



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 115461083 A

(43) 申请公布日 2022. 12. 09

(21) 申请号 202180032365.0

(22) 申请日 2021.03.02

(30) 优先权数据

62/983997 2020.03.02 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.11.01

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2021/020450 2021.03.02

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/178396 EN 2021.09.10

(71) 申请人 塔夫茨大学信托人

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 许巧兵

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

专利代理师 郭慧 梅黎

(51) Int.Cl.

A61K 47/22 (2006.01)

C07D 241/04 (2006.01)

C07D 295/13 (2006.01)

权利要求书5页 说明书19页 附图12页

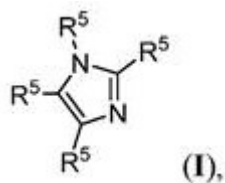
(54) 发明名称

用于在体内向免疫细胞递送mRNA的基于咪唑的合成类脂质

(57) 摘要

公开了包含咪唑头的脂质化合物和用于向T细胞有效递送核酸的包含本文公开的类脂质化合物的类脂质纳米颗粒(LNP)。

1. 式I的化合物或其药学上可接受的盐：



其中

R^5 是-W-L- $R^{\text{脂}}^{\text{脂}}$ 、氢、卤素、氨基、羟基、烷氧基、氰基、硝基、烷基、烯基、炔基、环烷基、杂环烷基、芳基或杂芳基；其中 R^5 中的一个且仅一个是-W-L- $R^{\text{脂}}^{\text{脂}}$ ；

L是二价接头；

W是 NR^{20} 、O或S；

$R^{\text{脂}}^{\text{脂}}$ 独立地是被取代的或未被取代的 C_{1-20} 烷基、被取代的或未被取代的 C_{1-20} 烯基、被取代的或未被取代的 C_{1-20} 炔基、被取代的或未被取代的 C_{1-20} 杂烷基、被取代的或未被取代的 C_{1-20} 杂烯基、或被取代的或未被取代的 C_{1-20} 杂炔基；且

R^{20} 是 $R^{\text{脂}}^{\text{脂}}$ 、H、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烯基或 C_{1-6} 炔基。

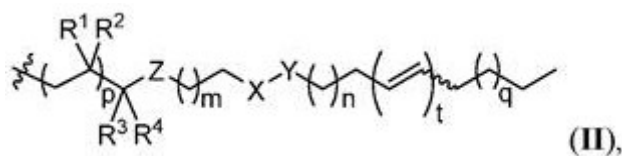
2. 权利要求1所述的化合物，其中W是 NR^{20} 或S。

3. 权利要求2所述的化合物，其中W是S。

4. 权利要求2所述的化合物，其中W是 NR^{20} 。

5. 权利要求4所述的化合物，其中 R^{20} 是 $R^{\text{脂}}^{\text{脂}}$ 。

6. 权利要求1-5中的任一项所述的化合物，其中 $R^{\text{脂}}^{\text{脂}}$ 由式II表示：



其中

R^1 和 R^2 独立地是H、甲基、OH、 NHR^{30} 或SH；

R^3 和 R^4 都是H；或 R^3 和 R^4 一起形成氧代(=O)基团；

Z是O、 NR^{30} 或S；

X和Y独立地是 CH_2 、 NR^{30} 、O、S或Se；

m是选自1-3的整数；

n是选自1-14的整数；

p是0或1；

q是选自1-10的整数；

t是0或1；且

R^{30} 是H、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烯基或 C_{1-6} 炔基。

7. 权利要求1-6中的任一项所述的化合物，其中 R^3 和 R^4 都是H。

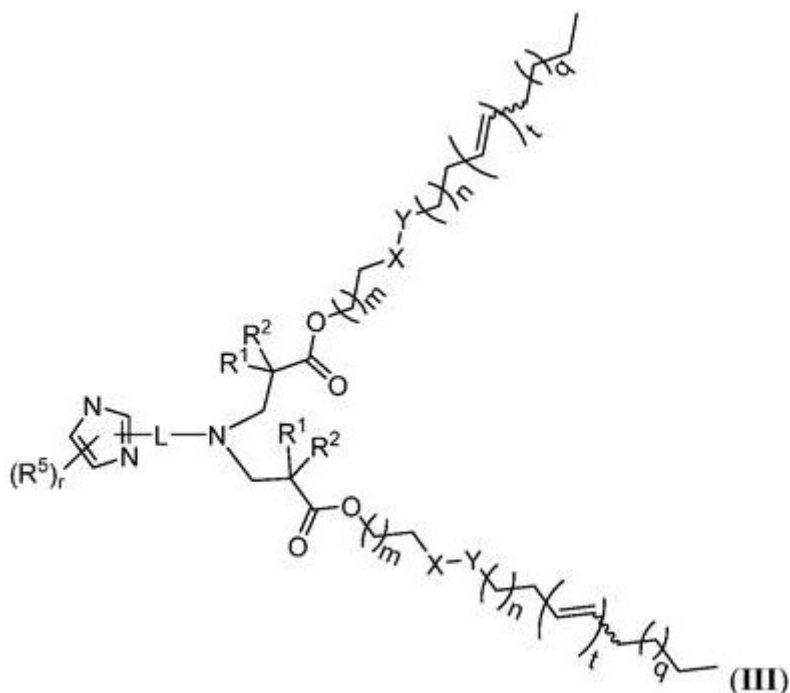
8. 权利要求1-6中的任一项所述的化合物，其中 R^3 和 R^4 一起形成氧代(=O)基团。

9. 权利要求1-8中的任一项所述的化合物，其中p是0。

10. 权利要求1-8中的任一项所述的化合物，其中p是1。

11. 权利要求1-10中的任一项所述的化合物，其中Z是O或 NR^{30} 。

12. 权利要求11所述的化合物, 其中Z是O。
 13. 权利要求11所述的化合物, 其中Z是 NR^{30} 。
 14. 权利要求1所述的化合物, 其中所述化合物是式III的化合物:



15. 权利要求1-14中的任一项所述的化合物, 其中 R^1 和 R^2 独立地是H、甲基或OH。
 16. 权利要求15所述的化合物, 其中 R^1 和 R^2 都是H。
 17. 权利要求15所述的化合物, 其中 R^1 是H且 R^2 是甲基。
 18. 权利要求15所述的化合物, 其中 R^1 是H; 且 R^2 是OH。
 19. 权利要求1-18中的任一项所述的化合物, 其中X和Y独立地是 CH_2 或O。
 20. 权利要求19所述的化合物, 其中X和Y都是 CH_2 。
 21. 权利要求19所述的化合物, 其中X和Y独立地是 CH_2 或O且X和Y是不同的。
 22. 权利要求1-18中的任一项所述的化合物, 其中X和Y独立地是 CH_2 或S。
 23. 权利要求22所述的化合物, 其中X和Y都是S。
 24. 权利要求22所述的化合物, 其中X和Y独立地是 CH_2 或S且X和Y是不同的。
 25. 权利要求1-24中的任一项所述的化合物, 其中m是1或2。
 26. 权利要求25所述的化合物, 其中m是1。
 27. 权利要求1-26中的任一项所述的化合物, 其中n是选自4-12的整数。
 28. 权利要求27所述的化合物, 其中n是选自6-10的整数。
 29. 权利要求1-28中的任一项所述的化合物, 其中q是选自2-8的整数。
 30. 权利要求29所述的化合物, 其中q是选自4-8的整数。
 31. 权利要求1-30中的任一项所述的化合物, 其中t是0。
 32. 权利要求1-30中的任一项所述的化合物, 其中t是1。
 33. 权利要求1-32中的任一项所述的化合物, 其中L是被取代的或未被取代的 C_{1-6} 亚烷基、被取代的或未被取代的 C_{1-6} 亚烯基、或被取代的或未被取代的 C_{1-6} 亚炔基、被取代的或未被取代的 C_{1-6} 亚杂烷基、被取代的或未被取代的 C_{1-6} 亚杂烯基、或被取代的或未被取代的 C_{1-6}

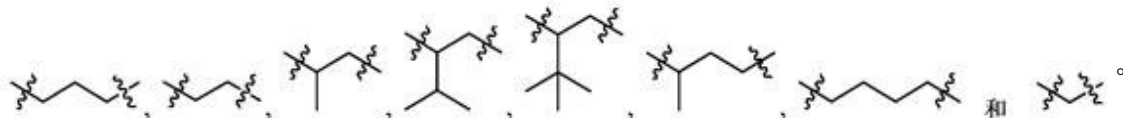
亚杂炔基。

34. 权利要求33所述的化合物, 其中L是被取代的或未被取代的C₁₋₆亚烷基。

35. 权利要求34所述的化合物, 其中L是未被取代的C₁₋₆亚烷基。

36. 权利要求34所述的化合物, 其中L是被C₁₋₆烷基取代的C₁₋₆亚烷基。

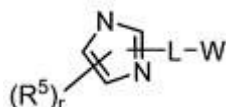
37. 权利要求33所述的化合物, 其中L选自:



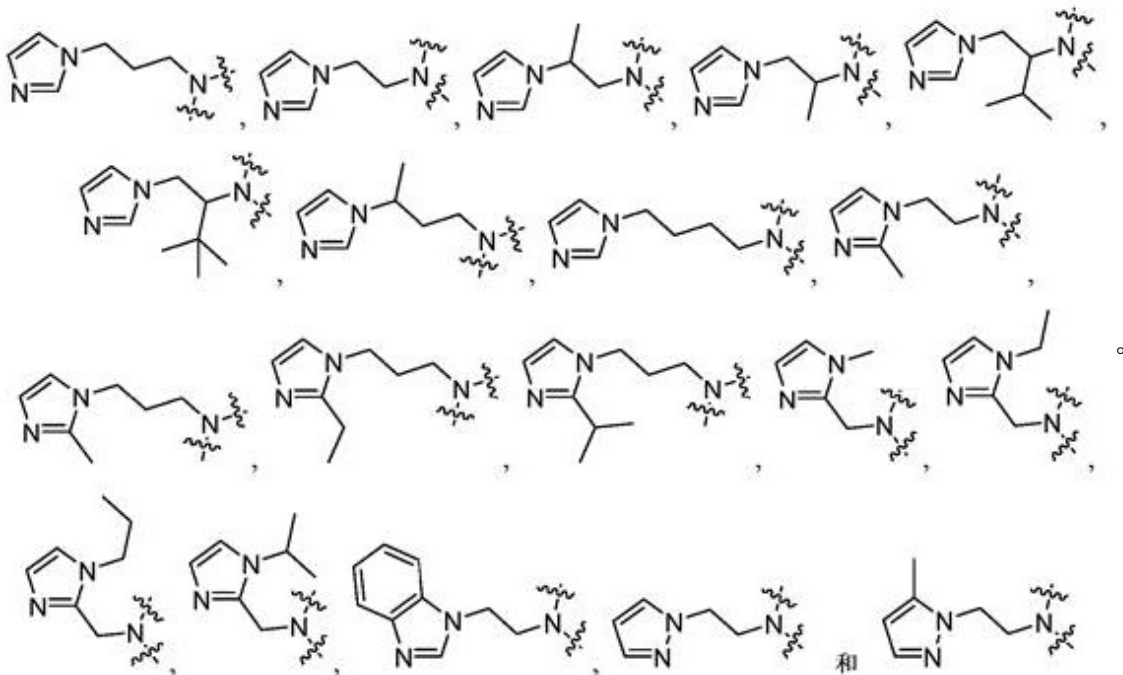
38. 权利要求1-37中的任一项所述的化合物, 其中R⁵是C₁₋₆烷基、C₂₋₆烯基、C₂₋₆炔基。

39. 权利要求38所述的化合物, 其中R⁵是C₁₋₆烷基。

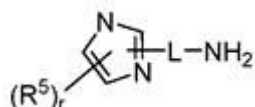
40. 权利要求1所述的化合物, 其中



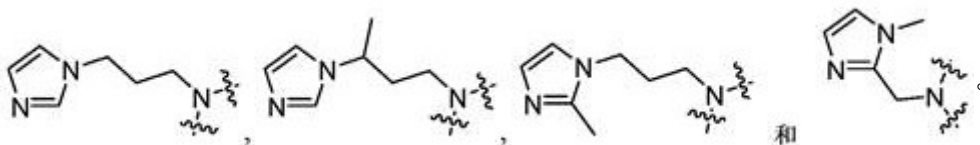
选自:



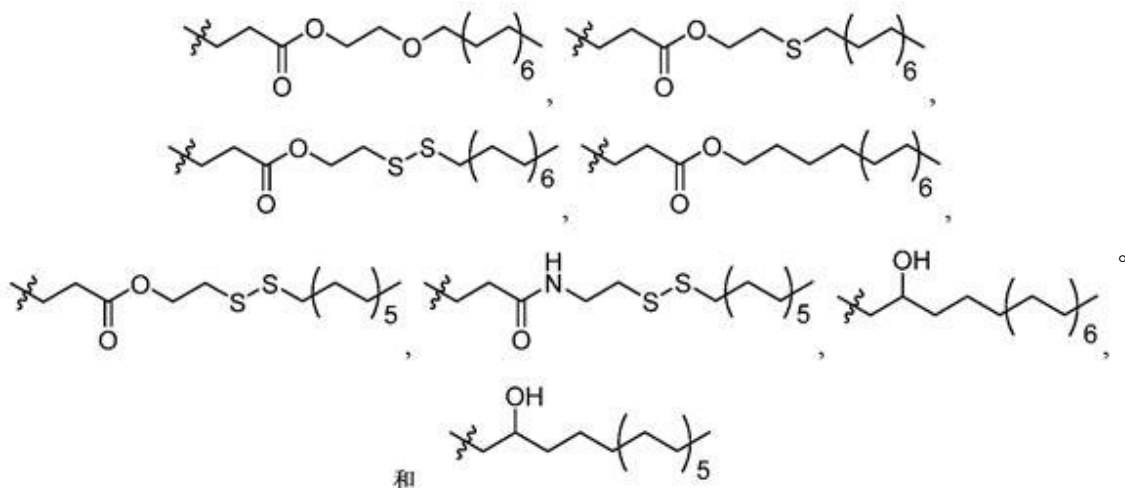
41. 权利要求40所述的化合物, 其中



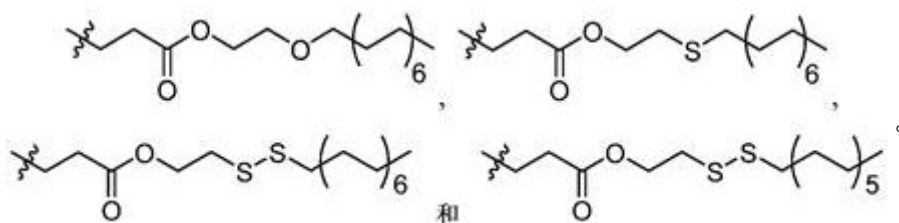
选自:



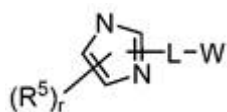
42. 权利要求1-41中的任一项所述的化合物, 其中R^脂的每个实例独立地选自



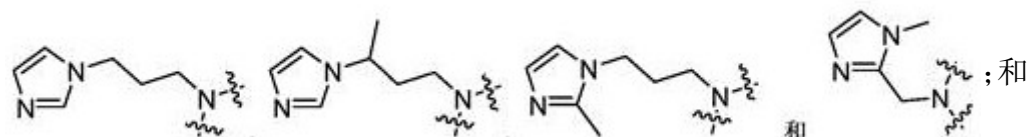
43. 权利要求42所述的化合物, 其中 $R^{\text{脂质}}$ 的每个实例独立地选自



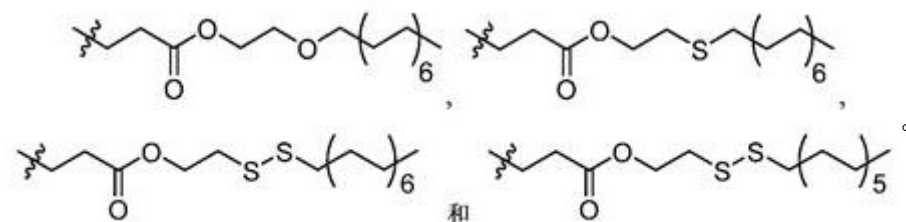
44. 权利要求1所述的化合物, 其中



选自:



$R^{\text{脂质}}$ 的每个实例独立地选自



45. 类脂质纳米颗粒, 其包含权利要求1-44中的任一项所述的化合物。

46. 权利要求45所述的类脂质纳米颗粒, 其中所述类脂质纳米颗粒进一步包含胆固醇。

47. 权利要求45或46所述的类脂质纳米颗粒, 其进一步包含DOPE或PEG2K-DEPC。

48. 权利要求45-47中的任一项所述的类脂质纳米颗粒, 其进一步包含二价镍, 其中所述化合物与所述二价镍形成螯合物。

49. 权利要求45-48中的任一项所述的类脂质纳米颗粒, 其进一步包含蛋白或核酸。

50. 权利要求49所述的类脂质纳米颗粒, 其中所述蛋白或所述核酸是GFP-Cre或

CRISPR/Cas9。

51. 权利要求50所述的类脂质纳米颗粒,其中所述蛋白或所述核酸是GFP-Cre。

52. 权利要求50所述的类脂质纳米颗粒,其中所述蛋白或所述核酸是CRISPR/Cas9。

53. 权利要求48-52中的任一项所述的类脂质纳米颗粒,其中所述二价镍通过非共价相互作用结合所述蛋白或所述核酸。

54. 权利要求45-53中的任一项所述的类脂质纳米颗粒,其进一步包含小分子。

55. 权利要求54所述的类脂质纳米颗粒,其中所述小分子是抗真菌剂或化学治疗剂。

56. 权利要求54所述的类脂质纳米颗粒,其中所述小分子选自:硼替佐米、伊马替尼、吉非替尼、埃罗替尼、阿法替尼、奥希替尼、达可替尼、盐酸柔红霉素、阿糖胞苷、氟尿嘧啶、盐酸伊立替康、硫酸长春新碱、甲氨蝶呤、紫杉醇、硫酸长春新碱、表柔比星、多西他赛、环磷酰胺、卡铂、来那度胺、依鲁替尼、醋酸阿比特龙、恩杂鲁胺、培美曲塞、帕博西尼、尼洛替尼、依维莫司、鲁索替尼、表柔比星、吡柔比星、伊达比星、戊柔比星、氨柔比星、博来霉素、腐草霉素、更生霉素、普卡霉素、链脲佐菌素、喷司他丁、Mitosaness丝裂霉素C、烯二炔类刺孢霉素、糖苷类蝴蝶霉素、大环内酯类埃博霉素、伊沙匹隆、喷司他丁、Salinosporamide A、长春碱、长春新碱、依托泊苷、替尼泊苷、长春瑞滨、多西他赛、喜树碱、和美新、隐翅虫素、Theopederins、Annamides、曲贝替定、Aplidine和Ecteinascidin 743 (ET743)。

57. 权利要求54所述的类脂质纳米颗粒,其中所述小分子是两性霉素B或多柔比星。

58. 权利要求45-57中的任一项所述的类脂质纳米颗粒,其中所述类脂质纳米颗粒具有约25 nm至约1000 nm的粒径。

59. 权利要求58所述的类脂质纳米颗粒,其中所述类脂质纳米颗粒具有约50 nm至约750 nm的粒径。

60. 药物组合物,其包含权利要求45-59中的任一项所述的类脂质纳米颗粒和药学上可接受的载体或赋形剂。

用于在体内向免疫细胞递送mRNA的基于咪唑的合成类脂质

[0001] 相关申请

本申请要求2020年3月2日提交的美国临时专利申请系列号62/983,997的优先权的权益。

[0002] 政府支持

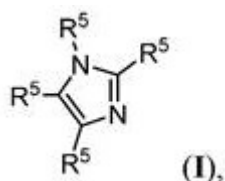
本发明是在国立卫生研究院授予的R01 EB027170-01和UG3 TR002636-01资助下在政府支持下完成的。美国政府具有本发明的某些权利。

[0003] 背景

工程化T淋巴细胞在推进癌症、病毒感染、炎症和自身免疫的治疗方面具有巨大潜力。例如,在过去几年中,嵌合抗原受体T细胞(CART)已成为FDA批准的淋巴瘤和白血病疗法之一¹。在当前的临床策略中,治疗分子向原代T淋巴细胞中的细胞内递送依赖于病毒递送系统或物理方法诸如电穿孔。然而,它需要离体富集T淋巴细胞,从而导致复杂的程序和高成本。因此,开发体内T细胞工程(其提供具有时效性且低成本的治疗)是至关重要的。由于其易于合成、快速和瞬时蛋白表达以及最小的诱变风险,mRNA是一种新兴的细胞工程方案。包括聚合物和脂质纳米颗粒的纳米材料已被研究用于将mRNA递送到不同类型的细胞中。然而,由于T淋巴细胞的有限胞吞作用和蛋白翻译,mRNA向T淋巴细胞的递送仍然是一项技术挑战。因此,需要开发用于增强体内T细胞工程的更好递送系统。

发明内容

[0004] 在某些方面,本文公开了式I的化合物及其药学上可接受的盐:



其中

R^5 是-W-L- $R^{\text{脂质}}$ 、氢、卤素、氨基、羟基、烷氧基、氰基、硝基、烷基、烯基、炔基、环烷基、杂环烷基、芳基或杂芳基;其中 R^5 中的一个且仅一个是-W-L- $R^{\text{脂质}}$;

L是二价接头;

W是 NR^{20} 、O或S;

$R^{\text{脂质}}$ 独立地是被取代的或未被取代的 C_{1-20} 烷基、被取代的或未被取代的 C_{1-20} 烯基、被取代的或未被取代的 C_{1-20} 炔基、被取代的或未被取代的 C_{1-20} 杂烷基、被取代的或未被取代的 C_{1-20} 杂烯基或被取代的或未被取代的 C_{1-20} 杂炔基;且

R^{20} 是 $R^{\text{脂质}}$ 、H、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烯基或 C_{1-6} 炔基。

[0005] 在某些实施方案中,W是 NR^{20} 或S。在某些实施方案中,W是S。在某些实施方案中,W是 NR^{20} 。

[0006] 在某些实施方案中, R^{20} 是 $R^{\text{脂质}}$ 。

[0007] 附图简述

图1A-1C显示了类脂质制剂、递送时间和递送浓度的优化。图1A显示了用不同比率的赋形剂配制的负载FLuc mRNA的93-017S处理过的原代人CD8⁺ T淋巴细胞的发光表达。仅配制的类脂质显示成功的递送活性。UT:未处理。将数据呈现为平均值 $\pm$ SD, $n = 3$ 。图1B-1C显示了用负载FLuc mRNA的93-017S处理过的原代人CD8⁺ T淋巴细胞的(图1B)时间依赖性的和(图1C)剂量依赖性的发光表达。UT:未处理。将数据呈现为平均值 $\pm$ SD, $n = 2$ 。

[0008] 图2是大致至详细筛选的示意图。从大致筛选选择含有咪唑的类脂质。构建含有咪唑和咪唑类似物的文库用于详细筛选。将从所述筛选选择的类脂质用于体内生物发光和基因重组。

[0009] 图3A-3C显示了用于在体外向原代T淋巴细胞递送mRNA的类脂质的大致筛选。图3A是类脂质的合成途径。图3B显示了用于类脂质合成的胺头和碳尾的化学结构。图3C显示了使用FLuc mRNA在原代人CD8⁺ T淋巴细胞中对不同类脂质文库的大致筛选的结果。“F”指示使用胆固醇、DOPE和DSPE-PEG配制为16: 4: 1: 1的重量比的类脂质。“NF”指示非配制的类脂质。LF2000:Lipofectamine 2000.mRNA:没有负载至纳米颗粒的单独mRNA。将数据呈现为平均值 $\pm$ SD, 两个单独实验, 每个一式三份。

[0010] 图4A-4B显示了含有咪唑和咪唑类似物头的类脂质的详细筛选。图4A显示了胺头93类似物头的化学结构。胺9310 - 9315具有在间隔物上的不同分支和不同的间隔物长度; 胺9321 - 9324具有在2-咪唑处的分支; 胺9331 - 9334具有在1-咪唑处的分支和在2-咪唑处的间隔物; 胺9341 - 9352的咪唑类似物被咪唑替代。红色结构指示对递送的正效应, 且蓝色结构指示对递送的负效应。图4B显示了使用FLuc mRNA在原代人CD8⁺ T淋巴细胞中对咪唑类似物头的详细筛选的结果。UT:未处理。将数据呈现为平均值 $\pm$ SD, $n = 3$ 。

[0011] 图5A-5B显示了类脂质尾的详细筛选。图5A显示了具有不同尾的类脂质的化学结构。图5B显示了使用FLuc mRNA在原代人CD8⁺ T淋巴细胞中对类脂质尾的详细筛选的结果。将数据呈现为平均值 $\pm$ SD, $n = 3$ 。* $p < 0.05$ 。** $p < 0.005$ 。

[0012] 图6的图显示了用不同浓度的负载了EGFP mRNA的93-017S或9322-017S处理后原代人CD8⁺ T淋巴细胞的流式细胞术直方图。UT:未处理。

[0013] 图7A-7B是类脂质纳米颗粒的pKa和溶血分析的条形图。图7A. 在详细胺头93类似物文库和尾文库中的类脂质的pKa分析; 图7B. 在详细胺头93类似物文库和尾文库中的类脂质的溶血分析。

[0014] 图8A-8C是使用所选类脂质的使用IVIS的生物发光图像。图8A-8B. 在静脉内注射负载FLuc mRNA的类脂质后(图8A)完整小鼠和(图8B)器官的代表性生物发光图像。图8C. 将组织和细胞匀浆化并裂解以检测来自静脉内注射了负载FLuc mRNA的类脂质的小鼠的发光表达。将发光强度归一化至总蛋白量。PBS:注射了PBS的小鼠。将数据呈现为平均值 $\pm$ SD, $n = 3$ 。

[0015] 图9A-9C是使用无效类脂质的使用IVIS的生物发光图像。图9A. 在静脉内注射负载FLuc mRNA的类脂质后使用IVIS的完整小鼠的代表性生物发光图像。图9B. 静脉内注射负载FLuc mRNA的9313-018S-S后使用IVIS的器官的代表性生物发光图像。图9C. 通过静脉途径向Ai14小鼠体内递送Cre重组酶mRNA。在注射后10天通过共焦显微术检测脾中的tdTomato表达。用CD3 ϵ 抗体标记T细胞。

[0016] 图10A-10C显示了通过静脉途径向Ai14小鼠体内递送Cre重组酶mRNA。图10A和

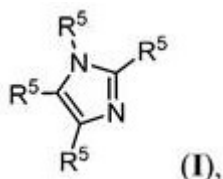
10B. 在注射后10天通过共焦显微术检测脾中的tdTomato表达。用(图10A) CD3 ϵ 抗体和(图10B) CD8a抗体标记T细胞。图10C. 在注射后10天脾细胞的流式细胞术分析。量化CD4 $^{+}$ T细胞、CD8 $^{+}$ T细胞、B细胞(CD45R)、巨噬细胞(F4/80)和树突细胞(CD11c)中的tdTomato表达。将数据呈现为三只小鼠的平均值 $\pm$ SD,每只一式两份。 $*p < 0.05$ 。 $**p < 0.005$ 。 $***p < 0.001$ 。

[0017] 图11显示了向巨噬细胞体内递送Cre重组酶mRNA。在静脉内注射后10天通过共焦显微术检测脾中的tdTomato表达。用F4/80抗体标记巨噬细胞。

[0018] 图12的图显示了通过静脉途径向Ai14小鼠体内递送Cre重组酶mRNA后脾细胞的流式细胞术点图。在递送后10天,分析CD4 $^{+}$ T细胞和CD8 $^{+}$ T细胞中的tdTomato表达。

[0019] 详细描述

在某些方面,本文公开了式I的化合物及其药学上可接受的盐:



其中

R^5 是-W-L- $R^{\text{脂膜}}$ 、氢、卤素、氨基、羟基、烷氧基、氰基、硝基、烷基、烯基、炔基、环烷基、杂环烷基、芳基或杂芳基;其中 R^5 中的一个且仅一个是-W-L- $R^{\text{脂膜}}$;

L是二价接头;

W是NR ^{20} 、O或S;

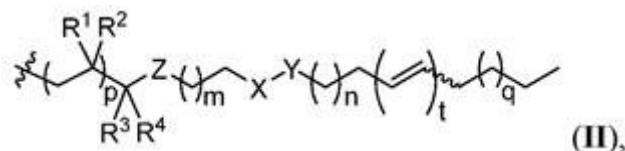
$R^{\text{脂膜}}$ 独立地是被取代的或未被取代的C $_{1-20}$ 烷基、被取代的或未被取代的C $_{1-20}$ 烯基、被取代的或未被取代的C $_{1-20}$ 炔基、被取代的或未被取代的C $_{1-20}$ 杂烷基、被取代的或未被取代的C $_{1-20}$ 杂烯基、或被取代的或未被取代的C $_{1-20}$ 杂炔基;且

R^{20} 是 $R^{\text{脂膜}}$ 、H、C $_{1-6}$ 烷基、C $_{1-6}$ 烯基或C $_{1-6}$ 炔基。

[0020] 在某些实施方案中,W是NR ^{20} 或S。在某些实施方案中,W是S。在某些实施方案中,W是NR ^{20} 。

[0021] 在某些实施方案中, R^{20} 是 $R^{\text{脂膜}}$ 。

[0022] 在某些实施方案中, $R^{\text{脂膜}}$ 由式II表示:



其中

R^1 和 R^2 独立地是H、甲基、OH、NHR ^{30} 或SH;

R^3 和 R^4 都是H;或 R^3 和 R^4 一起形成氧代(=O)基团;

Z是O、NR ^{30} 或S;

X和Y独立地是CH $_2$ 、NR ^{30} 、O、S或Se;

m是选自1-3的整数;

n是选自1-14的整数;

p是0或1;

q是选自1-10的整数;

t是0或1;且

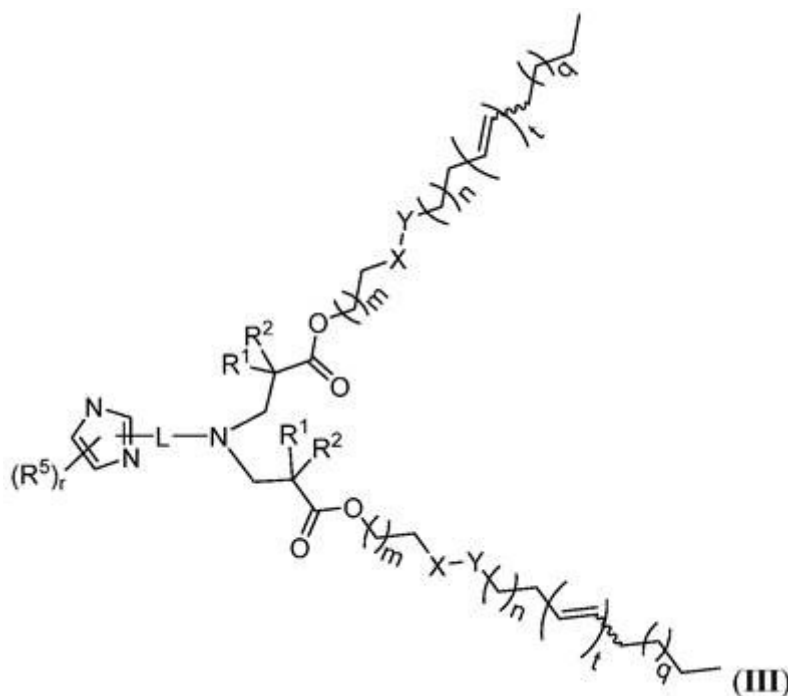
R^{30} 是H、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烯基或 C_{1-6} 炔基。

[0023] 在某些实施方案中, R^3 和 R^4 都是H。在某些实施方案中, R^3 和 R^4 一起形成氧代(=O)基团。

[0024] 在某些实施方案中,p是0。在某些实施方案中,p是1。

[0025] 在某些实施方案中,Z是O或 NR^{30} 。在某些实施方案中,Z是O。在某些实施方案中,Z是 NR^{30} 。

[0026] 在某些实施方案中,所述化合物是式III的化合物:



[0027] 在某些实施方案中, R^1 和 R^2 独立地是H、甲基或OH。在某些实施方案中, R^1 和 R^2 都是H。在某些实施方案中, R^1 是H且 R^2 是甲基。在某些实施方案中, R^1 是H;且 R^2 是OH。

[0028] 在某些实施方案中,X和Y独立地是 CH_2 或O。在某些实施方案中,X和Y都是 CH_2 。在某些实施方案中,X和Y独立地是 CH_2 或O且X和Y是不同的。

[0029] 在某些实施方案中,X和Y独立地是 CH_2 或S。在某些实施方案中,X和Y都是S。在某些实施方案中,X和Y独立地是 CH_2 或S且X和Y是不同的。

[0030] 在某些实施方案中,m是1或2。在某些实施方案中,m是1。

[0031] 在某些实施方案中,n是选自4-12的整数。在某些实施方案中,n是选自6-10的整数。

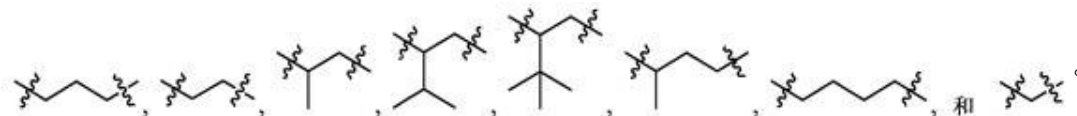
[0032] 在某些实施方案中,q是选自2-8的整数。在某些实施方案中,q是选自4-8的整数。

[0033] 在某些实施方案中,t是0。在某些实施方案中,t是1。

[0034] 在某些实施方案中,L是被取代的或未被取代的 C_{1-6} 亚烷基、被取代的或未被取代的 C_{1-6} 亚烯基或被取代的或未被取代的 C_{1-6} 亚炔基、被取代的或未被取代的 C_{1-6} 亚杂烷基、被取代的或未被取代的 C_{1-6} 亚杂烯基或被取代的或未被取代的 C_{1-6} 亚杂炔基。

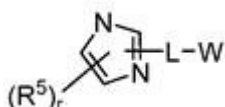
[0035] 在某些实施方案中,L是被取代的或未被取代的C₁₋₆亚烷基。在某些实施方案中,L是未被取代的C₁₋₆亚烷基。在某些实施方案中,L是被C₁₋₆烷基取代的C₁₋₆亚烷基。

[0036] 在某些实施方案中,L选自:

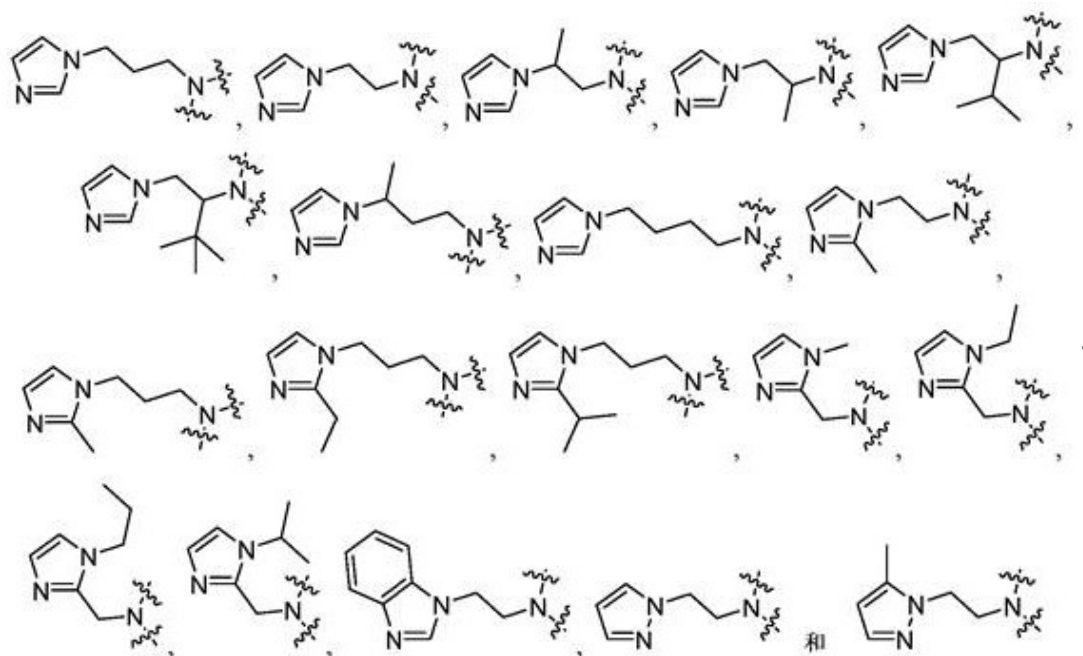


[0037] 在某些实施方案中,R⁵是C₁₋₆烷基、C₂₋₆烯基、C₂₋₆炔基。在某些实施方案中,R⁵是C₁₋₆烷基。

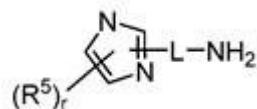
[0038] 在某些实施方案中,



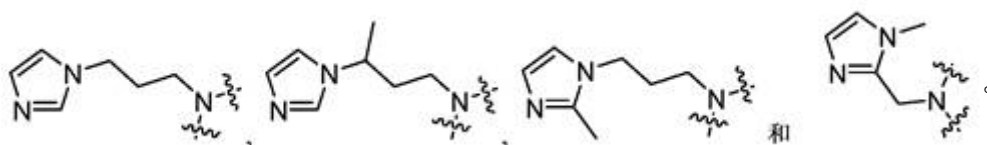
选自:



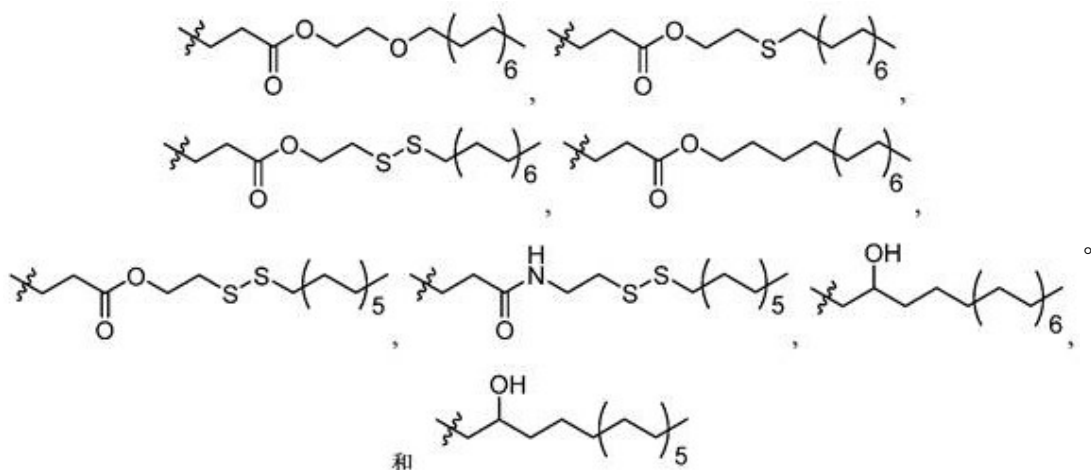
[0039] 在某些实施方案中,



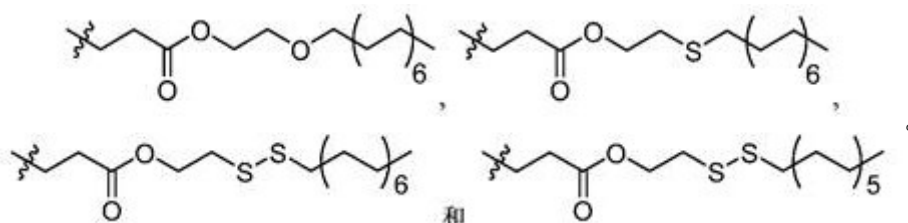
选自:



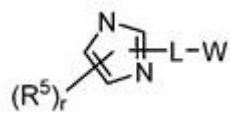
[0040] 在某些实施方案中,R^脂的每个实例独立地选自



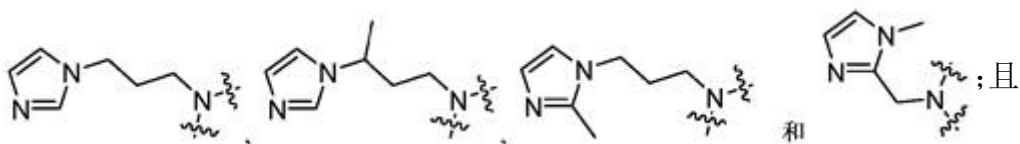
[0041] 在某些实施方案中, $R^{\text{脂质}}$ 的每个实例独立地选自



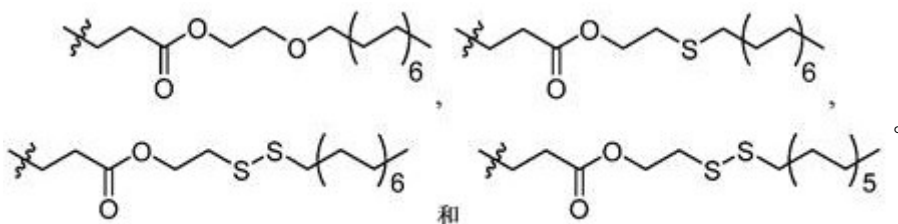
[0042] 在某些实施方案中,



选自:



$R^{\text{脂质}}$ 的每个实例独立地选自



[0043] 在另一个方面, 提供了类脂质纳米颗粒, 其包含本文中公开的化合物。

[0044] 在某些实施方案中, 所述类脂质纳米颗粒进一步包含胆固醇。

[0045] 在某些实施方案中, 所述类脂质纳米颗粒进一步包含DOPE或PEG2K-DEPC。

[0046] 在某些实施方案中, 所述类脂质纳米颗粒进一步包含二价镍, 其中所述化合物与
所述二价镍形成螯合物。

[0047] 在某些实施方案中, 所述类脂质纳米颗粒进一步包含蛋白或核酸。

[0048] 在某些实施方案中, 所述蛋白或所述核酸是GFP-Cre或CRISPR/Cas9。在某些实施
方案中, 所述蛋白或所述核酸是GFP-Cre。在某些实施方案中, 所述蛋白或所述核酸是

CRISPR/Cas9。

[0049] 在某些实施方案中,所述二价镍通过非共价相互作用结合所述蛋白或所述核酸。

[0050] 在某些实施方案中,所述类脂质纳米颗粒进一步包含小分子。

[0051] 在某些实施方案中,所述小分子是抗真菌剂或化学治疗剂。

[0052] 在某些实施方案中,所述小分子选自:硼替佐米、伊马替尼、吉非替尼、埃罗替尼、阿法替尼、奥希替尼、达可替尼、盐酸柔红霉素、阿糖胞苷、氟尿嘧啶、盐酸伊立替康、硫酸长春新碱、甲氨蝶呤、紫杉醇、硫酸长春新碱、表柔比星、多西他赛、环磷酰胺、卡铂、来那度胺、依鲁替尼、醋酸阿比特龙、恩杂鲁胺、培美曲塞、帕博西尼、尼洛替尼、依维莫司、鲁索替尼、表柔比星、吡柔比星、伊达比星、戊柔比星、氨柔比星、博来霉素、腐草霉素、更生霉素、普卡霉素、链脲佐菌素、喷司他丁、Mitosan丝裂霉素C、烯二炔类刺孢霉素(Enediynes calicheamycin)、糖苷类蝴蝶霉素、大环内酯类埃博霉素、伊沙匹隆、喷司他丁、Salinosporamide A、长春碱、长春新碱、依托泊苷、替尼泊苷、长春瑞滨、多西他赛、喜树碱、和美新、隐翅虫素(Pederin)、Theopederins、Annamides、曲贝替定(Trabectedin)、Aplidine和Ecteinascidin 743(ET743)。

[0053] 在某些实施方案中,其中所述小分子是两性霉素B或多柔比星。

[0054] 在某些实施方案中,所述类脂质纳米颗粒具有约25 nm至约1000 nm的粒径。在某些实施方案中,所述类脂质纳米颗粒具有约50 nm至约750 nm的粒径。

[0055] 在另一个方面,提供了药物组合物,其包含本文中公开的一类脂质纳米颗粒和药学上可接受的载体或赋形剂。

[0056] 定义

除非本文另有定义,否则本申请中使用的科学和技术术语应具有本领域技术人员通常所理解的含义。通常,本文描述的与化学、细胞和组织培养、分子生物学、细胞和癌症生物学、神经生物学、神经化学、病毒学、免疫学、微生物学、药理学、遗传学和蛋白质和核酸化学关联使用的术语和其技术是本领域众所周知和常用的那些。

[0057] 除非另有说明,否则通常根据本领域众所周知的常规方法和如贯穿本说明书引述和讨论的各种一般和更具体的参考文献所描述的那样执行本公开的方法和技术。参见,例如“Principles of Neural Science”, McGraw-Hill Medical, New York, N.Y. (2000); Motulsky, “Intuitive Biostatistics”, Oxford University Press, Inc. (1995); Lodish等人, “Molecular Cell Biology, 第4版”, W. H. Freeman & Co., New York (2000); Griffiths等人, “Introduction to Genetic Analysis, 第7版”, W. H. Freeman & Co., N.Y. (1999);和Gilbert等人, “Developmental Biology, 第6版”, Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA (2000)。

[0058] 除非在本文中另外定义,否则根据本领域中的常规用法使用本文中使用的化学术语,如“The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms”, Parker S.编, McGraw-Hill, San Francisco, C.A. (1985)所举例说明的。

[0059] 本文中使用的术语“任选的”或“任选地”是指,随后描述的事件或情况可能发生或可能不发生,并且所述描述包括所述事件或情况发生的情形以及所述事件或情况不发生的情形。例如,“任选地被取代的烷基”表示所述烷基可被取代以及所述烷基未被取代的情况。

[0060] 应当理解,本领域普通技术人员可以选择本发明的化合物上的取代基和取代模式

以产生化学上稳定的化合物,所述化合物可以通过本领域已知的技术以及下面阐述的那些方法从容易得到的起始材料容易地合成。如果取代基本身被超过一个基团取代,应当理解,这多个基团可以是在同一个碳上或在不同碳上,只要产生稳定的结构即可。

[0061] 本文中使用的术语“任选地被取代的”是指用指定取代基的基团替代给定结构中的1-6个氢基团,所述取代基包括、但不限于:羟基、羟基烷基、烷氧基、卤素、烷基、硝基、甲基硅烷基、酰基、酰氧基、芳基、环烷基、杂环基、氨基、氨基烷基、氰基、卤代烷基、卤代烷氧基、 $-OCO-CH_2-O-$ 烷基、 $-OP(O)(O-烷基)_2$ 或 $-CH_2-OP(O)(O-烷基)_2$ 。优选地,“任选地被取代的”是指用上面提及的取代基替代给定结构中的1-4个氢基团。更优选地,用上面提及的取代基替代1-3个氢基团。应当理解,所述取代基可以进一步被取代。

[0062] 冠词诸如“一个”、“一种”和“所述”可以是指一个/种或多于一个/种,除非指示相反情形或以其它方式从上下文显而易见。如果组成员中的一个、超过一个或全部存在于给定产品或方法中、用于给定产品或方法中、或以其它方式与给定产品或方法相关,那么在组的一个或多个成员之间包含“或”的权利要求或描述被认为是得到满足的,除非指示相反情形或以其它方式从上下文显而易见。本发明包括这样的实施方案,其中所述组的刚好一个成员存在于给定产品或方法中、用于给定产品或方法中或者以其它方式与给定产品或方法相关。本发明包括这样的实施方案,其中所述组成员中的超过一个或全部都存在于给定产品或方法中、用于给定产品或方法中或者以其它方式与给定产品或方法相关。

[0063] 本文中使用的术语“烷基”是指饱和的脂族基团,包括、但不限于 C_1-C_{10} 直链烷基基团或 C_1-C_{10} 支链烷基基团。优选地,所述“烷基”基团是指 C_1-C_6 直链烷基基团或 C_1-C_6 支链烷基基团。最优选地,所述“烷基”基团是指 C_1-C_4 直链烷基基团或 C_1-C_4 支链烷基基团。“烷基”的例子包括、但不限于甲基、乙基、1-丙基、2-丙基、正丁基、仲丁基、叔丁基、1-戊基、2-戊基、3-戊基、新戊基、1-己基、2-己基、3-己基、1-庚基、2-庚基、3-庚基、4-庚基、1-辛基、2-辛基、3-辛基或4-辛基等。“烷基”基团可以任选地被取代。

[0064] 术语“酰基”是本领域公认的,并且是指由通式 $HC(O)-$ 表示的基团,优选烷基 $C(O)-$ 。

[0065] 术语“酰基氨基”是本领域公认的,是指被酰基取代的氨基,并且可以例如由式 $HC(O)NH-$ 表示。

[0066] 术语“酰氧基”是本领域公认的,并且是指由通式 $HC(O)O-$ 表示的基团,优选烷基 $C(O)O-$ 。

[0067] 术语“烷氧基”是指具有与其连接的氧的烷基基团。代表性的烷氧基基团包括甲氧基、乙氧基、丙氧基、叔丁氧基等。

[0068] 术语“烷氧基烷基”是指被烷氧基取代的烷基,且可以由通式 $烷氧基-O-烷基$ 表示。

[0069] 术语“烷基”是指饱和的脂族基团,包括直链烷基基团、支链烷基基团、环烷基(脂环族)基团、烷基-取代的环烷基基团和环烷基-取代的烷基基团。在优选的实施方案中,直链或支链烷基在其主链中具有30个或更少的碳原子(例如,对于直链而言 C_{1-30} ,对于支链而言 C_{3-30}),且更优选20或更少。

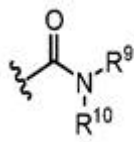
[0070] 此外,贯穿说明书、实施例和权利要求书使用的术语“烷基”意图包括未被取代的和被取代的烷基基团,其中后者是指具有取代基的烷基部分,所述取代基替代在烃主链的一个或多个碳上的氢,包括卤代烷基基团诸如三氟甲基和2,2,2-三氟乙基等。

[0071] 当与化学部分例如酰基、酰氧基、烷基、烯基、炔基或烷氧基结合使用时,术语“C_{x-y}”或“C_x-C_y”意在包括在链中含有x至y个碳的基团。C₀烷基指示氢(在该基团位于末端位置的情况下)、键(如果在内部)。例如,C₁₋₆烷基基团在链中含有1-6个碳原子。

[0072] 本文中使用的术语“烷基氨基”是指被至少一个烷基基团取代的氨基基团。

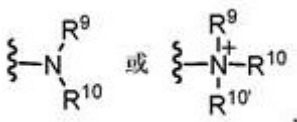
[0073] 本文中使用的术语“烷硫基”是指被烷基基团取代的巯基基团,且可以由通式烷基S-表示。

[0074] 本文中使用的术语“酰胺”是指基团



其中R⁹和R¹⁰各自独立地表示氢或烃基基团,或R⁹和R¹⁰与它们所连接的N原子一起形成在环结构中具有4-8个原子的杂环。

[0075] 术语“胺”和“氨基”是本领域公知的,且是指未被取代的和被取代的胺及其盐,例如,可以由下式表示的部分



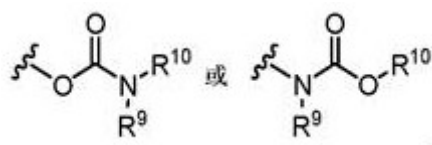
其中R⁹、R¹⁰和R^{10'}各自独立地表示氢或烃基基团,或R⁹和R¹⁰与它们所连接的N原子一起形成在环结构中具有4-8个原子的杂环。

[0076] 本文中使用的术语“氨基烷基”是指被氨基基团取代的烷基基团。

[0077] 本文中使用的术语“芳烷基”是指被芳基基团取代的烷基基团。

[0078] 本文中使用的术语“芳基”包括被取代的或未被取代的单环芳族基团,其中环的每个原子是碳。优选地,所述环是5-7元环,更优选6元环。术语“芳基”还包括具有两个或更多个环的多环系统,其中两个或更多个碳是两个邻接环所共有的,其中至少一个环是芳族环,例如,其它环可以是环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂芳基和/或杂环基。芳基包括苯、萘、菲、苯酚、苯胺等。

[0079] 术语“氨基甲酸酯”是本领域公认的,并且是指基团



其中R⁹和R¹⁰独立地表示氢或烃基基团。

[0080] 本文中使用的术语“碳环基烷基”是指被碳环基团取代的烷基基团。

[0081] 术语“碳环”包括5-7元单环和8-12元二环。二环碳环的每个环可以选自饱和的、不饱和的和芳族的环。碳环包括其中在两个环之间共享一个、两个或三个或更多个原子的二环分子。术语“稠合碳环”是指其中每个环与另一个环共享两个相邻原子的二环碳环。稠合碳环的每个环可以选自饱和的、不饱和的和芳族的环。在一个示例性实施方案中,芳族环(例如,苯基)可以稠合至饱和的或不饱和的环,例如,环己烷、环戊烷或环己烯。只要化合价

允许,饱和的、不饱和的和芳族的二环的任何组合都包括在碳环的定义中。示例性的“碳环”包括环戊烷、环己烷、二环[2.2.1]庚烷、1,5-环辛二烯、1,2,3,4-四氢萘、二环[4.2.0]辛-3-烯、萘和金刚烷。示例性的稠合碳环包括十氢化萘、萘、1,2,3,4-四氢萘、二环[4.2.0]辛烷、4,5,6,7-四氢-1H-茚和二环[4.1.0]庚-3-烯。“碳环”可以在任何一个或多个能够带有氢原子的位置被取代。

[0082] 本文中使用的术语“碳环基烷基”是指被碳环基团取代的烷基基团。

[0083] 术语“碳酸酯”是本领域公认的,并且是指基团 $-\text{OCO}_2^-$ 。

[0084] 本文中使用的术语“羧基”是指由式 $-\text{CO}_2\text{H}$ 表示的基团。

[0085] 本文中使用的术语“酯”是指基团 $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^9$,其中 R^9 表示烃基基团。

[0086] 本文中使用的术语“醚”是指通过氧连接至另一个烃基基团的烃基基团。因此,烃基基团的醚取代基可以是烃基-0-。醚可以是对称的或非对称的。醚的例子包括、但不限于杂环-0-杂环和芳基-0-杂环。醚包括“烷氧基烷基”基团,其可以由通式烷基-0-烷基表示。

[0087] 本文中使用的术语“卤代”和“卤素”是指卤素,并且包括氯、氟、溴和碘。

[0088] 本文中使用的术语“杂芳烷基(hetaralkyl)”和“杂芳烷基(heteroaralkyl)”是指被杂芳基基团取代的烷基基团。

[0089] 术语“杂芳基(heteroaryl)”和“杂芳基(hetaryl)”包括被取代的或未被取代的芳族单环结构,优选5至7元环,更优选5至6元环,其环结构包括至少一个杂原子,优选1至4个杂原子,更优选一个或两个杂原子。术语“杂芳基(heteroaryl)”和“杂芳基(hetaryl)”也包括具有两个或更多个环的多环系统,其中两个或更多个碳是两个邻接环所共有的,其中至少一个环是杂芳族的,例如,其它环可以是环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂芳基和/或杂环基。杂芳基包括例如吡咯、呋喃、噻吩、咪唑、噁唑、噻唑、吡唑、吡啶、吡嗪、哒嗪和嘧啶等。

[0090] 本文中使用的术语“杂原子”是指除了碳或氢以外的任何元素的原子。优选的杂原子是氮、氧和硫。

[0091] 本文中使用的术语“杂环基烷基”是指被杂环基团取代的烷基基团。

[0092] 术语“杂环基”、“杂环”和“杂环的”是指被取代的或未被取代的非芳族环结构,优选为3至10元环,更优选为3至7元环,其环结构包括至少一个杂原子,优选1至4个杂原子,更优选一个或两个杂原子。术语“杂环基”和“杂环的”也包括具有两个或更多个环的多环系统,其中两个或更多个碳是两个邻接环所共有的,其中至少一个环是杂环的,例如,其它环可以是环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂芳基和/或杂环基。杂环基基团包括,例如,哌啶、哌嗪、吡咯烷、吗啉、内酯、内酰胺等。

[0093] 本文中使用的术语“烃基”是指通过不具有 $=\text{O}$ 或 $=\text{S}$ 取代基的碳原子键合的基团,且通常具有至少一个碳-氢键和主要碳主链,但可以任选地包括杂原子。因此,为了本申请的目的,基团如甲基、乙氧基乙基、2-吡啶基和甚至三氟甲基被认为是烃基,但取代基诸如乙酰基(其在连接碳上具有 $=\text{O}$ 取代基)和乙氧基(其通过氧而不是碳连接)不是。烃基基团包括、但不限于芳基、杂芳基、碳环、杂环、烷基、烯基、炔基和它们的组合。

[0094] 本文中使用的术语“羟基烷基”是指被羟基取代的烷基。

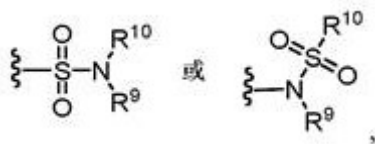
[0095] 当与化学部分例如酰基、酰氧基、烷基、烯基、炔基或烷氧基结合使用时,术语“低级”意在包括这样的基团:其中在取代基中存在十个或更少的原子,优选六个或更少。例如,“低级烷基”是指含有十个或更少碳原子、优选六个或更少碳原子的烷基。在某些实施方案

中,本文所定义的酰基、酰氧基、烷基、烯基、炔基或烷氧基取代基分别为低级酰基、低级酰氧基、低级烷基、低级烯基、低级炔基或低级烷氧基,无论它们是单独出现还是与其它取代基组合出现,例如在叙述羟基烷基和芳烷基中(在这种情况下,例如,当计数烷基取代基中的碳原子时,不计数芳基内的原子)。

[0096] 术语“多环基”、“多环”和“多环的”是指两个或更多个环(例如,环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂芳基和/或杂环基),其中两个或更多个原子是两个邻接环所共有的,例如,所述环是“稠合环”。多环的每个环可以是取代的或未被取代的。在某些实施方案中,多环的每个环在环中含有3-10个原子,优选5-7个。

[0097] 术语“硫酸酯”是本领域公认的,并且是指基团 $-\text{OSO}_3\text{H}$ 或其药学上可接受的盐。

[0098] 术语“磺酰胺”是本领域公认的,并且是指由以下通式表示的基团



其中 R^9 和 R^{10} 独立地表示氢或烃基。

[0099] 术语“亚砷”是本领域公认的,并且是指基团 $-\text{S}(0)^-$ 。

[0100] 术语“磺酸酯”是本领域公认的,并且是指基团 SO_3H 或其药学上可接受的盐。

[0101] 术语“砷”是本领域公认的,并且是指基团 $-\text{S}(0)_2^-$ 。

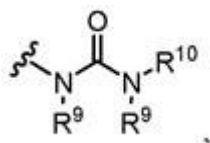
[0102] 术语“取代”是指具有替代主链的一个或多个碳上的氢的取代基的部分。应理解,“取代”或“被.....取代”包括隐含条件,即这样的取代是根据被取代的原子和取代基的允许化合价,并且所述取代产生稳定的化合物,例如其不会通过例如重排、环化、消除等而自发地发生转化。考虑本文中使用的术语“取代”包括有机化合物的所有可允许的取代基。在一个宽泛的方面,所述可允许的取代基包括有机化合物的无环的和环状的、支链的和直链的、碳环的和杂环的、芳族的和非芳族的取代基。可允许的取代基对于适当的有机化合物而言可以是一种或多种、相同或不同的。为了本发明的目的,杂原子(诸如氮)可以具有氢取代基和/或本文描述的有机化合物的任意可允许的取代基,所述取代基满足杂原子的化合价。取代基可以包括本文描述的任何取代基,例如,卤素、羟基、羰基(诸如羧基、烷氧基羰基、甲酰基或酰基)、硫代羰基(诸如硫代酸酯、硫代乙酸酯或硫代甲酸酯)、烷氧基、磷酰基、磷酸酯、膦酸酯、次膦酸酯、氨基、酰氨基、脒、亚胺、氰基、硝基、叠氮基、巯基、烷硫基、硫酸酯、磺酸酯、氨磺酰基、磺酰胺基、磺酰基、杂环基、芳烷基或芳族或杂芳族部分。本领域技术人员将理解,如果合适,在烃链上取代的部分本身可以被取代。

[0103] 本文中使用的术语“硫烷基”是指被巯基基团取代的烷基基团。

[0104] 本文中使用的术语“硫代酸酯”是指基团 $-\text{C}(0)\text{SR}^9$ 或 $-\text{SC}(0)\text{R}^9$,其中 R^9 表示烃基。

[0105] 本文中使用的术语“硫醚”等同于其中氧被硫替换的醚。

[0106] 术语“脲”是本领域公认的,并且可以由以下通式表示



其中 R^9 和 R^{10} 独立地表示氢或烃基。

[0107] 本文中使用的术语“调节”包括抑制或遏制功能或活性(诸如细胞增殖)以及增强功能或活性。

[0108] 短语“药学上可接受的”是本领域公认的。在某些实施方案中,该术语包括组合物、赋形剂、助剂、聚合物和其它材料和/或剂型,其在合理的医学判断范围内适合与人类和动物的组织接触使用,而没有过度的毒性、刺激、变应性反应或其它问题或并发症,与合理的效益/风险比相称。

[0109] “盐”在本文中用于表示酸加成盐或碱加成盐。

[0110] 可用于本公开的方法和组合物的许多化合物在其结构中具有至少一个立体中心。该立体中心可以以R或S构型存在,所述R和S符号与Pure Appl. Chem. (1976), 45, 11-30中描述的规则一致地使用。本公开涵盖化合物、盐、前药或其混合物的所有立体异构形式诸如对映异构体形式和非对映异构体形式(包括立体异构体的所有可能的混合物)。参见,例如,WO 01/062726。

[0111] 此外,某些含有烯基的化合物可以作为Z (zusammen)或E (entgegen)异构体存在。在每种情况下,本公开包括混合物和分开的单一异构体。

[0112] 一些化合物也可以以互变异构形式存在。尽管未在本文所述的式中明确指出,但这样的形式意图被包括在本公开的范围之内。

[0113] “药学上可接受的”是指,被联邦或州政府的管理机构或美国以外国家的相应机构批准或可被其批准,或在美国药典或其它普遍公认的药典中列出用于动物和更具体地用于人类。

[0114] “药学上可接受的盐”是指本发明的化合物的盐,其为药学上可接受的并且具有母体化合物的期望的药理学活性。特别地,这样的盐是无毒的,可以是无机或有机酸加成盐和碱加成盐。具体地,这样的盐包括:(1)酸加成盐,其由无机酸形成,所述无机酸例如盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸等;或由有机酸形成,所述有机酸例如乙酸、丙酸、己酸、环戊烷丙酸、羟乙酸、丙酮酸、乳酸、丙二酸、琥珀酸、苹果酸、马来酸、富马酸、酒石酸、柠檬酸、苯甲酸、3-(4-羟基苯甲酰基)苯甲酸、肉桂酸、扁桃酸、甲磺酸、乙磺酸、1,2-乙烷-二磺酸、2-羟基乙磺酸、苯磺酸、氯苯磺酸、2-萘磺酸、4-甲苯磺酸、樟脑磺酸、4-甲基二环[2.2.2]-辛-2-烯-1-甲酸、葡庚糖酸、3-苯基丙酸、三甲基乙酸、叔丁基乙酸、月桂基硫酸、葡萄糖酸、谷氨酸、羟基萘甲酸、水杨酸、硬脂酸、粘康酸等;或(2)当存在于母体化合物中的酸性质子被金属离子(例如,碱金属离子、碱土金属离子或铝离子)替代或与有机碱(诸如乙醇胺、二乙醇胺、三乙醇胺、N-甲基葡萄糖胺等)配位时形成的盐。仅作为例子,盐进一步包括钠、钾、钙、镁、铵、四烷基铵等;且当化合物含有碱性官能团时,无毒有机或无机酸的盐,诸如盐酸盐、氢溴酸盐、酒石酸盐、甲磺酸盐、乙酸盐、马来酸盐、草酸盐等。

[0115] 术语“药学上可接受的阳离子”是指酸性官能团的可接受的阳离子抗衡离子。这样的阳离子的例子为钠、钾、钙、镁、铵、四烷基铵阳离子等(参见,例如,Berge等人, J. Pharm. Sci. 66 (1):1-79 (77年1月))。

[0116] “药学上可接受的媒介物”是指与本发明的化合物一起施用的稀释剂、助剂、赋形剂或载体。

[0117] “药学上可接受的代谢可裂解基团”是指在体内裂解以产生本文所示结构式的母体分子的基团。代谢可裂解基团的例子包括-COR、-COOR、-CONRR和-CH₂OR基团,其中R在每

次出现时独立地选自烷基、三烷基甲硅烷基、碳环芳基或被一个或多个烷基、卤素、羟基或烷氧基取代的碳环芳基。代表性的代谢可裂解基团的具体例子包括乙酰基、甲氧基羰基、苯甲酰基、甲氧基甲基和三甲基甲硅烷基基团。

[0118] “前药”是指化合物，包括本发明化合物的衍生物，其具有可裂解基团并且通过溶剂分解或在生理条件下变成在体内具有药学活性的本发明化合物。这样的例子包括、但不限于胆碱酯衍生物等、N-烷基吗啉酯等。本发明化合物的其它衍生物以其酸和酸衍生物形式都具有活性，但是以酸敏感形式经常提供在哺乳动物生物体中的溶解度、组织相容性或延迟释放的优点(参见, Bundgard, H., *Design of Prodrugs*, 第7-9页, 21-24, Elsevier, Amsterdam 1985)。前药包括本领域从业人员众所周知的酸衍生物, 诸如、例如通过母体酸与合适的醇的反应制备的酯, 或者通过母体酸化合物与被取代的或未被取代的胺的反应制备的酰胺, 或者酸酐, 或者混合酸酐。从本发明化合物侧链上的酸性基团衍生出的简单脂族或芳族酯、酰胺和酸酐为特定前药。在某些情况下, 合乎需要的是, 制备双酯型前药, 诸如(酰氧基)烷基酯或(烷氧基羰基)氧基)烷基酯。特别是本发明化合物的C₁-C₈烷基、C₂-C₈烯基、C₂-C₈炔基、芳基、C₇-C₁₂取代的芳基和C₇-C₁₂芳基烷基酯。

[0119] “溶剂化物”是指通常通过溶剂分解反应与溶剂或水(也被称作“水合物”)缔合的化合物形式。该物理缔合包括氢键合。常规溶剂包括水、乙醇、乙酸等。本发明的化合物可以例如以结晶形式制备, 并且可以被溶剂化或水合。合适的溶剂化物包括药学上可接受的溶剂化物, 诸如水合物, 并且进一步包括化学计量的溶剂化物和化学计量的溶剂化物。在某些情况下, 溶剂化物将能够分离, 例如当一个或多个溶剂分子掺入结晶固体的晶格中时。“溶剂化物”包括溶液相和可分离的溶剂化物。代表性的溶剂化物包括水合物、乙醇化物和甲醇化物。

[0120] 考虑施用的“对象”包括、但不限于人类(即, 任何年龄组的男性或女性, 例如, 儿科对象(例如, 婴儿、儿童、青少年)或成人对象(例如, 年轻人、中年人或老年人))和/或非人动物(例如, 哺乳动物诸如灵长类动物(例如, 食蟹猴、恒河猴)、牛、猪、马、绵羊、山羊、啮齿类动物、猫和/或狗)。在某些实施方案中, 所述对象是人。在某些实施方案中, 所述对象是非人动物。术语“人”、“患者”和“对象”在本文中可互换使用。

[0121] “有效量”是指当施用给对象以治疗或预防疾病时足以实现这样的治疗或预防的化合物的量。“有效量”可以根据化合物、疾病及其严重程度以及待治疗的对象的年龄、体重等而变化。“治疗有效量”是指用于治疗性治疗的有效量。“预防有效量”是指用于预防性治疗的有效量。

[0122] “预防”或“防止”或“预防性治疗”是指降低获得或发展疾病或障碍的风险(即, 在尚未暴露于致病因子的对象中或在疾病发作之前在易患疾病的对象中造成疾病的至少一种临床症状不发展)。

[0123] 术语“预防”与“防止”相关, 并且是指以预防而非治疗或治愈疾病为目的的措施或程序。预防性措施的非限制性例子可以包括: 施用疫苗; 给由于例如固定而处于血栓形成的风险中的住院患者施用低分子量肝素; 和在访问疟疾流行或接触疟疾的风险很高的地理区域之前施用抗疟剂诸如氯喹。

[0124] 在一个实施方案中, 任何疾病或障碍的“治疗”或“治疗性治疗”是指改善疾病或障碍(即, 阻止疾病或减少其至少一种临床症状的表现、范围或严重程度)。在另一个实施方案

中,“治疗”是指改善对象可能无法辨别的至少一个身体参数。在再一个实施方案中,“治疗”是指在身体上(例如,可辨别症状的稳定)、在生理上(例如,身体参数的稳定)或在两者上调节疾病或障碍。在另一个实施方案中,“治疗”涉及减慢疾病的进展。

[0125] 本文中使用的术语“同位素变体”是指在构成这样的化合物的一个或多个原子处含有非天然比例的同位素的化合物。例如,化合物的“同位素变体”可以含有一种或多种非放射性同位素,例如,氘(^2H 或D)、碳-13 (^{13}C)、氮-15 (^{15}N)等。应当理解,在其中进行这样的同位素置换的化合物中,以下原子(如果存在的话)可以变化,使得例如任何氢可以为 ^2H /D,任何碳可以为 ^{13}C ,或者任何氮可以为 ^{15}N ,并且这样的原子的存在和位置可以在本领域技术范围内确定。同样,本发明可以包括用放射性同位素制备同位素变体,例如,在其中所得化合物可以用于药物和/或底物组织分布研究的情况下。考虑到它们易于掺入和检测手段方便,放射性同位素氚(即, ^3H)和碳-14 (即, ^{14}C)对于该目的是特别有用的。进一步,可以制备被正电子发射同位素(诸如 ^{11}C 、 ^{18}F 、 ^{15}O 和 ^{13}N)取代的化合物,并且所述化合物可用于正电子发射体层成像(PET)研究以检查底物受体占据。本文提供的化合物的所有同位素变体,无论是否具有放射性,都意图被包括在本发明范围内。

[0126] 还应当理解,具有相同分子式但其原子的性质或键合顺序或者其原子的空间排列不同的化合物被称为“异构体”。其原子的空间排列不同的异构体被称为“立体异构体”。

[0127] 不为彼此的镜像的立体异构体被称为“非对映异构体”,为彼此的不可重叠镜像的立体异构体被称为“对映异构体”。当化合物具有不对称中心(例如其键合至四个不同基团)时,一对对映异构体是可能的。对映异构体可以通过其不对称中心的绝对构型表征并且由Cahn和Prelog的R-和S-测序规则描述,或者通过其中分子旋转偏振光平面方式表征并指定为右旋或左旋(即分别作为(+)-或(-)-异构体)。手性化合物可以作为单一对映异构体或作为其混合物存在。含有等比例的对映异构体的混合物被称为“外消旋混合物”。

[0128] “互变异构体”是指这样的化合物:其为特定化合物结构的可互换形式,并且在氢原子和电子的置换方面有所不同。因此,通过其电子和原子(通常为H)的运动,两种结构可能处于平衡中。例如,烯醇和酮为互变异构体,因为它们通过用酸或碱处理而快速相互转化。互变异构的另一个例子为苯基硝基甲烷的酸(acid)和硝基形式,它们同样通过用酸或碱处理而形成。互变异构形式可能与目标化合物的最佳化学反应性和生物活性的获得相关。

[0129] 如本文使用的,纯的对映异构的化合物基本上不含有所述化合物的其它对映异构体或立体异构体(即,对映体过量)。换言之,化合物的“S”形式基本上不含有所述化合物的“R”形式,并且因此为“R”形式的对映体过量。术语“对映异构纯的”或“纯的对映异构体”表示化合物包含按重量计超过95%、按重量计超过96%、按重量计超过97%、按重量计超过98%、按重量计超过98.5%、按重量计超过99%、按重量计超过99.2%、按重量计超过99.5%、按重量计超过99.6%、按重量计超过99.7%、按重量计超过99.8%或按重量计超过99.9%的对映异构体。在某些实施方案中,所述重量是基于化合物的所有对映异构体或立体异构体的总重量。

[0130] 如本文所用并且除非另有说明,术语“对映异构纯的R-化合物”是指按重量计至少约95%的R-化合物和按重量计至多约5%的S-化合物,按重量计至少约99%的R-化合物和按重量计至多约1%的S-化合物,或按重量计至少约99.9%的R-化合物和按重量计至多约0.1%的S-化合物。在某些实施方案中,所述重量是基于化合物的总重量。

[0131] 如本文所用并且除非另有说明,术语“对映异构纯的S-化合物”或“S-化合物”是指按重量计至少约95%的S-化合物和按重量计至多约5%的R-化合物,按重量计至少约99%的S-化合物和按重量计至多约1%的R-化合物,或按重量计至少约99.9%的S-化合物和按重量计至多约0.1%的R-化合物。在某些实施方案中,所述重量是基于化合物的总重量。

[0132] 在本文提供的组合物中,对映异构纯的化合物或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物或前药可以与其它活性或无活性成分一起存在。例如,包含对映异构纯的R-化合物的药物组合物可以包含例如约90%赋形剂和约10%的对映异构纯的R-化合物。在某些实施方案中,按化合物的总重量计,在这样的组合物中的对映异构纯的R-化合物可以例如包含按重量计至少约95%的R-化合物和按重量计至多约5%的S-化合物。例如,包含对映异构纯的S-化合物的药物组合物可以包含例如约90%赋形剂和约10%的对映异构纯的S-化合物。在某些实施方案中,按化合物的总重量计,在这样的组合物中的对映异构纯的S-化合物可以例如包含按重量计至少约95%的S-化合物和按重量计至多约5%的R-化合物。在某些实施方案中,所述活性成分可以与极少赋形剂或载体一起配制或不与赋形剂或载体一起配制。

[0133] 本发明的化合物可以具有一个或多个不对称中心;因此,这样的化合物可以制备为单一(R)-或(S)-立体异构体或其混合物。

[0134] 除非另外指出,否则在说明书和权利要求书中对特定化合物的描述或命名意图包括其单一对映异构体和外消旋的或其它的混合物。用于确定立体化学并且分离立体异构体的方法是本领域众所周知的。

[0135] 有机合成领域的普通技术人员将认识到,稳定的、化学上可行的杂环(无论是芳族还是非芳族)中的杂原子的最大数目取决于环的大小、不饱和度和杂原子的化合价。一般而言,杂环可以具有1-4个杂原子,只要杂芳族环是化学上可行的和稳定的。

实施例

[0136] 为了可以更充分地理解本文描述的发明,阐述了下述实施例。提供在本申请中描述的实施例以解释本文提供的化合物、组合物、材料、装置和方法,并且不应以任何方式解释为限制它们的范围。

[0137] 材料和方法

类脂质合成。用于类脂质合成的化学物质购自Sigma-Aldrich并以接收状态使用。将脂族胺头和丙烯酸酯尾(0170、017S、017Se、018S-S、016S-S和N16S-S)或环氧化物尾(EC18和EC16)以1:2.4摩尔比在聚四氟乙烯内衬的玻璃螺旋盖小瓶中在70℃混合48小时。使用Teledyne Isco色谱系统纯化粗产物。

[0138] 纳米颗粒制剂。在制备纳米颗粒之前,将类脂质、胆固醇、DOPE和DSPE-PEG都溶解在乙醇溶液中。对于类脂质制剂,选择16:4:1:1(类脂质:胆固醇:DOPE:DSPE-PEG)w/w比率(图1A)。将乙醇溶液逐滴加入到三倍体积的25 mM醋酸钠缓冲液(pH 5.2)中。将配制的纳米颗粒在3.5K MWCO Slide-A-Lyzer透析装置(Thermo Fisher)中透析至少2小时。

[0139] 人原代CD8⁺ T细胞分离。人外周血单核细胞(PBMC)购自Research Blood Components,LLC。将淋巴细胞用Lympholyte-H (Cedarlane)通过密度梯度离心分离,并用PBS洗涤。将红细胞使用RBC裂解缓冲液(多物种)(eBioscience)裂解,并用PBS洗涤。根据生产商的方案,使用人CD8⁺ T细胞分离试剂盒(Miltenyi Biotec)分离CD8⁺ T细胞。将纯化的

CD8⁺ T细胞通过流式细胞术用CD3⁺ 抗体表征。

[0140] 用于类脂质筛选的体外萤光素酶测定。将人原代CD8⁺ T细胞以每孔25,000个细胞接种在48-孔平板内的250 μ L无血清RPMI培养基中,所述培养基含有10 ng/mL重组人IL-2 (BD Biosciences)、ImmunoCult人CD3/CD28 T细胞活化剂 (STEMCELL Technologies) 和100 U/mL Pen-Strep (Gibco)。在接种后立即将FLuc mRNA递送进T细胞。对于每个孔,将0.5 μ g CleanCap FLuc mRNA (TriLink Biotechnologies) 和5 μ g类脂质混合在50 μ L的25 mM醋酸钠缓冲液 (pH 5.2) 中,并在室温温育15分钟以进行包封。然后,将mRNA/类脂质复合物分别以1.7 μ g/mL和17 μ g/mL的终浓度加入细胞培养基中。将T细胞在37 $^{\circ}$ C温育6小时,然后裂解以使用萤火虫萤光素酶测定试剂盒2.0 (Biotium) 和SYNERGY H1微量培养板读数器 (BioTek) 测量萤光素酶表达。图表示一式三份实验的平均发光,误差条表示为 $\pm$ SD。发现最佳递送时间和类脂质浓度分别为约6 h和30 μ g/mL (图1B-1C)。

[0141] 体内FLuc mRNA递送和生物发光。如上所述制备类脂质/mRNA复合物。每只小鼠使用15 μ g CleanCap FLuc mRNA (5moU) (TriLink Biotechnologies) 和150 μ g类脂质,总体积为150 μ L PBS。向BALB/c小鼠静脉内注射类脂质/mRNA复合物。注射6h后,腹膜内注射3 mg D-萤光素,并使用IVIS Spectrum CT Biophotonic Imager (PerkinElmer) 测量生物发光。生物成像后,处死小鼠,也使用IVIS测量每个器官的发光。然后,通过萤光素酶测定定量FLuc mRNA向T细胞中的递送效率。通过使脾细胞穿过70- μ m细胞过滤网来收集脾单细胞悬浮液,随后使用RBC裂解缓冲液(多物种) (eBioscience) 进行红细胞裂解。将细胞用PBS洗涤一次,并根据生产商的方案使用小鼠CD8a MicroBeads (Miltenyi Biotec) 收集CD8⁺T细胞。使用萤火虫萤光素酶裂解缓冲液 (Biotium) 裂解脾细胞和其它器官,并使用萤火虫萤光素酶测定试剂盒2.0 (Biotium) 和SYNERGY H1微量培养板读数器 (BioTek) 测量发光强度。使用Pierce BCA蛋白测定试剂盒 (Thermo Scientific) 定量总蛋白量。将萤光素酶强度归一化至细胞或组织中的总蛋白量。

[0142] 体内Cre mRNA递送和共焦显微术。如上所述制备类脂质/mRNA复合物。每只小鼠使用15 μ g CleanCap Cre mRNA (5moU) (TriLink Biotechnologies) 和150 μ g类脂质,总体积为150 μ L PBS。每5天向Ai14小鼠静脉内注射类脂质/mRNA复合物两次。首次注射10天后,处死小鼠并收集脾脏。对于共焦显微术成像,将脾脏冷冻切片至15 μ m深度。将切片用PBS洗涤并用丙酮固定,随后用CD3 ϵ (APC)、CD8a (APC) 或F480 (APC) 的荧光抗体染色。使用SP8共焦显微镜 (Leica) 观察来自tdTomato和抗体的荧光信号。为了流式细胞术分析,通过使脾细胞穿过100- μ m细胞过滤网从脾收集单细胞悬浮液,然后使用RBC裂解缓冲液(多物种) (eBioscience) 进行红细胞裂解。将细胞用PBS洗涤一次,并在流式细胞术染色缓冲液 (eBioscience) 中用CD4 (APC) 和CD8a (APC) 的荧光抗体染色。使用LSR-II流式细胞计 (BD Biosciences) 测量荧光信号。

[0143] 结果和讨论

用于向人原代CD8⁺ T细胞中递送mRNA的类脂质的大致筛选

通过迈克尔加成反应以亲水胺头和疏水碳尾的组合方式合成阳离子脂质样材料(类脂质) (图3A和3B)。

[0144] 选择了对于核酸和蛋白递送显示出相对好的效率的类脂质,并对萤光素酶mRNA向原代T淋巴细胞的体外递送进行了大致筛选(图3C)。使用R-OnX、R-NnX或R-ECn形式的命名

约定对类脂质进行命名。在所有情况下,“R”指示如在图3B(左列)中所示的胺数目,“n”指示在原子取代前在疏水尾中的碳的数目,“X”指示在尾中的杂原子含量(O、S、Se或二硫化物),“EC”指示从环氧化物合成的类脂质尾。对于第一步大致筛选,测试了非配制类脂质和用三种赋形剂(即,胆固醇、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)和1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-[聚(乙二醇)-2000](DSPE-PEG))配制的类脂质。发现当单独使用时,所选择的类脂质都没有显示出对T淋巴细胞的有效递送,但当用上述赋形剂配制时,几种类脂质显示出有效递送(图3C)。在各种文库中,具有含硫族元素(O、S、Se)尾的文库显示出最有效的递送(图3C)。令人感兴趣的是,具有胺头93(1-(3-氨基丙基)咪唑)的类脂质在所有尾变体(93-0170、93-017S和93-017Se)中始终显示有效递送(图3C)。用单独mRNA的处理没有显示发光表达,表明mRNA本身在没有有效类脂质的情况下不能进入细胞。此外,即使是最常用的商业化脂质试剂Lipofectamine 2000(LF2000)也完全没有显示出转染效果,这揭示了非病毒颗粒在T细胞转染中的巨大挑战。根据大致筛选的结果,发现具有咪唑基团(在胺头93中)的类脂质在T淋巴细胞转染中具有巨大潜力。

[0145] 含有咪唑和咪唑类似物的类脂质的合成和详细筛选

基于大致筛选的结果,确定了咪唑是向原代T淋巴细胞递送mRNA的类脂质的关键结构。随后合成了含有咪唑或咪唑类似物的新类脂质,如图4A所示。

[0146] 含咪唑或咪唑类似物的胺头被分为四组:i)咪唑和胺基团之间的碳间隔物被一些碳支链和不同长度修饰(R: 9310-9315)。ii)将不同结构的碳支链添加到2-咪唑位置(R: 9321-9324)。iii)将在1-咪唑位置的碳间隔物移动到2-咪唑位置,并用具有不同长度和支链的碳链替换(R: 9331-9334)。iv)咪唑环被一些类似结构替代(R: 9341-9352)。三种脂族尾变化(0170、017S和016S-S)用于通过迈克尔加成反应构建新文库。

[0147] 如图3b所示,进行该新文库在体外向原代T淋巴细胞递送萤光素酶mRNA的详细筛选,并研究了胺头结构和递送效率之间的相关性。通常,胺头9313、9322、9331以及93在类脂质文库中总是显示高发光表达。此外,在胺头的化学结构和递送效率之间的相关性中发现了一些趋势。首先,当考虑接头分支结构时,我们发现具有单分支的接头(例如,9312和9313)显示出比直链接头(例如,93、9310和9315)或复杂支链接头(例如,9314和9316)更好的效率。接头长度似乎也会显著影响递送效率:4-碳9315不像3-碳93一样有效。类似地,9311头(其在结构上与9313相似,但短仅一个碳)完全没有显示递送效果,而9313非常有效。第二,发现在2-咪唑位置处的分支不影响递送效力(例如,9322、9323和9324)。第三,我们注意到,在接头位于2-咪唑位置处的组(例如,9331、9332、9333和9334)中,所有胺头都有一些正信号,表明接头位置可以是邻取代的,并且咪唑上的分支本身不影响递送效果。最后,具有咪唑环类似物的胺头(例如,9341、9351、9352)完全没有显示任何递送效率,这证明咪唑环是mRNA的T细胞递送的关键结构。除胺头结构外,碳尾结构也影响递送效率。在有效的胺头(即,9313、9322、9331和93)中,具有0170和017S尾的类脂质显示的递送效率分别是具有016S-S尾的类脂质的超过5倍和6倍(图4B)。从这些结果发现,从胺头9313、9322、9331和9332合成的类脂质对于mRNA向T淋巴细胞的递送是有效的,并将这些胺头用于碳尾筛选。

[0148] 碳尾结构的详细筛选和递送效率

如在图4B中所示,类脂质的尾是影响递送效率的另一个重要因素。为了进一步研究尾结构对T细胞转染的影响,合成了使用胺头9313、9322、9331和9332的具有8种不同碳尾

的详细类脂质文库(图5A),其在先前筛选中具有高转染效率。

[0149] 如在图4B中所示,具有0170、017S和018S-S尾的类脂质始终比其它尾更有效。令人感兴趣的是,对于使用017C尾的所有类脂质,其中整个尾由碳组成而没有任何杂原子,递送效率显著降低。此外,碳链的长度也影响递送效率。18个碳的尾长度,其中两个被取代为S-S(018S-S),比16个碳的尾长度(016S-S)显著更有效。此外,具有酯键的尾(016S-S)比具有酰胺键的尾(N16S-S)显著更好起作用。由环氧化物制成的尾(ECn系列)未显示有效递送。为了阐明成功转染的T细胞的阳性百分比,将具有93-017S和9322-017S的EGFP mRNA体外递送到CD8⁺ T细胞中,并用流式细胞术定量GFP表达。93-017S向CD8⁺ T细胞中的递送效率达到7.1%,且9322-017S向CD8⁺ T细胞中的递送效率达到11.1%(图6)。

[0150] mRNA向T细胞递送的结构相关差异的可能机制可能与LNP的各种行为有关,诸如表观pKa值和膜破坏能力。在本研究中,为了进一步阐明这些类脂质之间不同递送效果的可能机制,进一步分析了表观pKa值和磷脂双层膜破坏能力。在有效和无效类脂质之间pKa没有大的差异,表明pKa可能不是决定递送效率的主要因素(图7A)。

[0151] 但是,如在图7B中所示,大多数成功的类脂质显示出比不成功的类脂质更高的膜破坏能力,尤其是在具有组ii)中的头的这些类脂质中。

[0152] 纳米颗粒的体内mRNA递送和生物分布。

尽管体外筛选证明,从基于结构的筛选中发现的类脂质可以有效地将mRNA递送到原代T细胞中,但体内递送效果对于人体中的T细胞的原位程序化更为重要。此外,由于复杂的体内条件,在体内的递送效果大部分与体外结果不一致。为了研究通过体外筛选确定的类脂质是否在体内也起作用,还通过向BALB/c小鼠静脉内注射FLuc mRNA和类脂质复合物来评价类脂质递送的效果。注射后6小时,在活小鼠中检测到生物发光,随后处死小鼠,并观察到来自心、肝、脾、肺和肾的特异性生物发光。使用体内成像系统(IVIS)进行所有生物发光成像。具有0170和017S尾的胺头93和9322在脾中显示出强烈且特异性的发光表达(图8A和8B)。

[0153] 在用9322-017S递送的小鼠中,脾中的发光强度是肝中的1.6倍。另一方面,具有0170、017S或018S-S尾的胺头9313、9331和9332在任何器官中均未显示信号(图8A-8C和图9A-9B)。

[0154] 处死小鼠,收集脾细胞以用磁珠纯化CD8⁺ T细胞。定量来自脾细胞或每个器官的发光表达。虽然也有来自肝和脾中其它类型细胞的发光信号,但我们确认了使用93-017S、9322-0170和9322-017S向CD8⁺ T细胞中的有效递送(图8C)。发光强度也对应于IVIS结果(图8B和8C)。

[0155] 类脂质增强Cre重组酶介导的体内脾T细胞的基因重组

将包括mRNA、质粒和RNP的基因编辑分子向T细胞中的体内递送在T细胞工程中具有巨大的应用潜力。通过向Ai14小鼠(The Jackson Laboratory)静脉内递送Cre重组酶mRNA和类脂质复合物,证明了类脂质对于体内基因重组的效力。Ai14小鼠具有一个基因整合的STOP密码子,其侧面是刚好位于红色荧光蛋白(tdTomato)基因22上游的loxP位点。所述STOP密码子可以通过Cre蛋白的活性除去,所述Cre蛋白切除在loxP位点之间发现的DNA。因此,红色荧光信号通过Cre mRNA的成功转染来介导,然后表达Cre蛋白。将Cre mRNA/类脂质复合物每5天注射两次,然后用共焦显微术分析小鼠脾。从注射了93-017S或9322-017S的

小鼠观察到在脾中的强tdTomato表达(图10A和10B),而从单独注射了9313-018S-S或PBS的小鼠没有观察到tdTomato信号(图9C)。

[0156] 将脾组织用CD3 ϵ 或F4/80抗体标记,以分别用T淋巴细胞或巨噬细胞分析tdTomato信号的定位。此外,将CD8a抗体用于特异性地标记CD8 $^{+}$ T淋巴细胞。在荧光图像中的黄色信号指示红色tdTomato信号和绿色标记的细胞型抗体的共定位(由白色箭头指示)(图10A-10B和图8A-8C)。

[0157] 从小鼠脾脏收集单细胞悬浮液,并通过流式细胞术定量tdTomato表达。与未经处理的对照相比,93-017S和9322-017S均显示出tdTomato信号的显著表达。在体内,93-017S达到约8.2%的向CD4 $^{+}$ T细胞中的递送效率和约6.5%的向CD8 $^{+}$ T细胞中的递送效率(图10C和图10A-10C)。

[0158] 通过引用并入

本文提及的所有美国和PCT专利公开和美国专利特此通过引用整体并入,如同每篇单独的专利公开或专利被明确地且单独地指出通过引用并入。在冲突的情况下,以本申请(包括本文中的任何定义)为准。

[0159] 其它实施方案

本领域技术人员会认识到或仅仅使用例行实验就能够确定本文描述的具体实施方案的许多等同方案。本文描述的本实施方案的范围无意限于以上描述,而是如所附权利要求所述。本领域普通技术人员会明白,可以对本说明书做出各种改变和修改,而不背离如下述权利要求书所限定的本发明的精神或范围。

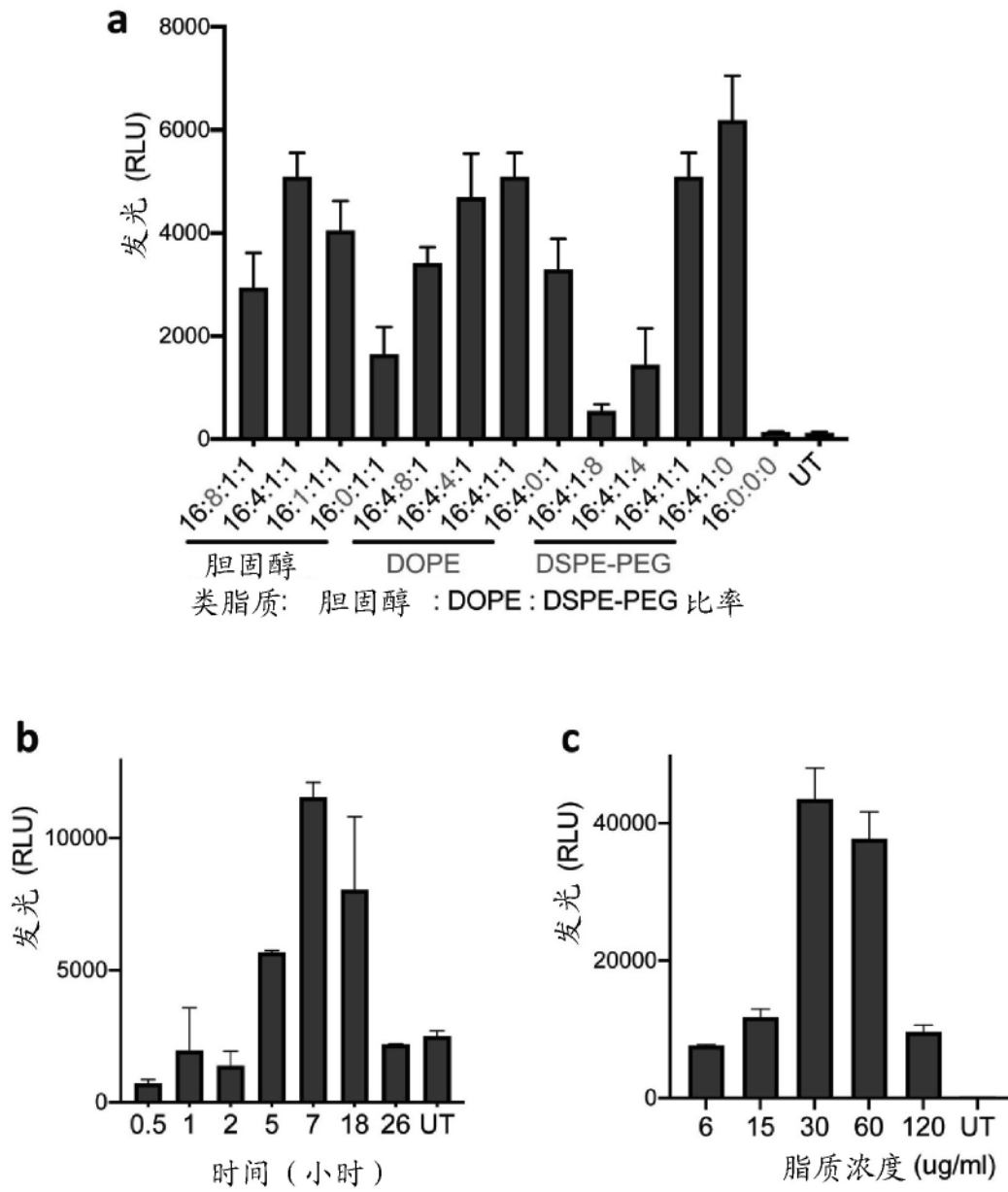


图 1

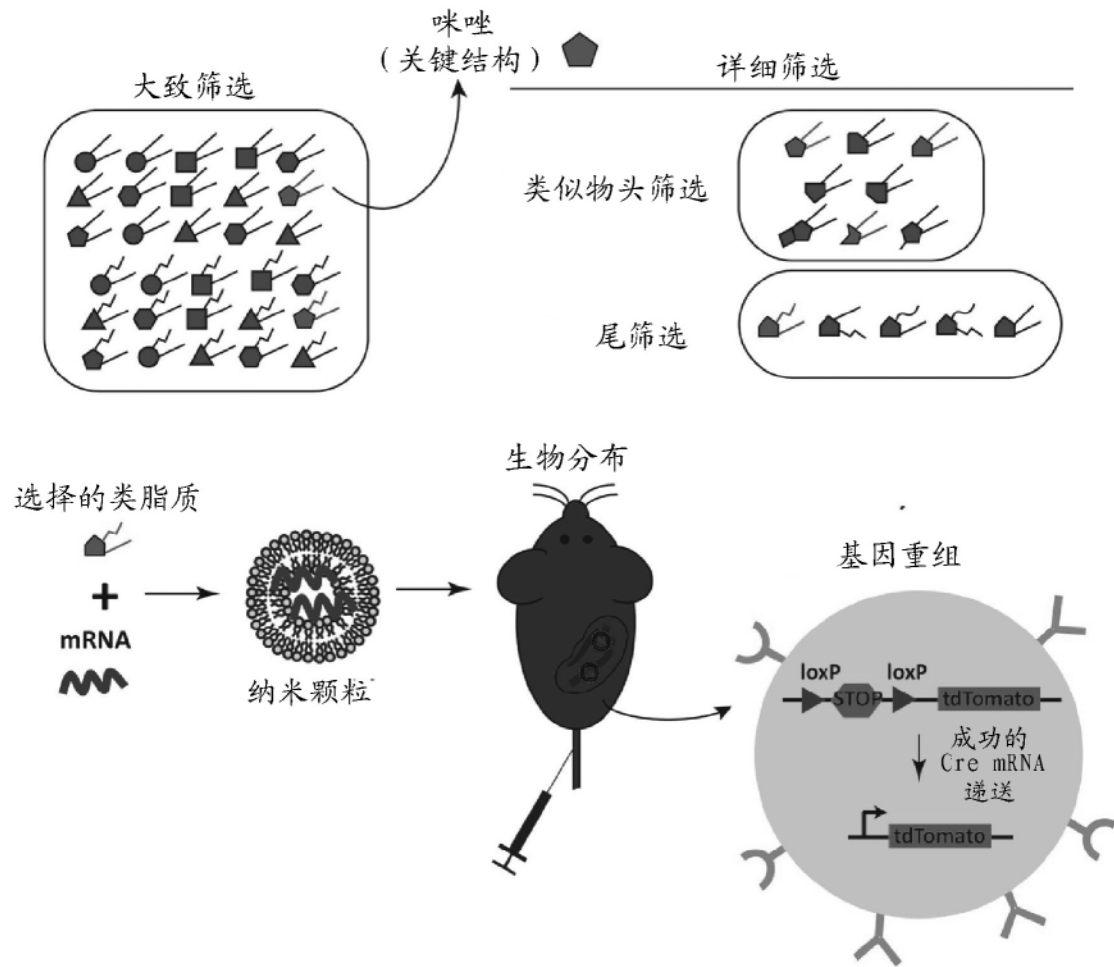


图 2

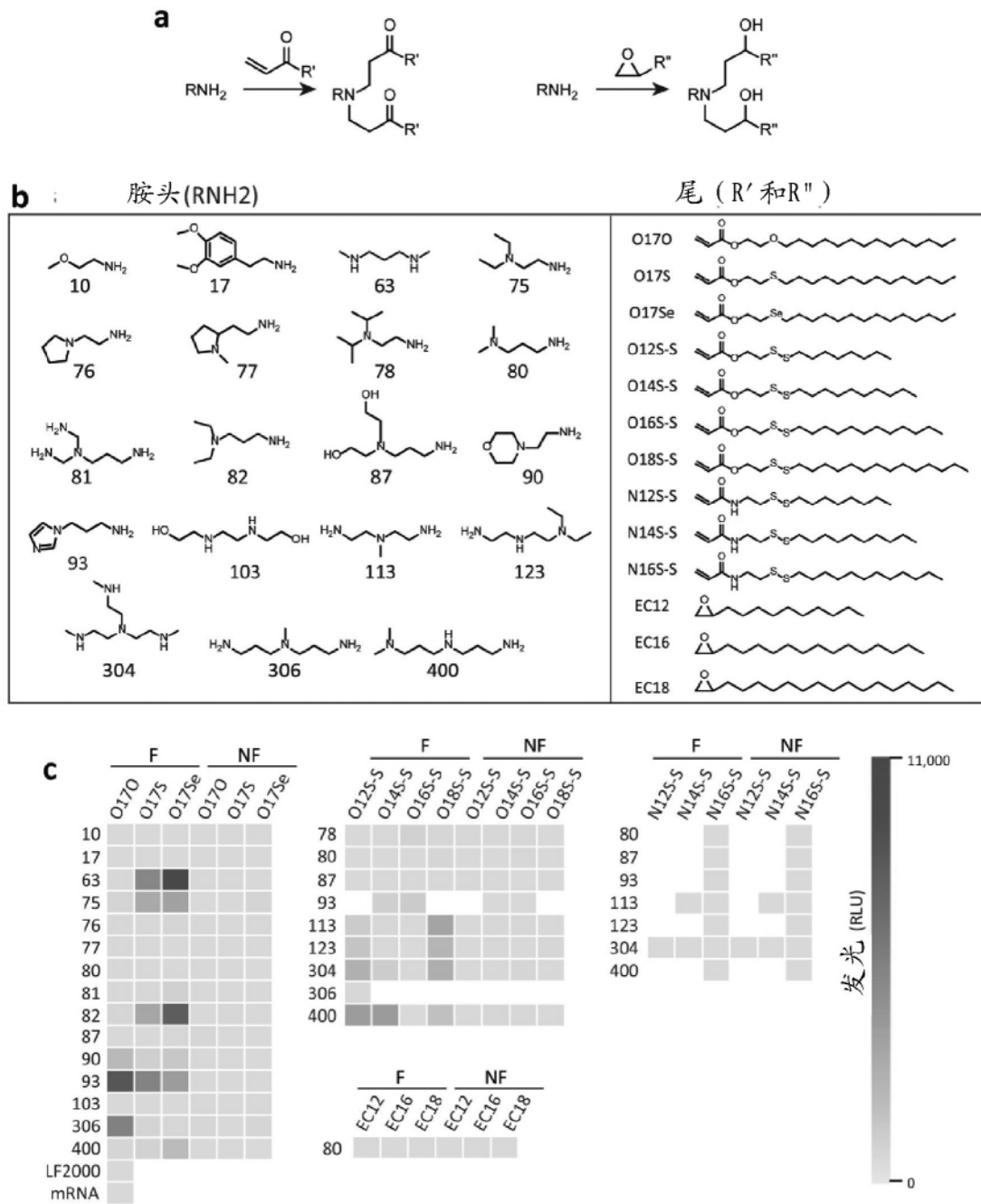


图 3

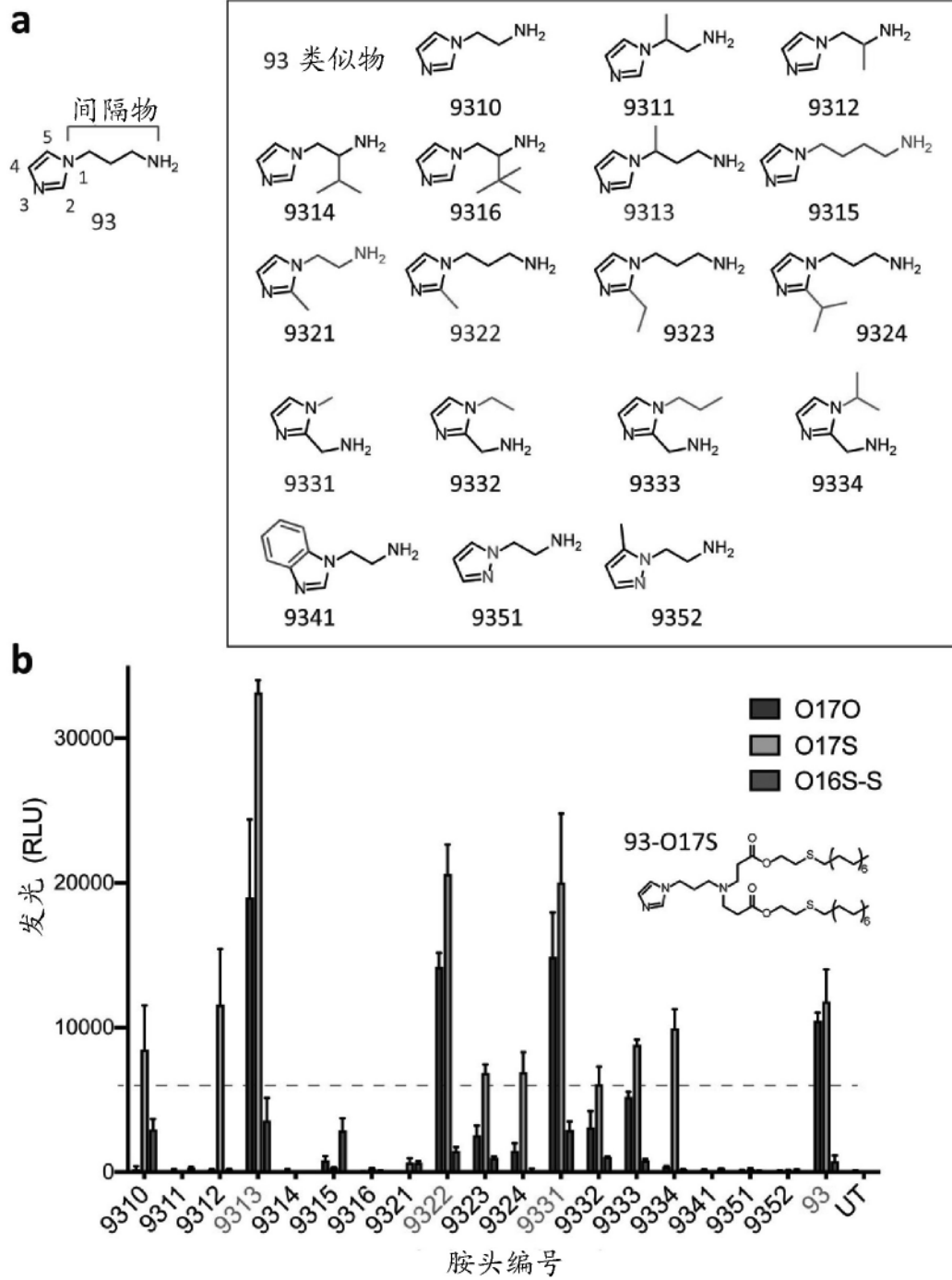


图 4

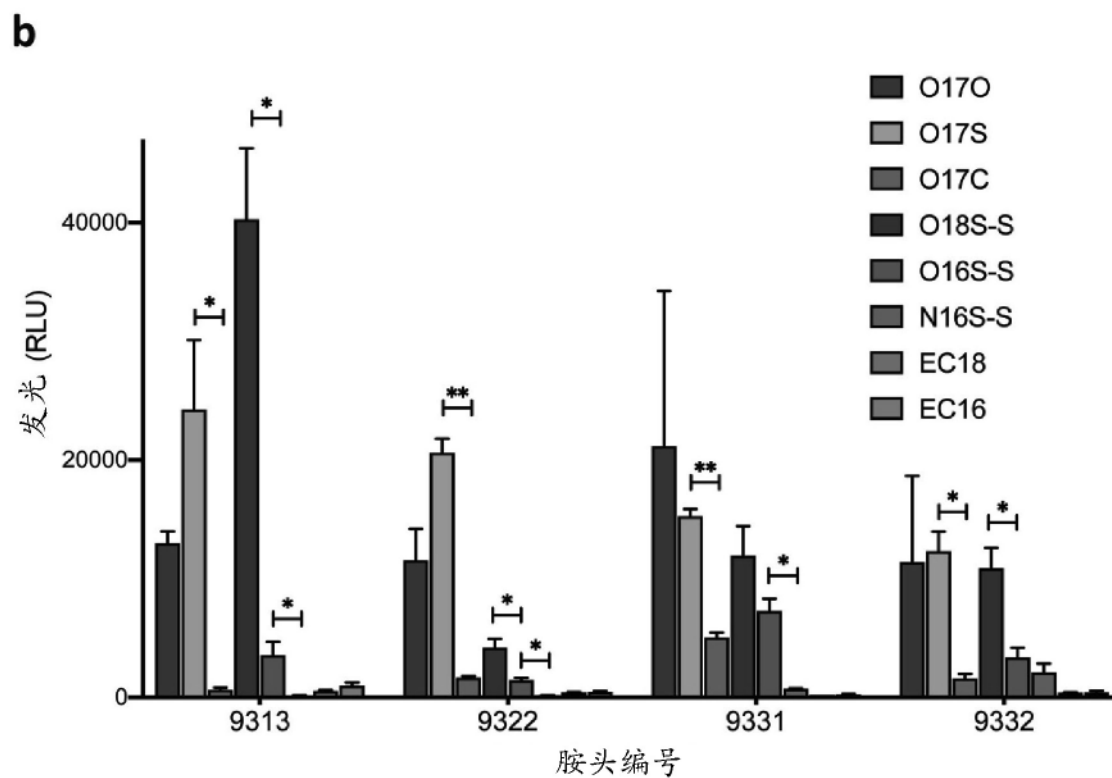
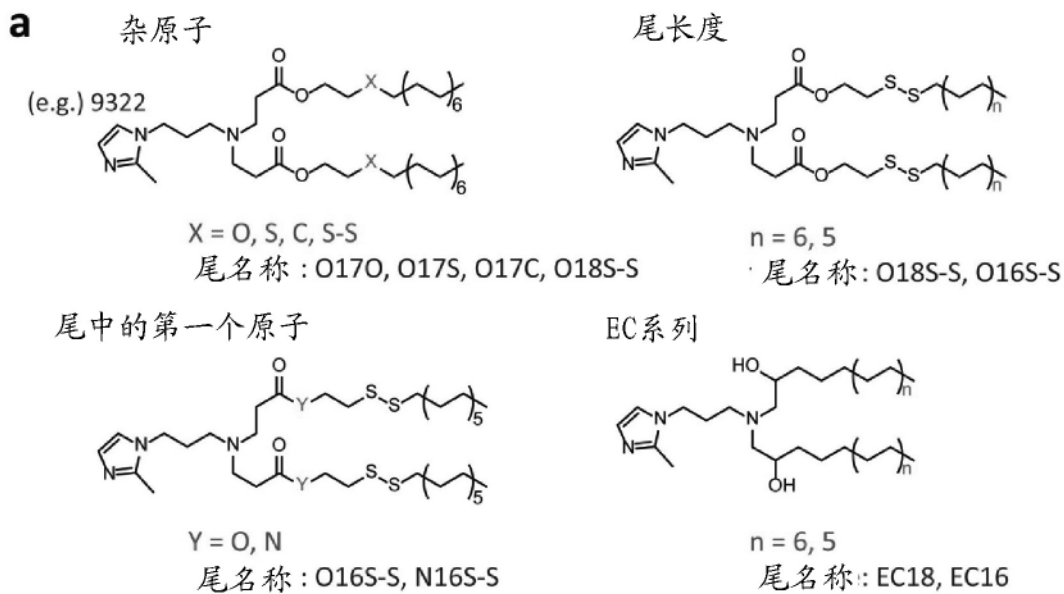


图 5

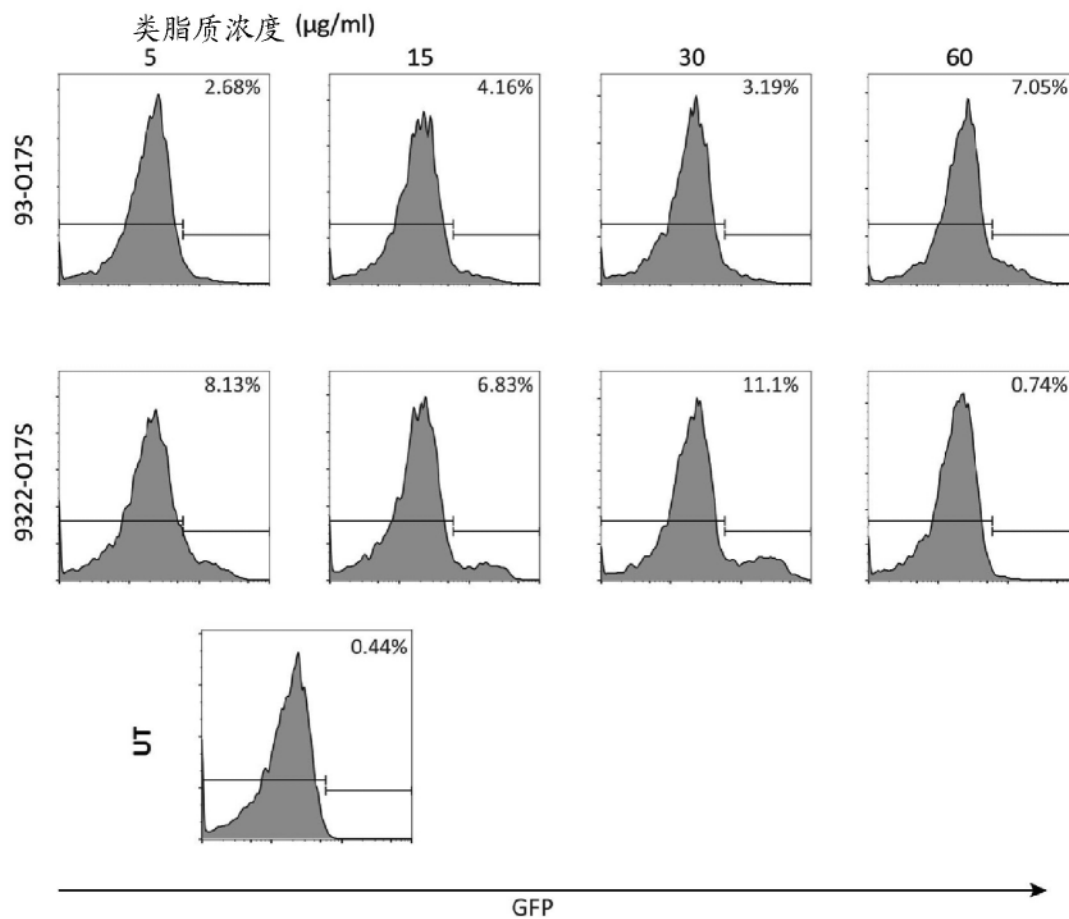


图 6

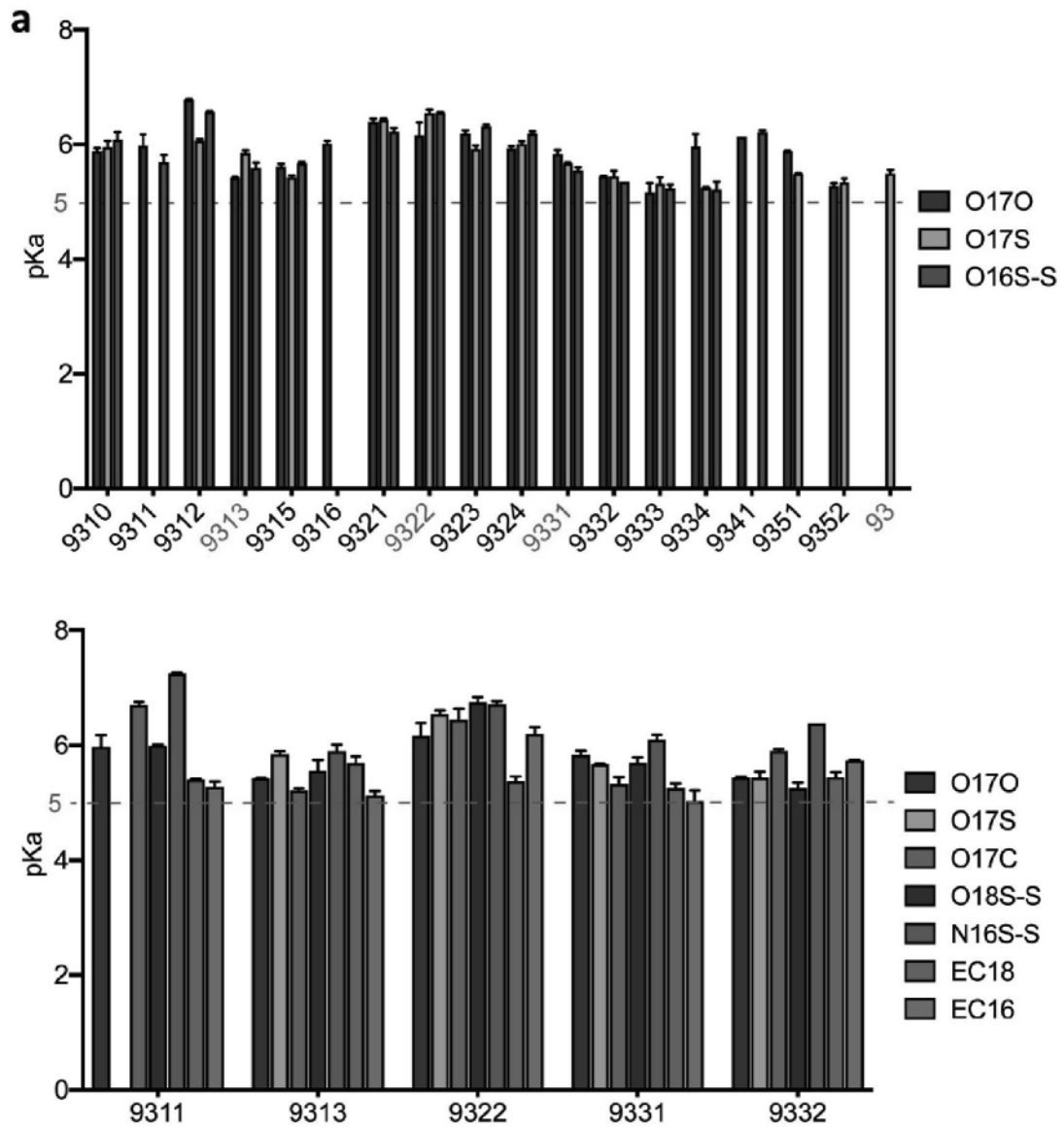


图 7

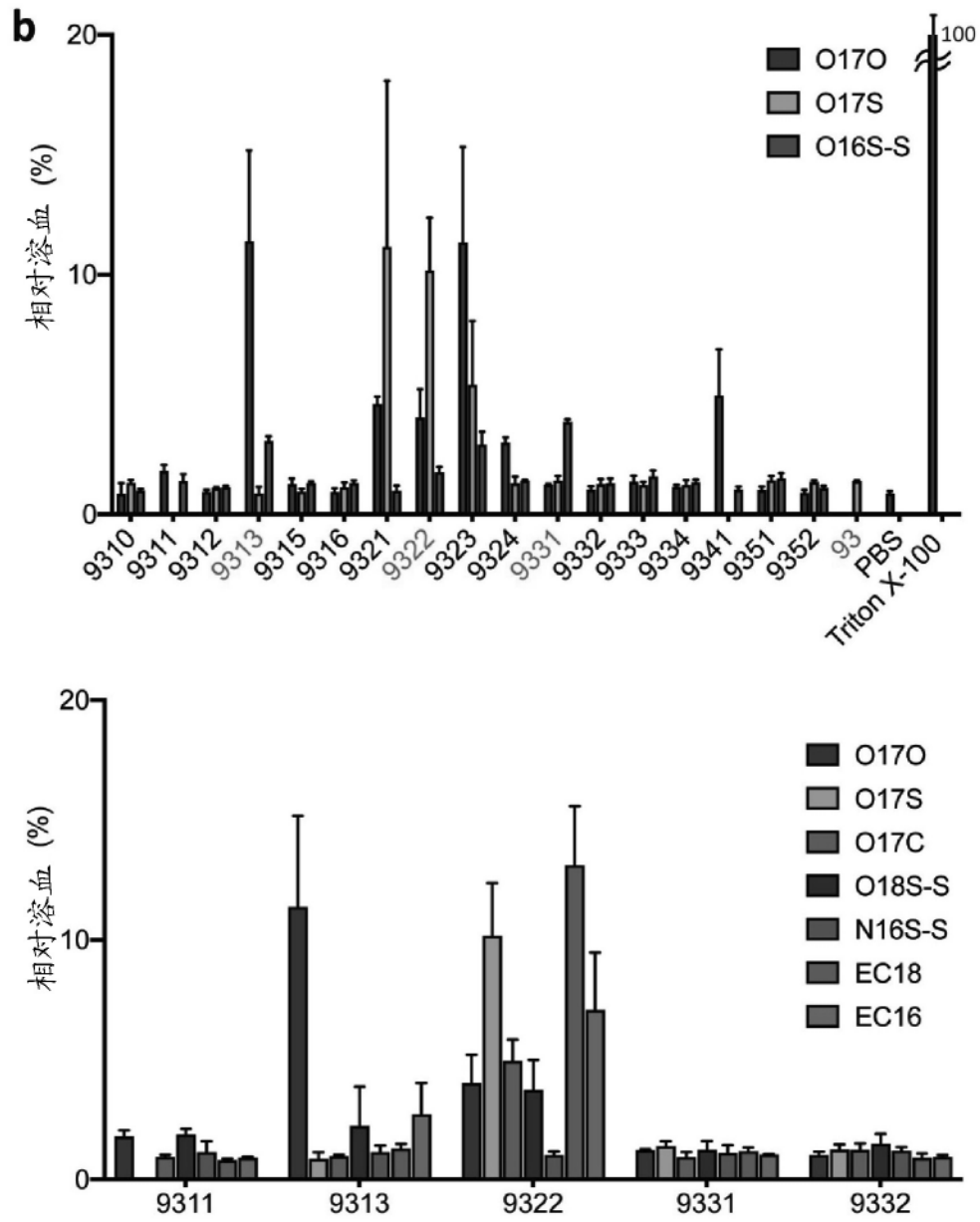


图 7 (续)

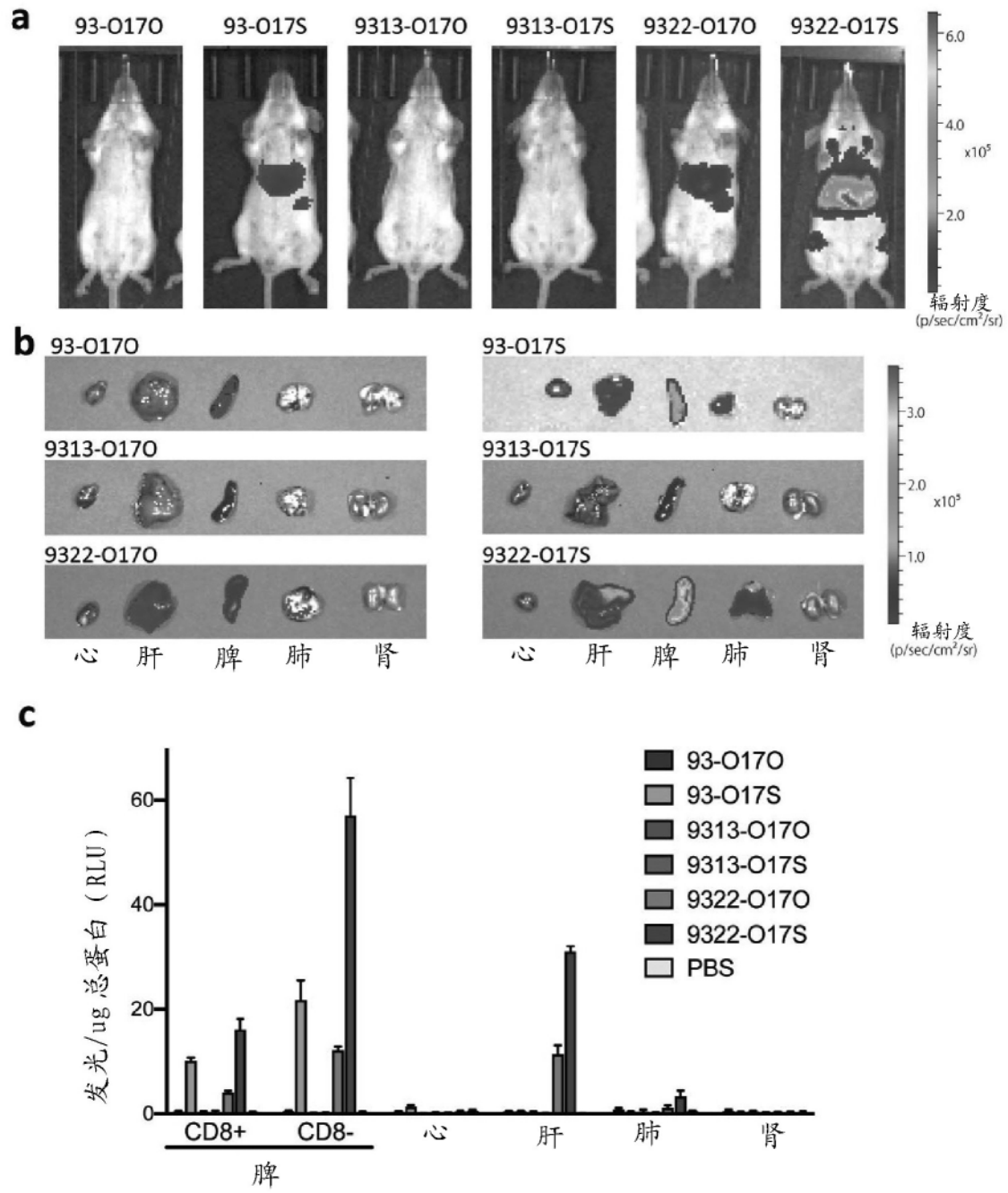


图 8

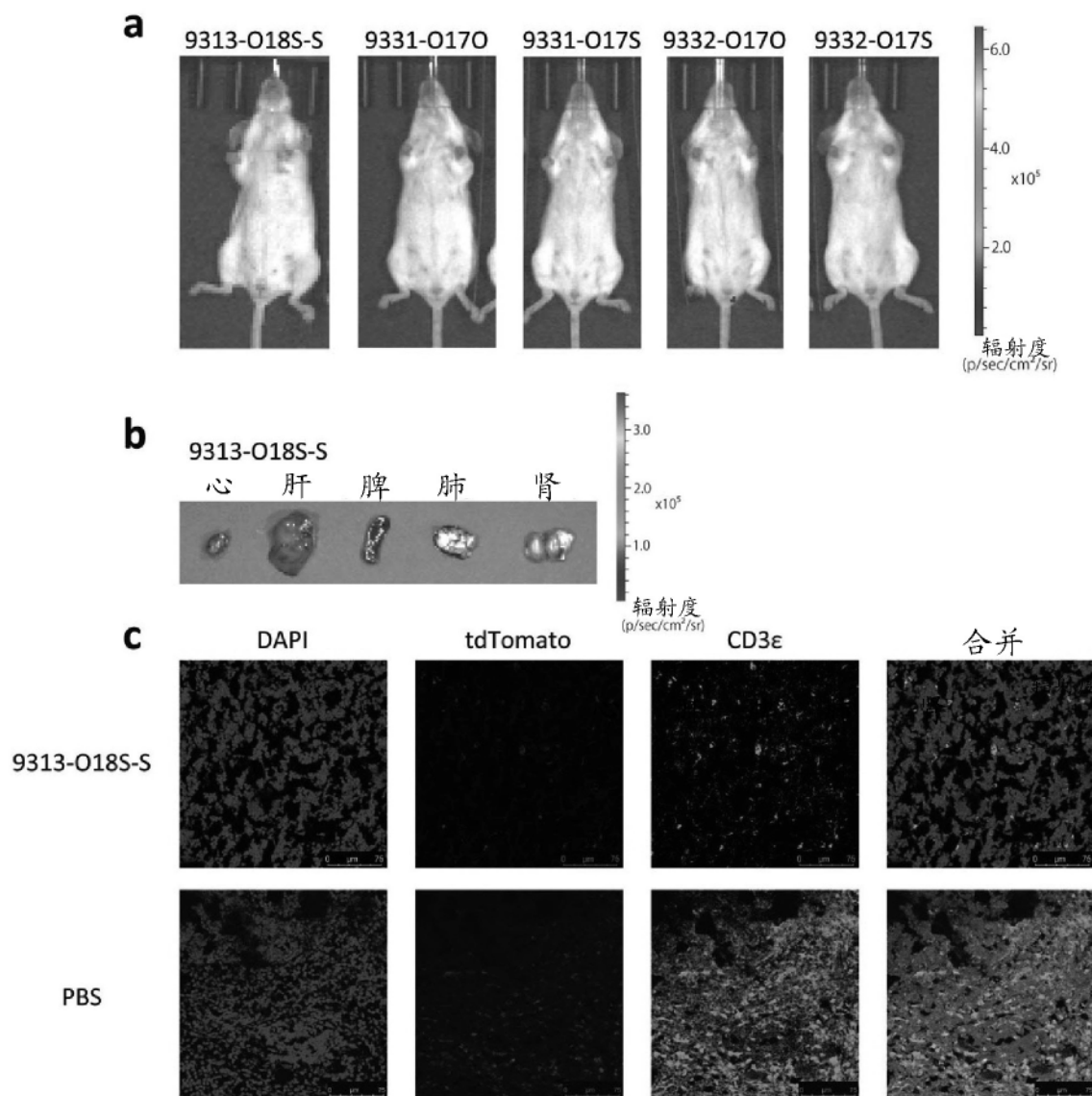


图 9

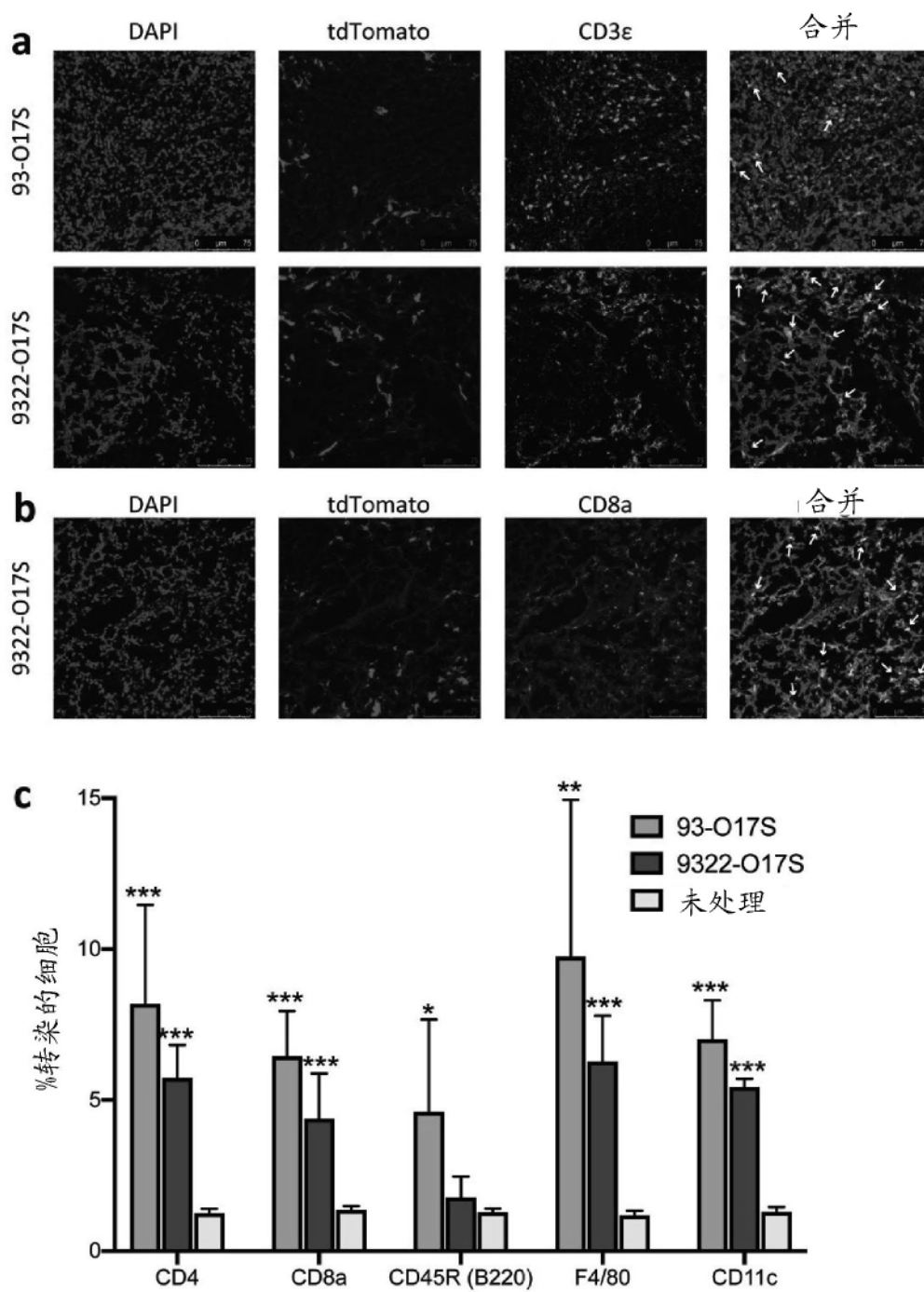


图 10

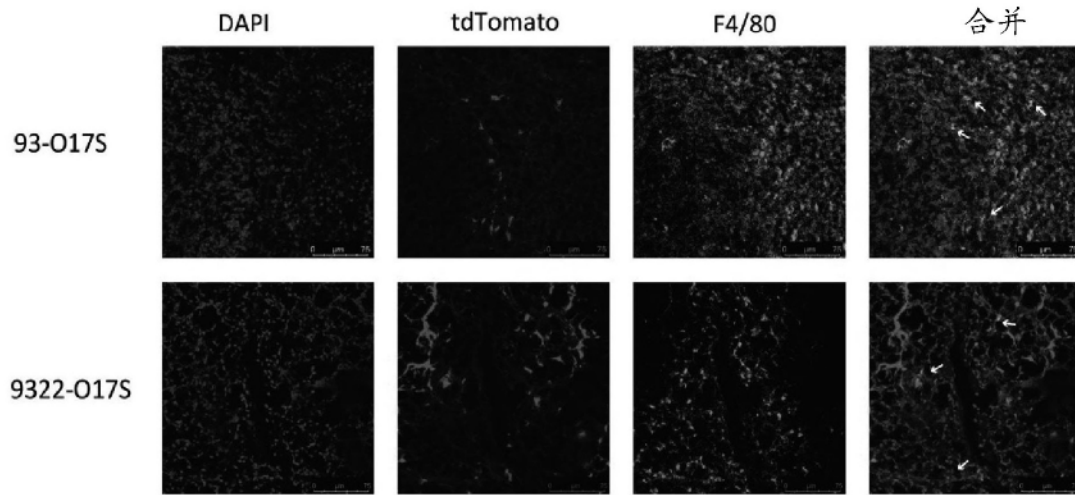


图 11

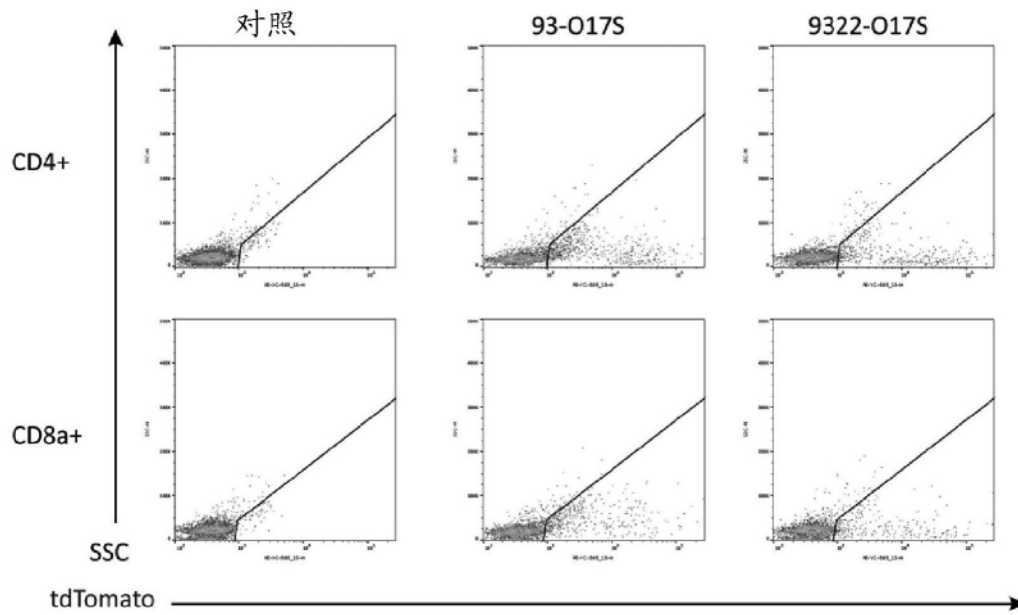


图 12