



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116096702 A

(43) 申请公布日 2023.05.09

(21) 申请号 202180062116.6

(22) 申请日 2021.07.16

(30) 优先权数据

63/052,815 2020.07.16 US

63/188,996 2021.05.14 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.03.10

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2021/042007 2021.07.16

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/016070 EN 2022.01.20

(71) 申请人 爱康泰生治疗公司

地址 加拿大不列颠哥伦比亚省

(72) 发明人 朱莉娅·加滕约 杜新曜

(74) 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理有限公司 11204

专利代理师 王达佐 洪欣

(51) Int.Cl.

C07C 233/36 (2006.01)

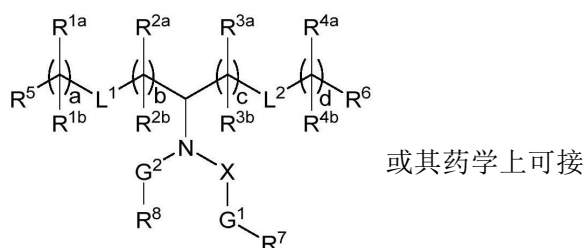
权利要求书4页 说明书38页

(54) 发明名称

用于脂质纳米颗粒的阳离子脂质

(57) 摘要

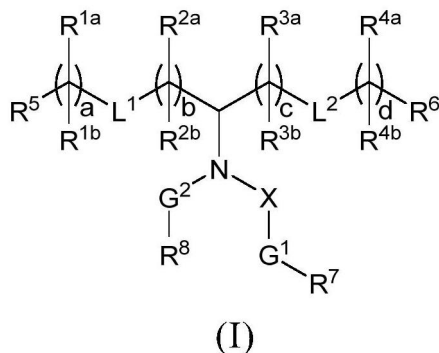
提供了具有以下结构的化合物：



(I)

受的盐、互变异构体或立体异构体，其中a、b、c、d、G<sup>1</sup>、G<sup>2</sup>、L<sup>1</sup>、L<sup>2</sup>、R<sup>1a</sup>、R<sup>1b</sup>、R<sup>2a</sup>、R<sup>2b</sup>、R<sup>3a</sup>、R<sup>3b</sup>、R<sup>4a</sup>、R<sup>4b</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>、R<sup>7</sup>、R<sup>8</sup>和X如本文所定义。还提供了所述化合物作为脂质纳米颗粒制剂的组分用于递送治疗剂的用途、包含所述化合物的组合物及其使用和制备方法。

1. 具有式(I)的结构的化合物:



或其药学上可接受的盐、互变异构体或立体异构体,其中:

$G^1$ 和 $G^2$ 各自独立地为 $C_1$ - $C_6$ 亚烷基;

$L^1$ 和 $L^2$ 各自独立地为 $-O(C=O)-$ 或 $-(C=O)O-$ ;

$R^{1a}$ 和 $R^{1b}$ 在每次出现时独立地为:(a) H或 $C_1$ - $C_{12}$ 烷基;或(b)  $R^{1a}$ 为H或 $C_1$ - $C_{12}$ 烷基,并且 $R^{1b}$ 与它所连接的碳原子一起与相邻的 $R^{1b}$ 和它所连接的碳原子一起形成碳碳双键;

$R^{2a}$ 和 $R^{2b}$ 在每次出现时独立地为:(a) H或 $C_1$ - $C_{12}$ 烷基;或(b)  $R^{2a}$ 为H或 $C_1$ - $C_{12}$ 烷基,并且 $R^{2b}$ 与它所连接的碳原子一起与相邻的 $R^{2b}$ 和它所连接的碳原子一起形成碳碳双键;

$R^{3a}$ 和 $R^{3b}$ 在每次出现时独立地为:(a) H或 $C_1$ - $C_{12}$ 烷基;或(b)  $R^{3a}$ 为H或 $C_1$ - $C_{12}$ 烷基,并且 $R^{3b}$ 与它所连接的碳原子一起与相邻的 $R^{3b}$ 和它所连接的碳原子一起形成碳碳双键;

$R^{4a}$ 和 $R^{4b}$ 在每次出现时独立地为:(a) H或 $C_1$ - $C_{12}$ 烷基;或(b)  $R^{4a}$ 为H或 $C_1$ - $C_{12}$ 烷基,并且 $R^{4b}$ 与它所连接的碳原子一起与相邻的 $R^{4b}$ 和它所连接的碳原子一起形成碳碳双键;

$R^5$ 和 $R^6$ 各自独立地为H或甲基;

$R^7$ 为 $-O(C=O)R^{10}$ 、 $-(C=O)OR^{10}$ 、 $-NR^9(C=O)R^{10}$ 或 $-(C=O)NR^9R^{10}$ ;

$R^8$ 为OH、 $-N(R^{11})(C=O)R^{12}$ 、 $-(C=O)NR^{11}R^{12}$ 、 $-NR^{11}R^{12}$ 、 $-(C=O)OR^{12}$ 或 $-O(C=O)R^{12}$ ;

$R^9$ 为H或 $C_1$ - $C_{15}$ 烷基;

$R^{10}$ 为 $C_1$ - $C_{15}$ 烷基;

$R^{11}$ 为H或 $C_1$ - $C_6$ 烷基;

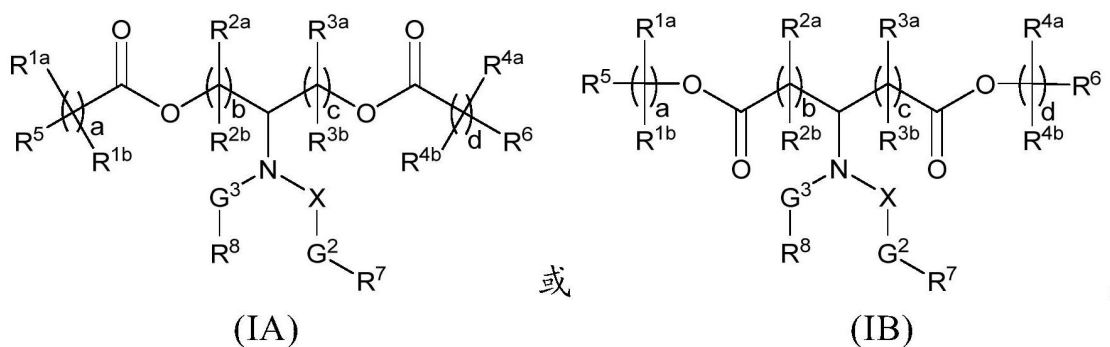
$R^{12}$ 为 $C_1$ - $C_6$ 烷基;

X为 $-(C=O)-$ 或直连键;以及

a、b、c和d各自独立地为1至24的整数;

其中每个烷基和亚烷基独立地为任选取代的。

2. 根据权利要求1所述的化合物,具有以下结构(IA)或(IB)中的一种:



或其药学上可接受的盐、互变异构体或立体异构体。

3. 根据权利要求1或2所述的化合物,其中 $G^1$ 为 $C_2$ - $C_3$ 亚烷基。

4. 根据权利要求1或2所述的化合物,其中 $G^1$ 为 $C_4$ - $C_6$ 亚烷基。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的化合物,其中 $G^2$ 为 $C_2$ - $C_4$ 亚烷基。

6. 根据权利要求5所述的化合物,其中 $G^2$ 为 $C_2$ - $C_3$ 亚烷基或 $C_3$ - $C_4$ 亚烷基。

7. 根据权利要求1至6中任一项所述的化合物,其中X为 $-(C=O)-$ 。

8. 根据权利要求1至6中任一项所述的化合物,其中X为直连键。

9. 根据权利要求1至8中任一项所述的化合物,其中 $R^7$ 为 $-O(C=O)R^{10}$ 或 $-(C=O)OR^{10}$ 。

10. 根据权利要求9所述的化合物,其中 $R^{10}$ 为直链 $C_1$ - $C_{15}$ 烷基。

11. 根据权利要求10所述的化合物,其中 $R^{10}$ 为直链 $C_6$ - $C_{10}$ 烷基。

12. 根据权利要求10所述的化合物,其中 $R^{10}$ 为甲基。

13. 根据权利要求10所述的化合物,其中 $R^{10}$ 为支化 $C_2$ - $C_{15}$ 烷基。

14. 根据权利要求13所述的化合物,其中 $R^{10}$ 为支化 $C_{10}$ - $C_{15}$ 烷基。

15. 根据权利要求1至8中任一项所述的化合物,其中 $R^7$ 为 $-NR^9(C=O)$ 或 $-(C=O)NR^9R^{10}$ 。

16. 根据权利要求15所述的化合物,其中 $R^9$ 为H。

17. 根据权利要求15所述的化合物,其中 $R^9$ 和 $R^{10}$ 各自独立地为 $C_6$ - $C_{10}$ 烷基。

18. 根据权利要求1至17中任一项所述的化合物,其中对于 $R^{1a}$ 和 $R^{1b}$ 的至少一次出现, $R^{1a}$ 为H或 $C_1$ - $C_{12}$ 烷基,并且 $R^{1b}$ 和它所连接的碳原子与相邻的 $R^{1b}$ 和它所连接的碳原子一起形成碳碳双键。

19. 根据权利要求1至18中任一项所述的化合物,其中对于 $R^{4a}$ 和 $R^{4b}$ 的至少一次出现, $R^{4a}$ 为H或 $C_1$ - $C_{12}$ 烷基,并且 $R^{4b}$ 和它所连接的碳原子与相邻的 $R^{4b}$ 和它所连接的碳原子一起形成碳碳双键。

20. 根据权利要求1至19中任一项所述的化合物,其中对于 $R^{2a}$ 和 $R^{2b}$ 的至少一次出现, $R^{2a}$ 为H或 $C_1$ - $C_{12}$ 烷基,并且 $R^{2b}$ 和它所连接的碳原子与相邻的 $R^{2b}$ 和它所连接的碳原子一起形成碳碳双键。

21. 根据权利要求1至20中任一项所述的化合物,其中对于 $R^{3a}$ 和 $R^{3b}$ 的至少一次出现, $R^{3a}$ 为H或 $C_1$ - $C_{12}$ 烷基,并且 $R^{3b}$ 和它所连接的碳原子与相邻的 $R^{3b}$ 和它所连接的碳原子一起形成碳碳双键。

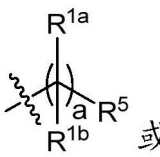
22. 根据权利要求1至17中任一项所述的化合物,其中 $R^{1a}$ 、 $R^{1b}$ 、 $R^{2a}$ 、 $R^{2b}$ 、 $R^{3a}$ 、 $R^{3b}$ 、 $R^{4a}$ 和 $R^{4b}$ 在每次出现时独立地为H或 $C_1$ - $C_{12}$ 烷基。

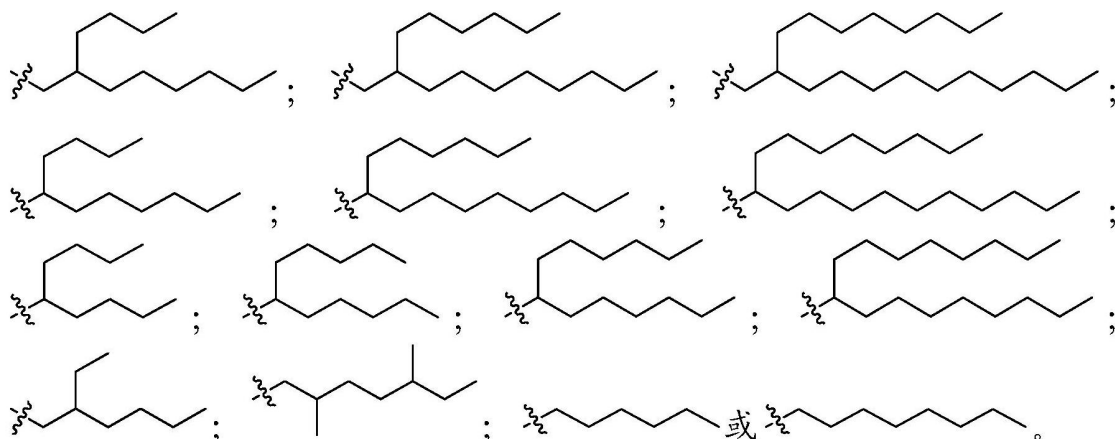
23. 根据权利要求22所述的化合物,其中 $R^{2a}$ 、 $R^{2b}$ 、 $R^{3a}$ 和 $R^{3b}$ 在每次出现时为H。

24. 根据权利要求22或23所述的化合物,其中 $R^{1a}$ 和 $R^{4a}$ 在每次出现时为H。

25. 根据权利要求22至24中任一项所述的化合物,其中 $R^{1b}$ 和 $R^{4b}$ 中的至少一个为 $C_1$ - $C_8$ 烷基。

26. 根据权利要求25所述的化合物,其中 $C_1$ - $C_8$ 烷基为甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基、正己基或正辛基。

27. 根据权利要求22至26中任一项所述的化合物, 其中  或两者独立地具有以下结构中的一种:



28. 根据权利要求1至27中任一项所述的化合物, 其中a、b、c和d各自独立地为2至12的整数。

29. 根据权利要求1至27中任一项所述的化合物, 其中a、b、c和d各自独立地为4至10、5至10、6至10、4至9、5至9或6至9的整数。

30. 根据权利要求1至29中任一项所述的化合物, 其中 $R^5$ 或 $R^6$ 中的一个为甲基。

31. 根据权利要求1至30中任一项所述的化合物, 其中 $R^5$ 和 $R^6$ 各自为甲基。

32. 根据权利要求1至31中任一项所述的化合物, 其中 $R^8$ 为OH。

33. 根据权利要求1至31中任一项所述的化合物, 其中 $R^8$ 为 $-N(R^{11})(C=O)R^{12}$ 。

34. 根据权利要求1至31中任一项所述的化合物, 其中 $R^8$ 为 $-(C=O)NR^{11}R^{12}$ 。

35. 根据权利要求1至31中任一项所述的化合物, 其中 $R^8$ 为 $-NR^{11}R^{12}$ 。

36. 根据权利要求33至35中任一项所述的化合物, 其中 $R^{11}$ 和 $R^{12}$ 各自独立地为H或 $C_1-C_8$ 烷基。

37. 根据权利要求33至36中任一项所述的化合物, 其中 $R^{11}$ 和 $R^{12}$ 各自独立地为H或 $C_1-C_3$ 烷基。

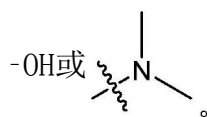
38. 根据权利要求36或37所述的化合物, 其中 $C_1-C_8$ 烷基或 $C_1-C_3$ 烷基为未取代的或被羟基取代的。

39. 根据权利要求33至36中任一项所述的化合物, 其中 $R^{11}$ 和 $R^{12}$ 各自为甲基。

40. 根据权利要求1至31中任一项所述的化合物, 其中 $R^8$ 为 $-(C=O)OR^{12}$ 。

41. 根据权利要求40所述的化合物, 其中 $R^8$ 为 $-O(C=O)R^{12}$ 。

42. 根据权利要求1至31中任一项所述的化合物, 其中 $R^8$ 具有以下结构中的一种:



43. 化合物, 选自表1中的化合物。

44. 脂质纳米颗粒, 包括权利要求1至43中任一项所述的化合物和治疗剂。

45. 根据权利要求44所述的脂质纳米颗粒, 还包含选自以下的一种或多种赋形剂: 中性脂质、类固醇和聚合物缀合的脂质。

46. 根据权利要求45所述的脂质纳米颗粒, 其中所述组合物包含选自以下的一种或多种中性脂质: DSPC、DPPC、DMPC、DOPC、POPC、DOPE和SM。

47. 根据权利要求46所述的脂质纳米颗粒, 其中所述中性脂质为DSPC。

48. 根据权利要求44至47中任一项所述的脂质纳米颗粒, 其中所述化合物与所述中性脂质的摩尔比为约2:1至约8:1。

49. 根据权利要求45至48中任一项所述的脂质纳米颗粒, 其中所述类固醇是胆固醇。

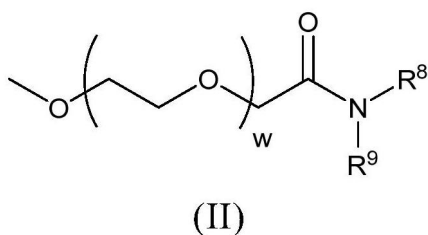
50. 根据权利要求49所述的脂质纳米颗粒, 其中所述化合物与所述胆固醇的摩尔比为5:1至1:1。

51. 根据权利要求45至50中任一项所述的脂质纳米颗粒, 其中所述聚合物缀合的脂质为聚乙二醇化脂质。

52. 根据权利要求51所述的脂质纳米颗粒, 其中所述化合物与所述聚乙二醇化脂质的摩尔比为约100:1至约20:1。

53. 根据权利要求51或52中任一项所述的脂质纳米颗粒, 其中所述聚乙二醇化脂质为PEG-DAG、PEG-PE、PEG-S-DAG、PEG-cer或PEG二烷氧基丙基氨基甲酸酯。

54. 根据权利要求51或52中任一项所述的脂质纳米颗粒, 其中所述聚乙二醇化脂质具有以下结构(II):



或其药学上可接受的盐、互变异构体或立体异构体, 其中:

$R^8$ 和 $R^9$ 各自独立地为具有10至30个碳原子的直链或支化的烷基、烯基或炔基, 其中所述烷基、烯基或炔基任选地被一个或多个酯键中断; 以及

w的平均值为30至60。

55. 根据权利要求54所述的脂质纳米颗粒, 其中 $R^8$ 和 $R^9$ 各自独立地为含有12至16个碳原子的直链烷基链。

56. 根据权利要求54或55中任一项所述的脂质纳米颗粒, 其中所述平均值w为约49。

57. 根据权利要求44至56中任一项所述的脂质纳米颗粒, 其中所述治疗剂包括核酸。

58. 根据权利要求57所述的脂质纳米颗粒, 其中所述核酸选自反义RNA和信使RNA。

59. 药物组合物, 包含权利要求44至58中任一项所述的脂质纳米颗粒和药学上可接受的稀释剂或赋形剂。

60. 用于治疗或预防有需要的患者的疾病的方法, 所述方法包括向所述患者施用权利要求44至58中任一项所述的脂质纳米颗粒或权利要求59所述的药物组合物。

61. 向有需要的患者接种疫苗以对抗病毒病原体的方法, 所述方法包括向所述患者施用权利要求44至58中任一项所述的脂质纳米颗粒或权利要求59所述的药物组合物, 其中所述治疗剂是病毒抗原或能够转录病毒抗原的核酸。

## 用于脂质纳米颗粒的阳离子脂质

### 背景技术

#### 技术领域

[0001] 本公开内容总体上涉及新型阳离子脂质,其可以与其他脂质组分(如中性脂质、胆固醇和聚合物缀合的脂质)组合使用,以形成脂质纳米颗粒以促进在体外和体内的治疗剂,如核酸(例如,寡核苷酸、信使RNA)的细胞内递送。

#### [0002] 相关技术描述

[0003] 与核酸递送相关的许多挑战影响生物系统中的期望响应。基于核酸的治疗具有巨大的潜力,但仍然需要将核酸更有效地递送至细胞或有机体内的适当位点,以实现这种潜力。治疗性核酸包括如信使RNA(mRNA)、反义寡核苷酸、核酶、DNA酶、质粒、免疫刺激性核酸、antagomir、antimir、模拟物、supermir和适配体。一些核酸,如mRNA或质粒,可用于实现特定细胞产物的表达,这对治疗例如与蛋白质或酶缺乏相关的疾病将是有益的。可翻译核苷酸递送的治疗应用极为广泛,因为可以合成构建体以产生任何选择的蛋白质序列,无论该序列是否是系统固有的。核酸的表达产物可以增加蛋白质的现有水平,替代蛋白质的缺失或无功能形式,或者在细胞或有机体中引入新的蛋白质及相关功能。

[0004] 一些核酸如miRNA抑制剂可用于实现受miRNA调节的特定细胞产物的表达,这对治疗例如与蛋白质或酶缺乏相关的疾病将是有益的。miRNA抑制的治疗应用极为广泛,因为可以合成构建体来抑制一种或多种miRNA,而所述一种或多种miRNA继而会调节mRNA产物的表达。抑制内源性miRNA可以增加其下游靶标内源性蛋白表达,并恢复细胞或有机体中适当的功能,作为治疗与特定miRNA或一组miRNA相关的疾病的手段。

[0005] 其他核酸可以下调特定mRNA的细胞内水平,因此可以通过诸如RNA干扰(RNAi)或反义RNA的互补结合的过程下调相应蛋白质的合成。反义寡核苷酸和RNAi的治疗应用也非常广泛,因为可以合成具有针对靶mRNA的任何核苷酸序列的寡核苷酸构建体。靶标可以包括来自正常细胞的mRNA,与疾病状态(如癌症)相关的mRNA,以及感染原(如病毒)的mRNA。迄今为止,在体外和体内模型中,反义寡核苷酸构建体均显示通过降解同源mRNA特异性下调靶蛋白的能力。另外,反义寡核苷酸构建体目前正在临床研究中评价。

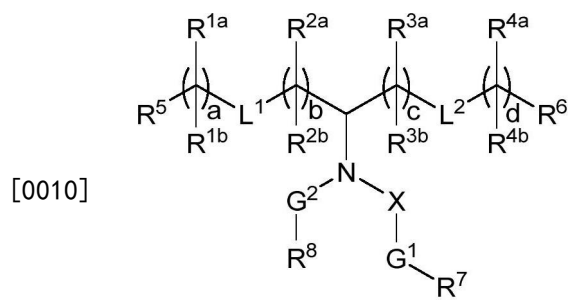
[0006] 然而,目前在治疗环境中使用寡核苷酸面临两个问题。首先,游离RNA对血浆中的核酸酶消化敏感。其次,游离RNA进入相关翻译机构所在的细胞内区室的能力有限。由与其他脂质组分(如中性脂质、胆固醇、PEG、聚乙二醇化脂质)一起的阳离子脂质和寡核苷酸形成的脂质纳米颗粒已用于阻断血浆中RNA的降解并促进细胞对寡核苷酸的摄取。

[0007] 仍然需要用于递送寡核苷酸的改良的阳离子脂质和脂质纳米颗粒。优选地,这些脂质纳米颗粒将提供最佳的药物:脂质比率,保护核酸免于血清中的降解和清除,适合全身或局部递送,并提供核酸的细胞内递送。另外,这些脂质-核酸颗粒应耐受良好,并提供足够的治疗指数,以便以有效剂量的核酸进行患者治疗而对患者没有不可接受的毒性和/或风险。本公开内容提供了这些以及相关的优点。

## 发明内容

[0008] 简而言之,本公开内容提供了脂质化合物(包括其立体异构体、药学上可接受的盐、或互变异构体),其可以单独使用或者与其他脂质组分如中性脂质、带电脂质、类固醇(包括例如所有固醇)和/或其类似物、和/或聚合物缀合的脂质组合使用以形成脂质纳米颗粒以用于递送治疗剂。在一些情况下,脂质纳米颗粒用于递送诸如反义和/或信使RNA的核酸。还提供了使用此类脂质纳米颗粒治疗或预防(例如,接种疫苗)各种疾病或病况(如由传染性实体和/或蛋白质不足引起的那些)的方法。

[0009] 在一个实施方案中,提供了具有以下结构(I)的化合物:



[0011] 或者其药学上可接受的盐、互变异构体或立体异构体,其中a、b、c、d、G<sup>1</sup>、G<sup>2</sup>、L<sup>1</sup>、L<sup>2</sup>、R<sup>1a</sup>、R<sup>1b</sup>、R<sup>2a</sup>、R<sup>2b</sup>、R<sup>3a</sup>、R<sup>3b</sup>、R<sup>4a</sup>、R<sup>4b</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>、R<sup>7</sup>、R<sup>8</sup>和X如本文所定义。

[0012] 还提供了包含一种或多种结构(I)的化合物和治疗剂的脂质纳米颗粒(LNP)以及包含所述脂质纳米颗粒的药物组合物。在一些实施方案中,纳米颗粒还包括一种或多种选自以下的组分:中性脂质、带电脂质、类固醇和聚合物缀合的脂质。此类LNP可用于治疗剂的递送,例如用于疾病的治疗或针对病毒病原体的疫苗接种。

[0013] 参考以下具体实施方式后,本公开内容的这些和其他方面将变得显而易见。

## 具体实施方式

[0014] 在以下描述中,阐述了某些特定细节以便提供对本公开内容的各种实施方案的透彻理解。然而,本领域技术人员将理解,可以在没有这些细节的情况下实践本公开内容。

[0015] 本公开内容部分基于这样的新型阳离子(氨基)脂质的发现:当用于脂质纳米颗粒中以将活性剂或治疗剂如核酸体内递送至哺乳动物细胞中时提供优势。特别地,本公开内容的实施方案提供了包含本文所述的一种或多种新型阳离子脂质的核酸-脂质纳米颗粒组合物,与先前所述的核酸-脂质纳米颗粒组合物相比,其提供了在体内增加的核酸活性和改良的组合物耐受性,从而导致治疗指数的显著提高。在其他实施方案中,当用于递送活性剂如核酸时,所公开的脂质和包含其相同的脂质纳米颗粒具有增加的安全性和/或耐受性。

[0016] 在具体实施方案中,本公开内容提供了新型阳离子脂质,其使得能够配制用于在体外和体内递送mRNA和/或其他寡核苷酸的改良的组合物。在一些实施方案中,这些改良的脂质纳米颗粒组合物可用于表达由mRNA编码的蛋白质。在其他实施方案中,这些改良的脂质纳米颗粒组合物可用于通过递送靶向一种特定miRNA的miRNA抑制剂或者调节一种靶mRNA或几种mRNA的一组miRNA来上调内源性蛋白表达。在其他实施方案中,这些改良的脂质纳米颗粒组合物可用于下调(如沉默)靶基因的蛋白质水平和/或mRNA水平。在一些其他实

施方案中,脂质纳米颗粒也可用于递送mRNA和质粒以表达转基因。在其他实施方案中,脂质纳米颗粒组合物可用于诱导由蛋白质表达产生的药理学效应,如通过递送适合的促红细胞生成素mRNA增加红细胞的产生,或者通过递送编码适合抗原或抗体的mRNA来保护免于感染。

[0017] 本公开内容的实施方案的脂质纳米颗粒和组合物可以用于多种目的,包括将封装的或缔合的(如,复合的)治疗剂如核酸在体外和体内递送至细胞。因此,本公开内容的实施方案提供了通过使有需要的个体与封装适合的治疗剂或与适合的治疗剂缔合的脂质纳米颗粒接触来治疗或预防所述个体中的疾病或病症的方法,其中所述脂质纳米颗粒包含本文所述的一种或多种新型阳离子脂质。

[0018] 如本文所述,本公开内容的脂质纳米颗粒的实施方案特别地可用于核酸的递送,所述核酸包括如mRNA、反义寡核苷酸、质粒DNA、微RNA(miRNA)、miRNA抑制剂(antagomir/antimir)、干扰信使RNA的互补RNA(micRNA)、DNA、多价RNA、Dicer底物RNA、互补DNA(cDNA)等。因此,本公开内容的某些实施方案的脂质纳米颗粒和组合物可用于通过使细胞与包含本文所述的一种或多种新型阳离子脂质的脂质纳米颗粒接触来在体内和体外诱导期望蛋白质的表达,其中脂质纳米颗粒封装核酸或与核酸缔合,所述核酸经表达以产生期望蛋白质(如,编码期望蛋白质的信使RNA或质粒)或抑制终止mRNA(如,miRNA抑制剂)表达的过程。在某些实施方案中,核酸表达的蛋白质是抗原,因此LNP诱导免疫反应(例如,接种疫苗)。可选地,本公开内容的实施方案的脂质纳米颗粒和组合物可用于通过使细胞与包含本文所述的一种或多种新型阳离子脂质的脂质纳米颗粒接触来减少在体外和体内表达靶基因和蛋白质,其中脂质纳米颗粒封装核酸或与核酸缔合,所述核酸减少靶基因表达(如,反义寡核苷酸或小干扰RNA(siRNA))。本公开内容的实施方案的脂质纳米颗粒和组合物还可用于分别或组合共递送不同的核酸(如mRNA和质粒DNA),如可用于提供需要不同核酸(如,编码适合的基因修饰酶的mRNA和用于掺入宿主基因组的DNA片段)的共定位的作用。

[0019] 可以根据任何可用技术来制备与本公开内容的实施方案一起使用的核酸。对于mRNA,主要的制备方法是但不限于酶促合成(也称为体外转录),这代表了目前最有效的产生生长序列特异性mRNA的方法。体外转录描述了从工程化的DNA模板进行模板指导的RNA分子合成的过程,该工程化的DNA模板包含与编码目标基因的下游序列连接的上游噬菌体启动子序列(如,包括但不限于来自T7、T3和SP6大肠杆菌噬菌体的启动子序列)。可以使用本领域中众所周知的适当技术(包括但不限于质粒DNA和聚合酶链式反应扩增)从多种来源制备用于在体外转录的模板DNA(参见Linpinsel, J.L和Conn, G.L., General protocols for preparation of plasmid DNA template, 以及Bowman, J.C., Azizi, B., Lenz, T.K., Ray, P., 和Williams, L.D. in RNA in vitro transcription and RNA purification by denaturing PAGE in Recombinant and in vitro RNA syntheses Methods第941卷Conn G.L. (编辑), New York, N.Y. Humana Press, 2012)。

[0020] 在支持聚合酶活性同时使所得的mRNA转录物的潜在降解最小化的条件下,在相应的RNA聚合酶和腺苷、鸟苷、尿苷和胞苷核糖核苷三磷酸(rNTP)的存在下,使用直链化的DNA模板在体外进行RNA转录。可以使用多种可商购获得的试剂盒以及可商购获得的试剂(包括RNA聚合酶和rNTP)进行体外转录,所述试剂盒包括但不限于RiboMax大规模RNA产生系统(Promega)、MegaScript转录试剂盒(Life Technologies)。用于mRNA的体外转录的方法是



本领域众所周知的。(参见,如,Losick,R.,1972,In vitro transcription,Ann Rev Biochem第41卷409-46;Kamakaka,R.T.和Kraus,W.L.2001.In Vitro Transcription.Current Protocols in Cell Biology.2:11.6:11.6.1-11.6.17;Beckert,B.和Masquida,B.,(2010) Synthesis of RNA by In Vitro Transcription in RNA in Methods in Molecular Biology第703卷(Neilson,H.编辑),New York, N.Y.Humana Press,2010;Brunelle,J.L.和Green,R.,2013,第五章-In vitro transcription from plasmid or PCR-amplified DNA,Methods in Enzymology第530卷,101-114;所有均通过引用并入本文)。

[0021] 然后,从转录或相关反应的不期望组分(包括未掺入的rNTP、蛋白酶、盐、短RNA寡聚物等)中纯化出期望的在体外转录的mRNA。用于分离mRNA转录物的技术是本领域众所周知的。众所周知的程序包括苯酚/氯仿萃取或用醇(乙醇、异丙醇)沉淀(在单价阳离子或氯化锂的存在下)。可以使用的纯化程序的其他非限制性实例包括尺寸排阻色谱(Lukavsky, P.J.和Puglisi,J.D.,2004, Large-scale preparation and purification of polyacrylamide-free RNA oligonucleotides, RNA第10卷,889-893)、基于二氧化硅的亲色和色谱和聚丙烯酰胺凝胶电泳(Bowman,J.C.,Azizi,B.,Lenz,T.K.,Ray,P.,和Williams, L.D.in RNA in vitro transcription and RNA purification by denaturing PAGE in Recombinant and in vitro RNA syntheses Methods第941卷,Conn G.L.(编辑),New York,N.Y.Humana Press,2012)。可以使用多种可商购获得的试剂盒进行纯化,所述试剂盒包括但不限于SV总分离系统(SV Total Isolation System)(Promega)和体外转录清理和浓缩试剂盒(In Vitro Transcription Cleanup and Concentration Kit)(Norgen Biotek)。

[0022] 此外,尽管逆转录可以产生大量的mRNA,但产物可含有许多与不期望的聚合酶活性相关的异常RNA杂质,可能需要从全长mRNA制备物中去除所述杂质。这些包括由流产转录起始产生的短RNA,以及由RNA依赖性RNA聚合酶活性、RNA引发的从RNA模板转录和自我互补的3'延伸而产生的双链RNA(dsRNA)。已经证实,具有dsRNA结构的这些污染物可通过与真核细胞中的发挥识别特异性核酸结构并诱导有效免疫应答的功能的各种先天免疫传感器相互作用而导致不期望的免疫刺激活性。这继而可显著减少mRNA翻译,因为先天细胞免疫应答期间蛋白质合成减少。因此,已经开发了去除这些dsRNA污染物的另外的技术,并且其是本领域已知的,包括但不限于可缩放的HPLC纯化(参见如Kariko,K.,Muramatsu,H.,Ludwig,J.和Weissman,D.,2011,Generating the optimal mRNA for therapy:HPLC purification eliminates immune activation and improves translation of nucleoside-modified,protein-encoding mRNA,Nucl Acid Res,v.39e142;Weissman,D.,Pardi,N.,Muramatsu,H.和Kariko,K.,HPLC Purification of in vitro transcribed long RNA in Synthetic Messenger RNA and Cell Metabolism Modulation in Methods in Molecular Biology v.969(Rabinovich,P.H.编辑),2013)。据报道,HPLC纯化的mRNA以高得多的水平翻译,特别是在原代细胞和体内。

[0023] 本领域中已经描述了各种各样的修饰,所述修饰用于改变体外转录的mRNA的特异性并提高其实用性。这些包括但不限于对mRNA的5'和3'末端的修饰。内源性真核mRNA通常在成熟分子的5'-末端含有帽结构,其在介导mRNA帽结合蛋白(CBP)的结合中起着重要作

用,所述mRNA帽结合蛋白(CBP)继而负责增强细胞中mRNA的稳定性和mRNA翻译的效率。因此,用加帽的mRNA转录物达到最高水平的蛋白质表达。5'-帽包括在5'-大多数核苷酸(5'-most nucleotide)与鸟嘌呤核苷酸之间的5'-5'-三磷酸键。缀合的鸟嘌呤核苷酸在N7位是甲基化的。另外的修饰包括2'-羟基基团上倒数第一和倒数第二个大多数5'-核苷酸的甲基化。

[0024] 多种不同的帽结构可用于生成体外转录的合成mRNA的5'-帽。合成mRNA的5'-加帽可以用化学帽类似物共转录进行(即体外转录期间加帽)。例如,抗-反向帽类似物(ARCA)帽含有5'-5'-三磷酸鸟嘌呤-鸟嘌呤键,其中一个鸟嘌呤含有N7甲基基团以及3'-O-甲基基团。然而,在该共转录过程中,多达20%的转录物保持未加帽,并且合成的帽类似物与真实细胞mRNA的5'-帽结构不同,从而可能降低可翻译性和细胞稳定性。可选地,合成的mRNA分子也可以在转录后被酶促加帽。这些可生成在结构上或功能上更紧密地模拟内源性5'-帽的更真实的5'-帽结构,其具有增强的帽结合蛋白的结合、延长的半衰期、以及降低的对5'核酸内切酶的敏感性和/或减少的5'脱帽。已经开发了许多合成的5'-帽类似物,并且在本领域中已知所述合成的5'-帽类似物增强mRNA稳定性和可翻译性(参见,如,Grudzien-Nogalska,E.,Kowalska,J.,Su,W.,Kuhn,A.N.,Slepenkov,S.V.,Darynkiewicz,E.,Sahin,U.,Jemielity,J.和Rhoads,R.E.,Synthetic mRNAs with superior translation and stability properties in Synthetic Messenger RNA and Cell Metabolism Modulation in Methods in Molecular Biology v.969(Rabinovich,P.H.编辑),2013)。

[0025] 在3'-末端,通常在RNA加工过程中将长链腺嘌呤核苷酸(聚-A尾)添加至mRNA分子中。转录后立即切割转录物的3'末端以释放3'羟基,在称为聚腺苷酸化的过程中,聚-A聚合酶会在该3'羟基上将腺嘌呤核苷酸链添加至RNA中。已广泛显示聚-A尾增强了mRNA的翻译效率和稳定性(参见Bernstein,P.和Ross,J.,1989,Poly(A),poly(A) binding protein and the regulation of mRNA stability,Trends Bio Sci v.14 373-377;Guhaniyogi,J.和Brewer,G.,2001,Regulation of mRNA stability in mammalian cells,Gene, v.265,11-23;Dreyfus,M.和Regnier,P.,2002,The poly(A) tail of mRNAs:Bodyguard in eukaryotes,scavenger in bacteria,Cell,v.111,611-613)。

[0026] 可以使用多种方法实现体外转录的mRNA的聚(A)加尾,所述方法包括但不限于将聚(T)簇(poly(T) tract)克隆至DNA模板中,或使用聚(A)聚合酶通过转录后添加。第一种情况允许根据聚(T)簇的大小在体外转录具有限定长度的聚(A)尾的mRNA,但需要对模板进行另外操作。后一种情况涉及使用将催化腺嘌呤残基掺入RNA的3'末端的聚(A)聚合酶将聚(A)尾酶促添加到体外转录的mRNA,这不需要另外操作DNA模板,但会产生具有不均一长度的聚(A)尾的mRNA。可以使用多种可商购获得的试剂盒以及可商购获得的试剂、各种ARCA帽、聚(A)聚合酶等进行5'-加帽和3'-聚(A)加尾,所述试剂盒包括但不限于聚(A)聚合酶加尾试剂盒(Poly(A) Polymerase Tailing kit) (EpiCenter)、mMESSAGE mMACHINE T7Ultra试剂盒和聚(A)加尾试剂盒(Poly(A) Tailing kit) (Life Technologies)。

[0027] 据报道,除了5'帽和3'聚腺苷酸化外,体外转录物的其他修饰还提供了与翻译效率和稳定性有关的益处。在本领域中众所周知,致病性DNA和RNA可以被真核生物内的多种传感器识别并触发有效的先天免疫应答。已显示区分致病性与自身DNA和RNA的能力至少部分基于结构和核苷修饰,因为天然来源的大多数核酸都含有修饰的核苷。相比之下,体外合

成的RNA缺少这些修饰,因此使得它具有免疫刺激性,继而可以抑制上文概述的有效的mRNA翻译。将修饰的核苷引入体外转录的mRNA可用于防止RNA传感器的识别和激活,从而减轻这种不期望的免疫刺激活性并增强翻译能力(参见如Kariko,K.和Weissman,D.2007, Naturally occurring nucleoside modifications suppress the immunostimulatory activity of RNA:implication for therapeutic RNA development,Curr Opin Drug Discov Devel,v.10 523-532;Pardi,N.,Muramatsu,H.,Weissman,D.,Kariko,K.,In vitro transcription of long RNA containing modified nucleosides in Synthetic Messenger RNA and Cell Metabolism Modulation in Methods in Molecular Biology v.969(Rabinovich,P.H.编辑),2013;Kariko,K.,Muramatsu,H.,Welsh,F.A.,Ludwig,J.,Kato,H.,Akira,S.,Weissman,D.,2008,Incorporation of Pseudouridine Into mRNA Yields Superior Nonimmunogenic Vector With Increased Translational Capacity and Biological Stability,Mol Ther v.16,1833-1840)。可以使用本领域已知的一般方法和程序来制备、监测和利用修饰的RNA合成中使用的修饰的核苷和核苷酸。可获得各种各样的核苷修饰,其可以单独地或与其他修饰的核苷组合在一定程度上掺入至体外转录的mRNA中(参见如US 2012/0251618)。据报道,核苷修饰的mRNA的体外合成降低了激活免疫传感器的能力,同时伴随着增强的翻译能力。

[0028] 可以进行修饰以提供可翻译性和稳定性方面益处的mRNA的其他组分包括5'和3'非翻译区(UTR)。已显示对UTR的优化(可以从细胞或病毒RNA中获得有利的5'和3'UTR),无论是同时进行还是单独进行,均提高了体外转录的mRNA的mRNA稳定性和翻译效率(参见如Pardi,N.,Muramatsu,H.,Weissman,D.,Kariko,K.,In vitro transcription of long RNA containing modified nucleosides in Synthetic Messenger RNA and Cell Metabolism Modulation in Methods in Molecular Biology v.969(Rabinovich,P.H.编辑),2013)。

[0029] 除了mRNA外,其他核酸有效载荷也可以用于本公开内容。对于寡核苷酸,制备方法包括但不限于化学合成和酶促、化学切割较长的前体、如上所述的体外转录等。合成DNA和RNA核苷酸的方法被广泛使用并且是本领域众所周知的(参见,如Gait,M.J.(编辑)Oligonucleotide synthesis:a practical approach,Oxford[Oxfordshire],Washington,D.C.:IRL Press,1984;和Herdewijn,P.(编辑)Oligonucleotide synthesis: methods and applications,Methods in Molecular Biology,v.288(Clifton,N.J.)Totowa,N.J.:Humana Press,2005;这两者通过引用并入本文)。

[0030] 对于质粒DNA,与本公开内容的实施方案一起使用的制备物通常利用但不限于在含有目标质粒的细菌的液体培养物中体外扩增和分离质粒DNA。目标质粒中编码对特定抗生素(青霉素、卡那霉素等)有抗性的基因的存在允许那些含有目标质粒的细菌能够在含有抗生素的培养物中选择性生长。分离质粒DNA的方法被广泛使用并且在本领域中是众所周知的(参见,如Heilig,J.,Elbing,K.L.和Brent,R(2001)Large-Scale Preparation of Plasmid DNA.Current Protocols in Molecular Biology.41:II:1.7:1.7.1-1.7.16; Rozkov,A.,Larsson,B., Gillström,S., Björnstedt,R.和Schmidt,S.R.(2008),Large-scale production of endotoxin-free plasmids for transient expression in mammalian cell culture.Biotechnol.Bioeng.,99:557-566;和US6,197,553B1)。可以使

用多种可商购获得的试剂盒以及可商购获得的试剂进行质粒分离,所述试剂盒包括但不限于Plasmid Plus (Qiagen)、GenJET Plasmid MaxiPrep (Thermo) 和PureYield MaxiPrep (Promega) 试剂盒。

[0031] 下文进一步详细描述了本公开内容的阳离子脂质、脂质纳米颗粒和包含脂质纳米颗粒的组合物的各种示例性实施方案,以及它们递送活性剂(例如治疗剂)如核酸以调节基因和蛋白质表达的用途。

[0032] 如本文所用,除非另外说明,否则以下术语具有赋予它们的含义。

[0033] 除非上下文另外要求,否则在整个说明书和权利要求书中,词语“包括/包含(comprise)”及其变型(如“包括/包含(comprises)”和“包括/包含(comprising)”)应以开放和包括性含义来解释,即“包括/包含但不限于”。

[0034] 在整个本说明书中,对“一个实施方案”或“实施方案”的提及意指结合该实施方案描述的具体的特征、结构或特性被包括在本公开内容的至少一个实施方案中。因此,在整个本说明书中的各处出现的短语“在一个实施方案中”或“在实施方案中”不必全部是指同一实施方案。此外,可以在一个或多个实施方案中以任何适合的方式组合该具体的特征、结构或特性。

[0035] 除非另外定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本公开内容所属领域的技术人员通常所理解的相同含义。如说明书和权利要求书中所使用的,单数形式“一个/一种(a)”、“一个/一种(an)”和“该/所述(the)”包括复数指代物,除非上下文另外明确指出。

[0036] 短语“诱导期望蛋白质的表达”是指核酸能够增加期望蛋白质的表达。为了检查蛋白质表达的程度,可以使测试样品(如,表达期望蛋白质的培养细胞样品)或测试哺乳动物(如,哺乳动物,诸如人类或动物)模型(如,啮齿动物(如,小鼠)或非人灵长类(如,猴)模型)与核酸(如,与本公开内容的脂质组合的核酸)接触。将测试样品或测试动物中期望蛋白质的表达与不与核酸接触或未施用核酸的对照样品(如,表达期望蛋白质的培养细胞样品)或对照哺乳动物(如,哺乳动物,诸如人类或动物)模型(如,啮齿动物(如,小鼠)或非人灵长类(如,猴)模型)中期望蛋白质的表达进行比较。当期望蛋白质存在于对照样品或对照哺乳动物中时,可以将对照样品或对照哺乳动物中期望蛋白质的表达赋值为1.0。在具体实施方案中,当测试样品或测试哺乳动物中期望蛋白质的表达与对照样品或对照哺乳动物中期望蛋白质的表达水平的比率大于1,例如约1.1、1.5、2.0、5.0或10.0时,就可以实现诱导期望蛋白质的表达。当对照样品或对照哺乳动物中不存在期望蛋白质时,当在测试样品或测试哺乳动物中检测到任何可测量水平的期望蛋白质时,实现了诱导期望蛋白质的表达。本领域普通技术人员将理解确定样品中蛋白质表达水平的适当测定,例如斑点印迹、Northern印迹、原位杂交、ELISA、免疫沉淀、酶功能和表型测定,或基于可在适当条件下产生荧光或发光的报告蛋白的测定。

[0037] 短语“抑制靶基因的表达”是指核酸能够沉默、减少或抑制靶基因的表达。为了检查基因沉默的程度,使测试样品(如,表达靶基因的培养细胞样品)或测试哺乳动物(如,哺乳动物诸如人类或动物)模型(如,啮齿动物(如,小鼠)或非人灵长类动物(如,猴)模型)与沉默、减少或抑制靶基因表达的核酸接触。将测试样品或测试动物中靶基因的表达与未接触或未施用核酸的对照样品(如,表达靶基因的培养细胞样品)或对照哺乳动物(如,哺乳动

物诸如人类或动物)模型(如,啮齿动物(如,小鼠)或非人灵长类动物(如,猴)模型)中的靶基因的表达进行比较。可以将对照样品或对照哺乳动物中靶基因的表达赋值为100%。在具体实施方案中,相对于对照样品或对照哺乳动物中靶基因表达水平,当测试样品或测试哺乳动物中靶基因表达水平为约95%、90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、5%或0%时,实现沉默、抑制或减少靶基因的表达。换言之,相对于未接触或未施用核酸的对照样品或对照哺乳动物中的靶基因表达水平,核酸能够将测试样品或测试哺乳动物中的靶基因表达沉默、减少或抑制至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%。用于确定靶基因表达水平的适合测定包括但不限于使用本领域技术人员已知的技术检查蛋白质或mRNA水平,例如斑点印迹、Northern印迹、原位杂交、ELISA、免疫沉淀、酶功能以及本领域技术人员已知的表型测定。

[0038] 活性剂或治疗剂如治疗性核酸的“有效量”或“治疗有效量”是足以产生期望效果(如与在不存在核酸的情况下检测到的正常表达水平相比靶序列表达的增加或抑制)的量。在没有核酸时不存在表达产物的情况下,当检测到任何可测量的水平时,实现了靶序列表达增加。在与核酸接触之前存在一定水平的表达产物的情况下,当用核酸如mRNA获得的值相对于对照的倍数增加为约1.05、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.75、2、2.5、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50、75、100、250、500、750、1000、5000、10000或更大时,实现了表达增加。当相对于对照,用核酸如反义寡核苷酸获得的值为约95%、90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、5%或0%时,实现了靶基因或靶序列表达的抑制。用于测量靶基因或靶序列表达的适合测定包括如使用本领域技术人员已知的技术检查蛋白质或RNA水平,如斑点印迹、Northern印迹、原位杂交、ELISA、免疫沉淀、酶功能、适合的报道蛋白的荧光或发光以及本领域技术人员已知的表型测定。

[0039] 如本文所用的术语“核酸”是指呈单链或双链形式的含有至少两种脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸的聚合物,并且包括DNA、RNA及其杂交物。DNA可以呈反义分子、质粒DNA、cDNA、PCR产物或载体的形式。RNA可以呈小发夹RNA(shRNA)、信使RNA(mRNA)、反义RNA、miRNA、micRNA、多价RNA、Dicer底物RNA或病毒RNA(vRNA)及其组合的形式。核酸包括含有已知核苷酸类似物或者修饰的主链残基或键的核酸,其是合成的、天然存在的和非天然存在的并且具有与参考核酸相似的结合特性。此类类似物的实例包括但不限于硫代磷酸酯、氨基磷酸酯、甲基磷酸酯、手性-甲基磷酸酯、2'-O-甲基核糖核苷酸和肽-核酸(PNA)。除非特别限定,否则该术语涵盖与参考核酸具有相似结合特性的含有天然核苷酸的已知类似物的核酸。除非另外说明,否则特定的核酸序列还隐含地涵盖其保守修饰的变体(如,简并密码子取代)、等位基因、直向同源物、单核苷酸多态性和互补序列以及明确指出的序列。具体而言,简并密码子取代可以通过生成其中一个或多个选定(或全部)密码子的第三位被混合碱基和/或脱氧肌苷残基取代的序列来实现(Batzer等人,Nucleic Acid Res.,19:5081(1991);Ohtsuka等人,J.Biol.Chem.,260:2605-2608(1985);Rossolini等人,Mol.Cell.Probes,8:91-98(1994))。“核苷酸”含有以下糖:脱氧核糖(DNA)或核糖(RNA);碱基和磷酸基团。核苷酸通过磷酸基团连接在一起。“碱基”包括嘌呤和嘧啶,其进一步包括天然化合物腺嘌呤、胸腺嘧啶、鸟嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶、肌苷和天然类似物,以及嘌呤和嘧啶的合成衍生物,包括但不限于放置新的反应性基团(如但不限于胺、醇、硫醇、羧化物和烷基

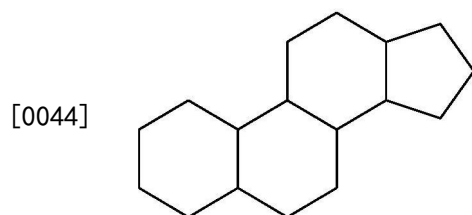
卤化物)的修饰。

[0040] 术语“基因”是指核酸(如,DNA或RNA)序列,其包含产生多肽或前体多肽所必需的部分长度或整个长度的编码序列。

[0041] 如本文所用的“基因产物”是指诸如RNA转录物或多肽的基因产物。

[0042] 术语“脂质”是指一组有机化合物,其包括但不限于脂肪酸的酯,并且通常以难溶于水但可溶于许多有机溶剂为特征。它们通常被分为至少三类:(1)“简单脂质”,包括脂肪和油以及蜡;(2)“复合脂质”,包括磷脂和糖脂;以及(3)“衍生脂质”如类固醇。

[0043] “类固醇”是包含以下碳骨架的化合物:



[0045] 类固醇的非限制实例包括胆固醇等。

[0046] “阳离子脂质”是指能够带正电的脂质。示例性的阳离子脂质包括带有正电荷的一个或多个胺基团。优选的阳离子脂质是可电离的,使得它们可以根据pH以带正电或中性形式存在。在不同的pH条件下,阳离子脂质的电离影响脂质纳米颗粒的表面电荷。这种电荷状态可影响对于细胞内递送核酸关键的血浆蛋白吸收、血液清除和组织分布(Semple,S.C.,等人,Adv.Drug Deliv Rev 32:3-17(1998))以及形成溶核内体(endosomolytic)非双层结构的能力(Hafez,I.M.,等人,Gene Ther 8:1188-1196(2001))。

[0047] 术语“聚合物缀合的脂质”是指包含脂质部分和聚合物部分的分子。聚合物缀合的脂质的实例是聚乙二醇化脂质。术语“聚乙二醇化脂质”是指包含脂质部分和聚乙二醇部分的分子。聚乙二醇化脂质在本领域中是已知的,并且包括1-(单甲氧基-聚乙二醇)-2,3-二肉豆蔻酰甘油(PEG-DMG)等。

[0048] 术语“中性脂质”是指在选定的pH下以不带电或中性的两性离子形式存在的多种脂质物质中的任一种。在生理pH下,此类脂质包括但不限于:磷脂酰胆碱如1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DSPC)、1,2-二棕榈酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DPPC)、1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DMPC)、1-棕榈酰基-2-油酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(POPC)、1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(DOPC),磷脂酰乙醇胺如1,2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(DOPE),鞘磷脂(SM),神经酰胺,类固醇如固醇及其衍生物。中性脂质可以是合成的或天然来源的。

[0049] 术语“带电脂质”是指在有用的生理范围(如pH~3至pH~9)内,以不依赖于pH的带正电或带负电形式存在的多种脂质物质中的任一种。带电脂质可以是合成的或天然来源的。带电脂质的实例包括磷脂酰丝氨酸、磷脂酸、磷脂酰甘油、磷脂酰肌醇、固醇半琥珀酸酯、二烷基三甲铵丙烷(如DOTAP、DOTMA)、二烷基二甲基氨基丙烷、乙基磷酸胆碱、二甲基氨基乙烷氨基甲酰基固醇(如DC-Chol)。

[0050] 术语“脂质纳米颗粒”是指具有至少一个纳米量级(如,1-1,000nm)尺寸的颗粒,其包含一种或多种结构(I)的化合物或其他指定的阳离子脂质。在一些实施方案中,包含公开的阳离子脂质(如结构(I)的化合物)的脂质纳米颗粒被包含在制剂中,该制剂可用于将活

性剂或治疗剂(诸如核酸(如mRNA))递送至目标靶部位(如细胞、组织、器官、肿瘤等)。在一些实施方案中,脂质纳米颗粒包含结构(I)的化合物和核酸。此类脂质纳米颗粒通常包含结构(I)的化合物和一种或多种选自以下的赋形剂:中性脂质、带电脂质、类固醇和聚合物缀合的脂质。在一些实施方案中,活性剂或治疗剂,如核酸,可被封装在脂质纳米颗粒的脂质部分中或者由脂质纳米颗粒的一些或所有脂质部分包封的水性空间中,从而保护其免于酶促降解或者由宿主有机体或细胞的机制诱导的其他不期望的作用如不良免疫应答。

[0051] 在各个实施方案中,脂质纳米颗粒的平均直径为约30nm至约150nm、约40nm至约150nm、约50nm至约150nm、约60nm至约130nm、约70nm至约110nm、约70nm至约100nm、约80nm至约100nm、约90nm至约100nm、约70至约90nm、约80nm至约90nm、约70nm至约80nm,或约30nm、35nm、40nm、45nm、50nm、55nm、60nm、65nm、70nm、75nm、80nm、85nm、90nm、95nm、100nm、105nm、110nm、115nm、120nm、125nm、130nm、135nm、140nm、145nm或150nm。在一些实施方案中,脂质纳米颗粒基本上是无毒的。在某些实施方案中,当在脂质纳米颗粒中存在时,核酸在水性溶液中对核酸酶的降解具有抗性。包含核酸的脂质纳米颗粒及其制备方法公开于如美国专利公开号2004/0142025、2007/0042031和PCT公开号WO 2013/016058和WO 2013/086373中,其全部公开内容出于所有目的通过引用整体并入本文。

[0052] 如本文所用,“封装的脂质”是指为活性剂或治疗剂(诸如核酸(如,mRNA))提供完全封装、部分封装或两者的脂质纳米颗粒。在实施方案中,将核酸(如,mRNA)完全封装在脂质纳米颗粒中。

[0053] 如本文所用,术语“水性溶液”是指包含水的组合物。

[0054] 关于核酸-脂质纳米颗粒,“血清稳定的”意指核苷酸在暴露于将显著降解游离DNA或RNA的血清或核酸酶测定后不显著降解。适合的测定包括例如标准血清测定、DNA酶测定或RNA酶测定。

[0055] 如本文所用,“全身递送”是指可导致有机体内活性剂广泛暴露的治疗性产物的递送。一些给药技术可以导致某些药剂的全身递送,而不会导致其他药剂的全身递送。全身递送意指有用的,优选治疗量的药剂暴露于身体的大部分。脂质纳米颗粒的全身递送可以通过本领域已知的任何手段进行,包括例如静脉内、动脉内、皮下和腹膜内递送。在一些实施方案中,脂质纳米颗粒的全身递送通过静脉内递送进行。

[0056] 如本文所用,“局部递送”是指将活性剂直接递送至有机体内的靶部位。例如,可通过直接注射到疾病部位(如肿瘤)、其他靶部位(如炎症部位)或靶器官(如肝脏、心脏、胰腺、肾脏等)中来局部递送药剂。局部递送还可以包括外用或局部注射技术,如肌内、皮下或皮内注射。局部递送并不排除全身性的药理学作用。

[0057] “烷基”是指仅由碳和氢原子组成的直链或支化的烃链基团,其是饱和的,具有例如一至二十四个碳原子( $C_1$ - $C_{24}$ 烷基)、四至二十个碳原子( $C_4$ - $C_{20}$ 烷基)、六至十六个碳原子( $C_6$ - $C_{16}$ 烷基)、六至九个碳原子( $C_6$ - $C_9$ 烷基)、一至十五个碳原子( $C_1$ - $C_{15}$ 烷基)、一至十二个碳原子( $C_1$ - $C_{12}$ 烷基)、一至八个碳原子( $C_1$ - $C_8$ 烷基)或一至六个碳原子( $C_1$ - $C_6$ 烷基),并且通过单键与分子的其余部分连接,例如,甲基、乙基、正丙基、1-甲基乙基(异丙基)、正丁基、正戊基、1,1-二甲基乙基(叔丁基)、3-甲基己基、2-甲基己基等。除非在说明书中另外特别说明,否则烷基基团是取代的或未取代的。

[0058] “亚烷基”是指仅由碳和氢组成的将分子的其余部分与基团连接的直链或支化的

二价烃链,其是饱和的并且具有例如一至二十四个碳原子( $C_1$ - $C_{24}$ 亚烷基)、一至十五个碳原子( $C_1$ - $C_{15}$ 亚烷基)、一至十二个碳原子( $C_1$ - $C_{12}$ 亚烷基)、一至八个碳原子( $C_1$ - $C_8$ 亚烷基)、一至六个碳原子( $C_1$ - $C_6$ 亚烷基)、二至四个碳原子( $C_2$ - $C_4$ 亚烷基)、一至二个碳原子( $C_1$ - $C_2$ 亚烷基),例如,亚甲基、亚乙基、亚丙基、亚正丁基等。亚烷基链通过单键与分子的其余部分连接以及通过单键与基团连接。亚烷基链与分子的其余部分和与基团的连接点可通过链内的一个碳或任两个碳。除非在说明书中另外特别说明,否则亚烷基链是取代的或未取代的。

[0059] “烯烃”和“亚烯基”分别是指包含至少一个碳碳双键的烷基和亚烷基。烯烃和亚烯基包含与如以上定义的烷基和亚烷基相同数量的碳原子,但烯烃和亚烯基必须包含至少两个碳。除非在说明书中另外特别说明,否则烯烃和亚烯基是取代的或未取代的。

[0060] 本文使用的术语“取代的”意指其中至少一个氢原子被连接至非氢原子的键取代的任一上述基团(如,烷基、亚烷基),非氢原子诸如但不限于:卤素原子如F、Cl、Br或I;氧代基团( $=O$ );羟基基团( $-OH$ );羧基基团( $-CO_2H$ ); $C_1$ - $C_{12}$ 烷基基团; $-(C=O)OR'$ ;  $-O(C=O)R'$ ;  $-C(=O)R'$ ;  $-OR'$ ;  $-S(O)_xR'$ ;  $-S-SR'$ ;  $-C(=O)SR'$ ;  $-SC(=O)R'$ ;  $-NR'R'$ ;  $-NR'C(=O)R'$ ;  $-C(=O)NR'R'$ ;  $-NR'C(=O)NR'R'$ ;  $-OC(=O)NR'R'$ ;  $-NR'C(=O)OR'$ ;  $-NR'S(O)_xNR'R'$ ;  $-NR'S(O)_xR'$ ; 和  $-S(O)_xNR'R'$ , 其中 $R'$ 在每次出现时独立地为H或 $C_1$ - $C_{15}$ 烷基,并且 $x$ 是0、1或2。在一些实施方案中,取代基是 $C_1$ - $C_{12}$ 烷基基团。在其他实施方案中,取代基是卤代基团,如氟代。在其他实施方案中,取代基是氧代基团。在其他实施方案中,取代基是羟基基团。在其他实施方案中,取代基是烷氧基基团( $-OR'$ )。在其他实施方案中,取代基是羧基基团。在其他实施方案中,取代基是胺基团( $-NR'R'$ )。

[0061] “任选的”或“任选地”(如,任选取代的)意指随后描述的情况事件可以发生或可以不发生,并且该描述包括所述事件或情况发生的情形以及所述事件或情况没有发生的情形。例如,“任选取代的烷基”意指烷基基团可以被取代或可以不被取代,并且该描述包括取代的烷基基团和没有取代的烷基基团。

[0062] 本文公开的公开内容还意在涵盖通过使一个或多个原子被具有不同原子量或质量数的原子替代而被同位素标记的结构(I)的化合物的所有药学上可接受的化合物。可掺入所公开化合物的同位素的实例包括氢、碳、氮、氧、磷、氟、氯和碘的同位素,如分别为 $^2H$ 、 $^3H$ 、 $^{11}C$ 、 $^{13}C$ 、 $^{14}C$ 、 $^{13}N$ 、 $^{15}N$ 、 $^{15}O$ 、 $^{17}O$ 、 $^{18}O$ 、 $^{31}P$ 、 $^{32}P$ 、 $^{35}S$ 、 $^{18}F$ 、 $^{36}Cl$ 、 $^{123}I$ 和 $^{125}I$ 。这些放射性标记的化合物可用于通过表征例如作用位点或作用模式或者与药理学重要的作用位点的结合亲和力来帮助确定或测量化合物的有效性。结构(I)、(IA)或(IB)的某些同位素标记的化合物,例如掺入放射性同位素的那些,可用于药物和/或底物组织分布研究。鉴于放射性同位素氚即 $^3H$ 和碳-14即 $^{14}C$ 掺入容易和检测手段现成,它们可特别用于该目的。

[0063] 用较重的同位素如氘(即 $^2H$ )进行取代可能会因更高的代谢稳定性而提供某些治疗优势,例如增加的体内半衰期或降低的剂量要求,因此在某些情况下可能是优选的。

[0064] 用正电子发射同位素如 $^{11}C$ 、 $^{18}F$ 、 $^{15}O$ 和 $^{13}N$ 取代可用于正电子发射断层扫描(PET)研究中,以检查底物受体占有率。结构(I)的同位素标记的化合物通常可以通过本领域技术人员已知的常规技术或通过下文阐述的制备和实施例描述的那些过程类似的过程使用适当的同位素标记的试剂来代替先前使用的非标记的试剂来制备。

[0065] “稳定的化合物”和“稳定的结构”意在指足够稳健以经受得住从反应混合物中分离至有用程度的纯度并配制成有效治疗剂的化合物。



[0066] “哺乳动物”包括人类以及家养动物如实验室动物和家庭宠物(如猫、狗、猪、牛、绵羊、山羊、马、兔)和非家养动物(如野生动物等)。

[0067] “药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂”包括但不限于已被美国食品和药品管理局批准对于用于人类或家养动物是可接受的任何佐剂、载体、赋形剂、助流剂、甜味剂、稀释剂、防腐剂、染料/着色剂、增味剂、表面活性剂、润湿剂、分散剂、助悬剂、稳定剂、等渗剂、溶剂或乳化剂。

[0068] “药学上可接受的盐”包括酸加成盐和碱加成盐。

[0069] “药学上可接受的酸加成盐”是指保留了游离碱的生物效力和性能,不是生物学上或其他方面不期望的,并且与无机酸(如但不限于盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸等)或与有机酸(如但不限于乙酸、2,2-二氯乙酸、己二酸、藻酸、抗坏血酸、天冬氨酸、苯磺酸、苯甲酸、4-乙酰氨基苯甲酸、樟脑酸、樟脑-10-磺酸、癸酸、己酸、辛酸、碳酸、肉桂酸、柠檬酸、环拉酸、十二烷基硫酸、乙烷-1,2-二磺酸、乙磺酸、2-羟基乙磺酸、甲酸、富马酸、半乳糖二酸(galactaric acid)、龙胆酸、葡庚糖酸、葡萄糖酸、葡萄糖醛酸、谷氨酸、戊二酸、2-氧代-戊二酸、甘油磷酸、乙醇酸、马尿酸、异丁酸、乳酸、乳糖酸、月桂酸、马来酸、苹果酸、丙二酸、扁桃酸、甲磺酸、粘酸、萘-1,5-二磺酸、萘-2-磺酸、1-羟基-2-萘甲酸、烟酸、油酸、乳清酸、草酸、棕榈酸、双羟萘酸、丙酸、焦谷氨酸、丙酮酸、水杨酸、4-氨基水杨酸、癸二酸、硬脂酸、琥珀酸、酒石酸、硫氰酸、对甲苯磺酸、三氟乙酸、十一碳烯酸等)形成的那些盐。

[0070] “药学上可接受的碱加成盐”是指保留了游离酸的生物效力和性能,不是生物学上或其他方面不期望的那些盐。这些盐是通过将无机碱或有机碱加到游离酸中来制备的。衍生自无机碱的盐包括但不限于钠盐、钾盐、锂盐、铵盐、钙盐、镁盐、铁盐、锌盐、铜盐、锰盐、铝盐等。优选的无机盐是铵盐、钠盐、钾盐、钙盐和镁盐。衍生自有机碱的盐包括但不限于伯胺、仲胺和叔胺的盐,取代的胺,其包括天然存在的取代的胺、环胺和碱性离子交换树脂,如氨、异丙胺、三甲胺、二乙胺、三乙胺、三丙胺、二乙醇胺、乙醇胺、地阿诺、2-二甲基氨基乙醇、2-二乙基氨基乙醇、二环己胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、咖啡因、普鲁卡因、海巴明、胆碱、甜菜碱、苯那明(benethamine)、苜蓿、乙二胺、葡糖胺、甲基葡糖胺、可可碱、三乙醇胺、氨丁三醇、嘌呤、哌嗪、哌啶、N-乙基哌啶、多胺树脂等。特别优选的有机碱是异丙胺、二乙胺、乙醇胺、三甲胺、二环己胺、胆碱和咖啡因。

[0071] 通常结晶产生本公开内容的化合物(即结构(I)的化合物)的溶剂化物。如本文所用,术语“溶剂化物”是指包含本公开内容的化合物的一个或多个分子与一个或多个溶剂分子的聚集体。溶剂可以是水,在这种情况下,溶剂化物可以是水合物。可选地,溶剂可以是有机溶剂。因此,本公开内容的化合物可以以水合物形式(包括一水合物、二水合物、半水合物、倍半水合物、三水合物、四水合物等)以及相应的溶剂化形式存在。本公开内容的化合物的溶剂化物可以是真正的溶剂化物,而在其他情况下,本公开内容的化合物可仅保留外来水或为水加一些外来溶剂的混合物。

[0072] “药物组合物”是指本公开内容的化合物和本领域普遍接受的用于将生物活性化合物递送至哺乳动物如人类的介质的制剂。此类介质包括用于其的所有药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

[0073] “有效量”或“治疗有效量”是指当施用于哺乳动物优选人时足以在哺乳动物优选人中实现治疗的本公开内容的化合物的量。构成“治疗有效量”的本公开内容的实施方案的

脂质纳米颗粒的量将根据化合物、病况及其严重程度、施用方式和待治疗哺乳动物的年龄而变化,但可以由本领域的普通技术人员根据自己的知识和本公开内容常规确定。

[0074] 如本文所用,“治疗(treating)”或“治疗(treatment)”涵盖在患有目标疾病或病况的哺乳动物,优选人中针对目标疾病或病况的治疗,并且包括:

[0075] (i) 预防该疾病或病况在哺乳动物中发生,特别是当此类哺乳动物易患该病况但尚未被诊断为患有该病况时;

[0076] (ii) 抑制该疾病或病况,即阻止其发展;

[0077] (iii) 减轻该疾病或病况,即导致该疾病或病况消退;或者

[0078] (iv) 缓解由该疾病或病况引起的症状,即缓解疼痛而不解决潜在的疾病或病况。

如本文所用,术语“疾病”和“病况”可以互换使用,或可以不同,因为特定的疾病或病况可能没有已知的病原体(使得病因尚未查明),因此其尚未被确认为疾病而仅被视为不期望的状况或综合征,其中临床医生已鉴定出或多或少特定的症状组。

[0079] 本公开内容的化合物或其药学上可接受的盐可包含一个或多个立体中心,因此可产生对映异构体、非对映异构体和可就绝对立体化学而言被定义为(R)-或(S)-或为(D)-或(L)- (对于氨基酸)的其他立体异构体形式。本公开内容意在包括所有此类可能的异构体,以及它们的外消旋和光学纯的形式。光学活性的(+)和(-)、(R)-和(S)-、或(D)-和(L)-异构体可以使用手性合成子或手性试剂制备,或者使用常规技术例如色谱和分步结晶拆分。用于制备/分离单独对映异构体的常规技术包括由适合的光学纯前体进行手性合成或使用例如手性高压液相色谱(HPLC)拆分外消旋物(或盐或衍生物的外消旋物)。当本文所述的化合物含有烯属双键或其他几何不对称中心时,并且除非另外说明,该化合物旨在包括E和Z几何异构体。同样地,也旨在包括所有互变异构体形式。

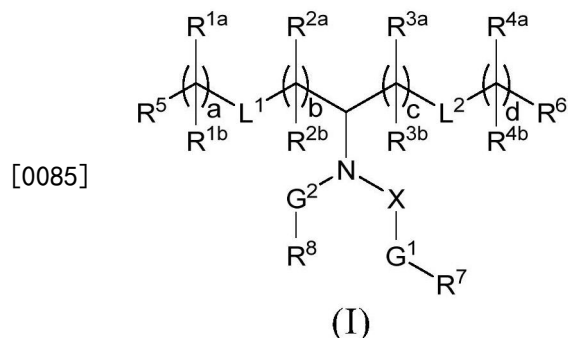
[0080] “立体异构体”是指由通过相同键键合的相同原子组成但具有不可互换的不同三维结构的化合物。本公开内容考虑了各种立体异构体及其混合物,并且包括“对映异构体”,其是指分子彼此为不重叠镜像的两种立体异构体。

[0081] “互变异构体”是指从分子的一个原子到同一分子的另一个原子的质子转移。本公开内容包括任何所述化合物的互变异构体。

[0082] 化合物

[0083] 在一方面,本公开内容提供了新型脂质化合物,其能够与其他脂质组分如中性脂质、带电脂质、类固醇和/或聚合物缀合的脂质组合以形成具有治疗剂(例如,寡核苷酸)的脂质纳米颗粒。不希望受到理论的束缚,认为这些脂质纳米颗粒庇护治疗剂免于在血清中降解,并提供了在体外和体内有效递送治疗剂至细胞。

[0084] 在一个实施方案中,化合物具有以下结构(I):





[0110] 在其他上述实施方案中,  $R^7$  为  $-NR^9(C=O)$  或  $-(C=O)NR^9R^{10}$ 。在一些这些实施方案中,  $R^9$  为 H。在另一些这些实施方案中,  $R^9$  和  $R^{10}$  各自独立地为  $C_6-C_{10}$  烷基。

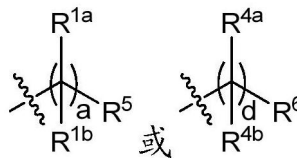
[0111] 在其他实施方案中, 对于  $R^{1a}$  和  $R^{1b}$  的至少一次存在,  $R^{1a}$  为 H 或  $C_1-C_{12}$  烷基, 并且  $R^{1b}$  它所连接的碳原子与相邻的  $R^{1b}$  和它所连接的碳原子一起形成碳碳双键。

[0112] 在其他实施方案中, 对于  $R^{4a}$  和  $R^{4b}$  的至少一次存在,  $R^{4a}$  为 H 或  $C_1-C_{12}$  烷基, 并且  $R^{4b}$  它所连接的碳原子与相邻的  $R^{4b}$  和它所连接的碳原子一起形成碳碳双键。

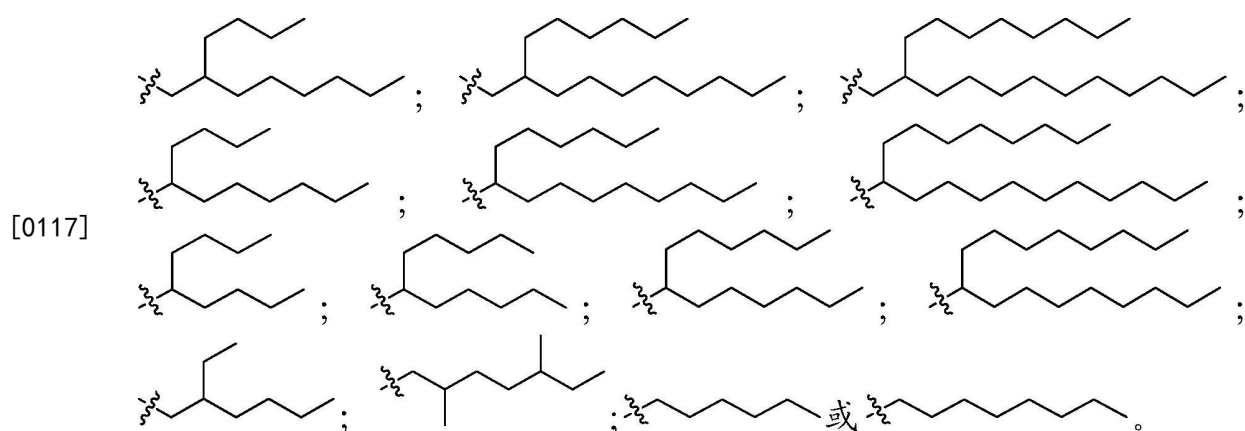
[0113] 在其他实施方案中, 对于  $R^{2a}$  和  $R^{2b}$  的至少一次存在,  $R^{2a}$  为 H 或  $C_1-C_{12}$  烷基, 并且  $R^{2b}$  它所连接的碳原子与相邻的  $R^{2b}$  和它所连接的碳原子一起形成碳碳双键。

[0114] 在其他实施方案中, 对于  $R^{3a}$  和  $R^{3b}$  的至少一次存在,  $R^{3a}$  为 H 或  $C_1-C_{12}$  烷基, 并且  $R^{3b}$  它所连接的碳原子与相邻的  $R^{3b}$  和它所连接的碳原子一起形成碳碳双键。

[0115] 在各种上述实施方案中,  $R^{1a}$ 、 $R^{1b}$ 、 $R^{2a}$ 、 $R^{2b}$ 、 $R^{3a}$ 、 $R^{3b}$ 、 $R^{4a}$  和  $R^{4b}$  在每次出现时独立地为 H 或  $C_1-C_{12}$  烷基。在其他实施方案中,  $R^{2a}$ 、 $R^{2b}$ 、 $R^{3a}$  和  $R^{3b}$  在每次出现时为 H。例如, 在某些实施方案中,  $R^{1a}$  和  $R^{4a}$  在每次出现时为 H。在不同的实施方案中,  $R^{1b}$  和  $R^{4b}$  中的至少一个为  $C_1-C_8$  烷基。例如, 在一些实施方案中,  $C_1-C_8$  烷基是甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基、正己基或正辛基。

[0116] 在其他更具体的实施方案中,  或两者独立地具有以下结构中的一种:

中的一种:



[0118] 在更多的实施方案中, a、b、c 和 d 各自独立地为 2 至 12 的整数。在更多的实施方案中, a、b、c 和 d 各自独立地为 4 至 10、5 至 10、6 至 10、4 至 9、5 至 9 或 6 至 9 的整数。在其它不同的实施方案中, b 和 c 独立地为 5、6、7、8、9 或 10。

[0119] 在一些实施方案中,  $R^5$  或  $R^6$  中的一个为甲基。在其他实施方案中,  $R^5$  或  $R^6$  各自为甲基。

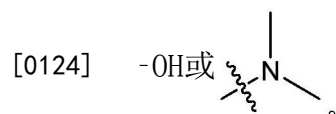
[0120] 在一些实施方案中,  $R^8$  为 OH。

[0121] 在其他实施方案中,  $R^8$  为  $-N(R^{11})(C=O)R^{12}$ 。在不同的实施方案中,  $R^8$  为  $-(C=O)NR^{11}R^{12}$ 。在更多不同的实施方案中,  $R^8$  为  $-NR^{11}R^{12}$ 。在一些上述实施方案中,  $R^{11}$  和  $R^{12}$  各自独立地为 H 或  $C_1-C_8$  烷基。在其他这些实施方案中,  $R^{11}$  和  $R^{12}$  各自独立地为 H 或  $C_1-C_3$  烷基。例如, 在一些实施方案中,  $C_1-C_8$  烷基或  $C_1-C_3$  烷基是未取代的或被羟基取代的。在其他不同的此类实施

方案中,  $R^{11}$  和  $R^{12}$  各自为甲基。

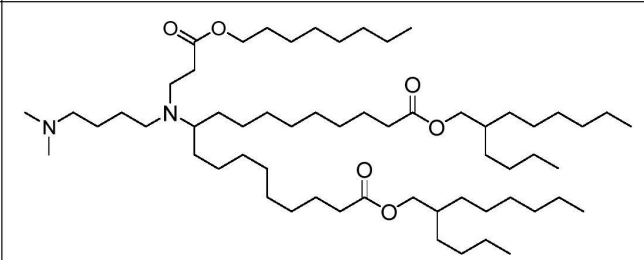
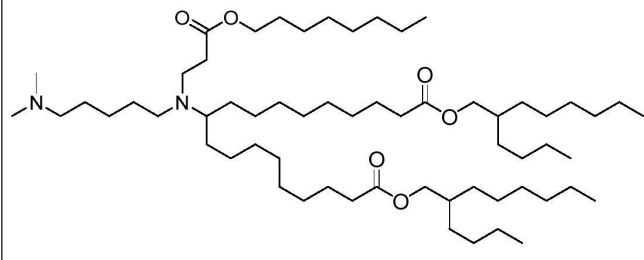
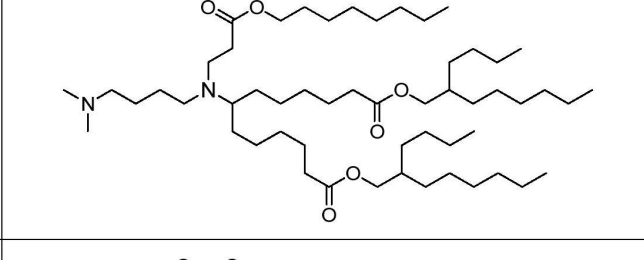
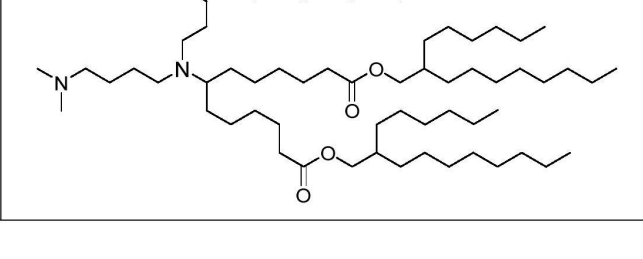
[0122] 在结构 (I) 的化合物的其他实施方案中,  $R^8$  为  $-(C=O)OR^{12}$ , 而在不同的实施方案中,  $R^8$  为  $-O(C=O)R^{12}$ 。

[0123] 在任一上述化合物的具体实施方案中,  $R^8$  具有以下结构中的一种:



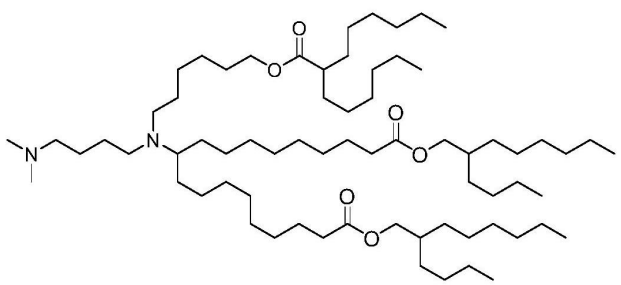
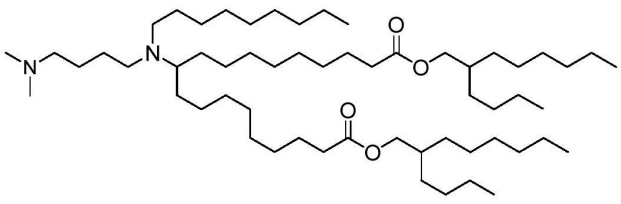
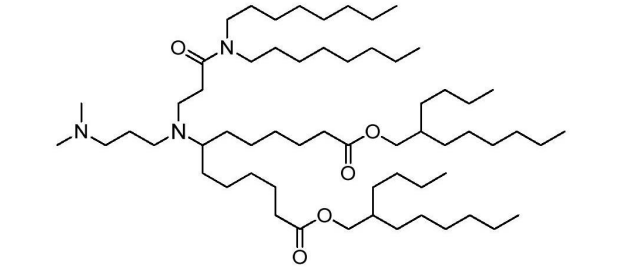
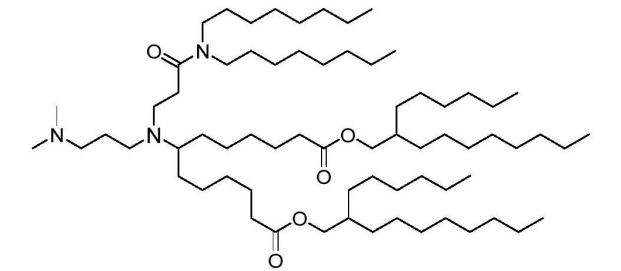
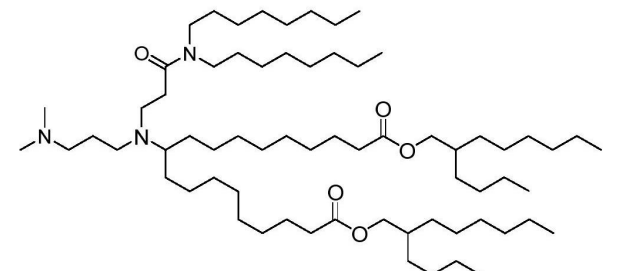
[0125] 在各种不同的实施方案中, 本公开内容提供了具有下表 1 中所述结构中的一种的化合物或其药学上可接受的盐或互变异构体。

[0126] 表 1: 代表化合物

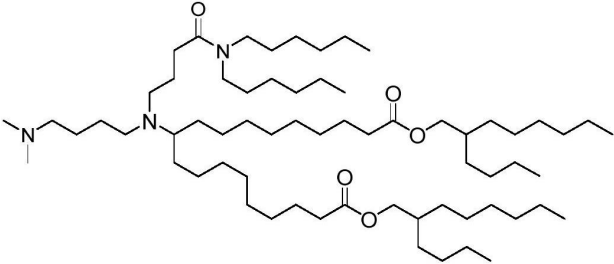
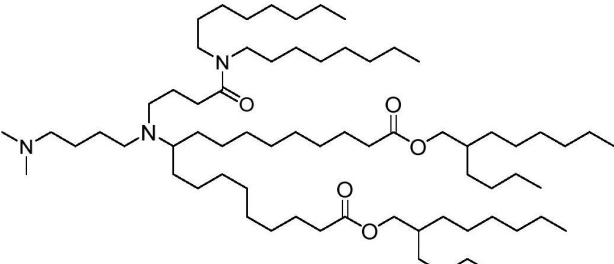
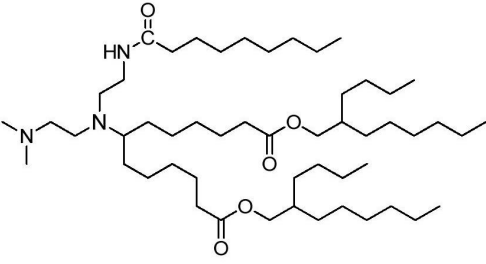
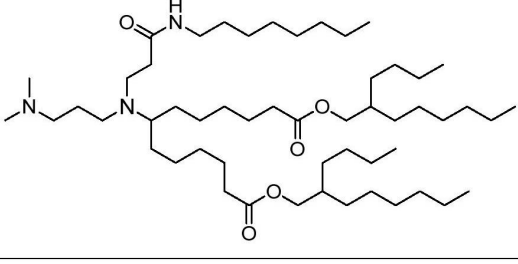
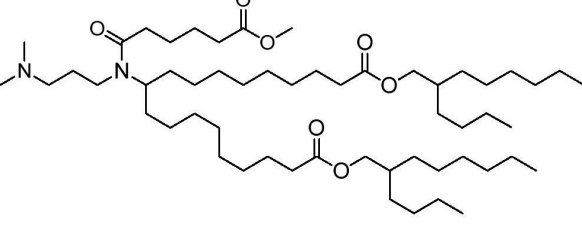
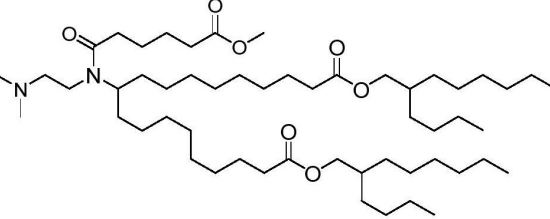
编号	结构
I-1	
I-2	
I-3	
I-4	

[0127]

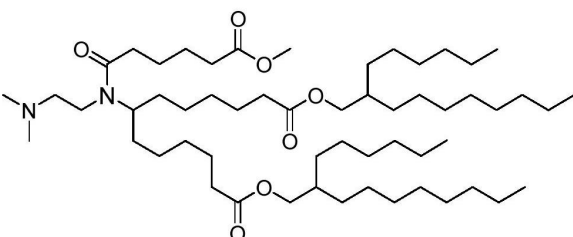
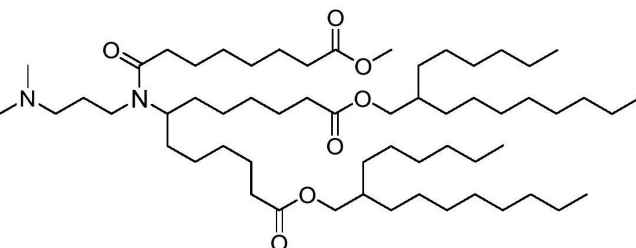
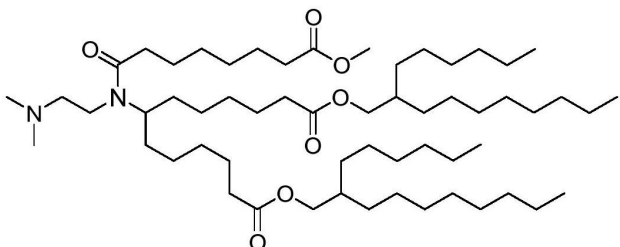
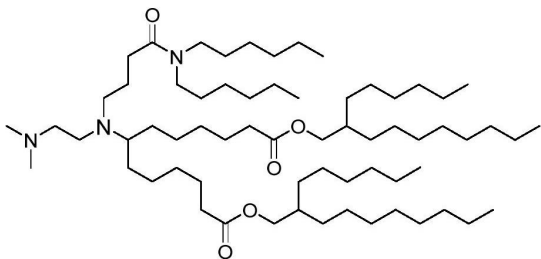
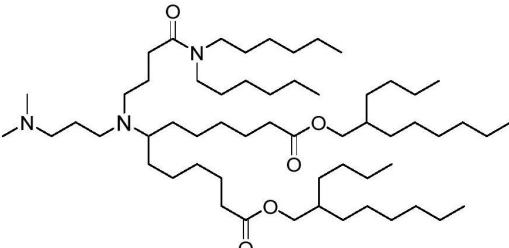
[0128]

编号	结构
I-5	
I-6	
I-7	
I-8	
I-9	

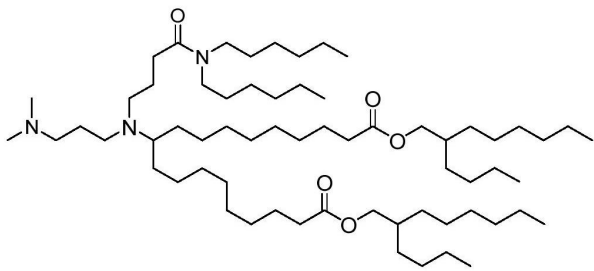
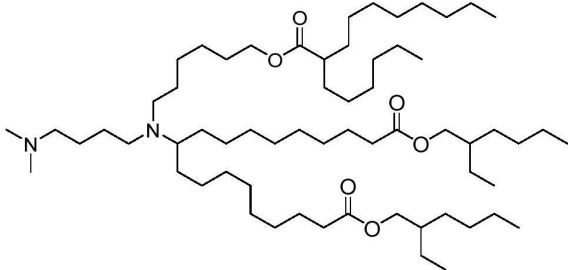
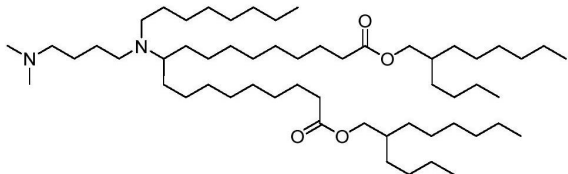
[0129]

编号	结构
I-10	
I-11	
I-12	
I-13	
I-14	
I-15	

[0130]

编号	结构
I-16	
I-17	
I-18	
I-19	
I-20	



编号	结构
I-21	
I-22	
I-23	

[0132] 应理解,如上所述的结构(I)的化合物的任何实施方案,以及如上所述的结构(I)的化合物的任何特定的取代基和/或变量可以独立地与结构(I)的化合物的其他实施方案和/或取代基和/或变量组合以形成以上未具体阐述的本公开内容的实施方案。另外,在具体实施方案和/或权利要求书中列出了任何具体的R基团、G基团、L基团或变量a、b、c、d或n的取代基和/或变量列表的情况下,应理解,每个单独的取代基和/或变量可以从具体实施方案和/或权利要求书中删除,并且取代基和/或变量的其余列表将被认为是在本公开内容的范围内。

[0133] 应理解,在本说明书中,所描绘的式的取代基和/或变量的组合仅当这样的贡献产生稳定的化合物时才是允许的。

[0134] 在一些实施方案中,提供了包含结构(I)的化合物的脂质纳米颗粒。脂质纳米颗粒任选地包含选自中性脂质、类固醇和聚合物缀合的脂质的赋形剂。

[0135] 在一些实施方案中,提供了包含结构(I)的化合物中的任一种或多种和治疗剂的组合物。例如,在一些实施方案中,组合物包含结构(I)的化合物中的任一种和治疗剂及一种或多种选自中性脂质、类固醇和聚合物缀合的脂质的赋形剂。其他药学上可接受的赋形剂和/或载体也被包含在组合物的各种实施方案中。

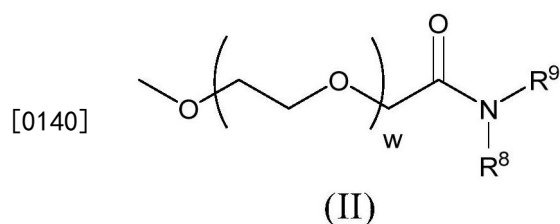
[0136] 在一些实施方案中,中性脂质选自DSPC、DPPC、DMPC、DOPC、POPC、DOPE和SM。在一些实施方案中,中性脂质是DSPC。在各个实施方案中,化合物与中性脂质的摩尔比为约2:1至约8:1。

[0137] 在各个实施方案中,组合物还包含类固醇或类固醇类似物。在某些实施方案中,类固醇或类固醇类似物是胆固醇。在一些这些实施方案中,化合物与胆固醇的摩尔比为约5:1

至1:1。

[0138] 在各个实施方案中,聚合物缀合的脂质是聚乙二醇化脂质。例如,一些实施方案包括聚乙二醇化二酰基甘油(PEG-DAG)如1-(单甲氧基-聚乙二醇)-2,3-二肉豆蔻酰甘油(PEG-DMG)、聚乙二醇化磷脂酰乙醇胺(PEG-PE)、PEG琥珀酸酯二酰基甘油(PEG-S-DAG)如4-O-(2',3'-二(十四烷酰氧基)丙基-1-O-( $\omega$ -甲氧基(聚乙氧基)乙基)丁二酸酯(PEG-S-DMG)、聚乙二醇化神经酰胺(PEG-cer)或PEG二烷氧基丙基氨基甲酸酯如 $\omega$ -甲氧基(聚乙氧基)乙基-N-(2,3-二(十四烷氧基)丙基)氨基甲酸酯或2,3-二(十四烷氧基)丙基-N-( $\omega$ -甲氧基(聚乙氧基)乙基)氨基甲酸酯。在各个实施方案中,化合物与聚乙二醇化脂质的摩尔比为约100:1至约20:1。

[0139] 在一些实施方案中,组合物包含具有以下结构(II)的聚乙二醇化脂质:



[0141] 或其药学上可接受的盐、互变异构体或立体异构体,其中:

[0142]  $R^8$ 和 $R^9$ 各自独立地为含有10至30个碳原子的直链或支化的、饱和或不饱和的烃基链,其中所述烃基链任选地被一个或多个酯键中断;以及

[0143]  $w$ 的平均值范围为30至60。

[0144] 在一些实施方案中, $R^8$ 和 $R^9$ 各自独立地为含有12至16个碳原子的直链饱和烷基链。在其它实施方案中,平均值 $w$ 为约42至55,例如约49。

[0145] 在上述组合物的一些实施方案中,治疗剂包括核酸。例如,在一些实施方案中,核酸选自反义RNA和信使RNA。在一些前述实施方案中,组合物包含脂质纳米颗粒。

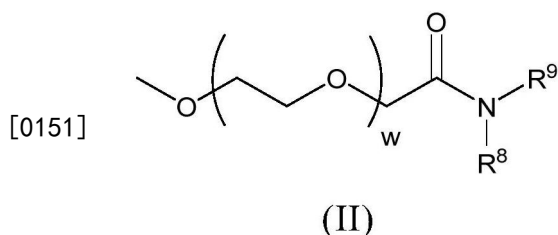
[0146] 一些相关的实施方案提供了包含任一前述实施方案的化合物(例如,结构(I)的化合物)的脂质纳米颗粒。在某些实施方案中,脂质纳米颗粒还包含治疗剂(例如,核酸,如反义RNA和信使RNA)。

[0147] 在一些实施方案中,脂质纳米颗粒还包含选自以下的一种或多种赋形剂:中性脂质、类固醇和聚合物缀合的脂质。在一些实施方案中,中性脂质选自DSPC、DPPC、DMPC、DOPC、POPC、DOPE和SM。在更具体的实施方案中,中性脂质为DSPC。

[0148] 在一些更具体的实施方案中,化合物与中性脂质的摩尔比为约2:1至约8:1。在一些实施方案中,类固醇为胆固醇。在一些实施方案中,化合物与胆固醇的摩尔比为5:1至1:1。

[0149] 在某些实施方案中,聚合物缀合的脂质为聚乙二醇化脂质。在某些更具体的实施方案中,化合物与聚乙二醇化脂质的摩尔比为约100:1至约20:1。

[0150] 在一些实施方案中,聚乙二醇化脂质为PEG-DAG、PEG-PE、PEG-S-DAG、PEG-cer或PEG二烷氧基丙基氨基甲酸酯。在其它实施方案中,聚乙二醇化脂质具有以下结构(II):



[0152] 或其药学上可接受的盐、互变异构体或立体异构体,其中:

[0153]  $R^8$ 和 $R^9$ 各自独立地为含有10至30个碳原子的直链或支化的、饱和或不饱和的烃基链,其中所述烃基链任选地被一个或多个酯键中断;以及

[0154]  $w$ 的平均值为30至60。

[0155] 在结构(II)的一些更具体的实施方案中, $R^8$ 和 $R^9$ 各自独立地为含有12至16个碳原子的直链饱和烷基链。在更具体的实施方案中,平均值 $w$ 为约49。

[0156] 在其他不同的实施方案中,本公开内容涉及用于向有需要的患者施用治疗剂的方法,所述方法包括制备或提供任一前述组合物以及向患者施用所述组合物。

[0157] 出于施用的目的,可以将本公开内容的化合物(通常呈与治疗剂组合的脂质纳米颗粒的形式)的实施方案作为化学原料施用或可以配制成药物组合物。本公开内容的实施方案的药物组合物包含结构(I)的化合物和一种或多种药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。在一些实施方案中,结构(I)的化合物以有效形成脂质纳米颗粒并递送治疗剂例如用于治疗特定的目标疾病或病况的量存在于组合物中。适当的浓度和剂量可以由本领域技术人员容易地确定。

[0158] 本公开内容的实施方案的组合物施用可以经由用于相似效用的试剂的任何可接受的施用模式来进行。本公开内容的实施方案的药物组合物可以配制成呈固体、半固体、液体或气体形式的制剂,如片剂、胶囊剂、粉剂、颗粒剂、软膏剂、溶液、混悬剂、栓剂、注射剂、吸入剂、凝胶剂、微球和气雾剂。施用此类药物组合物的典型途径包括但不限于经口、局部、透皮、吸入、肠胃外、舌下、经颊、经直肠、经阴道和鼻内。如本文所用的术语“肠胃外”包括皮下注射、静脉内、肌内、皮内、胸骨内注射或输注技术。配制本公开内容的实施方案的药物组合物,以使得其中包含的活性成分在将组合物施用至患者后是生物可利用的。在一些实施方案中,将要施用至个体或患者的组合物采取一个或多个剂量单位的形式,其中例如片剂可以是单个剂量单位,呈气雾剂形式的本公开内容的实施方案的化合物的容器可以容纳多个剂量单位。制备此类剂型的实际方法对于本领域技术人员而言是已知的,或者将是显而易见的;例如,参见Remington: The Science and Practice of Pharmacy,第20版(Philadelphia College of Pharmacy and Science,2000)。在一些实施方案中,根据本公开内容的教导,在任何情况下,待施用的组合物将含有治疗有效量的本公开内容的化合物或其药学上可接受的盐用于治疗目标疾病或病况。

[0159] 本公开内容的实施方案的药物组合物可以呈固体或液体的形式。在一方面,载体是颗粒状的,使得组合物呈例如片剂或粉末形式。载体可以是液体,其中组合物例如是口服糖浆、可注射液体或气雾剂,其可用于例如吸入施用。

[0160] 当意在经口施用时,某些实施方案的药物组合物优选呈固体或液体形式,其中半固体、半液体、混悬液和凝胶形式被包括在本文中被视为固体或液体的形式内。

[0161] 作为用于经口施用的固体组合物,可以将一些实施方案的药物组合物配制成粉

剂、颗粒剂、压制片剂、丸剂、胶囊剂、口香糖、薄片(wafer)等形式。此类固体组合物通常含有一种或多种惰性稀释剂或可食用载体。此外,可以存在以下中的一种或多种:粘合剂如羧甲基纤维素、乙基纤维素、微晶纤维素、黄蓍胶或明胶;赋形剂如淀粉、乳糖或糊精,崩解剂如海藻酸、海藻酸钠、Primogel、玉米淀粉等;润滑剂如硬脂酸镁或Sterotex;助流剂如胶态二氧化硅;甜味剂如蔗糖或糖精;调味剂如胡椒薄荷、水杨酸甲酯或橙香精;以及着色剂。

[0162] 当一些实施方案的药物组合物呈胶囊例如明胶胶囊形式时,除了上述类型的材料外,它还可以含有液体载体如聚乙二醇或油。

[0163] 一些实施方案的药物组合物可以呈液体的形式,例如酏剂、糖浆剂、溶液、乳剂或混悬剂。作为两个实例,该液体可以用于经口施用或用于通过注射递送。当意在用于经口施用时,除了结构(I)的化合物之外,优选的组合物还包含甜味剂、防腐剂、染料/着色剂和增味剂中的一种或多种。在旨在通过注射施用的组合物中,可以包含表面活性剂、防腐剂、湿润剂、分散剂、助悬剂、缓冲剂、稳定剂和等渗剂中的一种或多种。

[0164] 本公开内容的实施方案的液体药物组合物,无论它们是溶液、混悬剂或其他类似形式,都可以包含以下佐剂中的一种或多种:无菌稀释剂如注射用水、盐水溶液优选生理盐水、林格氏溶液、等渗氯化钠、可以用作溶剂或悬浮介质的诸如合成的甘油单酯或甘油二酯的不挥发油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其他溶剂;抗菌剂如苄醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂如乙二胺四乙酸;缓冲剂如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐,以及用于调节张力的试剂如氯化钠或右旋糖;用作冷冻保护剂的试剂,如蔗糖或海藻糖。肠胃外制剂可以装在玻璃或塑料制成的安瓿瓶、一次性注射器或多剂量小瓶中。生理盐水是优选的佐剂。可注射的药物组合物优选是无菌的。

[0165] 本公开内容的实施方案的药物组合物可以意在用于局部施用,在这种情况下,载体可以适合地包括溶液、乳剂、软膏剂或凝胶基质。基质例如可以包括以下中的一种或多种:凡士林、羊毛脂、聚乙二醇、蜂蜡、矿物油、稀释剂(如水和醇)以及乳化剂和稳定剂。增稠剂可存在于药物组合物中以用于局部施用。如果意在用于透皮施用,则组合物可以包括透皮贴剂或离子电渗疗法装置。

[0166] 本公开内容的实施方案的药物组合物可以包含改变固体或液体剂量单位的物理形式的各种材料。例如,组合物可以包含在活性成分周围形成包衣壳的材料。形成包衣壳的材料通常是惰性的,并且可以选自例如糖、虫胶和其他肠溶包衣剂。可选地,活性成分可以装在明胶胶囊中。

[0167] 呈固体或液体形式的本公开内容的实施方案的药物组合物可包含结合本公开内容的化合物并从而有助于递送LNP的试剂。可以这种能力发挥作用的适合试剂包括单克隆抗体或多克隆抗体或蛋白质。

[0168] 本公开内容的实施方案的药物组合物可以由可作为气雾剂施用的剂量单位组成。术语“气雾剂”用于表示范围从胶体性质的那些系统到由加压包装组成的系统的各种系统。可以通过液化或压缩气体或者通过分配活性成分的适合泵系统进行递送。可以以单相、两相或三相体系递送本公开内容的实施方案的LNP的气雾剂,以便递送活性成分。气雾剂的递送包括必需的容器、激活剂、阀、子容器等,其一起可以形成试剂盒。本领域技术人员无需过度实验就可以确定优选的气雾剂。

[0169] 本公开内容的实施方案的药物组合物可以通过制药领域众所周知的方法来制备。

例如,可以通过将本公开内容的脂质纳米颗粒与无菌蒸馏水或其他载体组合以形成溶液来制备意在通过注射施用的药物组合物。可以添加表面活性剂以促进均匀溶液或混悬液的形成。表面活性剂是与本公开内容的化合物非共价相互作用从而促进化合物在水性递送系统中的溶解或均匀悬浮的化合物。

[0170] 本公开内容的实施方案的组合物或其药学上可接受的盐以治疗有效量施用,所述量将根据多种因素而变化,这些因素包括所用具体治疗剂的活性;治疗剂的代谢稳定性和作用时长;患者的年龄、体重、总体健康、性别和饮食;施用方式和时间;排泄率;药物组合;特定病症或病况的严重程度;以及正在接受治疗的个体。

[0171] 本公开内容的实施方案的组合物也可以在施用一种或多种其他治疗剂的同时、之前或之后施用。此类组合疗法包括施用本公开内容的实施方案的组合物和一种或多种另外的活性剂的单一药物剂量制剂,以及以其自身分开的药物剂量制剂施用本发明的组合物和每种活性剂。例如,可以将本公开内容的实施方案的组合物和其他活性剂一起以单一口服剂量组合物(如片剂或胶囊剂)或以分开的口服剂量制剂施用的每种药剂施用至患者。当使用分开的剂量制剂时,本公开内容的实施方案的化合物和一种或多种另外的活性剂可以在基本上相同的时间即同时地,或在分别错开的时间即依序地施用;组合疗法被理解为包括所有这些方案。

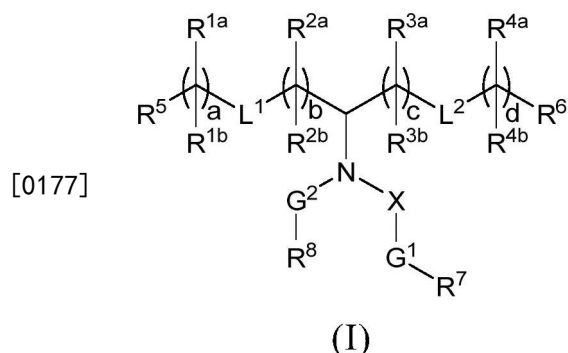
[0172] 上述化合物和组合物的制备方法在下文中描述和/或是本领域已知的。

[0173] 本领域技术人员将理解,在本文所述的过程中,中间体化合物的官能团可能需要被适合的保护基团保护。此类官能团包括羟基、氨基、巯基和羧酸。适合的羟基保护基团包括三烷基甲硅烷基或二芳基烷基甲硅烷基(例如,叔丁基二甲基甲硅烷基、叔丁基二苯基甲硅烷基或三甲基甲硅烷基)、四氢吡喃基、苄基等。适合的氨基、胍基和胍基的保护基团包括叔丁氧羰基、苄氧羰基等。适合的巯基保护基团包括-C(O)-R''(其中R''是烷基、芳基或芳基烷基)、对甲氧基苄基、三苯甲基等。适合的羧酸保护基包括烷基、芳基或芳基烷基酯。可以根据本领域技术人员已知并且如本文所述的标准技术来添加或去除保护基团。保护基团的使用详细描述于Green, T.W. 和P.G.M. Wutz, *Protective Groups in Organic Synthesis* (1999), 第3版, Wiley中。如本领域技术人员将理解的,保护基团也可以是聚合物树脂,如Wang树脂、Rink树脂或2-氯三苯甲基-氯化物树脂。

[0174] 本领域技术人员还将理解,尽管本公开内容的化合物的此类保护的衍生物可能本身不具有药理学活性,但可以将它们施用至哺乳动物并且随后在体内代谢以形成具有药理学活性的本公开内容的化合物。因此,此类衍生物可以被描述为“前药”。本公开内容的化合物的所有前药都包括在本公开内容的范围内。

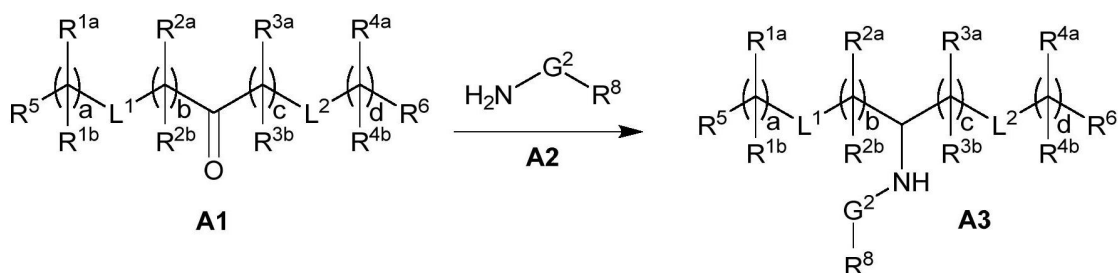
[0175] 此外,可以通过本领域技术人员已知的方法,通过用适当的无机或有机碱或酸处理,将以游离碱或酸形式存在的本公开内容的实施方案的化合物转化为它们的药学上可接受的盐。本公开内容的实施方案的化合物的盐可以通过标准技术转化为它们的游离碱或酸形式。

[0176] 以下一般反应方案1例示出制备本公开内容的化合物,即结构(I)的化合物或其药学上可接受的盐、互变异构体或立体异构体的示例性方法:

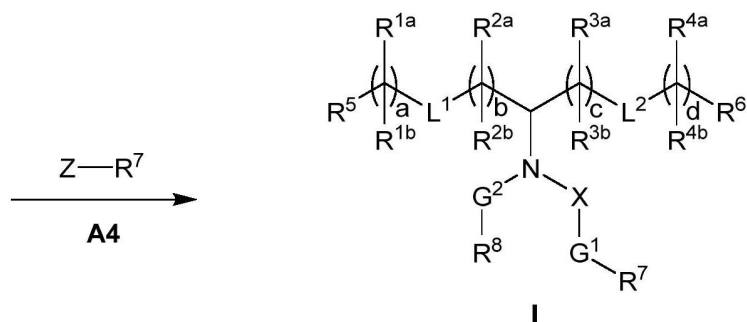


[0178] 其中a、b、c、d、G<sup>1</sup>、G<sup>2</sup>、L<sup>1</sup>、L<sup>2</sup>、R<sup>1a</sup>、R<sup>1b</sup>、R<sup>2a</sup>、R<sup>2b</sup>、R<sup>3a</sup>、R<sup>3b</sup>、R<sup>4a</sup>、R<sup>4b</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>、R<sup>7</sup>、R<sup>8</sup>和X如本文所定义。应理解,本领域技术人员可以能够通过相似的方法或通过组合本领域技术人员已知的其他方法来制备这些化合物。还应理解,本领域技术人员将能够通过使用适当的起始组分并根据需要改变合成参数以如下所述的类似方式制备以下未具体说明的其他结构(I)的化合物。通常,起始组分可从诸如Sigma Aldrich、Lancaster Synthesis, Inc.、Maybridge、Matrix Scientific、TCI和Fluorochem USA等的来源获得,或根据本领域技术人员已知的来源合成(参见例如,Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure, 第5版(Wiley, 2000年12月))或如本公开内容中所述制备。

[0179] 一般反应方案1



[0180]



[0181] 一般反应方案I提供了用于制备结构(I)的化合物(即,A5)的示例性方法。一般反应方案1中的a、b、c、d、G<sup>1</sup>、G<sup>2</sup>、L<sup>1</sup>、L<sup>2</sup>、R<sup>1a</sup>、R<sup>1b</sup>、R<sup>2a</sup>、R<sup>2b</sup>、R<sup>3a</sup>、R<sup>3b</sup>、R<sup>4a</sup>、R<sup>4b</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>、R<sup>8</sup>、R<sup>9</sup>和R<sup>10</sup>如本文所定义,并且Z表示G<sup>1</sup>的活性类似物,足以与A3的NH基团成键(例如,以醛、酸卤化物、丙烯酸酯等封端的烯烃或亚烷基)。根据一般反应方案I制备化合物所需的中间体和试剂(例如,A1和A2)可以是购买的或根据以下实例或本领域普通技术人员已知的方法制备的。

[0182] 应注意,用于制备结构(I)的化合物的各种替代策略是本领域普通技术人员可获得的。例如,其中其它结构(I)的化合物可以根据类似方法使用适当的起始材料制备。根据需要使用保护基团和对上述一般反应方案的其它修改对本领域普通技术人员而言将是显

而易见的。

[0183] 出于例示而非限制的目的提供以下实施例。

[0184] 实施例1

[0185] 使用脂质纳米颗粒组合物进行荧光素酶mRNA的体内评价

[0186] 根据PCT公开号W0 2015/199952和W0 2017/004143 (其全部公开内容通过引用并入本文) 中描述的一般程序制备和测试脂质纳米颗粒。简而言之, 将阳离子脂质、DSPC、胆固醇和PEG-脂质以约50:10:38.5:1.5或约47.5:10:40.8:1.7的摩尔比溶解在乙醇中。以总脂质与mRNA的重量比为约10:1至30:1制备脂质纳米颗粒(LNP)。将mRNA在10至50mM柠檬酸盐或乙酸盐缓冲液(pH4)中稀释至0.2mg/mL。使用注射器泵将乙醇脂质溶液与mRNA水性溶液以约1:5至1:3(vol/vol)的比率混合, 其中总流速高于15mL/min。然后去除乙醇, 并通过透析用PBS代替外部缓冲液。最后, 通过0.2 $\mu$ m孔无菌过滤器过滤脂质纳米颗粒。脂质纳米颗粒粒径的直径为约55-95nm, 在一些情况下为约70-90nm, 如使用Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK) 通过准弹性光散射所测定的。

[0187] 根据机构动物护理委员会(ACC)和加拿大动物护理议会(CCAC)确立的指南, 在6-8周龄雌性C57BL/6小鼠(Charles River)或8-10周龄CD-1(Harlan)小鼠(Charles River)中进行了研究。通过尾静脉注射全身施用各种剂量的mRNA-脂质纳米颗粒, 并且在施用后的特定时间点(如4小时)使动物安乐死。将肝脏和脾脏收集在预先称重的管中, 测定重量, 立即在液氮中速冻并保存在-80 $^{\circ}$ C直至处理用于分析。

[0188] 对于肝脏, 切下约50mg用于在2mL FastPrep管(MP Biomedicals, Solon OH)中进行分析。向每个管中加入1/4"陶瓷球(MP Biomedicals), 并向肝脏组织中加入500 $\mu$ L平衡至室温的Glo裂解缓冲液(Glo Lysis Buffer)-GLB(Promega, Madison WI)。用FastPrep24仪器(MP Biomedicals)以2 $\times$ 6.0m/s将肝组织匀浆15秒。将匀浆在室温下孵育5分钟, 然后在GLB中以1:4稀释并使用SteadyGlo荧光素酶测定系统(Promega)进行评估。具体而言, 将50 $\mu$ L稀释的组织匀浆与50 $\mu$ L SteadyGlo底物反应, 振荡10秒, 随后5分钟孵育, 然后使用CentroXS<sup>3</sup>LB 960发光计(Berthold Technologies, Germany)进行定量。通过使用BCA蛋白测定试剂盒(Pierce, Rockford, IL)确定测定的蛋白质的量。然后将相对发光单位(RLU)归一化至经测定的总 $\mu$ g蛋白质。为了将RLU转换为ng荧光素酶, 用QuantiLum重组荧光素酶(Promega)生成标准曲线。

[0189] 来自Trilink Biotechnologies的FLuc mRNA(L-6107或L-7202)将表达最初从萤火虫北斗萤火虫(*photinus pyralis*)中分离出来的荧光素酶蛋白。FLuc通常用于哺乳动物细胞培养中以测量基因表达和细胞活力。在底物荧光素的存在下, 它会发出生物发光。完全取代该加帽和聚腺苷酸化的mRNA中的尿苷和/或胞苷核苷。

[0190] 实施例2

[0191] 测定配制的脂质的pK<sub>a</sub>

[0192] 如别处所述, 配制的阳离子脂质的pK<sub>a</sub>与LNP递送核酸的效力相关(参见Jayaraman等人, *Angewandte Chemie, International Edition* (2012), 51 (34), 8529-8533; Semple等人, *Nature Biotechnology* 28, 172-176 (2010))。pK<sub>a</sub>的优选范围是 $\sim$ 5至 $\sim$ 7。使用基于2-(对甲苯氨基)-6-萘磺酸(TNS)的荧光的测定, 在脂质纳米颗粒中确定每种阳离子脂质的pK<sub>a</sub>。使用如实施例1所述的在线方法(in-line process)制备浓度为0.4mM总脂质的在PBS

中包含阳离子脂质/DSPC/胆固醇/PEG-脂质(50/10/38.5/1.5mol%)的脂质纳米颗粒。将TNS制备成100 $\mu$ M于蒸馏水中的储备液。在含10mM HEPES、10mM MES、10mM乙酸铵和130mM NaCl的2mL缓冲溶液中将囊泡稀释至24 $\mu$ M脂质,其中pH范围为2.5至11。将TNS溶液的等分试样加入以得到1 $\mu$ M的最终浓度,并且在涡旋混合后,在室温下使用321nm和445nm的激发和发射波长在SLM Aminco Series 2Luminescence分光光度计中测量荧光强度。将S形最佳拟合分析应用于荧光数据,并将pK<sub>a</sub>测量为产生最大荧光强度一半的pH。

[0193] 实施例3

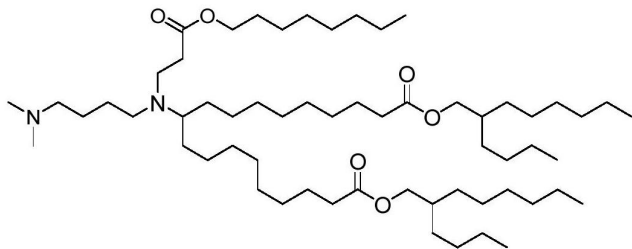
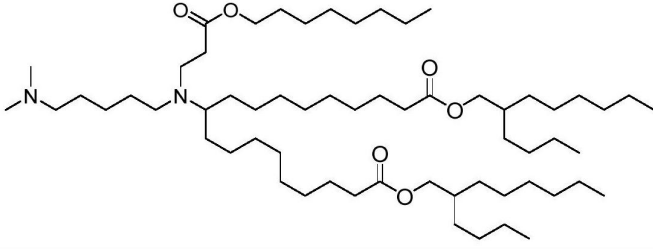
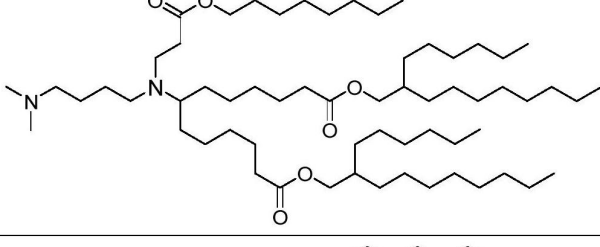
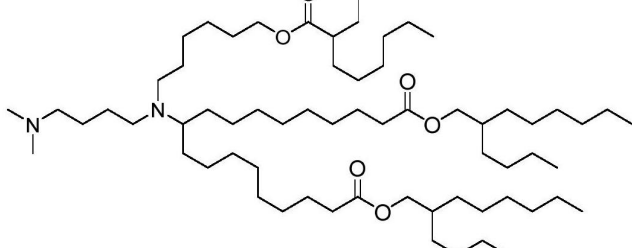
[0194] 使用体内荧光素酶mRNA表达啮齿动物模型测定含有各种阳离子脂质的脂质纳米粒制剂的功效

[0195] 使用以下摩尔比配制表2中所示的本公开内容的代表性化合物:50%阳离子脂质/10%二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)/38.5%胆固醇/1.5%PEG脂质2-[2-( $\omega$ )-甲氧基(聚乙二醇<sub>2000</sub>)乙氧基]-N,N-双十四烷基乙酰胺)或47.5%阳离子脂质/10% DSPC/40.7%胆固醇/1.8% PEG脂质。如实施例1所述,经由尾静脉注射施用后4小时通过测量肝脏中的荧光素酶的表达来测定相对活性。活性在1.0或0.5mg mRNA/kg的剂量下进行比较,并以施用后4小时测量的ng荧光素酶/g肝脏表示,如实施例1所述。表2中的化合物编号参照表1中的化合物编号。

[0196] 表2:新型阳离子脂质及其相关活性

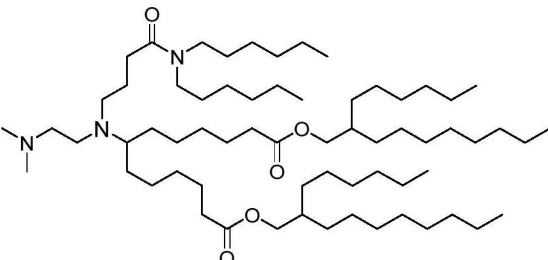
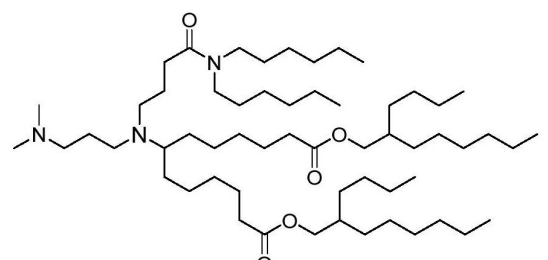
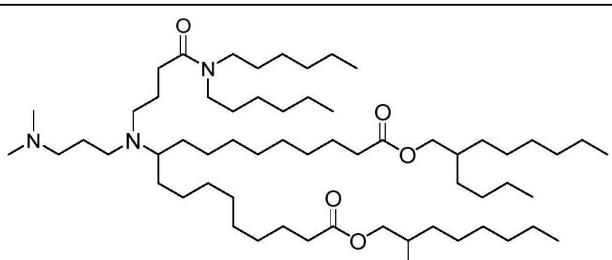
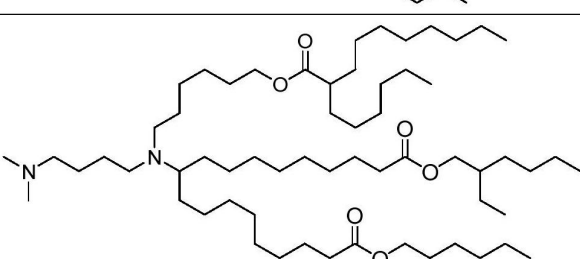
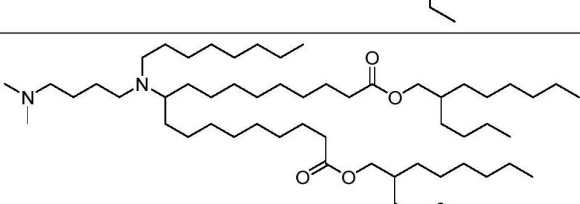


[0197]

化合物编号	pKa	在 1.0 mg/kg 下肝脏的 Luc (ng luc /g 肝 脏)	结构
I-1	6.11	24031 ± 4777	
I-2	6.67	122 ± 18* *在 0.3 mg/kg 下测定 682 ± 147** **在 1.0 mg/kg 下测定	
I-4	6.17	46932 ± 17399	
I-5	6.08	11720 ± 2439	

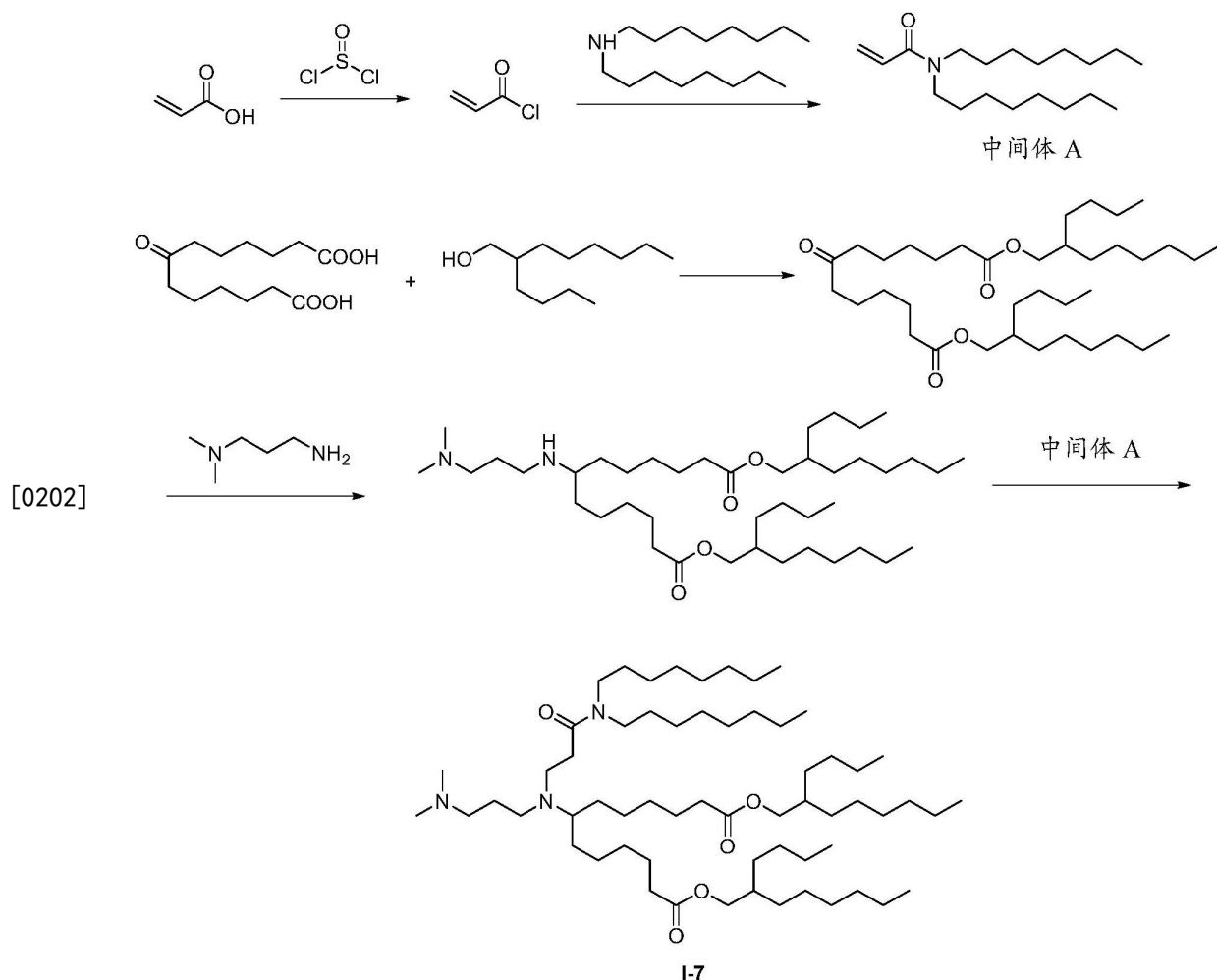
[0198]

化合物编号	pKa	在 1.0 mg/kg 下肝脏的 Luc (ng luc /g 肝 脏)	结构
I-6	6.22	4093 ± 1036* *在 0.3 mg/kg 下测定 11290 ± 6455** **在 1.0 mg/kg 下测定	
I-14	6.80	669 ± 575 * *在 0.5 mg/kg 下测定	
I-15	5.96	21357 ± 15325	
I-16	6.25	66763 ± 15823	
I-17	6.78	26691 ± 13186	
I-18	6.02	40650 ± 11479	

化合物编号	pKa	在 1.0 mg/kg 下肝脏的 Luc (ng luc /g 肝 脏)	结构
I-19	5.95	32706 ± 4621	
I-20	6.48	4140 ± 1117* *在 0.3 mg/kg 下测定 17095 ± 8181** **在 1.0 mg/kg 下测定	
I-21	6.40	7723 ± 1714* *在 0.3 mg/kg 下测定 20223 ± 5982** **在 1.0 mg/kg 下测定	
I-22	6.28	5291 ± 1348* *在 0.3 mg/kg 下测定 17654 ± 8167** **在 1.0 mg/kg 下测定	
I-23	6.33	553 ± 153 * *在 0.5 mg/kg 下测定	

[0200] 实施例4

[0201] 双(2-丁基辛基)7-((3-(二甲基氨基)丙基)(3-(二辛基氨基)-3-氧代丙基)氨基)十三烷二酸酯(化合物I-7)的合成



#### [0203] 丙烯酰氯的合成

[0204] 将丙烯酸(1.20g, 16.65mmol)溶于20mL无水二氯甲烷中。在 $\text{N}_2$ 下搅拌时,滴加亚硫酸酰氯(1.98g, 16.65mmol),将反应混合物加热回流4小时。反应完成后,粗产物浓缩成淡黄色液体,无需进一步纯化即可用于下一步。

#### [0205] N,N'-二辛基丙烯酰胺(中间体A)的合成

[0206] 将丙烯酰氯(1.12g, 12.37mmol)加入二辛胺的二氯甲烷冷却溶液( $0^\circ\text{C}$ )中,其中三乙胺(1当量)作为碱。将反应混合物在 $0^\circ\text{C}$ 下搅拌1小时,在室温下再搅拌1小时。将反应混合物过滤,得到的溶液用盐酸(1N HCl)洗涤,然后用饱和 $\text{NaHCO}_3$ 溶液和盐水洗涤。溶剂在减压下蒸发,生成粗产物(无色液体),无需进一步纯化即可用于下一步。

#### [0207] 双(2-丁基辛基)7-氧代十三烷二酸酯的合成

[0208] 向2-丁辛烷-1-醇(3.85g, 20.66mmol)、7-氧代十三烷二酸(1.34g, 5.17mmol)和4-二甲基氨基吡啶(DMAP)(1.9g, 15.55mmol)的无水DCM溶液中加入DCC(4.27g, 20.69mmol)。将得到的混合物在室温下搅拌过夜。然后将固体(DCU)过滤并用DCM洗涤。浓缩滤液。用硅胶柱色谱法(0-5%乙酸乙酯/己烷)对残余物(油/固体)进行纯化。获得呈无色油状物的所需产物(2.55g, 42.86mmol, 83%)。

#### [0209] 双(2-丁基辛基)7-((3-(二甲基氨基)丙基)氨基)十三烷二酸酯的合成

[0210] 用三乙酰氧基硼氢化钠(0.20g, 0.94mmol)和AcOH(55 $\mu\text{L}$ , 0.98mmol)处理3-(二甲基氨基)-1-丙胺(0.09g, 0.88mmol)和双(2-丁基辛基)7-氧代十三烷二酸酯(0.37g,

0.63mmol)的DCE溶液过夜。溶液用稀氢氧化钠溶液(1N NaOH)洗涤。有机相用盐水洗涤,用无水硫酸钠干燥,过滤并除去溶剂。使残余物通过小硅胶垫,用DCM/MeOH/Et<sub>3</sub>N(85:15:1)的混合物洗涤。将滤液浓缩以获得呈微黄色油状物的所需产物(240mg, 0.35mmol, 56%)。

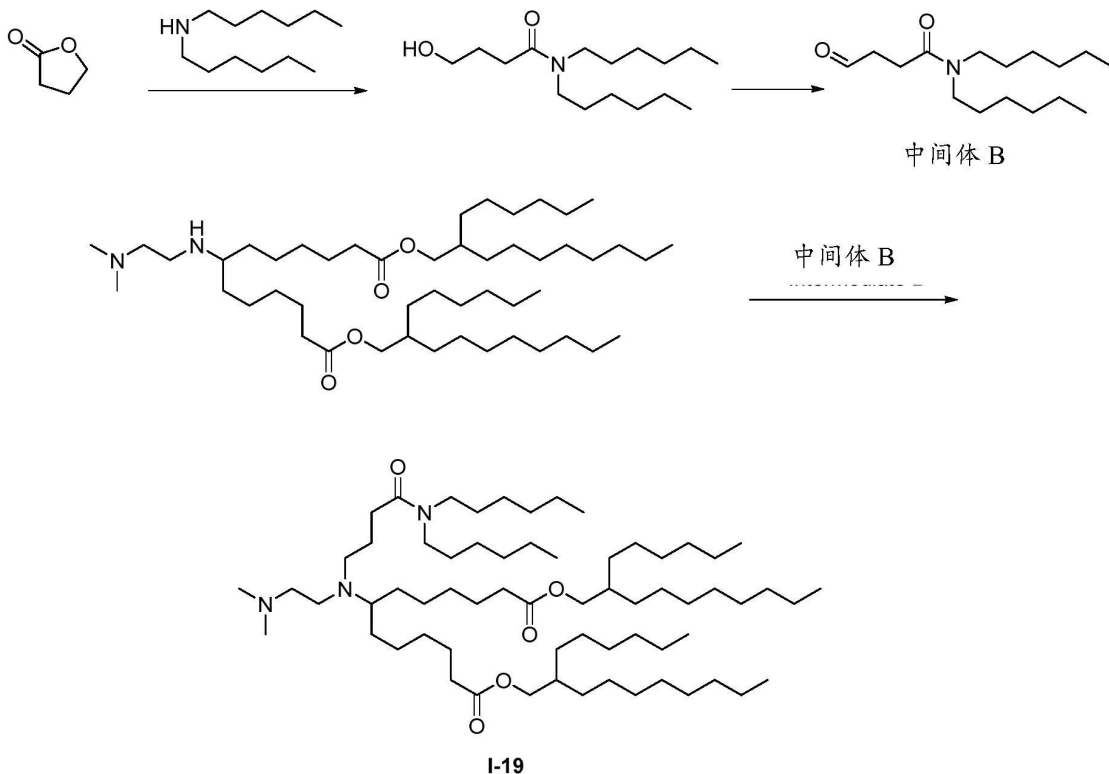
## [0211] I-7的合成

[0212] 将双(2-丁基辛基)7-((3-(二甲基氨基)丙基)氨基)十三烷二酸酯(210mg, 0.30mmol)和N,N-二辛基丙烯酰胺(1.5当量, 136mg, 0.46mmol)的EtOH溶液(10mL)在室温下搅拌过夜。将反应混合物加热回流7天。反应完成后, 除去溶剂。将残余物溶解在己烷和EtOAc(19:1)的混合物中, 并用饱和碳酸氢钠溶液和盐水洗涤。提取液经硫酸钠干燥。干燥的提取物通过硅胶垫过滤。用己烷/乙酸乙酯/三乙胺(80:20:1)的混合物洗涤该垫。浓缩洗涤液以得到所需的粗产品。

[0213] 将粗产物用硅胶快速干柱色谱法进一步纯化(0-5% MeOH/氯仿)。获得呈无色油状物的所需产物(30mg, 0.03mmol, 10%)。<sup>1</sup>HNMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 3.96(d, 5.8Hz, 4H), 3.30-3.16(m, 4H), 2.74(t, 7.2Hz, 2H), 2.65-2.24(m, 17H), 1.80-1.44(m, 12H), 1.43-1.15(64H), 0.93-0.82(m, 18H)。

## [0214] 实施例5

[0215] 双(2-己基癸基)7-((4-(二己基氨基)-4-氧代丁基)(2-(二甲基氨基)乙基)氨基)十三烷二酸酯(化合物I-19)的合成



[0217] N,N-二己基-4-氧代丁酰胺(中间体B)的合成

[0218] 将丁内酯(2.51g, 29.15mmol)和二己胺(5.40g, 29.13mmol)在61℃的压力瓶中加热4天。将反应混合物冷却至室温。粗产物通过硅胶柱色谱法纯化(0%-5% MeOH/DCM),得到呈微黄色油状物的N,N-二己基-4-羟基丁酰胺(6.30g, 79%)。

[0219] 将N,N-二己基-4-羟基丁酰胺(3.00g, 11.05mmol)溶解在DCM中, 用氯铬酸吡啶鎓

(2.38g, 11.05mmol) 处理2小时。加入乙醚,通过硅胶床过滤上清液。从滤液中除去溶剂,并且将所得的油溶解在己烷中。通过硅胶床过滤悬浮液并除去溶剂。粗产物(无色液体)无需进一步纯化即可用于下一步。

[0220] I-19的合成

[0221] 将N,N-二己基-4-氧代丁酰胺(0.56g, 1.97mmol)和双(2-己基癸基)7-((2-(二甲基氨基)乙基)氨基)十三烷二酸酯(0.44g, 0.56mmol, 根据实施例4的步骤制备)的1,2-二氯乙烷溶液(10mL)搅拌15分钟,然后将三乙酰氧基硼氢化钠(0.41g, 1.97mmol)一次性加入,在室温下再搅拌16小时。将混合物浓缩。将残余物用己烷和乙酸乙酯(96:4)的混合物提取,并用饱和NaHCO<sub>3</sub>水溶液和盐水洗涤。分离有机层,用无水硫酸钠干燥,在减压下过滤和蒸发,得到无色油。将粗产品通过硅胶快速柱色谱法(0-5% MeOH/氯仿)纯化,得到呈无色油状物的所需产物(260mg, 0.25mmol, 45%)。<sup>1</sup>HNMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 3.96 (d, 5.8Hz, 4H), 3.28 (类三重峰, 7.7Hz, 2H), 3.20 (类三重峰, 7.7Hz, 2H), 2.56-2.47 (m, 2H), 2.44 (t, 6.8Hz, 2H), 2.39-2.20 (m, 15H), 1.74-1.45 (m, 12H), 1.42-1.15 (72H), 0.93-0.84 (m, 18H)。

[0222] 实施例6

[0223] 双(2-丁基辛基)10-((4-(二己基氨基)-4-氧代丁基)(3-(二甲基氨基)丙基)氨基)十九烷二酸酯(化合物I-21)的合成

[0224] 根据实施例5的一般步骤制备化合物I-21,得到0.05g无色油, 0.03mmol, 32%。<sup>1</sup>HNMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 3.97 (d, 5.8Hz, 4H), 3.28 (类三重峰, 7.6Hz, 2H), 3.20 (类三重峰, 7.6Hz, 2H), 2.43-2.23 (m, 13H), 2.20 (s, 6H), 1.75-1.45 (m, 14H), 1.40-1.12 (m, 68H), 0.93-0.84 (m, 18H)。

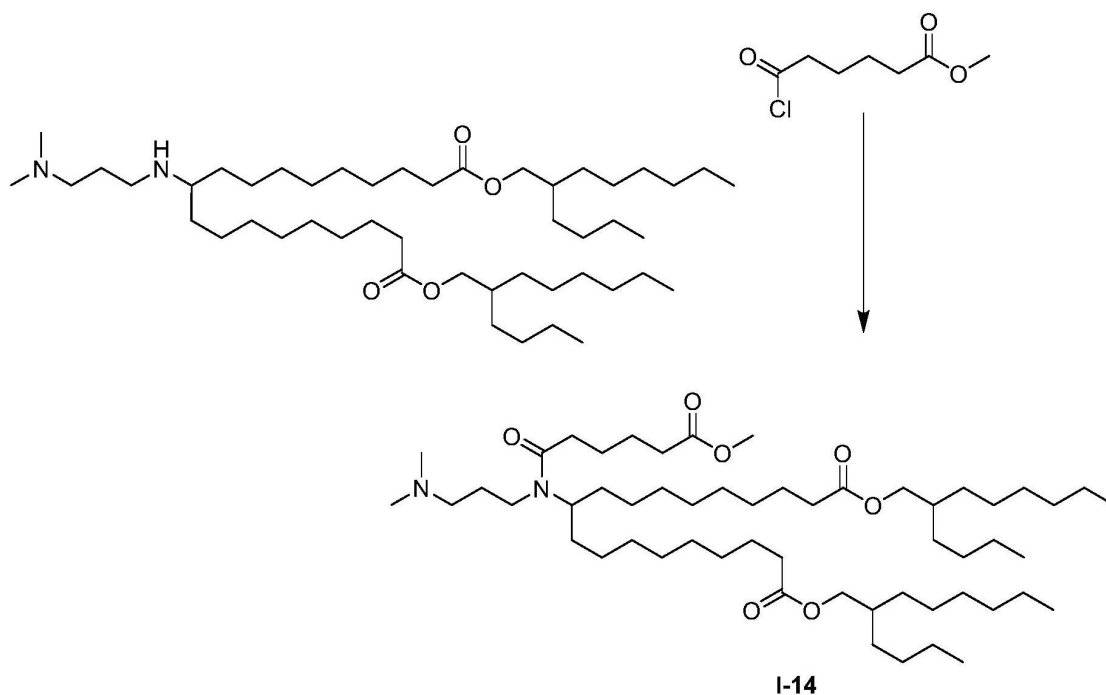
[0225] 实施例7

[0226] 双(2-丁基辛基)7-((4-(二己基氨基)-4-氧代丁基)(3-(二甲基氨基)丙基)氨基)十三烷二酸酯(化合物I-20)的合成

[0227] 根据实施例5的一般步骤制备化合物I-20,得到0.06g的无色油状物, 0.06mmol, 41%。<sup>1</sup>HNMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 3.96 (d, 5.8Hz, 4H), 3.27 (类三重峰, 7.6Hz, 2H), 3.19 (类三重峰, 7.6Hz, 2H), 2.62-2.17 (m, 19H), 1.79-1.43 (m, 14H), 1.42-1.10 (m, 56H), 0.95-0.81 (m, 18H)。

[0228] 实施例8

[0229] 双(2-丁基辛基)10-(N-(3-(二甲基氨基)丙基)-6-甲氧基-6-氧代己基酰胺)十九烷二酸酯(化合物I-14)的合成



[0231] 在室温下,历时5分钟将己二酰氯(0.12g,0.68mmol)的无水苯(5ml)经由注射器加入到双(2-丁基辛基)10-((3-(二甲基氨基)丙基)氨基)十九烷二酸酯(0.26g,0.34mmol,根据实施例4制备)、三乙胺(0.3mL,2.5mmol)和DMAP(5mg)的苯(10mL)溶液中。使混合物搅拌2h,然后加入甲醇(0.5mL)来除去过量的酰氯。将得到的混合物再搅拌一小时,然后通过硅胶垫过滤,用己烷/EtOAc/Et<sub>3</sub>N(70:30:1)的混合物洗涤并浓缩。残余物通过硅胶柱(0-4% MeOH/DCM梯度),得到呈无色油状物的化合物I-14(0.28g,0.30mmol,89%)。<sup>1</sup>HNMR(400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ:4.52-4.29(br.,估计的0.3H,由于关于酰胺键的缓慢异构化),3.96(d,5.8Hz,4H),3.65(s,3H),3.59(类五重峰,7.0Hz,0.7H),3.14-3.05(m,2H),2.37-2.24(m,10H),2.23-2.18(m,6H),1.73-1.54(m,12H),1.48-1.37(m,4H),1.34-1.14(m,52H),0.93-0.83(m,12H)。

#### [0232] 实施例9

[0233] 双(2-丁基辛基)10-(N-(2-(二甲基氨基)乙基)-6-甲氧基-6-氧代己基酰胺)十九烷二酸酯(化合物I-15)的合成

[0234] 根据实施例8的一般步骤制备化合物I-15,得到0.18g的无色油状物,0.20mmol,85%。<sup>1</sup>HNMR(400MHz,CDCl<sub>3</sub>) δ:4.53-4.30(br.,0.3H,由于关于酰胺键的缓慢异构化),3.96(d,5.8Hz,4H),3.65(s,3H),3.58(类五重峰,7Hz,0.7H),3.27-3.15(m,2H),2.46-2.22(m,16H),1.75-1.54(m,10H),1.50-1.36(m,4H),1.35-1.09(m,52H),0.94-0.82(m,12H)。

#### [0235] 实施例10

[0236] 双(2-己基癸基)7-(N-(2-(二甲基氨基)乙基)-6-甲氧基-6-氧代己基酰胺)十三烷二酸酯(化合物I-16)的合成

[0237] 根据实施例8的一般步骤制备化合物I-16,得到0.27g的无色油状物,0.29mmol,81%。<sup>1</sup>HNMR(400MHz,CDCl<sub>3</sub>) δ:4.53-4.30(br.,0.3H,由于关于酰胺键的缓慢异构化),3.99-3.92(m,4H),3.66(s,3H),3.59(类五重峰,7.0Hz,0.7H),3.28-3.14(m,2H),2.46-2.20(m,16H),1.75-1.53(m,10H),1.51-1.36(m,4H),1.35-1.09(m,56H),0.94-0.81(m,12H)。

## [0238] 实施例11

[0239] 双(2-己基癸基)7-(N-(3-(二甲基氨基)丙基)-8-甲氧基-8-氧代辛基酰胺)十三烷二酸酯(化合物I-17)的合成

[0240] 根据实施例8的一般步骤制备化合物I-17,得到0.08g的无色油状物,0.08mmol, 75%。<sup>1</sup>HNMR(400MHz,CDCl<sub>3</sub>) δ:4.53-4.30(br.,0.3H,由于关于酰胺键的缓慢异构化),3.99-3.91(m,4H),3.66(s,3H),3.61(类五重峰,7.0Hz,0.7H),3.15-3.06(m,2H),2.34-2.23(m,10H),2.22(s,6H),1.75-1.53(m,10H),1.51-1.38(m,4H),1.37-1.15(m,62H),0.93-0.82(m,12H)。

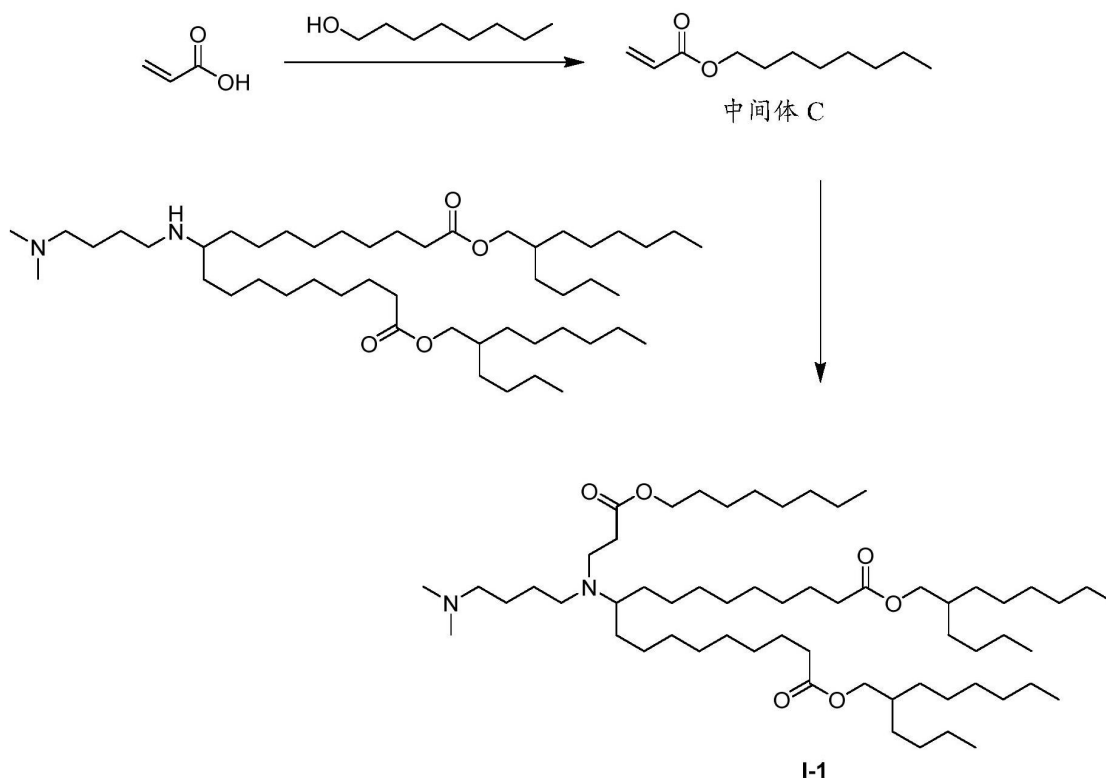
## [0241] 实施例12

[0242] 双(2-己基癸基)7-(N-(2-(二甲基氨基)乙基)-8-甲氧基-8-氧代辛基酰胺)十三烷二酸酯(化合物I-18)的合成

[0243] 根据实施例8的一般步骤制备化合物I-18,得到0.15g的无色油状物,0.16mmol, 79%。<sup>1</sup>HNMR(400MHz,CDCl<sub>3</sub>) δ:4.53-4.30(br.,0.3H,由于关于酰胺键的缓慢异构化),3.99-3.92(m,4H),3.66(s,3H),3.61(类五重峰,7.0Hz,0.7H),3.26-3.14(m,2H),2.47-2.35(m,2H),2.34-2.20(m,14H),1.73-1.53(m,8H),1.51-1.39(m,4H),1.38-1.14(m,62H),0.93-0.82(m,12H)。

## [0244] 实施例13

[0245] 双(2-丁基辛基)10-(N-(3-(二甲基氨基)丙基)-6-甲氧基-6-氧代己基酰胺)十九烷二酸酯(化合物I-1)的合成



[0246]

## [0247] 中间体C的合成

[0248] 将DCC(1.4当量,10.5mmol,2.16g)加入丙烯酸(1.1当量,8.25mmol,594mg)、正辛醇(1当量,975mg,7.5mmol)和DMAP(0.4当量,3mmol,366mg)的DCM溶液(15mL)中。所得混合



物室温下搅拌16小时。将反应混合物过滤，浓缩滤液。残余物在己烷(50ml)中提取，并装在硅胶柱上。用己烷(40ml)洗涤柱。将馏分合并，重新装载到柱上，并用己烷和乙酸乙酯的混合物(约99:1或98:2, 200mL)洗脱。得到无色油状物(986mg, 71%)。

[0249] 化合物I-1的合成

[0250] 在密封的压力瓶中，在氩气中，将双(2-丁基辛基)10-((4-(二甲基氨基)丁基)氨基)十九烷二酸酯(1当量, 220mg, 0.28mmol, 根据上述一般步骤制备)的乙醇溶液(10mL)和中间C(2.75当量, 0.77mmol, 140mg)在室温下搅拌4天。浓缩反应混合物。残余物通过硅胶快速干柱色谱法(正己烷-EtOAc-Et<sub>3</sub>N, 95:5:0至80:20:1, 含0-5% MeOH的氯仿)纯化两次。获得呈无色油状物的所需产物(68mg, 0.07mmol, 25%)。<sup>1</sup>HNMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 4.03 (t, 6.9Hz, 2H), 3.97 (d, 5.8Hz, 4H), 2.69 (t, 7.2Hz, 2H), 2.38-2.33 (m, 4H), 2.33-2.26 (m, 1H), 2.29 (t, 7.5Hz, 4H), 2.26-2.22 (m, 2H), 2.21 (s, 6H), 1.61 (类五重峰, 7.0Hz, 8H), 1.48-1.08 (70H), 0.92-0.86 (m, 15H)。

[0251] 实施例14

[0252] 双(2-丁基辛基)10-((5-(二甲基氨基)戊基)(3-(辛氧基)-3-氧代丙基)氨基)十九烷二酸酯(化合物I-2)的合成

[0253] 根据实施例13的一般步骤制备化合物I-2, 得到0.05g的无色油状物, 0.05mmol, 10%。<sup>1</sup>HNMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 4.03 (t, 6.8Hz, 2H), 3.96 (d, 5.8Hz, 4H), 2.69 (t, 7.2Hz, 2H), 2.38-2.21 (m, 17H), 1.61 (类五重峰, 7.0Hz, 8H), 1.51-1.10 (m, 72H), 0.93-0.84 (m, 15H)。

[0254] 实施例15

[0255] 双(2-丁基辛基)7-((4-(二甲基氨基)丁基)(3-(辛氧基)-3-氧代丙基)氨基)十三烷二酸酯(化合物I-3)的合成

[0256] 根据实施例13的一般步骤制备化合物I-3, 得到0.01g的无色油状物, 0.01mmol, 11%。<sup>1</sup>HNMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 4.03 (t, 6.9Hz, 2H), 3.96 (d, 5.6Hz, 4H), 2.69 (t, 7.1Hz, 2H), 2.38-2.20 (m, 17H), 1.69-1.56 (m, 10H), 1.48-1.09 (m, 56H), 0.92-0.84 (m, 15H)。

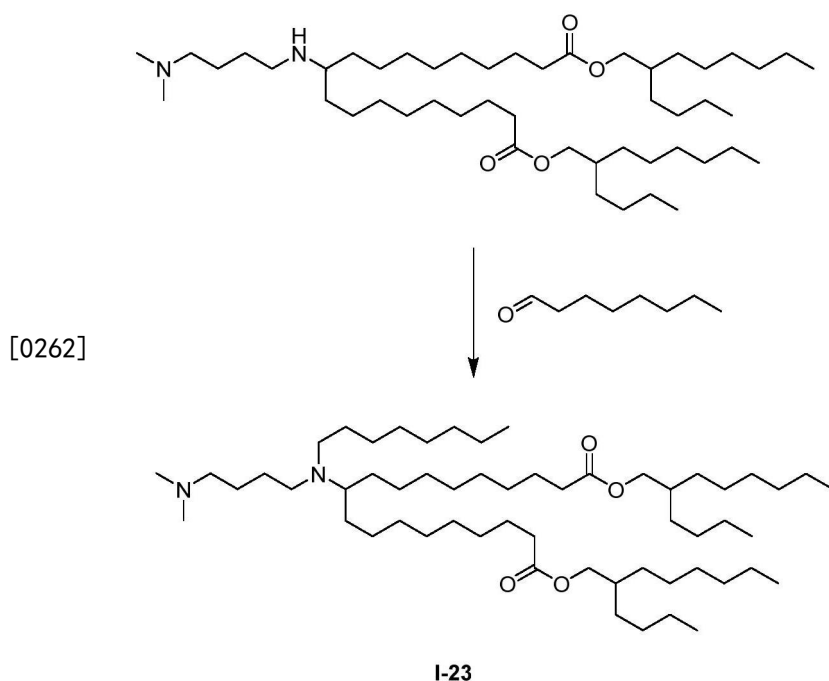
[0257] 实施例16

[0258] 双(2-己基癸基)7-((4-(二甲基氨基)丁基)(3-(辛氧基)-3-氧代丙基)氨基)十三烷二酸酯(化合物I-4)的合成

[0259] 根据实施例13的一般步骤制备化合物I-4, 得到0.05g的无色油状物, 0.05mmol, 13%。<sup>1</sup>HNMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 4.03 (t, 6.8Hz, 2H), 3.96 (d, 5.8Hz, 4H), 2.69 (t, 7.1Hz, 2H), 2.39-2.21 (m, 17H), 1.66-1.09 (m, 82H), 0.88 (t, 7.0Hz, 15H)。

[0260] 实施例17

[0261] 双(2-丁基辛基)10-((4-(二甲基氨基)丁基)(辛基)氨基)十九烷二酸酯(化合物I-23)的合成



[0263] 化合物I-23的合成

[0264] 将辛酸(3.5当量,0.90mmol,115mg,0.141mL)和双(2-丁基辛基)10-((4-(二甲基氨基)丁基)氨基)十九烷二酸酯(200mg,0.26mmol,根据上述一般步骤制备)的1,2-二氯乙烷溶液(5mL)搅拌15分钟,之后将三乙酰氧基硼氢化钠(3.5当量,0.9mmol,190mg)一次性加入。在室温下继续搅拌16小时。浓缩反应混合物。将残余物通过硅胶快速干柱色谱法(正己烷-EtOAc-Et<sub>3</sub>N,95:5:0至80:20:1,含0-5%的MeOH的氯仿)纯化两次。获得呈无色油状物的所需产物(203mg,0.23mmol,88%)。<sup>1</sup>HNMR(400MHz,CDCl<sub>3</sub>) $\delta$ :3.97(d,5.8Hz,4H),2.40-2.18(m,17H),1.69-1.56(m,6H),1.52-1.10(m,72H),0.92-0.86(m,15H)。

[0265] 实施例18

[0266] 双(2-乙基己基)10-((4-(二甲基氨基)丁基)(6-((2-己基癸酰基)氧基)己基)氨基)十九烷二酸酯(化合物I-22)的合成

[0267] 根据实施例17的一般步骤制备化合物I-22,得到0.19g的无色油状物,0.19mmol,80%。<sup>1</sup>HNMR(400MHz,CDCl<sub>3</sub>) $\delta$ :4.06(t,6.7Hz,2H),3.97(d,5.6Hz,4H),2.39-2.26(m,11H),2.23(s,6H),1.68-1.10(m,83H),0.94-0.82(m,18H)。

[0268] 实施例19

[0269] 双(2-丁基辛基)10-((4-(二甲基氨基)丁基)(6-((2-己基癸酰基)氧基)己基)氨基)十九烷二酸酯(化合物I-5)的合成

[0270] 根据实施例17的一般步骤制备化合物I-5,得到0.04g的无色油状物,0.04mmol,73%。<sup>1</sup>HNMR(400MHz,CDCl<sub>3</sub>) $\delta$ :4.05(t,7.0Hz,2H),3.96(d,5.8Hz,4H),2.38-2.26(m,11H),2.23(s,6H),1.71-1.09(m,99H),0.95-0.82(m,18H)。

[0271] 可以将上述各种实施方案组合以提供另外的实施方案。本说明书中引用的所有美国专利、美国专利申请公开、美国专利申请、外国专利、外国专利申请和非专利公开包括但不限于2020年7月16日提交的第63/052,815号美国临时专利申请,以及2021年5月14日提交的第63/188,996号美国临时专利申请,通过引用以其整体并入本文。如果必需采用各种专

利、申请和公开的概念,则可以修改实施方案的方面以提供另外的实施方案。可以根据以上详细描述对实施方案进行这些和其他改变。通常,在所附权利要求书中,所使用的术语不应解释为将权利要求限制为本说明书和权利要求书中公开的具体实施方案,而应解释为包括所有可能的实施方案以及此类权利要求所赋予的等同物的全部范围。因此,权利要求不受本公开内容的限制。