



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102215820 A

(43) 申请公布日 2011. 10. 12

(21) 申请号 200980145915. 9

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2009. 11. 17

A61K 9/127(2006. 01)

(30) 优先权数据

61/115, 378 2008. 11. 17 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 05. 17

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2009/064730 2009. 11. 17

(87) PCT申请的公布数据

W02010/057160 EN 2010. 05. 20

(71) 申请人 安龙制药公司

地址 美国新泽西州

(72) 发明人 赵洪 彦魏丽 史连军

马克西姆·瑞真 乌德春

(74) 专利代理机构 北京市兰台律师事务所

11354

代理人 张峰

权利要求书 15 页 说明书 60 页

序列表 5 页 附图 2 页

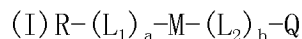
(54) 发明名称

用于核酸输送系统的可释放融合脂质

(57) 摘要

本发明涉及可释放融合脂质和包含上述物质的用于输送低聚核苷酸的纳米微粒组合物, 以及使用上述物质调整基因表达的方法。特别地, 本发明涉及包含亚胺连接基和两性离子基团的可释放融合脂质。

1. 一种化合物, 如式 (I) :



其中

R 是水溶的电中性或者含两性离子的基团 ;

$L_{1-2}$  是单独选择的双功能连接基 ;

M 是含亚胺的基团 ;

Q 是取代的或者非取代的, 饱和或者不饱和的含 C4-30 的基团 ;

(a) 是 0 或者正整数 ; 以及

(b) 是 0 或者正整数。

2. 根据权利要求 1 的化合物, 其中 M 为  $-N=CR_1-$  或  $-CR_1=N-$ , 其中  $R_1$  为氢、 $C_{1-6}$  烷基、 $C_{3-8}$  支链烷基、 $C_{3-8}$  环烷基、 $C_{1-6}$  取代的烷基、 $C_{3-8}$  取代的环烷基、芳基和取代的芳基。

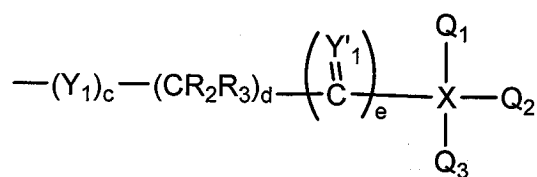
3. 根据权利要求 1 的化合物, 其中所述含两性离子的基团包括胺和酸, 其中酸性质子距离所述胺 3 到 8 个原子。

4. 根据权利要求 3 的化合物, 其中所述酸为羧酸、磺酸或磷酸。

5. 根据权利要求 3 的化合物, 其中所述含两性离子的基团为氨基酸的两性离子形式。

6. 根据权利要求 1 的化合物, 其中 Q 具有式 (Ia)

(Ia)



其中

$Y_1$  和  $Y'_1$  分别为 O、S 或  $NR_4$  ;

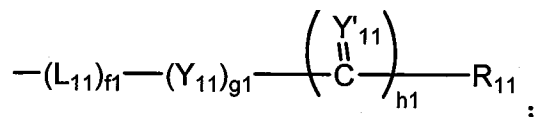
(c) 为 0 或 1 ;

(d) 为 0 或正整数 ;

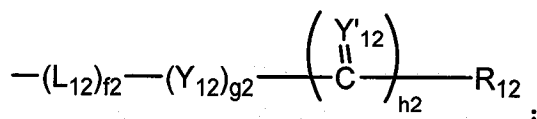
(e) 为 0 或 1 ;

X 为 C、N 或 P ;

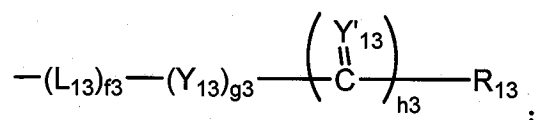
$Q_1$  为 H、 $C_{1-3}$  烷基、 $NR_5$ 、OH 或



$Q_2$  为 H、 $C_{1-3}$  烷基、 $NR_6$ 、OH 或



$Q_3$  为孤电子对、 $(=O)$ 、H、 $C_{1-3}$  烷基、 $NR_7$ 、OH 或



假定

(i) 当 X 为 C, Q<sub>3</sub> 不为孤电子对或 (= O) ;

(ii) 当 X 为 N, Q<sub>3</sub> 为孤电子对 ;以及

(iii) 当 X 为 P, Q<sub>3</sub> 为 (= O) 且 (e) 为 0,

其中

L<sub>11</sub>、L<sub>12</sub> 和 L<sub>13</sub> 为单独选择的双功能间隔基 ;

Y<sub>11</sub>、Y'<sub>11</sub>、Y<sub>12</sub>、Y'<sub>12</sub>、Y<sub>13</sub> 和 Y'<sub>13</sub> 分别为 O、S 或 NR ;

R<sub>11</sub>、R<sub>12</sub> 和 R<sub>13</sub> 分别为取代的或非取代的,饱和的或不饱和的 C<sub>4-30</sub> ;

(f1)、(f2) 和 (f3) 分别为 0 或 1 ;

(g1)、(g2)、(g3) 分别为 0 或 1 ;以及

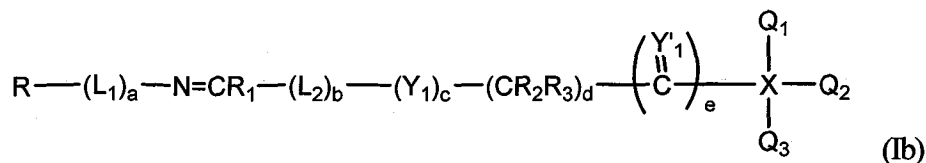
(h1)、(h2)、(h3) 分别为 0 或 1 ;

R<sub>2-3</sub> 独立地选自氢、羟基、胺、取代的胺、C<sub>1-6</sub> 烷基、C<sub>2-6</sub> 烯基、C<sub>2-6</sub> 炔基、C<sub>3-19</sub> 支链烷基、C<sub>3-8</sub> 环烷基、C<sub>1-6</sub> 取代的烷基、C<sub>2-6</sub> 取代的烯基、C<sub>2-6</sub> 取代的炔基、C<sub>3-8</sub> 取代的环烷基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、C<sub>1-6</sub> 杂烷基和取代的 C<sub>1-6</sub> 杂烷基 ;以及

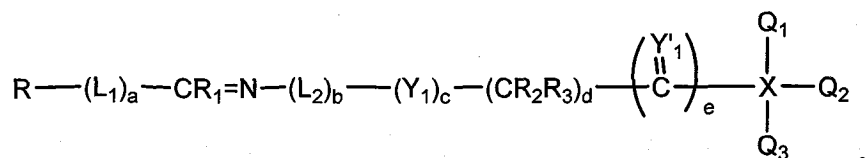
R<sub>4-8</sub> 独立地选自氢、C<sub>1-6</sub> 烷基、C<sub>2-6</sub> 烯基、C<sub>2-6</sub> 炔基、C<sub>3-19</sub> 支链烷基、C<sub>3-8</sub> 环烷基、C<sub>1-6</sub> 取代的烷基、C<sub>2-6</sub> 取代的烯基、C<sub>2-6</sub> 取代的炔基、C<sub>3-8</sub> 取代的环烷基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、C<sub>1-6</sub> 杂烷基和取代的 C<sub>1-6</sub> 杂烷基,

假定 Q 包括 R<sub>11</sub>、R<sub>12</sub> 和 R<sub>13</sub> 中的至少一个或两个。

7. 根据权利要求 6 的化合物,具有式 (Ib) 或 (I' b) :



或



8. 根据权利要求 6 的化合物,其中 Q<sub>1-3</sub> 分别包括选自下列的基 :C<sub>12-22</sub> 烷基、C<sub>12-22</sub> 烯基、C<sub>12-22</sub> 烷氧基、月桂酰 (C<sub>12</sub>)、肉豆蔻酰 (C<sub>14</sub>)、棕榈酰 (C<sub>16</sub>)、硬脂酰 (C<sub>18</sub>)、油酰 (C<sub>18</sub>) 和芥酰 (C<sub>22</sub>) ;饱和的或不饱和的 C<sub>12</sub> 烷氧基、C<sub>14</sub> 烷氧基、C<sub>16</sub> 烷氧基、C<sub>18</sub> 烷氧基、C<sub>20</sub> 烷氧基和 C<sub>22</sub> 烷氧基 ;以及,饱和的或不饱和的 C<sub>12</sub> 烷基、C<sub>14</sub> 烷基、C<sub>16</sub> 烷基、C<sub>18</sub> 烷基、C<sub>20</sub> 烷基和 C<sub>22</sub> 烷基。

9. 根据权利要求 6 的化合物,其中 L<sub>11</sub>、L<sub>12</sub> 和 L<sub>13</sub> 分别选自 :

-(CR<sub>31</sub>R<sub>32</sub>)<sub>q1</sub>- ;以及

-Y<sub>26</sub>(CR<sub>31</sub>R<sub>32</sub>)<sub>q1</sub>- ,

其中 :

Y<sub>26</sub> 为 O、NR<sub>33</sub> 或 S ;

R<sub>31-32</sub> 独立地选自氢、羟基、C<sub>1-6</sub> 烷基、C<sub>3-12</sub> 支链烷基、C<sub>3-8</sub> 环烷基、C<sub>1-6</sub> 取代的烷基、C<sub>3-8</sub> 取代的环烷基、C<sub>1-6</sub> 杂烷基、取代的 C<sub>1-6</sub> 杂烷基、C<sub>1-6</sub> 烷氧基、苯氧基和 C<sub>1-6</sub> 杂烷氧基 ;

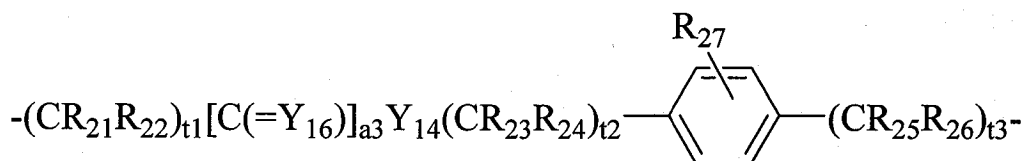
$R_{33}$  独立地选自氢、 $C_{1-6}$  烷基、 $C_{3-12}$  支链烷基、 $C_{3-8}$  环烷基、 $C_{1-6}$  取代的烷基、 $C_{3-8}$  取代的环烷基、 $C_{1-6}$  杂烷基、取代的  $C_{1-6}$  杂烷基、 $C_{1-6}$  烷氧基、苯氧基和  $C_{1-6}$  杂烷氧基；以及

(q1) 为 0 或正整数。

10. 根据权利要求 8 的化合物，其中  $L_{11}$ 、 $L_{12}$  和  $L_{13}$  分别选自： $-\text{CH}_2-$ 、 $-(\text{CH}_2)_2-$ 、 $-(\text{CH}_2)_3-$ 、 $-(\text{CH}_2)_4-$ 、 $-(\text{CH}_2)_5-$ 、 $-(\text{CH}_2)_6-$ 、 $-\text{O}(\text{CH}_2)_2-$ 、 $-\text{O}(\text{CH}_2)_3-$ 、 $-\text{O}(\text{CH}_2)_4-$ 、 $-\text{O}(\text{CH}_2)_5-$ 、 $-\text{O}(\text{CH}_2)_6-$ ，和  $\text{CH}(\text{OH})-$ 。

11. 根据权利要求 1 的化合物，其中  $L_1$  选自：

$-(\text{CR}_{21}\text{R}_{22})_{t1}-[\text{C}(=\text{Y}_{16})_{a3}-$   
 $-(\text{CR}_{21}\text{R}_{22})_{t1}\text{Y}_{17}-(\text{CR}_{23}\text{R}_{24})_{t2}-(\text{Y}_{18})_{a2}-[\text{C}(=\text{Y}_{16})_{a3}-$   
 $-(\text{CR}_{21}\text{R}_{22}\text{CR}_{23}\text{R}_{24}\text{Y}_{17})_{t1}-[\text{C}(=\text{Y}_{16})_{a3}-$   
 $-(\text{CR}_{21}\text{R}_{22}\text{CR}_{23}\text{R}_{24}\text{Y}_{17})_{t1}(\text{CR}_{25}\text{R}_{26})_{t4}-(\text{Y}_{18})_{a2}-[\text{C}(=\text{Y}_{16})_{a3}-$   
 $-(\text{CR}_{21}\text{R}_{22}\text{CR}_{23}\text{R}_{24})_{t2}\text{Y}_{17}]_{t3}(\text{CR}_{25}\text{R}_{26})_{t4}-(\text{Y}_{18})_{a2}-[\text{C}(=\text{Y}_{16})_{a3}-$   
 $-(\text{CR}_{21}\text{R}_{22})_{t1}-[(\text{CR}_{23}\text{R}_{24})_{t2}\text{Y}_{17}]_{t3}(\text{CR}_{25}\text{R}_{26})_{t4}-(\text{Y}_{18})_{a2}-[\text{C}(=\text{Y}_{16})_{a3}-$   
 $-(\text{CR}_{21}\text{R}_{22})_{t1}(\text{Y}_{17})_{a2}[\text{C}(=\text{Y}_{16})_{a3}(\text{CR}_{23}\text{R}_{24})_{t2}-$   
 $-(\text{CR}_{21}\text{R}_{22})_{t1}(\text{Y}_{17})_{a2}[\text{C}(=\text{Y}_{16})_{a3}\text{Y}_{14}(\text{CR}_{23}\text{R}_{24})_{t2}-$   
 $-(\text{CR}_{21}\text{R}_{22})_{t1}(\text{Y}_{17})_{a2}[\text{C}(=\text{Y}_{16})_{a3}(\text{CR}_{23}\text{R}_{24})_{t2}-\text{Y}_{15}-(\text{CR}_{23}\text{R}_{24})_{t3}-$   
 $-(\text{CR}_{21}\text{R}_{22})_{t1}(\text{Y}_{17})_{a2}[\text{C}(=\text{Y}_{16})_{a3}\text{Y}_{14}(\text{CR}_{23}\text{R}_{24})_{t2}-\text{Y}_{15}-(\text{CR}_{23}\text{R}_{24})_{t3}-$   
 $-(\text{CR}_{21}\text{R}_{22})_{t1}(\text{Y}_{17})_{a2}[\text{C}(=\text{Y}_{16})_{a3}(\text{CR}_{23}\text{R}_{24}\text{CR}_{25}\text{R}_{26}\text{Y}_{19})_{t2}(\text{CR}_{27}\text{CR}_{28})_{t3}-$   
 $-(\text{CR}_{21}\text{R}_{22})_{t1}(\text{Y}_{17})_{a2}[\text{C}(=\text{Y}_{16})_{a3}\text{Y}_{14}(\text{CR}_{23}\text{R}_{24}\text{CR}_{25}\text{R}_{26}\text{Y}_{19})_{t2}(\text{CR}_{27}\text{CR}_{28})_{t3}-$ ，以及



其中：

$\text{Y}_{16}$  为 O、 $\text{NR}_{28}$  或 S；

$\text{Y}_{14-15}$  和  $\text{Y}_{17-19}$  分别为 O、 $\text{NR}_{29}$  或 S；

$R_{21-27}$  独立地选自氢、氢氧基、胺、 $C_{1-6}$  烷基、 $C_{3-12}$  支链烷基、 $C_{3-8}$  环烷基、 $C_{1-6}$  取代的烷基、 $C_{3-8}$  取代的环烷基、芳基、取代的芳基、芳烷基、 $C_{1-6}$  杂芳基、取代的  $C_{1-6}$  杂芳基、 $C_{1-6}$  烷氧基、苯氧基和  $C_{1-6}$  杂烷氧基；以及

$R_{28-39}$  独立地选自氢、 $C_{1-6}$  烷基、 $C_{3-12}$  支链烷基、 $C_{3-8}$  环烷基、 $C_{1-6}$  取代的烷基、 $C_{3-8}$  取代的环烷基、芳基、取代的芳基、芳烷基、 $C_{1-6}$  杂芳基、取代的  $C_{1-6}$  杂芳基、 $C_{1-6}$  烷氧基、苯氧基和  $C_{1-6}$  杂烷氧基；

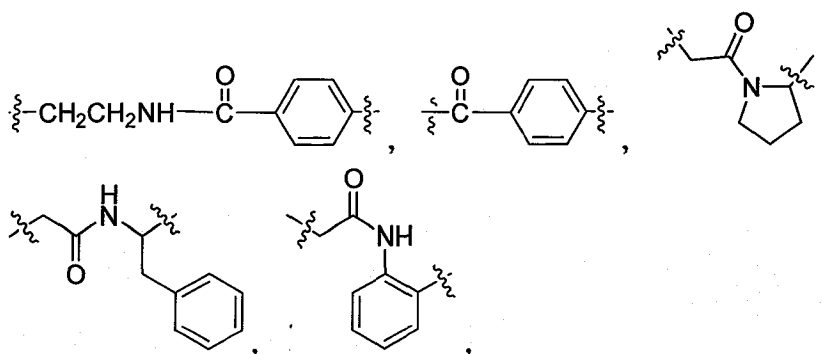
(t1)、(t2)、(t3) 和 (t4) 分别为 0 或正整数；以及

(a2) 和 (a3) 分别为 0 或 1。

12. 根据权利要求 1 的化合物，其中  $L_1$  选自：

$-\text{CH}_2-$ 、 $-(\text{CH}_2)_2-$ 、 $-(\text{CH}_2)_3-$ 、 $-(\text{CH}_2)_4-$ 、 $-(\text{CH}_2)_5-$ 、 $-(\text{CH}_2)_6-$ 、 $-\text{NH}(\text{CH}_2)-$ 、  
 $-\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CH}_2-$ 、  
 $-(\text{CH}_2)_4-\text{C}(=\text{O})-$ 、 $-(\text{CH}_2)_5-\text{C}(=\text{O})-$ 、 $-(\text{CH}_2)_6-\text{C}(=\text{O})-$ 、  
 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{O}-\text{C}(=\text{O})-$ 、  
 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2-\text{CH}_2\text{O}-\text{C}(=\text{O})-$ 、

$-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_3-\text{CH}_2\text{O}-\text{C}(=\text{O})-$ ,  
 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2-\text{C}(=\text{O})-$ ,  
 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-$ ,  
 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-$ ,  
 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-$ ,  
 $-\text{CH}_2-\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-$ ,  
 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-$ ,  
 $-\text{CH}_2-\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2-\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-$ ,  
 $-(\text{CH}_2)_4-\text{C}(=\text{O})\text{NH}-$ ,  $-(\text{CH}_2)_5-\text{C}(=\text{O})\text{NH}-$ ,  
 $-(\text{CH}_2)_6-\text{C}(=\text{O})\text{NH}-$ ,  
 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-$ ,  
 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2-\text{CH}_2\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-$ ,  
 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_3-\text{CH}_2\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-$ ,  
 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-$ ,  
 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-$ ,  
 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-$ ,  
 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-$ ,  
 $-\text{CH}_2-\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-$ ,  
 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-$ ,  
 $-\text{CH}_2-\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2-\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-$ ,  
 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2-$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{O}-$ ,  
 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$ ,  
 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_3-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$ ,  
 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$ ,  
 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$ ,  
 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$ ,  
 $-\text{CH}_2-\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$ ,  
 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ ,  
 $-\text{CH}_2-\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2-$ ,



$-\text{C}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_2-$ ,  $-\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_2-$ ,  
 $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_3-$ ,  $-\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_3-$ ,

$-\text{C}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_4-$ ,  $-\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_4-$ ,  
 $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_5-$ ,  $-\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_5-$ ,  
 $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_6-$ ,  $-\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_6-$ ,  
 $-\text{C}(=\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_2-$ ,  $-\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_2-$ ,  
 $-\text{C}(=\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_3-$ ,  $-\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_3-$ ,  
 $-\text{C}(=\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_4-$ ,  $-\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_4-$ ,  
 $-\text{C}(=\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_5-$ ,  $-\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_5-$ ,  
 $-\text{C}(=\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_6-$ ,  $-\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_6-$ ,

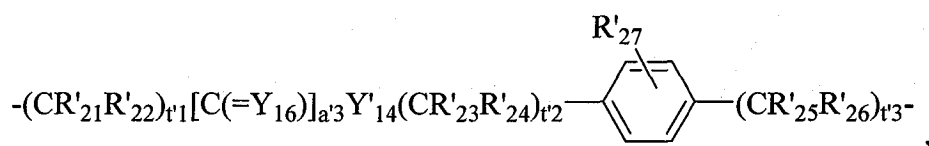
$-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{NHC}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_2-$ ,  
 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{NHC}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_3-$ ,  
 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{NHC}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_4-$ ,  
 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{NHC}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_5-$ ,  
 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{NHC}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_6-$ ,  
 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{NHC}(=\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_2-$ ,  
 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{NHC}(=\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_3-$ ,  
 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{NHC}(=\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_4-$ ,  
 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{NHC}(=\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_5-$ ,  
 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{NHC}(=\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_6-$ ,  
 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{NHC}(=\text{O})(\text{CH}_2)_2-$ ,  
 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{NHC}(=\text{O})(\text{CH}_2)_3-$ ,  
 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{NHC}(=\text{O})(\text{CH}_2)_4-$ ,  
 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{NHC}(=\text{O})(\text{CH}_2)_5-$ , 以及  
 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{NHC}(=\text{O})(\text{CH}_2)_6-$ 。

13. 根据权利要求 1 的化合物, 其中  $\text{L}_2$  选自:

$-(\text{CR}'_{21}\text{R}'_{22})_{\text{t}'1}-[\text{C}(=\text{Y}'_{16})]_{\text{a}'3}(\text{CR}'_{27}\text{CR}'_{28})_{\text{t}'2-}$ ,  
 $-(\text{CR}'_{21}\text{R}'_{22})_{\text{t}'1}\text{Y}'_{14}-(\text{CR}'_{23}\text{R}'_{24})_{\text{t}'2}-(\text{Y}'_{15})_{\text{a}'2}-[\text{C}(=\text{Y}'_{16})]_{\text{a}'3}(\text{CR}'_{27}\text{CR}'_{28})_{\text{t}'3-}$ ,  
 $-(\text{CR}'_{21}\text{R}'_{22}\text{CR}'_{23}\text{R}'_{24}\text{Y}'_{14})_{\text{t}'1}-[\text{C}(=\text{Y}'_{16})]_{\text{a}'3}(\text{CR}'_{27}\text{CR}'_{28})_{\text{t}'2-}$ ,  
 $-(\text{CR}'_{21}\text{R}'_{22}\text{CR}'_{23}\text{R}'_{24}\text{Y}'_{14})_{\text{t}'1}(\text{CR}'_{25}\text{R}'_{26})_{\text{t}'2}-(\text{Y}'_{15})_{\text{a}'2}-[\text{C}(=\text{Y}'_{16})]_{\text{a}'3}(\text{CR}'_{27}\text{CR}'_{28})_{\text{t}'3-}$ ,  
 $-[(\text{CR}'_{21}\text{R}'_{22}\text{CR}'_{23}\text{R}'_{24})_{\text{t}'2}\text{Y}'_{14}]_{\text{t}'1}(\text{CR}'_{25}\text{R}'_{26})_{\text{t}'2}-(\text{Y}'_{15})_{\text{a}'2}-[\text{C}(=\text{Y}'_{16})]_{\text{a}'3}(\text{CR}'_{27}\text{CR}'_{28})_{\text{t}'3-}$ ,  
 $-(\text{CR}'_{21}\text{R}'_{22})_{\text{t}'1}-[(\text{CR}'_{23}\text{R}'_{24})_{\text{t}'2}\text{Y}'_{14}]_{\text{t}'2}(\text{CR}'_{25}\text{R}'_{26})_{\text{t}'3}-(\text{Y}'_{15})_{\text{a}'2}-[\text{C}(=\text{Y}'_{16})]_{\text{a}'3}(\text{CR}'_{27}\text{CR}'_{28})_{\text{t}'4-}$ ,  
 $-(\text{CR}'_{21}\text{R}'_{22})_{\text{t}'1}(\text{Y}'_{14})_{\text{a}'2}[\text{C}(=\text{Y}'_{16})]_{\text{a}'3}(\text{CR}'_{23}\text{R}'_{24})_{\text{t}'2-}$ ,  
 $-(\text{CR}'_{21}\text{R}'_{22})_{\text{t}'1}(\text{Y}'_{14})_{\text{a}'2}[\text{C}(=\text{Y}'_{16})]_{\text{a}'3}\text{Y}'_{15}(\text{CR}'_{23}\text{R}'_{24})_{\text{t}'2-}$ ,  
 $-(\text{CR}'_{21}\text{R}'_{22})_{\text{t}'1}(\text{Y}'_{14})_{\text{a}'2}[\text{C}(=\text{Y}'_{16})]_{\text{a}'3}(\text{CR}'_{23}\text{R}'_{24})_{\text{t}'2}-\text{Y}'_{15}-(\text{CR}'_{23}\text{R}'_{24})_{\text{t}'3-}$ ,  
 $-(\text{CR}'_{21}\text{R}'_{22})_{\text{t}'1}(\text{Y}'_{14})_{\text{a}'2}[\text{C}(=\text{Y}'_{16})]_{\text{a}'3}\text{Y}'_{14}(\text{CR}'_{23}\text{R}'_{24})_{\text{t}'2}-\text{Y}'_{15}-(\text{CR}'_{23}\text{R}'_{24})_{\text{t}'3-}$ ,  
 $-(\text{CR}'_{21}\text{R}'_{22})_{\text{t}'1}(\text{Y}'_{14})_{\text{a}'2}[\text{C}(=\text{Y}'_{16})]_{\text{a}'3}(\text{CR}'_{23}\text{R}'_{24}\text{CR}'_{25}\text{R}'_{26}\text{Y}'_{15})_{\text{t}'2}(\text{CR}'_{27}\text{CR}'_{28})_{\text{t}'3-}$ ,  
 $-(\text{CR}'_{21}\text{R}'_{22})_{\text{t}'1}(\text{Y}'_{14})_{\text{a}'2}[\text{C}(=\text{Y}'_{16})]_{\text{a}'3}\text{Y}'_{17}(\text{CR}'_{23}\text{R}'_{24}\text{CR}'_{25}\text{R}'_{26}\text{Y}'_{15})_{\text{t}'2}(\text{CR}'_{27}\text{CR}'_{28})_{\text{t}'3-}$

$t'3^-$ ,

以及



其中：

$Y'_{16}$  为 O、 $NR'_{28}$  或 S；

$Y'_{14-15}$  和  $Y'_{17}$  分别为 O、 $NR'_{29}$  或 S；

$R'_{21-27}$  独立地选自氢、羟基、胺、 $C_{1-6}$  烷基、 $C_{3-12}$  支链烷基、 $C_{3-8}$  环烷基、 $C_{1-6}$  取代的烷基、 $C_{3-8}$  取代的环烷基、芳基、取代的芳基、芳烷基、 $C_{1-6}$  杂芳基、取代的  $C_{1-6}$  杂芳基、 $C_{1-6}$  烷氧基、苯氧基和  $C_{1-6}$  杂烷氧基；

$R'_{28-29}$  独立地选自氢、 $C_{1-6}$  烷基、 $C_{3-12}$  支链烷基、 $C_{3-8}$  环烷基、 $C_{1-6}$  取代的烷基、 $C_{3-8}$  取代的环烷基、芳基、取代的芳基、芳烷基、 $C_{1-6}$  杂芳基、取代的  $C_{1-6}$  杂芳基、 $C_{1-6}$  烷氧基、苯氧基和  $C_{1-6}$  杂烷氧基；

$(t'1)$ 、 $(t'2)$ 、 $(t'3)$  和  $(t'4)$  分别为 0 或正整数；以及

$(a'2)$  和  $(a'3)$  分别为 0 或 1。

14. 根据权利要求 1 的化合物，其中  $L_2$  选自：

$-\text{CH}_2-$ ， $-(\text{CH}_2)_2-$ ， $-(\text{CH}_2)_3-$ ， $-(\text{CH}_2)_4-$ ， $-(\text{CH}_2)_5-$ ， $-(\text{CH}_2)_6-$ ， $-\text{NH}(\text{CH}_2)-$ ，

$-\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CH}_2-$ ，

$-\text{O}(\text{CH}_2)_2-$ ， $-\text{C}(=\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_3-$ ， $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_3-$ ，

$-\text{C}(=\text{O})(\text{CH}_2)_2-$ ， $-\text{C}(=\text{O})(\text{CH}_2)_3-$ ，

$-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{O}(\text{CH}_2)_3-$ ，

$-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}(\text{CH}_2)_3-$ ，

$-\text{CH}_2-\text{OC}(=\text{O})-\text{O}(\text{CH}_2)_3-$ ，

$-\text{CH}_2-\text{OC}(=\text{O})-\text{NH}(\text{CH}_2)_3-$ ，

$-(\text{CH}_2)_2-\text{C}(=\text{O})-\text{O}(\text{CH}_2)_3-$ ，

$-(\text{CH}_2)_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}(\text{CH}_2)_3-$ ，

$-\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-$ ，

$-\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-$ ，

$-(\text{CH}_2)_2\text{C}(=\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-$ ，

$-(\text{CH}_2)_2\text{C}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-$ ，

$-\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ，

$-(\text{CH}_2)_2\text{C}(=\text{O})\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ，

$-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2-$ ， $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{O}-$ ，

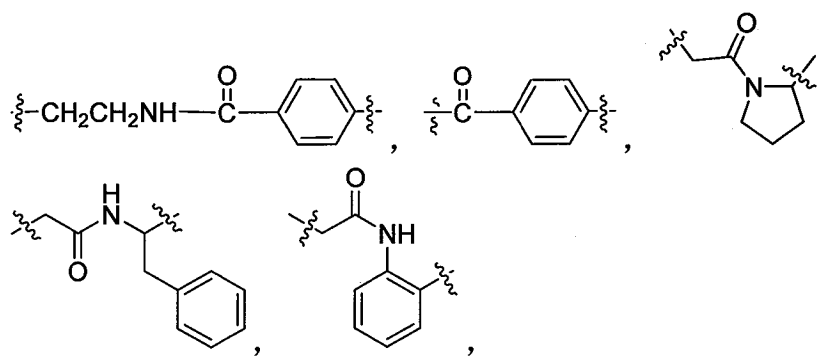
$-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$ ， $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_3-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$ ，

$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$ ，

$-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$ ，

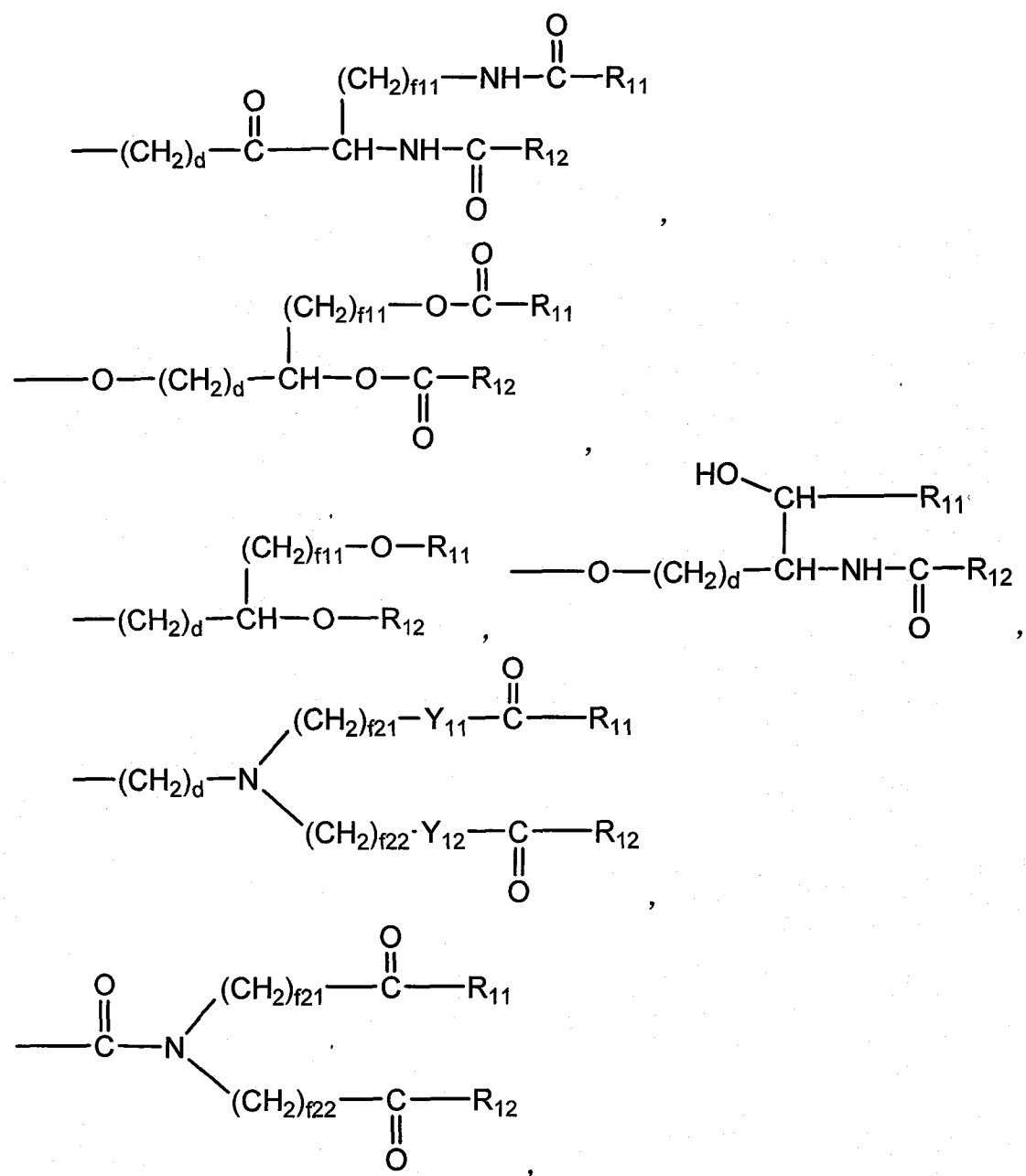
$-\text{CH}_2-\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$ ，

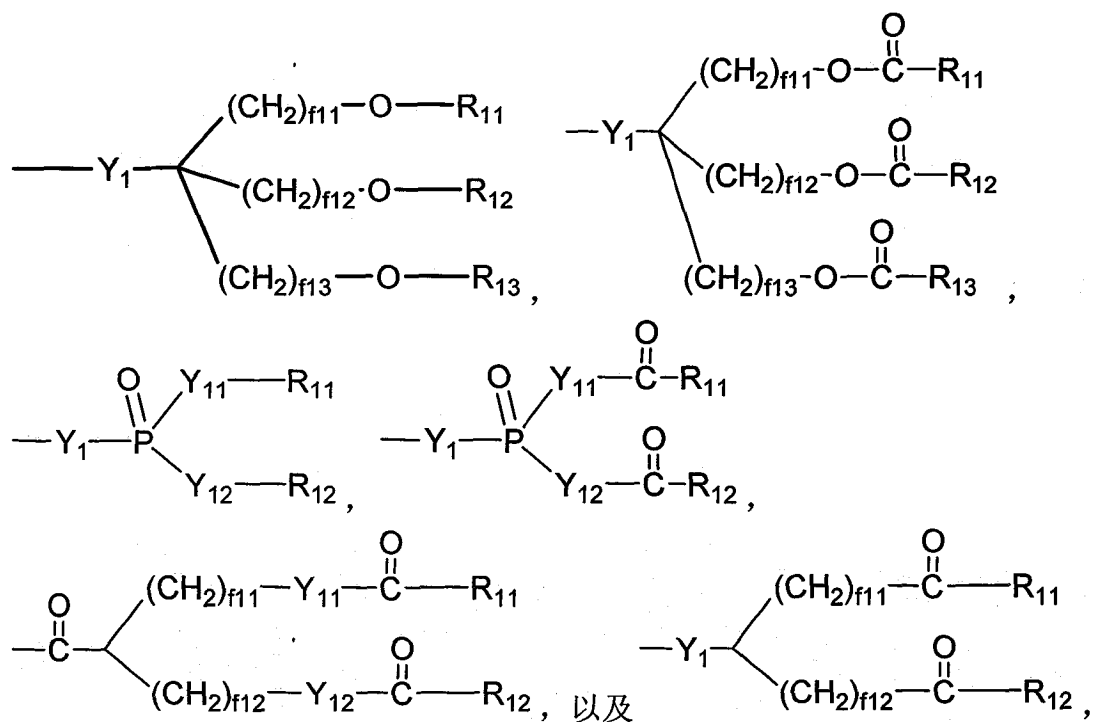
$-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ ， $-\text{CH}_2-\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2-$ ，



$-(\text{CH}_2)_2\text{NHC(=O)}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2-$ ,  
 $-\text{C(=O)NH}(\text{CH}_2)_2-$ ,  $-\text{CH}_2\text{C(=O)NH}(\text{CH}_2)_2-$ ,  
 $-\text{C(=O)NH}(\text{CH}_2)_3-$ ,  $-\text{CH}_2\text{C(=O)NH}(\text{CH}_2)_3-$ ,  
 $-\text{C(=O)NH}(\text{CH}_2)_4-$ ,  $-\text{CH}_2\text{C(=O)NH}(\text{CH}_2)_4-$ ,  
 $-\text{C(=O)NH}(\text{CH}_2)_5-$ ,  $-\text{CH}_2\text{C(=O)NH}(\text{CH}_2)_5-$ ,  
 $-\text{C(=O)NH}(\text{CH}_2)_6-$ ,  $-\text{CH}_2\text{C(=O)NH}(\text{CH}_2)_6-$ ,  
 $-\text{C(=O)O}(\text{CH}_2)_2-$ ,  $-\text{CH}_2\text{C(=O)O}(\text{CH}_2)_2-$ ,  
 $-\text{C(=O)O}(\text{CH}_2)_3-$ ,  $-\text{CH}_2\text{C(=O)O}(\text{CH}_2)_3-$ ,  
 $-\text{C(=O)O}(\text{CH}_2)_4-$ ,  $-\text{CH}_2\text{C(=O)O}(\text{CH}_2)_4-$ ,  
 $-\text{C(=O)O}(\text{CH}_2)_5-$ ,  $-\text{CH}_2\text{C(=O)O}(\text{CH}_2)_5-$ ,  
 $-\text{C(=O)O}(\text{CH}_2)_6-$ ,  $-\text{CH}_2\text{C(=O)O}(\text{CH}_2)_6-$ ,  
 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{NHC(=O)NH}(\text{CH}_2)_2-$ ,  
 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{NHC(=O)NH}(\text{CH}_2)_3-$ ,  
 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{NHC(=O)NH}(\text{CH}_2)_4-$ ,  
 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{NHC(=O)NH}(\text{CH}_2)_5-$ ,  
 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{NHC(=O)NH}(\text{CH}_2)_6-$ ,  
 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{NHC(=O)O}(\text{CH}_2)_2-$ ,  
 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{NHC(=O)O}(\text{CH}_2)_3-$ ,  
 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{NHC(=O)O}(\text{CH}_2)_4-$ ,  
 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{NHC(=O)O}(\text{CH}_2)_5-$ ,  
 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{NHC(=O)O}(\text{CH}_2)_6-$ ,  
 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{NHC(=O)}(\text{CH}_2)_2-$ ,  
 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{NHC(=O)}(\text{CH}_2)_3-$ ,  
 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{NHC(=O)}(\text{CH}_2)_4-$ ,  
 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{NHC(=O)}(\text{CH}_2)_5-$ , 以及  
 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{NHC(=O)}(\text{CH}_2)_6-$ 。

15. 根据权利要求 1 的化合物, 其中 Q 选自:





其中,

$\text{Y}_1$  为 O、S 或  $\text{NR}_{31}$ ;

$\text{R}_{11}$ 、 $\text{R}_{12}$  和  $\text{R}_{13}$  分别为取代的或非取代的、饱和的或不饱和的  $\text{C}_{4-30}$ ;

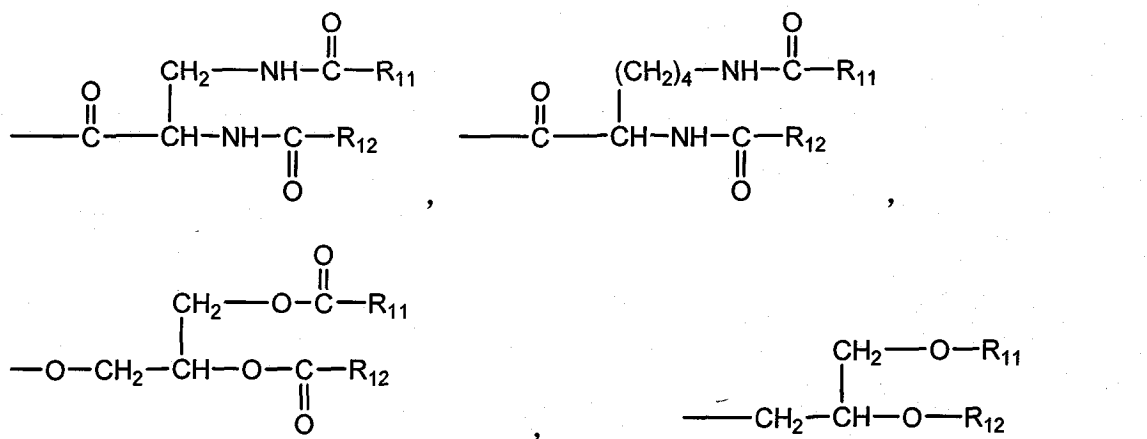
$\text{R}_{31}$  为氢、甲基或乙基;

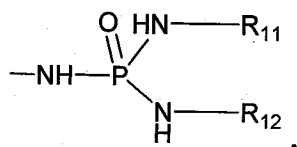
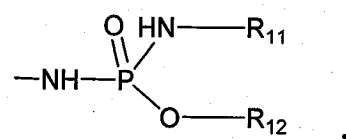
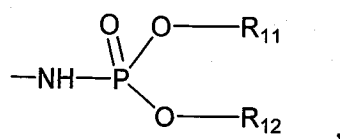
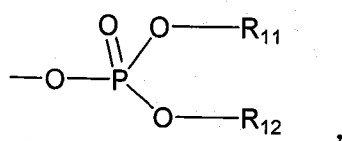
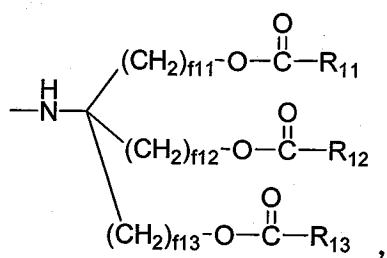
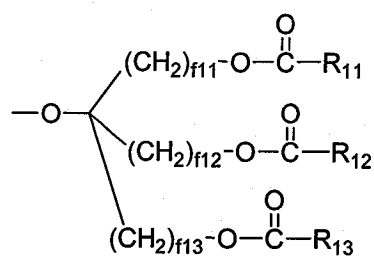
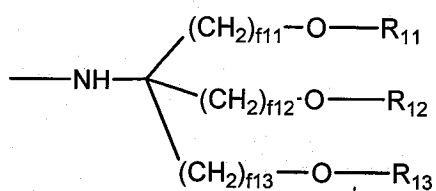
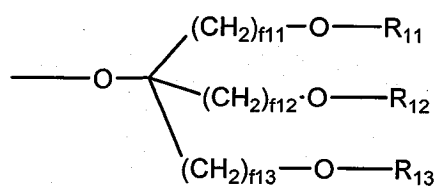
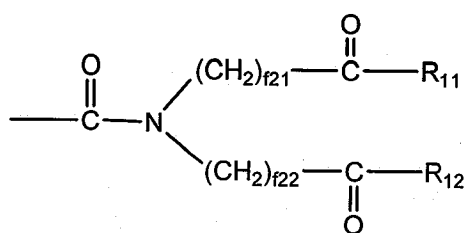
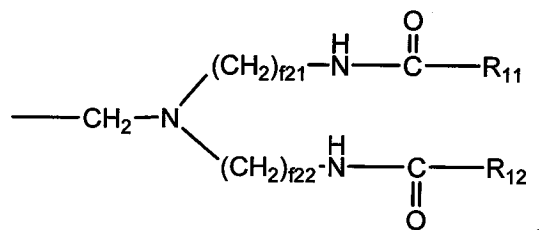
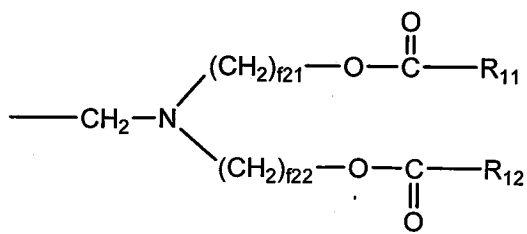
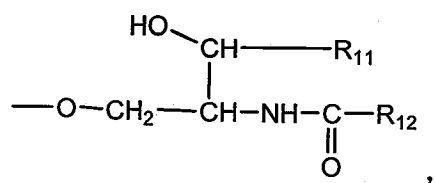
(d) 为 0 或正整数;以及

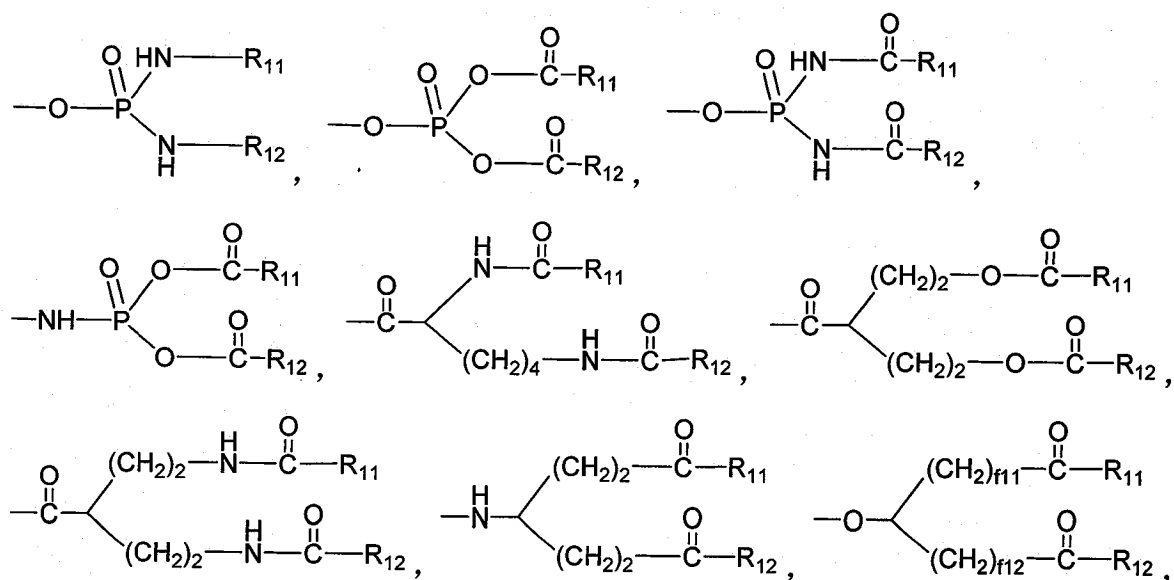
(f11)、(f12) 和 (f13) 分别为 0、1、2、3 或 4;以及

(f21) 和 (f22) 分别为 1、2、3 或 4。

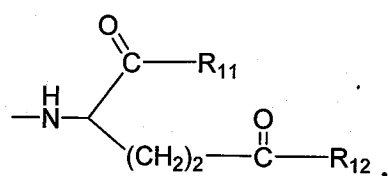
16. 根据权利要求 1 的化合物,其中 Q 选自:







以及

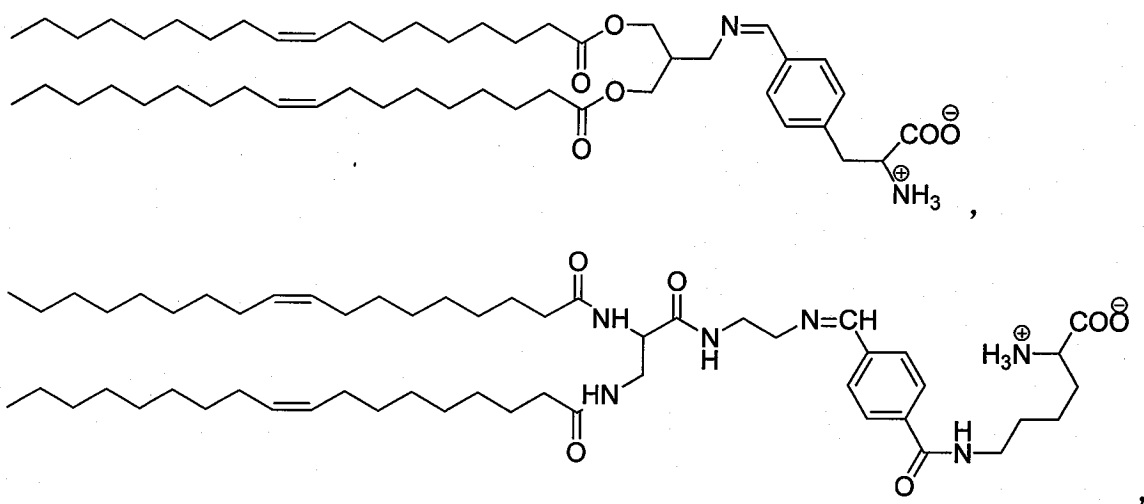


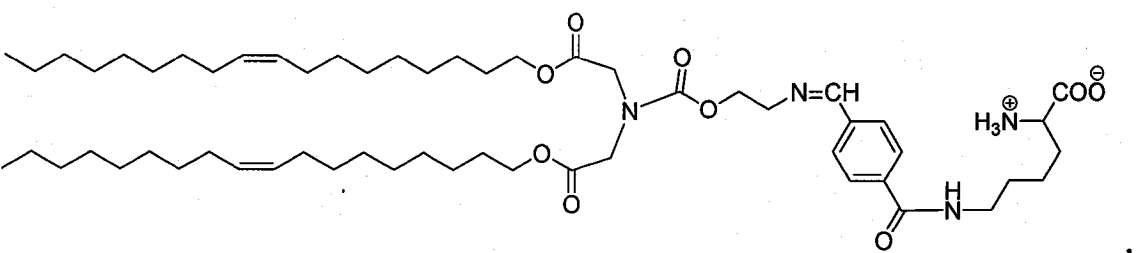
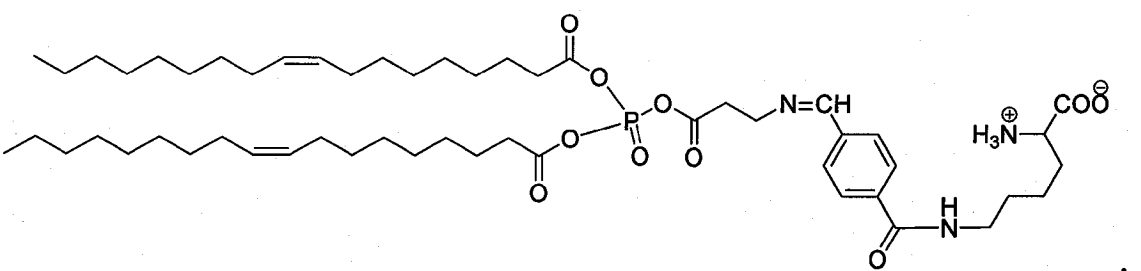
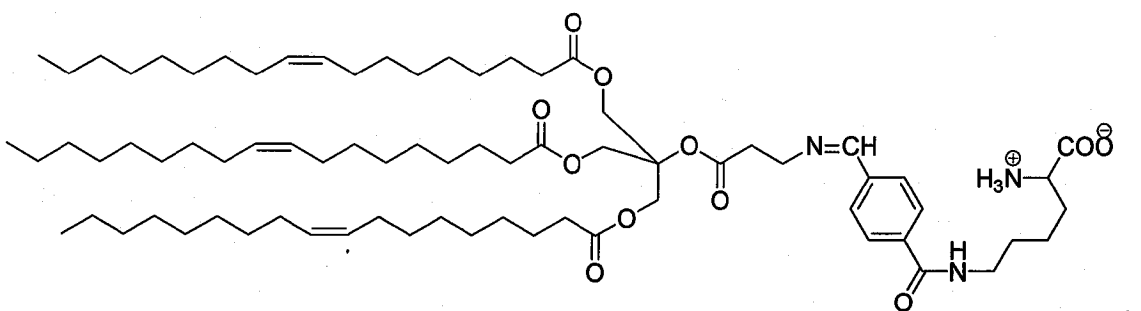
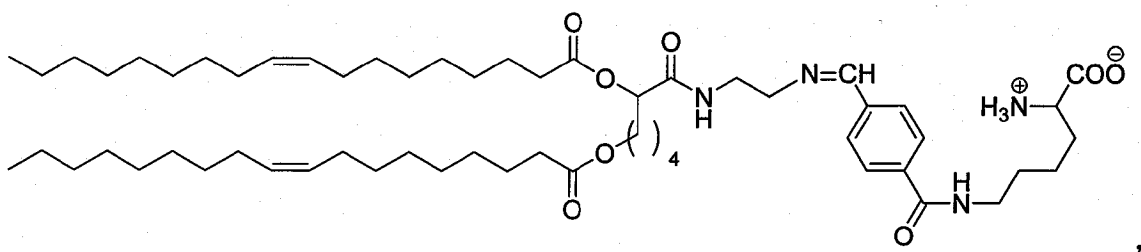
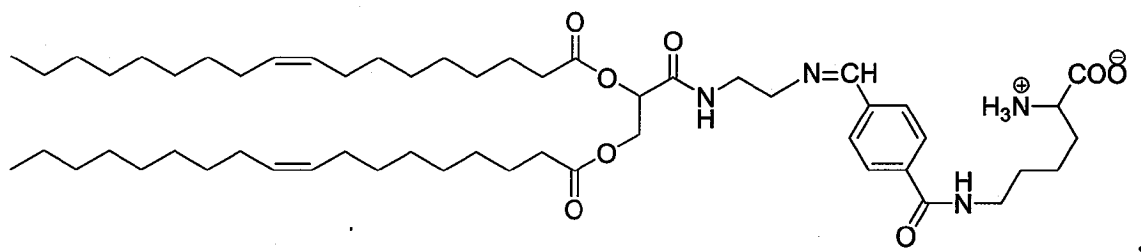
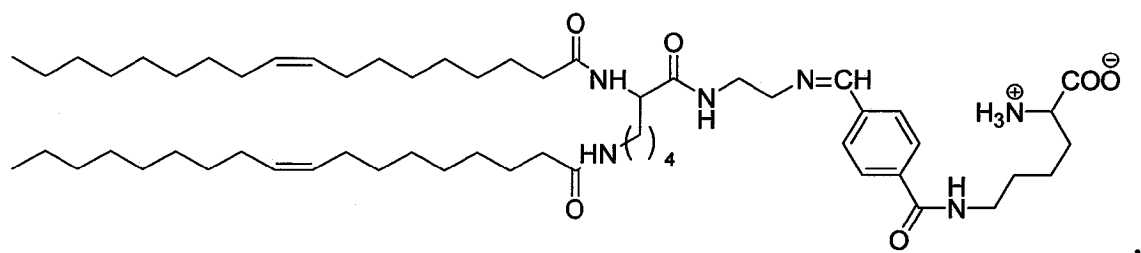
其中 R<sub>11-13</sub> 分别为相同或不同的 C12-22 饱和的或不饱和的脂肪族碳氢化合物；

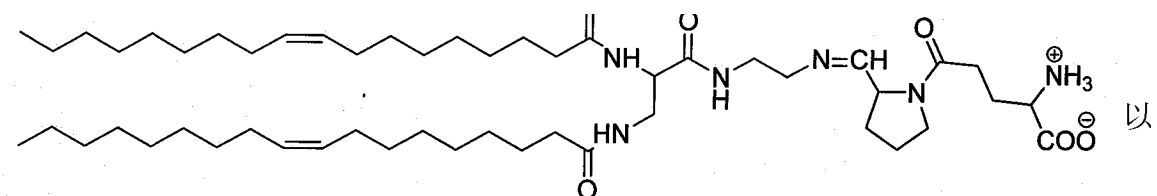
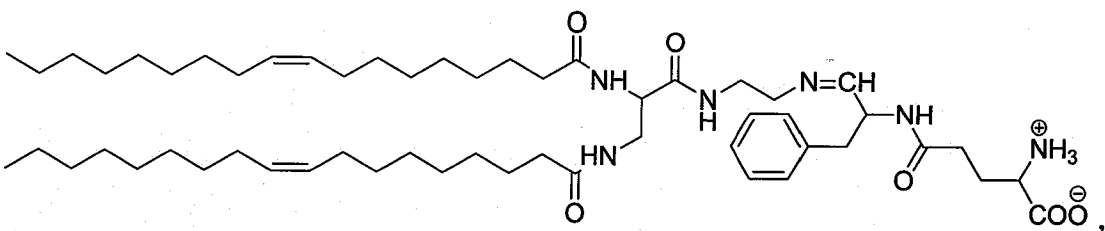
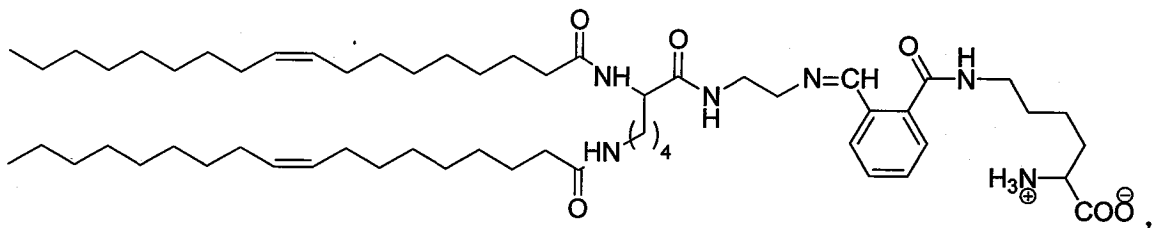
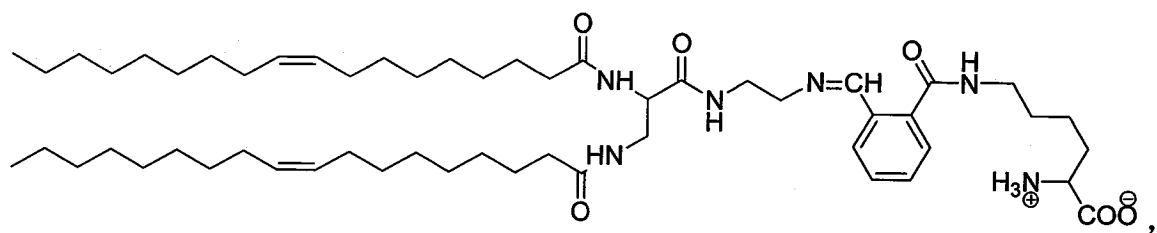
(f11)、(f12) 和 (f13) 分别为 0、1、2、3 或 4;以及

(f21) 和 (f22) 分别为 1、2、3 或 4。

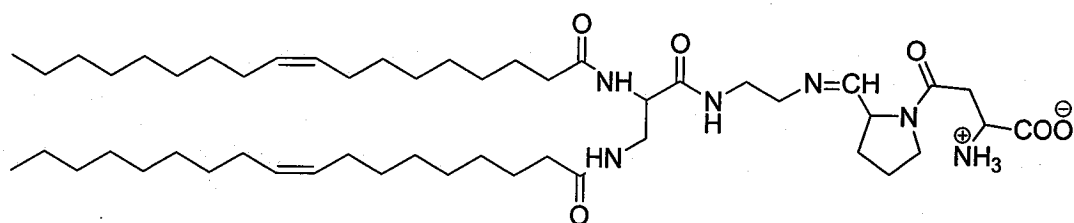
17. 根据权利要求 1 的化合物,选自:





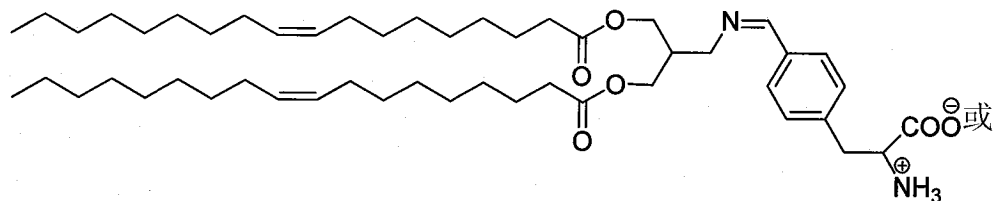


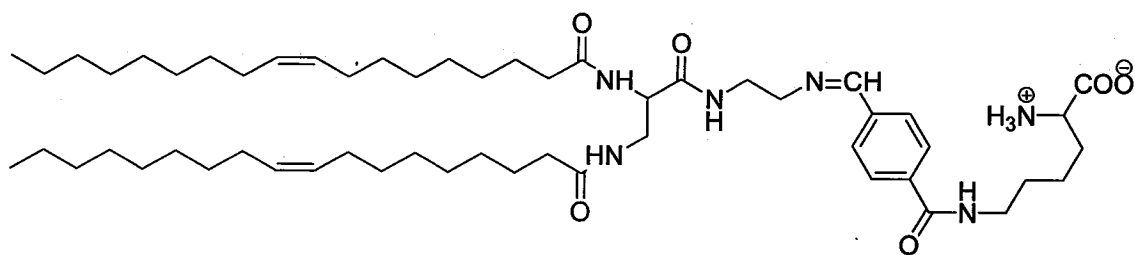
及



18. 一种包含权利要求 1 的式 (I) 的化合物的纳米微粒组合物。

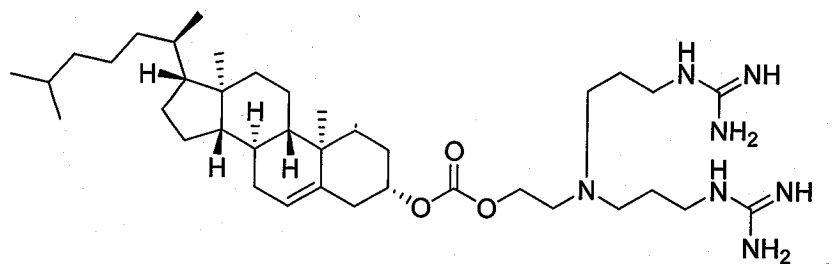
19. 根据权利要求 18 的纳米微粒组合物, 其中所述式 (I) 的化合物为





20. 根据权利要求 18 的纳米微粒组合物,进一步包含阳离子脂质和 PEG- 脂质。

21. 根据权利要求 20 的纳米微粒组合物,其中所述阳离子脂质为



22. 根据权利要求 20 的纳米微粒组合物,其中所述 PEG 脂质选自 PEG-DSPE、PEG- 二棕榈酰咪唑双酰胺、C16mPEG- 神经酰胺及其组合。

23. 根据权利要求 20 的纳米微粒组合物,进一步包括胆固醇。

24. 根据权利要求 20 的纳米微粒组合物,其中所述阳离子脂质以所述纳米微粒组合物中的脂质总量计摩尔比为约 10%到约 99.9%。

25. 根据权利要求 20 的纳米微粒组合物,其中所述阳离子脂质以所述纳米微粒组合物中的脂质总量计摩尔比为约 15%到约 25%。

26. 根据权利要求 24 的纳米微粒组合物,其中阳离子脂质、包括式 (I) 的化合物的融合脂质、PEG- 脂质和胆固醇的摩尔比为约 15-25% : 20-78% : 0-50% : 2-10% ;所述纳米微粒组合物中的脂质总量。

27. 一种纳米微粒,其包含核酸,该核酸封装在权利要求 18 的纳米微粒组合物内。

28. 根据权利要求 27 的纳米微粒,其中所述核酸是单链或双链低聚核苷酸。

29. 根据权利要求 27 的纳米微粒,其中所述核酸选自脱氧核苷酸、核糖核苷酸、锁核酸 (LNA)、短干扰 RNA (siRNA)、微 RNA (miRNA)、适体、肽核酸 (PNA)、偶磷二酰胺化吗啉代低聚核苷酸 (PMO)、三环 -DNA、双链低聚核苷酸 (诱导 ODN)、催化的 RNA (RNAi)、适体、镜像体、CpG 低聚物及其组合。

30. 根据权利要求 28 的纳米微粒,其中所述低聚核苷酸为反义低聚核苷酸。

31. 根据权利要求 28 的纳米微粒,其中所述低聚核苷酸具有磷酸二酯或硫代磷酸键合及其组合。

32. 根据权利要求 28 的纳米微粒,其中所述低聚核苷酸包括 LNA。

33. 根据权利要求 28 的纳米微粒,其中所述低聚核苷酸具有约 8 到 50 个核苷酸。

34. 根据权利要求 28 的纳米微粒,其中所述低聚核苷酸抑制致癌基因、前 - 血管生成路径基因、前 - 细胞增殖路径基因、病毒感染媒介基因和前 - 炎症路径基因的表达。

35. 根据权利要求 28 的纳米微粒,其中所述低聚核苷酸选自反义 bcl-2 低聚核苷酸、反

义 HIF-1 $\alpha$  低聚核苷酸、反义存活素低聚核苷酸、反义 ErbB3 低聚核苷酸、反义 PIK3CA 低聚核苷酸、反义 HSP27 低聚核苷酸、反义雄激素受体低聚核苷酸、反义 Gli2 低聚核苷酸和反义  $\beta$ -连环蛋白低聚核苷酸。

36. 根据权利要求 28 的纳米微粒,其中所述低聚核苷酸包括按照如下规定的 8 个或更多个连续的核苷酸:SEQ ID NO:1、SEQ ID NOs 2 和 3、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15 和 SEQ ID NO:16,且每种核酸均为天然的或改性的核酸。

37. 根据权利要求 27 的纳米微粒,其中所述核酸与所述式 (I) 的化合物的配料比的范围为约 1:20 到约 20:1。

38. 根据权利要求 27 的纳米微粒,其中所述纳米微粒尺寸的范围为约 50nm 到约 150nm。

39. 一种治疗哺乳动物体内疾病的方法,包括将权利要求 27 的纳米微粒给药到需要的哺乳动物。

40. 一种将低聚核苷酸引入细胞的方法,包括:

将细胞与权利要求 27 的纳米微粒接触。

41. 一种抑制人类细胞或组织内的基因表达的方法,包括:

将人类细胞或组织与权利要求 27 的纳米微粒接触。

42. 根据权利要求 41 的方法,其中所述细胞或组织是癌细胞或组织。

43. 一种下调哺乳动物体内的基因表达的方法,包括:

将有效量的权利要求 27 的纳米微粒给药到需要的哺乳动物。

44. 一种抑制癌细胞生长或增生的方法,包括:

将癌细胞与权利要求 27 的纳米微粒接触。

45. 根据权利要求 44 的方法,进一步包括抗癌药的给药。

## 用于核酸输送系统的可释放融合脂质

[0001] 相关申请的参照引用

[0002] 本申请主张对第 61/115,378 号美国临时专利申请的优先权。此专利申请日为 2008 年 11 月 17 日,专利内容在此引入作为参考。

### 背景技术

[0003] 近年来,使用核酸的治疗方法被作为治疗多种疾病的尝试。例如反义疗法等多种疗法是疾病治疗的有力工具,因为治疗性基因可以选择性地调整与疾病相关的基因表达,并将使用其他治疗方法时引起的副作用降至最低。

[0004] 然而,由于基因的稳定性和差、输送效率低,使用核酸的治疗方法受到限制。集中基因输送系统试图克服上述障碍,将治疗性基因有效地在体外以及体内送达目标区域,例如癌细胞或者组织。为了促进输送和强化治疗性基因的细胞吸收,上述尝试针对对脂质体的利用。

[0005] 尽管在输送质体方面已经取得一些进展,但当前可得的脂质体不能有效地将低聚核苷酸输送入人体。对于输送低聚核苷酸,理想的输送系统应当包括正电荷,此正电荷足以中和低聚核苷酸的负电荷。最近,Stuart, D. D. 等在 *Biochim. Biophys. Acta*, 2000, 1463 : 219-229 中,以及 Semple, S. C. 等在 *Biochim. Biophys. Acta*, 2001, 1510 : 152-166 中分别介绍了包覆阳离子脂质体 (coated cationic liposomal, CCL) 和稳定的核酸脂粒 (Stable Nucleic Acid-Lipid Particles, SNALP), 据报道,上述物质可以提供具有小尺寸、高核酸封装率、良好的血清稳定性和循环时间持久的纳米微粒。

[0006] 尽管有上述尝试和进展,但仍需提供改进的核酸输送系统。本发明即针对这一需要而提出。

### 发明内容

[0007] 本发明提供包含亚胺连接基和两性基的可释放融合脂质,以及包含同样物质用于核酸输送的纳米微粒组合物。多核酸 (polynucleic acids), 例如低聚核苷酸,被封装在包含阳离子脂质、本发明所述的可释放融合脂质和 PEG 脂质混合物的纳米微粒复合体中。

[0008] 根据本发明的这一方面,用于核酸(具体为低聚核苷酸)输送的可释放融合脂质具有式 (I) :

[0009] 
$$R-(L_1)_a-M-(L_2)_b-Q$$

[0010] 其中

[0011] R 是水溶的电中性或者含两性离子的基团 ;

[0012]  $L_{1-2}$  是单独选择的双功能连接基 ;

[0013] M 是含亚胺的基团 ;

[0014] Q 是取代的或者非取代的,饱和或者不饱和的含 C4-30 的基团 ;

[0015] (a) 是 0 或者正整数 ;以及

[0016] (b) 是 0 或者正整数。

[0017] 本发明还提供用于核酸输送的纳米微粒组合物。根据本发明,用于核酸(具体为低聚核苷酸)输送的纳米微粒组合物可以包括:

[0018] (i) 阳离子脂质;

[0019] (ii) 式(I)化合物;以及

[0020] (iii) PEG 脂质。

[0021] 另一方面,本发明提供将核酸(优选低聚核苷酸)在体内和体外送达细胞或者组织的方法。通过本发明所述的方法送入的低聚核苷酸可以调整目标基因的表达。

[0022] 同时,本发明提供抑制目标基因表达的方法。所述基因就是致癌基因以及与哺乳动物,优选为人的疾病相关的基因。所述方法包括使用本发明所述的纳米微粒组合物制成的纳米微粒/纳米微粒复合体来接触细胞,例如癌细胞或者组织。封装在纳米微粒中的低聚核苷酸被释放出来,其调节被治疗的细胞或者组织内的 mRNA 或者蛋白质的下调。使用纳米微粒的治疗允许在治疗恶性疾病时对目标基因的表达进行调整(并带来随之而来的相关益处),例如抑制癌细胞的生长。通过一种或多种有效的和/或被认可的治疗手段,这些疗法可以单独实施,也可以作为联合疗法的一部分实施。

[0023] 此外,本发明还包括制造式(I)化合物以及包含同样物质的纳米微粒的方法。

[0024] 包含本发明所述的可释放融合脂质的纳米微粒组合物提供了在体内以及体外核酸给药的方式。

[0025] 当包含本发明所述的可释放融合脂质的纳米微粒进入细胞和细胞区室时,它可以帮助释放封装在其中的核酸。不受任何理论的限制,这一特性部分归因于酸不稳定连接基。亚胺基连接基酸不稳定,并且在例如癌细胞和核内体的酸性环境中发生水解。因此,亚胺基连接基可以促进纳米微粒的破裂,从而允许核酸在细胞内的释放。

[0026] 包含两性电荷基团的可释放融合脂质增强核酸的细胞吸收。带有极性但电荷为中性的基团帮助纳米微粒穿过细胞膜。

[0027] 本发明所述的可释放融合脂质稳定了生物流体中的纳米微粒复合体以及其中的核酸。纳米微粒复合体可以将核酸分子与核酸酶隔开,从而防止核酸发生降解。

[0028] 本发明所述的纳米微粒输送系统允许在所期望的目标区域内选择性地出现足够量的治疗性低聚核苷酸,例如通过EPR(Enhanced Permeation and Retention)效应到达癌细胞。目标区域内的治疗性核酸可以有针对性地调整癌细胞或组织内的目标基因的表达。

[0029] 本发明所述的纳米微粒也可以用于生物活性分子的输送,例如小分子化学治疗以及一种或多种不同类型的治疗性核酸,因而在疾病的治疗中取得了协同效应。

[0030] 其他更多的优点会从如下说明中得到体现。

[0031] 基于本发明的目的,术语“残基”应当理解为化合物的一部分,其指的是例如 C6-30 碳氢化合物在与其他化合物发生取代反应之后的剩余。

[0032] 基于本发明的目的,术语“烷基”指的是饱和的脂肪族碳氢化合物,包括直链、支链和环烷基团。术语“烷基”还包括烷基-硫-烷基、烷氧基烷基、环烷基烷基、杂环烷基和 C<sub>1-6</sub> 烷羰基烷基基团。优选地,所述烷基基团具有 1 到 12 个碳。更为优选地,其为约 1 到 7 个碳的低碳数烷基,进一步优选为约 1 到 4 个碳。所述烷基基团可以是被取代的或者未被取代的。当烷基基团是被取代的时,取代基优选包括卤代基、氧、叠氮基、硝基、氰基、烷基、烷氧基、烷基-硫、烷基-硫-烷基、烷氧基烷基、烷基胺、三卤甲基、氢氧基、巯基、羟基、氰基、

硅烷基、环烷基、环烷基烷基、杂环烷基、杂芳基、烯基、炔基、 $C_{1-6}$  烃基、芳基和氨基。

[0033] 基于本发明的目的,术语“被取代的”指的是用下述基团之一增加或者替换包含在官能团或化合物中的一个或多个原子,所述基团包括:卤代基、氧、叠氮基、硝基、氰基、烷基、烷氧基、烷基-硫、烷基-硫-烷基、烷氧基烷基、烷基胺、三卤甲基、氢氧基、巯基、羟基、氰基、硅烷基、环烷基、环烷基烷基、杂环烷基、杂芳基、烯基、炔基、 $C_{1-6}$  烷羰基烷基、芳基和氨基。

[0034] 基于本发明的目的,术语“烯基”指的是包含至少一个碳-碳双键的基团,包括直链、支链和环状。优选地,所述烯基基团具有 2 到 12 个碳。更为优选地,其为约 2 到 7 个碳的低碳数烯基,进一步优选为约 2 到 4 个碳。所述烯基基团可以是被取代的或者未被取代的。当烯基基团是被取代的时,取代基优选包括卤代基、氧、叠氮基、硝基、氰基、烷基、烷氧基、烷基-硫、烷基-硫-烷基、烷氧基烷基、烷基胺、三卤甲基、氢氧基、巯基、羟基、氰基、硅烷基、环烷基、环烷基烷基、杂环烷基、杂芳基、烯基、炔基、 $C_{1-6}$  烃基、芳基和氨基。

[0035] 基于本发明的目的,术语“炔基”指的是包含至少一个碳-碳三键的基团,包括直链、支链和环状。优选地,所述炔基基团具有 2 到 12 个碳。更为优选地,其为约 2 到 7 个碳的低碳数炔基,进一步优选为约 2 到 4 个碳。所述炔基基团可以是被取代的或者未被取代的。当炔基基团是被取代的时,取代基优选包括卤代基、氧、叠氮基、硝基、氰基、烷基、烷氧基、烷基-硫、烷基-硫-烷基、烷氧基烷基、烷基胺、三卤甲基、氢氧基、巯基、羟基、氰基、硅烷基、环烷基、环烷基烷基、杂环烷基、杂芳基、烯基、炔基、 $C_{1-6}$  烃基、芳基和氨基。“炔基”的例子包括炔丙基、丙炔和 3-己炔。

[0036] 基于本发明的目的,术语“芳基”指的是包含至少一个芳香环的芳香碳氢化合物环状结构。所述芳香环可以是稠环,或者也可以连接到其他芳香碳氢化合物环或非芳香碳氢化合物环。芳基的例子包括,例如苯基、萘基、1,2,3,4-四氢化萘和联苯。芳基优选的例子包括苯基和萘基。

[0037] 基于本发明的目的,术语“环烷基”指的是  $C_{3-8}$  环状碳氢化合物。环烷基的例子包括环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基和环辛基。

[0038] 基于本发明的目的,术语“环烯基”指的是包含至少一个碳-碳双键的  $C_{3-8}$  环状碳氢化合物。环烯基的例子包括环戊烯基、环戊二烯基、环己烯基、1,3-环己二烯基、环庚烯、环庚三烯和环辛烯基。

[0039] 基于本发明的目的,术语“环烷基烷基”指的是用  $C_{3-8}$  环烷基取代的烷基。环烷基烷基的例子包括环丙基甲基和环戊基乙基。

[0040] 基于本发明的目的,术语“烷氧基”指的是指示数量的通过氧桥连接到主分子基团的碳原子组成的烷基。烷氧基的例子包括,例如甲氧基、乙氧基、丙氧基和异丙氧基。

[0041] 基于本发明的目的,“烷基芳基”指的是用烷基取代的芳基。

[0042] 基于本发明的目的,“芳烷基”指的是用芳基取代的烷基。

[0043] 基于本发明的目的,术语“烷氧基烷基”指的是用烷氧基取代的烷基。

[0044] 基于本发明的目的,术语“烷基硫-烷基”指的是烷基-S-烷基硫醚,例如二甲硫醚或者甲乙硫醚。

[0045] 基于本发明的目的,术语“氨基”指的是由氮通过一个或多个氢基被有机基团替换而衍生出来的本领域所知的含氮基团。例如,术语“酰氨基”和“烷基胺”指的是分别被酰

基和烷基取代基取代的特定的 N 取代游基团。

[0046] 基于本发明的目的,术语“烷羰基”指的是用烷基取代的羰基。

[0047] 基于本发明的目的,术语“卤素”或“卤代基”指的是氟、氯、溴和碘。

[0048] 基于本发明的目的,术语“杂环烷基”指的是包含至少一个选自氮、氧和硫的杂原子非芳香环状结构。杂环烷基环可以是稠环,或者也可以连接到其他杂环烷基环和 / 或非芳香碳氢化合物环。优选的杂环烷基具有 3 到 7 个部分。杂环烷基的例子包括,例如哌嗪、吗啉、哌啶、四氢呋喃、吡咯烷和吡唑。优选的杂环烷基包括哌啶基、哌嗪基、吗啉基和吡咯烷基。

[0049] 基于本发明的目的,术语“杂芳基”指的是包含至少一个选自氮、氧和硫的杂原子的芳香环结构。杂芳基环可以是稠环,或者也可以连接到一个或多个杂芳基环、芳香或非芳香碳氢化合物环或者杂环烷基环。杂芳基的例子包括,例如吡啶、呋喃、噻吩、5,6,7,8-四氢异喹啉和嘧啶。杂芳基的优选例子包括噻吩基、苯并噻吩基、吡啶基、喹啉基、吡嗪基、嘧啶基、咪唑基、苯并咪唑基、呋喃基、苯并呋喃基、噻唑基、苯并噻唑基、异恶唑基、氧二氮唑基、异硫代氮唑基、苯并异硫代氮唑基、三氮唑基、四氮唑基、吡咯基、吡唑基、吡啶基和苯并吡啶基。

[0050] 基于本发明的目的,术语“杂原子”指的是氮、氧和硫。

[0051] 在一些实例中,取代的烷基包括羧烷基、氨烷基、二烷基氨基、羟烷基和巯烷基;取代的烯基包括羧烯基、氨烯基、二烯基氨基、羟烯基和巯烯基;取代的炔基包括羧炔基、氨炔基、二炔基氨基、羟炔基和巯炔基;取代的环烷基包括例如 4-氯环己基的基团;芳基包括例如萘基的基团;取代的芳基包括例如 3-溴苯基的基团;芳烷基包括例如甲苯基的基团;杂烷基包括例如乙基噻吩的基团;取代的杂芳基包括例如 3-甲氧基噻吩的基团;烷氧基包括例如甲氧基的基团;以及苯氧基包括 3-硝基苯氧基的基团。卤代基应当理解为包括氟代基、氯代基、碘代基和溴代基。

[0052] 基于本发明的目的,“正整数”应当理解为包括等于或大于 1 的整数,并且应由具有普通技术知识的技术人员通过普通技术在合理的范围内进行理解。

[0053] 基于本发明的目的,术语“连接的”应当理解为包括一个基团与另一个基团的共价的(优选)或非共价的接合,即作为化学反应的结果。

[0054] 基于本发明的目的,术语“有效量”和“足够量”的意思应该是由本领域普通技术人员所理解的取得所需效果或治疗效果的量。

[0055] 本发明所述的术语“纳米微粒”和 / 或由纳米微粒组合物形成的“纳米微粒复合体”指的是脂质基纳米复合体。纳米微粒包含封装在阳离子脂质、融合脂质和 PEG 脂质的混合物中的核酸,例如低聚核苷酸。可选地,所述纳米微粒可以不含核酸。

[0056] 基于本发明的目的,术语“治疗性低聚核苷酸”指的是用作药物或诊断试剂的低聚核苷酸。

[0057] 基于本发明的目的,不考虑给药途径,与不使用本发明所述的纳米微粒治疗的情况相比较,“基因表达的调整”应当广义地理解为包括任何类型基因的下调或上调,尤其是与癌症和炎症相关的基因。

[0058] 基于本发明的目的,与不使用本发明所述的纳米微粒治疗的情况相比较,“抑制目标基因的表达”应当理解为 mRNA 表达或者蛋白质转译的量减少或减弱。这种抑制的适当测

定包括,使用本领域技术人员所知的技术对蛋白质或 mRNA 水平进行检验,例如本领域技术人员所知的斑点印迹、RNA 印迹、原位杂化、ELISA、免疫沉淀反应、酶功能以及表型测定。治疗条件可以通过例如细胞,优选癌细胞或组织内的 mRNA 水平的降低来确认。

[0059] 广义来说,当获得了所期望的反应,就应当认定抑制或者治疗获得了成功。例如,成功的抑制或者治疗可以被定义为获得与肿瘤生长抑制相关的基因的例如 10% 或更高的(具体为 20%、30%、40%)的下调。可选地,当与不使用本发明所述的纳米微粒治疗的情况相比较,成功的治疗可以被定义为癌细胞或组织内致癌基因 mRNA 降低了至少 20% 或优选 30%,甚至是 40% 或者更高(例如 50% 或 80%),包括本领域技术人员所预期的其他临床指标。

[0060] 此外,为了方便起见,说明书中单个术语的使用不受限制。因此,例如涉及由低聚核苷酸、胆固醇类似物、阳离子脂质、可释放融合脂质、PEG 脂质等组成的组合物时,其指的是所述低聚核苷酸、胆固醇类似物、阳离子脂质、可释放融合脂质、PEG 脂质等的一个或多个分子。可以预期的是,低聚核苷酸可以是同一种类或者不同种类的基因。应当理解的是,本发明并不限于此处所揭示的特定构型、处理步骤和材料,这些构型、处理步骤和材料可以适当多样化。

[0061] 还应当理解的是,本发明所用到的技术仅用于描述特定实例,并不受限制,本发明的范围由附加的权利要求书及其等同物来限定。

## 附图说明

[0062] 图 1 图表说明制备实例 6-11 所描述的化合物 6 的反应方案。

[0063] 图 2 图表说明制备实例 12-15 所描述的化合物 10 的反应方案。

## 具体实施方式

[0064] A. 概述

[0065] 1. 式 (I) 的可释放融合脂质

[0066] 根据本发明的一个方面,提供了式 (I) 化合物:

[0067]  $(I) R - (L_1)_a - M - (L_2)_b - Q$

[0068] 其中

[0069] R 是水溶的电中性或者含两性离子的基团;

[0070]  $L_{1-2}$  是单独选择的双功能连接基;

[0071] M 是含亚胺的基团;

[0072] Q 是取代的或者非取代的,饱和或者不饱和的含 C4-30 的基团;

[0073] (a) 是 0 或者正整数,优选为 0 或者从约 1 到约 10(例如 1、2、3、4、5、6) 的整数;以及

[0074] (b) 是 0 或者正整数,优选为 0 或者从约 1 到约 10(例如 1、2、3、4、5、6) 的整数。

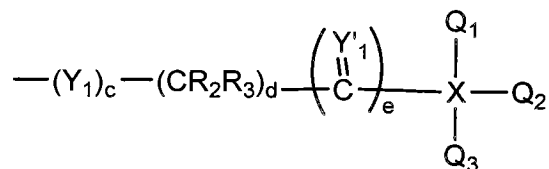
[0075] 当 (a) 和 (b) 等于或大于 2 时, $L_1$  和  $L_2$  分别相同或不同。

[0076] 在一个优选的方面,此处所述分子式的化合物包括 Q 碳氢化合物基团(脂肪族)。

Q 基团具有式 (Ia):

[0077] (Ia)

[0078]



[0079] 其中

[0080]  $Y_1$  和  $Y'_1$  分别为 O、S 或  $NR_4$ , 优选为氧;

[0081] (c) 为 0 或 1;

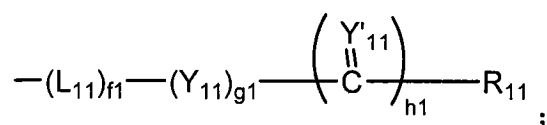
[0082] (d) 为 0 或正整数, 优选为 0 或从约 1 到约 10 (例如 1、2、3、4、5、6) 的整数;

[0083] (e) 为 0 或 1;

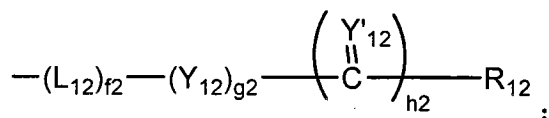
[0084] X 为 C、N 或 P;

[0085]  $Q_1$  为 H、 $C_{1-3}$  烷基、 $NR_5$ 、OH 或

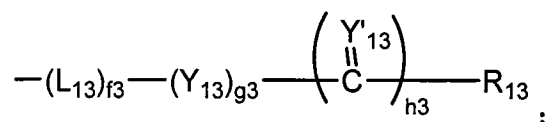
[0086]

[0087]  $Q_2$  为 H、 $C_{1-3}$  烷基、 $NR_6$ 、OH 或

[0088]

[0089]  $Q_3$  为孤电子对、( $=O$ )、H、 $C_{1-3}$  烷基、 $NR_7$ 、OH 或

[0090]



[0091] 假定

[0092] (i) 当 X 为 C,  $Q_3$  不为孤电子对或 ( $=O$ );[0093] (ii) 当 X 为 N,  $Q_3$  为孤电子对; 以及[0094] (iii) 当 X 为 P,  $Q_3$  为 ( $=O$ ) 且 (e) 为 0,

[0095] 其中

[0096]  $L_{11}$ 、 $L_{12}$  和  $L_{13}$  为单独选择的双功能间隔基;[0097]  $Y_{11}$ 、 $Y_{12}$  和  $Y_{13}$  分别为 O、S 或  $NR_8$ , 优选为 O 或  $NR_8$ ;[0098]  $Y'_{11}$ 、 $Y'_{12}$  和  $Y'_{13}$  分别为 O、S 或  $NR_8$ , 优选为氧;[0099]  $R_{11}$ 、 $R_{12}$  和  $R_{13}$  分别为取代的或非取代的, 饱和的或不饱和的  $C_{4-30}$ ;

[0100] (f1)、(f2) 和 (f3) 分别为 0 或 1;

[0101] (g1)、(g2)、(g3) 分别为 0 或 1; 以及

[0102] (h1)、(h2)、(h3) 分别为 0 或 1;

[0103]  $R_{2-3}$  独立地选自氢、羟基、胺、取代的胺、 $C_{1-6}$  烷基、 $C_{2-6}$  烯基、 $C_{2-6}$  炔基、 $C_{3-19}$  支链烷基、 $C_{3-8}$  环烷基、 $C_{1-6}$  取代的烷基、 $C_{2-6}$  取代的烯基、 $C_{2-6}$  取代的炔基、 $C_{3-8}$  取代的环烷基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、 $C_{1-6}$  杂烷基和取代的  $C_{1-6}$  杂烷基, 优选为氢、羟基、

胺、甲基、乙基和丙基；以及

[0104]  $R_{4-8}$  独立地选自氢、 $C_{1-6}$  烷基、 $C_{2-6}$  烯基、 $C_{2-6}$  炔基、 $C_{3-19}$  支链烷基、 $C_{3-8}$  环烷基、 $C_{1-6}$  取代的烷基、 $C_{2-6}$  取代的烯基、 $C_{2-6}$  取代的炔基、 $C_{3-8}$  取代的环烷基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、 $C_{1-6}$  杂烷基和取代的  $C_{1-6}$  杂烷基，优选为氢、甲基、乙基和丙基，

[0105] 假定 Q 包括  $R_{11}$ 、 $R_{12}$  和  $R_{13}$  中的至少一个或两个（例如一个、两个、三个）。

[0106] 在本发明的范围内可以预期的双功能连接基与双功能间隔基的组合，包括那些允许连接基和间隔基的变量和取代基进行组合的组合，由此这些组合形成式 (I) 的稳定化合物。例如，值和取代基的组合不允许氧、氮或羰基直接紧邻亚胺定位。

[0107] 优选地，Q 包括  $R_{11}$ 、 $R_{12}$  和  $R_{13}$  中的至少两个。

[0108] 当 (d) 等于或大于 2 时， $-C(R_2R_3)-$  基在各种情况下相同或者不同。

[0109] 本发明一个优选的方面在于，含亚胺基团具有分子式：

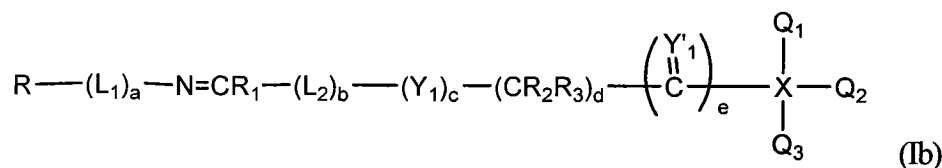
[0110]  $-N=CR_1-$  或  $-CR_1=N-$ ，

[0111] 其中  $R_1$  为氢、 $C_{1-6}$  烷基、 $C_{3-8}$  支链烷基、 $C_{3-8}$  环烷基、 $C_{1-6}$  取代的烷基、 $C_{3-8}$  取代的环烷基、芳基和取代的芳基，优选为氢、甲基、乙基或丙基。

[0112] 在一个实例中，酸不稳定的 M 连接基为  $-N=CH-$  或  $-CH=N-$ 。

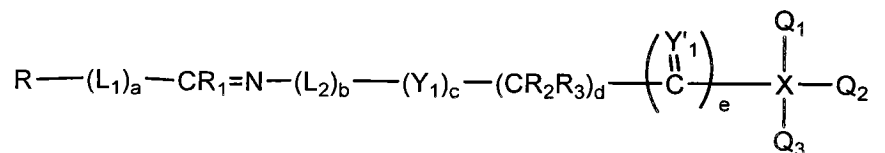
[0113] 根据本发明所述的可释放融合脂质具有式 (Ib) 或 (I' b)：

[0114]



[0115] 或

[0116]



[0117] 2. 水溶的电中性或者含两性离子的基团：R 基团

[0118] 本发明所述的化合物包括末端两性离子。在一个实例中，两性离子包括胺和酸。酸性质子距离所述胺 3 到 8 个原子（例如，所述酸性质子距离所述胺 3、4、5、6、7 或 8 个原子）。优选地，所述酸性质子距离所述胺 3 到 6 个原子。

[0119] 所述酸包括但不限于羧酸、磺酸或磷酸。

[0120] 在进一步的实例中，含两性离子的基团为氨基酸的两性离子形式。R 基的一些说明性实例包括但不限于：

[0121]  $-CH(COO)(NH_3)$ ，

[0122]  $Lys = -HN-(CH_2)_4CH(COO)(NH_3)$ ，

[0123]  $Glu = -C(=O)-(CH_2)_2CH(COO)(NH_3)$  和

[0124]  $Asp = -C(=O)-(CH_2)CH(COO)(NH_3)$ 。

[0125] 在另一实例中，含两性离子的基团为氨基酸的两性离子形式的衍生物。所述氨基酸可以是天然的氨基酸或者天然氨基酸的衍生物。氨基酸类似物和衍生物的一些实例包

括:2-氨基己二酸、3-氨基己二酸、 $\beta$ -丙氨酸、 $\beta$ -氨基丙酸、2-氨基丁酸、4-氨基丁酸、哌啶酸、6-氨基己酸、2-氨基庚酸、2-氨基异丁酸、3-氨基异丁酸、2-氨基庚二酸、2,4-氨基丁酸、锁链素、2,2-二氨基庚二酸、2,3-二氨基丙酸、N-乙基甘氨酸、N-乙基天门冬酰胺、3-羟基脯氨酸、4-羟基脯氨酸、异锁链素、别-异亮氨酸、N-甲基甘氨酸或肌氨酸、N-甲基-异亮氨酸、6-N-甲基赖氨酸、N-甲基缬氨酸、正缬氨酸、正亮氨酸、鸟氨酸、和其他列于 63 Fed. Reg., 29620, 29622 中的物质, 在此引入作为参考, 不再详述。

[0126] 3. 双功能连接基:  $L_1$  和  $L_2$  基团

[0127] 根据本发明, 包括在式 (I) 化合物之中的  $L_1$  基团选自:

[0128]  $-(CR_{21}R_{22})_{t1}-[C(=Y_{16})]_{a3}-$ ,

[0129]  $-(CR_{21}R_{22})_{t1}Y_{17}-(CR_{23}R_{24})_{t2}-(Y_{18})_{a2}-[C(=Y_{16})]_{a3}-$ ,

[0130]  $-(CR_{21}R_{22}CR_{23}R_{24}Y_{17})_{t1}-[C(=Y_{16})]_{a3}-$ ,

[0131]  $-(CR_{21}R_{22}CR_{23}R_{24}Y_{17})_{t1}(CR_{25}R_{26})_{t4}-(Y_{18})_{a2}-[C(=Y_{16})]_{a3}-$ ,

[0132]  $-[(CR_{21}R_{22}CR_{23}R_{24})_{t2}Y_{17}]_{t3}(CR_{25}R_{26})_{t4}-(Y_{18})_{a2}-[C(=Y_{16})]_{a3}-$ ,

[0133]  $-(CR_{21}R_{22})_{t1}-[(CR_{23}R_{24})_{t2}Y_{17}]_{t3}(CR_{25}R_{26})_{t4}-(Y_{18})_{a2}-[C(=Y_{16})]_{a3}-$ ,

[0134]  $-(CR_{21}R_{22})_{t1}(Y_{17})_{a2}[C(=Y_{16})]_{a3}(CR_{23}R_{24})_{t2}-$ ,

[0135]  $-(CR_{21}R_{22})_{t1}(Y_{17})_{a2}[C(=Y_{16})]_{a3}Y_{14}(CR_{23}R_{24})_{t2}-$ ,

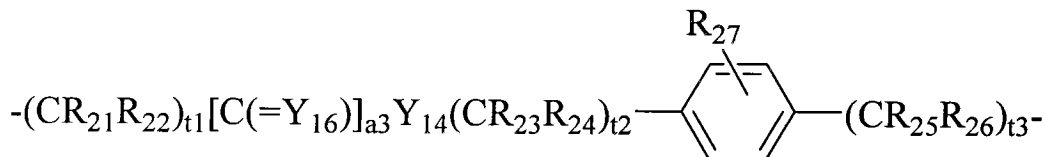
[0136]  $-(CR_{21}R_{22})_{t1}(Y_{17})_{a2}[C(=Y_{16})]_{a3}(CR_{23}R_{24})_{t2}Y_{15}-(CR_{23}R_{24})_{t3}-$ ,

[0137]  $-(CR_{21}R_{22})_{t1}(Y_{17})_{a2}[C(=Y_{16})]_{a3}Y_{14}(CR_{23}R_{24})_{t2}Y_{15}-(CR_{23}R_{24})_{t3}-$ ,

[0138]  $-(CR_{21}R_{22})_{t1}(Y_{17})_{a2}[C(=Y_{16})]_{a3}(CR_{23}R_{24}CR_{25}R_{26}Y_{19})_{t2}(CR_{27}CR_{28})_{t3}-$ ,

[0139]  $-(CR_{21}R_{22})_{t1}(Y_{17})_{a2}[C(=Y_{16})]_{a3}Y_{14}(CR_{23}R_{24}CR_{25}R_{26}Y_{19})_{t2}(CR_{27}CR_{28})_{t3}-$ , 以及

[0140]



[0141] 其中:

[0142]  $Y_{16}$  为 O、 $NR_{28}$  或 S, 优选为氧;

[0143]  $Y_{14-15}$  和  $Y_{17-19}$  分别为 O、 $NR_{29}$  或 S, 优选为 O 或  $NR_{29}$ ;

[0144]  $R_{21-27}$  独立地选自氢、羟基、胺、 $C_{1-6}$  烷基、 $C_{3-12}$  支链烷基、 $C_{3-8}$  环烷基、 $C_{1-6}$  取代的烷基、 $C_{3-8}$  取代的环烷基、芳基、取代的芳基、芳烷基、 $C_{1-6}$  杂芳基、取代的  $C_{1-6}$  杂芳基、 $C_{1-6}$  烷氧基、苯氧基和  $C_{1-6}$  杂烷氧基, 优选为氢、甲基、乙基或丙基; 以及

[0145]  $R_{28-29}$  独立地选自氢、 $C_{1-6}$  烷基、 $C_{3-12}$  支链烷基、 $C_{3-8}$  环烷基、 $C_{1-6}$  取代的烷基、 $C_{3-8}$  取代的环烷基、芳基、取代的芳基、芳烷基、 $C_{1-6}$  杂芳基、取代的  $C_{1-6}$  杂芳基、 $C_{1-6}$  烷氧基、苯氧基和  $C_{1-6}$  杂烷氧基, 优选为氢、甲基、乙基或丙基;

[0146]  $(t1)$ 、 $(t2)$ 、 $(t3)$  和  $(t4)$  分别为 0 或正整数, 优选为 0 或从约 1 到约 10 (例如 1、2、3、4、5、6) 的正整数; 以及

[0147]  $(a2)$  和  $(a3)$  分别为 0 或 1。

[0148] 在本发明的范围内可以预期的双功能  $L_1$  连接基, 包括那些允许取代基和变量进行组合的连接基, 由此这些组合形成式 (I) 的稳定化合物。例如, 当  $(a3)$  为 0 时,  $Y_{17}$  不直接与  $Y_{14}$  相连。

[0149] 基于本发明的目的,当双功能连接基的值是等于或大于 2 的正整数时,可以使用相同或不同的双功能连接基。

[0150] 当 (t1)、(t2)、(t3) 和 (t4) 都分别等于或大于 2 时,  $R_{21}$ - $R_{28}$  在各种情况下分别相同或不同。

[0151] 在一个实例中,  $Y_{14-15}$  和  $Y_{17-19}$  为 0 或 NH;  $R_{21-29}$  分别为氢或甲基。

[0152] 在另一个实例中,  $Y_{16}$  为 0;  $Y_{14-15}$  和  $Y_{17-19}$  为 0 或 NH;  $R_{21-29}$  为氢。

[0153] 在某些实例中,  $L_1$  独立地选自:

[0154]  $-(CH_2)_{t1}-[C(=O)]_{a3}-$ ,

[0155]  $-(CH_2)_{t1}Y_{17}-(CH_2)_{t2}-(Y_{18})_{a2}-[C(=O)]_{a3}-$ ,

[0156]  $-(CH_2CH_2Y_{17})_{t1}-[C(=O)]_{a3}-$ ,

[0157]  $-(CH_2CH_2Y_{17})_{t1}(CH_2)_{t4}-(Y_{18})_{a2}-[C(=O)]_{a3}-$ ,

[0158]  $-[(CH_2CH_2)_{t2}Y_{17}]_{t3}(CH_2)_{t4}-(Y_{18})_{a2}-[C(=O)]_{a3}-$ ,

[0159]  $-(CH_2)_{t1}-[(CH_2)_{t2}Y_{17}]_{t3}(CH_2)_{t4}-(Y_{18})_{a2}-[C(=O)]_{a3}-$ ,

[0160]  $-(CH_2)_{t1}(Y_{17})_{a2}[C(=O)]_{a3}(CH_2)_{t2}-$ ,

[0161]  $-(CH_2)_{t1}(Y_{17})_{a2}[C(=O)]_{a3}Y_{14}(CH_2)_{t2}-$ ,

[0162]  $-(CH_2)_{t1}(Y_{17})_{a2}[C(=O)]_{a3}(CH_2)_{t2}-Y_{15}-(CH_2)_{t3}-$ ,

[0163]  $-(CH_2)_{t1}(Y_{17})_{a2}[C(=O)]_{a3}Y_{14}(CH_2)_{t2}-Y_{15}-(CH_2)_{t3}-$ ,

[0164]  $-(CH_2)_{t1}(Y_{17})_{a2}[C(=O)]_{a3}(CH_2CH_2Y_{19})_{t2}(CH_2)_{t3}-$ , 以及

[0165]  $-(CH_2)_{t1}(Y_{17})_{a2}[C(=O)]_{a3}Y_{14}(CH_2CH_2Y_{19})_{t2}(CH_2)_{t3}-$ ,

[0166] 其中

[0167]  $Y_{14-15}$  和  $Y_{17-19}$  分别为 0 或 NH;

[0168] (t1)、(t2)、(t3) 和 (t4) 分别为 0 或正整数,优选为 0 或从约 1 到约 10(例如 1、2、3、4、5、6) 的正整数;以及

[0169] (a2) 和 (a3) 分别为 0 或 1。

[0170] 当 (t1) 或 (t3) 等于或大于 2 时,  $Y_{17}$  在各种情况下相同或不同。

[0171] 当 (t2) 等于或大于 2 时,  $Y_{17}$  在各种情况下相同或不同。

[0172] 在进一步的实例和 / 或可选的实例中,  $L_1$  基的说明性实例选自:

[0173]  $-CH_2-$ ,  $-(CH_2)_2-$ ,  $-(CH_2)_3-$ ,  $-(CH_2)_4-$ ,  $-(CH_2)_5-$ ,  $-(CH_2)_6-$ ,  $-NH(CH_2)-$ ,

[0174]  $-CH(NH_2)CH_2-$ ,

[0175]  $-(CH_2)_4-C(=O)-$ ,  $-(CH_2)_5-C(=O)-$ ,  $-(CH_2)_6-C(=O)-$ ,

[0176]  $-CH_2CH_2O-CH_2O-C(=O)-$ ,

[0177]  $-(CH_2CH_2O)_2-CH_2O-C(=O)-$ ,

[0178]  $-(CH_2CH_2O)_3-CH_2O-C(=O)-$ ,

[0179]  $-(CH_2CH_2O)_2-C(=O)-$ ,

[0180]  $-CH_2CH_2O-CH_2CH_2NH-C(=O)-$ ,

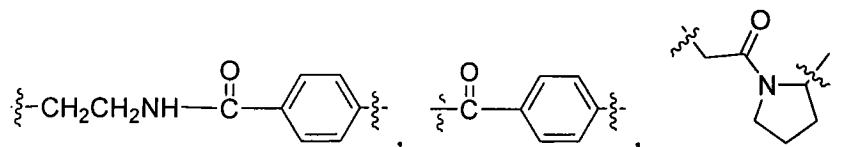
[0181]  $-(CH_2CH_2O)_2-CH_2CH_2NH-C(=O)-$ ,

[0182]  $-CH_2-O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2NH-C(=O)-$ ,

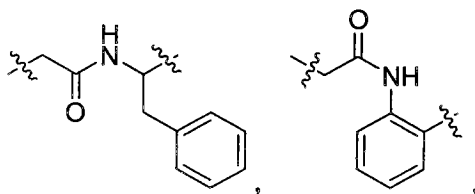
[0183]  $-CH_2-O-(CH_2CH_2O)_2-CH_2CH_2NH-C(=O)-$ ,

[0184]  $-CH_2-O-CH_2CH_2O-CH_2C(=O)-$ ,

- [0185]  $-\text{CH}_2-\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2-\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-$ ,  
 [0186]  $-(\text{CH}_2)_4-\text{C}(=\text{O})\text{NH}-$ ,  $-(\text{CH}_2)_5-\text{C}(=\text{O})\text{NH}-$ ,  
 [0187]  $-(\text{CH}_2)_6-\text{C}(=\text{O})\text{NH}-$ ,  
 [0188]  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-$ ,  
 [0189]  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2-\text{CH}_2\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-$ ,  
 [0190]  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_3-\text{CH}_2\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-$ ,  
 [0191]  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-$ ,  
 [0192]  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-$ ,  
 [0193]  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-$ ,  
 [0194]  $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-$ ,  
 [0195]  $-\text{CH}_2-\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-$ ,  
 [0196]  $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-$ ,  
 [0197]  $-\text{CH}_2-\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2-\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-$ ,  
 [0198]  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2-$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{O}-$ ,  
 [0199]  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$ ,  
 [0200]  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_3-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$ ,  
 [0201]  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$ ,  
 [0202]  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$ ,  
 [0203]  $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$ ,  
 [0204]  $-\text{CH}_2-\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$ ,  
 [0205]  $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ ,  
 [0206]  $-\text{CH}_2-\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2-$ ,  
 [0207]

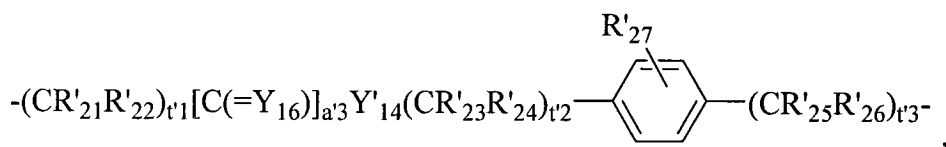


[0208]



- [0209]  $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_2-$ ,  $-\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_2-$ ,  
 [0210]  $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_3-$ ,  $-\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_3-$ ,  
 [0211]  $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_4-$ ,  $-\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_4-$ ,  
 [0212]  $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_5-$ ,  $-\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_5-$ ,  
 [0213]  $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_6-$ ,  $-\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_6-$ ,  
 [0214]  $-\text{C}(=\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_2-$ ,  $-\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_2-$ ,  
 [0215]  $-\text{C}(=\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_3-$ ,  $-\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_3-$ ,  
 [0216]  $-\text{C}(=\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_4-$ ,  $-\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_4-$ ,

- [0217]  $-\text{C}(=\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_5-, -\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_5-,$
- [0218]  $-\text{C}(=\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_6-, -\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_6-,$
- [0219]  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{NHC}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_2-,$
- [0220]  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{NHC}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_3-,$
- [0221]  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{NHC}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_4-,$
- [0222]  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{NHC}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_5-,$
- [0223]  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{NHC}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_6-,$
- [0224]  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{NHC}(=\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_2-,$
- [0225]  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{NHC}(=\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_3-,$
- [0226]  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{NHC}(=\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_4-,$
- [0227]  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{NHC}(=\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_5-,$
- [0228]  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{NHC}(=\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_6-,$
- [0229]  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{NHC}(=\text{O})(\text{CH}_2)_2-,$
- [0230]  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{NHC}(=\text{O})(\text{CH}_2)_3-,$
- [0231]  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{NHC}(=\text{O})(\text{CH}_2)_4-,$
- [0232]  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{NHC}(=\text{O})(\text{CH}_2)_5-,$  以及
- [0233]  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{NHC}(=\text{O})(\text{CH}_2)_6-。$
- [0234] 在某些实例中,  $\text{L}_2$  独立地选自:
- [0235]  $-(\text{CR}'_{21}\text{R}'_{22})_{\text{t}'1}-[\text{C}(=\text{Y}'_{16})]_{\text{a}'3}(\text{CR}'_{27}\text{CR}'_{28})_{\text{t}'2-},$
- [0236]  $-(\text{CR}'_{21}\text{R}'_{22})_{\text{t}'1}\text{Y}'_{14}-(\text{CR}'_{23}\text{R}'_{24})_{\text{t}'2}-(\text{Y}'_{15})_{\text{a}'2}-[\text{C}(=\text{Y}'_{16})]_{\text{a}'3}(\text{CR}'_{27}\text{CR}'_{28})_{\text{t}'3-},$
- [0237]  $-(\text{CR}'_{21}\text{R}'_{22}\text{CR}'_{23}\text{R}'_{24}\text{Y}'_{14})_{\text{t}'1}-[\text{C}(=\text{Y}'_{16})]_{\text{a}'3}(\text{CR}'_{27}\text{CR}'_{28})_{\text{t}'2-},$
- [0238]  $-(\text{CR}'_{21}\text{R}'_{22}\text{CR}'_{23}\text{R}'_{24}\text{Y}'_{14})_{\text{t}'1}(\text{CR}'_{25}\text{R}'_{26})_{\text{t}'2}-(\text{Y}'_{15})_{\text{a}'2}-[\text{C}(=\text{Y}'_{16})]_{\text{a}'3}(\text{CR}'_{27}\text{CR}'_{28})_{\text{t}'3-},$
- [0239]  $-[(\text{CR}'_{21}\text{R}'_{22}\text{CR}'_{23}\text{R}'_{24})_{\text{t}'2}\text{Y}'_{14}]_{\text{t}'1}(\text{CR}'_{25}\text{R}'_{26})_{\text{t}'2}-(\text{Y}'_{15})_{\text{a}'2}-[\text{C}(=\text{Y}'_{16})]_{\text{a}'3}(\text{CR}'_{27}\text{CR}'_{28})_{\text{t}'3-},$
- [0240]  $-(\text{CR}'_{21}\text{R}'_{22})_{\text{t}'1}-[(\text{CR}'_{23}\text{R}'_{24})_{\text{t}'2}\text{Y}'_{14}]_{\text{t}'2}(\text{CR}'_{25}\text{R}'_{26})_{\text{t}'3}-(\text{Y}'_{15})_{\text{a}'2}-[\text{C}(=\text{Y}'_{16})]_{\text{a}'3}(\text{CR}'_{27}\text{CR}'_{28})_{\text{t}'4-}$
- [0241]  $-(\text{CR}'_{21}\text{R}'_{22})_{\text{t}'1}(\text{Y}'_{14})_{\text{a}'2}[\text{C}(=\text{Y}'_{16})]_{\text{a}'3}(\text{CR}'_{23}\text{R}'_{24})_{\text{t}'2-},$
- [0242]  $-(\text{CR}'_{21}\text{R}'_{22})_{\text{t}'1}(\text{Y}'_{14})_{\text{a}'2}[\text{C}(=\text{Y}'_{16})]_{\text{a}'3}\text{Y}'_{15}(\text{CR}'_{23}\text{R}'_{24})_{\text{t}'2-},$
- [0243]  $-(\text{CR}'_{21}\text{R}'_{22})_{\text{t}'1}(\text{Y}'_{14})_{\text{a}'2}[\text{C}(=\text{Y}'_{16})]_{\text{a}'3}(\text{CR}'_{23}\text{R}'_{24})_{\text{t}'2}-\text{Y}'_{15}-(\text{CR}'_{23}\text{R}'_{24})_{\text{t}'3-},$
- [0244]  $-(\text{CR}'_{21}\text{R}'_{22})_{\text{t}'1}(\text{Y}'_{14})_{\text{a}'2}[\text{C}(=\text{Y}'_{16})]_{\text{a}'3}\text{Y}'_{14}(\text{CR}'_{23}\text{R}'_{24})_{\text{t}'2}-\text{Y}'_{15}-(\text{CR}'_{23}\text{R}'_{24})_{\text{t}'3-},$
- [0245]  $-(\text{CR}'_{21}\text{R}'_{22})_{\text{t}'1}(\text{Y}'_{14})_{\text{a}'2}[\text{C}(=\text{Y}'_{16})]_{\text{a}'3}(\text{CR}'_{23}\text{R}'_{24}\text{CR}'_{25}\text{R}'_{26}\text{Y}'_{15})_{\text{t}'2}(\text{CR}'_{27}\text{CR}'_{28})_{\text{t}'3-},$
- [0246]  $-(\text{CR}'_{21}\text{R}'_{22})_{\text{t}'1}(\text{Y}'_{14})_{\text{a}'2}[\text{C}(=\text{Y}'_{16})]_{\text{a}'3}\text{Y}'_{17}(\text{CR}'_{23}\text{R}'_{24}\text{CR}'_{25}\text{R}'_{26}\text{Y}'_{15})_{\text{t}'2}(\text{CR}'_{27}\text{CR}'_{28})_{\text{t}'3-},$  以及
- [0247]



[0248] 其中：

[0249]  $Y'_{16}$  为 O、 $NR'_{28}$  或 S，优选为氧；

[0250]  $Y'_{14-15}$  和  $Y'_{17}$  分别为 O、 $NR'_{29}$  或 S，优选为 O 或  $NR'_{29}$ ；

[0251]  $R'_{21-27}$  独立地选自氢、羟基、胺、 $C_{1-6}$  烷基、 $C_{3-12}$  支链烷基、 $C_{3-8}$  环烷基、 $C_{1-6}$  取代的烷基、 $C_{3-8}$  取代的环烷基、芳基、取代的芳基、芳烷基、 $C_{1-6}$  杂芳基、取代的  $C_{1-6}$  杂芳基、 $C_{1-6}$  烷氧基、苯氧基和  $C_{1-6}$  杂烷氧基，优选为氢、甲基、乙基或丙基；以及

[0252]  $R'_{28-29}$  独立地选自氢、 $C_{1-6}$  烷基、 $C_{3-12}$  支链烷基、 $C_{3-8}$  环烷基、 $C_{1-6}$  取代的烷基、 $C_{3-8}$  取代的环烷基、芳基、取代的芳基、芳烷基、 $C_{1-6}$  杂芳基、取代的  $C_{1-6}$  杂芳基、 $C_{1-6}$  烷氧基、苯氧基和  $C_{1-6}$  杂烷氧基，优选为氢、甲基、乙基或丙基；

[0253]  $(t'1)$ 、 $(t'2)$ 、 $(t'3)$  和  $(t'4)$  分别为 0 或正整数，优选为 0 或从约 1 到约 10（例如 1、2、3、4、5、6）的正整数；以及

[0254]  $(a'2)$  和  $(a'3)$  分别为 0 或 1。

[0255] 在本发明的范围内可以预期的双功能  $L_2$  连接基，包括那些允许连接基的变量和取代基进行组合的连接基，由此这些组合形成式 (I) 的稳定化合物。例如，当  $(a'3)$  为 0 时， $Y'_{14}$  不直接与  $Y'_{14}$  或  $Y'_{17}$  相连。

[0256] 基于本发明的目的，当包括可释放连接基的双功能  $L_2$  连接基的值是等于或大于 2 的正整数时，可以使用相同或不同的双功能连接基。

[0257] 在一个实例中， $Y'_{14-15}$  和  $Y'_{17}$  为 O 或 NH； $R'_{21-29}$  分别为氢或甲基。

[0258] 在另一个实例中， $Y'_{16}$  为 O； $Y'_{14-15}$  和  $Y'_{17}$  为 O 或 NH； $R'_{21-29}$  为氢。

[0259] 在某些实例中， $L_2$  选自：

[0260]  $-(CH_2)_{t'1}-[C(=O)]_{a'3}(CH_2)_{t'2}-$

[0261]  $-(CH_2)_{t'1}Y'_{14}-(CH_2)_{t'2}-(Y'_{15})_{a'2}-[C(=O)]_{a'3}(CH_2)_{t'3}-$

[0262]  $-(CH_2CH_2Y'_{14})_{t'1}-[C(=O)]_{a'3}(CH_2)_{t'2}-$

[0263]  $-(CH_2CH_2Y'_{14})_{t'1}(CH_2)_{t'2}-(Y'_{15})_{a'2}-[C(=O)]_{a'3}(CH_2)_{t'3}-$

[0264]  $-[(CH_2CH_2)_{t'2}Y'_{14}]_{t'1}(CH_2)_{t'2}-(Y'_{15})_{a'2}-[C(=O)]_{a'3}(CH_2)_{t'3}-$

[0265]  $-(CH_2)_{t'1}-[(CH_2)_{t'2}Y'_{14}]_{t'2}(CH_2)_{t'3}-(Y'_{15})_{a'2}-[C(=O)]_{a'3}(CH_2)_{t'4}-$

[0266]  $-(CH_2)_{t'1}(Y'_{14})_{a'2}[C(=O)]_{a'3}(CH_2)_{t'2}-$

[0267]  $-(CH_2)_{t'1}(Y'_{14})_{a'2}[C(=O)]_{a'3}Y'_{15}(CH_2)_{t'2}-$

[0268]  $-(CH_2)_{t'1}(Y'_{14})_{a'2}[C(=O)]_{a'3}(CH_2)_{t'2}-Y'_{15}-(CH_2)_{t'3}-$

[0269]  $-(CH_2)_{t'1}(Y'_{14})_{a'2}[C(=O)]_{a'3}Y'_{14}(CH_2)_{t'2}-Y'_{15}-(CH_2)_{t'3}-$

[0270]  $-(CH_2)_{t'1}(Y'_{14})_{a'2}[C(=O)]_{a'3}(CH_2CH_2Y'_{15})_{t'2}(CH_2)_{t'3}-$ , and

[0271]  $-(CH_2)_{t'1}(Y'_{14})_{a'2}[C(=O)]_{a'3}Y'_{17}(CH_2CH_2Y'_{15})_{t'2}(CH_2)_{t'3}-$

[0272] 其中

[0273]  $Y'_{14-15}$  和  $Y'_{17}$  分别为 O 或 NH；

[0274]  $(t'1)$ 、 $(t'2)$ 、 $(t'3)$  和  $(t'4)$  分别为 0 或正整数，优选为 0 或从约 1 到约 10（例如 1、2、3、4、5、6）的正整数；以及

[0275]  $(a'2)$  和  $(a'3)$  分别为 0 或 1。

[0276] 当  $(t'1)$  或  $(t'2)$  等于或大于 2 时， $Y'_{14}$  在各种情况下相同或不同。

[0277] 当  $(t'2)$  等于或大于 2 时， $Y'_{15}$  在各种情况下相同或不同。

[0278] 在进一步的实例和 / 或可选的实例中,  $L_2$  基的说明性实例选自:

[0279]  $-\text{CH}_2-$ ,  $-(\text{CH}_2)_2-$ ,  $-(\text{CH}_2)_3-$ ,  $-(\text{CH}_2)_4-$ ,  $-(\text{CH}_2)_5-$ ,  $-(\text{CH}_2)_6-$ ,  $-\text{NH}(\text{CH}_2)-$ ,

[0280]  $-\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CH}_2-$ ,

[0281]  $-\text{O}(\text{CH}_2)_2-$ ,  $-\text{C}(=\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_3-$ ,  $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_3-$ ,

[0282]  $-\text{C}(=\text{O})(\text{CH}_2)_2-$ ,  $-\text{C}(=\text{O})(\text{CH}_2)_3-$ ,

[0283]  $-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{O}(\text{CH}_2)_3-$ ,

[0284]  $-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}(\text{CH}_2)_3-$ ,

[0285]  $-\text{CH}_2-\text{OC}(=\text{O})-\text{O}(\text{CH}_2)_3-$ ,

[0286]  $-\text{CH}_2-\text{OC}(=\text{O})-\text{NH}(\text{CH}_2)_3-$ ,

[0287]  $-(\text{CH}_2)_2-\text{C}(=\text{O})-\text{O}(\text{CH}_2)_3-$ ,

[0288]  $-(\text{CH}_2)_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}(\text{CH}_2)_3-$ ,

[0289]  $-\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-$ ,

[0290]  $-\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-$ ,

[0291]  $-(\text{CH}_2)_2\text{C}(=\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-$ ,

[0292]  $-(\text{CH}_2)_2\text{C}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-$ ,

[0293]  $-\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ,

[0294]  $-(\text{CH}_2)_2\text{C}(=\text{O})\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ,

[0295]  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2-$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{O}-$ .

[0296]  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$ ,  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_3-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$ ,

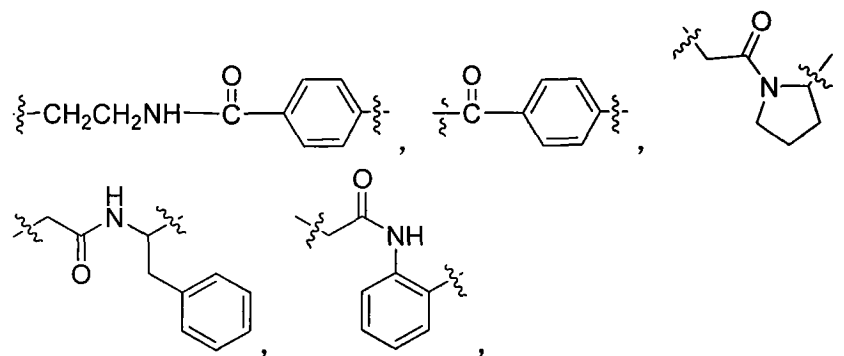
[0297]  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$ ,

[0298]  $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$ ,

[0299]  $-\text{CH}_2-\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$ ,

[0300]  $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2-$ ,

[0301]



[0302]  $-(\text{CH}_2)_2\text{NHC}(=\text{O})-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2-$ ,

[0303]  $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_2-$ ,  $-\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_2-$ ,

[0304]  $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_3-$ ,  $-\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_3-$ ,

[0305]  $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_4-$ ,  $-\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_4-$ ,

[0306]  $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_5-$ ,  $-\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_5-$ ,

[0307]  $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_6-$ ,  $-\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_6-$ ,

[0308]  $-\text{C}(=\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_2-$ ,  $-\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_2-$ ,

[0309]  $-\text{C}(=\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_3-$ ,  $-\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_3-$ ,

- [0310]  $-\text{C}(=\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_4-$ ,  $-\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_4-$ ,  
[0311]  $-\text{C}(=\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_5-$ ,  $-\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_5-$ ,  
[0312]  $-\text{C}(=\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_6-$ ,  $-\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_6-$ ,  
[0313]  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{NHC}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_2-$ ,  
[0314]  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{NHC}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_3-$ ,  
[0315]  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{NHC}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_4-$ ,  
[0316]  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{NHC}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_5-$ ,  
[0317]  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{NHC}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_6-$ ,  
[0318]  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{NHC}(=\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_2-$ ,  
[0319]  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{NHC}(=\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_3-$ ,  
[0320]  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{NHC}(=\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_4-$ ,  
[0321]  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{NHC}(=\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_5-$ ,  
[0322]  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{NHC}(=\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_6-$ ,  
[0323]  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{NHC}(=\text{O})(\text{CH}_2)_2-$ ,  
[0324]  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{NHC}(=\text{O})(\text{CH}_2)_3-$ ,  
[0325]  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{NHC}(=\text{O})(\text{CH}_2)_4-$ ,  
[0326]  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{NHC}(=\text{O})(\text{CH}_2)_5-$ , 以及  
[0327]  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{NHC}(=\text{O})(\text{CH}_2)_6-$ 。

[0328] 在进一步的实例中, 双功能连接基  $L_1$  和  $L_2$  可以是具有取代的饱和或不饱和的、支链的或直链的  $\text{C}_{3-50}$  烷基 (具体为  $\text{C}_{3-40}$  烷基、 $\text{C}_{3-20}$  烷基、 $\text{C}_{3-15}$  烷基、 $\text{C}_{3-10}$  烷基等), 其中可选地一个或多个碳被  $\text{NR}_6$ 、 $\text{O}$ 、 $\text{S}$  或  $\text{C}(=\text{Y})$  (优选为  $\text{O}$  或  $\text{NH}$ ) 替换, 但被替换的碳不超过 70% (具体为少于 65%、50%、40%、30%、20%、10%)。4. 双功能间隔基:  $L_{11}$ 、 $L_{12}$  和  $L_{13}$  基

[0329] 根据本发明, 双功能间隔基  $L_{11-13}$  分别选自:

[0330]  $-(\text{CR}_{31}\text{R}_{32})_{q1}-$ ; 以及

[0331]  $-\text{Y}_{26}(\text{CR}_{31}\text{R}_{32})_{q1}-$ ,

[0332] 其中:

[0333]  $\text{Y}_{26}$  为  $\text{O}$ 、 $\text{NR}_{33}$  或  $\text{S}$ , 优选为氧或  $\text{NR}_{33}$ ;

[0334]  $\text{R}_{31-32}$  独立地选自氢、羟基、 $\text{C}_{1-6}$  烷基、 $\text{C}_{3-12}$  支链烷基、 $\text{C}_{3-8}$  环烷基、 $\text{C}_{1-6}$  取代的烷基、 $\text{C}_{3-8}$  取代的环烷基、 $\text{C}_{1-6}$  杂烷基、取代的  $\text{C}_{1-6}$  杂烷基、 $\text{C}_{1-6}$  烷氧基、苯氧基和  $\text{C}_{1-6}$  杂烷氧基, 优选为氢、甲基、乙基或丙基;

[0335]  $\text{R}_{33}$  独立地选自氢、羟基、 $\text{C}_{1-6}$  烷基、 $\text{C}_{3-12}$  支链烷基、 $\text{C}_{3-8}$  环烷基、 $\text{C}_{1-6}$  取代的烷基、 $\text{C}_{3-8}$  取代的环烷基、 $\text{C}_{1-6}$  杂烷基、取代的  $\text{C}_{1-6}$  杂烷基、 $\text{C}_{1-6}$  烷氧基、苯氧基和  $\text{C}_{1-6}$  杂烷氧基, 优选为氢、甲基、乙基或丙基; 以及

[0336] ( $q1$ ) 为 0 或正整数, 优选为 0 或从约 1 到约 10 (例如 1、2、3、4、5、6) 的整数。

[0337] 在本发明的范围内可以预期的双功能连接基, 包括那些允许取代基和变量进行组合的连接基, 由此这些组合形成式 (I) 的稳定化合物。

[0338] 当 ( $q1$ ) 等于或大于 2 时,  $\text{R}_{31}$  和  $\text{R}_{32}$  在各种情况下分别相同或者不同。

[0339] 在一个优选的实例中,  $\text{R}'_{31-33}$  为氢或甲基。

[0340] 在某些优选的实例中,  $\text{R}_{31-32}$  为氢或甲基;  $\text{Y}_{26}$  为  $\text{O}$  或  $\text{NH}$ 。

[0341] 当 (q1) 等于或大于 2 时, C(R<sub>31</sub>)(R<sub>32</sub>) 基团相同或者不同。

[0342] 在进一步的和 / 或可选的实例中, L<sub>11-13</sub> 独立地选自 :

[0343] -CH<sub>2</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-,

[0344] -O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-, -O(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-, -O(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-, -O(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-, -O(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-, CH(OH)-,

[0345] -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-,

[0346] -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-,

[0347] -C(=O)O(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-, -C(=O)NH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-,

[0348] -C(=O)(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-, -C(=O)(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-,

[0349] -CH<sub>2</sub>-C(=O)-O(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-,

[0350] -CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-,

[0351] -CH<sub>2</sub>-OC(=O)-O(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-,

[0352] -CH<sub>2</sub>-OC(=O)-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-,

[0353] -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-C(=O)-O(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-,

[0354] -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-C(=O)-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-,

[0355] -CH<sub>2</sub>C(=O)O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-,

[0356] -CH<sub>2</sub>C(=O)NH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-,

[0357] -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>C(=O)O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-,

[0358] -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>C(=O)NH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-,

[0359] -CH<sub>2</sub>C(=O)O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, 以及

[0360] -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>C(=O)O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-。

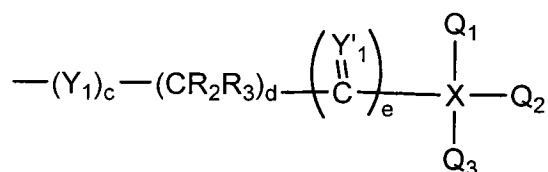
[0361] 5. Q 基

[0362] 根据本发明, Q 基包含一个或多个取代的或非取代的、饱和的或不饱和的含 C4-30 的基团。Q 基包括一个或多个 C4-30 脂肪族饱和的或不饱和的碳氢化合物。

[0363] Q 基由分子式 (Ia) 表示 :

[0364] (Ia)

[0365]

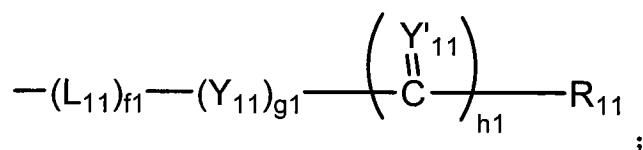


[0366] 其中

[0367] X 为 C、N 或 P ;

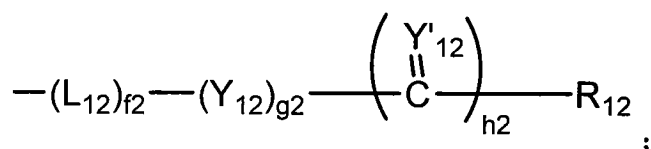
[0368] Q<sub>1</sub> 为 H、C<sub>1-3</sub> 烷基、NR<sub>5</sub>、OH 或

[0369]



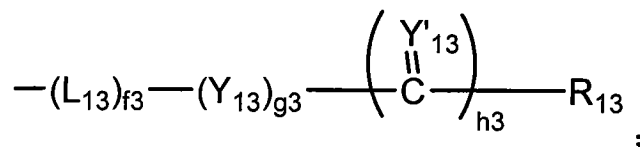
[0370] Q<sub>2</sub> 为 H、C<sub>1-3</sub> 烷基、NR<sub>6</sub>、OH 或

[0371]



[0372]  $Q_3$  为孤电子对、( = O)、H、 $C_{1-3}$  烷基、 $NR_7$ 、OH 或

[0373]



[0374]  $L_{11}$ 、 $L_{12}$  和  $L_{13}$  为独立地选择的间隔基；

[0375]  $Y_{11}$ 、 $Y'_{11}$ 、 $Y_{12}$ 、 $Y'_{12}$ 、 $Y_{13}$  和  $Y'_{13}$  分别为 O、S 或  $NR_8$ ；

[0376]  $R_{11}$ 、 $R_{12}$  和  $R_{13}$  分别为（取代的或非取代的）饱和的或不饱和的  $C_{4-30}$ ；以及

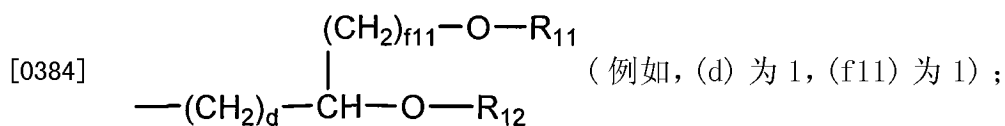
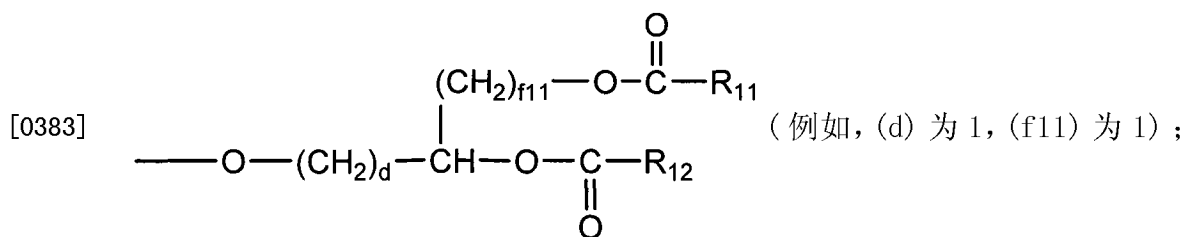
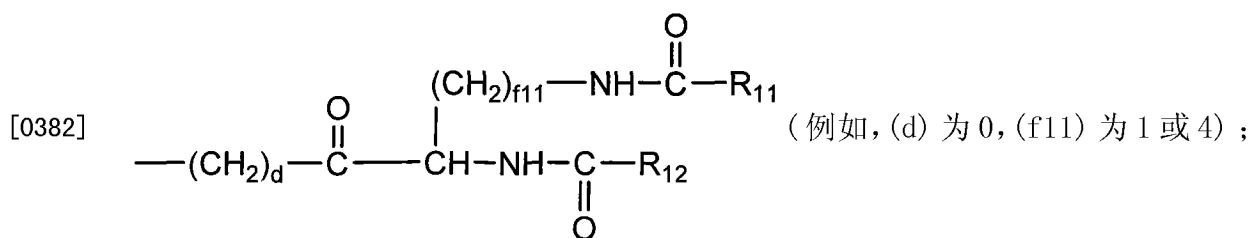
[0377] 所有其他变量如上述定义，

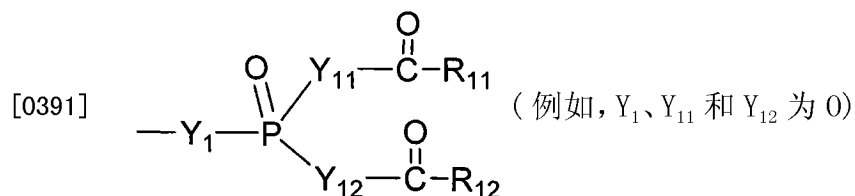
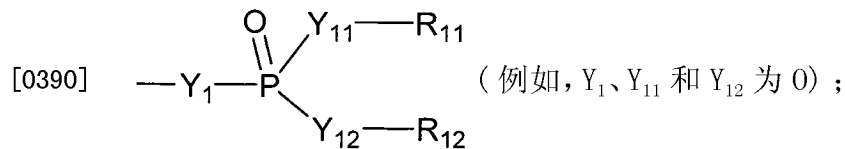
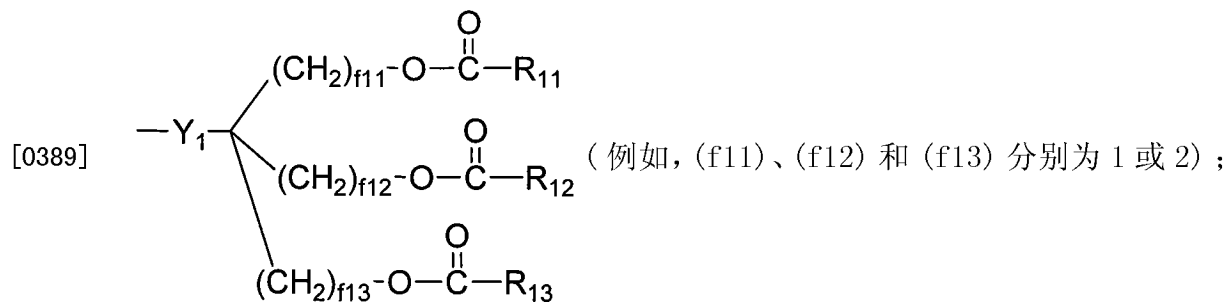
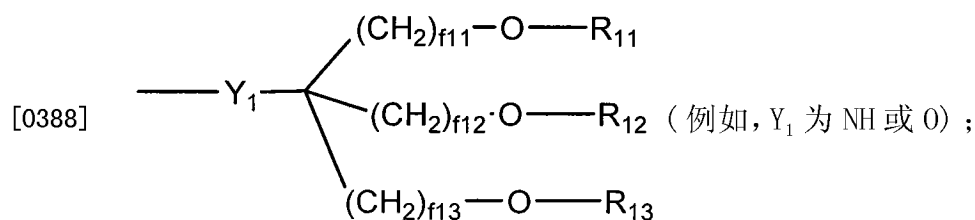
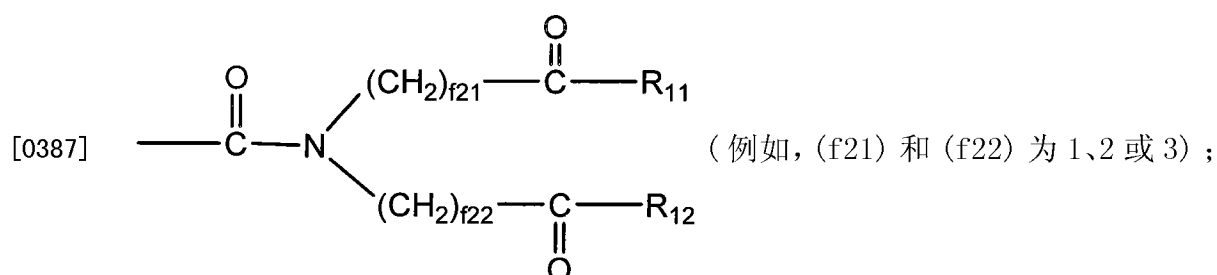
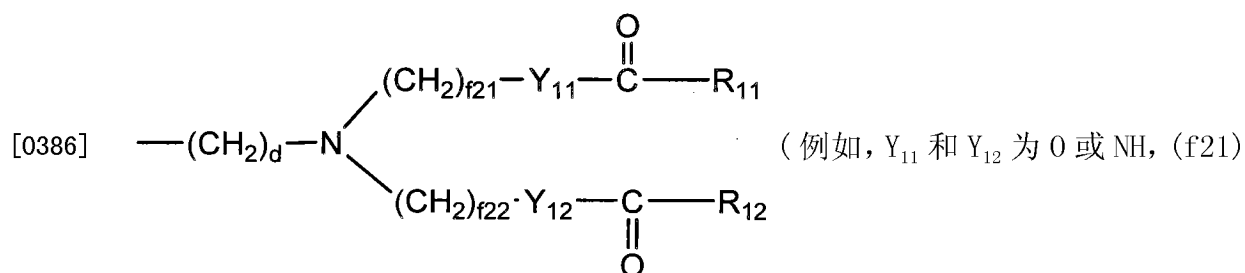
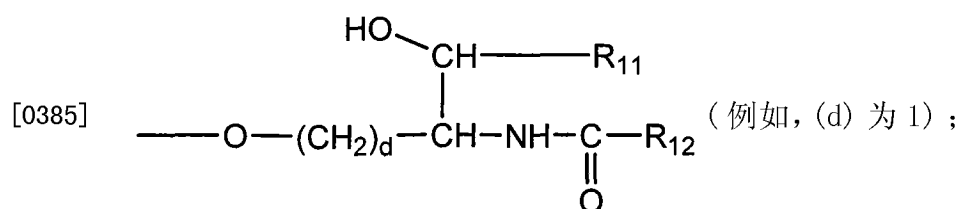
[0378] 假定 Q 包括  $R_{11}$ 、 $R_{12}$  和  $R_{13}$  中的至少一个或两个。

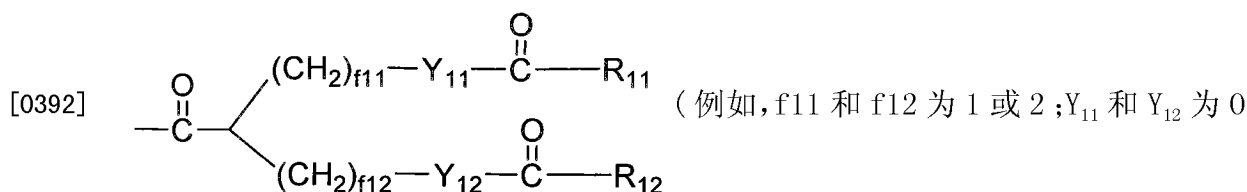
[0379] 在一个优选的实例中， $R_{11}$ 、 $R_{12}$  和  $R_{13}$  分别包括 C4-30 饱和的或不饱和的脂肪族碳氢化合物。更加优选地，脂肪族碳氢化合物均为饱和的或不饱和的 C8-24 碳氢化合物（进一步优选地，C12-22 碳氢化合物：C12-22 烷基、C12-22 烯基、C12-22 烷氧基）。脂肪族碳氢化合物的实例包括但不限于，月桂酰（C12）、肉豆蔻酰（C14）、棕榈酰（C16）、硬脂酰（C18）、油酰（C18）和芥酰（C22）；饱和的或不饱和的 C12 烷氧基、C14 烷氧基、C16 烷氧基、C18 烷氧基、C20 烷氧基和 C22 烷氧基；以及，饱和的或不饱和的 C12 烷基、C14 烷基、C16 烷基、C18 烷基、C20 烷基和 C22 烷基。

[0380] 优选地， $R_{11}$ 、 $R_{12}$  和  $R_{13}$  中的至少两个分别包括饱和的或不饱和的 C8-24 碳氢化合物（更加优选地，C12-22 碳氢化合物）。

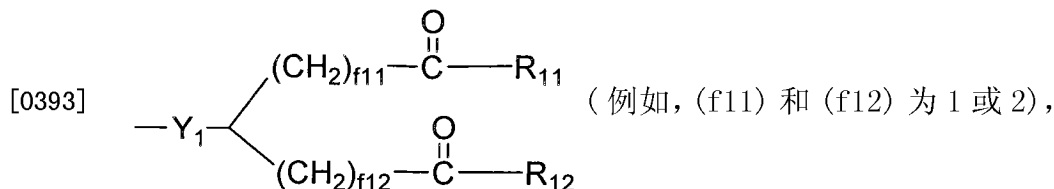
[0381] Q 基的一些实例由如下分子式表示：







或 NH) 以及



[0394] 其中,

[0395] Y1 为 O、S 或 NR31, 优选为氧或 NH;

[0396] R11、R12 和 R13 分别为取代的或非取代的、饱和的或不饱和的 C4-30 (烷基、烯基、烷氧基);

[0397] R31 为氢、甲基或乙基;

[0398] (d) 为 0 或正整数, 优选为 0 或从约 1 到约 10 (例如 1、2、3、4、5、6) 的整数。

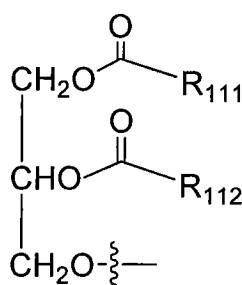
[0399] (f11)、(f12) 和 (f13) 分别为 0、1、2、3 或 4; 以及

[0400] (f21) 和 (f22) 分别为 1、2、3 或 4。

[0401] 在某些实例中, Q 基包括二酰甘油、二酰咪唑双酰胺、二烷丙基、磷脂酰乙醇胺或神经酰胺。适宜的二酰甘油或二酰咪唑双酰胺包括二酰甘油或二酰咪唑双酰胺基, 所述二酰甘油或二酰咪唑双酰胺基具有分别包含约 C4 到约 C30, 优选约 C8 到约 C24, 饱和的或不饱和的碳原子的烷基链长度。二酰甘油或二酰咪唑双酰胺基可以进一步包括一个或多个取代的烷基。

[0402] 本发明使用的术语“二酰甘油”(DAG) 指的是具有两个脂酰链, R111 和 R112。R11 和 R12 具有相同或不同的约 4 到 30 个碳 (优选为约 8 到约 24), 通过酯键连接至甘油。所述酰基可以饱和, 也可以不同程度的不饱和。DAG 具有总分子式:

[0403]

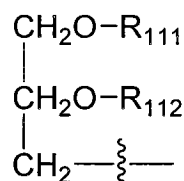


[0404] DAG 的实例可以选自二月桂酰基甘油 (C12)、二肉豆蔻酰基甘油 (C14, DMG)、二棕榈酰基甘油 (C16, DPG)、二硬脂酰基甘油 (C18, DSG)、二油酰基甘油 (C18)、二芥酰 (C22)、二月桂酰基咪唑双酰胺 (C12)、二肉豆蔻酰基咪唑双酰胺 (C14)、二棕榈酰基咪唑双酰胺 (C16)、二硬脂酰基咪唑双酰胺 (C18)、二油酰基咪唑双酰胺 (C18)、二芥酰基咪唑双酰胺 (C22)。本领域技术人员可以认识到其他二酰甘油也可以取得预期效果。

[0405] 术语“二烷氧基丙基”指的是具有两个烷基链 R111 和 R112 的化合物。R111 和 R112 烷基包括相同或不同的约 4 到 30 个碳 (优选约 8 到约 24)。所述烷基可以饱和, 也可以不同

程度的不饱和。二烷氧基丙基具有总分子式：

[0406]



[0407] 其中  $\text{R}_{111}$  和  $\text{R}_{112}$  烷基为具有约 4 到 30 个碳（优选为约 8 到约 24）的相同或不同的烷基。所述烷基可以饱和或不饱和。适合的烷基包括但不限于月桂基（C12）、肉豆蔻基（C14）、棕榈基（C16）、硬脂基（C18）、油酰基（C18）和二十酰基（C20）。

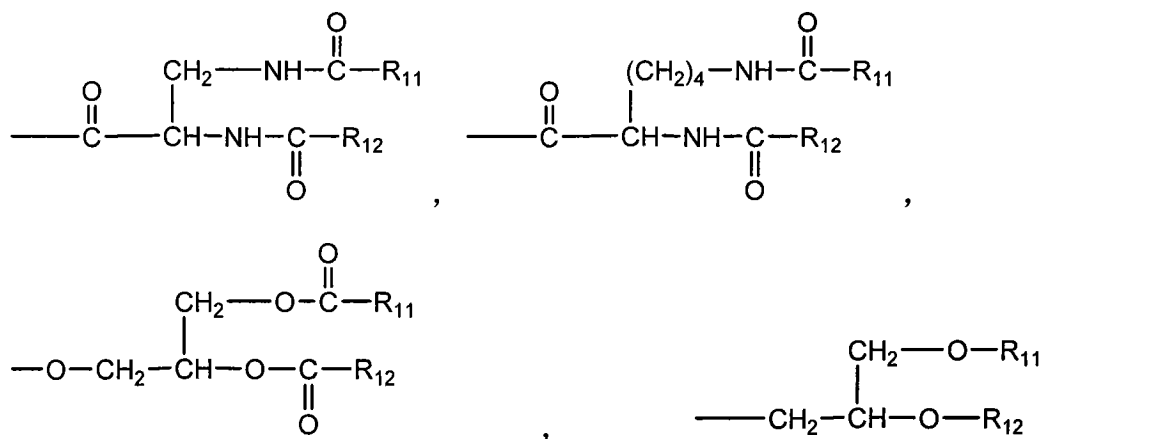
[0408] 在一个实例中， $\text{R}_{111}$  和  $\text{R}_{112}$  二者相同，就是说  $\text{R}_{111}$  和  $\text{R}_{112}$  均为肉豆蔻基（C14）或均为硬脂基（C18）等。在另一个实例中， $\text{R}_{111}$  和  $\text{R}_{112}$  不同，就是说  $\text{R}_{111}$  为肉豆蔻基（C14）， $\text{R}_{112}$  为硬脂基（C18）。

[0409] 在另一个实例中，Q 基可以包括磷脂酰乙醇胺（PE）。有助于可释放融合脂质配合的所述磷脂酰乙醇胺可以包含饱和的或不饱和的脂肪酸，其碳链长度在约 4 到 30 个碳（优选约 8 到约 24）范围内。适宜的磷脂酰乙醇胺包括但不限于：二肉豆蔻酰基磷脂酰乙醇胺（DMPE）、二棕榈酰基磷脂酰乙醇胺（DPPE）、二油酰基磷脂酰乙醇胺（DOPE）、二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺（DSPE）。

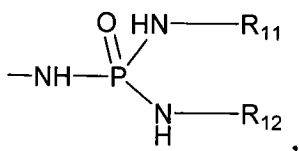
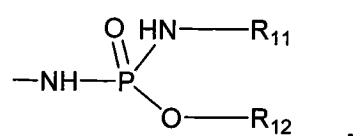
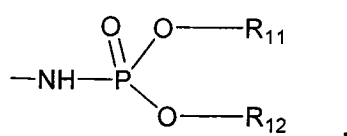
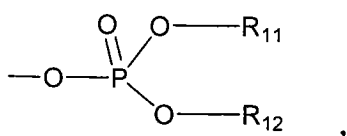
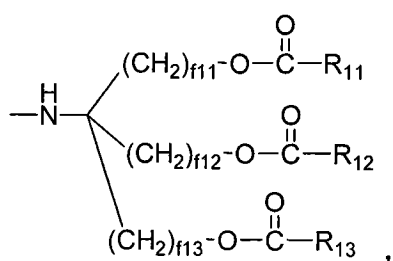
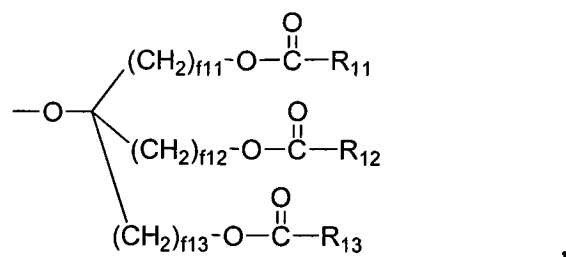
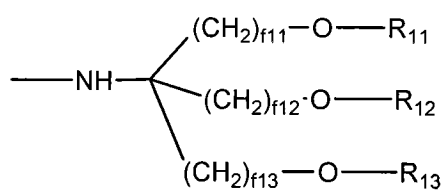
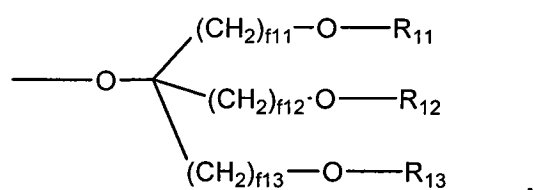
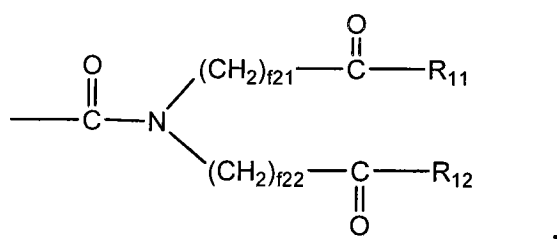
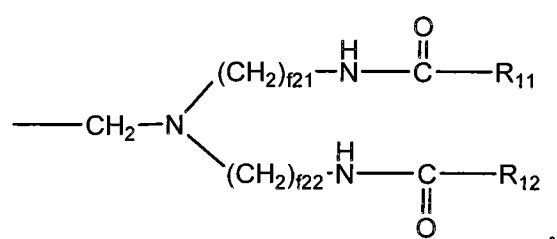
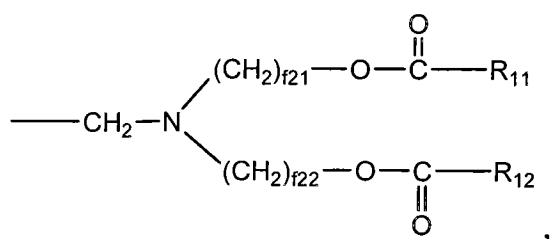
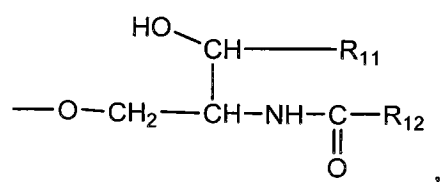
[0410] 在又一个实例中，Q 基可以包括神经酰胺（Cer）。神经酰胺具有唯一的酰基。神经酰胺可以具有饱和的或不饱和的、碳链长度在约 4 到 30 个碳（优选约 8 到约 24）范围内的脂肪酸。

[0411] 一个优选的实例包括：

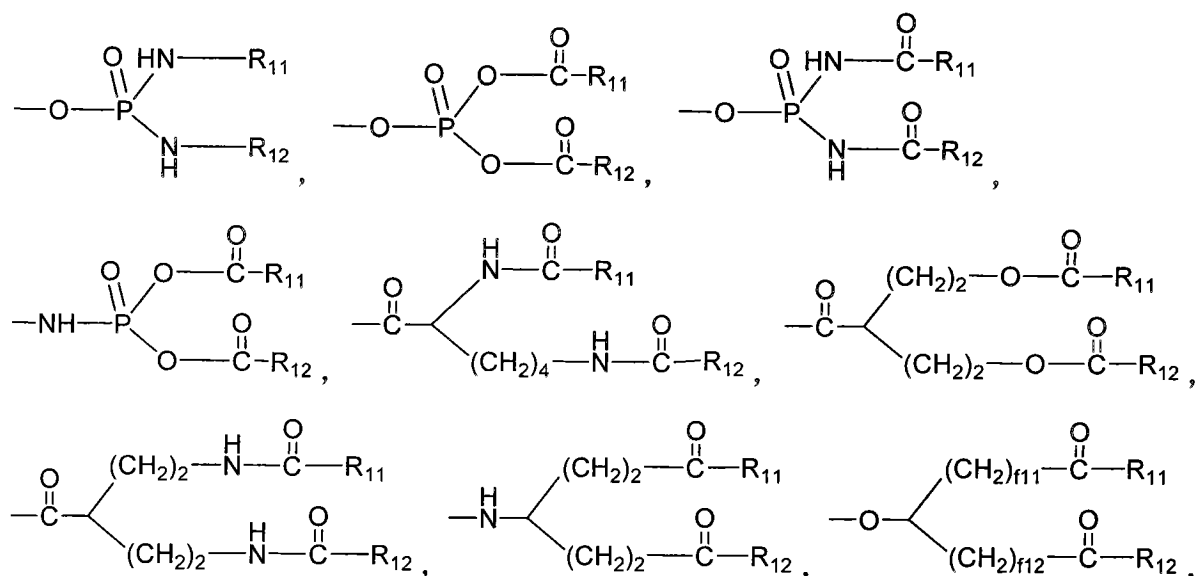
[0412]



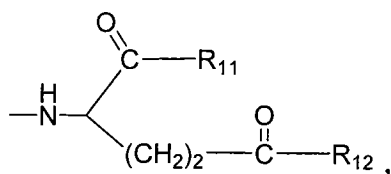
[0413]



[0414]



以及



[0415] 其中 R<sub>11-13</sub> 分别为相同或不同的 C12-22 饱和的或不饱和的脂肪族碳氢化合物,例如二月桂基 (C12)、二肉豆蔻基 (C14)、二棕榈基 (C16)、二硬脂基 (C18)、二油酰基 (C18) 和二芥酰基 (C22) ;

[0416] (f11)、(f12) 和 (f13) 分别为 0、1、2、3 或 4 ;以及

[0417] (f21) 和 (f22) 分别为 1、2、3 或 4。

[0418] B. 式 (I) 的可释放融合脂质的制备

[0419] 典型的、特定的化合物的合成在实例中进行阐释。不过总的来说,本发明的化合物可以通过几种方式制备。根据本发明所述的式 (I) 化合物的制备方法,包括将含胺的化合物与含醛的化合物进行反应,以提供具有亚胺基团的融合脂质。所述胺可以是伯胺,所述醛可以进一步包括脂肪族或芳香族取代基。

[0420] 图 1 和图 2 显示了融合脂质制备的典型实例。首先,在例如 EDC 或 DIPC 的偶联剂的参与下,脂质与亲核的多功能连接基 (化合物 1) 发生偶联以提供化合物 2。优选地,所述反应在例如二氯甲烷、三氯甲烷、甲苯、DMF 或其混合物的惰性溶液中进行,并且优选所述反应在例如 DMAP、DIEA、吡啶、三乙胺等碱的存在下,在 -4℃ 到约 70℃ (例如 -4℃ 到约 50℃) 的温度下进行。在一个优选的实例中,所述反应在 0℃ 到约 25℃ 或 0℃ 到约室温的温度下进行。

[0421] 化合物 2 的末端官能团进一步与例如化合物 4 的双功能连接基偶联,然后去除胺保护基以提供具有末端的脂质化合物 (化合物 6)。

[0422] 包含两性离子基团的化合物,例如 Fmoc-Lys(OMe)-NH<sub>2</sub>, 与例如化合物 7 的双功能连接基反应,以提供具有受保护的醛的化合物 8。所述醛保护基被去除。化合物 9 的所述醛与含胺脂质 (化合物 6) 在脱水条件下反应,然后去除胺保护基并皂化,以提供包含亚胺键

的融合脂质。

[0423] 所述脂质与所述亲核的多功能连接基的接合可以在碱的存在下,使用本领域技术人员所知的偶联剂,利用标准有机合成技术来实现,所述偶联剂例如 1,3-二异丙基碳化二亚胺(DIPC)、二烷基碳化二亚胺、2-卤-1-烷基吡啶卤化盐、1-(3-二甲基氨丙基)-3-乙基碳化二亚胺(EDC)、丙烷磷酸环酐(PPACA)和苯基二氯磷酸酯。此外,亚胺键的形成可以利用用于脱水标准有机合成技术来实现,例如使用分子筛、共沸、酸催化脱水等。

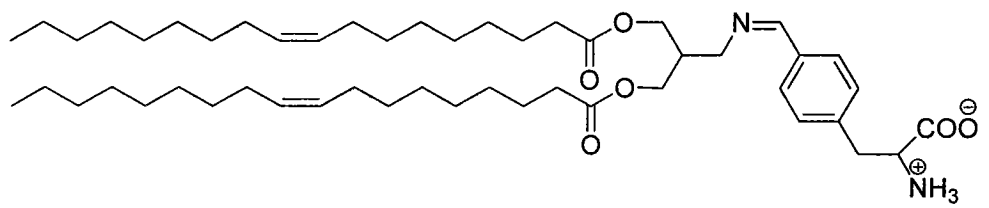
[0424] 在另一个实例中,活化的脂质酸,例如 NHS 或 PNP 脂,可以用来与例如化合物 1 的亲核的多功能连接基进行反应。

[0425] 可选地,当脂质用例如 NHS 或 PNP 的离去基团进行活化时,无需偶联剂,并且所述反应在碱的存在下进行。

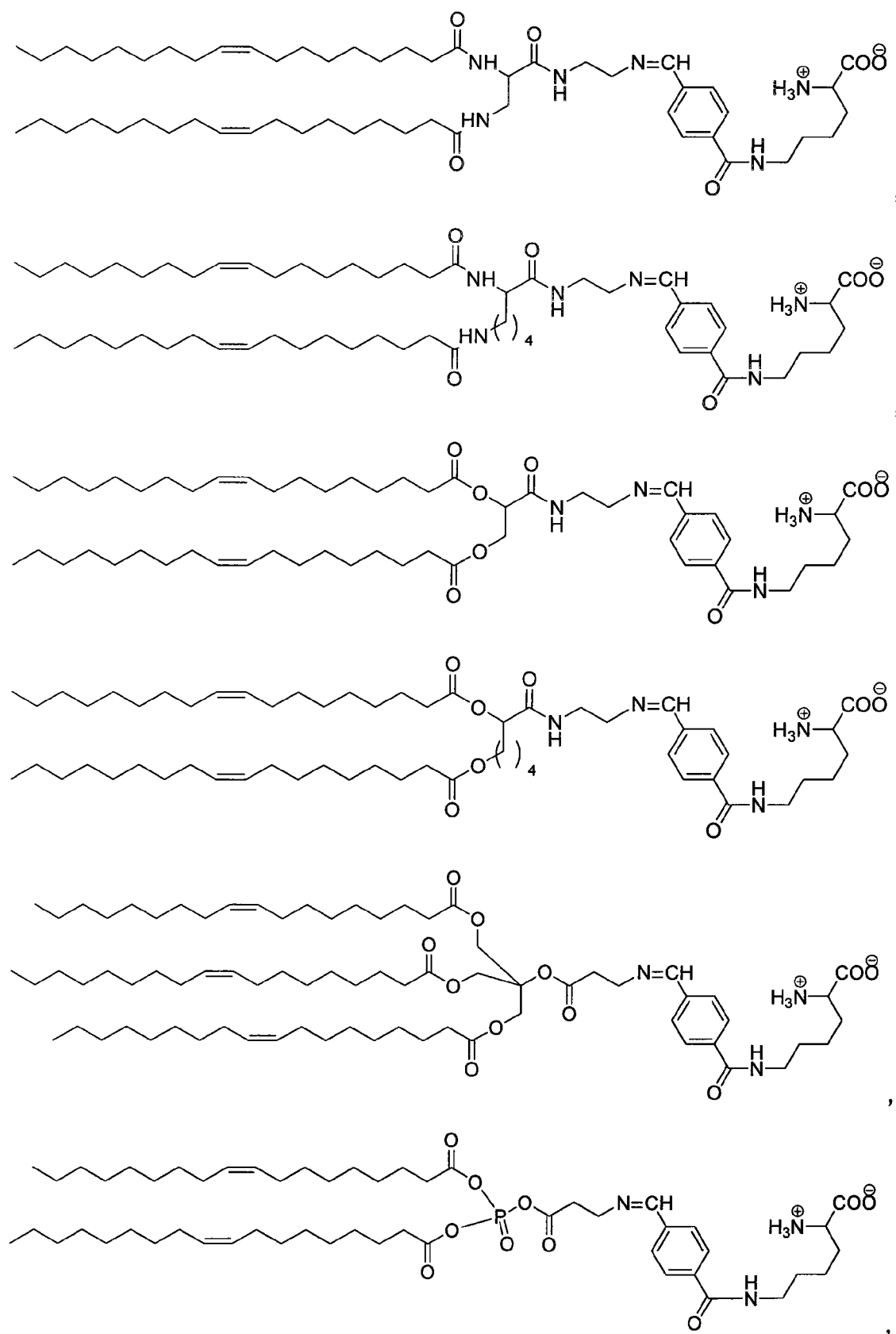
[0426] 将保护基从含胺化合物去除可以通过例如三氟乙酸(TFA)、HCL、硫酸等的强酸,或者催化氢化、自由基反应等进行。可选地,例如 Fmoc 的胺保护基的去除,可以通过例如哌啶或 DMAP 的碱进行。在一个优选的实例中,使用 HCL 溶液在二氧己环中进行 Boc 基的去保护。所述去保护反应可以在 -4℃ 到约 50℃ 的温度下进行。优选地,所述反应在 0℃ 到约 25℃ 或 0℃ 到室温的温度下进行。在一个更加优选的实例中, Boc 基的去保护在室温下进行。

[0427] 例如,通过本发明所述的方法制备的化合物包括:

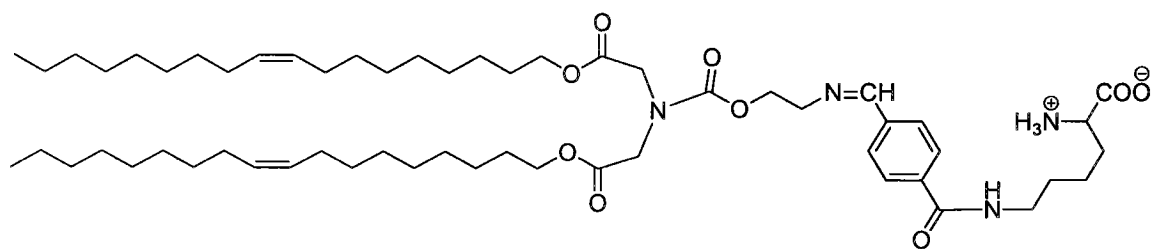
[0428]



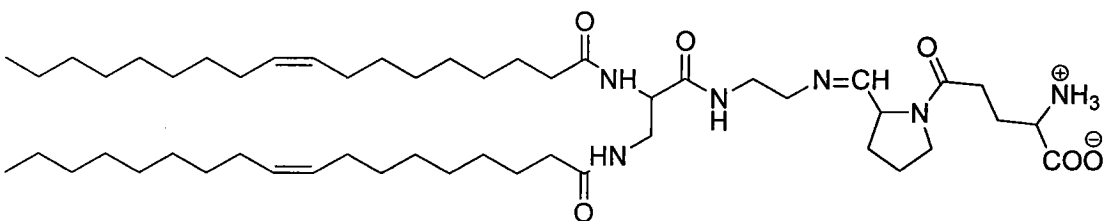
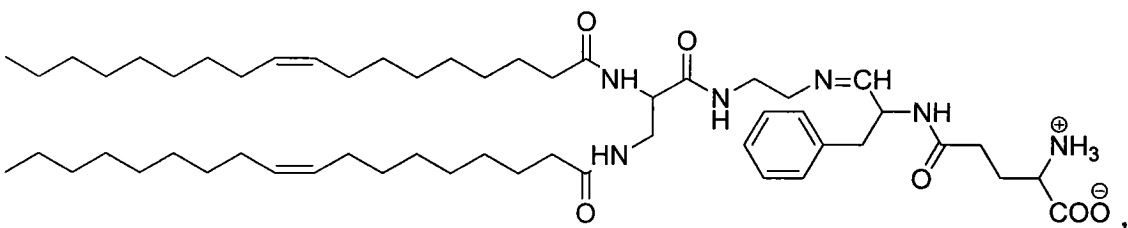
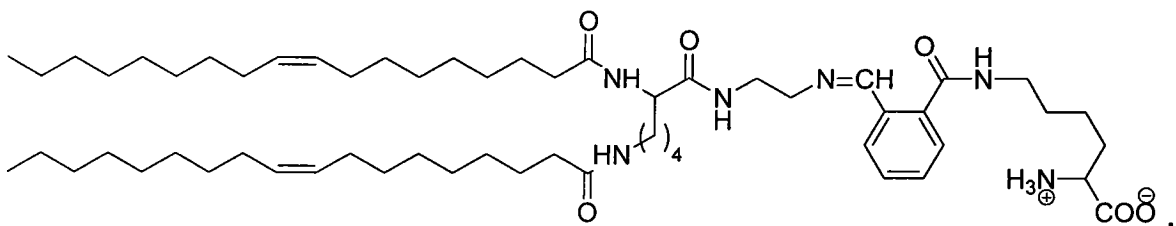
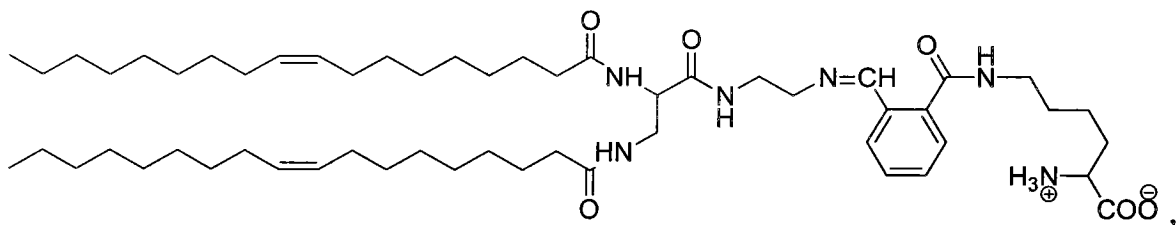
[0429]



[0430]

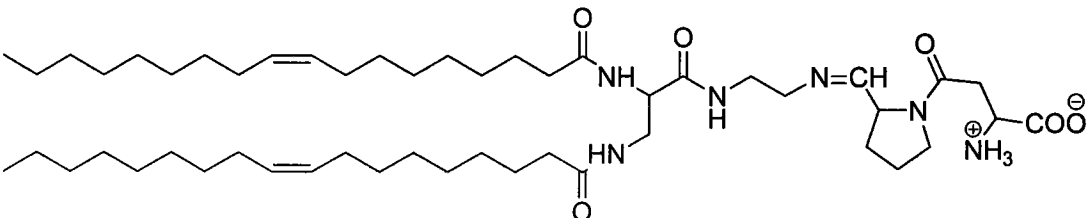


9



, 以

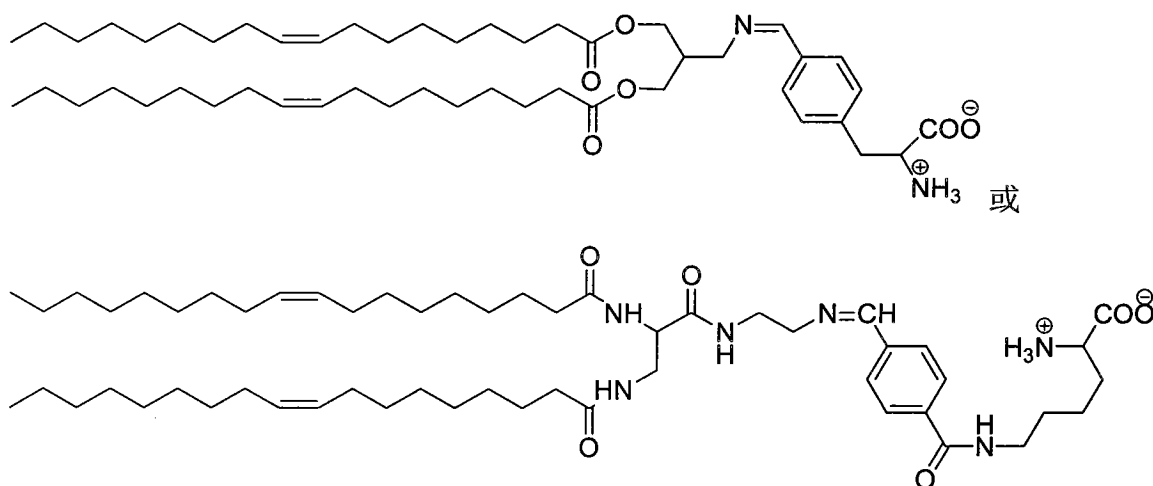
及



。

[0431] 优选地, 式 (I) 的可释放融合脂质包括:

[0432]



### [0433] C. 纳米微粒组合物

#### [0434] 1. 概述

[0435] 在本发明的一个方面，提供用于核酸输送的包含式 (I) 的可释放融合脂质的纳米微粒组合物。

[0436] 根据本发明，所述纳米微粒组合物包含阳离子脂质、式 (I) 的可释放融合脂质和 PEG 脂质。

[0437] 在本发明一个优选的方面，所述纳米微粒组合物包括胆固醇。

[0438] 在本发明的另一个方面，所述纳米微粒组合物可以包含本领域所知的融合脂质（非阳离子脂质）。可以预期包含阳离子脂质的混合物、不同的融合脂质的混合物和 / 或不同的任选 PEG 脂质的混合物的纳米微粒组合物。

[0439] 在另一个优选的方面，所述纳米微粒组合物包含以所述纳米微粒组合物中的脂质总量计摩尔比为约 10% 到约 99.9% 的阳离子脂质。

[0440] 以所述纳米微粒组合物中的脂质总量计，所述阳离子脂质的含量可以为约 2% 到约 60%、约 5% 到约 50%、约 10% 到约 45%、约 15% 到约 25% 或约 30% 到约 40%。

[0441] 在一个优选的实例中，以所述纳米微粒组合物中的脂质总量计，所述阳离子脂质的含量为约 15% 到约 25%（具体为 15、17、18、20 或 25%）。

[0442] 根据本发明，所述纳米微粒组合物包含以所述纳米微粒组合物中的脂质总量计摩尔比为约 20% 到约 85%、约 25% 到约 85%、约 60% 到约 80%（例如 65、75、78 或 80%）的包括胆固醇和 / 或非胆固醇基的融合脂质在内的所述融合脂质总量（优选为本发明所述的可释放融合脂质）。在一个优选的实例中，以所述纳米微粒组合物中的脂质总量计，所述融合 / 非阳离子脂质总量为约 80%。

[0443] 在某些实例中，以所述纳米微粒组合物中的脂质总量计，非胆固醇基的融合 / 非阳离子脂质的摩尔比为约 25% 到约 78%（25、35、47、60 或 78%）。在一个实例中，以所述纳米微粒组合物中的脂质总量计，非胆固醇基的融合 / 非阳离子脂质为约 60%。

[0444] 在某些实例中，所述纳米微粒组合物包含以所述纳米微粒组合物中的脂质总量计摩尔比为约 0% 到约 60%、约 10% 到约 60%、约 20% 到约 50%（例如 20、30、40 或 50%）的除了非胆固醇融合脂质之外的胆固醇。在一个实例中，以所述纳米微粒组合物中的脂质总量计，胆固醇为约 20%。

[0445] 在某些实例中，以所述纳米微粒组合物中的脂质总量计，所述纳米微粒组合物中

包含的所述 PEG 脂质的摩尔比为约 0.5% 到约 20%、约 1.5% 到约 18%。在纳米微粒组合物的一个实例中,以脂质总量计,包括的所述 PEG 脂质的摩尔比为约 2% 到约 10% (例如,2、3、4、5、6、7、8、9 或 10%)。例如,以所述纳米微粒组合物中的脂质总量计,所述 PEG 脂质总量为约 2%。

[0446] 基于本发明的目的,所述纳米微粒组合物中包含的可释放融合脂质的量可以理解所述的所述可释放融合脂质单独的量,或者式 (I) 的可释放融合脂质以及如果在所述纳米微粒组合物中存在的话,任何额外的本领域所知的融合脂质(可释放或不可释放均可)的总量。

[0447] 2. 式 (I) 的可释放融合脂质和任选的本领域所知的融合 / 非阳离子脂质

[0448] 本发明所述的纳米微粒组合物包含式 (I) 的可释放融合脂质。不受任何理论的限制,式 (I) 的可释放融合脂质在所述纳米微粒进入细胞之后促进封装在所述纳米微粒中的核酸从核内体和所述纳米微粒中释放出来。

[0449] 在本发明的另一个方面,所述的纳米微粒组合物可以包括额外的本领域所知的融合脂质。用在所述纳米微粒组合物中的适宜的额外的本领域所知的融合脂质包括中性融合 / 非阳离子脂质或阴离子融合脂质。

[0450] 中性脂质包括在选定的 pH 值,优选为生理 pH 值下以不带电的或中性的两性离子形式存在的脂质。这种本领域所知的融合脂质的实例包括二酰磷脂酰胆碱、二酰磷脂酰乙醇胺、神经酰胺、鞘磷脂、脑磷脂、胆固醇、脑苷脂和二酰甘油。

[0451] 阴离子脂质包括在生理 pH 值下带负电的脂质。这些脂质包括但不限于磷脂酰甘油、心磷脂、二酰磷脂酰丝氨酸、二酰磷脂酸、N- 十二烷酰磷脂酰乙醇胺、N- 丁二酰磷脂酰乙醇胺、N- 戊二酰磷脂酰乙醇胺、赖氨酰磷脂酰甘油、棕榈酰油酰磷脂酰甘油 (POPG) 和经过其他阴离子改性基改性过的中性脂质。

[0452] 许多本领域所知的融合脂质包括总体上具有疏水基团和极性头基的两亲性脂质,并且可以在水溶液中形成囊泡。

[0453] 可以预期融合脂质包括天然的和合成的磷脂和相关的脂质。

[0454] 非限定性的非阳离子脂质的列表选自磷脂和与非磷脂质相关的材料,例如卵磷脂;溶血卵磷脂;二酰磷脂酰胆碱;溶血磷脂酰胆碱;磷脂酰乙醇胺;溶血磷脂酰乙醇胺;磷脂酰丝氨酸;磷脂酰肌醇;鞘磷脂;脑磷脂;神经酰胺;心磷脂;磷脂酸;磷脂酰甘油;脑苷脂;联十六烷基磷酸酯;

[0455] 1,2- 二月桂酰 -sn- 甘油 (DLG);

[0456] 1,2- 二肉豆蔻酰 -sn- 甘油 (DMG);

[0457] 1,2- 二棕榈酰 -sn- 甘油 (DPG);

[0458] 1,2- 二硬脂酰 -sn- 甘油 (DSG);

[0459] 1,2- 二月桂酰 -sn- 丙三氧基 -3- 磷脂酸 (DLPA);

[0460] 1,2- 二肉豆蔻酰 -sn- 丙三氧基 -3- 磷脂酸 (DMPA);

[0461] 1,2- 二棕榈酰 -sn- 丙三氧基 -3- 磷脂酸 (DPPA);

[0462] 1,2- 二硬脂酰 -sn- 丙三氧基 -3- 磷脂酸 (DSPA);

[0463] 1,2- 花生四烯酰 -sn- 丙三氧基 -3- 磷酸胆碱 (DAPC);

[0464] 1,2- 二月桂酰 -sn- 丙三氧基 -3- 磷酸胆碱 (DLPC);

- [0465] 1,2- 二肉豆蔻酰 -sn- 丙三氧基 -3- 磷酸胆碱 (DMPC) ;
- [0466] 1,2- 二棕榈酰 -sn- 丙三氧基 -3- 乙基磷酸胆碱 (DPePC) ;
- [0467] 1,2- 二棕榈酰 -sn- 丙三氧基 -3- 磷酸胆碱或二棕榈酰磷脂酰胆碱或二棕榈酰磷脂酰胆碱 (DPPC) ;
- [0468] 1,2- 二硬脂酰 -sn- 丙三氧基 -3- 磷酸胆碱或二硬脂酰磷脂酰胆碱或二硬脂酰磷脂酰胆碱 (DSPC) ;
- [0469] 1,2- 二月桂酰 -sn- 丙三氧基 -3- 磷酸乙醇胺 (DLPE) ;
- [0470] 1,2- 二肉豆蔻酰 -sn- 丙三氧基 -3- 磷酸乙醇胺或二肉豆蔻酰磷酸乙醇胺 (DMPE) ;
- [0471] 1,2- 二棕榈酰 -sn- 丙三氧基 -3- 磷酸乙醇胺或二棕榈酰磷脂酰乙醇胺 (DPPE) ;
- [0472] 1,2- 二硬脂酰 -sn- 丙三氧基 -3- 磷酸乙醇胺 or 二硬脂酰磷脂酰乙醇胺 (DSPE) ;
- [0473] 1,2- 二月桂酰 -sn- 丙三氧基 -3- 磷酸甘油 (DLPG) ;
- [0474] 1,2- 二肉豆蔻酰 -sn- 丙三氧基 -3- 磷酸甘油 (DMPG) ;
- [0475] 1,2- 二肉豆蔻酰 -sn- 丙三氧基 -3- 磷酸 -sn-1- 甘油 (DMP-sn-1-G) ;
- [0476] 1,2- 二棕榈酰 -sn- 丙三氧基 -3- 磷酸甘油或二棕榈酰磷脂酰甘油 (DPPG) ;
- [0477] 1,2- 二硬脂酰 -sn- 丙三氧基 -3- 磷酸甘油 (DSPG) ;
- [0478] 1,2- 二硬脂酰 -sn- 丙三氧基 -3- 磷酸 -sn-1- 甘油 (DSP-sn-1-G) ;
- [0479] 1,2- 二棕榈酰 -sn- 丙三氧基 -3- 磷酸 -L-serine (DPPS) ;
- [0480] 1- 棕榈酰 -2- 亚油酰 -sn- 丙三氧基 -3- 磷酸胆碱 (PLinoPC) ;
- [0481] 1- 棕榈酰 -2- 油酰 -sn- 丙三氧基 -3- 磷酸胆碱或棕榈酰油酰磷脂酰胆碱 (POPC) ;
- [0482] 1- 棕榈酰 -2- 油酰 -sn- 丙三氧基 -3- 磷酸甘油 (POPG) ;
- [0483] 1- 棕榈酰 -2- 可溶 -sn- 丙三氧基 -3- 磷酸胆碱 (P-lyso-PC) ;
- [0484] 1- 硬脂酰 -2- 可溶 -sn- 丙三氧基 -3- 磷酸胆碱 (S-lyso-PC) ;
- [0485] 1,2- 二油酰 -sn- 丙三氧基 -3- 磷酸乙醇胺或二油酰磷脂酰乙醇胺 (DOPE) ;
- [0486] 二植烷酰磷脂酰乙醇胺 (DPhPE) ;
- [0487] 1,2- 二油酰 -sn- 丙三氧基 -3- 磷酸胆碱或二油酰磷脂酰胆碱或二油酰磷脂酰胆碱 (DOPC) ;以及
- [0488] 1,2- 二植烷酰 -sn- 丙三氧基 -3- 磷酸胆碱 (DPhPC) ,
- [0489] 二油酰磷脂酰甘油 (DOPG) ;
- [0490] 棕榈酰油酰磷脂酰乙醇胺 (POPE) ;
- [0491] 二油酰 - 磷脂酰乙醇胺 4-(N- 马来酰亚胺甲基)- 环己烷 -1- 羧酸盐 (DOPE-mal) ;
- [0492] 16-0- 单甲基 PE ;
- [0493] 16-0- 二甲基 PE ;
- [0494] 18-1- 反式 PE ;1- 硬脂酰 -2- 油酰 - 硬脂酰乙醇胺 (SOPE) ;
- [0495] 1,2- 二反油酰 -sn- 丙三氧基 -3- 磷酸乙醇胺 (反式 DOPE) ;其制药上可接受的盐及其混合物。融合脂质的详细描述参见美国专利申请 2007/0293449 和 2006/0051405。
- [0496] 非阳离子脂质包括固醇或类固醇,例如胆固醇。
- [0497] 额外的非阳离子脂质例如是硬脂酰胺、月桂酰胺、十六烷基胺、乙酰棕榈酸盐、甘

油蓖麻油酸脂、十六烷基固体盐、异丙基肉豆蔻酸盐、两性丙烯酸聚合物、三乙醇胺月桂基硫酸盐、烷基芳基硫酸盐、聚乙氨基苯腠酸脂肪酰胺和二十八烷基二甲基溴化铵。

[0498] 可以预期的阴离子脂质包括磷脂酰丝氨酸、磷脂酸、磷脂酰胆碱、血小板活性因子(PAF)、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰-DL-甘油、磷脂酰肌醇、磷脂酰肌醇、心磷脂、溶血磷脂、氢化磷脂、鞘氨脂质、神经节苷酯、植物鞘氨醇、鞘氨醇、其制药上可接受的盐及其混合物。

[0499] 有助于制备本发明所述的纳米微粒组合物的适当的非阳离子脂质包括二酰基磷脂酰胆碱(例如,二硬脂酰磷脂酰胆碱、二油酰磷脂酰胆碱、二棕榈酰磷脂酰胆碱和二亚油酰磷脂酰胆碱)、二酰基磷脂酰乙醇胺(例如,二油酰磷脂酰乙醇胺和棕榈酰油酰磷脂酰乙醇胺)、神经酰胺或鞘磷脂。这些脂质中的酰基优选为具有饱和的和不饱和的碳链的脂肪酸,例如亚麻酰、异硬脂酰、油烯基、反油酰、岩芹酰、亚麻烯酰、桐酰、花生四烯酰、肉豆蔻酰棕榈酰和月桂酰。更加优选的酰基为月桂酰、肉豆蔻酰、棕榈酰、硬脂酰或油酰,更加优选为具有饱和的和不饱和的  $C_8$ - $C_{30}$ (优选  $C_{10}$ - $C_{24}$ ) 碳链的脂肪酸。

[0500] 用于本发明所述的纳米微粒组合物的各种磷脂酰胆碱包括:

[0501] 1,2-二癸酰-sn-丙三氧基-3-磷酸胆碱(DDPC, C10:0, C10:0);

[0502] 1,2-二月桂酰-sn-丙三氧基-3-磷酸胆碱(DLPC, C12:0, C12:0);

[0503] 1,2-二肉豆蔻酰-sn-丙三氧基-3-磷酸胆碱(DMPC, C14:0, C14:0);

[0504] 1,2-二棕榈酰-sn-丙三氧基-3-磷酸胆碱(DPPC, C16:0, C16:0);

[0505] 1,2-二硬脂酰-sn-丙三氧基-3-磷酸胆碱(DSPC, C18:0, C18:0);

[0506] 1,2-二油酰-sn-丙三氧基-3-磷酸胆碱(DOPC, C18:1, C18:1);

[0507] 1,2-二芥酰-sn-丙三氧基-3-磷酸胆碱(DEPC, C22:1, C22:1);

[0508] 1,2-二二十碳五烯酰-sn-丙三氧基-3-磷酸胆碱(EPA-PC, C20:5, C20:5);

[0509] 1,2-二二十二碳六烯酰-sn-丙三氧基-3-磷酸胆碱(DHA-PC, C22:6, C22:6);

[0510] 1-肉豆蔻酰-2-棕榈酰-sn-丙三氧基-3-磷酸胆碱(MPPC, C14:0, C16:0);

[0511] 1-肉豆蔻酰-2-硬脂酰-sn-丙三氧基-3-磷酸胆碱(MSPC, C14:0, C18:0);

[0512] 1-棕榈酰-2-硬脂酰-sn-丙三氧基-3-磷酸胆碱(PMPC, C16:0, C14:0);

[0513] 1-棕榈酰-2-硬脂酰-sn-丙三氧基-3-磷酸胆碱(PSPC, C16:0, C18:0);

[0514] 1-硬脂酰-2-肉豆蔻酰-sn-丙三氧基-3-磷酸胆碱(SMPC, C18:0, C14:0);

[0515] 1-硬脂酰-2-棕榈酰-sn-丙三氧基-3-磷酸胆碱(SPPC, C18:0, C16:0);

[0516] 1,2-肉豆蔻酰-油酰-sn-丙三氧基-3-磷酸乙醇胺(MOPC, C14:0, C18:0);

[0517] 1,2-棕榈酰-油酰-sn-丙三氧基-3-磷酸乙醇胺(POPC, C16:0, C18:1);

[0518] 1,2-硬脂酰-油酰-sn-丙三氧基-3-磷酸乙醇胺(POPC, C18:0, C18:1),其制药上可接受的盐及其混合物。

[0519] 用于本发明所述的纳米微粒组合物的各种可溶磷脂酰胆碱包括:

[0520] 1-肉豆蔻酰-2-可溶-sn-丙三氧基-3-磷酸胆碱(M-LysoPC, C14:0);

[0521] 1-劣线酰-2-可溶-sn-丙三氧基-3-磷酸胆碱(P-LysoPC, C16:0);

[0522] 1-硬脂酰-2-可溶-sn-丙三氧基-3-磷酸胆碱(S-LysoPC, C18:0),其制药上可接受的盐及其混合物。

[0523] 用于本发明所述的纳米微粒组合物的各种磷脂酰甘油选自:

[0524] 氢化大豆磷脂酰甘油(HSPG);

- [0525] 非氢化卵磷脂酰甘油 (EPG) ;
- [0526] 1,2- 二肉豆蔻酰 -sn- 丙三氧基 -3- 磷酸甘油 (DMPG, C14:0, C14:0) ;
- [0527] 1,2- 二棕榈酰 -sn- 丙三氧基 -3- 磷酸甘油 (DPPG, C16:0, C16:0) ;
- [0528] 1,2- 二硬脂酰 -sn- 丙三氧基 -3- 磷酸甘油 (DSPG, C18:0, C18:0) ;
- [0529] 1,2- 二油酰 -sn- 丙三氧基 -3- 磷酸甘油 (DOPG, C18:1, C18:1) ;
- [0530] 1,2- 二芥酰 -sn- 丙三氧基 -3- 磷酸甘油 (DEPG, C22:1, C22:1) ;
- [0531] 1- 棕榈酰 -2- 油酰 -sn- 丙三氧基 -3- 磷酸甘油 (POPG, C16:0, C18:1), 其制药上可接受的盐及其混合物。
- [0532] 用于本发明所述的纳米微粒组合物的各种磷脂酸包括 :
- [0533] 1,2- 二肉豆蔻酰 -sn- 丙三氧基 -3- 磷脂酸 (DMPA, C14:0, C14:0) ;
- [0534] 1,2- 二棕榈酰 -sn- 丙三氧基 -3- 磷脂酸 (DPPA, C16:0, C16:0) ;
- [0535] 1,2- 二硬脂酰 -sn- 丙三氧基 -3- 磷脂酸 (DSPA, C18:0, C18:0), 其制药上可接受的盐及其混合物。
- [0536] 用于本发明所述的纳米微粒组合物的各种磷脂酰乙醇胺包括 :
- [0537] 氢化大豆磷脂酰乙醇胺 (HSPE) ;
- [0538] 非氢化卵磷脂酰乙醇胺 (EPE) ;
- [0539] 1,2- 二肉豆蔻酰 -sn- 丙三氧基 -3- 磷酸乙醇胺 (DMPE, C14:0, C14:0) ;
- [0540] 1,2- 二棕榈酰 -sn- 丙三氧基 -3- 磷酸乙醇胺 (DPPE, C16:0, C16:0) ;
- [0541] 1,2- 二硬脂酰 -sn- 丙三氧基 -3- 磷酸乙醇胺 (DSPE, C18:0, C18:0) ;
- [0542] 1,2- 二油酰 -sn- 丙三氧基 -3- 磷酸乙醇胺 (DOPE, C18:1, C18:1) ;
- [0543] 1,2- 二油酰 -sn- 丙三氧基 -3- 磷酸乙醇胺 (DEPE, C22:1, C22:1) ;
- [0544] 1,2- 二芥酰 -sn- 丙三氧基 -3- 磷酸乙醇胺 (POPE, C16:0, C18:1), 其制药上可接受的盐及其混合物。
- [0545] 用于本发明所述的纳米微粒组合物的各种磷脂酰丝氨酸包括 :
- [0546] 1,2- 二肉豆蔻酰 -sn- 丙三氧基 -3- 磷酸 -L- 丝氨酸 (DMPS, C14:0, C14:0) ;
- [0547] 1,2- 二棕榈酰 -sn- 丙三氧基 -3- 磷酸 -L- 丝氨酸 (DPPS, C16:0, C16:0) ;
- [0548] 1,2- 二硬脂酰 -sn- 丙三氧基 -3- 磷酸 -L- 丝氨酸 (DSPS, C18:0, C18:0) ;
- [0549] 1,2- 二油酰 -sn- 丙三氧基 -3- 磷酸 -L- 丝氨酸 (DOPS, C18:1, C18:1) ;
- [0550] 1- 棕榈酰 -2- 油酰 -sn-3- 磷酸 -L- 丝氨酸 (POPS, C16:0, C18:1), 其制药上可接受的盐及其混合物。
- [0551] 在一个优选的实例中, 有助于制备本发明所述的纳米微粒组合物的适合的中性脂质例如包括,
- [0552] 二油酰磷脂酰乙醇胺 (DOPE),
- [0553] 二硬脂酰磷脂酰乙醇胺 (DSPE),
- [0554] 棕榈酰油酰磷脂酰乙醇胺 (POPE),
- [0555] 卵磷脂酰胆碱 (EPC),
- [0556] 二棕榈酰磷脂酰胆碱 (DPPC),
- [0557] 二硬脂酰磷脂酰胆碱 (DSPC),
- [0558] 二油酰磷脂酰胆碱 (DOPC),

- [0559] 棕榈酰油酰磷脂酰胆碱 (POPC),
- [0560] 二棕榈酰磷脂酰甘油 (DPPG),
- [0561] 二油酰磷脂酰甘油 (DOPG),
- [0562] 二油酰-磷脂酰乙醇胺 4-(N-马来酰亚胺甲基)-环己烷-1-碳酸盐 (DOPE-mal), 胆固醇, 其制药上可接受的盐及其混合物。
- [0563] 在某些优选的实例中, 本发明所述的纳米微粒组合物包括 DSPC、EPC、DOPE 等及其混合物。
- [0564] 在本发明的另一个方面, 所述纳米微粒组合物包含例如固醇的非阳离子脂质。所述纳米微粒组合物优选包含胆固醇或其类似物, 更加优选为胆固醇。
- [0565] 3. 阳离子脂质
- [0566] 根据本发明所述的纳米微粒组合物可以包括阳离子脂质。可以预期的适合的脂质例如包括:
- [0567] 氯化 N-[1-(2,3-二油酰氧)丙基]-N,N,N-三甲基铵 (DOTMA);
- [0568] 氯化 1,2-二(油酰氧)-3-3-(三甲基铵)丙烷或氯化 N-(2,3-二油酰氧)丙基)-N,N,N-三甲基铵 (DOTAP);
- [0569] 1,2-二(六十烷酰氧)-3-3-(三甲基铵)丙烷 (DMTAP);
- [0570] 溴化 1,2-二肉豆蔻丙氧基-3-二甲基羟乙基铵或溴化 N-(1,2-二肉豆蔻丙氧基-3)-N,N-二甲基-N-羟乙基铵 (DMRIE);
- [0571] 溴化二甲基二十八烷基铵或溴化 N,N-二硬脂酰-N,N-二甲基铵 (DDAB);
- [0572] 3-(N-(N',N'-二甲基乙胺)氨基甲酰)胆固醇 (DC-胆固醇);
- [0573] 3 $\beta$ -[N',N'-二胍基乙基-乙胺)氨基甲酰]胆固醇 (BGTC);
- [0574] 2-(2-(3-(二(3-氨基丙基)氨基)丙胺基)乙酰胺基)-N,N-二四癸乙酰胺 (RPR209120);
- [0575] 1,2-二链烯酰-sn-丙三氧基-3-乙基磷酸胆碱 (例如, 1,2-二油酰-sn-丙三氧基-3-乙基磷酸胆碱、1,2-二硬脂酰-sn-丙三氧基-3-乙基磷酸胆碱和 1,2-二棕榈酰-sn-丙三氧基-3-乙基磷酸胆碱);
- [0576] 四甲基四棕榈酰精胺 (TMTPS);
- [0577] 四甲基四油烯基精胺 (TMTOS);
- [0578] 四甲基四月桂基精胺 (TMTLS);
- [0579] 四甲基四肉豆蔻基精胺 (TMTMS);
- [0580] 四甲基二油烯基精胺 (TMDOS);
- [0581] 2,5-二(3-氨基丙基氨基)-N-(2-(二十八烷基氨基)-2-羟乙基)戊酰胺 (DOGS);
- [0582] 2,5-二(3-氨基丙基氨基)-N-(2-(二(Z)-十八-9-二烯氨基)-2-氧代乙基)戊酰胺 (DOGS-9-en);
- [0583] 2,5-二(3-氨基丙基氨基)-N-(2-(二(9Z,12Z)-十八-9,12-二烯氨基)-2-氧代乙基)戊酰胺 (DLinGS);
- [0584] N4-精胺胆固醇基氨基甲酸酯 (GL-67);
- [0585] (9Z,9'-Z)-2-(2,5-二(3-氨基丙基氨基)戊酰胺)丙烷-1,3-二基-二十八-9-烯醇盐 (DOSPER);

[0586] 三氟乙酸 2,3- 二油烯氧 -N-[2( 精胺羧酰氨基 ) 乙基 ]-N, N- 二甲基 -1- 丙酰胺 (DOSPA) ;

[0587] 1,2- 二肉豆蔻酰 -3- 三甲基铵 - 丙烷 ;1,2- 二硬脂酰 -3- 三甲基铵 - 丙烷 ;

[0588] 二十八烷基二甲基铵 (DODMA) ;

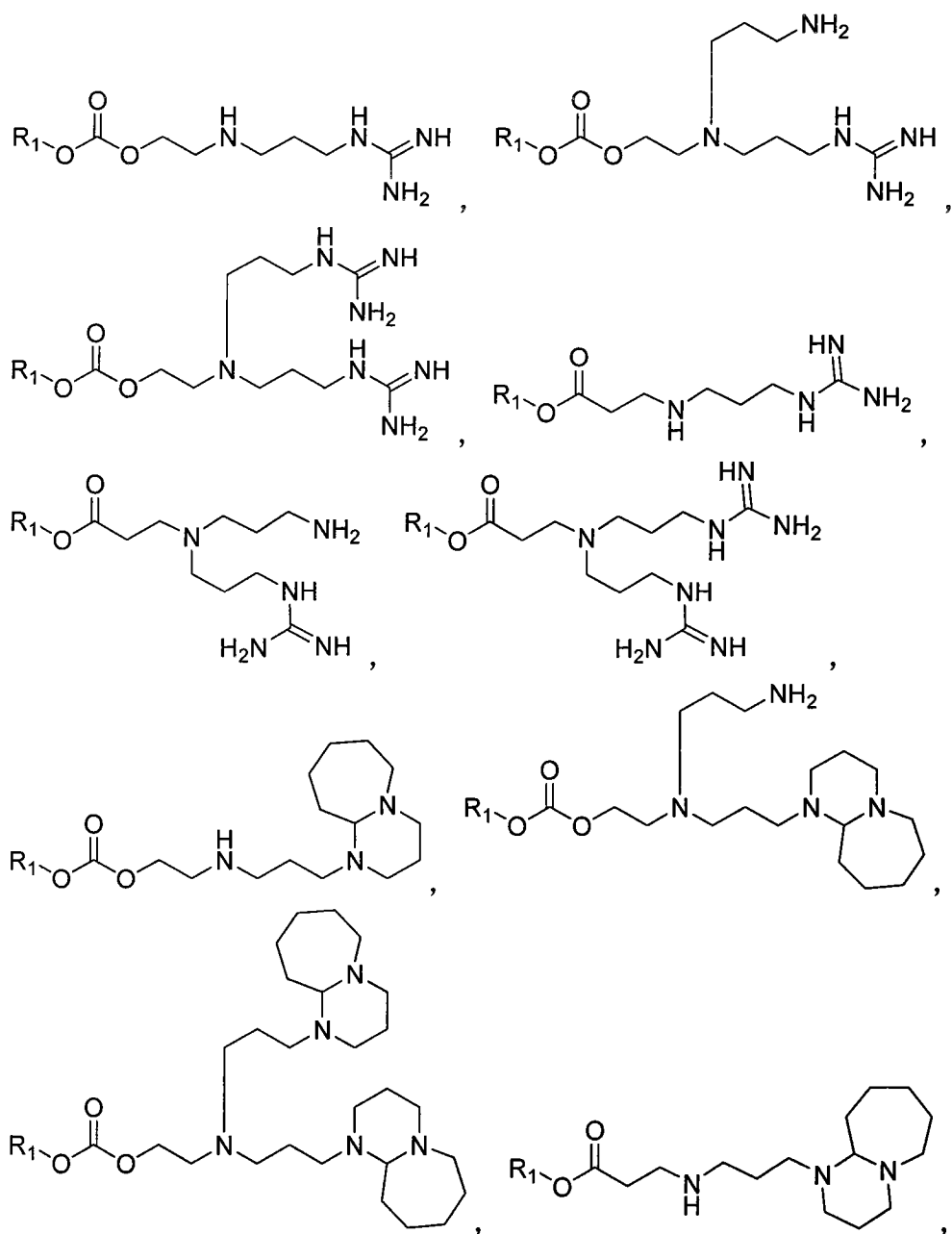
[0589] 二硬脂酰二甲基铵 (DSDMA) ;

[0590] 氯化 N, N- 二油烯基 -N, N- 二甲基铵 (DODAC) ;其制药上可接受的盐及其混合物。

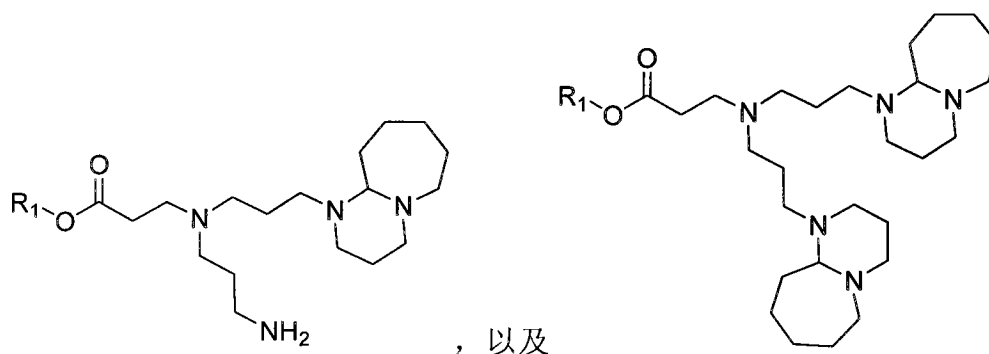
[0591] 阳离子脂质的详细描述参见 US2007/0293449 和美国专利 4, 897, 355 ;5, 279, 833 ; 6, 733, 777 ;6, 376, 248 ;5, 736, 392 ;5, 686, 958 ;5, 334, 761 ;5, 459, 127 ;2005/0064595 ; 5, 208, 036 ;5, 264, 618 ;5, 279, 833 ;5, 283, 185 ;5, 753, 613 ;以及 5, 785, 992。

[0592] 在一个优选的方面,所述阳离子脂质会在选定的 pH 值,例如  $\text{pH} < 13$  (例如,  $\text{pH} 6-12$ 、 $\text{pH} 6-8$ ) 带有正电荷。所述纳米微粒组合物的一个优选实例包括具有如下结构的所述阳离子脂质 :

[0593]



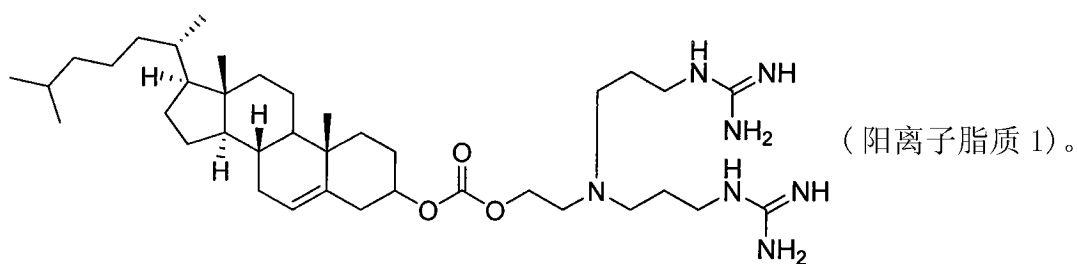
[0594]



[0595] 其中 R1 为胆固醇或其类似物。

[0596] 更加优选地, 纳米微粒组合物包括具有如下结构的所述阳离子脂质:

[0597]



[0598] 阳离子脂质的详细描述参见 PCT/US09/52396, 其内容在此引入作为参考。

[0599] 此外, 可以使用包括阳离子脂质的商业上可购买的制剂: 例如 LIPOFECTIN® (包含 DOTMA 和 DOPE 的阳离子脂质体, 来自美国纽约州格兰德岛市 GIBCO/BRL 公司); LIPOFECTAMINE® (包含 DOSPA 和 DOPE 的阳离子脂质体, 来自美国纽约州格兰德岛市 GIBCO/BRL 公司); 以及 TRANSFECTAM® (包含 DOGS 的阳离子脂质体, 来自美国威斯康星州麦迪逊市 Promega Corp. 公司)。

[0600] 4. PEG 脂质

[0601] 根据本发明所述的纳米微粒组合物包含 PEG 脂质。所述 PEG 脂质扩大本发明所述的纳米微粒的循环量, 并阻止所述纳米微粒过早地从身体排泄出来。所述 PEG 脂质降低免疫原性并增强所述纳米微粒的稳定性。

[0602] 用于所述纳米微粒组合物的所述 PEG 脂质包括融合 / 非阳离子脂质的 PEG 化的形式。所述 PEG 脂质包括, 例如与二酰甘油进行配合的 PEG (PEG-DAG), 与二酰咪唑双酰胺进行配合的 PEG, 与二酰丙氧基进行配合的 PEG (PEG-DAA), 与磷脂进行配合的 PEG、例如与磷脂酰乙醇胺发生偶联的 PEG (PEG-PE), 与神经酰胺进行配合的 PEG (PEG-Cer), 与胆固醇衍生物进行配合的 PEG (PEG-Chol) 或其混合物。参见美国专利 5, 885, 613 和 5, 820, 873, 以及美国专利公布 2006/051405, 其内容在此引入作为参考。

[0603] PEG 总的来说由如下结构表示:

[0604]  $-O-(CH_2CH_2O)_n-$

[0605] 其中 (n) 为从约 5 到约 2300 的正整数, 优选从约 5 到约 460, 由此 PEG 脂质的聚合部分具有约 200 到约 100, 000 道尔顿, 优选约 200 到约 20, 000 道尔顿的平均分子量。(n) 代表所述聚合物的聚合程度, 且取决于所述聚合物的所述分子量。

[0606] 在一个优选的方面, 所述 PEG 为聚乙二醇, 其平均分子量为约 200 到约 20, 000 道尔顿, 更加优选为约 500 到约 10, 000 道尔顿, 进一步优选为约 1, 000 到 5, 000 道尔顿 (具体为约 1, 500 到约 3, 000 道尔顿)。在一个实例中, 所述 PEG 具有约 2, 000 道尔顿的分子量。在另一个实例中, 所述 PEG 具有约 750 道尔顿的分子量。

[0607] 可选地, 所述聚乙二醇 (PEG) 残基部分可以由如下结构表示:

[0608]  $-Y_{71}-(CH_2CH_2O)_n-CH_2CH_2Y_{71}-$ ,

[0609]  $-Y_{71}-(CH_2CH_2O)_n-CH_2C(=Y_{72})-Y_{71}-$ ,

[0610]  $-Y_{71}-C(=Y_{72})-(CH_2)_{a12}-Y_{73}-(CH_2CH_2O)_n-CH_2CH_2-Y_{73}-(CH_2)_{a12}-C(=Y_{72})-Y_{71}-$  和

[0611]  $-Y_{71}-(CR_{71}R_{72})_{a12}-Y_{73}-(CH_2)_{b12}-O-(CH_2CH_2O)_n-(CH_2)_{b12}-Y_{73}-(CR_{71}R_{72})_{a12}-Y_{71}-$ ,

[0612] 其中:

[0613]  $Y_{71}$  和  $Y_{73}$  分别为 O、S、SO、SO<sub>2</sub>、NR<sub>73</sub> 或化学键;

[0614]  $Y_{72}$  为 O、S 或 NR<sub>74</sub>, 优选为氧;

[0615]  $R_{71-74}$  独立地选自氢、 $C_{1-6}$  烷基、 $C_{2-6}$  烯基、 $C_{2-6}$  炔基、 $C_{3-19}$  支链烷基、 $C_{3-8}$  环烷基、 $C_{1-6}$  取代的烷基、 $C_{2-6}$  取代的烯基、 $C_{2-6}$  取代的炔基、 $C_{3-8}$  取代的环烷基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、 $C_{1-6}$  杂烷基、取代的  $C_{1-6}$  杂烷基、 $C_{1-6}$  烷氧基、芳氧基、 $C_{1-6}$  杂烷氧基、杂芳氧基、 $C_{2-6}$  烷酰基、芳羰基、 $C_{2-6}$  烷氧羰基、芳氧羰基、 $C_{2-6}$  链烷酰氧基、芳羰氧基、 $C_{2-6}$  取代的烷酰基、取代的芳羰基、 $C_{2-6}$  取代的链烷酰氧基、取代的芳氧羰基、 $C_{2-6}$  取代的链烷酰氧基和取代的芳羰氧基，优选为氢、甲基、乙基和丙基；

[0616] (a12) 和 (b12) 分别是 0 或者正整数，优选为 0 或者从约 1 到约 6 (具体为 1、2、3、4、5、6) 的整数；以及

[0617] (n) 是从约 5 到约 2300 的整数，优选为从约 5 到约 460。

[0618] PEG 的末端可以结束于 H、 $NH_2$ 、OH、 $CO_2H$ 、 $C_{1-6}$  烷基 (例如甲基、乙基、丙基)、 $C_{1-6}$  烷氧基、酰基或芳基。在一个优选的实例中，PEG 的末端氢氧基被甲氧基或甲基取代。在一个优选的实例中，所述 PEG 脂质中使用的所述 PEG 为甲氧基 PEG。

[0619] 所述 PEG 可以直接或通过连接基基团与脂质进行配合。用于与脂质结构进行配合的所述聚合物转变成适当活化的聚合物，使用美国专利 5,122,614 和 5,808,096 中所描述的活化技术以及其他本领域所知的、无需过度实验的技术。

[0620] 有助于制备 PEG 脂质的活化的 PEG 的实例包括，例如甲氧基聚乙二醇-丁二酸盐、mPEG-NHS、甲氧基聚乙二醇-丁二酸亚胺基丁二酸盐、甲氧基聚乙二醇-乙酸 (mPEG- $CH_2COOH$ )、甲氧基聚乙二醇-胺 (mPEG- $NH_2$ )、和甲氧基聚乙二醇-磺酸酯 (mPEG-TRES)。

[0621] 在某些方面，具有末端羧酸的聚合物可以用于所述 PEG 脂质的制备。制备具有末端羧酸的高纯度聚合物的方法参见美国专利申请 11/328,662，其内容在此引入作为参考。

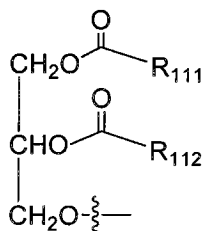
[0622] 在可选的实例中，具有末端胺基的聚合物被用来制备所述 PEG-脂质。制备包含末端胺的高纯度聚合物的方法参见美国专利申请 11/508,507 和 11/537,172，其内容在此引入作为参考。

[0623] PEG 和脂质可以通过键合，即包含连接基基团的非酯或包含连接基基团的酯结合在一起。适合的包含连接基的非酯包括但不限于酰胺基连接基基团、氨基连接基基团、羰基连接基基团、氨基甲酸酯连接基基团、碳酸酯 ( $OC(=O)O$ ) 连接基基团、尿素连接基基团、醚连接基基团、丁二酰连接基基团，及其组合。适合的酯连接基基团包括，例如丁二酰酯、磷酸酯 ( $-O-P(=O)(OH)-O-$ )、磺酸酯，及其组合。

[0624] 在一个实例中，本发明所述的纳米微粒组合物可以包括聚乙二醇-二酰甘油 (PEG-DAG) 或聚乙烯-二酰咪唑双酰胺。适合的聚乙二醇-二酰甘油或聚乙二醇-二酰咪唑双酰胺配合体包括分别具有约  $C_4$  到约  $C_{30}$  (优选约  $C_8$  到  $C_{24}$ ) 饱和的或不饱和的碳原子的烷基链长度的二烷基甘油或二烷基咪唑双酰胺基。所述二烷基甘油或二烷基咪唑双酰胺基可以进一步包括一个或多个取代的烷基。

[0625] 本发明中使用的术语“二酰甘油” (DAG) 指的是具有两个脂肪酰链， $R_{111}$  和  $R_{112}$  的化合物。 $R_{111}$  和  $R_{112}$  具有约 4 到约 30 个碳 (优选约 8 到约 24) 的相同或不同的碳链长度，并且通过酯键结合到甘油。所述酰基可以饱和，也可以不同程度的不饱和。DAG 具有总分子式：

[0626]



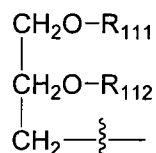
[0627] 在一个优选的实例中,所述 PEG-二酰甘油配合体是 PEG-二月桂基甘油 (C12)、PEG-二肉豆蔻基甘油 (C14, DMG)、PEG-二棕榈酰甘油 (C16, DPG) 或 PEG-二硬脂基甘油 (C18, DSG)。本领域技术人员可以理解的是,用于所述 PEG-二酰乙二酯配合体的其他二酰甘油也是可预期的。用于本发明的适合的 PEG-二酰甘油配合体,以及制备和应用它们的方法,参见美国专利公布 2003/0077829,和 PCT 专利申请 CA02/00669,其内容在此引入作为参考。

[0628] 所述 PEG-二酰甘油配合体的实例可以选自 PEG-二月桂基甘油 (C12)、PEG-二肉豆蔻基甘油 (C14)、PEG-二棕榈酰甘油 (C16)、PEG-二硬脂基甘油 (C18)。所述 PEG-二酰咪唑双酰胺的实例包括 PEG-二月桂基咪唑双酰胺 (C12)、PEG-二肉豆蔻基咪唑双酰胺 (C14)、PEG-二棕榈酰咪唑双酰胺 (C16) 和 PEG-二硬脂基咪唑双酰胺 (C18)。

[0629] 在另一个实例中,本发明所述的纳米微粒组合物可以包括聚乙二醇-二烷基丙氧基配合体 (PEG-DAA)。

[0630] 术语“二烷基丙氧基”指的是具有两个烷基链,  $\text{R}_{111}$  和  $\text{R}_{112}$  的化合物。 $\text{R}_{111}$  和  $\text{R}_{112}$  烷基包括约 4 到约 30 个碳 (优选约 8 到约 24) 的相同或不同的碳链长度。所述烷基可以饱和,也可以具有不同程度的不饱和度。二烷基丙氧基具有总分子式:

[0631]



[0632] 其中  $\text{R}_{111}$  和  $\text{R}_{112}$  烷基是具有约 4 到约 30 个碳 (优选约 8 到约 24) 的相同或不同的烷基。所述烷基可以饱和或不饱和。适合的烷基包括但不限于月桂基 (C12)、肉豆蔻基 (C14)、棕榈基 (C16)、硬脂基 (C18)、油酰基 (C18) 和二十酰基 (C20)。

[0633] 在一个实例中,  $\text{R}_{111}$  和  $\text{R}_{112}$  相同,具体地  $\text{R}_{111}$  和  $\text{R}_{112}$  均为肉豆蔻基 (C14)、硬脂基 (C18) 或油酰基 (C18) 等。在另一个实例中,  $\text{R}_{111}$  和  $\text{R}_{112}$  不同,具体地  $\text{R}_{111}$  为肉豆蔻基 (C14),  $\text{R}_{112}$  均硬脂基 (C18)。在优选的实例中,所述 PEG-二烷基丙基配合体包括相同的  $\text{R}_{111}$  和  $\text{R}_{112}$ 。

[0634] 在又一个实例中,本发明所述的纳米微粒组合物可以包括与磷脂酰乙醇胺配合的 PEG (PEG-PE)。有助于所述 PEG 脂质配合的所述磷脂酰乙醇胺可以包含具有约 4 到约 30 个碳 (优选约 8 到约 24) 的碳链长度的饱和的或不饱和的脂肪酸。适合的磷脂酰乙醇胺包括但不限于二肉豆蔻酰磷脂酰乙醇胺 (DMPE)、二棕榈酰磷脂酰乙醇胺 (DPPE)、二油酰磷脂酰乙醇胺 (DOPE) 和二硬脂酰磷脂酰乙醇胺 (DSPE)。

[0635] 在又一个实例中,本发明所述的纳米微粒组合物可以包括与神经酰胺配合的 PEG (PEG-Cer)。神经酰胺仅具有一个酰基。神经酰胺可以具有碳链长度为约 4 到约 30 个碳 (优选约 8 到约 24) 的饱和的或不饱和的脂肪酸。

[0636] 在可选的实例中,本发明所述的纳米微粒组合物可以包括与胆固醇衍生物配合的 PEG。术语“胆固醇衍生物”意为任何包含经过改性,即取代和 / 或其脱去的胆固醇结构的胆固醇类似物。所述术语胆固醇衍生物也包括类固醇激素和胆汁酸。

[0637] PEG 脂质的说明性实例包括 N-(羰基-甲氧基聚乙二醇)-1,2-二肉豆蔻酰-sn-丙三氧基-3-磷酸乙醇胺 ( $^{2\text{kDa}}$ mPEG-DMPE 或  $^{5\text{kDa}}$ mPEG-DMPE); N-(羰基-甲氧基聚乙二醇)-1,2-二棕榈酰-sn-丙三氧基-3-磷酸乙醇胺 ( $^{2\text{kDa}}$ mPEG-DPPE 或  $^{5\text{kDa}}$ mPEG-DPPE); N-(羰基-甲氧基聚乙二醇)-1,2-二硬脂酰-sn-丙三氧基-3-磷酸乙醇胺 ( $^{750\text{Da}}$ mPEG-DSPE、 $^{2\text{kDa}}$ mPEG-DSPE、 $^{5\text{kDa}}$ mPEG-DSPE); 及其制药上可接受的盐 (具体为钠盐) 及其混合物。

[0638] 在某些优选的实例中,本发明所述的纳米微粒组合物包括具有 PEG-DAG 或 PEG-神经酰胺的 PEG 脂质,其中 PEG 的分子量为约 200 到约 20,000,优选为约 500 到约 10,000,更加优选为约 1,000 到 5,000。

[0639] 表 1 提供了 PEG-DAG 和 PEG-神经酰胺的新的说明性实例。

[0640] 表 1

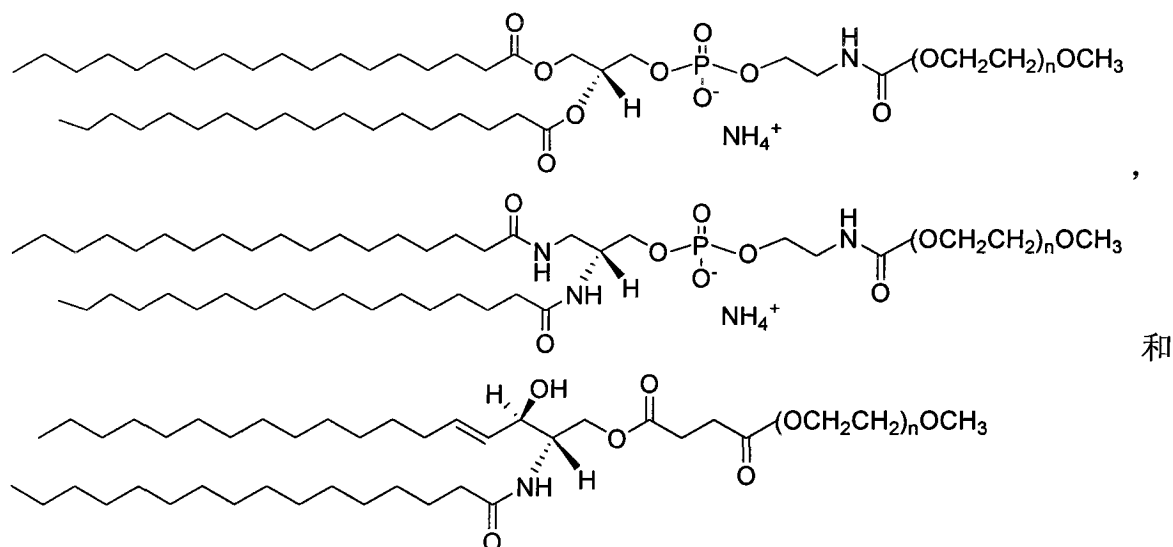
[0641]

| PEG 脂质   |              |
|----------|--------------|
| PEG-DAG  | mPEG-二肉豆蔻酰甘油 |
|          | mPEG-二棕榈酰甘油  |
|          | mPEG-二硬脂酰甘油  |
| PEG-神经酰胺 | mPEG-CerC8   |
|          | mPEG-CerC14  |
|          | mPEG-CerC16  |
|          | mPEG-CerC20  |

[0642]

[0643] 优选地,本发明所述的纳米微粒组合物包括所述 PEG 脂质,其选自 PEG-DSPE、PEG-二棕榈酰咪唑双酰胺 (C16)、PEG-神经酰胺 (C16) 等及其混合物。PEG-DSPE、mPEG-二棕榈酰咪唑双酰胺 (C16) 和 mPEG-神经酰胺 (C16) 的结构如下所示:

[0644]



[0645] 其中, (n) 是约 5 到约 2300, 优选约 5 到约 460 的整数。

[0646] 在一个优选的实例中, (n) 是约 45。

[0647] 在进一步的实例中, 并作为例如 PEG 的 PAO 基聚合物的替代选择, 可以使用一个或多个有效非抗原材料, 例如葡聚糖、聚乙烯醇、碳水化合物基质聚合物、羟丙基甲基丙烯酰胺 (HPMA)、聚烷撑氧、及 / 或其共聚物。可以代替 PEG 使用的合适的共聚物的实例包括但不限于聚乙烯吡咯烷酮、聚甲基恶唑啉、聚乙基恶唑啉、聚羟丙基甲基丙烯酰胺、聚甲基丙烯酰胺和聚二甲基丙烯酰胺、聚乳酸、聚乙醇酸, 及衍生的纤维素, 例如羟甲基纤维素或羟乙基纤维素。参见普通转让的美国专利 6, 153, 655, 其内容在此引入作为参考。本领域技术人员可以理解, 对于例如 PEG 的 PAO, 可以采用如本发明所述的相同类型的活化。本领域技术人员可以进一步了解, 上述列表仅是说明性的, 可以预期所有具有本发明所述的性质的聚合材料。基于本发明的目的, “本质上或实际上非抗原” 意为本领域中被认为在哺乳动物体内无毒并且不引起可感知的免疫反应的所有材料。

[0648] 在又一个实例中, 本发明所述的纳米微粒组合物包括具有例如缩酮或亚胺的可释放连接基的 PEG 脂质。这种可释放 PEG 脂质在输送系统进入细胞之后允许核酸 (低聚核苷酸) 从所述输送系统分离。关于这种可释放 PEG 脂质的更详细的描述参见美国临时专利申请 61/115, 379 和 61/115, 371, 名称分别为 “用于核酸输送系统的基于亚胺基团的可释放聚合脂质” 和 “用于核酸输送系统的基于缩酮或乙缩醛的可释放聚合脂质”, 以及在规定期提交的 PCT 专利申请 \_\_\_\_\_, 名称为 “用于核酸输送系统的可释放聚合脂质”, 其内容在此引入作为参考。

#### [0649] 5. 核酸 / 低聚核苷酸

[0650] 本发明所述的纳米微粒组合物可以用于将各种核酸输送到细胞或组织。所述核酸包括质粒和低聚核苷酸。优选地, 本发明所述的纳米微粒组合物用于输送低聚核苷酸。

[0651] 为了更加充分地了解本发明的范围, 定义如下术语。技术人员可以了解, 术语 “核酸” 或 “核苷酸” 适用于脱氧核糖核酸 (“DNA”)、核糖核酸 (“RNA”), 无论单链还是双链, 除非另有说明, 并且适用于其任何化学变体或类似物, 例如锁核酸 (LNA)。技术人员可以理解, 术语 “核酸” 所包括的有其多核酸、衍生物、变体和类似物。 “低聚核苷酸” 通常为相对较短的多核苷酸, 例如长度为约 2 到 200 个核苷酸, 优选为约 8 到约 50 个核苷酸, 更加优选为

约 8 到约 30 个核苷酸,进一步优选为约 8 到约 20 个或约 15 到约 28 个。根据本发明,所述低聚核苷酸通常为合成核酸,并且为单链,除非另有说明。术语“多核苷酸”和“多核酸”在本发明中可以作为同义词使用。

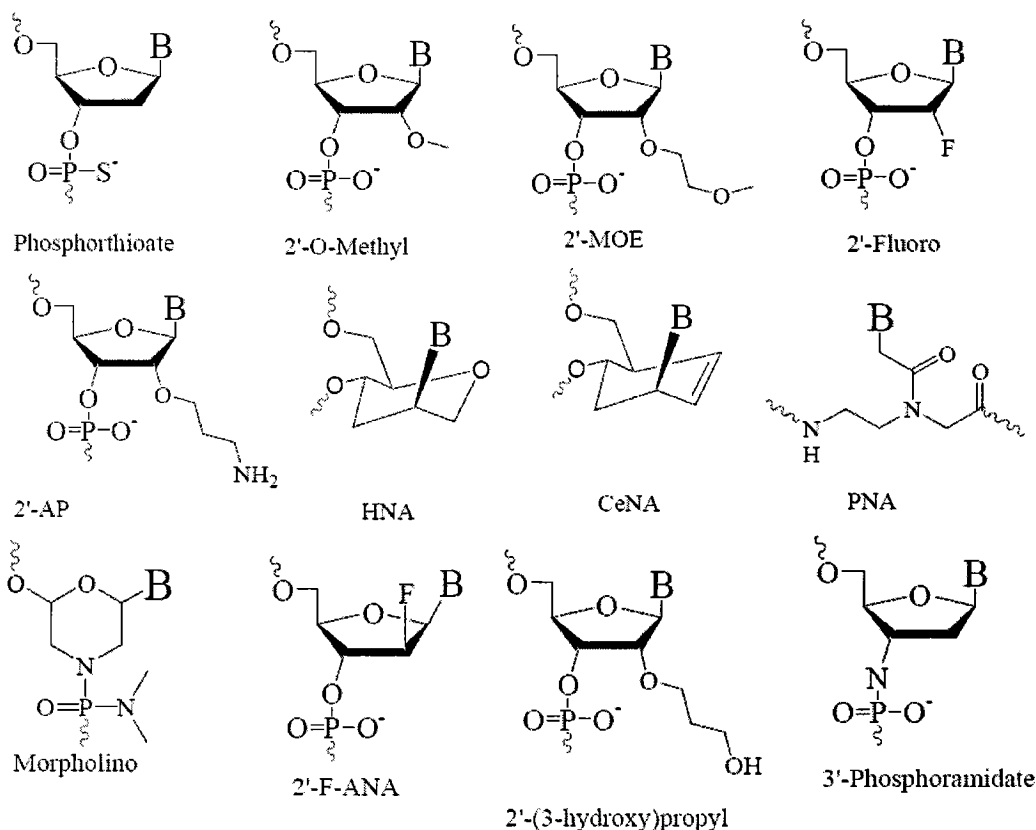
[0652] 所述低聚核苷酸(类似物)不限于单一种类的低聚核苷酸,相反,旨在与多种基团协同作用,可以理解连接基可以结合到核苷酸的一个或更多 3' - 或 5' - 末端,通常是 PO<sub>4</sub> 或 SO<sub>4</sub> 基。可以预期的核酸分子可以包括硫代磷酸核苷酸间键合变体、糖变体、核酸基变体和 / 或磷酸盐骨架变体。低聚核苷酸可以包含天然的偶磷二酯骨架或硫代磷酸骨架或任何其他改性的骨架类似物,例如 LNA(锁核酸)、PNA(具有肽骨架的核酸)、CpG 低聚物诸如此类,例如 Tides 2002,Oligonucleotide and Peptide Technology Conferences,May 6-8, 2002,Las Vegas,NV 和 Oligonucleotide & Peptide Technologies,18th & 19th November 2003,Hamburg,Germany 所披露的,其内容在此引入作为参考。

[0653] 通过本发明可以预期的低聚核苷酸的变体包括,例如将额外的电荷、极化性、氢键、散电相互作用和官能度引入到低聚核苷酸的官能基团的加成或取代。这种变体包括但不限于 2' - 位糖变体、5- 位嘧啶变体、8- 位嘌呤变体、在环外胺上的变体、4- 硫尿核苷的取代、5- 溴基或 5- 碘尿嘧啶的取代、骨架变体、甲基化、例如等基线异胞苷和异胍的碱基配对组合、以及类似的组合。本发明范围内可以预期的低聚核苷酸还可以包括 3' 和 / 或 5' 帽状结构。

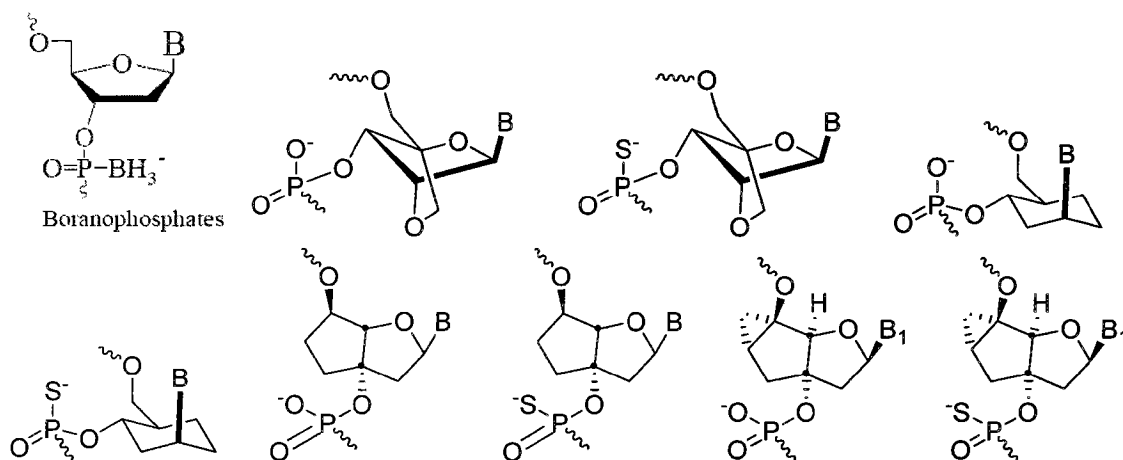
[0654] 基于本发明的目的,“帽状结构”应当理解为化学变体,其在所述低聚核苷酸的两个末端均被引入。所述帽可以出现在 5' - 末端(5' - 帽)或 3' - 末端(3' - 帽)或者同时出现在两个末端。所述 5' - 帽的非限制性实例包括反转的脱碱基残基(基团)、4', 5' - 亚甲基核苷酸;1-(β-D-赤型呋喃酮)核苷酸、4' - 硫代核苷酸、碳环核苷酸;1, 5- 失水己糖醇核苷酸;L- 核苷酸;α - 核苷酸;改性的碱性核苷酸;二硫代磷酸酯键合;苏型 - 戊呋喃酮核苷酸;无环 3', 4' - 断裂核苷酸;无环 3, 4- 二羟丁基核苷酸;无环 3, 5- 二羟戊基核苷酸;3' - 3' - 反转的核苷酸基团;3' - 3' - 反转的脱碱基基团;3' - 2' - 反转的核苷酸基团;3' - 2' - 反转的脱碱基基团;1, 4- 丁二醇磷酸酯;3' - 氨基磷酸酯;己基磷酸酯;氨己基磷酸酯;3' - 磷酸酯;3' - 硫代磷酸;二硫代磷酸酯;或者桥接或非桥接磷酸甲酯基团。详细描述参见 W097/26270,其内容在此引入作为参考。所述 3' - 帽可以包括,例如 4', 5' - 亚甲基核苷酸;1-(β-D-赤型呋喃酮)核苷酸;4' - 硫代核苷酸、碳环核苷酸;5' - 氨烷基磷酸酯;1, 3- 二氨 - 2- 丙基磷酸酯;3- 氨丙基磷酸酯;6- 氨己基磷酸酯;1, 2- 氨十二烷基磷酸酯;羟丙基磷酸酯;1, 5- 失水己糖醇核苷酸;L- 核苷酸;α - 核苷酸;改性的碱性核苷酸;二硫代磷酸酯;苏型 - 戊呋喃酮核苷酸;无环 3', 4' - 断裂核苷酸;3, 4- 二羟丁基核苷酸;3, 5- 二羟戊基核苷酸;5' - 5' - 反转的核苷酸基团;5' - 5' - 反转的脱碱基基团;5' - 氨基磷酸酯;5' - 硫代磷酸;1, 4- 丁二醇磷酸酯;5' - 氨基;桥接和 / 或非桥接 5' - 氨基磷酸酯、硫代磷酸和 / 或二硫代磷酸酯、桥接或非桥接磷酸甲酯和 5' - 巯基基团。参见 Beaucage and Iyer, 1993, Tetrahedron 49, 1925;其内容在此引入作为参考。

[0655] 核苷酸类似物的非限制性列表具有如下结构:

[0656]



[0657]



[0658] 参见 Freier & Altmann; Nucl. Acid Res., 1997, 25, 4429-4443 和 Uhlmann; Curr. Opinion in Drug Development, 2000, 3(2), 293-213 中所描述的核苷酸类似物的更多实例, 其内容在此引入作为参考。

[0659] 本发明所使用的术语“反义”指的是与能够编译出基因产物或能够编译出控制序列的特定的 DNA 或 RNA 互补的核苷酸序列。术语“反义链”用来指与“有义链”互补的核酸链。在细胞代谢的正常运行中, DNA 分子的有义链编译出核苷酸和 / 或其他基因产物。有义链充当信使 RNA (“mRNA”) 转录 (反义链) 的模板, 其依次指导任何编码的基因产物的合成。反义核酸分子可以通过包括合成在内的任何本领域所知的方法生产出来。一旦被引入到细胞中, 这个被转录的链与由所述细胞产生的天然序列合并以形成双链体。这些双链体

继而阻止 mRNA 的进一步转录或其转译。本领域了解,标识“负”或 (-) 指的是反义链,“正”或 (+) 指的是有义链。

[0660] 基于本发明的目的,“互补的”应当理解为一个核酸序列与另一个核酸序列形成氢键。百分比互补率表示核酸分子中可以与另一核酸序列形成氢键,即 Watson-Crick 碱基配对的相连的残基的百分比,具体为 10 个中有 5、6、7、8、9、10 个即为 50%、60%、70%、80%、90% 和 100% 互补。“完美互补的”意为核酸序列的所有相连的残基与另一核酸序列的相同数量的相连的残基之间形成氢键。

[0661] 用于本发明所述的纳米微粒中的核酸(例如一个或多个相同或不同的低聚核苷酸或低聚核苷酸衍生物)可以包括约 5 到约 1000 个核酸,优选为相对较短的多核苷酸,例如长度优选为约 8 到约 50 个核苷酸(例如,约 8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 或 30)。

[0662] 一方面,封装在本发明所述的纳米微粒中的有效的核酸包括低聚核苷酸和低聚脱氧核苷酸,其具有天然的偶磷二酯骨架或硫代磷酸骨架或任何其他经改性的骨架类似物,例如:

[0663] LNA(锁核酸);

[0664] PNA(具有肽骨架的核酸);

[0665] 短干扰 RNA(siRNA);

[0666] 微 RNA(miRNA);

[0667] 具有肽骨架的核酸(PNA);

[0668] 偶磷二酰胺化吗啉代低聚核苷酸(PMO);

[0669] 三环-DNA;

[0670] 诱导 ODN(双链低聚核苷酸);

[0671] 催化的 RNA 序列(RNAi);

[0672] 核糖酶;

[0673] 适体(aptamers);

[0674] 镜像体(spiegelmers, L-构型低聚核苷酸);

[0675] CpG 低聚物,诸如此类,例如下面所披露的:

[0676] Tides 2002, Oligonucleotide and Peptide Technology Conferences, May 6-8, 2002, Las Vegas, NV & Oligonucleotide & Peptide Technologies, 18th & 19th November 2003, Hamburg, Germany, 其内容在此引入作为参考。

[0677] 在封装在纳米微粒中的核酸的另一方面,低聚核苷酸可选地包括本领域所知的任何适当的核苷酸类似物和衍生物,包括下面表 2 所列的这些:

[0678] 表 2. 典型的核苷酸类似物和衍生物

[0679]

|             |                                                |
|-------------|------------------------------------------------|
| 4-乙酰胞苷      | 5-甲氧基氨基甲基-2-硫尿核苷                               |
| 5-(羧羟甲基)尿苷  | $\beta$ , D-甘露糖基喹啉                             |
| 2'-O-甲基胞苷   | 5-甲氧基羰基甲基-2-硫尿核苷                               |
| 5-甲氧基羰基甲基尿苷 | 5-羧甲基氨基甲基-2-硫尿核苷                               |
| 5-甲氧基尿苷     | 5-羰基氨基甲基尿苷                                     |
| 二氢尿苷        | 2-甲硫基-N6-异戊烯腺苷                                 |
| 2'-O-甲基假尿苷  | N-[(9- $\beta$ -D-呋核亚硝脒-2-甲基硫代嘌呤-6-yl)氨基甲酰]苏氨酸 |

[0680]

|           |                                      |
|-----------|--------------------------------------|
| D-半乳糖喹啉   | N-[(9-β-D-呋喃核糖基嘌呤-6-yl)N-甲基氨基甲酰] 苏氨酸 |
| 2'-O-甲基鸟苷 | 尿苷-5-羧乙酸-甲酯                          |
| 2'-卤-腺苷   | 2'-卤-胞苷                              |
| 2'-卤-鸟苷   | 2'-卤-胸腺嘧啶                            |
| 2'-卤-尿苷   | 2'-卤-甲基胞苷                            |
| 2'-氨基-腺苷  | 2'-氨基-胞苷                             |
| 2'-氨基-鸟苷  | 2'-氨基-胸腺嘧啶                           |
| 2'-氨基-尿苷  | 2'-氨基-甲基胞苷                           |
| 肌苷        | 尿苷-5-羧乙酸                             |
| N6-异戊烯腺苷  | Wybutoxosine                         |
| 1-甲基腺苷    | 假尿苷                                  |
| 1-甲基假尿苷   | 喹啉                                   |
| 1-甲基鸟苷    | 2-巯基胞苷                               |
| 1-甲基肌苷    | 5-甲基-2-硫尿核苷                          |
| 2,2-二甲基鸟苷 | 2-硫尿核苷                               |
| 2-甲基腺苷    | 4-硫尿核苷                               |
| 2-甲基鸟苷    | 5-甲基尿苷                               |
| 3-甲基胞苷    | N-[(9-β-D-呋喃核糖基嘌呤-6-yl)-氨基甲酰]苏氨酸     |
| 5-甲基胞苷    | 2'-O-甲基-5-甲基尿苷                       |
| N6-甲基腺苷   | 2'-O-甲基尿苷                            |
| 7-甲基鸟苷    | Wybutosine                           |
| 5-甲基氨甲基尿苷 | 3-(3-氨基-3-羧基-丙基)尿苷                   |
| 锁-腺苷      | 锁-胞苷                                 |
| 锁-鸟苷      | 锁-胸腺嘧啶                               |
| 锁-尿苷      | 锁-甲基胞苷                               |

[0681] 在一个优选的方面,封装在所述纳米微粒中的目标低聚核苷酸包括但不限于,例如致癌基因、前-血管生成路径基因、前-细胞增殖路径基因、病毒感染媒介基因和前-炎症路径基因。

[0682] 在一个优选的实例中,封装在本发明所述的纳米微粒中的低聚核苷酸涉及到瞄准肿瘤细胞或下调与肿瘤细胞相关的基因或蛋白质表达和/或肿瘤细胞对于抗癌治疗的抵

抗。例如,用来下调任何本领域所知的与癌症相关的细胞蛋白质的反义低聚核苷酸,例如 BCL-2,可以用于本发明。参见 2004 年 4 月 9 日提交的美国专利申请 10/822, 205, 其内容在此引入作为参考。优选的治疗性低聚核苷酸的非限制性列表包括反义 bcl-2 低聚核苷酸、反义 HIF-1  $\alpha$  低聚核苷酸、反义存活素低聚核苷酸、反义 ErbB3 低聚核苷酸、反义 PIK3CA 低聚核苷酸、反义 HSP27 低聚核苷酸、反义雄激素受体低聚核苷酸、反义 Gli2 低聚核苷酸和反义  $\beta$ -连环蛋白低聚核苷酸。

[0683] 更加优选地,根据本发明所述的低聚核苷酸包括硫代磷酸骨架和 LNA。

[0684] 在一个优选的实例中,低聚核苷酸可以是例如反义存活素 LNA、反义 ErbB3 LNA、或反义 HIF1- $\alpha$  LNA。

[0685] 在另一个优选的实例中,低聚核苷酸可以是例如具有相同或与 Genasense® (a/k/a oblimersen sodium, 由新泽西州柏克莱高地市 Genta Inc. 公司生产) 实质上相似的核苷酸序列的低聚核苷酸。Genasense® 是一种 18-链节硫代磷酸反义低聚核苷酸 (SEQ ID NO: 4), 其与人类 bcl-2 mRNA (人类 bcl-2 mRNA 为本领域所知, 在例如美国专利 6, 414, 134 的 SEQ ID NO: 19 中有描述, 在此引入作为参考) 起始序列的前六个密码子互补。

[0686] 可以预期的优选的实例包括:

[0687] (i) 反义存活素 LNA 低聚物 (SEQ ID NO: 1)

[0688]  ${}^m\text{C}_s\text{-T}_s\text{-}{}^m\text{C}_s\text{-A}_s\text{-a}_s\text{-t}_s\text{-c}_s\text{-c}_s\text{-a}_s\text{-t}_s\text{-g}_s\text{-g}_s\text{-}{}^m\text{C}_s\text{-A}_s\text{-G}_s\text{-c}$ ;

[0689] 其中大写字母代表 LNA, “s” 代表硫代磷酸骨架;

[0690] (ii) 反义 Bcl2 siRNA:

[0691] SENSE 5'-gcaugcggccucuguuugadTdT-3' (SEQ ID NO: 2)

[0692] ANTISENSE 3'-dTdTcguacgccggagacaaacu-5' (SEQ ID NO: 3)

[0693] 其中 dT 代表 DNA;

[0694] (iii) Genasense (硫代磷酸反义低聚核苷酸): (SEQ ID NO: 4)

[0695]  $t_s\text{-c}_s\text{-t}_s\text{-c}_s\text{-c}_s\text{-c}_s\text{-a}_s\text{-g}_s\text{-c}_s\text{-g}_s\text{-t}_s\text{-g}_s\text{-c}_s\text{-g}_s\text{-c}_s\text{-c}_s\text{-c}_s\text{-a}_s\text{-t}$

[0696] 其中小写字母代表 DNA 而 “s” 代表硫代磷酸骨架;

[0697] (iv) 反义 HIF1  $\alpha$  LNA 低聚物 (SEQ ID NO: 5)

[0698]  $T_sG_sG_sC_sA_sA_sG_sC_sA_sT_sC_sC_sT_sG_sT_sA$

[0699] 其中大写字母代表 LNA 而 “s” 代表硫代磷酸骨架。

[0700] (v) 反义 ErbB3 LNA 低聚物 (SEQ ID NO: 6)

[0701]  $T_sA_sG_sC_sC_sT_sG_sT_sC_sA_sC_sT_sT_s{}^{\text{Me}}\text{C}_sT_s{}^{\text{Me}}\text{C}_s$

[0702] 其中大写字母代表 LNA 而 “s” 代表硫代磷酸骨架。

[0703] (vi) 反义 ErbB3 LNA 低聚物 (SEQ ID NO: 7)

[0704]  $G_s{}^{\text{Me}}\text{C}_sT_sC_sC_sA_sG_sA_sC_sA_sT_sC_sA_s{}^{\text{Me}}\text{C}_sT_s{}^{\text{Me}}\text{C}$

[0705] 其中大写字母代表 LNA 而 “s” 代表硫代磷酸骨架。

[0706] (vii) 反义 PIK3CA LNA 低聚物 (SEQ ID NO: 8)

[0707]  $A_sG_s{}^{\text{Me}}\text{C}_sC_sA_sT_sT_sC_sA_sT_sT_sC_sC_sA_s{}^{\text{Me}}\text{C}_s{}^{\text{Me}}\text{C}$

[0708] 其中大写字母代表 LNA 而 “s” 代表硫代磷酸骨架。

[0709] (viii) 反义 PIK3CA LNA 低聚物 (SEQ ID NO: 9)

[0710]  $T_sT_sA_sT_sT_sG_sT_sG_sC_sA_sT_sC_sT_s{}^{\text{Me}}\text{C}_sA_sG$

[0711] 其中大写字母代表 LNA 而“s”代表硫代磷酸骨架。

[0712] (ix) 反义 HSP27 LNA 低聚物 (SEQ ID NO:10)

[0713]  $C_s G_s T_s G_s t_s a_s t_s t_s c_s c_s g_s c_s G_s T_s G$

[0714] 其中大写字母代表 LNA 而“s”代表硫代磷酸骨架。

[0715] (x) 反义 HSP27 LNA 低聚物 (SEQ ID NO:11)

[0716]  $G_s G_s^{Me} C_s a_s c_s a_s g_s c_s c_s a_s g_s t_s g_s G_s^{Me} C_s G$

[0717] 其中大写字母代表 LNA 而“s”代表硫代磷酸骨架。

[0718] (xi) 反义 Androgen Receptor LNA 低聚物 (SEQ ID NO:12)

[0719]  $^{Me} C_s^{Me} C_s^{Me} C_s a_s a_s g_s g_s c_s a_s c_s t_s g_s c_s A_s G_s A$

[0720] 其中大写字母代表 LNA 而“s”代表硫代磷酸骨架。

[0721] (xii) 反义 Androgen Receptor LNA 低聚物 (SEQ ID NO:13)

[0722]  $A_s^{Me} C_s^{Me} C_s a_s a_s g_s t_s t_s t_s c_s t_s t_s c_s A_s G_s^{Me} C$

[0723] 其中大写字母代表 LNA 而“s”代表硫代磷酸骨架。

[0724] (xiii) 反义 GLI2 LNA 低聚物 (SEQ ID NO:14)

[0725]  $^{Me} C_s T_s^{Me} C_s c_s t_s t_s g_s g_s t_s g_s c_s a_s g_s T_s^{Me} C_s T$

[0726] 其中大写字母代表 LNA 而“s”代表硫代磷酸骨架。

[0727] (xiv) 反义 GLI2 LNA 低聚物 (SEQ ID NO:15)

[0728]  $T_s^{Me} C_s A_s g_s a_s t_s t_s c_s a_s a_s c_s^{Me} C_s^{Me} C_s A$

[0729] 其中大写字母代表 LNA 而“s”代表硫代磷酸骨架

[0730] (xv) 反义  $\beta$ -连环蛋白 LNA 低聚物 (SEQ ID NO:16)

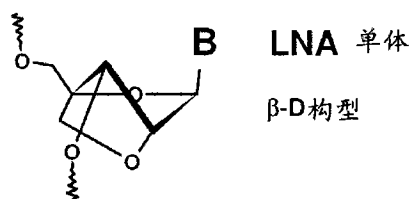
[0731]  $G_s T_s G_s t_s t_s c_s t_s a_s c_s a_s c_s a_s T_s T_s A$

[0732] 其中大写字母代表 LNA 而“s”代表硫代磷酸骨架。

[0733] 小写字母代表 DNA 单元,粗体大写字母代表 LNA,例如  $\beta$ -D-氧-LNA 单元。LNA 单体中的所有胞嘧啶碱基均为 5-甲基胞嘧啶。下标“s”代表硫代磷酸键合。

[0734] LNA 包括如下所示的 2'-O,4'-C 亚甲基二环核苷酸:

[0735]



[0736] 详细描述参见美国专利申请 11/272,124, 名称为“LNA 低聚核苷酸和癌症的治疗”, 和 10/776,934, 名称为“用于调整存活素表达的低聚化合物”中所披露的存活素 LNA, 其内容在此引入作为参考。另外参见美国专利 7,589,190 和美国专利公布 2004/0096848 中的 HIF-1 $\alpha$  调整; 美国专利公布 2008/0318894 和 PCT/US09/063357 中的 ErbB3 调整; 美国专利公布 2009/0192110 中的 PIK3CA 调整; PCT/IB09/052860 中的 HSP27 调整; 美国专利公布 2009/0181916 中的雄激素受体调整; 以及美国临时申请 61/081,135 和 PCT 申请 PCT/IB09/006407, 名称为“针对 GLI2 的 RNA 对抗剂”; 以及美国专利公布 2009/0005335 和 2009/0203137 中的  $\beta$  连环蛋白调整; 上述内容在此引入作为参考。适当的目标基因的额外的实例参见 WO 03/74654、PCT/US03/05028 和美国专利申请流水号 10/923,536, 其内容

在此引入作为参考。

[0737] 在另一个实例中,本发明所述的纳米微粒可以包括可释放地连接到内体释放促进基的低聚核苷酸。所述内体释放促进基,例如是组氨酸富集的肽,可以使内体膜破裂,因而促进治疗性药剂的细胞质输送。组氨酸富集的肽增强低聚核苷酸向细胞质的内体释放。继而,细胞内释放的低聚核苷酸可以转移到细胞核。更多关于低聚核苷酸-组氨酸富集的肽配合体的详细描述参见 2008 年 11 月 17 日提交的美国临时专利申请流水号 61/115,350 和 61/115,326,以及在规定期提交的 PCT 专利申请 \_\_\_\_\_, 名称为“用于核酸输送系统的可释放配合体”,其内容在此引入作为参考。

#### [0738] 6. 目标基团

[0739] 可选地/优选地,本发明所述的纳米微粒组合物进一步包括针对特定细胞或组织类型的目标配合基。所述目标基可以通过连接基分子结合到纳米微粒组合物的任何组件(优选为融合脂质和 PEG-脂质),所述连接基分子例如酰胺、酰胺基、羰基、酯、肽、二硫化物、硅烷、核苷、脱碱基核苷、聚醚、多胺、聚酰胺、肽、碳水化合物、脂质、聚碳氢化合物、磷酸酯、氨基磷酸酯、硫代磷酸酯、烷基磷酸酯、马来酰亚胺连接基或不耐光连接基。任何本领域所知的技术均可用于将目标基与所述纳米微粒组合物的任何组件进行配合,而无需过度的实验。

[0740] 例如,目标媒介可以结合到 PEG 脂质的聚合物部分以引导所述纳米微粒到达在体内的目标区域。本发明所述的纳米微粒的定向输送增强了封装治疗性核酸的纳米微粒的细胞吸收,因而改善了治疗效力。在某些方面,一些细胞穿透肽可以用多种目标肽替换,以实现向肿瘤位置的定向输送。

[0741] 在本发明一个优选的方面,目标基团允许纳米微粒针对特定的目标区域,所述目标基团例如是单链抗体(SCA)或单链抗原结合的抗体、单克隆抗体、例如 RGD 肽和选择蛋白的细胞粘附肽、例如 TAT、穿膜肽(Penetratin)和(Arg)<sub>9</sub>的细胞穿透肽(CPPs)、受体配合基、目标碳水化合物分子或外源凝集素。参见 J Pharm Sci. 2006 Sep ;95(9):1856-72 Cell adhesion molecules 中的定向药物输送,其内容在此引入作为参考。

[0742] 优选的目标基团包括单链抗体(SCAs)或抗体的单链可变片段(sFv)。SCA 包含抗体的域,其可以结合或识别目标肿瘤细胞的特定分子。除了保持抗原结合位置之外,与 PEG-脂质配合的 SCA 可以降低抗原性和提高 SCA 在血流中的半寿期。

[0743] 术语“单链抗体”(SCA)、“单链抗原结合的分子或抗体”或“单链 Fv”(sFv)可互换使用。所述单链抗体具有对所述抗原的结合亲和力。单链抗体(SCA)或单链 Fv 可以并已经通过几种方法构造出来。关于单链抗原结合的蛋白质的理论和制造的描述参见普通转让的美国专利申请 10/915,069 和美国专利 6,824,782,其内容在此引入作为参考。

[0744] 典型地,SCA 或 Fv 域可以选自单克隆抗体,其在文献中以如下缩写的形式被人所知:26-10、MOPC 315、741F8、520C9、McPC 603、D1.3、鼠类 ph0x、人类 ph0x、RFL3.8sTCR、1A6、Se155-4、18-2-3、4-4-20、7A4-1、B6.2、CC49、3C2、2c、MA-15C5/K<sub>12</sub>G<sub>0</sub>、Ox 等等(参见, Huston, J. S. 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883(1988); Huston, J. S. 等, SIM News 38(4)(Supp):11(1988); McCartney, J. 等, ICSU Short Reports 10:114(1990); McCartney, J. E. 等, unpublished results(1990); Nedelman, M. A. 等, J. Nuclear Med. 32(Supp.):1005(1991); Huston, J. S. 等, In:

Molecular Design and Modeling: Concepts and Applications, Part B, edited by J. J. Langone, Methods in Enzymology 203:46-88(1991); Huston, J. S. 等, In: Advances in the Applications of Monoclonal Antibodies in Clinical Oncology, Epenetos, A. A. (Ed.), London, Chapman & Hall(1993); Bird, R. E. 等, Science 242:423-426(1988); Bedzyk, W. D. 等, J. Biol. Chem. 265:18615-18620(1990); Colcher, D. 等, J. Nat. Cancer Inst. 82:1191-1197(1990); Gibbs, R. A. 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:4001-4004(1991); Milenic, D. E. 等, Cancer Research 51:6363-6371(1991); Pantoliano, M. W. 等, Biochemistry 30:10117-10125(1991); Chaudhary, V. K. 等, Nature 339:394-397(1989); Chaudhary, V. K. 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1066-1070(1990); Batra, J. K. 等, Biochem. Biophys. Res. Comm. 171:1-6(1990); Batra, J. K. 等, J. Biol. Chem. 265:15198-15202(1990); Chaudhary, V. K. 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:9491-9494(1990); Batra, J. K. 等, Mol. Cell. Biol. 11:2200-2205(1991); Brinkmann, U. 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8616-8620(1991); Seetharam, S. 等, J. Biol. Chem. 266:17376-17381(1991); Brinkmann, U. 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:3075-3079(1992); Glockshuber, R. 等, Biochemistry 29:1362-1367(1990); Skerra, A. 等, Bio/Technol. 9:273-278(1991); Pack, P. 等, Biochemistry 31:1579-1584(1992); Clackson, T. 等, Nature 352:624-628(1991); Marks, J. D. 等, J. Mol. Biol. 222:581-597(1991); Iverson, B. L. 等, Science 249:659-662(1990); Roberts, V. A. 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6654-6658(1990); Condra, J. H. 等, J. Biol. Chem. 265:2292-2295(1990); Laroche, Y. 等, J. Biol. Chem. 266:16343-16349(1991); Holvoet, P. 等, J. Biol. Chem. 266:19717-19724(1991); Anand, N. N. 等, J. Biol. Chem. 266:21874-21879(1991); Fuchs, P. 等, Biol. Technol. 9:1369-1372(1991); Breitling, F. 等, Gene 104:104-153(1991); Seehaus, T. 等, Gene 114:235-237(1992); Takkinen, K. 等, Protein Engng. 4:837-841(1991); Dreher, M. L. 等, J. Immunol. Methods 139:197-205(1991); Mottez, E. 等, Eur. J. Immunol. 21:467-471(1991); Traunecker, A. 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8646-8650(1991); Traunecker, A. 等, EMBO J. 10:3655-3659(1991); Hoo, W. F. S. 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4759-4763(1993)。上述出版物均在此引入作为参考。

[0745] 目标基的非限制性列表包括血管内皮细胞生长因子、FGF2、生长激素抑制素和生长激素抑制素类似物、转铁蛋白、促黑激素、ApoE 和 ApoE 肽、von Willebrand' s 因子和 von Willebrand' s 因子肽、腺病毒纤维蛋白质和腺病毒纤维蛋白质肽、PD1 和 PD1 肽、EGF 和 EGF 肽、RGD 肽、叶酸、茴香酰胺等。本领域技术人员所了解的其他可选的目标媒介也可以用于本发明所述的纳米微粒。

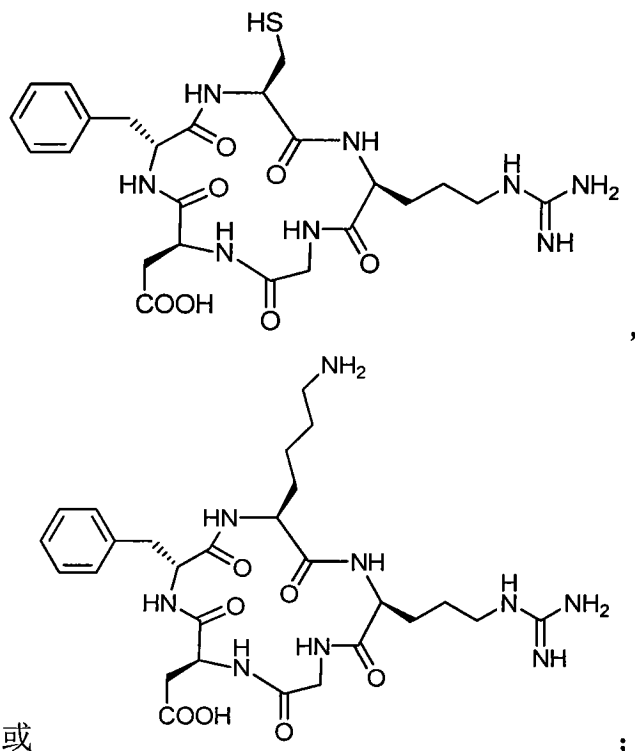
[0746] 在一个优选的实例中,用于本发明所述的化合物的目标媒介包括单链抗体(SCA)、RGD 肽、选择蛋白、TAT、穿膜肽(penetratin)、(Arg)<sub>9</sub>、叶酸、茴香酰胺等,这些媒介的一些优选的结构为:

[0747] C-TAT:(SEQ ID NO:17)CYGRKKRRQRRR;

[0748] C-(Arg)<sub>9</sub>:(SEQ ID NO:18)CRRRRRRRRR;

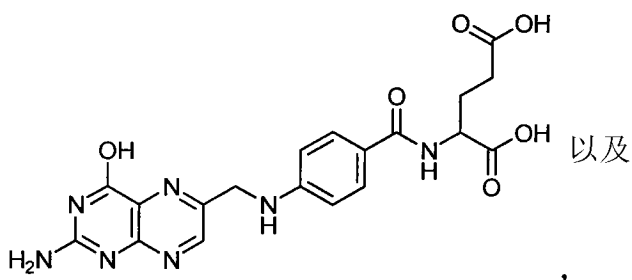
[0749] RGD 可以为链状或环状:

[0750]



[0751] 叶酸是下式的残基

[0752]



[0753] 茴香酰胺为 p-MeO-Ph-C(=O)OH。

[0754] Arg<sub>9</sub> 可以包括用于配合的半胱氨酸, 例如 CRRRRRRRRR, TAT 可以在所述肽的末端添加额外的半胱氨酸, 例如 CYGRKKRRQRRRC。

[0755] 基于本发明的目的, 说明和附图中使用的缩写代表如下结构:

[0756] (i) C-diTAT (SEQ ID NO:19) = CYGRKKRRQRRRYGRKKRRQRRR-NH<sub>2</sub>;

[0757] (ii) Linear RGD (SEQ ID NO:20) = RGDC;

[0758] (iii) Cyclic RGD (SEQ ID NO:21 和 SEQ ID NO:22) = c-RGDFC 或 c-RGDFK;

[0759] (iv) RGD-TAT (SEQ ID NO:23) = CYGRKKRRQRRRGGRGDS-NH<sub>2</sub>; 以及[0760] (v) Arg<sub>9</sub> (SEQ ID NO:24) = RRRRRRRRRR。

[0761] 可选地, 所述目标基包括, 糖和碳水化合物, 例如半乳糖、半乳糖胺和 N-乙酰半乳糖胺; 激素, 例如雌激素、睾酮、孕酮、糖皮质激素、肾上腺素、胰岛素、高血糖素、氢化可的松、维生素 D、甲状腺激素、视黄素和生长激素; 生长因子, 例如 VEGF、EGF、NGF 和 PDGF; 神经递质, 例如 GABA、谷氨酸、乙酰胆碱; NOGO; 肌醇三磷酸酯; 肾上腺素; 降肾上腺素; 一氧化氮、肽、维生素, 例如叶酸和吡哆醇、药物、抗体以及任何其他可以在体内或体外与细胞表面受体发生相互作用的分子。

[0762] D. 纳米微粒的制备

[0763] 本发明所述的纳米微粒可以通过本领域所知的任何方法制备,而无需过度的实验。

[0764] 例如,所述纳米微粒可以如此制备:在第一容器内的水溶液中提供例如低聚核苷酸的核酸(或用于比较研究的不含核酸的水溶液),在第二容器内提供包含本发明所述的纳米微粒组合物的有机脂质溶液,将所述水溶液与所述有机脂质溶液混合以制造封装了所述核酸的纳米微粒。该方法的详细描述参见美国专利公布 2004/0142025,其内容在此引入作为参考。

[0765] 可选地,本发明所述的纳米微粒可以使用本领域所知的任何方法制备,包括例如清洁剂透析法或改进的反相法,该方法在混合组分时利用有机溶剂以提供单相。在清洁剂透析法中,核酸(具体为 siRNA)与阳离子脂质的清洁剂溶液接触以形成包覆的核酸复合体。

[0766] 在本发明的一个实例中,所述阳离子脂质和例如低聚核苷酸的核酸进行合并以制造约 1 : 20 到约 20 : 1 的配料比,优选为约 1 : 5 到约 5 : 1,更加优选为约 1 : 2 到约 2 : 1。

[0767] 在本发明的一个实例中,所述阳离子脂质和例如低聚核苷酸的核酸进行合并以制造约 1 : 1 到约 20 : 1,约 1 : 1 到约 12 : 1,更加优选为约 2 : 1 到约 6 : 1 的配料比。可选地,所述纳米微粒组合物的氮与磷酸酯 (N/P) 之比为约 2 : 1 到约 5 : 1(具体为 2.5 : 1)。

[0768] 在另一个实例中,本发明所述的纳米微粒可以使用双泵系统制备。通常,所述过程包括提供在第一容器内的包含核酸的水溶液和在第二容器内的包含所述纳米微粒组合物的脂质溶液。使用双泵系统混合两种溶液以提供纳米微粒。随后将得到的混合溶液用水性缓冲液进行稀释,形成的纳米微粒可以通过渗析进行净化和/或分离。所述纳米微粒可以进一步通过使用 0.22  $\mu$ m 过滤器过滤来进行消毒处理。

[0769] 包含核酸的所述纳米微粒直径为约 5 到约 300nm。优选地,所述纳米微粒具有小于约 150nm(例如约 50-150nm)的中间粒径,更加优选为小于约 100nm 的直径,使用动态光散射技术 (DLS) 进行测量。大部分所述纳米微粒具有约 30 到 100nm(例如,59.5、66、68、76、80、93、96nm)的中间粒径,优选为约 60 到约 95nm。技术人员可以预测,使用本领域所知的其他技术,例如 TEM 进行测量,得到的中间粒径数值会比 DLS 技术增加一半。通过多分散性显示,本发明的纳米微粒尺寸大体上均匀。

[0770] 可选地,所述纳米微粒可以通过本领域所知的任何方法进行定径。尺寸可以由技术人员按照期望进行控制。进行定径是为了获得所需的尺寸范围,并使纳米微粒尺寸的分布相对狭窄。将所述纳米微粒确定为所需的尺寸有几种技术可供使用。例如参见美国专利 4,737,323,其内容在此引入作为参考。

[0771] 本发明提供制备血清稳定的纳米微粒的方法,由此核酸(例如 LNA 或 siRNA)被封装在脂质多层结构中,并被保护以防止分解。本发明所述的纳米微粒在水溶液中稳定。所述纳米微粒中所包括的核酸受到保护,免受体液内存在的核酸酶的影响。

[0772] 此外,根据本发明制备的纳米微粒在生理 pH 值下优选为中性或带正电荷。

[0773] 使用本发明所述的纳米微粒组合物制备的纳米微粒或纳米微粒复合体包括:(i)

阳离子脂质 ;(ii) 包括式 (I) 化合物的融合脂质 ;(iii) PEG 脂质和 (iv) 核酸,例如低聚核苷酸。

[0774] 在一个实例中,所述纳米微粒组合物包括下列混合物

[0775] 阳离子脂质、可选地具有二酰磷脂酰乙醇胺的式 (I) 化合物、与磷脂酰乙醇胺配合的 PEG (PEG-PE) 和胆固醇 ;

[0776] 阳离子脂质、可选地具有二酰磷脂酰胆碱的式 (I) 化合物、与磷脂酰乙醇胺配合的 PEG (PEG-PE) 和胆固醇 ;

[0777] 阳离子脂质、可选地具有二酰磷脂酰乙醇胺的式 (I) 化合物、二酰磷脂酰胆碱、与磷脂酰乙醇胺配合的 PEG (PEG-PE) 和胆固醇 ;

[0778] 阳离子脂质、可选地具有二酰磷脂酰乙醇胺的式 (I) 化合物、与神经酰胺配合的 PEG (PEG-Cer) 和胆固醇 ;以及

[0779] 阳离子脂质、可选地具有二酰磷脂酰乙醇胺的式 (I) 化合物、与磷脂酰乙醇胺配合的 PEG (PEG-PE)、与神经酰胺配合的 PEG (PEG-Cer) 和胆固醇。

[0780] 额外的纳米微粒组合物可以通过对包含本领域所知的阳离子脂质的组合物进行改性来制备。包含式 (I) 化合物的纳米微粒组合物可以通过添加本领域所知的阳离子脂质来进行改性。参见美国专利申请公布 2008/0020058 的表 IV 中描述的本领域所知的组合物,其内容在此引入作为参考。

[0781] 用于制备纳米微粒的纳米微粒组合物的非限制性列表见表 3。

[0782] 表 3

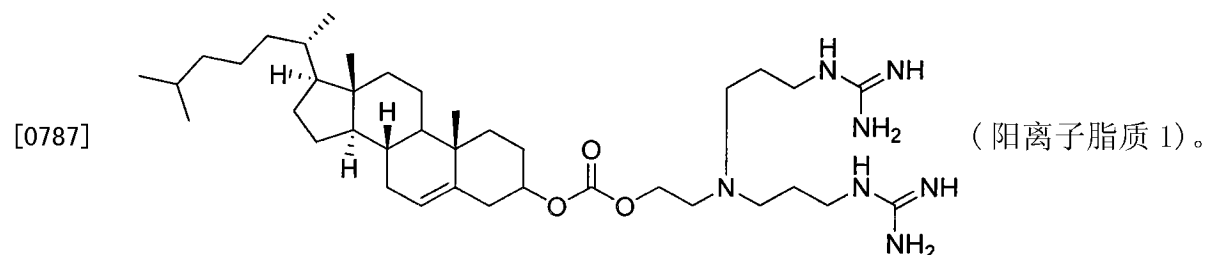
[0783]

| 样本号 | 纳米微粒组合物                                      | 摩尔比            | 低聚 (Oligo) |
|-----|----------------------------------------------|----------------|------------|
| 1   | 阳离子脂质 1: 化合物 10: DSPC: 胆固醇: DSPE-PEG         | 15:15:20:40:10 | 低聚-1       |
| 2   | 阳离子脂质 1: 化合物 10: DSPC: 胆固醇: DSPE-PEG         | 15:5:20:50:10  | 低聚-1       |
| 3   | 阳离子脂质 1: 化合物 10: DSPC: 胆固醇: DSPE-PEG         | 25:15:20:30:10 | 低聚-1       |
| 4   | 阳离子脂质 1: 化合物 10: 胆固醇: DSPE-PEG               | 20:47:30: 3    | 低聚-1       |
| 5   | 阳离子脂质 1: 化合物 10: 胆固醇: DSPE-PEG               | 17:60:20:3     | 低聚-1       |
| 6   | 阳离子脂质 1: 化合物 10: DSPE-PEG                    | 20:78: 2       | 低聚-1       |
| 7   | 阳离子脂质 1: 化合物 10: 胆固醇: C16mPEG-神经酰胺           | 17:60:20:3     | 低聚-2       |
| 8   | 阳离子脂质 1: 化合物 10: 胆固醇: DSPE-PEG: C16mPEG-神经酰胺 | 18:60:20:1:1   | 低聚-2       |

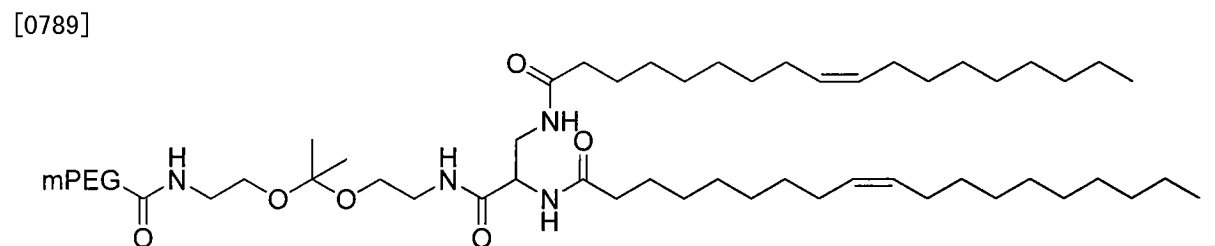
[0784] 在一个实例中, 纳米微粒中阳离子脂质 1: 化合物 10: 胆固醇: PEG-DSPE: C16mPEG-神经酰胺的摩尔比分别为约 18%: 60%: 20%: 1%: 1%。  
(样本 8 号)

[0785] 在另一个实例中, 纳米微粒包含阳离子脂质 1、化合物 10、胆固醇和 C16mPEG-神经酰胺的摩尔比以所述纳米微粒组合物中存在的脂质总量计为约 17%: 60%: 20%: 3%。  
(样本 7 号)

[0786] 在一个实例中, 组合物中所包含的阳离子脂质具有如下结构:



[0788] 在另一个实例中, 这些纳米微粒组合物包含具有如下结构的可释放聚合脂质:



[0790] 其中 PEG 脂质的聚合物部分具有约 2,000 道尔顿的数均重量。

[0791] 本发明所用的摩尔比指的是相对于所述纳米微粒组合中存在的脂质总量的量。

[0792] F. 治疗方法

[0793] 本发明所述的纳米微粒可以单独或与其他疗法联合用于治疗以阻止、抑制、降低或处理任何与细胞或组织内目标基因表达的水平相关或相应的性状、疾病或情况。所述方法包括将本发明所述的纳米微粒给药到需要的哺乳动物。

[0794] 本发明的一个方面提供了将治疗性药剂,例如核酸/低聚核苷酸,在体内和/或体外引入或输送到哺乳动物细胞中的方法。

[0795] 根据本发明的方法包括将细胞与本发明所述的化合物接触。所述输送可以作为适当的药物组合物的一部分在体内进行,或者自体内或在体外环境到达细胞。

[0796] 本发明有助于将低聚核苷酸引入到哺乳动物。本发明所述的化合物可以给药到哺乳动物,优选为人类。

[0797] 根据本发明,本发明优选提供抑制或下调(或调整)哺乳动物细胞或组织内的基因表达的方法。基因表达的下调或抑制可以在体内、自体内和/或在体外实现。所述方法包括将人类细胞或组织与封装了核酸的纳米微粒接触,或者将所述纳米微粒给药到需要的哺乳动物。一旦接触发生,与不使用本发明所述的纳米微粒相比,在体内、自体内或在体外可以确认至少约 10%,优选至少约 20%或更高(例如,至少约 25%、30%、40%、50%、60%),例如在 mRNA 或蛋白质水平方面,成功地发生了基因表达的抑制或下调。

[0798] 基于本发明的目的,“抑制”或“下调”应当理解为,当与不使用本发明所述的纳米微粒相比,目标基因的表达,或者 RNA 或编码为一个或多个蛋白质亚单元的等效 RNA 的水平,或者一个或多个蛋白质亚单元的活性发生了降低。

[0799] 在一个优选的实例中,目标基因包括但不限于,例如致癌基因、前-血管生成路径基因、前-细胞增殖路径基因、病毒感染媒介基因和前-炎症路径基因。

[0800] 优选地,癌细胞或组织内,例如脑、乳房、结肠直肠、胃、肺、口腔、胰、前列腺、皮肤或子宫颈的癌细胞,目标基因的基因表达受到了抑制。癌细胞或组织可以来自下列的一个或多个:实体瘤、淋巴瘤、小细胞肺癌、急性淋巴细胞性白血病(ALL)、胰腺癌、恶性胶质瘤、卵巢癌、胃癌、乳腺癌、结直肠癌、前列腺癌、子宫颈癌、脑肿瘤、KB 癌、肺癌、结肠癌、上皮癌等。

[0801] 在一个特定的实例中,根据本发明的方法制备的纳米微粒包括,例如反义 bcl-2 低聚核苷酸、反义 HIF-1 $\alpha$  低聚核苷酸、反义存活素低聚核苷酸、反义 ErbB3 低聚核苷酸、反义 PIK3CA 低聚核苷酸、反义 HSP27 低聚核苷酸、反义雄激素受体低聚核苷酸、反义 Gli2 低聚核苷酸和反义  $\beta$ -连环蛋白低聚核苷酸。

[0802] 根据本发明,所述纳米微粒可以包括低聚核苷酸(SEQ ID NO:1、SEQ ID NOs 2 和 3、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15 和 SEQ ID NO:16,其中每种核酸均为天然的或改性的核酸)。可以预期的疗法使用封装在上述纳米微粒中的核酸。在一个实例中,在治疗中可以使用包含八个或更多个连续的反义核苷酸的治疗性核苷酸。

[0803] 可选地,本发明还提供治疗哺乳动物的方法。所述方法包括将包含本发明所述的

纳米微粒的有效量的药物组合物给药到需要的患者。所述方法的效果取决于所述核酸对于治疗条件的效果。本发明提供适于哺乳动物体内不同医疗条件的治疗方法。所述方法包括将包含封装的治疗性核酸的有效量的纳米微粒给药到需要这种治疗的哺乳动物。本发明所述的纳米微粒尤其有助于治疗疾病,例如(但不限于)癌症、炎症性疾病和自身免疫疾病。

[0804] 在一个实例中,本发明还提供治疗具有恶性肿瘤或癌症的患者的方法,包括将包含本发明所述的纳米微粒的有效量的治疗性组合物给药到需要的患者。被治疗的癌症可以是下列的一个或多个:实性肿瘤、淋巴瘤、小细胞肺癌、急性淋巴细胞性白血病(ALL)、胰腺癌、恶性胶质瘤、卵巢癌、胃癌、结直肠癌、前列腺癌、子宫颈癌、脑肿瘤、KB 癌、肺癌、结肠癌、上皮癌等。所述纳米微粒通过下调目标基因的基因表达,在哺乳动物体内有助于治疗肿瘤疾病、降低肿瘤负担、阻止新生肿瘤转移和阻止肿瘤/新生肿瘤生长的复发。例如,所述纳米微粒有助于转移性疾病(具体为转移到肝脏的癌症)的治疗。

[0805] 在又一个方面,本发明提供在体内或体外抑制癌细胞生长或增生的方法。所述方法包括将癌细胞与本发明所述的纳米微粒接触。在一个实例中,本发明提供在体内或体外一直癌症生长的方法,其中细胞表达为 ErbB3 基因。

[0806] 在另一个方面,本发明提供将核酸(例如反义 ErbB3 LNA 低聚核苷酸)输送进癌细胞的手段,在癌细胞内其可以与 ErbB3 mRNA,例如在细胞核内结合。其结果是,ErbB3 蛋白质表达受到了抑制,其抑制了癌细胞的生长。所述方法将低聚核苷酸(例如,包括 LNA 的反义低聚核苷酸)引入到癌细胞并降低癌细胞或组织内的目标基因(例如,存活素、HIF-1  $\alpha$  或 ErbB3)表达。

[0807] 可选地,本发明提供调整癌细胞内凋亡的方法。在又一个方面,还提供在体内或体外提高癌细胞或组织对于化学疗法药剂的敏感性的方法。

[0808] 在又一个方面,提供在体内或体外杀死肿瘤细胞的方法。所述方法包括将本发明所述的化合物引入到肿瘤细胞以降低基因表达,例如 ErbB3 基因,并将所述肿瘤细胞与足以杀死部分肿瘤细胞的一定量的至少一种抗癌药(例如化学疗法药剂)接触。因此,肿瘤细胞被杀死的部分会大于相同剂量不使用本发明所述的纳米微粒的化学疗法药剂所能杀死的部分。

[0809] 在本发明的另一个方面,抗癌药/化学疗法药剂可以同时或先后与本发明所述的化合物联合使用。本发明所述的化合物可以先于或与抗癌药同时给药,或者在抗癌药给药之后给药。因此,本发明所述的纳米微粒可以在化学疗法药剂的治疗之前、同时或之后给药。

[0810] 更进一步的方面包括将本发明所述的化合物与其他抗癌药治疗结合以取得协同或附加的效果。

[0811] 可选地,本发明所述的纳米微粒组合物可以用来输送药物活性试剂,其优选具有相对于哺乳动物的负电荷或电中性。封装了纳米微粒的药物活性试剂/化合物可以给药到需要的哺乳动物。所述药物活性试剂/化合物包括小分子量分子。典型地,药物活性试剂具有小于约 1,500 道尔顿(具体为小于 1,000 道尔顿)的分子量。

[0812] 在进一步的实例中,本发明所述的化合物可以用来输送核酸、药物活性试剂或其组合。

[0813] 在又一个实例中,与治疗相关的纳米微粒可以包含一个或多个治疗性核酸(相同

或不同,例如相同或不同的低聚核苷酸)的混合物,和/或一个或多个用于协同应用的药物活性试剂。

[0814] G. 纳米微粒的药物组合物/制剂

[0815] 包含了本发明所述的纳米微粒的药物组合物/制剂可以与一个或多个生理上可接受的载体相结合来制备,所述载体包含赋形剂和助剂,所述助剂促进活性化合物转变为制药上可用的制剂。合适的制剂取决于所选择的给药途径,即采用局部还是全身的治疗。

[0816] 适当的剂型部分取决于使用或进入的途径,例如口服、皮肤用药或注射。本领域所知的制备合适的制剂需要考虑的因素包括但不限于,毒性和任何会阻止所述组合物或制剂发挥其效力的缺陷。

[0817] 本发明所述的纳米微粒的药物组合物的给药可以为口服、肺部、局部或非肠道。局部给药包括但不限于通过表皮、透皮、眼科途径的给药,包括通过粘膜,例如包括阴道和直肠输送。也可以想到非肠道给药,包括静脉、动脉、皮下、腹腔内或肌肉注射或者灌输。

[0818] 在一个优选的实例中,本发明包含治疗性低聚核苷酸的纳米微粒静脉(i. v.)或腹腔内(i. p.)给药。在本发明的许多方面,优选非肠道途径。

[0819] 为了注射,包括但不限于静脉、肌肉内和皮下注射,本发明的纳米微粒可以在水溶液中制备,优选在生理相容的缓冲液,例如生理盐水缓冲液或极性溶剂中,所述极性溶剂包括但不限于吡咯烷酮或二甲亚砜。

[0820] 纳米微粒也可以制备用于弹丸注射或用于连续灌输。用于注射的制剂可以以单位剂型提供,例如安瓿或多次剂量容器。有效的组合物包括但不限于悬液、溶液或油性或水性载体内的乳液,可以包含辅剂,例如悬浮剂、稳定剂和/或分散剂。用于非肠道给药的药物组合物包括水溶形式的水溶液。水性注射悬液可以包含调整所述悬液的粘度的物质,例如羧甲基纤维素钠、山梨醇或葡聚糖。可选地,所述悬液也可以包含合适的稳定剂和/或提高所述溶液中纳米微粒浓度的试剂。可选地,所述纳米微粒在使用前可以是粉末形式,用于与合适的载体,例如无菌、无热原的水形成的组成。

[0821] 为了口腔给药,本发明所述的纳米微粒可以通过将所述纳米微粒与本领域所知的制药上可接受的载体想结合来制备。这样的载体使得本发明的纳米微粒制备成片剂、丸剂、锭剂、糖衣丸、胶囊、液体、凝胶、糖浆、糊剂、浆液、溶液、悬液、浓缩的溶液和悬液用于在患者的饮用水中进行稀释、预混形式用于在患者的用餐中进行稀释,诸如此类,用于患者的口服。口服的药物制剂可以使用固体赋形剂来制造,在添加其他适当的辅剂(如果需要)之后,可选地,研磨得到的混合物,处理颗粒的混合物,以获得片剂或糖衣丸核。有效的赋形剂特别是,填充物,例如糖(例如,乳糖、蔗糖、甘露糖醇或山梨醇),纤维素制剂,例如玉米淀粉、小麦淀粉、米淀粉和马铃薯淀粉,以及其他材料,例如明胶、黄芪树胶、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,例如交联聚乙烯基吡咯烷酮、琼脂或海藻酸。也可以使用盐,例如海藻酸钠。

[0822] 为了通过吸入给药,本发明的纳米微粒可以方便地以喷雾剂的形式使用压力包装或喷雾器和适当的推进剂来输送。

[0823] 所述纳米微粒制备成直肠组合物,例如栓剂或保留灌肠,使用例如常规的栓剂基质,例如可可脂或其他甘油酯。

[0824] 除了上述制剂之外,所述纳米微粒还可以制备成长效制剂。这种长效制剂可以通

过埋入法（例如，皮下或肌肉内）或通过肌肉注射给药。本发明的纳米微粒可以为了这种给药途径制备，使用适当的聚合或疏水材料（例如，使用制药上可接受的油），使用离子交换树脂，或者作为微溶衍生物，例如但不限于，微溶盐。

[0825] 此外，所述纳米微粒可以使用缓释系统，例如包含所述纳米微粒的固体疏水聚合物的半透基质来输送。已经确认了多种缓释材料，并且为本领域技术人员所知。

[0826] 另外，可以在本发明所述的纳米微粒的药物组合物中使用抗氧化剂和悬浮剂。

[0827] H. 剂量

[0828] 为适于抑制一个或多个预先选定的基因的表达而确定剂量，例如临床意义上的治疗有效量，是本领域技术人员能够胜任的，尤其是鉴于本发明的公开性。

[0829] 对于本发明的方法中所使用的任何治疗性核酸，治疗有效量可以通过体外测定来初步测定。然后，可以确定在动物模型中使用的剂量，以获得包括该有效剂量的循环浓度范围。这一信息可以用来更精确地确定用于患者的剂量。

[0830] 药物组合物的给药量取决于包括在其中的核酸的效力。通常，用于治疗中的包含核酸的纳米微粒的量是可以有效地在哺乳动物体内获得需要的治疗结果的量。自然，不同纳米微粒的剂量会根据封装在其中（例如低聚核苷酸）的核酸（或药物活性试剂）而有所区别。此外，根据剂型和给药途径，剂量当然会不同。不过总的来说，封装在本发明所述的纳米微粒中的核酸可以以约 0.1 到约 1g/kg/ 周的量给药，优选为约 1 到约 500mg/kg，更加优选为 1 到约 100mg/kg（具体为约 3 到约 90mg/kg/ 服）。

[0831] 上述范围是说明性的，本领域技术人员可以根据临床经验和治疗指征确定最佳剂量。并且，确切的处方、给药途径和剂量可以通过医生个人对于患者情况的判断来选择。此外，本发明所述的纳米微粒的毒性和治疗效能可以通过使用本领域所知的方法在细胞培养或实验动物中进行的标准药物过程来确定。

[0832] 可选地，根据核酸的效力，在治疗中可以使用约 1mg 到约 100mg/kg/ 服（0.1 到 100mg/kg/ 服）的量。剂量单位形式总体上为约 1mg 到约 60mg 的活性剂低聚核苷酸。

[0833] 在一个实例中，本发明的治疗包括将一定量的本发明所述的纳米微粒给药到哺乳动物，所述一定量为约 1 到约 60mg/kg/ 服（约 25 到 60mg/kg/ 服，约 3 到约 20mg/kg/ 服），例如 60、45、35、30、25、15、5 或 3mg/kg/ 服（单次剂量或多次剂量制）。例如，本发明所述的纳米微粒可以在 q3dx9 以 5、25、30 或 60mg/kg/ 服的量静脉给药。再例如，治疗方案包括将反义低聚核苷酸以一定量给药，所述一定量为每周约 4 到约 18mg/kg/ 服，或每周约 4 到约 9.5mg/kg/ 服（例如，在六周的周期内以每周约 8mg/kg/ 服的剂量服用三周）。

[0834] 可选地，封装在本发明所述的纳米微粒中的低聚核苷酸的输送包括将一定浓度的低聚核苷酸在体内、自体内或在体外与肿瘤细胞或组织接触，所述浓度为约 0.1 到约 1000  $\mu$  M，优选为约 10 到约 1500  $\mu$  M（具体为约 10 到约 1000  $\mu$  M，约 30 到约 1000  $\mu$  M）。

[0835] 所述组合物可以每日一次给药，或者作为多周治疗方案的一部分分成多次剂量给药。精确的剂量取决于情况所处的阶段和严重程度，疾病，例如肿瘤对于核酸的敏感性，以及被治疗患者的个人特质，这是本领域技术人员可以了解的。

[0836] 在本发明涉及到纳米微粒给药的所有方面，所述的剂量是基于低聚核苷酸分子的量，而不是给药的纳米微粒的量。

[0837] 可以预测的是，所述治疗会持续一日或多日，直到取得需要的临床结果。根据患者

的性别、年龄和医疗状况以及由参与的临床医生确定的疾病的严重程度,封装了治疗性核酸(或药物活性试剂)的纳米微粒给药的确切的量、频率和周期当然会有所不同。

[0838] 更进一步的方面包括将本发明所述的的纳米微粒与其他抗癌疗法联合使用以取得协同或附加的效果。

[0839] 实例

[0840] 下述实例用来帮助进一步理解本发明,但并不以任何方式限制本发明的有效范围。

[0841] 在这些实例中,所有合成反应均在干燥的氮气或氩气中进行。N-(3- 氨丙基)-1, 3- 丙烷二氨)、BOC-ON、LiOCl<sub>4</sub>、胆固醇和 1H- 吡唑 -1- 甲脒 •HCl 购自 Aldrich。所有其他的试剂和溶剂无需进一步提纯直接使用。LNA 低聚 -1 目标存活素基因和低聚 -2 目标 ErbB3 基因自行制备,其序列见表 4。核苷内键合为硫代磷酸,<sup>18</sup>C 代表甲基化胞嘧啶,大写字母指代 LNA。

[0842] 表 4

[0843]

| LNA 低聚               | 序列                                                                   |
|----------------------|----------------------------------------------------------------------|
| 低聚 -1 (SEQ ID NO :1) | 5' - <sup>18</sup> CT <sup>18</sup> CAatccatgg <sup>18</sup> CAGc-3' |
| 低聚 -2 (SEQ ID NO :6) | 5' -TAGcctgtcactt <sup>18</sup> CT <sup>18</sup> C-3'                |

[0844] 在全部实例中使用下述缩写,诸如 LNA(Locked nucleic acid oligonucleotide)、BACC(2-[N, N' -二 (2- 胍丙基)] 氨乙基 -胆固醇基 -碳酸酯)、Chol(胆固醇)、DIEA(二异丙基乙胺)、DMAP(4-N, N-二甲氨基 -吡啶)、DOPE(L-α -二油酰基磷脂酰乙醇胺,美国 Avanti Polar Lipids 或日本 NOF)、DLS(动态光散射)、DSPC(1, 2-二硬脂基 -sn- 丙三氧基 -3- 磷酸胆碱)(日本 NOF)、DSPE-PEG(1,2-二硬脂基 -sn- 丙三氧基 -3- 磷酸乙醇胺 -N-( 聚乙二醇 )2000 铵盐或钠盐,美国 Avanti Polar Lipids 和日本 NOF)、KD(knowndown)、EPC(卵磷脂酰胆碱,美国 Avanti Polar Lipids) 以及 C16 mPEG-Ceramide(N-棕榈酰 -鞘氨醇 -1- 丁二酰 (甲氧基聚乙二醇)2000,美国 Avanti Polar Lipids)。也使用其他缩写,诸如 FAM(6- 羧基荧光素)、FBS(牛胎儿血清)、GAPDH(甘油醛 -3- 磷酸脱氢酶)、DMEM(Dulbecco' s Modified Eagle' s Medium)、MEM(Modified Eagle' s Medium)、TEAA(四乙基乙酸铵)、TFA(三氟乙酸)、RT-qPCR(逆转录 - 定量聚合酶链反应)。

[0845] 实例 1. 常规 NMR 方法。

[0846] 除非另有说明,使用 Varian Mercury 300NMR 光谱仪,以氘化的三氯甲烷作为溶剂,在 300MHz 得到 <sup>1</sup>H NMR 光谱,在 75.46MHz 得到 <sup>13</sup>C NMR 光谱。在四甲基硅烷 (TMS) 的磁场方向发现百万分级 (ppm) 的化学位移。

[0847] 实例 2. 常规 HPLC 方法。

[0848] 通过 Beckman Coulter System Gold® HPLC 设备对反应混合物和中间体的纯度以及最终产物进行监测。其使用 ZORBAX® 300SB C8 反相柱 (150×4.6mm) 或 Phenomenex Jupiter® 300A C18 反相柱 (150x4.6mm) 和 168 DiodeArray UV 检测器,使用流速为 1mL/

分的 0.05% TFA 中梯度为 10-90% 的乙腈或流速为 1mL/ 分的 50mM TEAA 缓冲液中梯度为 25-35% 的乙腈。在来自 GE healthcare (Amersham Biosciences) 的 AKTA explorer 100A 上运行阴离子交换色谱,使用来自 Applied Biosystems 的、填充在来自 Waters 的 AP-Empty 玻璃柱中的 Poros 50HQ 强阴离子交换树脂。使用来自 Amersham Biosciences 的 HiPrep 26/10 脱盐柱进行脱盐。(用于 PEG- 低聚)

[0849] 实例 3. 常规 mRNA 下调过程。

[0850] 细胞保持在完全培养基 (F-12K 或 DMEM, 用 10% FBS 补充) 中。一个在每个井孔中包含  $2.5 \times 10^5$  个细胞的 12 孔的井孔板在 37°C 下培养一整夜。用 Opti-MEM® 对细胞进行一次清洗,并向每个井孔中加入 400  $\mu$ L 的 Opti-MEM®。然后向每个井孔中加入包含低聚核苷酸的纳米微粒或 Lipofectamine 2000® 的溶液。对井孔培养 4 小时,再向每个井孔中加入 600  $\mu$ L 的培养基,并培养 24 小时。处理 24 小时之后,通过 RT-qPCR 对目标基因,例如人类存活素,和持家基因,例如 GAPDH 的细胞内 mRNA 水平进行定量。对 nRNA 的表达水平进行规格化。

[0851] 实例 4. 常规 RNA 制备过程。

[0852] 为了在体外的 mRNA 下调屏幕,使用 RNAqueous Kit® (Ambion) 根据厂家的说明制备全部 RNA。使用定量仪 (Nanodrop) 通过 OD<sub>260nm</sub> 确定 RNA 浓度。

[0853] 实例 5. 常规 RT-qPCR 过程。

[0854] 所有试剂均来自 Applied Biosystems: High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit® (4368813)、20x PCR master mix (4304437) 和用于人类 GAPDH (Cat. #0612177) 的 TaqMan® Gene Expression Assays 工具包以及存活素 (BIRK5 Hs00153353)。全部 2.0  $\mu$ g 的 RNA 用来 cDNA 合成,最终体积为 50  $\mu$ L。反应在 PCR 温度循环起中进行,25°C 下进行 10 分钟,在 37°C 下进行 120 分钟,在 85°C 下进行 5 秒钟,然后在 4°C 下贮存。使用 50°C -2 分钟、95°C -10 分钟和 95°C -15 秒钟 /60°C -1 分钟进行 40 次循环的程序进行实时 PCR。使用在最终 30  $\mu$ L 的体积中含 1  $\mu$ L 的 cDNA 用于每次 qPCR 反应。

[0855] 实例 6: H-Dap-OMe: 2HCl (化合物 1) 的制备

[0856] 在室温下,在 1,4- 二恶烷 (130mL) 中用 2M HCl 对 H-Dap-(Boc)-OMe: HCl (5g, 19.63mmol) 处理 30 分钟。在 30-35°C 下,在真空中将溶剂去除。残留物在乙醚中回溶并过滤。分离的固体在真空中用 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 进行干燥,得到 3.4g (90%) 产物: <sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  38.95、49.99、53.53、66.37、166.77。

[0857] 实例 7: 二油酰基 -Dap-OMe (化合物 2) 的制备

[0858] 将化合物 1 (3.4g, 17.8mmol) 在 26mL 无水 DMF 中的溶液加入到油酸 (22.5mL, 20.0g, 71.1mmol) 在 170mL 污水 DCM 的溶液中。混合物冷却到 0 到 5°C, 然后加入 EDC (20.5g, 106.7mmol) 和 DMAP (28.2g, 231.1mmol)。反应混合物搅拌一整夜,并被允许在氮气中升温到室温。使用 TLC (DCM: MeOH = 90: 1, v/v) 监测反应是否完成。反应混合物用 200mL 试剂级的 DCM 进行稀释,用 1N HCl (3 $\times$ 80mL) 和 0.5% 含水 NaHCO<sub>3</sub> (3 $\times$ 80mL) 进行清洗。将得到的有机层分离,用无水硫酸镁进行干燥,在 30°C 下真空中进行浓缩。残留物用硅胶柱色谱 (DCM/MeOH/TEA = 95: 5: 0.1, v/v/v) 进行提纯,得到 7.0g (61%) 产物: <sup>13</sup>C NMR  $\delta$  14.15、22.60、25.55、25.69、27.20、27.25、29.18、29.23、29.29、29.34、29.55、29.75、29.78、31.91、36.43、36.52、41.53、52.63、53.58、129.49、129.54、129.82、129.85、170.55、

173.59、174.49。

[0859] 实例 8 :二油酰基 -Dap-OH( 化合物 3) 的制备

[0860] 将 NaOH(0.87g, 21.63mmol) 在 7mL 水中的溶液加入到化合物 2(7.0g, 10.8mmol) 在 70mL 乙醇中的溶液中。混合物在室温下搅拌一整夜,在室温下真空中进行浓缩。残留物在 63mL 水中形成悬液,在 5℃下用 1N HCl 对溶液进行酸化。用 DCM 对水溶液萃取三次。将得到的有机层合并,用无水硫酸镁进行干燥。在 35℃下真空中将溶剂去除,得到 5.5g(80%) 产品:<sup>13</sup>C NMR δ 14.19、22.75、25.51、25.68、27.25、27.29、29.21、29.26、29.32、29.38、29.59、29.79、29.82、31.95、36.30、36.37、41.58、55.15、129.53、129.91、171.49、175.67、176.19。

[0861] 实例 9 :BocNHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>( 化合物 4) 的制备

[0862] 在 0-5℃下,将 Boc- 酸酐(60g, 274.9mmol) 在 150mL 无水 DCM 中的溶液花费 1.5 小时缓慢加入到乙烷-1,2- 二胺(41.3g, 687.3mmol) 在 250mL 无水 THF 和 200mL 无水 DCM 的溶液中。反应混合物搅拌一整夜,同时允许其升温到室温。将 300mL 的水加入到混合物中,在 30℃下真空中进行浓缩。用 DCM(3×300mL) 对得到的水溶液进行清洗,将有机层合并,并用 0.5N HCl(3×300mL) 对其进行萃取。将含水层合并,用 4N NaOH 溶液将 pH 值调节到 9-10,然后用 DCM(3×500mL) 进行萃取。将有机层合并,用无水硫酸镁进行干燥。在 35℃下真空中将溶剂去除,得到 17.6g(40%) 产品:<sup>13</sup>C NMR δ 28.23、41.67、43.19、78.77、155.93。

[0863] 实例 10 :二油酰基 -Dap-NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHBoc( 化合物 5) 的制备

[0864] 将 DMAP(6.2g, 51.2mmol) 加入到化合物 3(5.4g, 8.53mmol) 在 50mL 无水 DMF 和 400mL 无水 DCM 的溶液中,溶液在冰浴中进行冷却。将化合物 4(2.73g, 17.1mmol) 和 EDC(6.6g, 34.1mmol) 加入到溶液中,溶液搅拌一整夜,同时升温到室温。用 TLC(DCM/MeOH = 9 : 1, v/v) 监测反应是否完成,500mL 的 DCM 对反应混合物进行稀释,用 0.2N HCl(3×500mL) 和水(3×500mL) 进行清洗,并用无水硫酸镁进行干燥。在 35℃下真空中将溶剂去除,得到 5.6g(85%) 产品:<sup>13</sup>CNMR δ 14.16、22.72、25.52、25.77、27.23、27.26、28.43、29.24、29.35、29.56、29.79、31.92、36.50、40.25、40.38、41.99、55.22、76.57-77.42(CDC13)、79.41、129.54、129.86、156.35、170.44、174.25、175.35。

[0865] 实例 11 :二油酰基 -Dap-NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>( 化合物 6) 的制备

[0866] 将化合物 5(5.6g, 7.2mmol) 溶于 95mL DCM 中,在室温下用 24mL 三氟乙酸对溶液处理 30 分钟。在室温下真空中将溶剂去除,残留物用 200mL DCM 再溶解。用水对溶液进行清洗,并用 1% NaHCO<sub>3</sub> 清洗几次知道 pH 值为 8-9。用无水硫酸镁对有机层进行干燥,在 30℃下真空中将溶剂去除,得到 4.13g(85%) 产物:<sup>13</sup>C NMR δ 14.15、22.70、25.62、25.77、27.25、29.24、29.35、29.55、29.78、31.91、36.43、41.53、54.95、129.48、129.85、170.99、174.43、175.33。

[0867] 实例 12 :4-( 二甲基缩醛) 苯酸( 化合物 7) 的制备

[0868] 将 4- 甲酰苯酸(1.5g, 10mmol) 溶于 30mL 无水甲醇中,然后加入四氟硼酸锂在乙腈(300 μL, 0.3mmol)、原甲酸三甲酯(1.38g, 10mmol) 中的 1.0M 溶液。反应混合物回流一整夜。将溶剂去除,将残留物在沸腾的环己烷中悬浮 30 分钟。混合物冷却到室温,通过过滤将固体分离,得到 1.5g(77%) 产物:<sup>13</sup>C NMR(CD<sub>3</sub>OD) 53.26、103.88、127.75、130.47、131.14、

144. 29、169. 30。

[0869] 实例 13 : 化合物 8 的制备。

[0870] 将 FmocNH-Lys(OMe)-NH<sub>2</sub> (0. 60mmol) 和 DMAP (219. 6mg, 1. 80mmol) 溶于无水 DCM 和无水 DMF 中。混合物冷却到 0-5℃, 然后加入 EDC (345. 6mg, 1. 80mmol) 和化合物 7 (352. 8mg, 1. 80mmol)。在 0℃ 到室温下, N<sub>2</sub> 中反应混合物搅拌一整夜。将溶剂去除, 残留物从 DMF/IPA (10mL/100mL) 的混合溶剂中经过再结晶得到产物。

[0871] 实例 14 : 化合物 9 的制备。

[0872] 在室温下用 1. 68mL 86% 的甲酸对 6. 75mL 三氯甲烷中的化合物 8 (0. 46mmol) 处理一整夜。将溶剂去除, 残留物从 DCM/ 乙醚中经过两次再结晶得到产物。

[0873] 实例 15 : 化合物 10 的制备。

[0874] 将化合物 6 (0. 30mmol) 溶于 10mL 无水 DCM 和 2mL 无水 DMF 中, 然后加入化合物 9 (1. 0g, 0. 2mmol)、分子筛 (2g) 和 DIEA (25. 8mg, 0. 2mmol)。在室温下 N<sub>2</sub> 中, 反应混合物搅拌一整夜。将反应混合物过滤, 将滤出液在真空中进行浓缩。残留物从乙腈-IPA 中再结晶。将非常微细的固体悬浮物进行离心得到产物 : 用哌啶处理化合物, 除去 Fmoc 得到胺。用 NaOH 处理胺中间体, 使甲酯水解, 然后酸化以制备化合物 10。

[0875] 实例 16. LNA- 脂质纳米微粒组合物的制备

[0876] 在这个实例中, 制备封装了各种核酸的纳米微粒组合物, 例如包含低聚核苷酸的 LNA。例如, 阳离子脂质 1、化合物 10、胆固醇、DSPE-PEG 和 C<sub>16</sub>mPEG- 神经酰胺以 18 : 60 : 20 : 1 : 1 的摩尔比在 10mL 90% 乙醇中进行混合 (总脂质 30 μmole)。将 LNA 低聚核苷酸 (0. 4 μmole) 溶于 10mL 20mM Tris 缓冲液 (pH 7. 4-7. 6) 中。加热到 37℃ 之后, 两种溶液通过双注射泵混合在一起, 然后用 20mL 20mM Tris 缓冲液 (300mM NaCl, pH 7. 4-7. 6) 对混合溶液进行稀释。混合物 37℃ 下培养 30 分钟, 在 10mM PBS 缓冲液 (138mM NaCl, 2. 7mM KCl, pH 7. 4) 中进行渗析。通过渗析将乙醇从混合物中去除之后, 得到稳定的微粒。通过离心对纳米微粒溶液进行浓缩。将纳米微粒溶液转移到 15mL 离心过滤装置 (Amicon Ultra-15, 美国 Millipore)。离心在离心速度为 3, 000rpm, 温度为 4℃ 的条件下进行。在给定时间之后收集浓缩的悬浮物, 用 0. 22 μm 注射式过滤器 (Millex-GV, 美国 Millipore) 进行过滤以消毒。

[0877] 在 25° 水 (Sigma) 中, 纳米微粒在 Plus 90 Particle Size Analyzer Dynamic Light Scattering Instrument (Brookhaven, 纽约) 上作为介质, 测量其直径和多分散性。

[0878] 通过 UV-VIS (Agilent 8453) 确定 LNA 低聚核苷酸的封装效率。通过扫描溶液获得背景 UV-vis 光谱, 所述扫描溶液是由 PBS 缓冲盐水 (250 μL)、甲醇 (625 μL) 和三氯甲烷 (250 μL) 组成的混合溶液。为了确定封装起来的核酸浓度, 将甲醇 (625 μL) 和三氯甲烷 (250 μL) 添加到 PBS 缓冲盐水纳米微粒悬液 (250 μL) 中。混合之后, 得到清液, 该溶液经过声处理 2 分钟, 然后在 260nm 吸光度。根据公式 (1) 和 (2) 计算封装的核酸浓度和 The encapsulated nucleic acid concentration and 荷载效率 :

[0879]  $C_{en} (\mu g/ml) = A_{260} \times OD_{260} \text{ 单位 } (\mu g/ml) \times \text{稀 释 因 子 } (\mu L / \mu L) \text{-----} (1)$

[0880] 其中稀释因子由样品贮存容量 (μL) 除以测定容量 (μL) 得到。

[0881] 封装效率 (%) =  $[C_{en}/C_{initial}] \times 100 \text{-----} (2)$

)

[0882] 其中  $C_{en}$  经过提纯之后封装在纳米微粒悬浮物内的核酸（具体为 LNA 低聚核苷酸）浓度， $C_{initial}$  在纳米微粒悬液形成之前初始的核酸（LNA 低聚核苷酸）浓度。各种纳米微粒组合物的实例总结于表 5 和 6 中。

[0883] 表 5

[0884]

| 样本号 | 纳米微粒组合物                                         | 摩尔比            | 低聚   |
|-----|-------------------------------------------------|----------------|------|
| 1   | 阳离子脂质 1: 化合物 10: DSPC: 胆固醇:<br>PEG-DSPE         | 15:15:20:40:10 | 低聚-1 |
| 2   | 阳离子脂质 1: 化合物 10: DSPC: 胆固醇:<br>PEG-DSPE         | 15:5:20:50:10  | 低聚-1 |
| 3   | 阳离子脂质 1: 化合物 10: DSPC: 胆固醇:<br>PEG-DSPE         | 25:15:20:30:10 | 低聚-1 |
| 4   | 阳离子脂质 1: 化合物 10: 胆固醇: PEG-DSPE                  | 20:47:30: 3    | 低聚-1 |
| 5   | 阳离子脂质 1: 化合物 10: 胆固醇: PEG-DSPE                  | 17:60:20:3     | 低聚-1 |
| 6   | 阳离子脂质 1: 化合物 10: PEG-DSPE                       | 20:78: 2       | 低聚-1 |
| 7   | 阳离子脂质 1: 化合物 10: 胆固醇: C16mPEG-神经<br>酰胺          | 17:60:20:3     | 低聚-2 |
| 8   | 阳离子脂质 1: 化合物 10: 胆固醇: PEG-DSPE:<br>C16mPEG-神经酰胺 | 18:60:20:1:1   | 低聚-2 |

[0885] 表 6

[0886]

| 样本号 | 纳米微粒组合物                                         | 摩尔比          | 低聚       |
|-----|-------------------------------------------------|--------------|----------|
| NP1 | 阳离子脂质 1: 化合物 10: 胆固醇:<br>PEG-DSPE: C16mPEG-神经酰胺 | 18:60:20:1:1 | 低聚-2     |
| NP2 | 阳离子脂质 1: 化合物 10: 胆固醇:<br>PEG-DSPE: C16mPEG-神经酰胺 | 18:60:20:1:1 | FAM-低聚-2 |
| NP3 | 阳离子脂质 1: 化合物 10: 胆固醇:<br>PEG-DSPE: C16mPEG-神经酰胺 | 18:60:20:1:1 | None     |

[0887] 实例 17. 纳米微粒稳定性

[0888] 纳米微粒稳定性定义为其在 4℃ 下随着时间推移保持结构完整性的能力。纳米微粒的胶体稳定性通过监测其平均直径随时间的变化来评价。由表 6 中的样本 NP1 制备的纳米微粒分散到 10mM PBS 缓冲液 (138mM NaCl, 2.7mM KCl, pH 7.4) 中, 并在 4℃ 下贮藏。在一个给定的时间点, 取约 20–50  $\mu$ L 的纳米微粒悬浮物并用纯水稀释到 2mL。在 25℃ 下用

DLS 测量纳米微粒的尺寸。

[0889] 实例 18 :纳米微粒在体外的细胞吸收

[0890] 封装在本发明所述的纳米微粒中的核酸 (LNA oligonucleotide Oilgo-2) 的细胞吸收的效率在人类癌细胞,例如前列腺癌细胞 (15PC3 cell line) 中进行评价。使用实例 16 中所述的方法制备样本 NP2 的纳米微粒。LNA 低聚核苷酸 (低聚-2) 用 FAM 进行标记,以用于荧光显微镜研究。

[0891] 在 15PC3 细胞系中对纳米微粒进行评价。细胞保持在完全培养基 (DMEM, 用 10% FBS 补充) 中。一个在每个井孔中包含  $2.5 \times 10^5$  个细胞的 12 孔的井孔板在 37°C 下培养一整夜。用 Opti-MEM 对细胞进行一次清洗,并向每个井孔中加入 400μL 的 Opti-MEM。然后,用封装了核酸 (FAM- 改性的低聚 2) 的样本 NP2 (200nM) 的纳米微粒溶液,或者没有纳米微粒的自由核酸 (无封装的 FAM 改性的低聚 2) 的溶液 (作为对比) 对细胞进行处理。细胞在 37°C 下培养 24 小时。用 PBS 对细胞进行五次清洗,然后用 300μL 的 Hoechst 溶液 (2mg/mL) 对每个井孔进行 30 分钟染色处理,再用 PBS 清洗 5 次。细胞用预冷却的 (-20°C) 70% 乙醇在 -20°C 下固定 20 分钟。细胞在荧光显微镜下进行观察,以评价封装在本发明所述的纳米微粒内的核酸的细胞吸收效率。

[0892] 实例 19. 纳米微粒在各种人类癌细胞中在体外对于 mRNA 下调的效力

[0893] 对本发明所述的纳米微粒在各种癌细胞中的效力进行评价,所述癌细胞例如人类不能排除癌细胞 (A431)、人类胃癌细胞 (N87)、人类肺癌细胞 (A549、HCC827 或 H1581)、人类前列腺癌细胞 (15PC3、LNCaP、PC3、CWR22、DU145)、人类乳腺癌细胞 (MCF7、SKBR3)、结肠癌细胞 (SW480)、胰腺癌细胞 (BxPC3) 和黑素瘤 (518A2)。细胞用下列之一进行处理:纳米微粒封装的反义 ErbB3 低聚核苷酸 (样本 NP1) 或空白对照纳米微粒 (样本 NP3)。每种纳米微粒在体外对于 ErbB3 表达下调的效力用实例 3 所述的过程进行测量。

[0894] 实例 20. 在人类前列腺癌异种移植的小鼠模型中纳米微粒对于 mRNA 下调的效果

[0895] 本发明所述的纳米微粒在体内的效力在人类前列腺癌异种移植的小鼠体内进行评价。通过向右侧肋腹皮下注射  $5 \times 10^6$  细胞 / 鼠,在裸鼠体内移植 15PC3 人类前列腺肿瘤。当肿瘤达到 100mm<sup>3</sup> 的平均体积,小鼠被随机编为 5 只一组。每组的小鼠用封装了反义 ErbB3 低聚核苷酸 (样本 NP1) 的纳米微粒或相应的未封装低聚核苷酸 (低聚 2) 进行治疗。纳米微粒在 q3dx4 (或 q3dx10) 以 15mg/kg/ 服、5mg/kg/ 服、1mg/kg/ 服、或 0.5mg/kg/ 服的剂量静脉 (i. v.) 给药。剂量基于纳米微粒中低聚核苷酸的量。未封装低聚核苷酸在 q3dx4 以 30mg/kg/ 服的剂量腹腔内 (i. p.) 给药,或者以 25mg/kg/ 服或 45mg/kg/ 服的剂量静脉给药,历时 12 天。小鼠在末次服药之后二十四小时 sacrificed。从小鼠收集血浆样品并在 -20°C 下贮存。还从小鼠手机肿瘤和肝脏样品。对样品进行分析以得到肿瘤和肝脏中的 mRNA KD。对这些动物的存活进行观察。

[0001]

用于核酸输送系统的可释放融合脂质1310-PCT\_序列表.txt  
序列表

<110> ENZON PHARMACEUTICALS, INC.  
Hong ZHAO  
Weili YAN  
Lianjun SHI  
Dechun WU  
Maksim ROYZEN

<120> 用于核酸输送系统的可释放融合脂质

<130> 213. 1310-PCT

<140>

<141>

<150> 61/115,378

<151> 2008-11-17

<160> 24

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 16

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明：  
合成的低聚核苷酸

<400> 1

ctcaatccat ggcagc

16

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 组合DNA/RNA分子说明：  
合成的低聚核苷酸

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1) (19)

<223> RNA

<400> 2

gcaugcggcc ucuguugat t

21

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 组合DNA/RNA分子说明：  
合成的低聚核苷酸

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1) (19)

<223> RNA

<400> 3

ucaaacagag gccgcaguet t

21

<210> 4

<211> 19

[0002]

|                           |    |
|---------------------------|----|
| <212> DNA                 |    |
| <213> 人工序列                |    |
| <220>                     |    |
| <223> 人工序列说明：<br>合成的低聚核苷酸 |    |
| <400> 4                   |    |
| tctcccagcg tgcgccc        | 19 |
| <210> 5                   |    |
| <211> 16                  |    |
| <212> DNA                 |    |
| <213> 人工序列                |    |
| <220>                     |    |
| <223> 人工序列说明：<br>合成的低聚核苷酸 |    |
| <400> 5                   |    |
| tggcaagcat cctgta         | 16 |
| <210> 6                   |    |
| <211> 16                  |    |
| <212> DNA                 |    |
| <213> 人工序列                |    |
| <220>                     |    |
| <223> 人工序列说明：<br>合成的低聚核苷酸 |    |
| <400> 6                   |    |
| tagcctgtca cttctc         | 16 |
| <210> 7                   |    |
| <211> 16                  |    |
| <212> DNA                 |    |
| <213> 人工序列                |    |
| <220>                     |    |
| <223> 人工序列说明：<br>合成的低聚核苷酸 |    |
| <400> 7                   |    |
| gtccagaca tcactc          | 16 |
| <210> 8                   |    |
| <211> 16                  |    |
| <212> DNA                 |    |
| <213> 人工序列                |    |
| <220>                     |    |
| <223> 人工序列说明：<br>合成的低聚核苷酸 |    |
| <400> 8                   |    |
| agccattcat tccacc         | 16 |
| <210> 9                   |    |
| <211> 16                  |    |
| <212> DNA                 |    |
| <213> 人工序列                |    |
| <220>                     |    |
| <223> 人工序列说明：<br>合成的低聚核苷酸 |    |
| <400> 9                   |    |
| ttattgtgca tctcag         | 16 |

[0003]

<210> 10  
<211> 16  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
  
<220>  
<223> 人工序列说明：  
合成的低聚核苷酸  
  
<400> 10  
cgtgtatttc cgcgtg 16

<210> 11  
<211> 16  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
  
<220>  
<223> 人工序列说明：  
合成的低聚核苷酸  
  
<400> 11  
ggcacagcca gtggcg 16

<210> 12  
<211> 16  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
  
<220>  
<223> 人工序列说明：  
合成的低聚核苷酸  
  
<400> 12  
cccaaggcac tgcaga 16

<210> 13  
<211> 16  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
  
<220>  
<223> 人工序列说明：  
合成的低聚核苷酸  
  
<400> 13  
accaagtttc ttcagc 16

<210> 14  
<211> 16  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
  
<220>  
<223> 人工序列说明：  
合成的低聚核苷酸  
  
<400> 14  
ctccttggtg cagtct 16

<210> 15  
<211> 15  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
  
<220>  
<223> 人工序列说明：  
合成的低聚核苷酸

[0004]

<400> 15  
tcagattcaa accca 15

<210> 16  
<211> 16  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列说明：  
合成的低聚核苷酸

<400> 16  
gtgttctaca ccatta 16

<210> 17  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列说明：  
合成的肽

<400> 17  
Cys Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg  
1 5 10

<210> 18  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列说明：  
合成的肽

<400> 18  
Cys Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg  
1 5 10

<210> 19  
<211> 23  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列说明：  
合成的肽

<400> 19  
Cys Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Tyr Gly Arg Lys  
1 5 10 15  
Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg  
20

<210> 20  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列说明：  
合成的肽

<400> 20  
Arg Gly Asp Cys  
1

[0005]

<210> 21  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列说明：  
合成的肽

<400> 21  
Arg Gly Asp Phe Cys  
1 5

<210> 22  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列说明：  
合成的肽

<400> 22  
Arg Gly Asp Phe Lys  
1 5

<210> 23  
<211> 19  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列说明：  
合成的肽

<400> 23  
Cys Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Gly Gly Gly Arg  
1 5 10 15  
Gly Asp Ser

<210> 24  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列说明：  
合成的肽

<400> 24  
Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg  
1 5

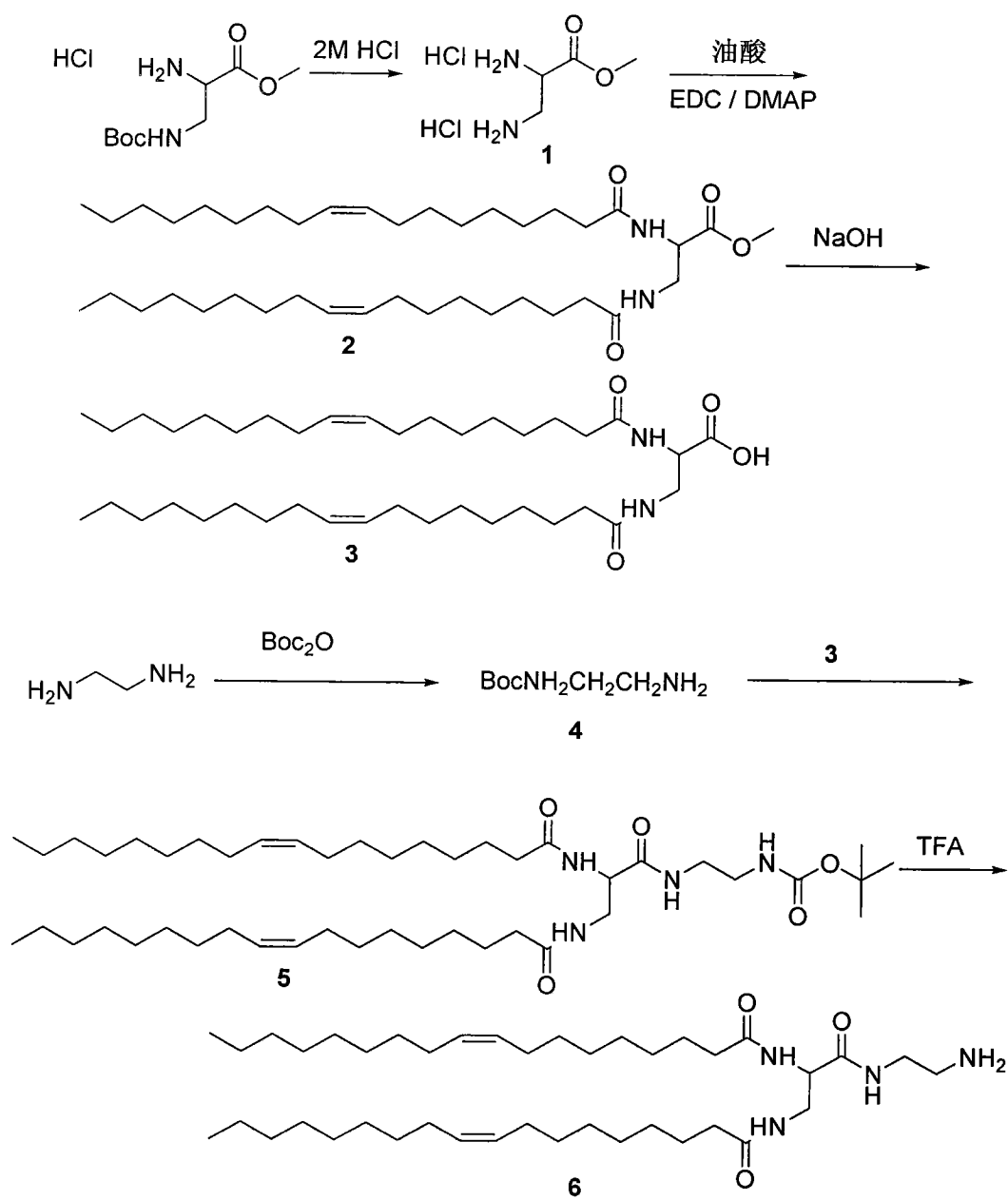


图 1

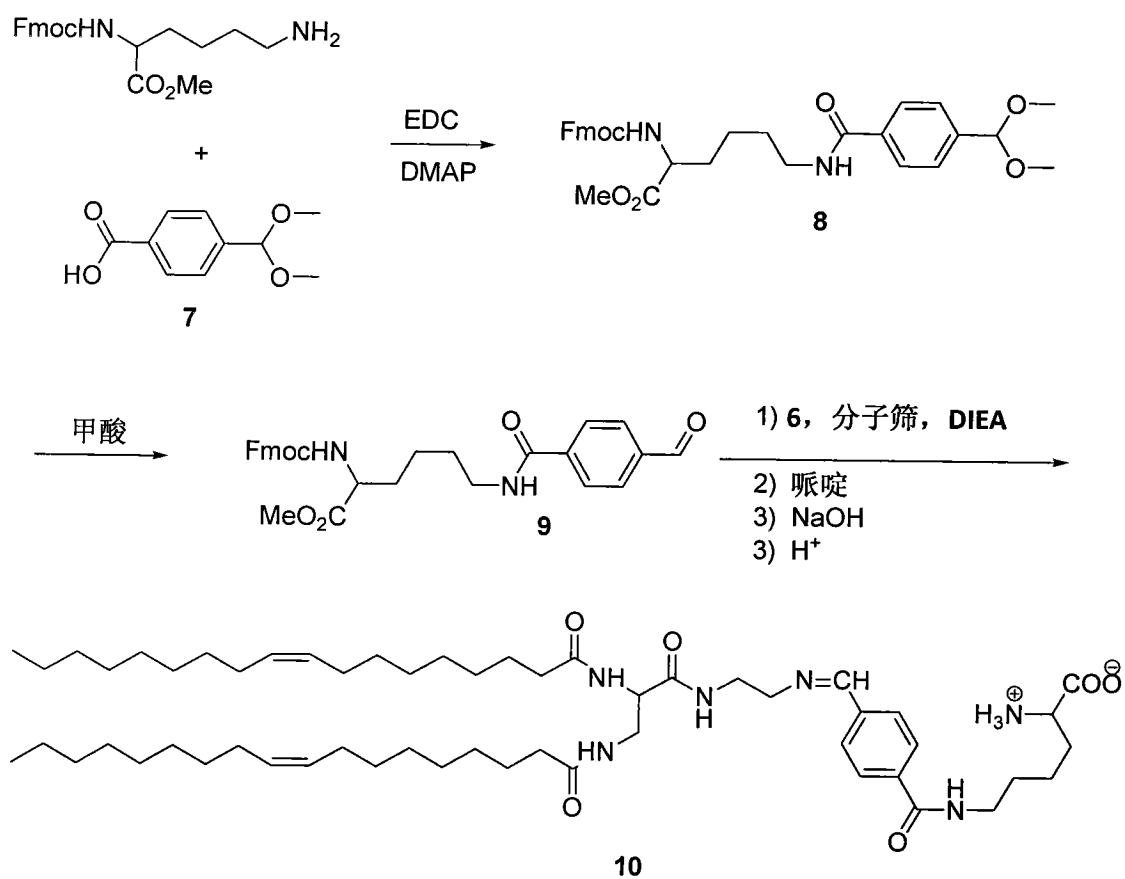


图 2