



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102940891 B

(45) 授权公告日 2016. 02. 24

(21) 申请号 201210472822. 0

A61K 47/48(2006. 01)

(22) 申请日 2005. 05. 06

A61K 45/00(2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 49/00(2006. 01)

04010700. 5 2004. 05. 05 EP

A61P 35/00(2006. 01)

04030847. 0 2004. 12. 27 EP

(56) 对比文件

(62) 分案原申请数据

CN 1378536 A, 2002. 11. 06,

200580014157. 9 2005. 05. 06

US 6395713 B1, 2002. 05. 28,

(73) 专利权人 赛伦斯治疗有限公司

审查员 翟羽

地址 德国柏林

(72) 发明人 O·凯尔 J·考夫曼

安斯加尔·桑特尔

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任

公司 11021

代理人 吴小明

(51) Int. Cl.

A61K 48/00(2006. 01)

A61K 47/18(2006. 01)

权利要求书5页 说明书32页

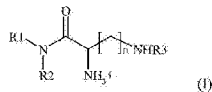
序列表5页 附图29页

(54) 发明名称

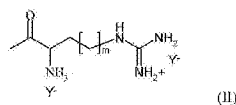
脂质、脂质复合物及其应用

(57) 摘要

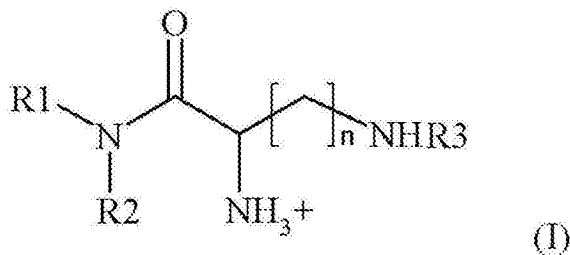
本发明是脂质、脂质复合物及其应用。其涉及按照式 (I) 的化合物, 其中 R₁和 R₂各自并且独立地选自包含烷基的组 ;n 是介于 1 和 4 之间的任何整数 ;R₃是选自包含赖氨酰、鸟氨酰、2, 4- 二氨基丁酰、组氨酰的组的酰基和按照式 (II) 的酰基部分, 其中 m 是 1-3 之间的任何整数且 Y⁻ 是药用阴



离子。



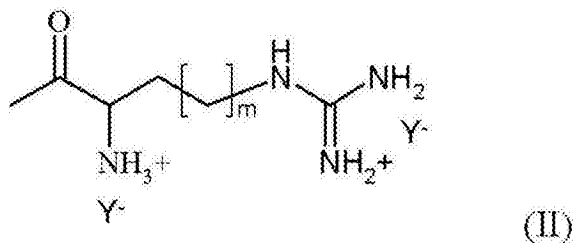
1. 一种用于将药物活性化合物递送入细胞的组合物,其包含脂质成分、药物活性化合物,至少一种辅助脂质成分和载体,其中所述脂质成分是按照式 (I) 的阳离子脂质化合物:



其中 R_1 和 R_2 各自并且独立地选自包含烷基的组;

n 是介于 1 和 4 之间的任何整数;

R_3 是选自包含赖氨酰、鸟氨酰、2,4-二氨基丁酰、组氨酰的组的酰基和按照式 (II) 的酰基部分,



其中 m 是 1-3 的任何整数;

Y 是药用阴离子;

其中所述药物活性化合物是核酸;

其中核酸与阳离子脂质的摩尔比是 0-0.075;且

其中核酸主链与阳离子脂质氮的电荷比是从 1 : 1.5 至 1 : 7,

其中所述核酸选自由 DNA, RNA, PNA 和 LNA 组成的组,

其中所述载体是水性载体或非水性载体,

其中所述辅助脂质成分选自由磷脂和类固醇组成的组。

2. 按照权利要求 1 的组合物,其中 R_1 和 R_2 各自并且独立地选自包含十二 烷基、十四烷基、十六烷基和油基的组。

3. 按照权利要求 1 和 2 中任一项的组合物,其中 R_1 是十二烷基且 R_2 是十四烷基;或 R_1 是十六烷基,且 R_2 是油基。

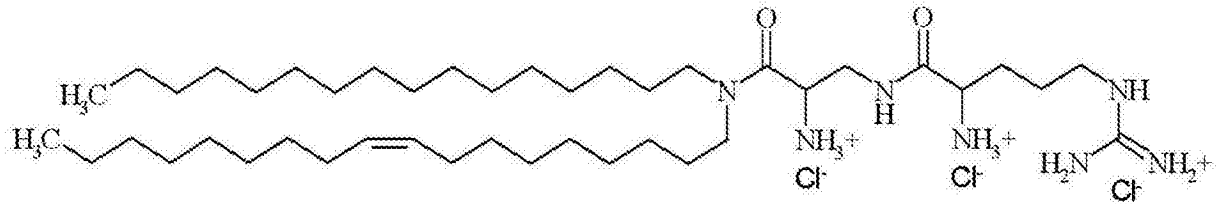
4. 按照权利要求 1-3 任一项的组合物,其中 m 是 1 或 2。

5. 按照权利要求 1-4 任一项的组合物,其中所述阳离子脂质化合物是与阴离子 Y 缔合的阳离子脂质。

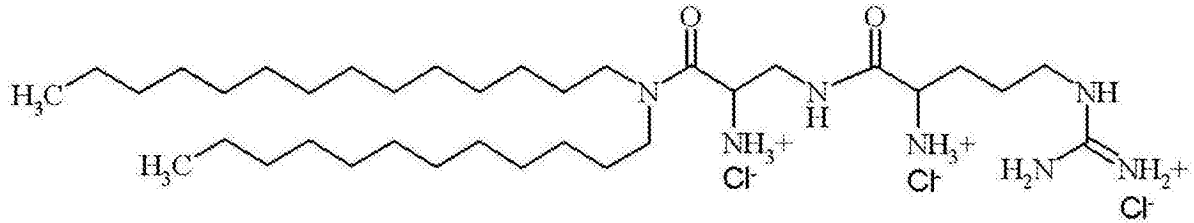
6. 按照权利要求 1-5 任一项的组合物,其中 Y 选自包括卤化物、乙酸根和三氟乙酸根的组。

7. 按照权利要求 1-6 任一项的组合物,其中所述阳离子脂质化合物选自包括下列各项的组:

- β -精氨酰 -2,3-二氨基丙酸 -N-十六烷基 -N-油基 -酰胺三盐酸盐

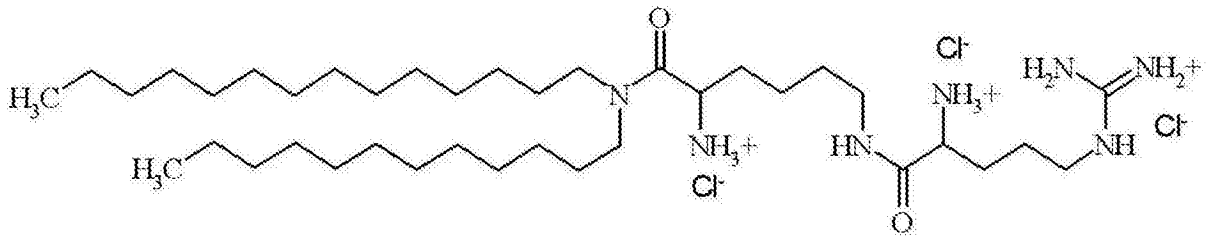


-β-精氨酸-2,3-二氨基丙酸-N-十二烷基-N-十四烷基-酰胺三盐酸盐



和

-ε-精氨酸-赖氨酸-N-十二烷基-N-十四烷基-酰胺三盐酸盐



8. 按照权利要求 1-7 任一项的组合物,其中所述组合物是药物组合物。

9. 按照权利要求 1-8 任一项的组合物,其中所述核酸选自包括下列各项的组:寡核苷酸和多核苷酸。

10. 按照权利要求 1-9 任一项的组合物,其中所述核酸选自自由 RNAi 分子, siRNA, siNA 分子,反义核酸,核酶,适体或 spiegelmer 组成的组。

11. 按照权利要求 1-10 任一项的组合物,其中所述核酸是双链核酸。

12. 按照权利要求 1-11 任一项的组合物,其中所述核酸与阳离子脂质的摩尔比是 0.02-0.05。

13. 按照权利要求 12 的组合物,其中所述核酸与阳离子脂质的摩尔比是 0.037。

14. 按照权利要求 1-13 任一项的组合物,其中所述核酸主链与阳离子脂质氮的电荷比是 1 : 4。

15. 按照权利要求 1 的组合物,其中所述辅助脂质成分选自包括下列各项的组:1,2-二植烷酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺和 1,2-二油基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺。

16. 按照权利要求 1 的组合物,其中所述辅助脂质成分的含量是从所述组合物的总脂质含量的 20mol%到 80mol%。

17. 按照权利要求 16 的组合物,其中所述辅助脂质成分的含量是从 35mol%到 65mol%。

18. 按照权利要求 1-17 任一项的组合物,其中所述脂质是 β-精氨酸-2,3-二氨基丙酸-N-十六烷基-N-油基-酰胺三盐酸盐,所述辅助脂质是 1,2-二植烷酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺。

19. 按照权利要求 18 的组合物,其中所述脂质是所述组合物的总脂质含量的 50mol%,所述辅助脂质是所述组合物的总脂质含量的 50mol%。

20. 按照权利要求 1-19 任一项的组合物,其中所述组合物包含至少两种辅助脂质。

21. 按照权利要求 20 的组合物,其中至少一种辅助脂质包含选自包括下列各项的组的部分:PEG 部分、HEG 部分、聚羟乙基淀粉部分和聚丙烯部分。

22. 按照权利要求 21 的组合物,其中所述部分提供 500-10000Da 的分子量。

23. 按照权利要求 21 的组合物,其中所述部分提供 2000-5000Da 的分子量。

24. 按照权利要求 20 或 21 的组合物,其中包含所述 PEG 部分的辅助脂质选自包括下列各项的组:1,2-二硬脂酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺,1,2-二烷基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺;和神经酰胺-PEG。

25. 按照权利要求 24 的组合物,其中所述 PEG 部分具有 500Da 到 10000Da 的分子量。

26. 按照权利要求 24 的组合物,其中所述 PEG 部分具有 2,000 到 5,000Da 的分子量。

27. 按照权利要求 24 的组合物,其中所述 PEG 部分具有 2,000Da 的分子量。

28. 按照权利要求 25 的组合物,其中所述组合物包含作为脂质成分的 β -精氨酸-2,3-二氨基丙酸-N-十六烷基-N-油基-酰胺三盐酸盐,作为第一辅助脂质的 1,2-二植烷酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺和作为第二辅助脂质的 1,2-二硬脂酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-PEG2000。

29. 按照权利要求 28 的组合物,其中所述第二辅助脂质的含量是 0.05mol% 到 4.9mol%。

30. 按照权利要求 28 的组合物,其中所述第二辅助脂质的含量是 1 到 3mol%。

31. 按照权利要求 29 的组合物,其中所述脂质的含量是 45mol% 到 50mol%,第一辅助脂质的含量是 45 到 50mol%,并且在存在 PEG 化的第二辅助脂质的条件下,所述第二辅助脂质的含量是 0.1mol% 到 5mol%,其中所述脂质、所述第一辅助脂质和所述第二辅助脂质的含量的总和是 100mol%,并且其中所述第一辅助脂质和所述第二辅助脂质的总和是 50mol%。

32. 按照权利要求 31 的组合物,其中所述第二辅助脂质的含量是 1-4mol%。

33. 按照权利要求 31 的组合物,其中所述第二辅助脂质的含量是 2%。

34. 按照权利要求 20-33 任一项的组合物,所述组合物含有:

a) 50mol% 的 β -精氨酸-2,3-二氨基丙酸-N-十六烷基-N-油基-酰胺三盐酸盐, 48mol% 的 1,2-二植烷酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺;和

2mol% 1,2-二硬脂酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-PEG2000,

或

b) 50mol% 的 β -L-精氨酸-2,3-L-二氨基丙酸-N-十六烷基-N-油基-酰胺三盐酸盐,

49mol% 1,2-二植烷酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺;和

1mol% N(羰基-甲氧基聚乙二醇-2000)-1,2-二硬脂酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺,优选其钠盐。

35. 按照权利要求 20-33 任一项的组合物,所述组合物含有:

a) 50mol% 的 β -精氨酸-2,3-二氨基丙酸-N-十六烷基-N-油基-酰胺三盐酸盐,

48mol%的 1,2-二植烷酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺;和
2mol% 1,2-二硬脂酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-PEG2000,
或

b) 50mol%的 β -L-精氨酸-2,3-L-二氨基丙酸-N-十六烷基-N-油基-酰胺三盐酸盐,

49mol% 1,2-二植烷酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺;和

1mol% N(羰基-甲氧基聚乙二醇-2000)-1,2-二硬脂酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺的钠盐。

36. 按照权利要求 1-35 任一项的组合物,其中所述阳离子脂质化合物和/或所述辅助脂质成分是在水性介质中的分散体存在。

37. 按照权利要求 1-35 任一项的组合物,其中所述阳离子脂质化合物和/或所述辅助脂质成分是在水混溶性溶剂中的溶液存在。

38. 按照权利要求 37 的组合物,其中所述溶剂选自包括乙醇和叔丁醇的组。

39. 按照权利要求 36 的组合物,其中所述分散体包含尺寸为 120nm 的颗粒。

40. 按照权利要求 1-39 任一项的组合物用于制备药物的应用,所述药物用于治疗 and / 或预防疾病。

41. 按照权利要求 40 的应用,其中所述组合物包含适合于治疗和/或预防所述疾病的药物活性化合物。

42. 按照权利要求 40-41 任一项的应用,其中所述药物用于治疗癌症和/或心血管相关的疾病。

43. 按照权利要求 40-41 任一项的应用,其中所述药物用于治疗癌症。

44. 按照权利要求 43 的应用,其中所述癌症选自包括实体瘤和非实体瘤的组。

45. 按照权利要求 44 的应用,其中所述实体瘤选自包括下列各项的组:胰腺癌、乳腺癌、前列腺癌、肺癌、结肠癌和肝细胞癌。

46. 按照权利要求 43-45 任一项的应用,其中所述癌症涉及选自包括血管发生和新血管发生的组的过程。

47. 按照权利要求 40-46 任一项的应用,其中所述药物用于将所述核酸施用到细胞中,所述细胞选自包括下列各项的组:内皮细胞、上皮细胞和肿瘤细胞。

48. 按照权利要求 47 的应用,其中所述细胞是内皮细胞。

49. 按照权利要求 48 的应用,其中所述内皮细胞是血管系统的内皮细胞。

50. 按照权利要求 49 的应用,其中所述血管系统是来新血管发生的血管系统。

51. 按照权利要求 50 的应用,其中所述血管系统是来肿瘤相关的新血管发生。

52. 按照权利要求 49 的应用,其中所述血管系统选自包括下列各项的组:肝血管系统、心脏血管系统、肾脏血管系统、胰腺血管系统和肺血管系统。

53. 按照权利要求 40-52 任一项的应用,其中所述药物用于系统给药。

54. 按照权利要求 40-52 任一项的应用,其中所述药物用于局部给药。

55. 按照权利要求 40-54 任一项的应用,其中所述药物是诊断剂。

56. 按照权利要求 1-39 任一项的组合物在制备转移剂中的应用。

57. 按照权利要求 56 的应用,其中所述转移剂将药物活性组分转移到哺乳动物细胞

中。

58. 按照权利要求 57 的应用,其中所述哺乳动物细胞是人细胞。

59. 按照权利要求 57-58 任一项的应用,其中所述细胞是内皮细胞。

60. 按照权利要求 59 的应用,其中所述内皮细胞是血管相关的内皮细胞。

61. 按照权利要求 1-39 任一项的组合物在制备用于系统给药的药物中的应用。

62. 按照权利要求 61 的应用,其中所述系统给药是对脊椎动物的系统给药。

63. 按照权利要求 61-62 任一项的应用,其中所述脊椎动物是哺乳动物。

64. 按照权利要求 63 的应用,其中所述哺乳动物选自包括下列各项的组:小鼠、大鼠、豚鼠、猫、狗、猴和人。

脂质、脂质复合物及其应用

[0001] 本申请是申请日为 2005 年 5 月 6 日、题为“脂质、脂质复合物及其应用”的中国专利申请号 2005800141579 的分案申请。

[0002] 本发明涉及阳离子脂质、包含其的组合物及其应用以及将化学化合物转移到细胞中的方法。

[0003] 分子生物学和分子医学在很大程度上依赖于生物活性化合物向细胞内的引入。这些生物活性化合物典型地分别包括,特别是, DNA、RNA 以及肽和蛋白质。典型地,要克服的屏障是脂双层,其具有带负电荷的外表面。在本领域,已经开发了许多技术来渗透细胞膜并且由此将生物活性化合物引入。然而,构思用于实验室的一些方法不能用在医学领域并且更特别地,不适合于药物递送。例如,本领域已知的电穿孔和冲击法,如果应用的话,仅容许生物活性化合物的局部递送。除此之外,所述脂双层细胞膜还包括运送系统。因此,尝试使用这种运送系统将生物活性化合物递送通过细胞膜。然而,由于这种递送系统的特异性或交叉反应性,它们的应用通常不是可应用的方法。

[0004] 本领域描述的将生物活性化合物转移到细胞中的更通用的方法是使用病毒载体。然而,病毒载体仅能用于将基因有效地转移到一些细胞类型中;但是它们不能用于将化学上合成的分子引入细胞。

[0005] 一种备选的方法是使用所谓的脂质体 (Bangham, J. Mol. Biol. 13, 238-252)。脂质体是在两亲性脂质在水中缔合后产生的小泡。脂质体典型地包括磷脂的同心排列的双分子层。取决于层数,可将脂质体分类为小的单层脂质体、多层脂质体和大的多层脂质体。已经证明脂质体是有效的递送试剂,因为它们容许亲水性化合物结合到水性中间层中,而将疏水性化合物结合到脂质层中。本领域众所周知的是,脂质制剂的组合物以及制备它们的方法对于得到的脂质聚集体的结构和大小具有影响,并且因此影响脂质体。还已知脂质体结合阳离子脂质。

[0006] 除了作为脂质体的成分之外,阳离子脂质还引起了相当多的关注,因为它们可以象这样用于生物聚合体的细胞递送。使用阳离子脂质,由于静电相互作用,可以将任何阴离子化合物基本上以定量方式进行包封。此外,认为阳离子脂质与带负电荷的细胞膜相互作用,启动细胞膜转运。已经发现,如此与生物活性化合物一起使用含有阳离子脂质的脂质体制剂或使用阳离子脂质需要探索式方法,每种制剂应用有限,因为通常在缺乏血清的情况下,其典型地可以将质粒递送到一些但是不是所有的细胞类型中。

[0007] 已经证实脂质和由它们转运的生物活性化合物的电荷和 / 或质量比率是递送不同类型的所述生物活性化合物的极其重要的因素。例如,已经显示适合于包括 5,000 到 10,000 个碱基大小的质粒递送的脂质制剂,通常对于递送寡核苷酸诸如典型地包括约 10 到约 50 个碱基的合成的核酶或反义分子是无效的。此外,最近已经显示指出反义寡核苷酸和核酶的优选递送条件甚至在相同的细胞类型中也是不同的。

[0008] 美国专利 6,395,713 公开了基于阳离子脂质的组合物和将这些组合物用于将生物活性化合物转移到细胞中的应用,所述组合物由亲脂性基团、接头和头部基团组成。

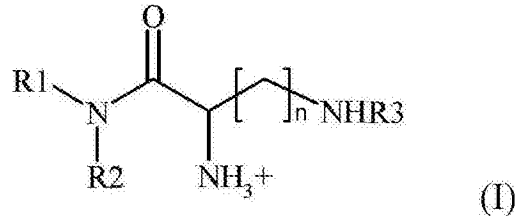
[0009] 本发明待解决的问题是提供将生物活性化合物引入细胞,优选地动物细胞的方

式。本发明待解决的另一个问题是提供核酸的递送试剂，特别是小核酸诸如 siRNA, siNA 和 RNAi 或适体和 spiegelmers。

[0010] 这些问题通过后附的独立权利要求的主题得以解决。优选的实施方案可以从其后附的附属权利要求获得。

[0011] 在第一个方面，本发明待解决的问题通过按照式 (I) 的化合物得以解决，

[0012]

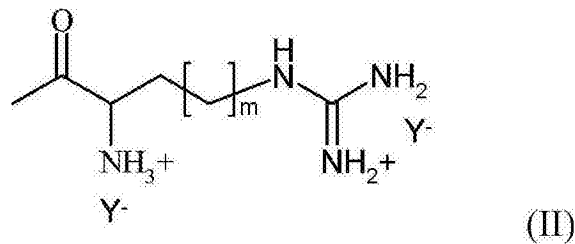


[0013] 其中 R_1 和 R_2 各自并且独立地选自包含烷基的组；

[0014] n 是介于 1 和 4 之间的任何整数；

[0015] R_3 是选自包含赖氨酰、鸟氨酰、2,4-二氨基丁酰、组氨酰的组的酰基和按照式 (II) 的酰基部分，

[0016]



[0017] 其中 m 是 1-3 之间的任何整数且

[0018] Y 是药用阴离子。

[0019] 在一个实施方案中， R_1 和 R_2 各自并且独立地选自包括十二烷基、十四烷基、十六烷基和油基的组。

[0020] 在一个实施方案中， R_1 是十二烷基且 R_2 是十四烷基；或

[0021] R_1 是十六烷基，且 R_2 是油基。

[0022] 在一个实施方案中， m 是 1 或 2。

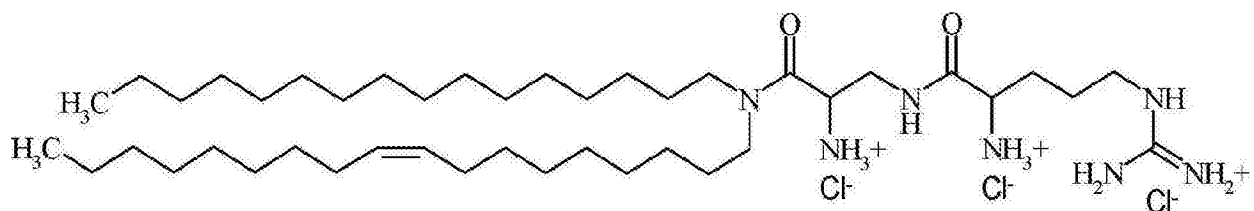
[0023] 在一个实施方案中，所述化合物是阳离子脂质，优选地与阴离子 Y 缔合 (association)。

[0024] 在一个实施方案中， Y 选自包括卤化物、乙酸盐 (酯) 和三氟乙酸盐 (酯) 的组。

[0025] 在一个实施方案中，所述化合物选自包括下列各项的组：

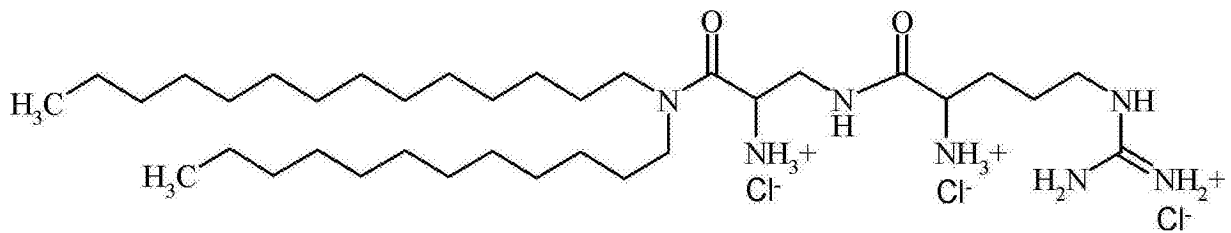
[0026] - β -精氨酰 -2,3-二氨基丙酸 -N-十六烷基 -N-油基 -酰胺三盐酸盐

[0027]



[0028] -β-精氨酸-2,3-二氨基丙酸-N-十二烷基-N-十四烷基-酰胺三盐酸盐

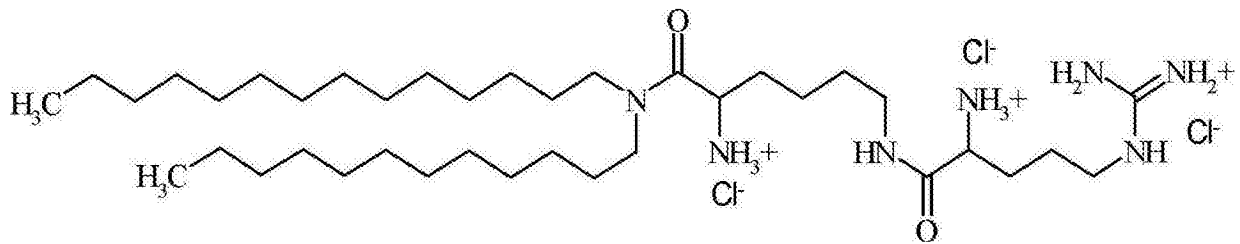
[0029]



[0030] 和

[0031] -ε-精氨酸-赖氨酸-N-十二烷基-N-十四烷基-酰胺三盐酸盐

[0032]



[0033] 在第二个方面,本发明待解决的问题通过包括作为脂质成分的按照第一个方面的化合物和载体的组合物得以解决。

[0034] 在一个实施方案中,所述组合物包括另一种组分。

[0035] 在第三个方面,本发明待解决的问题通过药物组合物得以解决,所述药物组合物包括按照第一个方面的化合物和药物活性化合物和优选地药用载体。

[0036] 在第二个和第三个方面的一个实施方案中,药物活性化合物和/或另一种组分选自包括下列各项的组:肽、蛋白质、寡核苷酸、多核苷酸和核酸。

[0037] 在第二和第三个方面的实施方案中,所述蛋白质是抗体,优选地是单克隆抗体。

[0038] 在第二和第三个方面的实施方案中,所述核酸选自包括DNA, RNA, PNA和LNA的组。

[0039] 在第二和第三个方面的实施方案中,所述核酸是功能性核酸,其中优选地,所述功能性核酸选自包括下列各项的组:RNAi, siRNA, siNA, 反义核酸,核酶,适体和spiegelmers。

[0040] 在第二和第三个方面的实施方案中,所述组合物还包括至少一种辅助脂质成分,其中优选地所述辅助脂质成分选自包括磷脂和类固醇的组。

[0041] 在第二个和第三个方面的优选实施方案中,所述辅助脂质成分选自包括下列各项的组:1,2-二植烷酰(diphytanoyl)-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺和1,2-二油基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺。

[0042] 在第二个和第三个方面的实施方案中,辅助脂质成分的含量从所述组合物的总脂质含量的约20mol%到约80mol%。

[0043] 在第二个和第三个方面的优选实施方案中,所述辅助脂质成分的含量从约35mol%到约65mol%。

[0044] 在第二个和第三个方面的实施方案中,所述脂质是β-精氨酸-2,3-二氨基丙酸-N-十六烷基-N-油基-酰胺三盐酸盐,所述辅助脂质是1,2-二植烷酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺。

[0045] 在第二和第三个方面的优选实施方案中,所述脂质是所述组合物的总脂质含量的 50mol%,所述辅助脂质是所述组合物的总脂质含量的 50mol%。

[0046] 在第二和第三个方面的实施方案中,所述组合物包含至少两种辅助脂质。

[0047] 在第二和第三个方面的优选实施方案中,至少一种辅助脂质包括选自包括下列各项的组的部分:PEG 部分、HEG 部分、聚羟基乙基淀粉 (polyHES) 部分和聚丙烯部分,其中这样的部分优选地提供约 500-10000Da 的分子量,更优选地约 2000-5000Da 的分子量。

[0048] 在第二和第三个方面的优选实施方案中,包括 PEG 部分的辅助脂质选自包括下列各项的组:1,2-二硬脂酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺,1,2-二烷基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺;和神经酰胺-PEG。

[0049] 在第二和第三个方面的更优选实施方案中,所述 PEG 部分具有约 500Da 到 10000Da 的分子量,优选地约 2,000 到 5,000Da 的分子量,更优选地 2,000Da 的分子量。

[0050] 在第二个和第三个方面的更优选实施方案中,所述组合物包括作为脂质成分的 β -精氨酸-2,3-二氨基丙酸-N-十六烷基-N-油基-酰胺三盐酸盐,作为第一辅助脂质的 1,2-二植烷酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺和作为第二辅助脂质的 1,2-二硬脂酰(disteroyl)-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-PEG2000。

[0051] 在第二和第三个方面的更优选实施方案中,所述第二辅助脂质的含量是约 0,05mol%到 4,9mol%,优选地约 1 到 3mol%。

[0052] 在第二和第三方面的更优选的实施方案中,脂质的含量是 45mol%到 50mol%,第一辅助脂质的含量是 45 到 50mol%,并且在存在 PEG 化的第二辅助脂质的情况下,所述第二辅助脂质的含量是约 0,1mol%到约 5mol%,优选地约 1-4mol%,且更优选地约 2%,其中所述脂质、所述脂质、所述第一辅助脂质和所述第二辅助脂质的含量的总和是 100mol%,并且其中所述第一辅助脂质和所述第二辅助脂质的总和是 50mol%。

[0053] 在第二和第三个方面的优选实施方案中,所述组合物包含下列:

[0054] a) 50mol%的 β -精氨酸-2,3-二氨基丙酸-N-十六烷基-N-油基-酰胺三盐酸盐,

[0055] 48mol%的 1,2-二植烷酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺;和

[0056] 2mol% 1,2-二硬脂酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-PEG2000.

[0057] 或

[0058] b) 50mol%的 β -L-精氨酸-2,3-L-二氨基丙酸-N-十六烷基-N-油基-酰胺三盐酸盐,

[0059] 49mol% 1,2-二植烷酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺;和

[0060] 1mol% N(羰基-甲氧基聚乙二醇-2000)-1,2-二硬脂酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺,优选其钠盐。

[0061] 在第二和第三个方面的优选实施方案中,功能性核酸是双链核糖核酸,其中所述组合物还包括核酸,优选地功能性核酸,其更优选地是双链核糖核酸,并且最优选地是选自包括下列各项的组的核酸:RNAi、siRNA、siNA、反义核酸和核酶,其中优选地 RNAi 与阳离子脂质的摩尔比率是约 0-0.075,优选地约 0.02-0.05 并且甚至更优选地 0.037。

[0062] 在第二和第三个方面的优选实施方案中,所述化合物和/或辅助脂质成分作为在水性介质中的分散体存在。

[0063] 在第二和第三个方面的优选实施方案中,所述化合物和 / 或辅助脂质成分作为在水混溶性溶剂中的溶液存在,其中优选地所述溶剂选自包括乙醇和叔丁醇的组。

[0064] 在第二和第三个方面的优选实施方案中,所述功能性核酸是双链核糖核酸,优选地选自包括 RNAi、siRNA、siNA、反义核酸和核酶的组的核酸,并且其中优选地 RNAi 与阳离子脂质的摩尔比率是从约 0-0.075,优选地从约 0.02-0.05,并且甚至更优选地 0.037。

[0065] 在第二和第三个方面的优选实施方案中,所述组合物包含核酸,其中核酸主链磷酸酯与阳离子脂质氮原子的电荷比率是约从 1 : 1,5-7,优选地 1 : 4。

[0066] 在第二和第三个方面的优选实施方案中,在分散体中的所述颗粒的大小是约 120nm。

[0067] 在第二和第三个方面的优选实施方案中,所述分散体是包含 1 到 100 μ M siRNA 的贮存分散体,其中优选地所述贮存分散体在体内或体外稀释 1 : 100 到 1 : 10000,更优选地 1 : 1000。

[0068] 在第四个方面,本发明待解决的问题通过将按照第一个方面的化合物或按照第二个或第三个方面的组合物用于制备药物而得以解决,所述药物优选地用于治疗癌症和 / 或心血管相关的疾病。

[0069] 在第四个方面的实施方案中,所述药物用于治疗癌症,其中优选地所述癌症选自包括实体和非实体肿瘤的组,并且其中更优选地所述实体瘤选自包括下列各项的组:胰腺癌、乳腺癌、前列腺癌、肺癌、结肠癌和肝细胞癌。

[0070] 在第四个方面的实施方案中,所述癌症涉及选自包括血管发生和新血管发生的过程。

[0071] 在第四个方面的实施方案中,所述药物用于将核酸施用到细胞中,所述细胞选自包括下列各项的组:内皮细胞、上皮细胞和肿瘤细胞,优选地所述细胞是内皮细胞。

[0072] 在第四个方面的实施方案中,所述内皮细胞是血管系统的内皮细胞。

[0073] 在第四个方面的实施方案中,所述血管系统是来自动脉发生、优选地肿瘤相关的新血管发生的血管系统。

[0074] 在第四个方面的实施方案中,血管系统选自包括下列各项的组:肝血管系统、心脏血管系统、肾脏血管系统、胰腺血管系统和肺血管系统。

[0075] 在第四个方面的实施方案中,所述药物用于系统施用。

[0076] 在第四个方面的实施方案中,所述药物用于局部施用。

[0077] 在第四个方面的实施方案中,所述药物用于治疗心血管相关疾病,其中所述心血管疾病选自包括下列各项的组:冠心病、心脏衰竭、高血压、血栓形成、心肌梗塞、缺血性心脏病诸如心绞痛和动脉粥样硬化 (arteriosclerosis)。

[0078] 在第四个方面的实施方案中,所述药物用于治疗血管发生相关疾病。优选地,这种血管发生与下列器官和疾病相关,其中认为血管发生是导致这样的疾病的主要原因,并且因此容许使用按照本发明的组合物 (Carmeliet P., Nature Medicine 9, 653-660 (2003))。

[0079] 血管 血管畸形, 迪乔治综合征, HHT, 海绵状血管瘤, 动脉硬化 (atherosclerosis), 移植性小动脉病, 高血压, 糖尿病, 再狭窄

[0080] 脂肪组织 肥胖症

[0081] 皮肤 银屑病, 肉赘, 变应性皮炎, 瘢痕疙瘩, 脓性肉芽肿, 发疱性疾病, 在 AIDS 患

者中的卡波西肉瘤,秃头,皮肤紫癜,毛细管扩张,静脉湖形成

[0082] 眼睛 持续增生性玻璃体综合征,糖尿病性视网膜病,早产儿视网膜病,脉络膜新血管形成

[0083] 肺 原发性肺高血压,哮喘,鼻息肉,新生儿呼吸窘迫,肺纤维化,肺气肿

[0084] 肠 炎性肠和牙周病,腹水,腹膜粘连

[0085] 生殖系统 子宫内膜异位,子宫出血,卵巢囊肿,卵巢超刺激,先兆子痫

[0086] 骨,关节 关节炎,滑膜炎,骨髓炎,骨赘形成,骨质疏松,受损的骨折愈合

[0087] 神经系统 阿尔茨海默病,肌萎缩性侧索硬化,糖尿病性神经病,中风

[0088] 胃肠道 胃或口腔溃疡,局限性回肠炎

[0089] 肾 肾病

[0090] 在第五个方面,本发明待解决的问题通过将按照第一个方面的化合物和 / 或按照第二和 / 或第三个方面的组合物用于制备诊断试剂的应用得以解决。

[0091] 在第六个方面,本发明待解决的问题通过将按照第一个方面的化合物或按照第二和 / 或第三个方面的组合物作为转移试剂的应用而得以解决。

[0092] 在第六个方面的实施方案中,所述转移试剂将药物活性成分和 / 或另一种成分转移到细胞中,优选地哺乳动物细胞和更优选地人细胞中。

[0093] 在第六个方面的实施方案中,所述细胞是内皮细胞,优选地血管相关的内皮细胞。

[0094] 在第七个方面,本发明待解决的问题通过将药物活性化合物和 / 或另一种成分转移到细胞中或穿过膜,优选地细胞膜的方法而得以解决,所述方法包括下列步骤:

[0095] - 提供细胞或膜;

[0096] - 提供按照第一个方面的任一的化合物;

[0097] - 提供药物活性化合物和 / 或另一种成分;和

[0098] - 使细胞或膜与药物活性化合物和 / 或另一种组分,以及按照第一个方面的化合物接触。

[0099] 在第八个方面,本发明待解决的问题通过将药物活性化合物和 / 或另一种组分转移到细胞中或穿过膜,优选地细胞膜的方法而得以解决,所述方法提供下列步骤:

[0100] - 提供细胞或膜;

[0101] - 提供按照第二或第三个方面的组合物;和

[0102] - 使细胞或膜与按照第二或第三个方面的组合物接触。

[0103] 在第七或第八个方面的实施方案中,所述药物活性化合物包括作为另外的步骤的:

[0104] - 在细胞中和 / 或越过 (beyond) 膜检测药物活性化合物和 / 或另一种组分。

[0105] 在第九个方面中,本发明待解决的问题通过合成 N-十六烷基-油胺的方法而得以解决,所述方法包括下列步骤:

[0106] - 提供油酸;

[0107] - 提供十六烷基胺;

[0108] - 使油酸和十六烷基胺反应以形成 N-十六烷基-油酰酰胺;和

[0109] - 将 N-十六烷基-油酰酰胺还原成 N-十六烷基-油胺,

[0110] 其中所述油酸是至少 90%,更优选地 95%和最优地 99%纯的,其中所述百分比

是油酸和不同于油酸的任何脂肪酸的摩尔比率。

[0111] 在第九个方面的实施方案中,所述油酸和十六烷基胺在室温反应。

[0112] 在第九个方面的实施方案中,所述油酸在将其与十六烷基胺反应之前进行预处理,其中所述预处理包括将油酸与氯甲酸乙酯,优选地在无水二氯甲烷或无水四氢呋喃中进行反应。

[0113] 在第九个方面的实施方案中,所述反应在 0°C,优选地在惰性气体下进行反应。

[0114] 在第九个方面的实施方案中,所述反应物还与酸清除剂反应,其中所述酸清除剂优选地选自包括三乙胺、二异丙基乙胺和吡啶的组。

[0115] 在第九个方面的实施方案中,氯甲酸乙酯、油酸、三乙胺和十六烷基胺的摩尔比率是约 1-1.05 : 1 : 1 : 1-3 : 1-1.10。

[0116] 在第九个方面的实施方案中,使用 LiAlH_4 来进行 N-十六烷基-油酰酰胺向 N-十六烷基-油胺的还原。

[0117] 在第九个方面的实施方案中,在油酸与十六烷基胺反应后,洗涤所述反应物,并将其进行沉淀,将由此获得的沉淀物任选地进行再结晶。

[0118] 在第十个方面中,本发明待解决的问题通过将按照第一个方面的化合物或按照第二或第三个方面的组合物用于系统给药,优选地向脊椎动物的系统给药的应用而得以解决。

[0119] 在第十个方面的实施方案中,所述脊椎动物是哺乳动物,更优选地选自包括下列各项的组的哺乳动物:小鼠、大鼠、豚鼠、猫、狗、猴和人。

[0120] 如图 1 所述,按照本发明的化合物可以被视为包括由 R1-N-R2 部分形成的亲脂性基团、由 $\text{C}(\text{O})-\text{CH}(\text{NH}_3^+)(\text{CH}_2)_n-\text{NH}$ 部分形成的接头基团和由 R3 部分形成的头部基团。本发明人出人意料地发现在接头基团显示正电荷的这种化合物特别适合于将生物活性化合物转移到细胞膜上并且优选地转移到细胞中,更优选地动物细胞中。此外,本发明人已经令人惊奇地发现由按照本发明的化合物介导的转移将是特别有效的,如果所述生物活性化合物是核酸、更优选地是 siRNA 和 siNA 的话。

[0121] 优选地用于本文时,术语烷基指包含 8-20 个碳原子,优选地 12-18 个碳原子的饱和脂族原子团,或包含 8-30 个碳原子、分别包含至少一个双键和三键的单或多不饱和脂族烃原子团。因此,在优选的实施方案中,术语烷基还包括烯烃基和炔烃基。烷基指支链和非支链,即非线性或直链烷基基团。优选的直链烷基基团包含 8-30 个碳原子。更优选的直链烷基基团包含 12-18 个碳原子。优先的支链烷基基团包含 8-30 个碳原子,其中 8-30 个碳原子的数目指形成这样的支链烷基基团的主链的碳原子的数目。支链烷基基团的主链包含至少一个烷基基团作为主链的分支,其中所述烷基基团如本文所定义,更优选地,所述烷基基团包含短链烷基基团,更优选地包含 1-6 个,更优选的 1-3 个和最优选的 1 个碳原子。更优选的是在主链中包含 12-18 个碳原子的支链烷基基团,其中支链烷基基团如前述定义。特别优选的烷基基团是植烷基基团。

[0122] 在备选的实施方案中,烷基是如上定义的不饱和的支链或非支链烷基基团。更优选地,这种不饱和的非脂族烃原子团包含 1, 2 或 3 或 4 个双键,其中具有一个双键的原子团是特别优选的。最优选的是 C18:1 δ 9 的油基,即具有 18 个碳原子的脂族烃原子团,其中在位置 9,存在顺式构型的双键,而不是连接 9 位置碳原子到 10 位置碳原子的单键。

[0123] 用于本文时, n 是 1-4 之间的整数, 这意味着 n 可以是 1, 2, 3 和 4。用于本文时, m 是介于 1-3 之间的任何整数, 这意味着 m 可以是 1, 2, 和 3。

[0124] 要理解的是, 按照本发明的化合物优选地是阳离子脂质。更优选地, 存在于按照本发明的化合物中的 NH 或 NH_2 基团的任一个以质子化的形式存在。典型地, 按照本发明的化合物的任何正电荷通过阴离子的存在进行抵消。这种阴离子可以是单价或多价阴离子。优选的阴离子是卤化物, 乙酸盐和三氟乙酸盐。用于本文的卤化物优选地是氟化物、氯化物、碘化物和溴化物。最优选的是氯化物。在阳离子脂质和待转移到细胞中的生物活性化合物缔合后, 所述卤化物阴离子被生物活性化合物所取代, 所述生物活性化合物优选地显示一个或多个负电荷, 尽管必需承认生物活性化合物的总电荷不一定是负的。

[0125] 要承认的是, 按照式 (I) 的任何化合物包括至少两个不对称碳原子。在本发明中的是, 本文公开的这种化合物的任何可能的对映异构体, 即特别是 R-R ; S-S ; R-S 和 S-R 对映异构体。

[0126] 按照本发明的化合物可以形成组合物或组合物的部分, 其中这种组合物包括载体。在这种也被称为脂质组合物的这种组合物中, 按照本发明的化合物也被称为脂质成分。这种载体优选地是液体载体。优选的液体载体是水性载体和非水性载体。优选的水性载体是水, 水性缓冲系统, 更优选地是具有生理缓冲强度和生理盐浓度的缓冲系统。优选的非水性载体是溶剂, 优选地是有机溶剂诸如乙醇、叔丁醇。不希望被任何理论所束缚, 原则上可以使用任何水混溶性有机溶剂。要承认的是, 所述组合物, 更具体地脂质组合物可以因此作为脂质体存在或形成脂质体。

[0127] 按照本发明的组合物可以包括一种或多种辅助脂质, 其在本文也被称为辅助脂质成分。所述辅助脂质成分优选地选自包括磷脂和类固醇的组。磷脂优选地是磷酸的二酯和单酯。磷脂的优选的成员是磷酸甘油酯和鞘脂类。用于本文时, 类固醇是基于部分氢化环戊 [a] 菲的天然存在和合成的化合物。优选地, 类固醇包含 21-30 个碳原子。特别优选的类固醇是胆固醇。

[0128] 特别优选的辅助脂质是 1, 2- 二植烷酰 -sn- 甘油基 -3- 磷酸乙醇胺 (DPhyPE) 和 1, 2- 二油酰 -sn- 甘油基 -3- 磷酸乙醇胺 (DOPE)。

[0129] 按照本发明的特别优选的组合物包括 β -精氨酸 -2, 3- 二氨基丙酸 -N- 十六烷基 -N- 油基 - 酰胺三盐酸盐 [#6], β -精氨酸 -2, 3- 二氨基丙酸 -N- 十二烷基 -N- 十四烷基 - 酰胺三盐酸盐 [#11] 或 ϵ -精氨酸 - 赖氨酸 -N- 十二烷基 -N- 十四烷基 - 酰胺三盐酸盐 [#15] 以及 DphyPE, 其中 DphyPE 的含量优选地是 80mol%, 65mol%, 50mol% 和 35mol%, 其中术语 mol% 指所述组合物的总脂质含量的百分比, 即所述组合物的脂质含量包括按照本发明的阳离子脂质和任何另外的脂质, 包括, 但不限于, 任何辅助脂质。

[0130] 在本发明中的是, 按照本发明的组合物优选地包括按照本发明的化合物和 / 或本文公开的一种或多种辅助脂质, 其中按照本发明的化合物的任一, 即所述阳离子脂质和 / 或辅助脂质成分作为在水性介质中的分散体存在。备选地, 按照本发明的化合物, 即阳离子脂质和 / 或辅助脂质成分作为在水混溶性溶剂中的溶液存在。作为水性介质, 优选地使用本文公开的水性载体的任一种。优选的水混溶性溶剂是以任何比率与水形成均相的任何溶剂。优选的溶剂是乙醇和叔丁醇。要承认的是, 所述组合物, 更特别地所述脂质组合物可以因此作为脂质体存在或形成脂质体。

[0131] 要承认的是在其各种实施方案中的按照本发明的组合物还可以用作药物组合物。在后一种情形中,所述药物组合物包括药物活性化合物和任选地药用载体。这种药用载体可以,优选地选自与按照本发明的组合物相关的,如上定义的载体的组。本领域技术人员将理解的是,如本文所述的任何组合物,原则上,也被用作药物组合物,假定其成分和其任何组合是药用的。药物组合物包括药物活性化合物。这种药物活性化合物可以是与按照本发明的组合物的另一种成分相同的,其优选地是任何生物活性化合物,更优选地是本文公开的任何生物活性化合物。另一种成分,药物活性化合物和 / 或生物活性化合物优选地选自包括下列的组:肽、蛋白质、寡核苷酸、多核苷酸和核酸。

[0132] 优选地,任何这种生物活性化合物是带负电荷的分子。尽管本发明人不希望被任何理论所束缚,术语带负电荷的分子意为包括具有至少一个带负电荷的基团的分子,所述带负电荷的基团可以与按照本发明的阳离子脂质的带正电荷的基团离子配对。原则上,在接头部分的正电荷还可以对象这样的脂质或在阳离子脂质和带负电荷的分子,即生物活性化合物之间形成的任何复合物的总体结构具有某种影响。除此之外,与在美国专利 6,395,713 中公开的阳离子脂质比较,被引入的按照本发明的脂质的另外的正电荷应该促进这种脂质的增加的毒性,如由 Xu Y, Szoka FC Jr. ;Biochemistry ;1996May07,35(18) : 5616-23 所教导的。与本领域技术人员从这种现有技术的文献中所预期的相反,按照本发明的化合物特别适合于本文公开的各种目的,并且特别地没有任何增加的毒性。

[0133] 优选地用于本文的肽是任何聚合物,所述聚合物由优选地通过肽键彼此共价连接的至少两个氨基酸组成。更优选地,肽由 2-10 个氨基酸组成。肽的特别优选的实施方案是寡肽,其更优选地包括约 10- 约 100 个氨基酸。优选地用于本文的蛋白质是这样的聚合物,所述聚合物由彼此共价连接的多个氨基酸组成。优选地,这种蛋白质包括约至少 100 个氨基酸或氨基酸残基。

[0134] 可以与阳离子脂质和按照本发明的组合物结合使用的优选蛋白质是任何抗体,优选地任何单克隆抗体。

[0135] 特别优选的生物活性化合物,即药物活性化合物和与按照本发明的化合物结合使用的这种另外的组分是核酸。这些核酸可以是 DNA, RNA, PNA 或其任何混合物的任一。更优选地,所述核酸是功能性核酸。优选地用于本文的功能性核酸是这样的核酸,所述核酸不是分别编码肽和蛋白质的核酸。优选的功能性核酸是本领域公知的 siRNA, siNA, RNAi, 反义 - 核酸,核酶,适体和 spiegelmers。

[0136] siRNA 是小的干扰 RNA,如例如描述于国际专利申请 PCT/EP03/08666。这些分子典型地由双链 RNA 结构组成,其包括 15-25 个,优选地 18-23 个核苷酸对,所述核苷酸对彼此碱基配对,即彼此是基本上互补的,其典型地由 Watson-Crick 碱基配对所介导。该双链 RNA 分子的一条链基本上与靶核酸,优选地 mRNA 互补,其中所述双链 RNA 分子的第二条链基本上与所述靶核酸的一段序列相同。所述 siRNA 分子可以分别在每一侧和每一段序列的两侧具有许多另外的寡核苷酸,然而,所述寡核苷酸不一定必须彼此碱基配对。

[0137] RNAi 基本上与 siRNA 的设计相同,然而,与 siRNA 相比,该分子显著更长。RNAi 分子典型地分别包括 50 或更多的核苷酸和碱基对。

[0138] 基于与 siRNA 和 RNAi 相同的作用模式具有活性的另一类功能性核酸是 siNA。SiNA 例如,描述于国际专利申请 PCT/EP03/074654。更具体地,siNA 对应于 siRNA,其中所述 siNA

分子不包括任何核糖核苷酸。

[0139] 优选地用于本文时,反义核酸是基于与靶 RNA,优选地 mRNA 碱基互补性杂交由此激活 RNA 酶 H 的寡核苷酸。RNA 酶 H 通过磷酸二酯和硫代磷酸酯 (phosphothioate)- 偶联的 DNA 被激活。然而,磷酸二酯偶联的 DNA 迅速被细胞核酸酶所降解,除了硫代磷酸酯-偶联的 DNA 之外。因此,反义多核苷酸仅在作为 DNA-RNA 杂交复合物时是有效的。反义核酸的优选长度范围是 16-23 个核苷酸。这种反义寡核苷酸的实例描述,特别是在美国专利 5,849,902 和美国专利 5,989,912 中。

[0140] 另一组功能性核酸是核酶,其是催化活性核酸,优选地由基本上包括两个部分的 RNA 组成。第一个部分显示催化活性,而第二个部分负责与靶核酸的特异性相互作用。在典型地通过在两条杂交链上的碱基的基本上互补的序列的杂交和 Watson-Crick 碱基配对进行靶核酸和核酶的所述部分相互作用后,催化活性部分可以变得有活性,这意味着在核酶的催化活性是磷酸二酯酶活性的情形中,其在分子内或分子间裂解靶核酸。核酶,应用和设计原则是本领域技术人员已知的,并且例如描述于 Doherty 和 Doudna (Annu. Ref. Biophys. Biomolstruct. 2000 ;30 :457-75)。

[0141] 另一组功能性核酸是适体。适体是 D- 核酸,其是单链或双链的并且与靶分子特异性相互作用。适体的制备或选择例如描述于欧洲专利 EP0533838 中。与 RNAi, siRNA, siNA, 反义-核苷酸和核酶相反,适体不降解任何靶 mRNA,但是与靶化合物诸如蛋白质的二级和三级结构特异性相互作用。在与靶相互作用后,所述靶典型地显示在生物学活性中的变化。适体的长度典型地在少到 15 个到多到 80 个核苷酸的范围内,并且优选地在约 20- 约 50 个核苷酸的范围内。

[0142] 另一组功能性核酸是 spiegelmers, 如例如描述在国际专利申请 W098/08856 中。Spiegelmers 是类似于适体的分子。然而,与适体相反,spiegelmers 完全或大部分由 L- 核苷酸,而不是 D- 核苷酸组成。另外,特别是关于 spiegelmers 的可能的长度,将与适体相关的概括应用于 spiegelmers。

[0143] 如前所提及,本发明人已经令人惊讶地发现按照本发明的化合物和包括这种化合物的各自的组合物在将 RNAi, 更特别地 siRNA 和 siNA 转移到细胞中可以是特别有效的。要注意的是,尽管不希望被任何理论所束缚,由于包含在按照本发明的脂质组合物中的辅助脂质的特别 mol 比例,所述辅助脂质可以是无 PEG 的辅助脂质或特别是包含 PEG 的辅助脂质,更具体地如果这种辅助脂质的任一种的含量包含在本文具体指出的浓度范围内,可以意识到令人惊讶的效果。与此相关,特别值得注意的是如果按照本发明的组合物包含包括 PEG 部分的辅助脂质,使用这种包含 PEG- 衍生的辅助脂质的组合物的任何递送或转染作用在递送核酸,特别是 RNAi 分子,最具体地 siRNA, siNA, 反义核苷酸和核酶中是特别有效的。本发明人已经令人惊奇地发现这一原因是包含超过约 4% 的含 PEG 的辅助脂质的脂质体不具有活性的,而具有少于 4% (优选地少于 3%) 的脂质体才介导功能性递送。基本上,本发明人已经发现在按照本发明的脂质组合物中的 PEG 的特定量适合于分别提供有效的转染和递送。

[0144] 在另一个方面,本发明人已经令人惊奇地发现优选地以脂质复合物 (lipoplexes) 或脂质体形式存在的按照本发明的脂质组合物优选地显示总的阳离子电荷并且因此显示额外的至少一个正电荷。更优选地,所述脂质组合物显示约 1 : 1.3 到 1 : 5 的电荷比率

负：正。因此，本发明由此在另一个方面涉及任何脂质组合物，所述脂质组合物包括至少一种阳离子脂质和核酸，优选地 RNAi，siRNA 或 siNA 或具有约 1 : 1.3 到 1 : 5 的电荷比率负：正的本文所述的任何其它功能性核酸。所述阳离子脂质优选地是本文所述的任何阳离子脂质。所述脂质组合物在优选的实施方案中包括本文所述的任何辅助脂质或复制脂质组合。在优选的实施方案中，包含核酸的按照本发明的组合物形成脂质复合物。在优选的实施方案中，用于本文的术语脂质复合物指由阳离子脂质、中性辅助脂质和核酸组成的组合物。

[0145] 本发明人还已经发现具体地，siRNA 和阳离子脂质的摩尔比率可以对于按照本发明的脂质组合物的成功应用是至关重要的，尤其是考虑到以上关于包含核酸的脂质制剂的阳离子总电荷的所述时。不希望被任何理论所束缚，似乎具体地本文公开的 1mol 的阳离子脂质可以提供最多三个正电荷 / 分子，而本文公开的核酸和更具体地 siRNA 分子提供最多 40 个负电荷 / 分子。为了达到按照本发明的包含 siRNA 的脂质制剂的总的正电荷，摩尔比率可以在 0 到最多 0.075 的范围内。优选的摩尔比率 (ration) 范围在约 0.02-0.05 的范围内，并且甚至更优选的是约 0.037 的摩尔比率范围。

[0146] 本发明人的另一个令人惊奇的发现是按照本发明的组合物显示特别有用的特性，如果所述组合物包含核酸，优选地 siRNA 分子或 siNA 分子，并且核酸主链磷酸酯与阳离子脂质氮原子的电荷比率是约 1 : 1,5-7，更优选地 1 : 4 的话。用于本文时，术语核酸主链磷酸酯指由形成这种核酸的单个核苷酸提供的核酸的磷酸酯部分。用于本文时，术语阳离子脂质氮原子指由优选地包括总共三个正电荷的阳离子脂质提供的那些氮原子。所述三个阳离子由两个伯氨基基团和胍基团所提供。出于确定由核酸主链磷酸酯所提供的电荷的目的，作出下列假设：在两个核苷之间的每个磷酸酯提供一个负电荷并且 3' 末端磷酸酯，如果存在，提供两个负电荷。出于确定由阳离子脂质氮原子提供的电荷和由磷酸酯原子提供的电荷的比率的目的，假设存在如上所述的电荷，尽管不得不承认在体外和 / 或体内应用下观察到的特定的情形下，有效的电荷比率可以不同于上面具体指出的。

[0147] 上面定义的电荷比率提供核酸穿过磷脂双层膜诸如细胞质膜的有效转移。

[0148] 提供其递送特性的按照本发明的组合物的另一特征是其大小分布。优选地，作为分散体存在的按照本发明的组合物的大小分布是约 120nm。大小优选地通过准弹性光散射进行确定，如在实施例部分中更详细描述。

[0149] 本发明人已经令人惊奇地发现按照本发明的组合物特别适合于递送核酸、优选地功能性核酸诸如 siRNA 和 siNA 分子到细胞中。如在实施例部分中更详细概述的，按照本发明的组合物在将所述核酸递送到内皮细胞、上皮细胞和癌细胞的细胞内空间中是非常具有活性的。似乎存在增加更多的特异性从而使所述递送在血管系统的内皮细胞中是特别有效的，尽管使用按照本发明的组合物也可以感染其它的内皮细胞。针对血管系统，更具体地作为如由肿瘤所诱导的新血管发生的结果的血管系统的内皮细胞，发生特别有效的转染。可以研究的其它血管系统是肾、心脏、肺、肝和胰腺的血管系统。

[0150] 要承认的是，按照本发明的组合物还在其是特别温和或非毒性的范围内是有利的。这种毒性的缺乏明显地比现有技术中的组合物更为有利，因为通过避免副作用因此增加患者顺应性和具体的施用形式诸如大丸剂给药，其明显有利于使用这种组合物的任何治疗的医用益处。如可从本文的实施例部分中所见，后者从动物研究中是显而易见的。

[0151] 在本发明中的是，所述组合物和更具体地药物组合物可以包括一种或多种前述生

物活性化合物,所述生物活性化合物可以分别包含在按照本发明的组合物中作为药物活性化合物和作为另外的组分。本领域技术人员要承认的是,这些化合物中的任一种,在原则上可以用作药物活性化合物。这种药物活性化合物典型地针对涉及疾病的病理机制的靶分子。由于各种生物活性化合物和由此的与本发明的任何方面相关使用的药物活性化合物的一般设计原则和作用模式,实际上可以针对任何靶标。因此,按照本发明的化合物和包含其的各自组合物可以用于治疗或预防任何疾病或疾病状况,所述疾病或疾病状况可以使用这种生物活性化合物进行处理、预防和/或治疗。要承认的是,除了这些生物活性化合物之外,任何其它生物活性化合物也可以是按照本发明的任何实施方案的组合物的一部分。优选地,这种其它生物活性化合物包括至少一个负电荷,优选地在这样的条件下,所述条件是这种其它生物活性化合物与按照本发明的化合物,更优选地作为阳离子脂质存在的按照本发明的化合物相互作用或复合。

[0152] 用于本文时,生物活性化合物优选地是任何具有生物活性的化合物,其优选地显示在生物系统上显示任何生物、化学和/或物理作用。这种生物系统优选地是任何生化反应,任何细胞、优选地任何动物细胞,更优选地任何脊椎动物细胞和最优选地任何哺乳动物细胞,包括但不限于任何人细胞,任何组织,任何器官和任何生物。任何这样的生物优选地选自包括下列各项的组:小鼠、大鼠、豚鼠、兔、猫、狗、猴和人。

[0153] 也在本发明中的是按照本发明的组合物,更具体地按照本发明的任何药物组合物的任一种可以包括任何其它的药物活性化合物。

[0154] 所述组合物,具体地按照本发明的药物组合物可以用于各种形式的给药,其中局部给药和系统给药是特别优选的。更为优选的是这样的给药途径,所述给药途径选自包括下列各项的组:肌肉(intramuscular)、经皮、皮下、静脉内和肺给药。优选地用于本文时,局部给药意味着各个组合物以分别与细胞、组织和器官的接近空间关系进行施用,所述组合物和生物活性化合物分别施用于所述细胞、组织和器官。用于本文时,系统给药意为这样的给药,所述给药不同于局部给药并且更优选地是向体液诸如血液和液体的给药,其中所述体液将组合物分别向细胞、组织和器官进行转运,所述组合物和生物活性化合物分别被递送到所述细胞、组织和器官中。

[0155] 用于本文时,穿过其细胞膜分别以按照本发明的化合物和组合物的方式来转移生物活性化合物的细胞优选地是真核生物细胞,更优选地脊椎动物细胞和甚至更优选地哺乳动物细胞。最优选地所述细胞是人细胞。

[0156] 可以分别使用按照本发明的化合物和组合物进行制备的任何药物用于患者的治疗和预防。优选地,这样的患者是脊椎动物,更优选地是哺乳动物和甚至更优选地这种哺乳动物选自包括下列各项的组中:小鼠、大鼠、狗、猫、豚鼠、兔、猴和人。在另一个方面中,按照本发明的化合物和组合物可以用作转移剂,更优选地作为转染剂。

[0157] 优选地用于本文的转移剂是任何适合于转移化合物,更优选地生物活性化合物诸如药物活性化合物穿过膜,优选地细胞膜和更优选地将这种化合物转移到如本文前面所述的细胞中的任何试剂。优选地,所述细胞是内皮细胞,更优选地脊椎动物的内皮细胞和最优选的哺乳动物的内皮细胞,所述哺乳动物诸如小鼠、大鼠、豚鼠、狗、猫、猴和人。

[0158] 在另一个方面中,本发明涉及用生物活性化合物转移,更具体地转染细胞的方法。在第一个步骤中,其中步骤的顺序不必受到限制,分别提供细胞和膜和细胞。在第二个步骤

中,提供按照本发明的化合物以及生物活性化合物诸如药物活性化合物。这种反应可以分别与细胞和膜接触,并且由于按照本发明的化合物和组合物的生物物理性质,所述生物活性化合物将从膜的一侧转移到另一侧,或在膜形成细胞的情形中,从细胞的外面到细胞内。在本发明中的是,在分别接触细胞和膜之前,生物活性化合物和按照本发明的化合物,即阳离子脂质接触,于是优选地形成复合物并且这种复合物分别与细胞和膜接触。

[0159] 在本发明的另一个方面中,用于分别转移生物活性化合物和药物活性化合物的方法包括分别提供细胞和膜的步骤,提供按照本发明的组合物和使组合物和细胞分别和膜接触。在本发明中的是,所述组合物可以在分别接触细胞和膜之前或在其过程中形成。

[0160] 在用于转移本文公开的生物活性化合物的任何方法的实施方案中,所述方法可以包括另外的步骤,优选地检测所述生物活性化合物是否已经被转移的步骤。这种检测反应在很大程度上取决于按照所述方法转移的生物活性化合物的种类并且对于本领域技术人员而言是显而易见的。在本发明中的是该方法在本文所述的任何细胞、组织、器官和生物上进行。

[0161] 本发明还通过参考下列图和实施例来进一步举例说明,本发明的其它特征、实施方案和优势可以从所述图和实施例中获得。

[0162] 更具体地,

[0163] 图 1 显示按照本发明的阳离子脂质的基本设计;

[0164] 图 2 显示 N-油基-十六烷基胺的合成,所述 N-油基-十六烷基胺是合成按照本发明的化合物的可能的原材料,其中这种合成是按照如在 US6,395,713 中所述的现有技术中描述的合成;

[0165] 图 3 描述 N-油基-十六烷基胺的合成,其是按照本发明的重要的原材料;

[0166] 图 4-9 描述 β -精氨酸-2,3-氨基丙酸-N-十六烷基-N-油基-酰胺三盐酸盐, β -精氨酸-2,3-二氨基丙酸-N-十二烷基-N-十四烷基-酰胺三盐酸盐和 ϵ -精氨酸-赖氨酸-N-十二烷基-N-十四烷基-酰胺三盐酸盐的合成;

[0167] 图 10 描述备选的阳离子头部基团的合成,其是合成按照本发明的阳离子脂质的备选成分;

[0168] 图 11 描述 β -精氨酸-2,3-二氨基丙酸-N-十六烷基-N-油基-酰胺三盐酸盐的备选合成路径;

[0169] 图 12A 和 12B 描述按照本发明的脂质制剂的大小分布和挤压以及高压均化的分别的影响;

[0170] 图 13 描述暴露于冷冻保护剂和贮存于不同温度的包含 RNAi 的脂质制剂的蛋白质印迹分析的结果;

[0171] 图 14 描述关于不同的 siRNA 加载对脂质制剂的影响的蛋白质印迹分析的结果,所述脂质制剂在它们的辅助脂质上是不同的;

[0172] 图 15 描述蛋白质印迹分析的结果和不同浓度的 PEG- 取代的脂质的影响;

[0173] 图 16 描述用于产生 RasV12- 依赖型肿瘤小鼠模型的实验设置及其在测试各种制剂中的应用;

[0174] 图 17A, 17B 和 17C 描述图表,所述图表显示肿瘤体积作为使用不同制剂进行细胞攻击后的天数的函数;

[0175] 图 18a 描述裸的和脂质复合的 PKN3 特异性 siRNA 的作用的蛋白质印迹分析的结果；

[0176] 图 18b 是显示裸的和配制的 siRNAs 的细胞内分布的共焦显微图片；

[0177] 图 18c 是描述肝中配制的脂质体和裸 siRNAs 的分布的落射荧光显微图片（上版）和共焦显微图片（下版）；

[0178] 图 18d 是用脂质体制配的 siRNAs 靶向的内皮细胞的落射和共焦荧光显微照片；

[0179] 图 18e 是不同肿瘤的内皮细胞的荧光显微照片；

[0180] 图 19a 是 PTEN 定向的 siRNA 对 DNA 合成的作用模式的图示，并且显示使用不同的 siRNA 种类的蛋白质印迹分析的结果和用所述不同的 siRNA 种类处理的 HELA 细胞的免疫荧光显微照片；

[0181] 图 19b 描述用不同的 siRNA 分子处理的内皮细胞的图片和表示在肝内皮细胞中的 BrdU 测定的结果的图表；

[0182] 图 19c 描述用不同的 siRNA 分子处理的内皮细胞的图片和表示在肿瘤内皮细胞中的 BrdU 测定的结果的图表；

[0183] 图 20a 描述确定有效的 siRNA 分子用于有效 CD31 的击倒 (knock-down) 的蛋白质印迹分析的结果；

[0184] 图 20b 是举例说明在小鼠的不同器官中抗 -CD31siRNA 对 CD31mRNA 水平的作用的图表；

[0185] 图 20c 显示使用抗 CD31siRNA 分子确定 CD31 蛋白质击倒在小鼠的不同器官中的功效的蛋白质印迹分析的结果；

[0186] 图 20d 显示通过直接免疫染色用抗 -CD31siRNA 分子处理的小鼠的石蜡肿瘤切片的 CD31 蛋白质的体内击倒的结果；

[0187] 图 21a 描述研究抗 -CD31siRNA 和抗 -PTEN siRNA 分子对 CD31, CD34, PTEN 和 p-Akt 击倒的功效的蛋白质印迹分析的结果；

[0188] 图 21b 是描述脂质复合物给药的不同模式对测试动物的体重的影响作为时间的函数的图表；

[0189] 图 21c 表示这样的图表，所述图表举例说明不同的抗 -CD31siRNA 处理方案对两种不同的肿瘤异种植物的体积的影响；和

[0190] 图 21d 是这样的图表，所述图表举例说明对在抗 -CD31 处理方案下建立的 PC-3 异种植物的生长的抑制。

[0191] 实施例 1：根据现有技术合成 N-油基 - 十六烷基胺

[0192] N-油基 - 十六烷基胺是按照本发明的化合物的重要原材料。在原则上，N-油基 - 十六烷基胺可以如 US6, 395, 713 中所述地那样进行合成。各个反应方案显示在图 2 中。不过，原材料是由例如，Fluka 提供的工业级的油基胺。通过气相色谱进行这种原材料的分析显示 $\geq 70\%$ 的纯度，其中所述材料的 30% 由具有不同链长度的胺组成。其原因可能是这种材料是由植物来源获得的。在 100 到 120°C 将两种原材料反应 30 分钟后，油基胺和 1-溴代十六烷（十六烷基溴）结合形成 N-油基 - 十六烷基胺。产率为大约 83%。

[0193] 实施例 2：合成按照本发明的 N-十六烷基 - 油基胺

[0194] 关于按照本发明的化合物，本发明人认识到一种新的合成法（图 3）。这种新的反

应方案是基于本发明人的发现,即大量的杂质影响基于这种原材料制备的转移剂的质量。因此,该反应使用通过气相色谱显示具有 $\geq 99\%$ 纯度的油酸并将这种油酸与氯甲酸乙酯、TEA 和 CH_2Cl_2 接触,并将由此获得的混合羧酸-碳酸酐与通过气相色谱显示也具有 $\geq 99\%$ 纯度的十六烷基胺(十六烷基胺)反应而起始。随后将反应产物 N-十六烷基-油酰基酰胺 [#1] 与 LiAlH_4 (在 THF 中) 反应,生成呈现为无色结晶固体的 85% N-十六烷基-油基胺 [#2]。

[0195] 下面列出更加详细的反应条件

[0196] N-十六烷基-油酰基酰胺 [#1] 的合成

[0197] 于氩气惰性气体下,在按照 Schlenk 的 250ml 氮气瓶里将 2.62ml (27.5mmol) 氯甲酸乙酯溶于 30ml 无水二氯甲烷中并冷却到 0°C 。在 20 分钟内在搅拌 (steering) 下逐滴加入在 40ml 无水二氯甲烷中的 7.93ml (25mmol) 油酸和 4.16ml (30mmol) 三乙胺溶液。在冰浴上搅拌 30 分钟后,逐滴快速加入 50ml CHCl_3 中的 6.64g (27.5mmol) 十六烷基胺溶液并将混合物于室温下搅拌 2 小时。随后,每次用 40ml 水将溶液洗涤三次,将有机相通过 Na_2SO_4 干燥并使用旋转式蒸发仪去除溶剂。由 100ml 丙酮将残余物再结晶。获得对应于 89% 产率的无色固体 11.25g (22.3mmol)。

[0198] N-十六烷基-油基胺 [#2] 的合成

[0199] 在氩气惰性气体下于 250ml 三颈烧瓶中提供在乙醚中的 20ml 1M LiAlH_4 , 所述烧瓶具有滴液漏斗和回流冷凝器,并且随后在 20 分钟内逐滴加入在 80ml THF 中的 7.59g (15mmol) 十六烷基油酰基酰胺溶液。将混合物回流 2.5 小时,随后加入另外 5ml 在乙醚中的 1M LiAlH_4 并再回流 2.5 小时。在冰浴冷却下使用 6M NaOH 分解多余的氢化物并滤去沉淀物。每次用 40ml 热 MtBE 抽提沉淀物两次,将合并的有机相通过 Na_2SO_4 进行干燥并使用旋转式蒸发仪除去溶剂。由 100ml MtBE 于 -20°C 将残余物结晶。获得对应于 85% 产率的无色结晶固体 6.23g (12.7mmol)。

[0200] 实施例 3 :Boc-Dap(Fmoc)-N-十六烷基(plamityl)-N-油基-酰胺 [#3] 的合成

[0201] 在 50ml 圆底烧瓶里溶解在 10ml 无水二氯甲烷中的 521mg (1.06mmol) N-油基-十六烷基胺并加入 289mg (1.17mmol) EEDQ。随后,在搅拌下,加入 500mg (1.17mmol) Boc-Dap(Fmoc)-OH 并将混合物于室温下搅拌 20 小时。用 80ml 二氯甲烷将溶液转移入分液漏斗中并每次用 20ml 0.1N HCl 洗涤三次并用 20ml 饱和 NaHCO_3 溶液洗涤一次。通过 Na_2SO_4 干燥后使用旋转式蒸发仪除去溶剂(图 4)。获得未作进一步纯化的微黄色粘性油。在使用 1 : 1 的己烷 / 乙酸乙酯的薄层色谱分析中观察到 R_f 为 0.70。

[0202] 实施例 4 :Boc-Dap-N-十六烷基-N-油基-酰胺 [#4] 的合成

[0203] 在 50ml 圆底烧瓶中将 1g Boc-Dap(Fmoc)-N-十六烷基-N-油基-酰胺粗产物溶于 8ml 无水二氯甲烷中。加入 3ml 二乙胺并于室温下搅拌(图 4)。反应的薄层色谱控制显示反应的薄层色谱控制显示在 4.5 小时之后完成起始产物的反应。通过旋转式蒸发仪除去挥发性组分并利用 40g 硅胶 60 (Merck) 使用己烷 / 乙酸乙酯 5 : 1 对残余物进行色谱法纯化。利用分级梯度来洗脱产物,所述梯度由乙酸乙酯、乙酸乙酯 / 甲醇 4 : 1 和二氯甲烷 / 甲醇 4 : 1 组成。获得作为黄色粘性油的 576mg (0.85mmol) Boc-Dap-N-十六烷基-N-油基-酰胺。

[0204] 实施例 5 :四-Boc-[β -精氨酸-2,3-二氨基丙酸-N-十六烷基-N-油基-酰胺]

[#5] 的合成

[0205] 在 100ml 圆底烧瓶中将 576mg (0.85mmol) Boc-Dap-N-十六烷基-N-油基-酰胺溶于 10ml 无水二氯甲烷并在搅拌下加入 210mg (0.85mmol) EEDQ 和 403mg (0.85mmol) Boc-Arg(Boc)₂-OH (图 5)。在氩气气氛下于室温将混合物搅拌 20 小时。随后,通过旋转式蒸发仪除去二氯甲烷并将在 100ml MtBE 中的残余物转移入分液漏斗中。用 0.1N HCl, 1N NaOH 和饱和 NaHCO₃ 溶液彻底洗涤有机相,通过 Na₂SO₄ 干燥并通过旋转式蒸发仪除去溶剂。随后通过急骤色谱法 (Combiflash Retrieve; Isco Inc.) 纯化粗制产物,利用己烷/乙酸乙酯作为洗脱剂。获得对应于 72% 的产率的 694mg (0.61mmol) 无色粘性油。

[0206] 实施例 6: β-精氨酸-2,3-二氨基丙酸-N-十六烷基-N-油基-酰胺三盐酸盐 [#6] 的合成

[0207] 在氩气气氛下,在根据 Schlenk 的 25ml 氮气瓶中提供 694mg (0.61mmol) 充分干燥的四-Boc-[β-精氨酸-2,3-二氨基丙酸-N-十六烷基-N-油基-酰胺] 并加入二噁烷中的 8ml 14N HCl (图 5)。在氩气惰性气体下于室温将混合物搅拌 24 小时,由此在大约 6-8 小时后产物由溶液沉淀为无定形的和部分蜡样的固体。在反应结束后(使用 CHCl₃/MeOH/NH₄OH 65 : 25 : 4 的薄层控制)在高真空下除去任何挥发性组分。获得作为三盐酸盐的 489mg (0.58mmol) β-精氨酸-2,3-二氨基丙酸-N-十六烷基-N-油基-酰胺。

[0208] 实施例 7: N-十二烷基-十四烷基胺 [#7] 的合成

[0209] 在具有回流冷凝器和滴液漏斗的 500ml 3-颈烧瓶中将 18.54g (100mmol) 十二烷基胺(十二烷基胺), 6.36g (60mmol) Na₂CO₃ 和 50mg 碘化四丁基胺(TBAI) 悬浮于 100ml 无水 DMF 中。在 100℃ 下于 110 分钟时间内逐滴加入在 100ml 无水二噁烷中的 16.4ml (60mmol) 1-溴代四癸烷溶液并在 100℃ 下将混合物再搅拌 3.5 小时(图 6)。在尽可能热的温度下过滤溶液。除去在 4℃ 过夜沉淀的结晶固体并用少许冷甲醇进行洗涤。随后,将固体从 200ml 甲醇重新结晶。获得由 100ml MtBE 重新结晶的 9g 无色叶状晶体。将晶体在 -18℃ 下沉淀,由冷却的玻璃料吸出并用冷 MtBE 进行洗涤。获得 7.94g (21mmol) 的无色结晶固体,对应于 35% 的产率。

[0210] 实施例 8: Boc-Dap(Fmoc)-N-十二烷基-N-十四烷基酰胺 [#8] 的合成

[0211] 在 50ml 圆底烧瓶中将 715mg (1.68mmol) Boc-Dap(Fmoc)-OH 溶于 15ml 无水二氯甲烷中并加入 420mg (1.7mmol) EEDQ。将混合物于室温下搅拌 45 分钟并且随后在 60 分钟内逐滴缓慢加入在 25ml 无水二氯甲烷中的 641mg (1.68mmol) N-十二烷基-十四烷基胺溶液(图 6)。在 20 小时的反应时间后通过旋转式蒸发仪除去溶剂并用 100ml MtBE 将残余物转移入分液漏斗中。用 0.1N HCl 和饱和 NaHCO₃ 溶液充分洗涤溶液,将有机相通过 Na₂SO₄ 干燥并通过旋转式蒸发仪除去溶剂。获得 1.02g 的粗制产物,通过用己烷/乙酸乙酯作为洗脱剂的急骤色谱法 (Combiflash Retrieve; Isco Inc.) 对其进行纯化。获得作为无色,极粘性油的 607mg 纯产物。使用己烷/乙酸乙酯 1 : 1 的薄层色谱分析提供了 0.58 的 R_f。

[0212] 实施例 9: Boc-Dap-N-十二烷基-N-十四烷基酰胺 [#9] 的合成

[0213] 在 50ml 圆底烧瓶中将 607mg Boc-Dap(Fmoc)-N-十二烷基-N-十四烷基酰胺溶于 8ml 无水二氯甲烷中(图 6)。加入 3ml 二乙胺并将反应物于室温下搅拌 4.5 小时。使用旋转式蒸发仪除去挥发性组分并通过使用 40g 硅胶 60 (Merck) 的色谱法以己烷/乙酸乙酯 5 : 1 纯化残余物。通过分级梯度来洗脱产物,所述分级梯度由乙酸乙酯、二氯甲烷和二氯

甲烷 / 甲醇 3 : 1 组成。获得作为微黄色, 粘性油的 372mg (0.655mmol) Boc-Dap-N- 十二烷基 -N- 十四烷基酰胺。

[0214] 实施例 10 : 四 -Boc-[β -精氨酸 -2,3-二氨基丙酸 -N- 十二烷基 -N- 十四烷基酰胺] [#10] 的合成

[0215] 在 50ml 圆底烧瓶中将 372mg (0.655mmol) Boc-Dap-N- 十二烷基 -N- 十四烷基酰胺溶于 8ml 无水二氯甲烷中并在搅拌下加入 162mg (0.655mmol) EEDQ 和 311mg (0.655mmol) Boc-Arg-(Boc)₂-OH (图 7)。将混合物于室温下搅拌 20 小时。随后, 使用旋转式蒸发器除去二氯甲烷并用 80ml MtBE 将残余物转移入分液漏斗中。用 0.1N HCl, 1N NaOH 和饱和 NaHCO₃ 溶液充分洗涤有机相, 通过 Na₂SO₄ 干燥并通过旋转式蒸发器除去溶剂。随后通过使用乙烷 / 乙酸乙酯的分级梯度的急骤色谱法 (Combiflash Retrieve; Isco Inc.) 纯化粗制产物。获得 500mg (0.5mmol) 的无色粘性油, 对应于产率 76%。

[0216] 实施例 11 : β -精氨酸 -2,3-二氨基丙酸 -N- 十二烷基 -N- 十四烷基酰胺三盐酸盐 [#11] 的合成

[0217] 在氩气下, 在 25ml 根据 Schlenk 的氩气瓶中提供 511mg (0.5mmol) 充分干燥的四 -Boc-[β -精氨酸 -2,3-二氨基丙酸 -N- 十二烷基 -N- 十四烷基酰胺] 并加入在二噁烷中的 10ml 14N HCl (图 7)。在氩气惰性气体下于室温将混合物搅拌 24 小时, 由此在 6 到 8 小时后产物由溶液沉淀为部分无定形的, 部分蜡样的固体。在反应结束后 (使用 CHCl₃/MeOH/NH₄OH 65 : 25 : 4 的薄层色谱法控制) 在高真空下除去所有挥发性组分。获得以三盐酸盐形式存在的 323mg (0.5mmol) β -精氨酸 -2,3-二氨基丙酸 -N- 十二烷基 -N- 十四烷基酰胺。

[0218] 实施例 12 : Boc-Lys(Fmoc)-N- 十二烷基 -N- 十四烷基酰胺 [#12] 的合成

[0219] 在 50ml 圆底烧瓶中将 937mg (2mmol) Boc-Lys(Fmoc)-OH 溶于 10ml 无水二氯甲烷中并加入 495mg (2mmol) EEDQ (图 8)。将混合物于室温下搅拌 60 分钟并且随后在 120 分钟内以逐滴的方式缓慢加入在 30ml 无水二氯甲烷中的 764mg (2mmol) N- 十二烷基 - 十四烷基胺溶液。在 20 小时的反应时间之后使用旋转式蒸发器除去溶剂, 并用 100ml MtBE 将残余物转移入分液漏斗中。用 0.1N HCl 和饱和 NaHCO₃ 充分洗涤溶液, 将有机相通过 Na₂SO₄ 干燥并使用旋转式蒸发器除去溶剂。获得 1.757g 的粗制产物, 利用以己烷 / 乙酸乙酯 4 : 1 作为洗脱剂的急聚色谱法对其进行纯化。获得了作为无色, 极粘性油的 1.377g 纯的产物。使用己烷 / 乙酸乙酯 1 : 1 的薄层色谱法给出了 0.57 的 R_f。

[0220] 实施例 13 : Boc-Lys-N- 十二烷基 -N- 十四烷基酰胺 [#13] 的合成

[0221] 在 50ml 圆底烧瓶中将 1.377g Boc-Lys(Fmoc)-N- 十二烷基 -N- 十四烷基 - 酰胺溶于 16ml 无水二氯甲烷中。加入 6ml 二乙胺并于室温下将混合物保持 5 小时 (图 8)。使用旋转式蒸发器除去挥发性组分并通过使用 40g 硅胶 60 (Merck) 的色谱法以己烷 / 乙酸乙酯 5 : 1 纯化残余物。利用分级梯度来洗脱产物, 所述分级梯度由乙酸乙酯、二氯甲烷和二氯甲烷 / 甲醇 3 : 1 组成。获得作为微黄色粘性油的 556mg (0.911mmol) Boc-Lys-N- 十二烷基 -N- 十四烷基酰胺以及 119mg 的混合级分。

[0222] 实施例 14 : 四 -Boc-[ϵ -精氨酸 - 赖氨酸 -N- 十二烷基 -N- 十四烷基酰胺] [#14] 的合成

[0223] 将 556mg (0.911mmol) Boc-Lys-N- 十二烷基 -N- 十四烷基 - 酰胺溶于 40ml 无水二氯甲烷中并在控制下加入 226mg (0.911mmol) EEDQ 和 433mg (0.911mmol)

Boc-Arg(Boc)₂-OH(图9)。将混合物保持于室温下达20小时。随后,使用旋转式蒸发器除去二氯甲烷并用80ml MtBE将残余物转移入分液漏斗中。用0.1N HCl和饱和NaHCO₃溶液充分洗涤有机相,通过Na₂SO₄将其进行干燥,使用旋转式蒸发器除去溶剂。随后通过使用己烷/乙酸乙酯分级梯度的急骤色谱法(Combiflash Retrieve;Isco Inc.)来纯化粗制产物。获得730mg(0.684mmol)的无色、粘性油,对应于75%的产率。

[0224] 实施例15:ε-精氨酸-赖氨酸-N-十二烷基-N-十四烷基酰胺三盐酸盐[#15]的合成

[0225] 在氩气下在25ml根据Schlenk的氩气瓶中提供730mg(0.684mmol)充分干燥的四-Boc-[ε-精氨酸-赖氨酸(lysine)-N-十二烷基-N-十四烷基酰胺]并加入在二噁烷中的10ml4N HCl(图9)。将混合物在氩气惰性气体下于室温搅拌24小时,由此在大约8小时后产物由溶液沉淀为无定形的,部分蜡样的固体。在反应如通过使用CHCl₃/MeOH/NH₄OH65:25:4的薄层色谱法控制结束后,在高真空下除去所有挥发性组分。获得作为三盐酸盐的491mg(0.633mmol)ε-精氨酸-赖氨酸-N-十二烷基-N-十四烷基酰胺。

[0226] 实施例16:Tri-Boc-γ-脯-α,γ-二氨基丁酸[#16]的合成

[0227] 在100ml圆底烧瓶中提供在15ml乙腈里的1.31g(6mmol)Boc-Dab-OH并加入12mmol二异丙基乙基胺(DIPEA)(图10)。随后逐滴加入水直到一部分Boc-Dab-OH溶解并且随后加入1.96g(5mmol)1,3-二-Boc-2-(三氟甲基磺酰基)脯。将混合物于室温下搅拌12小时,之后使用旋转式蒸发器除去乙腈。将水性残余物用5ml水稀释并加入50ml二氯甲烷。通过在搅拌下加入2N HCl将反应物酸化至pH2并且随后分离有机相。用50ml二氯甲烷抽提水相并且随后将合并的有机相用一些稀释的HCl和饱和NaCl溶液进行洗涤。将有机相通过Na₂SO₄干燥并使用旋转式蒸发器除去溶剂。使用利用己烷/乙酸乙酯2:1的在硅胶60上的色谱法来纯化残余物。获得了1.138g(2.47mmol)无色无定形固体,对应于50%的产率。

[0228] 实施例17:β-精氨酸-2,3-二氨基丙酸-N-十六烷基-N-油基-酰胺三盐酸盐[#6]的合成

[0229] 在氩气气氛下将在15ml无水CH₂Cl₂中的1.225g(6mmol)Boc-Dap-OH悬浮于包含滴液漏斗的250ml Schlenk烧瓶中并加入1.72ml三甲胺(trimethylamine)。在剧烈搅拌下于室温在15到20分钟内逐滴加入在30ml无水的CH₂Cl₂中的1.52ml(12mmol)TMSCI溶液。同时在氩气气氛下于100ml Schlenk烧瓶中将941mg(5.8mmol)羰二咪唑溶于8ml无水的CH₂Cl₂中。于室温并且在搅拌下在15到20分钟内逐滴加入在25ml无水的CH₂Cl₂中的2.66g(5.6mmol)Boc-Arg(Boc)₂-OH溶液。将两种反应溶液于室温下搅拌4h。随后,在氩气气氛下于室温通过滴液漏斗在15到20分钟内将832μl(6mmol)三乙胺加入第一种溶液中并且逐滴加入第二种溶液。在15到20分钟之后,加入30ml水,剧烈搅拌45分钟并将溶液调节到pH为2。分离有机相,并用CH₂Cl₂抽提水相几次。用NaCl和硫酸钠的饱和溶液干燥合并的有机相并使用旋转式蒸发器除去溶剂。利用在硅胶上的急骤色谱法用二氯甲烷作为洗脱剂纯化玻璃样残余物。获得2.74g(4.15mmol;74%)的无色、无定形固体[化合物17]。

[0230] 在基本上类似于实施例10的条件之下将这种固体与油基十六烷基胺[#2]反应,由此将温度设定为35到40℃(产率72%)。在裂解下如实施例11中所述的Boc保护基之

后获得所要的最终产物 β -精氨酸-2,3-二氨基丙酸-N-十六烷基-N-油基-酰胺三盐酸盐 [#6]。由此获得的产物可以利用在 RP-18 硅胶上的急骤色谱法用 MeOH/ 水作为洗脱剂作进一步纯化。

[0231] 实施例 18 :由阳离子脂质体和 siRNA 组成的复合物 (脂质复合物) 的制备

[0232] 利用本领域已知的标准技术如脂质薄膜 / 块再水合, 乙醇注射法, 反相蒸发或去污剂透析法制备由阳离子脂质体和 siRNA 组成的脂质复合物 [参见 Liposomes as Tools in Basic Research and Industry ;Jean R.Philippot 和 Francis Schuber ;CRC Press January1995und Liposome Technology :Preparation of Liposomes :001Gregory Gregoriadis CRC Press I Llc.April1984]。

[0233] 由此获得的脂质体, 其在本文中也称作结合核酸如 siRNA 的脂质复合物, 包含作为脂质的 β -精氨酸-2,3-二氨基丙酸-N-十六烷基-N-油基-酰胺三盐酸盐并且另外地 1,2-二植烷酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺或 1,2-二油基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺, 其中优选使用 1,2-二植烷酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺。这些脂质体和脂质复合物的脂质部分分别是 50mol% 的 β -精氨酸-2,3-二氨基丙酸-N-十六烷基-N-油基-酰胺三盐酸盐和 50mol% 的 1,2-二植烷酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺或 50mol% 的 1,2-二油基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺。

[0234] 50mol% 的 β -精氨酸-2,3-二氨基丙酸-N-十六烷基-N-油基-酰胺三盐酸盐和 50mol% 1,2-二植烷酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺的组合在本文中也称作 atuFect。

[0235] 所要理解的是在理论上本文公开的任何其它脂质和脂质复合物都可以利用先前提及的技术以及另外的加工步骤进行制备。

[0236] 将脂质体和脂质复合物分别进行进一步的加工步骤以便在大小、多分散性和片层性方面修整它们。这些特征可以通过超声波降解, 如穿过多孔膜的挤压, 和均化作用, 优选高压均化作用进行调整。

[0237] 通过用 Beckman-Coulter N5 亚微细粒分析仪进行光子相关光谱分析来表征由此形成的脂质体或脂质复合物, 这些通过挤压或通过高压均化作用限定大小的这些脂质体的结果分别描绘于图 12A 和 12B 中。

[0238] 从图 12A 可见脂质体的大小分布可以使用具有不同大小排阻的不同膜进行调整, 在该情形中分别为 1,000nm 和 400nm。在全部两种情况下, 都将挤压步骤重复 21 次。不过, 在本发明中, 大小排阻可以从大约 50 到 5000nm, 并且可以将挤压步骤重复 10 到 50 次。

[0239] 从图 12B 中可见, 高压均化作用还是调整脂质体大小分布的合适方法, 由此在应用这种高压均化作用后, 脂质体的大小依赖于脂质体所进行的均化作用的周期数。典型压力范围是 100-2500bar, 由此在该情形中外加的压力为 1,500bar。

[0240] 实施例 19 :atuFect 的贮存稳定性

[0241] 如果本文公开的组合物典型地用作药物组合物, 基本上这些药物制剂对于保存条件是稳定的。为了研究贮存稳定性设计了一种针对肿瘤抑制剂 PTEN 的 siRNA, 所述肿瘤抑制剂 PTEN 使用在实施例 18 中所述的 atuFect 进行配制。

[0242] 更加具体的是, 脂质体利用具有在下面描述的最终贮存浓度的液体贮存溶液, 通过在 300mM 蔗糖溶液中的脂质薄膜再水合进行制备, 随后分别进行挤压和高压均化作用。将由此获得的脂质体与下面所述的 siRNA 分子以 1 : 1 的 mol 比进行混合 ;或者脂质层可

以在 siRNA 存在的情况下进行再水合并且将由此获得的脂质复合物挤出或均化。

[0243] SiRNA 分子如下：

[0244] 反义 PTENAV10： 5' uaaguucuagcuguggg-P3'；

[0245] 有义 PTENBV10 5' ccaccacagcuagaacuua-P3'；

[0246] ，其中粗体核苷酸显示各自的核苷酸为 2'-O-甲基。

[0247] 将脂质复合物于 HeLa 细胞上，在包含血清的培养基存在的情况下以不同浓度温育 48h (siRNA 分子的 nM 显示于图 13 中)。如先前所述的那样（标准的蛋白质印迹方案）进行使用 p110a（负载对照）和 PTEN 特异性抗体，以全细胞提取物的免疫印迹。

[0248] 合适的冷冻保护剂包括，但，不限于，蔗糖、海藻糖、麦芽糖、纤维二糖、棉子糖、半乳糖、甘露糖 (mannitole) 和 PEG。在本实施例中，将 300mM 的蔗糖溶液用作包含 PTEN 靶向 siRNA 的 atuFect 制剂的载体。最终的贮存浓度为全脂质 1,445mg/ml 和 15 μ M PTEN-siRNA。将溶液保持于室温下，于 4°C 保存 7 天或保存于 -80°C 持续 7 天。在包含血清的培养基中稀释所述溶液到指示的最终浓度 (20, 10, 5nM)。在 HeLa 细胞上以 40,000 孔的细胞密度进行测试。结果描述于图 13 中，从该图可见冷冻在冷冻保护剂中包含 siRNA 的 atuFect 并且将其保存在 -80°C 下达 7 天，在融化后，和它在 4°C 保存一样有效。

[0249] 实施例 20：脂质组合物和 siRNA 负载

[0250] 制备两种不同类型的脂质制剂。脂质制剂 01 由作为阳离子脂质的 50mol% β -精氨酸-2,3-二氨基丙酸-N-十六烷基-N-油基-酰胺三盐酸盐，和 50mol% 1,2-二植烷酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺组成，而脂质制剂 02 由作为阳离子脂质的 50mol% β -精氨酸-2,3-二氨基丙酸-N-十六烷基-N-油基-酰胺三盐酸盐，和 50mol% 1,2-二油基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺组成。每种脂质制剂都包含针对 PTEN 的 siRNA，（贮存浓度为 15 μ M siRNA 和 1,445mg/ml 脂质），其中在细胞上滴定 siRNA 的摩尔浓度，分别导致 1 μ M, 500nM, 100nM 和 50nM 的最终浓度。

[0251] 将这种包含 PTEN 特异性 RNAi 的脂质制剂施用给生长在标准细胞培养条件下在 Dulbecco's 改进 Eagle's 培养基中的小鼠细胞系 (B16V, ATCCNo. :CRL6475)，所述培养基含有 4mM L-谷氨酰胺，调节至包含 1.5g/L 碳酸氢钠和 4.5g/L 葡萄糖，90%；胎牛血清，10%。细胞密度为 40,000 细胞/6 孔并且在 48 小时之后将细胞裂解并进行蛋白质印迹分析，其结果描绘于图 14。以对激酶 PRK2 特异性的单克隆抗体 (Becton Dickinson) 获得的信号用作与 PTEN 信号（单克隆抗体，Santa Cruze, CA）作比较的负载对照。

[0252] 从图 14 可见，如果 siRNA 含量为 50nM，脂质制剂 01，即包含 1,2-二植烷酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺的制剂仍然有效，而如通过 PTEN 特异性抗体 (Santa Cruze, CA) 检测，只有 siRNA 含量为大约 1 μ M 或更多，包含 1,2-二油基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺作为辅助脂质的脂质制剂 02 才能产生 PTEN 的降低 (knockdown)。非相关激酶 PRK2 的信号被用作负载对照并通过针对其的抗体进行检测。

[0253] 实施例 21：脂质组合物和 PEG 含量

[0254] 为了测试 PEG 对于脂质组合物的转染和递送功效的影响，根据本文公开的方法产生下列制剂，所述脂质组合物包含 β -精氨酸-2,3-二氨基丙酸-N-十六烷基-N-油基-酰胺三盐酸盐（阳离子脂质）作为脂质成分以及 1,2-二植烷酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺 (DPhyPE) 和 1,2-二硬脂酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-聚乙二醇-2000 (DSPE-PEG2000)：

[0255] C₁-C₅制剂：

[0256]

	阳离子脂质 [mol%]	DPhyPE [mol%]	DSPE-PEG [mol%]
C ₁	49	50 mol%	1
C ₂	48	50 mol%	2
C ₃	47	50 mol%	3
C ₄	46	50 mol%	4
C ₅	45	50 mol%	5

[0257] H₁-H₅制剂：

[0258]

	阳离子脂质 [mol%]	DPhyPE [mol%]	DSPE-PEG [mol%]
H ₁	50 mol%	49	1
H ₂	50 mol%	48	2
H ₃	50 mol%	47	3
H ₄	50 mol%	46	4
H ₅	50 mol%	45	5

[0259] 对于任何前述制剂来说,脂质浓度为在 300mM 蔗糖中的 1.445mg/ml, siRNA 浓度为 15 μM。稀释形成的浓缩贮存-复合物在细胞培养基中产生 20, 10, 5nM siRNA 的最终浓度。

[0260] 包含在所述制剂中的 RNAi 分子是针对 PTEN 的并且序列在实施例 22 中描述。将脂质制剂施用至在 6 孔板中所包含的 HeLa 细胞中,所述板每个包含 40,000 细胞/孔。对细胞分析 PTEN 的表达并且结果作为蛋白质印迹描绘于图 15 中。p110a 表达用作负载对照并且通过对 p110a 特异性的单克隆抗体进行检测。由图 15 中所描绘的任何蛋白质印迹可见大约 1 到 2mol% 的含有 PEG 的辅助脂质适于提供 PTEN 表达的有效降低。

[0261] 可以断定,优选地, DPhyPE 组分要被 PEG 化的辅助脂质所代替而非阳离子脂质成分被 PEG 化的辅助脂质所代替。这可以从上面的实验得知,其中 H 制剂似乎比 C 制剂更有效。PEG 化的辅助脂质的含量优选为从大约 0.05% 到 4.9%, 优选地 1-3% 并且更加优选地 2-3%。

[0262] 实施例 22:包含 siRNA 的脂质制剂的体内使用

[0263] 为了测试按照本发明的包含 siRNA 的脂质制剂的适合性,将所述脂质制剂用于小鼠模型中。与经常用于在体内向肝递送 siRNA 的,将相应于大约 10% 体重的体积,大约 2.5ml 的液体/小鼠快速注射到尾静脉中的所谓流体压注射相反,本发明的体内实验是这样实施的,从而使以低体积 (200-300 μl) 全身性施用包含 siRNA 的脂质制剂,其是缓慢地,

即,在几秒钟的时间上,注射入小鼠的尾静脉中,由此实施一种临床相关模式的给药。实验设置描述于图 16 中。

[0264] 使用致癌 Ras (Ras^{V12}) 转化功能上正常的大鼠胚胎成纤维细胞 (RAT2 ;ATCC :CRL-174)。随后将转化的 Ras^{V12} 依赖型成纤维细胞注射入小鼠中 (6 只小鼠每组;八周龄雄性 Shoe :NMRI-nu/nu, DIMED, 德国), 其在十天后发展成肿瘤。在此阶段,所述动物不进行处理直到在注射了转化的成纤维细胞之后第 19 天,或者使用各种制剂的处理在第 11 天开始。作为进一步的对照,将功能上正常的大鼠胚胎成纤维细胞注射入不发展肿瘤的小鼠体内。

[0265] 本文称作 T-Ras 的 siRNA 分子由在 5' -3' 方向上具有下列序列的第一链 T-Ras3A :aacguguagaaggcauccu-P 和在 5' -3' 方向上具有下列序列的第二链 T-Ras3B :aggauccuucucacacguu-P 组成。请注意以粗体打印并且下划线的核苷酸为 2'-O- 甲基核苷酸。在任何链上,前述序列中 3' 端起始以由 P 表示的磷酸酯。

[0266] 作为对照设计了 PTEN 特异性 siRNA 分子,带有具下列序列的第一链: 5' uaaguucuagcuguggugg-P3' 和第二序列 5' ccaccacagcuagaacuua-P3', 其中修饰模式分别与关于 T-Ras3A 和 T-Ras3B 所列出的相同。

[0267] 将下列制剂施用给小鼠模型:

[0268] 制剂组 A:

[0269] PBS;

[0270] T-Ras3 :10mg/kg/atuFect/3.7mg/kg;

[0271] 裸 T-Ras310mg/kg ;和

[0272] T-Ras35mg/kg/atuFect38.5mg/kg.

[0273] 制剂组 B:

[0274] PBS;

[0275] 仅 atuFect38.5mg/kg;

[0276] PTEN10mg/kg/atuFect38.5mg/kg ;和

[0277] T-Ras35mg/kg/atuFect38.5mg/kg.

[0278] 制剂组 C:

[0279] 蔗糖 (50mM);

[0280] T-Ras33.75mg/kg/atuFect-PEG28.9mg/kg, 静脉内给药 ;和

[0281] T-Ras33.75mg/kg/atuFect-PEG28.9mg/kg, 腹膜内给药。

[0282] 这里所用的 atuFect-PEG 意为在 50mM 蔗糖中, 50mol% β -精氨酸-2,3-二氨基丙酸-N-十六烷基-N-油基-酰胺三盐酸盐, 48mol% 1,2-二植烷酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺和 2mol% 1,2-二硬脂酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-聚乙二醇-2000 (DSPE-PEG2000)。

[0283] 在动物中的剂量为 5mg/kg siRNA 和 38.5mg/kg 总脂质;注射溶液中组分的浓度为 0.5mg/ml siRNA 和 3.85mg/ml 总脂质;摩尔比率为:siRNA :0.5mg/ml 相应于 0.04 μ mole/ml (分子量大约为 12500Da)。脂质为 3.85mg/ml 总脂质,其中阳离子脂质的含量为 1.97mg/ml (分子量 843.6) 相应于 2.3 μ mole/ml 阳离子脂质。siRNA 与阳离子脂质的摩尔比率为 0.0174 到 1。

[0284] 这些实验的结果描述于图 17A (制剂组 A), 图 17B (制剂组 B) 和图 17C (制剂组 C) 中, 显示肿瘤体积为时间即, 在细胞攻击后的天数的函数。

[0285] 由图 17A 和 17B 都可见,由以 atuFect 配制的 T-Ras 特异性 siRNA 组成的脂质复合物显示最强烈的抑制并且表明靶向的特异性。应当注意当与仅 atuFect 相比时,阴性对照分子 PTENV10 并不显示对肿瘤生长抑制作用的改进(图 17B)。

[0286] 由图 17C 也可见 atuFect-PEG 是高度有效的并且允许腹膜内以及静脉内给药,导致类似的效力。与之相关值得注意的是,显而易见,PEG 化的复合物是功能上具有活性的,并且可以假定由于 PEG 化作用,这些脂质组合物比缺少 PEG 化的(辅助)脂质的类似脂质组合物具有更小的毒性。

[0287] 实施例 23:实施例 24 到 27 的材料和方法

[0288] siRNA-脂质复合物的制备

[0289] 通过脂质薄膜在 300mM 无菌无 RNA 酶蔗糖溶液中重新水合至总脂质浓度 4.34mg/ml 来制备摩尔比率为 50/49/1 的包含阳离子脂质 β -L-精氨酸-2,3-L-二氨基丙酸-N-十六烷基-N-油基-酰胺三盐酸盐的阳离子脂质体,中性磷脂 1,2-二植烷酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, AL) 和 PEG 化的脂质 N-(羰基-甲氧基聚乙二醇-2000)-1,2-二硬脂酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺钠盐(Lipoid GmbH, Ludwigshafen, 德国)。随后通过利用 EmulsiFlex C3 装置(Avestin, Inc., Ottawa, 加拿大)进行高压均化作用(22 个循环于 750bar 和 5 个循环于 1000bar)将多层分散体作进一步处理。将获得的脂质体分散体与等体积的在 300mM 蔗糖中的 0.5625mg/ml 的 siRNA 溶液混合,导致核酸主链磷酸酯与阳离子脂质氮原子的计算电荷比为大约 1 到 4。通过准弹性光散射(N5Submicron Particle Size Analyzer, Beckman Coulter, Inc., Miami, FL)测定脂质复合物-分散体的大小为大约 120nm。对于体外实验来说,将这种分散体在包含 10% 血清的细胞培养基中进一步稀释为 5-20nM siRNA 的浓度。

[0290] 动物实验

[0291] 在整个本研究中使用无胸腺的雄性裸小鼠(Hsd:NMRI-nu/nu, 8 周龄)。对于已建立肿瘤异种移植物的肿瘤治疗实验来说,皮下(s.c)植入总共 5.0×10^6 细胞/100 μ l (对于 3Y1-Ras^{v12}在存在 50% matrigel 的情况下)。对于肿瘤治疗实验来说,通过低压,小体积的尾静脉注射静脉内给药脂质体 siRNA 复合物溶液。通过改变注射方案(每天对每两天)对 30g 小鼠使用包含 0.28mg/ml siRNA 和 2.17mg/ml 脂质(等同于 1.88mg/kg siRNA 和 14.5mg/kg 脂质的剂量)的 200 μ l 注射体积的贮存溶液来实现不同的给药剂量。使用测径器测定肿瘤体积并根据公式体积 = (长 x 宽²)/2 来进行计算。本研究中进行的所有动物实验都是根据批准的方案并且遵循 Landesamt für Arbeits-, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin, 德国 (No. G0264/99) 的指导方针来进行的。

[0292] 统计分析

[0293] 将数据表示为平均值 \pm S. EM.。差异的统计学显著性是通过 Mann-Whitney U 检验来确定的。P 值 < 0.05 被认为是统计学上显著的。

[0294] 在细胞培养物和小鼠中的 siRNA-Cy3 摄取实验

[0295] 对于细胞培养物中的非制剂化的 siRNA-Cy3 分子的摄取研究来说,将 HeLa 细胞与限定量的 siRNA 溶液一起在无血清的培养基中温育过夜。通过如下所述的过夜转染来实施脂质复合的 siRNA-Cy3 细胞的摄取。用冰冷的 PBS 漂洗经处理的细胞并在显微镜观察之前固定于 4% 甲醛/PBS 溶液中达 15 分钟。为了标记最近的内体和溶酶体,根据生产商的建

议将细胞与荧光染料LysoTracker (Molecular Probes) 一起温育并在固定后通过共焦显微镜观察进行检查。通过静脉内施用制剂化的和裸的 siRNA 来进行利用荧光标记 siRNA-Cy3 的体内递送实验。以最终剂量为 1.88mg/kg siRNA-Cy3 和 14.5mg/kg 脂质的单次 200 μ l 静脉内注射来处理小鼠。在限定的时间点上处死小鼠并通过甲醛固定的,石蜡包埋的或 OCT 安置的冷冻组织切片的显微观察检查荧光吸收。

[0296] 体外转染

[0297] 人 HUVEC, HeLa, PC-3 细胞系以及鼠 EOMA 和 NIH3T3 细胞系获自美国典型培养物保藏中心 (American Type Culture Collection) 并根据 ATCC's 的建议进行培养。人肝细胞瘤细胞系 HuH-7 可在 MDC, 柏林获得。根据描述³⁸通过可诱导 Ras^{V12} 的转导产生表达致癌性 Ras^{V12} 的大鼠 3Y1 细胞。

[0298] 利用上述阳离子脂质体以 siRNA 转染细胞系。简言之,在细胞接种之后大约 12 小时,向细胞中加入不同量的在包含血清的培养基中稀释的 siRNA-脂质复合物溶液以达到 1-50nM 范围的 siRNA 的转染浓度。在转染后 (48h) 将细胞裂解并如所述²⁰进行免疫印迹法。下列抗体用于免疫印迹法:兔抗 -PTEN (Ab-2, Neomarkers), 单克隆 p110 α / p85³⁹, 兔抗 -PKN3³⁸, 山羊抗 -CD31 (Santa Cruz Biotechnology), 兔抗 -CD34 (Santa Cruz Biotechnology), 兔抗 -磷酸化 Akt (S473) (Cell Signaling Technology)。

[0299] 体内 BrdU 测定法

[0300] 为了测量体内细胞增殖,通过腹膜内注射用 BrdU (Sigma ;250mg/kg) 处理小鼠并在两小时后处死。根据生产商的方案 (BrdU 原位检测试剂盒, Pharmingen), 将甲醛固定的石蜡包埋的肝或肿瘤组织切片进行 BrdU 染色。

[0301] 微血管密度 (MVD) 的测定

[0302] 通过在单一肿瘤切片的 3-8 个随机选择区域中计数 CD31-/CD34- 阳性血管来测定微血管的数目²⁴。将血管数目作为血管单位来估计而不管形状、分枝点和腔大小 (称作“血管数目”)。此外,通过利用 Axiovision3.0 软件 (Zeiss) 测定 CD31-/CD34- 阳性血管结构的总长度 (称作“血管长度总和”) 来评估血管密度。通过用 Zeiss AxioPlan 光学显微镜于 200x 放大倍率扫描肿瘤切片进行计数。

[0303] 组织学分析和显微术

[0304] 在处死小鼠后,将组织立即固定于 4.5% 经缓冲的甲醛中持续 16 小时并由此进行处理用于石蜡包埋。切出 4 μ m 切片并置于玻璃载玻片上。用山羊多克隆抗 -CD31/PECAM-1 (1 : 1000, Santa Cruz Biotechnology) (或者对于冷冻切片大鼠 CD31, 1 : 100, Pharmingen) 和大鼠单克隆抗 -CD34 (Cedarlane) 对组织切片进行染色以显现石蜡切片中的内皮细胞。根据标准方案对于石蜡组织切片进行免疫组织化学和苏木精 / 曙红 (H&E) 复染色。对于荧光标记的 siRNAs 的体内吸收研究,用 Zeiss AxioPlan 显微镜通过表面荧光对石蜡切片进行直接检查。记录图像并利用 Zeiss LSM5 成像软件进行处理。在 siRNA 吸收的深度显微分析中,用 Zeiss LSM510Meta 共焦显微镜来进行。为此,用二甲苯对切片进行脱蜡,通过分级乙醇洗涤进行再水合,用 Sytox Green 染料 (Molecular Probes 100nM ;10min) 进行复染色,漂洗并最后安置于 FluorSave (Calbiochem) 中用于显微镜检查。利用下列抗体,如所述⁴⁰的那样进行 NIH3T3 细胞的免疫荧光染色:免疫组织化学特异性兔抗磷酸化 -Akt (S473) (Cell Signaling Technology) 和小鼠抗 α -微管蛋白 (DM1A, Calbiochem)。

[0305] 表 1 在实施例 24-27 中所用的 siRNA 序列

siRNA 名称	序列 5' - 3'
PKN3 s	<u>gagagccuguacugcgaga</u>
PKN3 as	<u>ucucgcaguacaggcucuc</u>
[0306]	
PTEN s	<u>ccaccacagcuagaacuua</u>
PTEN as	<u>uaaguuc<u>u</u>agcuguggugg</u>
PTEN s (对照)	<u>ccaccacagcuagaacuua</u>
PTEN as (对照)	<u>uaaguuc<u>u</u>agcuguggugg</u>
PTEN s	<u>ccaccacagcuagaacuua</u>
	<u>uaaguuc<u>u</u>agcuguggugg-</u>
PTEN as-Cy3	Cy3
CD31-1 s	<u>ccaacuuc<u>u</u>acc<u>u</u>accagaa</u>
CD31-1 as	<u>uucuggauggugaaguugg</u>
[0307]	
CD31-2 s	<u>ggugauagccccgguggau</u>
CD31-2 as	<u>auccaccggggcu<u>u</u>acc</u>
CD31-6 s	<u>ccacuuc<u>u</u>gaac<u>u</u>ccaaca</u>
CD31-6 as	<u>uguuggaguucagaagugg</u>
CD31-8 s	<u>cagauac<u>u</u>cuagaacggaa</u>
CD31-8 as	<u>uuccguuc<u>u</u>agagu<u>u</u>aucg</u>

[0308] 具有 2' -O- 甲基修饰的核苷酸带下划线。

[0309] 实施例 24:体外和体内递送裸露的和配制的 siRNAs

[0310] 在本研究中,我们采用缺少 3' - 突出端的 19-mer siRNA 双链体,其通过在两条链上交替 2' -O- 甲基糖修饰来进行化学稳定化¹⁶,其中未修饰的核苷酸面对着在对应链上被修饰的核苷酸。实际使用的 siRNA 分子在实施例 23 中描述。

[0311] 在第一步中,我们分析了这些分子是否在缺乏递送载体的情况下介导细胞培养物

中的 RNAi。免疫印迹分析显示与对于 siRNA-脂质复合物所用的纳摩尔级浓度相比,即使当裸 siRNA 以微摩尔级浓度应用时也不会发生基因沉默。结果显示于图 18a 中。

[0312] 由图 18 可以更加详细地看到,关于脂质复合的 siRNAs 有浓度依赖型的 PKN3 蛋白表达抑制,但如通过免疫印迹评估,裸 siRNA 在 HeLa 细胞中没有抑制。PTEN 作为负载对照起作用。

[0313] 我们还测试了未修饰的常规 siRNAs(21-mer, 2 核苷酸 3' - 突出端)6 和几种缀合的分子,包括胆固醇缀合的或肽连接的 siRNAs,但是在缺乏递送载体的情况下没有检测到内源性蛋白质表达的任何目标特异性减弱(数据未显示)。

[0314] 为了分析缺乏基因沉默是否是由于阴离子 siRNAs 和带负电细胞膜之间排斥作用产生的效率低的细胞吸收的结果,我们采用了 3' 荧光(Cy3)标记的 siRNAs 以便通过共焦显微镜来研究它们的吸收。我们,以及其他人在之前已经显示,当用递送载体进行转染时,反义分子 3' 端的荧光标记并不损害 RNA 沉默活性^{16,17}。令人惊讶的是,当应用高浓度的 siRNA-Cy3 分子时在缺乏转染剂的情况下我们观察到荧光标记的 siRNAs 的显著摄取。不过,如通过 LysoTracker 标记进行共定位所显示的,大部分荧光标记好象在后期的内体/溶酶体小泡中结束(end up),提示未配制的 siRNAs 保持局限于内体途径中。相反地,作为脂质体复合物转染的 siRNAs 从这些小泡上解离下来并且释放到细胞质中。这些结果表明 siRNAs 的脂质体制剂对于 siRNAs 的功能性递送提供至少两种有益效果:增强的细胞摄取以及重要地是从内吞/内体途径逃逸到细胞质中¹⁸,在这里发生 RNAi- 介导的 mRNA 降解。

[0315] 图 18b 的详情如下。

[0316] 图 18b 显示裸的和配制的 siRNAs 的细胞内分布。在左行和中间行的 HeLa 细胞中,通过共焦显微镜分析荧光标记的 siRNAs-Cy3。右行显示在用 LysoTracker(绿色;箭头, siRNA-Cy3 关于内体/溶酶体区室的定位)复染后,亚细胞分布的并接图片。上排,裸的 siRNA-Cy3;下排脂质复合的 siRNA-Cy3。

[0317] 为了分析脂质体制剂是否改变 siRNAs 的体内药理学特性,我们注射(小体积和低压力)的单一剂量的 siRNA-Cy3 分子(1.88mg/kg siRNA)进入小鼠的尾静脉。包括胰腺、肺、肾和前列腺的几种器官的显微分析显示用配制的 siRNAs 在 Cy3 特异性荧光上有显著的增强(数据未显示)。在所有分析的时间点上(注射后 1h, 4h, 24h, 图 18c),在用脂质体制剂的 siRNAs 处理的小鼠的肝中都检测到最高量的荧光。这种结果表明当与裸 siRNAs 给药相比时,在脂质复合物中配制的 siRNAs 分子有更好的生物分布。

[0318] 不过,在全部器官中增强的生物分布并不一定表明这些分子的细胞内或细胞类型特异性的摄取,所述摄取是经递送 siRNAs 的功能性的必要条件。通过共焦显微镜对肝中配制的 siRNA-Cy3 吸收的更加详细的分析揭示在细胞水平上荧光染色主要存在于血管里层和血窦中(图 18c, 下版)。肝血管的更近检查揭示,与 PBS 对照相反,内皮层被荧光性 siRNA-Cy3 清楚地标记(图 18d, 上排)。在内皮细胞内, siRNA-Cy3 只存在于细胞质中(图 18d, 下版)。在未固定的肝冰冻切片中观察到相同的染色模式,这排除了任何甲醛固定的假象(数据未显示)。为了测试荧光标记的脂质复合 siRNA 是否也靶向肿瘤血管系统,我们用 siRNA-Cy3 脂质复合物的单次静脉内注射来处理具有不同实验性肿瘤的小鼠。在所有三个实验性肿瘤异种移植(两个皮下的, s. c, 和一个肝内的, i. hep.)中,我们检测在肿瘤血管系统中的显著的荧光信号(图 18e, 箭头)。肿瘤血管系统的内皮层的 siRNA-Cy3 吸收通

过用抗-CD34 抗体,内皮细胞标志物进行复染来证实(图 18e,下版)。此外,使用荧光标记的脂质来证实内皮对脂质复合的 siRNA 的吸收(未显示)。总体来说,这些数据证实 siRNAs 的基于阳离子脂质的制剂改善了 siRNAs 的动力学和分布特性并且使 RNAs 主要吸收到内皮细胞中。

[0319] 对于显示于图 18c 中的结果的实验设置如下。通过单一静脉内注射施用裸的或脂质复合的 siRNA-Cy3,并通过表面荧光显微镜术来分析指示时间点的肝组织切片(上版)。下版,肝切片的近距离共焦显微图像显示与脂质复合物(右图,siRNA-Cy3 红色;细胞核,通过用 Sytox Green 复染为绿色)比较的未配制的 siRNA-Cy3(左图)的分布。用相同的装置记录图像。比较肝血管(箭头)和血窦(双箭头)的染色强度。

[0320] 图 18d 的细节如下。与 PBS 处理的对照切片(左版)相反,用荧光 siRNA-Cy3(右版)处理肝血管的内皮层。共焦显微术显示在肝内皮细胞(红血细胞,双箭头)中配制的 siRNA-Cy3 的细胞质递送(红色,融合)。在细胞核(绿色,箭头)中没有未检测到荧光。

[0321] 对于在图 18e 中显示的结果的实验设置如下。用如箭头指示的脂质体配制的 siRNAs 靶向不同肿瘤的内皮细胞(siRNA-Cy3,红色;细胞核,绿色)。上排显示来自皮下生长的 PC-3 肿瘤(左版)和 Ras^{V12}转化的 3Y1 大鼠成纤维肿瘤(中版)或肝内生长的 HuH-7 肿瘤(右版)的切片的荧光图像。下排显示在 HuH-7 肿瘤的内皮细胞中的脂质体递送的 siRNA-Cy3 的检测。通过 H&E 染色显示肿瘤内皮细胞(左版),特征在于它们的薄的细胞质和突出的核(箭头)。连续切片分别显示内皮细胞的相应的 siRNA-Cy3 荧光(红色,中间版)和抗-CD34 免疫染色(右版)。

[0322] 实施例 25:PTEN 特异性 siRNAs 向肝和肿瘤内皮细胞的功能性递送

[0323] 为了证实 siRNA-脂质复合物体内沉默内皮细胞中的内源基因表达的能力,我们选择肿瘤抑制剂 PTEN,磷酸肌醇 3-激酶(PI3-激酶)的拮抗剂作为靶标。我们意欲通过在内皮细胞核中以 BrdU 掺入测量增加的 DNA 合成来在阳性读取系统中检测 PTEN 的功能性基因沉默。已知 PTEN 表达的减少缓慢激活 PI3-激酶信号传导,这可以通过下游激酶 Akt 的磷酸化的增加来进行测量¹⁹(图 19a)。PI3-激酶的缓慢激活还伴随以 DNA 合成的增加速率²⁰。

[0324] 首先,通过脂质-介导的转染体外证实选定的 siRNA^{PTEN}(参见实施例 23)靶向小鼠和人 PTEN mRNA 的 RNAi 活性(图 19a)。将在每个核苷酸上携带 2'-O-甲基修饰的相同 siRNA 序列用作阴性对照(siRNA^{对照}),因为这种统一的修饰模式彻底破坏了 RNAi 活性¹⁶。通过免疫印迹法来观察 PTEN 蛋白质击倒和 Akt 的增加的磷酸化。免疫荧光研究证实存在活性 siRNA^{PTEN}分子时增加的 Akt 磷酸化(图 19a)。这证实了 siRNA^{PTEN}分子在细胞培养物中激活 PI3-激酶信号传导的能力。

[0325] 为了测试体内 PTEN 基因沉默,连续三天通过低压,尾静脉注射,用 PBS、裸 siRNA^{PTEN},siRNA^{PTEN}-脂质复合物,或脂质载体来处理小鼠(每组 4 只)(见方法)。在处理的第 4 天,将 BrdU 注射到小鼠中并在 2 小时后,处死小鼠,通过对肝切片进行免疫组织学染色来测量 BrdU 阳性细胞核的 BrdU 结合。内皮细胞的小尺寸和在用磷酸化的 Akt 和 PTEN 特异性抗体检测可靠的信号中的难度不容许原位检测蛋白质击倒。然而,与观察到的荧光标记的 siRNA 向内皮细胞的细胞特异性递送一致,我们观察到在仅具有脂质体 siRNA^{PTEN}的肝内皮中 BrdU 的阳性细胞核的显著增加(图 19b)。用具有肿瘤的小鼠进行的相似实验揭示

在用脂质体制成的活性 PTEN-siRNA 处理后,肿瘤内皮的 BrdU 阳性细胞核的数量上的同样的增加(图 19c)。相对于 PBS 对照组,失活的、完全甲基化的对照分子 siRNA 对照没有导致 BrdU 结合的增加。我们从这些数据推论用阳离子脂质配制的稳定的 PTEN- 特异性 siRNAs 在体内是功能性的来在系统给药后诱导内皮细胞中的基因沉默。

[0326] 图 19a 的细节如下。稳定的 PTEN 特异性 siRNA (10nM) 的转染体外减少 PTEN 蛋白质水平并且增加下游激酶 Akt (P*-Akt) 的磷酸化,如通过免疫印迹法所揭示(右上版; PI3- 激酶亚基 p110 α , p85, 不受影响的负载对照)。SiRNA^{对照} 表示完全甲基化的失活的 siRNA^{PTEN} 分子; ut, 未处理的细胞。磷酸化 Akt 的增加还通过在用 siRNA^{PTEN} 转染的 NIH3T3 细胞中通过免疫荧光染色来观察(磷酸化 Akt, 红色; 作为细胞形态的标志物的抗- α -微管蛋白, 绿色)。

[0327] 图 19b 描述显示在肝样品中的 BrdU 阳性内皮细胞核(箭头)的数量上的显著不同的代表性图片(上版)和相应的量化(下面的图表),所述肝样品分别来自用 PBS, 裸 siRNA^{PTEN}, 脂质复合的 siRNA^{PTEN}, 和阳离子脂质体处理的动物。(对于每次处理显示两张图片)。统计学显著性:裸 siRNA^{PTEN} 对比 siRNA^{PTEN}- 脂质复合物, *P = 0.0286; 脂质体对比 siRNA^{PTEN}- 脂质复合物 *P = 0.0286。

[0328] 图 19c 的详情如下:用对于肿瘤血管系统的 BrdU 测定法证实脂质复合的 siRNA^{PTEN} 在 DNA 合成上的序列特异性。在肿瘤血管中检测增加的 BrdU 阳性细胞核(箭头),所述血管来自用 siRNA^{PTEN}- 脂质复合物对比 siRNA^{对照}- 脂质复合物处理的动物; Tu: 肿瘤组织。在内皮细胞中的 BrdU- 阳性细胞核的量化显著增加: siRNA^{对照}- 脂质复合物对比 siRNA^{PTEN}- 脂质复合物 *P = 0.032。

[0329] 实施例 26: CD31 的体内基因沉默

[0330] 为了直接证实体内 siRNA 介导的基因沉默,我们集中于靶向选择性在内皮细胞中表达的基因。我们选择也已知为 CD31 的血小板-内皮-细胞黏附分子 1 (PECAM-1), 作为适合的靶标, 因为其表达局限于血管系统的细胞, 主要是内皮细胞以及血小板、单核细胞、嗜中性粒细胞和选定的 T 细胞^{21 23}。

[0331] 在小鼠和人来源的内皮细胞系 (HUVEC, EOMA) 中筛选 2'-O- 甲基修饰的 siRNA 分子(参见实施例 23) 导致一些有效的人和小鼠特异性 CD31-siRNA 分子的鉴定(图 20a)。最有效的 siRNA 分子, siRNA^{CD31 8}, 如实施例 23 中描述进行脂质体制配, 并且被全身性施用到具有肿瘤的小鼠中达连续 2 或 7 天。用等渗蔗糖溶液或用脂质复合的 siRNA^{PTEN} 处理对照小鼠以测试特异性。处理后, 处死小鼠并且在各种组织中通过实时 RT-PCR (TaqMan) 和免疫印迹法来分析基因沉默。

[0332] 在用 siRNA^{CD31 8}- 脂质复合物处理的小鼠的肿瘤、肝和肺中观察到 CD31 mRNA 水平的减少, 但是在脾组织样品中未观察到。观察到的 CD31 mRNA 水平的减少指基于 mRNA 裂解的 RNAi- 作用模式(图 20b)。此外, 与在对照小鼠中观察到的未变化的蛋白质水平相反, 在来自用 siRNA^{CD31 8}- 脂质复合物处理连续 2 天的小鼠的肿瘤和肝裂解物中检测到 CD31 蛋白质水平的显著减少(图 20c, 左版)。

[0333] 为了测试特异性和等价负载, 我们在这些裂解物中平行分析了 CD34, 另一种内皮细胞标志物蛋白质以及 PTEN 的蛋白质水平。我们还已经从脾和肺检查了全细胞提取物, 但是在这些器官中通过免疫印迹分析我们没有检测到可靠的 CD31 蛋白质表达(数据未显

示)。通过 7 天每天一次的静脉内注射在非肿瘤携带小鼠上,在独立的实验中证实 CD31 蛋白质击倒(图 20c,右版)。

[0334] 此外,通过在异种移植物肿瘤小鼠模型中,测量内皮细胞标志物 CD31 和 CD34 在微血管密度(MVD)中的显著不同,还原位揭示了在 CD31 表达中的减少。MVD 测量是肿瘤血管发生的替代标志物,并且通过用 CD31 或 CD34 特异性抗体来对血管进行免疫组化染色进行分析²⁴⁻²⁶。将配制的 CD31 和 PTEN 特异性 siRNAs 在携带肿瘤的小鼠(肿瘤大小 800mm³)中在连续两天以常规体积(200 μ l)和常规压力通过尾静脉注射来施用配制的 CD31 和 PTEN 特异性 siRNAs。在第三天,将小鼠处死,并且在分别用 CD31 和 CD34 抗体免疫染色后,比较连续的切片之间的 MVD。

[0335] 用脂质复合的 siRNA^{CD31} 8 处理的小鼠显示在 CD31 阳性血管的总量中的统计学意义上的减少,如通过血管以及血管长度的总数所测量的(图 20d)。用 CD34 特异性抗体进行的染色没有揭示 MVD 的变化,再次指示特异性 CD31 沉默。两个对照组, siRNA^{PTEN} 和等渗蔗糖处理的,没有显示通过 CD31 或 CD34 染色在 MVD 测量中的不同。该结果以及在 mRNA 和蛋白质击倒上的分子数据指示响应于脂质复合的 siRNA^{CD31} 8 的系统施用,在 CD31 表达中的特异性减少,而在 CD34 阳性内皮细胞中没有减少。我们得出结论,体内 CD31(PECAM-1) 基因沉默可以通过在肿瘤和肝的血管系统中施用阳离子脂质配制的 siRNAs 来实现。

[0336] 图 20a 的详情如下。图 20a 显示用于有效 CD31 击倒的有效稳定的 siRNAs 的鉴定。用四个不同的靶向人、小鼠特异性 siRNAs 的 CD31(CD31-1, -2, -6, -8) 和对照 PTEN-siRNA 来转染 HUVEC 和鼠 EOMA 细胞。特异性蛋白质击倒通过使用抗 -CD31 和抗 -PTEN 的免疫印迹法来评估特异性蛋白质击倒,证实 siRNA^{CD31} 8 分子的最高的功效。

[0337] 图 20b 的细节如下。通过静脉内注射脂质复合的 siRNA^{CD31} 8 在连续的两天的处理小鼠显示在某些组织中的 CD31mRNA 水平的减少,如通过定量 TaqMan RT-PCR 所揭示。将 CD31mRNA 的相对量标准化为 PTEN mRNA 水平。

[0338] 图 20c 的详情如下。通过使用抗 -CD31 抗体和抗 -PTEN 以及抗 -CD34(另一种内皮细胞标志物蛋白质)以来自肝和肿瘤的提取物进行免疫印迹分析来显示等价的蛋白质负载来证实在用 siRNA^{CD31} 8-脂质复合物系统处理的小鼠中的 CD31 蛋白质击倒。通过在两天(左版:肝和肿瘤)或连续七天(右版:肝)通过静脉内注射来处理小鼠。在 siRNA^{CD31}-脂质复合物处理的动物的肝和肿瘤中观察到 CD31 蛋白质击倒(见动物 2,左版),但是在用等渗的蔗糖溶液处理的小鼠或 siRNA^{PTEN}-脂质复合物处理的小鼠(见动物 1,3)中未观察到。关于 7 天处理方案,与对照动物 4,7 和 8 相反,在动物 5 和 6 中观察到显著的 CD31 击倒(右版)。在 HUVEC 细胞中平行证实用于体内研究的 siRNA^{CD31} 8-脂质复合物的功能性(10nM siRNA)。

[0339] 图 20d 的详情如下。通过对石蜡肿瘤切片进行免疫染色来直接评价 CD31 蛋白质的体内击倒,所述肿瘤切片来自用等渗蔗糖、siRNA^{CD31} 8-脂质复合物和 siRNA^{PTEN}-脂质复合物处理的相应的小鼠。用抗 -CD31 和抗 -CD34 抗体分别对连续的切片进行染色以观察肿瘤的血管系统。在来自用 siRNA^{CD31} 8-脂质复合物处理的小鼠的肿瘤切片中观察到关于 CD31,而非 CD34 的减少的染色强度。CD31 阳性血管的 MVD 量化(通过血管的数量、上面的图表,和血管的总长度,下面的图表所确定)显示在来自 siRNA^{CD31} 8-脂质复合物处理的小鼠的样品中的减少的 MVD。通过 CD34 阳性血管的 MVD 测量没有观察到这种不同。

[0340] 与本文公开的抗-CD31siRNA 分子相关,要注意的是,本申请的公开内容涉及任何抗-CD31siRNA 分子并且更优选地显示修饰模式的抗-CD31siRNA,所述抗-CD31siRNA 在本文显示和描述诸如与抗 CD31-8siRNA 分子相关公开的。

[0341] 实施例 27:在肿瘤模型中系统施用 siRNA^{CD31}-脂质复合物的功效

[0342] 在该实施例中,我们致力于针对 CD31/PECAM-1 的配制的 siRNAs 是否显示在肿瘤生长上的任何治疗功效的问题。

[0343] CD31 涉及参与血管/血小板形成和功能的多样细胞机制^{23,27,28},但是其在肿瘤生长中对于新血管发生的可能的作用迄今尚未得到研究。用于治疗方法所选的 siRNA 分子包括特异性 siRNA^{CD31}⁸和 siRNA^{PTEN}作为对照分子。在体内实验前,在 HUVEC 中以剂量依赖转染实验测试了用于体内功效研究的 siRNA^{CD31}⁸-和 siRNA^{PTEN}-脂质复合物。证实这些 siRNA-脂质复合物的功能性和效力的代表性免疫印迹法显示于图 21a 中。

[0344] 用这些制剂,以低的亚-毫微摩尔范围的 siRNA^{CD31}⁸实现 CD31 蛋白质的击倒。介导基因沉默的 siRNA^{CD31}⁸的特异性通过探测 PTEN、磷酸化 Akt 和 CD34 来证实。不象用 siRNA^{PTEN}进行的转染,Akt 的磷酸化状态在 HUVEC 细胞中没有被 CD31 的减少所影响。当与未处理的对照相比时,用两种脂质复合物都未改变 CD34 蛋白质的水平。在具有两种不同类型的皮下肿瘤异种移植物的小鼠中研究了系统施用 CD31-siRNA-脂质复合物的潜在治疗效果。

[0345] 首先,我们确定了容许使用不同的脂质复合物每日剂量的重复系统处理的方案。通过每天一次施用或每两日一次施用尾静脉注射 200 μ l 脂质复合物溶液(单一剂量 1.88mg/kg/d siRNA;14.5mg/kg/d 脂质)来实现不同的总的剂量。我们没有观察到对动物健康的严重毒性作用,如通过监测作为一般健康的总体标志物的体重的变化所评估的(图 21b)。

[0346] 随后,我们分析在 siRNA^{CD31}⁸-脂质复合物对肿瘤生长抑制上的功效研究中的表示每日一次或每两日一次静脉内处理的两种给药方案。用脂质复合的 siRNA^{CD31}⁸的两种处理方案导致对已建立的、快速生长的 3Y1-Ras^{V12}皮下异种移植物的明显抑制作用(图 21c)。显而易见地,对于这种特别的肿瘤异种移植体而言,每两日一次的方案改善了对肿瘤生长的抑制作用。当与 siRNA^{PTEN}-脂质复合物以及蔗糖处理对照组比较时,这种抑制是统计学上显著的(图 21c)。

[0347] 在另外的实验中,与 siRNA^{PTEN}对照相反,用脂质体配制的 siRNA^{CD31}⁸对缓慢生长的皮下 PC-3 肿瘤异种移植体进行系统处理类似地导致肿瘤生长的显著延缓(图 21d)。总体而言,体内异种移植体实验明显证实在裸鼠中肿瘤细胞的生长可以通过脂质体配制的 CD31-siRNAs 的系统施用而受到抑制。这些数据还显示,CD31(PECAM-1),一种非经典的药物靶标,似乎是基于 RNAi 的抗-血管发生的治疗干预的适合靶标。

[0348] 图 21a 的详情如下。在 HUVEC 中,将脂质复合的 siRNA 的质量控制和功效测试用于全身性肿瘤处理。使用抗-CD31 抗体的免疫印迹法揭示在 siRNA^{CD31}⁸的情形中 CD31 的浓度依赖型击倒,但是在对照 siRNA^{PTEN}没有观察到这种击倒。与 siRNA^{PTEN}对照相反,CD31 的减少对于 PI3-激酶信号传导没有影响,如通过监测 Akt 磷酸化状态(P*-Akt)所揭示的。CD34 蛋白质水平没有受到影响。

[0349] 图 21b 的详情如下。监测两种不同的 siRNA-脂质复合物剂量对体重的影响。将不同的 siRNA^{PTEN}-脂质复合物剂量(正方形:导致 1.88mg/kg/dsiRNA 和 14.5mg/kg/d 脂质

的每日一次注射;菱形:每两日一次注射(8h间隔),3.75mg/kg/d siRNA 和 28.9mg/kg/d 施用达连续7天,测量体重中的变化并且标绘作平均值(n=7只小鼠)。出于比较,显示用等渗的蔗糖溶液(圆形)处理的动物的体重(平均值±S.E.M.)。

[0350] 图21c和21d的详情如下。通过CD31-siRNA-脂质复合物处理来抑制肿瘤生长。在裸鼠皮下建立两种不同的肿瘤异种移植物(c:3Y1-Ras^{V12},d:PC-3)(c:左图表:n=8小鼠/组,右,n=7小鼠/组;d:n=8/组)。用siRNA^{CD31}-脂质复合物(菱形)、siRNA^{PTEN}-脂质复合物(三角形)或等渗蔗糖(实心球形)来处理具有肿瘤的小鼠。如所示应用不同的处理方案;单箭头,每日一次;双箭头,每两日一次。(c)通过应用每两日一次给药方案,当与siRNA^{PTEN}-脂质复合物比较时,建立的3Y1-Ras^{V12}肿瘤的生长被siRNA^{CD31}-脂质复合物显著抑制(右面图表)。(d)如所示,与处理施用的siRNA^{PTEN}-脂质复合物比较,建立的PC-3异种移植物的生长被siRNA^{CD31}-脂质复合物显著抑制(1.88mg/kg/d siRNA;14.5mg/kg/d 脂质;箭头)。数据表示平均值±S.E.M.;显著性:按照Mann-Whitney,*P<0.05。

[0351] 下面的参考文献对应于实施例23-28并且全部内容结合于本文作为参考:

[0352] 6. Elbashir, S. M. 等 Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494-8 (2001).

[0353] 16. Czauderna, F. 等 Structural variations and stabilising modifications of synthetic siRNAs in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 31, 2705-16 (2003).

[0354] 17. Chiu, Y. L. & Rana, T. M. RNAi in human cells: basic structural and functional features of small interfering RNA. *Mol Cell* 10, 549-61 (2002).

[0355] 18. Zelphati, O. & Szoka, F. C., Jr. Mechanism of oligonucleotide release from cationic liposomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 11493-8 (1996).

[0356] 19. Stambolic, V. 等 Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell* 95, 29-39 (1998).

[0357] 20. Klippel, A. 等 Activation of phosphatidylinositol 3-kinase is sufficient for cell cycle entry and promotes cellular changes characteristic of oncogenic transformation. *Mol Cell Biol* 18, 5699-711 (1998).

[0358] 21. Watt, S. M., Gschmeissner, S. E. & Bates, P. A. PECAM-1: its expression and function as a cell adhesion molecule on hemopoietic and endothelial cells. *Leuk Lymphoma* 17, 229-44 (1995).

[0359] 22. Newman, P. J. 等 PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. *Science* 247, 1219-22 (1990).

[0360] 23. Ilan, N. & Madri, J. A. PECAM-1: old friend, new partners. *Curr Opin Cell Biol* 15, 515-24 (2003).

[0361] 24. Fox, S. B. & Harris, A. L. Histological quantitation of tumor angiogenesis. *Apmis* 112, 413-30 (2004).

[0362] 25. Uzzan, B., Nicolas, P., Cucherat, M. & Perret, G. Y. Microvessel density as a prognostic factor in women with breast cancer: a systematic review of the literature and meta-analysis. *Cancer Res* 64, 2941-55 (2004).

[0363] 26. Weidner, N., Semple, J. P., Welch, W. R. & Folkman, J. Tumor angiogenesis and

metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. N Engl J Med 324, 1-8 (1991).

[0364] 27. Ilan, N., Mahooti, S. & Madri, J. A. Distinct signal transduction pathways are utilized during the tube formation and survival phases of *in vitro* angiogenesis. J Cell Sci 111 (Pt 24), 3621-31 (1998).

[0365] 28. SoloWiej, A., Biswas, P., Graesser, D. & Madri, J. A. Lack of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 attenuates foreign body inflammation because of decreased angiogenesis. Am J Pathol 162, 953-62 (2003).

[0366] 38. Leenders, F. 等 PKN3 is required for malignant prostate cell growth downstream of activated PI3-kinase. Embo J 23, 3303-13 (2004).

[0367] 39. Klippel, A., Escobedo, J. A., Hirano, M. & Williams, L. T. The interaction of small domains between the subunits of phosphatidylinositol 3-kinase determines enzyme activity. Mol Cell Biol 14, 2675-85 (1994).

[0368] 40. Santel, A. & Fuller, M. T. Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. J Cell Sci 114, 867-74 (2001).

[0369] 在说明书中公开的本发明的特征, 权利要求和 / 或附图都可以单独地和以其任何组合作为理解以其各种形式存在的本发明的材料。

[0001]

序列表	IA127784序列表
<110> 赛伦斯治疗公司	
<120> 脂质、脂质复合物及其应用	
<130> A 19025 PCT	
<160> 20	
<170> PatentIn version 3.1	
<210> 1	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<221> misc feature	
<223> PTEN特异siRNA的反义链	
<220>	
<221> misc feature	
<223> PTEN特异siRNA分子的反义链	
<400> 1	
uaaguucuag cugugggg	19
<210> 2	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<221> misc feature	
<223> PTEN特异siRNA分子的有义链	
<400> 2	
ccaccacagc ugaacuuu	19
<210> 3	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<221> misc feature	
<223> T-Ras特异si RNA分子的有义链	
<220>	
<221> misc feature	
<223> T-Ras特异si RNA分子的链	
<400> 3	
aacguguaga aggcauccu	19
<210> 4	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<221> misc feature	
<223> T-Ras特异si RNA分子的有义链	
<220>	
<221> misc feature	

[0002]

		TA127784序列表
<223>	T-Ras特异si RNA分子的链	
<400>	4	
	aggauGCCUu cuacacguu	19
<210>	5	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<221>	misc feature	
<223>	PKN3特异si RNA分子的有义链	
<400>	5	
	gagagCCUGU acugcgaga	19
<210>	6	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<221>	misc feature	
<223>	PKN3特异si RNA分子的反义链	
<400>	6	
	ucucgcagua caggeucuc	19
<210>	7	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<221>	misc feature	
<223>	PTEN特异si RNA分子的有义链	
<400>	7	
	ccaccacagc uagaacuua	19
<210>	8	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<221>	misc feature	
<223>	PTEN特异si RNA分子的反义链	
<400>	8	
	uaaguucuaG cuguggugg	19
<210>	9	
<211>	19	
<212>	DNA	

[0003]

IA127784序列表

<213> 人工的	
<220>	
<221> misc feature	
<223> 对照PTEN特异si RNA分子的有义链	
<400> 9	
ccaccacagc ugaacuua	19
<210> 10	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<221> misc feature	
<223> 对照PTEN特异si RNA分子的反义链	
<400> 10	
uaaguucuag cuguggugg	19
<210> 11	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<221> misc feature	
<223> PTEN特异si RNA分子的有义链	
<400> 11	
ccaccacagc ugaacuua	19
<210> 12	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<221> misc feature	
<223> 在3'末端具有Cy3的PTEN特异si RNA分子的反义链	
<400> 12	
uaaguucuag cuguggugg	19
<210> 13	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<221> misc feature	
<223> CD 31特异si RNA分子(CD31-1)的有义链	
<400> 13	
ccaacuucac cauccagaa	19
<210> 14	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<221> misc feature	
<223> CD 31特异si RNA分子(CD31-1)的反义链	

[0004]

TA127784序列表

<400> 14		
uucuggaugg ugaaguugg		19
<210> 15		
<211> 19		
<212> DNA		
<213> 人工的		
<220>		
<221> misc feature		
<223> CD 3I特异si RNA分子 (CD3I-2)的有义链		
<400> 15		
ggugauagcc ccgguggau		19
<210> 16		
<211> 19		
<212> DNA		
<213> 人工的		
<220>		
<221> misc feature		
<223> CD 3I特异si RNA分子 (CD3I-2)的反义链		
<400> 16		
auccaccggg gcuaucacc		19
<210> 17		
<211> 19		
<212> DNA		
<213> 人工的		
<220>		
<221> misc feature		
<223> CD 3I特异si RNA分子 (CD3I-6) 的有义链		
<400> 17		
ccacuncuga acuccaaca		19
<210> 18		
<211> 19		
<212> DNA		
<213> 人工的		
<220>		
<221> misc feature		
<223> CD 3I特异si RNA分子 (CD3I-6) 的反义链		
<400> 18		
uguuggaguu cagaagugg		19
<210> 19		
<211> 19		
<212> DNA		
<213> 人工的		
<220>		
<221> misc feature		
<223> CD 3I特异si RNA分子 (CD3I-8)的有义链		
<400> 19		
cagauacucu agaacggaa		19
<210> 20		

[0005]

IA127784序列表

- <211> 19
- <212> DNA
- <213> 人工的

- <220>
- <221> misc. feature
- <223> CD 31特异si RNA分子 (CD31-8)的反义链

<400> 20
uuccguucua gaguaucug

19

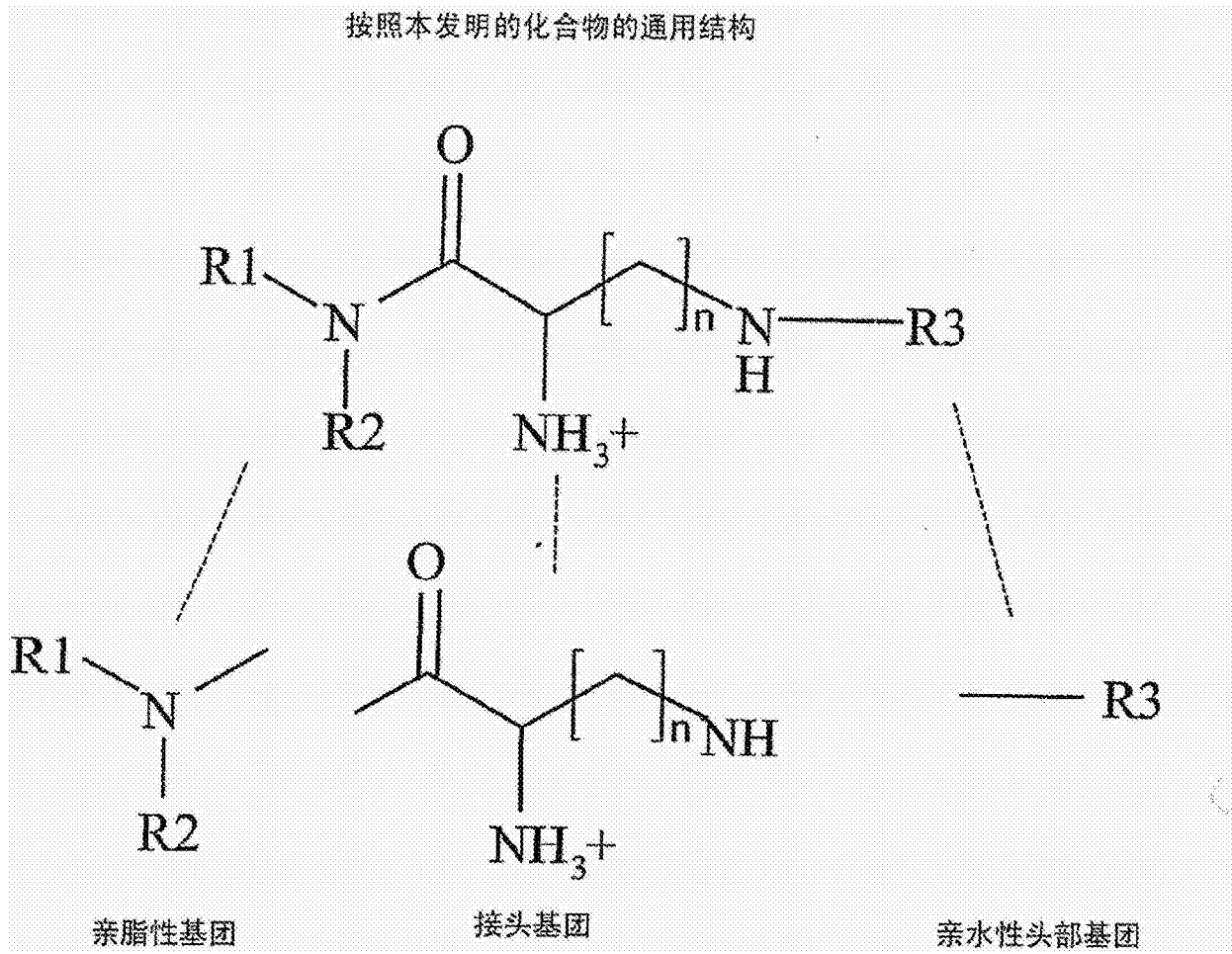


图 1

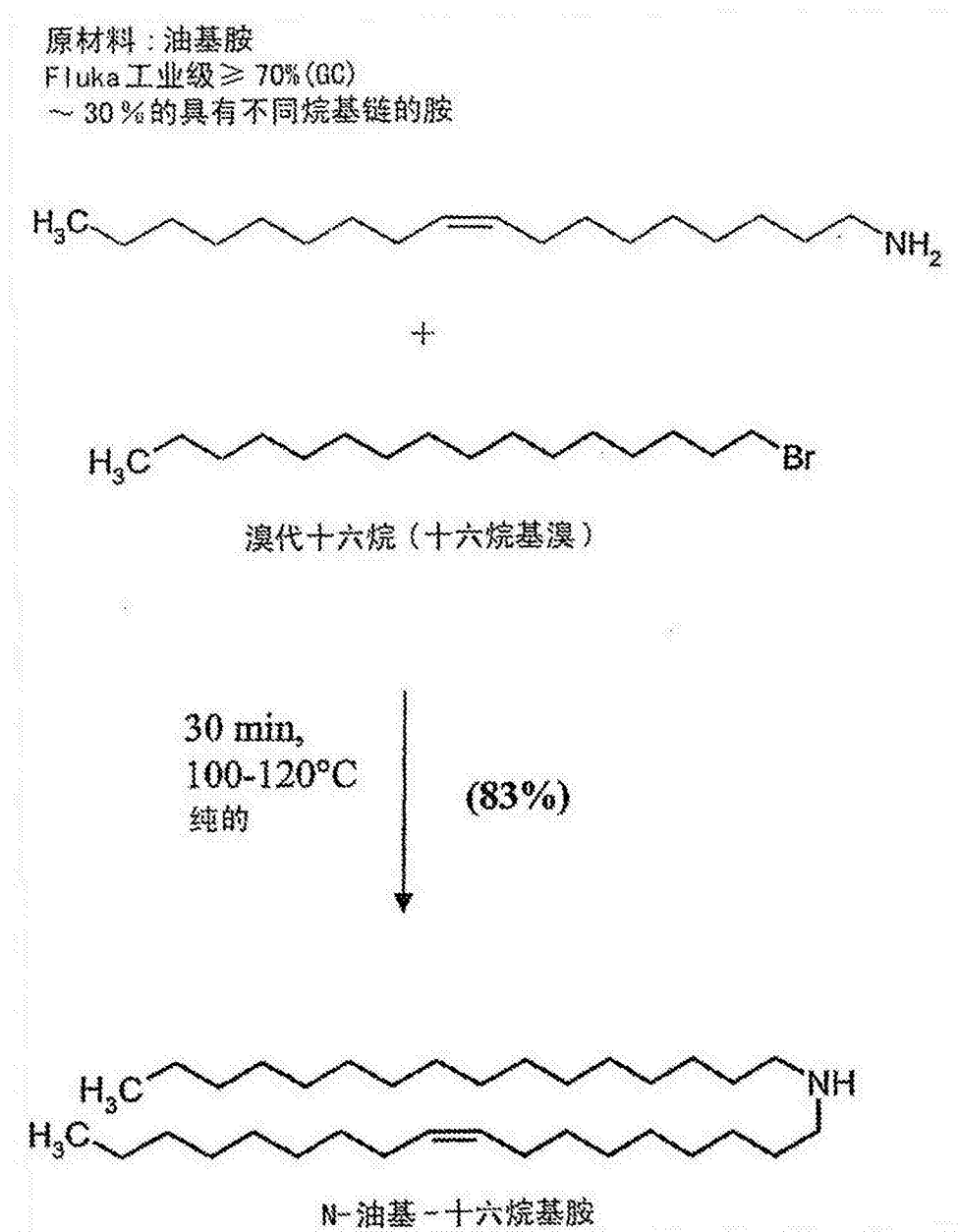


图 2

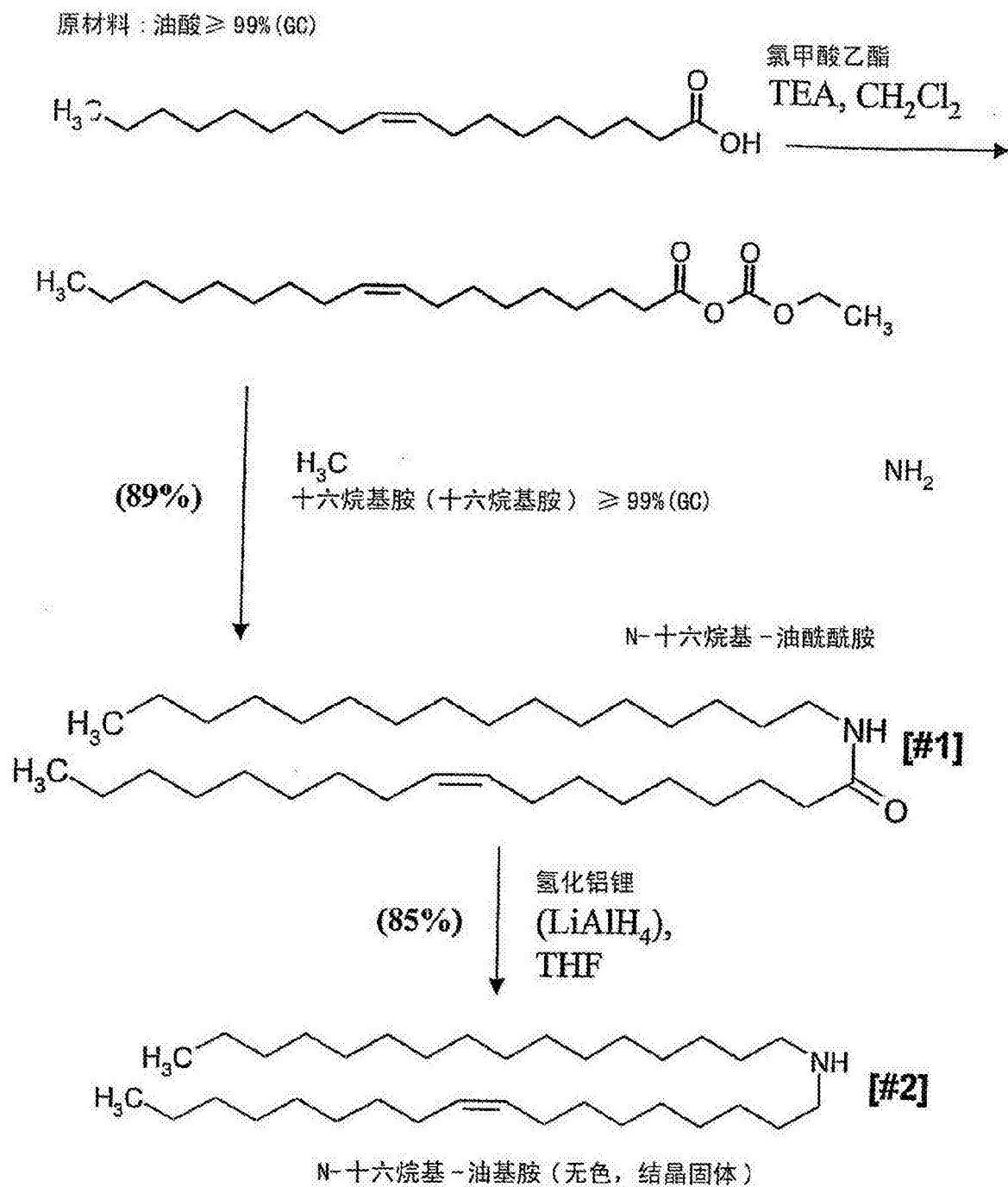


图 3

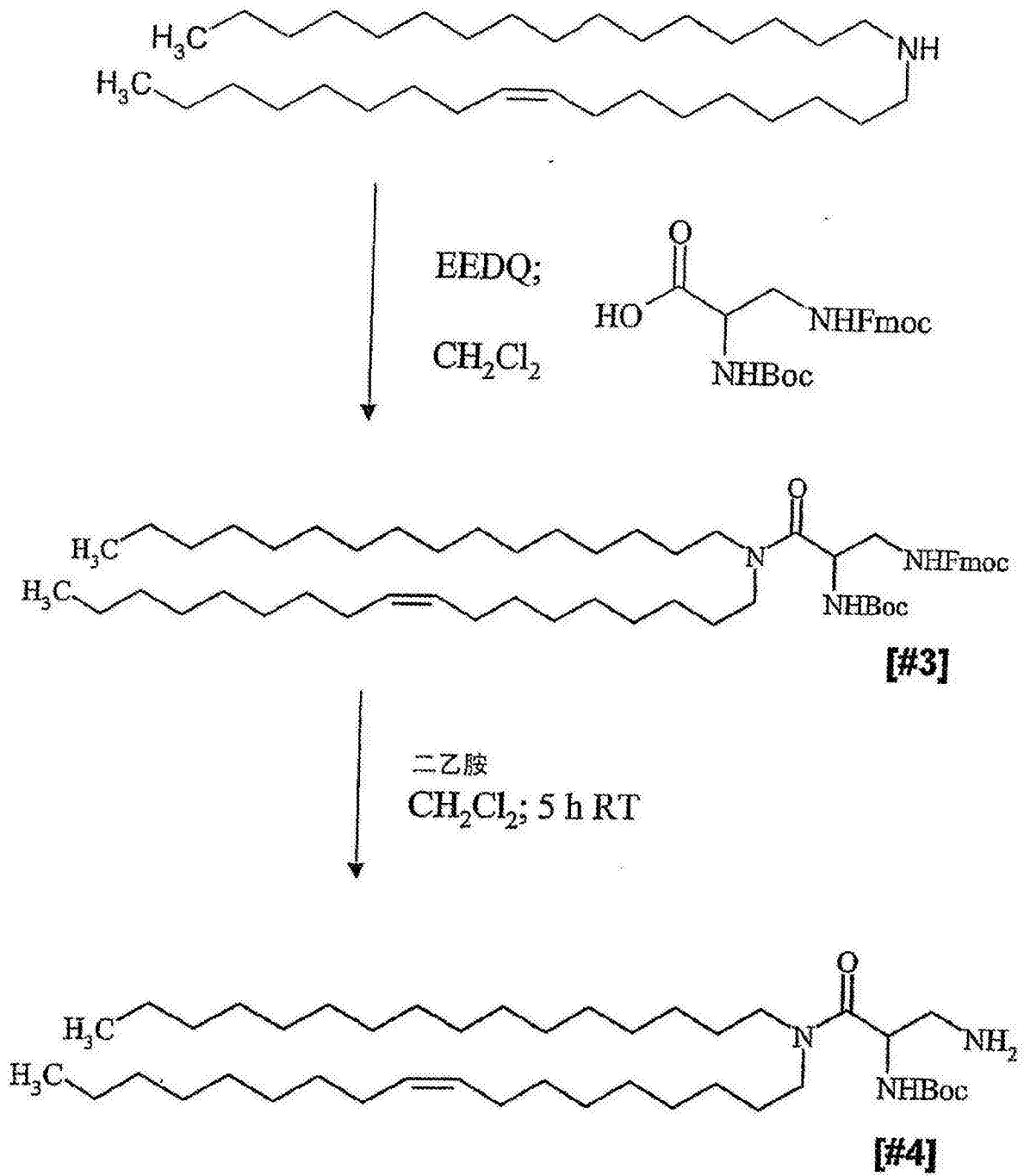


图 4

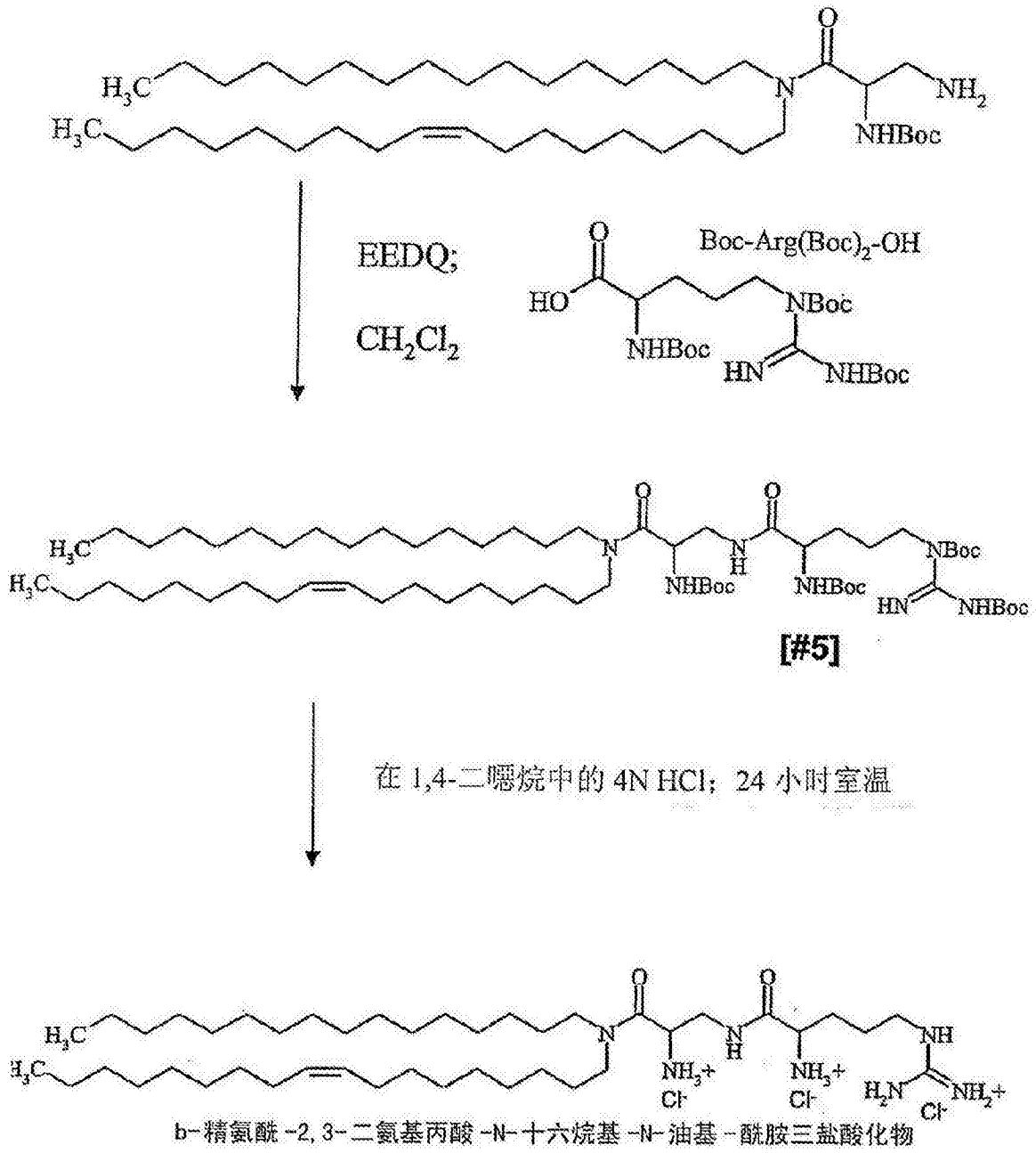


图 5

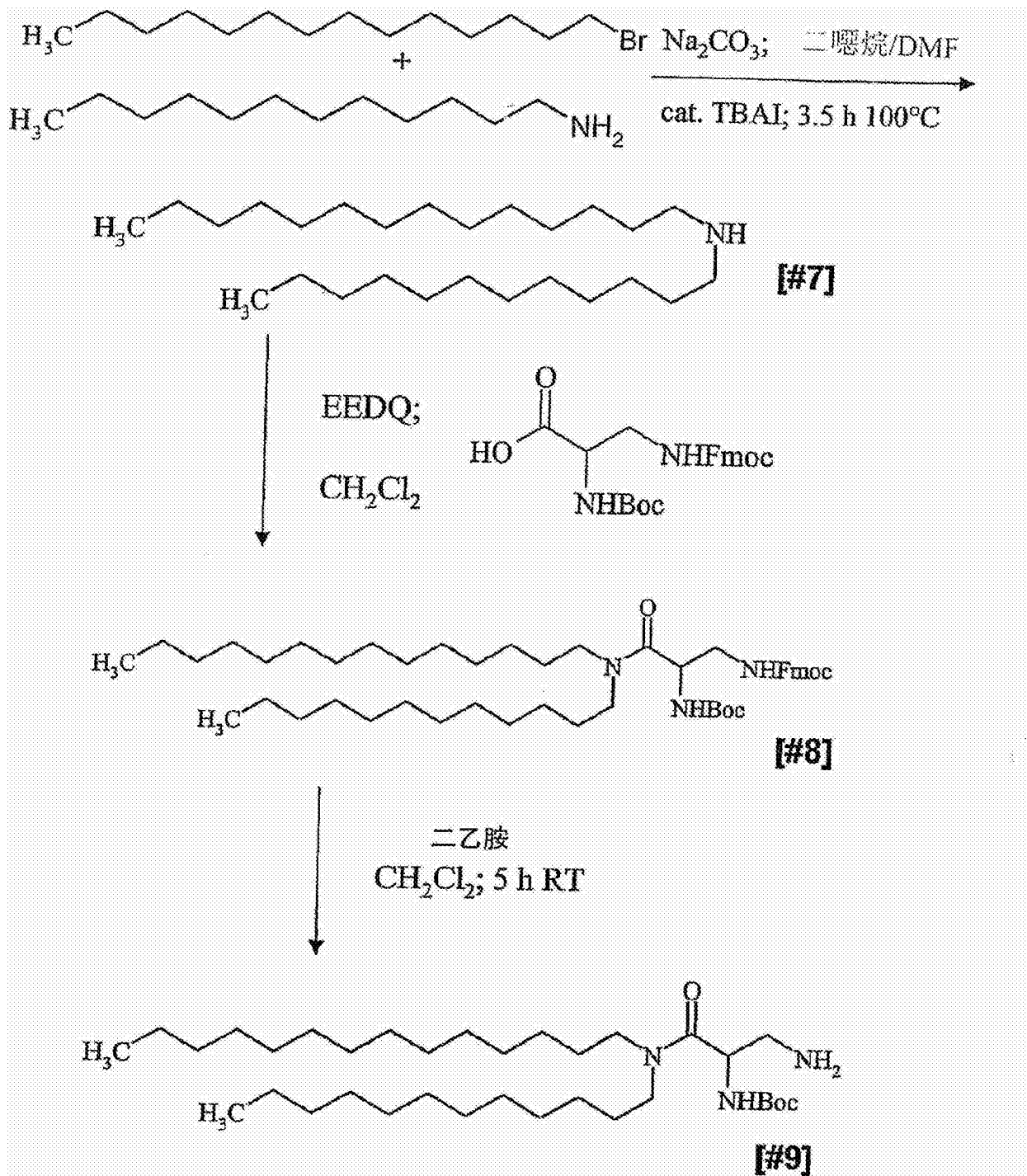


图 6

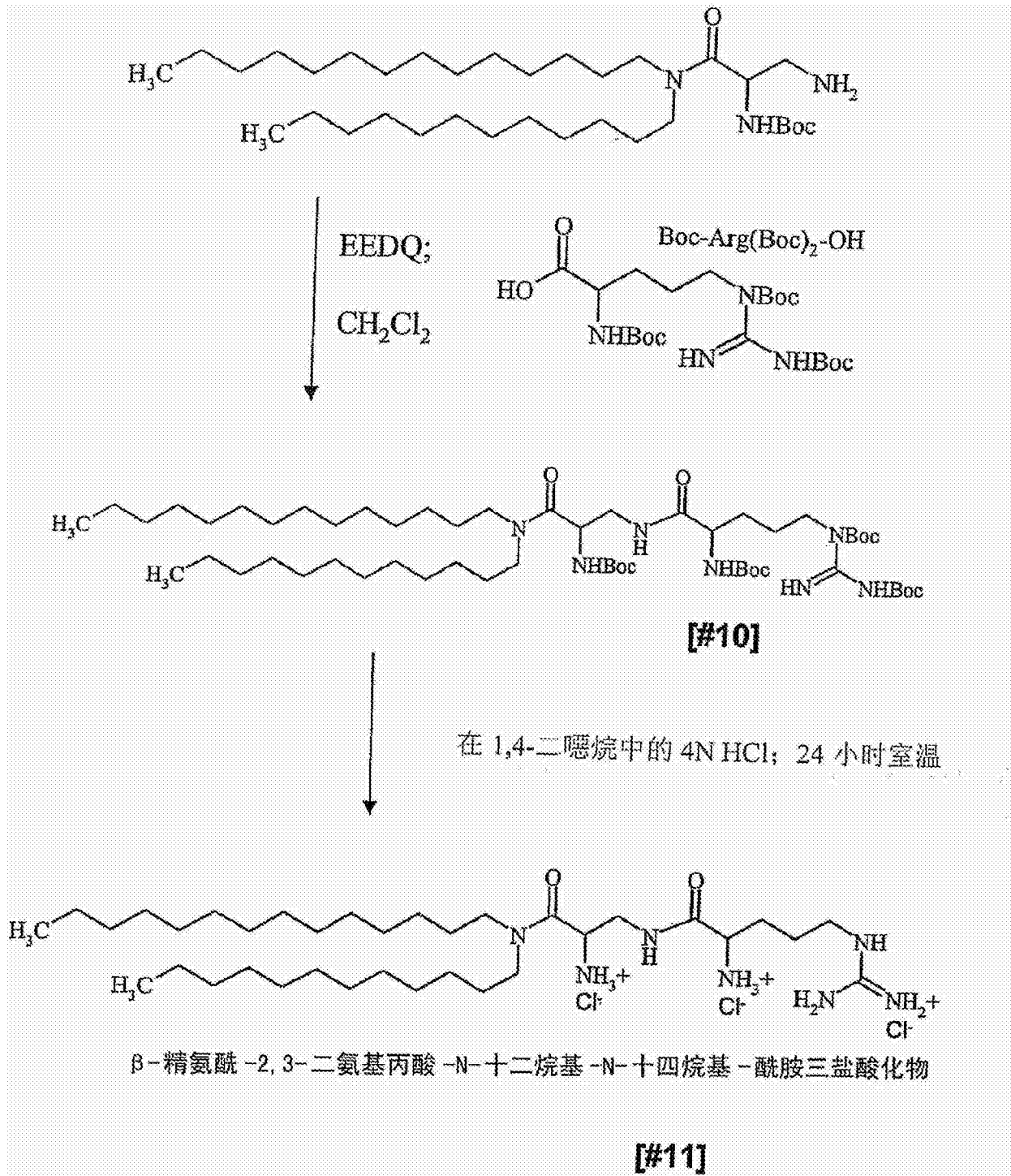


图 7

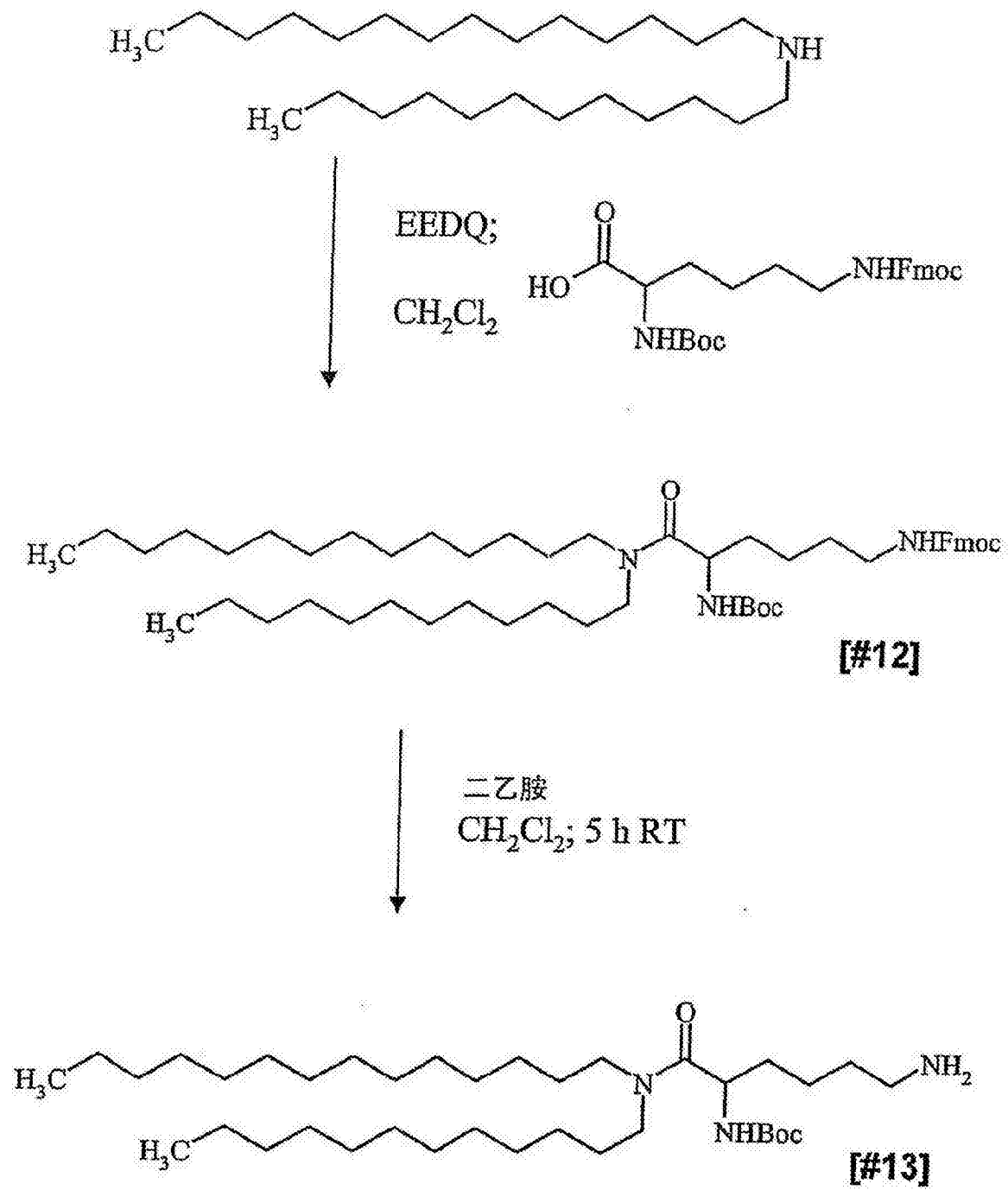


图 8

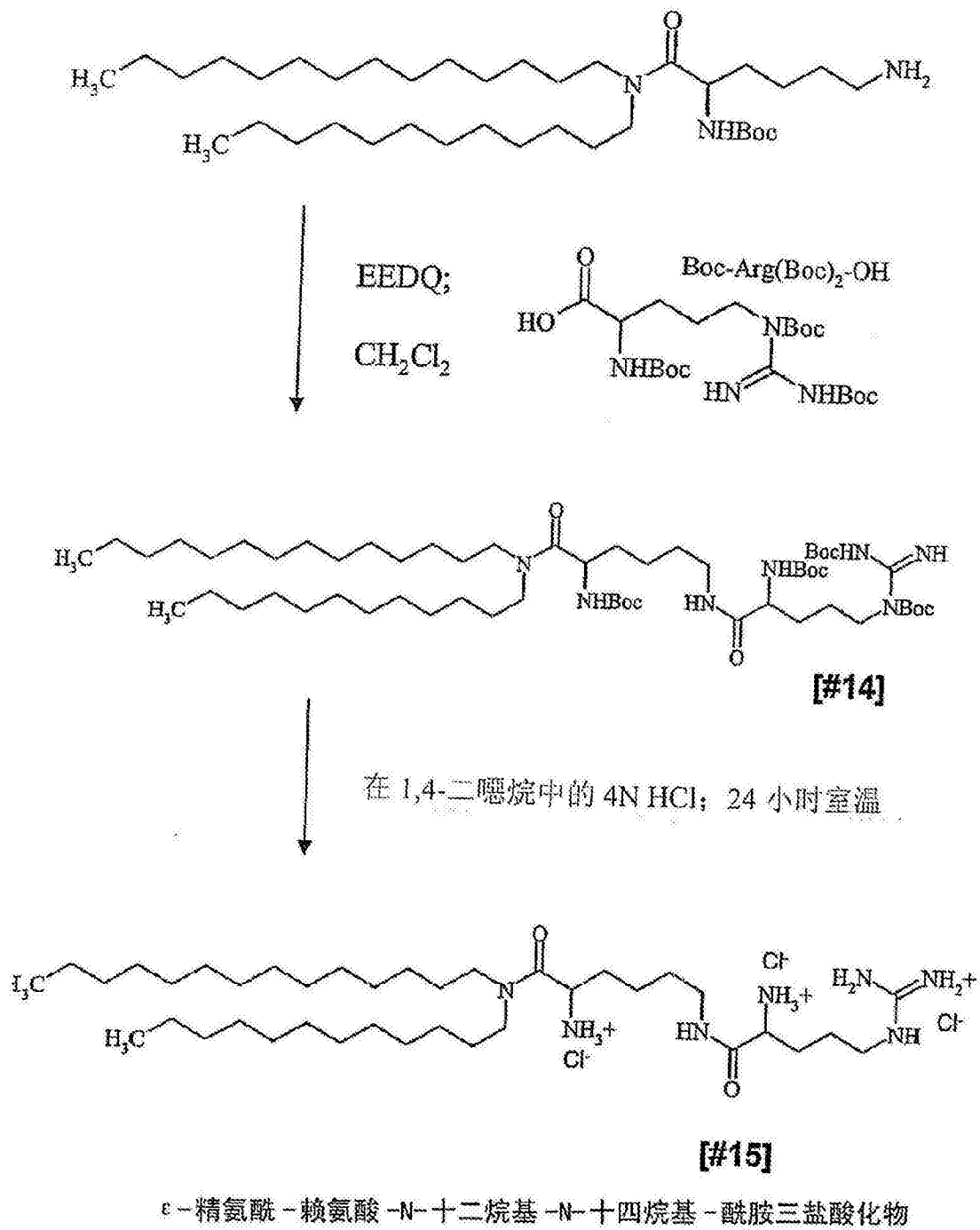


图 9

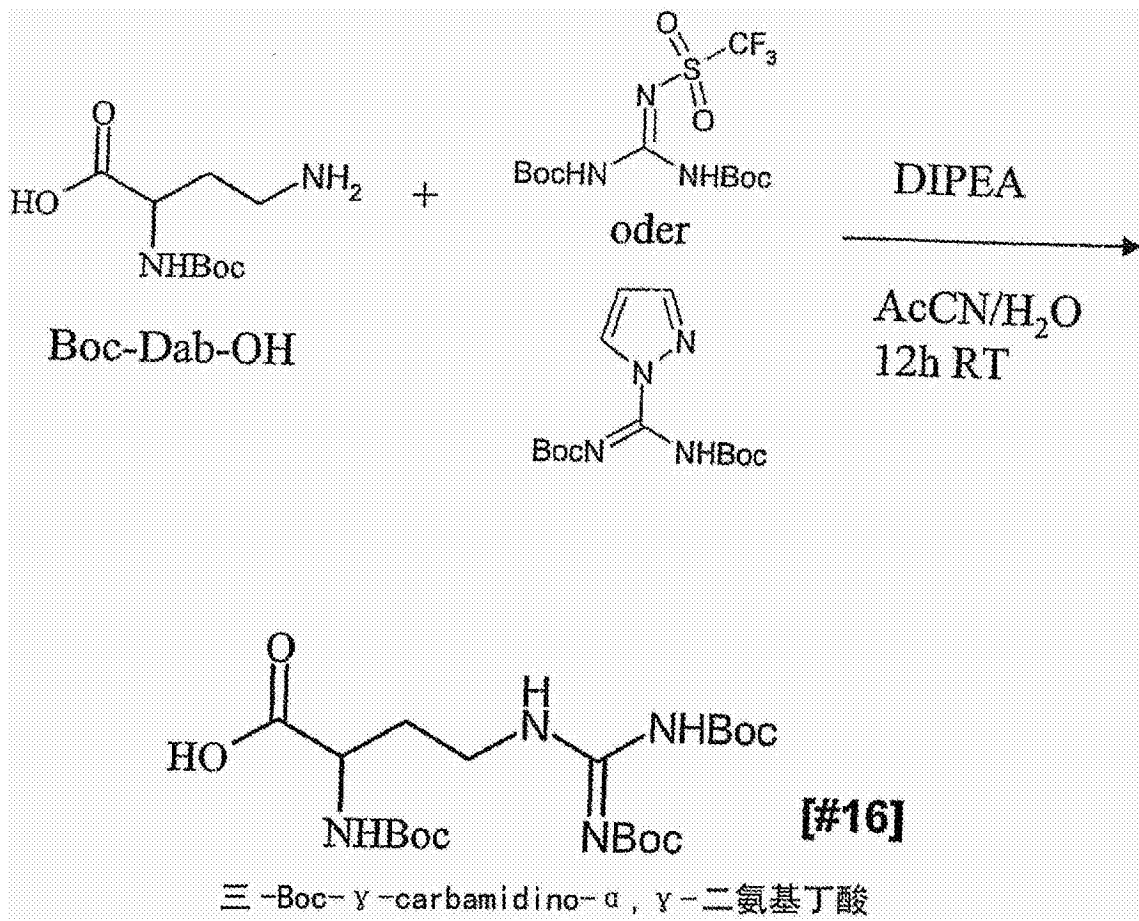


图 10

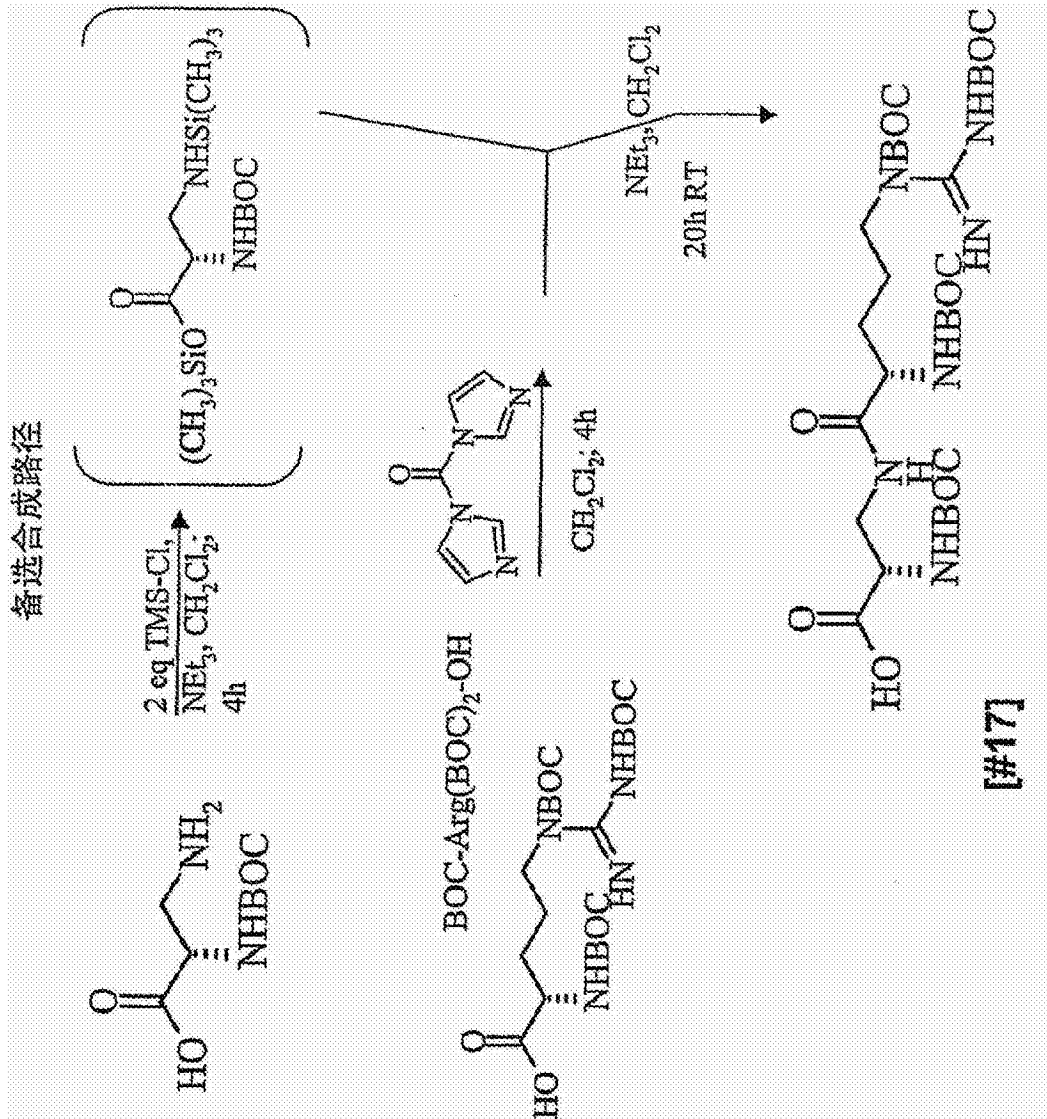


图 11- 部分 1

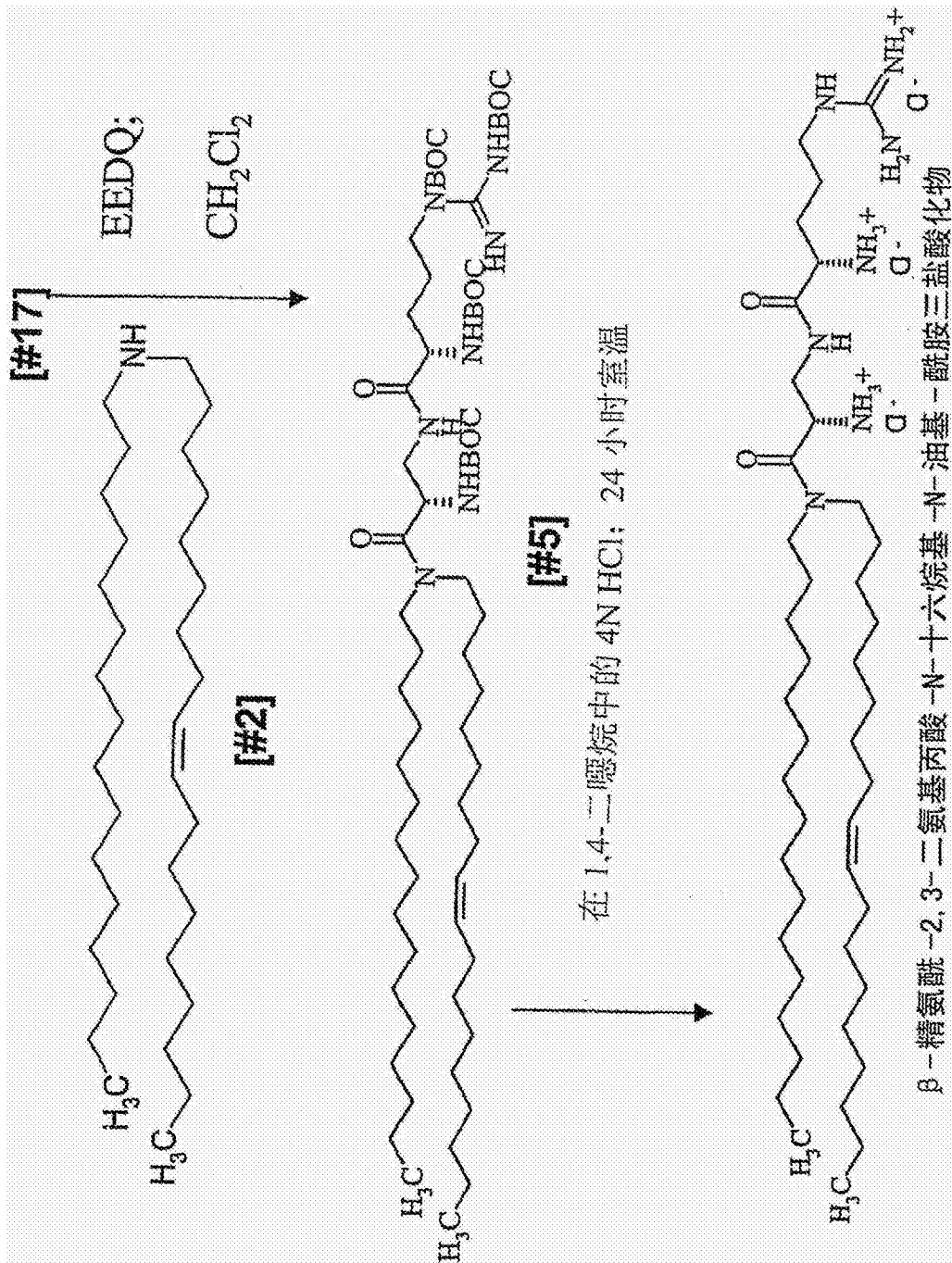


图 11- 部分 2

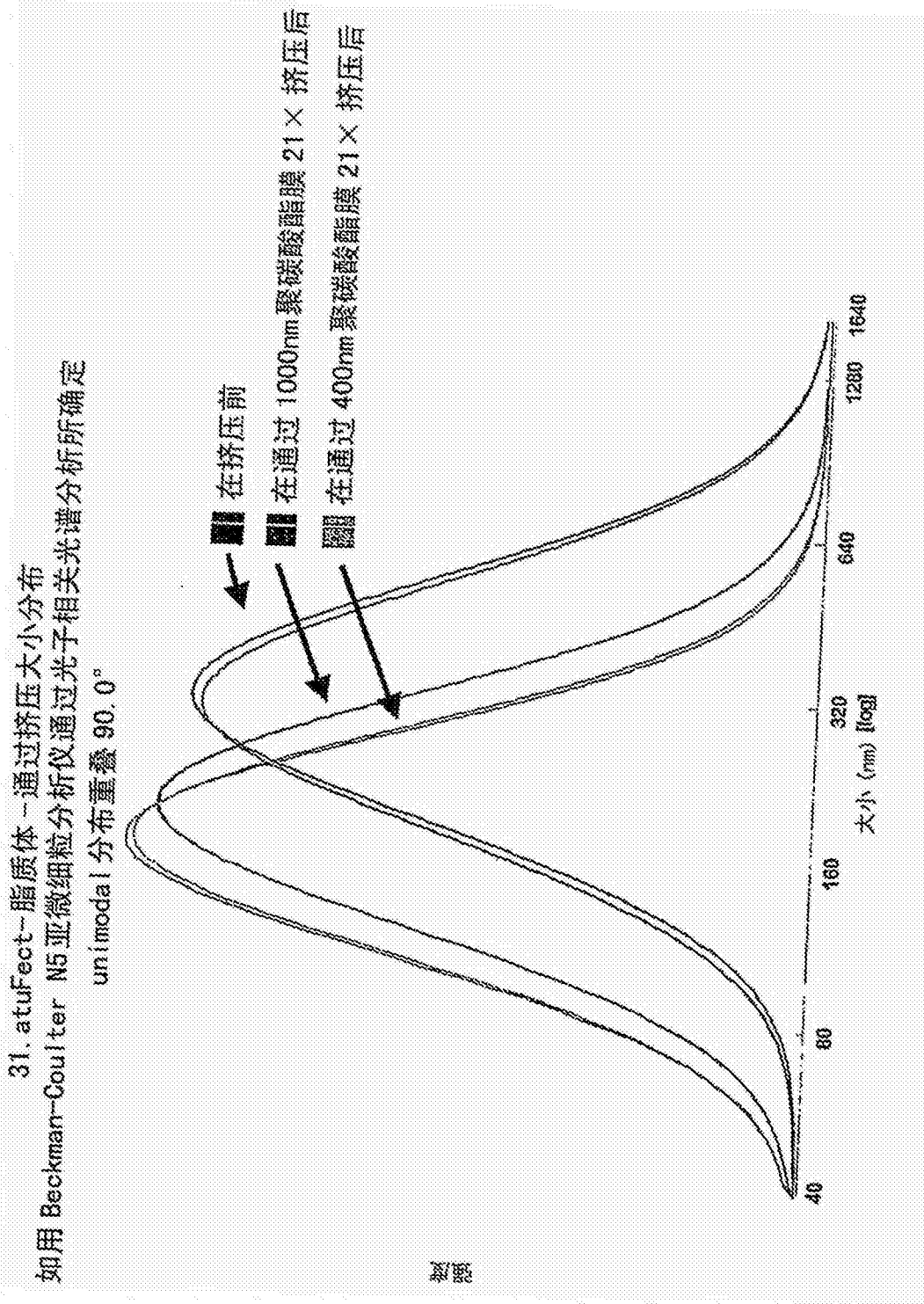


图 12A

atuFect-脂质体 - 通过高压均化作用大小分布
如用 Beckman-Coulter N5 亚微细粒分析仪通过光子相关光谱分析所确定

unimodal 分布重叠 90.0°

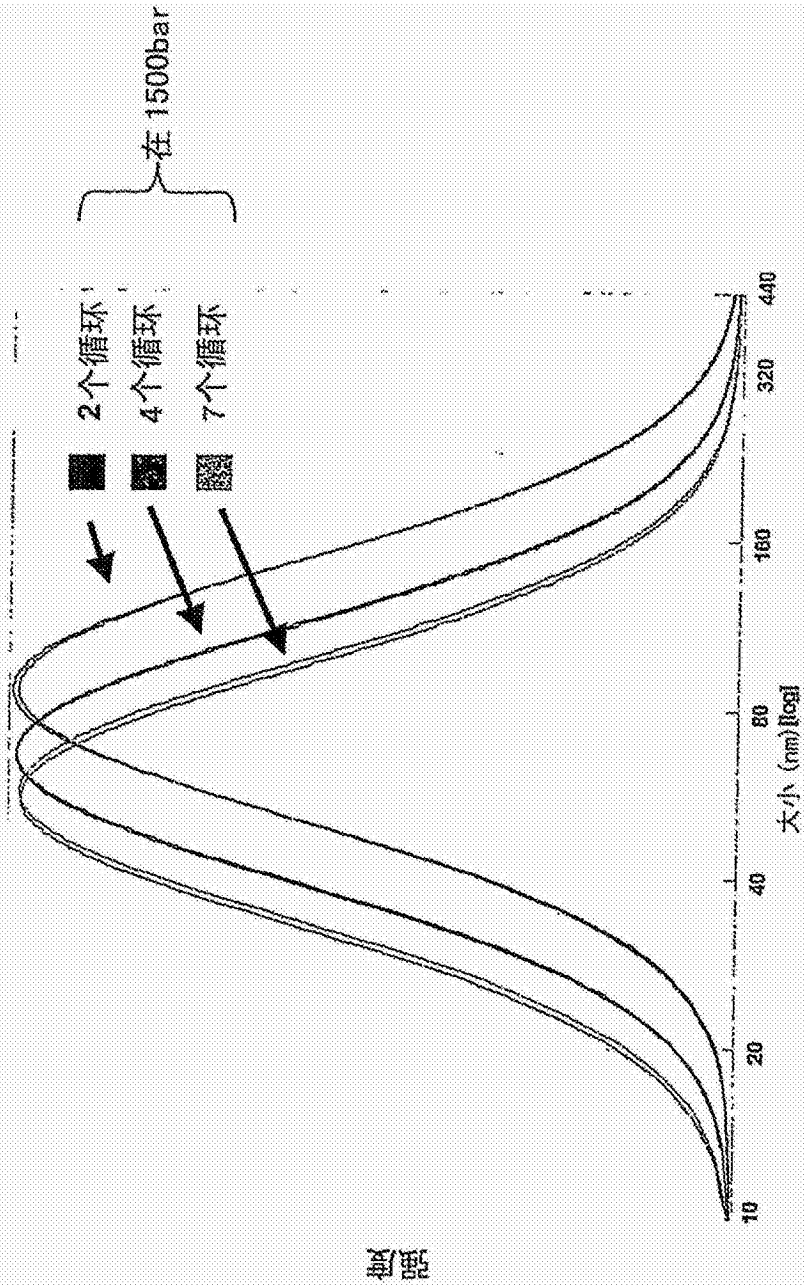


图 12B

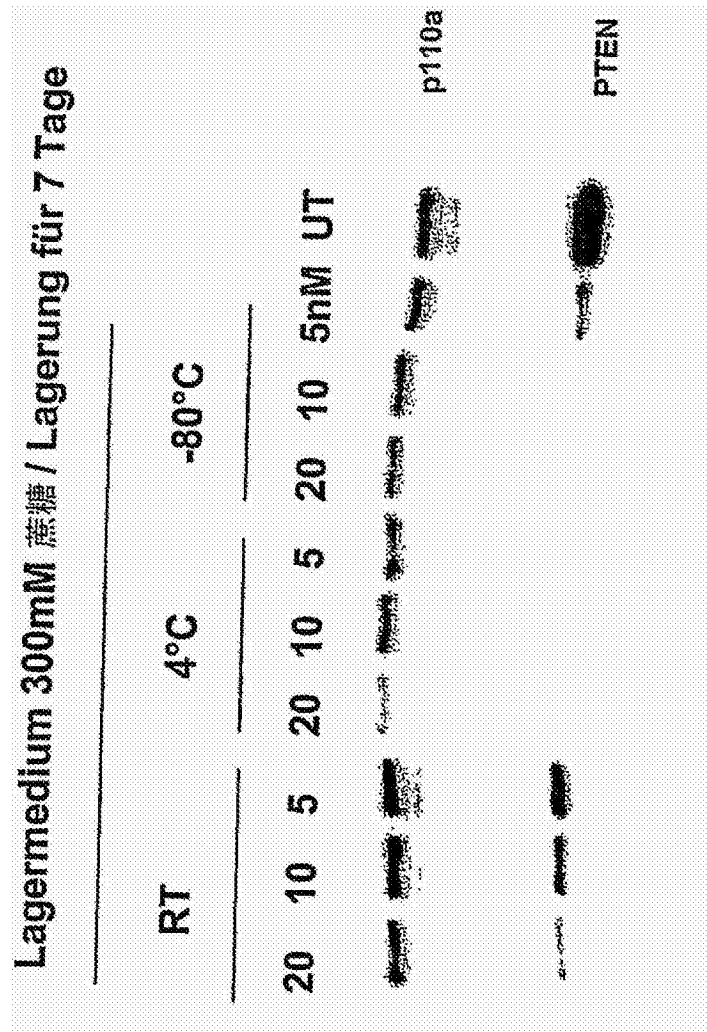


图 13

在 B16V 中的 PTENV10-击倒 (在 48 小时后) -50mo l% 阳离子脂质
 (专利的化合物 6) + 50mo l% DPhyPE (01) 或 50mo l% DOPE (02)

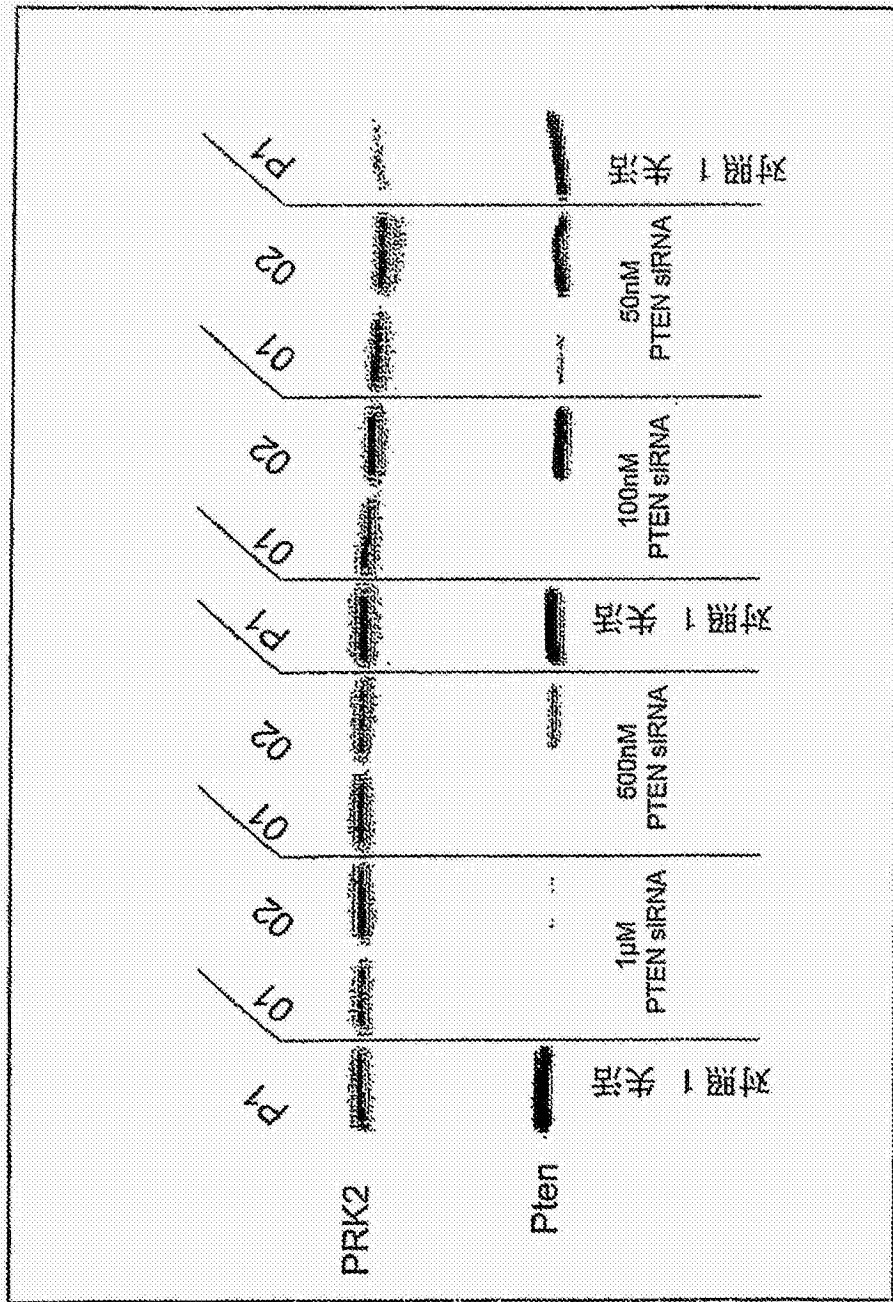


图 14

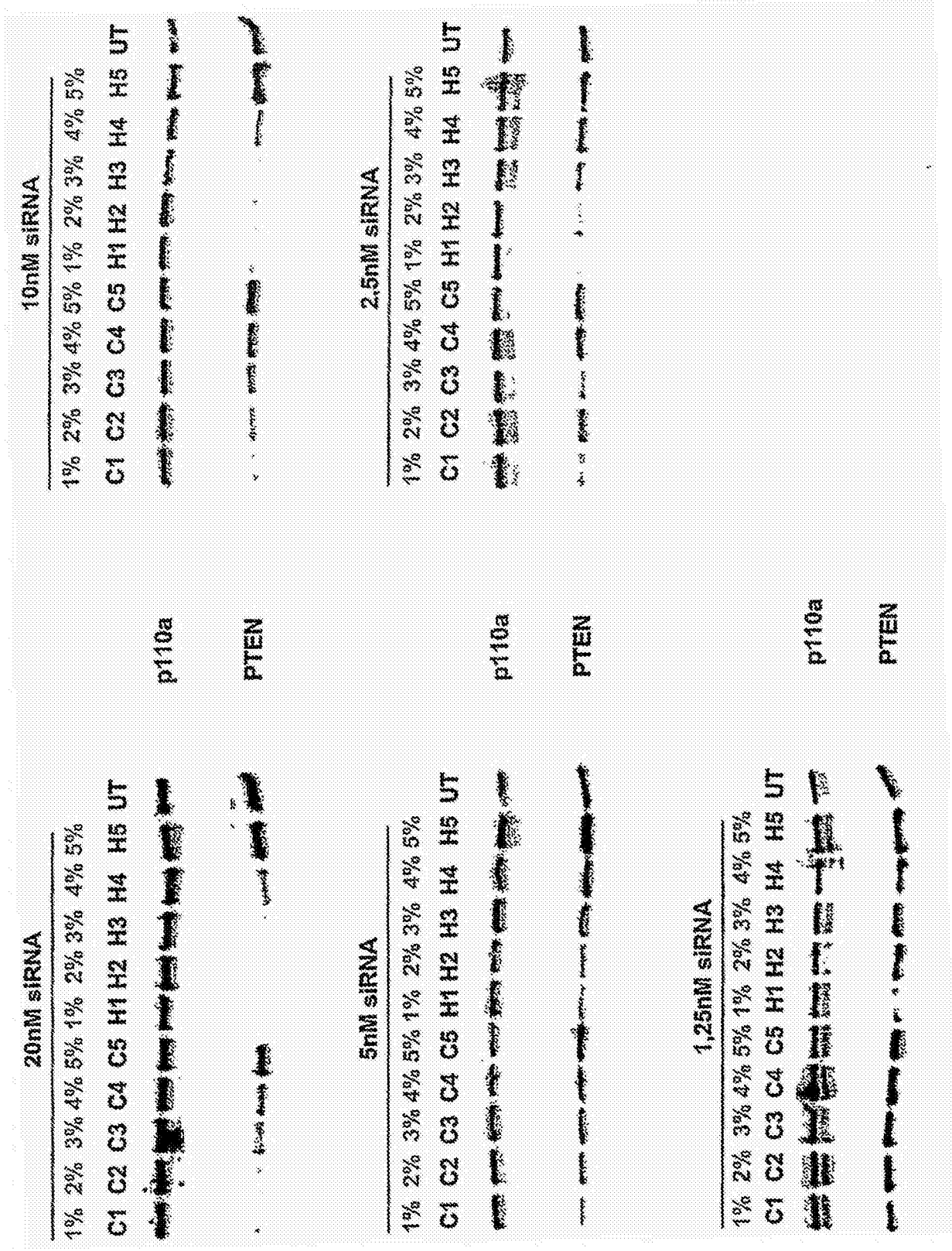


图 15

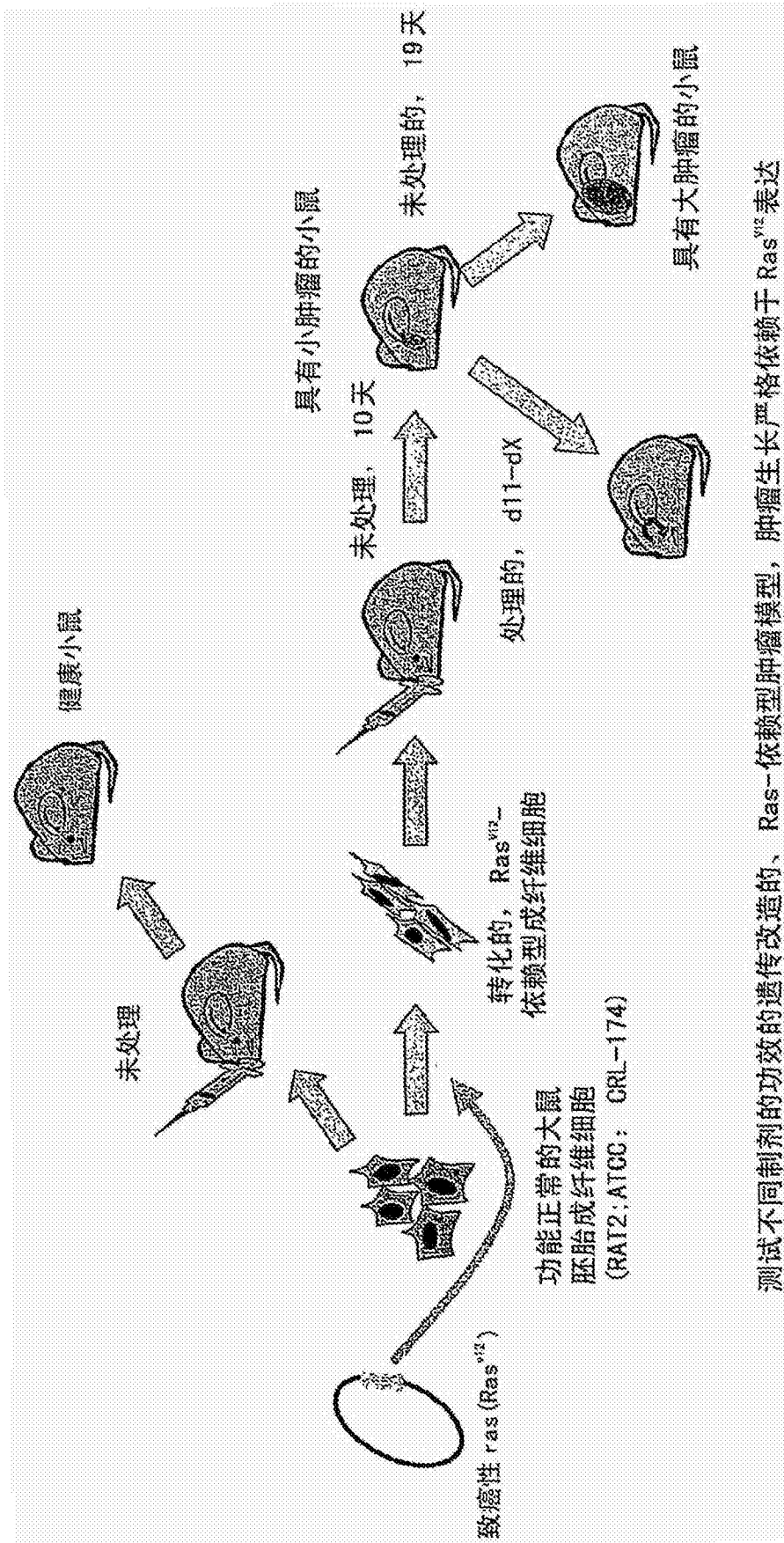


图 16

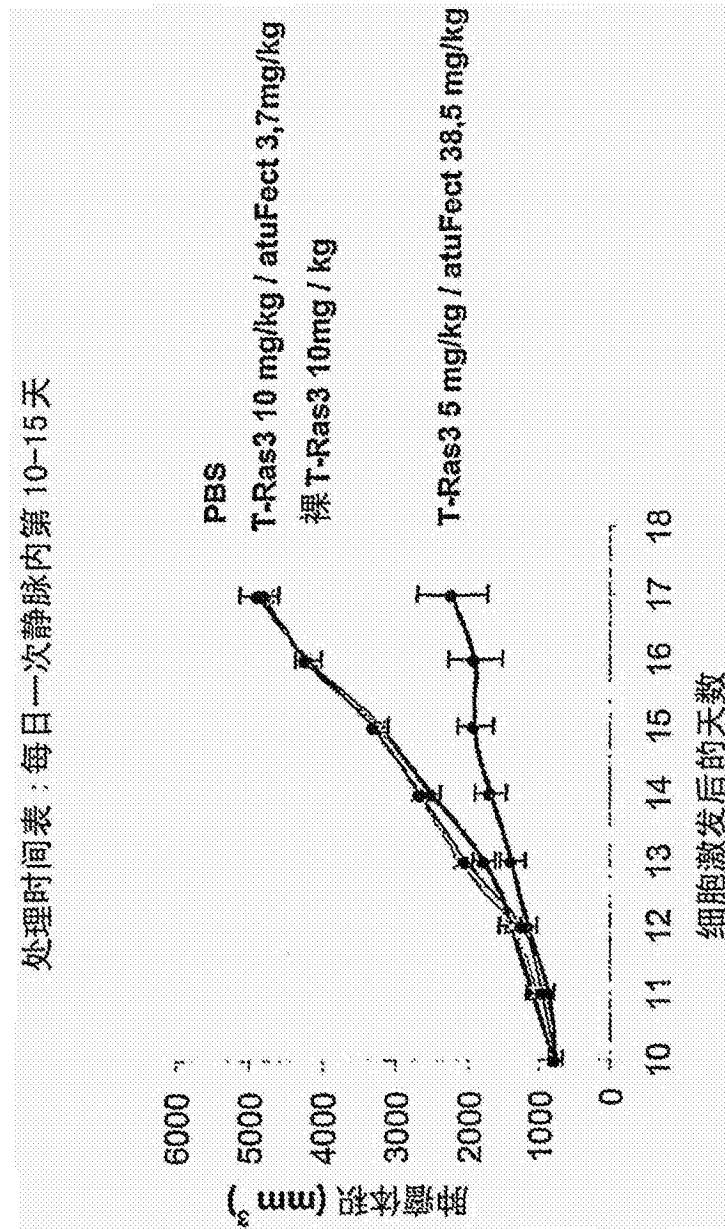


图 17A

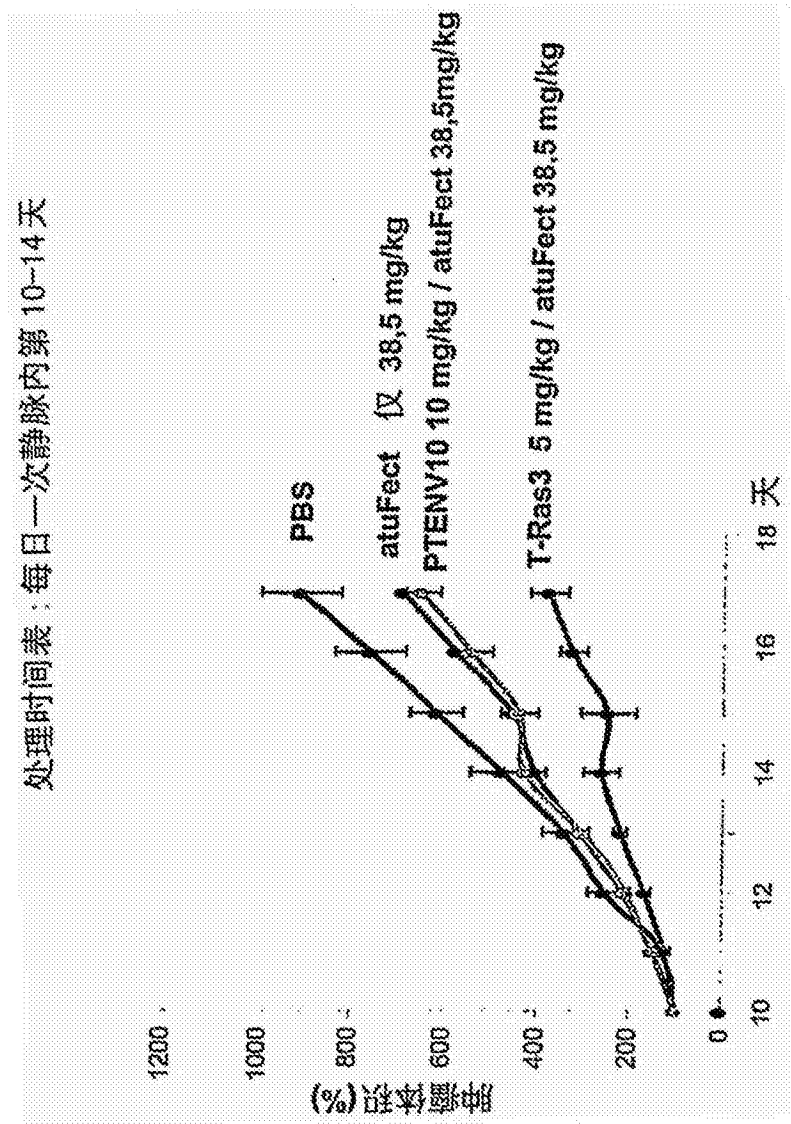


图 17B

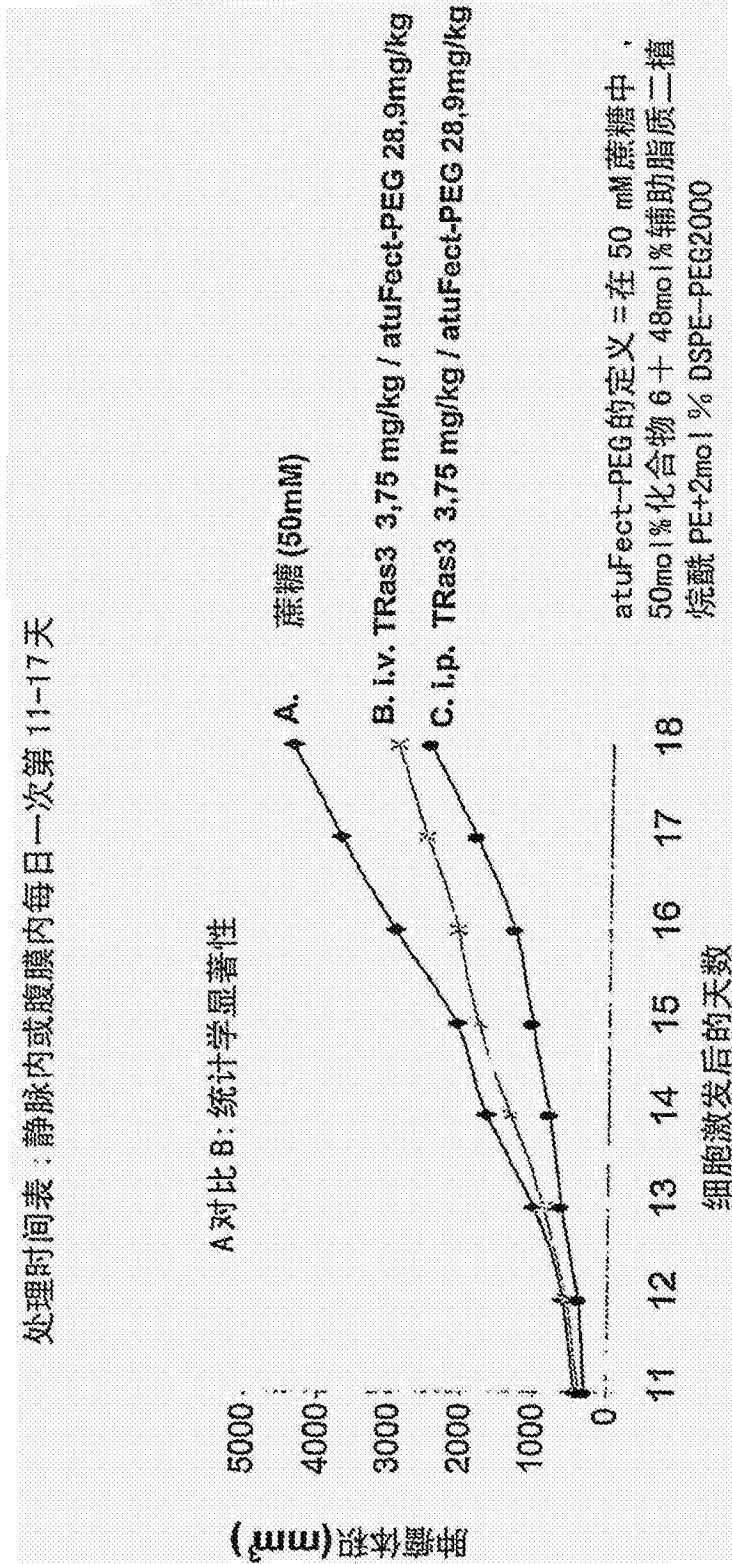


图 17C

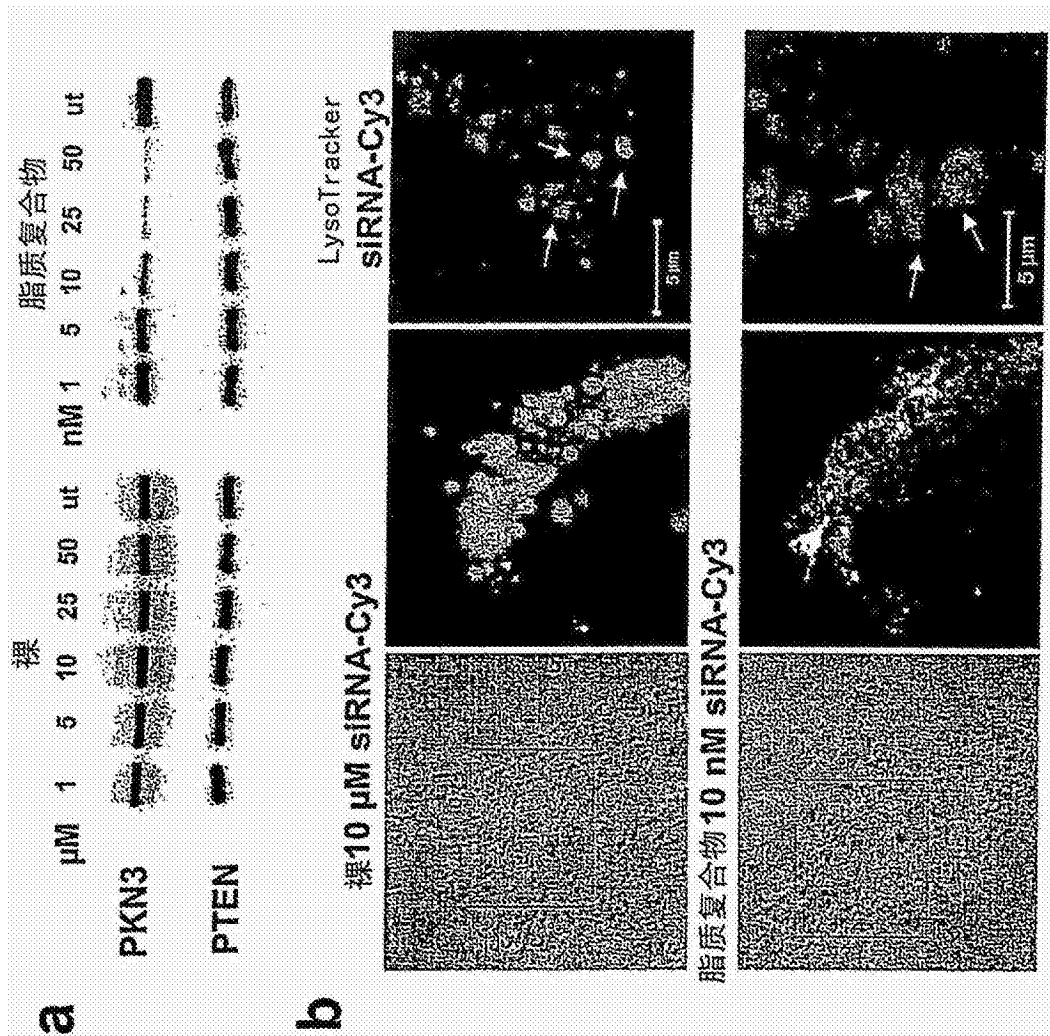


图 18/1

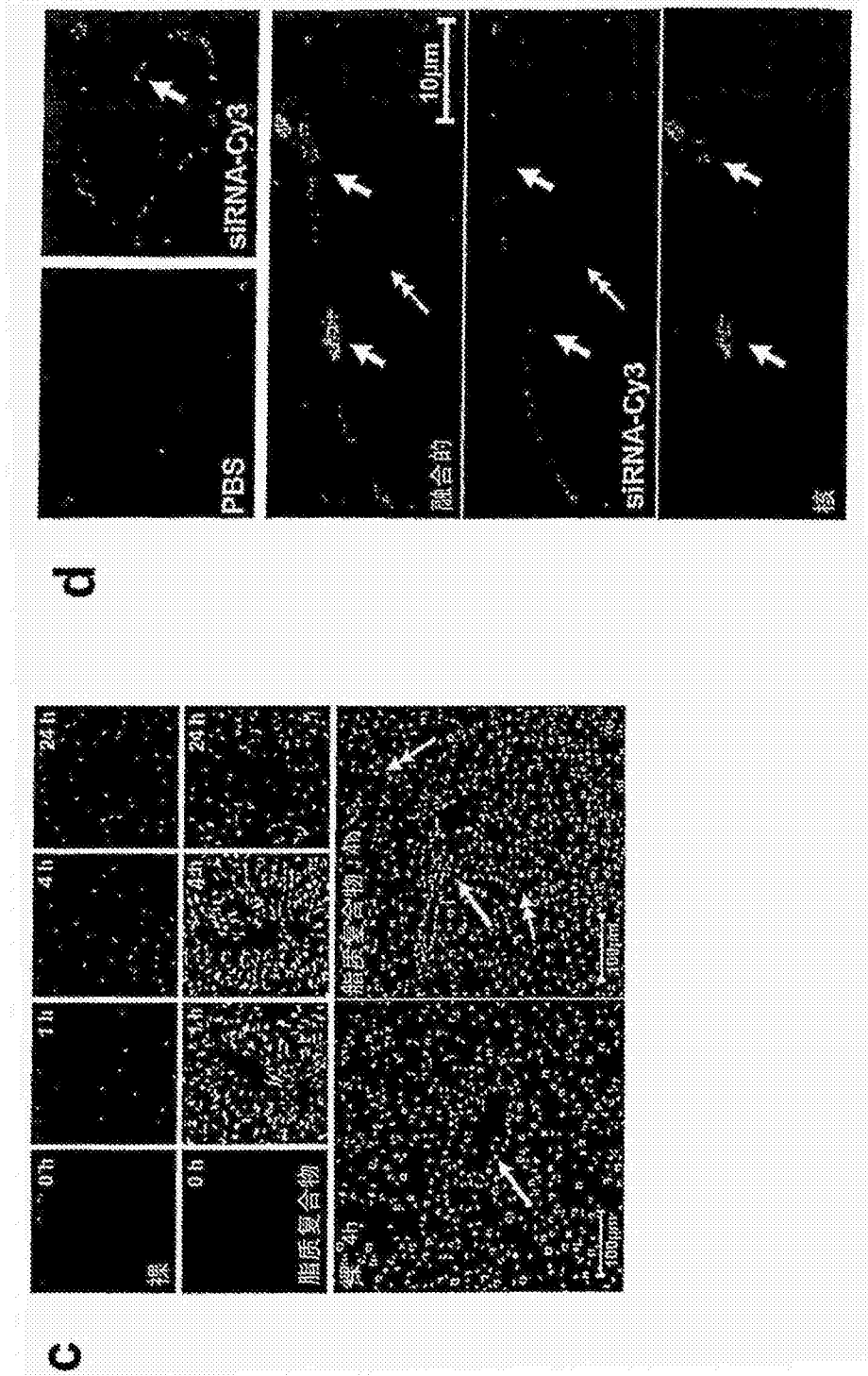


图 18/2

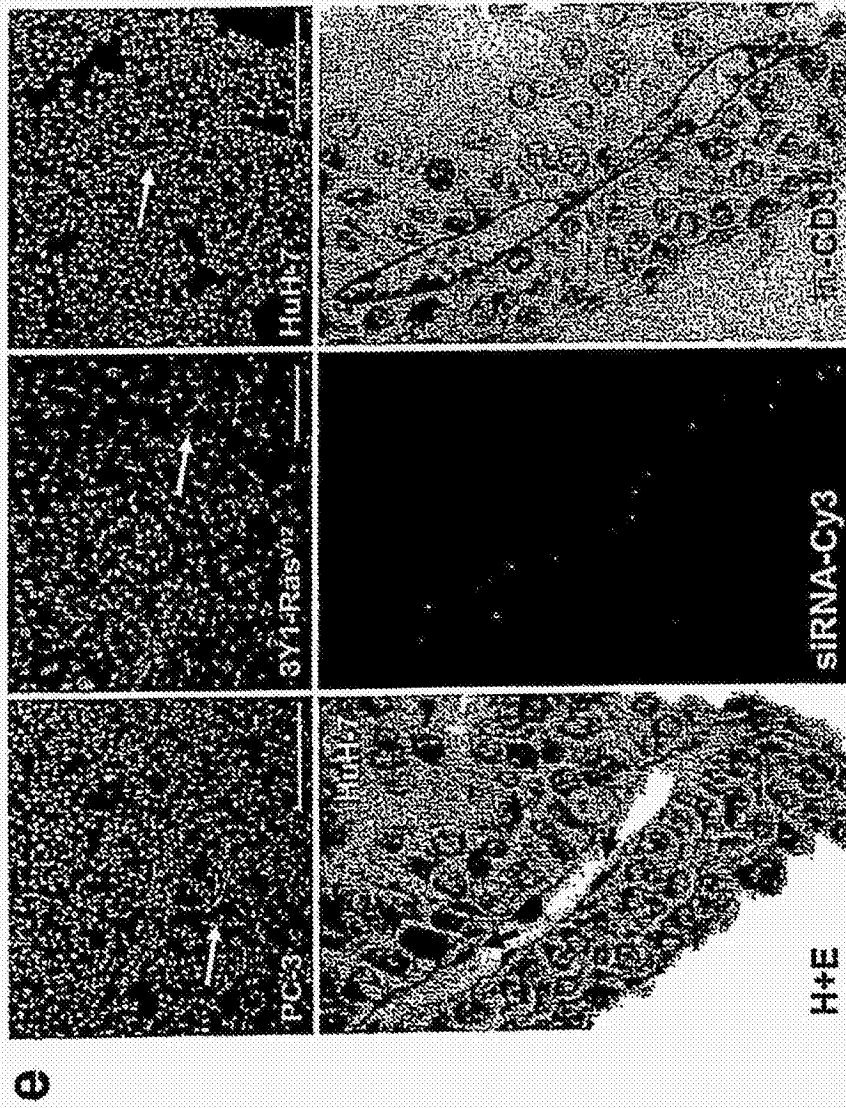


图 18/3

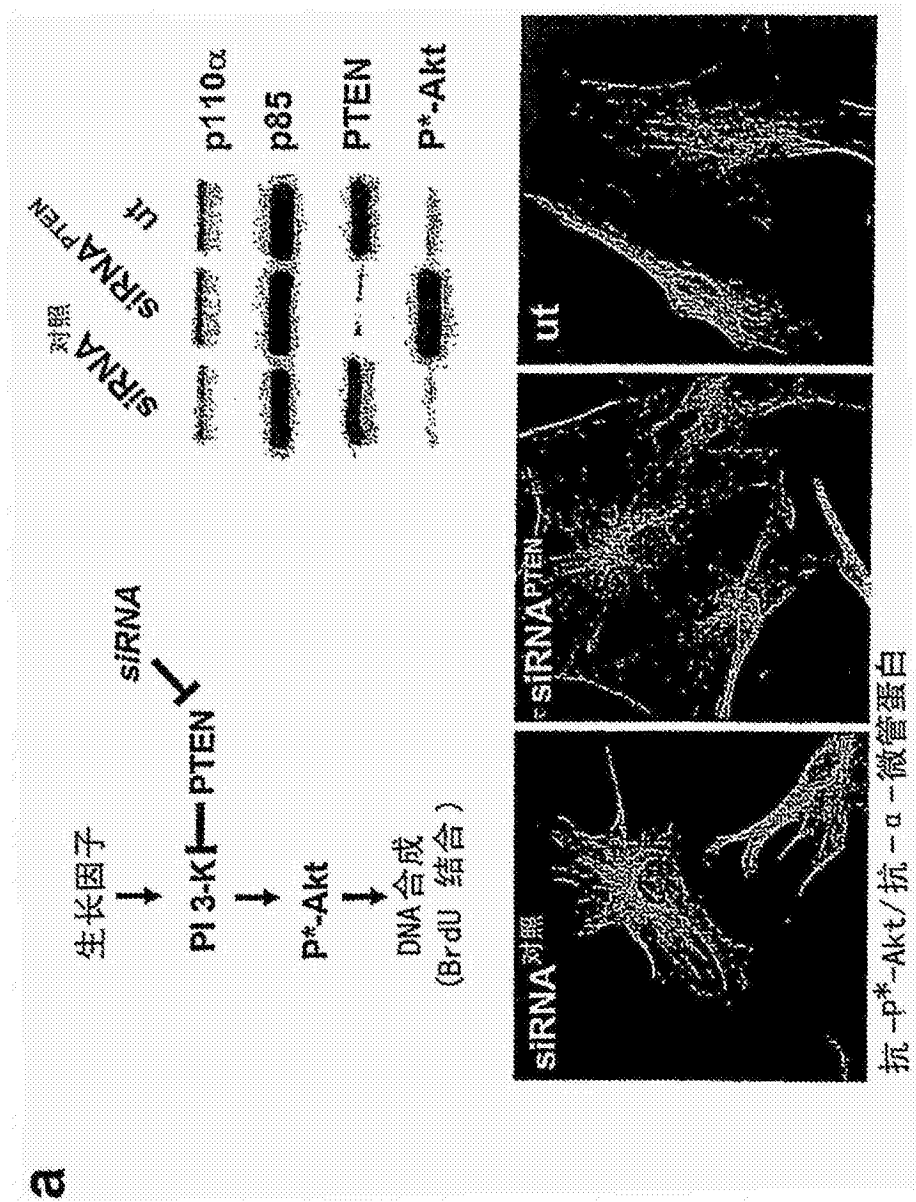


图 19/1

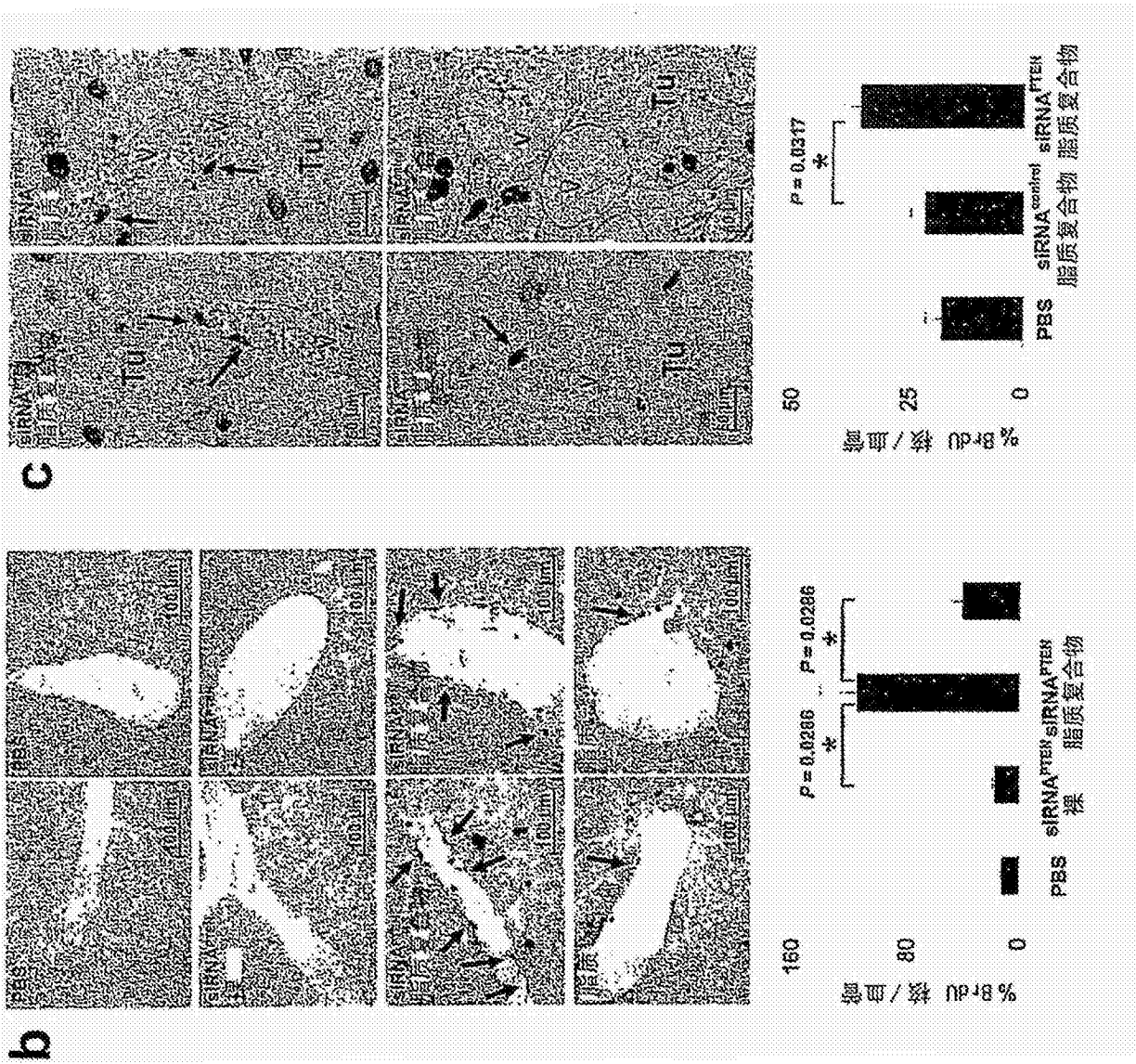


图 19/2

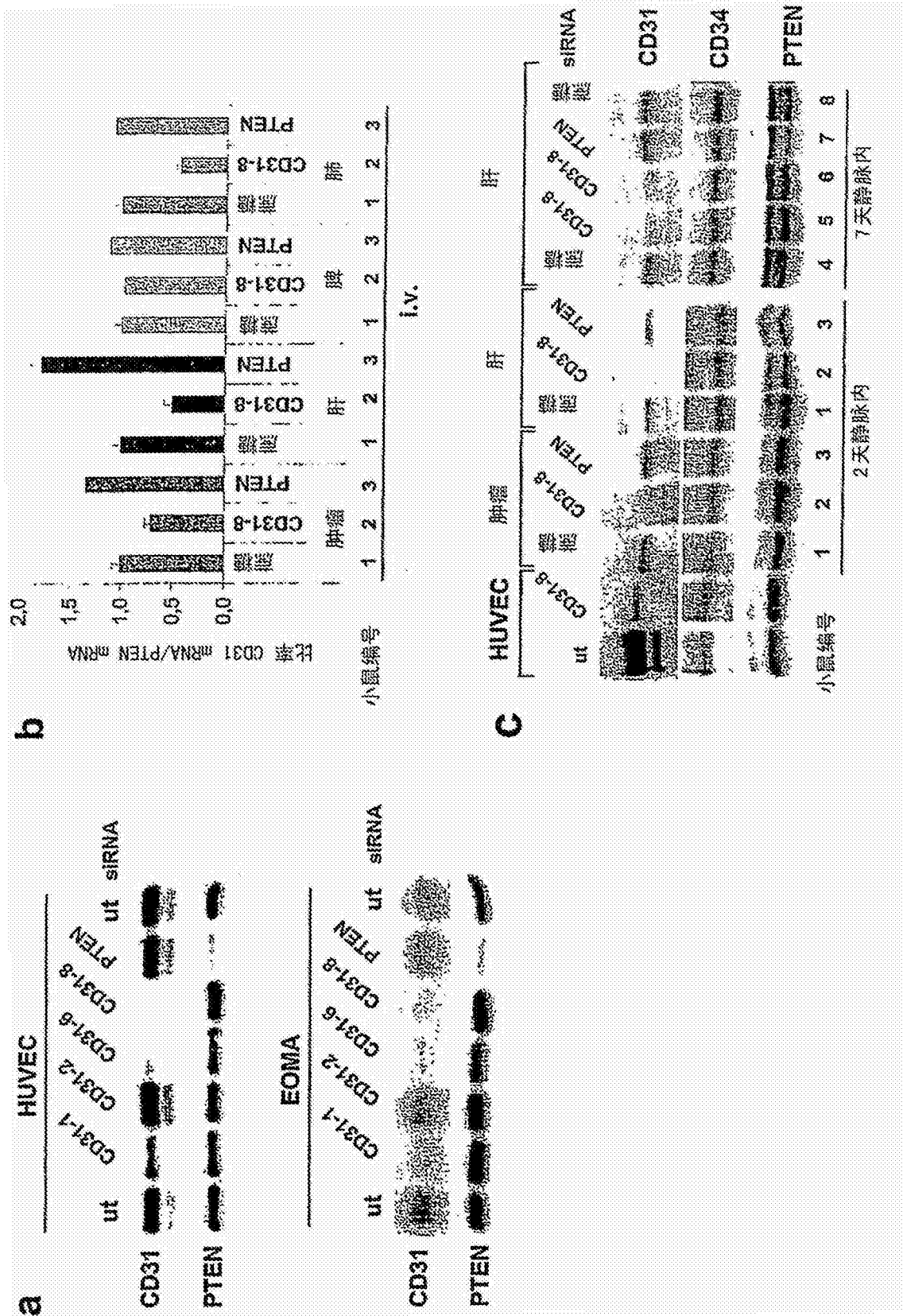


图 20/1

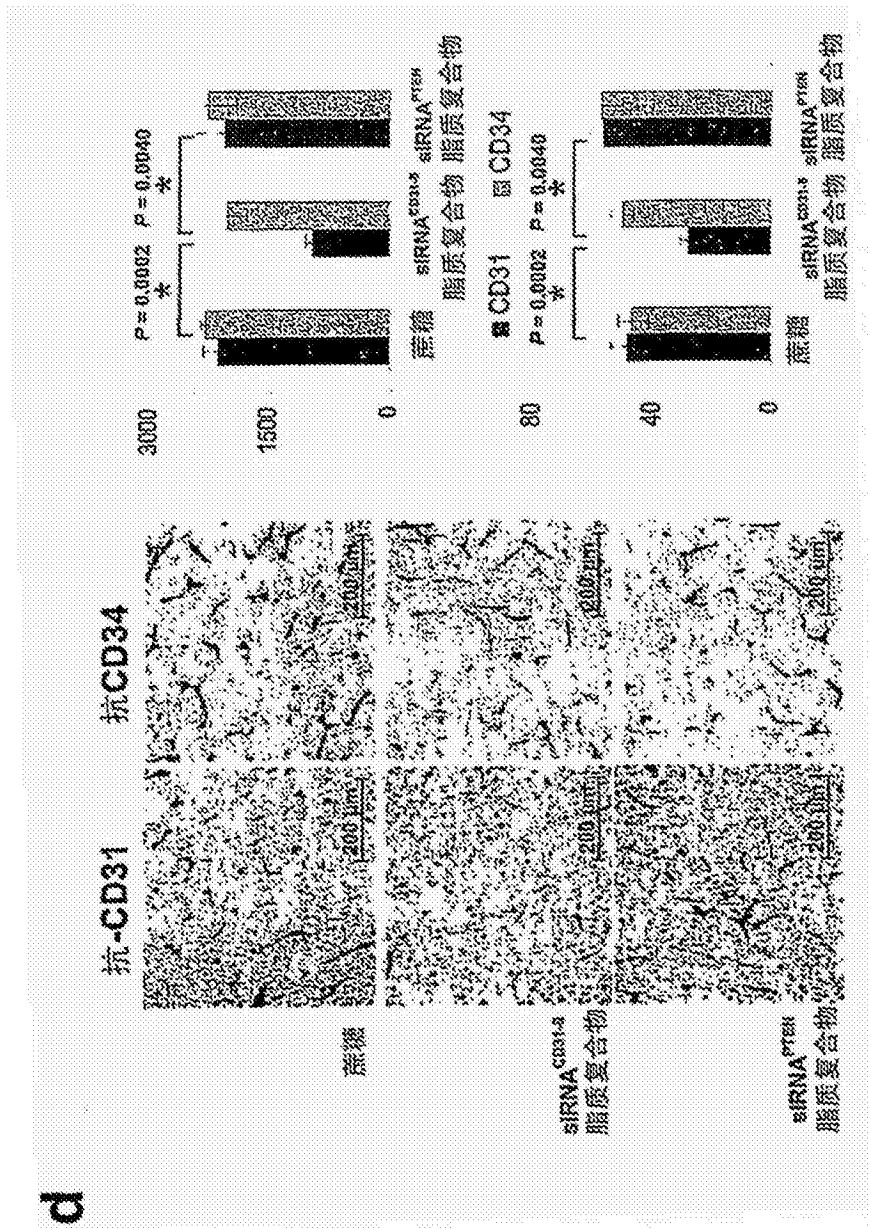


图 20/2

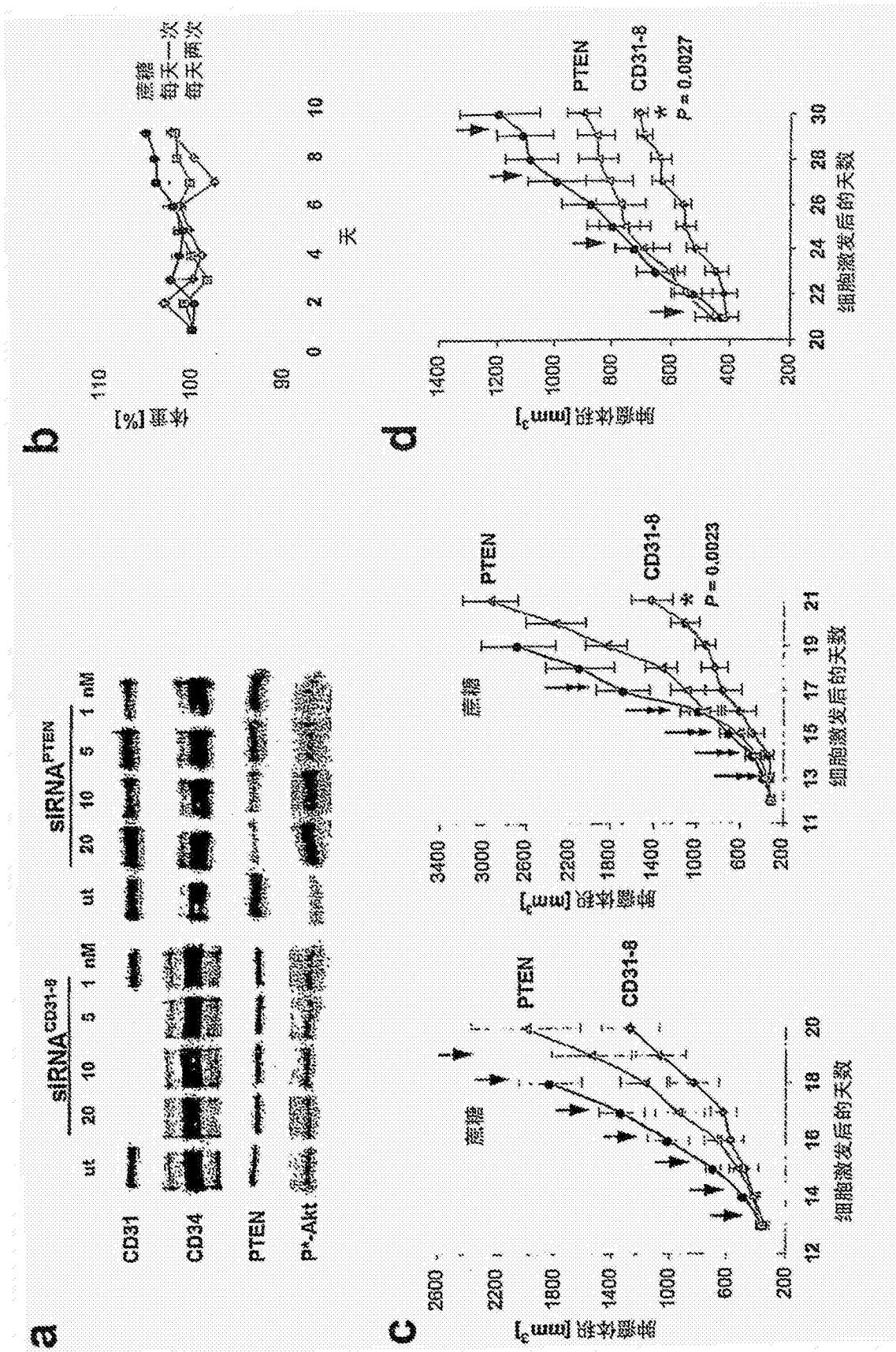


图 21