂。向用于固相合成的 50ml 反应器中的含 5g 以 1.3mmol/g 取代 (Novabiochem, 01-64-0114) 的 2-氯化三苯甲基氯化物树脂的 50ml 干 DCM, 加入 3.787g(9.75mmol, 1.5eq) 的 Fmoc-4-Pal-OH($M_w = 388.42$, Advanced ChemTech) 和 1.7ml(9.75mmol, 1.5eq) 的 DIPEA(Aldrich, $M_w = 129.2$, $d = 0.74$)。

[0799] 4-Pal-树脂。2 小时后,用 DCM/MeOH/DIPEA(17:2:1) 洗涤该树脂三次,用 $3 \times DCM$ 、 $2 \times DMF$ 、 $3 \times DCM$ 洗涤,且用 40ml 的 20% 哌啶/DMF 对 Fmoc 基团进行脱保护 2 次,每次 15 分钟。

[0800] C18 油酰-4-Pal-树脂。Fmoc 脱保护后,用 $3 \times DCM$ 、 $2 \times MeOH$ 和 $3 \times DCM$ 洗涤树脂,为了进行耦合反应,加入含 3.7g(13mmol) 的油酸 (Sigma, $M_w = 282.47$, $d = 0.891$)、5.37g(13mmol) 的 HCTU($M_w = 413.7$) 和 2.62ml(13mmol) 的 DIPEA($M_w = 129.2$, $d = 0.74$) 的 50ml DMF。

[0801] 反应 2 小时后,用 $3 \times DCM$ 、 $2 \times MeOH$ 和 $3 \times DCM$ 洗涤树脂,反应进程通过阴性的 Kaiser 试验(无游离胺基存在)检测。

[0802] 用 1% TFA/DCM(以 5X 50ml 进行 2 分钟,用 2ml 10% 哌啶/MeOH 过滤至烧瓶中)从树脂上切下 C18 油基-4-Pal-OH($M_w = 430.62$),并将溶剂蒸发。

[0803] C18 油酰-4-Pal-C16($M_w = 654.06$)。在溶液中进行二次耦合。向上述反应获得的油状残余物中添加含 2.354g(9.75mmol) 的 C16-胺 (Sigma, $M_w = 241.46$)、4.033g(9.75mmol) 的 HCTU($M_w = 413.7$) 和 1.69ml(9.75mmol) 的 DIPEA($M_w = 129.2$, $d = 0.74$) 的 50ml DMF。4 小时后,加入 AcOEt,在分液漏斗中用 $3 \times 0.5M$ HCl、 $3 \times 10\%$ $NaCO_3$ 和 $3 \times NaCl$ 洗涤有机层。AcOEt 层用无水 $MgSO_4$ 干燥并蒸发。将粗产物在 TELEDYNE Isco CombiFlash R_f 仪器上纯化,利用 48g 正相硅胶柱、3CV(柱体积)的 100% DCM 和 10CV 的 0-20% MeOH,检测波长 214nm,流速 45ml/分钟。将 DCM/MeOH 蒸发,用 0.1M HCl 沉淀残余物。产量:0.75g。

[0804] 实施例 24

[0805] 制备 (C18 油酰)-(1-CH₃-His)-NH-(C16 烷基)

[0806] N-(3-(1-甲基-1H-咪唑-4-基)-1-氧代-1-(十六烷基氨基)丙-2-基)十八-9-烯酰胺

[0807] Fmoc-His(1-Me)-树脂。向用于固相合成的 60ml 反应器中的含 1.7g 以 1.3mmol/

g 取代 (Novabiochem, 01-64-0114) 的 2- 氯化三苯甲基氯化物树脂的 30ml 干 DCM 中, 加入 1g (2.5mmol, 1.2eq) 的 Fmoc-His(1-Me)-OH ($M_w = 391.43$, ChemImpex) 和 0.435ml (2.5mmol, 1.2eq) 的 DIPEA (Aldrich, $M_w = 129.2$, $d = 0.74$)。

[0808] His(1-Me)-树脂。2 小时后, 用 DCM/MeOH/DIPEA (17 : 2 : 1) 洗涤该树脂三次, 用 3×DCM、2×DMF、3×DCM 洗涤, 且用 50ml 的 20% 哌啶 /DMF 对 Fmoc 基团进行脱保护 2 次, 每次 15 分钟。

[0809] C18_{油酰}-His(1-Me)-树脂。Fmoc 脱保护后, 用 3×DCM、2×MeOH 和 3×DCM 洗涤树脂, 为了进行耦合反应, 加入含 1.247g (4.4mmol) 的油酸 (Sigma, $M_w = 282.47$; $d = 0.891$)。1.82g (4.4mmol) 的 HCTU ($M_w = 413.7$) 和 0.765ml (9.1mmol) 的 DIPEA ($M_w = 129.2$, $d = 0.74$) 的 50ml DMF。

[0810] 反应 2 小时后, 用 3×DCM、2×MeOH 和 3×DCM 洗涤树脂, 反应进程通过阴性的 Kaiser 试验 (无游离胺基存在) 检测。

[0811] 用 1% TFA/DCM (以 5X 50ml 进行 2 分钟, 用 2ml 10% 哌啶 /MeOH 过滤至烧瓶中) 从树脂上切下 C18_{油基}-His(1-Me)-OH, 并将溶剂蒸发。

[0812] C18_{油酰}-His(1-Me)-C16 ($M_w = 657.07$)。在溶液中进行二次耦合。向上述反应获得的油状残余物中添加含 0.604g (2.5mmol) 的 C16 胺 (Sigma)、1.034g (2.5mmol) 的 HCTU ($M_w = 413.7$) 和 0.435ml (2.5mmol) 的 DIPEA ($M_w = 129.2$, $d = 0.74$) 的 50ml DMF。反应过夜后, 用乙酸醋酸酯稀释有机层, 在分液漏斗中用 3×0.5M HCl、3×10% NaCO₃ 和 3×NaCl 洗涤。AcOEt 层用无水 MgSO₄ 干燥并蒸发。将粗产物在 TELEDYNE Isco CombiFlash R_f 仪器上纯化, 利用 40g 正相硅胶柱、5CV (柱体积) 的 100% DCM 和 10CV 的 0-20% MeOH, 检测波长 214nm, 流速 40ml/分钟。用 0.1M HCl 沉淀纯化产物。产量: 1g。

[0813] 实施例 25

[0814] 制备 (C18 油酰)-(3', 5'-二碘-Tyr)-NH-(C16 烷基)

[0815] (E)-N-(1-(十六烷基氨基)-3-(4-羟基-3,5-二碘苯基)-1-氧丙-2-基)十八-9-烯酰胺

[0816] 建议的制备方法

[0817] Fmoc-Tyr(3', 5'-二碘)-树脂。向用于固相合成的 50ml 反应器中的含 5g 以 1.3mmol/g 取代 (Novabiochem, 01-64-0114) 的 2-氯化三苯甲基氯化物树脂的 50ml 干 DCM, 加入 6.388g (9.75mmol, 1.5eq) 的 Fmoc-Tyr(3', 5'-二 I)-OH ($M_w = 655.2$, AnaSpec) 和 1.69ml (9.75mmol, 1.5eq) 的 DIPEA (Aldrich, $M_w = 129.2$, $d = 0.74$)。

[0818] Tyr(3', 5'-二碘)-树脂。2 小时后, 用 DCM/MeOH/DIPEA (17 : 2 : 1) 洗涤该树脂三次, 用 3×DCM、2×DMF、3×DCM 洗涤, 且用 40ml 的 20% 哌啶 /DMF 对 Fmoc 基团进行脱保护 2 次, 每次 30 分钟。

[0819] C18 油酰-Tyr(3', 5'-二碘)-树脂。Fmoc 脱保护后, 用 3×DCM、2×MeOH 和 3×DCM 洗涤树脂, 为了进行耦合反应, 加入含 3.7g (13mmol) 的油酸 (Sigma, $M_w = 282.47$, $d = 0.891$)、5.37g (13mmol) 的 HCTU ($M_w = 413.7$) 和 2.62ml (13mmol) 的 DIPEA ($M_w = 129.2$, $d = 0.74$) 的 50ml DMF。

[0820] 反应 3 小时后, 用 3×DCM、2×MeOH 和 3×DCM 洗涤树脂, 反应进程通过阴性的 Kaiser 试验检测。

[0821] 用 1% TFA/DCM(以 5X 50ml 进行 2 分钟,用 2ml 10% 嘧啶 /MeOH 过滤至烧瓶中)从树脂上切下 C18 油基 -Tyr(3',5'-二碘)-OH($M_w = 697.43$),并将溶剂蒸发。

[0822] C18 油酰 -Tyr(3',5'-二碘)-C16($M_w = 920.38$)。在溶液中进行二次偶联。向上述反应获得的油状残余物中添加含 2.354g(9.75mmol) 的 C16-胺(Sigma, $M_w = 241.46$)、4.033g(9.75mmol) 的 HCTU($M_w = 413.7$) 和 1.69ml(9.75mmol) 的 DIPEA($M_w = 129.2$, $d = 0.74$) 的 50ml DMF。4 小时后,加入 100ml 的 AcOEt,在分液漏斗中用 $3 \times 0.5M$ HCl、 $3 \times 10\%$ $NaCO_3$ 和 $3 \times NaCl$ 洗涤有机层。AcOEt 层用无水 $MgSO_4$ 干燥并蒸发。将粗产物在 TELEDYNE Isco CombiFlashR_f 仪器上纯化,利用 48g 正相硅胶柱、3CV(柱体积)的 100% DCM 和 10CV 的 0-20% MeOH,检测波长 214nm,流速 45ml/分钟。将 DCM/MeOH 蒸发,用 AcCN/H₂O 混合物沉淀残余物。

[0823] 实施例 26

[0824] 实施例 在 9L 细胞中的 LacZ 基因表达敲除体外试验

[0825] 9L/LacZ 是稳定表达编码细菌半乳糖苷酶的 LacZ 基因的大鼠胶质肉瘤细胞系。LacZ 基因敲除测定可被用作干扰性 RNA 递送制剂的基于主要活性的体外试验。

[0826] 为了进行 LacZ 基因敲除测定,用 RNAi 制剂转染 9L/LacZ 细胞,并在转染 3 日后采集的细胞上进行 β -半乳糖苷酶试验。进行其它的试验来量化蛋白浓度。

[0827] 以 8000 个细胞/孔(96-孔)平铺 9L/LacZ 细胞,并在培养基中孵育过夜。转染时的融合度为约 15-20%。转染复合物的制备是通过将干扰性 RNA 加至 OptiMEM™ 培养基并搅拌,分别将递送制剂加至 OptiMEM™ 培养基并搅拌,最后将培养基中的干扰性 RNA 与培养基中的递送制剂混合,从而制成转染复合物。用新鲜的无血清培养基(无血清的 OptiMEM™)代替孵育细胞的培养基,并将转染复合物加至各孔中。细胞孵育 5 小时,然后加入 100 微升的完全培养基(DMEM 加 10% 胎牛血清)后,于 37°C 和 5% CO₂ 孵育过夜。第二天,在转染 24 小时后,将培养基换成新鲜的完全培养基,将细胞于 37°C 和 5% CO₂ 再孵育 48 小时。

[0828] 为了进行 LacZ 基因敲除,将采集的 9L/LacZ 细胞在 PBS 中洗涤,在 M-PER™ Reagent(Pierce)中裂解,并在室温下孵育 15 分钟。用 Micro BCA 试剂盒(Pierce, ThermoFisher Scientific)对采自各孔的裂解液进行蛋白分析,用 All-in-One™ β -半乳糖苷酶 Assay Reagent(Pierce)进行 β -gal 分析。

[0829] 实施例 在 A549 细胞中的 PPIB 基因表达敲除体外试验

[0830] 亲环素 B(PPIB) 基因敲除测定可被用作干扰性 RNA 递送制剂的主要活性的体外试验。亲环素 B(PPIB) 基因表达敲除是在人泡状上皮基底细胞 A549 中测定的。为了进行 PPIB 基因敲除测定,用干扰性 RNA 制剂转染 A549 细胞,转染后 24 小时制备总 RNA,并通过 RT-PCR 对 PPIB mRNA 进行分析。进行 36B4(酸性核糖体磷蛋白 P0)mRNA 表达的 QRT-PCR,从而进行标准化。

[0831] 以 7,500 个细胞/孔(96-孔)接种 A549 细胞,在培养基中过夜培养。转染时的融合度为约 50%。转染复合物的制备是通过将干扰性 RNA 加至培养基(OptiMEM™)并搅拌,分别将递送制剂加至培养基(OptiMEM™)并搅拌,最后将培养基中的干扰性 RNA 与培养基中的递送制剂混合,室温孵育 20 分钟,从而获得转染复合物。用新鲜的 OptiMEM™ 代替孵育细胞的培养基,将转染复合物加至各孔中。细胞 37°C 和 5% CO₂ 孵育 5 小时,然后添加完全培养基(至最终的胎牛血清浓度 10%),并孵育直至转染后 24 小时。

[0832] 为了进行 PPIB 基因敲除,将细胞裂解,制备 RNA(Invisorb RNA Cell HTS96-Kit/C, Invitek, Berlin, 或 RNeasy 96Kit, Qiagen)。在 DNA Engine Opticon2 热循环仪 (BioRad) 上,利用 One-Step qRT-PCR 试剂盒 (Invitrogen) 进行定量 RT-PCR。

[0833] PPIB 所用的引物是:

[0834] (SEQ ID NO :1)

[0835] 5' -GGCTCCCAGTTCTTCATCAC-3' (正向) 和

[0836] (SEQ ID NO :2)

[0837] 5' -CCTTCCGCACCACCTC-3' (反向) 以及

[0838] (SEQ ID NO :3)

[0839] 5' -FAM-CTAGATGGCAAGCATGTGGTGTGG-TAMRA-3' 作为探针。

[0840] 36B4 所用的引物是:

[0841] (SEQ ID NO :4)

[0842] 5' -TCTATCATCAACGGGTACAAACGA-3' (正向) 和

[0843] (SEQ ID NO :5)

[0844] 5' -CTTTTCAGCAAGTGGGAAGGTG-3' (反向) 以及

[0845] (SEQ ID NO :6)

[0846] 5' -FAM-CCTGGCCTTGTCTGTGGAGACGGATTA-TAMRA-3' 作为探针。

[0847] 实施例 小鼠流感病毒滴度敲除的体内试验

[0848] 小鼠体内流感病毒滴度敲除测试可被用作干扰性 RNA 氨基酸脂质递送制剂功效的体内测量标准。

[0849] 在该试验中,通常将 50uL 的 dsRNA 氨基酸脂质制剂,或作为对照组的 PBS,经鼻内施用给用克他命 / 甲苯噻嗪麻醉的 7-9 周龄的 Balb/C 小鼠。在第 -2、-1 和 0 天,每天给药,连续 3 天。在末次给药后的 4 小时诱导感染。

[0850] 流感侵染是用流感 A/Puerto Rico/8/34 (PR8, H1N1 亚型) 诱导的。为了进行感染,将 50 μ l 在 0.3% BSA/1XPBS/PS 中稀释的 20pfu PR8 经鼻内施用给用克他命 / 甲苯噻嗪麻醉的小鼠。感染 48 小时后,采集肺部,并在 600uL 0.3% BSA/1XPBS/PS 中匀浆。将匀浆液冻融两次以释放病毒。进行 TCID₅₀ 试验 (Tissue-Culture Infectious Dose 50),以便滴定肺匀浆液中的病毒。在平底 96-孔板中以 2×10^4 MDCK 细胞 / 孔接种细胞,并在 24 小时后除去含血清的培养基。将 30uL 的肺匀浆,未稀释或稀释 10^{-1} 至 10^{-7} 倍 (以 10 倍系列稀释),加入孔内,一式四份。孵育 1 小时后,将含 4 μ g/ml 胰蛋白酶的 170 μ l 的感染培养基 (DMEM/0.3% BSA/10mM HEPES/PS) 加至各孔内。在 37°C 孵育 48 小时后,通过鸡红血球的血凝集来确定培养上清液中是否存在病毒。利用 Spearman 和 Karber 公式评定病毒滴度。

[0851] 实施例 siRNA 浓度的 SYBR™ Gold 试验

[0852] 制剂中的 dsRNA 浓度可用通过如下所述的 SYBR™ Gold 试验来确定:将 10uL 的 dsRNA 制剂加至 100uL MeOH 中,并于 55°C 孵育 5 分钟。加入 50uL 肝素 (200mg/ml),将溶液于 55°C 孵育 5 分钟。加入 790uL PBS (磷酸盐缓冲液),并将样品在微型离心机中离心旋转造粒。用 10uL SYBR™ Gold 试剂 (Molecular Probes, Eugene, Oregon) 孵育 90uL 的沉淀样品。用 495nm 的激发光读取 Em 535nm 的荧光。

[0853] 实施例 RNA 分离和 ApoB 信使敲除的定量 RT-PCR 分析

[0854] 在对于这种管家基因的方案中,第一天在 8-10 周龄的 C57/B6 或 Balb/C 雌鼠 (5 小鼠 / 每组) 中分别通过鼻内或静脉内路径以 50uL 或 200uL 的 dsRNA 剂量进行肺部或全身给药。麻醉剂是克他命 / 甲苯噻嗪 (IP-0.2ml 剂量 / 小鼠)。第二天,从接受给药 1 天或连续给药 3 天后的肺模型小鼠分离全肺,或从全身模型小鼠分离肺、肝、肾、脾、心和 / 或全血。将组织置于含 2ml RNALATERRNA 稳定剂 (Qiagen 76106) 的 24 孔板内。平板置于干冰上立刻冷冻,并保存于 -80°C 直至制备匀浆液。

[0855] 从尸检时保存在 RNALATER 溶液中的组织样品提取总 RNA。总 RNA 的分离是根据制造商的关于分离哺乳动物组织的说明,利用 InvitrogenPURELINK 96 RNA 分离试剂盒完成的。然后,利用 NanoDrop 分光光度计对这些总 RNA 提取物进行定量,随后利用 the Agilent Bioanalyzer 2100 系统,评定质量以确定 RNA 的完整性。在确定总 RNA 质量和数量后,将样品标准化为相等的浓度,根据制造商的用法说明,利用 Applied Biosystems HighCapacity cDNA Archive 试剂盒将 50-100ng 的总 RNA 合成为 cDNA。然后,利用 Nanodrop 复核 cDNA 的浓度,接着以 1 : 10 稀释,用于 qRT-PCR 分析。

[0856] 使用 cDNA 样品和绿色 SYBR 技术,以及 200nM 的终引物浓度完成利用 qRT-PCR 的基因表达分析。利用 Quanta PerfectCta SYBR Green FastMix, ROX 以 10 μ L 的反应体积处理样品。利用 384- 孔型板在 Applied Biosystems7900HT 平台上以快速循环条件处理样品。然后,利用 0.2 的阈值将数据从 SDS 2.3 软件输出。利用用户输入到 Excel 的算法 QBASE 软件对其进行格式化而用于分析。内源对照所选的基因是基于 geNorm 分析,对于小鼠肝样品而言,GAPDH 和 PPIA 和 TBP 已经显示出是用于基因表达分析的非常稳定的标准品。

[0857] 血清胆固醇分析

[0858] 本试验的目的是确定,用 dsRNA 给药 48 小时后,小鼠血液内的血清胆固醇水平。使用 Invitrogen Amplex Red 胆固醇分析试剂盒 (cat# A12216)。采集小鼠全血,并置于血清分离管 (SST-BD cat#365956) 内,然后离心,从而将血清与其余的血液分离。血清在 DI-H₂O 中以 1 : 40 稀释,然后在来自 Amplex 分析试剂盒的 1X 反应缓冲液中以 1 : 5 进一步稀释 (总计 1 : 200)。标准物是试剂盒中附带的胆固醇参考标准物,浓度为 20ug/ml、10ug/ml、8ug/ml、6ug/ml、4ug/ml、2ug/ml 和 1ug/ml。将样品,标准物和空白加至平底黑色 96- 孔板 (CostarCatalogue#3916) 内。制备 Amplex 分析混合物,并加至分析孔内。在 37°C 孵育至少 30 分钟后,用 Molecular Devices SpectraMax M5 对该板进行读数。选定“终点”方案,激发范围设定在 530-560 (优选 544nm),和发射检测在 ~ 590。一旦对该板进行读取,就将数据输出到 excel,计算对照百分数,降低百分数和总血清胆固醇 (ug/ml)。

[0859] 实施例 27

[0860] 本发明的某些双链 RNAs (dsRNA) 的结构示于表 1 中。

[0861] 表 1 : 双链 RNAs

[0862]

RNA	序列
DX4227 ApoB	(SEQ ID NO :7) 正义 5' -GGAAUC _m UA _m UA _m U _m UGAUC _m CAsA-3' (SEQ ID NO :8) 反义 5' - _m U _m UGGAU _m CAAA _m UA _m UAAGA _m UUC _m Cs _m CsU-3'
DX3030 流感	(SEQ ID NO :9) 正义 5' -GGAUCUUAUUUCUUCGGAGACAAdTdG-3' (SEQ ID NO :10) 反义 5' -CAUUGUCUCCGAAGAAAUAAGAUCUU-3'

[0863]

RNA	序列
DX2816 非-靶标 Qneg	(SEQ ID NO :11) 正义 5' -UUCUCCGAACGUGUCACGUdTdT-3' (SEQ ID NO :12) 反义 5' -ACGUGACACGUUCGGAGAAdTdT-3'
DX2940 LacZ	(SEQ ID NO :13) 正义 5' -CUACACAAAUCAGCGAUUdTdT-3' (SEQ ID NO :14) 反义 5' -AAAUCGCUGAUUUGUGUAGdTdC-3'
DX2742 PPIB MoCypB	(SEQ ID NO :15) 正义 5' -GGAAAGACUGUCCAAAAAUU-3' (SEQ ID NO :16) 反义 5' -UUUUUGGAACAGUCUUCCUU-3'
DX 2744 G1498 流感	(SEQ ID NO :17) 正义 5' -GGAUCUUAUUUCUUCGGAGdTdT-3' (SEQ ID NO :18) 反义 5' -CUCCGAAGAAAUAAGAUCcdTdT-3'

经修饰的 DX 2918	(SEQ ID NO :19) 正义 5' -CCGTCAGCCGATTTGCTATTT-3'
Inm4	(SEQ ID NO :20)
TNFa	反义 5' -p-AUAGCAAATCGGCTGACGGTT-3'

[0864] 表 1 中,“mU”代表 2' -O- 甲基尿苷,“mC”代表 2' -O- 甲基胞苷,和“s”代表硫代磷酸酯键。

[0865] 实施例 28

[0866] 本发明的活性 RNA 制剂可以通过将干扰性 RNA 溶解在缓冲液或细胞培养基中并搅拌,分别将递送制剂与缓冲液或细胞培养基混合并搅拌,最后将和干扰性 RNA 混合物与递送制剂混合物掺合,而制成活性 RNAi 转染制剂。

[0867] 为了制备递送制剂,可以将氨基酸脂质以及其它脂质和 / 或赋形剂溶解在 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 中, N_2 下干燥,并在 pH 7.4 的含 5% 葡萄糖的 10mM HEPES 中水合。该混合物可以经超声处理,或挤出、透析和 / 或切向流过滤。

[0868] 本领域已知的各种稀释方法都可以用于制备本发明的活性 RNA 制剂。

[0869] 本发明的示例性干扰 RNA 制剂示于表 2 中。在该实例中,由名为 C8-Arg-C8 的氨基酸脂质提供用于向细胞内递送干扰性 siRNA 治疗剂的制剂。氨基酸脂质的量表示为递送组分的摩尔百分数,但不包括活性 RNA 试剂。名称“C16-Arg-C14”是指 (C15 烷基)-(C=O)-Arg-NH-(C14 烷基),其等同于 (C16 酰基)-Arg-NH-(C14 烷基)。

[0870] 表 2 :dsRNA 制剂

[0871]

组分	量
dsRNA	50nM
C16-Arg-C14 氨基酸脂质	100mole%

[0872] 本发明的示例性干扰 RNA 制剂示于表 3 中。在该实例中,由名为 C14- 正 Arg-C14 的氨基酸脂质提供用于向细胞内递送干扰 siRNA 治疗剂的制剂。氨基酸脂质的量表示为递送组分的摩尔百分数,不包括活性 RNA 试剂。名称“C14- 正 Arg-C14”是指 (C13 烷基)-(C=O)- 正 Arg-NH-(C14 烷基),其等同于 (C14 酰基)- 正 Arg-NH-(C14 烷基)。

[0873] 表 3 :dsRNA 制剂

[0874]

组分	量
dsRNA	50nM

C14- 正 Arg-C14 氨基酸脂质

100mole%

[0875] 本发明的示例性 RNAi 制剂示于表 4 中。在该实例中,将名为 C10- 正 Arg-C10 的氨基酸脂质与非 - 阳离子脂质在共递送制剂中组合。名称“C10- 正 Arg-C10”是指 (C9 烷基)-(C=O)-正 Arg-NH-(C10 烷基),其等同于 (C10 酰基)-正 Arg-NH-(C12 烷基)。

[0876] 表 4 :dsRNA 制剂

[0877]

组分	量
dsRNA DX3030	50nM
C10- 正 Arg-C10 氨基酸脂质	50mole%
DOPE	50mole%

[0878] 本发明的示例性 RNAi 制剂示于表 5 中。在该实例中,将名为 C12- 高 Arg-C12 的氨基酸脂质与阳离子脂质、非 - 阳离子脂质和聚乙二醇化脂质在多组分递送制剂中组合。名称“C12- 高 Arg-C12”是指 (C11 烷基)-(C=O)-高 Arg-NH-(C12 烷基),其等同于 (C12 酰基)-高 Arg-NH-(C12 烷基)。

[0879] 表 5 :dsRNA 制剂

[0880]

组分	量
dsRNA	25nM
C12- 正 Arg-C12	30mole%
DSPC	20mole%
胆固醇	49mole%
DSPE-PEG2000	1mole%

[0881] 本发明的示例性干扰 RNA 乳剂组合物示于表 6 中。在该实例中,阳离子氨基酸脂质称作 C14- 正 Arg-C14。

[0882] 表 6 :dsRNA 乳剂

[0883]

组分	量
dsRNA	25 nM, N/P 4
C14-正 Arg-C14	11% (油相的 w/w); 阳离子脂质与乳化剂的摩尔比 1:1
二油酰磷脂酰乙醇胺	
LABRAFAC PG	89% (油相的 w/w)
水	80%

[0884] 本发明的示例性干扰 RNA 分散组合物示于表 7 中。在该实例中,阳离子氨基酸脂质称作 C14-正 Arg-C14。

[0885] 表 7 :dsRNA 分散组合物

[0886]

组分	量
dsRNA	25nM, N/P4
C14-正 Arg-C14	12% (w/w of 脂质 / 分散剂相)
LABRASOL	88% (w/w of 脂质 / 分散剂相)
水	80%

[0887] 实施例 29

[0888] 本发明的干扰性 RNA 组合物的示例性脂质体制剂示于表 8。

[0889] 表 8 :示例制剂

[0890]

组合物 (mol%)
C18-正 Arg(NH ₃ Cl)-C18/DSPE-PEG2k/DSPC/cho1. (30:1:20:49)
C16-正 Arg(NH ₃ Cl)-C16/DSPE-PEG2k/DSPC/cho1. (30:1:20:49)
C14-正 Arg(NH ₃ Cl)-C14/DMPE-PEG2k/DSPC/cho1. (30:1:20:49)
C12-Arg(NH ₃ Cl)-C12/DSPE-PEG2k/DSPC/cho1. (30:1:20:49)
C10-Arg(NH ₃ Cl)-C10/DSPE-PEG2k/DSPC/cho1. (30:1:20:49)
C8-Arg(NH ₃ Cl)-C8/DSPE-PEG2k/DSPC/cho1. (30:1:20:49)
C10-D-Arg(NH ₃ Cl)-C18/DSPE-PEG2k/DSPC/cho1. (30:1:20:49)
C12-D-Arg(NH ₃ Cl)-C16/DPPE-PEG5k/DSPC/cho1. (30:1:20:49)

C14-D-Arg(NH ₃ Cl)-C14/DSPE-PEG2k/DSPC/cho1. (30:1:20:49)
C16- 高 Arg(NH ₃ Cl)-C12/DSPE-PEG2k/DSPC/cho1. (30:1:20:49)
C18- 高 Arg(NH ₃ Cl)-C10/DMPE-PEG5k/DSPC/cho1. (30:1:20:49)
C12- 高 Arg(NH ₃ Cl)-C12/DSPE-PEG2k/DSPC/cho1. (30:1:20:49)
C14- 正正 Arg(NH ₃ Cl)-C14/DSPE-PEG2k/DSPC/cho1. (30:1:20:49)
C16- 正正 Arg(NH ₃ Cl)-C16/DSPE-PEG2k/DSPC/cho1. (30:1:20:49)

[0891] 实施例 30

[0892] RNA 递送组合物的颗粒大小

[0893] 脂质体氨基酸脂质干扰 RNA 制剂的实例示于表 9 中。表 9 中各制剂的 N/P 为 1.8, 且显示的粒径为 106-139nm, 分散值为约 0.08-0.19。

[0894] 表 9 :RNA 递送组合物的粒径

[0895]

组合物 (mol%)	N/P	粒径 (nm)	PDI
C12- 正 Arg(NH ₃ Cl)-C12/DSPE-PEG2k/DSPC/CHOL (30 ;1 ;20 ;49)	1.8	139	0.19
C12-Arg(NH ₃ Cl)-C12/DSPE-PEG2k/DSPC/CHOL (30 ;1 ;20 ;49)	1.8	106	0.08
C12-D-Arg(NH ₃ Cl)-C12/DSPE-PEG2k/DSPC/CHOL (30 ;1 ;20 ;49)	1.8	112	0.19
C12- 高 Arg(NH ₃ Cl)-C12/DSPE-PEG2k/DSPC/CHOL (30/1/20/49)	1.8	119	0.15

[0896] 氨基酸脂质干扰 RNA 制剂的实例示于表 10 中。表 10 中制剂的 N/P 比为 1.5-1.9, 且显示的粒径为 140-148nm, 分散值为约 0.18-0.30。

[0897] 表 10 :RNA 递送组合物的颗粒大小

[0898]

组合物	N/P	粒径 (nm)	PDI
C12- 正 Arg(NH ₃ Cl)-C12/DSPE-PEG2k/DSPC/CHOL (30/1/20/49)	1.51	148.3	0.18
C12-Arg(NH ₃ Cl)-C12/DSPE-PEG2k/DSPC/CHOL (30/1/20/49)	1.51	148.3	0.18
C12-D-Arg(NH ₃ Cl)-C12/DSPE-PEG2k/DSPC/CHOL (30/1/20/49)	1.51	148.3	0.18
C12- 高 Arg(NH ₃ Cl)-C12/DSPE-PEG2k/DSPC/CHOL (30/1/20/49)	1.89	140.3	0.30

[0899] 本发明脂质体实施方案在 JEOL 1230 TEM 上的透射电子显微照片示于图 2 中。图 2 显示了用氨基酸脂质 C12- 正 Arg-C12 形成的球形脂质双分子层囊泡颗粒。显微照片的长度标尺是 0.5 微米,样品用 3% 乙酸双氧铀染色。脂质体制剂的脂质部分是 [C12- 正 Arg(NH₃⁺Cl⁻)-C12/DSPC/ 胆固醇 /DSPE-PEG-2000], 以总脂质的重量 / 重量百分比表示,其含量分别为 [30% /20% /49% /1%]。脂质体包括抗流感活性 dicer 底物 dsRNA DX3030。

[0900] 实施例 31

[0901] 氨基酸脂质 RNAi 二元组合物的体外 LacZ 基因敲除活性

[0902] 通过基于 LacZ 活性的体外试验,氨基酸脂质提供的有效干扰 -RNA 递送组合物如表 11 所示。表 11 的结果显示,采用在氨基酸脂质组合物中的干扰 RNA 的基因敲除结果由于了使用 RNAiMAX(Invitrogen) 的结果。

[0903] 表 11 :氨基酸脂质干扰性 RNA 制剂的 LacZ 敲除

[0904]

组合物	%敲除 vs. Qneg
C8- 正 Arg-C8:DOPE(1:1)	88
C10- 正 Arg-C10:DOPE(1:1)	89
C12- 正 Arg-C12:DOPE(1:1)	88
C8-L-Arg-C8:DOPE(1:1)	16
C10-L-Arg-C10:DOPE(1:1)	82

C12-L-Arg-C12:DOPE(1:1)	100
C8-D-Arg-C8:DOPE(1:1)	40
C10-D-Arg-C10:DOPE(1:1)	82
C12-D-Arg-C12:DOPE(1:1)	80
C8- 高 Arg-C8:DOPE(1:1)	52
C10- 高 Arg-C10:DOPE(1:1)	100
C12- 高 Arg-C12:DOPE(1:1)	51
C8- 正正 Arg-C8:DOPE(1:1)	78
C10- 正正 Arg-C10:DOPE(1:1)	78
C8- 正 Arg-C8:DPhPE(1:1)	43
C10- 正 Arg-C10:DPhPE(1:1)	73
RNAI-MAX	92

[0905] 在表 11 中, dsRNA 的终浓度是 100nM, 各组合物的 N/P 比是 1.8。

[0906] 实施例 32

[0907] 氨基酸脂质 RNAi 脂质体组合物的体外 LacZ 基因敲除

[0908] 通过基于 LacZ 活性的体外试验, 氨基酸脂质提供的有效干扰 -RNA 递送组合物如表 12 所示。

[0909] 表 12 :氨基酸脂质 RNAi 组合物的标准化 LacZ 基因敲除

[0910]

组合物	%敲除
C12- 正 Arg(NH ₃ Cl)-C12/DPhPE/DSPE-PEG (50/49/1)	60
C12-Arg(NH ₃ Cl)-C12/DPhPE/DSPE-PEG (50/49/1)	94
C12-D-Arg(NH ₃ Cl)-C12/DPhPE/DSPE-PEG (50/49/1)	86
C12- 高 Arg(NH ₃ Cl)-C12/DPhPE/DSPE-PEG (50/49/1)	81
RNAIMAX	82

[0911] 表 12 的标准化 LacZ 敲除结果显示, 所有氨基酸脂质组合物至少观察到 60% 敲除。表 12 的结果显示, 采用氨基酸脂质组合物中的干扰 -RNA 的基因敲除结果超过了使用 RNAIMAX 的结果。

[0912] 实施例 33

[0913] 氨基酸脂质 RNAi 组合物的体外基因敲除浓度应答

[0914] 在体外测定了多个三元氨基酸脂质 RNAi 组合物的基因敲除活性。

[0915] 如图 3 所示,根据在 A549 细胞中的基于 PPIB 敲除活性的体外试验,氨基酸脂质提供了有效的干扰 -RNA 递送组合物。根据图 3 的结果,如标准化 PPIB 值所表示,采用氨基酸脂质组合物中的干扰性 -RNA 的基因敲除超过了用 RNAIMAX 获得的结果。

[0916] 在图 3 中显示了两种氨基酸脂质制剂的标准化 PPIB 值的浓度应答相比 RNAIMAX 的结果。图 3 中的制剂 1 是 [C12- 正 Arg(NH₃Cl)-C12/DOPE/CHOL(50/32/18)] 和制剂 2 是 [C12- 正 Arg(NH₃Cl)-C12/CHEMS/DLPE(50/32/18)]。

[0917] 如图 4 所示,根据 9L 细胞中的基于 LacZ 敲除活性体外试验,氨基酸脂质提供了有效的干扰 -RNA 递送组合物。根据图 4 的结果,如标准化的 β -半乳糖苷酶值所表示,采用氨基酸脂质组合物中的干扰性 -RNA 的基因敲除超过了用 RNAIMAX 获得的结果。

[0918] 在图 4 中显示两种氨基酸脂质制剂的标准化 β -半乳糖苷酶值的浓度应答相比 RNAIMAX 的结果。图 4 的制剂 1 是 [C12- 正 Arg(NH₃Cl)-C12/DOPE/CHOL(50/32/18)] 和制剂 2 是 [C12- 正 Arg(NH₃Cl)-C12/CHEMS/DLPE(50/32/18)]。

[0919] 含三种脂质组分的多个氨基酸脂质制剂的体外基因敲除活性数据汇总于表 13 中。

[0920] 表 13:氨基酸脂质 RNAi 组合物的体外基因敲除

[0921]

制剂	dsRNA (nM)	% 敲除 (vs QNeg)	
		A549 PPIB	9L LacZ
C12 正 ArgC12/CHEMS/chol. (50/32/18) (N/P = 1.8)	25	85	95
	10	74	74
	1	9	49
C12 正 ArgC12/DOPE/chol. (50/32/18) (N/P = 5.0)	25	92	97
	10	93	91
	1	34	30
C12 正 ArgC12/CHEMS/DLPE (50/32/18) (N/P = 1.8)	25	98	97
	10	97	94
	1	23	39
C12 正 Arg/chol./DLPE (50/32/18) (N/P = 5.0)	25	78	83
	10	43	57
	1	2	24
RNAIMAX	25	87	89
	10	42	67
	1	7	16

[0922] 如表 13 所示,以浓度 10nM 的 dsRNA 获得的结果显示,这些含 C12- 正 Arg-C12 的示例性氨基酸脂质制剂提供的体外基因敲除活性超过了使用获得 RNAIMAX 的结果。

[0923] 在存在和不存在血清(胎牛血清)时获得的含三种脂质组分的某些氨基酸脂质制剂的体外基因敲除活性数据汇总于表 14 中。

[0924] 表 14 :含和不含血清的氨基酸脂质 RNAi 组合物在体外的 PPIB 基因敲除

[0925]

制剂	N:P	dsRNA (nM)	% 敲除 (vs Qneg)	
			w/ 血清	w/o 血清
C12-正 Arg-C12/CHEMS/chol.	4	25	94	91
	4	2.5	69	83
	4	0.25	42	23
C12-正 Arg-C12/CHEMS/chol.	4	25	96	95
	4	2.5	95	96
	4	0.25	65	47
RNAIMAX (每种制剂的固定量)	---	25	98	97
	---	2.5	97	94
	---	0.25	56	48

[0926] 如表 14 所示,含 C12- 正 Arg-C12 的示例性的氨基酸脂质制剂,在存在和不存在血清时,提供了高体外 PPIB 基因敲除活性。这些氨基酸脂质制剂是通过各种再水合和稀释方法制得的。

[0927] 含三种和四种脂质组分的某些氨基酸脂质制剂的体外基因敲除活性数据汇总于表 15。

[0928] 表 15 :氨基酸脂质 RNAi 组合物在体外的 LacZ 基因敲除 (KD)

[0929]

组合物	脂质 %(w/w)	dsRNA (nM)	%KD vs Qneg 9L/LacZ
C18:1-His(1-Me)-C16/C18:1-正 Arg-C16/chol.	8/42/50	25	90
		5	83
	16/32/50	25	91
		5	94
C18:1-His(1-Me)-C16/C18:1-正 Arg-C16/chol.	8/42/50	25	94
		5	90
	16/32/50	25	91
		5	91
C18:1-正 Arg-C16/CHEMS/chol.	50/32/18	25	43
		5	56
	50/32/18	25	72

[0930]

组合物	脂质 %(w/w)	dsRNA (nM)	%KD vs Qneg 9L/LacZ
		5	73
C18:1-正 Arg-C12/CHEMS/chol.	50/32/18	25	90
		5	92
C18:1-正 Arg-C8/CHEMS/chol.	50/32/18	25	92
		5	95
C18:2-正 Arg-C16/CHEMS/chol.	50/32/18	25	90
		5	33
	50/20/30	25	92
	50/24/26	25	93
	50/28/22	25	92
C18:1-正 Arg-C16/CHEMS/chol./DSPC	40/16/34/10	25	79
	40/19/31/10	25	82
	40/22/28/10	25	82
	40/26/24/10	25	88
C18:1-Pal-C16/C18:1-正 Arg-C16/chol.	4/46/50	25	72
	8/42/50	25	77
	16/32/50	25	88
	32/16/50	25	91

[0931] 如表 15 所示,含有三种和四种组分的某些氨基酸脂质制剂在体外提供了高 9L/LacZ 基因敲除活性。在利用氨基酸脂质混合物的知己和含有 CHEMS 或胆固醇作为额外脂质的制剂中观察高 9L/LacZ 敲除活性。

[0932] 实施例 34

[0933] 氨基酸脂质 RNAi 组合物的体外 ApoB 基因敲除浓度应答

[0934] 在体外测定了多个四组分氨基酸脂质 RNAi 组合物的 ApoB 基因敲除活性。

[0935] 图 5 中示出获自 HepG2 细胞体外试验的 ApoB 基因敲除活性的实例。显示了对干扰性 -RNA 的三种氨基酸脂质制剂在 25、2.5 和 0.25nM RNA 下的浓度应答的标准化 ApoB mRNA 表达值。制剂 1 是 [非氨基酸阳离子脂质 /DSPC/chol./DMPE-PEG2k(40/10/48/2)]。制剂 2 和 3 都是 [C18:1-正 Arg-C16/CHEMS/DLPE/DMPE-PEG2k(50/32/16/2)]。

[0936] ApoB dsRNA 是 DX4227 (ApoB-2P2098)。

[0937] 浓度应答是为了获得 HepG2 细胞中的 ApoB mRNA 表达敲除的百分比。HepG2 细胞筛查的试验步骤如下:第一天,用含 10% FBS、1x 非基本氨基酸,和 0.125%碳酸氢钠的新鲜 DMEM 生长培养基培养 HepG2 细胞。第二天,将 25 微升的复合物加至孔内,然后孔内加入 75 微升 OPTIMEM 中的 HepG2 单细胞悬浮液 (15000 个细胞 / 孔)。4 小时后,将含 20% FBS 的 100u1 DMEM 加至各孔。第三天,在细胞裂解 24 小时,制备 RNA,并对 ApoB 和 rGAPDH

[0938] mRNA 进行 qRT-PCR。

[0939] 多个四组分的氨基酸脂质 RNAi 组合物的 ApoB 基因敲除活性汇总于表 16 中。

[0940] 表 16 :氨基酸脂质 RNAi 组合物的体外 ApoB 基因敲除

[0941]

组合物	N/P		%敲除 vs UNT			
	pH	pH	100	25	2.5	0.25
	7.4	5.0	nM	nM	nM	nM
C18:1-正 Arg-C16/CHEMS/DLPE/DMPE-PEG2k (50/32/16/2)	1.8	4.9	84	93	36	0
C18:1-正 Arg-C16/CHEMS/DMPE/DMPE-PEG2k (50/32/16/2)	0.8	2.1	94	84	0	0
C18:1-正 Arg-C16/CHEMS/DPPE/DMPE-PEG2k (50/32/16/2)	0.8	2.1	96	82	19	0
C18:1-正 Arg-C16/CHEMS/DPLC/DMPE-PEG2k (50/32/16/2)	0.8	2.1	96	89	0	0
C18:1-正 Arg-C16/CHEMS/DSPC/DMPE-PEG2k (50/32/16/2)	0.8	2.1	94	89	37	0
C18:1-正 Arg-C16/CHEMS/DLPE/DMPE-PEG2k (50/32/16/2)	0.8	2.1	95	82	13	13
RNAIMAX	---	---		87	24	24

[0942] 实施例 35

[0943] 氨基酸脂质 RNAi 组合物的体内 ApoB 基因敲除

[0944] 某些三和四组分氨基酸脂质 RNAi 组合物 ApoB 基因敲除活性是在小鼠体内确定的。体内 ApoB mRNA 降低活性示于表 17 中。

[0945] 表 17 :氨基酸脂质 RNAi 组合物体内 ApoB 基因敲除

[0946]

组合物	%体内敲除
C18:1- 正 Arg-C16/CHEMS/DLPE/DMPE-PEG2k (50/32/16/2)	88
C18:1- 正 Arg-C16/cho1. /DMPE-PEG2k (50/48/2)	45
C18:1- 正 Arg-C16/CHEMS/cho1. /DMPE-PEG2k (50/15/33/2)	46
C18:1- 正 Arg-C16/CHEMS/cho1. /DMPE-PEG2k (50/32/16/2)	88

[0947] 获得了多个四组分氨基酸脂质 RNAi 组合物在小鼠体内的 ApoB 基因敲除剂量应答,并与小鼠血清胆固醇水平相比较。体内 ApoB mRNA 降低和相应的血清胆固醇降低汇总

于表 18 中。

[0948] 表 18 :氨基酸脂质 RNAi 组合物在体内的 ApoB 基因敲除 (KD) 剂量应答

[0949]

组合物	ApoB mRNA % KD (ApoB 9133)	ApoB mRNA % KD (ApoB 12211)	%血清胆固醇变化 (+/- 增加 / 损失)
C18:1- 正 Arg-C16/CHEMS/DLPE/DMPE-PEG2k (50/32/16/2) (N/P1.8, 2mg/kg)	72.0	72.6	-7.1
C18:1- 正 Arg-C16/CHEMS/DLPE/DMPE-PEG2k (50/32/16/2) (N/P1.8, 1mg/kg)	35.2	39.6	-4.0
C18:1- 正 Arg-C16/CHEMS/DLPE/DMPE-PEG2k (50/32/16/2) (N/P1.8, 0.5mg/kg)	17.6	20.6	10.6
C18:1- 正 Arg-C16/CHEMS/DLPE/DMPE-PEG2k (50/32/16/2) (N/P0.8, 4mg/kg)	69.9	70.6	-38.9
C18:1- 正 Arg-C16/CHEMS/DLPE/DMPE-PEG2k (50/32/16/2) (N/P0.8, 2mg/kg)	46.3	47.8	-14.5
PBS	---	1.2	0

[0951] 实施例 36

[0952] 氨基酸脂质 RNAi 组合物的抗病毒效应

[0953] 含有四种组分的氨基酸脂质干扰 RNA 制剂实例示于表 19 中。用表 19 的制剂来确定在小鼠流感模型体内的抗病毒活性。

[0954] 表 19 :实例 RNA 递送制剂和对比制剂

[0955]

组	组合物	dsRNA	dsRNA 剂量 (amt/kg/日)		脂质剂量 ($\mu\text{mol/kg/日}$)
			mg	nmol	
1	C12-正 Arg(NH_3^+Cl^-)-C12/ DSPE-PEG2k/DSPC/chol. (30;1;20;49)	DX3030	2	120	36
2	C12-正 Arg(NH_3^+Cl^-)-C12/ DSPE-PEG2k/DSPC/chol. (30;1;20;49)	Qneg DX2816	1.6	120	28.8
3	C14-正 Arg (NH_3^+Cl^-)-C14/ DSPE-PEG2k/DSPC/chol. (30;1;20;49)	DX3030	2	120	36

[0956]

组	组合物	dsRNA	dsRNA 剂量 (amt/kg/日)		脂质剂量 ($\mu\text{mol/kg/日}$)
			mg	nmol	
4	C14-正 Arg (NH_3^+Cl^-)-C14/ DSPE-PEG2k/DSPC/chol. (30;1;20;49)	Qneg DX2816	1.6	120	28.8
5	C16-正 Arg (NH_3^+Cl^-)-C16/ DSPE-PEG2k/DSPC/chol. (30;1;20;49)	DX3030	2	120	36
6	C16-正 Arg (NH_3^+Cl^-)-C16/ DSPE-PEG2k/DSPC/chol. (30;1;20;49)	Qneg DX2816	1.6	120	28.8
7	C18-正 Arg (NH_3^+Cl^-)-C18/ DSPE-PEG2k/DSPC/chol. (30;1;20;49)	DX3030	2	120	36
8	C18-正 Arg (NH_3^+Cl^-)-C18/ DSPE-PEG2k/DSPC/chol. (30;1;20;49)	Qneg DX2816	1.6	120	28.8
9	C18 油酰-正 Arg(NH_3^+Cl^-)-C16/ DSPE-PEG2k/DSPC/chol. (30;1;20;49)	DX3030	2	120	36
10	C18 油酰-正 Arg(NH_3^+Cl^-)-C16/ DSPE-PEG2k/DSPC/chol. (30;1;20;49)	Qneg DX2816	1.6	120	28.8
11	C12-正 Arg(NH_3^+Cl^-)-C12/ DSPE-PEG2k/DSPC/chol. (30;1;20;49)	NONE	---	---	36
12	PBS	---	---	---	---

[0957] 如表 20 所示,表 19 各制剂的 N/P 为 1.8,并显示粒径为 127-183nm(除了组 7-8),分散值为约 0.1-0.3。

[0958] 表 20 :RNA 递送制剂和对比制剂的特性

[0959]

组	组合物	N/P	大小 (nm)	PDI
1	C12- 正 Arg(NH ₃ ⁺ Cl ⁻)-C12/ DSPE-PEG2k/DSPC/cho1. (30 ;1 ;20 ;49)	1.8	151.1	0.315
2	C12- 正 Arg(NH ₃ ⁺ Cl ⁻)-C12/ DSPE-PEG2k/DSPC/cho1. (30 ;1 ;20 ;49)	1.8	128	0.134
3	C14- 正 Arg(NH ₃ ⁺ Cl ⁻)-C14/ DSPE-PEG2k/DSPC/cho1. (30 ;1 ;20 ;49)	1.8	144.5	0.201
4	C14- 正 Arg(NH ₃ ⁺ Cl ⁻)-C14/ DSPE-PEG2k/DSPC/cho1. (30 ;1 ;20 ;49)	1.8	126.6	0.114
5	C16- 正 Arg(NH ₃ ⁺ Cl ⁻)-C16/ DSPE-PEG2k/DSPC/cho1. (30 ;1 ;20 ;49)	1.8	182.8	0.141
6	C16- 正 Arg(NH ₃ ⁺ Cl ⁻)-C16/ DSPE-PEG2k/DSPC/cho1. (30 ;1 ;20 ;49)	1.8	174	0.157
7	C18- 正 Arg(NH ₃ ⁺ Cl ⁻)-C18/ DSPE-PEG2k/DSPC/cho1. (30 ;1 ;20 ;49)	1.8	977.4	1
8	C18- 正 Arg(NH ₃ ⁺ Cl ⁻)-C18/ DSPE-PEG2k/DSPC/cho1. (30 ;1 ;20 ;49)	1.8	625	0.925
9	C18 油基 - 正 Arg(NH ₃ ⁺ Cl ⁻)-C16/ DSPE-PEG2k/DSPC/cho1. (30 ;1 ;20 ;49)	1.8	139.3	0.155
10	C18 油基 - 正 Arg(NH ₃ ⁺ Cl ⁻)-C16/ DSPE-PEG2k/DSPC/cho1. (30 ;1 ;20 ;49)	1.8	130.2	0.109

[0960] 表 19 制剂的病毒滴度降低的程度示于表 21 中。各病毒滴度降低值都反应的是八只小鼠的数据。

[0961] 表 21 :RNAi 递送制剂的病毒滴度降低

[0962]

组	dsRNA	病毒滴度相比 PBS 对照的减少 倍数 (平均值)	病毒滴度相比 PBS 对照的减少 倍数 (中值)	p 值
1	DX3030	165.0	1698.0	0.0002
2	Qneg DX2816	2.1	2.3	0.034
3	DX3030	25.3	100.0	0.002
4	Qneg DX2816	3.8	5.6	0.008
5	DX3030	13.8	17.8	0.0003
6	Qneg DX2816	6.3	6.7	0.002
7	DX3030	26.7	31.6	0.001
8	Qneg DX2816	2.6	5.6	0.037
9	DX3030	25.7	22.8	0.0002
10	Qneg DX2816	20.0	17.8	0.0003

[0963] 整体而言,表 21 的结果显示,干扰 -RNA 氨基酸脂质制剂递送干扰性 -RNA 至体内细胞,其中与 PBS 对照相比,流感病毒滴度降低了高至约 1600- 倍或更高。对照组是 #2,4,6,8,和 10,其用 Qneg 给药。

[0001]

序列表

<110> MDRNA有限公司

<120> 氨基酸脂质及其用途

<130> 07-10PCT

<140>

<141>

<150> 61/022, 571

<151> 2008-01-22

<150> 60/972, 590

<151> 2007-09-14

<150> 60/972, 653

<151> 2007-09-14

<150> 60/953, 667

<151> 2007-08-02

<150> 60/947, 282

<151> 2007-06-29

<150> 60/916, 131

<151> 2007-05-04

<160> 20

<170> PatentIn Ver. 3.3

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 对人工序列的描述: 合成引物

<400> 1

ggctcccagt tcttcatcac

20

<210> 2

<211> 16

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 对人工序列的描述: 合成引物

<400> 2

ccttccgcac cacctc

16

[0002]

<210> 3
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 对人工序列的描述: 合成探针

<400> 3
ctagatggca agcatgtggt gtttgg 26

<210> 4
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 对人工序列的描述: 合成引物

<400> 4
tctatcatca acgggtacaa acga 24

<210> 5
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 对人工序列的描述: 合成引物

<400> 5
cttttcagca agtgggaagg tg 22

<210> 6
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 对人工序列的描述: 合成探针

<400> 6
cctggccttg tctgtggaga cggatta 27

<210> 7
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 对人工序列的描述: 合成寡核苷酸

<220>

[0003]

<221> modified_base
<222> (7)..(8)
<223> 2'-O-甲基尿苷

<220>
<221> modified_base
<222> (10)
<223> 2'-O-甲基尿苷

<220>
<221> modified_base
<222> (12)..(14)
<223> 2'-O-甲基尿苷

<220>
<221> modified_base
<222> (19)
<223> 2'-O-甲基胞苷

<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(21)
<223> 硫代磷酸酯连接

<400> 7
ggaaucuuau auuugaucca a

21

<210> 8
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 对人工序列的描述：合成寡核苷酸

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(2)
<223> 2'-O-甲基尿苷

<220>
<221> modified_base
<222> (7)
<223> 2'-O-甲基胞苷

<220>
<221> modified_base
<222> (11)
<223> 2'-O-甲基尿苷

<220>
<221> modified_base
<222> (13)
<223> 2'-O-甲基尿苷

<220>

[0004]

<221> modified_base
<222> (18)
<223> 2'-O-甲基尿苷

<220>
<221> modified_base
<222> (21)
<223> 2'-O-甲基胞苷

<220>
<221> modified_base
<222> (22)
<223> 2'-O-甲基胞苷

<220>
<221> misc_feature
<222> (21)..(22)
<223> 硫代磷酸酯连接

<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(23)
<223> 硫代磷酸酯连接

<400> 8
uuggaucaaa uauaagauuc ccu

23

<210> 9
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 对组合的DNA/RNA分子的描述：合成寡核苷酸

<220>
<223> 对人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 9
ggaucuuauu ucuucggaga caatg

25

<210> 10
<211> 27
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 对人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 10
caugucucc gaagaaauaa gauccuu

27

<210> 11

[0005]

<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 对组合的DNA/RNA分子的描述: 合成寡核苷酸

<220>
<223> 对人工序列的描述: 合成寡核苷酸

<400> 11
uucuccgaac gugucacgut t 21

<210> 12
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 对组合的DNA/RNA分子的描述: 合成寡核苷酸

<220>
<223> 对人工序列的描述: 合成寡核苷酸

<400> 12
acgugacacg uucggagaat t 21

<210> 13
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 对组合的DNA/RNA分子的描述: 合成寡核苷酸

<220>
<223> 对人工序列的描述: 合成寡核苷酸

<400> 13
cuacacaaau cagcgauuut t 21

<210> 14
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 对组合的DNA/RNA分子的描述: 合成寡核苷酸

<220>
<223> 对人工序列的描述: 合成寡核苷酸

<400> 14
aaaucgcuga uuuguguagt c 21

[0006]

<210> 15
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 对人工序列的描述: 合成寡核苷酸

<400> 15
ggaaagacug uuccaaaaau u 21

<210> 16
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 对人工序列的描述: 合成寡核苷酸

<400> 16
uuuuuggaac agucuuuccu u 21

<210> 17
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 对组合的DNA/RNA分子的描述: 合成寡核苷酸

<220>
<223> 对人工序列的描述: 合成寡核苷酸

<400> 17
ggaucuuauu ucuucgagt t 21

<210> 18
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 对组合的DNA/RNA分子的描述: 合成寡核苷酸

<220>
<223> 对人工序列的描述: 合成寡核苷酸

<400> 18
cuccgaagaa auaagaucct t 21

<210> 19

[0007]

<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 对人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 19
ccgtcagccg atttgctatt t 21

<210> 20
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 对组合的DNA/RNA分子的描述：合成寡核苷酸

<220>
<223> 对人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 20
auagcaaadc ggctgacggt t 21

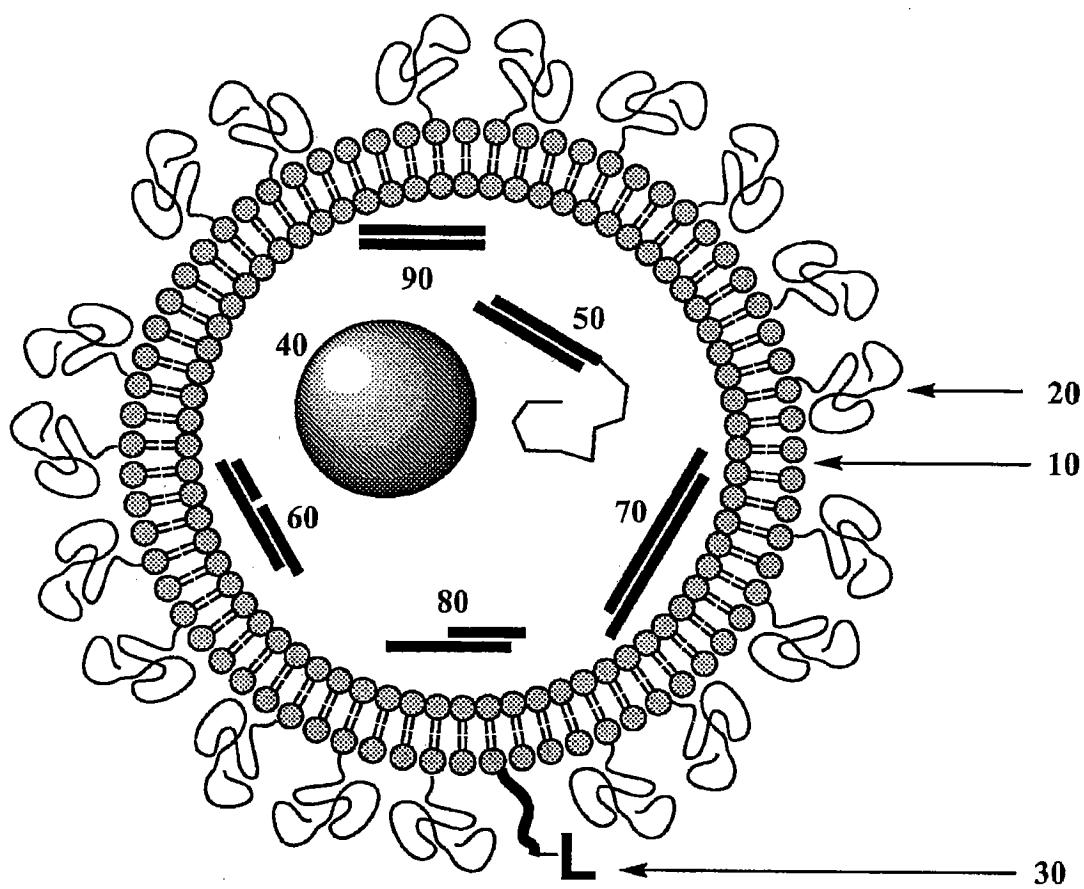


图 1

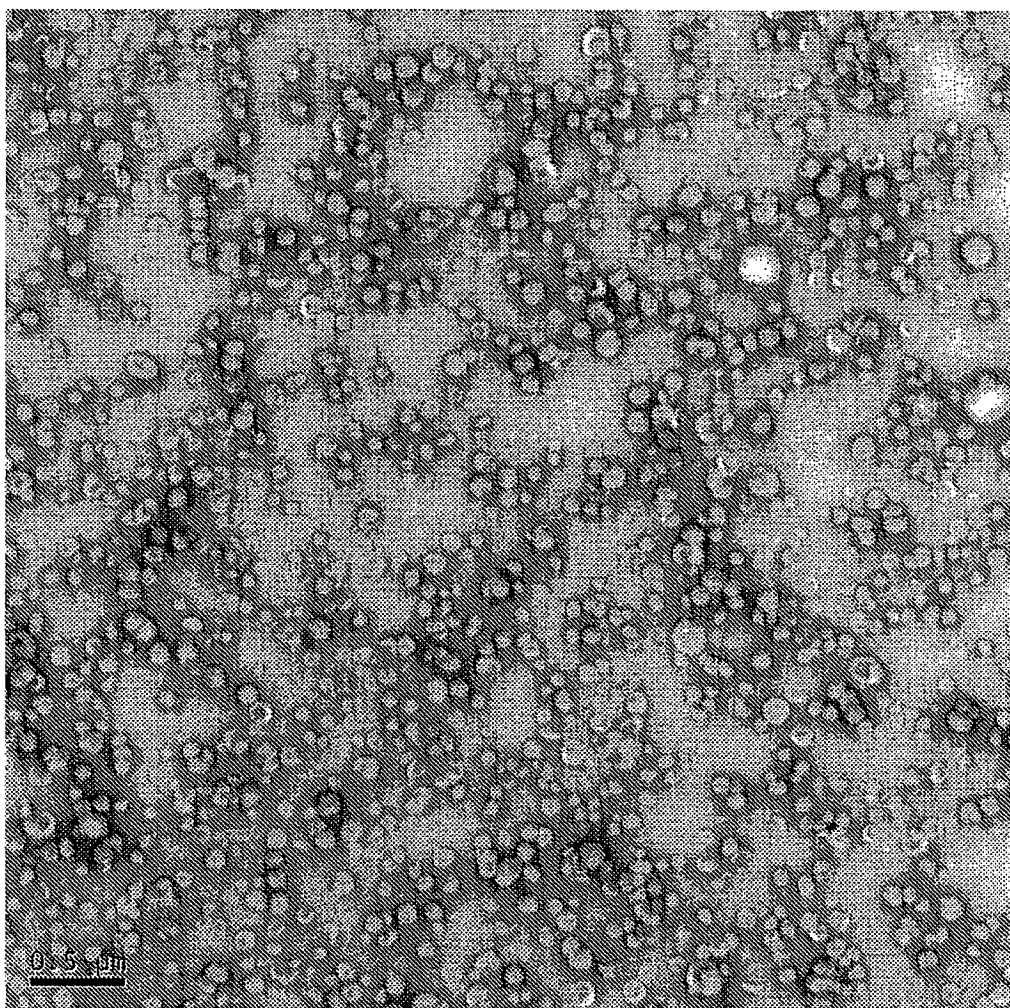


图 2

A549 24 h PPIB mRNA 表达
每孔7,500个细胞

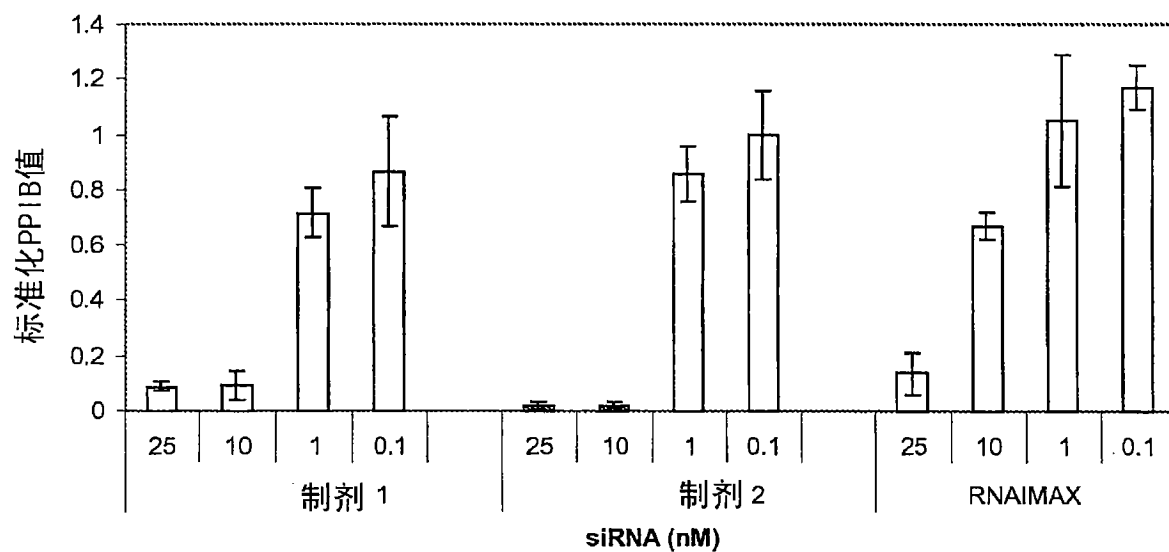


图 3

9L/lacZ 72 h β -半乳糖苷酶表达

每孔6,000个细胞

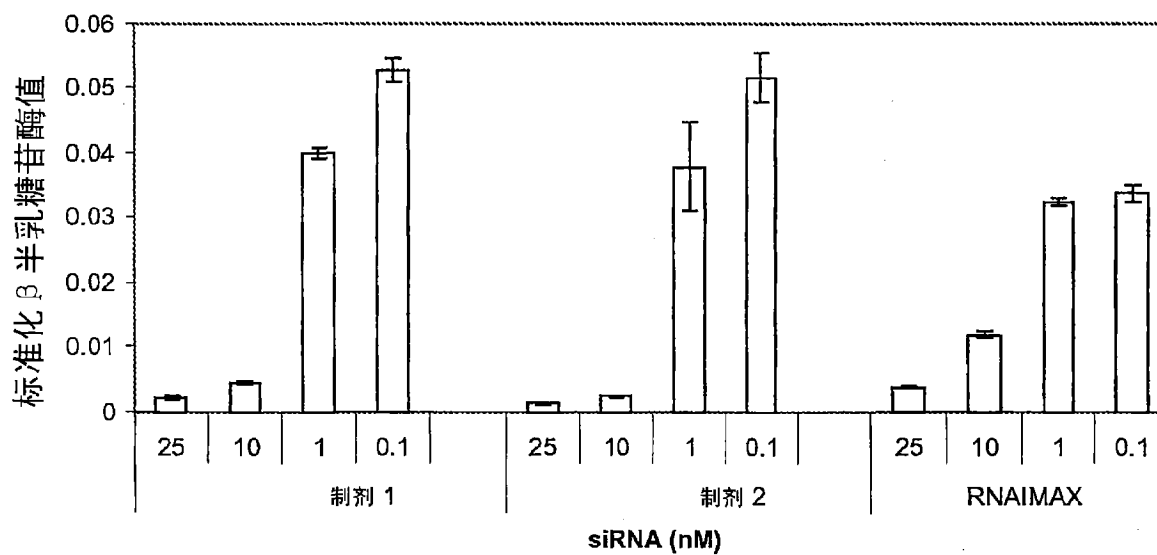


图 4

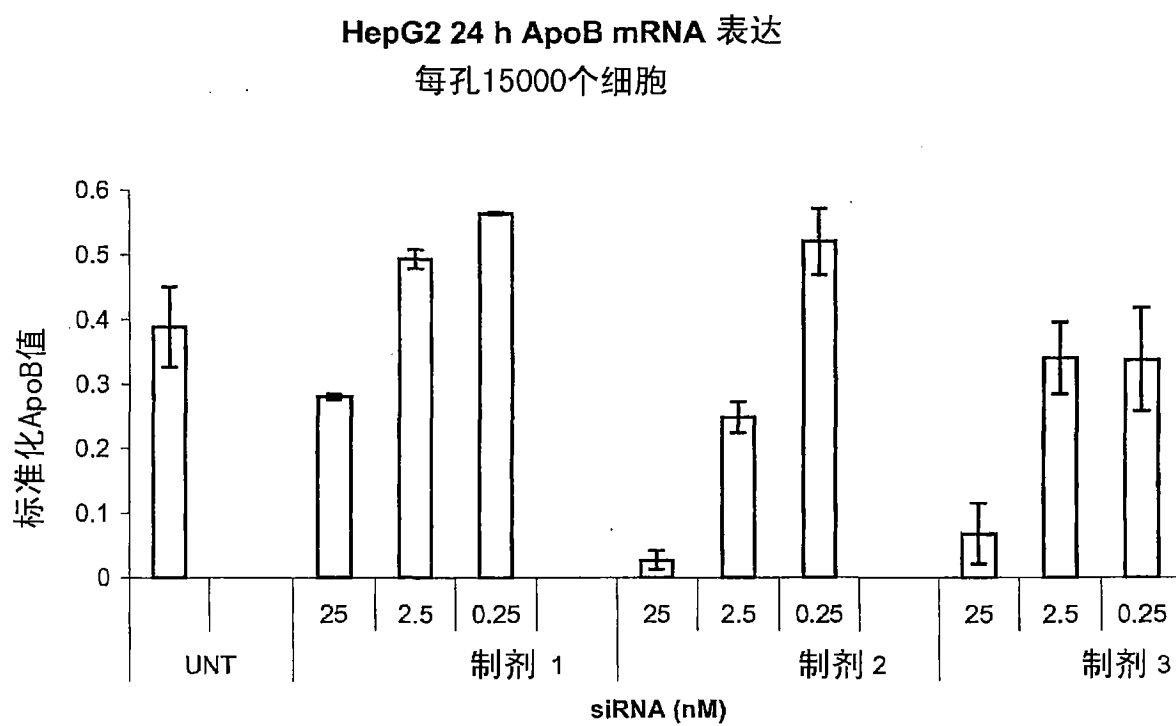


图 5