



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101970012 A

(43) 申请公布日 2011. 02. 09

(21) 申请号 200880116215. 2

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2008. 09. 12

A61K 47/48 (2006. 01)

A61K 31/337 (2006. 01)

(30) 优先权数据

60/972, 732 2007. 09. 14 US

61/016, 431 2007. 12. 21 US

61/084, 935 2008. 07. 30 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 05. 14

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2008/076287 2008. 09. 12

(87) PCT申请的公布数据

W02009/036368 EN 2009. 03. 19

(71) 申请人 日东电工株式会社

地址 日本大阪

(72) 发明人 俞磊 刘健 赵刚 马念春

桑·范

(74) 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理

有限责任公司 11204

代理人 王达佐 洪欣

权利要求书 6 页 说明书 32 页 序列表 2 页

附图 9 页

(54) 发明名称

药物载体

(57) 摘要

本文公开了包含阳离子聚合物载体、靶向剂和治疗剂的组合物。该治疗剂可以具有诸如抑制靶器官或靶组织内的纤维化或抑制癌细胞生长的治疗活性。

1. 治疗组合物,包含:
阳离子聚合物载体;
与所述阳离子聚合物载体操作地相关联的靶向剂,其中所述靶向剂包括类视黄醇;以及
与所述阳离子聚合物载体操作地相关联的治疗剂,其中所述治疗剂在递送至靶器官或靶组织时表现出治疗活性,并且其中所述治疗活性选自抑制所述靶器官或靶组织内的纤维化和抑制所述靶器官或靶组织内癌细胞的生长。
2. 根据权利要求1所述的治疗组合物,其中所述类视黄醇选自视黄醇、视黄醛和视黄酸。
3. 根据权利要求1所述的治疗组合物,其中所述类视黄醇选自全反式-视黄醇、全反式-视黄酸、棕榈酸视黄酯、11-顺式-视黄醛和13-顺式-视黄酸。
4. 根据权利要求1至3中任一项所述的治疗组合物,其中所述靶器官选自肝、胰、肾、肺、食道、喉、骨髓和脑。
5. 根据权利要求1至4中任一项所述的治疗组合物,其中所述靶向剂提供所述治疗组合物向所述靶器官或靶组织递送时的递送选择性的增加,与不含所述靶向剂的其他对照治疗组合物相比,所述递送选择性的增加至少为约两倍。
6. 根据权利要求5所述的治疗组合物,其中所述递送选择性的增加至少为约3倍。
7. 根据权利要求1至6中任一项所述的治疗组合物,其中所述靶向剂通过静电缔合与所述阳离子聚合物载体操作地相关联。
8. 根据权利要求1至6中任一项所述的治疗组合物,其中所述靶向剂通过共价键与所述阳离子聚合物载体操作地相关联。
9. 根据权利要求1至6中任一项所述的治疗组合物,还包含所述阳离子聚合物载体与所述靶向剂之间的连接基团。
10. 根据权利要求9所述的治疗组合物,其中所述阳离子聚合物载体通过所述连接基团与所述靶向剂操作地相关联。
11. 根据权利要求1至10中任一项所述的治疗组合物,其中所述治疗组合物包含基于所述治疗组合物总质量的约1%至约50%(重量/重量)的量的所述靶向剂。
12. 根据权利要求1至10中任一项所述的治疗组合物,其中所述治疗组合物包含基于所述治疗组合物总质量的约10%至约30%(重量/重量)的量的所述靶向剂。
13. 根据权利要求1至10中任一项所述的治疗组合物,其中所述治疗组合物包含基于所述治疗组合物总质量的约20%至约40%(重量/重量)的量的所述靶向剂。
14. 根据权利要求1至13中任一项所述的治疗组合物,其中所述治疗剂通过静电缔合与所述阳离子聚合物载体操作地相关联。
15. 根据权利要求1至13中任一项所述的治疗组合物,其中所述阳离子聚合物载体通过共价键与所述治疗剂操作地相关联。
16. 根据权利要求1至13中任一项所述的治疗组合物,还包含所述阳离子聚合物载体与所述治疗剂之间的连接基团。
17. 根据权利要求16所述的治疗组合物,其中所述阳离子聚合物载体通过所述连接基团与所述治疗剂操作地相关联。

18. 根据权利要求 1 至 17 中任一项所述的治疗组合物,其中所述阳离子聚合物载体包含均聚物。

19. 根据权利要求 18 所述的治疗组合物,其中所述均聚物为线型均聚物。

20. 根据权利要求 18 所述的治疗组合物,其中所述均聚物为支化均聚物。

21. 根据权利要求 1 至 17 中任一项所述的治疗组合物,其中所述阳离子聚合物载体包含共聚物。

22. 根据权利要求 21 所述的治疗组合物,其中所述共聚物为支化共聚物。

23. 根据权利要求 21 所述的治疗组合物,其中所述共聚物为线型共聚物。

24. 根据权利要求 1 至 23 中任一项所述的治疗组合物,其中所述阳离子聚合物载体包含至少两种聚合物的混合物。

25. 根据权利要求 1 至 24 中任一项所述的治疗组合物,其中所述阳离子聚合物载体是可降解的。

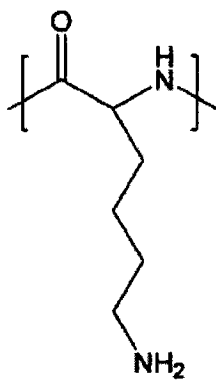
26. 根据权利要求 1 至 24 中任一项所述的治疗组合物,其中所述阳离子聚合物载体是不可降解的。

27. 根据权利要求 1 至 26 中任一项所述的治疗组合物,其中所述阳离子聚合物载体是水溶性的。

28. 根据权利要求 1 至 26 中任一项所述的治疗组合物,其中所述阳离子聚合物载体是非水溶性的。

29. 根据权利要求 1 至 28 中任一项所述的治疗组合物,其中所述阳离子聚合物载体是交联的。

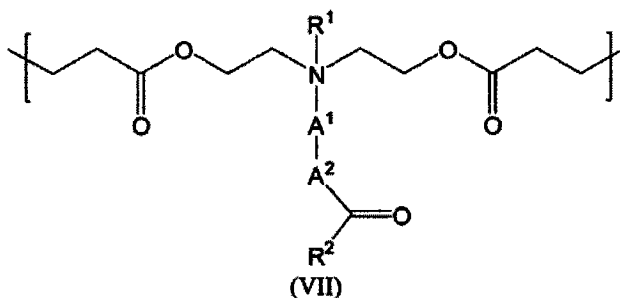
30. 根据权利要求 1 至 29 中任一项所述的治疗组合物,其中所述阳离子聚合物载体包含下述通式 (I) 的重复单元:



31. 根据权利要求 30 所述的治疗组合物,其中所述阳离子聚合物载体包含聚-L-赖氨酸。

32. 根据权利要求 1 至 31 中任一项所述的治疗组合物,其中所述阳离子聚合物载体包含选自通式 (II)、(III)、(IV)、(V) 和 (VI) 的重复单元:

45. 根据权利要求 36 至 44 中任一项所述的治疗组合物,其中所述重复的可降解单元为通式 (VII) 的重复单元:



其中:

A^1 不存在或者是任选地被取代的选自烷基、烯基、炔基、杂烷基、杂烯基、杂炔基和 $-(CH_2)_{n1}-D-(CH_2)_{n2}-$ 的取代基;

其中 $n1$ 和 $n2$ 各自独立地为 0 或者 1 至 10 的整数;并且

D 为任选地被取代的选自环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂芳基和杂环基的取代基;

A^2 为不存在、氧原子或 $-N(R^N)$, 其中 R^N 是 H 或 C_{1-6} 烷基;

R^1 为电子对、氢或任选地被取代的选自烷基、烯基、炔基、杂烷基、杂烯基、杂炔基、芳基、杂芳基和杂环基的取代基,

其中如果 R^1 是氢或任选地被取代的选自烷基、烯基、炔基、杂烷基、杂烯基、杂炔基、芳基、杂芳基和杂环基的取代基,那么与 R^1 相连的氮原子带有正电荷;并且

R^2 选自 C_2-C_{50} 烷基、 C_2-C_{50} 杂烷基、 C_2-C_{50} 烯基、 C_2-C_{50} 杂烯基、 C_2-C_{50} 炔基、 C_2-C_{50} 杂炔基、 C_5-C_{50} 芳基、 C_5-C_{50} 杂芳基、 $-(CH_2)_{p1}-E-(CH_2)_{p2}-$ 和甾醇;

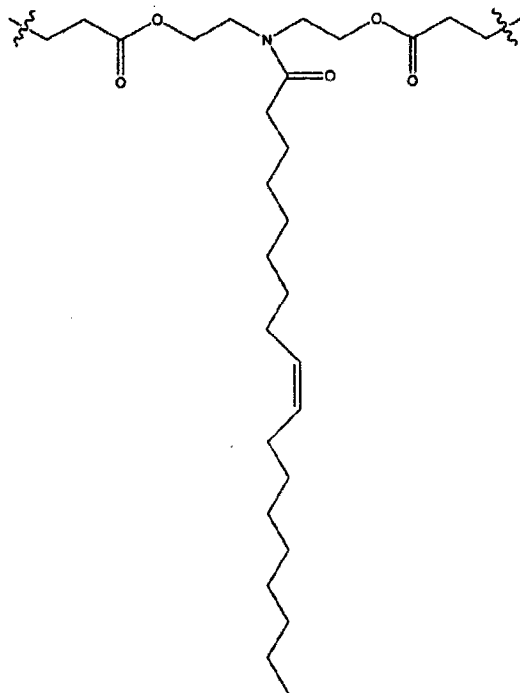
其中 $p1$ 和 $p2$ 各自独立地为 0 或 1 至 40 的整数;

E 为任选地被取代的选自环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂芳基和杂环基的取代基。

46. 根据权利要求 45 所述的治疗组合物,其中 R^2 选自油基、月桂基、肉豆蔻基、棕榈基、十七烷基、十八烷基、二十烷基、二十二烷基、二十四烷基和甾醇。

47. 根据权利要求 45 所述的治疗组合物,其中 R^2 是油基。

48. 根据权利要求 36 至 47 中任一项所述的治疗组合物,其中所述重复的可降解单元为:



49. 根据权利要求 1 至 48 中任一项所述的治疗组合物,其中所述阳离子聚合物载体是微粒。

50. 根据权利要求 1 至 48 中任一项所述的治疗组合物,其中所述阳离子聚合物载体是纳米颗粒。

51. 根据权利要求 1 至 50 中任一项所述的治疗组合物,其中所述治疗剂是细胞毒性的。

52. 根据权利要求 1 至 51 中任一项所述的治疗组合物,其中所述治疗剂选自 TGF β 抑制剂、MMP 促进剂、HGF 促进剂、TIMP 产生抑制剂、PPAR γ 配体、血管紧张素活性抑制剂、PDGF 抑制剂、钠通道抑制剂和凋亡诱导物。

53. 根据权利要求 1 至 52 中任一项所述的治疗组合物,其中所述治疗剂在递送至所述靶器官或靶组织时基本上抑制星状细胞的活化。

54. 根据权利要求 1 至 53 中任一项所述的治疗组合物,其中所述治疗剂包括核酸。

55. 根据权利要求 54 所述的治疗组合物,其中所述治疗剂在递送至所述靶器官或靶组织时基本上抑制胶原蛋白的产生。

56. 根据权利要求 54 至 55 中任一项所述的治疗组合物,其中所述治疗剂在递送至所述靶器官或靶组织时基本上抑制选自金属蛋白酶组织抑制剂 (TIMP) 和分子伴侣的试剂的活性。

57. 根据权利要求 56 所述的治疗组合物,其中所述分子伴侣为 HSP47。

58. 根据权利要求 54 至 57 中任一项所述的治疗组合物,其中所述治疗剂选自 siRNA、DNA、RNA 和反义核酸。

59. 根据权利要求 1 至 53 中任一项所述的治疗组合物,其中所述治疗剂是抗癌剂。

60. 根据权利要求 59 所述的治疗组合物,其中所述抗癌剂为紫杉醇。

61. 根据权利要求 1 至 60 中任一项所述的治疗组合物,其中所述治疗组合物包含基于所述治疗组合物总质量的约 25% 至约 75% (重量 / 重量) 的量的所述治疗剂。

62. 根据权利要求 1 至 60 中任一项所述的治疗组合物,其中所述治疗组合物包含基于

所述治疗组合物总质量的约 30%至约 60%（重量 / 重量）的量的所述治疗剂。

63. 根据权利要求 1 至 60 中任一项所述的治疗组合物,其中所述治疗组合物包含基于所述治疗组合物总质量的约 40%至约 70%（重量 / 重量）的量的所述治疗剂。

64. 根据权利要求 1 至 63 中任一项所述的治疗组合物,还包含选自药物可接受的赋形剂和稀释剂的至少一种。

65. 治疗至少部分地特征为异常纤维化的疾病状态的方法,所述方法包括向有需要的个体给予治疗有效量的一种或多种权利要求 1 至 64 中任一项所述的治疗组合物。

66. 根据权利要求 65 所述的方法,其中所述疾病状态选自癌症和纤维化疾病。

67. 根据权利要求 65 所述的方法,其中所述疾病状态为纤维化疾病。

68. 根据权利要求 65 所述的方法,其中所述疾病状态选自肝纤维化、肝硬化、胰腺炎、胰纤维化、囊性纤维化、声带瘢痕、声带粘膜纤维化、喉纤维化、肺纤维化、特发性肺纤维化、囊性纤维化、骨髓纤维化、腹膜后纤维化和肾源性系统纤维化。

69. 根据权利要求 65 所述的方法,其中所述疾病状态为肝纤维化。

70. 根据权利要求 65 所述的方法,其中所述疾病状态为癌症。

71. 根据权利要求 65 所述的方法,其中所述疾病状态选自肺癌、胰腺癌、乳腺癌、肝癌、胃癌和结肠癌。

72. 根据权利要求 65 所述的方法,其中所述疾病状态为胰腺癌。

药物载体

[0001] 相关申请信息

[0002] 本申请要求的优先权如下：序列号为 60/972,732、申请日为 2007 年 9 月 14 日的美国临时申请；序列号为 61/016,431、申请日为 2007 年 12 月 21 日的美国临时申请；以及序列号为 61/084,935、申请日为 2008 年 7 月 30 日的美国临时申请；全部上述临时申请的所有内容以引用方式全部并入本文并用于所有目的。

[0003] 序列表

[0004] 本申请与电子格式序列表一起提交。该序列表以名为 NDTCC-099VPC-SequenceListing.TXT 的文件提供，其创建于 2008 年 9 月 9 日，大小为 1.38Kb。电子格式序列表的信息以引用方式全部并入本文。

背景技术

发明领域

[0005] 本文公开了涉及有机化学、药物化学、生物化学、分子生物学及医学领域的组合物及方法。特别地，本文所公开的实施方式涉及将活性剂递送至细胞的组合物和方法，并涉及该组合物治疗和减轻特征为纤维化的疾病和病症的用途。

[0006] 相关技术描述

[0007] 纤维化或体内过度纤维结缔组织的发展与多数疾病和病症有关，例如肝纤维化、胰纤维化、声带瘢痕和各种形式的癌症。

[0008] 已经尝试各种方法来抑制器官或组织的纤维化。一种方法是抑制一种或多种星状细胞的活化，其中这类细胞活化的特征是细胞外基质 (ECM) 生成的增多。其他方法可以涉及抑制胶原蛋白的生成，例如促进胶原蛋白的降解或控制胶原蛋白的代谢。然而，靶向需要抑制纤维化的特定器官或组织可能是困难的。

[0009] 发明概述

[0010] 本文所述的一些实施方式涉及可以包含阳离子聚合物载体的治疗组合物；与该阳离子聚合物载体操作地相关联的靶向剂，其中该靶向剂包括类视黄醇；以及与该阳离子聚合物载体操作地相关联的治疗剂，其中该治疗剂在被递送至靶器官或靶组织时表现出治疗活性，并且其中所述治疗活性选自抑制靶器官或靶组织内的纤维化和抑制靶器官或靶组织内癌细胞的生长。

[0011] 一些实施方式涉及本文所述的治疗组合物，该治疗组合物还包含选自药物可接受的赋形剂和稀释剂中的至少一种。

[0012] 一些实施方式提供了用于治疗至少部分地特征为异常纤维化的疾病状态的方法，该方法包括向需要本文所述的治疗组合物的个体给予治疗有效量的本文所述的治疗组合物。

[0013] 其他实施方式提供了本文所述的治疗组合物用于治疗至少部分地特征为异常纤维化的疾病状态的用途。

[0014] 仍然其他实施方式提供用于治疗至少部分地特征为异常纤维化的疾病状态的本文所述的治疗组合物。

[0015] 这些及其他实施方式在下文中有更详细地描述。

[0016] 附图简述

[0017] 图 1 示出制备修饰的视黄醇的反应方案。

[0018] 图 2 示出制备包含聚-L-赖氨酸和视黄酸的阳离子聚合物载体的反应方案。

[0019] 图 3 示出制备包含支化聚乙烯亚胺 (polyethylenimine) 和修饰的视黄醇化合物的阳离子聚合物载体的反应方案。

[0020] 图 4 示出 siRNA 进入原代肝星状细胞的细胞摄取。

[0021] 图 5 是柱状图,其显示用单独的 siRNA、水溶性可降解交联阳离子聚合物+siRNA 或者水溶性可降解交联阳离子聚合物+视黄醇+siRNA 处理后,原代肝星状细胞 (HSC) 的细胞存活力。

[0022] 图 6 是柱状图,其显示用单独的 siRNA、阳离子聚合物+siRNA 或者阳离子聚合物+视黄醇+siRNA 处理后,热休克蛋白 (HSP-47)mRNA 的相对百分比。

[0023] 图 7 和 8 是柱状图,其显示用阳离子聚合物或者阳离子聚合物+siRNA 处理后,热休克蛋白 (HSP-47)mRNA 的相对百分比。

[0024] 图 9 示出 LD50 确定的结果。

[0025] 图 10 示出溶血测定的结果。

[0026] 发明详述

[0027] 除非另外说明,本文所用的所有技术和科学的术语与本领域普通技术人员之一通常理解的意义相同。本文所引用的所有专利、申请、公开申请和其他出版物以引用的方式全部并入本文。在对本文的术语有多种定义的情况下,除非另有规定,否则采用本章节中那些定义。

[0028] 本文所用的术语“阳离子聚合物载体”是指可以与一种或多种试剂操作地相关联的带有正电荷的聚合物(例如,均聚物或共聚物)。阳离子聚合物载体促进一种或多种与其操作地相关联的试剂从身体的一部分运送至靶细胞或靶组织和/或进入靶细胞或靶组织。本领域技术人员将理解,在确定聚合物载体的电荷时,任何与该聚合物载体操作地相关联的靶向剂和/或治疗剂不被认为是阳离子聚合物载体的一部分。换言之,在确定聚合物载体带正电荷时,任何与该聚合物载体操作地相关联的靶向剂和/或治疗剂所带的任何电荷都被忽略。

[0029] “微粒”是指所有维度上,大小为约 100nm 至约 1000nm 的颗粒。微粒可以具有任何形状和任何形态。

[0030] “纳米颗粒”是指所有维度上,大小为约 100nm 至约 1nm 的颗粒。纳米颗粒可以具有任何形状和任何形态。纳米颗粒的实例包括纳米粉末、纳米簇、纳米晶体、纳米球、纳米纤维和纳米管。

[0031] 术语“靶向剂”是指对特定的靶器官或靶组织表现出选择性的化合物。靶向剂能够指导与其操作地相关联的组合物到达特定的靶器官或靶组织。靶向剂可以与至少一种阳离子聚合物载体和/或其他试剂操作地相关联。

[0032] “视黄醇”是由以头-尾相接的方式连接的四个类异戊二烯单元组成的化合物类型

中的成员,见G. P. Moss,“Biochemical Nomenclature and Related Documents (生物化学系统命名及相关文件)”, 2nd Ed (第二版). Portland Press, pp. 247-251 (1992). “维生素A”是定性地表现出视黄醇生物活性的类视黄醇的通用描述符。如本文所用的,类视黄醇是指天然和合成的类视黄醇,其包括第一代、第二代和第三代类视黄醇。天然存在的类视黄醇的实例包括但不限于:(1) 11-顺式-视黄醛、(2) 全反式视黄醇、(3) 棕榈酸视黄酯、(4) 全反式视黄酸和(5) 13-顺式视黄酸。此外,术语“类视黄醇”包括视黄醇、视黄醛和视黄酸。

[0033] 术语“治疗”是指疾病或疾病状态的任何不期望的病征或症状的任何程度的减轻、预防或抑制。这些不期望的病征可以包括使个体的良好状态或外观的整体感觉恶化的那些病征。这个术语并非必须意味着疾病或疾病状态的完全治愈或消失。“治疗剂”是指在以治疗有效量向哺乳动物给药时,向该哺乳动物提供治疗益处的化合物。本文中,治疗剂可以指药物。本领域技术人员应当理解,术语“治疗剂”并不限于得到监管机构批准的药物。“治疗剂”可以与至少一种脂质体载体和/或其他试剂操作地相关联。

[0034] “纤维化”在本文中以其普通含义使用,并且指在器官或组织中,作为修复或反应过程的一部分的纤维瘢痕样结缔组织的发展。“异常纤维化”是指在器官或组织中,纤维瘢痕样结缔组织发展到损害该器官或组织的功能的程度。

[0035] 如本文所用的,“连接物(linker)”和“连接基团”是指一个或多个原子,其将一种化学部分连接到另一种化学部分。连接基团的实例包括相对低分子量的基团,如酰胺、酯、碳酸酯和醚;以及较高分子量的连接基团,如聚乙二醇(PEG)。

[0036] 当至少两个分子是“操作地相关联”时,这表示分子之间存在电子相互作用。这类相互作用可以采取化学键的形式,其包括但不限于共价键、极性共价键、离子键、静电缔合、配位共价键、芳香键、氢键、偶极或范德华相互作用。本领域的普通技术人员理解,这些相互作用的相对强度可以变化很大。

[0037] 如本文所用的,“C_m至C_n”,其中“m”和“n”为整数,是指烷基、烯基或炔基中的碳原子数目或者环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂芳基或杂脂环基(heteroalicyclic)的环中的碳原子数目。即,烷基、烯基、炔基、环烷基的环、环烯基的环、环炔基的环、芳基的环、杂芳基的环或杂脂环基的环可以含有“m”至“n”个碳原子,包括“m”和“n”个碳原子。因此,例如“C₁至C₄烷基”是指含有1至4个碳的所有烷基,即,CH₃-、CH₃CH₂-、CH₃CH₂CH₂-、(CH₃)₂CH-、CH₃CH₂CH₂CH₂-、CH₃CH₂CH(CH₃)-和(CH₃)₃C-。如果对于烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂芳基或杂脂环基,没有指明“m”和“n”,则采用这些定义中所述的最大范围。

[0038] 如本文所用的,“烷基”是指直链或支链烃链的完全饱和(不含双键或三键)的烃基。该烷基可以具有1至50个碳原子(当诸如“1至50”的数值范围在本文中出现时,其指给定范围内的每个整数;例如,“1至50个碳原子”表示烷基由1个碳原子、2个碳原子、3个碳原子等,高达并包括50个碳原子组成,尽管本发明的定义也涵盖了没有指定数值范围的术语“烷基”的情况)。烷基也可以是具有1至30个碳原子的中等大小的烷基。烷基也可以是具有1至5个碳原子的低级烷基。化合物的烷基可以指定为“C₁-C₄烷基”或类似的指定。仅作为示例,“C₁-C₄烷基”表示,在烷基链中有1至4个碳原子,即,该烷基链选自甲基、乙基、丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基和叔丁基。通常的烷基包括但决不限于甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、叔丁基、戊基、己基等。

[0039] 烷基可以被取代或未被取代。当被取代时,取代基为一个或多个各自独立地选自

下述基团的基团：烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂芳基、杂脂环基、芳烷基、杂芳烷基、（杂脂环基）烷基、羟基、受保护的羟基、烷氧基、芳氧基、酰基、酯、巯基、氰基、卤素、羰基、硫代羰基、O-氨基甲酰基、N-氨基甲酰基、O-硫代氨基甲酰基、N-硫代氨基甲酰基、C-酰氨基、N-酰氨基、S-磺酰氨基、N-磺酰氨基、C-羧基、受保护的C-羧基、O-羧基、异氰酸基、氰硫基、异氰硫基、硝基、甲硅烷基、亚氧硫基、亚硫酰基、磺酰基、卤代烷基（单、双和三取代的卤代烷基）、卤代烷氧基（单、双和三取代的卤代烷氧基）、三卤代甲烷磺酰基、三卤代甲烷磺酰氨基及包括单取代和双取代的氨基在内的氨基以及上述基团受保护的衍生物。

[0040] 如本文所用的，“烯基”是指在直链或支链的烃链中含有一个或多个双键的烃基。烯基可以未被取代或被取代。当被取代时，除非另外指明，取代基可以选自与上文关于烷基取代所公开的不同基团。

[0041] 如本文所用的，“炔基”是指在直链或支链的烃链中含有一个或多个叁键的烃基。炔基可以未被取代或被取代。当被取代时，除非另外指明，取代基可以选自与上文关于烷基取代所公开的不同基团。

[0042] 如本文所用的，“杂烷基”是指烷基主链上的一个或多个碳原子被诸如氮、硫和/或氧的杂原子代替的如本文所述的烷基。

[0043] 如本文所用的，“杂烯基”是指烯基主链上的一个或多个碳原子被诸如氮、硫和/或氧的杂原子代替的如本文所述的烯基。

[0044] 如本文所用的，“杂炔基”是指炔基主链上的一个或多个碳原子被诸如氮、硫和/或氧的杂原子取代的如本文所述的炔基。

[0045] 如本文所用的，“芳基”是指碳环（全碳）的单环或多环芳香环体系，其具有完全离域的 π 电子体系。芳基的实例包括但不限于苯、萘和蒽。芳基的环可以具有 5 至 50 个碳原子。芳基可以被取代或未被取代。当被取代时，除非另外指明取代基，氢原子被独立地选自下述基团的一个或多个基团的取代基置换：烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂芳基、杂脂环基、芳烷基、杂芳烷基、（杂脂环基）烷基、羟基、受保护的羟基、烷氧基、芳氧基、酰基、酯、巯基、氰基、卤素、羰基、硫代羰基、O-氨基甲酰基、N-氨基甲酰基、O-硫代氨基甲酰基、N-硫代氨基甲酰基、C-酰氨基、N-酰氨基、S-磺酰氨基、N-磺酰氨基、C-羧基、受保护的C-羧基、O-羧基、异氰酸基、氰硫基、异氰硫基、硝基、甲硅烷基、亚氧硫基、亚硫酰基、磺酰基、卤代烷基（单、双和三取代的卤代烷基）、卤代烷氧基（单、双和三取代的卤代烷氧基）、三卤代甲烷磺酰基、三卤代甲烷磺酰氨基及包括单取代和双取代的氨基在内的氨基以及上述基团受保护的衍生物。

[0046] 如本文所用的，“杂芳基”是指单环或多环芳环体系（具有完全离域的 π 电子体系的环体系），其含有一个或多个杂原子，即，包括但不限于氮、氧和硫的除了碳以外的元素。杂芳基的环可以具有 5 至 50 个碳原子。杂芳基可以被取代或未被取代。杂芳基环的实例包括但不限于呋喃、咪唑（furan）、噻吩、苯并噻吩、酞嗪（phthalazine）、吡咯、噁唑、苯并噁唑、1,2,3-噁二唑、1,2,4-噁二唑、噻唑、1,2,3-噻二唑、1,2,4-噻二唑、苯并噻唑、咪唑、苯并咪唑、吡啶、吡啶、吡啶、苯并吡啶、异噁唑、苯并异噁唑、异噻唑、三唑、苯并三唑、噻二唑、四唑、吡啶、哒嗪、嘧啶、吡嗪、嘌呤、蝶啶、喹啉、异喹啉、喹唑啉、喹喔啉、噌啉以及三嗪。杂芳基可以被取代或未被取代。当被取代时，氢原子被独立地选自下述基团的一个或多

个基团的取代基置换：烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂芳基、杂脂环基、芳烷基、杂芳烷基、(杂脂环基)烷基、羟基、受保护的羟基、烷氧基、芳氧基、酰基、酯、巯基、氰基、卤素、羰基、硫代羰基、O-氨基甲酰基、N-氨基甲酰基、O-硫代氨基甲酰基、N-硫代氨基甲酰基、C-酰氨基、N-酰氨基、S-磺酰氨基、N-磺酰氨基、C-羧基、受保护的C-羧基、O-羧基、异氰酸基、氰硫基、异氰硫基、硝基、甲硅烷基、亚氧硫基、亚硫酰基、磺酰基、卤代烷基(单、双和三取代的卤代烷基)、卤代烷氧基(单、双和三取代的卤代烷氧基)、三卤代甲烷磺酰基、三卤代甲烷磺酰氨基及包括单取代和双取代的氨基在内的氨基以及上述基团受保护的衍生物。

[0047] 如本文所用的，“环烷基”是指完全饱和(不含双键)的单环或多环的烃环体系。当由两个或更多个环组成时，环可以通过稠合、桥接或螺接(spiro-connected)的方式连接在一起。环烷基可以从C₃至C₁₀变化，在其他实施方式中，环烷基可以从C₃至C₈变化。环烷基可以未被取代或被取代。通常的环烷基包括但绝不限于环丙基、环丁基、环戊基、环己基等。如果被取代，除非另外指明，取代基可以是烷基，或者选自上文关于烷基的取代所指明的那些取代基。

[0048] 如本文所用的，“环烯基”是指环上含有一个或多个双键的环烷基，但是如果双键的数目多于一个，则双键不能在环上形成一个完全离域的 π 电子体系(否则该基团就是如本文所定义的“芳基”)。当由两个或更多个的环组成时，环可以通过稠合、桥接或螺接的方式连接在一起。环烯基可以未被取代或被取代。当被取代时，除非另外指明，取代基可以是烷基，或者选自上文关于烷基取代所公开的取代基。

[0049] 如本文所用的，“环炔基”是指环上含有一个或多个叁键的环烷基。当由两个或更多个环组成时，环可以通过稠合、桥接或螺接的方式连接在一起。环炔基可以未被取代或被取代。当被取代时，除非另外指明，取代基可以是烷基，或者选自上文关于烷基取代所公开的取代基。

[0050] 如本文所用的，“杂环基”和“杂脂环基”是指稳定的3至18元环，其由碳原子和1至5个选自氮、氧和硫的杂原子组成。“杂环基”或“杂脂环基”可以是单环、双环、三环或四环体系，其可以通过稠合、桥接或螺接的方式连接在一起；“杂环基”或“杂脂环基”中的氮、碳和硫原子可以任选地被氧化；氮可以任选地被季铵化；环还可以含有一个或多个双键，其条件是双键没有形成遍及所有环的完全离域的 π 电子体系。杂环和杂脂环基可以未被取代或被取代。当被取代时，取代基可以是独立地选自下述基团的一个或多个基团：烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂芳基、杂脂环基、芳烷基、杂芳烷基、(杂脂环基)烷基、羟基、受保护的羟基、烷氧基、芳氧基、酰基、酯、巯基、烷硫基(alkylthio)、芳硫基(arylthio)、氰基、卤素、羰基、硫代羰基、O-氨基甲酰基、N-氨基甲酰基、O-硫代氨基甲酰基、N-硫代氨基甲酰基、C-酰氨基、N-酰氨基、S-磺酰氨基、N-磺酰氨基、C-羧基、受保护的C-羧基、O-羧基、异氰酸基、氰硫基、异氰硫基、硝基、甲硅烷基、卤代烷基(单、双和三取代的卤代烷基)、卤代烷氧基(单、双和三取代的卤代烷氧基)、三卤代甲烷磺酰基、三卤代甲烷磺酰氨基及包括单取代和双取代的氨基在内的氨基以及上述基团受保护的衍生物。这些“杂脂环”或“杂脂环基”的实例包括但不限于氮杂卓基(azepinyl)、吡啶基、咪唑基、噁唑基、1,3-二氧芑、1,3-二噁烷、1,4-二噁烷、1,2-二氧戊环基、1,3-二氧戊环基、1,4-二氧戊环基、1,3-氧硫杂环己烷、1,4-氧硫杂环己二烯、1,3-氧硫杂环戊烷(oxathiolane)、

1,3-二硫杂环戊二烯、1,3-二硫戊环、1,4-氧硫杂环己烷、四氢-1,4-噻嗪、2H-1,2-噁嗪、马来酰亚胺、琥珀酰亚胺、巴比妥酸、硫代巴比妥酸、二酮哌嗪 (dioxopiperazine)、乙内酰胺、二氢尿嘧啶、三噁烷、六氢-1,3,5-三嗪、咪唑啉基、咪唑啉、异噁唑啉、异噁唑啉、噁唑啉、噁唑啉酮、噁唑啉、噁唑啉、吗啉基、环氧乙烷基、哌啶基 N-氧化物、哌啶基、哌嗪基、吡咯烷基、吡咯烷酮、pyrrolidione、4-哌啶酮基、吡唑啉、吡唑啉基、2-氧代吡咯烷基、四氢吡喃、4H-吡喃、四氢噻喃、硫代吗啉基、硫代吗啉基亚砷、硫代吗啉基砷和它们的苯并稠合类似物 (例如, 苯并咪唑啉酮、四氢喹啉、3,4-亚甲二氧基苯基)。

[0051] 当基团被描述为“任选地被取代”时, 该基团可以未被取代或被一个或多个指定的取代基所取代。同样地, 当基团被描述为“未被取代或被取代”时, 如果被取代, 则取代基可以选自一个或多个指定的取代基。

[0052] 除非另外指明, 当取代基被认为“任选地被取代”或“被取代”时, 这表明取代基是可以被一个或多个分别独立地选自下述基团的基团取代的基团: 烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂芳基、杂脂环基、芳烷基、杂芳烷基、(杂脂环基) 烷基、羟基、受保护羟基、烷氧基、芳氧基、酰基、酯、巯基、氰基、卤素、羰基、硫代羰基、O-氨基甲酰基、N-氨基甲酰基、O-硫代氨基甲酰基、N-硫代氨基甲酰基、C-酰氨基、N-酰氨基、S-磺酰氨基、N-磺酰氨基、C-羧基、受保护的 C-羧基、O-羧基、异氰酸基、氰硫基、异氰硫基、硝基、甲硅烷基、亚氧硫基、亚硫酰基、磺酰基、卤代烷基 (单、双和三取代的卤代烷基)、卤代烷氧基 (单、双和三取代的卤代烷氧基)、三卤代甲烷磺酰基、三卤代甲烷磺酰氨基及包括单取代和双取代的氨基在内的氨基以及上述基团受保护的衍生物。可以形成上述取代基的保护性衍生物的保护基是本领域技术人员已知的, 并能够在诸如 Greene and Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3rd Ed. (有机合成中的保护基, 第三版), John Wiley & Sons, New York, NY, 1999 的参考文献中找到, 该参考文献所有内容以引用方式全部并入本文。

[0053] 应当理解, 在具有一个或多个手性中心的本文所述的任何化合物中, 如果未明确地指明绝对立体化学, 那么每个中心可以独立地为 R-构型或 S-构型或它们的混合物。因此, 本文所提供的化合物可以是对映异构纯的或者是立体异构混合物。此外, 应当理解, 在具有一个或多个双键的任何化合物中, 所述双键产生能够被定义为 E 或 Z 的几何异构体, 每个双键可以独立为 E 或 Z 或它们的混合物。同样地, 还旨在包括所有的互变异构形式。

[0054] 如本文所用的, 除非另外指明, 任何保护基、氨基酸和其他化合物的缩写与它们通常的用法、公认的缩写或者 IUPAC-IUP 委员会关于生物化学的命名是一致的 (见, *Biochem. J.* 94:942-944 (1972))。

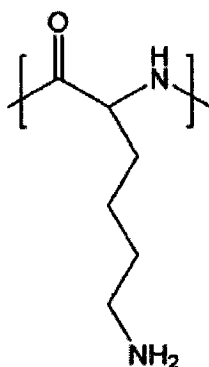
[0055] 本文所述的实施方式涉及治疗组合物, 其可以包含阳离子聚合物载体、与该载体操作地相关联的靶向剂和与该载体操作地相关联的治疗剂。

[0056] 各种阳离子聚合物载体可以用于本文所公开的组合物中。适当的阳离子聚合物是本领域技术人员已知的。在一些实施方式中, 阳离子聚合物载体可以包含均聚物, 如线型或支化均聚物。在一实施方式中, 阳离子聚合物载体可以包含聚-L-赖氨酸。在其他实施方式中, 阳离子聚合物载体可以包含支化或线型聚乙烯亚胺 (PEI)。仍然在其他实施方式中, 阳离子聚合物载体可以包含至少两种聚合物的混合物。仍然在其他实施方式中, 阳离子聚合物载体可以包含共聚物, 如线型或支化共聚物。

[0057] 阳离子聚合物载体可以包含各种重复单元。在一实施方式中, 阳离子聚合物载体

可以包含通式 (I) 的重复单元：

[0058]

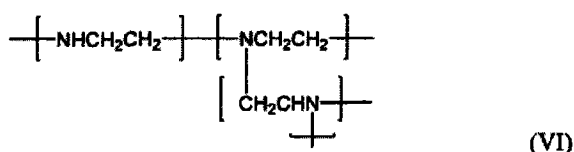
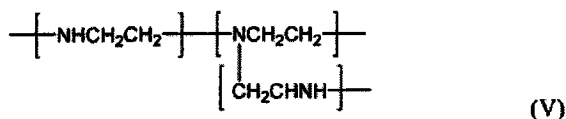
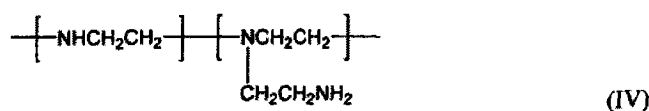
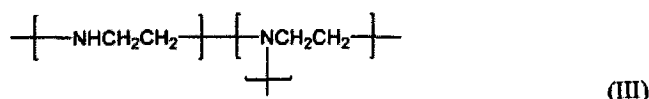
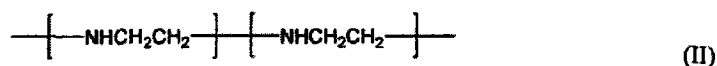


(I)

[0059] 当阳离子聚合物载体包含通式 (I) 的重复单元时, 该载体可以是聚-L-赖氨酸 (PLL)。

[0060] 在其他实施方式中, 阳离子聚合物载体可以包含一个或多个选自通式 (II)、(III)、(IV)、(V) 和 (VI) 的重复单元：

[0061]



[0062] 当阳离子聚合物载体包含通式 (II)、(III)、(IV)、(V) 和 / 或 (VI) 的重复单元时, 该载体可以是聚乙烯亚胺 (PEI)。PEI 可以是线型的或支化的。

[0063] 可以使用各种分子量的 PEI。在一些实施方式中, 重复的阳离子 PEI 单元的分子量可以为约 200 道尔顿至约 25,000 道尔顿。在一实施方式中, 重复的阳离子 PEI 单元的分子量可以为约 400 道尔顿至约 5,000 道尔顿。在另一实施方式中, 重复的阳离子 PEI 单元的分子量可以为约 600 道尔顿至约 2,000 道尔顿。在一实施方式中, 重复的阳离子 PEI 单元的分子量可以为约 400 道尔顿至约 1,200 道尔顿。在一些实施方式中, PEI 可以是支化的, 并且分子量大于等于或大于 600 道尔顿。在其他实施方式中, PEI 可以是线型的, 并且分子量小于 600 道尔顿。

[0064] 可以包含在阳离子聚合物载体中的其他重复单元公开于 2007 年 9 月 14 日申请的美国临时专利申请 60/972,732 号“CATIONIC POLYMERFORMULATIONS (阳离子聚合物配方)”

中,该申请以引用方式并入本文,并且特别地用于描述这类重复单元和阳离子聚合物载体的目的。可以并入阳离子聚合物中的合适的重复单元包括五亚乙基六胺、N,N'-双(2-氨基丙基)-乙二胺、精胺、N-(2-氨基乙基)-1,3-丙二胺、N-(3-氨基丙基)-1,3-丙二胺、N,N'-双(2-氨基乙基)-1,3-丙二胺、聚(酰氨基胺)树枝状聚合物(PAMAM)、聚(丙烯亚胺)树枝状聚合物(DAB-Am-16)、亚精胺、1,4-双(3-氨基丙基)哌嗪、1-(2-氨基乙基)哌嗪和三(2-氨基乙基)胺。在一些实施方式中,阳离子聚合物载体可以是可降解的,例如生物可降解的。在其他实施方式中,阳离子聚合物载体可以是不可降解的。在一实施方式中,可降解的阳离子聚合物载体可以包含可降解的交联阳离子聚合物。在一些实施方式中,阳离子聚合物载体可以是水溶性的。在其他实施方式中,阳离子聚合物载体可以是非水溶性的。在一实施方式中,可降解的交联阳离子聚合物可以是水溶性可降解的交联阳离子聚合物。

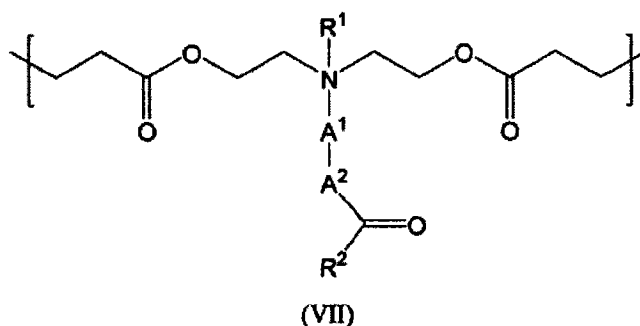
[0065] 在一实施方式中,水溶性可降解的交联阳离子聚合物可以包含(a)重复的聚乙二醇(PEG)单元、(b)重复的阳离子聚乙烯亚胺(PEI)单元和(c)重复的包含侧链脂类基团(lipid group)的可降解单元。

[0066] 在一些实施方式中,水溶性可降解的交联阳离子聚合物中的重复的聚乙二醇单元的分子量可以为约50道尔顿至约5,000道尔顿。在一实施方式中,水溶性可降解的交联阳离子聚合物中的重复的聚乙二醇单元的分子量可以为约400道尔顿至约600道尔顿。

[0067] 在一些实施方式中,水溶性可降解的交联阳离子聚合物中的重复的阳离子PEI单元的分子量可以为约200道尔顿至约25,000道尔顿。在一实施方式中,水溶性可降解的交联阳离子聚合物中的重复的阳离子PEI单元的分子量可以为约600道尔顿至约2,000道尔顿。

[0068] 在一实施方式中,重复的可降解单元可以是通式(VII)的重复单元:

[0069]



[0070] 在通式(VII)中, A^1 可以不存在,或者可以是任选地被取代的选自烷基、烯基、炔基、杂烷基、杂烯基、杂炔基和 $-(CH_2)_{n1}-D-(CH_2)_{n2}-$ 的取代基;其中 $n1$ 和 $n2$ 可以各自独立地为0或者1至10的整数; D 可以是任选地被取代的选自环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂芳基和杂环基的取代基; A^2 可以不存在,可以是氧原子或 $-N(R^N)$,其中 R^N 为H或 C_{1-6} 烷基; R^1 可以是电子对、氢或任选地被取代的选自烷基、烯基、炔基、杂烷基、杂烯基、杂炔基、芳基、杂芳基和杂环基的取代基,其中如果 R^1 是氢或任选地被取代的选自烷基、烯基、炔基、杂烷基、杂烯基、杂炔基、芳基、杂芳基和杂环基的取代基,那么与 R^1 相连的氮原子就会带有相关的正电荷; R^2 可以选自 C_2-C_{50} 烷基、 C_2-C_{50} 杂烷基、 C_2-C_{50} 烯基、 C_2-C_{50} 杂烯基、 C_2-C_{50} 炔基、 C_2-C_{50} 杂炔基、 C_5-C_{50} 芳基、 C_5-C_{50} 杂芳基、 $-(CH_2)_{p1}-E-(CH_2)_{p2}-$ 和甾醇;其中 $p1$ 和 $p2$ 可以各

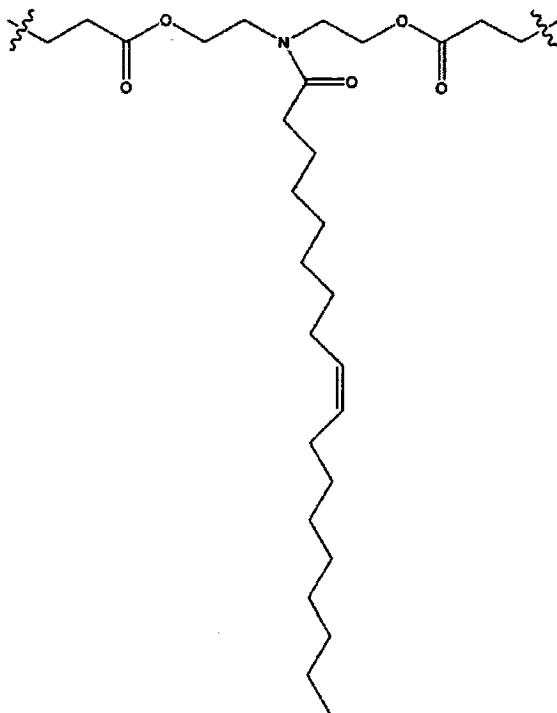
自独立地为 0 或 1 至 40 的整数；E 可以是任选地被取代的选自环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂芳基和杂环基的取代基；在一实施方式中， R^2 可以是 C_4 - C_{30} 烷基、 C_4 - C_{30} 烯基、 C_4 - C_{30} 炔基或甾醇。在另一实施方式中， R^2 可以是 C_8 - C_{24} 烷基、 C_8 - C_{24} 烯基、 C_8 - C_{24} 炔基或甾醇。虽然不被理论所束缚，但是认为通式 (VII) 中的酯基赋予水溶性可降解交联阳离子聚合物载体改善的生物降解性。

[0071] 在一些实施方式中， R^2 可以是脂类基团。在一些实施方式中， R^2 可以选自油基、月桂基、肉豆蔻基、棕榈基、十七烷基、十八烷基、二十烷基、二十二烷基和二十四烷基。在一实施方式中， R^2 可以是油基。在一些实施方式中， R^2 可以是甾醇。在一实施方式中，甾醇可以是胆甾醇 (cholesteryl) 部分。

[0072] 在通式 (VII) 中，与 R^1 连接的氮原子可以具有电子对、与其键合的氢或任选地被取代的选自烷基、烯基、炔基、杂烷基、杂烯基、杂炔基、芳基、杂芳基和杂环基的取代基。本领域技术人员应当理解，当氮原子具有电子对时，上述通式 (VII) 的重复单元在低 pH 值时是阳离子型的，并且当 R^1 为氢或任选地被取代的选自烷基、烯基、炔基、杂烷基、杂烯基、杂炔基、芳基、杂芳基和杂环基的取代基时，氮原子带有相关的正电荷。

[0073] 在一实施方式中，重复的可降解单元可以具有如下结构：

[0074]



[0075] 在一些实施方式中，水溶性可降解交联阳离子聚合物载体可以包含基于水溶性可降解交联阳离子聚合物载体中重复单元总摩尔数的约 1 摩尔%至约 95 摩尔%的重复可降解单元。在一实施方式中，水溶性可降解交联阳离子聚合物载体可以包含基于水溶性可降解交联阳离子聚合物载体中重复单元总摩尔数的约 30 摩尔%至约 90 摩尔%的重复可降解单元。在一些实施方式中，水溶性可降解交联阳离子聚合物载体可以包含基于水溶性可降解交联阳离子聚合物载体中重复单元总摩尔数的约 50 摩尔%至约 86 摩尔%的重复可降解单元。

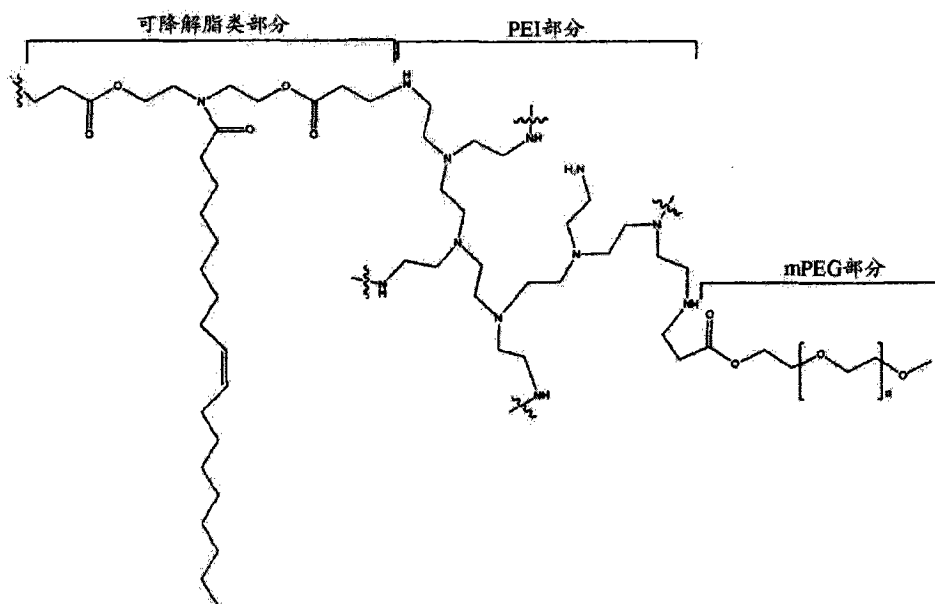
[0076] 在一实施方式中，水溶性可降解交联阳离子聚合物载体可以包含基于水溶性可降

解交联阳离子聚合物载体中重复单元总摩尔数的约 1 摩尔%至约 35 摩尔%的重复阳离子聚乙烯亚胺单元。在一些实施方式中,水溶性可降解交联阳离子聚合物载体可以包含基于水溶性可降解交联阳离子聚合物载体中重复单元总摩尔数的约 1 摩尔%至约 20 摩尔%的重复阳离子聚乙烯亚胺单元。在一实施方式中,水溶性可降解交联阳离子聚合物载体可以包含基于水溶性可降解交联阳离子聚合物载体中重复单元总摩尔数的约 5 摩尔%至约 15 摩尔%的重复阳离子聚乙烯亚胺单元。

[0077] 在一实施方式中,水溶性可降解交联阳离子聚合物载体可以包含基于水溶性可降解交联阳离子聚合物载体中重复单元总摩尔数的约 1 摩尔%至约 80 摩尔%的重复聚乙二醇单元。在一些实施方式中,水溶性可降解交联阳离子聚合物载体可以包含基于水溶性可降解交联阳离子聚合物载体中重复单元总摩尔数的约 1 摩尔%至约 50 摩尔%的重复聚乙二醇单元。在一实施方式中,水溶性可降解交联阳离子聚合物载体可以包含基于水溶性可降解交联阳离子聚合物载体中重复单元总摩尔数的约 5 摩尔%至约 30 摩尔%的重复聚乙二醇单元。在一些实施方式中,水溶性可降解交联阳离子聚合物载体可以包含基于水溶性可降解交联阳离子聚合物载体中重复单元总摩尔数的约 8 摩尔%至约 30 摩尔%的重复聚乙二醇单元。

[0078] 水溶性可降解交联阳离子聚合物载体的示例部分如下所示:

[0079]

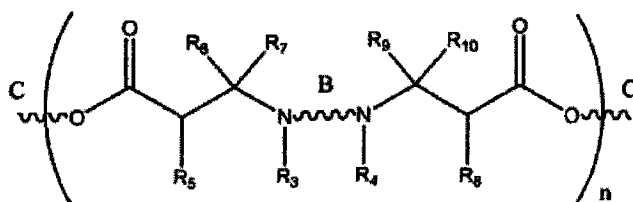


通式(VIIa)。

[0080] 在一实施方式中,水溶性可降解交联阳离子聚合物载体中可以包含该聚合物中的分子量为约 1200 道尔顿的一个或多个支化 PEI 阳离子重复单元;该聚合物中的一个或多个通式 (VII) 的可降解重复单元;以及该聚合物中的分子量为约 454 道尔顿的一个或多个聚乙二醇重复单元。

[0081] 在一实施方式中,阳离子聚合物载体可以包含一个或多个通式 (VIII) 的重复单元:

[0082]

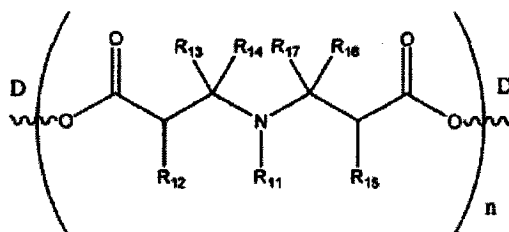


(VIII)

[0083] 通式 (VIII) 中的连接物 B 和 C 分别是各自共价地连接氨基和酯基的一组原子。每个连接物可以含有碳原子和 / 或杂原子 (例如, 氮、氧、硫等)。在一些实施方式中, 一个或多个这类连接物可以包含约 1 至 30 个原子, 或由约 1 至 30 个原子组成。在示例性实施方式中, 一个或多个这类连接物可以包含约 1 至 15 个原子, 或由约 1 至 15 个原子组成。连接物可以独立地被各种取代基任选地取代, 该取代基包括但不限于氢原子、烷基、烯基、炔基、氨基、烷基氨基、二烷基氨基、三烷基氨基、羟基、烷氧基、卤素、芳基、杂环、芳族杂环、氰基、酰胺、氨基甲酰基、羧酸、酯、硫醚、烷基硫醚、硫氢基和脲基。如本领域技术人员所理解的, 这些基团中的每一个可以被依次地取代。基团 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 、 R_9 和 R_{10} 可以独立地为包括但不限于氢原子、烷基、烯基、炔基、氨基、烷基氨基、二烷基氨基、三烷基氨基、羟基、烷氧基、卤素、芳基、杂环、芳族杂环、氰基、酰胺、氨基甲酰基、羧酸、酯、烷基硫醚、硫氢基和脲基的任何化学基团。在一些实施方式中, n 是约 5 至约 10,000 的整数。在示例性实施方式中, n 是约 10 至约 500 的整数。

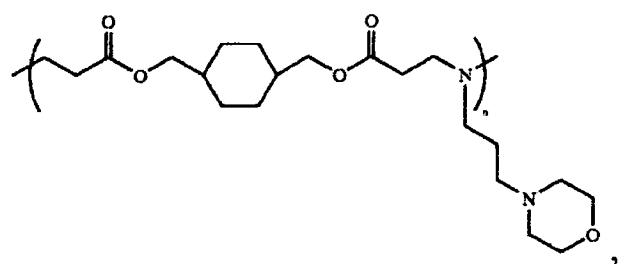
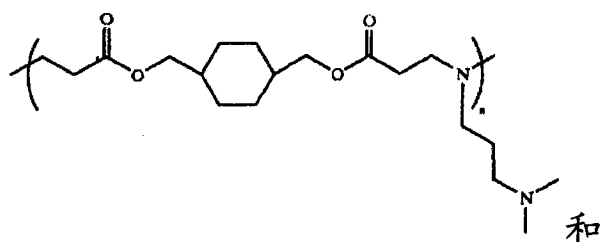
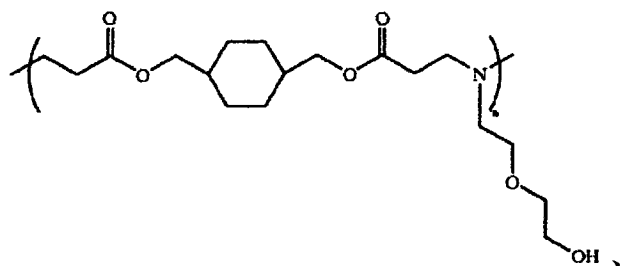
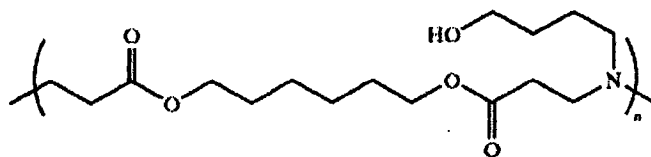
[0084] 在一实施方式中, 阳离子聚合物载体可以包含一个或多个通式 (IX) 的重复单元:

[0085]



(IX)

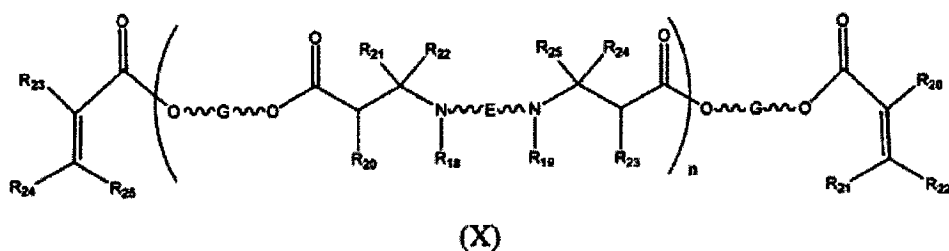
[0086] 通式 (IX) 中连接物 D 可以是共价地连接酯基的一组原子。连接物可以含有碳原子和 / 或杂原子 (例如, 氮、氧、硫等)。在一些实施方式中, 连接物可以包含 1 至约 30 个原子, 或由 1 至约 30 个原子组成。在示例性实施方式中, 连接物可以包含 1 至约 15 的长度 (long), 或由 1 至约 15 的长度组成。连接物可以独立地被各种取代基任选地取代, 该取代基包括但不限于氢原子、烷基、烯基、炔基、氨基、烷基氨基、二烷基氨基、三烷基氨基、羟基、烷氧基、卤素、芳基、杂环、芳族杂环、氰基、酰胺、氨基甲酰基、羧酸、酯、硫醚、烷基硫醚、硫氢基和脲基。如本领域技术人员所理解的, 这些基团中的每一个可以被依次地取代。 R_{11} 、 R_{12} 、 R_{13} 、 R_{14} 、 R_{15} 、 R_{16} 和 R_{17} 的每一个可以独立地为包括但不限于氢原子、烷基、烯基、炔基、氨基、烷基氨基、二烷基氨基、三烷基氨基、羟基、烷氧基、卤素、芳基、杂环、芳族杂环、氰基、酰胺、氨基甲酰基、羧酸、酯、烷基硫醚、硫氢基和脲基的任何化学基团。在一些实施方式中, n 可以是约 5 至约 10,000 的整数。在示例性实施方式中, n 可以是约 10 至约 500 的整数。可以包含于阳离子聚合物载体中的通式 (VIII) 和 (IX) 的重复单元另外的实例包括但不限于:



[0089] 其中 n 可以是约 3 至约 10,000 的整数。通式 (VIII) 和 (IX) 的重复单元可以被取代, 并包括它们的盐。

[0090] 在一实施方式中, 阳离子聚合物载体可以包含一个或多个通式 (X) 的重复单元:

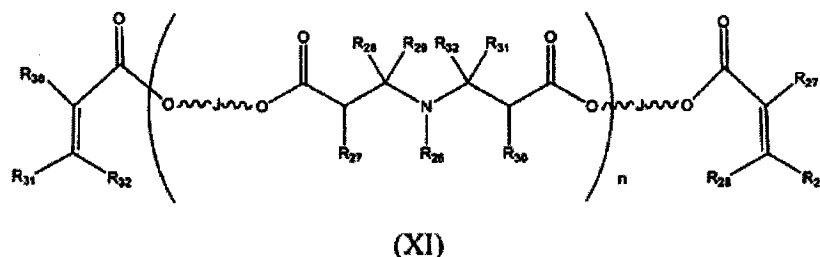
[0091]



[0092] 通式 (X) 中的连接物 E 和 G 可以分别是各自共价地连接氨基和酯基的一组原子。每个连接物可以含有碳原子和 / 或杂原子 (例如, 氮、氧、硫等)。在一些实施方式中, 一个或多个这类连接物包含 1 至约 30 的原子长度, 或 1 至约 30 的原子长度组成。在示例性实施方式中, 一个或多个连接物包含 1 至约 15 个原子, 或由 1 至约 15 个原子组成。连接物可以包含环状结构, 该环状结构包括芳基和杂芳基。连接物可以被各种取代基取代, 该取代基包括但不限于氢原子、烷基、烯基、炔基、氨基、烷基氨基、二烷基氨基、三烷基氨基、羟基、烷氧基、卤素、芳基、杂环、芳族杂环、氰基、酰胺、氨基甲酰基、羧酸、酯、硫醚、烷基硫醚、硫氢

基和脲基。如本领域技术人员所理解的,这些基团的每一个可以被依次地取代。基团 R_{18} 、 R_{19} 、 R_{20} 、 R_{21} 、 R_{22} 、 R_{23} 、 R_{24} 和 R_{25} 可以是包括但不限于氢原子、烷基、烯基、炔基、氨基、烷基氨基、二烷基氨基、三烷基氨基、羟基、烷氧基、卤素、芳基、杂环、芳族杂环、氰基、酰胺、氨基甲酰基、羧酸、酯、烷基硫醚、硫氢基和脲基的任何化学基团。在一些实施方式中, R_{18} 和 R_{19} 是相同的。在其他的实施方式中, R_{20} 和 R_{23} 是相同的; R_{22} 和 R_{24} 是相同的; 并且 R_{21} 和 R_{24} 是相同的。在一些实施方式中, n 是约 5 至约 10,000 的整数。在示例性实施方式中, n 是约 10 至约 500 的整数。

[0093] 在一实施方式中,阳离子聚合物载体可以包含一个或多个通式 (XI) 的重复单元:
[0094]



[0095] 通式 (XI) 中的连接物 J 可以是共价地连接丙烯酸酯 (acrylate) 部分的一组原子。连接物可以含有碳原子或杂原子 (例如,氮、氧、硫等)。在一些实施方式中,连接物可以包含 1 至约 30 个原子,或由 1 至约 30 个原子组成。在示例性实施方式中,连接物可以包含 1 至约 15 个原子,或由 1 至约 15 个原子组成。在另一实施方式中,连接物可以是约 2-10 的原子长度。在一些实施方式中,连接物 J 是被取代或未被取代、直链或支链的烷基链。在一实施方式中,连接物 J 可以含有约 3-10 个碳原子。在另一实施方式中,连接物 J 可以含有约 3、4、5、6 或 7 个碳原子。在其他实施方式中,连接物 J 是被取代或未被取代、直链或支链的杂脂肪族链 (heteroaliphatic chain)。在一实施方式中,连接物 J 可以含有约 3-10 个原子。在另一实施方式中,连接物 J 可以含有约 3、4、5、6 或 7 个原子。在一些实施方式中,连接物 J 包含含有氧原子和碳原子的重复单元。连接物可以任选地被各种取代基取代,该取代基包括但不限于氢原子、烷基、烯基、炔基、氨基、烷基氨基、二烷基氨基、三烷基氨基、羟基、烷氧基、卤素、芳基、杂环、芳族杂环、氰基、酰胺、氨基甲酰基、羧酸、酯、硫醚、烷基硫醚、硫氢基、酰基、乙酰基和脲基。如本领域技术人员所理解的,这些基团的每一个可以被依次地取代。 R_{26} 、 R_{27} 、 R_{28} 、 R_{29} 、 R_{30} 、 R_{31} 和 R_{32} 的每一个可以独立地为包括但不限于氢原子、烷基、烯基、炔基、氨基、烷基氨基、二烷基氨基、三烷基氨基、羟基、烷氧基、卤素、芳基、杂环、芳族杂环、氰基、酰胺、氨基甲酰基、羧酸、酯、烷基硫醚、硫氢基、酰基、乙酰基和脲基的任何化学基团。在一些实施方式中, R_{26} 可以包含羟基。在其他实施方式中, R_{26} 可以包含氨基、烷基氨基和 / 或二烷基氨基。在一些实施方式中, n 是约 3 至约 10,000 的整数。在示例性实施方式中, n 是约 10 至约 500 的整数。

[0096] 在另一实施方式中,阳离子聚合物可以是聚{(乙烯亚胺)-共-[N-2-氨基乙基)乙烯亚胺]-共-[N-(N-胆甾醇氧基羰基-(2-氨基乙基))乙烯亚胺]} (poly{(ethylene imine)-co-[N-2-aminoethyl)ethyleneimine]-co-[N-(N-cholesteryloxycarbonyl-(2-aminoethyl))ethyleneimine]}))。适当的阳离子聚合物的其他实施例公开于 2004 年 2 月 24 日授权的美国专利 6,696,038 号;2002 年 2 月 25 日提交的美国专利公开 2003/0073619 号;2003 年 11 月 19 日提交的美国专利公开 2004/0142474 号;以及 Lynn et al. J. Am. Chem.

Soc. (2001), 123, 8155-8156, 所有这些参考文献均以引用的方式并入本文, 并且特别地用于描述适当的阳离子聚合物和制备该阳离子聚合物的方法的目的。

[0097] 阳离子聚合物载体可以含有一个或多个手性碳原子。手性碳(可以标记为星号*)可以有 R(rectus)(右手)或 S(sinister)(左手)构型, 因此重复单元可以是外消旋的、对映异构的或富含对映异构的。

[0098] 如阳离子聚合物载体一样, 各种靶向剂可用于本发明的组合物中。一种合适的靶向剂可以包括类视黄醇, 如本文所述的那些类视黄醇。合适的类视黄醇包括视黄醇、视黄醛、视黄酸、rexinoid 或上述的衍生物或类似物。示例性视黄醇包括维生素 A、全反式视黄醇、棕榈酸视黄酯以及乙酸视黄酯。视黄醛的一个实例是 11-顺式-视黄醛。rexinoid 是对类视黄醇 X 受体 (RXR) 具有选择性的类视黄醇化合物。示例性 rexinoid 是类视黄醇贝沙罗汀。其他类视黄醇衍生物和类似物包括阿维 A 酯、阿维 A、他扎罗汀、贝沙罗汀、阿达帕林和芬维 A 胺。在一些实施方式中, 类视黄醇可以选自视黄醇、视黄醛、视黄酸、全反式-视黄醇、全反式-视黄酸、棕榈酸视黄酯、11-顺式-视黄醛和 13-顺式-视黄酸。在一实施方式中, 类视黄醇可以包括维生素 A。

[0099] 如上文所述, 靶向剂可以增加治疗组合物向特定靶器官或靶组织的递送选择性。靶器官可以包括, 例如, 肝、胰、肾、肺、食道、喉、骨髓和脑。在一些实施方式中, 与缺少靶向剂的其他对照治疗组合物相比, 递送选择性的增加可以至少为约两倍。在一实施方式中, 递送选择性的增加可以至少为 3 倍。在一些实施方式中, 与缺少靶向剂的其他对照治疗组合物的递送相比, 本文所述的治疗组合物能够提高治疗剂向靶器官的递送至少 10% 以上。在其他实施方式中, 与缺少靶向剂的其他对照治疗组合物的递送相比, 本文所述的治疗组合物能够提高治疗剂向靶器官的递送至少 25% 以上。仍然在其他实施方式中, 与缺少靶向剂的其他对照治疗组合物的递送相比, 本文所述的治疗组合物能够提高治疗剂向靶器官的递送至少 50% 以上。仍然在其他实施方式中, 与缺少靶向剂的其他对照治疗组合物的递送相比, 本文所述的治疗组合物能够提高治疗剂向靶器官的递送至少 75% 以上。

[0100] 存在于治疗组合物中靶向剂的量可以在大范围内变化。在一些实施方式中, 靶向剂可以是治疗组合物总质量(其中靶向剂的质量包含在治疗组合物总质量中)的约 1% 至约 50% (重量/重量)。在其他的实施方式中, 靶向剂可以是治疗组合物总质量的约 10% w/w 至约 30% w/w (同样的基准)。仍然在其他实施方式中, 靶向剂可以是治疗组合物总质量的约 20% w/w 至约 40% w/w (同样的基准)。

[0101] 本文所述的组合物中可以包含各种治疗剂。在一些实施方式中, 治疗剂的治疗活性可以抑制癌细胞的生长。治疗剂可以直接和/或间接地抑制癌细胞生长。例如, 治疗剂可以通过直接作用于癌细胞而诱导凋亡。治疗剂也可以通过靶向一种或多种支持癌细胞的成纤维细胞来间接地抑制癌细胞生长。在一实施方式中, 治疗剂可以是细胞毒性的。

[0102] 在一些实施方式中, 治疗剂的治疗活性可以包括抑制靶器官或靶组织内的纤维化, 例如上文所述的那些靶器官或靶组织内的纤维化。例如, 治疗剂可以在将治疗剂递送至靶器官或靶组织时抑制星状细胞的活化。本文所用的术语“活化”描述星状细胞的异常状态, 其特征为增加的增殖、降低的维生素 A 浓度和/或增加的胶原蛋白产生。

[0103] 在一些实施方式中, 治疗剂可以是抗癌剂。抗癌剂的实例为紫杉醇。在一些实施方式中, 治疗剂可以是小分子试剂。在这些实施方式中, 治疗剂可以选自转化生长因子

β (TGF β) 抑制剂、基质金属蛋白酶 (MMP) 促进剂、肝细胞生长因子 (HGF) 促进剂、金属蛋白酶组织抑制剂 (TIMP) 的产生抑制剂、 γ 型过氧化物酶体增殖物激活受体 (PPAR γ) 配体、血管紧张素活性抑制剂、血小板衍生生长因子 (PDGF) 抑制剂、钠通道抑制剂和凋亡诱导物。

[0104] 在其他实施方式中,治疗剂可以包括氨基酸。在这些实施方式中,治疗剂可以选自 siRNA、DNA、RNA 和反义核酸。在一实施方式中,治疗剂可以是 siRNA。在一些实施方式中,siRNA 包括具有 5 至 50 个碱基对、优选 10 至 35 个碱基对、更优选 19 至 27 个碱基对的 RNA。siRNA 还可以包括混合的 RNA/DNA 分子或混合的蛋白 /RNA 分子。在一实施方式中,治疗剂可以抑制胶原蛋白的分泌。治疗剂在递送至靶器官时可以基本上抑制金属蛋白酶组织抑制剂 (TIMP) 或分子伴侣的活性。在一些实施方式中,被治疗剂向靶器官的递送抑制的分子伴侣可以是胶原蛋白特异性的,例如,热休克蛋白 47 (HSP47)。

[0105] 存在于治疗组合物中的治疗剂的量可以在大范围内变化。治疗剂可以是治疗组合物总质量 (其中治疗剂的质量包含在治疗组合物总质量中) 的约 25% 至约 75% (重量 / 重量)。在其他实施方式中,治疗剂可以是治疗组合物总质量的约 30% w/w 至约 60% w/w (同样的基准)。仍然在其他实施方式中,治疗剂可以是治疗组合物总质量的约 40% w/w 至约 70% w/w (同样的基准)。

[0106] 在一些实施方式中,阳离子聚合物载体可以是微粒的形式。在其他实施方式中,阳离子聚合物载体可以是纳米颗粒的形式。

[0107] 本文所公开的治疗组合物可以通过多种方式来制备。如本文所公开的,一种或多种试剂可以通过静电缔合与阳离子聚合物载体操作地相关联。在一实施方式中,靶向剂可以通过静电缔合与阳离子聚合物载体操作地相关联。同样地,治疗剂可以通过静电缔合与阳离子聚合物载体操作地相关联。

[0108] 或者,在一些实施方式中,一种或多种试剂可以通过共价键与阳离子聚合物载体操作地相关联。在一些实施方式中,靶向剂与阳离子聚合物载体可以通过共价键操作地相关联。当通过共价键操作地相关联时,靶向剂与阳离子聚合物载体可以直接相互键合。在一实施方式中,视黄醇可以直接与阳离子聚合物载体键合。各种对本领域技术人员已知的机理可以用于在靶向剂与阳离子聚合物载体之间形成共价键。作为实例,视黄醇与阳离子聚合物载体可以通过缩合反应来直接相互键合。直接将视黄醇与阳离子聚合物载体键合的其他方法对本领域技术人员是已知的,并且可以通过本文提供的指导所告知的常规实验来确定。

[0109] 在其他实施方式中,一种或多种试剂可以与阳离子聚合物载体通过连接基团操作地相关联。连接基团的实例包括相对低分子量的基团,如酰胺、酯、碳酸酯和醚;以及较高分子量的连接基团,如聚乙二醇 (PEG)。当靶向剂、治疗剂和 / 或阳离子聚合物载体相互反应时,可以通过修饰靶向剂,治疗剂和阳离子聚合物载体的一种或多种来包含形成连接基团的部分从而引入连接基团。示例性的部分是双键。然后,可以使被修饰的靶向剂、治疗剂和 / 或载体相互反应,所利用的方法是本领域技术人员已知的,例如,通过迈克尔 (Michael) 反应 (见, J. March, *Advanced Organic Chemistry* 3rd Ed (高级有机化学, 第三版), pp. 711-712 (1985))。例如,可以使诸如类视黄醇的被修饰的靶向剂与聚-L-赖氨酸和 / 或 PEI 反应,从而将靶向剂与阳离子聚合物载体通过连接基团操作地相关联。将靶向剂通过连接基团与阳离子聚合物载体连接的替代方法对本领域技术人员是已知的,并且可以通过本

文提供的指导所告知的常规实验来确定。

[0110] 在一些实施方式中,治疗剂和靶向剂可以单独地或组合地与阳离子聚合物载体组合以形成混合物。可以在适当的条件下处理混合物(例如,孵育)来允许靶向剂和/或治疗剂与阳离子聚合物载体操作地相关联。如果需要,可以允许试剂的一种在添加其他试剂之前与阳离子聚合物载体反应。在一些实施方式中,靶向剂可以在添加治疗剂之前与阳离子聚合物载体组合。在其他实施方式中,治疗剂可以在添加靶向剂之前与阳离子聚合物载体组合。仍然在其他实施方式中,靶向剂和治疗剂可以大约同时与阳离子聚合物载体组合。

[0111] 或者,可以将靶向剂和/或治疗剂与用于形成阳离子聚合物载体的部分的单体连接。然后将单体利用本领域技术人员已知的方法聚合以形成阳离子聚合物载体。例如,可以将靶向剂和/或治疗剂在聚合之前连接至L-赖氨酸单体。然后,可以利用本领域技术人员已知的方法,使所得的具有连接的靶向剂和/或治疗剂的单体聚合以形成阳离子聚合物载体。

[0112] 各种靶向剂可以和阳离子聚合物载体操作地相关联。如上文所公开的,合适的靶向剂可以是类视黄醇。如上文所公开的,合适的类视黄醇包括但不限于视黄醇、视黄醛、视黄酸、retinoid及上述的衍生物和类似物。在一些实施方式中,靶向剂可以通过静电缔合与阳离子聚合物载体操作地相关联。在其他实施方式中,靶向剂可以通过共价键与阳离子聚合物载体操作地相关联。当通过共价键操作地相关联时,靶向剂和阳离子聚合物载体可以直接相互键合。例如,丙烯酰视黄醇可以通过改进的迈克尔加成与一个或多个本文所述的重复单元(例如,通式(I)、(II)、(III)、(IV)、(V)、(VI)、(VII)、(VIII)、(IX)和/或(X)的重复单元)直接键合。在其他实施方式中,如上文所述的,靶向剂和阳离子聚合物载体可以通过连接基团相互键合。

[0113] 包括上文所述那些治疗剂在内的各种治疗剂可以和阳离子聚合物载体操作地相关联。在一些实施方式中,治疗剂的治疗活性可以包括抑制靶器官或靶组织内的纤维化。在一些实施方式中,治疗剂可以是抗癌剂。示例性的抗癌剂为紫杉醇。在一些实施方式中,治疗剂可以是小分子试剂。在这些实施方式中,治疗剂可以选自转化生长因子 β (TGF β)抑制剂、基质金属蛋白酶(MMP)促进剂、肝细胞生长因子(HGF)促进剂、金属蛋白酶组织抑制剂(TIMP)的产生抑制剂、 γ 型过氧化物酶体增殖物激活受体(PPAR γ)配体、血管紧张素活性抑制剂、血小板衍生生长因子(PDGF)抑制剂、钠通道抑制剂和细胞凋亡诱导物。

[0114] 在其他实施方式中,治疗剂可以包括氨基酸。在这些实施方式中,治疗剂可以选自siRNA、DNA、RNA和反义核酸。在一实施方式中,治疗剂可以是siRNA。在一些实施方式中,siRNA包括具有5至50个的碱基对、优选10至35个碱基对、更优选19至27个碱基对的RNA。siRNA也可以包括混合的RNA/DNA分子或混合的蛋白/RNA分子。在一实施方式中,治疗剂可以抑制胶原蛋白的分泌。治疗剂在递送至靶器官时可以基本上抑制金属蛋白酶组织抑制剂(TIMP)或分子伴侣的活性。在一些实施方式中,被治疗剂向靶器官的递送抑制的分子伴侣可以是胶原蛋白特异性的,例如,热休克蛋白47(HSP47)。

[0115] 在其他实施方式中,治疗剂可以通过共价键与阳离子聚合物载体操作地相关联。当通过共价键操作地相关联时,治疗剂与阳离子聚合物载体可以直接相互键合。例如,抗癌剂可以与阳离子聚合物载体直接键合。在一实施方式中,紫杉醇可以在与C2'-碳连接的氧原子处与阳离子聚合物载体操作地相关联。在另一实施方式中,紫杉醇可以在与C7-碳连

接的氧原子处与阳离子聚合物载体操作地相关联。在一些实施方式中,阳离子聚合物载体可以在与 C2' - 碳连接的氧原子处和 / 或与 C7- 碳连接的氧原子处具有连接的紫杉醇。在其他实施方式中,如上文所述,治疗剂与阳离子聚合物载体可以通过连接基团相互键合。

[0116] 如本文所公开的,治疗剂与阳离子聚合物载体的操作关联可以通过本领域技术人员已知的许多不同方式进行。一种将治疗剂与阳离子聚合物载体的操作地关联的方法是利用加热(例如,用微波方法加热)。在一实施方式中,可以将反应加热到约 100°C 至约 150°C 的温度。在另一实施方式中,加热材料的时间为约 5 分钟至约 40 分钟。如果需要,可以将反应混合物冷却至室温。这些步骤可以手动、通过自动系统或通过二者的组合来进行。

[0117] 上文所提及的反应可以在任何合适的温度下发生,如,室温。通常为本领域技术人员已知和 / 或本文所述的合适的溶剂、偶联剂、催化剂和 / 或缓冲剂可以用于操作地关联治疗剂、靶向剂和阳离子聚合物载体。

[0118] 另外,本领域技术人员已知的合适的方法可以用于分离和 / 或纯化治疗组合物。例如,可以将反应混合物过滤至酸性水溶液中。然后将该反应混合物形成的任何沉淀过滤并用水洗涤。任选地,可以用本领域技术人员已知的任何合适方法纯化该沉淀。例如,可以将沉淀转移至丙酮中并溶解,并将所得的溶液再次过滤至碳酸氢钠溶液中。如果需要,可以将所得的反应溶液用纤维素膜在水中渗析,并且可以将聚合物冷冻干燥并分离。在形成治疗组合物之后,还可以测量任何游离量的未与载体操作地相关联的靶向剂或治疗剂。例如,薄层色谱法(TLC)可以用于证实在治疗组合物中基本上不存在剩下的游离治疗剂。

[0119] 靶向剂和治疗剂可以在相对于阳离子聚合物载体的各个位置与阳离子聚合物载体操作地相关联。这些位置可以是固定的(例如,在阳离子聚合物载体的中部、末尾或侧链)或相对的,例如,阳离子聚合物载体在特定的介质(如,水性介质)中表现出的构型可以使该阳离子聚合物载体具有内部和外部。在一实施方式中,靶向剂和治疗剂的一种或多种可以与阳离子聚合物载体的侧链部分操作地相关联。在其他实施方式中,靶向剂和治疗剂的一种或多种可以与阳离子聚合物载体的末尾或末端重复单元操作地相关联。仍然在其他实施方式中,靶向剂和治疗剂的一种或多种可以与阳离子聚合物载体的中部操作地相关联。仍然在其他实施方式中,靶向剂和治疗剂的一种或多种可以与阳离子聚合物载体的主链操作地相关联。在一实施方式中,靶向剂和治疗剂的一种或多种可以与阳离子聚合物载体的外面部分或外表面操作地相关联。在一些实施方式中,靶向剂和治疗剂的一种或多种可以与阳离子聚合物载体的里面部分或内表面操作地相关联。在一实施方式中,靶向剂和治疗剂的一种或多种可以至少被部分地包含在阳离子聚合物载体中。在另一实施方式中,靶向剂和治疗剂的一种或多种可以基本上被完全地包含在阳离子聚合物载体中。

[0120] 在一些实施方式中,一种类型的试剂(例如,治疗剂或靶向剂)可以在一个部分与阳离子聚合物载体操作地相关联,而另一种类型的试剂(例如,治疗剂或靶向剂)可以在另一部分与阳离子聚合物载体操作地相关联。作为实例,靶向剂可以与阳离子聚合物载体的外面部分或外表面操作地相关联,而治疗剂可以与阳离子聚合物载体的里面部分或内表面操作地相关联。可选择地,治疗剂可以与阳离子聚合物载体的外表面操作地相关联,而靶向剂可以与阳离子聚合物载体的内表面或核心操作地相关联。在其他实施方式中,一种类型的试剂(例如,治疗剂或靶向剂)可以在大约相同的部分与阳离子聚合物载体操作地相关联。作为实例,两种试剂都可以与阳离子聚合物载体的里面部分或内表面关联。可选择地,

两种试剂都可以与阳离子聚合物载体的外面部分或外表面关联。当一种或多种试剂与里面部分或内表面关联时,每种试剂都可以部分或完全地被封装在阳离子聚合物载体中。本领域普通技术人员将认识到,关联的位置和取向可以根据特定的靶向剂、治疗剂和阳离子聚合物载体的性质而变化。

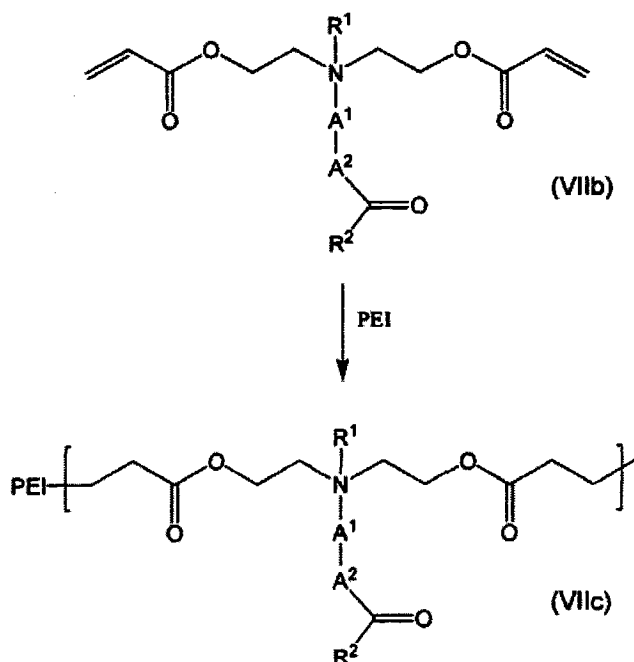
[0121] 在一些实施方式中,靶向剂和治疗剂的一种或多种可以在阳离子聚合物载体形成之前与氨基酸操作地相关联,其中该氨基酸形成阳离子聚合物载体的一部分。在其他实施方式中,靶向剂和治疗剂的一种或多种可以在阳离子聚合物载体形成之后与其操作地相关联。在一些实施方式中,阳离子聚合物载体可以在其与治疗剂操作地相关联之前,与靶向剂操作地相关联。在其他实施方式中,阳离子聚合物载体可以在其与治疗剂操作地相关联之后,与靶向剂操作地相关联。在一些实施方式中,靶向剂和治疗剂都可以与阳离子聚合物载体静电地相关联。在其他实施方式中,靶向剂和治疗剂都可以与阳离子聚合物载体共价地键合。仍然在其他实施方式中,一种类型的试剂(例如,靶向剂或治疗剂)可以与阳离子聚合物载体静电地相关联,而另一种类型的试剂(例如,治疗剂或靶向剂)可以与阳离子聚合物载体共价地键合。

[0122] 本文所公开的治疗组合物可以用本领域技术人员已知的各种方式来制备。本文所公开的阳离子聚合物载体可以根据各种方法进行制备。本文所公开的多种阳离子聚合物载体,如聚-L-赖氨酸和聚乙烯亚胺(PEI),可以是商购的或利用本领域普通技术人员已知的方法来制备。

[0123] 在一些实施方式中,水溶性可降解交联阳离子聚合物载体,如本文所公开的那些,可以根据 Lynn, et al. J. Am. Chem. Soc. 2001, 123, 8155-8156 中所公开的方法,利用二丙烯酸酯(diacrylate)作为阳离子化合物之间的连接分子进行制备。在一些实施方式中,可以包含(a)重复的聚乙二醇(PEG)单元、(b)重复的阳离子聚乙烯亚胺(PEI)单元和(c)含有侧链脂类基团的重复的可降解单元的水溶性可降解交联阳离子聚合物可以通过下述步骤合成:将包含重复的乙烯亚胺单元的第一反应物溶于有机溶剂中以形成溶解的或部分溶解的聚合反应物;使该溶解的或部分溶解的聚合反应物与可降解的单体反应物反应以形成可降解交联聚合物,其中该可降解的单体反应物包含脂类基团;以及,使该可降解交联聚合物与第三反应物反应,其中该第三反应物包含重复的聚乙二醇单元。例如,包含通式(VII)的重复主链可降解单元的水溶性可降解交联阳离子聚合物可以通过下文所示的一种方法合成。如方案A所示,通式(VIIb)的化合物可以与PEI反应以形成包含一个或多个通式(VIIc)部分的可降解交联阳离子聚合物。

[0124] 方案A

[0125]



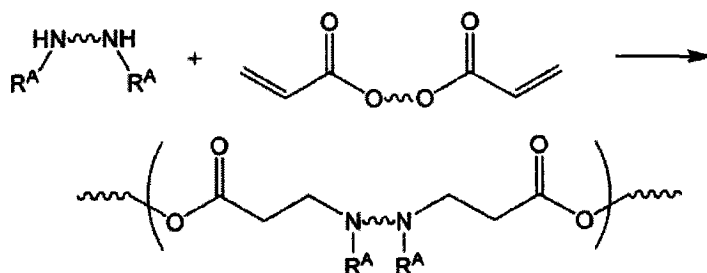
[0126] 在方案中, A¹、A²、R¹ 和 R² 具有本文所述的关于通式 (VII) 的相同含义。

[0127] 方案 A 中所示的反应可以如下进行: 将 PEI 和通式 (VIIb) 的化合物在诸如乙醇、甲醇或二氯甲烷的互溶剂中混合并搅拌; 优选在室温下搅拌数小时。所得的聚合物可以利用本领域技术人员已知的技术进行回收。例如, 可以将溶剂蒸发来回收所得的聚合物。本发明不受操作理论所限制, 但是认为 PEI 与通式 (VIIb) 的化合物的之间的反应涉及 PEI 的一个或多个胺与通式 (VIIb) 的化合物的双键之间的迈克尔反应。(见, J. March, *Advanced Organic Chemistry* 3rd Ed (高级有机化学, 第三版), pp. 711-712 (1985))。方案 A 中所示的通式 (VIIb) 的化合物可以通过美国公开 2006/0258751 号中所述的方式来制备, 该美国公开以引用方式并入本文中, 并且包括所有的附图。

[0128] 通式 (VIII)、(IX)、(X) 和 (XI) 的重复单元可以利用本领域技术人员已知的方法来合成。例如, 通式 (VIII) 和 (IX) 的重复单元可以通过双(仲胺)或伯胺与双(丙烯酸酯)的共轭加成来制备。一般的反应方案示于下述方案 B 和方案 C 中。

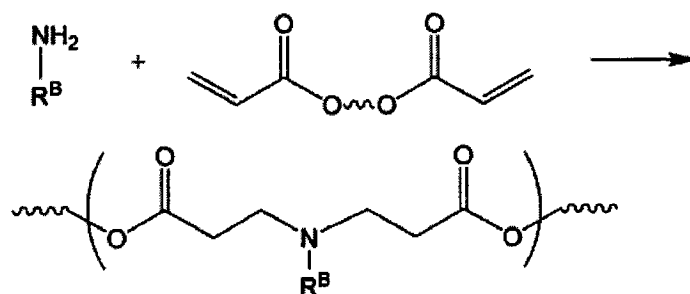
[0129] 方案 B

[0130]



[0131] 方案 C

[0132]



[0133] 在方案 B 和 C 中,基团 R^A 和 R^B 可以独立地为包括但不限于氢原子、烷基、烯基、炔基、氨基、烷基氨基、二烷基氨基、三烷基氨基、羟基、烷氧基、卤素、芳基、杂环、芳族杂环、氰基、酰胺、氨基甲酰基、羧酸、酯、烷基硫醚、硫氢基和脲基的任何化学基团。通式 (VIII)、(IX)、(X) 和 (XI) 的重复单元及其制备方法的其他实例公开于 2006 年 2 月 14 日授权的,题为“生物可降解的聚(β -氨基酯 (AMINO ESTER))及其用途”的美国专利 6,998,115 号;和 2007 年 6 月 5 日提交的,题为“交联的可降解聚合物及其用途”的美国专利公开 2008/0145338 号中,该美国专利和美国专利公开以引用方式并入本文中,以用于描述合适的阳离子聚合物载体及其制备方法的特定目的。关于包含通式 (VIII)、(IX)、(X) 和 / 或 (XI) 的重复单元的阳离子聚合物载体的合成的其他细节描述于 2001 年 10 月 2 日提交的,“生物可降解的聚(β -氨基酯)及其用途”的美国专利 6,998,115 号和 / 或 2007 年 6 月 5 日提交的,“交联的可降解聚合物及其用途”的美国专利公开号 2008/0145338 中。

[0134] 本文所公开的靶向剂可以是商购的或根据本领域技术人员已知的方法制备。另外,本文所公开的治疗剂可以根据本领域普通技术人员已知的各种方法来制备。诸如紫杉醇的某些治疗剂可以是商购的。在一些实施方式中,治疗剂可以包括核酸,如 siRNA、DNA、RNA 或反义核酸。在一些实施方式中,可以使核酸特异地适合于促进特定分子的降解。这种分子可以是,例如,金属蛋白酶组织抑制剂 (TIMP) 或分子伴侣。被治疗剂向靶器官或靶组织的递送抑制的分子伴侣可以是胶原蛋白特异性的,例如,热休克蛋白 47 (HSP47)。在一些实施方式中,可以将 siRNA 设计为特定的序列来识别 HSP47。本领域普通技术人员将认识到,以这种方式设计核酸的各种技术是可用的,并且化学合成的核酸可以是商购的。

[0135] 另一实施方式提供了药物组合物,其可以包含一种或多种本文所述的治疗组合物,还包含选自药物可接受的赋形剂、第二载体(除了本文所述的阳离子聚合物载体以外)和稀释剂的至少一种。在一些实施方式中提供了本文所公开的化合物的前药、代谢产物、立体异构体、水合物、溶剂合物、多晶型物和药物可接受的盐(例如,可以含有靶向剂和治疗剂的治疗组合物)。

[0136] 如果药物制剂的制备包括药物赋形剂与盐形式的活性成分的紧密混合,则可以期望地使用非碱性的药物赋形剂,即,酸性或中性的赋形剂。

[0137] 在各种实施方式中,可以单独地使用,与本文所公开的其他化合物组合地使用,或与在本文所述的治疗领域中具有活性的一种或多种其他试剂组合地使用本文所公开的组合物(例如,可以含有靶向剂和治疗剂的治疗组合物)。

[0138] 另一方面,本发明的公开涉及药物组合物和本文所公开的组合物(例如,可以含有靶向剂和治疗剂的治疗组合物),该药物组合物包含生理可接受的表面活性剂、另外的载体、稀释剂、赋形剂、光滑剂、悬浮剂、成膜物质和包衣助剂 (coating assistant) 的一种或多种,或上述的组合。可接受的另外的治疗用载体或稀释剂在药学领域是已知的,并且例

如,在 Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed (雷明顿制药科学, 第 18 版)., Mack Publishing Co., Easton, PA (1990) 中进行了描述, 该参考文献以引用的方式全部并入本文。可以在药物组合物中提供防腐剂、稳定剂、染料、甜味剂、芳香剂、调味剂等。例如, 可以作为防腐剂添加苯甲酸钠、抗坏血酸和对羟基苯甲酸的酯。另外, 可以使用抗氧化剂和悬浮剂。在各种实施方式中, 可以将醇、酯、硫酸化的脂肪醇等用作表面活性剂; 可以将蔗糖、葡萄糖、乳糖、淀粉、结晶的纤维素、甘露糖醇、轻质无水硅酸盐、铝酸镁、硅酸氯酸镁 (magnesium metasilicate aluminate)、合成的硅酸铝、碳酸钙、碳酸氢钠 (sodium acid carbonate)、磷酸氢钙、羧甲基纤维素钙等用作赋形剂; 可以将硬脂酸镁、滑石、硬化油等用作光滑剂; 可以将椰子油、橄榄油、芝麻油、花生油、大豆用作悬浮剂或润滑剂; 可以将诸如纤维素或糖的碳水化合物的衍生物乙酸邻苯二甲酸纤维素 (cellulose acetate phthalate), 或聚乙烯的衍生物乙酸甲酯-异丁烯酸酯共聚物用作悬浮剂; 以及可以将诸如邻苯二甲酸酯等的增塑剂用作悬浮剂。

[0139] 术语“药物组合物”是指本文所公开的组合物 (例如, 可以含有靶向剂和治疗剂的治疗组合物) 与诸如稀释剂或另外的载体的其他化学组分的混合物。药物组合物促进化合物向有机体的给药。给予药物组合物的多种技术存在于现有技术中, 该多种技术包括但不限于口服、注射、气雾剂 (aerosol)、胃肠外和局部给药。药物组合物也可以通过将化合物与无机或有机酸反应获得, 该无机或有机酸例如盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸、甲磺酸、乙磺酸、对甲苯磺酸、水杨酸等。

[0140] 术语“载体”是指与阳离子聚合物载体不同, 且除了阳离子聚合物载体之外的第二化合物, 其促进化合物并入细胞或组织中。例如, 二甲亚砜 (DMSO) 是常用的载体, 因为其促进许多有机化合物被吸收入有机体的细胞或组织。

[0141] 术语“稀释剂”是指稀释于水中的化合物, 其会溶解所关注的组合物 (例如, 可以含有靶向剂和治疗剂的治疗组合物), 并且使化合物的生物活性形式稳定。溶解在缓冲溶液中的盐在本领域中用作稀释剂。一种常用的缓冲溶液是磷酸缓冲盐溶液, 因为其模拟人血液中的盐条件。由于缓冲盐可以在低浓度下控制溶液的 pH, 所以缓冲的稀释剂几乎不改变化合物的生物活性。如本文所用的, “赋形剂”是指惰性物质, 其被添加至组合物中以为该组合物提供体积 (bulk)、稠度、稳定性、结合能力、润滑作用、崩解能力等, 而没有限制。“稀释剂”是一种类型的赋形剂。

[0142] 术语“生理可接受”是指不消除化合物的生物活性和性质的载体或稀释剂。

[0143] 可以向人患者给予本文所述的药物组合物本身, 或者如在联合治疗中那样, 以本文所述的药物组合物与其他活性成分或合适的载体或赋形剂混合的药物组合物进行给药。本申请化合物的制剂和给药的技术可以在“Remington's Pharmaceutical Sciences (雷明顿制药科学),” Mack Publishing Co., Easton, PA, 18th edition, 1990 中找到。

[0144] 合适的给药途径可以, 例如, 包括口服、直肠、跨粘膜、局部或肠给药; 胃肠外递送, 其包括肌肉内、皮下、静脉内、髓内注射以及鞘内、直接心室内 (intraventricular)、腹膜内、鼻内或眼内注射。也可以将化合物 (例如, 可以含有靶向剂和治疗剂的治疗组合物) 以缓释或控释的剂型进行给药, 该剂型包括积存注射 (depot injection)、渗透泵、丸剂、透皮 (包括电子传递 (electrotransport)) 贴剂等, 以用于延长和 / 或定时的、预定速率的脉冲给药。

[0145] 本发明的药物组合物可以用自身已知的方式来制备,例如通过常规的混合、溶解、造粒、糖衣丸制备 (dragee-making)、研磨、乳化、封装 (encapsulating)、包埋 (entrapping) 或压片过程。

[0146] 包含赋形剂和辅助剂 (auxiliary) 药物组合物可以通过任何常规方式,利用一种或多种的生理可接受的载体来配制,所述辅助剂有助于将活性化合物加工成可以在药学上使用的制剂。合适的制剂取决于所选择的给药途径。可以适当地并且如本领域所理解地使用任何已知的技术、载体和赋形剂,例如上文的 Remington's Pharmaceutical Sciences (雷明顿制药科学)。

[0147] 可以将注射剂 (injectable) 制备成常规形式,即,液体溶液或悬浮液、适合于注射前的液体溶液或悬浮液的固体形式,或者乳液。合适的赋形剂为,例如,水、盐水、葡萄糖、甘露糖醇、乳糖、卵磷脂、白蛋白、谷氨酸钠、盐酸半胱氨酸等。另外,如果需要,可注射的药物组合物可以含有少量无毒的辅助物质,如润湿剂、pH 缓冲剂等。生理相容缓冲剂包括但不限于汉克溶液 (Hank's solution)、林格溶液 (Ringer's solution) 或生理盐水缓冲液。如果需要,可以使用增强吸收的制剂。

[0148] 对于跨粘膜给药,可以在制剂中使用对要被透过的屏障适合的渗透剂。

[0149] 诸如通过团注射或连续输注的用于胃肠外给药的药物制剂包括水溶形式的活性化合物的水溶液。另外,可以将活性化合物的悬浮液制备为合适的油性注射悬浮液。水性注射悬浮液可以含有增加悬浮液粘度的物质,如羧甲基纤维素钠、山梨醇或葡聚糖。任选地,悬浮液也可以含有适当的稳定剂或增加化合物溶解性的试剂以允许制备高浓度的溶液。注射制剂可以以单位剂型存在,例如,在安瓿或多剂量容器中,并且可以添加防腐剂。组合物可以采取油性或水性媒介物中的悬浮液、溶液或乳液的形式,并且可以含有配制试剂 (formulatory agent),如悬浮剂、稳定剂和 / 或分散剂。或者,活性成分可以是用于在使用前用诸如灭菌的无热原水的合适的媒介物配制 (constitution) 的粉末形式。

[0150] 对于口服给药,组合物可以容易地通过将所关注的组合物 (例如,含有靶向剂和治疗剂的治疗组合物) 与本领域已知的药物可接受的载体组合来进行配制。对于要进行治疗的患者的口服摄入,除了阳离子聚合物载体之外可以使用的这些载体允许将本发明的组合物配制成片剂、丸剂、糖衣丸、胶囊剂、液体、凝胶、糖浆剂、浆液、悬浮液等。口服用药物制剂可以通过下述方法获得:将活性化合物与固体赋形剂组合,任选地将所得的混合物研磨,并在添加合适的辅助剂后将混合物加工成颗粒,如果需要,以获得片剂或糖衣丸内核。特别地,合适的赋形剂为诸如糖的填料,其包括乳糖、蔗糖、甘露糖醇或山梨醇;纤维素制品,例如,玉米淀粉、小麦淀粉、稻米淀粉、马铃薯淀粉、明胶、黄蓍胶、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羧甲基纤维素钠和 / 或聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)。如果需要,可以添加崩解剂,如交联聚乙烯吡咯烷酮、琼脂或者藻酸或其盐,如藻酸钠。为糖衣丸内核提供合适的包衣。为了这个目的,可以使用浓的糖溶液,其可以任选地含有阿拉伯树胶、滑石、聚乙烯吡咯烷酮、卡波姆凝胶 (carbopol gel),聚乙二醇和 / 或二氧化钛、漆溶液 (lacquer solution) 以及合适的有机溶剂或溶剂混合物。为了鉴定或表征活性化合物剂量的不同组合,可以向片剂或糖衣丸包衣添加染料或颜料。为了这个目的,可以使用浓的糖溶液,其可以任选地含有阿拉伯树胶、滑石、聚乙烯吡咯烷酮、卡波姆凝胶、聚乙二醇和 / 或二氧化钛、漆溶液以及合适的有机溶剂或溶剂混合物。为了鉴定或表征活性化合物剂量的不同组合,可以向片剂或糖衣丸包

衣添加染料或颜料。

[0151] 可以口服使用的药物制剂包括由明胶制成的推入配合 (push-fit) 胶囊, 以及由明胶和诸如甘油或山梨醇的增塑剂制成的软密封胶囊。推入配合胶囊可以含有与诸如乳糖的填料, 诸如淀粉的粘结剂和 / 或诸如滑石或硬脂酸镁的润滑剂, 以及任选的稳定剂混合的活性成分。在软胶囊中, 可以将活性化合物溶解或悬浮在合适的液体中, 例如, 脂肪油、液态石蜡或液态聚乙二醇。另外, 可以添加稳定剂。用于口服给药的所有制剂应该是适合这种给药方式的剂量。

[0152] 对于口腔含化 (buccal) 给药, 组合物可以可以采用以常规方式配制的片剂或锭剂的形式。

[0153] 对于通过吸入的给药, 组合物可以方便地以由加压包 (pressurized pack) 或喷雾器提供的气雾剂喷雾的形式进行递送, 并且使用合适的推进剂, 例如二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、二氧化碳或其他合适的气体。在使用加压气雾剂的情况下, 剂量单位可以通过提供递送计量的量的阀来确定。可以配制用于吸入器或吹入器的诸如明胶的胶囊和药筒 (cartridge), 其含有化合物与诸如乳糖或淀粉的合适粉末基质的粉末混合物。

[0154] 本文还公开了在药学领域已知、用于包括眼内、鼻内和耳内递送在内的用途的各种药物组合物。用于这些用途的合适的渗透剂在本领域内通常是已知的。为了稳定性和舒适度, 最经常且优选地将这些合适的药物制剂配制成无菌、等渗和缓冲的。用于鼻内递送的药物组合物也可以包括滴剂和喷雾剂, 它们经常被制备成在许多方面模拟鼻分泌物以确保维持正常的纤毛作用。如在 Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed (雷明顿制药科学, 第 18 版), Mack Publishing Co., Easton, PA (1990) 中所公开的, 该文献以引用的方式全部并入本文中, 并且对本领域技术人员已知的, 合适的制剂最经常且优选地是等渗的, 被稍微地缓冲以维持 5.5 至 6.5 的 pH, 并且最经常且优选地含有抗微生物防腐剂和合适的药物稳定剂。耳内递送的药物制剂包括用于耳内局部应用的悬浮液和软膏。这些耳用制剂的常用溶剂包括甘油和水。

[0155] 也可以将组合物制备成诸如栓剂或滞留型灌肠剂的直肠组合物, 其例如含有诸如可可脂或其他甘油酯的常规栓剂基质。

[0156] 除了上文所述的制剂以外, 也可以将组合物制备成长效制剂。这些长效制剂可以通过植入 (例如, 皮下或肌肉内) 或肌肉内注射进行给药。因此, 例如, 可以用合适的聚合或疏水材料 (例如可接受的油中的乳液) 或离子交换树脂来配制化合物, 或者可以将化合物配制为微溶的衍生物, 例如, 配制成微溶的盐

[0157] 对于疏水化合物, 合适的药物载体可以是包含苯甲醇、非极性表面活性剂、与水混溶的有机聚合物和水相的助溶剂体系。常用的助溶剂体系是 VPD 助溶剂体系, 其是 3% w/v 的苯甲醇、8% w/v 的非极性表面活性剂 Polysorbate 80™ 和 65% w/v 的聚乙二醇 300, 并用无水乙醇将体积补足的溶液。通常, 助溶剂体系的比例可以显著地变化而不破坏其溶解性和毒性特征。而且, 可以改变助溶剂组分的特性 (identity): 例如, 可以将其他低毒性非极性表面活性剂代替 POLYSORBATE 80™ 使用; 可以改变聚乙二醇的粒度级别 (fraction size); 诸如聚乙烯吡咯烷酮的其他生物相容的聚合物可以取代聚乙二醇; 以及, 其他糖或多糖可以代替葡萄糖。

[0158] 本文所公开的是治疗特征为异常纤维化的疾病状态的方法, 该方法可以包括给予

治疗有效量的如本文所述的治疗组合物。特征为异常纤维化的疾病状态可以包括癌症和/或纤维化疾病。可以被本文所述的治疗组合物治疗或改善的癌症的类型包括但不限于肺癌、胰腺癌、乳腺癌、肝癌、胃癌和结肠癌。在一实施方式中,可以被治疗或改善的癌症是胰腺癌。在另一实施方式中,可以被治疗或改善的癌症是肺癌。可以被本文所述的治疗组合物治疗或改善的纤维化疾病的类型包括但不限于肝纤维化、肝硬化、胰腺炎、胰纤维化、囊性纤维化、声带瘢痕、声带粘膜纤维化、喉纤维化、肺纤维化、特发性肺纤维化、囊性纤维化、骨髓纤维化、腹膜后纤维化和肾源性系统纤维化(nephrogenic systemic fibrosis)。在一实施方式中,可以被治疗或改善的疾病状态为肝纤维化。

[0159] 可以通过任何合适的方式向患者给予本文所公开的组合物或药物组合物。给药方法的非限制性实例包括(a)通过口服途径的给药,这种给药包括胶囊剂、片剂、粒剂、喷雾剂、糖浆或其他这种形式的给药;(b)通过非口服途径给药,如直肠、阴道、尿道内、眼内、鼻内或耳内给药,这种给药包括水性悬浮液、油性制剂等的给药,或者滴剂、喷雾剂、栓剂、药膏、软膏等的给药;(c)通过皮下、腹膜内、静脉内、肌肉内、皮内、眼窝内、囊内、脊柱内、胸骨内注射等的给药,其包括输注泵(infusion pump)递送;(d)局部(locally)给药,例如直接在肾或心脏部位的注射,如通过贮存植入(depot implantation)的注射;以及(e)局部(topically)给药;本领域技术人员认为合适的使活性化合物与活组织接触的给药方法;等给药方法。

[0160] 适合给药的药物组合物包含组合物,其中该组合物含有有效量的活性成分的以实现其预期目的。本文所公开的化合物作为剂量所要求的治疗有效量取决于给药途径、被治疗的包括人在内的动物的类型以及所考虑的特定动物的体质特征。可以调整剂量以实现期望的效果,但是仍取决于下列因素:如体重、饮食、同时进行的疗法以及医学领域技术人员将认识到的其他因素。更具体地,治疗有效量表示有效预防、减轻或改善疾病症状或延长被治疗个体的生存的化合物的量。治疗有效量的确定在本领域技术人员的能力范围内,特别是根据本文所提供的详细公开。

[0161] 对本领域技术人员显而易见的是,要被给予的有用体内剂量和给药的特定模式将根据年龄、体重、被治疗的哺乳动物的物种、使用的特定化合物以及这些化合物被使用的特定用途而变化。有效剂量水平,即实现期望结果所需的剂量水平的确定可以由本领域技术人员利用常规的药学方法完成。通常,产品的人临床应用以较低的剂量水平开始,并且增加剂量水平直到实现期望的效果。或者,可以利用确定的药学方法,使用可接受的体外研究来确定本发明的方法所确定的组合物的有用剂量和给药途径。

[0162] 在非人动物研究中,潜在产品的应用以较高的剂量水平开始,并且降低剂量水平直到不再实现期望效果或不良的副作用消失。取决于期望效果和治疗指标(indication),剂量可以变化很大。通常,剂量可以为约10微克/kg体重至约100mg/kg体重,优选为约100微克/kg体重至约10mg/kg体重。或者,如本领域技术人员所理解的,剂量可以基于患者的表面积,并根据患者的表面积来计算。

[0163] 个体医师可以根据患者的疾病状态来选择本发明药物组合物的确切的制剂、给药途径和剂量。(见,例如,Fingl et al.1975,“The Pharmacological Basis of Therapeutics(治疗的药学基础)”,该文献以引用的方式全部并入本文中,特别是对第一章,第一页(Ch.1, p.1)的引用)。通常,向患者给予的组合物剂量范围为患者体重的约

0.5mg/kg 至约 1000mg/kg。如患者所需要的,剂量可以是单次或在一天或更多天期间所给予的一系列的两次或更多次。在对于至少某些疾病状态已经确定了化合物的人剂量的情况下,本发明将使用那些与已经确定的人剂量相同的剂量,或者已经确定的人剂量的约 0.1% 至约 500%、更优选约 25% 至约 250% 的剂量。当未确定人剂量时,如对于新发现的药物组合物的情况,如通过动物毒性研究和功效研究所证明 (qualify) 的,合适的人剂量可以从 ED₅₀ 或 ID₅₀ 值或者源自体外或体内研究的其他合适的值来推断。

[0164] 应当注意,根据毒性或器官功能异常,主治医师将知道如何及何时终止、中断或调整给药。相反地,如果临床应答不合适(排除毒性的因素),则主治医师也将知道如何将治疗调整至更高水平。在相关病症的治疗 (management) 中,给药剂量的大小将随要被治疗的疾病状态的严重性及给药途径而变化。例如,疾病状态的严重性可以部分地通过标准预后评价方法来评价。而且,剂量和可能的剂量频率也将根据个体患者的年龄、体重和应答而变化。与上文所讨论的相当的程序可以用于兽医。

[0165] 尽管准确的剂量将基于各种药物 (drug-by-drug) 来确定,但是在大多数情况下,可以做出关于剂量的一些概括。成人患者的每日剂量方案可以是,例如,约 0.1mg 至 2000mg、优选约 1mg 至约 500mg、例如 5mg 至 200mg 的每种活性成分的口服剂量。在其他实施方式中,使用约 0.01mg 至约 100mg、优选约 0.1mg 至约 60mg、例如约 1mg 至约 40mg 的每种活性成分的静脉内、皮下或肌肉内的剂量。在药物可接受的盐的给药情况下,剂量可以按照游离碱来计算。在一些实施方式中,组合物每天给药 1 次至 4 次。或者,本发明的组合物可以通过连续静脉内输注来给药,优选的剂量为每种活性成分每天高达约 1000mg。如本领域技术人员所理解的,在某些情况下,需要给予超出、或者甚至远超出上文所指出的优选剂量范围的量的本文所公开的化合物以有效地并积极治疗特别的侵袭性 (aggressive) 疾病或感染。在一些实施方式中,将给药化合物一段连续治疗期,例如,一周或更长时间,或者数月或数年。

[0166] 可以单独地调整剂量和间隔时间以提供足以维持调节效果的活性部分的血浆水平,或提供最低有效浓度 (MEC)。MEC 将对每种化合物而变化,但是可以从体外数据进行估计。实现 MEC 所需的剂量取决于个体的特征和给药途径。然而,HPLC 测定或生物测定可用来确定血浆浓度。

[0167] 剂量间隔也可以利用 MEC 值来确定。组合物应当利用在 10% 至 90%、优选 30% 至 90%、最优选 50% 至 90% 的时间内将血浆水平保持高于 MEC 的方案进行给药。

[0168] 在局部给药或选择性吸收的情况下,药物的有效局部浓度可以与血浆浓度无关。

[0169] 给药的组合物的量可以取决于被治疗的个体、个体的体重、痛苦的严重性、给药方式以及开药医师的判断。

[0170] 可以利用已知的方法来评价本文所公开的组合物(例如,可以含有靶向剂和治疗剂的治疗组合物)的功效和毒性。例如,特定化合物或共有某种化学部分的化合物子集的毒理学可以通过确定对细胞系的体外毒性来建立,该细胞系例如哺乳动物的细胞系,优选人的细胞系。这些研究结果经常预示动物中的毒性,该动物例如哺乳动物,或更特别地,人。或者,特定化合物在诸如小鼠、大鼠、兔子或猴的动物模型中的毒性可以利用已知的方法来确定。特定化合物的功效可以利用几种公认的方法来确定,如体外方法、动物模型或人临床试验。对几乎每一类疾病状态都存在公认的体外模型,该疾病状态包括但不限于癌症、心血

管疾病和各种免疫功能异常。类似地,可接受的动物模型可以用来确定化学品治疗这类疾病状态的功效。当选择模型来确定功效时,熟练的技术人员可以通过现有技术水平的指导来选择合适的模型、剂量和给药途径以及方案。当然,人临床实验也可以用来确定化合物在人内的功效。

[0171] 如果需要,组合物可以以包装(pack)或分配器装置存在,其可以含有一个或多个含有活性成分的单位剂型。例如,包装可以包括金属或塑料箔,如泡式(blister)包装。包装或分配器装置可以附带给药说明。包装或分配器还可以附带与管理药品生产、使用或销售的政府机构所规定的形式的容器相关的通知,该通知反映了所述机构对于人或兽医给药的药物形式的批准。这类通知,例如,可以是美国食品药品监督管理局批准的处方药的标签或批准的产品的插页。也可以制备包含配制在相容药物载体中的本发明的化合物的组合物,将其置于合适的容器中,并标记为治疗指定的疾病状态。

[0172] 实施例

[0173] 提供下文的实施例以进一步描述本文所公开的实施方式。诸如甲醇、二氯甲烷(DCM)、聚乙二醇单甲醚丙烯酸酯(polyethylene glycol methylether acrylate)(PEG)、视黄醇的化学品和其他试剂购自Sigma-Aldrich化学公司(Sigma-Aldrich chemical company)。聚乙烯亚胺购自PolyScience, Inc。通式(VII)的可降解单体根据专利申请美国专利公开2006/0258751号所报道及本文所述的一般方法合成。水溶性可降解交联阳离子聚合物根据2008年5月23日提交的美国专利申请12/126,721号中所报道的一般方法合成,该专利申请通过引用的方式全部并入本文,并且包括任何附图。

[0174] 靶向HSP-47的siRNA序列购自Ambion, Inc。

[0175] 正义:GCAACUAAAAGACCUUGGAUGtt (SEQ ID NO :1)

[0176] 反义:ctCGUUGAUUUCUGGACCUAC (SEQ ID NO :2)

[0177] HeLa人宫颈癌细胞和B16F0小鼠皮肤黑素瘤购自ATCC,并在含有10% FBS的DMEM培养基中进行培养。GFP-表达稳定的细胞系通过将GFP表达载体转染进入细胞产生,并通过潮霉素B(用于HeLa-GFP)或新霉素(用于B16F0-GFP)进行选择。

[0178] 实施例1

[0179] 丙烯酰视黄醇根据图1中所示的一般方案制备如下:将视黄醇(302mg, 1mmol)溶于无水二氯甲烷(CH_2Cl_2 , 5mL)中。向视黄醇溶液中添加三乙胺(Et_3N , 0.25mL, 1.8mmol)和4-二(甲基氨基)吡啶(DMAP, 12mg, 0.1mmol)。在0°C下,将丙烯酰氯(0.12mL, 96%, 1.4mmol)逐滴添加至所得的溶液中并搅拌。添加后,继续在0°C下搅拌30分钟。然后,将溶液用 CH_2Cl_2 (15mL)稀释,并添加水(10mL)。将有机相萃取,分别用水、盐水洗涤,用无水硫酸钠干燥,并浓缩以用于色谱纯化(己烷/乙酸乙酯(EtOAc), 40:1)从而获得丙烯酰视黄醇(160mg, 47%)。色谱之后,浓缩之前,向丙烯酰视黄醇的己烷/EtOAc溶液中添加0.8mg(0.5% w/w)4-乙氧基苯酚以防止发生聚合。将所得的溶液在冰箱(-20°C)中避光保存。产物的鉴定通过NMR光谱确认。

[0180] 实施例2

[0181] 聚-L-赖氨酸(PLL)-视黄醇组合物根据图2所示的一般方案制备如下:将聚-L-赖氨酸(PLL)(PLL, 100mg)溶于DMF(10mL)中。向溶液中添加视黄酸(5mg)、EDC(30mg)和HOBT(5mg)。将所得的溶液在微波条件下放置5分钟。将反应混合物倒入0.2N

的 HCl 溶液中。通过离心分离白色沉淀。将沉淀再溶于 0.5M 碳酸氢钠溶液中。将溶液对水进行渗析。将产物 PLL- 视黄醇冷冻干燥。产物的鉴定通过 $^1\text{H-NMR}$ 确认。

[0182] 实施例 3

[0183] 聚(乙烯亚胺)(PEI)- 视黄醇组合物根据图 3 所示的一般方案制备如下:将 PEI600(50mg) 溶于乙醇(4mL) 中。向所得的溶液中逐滴添加丙烯酰视黄醇(5mg) 的乙醇(1mL) 溶液。将乙醇(1mL) 作为淋洗液(rinse) 添加至所得的溶液中, 然后将该所得的溶液搅拌 4 小时。将所得的混合物置于真空下以除去乙醇从而获得 PEI600- 视黄醇。产物的鉴定通过 $^1\text{H-NMR}$ 确认。利用各种量的起始原料也获得了相同的产物, 即 PEI600- 视黄醇, 并通过 $^1\text{H-NMR}$ 确认。例如, PEI600(50mg) 和丙烯酰视黄醇(10mg) 或者 PEI600(1200mg) 和丙烯酰视黄醇(10mg)。

[0184] 实施例 4

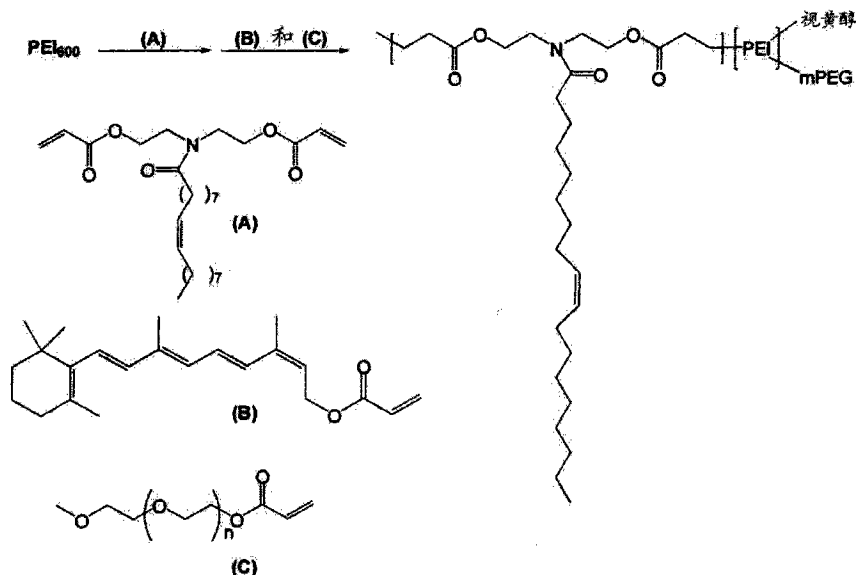
[0185] PEI- 视黄醇组合物根据图 3 所示的一般方案制备如下:将 PEI1200(50mg) 溶于乙醇(4mL) 中。向所得的溶液中逐滴添加丙烯酰视黄醇(5mg) 的乙醇(1mL) 溶液。将乙醇(1mL) 作为淋洗液添加至所得的溶液中, 然后将该所得的溶液搅拌 4 小时。将所得的混合物置于真空下以除去乙醇从而获得 PEI200- 视黄醇。产物的鉴定通过 $^1\text{H-NMR}$ 确认。

[0186] 实施例 5

[0187] PEI- 视黄醇组合物根据图 3 所示的一般方案制备如下:将 PEI2000(50mg) 溶于乙醇(4mL) 中。向所得的溶液中逐滴添加丙烯酰视黄醇(5mg) 的乙醇(1mL) 溶液。将乙醇(1mL) 作为淋洗液添加至所得的溶液中, 然后将该所得的溶液搅拌 4 小时。将所得的混合物置于真空下以除去乙醇从而获得 PEI2000- 视黄醇。产物的鉴定通过 $^1\text{H-NMR}$ 确认。用 1200mg PEI2000 开始反应也获得了相同的产物, 即 PEI2000- 视黄醇, 并通过 $^1\text{H-NMR}$ 确认。

[0188] 实施例 6

[0189]



[0190] 聚合物 1 的合成:将可降解的脂类连接物 (A, 23.9mg, 0.05mmol) 的 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1 : 2, 1.2mL) 溶液添加至 PEI₆₀₀(15.0mg, 0.025mmol) 的 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1 : 2, 1mL) 溶液中, 同时进行搅拌。将其在室温下剧烈搅拌 1 小时。然后添加丙烯酰视黄醇 (B, 3.4mg, 0.01mmol) 的 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1 : 2, 1mL) 溶液和丙烯酰聚乙二醇 (C, 18.2mg, 0.04mmol) 的

CH₂Cl₂/MeOH(1 : 2, 1mL) 溶液。在室温下剧烈搅拌另外的 2 小时后, 将其在冰水中冷却, 用 2M HCl/ 醚 (0. 5mL) 淬灭, 同时进行搅拌, 用冷二乙醚 (-20℃) 补加至 45mL。沉淀形成。通过离心 (5, 000rpm) 得到固体产物。向固体添加二乙醚 (30mL), 并将悬浮液再离心一次。将终产物于室温下过夜减压干燥以获得期望的产物 (60mg, 80%)。产物通过 NMR 光谱确认。

[0191] 聚合物 2 的合成: 将可降解的脂类连接物 (A, 47. 8mg, 0. 075mmol) 的 CH₂Cl₂/MeOH(1 : 2, 1. 8mL) 溶液添加至 PEI₆₀₀(15. 0mg, 0. 025mmol) 的 CH₂Cl₂/MeOH(1 : 2, 1mL) 溶液中, 同时进行搅拌。将其在室温下剧烈搅拌 1 小时。然后添加丙烯酰视黄醇 (B, 3. 4mg, 0. 01mmol) 的 CH₂Cl₂/MeOH(1 : 2, 1mL) 溶液和丙烯酰聚乙二醇 (C, 18. 2mg, 0. 04mmol) 的 CH₂Cl₂/MeOH(1 : 2, 1mL) 溶液。在室温下剧烈搅拌另外的 2 小时后, 将其在冰水中冷却, 用 2M HCl/ 醚 (0. 5mL) 淬灭, 同时进行搅拌, 用冷二乙醚 (-20℃) 补加至 45mL。沉淀形成。通过离心 (5, 000rpm) 得到固体产物。向固体添加二乙醚 (30mL), 并将悬浮液再离心一次。将终产物于室温下过夜减压干燥以获得期望的产物 (60mg, 80%)。产物通过 NMR 光谱确认。

[0192] 聚合物 3 的合成: 将可降解的脂类连接物 (A, 47. 8mg, 0. 10mmol) 的 CH₂Cl₂/MeOH(1 : 2, 1. 8mL) 溶液添加至 PEI₆₀₀(15. 0mg, 0. 025mmol) 的 CH₂Cl₂/MeOH(1 : 2, 1mL) 溶液中, 同时进行搅拌。将其在室温下剧烈搅拌 1 小时。然后添加丙烯酰视黄醇 (B, 3. 4mg, 0. 01mmol) 的 CH₂Cl₂/MeOH(1 : 2, 1mL) 溶液和丙烯酰聚乙二醇 (C, 18. 2mg, 0. 04mmol) 的 CH₂Cl₂/MeOH(1 : 2, 1mL) 溶液。在室温下剧烈搅拌另外的 2 小时后, 将其在冰水中冷却, 用 2M HCl/ 醚 (0. 5mL) 淬灭, 同时进行搅拌, 用冷二乙醚 (-20℃) 补加至 45mL。沉淀形成。通过离心 (5, 000rpm) 得到固体产物。向固体添加二乙醚 (30mL), 并将悬浮液再离心一次。将终产物于室温下过夜减压干燥以获得期望的产物 (60mg, 80%)。产物通过 NMR 光谱确认。

[0193] 聚合物 4 的合成: 将可降解的脂类连接物 (A, 47. 8mg, 0. 125mmol) 的 CH₂Cl₂/MeOH(1 : 2, 1. 8mL) 溶液添加至 PEI₆₀₀(15. 0mg, 0. 025mmol) 的 CH₂Cl₂/MeOH(1 : 2, 1mL) 溶液中, 同时进行搅拌。将其在室温下剧烈搅拌 1 小时。然后添加丙烯酰视黄醇 (B, 3. 4mg, 0. 01mmol) 的 CH₂Cl₂/MeOH(1 : 2, 1mL) 溶液和丙烯酰聚乙二醇 (C, 18. 2mg, 0. 04mmol) 的 CH₂Cl₂/MeOH(1 : 2, 1mL) 溶液。在室温下剧烈搅拌另外的 2 小时后, 将其在冰水中冷却, 用 2M HCl/ 醚 (0. 5mL) 淬灭, 同时进行搅拌, 用冷二乙醚 (-20℃) 补加至 45mL。沉淀形成。通过离心 (5, 000rpm) 得到固体产物。向固体添加二乙醚 (30mL), 并将悬浮液再离心一次。将终产物于室温下过夜减压干燥以获得期望的产物 (60mg, 80%)。产物通过 NMR 光谱确认。

[0194] 聚合物 5 的合成: 将 2. 37mg 通式 (VIIb) 的可降解单体反应物溶于二氯甲烷与甲醇 (1 : 2, 30mL) 的混合物中来制备通式 (VIIb) 的可降解单体反应物的溶液。向可降解单体反应物溶液添加支化 PEI (MW = 1200, 360mg) 在二氯甲烷与甲醇 (1 : 2, 3mL) 的混合物中的溶液。将混合物溶剂 (5mL) 作为淋洗液添加至反应混合物中。添加完成后, 将反应混合物在室温下搅拌 2 小时。然后添加 PEG (MW = 454, 272. 4mg) 在二氯甲烷与甲醇 (1 : 2, 2mL) 中的溶液。将混合溶剂 (3mL) 作为淋洗液添加至反应混合物中。然后将反应混合物搅拌另外的 1 小时。然后将反应在冰水中冷却 10 分钟, 随后在搅拌下用 2M 盐酸的醚 (270mL) 溶液淬灭。将悬浮液置于八个 50mL 锥形离心管中, 并用另外的冷的醚 (-20℃) 稀释。将管中的悬浮液离心。将液体倒出, 并且将白色固体产物用更多的醚洗涤并离心两次。将产物在真空下干燥以获得 2. 04g (62%)。产物, 即聚合物 5 (可降解脂类单元: mPEI : PEG (12 : 1 : 2)), 通过 ¹H-NMR 进行表征。

[0195] 聚合物 1 至 5 的概述

[0196]

聚合物	PEI	脂类连接物	视黄醇	PEG
聚合物 1	0.025mmol	0.050mmol	0.01mmol	0.04mmol
聚合物 2	0.025mmol	0.075mmol	0.01mmol	0.04mmol
聚合物 3	0.025mmol	0.100mmol	0.01mmol	0.04mmol
聚合物 4	0.025mmol	0.125mmol	0.01mmol	0.04mmol
聚合物 5	0.300mmol	4.950mmol	NA	0.60mmol

[0197] 实施例 7 siRNA 转染：

[0198] 在转染前一天，将表达绿色荧光蛋白 (GFP) 的细胞以每孔 1×10^4 个细胞的密度接种至 96 孔板。将 siRNA (1.0 μ g) 的溶液溶于蒸馏水中，并用 OptiMEM (Invitrogen) 进一步稀释至 30 μ l。这些实验中所用的 siRNA 是抗 -GFP (CGAGAAGCGCGAUCACAUGUU (SEQ ID NO : 3))。通过将递送试剂溶于适量的 dH₂O 中，将测试聚合物和对照聚合物制备成浓度为 5mg/mL。对于聚合物 5，将聚合物与视黄醇混合，并且如上文所述制备成浓度为 5mg/mL。根据化合物比 siRNA 的比率，将递送试剂溶液用 OptiMEM 进一步稀释至终体积为 30 μ L。将稀释的 siRNA 溶液和递送试剂溶液混合，并在室温下孵育 15 分钟。向预接种的细胞的每孔中添加 siRNA 与递送试剂的混合物 (15 μ L)，混合，并在在具有 5% CO₂ 的 37°C 培养箱中进行孵育。48 小时后，评价转染效率和细胞存活力。

[0199] 实施例 8 转染效率评价：

[0200] 转染通过在荧光显微镜下测量 GFP 的表达来评价。GFP 的吸收在 485nm 至 528nm 处用紫外可见酶标仪 (UV-vis microplate reader) 检测。

[0201] 实施例 9 细胞摄取：

[0202] 原代肝星状细胞 (HSC) NRK-49F 细胞利用已报道的方法 (Houglum et al. "Two Different cis-acting Regulatory Regions Direct Cell-specific Transcription of the Collagen $\alpha 1(1)$ Gene in Hepatic Stellate Cells and in Skin and Tendon Fibroblasts (两种不同的顺式作用调节区指导胶原蛋白 $\alpha 1$ 的细胞特异性转录 (1) 肝星状细胞和皮肤及腱成纤维细胞中的基因)。" J. Clin. Invest. 1995, 96, 2269-2276)，从肝组织中分离。将分离的肝星状细胞在 6 孔板中用合适的培养基培养过夜，并且接种密度为 3×10^5 / 2mL / 孔。对于聚合物 1 至 4，将测试聚合物的溶液溶于 Milli Q-H₂O (5mg/mL)。对于聚合物 5，将测试聚合物的溶液溶于 Milli Q-H₂O (5mg/mL)，并与溶于二甲亚砜 (DMSO, 28.65mg/mL, 约 100mM) 中的全反式视黄醇的溶液以 25 : 2.5 的视黄醇 : 测试聚合物的重量 / 重量比率混合。对于所有的聚合物，将混合物在 5% 的葡萄糖中进一步稀释至测试聚合物的终浓度为 0.17mg/mL。将混合物涡旋 20 秒并在室温下稳定 15 分钟。向混合物中添加在无 RNase 水中制备的 Cy3 标记的 siRNA 的溶液 (0.25mg/mL, 约 20mM) (测试聚合物 1 :

Cy3-siRNA 的重量比为 2.5 : 1)。将混合物进一步涡旋并在室温下孵育另外的 15 分钟。将混合物 (100 μ L) 添加至原代 HSC 培养中,并在 37 $^{\circ}$ C 下继续孵育另外的 4 小时。然后在荧光显微镜下捕捉图像 (Ex/Em :532/554nm)。对于两种对照, (a) 将视黄醇的 DMSO 溶液 (28.65mg/mL),以 25 : 1 的视黄醇 :Cy3-siRNA 重量比添加至在无 RNase 水中制备的 Cy3 标记的 siRNA 的溶液 (0.25mg/mL,约 20mM) 中,以及 (b) 将测试聚合物溶于 Milli Q-H₂O 中的溶液 (5mg/mL),以 2.5 : 1 的测试聚合物 :Cy3-siRNA 重量比添加至在无 RNase 水中制备的 Cy3 标记的 siRNA 的溶液 (0.25mg/mL,约 20mM) 中。将两种混合物用 5% 的葡萄糖进一步稀释,并在室温下孵育 15 分钟。将 100mL 每种混合物分别添加至原代 HSC 培养中,并在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 4 小时。在荧光显微镜下摄影捕捉图像 (Ex/Em :532/554nm)。结果显示在图 4 中。如图 4 中的照片所示,与用水溶性可降解交联阳离子聚合物 +siRNA 处理或用单独的 siRNA 处理的细胞相比,用阳离子聚合物 +siRNA+ 视黄醇处理的细胞吸收了更多 Cy3 发色团。

[0203] 实施例 10 细胞存活力测定:

[0204] 通过将 250mg 固体 3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四氮唑(鎓)溴化物 (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (MTT) 溶于 50mL 的 Dubecco PBS 中来制备 MTT 的溶液,并在 4 $^{\circ}$ C 下保存。转染 48 小时后,将 MTT 溶液 (10 μ L,浓度为 5mg/mL) 添加至细胞的每个孔中,并将细胞 37 $^{\circ}$ C 下孵育 2 至 4 小时,直到能够观察到紫色晶体的生长。然后,添加增溶的 (solubilized) 溶液 (100 μ L) 并在 37 $^{\circ}$ C 下孵育过夜。在波长为 570nm 处检测吸光度,并以 690nm 处的吸光度作为参考。细胞存活力测定的结果显示在图 5 中。如图 5 所示,阳离子聚合物 +siRNA+ 视黄醇与阳离子聚合物 +siRNA 及单独的 siRNA 的细胞毒性相当。

[0205] 实施例 11

[0206] 正常大鼠肾成纤维细胞 (NRK-49f) 购自 ATCC,并将其在含有 10% FBS、1% 青霉素和链霉素的 DMEM 培养基中,以 3×10^5 /2mL/孔的接种密度,于 6 孔板中培养过夜。靶向 HSP-47 (热休克蛋白) 的 siRNA 购自 Ambion, Inc。对于聚合物 1 至 4,将测试聚合物的溶液溶于 Milli Q-H₂O (5mg/mL)。对于聚合物 5,将测试聚合物的溶液溶于 Milli Q-H₂O (5mg/mL),并与溶于二甲亚砜 (DMSO, 28.65mg/mL,约 100mM) 中的全反式视黄醇的溶液以各种重量比混合。对于所有的聚合物,将混合物在 5% 的葡萄糖中进一步稀释至测试聚合物的终浓度为 0.17mg/mL。将混合物在 5% 的葡萄糖中进一步稀释至测试聚合物的终浓度为 0.17mg/mL。将混合物涡旋 20 秒并在室温下稳定 15 分钟。向混合物中,以各种重量比添加在无 RNase 水中制备的 siHSP-47 的溶液 (0.25mg/mL,约 20mM)。将混合物进一步涡旋并在室温下孵育另外的 15 分钟。将混合物 (200 μ L) 添加至原代 HSC 培养中,并在 37 $^{\circ}$ C 下继续孵育另外的 48 小时。转染 48 小时后,收获细胞,用 RNeasy Mini 试剂盒 (RNeasy Mini Kit) (Qiagen, Cat. No. #74104) 提取总 RNA,并用逆转录试剂盒 Superscript III RT-PCR 第一链合成系统 (Superscript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR) (Invitrogen, Cat. No. #18080-051) 来合成 cDNA。HSP-47 的定量 PCR 用 SYBR 亮绿 QPCR Mix (Brilliant SYBR Green QPCR Mix) (Stratagene, Cat. No. #600548) 在 Stratagene Mx3005P 系统上进行,所用的引物是 :5' -CAATGTGACCTGGAACTGG-3' (正向) (SEQ ID NO : 4) 和 5' -ATGAAGCCACGGTTGTCTAC-3' (SEQ ID NO :5)。结果显示在图 6 至 8 中。如图 6 至 8 中所示,与用阳离子聚合物 +siRNA 处理或单独的 siRNA 处理的成纤维细胞相比,用包含阳

离子聚合物 +siRNA+ 视黄醇的组合物处理的细胞中产生的 mRNA 的量减少了。

[0207] 实施例 12 LD50

[0208] 将聚合物 4 溶于 Milli Q- 水中, 浓度为 $50 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。将 siHSP47 用无 RNase 水稀释至 $2000 \mu\text{M}$ (相当于约 $25 \mu\text{g}/\mu\text{l}$)。向 30 克的 Nu/nu 雄性小鼠, 通过尾静脉单次团注射, 注射聚合物 4/siRNA 复合物 (聚合物 4/siRNA 的重量比 :5/1, $200 \mu\text{L}$), 并且注射了各种剂量的 siRNA : (1) $1\text{mg}/\text{kg}$ 、(2) $2.5\text{mg}/\text{kg}$ 、(3) $5\text{mg}/\text{kg}$ 、(4) $7.5\text{mg}/\text{kg}$ 、(5) $10\text{mg}/\text{kg}$ 以及 (6) $15\text{mg}/\text{kg}$ 。结果显示在图 9 中。发现 LD50 为 $10\text{mg}/\text{kg}$, 这明显地高于约 $2\text{mg}/\text{kg}$ 至 $3\text{mg}/\text{kg}$ 的示例性治疗水平。

[0209] 实施例 13 溶血测定

[0210] 将裸小鼠的血液样品收集在肝素管 (heparinize-tube) 中, 并以 $700 \times \text{g}$ 时离心 10 分钟。弃去上清液, 将红细胞团 (pellet) 用冷 PBS (pH 7.4) 洗涤三次, 并重悬浮于相同的缓冲液中。在 PBS 缓冲液中制备聚合物与 siEGFP 的不同浓度的溶液, 并以 $100 \mu\text{L}$ /孔添加至圆底板中。向每孔添加血液样品 ($10 \mu\text{L}$), 并将板在 37°C 下孵育 60 分钟。离心后 ($700\text{g}, 10\text{min}$), 通过分光光度分析 (photospectrometric analysis) 确定血红蛋白的释放。将来自每孔的上清液 ($100 \mu\text{L}$) 转移至平底板中。用酶标仪测量 540nm 处的荧光强度。结果显示在图 10 中。如图 10 所示, 如通过 540nm 处的高吸光度所表明的, 利用 0.2% TritonX-100 ($100 \mu\text{L}$ /孔, 含有 $10 \mu\text{L}$ 血液样品) 实现了完全的溶血 (即, 红细胞死亡), 从而获得了 100% 的对照值。本文所述的聚合物与 siRNA 的复合物显示了明显更低的吸光度, 这表明实现了不到 10% 的溶血。这种低溶血度提示, 本文所述的聚合物与 siRNA 的复合物在动物内是相对安全的。

[0211] 本领域技术人员应当理解, 可以做出许多和各种改变而不偏离本发明的精神。因此, 应当清楚地理解, 本发明的形式仅是示例性的, 而不意图限制本发明的范围。

[0001]

序列表

<110> 日东电工株式会社

俞磊
刘健
赵刚
马念春
桑·范

<120> 药物载体

<130> NDTCO.099VPC

<150> 61/084, 935

<151> 2008-07-30

<150> 61/016, 431

<151> 2007-12-21

<150> 60/972, 732

<151> 2007-09-14

<160> 5

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 源自丝氨酸蛋白酶抑制剂的siRNA序列

<400> 1

gcaacuaaag accuggaugt t

21

<210> 2

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 源自丝氨酸蛋白酶抑制剂的siRNA序列

<400> 2

[0002]

ctcguugauu ucuggaccua c	21
<210> 3	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 源自维多利亚水母(<i>Aequorea victoria</i>)的siRNA合成序列	
<400> 3	
cgagaagcgc gaucacaugu u	21
<210> 4	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> HSP-47 引物	
<400> 4	
caatgtgacc tggaaactgg	20
<210> 5	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> HSP-47 引物	
<400> 5	
atgaagccac ggttgtctac	20

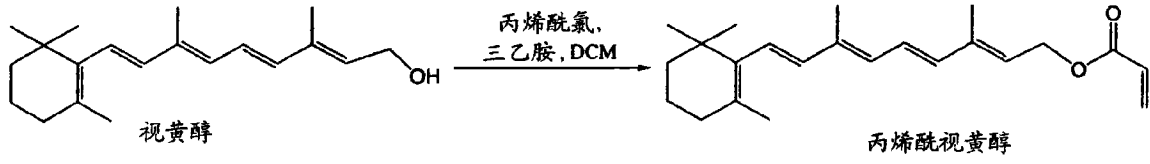


图 1

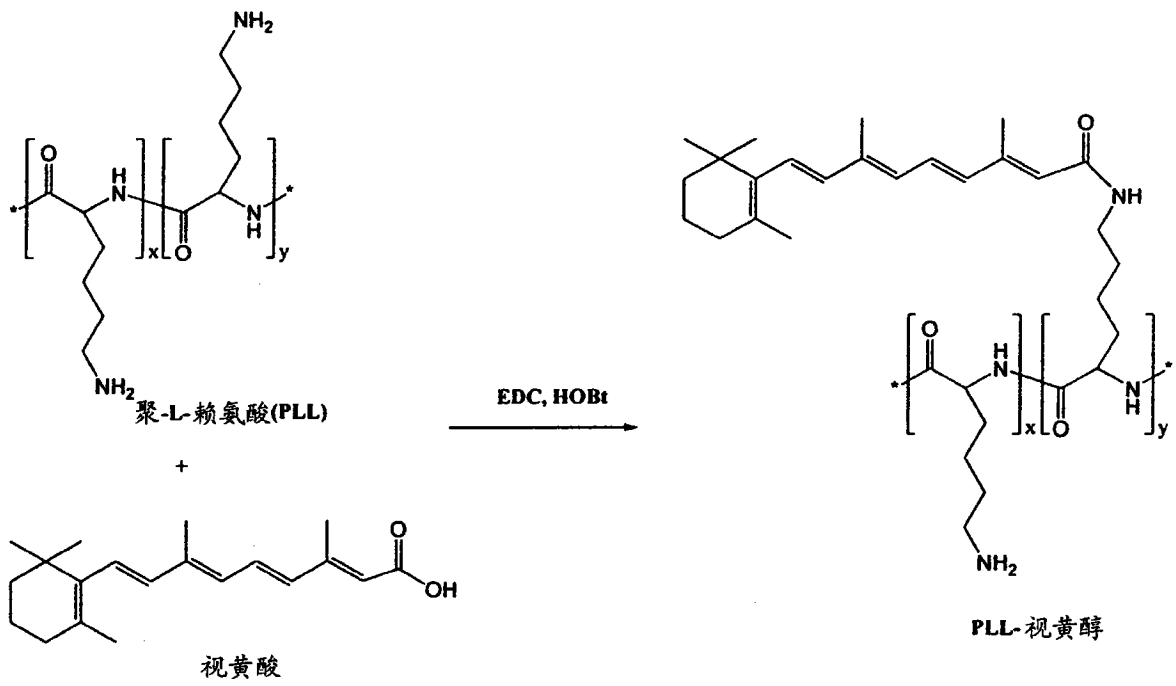


图 2

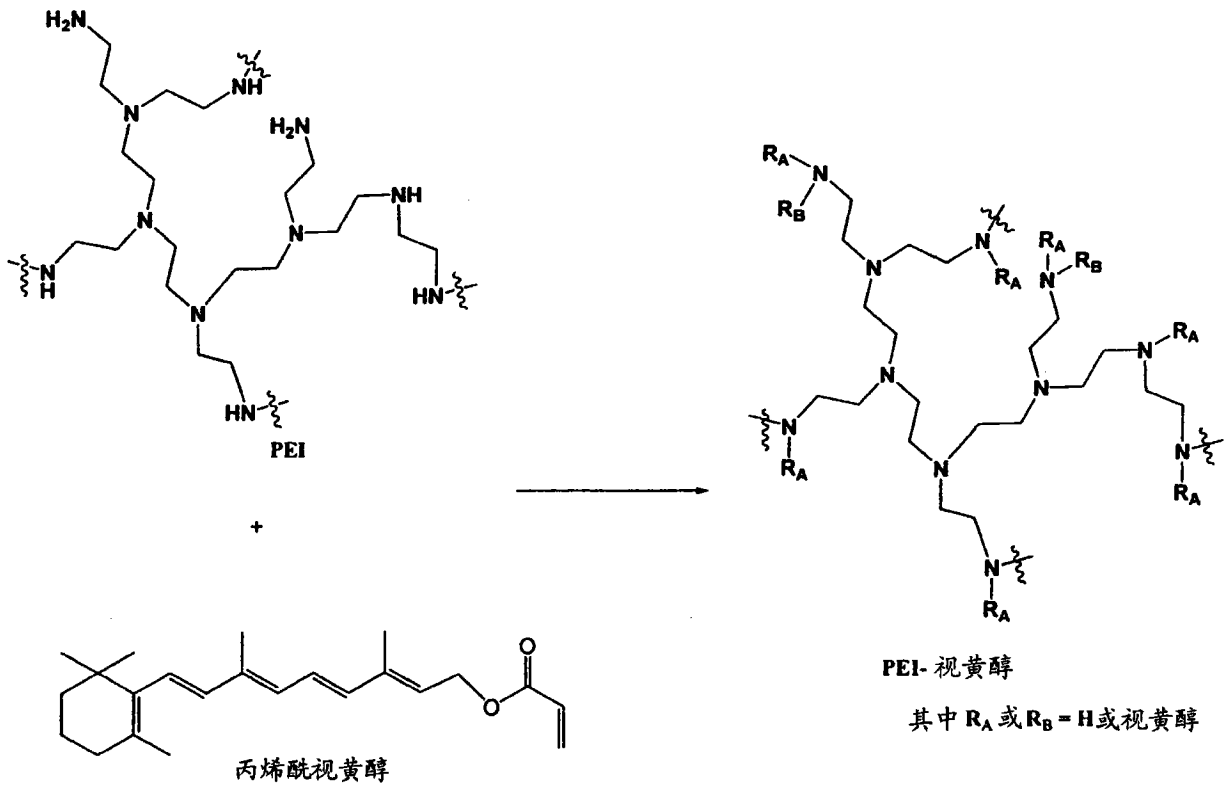
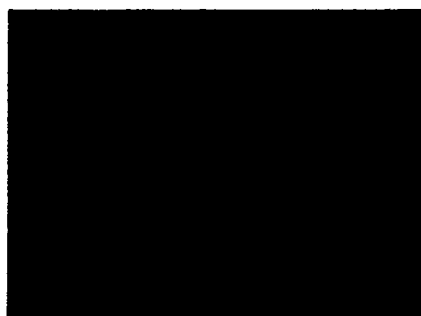
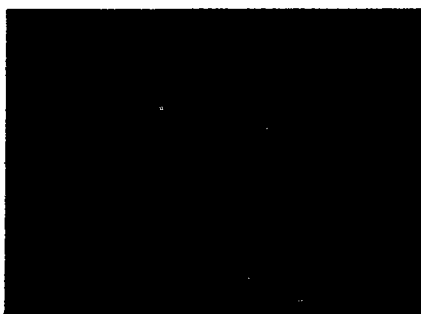


图 3



A



B



C

- A - 视黄醇 + Cy3-siRNA (25:1, w/w)
B - 聚合物5 + Cy3-siRNA (2.5:1, w/w)
C - 视黄醇+聚合物5 + Cy3-siRNA (25:2:1, w/w)

图4

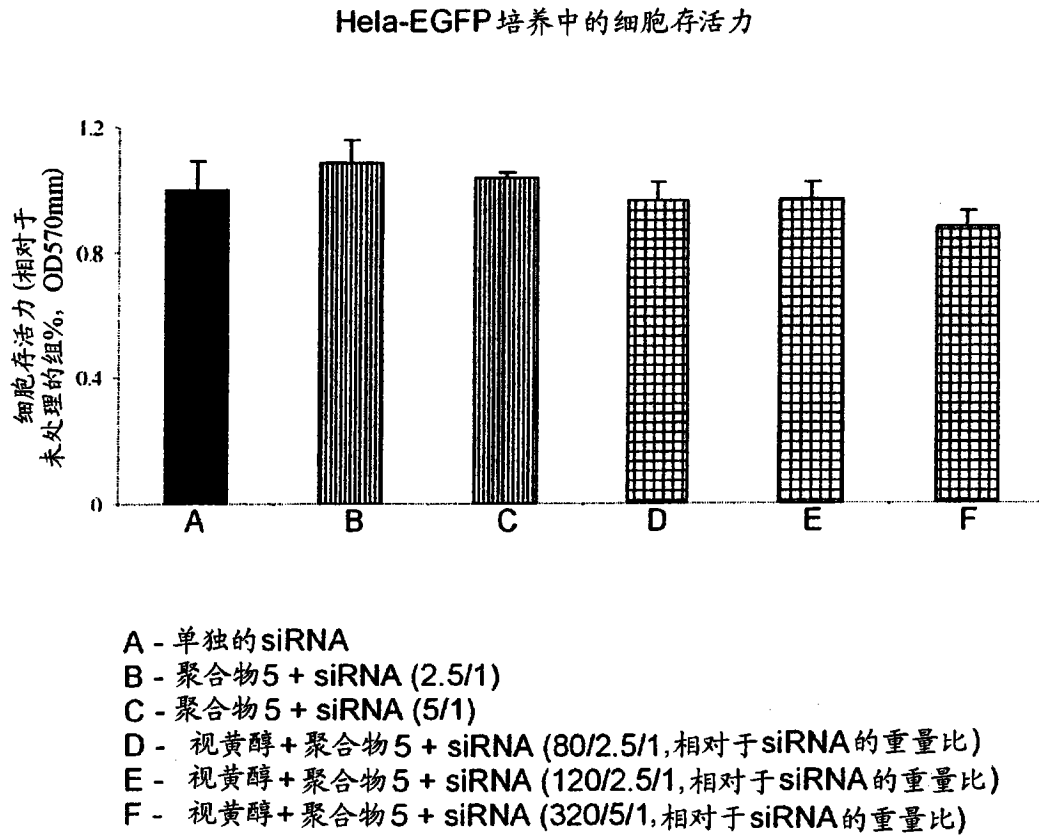
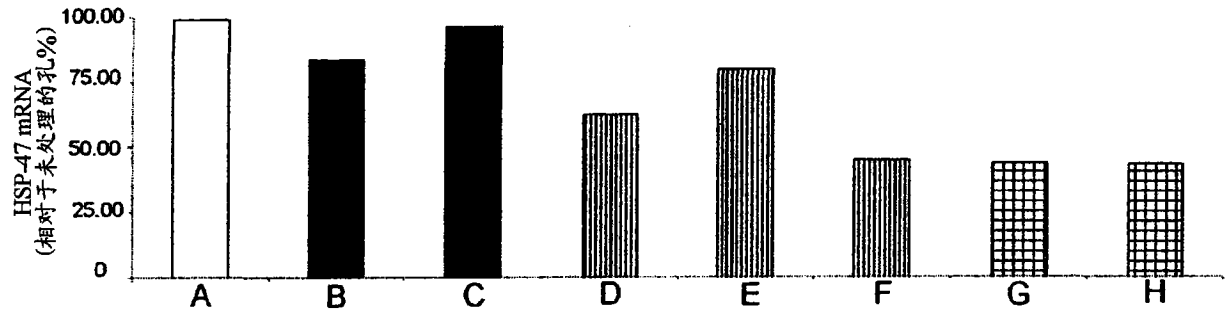


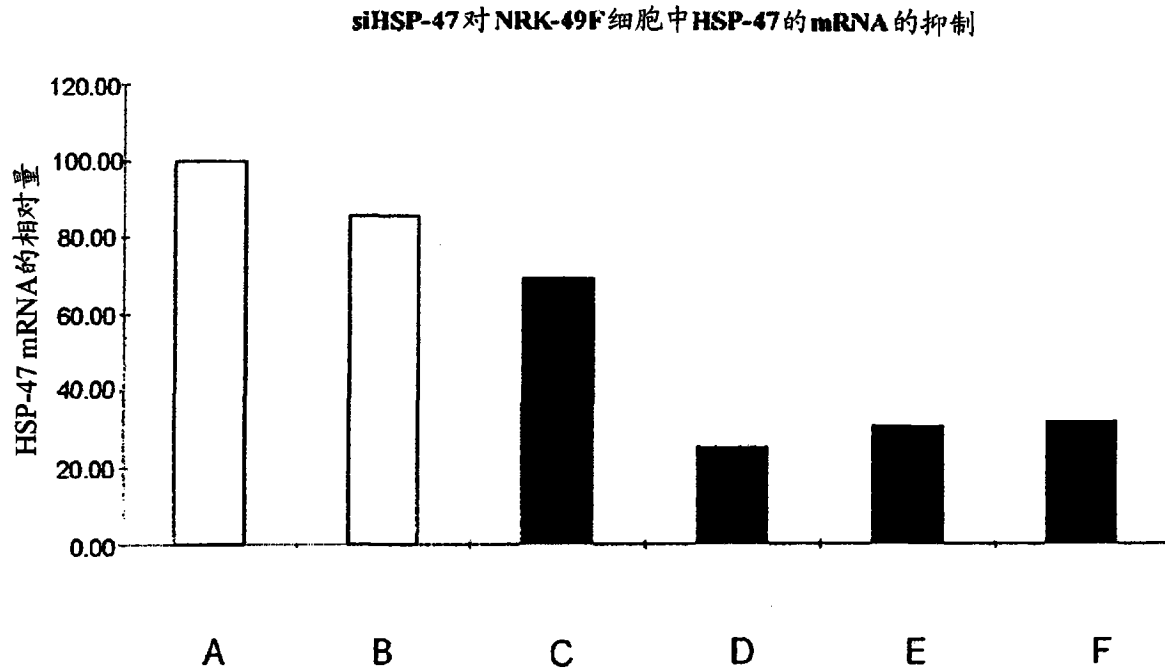
图 5

NRK-49F 细胞培养中 HSP-47 mRNA 的表达



- A - 空白
- B - siRNA
- C - 聚合物5
- D - 视黄醇 + 聚合物5 + siRNA (62/2/1, 1 μ g siRNA)
- E - 视黄醇 + 聚合物5 + siRNA (62/2/1, 2.5 μ g siRNA)
- F - 视黄醇 + 聚合物5 + siRNA (62/2/1, 5 μ g siRNA)
- G - 视黄醇 + 聚合物5 + siRNA (62/4/1, 1 μ g siRNA)
- H - 视黄醇 + 聚合物5 + siRNA (62/4/1, 2.5 μ g siRNA)

图 6



A - 聚合物 2

B - 聚合物 2/siegfp(5/1)

C - 聚合物 2/siHSP-47(5/1)

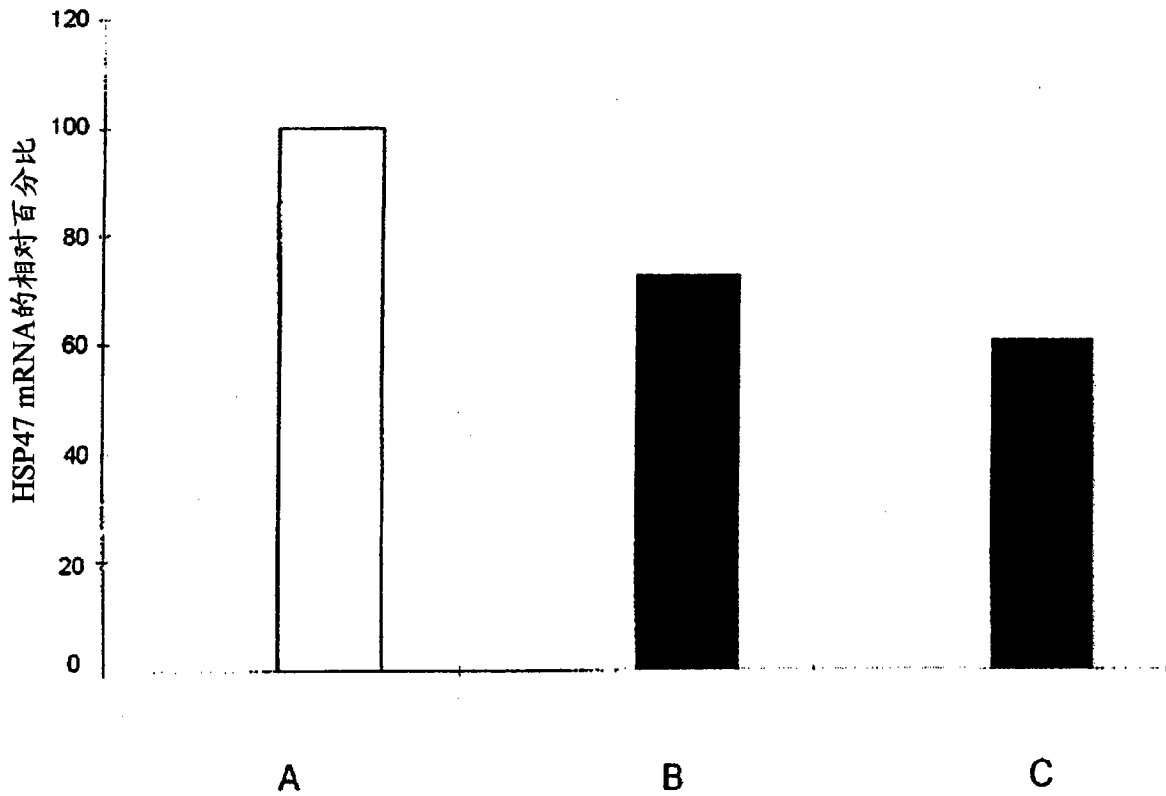
D - 聚合物 2/siHSP-47(10/1)

E - 聚合物 4/siHSP-47(5/1)

F - 聚合物 4/siHSP-47(10/1)

图 7

裸小鼠中肝HSP47 mRNA的HSP47 siRNA诱导的抑制



A - 聚合物 4

B - 聚合物 4/siHSP47 (5/1,1mg/kg)

C - 聚合物 4/siHSP47 (10/1,1mg/kg)

图 8

LD50

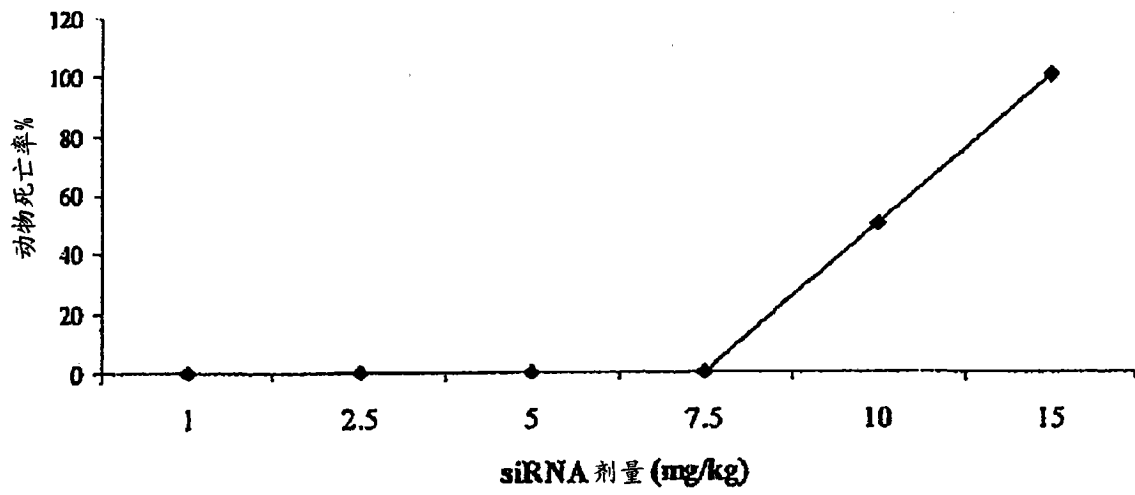
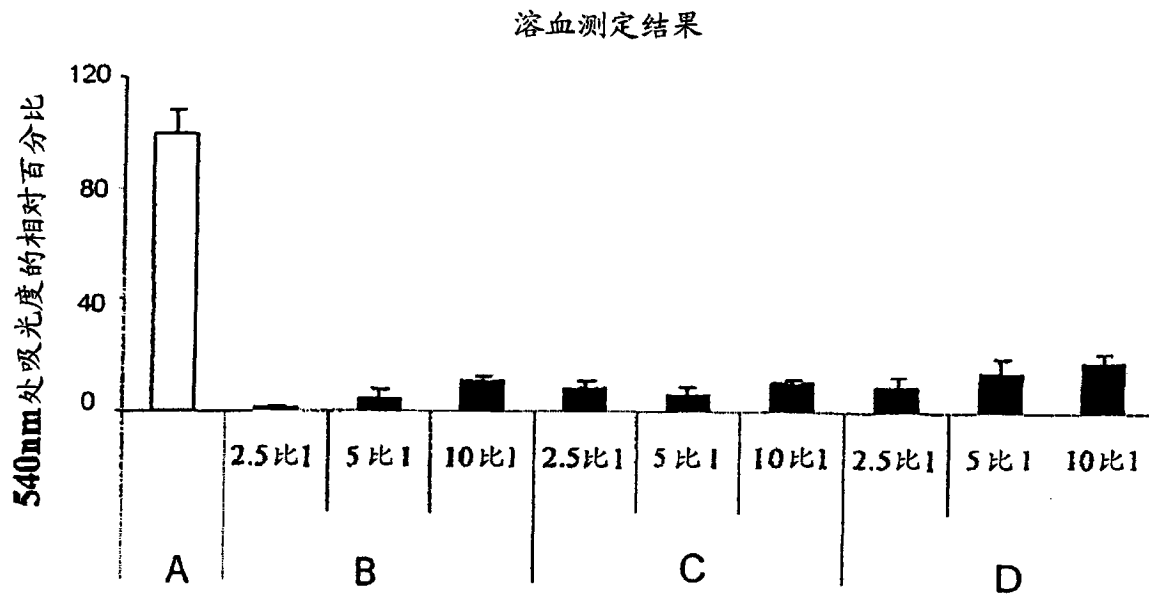


图 9



A - 0.2%TritonX-100

B - 聚合物 2/siRNA

C - 聚合物 3/siRNA

D - 聚合物 4/siRNA

图 10