(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119998259 A
(43)申请公布日 2025.05.13

(21)申请号 202380060452.6
(22)申请日 2023.06.23
(30)优先权数据
63/355,024 2022.06.23 US
63/386,482 2022.12.07 US
63/464,022 2023.05.04 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2025.02.18
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2023/026160 2023.06.23
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/250197 EN 2023.12.28
(71)申请人 特恩生物技术公司
地址 美国加利福尼亚州
(72)发明人 M•朱马 Z•卡迈勒 D•巴尔曼
(74)专利代理机构 北京聿华联合知识产权代理有限公司 11611
专利代理师 刘华联
(51)Int.Cl.
C07C 219/06(2006.01)
C07C 229/12(2006.01)
C07C 229/22(2006.01)
C07C 233/20(2006.01)
C07D 205/04(2006.01)
C07D 207/08(2006.01)
C07D 207/16(2006.01)
C07D 295/15(2006.01)
C07D 207/327(2006.01)
A61K 9/00(2006.01)
C12N 15/00(2006.01)

权利要求书50页 说明书151页 附图16页

(54)发明名称

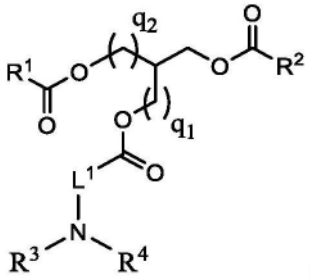
脂质结构及包含其的组合物

(57)摘要

本公开涉及可电离脂质和包含所述可电离脂质的组合物。描述了脂质-纳米颗粒组合物,其由可电离脂质任选地与其他脂质组分诸如辅助脂质、稳定脂质和结构脂质以及治疗剂诸如核酸组合而组成,以用于递送至哺乳动物细胞或器官。

CN 119998259 A

1.一种式(I)可电离脂质：



(I)

或其药学上可接受的盐或立体异构体，

其中：

L^1为C_1-C_6亚烷基；

R^1为C_6-C_{20}烯基；

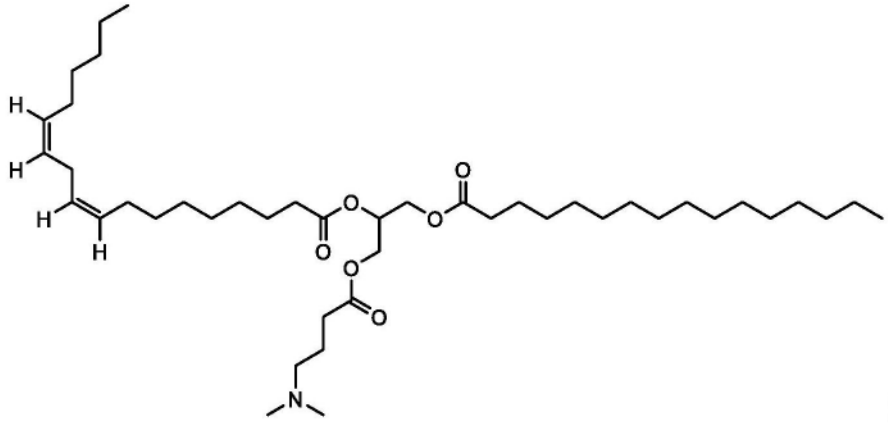
R^2为C_6-C_{20}烷基；

R^3和R^4各自独立地为H或C_1-C_3烷基；

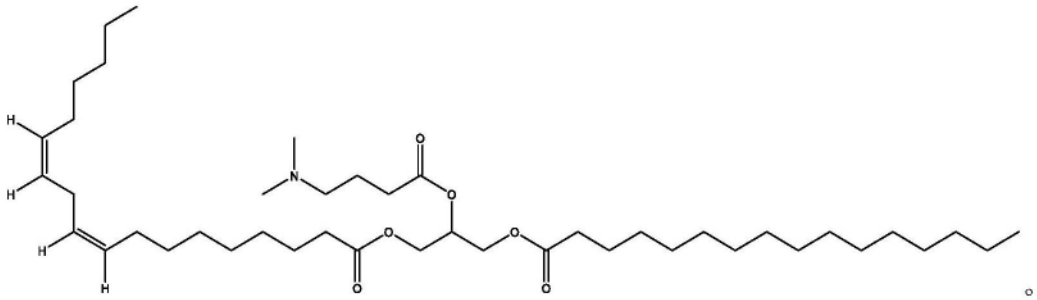
q_1不存在或为1；并且

q_2不存在或为1。

2.根据权利要求1所述的可电离脂质，其具有以下结构中的一种结构：

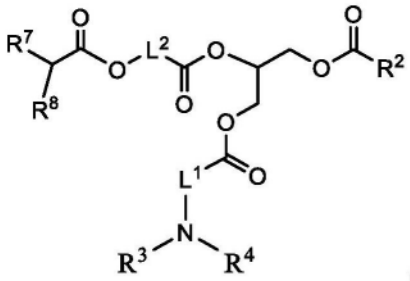


或



。

3.一种式(I-A)可电离脂质：



(I-A)

或其药学上可接受的盐或立体异构体，

其中：

L^1为C_1-C_6亚烷基；

L^2为C_1-C_8亚烷基；

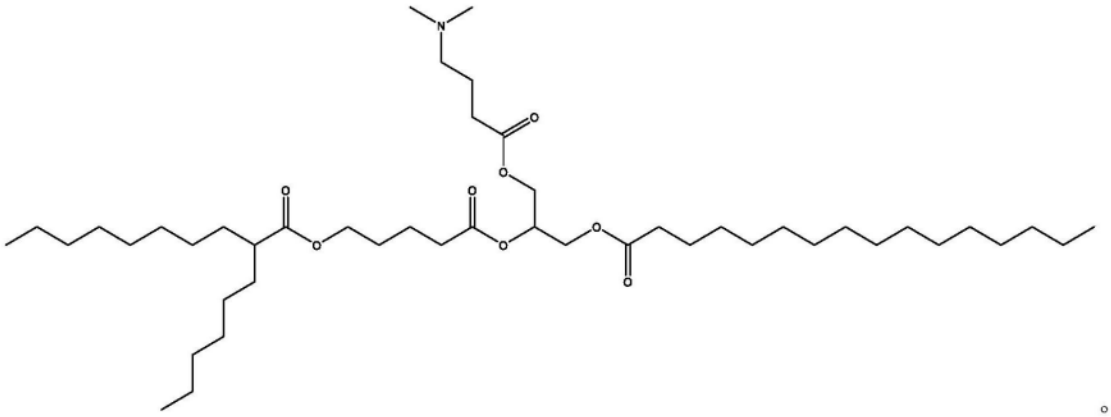
R^2为C_6-C_{20}烷基；

R^3和R^4各自独立地为H或C_1-C_3烷基；

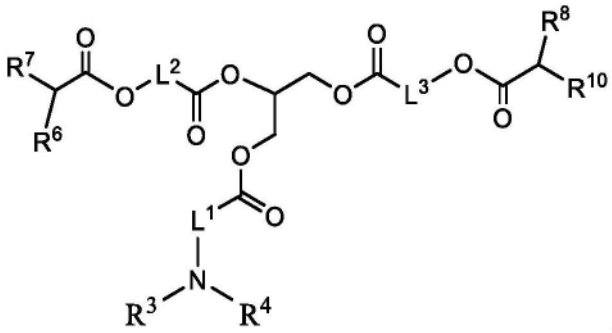
R^7为C_4-C_{20}烷基；并且

R^8为C_4-C_{20}烷基。

4.根据权利要求3所述的可电离脂质，其具有以下结构：



5.一种式(I-B)可电离脂质：



(I-B)

或其药学上可接受的盐或立体异构体，

其中：

L^1为C_1-C_6亚烷基；

L^2为C_1-C_8亚烷基；

L^3为C_1-C_8亚烷基；

R^3和R^4各自独立地为H、C_1-C_4烷基、-CH_2-环丙基、-$(CH_2)_n$OH,或者R^3与R^4一起形成N-杂环;

R^6为C_4-C_{20}烷基;

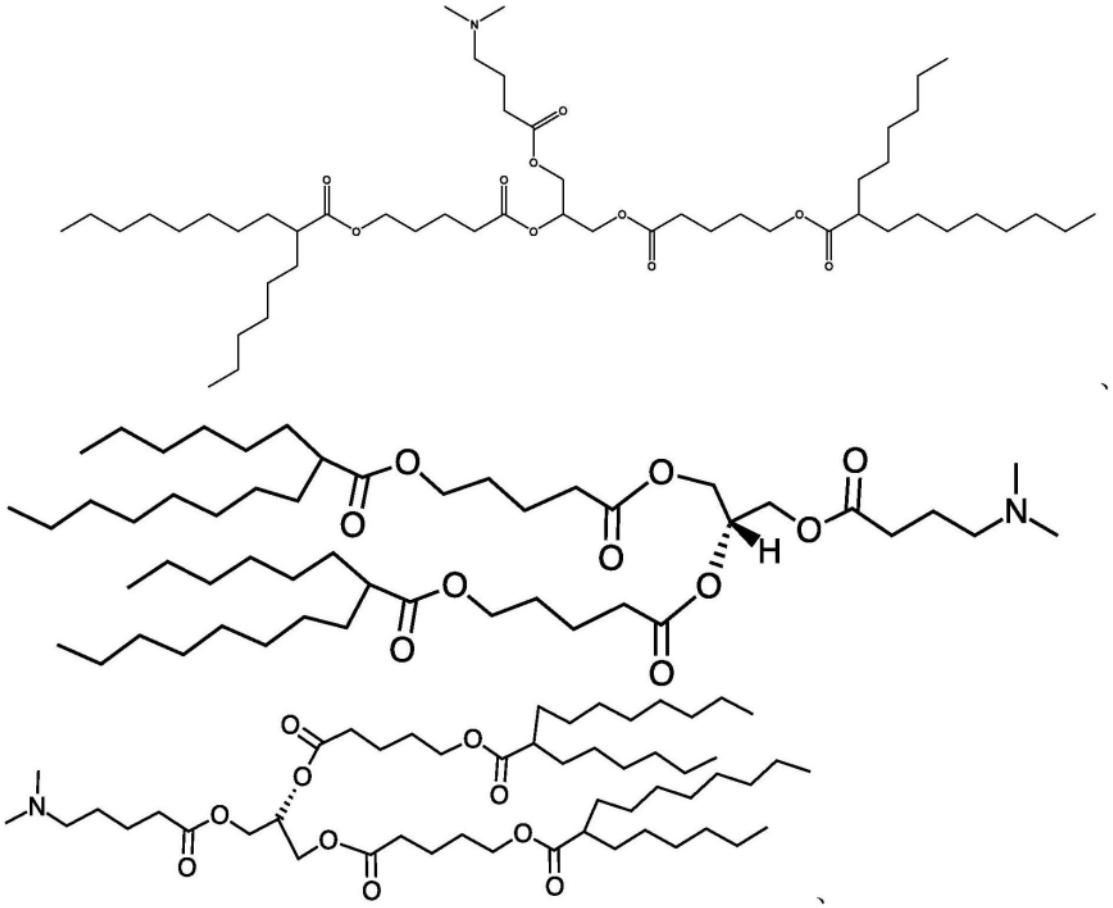
R^7为C_4-C_{20}烷基;

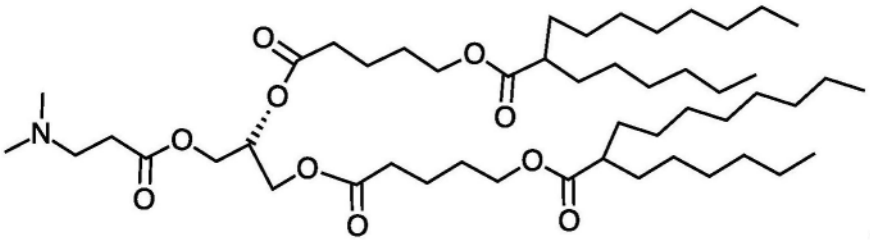
R^8为C_4-C_{20}烷基;

R^{10}为C_4-C_{20}烷基;并且

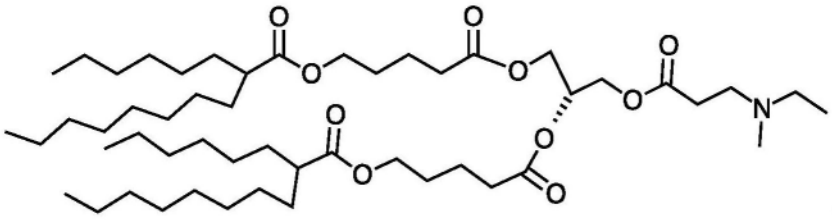
n为2、3或4。

6.根据权利要求5所述的可电离脂质,其中所述可电离脂质具有以下结构中的一种结构:

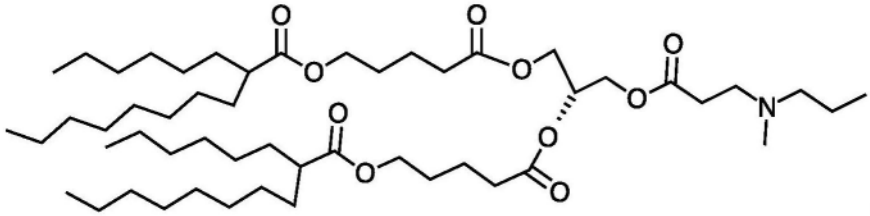




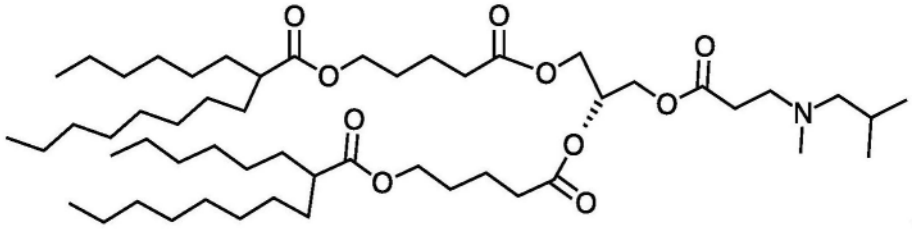
、



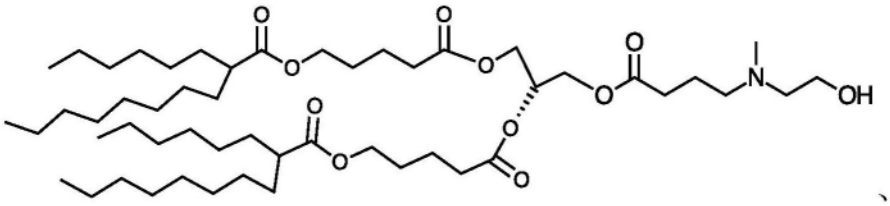
、



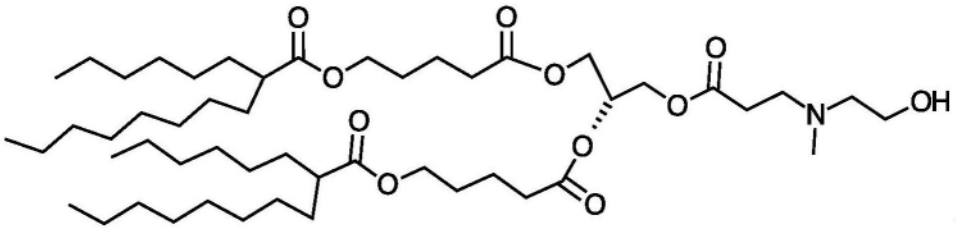
、



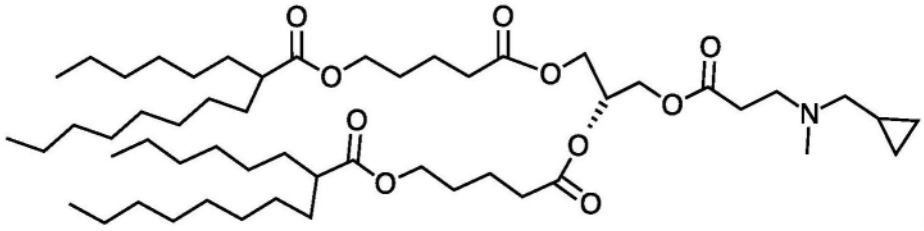
、



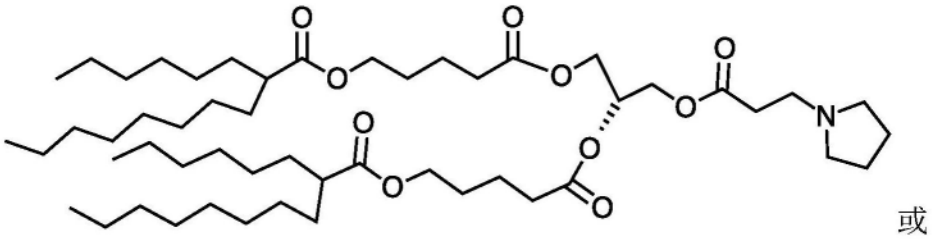
、



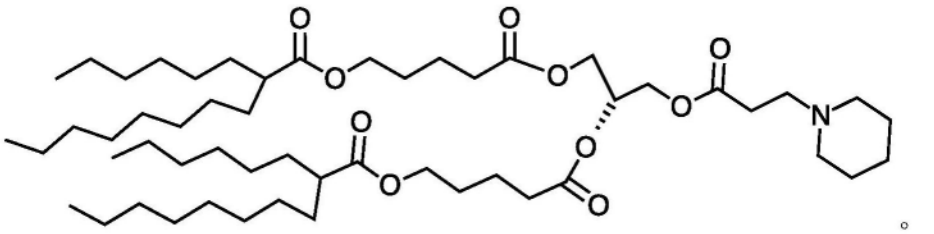
、



、

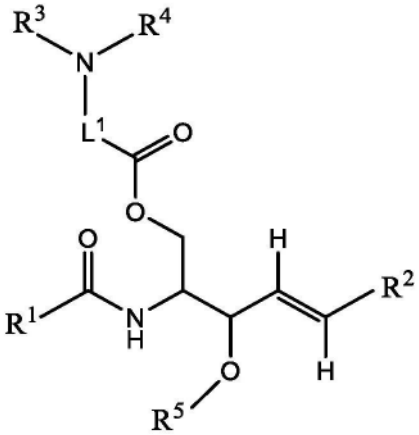


或



。

7.一种式(II)可电离脂质:



(II)

或其药学上可接受的盐或立体异构体,

其中:

L^1为C_1-C_6亚烷基;

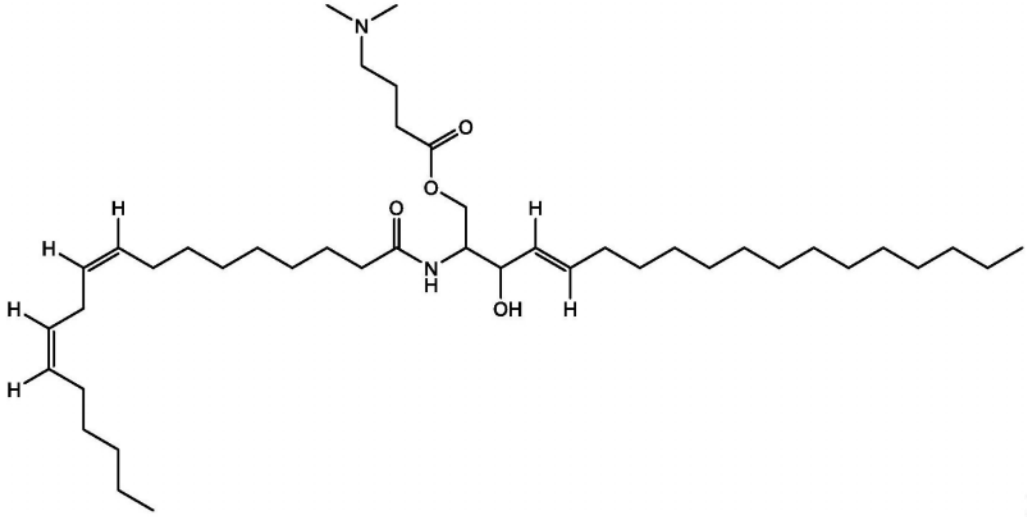
R^1为C_6-C_{20}烯基;

R^2为C_6-C_{20}烷基;

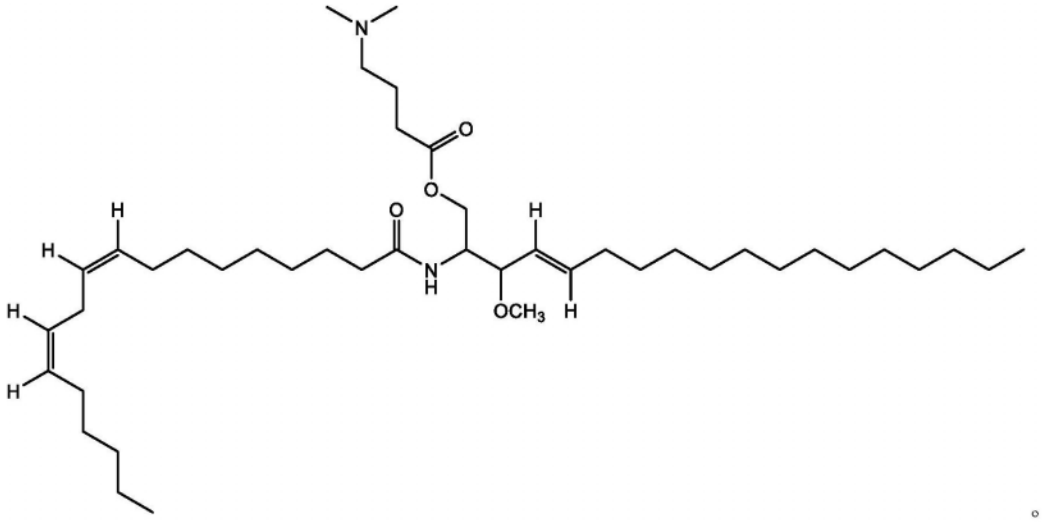
R^3和R^4各自独立地为H或C_1-C_3烷基;并且

R^5为H或C_1-C_3烷基。

8.根据权利要求7所述的可电离脂质,其具有以下结构中的一种结构:

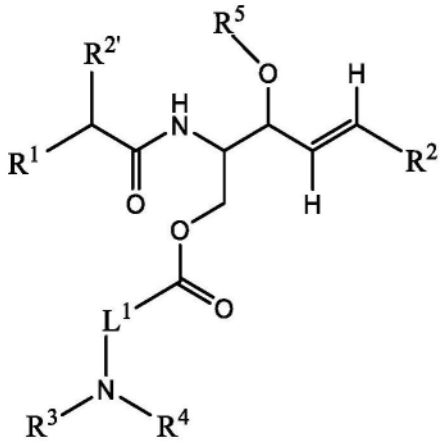


或



。

9.一种式(III)可电离脂质：



(III)

或其药学上可接受的盐或立体异构体,其中：

L^1为C_1-C_6亚烷基；

R^1为C_6-C_{20}烯基；

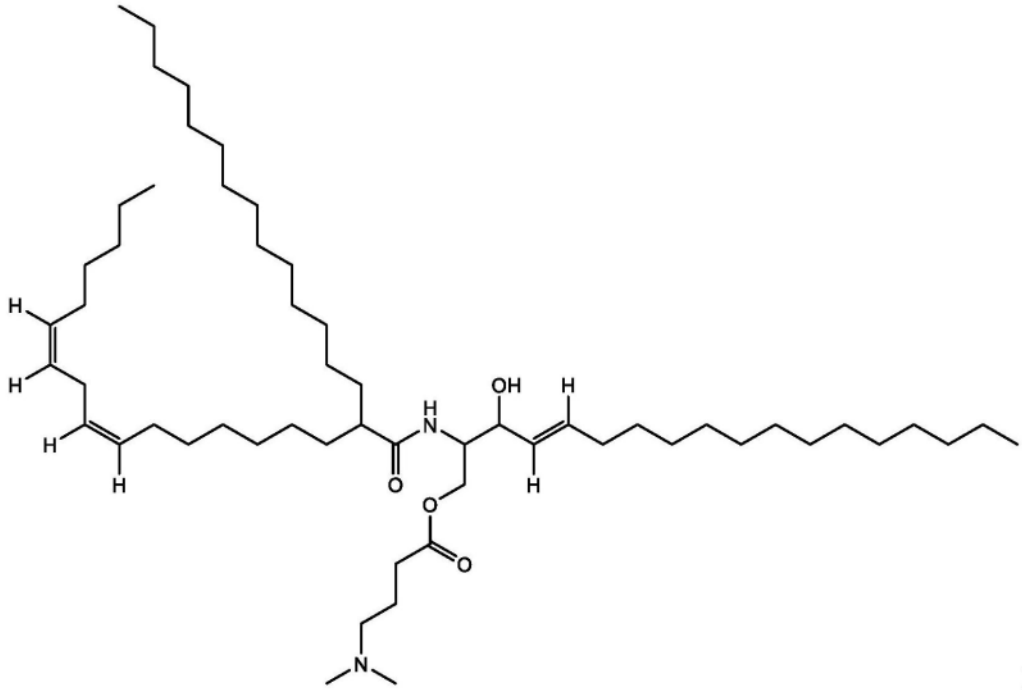
R^2为C_6-C_{20}烷基；

$R^{2'}$为C_6-C_{20}烷基；

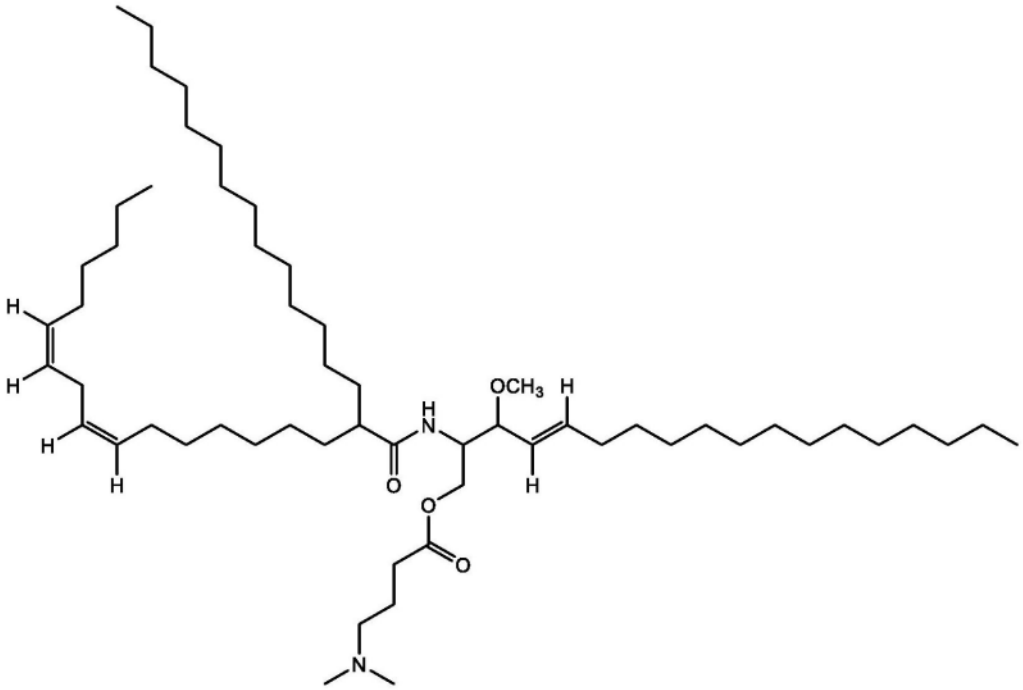
R^3和R^4各自独立地为H或C_1-C_3烷基;并且

R^5为H或C_1-C_3烷基。

10.根据权利要求9所述的可电离脂质,其具有以下结构中的一种结构:

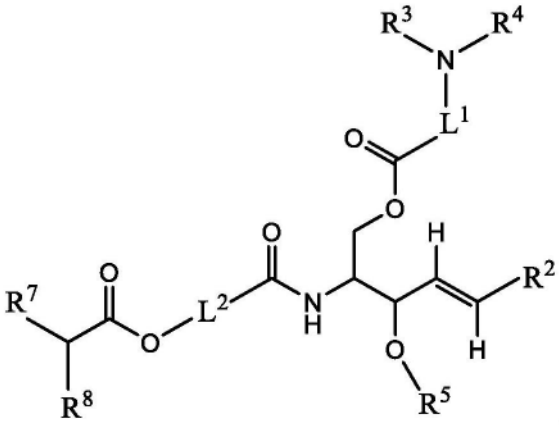


或



。

11.一种式(IV)可电离脂质:



(IV)

或其药学上可接受的盐或立体异构体，

其中：

L^1为C_1-C_6亚烷基；

L^2为C_1-C_8亚烷基；

R^2为C_6-C_{20}烷基；

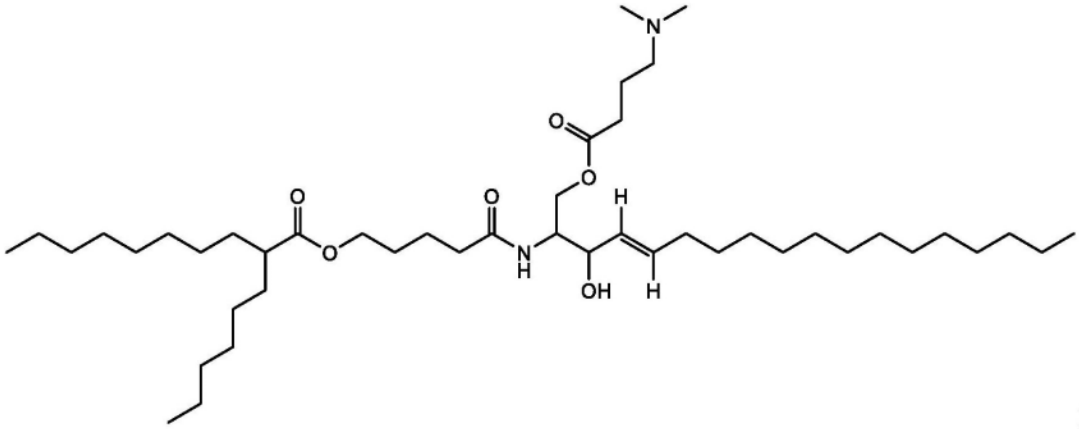
R^3和R^4各自独立地为H或C_1-C_3烷基；

R^5为H或C_1-C_3烷基；

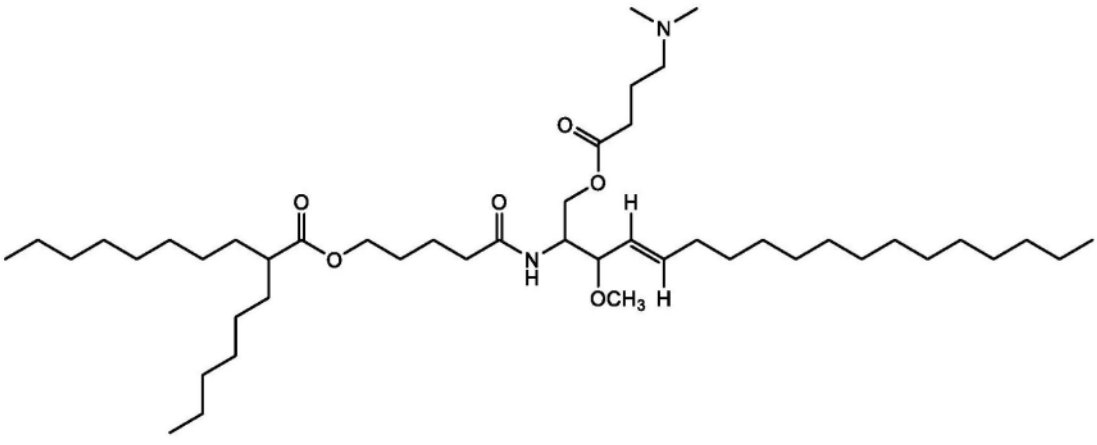
R^7为C_4-C_{20}烷基；并且

R^8为C_4-C_{20}烷基。

12.根据权利要求11所述的可电离脂质，其具有以下结构中的一种结构：

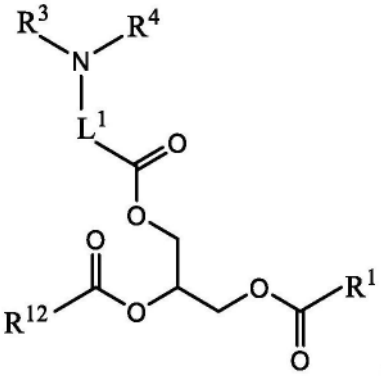


或



。

13.一种式(V)可电离脂质:



(V)

或其药学上可接受的盐或立体异构体,

其中:

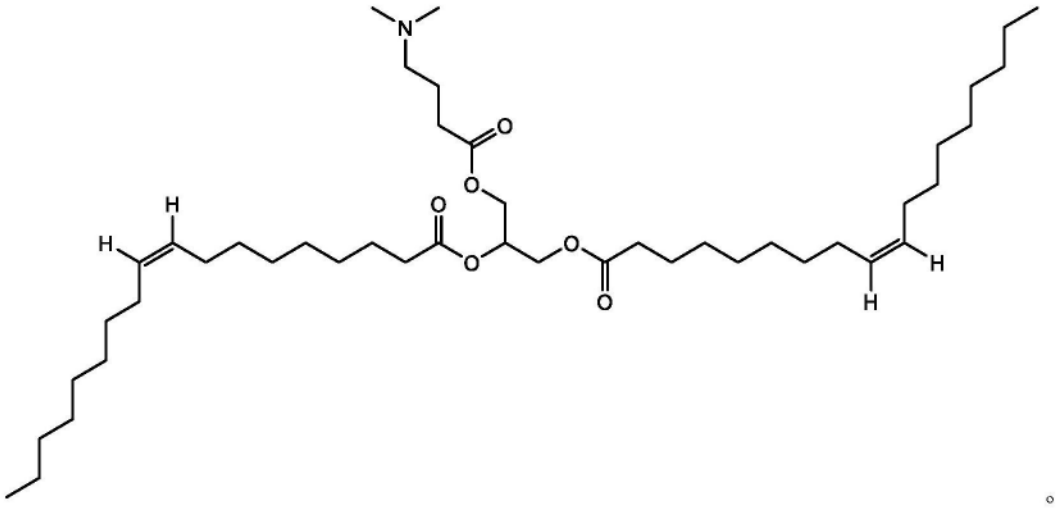
L^1为C_1-C_6亚烷基;

R^1为C_6-C_{20}烯基;

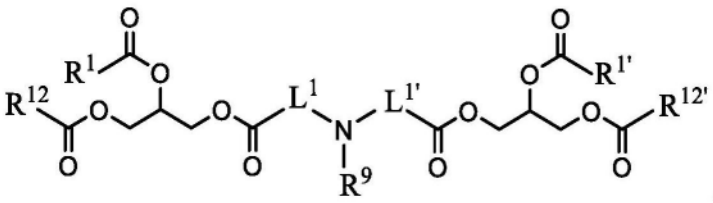
R^3和R^4各自独立地为H或C_1-C_3烷基;并且

R^{12}为C_6-C_{20}烯基。

14.根据权利要求13所述的可电离脂质,其具有以下结构:



15.一种式(VI)可电离脂质:



(VI)

或其药学上可接受的盐或立体异构体,

其中:

L^1为C_1-C_6亚烷基;

$L^{1'}$为C_1-C_6亚烷基;

R^1为C_6-C_{20}烯基;

R^{1}'为C_6-C_{20}烯基;

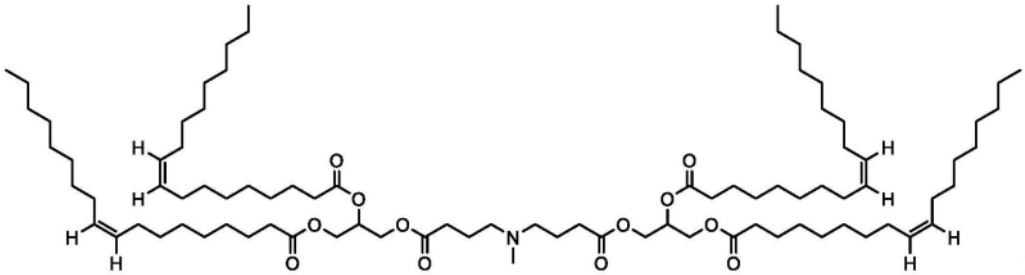
R^{9}为H、C_1-C_6烷基或-$(CH_2)_n$OH;

R^{12}为C_6-C_{20}烯基;

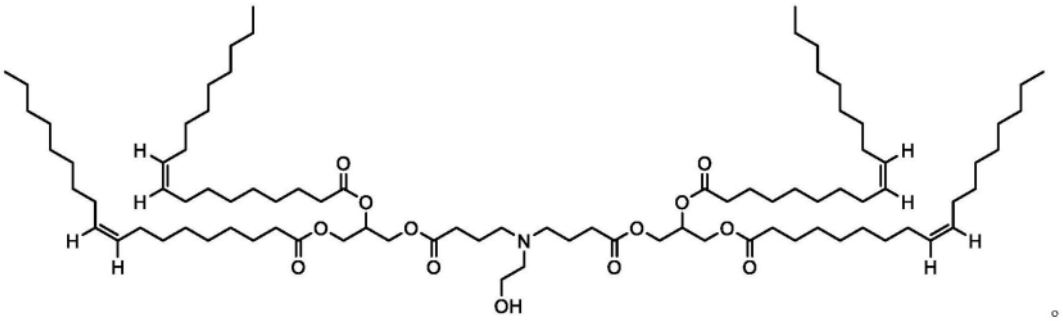
R^{12}'为C_6-C_{20}烯基;并且

n为2、3或4。

16.根据权利要求15所述的可电离脂质,其具有以下结构中的一种结构:

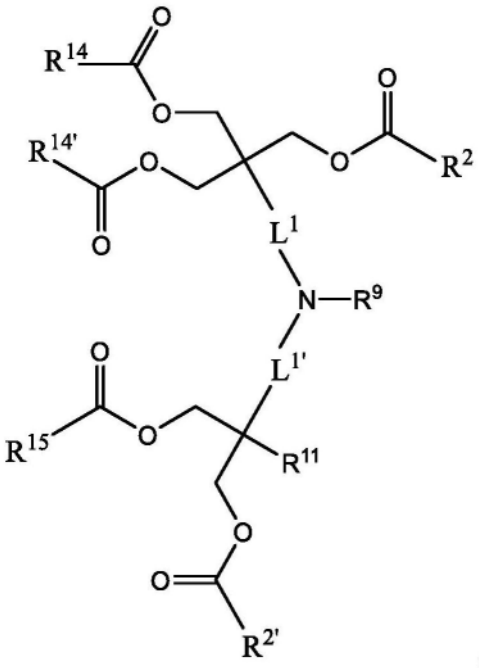


或



。

17.一种式(VII)可电离脂质:



(VII)

或其药学上可接受的盐或立体异构体,

其中:

L^{1}为C_1-C_6亚烷基;

L^{1}'为C_1-C_6亚烷基;

R^2为C_6-C_{20}烷基;

R^2'为C_6-C_{20}烷基;

R^9为H、C_1-C_6烷基或-$(CH_2)_n$OH;

R^{11}为H或-(CH_2)OC(=O)R^{16};

R^{14}为C_6-C_{20}烷基;

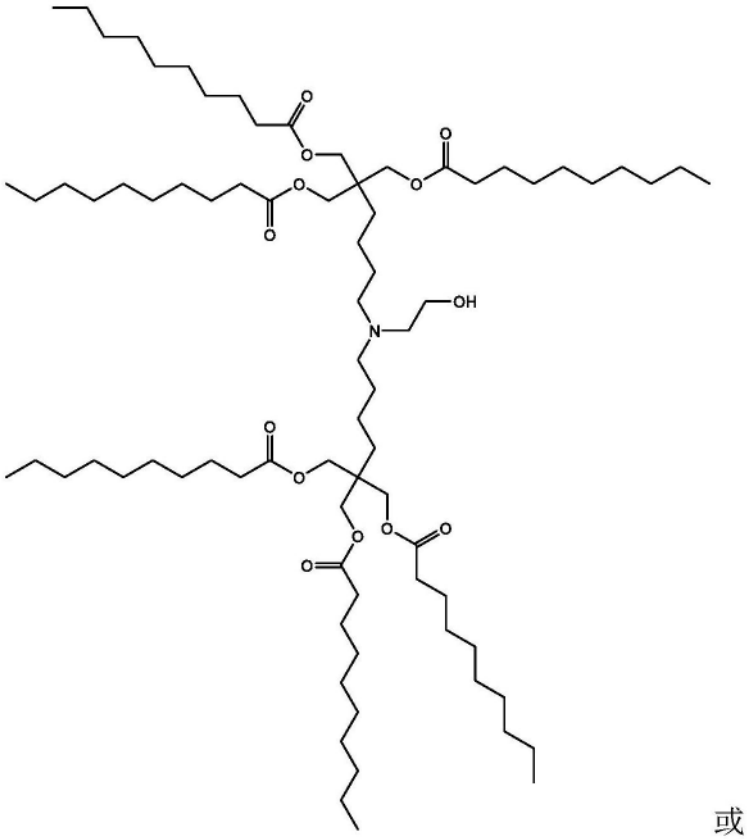
R^{14}'为C_6-C_{20}烷基;

R^{15}为C_6-C_{20}烷基;

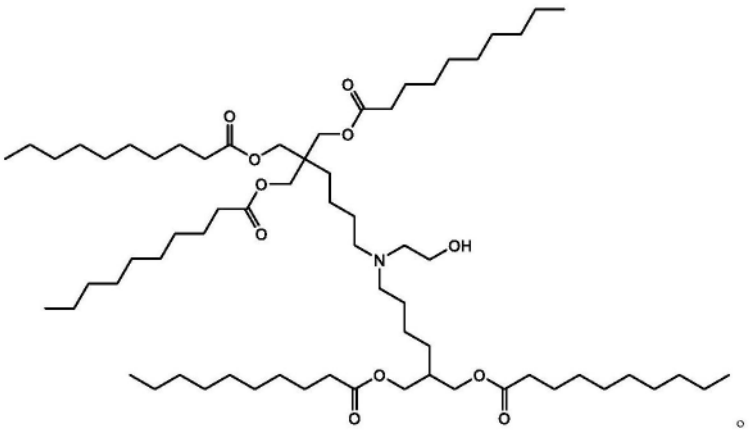
R^{16}为C_6-C_{20}烷基;并且

n为2、3或4。

18.根据权利要求17所述的可电离脂质,其具有以下结构中的一种结构:

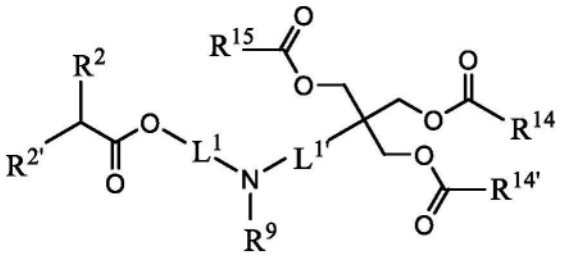


或



。

19.一种式(VIII)可电离脂质:



(VIII)

或其药学上可接受的盐或立体异构体,其中:

L^1为C_1-C_6亚烷基;

L^1'为C_1-C_6亚烷基;

R^2为C_6-C_{20}烷基;

R^2'为C_6-C_{20}烷基;

R^9为H、C_1-C_6烷基或-$(CH_2)_nOH$;

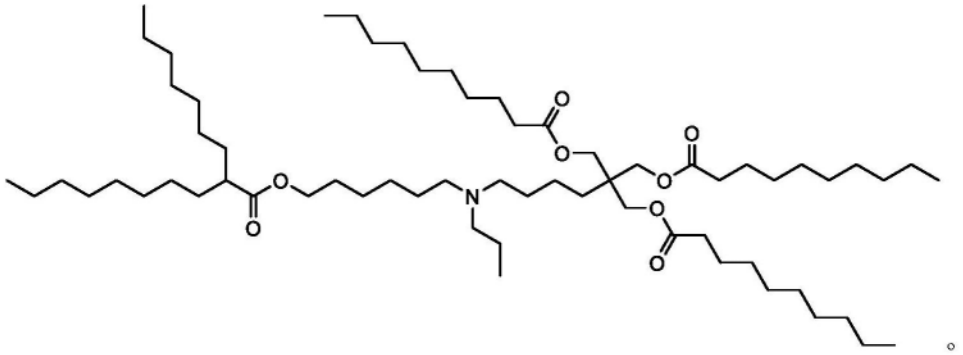
R^{14}为C_6-C_{20}烷基;

R^{14}'为C_6-C_{20}烷基;

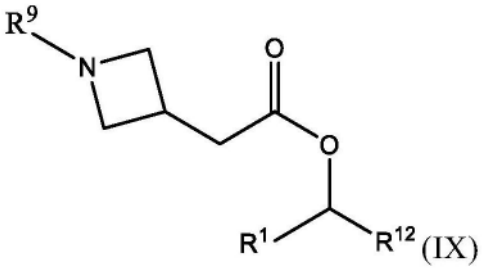
R^{15}为C_6-C_{20}烷基;并且

n为2、3或4。

20.根据权利要求19所述的可电离脂质,其具有以下结构:



21.一种式(IX)可电离脂质:



(IX)

或其药学上可接受的盐或立体异构体,

其中:

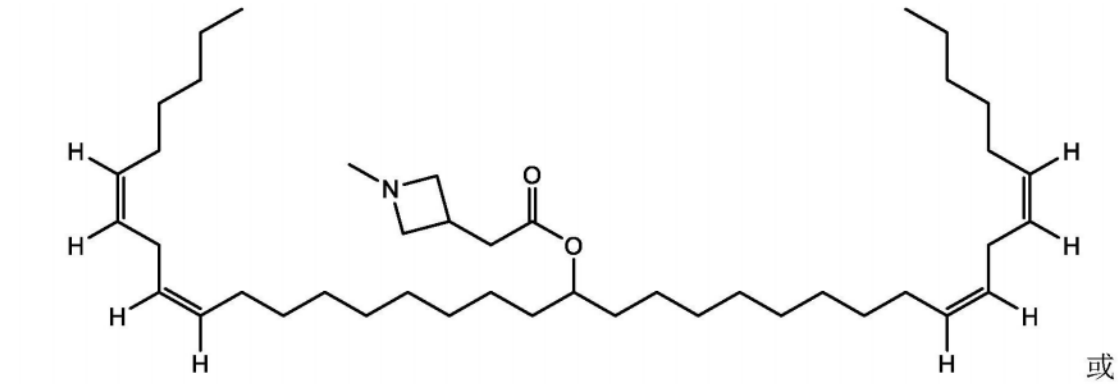
R^1为C_6-C_{20}烯基;

R^9为H、C_1-C_6烷基或-$(CH_2)_nOH$;

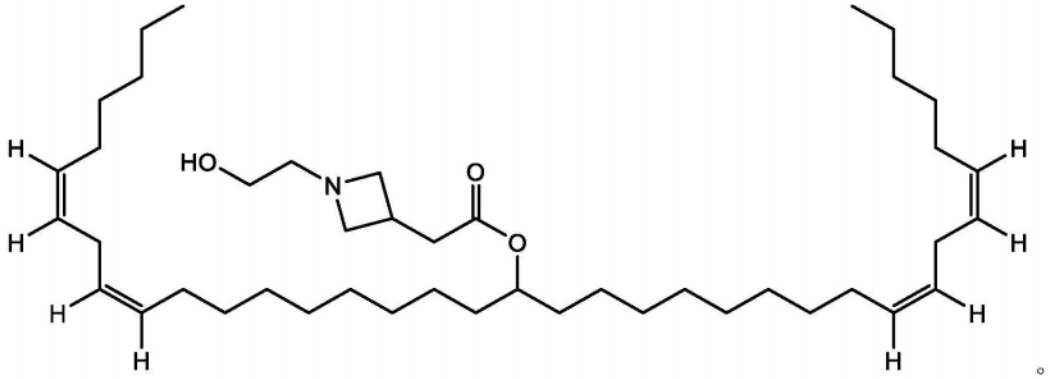
R^{12}为C_6-C_{20}烯基;并且

n为2、3或4。

22.根据权利要求21所述的可电离脂质,其具有以下结构中的一种结构:

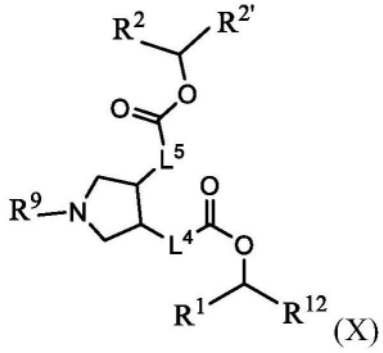


或



。

23.一种式(X)可电离脂质:



(X)

或其药学上可接受的盐或立体异构体,其中:

L^4不存在或为C_1-C_6亚烷基;

L^5不存在或为C_1-C_6亚烷基;

R^1为C_6-C_{20}烯基;

R^2为C_6-C_{20}烷基;

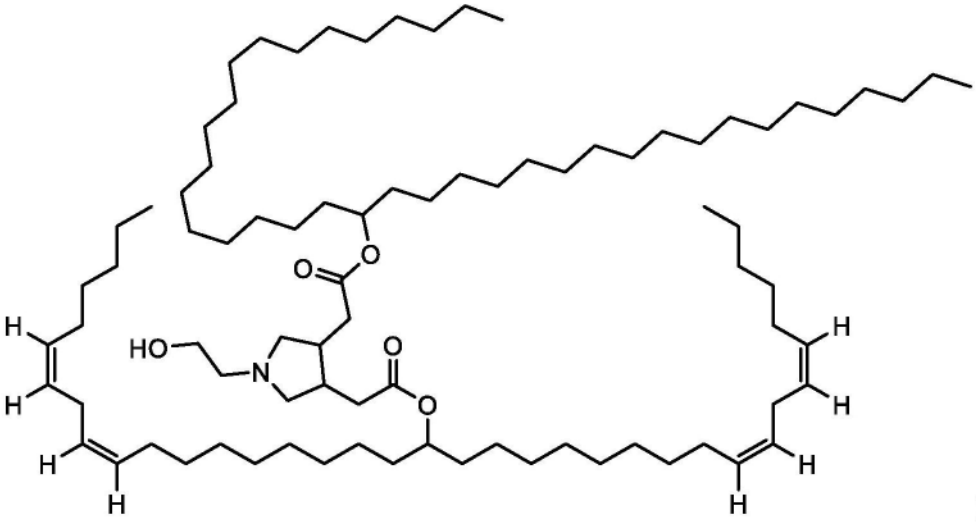
$R^{2'}$为C_6-C_{20}烷基;

R^9为H、C_1-C_6烷基或-$(CH_2)_nOH$;

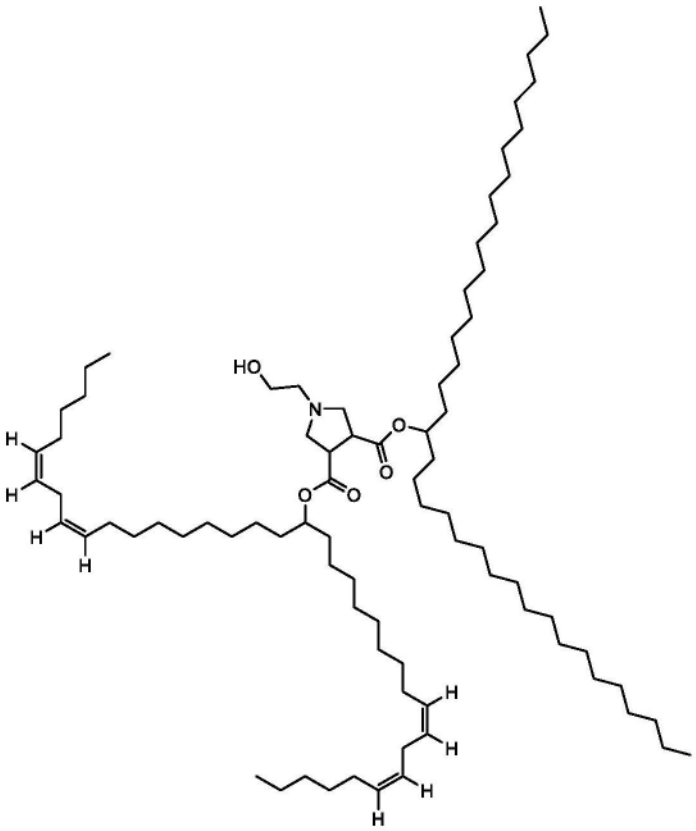
R^{12}为C_6-C_{20}烯基;并且

n为2、3或4。

24.根据权利要求23所述的可电离脂质,其具有以下结构中的一种结构:

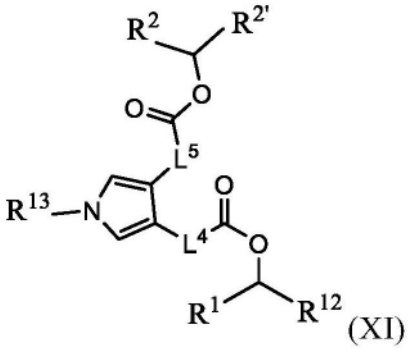


或



。

25.一种式(XI)可电离脂质：



(XI)

或其药学上可接受的盐或立体异构体，

其中：

L^4不存在或为C_1-C_6亚烷基；

L^5不存在或为C_1-C_6亚烷基；

R^1为C_6-C_{20}烯基；

R^2为C_6-C_{20}烷基；

$R^{2'}$为C_6-C_{20}烷基；

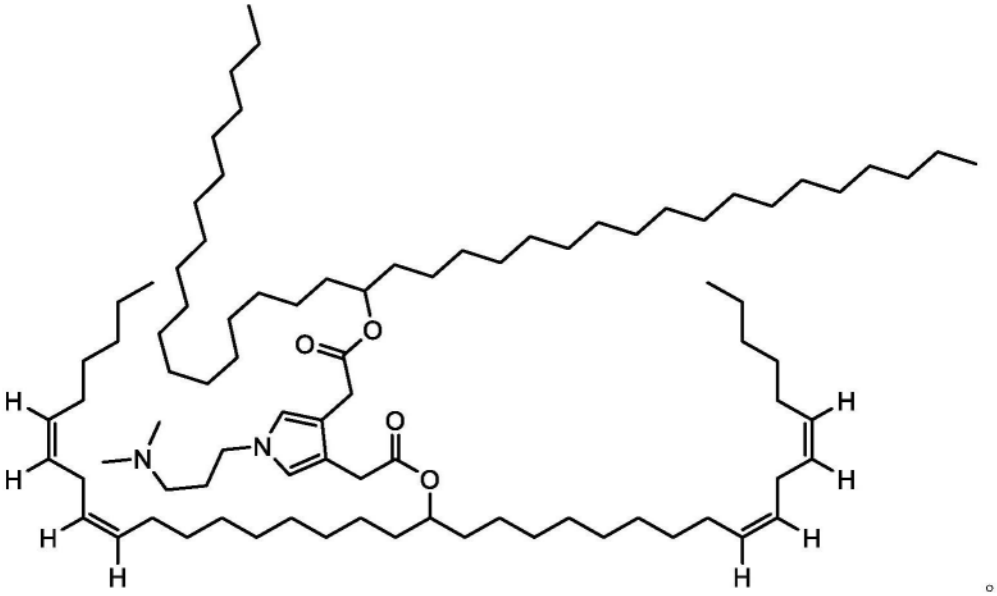
R^{12}为C_6-C_{20}烯基；

R^{13}为H、C_1-C_6烷基、-$(CH_2)_n$OH或-$(CH_2)_q$N$(CH_3)_2$；

n为2、3或4；并且

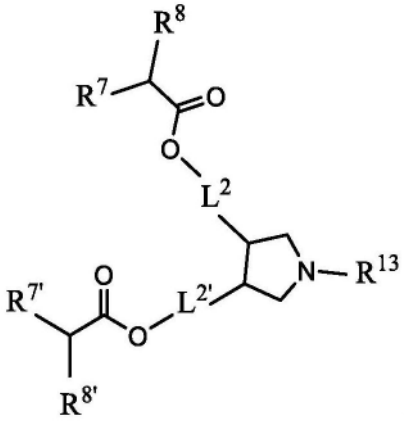
q为2、3或4。

26.根据权利要求25所述的可电离脂质，其具有以下结构：



。

27.一种式(XII)可电离脂质：



(XII)

或其药学上可接受的盐或立体异构体，

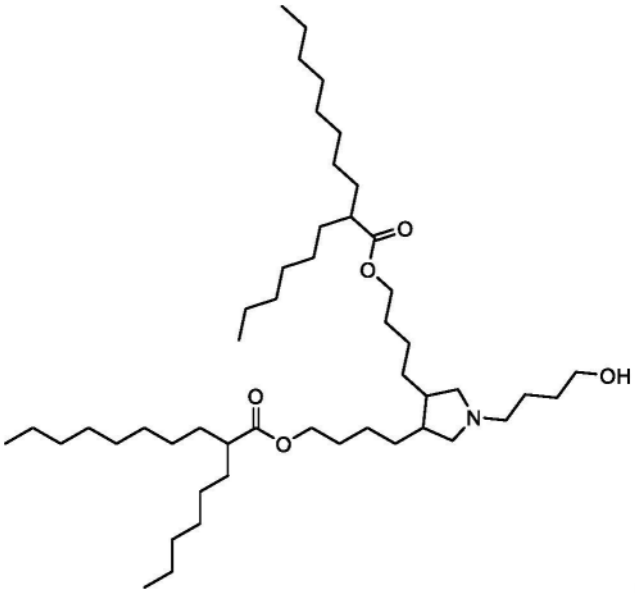
其中：

L^2为C_1-C_8亚烷基；

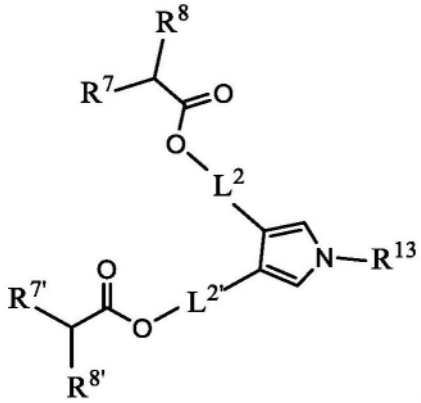
$L^{2'}$为C_1-C_8亚烷基；

R^7为C_4-C_{20}烷基;
$R^{7'}$为C_4-C_{20}烷基;
R^8为C_4-C_{20}烷基;
$R^{8'}$为C_4-C_{20}烷基;
R^{13}为H、C_1-C_6烷基、-$(CH_2)_nOH$或-$(CH_2)_qN(CH_3)_2$;
n为2、3或4;并且
q为2、3或4。

28.根据权利要求27所述的可电离脂质,其具有以下结构:



29.一种式(XIII)可电离脂质:



(XIII)

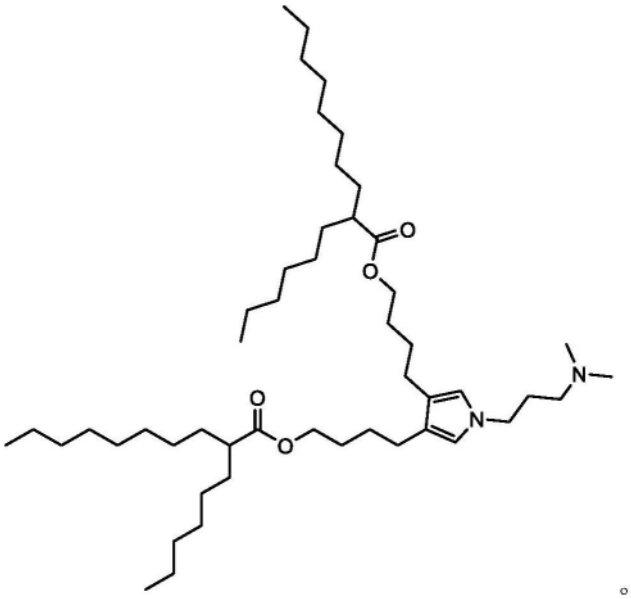
或其药学上可接受的盐或立体异构体,
其中:
L^2为C_1-C_8亚烷基;
$L^{2'}$为C_1-C_8亚烷基;
R^7为C_4-C_{20}烷基;
$R^{7'}$为C_4-C_{20}烷基;
R^8为C_4-C_{20}烷基;
$R^{8'}$为C_4-C_{20}烷基;

R^{13}为H、C_1-C_6烷基、-$(CH_2)_nOH$或-$(CH_2)_qN(CH_3)_2$;

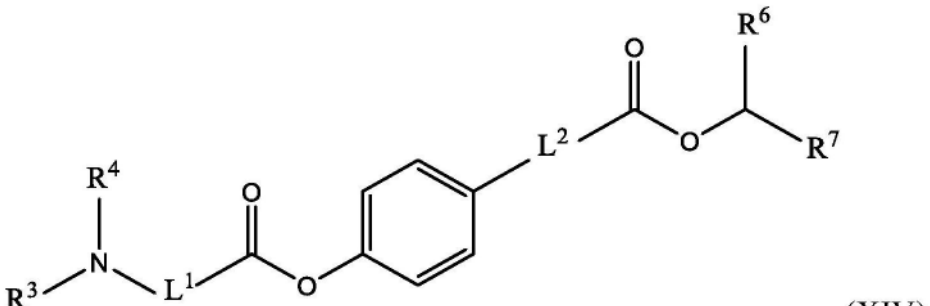
n为2、3或4;并且

q为2、3或4。

30.根据权利要求29所述的可电离脂质,其具有以下结构:



31.一种式(XIV)可电离脂质:



(XIV)

或其药学上可接受的盐或立体异构体,

其中:

L^1为C_1-C_6亚烷基;

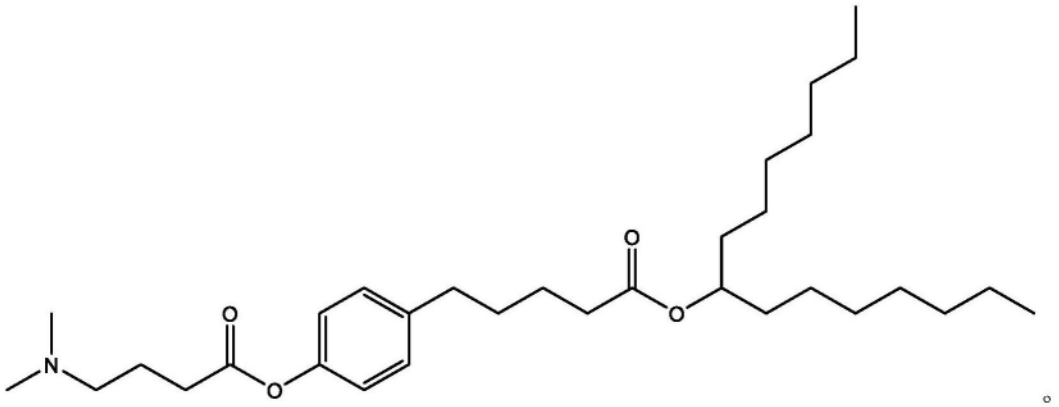
L^2为C_1-C_8亚烷基;

R^3和R^4各自独立地为H或C_1-C_3烷基;

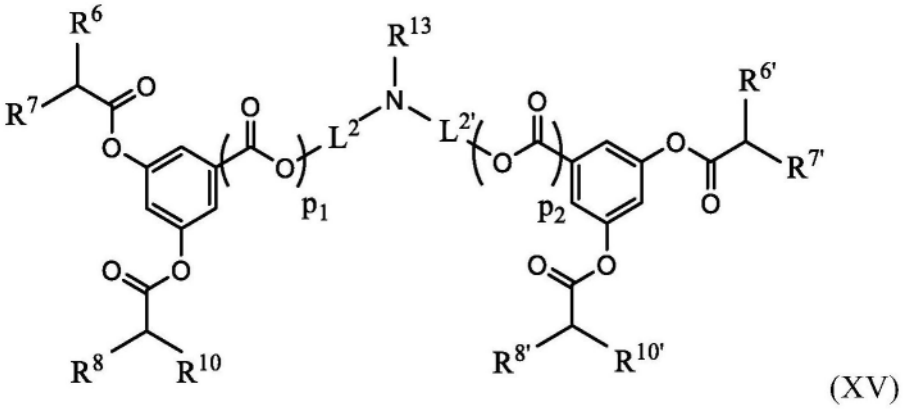
R^6为C_4-C_{20}烷基;并且

R^7为C_4-C_{20}烷基。

32.根据权利要求31所述的可电离脂质,其具有以下结构:



33.一种式(XV)可电离脂质:



(XV)

或其药学上可接受的盐或立体异构体,

其中:

L^2为C_1-C_8亚烷基;

$L^{2'}$为C_1-C_8亚烷基;

R^6为C_4-C_{20}烷基;

$R^{6'}$为C_4-C_{20}烷基;

R^7为C_4-C_{20}烷基;

$R^{7'}$为C_4-C_{20}烷基;

R^8为C_4-C_{20}烷基;

$R^{8'}$为C_4-C_{20}烷基;

R^{10}为C_4-C_{20}烷基;

$R^{10'}$为C_4-C_{20}烷基;

R^{13}为H、C_1-C_6烷基、-$(CH_2)_nOH$或-$(CH_2)_qN(CH_3)_2$;

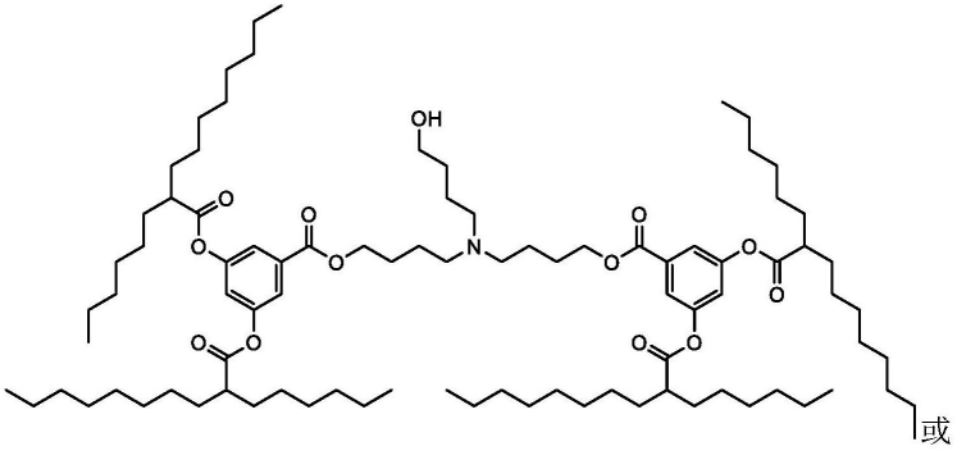
n为2、3或4;

p_1不存在或为1;

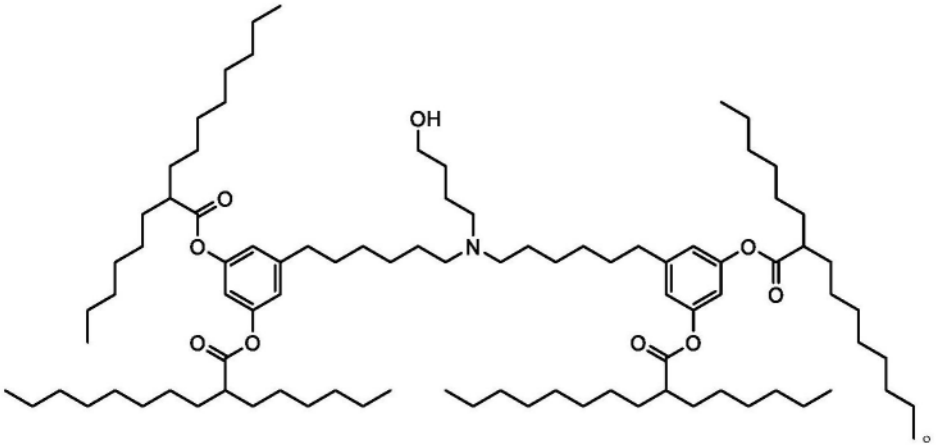
p_2不存在或为1;并且

q为2、3或4。

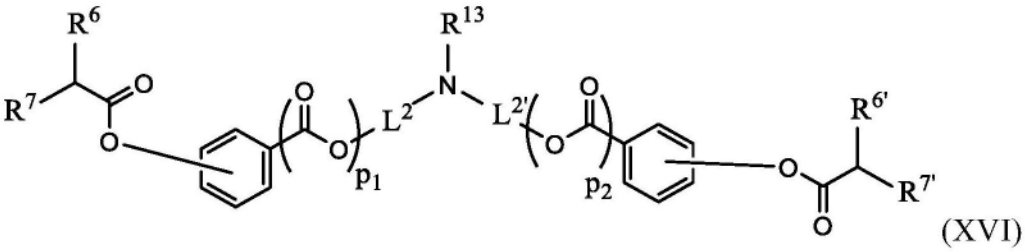
34.根据权利要求33所述的可电离脂质,其具有以下结构中的一种结构:



或



35.一种式(XVI)可电离脂质：



(XVI)

或其药学上可接受的盐或立体异构体，

其中：

L^2为C_1-C_8亚烷基；

$L^{2'}$为C_1-C_8亚烷基；

R^6为C_4-C_{20}烷基；

$R^{6'}$为C_4-C_{20}烷基；

R^7为C_4-C_{20}烷基；

$R^{7'}$为C_4-C_{20}烷基；

R^{13}为H、C_1-C_6烷基、-$(CH_2)_nOH$或-$(CH_2)_qN(CH_3)_2$；

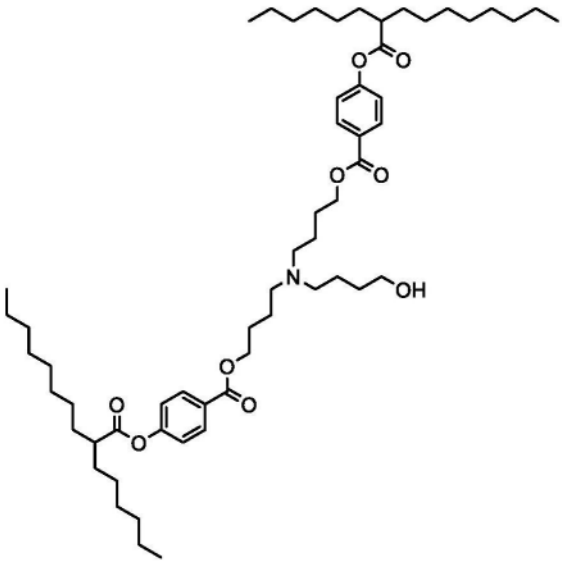
n为2、3或4；

p_1不存在或为1；

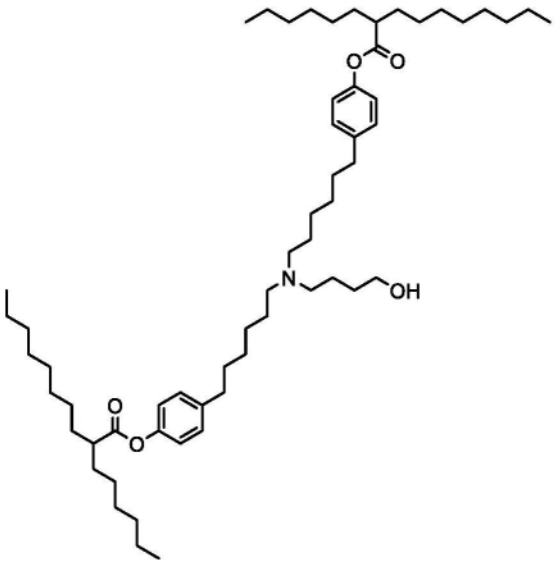
p_2不存在或为1；并且

q为2、3或4。

36.根据权利要求35所述的可电离脂质,其具有以下结构中的一种结构:

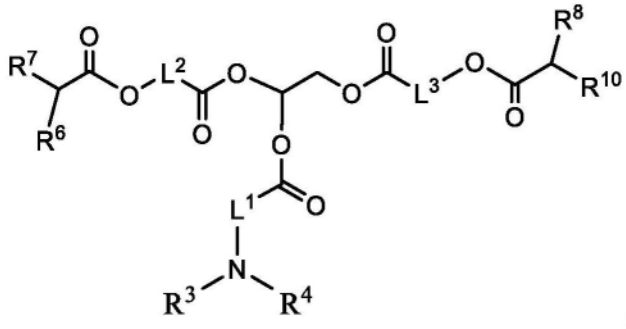


或



。

37.一种式(I-C)可电离脂质:



(I-C)

或其药学上可接受的盐或立体异构体,

其中:

L^1为C_1-C_6亚烷基;

L^2为C_1-C_8亚烷基;

L^3为C_1-C_8亚烷基;

R^3和R^4各自独立地为H、C_1-C_4烷基或-$(CH_2)_nOH$;

R^6为C_4-C_{20}烷基;

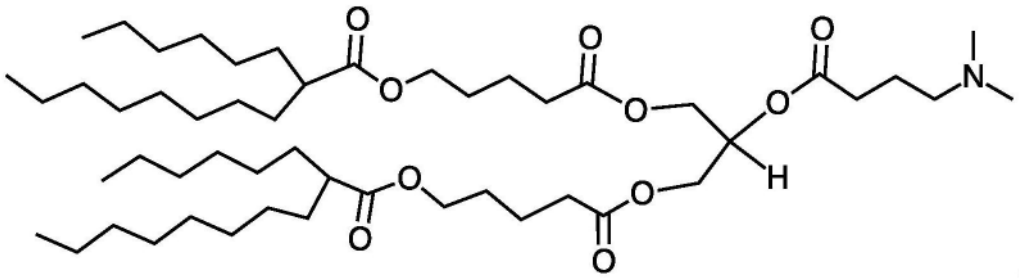
R^7为C_4-C_{20}烷基;

R^8为C_4-C_{20}烷基;

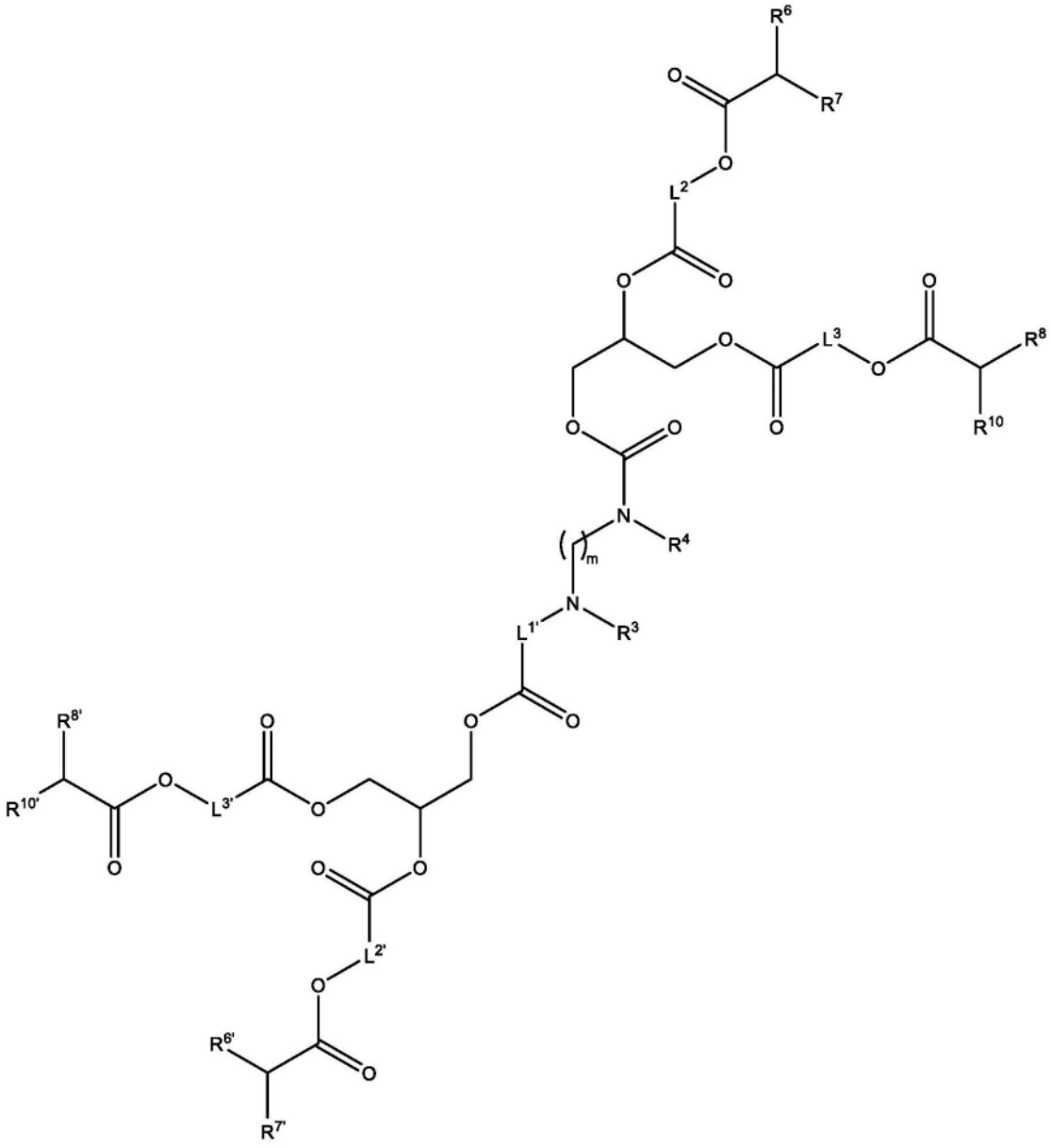
R^{10}为C_4-C_{20}烷基;并且

n为2、3或4。

38.根据权利要求37所述的可电离脂质,其中所述可电离脂质具有以下结构:



39.一种式(XXII)可电离脂质:



(XXII)

或其药学上可接受的盐或立体异构体，

其中：

L^1为C_1-C_6亚烷基；

L^1'为C_1-C_6亚烷基；

L^2为C_1-C_8亚烷基；

L^2'为C_1-C_8亚烷基；

L^3为C_1-C_8亚烷基；

L^3'为C_1-C_8亚烷基；

R^3和R^4各自独立地为H、C_1-C_4烷基、-CH_2-环丙基或-$(CH_2)_nOH$；

R^6为C_4-C_{20}烷基；

R^6'为C_4-C_{20}烷基；

R^7为C_4-C_{20}烷基；

R^{7}'为C_4-C_{20}烷基;

R^{8}为C_4-C_{20}烷基;

R^{8}'为C_4-C_{20}烷基;

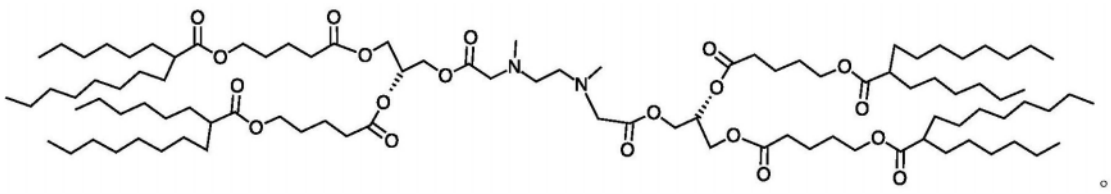
R^{10}为C_4-C_{20}烷基;

R^{10}'为C_4-C_{20}烷基;

n为2、3或4;并且

m为1、2、3、4或5。

40.根据权利要求39所述的可电离脂质,其中所述可电离脂质具有以下结构:



41.一种脂质-纳米颗粒组合物,其包含根据权利要求1至40中任一项所述的可电离脂质。

42.根据权利要求41所述的脂质-纳米颗粒组合物,其进一步包含辅助脂质、稳定脂质、结构脂质和核酸。

43.根据权利要求42所述的脂质-纳米颗粒组合物,其中所述辅助脂质选自由以下项组成的组:1,2-二亚油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DLPC)、1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-磷酸胆碱(DMPC)、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DOPC)、1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DPPC)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DSPC)、1,2-二(十一烷酰基)-sn-甘油-磷酸胆碱(DUPC)、1-棕榈酰基-2-油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(POPC)、1,2-二-O-十八烯基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(18:0二醚PC)、1-油酰基-2-胆固醇半琥珀酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(OChemsPC)、1-十六烷基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(C16 Lyso PC)、1,2-二亚麻酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-二花生四烯酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-二(二十二碳六烯酰基)-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)、1,2-二植烷酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(ME 16.0PE)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二亚油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二亚麻酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二花生四烯酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二(二十二碳六烯酰基)-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸-rac-(1-甘油)钠盐(DOPG)以及它们的混合物。

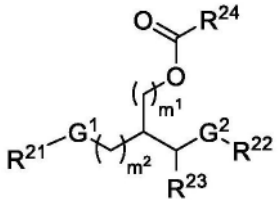
44.根据权利要求42所述的脂质-纳米颗粒组合物,其中所述稳定脂质为1-(单甲氧基-聚乙二醇)-2,3-二肉豆蔻酰基甘油(PEG-DMG),其平均PEG分子量为2000。

45.根据权利要求42所述的脂质-纳米颗粒组合物,其中所述结构脂质选自由胆固醇、胆固醇衍生物、粪甾醇、谷甾醇、麦角甾醇、菜油甾醇、豆甾醇、菜子甾醇、番茄碱、熊果酸、α生育酚以及它们的混合物组成的组。

46.根据权利要求42所述的脂质-纳米颗粒组合物,其中所述核酸选自由小干扰RNA(siRNA)、不对称干扰RNA(aiRNA)、微小RNA(miRNA)、Dicer底物RNA(dsRNA)、小发夹RNA(shRNA)、信使RNA(mRNA)以及它们的混合物组成的组。

47.一种药物组合物,其包含根据权利要求42至46所述的脂质-纳米颗粒组合物及其药学上可接受的载体。

48.一种具有以下式(XVII)结构的化合物:



(XVII)

或其立体异构体、盐或互变异构体,其中:

G^1和G^2各自独立地为-OC(=O)-、-NR^{25}C(=O)-或-CH=CH-;

R^{21}和R^{22}各自独立地为C_1-C_6烷基、直链C_{10}-C_{20}烷基、直链C_{10}-C_{20}烯基或支链C_{10}-C_{35}烯基,其中所述C_1-C_6烷基被-OC(=O)R^{26}取代;

R^{23}为H、OH或OCH_3;

R^{24}为C_1-C_8杂烷基;

R^{25}为H或C_1-C_4烷基;

R^{26}为支链C_{10}-C_{30}烷基;并且

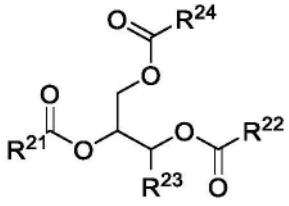
m^1和m^2各自独立地为整数0或1。

49.根据权利要求48所述的化合物,其中G^1和G^2各自为-OC(=O)-。

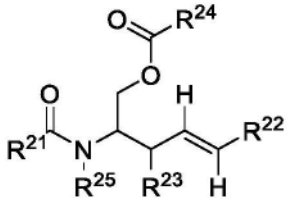
50.根据权利要求48至49中任一项所述的化合物,其中G^1或G^2中的一者为-NR^{25}C(=O)-并且G^1或G^2中的另一者为-CH=CH-。

51.根据权利要求48至50中任一项所述的化合物,其中m^2为0。

52.根据权利要求48至51中任一项所述的化合物,其中所述化合物具有以下式(XVIIA)至(XVIIB)结构中的一种结构:



(XVIIA)



(XVIIB)

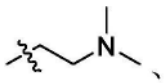
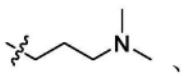
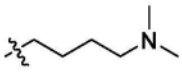
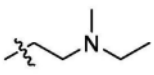
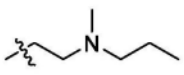
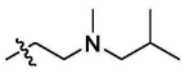
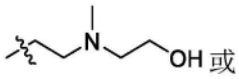
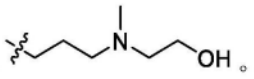
或其立体异构体、盐或互变异构体。

53.根据权利要求48至52中任一项所述的化合物,其中R^{24}为C_3-C_7杂烷基。

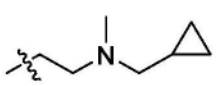
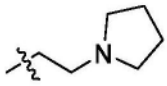
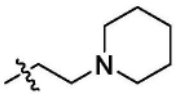
54.根据权利要求48至53中任一项所述的化合物,其中R^{24}为C_4杂烷基、C_5杂烷基、C_6杂烷基或C_7杂烷基。

55.根据权利要求48至54中任一项所述的化合物,其中R^{24}为C_4烷基胺、C_5烷基胺、C_6烷基

胺或C_7烷基胺。

56.根据权利要求48至55中任一项所述的化合物，其中R^{24}为  、  、  、  、  、  、  或  。

57.根据权利要求48至52中任一项所述的化合物，其中R^{24}的C_1-C_8杂烷基进一步被环烷基取代。

58.根据权利要求57所述的化合物，其中R^{24}为  、  或  。

59.根据权利要求48至58中任一项所述的化合物，其中R^{25}为H。

60.根据权利要求48至59中任一项所述的化合物，其中R^{25}为C_1-C_4烷基。

61.根据权利要求48至60中任一项所述的化合物，其中R^{25}为-CH_3。

62.根据权利要求48至61中任一项所述的化合物，其中R^{25}为-CH_2CH_3。

63.根据权利要求48至62中任一项所述的化合物，其中R^{21}和R^{22}各自独立地为被-OC(=O)R^{26}取代的C_2-C_5烷基、直链C_{12}-C_{18}烷基、直链C_{12}-C_{18}烯基或支链C_{14}-C_{32}烯基。

64.根据权利要求48至63中任一项所述的化合物，其中R^{21}或R^{22}中的一者为直链C_{12}-C_{18}烷基并且R^{21}或R^{22}中的另一者为直链C_{12}-C_{18}烯基。

65.根据权利要求48至64中任一项所述的化合物，其中R^{21}或R^{22}中的一者为被-OC(=O)R^{26}取代的C_2-C_5烷基并且R^{21}或R^{22}中的另一者为直链C_{12}-C_{18}烷基。

66.根据权利要求48至65中任一项所述的化合物，其中R^{21}或R^{22}中的一者为直链C_{12}-C_{18}烷基并且R^{21}或R^{22}中的另一者为支链C_{14}-C_{32}烯基。

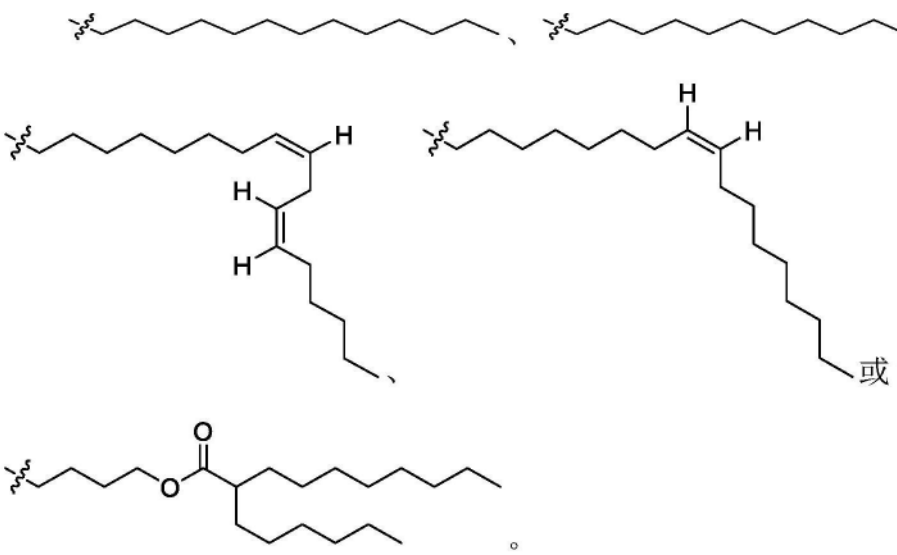
67.根据权利要求48至66中任一项所述的化合物，其中R^{21}和R^{22}各自为被-OC(=O)R^{26}取代的C_2-C_5烷基。

68.根据权利要求48至67中任一项所述的化合物，其中R^{21}和R^{22}各自为直链C_{12}-C_{18}烯基。

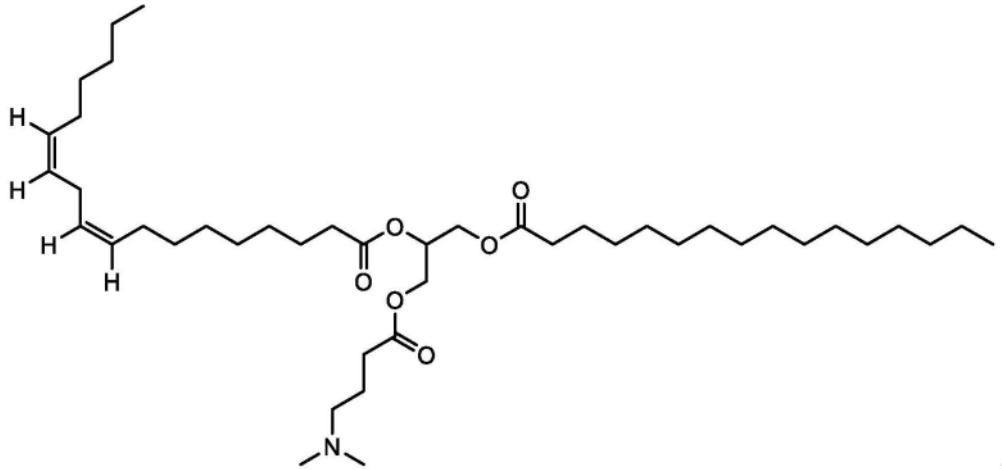
69.根据权利要求48至68中任一项所述的化合物，其中R^{26}为支链C_{10}-C_{20}烷基。

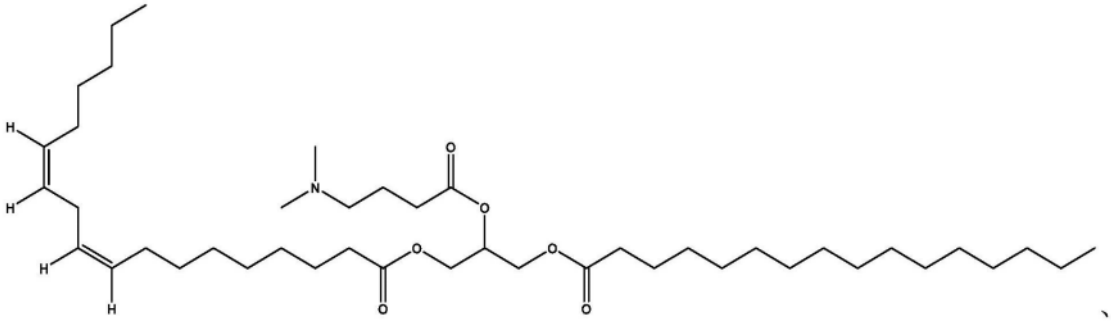
70.根据权利要求48至69中任一项所述的化合物，其中R^{26}为支链C_{12}-C_{18}烷基。

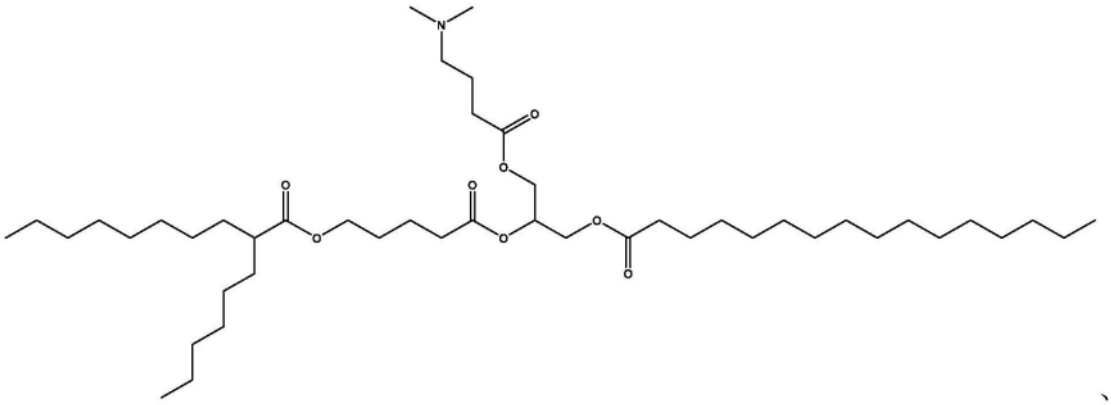
71.根据权利要求48至70中任一项所述的化合物，其中R^{21}和R^{22}各自独立地具有以下结构中的一种结构：

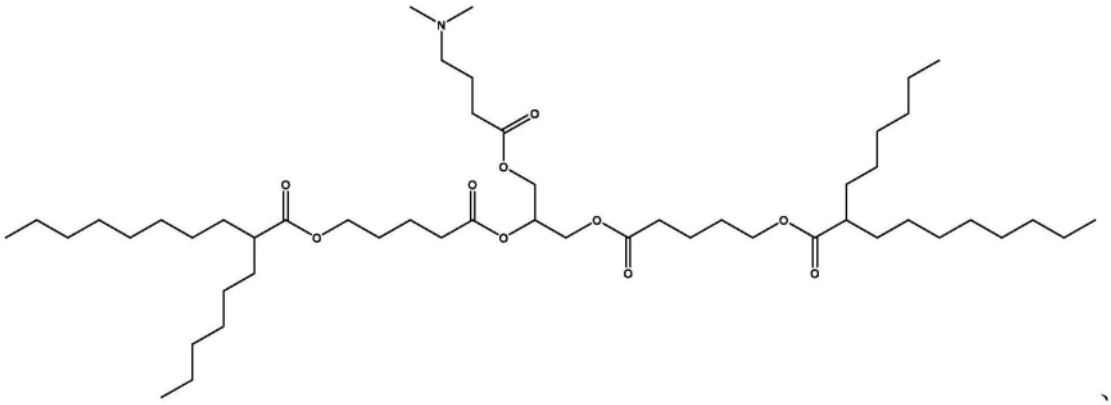


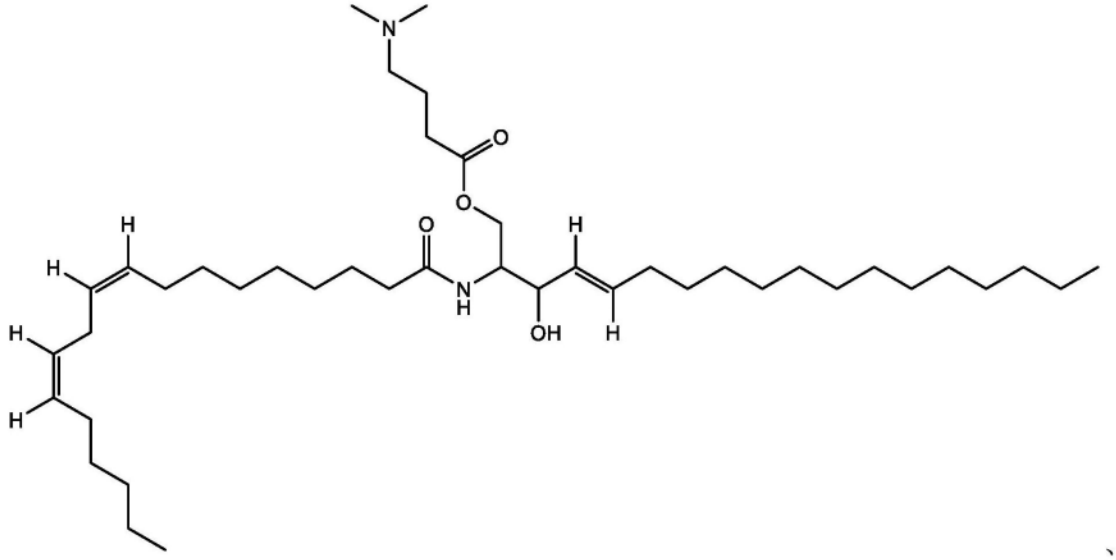
72.根据权利要求48所述的化合物,其中所述化合物具有以下结构中的一种结构:

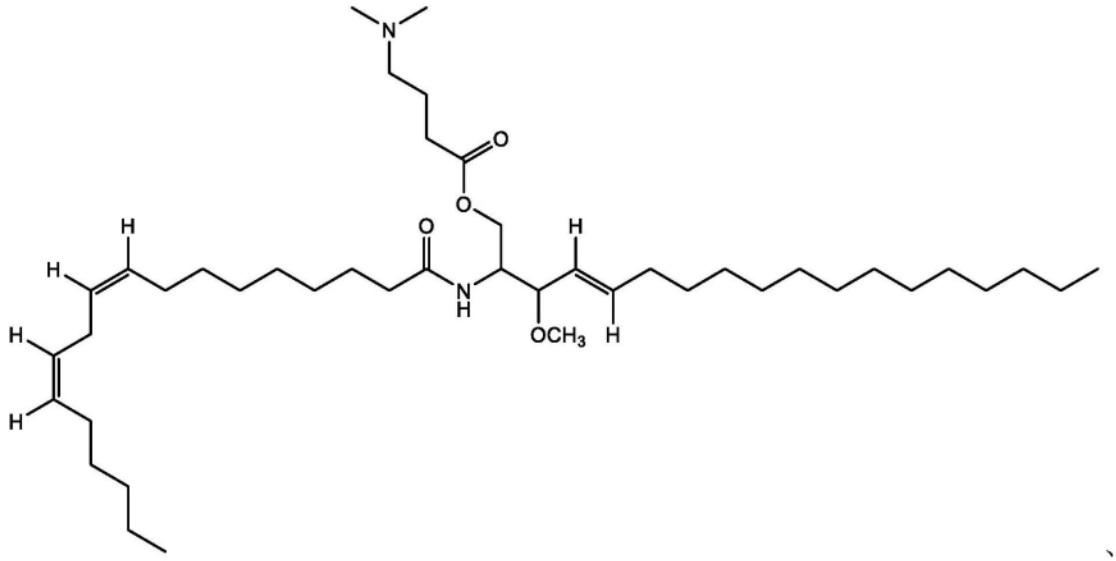


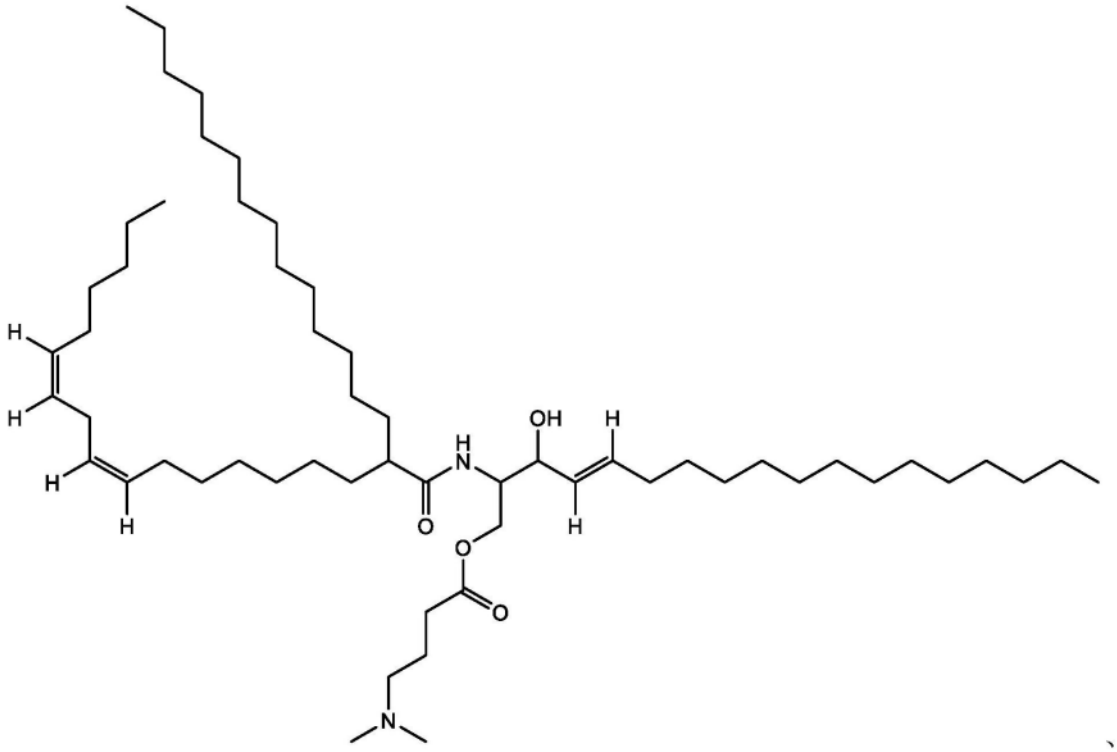


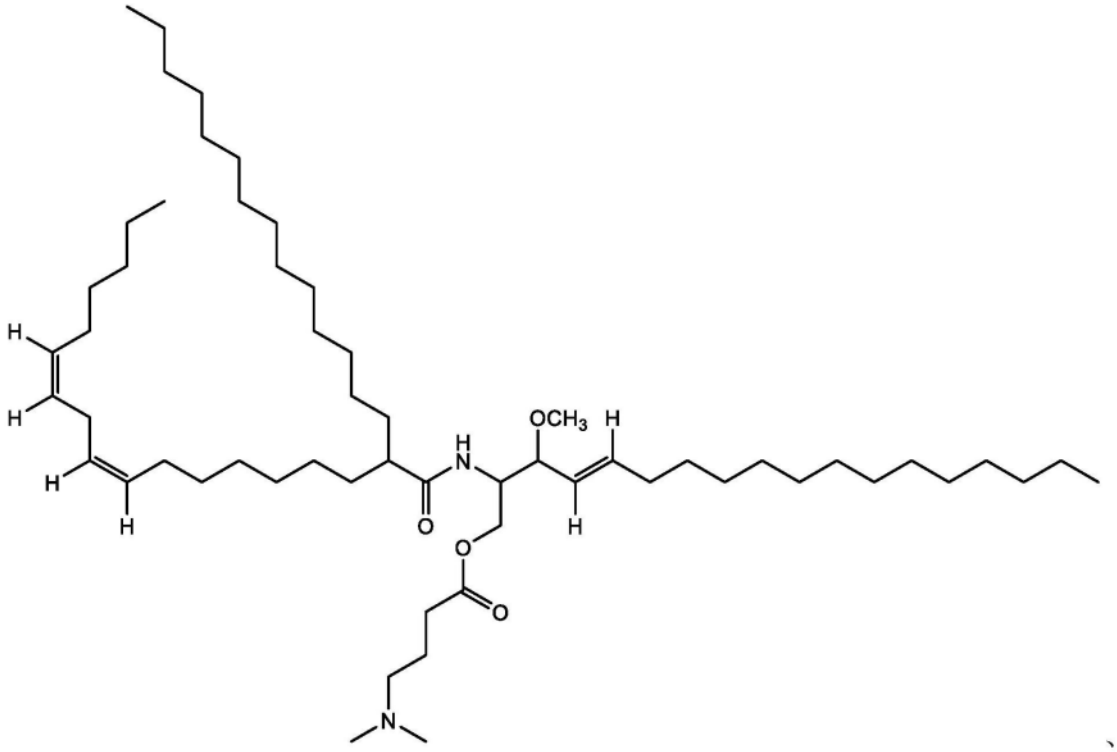


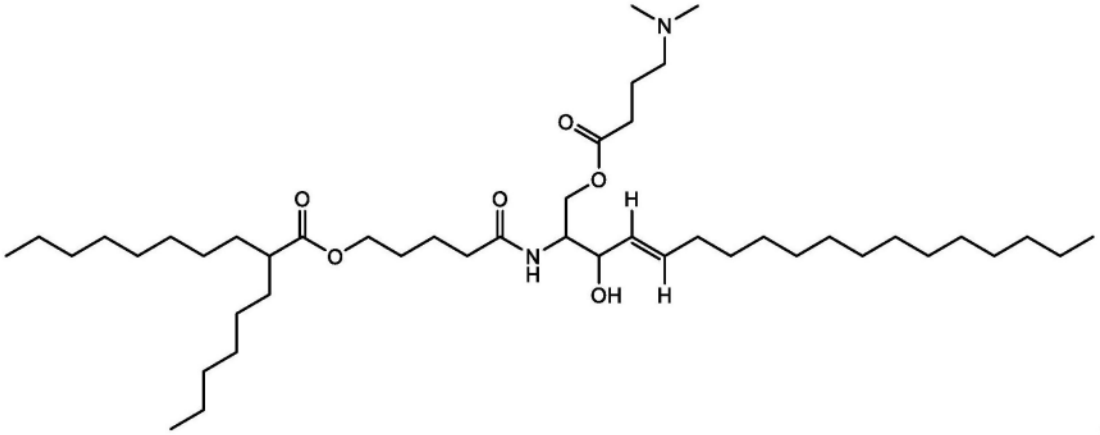


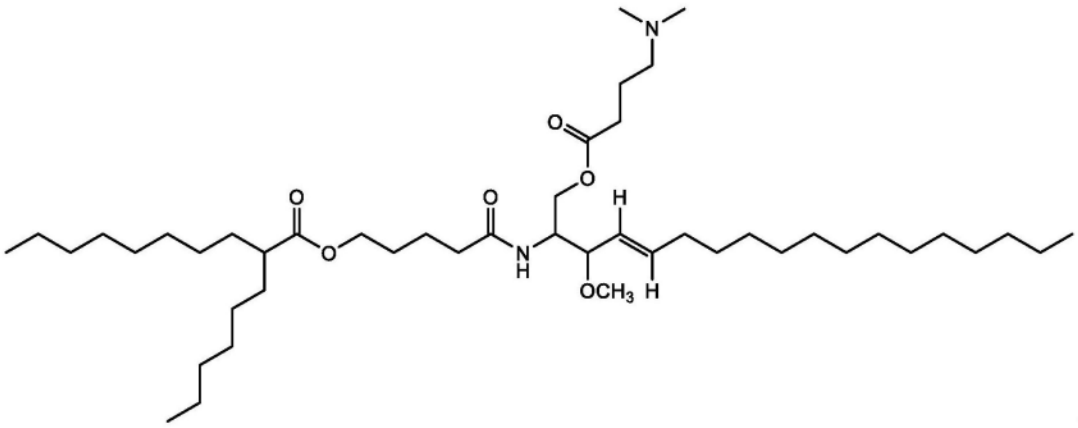


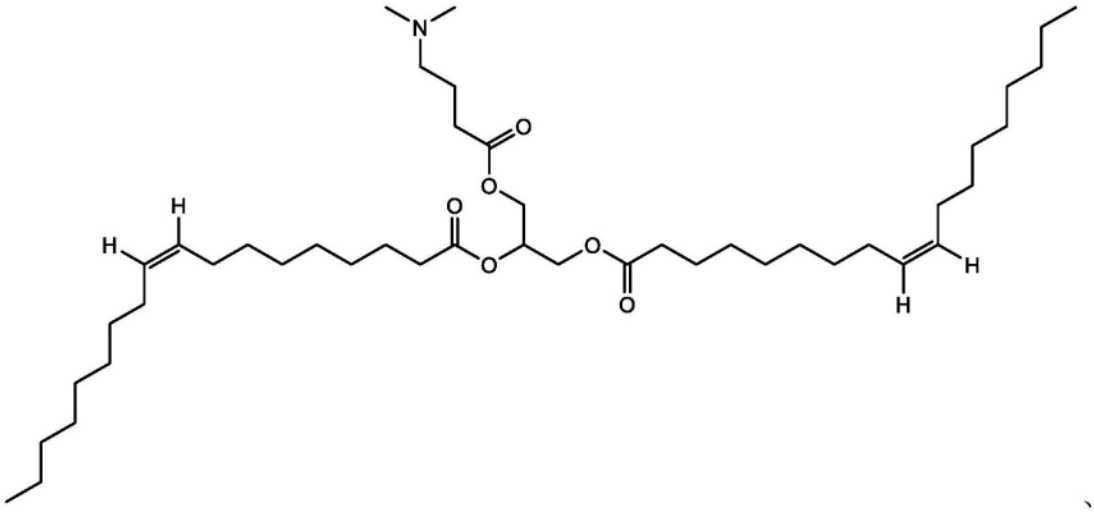


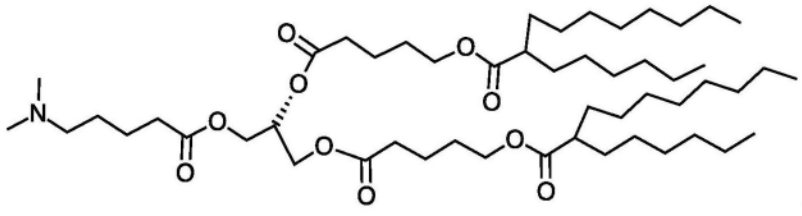

H
H
H
H
H
OH
H
N
O
O
O
N

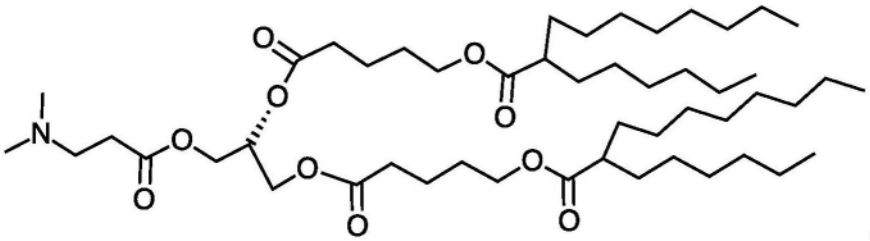

H
H
H
H
H
OCH3
H
N
O
O
O
N



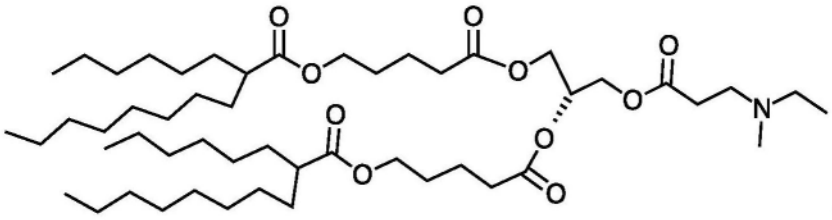




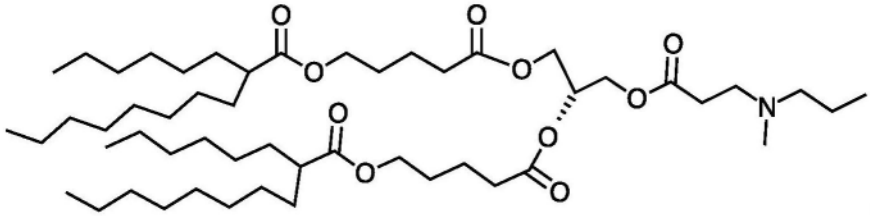




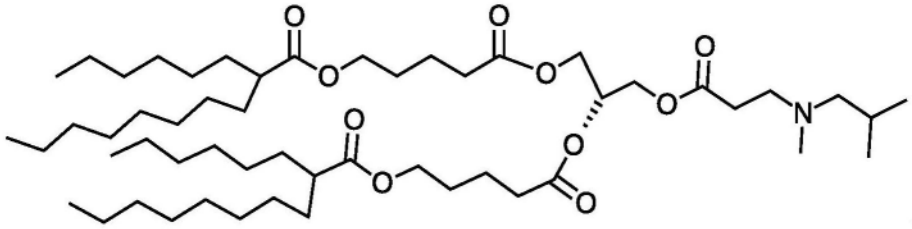
、



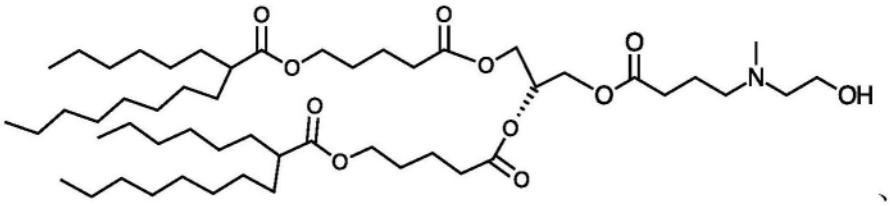
、



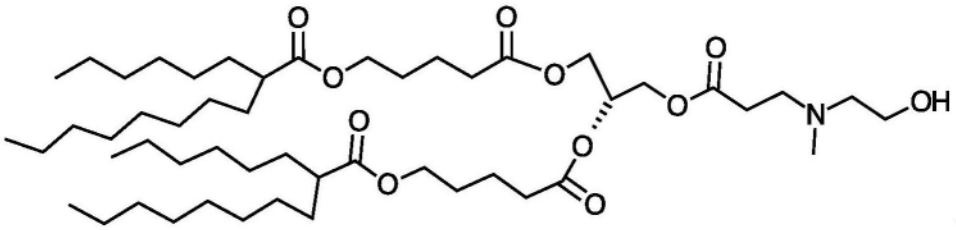
、



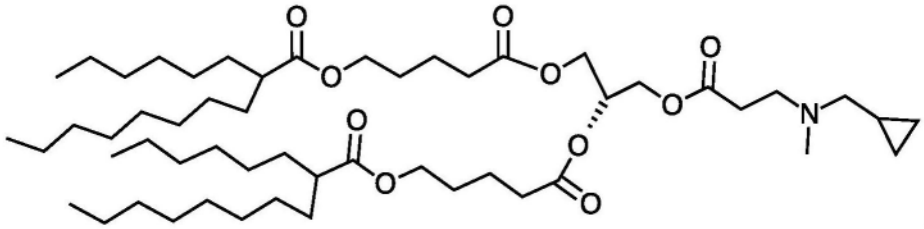
、



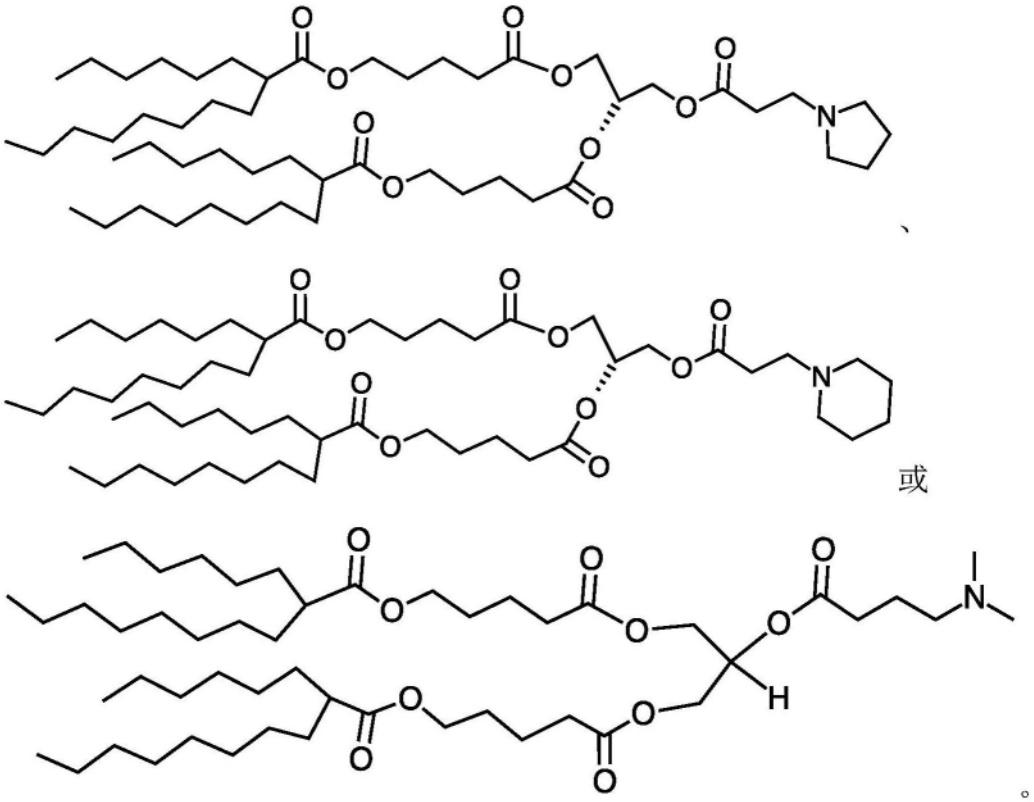
、



、

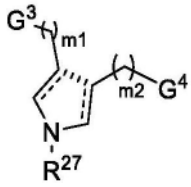


、



或

73.一种具有以下式(XVIII)结构的化合物:



(XVIII)

或其立体异构体、盐或互变异构体,其中:

G^3和G^4各自独立地为-OC(=O)R^{28}、-C(=O)OR^{28}、-CH(CH_2OC(=O)R^{28})$_2$、-C(CH_2OC(=O)R^{28})$_3$、-PhOC(=O)R^{28}、-Ph(OC(=O)R^{28})$_2$、-OC(=O)Ph(OC(=O)R^{28})$_2$或-C(=O)OCH_2C(OC(=O)R^{28})(CH_2OC(=O)R^{28});

R^{27}为H、C_1-C_6烷基或C_1-C_6杂烷基;

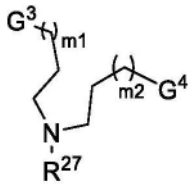
R^{28}各自独立地为直链C_6-C_{12}烷基、支链C_{10}-C_{40}烷基、直链C_{15}-C_{20}烯基或支链C_{20}-C_{40}烯基;

m^1和m^2各自独立地为1至6的整数;

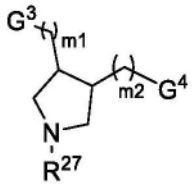
⁞⁞为直接键或不存在;并且

═为单键或双键。

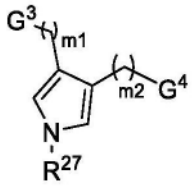
74.根据权利要求73所述的化合物,其中所述化合物具有以下式(XVIIIA)至(XVIIIC)结构中的一种结构:



(XVIIIA)



(XVIIIB)



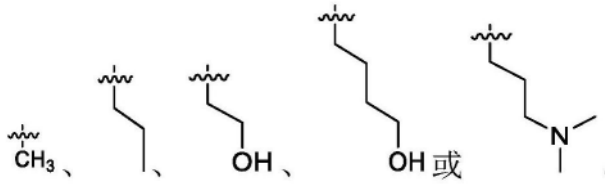
(XVIIIC)

或其立体异构体、盐或互变异构体。

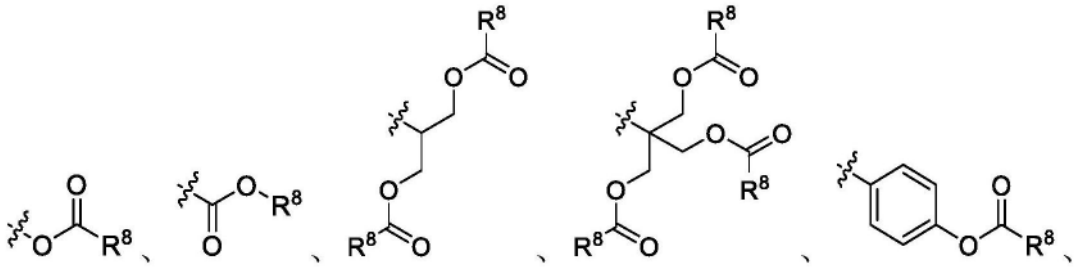
75.根据权利要求73至74中任一项所述的化合物,其中R^{27}为H、C_1-C_3烷基或C_1-C_5杂烷基。

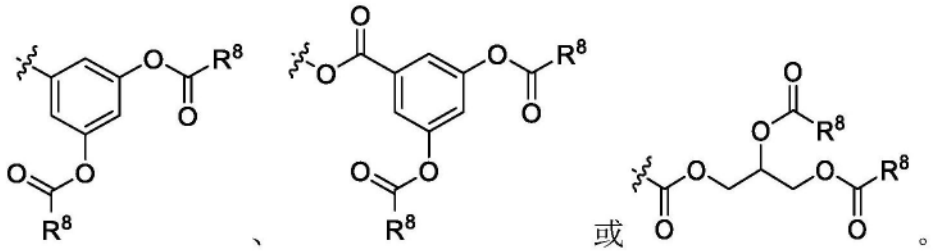
76.根据权利要求73至75中任一项所述的化合物,其中R^{27}为C_1-C_3烷基、C_2-C_4烷基醇或C_5烷基胺。

77.根据权利要求73至76中任一项所述的化合物,其中R^{27}具有以下结构中的一种结构:



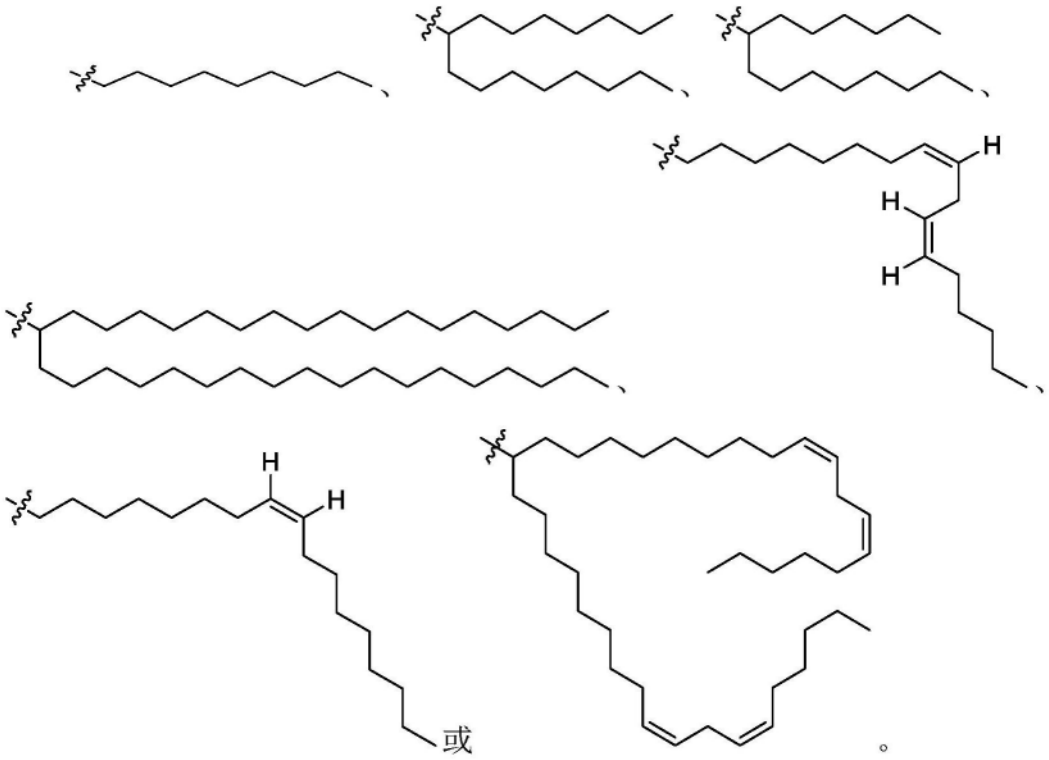
78.根据权利要求73至77中任一项所述的化合物,其中G^3和G^4各自具有以下结构中的一种结构:





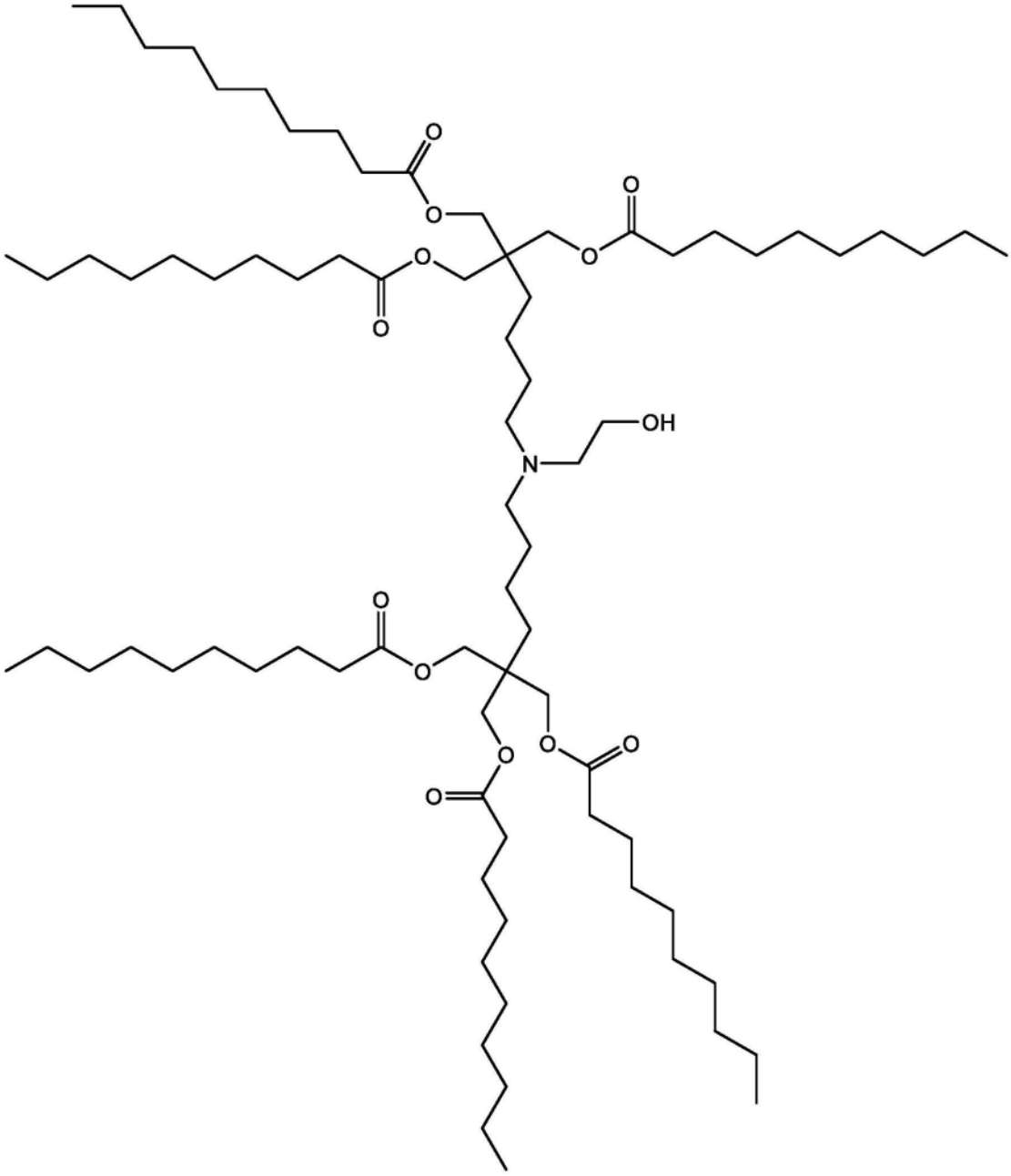
79.根据权利要求73至78中任一项所述的化合物,其中R^{28}各自独立地为直链C_7-C_{10}烷基、支链C_{14}-C_{40}烷基、直链C_{15}-C_{20}烯基或支链C_{30}-C_{40}烯基。

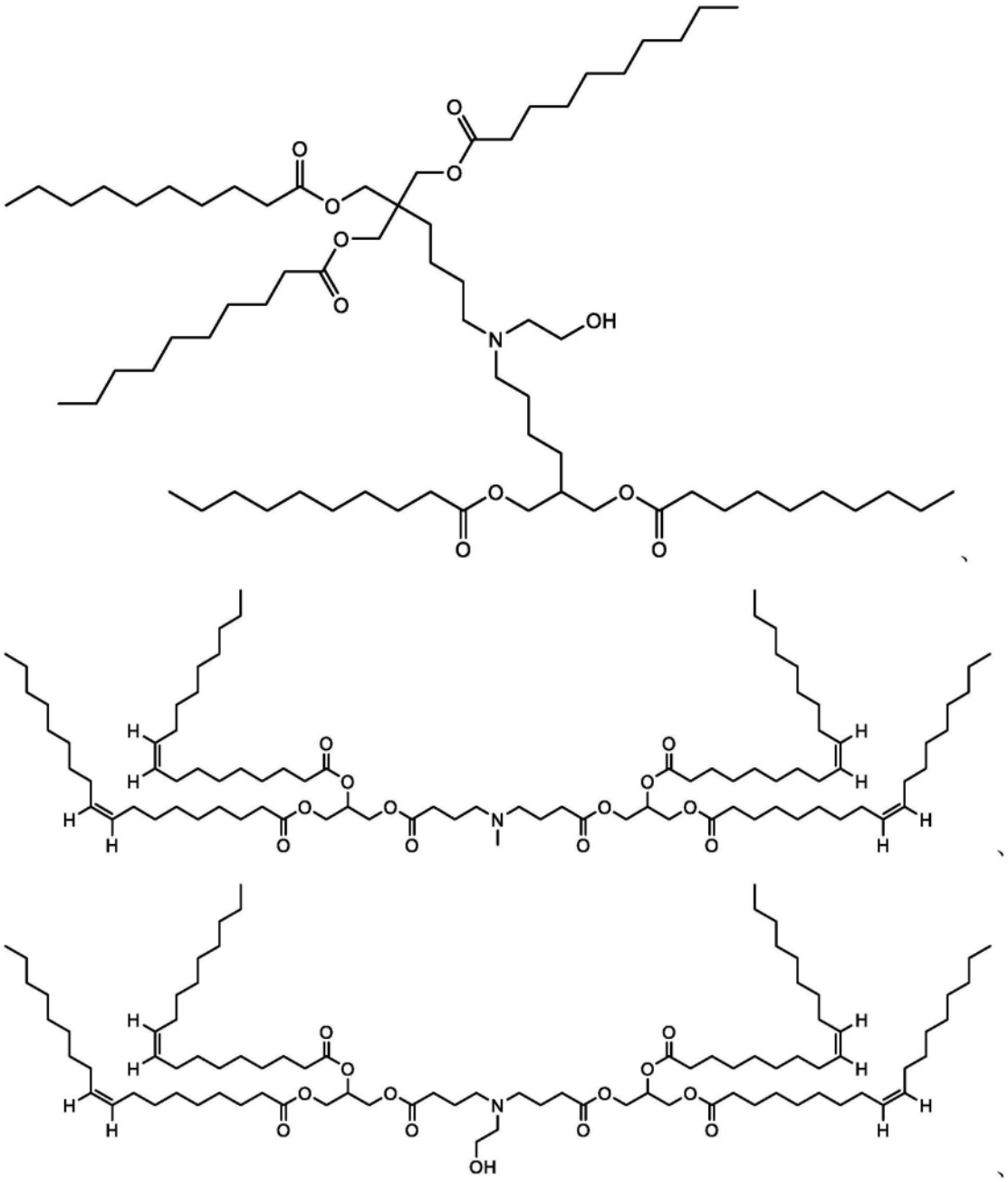
80.根据权利要求73至79中任一项所述的化合物,其中R^{28}各自独立地具有以下结构中的一种结构:

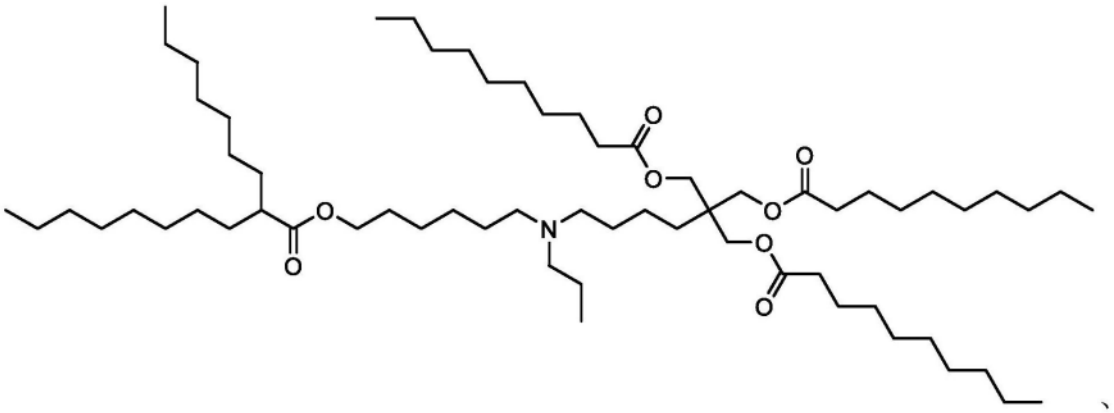


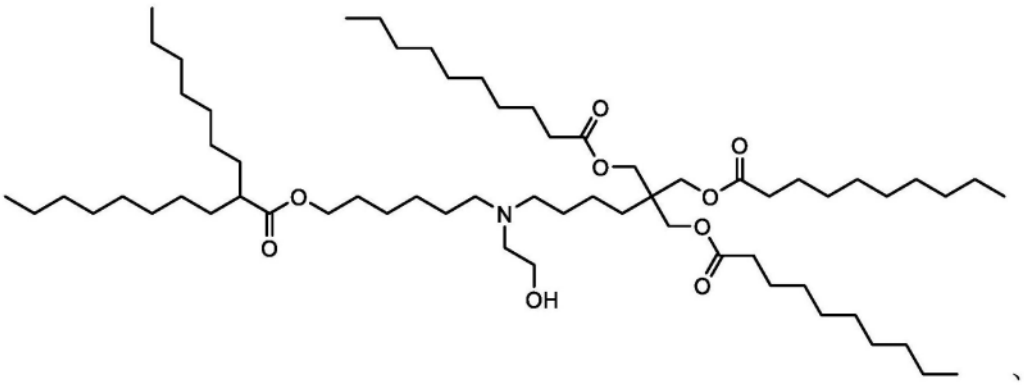
81.根据权利要求73至80中任一项所述的化合物,其中m^1和m^2各自独立地为1至4的整数。

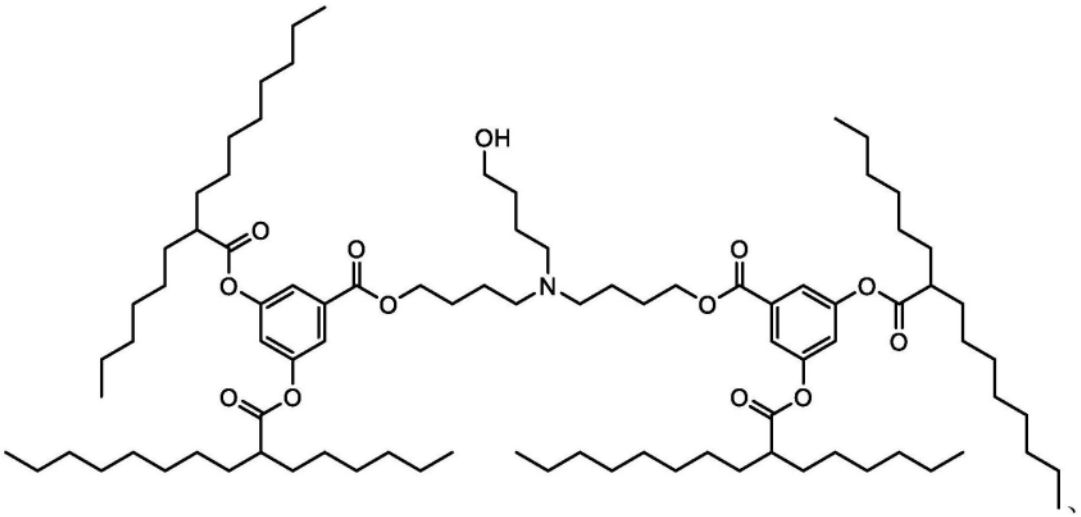
82.根据权利要求73所述的化合物,其中所述化合物具有以下结构中的一种结构:

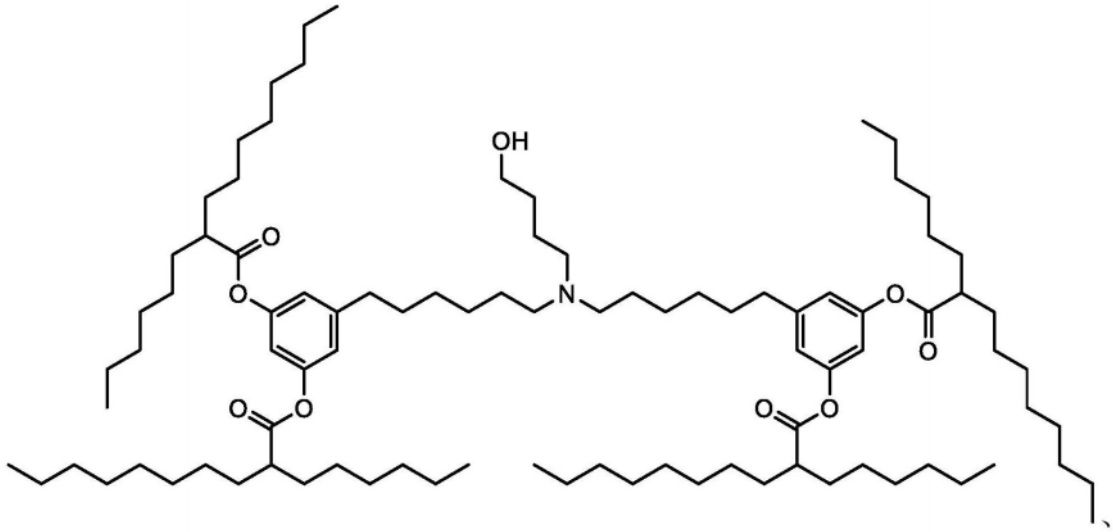

O
O
O
O
O
O
OH
N
O
O
O
O
O
O

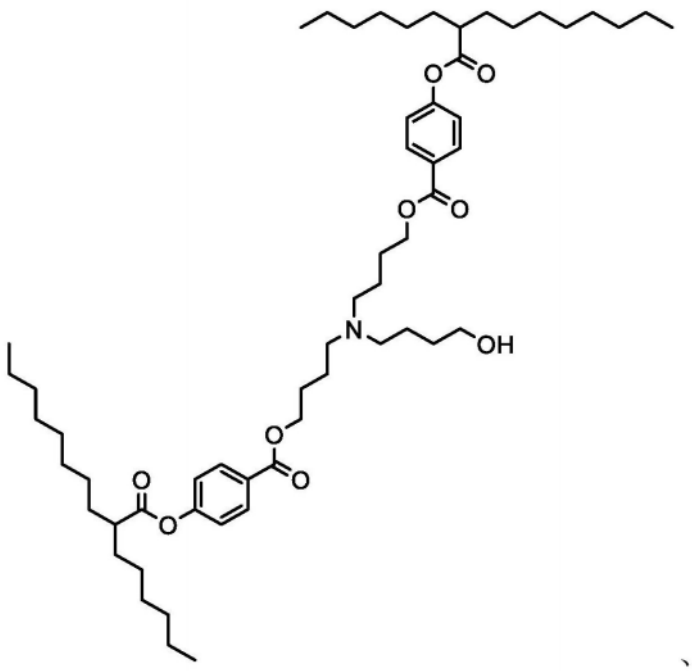


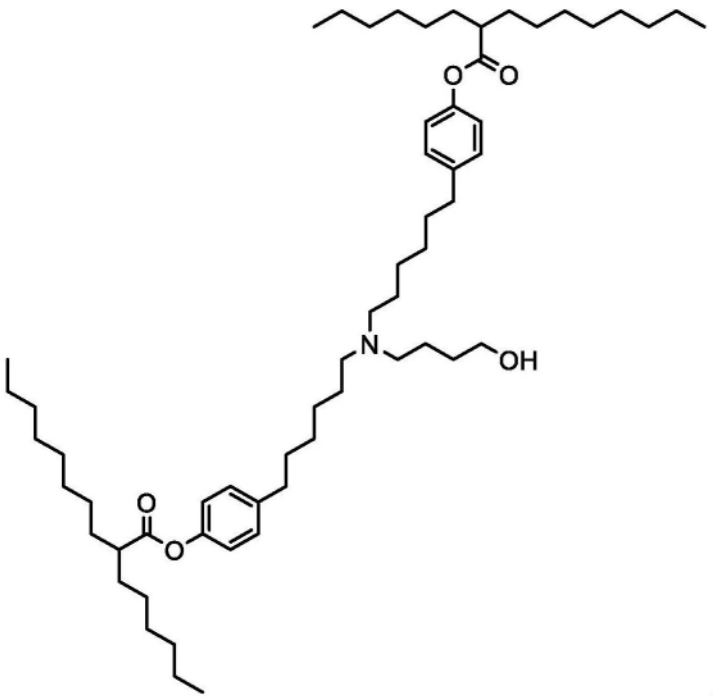


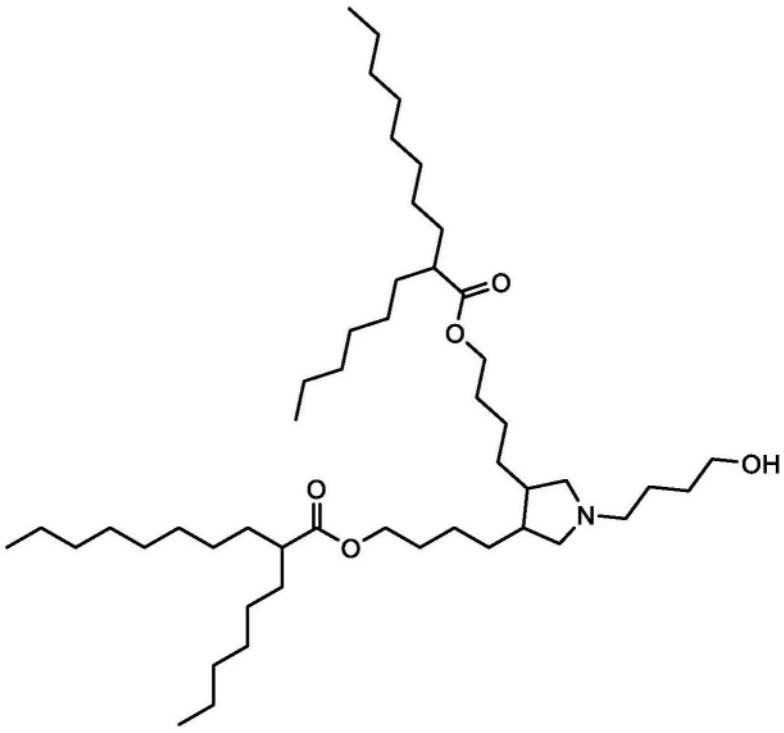


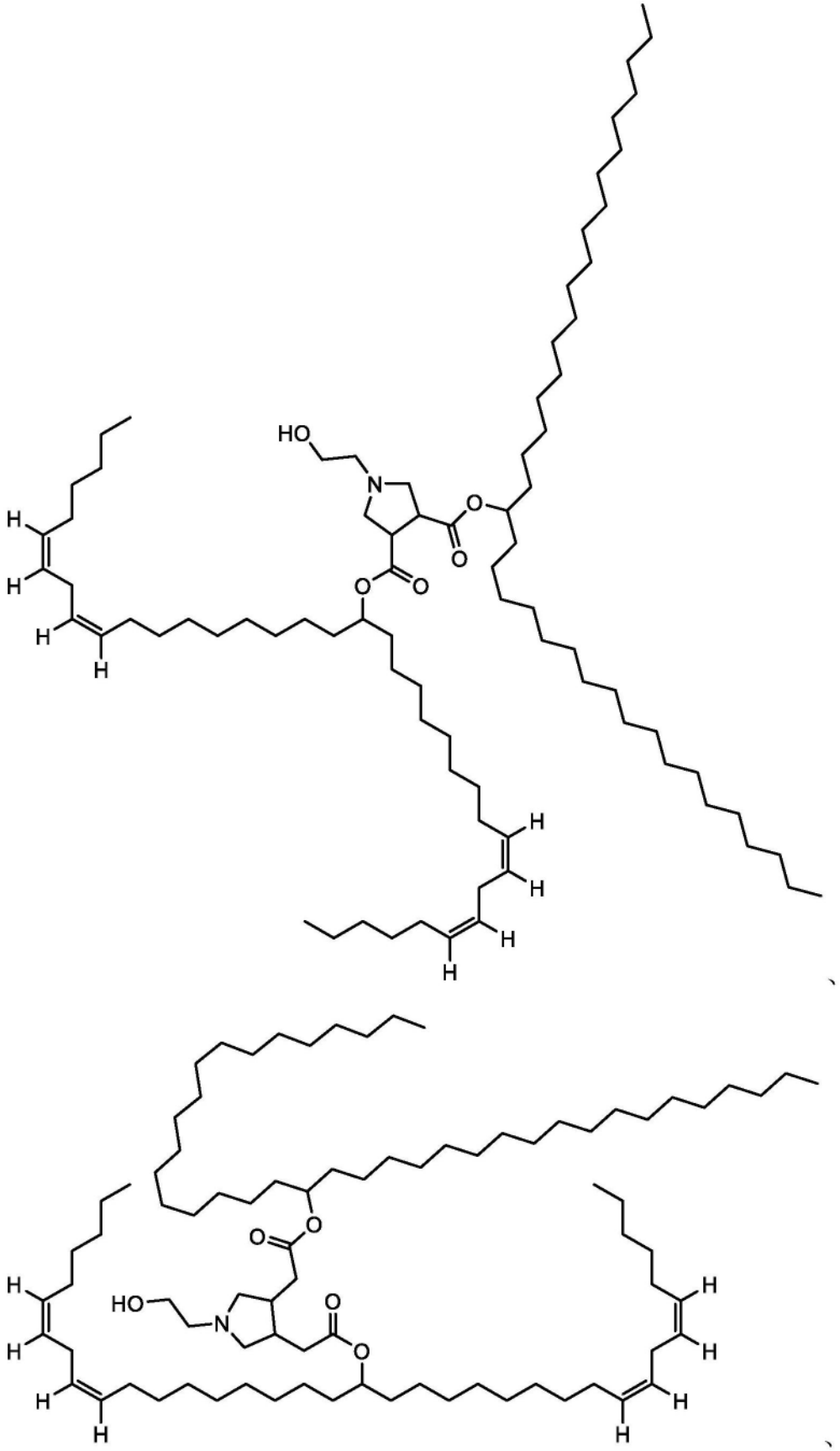


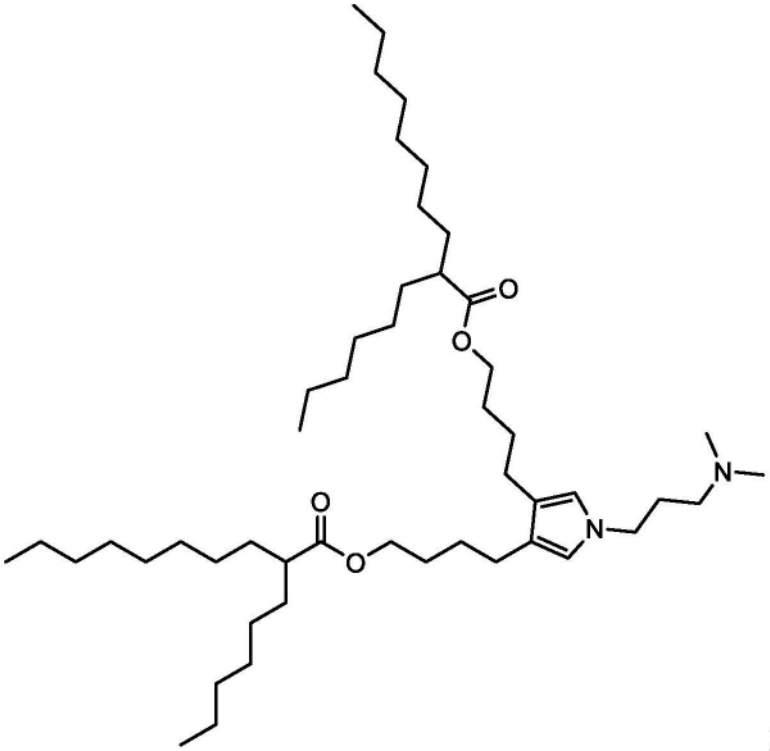




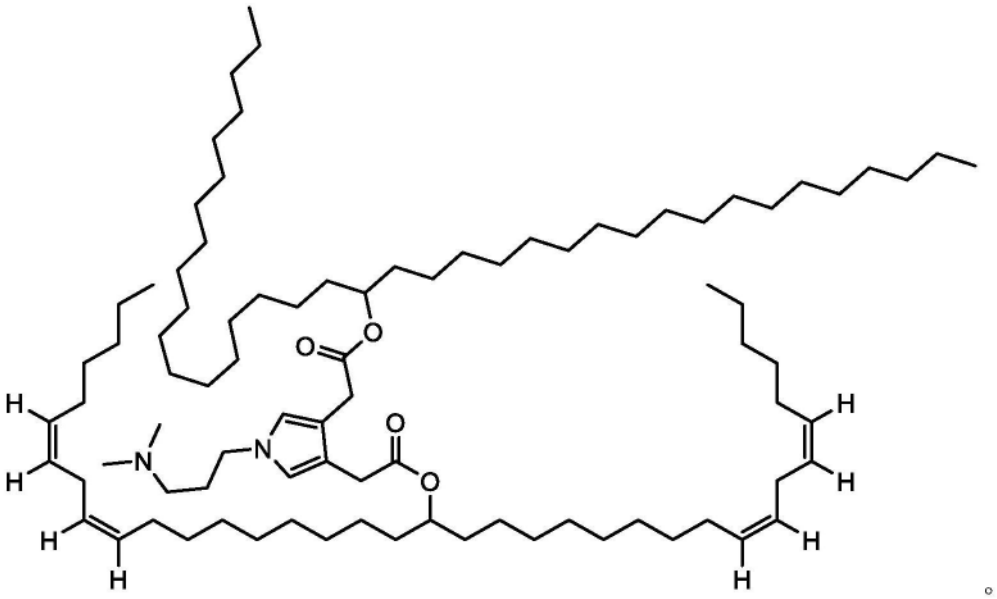

O
O
N
OH
O
O


O
O
OH
N
O
O

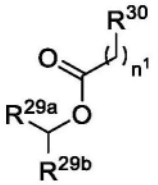

HO
N
O
O
O
O
H
H
H
H
H
H
H
H
H
HO
N
O
O
O
O
H
H
H
H
H
H
H
H
H



或



83.一种具有以下式(XIX)结构的化合物：



(XIX)

或其立体异构体、盐或互变异构体，其中：

R^{29a}和R^{29b}各自独立地为直链C_6-C_{10}烷基或直链C_{12}-C_{20}亚烷基；

R^{30}为芳基或C_3-C_6杂环，其中所述芳基或C_3-C_6杂环被-OC(=O)R^{31}、C_1-C_4烷基或C_1-C_4杂

烷基取代;

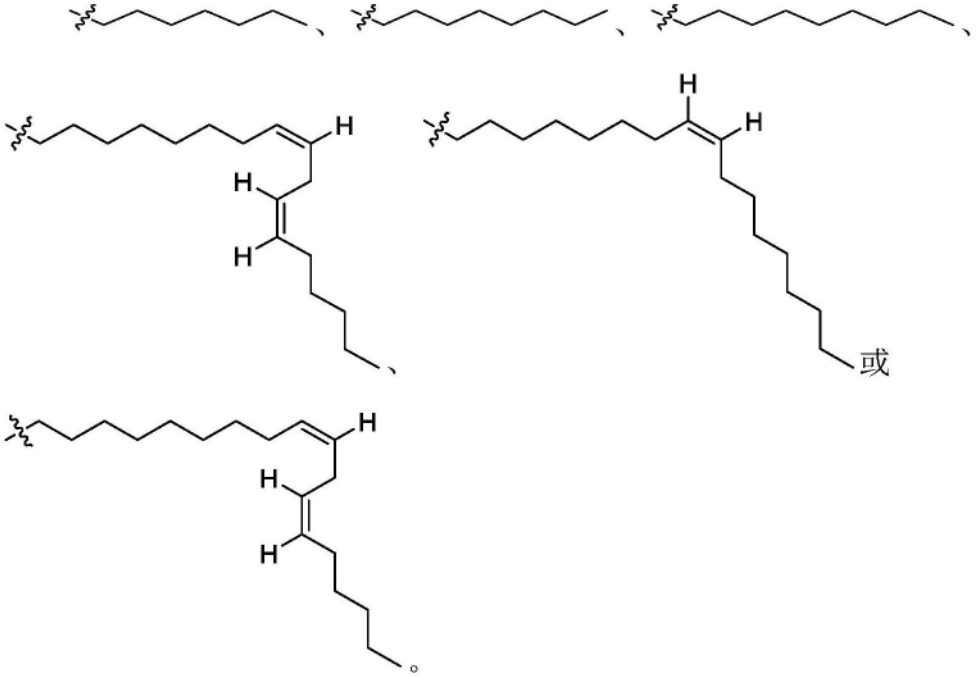
R^{31}为C_1-C_6杂烷基;并且

n^1为1至6的整数。

84.根据权利要求83所述的化合物,其中R^{29a}和R^{29b}各自为直链C_6-C_{10}烷基。

85.根据权利要求83至84中任一项所述的化合物,其中R^{29a}和R^{29b}各自为直链C_{12}-C_{20}亚烷基。

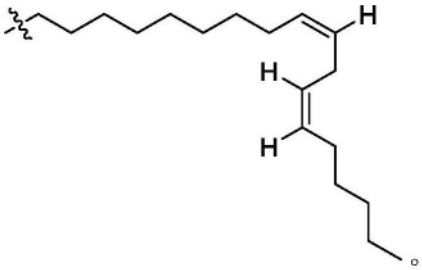
86.根据权利要求83至85中任一项所述的化合物,其中R^{29a}和R^{29b}各自独立地具有以下结构中的一种结构:



87.根据权利要求83至86中任一项所述的化合物,其中R^{29a}和R^{29b}各自为



88.根据权利要求83至87中任一项所述的化合物,其中R^{29a}和R^{29b}各自为



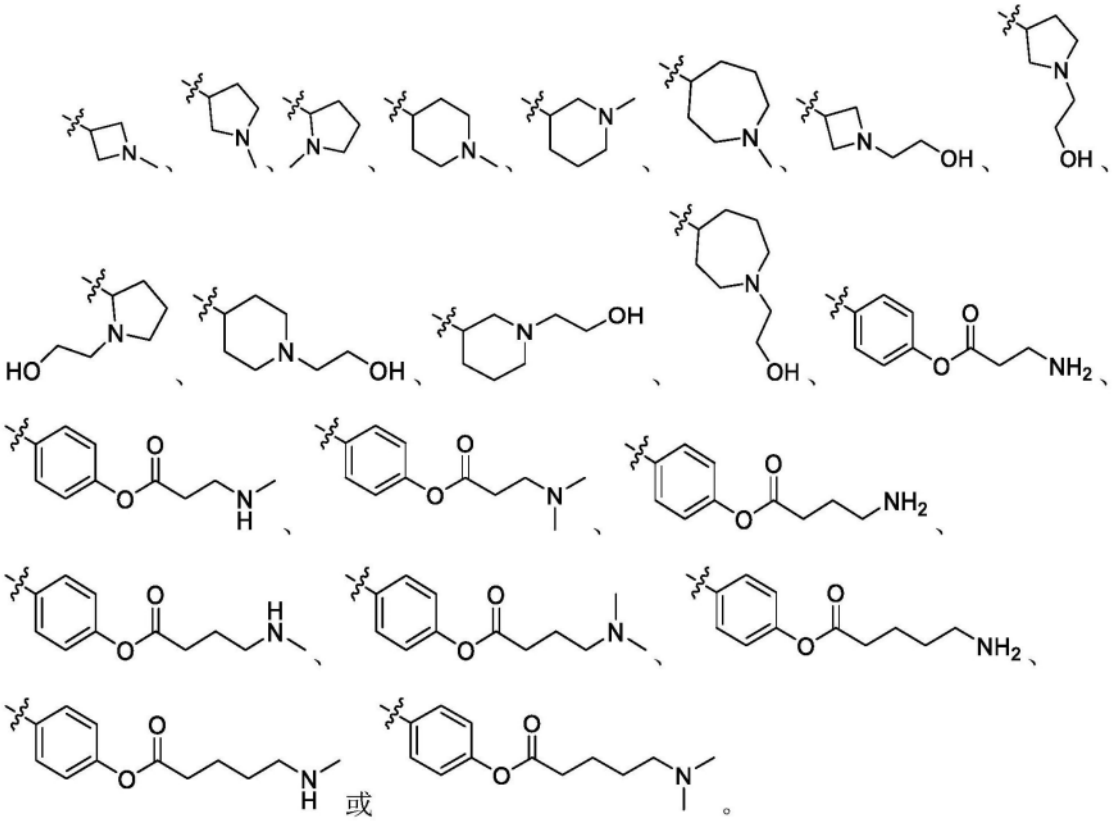
89.根据权利要求83至88中任一项所述的化合物,其中R^{30}的所述芳基为苯基或萘。

90.根据权利要求83至89中任一项所述的化合物,其中R^{30}的所述C_3-C_6杂环为氮杂环丁烷、吡咯烷、咪唑烷、吡唑烷、哌啶、二噻烷、三噻烷或氮杂环庚烷。

91.根据权利要求83至90中任一项所述的化合物,其中R^{30}为被-OC(=O)R^{31}取代的芳基、或被C_1-C_4烷基取代的C_3-C_6杂环、或C_1-C_4杂烷基。

92.根据权利要求83至91中任一项所述的化合物,其中R^{30}为被-OC(=O)R^{31}取代的苯基、或被C_1-C_4烷基取代的C_3-C_6 N-杂环、或C_1-C_4杂烷基。

93.根据权利要求83至92中任一项所述的化合物,其中R^{30}具有以下结构中的一种结构:

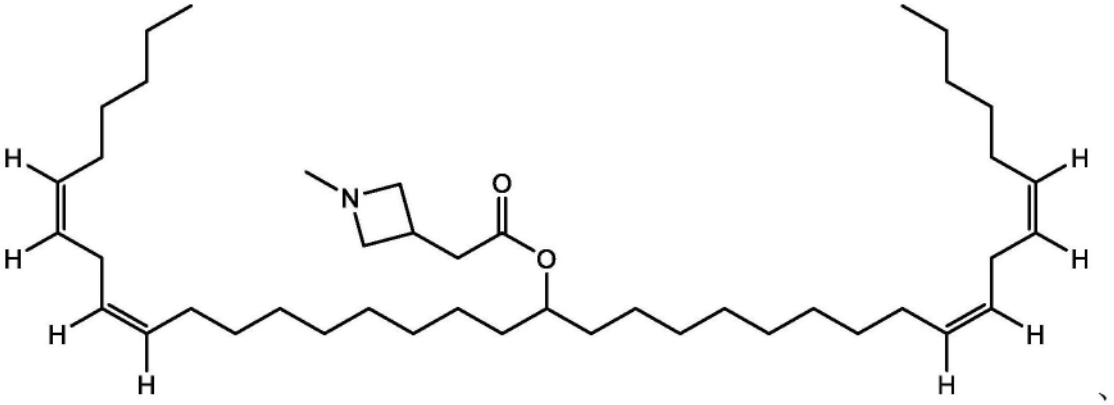


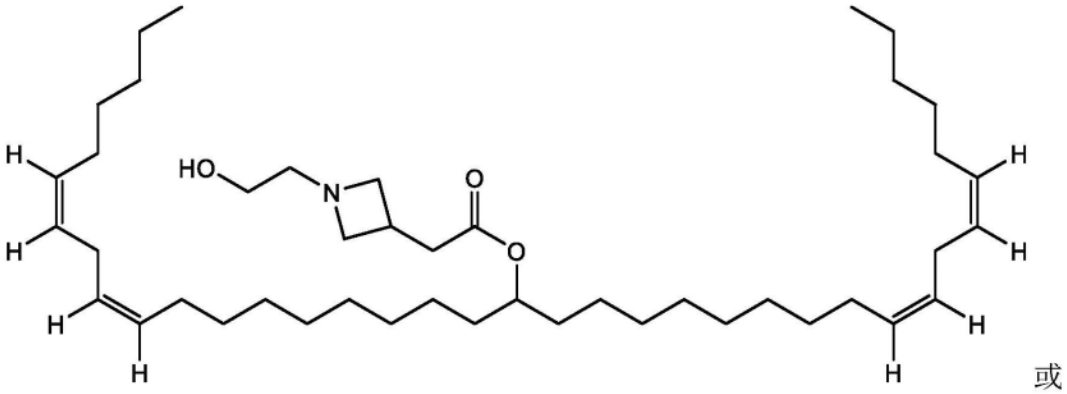
或。

94.根据权利要求83至93中任一项所述的化合物,其中n^1为1至4的整数。

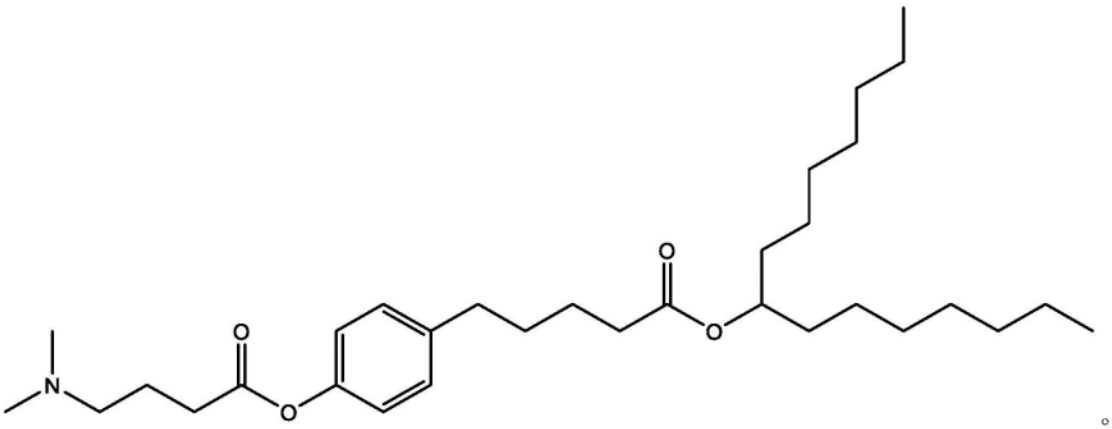
95.根据权利要求83至94中任一项所述的化合物,其中n^1为整数1或4。

96.根据权利要求83所述的化合物,其中所述化合物具有以下结构中的一种结构:

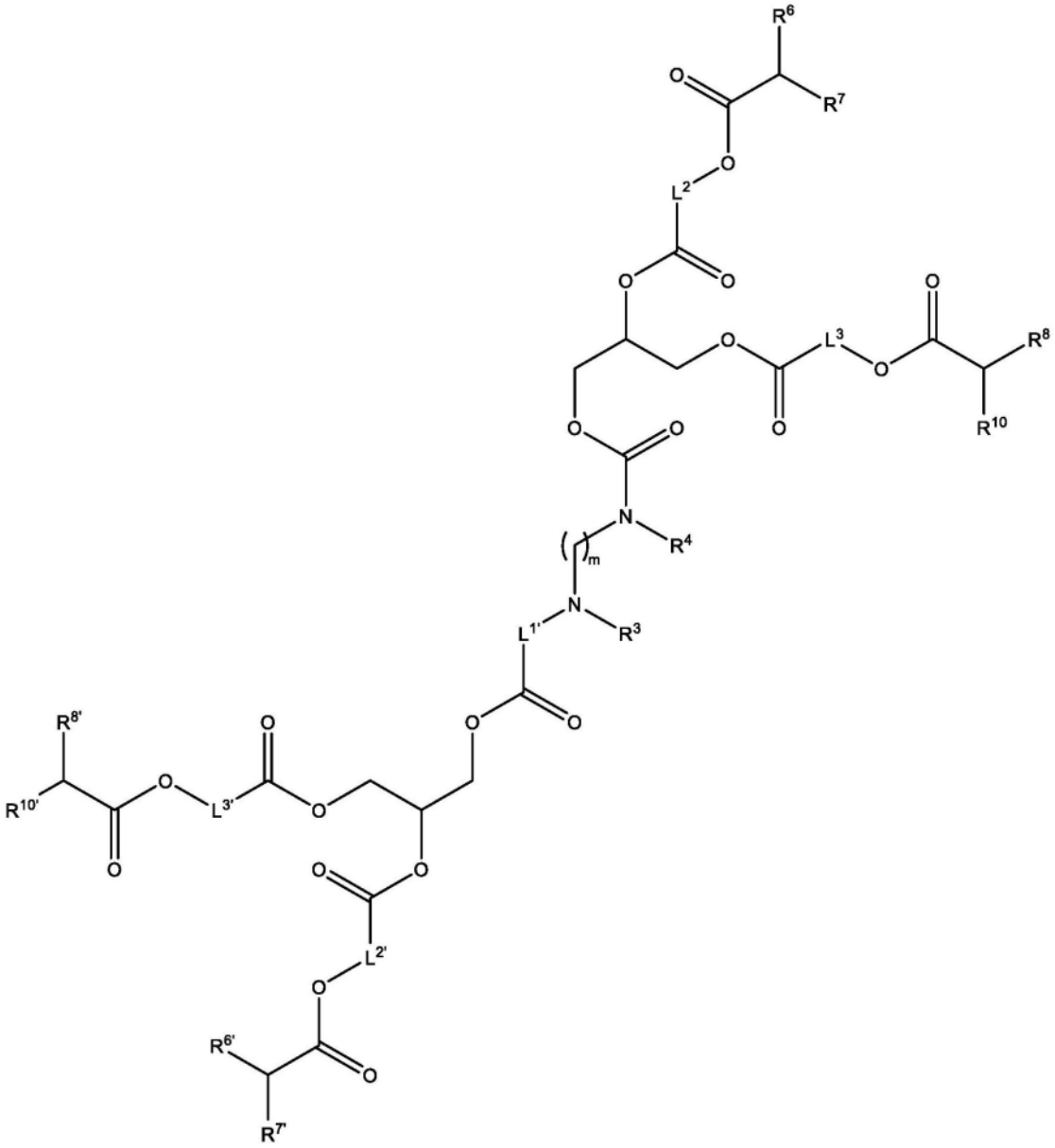




或



97.一种式(XXI)可电离脂质：



(XXI)

或其药学上可接受的盐或立体异构体,其中:

L^1为C_1-C_6亚烷基;

L^1'为C_1-C_6亚烷基;

L^2为C_1-C_8亚烷基;

L^2'为C_1-C_8亚烷基;

L^3为C_1-C_8亚烷基;

L^3'为C_1-C_8亚烷基;

R^3和R^4各自独立地为H、C_1-C_4烷基、-CH_2-环丙基或-$(CH_2)_n$OH;

R^6为C_4-C_{20}烷基;

R^6'为C_4-C_{20}烷基;

R^7为C_4-C_{20}烷基;

R^7'为C_4-C_{20}烷基;

R^8为C_4-C_{20}烷基;

$R^{8'}$为C_4-C_{20}烷基;

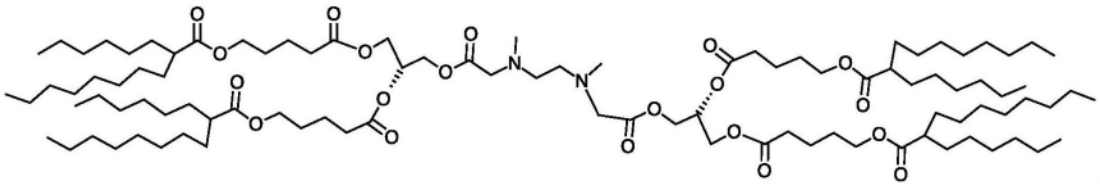
R^{10}为C_4-C_{20}烷基;

$R^{10'}$为C_4-C_{20}烷基;

n为2、3或4;并且

m为1、2、3、4或5。

98.根据权利要求97所述的可电离脂质,其中所述可电离脂质具有以下结构:



99.一种药物组合物,其包含根据权利要求48至98中任一项所述的化合物以及包含核酸的治疗剂。

100.根据权利要求99所述的药物组合物,其进一步包含辅助脂质、稳定脂质或结构脂质。

101.根据权利要求100所述的药物组合物,其中所述辅助脂质选自由以下项组成的组:1,2-二亚油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DLPC)、1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-磷酸胆碱(DMPC)、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DOPC)、1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DPPC)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DSPC)、1,2-二(十一烷酰基)-sn-甘油-磷酸胆碱(DUPC)、1-棕榈酰基-2-油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(POPC)、1,2-二-O-十八烯基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(18:0二醚PC)、1-油酰基-2-胆固醇半琥珀酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(OChemsPC)、1-十六烷基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(C16 Lyso PC)、1,2-二亚麻酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-二花生四烯酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-二(二十二碳六烯酰基)-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)、1,2-二植烷酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(ME 16.0PE)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二亚油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二亚麻酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二花生四烯酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二(二十二碳六烯酰基)-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸-rac-(1-甘油)钠盐(DOPG)以及它们的混合物。

102.根据权利要求100所述的药物组合物,其中所述稳定脂质为1-(单甲氧基-聚乙二醇)-2,3-二肉豆蔻酰基甘油(PEG-DMG),其平均PEG分子量为2000。

103.根据权利要求100所述的药物组合物,其中所述结构脂质选自由胆固醇、胆固醇衍生物、粪甾醇、谷甾醇、麦角甾醇、菜油甾醇、豆甾醇、菜子甾醇、番茄碱、熊果酸、α生育酚以及它们的混合物组成的组。

104.根据权利要求99所述的药物组合物,其中所述核酸选自小干扰RNA(siRNA)、不对称干扰RNA(aiRNA)、微小RNA(miRNA)、Dicer底物RNA(dsRNA)、小发夹RNA(shRNA)或信使RNA(mRNA)。

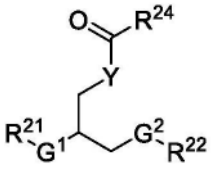
105.根据权利要求104所述的药物组合物,其中所述核酸为mRNA。

106.一种用于向有此需要的患者施用包含核酸的治疗剂的方法,所述方法包括向所述患者施用根据权利要求99所述的组合物。

107.一种脂质纳米颗粒,其包含根据权利要求48至98中任一项所述的化合物以及包含核酸的治疗剂。

108.根据权利要求107所述的脂质纳米颗粒,其中所述治疗剂为mRNA。

109.一种具有以下式(XX)结构的化合物:



(XX)

或其立体异构体、盐或互变异构体,其中:

G^1和G^2各自独立地为-OC(=O)-或-NR^{25}C(=O)-;

R^{21}和R^{22}各自独立地为C_1-C_6烷基、直链C_{10}-C_{20}烷基、直链C_{10}-C_{20}烯基或支链C_{10}-C_{35}烯基,其中所述C_1-C_6烷基被-OC(=O)R^{26}取代;

R^{24}为C_1-C_6杂烷基、芳基或被4至8元杂环烷基取代的C_1-C_4烷基;

R^{25}为H或C_1-C_4烷基;

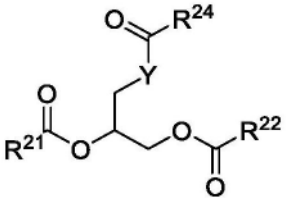
R^{26}为支链C_{10}-C_{30}烷基;并且

Y为O或NR^{32},其中R^{32}为H或C_1-C_4烷基。

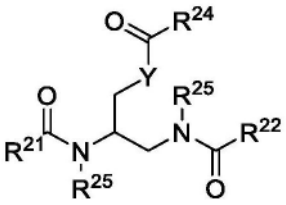
110.根据权利要求109所述的化合物,其中G^1和G^2各自为-OC(=O)-。

111.根据权利要求109所述的化合物,其中G^1和G^2各自为-NR^{25}C(=O)-。

112.根据权利要求109至111中任一项所述的化合物,其中所述化合物具有以下式(XXA)至(XXB)结构中的一种结构:



(XXA)



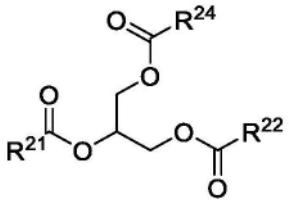
(XXB)

或其立体异构体、盐或互变异构体。

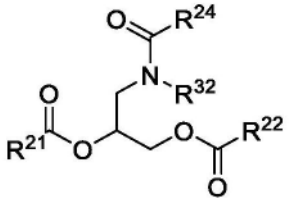
113.根据权利要求112所述的化合物,其中Y为O。

114.根据权利要求112所述的化合物,其中Y为NR^{32}。

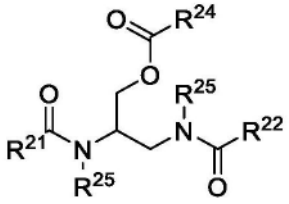
115.根据权利要求109至114中任一项所述的化合物,其中所述化合物具有以下式(XXA-1)至(XXB-2)结构中的一种结构:



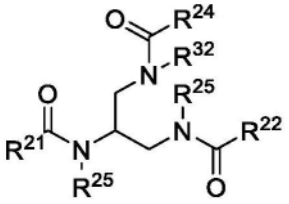
(XXA-1)



(XXA-2)



(XXB-1)



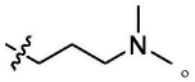
(XXB-2)

或其立体异构体、盐或互变异构体。

116.根据权利要求109至115中任一项所述的化合物,其中R^{24}为C_3-C_6杂烷基。

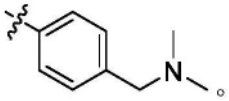
117.根据权利要求109至116中任一项所述的化合物,其中R^{24}为C_5杂烷基。

118.根据权利要求109至117中任一项所述的化合物,其中R^{24}为C_5烷基胺。

119.根据权利要求109至118中任一项所述的化合物,其中R^{24}为 

120.根据权利要求109至115中任一项所述的化合物,其中R^{24}为芳基。

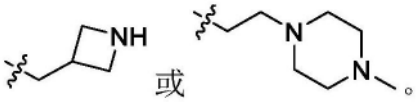
121.根据权利要求120所述的化合物,其中R^{24}的所述芳基被C_1-C_6杂烷基取代。

122.根据权利要求121所述的化合物,其中R^{24}为 

123.根据权利要求109至115中任一项所述的化合物,其中R^{24}为被4至8元杂环烷基取代的C_1-C_4烷基。

124.根据权利要求123所述的化合物,其中R^{24}为被4至6元杂环烷基取代的C_1-C_3烷基。

125.根据权利要求123或权利要求124所述的化合物,其中R^{24}具有以下结构中的一种结构:



126.根据权利要求109至125中任一项所述的化合物,其中R^{25}为H。

127.根据权利要求109至125中任一项所述的化合物,其中R^{25}为C_1-C_4烷基。

128.根据权利要求109至125中任一项所述的化合物,其中R^{25}为-CH_3。

129.根据权利要求109至125中任一项所述的化合物,其中R^{25}为-CH_2CH_3。

130.根据权利要求109至129中任一项所述的化合物,其中R^{21}和R^{22}各自独立地为被-OC(=O)R^{26}取代的C_2-C_5烷基、直链C_{12}-C_{18}烷基、直链C_{12}-C_{18}烯基或支链C_{14}-C_{32}烯基。

131.根据权利要求109至130中任一项所述的化合物,其中R^{21}或R^{22}中的一者为直链C_{12}-C_{18}烷基并且R^{21}或R^{22}中的另一者为直链C_{12}-C_{18}烯基。

132.根据权利要求109至131中任一项所述的化合物,其中R^{21}或R^{22}中的一者为被-OC(=O)R^{26}取代的C_2-C_5烷基并且R^{21}或R^{22}中的另一者为直链C_{12}-C_{18}烷基。

133.根据权利要求109至132中任一项所述的化合物,其中R^{21}或R^{22}中的一者为直链C_{12}-C_{18}烷基并且R^{21}或R^{22}中的另一者为支链C_{14}-C_{32}烯基。

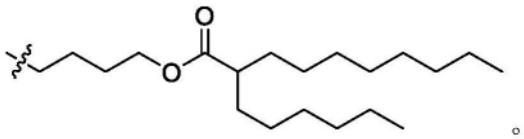
134.根据权利要求109至133中任一项所述的化合物,其中R^{21}和R^{22}各自为被-OC(=O)R^{26}取代的C_2-C_5烷基。

135.根据权利要求109至134中任一项所述的化合物,其中R^{21}和R^{22}各自为直链C_{12}-C_{18}烯基。

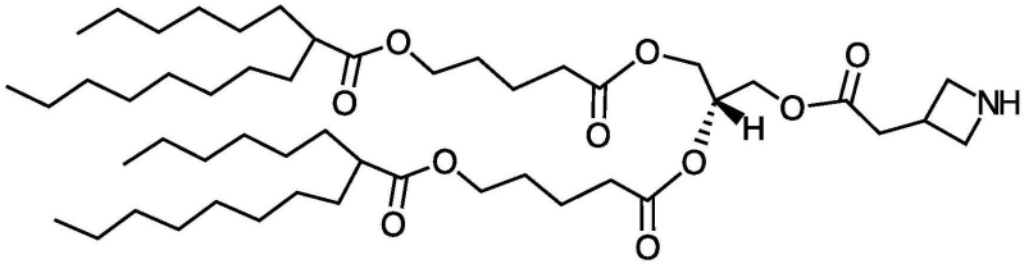
136.根据权利要求109至135中任一项所述的化合物,其中R^{26}为支链C_{10}-C_{20}烷基。

137.根据权利要求109至136中任一项所述的化合物,其中R^{26}为支链C_{12}-C_{18}烷基。

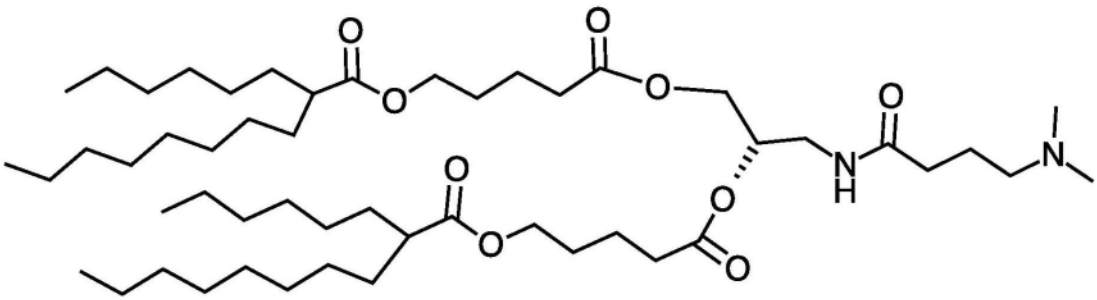
138.根据权利要求109至137中任一项所述的化合物,其中R^{21}和R^{22}各自独立地具有以下结构:



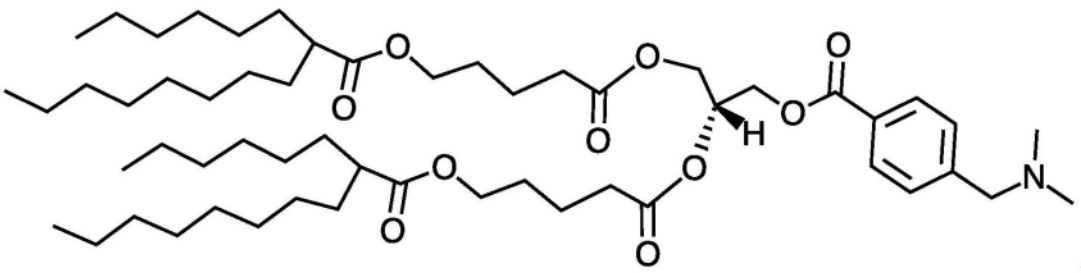
139.根据权利要求109所述的化合物,其中所述化合物具有以下结构中的一种结构:



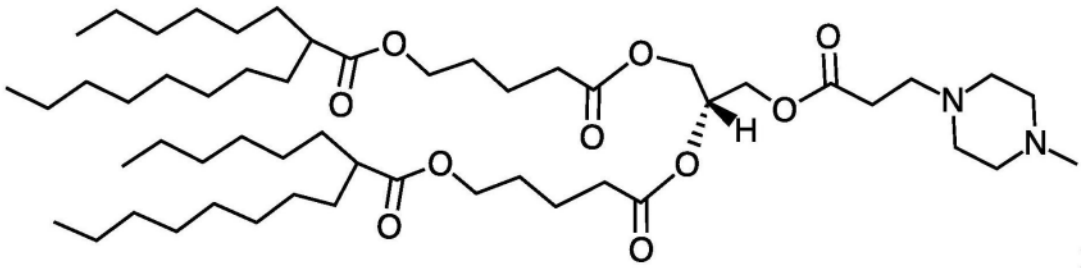
、



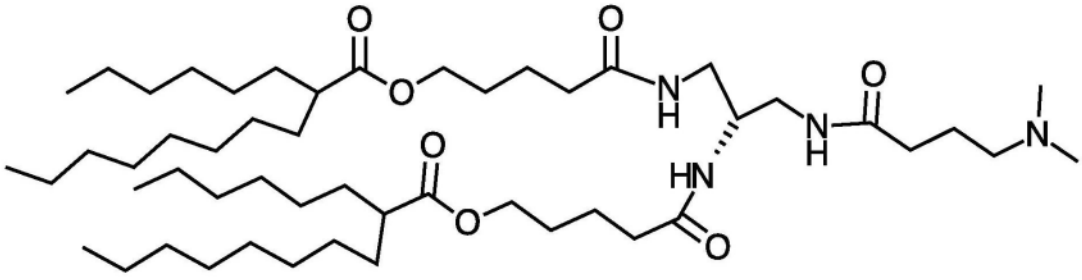
、



、



或



。

脂质结构及包含其的组合物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2022年6月23日提交的美国临时申请第63/355,024号、于2022年12月7日提交的美国临时申请第63/386,482号和于2023年5月4日提交的美国临时申请第63/464,022号的权益,这些申请中的每一个申请通过全文引用并入本文。

技术领域

[0003] 本公开涉及可电离脂质和辅助脂质,其可以与其他脂质组分诸如稳定脂质和结构脂质组合使用。本公开也提供了包含此类脂质的脂质-纳米颗粒组合物,用于递送治疗分子,特别是治疗核酸。

背景技术

[0004] 近年来,基于核酸的疗法已经引起了关注,因为通过在体内靶向疾病的基因蓝图来治疗疾病具有巨大的潜力。基于核酸的治疗可以经由基因抑制、添加、替换或编辑来实现持久或甚至治愈的效果。然而,核酸药物和其他治疗分子两者的临床转化取决于提高稳定性、促进内化和/或增加靶标亲和力的递送技术。

[0005] 基于脂质的递送系统,诸如但不限于脂质纳米颗粒(LNP),可以提供一种稳定并递送核酸和其他治疗分子的方法,并且仍然显著需要改进该技术。可以进一步改进设计特征,诸如最佳颗粒大小、封装效率、稳健的制造工艺、不同的亲脂性和适当的表面电荷,以为核酸和其他治疗分子提供有效的基于脂质的递送系统。

附图说明

[0006] 图1是用于复原人类成人真皮成纤维细胞的实验设计的示意性图示。

[0007] 图2示出来自免疫细胞化学实验的数据,其表明在使用含有脂质式(II)的脂质纳米颗粒和其中每个mRNA分子编码OCT4(O)、SOX2(S)、KLF4(K)、Lin28(L)、cMyc(M)或Nanog(N)的mRNA混合物对人类成人真皮成纤维细胞进行瞬时重编程处理之后SOD2和MMP1(皮肤老化和皮肤质量受损的标志物)的下调。

[0008] 图3示出来自免疫细胞化学实验的数据,其表明在使用含有脂质式(II)的脂质纳米颗粒和其中每个mRNA分子编码O、S、K、L、M或N的mRNA混合物对人类成人真皮成纤维细胞进行瞬时重编程处理之后SOD2、MMP1、MMP2和p16INK4A(皮肤老化、皮肤质量受损和衰老的标志物)的下调。

[0009] 图4示出数据,其表明在使用含有脂质式(II)的脂质纳米颗粒和其中每个mRNA分子编码O、S、K、L、M或N的mRNA混合物进行瞬时重编程处理之后人类成人真皮成纤维细胞的增殖增加。

[0010] 图5是用于使用本文的用于年龄表观遗传重编程(ERA)的组合物和方法来复原人类老化的皮肤外植体的实验设计的示意性图示。

[0011] 图6示出来自免疫组织化学实验的数据,其表明在使用含有脂质式(II)的脂质纳

米颗粒和其中每个mRNA分子编码O、S、K、L、M或N的mRNA混合物对人类成人真皮成纤维细胞进行瞬时重编程处理之后,与未处理的条件相比,SOD2(皮肤老化和氧化应激的标志物)的下调和胶原VII(皮肤质量的标志物)的上调。

[0012] 图7A至7B示出包含式(I)或(II)脂质的脂质纳米颗粒调配物的转染效率数据和转染效力。

[0013] 图8A至8D是示出经由电穿孔(EP,1350V和1600V)或经由Lipofectamine™用脂质纳米颗粒组合物中的增强型绿色荧光蛋白(eGFP)mRNA转染Pan T细胞(图8A和8C)或Jurkat细胞(图8B和8D)之后24小时的转染效率(图8A至8B)和细胞活力(图8C至8D)的条形图。

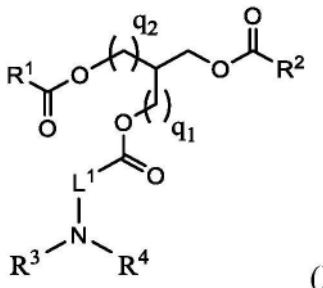
[0014] 图9A至9B是示出经由电穿孔(EP)或经由Lipofectamine™用脂质纳米颗粒组合物中的增强型绿色荧光蛋白(eGFP)mRNA转染Pan T细胞24小时之后的结果的条形图,其中转染效率在图9A中示出为eGFP的中值荧光强度,并且百分比细胞活力在图9B中示出。

[0015] 图10A至10C是示出用包含本文公开的可电离脂质的脂质纳米颗粒组合物中的增强型绿色荧光蛋白(eGFP)mRNA转染Pan T细胞之后18-24小时的结果的条形图,其中细胞活力在图10A中示出,转染效力在图10B中示出,并且转染效率在图10C中示出。

发明内容

[0016] 下文所述的以下方面及其实施例旨在是示例性和说明性的,而不限制范围。

[0017] 在一个方面,本公开涉及式(I)可电离脂质

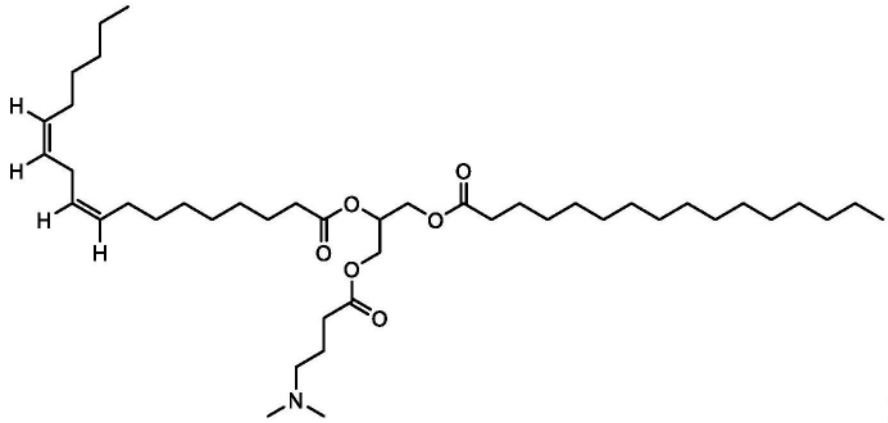
[0018] 

(I)

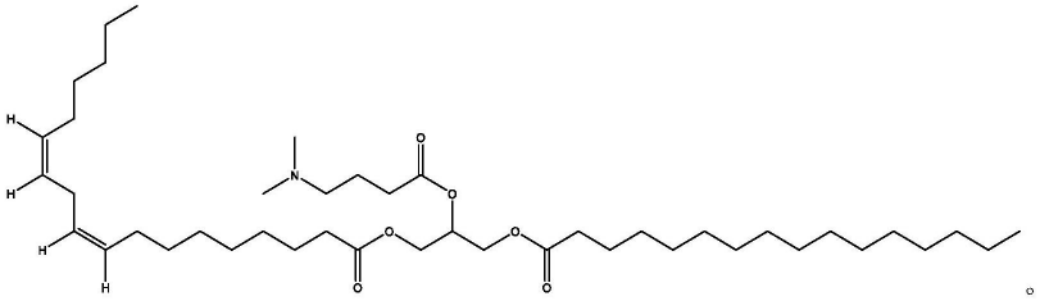
[0019] 或其药学上可接受的盐或立体异构体,其中:

[0020] L^1为C_1-C_6亚烷基;R^1为C_6-C_{20}烯基;R^2为C_6-C_{20}烷基;R^3和R^4各自独立地为H或C_1-C_3烷基;q_1不存在或为1;并且q_2不存在或为1。

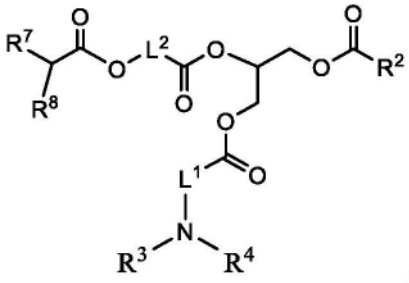
[0021] 在其他方面,式(I)可电离脂质具有以下结构中的一种结构:

[0022] 

或



[0023] 在一个方面,本公开涉及式(I-A)可电离脂质

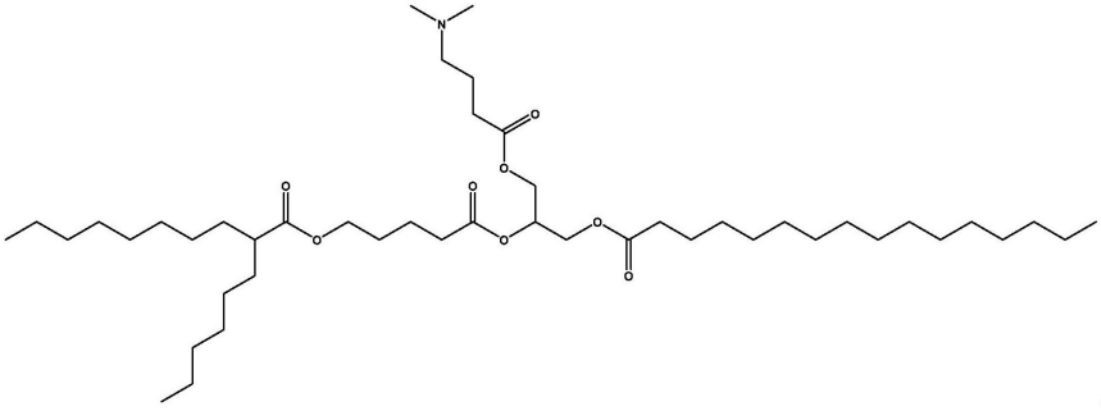
[0024] 

(I-A)

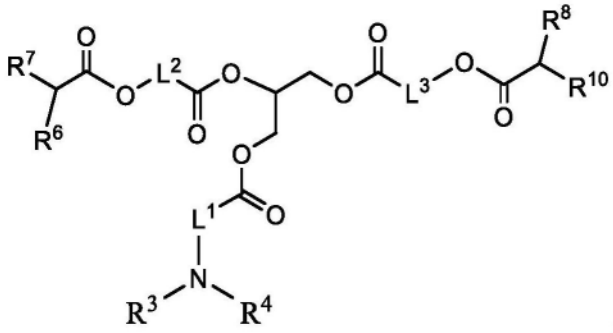
[0025] 或其药学上可接受的盐或立体异构体,其中:

[0026] L^1为C_1-C_6亚烷基;L^2为C_1-C_8亚烷基;R^2为C_6-C_{20}烷基;R^3和R^4各自独立地为H或C_1-C_3烷基;R^7为C_4-C_{20}烷基;并且R^8为C_4-C_{20}烷基。

[0027] 在其他方面,式(I-A)可电离脂质具有以下结构:

[0028] 

[0029] 在一个方面,本公开涉及式(I-B)可电离脂质

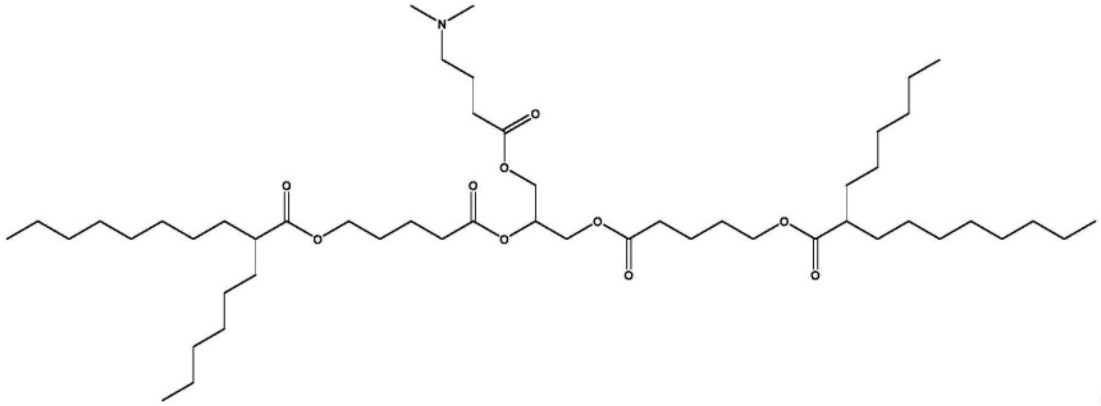
[0030] 

(I-B)

[0031] 或其药学上可接受的盐或立体异构体,其中:

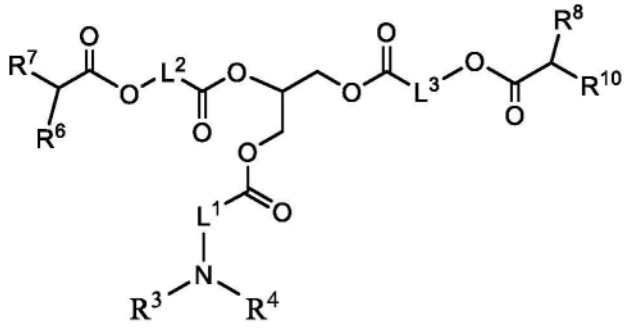
[0032] L^1为C_1-C_6亚烷基;L^2为C_1-C_8亚烷基;L^3为C_1-C_8亚烷基;R^3和R^4各自独立地为H或C_1-C_3烷基;R^6为C_4-C_{20}烷基;R^7为C_4-C_{20}烷基;R^8为C_4-C_{20}烷基;并且R^{10}为C_4-C_{20}烷基。

[0033] 在其他方面,式(I-B)可电离脂质具有以下结构:

[0034] 

。

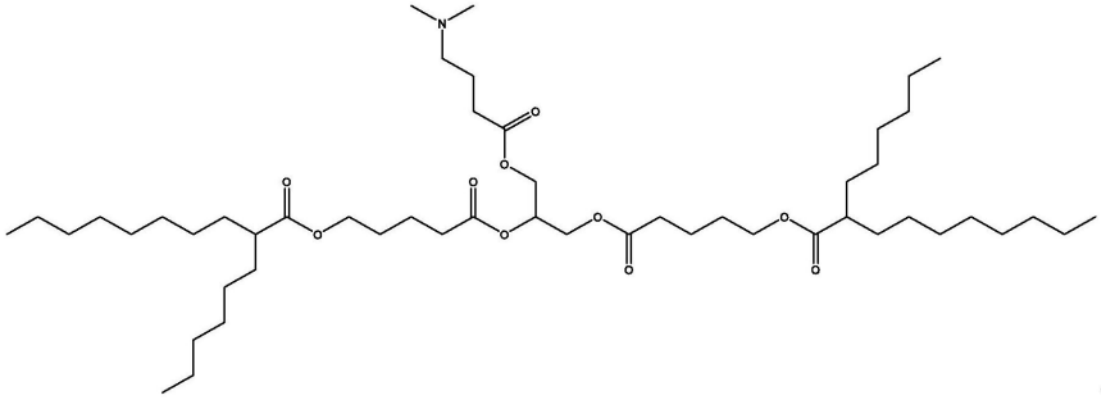
[0035] 在一个方面,本公开涉及式(I-B)可电离脂质

[0036] 

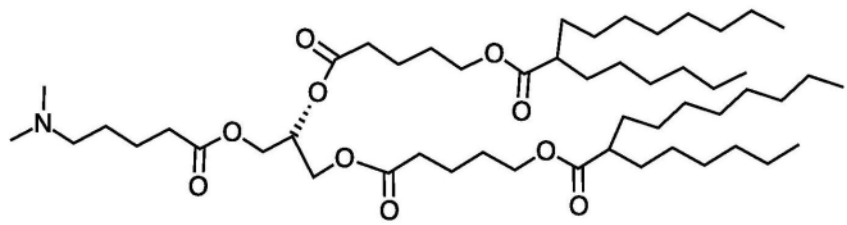
(I-B)

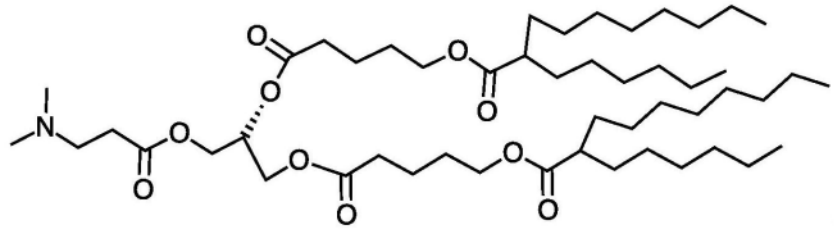
[0037] 或其药学上可接受的盐或立体异构体,其中:L^1为C_1-C_6亚烷基;L^2为C_1-C_8亚烷基;L^3为C_1-C_8亚烷基;R^3和R^4各自独立地为H、C_1-C_4烷基、-CH_2-环丙基、-$(CH_2)_n$OH,或者R^3与R^4一起形成N-杂环;R^6为C_4-C_{20}烷基;R^7为C_4-C_{20}烷基;R^8为C_4-C_{20}烷基;R^{10}为C_4-C_{20}烷基;并且n为2、3或4。

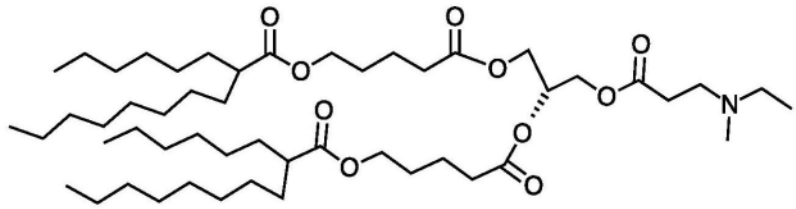
[0038] 在其他方面,式(I-B)可电离脂质具有以下结构中的一种结构:

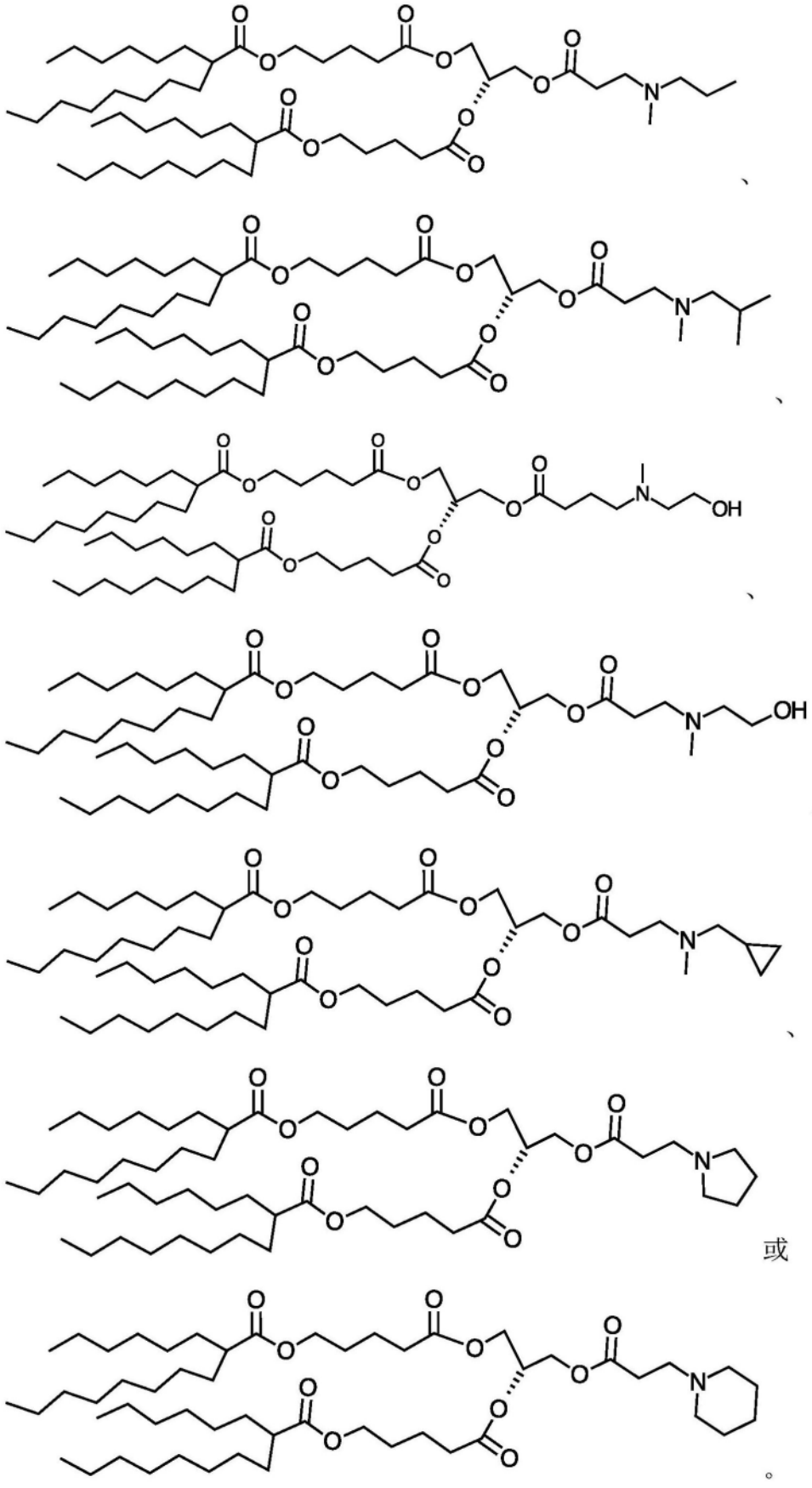


[0039]

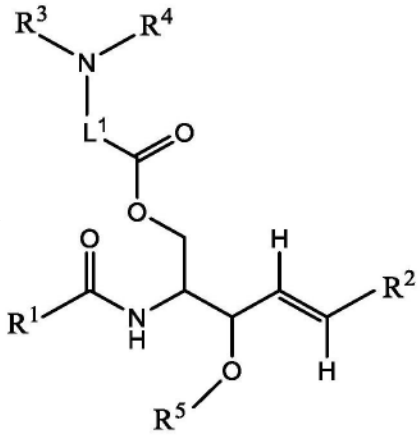






[0040] 

[0041] 在一个方面,本公开涉及式(II)可电离脂质

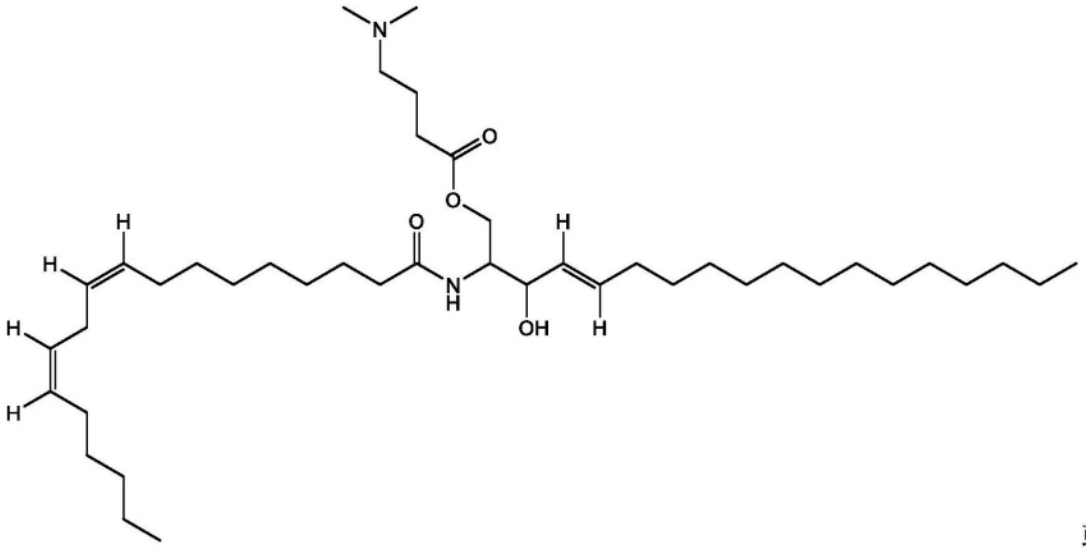


(II)

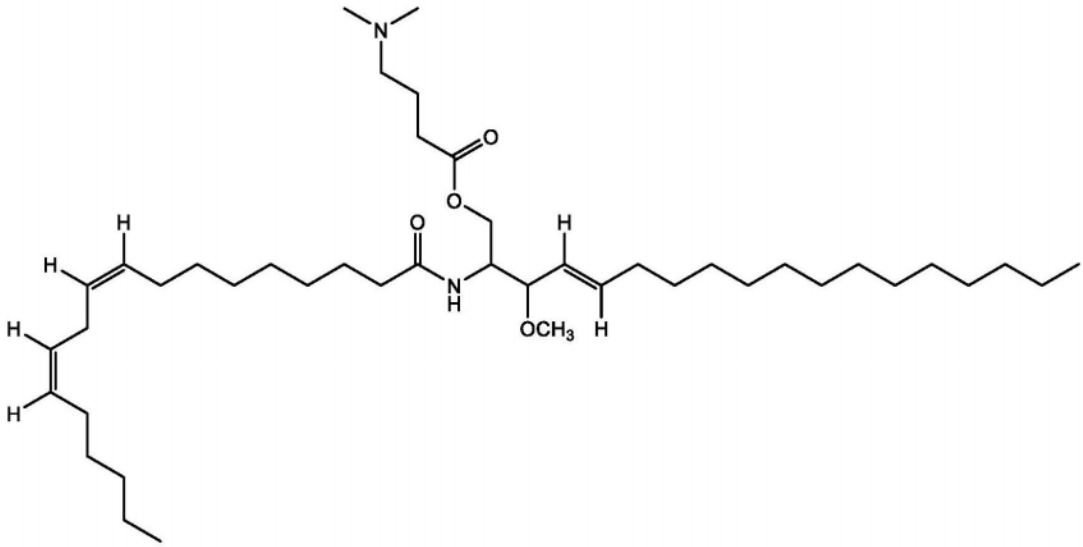
[0042] 或其药学上可接受的盐或立体异构体,其中:

[0043] L^1为C_1-C_6亚烷基;R^1为C_6-C_{20}烯基;R^2为C_6-C_{20}烷基;R^3和R^4各自独立地为H或C_1-C_3烷基;并且R^5为H或C_1-C_3烷基。

[0044] 在其他方面,式(II)可电离脂质具有以下结构中的一种结构:

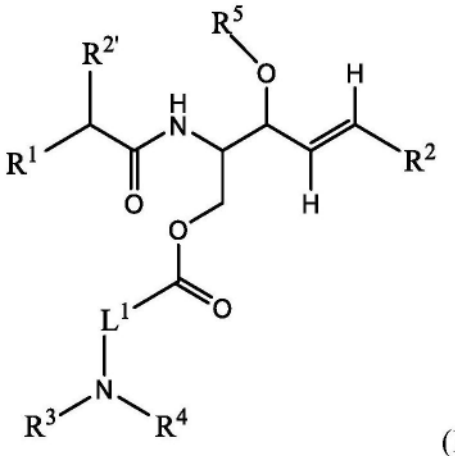


[0045] 或



。

[0046] 在一个方面,本公开涉及式(III)可电离脂质

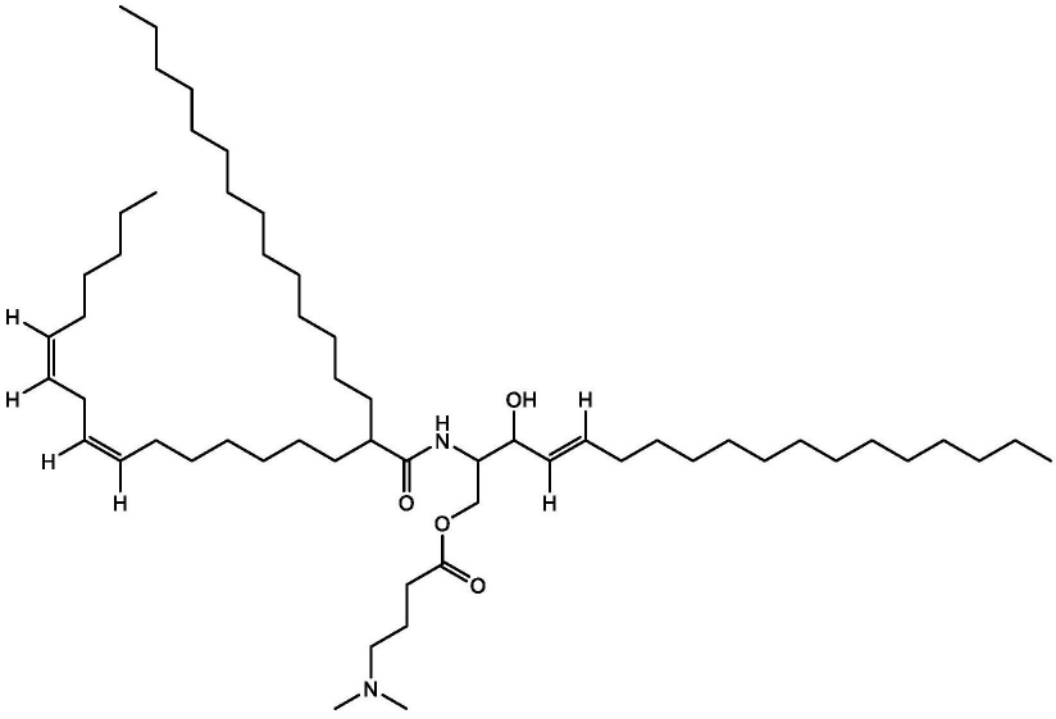
[0047] 

(III)

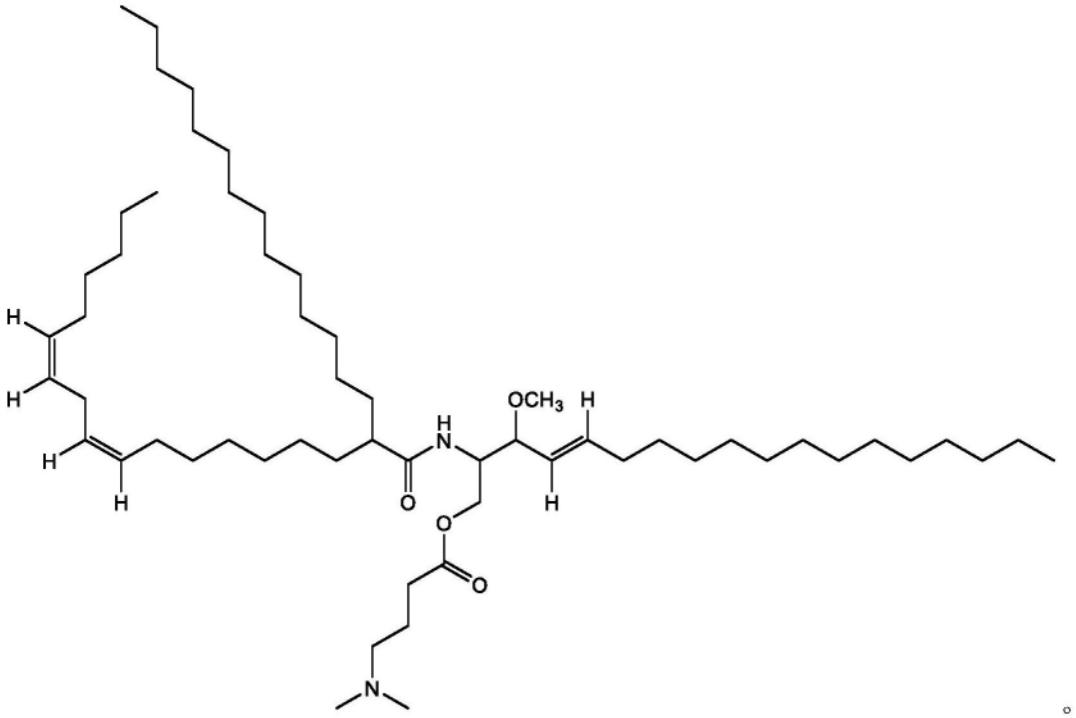
[0048] 或其药学上可接受的盐或立体异构体,其中:

[0049] L^1为C_1-C_6亚烷基;R^1为C_6-C_{20}烯基;R^2为C_6-C_{20}烷基;$R^{2'}$为C_6-C_{20}烷基;R^3和R^4各自独立地为H或C_1-C_3烷基;并且R^5为H或C_1-C_3烷基。

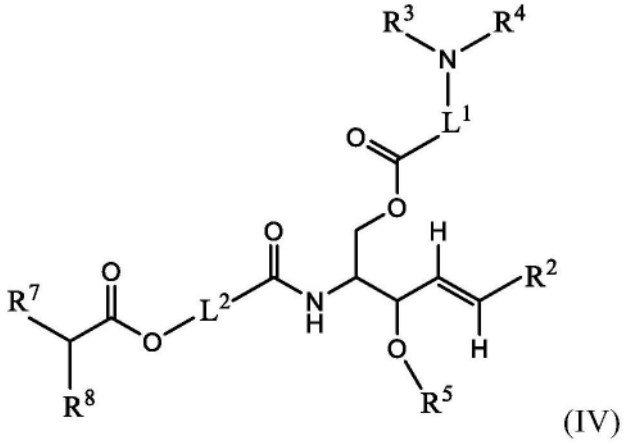
[0050] 在其他方面,式(III)可电离脂质具有以下结构中的一种结构:

[0051] 

或

[0052] 

[0053] 在一个方面,本公开涉及式(IV)可电离脂质

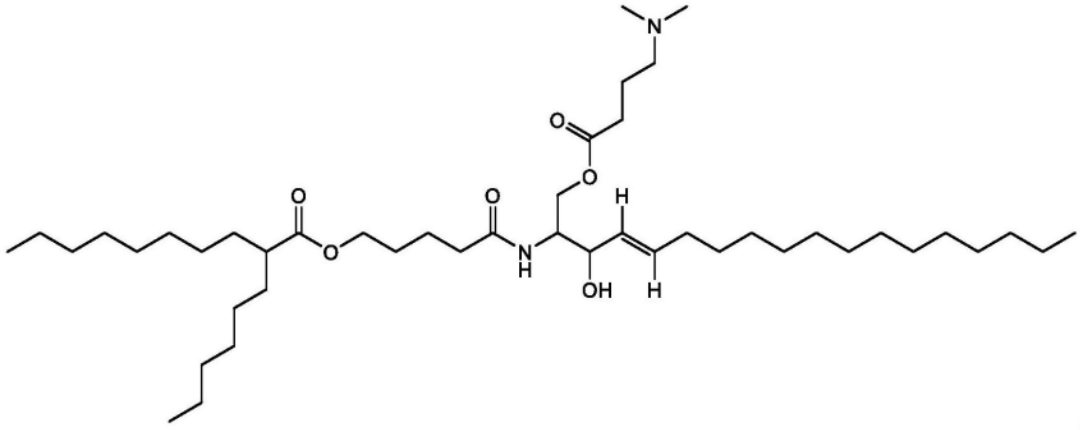
[0054] 

(IV)

[0055] 或其药学上可接受的盐或立体异构体,其中:

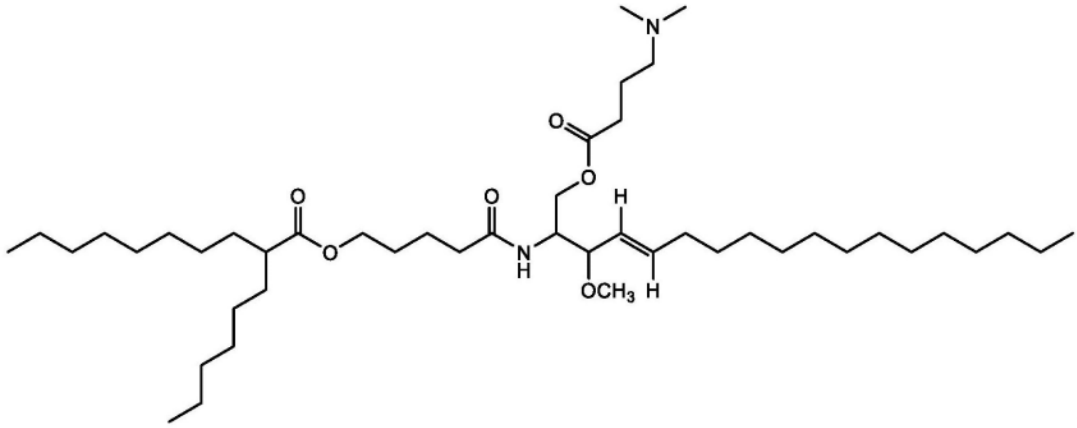
[0056] L^1为C_1-C_6亚烷基;L^2为C_1-C_8亚烷基;R^2为C_6-C_{20}烷基;R^3和R^4各自独立地为H或C_1-C_3烷基;R^5为H或C_1-C_3烷基;R^7为C_4-C_{20}烷基;并且R^8为C_4-C_{20}烷基。

[0057] 在其他方面,式(IV)可电离脂质具有以下结构中的一种结构:



或

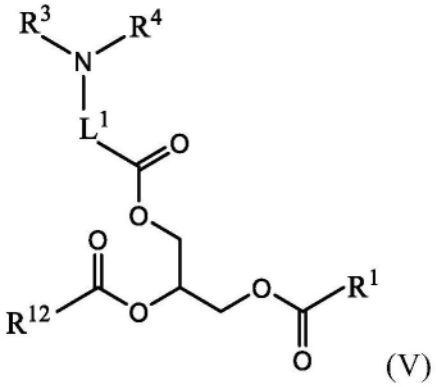
[0058]



。

[0059] 在一个方面,本公开涉及式(V)可电离脂质

[0060]

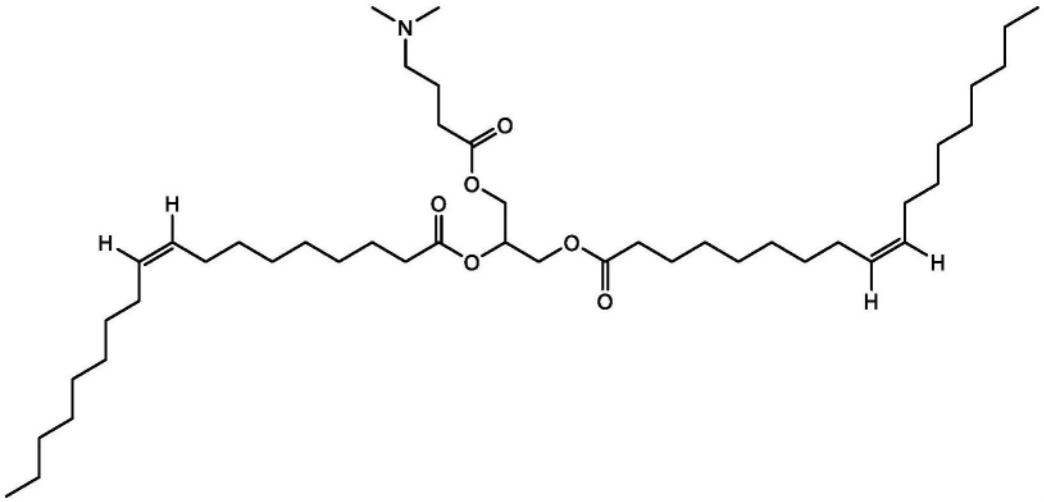


(V)

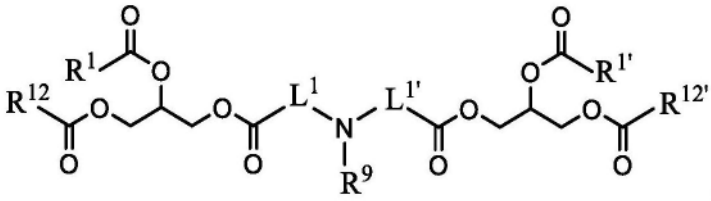
[0061] 或其药学上可接受的盐或立体异构体,其中:

[0062] L^1为C_1-C_6亚烷基;R^1为C_6-C_{20}烯基;R^3和R^4各自独立地为H或C_1-C_3烷基;并且R^{12}为C_6-C_{20}烯基。

[0063] 在其他方面,式(V)可电离脂质具有以下结构:

[0064] 

[0065] 在一个方面,本公开涉及式(VI)可电离脂质

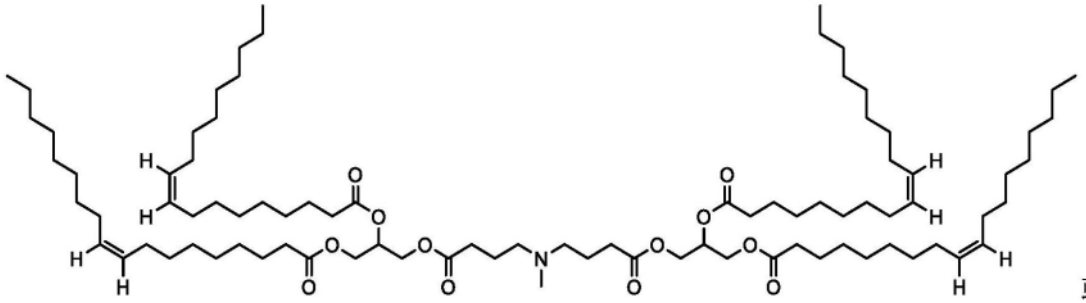
[0066] 

(VI)

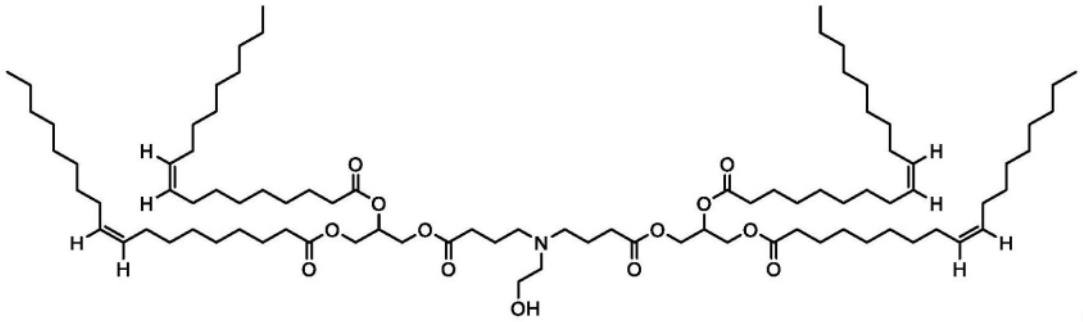
[0067] 或其药学上可接受的盐或立体异构体,其中:

[0068] L^1为C_1-C_6亚烷基;$L^{1'}$为C_1-C_6亚烷基;R^1为C_6-C_{20}烯基;$R^{1'}$为C_6-C_{20}烯基;R^9为H、C_1-C_6烷基或-$(CH_2)_nOH$;R^{12}为C_6-C_{20}烯基;$R^{12'}$为C_6-C_{20}烯基;并且n为2、3或4。

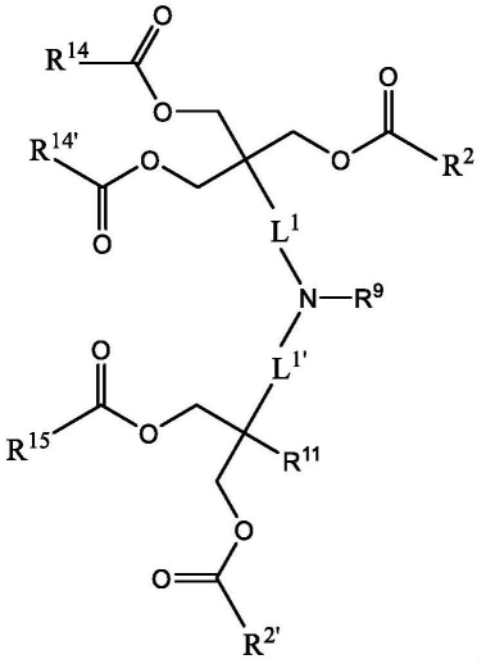
[0069] 在其他方面,式(VI)可电离脂质具有以下结构中的一种结构:

[0070] 

或



[0071] 在一个方面,本公开涉及式(VII)可电离脂质

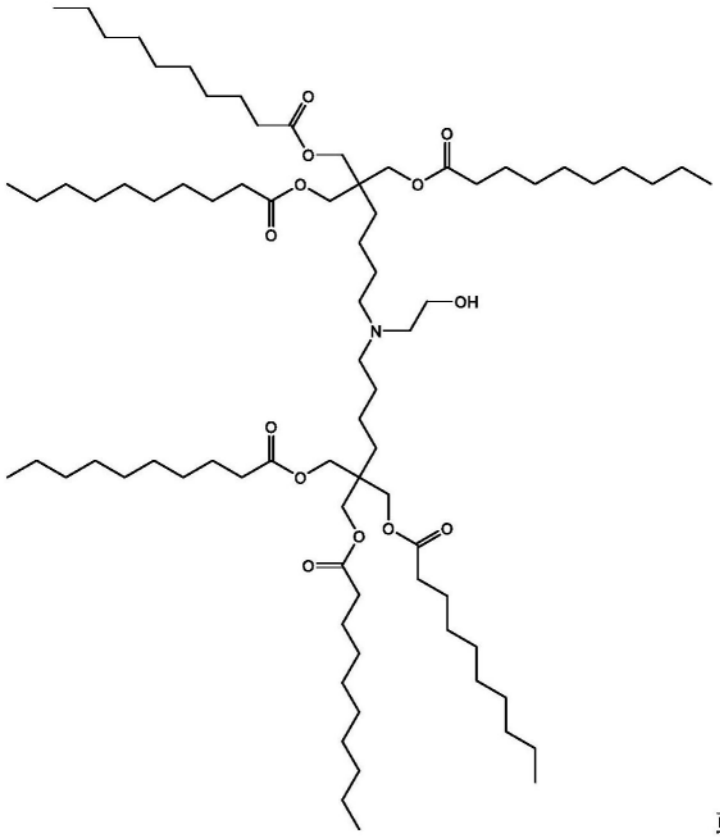
[0072] 

(VII)

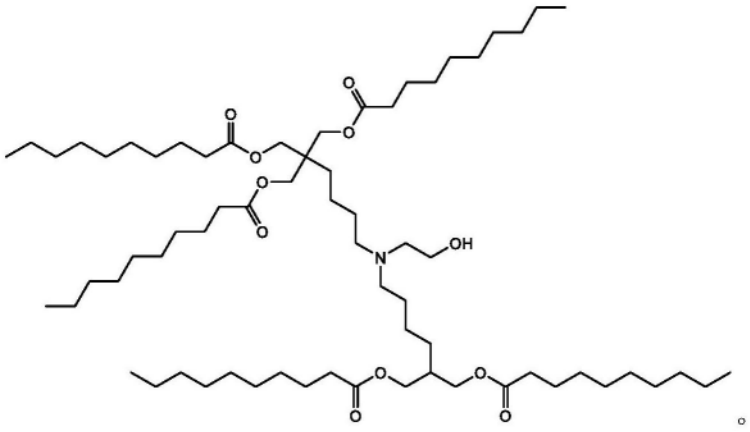
[0073] 或其药学上可接受的盐或立体异构体,其中:

[0074] L^1为C_1-C_6亚烷基;$L^{1'}$为C_1-C_6亚烷基;R^2为C_6-C_{20}烷基;$R^{2'}$为C_6-C_{20}烷基;R^9为H、C_1-C_6烷基或-$(CH_2)_nOH$;R^{11}为H或-$CH_2)OC(=O)R^{16}$;R^{14}为C_6-C_{20}烷基;$R^{14'}$为C_6-C_{20}烷基;R^{15}为C_6-C_{20}烷基;R^{16}为C_6-C_{20}烷基;并且n为2、3或4。

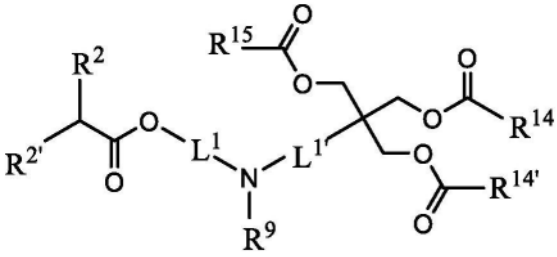
[0075] 在其他方面,式(VII)可电离脂质具有以下结构中的一种结构:

[0076] 

或

[0077] 

[0078] 在一个方面,本公开涉及式(VIII)可电离脂质

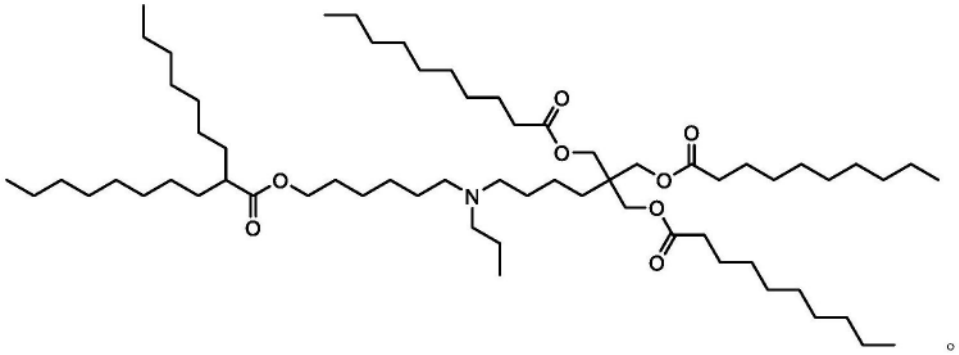
[0079] 

(VIII)

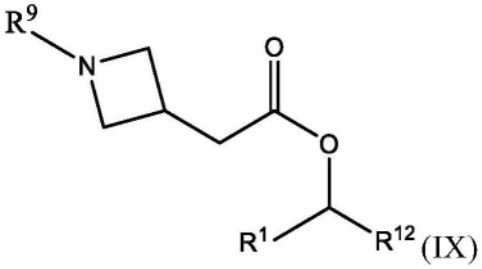
[0080] 或其药学上可接受的盐或立体异构体,其中:

[0081] L^1为C_1-C_6亚烷基;$L^{1'}$为C_1-C_6亚烷基;R^2为C_6-C_{20}烷基;$R^{2'}$为C_6-C_{20}烷基;R^9为H、C_1-C_6烷基或-$(CH_2)_nOH$;R^{14}为C_6-C_{20}烷基;$R^{14'}$为C_6-C_{20}烷基;R^{15}为C_6-C_{20}烷基;并且n为2、3或4。

[0082] 在其他方面,式(VIII)可电离脂质具有以下结构:

[0083] 

[0084] 在一个方面,本公开涉及式(IX)可电离脂质

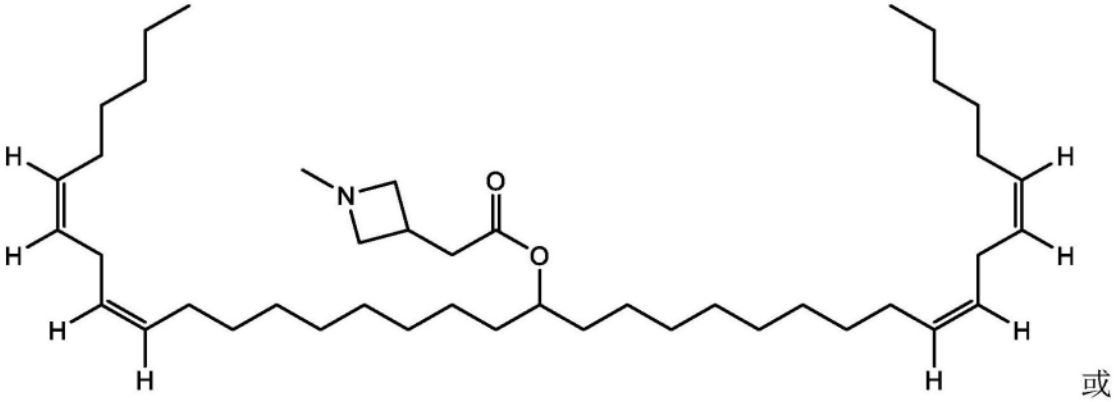
[0085] 

(IX)

[0086] 或其药学上可接受的盐或立体异构体,其中:

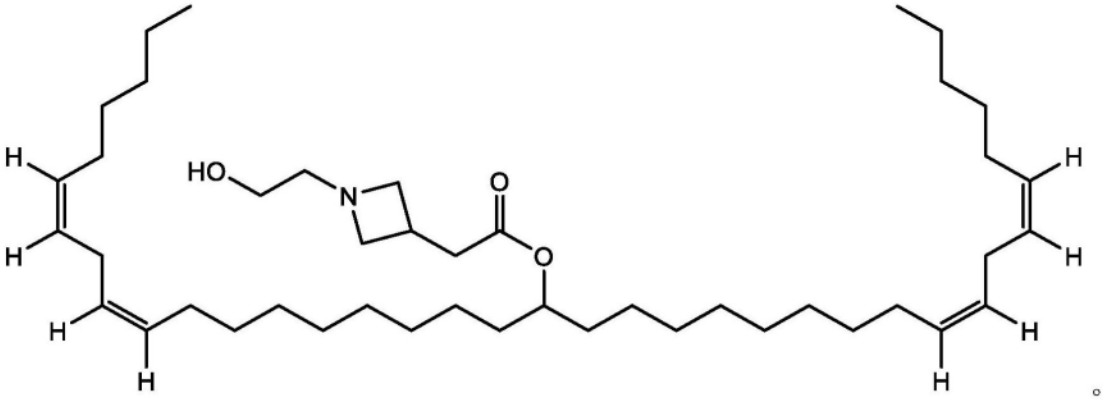
[0087] R^1为C_6-C_{20}烯基;R^9为H、C_1-C_6烷基或-$(CH_2)_nOH$;R^{12}为C_6-C_{20}烯基;并且n为2、3或4。

[0088] 在其他方面,式(IX)可电离脂质具有以下结构中的一种结构:



或

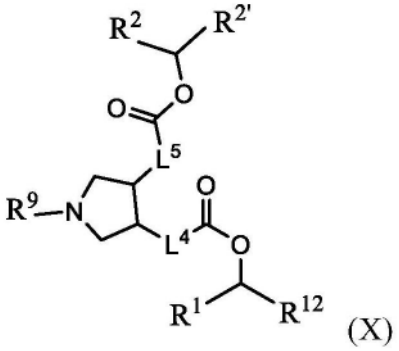
[0089]



。

[0090] 在一个方面,本公开涉及式(X)可电离脂质

[0091]

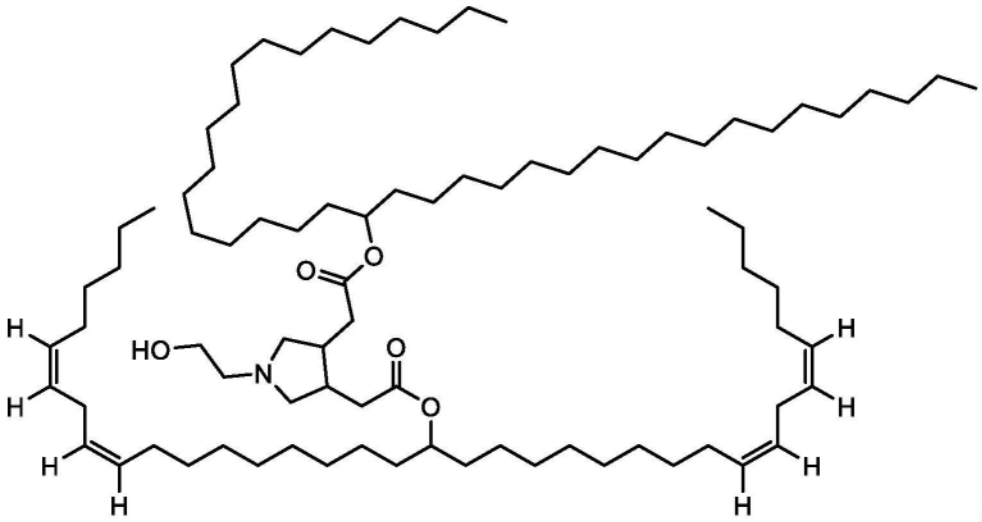


(X)

[0092] 或其药学上可接受的盐或立体异构体,其中:

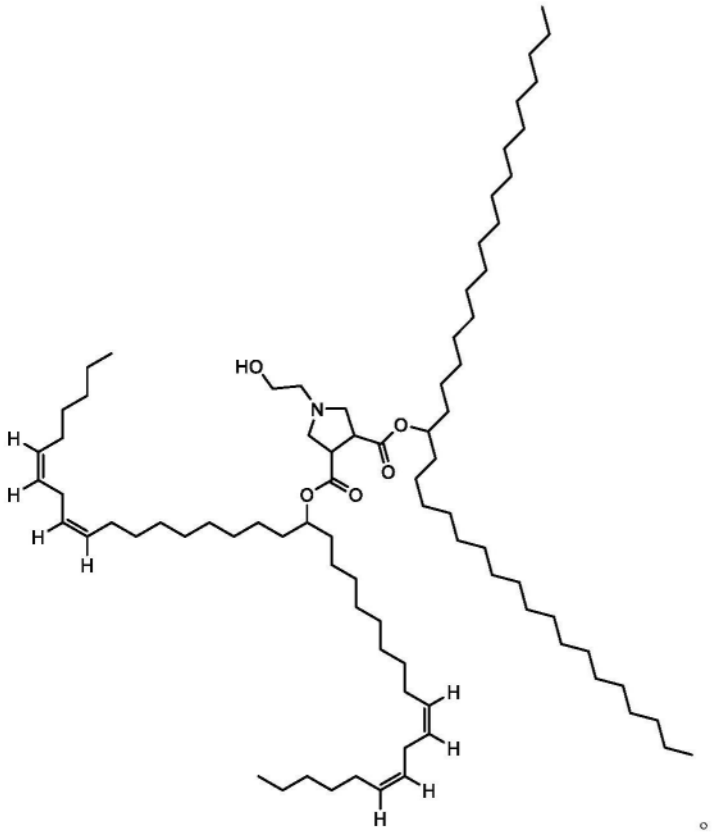
[0093] L^4不存在或为C_1-C_6亚烷基;L^5不存在或为C_1-C_6亚烷基;R^1为C_6-C_{20}烯基;R^2为C_6-C_{20}烷基;$R^{2'}$为C_6-C_{20}烷基;R^9为H、C_1-C_6烷基或-$(CH_2)_nOH$;R^{12}为C_6-C_{20}烯基;并且n为2、3或4。

[0094] 在其他方面,式(X)可电离脂质具有以下结构中的一种结构:



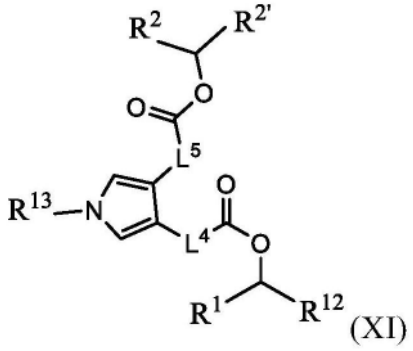
或

[0095]



[0096] 在一个方面,本公开涉及式(XI)可电离脂质

[0097]

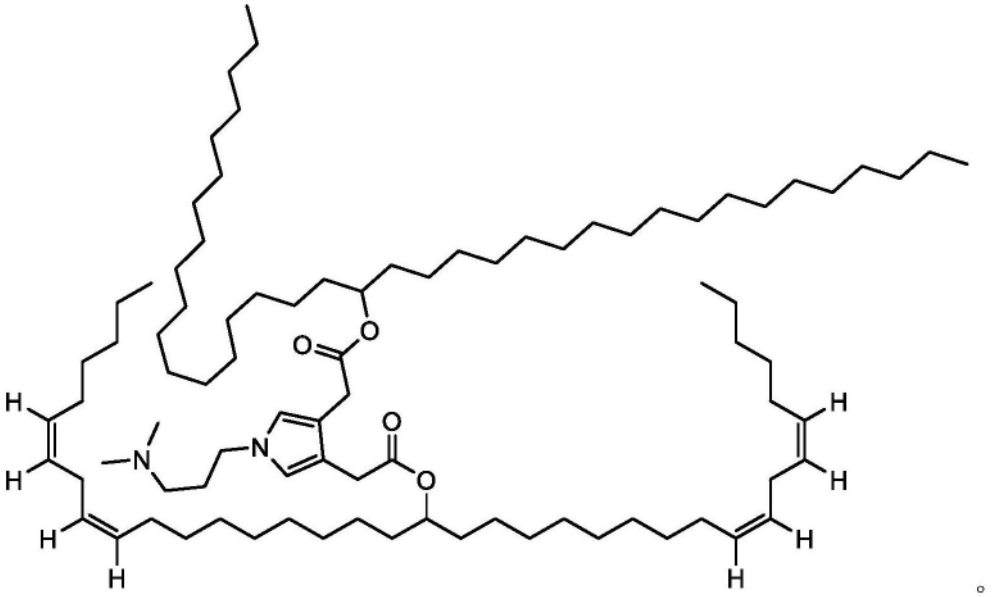


(XI)

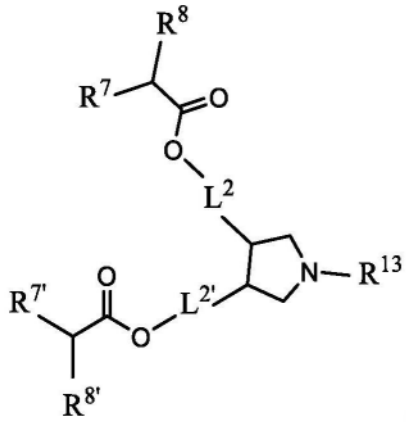
[0098] 或其药学上可接受的盐或立体异构体,其中:

[0099] L^4不存在或为C_1-C_6亚烷基;L^5不存在或为C_1-C_6亚烷基;R^1为C_6-C_{20}烯基;R^2为C_6-C_{20}烷基;$R^{2'}$为C_6-C_{20}烷基;R^{12}为C_6-C_{20}烯基;R^{13}为H、C_1-C_6烷基、-$(CH_2)_nOH$或-$(CH_2)_qN(CH_3)_2$;n为2、3或4;并且q为2、3或4。

[0100] 在其他方面,式(XI)可电离脂质具有以下结构:

[0101] 

[0102] 在一个方面,本公开涉及式(XII)可电离脂质

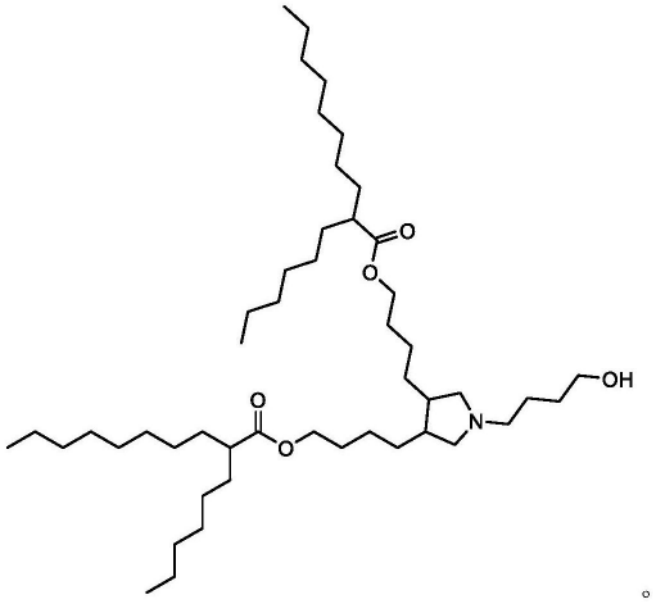
[0103] 

(XII)

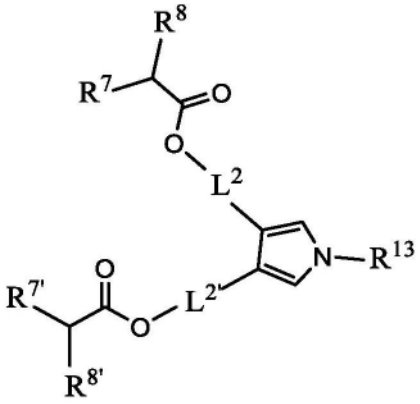
[0104] 或其药学上可接受的盐或立体异构体,其中:

[0105] L^2为C_1-C_8亚烷基;$L^{2'}$为C_1-C_8亚烷基;R^7为C_4-C_{20}烷基;$R^{7'}$为C_4-C_{20}烷基;R^8为C_4-C_{20}烷基;$R^{8'}$为C_4-C_{20}烷基;R^{13}为H、C_1-C_6烷基、-$(CH_2)_nOH$或-$(CH_2)_qN(CH_3)_2$;n为2、3或4;并且q为2、3或4。

[0106] 在其他方面,式(XII)可电离脂质具有以下结构:

[0107] 

[0108] 在一个方面,本公开涉及式(XIII)可电离脂质

[0109] 

(XIII)

[0110] 或其药学上可接受的盐或立体异构体,其中:

[0111] L^2为C_1-C_8亚烷基;$L^{2'}$为C_1-C_8亚烷基;R^7为C_4-C_{20}烷基;$R^{7'}$为C_4-C_{20}烷基;R^8为C_4-C_{20}烷基;$R^{8'}$为C_4-C_{20}烷基;R^{13}为H、C_1-C_6烷基、-$(CH_2)_nOH$或-$(CH_2)_qN(CH_3)_2$;n为2、3或4;并且q为2、3或4。

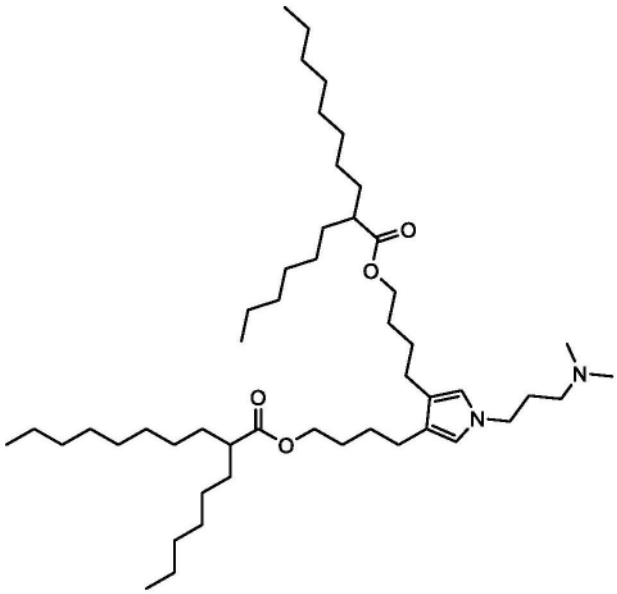
[0112] 在一些实施例中,L^2为C_1-C_8亚烷基;$L^{2'}$为C_1-C_8亚烷基;R^7为C_4-C_{20}烷基;$R^{7'}$为C4-C20烷基;R8为C4-C20烷基;R8'为C4-C20烷基;并且在式(XIII)中,R13为H。

[0113] 在一些实施例中,L2为C1-C8亚烷基;L2'为C1-C8亚烷基;R7为C4-C20烷基;R7'为C4-C20烷基;R8为C4-C20烷基;R8'为C4-C20烷基;并且在式(XIII)中,R13为甲基。

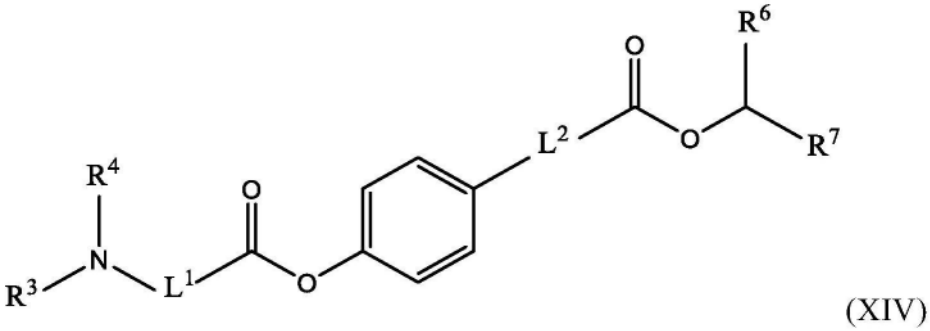
[0114] 在一些实施例中,L2为C1-C8亚烷基;L2'为C1-C8亚烷基;R7为C4-C20烷基;R7'为C4-C20烷基;R8为C4-C20烷基;R8'为C4-C20烷基;R13为-(CH2)nOH;并且在式(XIII)中,n为2。

[0115] 在一些实施例中,L2为C1-C8亚烷基;L2'为C1-C8亚烷基;R7为C4-C20烷基;R7'为C4-C20烷基;R8为C4-C20烷基;R8'为C4-C20烷基;R13为-(CH2)qN(CH3)2;并且在式(XIII)中,q为3。

[0116] 式(XIII)可电离脂质的示例性实例可以包括但不限于以下:

[0117] 

[0118] 在一个实施例中,可电离脂质具有式(XIV)

[0119] 

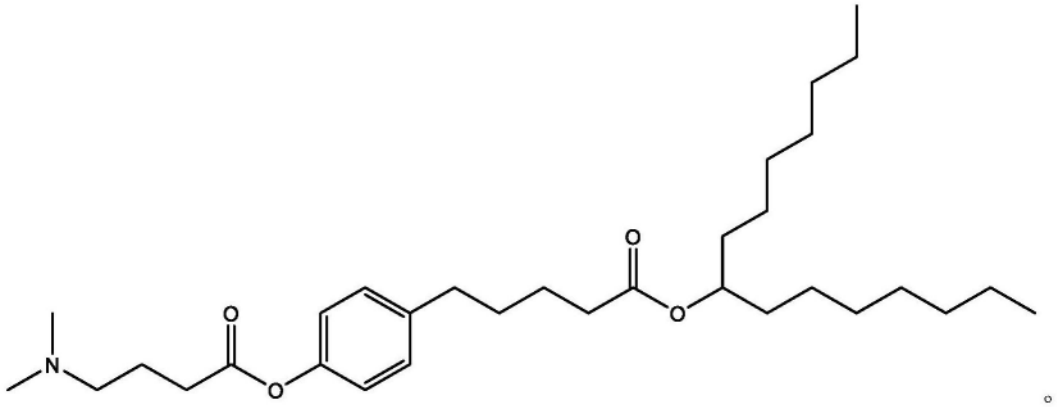
(XIV)

[0120] 或其药学上可接受的盐或立体异构体,其中:

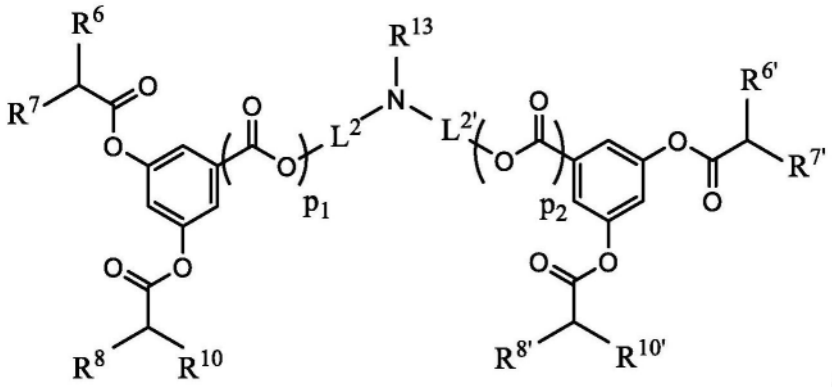
[0121] L1为C1-C6亚烷基;L2为C1-C8亚烷基;R3和R4各自独立地为H或C1-C3烷基;R6为C4-C20烷基;并且R7为C4-C20烷基。

[0122] 在一些实施例中,L1为C1-C6亚烷基;L2为C1-C8亚烷基;R3为甲基;R4为甲基;R6为C4-C20烷基;并且在式(XIV)中,R7为C4-C20烷基。

[0123] 式(XIV)可电离脂质的示例性实例可以包括但不限于以下

[0124] 

[0125] 在一个实施例中,可电离脂质具有式(XV)

[0126] 

(XV)

[0127] 或其药学上可接受的盐或立体异构体,其中:

[0128] L2为C1-C8亚烷基;L2'为C1-C8亚烷基;R6为C4-C20烷基;R6'为C4-C20烷基;R7为C4-C20烷基;R7'为C4-C20烷基;R8为C4-C20烷基;R8'为C4-C20烷基;R10为C4-C20烷基;R10'为C4-C20烷基;R13为H、C1-C6烷基、-(CH2)nOH或-(CH2)qN(CH3)2;n为2、3或4;p1不存在或为1;p2不存在或为1;并且q为2、3或4。

[0129] 在一些实施例中,L2为C1-C8亚烷基;L2'为C1-C8亚烷基;R6为C4-C20烷基;R6'为C4-C20烷基;R7为C4-C20烷基;R7'为C4-C20烷基;R8为C4-C20烷基;R8'为C4-C20烷基;R10为C4-C20烷基;R10'为C4-C20烷基;R13为H;p1不存在;并且在式(XV)中,p2不存在。

[0130] 在一些实施例中,L2为C1-C8亚烷基;L2'为C1-C8亚烷基;R6为C4-C20烷基;R6'为C4-C20烷基;R7为C4-C20烷基;R7'为C4-C20烷基;R8为C4-C20烷基;R8'为C4-C20烷基;R10为C4-C20烷基;R10'为C4-C20烷基;R13为H;p1为1;并且在式(XV)中,p2为1。

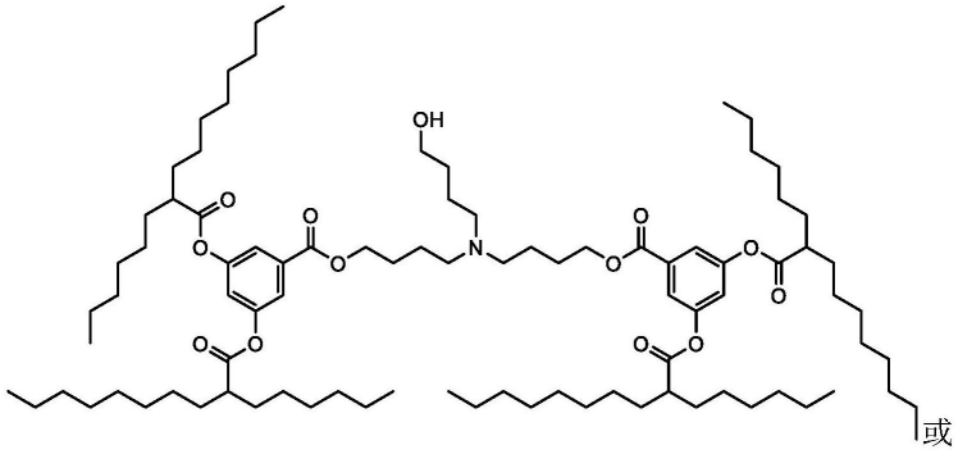
[0131] 在一些实施例中,L2为C1-C8亚烷基;L2'为C1-C8亚烷基;R6为C4-C20烷基;R6'为C4-C20烷基;R7为C4-C20烷基;R7'为C4-C20烷基;R8为C4-C20烷基;R8'为C4-C20烷基;R10为C4-C20烷基;R10'为C4-C20烷基;R13为甲基;p1不存在;并且在式(XV)中,p2不存在。

[0132] 在一些实施例中,L2为C1-C8亚烷基;L2'为C1-C8亚烷基;R6为C4-C20烷基;R6'为C4-C20烷基;R7为C4-C20烷基;R7'为C4-C20烷基;R8为C4-C20烷基;R8'为C4-C20烷基;R10为C4-C20烷基;R10'为C4-C20烷基;R13为甲基;p1为1;并且在式(XV)中,p2为1。

[0133] 在一些实施例中,L2为C1-C8亚烷基;L2'为C1-C8亚烷基;R6为C4-C20烷基;R6'为C4-C20烷基;R7为C4-C20烷基;R7'为C4-C20烷基;R8为C4-C20烷基;R8'为C4-C20烷基;R10为C4-C20烷基;R10'为C4-C20烷基;R13为-(CH2)nOH;n为4;p1不存在;并且在式(XV)中,p2不存在。

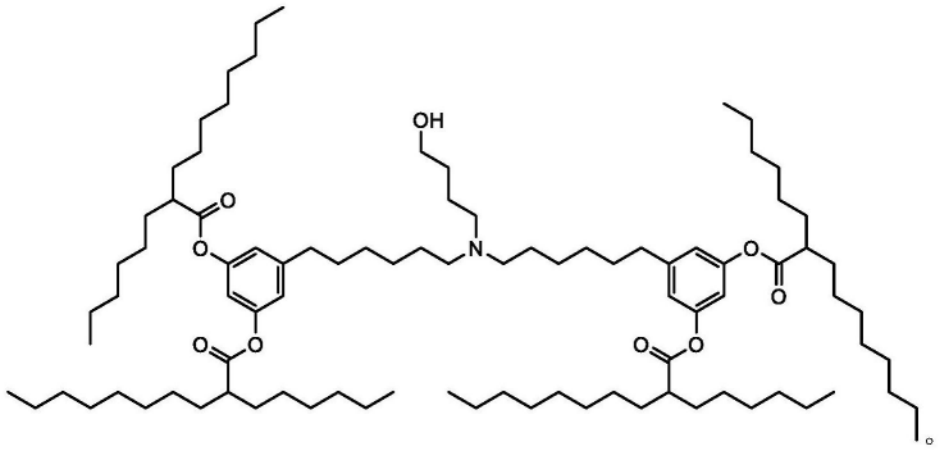
[0134] 在一些实施例中,L2为C1-C8亚烷基;L2'为C1-C8亚烷基;R6为C4-C20烷基;R6'为C4-C20烷基;R7为C4-C20烷基;R7'为C4-C20烷基;R8为C4-C20烷基;R8'为C4-C20烷基;R10为C4-C20烷基;R10'为C4-C20烷基;R13为-(CH2)nOH;n为4;p1为1;并且在式(XV)中,p2为1。

[0135] 式(XV)可电离脂质的示例性实例可以包括但不限于以下:



或

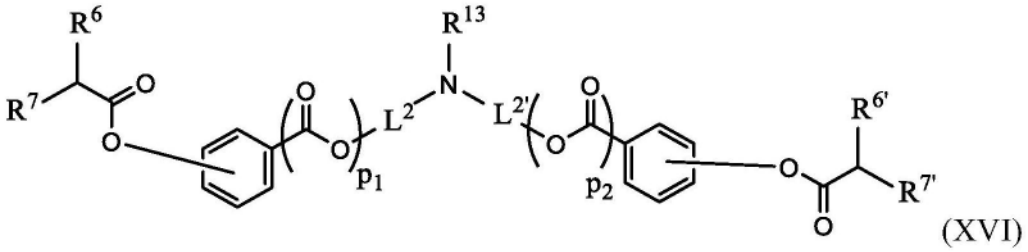
[0136]



。

[0137] 在一个实施例中,可电离脂质具有式(XVI)

[0138]



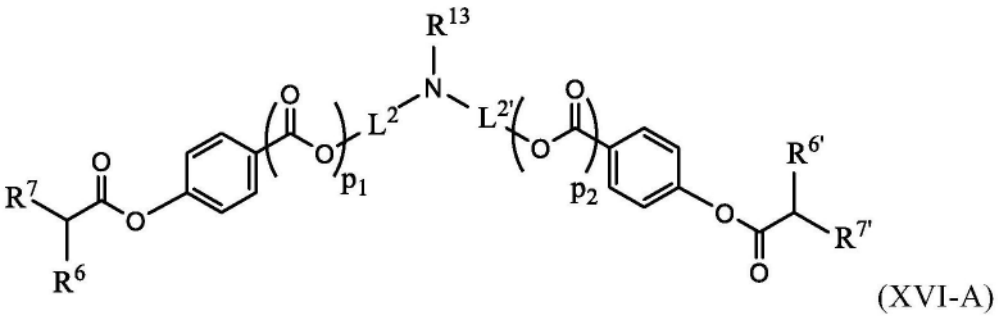
(XVI)

[0139] 或其药学上可接受的盐或立体异构体,其中:

[0140] L2为C1-C8亚烷基;L2'为C1-C8亚烷基;R6为C4-C20烷基;R6'为C4-C20烷基;R7为C4-C20烷基;R7'为C4-C20烷基;R13为H、C1-C6烷基、-(CH2)nOH或-(CH2)qN(CH3)2;n为2、3或4;p1不存在或为1;p2不存在或为1;并且q为2、3或4。

[0141] 在一个实施例中,可电离脂质具有式(XVI-A):

[0142]



(XVI-A)

[0143] 或其药学上可接受的盐或立体异构体,其中:

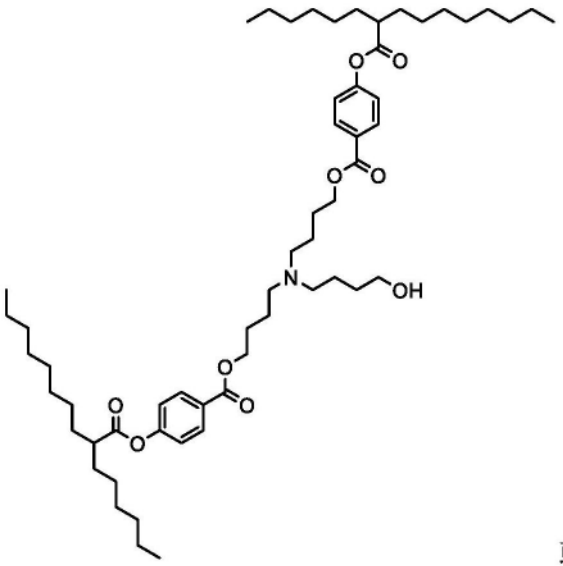
[0144] L^2为C_1-C_8亚烷基;L^2'为C_1-C_8亚烷基;R^6为C_4-C_{20}烷基;R^6'为C_4-C_{20}烷基;R^7为C_4-C_{20}烷基;R^7'为C_4-C_{20}烷基;R^{13}为H、C_1-C_6烷基、-$(CH_2)_nOH$或-$(CH_2)_qN(CH_3)_2$;n为2、3或4;p_1不存在或为1;p_2不存在或为1;并且q为2、3或4。

[0145] 在一些实施例中,L^2为C_1-C_8亚烷基;L^2'为C_1-C_8亚烷基;R^6为C_4-C_{20}烷基;R^6'为C_4-C_{20}烷基;R^7为C_4-C_{20}烷基;R^7'为C_4-C_{20}烷基;R^{13}为H;p_1不存在或为1;并且在式(XVI)和式(XVI-A)中,p_2不存在或为1。

[0146] 在一些实施例中,L^2为C_1-C_8亚烷基;L^2'为C_1-C_8亚烷基;R^6为C_4-C_{20}烷基;R^6'为C_4-C_{20}烷基;R^7为C_4-C_{20}烷基;R^7'为C_4-C_{20}烷基;R^{13}为甲基;p_1不存在或为1;并且在式(XVI)和式(XVI-A)中,p_2不存在或为1。在其他实施例中,L^2为C_1-C_8亚烷基;L^2'为C_1-C_8亚烷基;R^6为C_4-C_{20}烷基;R^6'为C_4-C_{20}烷基;R^7为C_4-C_{20}烷基;R^7'为C_4-C_{20}烷基;R^{13}为-$(CH_2)_nOH$;n为4;p_1不存在;并且在式(XVI)和式(XVI-A)中,p_2不存在。

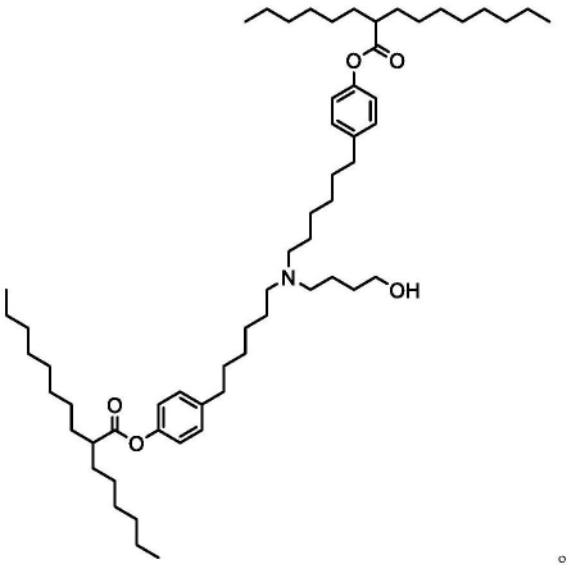
[0147] 在一些实施例中,L^2为C_1-C_8亚烷基;L^2'为C_1-C_8亚烷基;R^6为C_4-C_{20}烷基;R^6'为C_4-C_{20}烷基;R^7为C_4-C_{20}烷基;R^7'为C_4-C_{20}烷基;R^{13}为-$(CH_2)_nOH$;n为4;p_1为1;并且在式(XVI)和式(XVI-A)中,p_2为1。

[0148] 式(XVI)和式(XVI-A)可电离脂质的示例性实例可以包括但不限于以下:



或

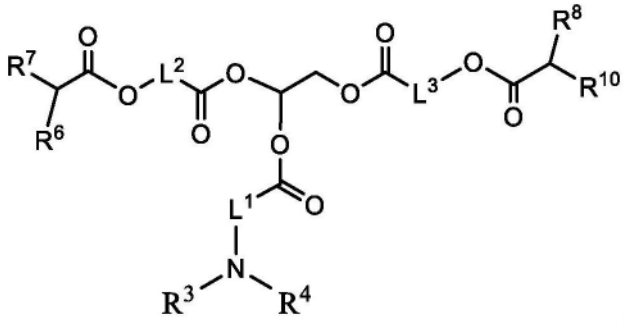
[0149]



。

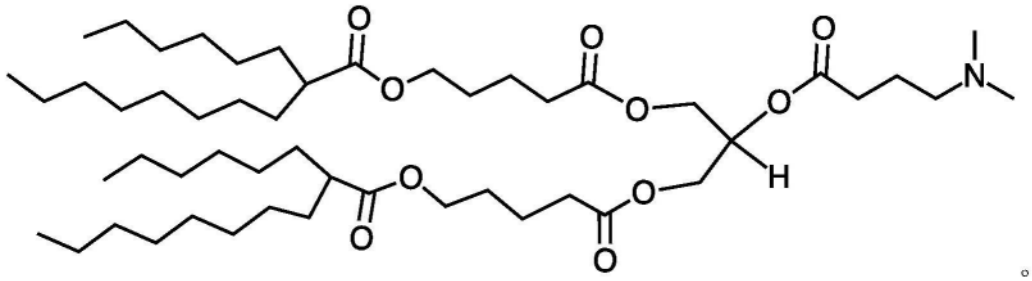
[0150] 在一个实施例中,式(I-C)可电离脂质:

[0151]

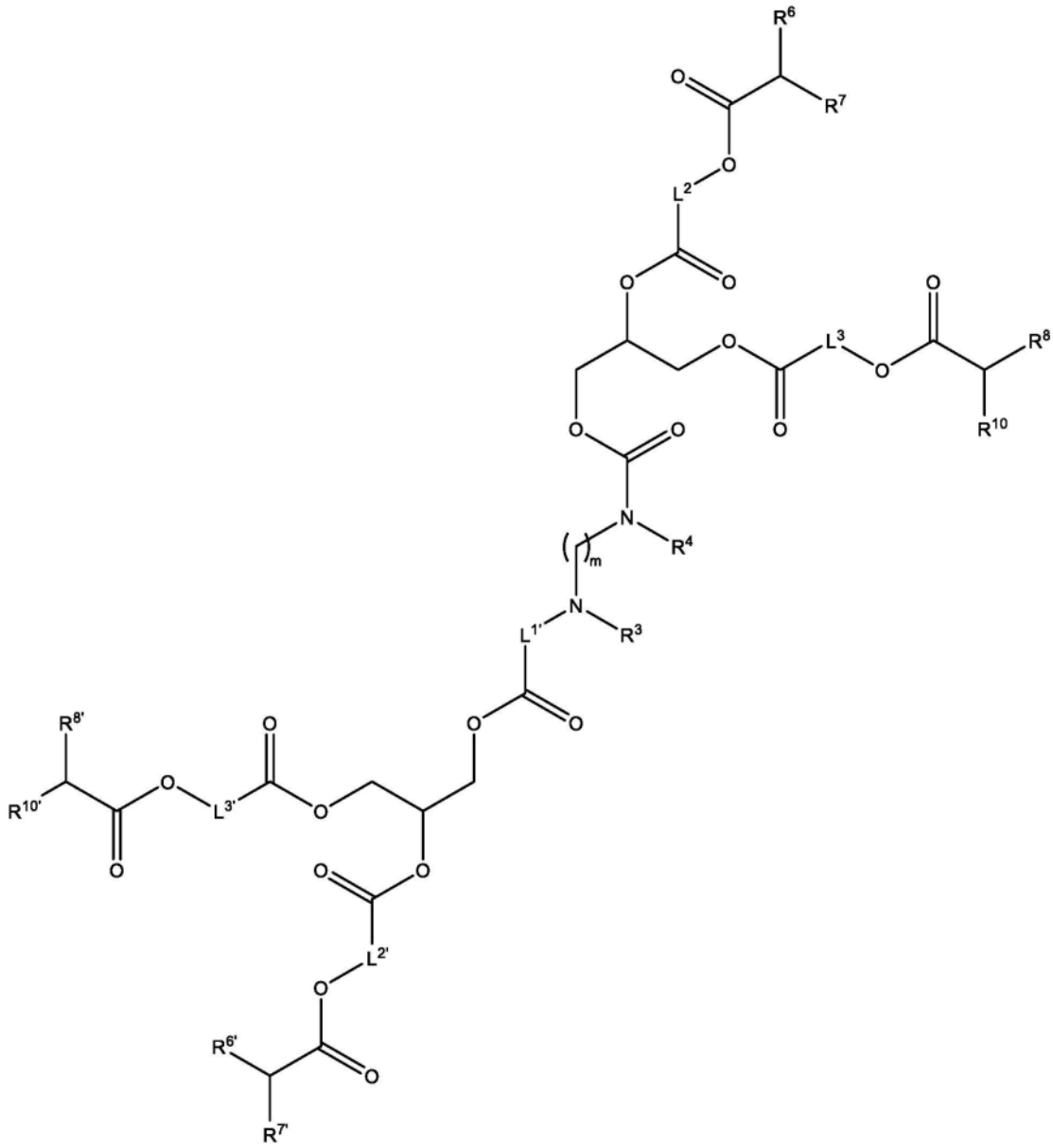


(I-C)

[0152] 或其药学上可接受的盐或立体异构体,其中:L^1为C_1-C_6亚烷基;L^2为C_1-C_8亚烷基;L^3为C_1-C_8亚烷基;R^3和R^4各自独立地为H、C_1-C_4烷基或-$(CH_2)_nOH$;R^6为C_4-C_{20}烷基;R^7为C_4-C_{20}烷基;R^8为C_4-C_{20}烷基;R^{10}为C_4-C_{20}烷基;并且n为2、3或4。在一些实施例中,可电离脂质具有以下结构:

[0153] 

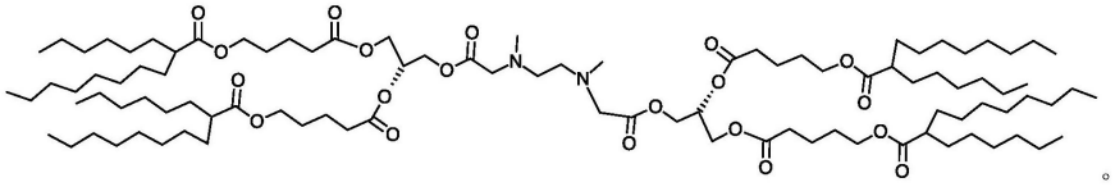
[0154] 在一个实施例中,式(XXII)可电离脂质:

[0155] 

(XXII)

[0156] 或其药学上可接受的盐或立体异构体,其中:L^1为C_1-C_6亚烷基;$L^{1'}$为C_1-C_6亚烷基;L^2为C_1-C_8亚烷基;$L^{2'}$为C_1-C_8亚烷基;L^3为C_1-C_8亚烷基;$L^{3'}$为C_1-C_8亚烷基;R^3和R^4各自独立地为H、C_1-C_4烷基、-CH_2-环丙基或-$(CH_2)_nOH$;R^6为C_4-C_{20}烷基;$R^{6'}$为C_4-C_{20}烷基;R^7为C_4-C_{20}烷基;$R^{7'}$为C_4-C_{20}烷基;R^8为C_4-C_{20}烷基;$R^{8'}$为C_4-C_{20}烷基;R^{10}为C_4-C_{20}烷基;$R^{10'}$为C_4-C_{20}烷基;n为2、3或4;并且m为1、2、3、4或5。

[0157] 在一些实施例中,可电离脂质具有以下结构:

[0158] 

[0159] 在一个方面,本公开涉及脂质-纳米颗粒组合物,其包含式(I)至式(XXII)中任一者的可电离脂质。在本文的整个公开内容中,“脂质-纳米颗粒组合物”可以指包含脂质纳米颗粒的组合物或者指脂质纳米颗粒本身。脂质-纳米颗粒组合物可以进一步包含辅助脂质、稳定脂质、结构脂质和活性剂,其中该活性剂为核酸、小分子、蛋白质或肽、或它们的组合。在实施例中,脂质-纳米颗粒组合物不包括稳定脂质。在实施例中,脂质-纳米颗粒组合物不包括缀合至聚乙二醇的脂质(PEG-脂质)。

[0160] 在一些方面,脂质-纳米颗粒组合物中的辅助脂质选自由以下项组成的组:1,2-二亚油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DLPC)、1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-磷酸胆碱(DMPC)、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DOPC)、1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DPPC)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DSPC)、1,2-二(十一烷酰基)-sn-甘油-磷酸胆碱(DUPC)、1-棕榈酰基-2-油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(POPC)、1,2-二-O-十八烯基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(18:0二醚PC)、1-油酰基-2-胆固醇半琥珀酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(OChemsPC)、1-十六烷基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(C16 Lyso PC)、1,2-二亚麻酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-二花生四烯酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-二(二十二碳六烯酰基)-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)、1,2-二植烷酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(ME 16.0PE)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二亚油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二亚麻酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二花生四烯酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二(二十二碳六烯酰基)-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸-rac-(1-甘油)钠盐(DOPG)以及它们的混合物。

[0161] 在一些方面,脂质-纳米颗粒组合物中的稳定脂质为1-(单甲氧基-聚乙二醇)-2,3-二肉豆蔻酰基甘油(PEG-DMG),其平均PEG分子量为约2000道尔顿。在一些方面,稳定脂质为聚肌氨酸-脂质缀合物。在一些实施例中,聚肌氨酸-脂质缀合物不与脂质-纳米颗粒组合物中的RNA缔合。在一些实施例中,聚肌氨酸-脂质缀合物不形成脂质-纳米颗粒组合物中的RNA颗粒。在一些实施例中,聚肌氨酸-脂质缀合物不与RNA缔合以形成脂质-纳米颗粒组合物中的RNA颗粒。

[0162] 在一些方面,脂质-纳米颗粒组合物中的结构脂质选自由胆固醇、胆固醇衍生物、粪甾醇、谷甾醇、麦角甾醇、菜油甾醇、豆甾醇、菜子甾醇、番茄碱、熊果酸、α生育酚以及它们的混合物组成的组。

[0163] 在一些方面,核酸选自由小干扰RNA(siRNA)、不对称干扰RNA(aiRNA)、微小RNA(miRNA)、Dicer底物RNA(dsRNA)、小发夹RNA(shRNA)、信使RNA(mRNA)、向导RNA(gRNA)、质粒DNA(pDNA)、反义寡脱氧核苷酸(ODN)、RNA或DNA疫苗以及它们的混合物组成的组。

[0164] 在一些方面,核酸或mRNA为自我扩增RNA。在一些方面,核酸或mRNA为多顺反子RNA。在一些方面,核酸或mRNA为自我扩增多顺反子RNA。在一些方面,核酸或mRNA为环状RNA。在一些方面,核酸或mRNA表达蛋白质或肽。在一些方面,从核酸或mRNA表达的蛋白质或

肽为抗体、人类抗体、骆驼抗体、纳米抗体、人源化抗体、双特异性抗体、酶、基因组编辑酶或核酸酶、生长因子、细胞因子、趋化因子、小分子-模拟肽、转录因子、结构分子、信号分子、重编程因子、疫苗抗原或它们的组合。在一些方面,mRNA编码在细胞内起作用的蛋白质或肽。在一些方面,mRNA编码至少一个重编程因子。

[0165] 在一些方面,从核酸或mRNA表达的蛋白质或肽为至少一种细胞外基质蛋白质。在一些实施例中,细胞外基质蛋白为胶原、层粘连蛋白、弹力素、纤连蛋白、整合素、生腱蛋白、蛋白聚糖、纤维蛋白或它们的组合。在一些实施例中,胶原为胶原I、II、III、IV、V、VI、VII、VIII、IX、X、XI、XII、XIII、XIV、XV、XVI、XVII、XVIII、XIX、XX、XXI、XXII、XXIII、XXIV、XXV、XXVI、XXVII、XXVIII或它们的组合。在一些实施例中,胶原为胶原VII。在一些实施例中,胶原VII在复原、治疗、重塑或改善皮肤或细胞外基质的方法中使用。在一些实施例中,胶原VII在伤口愈合的方法中使用。

[0166] 在一些方面,从核酸或mRNA表达的蛋白质或肽为生长因子、细胞因子或它们的组合。在一些实施例中,生长因子为EGF、FGF、NGF、CNTF、PDGF、VEGF、IGF、GMCSF、GCSF、TGF、促红细胞生成素、肝配蛋白、GDNF、GDF9、KGF、血管生成素、TPO、BMP、HGF、BDNF、GDF、HGH(生长激素)、神经营养素、MSF、SGF、GDF(包括GDF11)、TGF(包括TGF-b)或它们的组合。在一些实施例中,细胞因子为IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、TNF-α、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、CXCL8(以前称为IL-18)、IL-19、IL-20、IL-21、IL-22、IL-23、IL-24、IL-25、IL-26、IL-27、IL-28、IL-29、IL-30、IL-31、IL-32、IL-33或它们的组合。

[0167] 在一些方面,从核酸或mRNA表达的蛋白质或肽为人类抗体、人源化抗体、骆驼抗体、伴侣动物抗体或纳米抗体。在一些实施例中,从核酸或mRNA表达的蛋白质或肽为酶,诸如核酸酶,例如,在基因组编辑中使用的核酸酶。在一些方面,从核酸或mRNA表达的蛋白质或肽在细胞内起作用。在一些方面,分泌从核酸或mRNA表达的蛋白质或肽。在一些实施例中,抗体为以下中的至少一者或基本上与以下相似:曲妥珠单抗、格罗菲妥单抗、米利珠单抗、索米妥昔单抗、尼塞韦单抗、曲美木单抗、特立妥单抗、多南单抗、司培利单抗、乐卡奈单抗、替雷利珠单抗、潘普利单抗、信迪利单抗、特普利珠单抗、特瑞普利单抗、奥博妥单抗、瑞替凡利单抗、乌布利妥昔单抗、伊诺莫单抗、奥珀妥珠单抗、纳索利单抗、莫妥珠单抗、替沙格韦单抗、西加韦单抗、瑞拉利单抗、特本塔夫斯普、法瑞西单抗、舒替利单抗、索托韦单抗、瑞丹维单抗、卡斯瑞韦单抗、依米得韦单抗、特泽鲁单抗、替索单抗、埃万妥单抗、阿尼弗鲁单抗、朗妥昔单抗、比美吉珠单抗、曲罗芦单抗、依维苏单抗、沙西妥珠单抗、替妥木单抗、伊沙妥昔单抗、艾普奈珠单抗、多塔利单抗、安舒韦单抗、马吉妥昔单抗、那昔妥单抗、阿替韦单抗、玛替韦单抗、奥西韦单抗、玛贝妥单抗、坦昔妥单抗、萨特利珠单抗、英比利珠单抗、恩弗妥单抗、立赞利珠单抗、布西珠单抗、泊洛妥珠单抗、瑞莎珠单抗、罗莫佐单抗、卡拉西单抗、瑞武丽珠单抗、依玛鲁单抗、西米普利单抗、瑞玛奈珠单抗、莫塞妥莫单抗、加卡奈组单抗、拉那鲁单抗、莫格利珠单抗、厄瑞努单抗、替瑞奇珠单抗、艾巴利珠单抗、布洛舒单抗、德瓦鲁单抗、艾美赛珠单抗、贝那利珠单抗、奥瑞珠单抗、古塞奇尤单抗、英妥珠单抗、沙利鲁单抗、度普利尤单抗、阿维鲁单抗、博达路单抗、阿替利珠单抗、贝洛托珠单抗、奥拉单抗、瑞利珠单抗、奥托昔单抗、依奇珠单抗、达妥木单抗、埃罗妥珠单抗、耐昔妥珠单抗、艾达赛珠单抗、阿利库单抗、美泊利单抗、依洛尤单抗、达妥昔单抗、司库奇尤单抗、纳武利尤单抗、贝

林妥欧单抗、帕博利珠单抗、雷莫西尤单抗、维多珠单抗、西妥昔单抗、奥妥珠单抗、雷昔库单抗、帕妥珠单抗、本妥昔单抗、贝利木单抗、伊匹木单抗、地诺单抗、托珠单抗、奥法木单抗、卡那单抗、戈利木单抗、乌特克单抗、赛妥珠单抗、卡妥昔单抗、依库珠单抗、雷珠单抗、帕尼单抗、那他珠单抗、贝伐单抗、西妥昔单抗、依法利珠单抗、奥马珠单抗、托西莫单抗、伊布莫单抗、阿达木单抗、阿仑单抗、吉妥珠单抗、英夫利昔单抗、帕利珠单抗、巴利昔单抗、达克珠单抗、利妥昔单抗、阿昔单抗、依决洛单抗、奈巴库单抗或莫罗单抗。在一些实施例中，蛋白质或肽在治疗人类或兽医疾病的方法中使用。

[0168] 在一些方面，小分子为化疗剂、GPCR激动剂或拮抗剂、转录调节剂或RNA剪接调节剂。在一些方面，小分子在细胞内起作用。

[0169] 在一些方面，蛋白质或肽为抗体、人源化抗体、双特异性抗体、酶、基因组编辑酶或核酸酶、生长因子、细胞因子、趋化因子、小分子模拟肽、转录因子、结构分子、信号传导分子、重编程因子、疫苗抗原或它们的组合。在一些方面，蛋白质或肽在细胞内起作用。

[0170] 在一些方面，掺入脂质纳米颗粒中和/或由脂质纳米颗粒组合物递送的小分子、蛋白质或肽是用于维持祖细胞静止的“人工生态位”的组分。在一些实施例中，人工生态位组分选自由以下项组成的组：依降钙素；MGCD-265、JNJ-7706621、毛喉素、福马他汀、SB203580、SU5402、TGF-β、胰岛素-转铁蛋白-硒以及它们的组合。这些和其他人工生态位组公开于美国专利10,688,136中，该专利通过引用并入本文。

[0171] 在一些方面，本公开涉及一种药物组合物，其包含脂质-纳米颗粒组合物及其药学上可接受的载体。

[0172] 在一些方面，本文提供的方法和组合物应用于神经系统、肌肉系统、呼吸系统、心血管系统、骨骼系统、生殖系统、外皮系统、淋巴系统、排泄系统、免疫系统、内分泌系统(例如，内分泌和外分泌)或消化系统的细胞、组织或器官。如本文所述，可以潜在地复原任何类型的细胞，包括但不限于上皮细胞(例如，鳞状、立方状、柱状和假复层上皮细胞)、内皮细胞(例如，静脉、动脉和淋巴管内皮细胞)以及结缔组织、肌肉和神经系统的细胞。此类细胞可以包括但不限于表皮细胞、成纤维细胞、软骨细胞、骨骼肌细胞、卫星细胞、心肌细胞、平滑肌细胞、角质细胞、基底细胞、成釉细胞、外分泌细胞、肌上皮细胞、成骨细胞、破骨细胞、神经元(例如，感觉神经元、运动神经元和中间神经元)、神经胶质细胞(例如，少突胶质细胞、星形胶质细胞、室管膜细胞、小胶质细胞、雪旺细胞和卫星细胞)、柱细胞、脂肪细胞、周细胞、星状细胞、肺细胞、血液和免疫系统细胞(例如，红细胞、单核细胞、树突状细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、肥大细胞、T细胞、B细胞、自然杀伤细胞)、激素分泌细胞、生殖细胞、间质细胞、晶状体细胞、感光细胞、味觉受体细胞和嗅觉细胞；以及来自肾、肝、胰腺、胃、脾、胆囊、肠、膀胱、肺、前列腺、乳房、泌尿生殖道、垂体细胞、口腔、食道、皮肤、头发、指甲、甲状腺、甲状旁腺、肾上腺、眼睛、鼻子或大脑的细胞和/或组织。

[0173] 在一些方面，细胞选自成纤维细胞、内皮细胞、软骨细胞、骨骼肌干细胞、角质形成细胞、间充质干细胞和角膜上皮细胞。在实施例中，细胞为成纤维细胞。在实施例中，细胞为内皮细胞。在实施例中，细胞为软骨细胞。在实施例中，细胞为骨骼肌干细胞。在实施例中，细胞为角质形成细胞。在实施例中，细胞为间充质干细胞。在实施例中，细胞为角膜上皮细胞。

[0174] 在一些方面，本技术的方法和组合物应用于免疫细胞，包括但不限于淋巴细胞、粒

细胞、单核细胞、巨噬细胞、小胶质细胞或树突细胞。在一些实施例中,淋巴细胞为T细胞、B细胞或自然杀伤(NK)细胞。在一些实施例中,淋巴细胞为肿瘤浸润淋巴细胞。

[0175] 在一些实施例中,淋巴细胞为T细胞。在一些实施例中,T细胞为细胞毒性T细胞(CD8+)、辅助T细胞(CD4+)、抑制或调节T细胞(Treg)、记忆T细胞、自然杀伤T细胞(NKT细胞)或γδT细胞。在其他实施例中,辅助T细胞为Th1、Th2、Th17、Th9或Tfh T细胞。在一些实施例中,记忆T细胞为中央记忆T细胞、效应器记忆T细胞、组织驻留记忆T细胞或虚拟记忆T细胞。在一些实施例中,本技术的抑制或调节T细胞为FOXP3+T细胞或FOXP3-T细胞。在一些实施例中,NKT细胞为CD1d限制T细胞的子集。

[0176] 在一些实施例中,本技术的粒细胞为中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞或肥大细胞。

[0177] 在其他实施例中,本技术的淋巴细胞为B细胞。在一些实施例中,B细胞为记忆B细胞或浆细胞。

[0178] 在其他实施例中,免疫细胞为单核细胞、巨噬细胞、小胶质细胞或树突状细胞。

[0179] 在一些实施例中,可以使用本文所述的方法和组合物,其中细胞为免疫细胞,诸如天然免疫细胞或工程化免疫细胞。在一些实施例中,本文所述的方法和组合物与工程化细胞(包括工程化免疫细胞)的方法并行或连续使用,使得这些方法在对细胞进行工程化之前、期间和/或之后进行。在一些实施例中,本文所述的方法和组合物用于对细胞(包括工程化的免疫细胞)进行工程化。在一些实施例中,此类工程化包括工程化,使得细胞表达嵌合抗原受体,诸如表达嵌合抗原的免疫细胞。在一些实施例中,此类嵌合抗原受体靶向CD19、CD30、CD33、CD123、FLT3、BCMA、GD2或任何其他适合免疫疗法的抗原。在一些实施例中,此类工程化包括对细胞(包括免疫细胞)进行工程化,以表达其他蛋白质或肽,诸如生长因子和细胞因子。在一些实施例中,所述细胞因子包括IL-15。在一些实施例中,对细胞(诸如免疫细胞)的此类工程化在离体进行,例如,在细胞疗法产品(诸如自体或同种异体嵌合抗原受体(CAR)-T、CAR-NK、CAR-M或CAR-NKT细胞)的制造中。在一些实施例中,本文提供的CAR-NKT细胞通过嵌合抗原受体靶向GD2,并被工程化以表达IL-15。在此类实施例中,本文所述的免疫细胞复原方法在细胞疗法产品的制造期间或之后离体进行。在其他实施例中,对细胞和/或免疫细胞的此类工程化在离体进行,例如,在CAR工程化细胞的所谓“原位”产生中。在此类实施例中,将编码本公开的含脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物中所含的CAR或生长因子或细胞因子的RNA和/或mRNA体内注射到受试者或患者体内,例如,用于对患者的免疫细胞(诸如T细胞、NK细胞、巨噬细胞、肿瘤浸润淋巴细胞、树突状细胞和/或“原位”NKT细胞)的CAR工程化,即在患者体内,无需去除细胞即可体外转染。在此类实施例中,本文所述的免疫细胞复原方法也在体内进行,其中在mRNA编码CAR或其他细胞工程分子之前、同时或之后将编码一个或多个重编程因子的mRNA注射到患者体内。在一些实施例中,本公开的脂质和脂质-纳米颗粒组合物被选择用于靶向递送至体内任何细胞,包括免疫细胞,诸如T细胞、NK细胞、巨噬细胞、肿瘤浸润细胞、树突细胞和/或体内NKT细胞。在其他实施例中,体内治疗在不存在任何其他体内细胞工程化的情况下进行,以增强或恢复免疫系统的效力并治疗与免疫功能障碍或失调相关的疾病,诸如改善免疫系统对抗癌症或感染的效果或减少炎症。

[0180] 在一些实施例中,要复原的免疫细胞为非贴壁细胞,诸如非贴壁免疫细胞。在一些实施例中,以其中细胞保持非贴壁而不贴附于组织培养基质或形成或产生粘附于组织培养

基质的细胞或细胞集落的方式处理、瞬时重编程、复原或制造非贴壁细胞,包括非贴壁免疫细胞。在一些实施例中,选择重编程间隔和因子,使得复原细胞并保留细胞特性,其中细胞保持非贴壁而不贴附于组织培养基质或形成或产生贴附于组织培养基质的细胞或细胞集落。因此,在一些实施例中,本技术提供了用于递送编码至少一种用于细胞复原的重编程因子的mRNA的含脂质组合物和脂质-纳米颗粒组合物,其中,以其中复原细胞并保留细胞特性并且其中细胞保持在悬浮液中而不贴壁、它们也不变成或产生贴壁的细胞、变得贴壁或形成贴壁集落的方式重编程细胞,包括任何非贴壁细胞和/或非贴壁免疫细胞(例如,非贴壁T细胞、NK细胞、巨噬细胞、肿瘤浸润细胞、树突细胞和/或NKT细胞)。

[0181] 在一些实施例中,本文所述的方法(包括复原免疫细胞的方法;逆转、预防或抑制免疫细胞的衰竭的方法;或诱导免疫细胞的增殖)包括在1、2、3、4、5、6、7、8、9或10天的时期内向免疫细胞施用1、2、3、4、5、6、7、8、9或10次本公开的包含编码至少一个重编程因子的mRNA的含脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物。例如,可以在五天或六天时期的第一天或第二天施用一次mRNA,或者可以在五天或六天时期的第一天施用一次并在第三天施用一次,或者可以在一天时期内施用一次。在一些实施例中,在1、2、3、4、5或6天的时期内向免疫细胞施用1、2、3、4、5或6次mRNA。在一些实施例中,在免疫细胞活化步骤之后施用mRNA。在一些实施例中,免疫细胞活化步骤包括活化免疫细胞1、2或3天。在一些实施例中,免疫细胞活化步骤包括使用CD3、CD28和IL-2中的至少一者来活化免疫细胞。在一些实施例中,用CD3和CD28活化免疫细胞。在一些实施例中,mRNA施用期在免疫细胞活化步骤之后立即发生。在一些实施例中,mRNA施用期在免疫细胞活化步骤之后1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天发生。在一些实施例中,施用编码重编程因子的mRNA逆转由免疫细胞活化步骤引起的免疫细胞衰竭。在一些实施例中,施用编码重编程因子的mRNA逆转来自老年患者或供体的免疫细胞中的免疫细胞衰竭。在一些实施例中,在用于制造用于移植的免疫细胞(例如CAR-T、CAR-M或CAR-NK细胞)的制造工艺期间施用mRNA。

[0182] 在一些实施例中,与使用不同的mRNA递送机制相比,使用本公开的脂质或脂质纳米颗粒用于递送mRNA导致在使用本文的方法或组合物治疗或复原的细胞中增强的复原、增殖、衰竭恢复或预防、治疗效果、抗病原效果、抗癌效果、抗免疫原性效果或抗炎效果。在一些实施例中,此类增强的复原、增殖、衰竭恢复或预防、治疗效果、抗病原效果、抗癌效果、抗免疫原性效果或抗炎效果归因于与不同的递送机制比较时的较低毒性、免疫原性和/或对细胞的较低生理影响。在一些实施例中,不同的递送机制为电穿孔,使得与使用电穿孔时相比,使用本公开的脂质或脂质-纳米颗粒组合物用于递送mRNA导致在使用本文的方法或组合物治疗或复原的细胞中增强的复原、增殖、衰竭恢复或预防、治疗效果、抗病原效果、抗癌效果、抗免疫原效果或抗炎效果。与电穿孔相比的此类改进可以归因于与电穿孔相比毒性降低或对细胞的生理影响降低。

[0183] 在一些方面,本公开的脂质或脂质-纳米颗粒组合物在将治疗剂或诊断剂递送至皮肤的方法中使用,包括施用包含至少一种治疗剂或诊断剂的含脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物。在一些实施例中,本技术的脂质或脂质-纳米颗粒组合物以实现细胞(诸如皮肤细胞或免疫细胞)的瞬时重编程的方式提供治疗剂或诊断剂(诸如重编程因子)的递送。在一些实施例中,细胞的瞬时重编程提供治疗剂或诊断剂(诸如重编程因子)的瞬时表达,其中该药剂在细胞中表达足以重编程和/或恢复而不改变细胞的特性的持续时间,即恢复

皮肤或免疫细胞,以表现出特征或更年轻的皮肤或免疫细胞,同时保留皮肤或免疫细胞的特性。

[0184] 在一些方面,治疗剂为如本文公开的mRNA。在一些方面,本公开的脂质或脂质-纳米颗粒组合物在治疗或预防皮肤病学疾病或病症、治疗或预防皮肤的疾病或病症的方法中使用或用于皮肤中的美容应用,包括施用包含至少一种治疗剂或诊断剂的含脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物。在一些方面,本公开的脂质或脂质-纳米颗粒组合物在治疗或预防皮肤病学疾病或病症或皮肤的疾病或病症的方法中使用,包括施用包含至少一种治疗剂或诊断剂的含脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物。在一些方面,治疗剂为如本文公开的mRNA。在一些方面,mRNA编码至少一个重编程因子。在一些方面,本公开的脂质或脂质-纳米颗粒组合物用于皮肤中的美容应用,包括施用包含至少一种治疗剂或诊断剂的含脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物。在一些方面,治疗剂为如本文公开的mRNA。在一些方面,mRNA编码至少一个重编程因子。在一些方面,本公开的脂质或脂质-纳米颗粒组合物在复原皮肤的方法中使用,包括施用包含治疗剂或诊断剂的含脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物。在一些方面,本公开的脂质或脂质-纳米颗粒组合物在复原皮肤的方法中使用,包括施用包含编码至少一个重编程因子的mRNA的含脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物。在此类方法中,mRNA可以结合至脂质或包含在脂质纳米颗粒中。在一些方面,此类方法进一步包括用含脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物转染皮肤细胞以递送mRNA。在一些方面,本公开的脂质或脂质-纳米颗粒组合物用在复原皮肤的方法中使用,包括施用包含编码至少一个重编程因子的mRNA的含脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物,以实现皮肤的复原,同时保留细胞特性。在此类方法中,mRNA可以结合至脂质或包含在脂质纳米颗粒中。在一些方面,本公开的脂质或脂质-纳米颗粒组合物在复原皮肤的方法中使用,包括向皮肤细胞施用包含编码至少一个重编程因子的mRNA的含脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物,其中在皮肤细胞中表达至少一个重编程因子导致增加的成纤维细胞增殖并保留皮肤细胞特性。在一些方面,本公开的脂质或脂质-纳米颗粒组合物在增加皮肤厚度的方法中使用,包括施用包含治疗剂或诊断剂的含脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物。在一些方面,治疗剂为mRNA。在一些方面,本公开的脂质或脂质-纳米颗粒组合物在增加皮肤厚度的方法中使用,包括向皮肤细胞施用包含编码至少一个重编程因子的mRNA的含脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物,其中在皮肤细胞中表达至少一个重编程因子导致增加的皮肤厚度并保留皮肤细胞特性。在一些方面,本公开的脂质或脂质-纳米颗粒组合物在增加皮肤弹性的方法中使用,包括施用包含治疗剂或诊断剂的含脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物。在一些方面,治疗剂为mRNA。在一些方面,本公开的脂质或脂质-纳米颗粒组合物在增加皮肤弹性的方法中使用,包括向皮肤细胞施用包含编码至少一个重编程因子的mRNA的含脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物,其中在皮肤细胞中表达至少一个重编程因子导致增加的皮肤弹性并保留皮肤细胞特性。在此类方法中,mRNA可以结合至脂质或包含在脂质纳米颗粒中。

[0185] 在一些方面,本公开的脂质或脂质-纳米颗粒组合物在伤口愈合的方法中使用,包括施用包含治疗剂或诊断剂的含脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物。在一些方面,本公开的脂质或脂质-纳米颗粒组合物在伤口愈合的方法中使用,包括施用包含编码至少一个重编程因子的mRNA的含脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物。在此类方法中,mRNA可以结合至脂质或包含在脂质纳米颗粒中。在一些方面,本公开的脂质或脂质-纳米颗粒组合物在伤口

愈合的方法中使用,其中含脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物递送编码至少一个重编程因子的mRNA,以实现伤口愈合,同时保留细胞特性。在此类方法中,mRNA可以结合至脂质或包含在脂质纳米颗粒中。在一些方面,本公开的脂质或脂质-纳米颗粒组合物在伤口愈合的方法中使用,包括向皮肤细胞施用包含编码至少一个重编程因子的mRNA的含脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物,其中在皮肤细胞中表达至少一个重编程因子导致增加的成纤维细胞增殖。在此类方法中,mRNA可以结合至脂质或包含在脂质纳米颗粒中。

[0186] 在一些方面,本公开的脂质或脂质-纳米颗粒组合物在治疗或预防皮肤病学疾病或病症、治疗或预防皮肤疾病或病症的方法中使用或用于皮肤中的美容应用,包括施用包含治疗剂的含脂质组合物或脂质纳米-颗粒组合物,以实现至少一个皮肤老化标志物的逆转。在一些方面,本公开的脂质或脂质-纳米颗粒组合物在复原皮肤的方法中使用,包括施用含脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物,以将编码至少一个重编程因子的mRNA递送至皮肤,从而实现至少一个皮肤老化标志物的逆转,同时保留细胞特性。在一些方面,本公开的脂质或脂质-纳米颗粒组合物在伤口愈合的方法中使用,包括施用含脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物,以将编码至少一个重编程因子的mRNA递送至皮肤细胞,从而实现至少一个皮肤老化标志物的逆转,同时保留细胞特性。在一些实施例中,至少一个皮肤老化标志物的逆转是指产生复原细胞,该复原细胞以类似于与老化皮肤细胞相比在年轻皮肤细胞中看到的所述标志物的表达的方式表达至少一个皮肤老化标志物。

[0187] 在一些方面,标志物为IL6、CXCL8、CSF3、CXCL1、SERPINB2、LIF、IL11、CXCL2、IL24、PTGS2、MMP3、CCL2、TFPI2、IER3、ACKR3、PTGES、SLC16A6、TNFAIP6、PTPRN、IL1RN、IL1B、CXCL5、CXCL6、HAS1、HSD11B1、CH25H、ADGRD1、C3、RASD1、NR4A3、STC1、TCIM、SRGN、AC003092.1、LRRN3、CHI3L1、NR4A2、NAMPT、PRSS23、MMP1、SOD2、LOXL4、MMP11、ELN、CREG1、C15orf48、NFKBIZ、PID1或它们的任何组合的mRNA或蛋白质表达。在一些方面,至少一个皮肤老化标志物的逆转是IL6、CXCL8、CSF3、CXCL1、SERPINB2、LIF、IL11、CXCL2、IL24、PTGS2、MMP3、CCL2、TFPI2、IER3、ACKR3、PTGES、SLC16A6、TNFAIP6、PTPRN、IL1RN、IL1B、CXCL5、CXCL6、HAS1、HSD11B1、CH25H、ADGRD1、C3、RASD1、NR4A3、STC1、TCIM、SRGN、AC003092.1、LRRN3、CHI3L1、NR4A2、NAMPT、MMP1、SOD2、CREG1、C15orf48、NFKBIZ、PID1或它们的任何组合的mRNA或蛋白质表达的下调。在一些方面,至少一个皮肤老化标志物的逆转是PRSS23、LOXL4、MMP11、ELN或它们的任何组合的mRNA或蛋白质表达的上调。在一些方面,至少一个皮肤老化标志物的逆转是PRSS23的mRNA或蛋白质表达的上调。在一些方面,至少一个皮肤老化标志物的逆转是LOXL4的mRNA或蛋白质表达的上调。在一些方面,至少一个皮肤老化标志物的逆转是MMP11的mRNA或蛋白质表达的上调。在一些方面,至少一个皮肤老化标志物的逆转是ELN的mRNA或蛋白质表达的上调。在一些方面,至少一个皮肤老化标志物的逆转是MMP3、MMP1、SOD2或它们的任何组合的mRNA或蛋白质表达的下调。在一些方面,至少一个皮肤老化标志物的逆转是MMP3的mRNA或蛋白质表达的下调。在一些方面,至少一个皮肤老化标志物的逆转是MMP1的mRNA或蛋白质表达的下调。在一些方面,至少一个皮肤老化标志物的逆转是SOD2的mRNA或蛋白质表达的下调。在一些方面,至少一个皮肤老化标志物的逆转是PRSS23、LOXL4、MMP11或ELN中的至少一者的mRNA或蛋白质表达的上调;MMP3、MMP1、SOD2中的至少一者的mRNA或蛋白质表达的下调;或它们的任何组合。

[0188] 在一些方面,本公开的脂质或脂质-纳米颗粒组合物在治疗或预防皮肤病学疾病

或病症、治疗或预防皮肤疾病或病症的方法中使用或用于皮肤中的美容应用,包括施用包含治疗剂的含脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物,以实现至少一个皮肤质量标志物的改善。在一些方面,本公开的脂质或脂质-纳米颗粒组合物在增加皮肤厚度的方法中使用,包括向皮肤细胞施用包含编码至少一个重编程因子的mRNA的含脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物,其中在皮肤细胞中表达至少一个重编程因子导致增加的皮肤厚度并保留皮肤细胞特性。在一些方面,本公开的脂质或脂质-纳米颗粒组合物在增加皮肤弹性的方法中使用,包括向皮肤细胞施用包含编码至少一个重编程因子的mRNA的含脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物,其中在皮肤细胞中表达至少一个重编程因子导致增加的皮肤弹性并保留皮肤细胞特性。在一些方面,本公开的脂质或脂质-纳米颗粒组合物在复原皮肤的方法中使用,包括向皮肤细胞施用包含编码至少一个重编程因子的mRNA的含脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物,以实现至少一个皮肤质量标志物的改善。在一些实施例中,本公开的脂质或脂质-纳米颗粒组合物在复原皮肤的方法中使用,包括施用包含编码至少一个重编程因子的mRNA的含脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物,以实现至少一个皮肤质量标志物的改善,同时保留细胞特性。在一些方面,至少一个皮肤质量标志物包括皮肤厚度。在一些方面,表皮厚度增加。在一些方面,至少一个皮肤质量标志物为皮肤弹性。在一些方面,皮肤弹性增加。在一些方面,至少一个皮肤质量标志物为经表皮失水。皮肤厚度、皮肤弹性和经表皮失水可以根据本领域技术人员已知的任何方法来测量。

[0189] 在一些方面,本公开的脂质或脂质-纳米颗粒组合物在伤口愈合的方法中使用,包括向皮肤细胞施用包含编码至少一个重编程因子的mRNA的含脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物,以实现至少一个皮肤质量标志物的改善。在一些方面,标志物为I型胶原、III型胶原、V型胶原、VI型胶原、XI型胶原、弹力素、微原纤维相关蛋白5、骨膜素、多功能蛋白聚糖、结缔组织生长因子、赖氨酰氧化酶、SPARC、分泌型磷酸蛋白1、软骨寡聚基质蛋白、MMP1、MMP3、MMP12、SOD2或它们的任何组合的mRNA或蛋白质表达。在一些方面,至少一个皮肤质量标志物的改善是MMP1、MMP3、MMP12、SOD2或它们的任何组合的mRNA或蛋白质表达的下调。在一些方面,至少一个皮肤质量标志物的改善是I型胶原、III型胶原、IV型胶原、V型胶原、VI型胶原、XI型胶原、弹力素、微原纤维相关蛋白5、骨膜素、多功能蛋白聚糖、结缔组织生长因子、赖氨酰氧化酶、SPARC、分泌型磷酸蛋白1、软骨寡聚基质蛋白或它们的任何组合的mRNA或蛋白质表达的上调。在一些方面,至少一个皮肤质量标志物的改善是胶原的mRNA或蛋白质表达的上调。在一些方面,至少一个皮肤质量标志物的改善是I型胶原的mRNA或蛋白质表达的上调。在一些方面,至少一个皮肤质量标志物的改善是III型胶原的mRNA或蛋白质表达的上调。在一些方面,至少一个皮肤质量标志物的改善是IV型胶原的mRNA或蛋白质表达的上调。在一些方面,至少一个皮肤质量标志物的改善是V型胶原的mRNA或蛋白质表达的上调。在一些方面,至少一个皮肤质量标志物的改善是VI型胶原的mRNA或蛋白质表达的上调。在一些方面,至少一个皮肤质量标志物的改善是XI型胶原的mRNA或蛋白质表达的上调。在一些方面,至少一个皮肤质量标志物的改善是XI型胶原的mRNA或蛋白质表达的上调。在一些方面,至少一个皮肤质量标志物的改善是弹力素的mRNA或蛋白质表达的上调。在一些方面,至少一个皮肤质量标志物的改善是微原纤维相关蛋白5的mRNA或蛋白质表达的上调。在一些方面,至少一个皮肤质量标志物的改善是骨膜素的mRNA或蛋白质表达的上调。在一些方面,至少一个皮肤质量标志物的改善是多功能蛋白聚糖的mRNA或蛋白质表达的上调。在

一些方面,至少一个皮肤质量标志物的改善是结缔组织生长因子的mRNA或蛋白质表达的上调。在一些方面,至少一个皮肤质量标志物的改善是赖氨酰氧化酶的mRNA或蛋白质表达的上调。在一些方面,至少一个皮肤质量标志物的改善是SPARC的mRNA或蛋白质表达的上调。在一些方面,至少一个皮肤质量标志物的改善是分泌型磷酸蛋白1的mRNA或蛋白质表达的上调。在一些方面,至少一个皮肤质量标志物的改善是软骨寡聚基质蛋白的mRNA或蛋白质表达的上调。在一些方面,至少一个皮肤质量标志物的改善是MMP3、MMP1、SOD2或它们的任何组合的mRNA或蛋白质表达的下调。在一些方面,至少一个皮肤质量标志物的改善是MMP3的mRNA或蛋白质表达的下调。在一些方面,至少一个皮肤质量标志物的改善是MMP1的mRNA或蛋白质表达的下调。在一些方面,至少一个皮肤质量标志物的改善是SOD2的mRNA或蛋白质表达的下调。在一些方面,至少一个皮肤质量标志物的改善是胶原VII和弹力素的mRNA或蛋白质表达的上调。在一些方面,至少一个皮肤质量标志物的改善是胶原VII和弹力素中至少一者的mRNA或蛋白质表达的上调;MMP3、MMP1、SOD2中的至少一者的mRNA或蛋白质表达的下调;或它们的任何组合。

[0190] 在一些方面,向皮肤局部施用本公开的脂质-纳米颗粒组合物或含有本公开的脂质的组合物。在一些方面,以软膏、霜或药膏的形式向皮肤施用本公开的脂质-纳米颗粒组合物或含有本公开的脂质的组合物。在一些方面,经由真皮、皮内或皮下注射向皮肤施用本公开的脂质-纳米颗粒组合物或含有本公开的脂质的组合物。在一些方面,经由凝胶向皮肤施用本公开的脂质-纳米颗粒组合物或含有本公开的脂质的组合物。在一些方面,在体内、体外或离体施用本公开的脂质-纳米颗粒组合物或含有本公开的脂质的组合物。在一些方面,在体内施用本公开的脂质-纳米颗粒组合物或含有本公开的脂质的组合物。在一些方面,本公开的脂质-纳米颗粒组合物或含有本公开的脂质的组合物用于人类或动物受试者。

[0191] 在一些方面,本公开的脂质-纳米颗粒组合物或含有本公开的脂质的组合物转染皮肤细胞,以将至少一种治疗剂或诊断剂递送至皮肤细胞中。在一些方面,治疗剂为核酸。在一些方面,治疗剂为mRNA。在一些方面,治疗剂为mRNA和siRNA的组合。在一些方面,治疗剂为mRNA和miRNA的组合。在一些方面,皮肤细胞为角质形成细胞、黑素细胞、朗格汉斯细胞、卵泡细胞、成纤维细胞、内皮细胞、平滑肌细胞、默克尔细胞、基底细胞、鳞状细胞、顶浆腺细胞、小汗腺细胞、皮脂腺细胞、淋巴内皮细胞或它们的组合。在一些方面,选择脂质或脂质-纳米颗粒组合物以提供对特定细胞类型或多种细胞类型的进行选择性转染。在一些方面,选择脂质或脂质-纳米颗粒组合物以提供在皮肤内或在皮肤的至少一层内的扩散。

[0192] 在一些方面,使用本公开的脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物治疗或预防的皮肤病学疾病或病症或者所治疗的皮肤的疾病或病症为皮肤疏松症或慢性伤口。在一些方面,皮肤疏松症或慢性伤口为糖尿病性溃疡、缺血性溃疡和压疮。在一些方面,使用本公开的脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物治疗或预防的皮肤病学疾病或病症或者皮肤的疾病或病症为炎性皮肤病。在一些方面,炎性皮肤病为牛皮癣、特应性皮炎、白癜风、斑秃或化脓性汗腺炎。在一些方面,使用本公开的脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物治疗或预防的皮肤病学疾病或病症或者皮肤的疾病或病症为毛发疾患。在一些方面,毛发疾患为非疤痕性或疤痕性脱发、毛发花白、多毛症。在一些方面,毛发疾患为非疤痕性脱发,其为雄激素性脱发。在一些方面,疤痕性脱发为毛发扁平苔藓。在一些方面,使用本公开的脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物治疗或预防的皮肤病学疾病或病症或者皮肤的疾病或病症为皮肤癌。

在一些方面,皮肤癌为基底细胞癌、鳞状细胞癌或光化性角化病。在一些方面,使用本公开的脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物治疗或预防的皮肤病学疾病或病症或者皮肤的疾病或病症为结节性痒疹、痤疮、红斑痤疮或日光性雀斑。在一些方面,治疗皮肤病学疾病或病症或者疾病中的任何一者的方法包括施用包含治疗剂的含有本公开的脂质的组合物或本公开的包含治疗剂的脂质-纳米颗粒组合物。在一些方面,治疗剂为mRNA。在一些方面,治疗剂为编码抗体、人类抗体、人源化抗体、纳米抗体、骆驼抗体、双特异性抗体、酶、基因组编辑酶或核酸酶、生长因子、细胞因子、趋化因子、转录因子、结构分子、信号传导分子、重编程因子的mRNA。在一些方面,治疗剂为编码在细胞内起作用的蛋白质或肽的mRNA。在一些方面,治疗剂为编码至少一个重编程因子的mRNA。

[0193] 在一些方面,本公开的脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物在伤口愈合的方法中使用,其中伤口为皮肤疏松症或慢性伤口。在一些方面,皮肤疏松症或慢性伤口为糖尿病性溃疡、缺血性溃疡和压疮。在一些方面,本公开的脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物在伤口愈合的方法中使用,其中伤口为来自皮肤癌的病变。在一些方面,皮肤癌为基底细胞癌、鳞状细胞癌或光化性角化病。在一些方面,上述伤口愈合方法中的任何伤口愈合方法包括施用包含治疗剂的含有本公开的脂质的组合物或本公开的包含治疗剂的脂质-纳米颗粒组合物。在一些方面,治疗剂为mRNA。在一些方面,治疗剂为编码抗体、人类抗体、人源化抗体、纳米抗体、骆驼抗体、双特异性抗体、酶、基因组编辑酶或核酸酶、生长因子、细胞因子、趋化因子、转录因子、结构分子、信号传导分子、重编程因子的mRNA。在一些方面,治疗剂为编码在细胞内起作用的蛋白质或肽的mRNA。在一些方面,治疗剂为编码至少一个重编程因子的mRNA。

[0194] 在一些方面,与含有脂质式(II)的其他脂质-纳米颗粒组合物或与含有本公开的其他脂质的其他脂质-纳米颗粒组合物相比,本公开的含有脂质式(II)的一些脂质-纳米颗粒组合物在皮肤细胞中具有更高的转染效率并且在用于转染至少一个重编程因子时对至少一个皮肤质量标志物产生更大的改善。在一些方面,至少一个皮肤质量标志物为皮肤厚度、皮肤弹性、经表皮失水或它们的任何组合。

[0195] 在一些方面,本公开的脂质-纳米颗粒组合物或含有本公开的脂质的组合物转染皮肤细胞,以将至少一种治疗剂或诊断剂递送至眼细胞中。在一些方面,治疗剂为核酸。在一些方面,治疗剂为mRNA。在一些方面,治疗剂为mRNA和siRNA的组合。在一些方面,治疗剂为mRNA和miRNA的组合。在一些方面,眼细胞为视网膜色素上皮细胞、神经节细胞、感光细胞、视杆细胞、视锥细胞、脉络膜细胞、角膜细胞、结膜细胞、角膜上皮细胞、眼肌细胞或它们的组合。在一些方面,选择脂质或脂质-纳米颗粒组合物以提供对特定细胞类型或多种细胞类型的进行选择性转染。在一些方面,选择脂质或脂质-纳米颗粒组合物以提供在眼睛内(诸如在玻璃体液内或在视网膜内)的扩散。

[0196] 在一些方面,本公开的脂质或脂质-纳米颗粒组合物在治疗或预防眼部疾病或病症或者治疗或预防眼睛的疾病或病症的方法中使用,包括向眼睛施用包含治疗剂的含脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物。

[0197] 在一些方面,使用本公开的脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物治疗或预防的眼部疾病或病症或者所治疗的眼睛的疾病或病症为年龄相关性黄斑变性、青光眼、白内障、干眼症、糖尿病视网膜病变、视力丧失、近视、老花眼、干性黄斑变性或湿性黄斑变性。在一些

方面,治疗眼部疾病或病症或者疾病中的任何一者的方法包括施用含有本公开的脂质的组合物或本公开的包含治疗剂的脂质-纳米颗粒组合物。在一些方面,治疗剂为mRNA。在一些方面,治疗剂为编码抗体、人类抗体、人源化抗体、纳米抗体、骆驼抗体、双特异性抗体、酶、基因组编辑酶或核酸酶、生长因子、细胞因子、趋化因子、转录因子、结构分子、信号传导分子、重编程因子的mRNA。在一些方面,治疗剂为编码在细胞内起作用的蛋白质或肽的mRNA。在一些方面,治疗剂为编码至少一个重编程因子的mRNA。

[0198] 本文提供的方法包括使用脂质或脂质-纳米颗粒组合物来用编码一个或多个细胞重编程因子的一个或多个非整合信使RNA转染细胞,从而产生复原细胞。要复原的细胞可以具有任何细胞类型。在实施例中,细胞与mRNA接触、暴露于mRNA或用mRNA转染持续不超过约20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1天或者持续少于1天。在实施例中,细胞与mRNA接触、暴露于mRNA或用mRNA转染持续不超过约14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1天或者持续少于一天。在实施例中,细胞与mRNA接触、暴露于mRNA或用mRNA转染持续不超过约10、9、8、7、6、5、4、3、2或1天或者持续少于一天。在实施例中,细胞与mRNA接触、暴露于mRNA或用mRNA转染持续不超过约7、6、5、4、3、2或1天或者持续少于一天。在实施例中,细胞与mRNA接触、暴露于mRNA或用mRNA转染持续不超过约5、4、3、2或1天或者持续少于一天。在实施例中,至少一个重编程因子从细胞内的转染mRNA表达或者细胞暴露于从转染mRNA表达的至少一个重编程因子,持续不超过约20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1天或者持续少于1天。在实施例中,至少一个重编程因子从细胞内的转染mRNA表达或者细胞暴露于从转染mRNA表达的至少一个重编程因子,持续不超过约14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1天或者持续少于一天。在实施例中,至少一个重编程因子从细胞内的转染mRNA表达或者细胞暴露于从转染mRNA表达的至少一个重编程因子,持续至少约2天且不超过约14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3或2天。在实施例中,至少一个重编程因子从细胞内的转染mRNA表达或者细胞暴露于从转染mRNA表达的至少一个重编程因子,持续不超过约10、9、8、7、6、5、4、3、2或1天或者持续少于一天。在实施例中,至少一个重编程因子从细胞内的转染mRNA表达或者细胞暴露于从转染mRNA表达的至少一个重编程因子持续至少约2天且不超过约10、9、8、7、6、5、4、3或2天。在实施例中,至少一个重编程因子从细胞内的转染mRNA表达,或细胞暴露于从转染mRNA表达的至少一个重编程因子,持续不超过约7、6、5、4、3、2或1天或者持续少于一天。在实施例中,至少一个重编程因子从细胞内的转染mRNA表达,或细胞暴露于从转染mRNA表达的至少一个重编程因子,持续至少约2天且不超过约7、6、5、4、3或2天。在实施例中,至少一个重编程因子从细胞内的转染mRNA表达或者细胞暴露于从转染mRNA表达的至少一个重编程因子,持续不超过约5、4、3、2或1天或者持续少于一天。在实施例中,至少一个重编程因子从细胞内的转染mRNA表达或者细胞暴露于从转染mRNA表达的至少一个重编程因子持续至少约2天且不超过约5、4、3或2天。在实施例中,复原细胞具有与年轻细胞相似的表型或活性谱。表型或活性谱包括转录组谱、一个或多个核和/或表观遗传标志物的基因表达、蛋白水解活性、线粒体健康和功能、SASP细胞因子表达和甲基化景观中的一者或多者。

[0199] 在一些实施例中,复原细胞具有与年轻细胞的转录组谱更相似的转录组谱。在实施例中,复原细胞的转录组谱包括选自RPL37、RHOA、SRSF3、EPHB4、ARHGAP18、RPL31、FKBP2、MAP1LC3B2、Elf1、Phf8、Pol2s2、Taf1和Sin3a的一个或多个基因的基因表达的增加。

[0200] 在一些实施例中,复原细胞表现出一个或多个核和/或表观遗传标志物的与参考值相比增加的基因表达。在实施例中,一个或多个核和/或表观遗传标志物选自Hplgamma、H3K9me3、核纤层支持蛋白LAP2α和SIRT1蛋白。在实施例中,复原细胞具有更类似于年轻细胞的蛋白水解活性的蛋白水解活性。在实施例中,蛋白水解活性被测量为增加的细胞自噬体形成、增加的胰凝乳蛋白酶样蛋白酶体活性或它们的组合。在实施例中,复原细胞表现出与参考值相比改善的线粒体健康和功能。在实施例中,改善的线粒体健康和功能被测量为增加的线粒体膜电势、减少的反应性氧化物(ROS)或它们的组合。

[0201] 在一些实施例中,复原细胞表现出一个或多个SASP细胞因子的与参考值相比降低的表达。在实施例中,一个或多个SASP细胞因子包括IL18、ILIA、GROA、IL22和IL9。在实施例中,复原细胞表现出甲基化景观的逆转。在实施例中,甲基化景观的逆转通过Horvath时钟估计来测量。在一些实施例中,从老化细胞获得参考值。

[0202] 在实施例中,细胞通过用编码一个或多个细胞重编程因子的mRNA进行瞬时重编程来复原,该mRNA使用本公开的脂质或脂质-纳米颗粒组合物转染到细胞中。在一些实施例中,通过用非整合性mRNA转染细胞持续不超过约20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1天或者少于1天来完成瞬时重编程。在一些实施例中,通过用非整合性mRNA转染细胞持续不超过约14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1天或者少于1天来完成瞬时重编程。在一些实施例中,通过用非整合性mRNA转染细胞持续不超过约9、8、7、6、5、4、3、2或1天或者少于1天来完成瞬时重编程。在一些实施例中,通过用非整合性mRNA转染细胞持续不超过约6、5、4、3、2或1天或者少于1天来完成瞬时重编程。在一些实施例中,通过从细胞中转染的非整合性mRNA表达至少一个重编程因子或将细胞暴露于从细胞中转染的非整合性mRNA表达的至少一个重编程因子持续不超过约20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1天或者少于1天来完成瞬时重编程。在一些实施例中,通过从细胞中转染的非整合性mRNA表达至少一个重编程因子或将细胞暴露于从细胞中转染的非整合性mRNA表达的至少一个重编程因子持续至少2天且不超过约20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3或2天来完成瞬时重编程。在一些实施例中,通过从细胞中转染的非整合性mRNA表达至少一个重编程因子或将细胞暴露于从细胞中转染的非整合性mRNA表达的至少一个重编程因子持续不超过约14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1天或者少于1天来完成瞬时重编程。在一些实施例中,通过从细胞中转染的非整合性mRNA表达至少一个重编程因子或将细胞暴露于从细胞中转染的非整合性mRNA表达的至少一个重编程因子持续至少2天且不超过约14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3或2天来完成瞬时重编程。在一些实施例中,通过从细胞中转染的非整合性mRNA表达至少一个重编程因子或将细胞暴露于从细胞中转染的非整合性mRNA表达的至少一个重编程因子持续不超过约10、9、8、7、6、5、4、3、2或1天或者少于1天来完成瞬时重编程。在一些实施例中,通过从细胞中转染的非整合性mRNA表达至少一个重编程因子或将细胞暴露于从细胞中转染的非整合性mRNA表达的至少一个重编程因子持续至少2天且不超过约10、9、8、7、6、5、4、3或2天来完成瞬时重编程。在一些实施例中,通过从细胞中转染的非整合性mRNA表达至少一个重编程因子或将细胞暴露于从细胞中转染的非整合性mRNA表达的至少一个重编程因子持续不超过约7、6、5、4、3、2或1天或者少于1天来完成瞬时重编程。在一些实施例中,通过从细胞中转染的非整合性mRNA表达至少一个重编程因子或将细胞暴露于从细胞中转染的非整合性mRNA表达的至少一个重

编程因子持续至少2天且不超过约7、6、5、4、3或2天来完成瞬时重编程。在一些实施例中,通过从细胞中转染的非整合性mRNA表达至少一个重编程因子或将细胞暴露于从细胞中转染的非整合性mRNA表达的至少一个重编程因子持续不超过约5、4、3、2或1天或者少于1天来完成瞬时重编程。在一些实施例中,通过从细胞中转染的非整合性mRNA表达至少一个重编程因子或将细胞暴露于从细胞中转染的非整合性mRNA表达的至少一个重编程因子持续至少2天且不超过约5、4、3或2天来完成瞬时重编程。在实施例中,细胞的瞬时重编程消除了各种老化标志,同时避免了细胞完全去分化为干细胞。

[0203] 在本文提供的方法和组合物的实施例中,细胞年龄逆转或复原是通过由本公开的脂质或脂质-纳米颗粒组合物递送的编码细胞重编程因子的一个或多个mRNA的瞬时过表达来实现的。此类细胞重编程因子可以包括转录因子、表观遗传重塑剂或影响线粒体功能、蛋白水解活性、异染色质水平、组蛋白甲基化、核纤层多肽、细胞因子分泌或衰老的小分子。在实施例中,细胞重编程因子包括OCT4、SOX2、KLF4、c-MYC、LIN28和NANOG中的一者或多者。在实施例中,以不同摩尔比应用细胞重编程因子,例如,以a:b:c:d:e:f的摩尔比应用OCT4、SOX2、KLF4、c-MYC、LIN28和NANOG,其中a、b、c、d、e和f可以都是相同的数(例如,1:1:1:1:1:1),一些相同和一些不同的数(例如,3:1:1:1:1:1、2:1:1:1:1:1、2:2:1:1:1:1、2:2:2:1:1:1、2:2:2:2:1:1、2:2:2:2:2:1、3:3:3:3:2:2)或所有不同的数(例如6:4:5:3:2:1),并且其中a、b、c、d、e和f各自为1-7,即1-7:1-7:1-7:1-7:1-7:1-7(或1-7:1-7:1-7:1-7:1-7:1-7、1-7:1-7:1-7:1-7、1-7:1-7:1-7:1-7、1-7:1-7:1-7或1-7:1(在少于6种因子的组合的情况下)。

[0204] 在实施例中,本文提供的方法和组合物可以应用于有复原需要的任何类型的细胞、组织或器官。本公开的方法和组合物可以用于复原培养物中的细胞(例如,离体或体外),以改善供在细胞疗法中使用的功能和效力。在患者的治疗中使用的细胞可以是自体的或同种异体的。细胞可以源自患者或匹配的供体,或者它们可以从细胞库获得或源自iPS细胞。例如,在自体离体疗法中,细胞可以直接从要治疗的患者获得,用编码细胞重编程因子的mRNA转染,如本文所述,并重新植入患者体内。此类细胞可以例如从对患者进行的活检或外科手术中获得。或者,在同种异体离体疗法中,细胞可以从细胞库或源自iPS细胞的细胞系获得,用编码细胞重编程因子的mRNA转染,如本文所述,并重新植入患者体内。或者,可以用编码细胞重编程因子的mRNA在体内直接转染需要复原的细胞。

[0205] 在另一方面,本文提供了药物组合物,其包括通过用本公开的包含编码一个或多个细胞重编程因子的一种或多种非整合性信使RNA的含脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物转染细胞持续不超过连续4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天以瞬时重编程细胞用于复原来获得的复原细胞。在另一方面,本文提供了药物组合物,其包括通过用本公开的包含编码一个或多个细胞重编程因子的一种或多种非整合性信使RNA的含脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物转染细胞持续不超过连续4、5、6或7天以瞬时重编程细胞用于复原来获得的复原细胞。

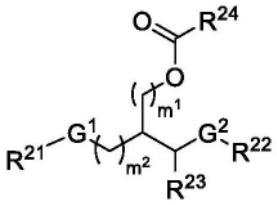
[0206] 在一些实施例中,本公开的含脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物用于递送表达重编程因子的mRNA,其提供更强大的细胞复原,因为重编程因子已经被优化以减少对蛋白质/多肽的任何触发的免疫反应,增加蛋白质/多肽的稳定性以及改变蛋白质/多肽活性,诸如与野生型重编程因子相比增加的活性。

[0207] 在一些实施例中,本公开的方法包括向细胞或受试者施用本公开的包含RNA的含

脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物,或用本公开的包含RNA的含脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物治疗或转染细胞持续不超过连续25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4或3天的给药间隔。在一些实施例中,本公开的包含RNA的含脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物的给药在给药间隔期间每天至少进行一次。在一些实施例中,在给药间隔期间以低于每天一次的频率进行给药,例如,每两天一次、每三天一次、每四天一次、每x天一次,其中x为4至25的数。因此,在此类实施例中,例如,在5天给药间隔内每5天给药一次本公开的包含RNA的含脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物意味着RNA在该间隔内给药一次,即在5天的总治疗期内给药一次,而在5天给药间隔内每天给药两次RNA意味着在该间隔中给药RNA 10次,即5天内给药10次。在一些实施例中,本公开的方法包括向细胞或受试者施用本公开的包含RNA的含脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物,或者用本公开的包含RNA的含脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物治疗或转染细胞持续不超过连续21、18、14、10、7或5天。在一些实施例中,本公开的方法包括向细胞或受试者施用本公开的包含RNA的含脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物,或者用本公开的包含RNA的含脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物治疗或转染细胞持续不超过连续18天在一些实施例中,本公开的方法包括向细胞或受试者施用本公开的包含RNA的含脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物,或者用本公开的包含RNA的含脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物治疗或转染细胞持续不超过连续14天。在一些实施例中,本公开的方法包括向细胞或受试者施用本公开的包含RNA的含脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物,或者用本公开的包含RNA的含脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物治疗或转染细胞持续不超过连续10天。在一些实施例中,本公开的方法包括向细胞或受试者施用本公开的包含RNA的含脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物,或者用本公开的包含RNA的含脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物治疗或转染细胞持续不超过连续7天。在一些实施例中,本公开的方法包括向细胞或受试者施用本公开的包含RNA的含脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物,或者用本公开的包含RNA的含脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物治疗或转染细胞持续不超过连续5天。在其他实施例中,所述暴露包括中断所述暴露并在所述中断之后重复所述暴露。在一些实施例中,所述暴露、治疗、转染、表达或施用包括暴露、治疗、转染、表达或施用持续连续约2-5天之间、连续约5-7天之间、连续约7-10天之间、连续约10-12天之间、连续约12-14天之间、连续约14-17天之间、连续约17-19天之间或连续约19-21天之间,并且在一些实施例中,进一步包括中断所述暴露并在所述中断之后重复所述暴露。

[0208] 在一些实施例中,暴露的持续时间由诸如自我扩增RNA、环状RNA、B18R和其他诱饵的机制和/或诸如L7Ae或其家族成员的启动/关闭开关的控制。在一些实施例中,所述重复进行任何次数,例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10次,或最多20次,或最多30次,或更多次。对于体内应用,所述重复可以持续任何持续时间,例如,直到疾病被成功治疗或治愈,或者贯穿受试者或患者的一生。在一些实施例中,所述重复在所述中断之后的任何时间执行,例如,在所述中断之后0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10天,最多20天,最多30天,最多3个月、最多6个月或最多1年。一个暴露周期被认为是一个给药间隔,使得例如一系列暴露-中断-重复暴露包含两个给药间隔。

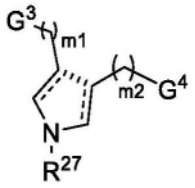
[0209] 在一个实施例中,提供了一种具有式(XVII)结构的化合物:

[0210] 

(XVII)

[0211] 或其立体异构体、盐或互变异构体,G^1、G^2、R^{21}、R^{22}、R^{23}、R^{24}、m^1和m^2如本文所定义。

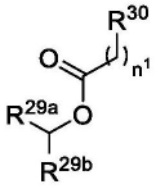
[0212] 在一个实施例中,提供了一种具有式(XVIII)结构的化合物:

[0213] 

(XVIII)

[0214] 或其立体异构体、盐或互变异构体,G^3、G^4、R^{27}、m^1和m^2如本文所定义。

[0215] 在一个实施例中,提供了一种具有式(XIX)结构的化合物:

[0216] 

(XIX)

[0217] 或其立体异构体、盐或互变异构体,R^{29a}、R^{29b}、R^{30}和n如本文所定义。

[0218] 也提供了包含前述式(XVII)至(XIX)化合物中的一种或多种化合物和治疗剂的药物组合物。

[0219] 在其他实施例中,提供了通过向有此需要的受试者施用前述式(I)化合物或包含式(XVII)至(XIX)化合物的药物组合物以治疗疾病的治疗方法。

[0220] 在一个实施例中,也提供了一种脂质纳米颗粒,其包含前述式(XVII)至(XIX)化合物中的一种或多种化合物以及包含核酸的治疗剂。

[0221] 现在将在下文中更全面地描述各个方面和实施例。此类方面和实施例可以采取许多不同的形式,并且本文中公开的示例性的方面和实施例不应被解释为限制性的;不如说,提供这些实施例是为了使得本公开将是透彻且完整的,并且将把其范围完整地传达给本领域的技术人员。

具体实施方式

[0222] 本公开至少部分涉及可电离脂质,这些可电离脂质在纳米颗粒组合物中用于将活性剂或治疗剂(诸如核酸)递送到细胞中时可以提供某些优点。

[0223] 本公开的可电离脂质包含可电离基团、一种或多种酯基团和一种或多种疏水尾基。可电离基团为含胺头部基团,其酸解离常数(pKa)高于7。不希望受任何理论的束缚,据认为高pKa允许可电离的脂质在酸性pH(<6.0)下带正电并且在生理pH(7.4)下是中性的。这

反过来又导致在酸性pH下核酸的高封装效率。可电离的脂质和其他辅助脂质也与核内体的带负电荷的膜相互作用,这导致其膜破裂并因此促进核酸的释放。

[0224] 本公开的可电离脂质中的一个或多个酯基团赋予生物可降解性,因为它是可电离脂质临床转化的关键特征。酯键包含在可电离基团减少积累和潜在副作用,从而在成功递送细胞内货物(例如核酸、小分子或肽或蛋白质)之后导致可电离脂质降解为非毒性代谢物。

[0225] 一个或多个疏水尾基由脂族碳链组成。脂族碳链可以进一步包括不饱和键,诸如双键或三键。疏水尾部可以进一步包括支链尾部。据信尾部长度和尾部饱和度可以极大地影响可电离脂质的流动性和递送效率。分子假设是,由于尾部区域的横截面增加,预期本公开的可电离脂质产生具有增强的内体破坏能力的锥形结构。由于可电离脂质在内体pH值下质子化,这反过来又促进了内体释放。本公开的包含可电离脂质的纳米颗粒组合物对于全身递送应用非常有用,因为它们可以表现出延长的循环寿命并且可以在体内介导转染基因的表达或靶基因表达的沉默。本发明的包含可电离脂质的纳米颗粒组合物对于局部递送应用非常有用,因为它们的特性诸如但不限于电离常数、尺寸和表面电荷可以被调节以用于递送和转染至特定组织。

[0226] 可电离脂质的设计受到基于脂质的天然产物(诸如脑磷脂和鞘磷脂)以及其他常见化合物(如甘油酯)的启发,以实现更好的体内递送及其后清除。据信,此类脂质也有助于提高转染效率和细胞选择性。

[0227] 在疏水链中引入芳香环可以通过π堆积引入更有组织的结构,这可以导致LNP的更好的堆积和稳定性。芳香环也为其他结构修改提供了简便的方法,以通过引入更多的脂肪链和/或通过改变不同位置处的连接点来改变锥体形状。

[0228] 在脂质头部基团中使用杂环旨在提供更明确的锥形脂质和更好的核酸包封。

[0229] I.定义

[0230] 为了方便起见,此处集中了在说明书、实例和权利要求书中所采用的某些术语。除非另有定义,否则本公开中使用的所有技术和科学术语具有与本公开所属领域的普通技术人员通常理解的相同含义。

[0231] 在提供值的范围的情况下,旨在将在范围的上限与下限之间的每个中间值以及在所陈述范围内的任何其他陈述值或中间值涵盖在本公开内。例如,如果规定了1mg至8mg的范围,旨在明确公开2mg、3mg、4mg、5mg、6mg和7mg,以及大于或等于1mg的值的范围和小于或等于8mg的值的范围。

[0232] 如本文所用,术语“Cn-m烷基”是指可以是直链或支链的饱和烃基团。烷基基团在形式上对应于烷烃,其中一个C-H键被烷基基团与化合物的其余部分的连接点所替代。术语“Cn-m烷基”是指具有n至m个碳原子的烷基。烷基基团的实例包括但不限于诸如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、叔丁基、异丁基、仲丁基等化学基团;更高级的同系物,诸如2-甲基-1-丁基、正戊基、3-戊基、正己基、1,2,2-三甲基丙基等。在一些实施例中,烷基含有1至6个碳原子、1至4个碳原子、1至3个碳原子或1至2个碳原子。在一些实施例中,烷基基团含有6至20个碳原子、6至18个碳原子、6至17个碳原子、6至15个碳原子、6至14个碳原子、6至13个碳原子、6至9个碳原子、6至8个碳原子或6至7个碳原子。在一些实施例中,烷基基团任选地被1、2、3或更多个卤素基团取代。在一些实施例中,烷基基团任选地被1、2、3或更多个杂基

团取代。

[0233] 如本文所用,术语“Cn-m烯基”是指不饱和烃基团,其可以是直链或支链的,对应于具有一个或多个碳碳双键的烷基基团。烯基基团形式上对应于烯烃,其中一个C-H键被烯基基团与化合物的其余部分的连接点所替代。术语“Cn-m烯基”是指具n至m个碳的烯基基团。烯基基团的实例包括但不限于诸如乙烯基、丙烯基、异丙烯基、正丁烯基、仲丁烯基等化学基团。在一些实施例中,烯基基团含有6至20个碳原子、6至18个碳原子、6至17个碳原子、6至15个碳原子、6至14个碳原子、6至13个碳原子、6至9个碳原子、6至8个碳原子或6至7个碳原子。在一些实施例中,烯基基团任选地被1、2、3或更多个卤素基团取代。在一些实施例中,烯基基团任选被1、2、3或更多个杂基团取代。

[0234] 如本文所用,术语“Cn-m亚烷基”是指二价烷基连接基团。亚烷基基团在形式上对应于烷烃,其中两个C-H键被亚烷基与化合物的其余部分的连接点所替代。术语“Cn-m亚烷基”是指具有n至m个碳原子的亚烷基。亚烷基的实例包括但不限于乙-1,2-二基、丙-1,3-二基、丙-1,2-二基、丁-1,4-二基、丁-1,3-二基、丁-1,2-二基、2-甲基-丙-1,3-二基等。在一些实施例中,亚烷基基团任选地被1、2、3或更多个卤素基团取代。在一些实施例中,亚烷基任选地被1、2、3或更多个杂基团取代。

[0235] 如本文所用,术语“大约”和“约”是指与所述参考值类似的值。在某些实施方案中,术语“大约”或“约”是指处于在任一方向上(大于或小于)所述参考值的25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或更小的值的范围,除非另有说明或从上下文可以明显看出(除非该数字将超过一个可能的值的100%)。例如,当在纳米颗粒组合物的脂质组分的量的上下文中使用时,“约”可以意指所列举的值的+/-10%。例如,包含具有约40%的给定脂质的脂质组分的纳米颗粒组合物可以包含30%-50%的脂质。

[0236] 如本文所用,术语“疾病”和“病症”可以互换使用或可以不同,因为特定弊病或病症可能没有已知的致病媒介(因此病因学尚未确定),并且因此所述特定弊病或病症尚未被识别为疾病,而仅被识别为其中临床医生或多或少已经鉴定了一组特定的症状的不期望的病状或综合征。

[0237] 如本文所用,术语“封装的”可以是指提供有效负载诸如核酸(例如,干扰RNA、质粒或寡核苷酸DNA、或mRNA)的脂质颗粒,具有完全封装、部分封装或两者。在一个实施例中,核酸完全封装在脂质颗粒中以形成脂质纳米颗粒(LNP)。术语“完全封装”表示脂质颗粒中的核酸在暴露于会显著降解游离RNA或蛋白质的血清或核酸酶或蛋白酶测定之后没有显著降解。完全封装可以通过Oligreen®测定来确定。Oligreen®是一种超灵敏荧光核酸染色剂,用于定量溶液中的RNA(可获自Invitrogen Corporation;Carlsbad,California)。“完全封装”也表明脂质颗粒是血清稳定的,即它们在体内施用后不会快速分解成其组成部分。在一个实施例中,核酸至少50%被封装在脂质中。在一个实施例中,核酸至少75%被封装在脂质中。在一个实施例中,核酸至少90%被封装在脂质中。在一个实施例中,核酸完全封装在脂质中。

[0238] 如本文所用,术语“卤代”或“卤素”是指F、Cl、Br或I。

[0239] 如本文所用,术语“杂”是指选自氧、氮和硫的杂原子。

[0240] 如本文所用,术语“干扰RNA”是指单链RNA(例如,成熟miRNA、环状RNA、指导RNA)或

双链RNA(即,双链体RNA,诸如siRNA、aiRNA或pre-miRNA)或者当干扰RNA与靶基因或序列位于同一细胞中时能够减少或抑制靶基因或序列的表达的RNA载体(例如,通过介导降解干扰RNA序列互补的mRNA的或抑制其翻译)。因此,干扰RNA是指与靶mRNA序列互补的单链RNA或由两条互补链或由单条自互补链形成的双链RNA。干扰RNA可以与靶基因或序列具有实质上或完全的同一性,或者可以包含错配区域(即,错配基序)。干扰RNA的序列可以对应于全长靶基因或其子序列。

[0241] 干扰RNA包括“小干扰RNA”或“siRNA”,例如,长度为约15-60、15-50或15-40个(双链体)核苷酸、更通常长度为约15-30、15-25、或19-25个(双链体)核苷酸并且优选地长度为约20-24、21-22或21-23个(双链体)核苷酸的干扰RNA(例如,双链siRNA的每个互补序列的长度为15-60、15-50、15-40、15-30、15-25或19-25个核苷酸,优选地,长度为约20-24、21-22或21-23个核苷酸,并且双链siRNA的长度为约15-60、15-50、15-40、15-30、15-25或19-25个碱基对,优选地,长度为约18-22、19-20或19-21个碱基对)。siRNA双链体可以包含约1至约4个核苷酸或约2至约3个核苷酸的3’突出端以及5’磷酸末端。siRNA的实例包括但不限于由两条单独的链分子组装而成的双链多核苷酸分子,其中一条链为有义链,并且另一条链为互补的反义链;由单链分子组装而成的双链多核苷酸分子,其中有义区和反义区通过基于核酸或基于非核酸的接头连接;具有发夹二级结构的双链多核苷酸分子,其具有自互补的有义区和反义区;以及具有两个或更多个环结构和具有自我互补的有义区和反义区的干的环状单链多核苷酸分子,其中环状多核苷酸可以在体内或体外处理以产生活性双链siRNA分子。

[0242] siRNA也可以化学合成。siRNA也可以通过用大肠杆菌RNA酶III或Dicer切割较长的dsRNA(例如,长度大于约25个核苷酸的dsRNA)来产生。这些酶将dsRNA处理成具有生物活性的siRNA(参见,例如,Yang等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,99:9942-9947(2002);Calegari等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,99:14236(2002);Byrom等人,Ambion TechNotes,10(1):4-6(2003);Kawasaki等人,Nucleic Acids Res.,31:981-987(2003);Knight等人,Science,293:2269-2271(2001);和Robertson等人,J.Biol.Chem.,243:82(1968))。优选地,dsRNA的长度至少为50个核苷酸至约100、200、300、400或500个核苷酸。dsRNA的长度可以长达1000、1500、2000、5000个核苷酸或更长。dsRNA可以编码整个基因转录本或部分基因转录本。在某些情况下,siRNA可以由质粒编码(例如,转录为自动折叠成具有发夹环的双链体的序列)。

[0243] 如本文所使,术语“体外”是指发生在人工环境,例如,测试管或反映器皿中、细胞培养基中、有盖培养皿中等而不是在生物体(例如,动物、植物或微生物)内。

[0244] 如本文所用,术语“体内”是指在生物体(例如,动物、植物或微生物或其细胞或组织)内发生的事件。

[0245] 如本文所用,术语“复原细胞”是指已经用一个或多个细胞重编程因子治疗或瞬时重编程的老化细胞,使得细胞具有较年轻细胞的转录组谱,同时仍保留一个或多个细胞特性标志物。在一些实施例中,经治疗的细胞被复原和重编程以表达较年轻细胞的标志物和转录组谱,同时仍保留细胞特性标志物,诸如复原细胞被重编程以表达与未经治疗的细胞相比复原标志物的表达的至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%或超过75%的增加/改善。

[0246] 如本文所用,术语“受试者”、“个体”和“患者”在本文中可互换使用,并且是指任何脊椎动物受试者,包括但不限于人类和其他灵长类动物,包括非人类灵长类动物,诸如黑猩猩和其他猿类和猴类;农场动物,诸如牛、羊、猪、山羊和马;家养哺乳动物,诸如狗和猫;啮齿动物,诸如小鼠、大鼠、兔子、仓鼠和豚鼠;禽类,包括家养禽类、野生禽类和游戏禽类,诸如鸡、火鸡和其他鸡科禽类、鸭、鹅等。在一些情况下,本公开的方法可用于实验动物、兽医应用和疾病动物模型的开发。该术语并不表示特定的年龄。因此,成人、青少年和新生儿个体都意图被涵盖在内。

[0247] 如本文所用,术语“转染”是指细胞摄取外源DNA或RNA。当外源DNA或RNA已经被引入细胞膜内时,细胞就已经被“转染”了。

[0248] 如本文所用,术语“转染效率”是指被转染的细胞摄取外源DNA或RNA的程度。转染效率可以测量为例如样品中表达转染的外源DNA或RNA的基因产物的细胞的百分比。样品中表达转染的外源DNA或RNA的基因产物的细胞的百分比可以根据本领域技术人员已知的方法通过使用流式细胞术在转染之后18-24小时确定样品中表达报告基因(诸如绿色荧光蛋白)的细胞的百分比来测量。

[0249] 如本文所用,术语“转染效力”是指样品中每个细胞转染的外源DNA或RNA的基因产物的平均表达水平。可以根据本领域技术人员熟知的方法通过使用流式细胞术确定样品中表达报告基因(诸如绿色荧光蛋白)的细胞的总荧光强度、除以样品中细胞的数量来在转染之后18-24小时测量样品中每个细胞转染的外源DNA或RNA的基因产物的平均表达水平。

[0250] 如本文所用,术语“活力”是指转染之后细胞保持存活的程度,并测量为经受转染的样品中保持存活的细胞的百分比。可以根据本领域技术人员熟知的方法使用流式细胞术在转染之后18-24小时测量存活力作为样品中碘化丙染色阳性的细胞的百分比。

[0251] 如本文所用,术语“瞬时重编程”是指将细胞暴露于细胞重编程因子一段足以使复原细胞(即,消除所有或一些衰老标志)的时间,但不足以引起去分化为干细胞。此类瞬时重编程导致复原细胞并保留其特性(即分化的细胞类型)。

[0252] 术语“治疗”在本文中使用,例如,关于治疗细胞、组织或受试者的方法,并且一般包括施用化合物或组合物,相对于未接受该化合物或组合物的受试者,该化合物或组合物降低受试者衰老或医学病症的症状的频率或延迟其发作。这可以包括以改善或稳定受试者病症的方式逆转、减少或阻止病症的症状、临床体征和潜在病理。

[0253] 如本文所用,术语“异构体”是指化合物的任何几何异构体、互变异构体、两性离子、立体异构体、对映异构体或非对映异构体。化合物可以包括一个或多个手性中心和/或双键,并且因此可以作为立体异构体存在,诸如双键异构体(即,几何E/Z异构体)或非对映异构体(例如,对映异构体(即,(+)或(-)或者顺式/反式异构体)。本公开涵盖本文所述化合物的任何和所有异构体,包括立体异构纯形式(例如,几何纯、对映异构纯或非对映异构纯)以及对映异构和立体异构混合物,例如,外消旋体。化合物的对映异构和立体异构混合物以及将它们拆分为其组分对映异构体或立体异构体的方法是众所周知的。

[0254] 在本公开中,为了方便起见,在一些情况下,脂质的结构式可以表示某种异构体,但是本公开包括所有异构体,诸如几何异构体、基于不对称碳的光学异构体、立体异构体、互变异构体等,应当理解,并非所有异构体都可以具有相同水平的活性。另外,由式表示的脂质可以存在晶体多态性。应注意的是,任何晶型、晶型混合物或者其酸酐或水合物均包括

在本公开的范围内。

[0255] 如本文所用,术语“基于脂质的递送系统”包括但不限于用于递送本文所述的任何有效负载(包括但不限于核酸)的脂质体、聚合复合物、脂质复合物和脂质纳米颗粒。

[0256] 如本文所用,术语“脂质纳米颗粒”或“LNP”是指由至少一种脂质形成的纳米颗粒或包含至少一种脂质的纳米颗粒。“脂质-纳米颗粒组合物”是指包含脂质纳米颗粒的组合物或者指脂质纳米颗粒本身。在一些实施例中,脂质纳米颗粒是脂质-核酸颗粒或核酸-脂质颗粒(例如,稳定的核酸-脂质颗粒)。LNP可以是由本公开的可电离脂质和封装在脂质内的货物形成或包含本公开的可电离脂质和封装在脂质内的货物的颗粒。在一些实施例中,货物为核酸。

[0257] LNP通常可以具有为约10nm至约200nm、约15nm至约150nm、约20nm至约150nm、约40nm至约150nm、约50nm至约150nm、约60nm至约130nm、约70nm至约110nm、约70nm至约100nm、约80nm至约100nm、约90nm至约100nm、约70至约90nm、约80nm至约90nm、约70nm至约80nm或者约30nm、35nm、40nm、45nm、50nm、55nm、60nm、65nm、70nm、75nm、80nm、85nm、90nm、95nm、100nm、105nm、110nm、115nm、120nm、125nm、130nm、135nm、140nm、145nm或150nm的平均直径。

[0258] 如本文所用,术语“哺乳动物”包括人类和家畜动物两者,诸如实验室动物和家养宠物(例如,猫、狗、猪、牛、绵羊、山羊、马、兔子)、和非家畜动物,诸如野生动物等。

[0259] 如本文所用,术语“纳米颗粒组合物”是指包含一种或多种脂质的组合物。纳米颗粒组合物的尺寸通常为微米或更小数量级,并且可以包括脂质双层。纳米颗粒组合物包括脂质纳米颗粒(LNP)、脂质体(例如,脂质囊泡)、聚合复合物和脂质复合物。例如,纳米颗粒组合物可以是直径为500nm或更小的脂质纳米颗粒。

[0260] 如本文所用,术语“核酸”是指含有至少两个单链或双链形式的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸的聚合物,并且包括DNA和RNA。DNA可以是例如反义分子、质粒DNA、预缩合DNA、PCR产物、载体(PI、PAC、BAC、YAC、人工染色体)、表达盒、嵌合序列、染色体DNA或这些基团的衍生物和组合的形式。RNA可以是siRNA、不对称干扰RNA(aiRNA)、微小RNA(miRNA)、mRNA、tRNA、rRNA、tRNA、病毒RNA(vRNA)、自我扩增RNA、多顺反子RNA、自我扩增多顺反子RNA、环状RNA的形式以及它们的组合。核酸包括含有已知核苷酸类似物或修饰的主链残基或键的核酸,其是合成的、天然存在的和非天然存在的,并且其具有与参考核酸类似的结合特性。此类修饰或类似物的实例包括但不限于5-甲基胞苷、5-甲基尿苷、2-硫尿苷、N6-甲基腺苷、假尿苷和N1-甲基假尿苷。此类类似物的实例包括但不限于硫代磷酸酯、氨基磷酸酯、甲基膦酸酯、手性-膦酸甲酯、2’-0-甲基核糖核苷酸和肽-核酸(PNA)。除非具体限制,否则所述术语涵盖含有天然核苷酸的已知类似物的核酸,该已知类似物具有与参考核酸类似的结合特性。除非另有说明,否则特定核酸序列还隐含地涵盖其保守修饰的变体(例如,简并密码子取代)、等位基因、直向同源物、SNP和互补序列以及明确指出的序列。具体而言,简并密码子取代可以通过产生其中一个或多个(或所有)所选择的密码子的第三位置被混合碱基和/或脱氧肌苷残基(Batzer等人,Nucleic Acid Res.,19:5081(1991);Ohtsuka等人,J.Biol.Chem.,260:2605-2608(1985);Rossolini等人,Mol.Cell.Probes,8:91-98(1994))取代的序列来实现。“核苷酸”包含糖脱氧核糖(DNA)或核糖(RNA)、碱基和磷酸基团。核苷酸通过磷酸基团连接在一起。“碱基”包括:嘌呤和嘧啶,其进一步包括天然化合物腺嘌呤、胸

腺嘧啶、鸟嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶、肌苷和天然类似物;以及嘌呤和嘧啶的合成衍生物,其包括但不限于放置新反应性基团(诸如但不限于胺、醇、硫醇、羧酸酯和烷基卤化物)的修饰。

[0261] 如本文所用,术语“任选地取代的”意指未取代的或取代的。术语“取代的”意指氢原子被去除并且被取代基替换。应理解的是,在给定原子处的取代受化合价的限制。

[0262] 如本文所用,术语“药学上可接受的”是指在正确医学判断的范围内适于与人类和/或其他动物的组织接触使用而不会产生过多毒性、刺激、过敏反应或其他问题或并发症的与合理的益处/风险比相称的那些化合物、盐、组合物、剂型等。在一些方面,“药学上可接受的”意指由联邦政府或州政府的监管机构批准的或在美国药典或其他公认的药典中列出的供在哺乳动物(例如,动物)中并且更具体地在人类中使用。

[0263] 如本文所用,术语“药学上可接受的载体”包括但不限于已经被美国食品和药品管理局批准为可接收供在人类或家畜动物使用的任何佐剂、载体、赋形剂、助流剂、甜味剂、稀释剂、防腐剂、染料/着色剂、增味剂、表面活性剂、润湿剂、分散剂、悬浮剂、稳定剂、等渗剂、溶剂或乳化剂。在一些方面,其中的“药学上可接受的载体”或载体、佐剂、赋形剂是用于维持祖细胞静止的“人工生态位”的组分。在一些实施例中,人工生态位组分选自由以下项组成的组:依降钙素;MGCD-265、JNJ-7706621、毛喉素、福马他汀、SB203580、SU5402、TGF-β、胰岛素-转铁蛋白-硒以及它们的组合。这些和其他“人工生态位”组分公开于美国专利10,688,136中,该专利通过引用并入本文。当用作赋形剂时,此类人工生态位组分可被脂质纳米颗粒封装、存在于脂质纳米颗粒的壳中、或与脂质纳米颗粒分开包含在调配物中。

[0264] 如本文所用,术语“药学上可接受的盐”包括酸加成盐和碱加成盐。

[0265] 如本文所用,术语“药物组合物”是指本领域普遍接受的用于将生物活性化合物递送至哺乳动物的纳米颗粒组合物和介质,诸如药学上可接受的载体。

[0266] 如本文所用,术语“受试者”或“患者”是指可以施用根据本公开的组合物的任何生物体,例如,用于实验、诊断、预防和/或治疗目的。典型的受试者包括动物,诸如但不限于哺乳动物,诸如但不限于小鼠、大鼠、兔、非人灵长类动物和人类。

[0267] 如本文所用,术语“全身递送”是指可以导致活性剂在生物体内广泛暴露的治疗产品的递送。一些给药技术可以导致某些药物的全身递送,但不能导致其他药物的全身递送。全身递送意味着有用量优选治疗量的药剂暴露于身体的大部分部位。本公开的组合物(例如,脂质纳米颗粒)的全身递送可以通过本领域已知的任何方式进行,包括例如静脉内、动脉内、皮下和腹膜内递送。在一些实施例中,脂质纳米颗粒的全身递送通过静脉内递送进行。

[0268] 如本文所用,术语“局部递送”是指可以导致活性剂在生物体内的特定位置、组织、器官或细胞类型内局部暴露的治疗产品的递送。一些离子化脂质组合物(包括一些脂质纳米颗粒)可以导致某些药剂的局部递送,但不能导致其他药剂的局部递送。局部递送意味着将有用量优选治疗量的药剂暴露于生物体内的特定位置、组织、器官或细胞类型。本公开的组合物(例如,脂质纳米颗粒)的局部递送可以通过本领域已知的任何方式进行,包括例如静脉内、动脉内、皮下、皮内、真皮、局部、组织内、器官内和腹膜内递送。在一些实施例中,本公开的组合物(例如,脂质纳米颗粒)的局部递送通过静脉内递送进行,其中纳米颗粒的特性(诸如大小、形状、电离常数和表面电荷)决定了LNC所靶向的特定位置、组织、器官或细胞类型。在一些实施例中,本公开的组合物(例如,脂质纳米颗粒)的局部递送通过局部注射到

靶向位置、组织或器官中进行,其中本公开的组合物(例如,脂质纳米颗粒)然后能够在该局部环境中进行转染。在一些实施例中,本公开的组合物(例如,脂质纳米颗粒)的局部递送通过真皮、皮内或皮下注射进行,其中本公开的组合物(例如,脂质纳米颗粒)然后能够在该局部环境中进行转染。在一些实施例中,本公开的组合物(例如,脂质纳米颗粒)的局部递送通过局部施用进行,其中本公开的组合物(例如,脂质纳米颗粒)然后能够在该局部环境中进行转染。

[0269] 如本文所用,术语“治疗剂”或“预防剂”是指当向受试者施用时具有治疗、诊断和/或预防作用且/或引发期望的生物学和/或药理学作用的任何药剂。治疗剂也称为“活性物”或“活性剂”。

[0270] 如本文所用,术语“有效量”或“治疗有效量”是指纳米颗粒组合物在向哺乳动物(优选地,人类)施用时足以实现对哺乳动物(优选地,人类)的治疗的量。构成“治疗有效量”的本公开的脂质纳米颗粒的量将依据本公开的组合物的性质(例如,所使用的特定脂质纳米颗粒)、病症及其严重程度、施用方式和要治疗的受试者的年龄而变化,但可以由本领域的普通技术人员根据其自己的知识和本公开来常规地进行确定。

[0271] 如本文所用,术语“治疗(treating)”或“治疗(treatment)”涵盖对患有所关注的疾病或病症的受试者(优选地,哺乳动物,更优选地,人类)中所关注的疾病或病症的治疗,并且包括预防疾病或病症发生,特别是当此类受试者易患该病症但尚未被诊断患有该病症时;抑制疾病或病症,即阻止其发展;缓解疾病或病症,即引起疾病或病症消退;或缓解由疾病或病症引起的症状,例如,缓解疼痛而不解决潜在的疾病或病症。

[0272] 如本文所用,术语“ζ电势”是指纳米颗粒组合物中脂质的动电势或纳米颗粒的动电势,例如脂质纳米颗粒的动电势。

[0273] 本公开的组合物可以包含本文所述的组分、基本上由其组成或由其组成。

[0274] 除非另有说明,所有百分比、份数和比例均基于组合物的总重量,并且所有测量均在约25℃进行。

[0275] 通过保留限制或排除可以根据范围或以任何类似的方式要求保护的任何此类组的任何单独成员的权利,包含所述组内的任何子范围或子范围的组合,少于本公开的全部措施可以出于任何原因要求保护。另外,通过保留限制或排除任何单独的取代基、类似物、化合物、配位体、结构或其组或所要求保护的组的任何成员的权利,少于本公开的全部措施可以出于任何原因要求保护。

[0276] 在整个本公开中,引用了各种专利、专利申请和出版物。这些专利、专利申请和出版物的公开内容通过整体引用并入本公开中,以便更全面地描述截至本公开之日本领域技术人员已知的现有技术状态。如果引用的专利、专利申请和出版物与本公开之间存在任何不一致,则以本公开为准。

[0277] 为了方便起见,此处集中了在说明书、实例和权利要求书中所采用的某些术语。除非另有定义,否则本公开中使用的所有技术和科学术语具有与本公开所属领域的普通技术人员通常理解的相同含义。

[0278] II.可电离脂质

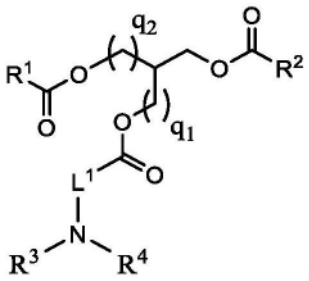
[0279] 本公开的可电离脂质在酸性pH下带正电荷,以将核酸(诸如RNA)凝结成脂质纳米颗粒(LNP)。可电离的脂质在生理pH值下呈中性,以最大限度地减少毒性。它们在细胞摄取

之后可以在酸性内体中质子化,并与阴离子内体磷脂相互作用以形成与双层不相容的锥形离子对。这些阳离子-阴离子脂质对驱动双层结构向倒置六边形HII相的转变,从而促进膜融合/破坏、内体逃逸和货物释放到胞质溶胶中(Semple,S.C.等人,Nat.Biotechnol.2010,28,172-176)。

[0280] 本文公开的可电离脂质的pKa为约8.5至约9.5。包含本文所述的可电离脂质中的一种或多种可电离脂质的脂质纳米颗粒可以具有约6.5至约7.5的pKa。

[0281] 本公开提供了式(I)至式(XVI)可电离脂质。这些脂质在生理pH下可带正电荷或部分正电荷。

[0282] 在一个实施例中,可电离脂质具有式(I):

[0283] 

(I)

[0284] 或其药学上可接受的盐或立体异构体,其中:

[0285] L^1为C_1-C_6亚烷基;R^1为C_6-C_{20}烯基;R^2为C_6-C_{20}烷基;R^3和R^4各自独立地为H或C_1-C_3烷基;q_1不存在或为1;并且q_2不存在或为1。

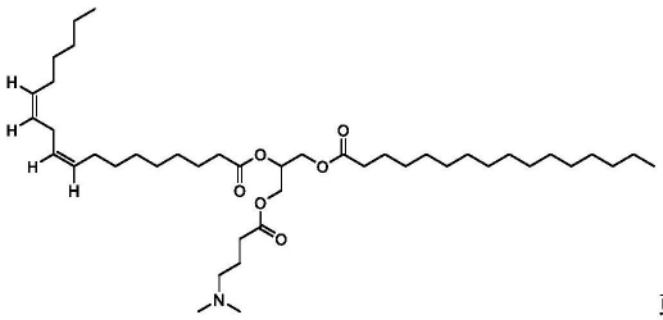
[0286] 在一些实施例中,L1为C1-C6亚烷基;R1为C6-C20烯基;R2为C6-C20烷基;R3为甲基;R4为甲基;q1不存在;并且在式(I)中,q2不存在。

[0287] 在一些实施例中,L1为C1-C6亚烷基;R1为C6-C20烯基;R2为C6-C20烷基;R3为甲基;R4为甲基;q1为1;并且在式(I)中,q2为1。

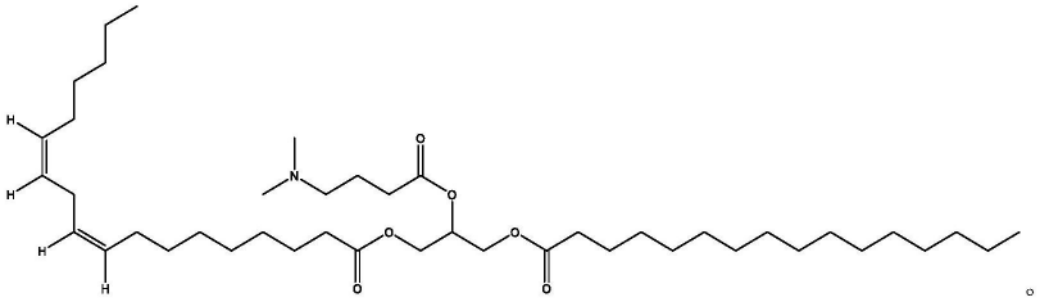
[0288] 在一些实施例中,L1为C1-C6亚烷基;R1为C6-C20烯基;R2为C6-C20烷基;R3为甲基;R4为甲基;q1不存在;并且在式(I)中,q2为1。

[0289] 在一些实施例中,L1为C1-C6亚烷基;R1为C6-C20烯基;R2为C6-C20烷基;R3为甲基;R4为甲基;q1为1;并且在式(I)中,q2不存在。

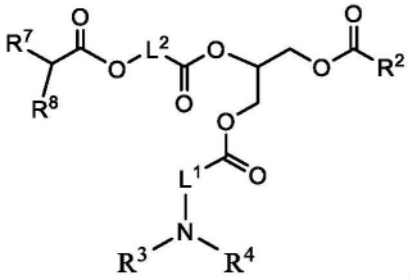
[0290] 式(I)可电离脂质的示例性实例可以包括但不限于以下:

[0291] 

或

[0292] 

[0293] 在一个实施例中,可电离脂质具有式(I-A):

[0294] 

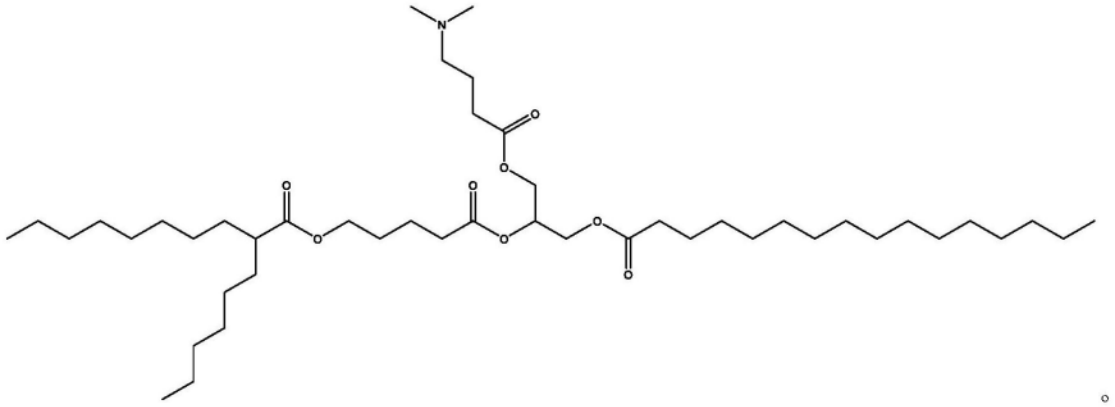
(I-A)

[0295] 或其药学上可接受的盐或立体异构体,其中:

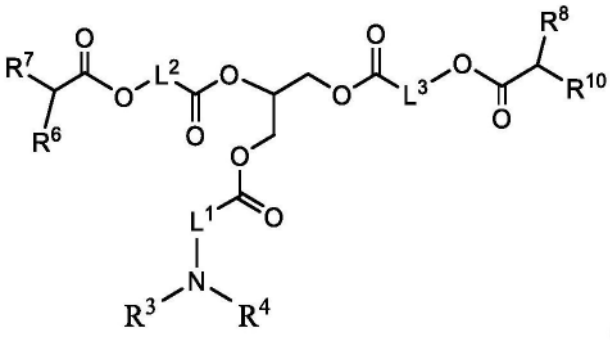
[0296] L^1为C_1-C_6亚烷基;L^2为C_1-C_8亚烷基;R^2为C_6-C_{20}烷基;R^3和R^4各自独立地为H或C_1-C_3烷基;R^7为C_4-C_{20}烷基;并且R^8为C_4-C_{20}烷基。

[0297] 在一些实施例中,L^1为C_1-C_6亚烷基;L^2为C_1-C_8亚烷基;R^2为C_6-C_{20}烷基;R^3为甲基;R^4为甲基;R^7为C_4-C_{20}烷基;并且在式(I-A)中,R^8为C_4-C_{20}烷基。

[0298] 式(I-A)可电离脂质的示例性实例可以包括但不限于以下:

[0299] 

[0300] 在一个实施例中,可电离脂质具有式(I-B):

[0301] 

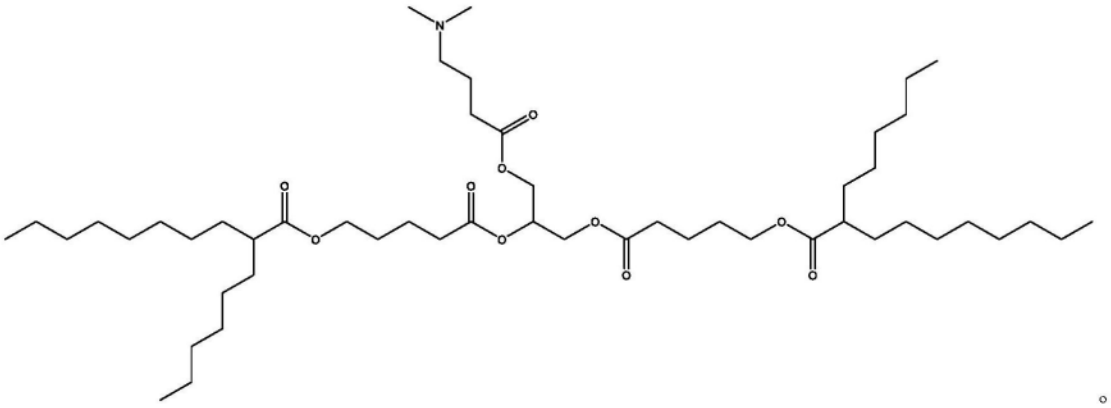
(I-B)

[0302] 或其药学上可接受的盐或立体异构体,其中:

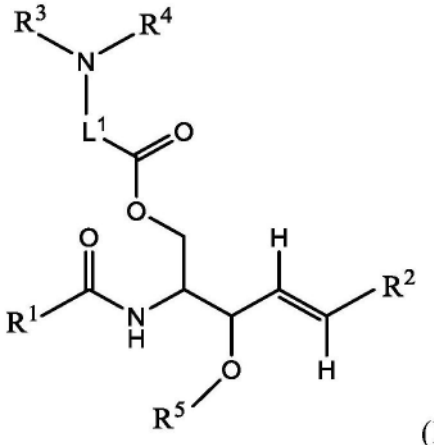
[0303] L^1为C_1-C_6亚烷基;L^2为C_1-C_8亚烷基;L^3为C_1-C_8亚烷基;R^3和R^4各自独立地为H或C_1-C_3烷基;R^6为C_4-C_{20}烷基;R^7为C_4-C_{20}烷基;R^8为C_4-C_{20}烷基;并且R^{10}为C_4-C_{20}烷基。

[0304] 在一些实施例中,L^1为C_1-C_6亚烷基;L^2为C_1-C_8亚烷基;L^3为C_1-C_8亚烷基;R^3为甲基;R^4为甲基;R^6为C_4-C_{20}烷基;R^7为C_4-C_{20}烷基;R^8为C_4-C_{20}烷基;并且在式(I-B)中,R^{10}为C_4-C_{20}烷基。

[0305] 式(I-B)可电离脂质的示例性实例可以包括但不限于以下:

[0306] 

[0307] 在一个实施例中,可电离脂质具有式(II):

[0308] 

(II)

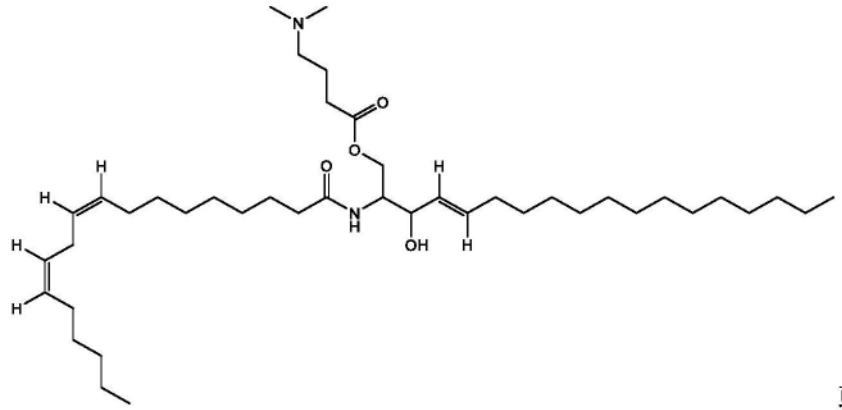
[0309] 或其药学上可接受的盐或立体异构体,其中:

[0310] L^1为C_1-C_6亚烷基;R^1为C_6-C_{20}烯基;R^2为C_6-C_{20}烷基;R^3和R^4各自独立地为H或C_1-C_3烷基;并且R^5为H或C_1-C_3烷基。

[0311] 在一些实施例中,L^1为C_1-C_6亚烷基;R^1为C_6-C_{20}烯基;R^2为C_6-C_{20}烷基;R^3为甲基;R^4为甲基;并且在式(II)中,R^5为H。

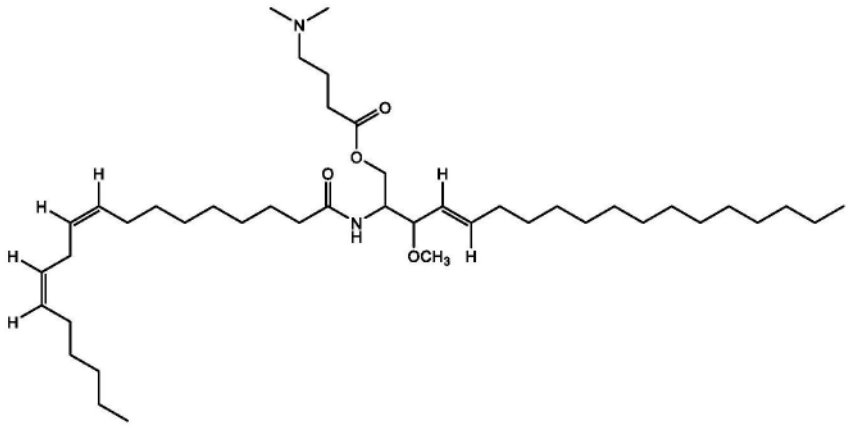
[0312] 在一些实施例中,L^1为C_1-C_6亚烷基;R^1为C_6-C_{20}烯基;R^2为C_6-C_{20}烷基;R^3为甲基;R^4为甲基;并且在式(II)中,R^5为甲基。

[0313] 式(II)可电离脂质的示例性实例可以包括但不限于以下:



或

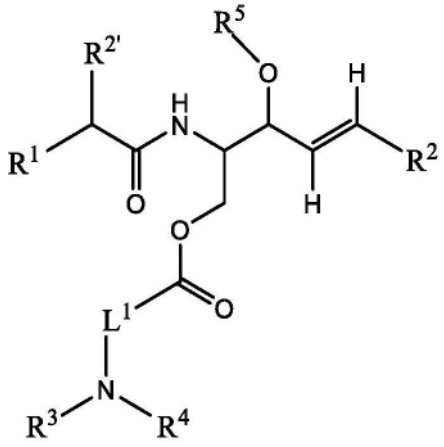
[0314]



。

[0315] 在一个实施例中,可电离脂质具有式(III):

[0316]



(III)

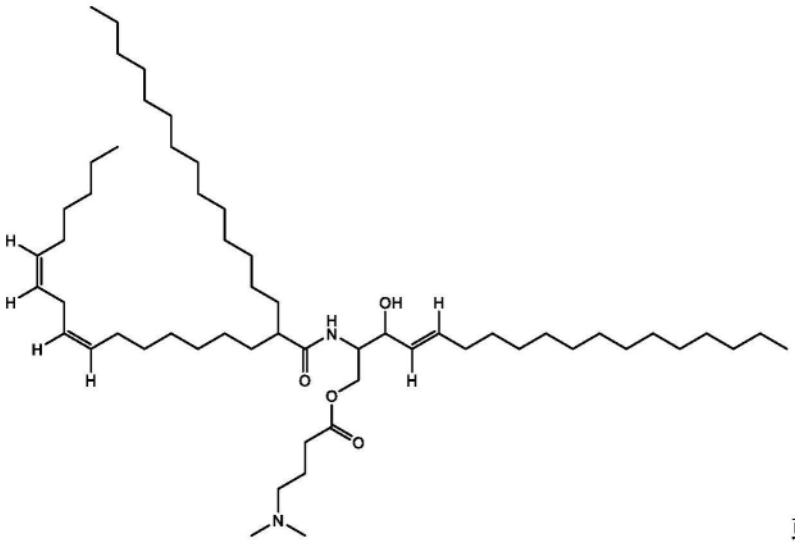
[0317] 或其药学上可接受的盐或立体异构体,其中:

[0318] L^1为C_1-C_6亚烷基;R^1为C_6-C_{20}烯基;R^2为C_6-C_{20}烷基;$R^{2'}$为C_6-C_{20}烷基;R^3和R^4各自独立地为H或C_1-C_3烷基;并且R^5为H或C_1-C_3烷基。

[0319] 在一些实施例中,L^1为C_1-C_6亚烷基;R^1为C_6-C_{20}烯基;R^2为C_6-C_{20}烷基;$R^{2'}$为C_6-C_{20}烷基;R^3为甲基;R^4为甲基;并且在式(III)中,R^5为H。

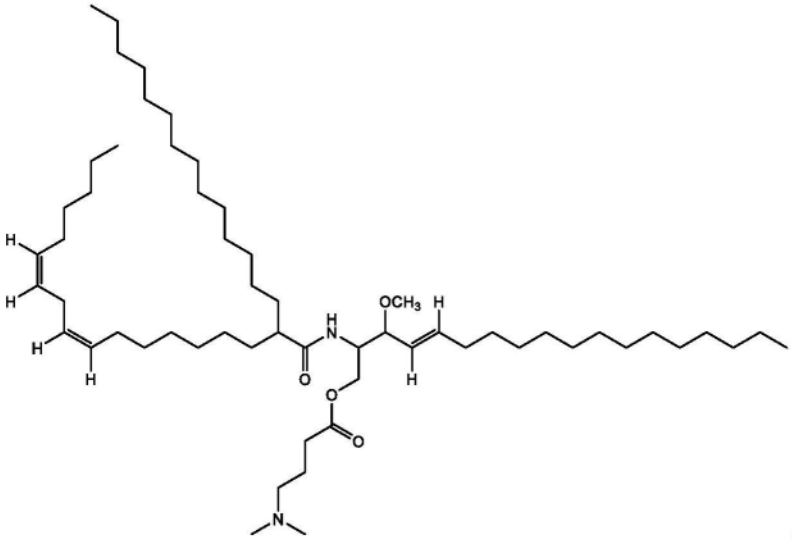
[0320] 在一些实施例中,L^1为C_1-C_6亚烷基;R^1为C_6-C_{20}烯基;R^2为C_6-C_{20}烷基;$R^{2'}$为C_6-C_{20}烷基;R^3为甲基;R^4为甲基;并且在式(III)中,R^5为甲基。

[0321] 式(III)可电离脂质的示例性实例可以包括但不限于以下:



或

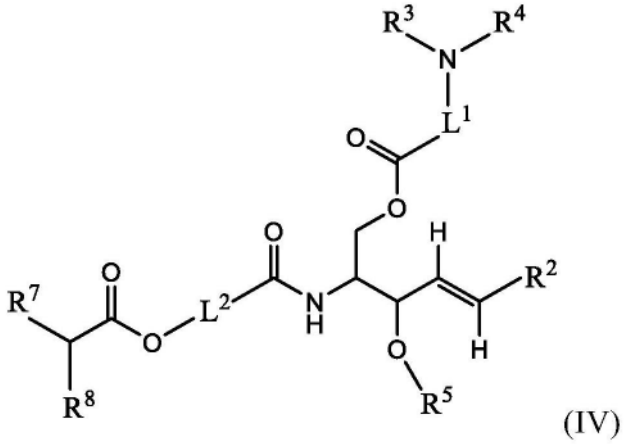
[0322]



。

[0323] 在一个实施例中,可电离脂质具有式(IV):

[0324]



(IV)

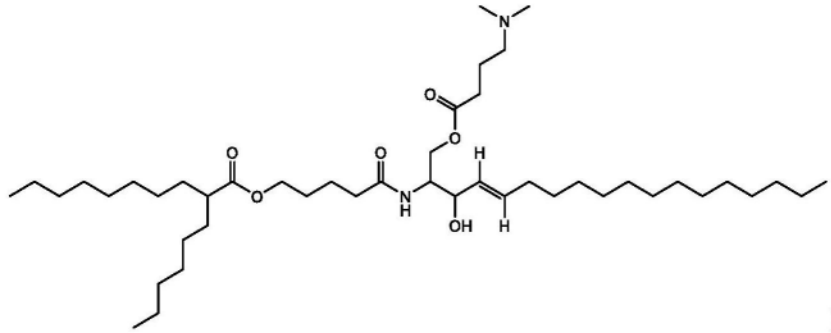
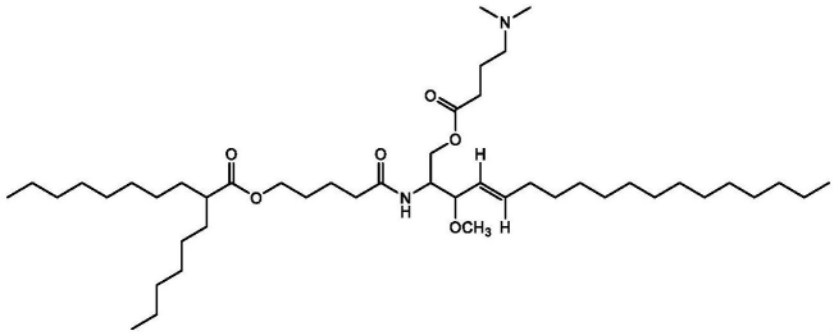
[0325] 或其药学上可接受的盐或立体异构体,其中:

[0326] L^1为C_1-C_6亚烷基;L^2为C_1-C_8亚烷基;R^2为C_6-C_{20}烷基;R^3和R^4各自独立地为H或C_1-C_3烷基;R^5为H或C_1-C_3烷基;R^7为C_4-C_{20}烷基;并且R^8为C_4-C_{20}烷基。

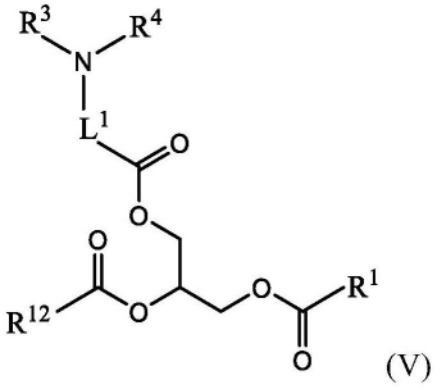
[0327] 在一些实施例中,L^1为C_1-C_6亚烷基;L^2为C_1-C_8亚烷基;R^2为C_6-C_{20}烷基;R^3为甲基;R^4为甲基;R^5为H;R^7为C_4-C_{20}烷基;并且在式(IV)中,R^8为C_4-C_{20}烷基。

[0328] 在一些实施例中,L^1为C_1-C_6亚烷基;L^2为C_1-C_8亚烷基;R^2为C_6-C_{20}烷基;R^3为甲基;R^4为甲基;R^5为甲基;R^7为C_4-C_{20}烷基;并且在式(IV)中,R^8为C_4-C_{20}烷基。

[0329] 式(IV)可电离脂质的示例性实例可以包括但不限于以下:

[0330]  或  。

[0331] 在一个实施例中,可电离脂质具有式(V):

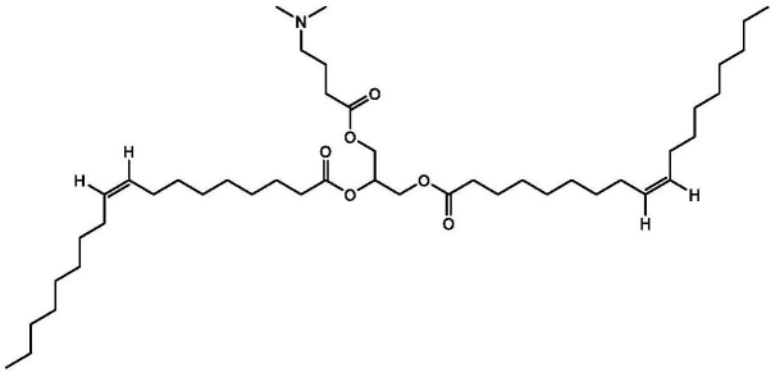
[0332] 
(V)

[0333] 或其药学上可接受的盐或立体异构体,其中:

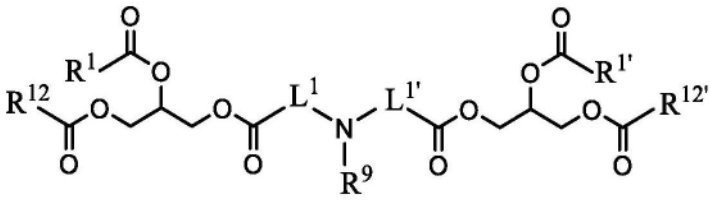
[0334] L^1为C_1-C_6亚烷基;R^1为C_6-C_{20}烯基;R^3和R^4各自独立地为H或C_1-C_3烷基;并且R^{12}为C_6-C_{20}烯基。

[0335] 在一些实施例中,L^1为C_1-C_6亚烷基;R^1为C_6-C_{20}烯基;R^3为甲基;R^4为甲基;并且在式(V)中,R^{12}为C_6-C_{20}烯基。

[0336] 式(V)可电离脂质的示例性实例可以包括但不限于以下:

[0337] 

[0338] 在一个实施例中,可电离脂质具有式(VI):

[0339] 

(VI)

[0340] 或其药学上可接受的盐或立体异构体,其中:

[0341] L^1为C_1-C_6亚烷基;$L^{1'}$为C_1-C_6亚烷基;R^1为C_6-C_{20}烯基;$R^{1'}$为C_6-C_{20}烯基;R^9为H、C_1-C_6烷基或-$(CH_2)_nOH$;R^{12}为C_6-C_{20}烯基;$R^{12'}$为C_6-C_{20}烯基;并且n为2、3或4。

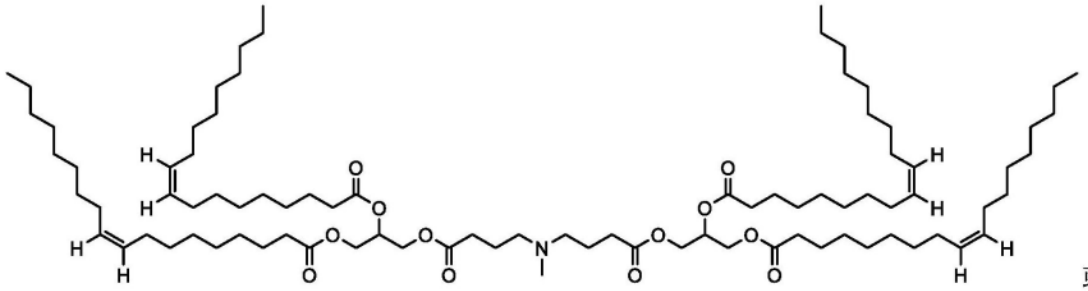
[0342] 在一些实施例中,L^1为C_1-C_6亚烷基;$L^{1'}$为C_1-C_6亚烷基;R^1为C_6-C_{20}烯基;$R^{1'}$为C_6-C_{20}烯基;R^9为H;R^{12}为C_6-C_{20}烯基;并且在式(VI)中,$R^{12'}$为C_6-C_{20}烯基。

[0343] 在一些实施例中,L^1为C_1-C_6亚烷基;$L^{1'}$为C_1-C_6亚烷基;R^1为C_6-C_{20}烯基;$R^{1'}$为C_6-C_{20}烯基;R^9为甲基;R^{12}为C_6-C_{20}烯基;并且在式(VI)中,$R^{12'}$为C_6-C_{20}烯基。

[0344] 在一些实施例中,L^1为C_1-C_6亚烷基;$L^{1'}$为C_1-C_6亚烷基;R^1为C_6-C_{20}烯基;$R^{1'}$为C_6-C_{20}烯基;R^9为-$(CH_2)_nOH$;R^{12}为C_6-C_{20}烯基;$R^{12'}$为C_6-C_{20}烯基;并且在式(VI)中,n为2、3或4。

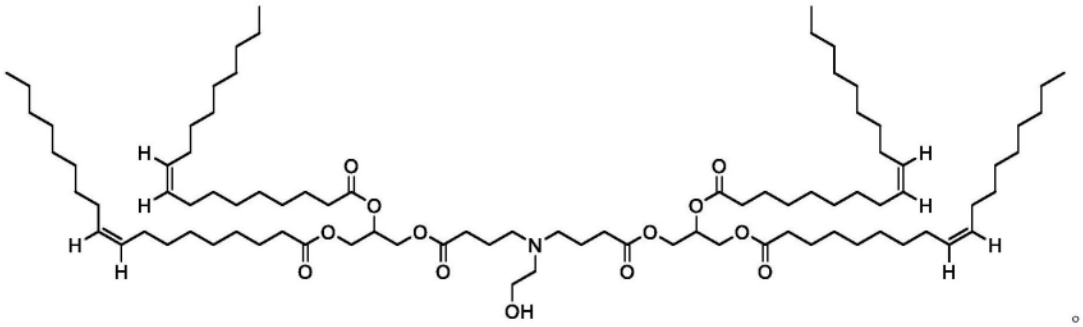
[0345] 在一些实施例中,L^1为C_1-C_6亚烷基;$L^{1'}$为C_1-C_6亚烷基;R^1为C_6-C_{20}烯基;$R^{1'}$为C_6-C_{20}烯基;R^9为-$(CH_2)_nOH$;R^{12}为C_6-C_{20}烯基;$R^{12'}$为C_6-C_{20}烯基;并且在式(VI)中,n为2。

[0346] 式(VI)可电离脂质的示例性实例可以包括但不限于以下:



或

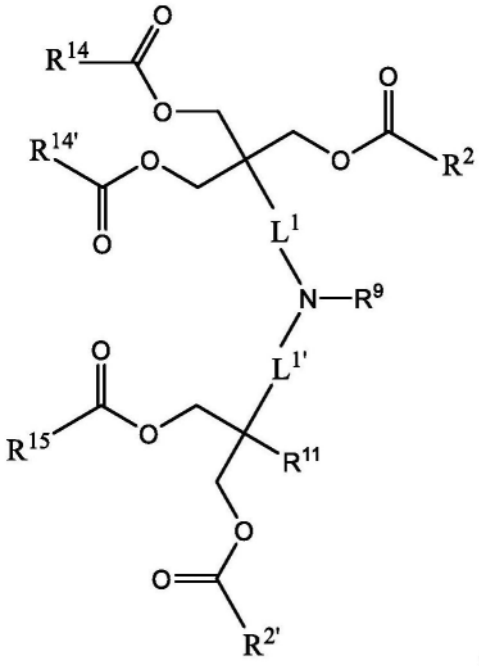
[0347]



。

[0348] 在一个实施例中,可电离脂质具有式(VII):

[0349]



(VII)

[0350] 或其药学上可接受的盐或立体异构体,其中:

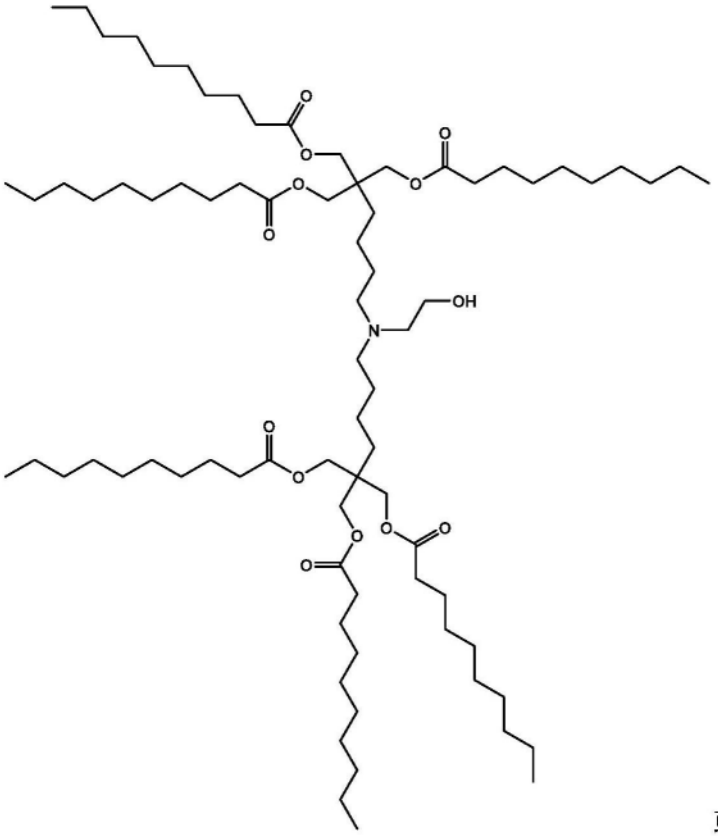
[0351] L^1为C_1-C_6亚烷基;$L^{1'}$为C_1-C_6亚烷基;R^2为C_6-C_{20}烷基;$R^{2'}$为C_6-C_{20}烷基;R^9为H、C_1-C_6烷基或-$(CH_2)_nOH$;R^{11}为H或-$CH_2)OC(=O)R^{16}$;R^{14}为C_6-C_{20}烷基;$R^{14'}$为C_6-C_{20}烷基;R^{15}为C_6-C_{20}烷基;R^{16}为C_6-C_{20}烷基;并且n为2、3或4。

[0352] 在一些实施例中,L^1为C_1-C_6亚烷基;$L^{1'}$为C_1-C_6亚烷基;R^2为C_6-C_{20}烷基;$R^{2'}$为C_6-C_{20}烷基;R^9为H;R^{11}为H;R^{14}为C_6-C_{20}烷基;$R^{14'}$为C_6-C_{20}烷基;并且在式(VII)中,R^{15}为C_6-C_{20}烷基。

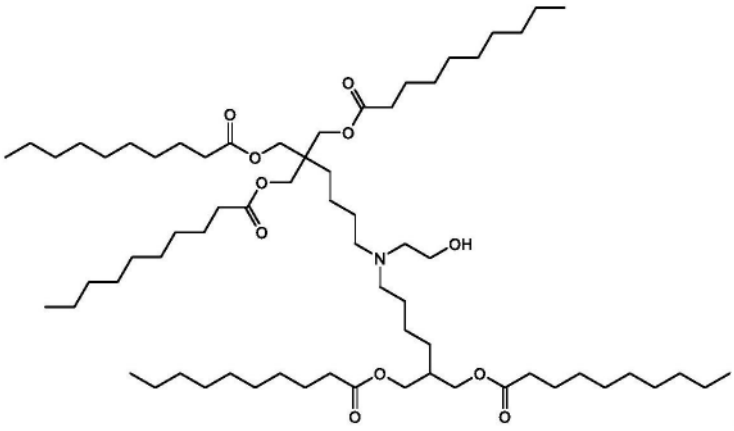
[0353] 在一些实施例中,L^1为C_1-C_6亚烷基;$L^{1'}$为C_1-C_6亚烷基;R^2为C_6-C_{20}烷基;$R^{2'}$为C_6-C_{20}烷基;R^9为甲基;R^{11}为H;R^{14}为C_6-C_{20}烷基;$R^{14'}$为C_6-C_{20}烷基;并且在式(VII)中,R^{15}为C_6-C_{20}烷基。

[0354] 在一些实施例中,L1为C1-C6亚烷基;L1'为C1-C6亚烷基;R2为C6-C20烷基;R2'为C6-C20烷基;R9为-(CH2)nOH;R11为H;R14为C6-C20烷基;R14'为C6-C20烷基;R15为C6-C20烷基;并且在式(VII)中,n为2。

[0355] 式(VII)可电离脂质的示例性实例可以包括但不限于以下:

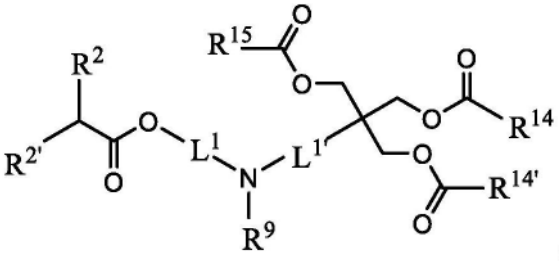
[0356] 

或

[0357] 

。

[0358] 在一个实施例中,可电离脂质具有式(VIII):

[0359] 

(VIII)

[0360] 或其药学上可接受的盐或立体异构体,其中:

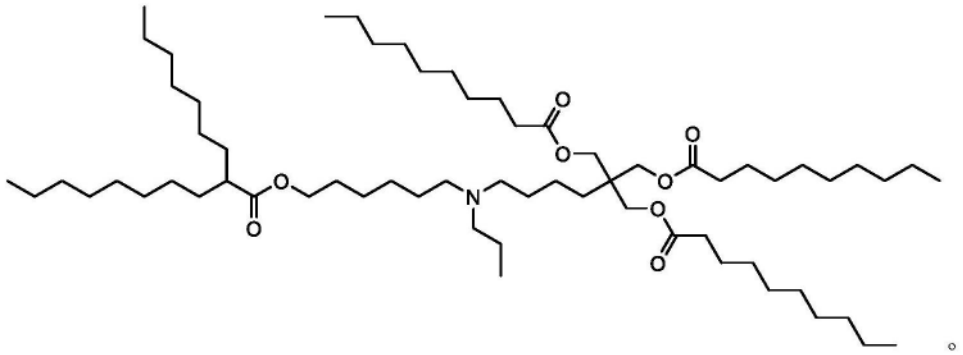
[0361] L^1为C_1-C_6亚烷基;$L^{1'}$为C_1-C_6亚烷基;R^2为C_6-C_{20}烷基;$R^{2'}$为C_6-C_{20}烷基;R^9为H、C_1-C_6烷基或-$(CH_2)_n$OH;R^{14}为C_6-C_{20}烷基;$R^{14'}$为C_6-C_{20}烷基;R^{15}为C_6-C_{20}烷基;并且n为2、3或4。

[0362] 在一些实施例中,L1为C1-C6亚烷基;L1'为C1-C6亚烷基;R2为C6-C20烷基;R2'为C6-C20烷基;R9为H;R14为C6-C20烷基;R14'为C6-C20烷基;并且在式(VIII)中,R15为C6-C20烷基。

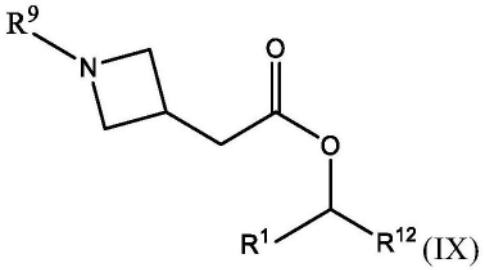
[0363] 在一些实施例中,L1为C1-C6亚烷基;L1'为C1-C6亚烷基;R2为C6-C20烷基;R2'为C6-C20烷基;R9为甲基;R14为C6-C20烷基;R14'为C6-C20烷基;并且在式(VIII)中,R15为C6-C20烷基。

[0364] 在一些实施例中,L1为C1-C6亚烷基;L1'为C1-C6亚烷基;R2为C6-C20烷基;R2'为C6-C20烷基;R9为-(CH2)nOH;R14为C6-C20烷基;R14'为C6-C20烷基;R15为C6-C20烷基;并且在式(VIII)中,n为2。

[0365] 式(VIII)可电离脂质的示例性实例可以包括但不限于以下:

[0366] 

[0367] 在一个实施例中,可电离脂质具有式(IX):

[0368] 

[0369] 或其药学上可接受的盐或立体异构体,其中:

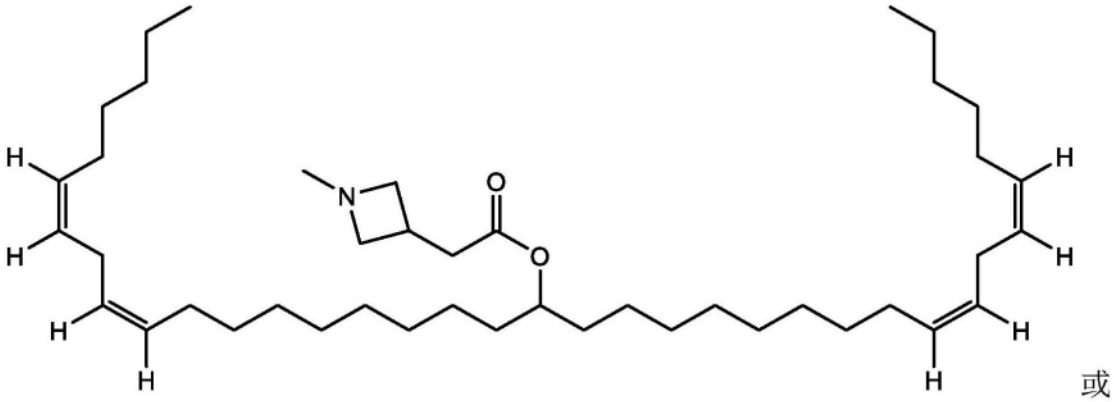
[0370] R^1为C_6-C_{20}烯基;R^9为H、C_1-C_6烷基或-$(CH_2)_n$OH;R^{12}为C_6-C_{20}烯基;并且n为2、3或4。

[0371] 在一些实施例中,R1为C6-C20烯基;R9为H;并且在式(IX)中,R12为C6-C20烯基。

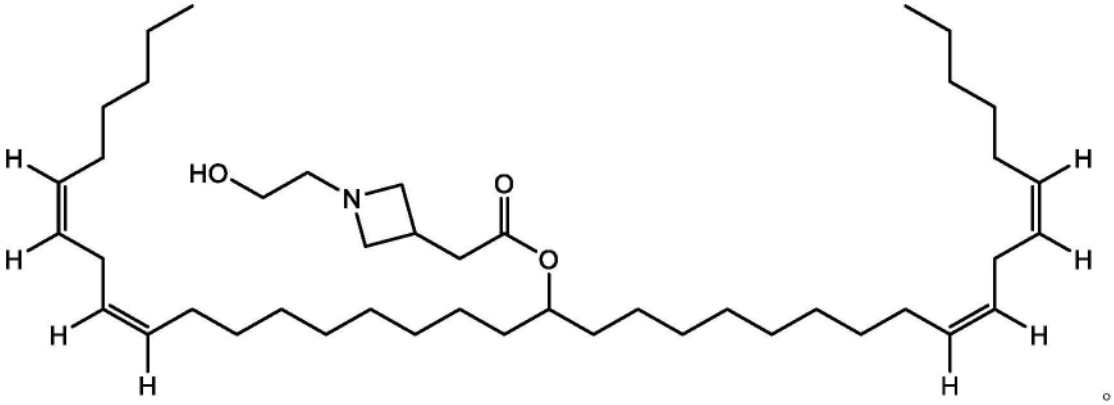
[0372] 在一些实施例中,R1为C6-C20烯基;R9为甲基;并且在式(IX)中,R12为C6-C20烯基。

[0373] 在一些实施例中,R1为C6-C20烯基;R9为-(CH2)nOH;R12为C6-C20烯基;并且在式(IX)中,n为2。

[0374] 式(IX)可电离脂质的示例性实例可以包括但不限于以下:

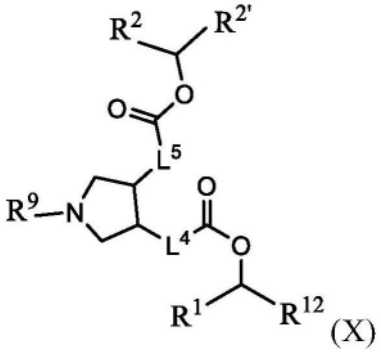
[0375] 

或

[0376] 

。

[0377] 在一个实施例中,可电离脂质具有式(X):

[0378] 

[0379] 或其药学上可接受的盐或立体异构体,其中:

[0380] L^4不存在或为C_1-C_6亚烷基;L^5不存在或为C_1-C_6亚烷基;R^1为C_6-C_{20}烯基;R^2为C_6-C_{20}烷基;$R^{2'}$为C_6-C_{20}烷基;R^9为H、C_1-C_6烷基或-$(CH_2)_n$OH;R^{12}为C_6-C_{20}烯基;并且n为2、3或4。

[0381] 在一些实施例中,L4不存在;L5不存在;R1为C6-C20烯基;R2为C6-C20烷基;R2'为C6-C20烷基;R9为H、C1-C6烷基或-(CH2)nOH;R12为C6-C20烯基;并且在式(X)中,n为2、3或4。

[0382] 在一些实施例中,L4为C1-C6亚烷基;L5为C1-C6亚烷基;R1为C6-C20烯基;R2为C6-C20烷基;R2'为C6-C20烷基;R9为H、C1-C6烷基或-(CH2)nOH;R12为C6-C20烯基;并且在式(X)中,n为2、3或4。

[0383] 在一些实施例中,L4不存在;L5为C1-C6亚烷基;R1为C6-C20烯基;R2为C6-C20烷基;R2'为C6-C20烷基;R9为H、C1-C6烷基或-(CH2)nOH;R12为C6-C20烯基;并且在式(X)中,n为2、3或4。

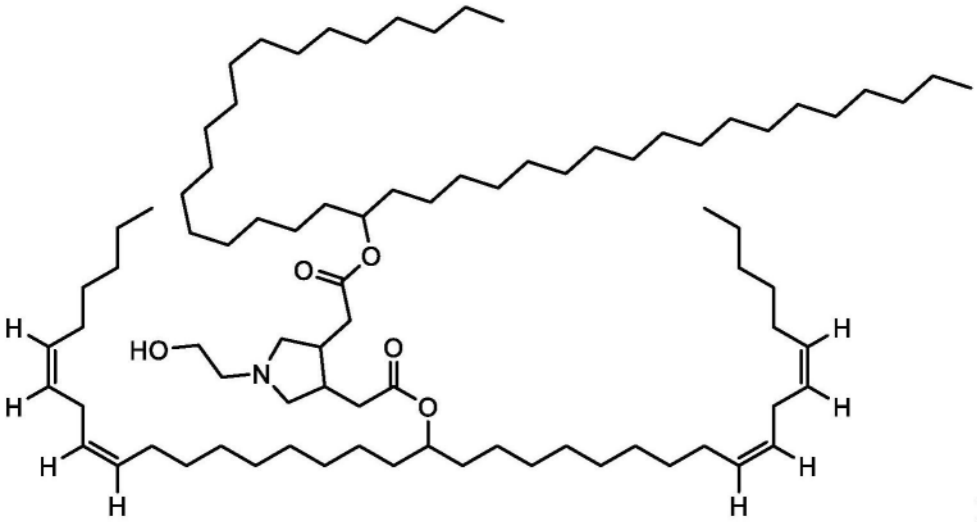
[0384] 在一些实施例中,L4为C1-C6亚烷基;L5不存在;R1为C6-C20烯基;R2为C6-C20烷基;R2'为C6-C20烷基;R9为H、C1-C6烷基或-(CH2)nOH;R12为C6-C20烯基;并且在式(X)中,n为2、3或4。

[0385] 在一些实施例中,L4不存在或为C1-C6亚烷基;L5不存在或为C1-C6亚烷基;R1为C6-C20烯基;R2为C6-C20烷基;R2'为C6-C20烷基;R9为H;并且在式(X)中,R12为C6-C20烯基。

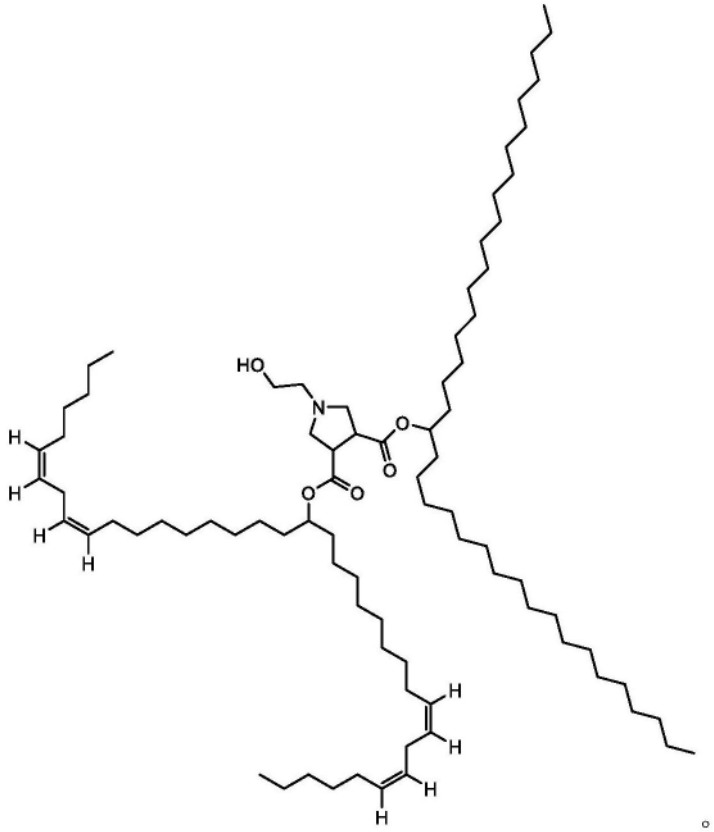
[0386] 在一些实施例中,L^4不存在或为C_1-C_6亚烷基;L^5不存在或为C_1-C_6亚烷基;R^1为C_6-C_{20}烯基;R^2为C_6-C_{20}烷基;$R^{2'}$为C_6-C_{20}烷基;R^9为甲基;并且在式(X)中,R^{12}为C_6-C_{20}烯基。

[0387] 在一些实施例中,L^4不存在或为C_1-C_6亚烷基;L^5不存在或为C_1-C_6亚烷基;R^1为C_6-C_{20}烯基;R^2为C_6-C_{20}烷基;$R^{2'}$为C_6-C_{20}烷基;R^9为$-(CH_2)_nOH$;R^{12}为C_6-C_{20}烯基;并且在式(X)中,n为2。

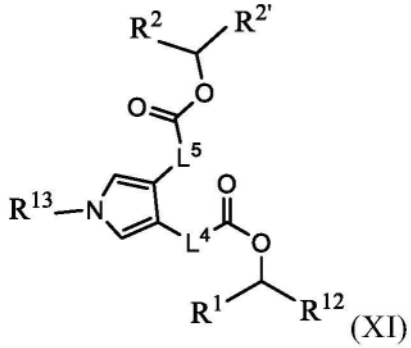
[0388] 式(X)可电离脂质的示例性实例可以包括但不限于以下:

[0389] 

或

[0390] 

[0391] 在一个实施例中,可电离脂质具有式(XI):

[0392] 

[0393] 或其药学上可接受的盐或立体异构体,其中:

[0394] L^4不存在或为C_1-C_6亚烷基;L^5不存在或为C_1-C_6亚烷基;R^1为C_6-C_{20}烯基;R^2为C_6-C_{20}烷基;$R^{2'}$为C_6-C_{20}烷基;R^{12}为C_6-C_{20}烯基;R^{13}为H、C_1-C_6烷基、-$(CH_2)_nOH$或-$(CH_2)_qN(CH_3)_2$;n为2、3或4;并且q为2、3或4。

[0395] 在一些实施例中,L3不存在;L4不存在;R1为C6-C20烯基;R2为C6-C20烷基;R2'为C6-C20烷基;R12为C6-C20烯基;R13为H、C1-C6烷基、-(CH2)nOH或-(CH2)qN(CH3)2;n为2、3或4;并且在式(XI)中,q为2、3或4。

[0396] 在一些实施例中,L3为C1-C6亚烷基;L4为C1-C6亚烷基;R1为C6-C20烯基;R2为C6-C20烷基;R2'为C6-C20烷基;R12为C6-C20烯基;R13为H、C1-C6烷基、-(CH2)nOH或-(CH2)qN(CH3)2;n为2、3或4;并且在式(XI)中,q为2、3或4。

[0397] 在一些实施例中,L3为C1-C6亚烷基;L4不存在;R1为C6-C20烯基;R2为C6-C20烷基;R2'为C6-C20烷基;R12为C6-C20烯基;R13为H、C1-C6烷基、-(CH2)nOH或-(CH2)qN(CH3)

2;n为2、3或4;并且在式(XI)中,q为2、3或4。

[0398] 在一些实施例中,L3不存在;L4为C1-C6亚烷基;R1为C6-C20烯基;R2为C6-C20烷基;R2'为C6-C20烷基;R12为C6-C20烯基;R13为H、C1-C6烷基、-(CH2)nOH或-(CH2)qN(CH3)2;n为2、3或4;并且在式(XI)中,q为2、3或4。

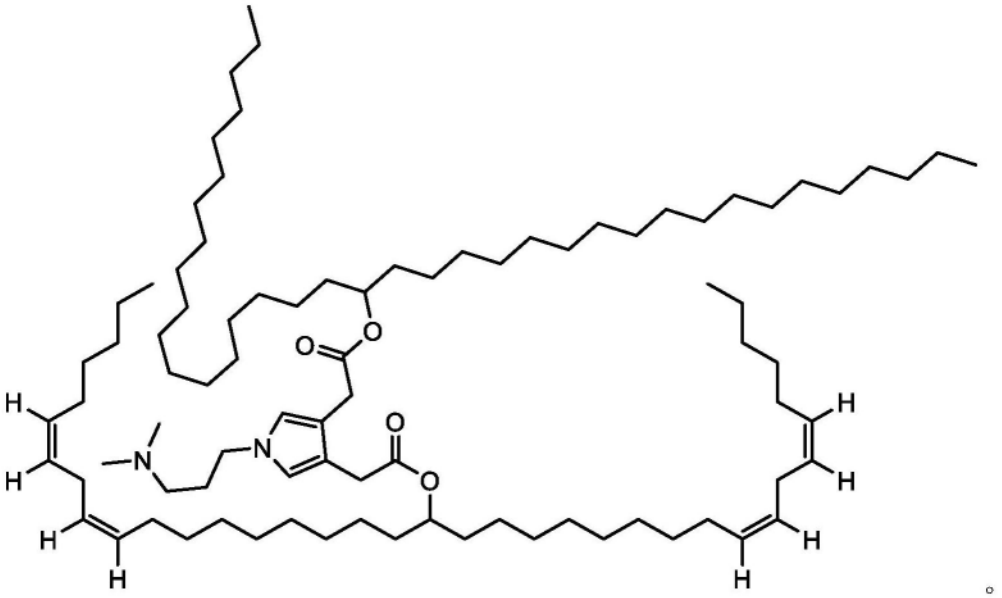
[0399] 在一些实施例中,L3不存在或为C1-C6亚烷基;L4不存在或为C1-C6亚烷基;R1为C6-C20烯基;R2为C6-C20烷基;R2'为C6-C20烷基;R12为C6-C20烯基;并且在式(XI)中,R13为H。

[0400] 在一些实施例中,L3不存在或为C1-C6亚烷基;L4不存在或为C1-C6亚烷基;R1为C6-C20烯基;R2为C6-C20烷基;$R^{2'}$为C_6-C_{20}烷基;R^{12}为C_6-C_{20}烯基;并且在式(XI)中,R^{13}为甲基。

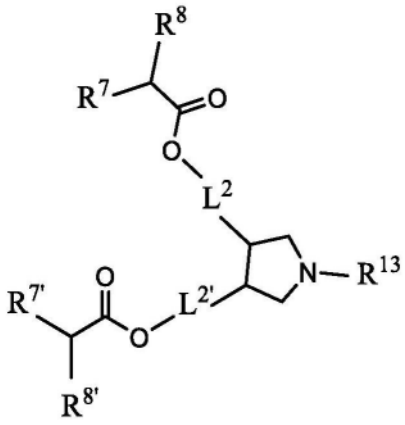
[0401] 在一些实施例中,L3不存在或为C1-C6亚烷基;L4不存在或为C1-C6亚烷基;R1为C6-C20烯基;R2为C6-C20烷基;R2'为C6-C20烷基;R12为C6-C20烯基;R13为-(CH2)nOH;并且在式(XI)中,n为2。

[0402] 在一些实施例中,L3不存在或为C1-C6亚烷基;L4不存在或为C1-C6亚烷基;R1为C6-C20烯基;R2为C6-C20烷基;R2'为C6-C20烷基;R12为C6-C20烯基;R13为-(CH2)qN(CH3)2;并且在式(XI)中,q为3。

[0403] 式(XI)可电离脂质的示例性实例可以包括但不限于以下:

[0404]  。

[0405] 在一个实施例中,可电离脂质具有式(XII):

[0406] 

(XII)

[0407] 或其药学上可接受的盐或立体异构体,其中:

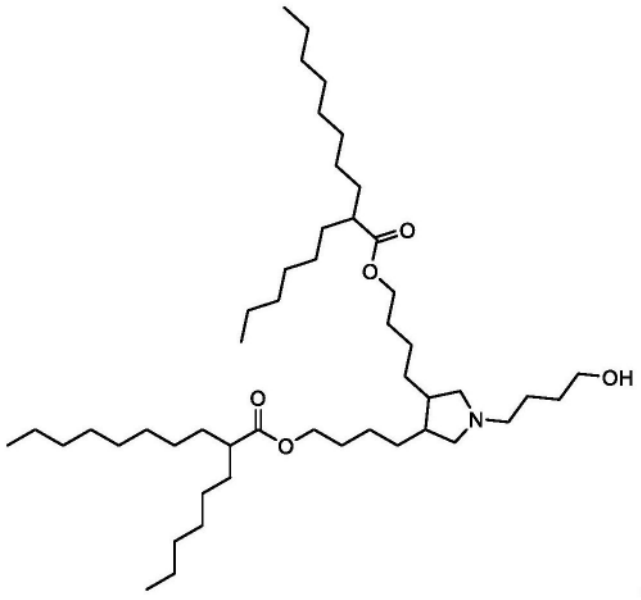
[0408] L^2为C_1-C_8亚烷基;$L^{2'}$为C_1-C_8亚烷基;R^7为C_4-C_{20}烷基;$R^{7'}$为C_4-C_{20}烷基;R^8为C_4-C_{20}烷基;$R^{8'}$为C_4-C_{20}烷基;R^{13}为H、C_1-C_6烷基、-$(CH_2)_nOH$或-$(CH_2)_qN(CH_3)_2$;n为2、3或4;并且q为2、3或4。

[0409] 在一些实施例中,L2为C1-C8亚烷基;L2'为C1-C8亚烷基;R7为C4-C20烷基;R7'为C4-C20烷基;R8为C4-C20烷基;R8'为C4-C20烷基;并且在式(XII)中,R13为H。

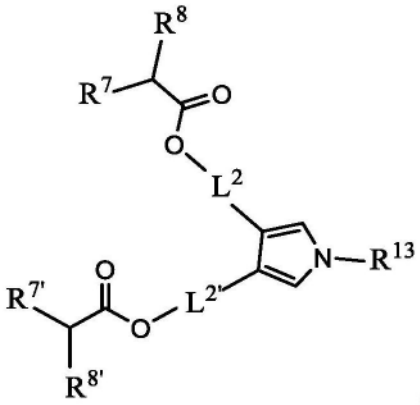
[0410] 在一些实施例中,L2为C1-C8亚烷基;L2'为C1-C8亚烷基;R7为C4-C20烷基;R7'为C4-C20烷基;R8为C4-C20烷基;R8'为C4-C20烷基;并且在式(XII)中,R13为甲基。

[0411] 在一些实施例中,L2为C1-C8亚烷基;L2'为C1-C8亚烷基;R7为C4-C20烷基;R7'为C4-C20烷基;R8为C4-C20烷基;R8'为C4-C20烷基;R13为-(CH2)nOH;并且在式(XII)中,n为4。

[0412] 式(XII)可电离脂质的示例性实例可以包括但不限于以下:

[0413] 

[0414] 在一个实施例中,可电离脂质具有式(XIII):

[0415] 

(XIII)

[0416] 或其药学上可接受的盐或立体异构体,其中:

[0417] L^2为C_1-C_8亚烷基;$L^{2'}$为C_1-C_8亚烷基;R^7为C_4-C_{20}烷基;$R^{7'}$为C_4-C_{20}烷基;R^8为C_4-C_{20}烷基;$R^{8'}$为C_4-C_{20}烷基;R^{13}为H、C_1-C_6烷基、-$(CH_2)_nOH$或-$(CH_2)_qN(CH_3)_2$;n为2、3或4;并且q为2、3或4。

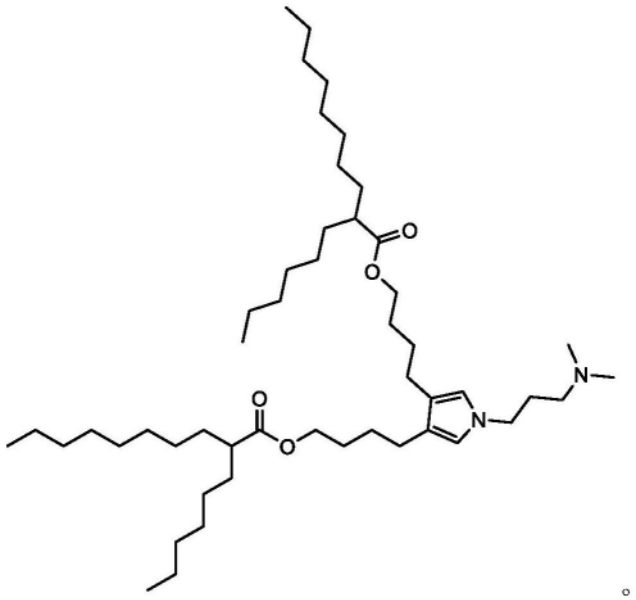
[0418] 在一些实施例中,L2为C1-C8亚烷基;L2'为C1-C8亚烷基;R7为C4-C20烷基;R7'为C4-C20烷基;R8为C4-C20烷基;R8'为C4-C20烷基;并且在式(XIII)中,R13为H。

[0419] 在一些实施例中,L2为C1-C8亚烷基;L2'为C1-C8亚烷基;R7为C4-C20烷基;R7'为C4-C20烷基;R8为C4-C20烷基;R8'为C4-C20烷基;并且在式(XIII)中,R13为甲基。

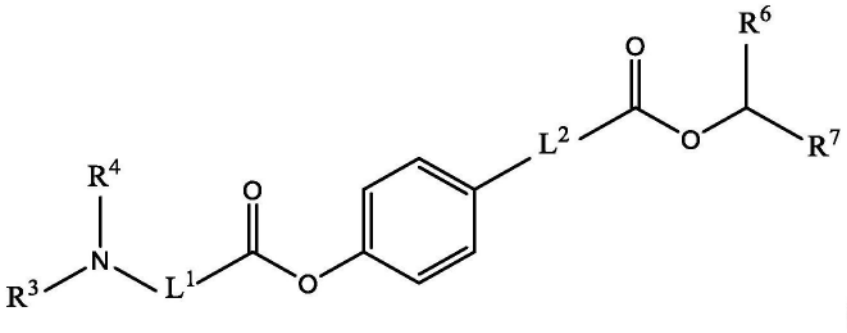
[0420] 在一些实施例中,L2为C1-C8亚烷基;L2'为C1-C8亚烷基;R7为C4-C20烷基;R7'为C4-C20烷基;R8为C4-C20烷基;R8'为C4-C20烷基;R13为-(CH2)nOH;并且在式(XIII)中,n为2。

[0421] 在一些实施例中,L2为C1-C8亚烷基;L2'为C1-C8亚烷基;R7为C4-C20烷基;R7'为C4-C20烷基;R8为C4-C20烷基;R8'为C4-C20烷基;R13为-(CH2)qN(CH3)2;并且在式(XIII)中,q为3。

[0422] 式(XIII)可电离脂质的示例性实例可以包括但不限于以下:

[0423] 

[0424] 在一个实施例中,可电离脂质具有式(XIV):

[0425] 

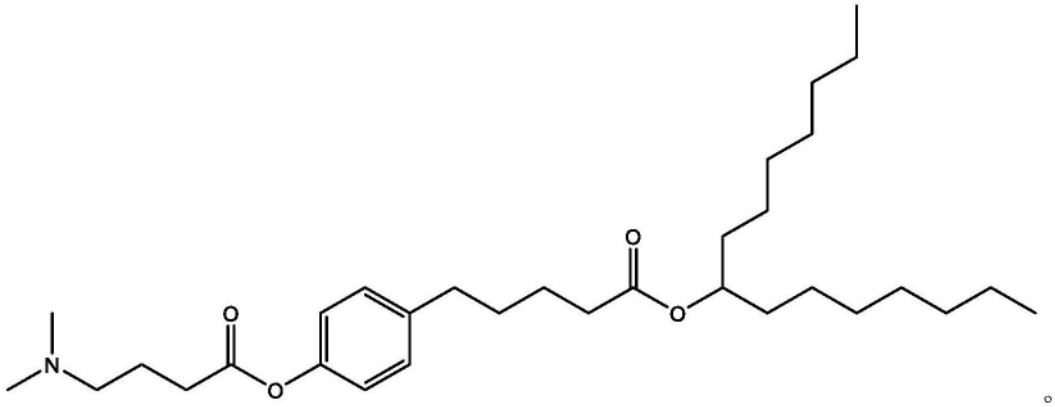
(XIV)

[0426] 或其药学上可接受的盐或立体异构体,其中:

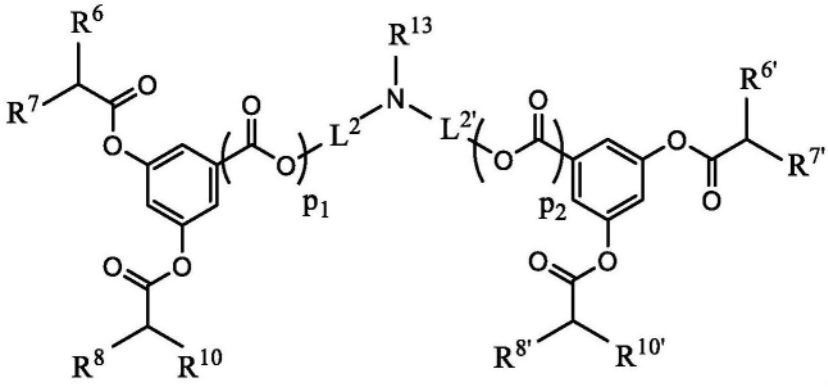
[0427] L^1为C_1-C_6亚烷基;L^2为C_1-C_8亚烷基;R^3和R^4各自独立地为H或C_1-C_3烷基;R^6为C_4-C_{20}烷基;并且R^7为C_4-C_{20}烷基。

[0428] 在一些实施例中,L^1为C_1-C_6亚烷基;L^2为C_1-C_8亚烷基;R^3为甲基;R^4为甲基;R^6为C_4-C_{20}烷基;并且在式(XIV)中,R^7为C_4-C_{20}烷基。

[0429] 式(XIV)可电离脂质的示例性实例可以包括但不限于以下:

[0430] 

[0431] 在一个实施例中,可电离脂质具有式(XV):

[0432] 

(XV)

[0433] 或其药学上可接受的盐或立体异构体,其中:

[0434] L^2为C_1-C_8亚烷基;$L^{2'}$为C_1-C_8亚烷基;R^6为C_4-C_{20}烷基;$R^{6'}$为C_4-C_{20}烷基;R^7为C_4-C_{20}烷基;$R^{7'}$为C_4-C_{20}烷基;R^8为C_4-C_{20}烷基;$R^{8'}$为C_4-C_{20}烷基;R^{10}为C_4-C_{20}烷基;$R^{10'}$为C_4-C_{20}烷基;R^{13}为H、C_1-C_6烷基、-$(CH_2)_nOH$或-$(CH_2)_qN(CH_3)_2$;n为2、3或4;p_1不存在或为1;p_2不存在或为1;并且q为2、3或4。

[0435] 在一些实施例中,L^2为C_1-C_8亚烷基;$L^{2'}$为C_1-C_8亚烷基;R^6为C_4-C_{20}烷基;$R^{6'}$为C_4-C_{20}烷基;R^7为C_4-C_{20}烷基;$R^{7'}$为C_4-C_{20}烷基;R^8为C_4-C_{20}烷基;$R^{8'}$为C_4-C_{20}烷基;R^{10}为C_4-C_{20}烷基;

R^{10}'为C_4-C_{20}烷基;R^{13}为H;p_1不存在;并且在式(XV)中,p_2不存在。

[0436] 在一些实施例中,L^2为C_1-C_8亚烷基;L^2'为C_1-C_8亚烷基;R^6为C_4-C_{20}烷基;R^6'为C_4-C_{20}烷基;R^7为C_4-C_{20}烷基;R^7'为C_4-C_{20}烷基;R^8为C_4-C_{20}烷基;R^8'为C_4-C_{20}烷基;R^{10}为C_4-C_{20}烷基;R^{10}'为C_4-C_{20}烷基;R^{13}为H;p_1为1;并且在式(XV)中,p_2为1。

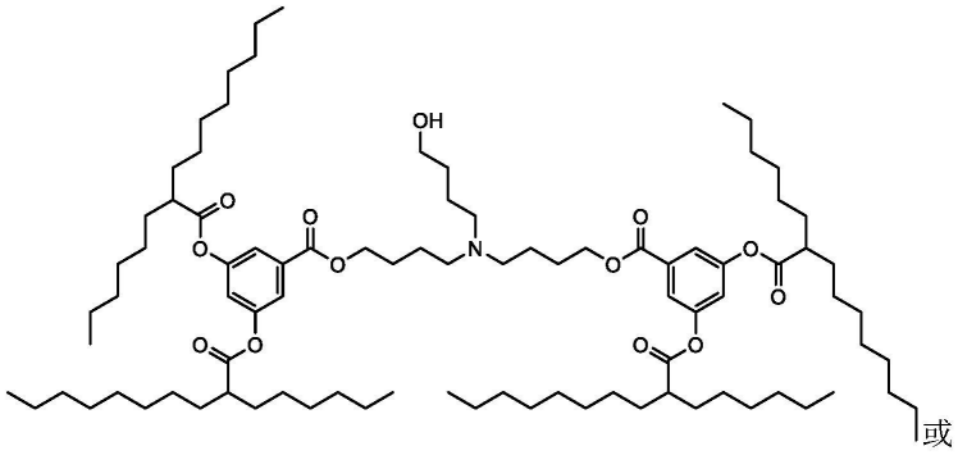
[0437] 在一些实施例中,L2为C1-C8亚烷基;L2'为C1-C8亚烷基;R6为C4-C20烷基;R6'为C4-C20烷基;R7为C4-C20烷基;R7'为C4-C20烷基;R8为C4-C20烷基;R8'为C4-C20烷基;R10为C4-C20烷基;R10'为C4-C20烷基;R13为甲基;p1不存在;并且在式(XV)中,p2不存在。

[0438] 在一些实施例中,L2为C1-C8亚烷基;L2'为C1-C8亚烷基;R6为C4-C20烷基;R6'为C4-C20烷基;R7为C4-C20烷基;R7'为C4-C20烷基;R8为C4-C20烷基;R8'为C4-C20烷基;R10为C4-C20烷基;R10'为C4-C20烷基;R13为甲基;p1为1;并且在式(XV)中,p2为1。

[0439] 在一些实施例中,L2为C1-C8亚烷基;L2'为C1-C8亚烷基;R6为C4-C20烷基;R6'为C4-C20烷基;R7为C4-C20烷基;R7'为C4-C20烷基;R8为C4-C20烷基;R8'为C4-C20烷基;R10为C4-C20烷基;R10'为C4-C20烷基;R13为-(CH2)nOH;n为4;p1不存在;并且在式(XV)中,p2不存在。

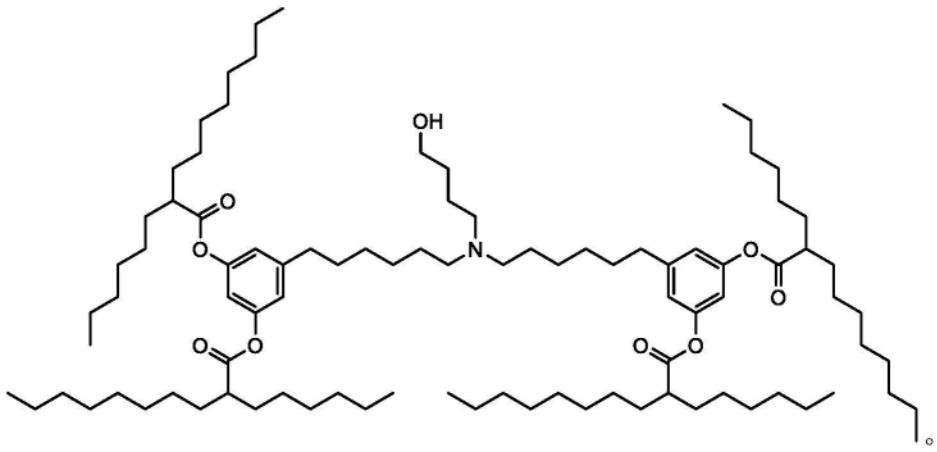
[0440] 在一些实施例中,L2为C1-C8亚烷基;L2'为C1-C8亚烷基;R6为C4-C20烷基;R6'为C4-C20烷基;R7为C4-C20烷基;R7'为C4-C20烷基;R8为C4-C20烷基;R8'为C4-C20烷基;R10为C4-C20烷基;R10'为C4-C20烷基;R13为-(CH2)nOH;n为4;p1为1;并且在式(XV)中,p2为1。

[0441] 式(XV)可电离脂质的示例性实例可以包括但不限于以下:



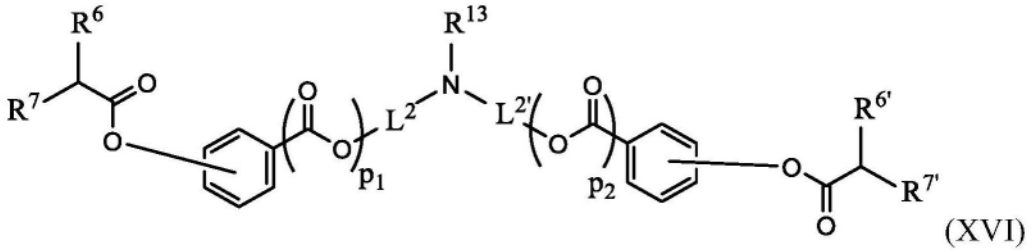
或

[0442]



。

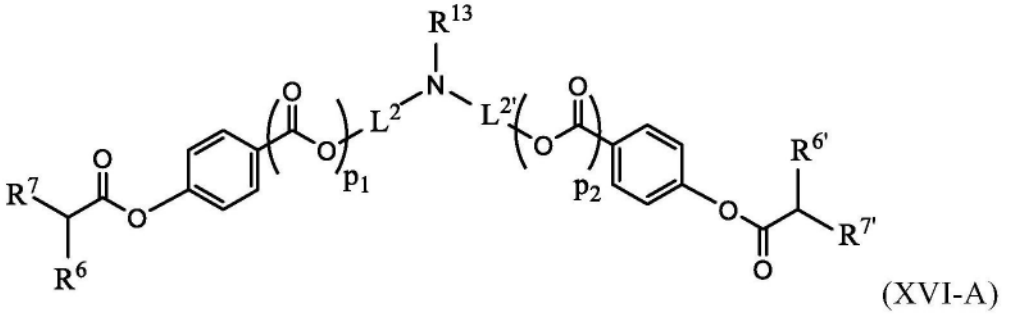
[0443] 在一个实施例中,可电离脂质具有式(XVI):

[0444] 
(XVI)

[0445] 或其药学上可接受的盐或立体异构体,其中:

[0446] L^2为C_1-C_8亚烷基;$L^{2'}$为C_1-C_8亚烷基;R^6为C_4-C_{20}烷基;$R^{6'}$为C_4-C_{20}烷基;R^7为C_4-C_{20}烷基;$R^{7'}$为C_4-C_{20}烷基;R^{13}为H、C_1-C_6烷基、-$(CH_2)_nOH$或-$(CH_2)_qN(CH_3)_2$;n为2、3或4;p_1不存在或为1;p_2不存在或为1;并且q为2、3或4。

[0447] 在一个实施例中,可电离脂质具有式(XVI-A):

[0448] 
(XVI-A)

[0449] 或其药学上可接受的盐或立体异构体,其中:

[0450] L^2为C_1-C_8亚烷基;$L^{2'}$为C_1-C_8亚烷基;R^6为C_4-C_{20}烷基;$R^{6'}$为C_4-C_{20}烷基;R^7为C_4-C_{20}烷基;$R^{7'}$为C_4-C_{20}烷基;R^{13}为H、C_1-C_6烷基、-$(CH_2)_nOH$或-$(CH_2)_qN(CH_3)_2$;n为2、3或4;p_1不存在或为1;p_2不存在或为1;并且q为2、3或4。

[0451] 在一些实施例中,L2为C1-C8亚烷基;L2'为C1-C8亚烷基;R6为C4-C20烷基;R6'为C4-C20烷基;R7为C4-C20烷基;R7'为C4-C20烷基;R13为H;p1不存在或为1;并且在式(XVI)和式(XVI-A)中,p2不存在或为1。

[0452] 在一些实施例中,L2为C1-C8亚烷基;L2'为C1-C8亚烷基;R6为C4-C20烷基;R6'为C4-C20烷基;R7为C4-C20烷基;R7'为C4-C20烷基;R13为甲基;p1不存在或为1;并且在式(XVI)和式(XVI-A)中,p2不存在或为1。

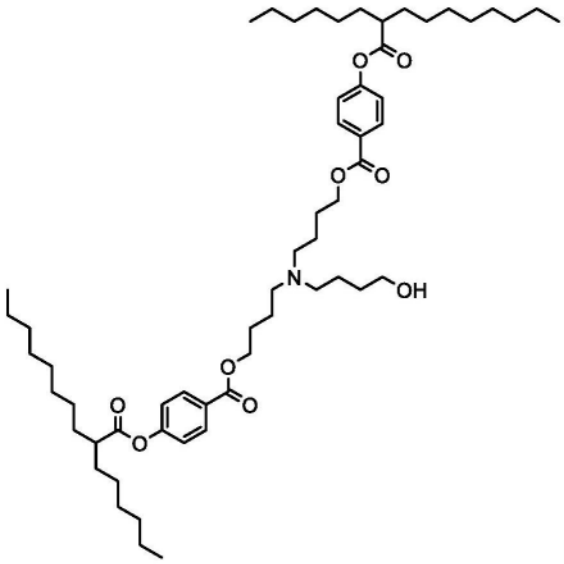
[0453] L2为C1-C8亚烷基;L2'为C1-C8亚烷基;R6为C4-C20烷基;R6'为C4-C20烷基;

[0454] R7为C4-C20烷基;R7'为C4-C20烷基;R13为-(CH2)nOH;n为4;p1不存在;

[0455] 并且在式(XVI)和式(XVI-A)中,p2不存在。

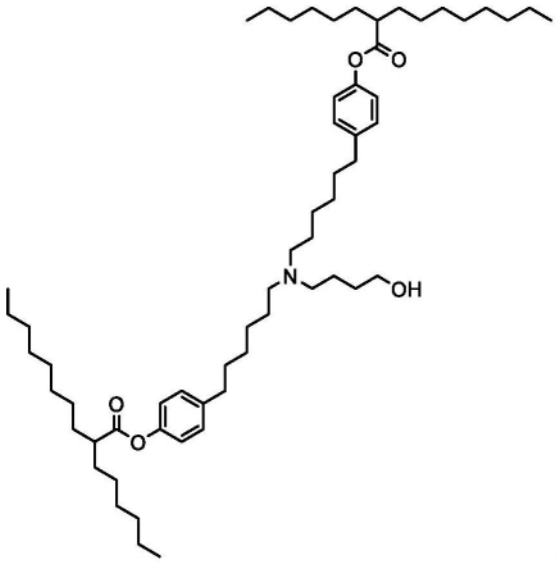
[0456] 在一些实施例中,L2为C1-C8亚烷基;L2'为C1-C8亚烷基;R6为C4-C20烷基;R6'为C4-C20烷基;R7为C4-C20烷基;R7'为C4-C20烷基;R13为-(CH2)nOH;n为4;p1为1;并且在式(XVI)和式(XVI-A)中,p2为1。

[0457] 式(XVI)和式(XVI-A)可电离脂质的示例性实例可以包括但不限于以下:



或

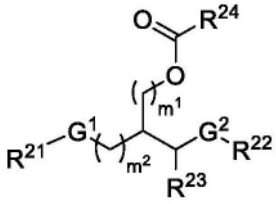
[0458]



。

[0459] 在一个实施例中,化合物具有以下式(XVII)结构:

[0460]



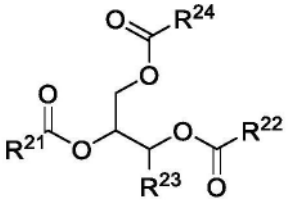
(XVII)

[0461] 或其立体异构体、盐或互变异构体,其中:G^1和G^2各自独立地为-OC(=O)-、-NR^{25}C(=O)-或-CH=CH-;R^{21}和R^{22}各自独立地为C_1-C_6烷基、直链C_{10}-C_{20}烷基、直链C_{10}-C_{20}烯基或支链C_{10}-C_{35}烯基,其中所述C_1-C_6烷基被-OC(=O)R^{26}取代;R^{23}为H、OH或OCH_3;R^{24}为C_1-C_8杂烷基;R^{25}为H或C_1-C_4烷基;R^{26}为支链C_{10}-C_{30}烷基;并且m^1和m^2各自独立地为整数0或1。

[0462] 在一个实施例中,G^1和G^2各自独立地为-OC(=O)-、-NR^{25}C(=O)-或-CH=CH-。在一些实施例中,G^1和G^2各自为-OC(=O)-。在一些实施例中,G^1或G^2中的一者为-NR^{25}C(=O)-并且G^1或G^2中的另一者为-CH=CH-。

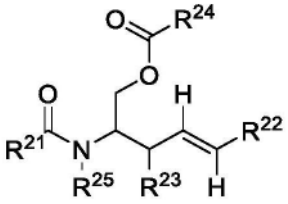
[0463] 在一个实施例中,m^2为0。在一些实施例中,m^2为1。

[0464] 在一个实施例中,化合物具有以下式(XVIIA)至(XVIIB)结构中的一种结构:

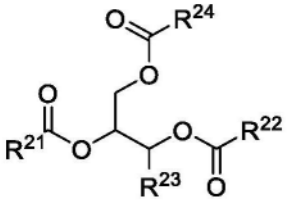
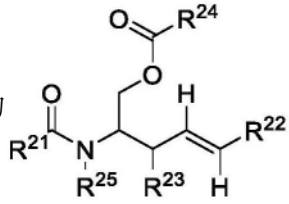


(XVIIA)

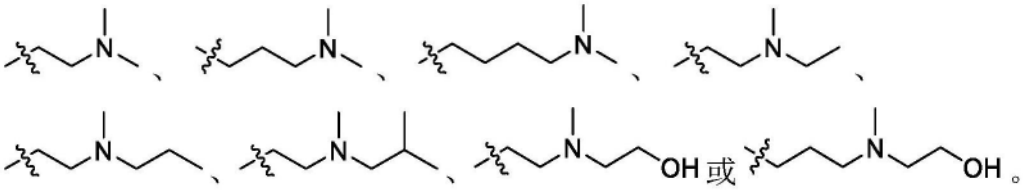
[0465]

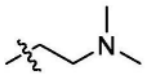
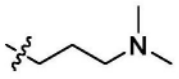
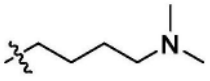
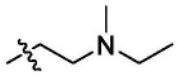
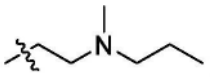
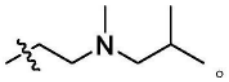
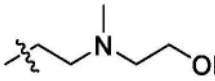


(XVIIB)

[0466] 或其立体异构体、盐或互变异构体。在一些实施例中,化合物为  。在一些实施例中,化合物为  。

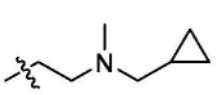
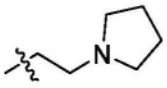
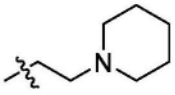
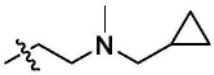
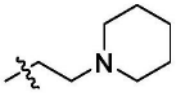
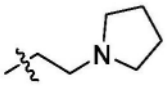
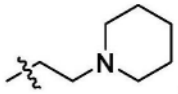
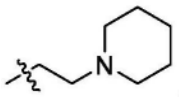
[0467] 在一个实施例中,R24为C1-C8杂烷基。在一些实施例中,R24为C3-C7杂烷基。在一些实施例中,R24为C3杂烷基。在一些实施例中,R24为C4杂烷基。在一些实施例中,R24为C5杂烷基。在一些实施例中,R24为C6杂烷基。在一些实施例中,R24为C7杂烷基。在一些实施例中,R24为C4烷基胺。在一些实施例中,R24为C5烷基胺。在一些实施例中,R24为C6烷基胺。在一些实施例中,R24为C7烷基胺。在一些某些实施例中,R24为



。在一些实施例中,R24为  。在一些实施例中,R24为  。在一些实施例中,R24为  。在一些实施例中,R24为  。在一些实施例中,R24为  。在一些实施例中,R24为  。在一些实施例中,R24为  。在一些实施例中,R24为

。

[0468] 在一些实施例中,R24的C1-C8杂烷基进一步被环烷基取代。在一些某些实施例中,

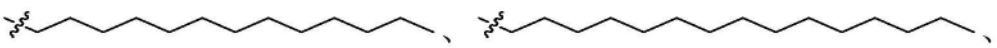
R24为  、  或  。在一些实施例中，R24为  。  。在一些实施例中，R24为  。  。在一些实施例中，R^{24}为  。

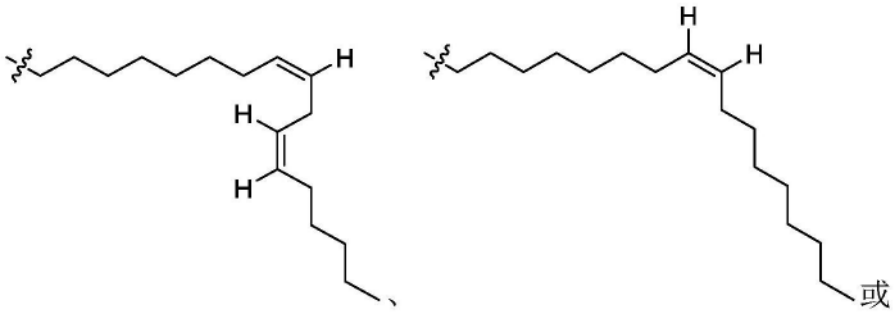
[0469] 在一个实施例中，R^{25}为H或C_1-C_4烷基。在一些实施例中，R^{25}为H。在一些实施例中，R^{25}为C_1-C_4烷基。在一些实施例中，R^{25}为C_1烷基。在一些实施例中，R^{25}为C_2烷基。在一些实施例中，R^{25}为C_3烷基。在一些实施例中，R^{25}为C_4烷基。在一些某些实施例中，R^{25}为-CH_3。在一些其他某些实施例中，R^{25}为-CH_2CH_3。

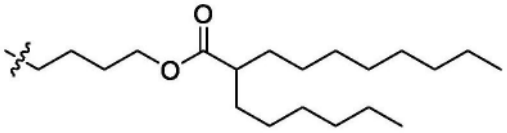
[0470] 在一个实施例中，R^{21}和R^{22}各自独立地为C_1-C_6烷基、直链C_{10}-C_{20}烷基、直链C_{10}-C_{20}烯基或支链C_{10}-C_{35}烯基，其中所述C_1-C_6烷基被-OC(=O)R^{26}取代。在一些实施例中，R^{21}和R^{22}各自独立地为被-OC(=O)R^{26}取代的C_2-C_5烷基、直链C_{12}-C_{18}烷基、直链C_{12}-C_{18}烯基或支链C_{14}-C_{32}烯基。在一些实施例中，R^{21}或R^{22}中的一者为直链C_{12}-C_{18}烷基，并且R^{21}或R^{22}中的另一者为直链C_{12}-C_{18}烯基。在一些实施例中，R^{21}或R^{22}中的一者为被-OC(=O)R^{26}取代的C_2-C_5烷基，并且R^{21}或R^{22}中的另一者为直链C_{12}-C_{18}烷基。在一些实施例中，R^{21}或R^{22}中的一者为直链C_{12}-C_{18}烷基，并且R^{21}或R^{22}中的另一者为支链C_{14}-C_{32}烯基。在一些实施例中，R^{21}和R^{22}各自为被-OC(=O)R^{26}取代的C_2-C_5烷基。在一些实施例中，R^{21}和R^{22}各自为被-OC(=O)R^{26}取代的C_2烷基。在一些实施例中，R^{21}和R^{22}各自为被-OC(=O)R^{26}取代的C_3烷基。在一些实施例中，R^{21}和R^{22}各自为被-OC(=O)R^{26}取代的C_4烷基。在一些实施例中，R^{21}和R^{22}各自为被-OC(=O)R^{26}取代的C_5烷基。在一些实施例中，R^{21}和R^{22}各自为直链C_{12}-C_{18}烯基。在一些实施例中，R^{21}和R^{22}各自为直链C_{12}烯基。在一些实施例中，R^{21}和R^{22}各自为直链C_{13}烯基。在一些实施例中，R^{21}和R^{22}各自为直链C_{14}烯基。在一些实施例中，R^{21}和R^{22}各自为直链C_{15}烯基。在一些实施例中，R^{21}和R^{22}各自为直链C_{16}烯基。在一些实施例中，R^{21}和R^{22}各自为直链C_{17}烯基。在一些实施例中，R^{21}和R^{22}各自为直链C_{18}烯基。

[0471] 在一个实施例中，R^{26}为支链C_{10}-C_{30}烷基。在一些实施例中，R^{26}为支链C_{10}-C_{20}烷基。在一些某些实施例中，R^{26}为支链C_{12}-C_{18}烷基。在一些某些实施例中，R^{26}为支链C_{12}烷基。在一些某些实施例中，R^{26}为支链C_{13}烷基。在一些某些实施例中，R^{26}为支链C_{14}烷基。在一些某些实施例中，R^{26}为支链C_{15}烷基。在一些某些实施例中，R^{26}为支链C_{16}烷基。在一些某些实施例中，R^{26}为支链C_{17}烷基。在一些某些实施例中，R^{26}为支链C_{18}烷基。

[0472] 在一些实施例中，R^{21}和R^{22}各自独立地具有以下结构中的一种结构：



[0473] 

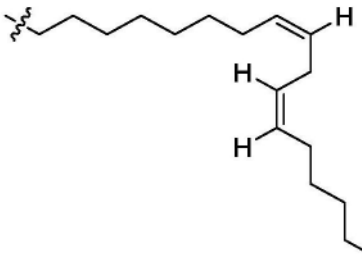


在一些实施例中,R^{21}或R^{22}为

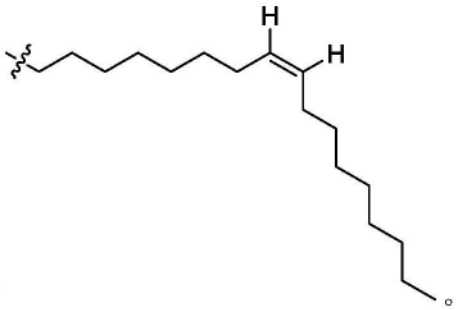
。


。在一些实施例中,R^{21}或R^{22}为

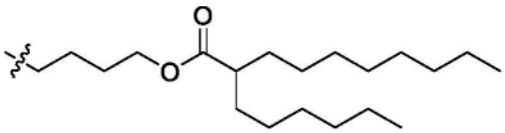

。在一些实施例中,R^{21}或R^{22}为



在一些实施例中,R^{21}或R^{22}为



。

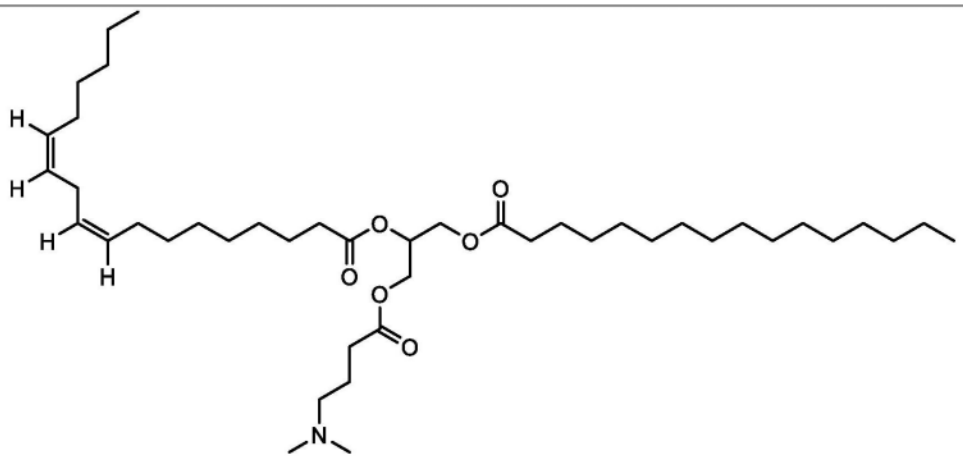
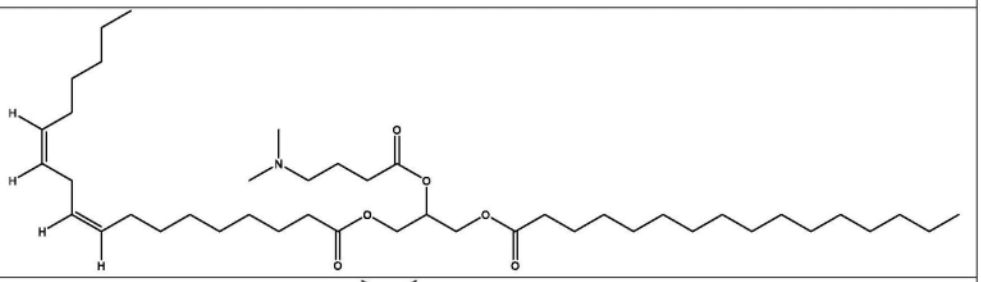
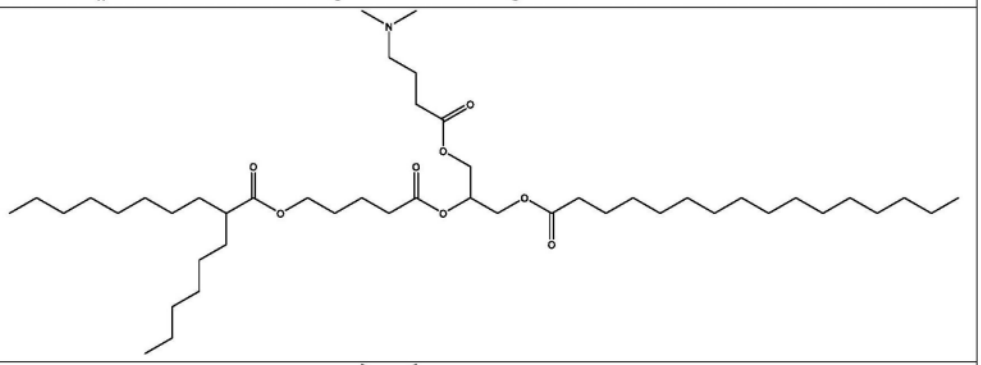
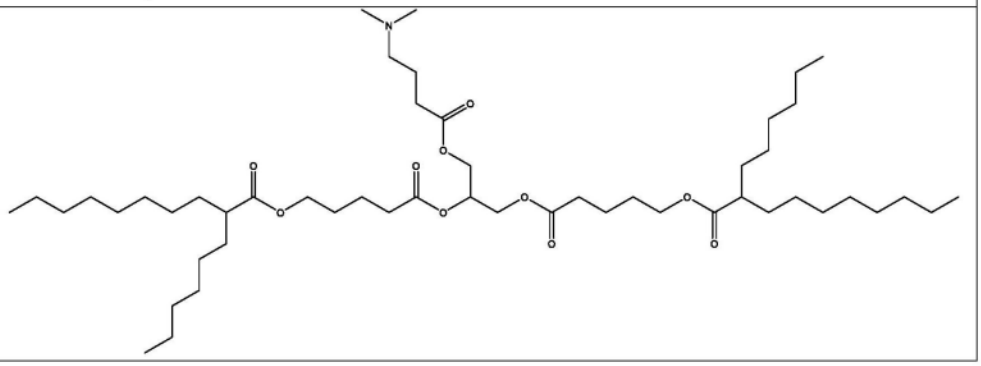
在一些实施例中,R^{21}或R^{22}为 

。

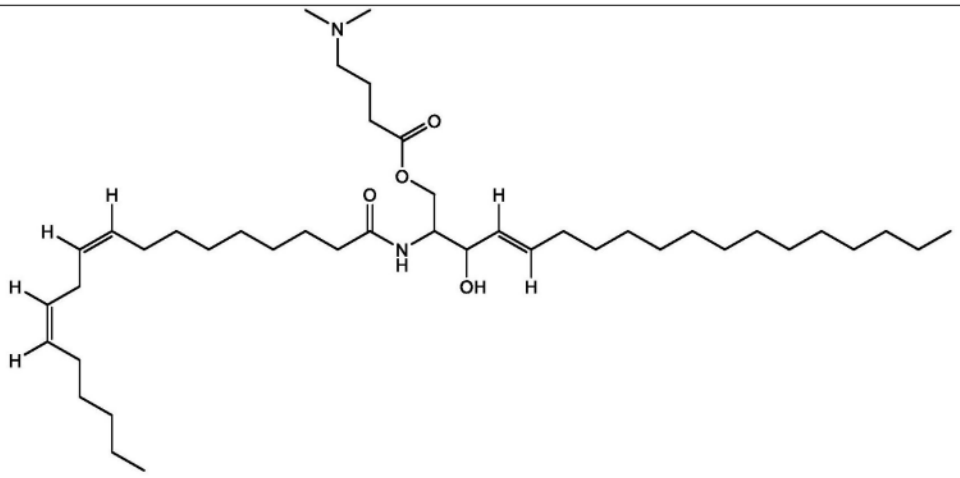
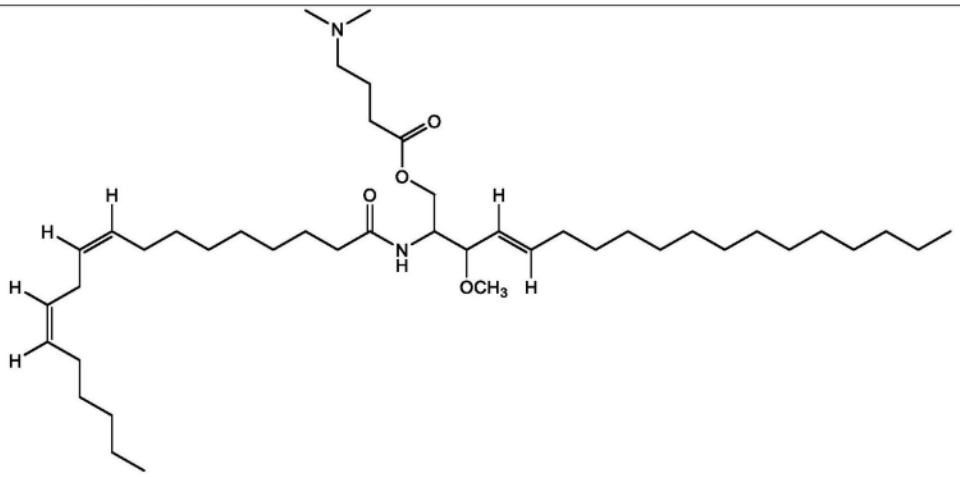
[0474] 在一个实施例中,化合物具有下表A中所示的以下结构中的一种结构。

[0475] 表A:(XVII)至(XVIIB)化合物的列表

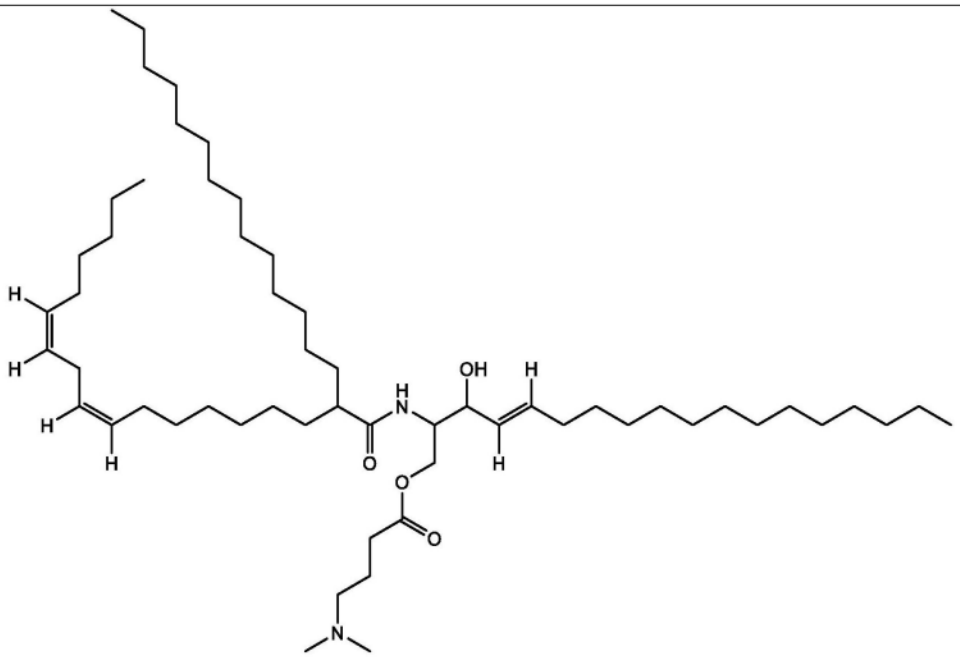
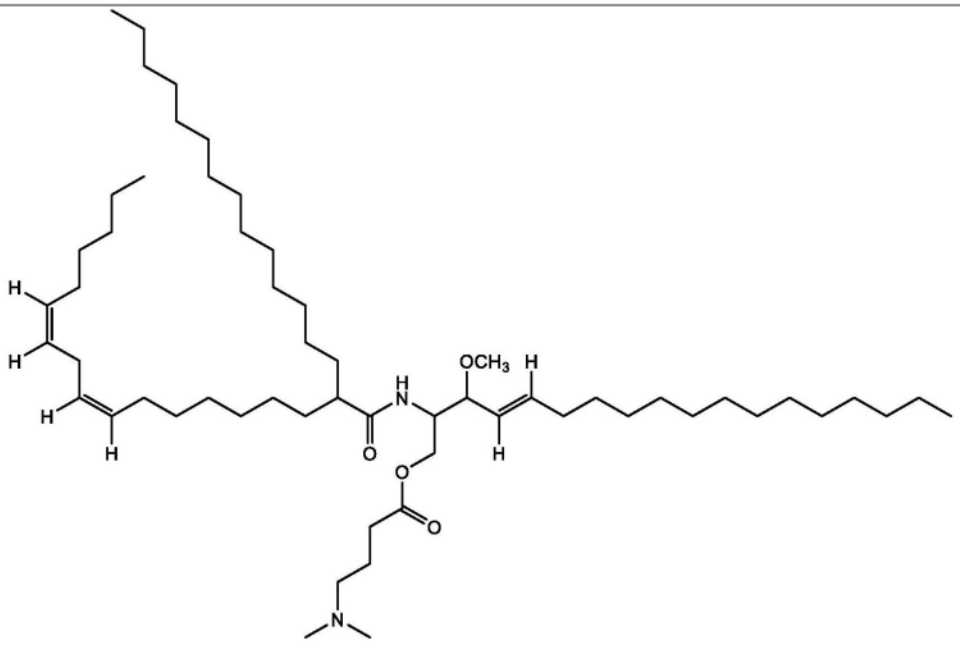
[0476]

化合物 ID	结构
24	
25	
26	
27	

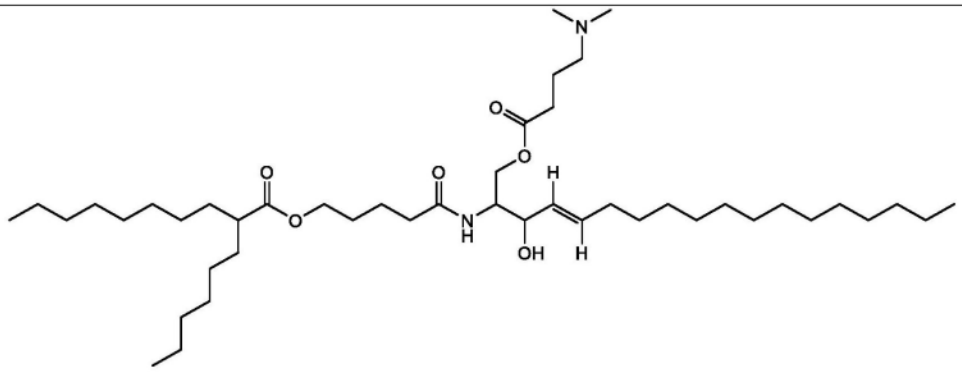
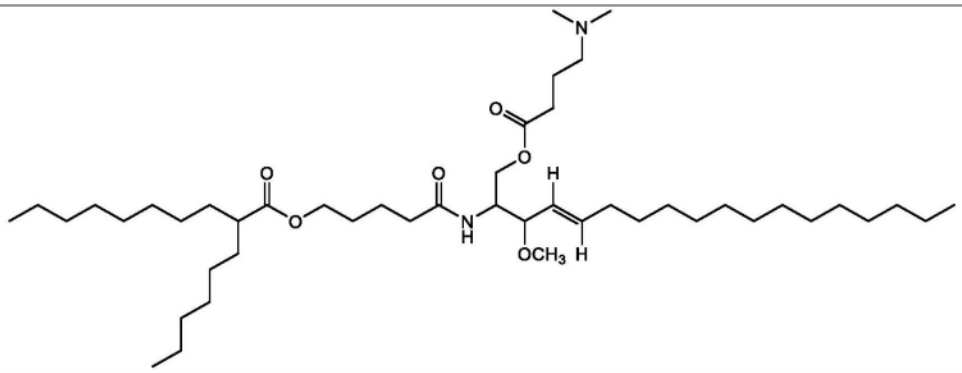
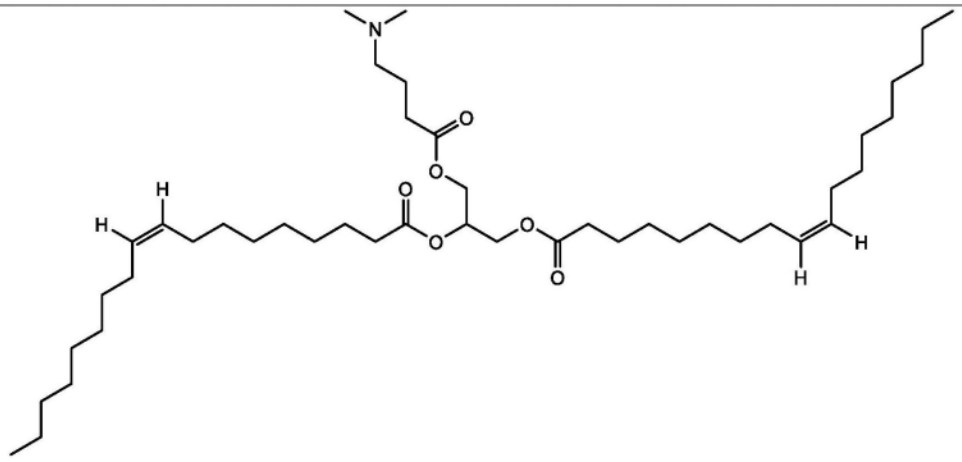
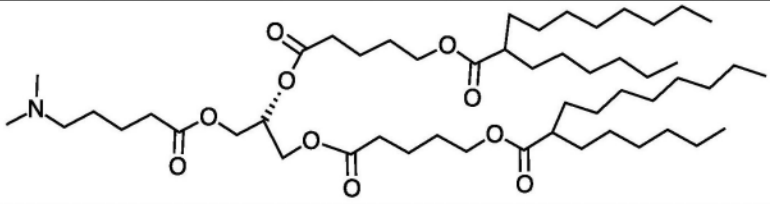
[0477]

化合物 ID	结构
2	
3	

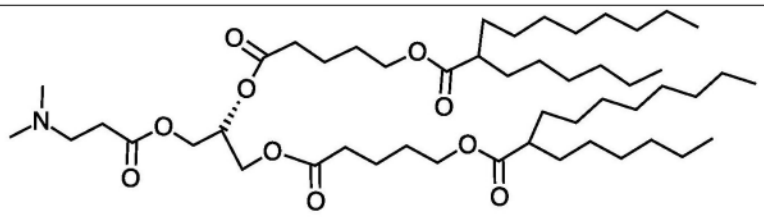
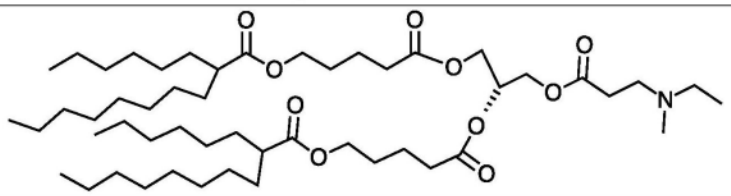
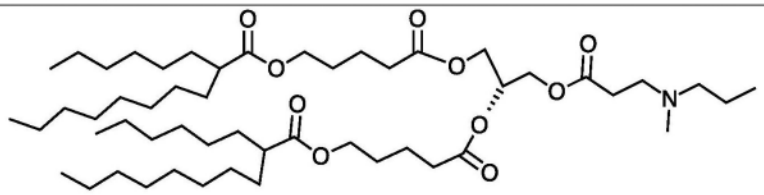
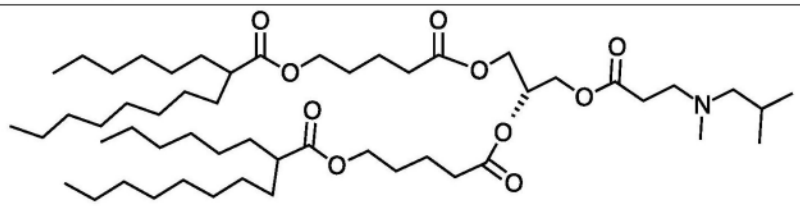
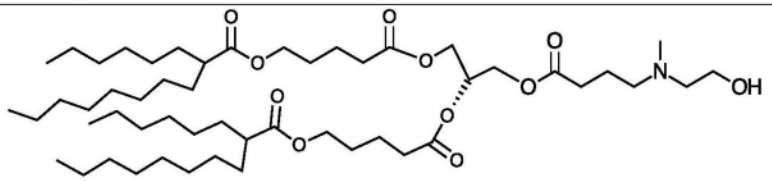
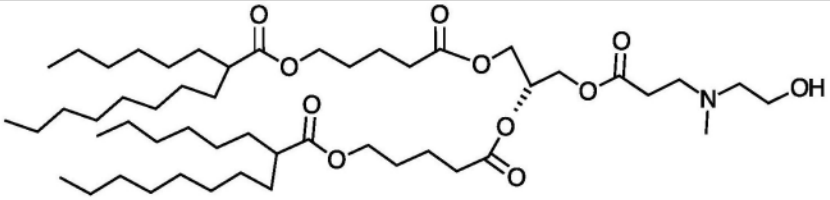
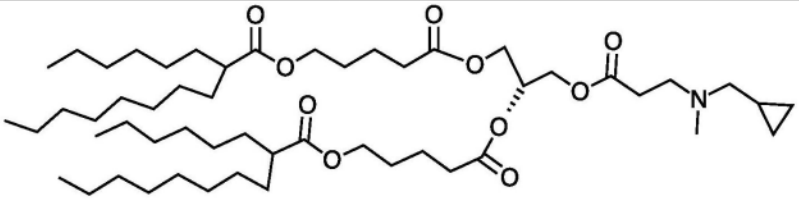
[0478]

化合物 ID	结构
4OH	
4OMe	

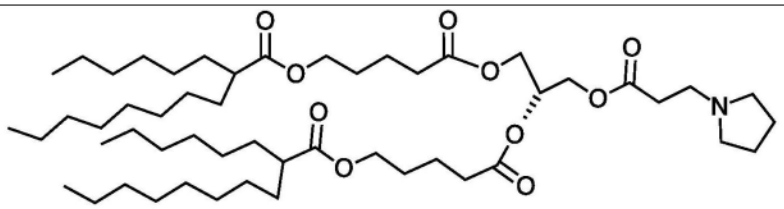
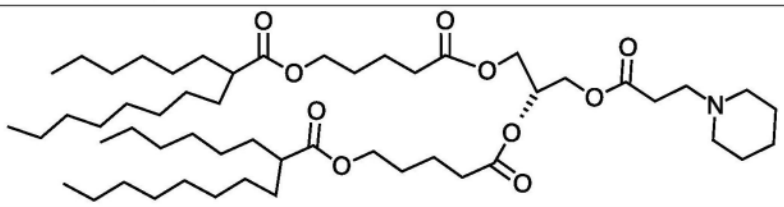
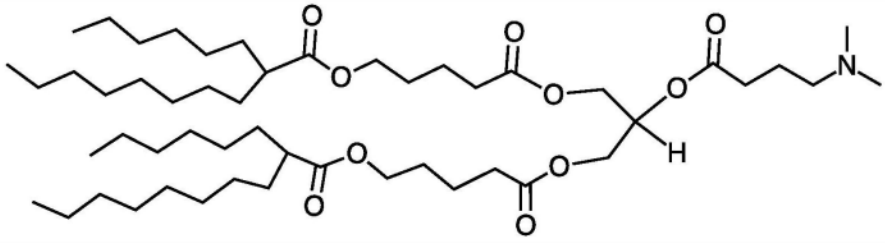
[0479]

化合物 ID	结构
5OH	
5OMe	
6	
45	

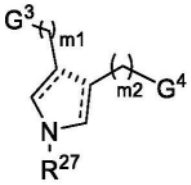
[0480]

化合物 ID	结构
46	
47	
48	
49	
50	
51	
52	

[0481]

化合物ID	结构
53	
54	
55	

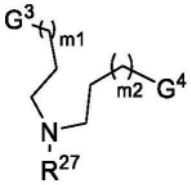
[0482] 在一个实施例中,化合物具有以下式(XVIII)结构:

[0483] 

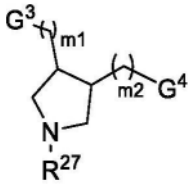
(XVIII)

[0484] 或其立体异构体、盐或互变异构体,其中:G^3和G^4各自独立地为-OC(=O)R^{28}、-C(=O)OR^{28}、-CH(CH_2OC(=O)R^{28})$_2$、-C(CH_2OC(=O)R^{28})$_3$、-PhOC(=O)R^{28}、-Ph(OC(=O)R^{28})$_2$、-OC(=O)Ph(OC(=O)R^{28})$_2$或-C(=O)OCH_2C(OC(=O)R^{28})(CH_2OC(=O)R^{28});R^{27}为H、C_1-C_6烷基或C_1-C_6杂烷基;R^{28}各自独立地为直链C_6-C_{12}烷基、支链C_{10}-C_{40}烷基、直链C_{15}-C_{20}烯基或支链C_{20}-C_{40}烯基;m^1和m^2各自独立地为1至6的整数;"""为直接键或不存在;和═为单键或双键。

[0485] 在一个实施例中,化合物具有以下式(XVIIIA)至(XVIIIC)结构中的一种结构:

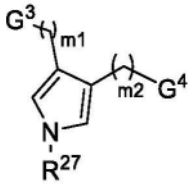
[0486] 

(XVIIIA)

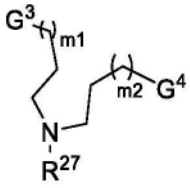
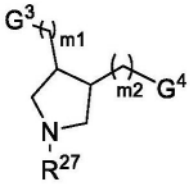
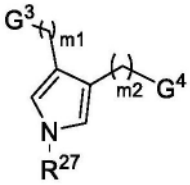


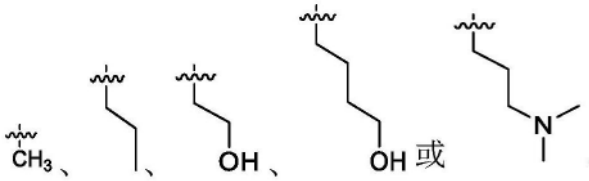
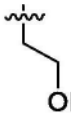
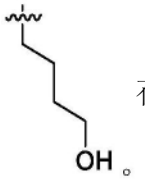
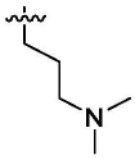
(XVIIIB)

[0487]

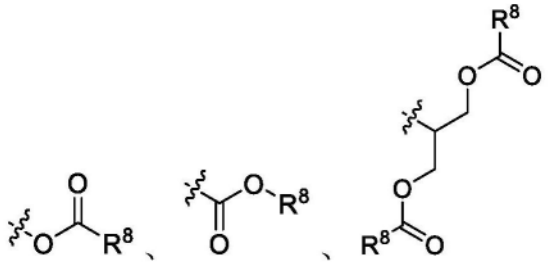
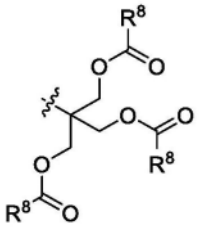
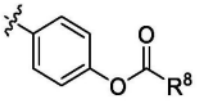
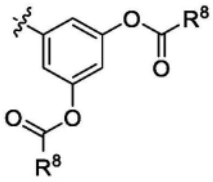
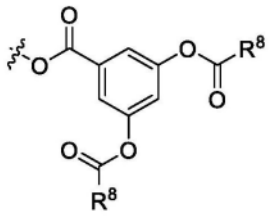
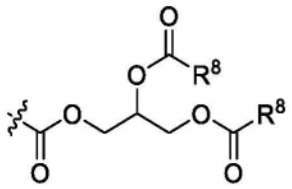
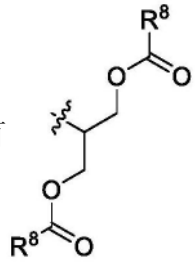
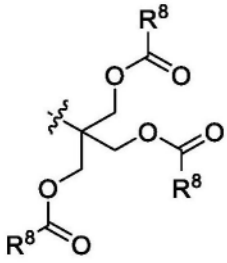
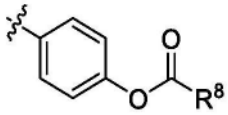
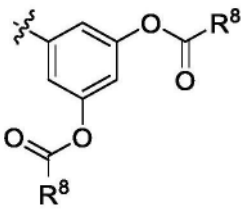
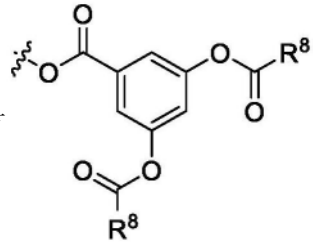
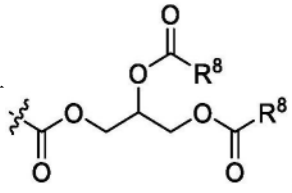


(XVIIIC)

[0488] 或其立体异构体、盐或互变异构体。在一些实施例中,化合物为  在一些实施例中,化合物为  。在一些实施例中,化合物为  。

[0489] 在一个实施例中,R^{27}为H、C_1-C_6烷基或C_1-C_6杂烷基。在一些实施例中,R^{27}为H、C_1-C_3烷基或C_1-C_5杂烷基。在一些实施例中,R^{27}为C_1-C_3烷基、C_2-C_4烷基醇或C_5烷基胺。在一些某些实施例中,R^{27}具有以下结构中的一种结构:  在一些实施例中,R^{27}为  。在一些实施例中,R^{27}为  在一些实施例中,R^{27}为  在一些实施例中,R^{27}为  在一些实施例中,R^{27}为  。

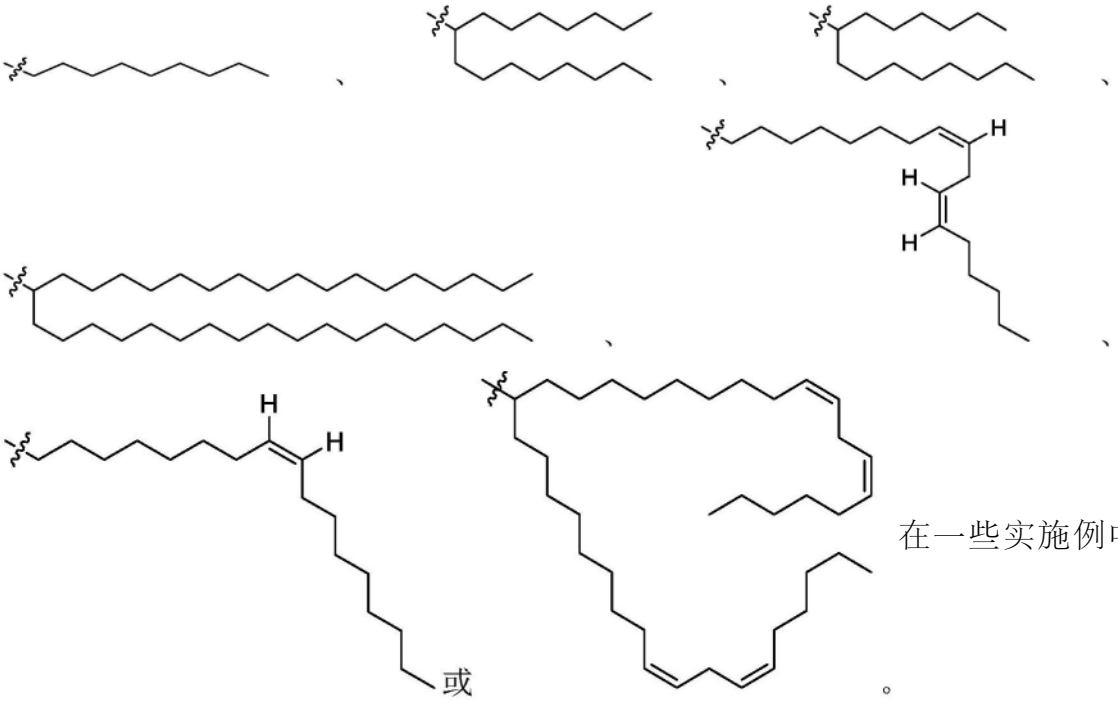
[0490] 在一个实施例中,G^3和G^4各自独立地为-OC(=O)R^{28}、-C(=O)OR^{28}、-CH(CH_2OC(=O)R^{28})$_2$、-C(CH_2OC(=O)R^{28})$_3$、-PhOC(=O)R^{28}、-Ph(OC(=O)R^{28})$_2$、-OC(=O)Ph(OC(=O)R^{28})$_2$或-C(=O)OCH_2C(OC(=O)R^{28})(CH_2OC(=O)R^{28})。在一些实施例中,G^3和G^4各自具有以下结构中的

一种结构：  、  、  、  、  或  。在一些实施例中，G^3或G^4具有  。在一些实施例中，G^3或G^4具有  。在一些实施例中，G^3或G^4具有  。在一些实施例中，G^3或G^4具有  。在一些实施例中，G^3或G^4具有  。在一些实施例中，G^3或G^4具有  。

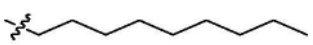
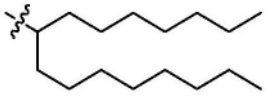
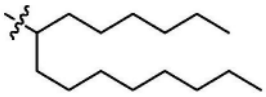
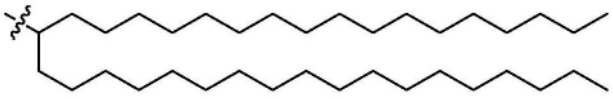
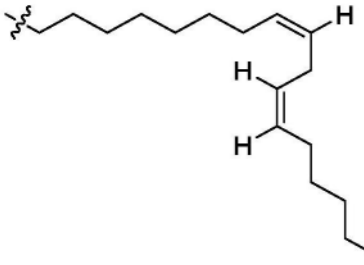
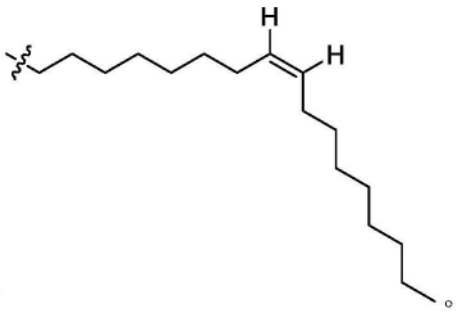
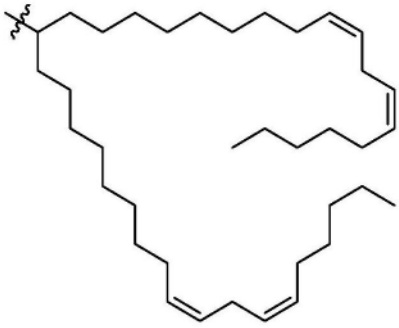
[0491] 在一个实施例中，R^{28}各自独立地为直链C_6-C_{12}烷基、支链C_{10}-C_{40}烷基、直链C_{15}-C_{20}烯基或支链C_{20}-C_{40}烯基。在一些实施例中，R^{28}各自独立地为直链C_7-C_{10}烷基、支链C_{14}-C_{40}烷基、直链C_{15}-C_{20}烯基或支链C_{30}-C_{40}烯基。在一些实施例中，R^{28}各自独立地为直链C_7烷基。在一些实施例中，R^{28}各自独立地为直链C_8烷基。在一些实施例中，R^{28}各自独立地为直链C_9烷基。在一些实施例中，R^{28}各自独立地为直链C_{10}烷基。在一些实施例中，R^{28}各自独立地为支链C_{14}烷基。在一些实施例中，R^{28}各自独立地为支链C_{15}烷基。在一些实施例中，R^{28}各自独立地为支

链C_{16}烷基。在一些实施例中,R^{28}各自独立地为支链C_{17}烷基。在一些实施例中,R^{28}各自独立地为支链C_{18}烷基。在一些实施例中,R^{28}各自独立地为支链C_{19}烷基。在一些实施例中,R^{28}各自独立地为支链C_{20}烷基。在一些实施例中,R^{28}各自独立地为支链C_{21}烷基。在一些实施例中,R^{28}各自独立地为支链C_{22}烷基。在一些实施例中,R^{28}各自独立地为支链C_{23}烷基。在一些实施例中,R^{28}各自独立地为支链C_{24}烷基。在一些实施例中,R^{28}各自独立地为支链C_{25}烷基。在一些实施例中,R^{28}各自独立地为支链C_{26}烷基。在一些实施例中,R^{28}各自独立地为支链C_{27}烷基。在一些实施例中,R^{28}各自独立地为支链C_{28}烷基。在一些实施例中,R^{28}各自独立地为支链C_{29}烷基。在一些实施例中,R^{28}各自独立地为支链C_{30}烷基。在一些实施例中,R^{28}各自独立地为支链C_{31}烷基。在一些实施例中,R^{28}各自独立地为支链C_{32}烷基。在一些实施例中,R^{28}各自独立地为支链C_{33}烷基。在一些实施例中,R^{28}各自独立地为支链C_{34}烷基。在一些实施例中,R^{28}各自独立地为支链C_{35}烷基。在一些实施例中,R^{28}各自独立地为支链C_{36}烷基。在一些实施例中,R^{28}各自独立地为支链C_{37}烷基。在一些实施例中,R^{28}各自独立地为支链C_{38}烷基。在一些实施例中,R^{28}各自独立地为支链C_{39}烷基。在一些实施例中,R^{28}各自独立地为支链C_{40}烷基。在一些实施例中,R^{28}各自独立地为直链C_{15}烯基。在一些实施例中,R^{28}各自独立地为直链C_{16}烯基。在一些实施例中,R^{28}各自独立地为直链C_{17}烯基。在一些实施例中,R^{28}各自独立地为直链C_{18}烯基。在一些实施例中,R^{28}各自独立地为直链C_{19}烯基。在一些实施例中,R^{28}各自独立地为直链C_{20}烯基。在一些实施例中,R^{28}各自独立地为支链C_{30}烯基。在一些实施例中,R^{28}各自独立地为支链C_{31}烯基。在一些实施例中,R^{28}各自独立地为支链C_{32}烯基。在一些实施例中,R^{28}各自独立地为支链C_{33}烯基。在一些实施例中,R^{28}各自独立地为支链C_{34}烯基。在一些实施例中,R^{28}各自独立地为支链C_{35}烯基。在一些实施例中,R^{28}各自独立地为支链C_{36}烯基。在一些实施例中,R^{28}各自独立地为支链C_{37}烯基。在一些实施例中,R^{28}各自独立地为支链C_{38}烯基。在一些实施例中,R^{28}各自独立地为支链C_{39}烯基。在一些实施例中,R^{28}各自独立地为支链C_{40}烯基。

[0492] 在一些某些实施例中,R^{28}各自独立地具有以下结构中的一种结构:



在一些实施例中,R^{28}为

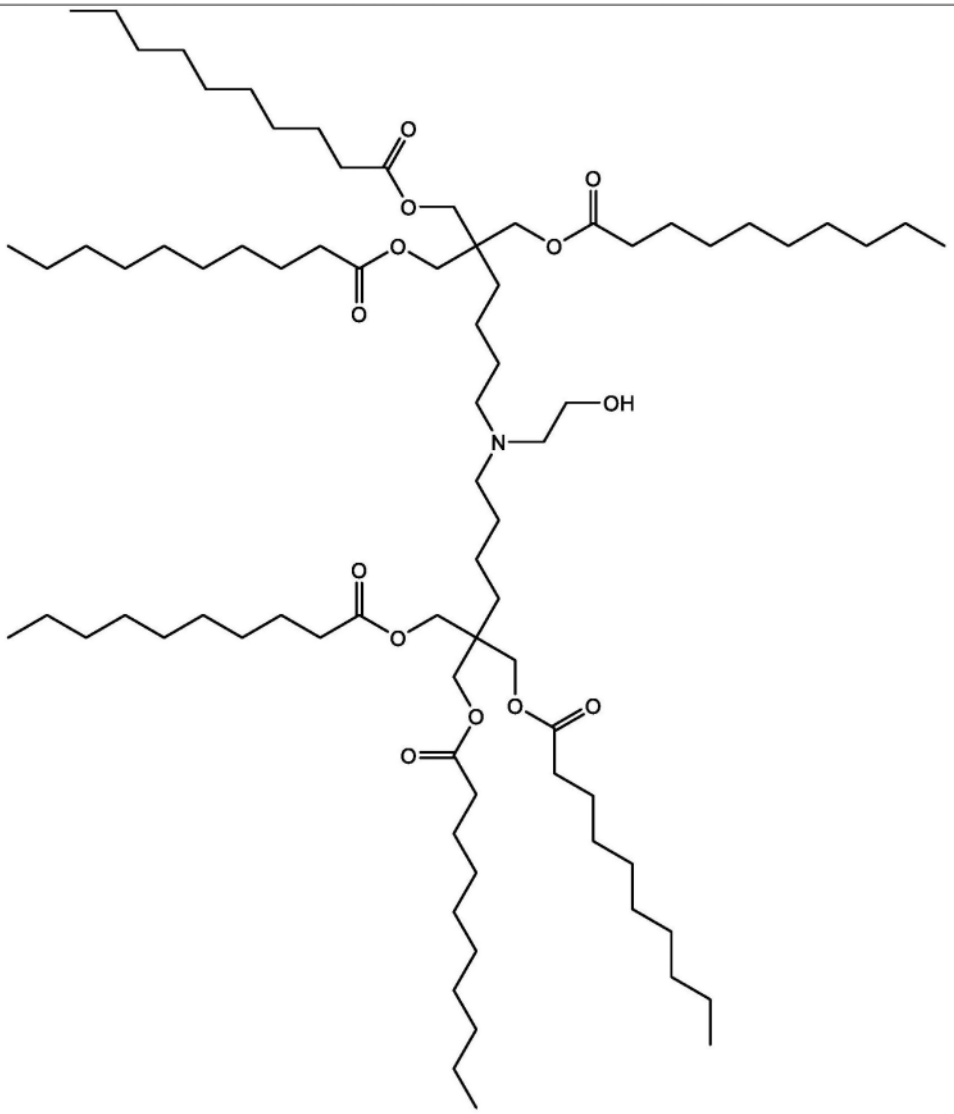
 。在一些实施例中,R^{28}为  。在一些实施例中,R^{28}为  。在一些实施例中,R^{28}为  。在一些实施例中,R^{28}为  。在一些实施例中,R^{28}为  。在一些实施例中,R^{28}为  。

[0493] 在一个实施例中,m^1和m^2各自独立地为1至6的整数。在一些实施例中,m^1和m^2各自独立地为1至4的整数。在一些某些实施例中,m^1或m^2为1。在一些某些实施例中,m^1或m^2为2。在一些某些实施例中,m^1或m^2为3。在一些某些实施例中,m^1或m^2为4。在一些某些实施例中,m^1或m^2为5。在一些某些实施例中,m^1或m^2为6。

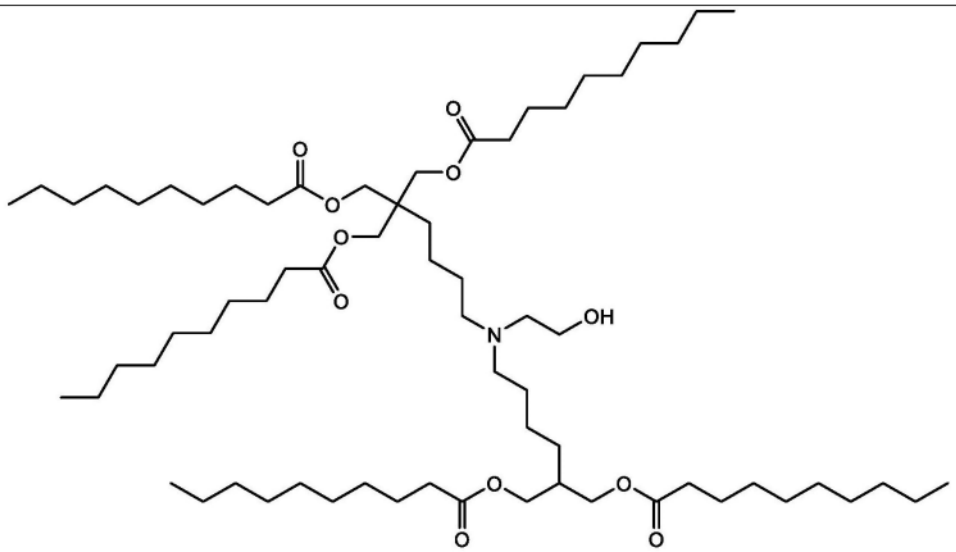
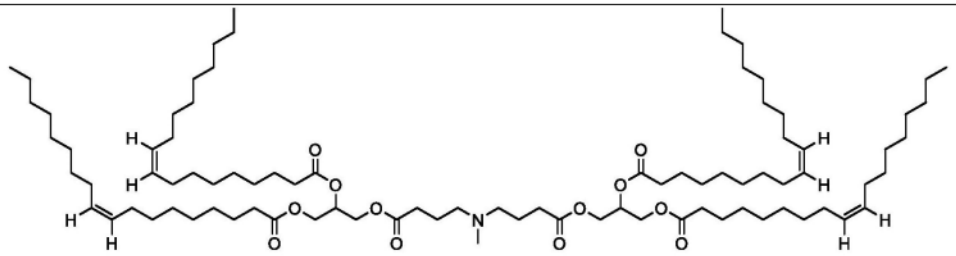
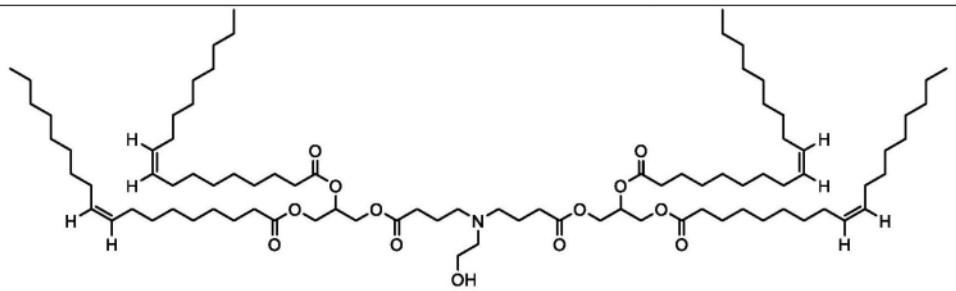
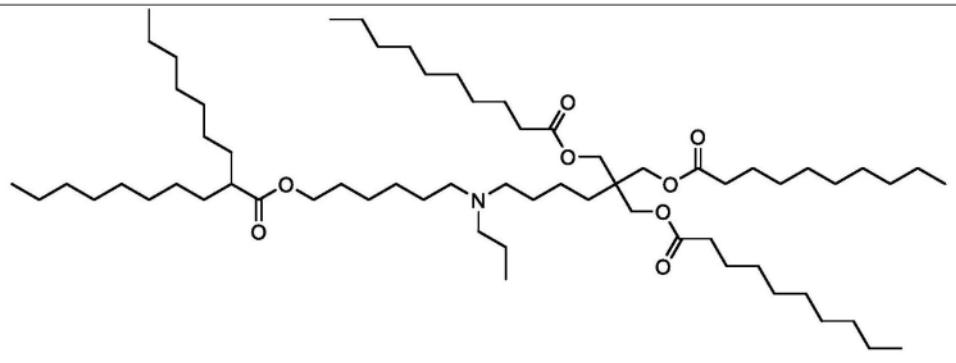
[0494] 在一个实施例中,化合物具有下表B中所示的以下结构中的一种结构。

[0495] 表B:(XVIII)至(XVIIIC)化合物的列表

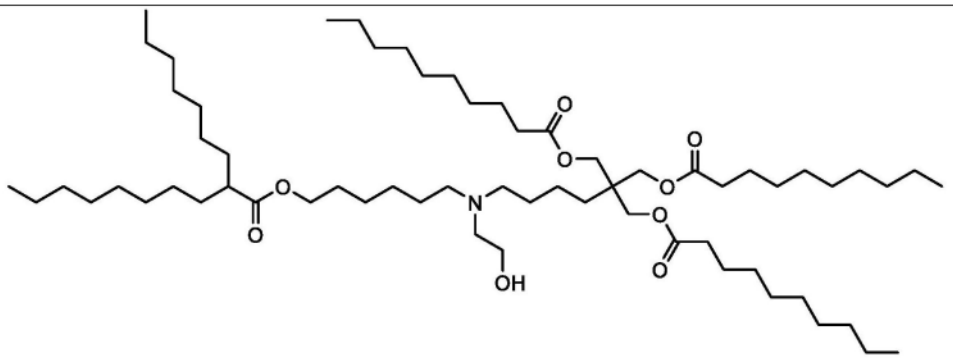
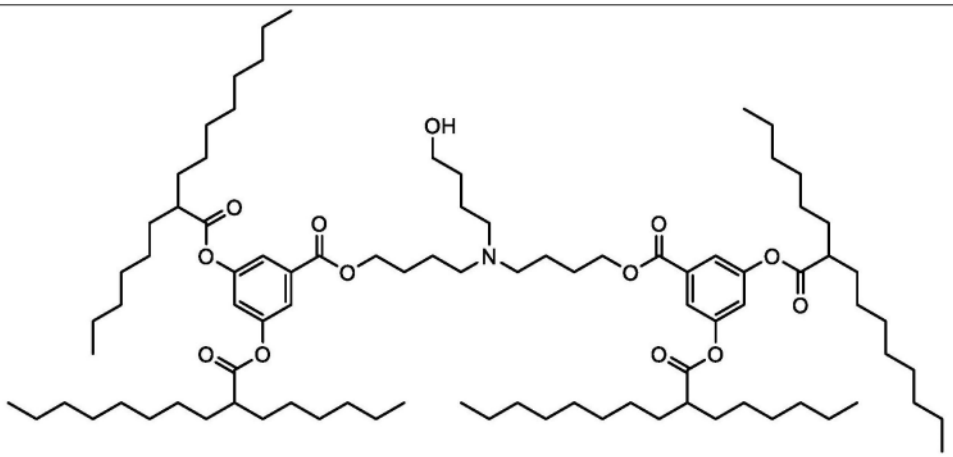
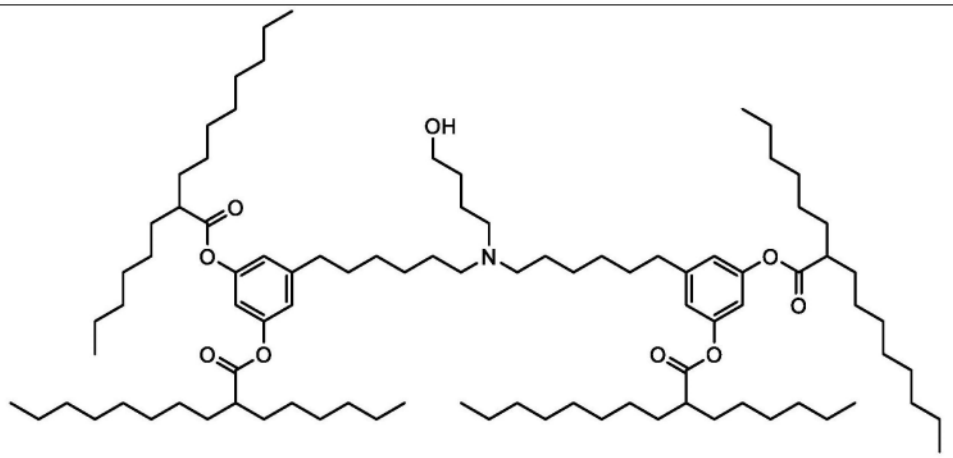
[0496]

化合物 ID	结构
9	

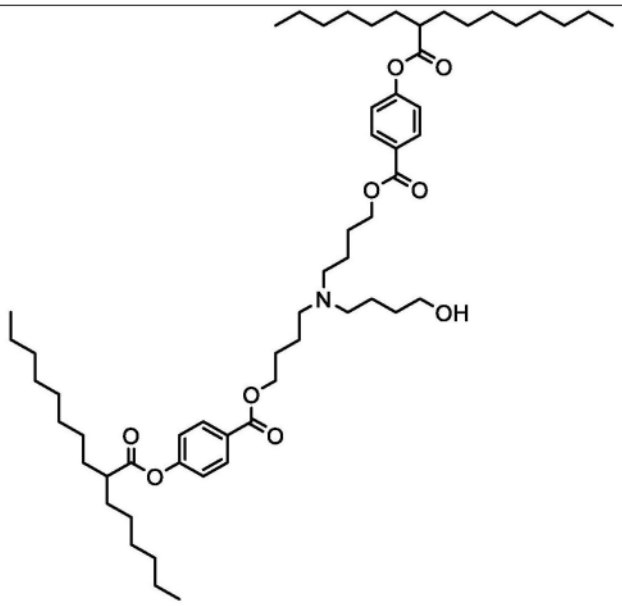
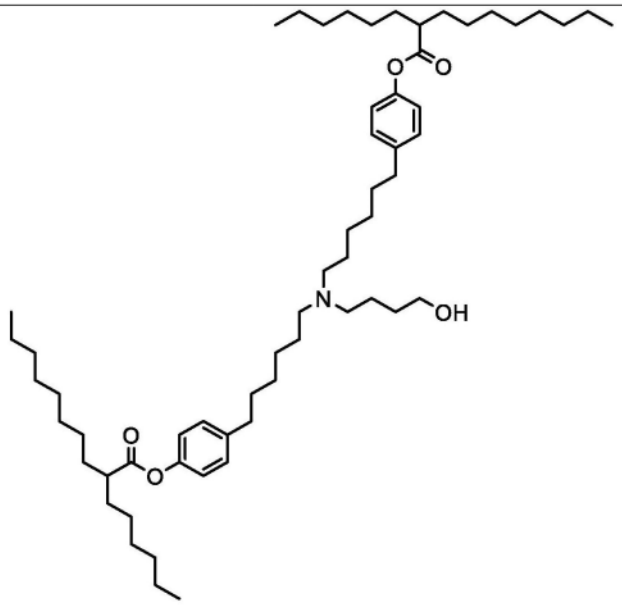
[0497]

化合物 ID	结构
10	
7	
8	
28	

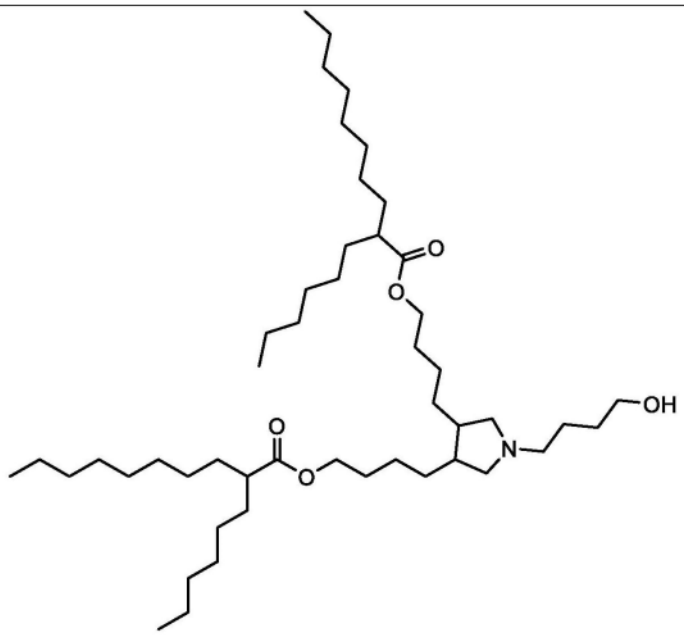
[0498]

化合物 ID	结构
11	
20	
29	

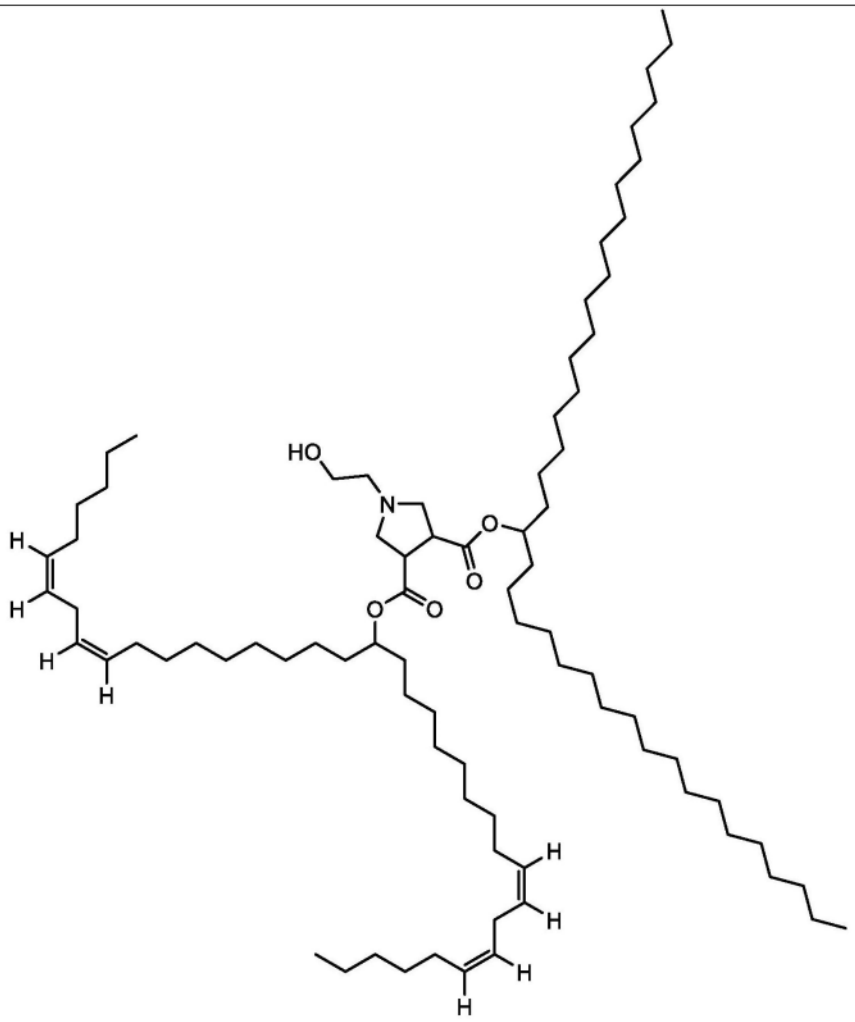
[0499]

化合物 ID	结构
21	
23	

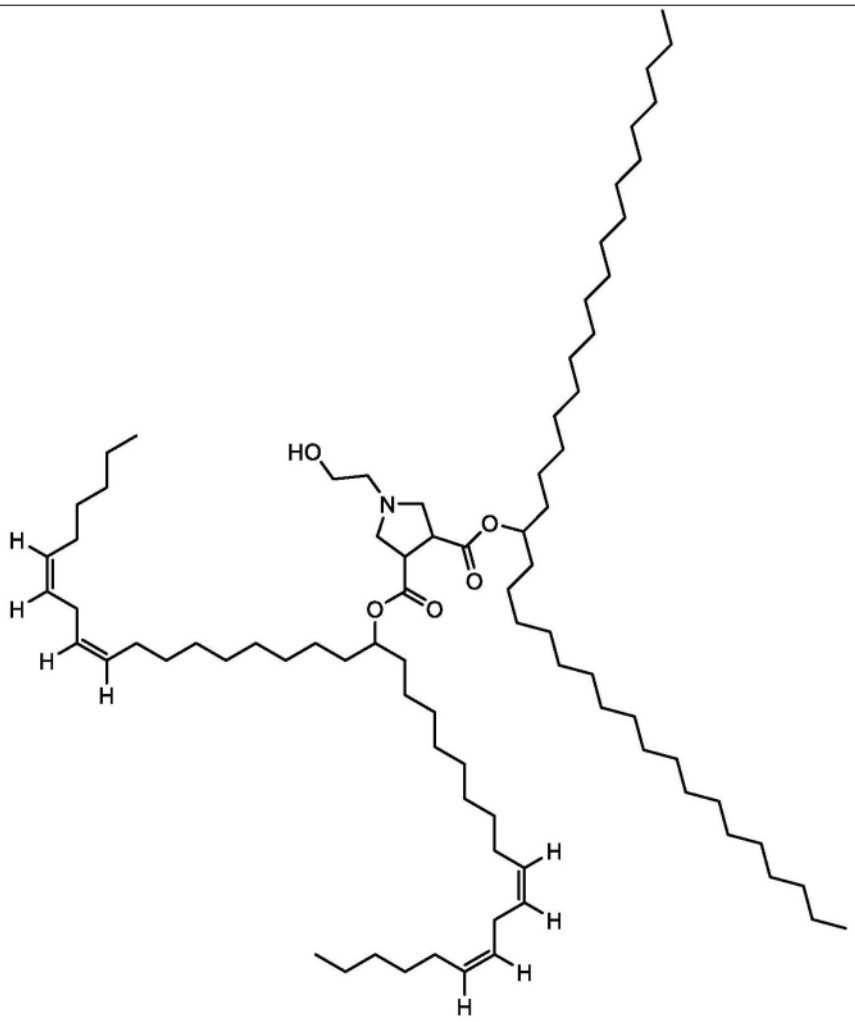
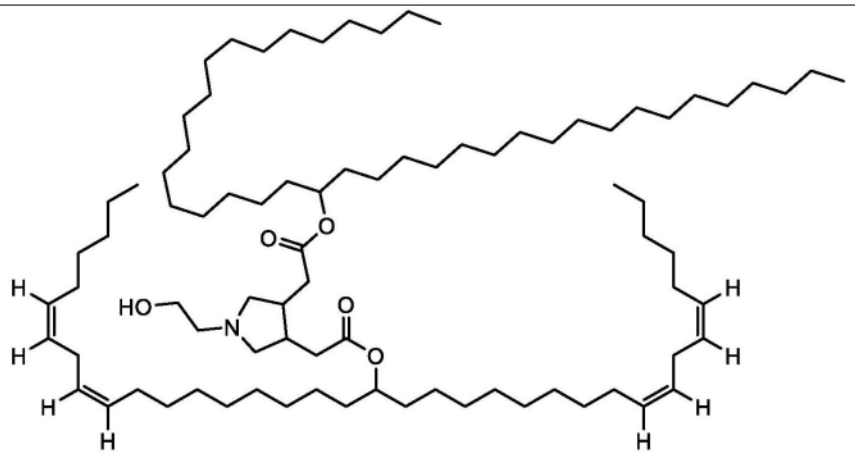
[0500]

化合物 ID	结构
17	

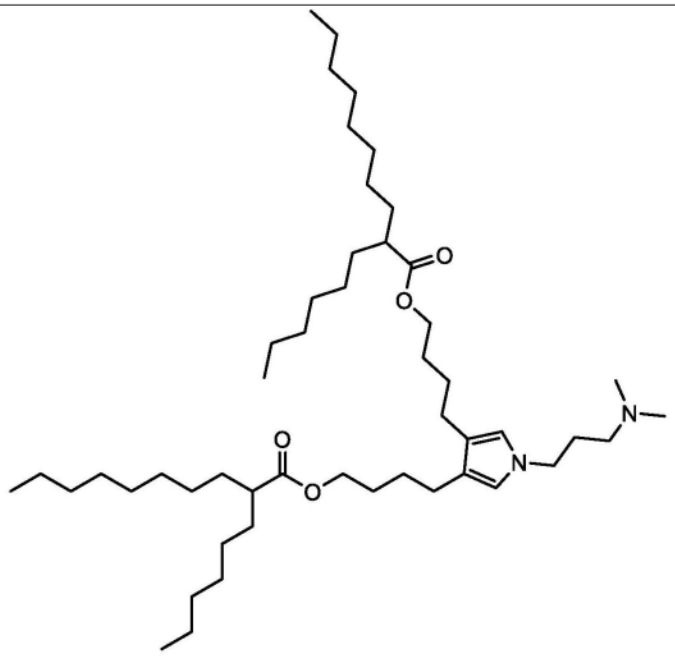
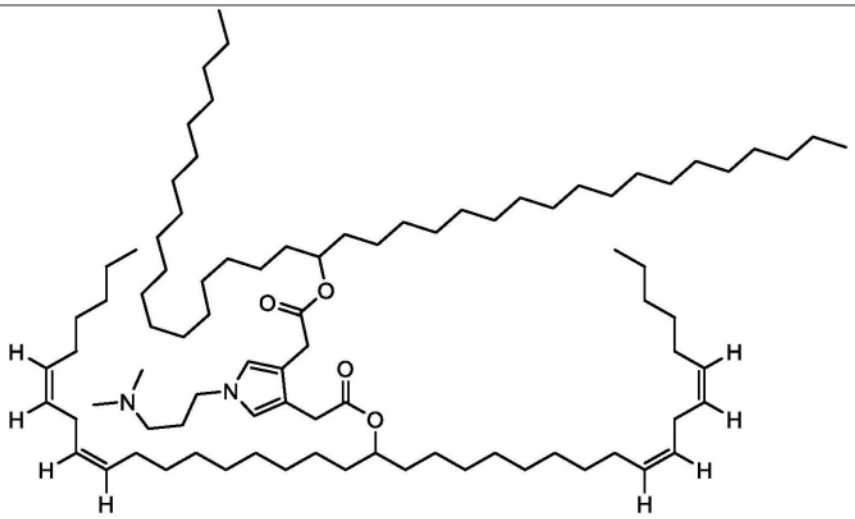
[0501]

化合物 ID	结构
15	

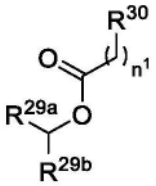
[0502]

化合物 ID	结构
30	
14	

[0503]

化合物 ID	结构
18	
16	

[0504] 在一个实施例中,化合物具有以下式(XIX)结构:

[0505] 

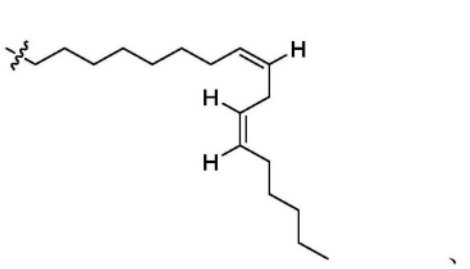
(XIX)

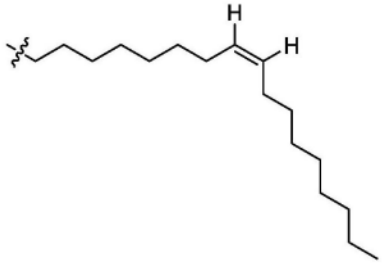
[0506] 或其立体异构体、盐或互变异构体,其中:R^{29a}和R^{29b}各自独立地为直链C_6-C_{10}烷基或直链C_{12}-C_{20}亚烷基;R^{30}为芳基或C_3-C_6杂环,其中所述芳基或C_3-C_6杂环被-OC(=O)R^{31}、C_1-C_4烷基或C_1-C_4杂烷基取代;R^{31}为C_1-C_6杂烷基;并且n^1为1至6的整数。

[0507] 在一个实施例中,R^{29a}和R^{29b}各自独立地为直链C_6-C_{10}烷基或直链C_{12}-C_{20}亚烷基。在一些实施例中,R^{29a}和R^{29b}各自为直链C_6-C_{10}烷基。在一些实施例中,R^{29a}和R^{29b}各自为直链C_{12}-

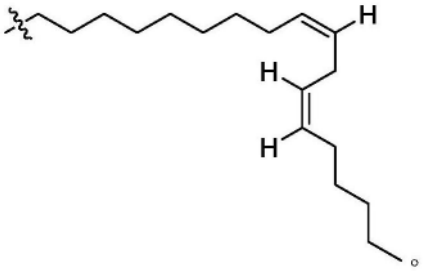
C_{20}亚烷基。在一些某些实施例中,R^{29a}和R^{29b}各自独立地具有以下结构中的一种结构:



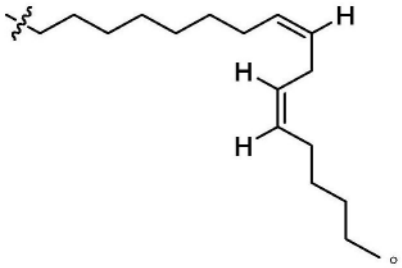




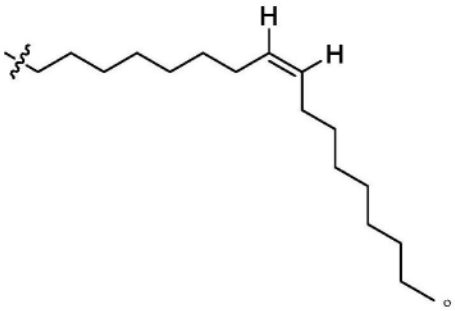
或



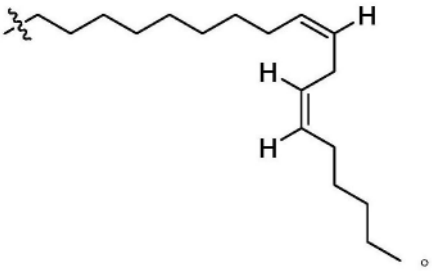
在一些实施例中,R^{29a}或R^{29b}为  。在一些实施例中,R^{29a}或R^{29b}为  。在一些实施例中,R^{29a}或R^{29b}为  。在一些实施例中,R^{29a}或R^{29b}为



在一些实施例中,R^{29a}或R^{29b}为

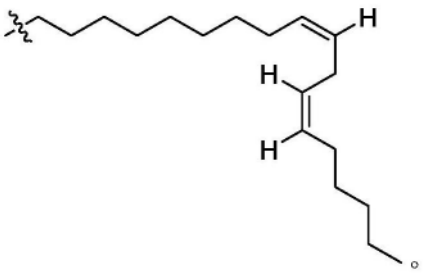


在一些实施例中,R^{29a}或R^{29b}为

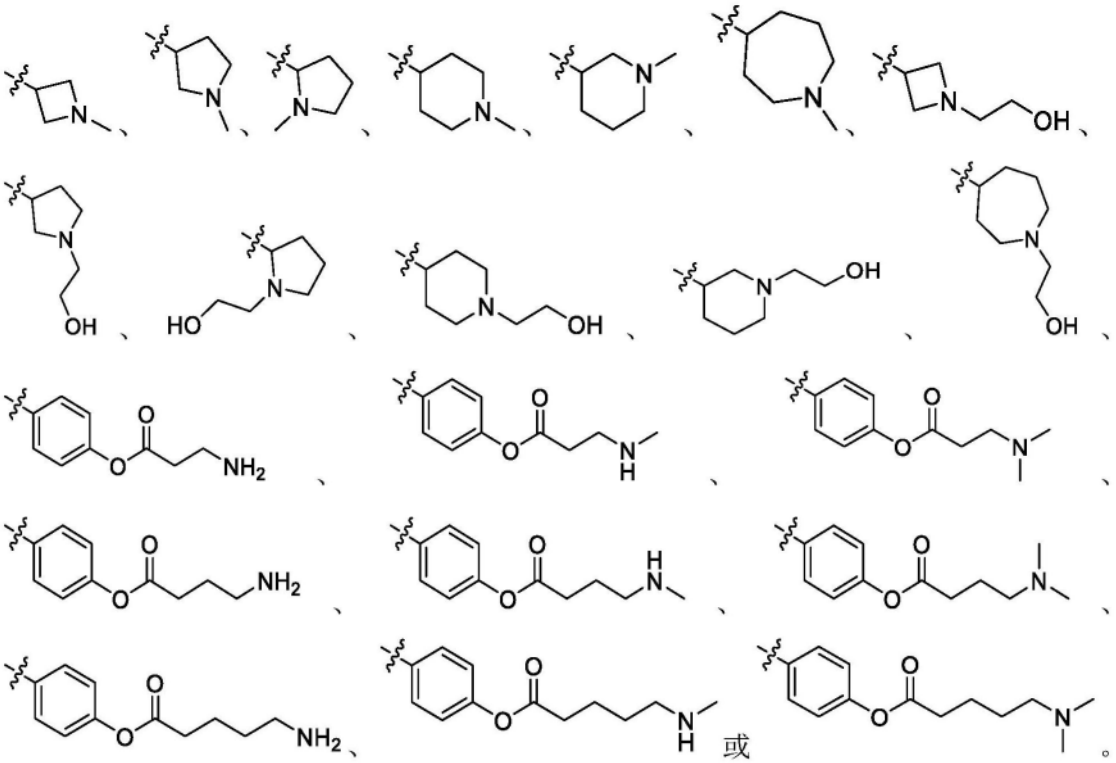


在一些某些实施例中,R^{29a}和R^{29b}各自为

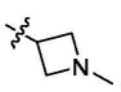
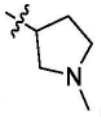
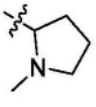
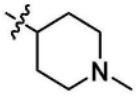
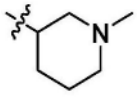
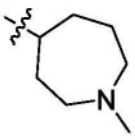
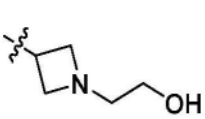
 。在一些其他某些实施例中,R^{29a}和R^{29b}各自为

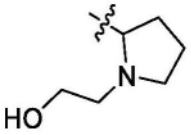
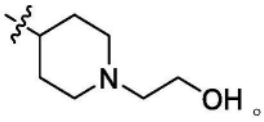
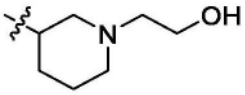
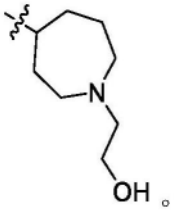
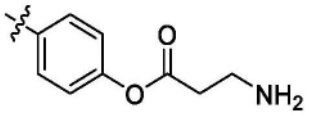
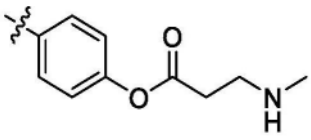
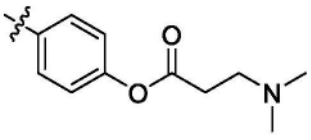
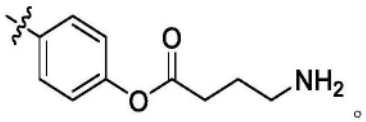
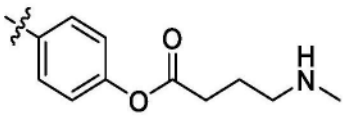
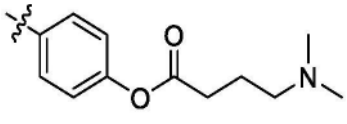


[0508] 在一个实施例中，R^{30}为芳基或C_3-C_6杂环，其中所述芳基或C_3-C_6杂环被-OC(=O)R^{31}、C_1-C_4烷基或C_1-C_4杂烷基取代。在一些实施例中，R^{30}的芳基为苯基或萘。在一些实施例中，R^{30}的C_3-C_6杂环为氮杂环丁烷、吡咯烷、咪唑烷、吡唑烷、哌啶、二噁烷、三噁烷或氮杂环庚烷。在一些实施例中，R^{30}为被-OC(=O)R^{31}取代的芳基、或被C_1-C_4烷基取代的C_3-C_6杂环、或C_1-C_4杂烷基。在一些实施例中，被-OC(=O)R^{31}取代的苯基、或被C_1-C_4烷基取代的C_3-C_6 N杂环、或C_1-C_4杂烷基。在一些实施例中，R^{30}具有以下结构中的一种结构：

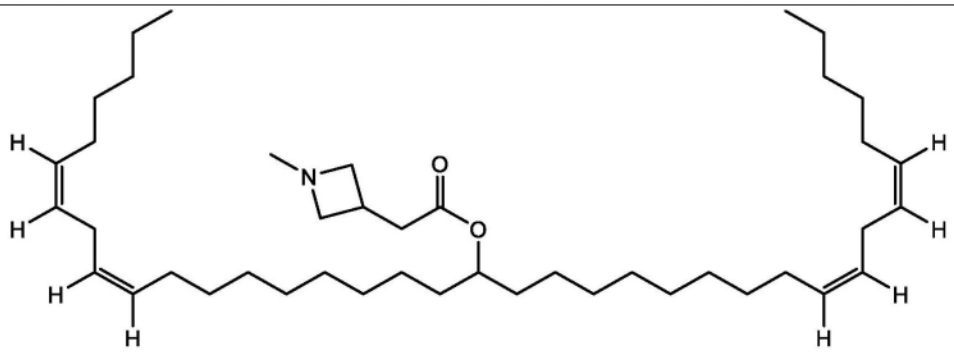
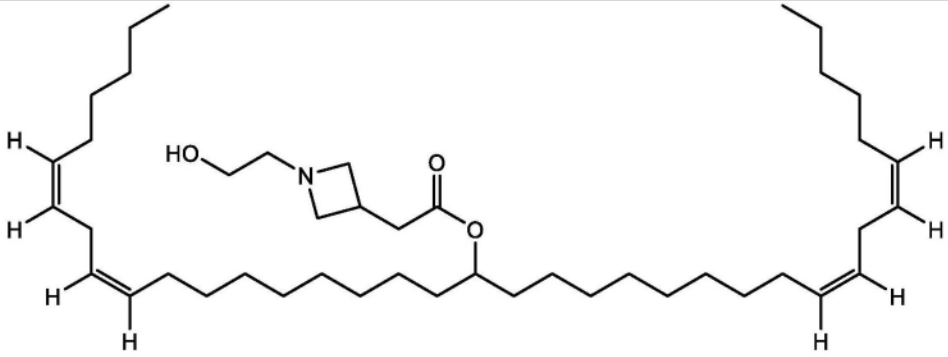
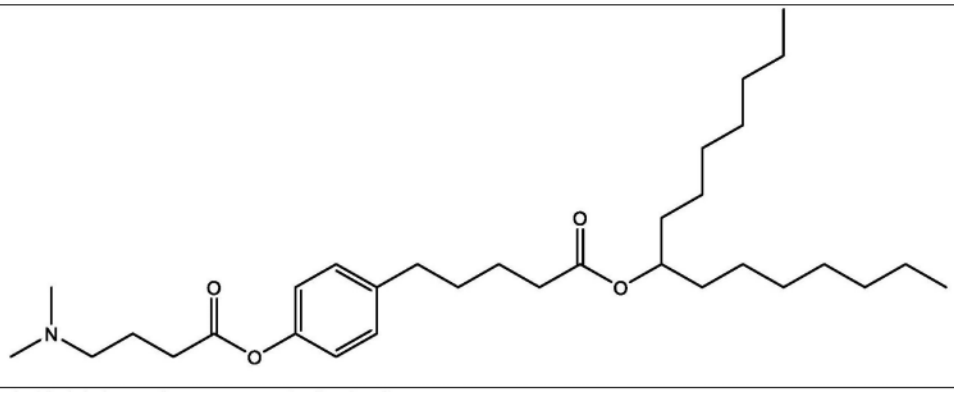


或

在一些实施例中，R^{30}为  。在一些实施例中，R^{30}为  。在一些实施例中，R^{30}为  。在一些实施例中，R^{30}为  。在一些实施例中，R^{30}为  。在一些实施例中，R^{30}为  。在一些实施例中，R^{30}为  。在一些实施例中，R^{30}为  。在一些

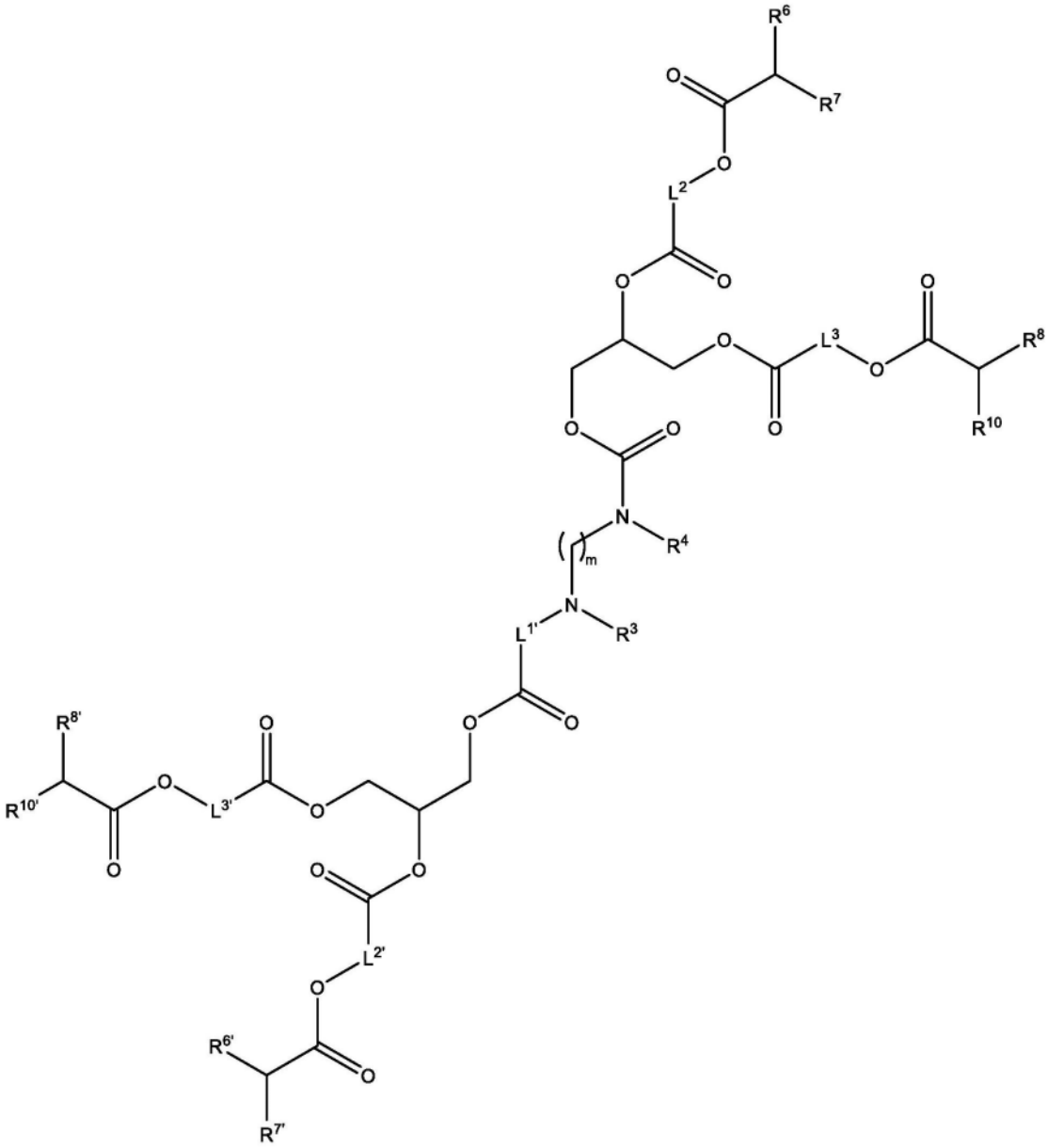
实施例中,R^{30}为  。在一些实施例中,R^{30}为  。在一些实施例中,R^{30}为  。在一些实施例中,R^{30}为  。在一些实施例中,R^{30}为  。在一些实施例中,R^{30}为  。在一些实施例中,R^{30}为  。在一些实施例中,R^{30}为  。在一些实施例中,R^{30}为  。在一些实施例中,R^{30}为在一些实施例中,R^{30}为  。

[0512]

化合物 ID	结构
12	
13	
19	

[0513] 在一个实施例中,式(XXI)可电离脂质:

[0514]



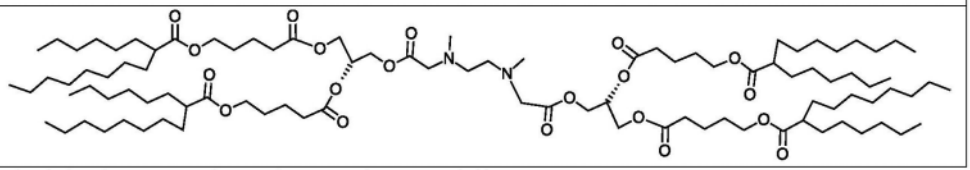
(XXI)

[0515] 或其药学上可接受的盐或立体异构体,其中:

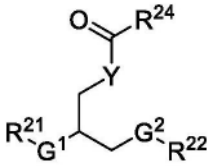
[0516] L^1为C_1-C_6亚烷基;$L^{1'}$为C_1-C_6亚烷基;L^2为C_1-C_8亚烷基;$L^{2'}$为C_1-C_8亚烷基;L^3为C_1-C_8亚烷基;$L^{3'}$为C_1-C_8亚烷基;R^3和R^4各自独立地为H、C_1-C_4烷基、-CH_2-环丙基或-$(CH_2)_n$OH;R^6为C_4-C_{20}烷基;$R^{6'}$为C_4-C_{20}烷基;R^7为C_4-C_{20}烷基;$R^{7'}$为C_4-C_{20}烷基;R^8为C_4-C_{20}烷基;$R^{8'}$为C_4-C_{20}烷基;R^{10}为C_4-C_{20}烷基;$R^{10'}$为C_4-C_{20}烷基;n为2、3或4;并且m为1、2、3、4或5。

[0517] 在一个实施例中,化合物具有下表D中所示的以下结构中的一种结构。

[0518] 表D:(XXI)化合物的列表

化合物ID	结构
56	

在一个实施例中,化合物具有以下式(XX)结构:

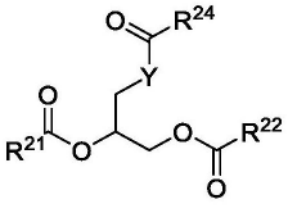
[0519] 

(XX)

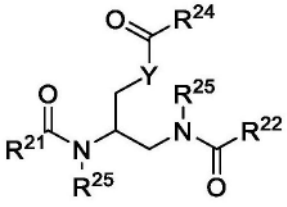
[0520] 或其立体异构体、盐或互变异构体,其中:G^1和G^2各自独立地为-OC(=O)-或-NR^{25}C(=O)-;R^{21}和R^{22}各自独立地为C_1-C_6烷基、直链C_{10}-C_{20}烷基、直链C_{10}-C_{20}烯基或支链C_{10}-C_{35}烯基,其中所述C_1-C_6烷基被-OC(=O)R^{26}取代;R^{24}为C_1-C_6杂烷基、芳基或被4至8元杂环烷基取代的C_1-C_4烷基;R^{25}为H或C_1-C_4烷基;R^{26}为支链C_{10}-C_{30}烷基;并且Y为O或NR^{32},其中R^{32}为H或C_1-C_4烷基。

[0521] 在一个实施例中,G^1和G^2各自独立地为-OC(=O)-或-NR^{25}C(=O)-。在一些实施例中,G^1和G^2各自为-OC(=O)-。在一些实施例中,G^1和G^2各自为-NR^{25}C(=O)-。在一些实施例中,G^1或G^2中的一者为-NR^{25}C(=O)-并且G^1或G^2中的另一者为-OC(=O)-。

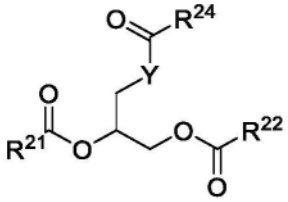
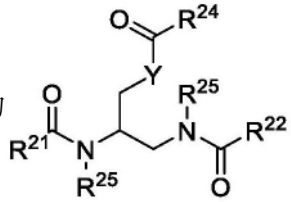
[0522] 在一个实施例中,化合物具有以下式(XXA)至(XXB)结构中的一种结构:



(XXA)

[0523] 

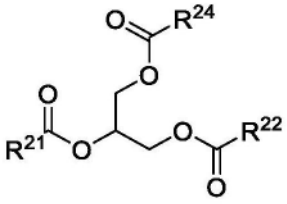
(XXB)

[0524] 或其立体异构体、盐或互变异构体。在一些实施例中,化合物为  。在一些实施例中,化合物为  。

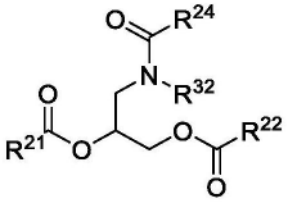
[0525] 在一个实施例中,Y为O。在其他实施例中,Y为NR^{32},其中R^{32}为H或C_1-C_4烷基。在一些

某些实施例中,Y为NR^{32}并且R^{32}为H。在一些实施例中,Y为NR^{32}并且R^{32}为C_1-C_4烷基。在一些实施例中,R^{32}的C_1-C_4烷基为甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、仲丁基或叔丁基。

[0526] 在一个实施例中,化合物具有以下式(XXA-1)至(XXB-2)结构中的一种结构:

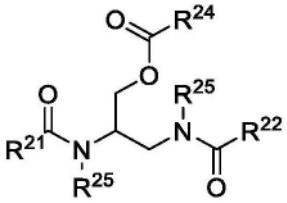


(XXA-1)

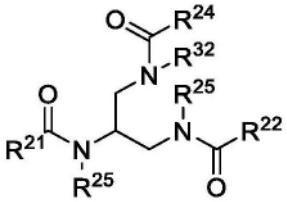


(XXA-2)

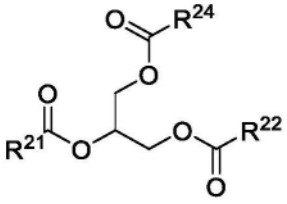
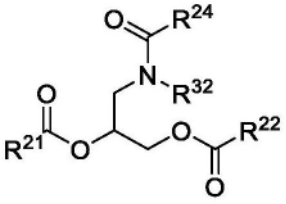
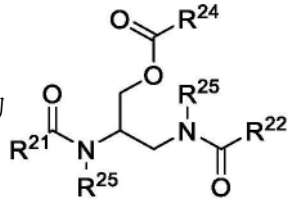
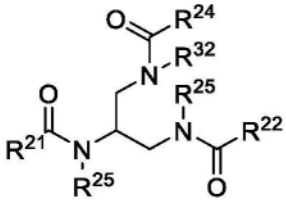
[0527]



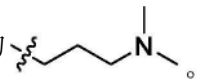
(XXB-1)

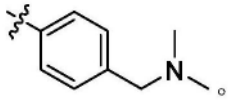


(XXB-2)

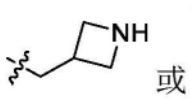
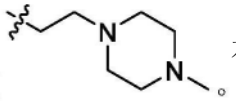
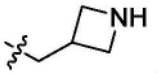
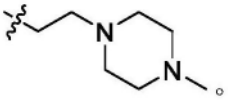
[0528] 或其立体异构体、盐或互变异构体。在一个实施例中,化合物为  。在一些实施例中,化合物为  。在一些实施例中,化合物为  。在一些实施例中,化合物为  。

[0529] 在一个实施例中,R^{24}为C_1-C_6杂烷基。在一些实施例中,R^{24}为C_3-C_6杂烷基。在一些实施例中,R^{24}为C_3杂烷基。在一些实施例中,R^{24}为C_4杂烷基。在一些实施例中,R^{24}为C_5杂烷基。

在一些实施例中，R^{24}为C_6杂烷基。在一些实施例中，R^{24}为C_5烷基胺。在一些某些实施例中，R^{24}为  。

[0530] 在一个实施例中，R^{24}为芳基。在一些实施例中，R^{24}的芳基被C_1-C_6杂烷基取代。在一些实施例中，R^{24}的芳基为苯基或萘。在一些某些实施例中，R^{24}的芳基为苯基。在一些其他实施例中，R^{24}的芳基被C_2-C_4杂烷基取代。在一些实施例中，例如，C_2-C_4杂烷基为取代的胺。在一些实施例中，R^{24}为被C_2-C_4杂烷基取代的苯基。在一些实施例中，R^{24}为被C_3杂烷基取代的苯基。在一些某些实施例中，R^{24}的取代的芳基为  。

[0531] 在一个实施例中，R^{24}为被4至8元杂环烷基取代的C_1-C_4烷基。在一些实施例中，R^{24}为被4至6元杂环烷基取代的C_1-C_3烷基。在一些实施例中，例如，R^{24}的C_1-C_3烷基为甲基、乙基或正丙基。在一些实施例中，例如，R^{24}的4至6元杂环烷基为氮杂环丁烷、氧杂环丁烷、磷杂环丁烷、硫杂环丁烷、二氮杂环丁烷、二氧杂环丁烷、二硫杂环丁烷、吡咯烷、四氢呋喃、磷杂环戊烷、四氢噻吩、咪唑烷、吡唑烷、硫杂环丁烷、异硫醇、噁唑烷、异噁唑烷、噻唑烷、二氧戊环、二硫戊环、哌啶、噁烷、膦烷、噻烷、二嗪烷、吗啉、噻噁烷、二噁烷或二噻烷。在一些某些实施例中，R^{24}的4至6元杂环烷基为氮杂环丁烷或1,4-二嗪烷。在一些实施例中，

[0532] R^{24}具有以下结构中的一种结构：  或  。在一些实施例中，R^{24}为  。在一些实施例中，R^{24}为  。

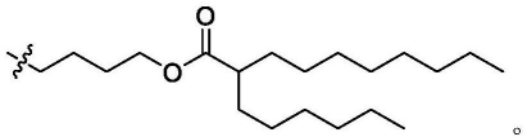
[0533] 在一个实施例中，R^{25}为H或C_1-C_4烷基。在一些实施例中，R^{25}为H。在一些实施例中，R^{25}为C_1-C_4烷基。在一些实施例中，R^{25}为C_1烷基。在一些实施例中，R^{25}为C_2烷基。在一些实施例中，R^{25}为C_3烷基。在一些实施例中，R^{25}为C_4烷基。在一些某些实施例中，R^{25}为-CH_3。在一些其他某些实施例中，R^{25}为-CH_2CH_3。

[0534] 在一个实施例中，R^{21}和R^{22}各自独立地为C_1-C_6烷基、直链C_{10}-C_{20}烷基、直链C_{10}-C_{20}烯基或支链C_{10}-C_{35}烯基，其中所述C_1-C_6烷基被-OC(=O)R^{26}取代。在一些实施例中，R^{21}和R^{22}各自独立地为被-OC(=O)R^{26}取代的C_2-C_5烷基、直链C_{12}-C_{18}烷基、直链C_{12}-C_{18}烯基或支链C_{14}-C_{32}烯基。在一些实施例中，R^{21}或R^{22}中的一者为直链C_{12}-C_{18}烷基，并且R^{21}或R^{22}中的另一者为直链C_{12}-C_{18}烯基。在一些实施例中，R^{21}或R^{22}中的一者为被-OC(=O)R^{26}取代的C_2-C_5烷基，并且R^{21}或R^{22}中的另一者为直链C_{12}-C_{18}烷基。在一些实施例中，R^{21}或R^{22}中的一者为直链C_{12}-C_{18}烷基，并且R^{21}或R^{22}中的另一者为支链C_{14}-C_{32}烯基。在一些实施例中，R^{21}和R^{22}各自为被-OC(=O)R^{26}取代的C_2-C_5烷基。在一些实施例中，R^{21}和R^{22}各自为被-OC(=O)R^{26}取代的C_2烷基。在一些实施例中，R^{21}和R^{22}各自为被-OC(=O)R^{26}取代的C_3烷基。在一些实施例中，R^{21}和R^{22}各自为被-OC(=O)R^{26}取代的C_4烷基。在一些实施例中，R^{21}和R^{22}各自为被-OC(=O)R^{26}取代的C_5烷基。在一些实施例中，R^{21}和R^{22}各自为直链C_{12}-C_{18}烯基。在一些实施例中，R^{21}和R^{22}各自为直链C_{12}烯基。在一些实施例中，R^{21}和R^{22}各自为直链C_{13}烯基。在一些实施例中，R^{21}和R^{22}各自为直链C_{14}烯基。在一些实施例中，R^{21}和R^{22}各自为直链C_{15}烯基。在一些实施例中，R^{21}和R^{22}各自为直链C_{16}烯基。在一些实施例中，R^{21}和R^{22}各自为直链C_{17}烯基。在一些实施例中，R^{21}和R^{22}各自

为直链C_{18}烯基。

[0535] 在一个实施例中,R^{26}为支链C_{10}-C_{30}烷基。在一些实施例中,R^{26}为支链C_{10}-C_{20}烷基。在一些某些实施例中,R^{26}为支链C_{12}-C_{18}烷基。在一些某些实施例中,R^{26}为支链C_{12}烷基。在一些某些实施例中,R^{26}为支链C_{13}烷基。在一些某些实施例中,R^{26}为支链C_{14}烷基。在一些某些实施例中,R^{26}为支链C_{15}烷基。在一些某些实施例中,R^{26}为支链C_{16}烷基。在一些某些实施例中,R^{26}为支链C_{17}烷基。在一些某些实施例中,R^{26}为支链C_{18}烷基。

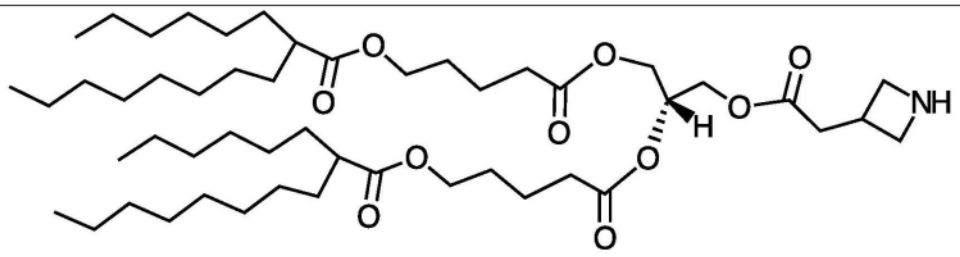
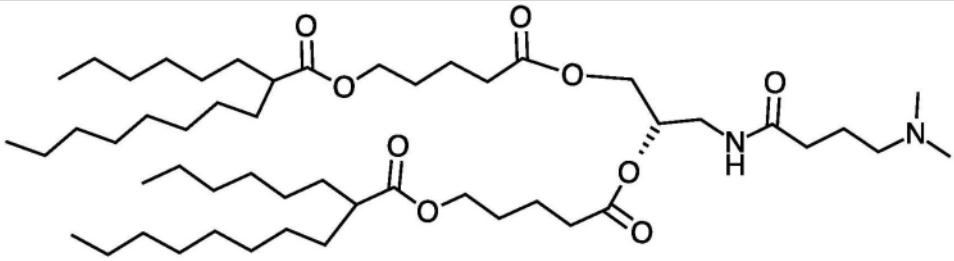
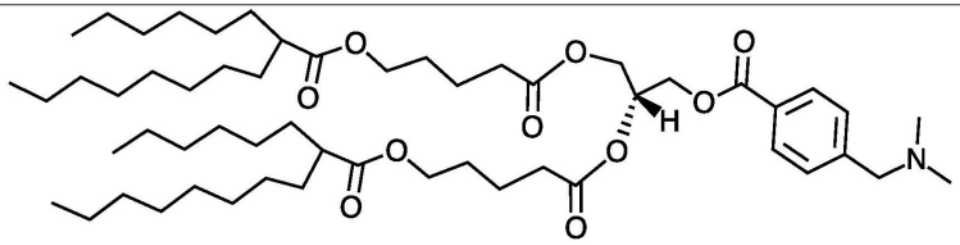
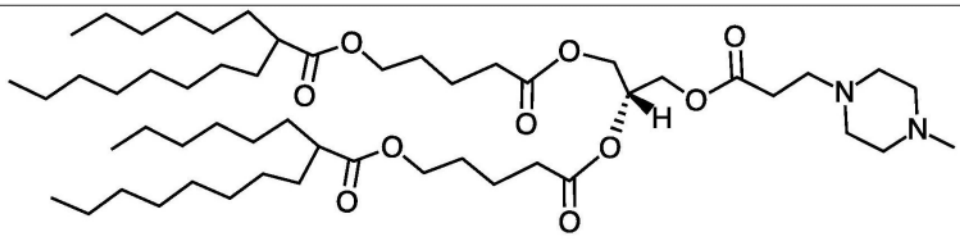
[0536] 在一些实施例中,R^{21}和R^{22}各自独立地具有以下结构:

[0537]  。

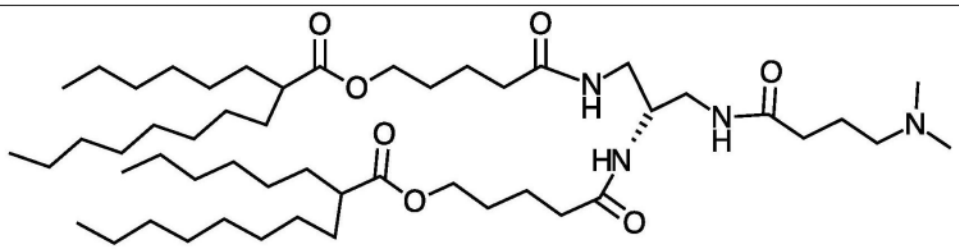
[0538] 在一个实施例中,化合物具有下表E中所示的以下结构中的一种结构。

[0539] 表E:(XX)至(XXB-2)化合物的列表

[0540]

化合物ID	结构
40	
41	
42	
43	

[0541]

化合物ID	结构
44	

[0542] III.核酸

[0543] 在一个方面,本公开的可电离脂质可用于核酸的递送。核酸包括但不限于小干扰RNA(siRNA)、不对称干扰RNA(aiRNA)、微小RNA(miRNA)、miRNA抑制剂(antagomirs/antimirs)、dicer底物RNA(dsRNA)、小发夹RNA(shRNA)、信使RNA(mRNA)、多价RNA以及它们的混合物。在一些方面,核酸或mRNA包括自我扩增RNA(saRNA)、多顺反子RNA、环状RNA以及它们的混合物。

[0544] 在一个方面,核酸包含干扰RNA分子,诸如siRNA、aiRNA、miRNA或它们的混合物。在某些其他方面,核酸包含一个或多个mRNA分子(例如,混合物)。

[0545] 干扰RNA分子包括“小干扰RNA”或“siRNA”,例如,长度为约15-60、15-50或15-40个(双链体)核苷酸、更通常长度为约15-30、15-25、或19-25个(双链体)核苷酸并且优选地长度为约20-24、21-22或21-23个(双链体)核苷酸的干扰RNA(例如,双链siRNA的每个互补序列的长度为15-60、15-50、15-40、15-30、15-25或19-25个核苷酸,优选地,长度为约20-24、21-22或21-23个核苷酸,并且双链siRNA的长度为约15-60、15-50、15-40、15-30、15-25或19-25个碱基对,优选地,长度为约18-22、19-20或19-21个碱基对)。siRNA双链体可以包含约1至约4个核苷酸或约2至约3个核苷酸的3’突出端以及5’磷酸末端。

[0546] siRNA的实例包括但不限于由两条单独的链分子组装而成的双链多核苷酸分子,其中一条链为有义链,并且另一条链为互补的反义链;由单链分子组装而成的双链多核苷酸分子,其中有义区和反义区通过基于核酸或基于非核酸的接头连接;具有发夹二级结构的双链多核苷酸分子,其具有自互补的有义区和反义区;以及具有两个或更多个环结构和具有自我互补的有义区和反义区的干的环状单链多核苷酸分子,其中环状多核苷酸可以在体内或体外处理以产生活性双链siRNA分子。

[0547] siRNA也可以化学合成。siRNA也可以通过用大肠杆菌RNA酶III或Dicer切割较长的dsRNA(例如,长度大于约25个核苷酸的dsRNA)来产生。这些酶将dsRNA处理成具有生物活性的siRNA(参见,例如,Yang等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,99:9942-9947(2002);Calegari等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,99:14236(2002);Byrom等人,Ambion TechNotes,10(1):4-6(2003);Kawasaki等人,Nucleic Acids Res.,31:981-987(2003);Knight等人,Science,293:2269-2271(2001);和Robertson等人,J.Biol.Chem.,243:82(1968))。优选地,dsRNA的长度至少为50个核苷酸至约100、200、300、400或500个核苷酸。dsRNA的长度可以长达1000、1500、2000、5000个核苷酸或更长。dsRNA可以编码整个基因转录本或部分基因转录本。在某些情况下,siRNA可以由质粒编码(例如,转录为自动折叠成具有发夹环的双链体的序列)。

[0548] 在一个实施例中,核酸包含siRNA。在一个实施例中,siRNA分子包含长度为约15至约60个核苷酸(例如,长度为约15-60、15-50、15-40、15-30、15-25或19-25个核苷酸或者长度为15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个核苷酸)的双链区域。siRNA分子可以在体外和/或体内沉默靶序列的表达。

[0549] 在其他实施例中,siRNA分子包含经修饰的核苷酸,包括但不限于2'-O-甲基(2'OMe)核苷酸、2'-脱氧-2'-氟(2'F)核苷酸、2'-脱氧核苷酸、2'-O-(2-甲氧基乙基)(MOE)核苷酸、锁核酸(LNA)核苷酸以及它们的混合物。在一些其他实施例中,siRNA包含2'-OMe核苷酸(例如,2-'OMe嘌呤和/或嘧啶核苷酸),诸如例如2'-OMe-鸟苷核苷酸、2'-OMe-尿苷核苷酸、2'OMe-腺苷核苷酸、2'-OMe-胞嘧啶核苷酸以及它们的混合物。在某些情况下,siRNA不包含2'-OMe-胞嘧啶核苷酸。在其他实施例中,siRNA包含发夹环结构。

[0550] 核酸可以根据任何可用的技术来制备。对于mRNA,主要的制备方法是但不限于用于产生长序列特异性mRNA的酶促合成(也称为体外转录)。体外转录描述了从工程化DNA模板中模板定向合成RNA分子的过程,该模板由连接到编码所关注基因的下游序列的上游噬菌体启动子序列(例如,包括但不限于来自T7、T3和SP6大肠杆菌噬菌体的启动子序列)组成。

[0551] 在支持聚合酶活性的条件下,在相应的RNA聚合酶和腺苷、鸟苷、尿苷和胞苷三磷酸核糖核苷(rNTP)存在下,使用线性化DNA模板在体外进行RNA转录,同时最大限度地减少所得mRNA转录物的潜在降解。体外转录可以使用各种市售试剂盒进行,包括但不限于RiboMax大规模RNA生产系统(Promega)、MegaScript转录试剂盒(Life Technologies)以及市售试剂,包括RNA聚合酶和rNTP。用于mRNA体外转录的方法是本领域众所周知的。(参见,例如,Losick,R.,1972,In vitro transcription,Ann Rev Biochem第41版409-46;Kamakaka,R.T.和Kraus,W.L.2001.In Vitro Transcription.Current Protocols in Cell Biology.2:11.6:11.6.1-11.6.17;Beckert,B.和Masquida,B.,(2010)Synthesis of RNA by In Vitro Transcription载于Methods in Molecular Biology第703版中的RNA(Neilson,H.编辑),New York,N.Y.Humana Press,2010;Brunelle,J.L.和Green,R.,2013,第五章—In vitro transcription from plasmid or PCR-amplified DNA,Methods in Enzymology第530版,101-114;所有这些文献都通过引用并入本文)。

[0552] 然后从转录或相关反应的不需要组分(包括未掺入的rNTP、蛋白酶、盐、短RNA寡核苷酸等)中纯化所需的体外转录mRNA。用于分离mRNA转录物的技术是本领域众所周知的。众所周知的方法包括苯酚/氯仿萃取或在单价阳离子或氯化锂存在下用任意醇(乙醇、异丙醇)沉淀。可以使用的纯化方法的附加非限制性实例包括尺寸排阻色谱(Lukaysky,P.J.和Puglisi,J.D.,2004,Large-scale preparation and purification of polyacrylamide-free RNA oligonucleotides,RNA第10版,889-893)、硅胶基亲和色谱和聚丙烯酰胺凝胶电泳(Bowman,J.C.,Azizi,B.,Lenz,T.K.,Ray,P.和Williams,L.D.在RNA in vitro transcription and RNA purification by denaturing PAGE中所述,该文章载于Recombinant and in vitro RNA syntheses Methods第941版Conn G.L.(编辑),New York,N.Y.Humana Press,2012)。可以使用各种市售试剂盒进行纯化,包括但不限于SV总分离系统(Promega)和体外转录净化和浓缩试剂盒(Norgen Biotek)。

[0553] 本领域已经描述了各种修饰,其用于改变体外转录的mRNA的特定性质并提高其效

用。这些包括但不限于对mRNA的5'和3'末端的修饰。内源性真核mRNA通常在成熟分子的5'端上含有帽结构,其在介导mRNA帽结合蛋白(CBP)的结合中发挥重要作用,而CBP反过来又负责增强mRNA在细胞中的稳定性和mRNA翻译效率。因此,通过加帽mRNA转录物可以实现最高水平的蛋白质表达。5'-帽在最5'端核苷酸和鸟嘌呤核苷酸之间含有5'-5'-三磷酸键。附加修饰包括2'-羟基基团上最后一个和倒数第二个5'-核苷酸的甲基化。

[0554] mRNA的可以进行修饰以提供可翻译性和稳定性方面的益处的其他组分包括5'和3'非翻译区(UTR)。UTR的优化(有利的5'和3'UTR可以从细胞或病毒RNA中获得),无论是两者还是独立地,已经被证明可以提高mRNA稳定性和体外转录的mRNA的翻译效率(参见,例如,Pardi,N.,Muramatsu,H.,Weissman,D.,Kariko,K.,In vitro transcription of long RNA containing modified nucleosides载于Methods in Molecular Biology第969版中的Synthetic Messenger RNA and Cell Metabolism Modulation(Rabinovich,P.H.编辑),2013)。

[0555] 在一些实施例中,核酸是单顺反子或多顺反子的RNA,其中多顺反子RNA具有2、3、4、5、6或更多个编码序列,其表达2、3、4、5、6或更多个不同的蛋白质或肽或者一种或多种蛋白质或肽的不同的亚基或片段。在一些方面,核酸是多个mRNA的混合物,每个mRNA编码至少一种蛋白质或肽或者蛋白质或肽的亚基或片段。在一些方面,核酸是多个mRNA的混合物,每个mRNA编码至少一个重编程因子,诸如但不限于OCT、SOX、KLF、Lin、Nanog、Myc或GLis1。在一些实施例中,重编程因子为LIN28或NANOG。在一些方面,重编程因子为Yamanaka因子,诸如OCT4、SOX2、c-Myc和KLF4。在一些实施例中,重编程因子为OCT4、SOX2和c-Myc的组合。在一些实施例中,重编程因子为OCT4、SOX2、KLF4和c-Myc的组合。在一些实施例中,重编程因子为OCT4、SOX2、KLF4、Lin28、Nanog和c-Myc的组合。在一些实施例中,重编程因子为OCT4、SOX2、KLF4、Lin28、Nanog和c-Myc的组合。在一些实施例中,上述组合中的任何组合中的c-Myc被Glis1替代。在一些实施例中,每个mRNA编码一个重编程因子。在一些实施例中,每个mRNA编码两个或更多个重编程因子。在一些实施例中,每个mRNA编码两个重编程因子。在一些实施例中,每个mRNA编码三个重编程因子。在一些实施例中,核酸为编码两个、三个、四个、五个、六个或更多个重编程因子的单个mRNA分子。在一些实施例中,核酸为编码三个重编程因子的单个mRNA分子。在一些实施例中,核酸为编码四个重编程因子的单个mRNA分子。在一些实施例中,核酸为编码五个重编程因子的单个mRNA分子。在一些实施例中,核酸为编码六个重编程因子的单个mRNA分子。

[0556] 在一些实施例中,RNA为编码一个或多个重编程因子(诸如但不限于OCT、SOX、KLF、Lin、Nanog、Myc或GLis1)的多顺反子RNA。在一些实施例中,重编程因子为LIN28或NANOG。在一些方面,重编程因子为Yamanaka因子,诸如OCT4、SOX2、c-Myc和KLF4。在一些实施例中,重编程因子为OCT4、SOX2和c-Myc的组合。在一些实施例中,重编程因子为OCT4、SOX2、KLF4和c-Myc的组合。在一些实施例中,重编程因子为OCT4、SOX2、KLF4、Lin28、Nanog和c-Myc的组合。在一些实施例中,重编程因子为OCT4、SOX2、KLF4、Lin28、Nanog和c-Myc的组合。在一些实施例中,上述组合中的任何组合中的c-Myc被Glis1替代。

[0557] 在一些实施例中,RNA为自我复制RNA。自我复制构建体描述于例如美国专利公开第2018/0216079号和第2021/0108179号中,其通过引用并入本文。在一些实施例中,自我复制RNA在哺乳动物例如人类中具有增加的半衰期。在一些方面,自我扩增RNA是多顺反子的。

在一些方面,自我扩增RNA是反式扩增RNA,其中扩增聚合酶由与扩增靶向的一条或多条链不同的RNA链编码。

[0558] 在一些实施例中,RNA为环状多核糖核苷酸或环状RNA。环状多核糖核苷酸或环状RNA为通过共价键或非共价键形成环状结构的多核糖核苷酸。在一些实施例中,环状多核糖核苷酸在哺乳动物例如人类中是非免疫原性的。在一些实施例中,环状多核糖核苷酸在哺乳动物例如人类中具有增加的半衰期。在一些实施例中,环状多核糖核苷酸能够在细胞中复制或在细胞中复制。在一些方面,环状RNA是多顺反子的。

[0559] 在一些实施例中,RNA包含调节元件,例如修饰RNA内编码序列的表达的序列。调节元件可以包括与编码表达产物的编码序列相邻的序列。调节元件可以可操作地连接至相邻序列。与不存在调节元件时表达的产物的量相比,调节元件可以增加表达的产物的量。此外,一个调节元件可以增加针对串联连接的多个表达序列表达的产物的量。因此,一个调控元件可以增强一个或多个表达序列的表达。多个调节元件是本领域普通技术人员众所周知的。在一些实施例中,调节元件为IRES或2A元件。在一些实施例中,IRES或2A元件存在于编码序列的上游。在一些实施例中,修饰或优化IRES或2A元件的序列以实现期望的表达谱。在多顺反子RNA的一些实施例中,每个编码序列分别由不同的IRES或2A元件调节,即,表达的每个基因具有其自己的IRES或2A元件。

[0560] 在一些实施例中,RNA分子中的一种或多种RNA分子编码b18r、b19r、E3、K3或其他“诱饵分子”以中和对转染的RNA的I型干扰素γ应答,从而减弱细胞对转染的RNA的免疫应答并导致由RNA编码的治疗分子(例如,上述重编程因子)的翻译增加。

[0561] 在一些实施例中,RNA具有约100至约300个核苷酸、约300至约1,000个核苷酸、约1,000至约3,000个核苷酸、约3,000至约5,000个核苷酸、约5,000至约7,000个核苷酸、约7,000至约10,000个核苷酸、约10,000至约13,000个核苷酸或者约100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300、2400、2500、2600、2700、2800、2900、3000、3100、3200、3300、3400、3500、3600、3700、3800、3900、4000、4100、4200、4300、4400、4500、4600、4700、4800、4900、5000、5100、5200、5300、5400、5500、5600、5700、5800、5900、6000、6100、6200、6300、6400、6500、6600、6700、6800、6900、7000、7100、7200、7300、7400、7500、7600、7700、7800、7900、8000、8100、8200、8300、8400、8500、8600、8700、8800、8900、9000、9100、9200、9300、9400、9500、9600、9700、9800、9900、10000、10100、10200、10300、10400、10500、10600、10700、10800、10900、11000、11100、11200、11300、11400、11500、11600、11700、11800、11900、12000、12100、12200、12300、12400、12500、12600、12700、12800、12900、13000个碱基对的长度。

[0562] 在一些实施例中,核酸(RNA或DNA)被克隆到载体中。在一些方面,载体是产生单顺反子mRNA或多顺反子mRNA的RNA载体,其中该载体是线性的或环状的。在一个实施例中,载体为mRNA产生载体,其通过DNA载体的体外转录产生mRNA。DNA载体可以是单顺反子或多顺反子的(具有2、3、4、5、6或更多个编码重编程因子的DNA序列)。

[0563] 在一些实施例中,RNA载体为多顺反子RNA载体。此类多顺反子RNA载体可以编码一个或多个重编程因子,诸如但不限于OCT、SOX、KLF、Lin、Nanog、Myc或Glis1。在一些实施例中,一个或多个重编程因子包括LIN28或NANOG。在一些方面,一个或多个重编程因子包括Yamanaka因子,诸如OCT4、SOX2、c-Myc和KLF4。在一些实施例中,多顺反子RNA载体编码

OCT4、SOX2和c-Myc。在一些实施例中,多顺反子RNA载体表达OCT4、SOX2、KLF4和c-Myc。在一些实施例中,多顺反子RNA载体编码OCT4、SOX2、KLF4、c-Myc、LIN28和NANOG。在上述实施例中的任何实施例中,c-Myc可以被Glis1替代。

[0564] 在一些方面,RNA载体为自我复制载体。在一些方面,自我复制载体具有关闭开关。自我复制和多顺反子构建体以及具有启动/关闭关的构建体描述于例如美国专利公开第2018/0216079号和第2021/0108179号(这些专利通过引用并入本文)中,或者描述于美国专利申请17/812,709、17/812,711和17/812,710(这些专利通过引用并入本文)中。

[0565] 在一些实施例中,RNA载体是环状多核糖核苷酸或环状RNA。环状多核糖核苷酸或环状RNA为通过共价键或非共价键形成环状结构的多核糖核苷酸。在一些实施例中,环状多核糖核苷酸在哺乳动物例如人类中是非免疫原性的。在一些实施例中,环状多核糖核苷酸能够在细胞中复制或在细胞中复制。

[0566] 在一些实施例中,环状多核糖核苷酸包含调节元件,例如,修饰环状多核糖核苷酸内表达序列的表达的序列。调节元件可以包括与编码表达产物的表达序列相邻的序列。调节元件可以可操作地连接至相邻序列。与不存在调节元件时表达的产物的量相比,调节元件可以增加表达的产物的量。此外,一个调节元件可以增加针对串联连接的多个表达序列表达的产物的量。因此,一个调控元件可以增强一个或多个表达序列的表达。多个调节元件是本领域普通技术人员众所周知的。

[0567] IV.脂质-纳米颗粒组合物

[0568] 本公开的特征在于可电离脂质及包含其的组合物。此类组合物可以是但不限于纳米颗粒组合物。本公开的脂质-纳米颗粒组合物可以包括式(I)至(XI)中的任一者的可电离脂质,以及诸如辅助脂质、稳定脂质和/或结构脂质的附加脂质。

[0569] 不希望受任何理论的束缚,据认为这些脂质纳米颗粒保护核酸免于在血清中降解,并提供核酸在体外和体内向细胞的有效递送。

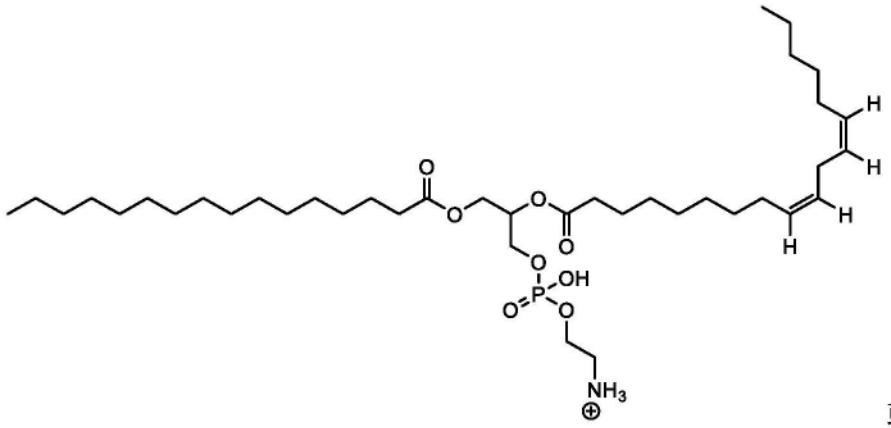
[0570] 本公开的脂质-纳米颗粒组合物可以进一步包括核酸(诸如RNA)作为治疗剂和/或预防剂和/或诊断剂,以用于递送至哺乳动物细胞或器官以调节多肽、蛋白质或基因表达。

[0571] 脂质组合物可以通过将式(I)至(XIX)可电离脂质或它们的组合与辅助脂质或其组合、稳定脂质和/或结构脂质或它们的组合在溶剂(诸如乙醇和水)中混合来制备,以产生所需的摩尔比。

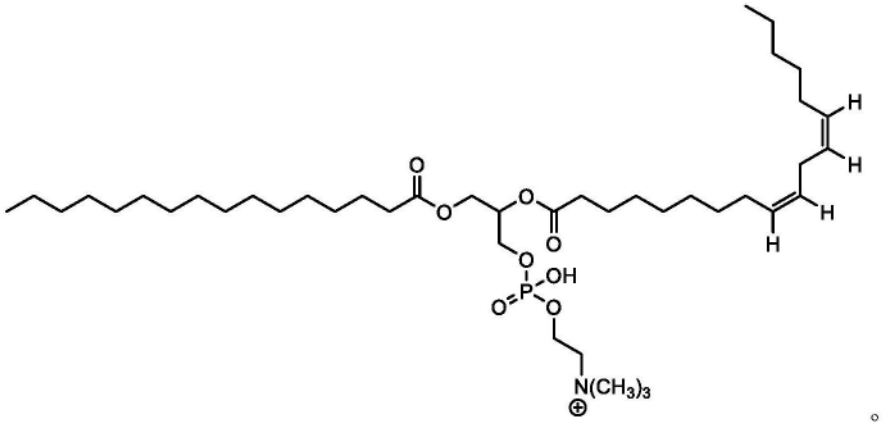
[0572] 供在本公开的脂质-纳米颗粒组合物中使用的辅助脂质可以包括可以组装成一种或多种脂质双层的脂质。供在本公开的脂质-纳米颗粒组合物的辅助脂质可以包括增加脂质纳米颗粒的稳定性或递送效率的脂质。

[0573] 也可以在本公开的脂质纳米颗粒组合物中使用的辅助脂质的示例性实例可以包括但不限于以下:

[0574]



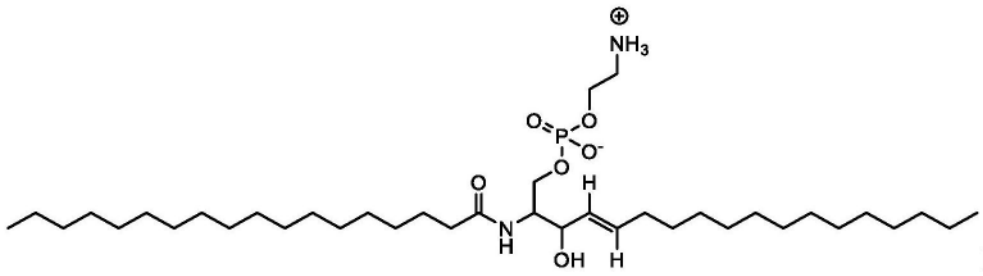
或



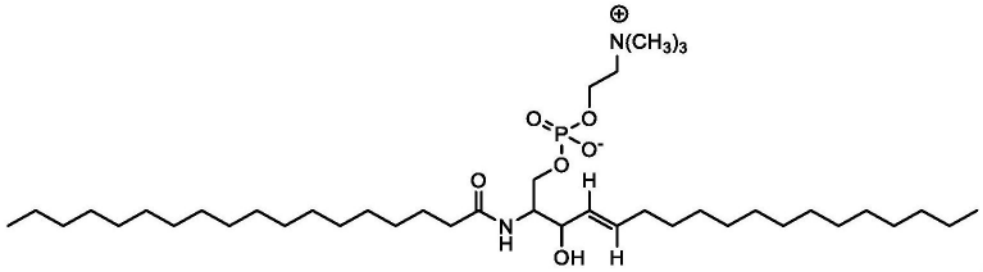
。

[0575] 可以在本公开的脂质纳米颗粒组合物中使用的辅助脂质的其他示例性实例可以包括但不限于以下：

[0576]



或



。

[0577] 此类示例性辅助脂质可以使用描述于J.Org.Chem.1994,第59卷,4805-4820,Org.Lett.2005,第7卷,2063-2065和Tet.Lett.1993,第34卷,6881-6884中的方法来制备。

[0578] 在又另一实施例中,可用于组合物中的辅助脂质可以选自由以下但不限于以下组成的磷脂质组:1,2-二亚油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DLPC)、1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-磷酸胆碱(DMPC)、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DOPC)、1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DPPC)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DSPC)、1,2-二(十一烷酰

基)-sn-甘油-磷酸胆碱(DUPC)、1-棕榈酰基-2-油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(POPC)、1,2-二-O-十八烯基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(18:0二醚PC)、1-油酰基-2-胆固醇半琥珀酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(OChemsPC)、1-十六烷基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(C16 Lyso PC)、1,2-二亚麻酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-二花生四烯酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-二(二十二碳六烯酰基)-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)、1,2-二植烷酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(ME 16.0PE)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二亚油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二亚麻酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二花生四烯酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二(二十二碳六烯酰基)-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸-rac-(1-甘油)钠盐(DOPG)以及它们的混合物。

[0579] 供在脂质-纳米颗粒组合物中使用的稳定脂质可以包括1-(单甲氧基-聚乙二醇)-2,3-二肉豆蔻酰基甘油(PEG-DMG),其平均PEG分子量为2000。

[0580] 脂质-纳米颗粒组合物的脂质组分可以包括一种或多种结构脂质。结构脂质可以选自由以下但不限于以下组成的组:胆固醇、粪甾醇、谷甾醇(包括β谷甾醇)、麦角甾醇、菜油甾醇、豆甾醇、菜子甾醇、番茄碱、熊果酸、α-生育酚以及它们的混合物。在一些实施例中,结构脂质为胆固醇。在一些实施例中,结构脂质包括胆固醇和皮质类固醇(诸如泼尼松龙、地塞米松、泼尼松和氢化可的松)或它们的组合。

[0581] 结构脂质也可以包括天然和合成胆固醇衍生物。天然胆固醇衍生物的一些实例包括但不限于(7β-OHC、22(R)-羟基胆固醇(22R-OHC)、24(S)-羟基胆固醇(24(S)-OHC))。合成胆固醇衍生物可以包括但不限于(22(R)-羟基-Δ9-胆甾烷醇(22R-ISO-OHC)、((23-(4-甲基呋喃-2,5-二酮)-3α-羟基-24-去甲-5β-胆烷(LITHO 1a)、23-(4-甲基呋喃-2,5-二酮)-3α,7α-二羟基-24-去甲-5β-胆烷(CHENO 1b)、23-(4-甲基-1H-吡咯-2,5-二酮)-3α-羟基-24-去甲-5β-胆烷(LITOMAL 7a)、23-(4-甲基-1H-吡咯-2,5-二酮)-3α,7α,12α-三羟基-24-去甲-5β-胆烷(COLMAL 7f)和石胆酸和鹅去氧胆酸的乙醇马来酰亚胺衍生物(LITOMET、CHENOMET))(146,147)。LITOMET的系统名称为(23-((2-羟乙基)-4-甲基-1H-吡咯-2,5-二酮)-3α-羟基-24-去甲-5β-胆烷),并且CHENOMET的系统名称为(23-((2-羟乙基)-4-甲基-1H-吡咯-2,5-二酮)-3α,7α-二羟基-24-正-5β-胆烷)。

[0582] 本公开的脂质-纳米颗粒组合物包括核酸,诸如但不限于小干扰RNA(siRNA)、不对称干扰RNA(aiRNA)、微小RNA(miRNA)、miRNA抑制剂(antagomirs/antimirs)、dicer底物RNA(dsRNA)、小发夹RNA(shRNA)、信使RNA(mRNA)、多价RNA以及它们的混合物。

[0583] 核酸或mRNA可以为自我扩增RNA、多顺反子RNA、自我扩增多顺反子RNA或环状RNA。在一些方面,核酸或mRNA表达蛋白质或肽。在一些方面,从核酸或mRNA表达的蛋白质或肽为抗体、人类抗体、骆驼抗体、纳米抗体、人源化抗体、双特异性抗体、酶、基因组编辑酶或核酸酶、生长因子、细胞因子、趋化因子、小分子-模拟肽、转录因子、结构分子、信号分子、重编程因子、疫苗抗原或它们的组合。在一些方面,mRNA编码在细胞内起作用的蛋白质或肽。在一些方面,mRNA编码至少一个重编程因子。

[0584] 由本技术的核酸或mRNA表达的蛋白质或肽可以是至少一种细胞外基质蛋白质,诸如胶原、层粘连蛋白、弹力素、纤连蛋白、整合素、生腱蛋白、蛋白聚糖、纤维蛋白或它们的组合。胶原可以是胶原I、II、III、IV、V、VI、VII、VIII、IX、X、XI、XII、XIII、XIV、XV、XVI、XVII、XVIII、XIX、XX、XXI、XXII、XXIII、XXIV、XXV、XXVI、XXVII、XXVIII或它们的组合。在一些实施

例中,胶原为胶原VII。在一些实施例中,胶原VII在复原、治疗、重塑或改善皮肤或细胞外基质的方法中使用。在一些实施例中,胶原VII在伤口愈合的方法中使用。

[0585] 由本技术的核酸或mRNA表达的蛋白质或肽也可以是生长因子、细胞因子或它们的组合,诸如EGF、FGF、NGF、CNTF、PDGF、VEGF、IGF、GMCSF、GCSF、TGF、促红细胞生成素、肝配蛋白、GDNF、GDF9、KGF、血管生成素、TPO、BMP、HGF、BDNF、GDF、HGH(生长激素)、神经营养素、MSF、SGF、GDF(包括GDF11)、TGF(包括TGF-b)或它们的组合。在一些实施例中,细胞因子为IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、TNF-α、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、CXCL8(以前称为IL-18)、IL-19、IL-20、IL-21、IL-22、IL-23、IL-24、IL-25、IL-26、IL-27、IL-28、IL-29、IL-30、IL-31、IL-32、IL-33或它们的组合。

[0586] 由本技术的核酸或mRNA表达的蛋白质或肽可以是人类抗体、人源化抗体、骆驼抗体、伴侣动物抗体或纳米抗体。在一些实施例中,从核酸或mRNA表达的蛋白质或肽为酶,诸如核酸酶,例如,在基因组编辑中使用的核酸酶。在一些方面,从核酸或mRNA表达的蛋白质或肽在细胞内起作用。在一些方面,分泌从核酸或mRNA表达的蛋白质或肽。在一些实施例中,抗体为以下中的至少一者或基本上与以下相似:曲妥珠单抗、格罗菲妥单抗、米利珠单抗、索米妥昔单抗、尼塞韦单抗、曲美木单抗、特立妥单抗、多南单抗、司培利单抗、乐卡奈单抗、替雷利珠单抗、潘普利单抗、信迪利单抗、特普利珠单抗、特瑞普利单抗、奥博妥单抗、瑞替凡利单抗、乌布利妥昔单抗、伊诺莫单抗、奥珀妥珠单抗、纳索利单抗、莫妥珠单抗、替沙格韦单抗、西加韦单抗、瑞拉利单抗、特本塔夫斯普、法瑞西单抗、舒替利单抗、索托韦单抗、瑞丹维单抗、卡斯瑞韦单抗、依米得韦单抗、特泽鲁单抗、替索单抗、埃万妥单抗、阿尼弗鲁单抗、朗妥昔单抗、比美吉珠单抗、曲罗芦单抗、依维苏单抗、沙西妥珠单抗、替妥木单抗、伊沙妥昔单抗、艾普奈珠单抗、多塔利单抗、安舒韦单抗、马吉妥昔单抗、那昔妥单抗、阿替韦单抗、玛替韦单抗、奥西韦单抗、玛贝妥单抗、坦昔妥单抗、萨特利珠单抗、英比利珠单抗、恩弗妥单抗、立赞利珠单抗、布西珠单抗、泊洛妥珠单抗、瑞莎珠单抗、罗莫佐单抗、卡拉西单抗、瑞武丽珠单抗、依玛鲁单抗、西米普利单抗、瑞玛奈珠单抗、莫塞妥莫单抗、加卡奈组单抗、拉那鲁单抗、莫格利珠单抗、厄瑞努单抗、替瑞奇珠单抗、艾巴利珠单抗、布洛舒单抗、德瓦鲁单抗、艾美赛珠单抗、贝那利珠单抗、奥瑞珠单抗、古塞奇尤单抗、英妥珠单抗、沙利鲁单抗、度普利尤单抗、阿维鲁单抗、博达路单抗、阿替利珠单抗、贝洛托珠单抗、奥拉单抗、瑞利珠单抗、奥托昔单抗、依奇珠单抗、达妥木单抗、埃罗妥珠单抗、耐昔妥珠单抗、艾达赛珠单抗、阿利库单抗、美泊利单抗、依洛尤单抗、达妥昔单抗、司库奇尤单抗、纳武利尤单抗、贝林妥欧单抗、帕博利珠单抗、雷莫西尤单抗、维多珠单抗、西妥昔单抗、奥妥珠单抗、雷昔库单抗、帕妥珠单抗、本妥昔单抗、贝利木单抗、伊匹木单抗、地诺单抗、托珠单抗、奥法木单抗、卡那单抗、戈利木单抗、乌特克单抗、赛妥珠单抗、卡妥昔单抗、依库珠单抗、雷珠单抗、帕尼单抗、那他珠单抗、贝伐单抗、西妥昔单抗、依法利珠单抗、奥马珠单抗、托西莫单抗、伊布莫单抗、阿达木单抗、阿仑单抗、吉妥珠单抗、英夫利昔单抗、帕利珠单抗、巴利昔单抗、达克珠单抗、利妥昔单抗、阿昔单抗、依决洛单抗、奈巴库单抗或莫罗单抗。在一些实施例中,蛋白质或肽在治疗人类或兽医疾病的方法中使用。

[0587] 本公开的脂质-纳米颗粒组合物可以通过混合过程来制备,诸如但不限于微流体和两种流体流的T形连接混合,其中一种流体流含有核酸并且另一种流体流具有脂质组分。此类混合过程引起纳米沉淀和颗粒形成。

[0588] 本公开的脂质-纳米颗粒组合物可以使用ζ粒度仪来表征以确定颗粒大小、多分散指数(PDI)和ζ电势。在一些实施例中,脂质-纳米颗粒组合物的ζ电势可以为约-10mV至约+20mV、约-10mV约+15mV、约-10mV至约+10mV、约-10mV至约+5mV、约-10mV至约0mV、约-10mV至约-5mV、约-5mV至约+20mV、约-5mV至约+15mV、约-5mV至约+10mV、约-5mV至约+5mV、约-5m V至约0mV、约0mV至约+20mV、约0mV至约+15mV、约0mV至约+10mV、约0mV至约+5mV、约+5mV至约+20mV、约+5mV至约+15mV或约+5mV至约+10mV。

[0589] 紫外-可见光谱可以用于测定纳米颗粒组合物中核酸的浓度。

[0590] 脂质-纳米颗粒组合物可以通过使细胞与包含本文所述的可电离脂质中的一种或多种本文所述的可电离脂质的脂质纳米颗粒接触而在体外和体内诱导所需蛋白质的表达,其中该脂质纳米颗粒被封装或与被表达以产生所需的蛋白质的核酸(例如,mRNA)缔合。

[0591] 脂质-纳米颗粒组合物可以通过使细胞与包含本文所述的可电离脂质中的一种或多种本文所述的可电离脂质的脂质纳米颗粒接触而在体外和体内减少靶基因和蛋白质两者的表达,其中该脂质纳米颗粒被封装或与减少靶基因表达的核酸(例如,siRNA)缔合。

[0592] 脂质-纳米颗粒组合物可以通过使细胞与包含本文所述的可电离脂质中的一种或多种本文所述的可电离脂质的脂质纳米颗粒接触而在体外和体内下调或静默靶基因和蛋白质两者的表达,其中该脂质纳米颗粒被封装或与下调或静默靶基因表达的核酸缔合。

[0593] 本文提供的方法和组合物应用于神经系统、肌肉系统、呼吸系统、心血管系统、骨骼系统、生殖系统、外皮系统、淋巴系统、排泄系统、免疫系统、内分泌系统(例如,内分泌和外分泌)或消化系统的细胞、组织或器官。如本文所述,可以潜在地复原任何类型的细胞,包括但不限于上皮细胞(例如,鳞状、立方状、柱状和假复层上皮细胞)、内皮细胞(例如,静脉、动脉和淋巴管内皮细胞)以及结缔组织、肌肉和神经系统的细胞。此类细胞可以包括但不限于表皮细胞、成纤维细胞、软骨细胞、骨骼肌细胞、卫星细胞、心肌细胞、平滑肌细胞、角质细胞、基底细胞、成釉细胞、外分泌细胞、肌上皮细胞、成骨细胞、破骨细胞、神经元(例如,感觉神经元、运动神经元和中间神经元)、神经胶质细胞(例如,少突胶质细胞、星形胶质细胞、室管膜细胞、小胶质细胞、雪旺细胞和卫星细胞)、柱细胞、脂肪细胞、周细胞、星状细胞、肺细胞、血液和免疫系统细胞(例如,红细胞、单核细胞、树突状细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、肥大细胞、T细胞、B细胞、自然杀伤细胞)、激素分泌细胞、生殖细胞、间质细胞、晶状体细胞、感光细胞、味觉受体细胞和嗅觉细胞;以及来自肾、肝、胰腺、胃、脾、胆囊、肠、膀胱、肺、前列腺、乳房、泌尿生殖道、垂体细胞、口腔、食道、皮肤、头发、指甲、甲状腺、甲状旁腺、肾上腺、眼睛、鼻子或大脑的细胞和/或组织。

[0594] 可以根据本技术治疗的细胞可以选自成纤维细胞、内皮细胞、软骨细胞、骨骼肌干细胞、角质形成细胞、间充质干细胞和角膜上皮细胞。在实施例中,细胞为成纤维细胞。在实施例中,细胞为内皮细胞。在实施例中,细胞为软骨细胞。在实施例中,细胞为骨骼肌干细胞。在实施例中,细胞为角质形成细胞。在实施例中,细胞为间充质干细胞。在实施例中,细胞为角膜上皮细胞。

[0595] 本技术的方法和组合物也可以应用于免疫细胞,包括但不限于淋巴细胞、粒细胞、单核细胞、巨噬细胞、小胶质细胞或树突细胞。在一些实施例中,淋巴细胞为T细胞、B细胞或自然杀伤(NK)细胞。在一些实施例中,淋巴细胞为肿瘤浸润淋巴细胞。

[0596] 本技术的方法和组合物也可以应用于淋巴细胞,其中该淋巴细胞为T细胞。在一些

实施例中,T细胞为细胞毒性T细胞(CD8+)、辅助T细胞(CD4+)、抑制或调节T细胞(Treg)、记忆T细胞、自然杀伤T细胞(NKT细胞)或γδT细胞。在其他实施例中,辅助T细胞为Th1、Th2、Th17、Th9或Tfh T细胞。在一些实施例中,记忆T细胞为中央记忆T细胞、效应器记忆T细胞、组织驻留记忆T细胞或虚拟记忆T细胞。在一些实施例中,本技术的抑制或调节T细胞为FOXP3+T细胞或FOXP3-T细胞。在一些实施例中,NKT细胞为CD1d限制T细胞的子集。

[0597] 本技术的方法和组合物也可以应用于粒细胞,其中该粒细胞为嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞或肥大细胞。

[0598] 本技术的方法和组合物也可以应用于淋巴细胞,其中该淋巴细胞为B细胞,诸如记忆B细胞或浆细胞。

[0599] 本技术的方法和组合物也可以应用于免疫细胞,其中该免疫细胞为单核细胞、巨噬细胞、小胶质细胞或树突细胞。

[0600] 可以使用本文所述的方法和组合物,其中细胞为免疫细胞,诸如天然免疫细胞或工程化免疫细胞。在一些实施例中,本文所述的方法和组合物与工程化细胞(包括工程化免疫细胞)的方法并行或连续使用,使得这些方法在对细胞进行工程化之前、期间和/或之后进行。在一些实施例中,本文所述的方法和组合物用于对细胞(包括工程化的免疫细胞)进行工程化。在一些实施例中,此类工程化包括工程化,使得细胞表达嵌合抗原受体,诸如表达嵌合抗原的免疫细胞。在一些实施例中,此类嵌合抗原受体靶向CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD123、FLT3、BCMA、GD2、HER2、MUC1、B7-H3、IL13Ra2、TAG72、MUC16、BCMA或任何其他适合免疫治疗的抗原中的至少一者。在一些实施例中,此类工程化包括对细胞(包括免疫细胞)进行工程化,以表达其他蛋白质或肽,诸如生长因子和细胞因子。在一些实施例中,所述细胞因子包括IL-15。在一些实施例中,对细胞(诸如免疫细胞)的此类工程化在离体进行,例如,在细胞疗法产品(诸如自体或同种异体嵌合抗原受体(CAR)-T、CAR-NK、CAR-M或CAR-NKT细胞)的制造中。在一些实施例中,本文提供的CAR-T细胞通过嵌合抗原受体靶向CD19、CD20、CD22、HER2、MUC1、CD30、CD33、CD123、FLT3、B7-H3、IL13Ra2、GD2、TAG72、MUC16或BCMA中的至少一者。在一些实施例中,本文提供的CAR-T细胞通过嵌合抗原受体靶向CD19或BCMA中的至少一者。在一些实施例中,本文提供的CAR-T细胞通过嵌合抗原受体靶向CD19。在一些实施例中,本文提供的CAR-T细胞通过嵌合抗原受体靶向BCMA。在一些实施例中,本文提供的CAR-NK细胞通过嵌合抗原受体靶向CD19、FLT3、CD20、CD38、CD138、BCMS、CS1、CD3、CD5、CD7、NKG2D、HER2、EGFR、EpCAM、TF、B7-H6、HLA-G、CD24、CD44、CD133、间皮素或αFR中的至少一者。在一些实施例中,本文提供的CAR-M细胞通过嵌合抗原受体靶向CD19、HER2、CD22或ALK19中的至少一者。在一些实施例中,本文提供的CAR-NK细胞被工程化以表达IL-2和/或IL-15。在一些实施例中,本文提供的CAR-NKT细胞通过嵌合抗原受体靶向GD2,并被工程化以表达IL-15。在一些实施例中,本文所述的免疫细胞复原方法在细胞治疗产品的制造期间或之后离体进行。在其他实施例中,对细胞和/或免疫细胞的此类工程化在离体进行,例如,在CAR工程化细胞的所谓“原位”产生中。在此类实施例中,将编码本公开的含脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物中所含的CAR或生长因子或细胞因子的RNA和/或mRNA体内注射到受试者或患者体内,例如,用于对患者的免疫细胞(诸如T细胞、NK细胞、巨噬细胞、肿瘤浸润淋巴细胞、树突状细胞和/或“原位”NKT细胞)的CAR工程化,即在患者体内,无需去除细胞即可体外转染。在此类实施例中,本文所述的免疫细胞复原方法也在体内进行,其中在mRNA编码

CAR或其他细胞工程分子之前、同时或之后将编码一个或多个重编程因子的mRNA注射到患者体内。在一些实施例中,本公开的脂质和脂质-纳米颗粒组合物被选择用于靶向递送至体内任何细胞,包括免疫细胞,诸如T细胞、NK细胞、巨噬细胞、肿瘤浸润细胞、树突细胞和/或体内NKT细胞。在其他实施例中,体内治疗在不存在任何其他体内细胞工程化的情况下进行,以增强或恢复免疫系统的效力并治疗与免疫功能障碍或失调相关的疾病,诸如改善免疫系统对抗癌症或感染的效果或减少炎症。

[0601] 本技术的方法和组合物也可以应用于免疫细胞的复原,其中要复原的免疫细胞为非贴壁细胞,诸如非贴壁免疫细胞。在一些实施例中,以其中细胞保持非贴壁而不贴附于组织培养基质或形成或产生粘附于组织培养基质的细胞或细胞集落的方式处理、瞬时重编程、复原或制造非贴壁细胞,包括非贴壁免疫细胞。在一些实施例中,选择重编程间隔和因子,使得复原细胞并保留细胞特性,其中细胞保持非贴壁而不贴附于组织培养基质或形成或产生贴附于组织培养基质的细胞或细胞集落。因此,在一些实施例中,本技术提供了用于递送编码至少一种用于细胞复原的重编程因子的mRNA的含脂质组合物和脂质-纳米颗粒组合物,其中,以其中复原细胞并保留细胞特性并且其中细胞保持在悬浮液中而不贴壁、它们也不变成或产生贴壁的细胞、变得贴壁或形成贴壁集落的方式重编程细胞,包括任何非贴壁细胞和/或非贴壁免疫细胞(例如,非贴壁T细胞、NK细胞、巨噬细胞、肿瘤浸润细胞、树突细胞和/或NKT细胞)。

[0602] 本文所述的方法(包括复原免疫细胞的方法;逆转、预防或抑制免疫细胞的衰竭的方法;或诱导免疫细胞的增殖)包括在约1、2、3、4、5、6、7、8、9或10天的时期内向免疫细胞施用约1、2、3、4、5、6、7、8、9或10次本公开的包含提供编码至少一个重编程因子的mRNA的含脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物。例如,可以在五天或六天时期的第一天或第二天施用一次mRNA,或者可以在五天或六天时期的第一天施用一次并在第三天施用一次,或者可以在一天时期内施用一次。在一些实施例中,在1、2、3、4、5或6天的时期内向免疫细胞施用1、2、3、4、5或6次mRNA。在一些实施例中,在免疫细胞活化步骤之后施用mRNA。在一些实施例中,免疫细胞活化步骤包括活化免疫细胞1、2或3天。在一些实施例中,免疫细胞活化步骤包括使用CD3、CD28和IL-2中的至少一者来活化免疫细胞。在一些实施例中,用CD3和CD28活化免疫细胞。在一些实施例中,mRNA施用期在免疫细胞活化步骤之后立即发生。在一些实施例中,mRNA施用期在免疫细胞活化步骤之后1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天发生。在一些实施例中,施用编码重编程因子的mRNA逆转由免疫细胞活化步骤引起的免疫细胞衰竭。在一些实施例中,施用编码重编程因子的mRNA逆转来自老年患者或供体的免疫细胞中的免疫细胞衰竭。在一些实施例中,在用于制造用于移植的免疫细胞(例如CAR-T、CAR-M或CAR-NK细胞)的制造工艺期间施用mRNA。

[0603] 与使用不同的mRNA递送机制相比,使用本技术的脂质或脂质纳米颗粒用于递送mRNA提供在使用本文的方法或组合物治疗或复原的细胞中增强的复原、增殖、衰竭恢复或预防、治疗效果、抗病原效果、抗癌效果、抗免疫原性效果或抗炎效果。在一些实施例中,此类增强的复原、增殖、衰竭恢复或预防、治疗效果、抗病原效果、抗癌效果、抗免疫原性效果或抗炎效果归因于与不同的递送机制比较时的较低毒性、免疫原性和/或对细胞的较低生理影响。在一些实施例中,不同的递送机制为电穿孔,使得与使用电穿孔时相比,使用本公开的脂质或脂质-纳米颗粒组合物用于递送mRNA导致在使用本文的方法或组合物治疗或复

原的细胞中增强的复原、增殖、衰竭恢复或预防、治疗效果、抗病原效果、抗癌效果、抗免疫原效果或抗炎效果。与电穿孔相比的此类改进可以归因于与电穿孔相比毒性降低或对细胞的生理影响降低。

[0604] 本技术的脂质或脂质-纳米颗粒组合物在将治疗剂或诊断剂递送至皮肤的方法中使用,诸如施用包含至少一种治疗剂或诊断剂的含脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物。在一些实施例中,本技术的脂质或脂质-纳米颗粒组合物以实现细胞(诸如皮肤细胞或免疫细胞)的瞬时重编程的方式提供治疗剂或诊断剂(诸如重编程因子)的递送。在一些实施例中,细胞的瞬时重编程提供治疗剂或诊断剂(诸如重编程因子)的瞬时表达,其中该药剂在细胞中表达足以重编程和/或恢复而不改变细胞的特性的持续时间,即恢复皮肤或免疫细胞,以表现出特征或更年轻的皮肤或免疫细胞,同时保留皮肤或免疫细胞的特性。

[0605] 在一些情况下,本技术的治疗剂为本文公开的mRNA。在一些方面,本公开的脂质或脂质-纳米颗粒组合物在治疗或预防皮肤病学疾病或病症、治疗或预防皮肤的疾病或病症的方法中使用或用于皮肤中的美容应用,包括施用包含至少一种治疗剂或诊断剂的含脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物。在一些方面,本公开的脂质或脂质-纳米颗粒组合物在复原皮肤的方法中使用,包括施用包含治疗剂或诊断剂的含脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物。在一些方面,本公开的脂质或脂质-纳米颗粒组合物在复原皮肤的方法中使用,包括施用包含编码至少一个重编程因子的mRNA的含脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物。在此类方法中,mRNA可以结合至脂质或包含在脂质纳米颗粒中。在一些方面,此类方法进一步包括用含脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物转染皮肤细胞以递送mRNA。在一些方面,本公开的脂质或脂质-纳米颗粒组合物用在复原皮肤的方法中使用,包括施用包含编码至少一个重编程因子的mRNA的含脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物,以实现皮肤的复原,同时保留细胞特性。在此类方法中,mRNA可以结合至脂质或包含在脂质纳米颗粒中。在一些方面,本公开的脂质或脂质-纳米颗粒组合物在复原皮肤的方法中使用,包括向皮肤细胞施用包含编码至少一个重编程因子的mRNA的含脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物,其中在皮肤细胞中表达至少一个重编程因子导致增加的成纤维细胞增殖并保留皮肤细胞特性。在此类方法中,mRNA可以结合至脂质或包含在脂质纳米颗粒中。

[0606] 脂质或脂质-纳米颗粒组合物可以在伤口愈合的方法中使用,包括施用包含治疗剂或诊断剂的含脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物。在一些方面,脂质或脂质-纳米颗粒组合物在伤口愈合的方法中使用,包括施用包含编码至少一个重编程因子的mRNA的含脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物。在此类方法中,mRNA可以结合至脂质或包含在脂质纳米颗粒中。在一些方面,脂质或脂质-纳米颗粒组合物在伤口愈合的方法中使用,其中含脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物递送编码至少一个重编程因子的mRNA,以实现伤口愈合,同时保留细胞特性。在此类方法中,mRNA可以结合至脂质或包含在脂质纳米颗粒中。在一些方面,本公开的脂质或脂质-纳米颗粒组合物在伤口愈合的方法中使用,包括向皮肤细胞施用包含编码至少一个重编程因子的mRNA的含脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物,其中在皮肤细胞中表达至少一个重编程因子导致增加的成纤维细胞增殖。在此类方法中,mRNA可以结合至脂质或包含在脂质纳米颗粒中。

[0607] 脂质或脂质-纳米颗粒组合物可以在治疗或预防皮肤病学疾病或病症、治疗或预防皮肤疾病或病症的方法中使用或用于皮肤中的美容应用,包括施用包含治疗剂的含脂质

组合物或脂质-纳米颗粒组合物,以实现至少一个皮肤老化标志物的逆转。在一些方面,脂质或脂质-纳米颗粒组合物在复原皮肤的方法中使用,包括施用含脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物,以将编码至少一个重编程因子的mRNA递送至皮肤,从而实现至少一个皮肤老化标志物的逆转,同时保留细胞特性。在一些方面,脂质或脂质-纳米颗粒组合物在伤口愈合的方法中使用,包括施用含脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物,以将编码至少一个重编程因子的mRNA递送至皮肤细胞,从而实现至少一个皮肤老化标志物的逆转,同时保留细胞特性。在一些实施例中,至少一个皮肤老化标志物的逆转是指产生复原细胞,该复原细胞以类似于与老化皮肤细胞相比在年轻皮肤细胞中看到的所述标志物的表达的方式表达至少一个皮肤老化标志物。

[0608] 根据本技术可能受影响的标志物包括IL6、CXCL8、CSF3、CXCL1、SERPINB2、LIF、IL11、CXCL2、IL24、PTGS2、MMP3、CCL2、TFPI2、IER3、ACKR3、PTGES、SLC16A6、TNFAIP6、PTPRN、IL1RN、IL1B、CXCL5、CXCL6、HAS1、HSD11B1、CH25H、ADGRD1、C3、RASD1、NR4A3、STC1、TCIM、SRGN、AC003092.1、LRRN3、CHI3L1、NR4A2、NAMPT、PRSS23、MMP1、SOD2、LOXL4、MMP11、ELN、CREG1、C15orf48、NFKBIZ、PID1或它们的任何组合的mRNA或蛋白质表达。在一些方面,至少一个皮肤老化标志物的逆转是IL6、CXCL8、CSF3、CXCL1、SERPINB2、LIF、IL11、CXCL2、IL24、PTGS2、MMP3、CCL2、TFPI2、IER3、ACKR3、PTGES、SLC16A6、TNFAIP6、PTPRN、IL1RN、IL1B、CXCL5、CXCL6、HAS1、HSD11B1、CH25H、ADGRD1、C3、RASD1、NR4A3、STC1、TCIM、SRGN、AC003092.1、LRRN3、CHI3L1、NR4A2、NAMPT、MMP1、SOD2、CREG1、C15orf48、NFKBIZ、PID1或它们的任何组合的mRNA或蛋白质表达的下调。在一些方面,至少一个皮肤老化标志物的逆转是PRSS23、LOXL4、MMP11、ELN或它们的任何组合的mRNA或蛋白质表达的上调。在一些方面,至少一个皮肤老化标志物的逆转是PRSS23的mRNA或蛋白质表达的上调。在一些方面,至少一个皮肤老化标志物的逆转是LOXL4的mRNA或蛋白质表达的上调。在一些方面,至少一个皮肤老化标志物的逆转是MMP11的mRNA或蛋白质表达的上调。在一些方面,至少一个皮肤老化标志物的逆转是ELN的mRNA或蛋白质表达的上调。在一些方面,至少一个皮肤老化标志物的逆转是MMP3、MMP1、SOD2或它们的任何组合的mRNA或蛋白质表达的下调。在一些方面,至少一个皮肤老化标志物的逆转是MMP3的mRNA或蛋白质表达的下调。在一些方面,至少一个皮肤老化标志物的逆转是MMP1的mRNA或蛋白质表达的下调。在一些方面,至少一个皮肤老化标志物的逆转是SOD2的mRNA或蛋白质表达的下调。在一些方面,至少一个皮肤老化标志物的逆转是PRSS23、LOXL4、MMP11或ELN中的至少一者的mRNA或蛋白质表达的上调;MMP3、MMP1、SOD2中的至少一者的mRNA或蛋白质表达的下调;或它们的任何组合。

[0609] 脂质或脂质-纳米颗粒组合物可以在治疗或预防皮肤病学疾病或病症、治疗或预防皮肤疾病或病症的方法中使用或用于皮肤中的美容应用,包括施用包含治疗剂的含脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物,以实现至少一个皮肤质量标志物的改善。在一些方面,脂质或脂质-纳米颗粒组合物在复原皮肤的方法中使用,包括向皮肤细胞施用包含编码至少一个重编程因子的mRNA的含脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物,以实现至少一个皮肤质量标志物的改善。在一些实施例中,脂质或脂质-纳米颗粒组合物在复原皮肤的方法中使用,包括施用包含编码至少一个重编程因子的mRNA的含脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物,以实现至少一个皮肤质量标志物的改善,同时保留细胞特性。

[0610] 脂质或脂质-纳米颗粒组合物可以在伤口愈合的方法中使用,包括向皮肤细胞施

用包含编码至少一个重编程因子的mRNA的含脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物,以实现至少一个皮肤质量标志物的改善。在一些方面,标志物为I型胶原、III型胶原、V型胶原、VI型胶原、XI型胶原、弹力素、微原纤维相关蛋白5、骨膜素、多功能蛋白聚糖、结缔组织生长因子、赖氨酰氧化酶、SPARC、分泌型磷酸蛋白1、软骨寡聚基质蛋白、MMP1、MMP3、MMP12、SOD2或它们的任何组合的mRNA或蛋白质表达。在一些方面,至少一个皮肤质量标志物的改善是MMP1、MMP3、MMP12、SOD2或它们的任何组合的mRNA或蛋白质表达的下调。在一些方面,至少一个皮肤质量标志物的改善是I型胶原、III型胶原、IV型胶原、V型胶原、VI型胶原、XI型胶原、弹力素、微原纤维相关蛋白5、骨膜素、多功能蛋白聚糖、结缔组织生长因子、赖氨酰氧化酶、SPARC、分泌型磷酸蛋白1、软骨寡聚基质蛋白或它们的任何组合的mRNA或蛋白质表达的上调。在一些方面,至少一个皮肤质量标志物的改善是胶原的mRNA或蛋白质表达的上调。在一些方面,至少一个皮肤质量标志物的改善是I型胶原的mRNA或蛋白质表达的上调。在一些方面,至少一个皮肤质量标志物的改善是III型胶原的mRNA或蛋白质表达的上调。在一些方面,至少一个皮肤质量标志物的改善是IV型胶原的mRNA或蛋白质表达的上调。在一些方面,至少一个皮肤质量标志物的改善是V型胶原的mRNA或蛋白质表达的上调。在一些方面,至少一个皮肤质量标志物的改善是VI型胶原的mRNA或蛋白质表达的上调。在一些方面,至少一个皮肤质量标志物的改善是XI型胶原的mRNA或蛋白质表达的上调。在一些方面,至少一个皮肤质量标志物的改善是XI型胶原的mRNA或蛋白质表达的上调。在一些方面,至少一个皮肤质量标志物的改善是弹力素的mRNA或蛋白质表达的上调。在一些方面,至少一个皮肤质量标志物的改善是微原纤维相关蛋白5的mRNA或蛋白质表达的上调。在一些方面,至少一个皮肤质量标志物的改善是骨膜素的mRNA或蛋白质表达的上调。在一些方面,至少一个皮肤质量标志物的改善是多功能蛋白聚糖的mRNA或蛋白质表达的上调。在一些方面,至少一个皮肤质量标志物的改善是结缔组织生长因子的mRNA或蛋白质表达的上调。在一些方面,至少一个皮肤质量标志物的改善是赖氨酰氧化酶的mRNA或蛋白质表达的上调。在一些方面,至少一个皮肤质量标志物的改善是SPARC的mRNA或蛋白质表达的上调。在一些方面,至少一个皮肤质量标志物的改善是分泌型磷酸蛋白1的mRNA或蛋白质表达的上调。在一些方面,至少一个皮肤质量标志物的改善是软骨寡聚基质蛋白的mRNA或蛋白质表达的上调。在一些方面,至少一个皮肤质量标志物的改善是MMP3、MMP1、SOD2或它们的任何组合的mRNA或蛋白质表达的下调。在一些方面,至少一个皮肤质量标志物的改善是MMP3的mRNA或蛋白质表达的下调。在一些方面,至少一个皮肤质量标志物的改善是MMP1的mRNA或蛋白质表达的下调。在一些方面,至少一个皮肤质量标志物的改善是SOD2的mRNA或蛋白质表达的下调。在一些方面,至少一个皮肤质量标志物的改善是胶原VII和弹力素的mRNA或蛋白质表达的上调。在一些方面,至少一个皮肤质量标志物的改善是胶原VII和弹力素中至少一者的mRNA或蛋白质表达的上调;MMP3、MMP1、SOD2中的至少一者的mRNA或蛋白质表达的下调;或它们的任何组合。

[0611] 本公开的脂质-纳米颗粒组合物或含脂质组合物可以向皮肤局部施用。在一些方面,以软膏、霜或药膏的形式向皮肤施用本公开的脂质-纳米颗粒组合物或含有本公开的脂质的组合物。在一些方面,经由真皮、皮内或皮下注射向皮肤施用本公开的脂质-纳米颗粒组合物或含有本公开的脂质的组合物。在一些方面,经由凝胶向皮肤施用本公开的脂质-纳米颗粒组合物或含有本公开的脂质的组合物。在一些方面,在体内、体外或离体施用本公开

的脂质-纳米颗粒组合物或含有本公开的脂质的组合物。在一些方面,在体内施用本公开的脂质-纳米颗粒组合物或含有本公开的脂质的组合物。在一些方面,本公开的脂质-纳米颗粒组合物或含有本公开的脂质的组合物用于人类或动物受试者。

[0612] 本公开的脂质-纳米颗粒组合物或含脂质组合物可以转染皮肤细胞以将至少一种治疗剂或诊断剂递送到皮肤细胞中。在一些方面,治疗剂为核酸。在一些方面,治疗剂为mRNA。在一些方面,治疗剂为mRNA和siRNA的组合。在一些方面,治疗剂为mRNA和miRNA的组合。在一些方面,皮肤细胞为角质形成细胞、黑素细胞、朗格汉斯细胞、卵泡细胞、成纤维细胞、内皮细胞、平滑肌细胞、默克尔细胞、基底细胞、鳞状细胞、顶浆腺细胞、小汗腺细胞、皮脂腺细胞、淋巴内皮细胞或它们的组合。在一些方面,选择脂质或脂质-纳米颗粒组合物以提供对特定细胞类型或多种细胞类型的进行选择性转染。在一些方面,选择脂质或脂质-纳米颗粒组合物以提供在皮肤内或在皮肤的至少一层内的扩散。

[0613] 可以治疗或预防的疾病或病症包括皮肤病学疾病或病症或者可以使用本技术的脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物来治疗或预防的所治疗的皮肤的疾病或病症。例如,可以根据本技术治疗皮肤疏松症或慢性伤口。在一些方面,皮肤疏松症或慢性伤口为糖尿病性溃疡、缺血性溃疡和压疮。在一些方面,使用本公开的脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物治疗或预防的皮肤病学疾病或病症或者皮肤的疾病或病症为炎性皮肤病。在一些方面,炎性皮肤病为牛皮癣、特应性皮炎、白癜风、斑秃或化脓性汗腺炎。在一些方面,使用本公开的脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物治疗或预防的皮肤病学疾病或病症或者皮肤的疾病或病症为毛发疾患。在一些方面,毛发疾患为非疤痕性或疤痕性脱发、毛发花白、多毛症。在一些方面,毛发疾患为非疤痕性脱发,其为雄激素性脱发。在一些方面,疤痕性脱发为毛发扁平苔藓。在一些方面,使用本公开的脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物治疗或预防的皮肤病学疾病或病症或者皮肤的疾病或病症为皮肤癌。在一些方面,皮肤癌为基底细胞癌、鳞状细胞癌或光化性角化病。在一些方面,使用本公开的脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物治疗或预防的皮肤病学疾病或病症或者皮肤的疾病或病症为结节性痒疹、痤疮、红斑痤疮或日光性雀斑。在一些方面,治疗皮肤病学疾病或病症或者疾病中的任何一者的方法包括施用包含治疗剂的含有本公开的脂质的组合物或本公开的包含治疗剂的脂质-纳米颗粒组合物。在一些方面,治疗剂为mRNA。在一些方面,治疗剂为编码抗体、人类抗体、人源化抗体、纳米抗体、骆驼抗体、双特异性抗体、酶、基因组编辑酶或核酸酶、生长因子、细胞因子、趋化因子、转录因子、结构分子、信号传导分子、重编程因子的mRNA。在一些方面,治疗剂为编码在细胞内起作用的蛋白质或肽的mRNA。在一些方面,治疗剂为编码至少一个重编程因子的mRNA。

[0614] 脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物可以在伤口愈合的方法中使用,其中伤口是皮肤疏松症或慢性伤口。在一些方面,皮肤疏松症或慢性伤口为糖尿病性溃疡、缺血性溃疡和压疮。在一些方面,本公开的脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物在伤口愈合的方法中使用,其中伤口为来自皮肤癌的病变。在一些方面,皮肤癌为基底细胞癌、鳞状细胞癌或光化性角化病。在一些方面,上述伤口愈合方法中的任何伤口愈合方法包括施用包含治疗剂的含有本公开的脂质的组合物或包含治疗剂的脂质-纳米颗粒组合物。在一些方面,治疗剂为mRNA。在一些方面,治疗剂为编码抗体、人类抗体、人源化抗体、纳米抗体、骆驼抗体、双特异性抗体、酶、基因组编辑酶或核酸酶、生长因子、细胞因子、趋化因子、转录因子、结构分子、

信号传导分子、重编程因子的mRNA。在一些方面,治疗剂为编码在细胞内起作用的蛋白质或肽的mRNA。在一些方面,治疗剂为编码至少一个重编程因子的mRNA。

[0615] 脂质-纳米颗粒组合物可以含有脂质式(II)并且与含有脂质式(II)的其他脂质-纳米颗粒组合物或含有本文所述的其他脂质的其他脂质的其他脂质-纳米颗粒组合物相比,在皮肤细胞中具有更高的转染效率。此类包含脂质式(II)的组合物当用于转染至少一个重编程因子时,与其他调配物或与含有本文所述的其他脂质的脂质-纳米颗粒组合物相比,可以产生至少一个皮肤质量标志物的更大改善。

[0616] 在实施例中,与含有本文所述的其他脂质的脂质-纳米颗粒组合物相比,含有脂质式(I-B)的脂质-纳米颗粒组合物提供更高的转染效率。在实施例中,与具有相同头部基团的含有脂质式(I)的脂质-纳米颗粒组合物相比,含有脂质式(I-B)的脂质-纳米颗粒组合物提供更高的转染效率。在实施例中,与含有本文所述的其他脂质的脂质-纳米颗粒组合物相比,含有脂质式(I-B)的脂质-纳米颗粒组合物在皮肤细胞中提供更高的转染效率。在实施例中,与具有相同头部基团的含有脂质式(I)的脂质-纳米颗粒组合物相比,含有脂质式(I-B)的脂质-纳米颗粒组合物在皮肤细胞中提供更高的转染效率。在实施例中,与含有本文所述的其他脂质的脂质-纳米颗粒组合物相比,含有脂质式(I-B)的脂质-纳米颗粒组合物在成纤维细胞中提供更高的转染效率。在实施例中,与具有相同头部基团的含有脂质式(I)的脂质-纳米颗粒组合物相比,含有脂质式(I-B)的脂质-纳米颗粒组合物在成纤维细胞中提供更高的转染效率。在实施例中,与含有本文所述的其他脂质的脂质-纳米颗粒组合物相比,含有脂质式(I-B)的脂质-纳米颗粒组合物在免疫细胞中提供更高的转染效率。在实施例中,与具有相同头部基团的含有脂质式(I)的脂质-纳米颗粒组合物相比,含有脂质式(I-B)的脂质-纳米颗粒组合物在免疫细胞中提供更高的转染效率。在实施例中,与含有本文所述的其他脂质的脂质-纳米颗粒组合物相比,含有脂质式(I-B)的脂质-纳米颗粒组合物在T细胞中提供更高的转染效率。在实施例中,与具有相同头部基团的含有脂质式(I)的脂质-纳米颗粒组合物相比,含有脂质式(I-B)的脂质-纳米颗粒组合物在T细胞中提供更高的转染效率。在实施例中,脂质式(I-B)的尾部结构为脂质-纳米颗粒组合物提供增加的转染效率。在实施例中,与脂质-纳米颗粒组合物的非支链烷基或烯基尾部结构相比,脂质式(I-B)的尾部结构提供增加的转染效率。在实施例中,与具有相同头部基团的脂质式(I)尾部结构相比,脂质式(I-B)的尾部结构为脂质-纳米颗粒组合物提供增加的转染效率。在实施例中,本文所述的脂质的尾部结构中与烷基基团的支化相邻的酯基团为脂质-纳米颗粒组合物提供增加的转染效率。在实施例中,与没有支化的烷基或烯基尾部结构相比,本文所述的脂质的尾部结构中与烷基基团的支化相邻的酯基团为脂质-纳米颗粒组合物提供了增加的转染效率。

[0617] 在实施例中,与含有本文所述的其他脂质的脂质-纳米颗粒组合物相比,含有脂质式(I-B)的脂质-纳米颗粒组合物提供更高的活力。在实施例中,与具有相同头部基团的含有脂质式(I)的脂质-纳米颗粒组合物相比,含有脂质式(I-B)的脂质-纳米颗粒组合物提供更高的活力。在实施例中,与含有本文所述的其他脂质的脂质-纳米颗粒组合物相比,含有脂质式(I-B)的脂质-纳米颗粒组合物在皮肤细胞中提供更高的活力。在实施例中,与具有相同头部基团的含有脂质式(I)的脂质-纳米颗粒组合物相比,含有脂质式(I-B)的脂质-纳米颗粒组合物在皮肤细胞中提供更高的活力。在实施例中,与含有本文所述的其他脂质的

脂质-纳米颗粒组合物相比,含有脂质式(I-B)的脂质-纳米颗粒组合物在成纤维细胞中提供更高的活力。在实施例中,与具有相同头部基团的含有脂质式(I)的脂质-纳米颗粒组合物相比,含有脂质式(I-B)的脂质-纳米颗粒组合物在成纤维细胞中提供更高的活力。在实施例中,与含有本文所述的其他脂质的脂质-纳米颗粒组合物相比,含有脂质式(I-B)的脂质-纳米颗粒组合物在免疫细胞中提供更高的活力。在实施例中,与具有相同头部基团的含有脂质式(I)的脂质-纳米颗粒组合物相比,含有脂质式(I-B)的脂质-纳米颗粒组合物在免疫细胞中提供更高的活力。在实施例中,与含有本文所述的其他脂质的脂质-纳米颗粒组合物相比,含有脂质式(I-B)的脂质-纳米颗粒组合物在T细胞中提供更高的活力。在实施例中,与具有相同头部基团的含有脂质式(I)的脂质-纳米颗粒组合物相比,含有脂质式(I-B)的脂质-纳米颗粒组合物在T细胞中提供更高的活力。在实施例中,脂质式(I-B)的尾部结构为脂质-纳米颗粒组合物提供增加的活力。在实施例中,与非支化烷基或烯基尾部结构相比,脂质式(I-B)的尾部结构为脂质-纳米颗粒组合物提供增加的活力。在实施例中,与脂质式(I)的尾部结构相比,脂质式(I-B)的尾部结构为脂质-纳米颗粒组合物提供增加的活力。在实施例中,本文所述的脂质的尾部结构中与烷基基团的支化相邻的酯基团为脂质-纳米颗粒组合物提供增加的活力。在实施例中,与没有支化的烷基或烯基尾部结构相比,本文所述的脂质的尾部结构中与烷基基团的支化相邻的酯基团为脂质-纳米颗粒组合物提供了增加的活力。在实施例中,脂质式(I-B)的尾部结构中与R6和R7以及与R8和R10相邻的酯基团与R6、R7、R8和R10的支化一起为脂质-纳米颗粒组合物提供增加的活力。在实施例中,脂质式(I-B)的尾部结构中与R6和R7以及与R8和R10相邻的酯基团与R6、R7、R8和R10的支化一起为脂质-纳米颗粒组合物提供与没有支化的烷基或烯基尾部结构相比增加的活力。

[0618] 在实施例中,与含有本文所述的其他脂质的脂质-纳米颗粒组合物相比,含有脂质式(I-B)的脂质-纳米颗粒组合物提供更高的活力和更高的转染效率两者。在实施例中,与具有相同头部基团的含有脂质式(I)的脂质-纳米颗粒组合物相比,含有脂质式(I-B)的脂质-纳米颗粒组合物提供更高的活力和更高的转染效率两者。在实施例中,与含有本文所述的其他脂质的脂质-纳米颗粒组合物相比,含有脂质式(I-B)的脂质-纳米颗粒组合物在皮肤细胞中提供更高的活力和更高的转染效率两者。在实施例中,与具有相同头部基团的含有脂质式(I)的脂质-纳米颗粒组合物相比,含有脂质式(I-B)的脂质-纳米颗粒组合物在皮肤细胞中提供更高的活力和更高的转染效率两者。在实施例中,与含有本文所述的其他脂质的脂质-纳米颗粒组合物相比,含有脂质式(I-B)的脂质-纳米颗粒组合物在成纤维细胞中提供更高的活力和更高的转染效率两者。在实施例中,与具有相同头部基团的含有脂质式(I)的脂质-纳米颗粒组合物相比,含有脂质式(I-B)的脂质-纳米颗粒组合物在成纤维细胞中提供更高的活力和更高的转染效率两者。在实施例中,与含有本文所述的其他脂质的脂质-纳米颗粒组合物相比,含有脂质式(I-B)的脂质-纳米颗粒组合物在免疫细胞中提供更高的活力和更高的转染效率两者。在实施例中,与具有相同头部基团的含有脂质式(I)的脂质-纳米颗粒组合物相比,含有脂质式(I-B)的脂质-纳米颗粒组合物在免疫细胞中提供更高的活力和更高的转染效率两者。在实施例中,与含有本文所述的其他脂质的脂质-纳米颗粒组合物相比,含有脂质式(I-B)的脂质-纳米颗粒组合物在T细胞中提供更高的活力和更高的转染效率两者。在实施例中,与具有相同头部基团的含有脂质式(I)的脂质-纳米颗粒组合物相比,含有脂质式(I-B)的脂质-纳米颗粒组合物在T细胞中提供更高的活力和更

高的转染效率两者。在实施例中,脂质式(I-B)的尾部结构提供增加的转染效率和增加的活力两者。在实施例中,脂质式(I-B)的尾部结构提供与没有支化的烷基或烯基尾部结构相比增加的转染效率和增加的活力两者。在实施例中,与脂质式(I)的尾部结构相比,脂质式(I-B)的尾部结构为脂质-纳米颗粒组合物提供增加的转染效率和增加的活力两者。在实施例中,本文所述的脂质的尾部结构中与烷基基团的支化相邻的酯基团为脂质-纳米颗粒组合物提供增加的转染效率和增加的活力两者。在实施例中,脂质式(I-B)的尾部结构中与R6和R7以及与R8和R10相邻的酯基团与R6、R7、R8和R10的支化一起为脂质-纳米颗粒组合物提供增加的转染效率和增加的活力两者。在实施例中,脂质式(I-B)的尾部结构中与R6和R7以及与R8和R10相邻的酯基团与R6、R7、R8和R10的支化一起为脂质-纳米颗粒组合物提供与没有支化的烷基或烯基尾部结构相比增加的转染效率和增加的活力两者。

[0619] 当用于将至少一个重编程因子转染至皮肤细胞中时,与含有本文所述的其他脂质的脂质-纳米颗粒组合物相比,包含脂质式(I-B)的此类组合物可以产生至少一个皮肤复原标志物或皮肤质量标志物的更大改善。当用于将至少一个重编程因子转染至皮肤细胞中时,与具有相同头部基团的包含脂质式(I)的脂质-纳米颗粒组合物,包含脂质式(I-B)的此类组合物可以产生至少一个皮肤复原标志物或皮肤质量标志物的更大改善。当用于将至少一个重编程因子转染至免疫细胞中时,与含有本文所述的其他脂质的脂质-纳米颗粒组合物相比,包含脂质式(I-B)的此类组合物可以产生至少一个免疫细胞复原标志物或免疫细胞干性标志物的更大改善。当用于将至少一个重编程因子转染至免疫细胞中时,与具有相同头部基团的含有脂质式(I)的脂质-纳米颗粒组合物相比,包含脂质式(I-B)的此类组合物可以产生至少一个免疫细胞复原标志物或干性复原标志物的更大改善。

[0620] 在实施例中,与含有本文所述的其他脂质的脂质-纳米颗粒组合物相比,含有其中q1不存在且q2为1的脂质式(I)的脂质-纳米颗粒组合物提供更高的转染效率。在实施例中,与含有其中q1为1且q2不存在的(I)的脂质-纳米颗粒组合物相比,含有其中q1不存在且q2为1的脂质式(I)的脂质-纳米颗粒组合物提供更高的转染效率。在实施例中,与含有本文所述的其他脂质的脂质-纳米颗粒组合物相比,含有其中q1不存在且q2为1的脂质式(I)的脂质-纳米颗粒组合物在皮肤细胞中提供更高的转染效率。在实施例中,与含有其中q1为1且q2不存在的脂质式(I)的脂质-纳米颗粒组合物相比,含有其中q1不存在且q2为1的脂质式(I)的脂质-纳米颗粒组合物在皮肤细胞中提供更高的转染效率。在实施例中,与含有本文所述的其他脂质的脂质-纳米颗粒组合物相比,含有其中q1不存在且q2为1的脂质式(I)的脂质-纳米颗粒组合物在成纤维细胞中提供更高的转染效率。在实施例中,与含有其中q1为1且q2不存在的脂质式(I)的脂质-纳米颗粒组合物相比,含有其中q1不存在且q2为1的脂质式(I)的脂质-纳米颗粒组合物在成纤维细胞中提供更高的转染效率。在实施例中,与含有本文所述的其他脂质的脂质-纳米颗粒组合物相比,含有其中q1不存在且q2为1的脂质式(I)的脂质-纳米颗粒组合物在免疫细胞中提供更高的转染效率。在实施例中,与含有其中q2不存在且q1为1的脂质式(I)的脂质-纳米颗粒组合物相比,含有其中q1不存在且q2为1的脂质式(I)的脂质-纳米颗粒组合物在免疫细胞中提供更高的转染效率。在实施例中,与含有本文所述的其他脂质的脂质-纳米颗粒组合物相比,含有其中q1不存在且q2为1的脂质式(I)的脂质-纳米颗粒组合物在T细胞中提供更高的转染效率。在实施例中,与含有其中q1为1且q2不存在的脂质式(I)的脂质-纳米颗粒组合物相比,含有其中q1不存在且q2为1的脂质

式(I)的脂质-纳米颗粒组合物在T细胞中提供更高的转染效率。

[0621] 在实施例中,与含有本文所述的其他脂质的脂质-纳米颗粒组合物相比,含有其中q1不存在且q2为1的脂质式(I)的脂质-纳米颗粒组合物提供更高的活力。在实施例中,与含有其中q1为1且q2不存在的脂质式(I)的脂质-纳米颗粒组合物相比,含有其中q1不存在且q2为1的脂质式(I)的脂质-纳米颗粒组合物提供更高的活力。在实施例中,与含有本文所述的其他脂质的脂质-纳米颗粒组合物相比,含有其中q1不存在且q2为1的脂质式(I)的脂质-纳米颗粒组合物在皮肤细胞中提供更高的活力。在实施例中,与含有其中q1为1且q2不存在的脂质式(I)的脂质-纳米颗粒组合物相比,含有其中q1不存在且q2为1的脂质式(I)的脂质-纳米颗粒组合物在皮肤细胞中提供更高的活力。在实施例中,与含有本文所述的其他脂质的脂质-纳米颗粒组合物相比,含有其中q1不存在且q2为1的脂质式(I)的脂质-纳米颗粒组合物在成纤维细胞中提供更高的活力。在实施例中,与含有其中q1为1且q2不存在的脂质式(I)的脂质-纳米颗粒组合物相比,含有其中q1不存在且q2为1的脂质式(I)的脂质-纳米颗粒组合物在成纤维细胞中提供更高的活力。在实施例中,与含有本文所述的其他脂质的脂质-纳米颗粒组合物相比,含有其中q1不存在且q2为1的脂质式(I)的脂质-纳米颗粒组合物在免疫细胞中提供更高的活力。在实施例中,与含有其中q1为1且q2不存在的脂质式(I)的脂质-纳米颗粒组合物相比,含有其中q1不存在且q2为1的脂质式(I)的脂质-纳米颗粒组合物在免疫细胞中提供更高的活力。在实施例中,与含有本文所述的其他脂质的脂质-纳米颗粒组合物相比,含有其中q1不存在且q2为1的脂质式(I)的脂质-纳米颗粒组合物在T细胞中提供更高的活力。在实施例中,与含有其中q1为1且q2不存在的脂质式(I)的脂质-纳米颗粒组合物相比,含有其中q1不存在且q2为1的脂质式(I)的脂质-纳米颗粒组合物在T细胞中提供更高的活力。

[0622] 在实施例中,与含有本文所述的其他脂质的脂质-纳米颗粒组合物相比,含有其中q1不存在且q2为1的脂质式(I)的脂质-纳米颗粒组合物提供更高的活力和更高的转染效率两者。在实施例中,与含有其中q1为1且q2不存在的脂质式(I)的脂质-纳米颗粒组合物相比,含有其中q1不存在且q2为1的脂质式(I)的脂质-纳米颗粒组合物提供更高的活力和更高的转染效率两者。在实施例中,与含有本文所述的其他脂质的脂质-纳米颗粒组合物相比,含有其中q1不存在且q2为1的脂质式(I)的脂质-纳米颗粒组合物在皮肤细胞中提供更高的活力和更高的转染效率两者。在实施例中,与含有其中q1为1且q2不存在的脂质式(I)的脂质-纳米颗粒组合物相比,含有其中q1不存在且q2为1的脂质式(I)的脂质-纳米颗粒组合物在皮肤细胞中提供更高的活力和更高的转染效率两者。在实施例中,与含有本文所述的其他脂质的脂质-纳米颗粒组合物相比,含有其中q1不存在且q2为1的脂质式(I)的脂质-纳米颗粒组合物在成纤维细胞中提供更高的活力和更高的转染效率两者。在实施例中,与含有其中q1为1且q2不存在的脂质式(I)的脂质-纳米颗粒组合物相比,含有其中q1不存在且q2为1的脂质式(I)的脂质-纳米颗粒组合物在成纤维细胞中提供更高的活力和更高的转染效率两者。在实施例中,与含有本文所述的其他脂质的脂质-纳米颗粒组合物相比,含有其中q1不存在且q2为1的脂质式(I)的脂质-纳米颗粒组合物在免疫细胞中提供更高的活力和更高的转染效率两者。在实施例中,与含有其中q1为1且q2不存在的脂质式(I)的脂质-纳米颗粒组合物相比,含有其中q1不存在且q2为1的脂质式(I)的脂质-纳米颗粒组合物在免疫细胞中提供更高的活力和更高的转染效率两者。在实施例中,与含有本文所述的其他脂

质的脂质-纳米颗粒组合物相比,含有脂质式(I-B)的脂质-纳米颗粒组合物在T细胞中提供更高的活力和更高的转染效率两者。在实施例中,与含有其中q1为1且q2不存在的脂质式(I)的脂质-纳米颗粒组合物相比,含有其中q1不存在且q2为1的脂质式(I)的脂质-纳米颗粒组合物在T细胞中提供更高的活力和更高的转染效率两者。

[0623] 当用于将至少一个重编程因子转染至皮肤细胞中时,与含有本文所述的其他脂质的脂质-纳米颗粒组合物相比,包含其中q1不存在且q2为1的脂质式(I)的此类组合物可以产生至少一个皮肤复原标志物或皮肤质量标志物的更大改善。当用于将至少一个重编程因子转染至皮肤细胞中时,与含有其中q1为1且q2不存在的脂质式(I)的纳米颗粒组合物相比,包含其中q1不存在且q2为1的脂质式(I)的此类组合物可以产生至少一个皮肤复原标志物或皮肤质量标志物的更大改善。当用于将至少一个重编程因子转染至免疫细胞中时,与含有本文所述的其他脂质的脂质-纳米颗粒组合物相比,包含其中q1不存在且q2为1的脂质式(I)的此类组合物可以产生至少一个免疫细胞复原标志物或免疫细胞干性标志物的更大改善。当用于将至少一个重编程因子转染至免疫细胞中时,与具有相同头部基团的含有其中q1为1且q2不存在的脂质式(I)的纳米颗粒组合物相比,包含其中q1不存在且q2为1的脂质式(I)的此类组合物可以产生至少一个免疫细胞复原标志物或干性复原标志物的更大改善。

[0624] 本文提供的方法包括使用脂质或脂质-纳米颗粒组合物来用编码一个或多个细胞重编程因子的一个或多个非整合信使RNA转染细胞,从而产生复原细胞。要复原的细胞可以具有任何细胞类型。在实施例中,细胞与mRNA接触、暴露于mRNA或用mRNA转染持续不超过约20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1天或者持续少于1天。在实施例中,细胞与mRNA接触、暴露于mRNA或用mRNA转染持续不超过约14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1天或者持续少于一天。在实施例中,细胞与mRNA接触、暴露于mRNA或用mRNA转染持续不超过约10、9、8、7、6、5、4、3、2或1天或者持续少于一天。在实施例中,细胞与mRNA接触、暴露于mRNA或用mRNA转染持续不超过约7、6、5、4、3、2或1天或者持续少于一天。在实施例中,细胞与mRNA接触、暴露于mRNA或用mRNA转染持续不超过约5、4、3、2或1天或者持续少于一天。在实施例中,至少一个重编程因子从细胞内的转染mRNA表达或者细胞暴露于从转染mRNA表达的至少一个重编程因子,持续不超过约20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1天或者持续少于1天。在实施例中,至少一个重编程因子从细胞内的转染mRNA表达或者细胞暴露于从转染mRNA表达的至少一个重编程因子,持续不超过约14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1天或者持续少于一天。在实施例中,至少一个重编程因子从细胞内的转染mRNA表达或者细胞暴露于从转染mRNA表达的至少一个重编程因子,持续至少约2天且不超过约14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3或2天。在实施例中,至少一个重编程因子从细胞内的转染mRNA表达或者细胞暴露于从转染mRNA表达的至少一个重编程因子,持续不超过约10、9、8、7、6、5、4、3、2或1天或者持续少于一天。在实施例中,至少一个重编程因子从细胞内的转染mRNA表达或者细胞暴露于从转染mRNA表达的至少一个重编程因子持续至少约2天且不超过约10、9、8、7、6、5、4、3或2天。在实施例中,至少一个重编程因子从细胞内的转染mRNA表达,或细胞暴露于从转染mRNA表达的至少一个重编程因子,持续不超过约7、6、5、4、3、2或1天或者持续少于一天。在实施例中,至少一个重编程因子从细胞内的转染mRNA表达,或细胞暴露于从转染mRNA表达的至少一个重编程因子,持续至少约2天且不超过

约7、6、5、4、3或2天。在实施例中,至少一个重编程因子从细胞内的转染mRNA表达或者细胞暴露于从转染mRNA表达的至少一个重编程因子,持续不超过约5、4、3、2或1天或者持续少于一天。在实施例中,至少一个重编程因子从细胞内的转染mRNA表达或者细胞暴露于从转染mRNA表达的至少一个重编程因子持续至少约2天且不超过约5、4、3或2天。在实施例中,复原细胞具有与年轻细胞相似的表型或活性谱。表型或活性谱包括转录组谱、一个或多个核和/或表观遗传标志物的基因表达、蛋白水解活性、线粒体健康和功能、SASP细胞因子表达和甲基化景观中的一者或多者。

[0625] 本文所述的复原细胞可以具有与年轻细胞的转录组谱更相似的转录组谱。在实施例中,复原细胞的转录组谱包括选自RPL37、RHOA、SRSF3、EPHB4、ARHGAP18、RPL31、FKBP2、MAP1LC3B2、Elf1、Phf8、Pol2s2、Taf1和Sin3a的一个或多个基因的基因表达的增加。

[0626] 本文所述的复原细胞也可以以表现出一个或多个核和/或表观遗传标志物的与参考值相比增加的基因表达。在实施例中,一个或多个核和/或表观遗传标志物选自Hplgamma、H3K9me3、核纤层支持蛋白LAP2α和SIRT1蛋白。在实施例中,复原细胞具有更类似于年轻细胞的蛋白水解活性的蛋白水解活性。在实施例中,蛋白水解活性被测量为增加的细胞自噬体形成、增加的胰凝乳蛋白酶样蛋白酶体活性或它们的组合。在实施例中,复原细胞表现出与参考值相比改善的线粒体健康和功能。在实施例中,改善的线粒体健康和功能被测量为增加的线粒体膜电势、减少的反应性氧化物(ROS)或它们的组合。

[0627] 本文所述的复原细胞也可以表现出一个或多个SASP细胞因子的与参考值相比减少的表达。在实施例中,一个或多个SASP细胞因子包括IL18、ILIA、GROA、IL22和IL9。在实施例中,复原细胞表现出甲基化景观的逆转。在实施例中,甲基化景观的逆转通过Horvath时钟估计来测量。在一些实施例中,从老化细胞获得参考值。

[0628] 如本文所述,细胞可以通过用编码一个或多个细胞重编程因子的mRNA进行瞬时重编程来复原,该mRNA使用本公开的脂质或脂质-纳米颗粒组合物转染到细胞中。在一些实施例中,通过用非整合性mRNA转染细胞持续不超过约20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1天或者少于1天来完成瞬时重编程。在一些实施例中,通过用非整合性mRNA转染细胞持续不超过约14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1天或者少于1天来完成瞬时重编程。在一些实施例中,通过用非整合性mRNA转染细胞持续不超过约9、8、7、6、5、4、3、2或1天或者少于1天来完成瞬时重编程。在一些实施例中,通过用非整合性mRNA转染细胞持续不超过约6、5、4、3、2或1天或者少于1天来完成瞬时重编程。在一些实施例中,通过从细胞中转染的非整合性mRNA表达至少一个重编程因子或将细胞暴露于从细胞中转染的非整合性mRNA表达的至少一个重编程因子持续不超过约20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1天或者少于1天来完成瞬时重编程。在一些实施例中,通过从细胞中转染的非整合性mRNA表达至少一个重编程因子或将细胞暴露于从细胞中转染的非整合性mRNA表达的至少一个重编程因子持续至少2天且不超过约20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3或2天来完成瞬时重编程。在一些实施例中,通过从细胞中转染的非整合性mRNA表达至少一个重编程因子或将细胞暴露于从细胞中转染的非整合性mRNA表达的至少一个重编程因子持续不超过约14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1天或者少于1天来完成瞬时重编程。在一些实施例中,通过从细胞中转染的非整合性mRNA表达至少一个重编程因子或将细胞暴露于从细胞中转染的非整合性mRNA表达的至少一个重编程因子持

续至少2天且不超过约14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3或2天来完成瞬时重编程。在一些实施例中,通过从细胞中转染的非整合性mRNA表达至少一个重编程因子或将细胞暴露于从细胞中转染的非整合性mRNA表达的至少一个重编程因子持续不超过约10、9、8、7、6、5、4、3、2或1天或者少于1天来完成瞬时重编程。在一些实施例中,通过从细胞中转染的非整合性mRNA表达至少一个重编程因子或将细胞暴露于从细胞中转染的非整合性mRNA表达的至少一个重编程因子持续至少2天且不超过约10、9、8、7、6、5、4、3或2天来完成瞬时重编程。在一些实施例中,通过从细胞中转染的非整合性mRNA表达至少一个重编程因子或将细胞暴露于从细胞中转染的非整合性mRNA表达的至少一个重编程因子持续不超过约7、6、5、4、3、2或1天或者少于1天来完成瞬时重编程。在一些实施例中,通过从细胞中转染的非整合性mRNA表达至少一个重编程因子或将细胞暴露于从细胞中转染的非整合性mRNA表达的至少一个重编程因子持续至少2天且不超过约7、6、5、4、3或2天来完成瞬时重编程。在一些实施例中,通过从细胞中转染的非整合性mRNA表达至少一个重编程因子或将细胞暴露于从细胞中转染的非整合性mRNA表达的至少一个重编程因子持续不超过约5、4、3、2或1天或者少于1天来完成瞬时重编程。在一些实施例中,通过从细胞中转染的非整合性mRNA表达至少一个重编程因子或将细胞暴露于从细胞中转染的非整合性mRNA表达的至少一个重编程因子持续至少2天且不超过约5、4、3或2天来完成瞬时重编程。在实施例中,细胞的瞬时重编程消除了各种老化标志,同时避免了细胞完全去分化为干细胞。

[0629] 本文提供的方法和组合物通过由本公开的脂质或脂质-纳米颗粒组合物递送的编码细胞重编程因子的一个或多个mRNA的瞬时过表达来实现细胞年龄逆转或复原。此类细胞重编程因子可以包括转录因子、表观遗传重塑剂或影响线粒体功能、蛋白水解活性、异染色质水平、组蛋白甲基化、核纤层多肽、细胞因子分泌或衰老的小分子。在实施例中,细胞重编程因子包括OCT4、SOX2、KLF4、c-MYC、LIN28和NANOG中的一者或多者。在实施例中,以不同摩尔比应用细胞重编程因子,例如,以a:b:c:d:e:f的摩尔比应用OCT4、SOX2、KLF4、c-MYC、LIN28和NANOG,其中a、b、c、d、e和f可以都是相同的数(例如,1:1:1:1:1:1),一些相同和一些不同的数(例如,3:1:1:1:1:1、2:1:1:1:1:1、2:2:1:1:1:1、2:2:2:1:1:1、2:2:2:2:1:1、2:2:2:2:2:1、3:3:3:3:2:2)或所有不同的数(例如6:4:5:3:2:1)。在实施例中,a、b、c、d、e和/或f各自在1-7之间,即1-7:1-7:1-7:1-7:1-7:1-7:1-7(或在少于6种因子的组合的情况下,1-7:1-7:1-7:1-7:1-7、1-7:1-7:1-7:1-7、1-7:1-7:1-7、1-7:1-7或1-7:1)。在实施例中,以不同重量比应用细胞重编程因子,例如,以a:b:c:d:e:f的重量比应用OCT4、SOX2、KLF4、c-MYC、LIN28和NANOG,其中a、b、c、d、e和f可以都是相同的数(例如,1:1:1:1:1:1),a、b、c、d、e和f中的每一者可以为一些相同和一些不同的数(例如,3:1:1:1:1:1、2:1:1:1:1:1、2:2:1:1:1:1、2:2:2:1:1:1、2:2:2:2:1:1、2:2:2:2:2:1、3:3:3:3:2:2)或者每一者可以为不同的数(例如6:4:5:3:2:1)。在实施例中,a、b、c、d、e和/或f各自在1-7之间,即1-7:1-7:1-7:1-7:1-7:1-7(或在少于6种因子的组合的情况下,1-7:1-7:1-7:1-7:1-7、1-7:1-7:1-7:1-7、1-7:1-7:1-7、1-7:1-7或1-7:1)。

[0630] 本文提供的方法和组合物可以应用于有复原需要的任何类型的细胞、组织或器官。本公开的方法和组合物可以用于复原培养物中的细胞(例如,离体或体外),以改善供在细胞疗法中使用的功能和效力。在患者的治疗中使用的细胞可以是自体的或同种异体的。细胞可以源自患者或匹配的供体,或者它们可以从细胞库获得或源自iPS细胞。例如,在自

体离体疗法中,细胞可以直接从要治疗的患者获得,用编码细胞重编程因子的mRNA转染,如本文所述,并重新植入患者体内。此类细胞可以例如从对患者进行的活检或外科手术中获得。或者,在同种异体离体疗法中,细胞可以从细胞库或源自iPS细胞的细胞系获得,用编码细胞重编程因子的mRNA转染,如本文所述,并重新植入患者体内。或者,可以用编码细胞重编程因子的mRNA在体内直接转染需要复原的细胞。

[0631] 本公开的含脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物可以用于递送表达重编程因子的mRNA,其提供更强大的细胞复原,因为重编程因子已经被优化以减少对蛋白质/多肽的任何触发的免疫反应,增加蛋白质/多肽的稳定性以及改变蛋白质/多肽活性,诸如与野生型重编程因子相比增加的活性。

[0632] 本文提供的方法包括向细胞或受试者施用本公开的包含RNA的含脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物,或用包含RNA的含脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物治疗或转染细胞持续不超过连续25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3或2天的给药间隔。在一些实施例中,给药间隔为一天。在一些实施例中,施用组合物一次。在一些实施例中,包含RNA的含脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物的给药在给药间隔期间每天至少进行一次。在一些实施例中,在给药间隔期间以低于每天一次的频率进行给药,例如,每两天一次、每三天一次、每四天一次、每x天一次,其中x为4至25的数。因此,在此类实施例中,例如,在5天给药间隔内每5天给药一次包含RNA的含脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物意味着RNA在该间隔内给药一次,即在5天的总治疗期内给药一次,而在5天给药间隔内每天给药两次RNA意味着在该间隔中给药RNA 10次,即5天内给药10次。在一些实施例中,该方法包括向细胞或受试者施用包含RNA的含脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物,或者用包含RNA的含脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物治疗或转染细胞持续不超过连续21、18、14、10、7或5天。在一些实施例中,该方法包括向细胞或受试者施用包含RNA的含脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物,或者用包含RNA的含脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物治疗或转染细胞持续不超过连续18天。在一些实施例中,该方法包括向细胞或受试者施用包含RNA的含脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物,或者用本公开的包含RNA的含脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物治疗或转染细胞持续不超过连续14天。在一些实施例中,该方法包括向细胞或受试者施用包含RNA的含脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物,或者用包含RNA的含脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物治疗或转染细胞持续不超过连续10天。在一些实施例中,该方法包括向细胞或受试者施用包含RNA的含脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物,或者用包含RNA的含脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物治疗或转染细胞持续不超过连续7天。在一些实施例中,该方法包括向细胞或受试者施用包含RNA的含脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物,或者用包含RNA的含脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物治疗或转染细胞持续不超过连续5天。在其他实施例中,所述暴露包括中断所述暴露并在所述中断之后重复所述暴露。在一些实施例中,所述暴露、治疗、转染、表达或施用包括暴露、治疗、转染、表达或施用持续连续约2-5天之间、连续约5-7天之间、连续约7-10天之间、连续约10-12天之间、连续约12-14天之间、连续约14-17天之间、连续约17-19天之间或连续约19-21天之间,并且在一些实施例中,进一步包括中断所述暴露并在所述中断之后重复所述暴露。

[0633] 暴露的持续时间由诸如自我扩增RNA、环状RNA、B18R和其他诱饵的机制和/或诸如L7Ae或其家族成员的启动/关闭开关的控制。在一些实施例中,所述重复进行任何次数,例

如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10次,或最多20次,或最多30次,或更多次。对于体内应用,所述重复可以持续任何持续时间,例如,直到疾病被成功治疗或治愈,或者贯穿受试者或患者的一生。在一些实施例中,所述重复在所述中断之后的任何时间执行,例如,在所述中断之后0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10天,最多20天,最多30天,最多3个月、最多6个月或最多1年。一个暴露周期被认为是一个给药间隔,使得例如一系列暴露-中断-重复暴露包含两个给药间隔。

[0634] V.药物组合物

[0635] 本发明也提供了一种药物组合物,其包含本文所述的纳米颗粒组合物及其药学上可接受的载体。该药物组合物特别可用于将核酸递送至患者(例如,人类)或细胞以治疗所关注的特定疾病或病症。本领域技术人员可以容易地确定合适的浓度和剂量。

[0636] 可以通过用本公开的包含编码一个或多个细胞重编程因子的一种或多种非整合性信使RNA的含脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物转染细胞持续不超过连续4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天以瞬时重编程细胞用于复原来获得包括复原细胞的药物组合物。也涵盖通过用本公开的包含治疗mRNA的含脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物转染来治疗细胞,其中,在实施例中,进行一次转染以获得经治疗的细胞,诸如复原细胞。例如对于自我复制RNA构建体考虑单一转染步骤。在另一方面,本文提供了药物组合物,其包括通过用本公开的包含编码一个或多个细胞重编程因子的一种或多种非整合性信使RNA的含脂质组合物或脂质-纳米颗粒组合物转染细胞持续不超过连续4、5、6或7天以瞬时重编程细胞用于复原来获得的复原细胞。

[0637] 本公开的药物组合物可以调配成固体、半固体、液体或气体形式的制剂,诸如片剂、胶囊、粉末、颗粒、软膏、溶液、悬浮液、栓剂、注射剂、吸入剂、凝胶、微球和气雾剂。施用此类药物组合物的典型途径包括但不限于局部(local)、口服、局部(topical)、透皮、吸入、胃肠外、舌下、口含、直肠、阴道和鼻内施用。本文所用的术语胃肠外包括皮下注射、静脉内注射、肌内注射、皮内注射、胸骨内注射或输注技术。调配本公开的药物组合物,使得在向患者施用组合物时其中含有的活性成分是生物可利用的。将向受试者或患者施用的组合物采取一个或多个剂量单位的形式,其中例如片剂可以是单个剂量单位,并且本公开的气雾剂形式的化合物的容器可以容纳多个剂量单位。制备此类剂型的实际方法是本领域技术人员已知的或将是显而易见的;例如,参见Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第20版(Philadelphia College of Pharmacy and Science,2000)。要施用的组合物将包括治疗有效量的纳米颗粒组合物,用于治疗所关注的疾病或病症。

[0638] 本公开的药物组合物可以为固体或液体形式。在一个方面,载体是颗粒状的,使得组合物是例如片剂或粉末形式。载体可以是液体,其中组合物是例如口服糖浆、注射液或气雾剂,其可用于例如吸入给药。

[0639] 当旨在用于口服施用时,药物组合物优选地为固体或液体形式,其中半固体、半液体、悬浮液和凝胶形式包括在本文视为固体或液体的形式内。

[0640] 作为用于口服施用的固体组合物,药物组合物可以调配成粉末、颗粒、压片、丸剂、胶囊、口香糖、糯米纸囊剂等形式。此类固体组合物将通常含有一种或多种惰性稀释剂或可食用载体。另外,可以存在以下中的一者或多者:粘合剂,诸如羧甲基纤维素、乙基纤维素、微晶纤维素、黄蓍胶或明胶;赋形剂,诸如淀粉、乳糖或糊精,崩解剂,诸如海藻酸、海藻酸钠、Primogel、玉米淀粉等;润滑剂,诸如硬脂酸镁或氢化植物油(Sterotex);助流剂,诸如

胶体二氧化硅;甜味剂,诸如蔗糖或糖精;调味剂,诸如薄荷、水杨酸甲酯或橙子调味剂;以及着色剂。

[0641] 当药物组合物为胶囊形式时,例如,明胶胶囊,除了上述类型的材料之外,其也可以含有液体载体,诸如聚乙二醇或油。

[0642] 药物组合物可以为液体形式,例如,酏剂、糖浆、溶液、乳液或悬浮液。作为两个实例,液体可以用于口服施用或用于通过注射递送。当旨在用于口服施用时,除了本发明化合物之外,优选的组合物也包含甜味剂、防腐剂、染料/着色剂和风味增强剂中的一者或多者。在旨在通过注射施用的组合物中,可以包括表面活性剂、防腐剂、润湿剂、分散剂、悬浮剂、缓冲剂、稳定剂和等渗剂中的一者或多者。

[0643] 本公开的液体药物组合物(无论它们是溶液、混悬液或其他类似形式)可以包括以下佐剂中的一者或多者:无菌稀释剂,诸如注射用水、盐水溶液,优选地,生理盐水、林格氏溶液、等渗氯化钠、固定油,诸如可以用作溶剂或悬浮介质的合成甘油单酯或甘油二酯、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其他溶剂;抗菌剂,诸如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂,诸如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂,诸如乙二胺四乙酸;缓冲剂,诸如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐和用于调节张力的试剂诸如氯化钠或葡萄糖;充当冷冻保护剂的药剂,诸如蔗糖或海藻糖。可以将肠胃外制剂密封在由玻璃或塑料制成的安瓿、一次性注射器或多剂量小瓶中。生理盐水是优选的佐剂。可注射药物组合物优选地是无菌的。

[0644] 旨在用于肠胃外或口服施用的本公开的液体药物组合物应当含有一定量的本公开的化合物,以便获得合适的剂量。

[0645] 本公开的药物组合物可以旨在用于局部施用,在这种情况下,载体可以适当地包含溶液、乳液、软膏或凝胶基质。例如,基质可以包含以下中的一者或多者:凡士林、羊毛脂、聚乙二醇、蜂蜡、矿物油、稀释剂诸如水和醇、以及乳化剂和稳定剂。增稠剂可以存在于药物组合物中用于局部施用。如果旨在用于透皮施用,则组合物可以包括透皮贴剂或离子电渗装置。

[0646] 本公开的药物组合物可以旨在以例如栓剂的形式用于直肠施用,其将在直肠中融化并释放药物。用于直肠施用的组合物可以含有油质基质作为合适的无刺激性赋形剂。此类基质包括但不限于羊毛脂、可可脂和聚乙二醇。

[0647] 本公开的药物组合物可以包括改变固体或液体剂量单位的物理形式的各种材料。例如,组合物可以包含在活性成分周围形成包衣壳的材料。形成包衣壳的材料通常是惰性的,并且可以选自例如糖、虫胶和其他肠溶包衣剂。或者,可以将活性成分装入明胶胶囊中。

[0648] 本公开的固体或液体形式的药物组合物可以包含与本公开的化合物结合并由此有助于化合物的递送的药剂。可以以这种能力起作用的合适的药剂包括单克隆或多克隆抗体或蛋白质。

[0649] 本公开的药物组合物可以由可以作为气雾剂施用的剂量单位组成。术语气溶胶用于表示各种系统,范围从胶体性质的系统到由加压包组成的系统。可以通过液化气体或压缩气体或通过分配活性成分的合适的泵系统来递送。本公开的化合物的气雾剂可以以单相、双相或三相系统递送,以便递送活性成分。气雾剂的递送包括必要的容器、活化剂、阀门、子容器等,它们一起可以形成套试剂盒。本领域技术人员无需过多实验即可确定优选的气雾剂。

[0650] 本公开的药物组合物可以通过制药领域熟知的方法来制备。例如,旨在通过注射施用的药物组合物可以通过将本公开的脂质纳米颗粒与无菌蒸馏水、缓冲液或其他载体组合以形成溶液来制备。可以添加表面活性剂以促进均匀溶液或悬浮液的形成。表面活性剂是与本公开的化合物非共价相互作用以促进该化合物在水性递送系统中溶解或均匀悬浮的化合物。

[0651] 本公开的包含本文所述的化合物或其药学上可接受的盐的组合物以治疗有效量施用,该量将根据多种因素而变化,包括所采用的具体治疗剂的活性;治疗剂的代谢稳定性和作用时间;患者的年龄、体重、一般健康状况、性别和饮食;施用方式和时间;排泄率;药物组合;特定病患或病症的严重程度;以及正在接受治疗的受试者。

[0652] 也可以在一种或多种其他治疗剂的施用同时、之前或之后施用本公开的组合物。此类联合疗法包括施用本公开的组合物和一种或多种附加活性剂的单一药物剂量调配物,以及施用本公开的组合物以及其自身单独药物剂量调配物形式的每种活性剂。例如,可以以单一口服剂量组合物(诸如片剂或胶囊)或单一注射剂(诸如皮下、皮内或静脉内注射剂)向患者一起施用本公开的组合物和其他活性剂,或者可以以单独口服剂量调配物或单独的注射剂施用每种药剂。当使用单独剂量调配物时,可以基本上同时(即同时或在单独交错的时间,即依次)施用本公开的化合物和一种或多种附加活性剂;联合疗法被理解为包括所有这些方案。

[0653] VI.实例

[0654] 本公开提供了含脂质纳米颗粒组合物,以将生物活性物质诸如核酸(例如,RNA)输送到细胞和或细胞内区室中以促进治疗剂/预防剂的递送。此类组合物通常包括至少一种可电离脂质。

[0655] 本发明的可电离脂质可以通过采用本领域技术人员已知的标准合成方法和程序或根据本文的教导对于本领域技术人员来说是显而易见的方法和程序使用市售起始材料、文献中已知的化合物或由容易制备的中间体以多种方式来制备。

[0656] 用于制备有机分子以及官能团转化和操作的标准合成方法和程序可以从相关科学文献或从本领域的标准教科书中获得。尽管不限于任何一个或多个来源,但通过引用并入本文的经典文本,诸如Smith,M.B.,March,J.,March's Advanced Organic Chemistry:Reactions,Mechanisms,and Structure,第5版,John Wiley&Sons:New York,2001;Greene,T.W.,Wuts,P.G.M.,Protective Groups in Organic Synthesis,第3版,John Wiley&Sons:New York,1999;R.Larock,Comprehensive Organic Transformations,VCH Publishers(1989);L.Fieser和M.Fieser,Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis,John Wiley and Sons(1994);和L.Paquette编辑,Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis,John Wiley and Sons(1995),是本领域技术人员已知的有用且公认的有机合成参考教科书。以下合成方法的描述旨在说明但不限制用于制备本公开的化合物的一般程序。

[0657] 应当注意,本文提供的反应方案提供了用于制备本公开的可电离脂质的示例性方法。根据需要使用保护基团以及对以下实例中提到的一般反应方案的其他修改对于本领域普通技术人员来说将是显而易见的。保护基团的列表以及如何引入和去除这些基团可以在Greene,T.W.,Wuts,P.G.M.,Protective Groups in Organic Synthesis,第3版,John

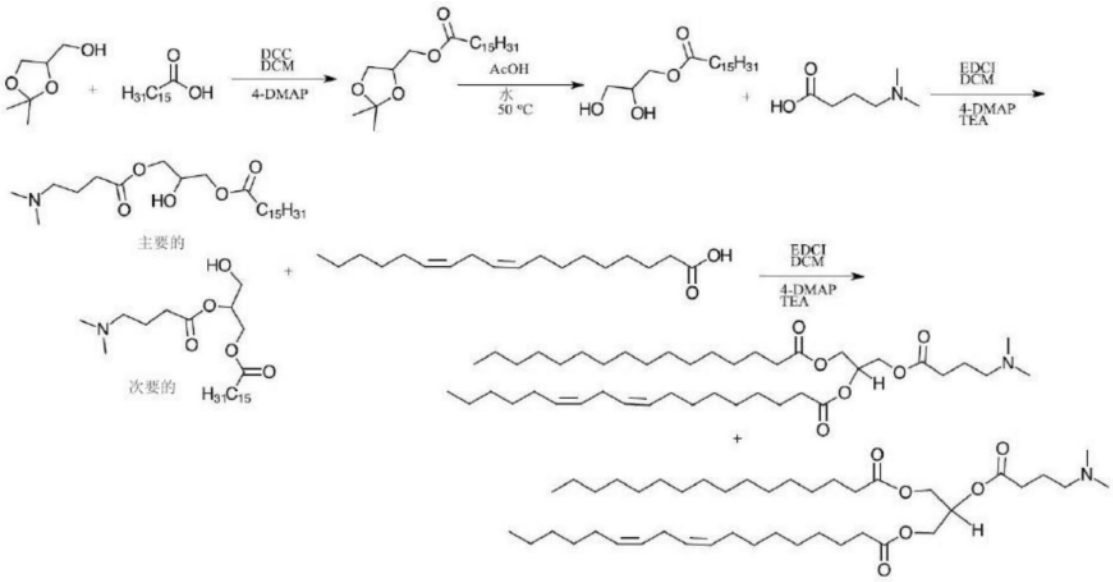
Wiley&Sons:New York,1999中找到。

[0658] 在本文所述的反应方案中,可以产生多种立体异构体。当没有指明特定的立体异构体时,应理解为是指可以由反应产生的所有可能的立体异构体。本领域普通技术人员将认识到,可以优化反应以优先给出一种异构体,或者可以设计新方案以产生单一异构体。如果产生混合物,可以使用诸如制备型薄层色谱、制备型HPLC、制备型手性HPLC或制备型SFC等技术来分离异构体。

[0659] 本公开的可电离脂质的以下实例本质上是说明性的并且决不旨在进行限制。

[0660] 实例1:式(I)可电离脂质的合成

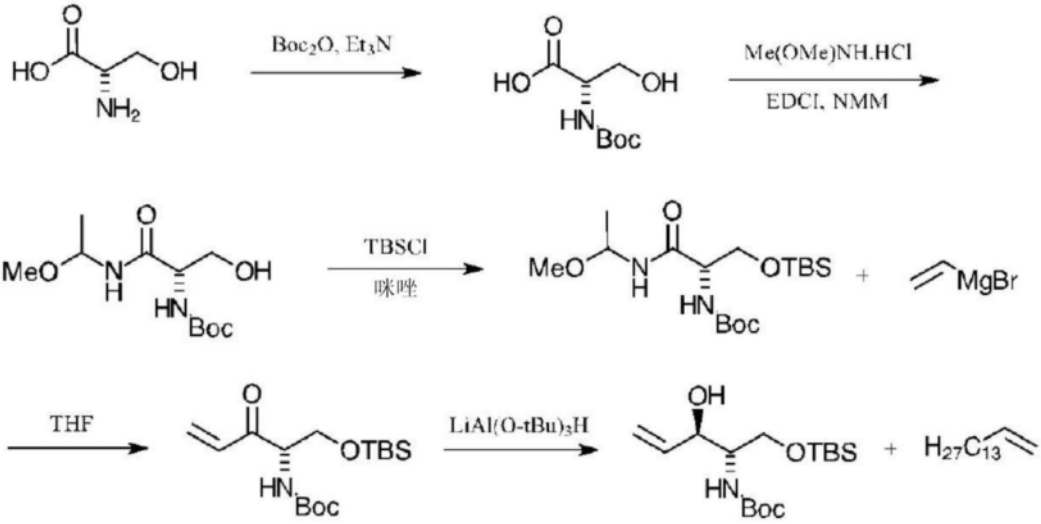
[0661] 式(I)可电离脂质基于脑磷脂支架。式(I)可电离脂质的合成分别描绘于方案1中。这些程序和方法在文献中是众所周知的,并且描述于Chem.Sci.,2021,12,2549-2557中。类似的基于脑磷脂的式(I)可电离脂质可以使用本领域众所周知的方法合成。

[0662] 

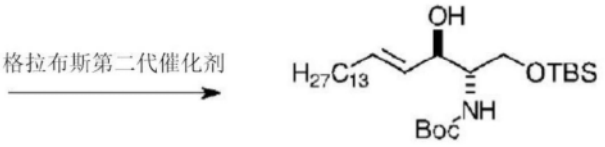
[0663] 方案1:可电离脂质1的合成。

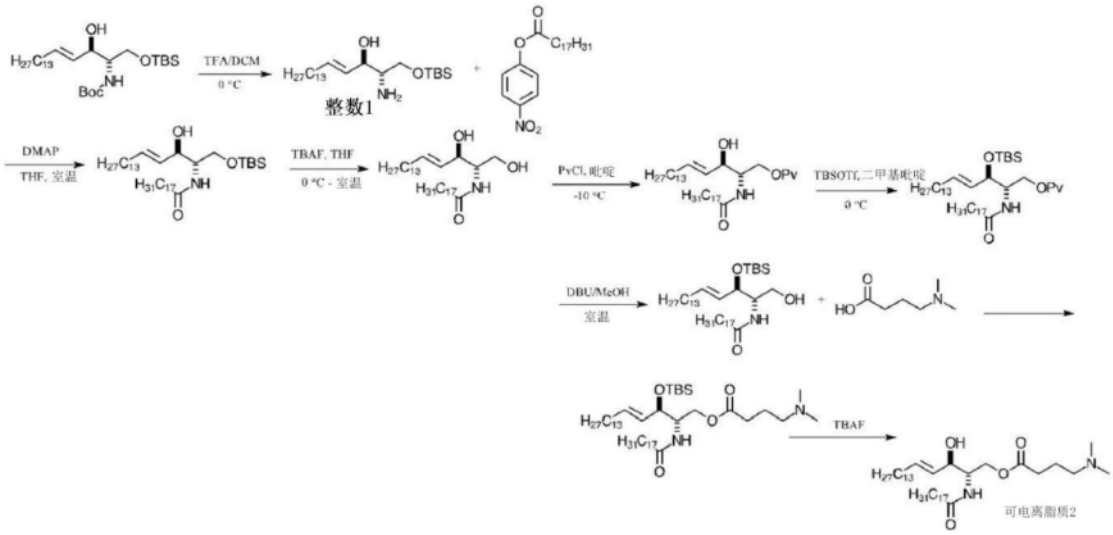
[0664] 实例2:式(II)可电离脂质的合成

[0665] 式(II)可电离脂质基于鞘磷脂支架。式(II)可电离脂质的合成分别描绘于方案2和方案3中。这些程序和方法在文献中是众所周知的,并且描述于Org.Lett.2006,8,5569(对于方案2)和Chem.Eur.J.2011,17,8568-8575(对于方案2和3)中。类似的基于鞘磷脂的式(II)可电离脂质可以使用本领域众所周知的方法来合成。



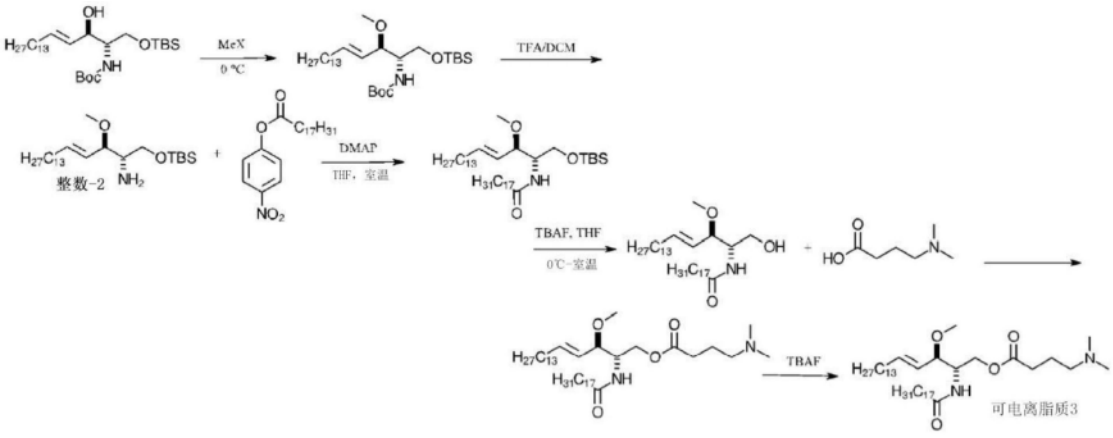
[0666]





[0667] 方案2:可电离脂质2的合成。

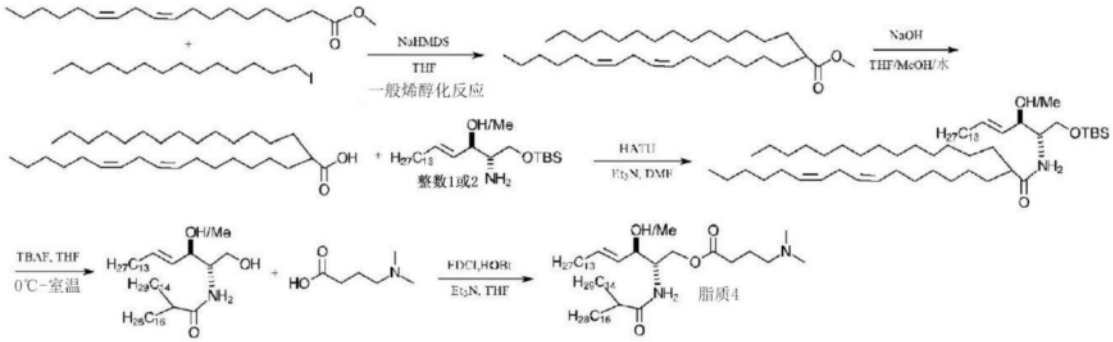
[0668]



[0669] 方案3:可电离脂质3的合成。

[0670] 实例3:式(III)可电离脂质的合成

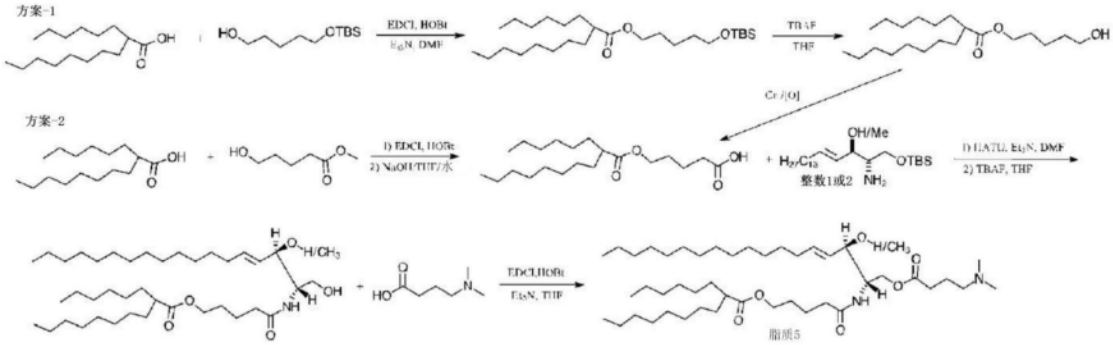
[0671] 式(III)可电离脂质基于鞘磷脂支架。式(III)可电离脂质的合成分别描绘于方案4中。这些程序和方法在文献中是众所周知的,并且描述于Chem.Eur.J.2011,17,8568-8575中。类似的基于鞘磷脂的式(III)可电离脂质可以使用本领域众所周知的方法来合成。

[0672] 

[0673] 方案4:可电离脂质4的合成。

[0674] 实例4:式(IV)可电离脂质的合成

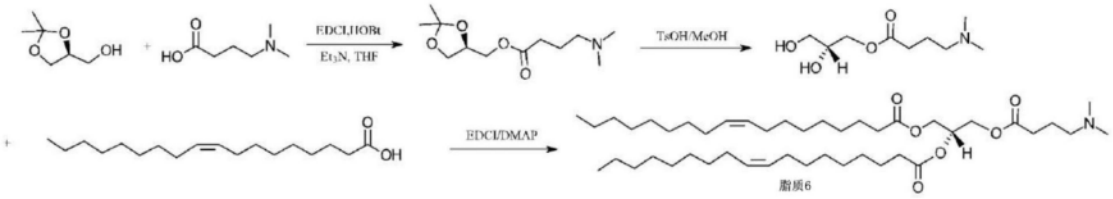
[0675] 式(IV)可电离脂质基于鞘磷脂支架。式(IV)可电离脂质的合成分别描绘于方案5和方案6中。这些程序和方法在文献中是众所周知的,并且描述于Chem.Eur.J.2011,17,8568-8575和WO 2017/075531中。类似的基于鞘磷脂的式(IV)可电离脂质可以使用本领域众所周知的方法来合成。

[0676] 

[0677] 方案5和方案6:可电离脂质5的合成。

[0678] 实例5:式(V)可电离脂质的合成

[0679] 式(V)可电离脂质具有DOPE核心。式(V)可电离脂质的合成分别描绘于方案7中。程序和方法在文献中是众所周知的并且描述于J.Med.Chem.2005,48,7305-7314中。类似的基于DOPE核心的式(V)可电离脂质可以使用本领域众所周知的方法来合成。

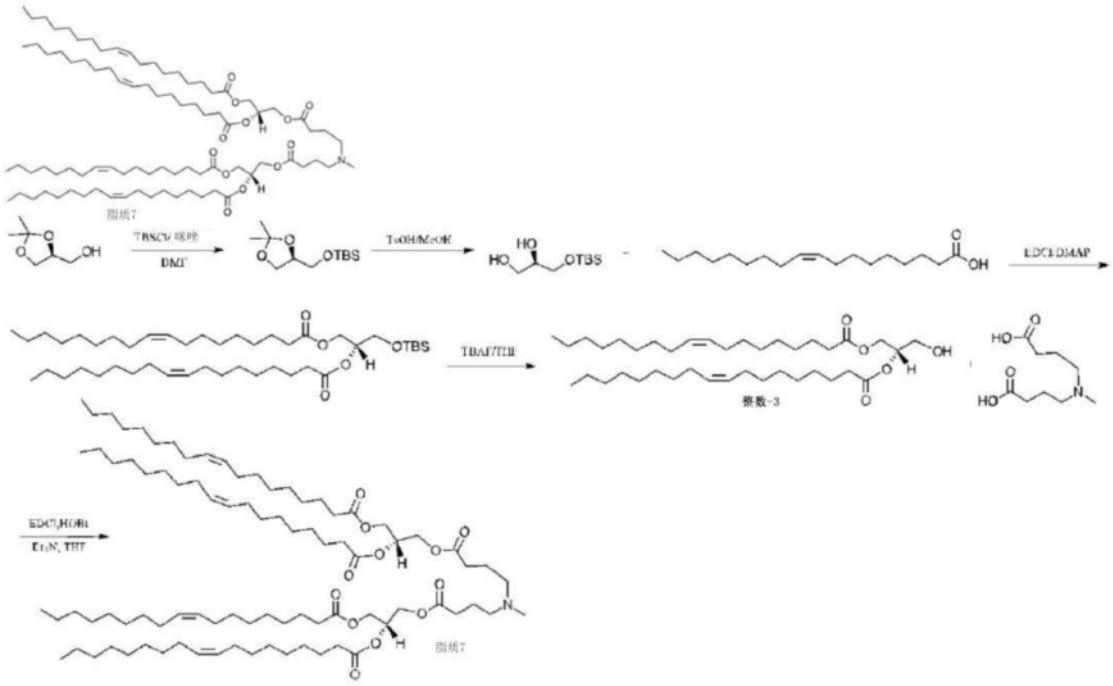
[0680] 

[0681] 方案7:可电离脂质6的合成。

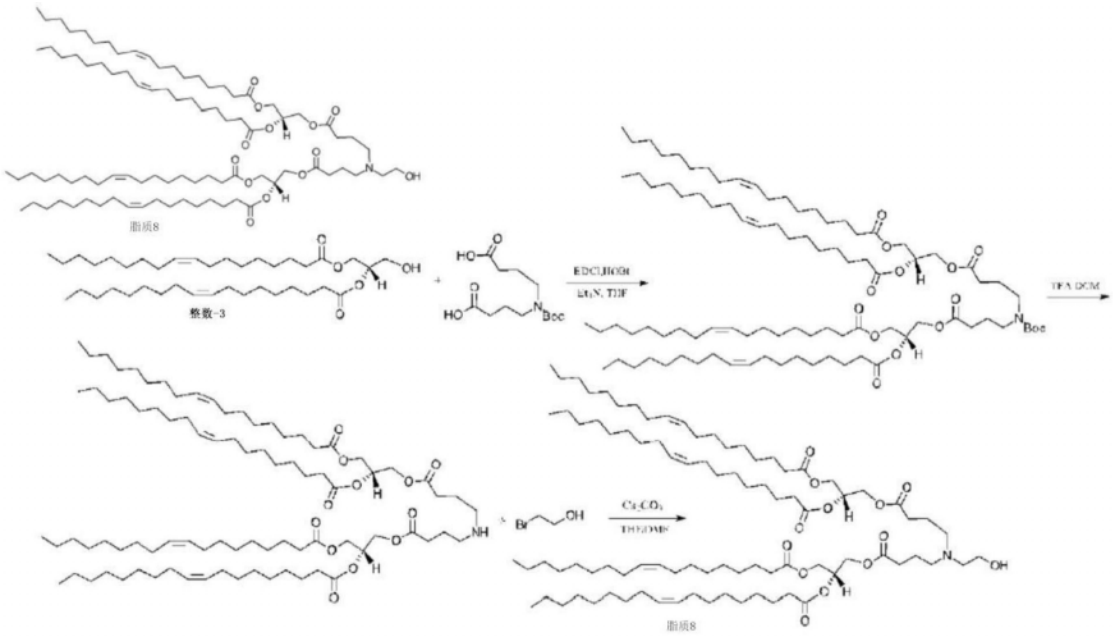
[0682] 实例6:式(VI)可电离脂质的合成

[0683] 式(VI)可电离脂质具有DOPE核心。式(VI)可电离脂质的合成分别描绘于方案8和方案9中。类似的基于DOPE核心的式(VI)可电离脂质可以使用本领域众所周知的合成方案

来合成。

[0684] 

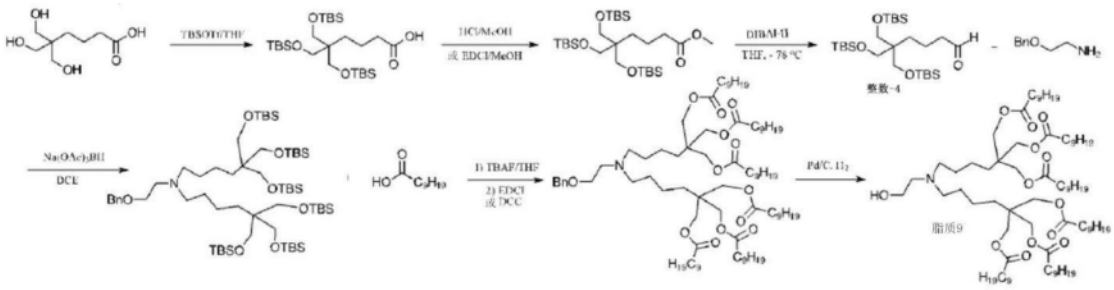
[0685] 方案8:可电离脂质7的合成。

[0686] 

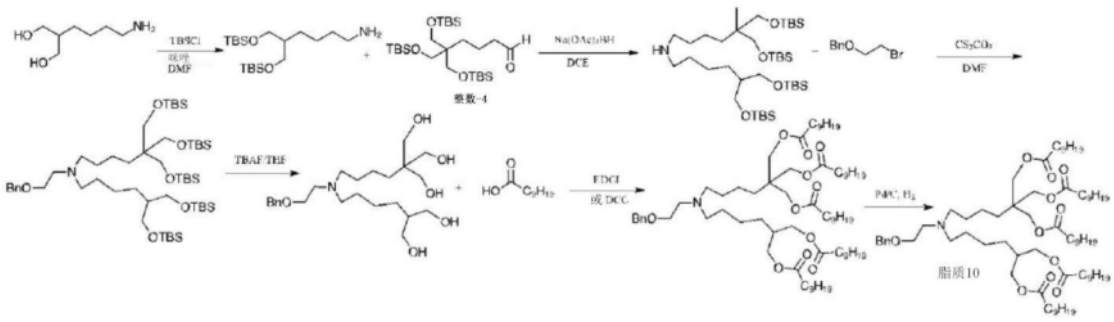
[0687] 方案9:可电离脂质8的合成。

[0688] 实例7:式(VII)可电离脂质的合成

[0689] 式(VII)可电离脂质基于甘油三酯支架。式(VII)可电离脂质的合成分别描绘于方案10和方案11中。式(VII)可电离脂质的类似的基于甘油三酯修饰可以使用本领域众所周知的方法来合成。

[0690] 

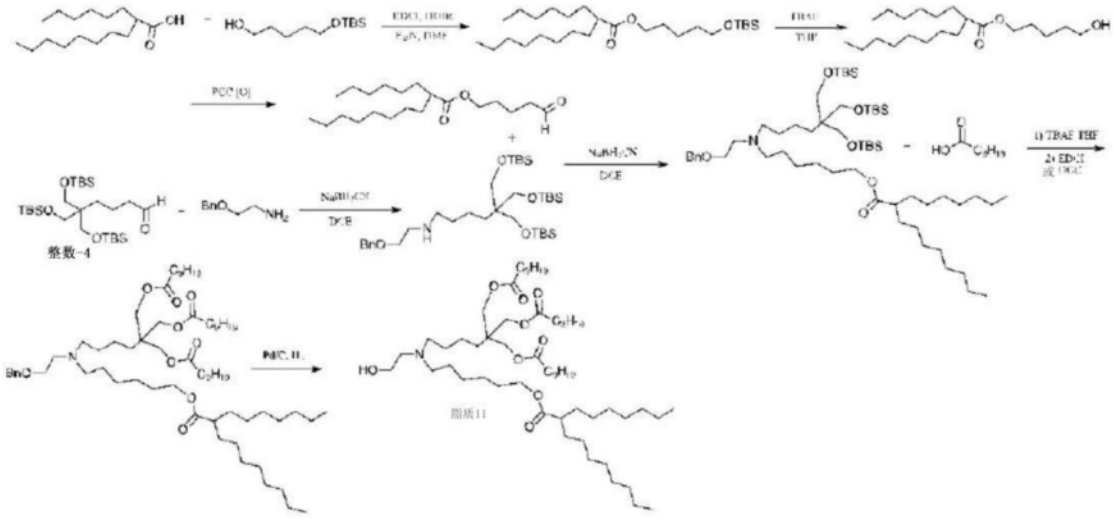
[0691] 方案10:可电离脂质9的合成。

[0692] 

[0693] 方案11:可电离脂质10的合成。

[0694] 实例8:式(VIII)可电离脂质的合成

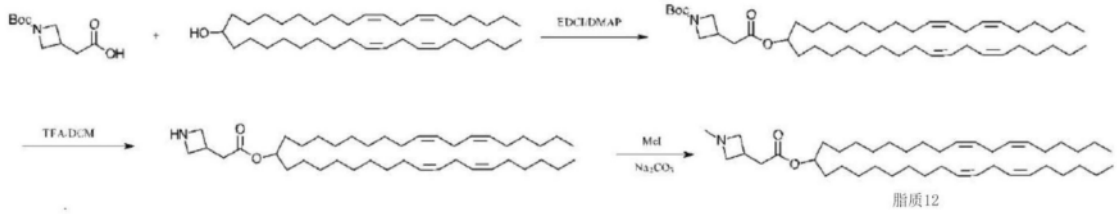
[0695] 式(VIII)可电离脂质基于甘油三酯支架。式(VIII)可电离脂质的合成分别描绘于方案12中。式(VIII)可电离脂质的类似的基于甘油三酯修饰可以使用本领域众所周知的方法来合成。

[0696] 

[0697] 方案12:可电离脂质11的合成。

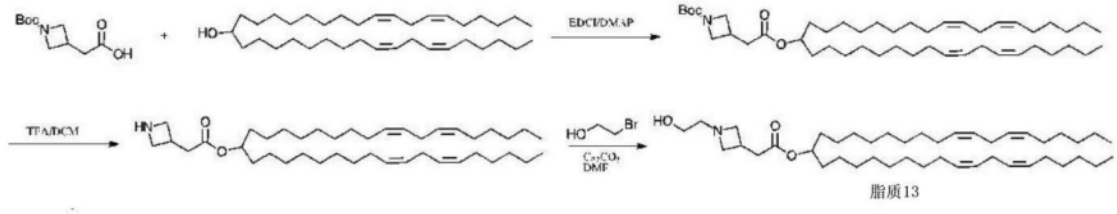
[0698] 实例9:式(IX)可电离脂质的合成

[0699] 式(IX)可电离脂质在支架中具有环状头部基团。式(IX)可电离脂质的合成分别描绘于方案13和方案14中。式(IX)可电离脂质的类似的基于环状头部基团的修饰可以使用本领域众所周知的方法来合成。

[0700] 

脂质12

[0701] 方案13:可电离脂质12的合成。

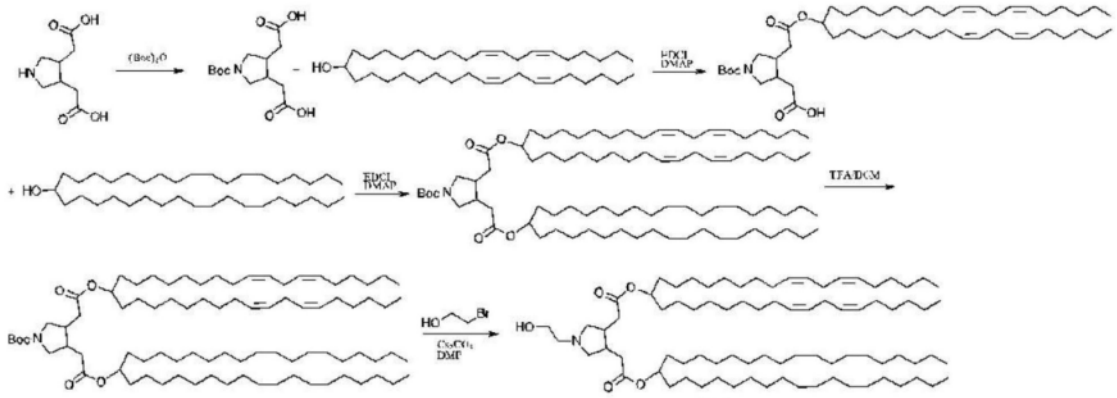
[0702] 

脂质13

[0703] 方案14:可电离脂质13的合成。

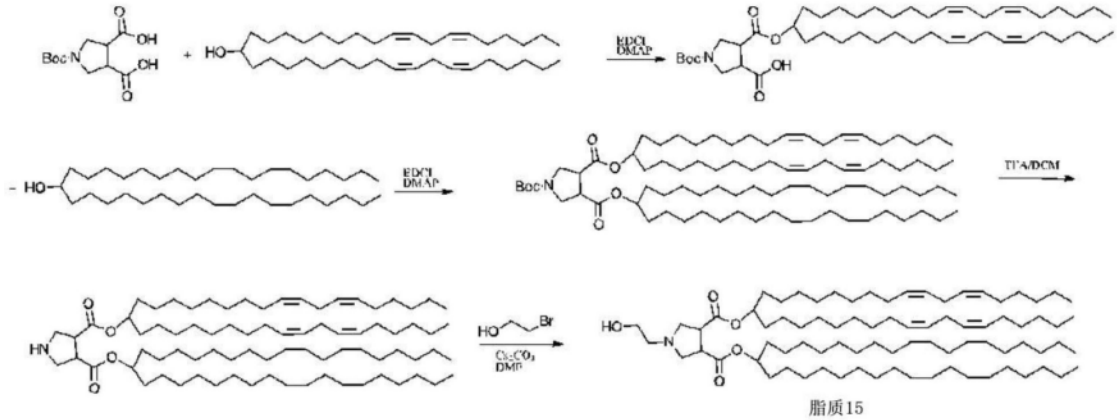
[0704] 实例10:式(X)可电离脂质的合成

[0705] 式(X)可电离脂质在支架中具有环状头部基团。式(X)可电离脂质的合成分别描述于方案15和方案16中。式(X)可电离脂质的类似的基于环状头部基团的修饰可以使用本领域众所周知的方法来合成。

[0706] 

脂质14

[0707] 方案15:可电离脂质14的合成。

[0708] 

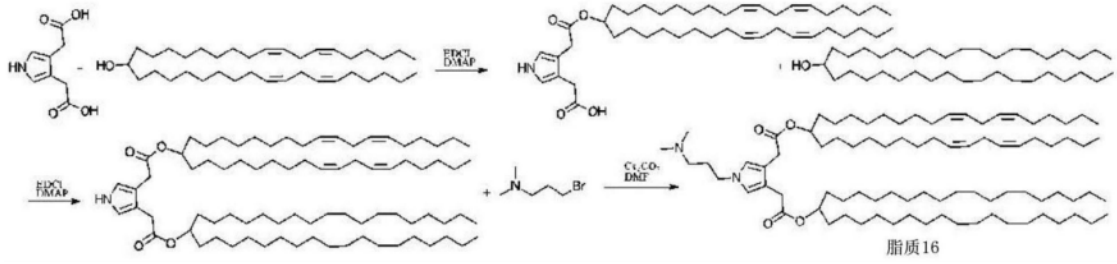
脂质15

[0709] 方案16:可电离脂质15的合成。

[0710] 实例11:式(XI)可电离脂质的合成

[0711] 式(XI)可电离脂质在支架中具有环状头部基团。式(XI)可电离脂质的合成分别描绘于方案17中。式(XI)可电离脂质的类似的基于环状头部基团的修饰可以使用本领域众所

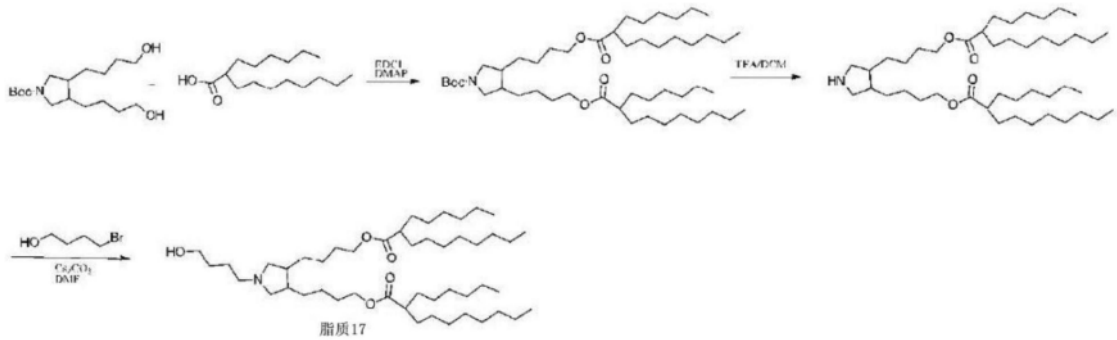
周知的方法来合成。

[0712] 

[0713] 方案17:可电离脂质16的合成。

[0714] 实例12:式(XII)可电离脂质的合成

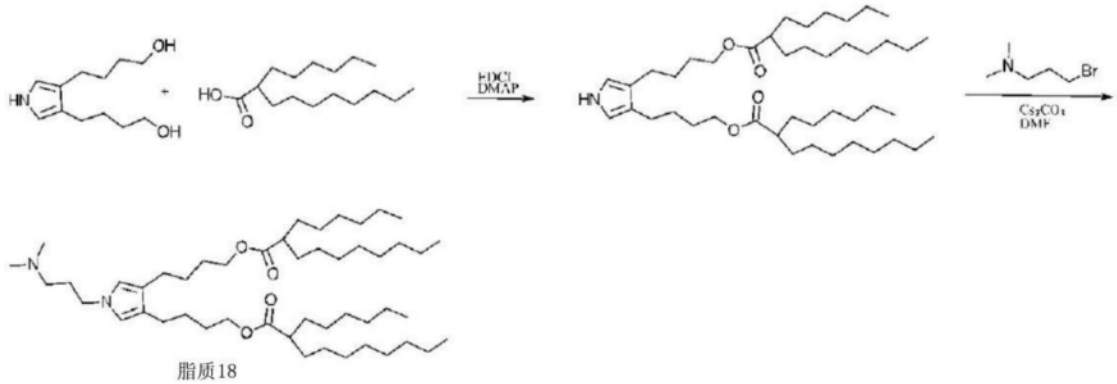
[0715] 式(XII)可电离脂质在支架中具有环状头部基团。式(XII)可电离脂质的合成分别描绘于方案18中。式(XII)可电离脂质的类似的基于环状头部基团的修饰可以使用本领域众所周知的方法来合成。

[0716] 

[0717] 方案18:可电离脂质17的合成。

[0718] 实例13:式(XIII)可电离脂质的合成

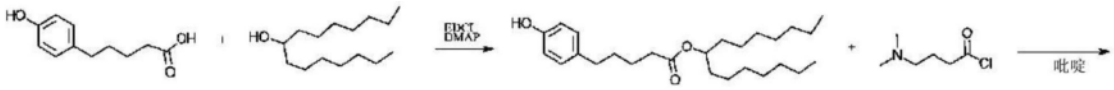
[0719] 式(XIII)可电离脂质在支架中具有环状头部基团。式(XIII)可电离脂质的合成分别描绘于方案19中。式(XIII)可电离脂质的类似的基于环状头部基团的修饰可以使用本领域众所周知的方法来合成。

[0720] 

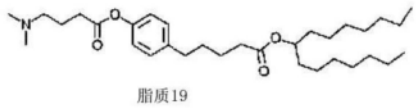
[0721] 方案19:可电离脂质18的合成。

[0722] 实例14:式(XIV)可电离脂质的合成

[0723] 式(XIV)可电离脂质在支架中具有芳香环。式(XIV)可电离脂质的合成分别描绘于方案20中。类似的式(XIV)含芳环可电离脂质可以使用本领域众所周知的方法合成。



[0724]

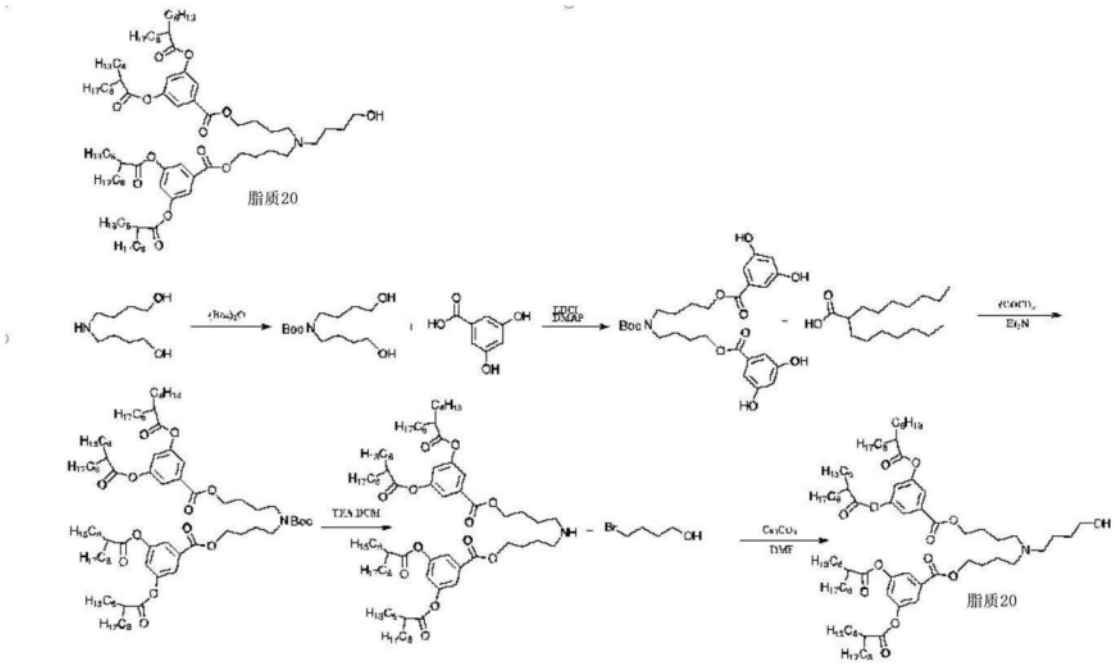


[0725] 方案20:可电离脂质19的合成。

[0726] 实例15:式(XV)可电离脂质的合成

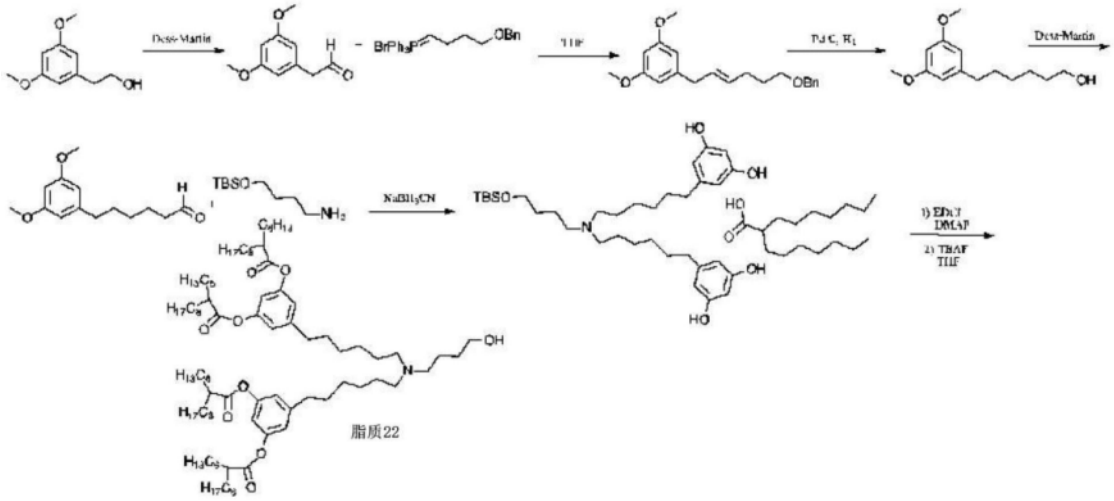
[0727] 式(XV)可电离脂质在支架中具有芳香环。式(XV)可电离脂质的合成分别描绘于方案21和方案22中。类似的式(XV)含芳环可电离脂质可以使用本领域众所周知的方法合成。

[0728]



[0729] 方案21:可电离脂质20的合成。

[0730]

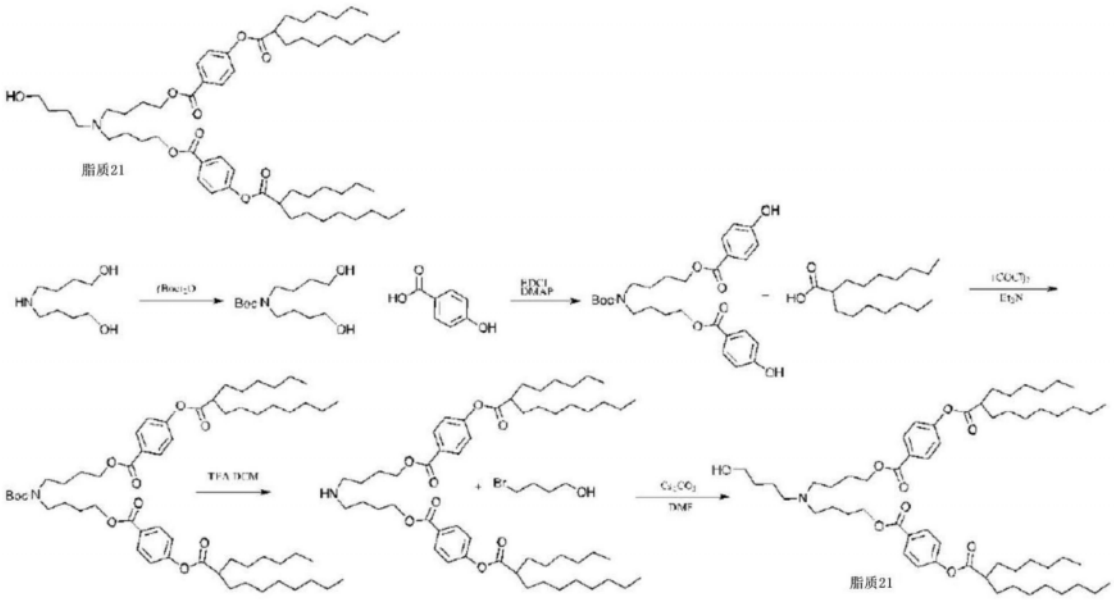


[0731] 方案22:可电离脂质22的合成。

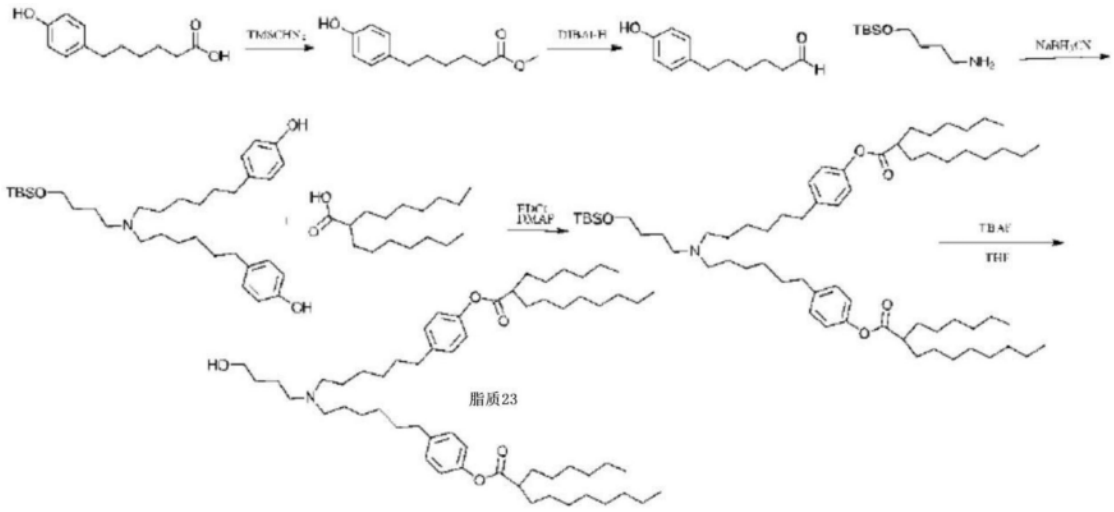
[0732] 实例16:式(XVI)和式(XVI-A)可电离脂质的合成

[0733] 式(XVI)和式(XVI-A)可电离脂质在支架中具有芳香环。式(XVI)和式(XVI-A)可电

离脂质的合成分别描述于方案23和方案24中。类似的式(XVI)和式(XVI-A)含芳环可电离脂质可以使用本领域众所周知的方法合成。

[0734] 

[0735] 方案23:可电离脂质21的合成。

[0736] 

[0737] 方案24:可电离脂质23的合成。

[0738] 实例16:衰老的人类真皮成纤维细胞的转染和复原

[0739] 将来自40岁女性供体的原代人类真皮成纤维细胞以200,000至250,000个细胞/孔的密度接种在6孔板中。一些孔未被治疗,一些孔用携带mCherry表达mRNA(报告基因)的脂质纳米颗粒转染作为对照,并且一些孔用包含单顺反子mRNA混合物的脂质纳米颗粒转染,其中每个mRNA分子表达重编程因子O、S、K、L、M或N中的一者。每孔用1微克RNA转染。脂质纳米颗粒含有本公开的脂质式(II)以及附加组分,诸如DOPC、DMG-PEG和胆固醇,例如摩尔比为50:10:1.5:38.5。

[0740] 在第1、2、3和4天进行转染。在第6天,对细胞进行计数,并对SOD2、MMP1、MMP9和$p16^{INK4A}$进行免疫荧光分析作为皮肤复原、皮肤质量和/或衰老的标志物。实验设计在图1中示出。免疫荧光显示当使用含有脂质式(II)和编码O、S、K、L、M和N的mRNA混合物的脂质纳米颗粒对细胞进行瞬时重编程时与未治疗的细胞相比SOD2、MMP1、MMP9和$p16^{INK4A}$的下调。数据

在图2至3中示出。与未治疗的细胞相比,细胞增殖也增加,如图4所示。这是皮肤复原、皮肤质量提高、氧化应激减少和衰老减少的代表。

[0741] 实例17:人类皮肤外植体的转染和复原

[0742] 用12mm穿刺活检从一名52岁女性患者获得人类皮肤样本并准备进行培养。他们未被治疗;用RENOVA®(一种含有维甲酸的类维生素A霜,临床上用于通过减少细纹和皱纹、减少粗糙度和改善肤色来改善皮肤外观)治疗;或皮下注射包含单顺反子mRNA混合物的脂质纳米颗粒,其中每个mRNA分子表达重编程因子O、S、K、L、M或N中的一者。每次注射包含2微克RNA。实验设计在图5中示出。

[0743] 在第0、1、2和3天进行转染。在第6天,冷冻皮肤外植体,通过免疫组织化学分析SOD2和胶原VII,作为皮肤复原和皮肤质量的标志物。免疫组织化学显示当使用含有脂质式(II)的脂质纳米颗粒和编码O、S、K、L、M和N的mRNA混合物对皮肤外植体进行瞬时重编程时与未处理的细胞相比SOD2的下调和胶原VII的上调。这表明人类皮肤的皮肤复原、皮肤质量提高以及氧化应激减少。含有脂质式(II)和编码O、S、K、L、M和N的mRNA混合物的脂质纳米颗粒诱导比RENOVA.®更高的胶原VII表达。数据在图6中示出。

[0744] 实例18:用脂质纳米颗粒组合物进行转染

[0745] 使用原代人类真皮成纤维细胞制备脂质纳米颗粒组合物用于体外转染研究。表达作为报告基因的mCherry的mRNA被用作调配物中的有效负载,并且其荧光被用作转染效率的直接测量。表18-1中列出了脂质纳米颗粒调配物中使用的脂质,并且每种调配物包括磷脂和亲水性聚合物。

[0746] 表18-1

[0747]

调配物 ID 编号	调配物中的脂质
#29	式 I-B
#30	式 I-B
#32	式 I
#33	式 I

[0748]

#29S	式 II
#30S	式 II

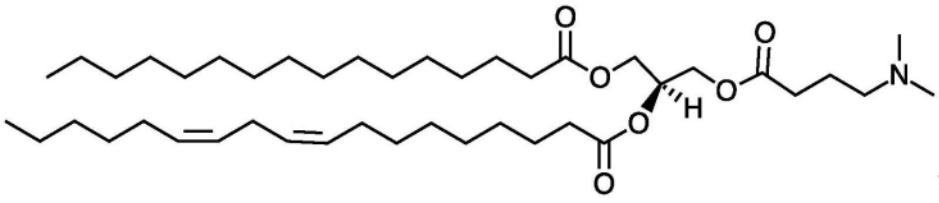
[0749] 为了转染,将细胞以每孔约17,000-25,000个细胞铺板于96孔板中。第二天用脂质纳米颗粒调配物转染细胞。基于每种调配物的mCherry mRNA浓度,对每种调配物进行系列稀释,以提供每孔100ng、50ng或25ng的mRNA剂量。转染后24小时,通过对细胞成像并计数表达mCherry报告基因(以红色检测)的细胞(用DAPI复染)百分比来确定转染效率。也使用SpectraMax读板仪(Molecular Devices)在587nm/610nm处对相对荧光进行定量。从原始数据中减去来自空白的背景荧光。来自进行100ng mRNA给药的细胞的数据呈现在图7A至7B中,其中图7A是用调配物ID编号#29治疗的细胞的图像,并且图7B是示出针对被识别的调配物进行转染的细胞的百分比的条形图,每者进行100ng mRNA的给药。具有“2X”指示的调配

物用脂质组分的量是没有2X指示的调配物的两倍来制备。未治疗的细胞和用表达mCherry的mRNA的细胞和转染试剂Lipofectamine™治疗的细胞作为对照。

[0750] 含有式I-B可电离脂质的脂质纳米颗粒(调配物ID编号#29和#30)在原代人类真皮成纤维细胞中提供比含有式I可电离脂质的脂质纳米颗粒(分别为调配物ID编号#32和#33)更高的转染效率,其中可电离脂质的差异是调配物ID编号#29与#32之间以及调配物ID编号#30与#33之间组分的唯一差异。对于两种不同的脂质纳米颗粒组合物观察到这种改善,每种组合物含有不同的辅助脂质,即#29和#32含有一种辅助脂质,并且调配物ID编号#30和调配物ID编号#33含有不同的辅助脂质。

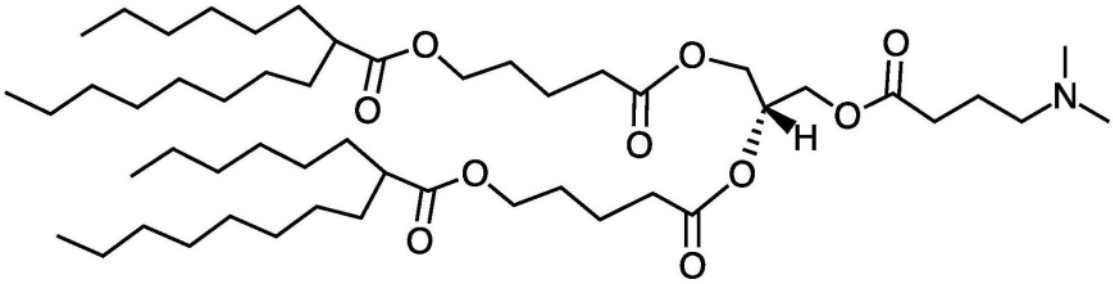
[0751] 实例19:用脂质纳米颗粒组合物进行转染

[0752] 制备脂质纳米颗粒组合物用于转染增强型绿色荧光蛋白(eGFP)mRNA。组合物在表19-1中列出。被识别为组合物ID编号19-5A和组合物ID编号19-5B的组合物包含如下所示的其S-异构体形式的可电离脂质,即式I脂质且对应于实例1中的可电离脂质1:

[0753] 

可电离脂质 1

[0754] 被识别为组合物ID编号19-6A和组合物ID编号19-6B的组合物包含如下所示的其R-异构体形式的可电离脂质,即具有表A的化合物27的结构的式I-B的脂质:

[0755] 

化合物 27，R-异构体，式 I-B

[0756] 所有脂质纳米颗粒组合物均包含eGFP mRNA、指定的可电离脂质(45-50wt%)、辅助脂质(诸如DSCP、DOPC、DOPE)、稳定脂质(例如,DMG-PEG)和结构脂质(鞘磷脂、胆固醇)。

[0757] 表19-1

[0758]

组合物 ID 编号	可电离脂质
19-1A	可电离脂质 1（式 I）
19-1B	可电离脂质 1（式 I）
19-2A	化合物 27 R-异构体 式 I-B
19-2B	化合物 27 R-异构体 式 I-B

[0759] 将Jurkat细胞和活化的Pan T细胞以每孔约1x 10^6个细胞铺板于96孔板中。将每种组合物以提供3μg eGFP mRNA剂量所需的量施加到孔(n＝3)中。将细胞在37℃孵育10分钟,并且然后转移至培养基中。18-24小时后,通过流式细胞术测量eGFP蛋白的表达,并用碘化丙啶对细胞进行染色以评估毒性。

[0760] 为了与脂质纳米颗粒组合物进行比较,也通过电穿孔(1350V或1600V,持续10ms以及3个脉冲)和Lipofectamine™ MessengerMAX™转染细胞,其中每1x10^6个细胞使用1.25μL Lipofectamine。

[0761] 结果在图8A至8D中示出。含有式I-B可电离脂质、组合物ID编号19-2A和19-2B的脂质纳米颗粒组合物在Jurkat和原代T细胞两者中均提供比含有式I可电离脂质、组合物ID编号19-1A和19-1B的脂质纳米颗粒更高的转染效率,其中可电离脂质的差异是组合物ID编号19-1A和19-2A之间以及组合物ID编号19-1B和19-2B之间组分的差异。对于两种不同的脂质纳米颗粒组合物观察到这种改善,每种组合物含有不同的辅助脂质,即,组合物ID编号19-1A和19-2A含有一种辅助脂质,并且组合物ID编号19-1B和19-2B含有不同的辅助脂质。类似地,含有式I-B可电离脂质的脂质纳米颗粒(组合物ID编号19-2A和19-2B)在Jurkat和原代T细胞中提供比含有式I可电离脂质的脂质纳米颗粒(组合物ID编号19-1A和19-1B)更高的活力;值得注意的是,含有式I-B可电离脂质的脂质纳米颗粒在原代T细胞中实际上是无毒的,而含有式I可电离脂质的脂质纳米颗粒是有毒的。

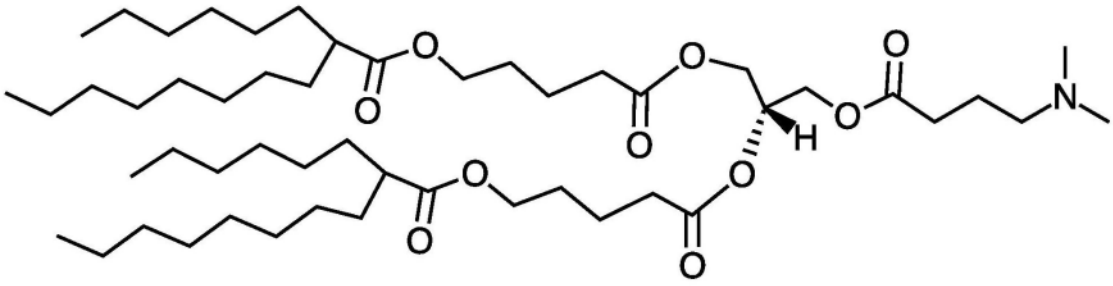
[0762] 含有式I-B可电离脂质的脂质纳米颗粒的转染效率高于Lipofectamine™的转染效率。与电穿孔相比,活力也得到改善。

[0763] 实例20:用脂质纳米颗粒组合物进行转染

[0764] 制备脂质纳米颗粒组合物用于转染增强型绿色荧光蛋白(eGFP)mRNA。组合物在表20-1中列出。

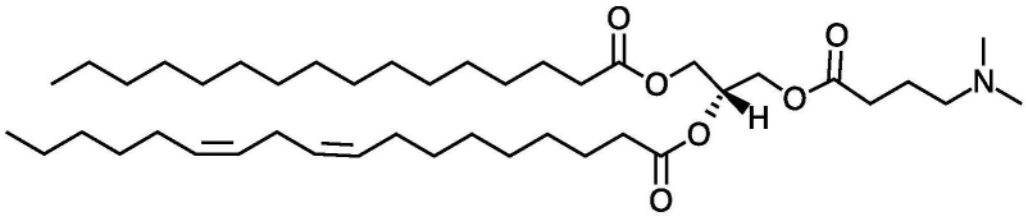
[0765] 被识别为组合物ID编号20-2A和20-2B的组合物包含如下所示的其R-异构体形式

的可电离脂质,即具有表A的化合物27的结构的式I-B脂质:

[0766] 

化合物 27，R-异构体，式 I-B

[0767] 被识别为组合物ID编号20-3A和组合物ID编号20-3B的组合物包含如下所示的其R-异构体形式的可电离脂质,即具有化合物24(表A)的结构的式I的脂质:

[0768] 

化合物 24，R-异构体，式 I

[0769] 所有脂质纳米颗粒组合物均包含eGFP mRNA、指定的可电离脂质(50wt%)、辅助脂质(诸如DSCP、DOPC、DOPE)、稳定脂质(例如,DMG-PEG)和结构脂质(鞘磷脂或胆固醇)。

[0770] 表20-1

[0771]

组合物 ID 编号	可电离脂质
20-1A	化合物 27 R-异构体 (式 I-B
20-1B	化合物 27 R-异构体 (式 I-B)
20-2A	化合物 24 R-异构体 (式 I)
20-2B	化合物 24 R-异构体 (式 I)
20-2C	化合物 24 R-异构体 (式 I)
20-2D	化合物 24 R-异构体 (式 I)

[0772] 将活化的Pan T细胞以每孔约1x 10^6个细胞的密度接种于96孔板中。将每种组合物以提供3μg eGFP mRNA剂量所需的量施加到孔(n=3)中。将细胞在37℃孵育10分钟,并且然后转移至培养基中。24小时后,通过流式细胞术测量eGFP蛋白的表达,并用碘化丙啶对细胞进行染色以评估毒性。

[0773] 为了进行比较,也通过电穿孔(1350V,持续10ms以及3个脉冲)用eGFP mRNA转染细胞。

[0774] 结果在图9A至9B中示出。包含式I-B可电离脂质的被标识为组合物ID编号20-1A和20-1B的脂质纳米颗粒组合物在原代T细胞中提供比含有式I可电离脂质的脂质纳米颗粒(分别为组合物ID编号20-2B和20-2C)更高的转染效率,其中可电离脂质的差异是组合物ID编号20-1(A、B)和组合物ID编号20-2(B、C)之间组分的唯一差异。对两种不同的脂质纳米颗粒组合物中观察到了这种改善,每种组合物都含有不同的辅助脂质,即组合物ID编号20-1A和组合物ID编号20-2B含有一种辅助脂质,并且组合物ID编号20-1B和组合物ID编号20-2C含有不同的辅助脂质。类似地,含有式I-B可电离脂质的脂质纳米颗粒(组合物ID编号20-1A

和组合物ID编号20-1B)在原代T细胞中提供比含有式I可电离脂质的脂质纳米颗粒(分别为组合物ID编号20-1B和组合物ID编号20-2C)更高的活力。

[0775] 因此,实例19和20表明,对于含有四种不同辅助脂质的四种不同脂质纳米颗粒组合物,式I-B可电离脂质比式I可电离脂质提供更高的转染效率和更高的活力,即更低的毒性。这些发现表明式I-B可电离脂质的"尾部"结构提供了更高的转染效率和更低的毒性。

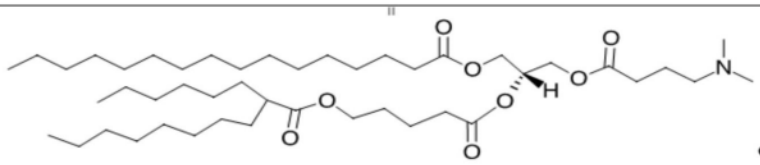
[0776] 实例20中的组合物ID编号20-1A、组合物ID编号20-1B、组合物ID编号20-2B和组合物ID编号20-2C包含与实例18中的组合物ID编号#29、#30、#32和#33相同的可电离脂质。因此,在两种不同的细胞类型(漂浮细胞和贴壁细胞两者)中的不同脂质纳米颗粒组合物中观察到由式I-B可电离脂质提供的转染效率的改善。

[0777] 实例21:用脂质纳米颗粒组合物进行转染

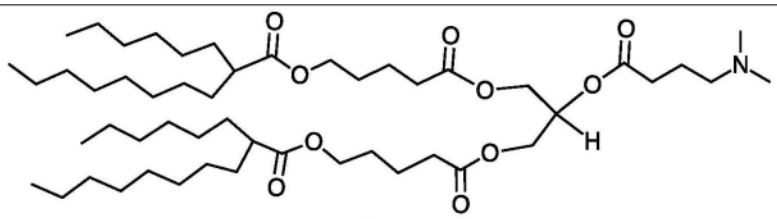
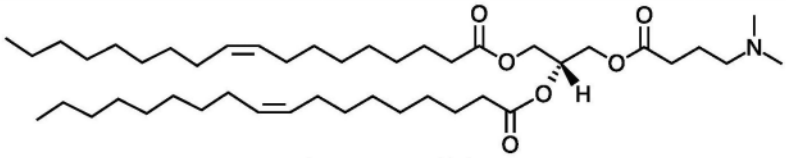
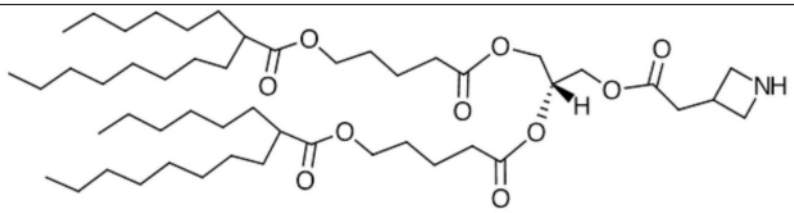
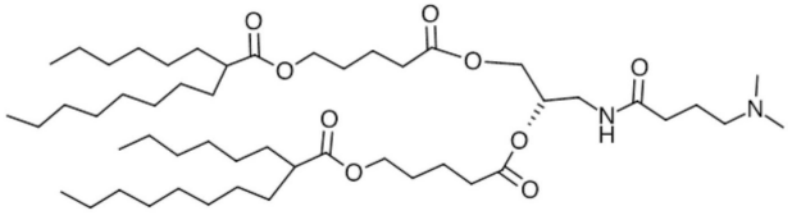
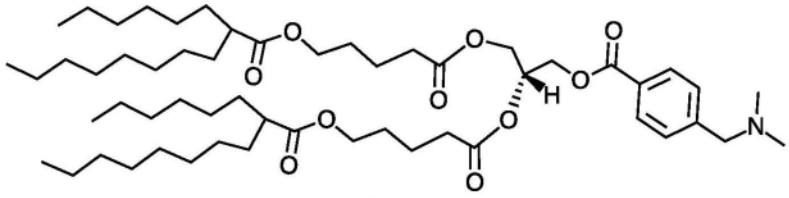
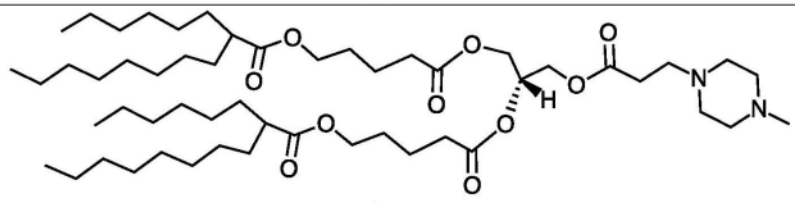
[0778] 制备脂质纳米颗粒组合物用于转染增强型绿色荧光蛋白(eGFP)mRNA。每种组合物中的可电离脂质结构在表21-1中列出。所有脂质纳米颗粒组合物包含eGFP mRNA、指定的可电离脂质(50wt%)、辅助脂质(DOPC或DOPE)、稳定脂质(例如,DMG-PEG)和结构脂质(胆固醇)。

[0779] 表21-1

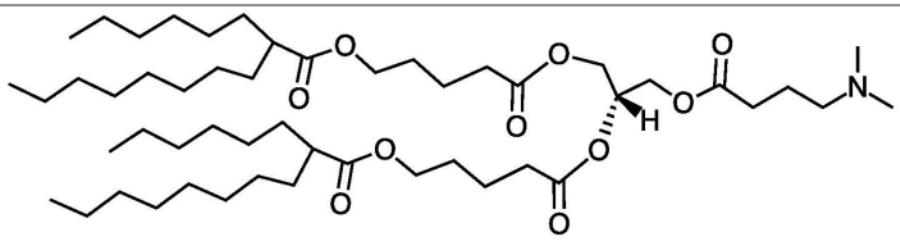
[0780]

组合物ID编号	可电离脂质和结构
21-1A	
21-1B	式I-A

[0781]

组合物 ID 编号	可电离脂质和结构
21-2A	 式 I-B
21-2B	
21-3A	 式 V，R-异构体
21-3B	
21-4A	 式 XX
21-4B	
21-5A	 式 XX
21-5B	
21-6A	 式 XX
21-6B	
21-7A	 式 XX
21-7B	

[0782]

组合物 ID 编号	可电离脂质和结构
21-8A	
21-8B	化合物 27 R-异构体 （式 I-B）

[0783] 将活化的Pan T细胞以每孔约1x 10^6个细胞的密度接种于96孔板中。将每种组合物以提供3μg eGFP mRNA剂量所需的量施加到孔(n＝2)中。将细胞在25℃孵育1分钟,并且然后转移至培养基中。18-24小时后,通过流式细胞术测量eGFP蛋白的表达,并用碘化丙啶对细胞进行染色以评估毒性。

[0784] 为了进行比较,也通过电穿孔(1350V,持续10ms以及3个脉冲)用eGFP mRNA转染细胞。

[0785] 结果在图10A至10C中示出,其中细胞活力在图10A中示出,转染效力在图10B中示出,并且转染效率在图10C中示出。

[0786] 实例22-38:LCMS方法和缩写:实例22-38中引用了以下方法和缩写。

[0787] 方法A:Chromolith,RP-18e,50-4.6mm,流动相A:0.05％ TFA水溶液,流动相B:0.05％ TFA乙腈溶液,95A/5B-0A/100B持续9.5min,保持9.5-10.5min,95A/5B

[0788] 10.5-12min。

[0789] 方法B:Chromolith,RP-18e,50-4.6mm,流动相A:0.05％ TFA水溶液,流动相B:

[0790] 0.05％ TFA乙腈溶液,95A/5B-0A/100B持续8min,保持8-9min,95A/5B 9-9.1min,

[0791] 保持9.1-12min。

[0792] 方法C:Chromolith,RP-18e,50-4.6mm,流动相A:0.05％ TFA水溶液,流动相B:0.05％ TFA乙腈溶液,50A/50B-0A/100B持续8min,保持8-9min,95A/5B 9-9.1

[0793] min,保持9.1-12min。

[0794] 方法D:Chromolith,RP-18e,50-4.6mm,流动相A:0.1％ TFA水溶液,流动相B:

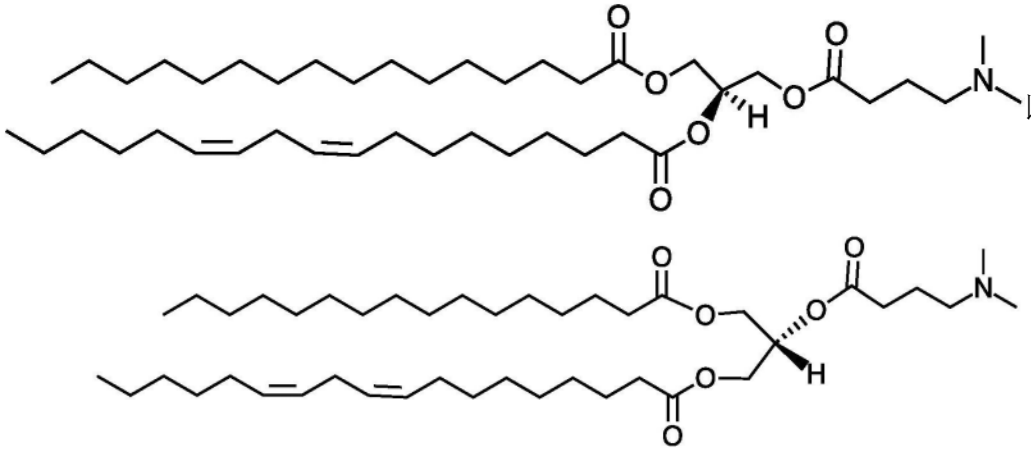
[0795] 0.1％ TFA乙腈溶液,50A/50B-0A/100B持续3min,保持3-9min,50A/50B 9-9.1min,保持9.1-12min。

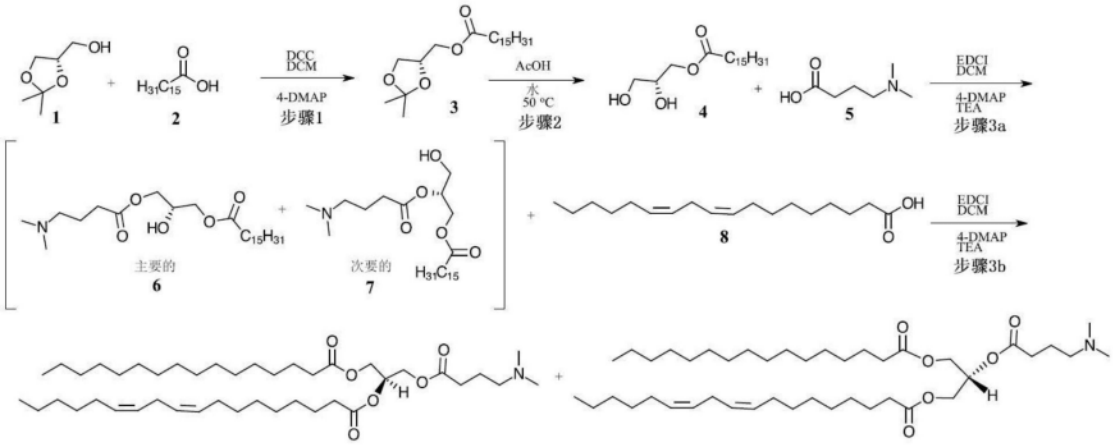
[0796] 缩写:N,N'-二环已基碳二亚胺(DCC);二氯甲烷(DCM);4-(二甲氨基)吡啶(4-DAMP);

[0797] 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDCI);三乙胺(TEA);和2,3-二氯-5,6-二氰基-1,4-苯醌(DDQ)。

[0798] 实例22:化合物的合成

[0799] 本施例展示脂质化合物的合成:

[0800] 
以及

[0801] 

[0802] 方案22

[0803] 步骤1:向(S)-(+)-2,2-二甲基-1,3-二氧戊环-4-甲醇1(0.88mL,7.1mmol,1当量)在无水二氯甲烷(25mL)中的溶液中添加棕榈酸2(1.82g,7.1mmol,1当量)和4-DMAP(52mg,0.42mmol,0.06当量)。将所得混合物在冰/水浴下冷却至大约0℃。在25min内向该溶液中滴加N,N'-二环已基碳二亚胺(2.92g,14.2mmol,2当量)在无水二氯甲烷(20mL)中的混合物。将反应混合物温热至一定温度并再搅拌72h。将反应混合物用已烷(50mL)稀释,并将所得白色沉淀物滤出并用已烷(2×25mL)洗涤。将滤液在真空中浓缩,并在30min内使用已烷中的0-10%乙酸乙酯通过硅胶快速柱色谱进行纯化,以获得纯中间体3(2.48g,94%产率)。LCMS(M+1)=371.88,Rt=9.86min。(方法A)

[0804] 步骤2:将中间体3(1g,2.7mmol)在乙酸(4mL)和水(1mL)中的溶液在50℃搅拌2h,并且然后在30℃搅拌48h。然后将反应混合物在水(100mL)与乙醚(100mL)之间分配。分离有机层并用饱和碳酸氢钠水溶液(2×100mL)和盐水(50mL)洗涤。将有机层在无水硫酸镁下干燥,过滤并在真空中浓缩,以提供粗制产物,将其在已烷和乙酸乙酯中结晶以提供中间体4(0.89g,79%产率)。LCMS(M+Na)=353.51,Rt=5.26min。(方法B)。

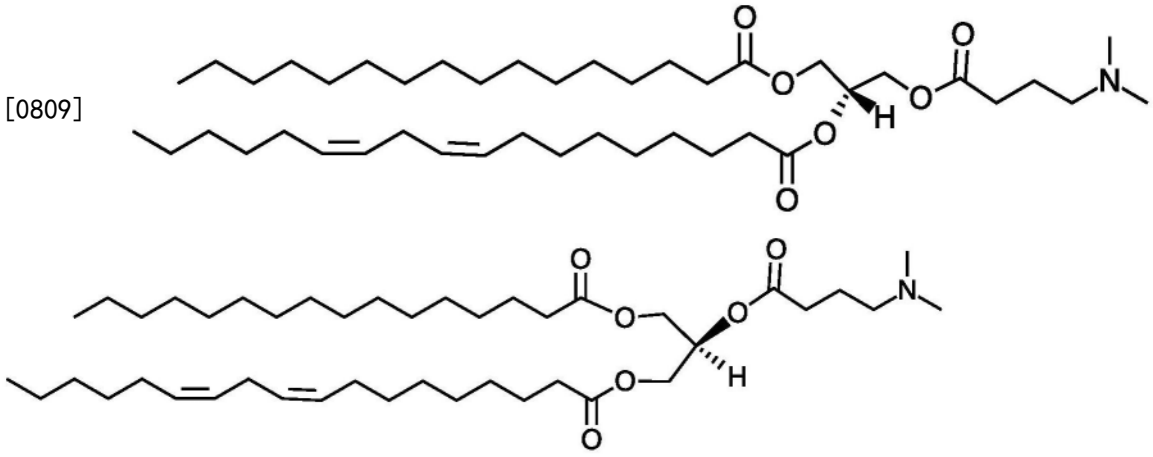
[0805] 步骤3a:向中间体4(202mg,0.61mmol,1当量)在二氯甲烷(15mL)中的溶液中添加4-二甲氨基丁酸盐酸盐(92mg,0.55mmol,0.9当量)、EDCI.HCl(140mg,0.73mmol,1.2当量)、三乙胺(0.255mL,1.83mmol,3当量)和4-DMAP(7mg,0.06mmol,0.1当量)。将反应混合物在室温下搅拌1.5h。

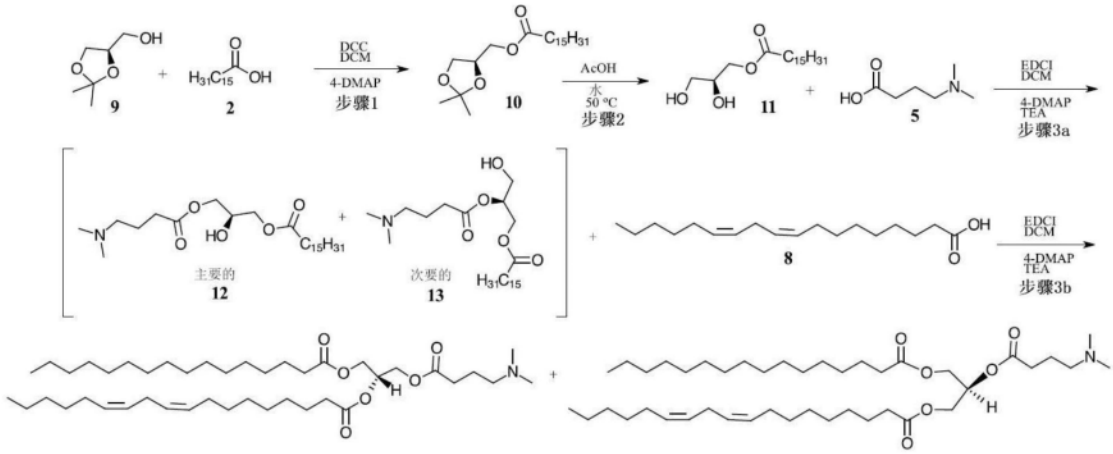
[0806] 步骤3b:添加亚油酸8(0.379mL,1.22mmol,2当量)、EDCI.HCl(0.175g,0.91mmol,

1.5当量)、三乙胺(0.27mL,1.9mmol,3当量)和4-DMAP(7mg,0.06mmol,0.1当量),并将所得混合物在室温下搅拌16h。在真空中减少溶剂,并使用在二氯甲烷中的0%-10%甲醇直接在硅胶快速色谱上纯化粗制混合物,以获得上示第一脂质化合物(37mg,两步8.6%产率)。LCMS(M+1)=706.27,Rt=8.79min(方法C)和上示第二脂质化合物(17mg,两步4%产率)。LCMS(M+1)=706.26,Rt=8.71min(方法C)。

[0807] 实施例23:化合物的合成

[0808] 本施例展示脂质化合物的合成:

[0809]  以及



[0810] 方案23:化合物的合成

[0811] 步骤1:向(R)-(+)-2,2-二甲基-1,3-二氧戊环-4-甲醇9(0.94mL,7.6mmol,1当量)在无水二氯甲烷(20mL)中的溶液中添加棕榈酸2(1.94g,7.6mmol,1当量)和4-DMAP(55mg,0.45mmol,0.06当量)。将所得混合物在冰/水浴下冷却至大约0℃。在30min内向该溶液中滴加N,N'-二环已基碳二亚胺(3.12g,15.1mmol,2当量)在无水二氯甲烷(35mL)中的混合物。将反应混合物温热至一定温度并再搅拌12h。将反应混合物用已烷(60mL)稀释,并将所得白色沉淀物滤出并用已烷(2×30mL)洗涤。将滤液在真空中浓缩,并在30min内使用已烷中的0-10%乙酸乙酯通过硅胶快速柱色谱进行纯化,以获得纯中间体10(2.1g,80%产率)。

[0812] 步骤2:将中间体10(1.5g,4mmol)在乙酸(12mL)和水(3mL)中的溶液在50℃搅拌2h,并且然后在室温下搅拌16h。然后将反应混合物在水(50mL)与乙醚(150mL)之间分配。分离有机层,并且用乙醚(50mL)反萃取水层。将合并的有机层用饱和碳酸氢钠水溶液(2×60mL)和盐水(50mL)洗涤。将有机层在无水硫酸钠下干燥,过滤并在真空中浓缩,以提供粗

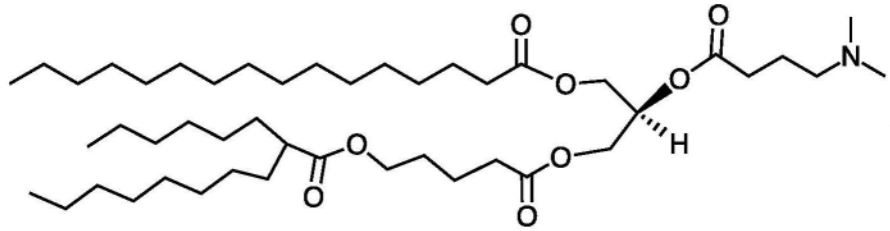
制产物,将其在己烷和乙酸乙酯中结晶以提供中间体11(1.28g,97%产率)。

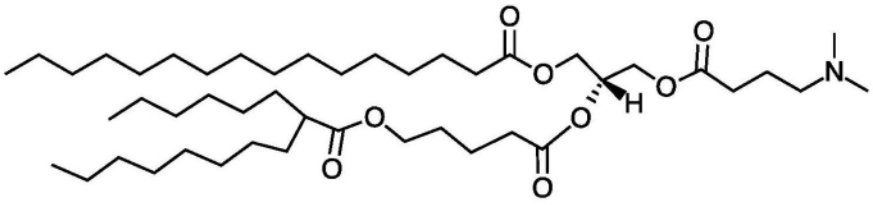
[0813] 步骤3a:向中间体11(500mg,1.5mmol,1当量)在二氯甲烷(70mL)中的溶液中添加4-二甲氨基丁酸盐酸盐(228mg,1.36mmol,0.9当量)、EDCI.HCl(320mg,1.66mmol,1.1当量)、三乙胺(0.675mL,4.84mmol,3.2当量)和4-DMAP(18mg,0.15mmol,0.1当量)。将反应混合物在室温下搅拌1.5h。

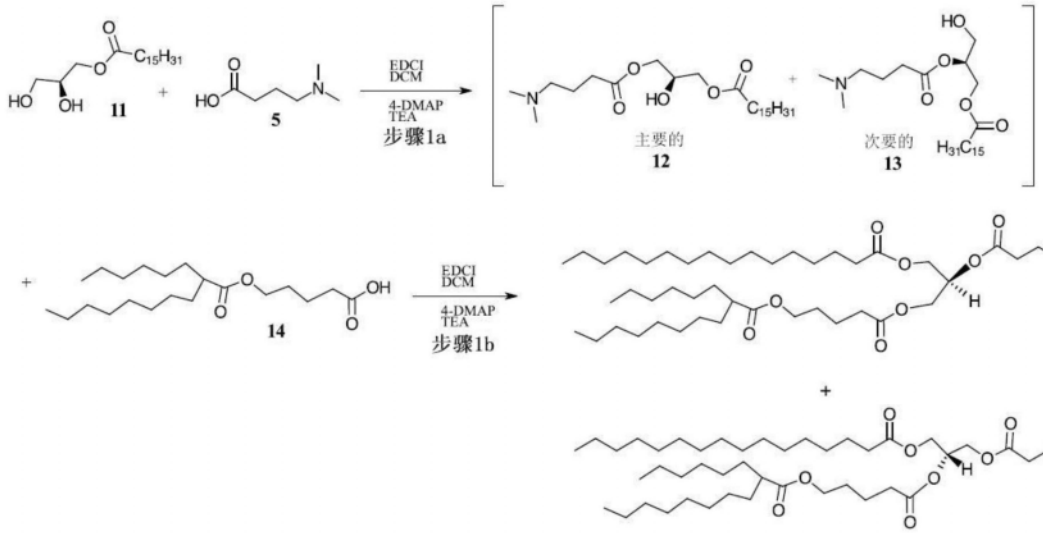
[0814] 步骤3b:添加亚油酸8(0.940mL,3.02mmol,2当量)、EDCI.HCl(0.638g,3.32mmol,2.2当量)、三乙胺(0.740mL,5.3mmol,3.5当量)和4-DMAP(18mg,0.15mmol,0.1当量),并将所得混合物在室温下搅拌16h。在真空中减少溶剂,并使用在二氯甲烷:乙酸乙酯的75:25混合物中的0%-10%甲醇直接在硅胶快速色谱上纯化粗制混合物,以获得上示第一脂质化合物(81mg,两步7.6%产率)。LCMS(M+1)=706.18,Rt=9.16min,和上示第二化合物(12mg,两步1.1%收率)。LCMS(M+1)=706.19,Rt=8.98min(方法C)。

[0815] 实施例24:化合物的合成

[0816] 本施例展示脂质化合物的合成:

[0817]  以及





[0818] 方案24:化合物的合成

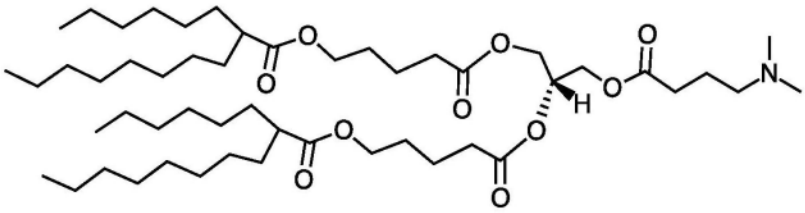
[0819] 向中间体11(300mg,0.9mmol,1当量)在二氯甲烷(15mL)中的溶液中添加4-二甲氨基丁酸盐酸盐(152mg,0.9mmol,1当量)、EDCI.HCl(208mg,1.1mmol,1.2当量)、三乙胺(0.443mL,3.17mmol,3.5当量)和4-DMAP(11mg,0.09mmol,0.1当量)。将反应混合物在室温

下搅拌1.5h。

[0820] 添加羧酸14(398mg,1.1mmol,1.23当量)、EDCI.HCl(0.226g,1.2mmol,1.3当量)和三乙胺(0.380mL,2.7mmol,3当量)的二氯甲烷(5mL)溶液并将所得混合物在室温下搅拌16h。在真空中减少溶剂,并使用在二氯甲烷中的0%-10%甲醇直接在硅胶快速色谱上纯化粗制混合物,以获得上示两种产物化合物,为大约45:55的混合物(29mg,两步4%产率)。LCMS(M+1)=782.61,分别为Rt=9.07和9.19min(方法C)。

[0821] 实例25:化合物的合成

[0822] 该实例演示脂质化合物的合成:

[0823] 

[0824] 方案25:化合物的合成

[0825] 步骤1:在氮气气氛下,向干燥的100mL圆底烧瓶中添加60%分散在油中的NaH(225mg,5.6mmol,1.25当量)。经由注射器依次缓慢添加无水THF(18mL)和无水DMF(5mL)。在10min之后,经由注射器缓慢添加(S)-(+)-2,2-二甲基-1,3-二氧戊环-4-甲醇1(0.5mL,4.5mmol,1当量)并将所得反应混合物在室温下搅拌1h。添加4-甲氧基苄基氯(0.67mL,5mmol,1.1当量)和四丁基碘化铵(59mg,0.16mmol,0.036当量)并将反应混合物进一步搅拌12h。添加MeOH(2mL)。然后将反应混合物用饱和氯化铵水溶液(25mL)、水(25mL)和盐水(25mL)洗涤。合并水层并用DCM(2X 50mL)反萃取。合并有机层并经无水硫酸钠干燥,过滤并在真空中浓缩以提供粗制产物,使用已烷中的0-10%乙酸乙酯在硅胶快速色谱上来纯化该粗制产物,以提供中间体15(980mg,96%产率)。

[0826] 步骤2:向中间体15(1g,4mmol,1当量)在甲醇(5mL)中的溶液中添加对甲苯磺酸(38mg,0.2mmol,0.05当量)并将所得反应混合物在室温下搅拌72h。添加三乙胺(0.046mL)。在硅胶上制备反应混合物的浆液并使用已烷中的0%-100%乙酸乙酯在硅胶快速色谱上直接纯化以获得中间体16(390mg,46%产率)。

[0827] 步骤3:在室温下,向二醇16(150mg,0.71mmol,1当量)在二氯甲烷(6.mL)中的溶液中添加酸14(579mg,1.6mmol,2.3当量)、EDCI盐酸盐(338mg,1.8mmol、2.5当量)、三乙胺

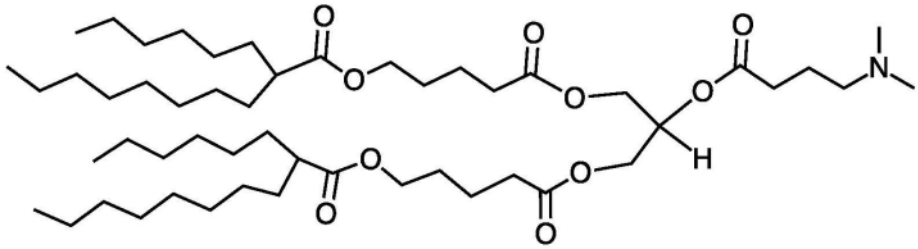
(0.690mL,4.9mmol,7当量)和4-DMAP(17mg,0.14mmol,0.2当量),并将所得反应混合物搅拌48h。将反应混合物在真空中浓缩并使用己烷中的0%-25%乙酸乙酯通过硅胶快速色谱纯化,以获得纯的中间体17,为透明浅黄色糖浆(232mg,37%产率)。

[0828] 步骤4:将中间体17(190mg,0.21mmol,1当量)添加至二氯甲烷(9mL)和水(0.565mL)的混合物中。分批缓慢添加DDQ(122mg,0.53mmol,2.5当量)并将所得反应混合物在室温下搅拌过夜。通过添加饱和碳酸氢钠水溶液(15mL)淬灭反应混合物。将水层用二氯甲烷(4x 25mL)来萃取。将合并的有机层用饱和碳酸氢钠水溶液(25mL)、盐水(2×25mL)洗涤,经无水硫酸钠干燥,过滤并减压浓缩以获得粗制产物,使用己烷中的0%-30%乙酸乙酯通过快速硅胶色谱来纯化该粗制产物。将纯级分浓缩至干以获得所需产物醇18,为浅黄色透明油(160mg,定量)。

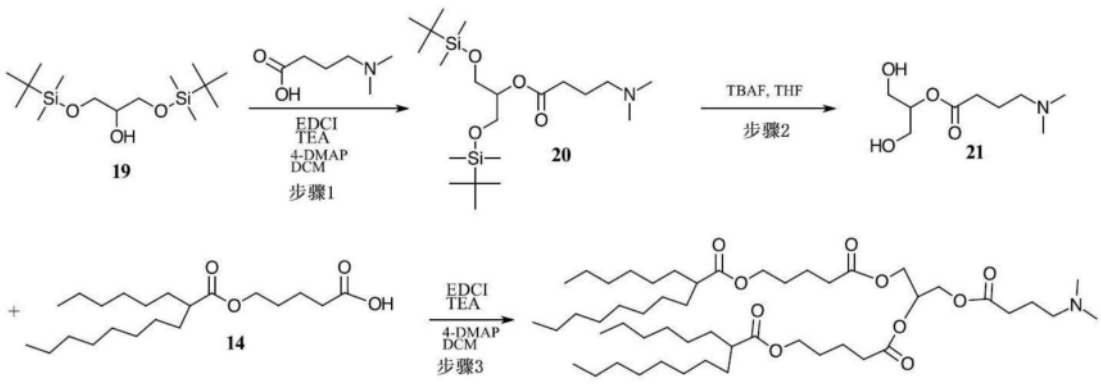
[0829] 步骤5:向中间体醇18(145mg,0.19mmol,1当量)在二氯甲烷(3.5mL)中的溶液中添加4-二甲基氨基丁酸盐酸盐(64mg,0.38mmol,2当量)、EDCI盐酸盐(92mg,0.47mmol,2.5当量)、三乙胺(0.250mL,1.8mmol,9.4当量)、4-DMAP(10mg,0.08mmol,0.4当量),并将所得反应混合物在室温下搅拌16h。LCMS表明所需产物的形成。将反应混合物直接加载到硅胶柱上并使用在二氯甲烷中的0%-10%甲醇纯化。合并纯级分,在旋转蒸发器中浓缩并在高真空下干燥过夜,以获得所需产物(140mg,84%产率)。LCMS(M+1)=882.68,Rt=8.89min(方法C)。^{1}H NMR:(500MHz,氯仿-d)δ5.26(ddd,J=10.1,5.9,4.2Hz,1H),4.32(dd,J=4.4,2.2Hz,1H),4.29(dd,J=4.4,2.2Hz,1H),4.14(ddd,J=12.0,5.9,1.8Hz,2H),4.08(dt,J=6.3,3.1,3.1Hz,4H),2.36(td,J=7.2,7.1,2.8Hz,6H),2.30(td,J=8.7,8.5,4.4Hz,4H),2.22(s,6H),1.79(p,J=7.3,7.3,7.3,7.3Hz,2H),1.69(dh,J=12.3,3.6,3.6,3.2,3.2,3.2Hz,8H),1.58(h,J=7.4,7.4,7.4,5.1,5.1Hz,4H),1.43(p,J=7.1,7.1,5.6,5.6Hz,4H),1.25(s,40H),0.92-0.83(m,12H)。

[0830] 实例26:化合物的制备

[0831] 该实例演示脂质化合物的合成:



[0832]



[0833] 方案26:化合物的合成

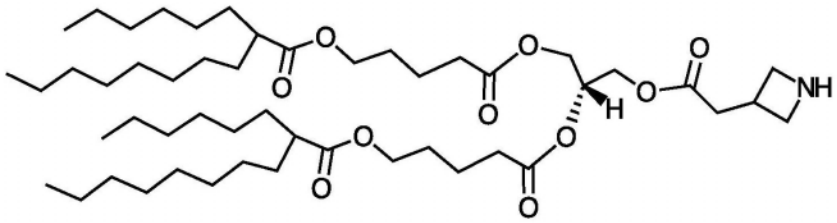
[0834] 步骤1:在室温下,向化合物19(500mg,1.56mmol,1当量)在二氯甲烷(15.mL)中的溶液中添加4-(二甲基氨基)丁酸(392mg,2.34mmol,1.5当量)、EDCI盐酸盐(750mg,3.9mmol,2.5当量)、三乙胺(1.2mL,7.8mmol,5当量)和4-DMAP(96mg,0.78mmol,0.5当量),并将所得反应混合物搅拌48h。将反应混合物在真空中浓缩并使用已烷中的0%-25%乙酸乙酯通过硅胶快速色谱纯化,以获得纯中间体20,为固体(168mg,25%产率)。

[0835] 步骤2:向中间体20(150mg,0.4mmol,1当量)在THF(2mL)中的溶液中添加TBAF(2mL,4.67mmol,10当量),并将所得反应混合物在室温下搅拌3h。在硅胶上制备反应混合物的浆液并使用在DCM中的0%-10%甲醇在硅胶快速色谱上直接纯化,以获得中间体21(51mg,54%产率)。

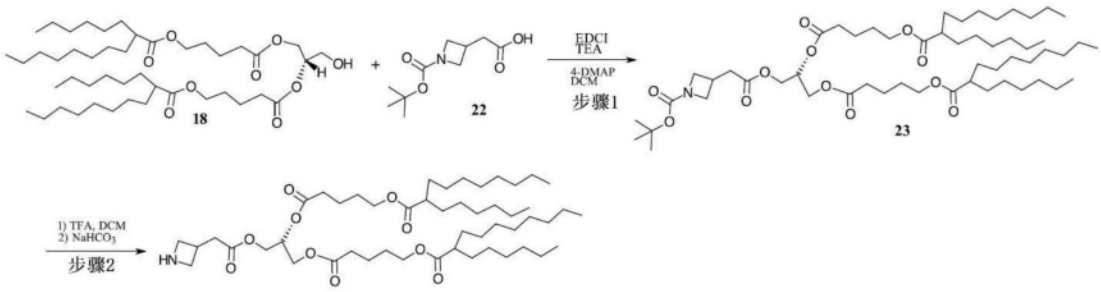
[0836] 步骤3:在室温下,向二醇中间体21(51mg,0.25mmol,1当量)在二氯甲烷(3mL)中的溶液中添加酸14(200mg,0.55mmol,2.1当量)、EDCI盐酸盐(120mg,0.625mmol、2.5当量)、三乙胺(0.2mL,1.25mmol,5当量)和4-DMAP(6mg,0.05mmol,0.2当量),并将所得反应混合物搅拌48h。将反应混合物在真空中浓缩并使用已烷中的0%-40%丙酮通过硅胶快速色谱纯化,以获得纯的所需产物化合物(92mg,45%产率,[M+1]883.36。

[0837] 实例27:化合物的制备

[0838] 该实例演示脂质化合物的合成:



[0839]



[0840] 方案27:化合物的合成

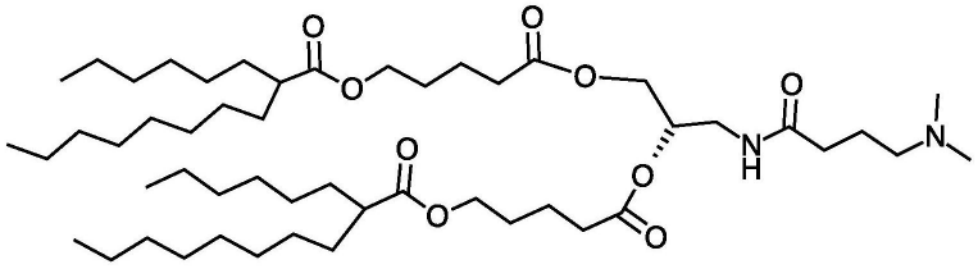
[0841] 步骤1:向醇18(137mg,0.18mmol,1当量)在二氯甲烷(5mL)中的溶液中添加2(1-叔丁氧羰基-3-氮杂环丁烷基)乙酸22(57mg,0.26mmol,1.5当量)、EDCI盐酸盐(57mg,0.29mmol,1.7当量)、三乙胺(0.2mL,0.89mmol,5当量)、4-DMAP(11mg,0.08mmol,0.5当量)并将所得反应混合物在室温下搅拌16h。LCMS表明所需产物的形成。将反应混合物直接加载到硅胶柱上并使用已烷中的0%-40%丙酮纯化。合并纯级分,在真空中浓缩并在高真空下干燥过夜以获得所需产物23(132mg,98%产率)。

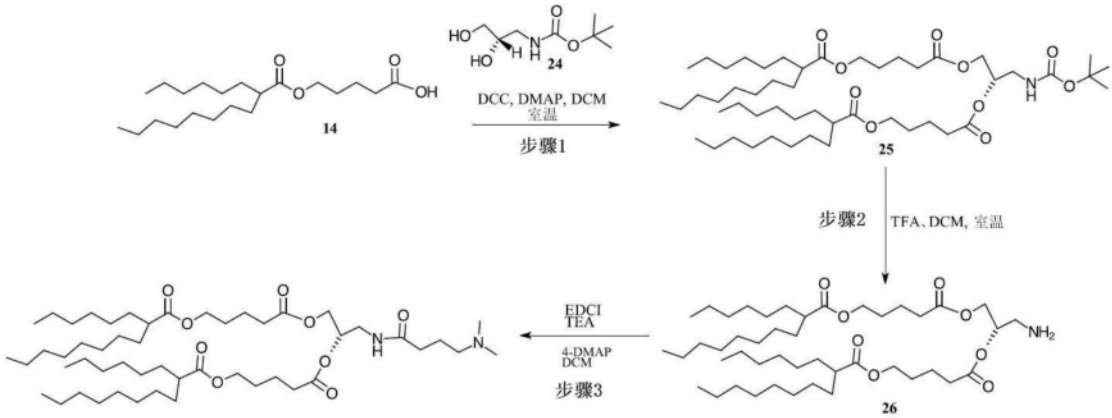
[0842] 步骤2:向化合物23(157mg,0.16mmol,1当量)在二氯甲烷(5mL)中的溶液中添加TFA(1ml)。将反应搅拌1小时,添加饱和碳酸氢钠水溶液(5mL),并将所得混合物用二氯甲烷(2×5mL)萃取,将合并的有机层用盐水洗涤,经无水硫酸钠干燥,过滤并在真空中浓缩,并且在高真空下干燥过夜,以获得所需产物(32mg,20%产率)。LCMS(M+1)=867.8,Rt=

4.96min(方法D)。

[0843] 实例28:化合物的制备

[0844] 该实例演示脂质化合物的合成:

[0845] 

[0846] 

[0847] 方案28:化合物的合成

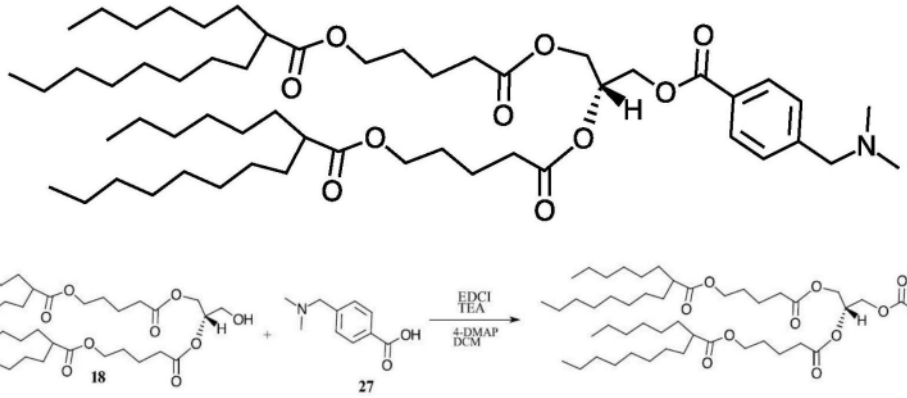
[0848] 步骤1:向(S)-2,3-二羟基丙氨基-甲酰基叔丁酯24(500mg,1.57mmol,1当量)在二氯甲烷(25mL)中的溶液中添加酸14(1.17g,3.29mmol,2.1当量)、EDCI盐酸盐(662mg,3.45mmol,2.2当量)、三乙胺(2.3ml,15.7mmol,10当量)和4-DMAP(20mg,0.16mmol,0.1当量)。将所得混合物在室温下搅拌16h。LCMS表明所需产物的形成。将反应混合物直接加载到硅胶柱上并使用已烷中的0%-20%丙酮纯化。将纯级分合并,在真空中浓缩并在高真空下干燥过夜以获得无色液体化合物25(681mg,49%产率)。

[0849] 步骤2:向化合物25(200mg,0.23mmol,1当量)在二氯甲烷(5mL)中的溶液中添加1.5ml TFA。将所得反应混合物在室温下搅拌2h并通过LCMS监测反应。将反应混合物在真空中浓缩并在高真空下干燥,以获得无色液体。将反应混合物(化合物26)用于下一步骤而无需纯化。

[0850] 步骤3:向化合物26(180mg,0.23mmol,1当量)在二氯甲烷(4mL)中的溶液中添加4-(二甲基氨基)丁酸(79mg,0.47mmol,2当量)、EDCI盐酸盐(113mg,0.58mmol,2.5当量)、三乙胺(170ul,1.17mmol,5当量)和4-DMAP(15mg,0.12mmol,0.5当量)。将反应混合物在室温下搅拌16h。LCMS表明所需产物的形成。添加二氯甲烷5mL并将所得混合物用水洗涤。分离有机层,经无水硫酸钠干燥并浓缩至总体积的约1/3,并且直接加载到硅胶柱上并使用已烷中的0%-20%丙酮纯化。合并纯级分,在真空中浓缩并在高真空下干燥过夜以获得所需产物,为无色液体(115mg,56%产率)。LCMS(M+1)=882.39,Rt=4.81min(方法D)。

[0851] 实例29:化合物的制备

[0852] 该实例演示脂质化合物的合成:

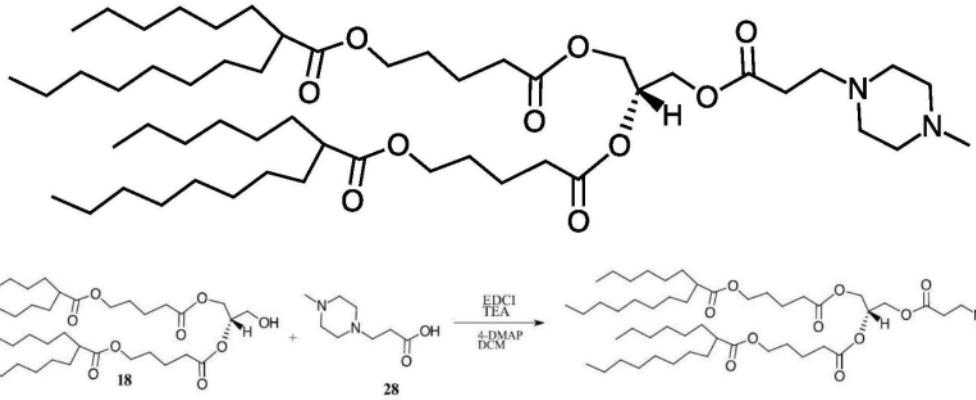
[0853] 

[0854] 方案29:化合物XII的合成

[0855] 向中间体醇18(50mg,0.065mmol,1当量)在二氯甲烷(3mL)中的溶液中添加p-[(二甲基氨基)甲基]苯甲酸27(18mg,0.097mmol,1.5当量)、EDCI盐酸盐(20mg,0.097mmol,1.5当量)、三乙胺(20uL,0.13mmol,2当量)、4-DMAP(2mg,0.03mmol,0.5当量),并将所得反应混合物在室温下搅拌16h。LCMS表明所需产物的形成。将反应混合物直接加载到硅胶柱上并使用已烷中的0%-40%丙酮纯化。合并纯级分,在真空中浓缩并在高真空下干燥过夜以获得所需产物(46mg,76%产率)LCMS(M+1)=931.43,Rt=4.22min(方法D)。

[0856] 实例30:化合物的制备

[0857] 该实例演示脂质化合物的合成:

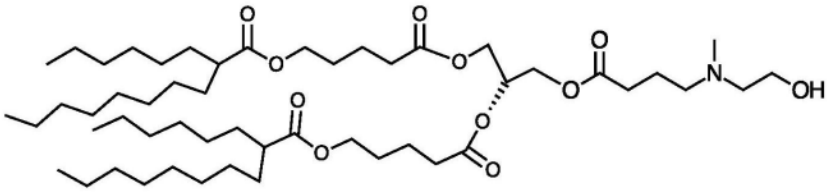
[0858] 

[0859] 方案30:化合物的合成

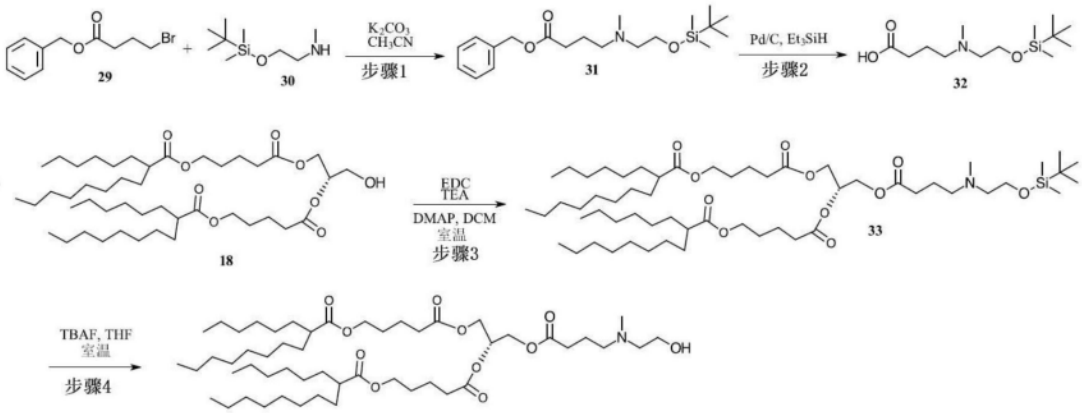
[0860] 向中间体醇18(50mg,0.065mmol,1当量)在二氯甲烷(3mL)中的溶液中添加3-(4-甲基-1-哌嗪基)丙酸28(17mg,0.097mmol,1.5当量)、EDCI盐酸盐(20mg,0.097mmol,1.5当量)、三乙胺(20uL,0.13mmol,2当量)、4-DMAP(2mg,0.03mmol,0.5当量),并将所得反应混合物在室温下搅拌16h。LCMS表明所需产物的形成。将反应混合物直接加载到硅胶柱上并使用在DCM中的0%-10%甲醇纯化。合并纯级分,在真空中浓缩并在高真空下干燥过夜以获得所需产物(27mg,45%产率)LCMS(M+1)=924.4,Rt=5.61min(方法D)。

[0861] 实例31:化合物的制备

[0862] 该实例演示脂质化合物的合成:



[0863]



[0864] 方案31:化合物的合成

[0865] 步骤1:向4-溴丁酸苄酯29(2g,7.78mmol,1当量)在乙腈(10mL)中的溶液中添加N-甲基{2-[(叔丁基)双(甲基)甲硅烷氧基]乙基}胺30(1.8g,9.33mmol,1.2当量)。添加碳酸钾(2.2g,15.36,2当量)并将所得反应混合物在室温下搅拌16h。LCMS表明所需产物的形成。在硅胶上制备反应混合物的浆液并使用己烷中的0%-30%乙酸乙酯通过硅胶柱色谱直接纯化。将纯级分合并,浓缩并在高真空下干燥过夜以获得化合物31(2.6g,91%产率),为白色固体。

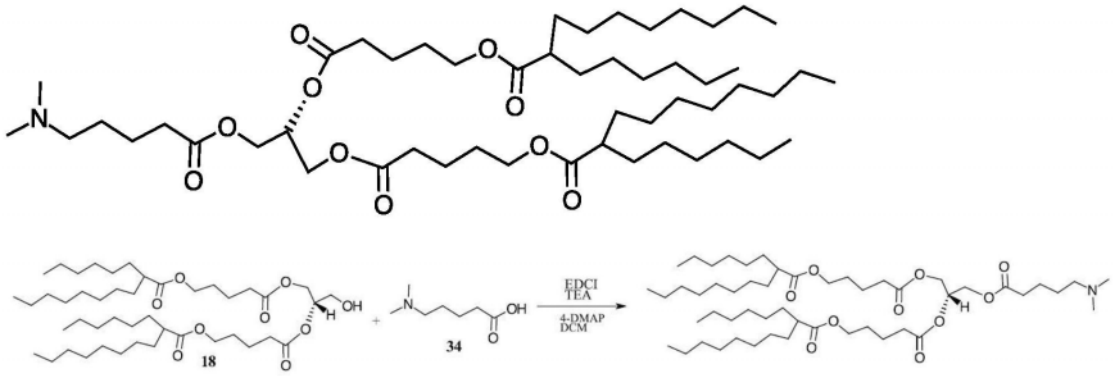
[0866] 步骤2:用氩气冲洗化合物31(780mg,2.14mmol,1当量)在无水甲醇(20mL)中的溶液。添加10% Pd/C(30mg,0.214mmol,0.1当量)并搅拌20min。将三乙基硅烷(1ml,6.42mmol,3当量)添加到所得混合物中。将反应混合物在室温下搅拌2h。然后将反应混合物通过硅藻土床过滤,并将滤液在真空中浓缩,在高真空下干燥以获得化合物32,为白色固体(560mg,95%收率),将其用于下一步骤无需任何进一步纯化。

[0867] 步骤3:向化合物18(89mg,0.12mmol,1当量)在二氯甲烷(4mL)中的溶液中添加化合物32(40mg,0.14mmol,1.2当量)、EDC盐酸盐(56mg,0.29mmol,2.5当量)、三乙胺(167μl,1.17mmol,10当量)和4-DMAP(2mg,0.01mmol,0.1当量)。将所得混合物在室温下搅拌16h。LCMS表明所需产物的形成。添加水(10mL)并用二氯甲烷(3×15mL)萃取。将合并的有机层用盐水洗涤,经无水硫酸钠干燥,过滤并浓缩以获得粗制产物,使用己烷中的0%-20%丙酮在硅胶柱上纯化该粗制产物。合并纯级分,在真空中浓缩并在高真空下干燥过夜以获得无色液体化合物33(93mg,47%产率)。LCMS(M+1)=1027.3,Rt=4.81min(方法D)。

[0868] 步骤4:向化合物33(93mg,0.09mmol,1当量)在THF(3mL)中的溶液中添加TBAF(0.2ml,10当量),并将所得反应混合物在室温下搅拌2h。LCMS表明反应的完成。将反应混合物直接加载到硅胶柱上并使用己烷中的0%-40%丙酮纯化以获得所需产物(57mg,69%产率)。LCMS(M+1)=913.56,Rt=5.06min(方法D)。

[0869] 实例32:化合物的制备

[0870] 该实例演示脂质化合物的合成:

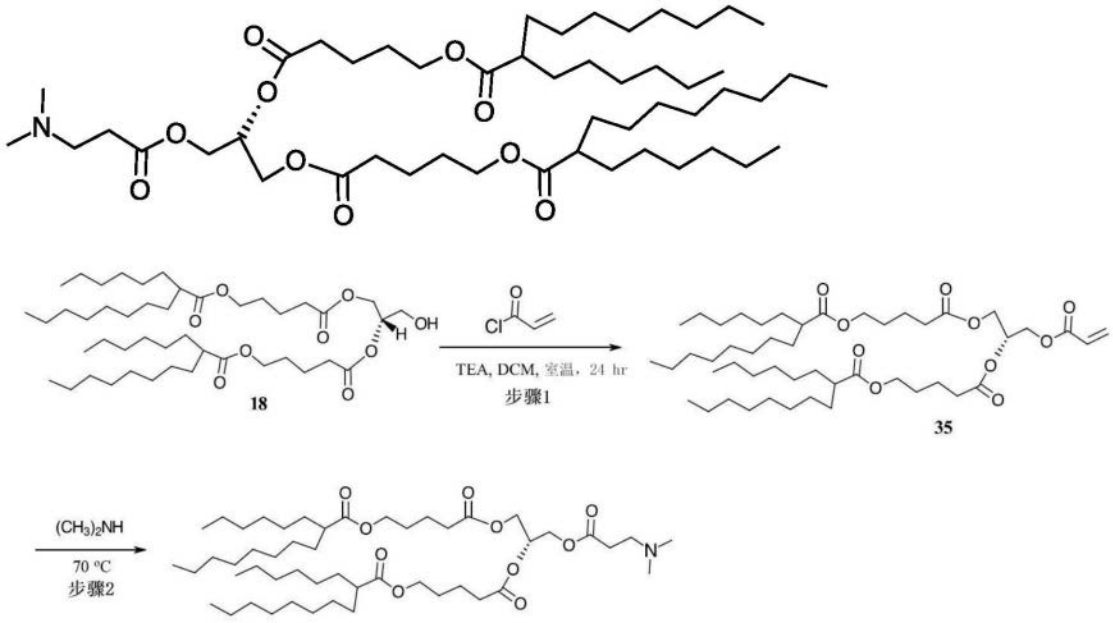
[0871] 

[0872] 方案32:化合物的合成

[0873] 向中间体醇18(102mg,0.133mmol,1当量)在二氯甲烷(4mL)中的溶液中添加5-(二甲基氨基)戊酸34(40mg,0.28mmol,2当量)、EDCI盐酸盐(64mg,0.33mmol,2.5当量)、三乙胺(96μL,0.66mmol,5当量)、4-DMAP(10mg,0.06mmol,0.5当量),并所得反应混合物在室温下搅拌16h。LCMS表明所需产物的形成。将反应混合物直接加载到硅胶柱上并使用已烷中的0%-60%丙酮纯化。合并纯级分,在旋转蒸发器中浓缩并在高真空下干燥过夜,以获得所需产物(56mg,47%产率)。LCMS(M+1)=897.34.8,Rt=4.99min(方法D)。

[0874] 实例33:化合物的制备

[0875] 该实例演示脂质化合物的合成:

[0876] 

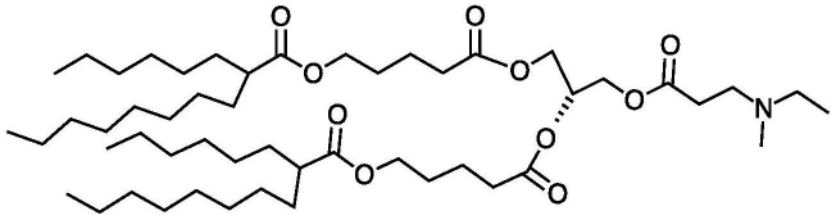
[0877] 方案33:化合物的合成

[0878] 步骤1:在氩气氛下向干燥的100mL圆底烧瓶中添加化合物18(1.1g,1.41mmol,1当量)。经由注射器缓慢添加无水二氯甲烷(18mL)。在10min之后,经由注射器缓慢添加三乙胺(0.2mL,4.23mmol,3当量),并将所得反应混合物在室温下搅拌10min。添加丙烯酰氯(0.34mL,4.23mmol,3当量)并将反应混合物进一步搅拌12小时。添加水(15mL),并分离有机层。将水层用二氯甲烷(2×15mL)反萃取,并将合并的有机层用盐水洗涤,经无水硫酸钠干燥,过滤并在真空中浓缩以提供粗制产物,使用已烷中的0%-30%乙酸乙酯在硅胶快速色谱上纯化该粗制产物以提供中间体35(754mg,65%产率)。

[0879] 步骤2:一般方法:将适当的胺(5当量)添加到纯中间体35(1当量)中,并将所得反应混合物在70℃搅拌3小时。在硅胶上制备反应混合物的浆液并使用己烷中的0%-40%梯度的丙酮在硅胶快速色谱上直接纯化,以通过使用二甲胺(在THF中的2M溶液)获得所需产物(320mg,96%产率)LCMS(M+1)=869.04,Rt=4.99min(方法D)。

[0880] 实例34:化合物的制备

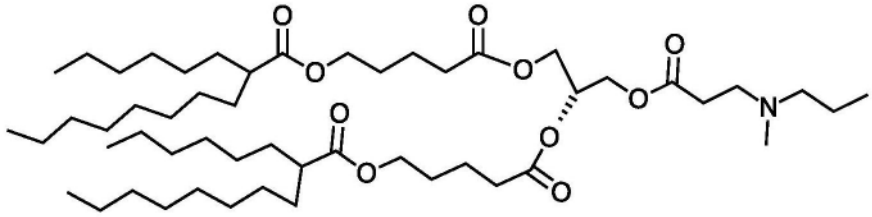
[0881] 该实例演示脂质化合物的合成:

[0882] 

[0883] 按照实例33、方案33中所示针对合成脂质化合物所描述的程序,通过使用N-乙基甲胺并使用己烷中的0%-30%丙酮进行的纯化,制备上示脂质化合物(63mg,77%产率)。LCMS(M+1)=883.77,Rt=5.01min(方法D)。

[0884] 实例35:化合物的制备

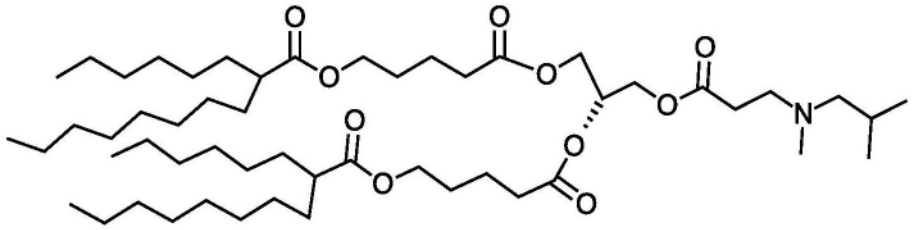
[0885] 该实例演示脂质化合物的合成:

[0886] 

[0887] 按照实例33、方案33中所示针对合成脂质化合物所描述的程序,通过使用N-丙基甲胺并使用己烷中的0%-30%丙酮进行的纯化,制备上示脂质化合物(78mg,82%产率)。LCMS(M+1)=897.63,Rt=5.00min(方法D)。

[0888] 实例36:化合物的制备

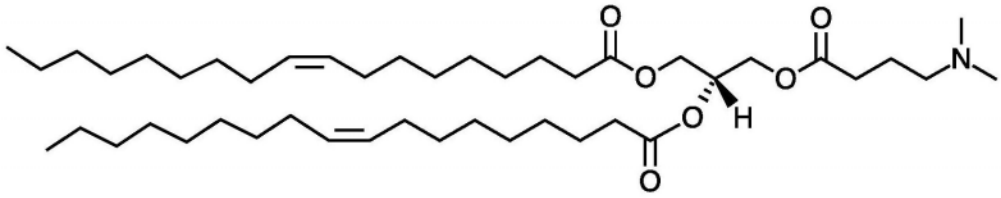
[0889] 该实例演示脂质化合物的合成:

[0890] 

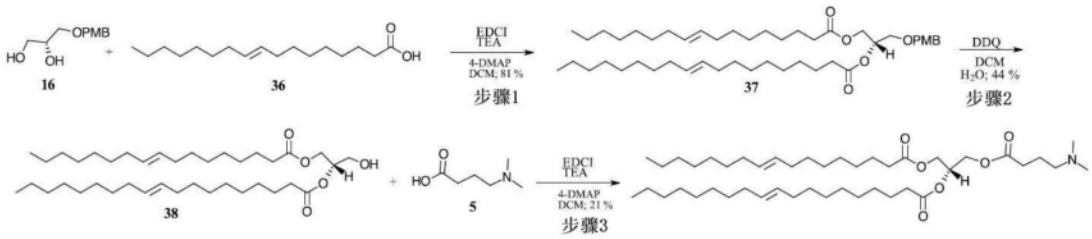
[0891] 按照实例33、方案33中所示针对合成脂质化合物所描述的程序,通过使用N-甲基异丁胺并使用己烷中的0%-30%丙酮进行的纯化,制备上示脂质化合物(89mg,67%产率)。LCMS(M+1)=911.59Rt=5.04min(方法D)。

[0892] 实例37:化合物的制备

[0893] 该实例演示脂质化合物的合成:



[0894]



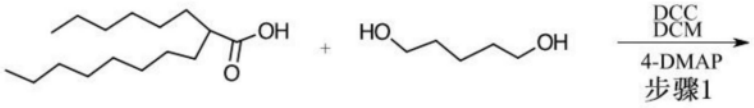
[0895] 方案37:化合物的合成

[0896] 步骤1:在室温下,向二醇16(500mg,2.35mmol,1当量)在二氯甲烷(20.mL)中的溶液中添加酸36(1.5g,5.18mmol,2.2当量)、EDCI盐酸盐(1.13g,5.80mmol,2.5当量)、三乙胺(3.4mL,23.54mmol,10当量)和4-DMAP(144mg,1.17mmol,0.5当量),并将所得反应混合物搅拌48h。将反应混合物在真空中浓缩并使用已烷中的0%-25%乙酸乙酯通过硅胶快速色谱纯化,以获得纯中间体37,为无色液体(1.355g,81%产率)。

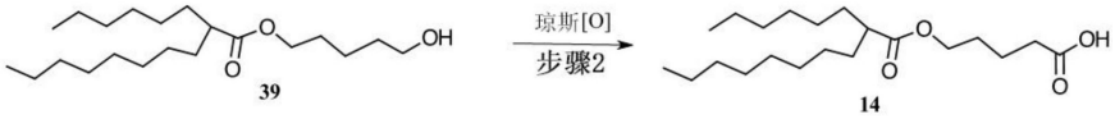
[0897] 步骤2:将中间体37(1.355g,1.9mmol,1当量)添加至二氯甲烷(15mL)和水(2mL)的混合物中。分批缓慢添加DDQ(1.1g,4.75mmol,2.5当量)并将所得反应混合物在室温下搅拌过夜。通过添加饱和碳酸氢钠水溶液(15mL)淬灭反应混合物。将水层用二氯甲烷(4x 25mL)来萃取。将合并的有机层用饱和碳酸氢钠水溶液(25mL)、盐水(2×25mL)洗涤,经无水硫酸钠干燥,过滤并减压浓缩以获得粗制产物,使用已烷中的0%-10%丙酮通过快速硅胶色谱来纯化该粗制产物。将纯级分浓缩至干以获得所需产物醇38,为透明油(750mg,44%产率)。

[0898] 步骤3:向中间体醇38(125mg,0.2mmol,1当量)在二氯甲烷(5mL)中的溶液中添加4-二甲基氨基丁酸盐酸盐(71mg,0.42mmol,2.1当量)、EDCI盐酸盐(97mg,0.5mmol,2.5当量)、三乙胺(0.3mL,2mmol,10当量)、4-DMAP(13mg,0.1mmol,0.5当量),并将所得反应混合物在室温下搅拌16h。LCMS表明所需产物的形成。将反应混合物直接加载到硅胶柱上并使用已烷中的0%-40%丙酮纯化。合并纯级分,在旋转蒸发器中浓缩并在高真空下干燥过夜,以获得所需产物(33mg,24%产率)。LCMS(M+1)=734.91,Rt=5.14min(方法D)。

[0899] 实例38:中间体14的合成



[0900]



[0901] 方案38:中间体14的合成

[0902] 步骤1:向2-己基癸酸(5g,19.5mmol,1当量)在二氯甲烷(120mL)中的溶液中添加1,5-戊二醇(6.1g,58.5mmol,3当量)、DCC(4.6g,22.2mmol,1.14当量)和4-DMAP(2.85g,23.4mmol,1.2当量)。将反应混合物在室温下搅拌12h。添加已烷(100mL),将所得沉淀物滤

出并将滤液在真空中浓缩以获得粗物质,使用已烷中的0%-15%乙酸乙酯通过硅胶色谱纯化该粗制产物以获得纯中间体39(3.5g,52%产率)。

[0903] 步骤2:将中间体醇39(918mg,2.7mmol,1当量)在丙酮(10mL)中的溶液在冰/水浴下冷却至大约0℃。经由注射器缓慢添加琼斯试剂(2M,2.16mL,4.32mmol,1.6当量)并将所得反应混合物逐渐温热至室温并搅拌16h。添加甲醇(0.5mL)以淬灭反应。将反应混合物减压浓缩,用水(200mL)稀释并用乙酸乙酯(100mL)萃取。用附加的乙酸乙酯(100mL)反萃取水层。将有机层经无水硫酸钠干燥、过滤并在真空中浓缩。使用已烷中的0%-15%乙酸乙酯通过硅胶柱色谱纯化粗制产物,以获得中间体14,为透明无色油(710mg,74%产率)。

[0904] 等效物

[0905] 应当理解,虽然已经结合本公开的具体描述对本公开进行了描述,但前面的描述旨在说明而非限制本公开的范围,本公开的范围由所附权利要求书的范围限定。其他方面、优点以及变更都在以下权利要求书的范围内。

用于真皮成纤维细胞复原的实验设计
第0天
接种的成人
成纤维细胞
第1天
变为重编程
培养基，
转染
第2天
转染
第3天
转染
第4天
转染
第5天
替换生长
培养基
第6天
细胞计数
如果：SOD2、
MMP1、
MMP9、p16
原代人类成人真皮成纤维细胞（40岁，女性）
• 6孔接种密度：（200K-250K个细胞/孔）
每孔 = 1 ug RNA
组 (n=3)
• 未处理的
• mCherry mRNA
• OSKLMN 重编程因子单顺反子 mRNA (mERA)
分析
• 细胞计数
• 免疫荧光
▪ SOD2
▪ MMP1
▪ MMP9
▪ p16INK4A

图1

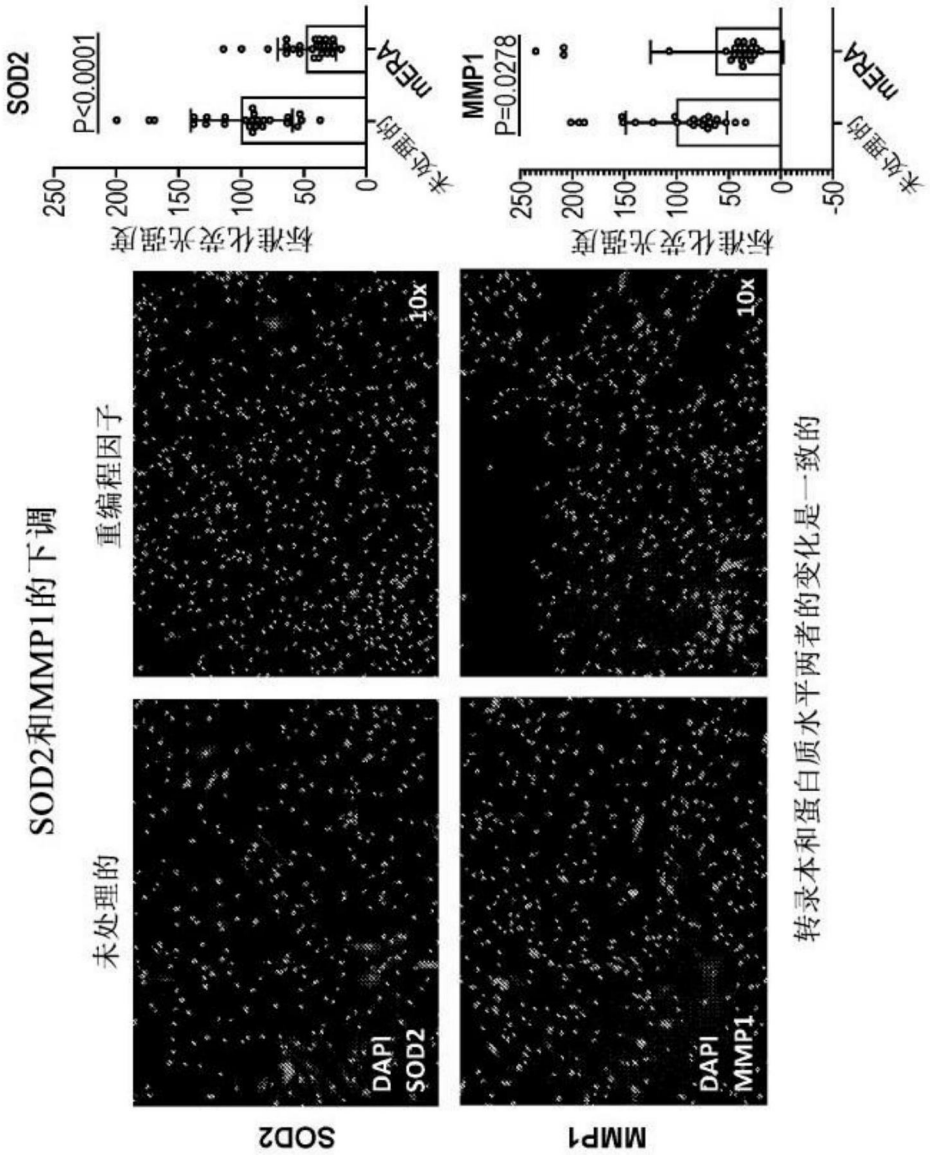

SOD2和MMP1的下调
未处理的
重编程因子
SOD2
MMP1
DAPI
SOD2
DAPI
MMP1
10x
10x
SOD2
P<0.0001
MMP1
P=0.0278
标准化荧光强度
250
200
150
100
50
0
-50
未处理的
MERA
转录本和蛋白质水平两者的变化是一致的

图2

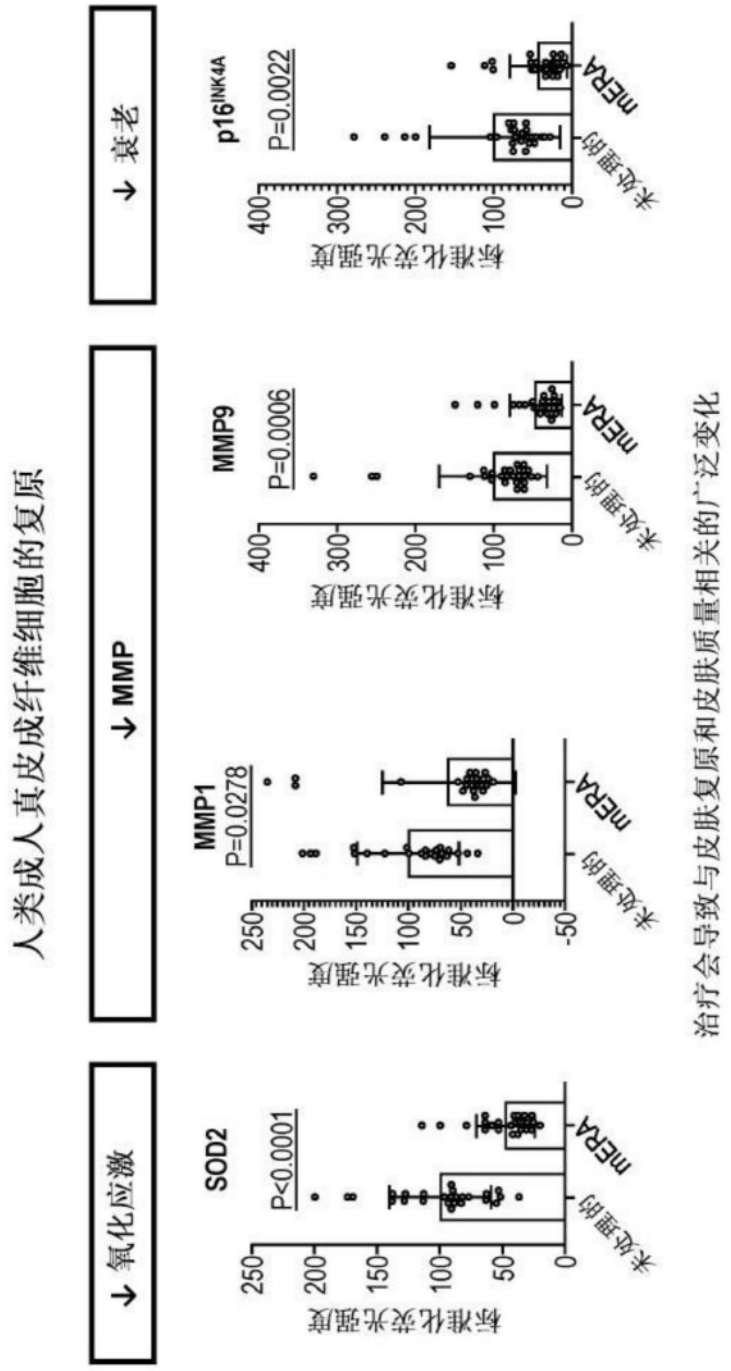

人类成人真皮成纤维细胞的复原
↓ 氧化应激
↓ MMP
↓ 衰老
SOD2
P<0.0001
MMP1
P=0.0278
MMP9
P=0.0006
p16INK4A
P=0.0022
标准化荧光强度
未处理的
MEPA
治疗会导致与皮肤复原和皮肤质量相关的广泛变化

图3

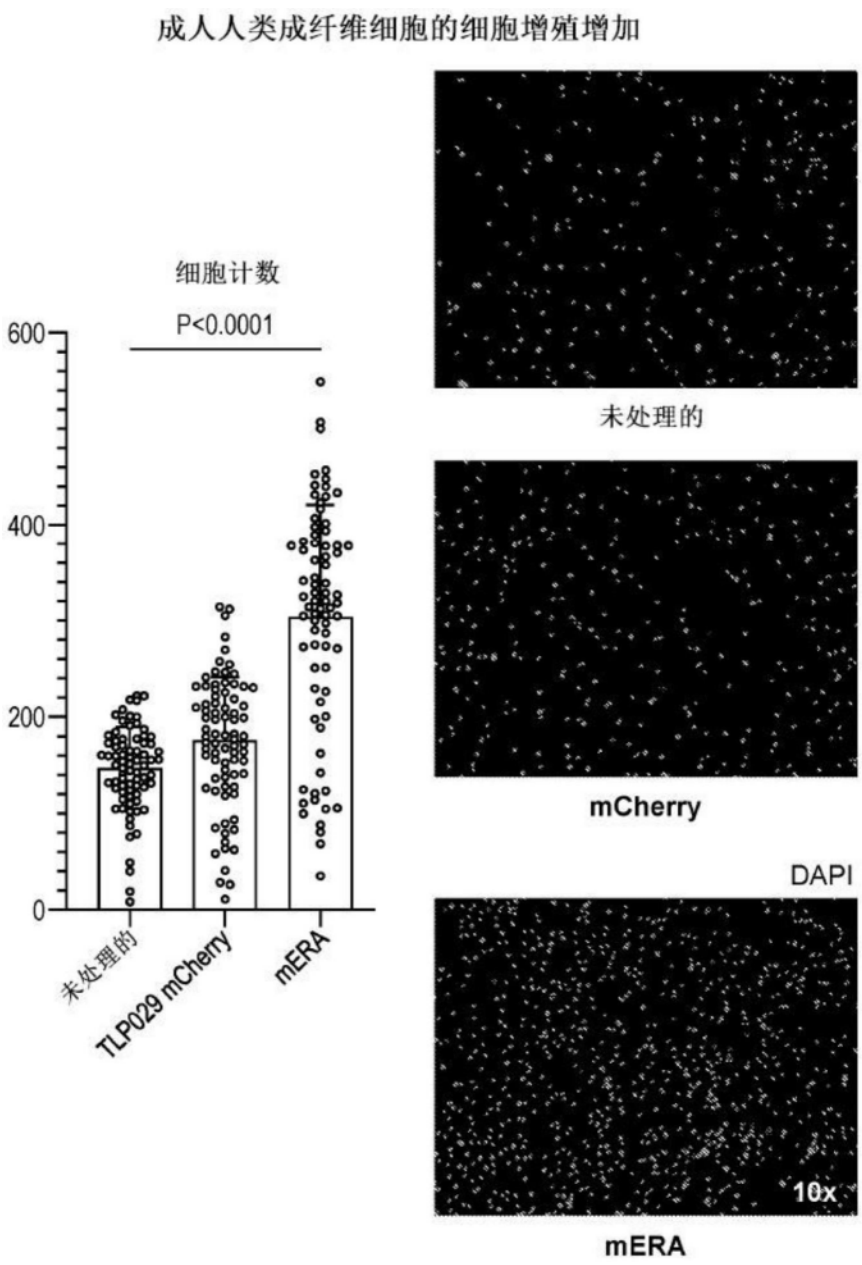

成人人类成纤维细胞的细胞增殖增加
细胞计数
P<0.0001
600
400
200
0
未处理的
TLP029 mCherry
mERA
未处理的
mCherry
DAPI
10x
mERA

图4

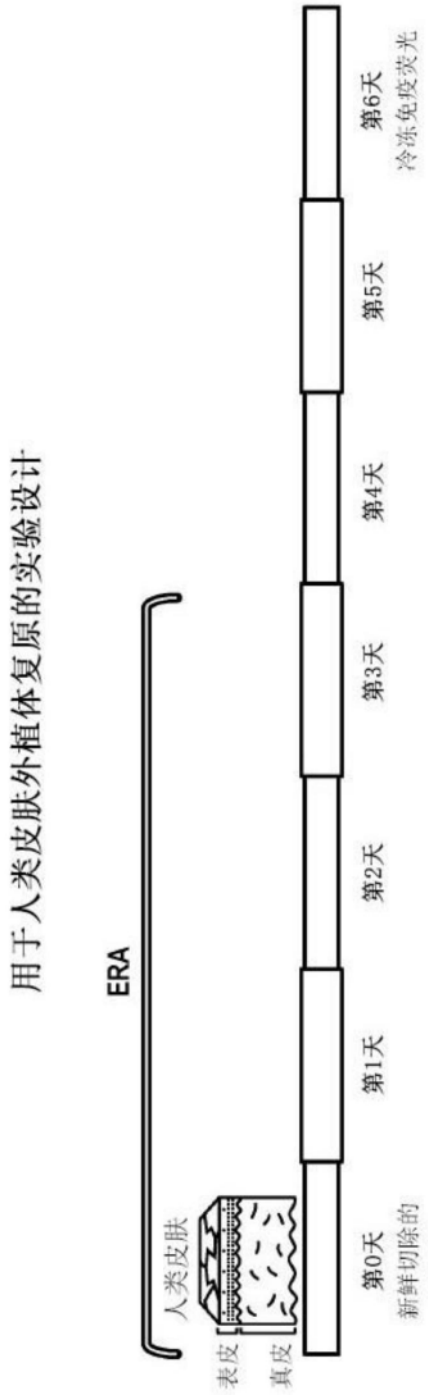

用于人类皮肤外植体复原的实验设计
ERA
人类皮肤
表皮
真皮
第0天
新鲜切除的
人类皮肤
第1天
第2天
第3天
第4天
第5天
第6天
冷冻免疫荧光

图5

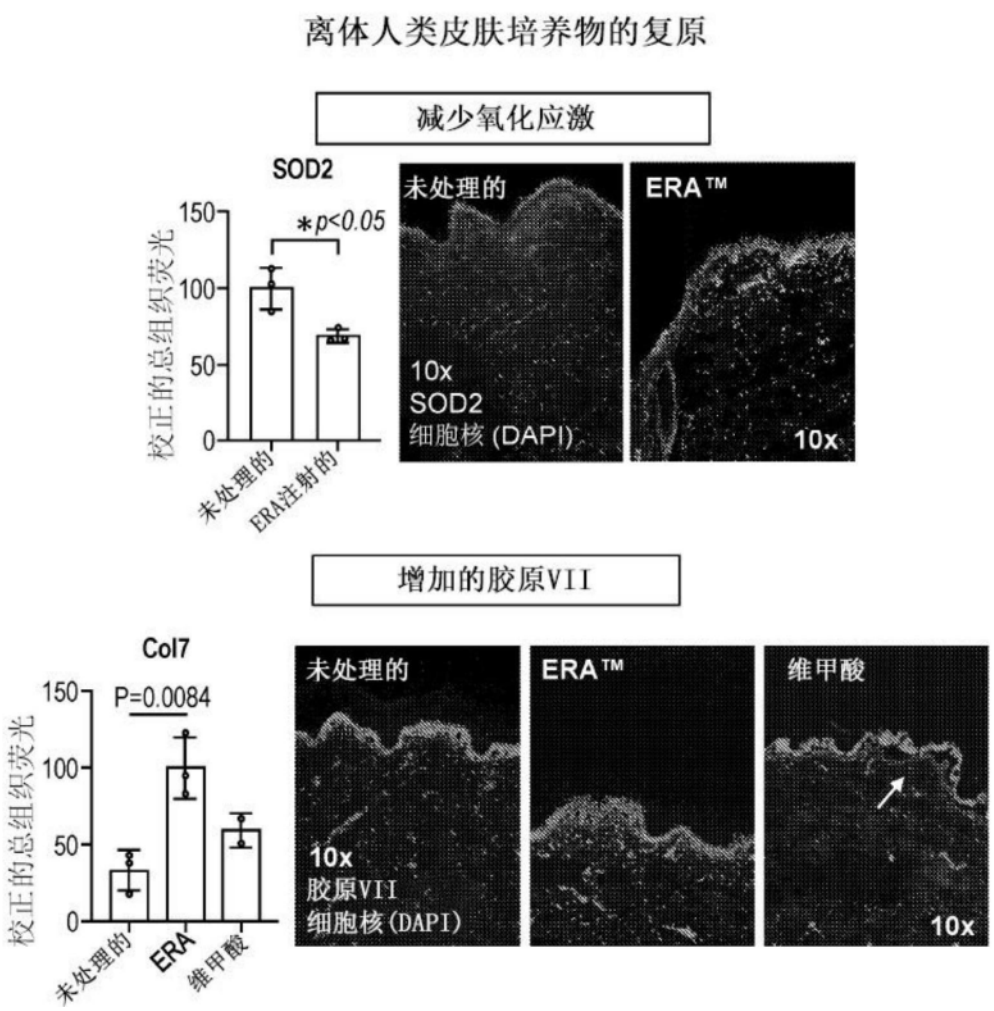

离体人类皮肤培养物的复原
减少氧化应激
SOD2
*p<0.05
校正的总组织荧光
150
100
50
0
未处理的
ERA注射的
未处理的
10x
SOD2
细胞核 (DAPI)
ERA™
10x
增加的胶原VII
Col7
P=0.0084
校正的总组织荧光
150
100
50
0
未处理的
ERA
维甲酸
未处理的
10x
胶原VII
细胞核(DAPI)
ERA™
维甲酸
10x

图6

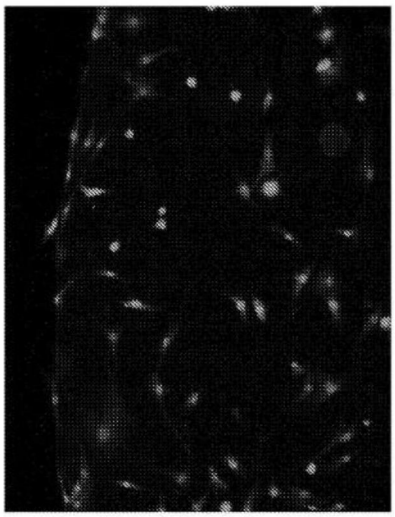


图7A

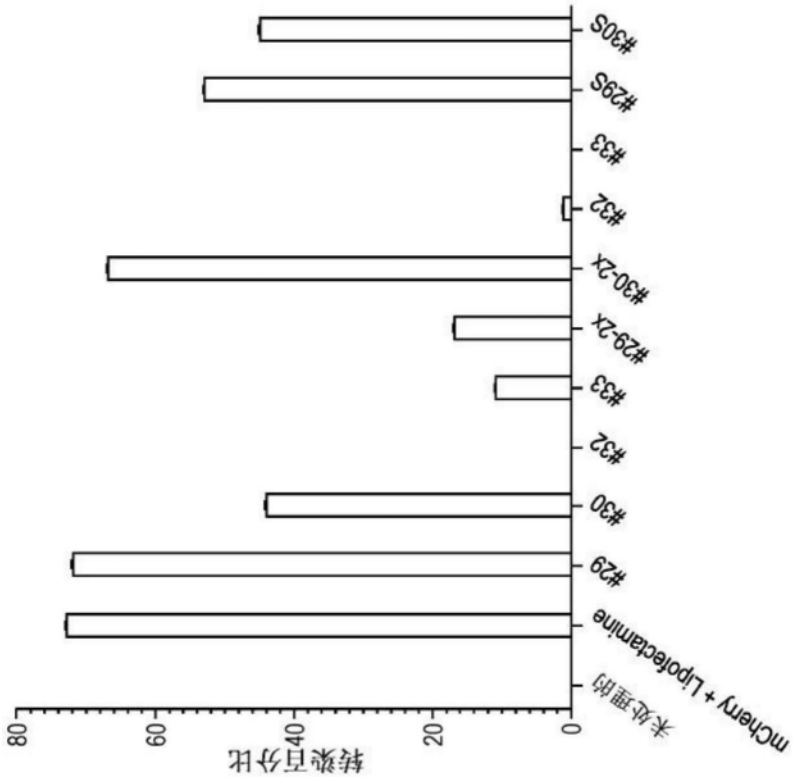

#30S
#29S
#33
#32
#30-2X
#29-2X
#33
#32
#30
#29
mCherry + Lipofectamine
未处理的
0
20
40
60
80
转染百分比

图7B

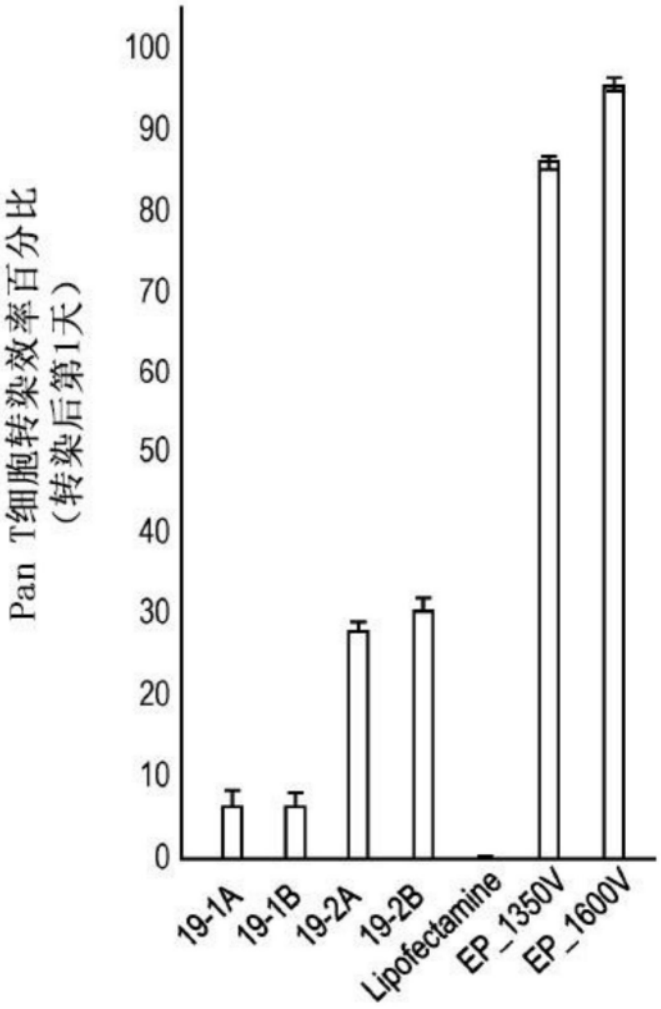

Pan T细胞转染效率百分比
（转染后第1天）
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
19-1A
19-1B
19-2A
19-2B
Lipofectamine
EP_1350V
EP_1600V

图8A

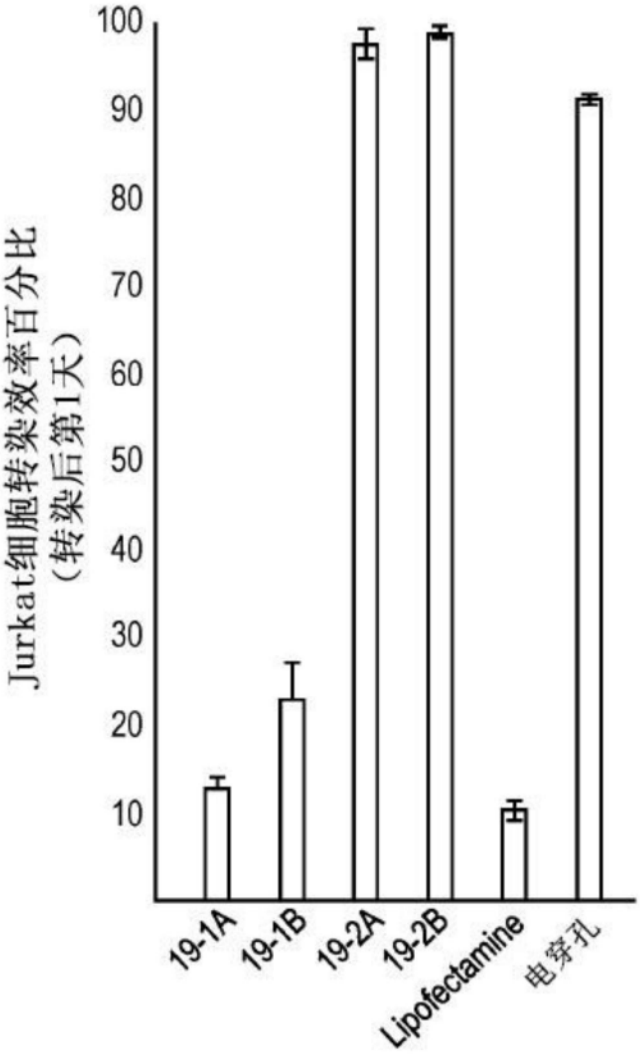

Jurkat细胞转染效率百分比
（转染后第1天）
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
19-1A
19-1B
19-2A
19-2B
Lipofectamine
电穿孔

图8B

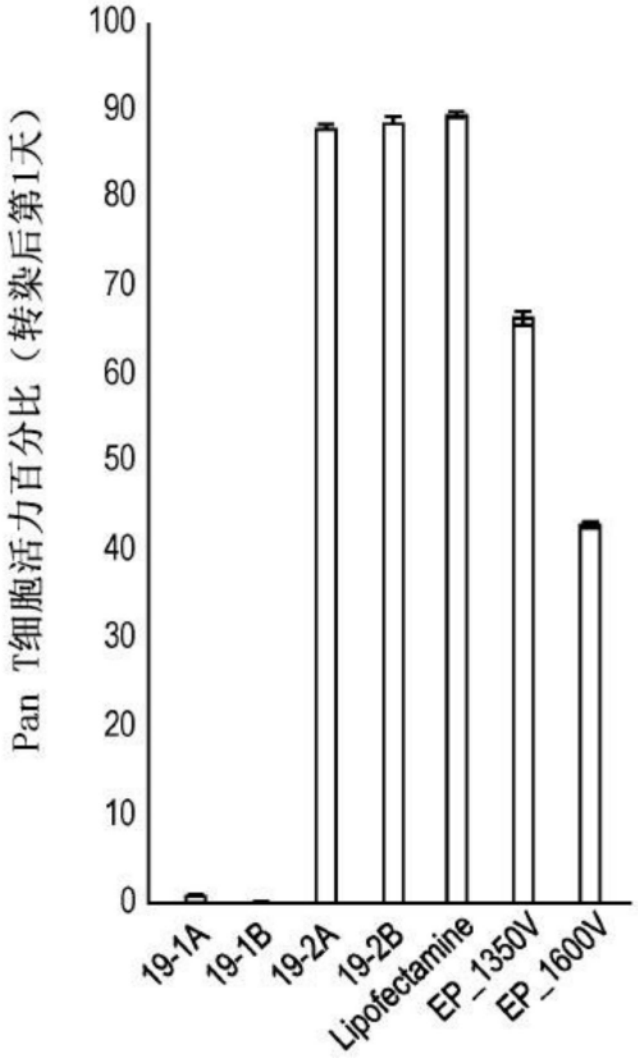

Pan T细胞活力百分比（转染后第1天）
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
19-1A
19-1B
19-2A
19-2B
Lipofectamine
EP_1350V
EP_1600V

图8C

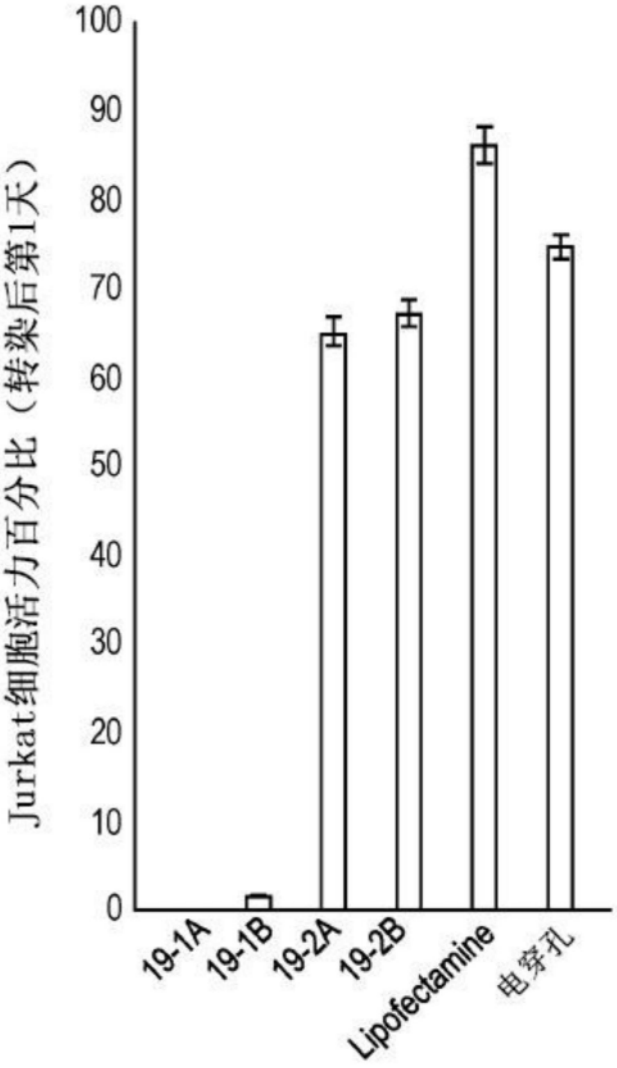

Jurkat细胞活力百分比（转染后第1天）
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
19-1A
19-1B
19-2A
19-2B
Lipofectamine
电穿孔

图8D

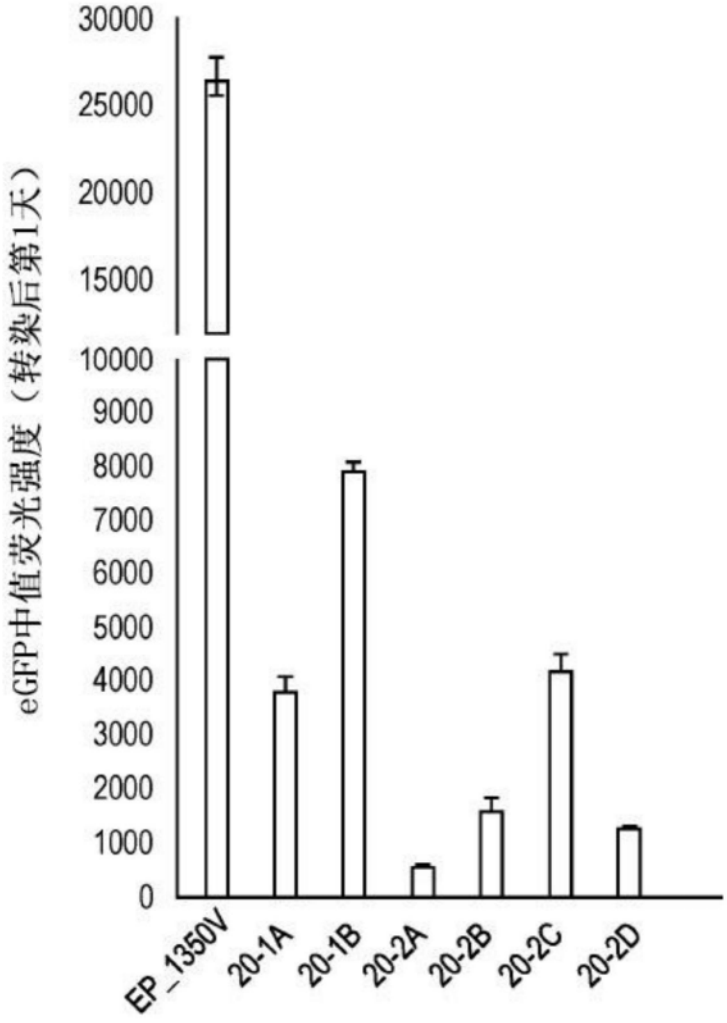

eGFP中值荧光强度（转染后第1天）
30000
25000
20000
15000
10000
9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
EP_1350V
20-1A
20-1B
20-2A
20-2B
20-2C
20-2D

图9A

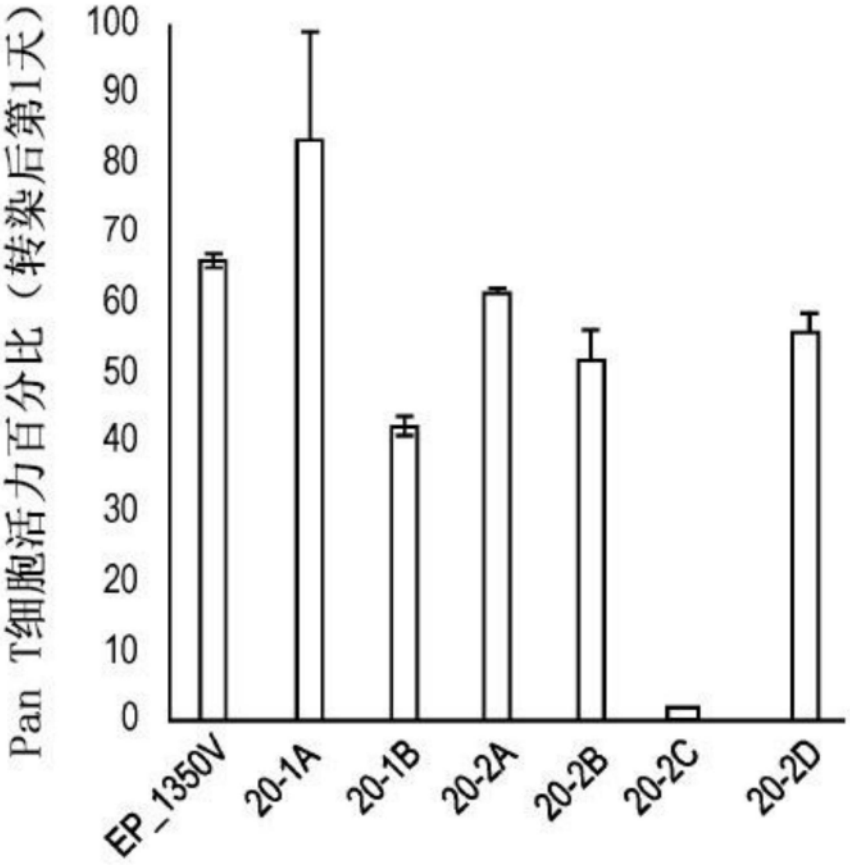

Pan T细胞活力百分比（转染后第1天）
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
EP_1350V
20-1A
20-1B
20-2A
20-2B
20-2C
20-2D

图9B

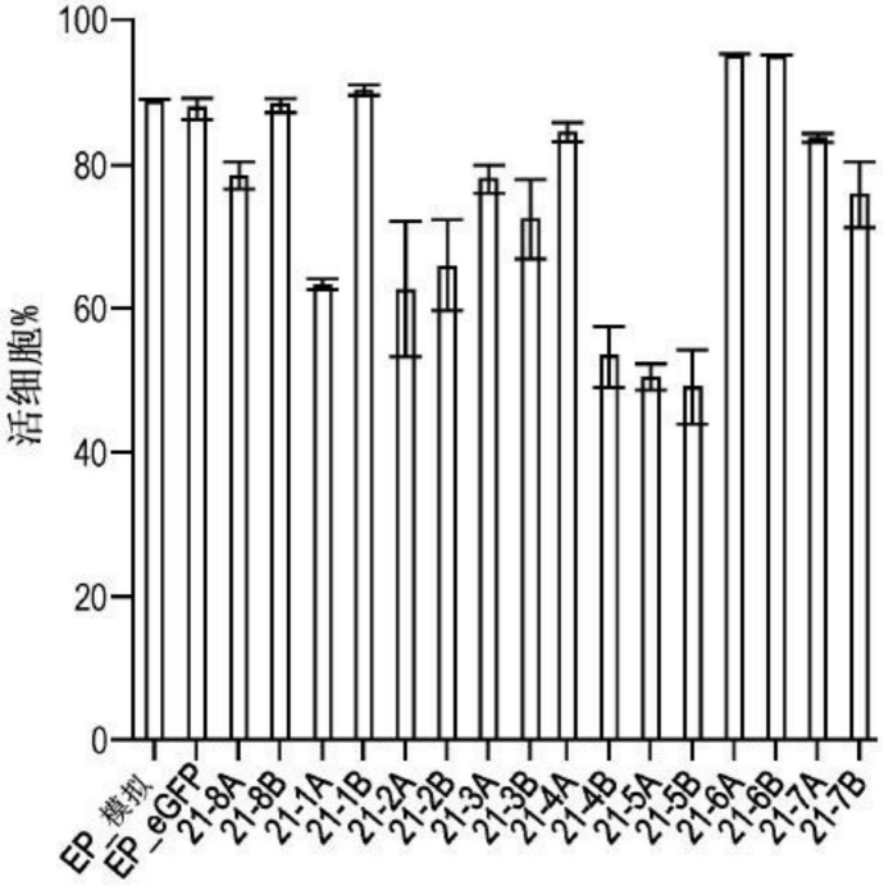

100
80
60
40
20
0
活细胞%
EP_模拟
EP_eGFP
21-8A
21-8B
21-1A
21-1B
21-2A
21-2B
21-3A
21-3B
21-4A
21-4B
21-5A
21-5B
21-6A
21-6B
21-7A
21-7B

图10A

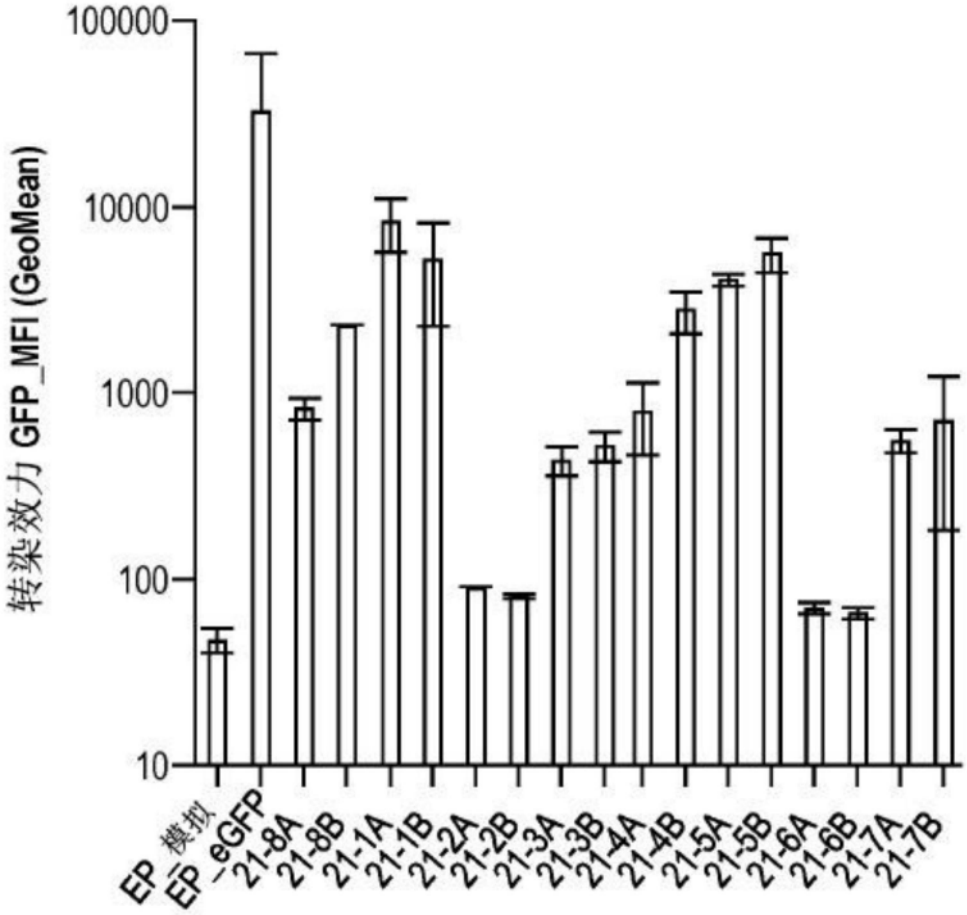

转染效力 GFP_MFI (GeoMean)
100000
10000
1000
100
10
EP_模拟
EP_eGFP
21-8A
21-8B
21-1A
21-1B
21-2A
21-2B
21-3A
21-3B
21-4A
21-4B
21-5A
21-5B
21-6A
21-6B
21-7A
21-7B

图10B

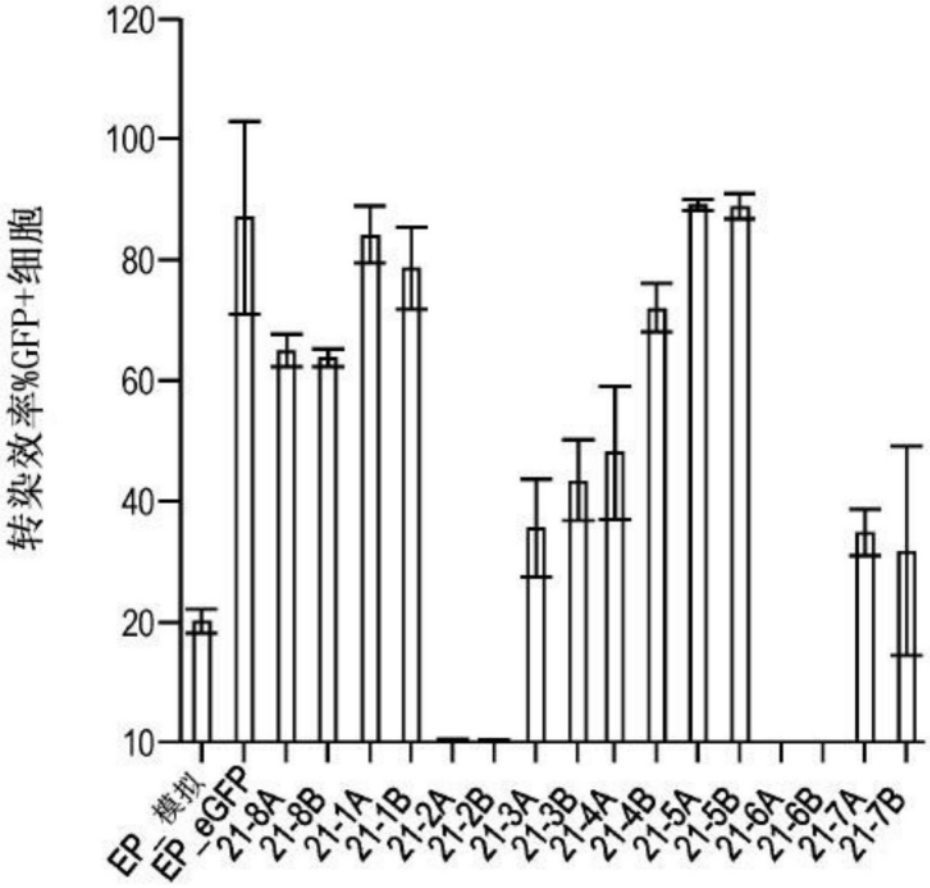

转染效率%GFP+细胞
120
100
80
60
40
20
10
EP
模拟
EP_eGFP
21-8A
21-8B
21-1A
21-1B
21-2A
21-2B
21-3A
21-3B
21-4A
21-4B
21-5A
21-5B
21-6A
21-6B
21-7A
21-7B

图10C