



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 118922401 A

(43) 申请公布日 2024. 11. 08

(21) 申请号 202380026325.4

(22) 申请日 2023.01.31

(30) 优先权数据

63/305,181 2022.01.31 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.09.09

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2023/050811 2023.01.31

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/144798 EN 2023.08.03

(71) 申请人 盖纳万科学有限公司

地址 瑞士

(72) 发明人 理查德·J·霍兰德 林莽梦

戴纳·路易 詹姆斯·海斯

艾伦·马丁 马克·伍德 张文煊

(74) 专利代理机构 北京品源专利代理有限公司

11332

专利代理师 刘明海 胡彬

(51) Int.Cl.

C07C 233/36 (2006.01)

C07C 237/12 (2006.01)

C07C 243/28 (2006.01)

C07C 251/76 (2006.01)

C07C 251/78 (2006.01)

C07C 259/14 (2006.01)

C07C 271/22 (2006.01)

C07C 311/06 (2006.01)

C07D 295/15 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

A61K 47/00 (2006.01)

权利要求书42页 说明书198页

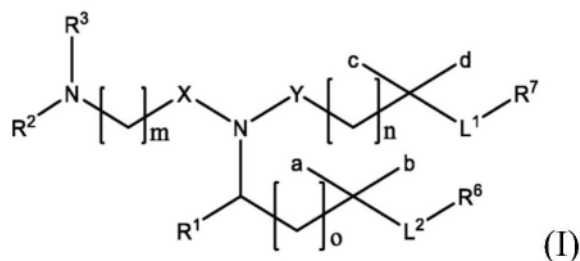
(54) 发明名称

用于脂质纳米颗粒的可电离阳离子脂质

(57) 摘要

本发明的某些实施方案提供了具有优化的清除特性的可电离脂质。本发明的某些实施方案还提供了核酸-脂质颗粒,所述核酸-脂质颗粒包含可电离脂质,制备所述脂质颗粒的方法,以及递送和/或施用所述脂质颗粒的方法。

1. 一种式 (I) 化合物:



或其盐, 其中:

X 是 $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{O}(\text{C}=\text{O})-$ 或 $-\text{C}(=\text{O})-$

Y 不存在、是 $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{SO}_2-$ 或 $-\text{C}(=\text{O})-$;

R^1 是 C_2 - C_{25} 烷基;

R^2 是 C_1 - C_3 烷基; 并且 R^3 是 C_1 - C_3 烷基; 或者 R^2 和 R^3 与它们所连接的氮一起形成氮杂环丙烷子基、氮杂环丁烷子基或吡咯烷子基环;

m 是 0、1、2、3、4、5 或 6;

n 是 0-15;

o 是 0-15;

L^1 不存在、是 $-(\text{C}=\text{O})-\text{O}-$ 、 $-(\text{C}=\text{O})\text{N}(\text{H})\text{N}(\text{R}^4)-$ 、 $-(\text{C}=\text{O})\text{N}(\text{H})-\text{N}=\text{C}(\text{R}^4)-$ 、 $-(\text{C}=\text{O})\text{N}(\text{H})\text{N}(\text{H})\text{C}(\text{R}^4)(\text{R}^5)-$ 、 $-(\text{C}=\text{O})-\text{O}-\text{CH}_2-\text{R}^z$ 或 $-\text{O}(\text{C}=\text{O})-\text{R}^w-$;

L^2 不存在、是 $-(\text{C}=\text{O})-\text{O}-$ 、 $-(\text{C}=\text{O})\text{N}(\text{H})\text{N}(\text{R}^4)-$ 、 $-(\text{C}=\text{O})\text{N}(\text{H})-\text{N}=\text{C}(\text{R}^4)-$ 、 $-(\text{C}=\text{O})\text{N}(\text{H})\text{N}(\text{H})\text{C}(\text{R}^4)(\text{R}^5)-$ 、 $-(\text{C}=\text{O})-\text{O}-\text{CH}_2-\text{R}^z$ 或 $-\text{O}(\text{C}=\text{O})-\text{R}^x-$

a 是 H 或 F;

b 是 H 或 F;

c 是 H 或 F; 并且 d 是 H 或 F; 或者 c 和 d 与它们所连接的碳一起形成 $-\text{C}(=\text{O})-$;

R^4 是 H 或 C_2 - C_{25} 烷基;

R^5 是 H 或 C_2 - C_{25} 烷基;

$\text{R}^{4'}$ 是 H 或 C_2 - C_{25} 烷基;

$\text{R}^{5'}$ 是 H 或 C_2 - C_{25} 烷基;

R^6 是 C_2 - C_{25} 烷基;

R^7 是 C_2 - C_{25} 烷基;

R^w 不存在、是 $-\text{C}(\text{F})\text{H}-$ 或 $-\text{C}(\text{F})_2-$;

R^x 不存在、是 $-\text{C}(\text{F})\text{H}-$ 或 $-\text{C}(\text{F})_2-$;

R^z 是被 1、2 或 3 个独立地选自 C_2 - C_{10} 烷基的基团取代的苯基; 并且

$\text{R}^{z'}$ 是被 1、2 或 3 个独立地选自 C_2 - C_{10} 烷基的基团取代的苯基。

2. 如权利要求 1 所述的化合物或盐, 其中 X 是 $-\text{CH}_2-$ 。

3. 如权利要求 1 所述的化合物或盐, 其中 X 是 $-\text{C}(=\text{O})-$ 。

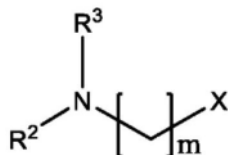
4. 如权利要求 1 所述的化合物或盐, 其中 X 是 $-\text{O}-$ 。

5. 如权利要求 1-4 中任一项所述的化合物或盐, 其中 R^2 是甲基。

6. 如权利要求 1-4 中任一项所述的化合物或盐, 其中 R^2 是乙基。

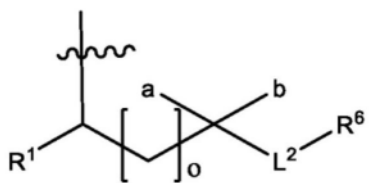
7. 如权利要求 1-4 中任一项所述的化合物或盐, 其中 R^2 是丙基。

8. 如权利要求1-7中任一项所述的化合物或盐,其中 R^3 是甲基。
9. 如权利要求1-7中任一项所述的化合物或盐,其中 R^3 是乙基。
10. 如权利要求1-7中任一项所述的化合物或盐,其中 R^3 是丙基。
11. 如权利要求1-10中任一项所述的化合物或盐,其中 m 是1。
12. 如权利要求1-10中任一项所述的化合物或盐,其中 m 是2。
13. 如权利要求1-10中任一项所述的化合物或盐,其中 m 是3。
14. 如权利要求1所述的化合物,其中:

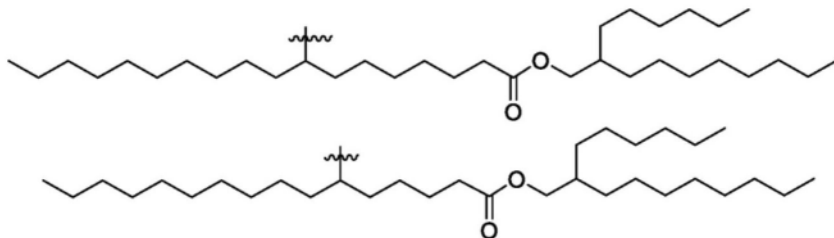


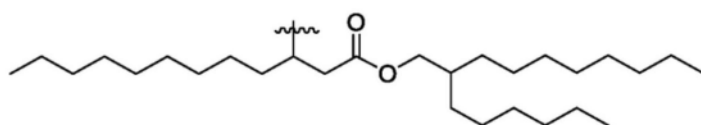
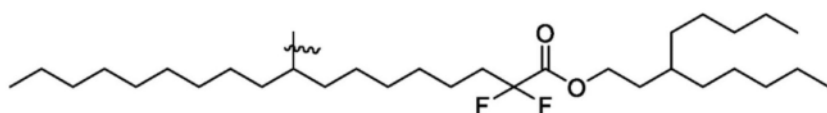
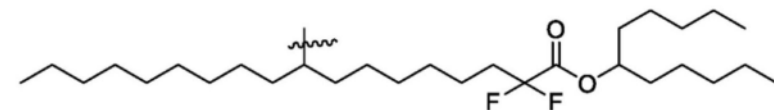
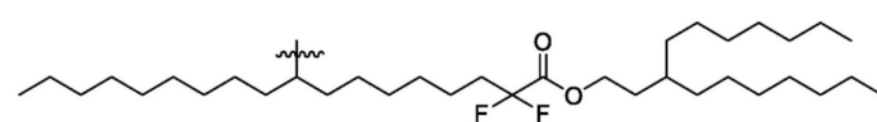
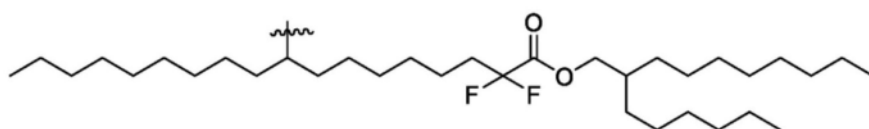
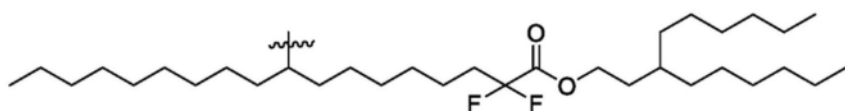
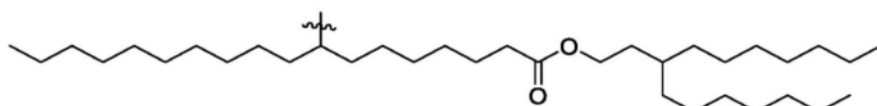
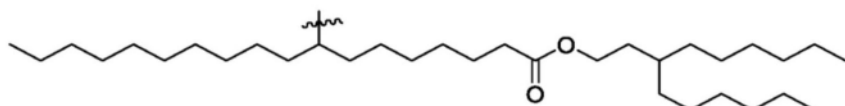
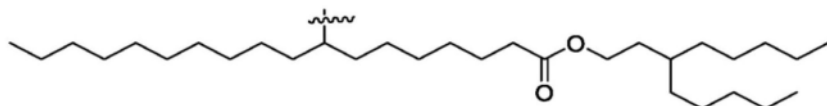
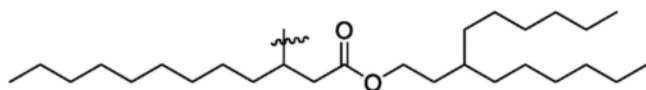
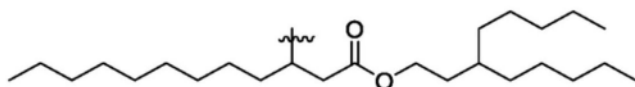
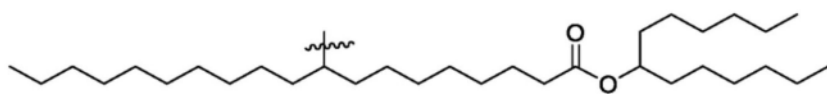
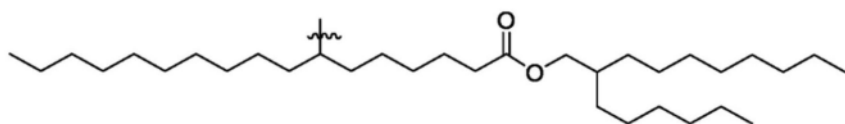
选自自由以下组成的组: $(CH_3)_2NCH_2CH_2C(=O)-$ 、 $(CH_3)_2NCH_2CH_2CH_2C(=O)-$ 、 $(CH_3)_2NCH_2CH_2CH_2CH_2C(=O)-$ 、 $(CH_3)_2NCH_2CH_2-$ 、 $(CH_3)_2NCH_2CH_2CH-$ 、5-吡咯烷-1-基戊酰基和 $(CH_3)_2NCH_2CH_2CH_2O-$ 。

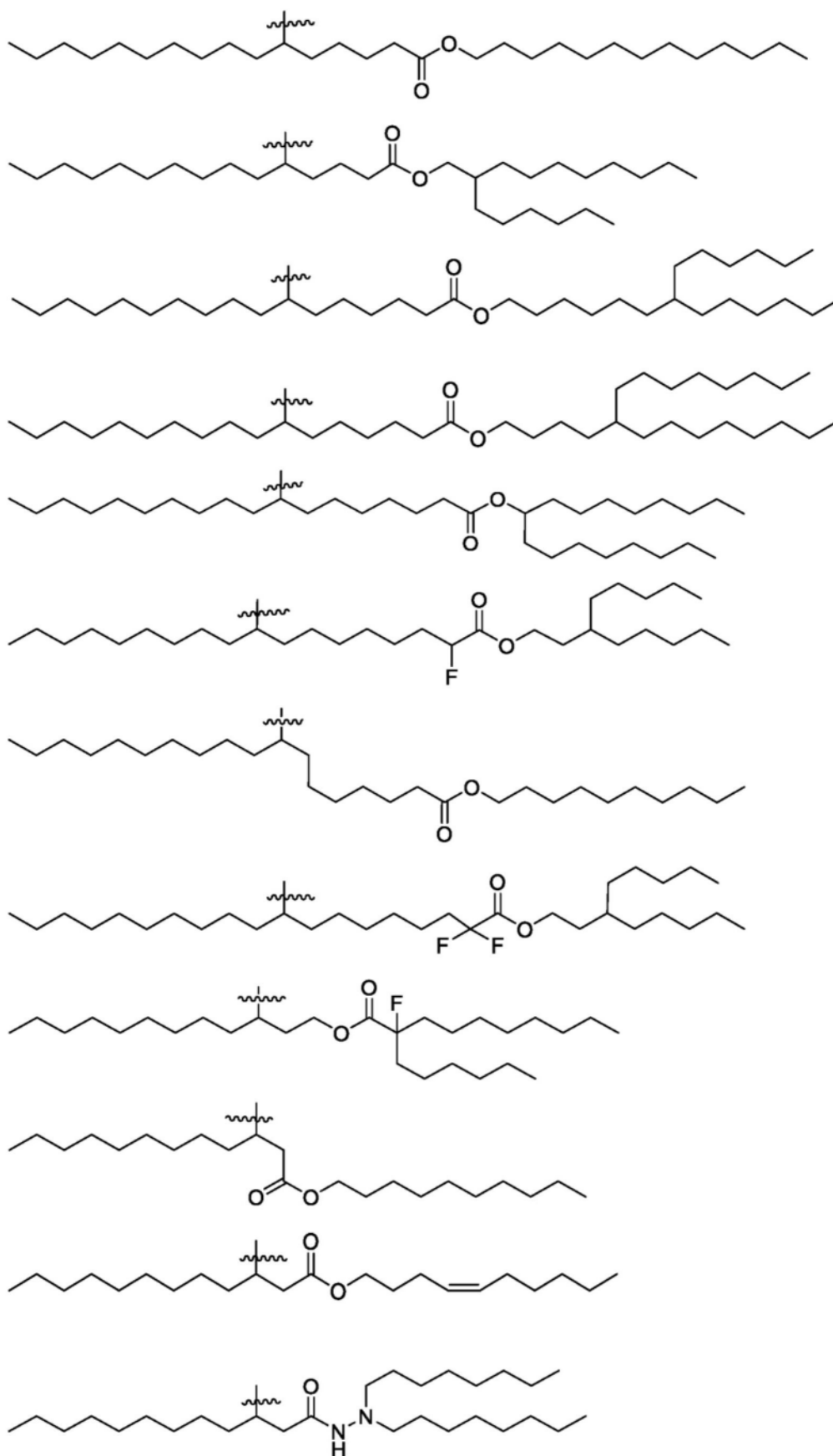
15. 如权利要求1-14中任一项所述的化合物或盐,其中 R^1 是 C_5-C_{25} 烷基。
16. 如权利要求1-14中任一项所述的化合物或盐,其中 R^1 是 C_2-C_{25} 烷基。
17. 如权利要求1-14中任一项所述的化合物或盐,其中 R^1 是 C_5-C_{25} 烷基。
18. 如权利要求1-14中任一项所述的化合物或盐,其中 R^1 是 C_5-C_{25} 烯基。
19. 如权利要求1-14中任一项所述的化合物或盐,其中 R^1 是1-壬基或1-癸基。
20. 如权利要求1-19中任一项所述的化合物或盐,其中 o 是2-15。
21. 如权利要求1-19中任一项所述的化合物或盐,其中 o 是10-15。
22. 如权利要求1-19中任一项所述的化合物或盐,其中 o 是2-10。
23. 如权利要求1-19中任一项所述的化合物或盐,其中 o 是2-5。
24. 如权利要求1-23中任一项所述的化合物或盐,其中 L^2 是 $-(C=O)-O-$ 、 $-(C=O)N(H)N(R^4)(R^5)-$ 、 $-(C=O)N(H)-N=C(R^4)-$ 、 $-(C=O)N(H)N(H)C(R^4)(R^5)-$ 或 $-(C=O)-O-CH_2-R^z$ 。
25. 如权利要求1-23中任一项所述的化合物或盐,其中 L^2 是 $-(C=O)-O-$ 。
26. 如权利要求1-23中任一项所述的化合物或盐,其中 L^2 是 $-(C=O)N(H)N(R^4)(R^5)-$ 。
27. 如权利要求1-23中任一项所述的化合物或盐,其中 L^2 是 $-(C=O)-O-CH_2-R^z$ 。
28. 如权利要求1-27中任一项所述的化合物或盐,其中 a 是H。
29. 如权利要求1-27中任一项所述的化合物或盐,其中 a 是F。
30. 如权利要求1-29中任一项所述的化合物或盐,其中 b 是H。
31. 如权利要求1-29中任一项所述的化合物或盐,其中 b 是F。
32. 如权利要求1-31中任一项所述的化合物或盐,其中 R^6 是 C_2-C_{25} 烷基。
33. 如权利要求1-31中任一项所述的化合物或盐,其中 R^6 是 C_5-C_{25} 烷基。
34. 如权利要求1-31中任一项所述的化合物或盐,其中 R^6 是 C_2-C_{25} 烷基。
35. 如权利要求1-31中任一项所述的化合物或盐,其中 R^6 是 C_5-C_{25} 烷基。
36. 如权利要求1-31中任一项所述的化合物或盐,其中 R^6 是 C_5-C_{25} 烯基。
37. 如权利要求1-14中任一项所述的化合物或盐,其中:

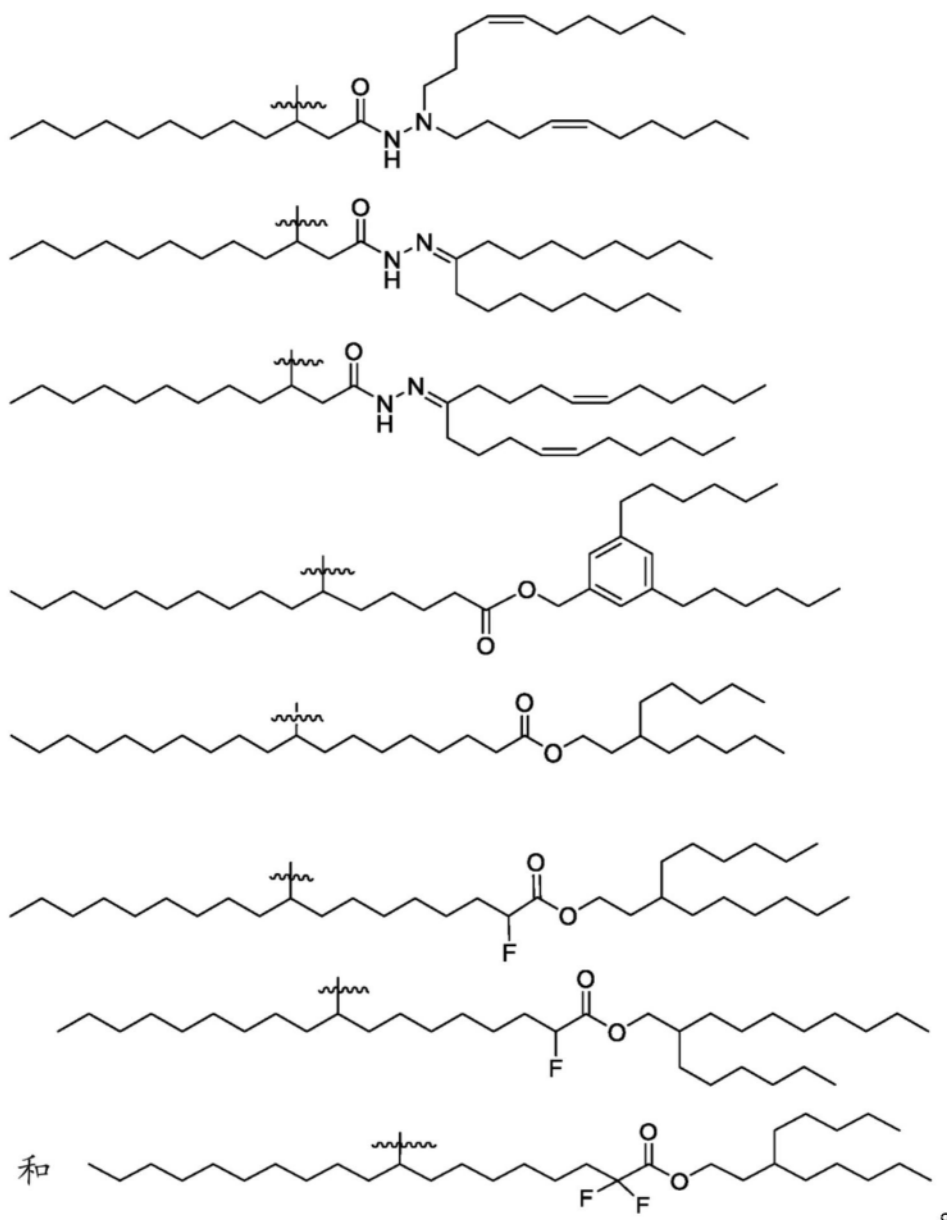


选自由以下组成的组：

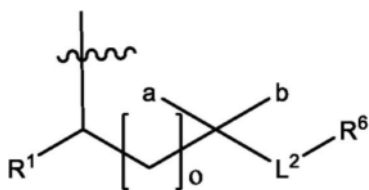




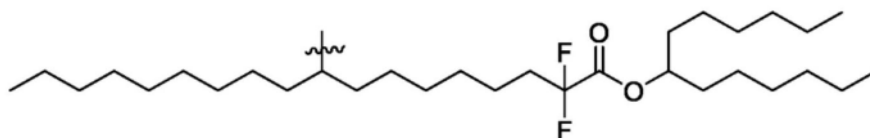


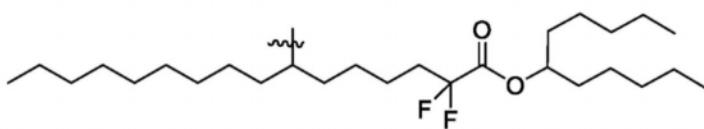
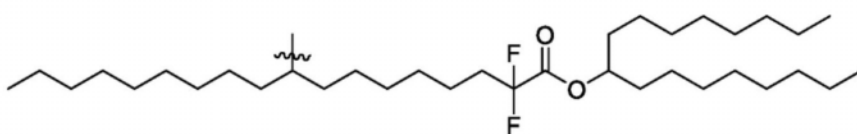
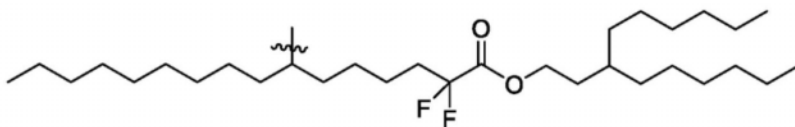
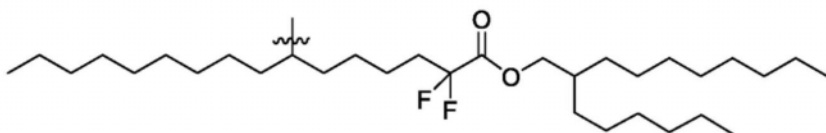
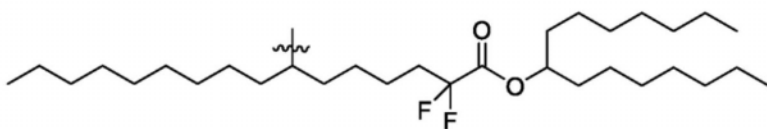
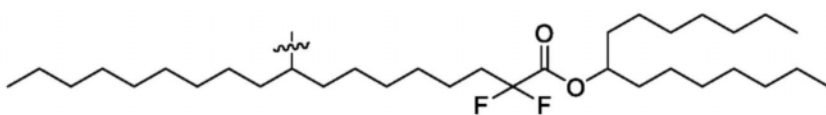


38. 如权利要求1-14中任一项所述的化合物或盐,其中:

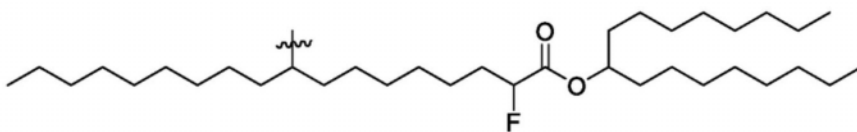
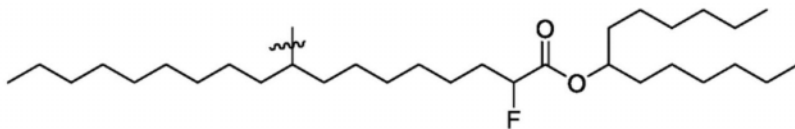
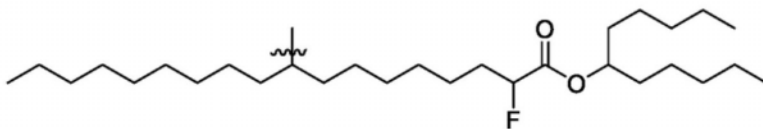
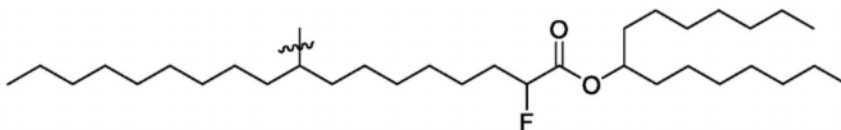
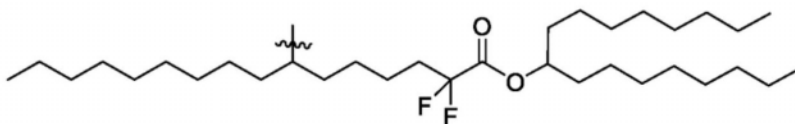


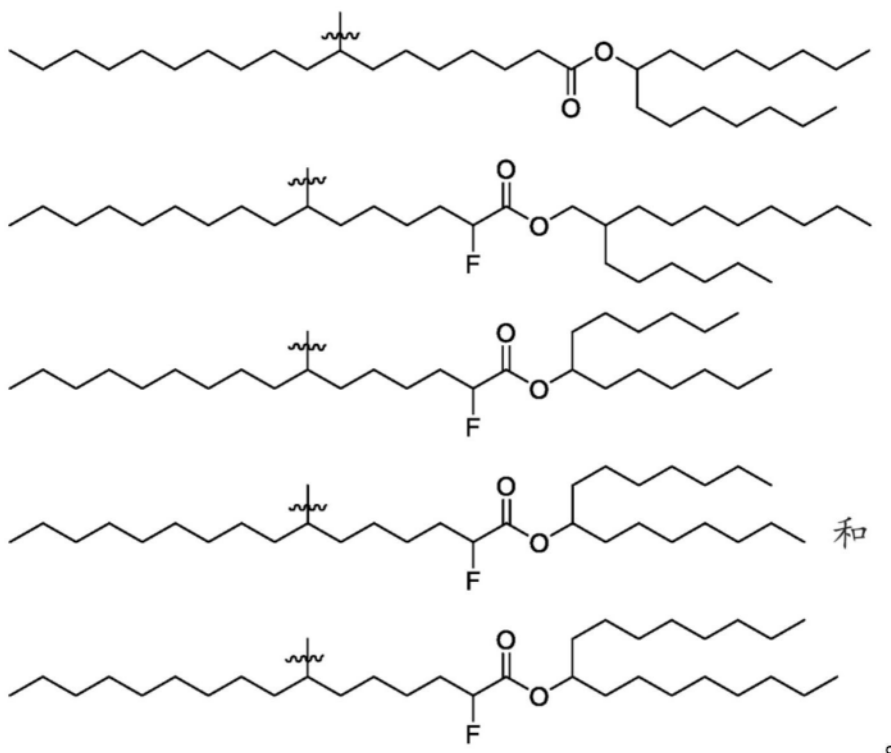
选自由以下组成的组:



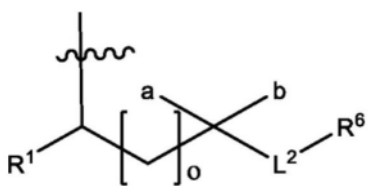


-

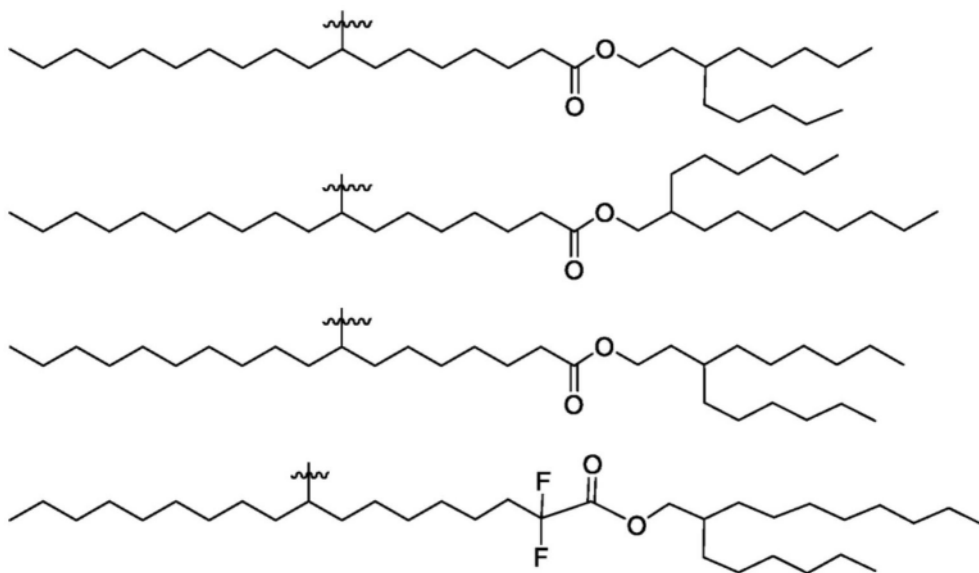


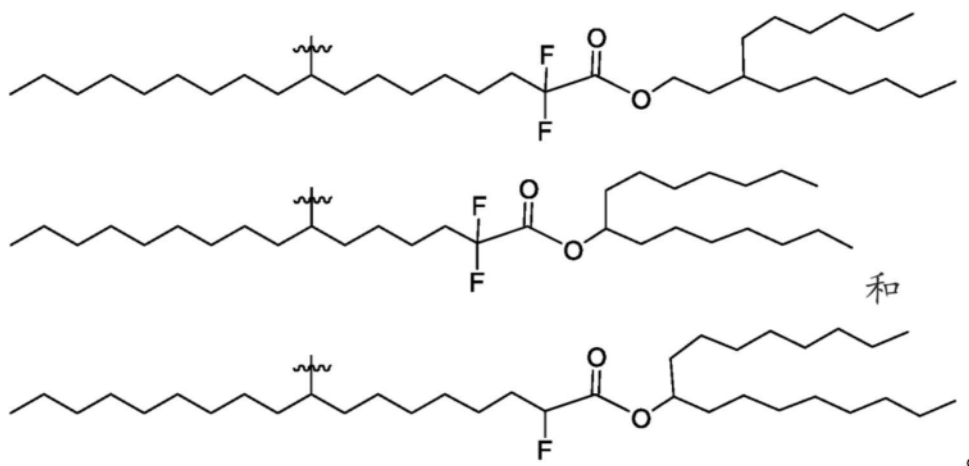


39. 如权利要求1-14中任一项所述的化合物或盐,其中:

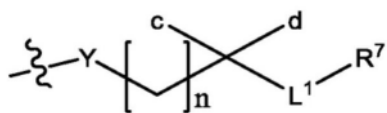


选自由以下组成的组:

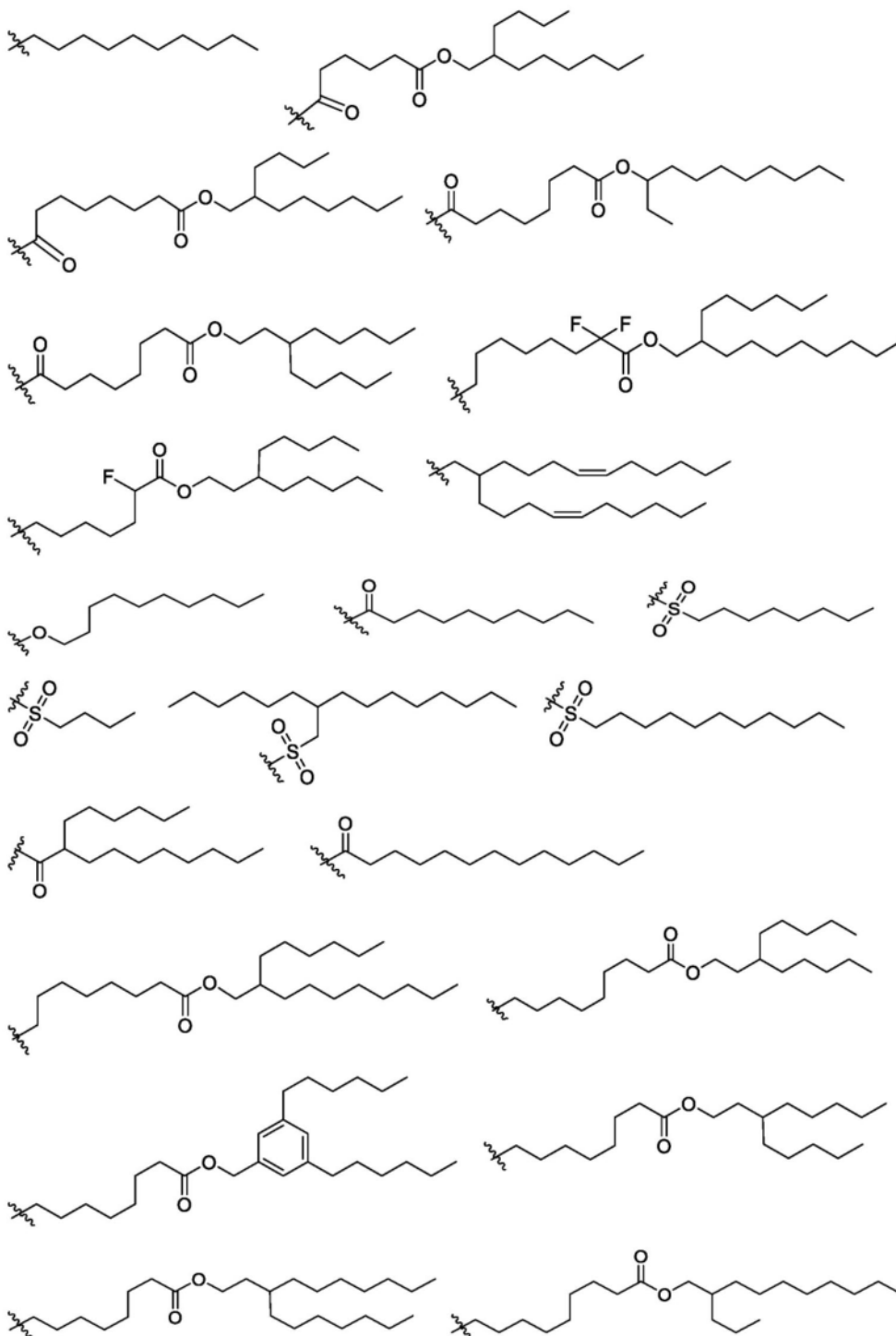


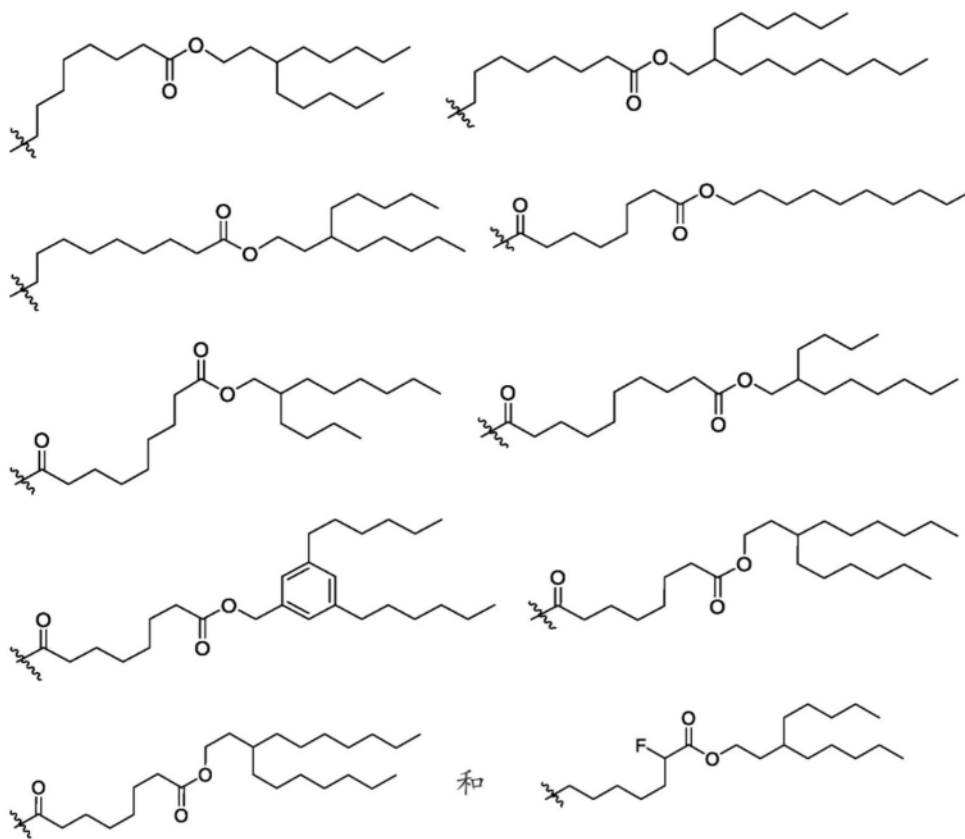


40. 如权利要求1-39中任一项所述的化合物或盐,其中Y是 $-\text{CH}_2-$ 。
41. 如权利要求1-39中任一项所述的化合物或盐,其中Y是 $-\text{C}(=\text{O})-$ 。
42. 如权利要求1-39中任一项所述的化合物或盐,其中Y是 $-\text{O}-$ 。
43. 如权利要求1-42中任一项所述的化合物或盐,其中n是2-15。
44. 如权利要求1-42中任一项所述的化合物或盐,其中n是10-15。
45. 如权利要求1-42中任一项所述的化合物或盐,其中n是2-10。
46. 如权利要求1-42中任一项所述的化合物或盐,其中n是2-5。
47. 如权利要求1-46中任一项所述的化合物或盐,其中 L^1 不存在;并且 L^2 是 $-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{H})\text{N}(\text{R}^4)(\text{R}^5)-$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{H})-\text{N}=\text{C}(\text{R}^4)-$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{H})\text{N}(\text{H})\text{C}(\text{R}^4)(\text{R}^5)-$ 或 $-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{CH}_2-\text{R}^z$ 。
48. 如权利要求1-46中任一项所述的化合物或盐,其中 L^1 是 $-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{H})\text{N}(\text{R}^4)(\text{R}^5)-$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{H})-\text{N}=\text{C}(\text{R}^4)-$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{H})\text{N}(\text{H})\text{C}(\text{R}^4)(\text{R}^5)-$ 或 $-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{CH}_2-\text{R}^a$;并且 L^2 不存在。
49. 如权利要求1-46中任一项所述的化合物或盐,其中 L^1 是 $-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{H})\text{N}(\text{R}^4)(\text{R}^5)-$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{H})-\text{N}=\text{C}(\text{R}^4)-$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{H})\text{N}(\text{H})\text{C}(\text{R}^4)(\text{R}^5)-$ 或 $-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{CH}_2-\text{R}^a$ 。
50. 如权利要求1-46中任一项所述的化合物或盐,其中 L^1 是 $-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-$ 。
51. 如权利要求1-46中任一项所述的化合物或盐,其中 L^1 是 $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{H})\text{N}(\text{R}^4)(\text{R}^5)-$ 。
52. 如权利要求1-46中任一项所述的化合物或盐,其中 L^1 是 $-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{CH}_2-\text{R}^z$ 。
53. 如权利要求1-52中任一项所述的化合物或盐,其中c是H。
54. 如权利要求1-52中任一项所述的化合物或盐,其中c是F。
55. 如权利要求1-54中任一项所述的化合物或盐,其中d是H。
56. 如权利要求1-54中任一项所述的化合物或盐,其中d是F。
57. 如权利要求1-56中任一项所述的化合物或盐,其中 R^7 是 C_2-C_{25} 烷基。
58. 如权利要求1-56中任一项所述的化合物或盐,其中 R^7 是 C_5-C_{25} 烷基。
59. 如权利要求1-56中任一项所述的化合物或盐,其中 R^7 是 C_2-C_{25} 烷基。
60. 如权利要求1-56中任一项所述的化合物或盐,其中 R^7 是 C_5-C_{25} 烷基。
61. 如权利要求1-56中任一项所述的化合物或盐,其中 R^7 是 C_5-C_{25} 烯基。
62. 如权利要求1-39中任一项所述的化合物或盐,其中:

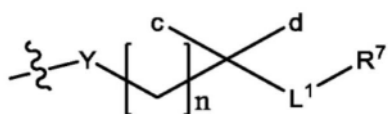


选自由以下组成的组：

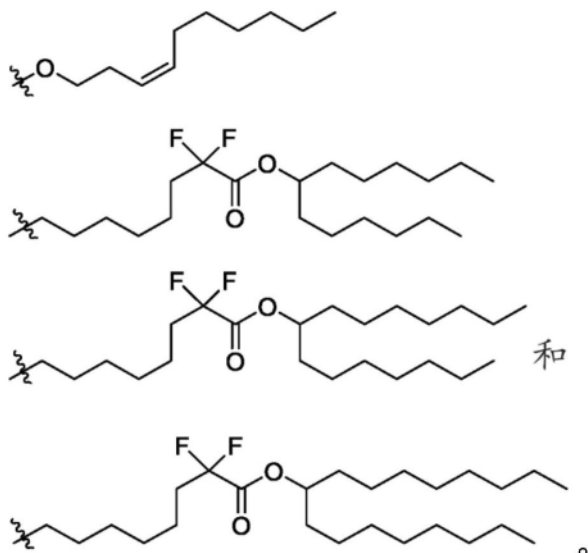




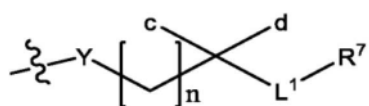
63. 如权利要求1-39中任一项所述的化合物或盐,其中:



选自由以下组成的组:



64. 如权利要求1-37中任一项所述的化合物或盐,其中:



选自自由以下组成的组：

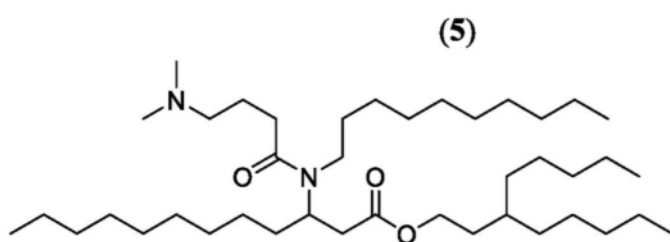
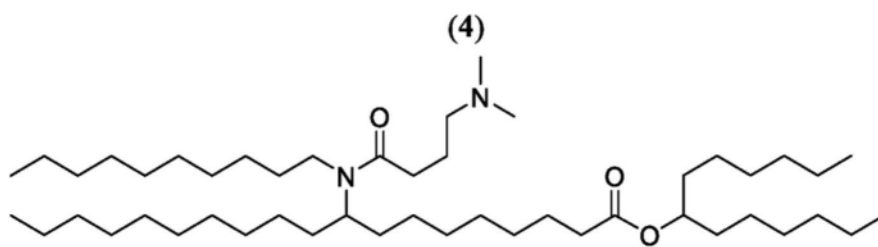
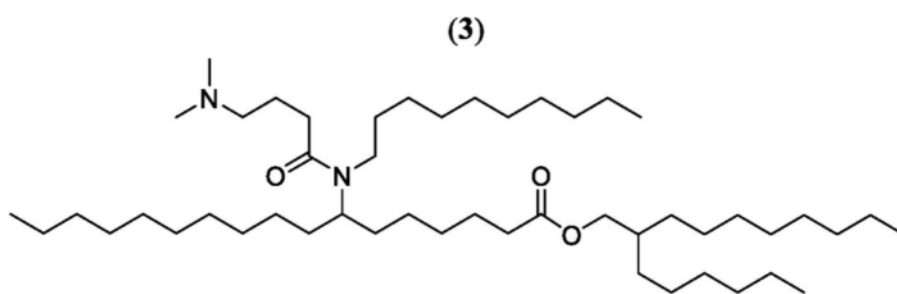
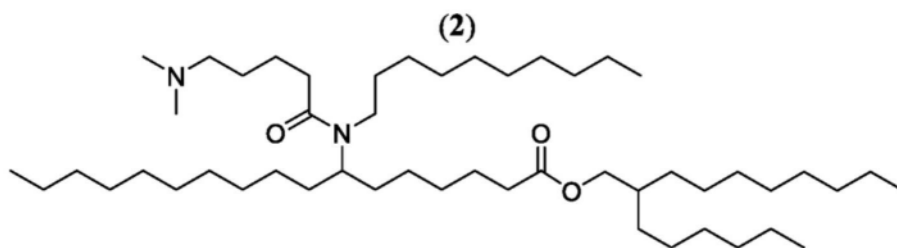
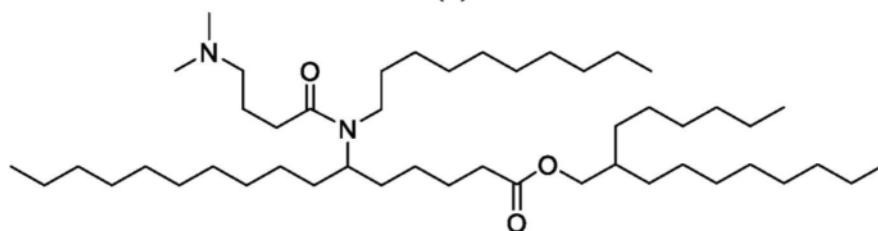
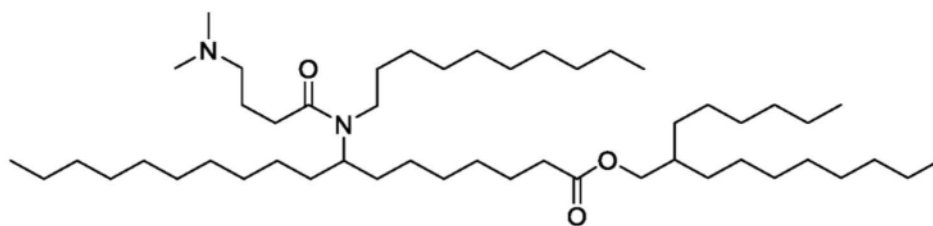


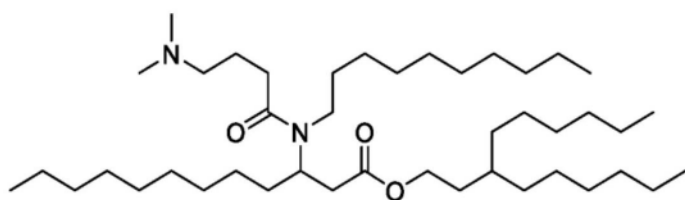
65. 如权利要求1-46和53-61中任一项所述的化合物或盐,其中R⁴是C₂-C₂₅烃基。
66. 如权利要求1-46和53-61中任一项所述的化合物或盐,其中R⁴是C₅-C₂₅烃基。
67. 如权利要求1-46和53-61中任一项所述的化合物或盐,其中R⁴是C₂-C₂₅烷基。
68. 如权利要求1-46和53-61中任一项所述的化合物或盐,其中R⁴是C₅-C₂₅烷基。
69. 如权利要求1-46和53-61中任一项所述的化合物或盐,其中R⁴是C₅-C₂₅烯基。
70. 如权利要求1-46和53-61中任一项所述的化合物或盐,其中R⁵是C₂-C₂₅烃基。
71. 如权利要求1-46和53-61中任一项所述的化合物或盐,其中R⁵是C₅-C₂₅烃基。
72. 如权利要求1-46和53-61中任一项所述的化合物或盐,其中R⁵是C₂-C₂₅烷基。
73. 如权利要求1-46和53-61中任一项所述的化合物或盐,其中R⁵是C₅-C₂₅烷基。
74. 如权利要求1-46和53-61中任一项所述的化合物或盐,其中R⁵是C₅-C₂₅烯基。
75. 如权利要求1-23和28-36中任一项所述的化合物或盐,其中R^{4'}是C₂-C₂₅烃基。
76. 如权利要求1-23和28-36中任一项所述的化合物或盐,其中R^{4'}是C₅-C₂₅烃基。
77. 如权利要求1-23和28-36中任一项所述的化合物或盐,其中R^{4'}是C₂-C₂₅烷基。
78. 如权利要求1-23和28-36中任一项所述的化合物或盐,其中R^{4'}是C₅-C₂₅烷基。
79. 如权利要求1-23和28-36中任一项所述的化合物或盐,其中R^{4'}是C₅-C₂₅烯基。
80. 如权利要求1-23和28-36中任一项所述的化合物或盐,其中R^{5'}是C₂-C₂₅烃基。
81. 如权利要求1-23和28-36中任一项所述的化合物或盐,其中R^{5'}是C₅-C₂₅烃基。
82. 如权利要求1-23和28-36中任一项所述的化合物或盐,其中R^{5'}是C₂-C₂₅烷基。
83. 如权利要求1-23和28-36中任一项所述的化合物或盐,其中R^{5'}是C₅-C₂₅烷基。
84. 如权利要求1-23和28-36中任一项所述的化合物或盐,其中R^{5'}是C₅-C₂₅烯基。
85. 如权利要求1-46和53-61中任一项所述的化合物或盐,其中R^z是被1或2个独立地选自C₂-C₁₀烃基的基团取代的苯基。
86. 如权利要求85所述的化合物或盐,其中每个C₂-C₁₀烃基独立地选自由C₅-C₁₀烃基组成的组。
87. 如权利要求85所述的化合物或盐,其中每个C₂-C₁₀烃基独立地选自由C₂-C₁₀烷基组成的组。
88. 如权利要求85所述的化合物或盐,其中每个C₂-C₁₀烃基独立地选自由C₅-C₁₀烷基组成的组。
89. 如权利要求85所述的化合物或盐,其中每个C₂-C₁₀烃基独立地选自由C₅-C₁₀烯基组成的组。
90. 如权利要求1-23和28-36中任一项所述的化合物或盐,其中R^{z'}是被1或2个独立地选自C₂-C₁₀烃基的基团取代的苯基。
91. 如权利要求90所述的化合物或盐,其中每个C₂-C₁₀烃基独立地选自由C₅-C₁₀烃基组成的组。
92. 如权利要求90所述的化合物或盐,其中每个C₂-C₁₀烃基独立地选自由C₂-C₁₀烷基组成的组。

93. 如权利要求90所述的化合物或盐, 其中每个 C_2-C_{10} 烃基独立地选自由 C_5-C_{10} 烷基组成的组。

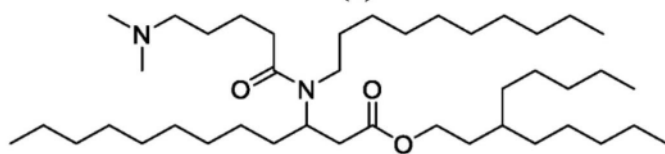
94. 如权利要求90所述的化合物或盐, 其中每个 C_2-C_{10} 烃基独立地选自由 C_5-C_{10} 烯基组成的组。

95. 一种选自由以下组成的组的化合物:

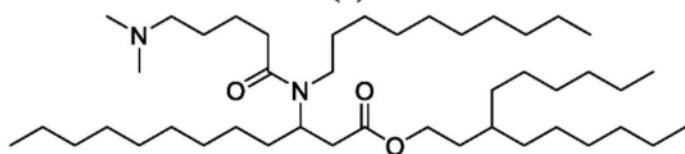




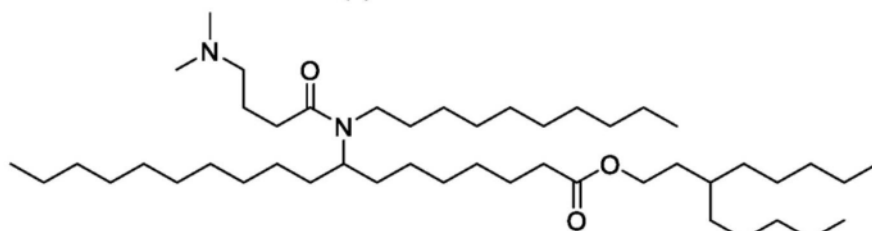
(7)



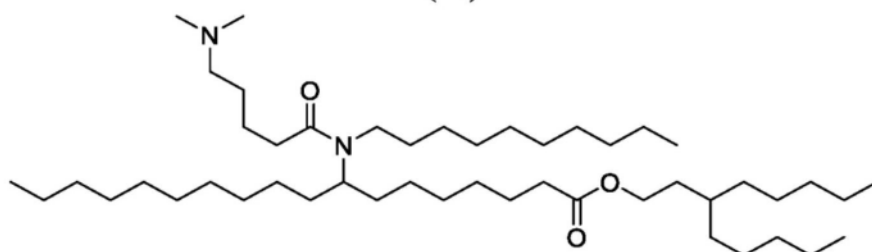
(8)



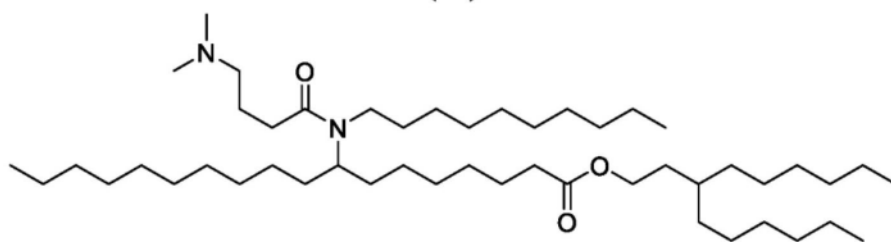
(9)



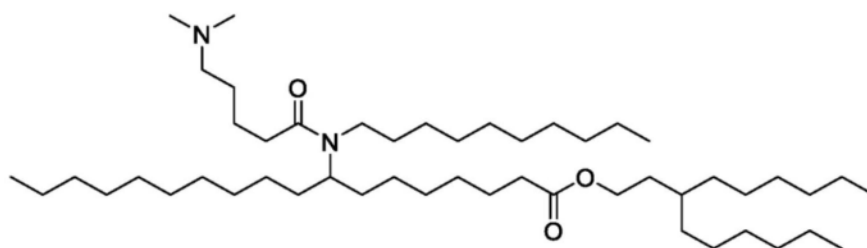
(10)



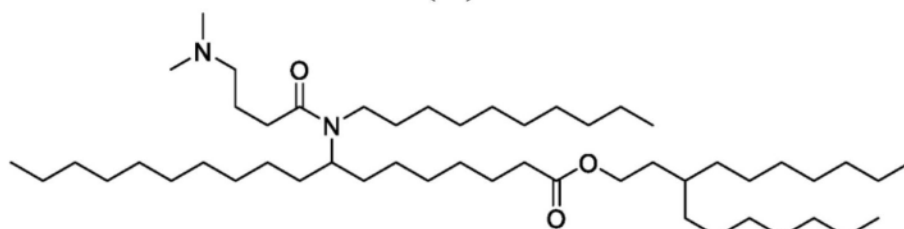
(11)



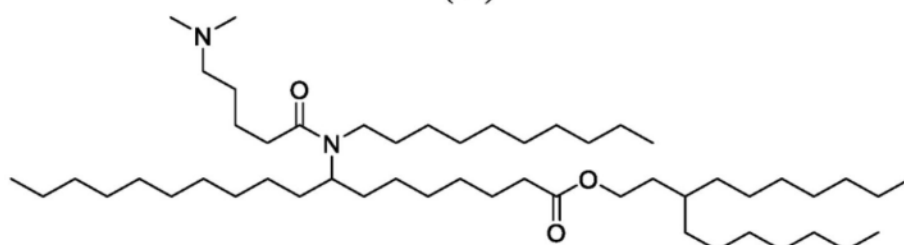
(12)



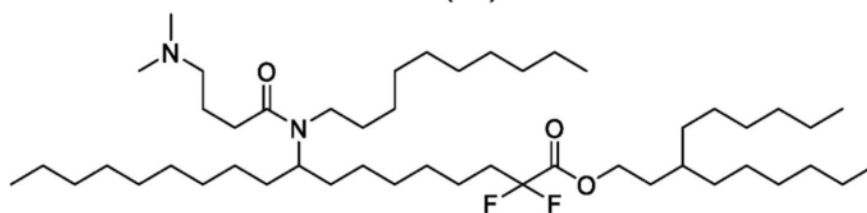
(13)



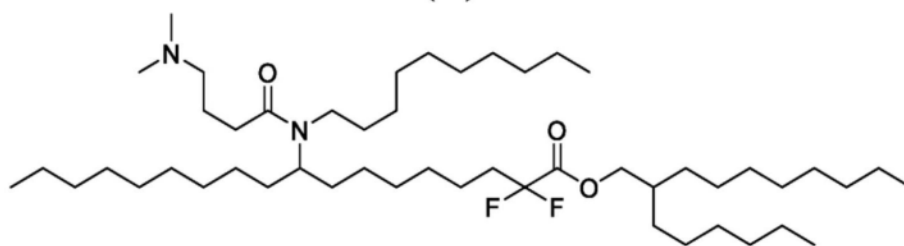
(14)



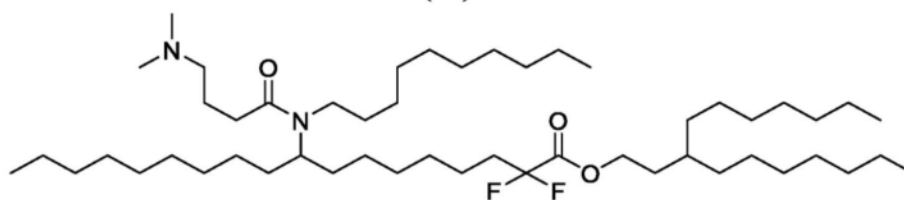
(15)



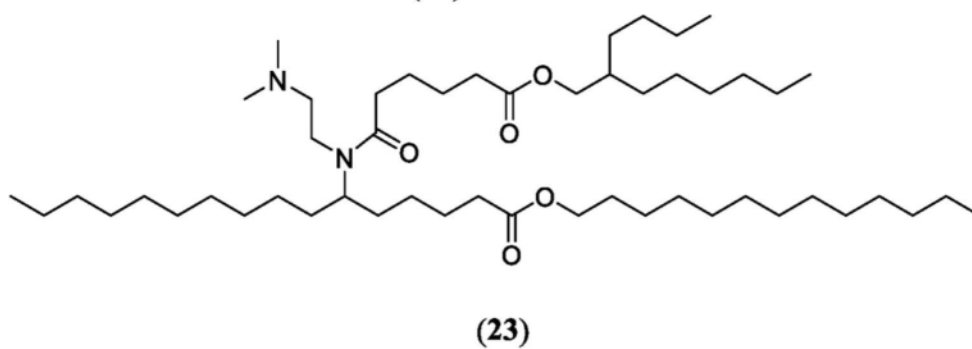
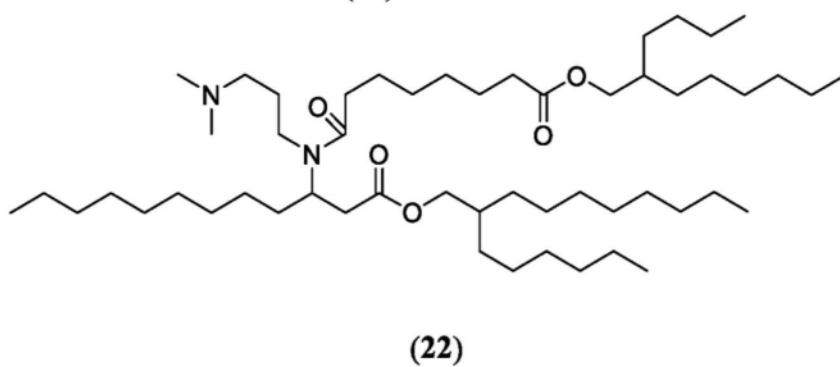
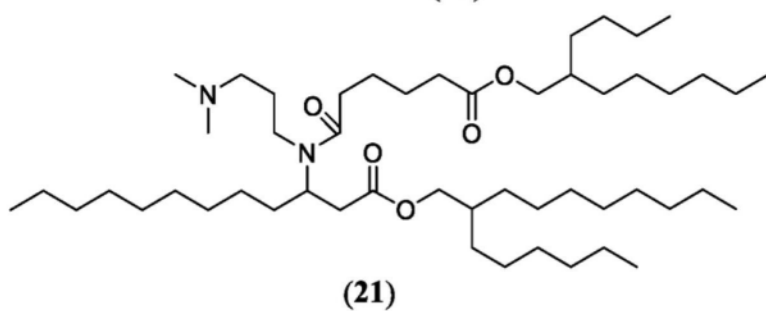
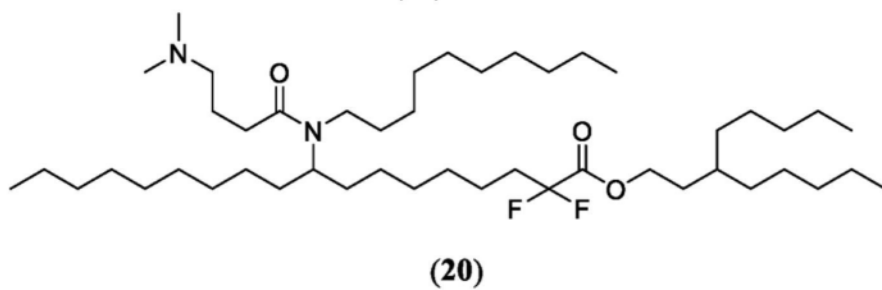
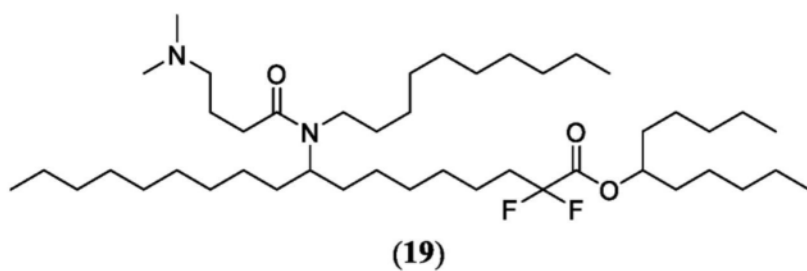
(16)

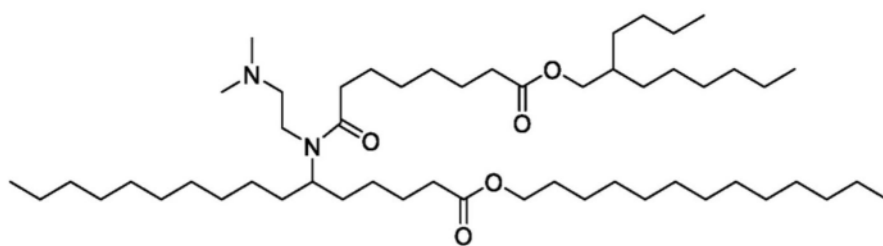


(17)

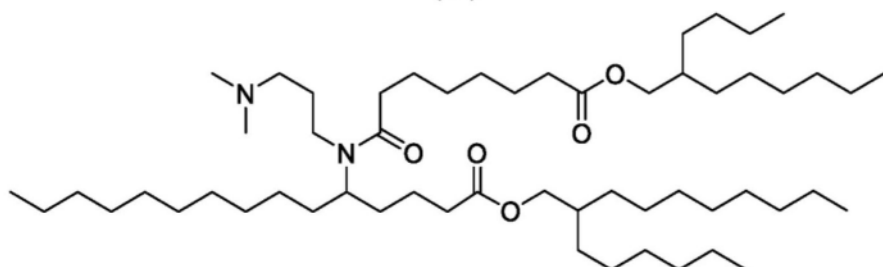


(18)

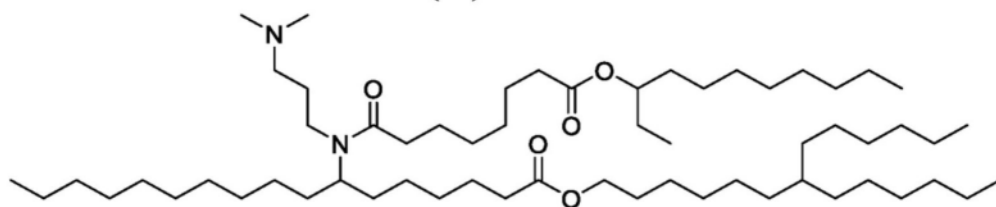




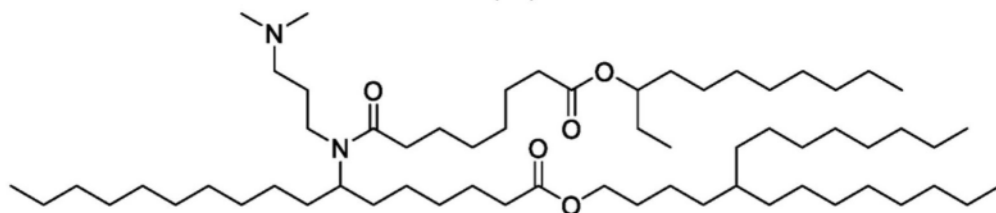
(24)



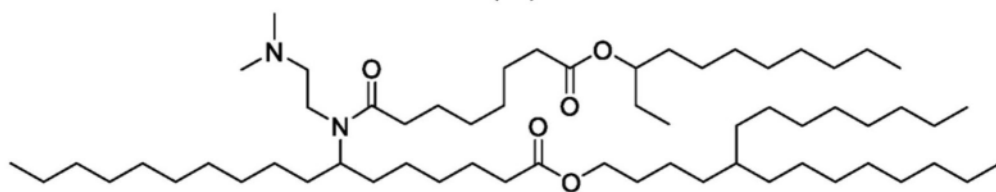
(25)



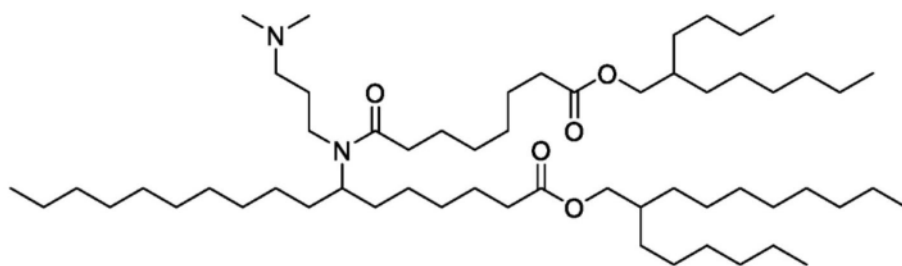
(26)



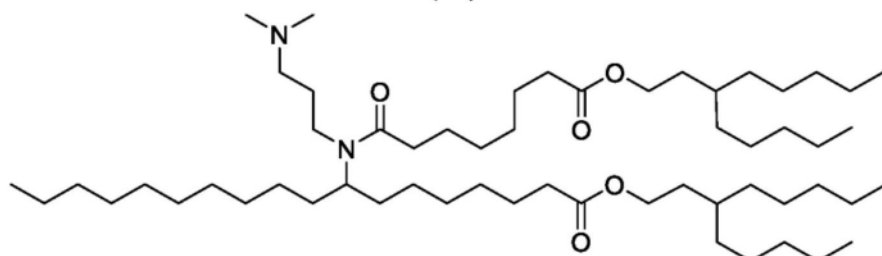
(27)



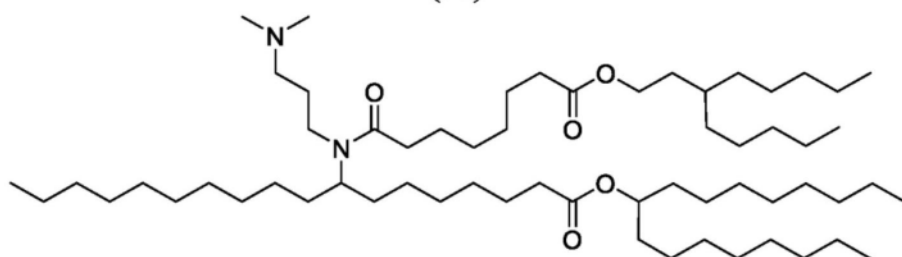
(28)



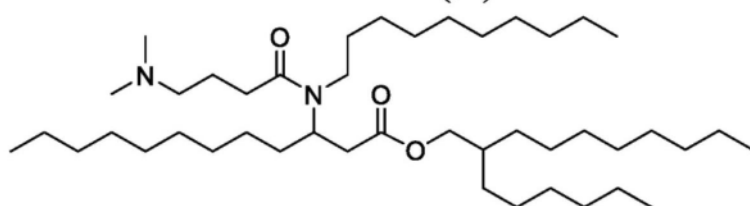
(29)



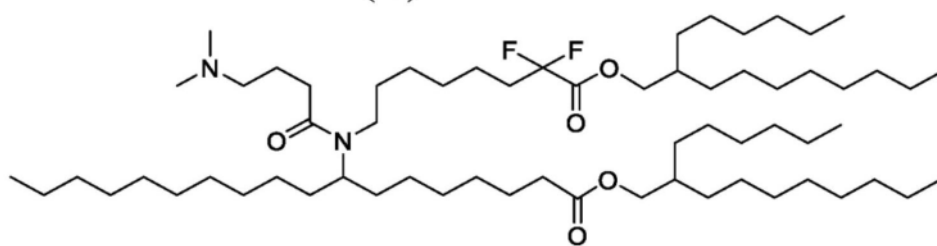
(30)



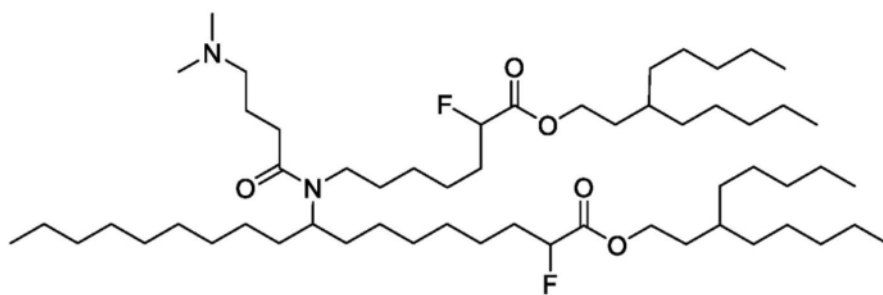
(31)



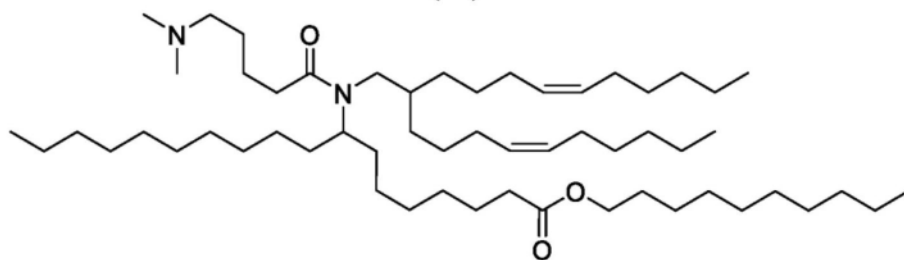
(32)



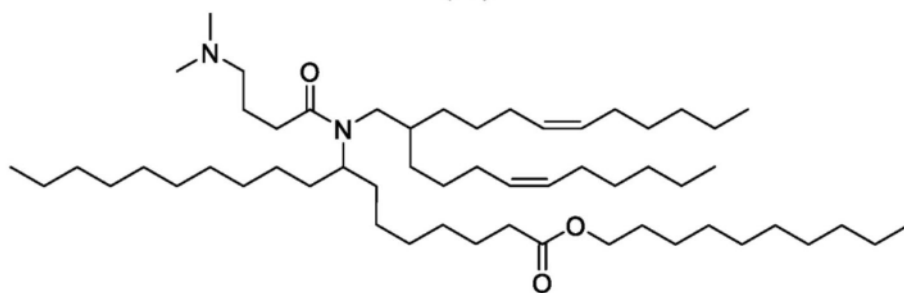
(33)



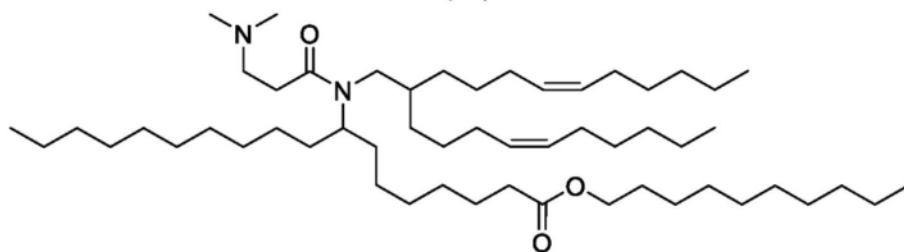
(34)



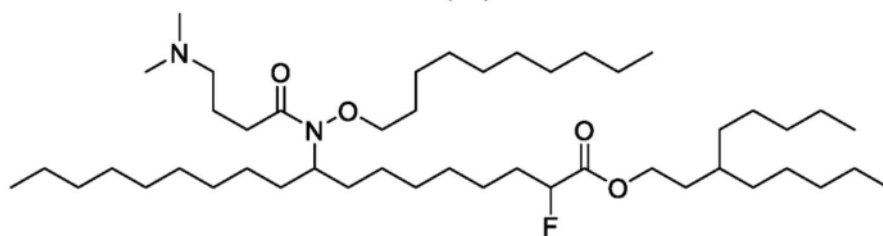
(35)



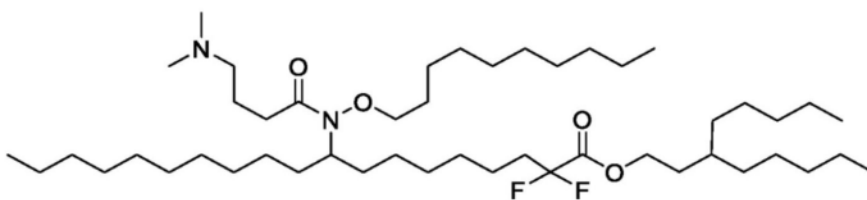
(36)



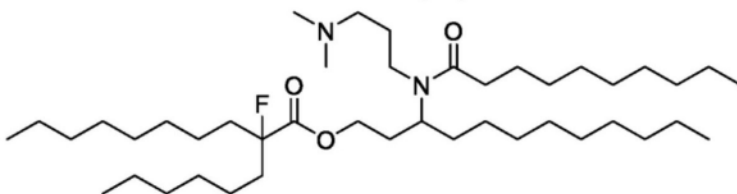
(37)



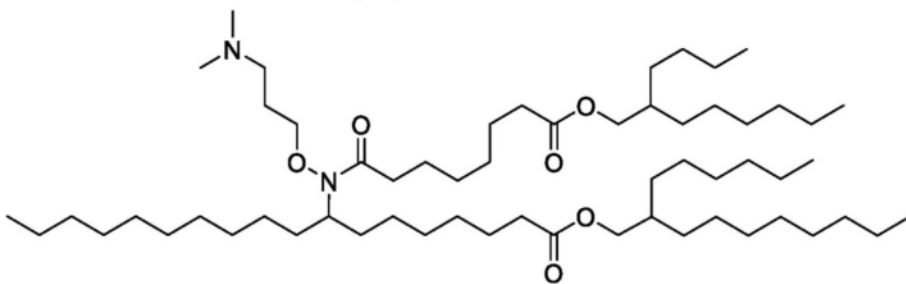
(38)



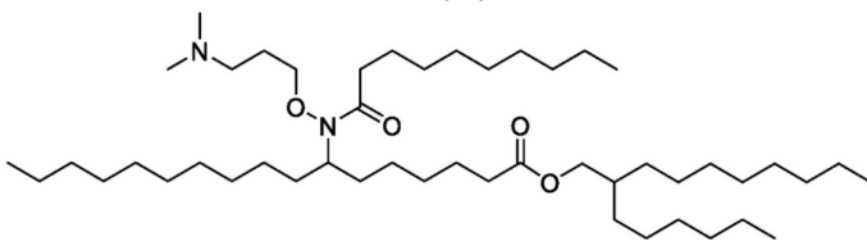
(39)



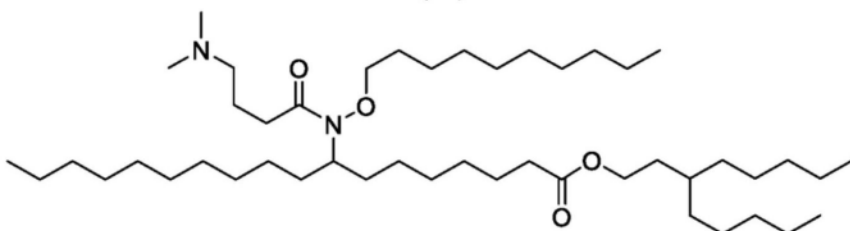
(40)



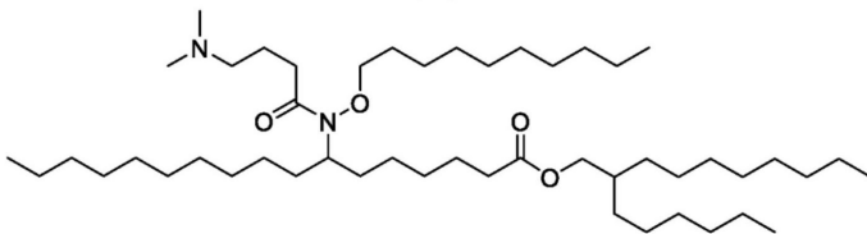
(41)



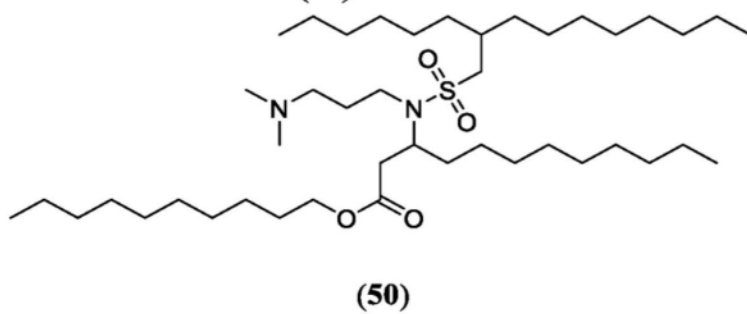
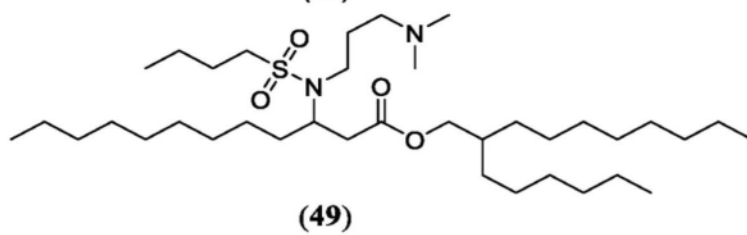
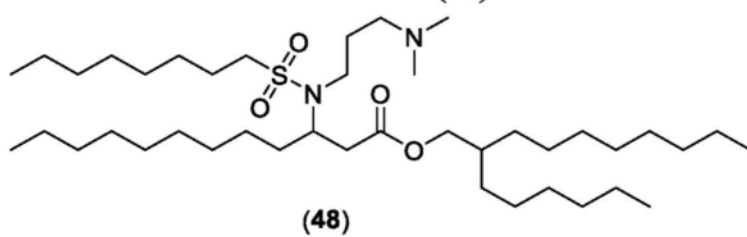
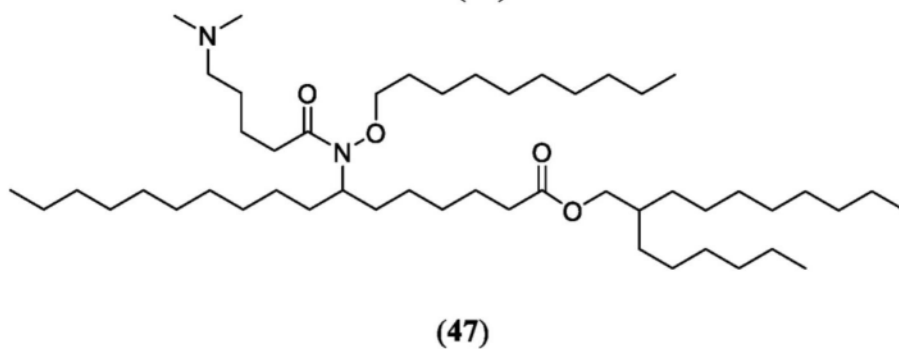
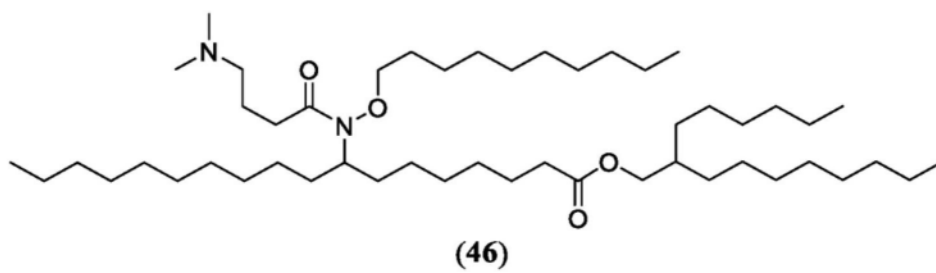
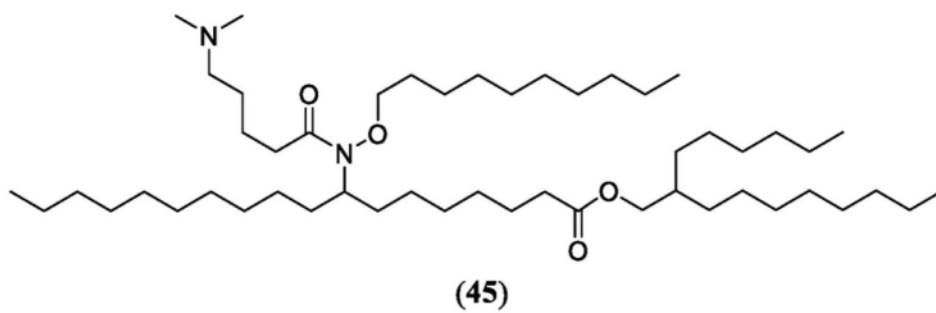
(42)

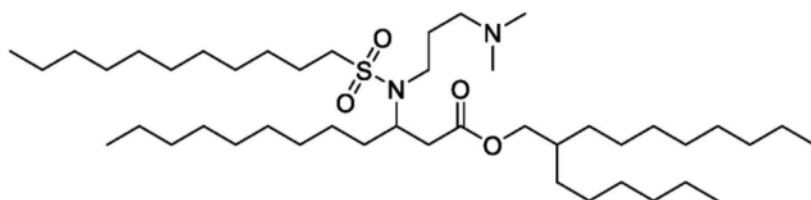


(43)

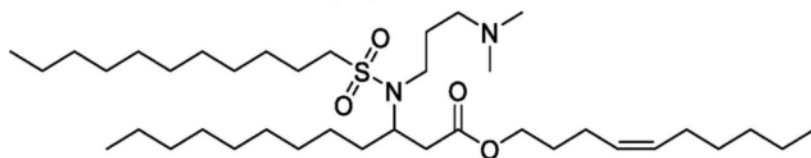


(44)

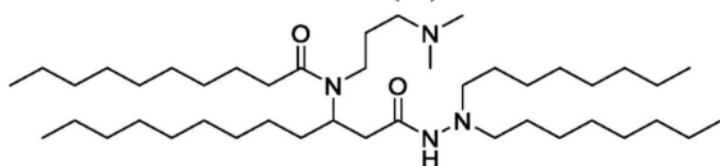




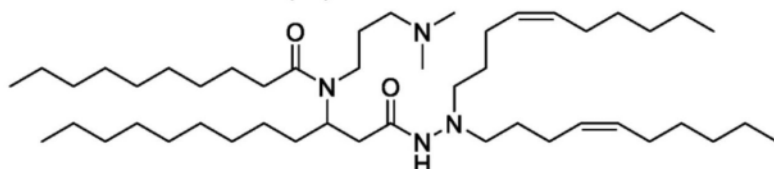
(51)



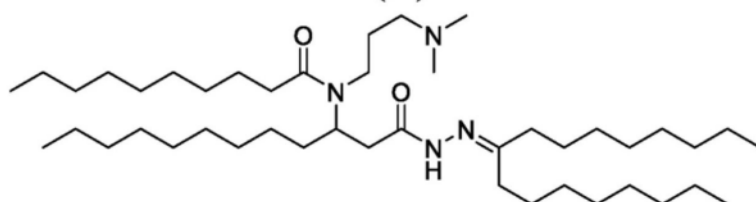
(52)



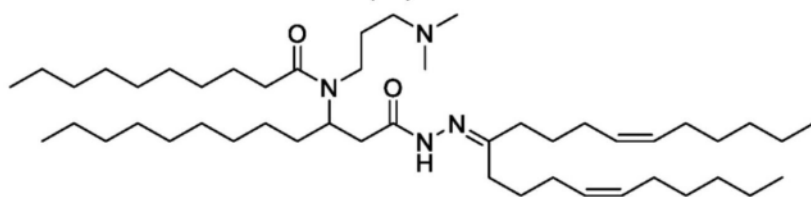
(53)



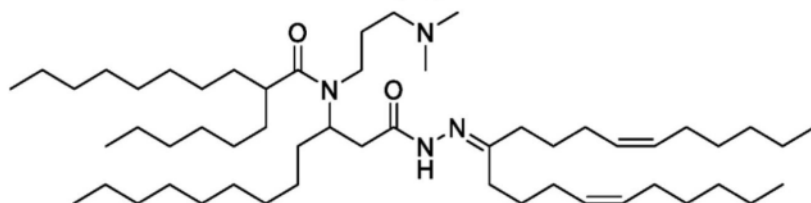
(54)



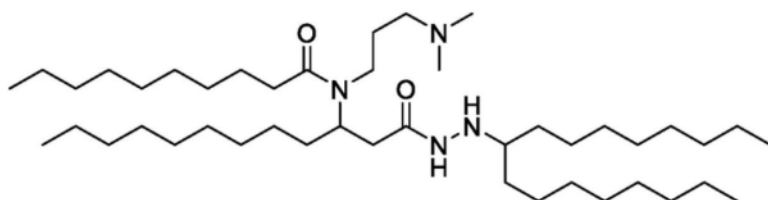
(55)



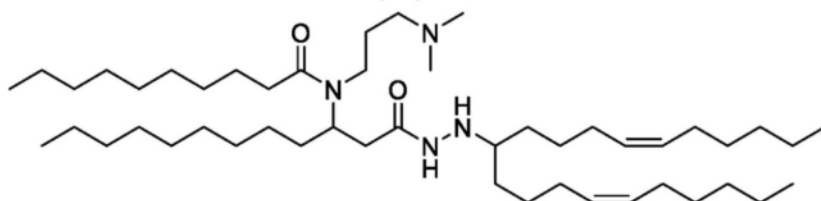
(56)



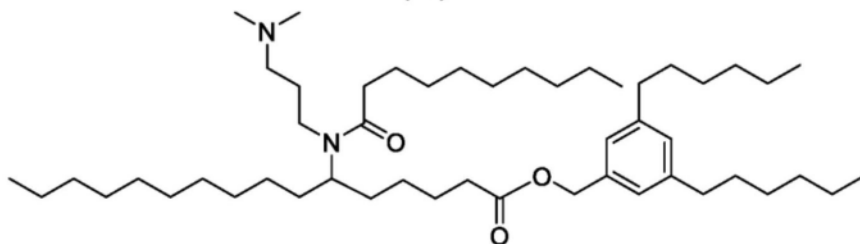
(57)



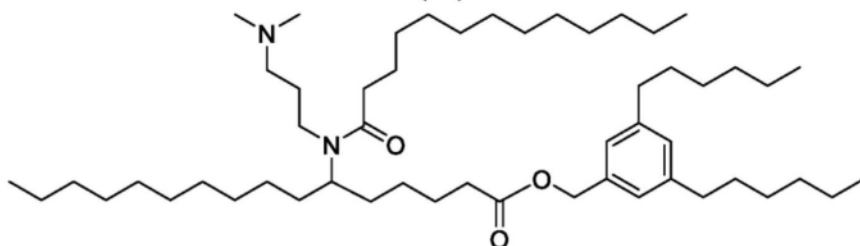
(58)



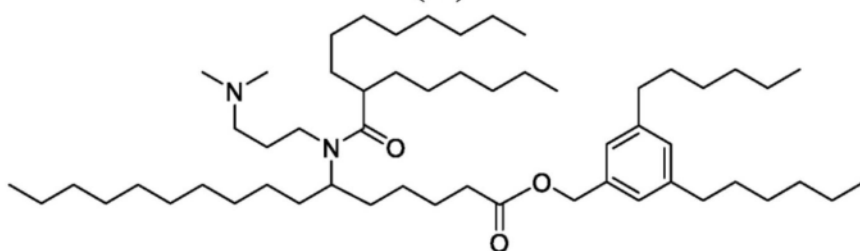
(59)



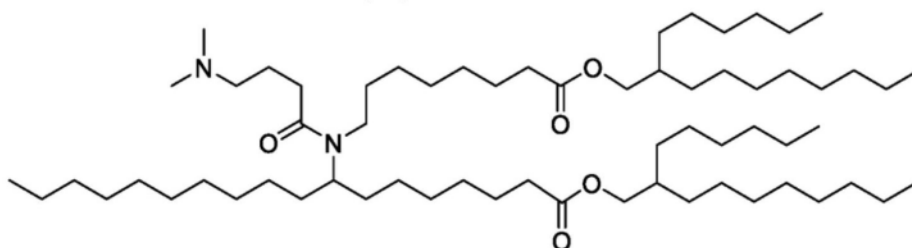
(60)



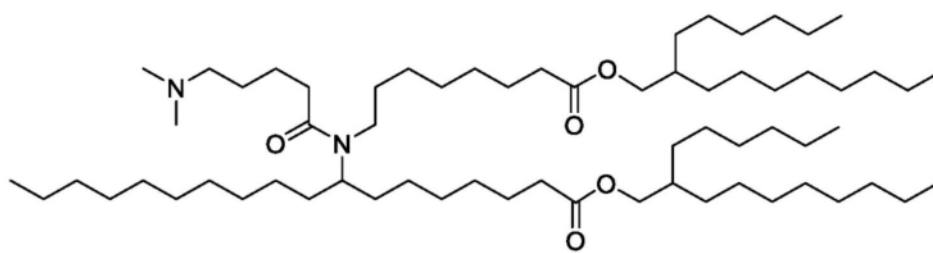
(61)



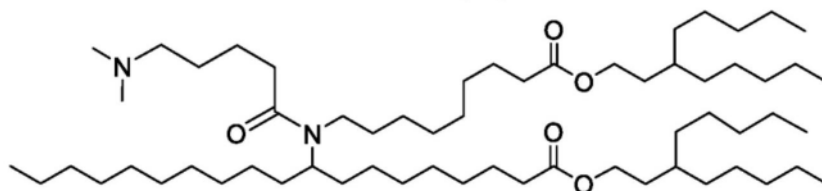
(62)



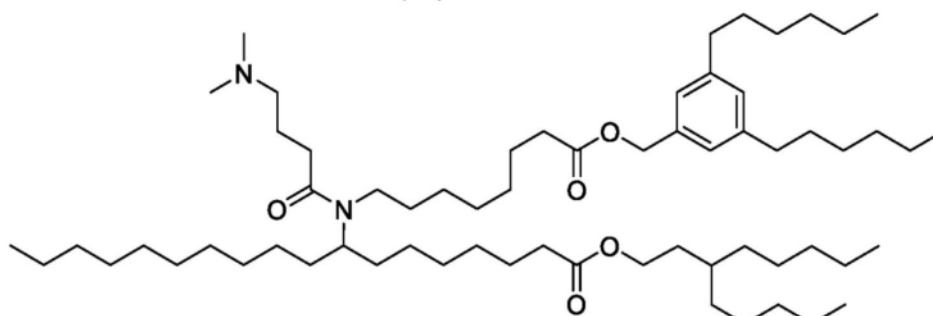
(63)



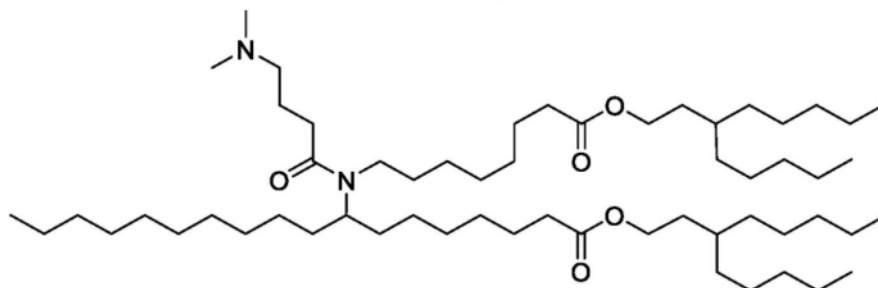
(64)



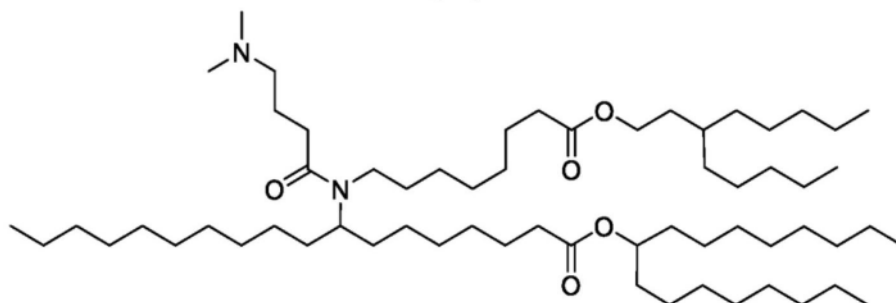
(65)



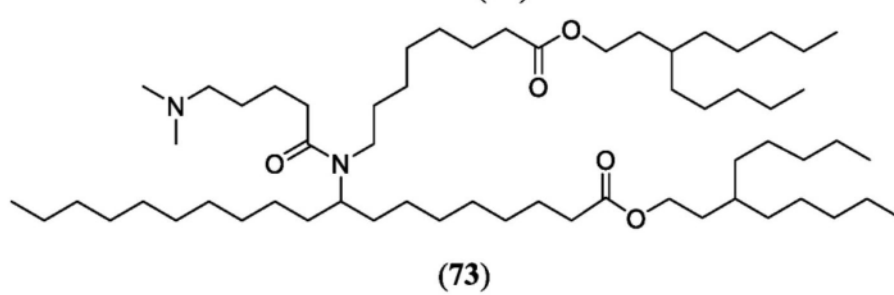
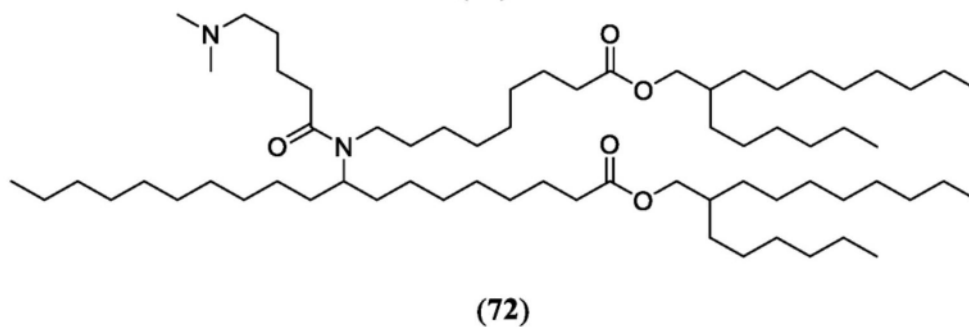
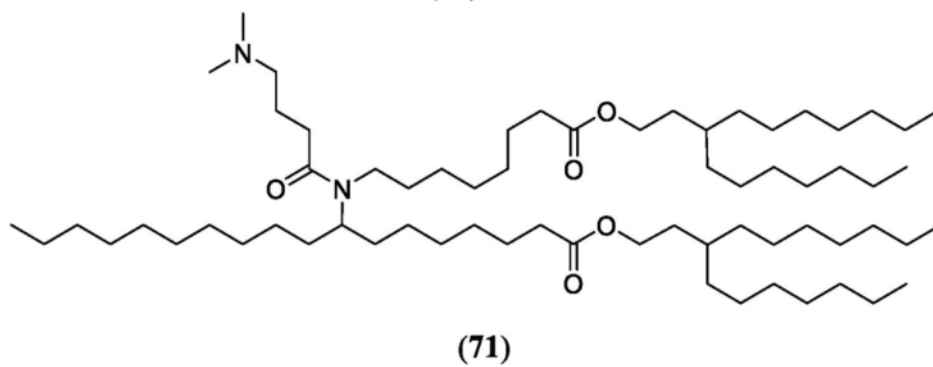
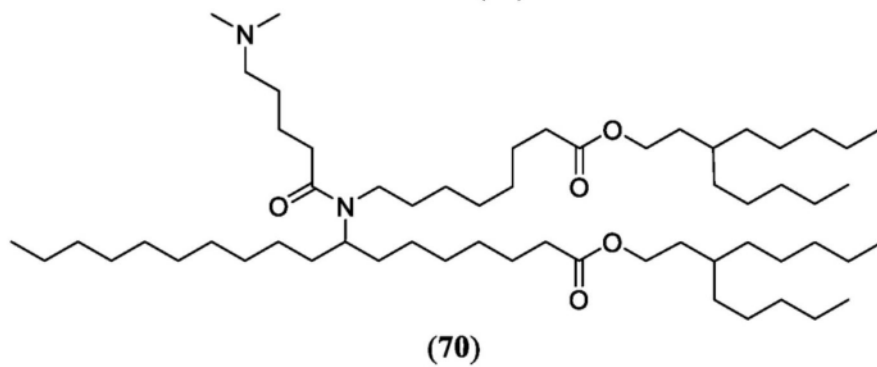
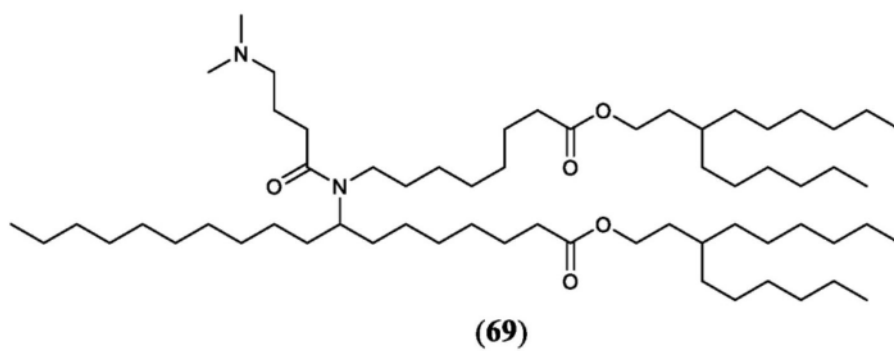
(66)

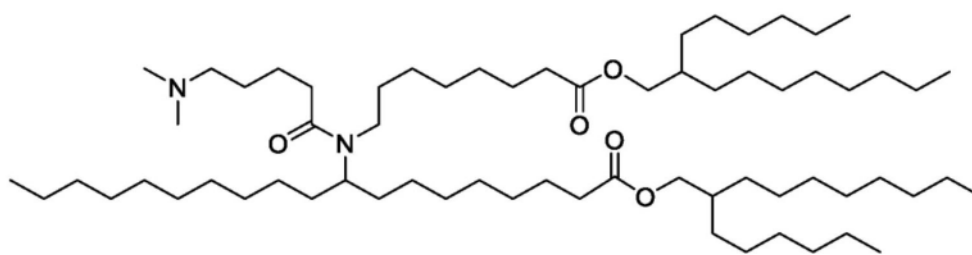


(67)

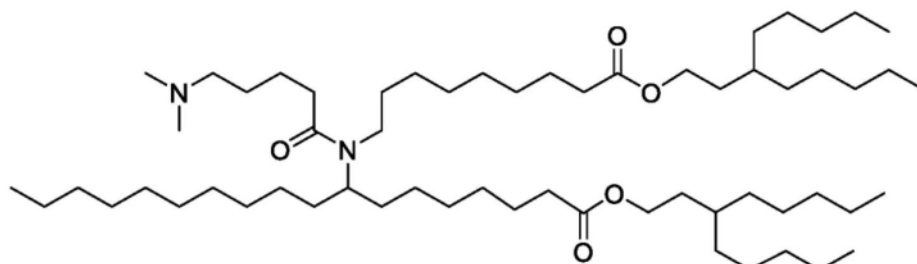


(68)

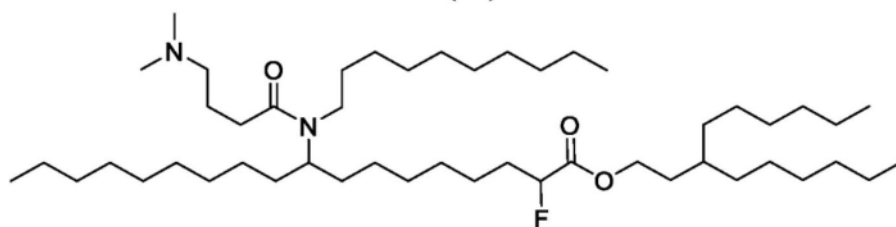




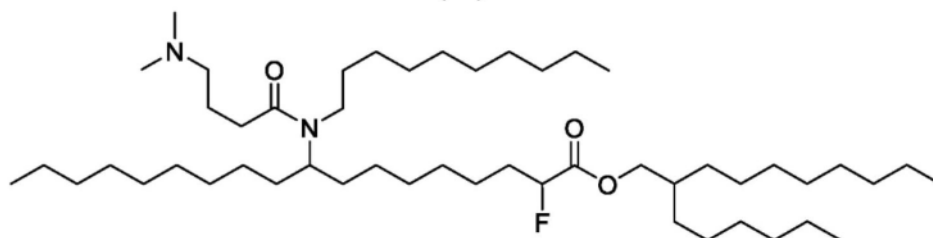
(74)



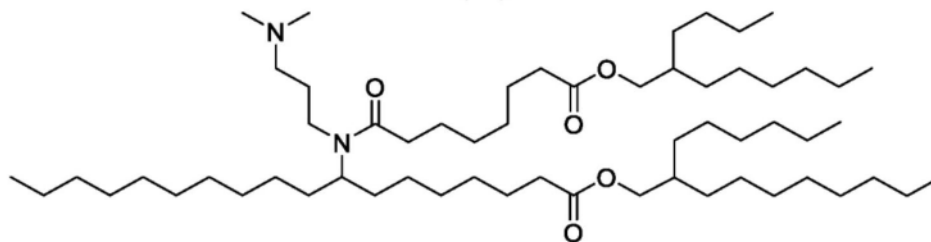
(75)



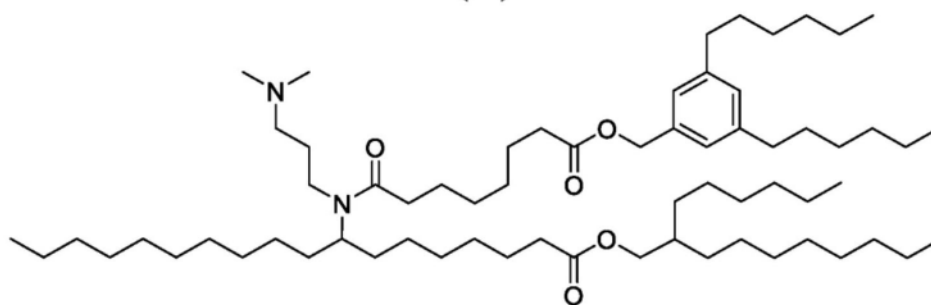
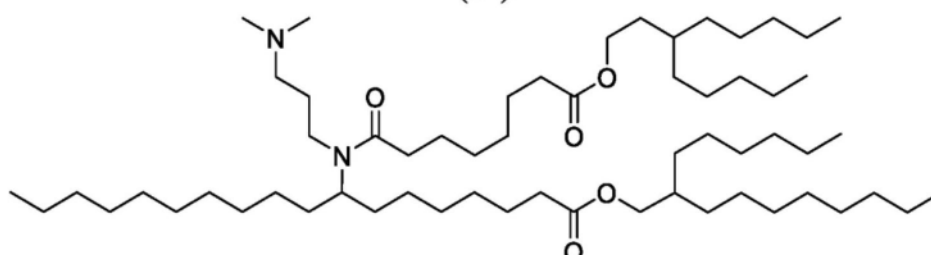
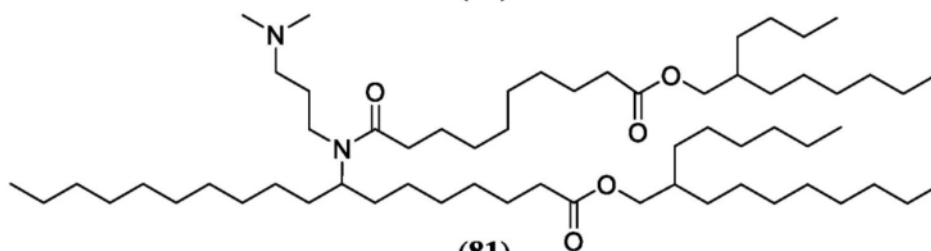
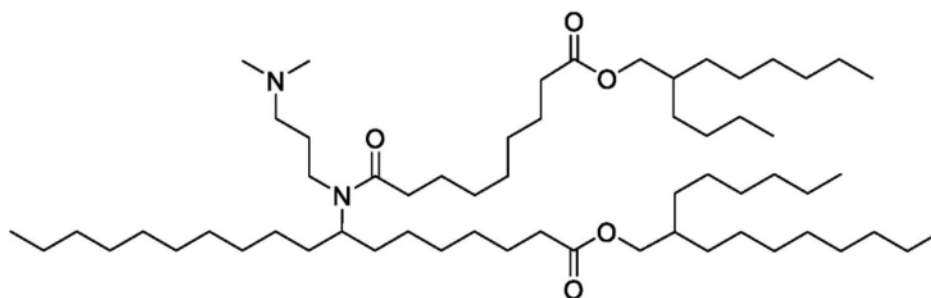
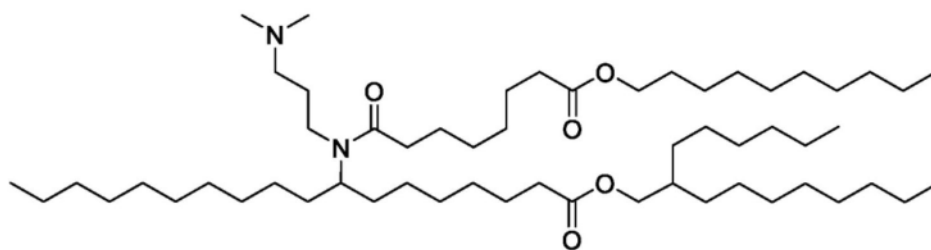
(76)

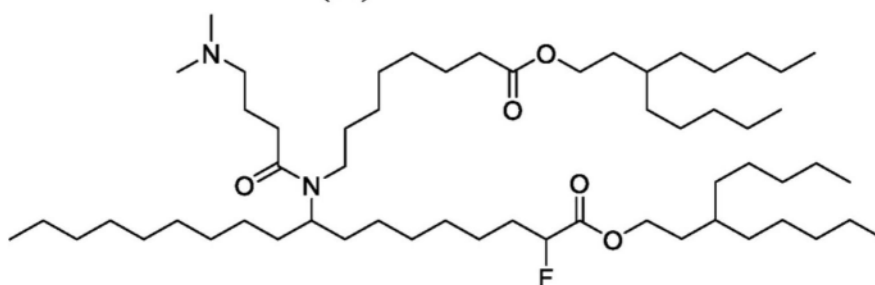
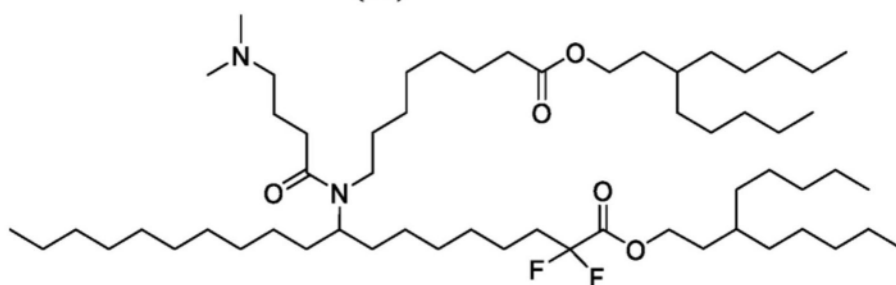
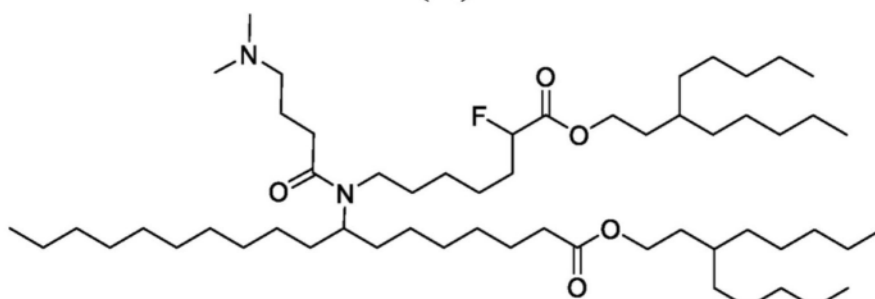
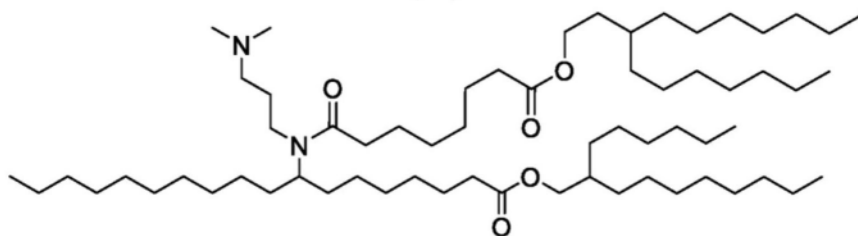
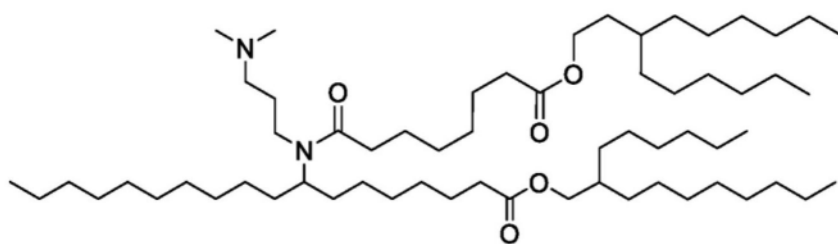


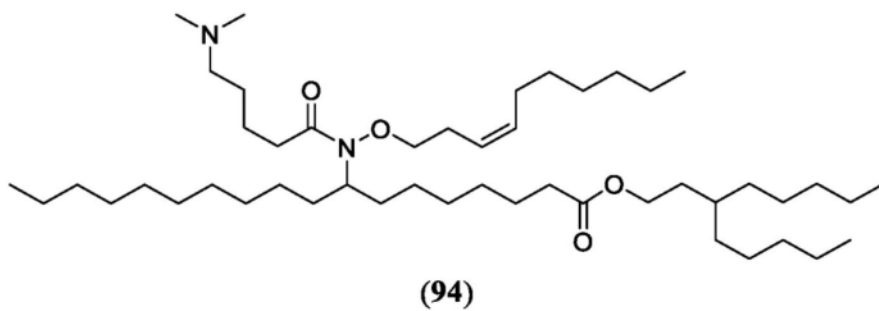
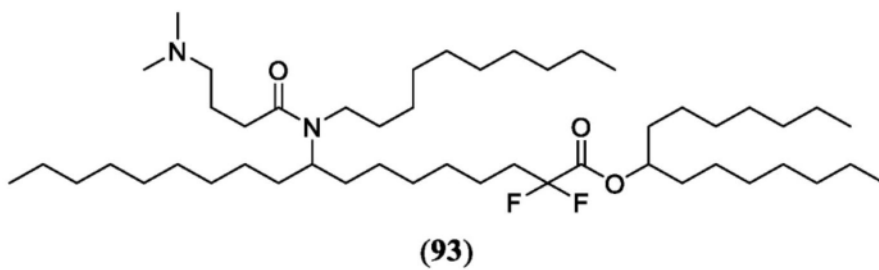
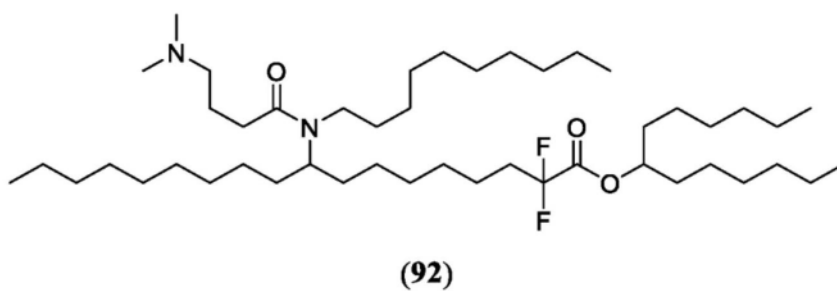
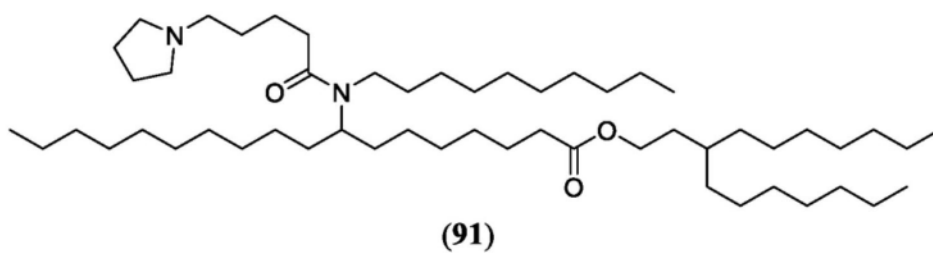
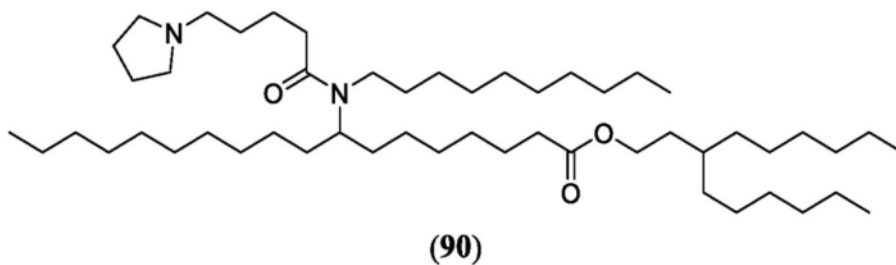
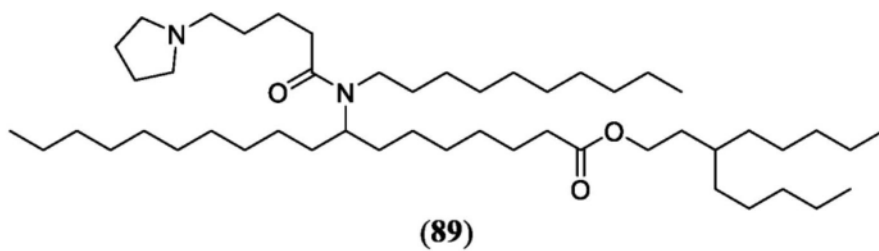
(77)

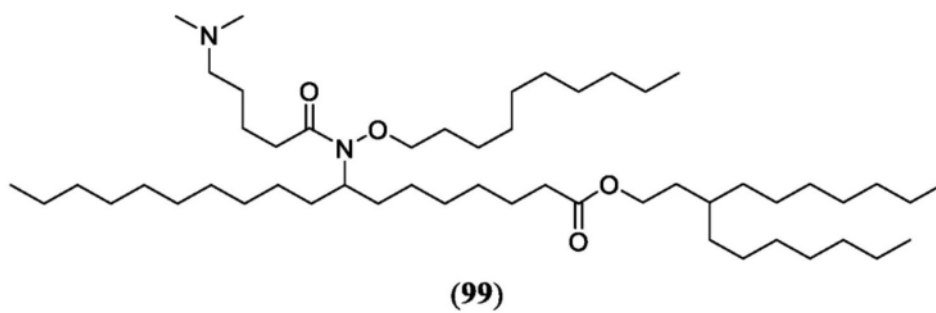
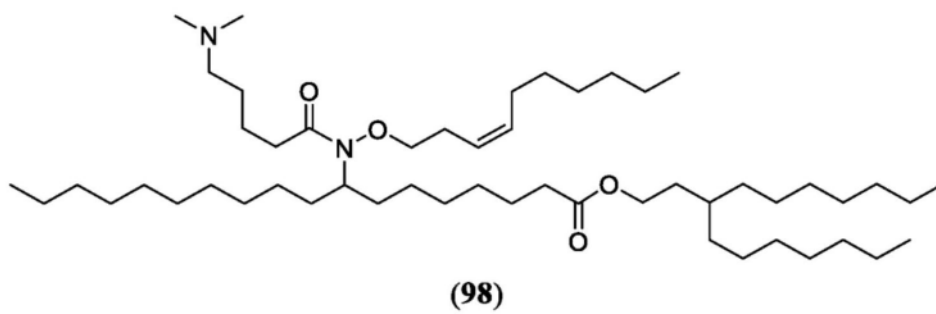
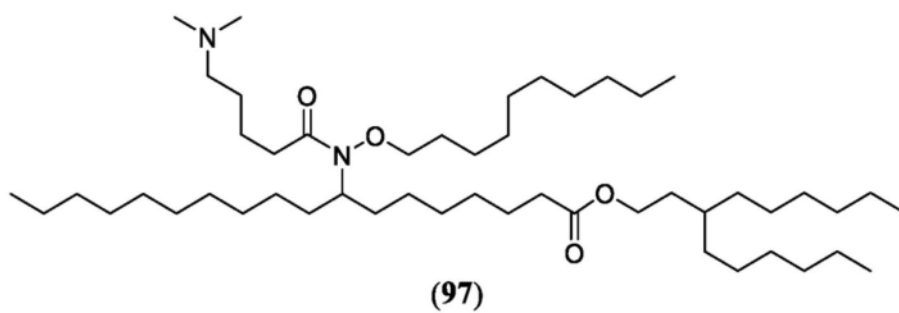
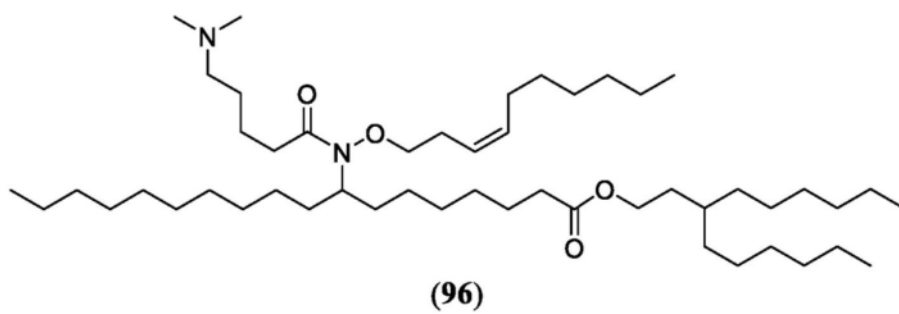
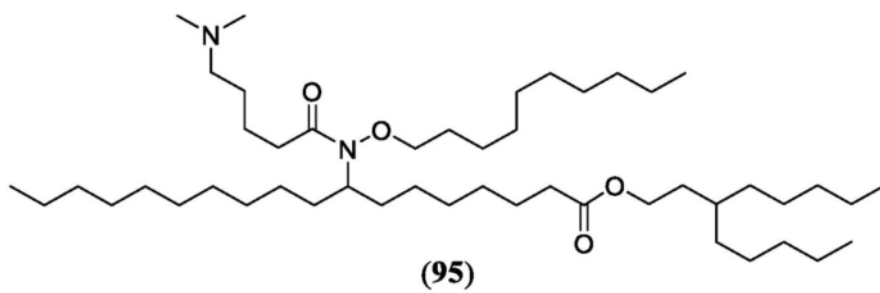


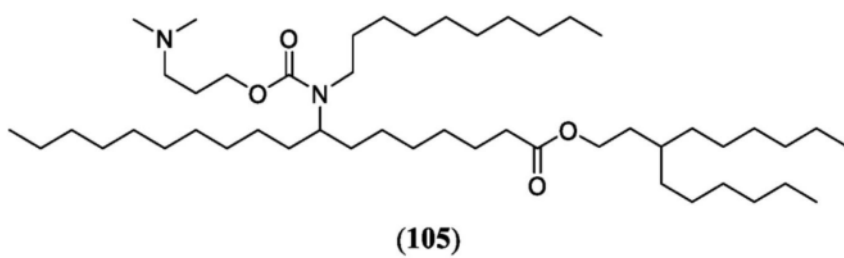
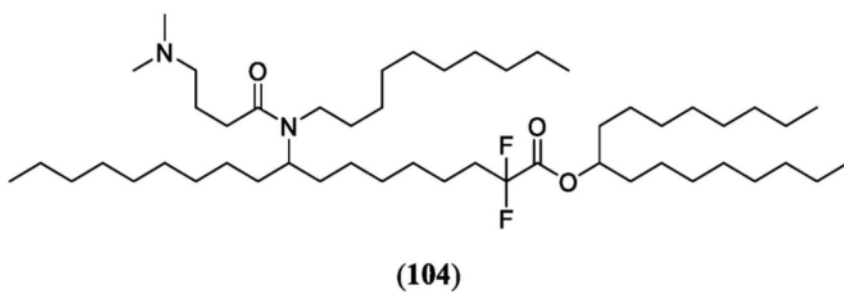
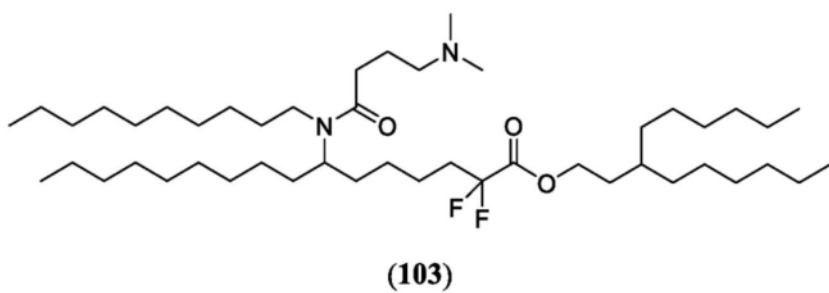
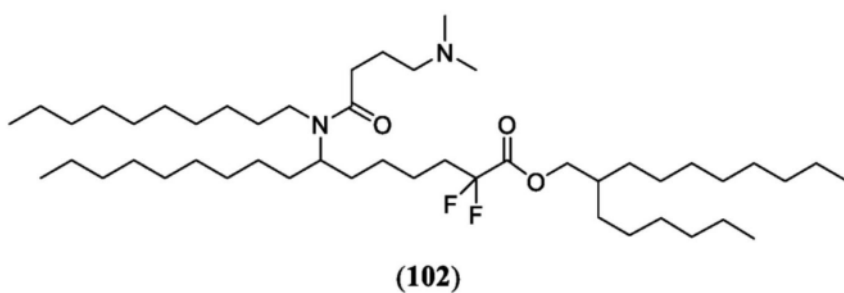
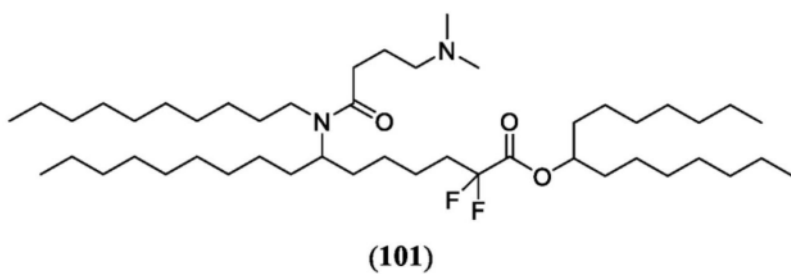
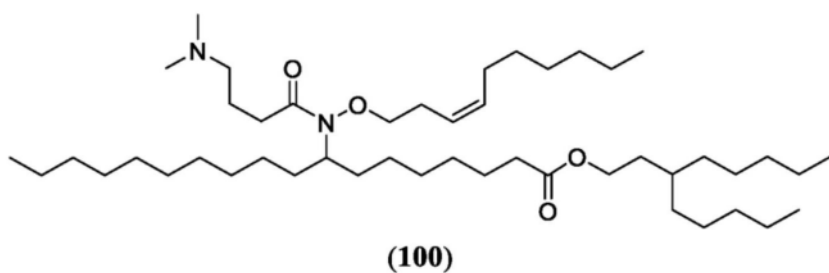
(78)

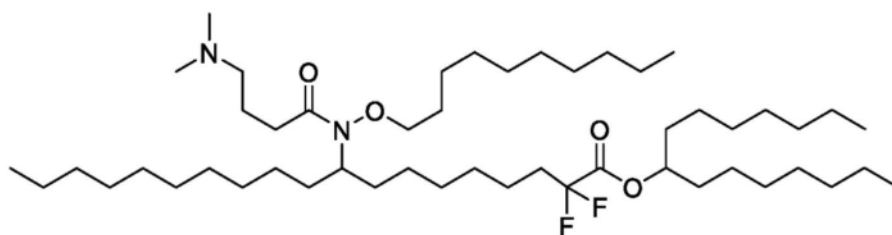




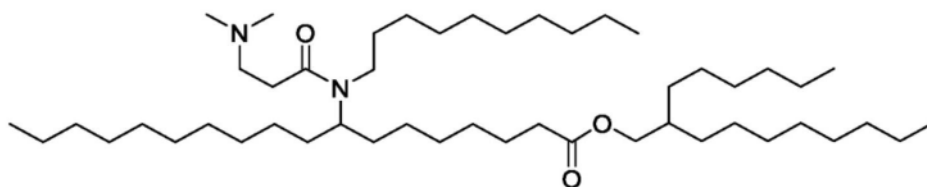




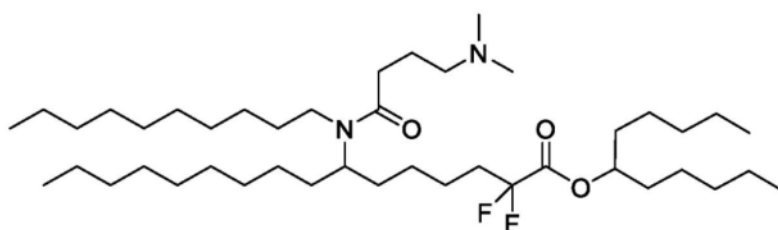




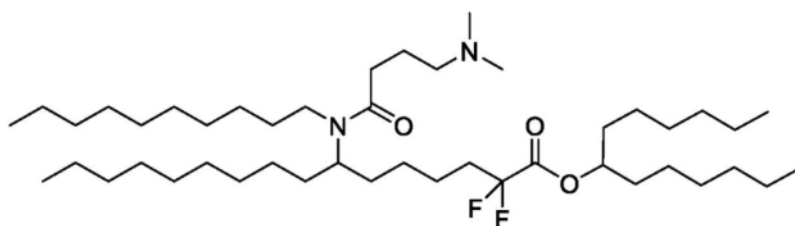
(106)



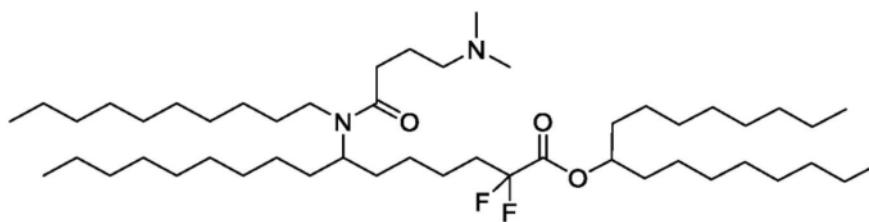
(107)



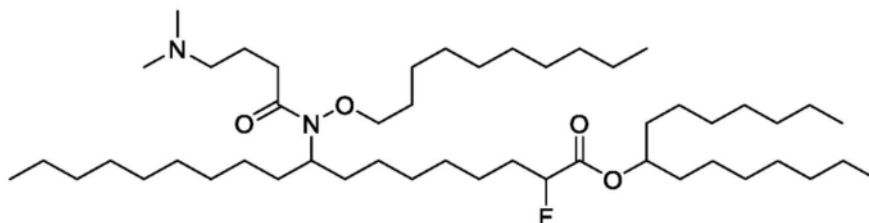
(108)



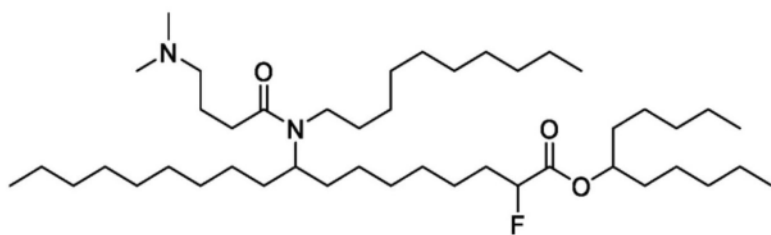
(109)



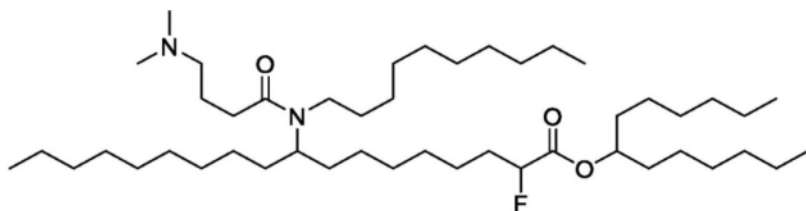
(110)



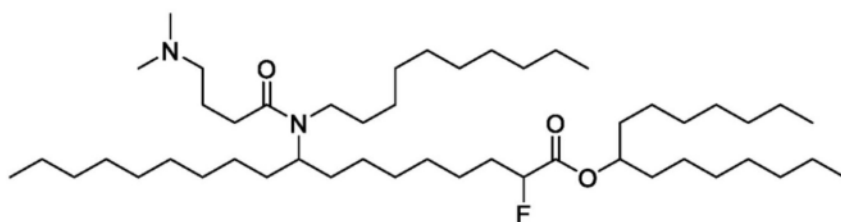
(111)



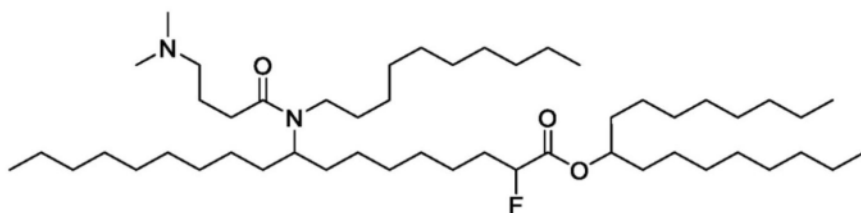
(112)



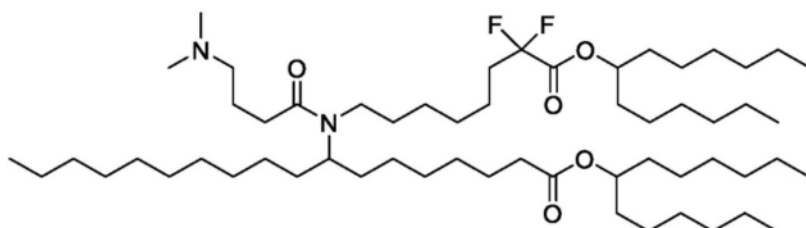
(113)



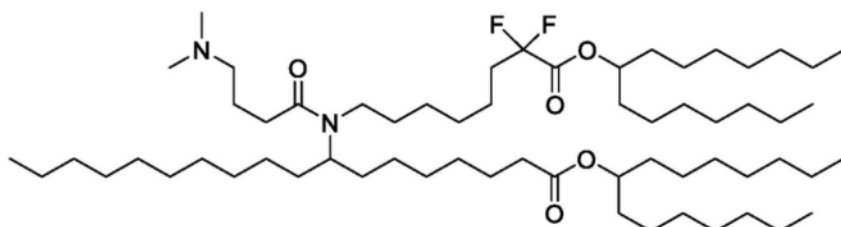
(114)



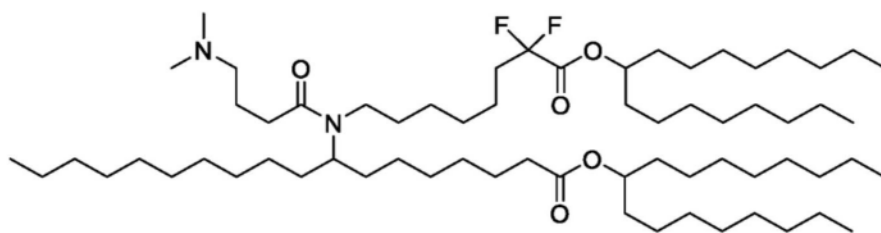
(115)



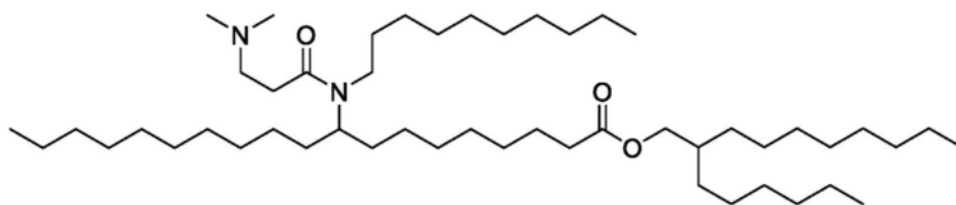
(116)



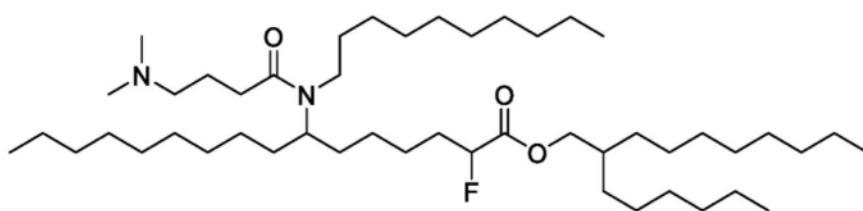
(117)



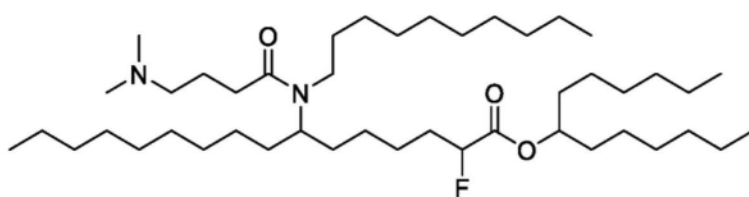
(118)



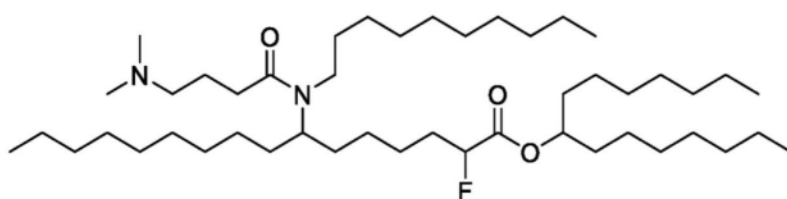
(119)



(120)

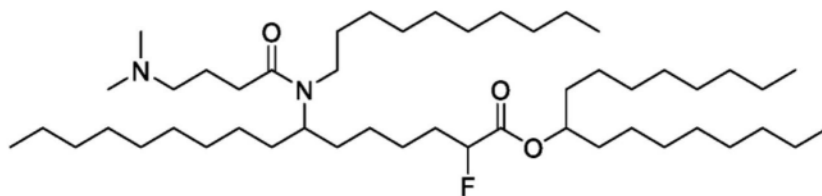


(121)



(122)

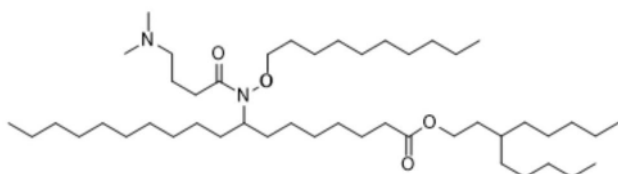
和



(123)

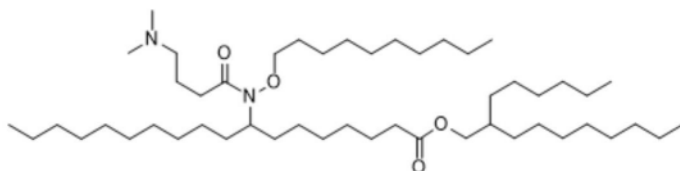
或其盐。

96. 如权利要求1所述的化合物或盐,其是化合物:



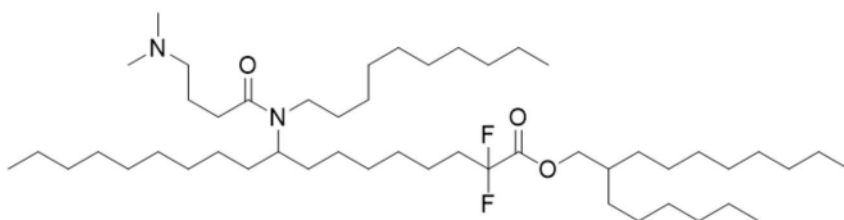
或其盐。

97. 如权利要求1所述的化合物或盐,其是化合物:



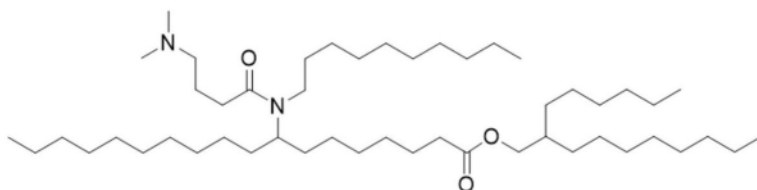
或其盐。

98. 如权利要求1所述的化合物或盐,其是化合物:



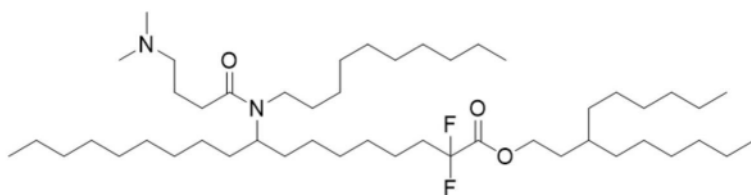
或其盐。

99. 如权利要求1所述的化合物或盐,其是化合物:



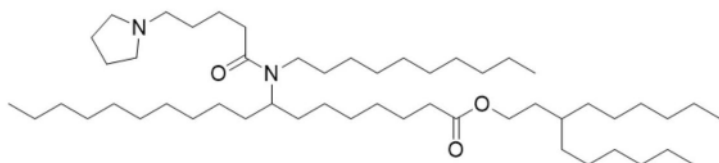
或其盐。

100. 如权利要求1所述的化合物或盐,其是化合物:



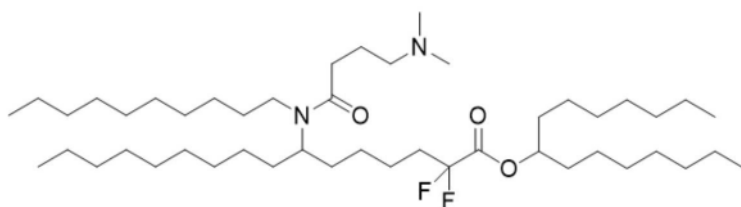
或其盐。

101. 如权利要求1所述的化合物或盐,其是化合物:



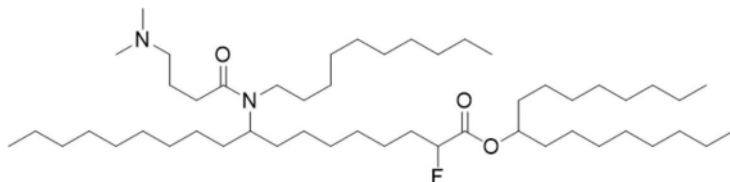
或其盐。

102. 如权利要求1所述的化合物或盐,其是化合物:



或其盐。

103. 如权利要求1所述的化合物或盐,其是化合物:



或其盐。

104. 一种核酸-脂质颗粒,其包含:

- (a) 一种或多种核酸分子;
- (b) 非阳离子脂质;
- (c) 缀合脂质;以及

(d) 如权利要求1-103中任一项所描述的化合物或盐,其中所述一种或多种核酸分子被包封在所述脂质颗粒内。

105. 如权利要求104所述的核酸-脂质颗粒,其中所述化合物或盐占所述颗粒中存在的总脂质的约30mol%至约85mol%;所述非阳离子脂质占所述颗粒中存在的所述总脂质的约13mol%至约49.5mol%;并且所述缀合脂质占所述颗粒中存在的所述总脂质的约0.1mol%至约10mol%。

106. 如权利要求104所述的核酸-脂质颗粒,其中所述化合物或盐占所述颗粒中存在的所述总脂质的约30mol%至约85mol%;所述非阳离子脂质占所述颗粒中存在的所述总脂质的约13mol%至约49.5mol%;并且所述缀合脂质占所述颗粒中存在的所述总脂质的约0.1mol%至约10mol%。

107. 如权利要求104-106中任一项所述的核酸-脂质颗粒,其中所述核酸选自由以下组成的组:小干扰RNA (siRNA)、切丁酶-底物dsRNA、小发夹RNA (shRNA)、不对称干扰RNA (aiRNA)、微小RNA (miRNA)、mRNA、tRNA、rRNA、病毒RNA (vRNA)、自我扩增RNA以及它们的组合。

108. 如权利要求107所述的核酸-脂质颗粒,其中所述核酸是mRNA分子。

109. 如权利要求107所述的核酸-脂质颗粒,其中所述核酸包含双链siRNA分子。

110. 如权利要求109所述的核酸-脂质颗粒,其中所述双链siRNA分子包含至少一个经修饰的核苷酸。

111. 如权利要求110所述的核酸-脂质颗粒,其中所述siRNA包含至少一个2'-O-甲基(2' OMe)核苷酸。

112. 如权利要求104-111中任一项所述的核酸-脂质颗粒,其中所述非阳离子脂质包含胆固醇或其衍生物。

113. 如权利要求112所述的核酸-脂质颗粒,其中所述胆固醇或其衍生物占所述颗粒中

存在的所述总脂质的约31.5mol%至约42.5mol%。

114. 如权利要求104-111中任一项所述的核酸-脂质颗粒,其中所述非阳离子脂质包含磷脂。

115. 如权利要求104-111中任一项所述的核酸-脂质颗粒,其中所述非阳离子脂质包含磷脂与胆固醇或其衍生物的混合物。

116. 如权利要求115所述的核酸-脂质颗粒,其中所述磷脂包含二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)、二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)或它们的混合物。

117. 如权利要求115所述的核酸-脂质颗粒,其中所述磷脂占所述颗粒中存在的所述总脂质的约4mol%至约10mol%,并且所述胆固醇占所述颗粒中存在的所述总脂质的约30mol%至约40mol%。

118. 如权利要求115所述的核酸-脂质颗粒,其中所述磷脂占所述颗粒中存在的所述总脂质的约10mol%至约30mol%,并且所述胆固醇占所述颗粒中存在的所述总脂质的约10mol%至约30mol%。

119. 如权利要求104-118中任一项所述的核酸-脂质颗粒,其中所述缀合脂质包含聚乙二醇(PEG)-脂质缀合物。

120. 如权利要求119所述的核酸-脂质颗粒,其中所述PEG-脂质缀合物包含PEG-二酰基甘油(PEG-DAG)缀合物、PEG-二烷基氧基丙基(PEG-DAA)缀合物或它们的混合物。

121. 如权利要求120所述的核酸-脂质颗粒,其中所述PEG-DAA缀合物包含PEG-二肉豆蔻基氧基丙基(PEG-DMA)缀合物、PEG-二硬脂基氧基丙基(PEG-DSA)缀合物或它们的混合物。

122. 如权利要求120所述的核酸-脂质颗粒,其中所述PEG-DAA缀合物包含PEG-二肉豆蔻基氧基丙基(PEG-DMA)缀合物。

123. 如权利要求119所述的核酸-脂质颗粒,其中所述聚乙二醇(PEG)-脂质缀合物是下式的化合物:

A-B-C

或其盐,其中:

A是(C₁-C₆)烷基、(C₃-C₈)环烷基、(C₃-C₈)环烷基(C₁-C₆)烷基、(C₁-C₆)烷氧基、(C₂-C₆)烯基、(C₂-C₆)炔基、(C₁-C₆)烷酰基、(C₁-C₆)烷氧基羰基、(C₁-C₆)烷硫基或(C₂-C₆)烷酰基氧基,其中任何(C₁-C₆)烷基、(C₃-C₈)环烷基、(C₃-C₈)环烷基(C₁-C₆)烷基、(C₁-C₆)烷氧基、(C₂-C₆)烯基、(C₂-C₆)炔基、(C₁-C₆)烷酰基、(C₁-C₆)烷氧基羰基、(C₁-C₆)烷硫基和(C₂-C₆)烷酰基氧基被一个或多个阴离子前体基团取代,并且其中任何(C₁-C₆)烷基、(C₃-C₈)环烷基、(C₃-C₈)环烷基(C₁-C₆)烷基、(C₁-C₆)烷氧基、(C₂-C₆)烯基、(C₂-C₆)炔基、(C₁-C₆)烷酰基、(C₁-C₆)烷氧基羰基、(C₁-C₆)烷硫基和(C₂-C₆)烷酰基氧基任选地被一个或多个独立地选自以下组成的组的基团取代:卤基、羟基、(C₁-C₃)烷氧基、(C₁-C₆)烷酰基、(C₁-C₃)烷氧基羰基、(C₁-C₃)烷硫基或(C₂-C₃)烷酰基氧基;

B是具有约550道尔顿至约10,000道尔顿的分子量的聚乙二醇链;

C是-L-R^a

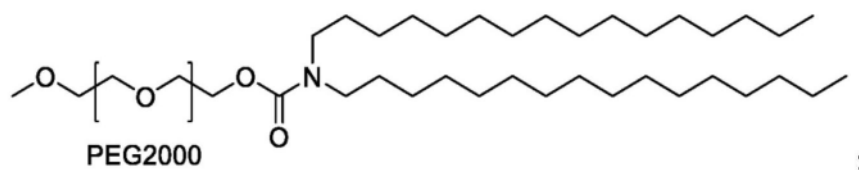
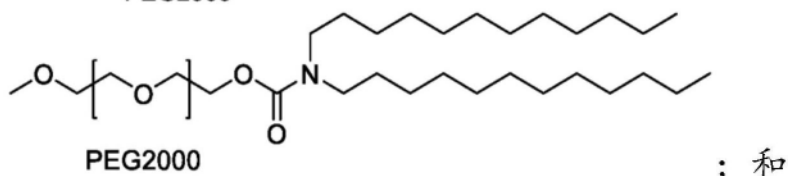
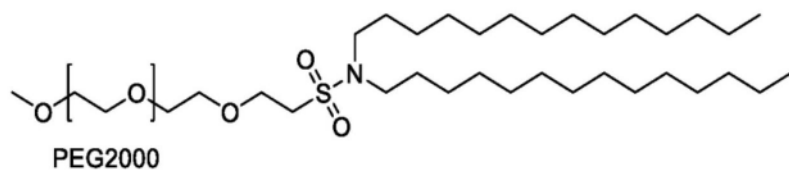
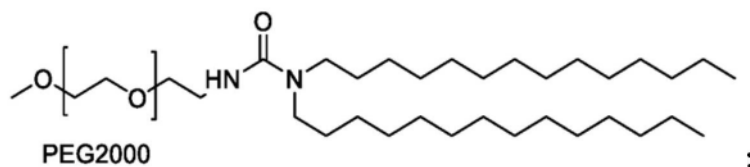
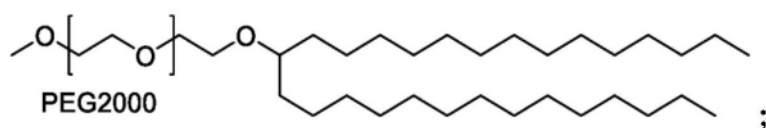
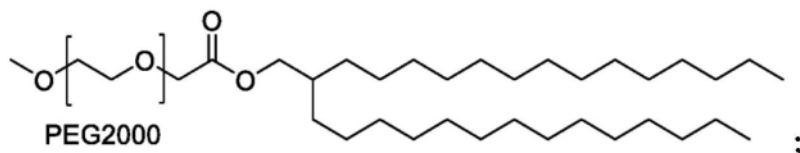
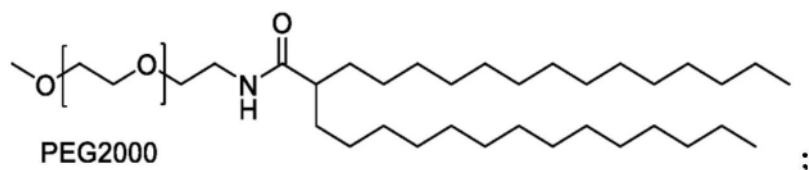
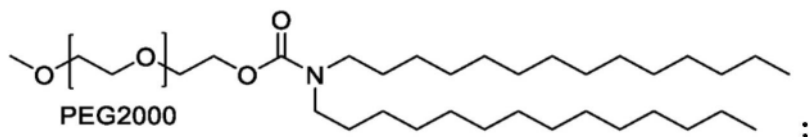
L选自以下组成的组:直接键、-C(O)O-、-C(O)NR^b-、-NR^b-、-C(O)-、-NR^bC(O)O-、-NR^bC(O)NR^b-、-S-S-、-O-、-(O)CCH₂CH₂C(O)-和-NHC(O)CH₂CH₂C(O)NH-;

R^a 是支链 (C_{10} - C_{50}) 烷基或支链 (C_{10} - C_{50}) 烯基, 其中所述支链 (C_{10} - C_{50}) 烷基或支链 (C_{10} - C_{50}) 烯基的一个或多个碳原子已被 -O- 替代; 并且

每个 R^b 独立地为 H 或 (C_1 - C_6) 烷基。

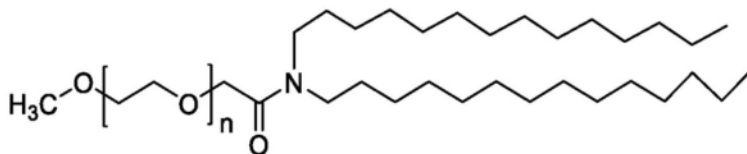
124. 如权利要求 104-123 中任一项所述的核酸-脂质颗粒, 其中所述 PEG 具有约 2,000 道尔顿的平均分子量。

125. 如权利要求 104-118 中任一项所述的核酸-脂质颗粒, 其中所述缀合脂质包含选自以下的 PEG-脂质缀合物:



或其盐。

126. 如权利要求93-107中任一项所述的核酸-脂质颗粒,其中所述缀合脂质包含下式的化合物:



其中n是45-50。

127. 如权利要求104-126中任一项所述的核酸-脂质颗粒,其中所述缀合脂质占所述颗粒中存在的所述总脂质的约1mol%至约2mol%。

128. 如权利要求104-127中任一项所述的核酸-脂质颗粒,其中在将所述核酸-脂质颗粒在37℃下在血清中孵育30分钟后所述颗粒中的所述核酸基本上不降解。

129. 如权利要求104-128中任一项所述的核酸-脂质颗粒,其中所述核酸被完全包封在所述核酸-脂质颗粒中。

130. 如权利要求104-129中任一项所述的核酸-脂质颗粒,其中所述核酸-脂质颗粒具有约5至约15的脂质:核酸质量比。

131. 如权利要求104-129中任一项所述的核酸-脂质颗粒,其中所述核酸-脂质颗粒具有约5至约30的脂质:核酸质量比。

132. 如权利要求104-131中任一项所述的核酸-脂质颗粒,其中所述核酸-脂质颗粒具有约40nm至约150nm的中值直径。

133. 如权利要求104所述的核酸-脂质颗粒,其中所述化合物或盐占所述颗粒中存在的所述总脂质的约56.5mol%至约66.5mol%;所述非阳离子脂质包含占所述颗粒中存在的所述总脂质的约31.5mol%至约42.5mol%的胆固醇或其衍生物;并且PEG-脂质缀合物占所述颗粒中存在的所述总脂质的约1mol%至约2mol%。

134. 如权利要求133所述的核酸-脂质颗粒,其中所述核酸-脂质颗粒包含约61.5mol%的化合物或盐、约36.9%的胆固醇或其衍生物以及约1.5mol%的PEG-脂质缀合物。

135. 如权利要求104所述的核酸-脂质颗粒,其中所述化合物或盐占所述颗粒中存在的所述总脂质的约52mol%至约62mol%;所述非阳离子脂质包含占所述颗粒中存在的所述总脂质的约36mol%至约47mol%的磷脂与胆固醇或其衍生物的混合物;并且所述PEG-脂质缀合物占所述颗粒中存在的所述总脂质的约1mol%至约2mol%。

136. 如权利要求135所述的核酸-脂质颗粒,其中所述核酸-脂质颗粒包含约57.1mol%的化合物或盐、约7.1mol%的磷脂、约34.3mol%的胆固醇或其衍生物以及约1.4mol%的PEG-脂质缀合物。

137. 如权利要求135所述的核酸-脂质颗粒,其中所述核酸-脂质颗粒包含约57.1mol%的化合物或盐、约20mol%的磷脂、约20mol%的胆固醇或其衍生物以及约1.4mol%的PEG-脂质缀合物。

138. 如权利要求104所述的核酸-脂质颗粒,其中所述化合物或盐占所述颗粒中存在的所述总脂质的50mol%至65mol%;所述非阳离子脂质包含磷脂与胆固醇或其衍生物的混合物,其中所述磷脂占所述颗粒中存在的所述总脂质的4mol%至10mol%,并且所述胆固醇或

其衍生物占所述颗粒中存在的所述总脂质的30mol%至40mol%；并且所述缀合脂质占所述颗粒中存在的所述总脂质的0.5mol%至2mol%。

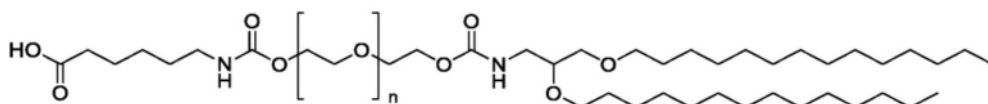
139. 如权利要求104所述的核酸-脂质颗粒,其中所述化合物或盐占所述颗粒中存在的所述总脂质的50mol%至65mol%；所述非阳离子脂质包含磷脂与胆固醇或其衍生物的混合物,其中所述磷脂占所述颗粒中存在的所述总脂质的3mol%至15mol%,并且所述胆固醇或其衍生物占所述颗粒中存在的所述总脂质的30mol%至40mol%；并且所述缀合脂质占所述颗粒中存在的所述总脂质的0.5mol%至2mol%。

140. 如权利要求104所述的核酸-脂质颗粒,其中所述化合物或盐占所述颗粒中存在的所述总脂质的50mol%至65mol%；所述非阳离子脂质占所述颗粒中存在的所述总脂质的至多49.5mol%；所述胆固醇或其衍生物占所述颗粒中存在的所述总脂质的30mol%至40mol%；并且所述缀合脂质占所述颗粒中存在的所述总脂质的0.5mol%至2mol%。

141. 如权利要求104所述的核酸-脂质颗粒,其中所述化合物或盐占所述颗粒中存在的所述总脂质的50mol%至85mol%；所述非阳离子脂质占所述颗粒中存在的所述总脂质的13mol%至49.5mol%；并且所述缀合脂质占所述颗粒中存在的所述总脂质的0.5mol%至2mol%。

142. 如权利要求104所述的核酸-脂质颗粒,其中所述化合物或盐占所述颗粒中存在的所述总脂质的约30mol%至约50mol%；所述非阳离子脂质包含占所述颗粒中存在的所述总脂质的约47mol%至约69mol%的磷脂与胆固醇或其衍生物的混合物；并且所述PEG-脂质缀合物占所述颗粒中存在的所述总脂质的约1mol%至约3mol%。

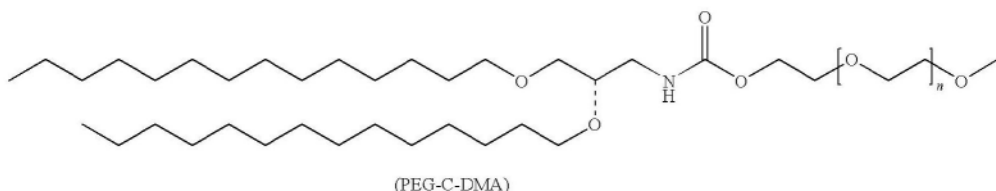
143. 如权利要求104所述的核酸-脂质颗粒,其中所述非阳离子脂质包含胆固醇与DSPC的混合物；所述缀合脂质是：



其中选择n,使得所得聚合物链具有约2000道尔顿的分子量

其中所述缀合脂质占所述颗粒中存在的所述总脂质的约2mol%；DSPC占所述颗粒中存在的所述总脂质的约10mol%；胆固醇占所述颗粒中存在的所述总脂质的约48mol%；并且所述化合物或盐占所述颗粒中存在的所述总脂质的约40mol%。

144. 如权利要求104所述的核酸-脂质颗粒,其中所述非阳离子脂质包含胆固醇与DSPC的混合物；所述缀合脂质是：

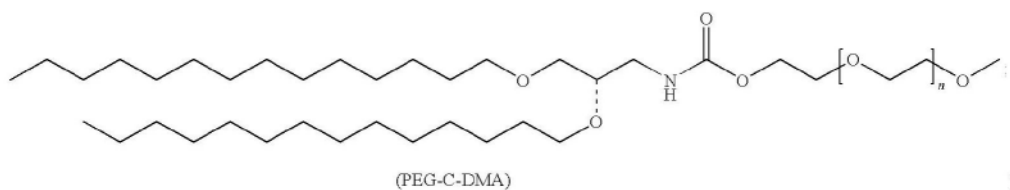


其中选择n,使得所得聚合物链具有约2000道尔顿的分子量；

其中所述缀合脂质占颗粒中存在的总脂质的约2mol%；DSPC占颗粒中存在的总脂质的约10mol%；胆固醇占颗粒中存在的总脂质的约48mol%；并且化合物或盐占颗粒中存在的总脂质的约40mol%。

145. 如权利要求104所述的核酸-脂质颗粒,其中所述非阳离子脂质包含胆固醇与DSPC

的混合物;所述缀合脂质是:



其中选择n,使得所得聚合物链具有约2000的分子量;

其中所述缀合脂质占所述颗粒中存在的所述总脂质的约1.6mol%;DSPC占所述颗粒中存在的所述总脂质的约10.9mol%;胆固醇占所述颗粒中存在的所述总脂质的约32.8mol%;并且所述化合物或盐占所述颗粒中存在的所述总脂质的约54.9mol%。

146.如权利要求142-145中任一项所述的核酸-脂质颗粒,其中所述脂质与核酸比率是约24。

147.如权利要求104-146中任一项所述的核酸-脂质颗粒,其包含两种或更多种权利要求1-103中任一项所述的化合物或盐。

148.一种药物组合物,其包含如权利要求104-147中任一项所述的核酸-脂质颗粒和药学上可接受的载体。

149.一种用于将核酸引入到细胞中的方法,所述方法包括:

使所述细胞与权利要求104-147中任一项所述的核酸-脂质颗粒或如权利要求148所述的组合物接触。

150.如权利要求149所述的方法,其中所述细胞在哺乳动物体内。

151.一种用于体内递送核酸的方法,所述方法包括:

向哺乳动物受试者施用如权利要求104-147中任一项所述的核酸-脂质颗粒或如权利要求148所述的组合物。

152.如权利要求151所述的方法,其中所述施用选自以下组成的组:口服、鼻内、静脉内、腹膜内、肌肉内、关节内、病灶内、气管内、皮下和皮内。

153.如权利要求104-147中任一项所述的核酸-脂质颗粒或如权利要求148所述的组合物,其用于将核酸体内递送至哺乳动物。

154.如权利要求104-147中任一项所述的核酸-脂质颗粒或如权利要求148所述的组合物用于制备用于将核酸体内递送至哺乳动物的药剂的用途。

155.一种用于治疗有需要的哺乳动物受试者的疾病或病症的方法,所述方法包括:

向所述哺乳动物受试者施用治疗有效量的权利要求104-147中任一项所述的核酸-脂质颗粒或如权利要求148所述的组合物。

156.如权利要求155所述的方法,其中所述疾病或病症选自以下组成的组:病毒感染、肝脏疾病或病症以及癌症。

157.如权利要求104-147中任一项所述的核酸-脂质颗粒或如权利要求148所述的组合物,其用于治疗哺乳动物的疾病或病症。

158.如权利要求104-147中任一项所述的核酸-脂质颗粒或如权利要求148所述的组合物用于制备用于治疗哺乳动物的疾病或病症的药剂的用途。

用于脂质纳米颗粒的可电离阳离子脂质

[0001] 优先权

[0002] 本申请要求2021年1月31日提交的美国临时专利申请第63/305,181号的优先权。此美国临时专利申请的全部内容特此通过引用并入本文。

背景技术

[0003] 可电离阳离子脂质通常是脂质纳米颗粒 (LNP) 中的主要脂质组分。它们被设计为在标准生理pH (约7) 下为电荷中性,但在较低 (酸性) pH下获得正电荷。这有助于在LNP形成过程中的核酸有效载荷包封,并且由于内体融合步骤需要可电离脂质上的正电荷而有助于细胞内递送。

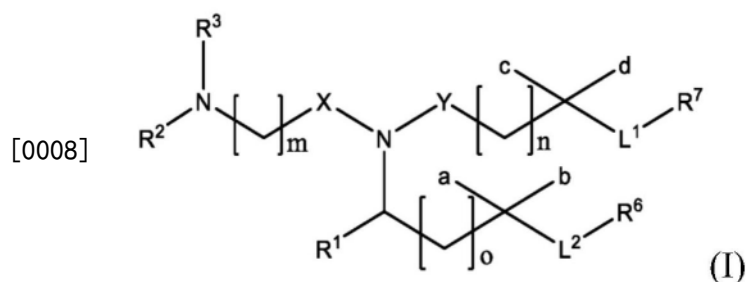
[0004] 可电离脂质如MC3 (用于FDA批准的siRNA-LNP产品Onpattro中) 和3D-P-DMA在各种应用中表现出优异的活性和耐受性。然而,它们不能快速代谢,并且它们需要数周来从靶组织中清除。这使得它们对于需要多次给药的应用不太有吸引力,特别是对于短剂量间隔和/或慢性适应症。

[0005] 目前,需要表现出改善的清除率、同时在其递送核酸的能力方面保持良好活性的可电离脂质。还需要具有有益的或改善的生物降解性的可电离脂质。

发明内容

[0006] 本发明提供了具有改善的生物降解性和/或清除率的可电离脂质。

[0007] 在一个实施方案中,本发明提供了一种可电离脂质,所述可电离脂质是式 (I) 化合物:



[0009] 或其盐,其中:

[0010] X是-CH₂-、-O-、-O(C=O)或-C(=O)-

[0011] Y是-CH₂-、-O-、-SO₂-或-C(=O)-;

[0012] R¹是C₂-C₂₅烷基;

[0013] R²是C₁-C₃烷基;并且R³是C₁-C₃烷基;或者R²和R³与它们所连接的氮一起形成氮杂环丙烷子基、氮杂环丁烷子基或吡咯烷子基环;

[0014] m是0、1、2、3、4、5或6;

[0015] n是0-15;

[0016] o是0-15;

[0017] L¹不存在、是-(C=O)-O-、-(C=O)N(H)N(R⁴)-、-(C=O)N(H)-N=C(R⁴)-、-(C=O)N

(H)N(H)C(R⁴)(R⁵)-、-(C=O)-O-CH₂-R^z或-O(C=O)-R^w-;

[0018] L²不存在、是-(C=O)-O-、-(C=O)N(H)N(R^{4'})-、-(C=O)N(H)-N=C(R^{4'})-、-(C=O)N(H)N(H)C(R^{4'})(R^{5'})-、-(C=O)-O-CH₂-R^{z'}或-O(C=O)-R^x-

[0019] a是H或F;

[0020] b是H或F;

[0021] c是H或F;并且d是H或F;或者c和d与它们所连接的碳一起形成-C(=O)-

[0022] R⁴是H或C₂-C₂₅烷基;

[0023] R⁵是H或C₂-C₂₅烷基;

[0024] R^{4'}是H或C₂-C₂₅烷基;

[0025] R^{5'}是H或C₂-C₂₅烷基;

[0026] R⁶是C₂-C₂₅烷基;

[0027] R⁷是C₂-C₂₅烷基;

[0028] R^w不存在、是-C(F)H-或-C(F)₂-;

[0029] R^x不存在、是-C(F)H-或-C(F)₂-;

[0030] R^z是被1、2或3个独立地选自C₂-C₁₀烷基的基团取代的苯基;并且

[0031] R^{z'}是被1、2或3个独立地选自C₂-C₁₀烷基的基团取代的苯基。

[0032] 本发明还提供了一种组合物,所述组合物包含1)本发明的可电离脂质,和2)活性剂或治疗剂。

[0033] 本发明还提供了一种脂质纳米颗粒,所述脂质纳米颗粒包含本发明的可电离脂质。

[0034] 本发明还提供了一种脂质纳米颗粒,所述脂质纳米颗粒包含:(a)一种或多种活性剂或治疗剂;(b)本发明的可电离脂质;(c)非阳离子脂质;

[0035] 和(d)缀合脂质。通常,一种或多种剂被包封在脂质纳米颗粒内。

[0036] 本发明还提供了一种药物组合物,所述药物组合物包含:1)本发明的可电离脂质,和2)一种或多种活性剂或治疗剂。

[0037] 本发明还提供了一种药物组合物,所述药物组合物包含本发明的脂质纳米颗粒和药学上可接受的载体。

[0038] 本发明还提供了一种用于向动物递送活性剂或治疗剂(例如核酸)的方法,所述方法包括向所述动物施用本发明的纳米颗粒。

[0039] 本发明还提供了一种用于将核酸引入细胞中的方法,所述方法包括使所述细胞在体内、离体或体外与本文所述的核酸-脂质颗粒接触。

[0040] 本发明还提供了一种用于治疗动物的疾病或病症的方法,所述方法包括向所述动物施用治疗有效量的本文所述的核酸-脂质颗粒。

[0041] 本发明还提供了本文公开的可用于制备本发明的化合物、制剂或纳米颗粒的方法和中间体。

具体实施方式

[0042] 定义

[0043] 如本文所用,除非另外指明,否则以下术语具有赋予其的含义。

[0044] 如本文所用的术语“烃基”描述由约4至约500个选自碳和氢的原子组成的有机化合物或基团。某些特定烃基部分具有指定的碳原子数,例如, C_2-C_{25} 烃基是具有2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个碳原子和多达52个氢原子的烃,其取决于不饱和度水平。烃基部分包括但不限于支链或非支链烷基、支链或非支链烯基、支链或非支链炔基、环烷基和芳基部分。在一个实施方案中,烃基由约4至约400个选自碳和氢的原子组成。在一个实施方案中,烃基由约4至约300个选自碳和氢的原子组成。在一个实施方案中,烃基由约4至约200个选自碳和氢的原子组成。在一个实施方案中,烃基由约4至约100个选自碳和氢的原子组成。在一个实施方案中,烃基由约4至约62个选自碳和氢的原子组成。在一个实施方案中,烃基由约20至约500个选自碳和氢的原子组成。在一个实施方案中,烃基由约20至约400个选自碳和氢的原子组成。在一个实施方案中,烃基由约20至约300个选自碳和氢的原子组成。在一个实施方案中,烃基由约20至约200个选自碳和氢的原子组成。在一个实施方案中,烃基由约20至约100个选自碳和氢的原子组成。在一个实施方案中,烃基由约20至约62个选自碳和氢的原子组成。在一个实施方案中,烃基由约40至约500个选自碳和氢的原子组成。在一个实施方案中,烃基由约40至约400个选自碳和氢的原子组成。在一个实施方案中,烃基由约40至约300个选自碳和氢的原子组成。在一个实施方案中,烃基由约40至约200个选自碳和氢的原子组成。在一个实施方案中,烃基由约40至约100个选自碳和氢的原子组成。在一个实施方案中,烃基由约40至约62个选自碳和氢的原子组成。在一个实施方案中,烃基由至少约20、至少约40、至少约60或至少约80个选自碳和氢的原子组成。在一个实施方案中,烃基由少于约500个、少于约400个、少于约300个、少于约200个或少于约100个选自碳和氢的原子组成。

[0045] 除非另有说明,否则术语“烷基”本身或作为另一个取代基的一部分是指具有指定的碳原子数(即, C_{1-8} 表示一个至八个碳)的直链或支链烃基团。实例包括(C_1-C_8)烷基、(C_2-C_8)烷基、(C_1-C_6)烷基、(C_2-C_6)烷基和(C_3-C_6)烷基。烷基的实例包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、叔丁基、异丁基、仲丁基、正戊基、正己基、正庚基、正辛基以及更高级同系物和异构体。

[0046] 术语“烯基”是指具有一个或多个(例如,1、2、3或4个)双键的不饱和烷基。此类不饱和烷基的实例包括乙烯基、2-丙烯基、巴豆基、2-异戊烯基、2-(丁二烯基)、2,4-戊二烯基、3-(1,4-戊二烯基)以及高级同系物和异构体。

[0047] 术语“炔基”是指具有一个或多个(例如,1、2、3或4个)三键的不饱和烷基。此类不饱和烷基的实例包括乙炔基、1-丙炔基和3-丙炔基、3-丁炔基以及高级同系物和异构体。

[0048] 术语“烷氧基”是指经由氧原子(“氧基”)与分子的其余部分连接的烷基。

[0049] 术语“烷硫基”是指经由硫基连接到分子其余部分的烷基。

[0050] 术语“环烷基”是指具有3至8个碳原子的饱和或部分不饱和(非芳香族)全碳环(即(C_3-C_8)碳环)。所述术语还包括多缩合的、饱和的全碳环系统(例如,包含2、3或4个碳环的环系统)。相应地,碳环包括多环碳环,如二环碳环(例如,具有约3至15个碳原子、约6至15个碳原子或6至12个碳原子的二环碳环,如双环[3.1.0]己烷和双环[2.1.1]己烷),以及多环碳环(例如,具有最多约20个碳原子的三环和四环碳环)。当化合价需要允许时,多缩合环系统的环可通过稠合、螺和桥接键彼此连接。例如,多环碳环可通过单个碳原子彼此连接以形成螺环连接(例如,螺戊烷、螺[4,5]癸烷等)、通过两个相邻的碳原子彼此连接以形成稠合连

接(例如,碳环,诸如十氢萘、降桉烷(norsabinane)、降薷烷),或通过两个不相邻的碳原子彼此连接以形成桥接连接(例如,降冰片烷、双环[2.2.2]辛烷等)。环烷基的非限制性实例包括环丙基、环丁基、环戊基、环己基、双环[2.2.1]庚烷、蒾烷和金刚烷。

[0051] 如本文所用的术语“芳基”是指单个全碳芳环或多缩合全碳环系统,其中至少一个环为芳族。例如,在某些实施方案中,芳基具有6至20个碳原子、6至14个碳原子、6至12个碳原子或6至10个碳原子。芳基包括苯基。芳基还包括具有约9至20个碳原子的多缩合碳环系统(例如,包含2、3或4个环的环系统),其中至少一个环是芳族,并且其中其它环可以是芳族或不是芳族(即环烷基)。当化合价需要允许时,多缩合环系统的环可通过稠合、螺和桥接键彼此连接。应当理解,如上文所定义的多缩合环系统的连接点可以是环系统的任何位置,包括环的芳族或碳环部分。芳基的非限制性实例包括但不限于苯基、茛基、茛满基、萘基、1,2,3,4-四氢萘基、蒽基等。

[0052] 术语“干扰RNA”或“RNAi”或“干扰RNA序列”是指在干扰RNA处于与靶基因或序列相同的细胞中时,能够减少或抑制靶基因或序列的表达(例如,通过介导降解或抑制与干扰RNA序列互补的mRNA的翻译)的单链RNA(例如,成熟miRNA)或双链RNA(即,双链体RNA,如siRNA、aiRNA或前体miRNA)。干扰RNA因此是指与靶mRNA序列互补的单链RNA或由两条互补链或由单条自身互补链形成的双链RNA。干扰RNA可与靶基因或序列基本同一或完全同一,或者可包含错配区(即,错配基序)。干扰RNA的序列可对应于全长靶基因或其子序列。

[0053] 干扰RNA包括“小干扰RNA”或“siRNA”,例如长度为约15-60、15-50或15-40个(双链体)核苷酸的干扰RNA,更通常地长度为约15-30、15-25或19-25个(双链体)核苷酸,并且优选地长度为约20-24、21-22或21-23个(双链体)核苷酸(例如,双链siRNA的每个互补序列的长度均为15-60、15-50、15-40、15-30、15-25或19-25个核苷酸,优选地长度为约20-24、21-22或21-23个核苷酸,并且双链siRNA的长度为约15-60、15-50、15-40、15-30、15-25或19-25个碱基对,优选地长度为约18-22、19-20或19-21个碱基对)。siRNA双链体可包含约1至约4个核苷酸或约2至约3个核苷酸的3'突出端和5'磷酸酯末端。siRNA的实例包括但不限于:由两个分开链分子组装的双链多核苷酸分子,其中一条链为有义链并且另一个为互补反义链;由单链分子组装的双链多核苷酸分子,其中有义区和反义区由基于核酸或基于非核酸的接头连接;具有带自身互补有义区和反义区的发夹二级结构的双链多核苷酸分子;以及具有带自身互补有义区和反义区的两个或更多个环结构和一个茎结构的环形单链多核苷酸分子,其中环形多核苷酸可在体内或体外加工以产生活性双链siRNA分子。

[0054] 优选地,化学合成siRNA。还可通过用大肠杆菌RNA酶III或切丁酶裂解较长的dsRNA(例如,长度大于约25个核苷酸的dsRNA)来产生siRNA。这些酶将dsRNA加工成生物活性的siRNA(参见,例如Yang等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,99:9942-9947(2002); Calegari等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,99:14236(2002); Byrom等人,Ambion TechNotes,10(1):4-6(2003); Kawasaki等人,Nucleic Acids Res.,31:981-987(2003); Knight等人,Science,293:2269-2271(2001);以及Robertson等人,J.Biol.Chem.,243:82(1968))。优选地,dsRNA的长度为至少50个核苷酸至约100、200、300、400或500个核苷酸。dsRNA的长度可长达1000、1500、2000、5000个核苷酸或更长。dsRNA可编码整个基因转录物或部分基因转录物。在某些实例中,可由质粒编码siRNA(例如,转录为自动折叠到具有发夹环的双链体中的序列)。

[0055] 如本文所使用,术语“错配基序”或“错配区”是指对其靶序列不具有100%互补性的干扰RNA(例如,siRNA、aiRNA、miRNA)序列的一部分。干扰RNA可具有至少一个、两个、三个、四个、五个、六个或更多个错配区。错配区可为邻接的或者可由1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12或更多个核苷酸隔开。错配基序或区可包含单个核苷酸或者可包含两个、三个、四个、五个或更多个核苷酸。

[0056] 诸如核酸(例如,干扰RNA或mRNA)的活性剂或治疗剂的“有效量”或“治疗有效量”是足以产生所需效果,例如与不存在干扰RNA的情况下检测到的正常表达水平相比抑制靶序列的表达;或抑制一定量的蛋白质的mRNA定向表达的量,在表达所述蛋白质的生物体中引起理想的生物学效应。当相对于对照使用干扰RNA获得的值为约90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、5%或0%时,实现靶基因或靶序列的表达的抑制。在其他实施方案中,所表达的蛋白质是通常在体内细胞类型中表达的蛋白质的活性形式,并且mRNA的治疗有效量是产生为通常在健康个体的细胞类型中表达的蛋白质的量的至少50%(例如,至少60%或至少70%或至少80%或至少90%)的量的所编码蛋白质的量。用于测量靶基因或靶序列的表达的合适测定包括,例如,使用本领域技术人员已知的技术(如斑点印迹、RNA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检查蛋白质或RNA水平。

[0057] 由干扰RNA引起的免疫应答“减小(decrease)”、“减小(decreasing)”、“减少(reduce)”或“减少(reducing)”旨在意指给定干扰RNA(例如,经修饰的干扰RNA)的免疫应答的可检测的减小。可相对于存在未修饰的干扰RNA情况下的免疫应答水平确定由经修饰的干扰RNA引起的免疫应答的减小量。可检测的减小可比在存在未修饰的干扰RNA情况下检测到的免疫应答低约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%或更多。通常通过由体外应答细胞引起的细胞因子产生减少(例如,IFN γ 、IFN α 、TNF α 、IL-6或IL-12)或在施用干扰RNA之后哺乳动物受试者的血清中的细胞因子产生减少来测量干扰RNA的免疫应答减小。

[0058] 由mRNA引起的免疫应答“减小(decrease)”、“减小(decreasing)”、“减少(reduce)”或“减少(reducing)”旨在意指对给定mRNA(例如,经修饰的mRNA)的免疫应答的可检测的减小。可相对于存在未修饰的mRNA情况下的免疫应答水平确定由经修饰的mRNA引起的免疫应答的减小量。可检测的减小可比在存在未修饰的mRNA情况下检测到的免疫应答低约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%或更多。通常通过由体外应答细胞引起的细胞因子产生减少(例如,IFN γ 、IFN α 、TNF α 、IL-6或IL-12)或在施用mRNA之后哺乳动物受试者的血清中的细胞因子产生减少来测量mRNA的免疫应答减小。

[0059] 如本文所使用,术语“应答细胞”是指在与免疫刺激性干扰RNA如未修饰的siRNA接触时产生可检测的免疫应答的细胞,优选为哺乳动物细胞。示例性的应答细胞包括例如树突细胞、巨噬细胞、外周血单核细胞(PBMC)、脾细胞等。可检测的免疫应答包括例如产生细胞因子或生长因子如TNF- α 、IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-12、IL-13、TGF及其组合。

[0060] “基本同一性”是指序列在严格条件下与参考序列杂交,或指在参考序列的指定区上具有指定同一性百分比的序列。

[0061] 短语“严格杂交条件”是指在所述条件下,通常在核酸的复杂混合物中,核酸将与其靶序列杂交但不与其他序列杂交的条件。严格条件是序列依赖性的并且在不同的环境中将是不同的。较长的序列在较高温度下特异性地杂交。核酸杂交的详尽指南参见Tijssen, *Techniques in Biochemistry and Molecular Biology—Hybridization with Nucleic Probes*, “Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays” (1993)。通常,将严格条件选择为比限定离子强度pH下的特定序列的热熔点(T_m)低约5°C-10°C。 T_m 是在所述温度下处于平衡时50%互补于靶标的探针杂交于靶序列(因为靶序列过量存在,所以在 T_m 下,在平衡时50%的探针被占据)的温度(在限定的离子强度、pH和核酸浓度下)。严格条件还可通过添加去稳定剂如甲酰胺来实现。针对选择性或特异性杂交,阳性信号为背景的至少两倍,优选地为背景杂交的10倍。

[0062] 示例性严格性杂交条件可如下:50%甲酰胺、5×SSC和1% SDS,在42°C孵育,或者5×SSC、1% SDS,在65°C孵育,其中在0.2×SSC和0.1% SDS中在65°C下洗涤。对应PCR,低严格性扩增的温度通常为约36°C,虽然退火温度可取决于引物长度在约32°C与48°C之间变化。对于高严格性PCR扩增,通常的温度为约62°C,虽然高严格性退火温度可取决于引物长度和特异性在约50°C至约65°C的范围内。通常用于高严格性和低严格性扩增的循环条件包括90°C-95°C的变性阶段持续30秒-2分钟、持续30秒-2分钟的退火阶段以及约72°C的延伸阶段持续1-2分钟。用于低严格性和高严格性扩增反应的方案和指导提供于例如Innis等人, *PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, Inc. N.Y. (1990)中。

[0063] 如果它们编码的多肽基本上相同,则在严格条件下不彼此杂交的核酸仍然是基本上相同的。例如,当使用遗传密码所允许的最大密码子简并性而生成核酸的拷贝时,发生这种情况。在此类情况下,核酸通常在中等严格杂交条件下杂交。示例性“中等严格杂交条件”包括在37°C下、在40%甲酰胺、1M NaCl、1% SDS的缓冲液中杂交,并且在45°C下在1×SSC中洗涤。阳性杂交为背景的至少两倍。本领域技术人员将很容易地认识到,可使用替代的杂交和洗涤条件来提供类似严格性的条件。用于确定杂交参数的另外指导提供于许多参考文献中,例如 *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel等编著。

[0064] 在两种或更多种核酸背景下的术语“基本同一(substantially identical)”或“基本同一性(substantial identity)”是指当在使用以下序列比较算法之一或通过手动比对和目测检查所测量的比较窗口或指定区上比较并且比对最大对应性时,相同的或具有指定百分比的相同核苷酸(即,在指定区上至少约60%、优选地至少约65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%同一性)的两个或更多个序列或子序列。当上下文指明时,这个定义还类似地指序列的互补序列。优选地,基本同一性存在于长度为至少约5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55或60个核苷酸的区上。

[0065] 对于序列比较,通常一个序列充当参考序列,测试序列与其进行比较。当使用序列比较算法时,将测试序列和参考序列输入到计算机中,如果需要,指定子序列坐标,并且指定序列算法程序参数。可使用默认程序参数或者可指定替代参数。序列比较算法然后基于程序参数计算测试序列相对于参考序列的序列同一性百分比。

[0066] 如本文所使用的“比较窗口”包括涉及多个连续位置中的任一个区段,所述连续位置选自约5至约60、通常约10至约45、更通常约15至约30组成的组,其中在两个序列最佳

对比之后,可将一个序列与相同数目的连续位置的参考序列比较。比对用于比较的序列的方法是本领域中熟知的。可通过以下方法来进行序列的最佳比对以供比较,例如Smith和Waterman, *Adv. Appl. Math.*, 2:482 (1981) 的局部同源性算法;Needleman和Wunsch, *J. Mol. Biol.*, 48:443 (1970) 的同源性比对算法;Pearson和Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:2444 (1988) 的相似性搜索法;这些算法的计算机实施(威斯康辛遗传学软件包(Wisconsin Genetics Software Package)中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.);或手动比对和目视检查(参见例如, *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel等人, 编辑(1995增刊))。

[0067] 适合用于确定序列同一性百分比和序列相似性的算法的优选实例是BLAST和BLAST 2.0算法,其分别描述于Altschul等人, *Nuc. Acids Res.*, 25:3389-3402 (1977) 和Altschul等人, *J. Mol. Biol.*, 215:403-410 (1990) 中。使用具有本文描述的参数的BLAST和BLAST 2.0来确定本发明的核酸的序列同一性百分比。用于执行BLAST分析的软件可通过国家生物技术信息中心公开获得(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。

[0068] BLAST算法还进行两个序列之间的相似性的统计分析(参见,例如Karlin和Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:5873-5787 (1993))。由BLAST算法提供的相似性的一个量度是最小和概率($P(N)$)法,它提供了两个核苷酸序列之间的匹配偶然发生的概率的指示。例如,如果在测试核酸序列与参考核酸序列的比较中,最小和概率小于约0.2、更优选地小于约0.01并且最优选地小于约0.001,则认为测试核酸序列与参考序列相似。

[0069] 如本文所用的术语“核酸”是指含有呈单链或双链形式的至少两个脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸的聚合物并且包括DNA和RNA。DNA可呈以下形式:例如反义分子、质粒DNA、预先缩合的DNA、PCR产物、载体(P1、PAC、BAC、YAC、人工染色体)、表达盒、嵌合序列、染色体DNA或这些组的衍生物和组合。RNA可呈以下形式:siRNA、不对称干扰RNA(aiRNA)、微小RNA(miRNA)、mRNA、tRNA、rRNA、病毒RNA(vRNA)、自我扩增RNA以及它们的组合。核酸包括含有已知核苷酸类似物或经修饰的主链残基或键联的核酸,所述核酸是合成的、天然存在的和非天然存在的,并且其具有与参考核酸类似的结合性质。此类类似物的实例包括但不限于硫代磷酸酯、氨基磷酸酯、磷酸甲酯、手性磷酸甲酯、2'-O-甲基核糖核苷酸和肽-核酸(PNA)。除非确切地限制,否则术语涵盖具有与参考核酸类似的结合性质的含有天然核苷酸的已知类似物的核酸。除非另外指明,否则特定核酸序列还隐含地涵盖其保守修饰的变体(例如,简并密码子取代)、等位基因、直向同源物、SNP和互补序列以及明确指明的序列。具体地说,简并密码子取代可通过产生其中一个或多个选择的(或所有)密码子的第三位置被混合型碱基和/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”含有糖脱氧核糖(DNA)或核糖(RNA)、碱基和磷酸酯基团。核苷酸通过磷酸酯基团连接在一起。“碱基”包括嘌呤和嘧啶,所述嘌呤和嘧啶进一步包括天然化合物腺嘌呤、胸腺嘧啶、鸟嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶、肌苷和天然类似物;以及嘌呤和嘧啶的合成衍生物,其包括但不限于放置新反应性基团如但不限于胺、醇、硫醇、羧酸酯和烷基卤化物的修饰。

[0070] 术语“基因”是指包含产生多肽或前体多肽所需要的编码部分长度或全长序列的

核酸(例如,DNA或RNA)序列。

[0071] 如本文所用的“基因产物”是指基因的产物,如RNA转录物或多肽。

[0072] 术语“脂质”是指包括但不限于脂肪酸的酯的一组有机化合物,并且特征在于不溶于水但溶于许多有机溶剂。它们通常分成至少三类:(1)“简单脂质”,其包括脂肪和油以及蜡;(2)“复合脂质”,其包括磷脂和糖脂;以及(3)“衍生的脂质”如类固醇。

[0073] 如本文所用,术语“LNP”是指脂质-核酸颗粒或核酸-脂质颗粒(例如,稳定的核酸-脂质颗粒)。LNP表示由脂质(例如,本发明的可电离脂质、非阳离子脂质和防止颗粒聚集的缀合脂质)和核酸制成的颗粒,其中核酸(例如,siRNA、aiRNA、miRNA、ssDNA、dsDNA、ssRNA、短发夹RNA(shRNA)、dsRNA、mRNA、自我扩增RNA或质粒,包括由其转录干扰RNA或mRNA的质粒)包封在脂质中。在一个实施方案中,核酸被至少50%包封在脂质中;在一个实施方案中,核酸被至少75%包封在脂质中;在一个实施方案中,核酸被至少90%包封在脂质中;并且在一个实施方案中,核酸被完全包封在脂质中。LNP通常含有阳离子脂质、非阳离子脂质和脂质缀合物(例如,PEG-脂质缀合物)。LNP极其有用于系统应用,因为它们可在静脉内(i.v.)注射后表现出延长的循环寿命,它们可在远端部位(例如,与施用部位物理分开的部位)上累积,并且它们可在这些远端部位处介导所转染基因的表达或靶基因表达的沉默。

[0074] 本发明的脂质颗粒(例如,LNP)通常具有约40nm至约150nm的平均直径。在一个实施方案中,本发明的脂质颗粒具有约40nm至约80nm的平均直径。在一个实施方案中,本发明的脂质颗粒具有约40nm至约70nm的平均直径。在一个实施方案中,本发明的脂质颗粒具有约40nm至约60nm的平均直径。在一个实施方案中,本发明的脂质颗粒具有约50nm至约60nm的平均直径。在一个实施方案中,本发明的脂质颗粒具有约50nm至约150nm的平均直径。在一个实施方案中,本发明的脂质颗粒具有约60nm至约130nm的平均直径。在一个实施方案中,本发明的脂质颗粒具有约70nm至约110nm的平均直径。在一个实施方案中,本发明的脂质颗粒具有约70至约90nm的平均直径。本发明的脂质颗粒是基本上无毒的。另外,当存在于本发明的脂质颗粒中时,核酸在水溶液中对使用核酸酶的降解具有抗性。核酸-脂质颗粒及其制备方法公开于例如美国专利公布号20040142025和20070042031中,所述专利公布的公开内容出于所有目的通过引用以其整体并入本文。

[0075] 如本文所用,“脂质包封的”可以是指在完全包封、部分包封或两者情况下提供活性剂或治疗剂如核酸(例如,干扰RNA或mRNA)的脂质颗粒。在优选的实施方案中,核酸被完全包封在脂质颗粒中(例如,以形成SPLP、pSPLP、LNP或其他核酸-脂质颗粒)。

[0076] 术语“脂质缀合物”是指抑制脂质颗粒聚集的聚合物缀合的脂质。此类脂质缀合物包括但不限于聚酰胺低聚物(例如,ATTA-脂质缀合物)、聚肌氨酸-脂质缀合物、聚噁唑啉(POZ)-脂质缀合物、PEG-脂质缀合物,如与二烷基氧基丙基偶联的PEG、与二酰基甘油偶联的PEG、与胆固醇偶联的PEG、与磷脂酰乙醇胺偶联的PEG、与神经酰胺缀合的PEG(参见例如,美国专利号5,885,613,其公开内容出于所有目的通过引用以其整体并入本文),阳离子PEG脂质及其混合物。PEG可直接缀合至脂质或者可经由接头部分连接至脂质。可使用适合用于将PEG偶联至脂质的任何接头部分,包括例如含有非酯的接头部分和含酯接头部分。在优选的实施方案中,使用了含有非酯的接头部分。

[0077] 术语“两亲性脂质”部分地指其中脂质材料的疏水部分定向到疏水相中而亲水部分定向朝向水相的任何适合的材料。亲水特征来源于极性或带电荷的基团的存在,如碳水

化合物、磷酸酯、羧酸、硫酸根、氨基、巯基、硝基、羟基以及其他类似基团。可通过包括非极性基团来赋予疏水性,所述非极性基团包括但不限于长链饱和和不饱和的脂肪族烃基和被一个或多个芳香族、脂环族或杂环基团取代的此类基团。两亲性化合物的实例包括但不限于磷脂、氨基脂和鞘脂。

[0078] 磷脂的代表性实例包括但不限于磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、磷脂酸、棕榈酰油酰基磷脂酰胆碱、溶血磷脂酰胆碱、溶血磷脂酰乙醇胺、二棕榈酰磷脂酰胆碱、二油酰磷脂酰胆碱、二硬脂酰磷脂酰胆碱以及二亚油酰磷脂酰胆碱。缺少磷的其他化合物如鞘脂、糖鞘脂家族、二酰基甘油以及 β -酰氧基酸也在称为两亲性脂质的组内。另外,以上描述的两亲性脂质可与包括甘油三酯和甾醇的其他脂质混合。

[0079] 术语“中性脂质”是指在选择的pH下以不带电荷或中性的两性离子形式存在的许多脂质种类中的任一种。在生理pH下,此类脂质包括例如二酰基磷脂酰胆碱、二酰基磷脂酰乙醇胺、神经酰胺、鞘磷脂、脑磷脂、胆固醇、脑苷脂以及二酰基甘油。

[0080] 术语“非阳离子脂质”是指任何两亲性脂质以及任何其他中性脂质或阴离子脂质。

[0081] 术语“阴离子脂质”是指在生理pH下带负电荷的任何脂质。这些脂质包括但不限于:磷脂酰甘油、心磷脂、二酰基磷脂酰丝氨酸、二酰基磷脂酸、N-十二烷酰磷脂酰乙醇胺、N-琥珀酰磷脂酰乙醇胺、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)以及与中性脂质连接的其他阴离子修饰基团。

[0082] 术语“阳离子脂质”是指可带正电荷的脂质。这些脂质包括具有一个或多个带正电荷的胺基团的脂质。某些阳离子脂质是可电离的(并且称为“可电离脂质”),并且取决于周围pH可以电荷中性或带正电荷的状态存在。

[0083] 在一个实施方案中,阳离子脂质是如本文所述的式(I)化合物,其在某些实施方案中具有使得在施用后七(7)天剩余<10%的母体可电离脂质的清除率(例如,在实施例33中描述的测定中)。

[0084] 术语“疏水性脂质”是指具有非极性基团的化合物,所述非极性基团包括但不限于长链饱和和不饱和的脂肪族烃基和任选地被一个或多个芳香族、脂环族或杂环基团取代的此类基团。适合的实例包括但不限于二酰基甘油、二烷基甘油、N-N-二烷基氨基、1,2-二酰氧基-3-氨基丙烷以及1,2-二烷基-3-氨基丙烷。

[0085] 术语“促融合的”是指脂质颗粒如LNP与细胞的膜融合的能力。膜可为质膜或包围细胞器例如核内体、细胞核等的膜。

[0086] 如本文所用,术语“水溶液”是指全部或部分包含水的组合物。

[0087] 如本文所用,术语“有机脂质溶液”是指全部或部分包含具有脂质的有机溶剂的组合物。

[0088] 如本文所使用的“远端部位”是指物理分开的部位,其不限于相邻毛细血管床,但包括广泛分布在整个生物体中的部位。

[0089] 与核酸-脂质颗粒如LNP相关的“血清稳定的”意指颗粒在暴露于将显著降解游离DNA或RNA的血清或核酸酶测定之后不会显著降解。适合的测定包括例如标准血清测定、DNA酶测定或RNA酶测定。

[0090] 如本文所用的“系统递送”是指引起活性剂或治疗剂(如干扰RNA或mRNA)广泛生物分布在生物体内的脂质颗粒的递送。施用的一些技术可引起某些剂的系统递送,但不会引

起其他剂的系统递送。系统递送意指将有用量,优选地治疗量的剂暴露于身体的大多数部分。为了获得广泛生物分布,通常需要血液寿命,使得剂在到达远离施用部位的疾病部位之前不会被快速降解或清除(如通过首过器官(肝脏、肺等)或通过快速非特异性细胞结合)。脂质颗粒的系统递送可通过本领域中已知的任何方式实现,包括例如静脉内、皮下和腹膜内。在优选的实施方案中,脂质颗粒的系统递送通过静脉内递送实现。

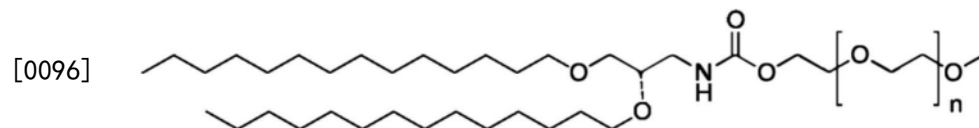
[0091] 如本文所用的“局部递送”是指直接向生物体内的靶部位递送活性剂或治疗剂,如干扰RNA或mRNA。例如,可通过直接注射到疾病部位如肿瘤或其他靶部位如炎症的部位或靶器官如肝脏、心脏、胰腺、肾脏等中来局部递送剂。

[0092] 术语“哺乳动物”是指任何哺乳动物种类,如人、小鼠、大鼠、犬、猫、仓鼠、豚鼠、兔、家畜等。

[0093] 术语“癌症”是指特征在于异常细胞不受控制生长的一类疾病的任何成员。术语包括所有已知的癌症和肿瘤性病状,无论表征为恶性的、良性的、软组织或实体以及所有阶段和等级的癌症,包括转移前癌症和转移后癌症。不同类型的癌症的实例包括但不限于肺癌、结肠癌、直肠癌、肛门癌、胆管癌、小肠癌、胃(胃部)癌、食道癌;胆囊癌、肝癌、胰腺癌、阑尾癌、乳腺癌、卵巢癌;宫颈癌、前列腺癌、肾癌(例如,肾细胞癌)、中枢神经系统的癌症、成胶质细胞瘤、皮肤癌、淋巴瘤、绒毛膜癌、头颈癌、骨原性肉瘤以及血癌。具体类型的肝癌的非限制性实例包括肝细胞癌(HCC)、继发性肝癌(例如,由一些其他非肝癌细胞类型的转移引起)以及肝母细胞瘤。如本文所使用,“肿瘤”包含一个或多个癌细胞。

[0094] 术语“阴离子前体基团”包括能够在生理pH下形成离子的基团。例如,所述术语包括基团 $-CO_2H$ 、 $-O-P(=O)(OH)_2$ 、 $-OS(=O)_2(OH)$ 、 $-O-S(=O)(OH)$ 和 $-B(OH)_2$ 。在一个实施方案中,阴离子前体是 $-CO_2H$ 。

[0095] 在特定实施方案中,PEG-C-DMA具有以下结构:



[0097] 其中选择n,使得所得聚合物链具有约500至约10,000的分子量。在一个实施方案中,选择n,使得所得聚合物链具有约500至约7500的分子量。在一个实施方案中,选择n,使得所得聚合物链具有约500至约6000的分子量。在一个实施方案中,选择n,使得所得聚合物链具有约500至约5000的分子量。在一个实施方案中,选择n,使得所得聚合物链具有约500至约3000的分子量。在一个实施方案中,选择n,使得所得聚合物链具有约1000至约7500的分子量。在一个实施方案中,选择n,使得所得聚合物链具有约1000至约6000的分子量。在一个实施方案中,选择n,使得所得聚合物链具有约1000至约5000的分子量。在一个实施方案中,选择n,使得所得聚合物链具有约1000至约3000的分子量。在另一个实施方案中,选择n,使得所得聚合物链具有约2000的分子量。PEG-C-DMA可如Heyes等人,Synthesis and Characterization of Novel Poly(Ethylene Glycol)-lipid Conjugates Suitable for use in Drug Delivery,”Journal of Controlled Release,2006和美国专利号8,936,942所述来制备。

[0098] 实施方案的描述

[0099] 本发明提供了包含一种或多种活性剂或治疗剂的新型、血清稳定的脂质颗粒,制

备所述脂质颗粒的方法,以及递送和/或施用所述脂质颗粒(例如,用于治疗疾病或病症)的方法。

[0100] 在一个方面,本发明提供了脂质颗粒,所述脂质颗粒包含:(a)一种或多种活性剂或治疗剂;(b)占所述颗粒中存在的总脂质的约30mol%至约85mol%的一种或多种本发明的可电离脂质;(c)占所述颗粒中存在的总脂质的约13mol%至约49.5mol%的一种或多种非阳离子脂质;以及(d)占所述颗粒中存在的总脂质的约0.1mol%至约10mol%的一种或多种抑制颗粒聚集的缀合脂质。

[0101] 在一个方面,本发明提供了脂质颗粒,所述脂质颗粒包含:(a)一种或多种活性剂或治疗剂;(b)占所述颗粒中存在的总脂质的约50mol%至约85mol%的一种或多种本发明的可电离脂质;(c)占所述颗粒中存在的总脂质的约13mol%至约49.5mol%的一种或多种非阳离子脂质;以及(d)占所述颗粒中存在的总脂质的约0.5mol%至约2mol%的一种或多种抑制颗粒聚集的缀合脂质。

[0102] 在某些实施方案中,活性剂或治疗剂被完全包封在脂质颗粒的脂质部分内,使得脂质颗粒中的活性剂或治疗剂在水溶液中对例如由核酸酶或蛋白酶引起的酶促降解具有抗性。在某些其他实施方案中,脂质颗粒对哺乳动物如人基本无毒。

[0103] 在一些实施方案中,活性剂或治疗剂包含核酸。在某些实例中,核酸包含干扰RNA分子,例如像siRNA、aiRNA、miRNA或它们的混合物。在某些其他实例中,核酸包含单链或双链DNA、RNA或DNA/RNA杂交体,例如像反义寡核苷酸、核酶、质粒、免疫刺激性寡核苷酸或它们的混合物。在某些情况下,核酸包含mRNA分子。

[0104] 在其他实施方案中,活性剂或治疗剂包含肽或多肽。在某些情况下,肽或多肽包含抗体,例如像多克隆抗体、单克隆抗体、抗体片段;人源化抗体、重组抗体、重组人抗体、Primatized™抗体或它们的混合物。在某些其他实例中,肽或多肽包含细胞因子、生长因子、凋亡因子、分化诱导因子、细胞表面受体、配体、激素、小分子(例如,小有机分子或化合物)或它们的混合物。

[0105] 在一个实施方案中,活性剂或治疗剂包含siRNA。在一个实施方案中,siRNA分子包含长度约为15至约60个核苷酸(例如,长度为约15-60个、15-50个、15-40个、15-30个、15-25个或19-25个核苷酸,或长度为15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个或25个核苷酸)的双链区。本发明的siRNA分子能够在体外和/或在体内使靶序列的表达沉默。

[0106] 在一些实施方案中,siRNA分子包含至少一个经修饰的核苷酸。在某些优选实施方案中,siRNA分子在双链区中包含一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个或更多个经修饰的核苷酸。在某些实例中,siRNA在双链区中包含约1%至约100%(例如,约1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%)经修饰的核苷酸。在优选的实施方案中,双链区中少于约25%(例如,少于约25%、20%、15%、10%或5%)或约1%至约25%(例如,约1%-25%、5%-25%、10%-25%、15%-25%、20%-25%或10%-20%)的核苷酸包含经修饰的核苷酸。

[0107] 在其他实施方案中,siRNA分子包含经修饰的核苷酸,包括但不限于2'-O-甲基(2' OMe)核苷酸、2'-脱氧-2'-氟(2'F)核苷酸、2'-脱氧核苷酸、2'-O-(2-甲氧基乙基)(MOE)核苷酸、锁核酸(LNA)核苷酸以及它们的混合物。在优选的实施方案中,siRNA包含2' OMe核苷酸(例如,2' OMe嘌呤和/或嘧啶核苷酸),例如像2' OMe-鸟苷核苷酸、2' OMe-尿苷核苷酸、2'

OMe-腺苷核苷酸、2' OMe-胞嘧啶核苷酸以及它们的混合物。在某些情况下, siRNA不包含2' OMe-胞嘧啶核苷酸。在其他实施方案中, siRNA包含发夹环结构。

[0108] siRNA可在siRNA分子的双链区的一条链(即,有义或反义的)或两条链中包含经修饰的核苷酸。优选地,在siRNA双链体的双链区中的选择性位置修饰尿苷和/或鸟苷核苷酸。关于尿苷核苷酸修饰,有义和/或反义链中的至少一个、两个、三个、四个、五个、六个或更多个尿苷核苷酸可以是经修饰的尿苷核苷酸,如2' OMe-尿苷核苷酸。在一些实施方案中,有义和/或反义链中的每个尿苷核苷酸都是2' OMe-尿苷核苷酸。关于鸟苷核苷酸修饰,有义和/或反义链中的至少一个、两个、三个、四个、五个、六个或更多个鸟苷核苷酸可以是经修饰的鸟苷核苷酸,如2' OMe-鸟苷核苷酸。在一些实施方案中,有义和/或反义链中的每个鸟苷核苷酸都是2' OMe-鸟苷核苷酸。

[0109] 在某些实施方案中, siRNA序列中的至少一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个或更多个5' -GU-3' 基序可例如通过引入错配以消除5' -GU-3' 基序和/或通过引入经修饰的核苷酸如2' OMe核苷酸来加以修饰。5' -GU-3' 基序可处于siRNA序列的有义链、反义链或这两条链中。5' -GU-3' 基序可彼此相邻或可替代地,它们可被1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12或更多个核苷酸分开。

[0110] 在一些优选的实施方案中,经修饰的siRNA分子的免疫刺激性比相应的未修饰的siRNA序列的免疫刺激性小。在此类实施方案中,具有减小的免疫刺激性质的经修饰的siRNA分子有利地保留对抗靶序列的RNAi活性。在另一个实施方案中,经修饰的siRNA分子的免疫刺激性质和使其靶基因表达沉默的能力可通过在siRNA序列内,例如像在siRNA双链体的双链区内引入最小的且选择性的2' OMe修饰来加以平衡或优化。在某些实例中,经修饰的siRNA的免疫刺激性比相应的未修饰的siRNA的免疫刺激性小至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。本领域技术人员将很容易看出,经修饰的siRNA分子和相应的未修饰的siRNA分子的免疫刺激性质可通过例如在哺乳动物体内系统施用或使用适当的基于脂质的递送系统(如本文公开的LNP递送系统)转染哺乳动物应答细胞之后约两小时至约十二小时测量INF- α 和/或IL-6水平来确定。

[0111] 在某些实施方案中,经修饰的siRNA分子具有小于或等于相应的未修饰的siRNA十倍的 C_{50} (即,半数最大抑制浓度)(即,经修饰的siRNA具有小于或等于相应的未修饰的siRNA的 IC_{50} 十倍的 IC_{50})。在其他实施方案中,经修饰的siRNA具有小于或等于相应的未修饰的siRNA序列三倍的 IC_{50} 。在其他实施方案中,经修饰的siRNA具有小于或等于相应的未修饰的siRNA两倍的 IC_{50} 。本领域技术人员将很容易看出,可产生剂量-反应曲线并且经修饰的siRNA和相应的未修饰的siRNA的 IC_{50} 值可使用本领域技术人员已知的方法容易地确定。

[0112] 在另一个实施方案中,相对于相应的未修饰的siRNA序列,经修饰的siRNA分子能够使至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%的靶序列的表达沉默。

[0113] 在一些实施方案中, siRNA分子例如在双链区的有义和/或反义链中不包含磷酸主链修饰。在其他实施方案中, siRNA例如在双链区的有义和/或反义链中包含一个、两个、三个、四个或更多个磷酸主链修饰。在优选的实施方案中, siRNA不包含磷酸主链修饰。

[0114] 在另外的实施方案中, siRNA例如在双链区的有义和/或反义链中不包含2' -脱氧

核苷酸。在另外的实施方案中, siRNA例如在双链区的有义和/或反义链中包含一个、两个、三个、四个或更多个2'-脱氧核苷酸。在优选的实施方案中, siRNA不包含2'-脱氧核苷酸。

[0115] 在某些实例中, 在有义和/或反义链中的双链区的3'-末端上的核苷酸不是经修饰的核苷酸。在某些其他实例中, 接近有义和/或反义链中的双链区的3'-末端(例如, 在3'-末端的一个、两个、三个或四个核苷酸内)的核苷酸不是经修饰的核苷酸。

[0116] 本文描述的siRNA分子可在双链区的一侧或两侧上具有一个、两个、三个、四个或更多个核苷酸的3'突出端, 或可在双链区的一侧或两侧上缺乏突出端(即, 具有平末端)。优选地, siRNA在双链区的每一侧具有两个核苷酸的3'突出端。在某些实例中, 反义链上的3'突出端与靶序列具有互补性, 并且有义链上的3'突出端与靶序列的互补链具有互补性。可替代地, 3'突出端与靶序列或其互补链不具有互补性。在一些实施方案中, 3'突出端包含一个、两个、三个、四个或更多个核苷酸, 如2'-脱氧(2'H)核苷酸。在某些优选的实施方案中, 3'突出端包含脱氧胸苷(dT)和/或尿苷核苷酸。在其他实施方案中, 双链区的一侧或两侧上的3'突出端中的一个或多个核苷酸包含经修饰的核苷酸。经修饰的核苷酸的非限制性实例在上文描述, 并且包括2'OMe核苷酸、2'-脱氧-2'F核苷酸、2'-脱氧核苷酸、2'-O-2-MOE核苷酸、LNA核苷酸以及它们的混合物。在优选的实施方案中, 存在于siRNA的有义和/或反义链上的3'突出端中的一个、两个、三个、四个或更多个核苷酸包含2'OMe核苷酸(例如, 2'OMe嘌呤和/或嘧啶核苷酸), 例如像2'OMe-鸟苷核苷酸、2'OMe-尿苷核苷酸、2'OMe-腺苷核苷酸、2'OMe-胞嘧啶核苷酸以及它们的混合物。

[0117] siRNA可包含使靶基因表达沉默的未修饰的和/或经修饰的siRNA序列中的至少一个或混合物(例如, 至少两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个或更多个)。siRNA的混合物可包含针对相同区或结构域(例如“热点”)和/或针对一种或多种靶基因的不同区或结构域的序列。在某些实例中, 在混合物中存在使靶基因表达沉默的一个或多个(例如, 至少两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个或更多个)经修饰的siRNA。在某些其他实例中, 在混合物中存在使靶基因表达沉默的一个或多个(例如, 至少两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个或更多个)未修饰的siRNA序列。

[0118] 在一些实施方案中, siRNA分子的反义链包含与靶序列或其一部分至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%互补的序列或由组成。在其他实施方案中, siRNA分子的反义链包含与靶序列或其一部分100%互补的序列或由组成。在其他实施方案中, siRNA分子的反义链包含与靶序列或其一部分特异性地杂交的序列或由组成。

[0119] 在其他实施方案中, siRNA分子的有义链包含与靶序列或其一部分至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一的序列或由组成。在另外的实施方案中, siRNA分子的有义链包含与靶序列或其一部分100%同一的序列或由组成。

[0120] 在一些实施方案中, 本发明的可电离脂质可占颗粒中存在的总脂质的约30mol%至约90mol%、约30mol%至约85mol%、约30mol%至约80mol%、约30mol%至约75mol%、约30mol%至约70mol%、约30mol%至约65mol%或约30mol%至约60mol%。

[0121] 在一些实施方案中, 本发明的可电离脂质可占颗粒中存在的总脂质的约40mol%至约90mol%、约40mol%至约85mol%、约40mol%至约80mol%、约40mol%至约75mol%、约40mol%至约70mol%、约40mol%至约65mol%或约40mol%至约60mol%。

[0122] 在其他实施方案中, 本发明的可电离脂质可占颗粒中存在的总脂质的约55mol%

至约90mol %、约55mol %至约85mol %、约55mol %至约80mol %、约55mol %至约75mol %、约55mol %至约70mol %或约55mol %至约65mol %。

[0123] 在其他实施方案中,本发明的可电离脂质可占颗粒中存在的总脂质的约60mol %至约90mol %、约60mol %至约85mol %、约60mol %至约80mol %、约60mol %至约75mol %或约60mol %至约70mol %。

[0124] 在其他实施方案中,本发明的可电离脂质可占颗粒中存在的总脂质的约65mol %至约90mol %、约65mol %至约85mol %、约65mol %至约80mol %或约65mol %至约75mol %。

[0125] 在其他实施方案中,本发明的可电离脂质可占颗粒中存在的总脂质的约70mol %至约90mol %、约70mol %至约85mol %、约70mol %至约80mol %、约75mol %至约90mol %、约75mol %至约85mol %或约80mol %至约90mol %。

[0126] 在另外的实施方案中,本发明的可电离脂质可占颗粒中存在的总脂质的(至少)约30mol %、35mol %、40mol %、45mol %、50mol %、51mol %、52mol %、53mol %、54mol %、55mol %、56mol %、57mol %、58mol %、59mol %、60mol %、61mol %、62mol %、63mol %、64mol %、65mol %、66mol %、67mol %、68mol %、69mol %、70mol %、71mol %、72mol %、73mol %、74mol %、75mol %、76mol %、77mol %、78mol %、79mol %、80mol %、81mol %、82mol %、83mol %、84mol %、85mol %、86mol %、87mol %、88mol %、89mol %或90mol % (或其任何分数或其中的范围)。

[0127] 在本发明的脂质颗粒中,非阳离子脂质可包含例如一种或多种阴离子脂质和/或中性脂质。在优选的实施方案中,非阳离子脂质包含以下中性脂质组分中的一种:(1)胆固醇或其衍生物;(2)磷脂;或(3)磷脂与胆固醇或其衍生物的混合物。

[0128] 胆固醇衍生物的实例包括但不限于胆固醇、胆甾烷酮、胆甾烯酮、粪固醇、胆固醇基-2'-羟乙基醚、胆固醇基-4'-羟丁基醚以及它们的混合物。本文描述了胆固醇基-2'-羟乙基醚的合成。

[0129] 磷脂可以是中性脂质,包括但不限于二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)、二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)、二油酰磷脂酰乙醇胺(DOPE)、棕榈酰油酰-磷脂酰胆碱(POPC)、棕榈酰油酰-磷脂酰乙醇胺(POPE)、棕榈酰油酰-磷脂酰甘油(POPG)、二棕榈酰-磷脂酰乙醇胺(DPPE)、二肉豆蔻酰-磷脂酰乙醇胺(DMPE)、二硬脂酰-磷脂酰乙醇胺(DSPE)、单甲基-磷脂酰乙醇胺、二甲基-磷脂酰乙醇胺、二反式油酰基-磷脂酰乙醇胺(DEPE)、硬脂酰油酰-磷脂酰乙醇胺(SOPE)、卵磷脂酰胆碱(EPC)以及它们的混合物。在某些优选的实施方案中,磷脂是DPPC、DSPC或它们的混合物。

[0130] 在一些实施方案中,非阳离子脂质(例如,一种或多种磷脂和/或胆固醇)可占颗粒中存在的总脂质的约10mol %至约70mol %、约15mol %至约70mol %、约20mol %至约70mol %、约25mol %至约70mol %、约30mol %至约70mol %、约10mol %至约55mol %、约15mol %至约55mol %、约20mol %至约55mol %、约25mol %至约55mol %、约30mol %至约55mol %、约13mol %至约50mol %、约15mol %至约50mol %或约20mol %至约50mol %。当非阳离子脂质是磷脂与胆固醇或胆固醇衍生物的混合物时,所述混合物可占颗粒中存在的总脂质的至多约40mol %、50mol %或60mol %。

[0131] 在其他实施方案中,非阳离子脂质(例如,一种或多种磷脂和/或胆固醇)可占颗粒中存在的总脂质的约10mol %至约49.5mol %、约13mol %至约49.5mol %、约15mol %至约

49.5mol %、约20mol %至约49.5mol %、约25mol %至约49.5mol %、约30mol %至约49.5mol %、约35mol %至约49.5mol %或约40mol %至约49.5mol %。

[0132] 在其他实施方案中,非阳离子脂质(例如,一种或多种磷脂和/或胆固醇)可占颗粒中存在的总脂质的约10mol %至约45mol %、约13mol %至约45mol %、约15mol %至约45mol %、约20mol %至约45mol %、约25mol %至约45mol %、约30mol %至约45mol %或约35mol %至约45mol %。

[0133] 在其他实施方案中,非阳离子脂质(例如,一种或多种磷脂和/或胆固醇)可占颗粒中存在的总脂质的约10mol %至约40mol %、约13mol %至约40mol %、约15mol %至约40mol %、约20mol %至约40mol %、约25mol %至约40mol %或约30mol %至约40mol %。

[0134] 在其他实施方案中,非阳离子脂质(例如,一种或多种磷脂和/或胆固醇)可占颗粒中存在的总脂质的约10mol %至约35mol %、约13mol %至约35mol %、约15mol %至约35mol %、约20mol %至约35mol %或约25mol %至约35mol %。

[0135] 在其他实施方案中,非阳离子脂质(例如,一种或多种磷脂和/或胆固醇)可占颗粒中存在的总脂质的约10mol %至约30mol %、约13mol %至约30mol %、约15mol %至约30mol %、约20mol %至约30mol %、约10mol %至约25mol %、约13mol %至约25mol %或约15mol %至约25mol %。

[0136] 在另外的实施方案中,非阳离子脂质(例如,一种或多种磷脂和/或胆固醇)可占颗粒中存在的总脂质的(至少)约10mol %、11mol %、12mol %、13mol %、14mol %、15mol %、16mol %、17mol %、18mol %、19mol %、20mol %、21mol %、22mol %、23mol %、24mol %、25mol %、26mol %、27mol %、28mol %、29mol %、30mol %、31mol %、32mol %、33mol %、34mol %、35mol %、36mol %、37mol %、38mol %、39mol %、40mol %、41mol %、42mol %、43mol %、44mol %、45mol %、46mol %、47mol %、48mol %、49mol %、50mol %、51mol %、52mol %、53mol %、54mol %、55mol %、56mol %、57mol %、58mol %、59mol %或60mol % (或其任何分数或其中的范围)。

[0137] 在某些优选的实施方案中,非阳离子脂质包含占颗粒中存在的总脂质的约31.5mol %至约42.5mol %的胆固醇或其衍生物。作为非限制性实例,本发明的不含磷脂的脂质颗粒可包含占颗粒中存在的总脂质的约37mol %的胆固醇或其衍生物。在其他优选的实施方案中,本发明的不含磷脂的脂质颗粒可包含占颗粒中存在的总脂质的约30mol %至约45mol %、约30mol %至约40mol %、约30mol %至约35mol %、约35mol %至约45mol %、约40mol %至约45mol %、约32mol %至约45mol %、约32mol %至约42mol %、约32mol %至约40mol %、约34mol %至约45mol %、约34mol %至约42mol %、约34mol %至约40mol %或约30mol %、31mol %、32mol %、33mol %、34mol %、35mol %、36mol %、37mol %、38mol %、39mol %、40mol %、41mol %、42mol %、43mol %、44mol %或45mol % (或其任何分数或其中的范围)的胆固醇或其衍生物。

[0138] 在某些其他优选的实施方案中,非阳离子脂质包含以下的混合物:(i) 占颗粒中存在的总脂质的约4mol %至约10mol %的磷脂;和(ii) 占颗粒中存在的总脂质的约30mol %至约40mol %的胆固醇或其衍生物。作为非限制性实例,包含磷脂与胆固醇的混合物的脂质颗粒可包含颗粒中存在的总脂质的约7mol %的DPPC和约34mol %的胆固醇。在其他实施方案中,非阳离子脂质包含以下的混合物:(i) 颗粒中存在的总脂质的约3mol %至约15mol %、约

4mol %至约15mol %、约4mol %至约12mol %、约4mol %至约10mol %、约4mol %至约8mol %、约5mol %至约12mol %、约5mol %至约9mol %、约6mol %至约12mol %、约6mol %至约10mol %或约3mol %、4mol %、5mol %、6mol %、7mol %、8mol %、9mol %、10mol %、11mol %、12mol %、13mol %、14mol %或15mol % (或其任何分数或其中的范围) 的磷脂;和(ii) 颗粒中存在的总脂质的约25mol %至约45mol %、约30mol %至约45mol %、约25mol %至约40mol %、约30mol %至约40mol %、约25mol %至约35mol %、约30mol %至约35mol %、约35mol %至约45mol %、约40mol %至约45mol %、约28mol %至约40mol %、约28mol %至约38mol %、约30mol %至约38mol %、约32mol %至约36mol %、或约25mol %、26mol %、27mol %、28mol %、29mol %、30mol %、31mol %、32mol %、33mol %、34mol %、35mol %、36mol %、37mol %、38mol %、39mol %、40mol %、41mol %、42mol %、43mol %、44mol %或45mol % (或其任何分数或其中的范围) 的胆固醇或其衍生物。

[0139] 在其他优选的实施方案中,非阳离子脂质包含以下的混合物:(i) 颗粒中存在的总脂质的约10mol %至约30mol %的磷脂;和(ii) 颗粒中存在的总脂质的约10mol %至约30mol %的胆固醇或其衍生物。作为非限制性实例,包含磷脂与胆固醇的混合物的脂质颗粒可包含颗粒中存在的总脂质的约20mol %的DPPC和约20mol %的胆固醇。在其他实施方案中,非阳离子脂质包含以下的混合物:(i) 颗粒中存在的总脂质的约10mol %至约30mol %、约10mol %至约25mol %、约10mol %至约20mol %、约15mol %至约30mol %、约20mol %至约30mol %、约15mol %至约25mol %、约12mol %至约28mol %、约14mol %至约26mol %、或约10mol %、11mol %、12mol %、13mol %、14mol %、15mol %、16mol %、17mol %、18mol %、19mol %、20mol %、21mol %、22mol %、23mol %、24mol %、25mol %、26mol %、27mol %、28mol %、29mol %或30mol % (或其任何分数或其中的范围) 的磷脂;和(ii) 颗粒中存在的总脂质的约10mol %至约30mol %、约10mol %至约25mol %、约10mol %至约20mol %、约15mol %至约30mol %、约20mol %至约30mol %、约15mol %至约25mol %、约12mol %至约28mol %、约14mol %至约26mol %、或约10mol %、11mol %、12mol %、13mol %、14mol %、15mol %、16mol %、17mol %、18mol %、19mol %、20mol %、21mol %、22mol %、23mol %、24mol %、25mol %、26mol %、27mol %、28mol %、29mol %或30mol % (或其任何分数或其中的范围) 的胆固醇或其衍生物。

[0140] 缀合脂质

[0141] 在本发明的脂质颗粒(例如,包含例如干扰RNA,如siRNA或mRNA的LNP)中,缀合脂质可包含例如以下中的一者或多者:聚乙二醇(PEG)-脂质缀合物、聚酰胺(ATA)-脂质缀合物或它们的混合物。在一个优选的实施方案中,核酸-脂质颗粒包含PEG-脂质缀合物或ATA-脂质缀合物。缀合脂质可包含PEG-脂质,包括例如PEG-二酰基甘油(DAG)、PEG二烷基氧基丙基(DAA)、PEG-磷脂、PEG-神经酰胺(Cer)或它们的混合物。PEG-DAA缀合物可以是PEG-二月桂基氧基丙基(C12)、PEG-二肉豆蔻基氧基丙基(C14)、PEG-二棕榈基氧基丙基(C16)、PEG-二硬脂基氧基丙基(C18)或它们的混合物。

[0142] 适用于本发明的另外的PEG-脂质缀合物包括但不限于,mPEG2000-1,2-二-O-烷基-sn3-氨基甲酰基甘油酯(PEG-C-DMG)。PEG-C-DMG的合成在2008年12月31日提交的PCT申请号PCT/US08/88676中描述,所述申请的公开内容出于所有目的通过引用以其整体并入本文。适用于本发明的另外的PEG-脂质缀合物包括但不限于,1-[8'-(1,2-二肉豆蔻酰基-

3-丙氧基)-甲酰胺基-3',6'-二氧杂辛基]氨基甲酰基-w-甲基-聚(乙二醇)(2KPEG-DMG)。2KPEG-DMG的合成在美国专利号7,404,969中描述,所述专利的公开内容出于所有目的通过引用以其整体并入本文。

[0143] 本文描述的PEG-脂质缀合物的PEG部分可包含约550道尔顿至约10,000道尔顿范围内的平均分子量。在某些实例中,PEG部分具有约750道尔顿至约5,000道尔顿(例如,约1,000道尔顿至约5,000道尔顿、约1,500道尔顿至约3,000道尔顿、约750道尔顿至约3,000道尔顿、约750道尔顿至约2,000道尔顿等)的平均分子量。在优选的实施方案中,PEG部分具有约2,000道尔顿或约750道尔顿的平均分子量。

[0144] 在某些实例中,缀合脂质(例如,PEG-脂质缀合物)可占颗粒中存在的总脂质的约0.1%至约10%(或其任何分数或其中的范围)。在某些实例中,缀合脂质(例如,PEG-脂质缀合物)可占颗粒中存在的总脂质的约0.1mol%至约2mol%、约0.5mol%至约2mol%、约1mol%至约2mol%、约0.6mol%至约1.9mol%、约0.7mol%至约1.8mol%、约0.8mol%至约1.7mol%、约1mol%至约1.8mol%、约1.2mol%至约1.8mol%、约1.2mol%至约1.7mol%、约1.3mol%至约1.6mol%、约1.4mol%至约1.5mol%、或约1mol%、1.1mol%、1.2mol%、1.3mol%、1.4mol%、1.5mol%、1.6mol%、1.7mol%、1.8mol%、1.9mol%或2mol%(或其任何分数或其中的范围)。

[0145] 在本发明的脂质颗粒中,活性剂或治疗剂可完全包封在所述颗粒的脂质部分内,从而保护活性剂或治疗剂不受酶促降解。在优选的实施方案中,包含核酸如干扰RNA(例如siRNA)或mRNA的LNP被完全包封在颗粒的脂质部分内,从而保护核酸不受核酸酶降解。在某些实例中,在37℃下将颗粒暴露于核酸酶至少约20、30、45或60分钟之后LNP中的核酸基本上不降解。在某些其他实例中,在37℃下将颗粒在血清中孵育至少约30、45或60分钟或至少约2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34或36小时之后LNP中的核酸基本上不降解。在其他实施方案中,活性剂或治疗剂(例如核酸,如siRNA)与颗粒的脂质部分复合。本发明的制剂的益处之一为脂质颗粒组合物对哺乳动物如人基本无毒。

[0146] 术语“完全包封”表示脂质颗粒中的活性剂或治疗剂在暴露于血清或将显著降解游离DNA、RNA或蛋白质的核酸酶或蛋白酶测定后没有显著降解。在完全包封的系统中,在将通常降解100%的游离活性剂或治疗剂的处理中降解优选小于约25%的颗粒中的活性剂或治疗剂,更优选小于约10%并且最优选小于约5%的颗粒中的活性剂或治疗剂被降解。在核酸治疗剂的背景下,完全包封可通过Oligreen®测定来确定。Oligreen®是用于定量溶液中的寡核苷酸和单链DNA或RNA的超灵敏荧光核酸染色剂(可从Invitrogen Corporation; Carlsbad, Calif. 获得)。“完全包封的”还指示脂质颗粒为血清稳定的,也就是说当体内施用它们不会快速分解为其组分部分。

[0147] 在另一个方面,本发明提供了包含多脂质颗粒的脂质颗粒(例如,LNP)组合物。在优选的实施方案中,活性剂或治疗剂(例如,核酸)完全包封在脂质颗粒(例如LNP)的脂质部分内,使得约30%至约100%、约40%至约100%、约50%至约100%、约60%至约100%、约70%至约100%、约80%至约100%、约90%至约100%、约30%至约95%、约40%至约95%、约50%至约95%、约60%至约95%、约70%至约95%、约80%至约95%、约85%至约95%、约90%至约95%、约30%至约90%、约40%至约90%、约50%至约90%、约60%至约90%、约70%至约90%、约80%至约90%或至少约30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、

70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99% (或其任何分数或其中的范围) 的脂质颗粒 (例如LNP) 在其中包封活性剂或治疗剂。

[0148] 通常, 本发明的脂质颗粒 (例如, LNP) 具有约1至约100的脂质: 活性剂 (例如, 脂质: 核酸) 比率 (质量/质量比率)。在一些实例中, 脂质: 活性剂 (例如, 脂质: 核酸) 比率 (质量/质量比率) 在约1至约50、约2至约25、约3至约20、约4至约15或约5至约10的范围内。在优选的实施方案中, 本发明的脂质颗粒具有约5至约15, 例如约5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15 (或其任何分数或其中的范围) 的脂质: 活性剂 (例如脂质: 核酸) 比率 (质量/质量比率)。

[0149] 通常, 本发明的脂质颗粒 (例如, LNP) 具有约40nm至约150nm的平均直径。在优选的实施方案中, 本发明的脂质颗粒 (例如, LNP) 具有约40nm至约130nm、约40nm至约120nm、约40nm至约100nm、约50nm至约120nm、约50nm至约100nm、约40nm至约80nm、约40nm至约60nm、约50nm至约60nm、约60nm至约120nm、约60nm至约110nm、约60nm至约100nm、约60nm至约90nm、约60nm至约80nm、约70nm至约120nm、约70nm至约110nm、约70nm至约100nm、约70nm至约90nm、约70nm至约80nm或小于约150nm、120nm、110nm、100nm、90nm或80nm (或其任何分数或其中的范围) 的平均直径。

[0150] 在本发明的一个具体实施方案中, LNP包含: (a) 一个或多个未修饰的和/或经修饰的核酸分子 (例如, 使靶基因表达沉默的干扰RNA, 如siRNA、aiRNA、miRNA; 或导致靶蛋白表达的mRNA); (b) 占颗粒中存在的总脂质的约56.5mol%至约66.5mol%的本发明的可电离脂质; (c) 占颗粒中存在的总脂质的约31.5mol%至约42.5mol%的非阳离子脂质; 以及 (d) 占颗粒中存在的总脂质的约1mol%至约2mol%的抑制颗粒聚集的缀合脂质。LNP的这一具体实施方案在本文中通常称为“1:62”制剂。

[0151] 在本发明的另一个具体实施方案中, LNP包含: (a) 一个或多个未修饰的和/或经修饰的核酸分子 (例如, 使靶基因表达沉默的干扰RNA, 如siRNA、aiRNA、miRNA; 或导致靶蛋白表达的mRNA); (b) 占颗粒中存在的总脂质的约52mol%至约62mol%的本发明的可电离脂质; (c) 占颗粒中存在的总脂质的约36mol%至约47mol%的非阳离子脂质; 以及 (d) 占颗粒中存在的总脂质的约1mol%至约2mol%的抑制颗粒聚集的缀合脂质。LNP的这一具体实施方案在本文中通常称为“1:57”制剂。

[0152] 本发明还提供了一种药物组合物, 所述药物组合物包含本文所述的脂质颗粒 (例如, LNP) 和药学上可接受的载体。

[0153] 在另一方面, 本发明提供了一种用于将一种或多种活性剂或治疗剂 (例如核酸) 引入细胞中的方法, 所述方法包括使所述细胞与本文所述的脂质颗粒 (例如, LNP) 接触。在一个实施方案中, 细胞处于哺乳动物中并且哺乳动物为人。在另一个实施方案中, 本发明提供了一种用于体内递送一种或多种活性剂或治疗剂 (例如核酸) 的方法, 所述方法包括向哺乳动物受试者施用本文所述的脂质颗粒 (例如, LNP)。在优选的实施方案中, 施用方式包括但不限于口服、鼻内、静脉内、腹膜内、肌肉内、关节内、病灶内、气管内、皮下和皮内。优选地, 哺乳动物受试者是人。

[0154] 在一个实施方案中, 在注射后约8、12、24、36或48小时, 至少约5%、10%、15%、20%或25%的脂质颗粒 (例如, LNP) 的总注射剂量存在于血浆中。在其他实施方案中, 在注射之后约8、12、24、36或48小时, 多于约20%、30%、40%以及多达约60%、70%或80%的脂质颗粒 (例如, LNP) 的总注射剂量存在于血浆中。在某些实例中, 在施用后约1小时, 多于约

10%的多个颗粒存在于哺乳动物的血浆中。在某些其他实例中,在施用颗粒后至少约1小时可检测到脂质颗粒(例如,LNP)的存在。在某些实施方案中,在施用后(例如,肺、肝脏、肿瘤或炎症部位)约8、12、24、36、48、60、72或96小时的细胞中可检测到活性剂或治疗剂,如干扰RNA(例如siRNA)或mRNA的存在。在其他实施方案中,在施用后约8、12、24、36、48、60、72或96小时可检测到活性剂或治疗剂,如干扰RNA(例如,siRNA)对靶序列表达的下调。在其他实施方案中,活性剂或治疗剂如干扰RNA(例如,siRNA)对靶序列表达的下调优先在肿瘤细胞或炎症部位的细胞中发生。在其他实施方案中,在施用后约12、24、48、72或96小时或约6、8、10、12、14、16、18、19、20、22、24、26或28天可检测到施用部位近端或远端部位处的细胞中或肺、肝脏或肿瘤细胞中的活性剂或治疗剂如干扰RNA(例如,siRNA)的存在或作用。在其他实施方案中,在施用后约8、12、24、36、48、60、72或96小时可检测到活性剂或治疗剂,如mRNA或自我扩增RNA对靶序列表达的上调。在其他实施方案中,活性剂或治疗剂如mRNA或自我扩增RNA对靶序列表达的上调优先在肿瘤细胞或炎症部位的细胞中发生。在其他实施方案中,在施用后约12、24、48、72或96小时或约6、8、10、12、14、16、18、19、20、22、24、26或28天可检测到施用部位近端或远端部位处的细胞中或肺、肝脏或肿瘤细胞中的活性剂或治疗剂如mRNA或自我扩增RNA的存在或作用。在另外的实施方案中,本发明的脂质颗粒(例如,LNP)胃肠外或腹膜内施用。

[0155] 在一些实施方案中,本发明的脂质颗粒(例如,LNP)在用于治疗性递送包含干扰RNA序列(例如,siRNA)的一种或多种核酸的方法中特别有用。具体地说,本发明的目的为提供用于通过下调或沉默感兴趣的一个或多个靶核酸序列或基因的转录和/或翻译来治疗哺乳动物(例如,啮齿动物如小鼠或灵长类动物如人、黑猩猩或猴)体内的疾病或病症的体外和体内方法。作为一个非限制性实例,本发明的方法有助于将干扰RNA(例如,siRNA)体内递送至哺乳动物受试者的肝脏和/或肿瘤。在某些实施方案中,疾病或病症与基因的表达和/或过表达相关,并且基因的表达或过表达通过干扰RNA(例如,siRNA)减少。在某些其他实施方案中,可向哺乳动物施用治疗有效量的脂质颗粒(例如,LNP)。在一些实例中,将干扰RNA(例如,siRNA)配制成LNP,并且将所述颗粒施用于需要这种治疗的患者。在其他实例中,从患者中去除细胞,体外(例如,使用本文所述的LNP)递送干扰RNA(例如,siRNA),并且将细胞再注入患者中。

[0156] 在另一方面,本发明提供了包含使靶基因表达沉默的不对称干扰RNA(aiRNA)分子的脂质颗粒(例如,LNP),以及使用此类颗粒来使靶基因表达沉默的方法。

[0157] 在一个实施方案中,aiRNA分子包含长度为约10至约25个(碱基配对)核苷酸的双链(双链体)区,其中aiRNA分子包含含有5'和3'突出端的反义链,并且其中aiRNA分子能够使靶基因表达沉默。

[0158] 在某些实例中,aiRNA分子包含长度为约12-20、12-19、12-18、13-17或14-17个(碱基配对)核苷酸,更通常为长度为12、13、14、15、16、17、18、19或20个(碱基配对)核苷酸的双链(双链体)区。在某些其他实例中,反义链上的5'和3'突出端包含与靶RNA序列互补的序列,并且可任选地进一步包含非靶序列。在一些实施方案中,反义链上的5'和3'突出端各自包含1、2、3、4、5、6、7个或更多个核苷酸或由1、2、3、4、5、6、7个或更多个核苷酸组成。

[0159] 在其他实施方案中,aiRNA分子包含选自以下组成的组的经修饰的核苷酸:2'OMe核苷酸、2'F核苷酸、2'-脱氧核苷酸、2'-O-MOE核苷酸、LNA核苷酸以及它们的混合物。在

一个优选的实施方案中,aiRNA分子包含2'OMe核苷酸。作为非限制性实例,2'OMe核苷酸可选自由以下组成的组:2'OMe-鸟苷核苷酸、2'OMe-尿苷核苷酸以及它们的混合物。

[0160] 在相关方面,本发明提供了包含使靶基因表达沉默的微小RNA(miRNA)分子的脂质颗粒(例如,LNP),以及使用此类组合物来使靶基因表达沉默的方法。

[0161] 在一个实施方案中,miRNA分子包含约15至约60个核苷酸的长度,其中所述miRNA分子能够使靶基因表达沉默。

[0162] 在某些实例中,miRNA分子包含约15-50、15-40或15-30个核苷酸的长度,更通常地约15-25或19-25个核苷酸的长度,并且优选约20-24、21-22或21-23个核苷酸的长度。在优选的实施方案中,miRNA分子是靶向目标RNA序列的成熟miRNA分子。

[0163] 在一些实施方案中,miRNA分子包含选自由以下组成的组的经修饰的核苷酸:2'OMe核苷酸、2'F核苷酸、2'-脱氧核苷酸、2'-O-MOE核苷酸、LNA核苷酸以及它们的混合物。在一个优选的实施方案中,miRNA分子包含2'OMe核苷酸。作为非限制性实例,2'OMe核苷酸可选自由以下组成的组:2'OMe-鸟苷核苷酸、2'OMe-尿苷核苷酸以及它们的混合物。

[0164] 在一些实施方案中,本发明的脂质颗粒(例如,LNP)可用于治疗性递送一种或多种mRNA分子的方法中。具体地,本发明的一个目的是提供用于通过表达一种或多种靶蛋白来治疗哺乳动物(例如,啮齿动物如小鼠或灵长类动物如人、黑猩猩或猴)的疾病或病症的体外和体内方法。作为非限制性实例,本发明的方法可用于将一种或多种mRNA分子体内递送至哺乳动物受试者。在某些其他实施方案中,可向哺乳动物施用治疗有效量的脂质颗粒(例如,LNP)。在一些实例中,将一种或多种mRNA分子配制成LNP,并且将所述颗粒施用于需要这种治疗的患者。在其他实例中,从患者中去除细胞,体外(例如,使用本文所述的LNP)递送一种或多种mRNA分子,并且将细胞再注入患者中。

[0165] 如此,本发明的脂质颗粒(例如LNP)是有利的并且适合用于向受试者(例如哺乳动物,诸如人)施用活性剂或治疗剂,诸如核酸(例如干扰RNA,诸如siRNA、aiRNA和/或miRNA;或mRNA;引导RNA;自我扩增RNA;环状RNA;DNA,包括质粒DNA和封端DNA,因为它们在循环中稳定,具有药效学行为所需的大小,从而使得接近血管外位点,并且能够到达靶细胞群体。

[0166] 活性剂

[0167] 活性剂(例如,治疗剂)包括能够对细胞、组织、器官或受试者施加所需效果的任何分子或化合物。此类效果可以是例如生物的、生理的和/或化妆用的。活性剂可以是任何类型的分子或化合物,包括但不限于核酸、肽、多肽、小分子以及它们的混合物。核酸的非限制性实例包括干扰RNA分子(例如,siRNA、aiRNA、miRNA)、反义寡核苷酸、mRNA、自我扩增RNA、质粒、核酶、免疫刺激性寡核苷酸以及它们的混合物。肽或多肽的实例包括但不限于抗体(例如,多克隆抗体、单克隆抗体、抗体片段;人源化抗体、重组抗体、重组人抗体、PrimatizedTM抗体)、细胞因子、生长因子、凋亡因子、分化诱导因子、细胞表面受体及其配体、激素以及它们的混合物。小分子的实例包括但不限于小的有机分子或化合物,如本领域技术人员已知的任何常规试剂或药物。

[0168] 在一些实施方案中,活性剂为治疗剂或其盐或衍生物。治疗剂衍生物可以本身为治疗活性的或它们可以是前药,其在进一步修饰时变为活性的。因此,在一个实施方案中,与未修饰的剂相比治疗剂衍生物保留一些或所有治疗活性,而在另一个实施方案中,治疗剂衍生物为缺乏治疗活性的前药,但在进一步修饰时变为活性的。

[0169] 核酸

[0170] 在某些实施方案中,本发明的脂质颗粒与核酸缔合,从而产生核酸-脂质颗粒(例如,LNP)。在一些实施方案中,核酸完全包封在脂质颗粒中。如本文所使用,术语“核酸”包括具有通常称为寡核苷酸的含有高达至60个核苷酸的片段和称为多核苷酸的较长片段的任何寡核苷酸或多核苷酸。在具体实施方案中,本发明的寡核苷酸的长度为约15至约60个核苷酸。核酸可在本发明的脂质颗粒中单独施用或与包含肽、多肽或小分子如常规药物的本发明脂质颗粒组合施用(例如,共同施用)。

[0171] 在本发明的上下文中,术语“多核苷酸”和“寡核苷酸”是指由天然存在的碱基、糖和糖间(骨架)连接组成的核苷酸单体或核苷单体的聚合物或低聚物。术语“多核苷酸”和“寡核苷酸”还包括包含非天然存在的单体或其功能类似的部分的聚合物或低聚物。此类经修饰的或取代的寡核苷酸常常优于天然形式,因为例如像细胞摄取增强、免疫原性减小以及在核酸酶存在下稳定性增加的性质。

[0172] 寡核苷酸通常分为脱氧核糖寡核苷酸或核糖寡核苷酸。脱氧核糖寡核苷酸由称为脱氧核糖的5-碳糖组成,其在此糖的5'和3'碳上共价连接至磷酸酯以形成交替非支链聚合物。核糖寡核苷酸由类似重复结构组成,其中5-碳糖为核糖。

[0173] 存在于根据本发明的脂质-核酸颗粒中的核酸包括已知的任何形式的核酸。本文使用的核酸可以是单链DNA或RNA、或双链DNA或RNA、或DNA-RNA杂交体。本文描述了双链DNA的实例并且包括例如结构基因、包括控制区和终止区的基因以及自我复制系统如病毒或质粒DNA。双链RNA的实例在本文进行了描述并且包括例如siRNA和其他RNAi剂,如aiRNA和前体miRNA。单链核酸包括例如反义寡核苷酸、核酶、成熟miRNA以及形成三链体的寡核苷酸(triplex-forming oligonucleotide)。

[0174] 本发明的核酸可具有各种长度,通常取决于核酸的具体形式。例如,在具体实施方案中,质粒或基因的长度可为约1,000个至约100,000个核苷酸残基。在具体实施方案中,寡核苷酸的长度可在约10至约100个核苷酸范围内。在各种相关实施方案中,单链、双链和三链的寡核苷酸的长度都可在约10至约60个核苷酸、约15至约60个核苷酸、约20至约50个核苷酸、约15至约30个核苷酸或约20至约30个核苷酸的范围内。

[0175] 在具体实施方案中,本发明的寡核苷酸(或其链)特异性地与靶多核苷酸序列杂交或与靶多核苷酸序列互补。如本文所使用的术语“可特异性杂交”和“互补”指明充分程度的互补性,使得在DNA或RNA靶与寡核苷酸之间发生稳定的且特异性的结合。应理解,寡核苷酸不需要与其待特异性杂交的靶核酸序列100%互补。在优选的实施方案中,在寡核苷酸与靶序列的结合干扰靶序列的正常功能以引起其实用性或表达丧失时,寡核苷酸为可特异性杂交的,并且存在充分程度的互补性以避免在其中所需特异性结合的条件下,即,在体内测定或治疗处理的情况下在生理条件下、或在体外测定的情况下在其中进行测定的条件下寡核苷酸与非靶序列非特异性结合。因此,与靶向或与其特异性杂交的基因或mRNA序列的区相比,寡核苷酸可包括1、2、3或更多个碱基取代。

[0176] siRNA

[0177] 本发明的核酸-脂质颗粒的siRNA组分能够使感兴趣的靶基因的表达沉默。siRNA双链体的每条链的长度通常均为约15至约60个核苷酸,优选地长度为约15至约30个核苷酸。在某些实施方案中,siRNA包含至少一个经修饰的核苷酸。经修饰的siRNA的免疫刺激性

通常比相应的未修饰的siRNA序列小并且保留对感兴趣的靶基因的RNAi活性。在一些实施方案中,经修饰的siRNA含有至少一个2'OMe嘌呤或嘧啶核苷酸,如2'OMe-鸟苷、2'OMe-尿苷、2'OMe-腺苷和/或2'OMe-胞嘧啶核苷酸。在优选的实施方案中,尿苷和/或鸟苷核苷酸中的一个或多个经修饰。经修饰的核苷酸可存在于siRNA的一条链(即,有义或反义的)或两条链中。siRNA序列可具有突出端(例如,如在Elbashir等人,Genes Dev.,15:188(2001)或Nykänen等人,Cell,107:309(2001)中描述的3'或5'突出端),或者可缺乏突出端(即,具有平末端)。

[0178] 经修饰的siRNA通常在siRNA双链体的双链区中包含约1%至约100%(例如,约1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%)的经修饰的核苷酸。在某些实施方案中,siRNA的双链区中的一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个或更多个核苷酸包含经修饰的核苷酸。

[0179] 在一些实施方案中,在siRNA的双链区中,少于约25%(例如,少于约25%、24%、23%、22%、21%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或1%)的核苷酸包含经修饰的核苷酸。

[0180] 在其他实施方案中,在siRNA的双链区中,1%至约25%(例如,约1%-25%、2%-25%、3%-25%、4%-25%、5%-25%、6%-25%、7%-25%、8%-25%、9%-25%、10%-25%、11%-25%、12%-25%、13%-25%、14%-25%、15%-25%、16%-25%、17%-25%、18%-25%、19%-25%、20%-25%、21%-25%、22%-25%、23%-25%、24%-25%等)或约1%至约20%(例如,约1%-20%、2%-20%、3%-20%、4%-20%、5%-20%、6%-20%、7%-20%、8%-20%、9%-20%、10%-20%、11%-20%、12%-20%、13%-20%、14%-20%、15%-20%、16%-20%、17%-20%、18%-20%、19%-20%、1%-19%、2%-19%、3%-19%、4%-19%、5%-19%、6%-19%、7%-19%、8%-19%、9%-19%、10%-19%、11%-19%、12%-19%、13%-19%、14%-19%、15%-19%、16%-19%、17%-19%、18%-19%、1%-18%、2%-18%、3%-18%、4%-18%、5%-18%、6%-18%、7%-18%、8%-18%、9%-18%、10%-18%、11%-18%、12%-18%、13%-18%、14%-18%、15%-18%、16%-18%、17%-18%、1%-17%、2%-17%、3%-17%、4%-17%、5%-17%、6%-17%、7%-17%、8%-17%、9%-17%、10%-17%、11%-17%、12%-17%、13%-17%、14%-17%、15%-17%、16%-17%、1%-16%、2%-16%、3%-16%、4%-16%、5%-16%、6%-16%、7%-16%、8%-16%、9%-16%、10%-16%、11%-16%、12%-16%、13%-16%、14%-16%、15%-16%、1%-15%、2%-15%、3%-15%、4%-15%、5%-15%、6%-15%、7%-15%、8%-15%、9%-15%、10%-15%、11%-15%、12%-15%、13%-15%、14%-15%等)的核苷酸包含经修饰的核苷酸。

[0181] 在其他实施方案中,例如,当siRNA的一条或两条链在尿苷和/或鸟苷核苷酸处选择性地修饰时,所得的经修饰的siRNA可包含少于约30%的经修饰的核苷酸(例如,少于约30%、29%、28%、27%、26%、25%、24%、23%、22%、21%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或1%的经修饰的核苷酸)或约1%至约30%的经修饰核苷酸(例如,约1%-30%、2%-30%、3%-30%、4%-

30%、5%-30%、6%-30%、7%-30%、8%-30%、9%-30%、10%-30%、11%-30%、12%-30%、13%-30%、14%-30%、15%-30%、16%-30%、17%-30%、18%-30%、19%-30%、20%-30%、21%-30%、22%-30%、23%-30%、24%-30%、25%-30%、26%-30%、27%-30%、28%-30%或29%-30%的经修饰的核苷酸)。

[0182] siRNA序列的选择

[0183] 可使用本领域中已知的任何方式鉴定合适的siRNA序列。通常,将在Elbashir等人, *Nature*, 411:494-498(2001) 和Elbashir等人, *EMBO J.*, 20:6877-6888(2001) 中描述的方法与在Reynolds等人, *Nature Biotech.*, 22(3):326-330(2004) 中列举出的合理设计规则组合。

[0184] 一般来说,扫描来自目标靶基因的转录物的AUG起始密码子的核苷酸序列3'的二核苷酸序列(例如,AA、NA、CC、GG或UU,其中N=C、G或U)(参见,例如Elbashir等人, *EMBO J.*, 20:6877-6888(2001))。将紧邻二核苷酸序列的3'的核苷酸鉴定为可能的siRNA序列(即,靶序列或有义链序列)。通常,将紧邻二核苷酸序列的3'的19个、21个、23个、25个、27个、29个、31个、33个、35个或更多个核苷酸鉴定为可能的siRNA序列。在一些实施方案中,二核苷酸序列是AA或NA序列,并且将紧邻AA或NA二核苷酸的3'的19个核苷酸鉴定为可能的siRNA序列。siRNA序列通常沿着靶基因的长度在不同位置间隔开。为了进一步增强siRNA序列的沉默效率,可分析可能的siRNA序列以鉴定例如在靶细胞或生物体中不含有与其他编码序列同源的区的位点。例如,具有约21个碱基对的适合siRNA序列通常在靶细胞或生物体中将不具有多于16-17个与编码序列同源的邻接碱基对。如果siRNA序列将从RNA Pol III启动子表达,选择缺乏多于4个邻接A's或T's的siRNA序列。

[0185] 一旦已经鉴定出可能的siRNA序列,就可设计互补序列(即,反义链序列)。还可使用本领域中已知的各种标准分析可能的siRNA序列。例如,为了增强其沉默效率,可通过合理的设计算法鉴定具有以下特征中的一个或多个的序列来分析siRNA序列:(1)G/C含量为约25%至约60% G/C;(2)在有义链的位置15-19上有至少3个A/U;(3)没有内部重复;(4)在有义链的位置19上有A;(5)在有义链的位置3上有A;(6)在有义链的位置10上有U;(7)在有义链的位置19上没有G/C;以及(8)在有义链的位置13上没有G。掺入为每个这些特征赋予适合值并且有助于选择siRNA的算法的siRNA设计工具可在例如<http://boz094.ust.hk/RNAi/siRNA>找到。本领域技术人员将了解,可选择具有一个或多个上述特征的序列用于进一步分析并且测试作为可能的siRNA序列。

[0186] 另外,具有一个或多个以下标准的可能的siRNA序列可常常省略为siRNA:(1)包含成排的4个或更多个相同碱基的延伸的序列;(2)包含G的同聚物(即,为了减少由于这些聚合物的结构特征引起的可能的非特异性效应的序列;(3)包含三碱基基序(例如,GGG、CCC、AAA或TTT)的序列;(4)包含成排的7个或更多个G/C的延伸的序列;以及(5)在导致内部折回结构的候选物内包含具有4个或更多个碱基的直接重复的序列。然而,本领域技术人员将了解仍然可选择具有一个或多个上述特征的序列用于进一步分析并且测试作为可能的siRNA序列。

[0187] 在一些实施方案中,可基于如在例如Khvorova等人, *Cell*, 115:209-216(2003); 和Schwarz等人, *Cell*, 115:199-208(2003) 中描述的siRNA双链体不对称性进一步分析可能的siRNA序列。在其他实施方案中,可能的siRNA序列可基于如在例如Luo等人,

Biophys. Res. Commun., 318:303-310 (2004) 中描述的在靶位点处的二级结构进一步分析。例如,可使用Mfold算法(在<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/rna/form1.cgi>可获得)来建模靶位点处的二级结构以选择有利于在靶位点进入的siRNA序列,其中存在较少的呈碱基配对和茎-环形式的二级结构。

[0188] 一旦已经鉴定出可能的siRNA序列,就可例如使用体外细胞因子测定或体内动物模型分析序列的任何免疫刺激性质的存在。siRNA序列的有义链和/或反义链中的基序如富含GU的基序(例如,5'-GU-3'、5'-UGU-3'、5'-GUGU-3'、5'-UGUGU-3'等)还可提供序列是否可能为免疫刺激性的指示。一旦发现siRNA分子为免疫刺激性的,然后就可如本文所描述对其修饰以减少其免疫刺激性质。作为一个非限制性实例,可在使得细胞产生可检测的免疫应答以确定siRNA是否为免疫刺激性或非免疫刺激性的siRNA的条件下使siRNA序列与哺乳动物应答细胞接触。哺乳动物应答细胞可来自初生哺乳动物(即,先前尚未与siRNA序列的基因产物接触的哺乳动物)。哺乳动物应答细胞可以是例如外周血单核细胞(PBMC)、巨噬细胞等。可检测的免疫应答可包括产生细胞因子或生长因子例如像TNF- α 、IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 、IL-6、IL-12或其组合。然后可通过用修饰的核苷酸替代有义链和/或反义链上的至少一个核苷酸来修饰鉴定为免疫刺激性的siRNA分子以减少其免疫刺激性质。例如,在siRNA双链体的双链区中,少于约30% (例如,少于约30%、25%、20%、15%、10%或5%)的核苷酸可被经修饰的核苷酸如2' OMe核苷酸替代。然后可使经修饰的siRNA与如上描述的哺乳动物应答细胞接触以证实其免疫刺激性质有所减小或消除。

[0189] 用于检测免疫应答的适合的体外测定包括但不限于David等人(美国专利号4,376,110)的双单克隆抗体夹心免疫测定技术;单克隆-多克隆抗体夹心测定(Wide等人,在Kirkham和Hunter,编辑,Radioimmunoassay Methods, E. and S. Livingstone, Edinburgh (1970)中);Gordon等人(美国专利号4,452,901)的“蛋白质印迹”方法;标记配体的免疫沉淀(Brown等人, J. Biol. Chem., 255:4980-4983 (1980));如例如由Raines等人, J. Biol. Chem., 257:5154-5160 (1982)所描述的酶联免疫吸附测定(ELISA);免疫细胞化学技术,包括使用荧光染料(Brooks等人, Clin. Exp. Immunol., 39:477 (1980));以及活性的中和(Bowen-Pope等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:2396-2400 (1984))。除了以上描述的免疫测定之外,许多其他免疫测定可供使用,包括在美国专利号3,817,827;3,850,752;3,901,654;3,935,074;3,984,533;3,996,345;4,034,074和4,098,876中描述的那些。这些参考文献的公开内容出于所有目的通过引用整体并入本文。

[0190] 用于检测免疫应答的体内模型的非限制性实例包括如在例如Judge等人, Mol. Ther., 13:494-505 (2006)中描述的体内小鼠细胞因子诱导测定。在某些实施方案中,可进行的测定如下:(1)可通过在侧尾静脉中的标准静脉注射来施用siRNA;(2)在施用后约6小时可通过心脏穿刺收集血液并且加工成血浆用于细胞因子分析;以及(3)可根据制造商的说明使用夹心ELISA试剂盒来定量细胞因子(例如,小鼠和人IFN- α (PBL Biomedical; Piscataway, N.J.);人IL-6和TNF- α (eBioscience; San Diego, Calif.);以及小鼠IL-6、TNF- α 和IFN- γ (BD Biosciences; San Diego, Calif.))。

[0191] 特异性地结合细胞因子和生长因子的单克隆抗体可从多种来源商业上获得并且可使用本领域中已知的方法产生(参见,例如Kohler等人, Nature, 256:495-497 (1975)以及Harlow和Lane, ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Publication,

New York (1999))。先前已描述了单克隆抗体的产生并且可通过本领域中已知的任何方式实现 (Buhning 等人, 在 *Hybridoma*, 第10卷, 第1期, 第77-78页 (1991) 中)。在一些方法中, 标记 (例如, 使用通过光谱、光化学、生物化学、电学、光学或化学方式可检测的任何组合物) 单克隆抗体以有利于检测。

[0192] 产生 siRNA 分子

[0193] 可以若干形式提供 siRNA, 包括例如呈一种或多种分离的小干扰 RNA (siRNA) 双链体、呈较长的双链 RNA (dsRNA) 或呈由 DNA 质粒中的转录盒转录的 siRNA 或 dsRNA。siRNA 序列可具有突出端 (例如, 如在 Elbashir 等人, *Genes Dev.*, 15:188 (2001) 或 Nykänen 等人, *Cell*, 107:309 (2001) 中描述的 3' 或 5' 突出端), 或者可缺乏突出端 (即, 具有平末端)。

[0194] RNA 群可用来提供长前体 RNA, 或与选择的靶序列基本上或完全同一的长前体 RNA 可用来制造 siRNA。可根据本领域技术人员熟知的方法从细胞或组织中分离 RNA, 合成和/或克隆 RNA。RNA 可以是混合群体 (从细胞或组织获得, 由 cDNA 转录, 减去, 选择等), 或者可代表单一靶序列。RNA 可以是天然存在的 (例如, 从组织或细胞样品中分离的)、体外合成 (例如, 使用 T7 或 SP6 聚合酶和 PCR 产物或克隆的 cDNA) 或化学合成。

[0195] 为了形成长 dsRNA, 针对合成的 RNA, 还在体外转录并且杂交补体以形成 dsRNA。如果使用天然存在的 RNA 群, 还例如通过转录相应于 RNA 群的 cDNA 或通过使用 RNA 聚合酶提供 RNA 补体 (例如, 以形成用于被大肠杆菌 RNA 酶 III 或切丁酶消化的 dsRNA)。然后杂交前体 RNA 以形成用于消化的双链 RNA。可直接向受试者施用 dsRNA 或可在施用之前体外消化所述 dsRNA。

[0196] 用于分离 RNA、合成 RNA、杂交核酸、制造和筛选 cDNA 文库以及进行 PCR 的方法为本领域中熟知的 (参见, 例如, Gubler 和 Hoffman, *Gene*, 25:263-269 (1983); Sambrook 等人, 同上; Ausubel 等人, 同上), PCR 方法同样如此 (参见, 美国专利号 4,683,195 和 4,683,202; PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis 等人, 编辑, 1990))。表达文库也为本领域技术人员熟知的。公开了在本发明中使用的一般方法的另外基础文章包括 Sambrook 等人, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (第2版 1989); Kriegler, *Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual* (1990); 以及 *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel 等人, 编辑, 1994)。这些参考文献的公开内容出于所有目的通过引用整体并入本文。

[0197] 优选地, 化学合成 siRNA。包含本发明的 siRNA 分子的寡核苷酸可使用本领域中已知的任何各种技术来合成, 如在 Usman 等人, *J. Am. Chem. Soc.*, 109:7845 (1987); Scaringe 等人, *Nucl. Acids Res.*, 18:5433 (1990); Wincott 等人, *Nucl. Acids Res.*, 23:2677-2684 (1995); 以及 Wincott 等人, *Methods Mol. Bio.*, 74:59 (1997) 中描述的那些。寡核苷酸的合成使用了常见的核酸保护基和偶联基, 如 5'-末端上的二甲氧基三苯甲基和 3'-末端上的亚磷酰胺。作为一个非限制性实例, 小规模合成可在使用 0.2 μmol 规模方案的 Applied Biosystems 合成仪上进行。或者, 在 0.2 μmol 规模下的合成可在来自 Protogene (Palo Alto, Calif.) 的 96 孔板合成仪上进行。然而, 更大或更小规模的合成也在本发明的范围内。用于寡核苷酸合成的适合试剂、用于 RNA 去保护的方法以及用于 RNA 纯化的方法为本领域技术人员已知的。

[0198] siRNA 分子还可经由串联合成技术合成, 其中两条链均合成为通过可裂解接头分

开的单一连续寡核苷酸片段或链,所述可裂解接头随后裂解以提供杂交形成siRNA双链体的分开的片段或链。接头可为多核苷酸接头或非核苷酸接头。siRNA的串联合成可易于适应多孔/多板合成平台以及采用间歇反应器、合成塔等的大规模合成平台。或者,可由两个相异的寡核苷酸组装siRNA分子,其中一个寡核苷酸包含siRNA的有义链并且另一个包含siRNA的反义链。例如,可分开合成每条链并且在合成和/或去保护之后通过杂交或连接连在一起。在某些其他实例中,siRNA分子可合成为单一连续寡核苷酸片段,其中自身互补有义区和反义区杂交形成具有发夹二级结构的siRNA双链体。

[0199] 修饰siRNA序列

[0200] 在某些方面中,siRNA分子在双链区中包含具有两条链的双链体和至少一个经修饰的核苷酸,其中每条链的长度均为约15至约60个核苷酸。有利地,经修饰的siRNA的免疫刺激性比相应的未修饰的siRNA序列的免疫刺激性小,但仍保留使靶序列的表达沉默的能力。在优选的实施方案中,引入到siRNA分子中的化学修饰的程度在siRNA的免疫刺激性质的减小或消除与RNAi活性保留之间达成平衡。作为一个非限制性实例,靶向感兴趣的基因的siRNA分子可在siRNA双链体内的选择性尿苷和/或鸟苷核苷酸上最小修饰(例如,小于约30%、25%、20%、15%、10%或5%修饰)以消除由siRNA产生的免疫应答同时保留其使靶基因表达沉默的能力。

[0201] 适合用于本发明的经修饰的核苷酸的实例包括但不限于具有2'-O-甲基(2'OMe)、2'-脱氧-2'-氟(2'F)、2'-脱氧-5-C-甲基、2'-O-(2-甲氧基乙基)(MOE)、4'-硫基、2'-氨基或2'-C-烯丙基的核糖核苷酸。具有Northern构象的经修饰的核苷酸如在例如Saenger, Principles of Nucleic Acid Structure, Springer-Verlag编著(1984)中描述的那些也适合用于siRNA分子。此类经修饰的核苷酸包括但不限于锁核酸(LNA)核苷酸(例如,2'-O核苷酸、4'-C-亚甲基-(D-呋喃核糖基)核苷酸)、2'-O-(2-甲氧基乙基)(MOE)核苷酸、2'-甲基-硫-乙基核苷酸、2'-脱氧-2'-氟(2'F)核苷酸、2'-脱氧-2'-氯(2'Cl)核苷酸以及2'-叠氮基核苷酸。在某些实例中,本文描述的siRNA分子包括一个或多个G型夹核苷酸。G型夹核苷酸是指经修饰的胞嘧啶类似物,其中修饰赋予双链体内的互补鸟嘌呤核苷酸的Watson-Crick和Hoogsteen这两个面的氢键能力(参见,例如Lin等人, J. Am. Chem. Soc., 120: 8531-8532 (1998))。另外,具有核苷酸碱基类似物例如像C-苯基、C-萘基、其他芳香族衍生物、肌苷、吡咯羧酰胺(azole carboxamide)以及硝基吡咯衍生物如3-硝基吡咯、4-硝基吡咯、5-硝基吡咯和6-硝基吡咯(参见,例如Loakes, Nucl. Acids Res., 29: 2437-2447 (2001))的核苷酸可掺入到siRNA分子中。

[0202] 在某些实施方案中,siRNA分子还可包含一种或多种化学修饰,如末端帽部分、磷酸主链修饰等。末端帽部分的实例包括但不限于:反向脱氧脱碱基残基、甘油基修饰、4', 5'-亚甲基核苷酸、1-(β -D-赤呋喃糖基)核苷酸、4'-硫代核苷酸、碳环核苷酸、1,5-脱水己糖醇核苷酸、L-核苷酸、 α -核苷酸、经修饰的碱基核苷酸、苏型呋喃戊糖基核苷酸、无环3', 4'-闭联核苷酸、无环3,4-二羟基丁基核苷酸、无环3,5-二羟基戊基核苷酸、3'-3'-反向核苷酸部分、3'-3'-反向脱碱基部分、3'-2'-反向核苷酸部分、3'-2'-反向脱碱基部分、5'-5'-反向核苷酸部分、5'-5'-反向脱碱基部分、3'-5'-反向脱氧脱碱基部分、磷酸5'-氨基-烷基酯、磷酸1,3-二氨基-2-丙酯、磷酸3-氨基丙酯、磷酸6-氨基己酯、磷酸1,2-氨基十二烷基酯、磷酸羟丙酯、磷酸1,4-丁二醇酯、3'-氨基磷酸酯、5'-氨基磷酸酯、磷酸己酯、磷酸氨

基己酯、3'-磷酸酯、5'-氨基、3'-硫代磷酸酯、5'-硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯以及桥联或未桥联的磷酸甲酯或5'-巯基部分(参见,例如美国专利号5,998,203;Beaucage等人,Tetrahedron 49:1925(1993))。磷酸主链修饰(即,产生经修饰的核苷酸间键联)的非限制性实例包括硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酸甲酯、磷酸三酯、吗啉代、酰胺化物、氨基甲酸酯、羧甲基、乙酰胺酯、聚酰胺、磺酸酯、磺酰胺、氨基磺酸酯、甲缩醛(formacetal)、硫代甲缩醛以及烷基甲硅烷基取代(参见,例如Hunziker等人,Nucleic Acid Analogues: Synthesis and Properties,在Modern Synthetic Methods,VCH,331-417(1995)中;Mesmaeker等人,Novel Backbone Replacements for Oligonucleotides,在Carbohydrate Modifications in Antisense Research,ACS,24-39(1994)中)。此类化学修饰可发生在siRNA的有义链、反义链或这两条链的5'-末端和/或3'-末端。这些参考文献的公开内容出于所有目的通过引用整体并入本文。

[0203] 在一些实施方案中,siRNA分子的有义链和/或反义链还可包含3'-末端突出端,其具有约1至约4个(例如,1个、2个、3个或4个)2'-脱氧核糖核苷酸和/或经修饰的和未修饰的核苷酸的任何组合。可引入到siRNA分子中的经修饰的核苷酸和化学修饰的类型的另外实例描述于例如英国专利号GB 2,397,818 B和美国专利公布号20040192626、20050282188和20070135372中,所述专利的公开内容出于所有目的通过引用整体并入本文。

[0204] 本文描述的siRNA分子可在siRNA的一条链或两条链中任选地包含一个或多个非核苷酸。如本文所使用,术语“非核苷酸”是指可替代一个或多个核苷酸单元掺入到核酸链中的任何基团或化合物,包括糖和/或磷酸酯取代,并且允许剩余的碱基展现其活性。所述基团或化合物是脱碱基的,因为其不含有公认的核苷酸碱基如腺苷、鸟嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶并且因此在1'-位上缺乏碱基。

[0205] 在其他实施方案中,siRNA的化学修饰包括将缀合物附接至siRNA分子。缀合物可经由共价附接例如像生物可降解的接头在siRNA的有义链和/或反义链的5'-末端和/或3'-末端上附接。还可例如通过氨基甲酸酯基团或其他连接基团将缀合物附接至siRNA(参见,例如美国专利公布号20050074771、20050043219和20050158727)。在某些实例中,缀合物是有益于siRNA递送至细胞中的分子。适用于附接至siRNA的缀合物分子的实例包括但不限于类固醇如胆固醇、二醇如聚乙二醇(PEG)、人血清白蛋白(HSA)、脂肪酸、类胡萝卜素、萜烯、胆汁酸、叶酸盐(例如,叶酸、叶酸盐类似物及其衍生物)、糖(例如,半乳糖、半乳糖胺、N-乙酰基半乳糖胺、葡萄糖、甘露糖、果糖、岩藻糖等)、磷脂、肽、能够介导细胞摄取的细胞受体的配体及其组合(参见,例如美国专利公布号20030130186、20040110296和20040249178;美国专利号6,753,423)。其他实例包括描述于美国专利公布号20050119470和20050107325中的亲脂性部分、维生素、聚合物、肽、蛋白质、核酸、小分子、寡糖、碳水化合物簇、嵌入剂、小沟粘合剂、裂解剂以及交联剂缀合物分子。其他的实例包括描述于美国专利公布号20050153337中的2'-O-烷基胺、2'- β -烷氧基烷基胺、多胺、C5-阳离子修饰的嘧啶、阳离子肽、胍基、脒鎓基团、阳离子氨基酸缀合物分子。其他实例包括描述于美国专利公布号20040167090中的疏水性基团、膜活性化合物、细胞穿透化合物、细胞靶向信号、相互作用改性剂以及空间稳定剂缀合物分子。另外的实例包括描述于美国专利公布号20050239739中的缀合物分子。可针对siRNA的改进的药物代谢动力学特征、生物利用度和/或稳定性同时保留RNAi活性来评价所使用的缀合物的类型和缀合至siRNA分子的程度。因此,本领域技术

人员可使用任何各种熟知的体外细胞培养物或体内动物模型筛选具有附接至其上的各种缀合物的siRNA分子以鉴定具有改进性质和全部RNAi活性的siRNA分子。上述专利文件的公开内容出于所有目的通过引用整体并入本文。

[0206] 靶基因

[0207] 在某些实施方案中,本文描述的核酸-脂质颗粒的核酸(例如,siRNA)组分可用来下调或沉默目标基因的翻译(即,表达)。目标基因包括但不限于:与病毒感染和存活相关的基因、与代谢疾病和病症(例如,肝脏疾病和病症)相关的基因、与肿瘤发生和细胞转化(例如,癌症)相关的基因、血管生成基因、免疫调节基因如与炎性和自身免疫应答相关的那些、配体受体基因以及与神经变性病症相关的基因。在某些实施方案中,目标基因在肝细胞中表达。

[0208] 与病毒感染和存活相关的基因包括病毒表达的那些基因,以便与细胞结合,进入细胞和在细胞中复制。特别感兴趣的是与慢性病毒疾病相关的病毒序列。特别感兴趣的病毒序列包括以下病毒的序列:丝状病毒,如埃博拉病毒和马尔堡病毒(参见,例如,Geisbert等人,J.Infect.Dis.,193:1650-1657(2006));沙粒病毒如拉沙病毒、胡宁病毒、马丘波病毒、瓜纳瑞托病毒和萨比亚病毒(Buchmeier等人,Arenaviridae:the viruses and their replication,In:FIELD'S VIROLOGY,Knipe等人(编辑),第4版,Lippincott-Raven,Philadelphia,(2001));流感病毒如甲型流感病毒、乙型流感病毒和丙型流感病毒(参见,例如Steinhauer等人,Annu Rev Genet.,36:305-332(2002);和Neumann等人,J Gen Virol.,83:2635-2662(2002));肝炎病毒(参见,例如Hamasaki等人,FEBS Lett.,543:51(2003);Yokota等人,EMBO Rep.,4:602(2003);Schlomag等人,Hepatology,37:764(2003);Wilson等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,100:2783(2003);Kapadia等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,100:2014(2003);和FIELD'S VIROLOGY,Knipe等人(编辑),第4版,Lippincott-Raven,Philadelphia(2001));人免疫缺陷病毒(HIV)(Banerjee等人,Mol.Ther.,8:62(2003);Song等人,J.Virol.,77:7174(2003);Stephenson,JAMA,289:1494(2003);Qin等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,100:183(2003));疱疹病毒(Jia等人,J.Virol.,77:3301(2003));以及人乳头瘤病毒(HPV)(Hall等人,J.Virol.,77:6066(2003);Jiang等人,Oncogene,21:6041(2002))。

[0209] 可被沉默的示例性丝状病毒核酸序列包括但不限于编码结构蛋白(例如,VP30、VP35、核蛋白(NP)、聚合酶蛋白(L-pol))和膜相关蛋白(例如,VP40、糖蛋白(GP)、VP24)的核酸序列。用于埃博拉病毒的完整基因组序列在例如Genbank登录号NC_002549;AY769362;NC_006432;NC_004161;AY729654;AY354458;AY142960;AB050936;AF522874;AF499101;AF272001;以及AF086833中列出。埃博拉病毒VP24序列在例如Genbank登录号U77385和AY058897中列出。埃博拉病毒L-pol序列在例如Genbank登录号X67110中列出。埃博拉病毒VP40序列在例如Genbank登录号AY058896中列出。埃博拉病毒NP序列在例如Genbank登录号AY058895中列出。埃博拉病毒GP序列在例如Genbank登录号AY058898;Sanchez等人,Virus Res.,29:215-240(1993);Will等人,J.Virol.,67:1203-1210(1993);Volchikov等人,FEBS Lett.,305:181-184(1992);以及美国专利号6,713,069中列出。额外的埃博拉病毒序列在例如Genbank登录号L11365和X61274中列出。用于马尔堡病毒的完整基因组序列在例如Genbank登录号NC_001608;AY430365;AY430366和AY358025中列出。马尔堡病毒GP序列在例

如Genbank登录号AF005734;AF005733和AF005732中列出。马尔堡病毒VP35序列在例如Genbank登录号AF005731和AF005730中列出。额外的马尔堡病毒序列在例如Genbank登录号X64406;Z29337;AF005735和Z12132中列出。靶向埃博拉病毒和马尔堡病毒核酸序列的siRNA分子的非限制性实例包括在美国专利公布号20070135370中描述的那些,所述专利的公开内容出于所有目的通过引用整体并入本文。

[0210] 可被沉默的示例性流感病毒核酸序列包括但不限于编码核蛋白(NP)、基质蛋白(M1和M2)、非结构蛋白(NS1和NS2)、RNA聚合酶(PA、PB1、PB2)、神经氨酸酶(NA)以及血凝素(HA)的核酸序列。甲型流感病毒NP序列在例如Genbank登录号NC_004522;AY818138;AB166863;AB188817;AB189046;AB189054;AB189062;AY646169;AY646177;AY651486;AY651493;AY651494;AY651495;AY651496;AY651497;AY651498;AY651499;AY651500;AY651501;AY651502;AY651503;AY651504;AY651505;AY651506;AY651507;AY651509;AY651528;AY770996;AY790308;AY818138;以及AY818140中列出。甲型流感病毒PA序列在例如Genbank登录号AY818132;AY790280;AY646171;AY818132;AY818133;AY646179;AY818134;AY551934;AY651613;AY651610;AY651620;AY651617;AY651600;AY651611;AY651606;AY651618;AY651608;AY651607;AY651605;AY651609;AY651615;AY651616;AY651640;AY651614;AY651612;AY651621;AY651619;AY770995;以及AY724786中列出。靶向流感病毒核酸序列的siRNA分子的非限制性实例包括在美国专利公布号20070218122中描述的那些,所述专利的公开内容出于所有目的通过引用整体并入本文。

[0211] 可被沉默的示例性肝炎病毒核酸序列包括但不限于在转录和翻译中涉及的核酸序列(例如,En1、En2、X、P)以及编码结构蛋白(例如,包括C蛋白和C相关蛋白的核心蛋白;包括S蛋白、M蛋白和/或L蛋白的衣壳蛋白和包膜蛋白或其片段)的核酸序列(参见,例如FIELDS VIROLOGY,同上)。可被沉默的示例性丙型肝炎病毒(HCV)核酸序列包括但不限于5'-非翻译区(5'-UTR)、3'-非翻译区(3'-UTR)、多蛋白翻译起始密码子区、内部核糖体进入位点(IRES)序列、和/或编码以下蛋白质的核酸序列:核心蛋白、E1蛋白、E2蛋白、p7蛋白、NS2蛋白、NS3蛋白酶/解旋酶、NS4A蛋白、NS4B蛋白、NS5A蛋白、和/或NS5B RNA依赖性的RNA聚合酶。HCV基因组序列在例如Genbank登录号NC_004102(HCV基因型1a)、AJ238799(HCV基因型1b)、NC_009823(HCV基因型2)、NC_009824(HCV基因型3)、NC_009825(HCV基因型4)、NC_009826(HCV基因型5)和NC_009827(HCV基因型6)中列出。甲型肝炎病毒核酸序列在例如Genbank登录号NC_001489中列出;乙型肝炎病毒核酸序列在例如Genbank登录号NC_003977中列出;丁型肝炎病毒核酸序列在例如Genbank登录号NC_001653中列出;戊型肝炎病毒核酸序列在例如Genbank登录号NC_001434中列出;以及庚型肝炎病毒核酸序列在例如Genbank登录号NC_001710中列出。使编码与病毒感染和存活相关的基因的序列沉默可方便地与用来治疗病毒病状的常规剂的施用组合使用。靶向肝炎病毒核酸序列的siRNA分子的非限制性实例包括在美国专利公布号20060281175;20050058982和20070149470;美国专利号7,348,314;和2009年3月20日提交的美国临时申请号61/162,127中描述的那些,所述专利的公开内容出于所有目的通过引用整体并入本文。

[0212] 与代谢疾病和病症(例如,其中肝脏为靶标的病症以及肝脏疾病和病症)相关的基因包括例如在血脂异常中表达的基因(例如肝脏X受体如LXR α 和LXR β (Genbank登录号NM_007121)、法尼酯X受体(FXR)(Genbank登录号NM_005123)、固醇调控元件结合蛋白(SREBP)、

位点-1蛋白酶(S1P)、3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶-A还原酶(HMG辅酶-A还原酶)、载脂蛋白B(APOB)(Genbank登录号NM_000384)、载脂蛋白CIII(APOC3)(Genbank登录号NM_000040和NG_008949REGION:5001.8164)和载脂蛋白E(APOE)(Genbank登录号NM_000041和NG_007084REGION:5001.8612));以及在糖尿病中表达的基因(例如,葡萄糖6-磷酸酶)(参见,例如Forman等人,Cell,81:687(1995);Seol等人,Mol.Endocrinol.,9:72(1995);Zavacki等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,94:7909(1997);Sakai等人,Cell,85:1037-1046(1996);Duncan等人,J.Biol.Chem.,272:12778-12785(1997);Willy等人,Genes Dev.,9:1033-1045(1995);Lehmann等人,J.Biol.Chem.,272:3137-3140(1997);Janowski等人,Nature,383:728-731(1996);以及Peet等人,Cell,93:693-704(1998))。本领域技术人员将了解,与代谢疾病和病症(例如,其中肝脏为靶的疾病和病症以及肝脏疾病和病症)相关的基因包括在肝脏本身中表达的基因以及在其他器官和组织中表达的基因。使编码与代谢疾病和病症相关的基因的序列沉默可方便地与用来治疗疾病或病症的常规剂的施用组合使用。靶向ApoB基因的siRNA分子的非限制性实例包括在美国专利公布号20060134189中描述的那些,所述专利的公开内容出于所有目的通过引用整体并入本文。靶向ApoC3基因的siRNA分子的非限制性实例包括在2009年1月26日提交的美国临时申请号61/147,235中描述的那些,所述专利的公开内容出于所有目的通过引用整体并入本文。

[0213] 与肿瘤发生和细胞转化(例如,癌症或其他瘤形成)相关的基因序列的实例包括有丝分裂驱动蛋白如Eg5(KSP,KIF11;Genbank登录号NM_004523);丝氨酸/苏氨酸激酶如polo样激酶1(PLK-1)(Genbank登录号NM_005030;Barr等人,Nat.Rev.Mol.Cell.Biol.,5:429-440(2004));酪氨酸激酶如WEE1(Genbank登录号NM_003390和NM_001143976);凋亡抑制剂如XIAP(Genbank登录号NM_001167);COP9信号体亚基如CSN1、CSN2、CSN3、CSN4、CSN5(JAB1;Genbank登录号NM_006837);CSN6、CSN7A、CSN7B以及CSN8;泛素连接酶如COP1(RFWD2;Genbank登录号NM_022457和NM_001001740);以及组蛋白去乙酰酶如HDAC1、HDAC2(Genbank登录号NM_001527)、HDAC3、HDAC4、HDAC5、HDAC6、HDAC7、HDAC8、HDAC9等。靶向Eg5和XIAP基因的siRNA分子的非限制性实例包括在2007年5月29日提交的美国专利申请序列号11/807,872中描述的那些,所述专利申请的公开内容出于所有目的通过引用整体并入本文。靶向PLK-1基因的siRNA分子的非限制性实例包括在美国专利公布号20050107316和20070265438;和2008年12月23日提交的美国专利申请序列号12/343,342中描述的那些,所述专利的公开内容出于所有目的通过引用整体并入本文。靶向CSN5基因的siRNA分子的非限制性实例包括在2008年4月15日提交的美国临时申请号61/045,251中描述的那些,所述临时申请的公开内容出于所有目的通过引用整体并入本文。

[0214] 与肿瘤发生或细胞转化相关的基因序列的另外实例包括易位序列如MLL融合基因、BCR-ABL(Wilda等人,Oncogene,21:5716(2002);Scherr等人,Blood,101:1566(2003))、TEL-AML1、EWS-FLI1、TLS-FUS、PAX3-FKHR、BCL-2、AML1-ETO和AML1-MTG8(Heidenreich等人,Blood,101:3157(2003));过表达序列如多药耐药性基因(Nieth等人,FEBS Lett.,545:144(2003);Wu等人,Cancer Res.63:1515(2003))、细胞周期蛋白(Li等人,Cancer Res.,63:3593(2003);Zou等人,Genes Dev.,16:2923(2002))、 β -连环蛋白(Verma等人,Clin Cancer Res.,9:1291(2003))、端粒酶基因(Kosciolek等人,Mol Cancer Ther.,2:209(2003))、c-MYC、N-MYC、BCL-2、生长因子受体(例如,EGFR/ErbB1(Genbank登录号NM_

005228、NM_201282、NM_201283和NM_201284;还参见Nagy等人Exp.Cell Res.,285:39-49 (2003)、ErbB2/HER-2 (Genbank登录号NM_004448和NM_001005862)、ErbB3 (Genbank登录号NM_001982和NM_001005915)和ErbB4 (Genbank登录号NM_005235和NM_001042599);以及突变序列如RAS (在Tuschl和Borkhardt,Mol.Interventions,2:158(2002)中综述)。靶向EGFR基因的siRNA分子的非限制性实例包括2007年5月29日提交的美国专利申请序列号11/807,872中描述的那些,所述专利申请的公开内容出于所有目的通过引用整体并入本文。

[0215] 使编码DNA修复酶的序列沉默与化学治疗剂的施用组合使用(Collis等,Cancer Res.,63:1550(2003))。编码与肿瘤迁移相关的蛋白质的基因还靶向感兴趣的序列,例如整合蛋白、选择蛋白和金属蛋白酶。上述实例不是排他的。本领域技术人员将理解,可包括有利于或促进肿瘤发生或细胞转化、肿瘤生长或肿瘤迁移的任何全部或部分基因序列作为模板序列。

[0216] 血管生成基因能够促进新血管的形成。特别令人感兴趣的是血管内皮生长因子(VEGF)(Reich等人,Mol.Vis.,9:210(2003))或VEGFR。靶向VEGFR的siRNA序列在例如GB 2396864;美国专利公布号20040142895;和CA 2456444中列出,所述专利的公开内容出于所有目的通过引用整体并入本文。

[0217] 抗血管生成基因能够抑制新血管形成。这些基因对于治疗其中血管生成在疾病的病理发展中起作用的那些癌症特别有用。抗血管生成基因的实例包括但不限于内皮抑素(参见例如,美国专利号6,174,861)、血管抑素(参见例如,美国专利号5,639,725)和VEGFR2(参见例如,Decaussin等人,J.Pathol.,188:369-377(1999)),所述文献的公开内容出于所有目的通过引用整体并入本文。

[0218] 免疫调节基因是调节一种或多种免疫应答的基因。免疫调节基因的实例包括但不限于细胞因子如生长因子(例如,TGF- α 、TGF- β 、EGF、FGF、IGF、NGF、PDGF、CGF、GM-CSF、SCF等)、白细胞介素(例如,IL-2、IL-4、IL-12(Hill等人,J.Immunol.,171:691(2003))、IL-15、IL-18、IL-20等)、干扰素(例如,IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 等)以及TNF。Fas基因和Fas配体基因也是目标免疫调节靶序列(Song等人,Nat.Med.,9:347(2003))。在造血细胞和淋巴样细胞中编码二级信号传导分子的基因也包括在本发明中,例如Tec家族激酶如布鲁顿酪氨酸激酶(Btk)(Heinonen等人,FEBS Lett.,527:274(2002))。

[0219] 细胞受体配体包括能够与细胞表面受体(例如胰岛素受体、EPO受体、G蛋白偶联受体、具有酪氨酸激酶活性的受体、细胞因子受体、生长因子受体等)结合以调节(例如,抑制,激活等)受体所参与的生理途径(例如,葡萄糖水平调节、血细胞发育、有丝分裂发生等)。细胞受体配体的实例包括但不限于细胞因子、生长因子、白细胞介素、干扰素、促红细胞生成素(EPO)、胰岛素、胰高血糖素、G蛋白偶联受体配体等。编码三核苷酸重复序列(例如,CAG重复序列)的扩增的模板可用于在由三核苷酸重复序列的扩增引起的神经变性病中使致病序列沉默,所述神经变性病如脊髓延髓肌肉萎缩和亨廷顿氏病(Caplen等人,Hum.Mol.Genet.,11:175(2002))。

[0220] 可被核酸(例如,被siRNA)靶向以下调或沉默基因表达的某些其他靶基因包括但不限于肌动蛋白、 α 2-平滑肌、Aorta(ACTA2)、乙醇脱氢酶1A(ADH1A)、乙醇脱氢酶4(ADH4)、乙醇脱氢酶6(ADH6)、Afinin(AFM)、血管紧张素原(AGT)、丝氨酸-丙酮酸氨基转移酶(AGXT)、 α -2-HS-糖蛋白(AHSG)、醛-酮还原酶家族1成员C4(AKR1C4)、血清白蛋白(ALB)、 α -

1-微球蛋白/二库宁前体 (AMBP)、血管生成素相关蛋白3 (ANGPTL3)、血清淀粉样蛋白P组分 (APCS)、载脂蛋白A-II (APOA2)、载脂蛋白B-100 (APOB)、载脂蛋白C3 (APOC3)、载脂蛋白C-IV (APOC4)、载脂蛋白F (APOF)、 β -2-糖蛋白1 (APOH)、水通道蛋白9 (AQP9)、胆汁酸-CoA:氨基酸 N-酰基转移酶 (BAAT)、C4b结合蛋白 β 链 (C4BPB)、由LINC01554 (C5orf27) 编码的推定未表征蛋白、补体因子3 (C3)、补体因子5 (C5)、补体组分C6 (C6)、补体组分C8 α 链 (C8A)、补体组分C8 β 链 (C8B)、补体组分C8 γ 链 (C8G)、补体组分C9 (C9)、钙调蛋白结合转录激活因子1 (CAMTA1)、CD38 (CD38)、补体因子B (CFB)、补体因子H相关蛋白1 (CFHR1)、补体因子H相关蛋白2 (CFHR2)、补体因子H相关蛋白3 (CFHR3)、大麻素受体1 (CNR1)、血浆铜蓝蛋白 (CP)、羧肽酶B2 (CPB2)、结缔组织生长因子 (CTGF)、C-X-C基序趋化因子2 (CXCL2)、细胞色素P450 1A2 (CYP1A2)、细胞色素P450 2A6 (CYP2A6)、细胞色素P450 2C8 (CYP2C8)、细胞色素P450 2C9 (CYP2C9)、细胞色素P450家族2亚家族D成员6 (CYP2D6)、细胞色素P450 2E1 (CYP2E1)、叶绿醌 ω -羟化酶CYP4F2 (CYP4F2)、7- α -羟基胆甾-4-烯-3-酮12- α -羟化酶 (CYP8B1)、二肽基肽酶4 (DPP4)、凝血因子12 (F12)、凝血因子II (凝血酶) (F2)、凝血因子IX (F9)、纤维蛋白原 α 链 (FGA)、纤维蛋白原 β 链 (FGB)、纤维蛋白原 γ 链 (FGG)、纤维蛋白原样1 (FGL1)、含黄素单氧化酶3 (FM03)、含黄素单氧化酶5 (FM05)、群组特异性组分 (维生素D结合蛋白) (GC)、生长激素受体 (GHR)、甘氨酸N-甲基转移酶 (GNMT)、透明质酸结合蛋白2 (HABP2)、铁调素抗微生物肽 (HAMP)、羟基酸氧化酶 (乙醇酸氧化酶) 1 (HA01)、HGF激活因子 (HGFAC)、结合珠蛋白相关蛋白质;结合珠蛋白 (HPR)、血色素结合蛋白 (HPX)、富含组氨酸的糖蛋白 (HRG)、羟基类固醇 (11- β) 脱氢酶1 (HSD11B1)、羟基类固醇 (17- β) 脱氢酶13 (HSD17B13)、间 α -胰蛋白酶抑制因子重链H1 (ITIH1)、间 α -胰蛋白酶抑制因子重链H2 (ITIH2)、间 α -胰蛋白酶抑制因子重链H3 (ITIH3)、间 α -胰蛋白酶抑制因子重链H4 (ITIH4)、前激肽释放酶 (KLKB1)、乳酸脱氢酶A (LDHA)、肝脏表达的抗菌肽2 (LEAP2)、白细胞源性趋化因子2 (LECT2)、脂蛋白 (a) (LPA)、甘露聚糖结合凝集素酶2 (MASP2)、S-腺苷甲硫氨酸合酶同种型1型 (MAT1A)、NADPH氧化酶4 (NOX4)、具有[ADP-核糖]聚合酶1 (PARP1)、对氧磷酶1 (PON1)、对氧磷酶3 (PON3)、维生素K依赖性蛋白C (PROC)、视黄醇脱氢酶16 (RDH16)、血清淀粉样蛋白A4、组成型 (SAA4)、丝氨酸脱水酶 (SDS)、Serp家族A成员1 (SERPINA1)、Serp A11 (SERPINA11)、激肽释放素抑素 (SERPINA4)、皮质类固醇结合球蛋白 (SERPINA6)、抗凝血酶-III (SERPINC1)、肝素辅因子2 (SERPIND1)、Serp家族H成员1 (SERPINH1)、溶质运载蛋白家族5成员2 (SLC5A2)、纳/胆汁酸协同转运蛋白 (SLC10A1)、溶质运载蛋白家族13成员5 (SLC13A5)、溶质运载蛋白家族22成员1 (SLC22A1)、溶质运载蛋白家族25成员47 (SLC25A47)、溶质运载蛋白家族2,促葡萄糖转运蛋白成员2 (SLC2A2)、钠偶联的中性氨基酸转运蛋白4 (SLC38A4)、溶质运载蛋白有机阴离子转运蛋白家族1B1 (SLC01B1)、神经鞘磷脂磷酸二酯酶1 (SMPD1)、胆汁盐磺基转移酶 (SULT2A1)、酪氨酸氨基转移酶 (TAT)、色氨酸2,3-双加氧酶 (TD02)、UDP葡萄糖醛酸基转移酶2家族,多肽B10 (UGT2B10)、UDP葡萄糖醛酸基转移酶2家族,多肽B15 (UGT2B15)、UDP葡萄糖醛酸基转移酶2家族,多肽B4 (UGT2B4) 以及玻连蛋白 (VTN)。

[0221] 除了其用于使治疗目的的任何以上描述的基因的表达沉默之外,本文描述的某些核酸(例如siRNA)还有用于研究和开发应用以及诊断、预防、预后、临床和其他医疗保健应用。作为非限制性实例,某些核酸(例如siRNA)可用于针对测试感兴趣的基因是否可能成为治疗性靶的靶验证研究中。某些核酸(例如siRNA)还可用于旨在发现作为可能的治疗性靶

的基因的靶鉴定研究中。

[0222] CRISPR

[0223] 靶向基因组编辑已从小众技术发展为许多生物学家使用的方法。聚簇规律间隔的短回文重复序列 (CRISPR) 技术的出现在很大程度上推动了这一进展 (参见例如, Sander等人, *Nature Biotechnology*, 32(4), 347-355, 包括补充信息 (2014) 和国际公布号 WO 2016/197132 和 WO 2016/197133)。因此, 本文提供了可与 CRISPR 技术组合使用以治疗诸如 HBV 的疾病的改进 (例如脂质纳米颗粒及其制剂)。关于使用 CRISPR 的靶标, 可将 CRISPR 技术中使用的向导 RNA (gRNA) 设计为靶向特异性鉴定的序列, 例如 HBV 基因组的靶基因。此类靶序列的实例在国际公布号 WO 2016/197132 中提供。此外, 国际公布号 WO 2013/151665 (例如, 参见表 6; 所述文件通过引用明确地并入本文, 特别是包括表 6, 以及相关的序列表) 描述在 mRNA 表达构建体的背景下要求保护的约 35,000 个 mRNA 序列。本发明的某些实施方案利用 CRISPR 技术来靶向这些序列中的任一者的表达。本发明的某些实施方案还可利用 CRISPR 技术来靶向本文讨论的靶基因的表达。

[0224] aiRNA

[0225] 像 siRNA 一样, 不对称干扰 RNA (aiRNA) 可募集 RNA-诱导的沉默复合体 (RISC) 并且通过介导相对于反义链的 5' 末端的核苷酸 10 与核苷酸 11 之间的靶序列的序列特异性裂解而在哺乳动物细胞中导致各种基因的有效沉默 (Sun 等人, *Nat. Biotech.*, 26:1379-1382 (2008))。通常, aiRNA 分子包含具有有义链和反义链的短 RNA 双链体, 其中双链体在反义链的 3' 末端和 5' 末端上含有突出端。aiRNA 一般为不对称的, 因为当与互补反义链相比时, 有义链在两端上更短。在一些方面中, 可在类似于用于 siRNA 分子的那些条件下设计、合成和退火 aiRNA 分子。作为一个非限制性实例, 可使用以上描述用于选择 siRNA 序列的方法选择和产生 aiRNA 序列。

[0226] 在另一个实施方案中, 可设计在反义链的 3' 末端和 5' 末端上具有突出端的各种长度 (例如, 约 10-25、12-20、12-19、12-18、13-17 或 14-17 个碱基对, 更通常地 12、13、14、15、16、17、18、19 或个碱基对) 的 aiRNA 双链体以靶向目标 mRNA。在某些实例中, aiRNA 分子的有义链的长度为约 10-25、12-20、12-19、12-18、13-17 或 14-17 个核苷酸, 更通常地长度为 12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 个核苷酸。在某些其他实例中, aiRNA 分子的反义链的长度为约 15-60、15-50 或 15-40 个核苷酸, 更通常地长度为约 15-30、15-25 或 19-25 个核苷酸, 并且优选地长度为约 20-24、21-22 或 21-23 个核苷酸。

[0227] 在一些实施方案中, 5' 反义突出端含有一个、两个、三个、四个或更多个非靶向核苷酸 (例如, “AA”、“UU”、“dTdT”等)。在其他实施方案中, 3' 反义突出端含有一个、两个、三个、四个或更多个非靶向核苷酸 (例如, “AA”、“UU”、“dTdT”等)。在某些方面中, 本文描述的 aiRNA 分子可例如在双链 (双链体) 区和/或在反义突出端中包含一个或多个经修饰的核苷酸。作为一个非限制性实例, aiRNA 序列可包含一个或多个以上针对 siRNA 序列描述的经修饰的核苷酸。在优选的实施方案中, aiRNA 分子包含 2' OMe 核苷酸例如像 2' OMe-鸟苷核苷酸、2' OMe-尿苷核苷酸或其混合物。

[0228] 在某些实施方案中, aiRNA 分子可包含相应于 siRNA 分子例如本文描述的 siRNA 分子之一的反义链的反义链。在其他实施方案中, aiRNA 分子可用于使上述靶基因中的任一者的表达沉默, 例如与病毒感染和存活相关的基因、与代谢疾病和病症相关的基因、与肿瘤发

生和细胞转化相关的基因、血管生成基因、免疫调节基因(如与炎症性和自身免疫应答相关的基因)、配体受体基因以及与神经变性病相关的基因。

[0229] miRNA

[0230] 通常,微小RNA(miRNA)为调节基因表达的长度为约21-23个核苷酸的单链RNA分子。miRNA由转录它们的DNA的基因编码,但是miRNA并没有翻译为蛋白质(非编码RNA);相反,每个初始转录物(初始-miRNA)均被加工为称作前体-miRNA的短茎-环结构并且最终成为功能性成熟miRNA。成熟miRNA分子与一个或多个信使RNA(mRNA)分子部分或完全互补,并且其主要功能为下调基因表达。miRNA分子的鉴定在例如Lagos-Quintana等人,Science,294:853-858;Lau等人,Science,294:858-862;和Lee等人,Science,294:862-864中描述。

[0231] 编码miRNA的基因比加工的成熟miRNA分子长很多。首先miRNA被转录为初始转录物或具有帽和多聚A尾的初始-miRNA并且在细胞核中被加工成称为前体-miRNA的短的、大约70个核苷酸的茎-环结构。通过称为由核酸酶Drosha和双链RNA结合蛋白Pasha组成的微处理器复合体的蛋白质复合体在动物体内进行此加工(Denli等人,Nature,432:231-235(2004))。然后通过核酸内切酶切丁酶相互作用在细胞质中将前体-miRNA加工为成熟的miRNA,这还启动RNA-诱导的沉默复合体(RISC)的形成(Bernstein等人,Nature,409:363-366(2001))。DNA的有义链或反义链可用作产生miRNA的模板。

[0232] 当切丁酶裂解前体-miRNA茎-环时,形成两个互补的短RNA分子,但只有一个合并到RISC复合体中。此链称为引导链并且基于5'末端的稳定性通过RISC复合体中的催化活性RNA酶argonaute蛋白来选择(Preali等人,Curr.Biol.,16:530-535(2006))。称为反引导或过客链的剩余链被降解为RISC复合体底物(Gregory等人,Cell,123:631-640(2005))。在合并到活性RISC复合体中之后,miRNA与其互补mRNA分子碱基配对并且诱导靶mRNA降解和/或翻译沉默。

[0233] 哺乳动物miRNA分子通常与靶mRNA序列的3'UTR中的位点互补。在某些实例中,miRNA与靶mRNA的退火通过阻断蛋白质翻译机制而抑制了蛋白质翻译。在某些其他例子中,miRNA与靶mRNA的退火通过类似于RNA干扰(RNAi)的方法有利于靶mRNA的裂解和降解。miRNA还可靶向相应于靶向的mRNA的基因组位点的甲基化。通常,与蛋白质的补体相关的miRNA功能统称为miRNP。

[0234] 在某些方面中,本文描述的miRNA分子的长度为约15-100、15-90、15-80、15-75、15-70、15-60、15-50或15-40个核苷酸,更通常地长度为约15-30、15-25或19-25个核苷酸,并且优选地长度为约20-24、21-22或21-23个核苷酸。在某些其他方面中,miRNA分子可包含一个或多个经修饰的核苷酸。作为一个非限制性实例,miRNA序列可包含一个或多个以上针对siRNA序列描述的经修饰的核苷酸。在优选的实施方案中,miRNA分子包含2'OMe核苷酸例如像2'OMe-鸟苷核苷酸、2'OMe-尿苷核苷酸或其混合物。

[0235] 在一些实施方案中,miRNA分子可用于使上述靶基因中的任一者的表达沉默,例如与病毒感染和存活相关的基因、与代谢疾病和病症相关的基因、与肿瘤发生和细胞转化相关的基因、血管生成基因、免疫调节基因(如与炎症性和自身免疫应答相关的基因)、配体受体基因以及与神经变性病相关的基因。

[0236] 在其他实施方案中,使用本发明的脂质颗粒(例如,核酸-脂质颗粒)施用阻断靶向目标mRNA的miRNA的活性的一种或多种剂。阻断剂的实例包括但不限于空间阻挡寡核苷酸、

锁核酸寡核苷酸以及吗啉代寡核苷酸。此类阻断剂可直接与miRNA结合或与靶mRNA上的miRNA结合位点结合。

[0237] 反义寡核苷酸

[0238] 在一个实施方案中,核酸为涉及感兴趣的靶基因或序列的反义寡核苷酸。术语“反义寡核苷酸”或“反义”包括与靶向的多核苷酸序列互补的寡核苷酸。反义寡核苷酸为与选择的序列互补的DNA或RNA的单链。反义RNA寡核苷酸通过与RNA结合防止互补RNA链的翻译。反义DNA寡核苷酸可用来靶向特异性的互补(编码或非编码)RNA。如果发生结合,此DNA/RNA杂交体可被酶RNA酶H降解。在具体实施方案中,反义寡核苷酸包含约10至约60个核苷酸,更优选地约15至约30个核苷酸。术语还涵盖可能不与所需的靶基因精确互补的反义寡核苷酸。因此,本发明可用于使用反义发现非靶特异性活性的实例中,或其中与靶序列含有一个或多个错配的反义序列为最优选的具体使用的实例中。

[0239] 已证明反义寡核苷酸为蛋白质合成的有效且靶向的抑制剂,并且因此可用来通过靶向基因特异性地抑制蛋白质合成。反义寡核苷酸用于抑制蛋白质合成的功效为良好确立的。例如,通过涉及其对应的mRNA序列的反义寡核苷酸抑制聚半乳糖醛酸酶(polygalacturonase)和毒蕈碱2型乙酰胆碱受体的合成(参见,美国专利号5,739,119和5,759,829)。此外,反义抑制的实例已证明有核蛋白细胞周期蛋白、多药耐药性基因(MDR1)、ICAM-1、E-选择蛋白、STK-1、纹状体GABAA受体以及人EGF(参见Jaskulski等人, Science, 240:1544-6 (1988); Vasanthakumar等人, Cancer Commun., 1:225-32 (1989); Penis等人, Brain Res Mol Brain Res., 15:57:310-20 (1998); 以及美国专利号5,801,154; 5,789,573; 5,718,709和5,610,288)。此外,反义构建体也已被描述抑制并且可用来治疗各种异常的细胞增殖例如癌症(参见,美国专利号5,747,470; 5,591,317; 以及5,783,683)。这些参考文献的公开内容出于所有目的通过引用整体并入本文。

[0240] 产生反义寡核苷酸的方法为本领域中已知的并且可容易地适合产生靶向任何多核苷酸序列的反义寡核苷酸。对给定的靶序列特异性的反义寡核苷酸序列的选择基于选择的靶序列的分析和二级结构、 T_m 、结合能以及相对稳定性的确定。可基于其相对不能形成二聚体、发夹或其他二级结构的能力选择反义寡核苷酸,所述结构将在宿主细胞中减少或禁止与靶mRNA的特异性结合。mRNA的高度优选的靶区包括处于或接近AUG翻译起始密码子的那些区和与mRNA的5'区基本上互补的那些序列。这些二级结构分析和靶位点选择考虑可例如使用OLIGO引物分析软件v.4版(Molecular Biology Insights)和/或BLASTN 2.0.5算法软件(Altschul等人, Nucleic Acids Res., 25:3389-402 (1997))来进行。

[0241] 核酶

[0242] 根据本发明的另一个实施方案,核酸-脂质颗粒与核酶缔合。核酶为具有拥有核酸内切酶活性的特异性催化结构域的RNA-蛋白质复合物(参见, Kim等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 84:8788-92 (1987); 和Forster等人, Cell, 49:211-20 (1987))。例如,大量核酶加速了高度特异性的磷酸酯转移反应,常常在寡核苷酸底物中仅裂解若干磷酸酯之一(参见, Cech等人, Cell, 27:487-96 (1981); Michel等人, J. Mol. Biol., 216:585-610 (1990); Reinhold-Hurek等人, Nature, 357:173-6 (1992))。此特异性归因于在化学反应之前经由特异性碱基配对相互作用的底物与核酶的内部引导序列(“IGS”)结合的需要。

[0243] 目前已知天然存在的酶促RNA分子的至少六种基本种类。每种均可在生理条件下

催化反式RNA磷酸二酯键的水解(并且因此可裂解其他RNA分子)。一般来说,酶性核酸通过首先结合于靶标RNA来起作用。所述结合通过酶性核酸的靶标结合部分来发生,所述部分被保持紧密邻近于分子的起裂解靶标RNA作用的酶性部分。因此,酶性核酸首先通过互补碱基配对来识别并接着结合靶标RNA,并且一旦结合于恰当位点,即以酶促方式起切割靶标RNA作用。策略性裂解所述靶标RNA将破坏它的引导编码蛋白质的合成的能力。在酶性核酸已结合并裂解它的RNA靶标之后,它自那个RNA释放以搜索另一靶标,并且可重复结合并裂解新靶标。

[0244] 酶促核酸分子可在例如锤头、发夹、肝炎δ病毒、I组内含子或RNA酶P RNA(与RNA引导序列相关)或脉孢菌属VS RNA基序中形成。锤头基序的具体实例在例如Rossi等人, *Nucleic Acids Res.*, 20:4559-65 (1992) 中描述。发夹基序的实例在例如EP 0360257; Hampel等人, *Biochemistry*, 28:4929-33 (1989); Hampel等人, *Nucleic Acids Res.*, 18:299-304 (1990); 以及美国专利号5,631,359中描述。肝炎δ病毒基序的实例在例如Perrotta等人, *Biochemistry*, 31:11843-52 (1992) 中描述。RNA酶P基序的实例在例如Guerrier-Takada等人, *Cell*, 35:849-57 (1983) 中描述。脉孢菌属VS RNA核酶基序的实例在例如Saville等人, *Cell*, 61:685-96 (1990); Saville等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:8826-30 (1991); Collins等人, *Biochemistry*, 32:2795-9 (1993) 中描述。I组内含子的实例在例如美国专利号4,987,071中描述。根据本发明使用的酶促核酸分子的重要特征是它们具有与一个或多个靶基因DNA或RNA区互补的特异性底物结合位点,并且它们在向分子施加RNA裂解活性的底物结合位点内或在其周围具有核苷酸序列。因此,核酶构建体不需要限制于本文提到的具体基序。这些参考文献的公开内容出于所有目的通过引用整体并入本文。

[0245] 产生靶向任何多核苷酸序列的核酶的方法为本领域中已知的。可如在例如PCT公布号W0 93/23569和W0 94/02595中所描述设计核酶并且合成以如在其中所描述的在体外和/或体内测试。这些PCT公布的公开内容出于所有目的通过引用整体并入本文。

[0246] 核酶活性可通过改变核酶结合臂的长度或化学合成具有防止其被血清核糖核酸酶降解的经修饰的核酶(参见,例如PCT公布号W0 92/07065、W0 93/15187、W0 91/03162和W0 94/13688;EP 92110298.4;以及美国专利号5,334,711,所述专利描述了可对酶促RNA分子的糖部分进行的各种化学修饰,所述专利的公开内容出于所有目的各自通过引用整体并入本文),增强其在细胞中的功效的修饰以及去除茎II碱基以缩短RNA合成时间和减少化学需要来优化。

[0247] 免疫刺激性寡核苷酸

[0248] 与本发明的脂质颗粒缔合的核酸可为免疫刺激性的,包括在向受试者施用能够诱导免疫应答的免疫刺激性寡核苷酸(ISS;单链或双链),所述受试者可为哺乳动物如人。ISS包括例如导致发夹二级结构的某些回文序列(参见,Yamamoto等人, *J. Immunol.*, 148:4072-6 (1992))或CpG基序以及其他已知的ISS特征(如多G结构域;参见PCT公布号W0 96/11266,所述专利的公开内容出于所有目的通过引用整体并入本文)。

[0249] 免疫刺激性核酸被认为在不需要它们特异性结合靶序列和减少靶序列的表达以便引起免疫应答时为非序列特异性的。因此,某些免疫刺激性核酸可包含相应于天然存在的基因或mRNA的区的序列,但是它们可仍然认为是非序列特异性的免疫刺激性核酸。

[0250] 在一个实施方案中,免疫刺激性核酸或寡核苷酸包含至少一个CpG二核苷酸。寡核

苷酸或CpG二核苷酸可为未甲基化或甲基化的。在另一个实施方案中,免疫刺激性核酸包含至少一个具有甲基化的胞嘧啶的CpG二核苷酸。在一个实施方案中,核酸包含单个CpG二核苷酸,其中CpG二核苷酸中的胞嘧啶为甲基化的。在替代实施方案中,核酸包含至少两个CpG二核苷酸,其中CpG二核苷酸中的至少一个胞嘧啶为甲基化的。在另外的实施方案中,存在于序列中的CpG二核苷酸中的每个胞嘧啶均为甲基化的。在另一个实施方案中,核酸包含多个CpG二核苷酸,其中至少一个CpG二核苷酸包含甲基化的胞嘧啶。适合用于本发明的组合物和方法的免疫刺激性寡核苷酸的实例在2008年12月31日提交的PCT申请号PCT/US08/88676、PCT公布号W0 02/069369和W0 01/15726、美国专利号6,406,705以及Raney等人, J.Pharm.Exper.Ther.,298:1185-92(2001)中描述,所述文献的公开内容各自出于所有目的通过引用整体并入本文。在某些实施方案中,用于本发明的组合物和方法中的寡核苷酸具有磷酸二酯(“PO”)骨架或硫代磷酸酯(“PS”)骨架,和/或在CpG基序中具有至少一个甲基化的胞嘧啶残基。

[0251] mRNA

[0252] 在某些实施方案中,核酸是一个或多个mRNA分子(例如,mRNA分子的混合物)。

[0253] 对mRNA的修饰

[0254] 在本发明的实践中使用的mRNA可包含一个、两个或多于两个核苷修饰。在一些实施方案中,相对于相应的未修饰的mRNA,经修饰的mRNA在引入了mRNA的细胞中表现出降低的降解。

[0255] 在一些实施方案中,经修饰的核苷包括吡啶-4-酮核糖核苷、5-氮杂-尿苷、2-硫代-5-氮杂-尿苷、2-硫代尿苷、4-硫代-假尿苷、2-硫代-假尿苷、5-羟基尿苷、3-甲基尿苷、5-羧甲基-尿苷、1-羧甲基-假尿苷、5-丙炔基-尿苷、1-丙炔基-假尿苷、5-牛磺酸甲基尿苷、1-牛磺酸甲基-假尿苷、5-牛磺酸甲基-2-硫代-尿苷、1-牛磺酸甲基-4-硫代-尿苷、5-甲基-尿苷、1-甲基-1-假尿苷、4-硫代-1-甲基-1-假尿苷、2-硫代-1-甲基-1-假尿苷、1-甲基-1-脱氮-假尿苷、2-硫代-1-甲基-1-脱氮-假尿苷、二氢尿苷、二氢假尿苷、2-硫代-二氢尿苷、2-硫代-二氢假尿苷、2-甲氧基尿苷、2-甲氧基-4-硫代-尿苷、4-甲氧基-假尿苷和4-甲氧基-2-硫代-假尿苷。

[0256] 在一些实施方案中,经修饰的核苷包括5-氮杂-胞苷、假异胞苷、3-甲基-胞苷、N4-乙酰基胞苷、5-甲酰基胞苷、N4-甲基胞苷、5-羟甲基胞苷、1-甲基-假异胞苷、吡咯并-胞苷、吡咯并-假异胞苷、2-硫代-胞苷、2-硫代-5-甲基-胞苷、4-硫代-假异胞苷、4-硫代-1-甲基-假异胞苷、4-硫代-1-甲基-1-脱氮-假异胞苷、1-甲基-1-脱氮-假异胞苷、泽布拉恩、5-氮杂-泽布拉恩、5-甲基-泽布拉恩、5-氮杂-2-硫代-泽布拉恩、2-硫代-泽布拉恩、2-甲氧基-胞苷、2-甲氧基-5-甲基-胞苷、4-甲氧基-假异胞苷和4-甲氧基-1-甲基-假异胞苷。

[0257] 在其他实施方案中,经修饰的核苷包括2-氨基嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、7-脱氮-腺嘌呤、7-脱氮-8-氮杂-腺嘌呤、7-脱氮-2-氨基嘌呤、7-脱氮-8-氮杂-2-氨基嘌呤、7-脱氮-2,6-二氨基嘌呤、7-脱氮-8-氮杂-2,6-二氨基嘌呤、1-甲基腺苷、N6-甲基腺苷、N6-异戊烯基腺苷、N6-(顺式-羟基异戊烯基)腺苷、2-甲硫基-N6-(顺式-羟基异戊烯基)腺苷、N6-甘氨酸基氨甲酰基腺苷、N6-苏氨酸基氨甲酰基腺苷、2-甲硫基-N6-苏氨酸基氨甲酰基腺苷、N6,N6-二甲基腺苷、7-甲基腺嘌呤、2-甲硫基-腺嘌呤和2-甲氧基-腺嘌呤。

[0258] 在具体实施方案中,经修饰的核苷是5'-0-(1-硫代磷酸酯)-腺苷、5'-0-(1-硫代

磷酸酯)-胞苷、5'-0-(1-硫代磷酸酯)-鸟苷、5'-0-(1-硫代磷酸酯)-尿苷或5'-0-(1-硫代磷酸酯)-假尿苷。提供 α -硫代取代的磷酸酯部分以便通过非天然的硫代磷酸酯主链键联来对RNA聚合物赋予稳定性。硫代磷酸酯RNA具有增加的核酸酶抗性并且因此在细胞环境中具有更长的半衰期。预期硫代磷酸酯连接的核酸还通过细胞先天性免疫分子的较弱结合/激活来减少先天性免疫应答。

[0259] 在某些实施方案中,例如,如果需要精确的蛋白质生产时间,则希望在细胞内降解引入细胞中的经修饰的核酸。因此,本发明提供一种含有降解结构域的经修饰的核酸,所述降解结构域能够在细胞内以定向的方式被作用。

[0260] 在其他实施方案中,经修饰的核苷包括肌苷、1-甲基-肌苷、怀俄苷、怀丁苷、7-脱氮-鸟苷、7-脱氮-8-氮杂-鸟苷、6-硫代-鸟苷、6-硫代-7-脱氮-鸟苷、6-硫代-7-脱氮-8-氮杂-鸟苷、7-甲基-鸟苷、6-硫代-7-甲基-鸟苷、7-甲基肌苷、6-甲氧基-鸟苷、1-甲基鸟苷、N2-甲基鸟苷、N2,N2-二甲基鸟苷、8-氧代-鸟苷、7-甲基-8-氧代-鸟苷、1-甲基-6-硫代-鸟苷、N2-甲基-6-硫代-鸟苷和N2,N2-二甲基-6-硫代-鸟苷。

[0261] 经修饰的核酸的任选组分

[0262] 在其他实施方案中,经修饰的核酸可包括其他任选的组分,其在一些实施方案中可以是有益的。这些任选的组分包括但不限于非翻译区、kozak序列、内含子核苷酸序列、内部核糖体进入位点(IRES)、帽和多聚A尾。例如,可提供5'非翻译区(UTR)和/或3'UTR,其中任一者或两者可独立地含有一种或多种不同的核苷修饰。在此类实施方案中,核苷酸修饰还可存在于可翻译区中。还提供了含有Kozak序列的核酸。

[0263] 另外,提供了含有一个或多个能够从核酸中切除的内含子核苷酸序列的核酸。

[0264] 非翻译区(UTR)

[0265] 基因的非翻译区(UTR)被转录但不被翻译。5'UTR始于转录起始位点,并且继续至起始密码子,但不包括起始密码子;而3'UTR在终止密码子之后立即开始,并且持续直到转录终止信号。越来越多的证据表明,UTR在核酸分子的稳定性和翻译方面起着调控作用。可将UTR的调控特征并入本发明中使用的mRNA中以增加分子的稳定性。在转录物被错误引导至所不希望的器官部位的情况下还可并入所述特定特征以确保转录物的受控下调。

[0266] 5'加帽

[0267] mRNA的5'帽结构涉及核输出,从而增加mRNA稳定性,并且结合mRNA帽结合蛋白(CBP),所述mRNA帽结合蛋白通过CBP与聚(A)结合蛋白缔合以形成成熟的环状mRNA物种来负责细胞中的mRNA稳定性和翻译能力。所述帽在mRNA剪接过程中进一步帮助去除5'近端内含子。

[0268] 内源性mRNA分子可以是5'端加帽的,从而在末端鸟苷帽残基与mRNA分子的5'末端转录的有义核苷酸之间产生5'-ppp-5'-三磷酸酯键联。这种5'-鸟苷酸帽然后可被甲基化以便产生N7-甲基-鸟苷酸残基。mRNA的5'端的末端和/或前末端转录的核苷酸的核糖也可任选地2'-O-甲基化。通过鸟苷酸帽结构的水解和裂解进行的5'-脱帽可靶向降解的核酸分子,如mRNA分子。

[0269] IRES序列

[0270] 含有内部核糖体进入位点(IRES)的mRNA也可用于实施本发明。IRES可用作唯一核糖体结合位点或可用作mRNA的多个核糖体结合位点之一。含有多于一个功能性核糖体结合

位点的mRNA可编码独立地通过核糖体翻译的几种肽或多肽(“多顺反子mRNA”)。当mRNA具有IRES时,进一步任选地提供第二可翻译区。可根据本发明使用的IRES序列的实例包括但不限于来自以下病毒的那些:细小核糖核酸病毒(例如FMDV)、昆虫病毒(CFFV)、脊髓灰质炎病毒(PV)、脑心肌炎病毒(ECMV)、口蹄疫病毒(FMDV)、丙型肝炎病毒(HCV)、典型猪瘟病毒(CSFV)、鼠白血病毒(MLV)、猿猴免疫缺陷病毒(SIV)或蟋蟀麻痹病毒(CrPV)。

[0271] 多聚A尾

[0272] 在RNA加工过程中,可将长链腺嘌呤核苷酸(多聚A尾)添加至多核苷酸如mRNA分子以便增加稳定性。紧随转录之后,转录物的3'端可被裂解以释放3'羟基。然后多聚A聚合酶将腺嘌呤核苷酸链添加至RNA。所述过程(称为多腺苷酸化)添加长度可介于100与250个残基之间的多聚A尾。

[0273] 一般而言,多聚A尾的长度大于30个核苷酸。在另一个实施方案中,多聚A尾在长度上大于35个核苷酸(例如,至少或大于约35、40、45、50、55、60、70、80、90、100、120、140、160、180、200、250、300、350、400、450、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800、1900、2,000、2,500以及3,000个核苷酸)。

[0274] 在这种背景下,多聚A尾可在长度上大于经修饰的mRNA 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%。多聚A尾还可被设计为它所属的经修饰的核酸的一部分。在这种背景下,多聚A尾可以是经修饰的mRNA的总长度或经修饰的mRNA减去多聚A尾的总长度的10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%或更多。

[0275] 产生mRNA分子

[0276] 用于分离RNA、合成RNA、杂交核酸、制备和筛选cDNA文库以及进行PCR的方法是本领域中熟知的(参见例如,Gubler和Hoffman, *Gene*, 25:263-269 (1983); Sambrook等人, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (第2版1989)); PCR方法同样如此(参见,美国专利号4,683,195和4,683,202; PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis等人, 编辑, 1990))。表达文库也是本领域技术人员熟知的。公开了在本发明中使用的一般方法的另外基础文章包括Kriegler, *Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual* (1990); 和 *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel等人, 编辑, 1994)。这些参考文献的公开内容出于所有目的通过引用整体并入本文。

[0277] 编码的多肽

[0278] 本文所述的核酸-脂质颗粒的mRNA组分可用于表达目标多肽。人的某些疾病是由其中蛋白质正常存在且具有活性的细胞类型中的功能性蛋白的缺失或受损引起的。由于例如编码基因的转录失活或由于编码基因中存在使蛋白质完全或部分无功能的突变,因此功能性蛋白可完全或部分缺失。由蛋白质的完全或部分失活引起的人疾病的实例包括X连锁严重联合免疫缺陷症(X-SCID)和肾上腺脑白质营养不良(X-ALD)。X-SCID是由编码共同的 γ 链蛋白的基因中的一个或多个突变引起的,所述基因是参与免疫系统中B细胞和T细胞的发育和成熟的几种白细胞介素受体的组分。X-ALD是由称为ABCD1的过氧化物酶体膜转运蛋白基因中的一个或多个突变引起的。患有X-ALD的个体在整个身体的组织中都具有非常高水平的长链脂肪酸,其导致可能导致精神障碍或死亡的多种症状。

[0279] 已经尝试使用基因疗法来治疗由其中蛋白质正常存在且具有活性的细胞类型中的功能性蛋白的缺乏或损害所引起的一些疾病。基因治疗通常包括将包含编码受影响蛋白

质的功能形式的基因的载体引入患病的人,并且表达所述功能性蛋白以治疗所述疾病。迄今为止,基因治疗取得了有限的成功。另外,例如在国际公布号W0 2018/006052和W0 2015/011633中描述了使用LNP递送mRNA的某些方面。

[0280] 如此,持续需要改进以在患有由功能性蛋白的完全或部分缺失引起的疾病的人中表达蛋白质的功能性形式,并且需要通过例如可触发更少的对疗法的免疫应答的方法和组合物进行的改进的核酸(例如,mRNA)递送。本发明的某些实施方案在此背景下是有用的。因此,在某些实施方案中,多肽的表达改善疾病或病症的一种或多种症状。本发明的某些组合物和方法可用于治疗由人体内功能性多肽的缺乏或水平降低引起的人疾病。在其他实施方案中,本发明的某些组合物和方法可用于表达用于治疗癌症的疫苗抗原。

[0281] 自我扩增RNA

[0282] 在某些实施方案中,核酸是一种或多种自我扩增RNA分子。自我扩增RNA(sa-RNA)也可称为自我复制RNA、具有复制能力的RNA、复制子或RepRNA。RepRNA(称为自我扩增mRNA)当来源于正链病毒时,是从缺乏至少一种结构基因的病毒基因组产生的;它可翻译和复制(因此“自我扩增”)而不会产生传染性子代病毒。在某些实施方案中,RepRNA技术可用于插入编码所需目标抗原的基因盒。例如,甲病毒基因组被分为两个开放阅读框(ORF):第一ORF编码RNA依赖性RNA聚合酶(复制酶)的蛋白,并且第二ORF编码结构蛋白。在sa-RNA疫苗构建体中,编码病毒结构蛋白的ORF可用任何选择的抗原替代,而病毒复制酶仍然是疫苗的组成部分,并且在免疫后驱动RNA的细胞内扩增。

[0283] 其他活性剂

[0284] 在某些实施方案中,与本发明的脂质颗粒缔合的活性剂可包含一种或多种治疗性蛋白、多肽或小的有机分子或化合物。此类治疗有效剂或药物的非限制性实例包括肿瘤药物(例如,化学治疗药物、激素治疗剂、免疫治疗剂、放射治疗剂等)、降脂剂、抗病毒药物、抗炎性化合物、抗抑郁剂、兴奋剂、止痛剂、抗生素、节育药剂、退热剂、血管扩张剂、抗血管生成剂、细胞血管剂(cytovascular agent)、信号转导抑制剂、心血管药物如抗心律不齐剂、激素、血管收缩剂和类固醇。这些活性剂可在本发明的脂质颗粒中单独施用或与包含核酸如干扰RNA或mRNA的本发明脂质颗粒组合施用(例如,共同施用)。

[0285] 化学治疗药物的非限制性实例包括基于铂的药物(例如,奥沙利铂、顺铂、卡铂、螺铂、异丙铂、沙铂等)、烷化剂(例如,环磷酰胺、异环磷酰胺、苯丁酸氮芥、白消安、美法仑、氮芥、乌拉莫司汀(ura mustine)、塞替派、亚硝基脲等)、抗代谢物(例如,5-氟尿嘧啶(5-FU)、硫唑嘌呤、甲氨蝶呤、甲酰四氢叶酸、卡培他滨、阿糖胞苷、氟尿苷、氟达拉滨、吉西他滨、培美曲塞、雷替曲塞等)、植物生物碱(例如,长春新碱、长春碱、长春瑞滨、长春地辛、鬼臼毒素、紫杉醇(紫杉酚)、多西他赛等)、拓扑异构酶抑制剂(例如,伊立替康(CPT-11;盐酸伊立替康(Camptosar))、托泊替康、安吡啶、依托泊苷(VP16)、磷酸依托泊苷、替尼泊苷等)、抗肿瘤抗生素(例如,多柔比星、阿霉素、柔红霉素、表柔比星、放线菌素、博来霉素、丝裂霉素、米托蒽醌、普卡霉素等)、酪氨酸激酶抑制剂(例如,吉非替尼(Iressa®)、舒尼替尼(Sutent®;SU11248)、厄洛替尼(Tarceva®;OSI-1774)、拉帕替尼(lapatinib)(GW572016;GW2016)、卡奈替尼(canertinib)(CI 1033)、司马沙尼(semaxinib)(SU5416)、瓦他拉尼(vatalanib)(PTK787/ZK222584)、索拉非尼(BAY 43-9006)、伊马替尼(Gleevec®;STI571)、达沙替尼(BMS-354825)、来氟米特(SU101)、凡德他尼(vandetanib)(Zactima™;ZD6474)等)、其药学

上可接受的盐、其立体异构体、其衍生物、其类似物及其组合。

[0286] 常规激素治疗剂的实例包括但不限于类固醇(例如,地塞米松)、非那雄胺、芳香酶抑制剂、他莫昔芬和戈舍瑞林以及其他促性腺激素释放激素激动剂(GnRH)。

[0287] 常规免疫治疗剂的实例包括但不限于免疫刺激剂(例如,卡介苗(BCG)、左旋咪唑、白细胞介素-2、 α -干扰素等)、单克隆抗体(例如,抗CD20、抗HER2、抗CD52、抗HLA-DR以及抗VEGF单克隆抗体)、免疫毒素(例如,抗CD33单克隆抗体-加利车霉素(calicheamicin)缀合物、抗CD22单克隆抗体-假单胞菌外毒素缀合物等)以及放射免疫疗法(例如,缀合至 ^{111}In 、 ^{90}Y 或 ^{131}I 等的抗CD20单克隆抗体)。

[0288] 常规放射治疗剂的实例包括但不限于放射性核素,如 ^{47}Sc 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{89}Sr 、 ^{86}Y 、 ^{87}Y 、 ^{90}Y 、 ^{105}Rh 、 ^{111}Ag 、 ^{111}In 、 $^{117\text{m}}\text{Sn}$ 、 ^{149}Pm 、 ^{153}Sm 、 ^{166}Ho 、 ^{177}Lu 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{211}At 和 ^{212}Bi ,任选地缀合至针对肿瘤抗原的抗体。

[0289] 根据本发明可使用的另外肿瘤药物包括但不限于爱克兰、别嘌呤醇、六甲蜜胺、氨磷汀(amifostine)、阿那曲唑、araC、三氧化二砷、贝沙罗汀(bexarotene)、bICNU、卡莫司汀(carmustine)、CCNU、塞来昔布、克拉屈滨(cladribine)、环孢菌素A、阿糖胞苷、环磷酰胺、右雷佐生(dexrazoxane)、DTIC、雌莫司汀、依西美坦、FK506、吉妥珠单抗-奥佐米星(gemtuzumab-ozogamicin)、羟基脲(hydra) 、羟基脲(hydroxyurea)、伊达比星、干扰素、来曲唑、克拉立平(leustatin)、亮丙瑞林(leuprolide)、阿利维A酸(litretinoin)、甲地孕酮(megastrol)、L-PAM、美司钠(mesna)、甲氧沙林(methoxsalen)、普卡霉素、氮芥、帕米膦酸盐(pamidronate)、培加酶(Pegademase)、喷司他丁(pentostatin)、吡吩姆钠(porfimer sodium)、泼尼松、美罗华(rituxan)、链佐星(streptozocin)、STI-571、泰索帝(taxotere)、替莫唑胺(temozolamide)、VM-26、托瑞米芬(toremifene)、维甲酸(tretinoin)、ATRA、戊柔比星(valrubicin)以及长春碱。根据本发明可使用的肿瘤药物的其他实例为玫瑰树碱(ellipticin)和玫瑰树碱类似物或衍生物、埃坡霉素(epothilone)、细胞内激酶抑制剂以及喜树碱(camptothecin)。

[0290] 用于治疗与升高的甘油三酯、胆固醇和/或葡萄糖相关的脂质疾病或病症的降脂剂的非限制性实例包括他汀类药物、贝特类药物、依泽替米贝、噻唑烷二酮、烟酸、 β -阻断剂、硝化甘油、钙拮抗剂、鱼油及其混合物。

[0291] 抗病毒药物的实例包括但不限于阿巴卡韦(abacavir)、阿昔洛韦(aciclovir)、无环鸟苷(acyclovir)、阿德福韦(adefovair)、金刚烷胺(amantadine)、安泼那韦(amprenavir)、阿比多尔(arbidol)、阿扎那韦(atazanavir)、立普妥(atripla)、西多福韦(cidofovir)、可比韦(combivir)、达芦那韦(darunavir)、地拉韦啉(delavirdine)、地达诺新(didanosine)、二十二烷醇、依度尿苷(edoxudine)、依法韦仑(efavirenz)、恩曲他滨(emtricitabine)、恩夫韦地(enfuvirtide)、恩替卡韦(entecavir)、进入抑制剂、泛昔洛韦(famciclovir)、固定剂量组合、福米韦生(fomivirsen)、福沙那韦(fosamprenavir)、膦甲酸(foscarnet)、膦乙酸(fosfonet)、融合抑制剂、更昔洛韦(ganciclovir)、伊巴他滨(ibacitabine)、异丙肌苷(immunovir)、碘苷(idoxuridine)、咪喹莫特(imiquimod)、茚地那韦(indinavir)、肌苷、整合酶抑制剂、III型干扰素(例如,IFN- λ 分子如IFN- λ 1、IFN- λ 2和IFN- λ 3)、II型干扰素(例如,IFN- γ)、I型干扰素(例如,IFN- α 如PEG化的IFN- α 、IFN- β 、IFN- κ 、IFN- δ 、IFN- ϵ 、IFN- τ 、IFN- ω 和IFN- ζ)、干扰素、拉米夫定(lamivudine)、洛匹那韦

(lopinavir)、洛韦胺(loviride)、MK-0518、马拉韦罗(maraviroc)、吗啉胍(moroxydine)、奈非那韦(nelfinavir)、奈韦拉平(nevirapine)、nexavir、核苷类似物、奥塞米韦(oseltamivir)、喷昔洛韦(penciclovir)、帕拉米韦(peramivir)、普来可那立(pleconaril)、鬼臼毒素、蛋白酶抑制剂、逆转录酶抑制剂、利巴韦林(ribavirin)、金刚乙烷、利托那韦(ritonavir)、沙奎那韦(saquinavir)、司他夫定(stavudine)、协同增强剂、替诺福韦(tenofovir)、替诺福韦酯(tenofovir disoproxil)、替拉那韦(tipranavir)、曲氟尿苷(trifluridine)、三协唯(trizivir)、曲金刚胺(tromantadine)、特鲁瓦达(truvada)、伐昔洛韦(valaciclovir)、缬更昔洛韦(valganciclovir)、维立韦罗(vicriviroc)、阿糖腺苷、韦拉米定(viramidine)、扎西他滨(zalcitabine)、扎那米韦(zanamivir)、齐多夫定(zidovudine)、其药学上可接受的盐、其立体异构体、其衍生物、其类似物及其混合物。

[0292] 脂质颗粒

[0293] 本发明的脂质颗粒通常包含活性剂或治疗剂、本发明的可电离脂质、非阳离子脂质以及抑制颗粒聚集的缀合的脂质。在一些实施方案中,活性剂或治疗剂被完全包封在脂质颗粒的脂质部分内,使得脂质颗粒中的活性剂或治疗剂在水溶液中对例如由核酸酶或蛋白酶引起的酶促降解有抗性。在其他实施方案中,本文描述的脂质颗粒对哺乳动物如人基本无毒。本发明的脂质颗粒通常具有约40nm至约150nm、约40nm至约80nm、约40nm至约60nm、约50nm至约80nm、约50nm至约60nm、约50nm至约150nm、约60nm至约130nm、约70nm至约110nm或约70至约90nm的平均直径。

[0294] 在优选的实施方案中,本发明的脂质颗粒是血清稳定的核酸-脂质颗粒(LNP),其包含一种或多种核酸分子,如干扰RNA(例如,siRNA,aiRNA和/或miRNA)或mRNA;本发明的可电离脂质(例如,式I的阳离子脂质);非阳离子脂质(例如,单独胆固醇或一种或多种磷脂与胆固醇的混合物);以及抑制颗粒聚集的缀合脂质(例如,一种或多种PEG-脂质缀合物)。LNP可包含至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个未修饰和/或经修饰的核酸分子。核酸-脂质颗粒和其制备方法在例如美国专利号5,753,613;5,785,992;5,705,385;5,976,567;5,981,501;6,110,745和6,320,017以及PCT公布号W0 96/40964中描述,所述专利的公开内容出于所有目的各自通过引用整体并入本文。

[0295] 可电离脂质

[0296] 在一个实施方案中,本发明提供了一种可电离脂质,所述可电离脂质由以下组成:式-NR²R³的可电离基团,其中R²是C₁-C₄烷基,并且R³是C₁-C₄烷基;15-40个碳原子;30-80个氢原子;0-10个氧原子;0-10个氮原子;0-4个氟;以及0-5个硫原子,其中所述可电离脂质具有使得在施用后七(7)天内剩余<10%的母体可电离脂质的清除率(例如,在本文实施例32中描述的测定中)。

[0297] 在一个实施方案中,可电离脂质包含至少一个式-C(=O)-O-的基团。

[0298] 在一个实施方案中,可电离脂质包含至少两个式-C(=O)-O-的基团。

[0299] 在一个实施方案中,可电离脂质包含至少一个式-(C=O)N(H)N(R⁴)(R⁵)-的基团,其中R⁴是C₂-C₃₀烃基;并且R⁵是C₂-C₃₀烃基。

[0300] 在一个实施方案中,可电离脂质包含至少一个式-(C=O)N(H)-N=C(R⁴)-的基团,其中R⁴是C₂-C₃₀烃基;并且R⁵是C₂-C₃₀烃基。

[0301] 在一个实施方案中,可电离脂质包含至少一个式-(C=O)N(H)N(H)(R⁴)(R⁵)-的基

团,其中 R^4 是 C_2-C_{30} 烃基;并且 R^5 是 C_2-C_{30} 烃基。

[0302] 在一个实施方案中,可电离脂质包含至少一个式 $-CHF-C(=O)-O-$ 或 $-CF_2-C(=O)-O-$ 的基团。

[0303] 在一个实施方案中, X 是 $-CH_2-$ 。

[0304] 在一个实施方案中, X 是 $-C(=O)-$ 。

[0305] 在一个实施方案中, X 是 $-O-$ 。

[0306] 在一个实施方案中, R^2 是甲基。

[0307] 在一个实施方案中, R^2 是乙基。

[0308] 在一个实施方案中, R^2 是丙基。

[0309] 在一个实施方案中, R^3 是甲基。

[0310] 在一个实施方案中, R^3 是乙基。

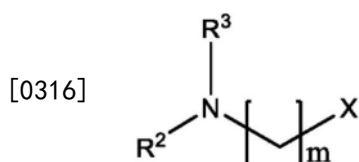
[0311] 在一个实施方案中, R^3 是丙基。

[0312] 在一个实施方案中, m 是1。

[0313] 在一个实施方案中, m 是2。

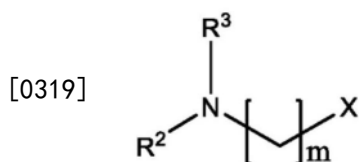
[0314] 在一个实施方案中, m 是3。

[0315] 在一个实施方案中,基团:



[0317] 选自由以下组成的组: $(CH_3)_2NCH_2CH_2C(=O)-$ 、 $(CH_3)_2NCH_2CH_2CH_2C(=O)-$ 、 $(CH_3)_2NCH_2CH_2CH_2CH_2C(=O)-$ 、 $(CH_3)_2NCH_2CH_2-$ 、 $(CH_3)_2NCH_2CH_2CH-$ 、5-吡咯烷-1-基戊酰基和 $(CH_3)_2NCH_2CH_2CH_2O-$ 。

[0318] 在一个实施方案中,基团:



[0320] 选自由以下组成的组: $(CH_3)_2NCH_2CH_2C(=O)-$ 、 $(CH_3)_2NCH_2CH_2CH_2C(=O)-$ 、 $(CH_3)_2NCH_2CH_2CH_2CH_2C(=O)-$ 、 $(CH_3)_2NCH_2CH_2-$ 、 $(CH_3)_2NCH_2CH_2CH-$ 和 $(CH_3)_2NCH_2CH_2CH_2O-$ 。

[0321] 在一个实施方案中, R^1 是 C_5-C_{25} 烃基。

[0322] 在一个实施方案中, R^1 是 C_2-C_{25} 烷基。

[0323] 在一个实施方案中, R^1 是 C_5-C_{25} 烷基。

[0324] 在一个实施方案中, R^1 是 C_5-C_{25} 烯基。

[0325] 在一个实施方案中, R^1 是1-壬基或1-癸基。

[0326] 在一个实施方案中, o 是2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15。

[0327] 在一个实施方案中, o 是10、11、12、13、14或15。

[0328] 在一个实施方案中, o 是2、3、4、5、6、7、8、9或10。

[0329] 在一个实施方案中, o 是2、3、4或5。

[0330] 在一个实施方案中, L^2 是 $-(C=O)-O-$ 、 $-(C=O)N(H)N(R^4)-$ 、 $-(C=O)N(H)-N=C(R^4)-$ 、 $-(C=O)N(H)N(H)C(R^4)(R^5)-$ 或 $-(C=O)-O-CH_2-R^z$ 。

[0331] 在一个实施方案中, L^2 是 $-(C=O)-O-$ 。

[0332] 在一个实施方案中, L^2 是 $-(C=O)N(H)N(R^4)-$ 。在一个实施方案中, L^2 是 $-(C=O)-O-CH_2-R^z$ 。在一个实施方案中, a 是 H 。

[0333] 在一个实施方案中, a 是 F 。

[0334] 在一个实施方案中, b 是 H 。

[0335] 在一个实施方案中, b 是 F 。

[0336] 在一个实施方案中, R^6 是 C_2-C_{25} 烷基。

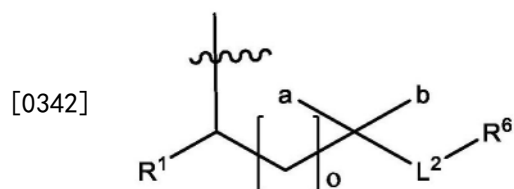
[0337] 在一个实施方案中, R^6 是 C_5-C_{25} 烷基。

[0338] 在一个实施方案中, R^6 是 C_2-C_{25} 烷基。

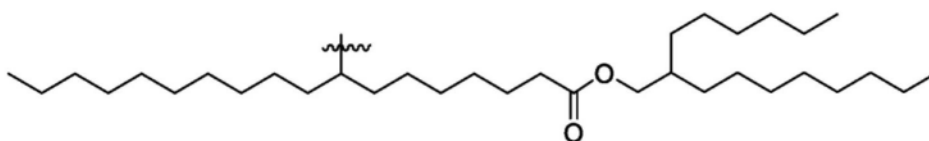
[0339] 在一个实施方案中, R^6 是 C_5-C_{25} 烷基。

[0340] 在一个实施方案中, R^6 是 C_5-C_{25} 烯基。

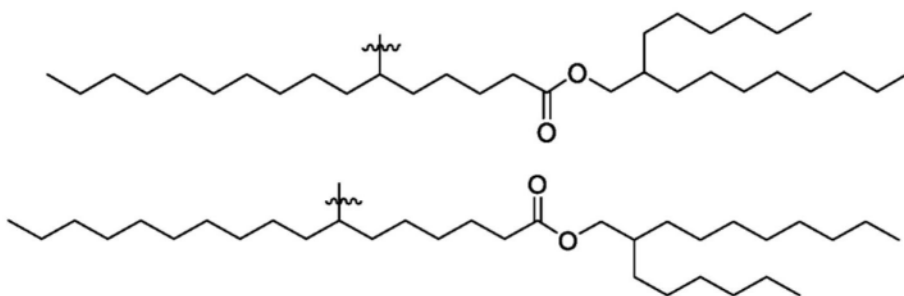
[0341] 在一个实施方案中, 基团:

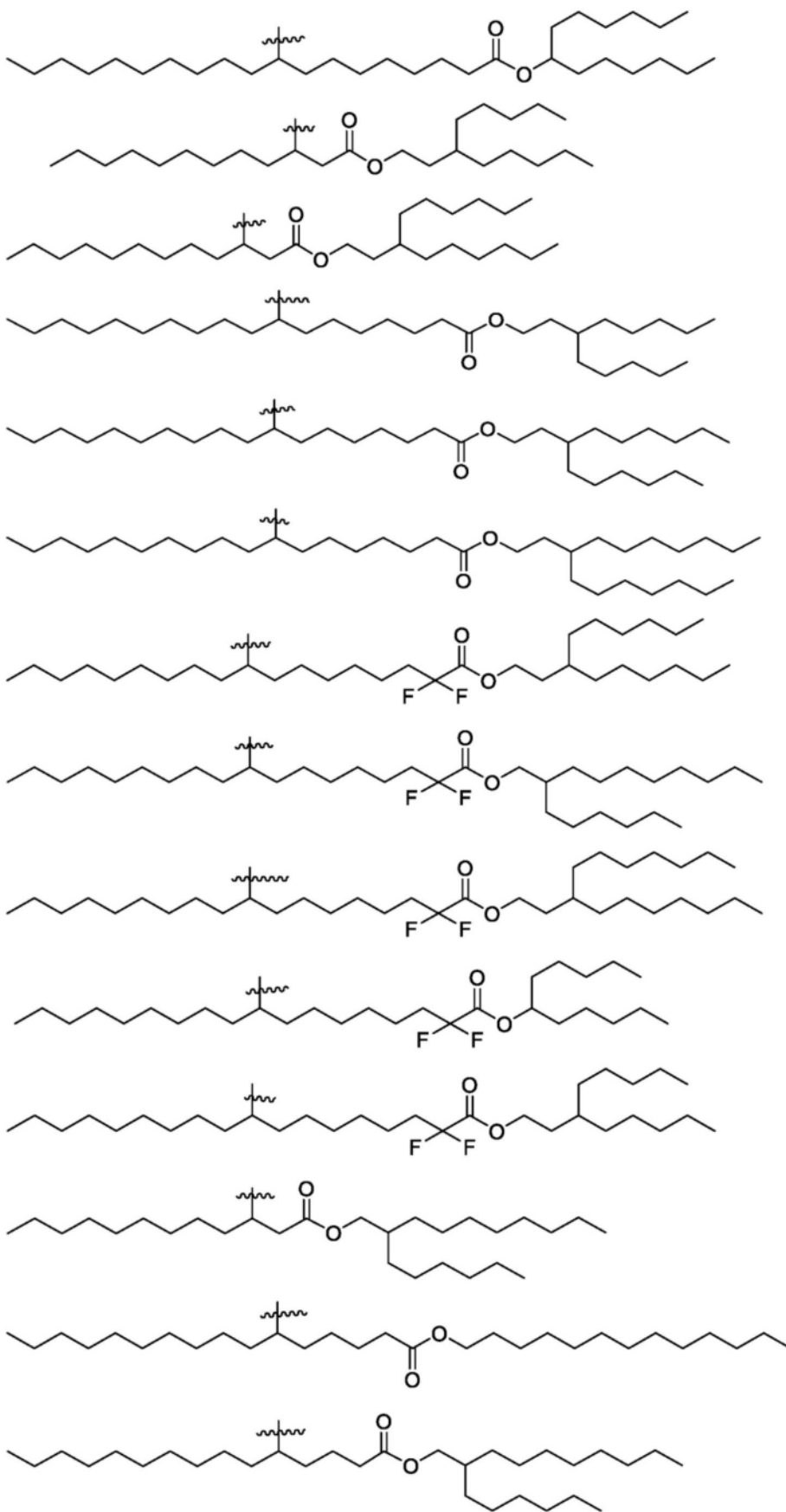


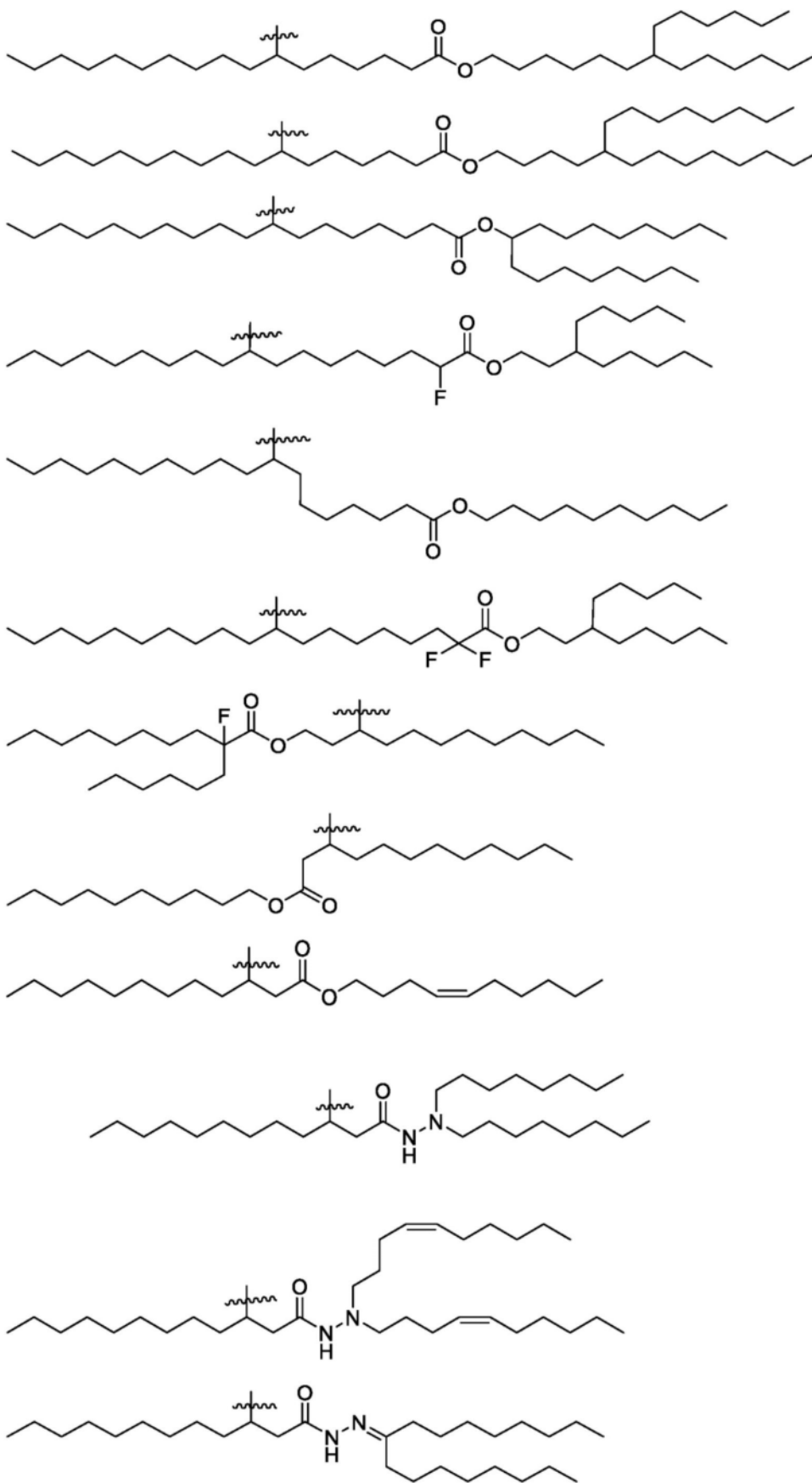
[0343] 选自由以下组成的组:

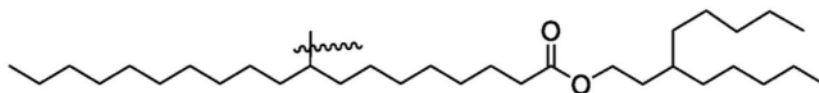
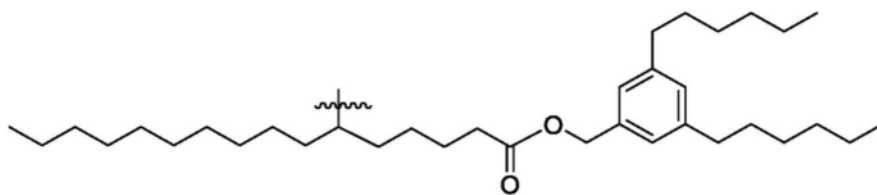
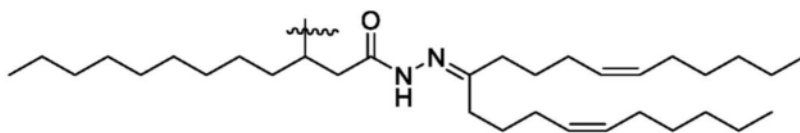


[0344]

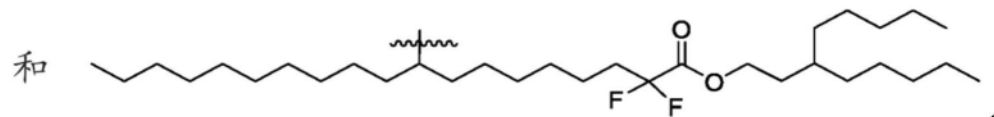
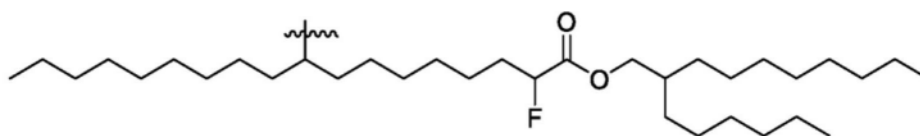
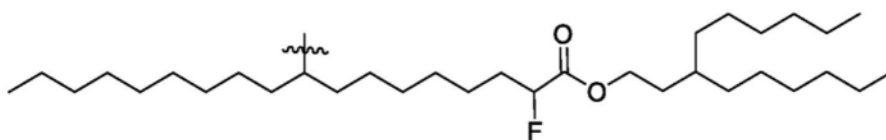






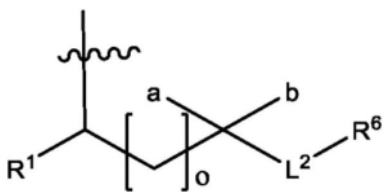


[0347]



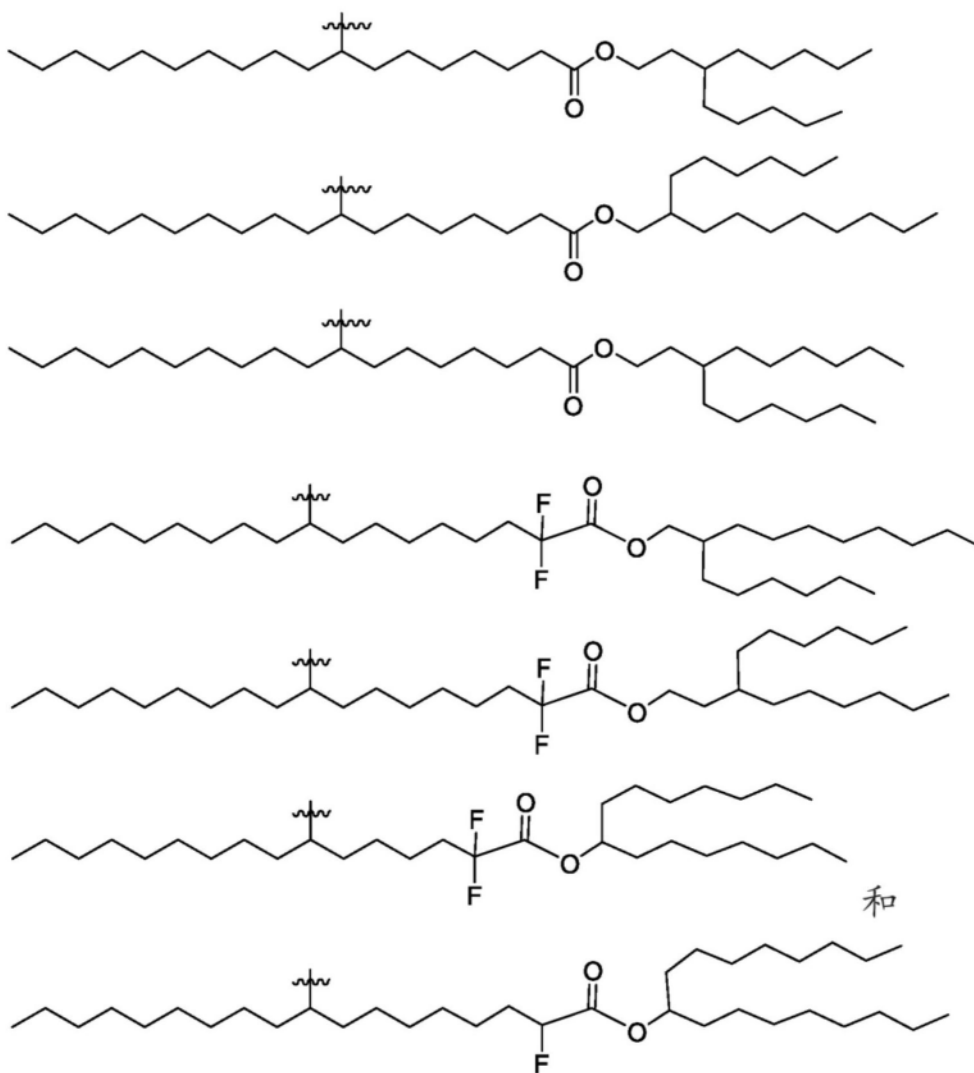
[0348] 在一个实施方案中,基团:

[0349]



[0350] 选自由以下组成的组:

[0351]



。

[0352] 在一个实施方案中,Y是-CH₂-。

[0353] 在一个实施方案中,Y是-C(=O)-。

[0354] 在一个实施方案中,Y是-O-。

[0355] 在一个实施方案中,n是2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15。

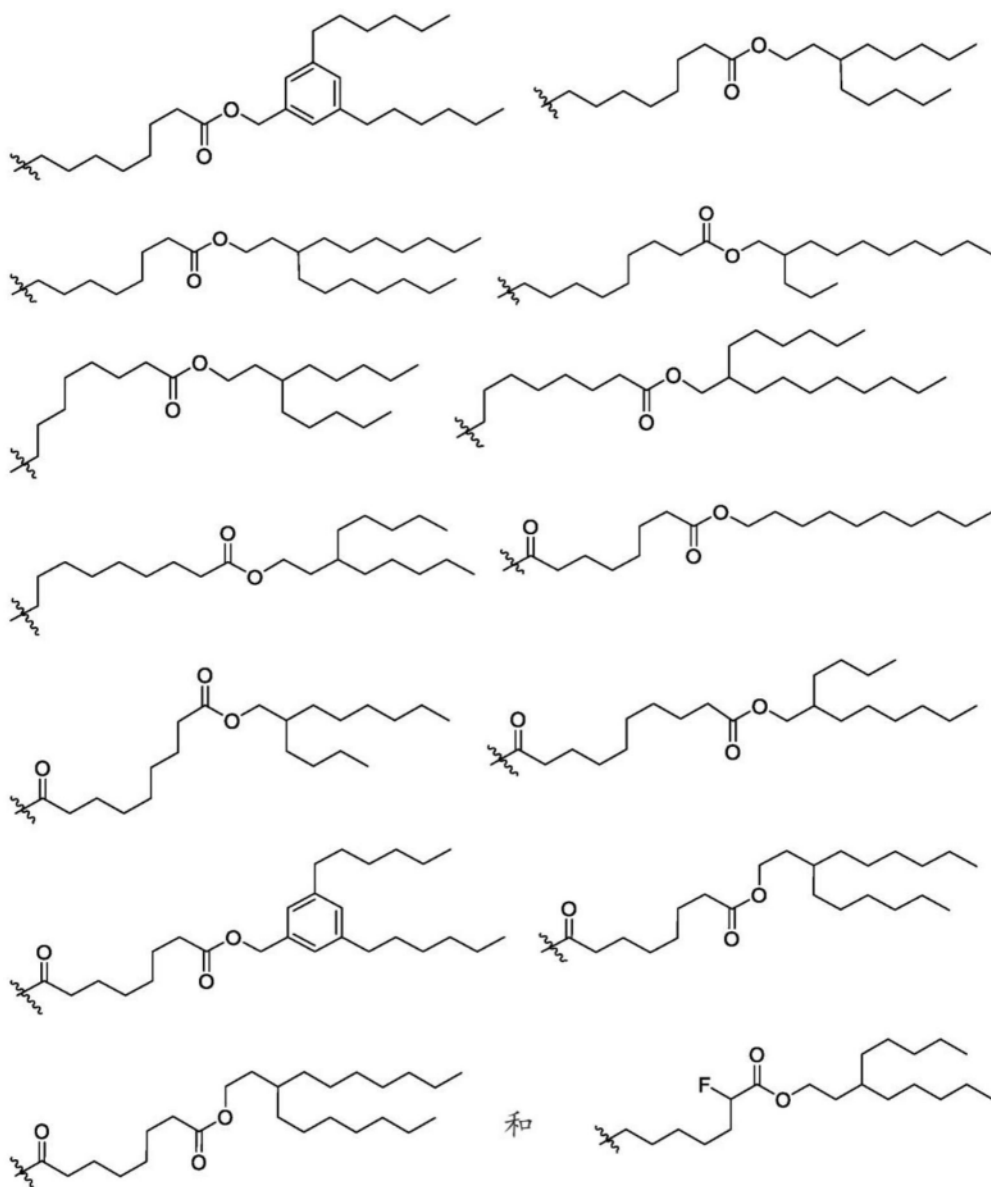
[0356] 在一个实施方案中,n是10、11、12、13、14或15。

[0357] 在一个实施方案中,n是2、3、4、5、6、7、8、9或10。

[0358] 在一个实施方案中,n是2、3、4或5。

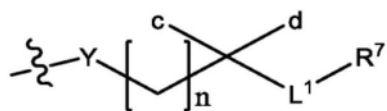
[0359] 在一个实施方案中,L¹不存在;并且L²是-(C=O)-O-、-(C=O)N(H)N(R⁴)-、-(C=O)N(H)-N=C(R⁴)-、-(C=O)N(H)N(H)C(R⁴)(R⁵)-或-(C=O)-O-CH₂-R^z。[0360] 在一个实施方案中,L¹是-(C=O)-O-、-(C=O)N(H)N(R⁴)-、-(C=O)N(H)-N=C(R⁴)-、-(C=O)N(H)N(H)C(R⁴)(R⁵)-或-(C=O)-O-CH₂-R^a;并且L²不存在。[0361] 在一个实施方案中,L¹是-(C=O)-O-、-(C=O)N(H)N(R⁴)-、-(C=O)N(H)-N=C(R⁴)-、-(C=O)N(H)N(H)C(R⁴)(R⁵)-或-(C=O)-O-CH₂-R^a。[0362] 在一个实施方案中,L¹是-(C=O)-O-。[0363] 在一个实施方案中,L¹是-(C=O)N(H)N(R⁴)-。

[0378]



[0379] 在一个实施方案中,基团:

[0380]



[0381] 选自由以下组成的组:

[0382]

[0383] 在一个实施方案中, R^4 是 C_2 - C_{25} 烷基。在一个实施方案中, R^4 是 C_5 - C_{25} 烷基。[0384] 在一个实施方案中, R^4 是 C_2 - C_{25} 烷基。[0385] 在一个实施方案中, R^4 是 C_5 - C_{25} 烷基。[0386] 在一个实施方案中, R^4 是 C_5 - C_{25} 烯基。[0387] 在一个实施方案中, R^5 是 C_2 - C_{25} 烷基。[0388] 在一个实施方案中, R^5 是 C_5 - C_{25} 烷基。[0389] 在一个实施方案中, R^5 是 C_2 - C_{25} 烷基。

- [0390] 在一个实施方案中, R^5 是 C_5 - C_{25} 烷基。
- [0391] 在一个实施方案中, R^5 是 C_5 - C_{25} 烯基。
- [0392] 在一个实施方案中, $R^{4'}$ 是 C_2 - C_{25} 烃基。
- [0393] 在一个实施方案中, $R^{4'}$ 是 C_5 - C_{25} 烃基。
- [0394] 在一个实施方案中, $R^{4'}$ 是 C_2 - C_{25} 烷基。
- [0395] 在一个实施方案中, $R^{4'}$ 是 C_5 - C_{25} 烷基。
- [0396] 在一个实施方案中, $R^{4'}$ 是 C_5 - C_{25} 烯基。
- [0397] 在一个实施方案中, $R^{5'}$ 是 C_2 - C_{25} 烃基。
- [0398] 在一个实施方案中, $R^{5'}$ 是 C_5 - C_{25} 烃基。
- [0399] 在一个实施方案中, $R^{5'}$ 是 C_2 - C_{25} 烷基。
- [0400] 在一个实施方案中, R^5 是 C_5 - C_{25} 烷基。
- [0401] 在一个实施方案中, $R^{5'}$ 是 C_5 - C_{25} 烯基。
- [0402] 在一个实施方案中, R^Z 是被1或2个独立地选自 C_2 - C_{10} 烃基的基团取代的苯基。在一个实施方案中, 每个 C_2 - C_{10} 烃基独立地选自由 C_5 - C_{10} 烃基组成的组。在一个实施方案中, 每个 C_2 - C_{10} 烃基独立地选自由 C_2 - C_{10} 烷基组成的组。在一个实施方案中, 每个 C_2 - C_{10} 烃基独立地选自由 C_5 - C_{10} 烷基组成的组。在一个实施方案中, 每个 C_2 - C_{10} 烃基独立地选自由 C_5 - C_{10} 烯基组成的组。
- [0403] 在一个实施方案中, R^Z 是被1或2个独立地选自 C_2 - C_{10} 烃基的基团取代的苯基。在一个实施方案中, 每个 C_2 - C_{10} 烃基独立地选自由 C_5 - C_{10} 烃基组成的组。在一个实施方案中, 每个 C_2 - C_{10} 烃基独立地选自由 C_2 - C_{10} 烷基组成的组。在一个实施方案中, 每个 C_2 - C_{10} 烃基独立地选自由 C_5 - C_{10} 烷基组成的组。在一个实施方案中, 每个 C_2 - C_{10} 烃基独立地选自由 C_5 - C_{10} 烯基组成的组。
- [0404] 在一个实施方案中, 可电离脂质选自实施例1、16、17、43、46、90、101和115的化合物及其盐。
- [0405] 在一个实施方案中, X是 $-C(=O)-$, 并且Y不存在或是 $-O-$ 。
- [0406] 在一个实施方案中, X是 $-C(=O)-$, 并且Y是 $-O-$ 。
- [0407] 在一个实施方案中, Y是 $-\text{CH}_2-$; L^1 不存在; 并且c和d各自为H。
- [0408] 在一个实施方案中, a是F, 或者b是H。
- [0409] 在一个实施方案中, a是F, 并且b是F。
- [0410] 在一个实施方案中, a是F; b是H; 并且 L^1 是 $-(C=O)-O-$ 。
- [0411] 在一个实施方案中, a是F; b是F; 并且 L^1 是 $-(C=O)-O-$ 。
- [0412] 在一个实施方案中, R^2 和 R^3 各自为甲基。
- [0413] 在一个实施方案中, L^1 不存在; 并且c和d各自为H。
- [0414] 在一个实施方案中, L^1 不存在; 并且a、b、c和d各自为H。
- [0415] 在一个实施方案中, L^1 和 L^2 中的一者是 $-(C=O)-O-$ 。
- [0416] 在一个实施方案中, L^1 是 $-(C=O)-O-$, 并且 R^7 是支链 C_2 - C_{25} 烃基。
- [0417] 在一个实施方案中, L^1 是 $-(C=O)-O-$, 并且 R^7 是在与 L^1 的连接点的3个碳以内的碳处支化的 C_5 - C_{25} 烃基。
- [0418] 在一个实施方案中, L^1 是 $-(C=O)-O-$, 并且 R^7 是在与 L^1 的连接点的2个碳以内的碳

处支化的C₄-C₂₅烃基。

[0419] 在一个实施方案中,L¹是-(C=O)-O-,并且R⁷是在与L¹连接的碳处支化的C₃-C₂₅烃基。

[0420] 在一个实施方案中,L¹和L²中的一者是-(C=O)-O-,并且R⁷是支链C₂-C₂₅烃基。

[0421] 在一个实施方案中,L¹和L²中的一者是-(C=O)-O-,并且R⁷是在与L¹的连接点的3个碳以内的碳处支化的C₅-C₂₅烃基。

[0422] 在一个实施方案中,L¹和L²中的一者是-(C=O)-O-,并且R⁷是在与L¹的连接点的2个碳以内的碳处支化的C₄-C₂₅烃基。

[0423] 在一个实施方案中,L¹和L²中的一者是-(C=O)-O-,并且R⁷是在与L¹连接的碳处支化的C₃-C₂₅烃基。

[0424] 在一个实施方案中,Y不存在或是-O-;N是0;c是H;d是H;L¹不存在;并且R⁷是C₂-C₂₅烃基。

[0425] 在一个实施方案中,Y不存在或是-O-;N是0;c是H;d是H;L¹不存在;并且R⁷是C₅-C₁₅烃基。

[0426] 在一个实施方案中,Y不存在或是-O-;N是0;c是H;d是H;L¹不存在;并且R⁷是C₁₀烃基。

[0427] 在一个实施方案中,Y不存在或是-O-;N是0;c是H;d是H;L¹不存在;并且R⁷是在与式(I)化合物的其余部分的连接点的3个碳以内的碳处支化的C₅-C₁₅烃基。

[0428] 在一个实施方案中,Y不存在或是-O-;N是0;c是H;d是H;L¹不存在;并且R⁷是在与式(I)化合物的其余部分的连接点的2个碳以内的碳处支化的C₅-C₁₅烃基。

[0429] 在一个实施方案中,Y不存在或是-O-;N是0;c是H;d是H;L¹不存在;并且R⁷是在与式(I)化合物的其余部分连接的碳处支化的C₅-C₁₅烃基。

[0430] 在一个实施方案中,Y不存在或是-O-;N是0;c是H;d是H;L¹不存在;并且R⁷是在与式(I)化合物的其余部分的连接点的3个碳以内的碳处支化的C₁₀烃基。

[0431] 在一个实施方案中,Y不存在或是-O-;N是0;c是H;d是H;L¹不存在;并且R⁷是在与式(I)化合物的其余部分的连接点的2个碳以内的碳处支化的C₁₀烃基。

[0432] 在一个实施方案中,Y不存在或是-O-;N是0;c是H;d是H;L¹不存在;并且R⁷是在与式(I)化合物的其余部分连接的碳处支化的C₁₀烃基。

[0433] 在一个实施方案中,L²是-(C=O)-O-,并且R⁶是支链C₂-C₂₅烃基。

[0434] 在一个实施方案中,L²是-(C=O)-O-,并且R⁶是在与L²的连接点的3个碳以内的碳处支化的C₅-C₂₅烃基。

[0435] 在一个实施方案中,L²是-(C=O)-O-,并且R⁶是在与L²的连接点的2个碳以内的碳处支化的C₄-C₂₅烃基。

[0436] 在一个实施方案中,L²是-(C=O)-O-,并且R⁶是在与L²连接的碳处支化的C₃-C₂₅烃基。

[0437] 在一个实施方案中,L²是-(C=O)-O-;a是F;b是H;并且R⁶是支链C₂-C₂₅烃基。

[0438] 在一个实施方案中,L²是-(C=O)-O-;a是F;b是H;并且R⁶是在与L²的连接点的3个碳以内的碳处支化的C₅-C₂₅烃基。

[0439] 在一个实施方案中,L²中的一者是-(C=O)-O-;a是F;b是H;并且R⁶是在与L²的连接

点的2个碳以内的碳处支化的 C_4-C_{25} 烷基。

[0440] 在一个实施方案中, L^2 是 $-(C=O)-O-$;a是F;b是H;并且 R^6 是在与 L^2 连接的碳处支化的 C_3-C_{25} 烷基。

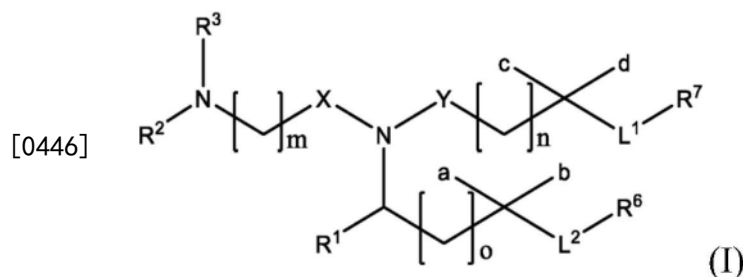
[0441] 在一个实施方案中, L^2 是 $-(C=O)-O-$;a是F;b是F;并且 R^6 是支链 C_2-C_{25} 烷基。

[0442] 在一个实施方案中, L^2 是 $-(C=O)-O-$;a是F;b是F;并且 R^6 是在与 L^2 的连接点的3个碳以内的碳处支化的 C_5-C_{25} 烷基。

[0443] 在一个实施方案中, L^2 是 $-(C=O)-O-$;a是F;b是F;并且 R^6 是在与 L^2 的连接点的2个碳以内的碳处支化的 C_4-C_{25} 烷基。

[0444] 在一个实施方案中, L^2 是 $-(C=O)-O-$;a是F;b是F;并且 R^6 是在与 L^2 连接的碳处支化的 C_3-C_{25} 烷基。

[0445] 在一个实施方案中,本发明提供了一种式(I)化合物:



[0447] 或其盐,其中:

[0448] X是 $-\text{CH}_2-$ 、 $-O-$ 、 $-O(C=O)-$ 或 $-C(=O)-$

[0449] Y是 $-\text{CH}_2-$ 、 $-O-$ 、 $-\text{SO}_2-$ 或 $-C(=O)-$;

[0450] R^1 是 C_2-C_{25} 烷基;

[0451] R^2 是 C_1-C_3 烷基;并且 R^3 是 C_1-C_3 烷基;或者 R^2 和 R^3 与它们所连接的氮一起形成氮杂环丙烷子基、氮杂环丁烷子基或吡咯烷子基环;

[0452] m是0、1、2、3、4、5或6;

[0453] n是0-15;

[0454] o是0-15;

[0455] L^1 不存在、是 $-(C=O)-O-$ 、 $-(C=O)N(H)N(R^4)-$ 、 $-(C=O)N(H)-N=C(R^4)-$ 、 $-(C=O)N(H)N(H)C(R^4)(R^5)-$ 、 $-(C=O)-O-CH_2-R^z$ 或 $-O(C=O)-R^w-$;

[0456] L^2 不存在、是 $-(C=O)-O-$ 、 $-(C=O)N(H)N(R^4)-$ 、 $-(C=O)N(H)-N=C(R^4)-$ 、 $-(C=O)N(H)N(H)C(R^4)(R^5)-$ 、 $-(C=O)-O-CH_2-R^z$ 或 $-O(C=O)-R^x-$

[0457] a是H或F;

[0458] b是H或F;

[0459] c是H或F;并且d是H或F;或者c和d与它们所连接的碳一起形成 $-C(=O)-$;

[0460] R^4 是H或 C_2-C_{25} 烷基;

[0461] R^5 是H或 C_2-C_{25} 烷基;

[0462] R^4 是H或 C_2-C_{25} 烷基;

[0463] R^5 是H或 C_2-C_{25} 烷基;

[0464] R^6 是 C_2-C_{25} 烷基;

[0465] R^7 是 C_2-C_{25} 烷基;

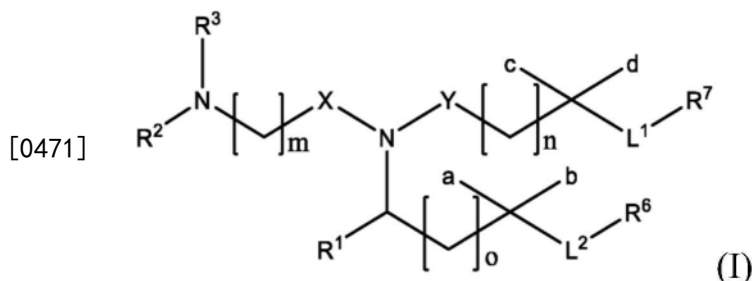
[0466] R^w 不存在、是 $-C(F)H-$ 或 $-C(F)_2-$;

[0467] R^x 不存在、是 $-C(F)H-$ 或 $-C(F)_2-$;

[0468] R^z 是被1、2或3个独立地选自 C_2-C_{10} 烃基的基团取代的苯基;并且

[0469] $R^{z'}$ 是被1、2或3个独立地选自 C_2-C_{10} 烃基的基团取代的苯基。

[0470] 在一个实施方案中,本发明提供了一种式(I)化合物:



[0472] 或其盐,其中:

[0473] X是 $-CH_2-$ 、 $-O-$ 、 $-O(C=O)-$ 或 $-C(=O)-$;

[0474] Y是 $-CH_2-$ 、 $-O-$ 、 $-SO_2-$ 或 $-C(=O)-$;

[0475] R^1 是 C_2-C_{25} 烃基;

[0476] R^2 是 C_1-C_3 烷基;并且 R^3 是 C_1-C_3 烷基;或者 R^2 和 R^3 与它们所连接的氮一起形成氮杂环丙烷基、氮杂环丁烷基或吡咯烷基环;

[0477] m是0、1、2、3、4、5或6;

[0478] n是0-15;

[0479] o是0-15;

[0480] L^1 不存在或是 $-(C=O)-O-$;

[0481] L^2 不存在或是 $-(C=O)-O-$;

[0482] a是H或F;

[0483] b是H或F;

[0484] c是H或F;并且d是H或F;或者c和d与它们所连接的碳一起形成 $-C(=O)-$;

[0485] R^4 是H或 C_2-C_{25} 烃基;

[0486] R^5 是H或 C_2-C_{25} 烃基;

[0487] R^4 是H或 C_2-C_{25} 烃基;

[0488] R^5 是H或 C_2-C_{25} 烃基;

[0489] R^6 是 C_2-C_{25} 烃基;

[0490] R^7 是 C_2-C_{25} 烃基;

[0491] R^w 不存在、是 $-C(F)H-$ 或 $-C(F)_2-$;

[0492] R^x 不存在、是 $-C(F)H-$ 或 $-C(F)_2-$;

[0493] R^z 是被1、2或3个独立地选自 C_2-C_{10} 烃基的基团取代的苯基;并且

[0494] $R^{z'}$ 是被1、2或3个独立地选自 C_2-C_{10} 烃基的基团取代的苯基。

[0495] 具体实施方案

[0496] 在一个具体实施方案中,本发明提供了一种式(I)的可电离脂质,其中X是 $-C(=O)-$ 。此类可电离脂质通常表现出高活性。

[0497] 在一个具体实施方案中,本发明提供了一种式(I)的可电离脂质,其中X是 $-C(=$

0) -, 并且Y是-O-。此类可电离脂质通常表现出高活性并且具有期望的pKa特性。

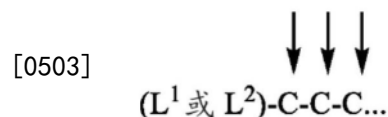
[0498] 在一个具体实施方案中,本发明提供了一种式(I)的可电离脂质,其中Y是-CH₂-;L¹不存在;并且c和d各自为H。此类可电离脂质通常表现出高活性。

[0499] 在一个具体实施方案中,本发明提供了一种式(I)的可电离脂质,其中R²是甲基,并且R³是甲基。此类可电离脂质通常表现出高活性。

[0500] 在一个具体实施方案中,本发明提供了一种式(I)的可电离脂质,其中L¹不存在;并且c和d各自为H。此类可电离脂质通常表现出高活性。

[0501] 在一个具体实施方案中,本发明提供了一种式(I)的可电离脂质,其中L²是-(C=O)-O-, 并且R⁶是在与L²连接的碳原子处支化或在距与L²连接点2个碳的碳原子处支化或在距与L²的连接点3个碳的碳原子处支化的C₂-C₂₅烷基。此类可电离脂质通常表现出高活性。

[0502] 当烷基在与L¹或L²连接的碳原子处支化,或在距与L¹或L²的连接点2个碳的碳原子处支化,或在距与L¹或L²的连接点3个碳的碳原子处支化时,应理解所述烷基在下式中所示的碳之一处支化:



[0504] 在一个实施方案中,本发明提供了一种核酸-脂质颗粒,所述核酸-脂质颗粒包含:

[0505] (a) 一种或多种核酸分子;

[0506] (b) 非阳离子脂质;

[0507] (c) 缀合脂质;以及

[0508] (d) 式(I)化合物或其盐,其中所述一种或多种核酸分子被包封在所述脂质颗粒内。

[0509] 在一个实施方案中,化合物或盐占颗粒中存在的总脂质的约30mol%至约85mol%;非阳离子脂质占颗粒中存在的总脂质的约13mol%至约49.5mol%;并且缀合脂质占颗粒中存在的总脂质的约0.1mol%至约10mol%。

[0510] 在一个实施方案中,化合物或盐占颗粒中存在的总脂质的约30mol%至约85mol%;非阳离子脂质占颗粒中存在的总脂质的约13mol%至约49.5mol%;并且缀合脂质占颗粒中存在的总脂质的约0.1mol%至约10mol%。

[0511] 在一个实施方案中,核酸选自以下组成的组:小干扰RNA(siRNA)、切丁酶-底物dsRNA、小发夹RNA(shRNA)、不对称干扰RNA(aiRNA)、微小RNA(miRNA)、mRNA、tRNA、rRNA、病毒RNA(vRNA)、自我扩增RNA以及它们的组合。

[0512] 在一个实施方案中,核酸是mRNA分子。

[0513] 在一个实施方案中,核酸包含双链siRNA分子。

[0514] 在一个实施方案中,双链siRNA分子包含至少一个经修饰的核苷酸。

[0515] 在一个实施方案中,siRNA包含至少一个2'-O-甲基(2' OMe)核苷酸。

[0516] 在一个实施方案中,非阳离子脂质包含胆固醇或其衍生物。

[0517] 在一个实施方案中,胆固醇或其衍生物占颗粒中存在的总脂质的约31.5mol%至约42.5mol%。

[0518] 在一个实施方案中,非阳离子脂质包含磷脂。

[0519] 在一个实施方案中,非阳离子脂质包含磷脂与胆固醇或其衍生物的混合物。

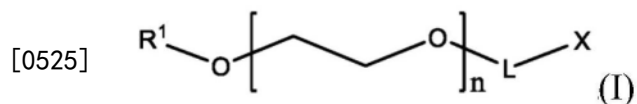
[0520] 在一个实施方案中,磷脂包含二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)、二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)或其混合物。

[0521] 在一个实施方案中,磷脂占颗粒中存在的总脂质的约4mol%至约10mol%,并且胆固醇占颗粒中存在的总脂质的约30mol%至约40mol%。

[0522] 在一个实施方案中,磷脂占颗粒中存在的总脂质的约10mol%至约30mol%,并且胆固醇占颗粒中存在的总脂质的约10mol%至约30mol%。

[0523] 在一个实施方案中,缀合脂质包含聚乙二醇(PEG)-脂质缀合物。

[0524] 在一个实施方案中,PEG-脂质缀合物包含式(I)化合物:



[0526] 或其盐,其中:

[0527] R^1 是H、 $(\text{C}_1\text{-C}_6)$ 烷基或 $(\text{C}_1\text{-C}_6)$ 烷酰基;

[0528] n 是在约10至约150范围内的整数;并且

[0529] L 不存在,并且 X 是 $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}^2\text{R}^3$;或者

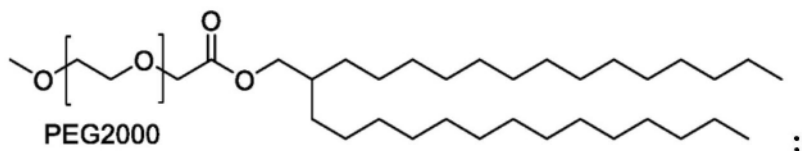
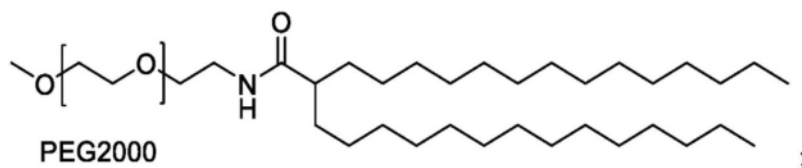
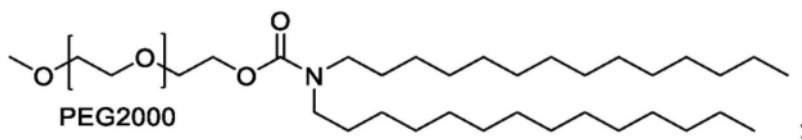
[0530] L 是 $(\text{C}_1\text{-C}_6)$ 烷基,并且 X 选自由以下组成的组: $-\text{N}(\text{R}^4)\text{C}(=\text{O})\text{CH}(\text{R}^2)(\text{R}^3)$ 、 $-\text{OCH}(\text{R}^2)(\text{R}^3)$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{OCH}_2\text{CH}(\text{R}^2)(\text{R}^3)$ 、 $-\text{N}(\text{R}^4)\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{R}^2)(\text{R}^3)$ 和 $-\text{SO}_2\text{N}(\text{R}^2)(\text{R}^3)$;

[0531] R^2 是 $(\text{C}_{10}\text{-C}_{20})$ 烷基;

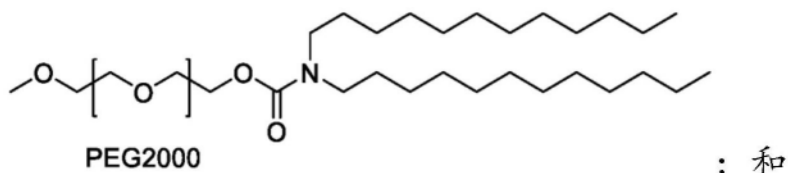
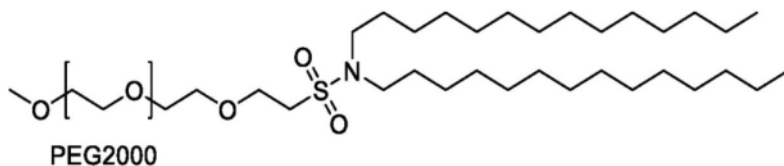
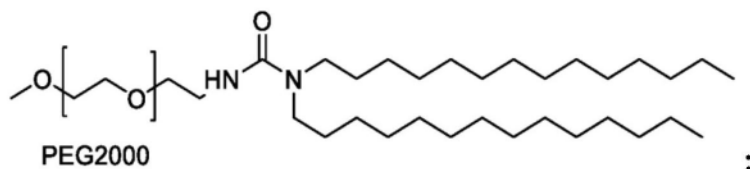
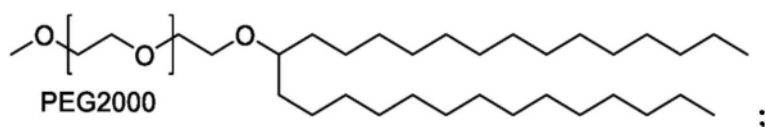
[0532] R^3 是 $(\text{C}_{10}\text{-C}_{20})$ 烷基;并且

[0533] R^4 是H或 $(\text{C}_1\text{-C}_6)$ 烷基。

[0534] 在一个实施方案中,PEG-脂质缀合物包含选自以下的化合物:

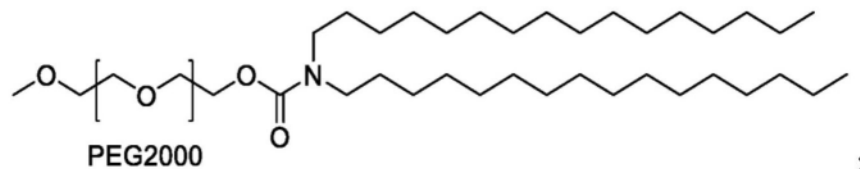


[0535]



; 和

[0536]

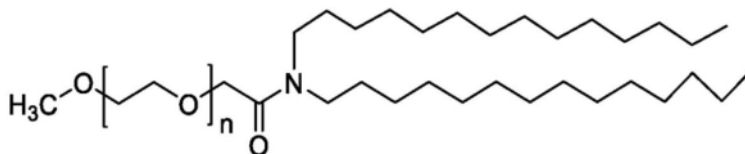


;

[0537] 或其盐。

[0538] 在一个实施方案中,PEG-脂质缀合物包含下式的化合物:

[0539]



[0540] 其中n是45-50。

[0541] 在一个实施方案中,PEG-脂质缀合物包含PEG-二酰基甘油(PEG-DAG)缀合物、PEG-二烷基氧基丙基(PEG-DAA)缀合物或它们的混合物。

[0542] 在一个实施方案中,PEG-DAA缀合物包含PEG-二肉豆蔻基氧基丙基(PEG-DMA)缀合物、PEG-二硬脂基氧基丙基(PEG-DSA)缀合物或它们的混合物。

[0543] 在一个实施方案中,PEG-DAA缀合物包含PEG-二肉豆蔻基氧基丙基(PEG-DMA)缀合物。

[0544] 在一个实施方案中,聚乙二醇(PEG)-脂质缀合物是下式的化合物:

[0545] A-B-C

[0546] 或其盐,其中:

[0547] A是(C₁-C₆)烷基、(C₃-C₈)环烷基、(C₃-C₈)环烷基(C₁-C₆)烷基、(C₁-C₆)烷氧基、(C₂-C₆)烯基、(C₂-C₆)炔基、(C₁-C₆)烷酰基、(C₁-C₆)烷氧基羰基、(C₁-C₆)烷硫基或(C₂-C₆)烷酰基氧基,其中任何(C₁-C₆)烷基、(C₃-C₈)环烷基、(C₃-C₈)环烷基(C₁-C₆)烷基、(C₁-C₆)烷氧基、(C₂-C₆)烯基、(C₂-C₆)炔基、(C₁-C₆)烷酰基、(C₁-C₆)烷氧基羰基、(C₁-C₆)烷硫基和(C₂-C₆)烷酰基氧基被一个或多个阴离子前体基团取代,并且其中任何(C₁-C₆)烷基、(C₃-C₈)环烷基、(C₃-C₈)环烷基(C₁-C₆)烷基、(C₁-C₆)烷氧基、(C₂-C₆)烯基、(C₂-C₆)炔基、(C₁-C₆)烷酰基、(C₁-C₆)烷氧基羰基、(C₁-C₆)烷硫基和(C₂-C₆)烷酰基氧基任选地被一个或多个独立地选自以下组成的组的基团取代:卤基、羧基、(C₁-C₃)烷氧基、(C₁-C₆)烷酰基、(C₁-C₃)烷氧基羰基、(C₁-C₃)烷硫基或(C₂-C₃)烷酰基氧基;

[0548] B是具有约550道尔顿至约10,000道尔顿的分子量的聚乙二醇链;

[0549] C是-L-R^a

[0550] L选自以下组成的组:直接键、-C(O)O-、-C(O)NR^b-、-NR^b-、-C(O)-、-NR^bC(O)O-、-NR^bC(O)NR^b-、-S-S-、-O-、-(O)CCH₂CH₂C(O)-和-NHC(O)CH₂CH₂C(O)NH-;

[0551] R^a是支链(C₁₀-C₅₀)烷基或支链(C₁₀-C₅₀)烯基,其中所述支链(C₁₀-C₅₀)烷基或支链(C₁₀-C₅₀)烯基的一个或多个碳原子已被-O-替代;并且

[0552] 每个R^b独立地为H或(C₁-C₆)烷基。

[0553] 在一个实施方案中,PEG具有约2,000道尔顿的平均分子量。

[0554] 在一个实施方案中,缀合脂质占颗粒中存在的总脂质的约1mol%至约2mol%。

[0555] 在一个实施方案中,在将核酸-脂质颗粒在37°C下在血清中孵育30分钟后,所述颗粒中的核酸基本上不降解。

[0556] 在一个实施方案中,核酸完全包封在核酸-脂质颗粒中。

[0557] 在一个实施方案中,核酸-脂质颗粒具有约5至约15的脂质:核酸质量比。

[0558] 在一个实施方案中,核酸-脂质颗粒具有约5至约30的脂质:核酸质量比。

[0559] 在一个实施方案中,核酸-脂质颗粒具有约40nm至约150nm的中值直径。

[0560] 在一个实施方案中,化合物或盐占颗粒中存在的总脂质的约56.5mol%至约66.5mol%;非阳离子脂质包含占颗粒中存在的总脂质的约31.5mol%至约42.5mol%的胆固醇或其衍生物;并且PEG-脂质缀合物占颗粒中存在的总脂质的约1mol%至约2mol%。

[0561] 在一个实施方案中,核酸-脂质颗粒包含约61.5mol%的化合物或盐、约36.9%的胆固醇或其衍生物和约1.5mol%的PEG-脂质缀合物。

[0562] 在一个实施方案中,化合物或盐占颗粒中存在的总脂质的约52mol%至约

62mol % ;非阳离子脂质包含占颗粒中存在的总脂质的约36mol %至约47mol %的磷脂与胆固醇或其衍生物的混合物;并且PEG-脂质缀合物占颗粒中存在的总脂质的约1mol %至约2mol %。

[0563] 在一个实施方案中,核酸-脂质颗粒包含约57.1mol %的化合物或盐、约7.1mol %的磷脂、约34.3mol %的胆固醇或其衍生物和约1.4mol %的PEG-脂质缀合物。

[0564] 在一个实施方案中,核酸-脂质颗粒包含约57.1mol %的化合物或盐、约20mol %的磷脂、约20mol %的胆固醇或其衍生物和约1.4mol %的PEG-脂质缀合物。

[0565] 在一个实施方案中,化合物或盐占颗粒中存在的总脂质的50mol %至65mol % ;非阳离子脂质包含磷脂与胆固醇或其衍生物的混合物,其中所述磷脂占颗粒中存在的总脂质的4mol %至10mol % ,并且所述胆固醇或其衍生物占颗粒中存在的总脂质的30mol %至40mol % ;并且缀合脂质占颗粒中存在的总脂质的0.5mol %至2mol %。

[0566] 在一个实施方案中,化合物或盐占颗粒中存在的总脂质的50mol %至65mol % ;非阳离子脂质包含磷脂与胆固醇或其衍生物的混合物,其中所述磷脂占颗粒中存在的总脂质的3mol %至15mol % ,并且所述胆固醇或其衍生物占颗粒中存在的总脂质的30mol %至40mol % ;并且缀合脂质占颗粒中存在的总脂质的0.5mol %至2mol %。

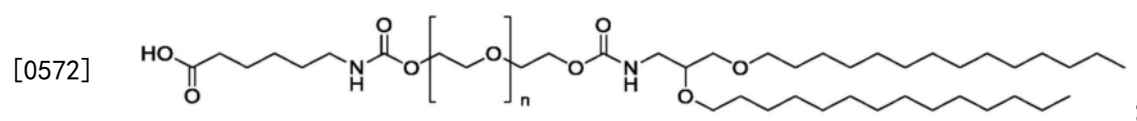
[0567] 在一个实施方案中,化合物或盐占颗粒中存在的总脂质的50mol %至65mol % ;非阳离子脂质占颗粒中存在的总脂质的至多49.5mol % ;胆固醇或其衍生物占颗粒中存在的总脂质的30mol %至40mol % ;

[0568] 并且缀合脂质占颗粒中存在的总脂质的0.5mol %至2mol %。

[0569] 在一个实施方案中,化合物或盐占颗粒中存在的总脂质的50mol %至85mol % ;非阳离子脂质占颗粒中存在的总脂质的13mol %至49.5mol % ;并且缀合脂质占颗粒中存在的总脂质的0.5mol %至2mol %。

[0570] 在一个实施方案中,化合物或盐占颗粒中存在的总脂质的约30mol %至约50mol % ;非阳离子脂质包含占颗粒中存在的总脂质的约47mol %至约69mol %的磷脂与胆固醇或其衍生物的混合物;并且缀合脂质占颗粒中存在的总脂质的约1mol %至约3mol %。

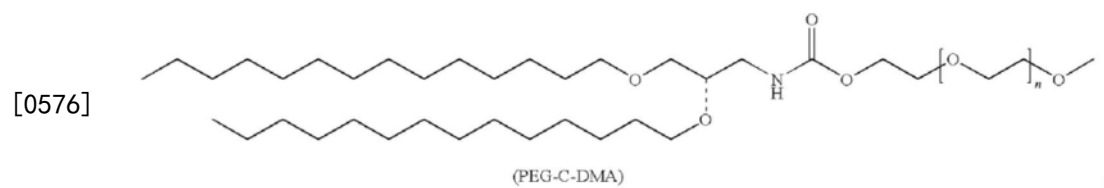
[0571] 在一个实施方案中,非阳离子脂质包含胆固醇与DSPC的混合物;缀合脂质是:



[0573] 其中选择n,使得所得聚合物链具有约2000道尔顿的分子量

[0574] 其中所述缀合脂质占颗粒中存在的总脂质的约2mol % ;DSPC占颗粒中存在的总脂质的约10mol % ;胆固醇占颗粒中存在的总脂质的约48mol % ;并且化合物或盐占颗粒中存在的总脂质的约40mol %。

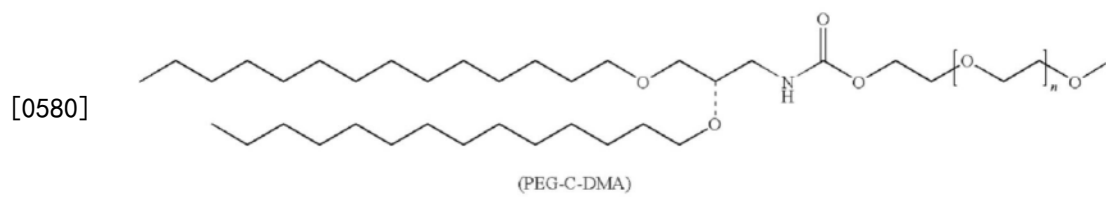
[0575] 在一个实施方案中,非阳离子脂质包含胆固醇与DSPC的混合物;缀合脂质是:



[0577] 其中选择n,使得所得聚合物链具有约2000道尔顿的分子量;

[0578] 其中所述缀合脂质占颗粒中存在的总脂质的约2mol % ;DSPC占颗粒中存在的总脂质的约10mol % ;胆固醇占颗粒中存在的总脂质的约48mol % ;并且化合物或盐占颗粒中存在的总脂质的约40mol % 。

[0579] 在一个实施方案中,非阳离子脂质包含胆固醇与DSPC的混合物;缀合脂质是:



[0581] 其中选择n,使得所得聚合物链具有约2000的分子量;

[0582] 其中所述缀合脂质占颗粒中存在的总脂质的约1.6mol % ;DSPC占颗粒中存在的总脂质的约10.9mol % ;胆固醇占颗粒中存在的总脂质的约32.8mol % ;并且化合物或盐占颗粒中存在的总脂质的约54.9mol % 。

[0583] 在一个实施方案中,脂质与核酸比率是约24。

[0584] 在一个实施方案中,核酸-脂质颗粒包含两种或更多种不同的式(I)化合物或其盐。

[0585] 非阳离子脂质

[0586] 用于本发明的脂质颗粒(例如,LNP)中的非阳离子脂质可为能够产生稳定复合体的任何各种中性不带电荷、两性离子或阴离子脂质。

[0587] 非阳离子脂质的非限制性实例包括磷脂如卵磷脂、磷脂酰乙醇胺、溶血卵磷脂、溶血磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、鞘磷脂、卵鞘磷脂(ESM)、脑磷脂、心磷脂、磷脂酸、脑苷脂、磷酸二鲸蜡酯、二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)、二油酰磷脂酰胆碱(DOPC)、二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)、二油酰磷脂酰甘油(DOPG)、二棕榈酰磷脂酰甘油(DPPG)、二油酰磷脂酰乙醇胺(DOPE)、棕榈酰油酰基-磷脂酰胆碱(POPC)、棕榈酰油酰基-磷脂酰乙醇胺(POPE)、棕榈酰油酰基-磷脂酰甘油(POPG)、二油酰磷脂酰乙醇胺4-(N-马来酰亚胺基甲基)-环己烷-1-羧酸酯(DOPE-mal)、二棕榈酰基-磷脂酰乙醇胺(DPPE)、二肉豆蔻酰基-磷脂酰乙醇胺(DMPE)、二硬脂酰基-磷脂酰乙醇胺(DSPE)、单甲基-磷脂酰乙醇胺、二甲基-磷脂酰乙醇胺、二反式油酰基-磷脂酰乙醇胺(DEPE)、硬脂酰油酰基-磷脂酰乙醇胺(SOPE)、溶血磷脂酰胆碱、二亚油酰基磷脂酰胆碱及其混合物。还可使用其他二酰基磷脂酰胆碱和二酰基磷脂酰乙醇胺磷脂。这些脂质中的酰基优选地为衍生自具有C₁₀-C₂₄碳链的脂肪酸的酰基,例如月桂酰基、肉豆蔻酰基、棕榈酰基、硬脂酰基或油酰基。

[0588] 非阳离子脂质的另外实例包括固醇,如胆固醇及其衍生物,如胆固醇、胆甾烷酮、胆甾烯酮、粪固醇、胆固醇基-2'-羟乙基醚、胆固醇基-4'-羟丁基醚以及它们的混合物。

[0589] 在一些实施方案中,存在于脂质颗粒(例如,LNP)中的非阳离子脂质包含胆固醇或其衍生物或由其组成,例如不含磷脂的脂质颗粒制剂。在其他实施方案中,存在于脂质颗粒(例如,LNP)中的非阳离子脂质包含一种或多种磷脂或由其组成,例如不含胆固醇的脂质颗粒制剂。在其他实施方案中,存在于脂质颗粒(例如,LNP)中的非阳离子脂质包含一种或多种磷脂和胆固醇或其衍生物的混合物或由其组成。

[0590] 适合用于本发明的非阳离子脂质的其他实例包括不含磷的脂质例如像亚麻醇、乙

酰基棕榈酸酯、甘油蓖麻醇酸酯(glycerolricinoleate)、硬脂酸十六烷基酯、肉豆蔻酸异丙酯、两性丙烯酸聚合物、十二烷基硫酸三乙醇胺、烷基-芳基硫酸酯聚乙氧基化脂肪酸酰胺、神经酰胺、鞘磷脂等。

[0591] 在一些实施方案中,非阳离子脂质占颗粒中存在的总脂质的约13mol%至约49.5mol%、约20mol%至约45mol%、约25mol%至约45mol%、约30mol%至约45mol%、约35mol%至约45mol%、约20mol%至约40mol%、约25mol%至约40mol%或约30mol%至约40mol%(或其任何分数或其中的范围)。

[0592] 在某些实施方案中,存在于不含磷脂的脂质颗粒中的胆固醇占所述颗粒中存在的总脂质的约30mol%至约45mol%、约30mol%至约40mol%、约35mol%至约45mol%或约35mol%至约40mol%。作为非限制性实例,不含磷脂的脂质颗粒可包含颗粒中存在的总脂质的约37mol%的胆固醇。

[0593] 在某些其他实施方案中,存在于含有磷脂和胆固醇的混合物的脂质颗粒中的胆固醇占所述颗粒中存在的总脂质的约30mol%至约40mol%、约30mol%至约35mol%或约35mol%至约40mol%。作为非限制性实例,包含磷脂和胆固醇的混合物的脂质颗粒可包含所述颗粒中存在的总脂质的约34mol%的胆固醇。作为其他非限制性实例,颗粒可包含33%或38.5%的胆固醇。

[0594] 在其他实施方案中,存在于含有磷脂和胆固醇的混合物的脂质颗粒中的胆固醇占所述颗粒中存在的总脂质的约10mol%至约30mol%、约15mol%至约25mol%或约17mol%至约23mol%。作为非限制性实例,包含磷脂和胆固醇的混合物的脂质颗粒可包含所述颗粒中存在的总脂质的约20mol%的胆固醇。

[0595] 在其中脂质颗粒含有磷脂与胆固醇或胆固醇衍生物的混合物的实施方案中,混合物可占颗粒中存在的总脂质的高达至约40mol%、45mol%、50mol%、55mol%或60mol%。在某些实例中,混合物中的磷脂组分可占颗粒中存在的总脂质的约2mol%至约20mol%、约2mol%至约15mol%、约2mol%至约12mol%、约2mol%至约10mol%、约2mol%至约9mol%、约2mol%至约8mol%、4mol%至约20mol%、约4mol%至约15mol%、约4mol%至约12mol%、约4mol%至约10mol%、约4mol%至约9mol%、约4mol%至约8mol%、6mol%至约20mol%、约6mol%至约15mol%、约6mol%至约12mol%、约6mol%至约10mol%、约6mol%至约9mol%、约2mol%至约8mol%、8mol%至约20mol%、约8mol%至约15mol%、约8mol%至约12mol%、约8mol%至约10mol%、约8mol%至约9mol%。作为非限制性实例,包含磷脂和胆固醇的混合物的脂质颗粒可包含颗粒中存在的总脂质的约7mol%的磷脂如DPPC或DSPC(例如,在具有约34mol%胆固醇的混合物中)。在某些其他实例中,混合物中的磷脂组分可占颗粒中存在的总脂质的约10mol%至约30mol%、约10mol%至约15mol%、约15mol%至约20mol%、约15mol%至约25mol%或约17mol%至约23mol%。作为另一个非限制性实例,包含磷脂和胆固醇的混合物的脂质颗粒可包含颗粒中存在的总脂质的约20mol%的磷脂如DPPC或DSPC(例如,在具有约20mol%胆固醇的混合物中)。

[0596] 脂质缀合物

[0597] 除了阳离子脂质和非阳离子脂质外,本发明的脂质颗粒(例如,LNP)还可包含脂质缀合物。缀合的脂质是有用的,因为它防止了颗粒的聚集。适合的缀合的脂质包括但不限于PEG-脂质缀合物、ATTA-脂质缀合物、阳离子聚合物-脂质缀合物(CPL)、POZ聚噁唑啉(POZ)-

脂质、聚肌氨酸 (pSAR) - 脂质以及它们的混合物。在某些实施方案中,颗粒包含PEG-脂质缀合物或ATTA-脂质缀合物连同CPL。

[0598] 在优选的实施方案中,脂质缀合物为PEG-脂质。PEG-脂质的实例包括但不限于如在例如PCT公布号W0 05/026372中所描述的偶联至二烷基氧基丙基的PEG (PEG-DAA)、如在例如美国专利公布号20030077829和2005008689中所描述的偶联至二酰基甘油的PEG (PEG-DAG)、偶联至磷脂如磷脂酰乙醇胺的PEG (PEG-PE)、如在例如美国专利号5,885,613中所描述的缀合至神经酰胺的PEG、缀合至胆固醇或其衍生物的PEG以及它们的混合物。这些专利文件的公开内容出于所有目的以引用的方式整体并入本文。另外的PEG-脂质包括但不限于PEG-C-DMG、2KPEG-DMG以及它们的混合物。

[0599] PEG为乙二醇重复单元的线性、水溶性聚合物。通过其分子量对PEG分类;例如PEG 2000的平均分子量为约2,000道尔顿,并且PEG 5000的平均分子量为约5,000道尔顿。PEG可从Sigma Chemical Co.和其他公司商购获得,并且包括例如以下:单甲氧基聚乙二醇 (MePEG-OH)、单甲氧基聚乙二醇-琥珀酸酯 (MePEG-S)、单甲氧基聚乙二醇-琥珀酰亚胺琥珀酸酯 (MePEG-S-NHS)、单甲氧基聚乙二醇-胺 (MePEG-NH₂)、单甲氧基聚乙二醇-三苯甲酸酯 (MePEG-TRES) 和单甲氧基聚乙二醇-咪唑基-羰基 (MePEG-IM)。如在美国专利号6,774,180和7,053,150中描述的那些的其他PEG (例如,mPEG (20KDa) 胺) 也有用于制备本发明的PEG-脂质缀合物。这些专利的公开内容出于所有目的以引用的方式整体并入本文。另外,单甲氧基聚乙二醇乙酸 (MePEG-CH₂COOH) 特别有助于制备PEG-脂质缀合物包括例如PEG-DAA缀合物。

[0600] 本文描述的PEG-脂质缀合物的PEG部分可包含约550道尔顿至约10,000道尔顿范围内的平均分子量。在某些实例中,PEG部分具有约750道尔顿至约5,000道尔顿 (例如,约1,000道尔顿至约5,000道尔顿、约1,500道尔顿至约3,000道尔顿、约750道尔顿至约3,000道尔顿、约750道尔顿至约2,000道尔顿等) 的平均分子量。在优选的实施方案中,PEG部分具有约2,000道尔顿或约750道尔顿的平均分子量。

[0601] 在某些实例中,PEG可任选地被烷基、烷氧基、酰基或芳基取代。PEG可直接缀合至脂质或可经由接头部分连接至脂质。可使用适合于将PEG偶联至脂质的任何接头部分,包括例如含有非酯的接头部分和含酯接头部分。在优选的实施方案中,接头部分为含有非酯的接头部分。如本文所使用,术语“含有非酯的接头部分”是指不含有羧酸酯键(—OC(O)—)的接头部分。适合的含有非酯的接头部分包括但不限于酰胺基(—C(O)NH—)、氨基(—NR—)、羰基(—C(O)—)、氨基甲酸酯(—NHC(O)O—)、脲(—NHC(O)NH—)、二硫化物(—S—S—)、醚(—O—)、琥珀酰基(—(O)CCH₂CH₂C(O)—)、琥珀酰胺基(—NHC(O)CH₂CH₂C(O)NH—)、醚、二硫化物以及它们的组合 (如含有氨基甲酸酯接头部分和酰胺基接头部分的接头)。在优选的实施方案中,氨基甲酸酯接头用来将PEG偶联至脂质。

[0602] 在其他实施方案中,含酯接头部分用来将PEG偶联至脂质。适合的含酯接头部分包括例如碳酸酯(—OC(O)O—)、琥珀酰基、磷酸酯(—O—(O)POH—O—)、磺酸酯以及它们的组合。

[0603] 适用于本发明中的另外PEG-脂质缀合物包括但不限于下式的化合物:

[0604] A-B-C

[0605] 或其盐,其中:

[0606] A是(C₁-C₆)烷基、(C₃-C₈)环烷基、(C₃-C₈)环烷基(C₁-C₆)烷基、(C₁-C₆)烷氧基、(C₂-C₆)烯基、(C₂-C₆)炔基、(C₁-C₆)烷酰基、(C₁-C₆)烷氧基羰基、(C₁-C₆)烷硫基或(C₂-C₆)烷酰基氧基,其中任何(C₁-C₆)烷基、(C₃-C₈)环烷基、(C₃-C₈)环烷基(C₁-C₆)烷基、(C₁-C₆)烷氧基、(C₂-C₆)烯基、(C₂-C₆)炔基、(C₁-C₆)烷酰基、(C₁-C₆)烷氧基羰基、(C₁-C₆)烷硫基和(C₂-C₆)烷酰基氧基被一个或多个阴离子前体基团取代,并且其中任何(C₁-C₆)烷基、(C₃-C₈)环烷基、(C₃-C₈)环烷基(C₁-C₆)烷基、(C₁-C₆)烷氧基、(C₂-C₆)烯基、(C₂-C₆)炔基、(C₁-C₆)烷酰基、(C₁-C₆)烷氧基羰基、(C₁-C₆)烷硫基和(C₂-C₆)烷酰基氧基任选地被一个或多个独立地选自以下组成的组的基团取代:卤基、羟基、(C₁-C₃)烷氧基、(C₁-C₆)烷酰基、(C₁-C₃)烷氧基羰基、(C₁-C₃)烷硫基或(C₂-C₃)烷酰基氧基;

[0607] B是具有约550道尔顿至约10,000道尔顿的分子量的聚乙二醇链;

[0608] C是-L-R^a;

[0609] L选自以下组成的组:直接键、-C(O)O-、-C(O)NR^b-、-NR^b-、-C(O)-、-NR^bC(O)O-、-NR^bC(O)NR^b-、-S-S-、-O-、-(O)CCH₂CH₂C(O)-和-NHC(O)CH₂CH₂C(O)NH-;

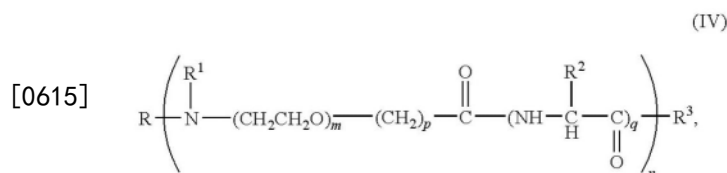
[0610] R^a是支链(C₁₀-C₅₀)烷基或支链(C₁₀-C₅₀)烯基,其中所述支链(C₁₀-C₅₀)烷基或支链(C₁₀-C₅₀)烯基的一个或多个碳原子已被-O-替代;并且

[0611] 每个R^b独立地为H或(C₁-C₆)烷基。

[0612] 缀合的脂质可包含PEG-脂质,包括例如式A-PEG-二酰基甘油(DAG)、A-PEG二烷基氧基丙基(DAA)、A-PEG-磷脂、A-PEG-神经酰胺(Cer)或它们的混合物,其中A是(C₁-C₆)烷基、(C₃-C₈)环烷基、(C₃-C₈)环烷基(C₁-C₆)烷基、(C₁-C₆)烷氧基、(C₂-C₆)烯基、(C₂-C₆)炔基、(C₁-C₆)烷酰基、(C₁-C₆)烷氧基羰基、(C₁-C₆)烷硫基或(C₂-C₆)烷酰基氧基,其中任何(C₁-C₆)烷基、(C₃-C₈)环烷基、(C₃-C₈)环烷基(C₁-C₆)烷基、(C₁-C₆)烷氧基、(C₂-C₆)烯基、(C₂-C₆)炔基、(C₁-C₆)烷酰基、(C₁-C₆)烷氧基羰基、(C₁-C₆)烷硫基和(C₂-C₆)烷酰基氧基被一个或多个阴离子前体基团取代,并且其中任何(C₁-C₆)烷基、(C₃-C₈)环烷基、(C₃-C₈)环烷基(C₁-C₆)烷基、(C₁-C₆)烷氧基、(C₂-C₆)烯基、(C₂-C₆)炔基、(C₁-C₆)烷酰基、(C₁-C₆)烷氧基羰基、(C₁-C₆)烷硫基和(C₂-C₆)烷酰基氧基任选地被一个或多个独立地选自以下组成的组的基团取代:卤基、羟基、(C₁-C₃)烷氧基、(C₁-C₆)烷酰基、(C₁-C₃)烷氧基羰基、(C₁-C₃)烷硫基或(C₂-C₃)烷酰基氧基。A-PEG-DAA缀合物可以是A-PEG-二月桂基氧基丙基(C12)、A-PEG-二肉豆蔻基氧基丙基(C14)、A-PEG-二棕榈基氧基丙基(C16)或A-PEG-二硬脂基氧基丙基(C18)或它们的混合物。

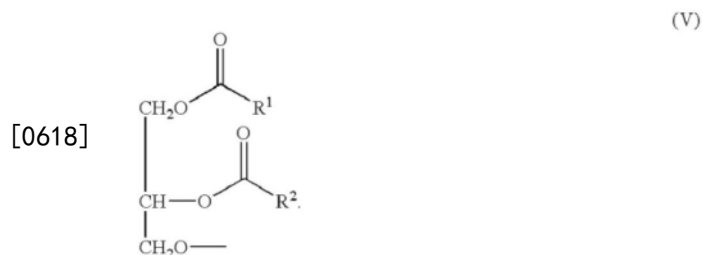
[0613] 具有不同链长度和饱和度的各种酰基链基团的磷脂酰乙醇胺可缀合至PEG以形成脂质缀合物。此类磷脂酰乙醇胺是可商购的,或者可使用本领域技术人员已知的常规技术分离或合成。优选的是含有饱和或不饱和脂肪酸且碳链长度在C₁₀至C₂₀范围内的磷脂酰乙醇胺。还可使用具有单不饱和脂肪酸或双不饱和脂肪酸以及饱和脂肪酸和不饱和脂肪酸的混合物的磷脂酰乙醇胺。适合的磷脂酰乙醇胺包括但不限于二肉豆蔻酰基-磷脂酰乙醇胺(DMPE)、二棕榈酰基-磷脂酰乙醇胺(DPPE)、二油酰基磷脂酰乙醇胺(DOPE)以及二硬脂酰基-磷脂酰乙醇胺(DSPE)。

[0614] 术语“ATTR”或“聚酰胺”是指但不限于在美国专利号6,320,017和6,586,559中描述的化合物,所述专利的公开内容出于所有目的以引用的方式整体并入本文。这些化合物包括具有下式的化合物:



[0616] 其中R是选自由氢、烷基和酰基组成的组的成员;R¹是选自由氢和烷基组成的组的成员;或任选地,R和R¹以及它们结合的氮形成叠氮基部分;R²是选自氢、任选取代的烷基、任选取代的芳基以及氨基酸的侧链的组的成员;R³是选自由氢、卤素、羟基、烷氧基、巯基、胍基、氨基和NR⁴R⁵组成的组的成员,其中R⁴和R⁵独立地是氢或烷基;n是4至80;m是2至6;p是1至4;并且q是0或1。本领域技术人员将清楚其他聚酰胺可用于本发明的化合物中。

[0617] 术语“二酰基甘油”是指具有2个脂肪酰基链R¹和R²(所述脂肪酰基链均独立地具有通过酯键联结合至甘油的1-位和2-位的介于2与30个之间的碳)的化合物。酰基可是饱和的或具有不同的不饱和度。合适的酰基包括但不限于月桂基(C₁₂)、肉豆蔻基(C₁₄)、棕榈基(C₁₆)、硬脂基(C₁₈)和二十烷基(C₂₀)。在优选的实施方案中,R¹和R²是相同的,即R¹和R²两者均是肉豆蔻基(即二肉豆蔻基),R¹和R²两者均是硬脂基(即二硬脂基),等等。二酰基甘油具有以下通式:



[0619] 术语“二烷基氧基丙基”是指具有2个烷基链R¹和R²(所述烷基链均独立地具有介于2个与30个之间的碳)的化合物。烷基可为饱和的或具有不同的不饱和度。二烷基氧基丙基具有以下通式:



[0621] 在优选的实施方案中,PEG-脂质为具有下式的PEG-DAA缀合物:

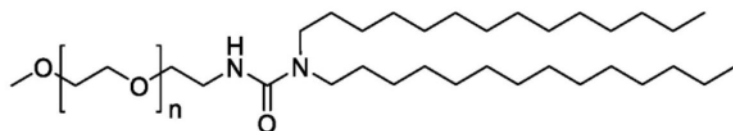


[0623] 其中R¹和R²被独立地选择并且为具有约10至约22个碳原子的长链烷基;PEG是聚乙二醇;并且L是如上所述的含有非酯的接头部分或含酯接头部分。长链烷基可为饱和或不饱和的。合适的烷基包括但不限于月桂基(C₁₂)、肉豆蔻基(C₁₄)、棕榈基(C₁₆)、硬脂基(C₁₈)和二十烷基(C₂₀)。在优选的实施方案中,R¹和R²是相同的,即R¹和R²两者均是肉豆蔻基(即二肉豆蔻基),R¹和R²两者均是硬脂基(即二硬脂基),等等。

[0624] 在以上的式VII中,PEG具有在约550道尔顿至约10,000道尔顿范围内的平均分子量。在某些实例中,PEG具有约500道尔顿至约5,000道尔顿(例如,约1,000道尔顿至约5,000道尔顿、约1,500道尔顿至约3,000道尔顿、约750道尔顿至约3,000道尔顿、约750道尔顿至约2,000道尔顿等)的平均分子量。在优选的实施方案中,PEG具有约2,000道尔顿或约750道尔顿的平均分子量。PEG可任选地被烷基、烷氧基、酰基或芳基取代。在某些实施方案中,末端羟基被甲氧基或甲基取代。

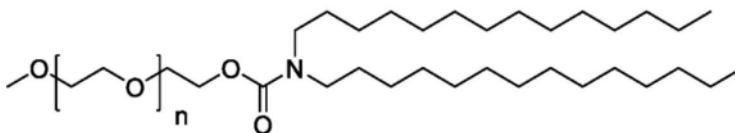
[0625] 在优选的实施方案中,“L”为含有非酯的接头部分。适合的含有非酯的接头包括但不限于酰胺基接头部分、氨基接头部分、羰基接头部分、氨基甲酸酯接头部分、脲接头部分、醚接头部分、二硫化物接头部分、琥珀酰胺基接头部分及其组合。在优选的实施方案中,含有非酯的接头部分为氨基甲酸酯接头部分(即,PEG-C-DAA缀合物)。在另一个优选的实施方案中,含有非酯的接头部分为酰胺基接头部分(即,PEG-A-DAA缀合物)。在又一个优选的实施方案中,含有非酯的接头部分为琥珀酰胺基接头部分(即,PEG-S-DAA缀合物)。

[0626] 在特定实施方案中,PEG-脂质缀合物选自:



甲氧基PEG 1,1-双十四烷基脲

[0627]



甲氧基PEG双十四烷基氨基甲酸酯

[0628] 在一个实施方案中,选择n,使得所得聚合物链具有约2000的分子量。

[0629] 使用本领域技术人员已知的标准技术和试剂合成PEG-DAA缀合物。将认识到PEG-DAA缀合物将含有各种酰胺、胺、醚、硫基、氨基甲酸酯和脲键。本领域技术人员将认识到用于形成这些键的方法和试剂为熟知的并且容易获得。参见,例如March,ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY(Wiley 1992);Larock,COMPREHENSIVE ORGANIC TRANSFORMATIONS(VCH 1989);以及Furniss,VOGEL'S TEXTBOOK OF PRACTICAL ORGANIC CHEMISTRY,第5版(Longman 1989)。还将了解,存在的任何官能团可在合成PEG-DAA缀合物中的不同点处需要保护和去保护。本领域技术人员将认识到此类技术为熟知的。参见,例如Green和Wuts,PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS(Wiley 1991)。

[0630] 优选地,PEG-DAA缀合物是二月桂基氧基丙基(C_{12})-PEG缀合物、二肉豆蔻基氧基丙基(C_{14})-PEG缀合物、二棕榈基氧基丙基(C_{16})-PEG缀合物或二硬脂基氧基丙基(C_{18})-PEG缀合物。本领域技术人员将很容易了解到,其他二烷基氧基丙基可用于本发明的PEG-DAA缀合物中。

[0631] 除了上述内容之外,本领域技术人员将很容易清楚其他亲水聚合物可代替PEG而

使用。可代替PEG而使用的适合的聚合物的实例包括但不限于聚乙烯吡咯烷酮、聚甲基噁唑啉、聚乙基噁唑啉、聚羟丙基甲基丙烯酸酰胺、聚甲基丙烯酸酰胺和聚二甲基丙烯酸酰胺、聚乳酸、聚乙醇酸以及衍生的纤维素如羟甲基纤维素或羟乙基纤维素。

[0632] 聚阳离子部分上的电荷可分布在整个颗粒部分周围,或可选地,它们可在颗粒部分的一个具体区域中为不连续浓度的电荷密度,例如电荷尖峰(charge spike)。如果电荷密度分布在颗粒上,电荷密度可均匀分布或不均匀分布。本发明涵盖聚阳离子部分的电荷分布的所有变化。

[0633] 在某些实例中,聚阳离子部分可具有附接的配体,如用于络合钙的靶向配体或螯合部分。优选地,在配体附接之后,阳离子部分维持正电荷。在某些实例中,附接的配体具有正电荷。适合的配体包括但不限于具有反应性官能团的化合物或装置并且包括脂质、两亲性脂质、载体化合物、生物亲和性化合物、生物材料、生物聚合物、生物医学装置、分析可检测化合物、治疗活性化合物、酶、肽、蛋白质、抗体、免疫刺激剂、放射性标记、荧光团、生物素、药物、半抗原、DNA、RNA、多糖、脂质体、病毒体、胶束、免疫球蛋白、官能团、其他靶向部分或毒素。

[0634] 脂质缀合物(例如,PEG-脂质)通常占颗粒中存在的总脂质的约0.1mol%至约10mol%、约0.5mol%至约10mol%、约1mol%至约10mol%、约2mol%至约10mol%、约2mol%至约8mol%、约2mol%至约5mol%、约2mol%至约4mol%、约0.6mol%至约1.9mol%、约0.7mol%至约1.8mol%、约0.8mol%至约1.7mol%、约0.9mol%至约1.6mol%、约0.9mol%至约1.8mol%、约1mol%至约1.8mol%、约1mol%至约1.7mol%、约1.2mol%至约1.8mol%、约1.2mol%至约1.7mol%、约1.3mol%至约1.6mol%或约1.4mol%至约1.5mol%。

[0635] 本领域技术人员将了解,脂质缀合物的浓度可取决于所采用的脂质缀合物和核酸-脂质颗粒变为融合性的速率而改变。

[0636] 通过控制脂质缀合物的组成和浓度,可控制从核酸-脂质颗粒交换出脂质缀合物的速率,并且反过来控制核酸-脂质颗粒变为融合性的速率。例如,当PEG-磷脂酰乙醇胺缀合物或PEG-神经酰胺缀合物用作脂质缀合物时,核酸-脂质颗粒变为融合性的速率可例如通过改变脂质缀合物的浓度、通过改变PEG的分子量或通过改变磷脂酰乙醇胺或神经酰胺上的酰基链的链长和饱和度来改变。另外,其他变量包括例如pH、温度、离子强度等可用来改变和/或控制核酸-脂质颗粒变为融合性的速率。当阅读本公开内容时,可用来控制核酸-脂质颗粒变为融合性的速率的其他方法将对本领域技术人员而言变得清楚。

[0637] 脂质颗粒的制备

[0638] 本发明的脂质颗粒(例如LNP)可通过本领域中已知的任何方法来形成,包括但不限于连续混合方法或直接稀释方法,其中活性剂或治疗剂如核酸被包封在脂质双层中并且被保护免于降解。

[0639] 在优选的实施方案中,非阳离子脂质是卵鞘磷脂(ESM)、二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)、二油酰磷脂酰胆碱(DOPC)、1-棕榈酰基-2-油酰基-磷脂酰胆碱(POPC)、二棕榈酰基-磷脂酰胆碱(DPPC)、单甲基-磷脂酰乙醇胺、二甲基-磷脂酰乙醇胺、14:0PE(1,2-二肉豆蔻酰基-磷脂酰乙醇胺(DMPE))、16:0PE(1,2-二棕榈酰基-磷脂酰乙醇胺(DPPE))、18:0PE(1,2-二硬脂酰基-磷脂酰乙醇胺(DSPE))、18:1PE(1,2-二油酰基-磷脂酰乙醇胺(DOPE))、

18:1反式PE(1,2-二反式油酰基-磷脂酰乙醇胺(DEPE))、18:0-18:1PE(1-硬脂酰基-2-油酰基-磷脂酰乙醇胺(SOPE))、16:0-18:1PE(1-棕榈酰基-2-油酰基-磷脂酰乙醇胺(POPE))、基于聚乙二醇的聚合物(例如,PEG 2000、PEG 5000、PEG-改性的二酰基甘油或PEG-改性的二烷基氧基丙基)、胆固醇或它们的组合。

[0640] 在某些实施方案中,本发明提供了经由连续混合方法产生的LNP,所述连续混合物方法是例如包括以下步骤的方法:在第一储罐中提供包含核酸(如干扰RNA或mRNA)的水溶液,在第二储罐中提供有机脂质溶液,以及将所述水溶液与所述有机脂质溶液混合,使得所述有机脂质溶液与所述水溶液混合,从而基本上瞬时产生包封核酸(例如,干扰RNA或mRNA)的脂质体。这种方法和用于进行这种方法的装置在美国专利公布号20040142025中详细描述,所述专利的公开内容出于所有目的以引用的方式整体并入本文。

[0641] 连续将脂质和缓冲溶液引入到混合环境中如在混合室中的动作引起用缓冲溶液连续稀释脂质溶液,从而当混合时基本上瞬时产生脂质体。如本文所使用,短语“用缓冲溶液连续稀释脂质溶液”(和变化)通常意指用足够实现囊泡产生的力在水合过程中充分快速地稀释脂质溶液。在存在缓冲溶液(即,水溶液)的情况下通过使包含核酸的水溶液与有机脂质溶液混合有机脂质溶液经历连续逐步稀释以产生核酸-脂质颗粒。

[0642] 使用连续混合方法形成的LNP通常具有约40nm至约150nm、约40nm至约80nm、约40nm至约60nm、约50nm至约60nm、约50nm至约150nm、约60nm至约130nm、约70nm至约110nm或约70nm至约90nm的大小。因此所形成的颗粒不会聚集并且任选地大小设定为实现均匀的粒度。

[0643] 在另一个实施方案中,本发明提供了经由直接稀释方法产生的LNP,所述直接稀释方法包括形成脂质体溶液和立即并直接将所述脂质体溶液引入到含有控制量的稀释缓冲液的收集容器中。在优选的方面中,收集容器包括一个或多个被配置成搅拌收集容器的内容物以稀释的元件。在一个方面中,存在于收集容器中的稀释缓冲液的量基本上等于引入其中的脂质体溶液的体积。作为非限制性实例,当引入到含有相等体积的稀释缓冲液的收集容器中时,在45%乙醇中的脂质体溶液将有利地产生更小的颗粒。

[0644] 在另一个实施方案中,本发明提供了经由直接稀释方法产生的LNP,其中含有稀释缓冲液的第三储罐流体联接至第二混合区。在此实施方案中,在第一混合区中形成的脂质体溶液立即并直接与第二混合区中的稀释缓冲液混合。在优选的方面中,第二混合区包括T-连接器,所述T-连接器被布置以使得脂质体溶液流和稀释缓冲液流相遇呈反向180°流动;然而,可使用例如约27°至约180°的提供更小角度的连接器。泵机构将可控流量的缓冲液递送至第二混合区。在一个方面中,提供至第二混合区的稀释缓冲液的流速控制为基本上等于从第一混合区将脂质体溶液引入其中的流速。在另一方面,将提供至第二混合区的稀释缓冲液的流速控制为基本上不同于脂质体溶液从第一混合区引入其中的流速。此实施方案有利地允许对与第二混合区中的脂质体溶液混合的稀释缓冲液的流量的更多控制,并且因此还控制整个第二混合过程中的缓冲液中的脂质体溶液的浓度。对稀释缓冲液流速的此种控制有利地允许在减少的浓度下的小的粒度形成。

[0645] 这些方法和用于进行这些直接稀释方法的装置在美国专利公布号20070042031中详细描述,所述专利的公开内容出于所有目的通过引用整体并入本文。

[0646] 使用直接稀释方法形成的LNP通常具有约40nm至约150nm、约40nm至约80nm、约

40nm至约60nm、约50nm至约60nm、约50nm至约150nm、约60nm至约130nm、约70nm至约110nm或约70nm至约90nm的大小。因此所形成的颗粒不会聚集并且任选地大小设定为实现均匀的粒度。

[0647] 如果需要,本发明的脂质颗粒(例如,LNP)可通过可供用于设定脂质体大小的任何方法来设定大小。可进行设定大小以便实现所需的大小范围和相对窄的粒度分布。

[0648] 若干技术可供用于将颗粒的大小设定为所需的大小。用于脂质体并且同等可适用于本发明颗粒的一种设定大小的方法在美国专利号4,737,323中描述,所述专利的公开内容出于所有目的通过引用整体并入本文。通过浴或探针超声对颗粒悬浮液超声产生了大小逐渐减小至大小小于约50nm的颗粒。均质化为依赖于剪切能量将更大的颗粒破碎成更小的颗粒的另一种方法。在通常的均质化工序中,颗粒流通穿过标准的乳液均化器直到观察到选择的粒度,通常在约60nm与约80nm之间。在这两种方法中,粒度分布可通过常规的激光束粒度鉴别或QELS来监测。

[0649] 通过小孔聚碳酸酯膜或不对称陶瓷膜将颗粒挤出也是用于将粒度减小至相对明确定义的大小分布的有效方法。通常,悬浮液循环穿过膜一次或多次直到实现所需的粒度分布。可通过孔越来越小的膜挤出颗粒来实现大小逐渐减小。

[0650] 在一些实施方案中,LNP中的核酸是如例如美国专利申请序列号09/744,103中所描述进行预缩合,所述专利的公开内容出于所有目的通过引用整体并入本文。

[0651] 在其他实施方案中,所述方法将进一步包括使用本发明组合物添加有用于实现细胞脂转染的非脂质聚阳离子。适合的非脂质聚阳离子的实例包括海美溴铵(hexadimethrine bromide)(以商品名**POLYBRENE®**出售,来自Aldrich Chemical Co.,Milwaukee,Wis.,USA)或海地美铵的其他盐。其他适合的聚阳离子包括例如聚-L-鸟氨酸、聚-L-精氨酸、聚-L-赖氨酸、聚-D-赖氨酸、聚丙烯胺以及聚乙烯亚胺的盐。这些盐的加入优选地在颗粒已形成之后。

[0652] 在一些实施方案中,形成的LNP中的核酸与脂质比率(质量/质量比率)将在约0.01至约0.2、约0.02至约0.1、约0.03至约0.1或约0.01至约0.08的范围内。起始材料的比率也落于此范围内。在其他实施方案中,LNP制备使用每10mg总脂质约400 μ g核酸或约0.01至约0.08的核酸与脂质质量比率,并且更优选地约0.04,其相应于每50 μ g核酸1.25mg总脂质。在其他优选的实施方案中,颗粒的核酸:脂质质量比为约0.08。

[0653] 在其他实施方案中,形成的LNP中的脂质与核酸比率(质量/质量比率)将在约1(1:1)至约100(100:1)、约5(5:1)至约100(100:1)、约1(1:1)至约50(50:1)、约2(2:1)至约50(50:1)、约3(3:1)至约50(50:1)、约4(4:1)至约50(50:1)、约5(5:1)至约50(50:1)、约1(1:1)至约25(25:1)、约2(2:1)至约25(25:1)、约3(3:1)至约25(25:1)、约4(4:1)至约25(25:1)、约5(5:1)至约25(25:1)、约5(5:1)至约20(20:1)、约5(5:1)至约15(15:1)、约5(5:1)至约10(10:1)、约5(5:1)、6(6:1)、7(7:1)、8(8:1)、9(9:1)、(10:1)、11(11:1)、12(12:1)、13(13:1)、14(14:1)、15(15:1)、16(16:1)、17(17:1)、18(18:1)、19(19:1)、20(20:1)、21(21:1)、22(22:1)、23(23:1)、24(24:1)、25(25:1)、26(26:1)、27(27:1)、28(28:1)、29(29:1)或30(30:1)的范围内。起始材料的比率通常也落于此范围内。

[0654] 如先前所讨论,缀合的脂质可进一步包括CPL。本文讨论了用于制造LNP-CPL(含CPL的LNP)的各种通用方法。两种通用技术包括:“后插入”技术,即将CPL插入到例如预先形

成的LNP中;和“标准”技术,其中CPL在例如LNP形成步骤过程中包括在脂质混合物中。后插入技术产生主要在LNP双层膜的外表面中具有CPL的LNP,而标准技术提供在内表面和外表面均具有CPL的LNP。方法尤其有用于从磷脂(其可含有胆固醇)制得的囊泡并且还有用于含有PEG-脂质(如PEG-DAA和PEG-DAG)的囊泡。制造LNP-CPL的方法例如在美国专利号5,705,385;6,586,410;5,981,501;6,534,484和6,852,334;美国专利公布号20020072121;以及PCT公布号WO 00/62813中教导,所述专利的公开内容出于所有目的以引用的方式整体并入本文。

[0655] 用于产生LNP的其他方法可例如在美国专利号9,005,654和PCT公布号WO 2007/012191中找到,所述专利的公开内容出于所有目的以引用的方式整体并入本文。

[0656] 药盒

[0657] 本发明还提供了呈药盒形式的脂质颗粒(例如,LNP)。所述药盒可包括被分成隔间用于容纳脂质颗粒的各种要素(例如,活性剂或治疗剂如核酸和颗粒的单独脂质组分)的容器。在一些实施方案中,药盒还可包括内体膜去稳定剂(例如,钙离子)。药盒通常含有本发明的脂质颗粒组合物,优选呈脱水形式,以及其再水合和施用的说明书。

[0658] 如本文所解释,本发明的脂质颗粒(例如LNP)可定制为优先靶向特定目标组织、器官或肿瘤。在某些实例中,可通过控制颗粒本身的组成来进行脂质颗粒如LNP的优先靶向。例如,如实施例11所述,已发现1:57PEG-cDSALNP制剂可用于优先靶向肝脏外肿瘤,而1:57PEG-cDMALNP制剂可用于优先靶向肝脏(包括肝脏肿瘤)。

[0659] 在某些其他实例中,可使靶向部分附接至脂质颗粒的表面以进一步增强颗粒的靶向是令人希望的。将靶向部分(例如,抗体、蛋白质等)附接至脂质(如用于本发明颗粒中的那些)的方法为本领域技术人员所已知。

[0660] 脂质颗粒的施用

[0661] 一旦形成,本发明的脂质颗粒(例如,LNP)可用于将活性剂或治疗剂(例如,核酸如干扰RNA或mRNA)引入到细胞中。因此,本发明还提供了用于将活性剂或治疗剂如核酸(例如,干扰RNA或mRNA)引入到细胞中的方法。通过首先形成如上所述的颗粒并且然后使颗粒与细胞接触足够用于发生活性剂或治疗剂递送至细胞的一段时间来体外或体内进行所述方法。

[0662] 本发明的脂质颗粒(例如,LNP)可被吸收至几乎与其混合或接触的任何细胞类型中。一旦吸收,颗粒可被细胞的一部分内吞,与细胞膜交换脂质,或与细胞融合。颗粒的活性剂或治疗剂(例如,核酸)部分的转移或掺入可经由这些途径中的任何一种来发生。具体地说,当融合发生时,颗粒膜并入细胞膜中并且颗粒的内容物与细胞内流体组合。

[0663] 本发明的脂质颗粒(例如,LNP)可单独地或与根据施用途和标准药物实践选择的药学上可接受的载体(例如,生理盐水或磷酸盐缓冲液)混合施用。通常,生理缓冲盐水(例如,135-150mM NaCl)将采用作为药学上可接受的载体。其他适合的载体包括例如水、缓冲水、0.4%盐水、0.3%甘氨酸等,包括用于增强稳定性的糖蛋白,如白蛋白、脂蛋白、球蛋白等。另外合适的载体在例如REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, Mack Publishing Company, Philadelphia, Pa., 第17版(1985)中描述。如本文所使用,“载体”包括任何和所有的溶剂、分散介质、媒介物、包衣、稀释剂、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂、缓冲剂、载体溶液、悬浮液、胶体等。短语“药学上可接受的”是指当向人施用时不会产生过敏或

类似不良反应的分子实体和组合物。

[0664] 药学上可接受的载体通常在颗粒形成后添加。因此,在颗粒形成后,可将颗粒稀释到药学上可接受的载体如生理缓冲盐水中。

[0665] 药物制剂中的颗粒浓度可广泛变化,即,从小于约0.05重量%,通常在或至少约2重量%至5重量%至多达约10重量%至90重量%,并且将根据所选择的具体施用方式主要通过流体体积、粘度等来选择。例如,可增加浓度以降低与治疗相关的流体负荷。这可在患有动脉粥样硬化相关的充血性心力衰竭或严重高血压的患者中是特别可取的。或者,可将主要由刺激性脂质组成的颗粒稀释至低浓度以减少施用部位上的炎症。

[0666] 本发明的药物组合物可通过常规熟知的灭菌技术来灭菌。可将水性溶液进行包装以期使用或在无菌条件下过滤并冻干,冻干制剂在施用之前与无菌水溶液混合。当需要接近生理条件时,组合物可含有药学上可接受的辅助物质,如pH调节剂和缓冲剂、张力调节剂等,例如乙酸钠、乳酸钠、氯化钠、氯化钾以及氯化钙。另外,颗粒悬浮液可包括在储存时保护脂质不受自由基和脂质过氧化损害的脂质保护剂。亲脂性自由基淬灭剂如 α 生育酚和水溶性铁特异性螯合剂如铁草胺为适合的。

[0667] 体内施用

[0668] 使用核酸-脂质颗粒如在PCT公布号WO 05/007196、WO 05/121348、WO 05/120152和WO 04/002453中描述的那些已实现了用于体内疗法的系统递送,例如经由身体系统如循环将治疗性核酸递送至远端靶细胞,所述专利的公开内容出于所有目的以引用的方式整体并入本文。本发明还提供了完全包封的脂质颗粒,其保护核酸不受血清中的核酸酶降解、为非免疫原性的、尺寸小的并且适用于重复给药。

[0669] 针对体内施用,施用可以本领域中已知的任何方式,例如通过注射、口服施用、吸入(例如,鼻内或气管内)、透皮涂敷或直肠施用。施用可经由单次剂量或分开剂量来完成。药物组合物可胃肠外,即关节内、静脉内、腹膜内、皮下或肌肉内施用。在一些实施方案中,药物组合物通过团注静脉内或腹膜内施用(参见,例如美国专利号5,286,634)。细胞内核酸递送还论述于Straubinger等人,Methods Enzymol.,101:512(1983);Mannino等人,Biotechniques,6:682(1988);Nicolau等人,Crit.Rev.Ther.Drug Carrier Syst.,6:239(1989);和Behr,Acc.Chem.Res.,26:274(1993)。施用基于脂质的治疗剂的其他方法在例如美国专利号3,993,754;4,145,410;4,235,871;4,224,179;4,522,803以及4,588,578中描述。脂质颗粒可通过在疾病部位处直接注射或通过远离疾病部位的部位处注射来施用(参见,例如Culver,HUMAN GENE THERAPY,MaryAnn Liebert Inc.,Publishers,New York.第70-71页(1994))。上述参考文献的公开内容出于所有目的通过引用整体并入本文。

[0670] 单独或与其他适合的组分组合的本发明组合物可制成有待经由吸入(例如,鼻内或气管内)施用的气雾剂制剂(即,它们可被“雾化”)(参见,Brigham等人,Am.J.Sci.,298:278(1989))。气雾剂制剂可被置于加压可接受的推进剂中,如二氯二氟甲烷、丙烷、氮等。

[0671] 在某些实施方案中,药物组合物可通过鼻内喷雾、吸入和/或其他气雾剂递送媒介物来递送。用于经由鼻气雾剂喷雾直接将核酸组合物递送至肺的方法已描述于例如美国专利号5,756,353和5,804,212中。同样,使用鼻内微粒树脂和溶血磷脂酰-甘油化合物递送药物(美国专利号5,725,871)在药学领域中也是熟知的。类似地,以聚四氟乙烯载体基质形式的透粘膜药物递送在美国专利号5,780,045中描述。上述专利的公开内容出于所有目的通

过引用整体并入本文。

[0672] 适用于胃肠外施用例如像通过关节内(在关节中)、静脉内、肌肉内、皮内、腹膜内以及皮下途径的制剂包括水性和非水性的等渗无菌注射溶液,其可含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和使制剂与所预期的受体的血液等渗的溶质;和水性和非水性的无菌悬浮液,其可包括悬浮剂、增溶剂、增稠剂、稳定剂和防腐剂。在本发明的实践中,组合物优选地例如通过静脉内输注、口服、局部、腹膜内、膀胱内或鞘内施用。

[0673] 通常,当静脉内施用时,脂质颗粒制剂用适合的药物载体配制。许多药学上可接受的载体可在本发明的组合物和方法中采用。用于本发明的适合制剂例如在REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, Mack Publishing Company, Philadelphia, Pa., 第17版(1985)中找到。可使用各种水性载体,例如水、缓冲水、0.4%盐水、0.3%甘氨酸等,并且可包括用于增强稳定性的糖蛋白,如白蛋白、脂蛋白、球蛋白等。通常,生理缓冲盐水(135mM-150mM NaCl)将采用作为药学上可接受的载体,但其他适合的载体也将满足需要。这些组合物可通过常规脂质体灭菌技术如过滤来灭菌。当需要接近生理条件时,组合物可含有药学上可接受的辅助物质,如pH调节剂和缓冲剂、张力调节剂、湿润剂等,例如乙酸钠、乳酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、脱水山梨糖醇单月桂酸酯、三乙醇胺油酸酯等。可使用以上提到的技术对这些组合物进行灭菌,或者可替代地这些组合物可在无菌条件下产生。所得到的水溶液可包装使用或在无菌条件下过滤并且冻干,冻干的制剂在施用之前与无菌水溶液组合。

[0674] 在某些应用中,本文公开的脂质颗粒可经由口服施用向个体递送。颗粒可与赋形剂合并并且以可摄取片剂、颊部片剂、锭剂、胶囊剂、丸剂、糖锭、酏剂、漱口水、混悬剂、口服喷雾剂、糖浆剂、晶片等形式使用(参见,例如美国专利号5,641,515、5,580,579以及5,792,451,所述专利的公开内容出于所有目的以引用的方式整体并入本文)。这些口服剂型还可含有以下物质:粘合剂、明胶;赋形剂、润滑剂和/或调味剂。当单位剂型为胶囊剂时,它可含有除了以上描述的材料以外的液体载体。各种其他材料可作为包衣存在或以其他方式修饰剂量单位的物理形式。当然,用于制备任何单位剂型的任何材料应该为药物纯的并且在所采用的量的情况下基本上无毒。

[0675] 通常,这些口服制剂可含有至少约0.1%的脂质颗粒或更多,虽然颗粒的百分比当然可改变并且可常规上为总制剂的重量或体积的约1%或2%与约60%或70%或更多之间。自然地,可适合剂量将在化合物的任何给定单位剂量中获得的方式制备每个治疗有用的组合物中的颗粒的量。制备此类药物制剂的领域中的技术人员将想到如溶解度、生物利用度、生物半衰期、施用途径、产品有效期的因素以及其他药理学考虑,并且同样地,各种剂量和治疗方案可以是可取的。

[0676] 适用于口服施用的制剂可由以下组成:(a)液体溶液,如有效量的悬浮在稀释剂如水、盐水或PEG 400中的包装的治疗剂如核酸(例如,干扰RNA或mRNA);(b)胶囊剂、小药囊剂或片剂,每种均含有呈液体、固体、细粒或明胶形式的预先确定的量的治疗剂如核酸(例如,干扰RNA或mRNA);(c)在适当液体中的悬浮液;以及(d)适合的乳液。片剂形式可包含以下中的一者或多者:乳糖、蔗糖、甘露糖醇、山梨糖醇、磷酸钙、玉米淀粉、土豆淀粉、微晶纤维素、明胶、胶态二氧化硅、滑石、硬脂酸镁、硬脂酸和其他赋形剂、着色剂、填充剂、粘合剂、稀释剂、缓冲剂、湿润剂、防腐剂、调味剂、染料、崩解剂以及药学上相容的载体。糖锭形式可包含在香料例如蔗糖中的治疗剂如核酸(例如,干扰RNA或mRNA)以及在惰性基质如明胶和甘油

或蔗糖中包含治疗剂的锭剂和除了治疗剂以外含有本领域中已知的载体的阿拉伯树胶乳液、凝胶等。

[0677] 在其使用的另一个实例中,脂质颗粒可并入广范围的局部剂型中。例如,含有核酸-脂质颗粒如LNP的悬浮液可配制成凝胶、油、乳液、局部霜剂、糊剂、软膏、洗剂、泡沫、摩丝等形式并且以所述形式施用。

[0678] 当制备本发明的脂质颗粒的药物制剂时,优选使用大量已纯化减少或消除空颗粒或具有治疗剂如与外表面缔合的核酸的颗粒的这些颗粒。

[0679] 本发明的方法可在各种宿主中实践。优选的宿主包括哺乳动物种类,如灵长类动物(例如,人和黑猩猩以及其他非人灵长类动物)、犬、猫、马、牛、绵羊、山羊、啮齿动物(例如,大鼠和小鼠)、兔类动物以及猪。

[0680] 所施用的颗粒的量将取决于治疗剂(例如,核酸)与脂质的比率、所使用的具体治疗剂(例如,核酸)、治疗的疾病或病症、患者的年龄、重量和病状以及临床医生的判断,但是通常将在约0.01mg/Kg体重与约50mg/Kg体重之间,优选地约0.1mg/Kg体重与约5mg/Kg体重之间,或每次施用(例如,注射)约 10^8 - 10^{10} 个颗粒。

[0681] 体外施用

[0682] 针对体外应用,治疗剂如核酸(例如,干扰RNA或mRNA)可递送至培养生长的任何细胞,无论具有植物或动物来源、脊椎动物或无脊椎动物以及具有任何组织或类型。在优选的实施方案中,细胞是动物细胞,更优选地哺乳动物细胞,并且最优选地人细胞。

[0683] 当体外进行时细胞与脂质颗粒之间的接触发生在生物相容的培养基中。颗粒的浓度广泛取决于具体应用而改变,但是通常在约 $1\mu\text{mol}$ 与约 10mmol 之间。通常在生理温度(约 37°C)下进行用脂质颗粒对细胞的治疗,持续约1至48小时、优选地约2至4小时的时间段。

[0684] 在一组优选的实施方案中,将脂质颗粒悬浮液添加至细胞密度为约 10^3 至约 10^5 个细胞/ml、更优选地约 2×10^4 个细胞/ml的60%-80%汇合的涂铺细胞中。添加至细胞中的悬浮液的浓度优选地为约 $0.01\mu\text{g/ml}$ 至 $0.2\mu\text{g/ml}$,更优选地约 $0.1\mu\text{g/ml}$ 。

[0685] 使用内体释放参数(ERP)测定,可优化本发明的LNP或其他脂质颗粒的递送效率。ERP测定在美国专利公布号20030077829中详细描述,所述专利的公开内容出于所有目的通过引用整体并入本文。更具体地,ERP测定的目的在于基于其对内体膜的结合/吸收或融合/去稳定的相对作用区分LNP的各种阳离子脂质和协助脂质组分的作用。此测定允许人们定量确定LNP或其他脂质颗粒的每种组分如何影响递送效率,从而优化LNP或其他脂质颗粒。通常,ERP测定测量报告蛋白质(例如,荧光素酶、 β -半乳糖苷酶、绿色荧光蛋白(GFP)等)的表达,并且在一些实例中,针对表达质粒优化的LNP制剂也将适用于包封干扰RNA或mRNA。在其他实例中,ERP测定可适用于测量干扰RNA(例如,siRNA)存在或不存在情况下的靶序列的转录或翻译的下调。在其他实例中,ERP测定可适用于测量在存在或不存在mRNA的情况下靶蛋白的表达。通过比较各种LNP或其他脂质颗粒中的每一种的ERP,人们可容易地确定优化的系统,例如在细胞中具有最大吸收的LNP或其他脂质颗粒。

[0686] 用于递送脂质颗粒的细胞

[0687] 本发明的组合物和方法用来体内和体外治疗各种各样的细胞类型。合适的细胞包括例如造血前体(干)细胞、成纤维细胞、角质形成细胞、肝细胞、内皮细胞、骨骼肌和平滑肌细胞、成骨细胞、神经元、休眠淋巴细胞、终末分化细胞、慢循环或不循环原代细胞、实质细

胞、淋巴样细胞、上皮细胞、骨细胞等。在优选的实施方案中,将活性剂或治疗剂如一种或多种核酸分子(例如,干扰RNA(例如siRNA)或mRNA)递送至癌细胞,例如像肺癌细胞、结肠癌细胞、直肠癌细胞、肛门癌细胞、胆管癌细胞、小肠癌细胞、胃(胃的)癌细胞、食管癌细胞、胆囊癌细胞、肝癌细胞、胰腺癌细胞、阑尾癌细胞、乳腺癌细胞、卵巢癌细胞、宫颈癌细胞、前列腺癌细胞、肾癌细胞、中枢神经系统的癌细胞、成胶质细胞瘤肿瘤细胞、皮肤癌细胞、淋巴瘤细胞、绒毛膜癌肿瘤细胞、头颈癌细胞、骨原性肉瘤肿瘤细胞以及血癌细胞。

[0688] 脂质体颗粒的体内递送,如包封一种或多种核酸分子(例如,干扰RNA(例如, siRNA)或mRNA)的LNP适合于靶向任何细胞类型的细胞。可针对各种各样的脊椎动物采用本发明的方法和组合物,所述脊椎动物包括哺乳动物例如像犬、猫、马、牛、绵羊、山羊、啮齿动物(例如,小鼠、大鼠和豚鼠)、兔类动物、猪以及灵长类动物(例如,猴、黑猩猩和人)。

[0689] 根据细胞的组织培养可能需要的程度,它是本领域中熟知的。例如, Freshney, *Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique*, 第3版, Wiley-Liss, New York (1994); Kuchler等人, *Biochemical Methods in Cell Culture and Virology*, Dowden, Hutchinson and Ross Inc. (1977) 以及在其中引用的参考文献提供了细胞培养的一般指导。培养的细胞系统常常将呈细胞单层的形式,虽然也使用细胞悬液。

[0690] 脂质颗粒的检测

[0691] 在一些实施方案中,本发明的脂质颗粒(例如,LNP)可在约1、2、3、4、5、6、7、8或更多小时下在受试者体内检测到。在其他实施方案中,本发明的脂质颗粒(例如,LNP)可在颗粒施用之后约8、12、24、48、60、72或96小时或约6、8、10、12、14、16、18、19、22、24、25或28天时受试者体内检测到。可在来自受试者的细胞、组织或其他生物样品中检测到颗粒的存在。可例如通过直接检测颗粒、检测治疗性核酸如干扰RNA(例如, siRNA)序列或mRNA序列、检测目标靶序列(即,通过检测目标序列的表达或减少的表达)或其组合来检测颗粒。

[0692] 颗粒的检测

[0693] 可使用本领域中已知的任何方法检测本发明的脂质颗粒如LNP。例如,可使用本领域中熟知的方法直接或间接地将标记偶联至脂质颗粒的组分。可使用各种各样的标记,其中标记的选择取决于所需要的灵敏度、与脂质颗粒组分缀合的容易性、稳定性要求以及可供使用的仪器和防护条件。适合的标记包括但不限于光谱标记如荧光染料(例如,荧光素和衍生物,如异硫氰酸荧光素(FITC)和Oregon GreenTM;罗丹明和衍生物如德克萨斯红、异硫氰酸四甲基罗丹明(TRITC)等、地高辛(digoxigenin)、生物素、藻红蛋白、AMCA、CyDyesTM等;放射性标记如³H、¹²⁵I、³⁵S、¹⁴C、³²P、³³P等;酶如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶等;光谱比色标记如胶体金或有色玻璃或塑料珠如聚苯乙烯、聚丙烯、乳胶等。可使用本领域中已知的任何方式检测标记。

[0694] 核酸的检测

[0695] 通过本领域技术人员熟知的许多方式中的任一种在本文中检测和定量核酸(例如,干扰RNA或mRNA)。可通过熟知的方法如DNA分析、RNA分析、凝胶电泳、PCR、放射性标记、闪烁计数以及亲和色谱法来进行核酸的检测。还可采用另外的分析生物化学方法如分光光度法、放射显影法、电泳、毛细管电泳、高效液相色谱法(HPLC)、薄层色谱法(TLC)以及高扩散色谱法。

[0696] 核酸杂交形式的选择不是关键性的。各种核酸杂交形式为本领域技术人员已知

的。例如,常见形式包括夹心测定和竞争或置换测定。杂交技术通常描述于例如“Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach,”编著Hames和Higgins, IRL Press (1985) 中。

[0697] 可通过使用使所检测到的靶核酸倍增的核酸扩增系统来增强杂交测定的灵敏度。适用于扩增用作分子探针的序列或用于产生用于随后亚克隆的核酸片段的体外扩增技术为已知的。通过包括聚合酶链反应 (PCR)、连接酶链反应 (LCR)、 Φ -复制酶扩增以及其他RNA聚合酶介导的技术(例如, NASBATM) 的此类体外扩增方法足够指导技术人员的技术的实例在 Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2000); 和 Ausubel 等人, SHORT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, 编辑, Current Protocols, Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc. (2002); 以及美国专利号 4,683,202; PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications (Innis 等人编辑) Academic Press Inc. San Diego, Calif. (1990); Arnheim 和 Levinson (1990 年 10 月 1 日), C&EN 36; The Journal Of NIH Research, 3:81 (1991); Kwoh 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:1173 (1989); Guatelli 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:1874 (1990); Lomell 等人, J. Clin. Chem., 35:1826 (1989); Landegren 等人, Science, 241:1077 (1988); Van Brunt, Biotechnology, 8:291 (1990); Wu 和 Wallace, Gene, 4:560 (1989); Barringer 等人, Gene, 89:117 (1990); 以及 Sooknanan 和 Malek, Biotechnology, 13:563 (1995) 中找到。体外克隆扩增的核酸的改进方法描述于美国专利号 5,426,039 中。在本领域中描述的其他方法为基于核酸序列的扩增 (NASBATM, Cangene, Mississauga, Ontario) 和 Φ -复制酶系统。这些系统可用来直接鉴定其中存在选择序列时 PCR 或 LCR 引物仅设计为延伸或连接的突变体。或者, 通常可使用例如非特异性 PCR 引物和后来探测指明突变的特异性序列的扩增的靶区来扩增选择序列。上述参考文献的公开内容出于所有目的通过引用整体并入本文。

[0698] 用作例如在体外扩增方法中的探针、用作基因探针或作为抑制剂组分的核酸通常根据 Beaucage 等人, Tetrahedron Letts., 22:1859 1862 (1981) 所描述的固相亚磷酰胺三酯方法, 例如使用如在 Needham VanDevanter 等人, Nucleic Acids Res., 12:6159 (1984) 中描述的自动合成器来化学合成。在必要的情况下, 通常通过天然丙烯酰胺凝胶电泳或通过如在 Pearson 等人, J. Chrom., 255:137 149 (1983) 中描述的阴离子交换 HPLC 来进行多核苷酸的纯化。可使用 Maxam 和 Gilbert (1980) 在 Grossman 和 Moldave (编辑) Academic Press, New York, Methods in Enzymology, 65:499 的化学降解方法验证合成多核苷酸的序列。

[0699] 用于确定转录水平的替代方式为原位杂交。原位杂交测定为熟知的并且通常描述于 Angerer 等人, Methods Enzymol., 152:649 (1987) 中。在原位杂交测定中, 细胞被固定至固体载体, 通常为载玻片。如果探测 DNA, 用加热或碱使细胞变性。然后在中等温度下使细胞与杂交溶液接触以容许标记的特异性探针退火。探针优选地用放射性同位素或荧光报告分子标记。

[0700] 可电离脂质

[0701] 可电离阳离子脂质通常是脂质纳米颗粒 (LNP) 中的主要脂质组分。它们被设计为在标准生理 pH (约 7) 下为电荷中性, 但在较低 (酸性) pH 下获得正电荷。这有助于在 LNP 形成过程中的核酸有效载荷包封和细胞内递送 (内体融合步骤需要可电离脂质上的正电荷)。

[0702] 可电离脂质如MC3 (用于FDA批准的siRNA-LNP产品Onpattro中) 和3D-P-DMA在各种应用中表现出优异的活性和耐受性。然而,它们不能快速代谢,并且需要数周来从靶组织中清除。这使得它们对于需要多次给药的应用不太有吸引力,特别是对于短剂量间隔和/或慢性适应症。

[0703] 实现更有利的特征的一种方式是在脂质的疏水结构域中包含羧酸酯基团。酯基在体内被酶分解,并且据报道这可改善靶组织中的脂质清除率 (Maier等人2013)。然而,必须考虑酯周围的化学结构,因为这会影响策略的有效性。ALC-0315是BNT162b2 (也称为Pfizer COVID疫苗) 中的可电离脂质,在其疏水结构域中具有羧酸酯,但被发现以与MC3相似的速率代谢[参考:Comirnaty评估报告,欧洲药品管理局]。此外,必须在保持有利的活性和耐受性特征的同时掺入酯。

[0704] 为此,已经设计、合成了一系列掺有酯官能团的可电离阳离子脂质,并按以下方式进行了评价:

[0705] • 可配制性 (粒度、多分散性、有效载荷包封、pKa)

[0706] • 效力 (小鼠肝脏表达模型,递送荧光素酶编码和OTC mRNA)

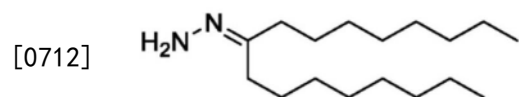
[0707] • 耐受性 (小鼠免疫刺激模型,细胞因子读数)

[0708] • 脂质清除 (小鼠模型-从靶组织 (肝脏) 清除)

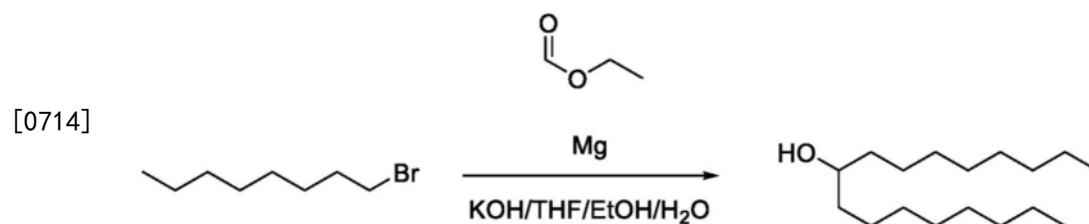
[0709] 将通过具体实施例来更详细地描述本发明。以下实施例是出于说明目的而提供,而不旨在以任何方式限制本发明。本领域技术人员将容易地认识到,可改变或修改各种非关键性参数以产生基本上相同的结果。

[0710] 实施例

[0711] 制备实施例1. 十七烷-9-亚基肼的合成

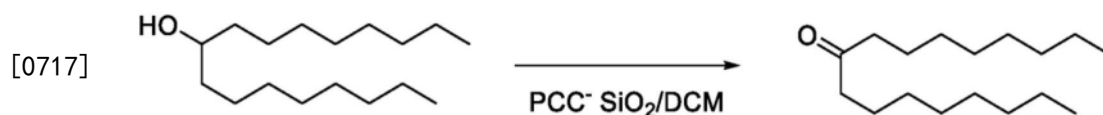


[0713] 步骤1.9-十七烷醇的合成



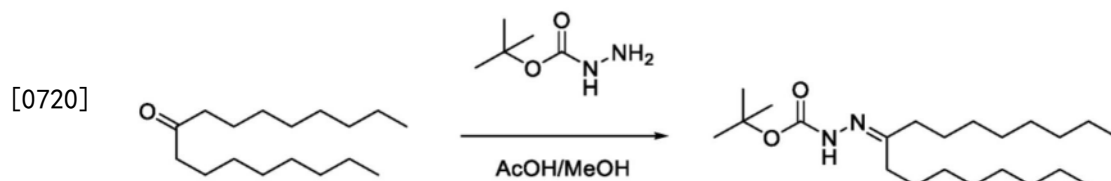
[0715] 在THF中由1-溴辛烷 (6g, 31mmol) 和镁 (808mg, 33mmol) 制备格氏试剂,在45℃下搅拌2hr。将反应物冷却至10℃并逐滴添加THF (5mL) 中的甲酸乙酯 (2.6mL, 32mmol)。添加H₂O (3mL) 和6M HCl (8mL) 以溶解残余的镁。将反应物在己烷与H₂O之间分配。将有机物用盐水洗涤,干燥 (MgSO₄),过滤并在真空中浓缩。将残余物在EtOH中与水 (3mL) 中的KOH (1.6g) 溶液一起搅拌。在真空中除去乙醇,并将残余物在6M HCl与己烷之间分配。将有机物用H₂O和盐水洗涤,干燥 (MgSO₄),过滤并在真空中浓缩。将粗产物通过自动快速色谱 (0% - 20% EtOAc/Hex) 纯化,得到9-十七烷醇 (3.2g, 81.2%)。

[0716] 步骤2.9-十七烷酮的合成



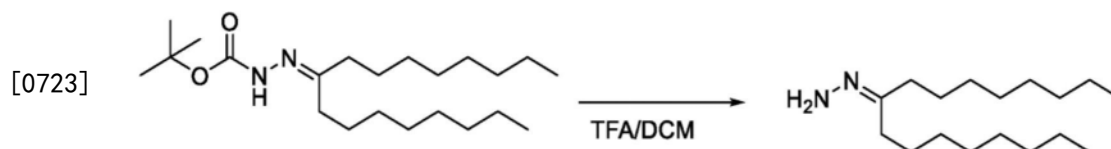
[0718] 将9-十七烷醇(3.2g, 12.6mmol)和PCC-SiO₂(1:1)(16.3g, 38mmol)在DCM(100mL)中在RT下搅拌16hr。将反应物通过二氧化硅过滤,用EtOAc洗脱。将有机物在真空中浓缩并通过自动快速色谱(0%-10% EtOAc/Hex)纯化,得到9-十七烷酮(3.2g, 99.6%)。

[0719] 步骤3.N'-(十七烷-9-亚基)叔丁氧基碳酰肼的合成



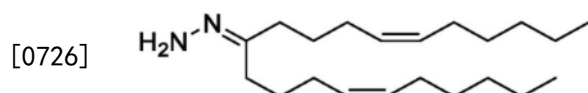
[0721] 将叔丁氧基碳酰肼(195mg, 1.47mmol)、9-十七烷酮(750mg, 2.9mmol)和AcOH(催化量)在MeOH(10mL)中在回流下搅拌15hr。将反应物在真空中浓缩并通过自动快速色谱(0%-20% EtOAc/Hex)纯化,得到N'-(十七烷-9-亚基)叔丁氧基碳酰肼(320mg, 58.9%)。

[0722] 步骤4. 十七烷-9-亚基肼的合成



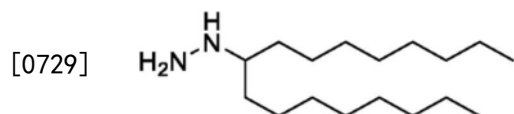
[0724] 将N'-(十七烷-9-亚基)叔丁氧基碳酰肼(320mg, 0.9mmol)在25%于DCM(40mL)中的TFA中在RT下搅拌,直至反应完成。在真空中除去溶剂,得到十七烷-9-亚基肼(231mg, 99.1%),其不经进一步纯化即使用。

[0725] 制备实施例2. ((6Z, 15Z)-二十一碳-6, 15-二烯-11-亚基)肼的合成

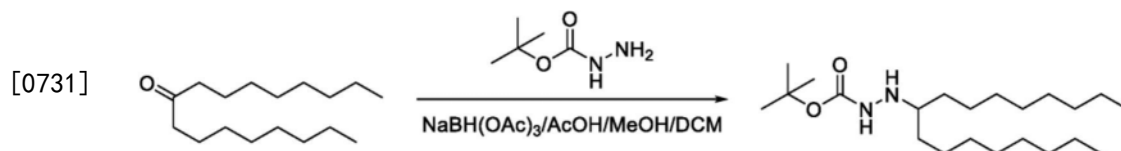


[0727] 使用如上所述的类似方法制备((6Z, 15Z)-二十一碳-6, 15-二烯-11-亚基)肼。

[0728] 制备实施例3. 十七烷-9-基肼的合成

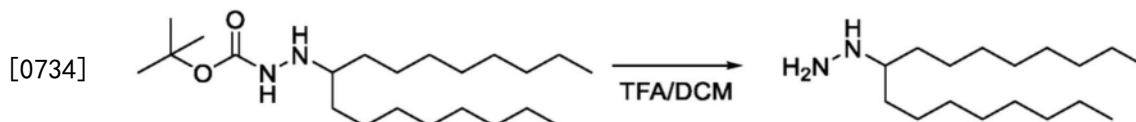


[0730] 步骤1.N'-(十七烷-9-基)叔丁氧基碳酰肼的合成



[0732] 叔丁氧基碳酰肼(412mg, 3.1mmol)、9-十七烷酮(794mg, 3.1mmol)、AcOH(0.75mL, 3.2mmol)和NaBH(OAc)₃(2.0g, 9.4mmol)在DCM(20mL)中在RT下搅拌2天,并且在40℃下再搅拌20hr。将反应物用饱和NaHCO₃和盐水洗涤,干燥(MgSO₄),过滤并在真空中浓缩。将残余物通过自动快速色谱(0%-12% EtOAc/Hex)纯化,得到N'-(十七烷-9-基)叔丁氧基碳酰肼(700mg, 60.5%)。

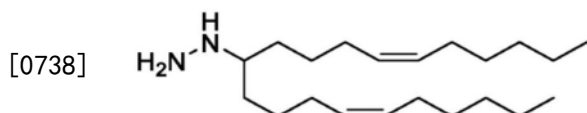
[0733] 步骤2十七烷-9-基肼的合成



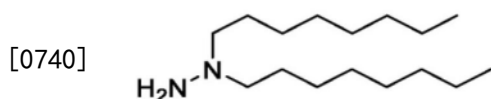
[0735] 将N'-((十七烷-9-基)叔丁氧基碳酰肼(700mg, 1.9mmol)与25%于DCM(10mL)中的TFA一起在RT下搅拌1.5hr。在真空中浓缩反应物,得到十七烷-9-基肼(500mg, 97.9%),其不经纯化即使用。

[0736] 制备实施例4. ((6Z,15Z)-二十一碳-6,15-二烯-11-基)肼的合成

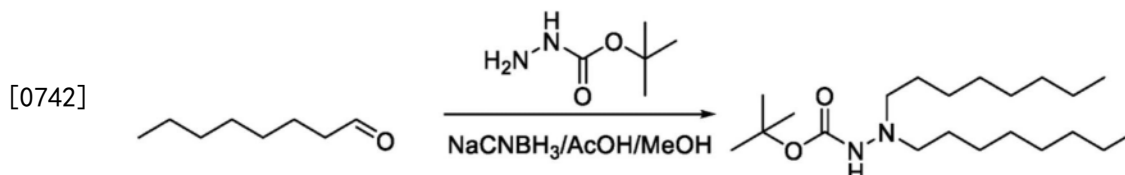
[0737] 使用如上所述的类似方法制备((6Z,15Z)-二十一碳-6,15-二烯-11-基)肼。



[0739] 制备实施例5.1,1-二辛基肼的合成

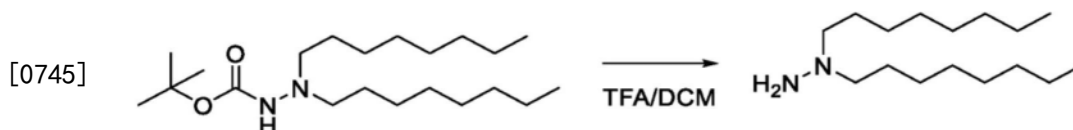


[0741] 步骤1N',N'-二辛基叔丁氧基碳酰肼的合成



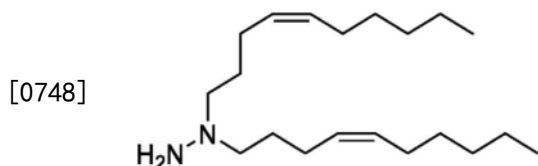
[0743] 将辛醛(2.4mL, 15.0mmol)、叔丁氧基碳酰肼(1g, 7.6mmol)和AcOH(7.6mmol)在氮气氛围下在75℃下在无水MeOH中搅拌1hr。冷却至RT后,添加NaBH₃CN(1.9g, 30.3mmol),并将混合物在RT下搅拌15hr。在真空中除去溶剂,将残余物溶解于EtOAc中,用H₂O和盐水洗涤,干燥(MgSO₄),过滤并浓缩。将粗物质通过自动快速色谱(0%-10% EtOAc/Hex)纯化,得到N',N'-二辛基叔丁氧基碳酰肼(2.0g, 74.3%)。

[0744] 步骤2 1,1-二辛基肼的合成



[0746] 在0℃下将N',N'-二辛基叔丁氧基碳酰肼(1.1g, 3.0mmol)在30%于DCM(20mL)中的TFA中搅拌,直至完全升温至RT。在真空中除去溶剂,得到1,1-二辛基肼(782mg, 定量),其不经纯化即使用。

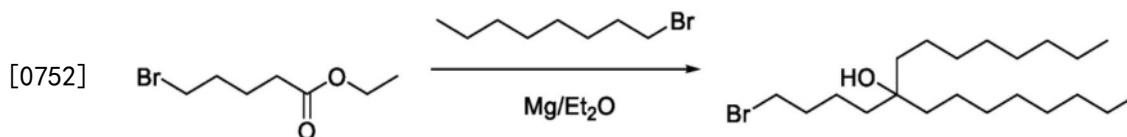
[0747] 制备实施例6.1,1-二((Z)-癸-4-烯-1-基)肼的合成



[0749] 使用类似方法制备1,1-二((Z)-癸-4-烯-1-基)肼

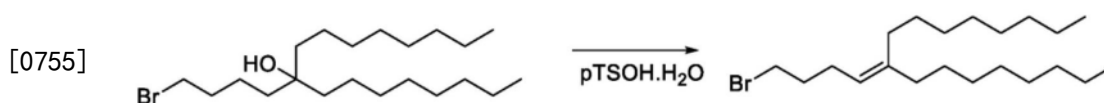
[0750] 制备实施例7.用于合成支链烷基醇的一般方法(a)-通过5-辛基十三碳-4-烯-1-醇的合成举例说明

[0751] 步骤1.9-(4-溴丁基)十七烷-9-醇的合成



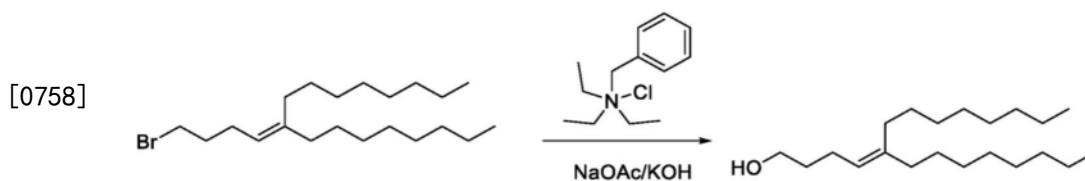
[0753] 在无水Et₂O(35mL)中由Mg(2.6g,105mmol)和1-溴辛烷(20.0g,105mmol)制备格氏试剂,回流1hr.冷却反应物,并且逐滴添加5-溴戊酸乙酯(8.0g,38.3mmol)于无水Et₂O(25mL)中的溶液,然后再回流1hr.将反应物冷却至RT并倒入100mL饱和冰/NH₄Cl溶液中.用Et₂O萃取水性部分并将有机物干燥(MgSO₄),过滤并在真空中浓缩.将粗物质通过自动快速色谱(0%-20% EtOAc/Hex)纯化,得到9-(4-溴丁基)十七烷-9-醇(10.6g,70.7%)。

[0754] 步骤2.9-(4-溴亚丁基)十七烷的合成



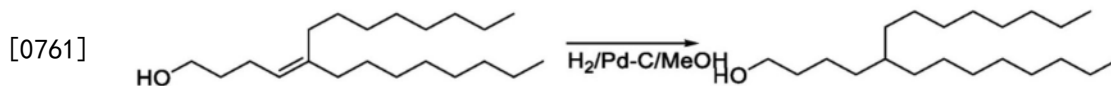
[0756] 将9-(4-溴丁基)十七烷-9-醇(10.6g,27.0mmol)和p-TsOH.H₂O(93mg,0.54mmol)在N₂气氛下在130℃下搅拌2hr.将粗物质通过自动快速色谱(0%-4% EtOAc/Hex)纯化,得到9-(4-溴亚丁基)十七烷(8.84g,87.5%)。

[0757] 步骤3.5-辛基十三碳-4-烯-1-醇的合成



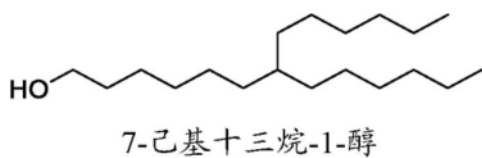
[0759] 将9-(4-溴亚丁基)十七烷(8.84g,23.7mmol)、苄基(氯)三乙胺(540mg,2.4mmol)和NaOAc(7.8g,94.7mmol)在DMF(60mL)中在70℃下搅拌20hr.将反应物倒入冰/水中并用Et₂O萃取.将合并的有机物干燥(MgSO₄),过滤并在真空中浓缩.将残余物溶解于MeOH中,添加H₂O中的KOH(18.6g,332mmol),并将反应物搅拌30分钟.在真空中除去MeOH,并将反应物在H₂O与Et₂O之间分配.将合并的有机物干燥(MgSO₄),过滤并在真空中浓缩,并将粗物质通过自动快速色谱(0%-15% EtOAc/Hex)纯化,得到5-辛基十三碳-4-烯-1-醇(4.5g,60.8%)。

[0760] 步骤4.5-辛基十三烷-1-醇的合成

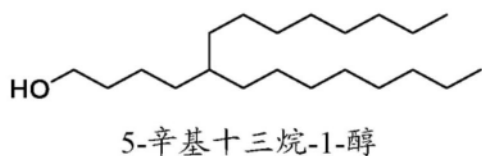


[0762] 将5-辛基十三碳-4-烯-1-醇(4.469g,14.39mmol)在RT下在MeOH(50mL)中经Pd-C催化氢化15hr.将反应物过滤并在真空中浓缩,得到5-辛基十三烷-1-醇(3.5g,77.8%),其不经进一步纯化即使用。

[0763] 使用如上所述的类似方法制备以下化合物



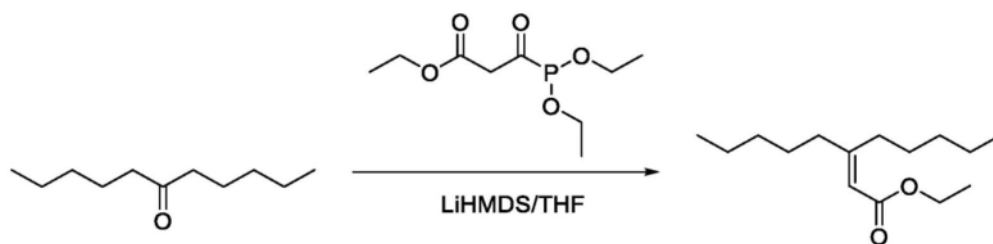
[0764]



[0765] 制备实施例8.用于合成支链烷基醇的一般方法(b)-通过3-戊基辛-1-醇的合成举例说明

[0766] 步骤1.3-戊基辛-2-烯酸乙酯的合成

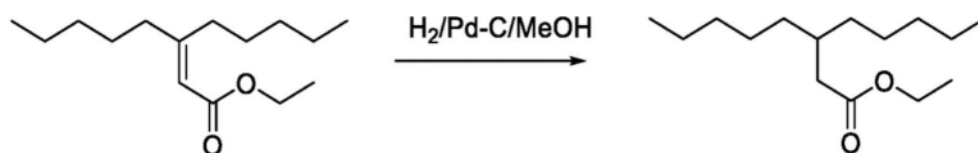
[0767]



[0768] 将磷酰基乙酸三乙酯(65.8g,294mmol)在-10℃下在THF(220mL)中搅拌。逐滴添加1M于THF(294mL,294mmol)中的LiHMDS,并将反应物在-10℃下搅拌1hr,然后在0℃下搅拌1hr。添加6-十一烷酮(25g,147mmol),并将反应物在45℃下搅拌16hr。用H₂O淬灭反应物,用Et₂O萃取并用盐水洗涤。将有机物干燥(MgSO₄),过滤并在真空中浓缩,得到3-戊基辛-2-烯酸乙酯(43.5g),其不经进一步加工即用于后续步骤中。

[0769] 步骤2.3-戊基辛酸乙酯的合成

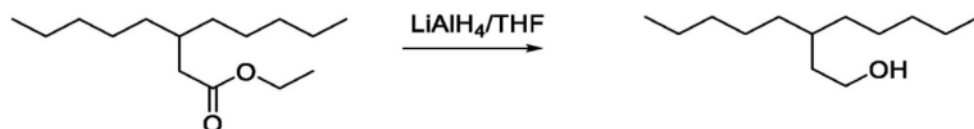
[0770]



[0771] 将3-戊基辛-2-烯酸乙酯(35g,147mmol)在RT下在MeOH(100mL)中经Pd-C催化氢化20hr。将反应物过滤并在真空中浓缩,得到3-戊基辛酸乙酯(33.3g,93.6%),其不经进一步纯化即使用。

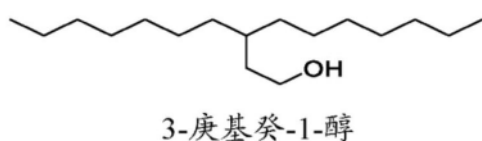
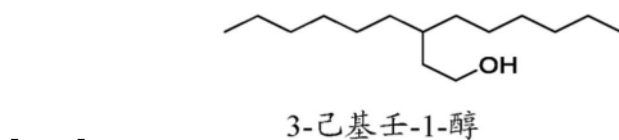
[0772] 步骤3.3-戊基辛-1-醇的合成

[0773]



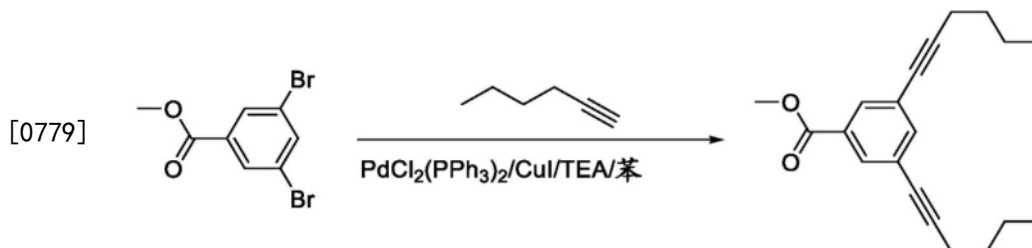
[0774] 将LiAlH₄(6.8g,179mmol)在THF(500mL)中在0℃下搅拌30分钟。逐滴添加THF(500mL)中的3-戊基辛酸乙酯(33.3g,138mmol,并将反应物在RT下搅拌直至完成。将反应物冷却至0℃,用Et₂O(500mL)稀释,并用1M NaOH(16mL)淬灭。将反应物搅拌30分钟,干燥(MgSO₄),通过硅藻土过滤并在真空中浓缩。将粗物质通过自动快速色谱(0%-30% EtOAc/Hex)纯化,得到3-戊基辛-1-醇(24.7g,89.7%)。

[0775] 使用如上所述的类似方法制备以下化合物:



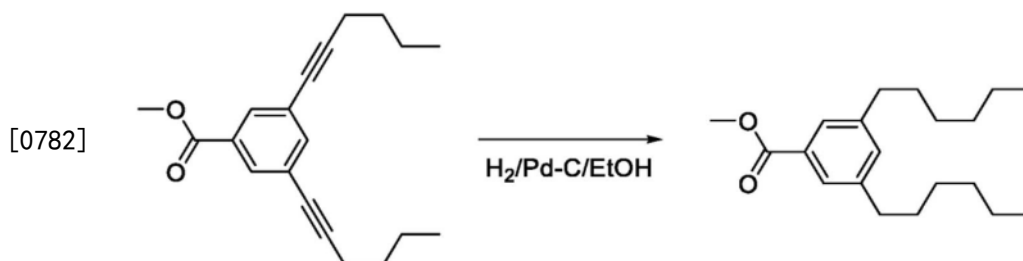
[0777] 制备实施例9. (3,5-二己基苯基) 甲醇的合成

[0778] 步骤1. 3,5-双(己-1-炔-1-基) 苯甲酸甲酯的合成



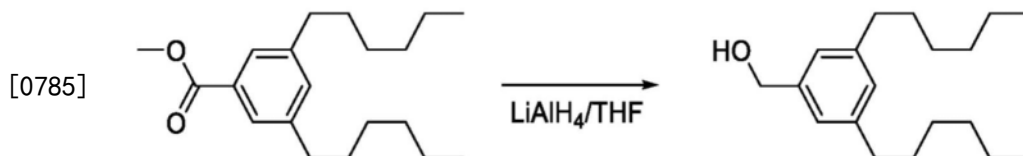
[0780] 将3,5-二溴苯甲酸甲酯(7.4g, 25.0mmol)、己炔(8.2g, 100.0mmol)、二氯双[4-(二苯基膦基)苯基]钯(1.4g, 2.0mmol)、CuI(0.2g, 1.0mmol)和TEA(21.0mL, 150mmol)在苯(100mL)中在80℃下搅拌48hr。将反应物通过二氧化硅垫过滤,用EtOAc洗脱。将有机物在真空中浓缩,并将粗物质通过自动快速色谱(0%-20% EtOAc/Hex)纯化,得到3,5-双(己-1-炔-1-基)苯甲酸甲酯(7.0g, 94.4%)。

[0781] 步骤2. 3,5-二己基苯甲酸甲酯的合成



[0783] 将3,5-双(己-1-炔-1-基)苯甲酸甲酯(7.0g, 23.6mmol)在RT下在EtOH(100mL)中经Pd-C催化氢化18hr。将反应物通过硅藻土过滤并在真空中浓缩,得到3,5-二己基苯甲酸甲酯(6.3g, 87.7%),其不经进一步纯化即使用。

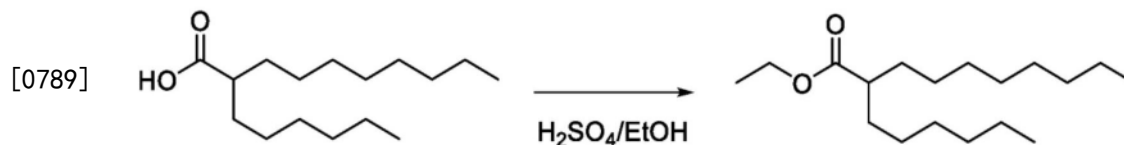
[0784] 步骤3. (3,5-二己基苯基) 甲醇的合成



[0786] 将3,5-二己基苯甲酸甲酯(6.3g, 20.7mmol)在0℃下在无水THF中搅拌。分批添加LiAlH₄(1.2g, 31.0mmol)并将反应物搅拌1hr,使其升温至RT。完成后,将反应物用H₂O和1M NaOH淬灭,并用EtOAc萃取。将有机物干燥(MgSO₄),过滤,在真空中浓缩并通过自动快速色谱(10% EtOAc/Hex)纯化,得到(3,5-二己基苯基)甲醇(3.0g, 52.4%)。

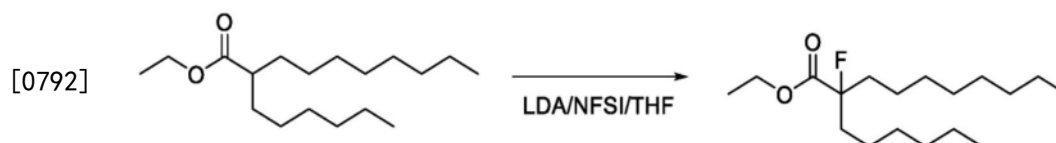
[0787] 制备实施例10.2-氟-2-己基癸酸的合成

[0788] 步骤1.2-己基癸酸乙酯的合成



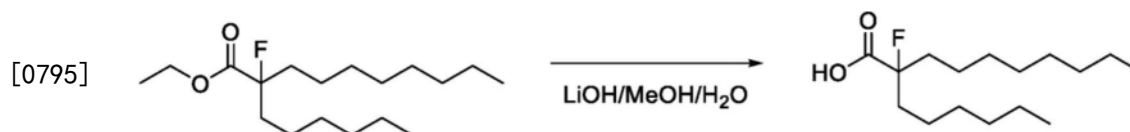
[0790] 将己基癸酸 (3g, 11.7mmol) 和 H_2SO_4 (催化量) 在 EtOH (20mL) 中回流 15hr。将反应物在真空中浓缩并将残余物在己烷与水之间分配。将有机物干燥 (MgSO_4), 过滤, 在真空中浓缩并将残余物通过自动快速色谱 (0% - 6% EtOAc/Hex) 纯化, 得到 2-己基癸酸乙酯 (3.0g, 90.7%)。

[0791] 步骤2.2-氟-2-己基癸酸乙酯的合成



[0793] 在 -78°C 下将 THF 中的 2-己基癸酸乙酯 (1g, 3.5mmol) 逐滴添加至 LDA 溶液 (2.6mL, 2M, 5.273mmol) 中并搅拌 0.5hr。逐滴添加 THF (15mL) 中的 N-氟苯磺酰亚胺 (1.7g, 5.3mmol), 并将反应物搅拌 18hr, 使其升温至 RT。将反应物用 EtOAc 稀释, 依次用饱和 NH_4Cl 水溶液、水和盐水洗涤, 干燥 (MgSO_4), 在真空中浓缩并通过自动快速色谱 (0% - 6% EtOAc/Hex) 纯化。NMR 显示 60% 转化。重复所述反应第二次, 得到 2-氟-2-己基癸酸乙酯 (770mg, 72.4%)。

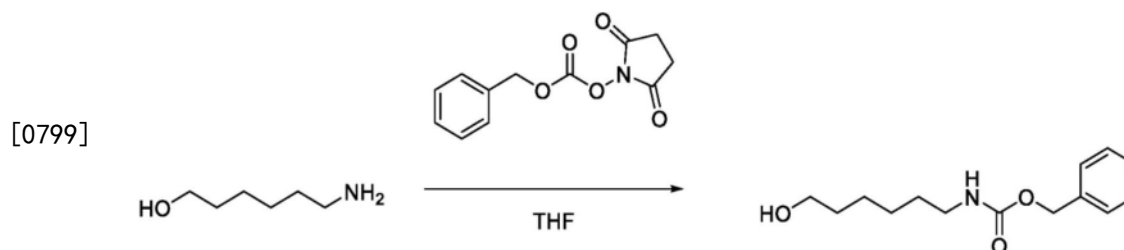
[0794] 步骤3.2-氟-2-己基癸酸的合成



[0796] 将 2-氟-2-己基癸酸乙酯 (770mg, 2.5mmol) 和 LiOH (125mg, 5.2mmol) 在 MeOH (10mL) 和 H_2O (2mL) 中在 RT 下搅拌 15hr。添加 6M HCl (0.87mL) 并在真空中除去 MeOH。将残余物溶解于 DCM 中, 用盐水洗涤, 干燥 (MgSO_4), 过滤并在真空中浓缩, 得到 2-氟-2-己基癸酸 (520mg, 74.4%)。

[0797] 制备实施例11. 氨基醇 THP 醚的合成, 通过 5-(噁烷-2-基氧基) 戊-1-胺的合成举例说明

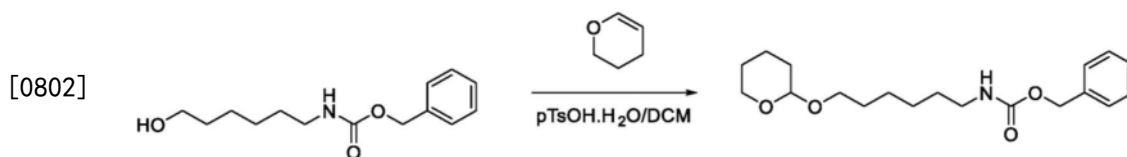
[0798] 步骤1.N-(5-羟基戊基) 氨基甲酸苄酯的合成



[0800] 将 5-氨基戊醇 (21.0g, 203mmol) 和苄基 2,5-二氧代吡咯烷-1-基碳酸酯 (50.7g, 203mmol) 在 THF 中在 RT 下搅拌 16hr。将反应物在真空中浓缩, 将残余物溶解于 EtOAc (250mL) 中, 用 1M HCl 和 0.5M NaOH 洗涤, 干燥 (MgSO_4), 过滤并在真空中浓缩。将所得油状物在己烷中搅拌直至产物结晶。通过过滤回收固体, 得到 N-(5-羟基戊基) 氨基甲酸苄酯 (44g,

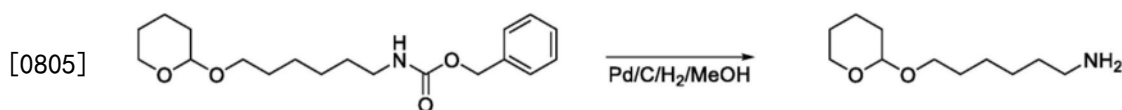
91.0%)。

[0801] 步骤2.N-[5-(噁烷-2-基氧基)戊基]氨基甲酸苄酯的合成



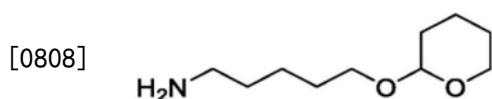
[0803] 将N-[5-(羟基戊基)氨基甲酸苄酯(20.0g,84mmol)、2H-吡喃,3,4-二氢-(8.6g,101)和pTsOH-H₂O(1.6g,8.4mmol)在DCM(270mL)中在RT下搅拌2hr。将反应物用NaHCO₃(饱和溶液)和盐水洗涤,干燥(MgSO₄),过滤并在真空中浓缩。将粗物质通过自动快速色谱(10%-50% EtOAc/Hex)纯化,得到N-[5-(噁烷-2-基氧基)戊基]氨基甲酸苄酯(19.5g,72.0%)。

[0804] 步骤3.5-(噁烷-2-基氧基)戊-1-胺的合成



[0806] 将N-[5-(噁烷-2-基氧基)戊基]氨基甲酸苄酯(19.0g,59mmol)在RT下在MeOH中经Pd/C催化氢化16hr。将反应物通过硅藻土过滤并在真空中浓缩,得到5-(噁烷-2-基氧基)戊-1-胺(10.9g,98.5%),其不经纯化即使用。

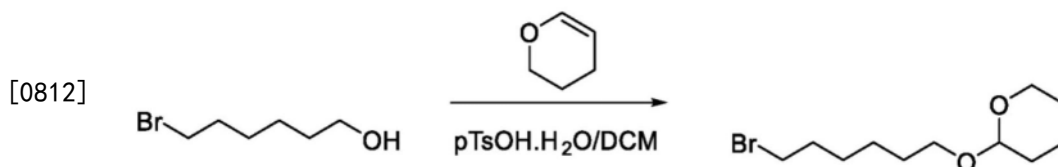
[0807] 使用如上所述的类似方法制备以下化合物:



[0809] 5-((四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)戊-1-胺

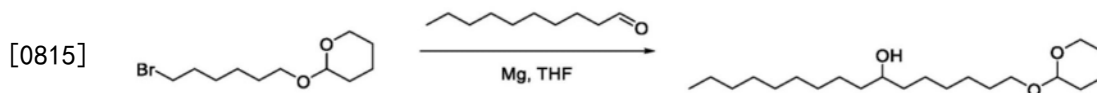
[0810] 制备实施例12.酮基-THP醚的合成,通过1-(噁烷-2-基氧基)十六烷-7-酮的合成举例说明

[0811] 步骤1.2-[(6-溴己基)氧基]噁烷的合成



[0813] 将6-溴-1-己醇(40g,220mmol)、二氢吡喃(23g,265mmol)和pTsOH-H₂O(4.2g,22.0mmol)在DCM(500mL)中在RT下搅拌2hr。将反应物用NaHCO₃(饱和溶液)和盐水洗涤,干燥(MgSO₄),过滤并在真空中浓缩。将粗物质通过快速色谱(0%-20% EtOAc/Hex)纯化,得到2-[(6-溴己基)氧基]噁烷(49g,83.6%)。

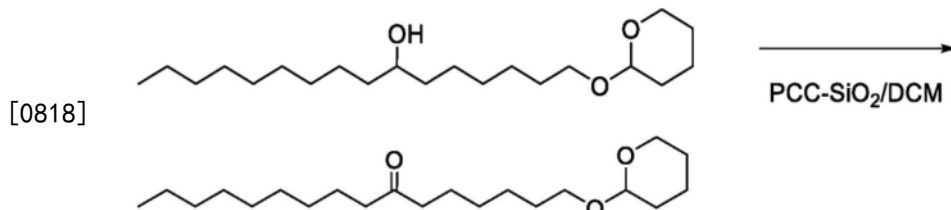
[0814] 步骤2.1-(噁烷-2-基氧基)十六烷-7-醇的合成



[0816] 在无水THF(175mL)中由2-[(6-溴己基)氧基]噁烷(49g,185mmol)和镁(5.4g,222mmol)制备格氏试剂,回流30分钟。将反应物冷却至0℃,并在1hr内逐滴添加无水THF(144mL)中的癸醛(23g,148mmol)。将反应物搅拌2hr,使其升温至RT,然后用饱和NH₄Cl溶液淬灭。将有机物分离,用水和盐水洗涤并干燥(MgSO₄)。将滤液在真空中浓缩并将残余物通

过自动快速色谱 (0% - 15% EtOAc/Hex) 纯化, 得到1-(噁烷-2-基氧基)十六烷-7-醇 (47g, 92.8%)。

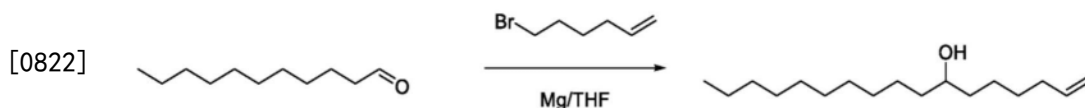
[0817] 步骤3.1-(噁烷-2-基氧基)十六烷-7-酮的合成



[0819] 将1-(噁烷-2-基氧基)十六烷-7-醇 (47g, 137mmol) 和PCC/SiO₂ (1:1) (118g, 274mmol) 在DCM (294mL) 中在RT下搅拌16hr。将混合物通过二氧化硅垫过滤并用50:50EtOAc/Hex洗脱。将滤液在真空中浓缩并将残余物通过自动快速色谱 (0% - 10% EtOAc/Hex) 纯化, 得到1-(噁烷-2-基氧基)十六烷-7-酮 (37.5g, 80.3%)。

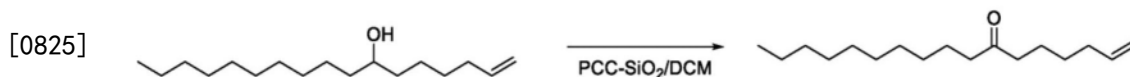
[0820] 制备实施例13. 氧代-烯炔的合成, 通过十七碳-1-烯-7-酮的合成举例说明

[0821] 步骤1. 十七碳-1-烯-7-醇的合成



[0823] 在THF (250mL) 中由6-溴己-1-烯 (35g, 215mmol) 和镁 (6.3g, 258mmol) 制备格氏试剂。初始回流后, 将反应物搅拌2小时, 然后冷却至0℃, 逐滴添加十一醛 (29g, 172mmol), 并将反应物在RT下搅拌16小时。将反应物用水 (100mL) 淬灭, 冷却至0℃, 并添加6M HCl (50mL) 以溶解残余的镁。将溶液用Et₂O (250mL) 稀释, 将有机物分离, 用盐水洗涤, 干燥 (MgSO₄), 过滤并在真空中浓缩, 得到十七碳-1-烯-7-醇 (43g, 98.4%), 其不经进一步纯化即使用。

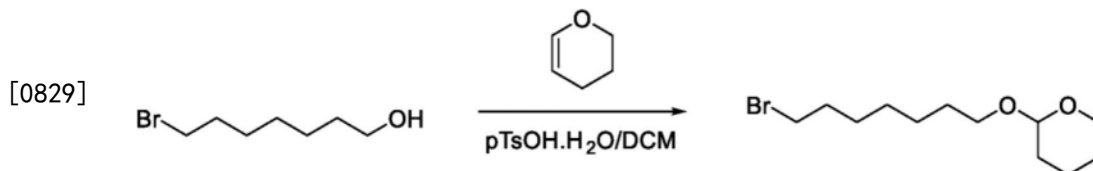
[0824] 步骤2. 十七碳-1-烯-7-酮的合成



[0826] 将十七碳-1-烯-7-醇 (43g, 169mmol) 和PCC/二氧化硅1:1wt (91g, 211mmol) 在DCM (300mL) 中在RT下搅拌16hr。将反应物通过二氧化硅过滤, 用DCM洗脱并将滤液在真空中浓缩。将残余物通过自动快速色谱 (0% - 10% EtOAc/己烷) 纯化, 得到十七碳-1-烯-7-酮 (31g, 72.7%)。

[0827] 制备实施例14. 氧代-羧酸的合成。方法 (a), 通过8-氧代十八烷酸的合成举例说明

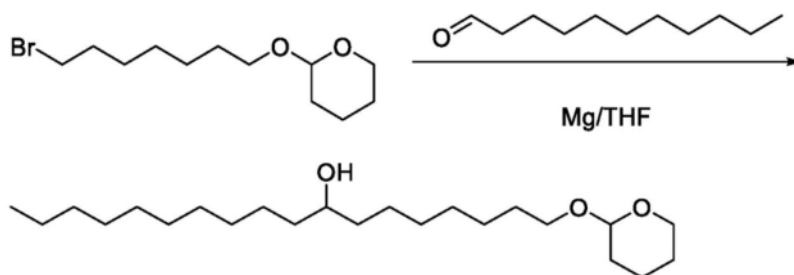
[0828] 步骤1 2-[(7-溴庚基)氧基]噁烷的合成



[0830] 将7-溴庚-1-醇 (102g, 523mmol)、二氢吡喃 (53g, 627mmol) 和pTsOH-H₂O (10g, 52mmol) 在DCM (1370mL) 中搅拌2hr。将反应物用NaHCO₃ (饱和溶液) 和盐水洗涤, 干燥 (MgSO₄), 过滤并在真空中浓缩。使粗物质通过含25% EtOAc/Hex的二氧化硅垫, 并将合并的有机物在真空中浓缩, 得到2-[(7-溴庚基)氧基]噁烷 (135g, 92.5%), 其不经进一步纯化

即使用。

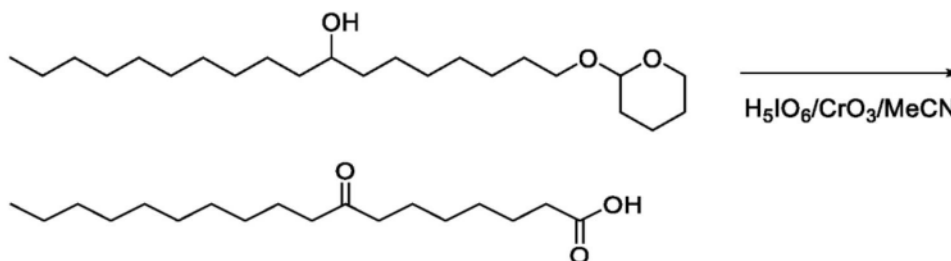
[0831] 步骤2 1-(噁烷-2-基氧基)十八烷-8-醇的合成



[0832]

[0833] 在无水THF (82mL) 中由2-[(7-溴庚基)氧基]噁烷 (135g, 483mmol) 和镁 (14.1g, 580mmol) 制备格氏试剂。添加溴化物后, 将反应物在回流下搅拌30分钟。将反应物冷却至0℃, 并在1hr内逐滴添加无水THF (412mL) 中的十一醛 (66g, 387mmol)。将反应物搅拌16hr, 使其升温至RT, 然后用H₂O (100mL) 淬灭, 随后用6M HCl (200mL) 淬灭。将反应物用EtOAc萃取, 用H₂O和盐水洗涤, 干燥 (MgSO₄) 并在真空中浓缩。将残余物通过自动快速色谱 (0% - 50% EtOAc/Hex) 纯化, 得到1-(噁烷-2-基氧基)十八烷-8-醇 (68g, 47.0%)。

[0834] 步骤3 8-氧代十八烷酸的合成



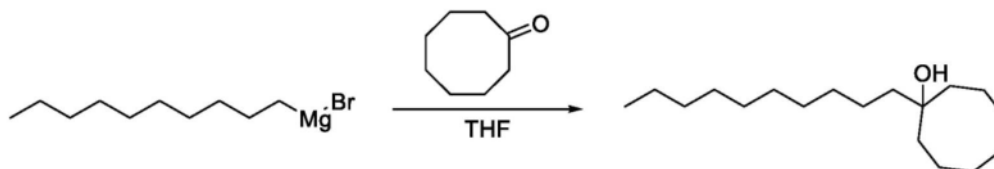
[0835]

[0836] 将过碘酸 (239g, 1009mmol) 和CrO₃ (0.5g, 2.6mol%) 在RT下溶解于MeCN (3L, 0.75% H₂O V/V) 中持续16hr。在30-60分钟内添加MeCN (1L, 0.75v% 水) 中的1-(噁烷-2-基氧基)十八烷-8-醇 (68g, 183mmol), 同时将反应温度保持在0℃-5℃。将反应物搅拌16hr, 使其升温至RT。添加Na₂HPO₄ (163g于2.7L H₂O中) 以淬灭, 并用EtOAc萃取反应物。将有机物依次用盐水、NaHSO₃水溶液 (29.91g于680mL H₂O中) 和盐水洗涤。将反应物干燥 (MgSO₄), 过滤并在真空中浓缩。将残余固体在最小体积的MeCN中研磨, 得到8-氧代十八烷酸 (40.9g, 74.7%)。

[0837] 制备实施例15. 氧代-羧酸的合成。方法 (b), 通过8-氧代十八烷酸的合成举例说明

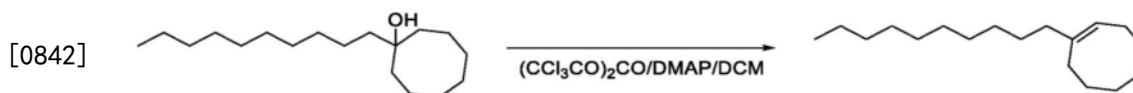
[0838] 步骤1.1-癸基环辛-1-醇的合成

[0839]



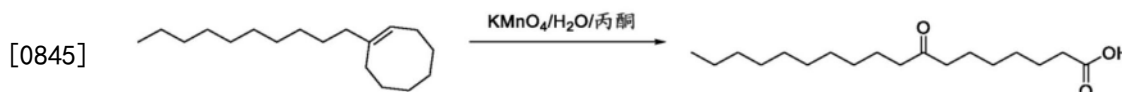
[0840] 将溴(癸基)镁 (22.2g, 90.4mmol) 在10℃下在THF (150mL) 中搅拌。逐滴添加THF (50mL) 中的环辛酮 (9.3g, 72mmol)。完成添加后, 将反应物冷却至0℃, 并用水 (100mL) 和6M HCl (400mL) 淬灭。将有机物分离, 用盐水洗涤, 干燥 (MgSO₄), 过滤并在真空中浓缩。将粗物质通过自动快速色谱 (0% - 10% EtOAc-己烷) 纯化, 得到1-癸基环辛-1-醇 (14.2g, 73.1%)。

[0841] 步骤2. (Z)-1-癸基环辛-1-烯的合成



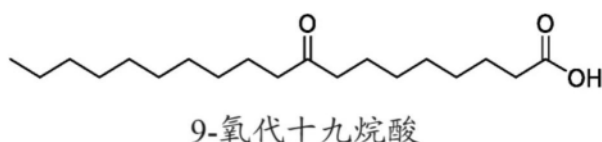
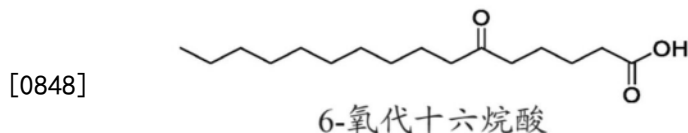
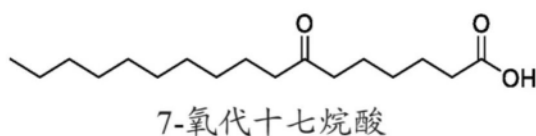
[0843] 将1-癸基环辛-1-醇(7.71g, 28.8)和DMAP(7.0g, 57.4mmol)在0℃下在DCM(77.1mL)中搅拌。逐滴添加DCM(40mL)中的三光气(4.3g, 14.4mmol)。将反应物搅拌3hr,使其升温至RT,然后用2M HCl淬灭。将有机物分离,用盐水洗涤,干燥(MgSO₄),过滤并在真空中浓缩。将粗物质通过自动快速色谱(100%己烷)纯化,得到(Z)-1-癸基环辛-1-烯(7.2g, 76.5%)。

[0844] 步骤3.8-氧代十八烷酸的合成

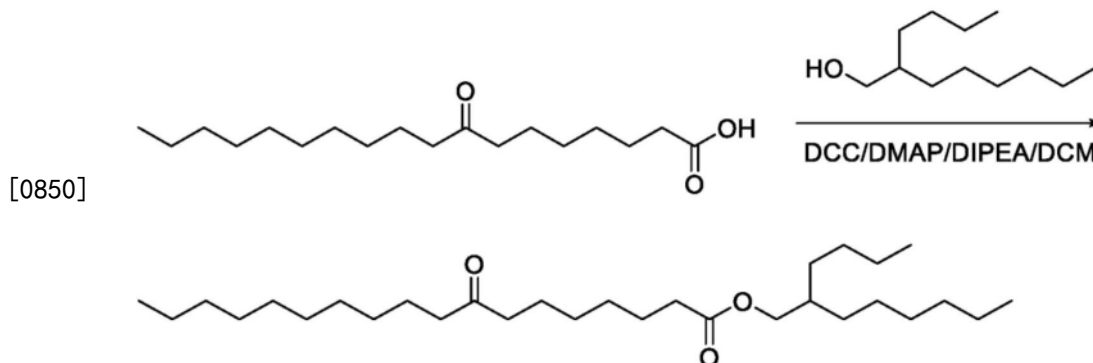


[0846] 将(1Z)-1-癸基环辛-1-烯(5.5g, 22mmol)在0℃下在丙酮(55mL)和H₂O(5.5mL)中搅拌。在4hr内分批添加KMnO₄(17.4g, 110mmol),同时将温度保持在0℃。将反应物搅拌18hr,使其升温至RT,然后通过交替添加亚硫酸氢钠和6M HCl淬灭。将反应物在1M HCl与EtOAc之间分配,并将合并的有机物用盐水洗涤,干燥(MgSO₄),过滤并在真空中浓缩。将粗物质通过自动快速色谱(5%-30% EtOAc-己烷)纯化,得到8-氧代十八烷酸(3.7g, 56.0%)。

[0847] 使用如上所述的类似方法制备以下化合物:



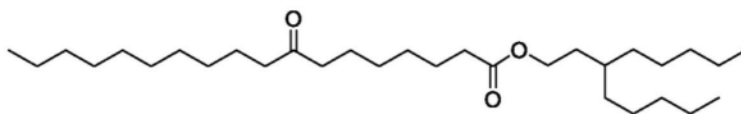
[0849] 制备实施例16. 氧代酯的合成,通过8-氧代十八烷酸2-丁基辛酯的合成举例说明



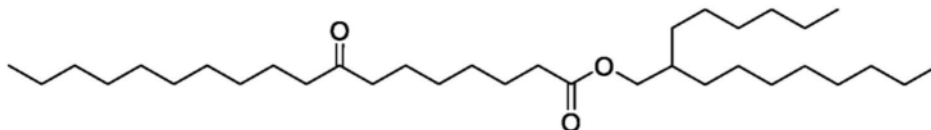
[0851] 将8-氧代十八烷酸(1g, 3.4mmol)、丁基辛醇(687mg, 3.7mmol)、DCC(1.4g, 6.7mmol)和DMAP(20mg, 0.17mmol)在DCM中在RT下搅拌1.5hr。将反应物在真空中浓缩,将残

余物悬浮于己烷中并过滤。将滤液在真空中浓缩,并将残余物通过自动快速色谱(0%-25% EtOAc/Hex)纯化,得到8-氧代十八烷酸2-丁基辛酯(1.1g,68.9%)。

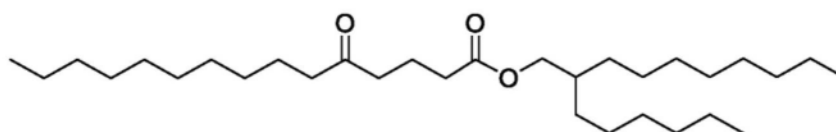
[0852] 使用以上所述的类似方法制备以下化合物



8-氧代十八烷酸3-戊基辛酯

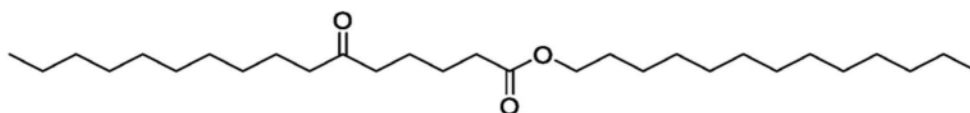


8-氧代十八烷酸2-己基癸酯

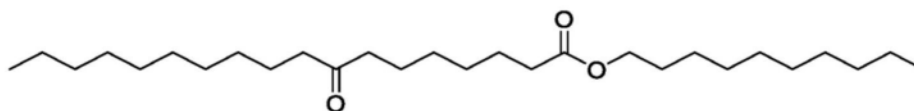


5-氧代十五烷酸2-己基癸酯

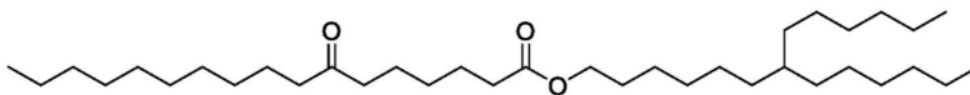
[0853]



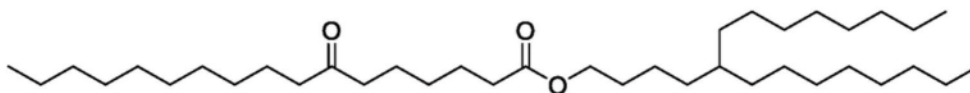
6-氧代十六烷酸十三烷基酯



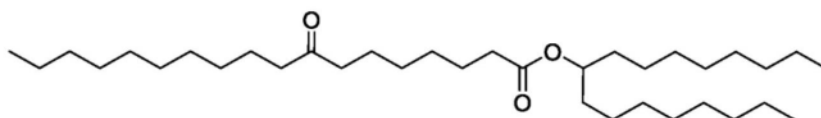
8-氧代十八烷酸癸酯



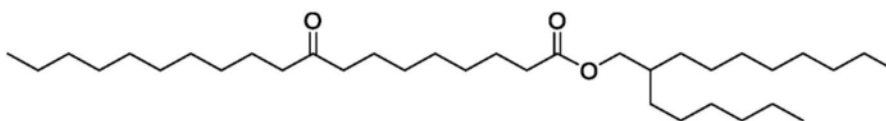
7-氧代十七烷酸7-己基十三烷基酯



7-氧代十七烷酸5-辛基十三烷基酯

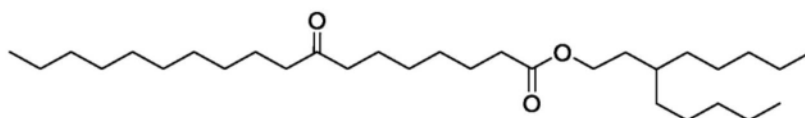


8-氧代十八烷酸十七烷-9-基酯

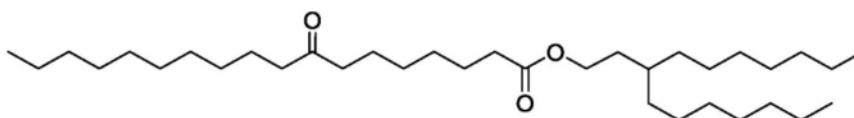


9-氧代十九烷酸2-己基癸酯

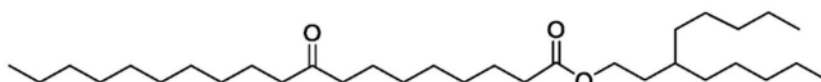
[0854]



8-氧代十八烷酸3-戊基辛酯

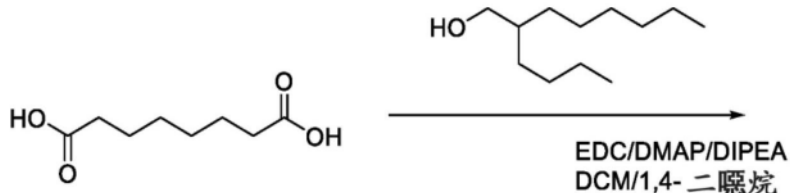


8-氧代十八烷酸3-庚基癸酯

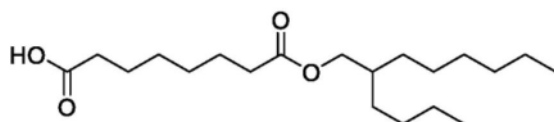


9-氧代十九烷酸3-戊基辛酯

[0855] 制备实施例17.8-[(2-丁基辛基)氧基]-8-氧代辛酸的合成

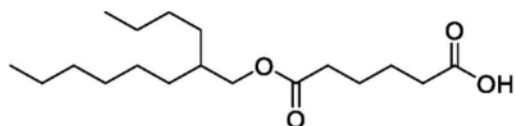


[0856]

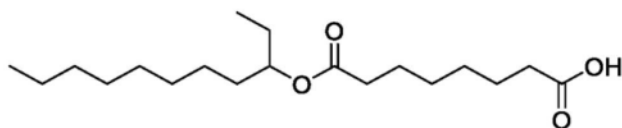


[0857] 将辛二酸 (5g, 28.7mmol)、丁基辛醇 (5.4g, 28.7mmol)、EDC (5.8g, 30.1mmol)、DIPEA (10mL, 57.4mmol) 和 DMAP (催化量) 在 DCM (10mL) 和 1,4-二噁烷 (180mL) 中在 RT 下搅拌 18hr。将反应物在真空中浓缩, 将残余物溶解于 DCM 中, 用 NaHCO_3 (饱和溶液) 和盐水洗涤, 干燥 (MgSO_4), 过滤并在真空中浓缩。将粗物质通过自动快速色谱 (5%-30% EtOAc-己烷) 纯化, 得到 8-[(2-丁基辛基) 氧基]-8-氧代辛酸 (4.4g, 45.0%)。

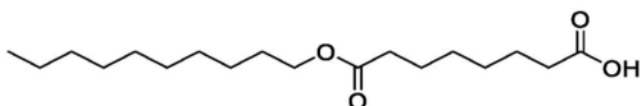
[0858] 使用如上所述的类似方法制备以下化合物



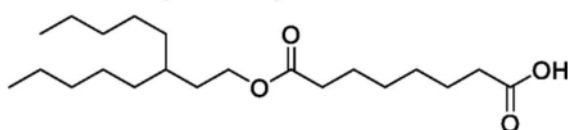
6-((2-丁基辛基)氧基)-6-氧代己酸



8-氧代-8-(十一烷-3-基氧基)辛酸

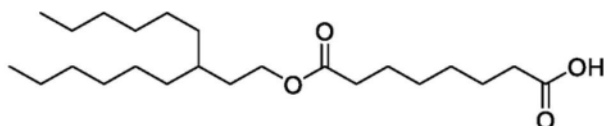


8-(癸氧基)-8-氧代辛酸

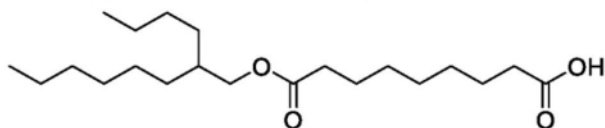


8-氧代-8-((3-戊基辛基)氧基)辛酸

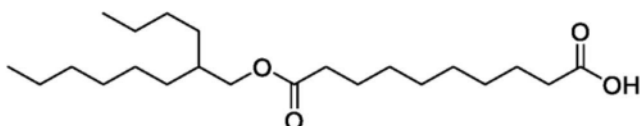
[0859]



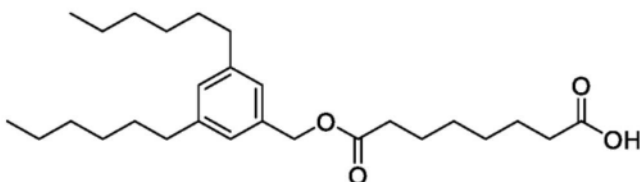
8-((3-己基壬基)氧基)-8-氧代辛酸



9-((2-丁基辛基)氧基)-9-氧代壬酸



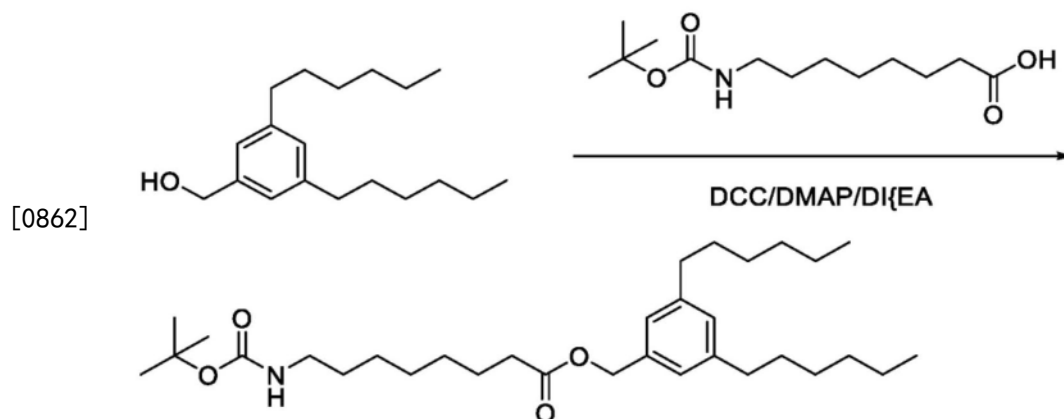
10-((2-丁基辛基)氧基)-10-氧代癸酸



8-((3,5-二己基苄基)氧基)-8-氧代辛酸

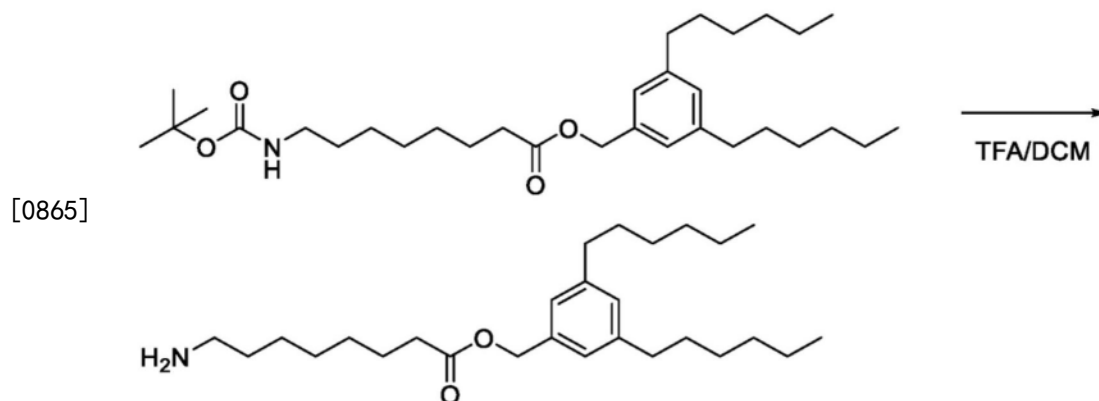
[0860] 制备实施例18.8-氨基辛酸3,5-二己基苄酯的合成

[0861] 步骤1.8-[(叔丁氧基羰基) 氨基] 辛酸 (3,5-二己基苄基) 甲酯的合成



[0863] 将(3,5-二己基苯基)甲醇(3.0g,10.9mmol)、8-[(叔丁氧基羰基)-氨基]辛酸(2.8g,10.9mmol)、DCC(2.5g,11.9mmol)、DIPEA(3.8mL,21.7mmol)和DMAP(133mg,1.1mmol)在DCM中在RT下搅拌16hr。通过过滤除去所得沉淀物,在真空中浓缩滤液并通过自动快速色谱(10% EtOAc/Hex)纯化残余物,得到8-[(叔丁氧基羰基)氨基]辛酸(3,5-二己基苯基)甲酯(1.81g,32.2%)。

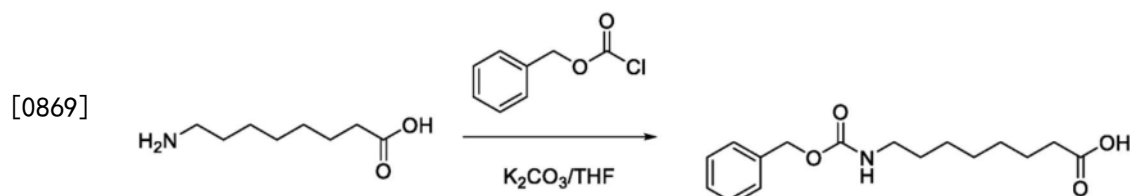
[0864] 步骤2.8-氨基辛酸(3,5-二己基苯基)甲酯的合成



[0866] 将8-[(叔丁氧基羰基)氨基]辛酸(3,5-二己基苯基)甲酯(1.8g,3.5mmol)在RT下在DCM中的20% TFA溶液中搅拌1hr。在真空中浓缩反应物,将残余物溶解于DCM中并用1M NaOH转化为游离碱。将有机物分离,干燥(MgSO_4)并在真空中浓缩,得到8-氨基辛酸(3,5-二己基苯基)甲酯(1.35g,93.0%),其不经纯化即使用。

[0867] 制备实施例19.8-氨基辛酸2-己基癸酯的合成

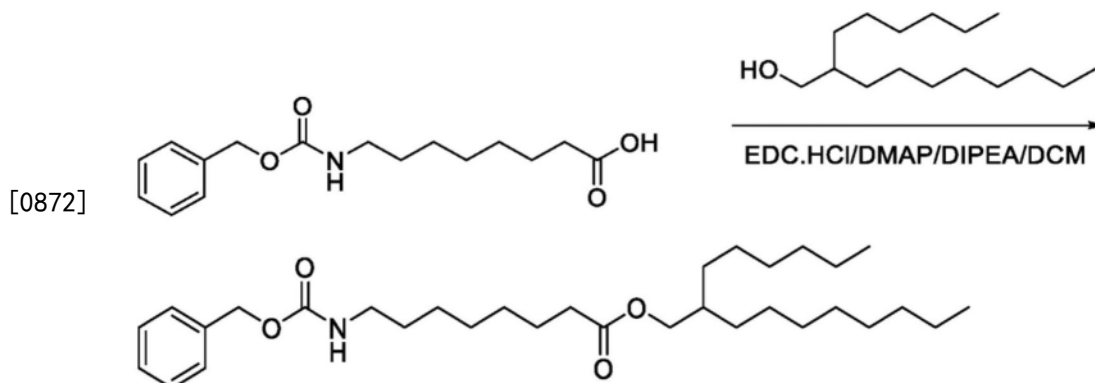
[0868] 步骤1.8-[(苄氧基)羰基]氨基辛酸的合成



[0870] 将8-氨基辛酸(5g,31.4mmol)、 K_2CO_3 (8.7g,63mmol)和氯甲酸苄酯(7.0mL,47.1mmol)在RT下在THF(150mL)中搅拌16hr。将反应物酸化(6M HCl)并在真空中浓缩。将残余物在DCM(100mL)与 H_2O 水(100mL)之间分配并用DCM萃取水层。将合并的有机物干燥(MgSO_4),过滤并在真空中浓缩,得到8-[(苄氧基)羰基]氨基辛酸(8.4g,91.2%),其不经

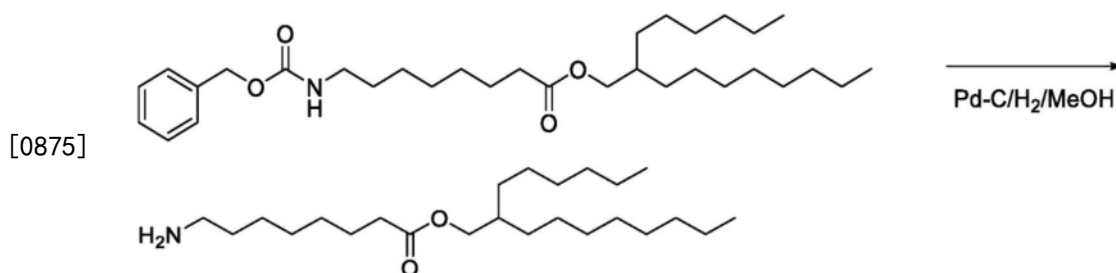
纯化即使用。

[0871] 步骤2.8- {[(苄氧基) 羰基] 氨基} 辛酸2-己基癸酯的合成



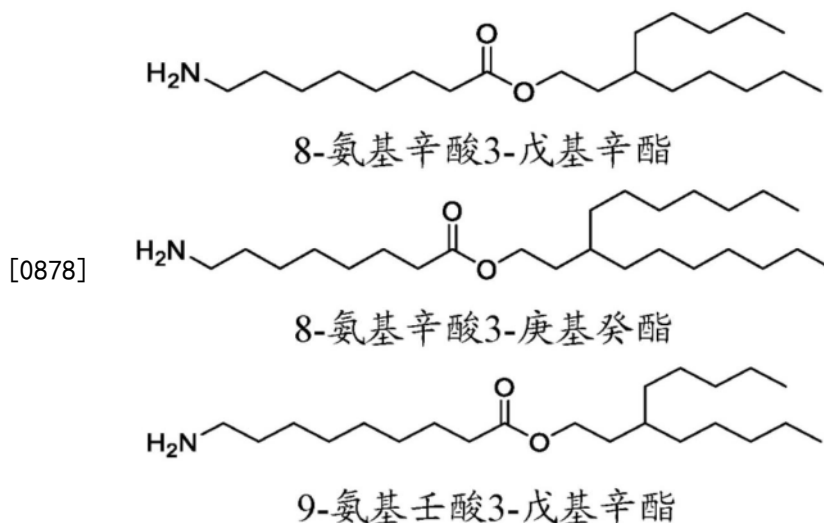
[0873] 将8- {[(苄氧基) 羰基] 氨基} 辛酸 (1.05g, 3.6mmol)、EDC.HCl (1.4g, 7.2mmol)、己基癸醇 (1.0g, 4.0mmol)、DMAP (22mg, 0.18mmol) 和DIPEA (1.9mL, 10.7mmol) 在DCM (25mL) 中在RT下搅拌16hr。将反应物在真空中浓缩, 溶解于EtOAc (100mL) 中, 用饱和NaHCO₃和盐水洗涤, 干燥 (MgSO₄), 过滤并在真空中浓缩。将残余物通过自动快速色谱 (0% - 50% EtOAc/己烷) 纯化, 得到8- {[(苄氧基) 羰基] 氨基} 辛酸2-己基癸酯 (1.45g, 64.5%)。

[0874] 步骤3.8-氨基辛酸2-己基癸酯的合成



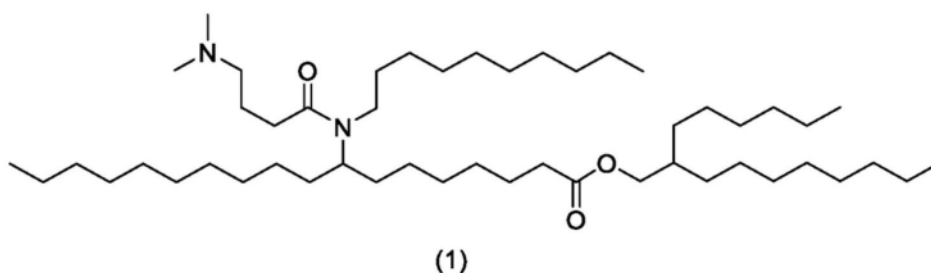
[0876] 将8- {[(苄氧基) 羰基] 氨基} 辛酸2-己基癸酯 (1g, 1.9mmol) 在RT下在MeOH (25mL) 中经10% 钯碳 (100mg) 催化氢化16hr。将反应物通过硅藻土过滤并在真空中浓缩, 得到8-氨基辛酸2-己基癸酯 (0.71g, 95.8%)。

[0877] 使用如上所述的类似方法制备以下化合物。



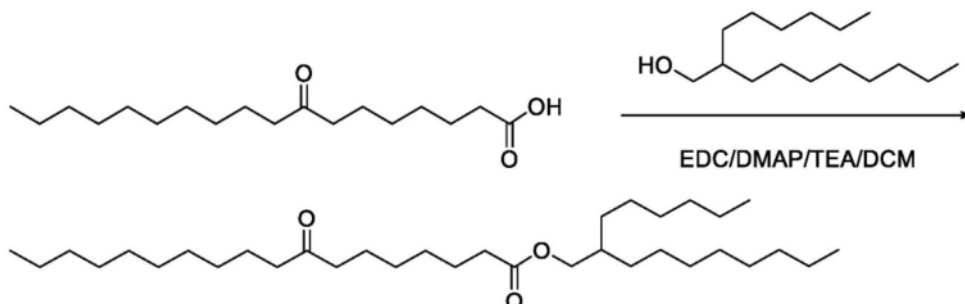
[0879] 实施例1.8- (N-癸基-4-(二甲基氨基) 丁酰胺基) -十八烷酸2-己基癸酯 (1) 的合成

[0880]



[0881] 步骤1.8-氧代十八烷酸2-己基癸酯的合成

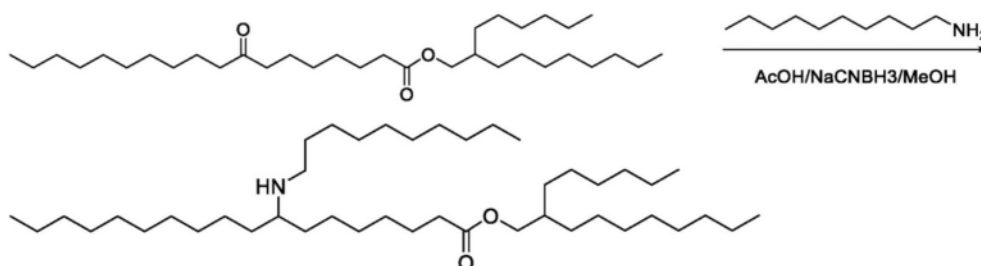
[0882]



[0883] 将8-氧代十八烷酸(1g, 3.4mmol)、己基癸醇(894mg, 3.7mmol)、EDC(1.29g, 6.7mmol)、DIPEA(1.8mL, 10.1mmol)和DMAP(催化量)在DCM(30mL)中在RT下搅拌18hr。将反应物用DCM稀释,用NaHCO₃(饱和)和盐水洗涤,干燥(MgSO₄),过滤并在真空中浓缩。将粗物质通过自动快速色谱(0%-10% EtOAc-己烷)纯化,得到8-氧代十八烷酸2-己基癸酯(1.33g, 75.9%)。

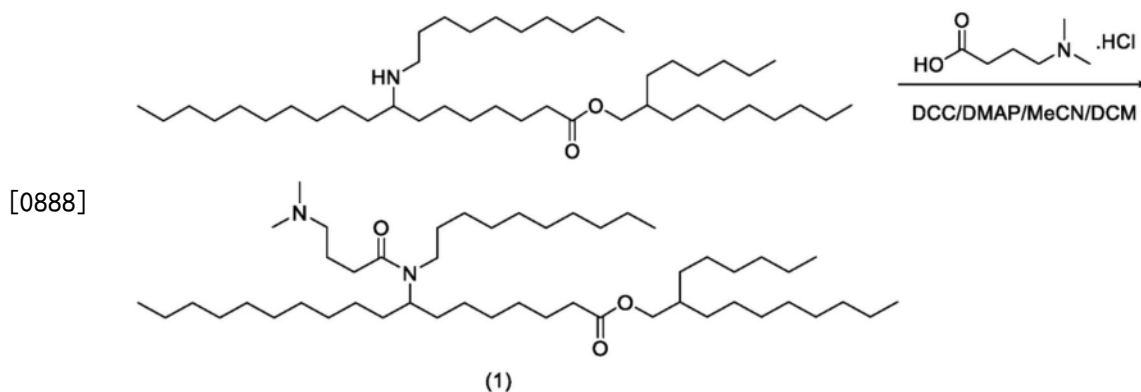
[0884] 步骤2.8-(癸基氨基)十八碳烯酸2-己基癸酯的合成

[0885]



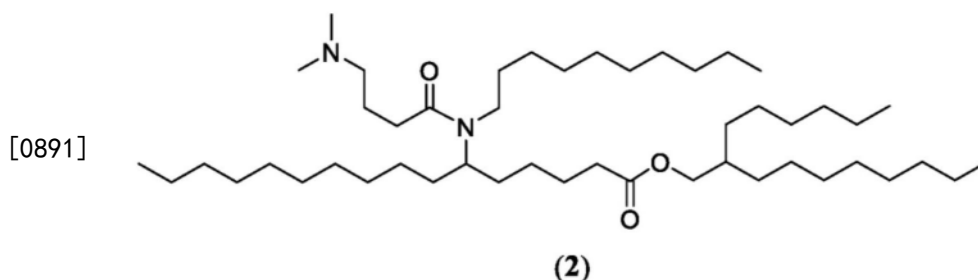
[0886] 将8-氧代十八烷酸2-己基癸酯(933mg, 1.8mmol)、N-癸胺(0.3g, 1.9mmol)、NaCNBH₃(340mg, 5.4mmol)和AcOH(0.2g, 3.6mmol)在MeOH(10ml)中在50℃下加热18hr。将反应物在真空中浓缩,将残余物溶解于DCM中并用NaHCO₃(饱和)和盐水洗涤,干燥(MgSO₄),过滤并在真空中浓缩。将粗物质通过自动快速色谱(0%-5% MeOH-DCM)纯化,得到8-(癸基氨基)十八碳烯酸2-己基癸酯(447mg, 37.7%)。

[0887] 步骤3.8-[N-癸基-4-(二甲基氨基)丁酰胺基]-十八碳烯酸2-己基癸酯(1)的合成

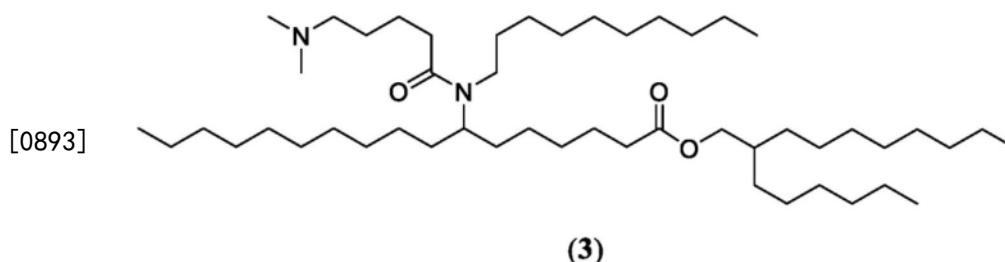


[0889] 将4-二甲基氨基丁酸(HCl)(0.38g,2.2mmol)、DCC(0.51g,2.5mmol)和DMAP(0.41g,3.4mmol)在MeCN(6mL)中在RT下搅拌3hr。添加8-(癸基氨基)十八烷酸2-己基癸酯(744mg,1.1mmol)于DCM(8mL)中的溶液,并将反应物在RT下搅拌18hr。将反应物浓缩,分散于己烷:EtOAc:TEA(75:25:1)中,通过硅藻土过滤,并将滤液在真空中浓缩。将残余物通过自动色谱(0%-10% MeOH-DCM)纯化,得到8-[N-癸基-4-(二甲基氨基)丁酰胺基]十八烷酸2-己基癸酯(1)(230mg,26.4%)。¹H NMR(400MHz,CDCl₃) δ4.01-3.92(m,2H),3.63(s,1H),3.10-2.97(m,2H),2.31(h,J=6.6Hz,6H),2.22(s,6H),1.82(q,J=7.7Hz,2H),1.48(d,J=36.9Hz,10H),1.27(s,58H),0.88(t,J=6.6Hz,12H)。

[0890] 使用如上所述的类似方法制备以下化合物

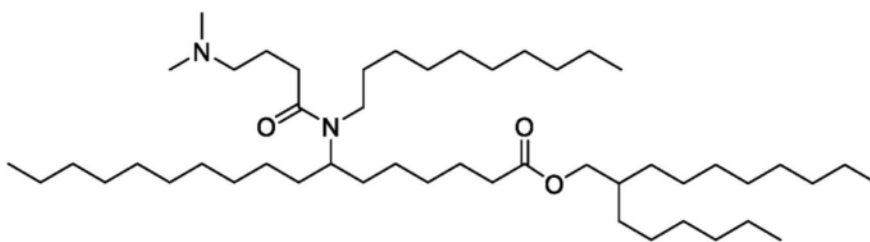


[0892] 6-(N-癸基-4-(二甲基氨基)丁酰胺基)十六烷酸2-己基癸酯(2)。¹H NMR(400MHz,CDCl₃) δ3.95(d,J=5.7Hz,2H),3.65(s,1H),3.09-2.98(m,2H),2.31(dt,J=15.3,7.4Hz,6H),2.21(s,6H),1.82(q,J=7.7Hz,2H),1.48(d,J=29.4Hz,10H),1.27(s,54H),0.88(t,J=6.7Hz,12H)。



[0894] 7-(N-癸基-5-(二甲基氨基)戊酰胺基)十七烷酸2-己基癸酯(3)。¹H NMR(400MHz,CDCl₃) δ3.98(dd,J=5.8,3.9Hz,2H),3.70-3.57(m,1H),3.04(s,2H),2.31(dtt,J=7.5,5.8,3.0Hz,6H),2.24(s,6H),1.75-1.40(m,17H),1.28(p,J=5.4Hz,55H),0.90(td,J=6.8,2.1Hz,12H)。

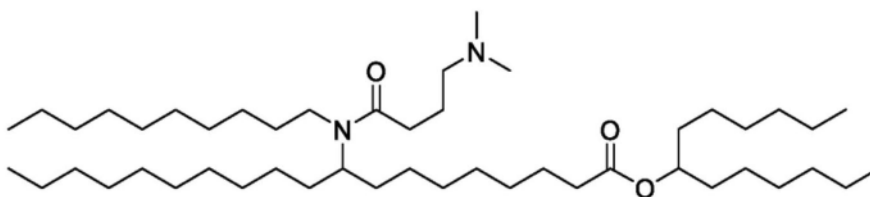
[0895]



(4)

[0896] 7-(N-癸基-4-(二甲基氨基)丁酰胺基)十七烷酸2-己基癸酯(4)。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 3.98(dd, $J=5.8, 4.1\text{Hz}$, 2H), 3.72-3.60(m, 1H), 3.06(q, $J=7.7\text{Hz}$, 2H), 2.39-2.27(m, 6H), 2.24(d, $J=1.1\text{Hz}$, 6H), 1.85(h, $J=7.4\text{Hz}$, 2H), 1.72-1.40(m, 13H), 1.29(dq, $J=10.3, 6.5\text{Hz}$, 55H), 0.90(td, $J=6.8, 2.3\text{Hz}$, 12H)。

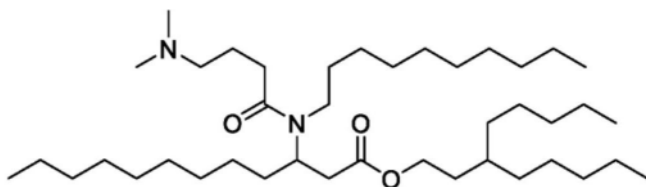
[0897]



(5)

[0898] 9-(N-癸基-4-(二甲基氨基)丁酰胺基)十九烷酸十三烷-7-基酯(5)。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 4.88(q, $J=6.4\text{Hz}$, 1H), 3.66(t, $J=7.1\text{Hz}$, 1H), 3.06(q, $J=6.7\text{Hz}$, 2H), 2.39-2.25(m, 6H), 2.24(s, 6H), 1.84(h, $J=7.6\text{Hz}$, 2H), 1.72-1.40(m, 17H), 1.29(d, $J=8.9\text{Hz}$, 57H), 0.90(t, $J=6.4\text{Hz}$, 12H)。

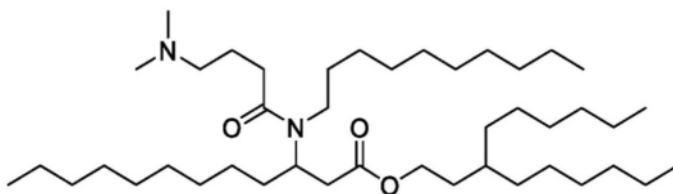
[0899]



(6)

[0900] 3-(N-癸基-4-(二甲基氨基)丁酰胺基)十二烷酸3-戊基辛酯(6)。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 4.37-4.16(m, 1H), 4.08(q, $J=7.1\text{Hz}$, 2H), 3.17(tt, $J=8.4, 4.9\text{Hz}$, 1H), 2.83-2.35(m, 3H), 2.32(qd, $J=8.0, 1.8\text{Hz}$, 3H), 2.24(m, 6H), 1.83(qd, $J=7.6, 5.3\text{Hz}$, 2H), 1.58(q, $J=6.9\text{Hz}$, 4H), 1.50(d, $J=5.9\text{Hz}$, 2H), 1.29(dd, $J=13.2, 5.6\text{Hz}$

[0901]

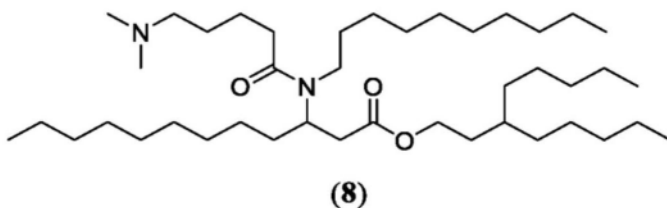


(7)

[0902] 3-(N-癸基-4-(二甲基氨基)丁酰胺基)十二烷酸3-己基壬酯(7)。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 4.36-4.19(m, 1H), 4.08(q, $J=7.2\text{Hz}$, 2H), 3.17(tt, $J=8.1, 4.7\text{Hz}$, 2H), 2.77-2.36(m, 4H), 2.32(qd, $J=7.7, 2.2\text{Hz}$, 3H), 2.24(m, 6H), 1.83(qd, $J=7.6, 5.1\text{Hz}$, 2H), 1.76(s,

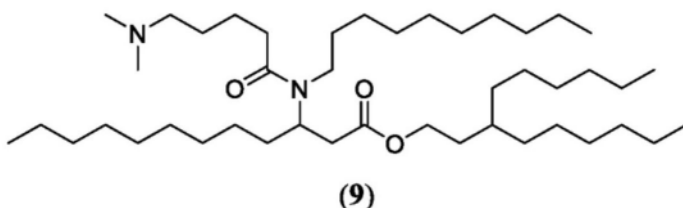
1H), 1.55 (dh, J=24.3, 6.8Hz, 5H), 1.37-1.18 (m, 47H), 0.90 (t, J=6.8Hz, 12H)。

[0903]



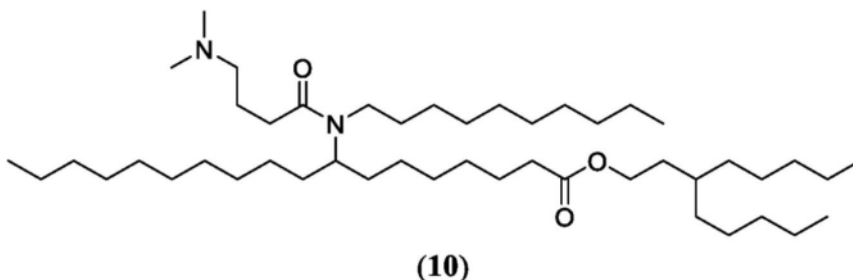
[0904] 3-(N-癸基-5-(二甲基氨基)戊酰胺基)十二烷酸3-戊基辛酯(8)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ4.35-4.15 (m, 1H), 4.08 (q, J=7.5Hz, 2H), 3.23-3.09 (m, 1H), 3.06-2.91 (m, 1H), 2.80-2.33 (m, 3H), 2.29 (ddd, J=7.7, 6.1, 3.9Hz, 3H), 2.23 (d, J=1.2Hz, 6H), 1.66 (p, J=7.5Hz, 3H), 1.61-1.45 (m, 7H), 1.37-1.14 (m, 44H), 0.90 (td, J=6.9, 2.7Hz, 12H)。

[0905]



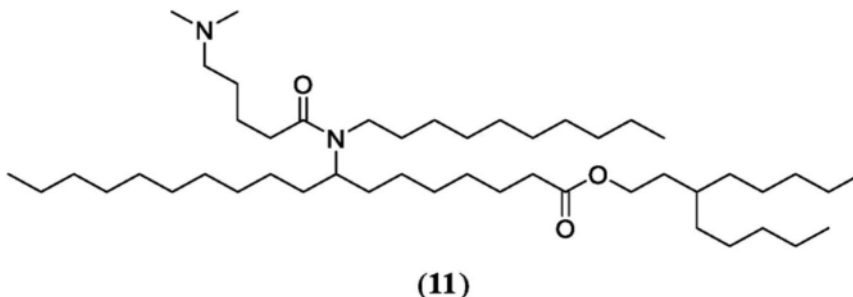
[0906] 3-(N-癸基-5-(二甲基氨基)戊酰胺基)十二烷酸3-己基壬酯(9)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ4.26 (s, 1H), 4.08 (q, J=7.5Hz, 2H), 3.21-3.08 (m, 1H), 2.78-2.33 (m, 3H), 2.29 (ddd, J=7.5, 6.1, 3.7Hz, 3H), 2.23 (d, J=1.2Hz, 6H), 1.67 (p, J=7.5Hz, 3H), 1.61-1.45 (m, 7H), 1.28 (t, J=5.7Hz, 49H), 0.90 (td, J=6.9, 2.5Hz, 12H)。

[0907]



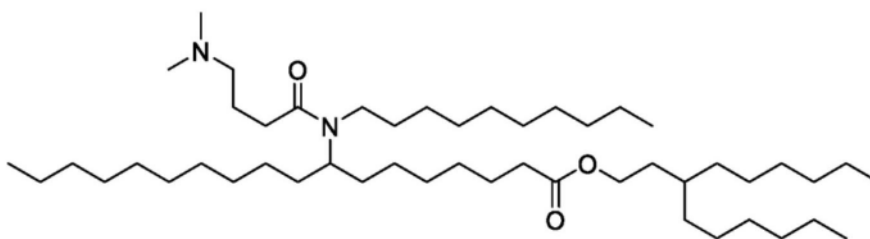
[0908] 8-(N-癸基-4-(二甲基氨基)丁酰胺基)十八碳烯酸3-戊基辛酯(10)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ4.10 (td, J=7.1, 2.8Hz, 2H), 3.05 (t, J=8.3Hz, 2H), 2.40 (dd, J=20.2, 11.9Hz, 6H), 2.29 (td, J=7.6, 4.9Hz, 3H), 1.65-1.54 (m, 6H), 1.44 (q, J=6.2Hz, 5H), 1.29 (d, J=10.3Hz, 52H), 0.90 (td, J=6.9, 2.7Hz, 12H), 0.09 (s, 2H)。

[0909]



[0910] 8-(N-癸基-5-(二甲基氨基)戊酰胺基)十八碳烯酸3-戊基辛酯(11)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ4.10 (td, J=7.1, 2.8Hz, 2H), 3.04 (t, J=8.3Hz, 2H), 2.37 (s, 3H), 2.36-2.26 (m, 6H), 1.64-1.55 (m, 6H), 1.53 (s, 2H), 1.45 (s, 5H), 1.29 (d, J=10.2Hz, 48H), 0.90 (td, J=6.9, 2.9Hz, 12H)。

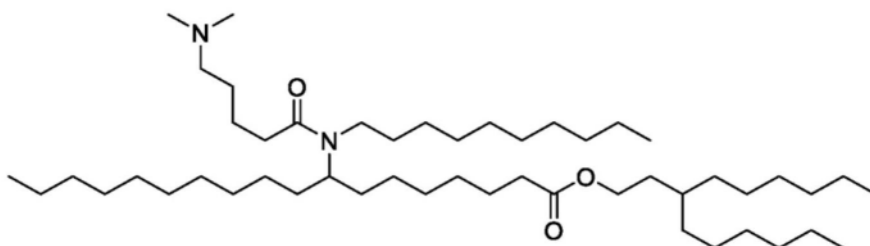
[0911]



(12)

[0912] 8-(N-癸基-4-(二甲基氨基)丁酰胺基)十八碳烯酸3-己基壬酯(12)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ4.10(td, J=7.1, 3.0Hz, 2H), 3.06(q, J=6.7Hz, 2H), 2.47(s, 1H), 2.42-2.34(m, 6H), 2.29(td, J=7.6, 5.1Hz, 4H), 1.96-1.88(m, 2H), 1.66-1.51(m, 7H), 1.44(d, J=7.0Hz, 5H), 1.29(d, J=9.5Hz, 56H), 0.90(td, J=6.9, 2.4Hz, 12H)。

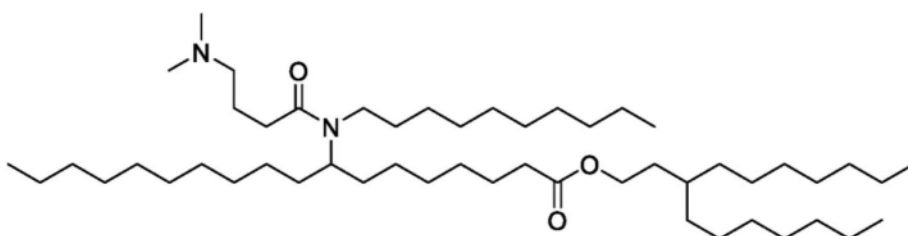
[0913]



(13)

[0914] 8-(N-癸基-5-(二甲基氨基)戊酰胺基)十八碳烯酸3-己基壬酯(13)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ4.10(td, J=7.1, 2.7Hz, 2H), 3.08-2.99(m, 2H), 2.47(s, 2H), 2.34(d, J=7.1Hz, 6H), 2.29(td, J=7.5, 5.6Hz, 3H), 1.75-1.54(m, 10H), 1.45(s, 5H), 1.29(d, J=9.9Hz, 56H), 0.90(td, J=6.8, 2.3Hz, 12H)。

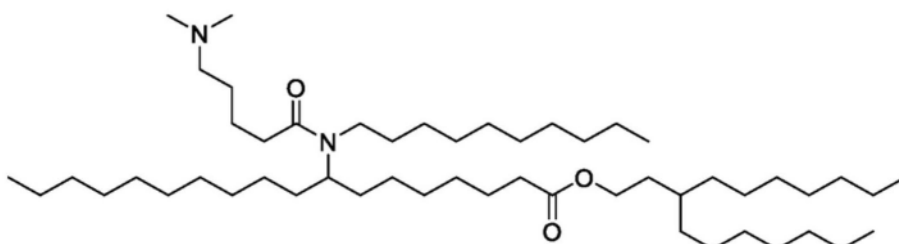
[0915]



(14)

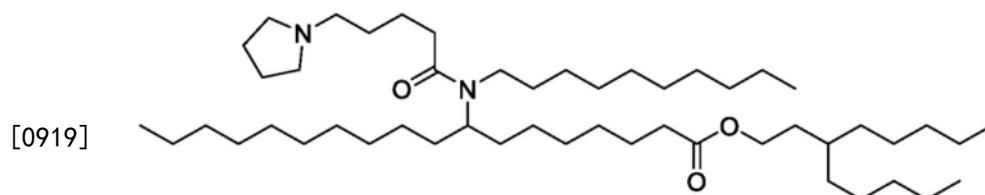
[0916] 8-(N-癸基-4-(二甲基氨基)丁酰胺基)十八碳烯酸3-庚基癸酯(14)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ4.09(td, J=7.1, 2.9Hz, 2H), 3.06(q, J=6.8Hz, 2H), 2.62(s, 2H), 2.40(dt, J=9.5, 7.0Hz, 6H), 2.29(td, J=7.5, 5.0Hz, 2H), 1.98(s, 2H), 1.59(tq, J=16.8, 8.3Hz, 6H), 1.44(d, J=7.2Hz, 5H), 1.29(d, J=9.8Hz, 61H), 0.90(td, J=6.8, 2.1Hz, 12H)。

[0917]



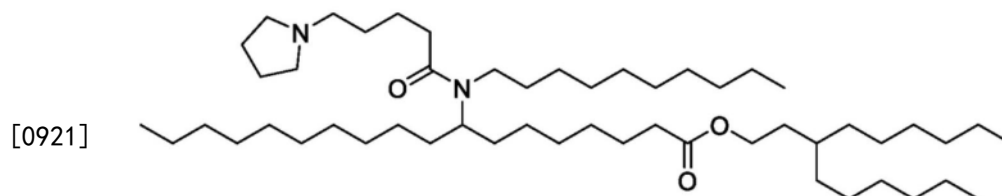
(15)

[0918] 8-(N-癸基-5-(二甲基氨基)戊酰胺基)十八碳烯酸3-庚基癸酯(15)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ4.09 (td, J=7.1, 2.6Hz, 2H), 3.04 (q, J=7.4Hz, 2H), 2.67 (s, 2H), 2.53 (s, 6H), 2.41-2.24 (m, 4H), 1.72 (s, 4H), 1.60 (dq, J=13.8, 7.0Hz, 7H), 1.49-1.38 (m, 5H), 1.29 (d, J=9.3Hz, 59H), 0.90 (td, J=6.9, 2.2Hz, 12H)。



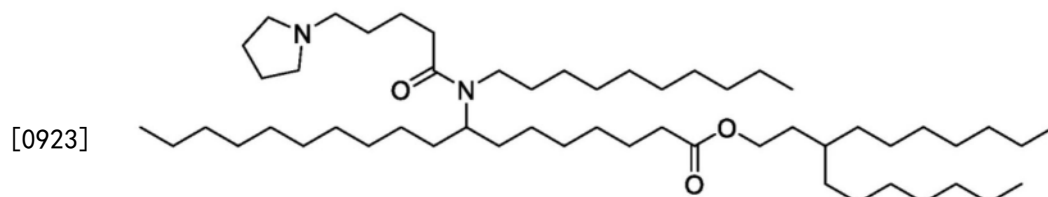
(89)

[0920] 8-(N-癸基-5-(吡咯烷-1-基)戊酰胺基)十八烷酸3-戊基辛酯(89)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ4.10 (td, J=7.1, 3.1Hz, 2H), 3.04 (dd, J=11.3, 7.0Hz, 2H), 2.54-2.42 (m, 6H), 2.30 (ddd, J=15.2, 7.7, 5.3Hz, 4H), 1.83-1.75 (m, 4H), 1.70 (dq, J=16.0, 7.7Hz, 3H), 1.64-1.50 (m, 11H), 1.49-1.41 (m, 5H), 1.29 (d, J=11.0Hz, 53H), 0.90 (td, J=6.9, 2.8Hz, 12H)。



(90)

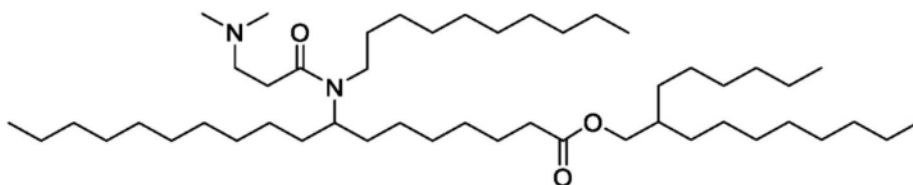
[0922] 8-(N-癸基-5-(吡咯烷-1-基)戊酰胺基)十八烷酸3-己基壬酯(90)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ4.10 (td, J=7.1, 3.1Hz, 2H), 3.04 (dd, J=10.9, 6.4Hz, 2H), 2.48 (ddt, J=18.2, 7.6, 3.0Hz, 6H), 2.30 (ddd, J=15.2, 7.7, 5.3Hz, 4H), 1.79 (q, J=3.2Hz, 4H), 1.71 (dd, J=10.0, 7.2Hz, 3H), 1.66-1.52 (m, 9H), 1.49-1.41 (m, 5H), 1.29 (d, J=10.0Hz, 55H), 0.90 (td, J=6.9, 2.4Hz, 12H)。



(91)

[0924] 8-(N-癸基-5-(吡咯烷-1-基)戊酰胺基)十八烷酸3-庚基癸酯(91)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ4.10 (td, J=7.1, 3.1Hz, 2H), 3.03 (d, J=12.6Hz, 2H), 2.54-2.42 (m, 6H), 2.30 (ddd, J=15.3, 7.7, 5.4Hz, 4H), 1.79 (q, J=3.6Hz, 4H), 1.74-1.65 (m, 2H), 1.63-1.54 (m, 12H), 1.46 (s, 6H), 1.29 (d, J=10.0Hz, 54H), 0.90 (td, J=6.8, 2.3Hz, 12H)。

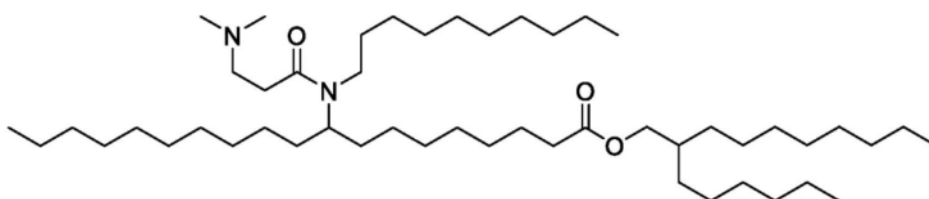
[0925]



(107)

[0926] 8-(N-癸基-3-(二甲基氨基)丙酰胺基)十八烷酸2-己基癸酯(107)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ3.98(dd, J=5.8, 2.7Hz, 2H), 3.68-3.57(m, 1H), 3.10-3.01(m, 2H), 2.68(q, J=8.1Hz, 2H), 2.51(q, J=7.8Hz, 2H), 2.35-2.26(m, 8H), 1.79-1.40(m, 12H), 1.28(d, J=6.6Hz, 64H), 0.90(q, J=4.2Hz, 12H)。

[0927]

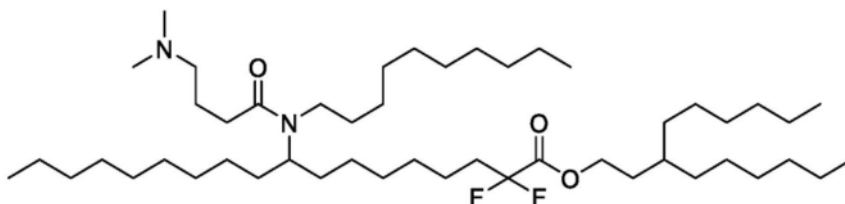


(119)

[0928] 9-(N-癸基-3-(二甲基氨基)丙酰胺基)十九烷酸2-己基癸酯(119)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ3.99(d, J=5.7Hz, 2H), 3.69-3.58(m, 1H), 3.06(dd, J=10.8, 5.9Hz, 2H), 2.70(dd, J=10.9, 6.4Hz, 2H), 2.53(q, J=8.1Hz, 2H), 2.30(t, J=4.2Hz, 8H), 1.71-1.11(m, 77H), 0.90(t, J=6.6Hz, 12H)。

[0929] 实施例2.9-(N-癸基-4-(二甲基氨基)丁酰胺基)-2,2-二氟十八烷酸3-己基壬酯(16)的合成

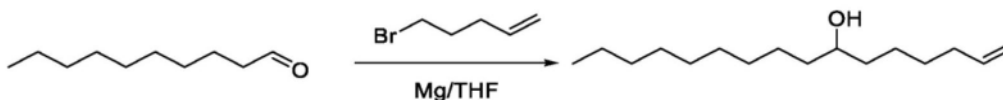
[0930]



(16)

[0931] 步骤1.十六碳-1-烯-7-醇的合成

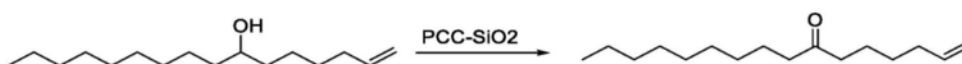
[0932]



[0933] 在THF(150mL)中用6-溴己-1-烯(70g, 429mmol)和镁(11.2g, 459mmol)制备格氏试剂,并在45℃下搅拌2hr。将反应物冷却至15℃并逐滴添加THF(150mL)中的癸醛(54g, 343mmol)。1hr后,将反应物冷却(0℃,冰浴),并用H₂O淬灭,然后用6M HCl(350mL)淬灭。用己烷萃取反应物,将有机物用盐水洗涤,干燥(MgSO₄),过滤并在真空中浓缩。将残余物通过自动柱色谱(2%-20% EtOAc-己烷)纯化,得到十六碳-1-烯-7-醇(65g,产率78.7%)。

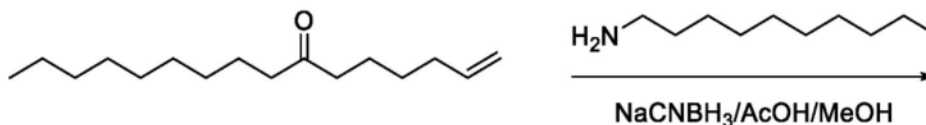
[0934] 步骤2.十六碳-1-烯-7-酮的合成

[0935]

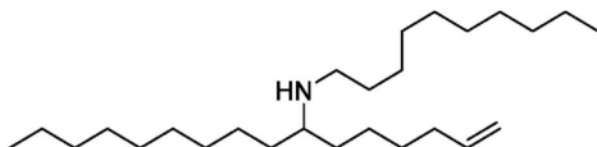


[0936] 将十六碳-1-烯-7-醇 (65g, 270mmol) 和PCC-SiO₂ (1:1) (140g, 324mmol) 在DCM (600mL) 中在RT下搅拌18hr。将混合物在真空中部分浓缩, 并通过短二氧化硅床用EtOAc-己烷 (25%, 700mL) 洗脱。将合并的有机物在真空中浓缩并通过自动快速色谱 (0%-10% EtOAc-己烷) 纯化, 得到十六碳-1-烯-7-酮 (59g, 91.5%)。

[0937] 步骤3. 癸基 (十六碳-1-烯-7-基) 胺的合成

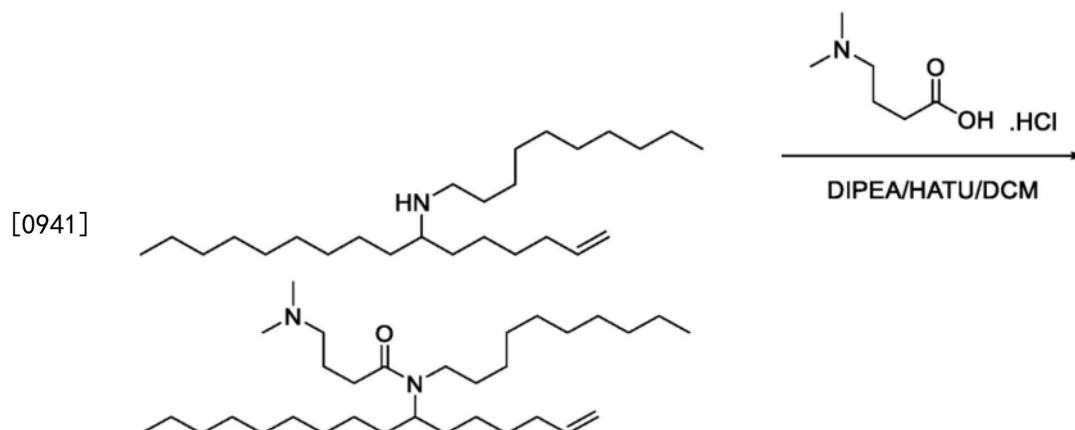


[0938]



[0939] 将十六碳-1-烯-7-酮 (59g, 247mmol)、N-癸胺 (40.9g, 260mmol)、NaCNBH₃ (47g, 742mmol) 和AcOH (30g, 495mmol) 在MeOH中在50℃下搅拌18hr。将反应物在真空中浓缩, 将残余物溶解于Et₂O中并依次用NaHCO₃ (饱和溶液) 和盐水洗涤, 干燥 (MgSO₄), 过滤并在真空中浓缩。将粗物质通过自动快速色谱 (0%-10% MeOH-DCM) 纯化, 得到癸基 (十六碳-1-烯-7-基) 胺 (50g, 53.2%)。

[0940] 步骤4. N-癸基-4- (二甲基氨基) -N- (十六碳-1-烯-7-基) 丁酰胺的合成

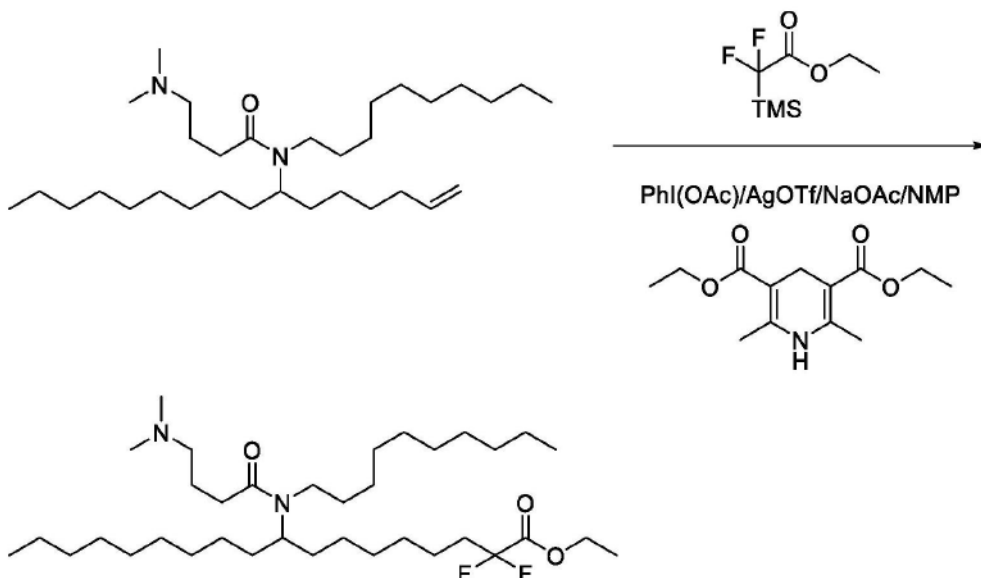


[0941]

[0942] 将4-二甲基氨基]丁酸 (HCl盐) (25.4g, 151mmol)、HATU (60g, 158mmol) 和DIPEA (46mL, 263mmol) 在DCM (500mL) 中在RT下搅拌1hr。添加癸基 (十六碳-1-烯-7-基) 胺 (25g, 66mmol) 于DCM (65mL) 中) 并将反应物在RT下搅拌18hr。将反应物在真空中浓缩, 将残余物溶解于Et₂O中并依次用1M NaOH、NaHCO₃ (饱和溶液)、水和盐水洗涤, 干燥 (MgSO₄), 过滤并在真空中浓缩。将残余物通过自动快速色谱 (0%-10% MeOH-DCM) 纯化, 得到N-癸基-4- (二甲基氨基) -N- (十六碳-1-烯-7-基) 丁酰胺 (20g, 61.6%)。

[0943] 步骤5. 9- [N-癸基-4- (二甲基氨基) 丁酰胺基] -2,2-二氟十八烷酸乙酯的合成

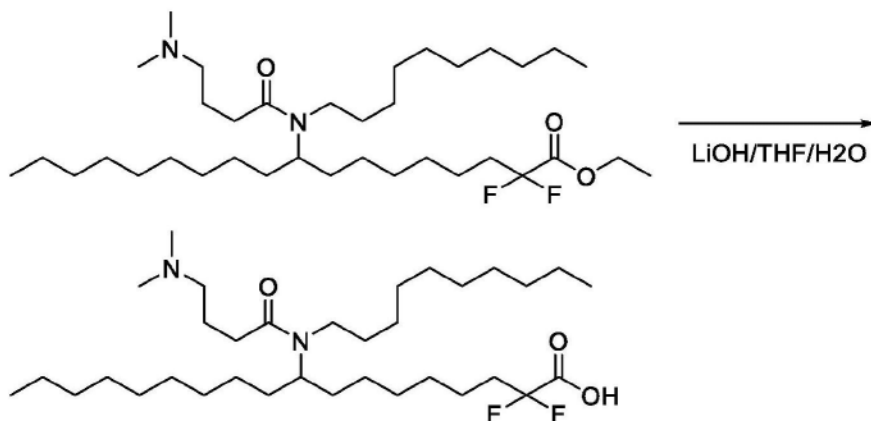
[0944]



[0945] 在真空、热干燥的烧瓶中,添加Hantsch酯(2.3g,9.13mmol)、NaOAc(2.25g,27.4mmol)、AgOTf(5.9g,22.8mmol)和二乙酸碘苯(5.9g,18.3mmol),并将烧瓶抽空并用氮气回填。添加NMP(15mL)、NMP中的N-癸基-4-(二甲基氨基)-N-(十六碳-1-烯-7-基)丁酰胺(4.5g,9.1mmol)和2,2-二氟-2-(三甲基甲硅烷基)乙酸乙酯(9.0g,46mmol),并将反应物在RT下搅拌18hr。将混合物通过硅藻土过滤,用 Et_2O 洗脱。将有机物用水和盐水洗涤,干燥(MgSO_4),过滤并在真空中浓缩。将残余物通过自动快速色谱(0%-10% MeOH-DCM)纯化,得到9-[N-癸基-4-(二甲基氨基)丁酰胺基]-2,2-二氟十八烷酸乙酯(5g,80.0%)。

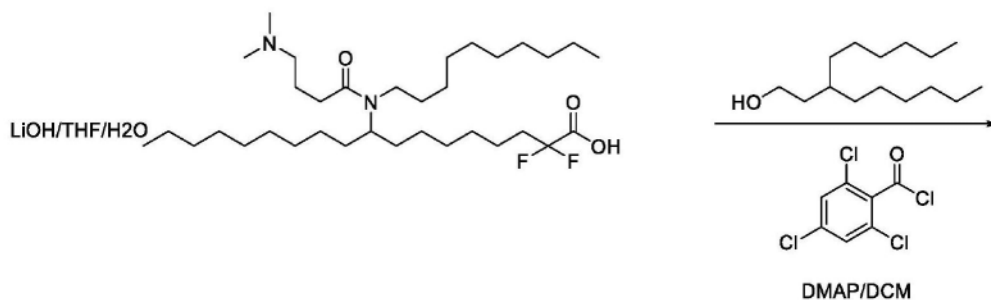
[0946] 步骤6.9-[N-癸基-4-(二甲基氨基)丁酰胺基]-2,2-二氟十八烷酸的合成

[0947]

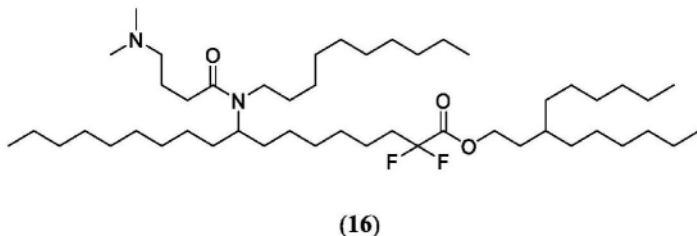


[0948] 将9-[N-癸基-4-(二甲基氨基)丁酰胺基]-2,2-二氟十八烷酸乙酯(5g,8.1mmol)和 LiOH (0.39g,16.2mmol)在THF(50mL)和 H_2O (10mL)中在50℃下搅拌2hr。将反应物用6M HCl (3.0mL)淬灭并部分浓缩。将水性残余物用 H_2O 稀释并用DCM萃取。将合并的有机物用盐水洗涤,干燥(MgSO_4),过滤并在真空中浓缩。将残余物与甲苯(50mL)共沸,得到9-[N-癸基-4-(二甲基氨基)丁酰胺基]-2,2-二氟十八烷酸,其不经纯化即使用。

[0949] 步骤7.9-[N-癸基-4-(二甲基氨基)丁酰胺基]-2,2-二氟十八烷酸3-己基壬酯的合成

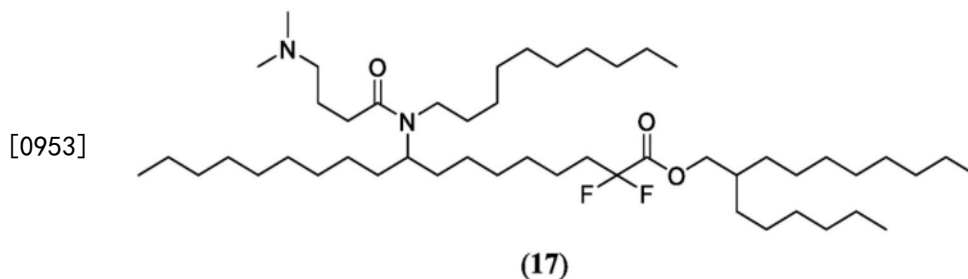


[0950]

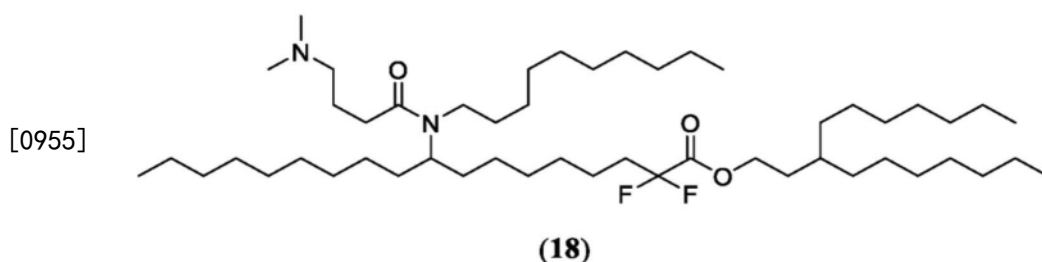


[0951] 将9-[N-癸基-4-(二甲基氨基)丁酰胺基]-2,2-二氟十八烷酸(4g,6.8mmol)、3-己基壬-1-醇(1.63g,7.1mmol)、2,4,6三氯苯甲酰氯(1.8g,7.5mmol)和DMAP(1.7g,13.6mmol)在DCM(100mL)中在RT下搅拌3hr。将反应物在真空中浓缩,并将残余物在Et₂O与H₂O之间分配。将有机物用NaHCO₃(饱和溶液)和盐水洗涤,干燥(MgSO₄),过滤并在真空中浓缩。将残余物通过自动快速色谱(0%-12% MeOH-DCM)纯化,得到9-[N-癸基-4-(二甲基氨基)丁酰胺基]-2,2-二氟十八烷酸3-己基壬酯(16)(2.44g,44.9%)。¹H NMR(400MHz,CDC13)δ4.29(td,J=7.1,1.9Hz,2H),3.66(dd,J=9.4,4.8Hz,1H),3.06(q,J=7.1Hz,2H),2.41-2.31(m,4H),2.27(s,6H),2.13-1.96(m,2H),1.87(h,J=7.3Hz,2H),1.67(q,J=6.9Hz,2H),1.60-1.39(m,9H),1.28(q,J=6.6Hz,56H),0.95-0.84(m,12H)。¹⁹F NMR(376MHz,CDC13)δ-105.9(2F)。

[0952] 使用如上所述的类似方法制备以下化合物

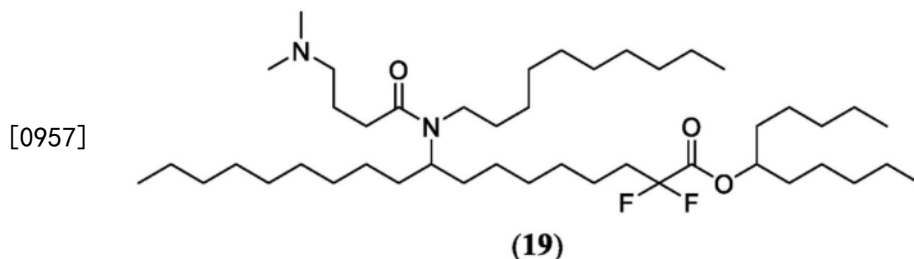


[0954] 9-[N-癸基-4-(二甲基氨基)丁酰胺基]-2,2-二氟十八烷酸2-己基癸酯(17)。¹H NMR(400MHz,CDC1₃)δ4.18(dd,J=6.0,2.0Hz,2H),3.69-3.57(m,1H),3.06(q,J=7.1Hz,2H),2.57(s,2H),2.46-2.34(m,8H),2.01-1.89(m,3H),1.59-1.40(m,8H),1.38-1.18(m,60H),0.90(td,J=6.8,2.7Hz,12H)。

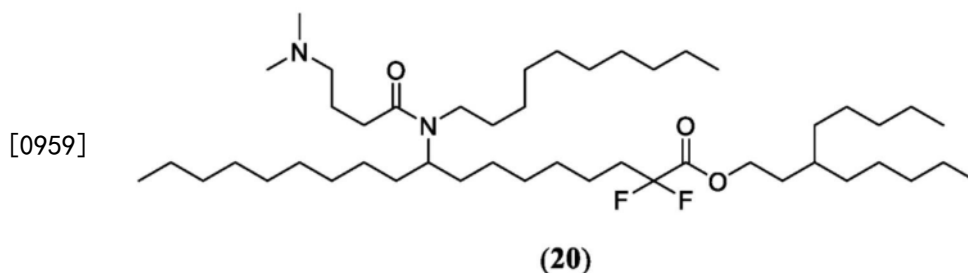


[0955]

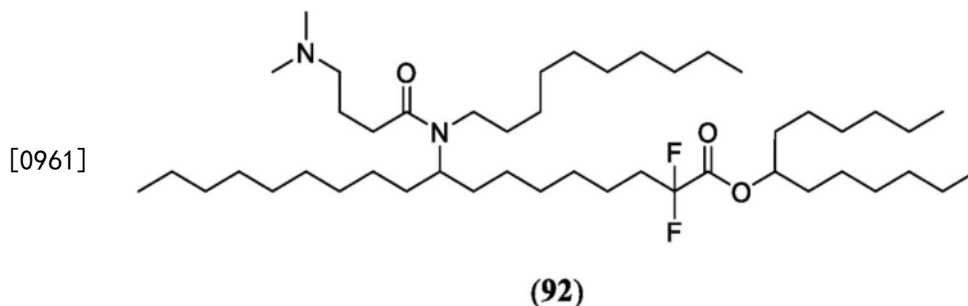
[0956] 9-(N-癸基-4-(二甲基氨基)丁酰胺基)-2,2-二氟十八烷酸3-庚基癸酯(18)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ4.29 (td, J=7.1, 1.9Hz, 2H), 3.71-3.56 (m, 1H), 3.06 (q, J=7.0Hz, 2H), 2.42-2.29 (m, 8H), 2.04 (ddt, J=16.8, 11.4, 5.3Hz, 3H), 1.91 (h, J=7.1Hz, 3H), 1.67 (q, J=6.9Hz, 2H), 1.60-1.39 (m, 9H), 1.29 (d, J=8.3Hz, 53H), 0.90 (td, J=6.7, 3.1Hz, 12H)。



[0958] 9-(N-癸基-4-(二甲基氨基)丁酰胺基)-2,2-二氟十八烷酸十一烷-6-基酯(19)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ3.57 (s, 1H), 3.28 (q, J=7.8Hz, 2H), 3.06 (dd, J=11.9, 5.3Hz, 2H), 2.94 (d, J=2.3Hz, 6H), 2.60 (t, J=5.9Hz, 1H), 2.53 (t, J=5.9Hz, 1H), 2.18-1.75 (m, 11H), 1.70-1.42 (m, 13H), 1.42-1.16 (m, 55H), 0.90 (t, J=6.6Hz, 12H)。

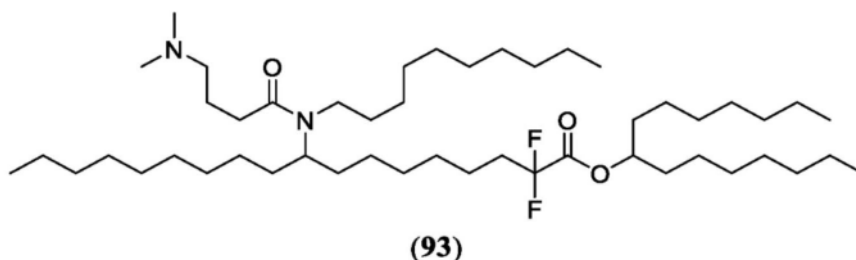


[0960] 9-(N-癸基-4-(二甲基氨基)丁酰胺基)-2,2-二氟十八烷酸3-戊基辛酯(20)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ4.29 (td, J=7.1, 1.9Hz, 2H), 3.71-3.60 (m, 1H), 3.06 (q, J=7.4Hz, 2H), 2.35 (tdd, J=6.6, 4.2, 2.4Hz, 4H), 2.26 (s, 6H), 2.13-1.96 (m, 3H), 1.85 (h, J=7.4Hz, 2H), 1.68 (q, J=6.8Hz, 2H), 1.60-1.40 (m, 9H), 1.38-1.19 (m, 49H), 0.94-0.86 (m, 12H)。



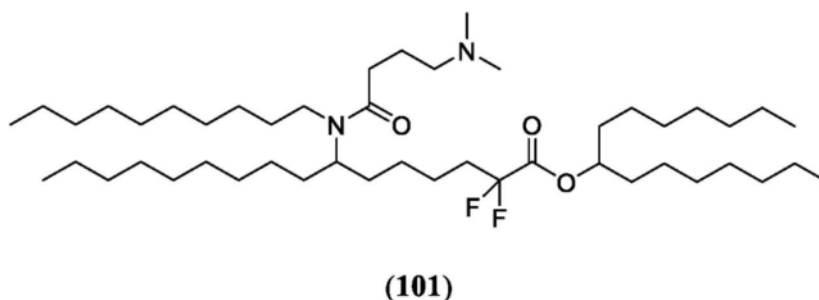
[0962] 9-(N-癸基-4-(二甲基氨基)丁酰胺基)-2,2-二氟十八烷酸十三烷-7-基酯(92)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ5.02 (p, J=6.8Hz, 1H), 3.65 (t, J=7.2Hz, 1H), 3.06 (q, J=7.1Hz, 2H), 2.40-2.31 (m, 4H), 2.29 (s, 6H), 2.16-1.94 (m, 2H), 1.68-1.10 (m, 65H), 0.90 (t, J=6.7Hz, 12H)。

[0963]



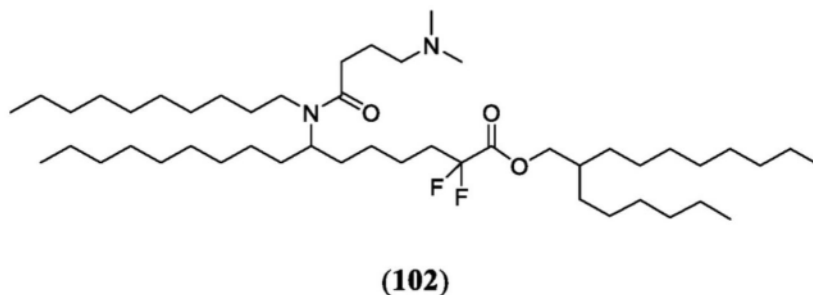
[0964] 9-(N-癸基-4-(二甲基氨基)丁酰胺基)-2,2-二氟十八烷酸十五烷-8-基酯 (93)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 5.09-4.94 (m, 1H), 3.65 (t, J=7.2Hz, 1H), 3.06 (q, J=7.0Hz, 2H), 2.37 (dt, J=14.7, 7.7Hz, 4H), 2.30 (s, 6H), 2.20-1.97 (m, 2H), 1.88 (h, J=7.2Hz, 2H), 1.67-1.08 (m, 68H), 0.90 (t, J=6.7Hz, 12H)。

[0965]



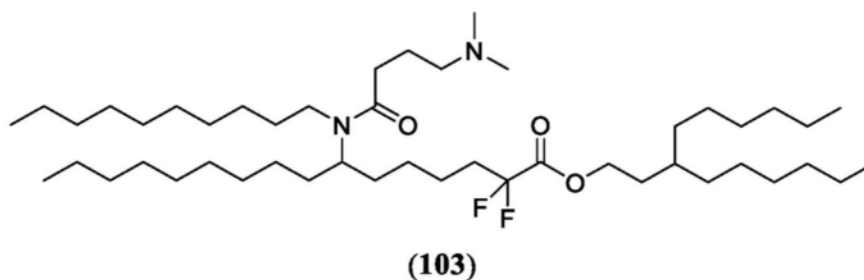
[0966] 7-(N-癸基-4-(二甲基氨基)丁酰胺基)-2,2-二氟十六烷酸十五烷-8-基酯 (101)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 5.01 (q, J=5.8Hz, 1H), 3.78-3.57 (m, 1H), 3.15-2.94 (m, 2H), 2.58-2.17 (m, 10H), 2.04 (tq, J=16.1, 7.6Hz, 2H), 1.88 (h, J=7.5Hz, 2H), 1.73-1.01 (m, 66H), 0.90 (t, J=6.6Hz, 12H)。

[0967]



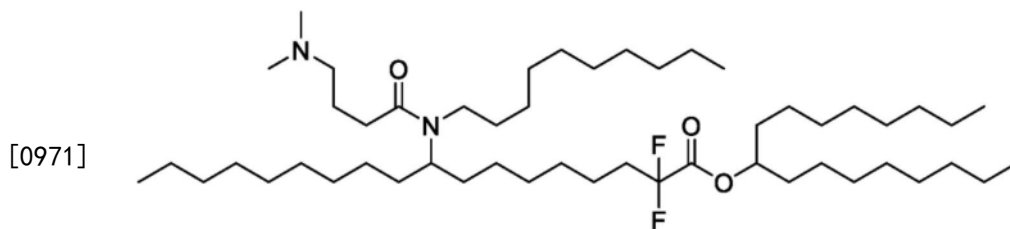
[0968] 7-(N-癸基-4-(二甲基氨基)丁酰胺基)-2,2-二氟十六烷酸2-己基癸酯 (102)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 4.18 (dd, J=5.7, 3.2Hz, 2H), 3.71-3.61 (m, 0H), 3.05 (dd, J=10.6, 6.2Hz, 2H), 2.59-2.27 (m, 9H), 2.06 (dp, J=16.6, 8.1Hz, 1H), 1.92 (q, J=7.2Hz, 2H), 1.73 (s, 1H), 1.59-1.40 (m, 8H), 1.29 (dt, J=10.2, 6.3Hz, 53H), 0.90 (td, J=6.7, 2.7Hz, 12H)。

[0969]



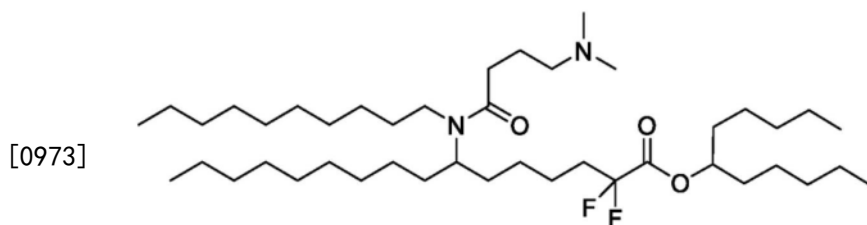
[0970] 7-(N-癸基-4-(二甲基氨基)丁酰胺基)-2,2-二氟十六烷酸3-己基壬酯 (103)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 4.29 (td, J=7.1, 2.9Hz, 2H), 3.65 (d, J=8.4Hz, 1H), 3.05 (dd, J=

10.5, 6.2Hz, 2H), 2.49 (s, 2H), 2.45-2.31 (m, 7H), 2.04 (tt, J=16.5, 8.2Hz, 2H), 1.91 (p, J=7.0Hz, 2H), 1.72-1.62 (m, 2H), 1.59-1.40 (m, 13H), 1.29 (d, J=8.3Hz, 53H), 0.90 (td, J=6.8, 3.0Hz, 12H)。



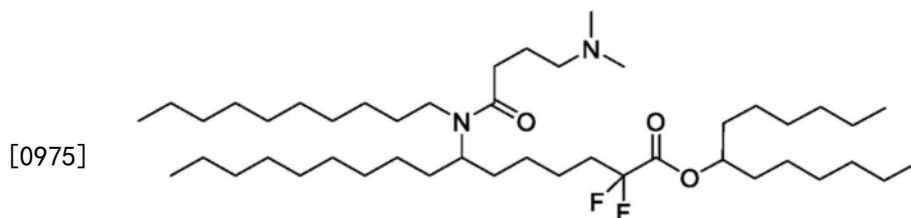
(104)

[0972] 9-(N-癸基-4-(二甲基氨基)丁酰胺基)-2,2-二氟十八烷酸十七烷-9-基酯 (104)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 5.06-4.96 (m, 1H), 3.74-3.50 (m, 1H), 3.06 (q, J=7.1Hz, 2H), 2.64-2.26 (m, 9H), 2.14-1.89 (m, 4H), 1.73-1.12 (m, 71H), 0.90 (t, J=6.8Hz, 12H)。



(108)

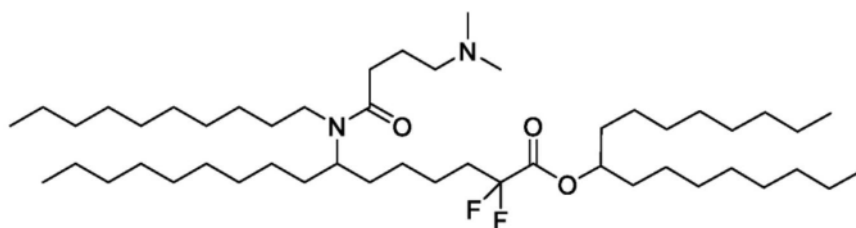
[0974] 7-(N-癸基-4-(二甲基氨基)丁酰胺基)-2,2-二氟十六烷酸十一烷-6-基酯 (108)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 5.01 (d, J=8.0Hz, 1H), 3.67 (s, 0H), 3.05 (d, J=10.4Hz, 2H), 2.35 (q, J=7.7Hz, 4H), 2.27 (s, 6H), 2.05 (dt, J=16.2, 8.2Hz, 2H), 1.86 (h, J=7.7Hz, 2H), 1.67-1.42 (m, 8H), 1.40-1.24 (m, 41H), 0.94-0.86 (m, 12H)。



(109)

[0976] 7-(N-癸基-4-(二甲基氨基)丁酰胺基)-2,2-二氟十六烷酸十三烷-7-基酯 (107)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 5.14-4.93 (m, 1H), 3.05 (dd, J=11.0, 6.0Hz, 2H), 2.35 (q, J=7.4Hz, 3H), 2.27 (s, 5H), 2.03 (tt, J=16.2, 8.2Hz, 2H), 1.87 (h, J=7.5Hz, 2H), 1.74-1.41 (m, 10H), 1.34-1.21 (m, 47H), 0.90 (t, J=6.6Hz, 12H)。

[0977]

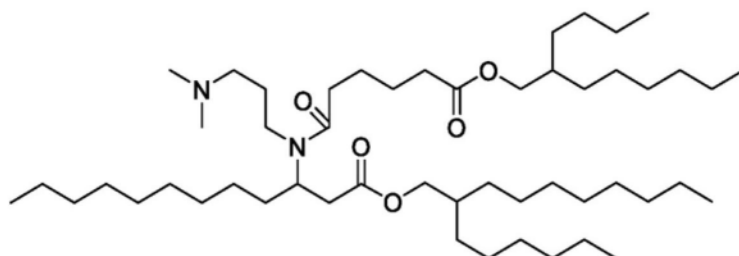


(110)

[0978] 7-(N-癸基-4-(二甲基氨基)丁酰胺基)-2,2-二氟十六烷酸十七烷-9-基酯 (110)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 5.01 (d, J=7.4Hz, 1H), 3.05 (dd, J=10.9, 6.1Hz, 2H), 2.52 (s, 2H), 2.39 (d, J=6.2Hz, 7H), 2.15-1.87 (m, 3H), 1.73-1.40 (m, 10H), 1.29 (d, J=8.5Hz, 54H), 0.90 (t, J=6.7Hz, 12H)。

[0979] 实施例3.3- {6-[(2-丁基辛基) 氧基]-N-[3-(二甲基氨基) 丙基]-6-氧代己酰胺基} 十二烷酸2-己基癸酯 (21) 的合成

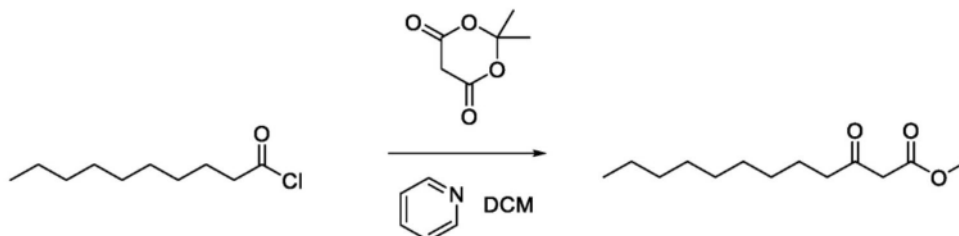
[0980]



(21)

[0981] 步骤1.3-氧代十二烷酸甲酯的合成

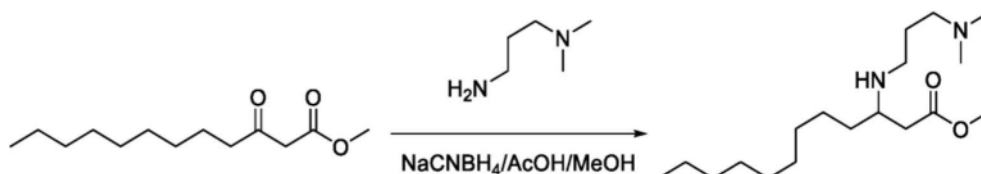
[0982]



[0983] 将米氏酸 (15g, 104mmol) 和吡啶 (16.5g, 208mmol) 在0℃下在DCM (250mL) 中搅拌。逐滴添加癸酰氯 (21.6mL, 104mmol) 并将反应物搅拌16hr, 使其升温至RT。将反应物用1M HCl洗涤, 干燥 (MgSO₄), 过滤并在真空中浓缩。将残余物在MeOH (200mL) 中回流3.5hr, 然后在真空中浓缩。将残余物通过自动快速色谱 (2%-20% EtOAc-己烷) 纯化, 得到3-氧代十二烷酸甲酯 (17.7g, 74.4%)。

[0984] 步骤2.3- {[3-(二甲基氨基) 丙基] 氨基} 十二烷酸酯的合成

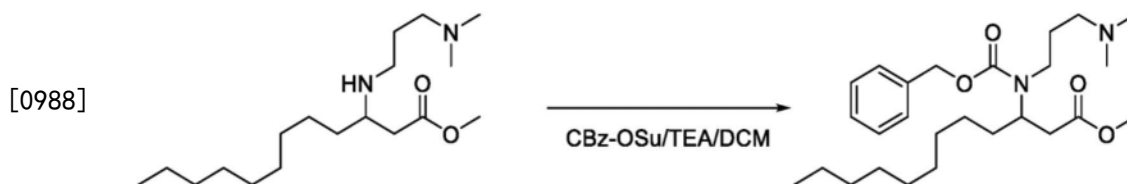
[0985]



[0986] 将3-氧代十二烷酸甲酯 (7.92g, 34.7mmol)、DMAP (4.08g, 40.0mmol) 和AcOH (7.9mL, 139mmol) 在MeOH (285mL) 中在回流下加热1hr, 然后冷却至0℃并用NaCNBH₃ (4.9g, 69mmol) 分批处理。将反应物在RT下搅拌40hr, 在真空中部分浓缩, 将残余物溶解于EtOAc中

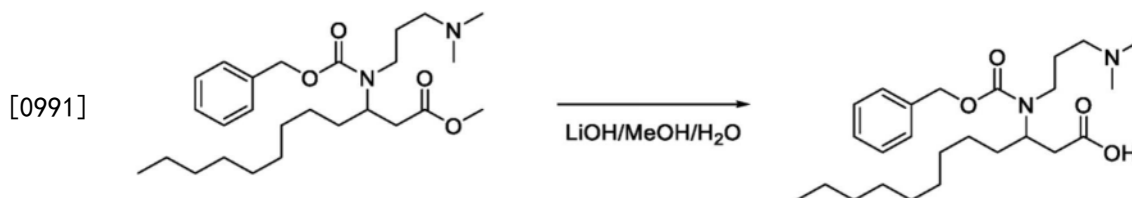
并依次用 NaHCO_3 (饱和溶液) 和盐水洗涤, 干燥 (MgSO_4), 过滤并在真空中浓缩。将粗物质通过自动快速色谱 (0% - 12% MeOH-DCM) 纯化, 得到3- {[3- (二甲基氨基) 丙基] 氨基} 十二烷酸酯 (1.9g, 17.4%)。

[0987] 步骤3.3- {[(苄氧基) 羰基] [3- (二甲基氨基) -丙基] 氨基} 十二烷酸甲酯的合成



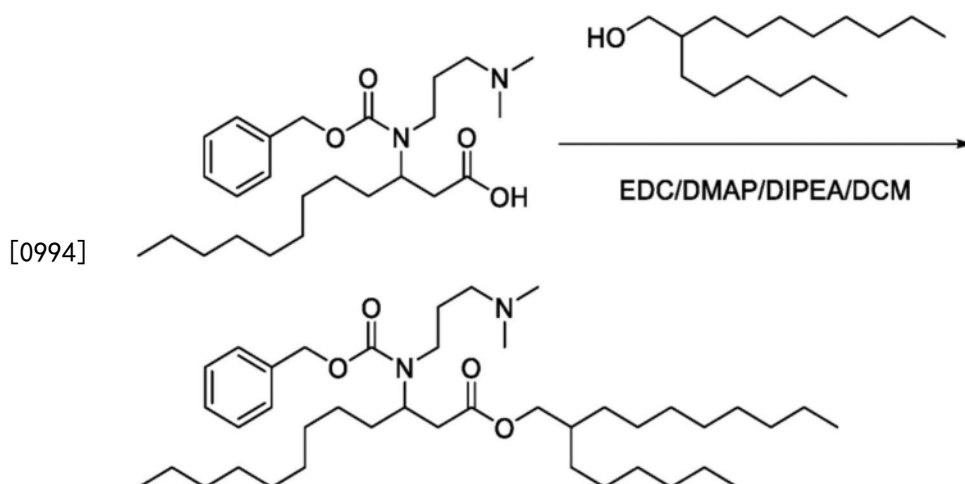
[0989] 将3- {[3- (二甲基氨基) 丙基] 氨基} 十二烷酸甲酯 (1.2g, 3.8mmol)、CBz-OSu (1.0g, 4.2mmol) 和TEA (0.8mL, 5.7mmol) 在DCM (35mL) 中在RT下搅拌18hr。将有机物用 NaHCO_3 (饱和溶液) 和盐水洗涤, 干燥 (MgSO_4), 过滤并在真空中浓缩。将粗物质通过自动快速色谱 (50:50EtOAc/Hex) 纯化, 得到3- {[(苄氧基) 羰基] [3- (二甲基氨基) 丙基] 氨基} 十二烷酸甲酯 (1.6g, 93.5%)。

[0990] 步骤4.3- (((苄氧基) 羰基) (3- (二甲基氨基) 丙基) 氨基) 十二烷酸的合成



[0992] 将3- {[(苄氧基) 羰基] [3- (二甲基氨基) 丙基] 氨基} 十二烷酸甲酯 (1.68g, 3.7mmol) 和LiOH (0.18g, 7.5mmol) 在MeOH/H₂O (20:3) 中在50℃下加热18hr。将反应物冷却至RT, 用1M HCl (1.3mL) 淬灭并在真空中浓缩。将残余物溶解于DCM中, 用盐水洗涤, 干燥 (MgSO_4), 过滤并在真空中浓缩, 得到3- (((苄氧基) 羰基) (3- (二甲基氨基) 丙基) 氨基) 十二烷酸, 其不经纯化即使用。

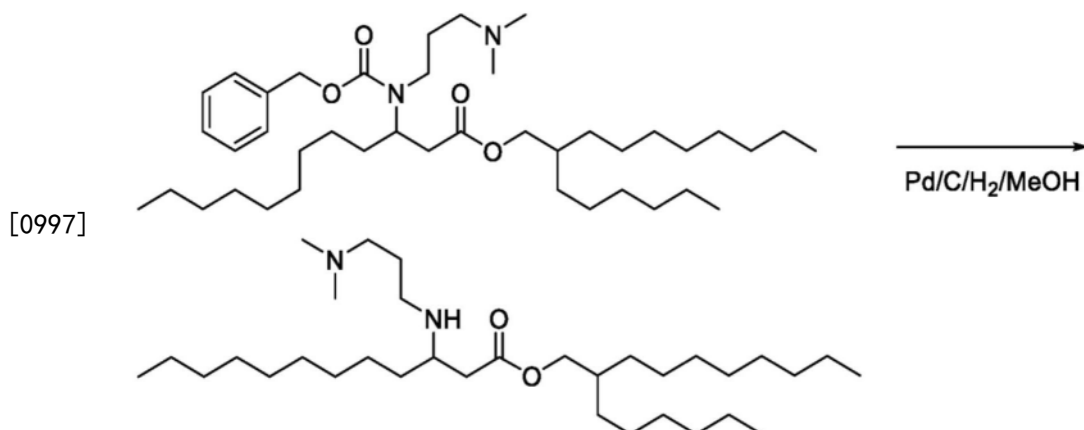
[0993] 步骤5.3- {[(苄氧基) 羰基] [3- (二甲基氨基) -丙基] 氨基} 十二烷酸2-己基癸酯的合成



[0995] 将3- {[(苄氧基) 羰基] [3- (二甲基氨基) 丙基] 氨基} 十二烷酸 (1.2g, 2.8mmol)、己基癸醇 (0.72g, 3.0mmol)、EDC (1.04g, 5.4mmol)、DIPEA (1.4mL, 8.1mmol) 和DMAP (催化量) 在DCM (30mL) 中在RT下搅拌18hr。将反应物用 NaHCO_3 (饱和溶液) 和盐水洗涤, 干燥 (MgSO_4), 过

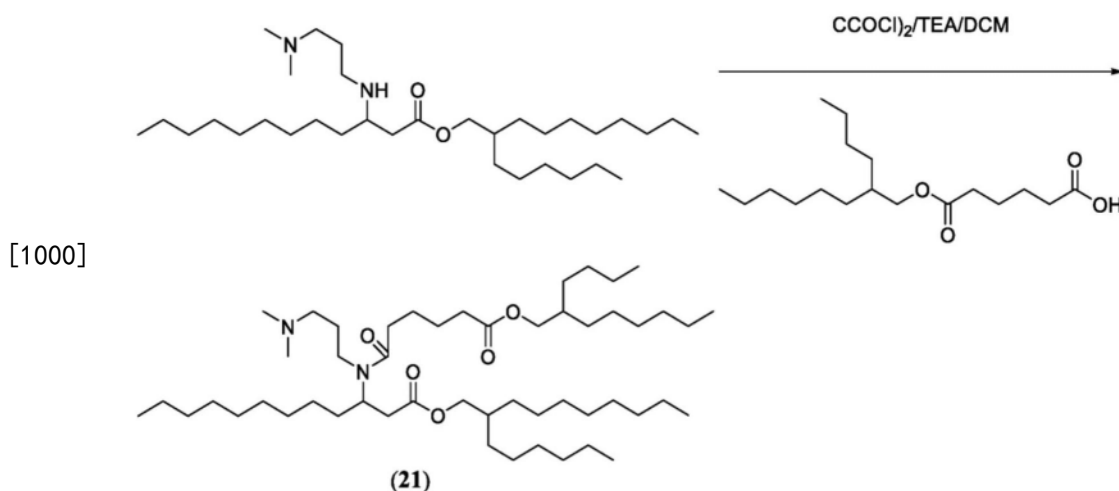
滤并在真空中浓缩。将粗物质通过自动快速色谱纯化,得到3-{[(苄氧基)羰基][3-(二甲基氨基)丙基]氨基}十二烷酸2-己基癸酯(827mg,46.2%)。

[0996] 步骤6.3-{[3-(二甲基氨基)丙基]氨基}十二烷酸2-己基癸酯的合成



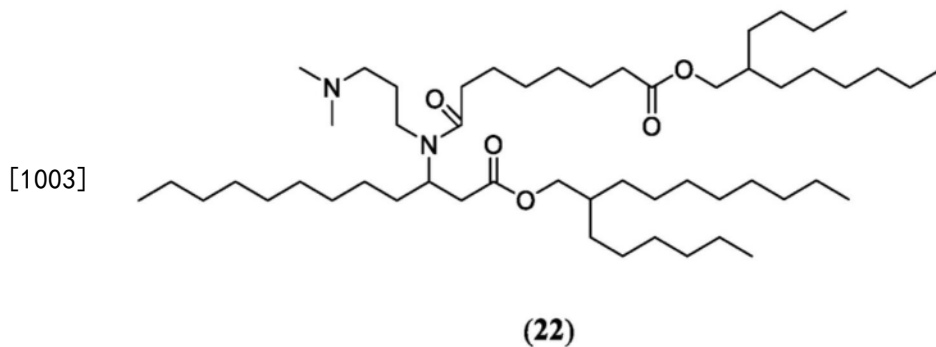
[0998] 将3-{[(苄氧基)羰基][3-(二甲基氨基)丙基]氨基}十二烷酸2-己基癸酯(874mg,1.3mmol)在MeOH(5mL)中经10% Pd/C催化氢化18hr。将反应物通过硅藻土过滤,在真空中浓缩,并将粗物质通过自动快速色谱(0%-15% MeOH/DCM)纯化,得到3-{[3-(二甲基氨基)丙基]氨基}十二烷酸2-己基癸酯(294mg,42.2%)。

[0999] 步骤7.3-{6-[(2-丁基辛基)氧基]-N-[3-(二甲基氨基)丙基]-6-氧代己酰胺基}十二烷酸2-己基癸酯(21)的合成



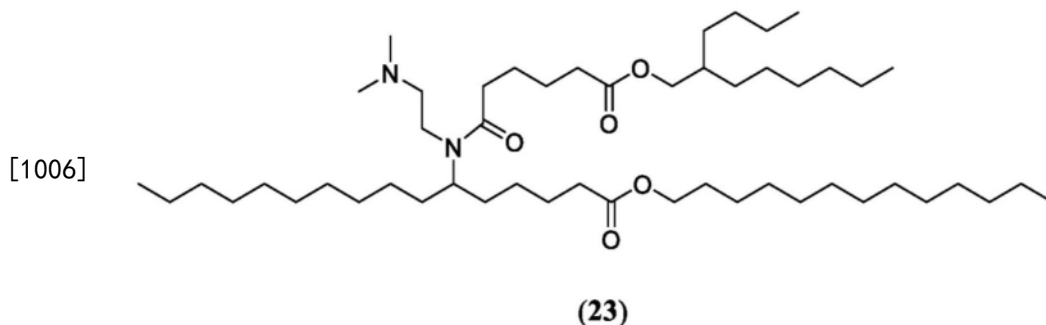
[1001] 将6-[(2-丁基辛基)氧基]-6-氧代己酸(252mg,0.8mmol)和草酰氯(0.20g,1.7mmol)在RT下搅拌3hr。将反应物在真空中浓缩并将残余物重新溶解于DCM(5mL)中。将酰氯中间体添加至DCM(5mL)中的3-{[3-(二甲基氨基)丙基]氨基}十二烷酸2-己基癸酯(295mg,0.6mmol)和TEA(0.14ml,1.6mmol)中,并在RT下搅拌2hr。将反应物用DCM稀释,用NaHCO₃(饱和溶液)和盐水洗涤,干燥(MgSO₄),过滤并在真空中浓缩。将粗物质通过自动快速色谱(0%-10%MeOH/DCM)纯化,得到3-{6-[(2-丁基辛基)氧基]-N-[3-(二甲基氨基)丙基]-6-氧代己酰胺基}十二烷酸2-己基癸酯(21)(231mg,50.%)。¹H NMR(400MHz,CDCl₃) δ 4.23(s,1H),3.95(q,J=5.3Hz,4H),3.22(q,J=8.2Hz,2H),3.04(s,1H),2.52(td,J=15.1,6.8Hz,2H),2.40-2.23(m,6H),2.21(s,6H),1.79-1.55(m,11H),1.25(q,J=4.8Hz,53H),0.88(td,J=6.7,3.9Hz,15H)。

[1002] 使用如上所述的类似方法制备以下化合物。

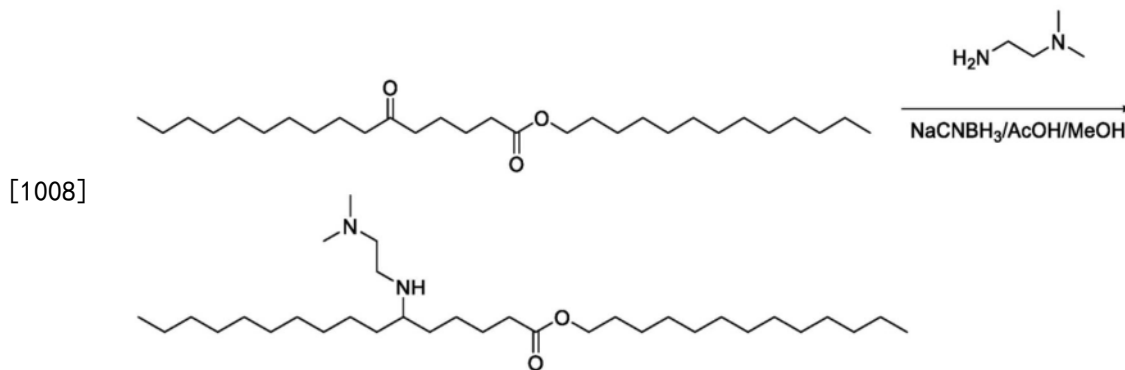


[1004] 3-(8-((2-丁基辛基)氧基)-N-(3-(二甲基氨基)丙基)-8-氧代辛酰胺基)-十二烷酸2-己基癸酯(22)。¹H NMR(400MHz,CDCl₃) δ4.27(s,1H),3.97(t,J=6.4Hz,4H),3.24(dq,J=12.2,6.8Hz,2H),3.07(d,J=4.7Hz,1H),2.62-2.45(m,2H),2.36-2.25(m,5H),2.24(s,6H),1.71-1.59(m,8H),1.29(q,J=4.6Hz,57H),0.91(td,J=6.7,3.9Hz,15H)。

[1005] 实施例4.6-{6-[(2-丁基辛基)氧基]-N-[2-(二甲基氨基)乙基]-6-氧代己酰胺基}十六烷酸十三烷基酯(23)的合成

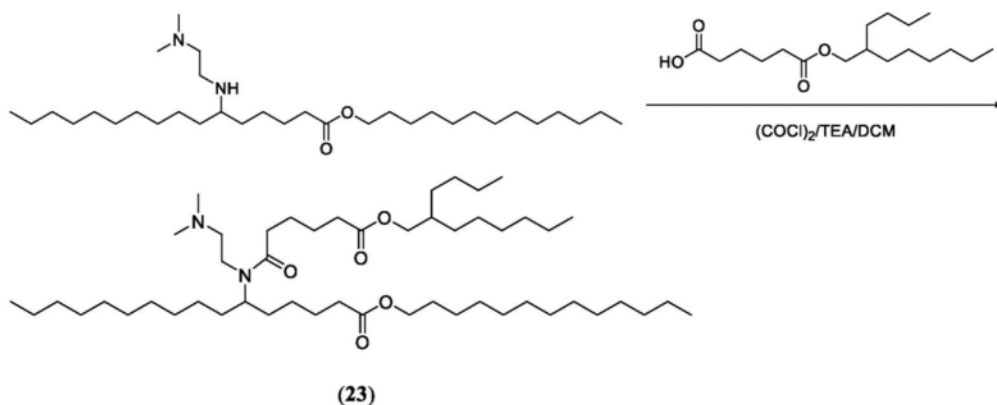


[1007] 步骤1.6-{[2-(二甲基氨基)乙基]氨基}十六烷酸十三烷基酯的合成



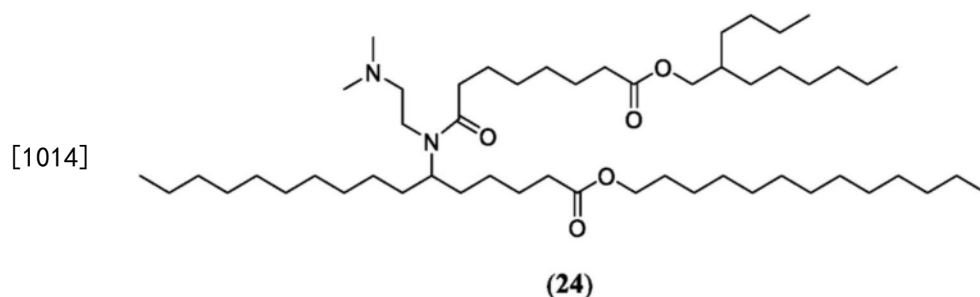
[1009] 将6-氧代十六烷酸十三烷基酯(377mg,0.83mmol)、1,1-二甲基乙二胺(81mg,0.92mmol)、AcOH(0.1mL,1.7mmol)和NaCNBH₃(157mg,2.5mmol)在MeOH中在50℃下搅拌2hr。将反应物从加热中移除并继续搅拌另外30hr。将反应物在真空中部分浓缩,然后溶解于DCM中,洗涤(NaHCO₃和盐水),干燥(MgSO₄),过滤并在真空中浓缩。将粗物质通过自动快速色谱(0%-15% MeOH-DCM)纯化,得到6-{[2-(二甲基氨基)乙基]氨基}十六烷酸十三烷基酯(201mg,46.0%)。

[1010] 步骤2.6-{6-[(2-丁基辛基)氧基]-N-[2-(二甲基氨基)乙基]-6-氧代己酰胺基}十六烷酸酯(23)的合成

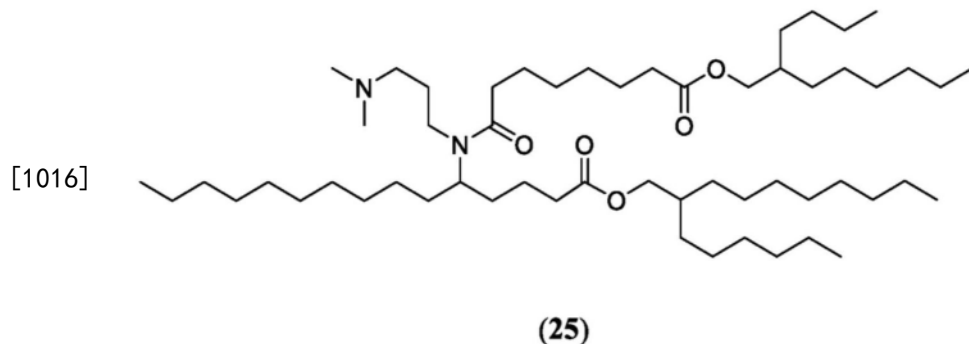


[1012] 将6-[(2-丁基辛基)氧基]-6-氧代己酸(0.2g,0.64mmol)和草酰氯(0.15mL,1.74mmol)在含有DMF(1滴)的DCM(10mL)中在RT下搅拌3hr。将反应物在真空中浓缩,将残余物溶解于DCM(5mL)中并添加至DCM(10mL)中的6-[[2-(二甲基氨基)乙基]氨基]十六烷酸十三烷基酯(303mg,0.6mmol)和TEA(0.32mL,2.3mmol)中。在RT下搅拌1hr后,将反应物用DCM稀释,洗涤(NaHCO_3 (饱和水溶液)和盐水),干燥(MgSO_4),过滤并在真空中浓缩。将粗物质通过自动快速色谱(0%-12% MeOH-DCM)纯化,得到6-{6-[(2-丁基辛基)氧基]-N-[2-(二甲基氨基)乙基]-6-氧代己酰胺基}十六烷酸十三烷基酯(23)(113mg,23.8%)。 ^1H NMR(400MHz, CDCl_3) δ 4.07(td,J=6.8,4.4Hz,2H),3.99(d,J=5.8Hz,2H),3.31(d,J=8.4Hz,1H),2.58(s,1H),2.47-2.25(m,12H),1.74-1.58(m,9H),1.49(td,J=11.9,7.6Hz,4H),1.39-1.16(m,52H),0.91(m,12H)。

[1013] 使用如上所述的类似方法制备以下化合物。

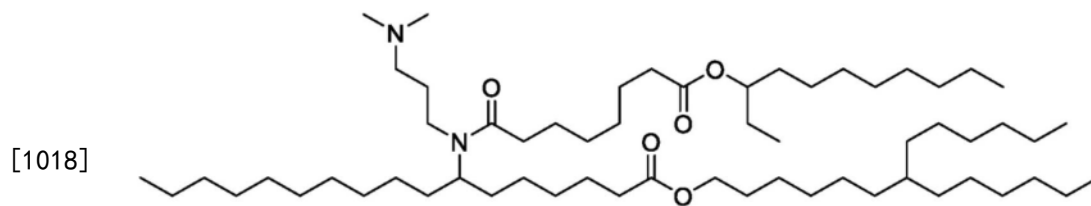


[1015] 6-(8-((2-丁基辛基)氧基)-N-(2-(二甲基氨基)乙基)-8-氧代辛酰胺基)-十六烷酸十三烷基酯(24)。 ^1H NMR(400MHz, CDCl_3) δ 4.07(td,J=6.8,4.4Hz,2H),3.99(d,J=5.8Hz,2H),3.31(d,J=8.4Hz,1H),2.58(s,1H),2.47-2.25(m,12H),1.74-1.58(m,9H),1.49(td,J=11.9,7.6Hz,4H),1.39-1.16(m,52H),0.91(m,12H)。



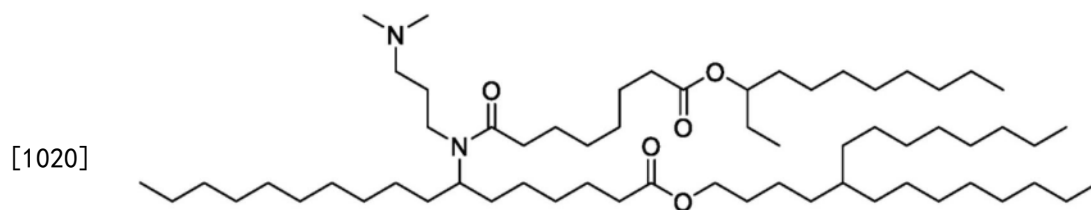
[1017] 5-(8-((2-丁基辛基)氧基)-N-(3-(二甲基氨基)丙基)-8-氧代辛酰胺基)-十五烷

酸2-己基癸酯 (25)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ3.99 (dd, J=5.8, 2.1Hz, 4H), 3.14 (dd, J=11.0, 5.8Hz, 2H), 2.44-2.22 (m, 13H), 1.71-1.60 (m, 7H), 1.48 (s, 6H), 1.40-1.16 (m, 60H), 0.91 (td, J=6.7, 4.0Hz, 15H)。



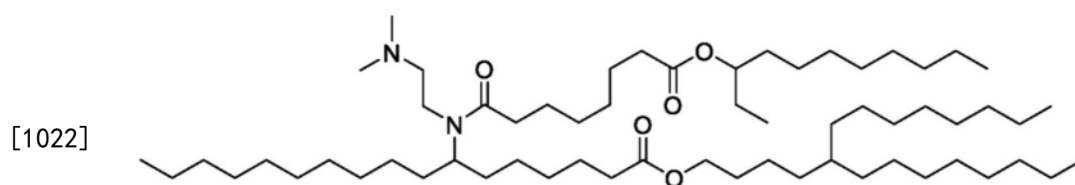
(26)

[1019] 7-(N-(3-(二甲基氨基)丙基)-8-氧代-8-(十一烷-3-基氧基)辛酰胺基)-十七烷酸7-己基十三烷基酯 (26)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ4.12-4.02 (m, 3H), 2.46-2.15 (m, 14H), 1.59 (dt, J=34.1, 5.6Hz, 28H), 1.42-1.16 (m, 58H), 0.98-0.79 (m, 15H)。



(27)

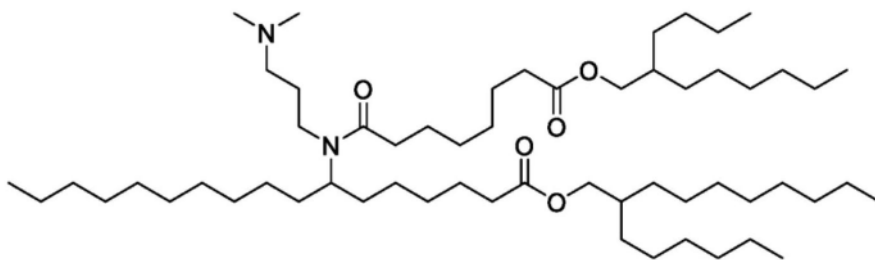
[1021] 7-(N-(3-(二甲基氨基)丙基)-8-氧代-8-(十一烷-3-基氧基)辛酰胺基)-十七烷酸5-辛基十三烷基酯 (27)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ3.69-3.63 (m, 1H), 3.36-3.29 (m, 2H), 2.36-2.27 (m, 2H), 2.15-1.96 (m, 14H), 1.85-1.48 (m, 44H), 1.46-1.16 (m, 44H), 0.89 (t, J=6.7Hz, 15H)。



(28)

[1023] 7-(N-(2-(二甲基氨基)乙基)-8-氧代-8-(十一烷-3-基氧基)辛酰胺基)-十七烷酸5-辛基十三烷基酯 (28)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ3.69-3.63 (m, 1H), 3.35-3.28 (m, 2H), 2.18-1.93 (m, 15H), 1.89-1.82 (m, 2H), 1.71-1.55 (m, 41H), 1.43-1.19 (m, 44H), 0.89 (t, J=6.7Hz, 15H)。

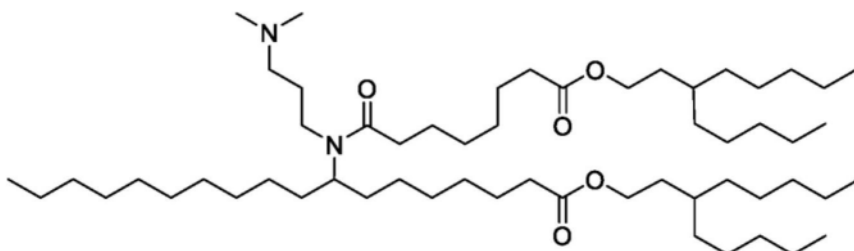
[1024]



(29)

[1025] 7-(8-((2-丁基辛基)氧基)-N-(3-(二甲基氨基)丙基)-8-氧代辛酰胺基)-十七烷酸2-己基癸酯 (29)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ4.03-3.94 (m, 4H), 3.67-3.61 (m, 1H), 3.18-3.09 (m, 2H), 2.42-2.12 (m, 12H), 1.81-1.41 (m, 24H), 1.41-1.03 (m, 56H), 0.90 (t, J=3.2Hz, 15H)。

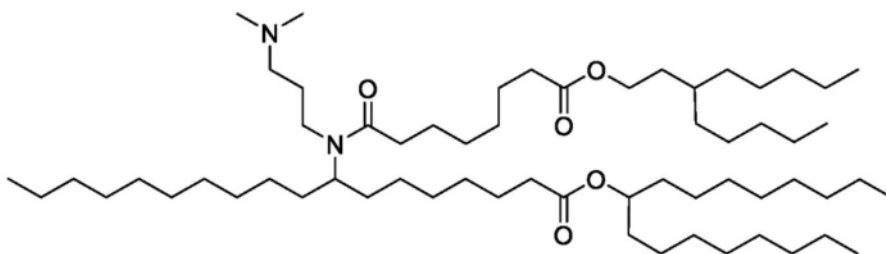
[1026]



(30)

[1027] 8-(N-(3-(二甲基氨基)丙基)-8-氧代-8-((3-戊基辛基)氧基)-辛酰胺基)十八碳烯酸3-戊基辛酯 (30)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ4.14-4.07 (m, 4H), 3.67-3.61 (m, 1H), 3.19-3.11 (m, 2H), 2.36-2.21 (m, 10H), 1.72-1.53 (m, 22H), 1.53-1.39 (m, 6H), 1.39-1.18 (m, 52H), 0.97-0.84 (m, 15H)。

[1028]

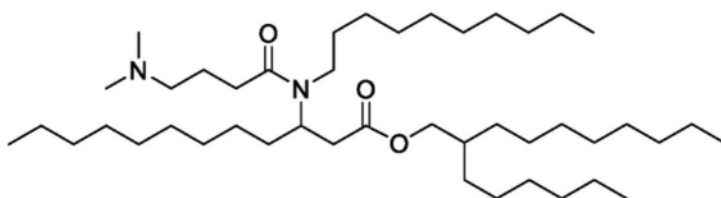


(31)

[1029] 8-(N-(3-(二甲基氨基)丙基)-8-氧代-8-((3-戊基辛基)氧基)-辛酰胺基)十八碳烯酸十七烷-9-基酯 (31)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ4.91-4.85 (m, 1H), 4.10 (t, J=7.1Hz, 2H), 2.42-2.19 (m, 12H), 2.04-1.83 (m, 12H), 1.77-1.46 (m, 18H), 1.39-1.13 (m, 60H), 0.96-0.82 (m, 15H)。

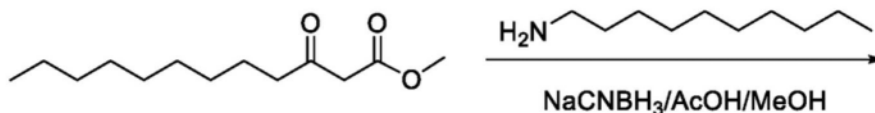
[1030] 实施例5.3-[N-癸基-4-(二甲基氨基)-丁酰胺基]十二烷酸2-己基癸酯 (32) 的合成

[1031]

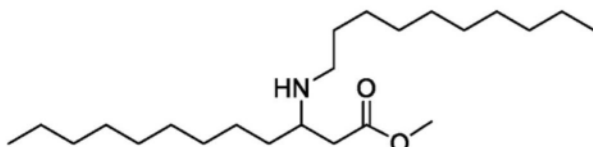


(32)

[1032] 步骤1.3-(癸基氨基)十二烷酸甲酯的合成

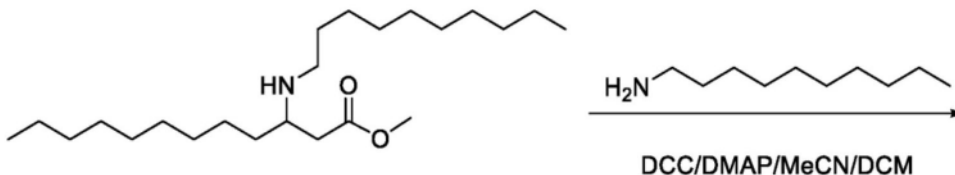


[1033]

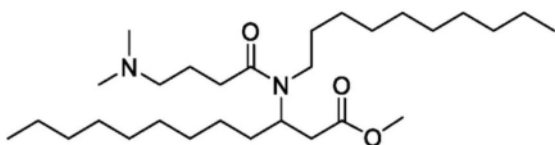


[1034] 将3-氧代十二烷酸甲酯(1g, 4.4mmol)、N-癸胺(723mg, 5.0mmol)、NaCNBH₃(826mg, 13.1mmol)和AcOH(0.5mL, 8.8mmol)在甲醇中的MeOH中在50℃下搅拌18hr。将反应物冷却至RT并在真空中部分浓缩。将混合物溶解于DCM中,用NaHCO₃(饱和水溶液)和盐水洗涤,干燥(MgSO₄),过滤并在真空中浓缩。将粗物质通过自动快速色谱(0%-12% MeOH-DCM)纯化,得到3-(癸基氨基)十二烷酸甲酯(560mg, 34.6%)。

[1035] 步骤2.3-[N-癸基-4-(二甲基氨基)丁酰胺基]十二烷酸甲酯的合成



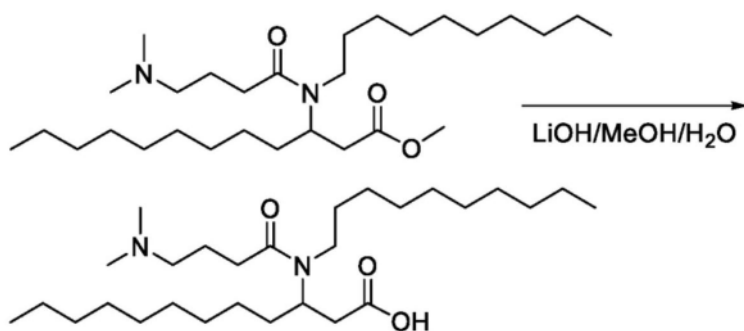
[1036]



[1037] 将4-二甲基氨基]丁酸HCl盐(508mg, 3.03mmol)、DCC(688mg, 3.3mmol)和DMAP(555mg, 4.5mmol)在MeCN(5mL)中在RT下搅拌2hr。添加DCM(5mL)中的3-(癸基氨基)十二烷酸甲酯(560mg, 1.5mmol)并继续搅拌72hr。将反应物通过硅藻土过滤,用DCM冲洗,并将滤液用NaHCO₃(饱和水溶液)和盐水洗涤,干燥(MgSO₄),过滤并在真空中浓缩。将粗物质通过自动快速色谱(0%-10% MeOH-DCM)纯化,得到3-[N-癸基-4-(二甲基氨基)丁酰胺基]十二烷酸甲酯(498mg, 68.1%)。

[1038] 步骤3.3-[N-癸基-4-(二甲基氨基)丁酰胺基]十二烷酸的合成

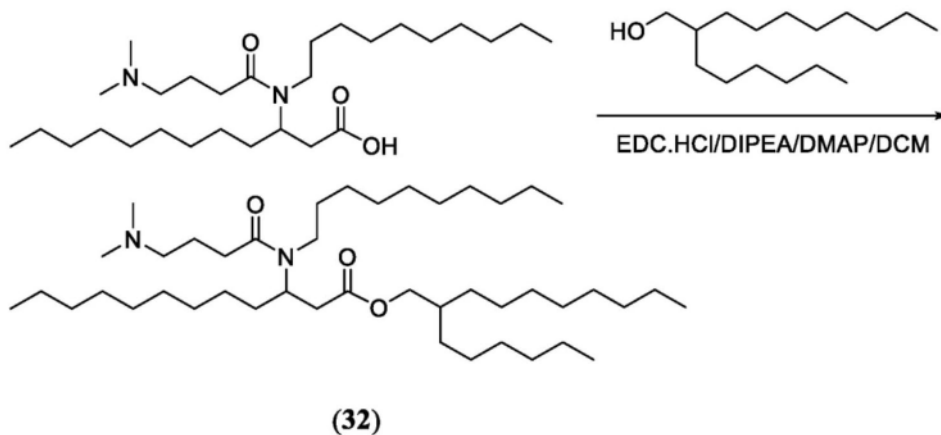
[1039]



[1040] 将3-[N-癸基-4-(二甲基氨基)丁酰胺基]十二烷酸甲酯(498mg, 1.0mmol)和LiOH(49mg, 2.1mmol)在MeOH(3.0mL)和H₂O水(0.5mL)中在50℃下搅拌2hr。将反应物冷却至RT并用6M HCl(0.35mL)淬灭。将反应物在真空中部分浓缩,然后在H₂O水与DCM之间分配。用DCM萃取水层,并将合并的有机物用盐水洗涤,干燥(MgSO₄),过滤并在真空中浓缩,得到3-[N-癸基-4-(二甲基氨基)丁酰胺基]十二烷酸(409mg, 84.6%),其不经进一步纯化即使用。

[1041] 步骤4.3-[N-癸基-4-(二甲基氨基)丁酰胺基]十二烷酸2-己基癸酯(32)的合成

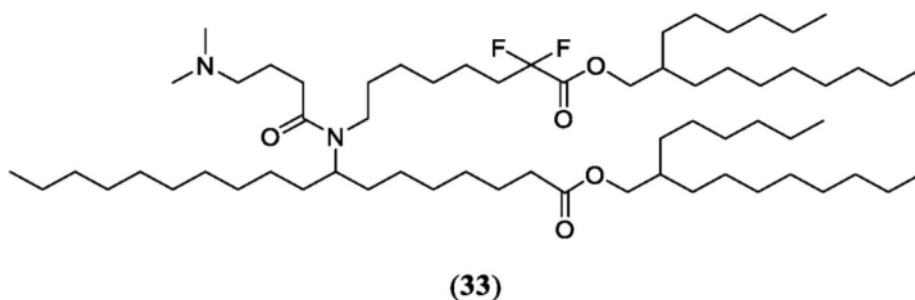
[1042]



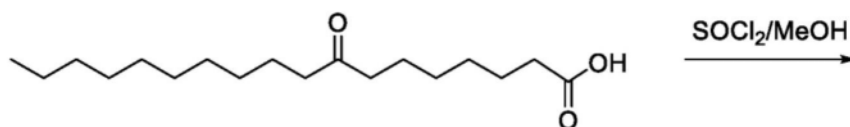
[1043] 将3-[N-癸基-4-(二甲基氨基)丁酰胺基]十二烷酸(369mg, 0.8mmol)、己基癸醇(229mg, 0.95mmol)、EDC(302mg, 1.6mmol)、DIPEA(0.411mL, 2.4mmol)和DMAP(催化量)在DCM(5mL)中在RT下搅拌18hr。将反应物用NaHCO₃(饱和水溶液)和盐水洗涤,干燥(MgSO₄),过滤并在真空中浓缩。将粗物质通过自动快速色谱(0%-12% MeOH-DCM)纯化,得到3-[N-癸基-4-(二甲基氨基)丁酰胺基]十二烷酸2-己基癸酯(32)。(88mg, 16.1%)。¹H NMR(400MHz, CDCl₃) δ4.26(s, 1H), 4.03-3.93(m, 2H), 3.89-3.76(m, 1H), 3.16(ddt, J=15.2, 10.6, 5.7Hz, 1H), 2.98(s, 1H), 2.79-2.22(m, 13H), 1.90(ddd, J=27.0, 14.0, 7.1Hz, 3H), 1.51(dq, J=22.6, 6.4Hz, 5H), 1.28(q, J=4.2Hz, 51H), 0.90(m, 12H)。

[1044] 实施例6.8-(N-{7,7-二氟-8-[(2-己基癸基)氧基]-8-氧代辛基}-4-(二甲基氨基)丁酰胺基)十八碳烯酸2-己基癸酯(33)的合成

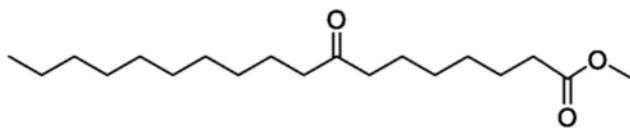
[1045]



[1046] 步骤1.8-氧代十八烷酸甲酯的合成

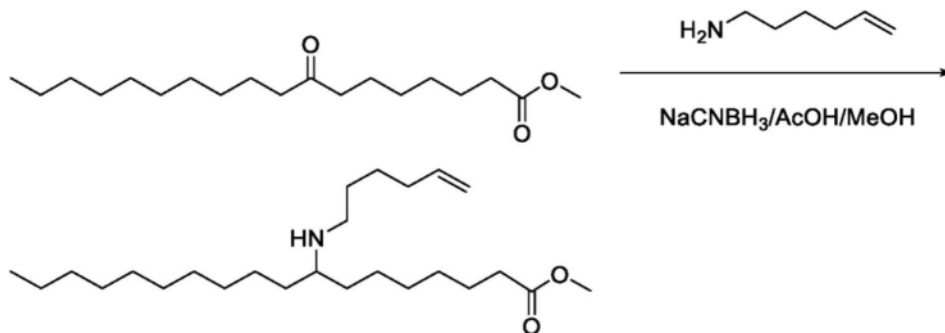


[1047]

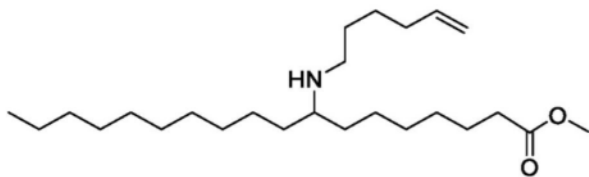


[1048] 将8-氧代十八烷酸 (3.3g, 10.9mmol) 在 0°C 下在MeOH (60mL) 中搅拌。逐滴添加亚硫酸氯 (1.43g, 12.0mmol) 并将反应物搅拌18hr, 使其升温至RT。将反应物在真空中浓缩, 将残余物溶解于己烷中并用 NaHCO_3 (饱和溶液) 和盐水洗涤, 干燥 (MgSO_4), 过滤并在真空中浓缩。将粗物质通过自动快速色谱 (2% - 20% EtOAc-己烷) 纯化, 得到8-氧代十八烷酸甲酯 (3.33g, 97.9%)。

[1049] 步骤2.8-(己-5-烯-1-基氨基)十八碳烯酸甲酯的合成

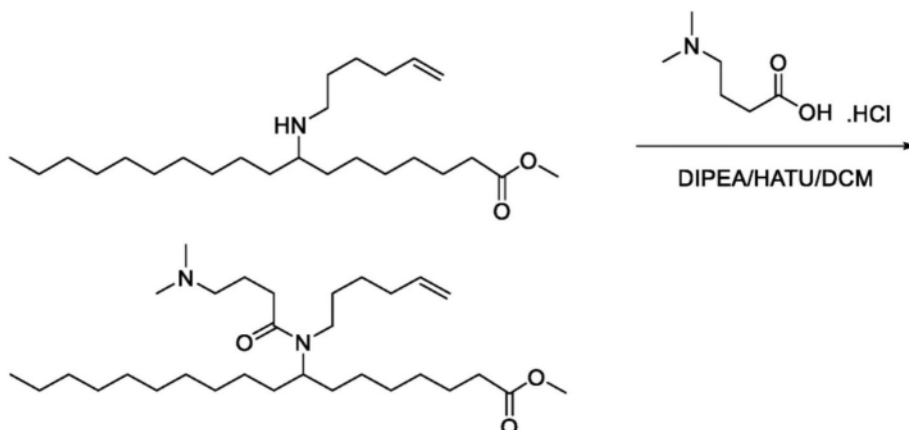


[1050]

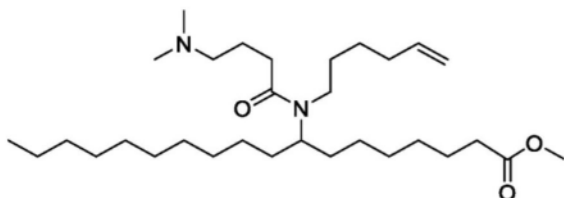


[1051] 将8-氧代十八烷酸甲酯 (2.68g, 8.6mmol)、己-5-烯-1-胺 (0.94g, 9.4mmol)、AcOH (1.0mL, 17.2mmol) 和 NaCNBH_3 (1.62g, 25.7mmol) 在MeOH (32mL) 中在 50°C 下搅拌18hr。将反应物在真空中浓缩, 将残余物溶解于EtOAc中并用 NaHCO_3 (饱和溶液) 和盐水洗涤, 干燥 (MgSO_4), 过滤并浓缩。将粗物质通过自动快速色谱 (0% - 10% MeOH-DCM) 纯化, 得到8-(己-5-烯-1-基氨基)十八烷酸甲酯 (2.1g, 61.9%)。

[1052] 步骤3.8-[4-(二甲基氨基)-N-(己-5-烯-1-基)丁酰胺基]十八碳烯酸酯的合成



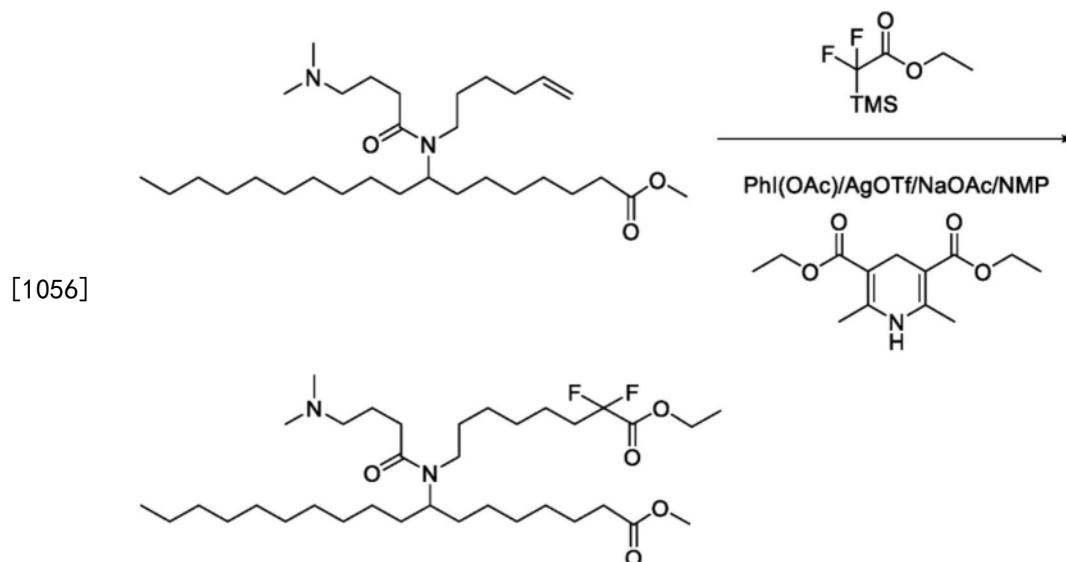
[1053]



[1054] 将4-二甲基氨基丁酸 (HCl盐) (1.8g, 10.6mmol)、HATU (4.0g, 10.6mmol) 和DIPEA (3.7mL, 21.2mmol) 在DCM (50mL) 中在RT下搅拌1hr。添加DCM (5mL) 中的8-(己-5-烯-1-基氨基)十八烷酸甲酯 (2.1g, 5.3mmol) 并将反应物在RT下搅拌18hr。将反应物在真空中浓缩, 将

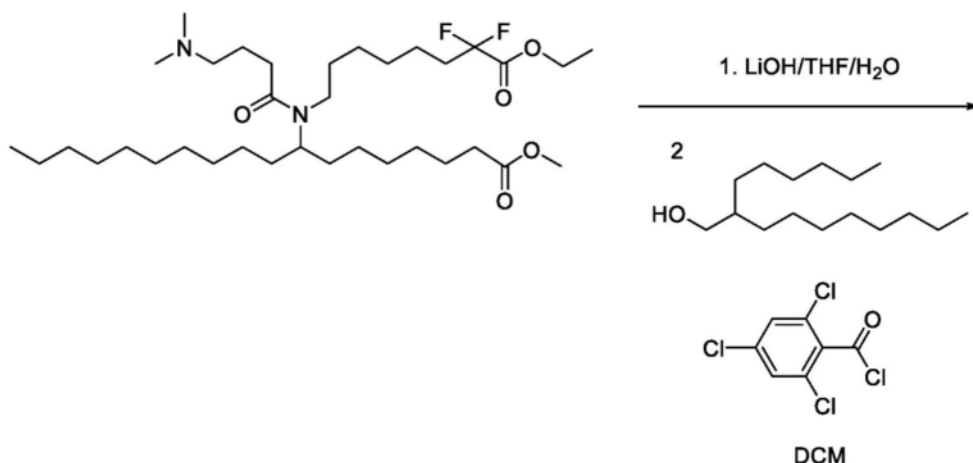
残余物溶解于EtOAc中并用NaHCO₃ (饱和溶液) 和盐水洗涤,干燥 (MgSO₄),过滤并在真空中浓缩。将粗物质通过自动快速色谱 (1% -15% MeOH-DCM) 纯化,得到8-[4-(二甲基氨基)-N-(己-5-烯-1-基)丁酰胺基]十八烷酸甲酯 (2.0g, 74.1%)。

[1055] 步骤4.8-[4-(二甲基氨基)-N-[(5E)-8-乙氧基-7,7-二氟-8-氧代辛-5-烯-1-基]丁酰胺基]十八碳烯酸甲酯的合成

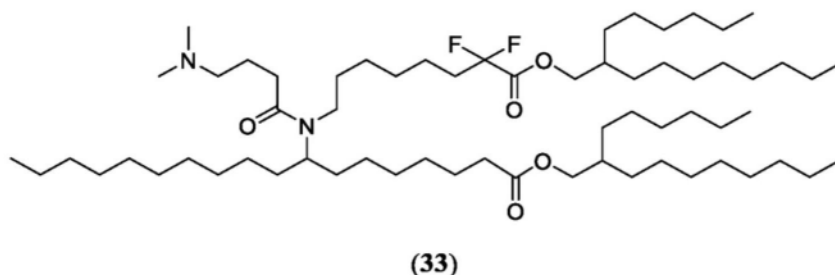


[1057] 在真空、热干燥的烧瓶中,将Hantzsch酯 (1.0g, 3.9mmol)、二乙酸碘苯 (2.5g, 7.9mmol)、NaOAc (1.0g, 11.8mmol) 和AgOTf (2.5g, 9.8mmol) 用氮气吹扫并溶解于NMP (40mL) 中。添加8-[4-(二甲基氨基)-N-(己-5-烯-1-基)丁酰胺基]十八烷酸甲酯 (2g, 3.9mmol) 和 2,2-二氟-2-(三甲基甲硅烷基)乙酸乙酯 (3.6g, 20.0mmol), 并将反应物在RT下搅拌18hr。将反应物通过硅藻土过滤,将滤液用水和盐水洗涤,干燥 (MgSO₄),过滤并在真空中浓缩。将粗物质通过自动快速色谱 (0% -10% MeOH-DCM) 纯化,得到8-[4-(二甲基氨基)-N-[(5E)-8-乙氧基-7,7-二氟-8-氧代辛-5-烯-1-基]丁酰胺基]十八烷酸甲酯 (2.21g, 66.8%)。

[1058] 步骤5.8-(N-{7,7-二氟-8-[(2-己基癸基)氧基]-8-氧代辛基}-4-(二甲基氨基)丁酰胺基)十八碳烯酸2-己基癸酯 (33) 的合成。



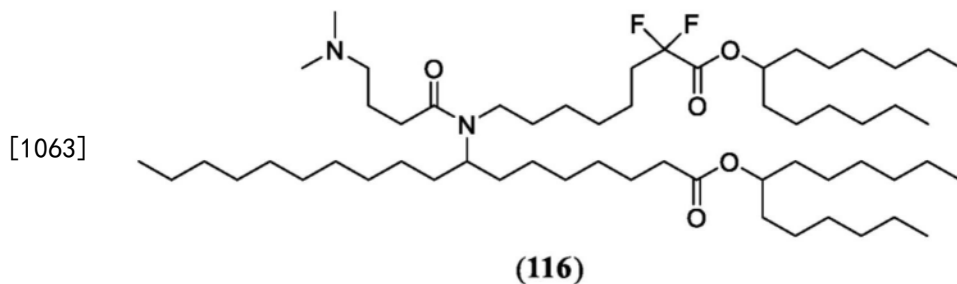
[1059]



[1060] 将8-[4-(二甲基氨基)-N-(8-乙氧基-7,7-二氟-8-氧代辛基)丁酰胺基]-十八烷酸甲酯(2.21g, 3.9mmol)和LiOH(335mg, 14.0mmol)在THF(22mL)和H₂O(6.6mL)中在50℃下搅拌2hr。将反应物用6M HCl(11.6mL)淬灭并在真空中部分浓缩。将水层用HCl(1M)稀释并用DCM萃取。将合并的有机物用盐水洗涤,干燥(MgSO₄),过滤并在真空中浓缩,与甲苯共沸。

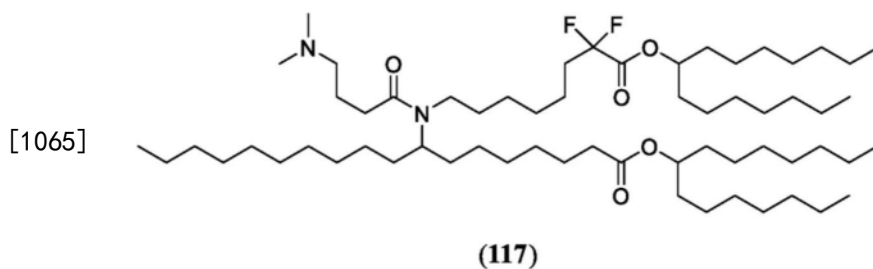
[1061] 将双酸和2-己基癸-1-醇(1.8g, 7.3mmol)溶解于DCM(22mL)中,并且添加2,4,6三氯苯甲酰氯(1.87g, 7.76mmol)和DMAP(1.71g, 14.0mmol)。将反应物在RT下搅拌18hr,在真空中浓缩并将残余物溶解于EtOAc中。将有机物用NaHCO₃(饱和溶液)和盐水洗涤,干燥(MgSO₄),过滤并在真空中浓缩。将粗物质通过快速色谱(0%-12%MeOH-DCM)纯化,得到8-(N-{7,7-二氟-8-[(2-己基癸基)氧基]-8-氧代辛基}-4-(二甲基氨基)丁酰胺基)十八碳烯酸2-己基癸酯(33)(615mg, 16.9%)。¹H NMR(400MHz, CDCl₃) δ4.18(dd, J=5.8, 4.0Hz, 2H), 3.98(dd, J=5.8, 3.2Hz, 2H), 3.65(t, J=7.2Hz, 1H), 3.11-3.00(m, 2H), 2.39-2.28(m, 6H), 2.26(s, 6H), 2.16-1.97(m, 3H), 1.85(dt, J=9.2, 6.9Hz, 3H), 1.73(s, 1H), 1.68-1.38(m, 13H), 1.29(m, 73H), 0.95-0.86(m, 15H)。¹⁹F NMR(376MHz, CDCl₃) δ-105.78(m, 2F)。

[1062] 使用如上所述的类似方法制备以下化合物。

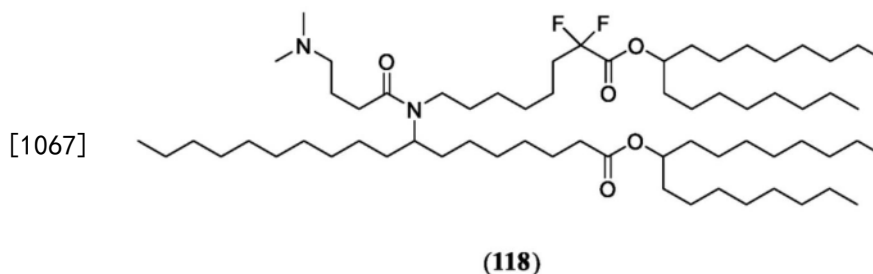


[1064] 8-(N-(7,7-二氟-8-氧代-8-(十三烷-7-基氧基)辛基)-4-(二甲基氨基)-丁酰胺基)十八烷酸十三烷-7-基酯(116)。¹H NMR(400MHz, CDCl₃) δ5.02(q, J=6.5Hz, 1H), 4.89(t,

$J=6.4\text{Hz}$, 1H), 3.67(d, $J=7.8\text{Hz}$, 0H), 3.40(s, 0H), 3.06(t, $J=8.0\text{Hz}$, 2H), 2.38-2.25(m, 5H), 2.24(s, 4H), 2.07(tq, $J=16.8, 9.2\text{Hz}$, 2H), 1.84(q, $J=8.1\text{Hz}$, 2H), 1.73-1.15(m, 59H), 0.90(t, $J=6.6\text{Hz}$, 12H)。

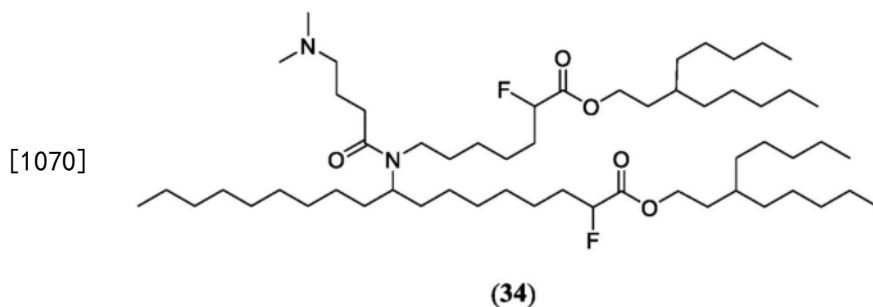


[1066] 8-(N-(7,7-二氟-8-氧代-8-(十五烷-8-基氧基)辛基)-4-(二甲基氨基)丁酰胺基)十八烷酸十五烷-8-基酯(117)。 ^1H NMR(400MHz, CDCl_3) δ 5.07-4.98(m, 1H), 4.88(td, $J=6.5, 3.1\text{Hz}$, 1H), 3.64(s, 0H), 2.47(s, 1H), 2.42-2.24(m, 7H), 2.06(tt, $J=16.7, 8.3\text{Hz}$, 2H), 1.96-1.88(m, 2H), 1.72-1.15(m, 65H), 0.90(t, $J=6.7\text{Hz}$, 12H)。

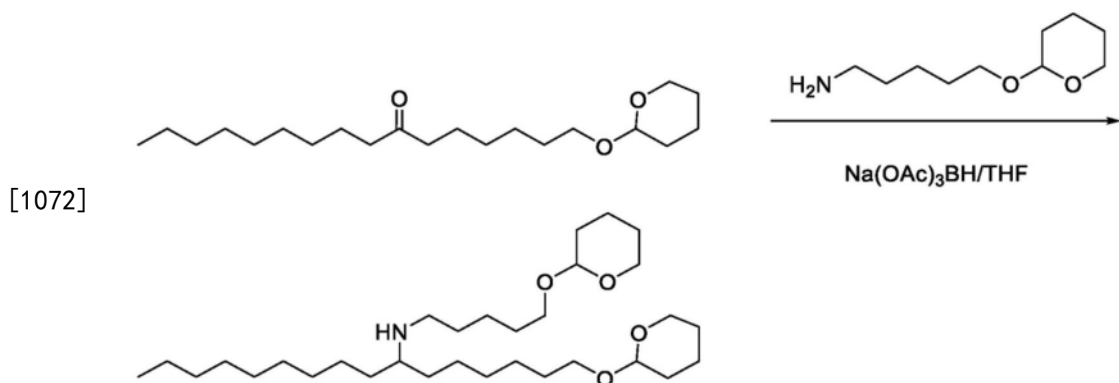


[1068] 8-(N-(7,7-二氟-8-(十七烷-9-基氧基)-8-氧代辛基)-4-(二甲基氨基)丁酰胺基)十八烷酸十七烷-9-基酯(118)。 ^1H NMR(400MHz, CDCl_3) δ 5.02(q, $J=5.9\text{Hz}$, 1H), 4.88(t, $J=6.1\text{Hz}$, 1H), 3.64(s, 1H), 3.43-3.38(m, 0H), 3.06(dd, $J=11.6, 5.5\text{Hz}$, 2H), 2.51(s, 2H), 2.43-2.24(m, 7H), 2.07(tq, $J=16.7, 9.2\text{Hz}$, 2H), 1.93(q, $J=7.2\text{Hz}$, 2H), 1.72-1.13(m, 76H), 0.90(t, $J=6.7\text{Hz}$, 12H)。

[1069] 实施例7.9-[4-(二甲基氨基)-N-{6-氟-7-氧代-7-[(3-戊基辛基)氧基]庚基}丁酰胺基]-2-氟十八烷酸3-戊基辛酯(34)的合成

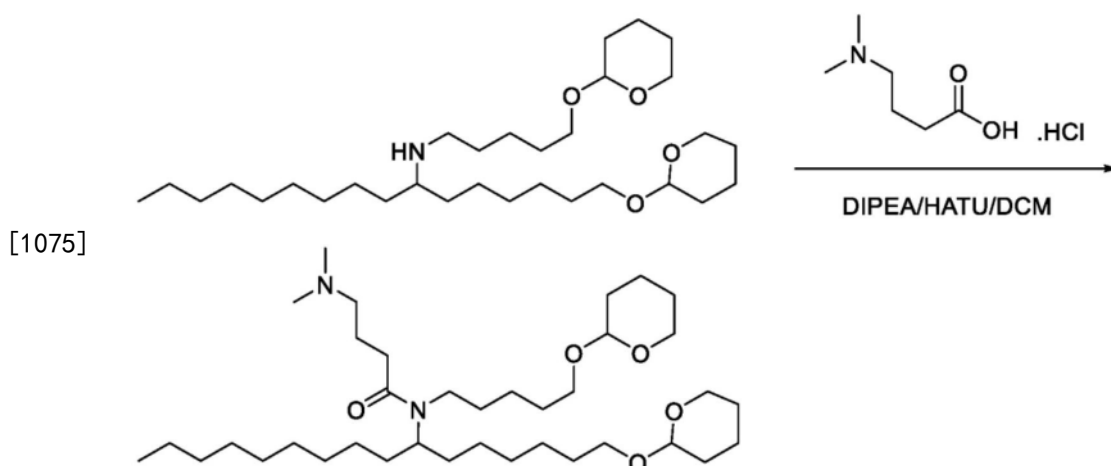


[1071] 步骤1.[1-(噁烷-2-基氧基)十六烷-7-基][5-(噁烷-2-基氧基)戊基]胺的合成



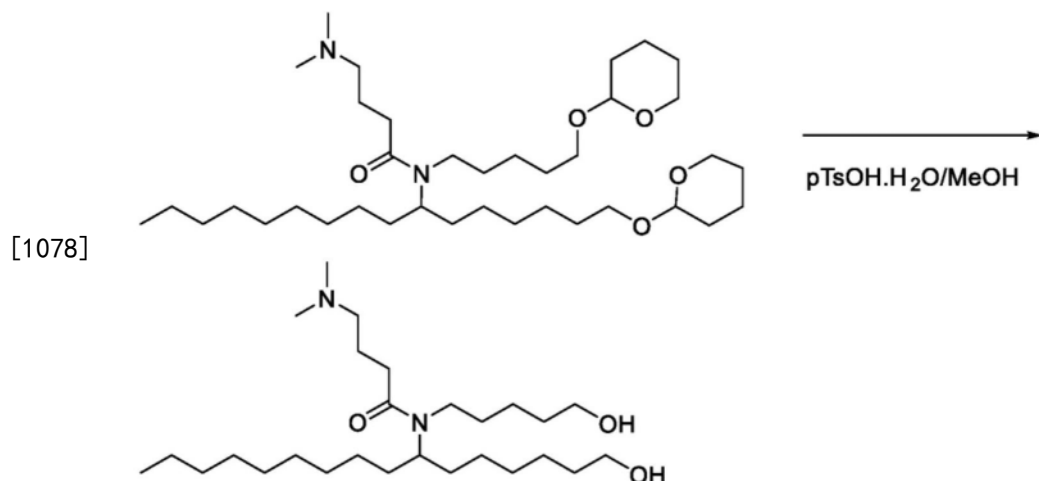
[1073] 将1-(噁烷-2-基氧基)十六烷-7-酮(9.9g, 29.1mmol)、5-(噁烷-2-基氧基)戊-1-胺(6g, 32.0mmol)和 $\text{Na}(\text{OAc})_3\text{BH}$ (18.5g, 87.4mmol)在THF(100mL)中在50℃下搅拌18hr。将反应物在真空中浓缩,将残余物溶解于 Et_2O 中,用 NaHCO_3 (饱和溶液)和盐水洗涤,干燥(MgSO_4),过滤并在真空中浓缩。将粗物质通过自动快速色谱(0%-10% MeOH-DCM)纯化,得到[1-(噁烷-2-基氧基)十六烷-7-基][5-(噁烷-2-基氧基)戊基]胺(5.2g, 34.9%)。

[1074] 步骤2.4-(二甲基氨基)-N-[1-(噁烷-2-基氧基)十六烷-7-基]-N-[5-(噁烷-2-基氧基)戊基]丁酰胺的合成



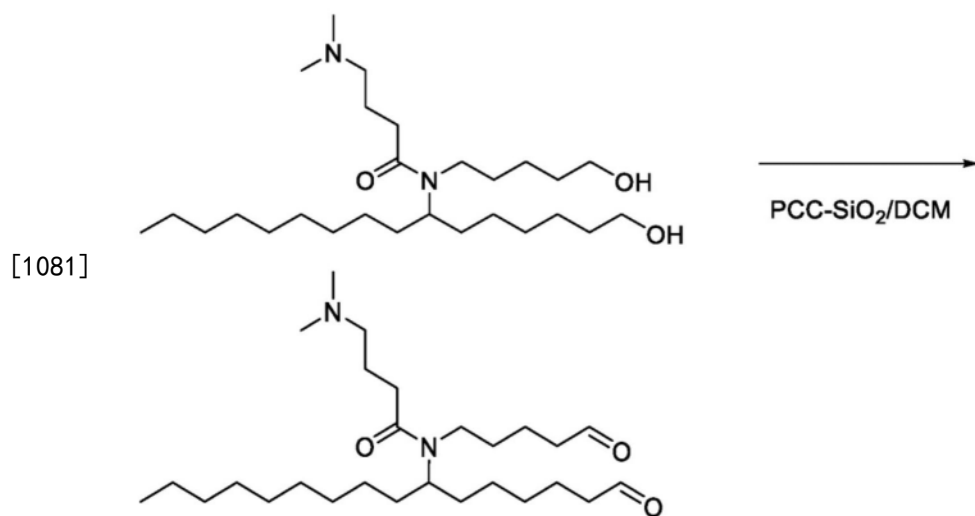
[1076] 将4-(二甲基氨基)丁酸(HCl盐)(5.2g, 31.1mmol)、HATU(11.8g, 31.0mmol)和DIPEA(10.8mL, 62.1mmol)在DCM(75mL)中在RT下搅拌1hr。添加DCM(10mL)中的[1-(噁烷-2-基氧基)十六烷-7-基][5-(噁烷-2-基氧基)戊基]胺(5.3g, 10.4mmol)溶液,并在RT下继续搅拌18hr。将反应物在真空中浓缩,将残余物溶解于 EtOAc 中,用 NaHCO_3 (饱和溶液)和盐水洗涤,干燥(MgSO_4),过滤并在真空中浓缩。将粗物质通过自动快速色谱(1%-15% MeOH-DCM)纯化,得到4-(二甲基氨基)-N-[1-(噁烷-2-基氧基)十六烷-7-基]-N-[5-(噁烷-2-基氧基)戊基]丁酰胺(2.08g, 32.1%)。

[1077] 步骤3.4-(二甲基氨基)-N-(1-羟基十六烷-7-基)-N-(5-羟基戊基)丁酰胺的合成



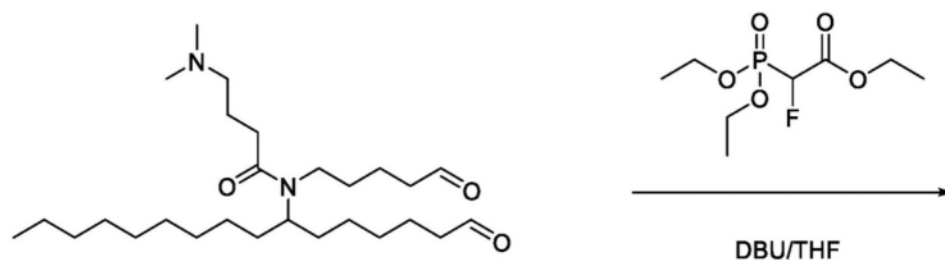
[1079] 将4-(二甲基氨基)-N-[1-(噁烷-2-基氧基)十六烷-7-基]-N-[5-(噁烷-2-基氧基)戊基]丁酰胺(2.08g, 3.3mmol)和pTsOH-H₂O(127mg, 0.7mmol)在MeOH(25mL)中在RT下搅拌18hr。将反应物在真空中浓缩,将残余物溶解于EtOAc中,用NaHCO₃(饱和溶液)和盐水洗涤,干燥(MgSO₄),过滤并在真空中浓缩,得到4-(二甲基氨基)-N-(1-羟基十六烷-7-基)-N-(5-羟基戊基)丁酰胺(1.5g, 98.7%),其不经进一步加工即使用。

[1080] 步骤4.4-(二甲基氨基)-N-(1-氧代十六烷-7-基)-N-(5-氧代戊基)-丁酰胺的合成

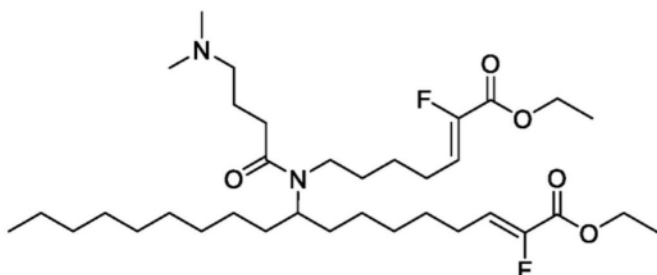


[1082] 将4-(二甲基氨基)-N-(1-羟基十六烷-7-基)-N-(5-羟基戊基)丁酰胺(1.5g, 3.3mmol)和PCC-SiO₂(1:1)(5.0g, 11.5mmol)在DCM(30mL)中在RT下搅拌18hr。将混合物通过二氧化硅床过滤,用EtOAc洗脱。将滤液在真空中浓缩并将粗物质通过自动快速色谱(0%-12%MeOH-DCM)纯化,得到4-(二甲基氨基)-N-(1-氧代十六烷-7-基)-N-(5-氧代戊基)丁酰胺(486mg, 32.7%)。

[1083] 步骤5.(2Z)-9-[4-(二甲基氨基)-N-[(5Z)-7-乙氧基-6-氟-7-氧代庚-5-烯-1-基]丁酰胺基]-2-氟十八碳-2-烯酸乙酯的合成

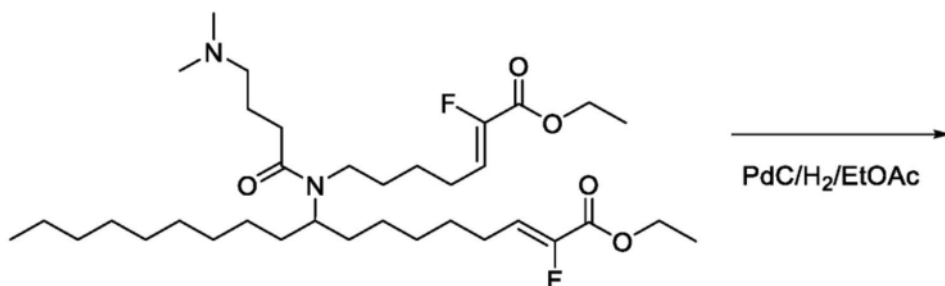


[1084]

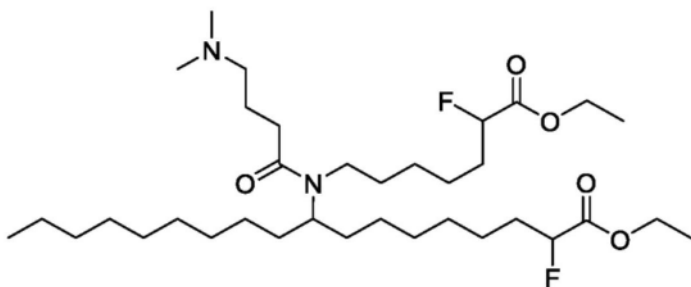


[1085] 将4-(二甲基氨基)-N-(1-氧代十六烷-7-基)-N-(5-氧代戊基)丁酰胺(346mg, 0.76mmol)、2-(二乙氧基磷酰基)-2-氟乙酸乙酯(0.62mL, 3.1mmol)和DBU(0.46mL, 3.1mmol)在THF(10mL)中在RT下搅拌18hr。将反应物在真空中浓缩,将残余物溶解于EtOAc中,用NaHCO₃(饱和溶液)和盐水洗涤,干燥(MgSO₄),过滤并在真空中浓缩。将粗物质通过自动快速色谱(0%-10% MeOH-DCM)纯化,得到(2Z)-9-[4-(二甲基氨基)-N-[(5Z)-7-乙氧基-6-氟-7-氧代庚-5-烯-1-基]丁酰胺基]-2-氟十八碳-2-烯酸乙酯(116mg, 24.1%)。

[1086] 步骤6.9-[4-(二甲基氨基)-N-(7-乙氧基-6-氟-7-氧代庚基)-丁酰胺基]-2-氟十八烷酸乙酯的合成



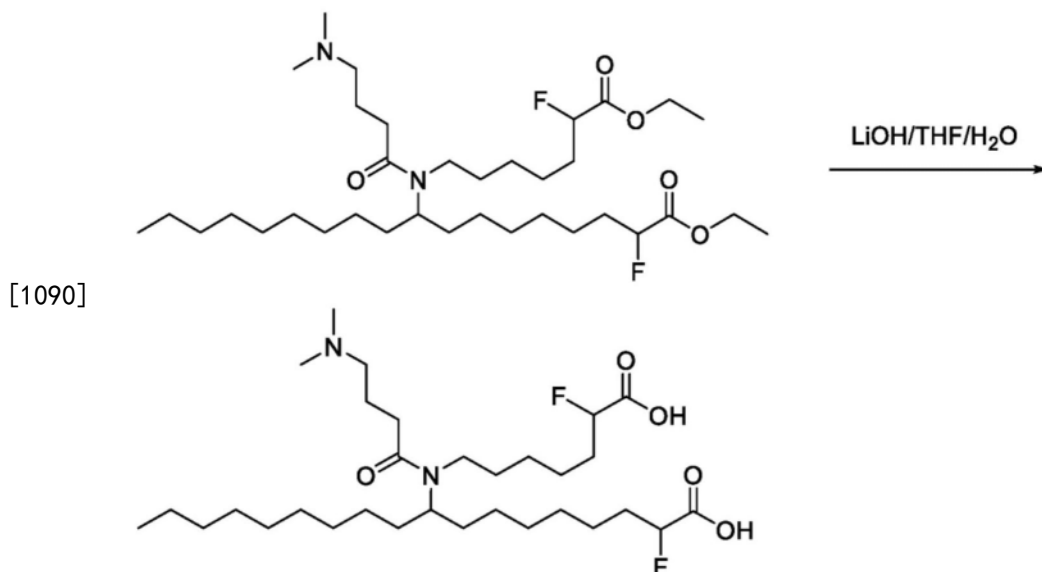
[1087]



[1088] 将(2Z)-9-[4-(二甲基氨基)-N-[(5Z)-7-乙氧基-6-氟-7-氧代庚-5-烯-1-基]丁酰胺基]-2-氟十八碳-2-烯酸乙酯(116mg, 0.18mmol)在RT下在EtOAc(5mL)中经Pd/C(10% w/w)(15mg)催化氢化18hr。将混合物通过硅藻土过滤,并将滤液在真空中浓缩,得到9-[4-(二甲基氨基)-N-(7-乙氧基-6-氟-7-氧代庚基)丁酰胺基]-2-氟十八烷酸乙酯(117mg, 100%),其不经纯化即使用。

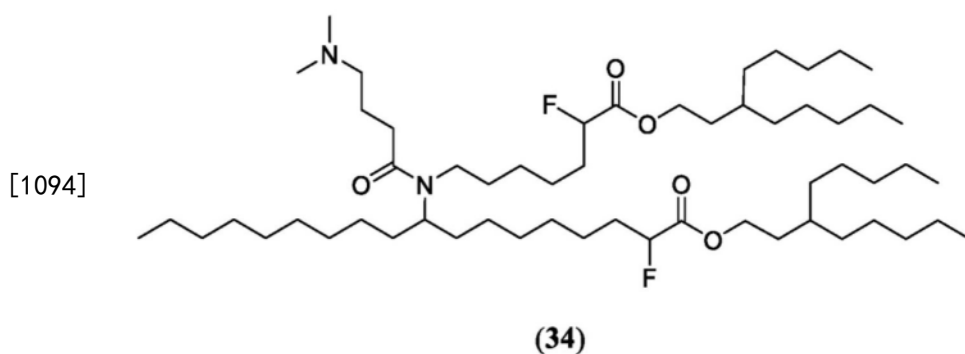
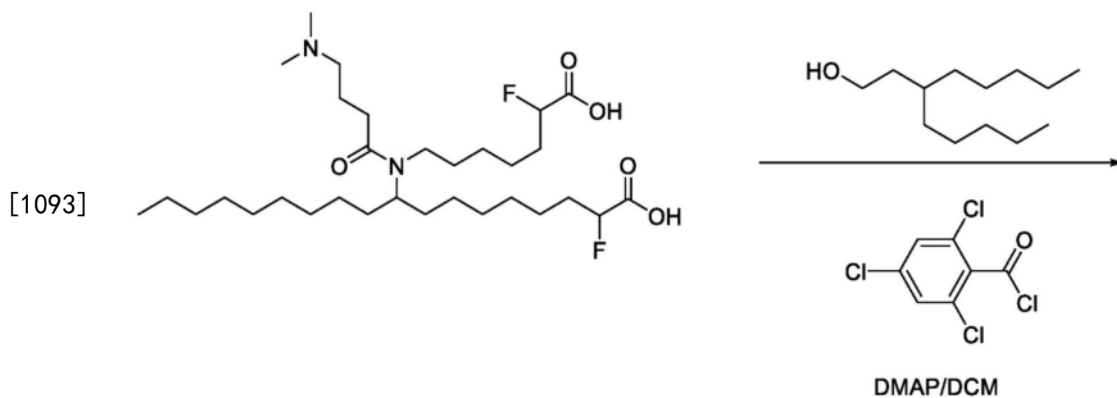
[1089] 步骤7.9-[N-(6-羧基-6-氟己基)-4-(二甲基氨基)丁酰胺基]-2-氟十八烷酸的合

成



[1091] 将9-[4-(二甲基氨基)-N-(7-乙氧基-6-氟-7-氧代庚基)丁酰胺基]-2-氟十八烷酸乙酯(117mg, 0.19mmol)和LiOH(18mg, 0.74mmol)在THF (0.6mL)和H₂O水(0.18mL)中在50℃下搅拌2hr。将反应物冷却至RT,用6M HCl (0.126mL)淬灭并用DCM萃取。将合并的有机物用盐水洗涤并干燥(MgSO₄),过滤并在真空中浓缩,得到9-[N-(6-羧基-6-氟己基)-4-(二甲基氨基)丁酰胺基]-2-氟十八烷酸(75mg, 70.3%),其不经纯化即使用。

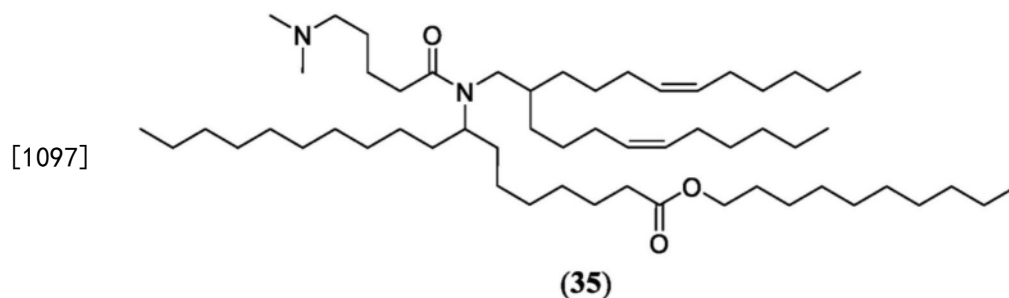
[1092] 步骤8.9-[4-(二甲基氨基)-N-{6-氟-7-氧代-7-[(3-戊基辛基)氧基]庚基}丁酰胺基]-2-氟十八烷酸3-戊基辛酯(34)的合成



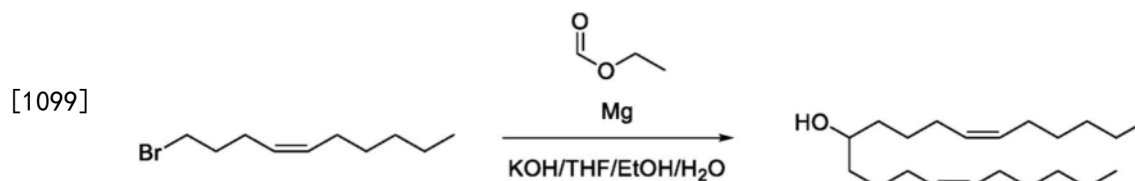
[1095] 将9-[N-(6-羧基-6-氟己基)-4-(二甲基氨基)丁酰胺基]-2-氟十八烷酸(75mg, 0.13mmol)、3-戊基辛-1-醇(72mg, 0.36mmol)、2,4,6三氯苯甲酰氯(95g, 0.4mmol)和DMAP

(64mg, 0.52mmol) 在DCM(4mL) 中在RT下搅拌18hr。将反应物在真空中浓缩, 将残余物溶解于EtOAc中, 用NaHCO₃ (饱和溶液) 和盐水洗涤, 干燥(MgSO₄), 过滤并在真空中浓缩。将粗物质通过自动快速色谱(0%-12% MeOH-DCM) 纯化, 得到9-[4-(二甲基氨基)-N-{6-氟-7-氧代-7-[(3-戊基辛基) 氧基] 庚基} 丁酰胺基]-2-氟十八烷酸3-戊基辛酯(34) (42mg, 34.3%)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ5.00-4.91 (m, 1H), 4.88-4.79 (m, 1H), 4.23 (qd, J=6.2, 2.9Hz, 4H), 3.71-3.56 (m, 1H), 3.07 (d, J=8.3Hz, 2H), 2.62 (s, 2H), 2.45 (m, 8H), 1.99-1.80 (m, 7H), 1.69-1.40 (m, 18H), 1.39-1.15 (m, 56H), 0.95-0.86 (m, 15H)。

[1096] 实施例8.8- {N-[(6Z)-2-[(4Z)-癸-4-烯-1-基] 十二碳-6-烯-1-基]-5-(二甲基氨基) 戊酰胺基} 十八碳烯酸癸酯(35)的合成

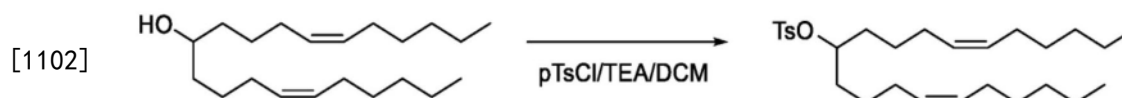


[1098] 步骤1. (6Z, 15Z)-二十一碳-6, 15-二烯-11-醇的合成



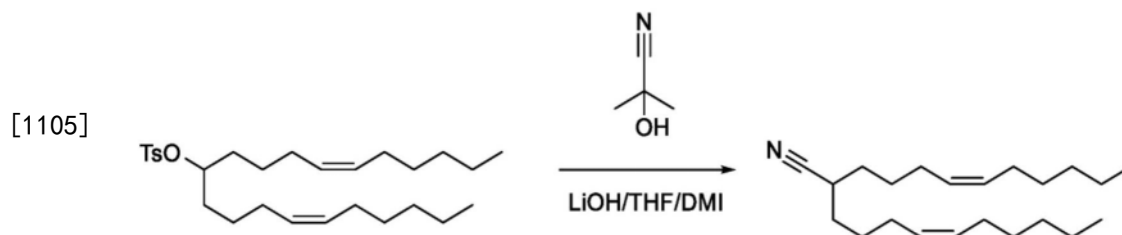
[1100] 在THF中由(4Z)-1-溴癸-4-烯(19.9g, 91mmol)和镁(2.4g, 97.0mmol)制备格氏试剂。将反应物在45℃下加热3hr。冷却至10℃后, 逐滴添加甲酸乙酯(7.0g, 93.5mmol)于THF(35mL)中, 并将反应物搅拌1hr。添加水(40mL)和6M HCl(50mL)以淬灭并将反应物在水与己烷之间分配。将有机物分离, 用盐水洗涤, 干燥(MgSO₄), 过滤并在真空中浓缩。将残余物溶解于EtOH(30mL)中并用KOH(4.6g)于水(10mL)中的溶液处理。5分钟后, 除去EtOH, 并将残余物在己烷与6M HCl之间分配。将有机物用水和盐水洗涤, 干燥(MgSO₄), 过滤并在真空中浓缩。将粗物质通过自动快速色谱(0%-10% EtOAc-己烷) 纯化, 得到(6Z, 15Z)-二十一碳-6, 15-二烯-11-醇(11.4g, 81.4%)。

[1101] 步骤2. 4-甲基苯磺酸(6Z, 15Z)-二十一碳-6, 15-二烯-11-基酯的合成



[1103] 将(6Z, 15Z)-二十一碳-6, 15-二烯-11-醇(10g, 32.4mmol)、TEA(9.0mL, 64.8mmol)、三甲基铵HCl(0.31g, 3.2mmol)和对甲苯磺酰氯(8.0g, 42.1mmol)在DCM(50mL)中在RT下搅拌18hr。用N,N-二甲基丙二胺(1.09g, 10.7mmol)缓慢地淬灭反应。搅拌15分钟后, 将反应物用水和盐水洗涤, 干燥(MgSO₄), 过滤并在真空中浓缩。将粗物质通过自动快速色谱纯化, 得到4-甲基苯磺酸(6Z, 15Z)-二十一碳-6, 15-二烯-11-基酯(0%-5% EtOAc-己烷) (8.7g, 57.9%)。

[1104] 步骤3. (6Z)-2-[(4Z)-癸-4-烯-1-基] 十二碳-6-烯腈的合成



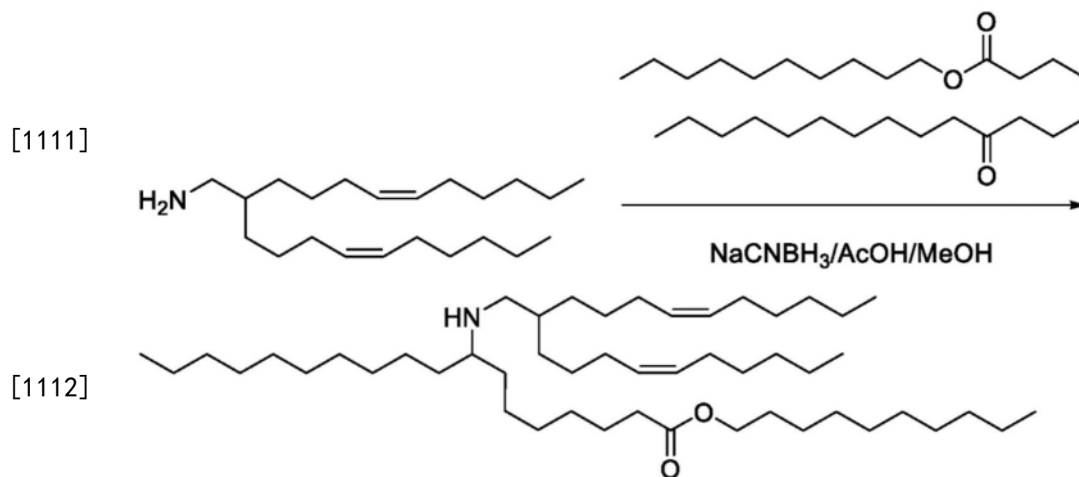
[1106] 将4-甲基苯磺酸(6Z,15Z)-二十一碳-6,15-二烯-11-基酯(8.7g,18.8mmol)、二甲基咪唑烷酮(22.6mL,0.83M)、丙酮氰醇(3.5g,41.5mmol)和LiOH(880mg,36.6mmol)在THF(52mL)中在65℃下搅拌18hr。将反应物在EtOAc-己烷(1:1,500mL)与水之间分配,将有机物用盐水洗涤,干燥(MgSO_4),过滤并在真空中浓缩。将粗物质通过自动快速色谱(0%-10% EtOAc-己烷)纯化,得到(6Z)-2-[(4Z)-癸-4-烯-1-基]十二碳-6-烯腈(4.9g,81.5%)。

[1107] 步骤4. (6Z,15Z)-11-(氨基甲基)二十一碳-6,15-二烯的合成



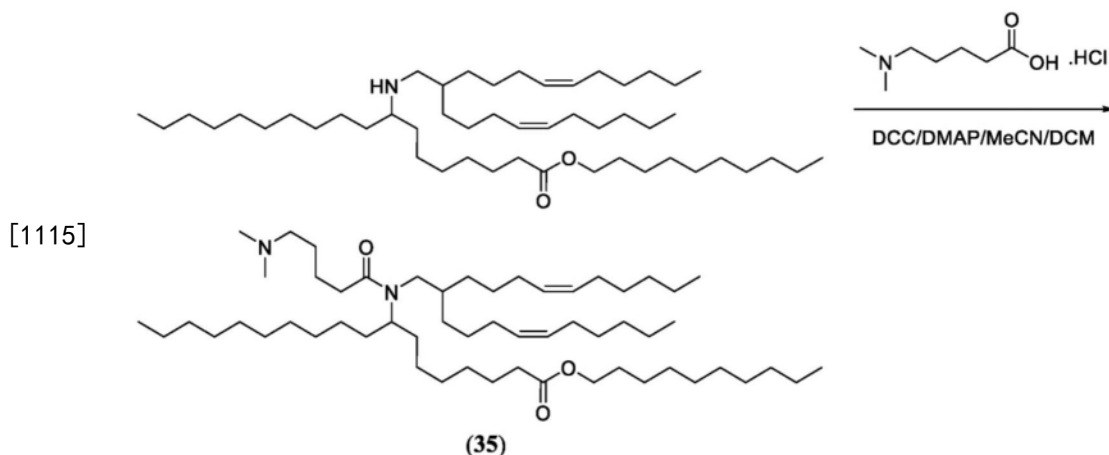
[1109] 将(6Z)-2-[(4Z)-癸-4-烯-1-基]十二碳-6-烯腈(3.4g,9.9mmol)和 LiAlH_4 (1.9g,50.0mmol)在THF(75mL)中在0℃下搅拌18hr,然后升温至RT。将反应物冷却至0℃并用1M NaOH(1.9mL)淬灭。将混合物干燥(MgSO_4),过滤并在真空中浓缩,并将粗物质通过自动快速色谱(0%-10% MeOH-DCM)纯化,得到(6Z,15Z)-11-(氨基甲基)二十一碳-6,15-二烯(2.4g,75.4%)。

[1110] 步骤5.8- {[(6Z)-2-[(4Z)-癸-4-烯-1-基]十二碳-6-烯-1-基]氨基}十八碳烯酸癸酯的合成



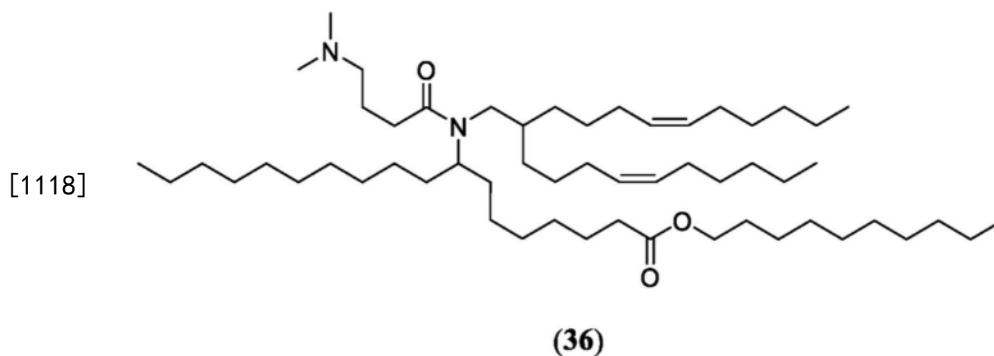
[1113] 将8-氧代十八烷酸癸酯(368mg,0.84mmol)、(6Z,15Z)-11-(氨基甲基)二十一碳-6,15-二烯(297mg,0.9mmol)、AcOH(0.1mL,1.7mmol)和 NaCNBH_3 (156mg,2.5mmol)在MeOH(10mL)中在(50℃)下搅拌18hr。将反应物在真空中浓缩,将残余物溶解于DCM中,用 NaHCO_3 (饱和溶液)和盐水洗涤,干燥(MgSO_4),过滤并在真空中浓缩。将粗物质通过自动快速色谱(5%-40% EtOAc-己烷)纯化,得到8- {[(6Z)-2-[(4Z)-癸-4-烯-1-基]十二碳-6-烯-1-基]氨基}十八烷酸癸酯(438mg,70.2%)。

[1114] 步骤6.8- {N-[(6Z)-2-[(4Z)-癸-4-烯-1-基]十二碳-6-烯-1-基]-5-(二甲基氨基)-戊酰胺基}十八碳烯酸癸酯



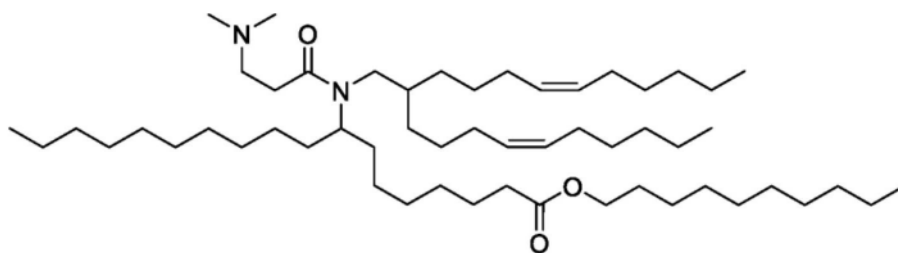
[1116] 将5-二甲基氨基]戊酸HCl盐(71mg, 0.4mmol)、DCC(90mg, 0.43mmol)和DMAP(72mg, 0.6mmol)在MeCN(5mL)中在RT下搅拌3hr。添加DCM(2mL)中的8-{[(6Z)-2-[(4Z)-癸-4-烯-1-基]十二碳-6-烯-1-基]氨基}十八烷酸癸酯(146mg, 0.2mmol), 并将反应物在RT下搅拌18hr。将反应物在真空中浓缩, 将残余物分散于己烷:EtOAc:TEA(75:25:1)中, 通过硅藻土过滤, 并将滤液在真空中浓缩。将粗物质通过自动快速色谱(0%-12% MeOH-DCM)纯化, 得到8-{N-[(6Z)-2-[(4Z)-癸-4-烯-1-基]十二碳-6-烯-1-基]-5-(二甲基氨基)戊酰胺基}十八烷酸癸酯(35)(88mg, 51.5%)。¹H NMR(400MHz, CDCl₃) δ5.38(hd, J=7.9, 5.4Hz, 4H), 4.07(td, J=6.8, 2.4Hz, 2H), 3.63(s, 1H), 3.09(dd, J=18.4, 7.5Hz, 2H), 2.42-2.26(m, 6H), 2.23(d, J=1.5Hz, 6H), 2.01(dd, J=13.6, 6.8Hz, 8H), 1.76-1.57(m, 11H), 1.51(dq, J=14.7, 7.2Hz, 5H), 1.43-1.17(m, 53H), 0.96-0.84(m, 12H)。

[1117] 使用如上所述的类似方法制备以下化合物。



[1119] 8-(N-((Z)-2-((Z)-癸-4-烯-1-基)十二碳-6-烯-1-基)-4-(二甲基氨基)丁酰胺基)-十八碳烯酸癸酯(36)。¹H NMR(400MHz, CDCl₃) δ5.48-5.25(m, 4H), 4.07(td, J=6.8, 2.7Hz, 2H), 3.66(s, 1H), 3.09(d, J=7.5Hz, 2H), 2.42-2.26(m, 6H), 2.24(s, 6H), 2.02(t, J=6.9Hz, 7H), 1.82(dt, J=9.7, 7.2Hz, 2H), 1.63(d, J=4.1Hz, 9H), 1.47(s, 2H), 1.41-1.18(m, 53H), 0.97-0.84(m, 12H)。

[1120]

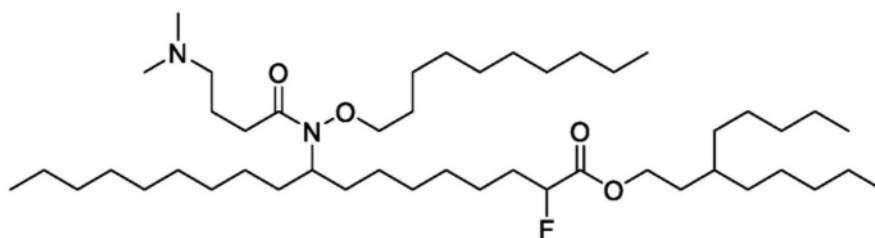


(37)

[1121] 8-(N-((Z)-2-((Z)-癸-4-烯-1-基)十二碳-6-烯-1-基)-3-(二甲基氨基)丙酰胺基)-十八碳烯酸癸酯 (37)。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 5.46-5.30 (m, 4H), 4.96-4.83 (m, 1H), 4.07 (td, $J=6.8, 2.0\text{Hz}$, 3H), 3.09 (d, $J=7.5\text{Hz}$, 2H), 2.75-2.61 (m, 3H), 2.60-2.45 (m, 3H), 2.35-2.23 (m, 9H), 2.03 (q, $J=6.5\text{Hz}$, 7H), 1.58 (d, $J=53.6\text{Hz}$, 20H), 1.43-1.19 (m, 57H), 0.91 (ddt, $J=6.9, 3.6, 2.3\text{Hz}$, 12H)。

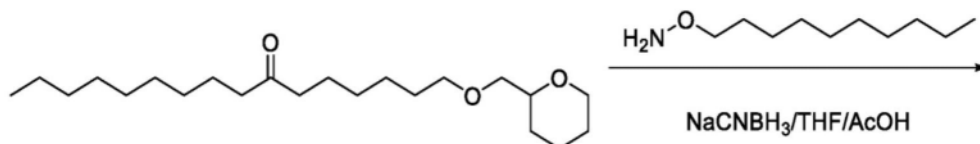
[1122] 实施例9.9-[N-(癸氧基)-4-(二甲基氨基)丁酰胺基]-2-氟十八烷酸3-戊基辛酯 (38)的合成

[1123]

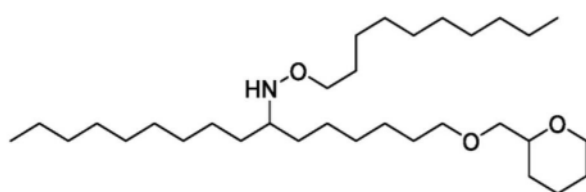


(38)

[1124] 步骤1. (癸氧基)[1-(噁烷-2-基氧基)十六烷-7-基]胺的合成

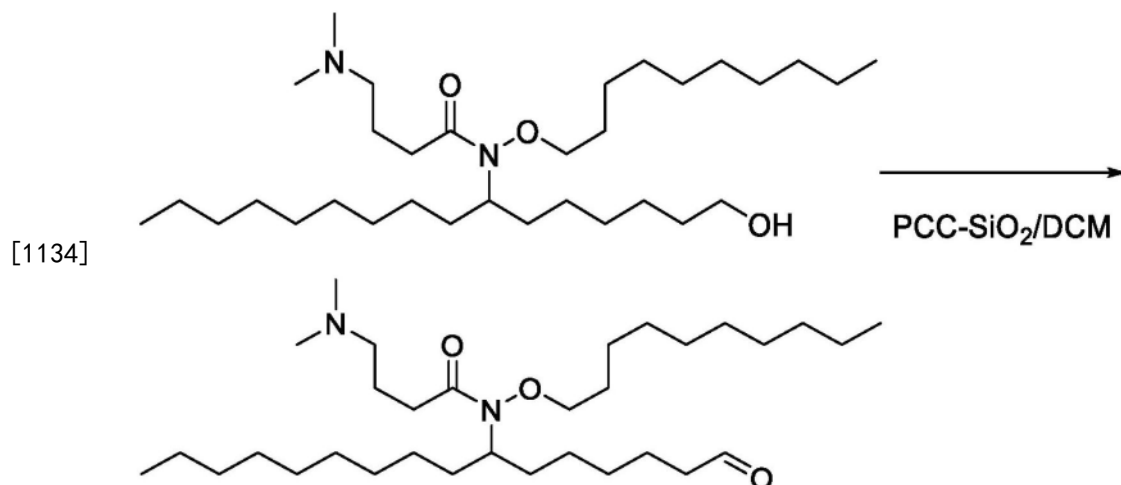


[1125]



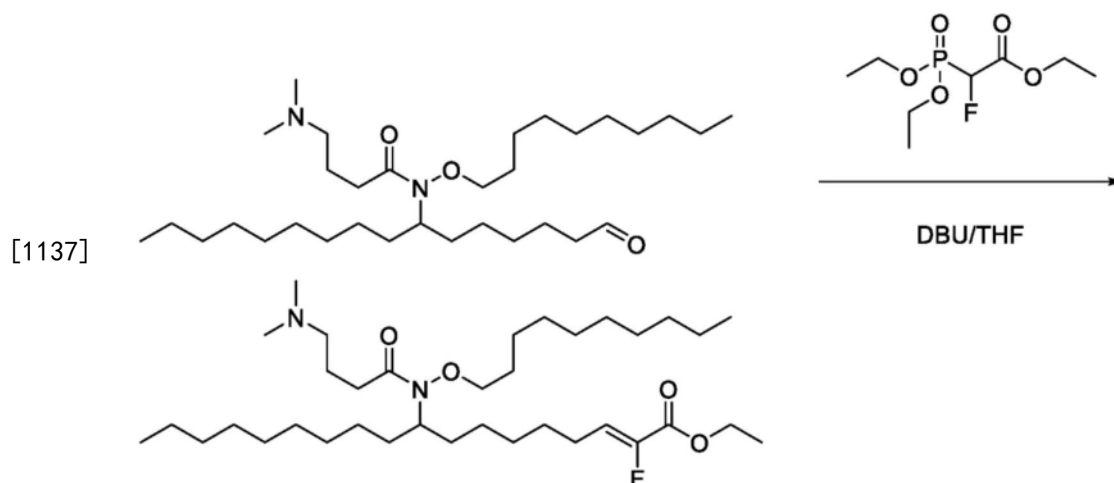
[1126] 将1-(噁烷-2-基氧基)十六烷-7-酮 (7g, 20.6mmol)、0-癸基羟胺 (3.6g, 21mmol) 和 NaCNBH_3 (3.9g, 61.7mmol) 在THF (10mL) 中在50℃下搅拌16hr。将反应物在真空中浓缩,将残余物溶解于EtOAc中并用水洗涤。用EtOAc反萃取水层,并将合并的有机物用盐水洗涤,干燥 (MgSO_4),过滤并在真空中浓缩。将残余物通过自动快速色谱 (0%-10% EtOAc/Hex) 纯化,得到(癸氧基)[1-(噁烷-2-基氧基)十六烷-7-基]胺 (700mg, 6.8%)。

[1127] 步骤2.N-(癸氧基)-4-(二甲基氨基)-N-[1-(噁烷-2-基氧基)十六烷-7-基]丁酰胺的合成



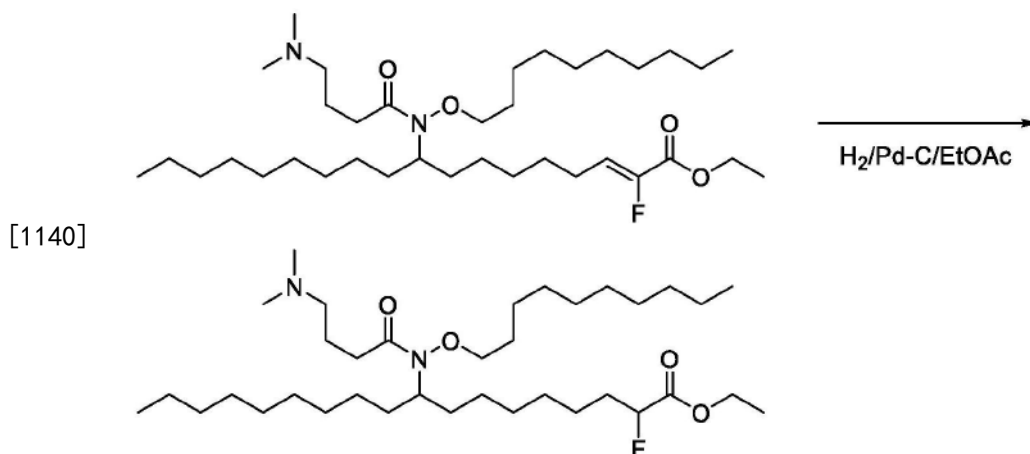
[1135] 将N-(癸氧基)-4-(二甲基氨基)-N-(1-羟基十六烷-7-基)丁酰胺(1.0g, 1.9mmol)和PCC-SiO₂(1:1)(3.3g, 7.6mmol)在DCM(10mL)中在RT下搅拌16hr。将反应物通过二氧化硅过滤并在真空中浓缩。将残余物通过自动快速色谱(0%-30% ACN/DCM)纯化,得到N-(癸氧基)-4-(二甲基氨基)-N-(1-氧代十六烷-7-基)丁酰胺(438mg, 44.0%)。

[1136] 步骤5. (2Z)-9-[N-(癸氧基)-4-(二甲基氨基)丁酰胺基]-2-氟十八碳-2-烯酸乙酯的合成



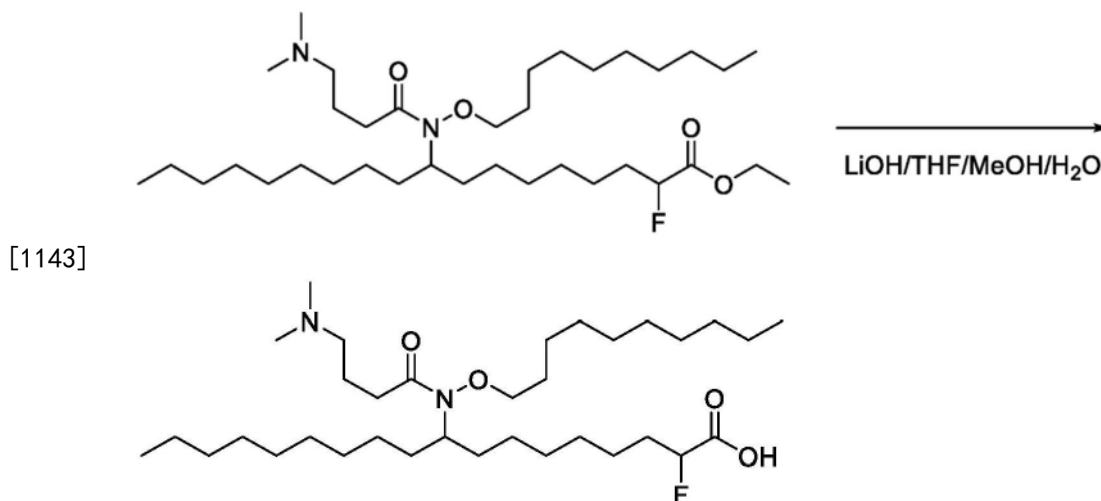
[1138] 将N-(癸氧基)-4-(二甲基氨基)-N-(1-氧代十六烷-7-基)丁酰胺(438mg, 0.8mmol)、2-(二乙氧基磷酰基)-2-氟乙酸乙酯(606mg, 2.5mmol)和DBU(381mg, 2.5mmol)在THF(10mL)中在RT下搅拌16hr。在真空中除去溶剂,将残余物溶解于EtOAc中,用盐水洗涤并干燥(MgSO₄)。将滤液在真空中浓缩并通过自动快速色谱(0%-20% ACN/DCM)纯化,得到(2Z)-9-[N-(癸氧基)-4-(二甲基氨基)丁酰胺基]-2-氟十八碳-2-烯酸乙酯(512mg, 100.0%)。

[1139] 步骤6. 粗9-[N-(癸氧基)-4-(二甲基氨基)丁酰胺基]-2-氟十八烷酸乙酯的合成



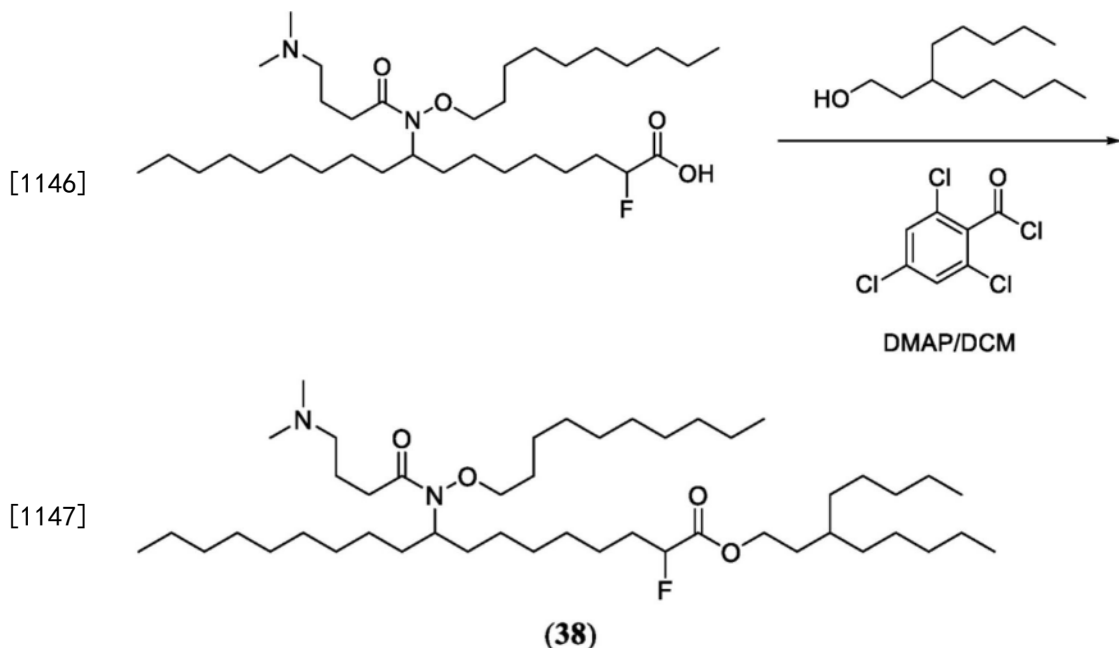
[1141] 将(2Z)-9-[N-(癸氧基)-4-(二甲基氨基)丁酰胺基]-2-氟十八碳-2-烯酸乙酯(546mg, 0.9mmol)在RT下在EtOAc(10mL)中经Pd-C催化氢化直至完成。将反应物通过硅藻土过滤并在真空中浓缩,得到9-[N-(癸氧基)-4-(二甲基氨基)丁酰胺基]-2-氟十八烷酸乙酯,其不经纯化即使用。

[1142] 步骤7.9-[N-(癸氧基)-4-(二甲基氨基)丁酰胺基]-2-氟十八烷酸的合成



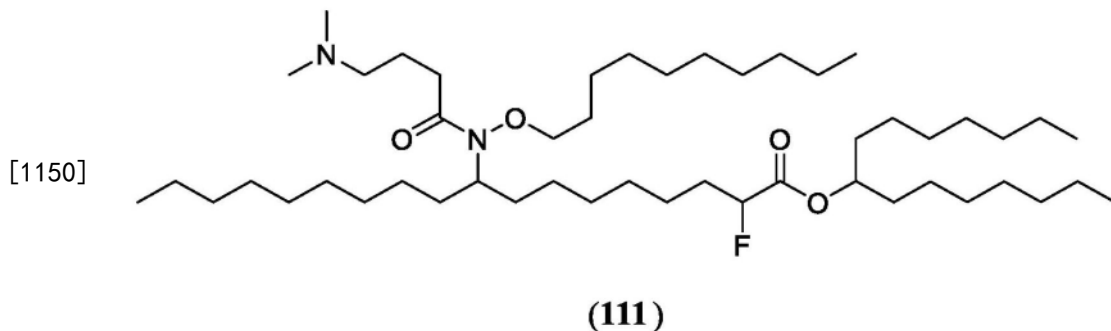
[1144] 将9-[N-(癸氧基)-4-(二甲基氨基)丁酰胺基]-2-氟十八烷酸乙酯(548mg, 0.9mmol)和LiOH(85mg, 3.6mmol)在THF(10mL)和H₂O(1mL)中在RT下搅拌16hr。添加6M HCl(0.9mL)并在真空中除去THF。将残余物溶解于DCM中,用水洗涤,用DCM反萃取水层,并用盐水洗涤合并的有机物。将有机物干燥(MgSO₄),过滤并在真空中浓缩,得到9-[N-(癸氧基)-4-(二甲基氨基)丁酰胺基]-2-氟十八烷酸(390mg, 74.6%),其不经纯化即使用。

[1145] 步骤8.9-[N-(癸氧基)-4-(二甲基氨基)丁酰胺基]-2-氟十八烷酸3-戊基辛酯(38)的合成



[1148] 将9-[N-(癸氧基)-4-(二甲基氨基)丁酰胺基]-2-氟十八烷酸(390mg, 0.66mmol)、3-戊基辛-1-醇(0.2g, 1.0mmol)、2,4,6-三氯苯甲酰氯(324mg, 1.33mmol)、TEA(81mg, 0.8mmol)和DMAP(106mg, 0.86mmol)在THF(6mL)中在RT下搅拌1.5hr。将反应物过滤,在真空中浓缩,并将残余物通过自动快速色谱(0%-100% DCM/Hex和0%-30% ACN/DCM)纯化,得到9-[N-(癸氧基)-4-(二甲基氨基)丁酰胺基]-2-氟十八烷酸3-戊基辛酯(38)(30mg, 5.9%)。¹H NMR(400MHz, CDCl₃) δ4.30-4.20(m, 3H), 3.98-3.89(m, 2H), 3.30(d, J=5.3Hz, 2H), 2.97(s, 6H), 2.93-2.88(m, 2H), 2.29-2.09(m, 2H), 2.09-1.58(m, 8H), 1.56-0.92(m, 56H), 0.95-0.75(m, 12H)。

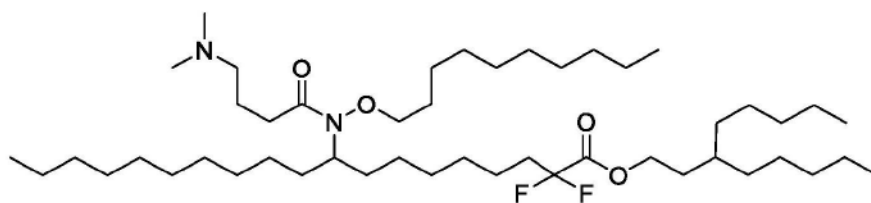
[1149] 使用如上所述的类似方法制备以下化合物。



[1151] 9-[N-(癸氧基)-4-(二甲基氨基)丁酰胺基]-2-氟十八烷酸十五烷-8-基酯(111)。¹H NMR(400MHz, CDCl₃) δ5.05-4.90(m, 1H), 4.81(t, J=5.9Hz, 0H), 4.39-4.18(m, 1H), 3.86(t, J=6.5Hz, 2H), 2.48(t, J=7.5Hz, 2H), 2.33(t, J=7.4Hz, 2H), 2.25(s, 6H), 1.94-1.77(m, 4H), 1.69-1.53(m, 11H), 1.45(td, J=13.9, 6.4Hz, 5H), 1.29(dd, J=11.9, 6.1Hz, 56H), 0.90(t, J=6.7Hz, 12H)。

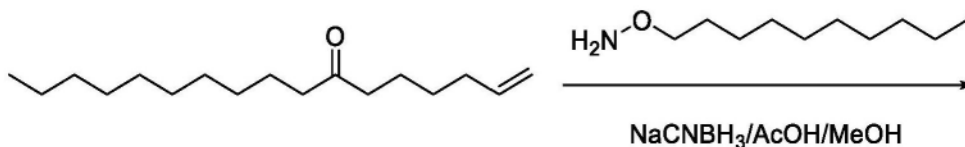
[1152] 实施例10.9-[N-(癸氧基)-4-(二甲基氨基)丁酰胺基]-2,2-二氟十九烷酸3-戊基辛酯(39)的合成

[1153]

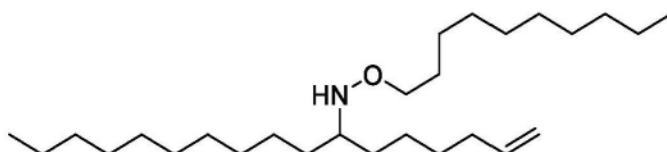


(39)

[1154] 步骤1. (癸氧基) (十七碳-1-烯-7-基) 胺的合成



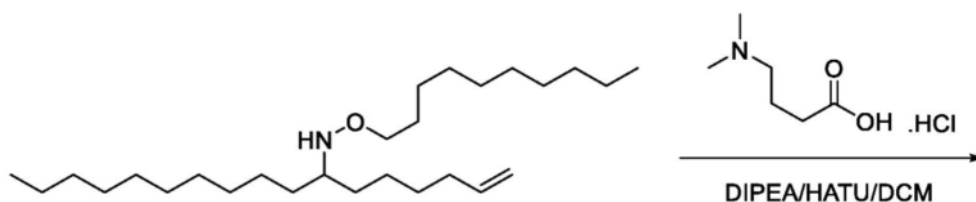
[1155]



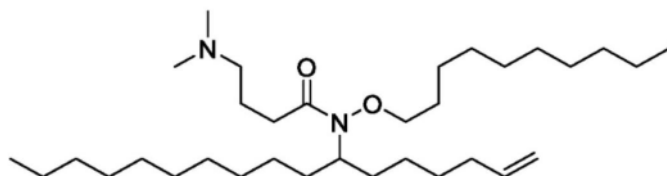
[1156] 将十七碳-1-烯-7-酮 (5.2g, 20.8mmol)、AcOH (2.4mL, 42mmol) 和 NaCNBH₃ (4.0g, 62.0mmol) 在 THF (60mL) 中在 50℃ 下搅拌 15hr。在真空中除去溶剂并将残余物分配在 H₂O (50mL) 与 DCM (50mL) 之间。用 DCM 进一步萃取水层, 将合并的有机物干燥 (Na₂SO₄), 在真空中浓缩, 并将残余物通过自动快速色谱 (0% - 15% EtOAc/Hex) 纯化, 得到 (癸氧基) (十七碳-1-烯-7-基) 胺 (4.04g, 47.5%)。

[1157] 步骤2. N-(癸氧基)-4-(二甲基氨基)-N-(十七碳-1-烯-7-基) 丁酰胺的合成

[1158]



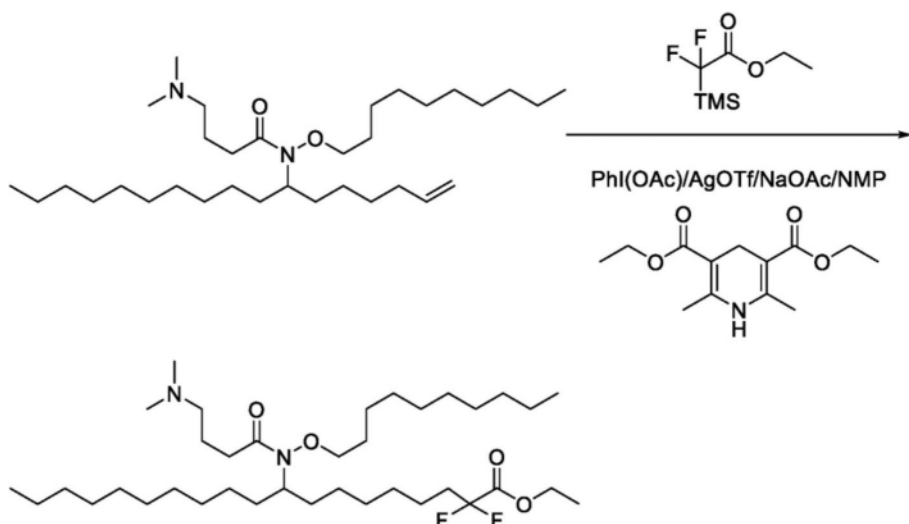
[1159]



[1160] 将 4-(二甲基氨基) 丁酸 HCl 盐 (3.3g, 19.5mmol)、HATU (7.4g, 19.5mmol) 和 DIPEA (7.6g, 58.6mmol) 在 DCM (40mL) 中在 RT 下搅拌 1hr。添加 DCM (10mL) 中的 (癸氧基) (十七碳-1-烯-7-基) 胺 (4g, 9.8mmol) 并将反应物在回流下加热 16hr。在冷却后, 将反应物依次用 1M HCl、饱和 NaHCO₃ 和盐水洗涤, 干燥 (MgSO₄), 过滤并在真空中浓缩滤液。将残余物通过自动快速色谱 (0% - 10% MeOH/DCM) 纯化, 得到 N-(癸氧基)-4-(二甲基氨基)-N-(十七碳-1-烯-7-基) 丁酰胺 (4.1g, 80.3%)。

[1161] 步骤3. 9-[N-(癸氧基)-4-(二甲基氨基) 丁酰胺基]-2,2-二氟十九烷酸乙酯的合成

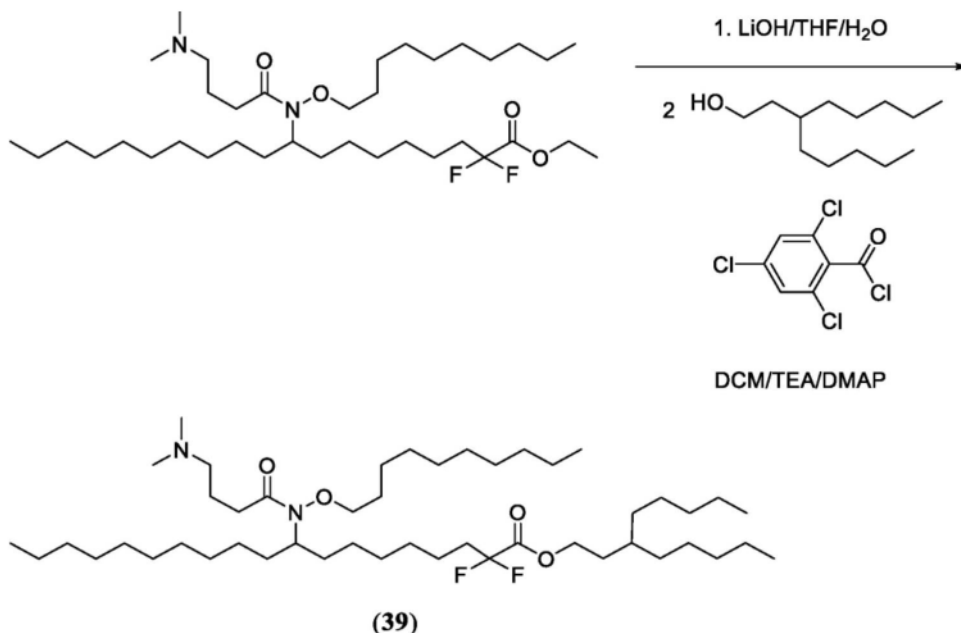
[1162]



[1163] 在真空干燥的烧瓶中,将Hantsch酯(2.0g,7.7mmol)、NaOAc(4.9g,15.3mmol)、AgOTf(4.9g,19.1mmol)和二乙酸碘苯(4.9g,15.3mmol)在氮气下在NMP(30mL)中搅拌。添加NMP(30mL)中的N-(癸氧基)-4-(二甲基氨基)-N-(十七碳-1-烯-7-基)丁酰胺(4g,7.7mmol)和2,2-二氟-2-(三甲基甲硅烷基)乙酸乙酯(7.5g,38.3mmol),并将反应物在RT下搅拌18hr。将反应物通过硅藻土过滤,并将滤液用盐水洗涤,干燥(MgSO_4),过滤并在真空中浓缩。将粗物质通过自动快速色谱(0%-50% ACN/DCM)纯化,得到9-[N-(癸氧基)-4-(二甲基氨基)丁酰胺基]-2,2-二氟十九烷酸乙酯(3.2g,64.7%)。

[1164] 步骤4.9-[N-(癸氧基)-4-(二甲基氨基)丁酰胺基]-2,2-二氟十九烷酸3-戊基辛酯(39)的合成

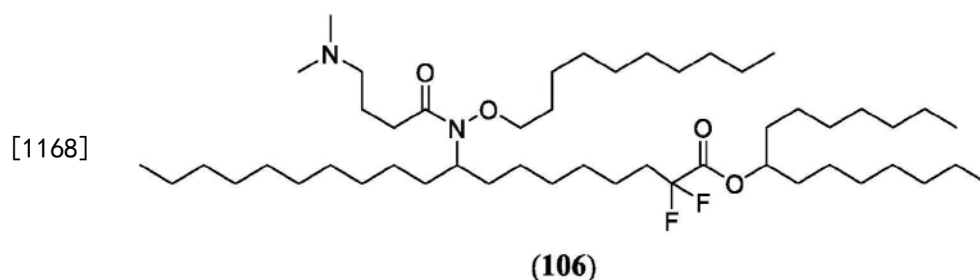
[1165]



[1166] 将9-[N-(癸氧基)-4-(二甲基氨基)丁酰胺基]-2,2-二氟十九烷酸乙酯(731mg,1.1mmol)和LiOH(108mg,4.5mmol)在RT下在THF(10mL)和水(2mL)中搅拌直至完成。将反应物用6M HCl(0.75mL)淬灭并在真空中部分浓缩。将反应物用DCM稀释,用盐水洗涤,干燥(MgSO_4),过滤并在真空中浓缩,与甲苯(25mL)共沸。将粗羧酸、3-戊基辛-1-醇(0.34g,1.7mmol)、2,4,6-三氯苯甲酰氯(0.6g,2.3mmol)、TEA(137mg,1.4mmol)和DMAP(179mg,

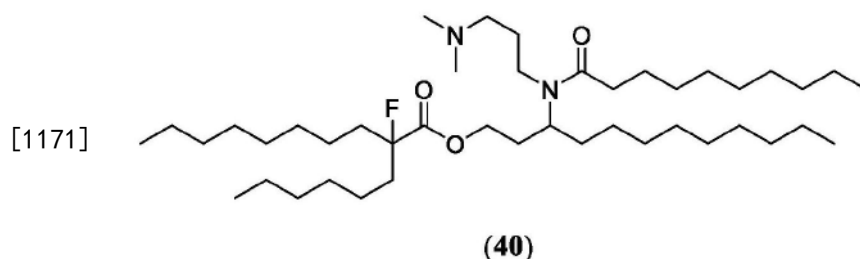
1.5mmol) 在RT下在THF (6mL) 中搅拌1.5hr。将反应物在真空中浓缩,并将粗物质通过自动快速色谱(0%-100% DCM/Hex和0%-15% ACN/DCM)纯化,得到9-[N-(癸氧基)-4-(二甲基氨基)丁酰胺基]-2,2-二氟十九烷酸3-戊基辛酯和不饱和杂质的混合物。将混合物在RT下在EtOAc (10mL) 中经Pd-C催化氢化1hr。将反应物通过硅藻土过滤并在真空中浓缩,得到9-[N-(癸基氧基)-4-(二甲基氨基)丁酰胺基]-2,2-二氟十九烷酸3-戊基辛酯(39) (371mg, 41.0%)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ4.30 (t, J=7.1Hz, 2H), 4.24 (dd, J=9.5, 4.6Hz, 1H), 3.99-3.92 (m, 2H), 3.30 (dd, J=12.4, 7.1Hz, 2H), 2.98 (s, 6H), 2.92 (dd, J=7.3, 4.3Hz, 2H), 2.04 (dt, J=11.6, 6.4Hz, 4H), 1.74-1.61 (m, 6H), 1.53-1.19 (m, 57H), 0.94-0.87 (zm, 12H)。

[1167] 使用如上所述的类似方法制备以下化合物。

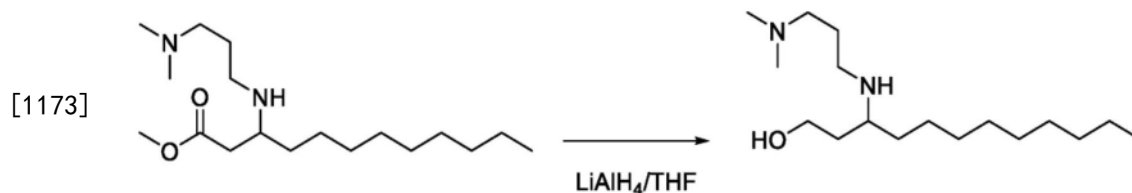


[1169] 9-[N-(癸氧基)-4-(二甲基氨基)丁酰胺基]-2,2-二氟-十九烷酸十五烷-8-基酯(106)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ7.31, 7.28, 5.32, 5.03, 5.02, 5.00, 4.30, 3.88, 3.86, 3.84, 2.50, 2.48, 2.46, 2.34, 2.32, 2.30, 2.25, 2.07, 2.05, 2.03, 2.01, 1.99, 1.87, 1.85, 1.83, 1.81, 1.64, 1.62, 1.60, 1.58, 1.47, 1.30, 1.29, 1.27, 0.92, 0.91, 0.90, 0.88。

[1170] 实施例11.2-氟-2-己基癸酸3-[N-[3-(二甲基氨基)丙基]癸酰胺基]-十二烷基酯(40)的合成

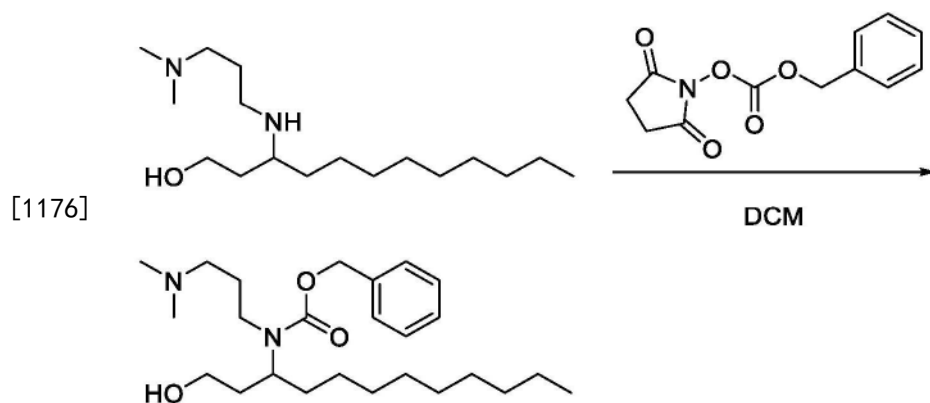


[1172] 步骤1.3-[3-(二甲基氨基)丙基]氨基}十二烷-1-醇的合成



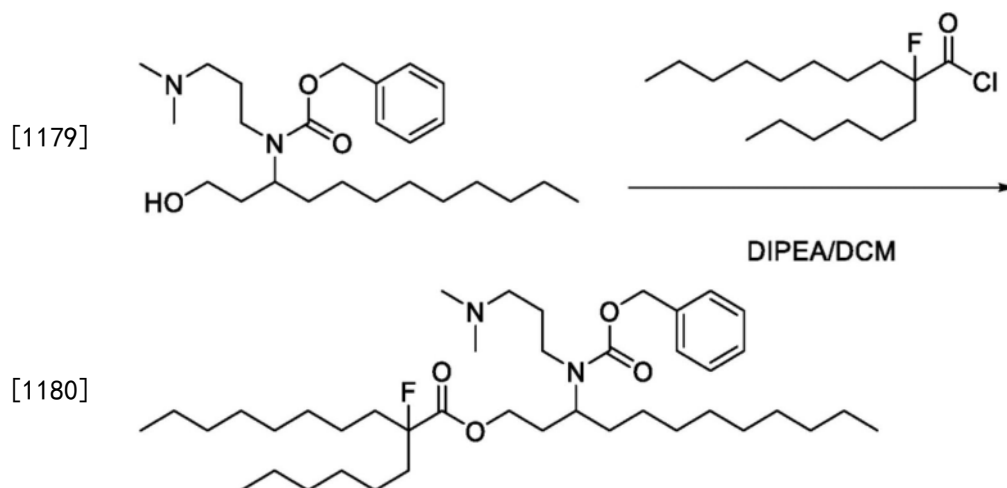
[1174] 将LiAlH₄ (1.7g, 26.8mmol) 在0℃下在THF (100mL) 中搅拌。逐滴添加THF (100mL) 中的3-[3-(二甲基氨基)丙基]氨基}十二烷酸甲酯(2.8g, 8.9mmol), 并将反应物在RT下搅拌直至完成。将反应物冷却至0℃, 添加1M NaOH (20mL) 并用EtOAc萃取。将有机物干燥(MgSO₄), 过滤, 并将滤液在真空中浓缩, 得到粗3-[3-(二甲基氨基)丙基]氨基}十二烷-1-醇(2.6g, 100.0%), 其不经纯化即使用。

[1175] 步骤2.N-[3-(二甲基氨基)丙基]-N-(1-羟基十二烷-3-基)氨基甲酸苄酯的合成



[1177] 将3-[[3-(二甲基氨基)丙基]氨基]十二烷-1-醇(2.6g,8.9mmol)和2,5-二氧代吡咯烷-1-基碳酸苄酯(2.2g,8.9mmol)在DCM(50mL)中在0℃下搅拌16hr,然后升温至RT。将反应物在真空中浓缩,并将残余物通过自动快速色谱(0%-20% MeOH/DCM)纯化,得到N-[3-(二甲基氨基)丙基]-N-(1-羟基十二烷-3-基)氨基甲酸苄酯(2.1g,56.0%)

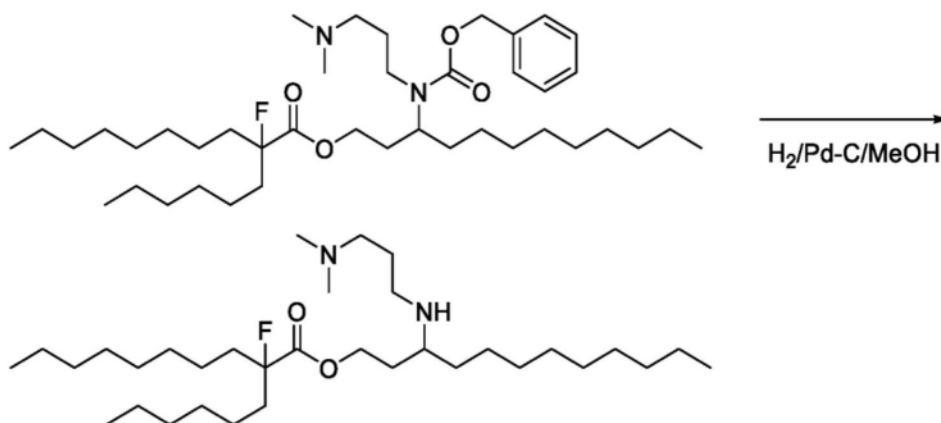
[1178] 步骤3.2-氟-2-己基癸酸3-[[(苄氧基) 羰基][3-(二甲基氨基)丙基]氨基]十二烷基酯的合成



[1181] 将N-[3-(二甲基氨基)丙基]-N-(1-羟基十二烷-3-基)氨基甲酸苄酯(230mg,0.5mmol)、2-氟-2-己基癸酰氯(160mg,0.5mmol)和DIPEA(0.2mL,1.1mmol)在DCM中在微波照射下在80℃下加热10分钟。将反应物在真空中浓缩并将残余物通过自动快速色谱(0%-15%MeOH/DCM)纯化,得到2-氟-2-己基癸酸3-[[(苄氧基) 羰基][3-(二甲基氨基)丙基]氨基]十二烷基酯(196mg,53.0%)。

[1182] 步骤4.2-氟-2-己基癸酸3-[[3-(二甲基氨基)丙基]氨基]十二烷基酯的合成

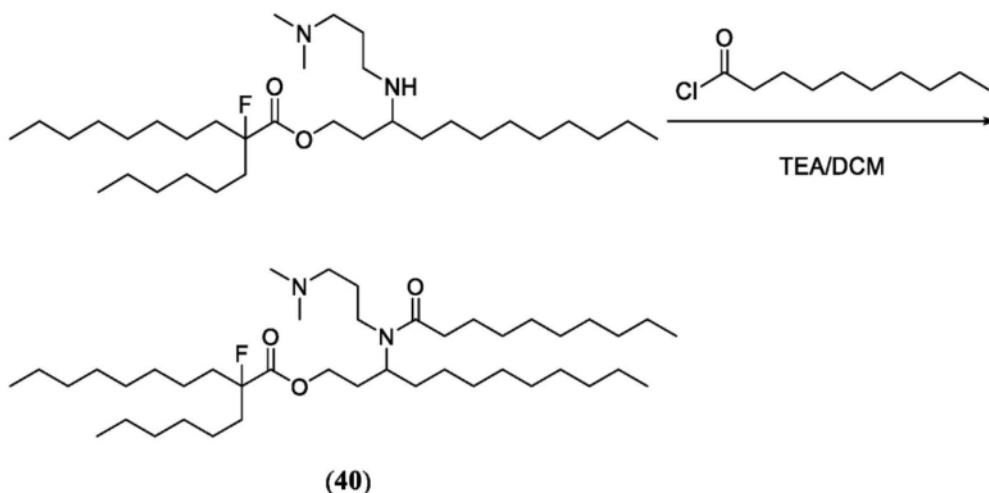
[1183]



[1184] 将2-氟-2-己基癸酸3-{[(苄氧基)羰基][3-(二甲基氨基)丙基]氨基}十二烷基酯(196mg, 0.3mmol)在RT下在MeOH中经Pd/C催化氢化16hr。将反应物过滤并在真空中浓缩,得到2-氟-2-己基癸酸3-{[3-(二甲基氨基)丙基]氨基}十二烷基酯(157mg, 99.9%),其不经进一步纯化即使用。

[1185] 步骤5.2-氟-2-己基癸酸3-{N-[3-(二甲基氨基)丙基]癸酰胺基}十二烷基酯(40)的合成

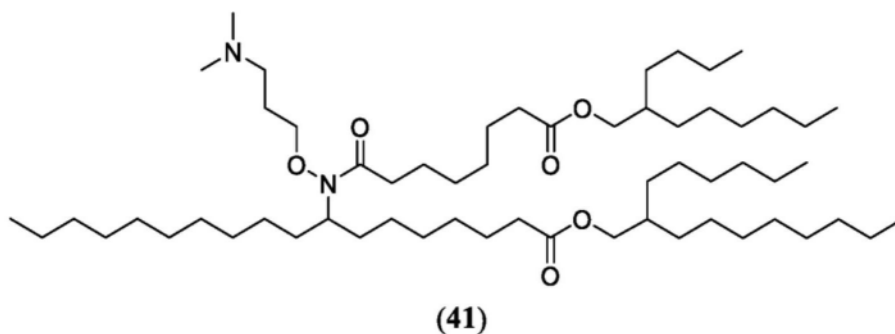
[1186]



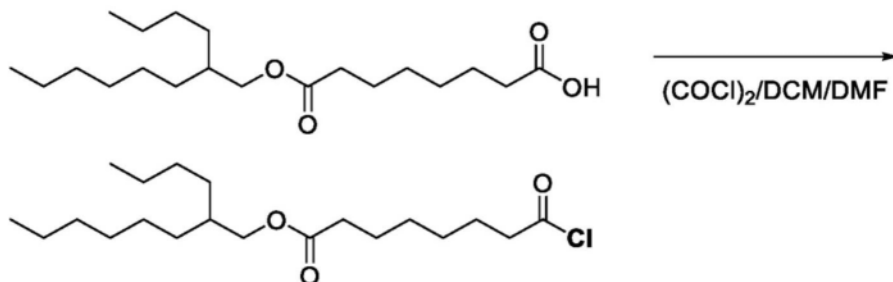
[1187] 将2-氟-2-己基癸酸3-{[3-(二甲基氨基)丙基]氨基}十二烷基酯(157mg, 0.3mmol)、癸酰氯(61mg, 0.32mmol)和TEA(59mg, 0.6mmol)在DCM(20mL)中回流24hr。冷却后,将反应物用NaHCO₃、盐水洗涤,干燥(MgSO₄)并过滤。将滤液在真空中浓缩并将残余物通过自动华快速色谱(0%-10% MeOH/DCM)纯化,得到2-氟-2-己基癸酸3-{N-[3-(二甲基氨基)丙基]癸酰胺基}十二烷基酯(40)(64mg, 31.7%)。¹H NMR(400MHz, CDCl₃) δ 4.41-4.34(m, 1H), 4.23-4.16(m, 1H), 4.12-4.05(m, 1H), 4.01-3.94(m, 1H), 3.93-3.85(m, 1H), 3.78-3.71(m, 1H), 3.24-3.15(m, 2H), 2.39-2.23(m, 7H), 1.96-1.72(m, 8H), 1.51(d, J=7.4Hz, 8H), 1.39-1.08(m, 42H), 0.90(t, 12H)。

[1188] 实施例12.8-{8-[(2-丁基辛基)氧基]-N-[3-(二甲基氨基)丙氧基]-8-氧代辛酰胺基}十八碳烯酸2-己基癸酯(41)的合成

[1189]



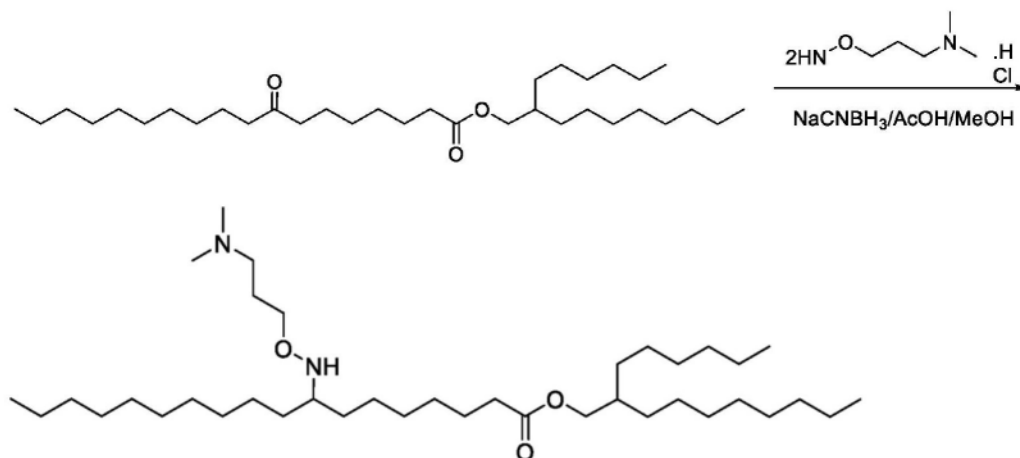
[1190] 步骤1.8-氯-8-氧代辛酸2-丁基辛酯的合成



[1191]

[1192] 将8-[(2-丁基辛基) 氧基]-8-氧代辛酸 (120mg, 0.35mmol)、草酰氯 (67mg, 0.53mmol) 和DMF (催化量) 在DCM中在RT下搅拌3hr.将反应物在真空中浓缩并将残余物在真空中干燥,得到8-氯-8-氧代辛酸2-丁基辛酯 (126mg, 99.6%), 其不经纯化即使用。

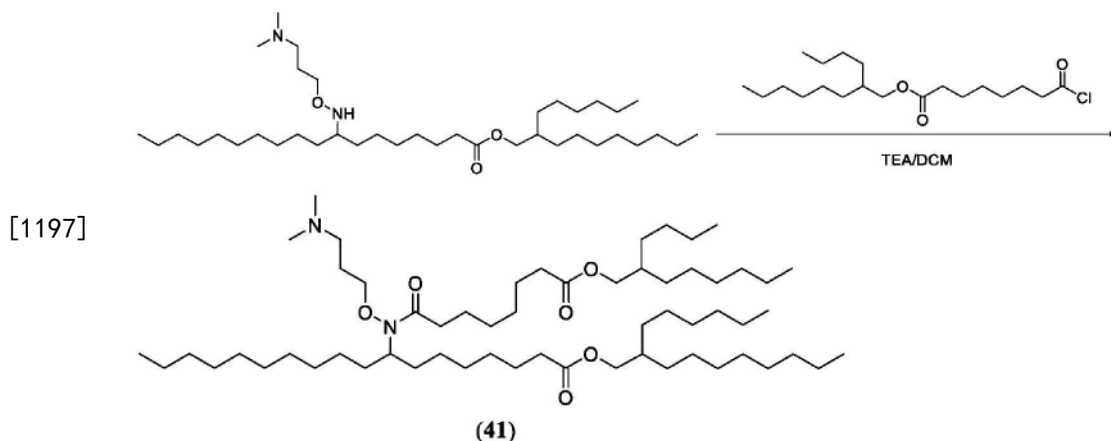
[1193] 步骤2.8- { [3- (二甲基氨基) 丙氧基] 氨基} 十八碳烯酸2-己基癸酯的合成



[1194]

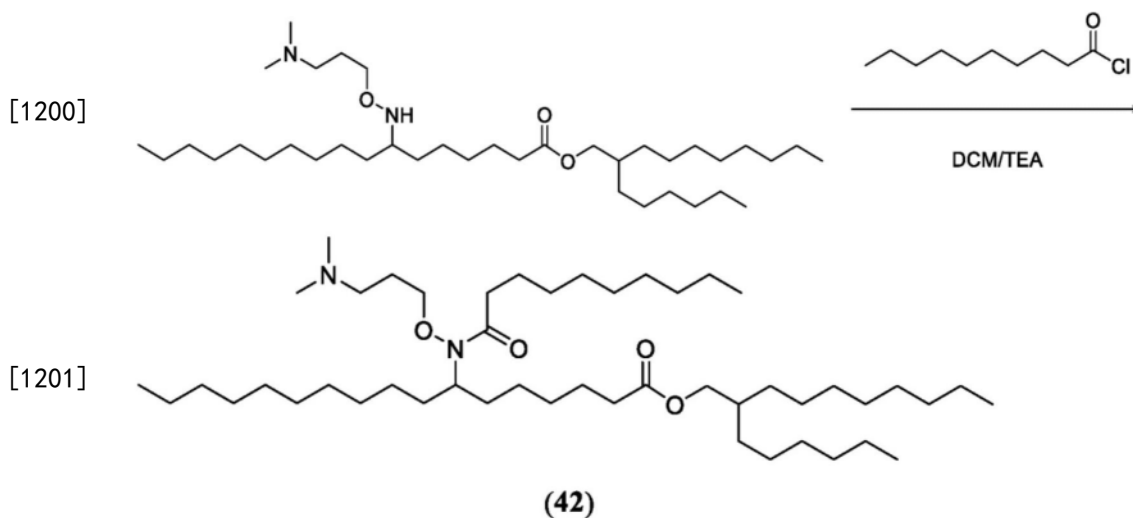
[1195] 将[3- (二甲基氨基) 丙氧基] 胺 (HCl 盐) (148mg, 1.0mmol)、8-氧代十八烷酸2-己基癸酯 (500mg, 1.0mmol)、AcOH (115mg, 1.9mmol) 和NaCNBH₃ (180mg, 2.9mmol) 在MeOH (8mL) 中在45℃下搅拌3天.将反应物在真空中浓缩,并将残余物在1:1DCM/H₂O之间分配.用DCM进一步萃取水层,并将有机物用盐水洗涤,经MgSO₄干燥,过滤并在真空中浓缩.将残余物通过自动快速色谱 (0% -15% MeOH/DCM) 纯化,得到8- { [3- (二甲基氨基) 丙氧基] 氨基} 十八烷酸2-己基癸酯 (385mg, 64.4%)。

[1196] 步骤3.8- {8-[(2-丁基辛基) 氧基]-N-[3- (二甲基氨基) 丙氧基]-8-氧代辛酰胺基} 十八烷酸2-己基癸酯 (41) 的合成



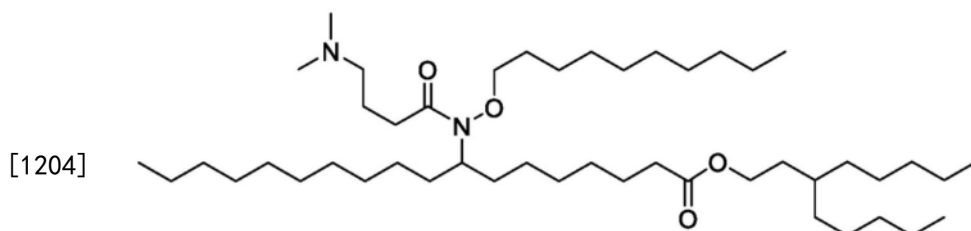
[1198] 将8-[[3-(二甲基氨基)丙氧基]氨基]十八烷酸2-己基癸酯(192mg,0.31mmol)和TEA(62mg,0.6mmol)在RT下在DCM中搅拌。添加DCM中的8-氯-8-氧代辛酸2-丁基辛酯(133mg,0.37mmol),并将反应物在RT下搅拌18hr。将有机物用饱和NaHCO₃和盐水洗涤,干燥(MgSO₄),过滤并在真空中浓缩。将粗物质通过自动快速色谱(0%-15%MeOH/DCM)纯化,得到8-[[8-[(2-丁基辛基)氧基]-N-[3-(二甲基氨基)丙氧基]-8-氧代辛酰胺基]十八烷酸2-己基癸酯(41)(88mg,30.2%)。¹H NMR(400MHz,CDC13) δ4.32-4.24(m,1H),3.99(m,4H),3.93-3.89(m,2H),2.53-2.13(m,14H),1.60-1.42(m,14H),1.43-1.02(m,66H),0.94-0.85(m,15H)。

[1199] 实施例13.7-{N-[3-(二甲基氨基)丙氧基]癸酰胺基}-十七烷酸2-己基癸酯(42)的合成



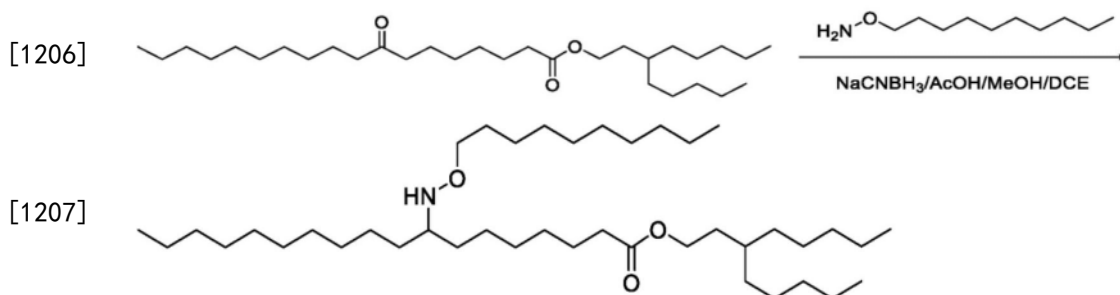
[1202] 将7-[[3-(二甲基氨基)丙氧基]氨基]十七烷酸2-己基癸酯(133mg,0.22mmol)和TEA(44mg,0.44mmol)在RT下在DCM(3mL)中搅拌。逐滴添加DCM中的癸酰氯(5mg,0.26mmol)。将反应物在RT下搅拌18hr。将有机物用饱和NaHCO₃溶液和盐水洗涤,干燥(MgSO₄),过滤并在真空中浓缩。将粗产物通过自动快速色谱(0%-10%MeOH/DCM)纯化,得到7-{N-[3-(二甲基氨基)丙氧基]癸酰胺基}十七烷酸2-己基癸酯(42)(51mg,30.6%)。¹H NMR(400MHz,CDC13) δ4.30(s,2H),3.98(d,J=5.8Hz,2H),3.92(s,1H),2.57-2.19(m,12H),1.87-1.81(m,2H),1.65-1.56(m,11H),1.48-1.42(s,3H),1.38-1.17(m,51H),0.90(td,J=6.9,1.8Hz,12H)。

[1203] 实施例14.8-[N-(癸氧基)-4-(二甲基氨基)丁酰胺基]-十八碳烯酸酯(43)的合成



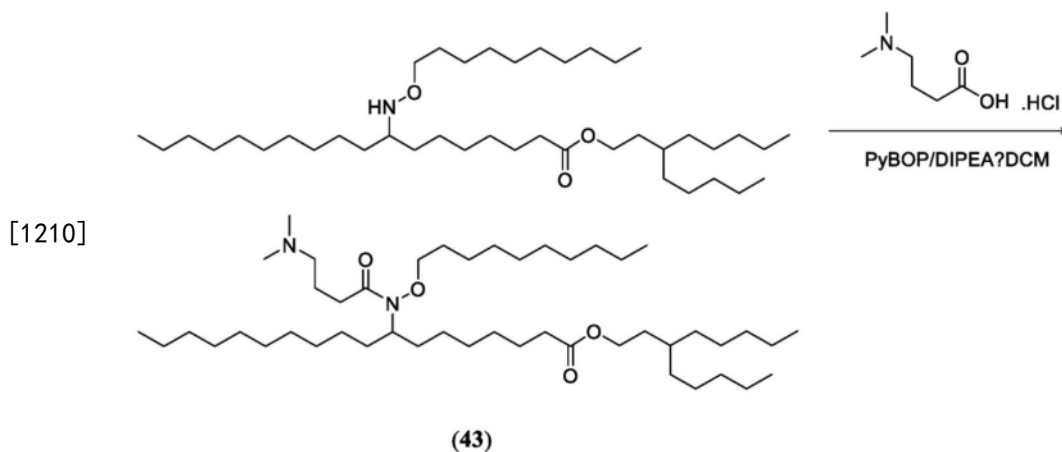
(43)

[1205] 步骤1.8-[(癸氧基) 氨基] 十八碳烯酸3-戊基辛酯的合成



[1208] 将8-氧代十八烷酸3-戊基辛酯 (13.3g, 28mmol)、0-癸基羟胺 (7.2g, 41.5mmol)、AcOH (3.2mL, 55mmol) 和NaCNBH₃ (5.2g, 83mmol) 在MeOH (100mL) 和DCE (50mL) 中在50℃下搅拌15hr。添加额外的NaCNBH₃ (1当量), 并将反应物在60℃下搅拌72hr。将反应物在真空中浓缩, 并将残余物在H₂O (50mL) 与DCM (50mL) 之间分配。用DCM萃取水层, 并将合并的有机物经MgSO₄干燥, 过滤, 在真空中浓缩, 并将残余物通过自动快速色谱纯化, 得到8-[(癸氧基) 氨基] 十八烷酸3-戊基辛酯 (18g, 28.2mmol, 定量)。

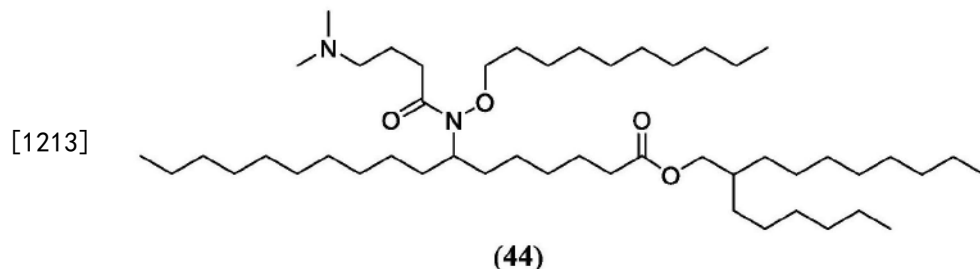
[1209] 步骤2.8-[N-(癸氧基)-4-(二甲基氨基) 丁酰胺基]-十八碳烯酸3-戊基辛酯 (43) 的合成



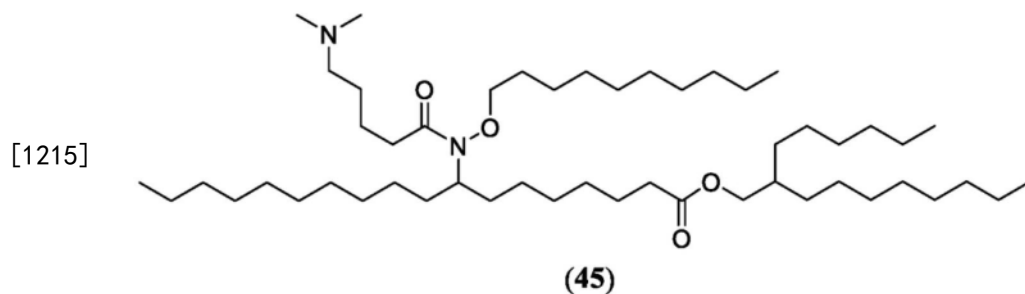
[1211] 将8-[(癸氧基) 氨基] 十八烷酸3-戊基辛酯 (16.21g, 25.4mmol)、4-(二甲基氨基) 丁烷羧酸HCl盐 (4.7g, 27.9mmol)、DIPEA (10.8g, 83.8mmol) 和PyBOP (14.5g, 27.9mmol) 在DCM (50mL) 中在RT下搅拌18hr。将反应物用1M HCl、NaHCO₃ (饱和水溶液) 和盐水洗涤, 干燥 (MgSO₄), 过滤并在真空中浓缩。将粗物质通过自动快速色谱 (0%-15% MeOH/DCM) 纯化, 得到8-[N-(癸氧基)-4-(二甲基氨基) 丁酰胺基] 十八烷酸3-戊基辛酯, 将其溶解于EtOAc中, 用饱和NaHCO₃ (3×) 和1M NaOH (2×) 洗涤两次, 干燥 (MgSO₄), 过滤并在真空中浓缩, 得到8-

[N-(癸氧基)-4-(二甲基氨基)丁酰胺基]十八烷酸酯(43) (6.4g, 33.5%)。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 4.25 (tt, $J=9.9, 5.0\text{Hz}$, 1H), 4.05 (t, $J=7.1\text{Hz}$, 2H), 3.81 (t, $J=6.5\text{Hz}$, 2H), 2.43 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 2H), 2.26 (dt, $J=17.2, 7.4\text{Hz}$, 4H), 2.20 (s, 6H), 1.78 (p, $J=7.4\text{Hz}$, 2H), 1.56 (dq, $J=20.5, 6.6\text{Hz}$, 8H), 1.47-1.33 (m, 5H), 1.24 (dd, $J=13.4, 4.8\text{Hz}$, 50H), 0.85 (td, $J=6.9, 3.0\text{Hz}$, 12H)。

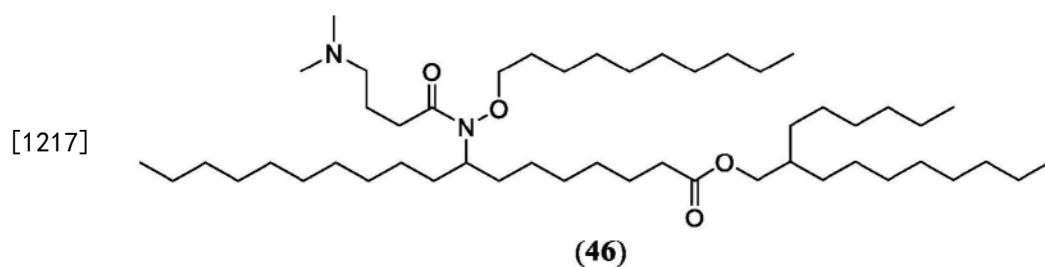
[1212] 使用如上所述的类似方法制备以下化合物。



[1214] 7-(N-(癸氧基)-4-(二甲基氨基)丁酰胺基)十七烷酸2-己基癸酯(44)。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 4.29 (s, 1H), 3.98 (d, $J=5.8\text{Hz}$, 2H), 3.86 (t, $J=6.5\text{Hz}$, 2H), 2.55-2.21 (m, 10H), 1.61-1.90 (m, 19H), 1.29 (m, 48H), 0.99-0.73 (m, 12H)。

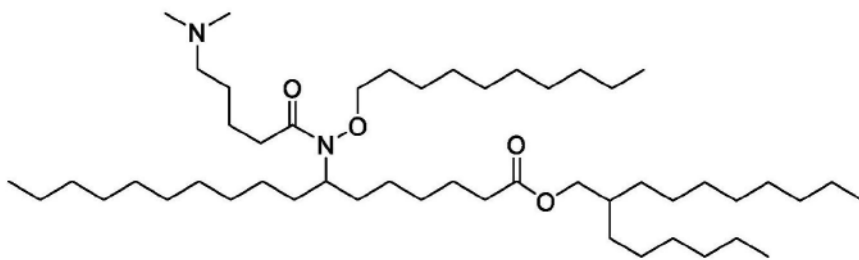


[1216] 8-(N-(癸氧基)-5-(二甲基氨基)戊酰胺基)十八碳烯酸2-己基癸酯(45)。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 4.29 (s, 1H), 3.98 (d, $J=5.8\text{Hz}$, 2H), 3.85 (t, $J=6.5\text{Hz}$, 2H), 2.47 (t, $J=7.2\text{Hz}$, 2H), 2.38 (s, 2H), 2.29 (d, $J=7.8\text{Hz}$, 6H), 1.84-1.52 (m, 22H), 1.52-1.06 (m, 53H), 0.90 (td, $J=6.9, 2.0\text{Hz}$, 12H)。



[1218] 8-(N-(癸氧基)-4-(二甲基氨基)丁酰胺基)十八碳烯酸2-己基癸酯(46)。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 4.28 (s, 1H), 3.98 (d, $J=5.8\text{Hz}$, 2H), 3.86 (t, $J=6.6\text{Hz}$, 2H), 2.51 (t, $J=7.3\text{Hz}$, 3H), 2.30 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 4H), 1.96-1.83 (m, 2H), 1.63 (d, $J=16.9\text{Hz}$, 22H), 1.54-1.22 (m, 52H), 0.90 (td, $J=6.8, 2.1\text{Hz}$, 12H)。

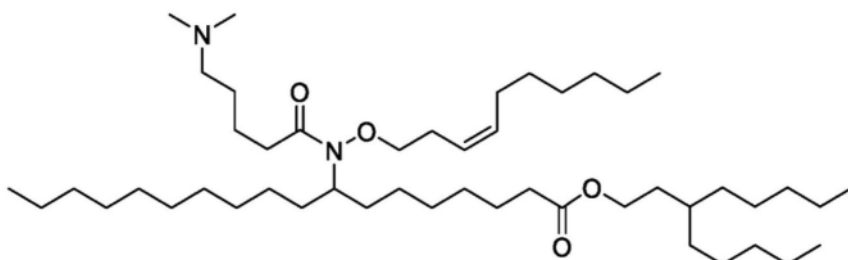
[1219]



(47)

[1220] 7- (N- (癸氧基) -5- (二甲基氨基) 戊酰胺基) 十七烷酸2-己基癸酯 (47)。产物通过 MS (ESI+ve) 确认

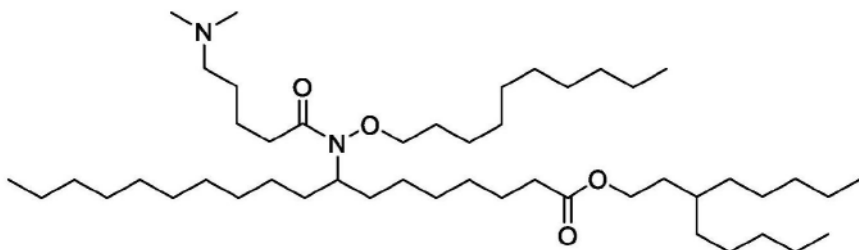
[1221]



(94)

[1222] (Z) -8- (N- (癸-3-烯-1-基氧基) -5- (二甲基氨基) 戊酰胺基) 十八烷酸3-戊基辛酯 (94)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ5.51-5.30 (m, 2H), 4.39-4.19 (m, 1H), 4.10 (t, J=7.1Hz, 2H), 3.86 (t, J=6.6Hz, 2H), 2.47 (t, J=7.3Hz, 2H), 2.40-2.24 (m, 10H), 2.05 (dd, J=13.8, 6.7Hz, 2H), 1.95 (s, 7H), 1.76-1.49 (m, 7H), 1.44-1.20 (m, 44H), 0.91 (ddt, J=7.0, 5.3, 2.6Hz, 12H)。

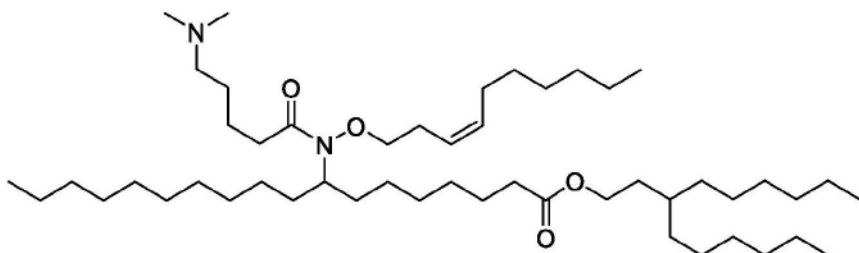
[1223]



(95)

[1224] 8- (N- (癸氧基) -5- (二甲基氨基) 戊酰胺基) 十八烷酸3-戊基辛酯 (95)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ4.29 (d, J=4.9Hz, 0H), 4.10 (t, J=7.1Hz, 2H), 3.85 (t, J=6.5Hz, 2H), 2.47 (t, J=7.4Hz, 2H), 2.34 (dd, J=16.2, 8.8Hz, 3H), 2.29 (d, J=5.3Hz, 7H), 1.74-1.51 (m, 20H), 1.51-1.14 (m, 57H), 0.90 (td, J=6.9, 2.6Hz, 12H)。

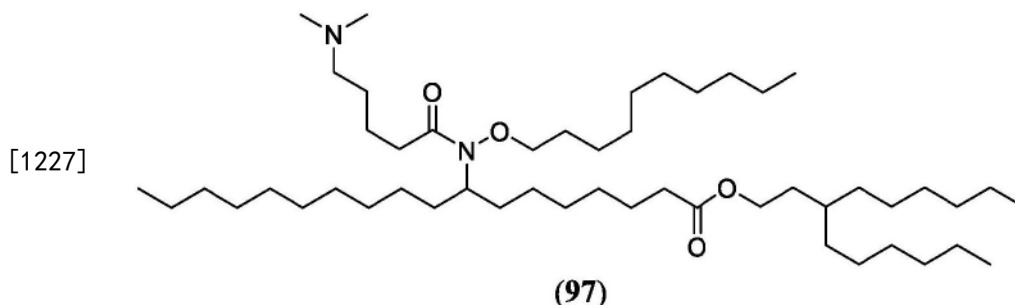
[1225]



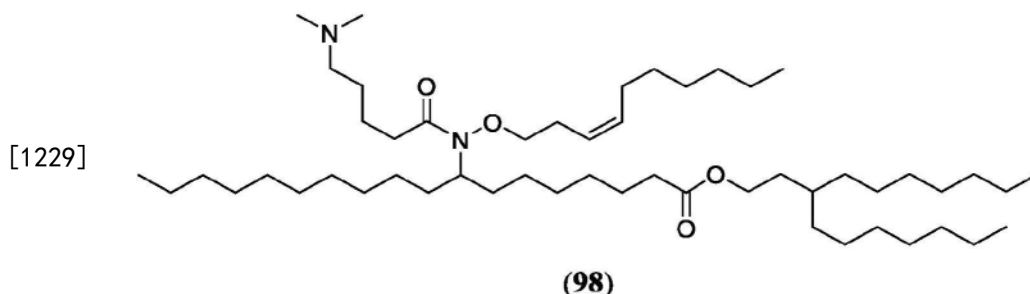
(96)

[1226] (Z) -8- (N- (癸-3-烯-1-基氧基) -5- (二甲基氨基) 戊酰胺基) 十八烷酸3-己基壬酯

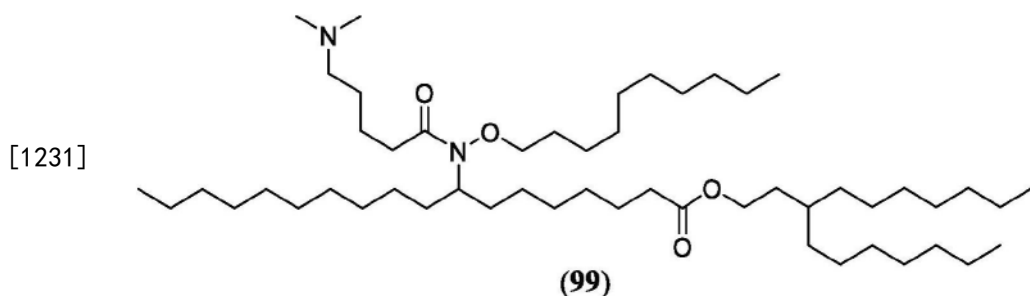
(96)。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 5.50-5.31 (m, 2H), 4.29 (s, 1H), 4.10 (t, $J=7.1\text{Hz}$, 2H), 3.86 (t, $J=6.6\text{Hz}$, 2H), 2.47 (t, $J=7.4\text{Hz}$, 2H), 2.37-2.23 (m, 10H), 2.16 (q, $J=7.4\text{Hz}$, 2H), 2.05 (q, $J=7.1\text{Hz}$, 2H), 1.76-1.54 (m, 20H), 1.52-1.15 (m, 47H), 0.91 (tt, $J=6.8, 2.8\text{Hz}$, 12H)。



[1228] 8- (N- (癸氧基) -5- (二甲基氨基) 戊酰胺基) 十八烷酸3-己基壬酯 (97)。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 4.29 (d, $J=5.1\text{Hz}$, 0H), 4.10 (t, $J=7.1\text{Hz}$, 2H), 3.85 (t, $J=6.6\text{Hz}$, 2H), 2.47 (t, $J=7.4\text{Hz}$, 2H), 2.38-2.22 (m, 9H), 1.74-1.51 (m, 17H), 1.50-1.19 (m, 57H), 0.90 (td, $J=6.8, 2.2\text{Hz}$, 12H)。

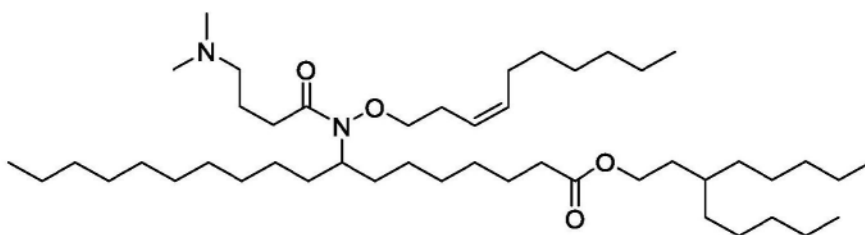


[1230] (Z) -8- (N- (癸-3-烯-1-基氧基) -5- (二甲基氨基) 戊酰胺基) 十八烷酸3-庚基癸酯 (98)。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 5.51-5.31 (m, 2H), 4.29 (s, 1H), 4.09 (t, $J=7.1\text{Hz}$, 2H), 3.86 (t, $J=6.6\text{Hz}$, 2H), 2.48 (t, $J=7.2\text{Hz}$, 2H), 2.44-2.23 (m, 9H), 2.17 (q, $J=7.5\text{Hz}$, 2H), 1.77-1.18 (m, 70H), 0.90 (td, $J=6.7, 2.3\text{Hz}$, 12H)。



[1232] 8- (N- (癸氧基) -5- (二甲基氨基) 戊酰胺基) 十八烷酸3-庚基癸酯。(99)。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 4.29 (s, 1H), 4.09 (t, $J=7.1\text{Hz}$, 2H), 3.85 (t, $J=6.5\text{Hz}$, 2H), 2.68-2.14 (m, 12H), 1.63 (tq, $J=13.9, 7.3\text{Hz}$, 21H), 1.53-1.16 (m, 60H), 1.00-0.79 (m, 12H)。

[1233]

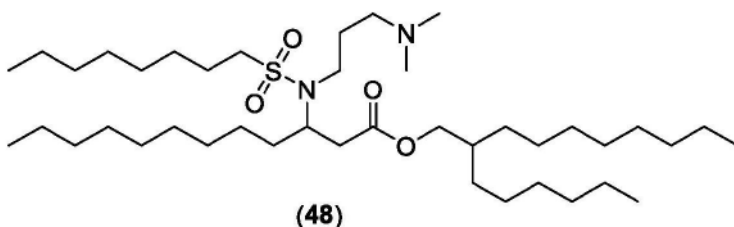


(100)

[1234] (Z)-8-(N-(癸-3-烯-1-基氧基)-4-(二甲基氨基)丁酰胺基)十八烷酸3-戊基辛酯 (100)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 5.50-5.31 (m, 2H), 4.29 (s, 0H), 4.10 (t, J=7.1Hz, 2H), 3.87 (t, J=6.6Hz, 2H), 2.50 (t, J=7.4Hz, 2H), 2.40 (s, 2H), 2.33-2.27 (m, 7H), 2.16 (q, J=7.4Hz, 2H), 2.05 (q, J=7.0Hz, 2H), 1.87 (p, J=7.4Hz, 2H), 1.77-1.54 (m, 16H), 1.29 (d, J=13.9Hz, 42H), 0.91 (tt, J=6.9, 2.8Hz, 12H)。

[1235] 实施例15.3- {N-[3-(二甲基氨基)丙基]辛烷-1-磺酰胺基} 十二烷酸2-己基癸酯 (48) 的合成

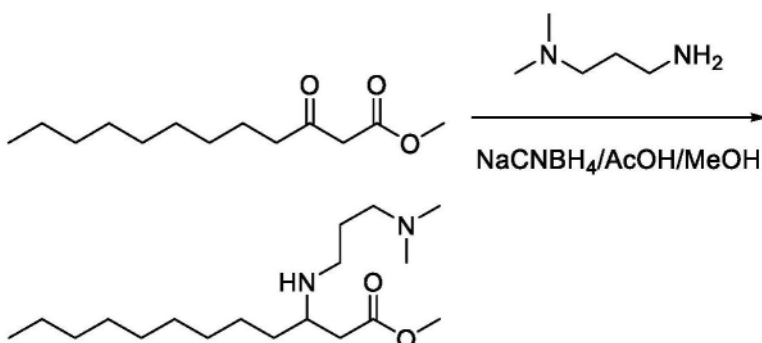
[1236]



(48)

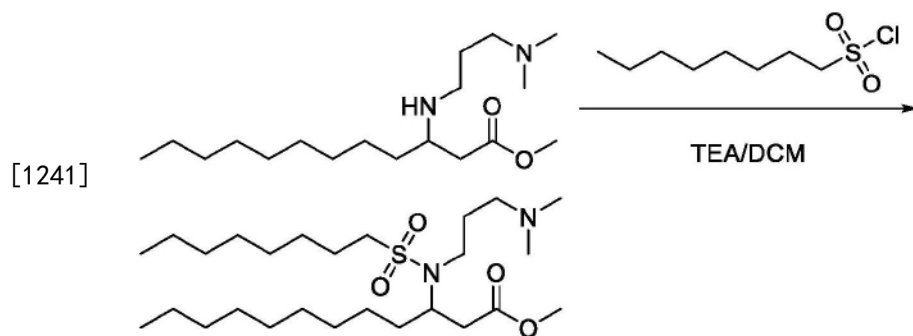
[1237] 步骤1.3- {[3-(二甲基氨基)丙基]氨基} 十二烷酸甲酯的合成

[1238]



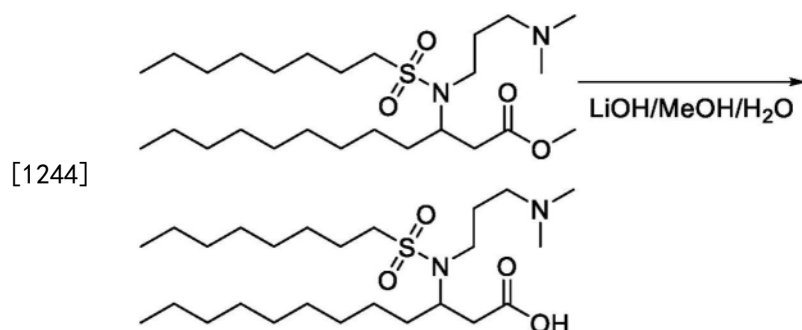
[1239] 将3-氧代十二烷酸甲酯 (5g, 21.9mmol)、二甲基氨基丙胺 (2.2g, 21.9mmol) 和AcOH (1.4g, 22.6mmol) 在MeOH (100mL) 中在75℃下搅拌1hr。冷却后,分批添加NaCNBH₃ (2.8g, 43.8mmol),并将反应物在RT下搅拌18hr。将反应物在真空中浓缩,将残余物溶解于EtOAc中,用H₂O和盐水洗涤,干燥 (MgSO₄),过滤并在真空中浓缩。将粗物质通过自动快速色谱 (0%-10% MeOH/DCM/0.5% TEA) 纯化,得到3- {[3-(二甲基氨基)丙基]氨基} 十二烷酸甲酯 (2.62g, 38.0%)。

[1240] 步骤2.3- {N-[3-(二甲基氨基)丙基]辛烷-1-磺酰胺基} 十二烷酸甲酯的合成



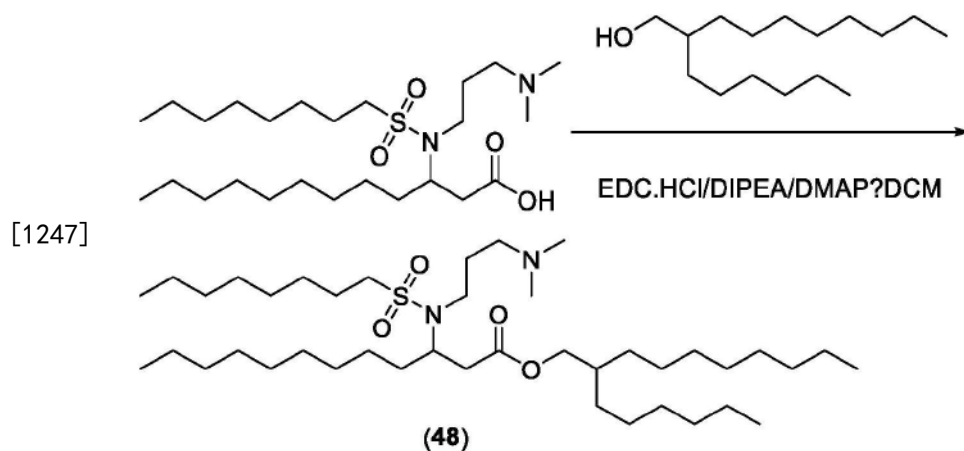
[1242] 将3-{[3-(二甲基氨基)丙基]氨基}十二烷酸甲酯(300mg, 1.0mmol)、TEA(193mg, 1.9mmol)和1-辛烷磺酰氯(213mg, 1.0mmol)在DCM中在RT下搅拌18hr。将有机物用盐水洗涤,干燥(MgSO₄),过滤并在真空中浓缩。将残余物通过自动快速色谱(0%-5%MeOH/DCM)纯化,得到3-{N-[3-(二甲基氨基)丙基]辛烷-1-磺酰胺基}十二烷酸甲酯(276mg, 59.0%)。

[1243] 步骤3.3-{N-[3-(二甲基氨基)丙基]辛烷-1-磺酰胺基}十二烷酸的合成



[1245] 将3-{N-[3-(二甲基氨基)丙基]辛烷-1-磺酰胺基}十二烷酸甲酯(278mg, 0.6mmol)和LiOH(27mg, 1.1mmol)在MeOH(10mL)和H₂O(2mL)中在RT下搅拌18hr。添加6M HCl(0.19mL, 6M, 1.1mmol),将反应物用水稀释并用DCM萃取。将有机物干燥(MgSO₄),过滤并在真空中浓缩,得到3-{N-[3-(二甲基氨基)丙基]辛烷-1-磺酰胺基}十二烷酸(0.27g, 定量),其不经纯化即使用。

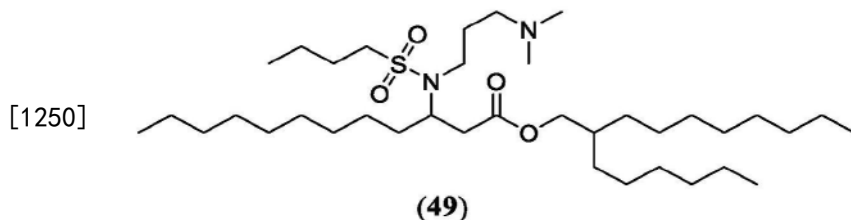
[1246] 步骤4.3-{N-[3-(二甲基氨基)丙基]辛烷-1-磺酰胺基}十二烷酸2-己基癸酯(48)的合成



[1248] 将3-{N-[3-(二甲基氨基)丙基]辛烷-1-磺酰胺基}十二烷酸(0.27g, 0.6mmol)、己基癸醇(151mg, 0.6mmol)、EDC HCl(217mg, 1.1mmol)、DIPEA(0.3mL, 1.7mmol)和DMAP(催化

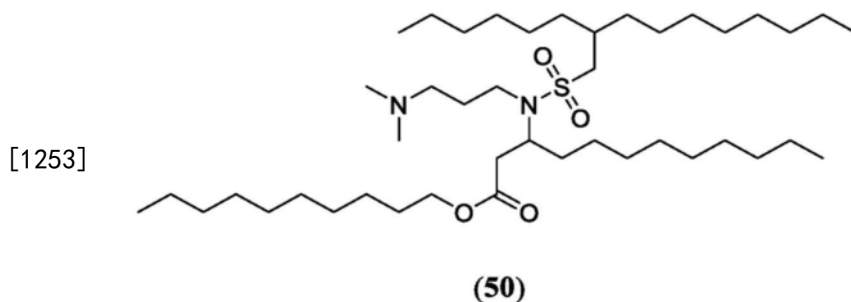
量)在RT下搅拌18hr。将有机物用饱和 NaHCO_3 和盐水洗涤,干燥(MgSO_4),过滤并在真空中浓缩。将残余物通过自动快速色谱(0%-12% MeOH/DCM)和(0%-2%MeOH/EtOAc)纯化,得到3-{N-[3-(二甲基氨基)丙基]辛烷-1-磺酰胺基}十二烷酸2-己基癸酯(48)(61mg,15.4%)。 ^1H NMR(400MHz,CDC13) δ 4.05-4.00(m,3H),3.25-3.14(m,2H),2.95(td,J=7.0,3.2Hz,2H),2.71-2.53(m,2H),2.32-2.24(m,7H),1.91-1.58(m,12H),1.43-1.28(m,44H),0.93-0.75(m,12H)。

[1249] 使用如上所述的类似方法制备以下化合物。

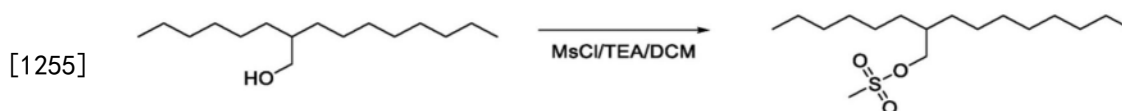


[1251] 3-(N-(3-(二甲基氨基)丙基)丁基磺酰胺基)十二烷酸2-己基癸酯(49)。产物通过MS(ESI+ve)确认

[1252] 实施例16.3-{N-[3-(二甲基氨基)丙基]2-己基癸烷磺酰胺基}十二烷酸癸酯(50)的合成

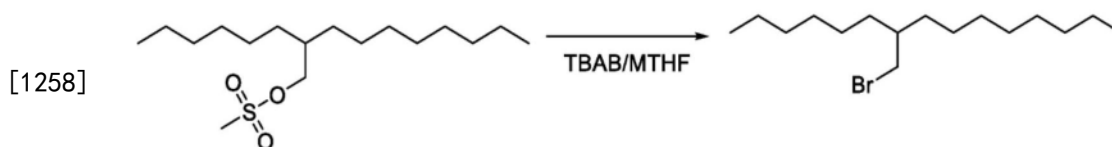


[1254] 步骤1.甲磺酸2-己基癸酯的合成



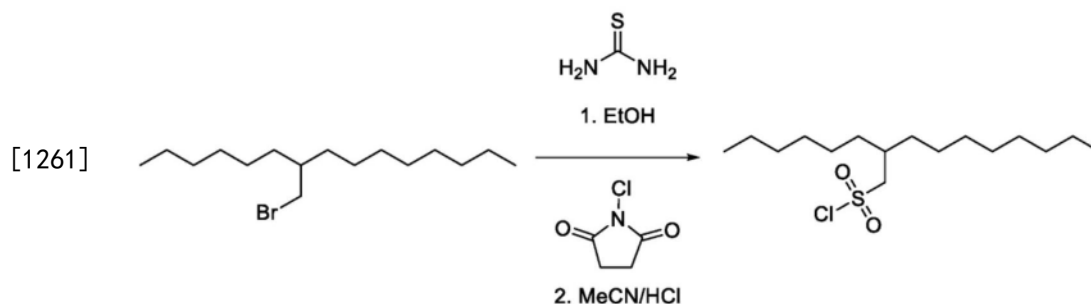
[1256] 将己基癸醇(2g,8.2mmol)和TEA(1.44mL,10.3mmol)在0℃下在DCM(30mL)中搅拌。逐滴添加MsCl(0.7mL,9.1mmol)并将反应物在RT下搅拌2hr。将反应物用饱和 NaHCO_3 淬灭并用 Et_2O 稀释。将有机物用盐水洗涤,干燥(MgSO_4)并在真空中浓缩,得到粗甲磺酸2-己基癸酯(2.64g,定量),其不经纯化即使用。

[1257] 步骤2.7-(溴甲基)十五烷的合成



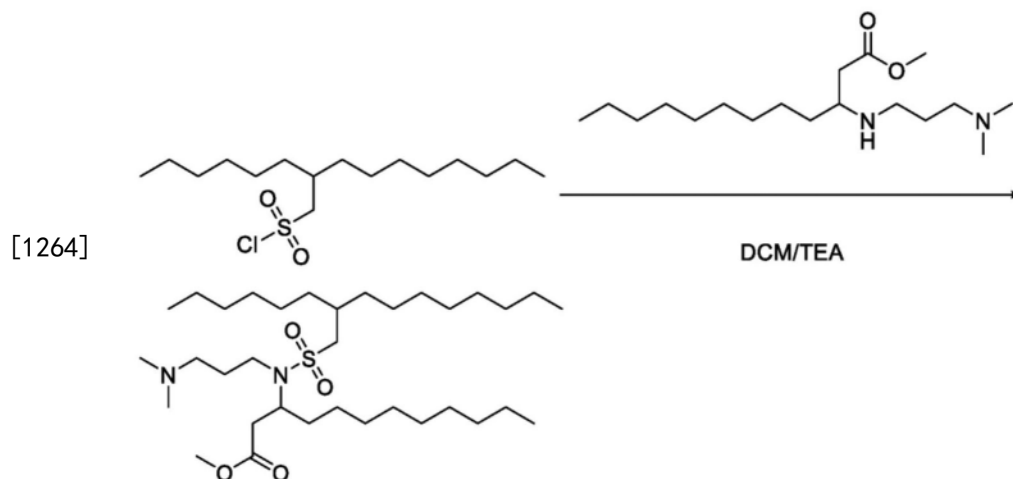
[1259] 将甲磺酸2-己基癸酯(2.64g,8.2mmol)和TBAB(3.5g,10.7mmol)在甲基THF(50mL)中在80℃下搅拌2.5hr。将反应物倒入冰水中并用己烷萃取。用己烷反萃取水层,并将合并的有机物用盐水洗涤,干燥(MgSO_4),过滤并在真空中浓缩。将粗物质通过自动快速色谱(100%己烷)纯化,得到7-(溴甲基)十五烷(2.52g,95.2%)。

[1260] 步骤3.2-己基癸烷-1-磺酰氯的合成



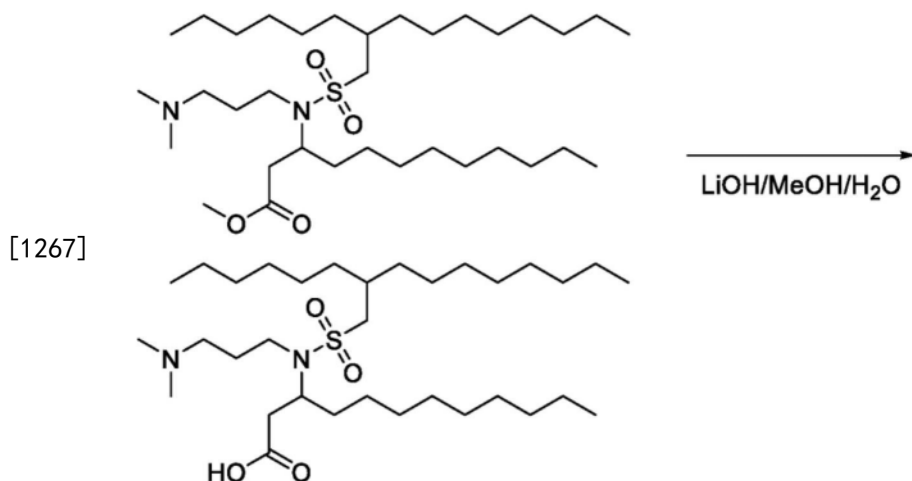
[1262] 将7-(溴甲基)十五烷(500mg, 1.64mmol)和硫脲(124mg, 1.64mmol)在EtOH(10mL)中回流1hr。在真空中除去溶剂,并将残余物与氯代琥珀酰亚胺(1.1g, 8.2mmol)、2M HCl(1.1mL, 1.1mmol)和MeCN(10mL)一起搅拌,将温度保持在10℃与20℃之间,持续15分钟。将反应物在Et₂O(15mL)与H₂O(15mL)之间分配。将有机物分离,干燥(Na₂SO₄),在真空中浓缩,并将粗物质通过自动快速色谱(PE-EtOAc, 5:1)纯化,得到2-己基癸烷-1-磺酰氯(436mg, 82.0%)。

[1263] 步骤4.3- {N-[3-(二甲基氨基)丙基]2-己基癸烷磺酰胺基}-十二烷酸甲酯的合成



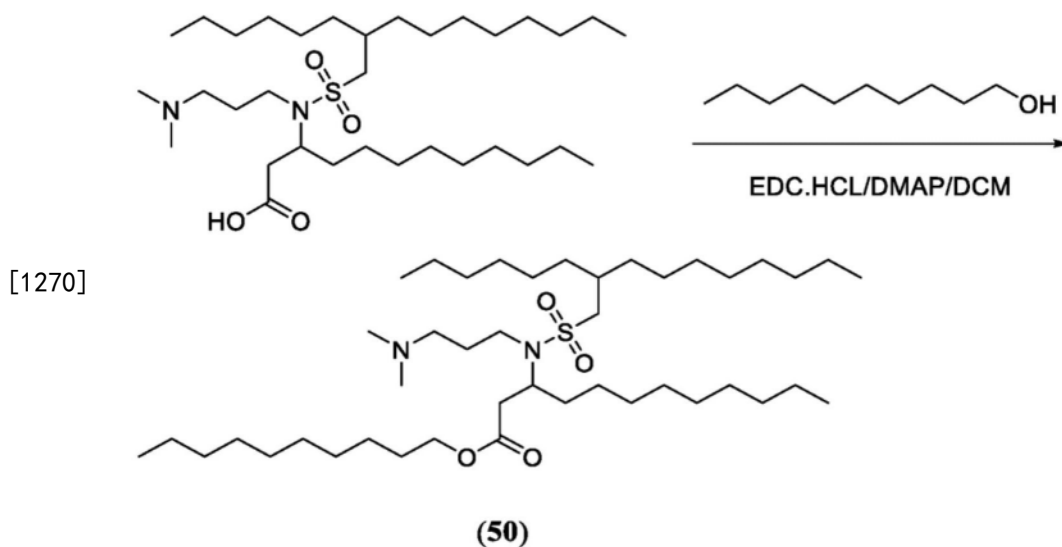
[1265] 将3-{[3-(二甲基氨基)丙基]氨基}十二烷酸甲酯(426mg, 1.4mmol)、TEA(380μL, 2.7mmol)和2-己基癸烷-1-磺酰氯(462mg, 1.4mmol)在DCM(10mL)中在RT下搅拌2天。将有机物用盐水洗涤,干燥(MgSO₄),过滤,将滤液在真空中浓缩并将残余物通过自动快速色谱(0%-10% MeOH/DCM)纯化,得到3-{N-[3-(二甲基氨基)丙基]2-己基癸烷磺酰胺基}十二烷酸甲酯(366mg, 44.8%)。

[1266] 步骤5.3- {N-[3-(二甲基氨基)丙基]2-己基癸烷磺酰胺基}-十二烷酸的合成



[1268] 将3- {N-[3-(二甲基氨基)丙基]2-己基癸烷磺酰胺基}十二烷酸甲酯(366mg, 0.61mmol)和LiOH(29mg, 1.2mmol)在MeOH(10mL)和H₂O(2mL)中在RT下搅拌18hr。将反应物用6M HCl(0.2mL)淬灭,用H₂O稀释并用DCM萃取。将有机物干燥(MgSO₄),过滤并在真空中浓缩,得到3- {N-[3-(二甲基氨基)丙基]2-己基癸烷磺酰胺基}十二烷酸(291mg, 81.4%),其不经进一步纯化即使用。

[1269] 步骤6.3- {N-[3-(二甲基氨基)丙基]2-己基癸烷-磺酰胺基}十二烷酸癸酯(50)的合成

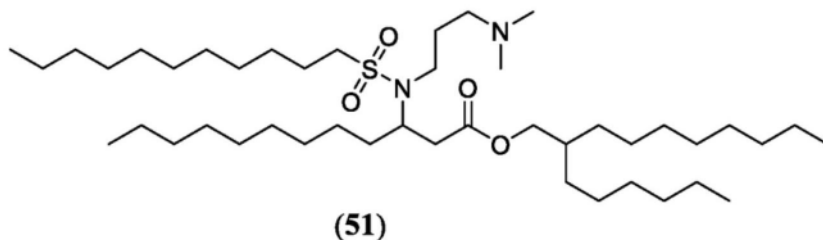


[1271] 将癸醇(86mg, 0.54mmol)、3- {N-[3-(二甲基氨基)丙基]2-己基癸烷-磺酰胺基}十二烷酸(291mg, 0.5mmol)、EDC HCl(189mg, 1.0mmol)、DIPEA(0.26mL, 1.5mmol)和DMAP(6mg, 0.05mmol)在DCM(2mL)中在RT下搅拌18hr。将有机物用饱和NaHCO₃和盐水洗涤,干燥(MgSO₄),过滤并在真空中浓缩。将残余物通过自动快速色谱(0%-2% MeOH/EtOAc)纯化两次,得到3- {N-[3-(二甲基氨基)丙基]2-己基癸烷-磺酰胺基}十二烷酸癸酯(50)(41mg, 11.4%)。¹H NMR(400MHz, CDC13) δ4.11-4.04(m, 3H), 3.20-3.14(m, 2H), 2.91(dd, J=13.7, 6.2Hz, 1H), 2.80(dd, J=13.7, 6.1Hz, 1H), 2.65(dd, J=15.4, 7.1Hz, 1H), 2.55(dd, J=15.5, 6.9Hz, 1H), 2.31-2.23(m, 7H), 2.08-2.02(m, 1H), 1.84-1.63(m, 10H), 1.42-1.49(m, 5H), 1.49-1.28(m, 44H), 0.90(t, J=6.6Hz, 12H)。

[1272] 实施例17.3- {N-[3-(二甲基氨基)丙基]十一烷-1-磺酰胺基}十二烷酸酯(51)的

合成

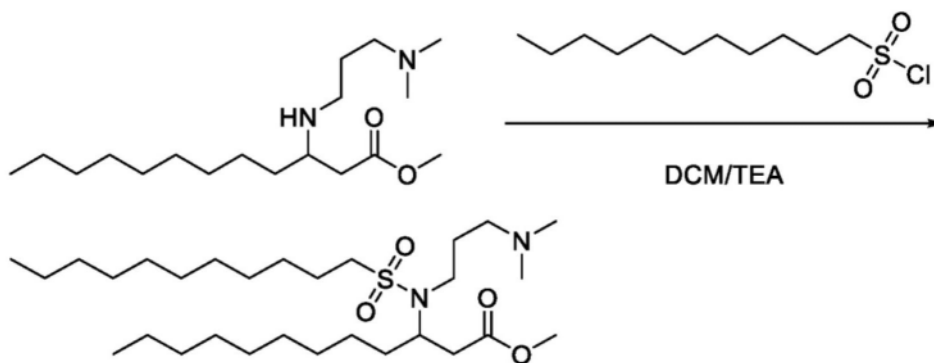
[1273]



(51)

[1274] 步骤1.3- {N-[3-(二甲基氨基)丙基]十一烷-1-磺酰胺基} 十二烷酸甲酯的合成

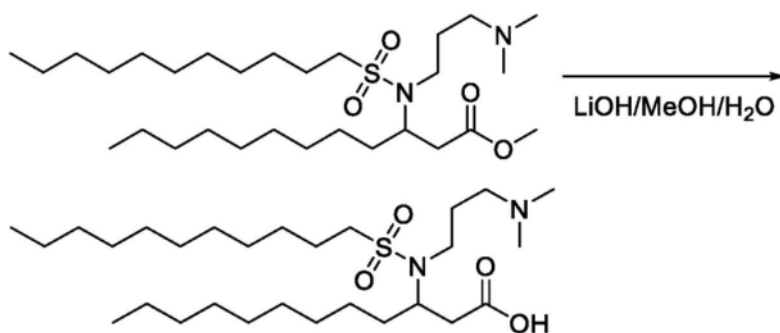
[1275]



[1276] 将3- {[3-(二甲基氨基)丙基]氨基} 十二烷酸甲酯 (939mg, 3.0mmol)、TEA (0.8mL, 6.0mmol) 和十一烷-1-磺酰氯 (989mg, 3.9mmol) 在DCM (30mL) 中在RT下搅拌18hr。将有机物用盐水洗涤,干燥 (MgSO₄), 过滤并将滤液在真空中浓缩。将残余物通过自动快速色谱 (0% - 10% MeOH/DCM) 纯化, 得到3- {N-[3-(二甲基氨基)丙基]十一烷-1-磺酰胺基} 十二烷酸甲酯 (564mg, 35.5%)。

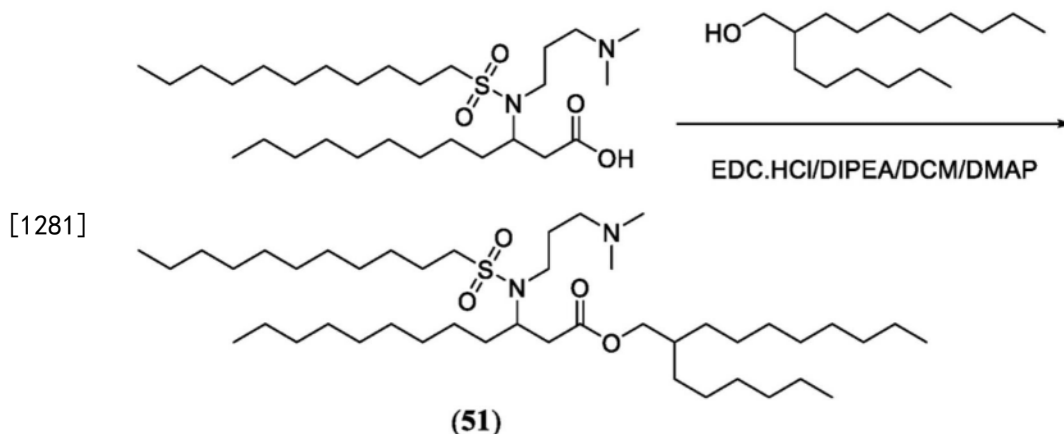
[1277] 步骤2.3- {N-[3-(二甲基氨基)丙基]十一烷-1-磺酰胺基} 十二烷酸的合成

[1278]



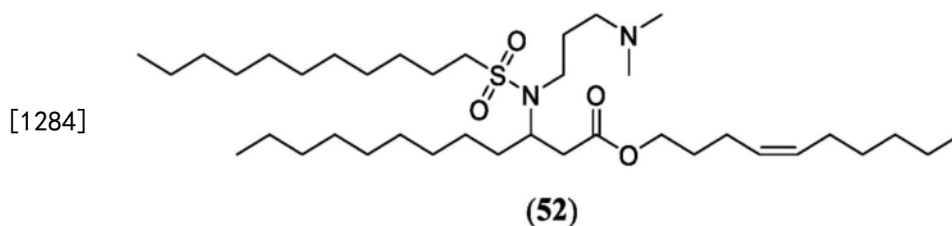
[1279] 将3- {N-[3-(二甲基氨基)丙基]十一烷-1-磺酰胺基} 十二烷酸甲酯 (564mg, 1.1mmol) 和LiOH (76mg, 3.2mmol) 在MeOH (10mL) 和H₂O (2mL) 中在RT下搅拌18hr。添加6M HCl (0.53mL), 将反应物用H₂O稀释并用DCM萃取。将有机物干燥 (MgSO₄), 过滤并在真空中浓缩, 得到3- {N-[3-(二甲基氨基)丙基]十一烷-1-磺酰胺基} 十二烷酸, 其不经纯化即使用。

[1280] 步骤3.3- {N-[3-(二甲基氨基)丙基]十一烷-1-磺酰胺基} 十二烷酸2-己基癸酯 (51) 的合成



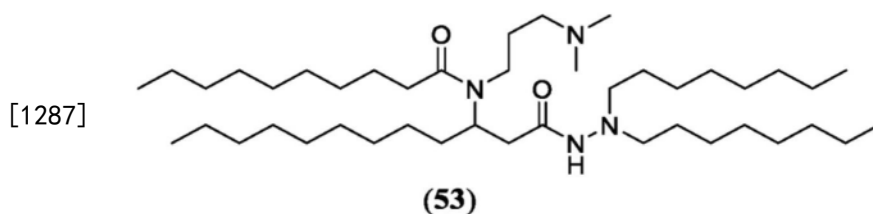
[1282] 将己基癸醇 (139mg, 0.6mmol)、3- {N-[3-(二甲基氨基)丙基]十一烷-1-磺酰胺基} 十二烷酸 (270mg, 0.52mmol)、EDC HCl (0.2g, 1.04mmol)、DIPEA (202mg, 0.3mL, 1.56mmol) 和 DMAP (13mg, 0.1mmol) 在 DCM (10mL) 中在 RT 下搅拌 18hr。将有机物用饱和 NaHCO_3 和盐水洗涤, 干燥 (MgSO_4), 过滤并在真空中浓缩。将残余物通过自动快速色谱 (0% - 4% MeOH/EtOAc 和 0% - 10% MeOH/DCM) 纯化, 得到 3- {N-[3-(二甲基氨基)丙基]十一烷-1-磺酰胺基} 十二烷酸 2-己基癸酯 (51) (50mg, 13.0%)。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 4.08-3.89 (m, 3H), 3.29-3.08 (m, 2H), 3.01-2.83 (m, 2H), 2.72-2.47 (m, 2H), 2.33-2.09 (m, 7H), 1.86-1.45 (m, 10H), 1.44-0.94 (m, 52H), 0.87 (t, $J=6.5\text{Hz}$, 12H)。

[1283] 使用如上所述的类似方法制备以下化合物

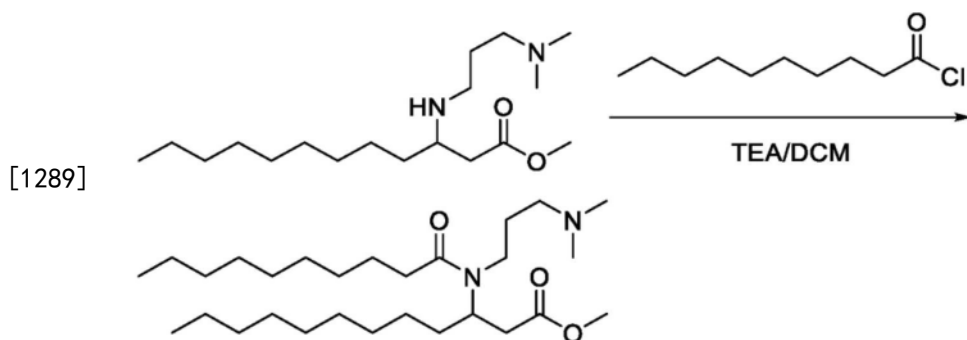


[1285] 3- (N- (3- (二甲基氨基) 丙基) 十一烷基磺酰胺基) 十二烷酸 (Z) - 癸-4-烯-1-基酯 (52)。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 5.46-5.26 (m, 2H), 4.15-3.91 (m, 3H), 3.23-3.06 (m, 2H), 3.01-2.82 (m, 2H), 2.70-2.46 (m, 2H), 2.35-2.13 (m, 7H), 2.05 (dq, $J=35.5, 7.2\text{Hz}$, 4H), 1.89-1.45 (m, 10H), 1.44-0.99 (m, 35H), 0.94-0.80 (m, 9H)。

[1286] 实施例 18. N-[3-(二甲基氨基)丙基]-N-[1-(N',N'-二辛基胍基)十一烷-2-基] 癸酰胺 (53) 的合成

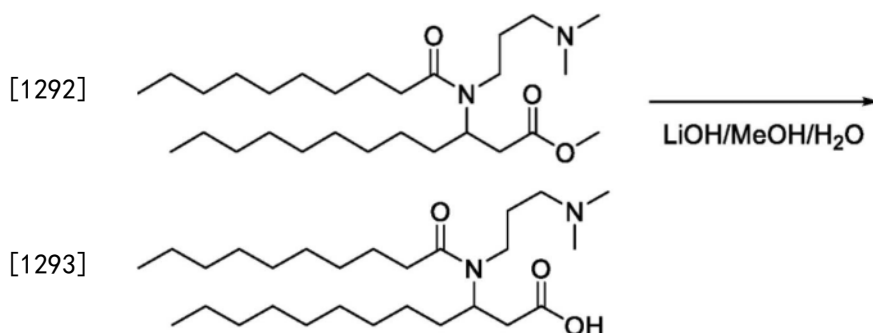


[1288] 步骤 1.3- {N-[3-(二甲基氨基)丙基]癸酰胺基} 十二烷酸甲酯的合成



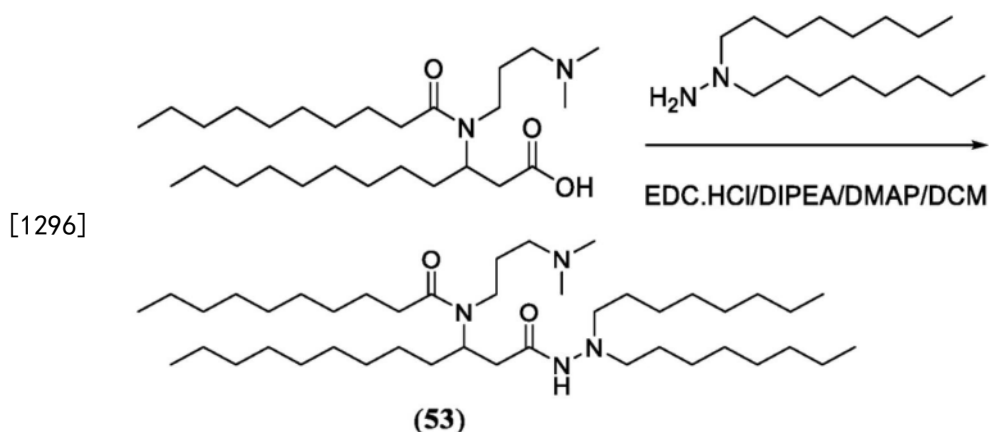
[1290] 将3-[[3-(二甲基氨基)丙基]氨基]十二烷酸甲酯(2g,6.4mmol)和TEA(4.6mL,12.7mmol)在DCM中在RT下搅拌。逐滴添加癸酰氯(1.3g,7.0mmol)并将反应物在RT下搅拌18hr。将有机物用盐水洗涤,干燥(MgSO_4),过滤并在真空中浓缩。将残余物通过(0%-10% MeOH/DCM)纯化,得到3-{N-[3-(二甲基氨基)丙基]癸酰胺基}十二烷酸甲酯(2g,67.4%)。

[1291] 步骤2.3-{N-[3-(二甲基氨基)丙基]癸酰胺基}十二烷酸的合成



[1294] 将3-{N-[3-(二甲基氨基)丙基]癸酰胺基}十二烷酸甲酯(3.4g,7.3mmol)和LiOH(347mg,14.5mmol)在MeOH(8mL)和H₂O(2mL)中在RT下搅拌18hr。添加6M HCl(2.4mL)并用DCM萃取反应物。将有机物合并,干燥(MgSO_4),过滤并在真空中浓缩,得到3-{N-[3-(二甲基氨基)丙基]癸酰胺基}十二烷酸(3.03g,91.9%),其不经纯化即使用。

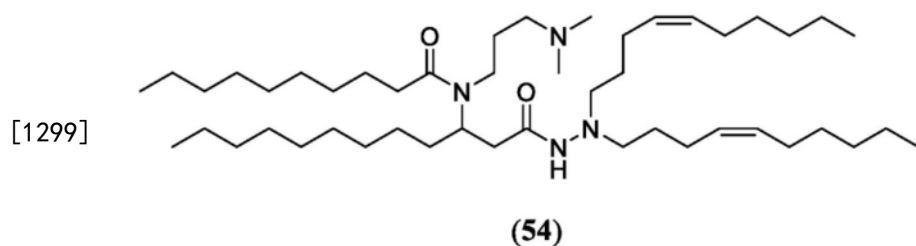
[1295] 步骤3.N-[3-(二甲基氨基)丙基]-N-[1-(N',N'-二辛基胍-羰基)十一烷-2-基]癸酰胺(53)的合成



[1297] 将1,1-二辛基胍(782mg,3.0mmol)、3-{N-[3-(二甲基氨基)丙基]-癸酰胺基}十二烷酸(1.5g,3.35mmol)、EDC HCl(1.17g,6.1mmol)和DMAP(37mg,0.31mmol)在DCM中在RT下搅拌16hr。将反应物用饱和NaHCO₃淬灭,用DCM萃取,将有机物用盐水洗涤,干燥(MgSO_4)并在真空中浓缩。将残余物通过自动快速色谱(5% MeOH/DCM)纯化,得到N-[3-(二甲基氨基)丙

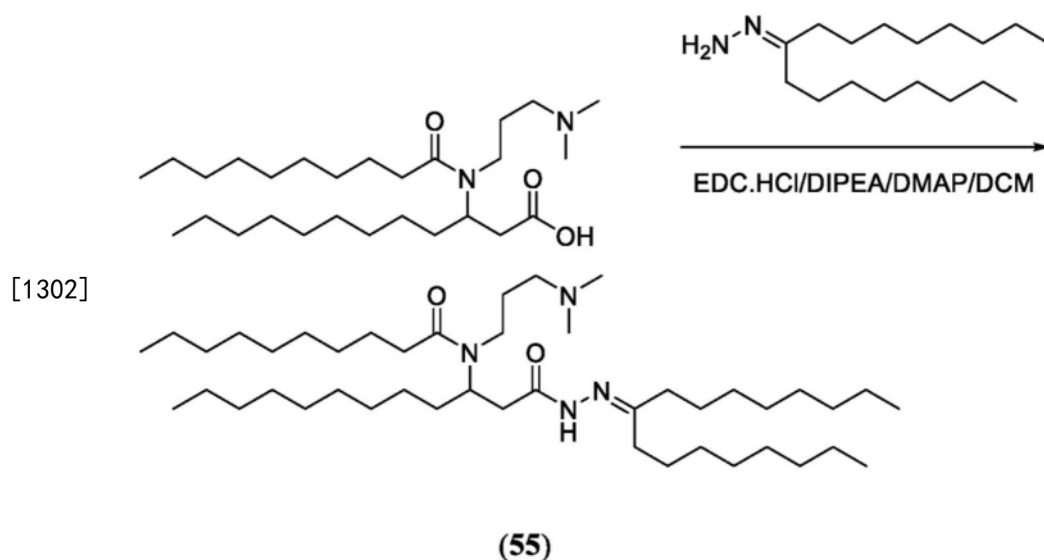
基]-N-[1-(N',N'-二辛基胍基)十一烷-2-基]癸酰胺(53)(495mg,23.4%)。¹H NMR(400MHz,CDC13) δ 5.74(s,1H),3.32-3.07(m,2H),2.83-2.55(m,5H),2.55-2.14(m,12H),1.79-1.64(m,5H),1.55-1.40(m,5H),1.39-0.99(m,46H),0.96-0.84(m,12H)。

[1298] 使用如上所述的类似方法制备以下化合物。



[1300] N-(1-(2,2-二((Z)-癸-4-烯-1-基)胍基)-1-氧代十二烷-3-基)-N-(3-(二甲基氨基)-丙基)癸酰胺(54)。¹H NMR(400MHz,CDC13) δ 5.72(d,J=31.3Hz,1H),5.45-5.22(m,4H),4.45(d,J=57.4Hz,1H),3.31-3.16(m,1H),2.80-2.59(m,6H),2.59-2.20(m,9H),2.11-1.93(m,8H),1.82-1.43(m,10H),1.43-1.13(m,40H),0.99-0.78(m,12H)。

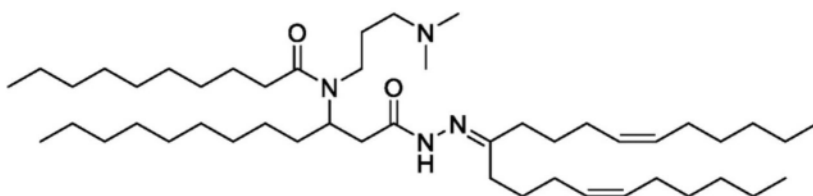
[1301] 实施例19.N-[3-(二甲基氨基)丙基]-N-{1-[N'-(十七烷-9-亚基)胍基]十一烷-2-基}癸酰胺(55)的合成



[1303] 将十七烷-9-亚基胍(231mg,0.86mmol)、3-[N-[3-(二甲基氨基)-丙基]癸酰胺基]十二烷酸(430mg,0.95mmol)、EDC Hcl(330mg,1.7mmol)和DMAP(10mg,0.1mmol)在DCM(20mL)中在RT下搅拌16hr。将反应物用饱和NaHCO₃溶液淬灭并用DCM萃取。将有机物用盐水洗涤,干燥(MgSO₄),在真空中浓缩,并将残余物通过自动快速色谱(5% MeOH/DCM)纯化,得到N-[3-(二甲基氨基)丙基]-N-{1-[N'-(十七烷-9-亚基)胍基]十一烷-2-基}癸酰胺(55)(176mg,29.0%)。¹H NMR(400MHz,CDC13) δ 8.19(s,1H),4.53-4.38(m,1H),3.73-3.65(m,1H),3.39-3.09(m,3H),2.95-2.86(m,1H),2.82-2.65(m,3H),2.59-2.19(m,12H),2.19-2.10(m,2H),1.57-1.41(m,6H),1.40-1.15(m,46H),0.95-0.84(m,12H)。

[1304] 使用如上所述的类似方法制备以下化合物。

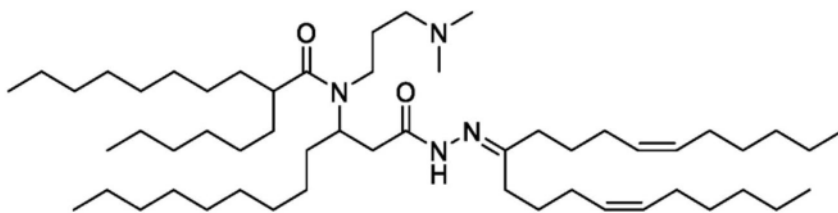
[1305]



(56)

[1306] N-(3-(二甲基氨基)丙基)-N-(1-(2-((6Z,15Z)-二十一碳-6,15-二烯-11-亚基)肼基)-1-氧代十二烷-3-基)癸酰胺 (56)。¹H NMR (400MHz, CDC13) δ 8.21 (s, 1H), 5.49-5.30 (m, 4H), 4.58-4.35 (m, 3H), 3.35-3.12 (m, 3H), 3.04-2.59 (m, 7H), 2.54-2.21 (m, 10H), 2.18-1.77 (m, 12H), 1.51-1.05 (m, 40H), 0.95-0.77 (m, 12H)。

[1307]

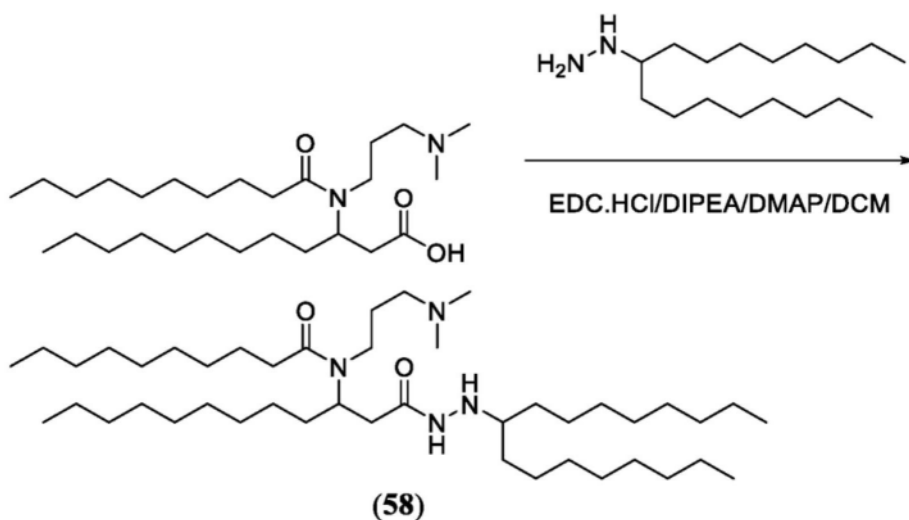


(57)

[1308] N-(3-(二甲基氨基)丙基)-N-(1-(2-((6Z,15Z)-二十一碳-6,15-二烯-11-亚基)肼基)-1-氧代十二烷-3-基)-2-己基癸酰胺 (57)。¹H NMR (400MHz, CDC13) δ 5.53-5.22 (m, 4H), 4.57-4.38 (m, 2H), 4.32-4.19 (m, 2H), 3.44-3.15 (m, 4H), 3.15-2.15 (m, 16H), 2.15-1.75 (m, 9H), 1.60-1.01 (m, 52H), 0.97-0.67 (m, 15H)。

[1309] 实施例20. N-[3-(二甲基氨基)丙基]-N-{1-[N'-(十七烷-9-基)肼基]十一烷-2-基}癸酰胺 (58) 的合成

[1310]

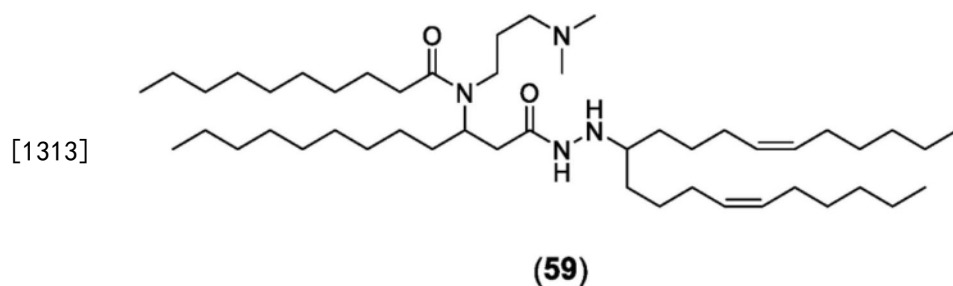


(58)

[1311] 将十七烷-9-基肼 (500mg, 1.9mmol)、3-{N-[3-(二甲基氨基)-丙基]癸酰胺基}十二烷酸 (925mg, 2.0mmol)、EDC.HCl (709mg, 3.7mmol) 和 DMAP (23mg, 0.19mmol) 在 RT 下搅拌 16hr。将反应物用饱和 NaHCO₃ 溶液淬灭, 用 DCM 萃取, 用盐水洗涤, 干燥 (MgSO₄) 并在真空中浓缩。将残余物通过自动快速色谱 (0%-100% EtOAc/Hex 和 0%-10% MeOH/DCM) 纯化, 得到 N-[3-(二甲基氨基)丙基]-N-{1-[N'-(十七烷-9-基)肼基]十一烷-2-基}癸酰胺 (58) (598mg, 45.7%)。¹H NMR (400MHz, CDC13) δ 8.29-8.15 (m, 1H), 4.45 (s, 1H), 3.54-3.13 (m,

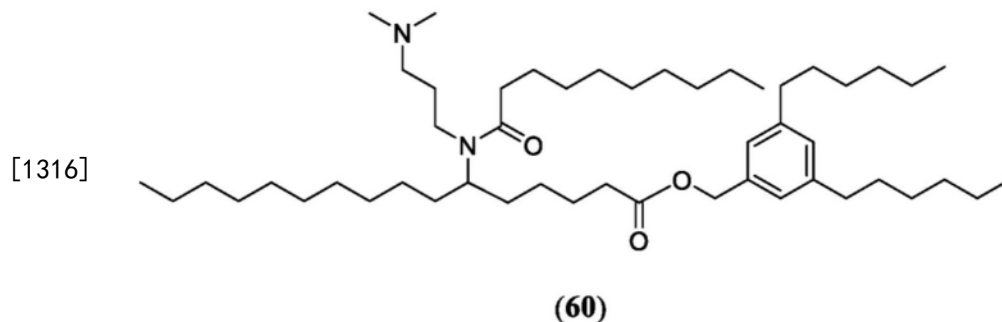
4H), 2.76-2.03 (m, 14H), 2.01-1.70 (m, 2H), 1.59-1.03 (m, 56H), 1.02-0.81 (m, 12H)。

[1312] 使用如上所述的类似方法制备以下化合物。

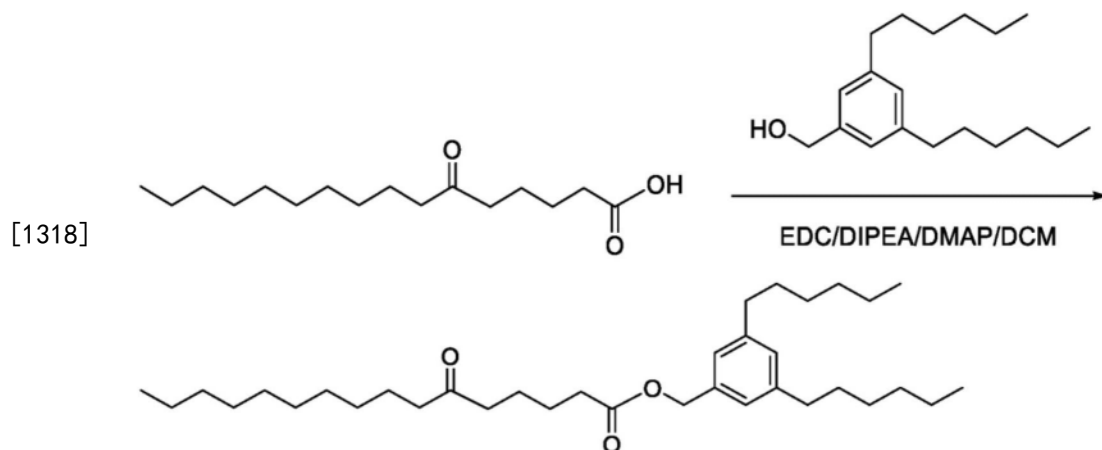


[1314] N-(3-(二甲基氨基)丙基)-N-(1-(2-((6Z,15Z)-二十一碳-6,15-二烯-11-基)肼基)-1-氧代十二烷-3-基)癸酰胺 (59)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 8.20 (d, J=25.7Hz, 1H), 5.47-5.26 (m, 4H), 3.34-3.19 (m, 2H), 3.09-2.95 (m, 1H), 2.79-2.66 (m, 1H), 2.62-2.19 (m, 10H), 2.11-1.97 (m, 8H), 1.77-1.46 (m, 7H), 1.45-1.13 (m, 48H), 0.94-0.86 (m, 12H)。

[1315] 实施例21.6- {N-[3-(二甲基氨基)-丙基]癸酰胺基}十六烷酸(3,5-二己基苯基)甲酯 (60) 的合成

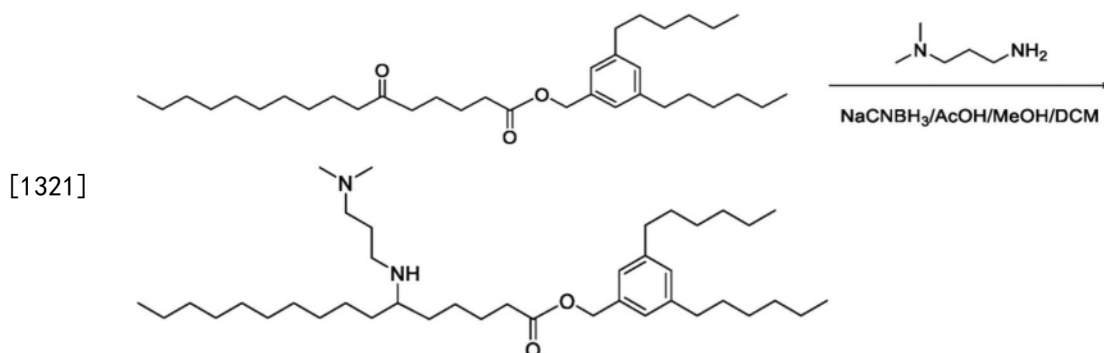


[1317] 步骤1.6-氧代十六烷酸(3,5-二己基苯基)甲酯的合成



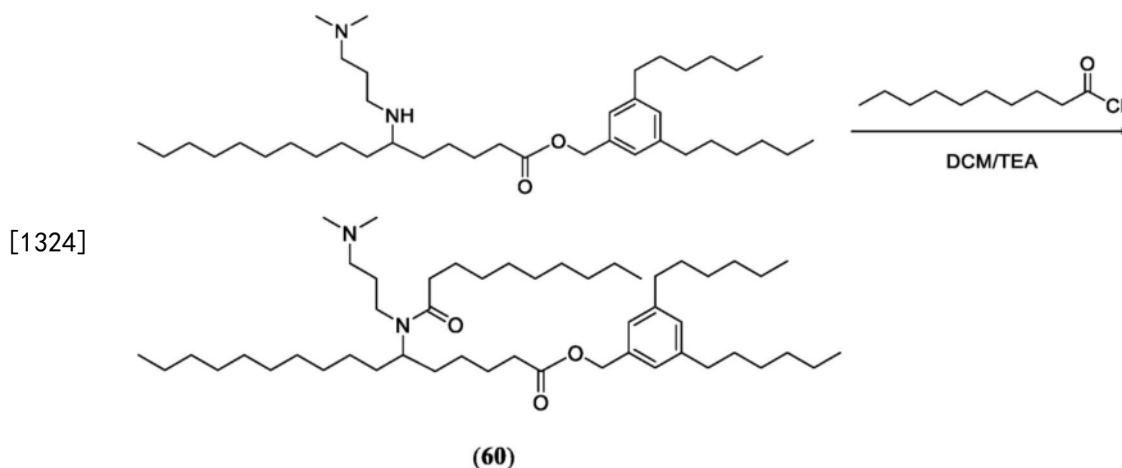
[1319] 将6-氧代十六烷酸(500mg, 1.8mmol)、(3,5-二己基苯基)甲醇(511mg, 1.8mmol)、DIPEA(1.0mL, 5.5mmol)、EDC(710mg, 3.7mmol)和DMAP(100mg, 0.19mmol)在DCM(10mL)中在0℃下搅拌16hr,使其升温至RT。将反应物用饱和NaHCO₃和盐水洗涤,干燥(MgSO₄),过滤,在真空中浓缩,并将残余物通过自动快速色谱(0%-15% EtOAc/Hex)纯化,得到6-氧代十六烷酸(3,5-二己基苯基)甲酯(546mg, 55.8%)。

[1320] 步骤2.6- {[3-(二甲基氨基)丙基]-氨基}十六烷酸(3,5-二己基苯基)甲酯的合成



[1322] 将6-氧代十六烷酸(3,5-二己基苯基)甲酯(546mg,1.1mmol)、二甲基氨基丙烷(119mg,1.2mmol)、AcOH(0.12mL,2.12mmol)和NaCNBH₃(200mg,3.2mmol)在MeOH(10mL)和DCM(3mL)中在RT下搅拌15hr。将反应物在真空中浓缩,并将残余物在H₂O(50mL)与EtOAc(50mL)之间分配。用EtOAc萃取水层,将合并的有机物干燥(Na₂SO₄),过滤并在真空中浓缩。将残余物通过自动快速色谱(0%-15% MeOH/DCM/0.5% TEA)纯化,得到6-{[3-(二甲基氨基)丙基]氨基}十六烷酸(3,5-二己基苯基)甲酯(490mg,75.1%)。

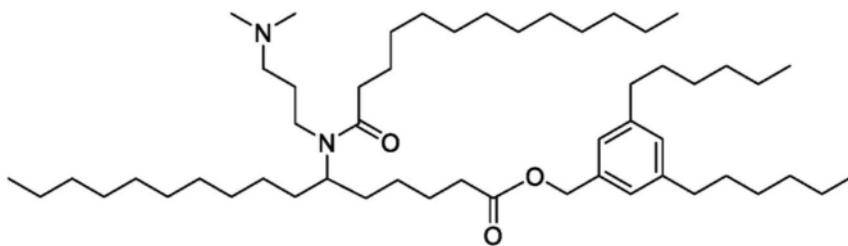
[1323] 步骤3.6- {N-[3-(二甲基氨基)丙基]-癸酰胺基}十六烷酸(3,5-二己基苯基)甲酯(60)



[1325] 将6-{[3-(二甲基氨基)丙基]氨基}十六烷酸(3,5-二己基苯基)甲酯(163mg,0.27mmol)和TEA(80mg,0.80mmol)溶解于DCM(10mL)中,然后逐滴添加DCM(10mL)中的癸酰氯(0.11mL,0.53mmol)。将反应物在RT下搅拌20hr,用饱和NaHCO₃和盐水洗涤,干燥(MgSO₄),过滤并在真空中浓缩。将残余物通过自动快速色谱(0%-15%MeOH/DCM)纯化,得到6-{N-[3-(二甲基氨基)丙基]癸酰胺基}十六烷酸(3,5-二己基苯基)甲酯(60)(61mg,30.0%)。¹H NMR(400MHz,CDC13) δ6.98(s,3H),5.06(s,2H),3.70-3.62(m,1H),3.22-3.12(m,2H),2.64-2.49(m,8H),2.40-2.25(m,6H),1.71-1.58(m,8H),1.54-1.42(m,4H),1.42-1.14(m,46H),0.93-0.86(m,12H)。

[1326] 使用如上所述的类似方法制备以下化合物。

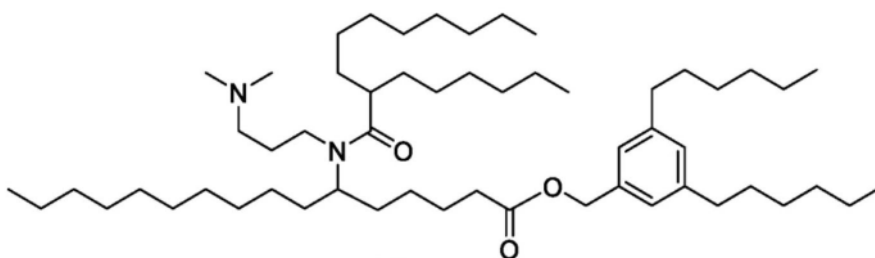
[1327]



(61)

[1328] 6-(N-(3-(二甲基氨基)丙基)十三烷酰胺基)十六烷酸3,5-二己基苄酯(61)。¹H NMR(400MHz,CDC13) δ6.98(s,3H),5.07(s,2H),3.69-3.62(m,1H),3.19-3.10(m,2H),2.62-2.56(m,4H),2.41-2.20(m,10H),1.64-1.56(m,8H),1.56-1.41(m,6H),1.41-1.13(m,50H),0.95-0.86(m,12H)。

[1329]

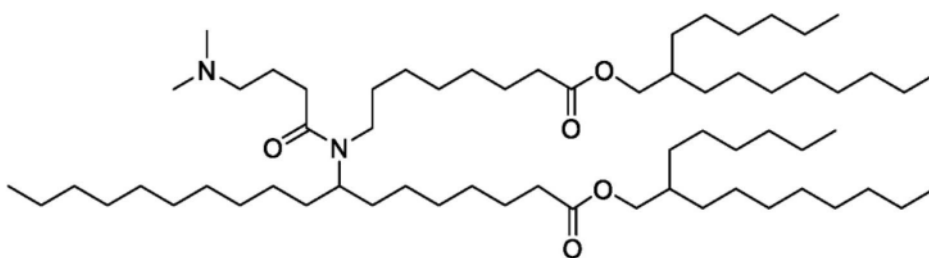


(62)

[1330] 6-(N-(3-(二甲基氨基)丙基)-2-己基癸酰胺基)十六烷酸3,5-二己基苄酯(62)。¹H NMR(400MHz,CDC13) δ6.98(s,3H),5.06(s,2H),3.78-3.71(m,1H),3.24-2.96(m,4H),2.69-2.55(m,6H),2.51-2.45(m,1H),2.43-2.20(m,7H),1.61-1.12(m,65H),0.96-0.81(m,15H)。

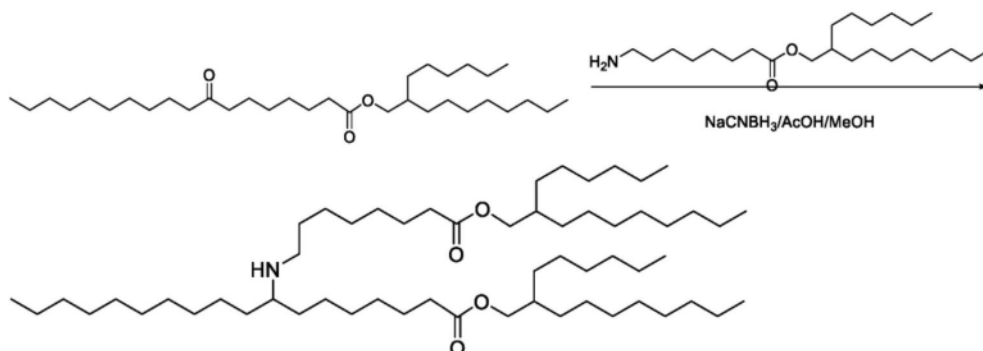
[1331] 实施例22.7-({9-[(2-己基癸基)氧基]-9-氧代壬基}氨基)十七烷酸2-己基癸酯(63)的合成

[1332]



(63)

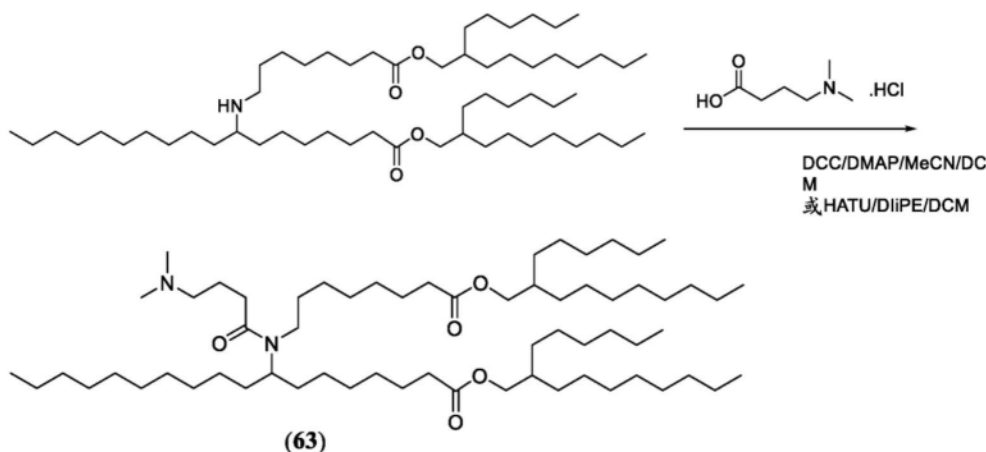
[1333] 步骤1.8-({8-[(2-己基癸基)氧基]-8-氧代辛基}氨基)-十八碳烯酸2-己基癸酯的合成



[1334]

[1335] 将8-氧代十八烷酸2-己基癸酯(743mg, 1.4mmol)、8-氨基辛酸2-己基癸酯(600mg, 1.6mmol)和AcOH(170mg, 2.8mmol)在MeOH中在50℃下搅拌30分钟。添加NaCNBH₃(268mg, 4.3mmol)并继续搅拌16hr。将溶液在真空中浓缩,溶解于EtOAc(75mL)中,用饱和NaHCO₃和盐水洗涤,干燥(MgSO₄),过滤并在真空中浓缩。将残余物通过自动快速色谱(0%-10% MeOH/DCM)纯化,得到8-({8-[(2-己基癸基)氧基]-8-氧代辛基}氨基)十八烷酸2-己基癸酯(567mg, 44.8%)。

[1336] 步骤2.8-[4-(二甲基氨基)-N-{8-[(2-己基癸基)氧基]-8-氧代辛基}丁酰胺基]十八碳烯酸2-己基癸酯(63)的合成



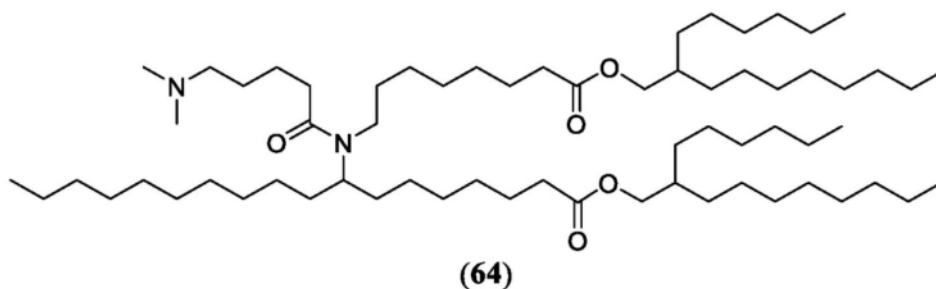
[1337]

[1338] 将4-二甲基氨基丁酸HCl盐(94mg, 0.6mmol)、DMAP(103mg, 0.84mmol)和DCC(127mg, 0.62mmol)在ACN(1.25mL)中在RT下搅拌2hr。添加DCM(1.25mL)中的8-({8-[(2-己基癸基)氧基]-8-氧代辛基}氨基)十八烷酸2-己基癸酯(250mg, 0.28mmol)并继续搅拌18hr。将反应物在真空中浓缩,将残余物悬浮于己烷中并过滤,并将滤液在真空中浓缩。将残余物通过自动快速色谱(100% EtOAc,然后0%-10% MeOH/EtOAc)纯化,得到8-[4-(二甲基氨基)-N-{8-[(2-己基癸基)氧基]-8-氧代辛基}丁酰胺基]十八碳烯酸2-己基癸酯(63)(64mg, 22.7%)。¹H NMR(400MHz, CDCl₃) δ3.99(d, J=5.9Hz, 4H), 3.67(s, 1H), 3.13-3.00(m, 2H), 2.39-2.27(m, 8H), 2.25(s, 6H), 1.85(q, J=7.9Hz, 3H), 1.63(d, J=10.2Hz, 15H), 1.46(s, 4H), 1.30(s, 74H), 0.91(d, J=7.2Hz, 15H)。MS(ESI)m/z: C₆₄H₁₂₆N₂O₅的[M+H]⁺计算值:1003.97;实测值:1003.2

[1339] 注意,HATU/DIPEA/DCM也可用于产生最终的酰胺偶联

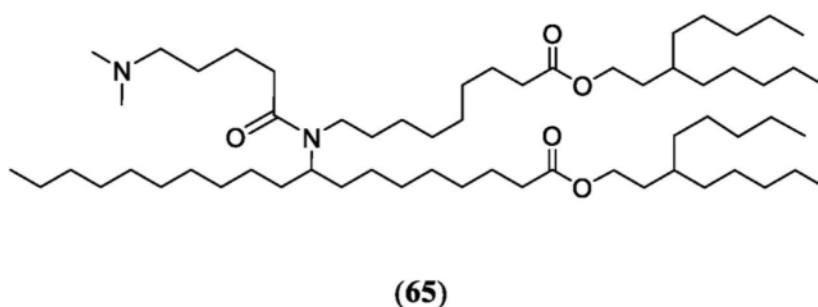
[1340] 使用如上所述的类似方法制备以下化合物。

[1341]



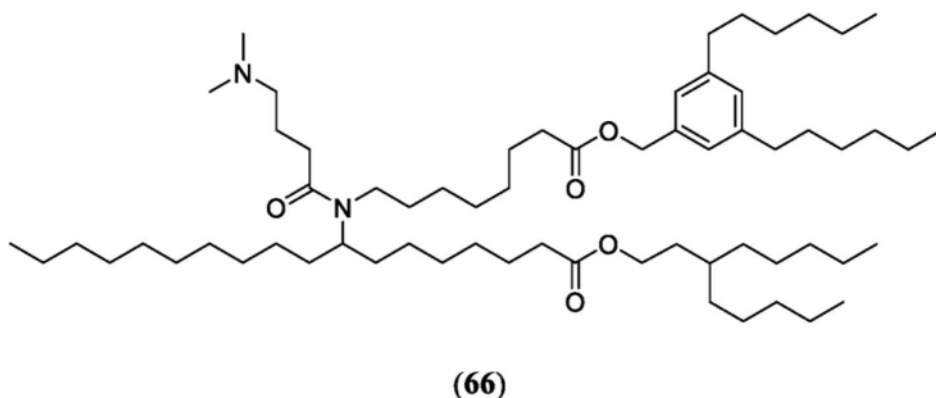
[1342] 8-(5-(二甲基氨基)-N-(8-((2-己基癸基)氧基)-8-氧代辛基)戊酰胺基)-十八碳烯酸2-己基癸酯(64)。¹H NMR(400MHz,CDCl₃) δ3.99(d,J=6.0Hz,4H),3.64(s,1H),3.04(d,J=8.4Hz,2H),2.41-2.26(m,8H),2.24(d,J=3.1Hz,6H),1.79-1.41(m,20H),1.41-1.02(m,74H),1.02-0.79(m,15H)。MS(ESI)m/z:C₆₅H₁₂₈N₂O₅的[M+H]⁺计算值:1017.98;实测值:1017.2

[1343]



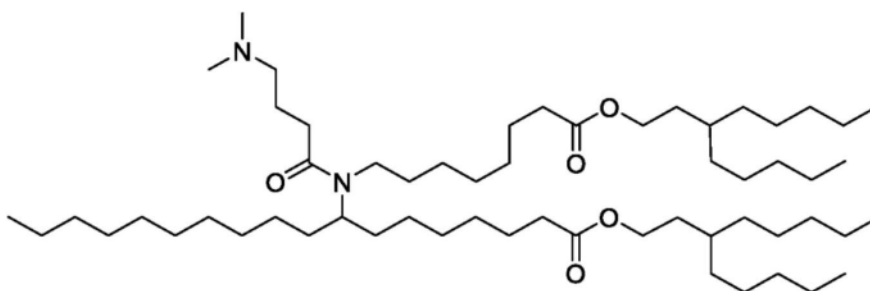
[1344] 9-(5-(二甲基氨基)-N-(9-氧代-9-((3-戊基辛基)氧基)壬基)-戊酰胺基)-十九烷酸3-戊基辛酯(65)。MS(ESI)m/z:C₅₉H₁₁₆N₂O₅的[M+H]⁺计算值:933.89;实测值:933

[1345]



[1346] 8-(N-(8-((3,5-二己基苄基)氧基)-8-氧代辛基)-4-(二甲基氨基)-丁酰胺基)-十八碳烯酸3-戊基辛酯(66)。¹H NMR(400MHz,CDCl₃) δ7.28(s,1H),6.99(s,2H),5.07(s,2H),4.09(m,2H),3.05(m,2H),2.83(s,6H),2.65(m,10H),2.29-2.37(m,5H),1.28-1.6(m,66H),0.89(m,15H)

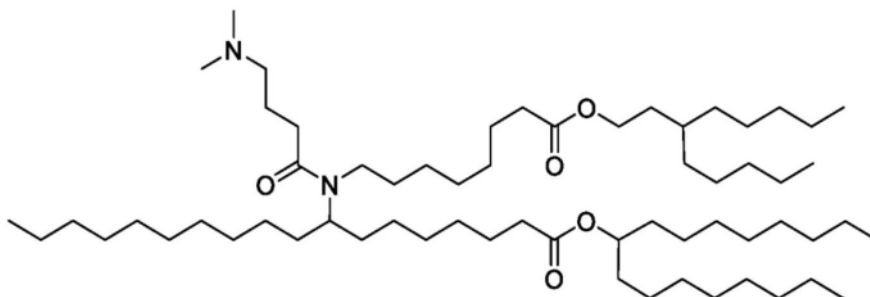
[1347]



(67)

[1348] 8-(4-(二甲基氨基)-N-(8-氧代-8-((3-戊基辛基)氧基)辛基)-丁酰胺基)-十八碳烯酸3-戊基辛酯(67)。¹H NMR(400MHz,CDCl₃) δ4.11(d,J=6.4Hz,4H),3.66(s,1H),3.11-3.01(m,2H),2.33(dq,J=15.0,6.8Hz,8H),2.24(s,6H),1.85(h,J=7.6Hz,2H),1.61(dq,J=14.1,7.2Hz,13H),1.47(s,0H),1.44(s,7H),1.30(d,J=16.7Hz,60H),0.91(t,J=6.9Hz,15H)。MS(ESI)m/z:C₅₈H₁₁₄N₂O₅的[M+H]⁺计算值:919.88;实测值:920.0

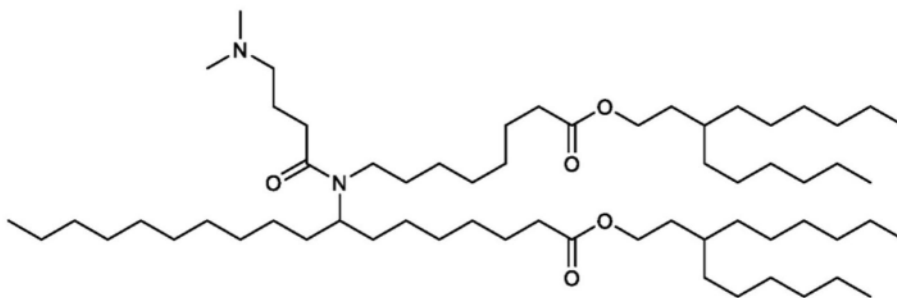
[1349]



(68)

[1350] 8-(4-(二甲基氨基)-N-(8-氧代-8-((3-戊基辛基)氧基)-辛基)-丁酰胺基)-十八碳烯酸十七烷-9-基酯(68)MS(ESI)m/z:C₆₂H₁₂₂N₂O₅的[M+H]⁺计算值:975.94;实测值:975.2

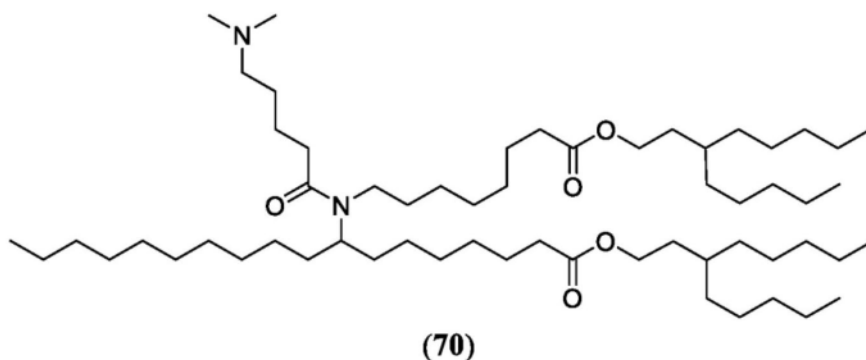
[1351]



(69)

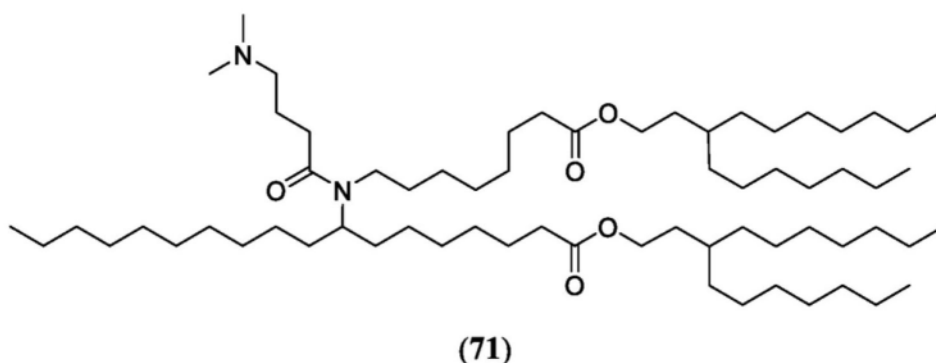
[1352] 8-(4-(二甲基氨基)-N-(8-((3-己基壬基)氧基)-8-氧代辛基)-丁酰胺基)-十八碳烯酸3-己基壬酯(69)。¹H NMR(400MHz,CDCl₃) δ4.10(t,4H),2.38-2.25(m,8H),2.24(s,6H),1.68(s,5H),1.60(dq,J=15.2,7.5Hz,13H),1.49-1.40(m,5H),1.33(d,J=7.5Hz,8H),1.30(s,9H),1.27(s,45H),0.94-0.86(m,15H)。

[1353]



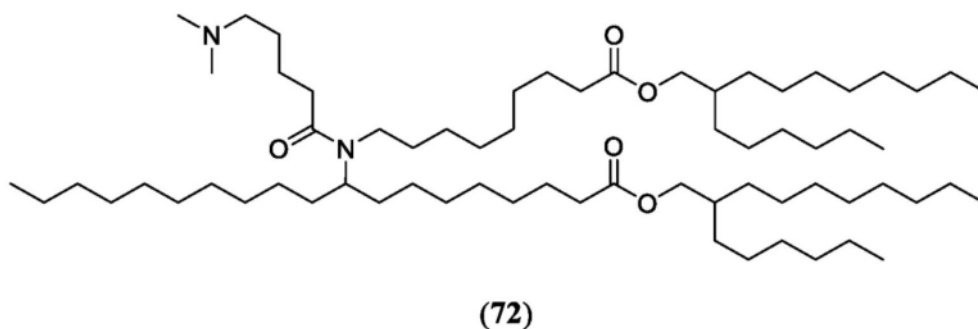
[1354] 8-(5-(二甲基氨基)-N-(8-氧代-8-((3-戊基辛基)氧基)辛基)-戊酰胺基)-十八碳烯酸3-戊基辛酯(70)。¹H NMR(400MHz,CDCl₃) δ4.10(t,J=7.1,4H),2.38-2.29(m,7H),2.27(s,6H),1.58(dt,J=17.0,8.5Hz,19H),1.43(s,7H),1.29(d,J=15.8Hz,65H),0.91(t,J=7.0Hz,15H)。

[1355]



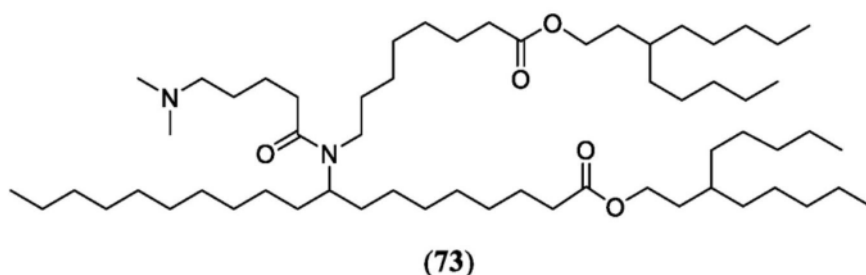
[1356] 8-(4-(二甲基氨基)-N-(8-((3-庚基癸基)氧基)-8-氧代辛基)丁酰胺基)-十八碳烯酸3-庚基癸酯(71)。¹H NMR(400MHz,CDCl₃) δ4.10(td,J=7.2,2.6Hz,4H),3.11-2.99(m,2H),2.41-2.29(m,7H),2.28(s,7H),1.85(dt,J=14.9,7.5Hz,2H),1.75(s,8H),1.60(dt,J=13.9,6.8Hz,7H),1.45(t,J=7.3Hz,6H),1.37-1.18(m,76H),0.94-0.87(m,15H)。

[1357]



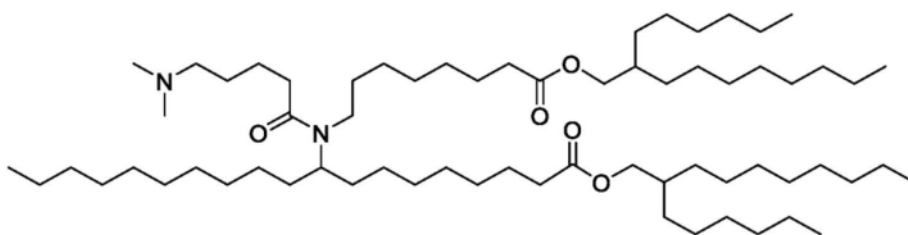
[1358] 9-(5-(二甲基氨基)-N-(9-((2-己基癸基)氧基)-9-氧代壬基)戊酰胺基)-十九烷酸2-己基癸酯(72)MS(ESI)m/z:C₆₇H₁₃₂N₂O₅的[M+H]⁺计算值:1045.01;实测值:1046.3

[1359]



[1360] 9-(5-(二甲基氨基)-N-(8-氧代-8-((3-戊基辛基)氧基)辛基)-戊酰胺基)-十九烷酸3-戊基辛酯(73)。¹H NMR(400MHz,CDCl₃) δ4.10(t,J=7.1,4H),2.34(s,6H),2.30(t,J=8.6Hz,5H),1.62-1.56(m,17H),1.49-1.41(m,6H),1.30(d,J=16.9Hz,57H),0.91(t,J=6.9Hz,15H)。

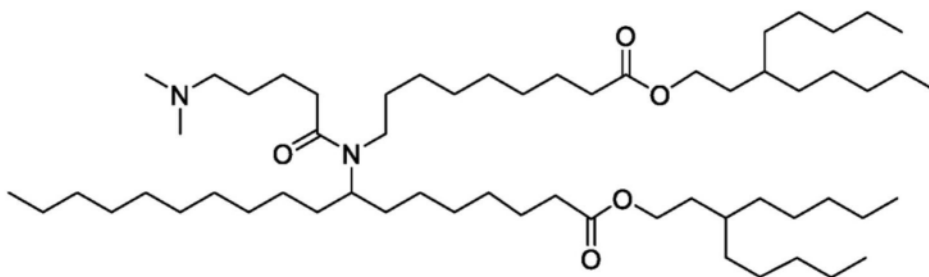
[1361]



(74)

[1362] 9-(5-(二甲基氨基)-N-(8-((2-己基癸基)氧基)-8-氧代辛基)-戊酰胺基)-十九烷酸2-己基癸酯(74)。¹H NMR(400MHz,CDCl₃) δ3.98(d,J=5.4Hz,4H),2.38-2.29(m,7H),2.27(s,6H),1.84-1.77(m,3H),1.64(h,J=7.0Hz,9H),1.30(d,J=7.4Hz,78H),0.90(t,J=6.6Hz,15H)。

[1363]

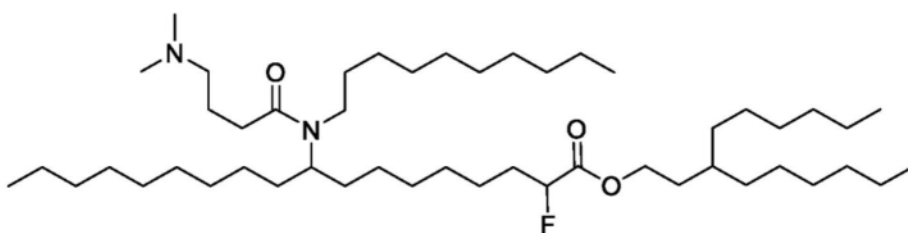


(75)

[1364] 8-(5-(二甲基氨基)-N-(9-氧代-9-((3-戊基辛基)氧基)壬基)-戊酰胺基)-十八碳烯酸3-戊基辛酯(75)。¹H NMR(400MHz,CDCl₃) δ4.10(t,J=7.3Hz,4H),2.34(dd,J=14.1,7.2Hz,5H),2.29(s,6H),1.62(qq,J=17.6,5.4Hz,16H),1.49-1.39(m,6H),1.38-1.22(m,62H),0.91(t,J=6.9Hz,15H)。

[1365] 实施例23.9-[N-癸基-4-(二甲基氨基)丁酰胺基]-2-氟十八烷酸3-己基壬酯(76)的合成

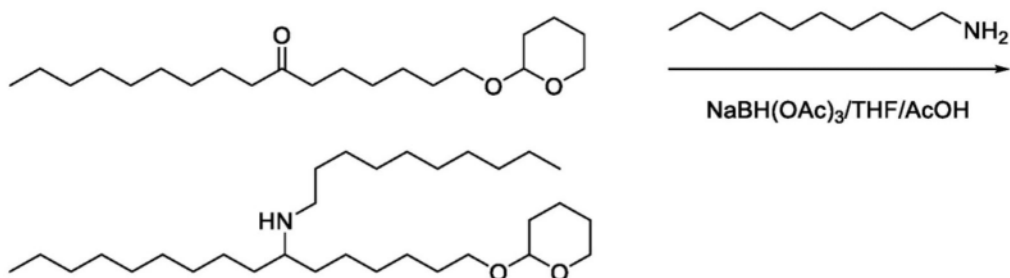
[1366]



(76)

[1367] 步骤1.癸基[1-(噁烷-2-基氧基)十六烷-7-基]胺的合成

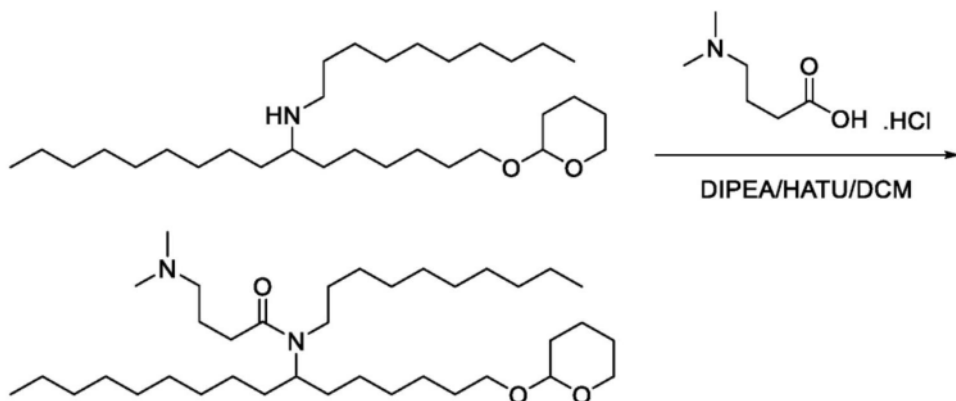
[1368]



[1369] 将1-(噁烷-2-基氧基)十六烷-7-酮(5g, 14.7mmol)和N-癸胺(2.31g, 14.7mmol)在THF(100mL)中在50℃下搅拌30分钟。添加 NaBH(OAc)_3 (9.3g, 44.0mmol)并继续搅拌16hr。将反应物在真空中浓缩,将残余物用饱和 NaHCO_3 淬灭并用EtOAc萃取水层。将有机物干燥(MgSO_4),过滤并在真空中浓缩。将残余物通过自动快速色谱纯化,得到癸基[1-(噁烷-2-基氧基)十六烷-7-基]胺(4.9g, 69.3%)。

[1370] 步骤2.N-癸基-4-(二甲基氨基)-N-[1-(噁烷-2-基氧基)十六烷-7-基]丁酰胺的合成

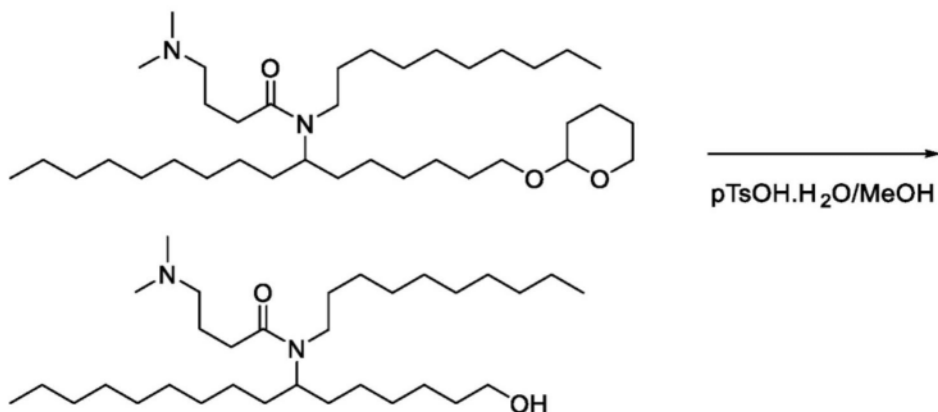
[1371]



[1372] 将4-(二甲基氨基)丁酸HCl盐(4.0g, 30.5mmol)、HATU(11.6g, 30.5mmol)和DIPEA(10.7mL 61.0mmol)在DCM(50mL)中在RT下搅拌30分钟。添加DCM中的癸基[1-(噁烷-2-基氧基)十六烷-7-基]胺(4.9g, 10.2mmol),并且搅拌反应物直至完成。将反应物在真空中浓缩,将残余物在饱和 NaHCO_3 与EtOAc之间分配。将有机物用盐水洗涤,干燥(MgSO_4)并在真空中浓缩。将残余物通过自动快速色谱(0%-15% MeOH/DCM)纯化,得到N-癸基-4-(二甲基氨基)-N-[1-(噁烷-2-基氧基)十六烷-7-基]丁酰胺(4.7g, 77.7%)。

[1373] 步骤3.N-癸基-4-(二甲基氨基)-N-(1-羟基十六烷-7-基)丁酰胺的合成

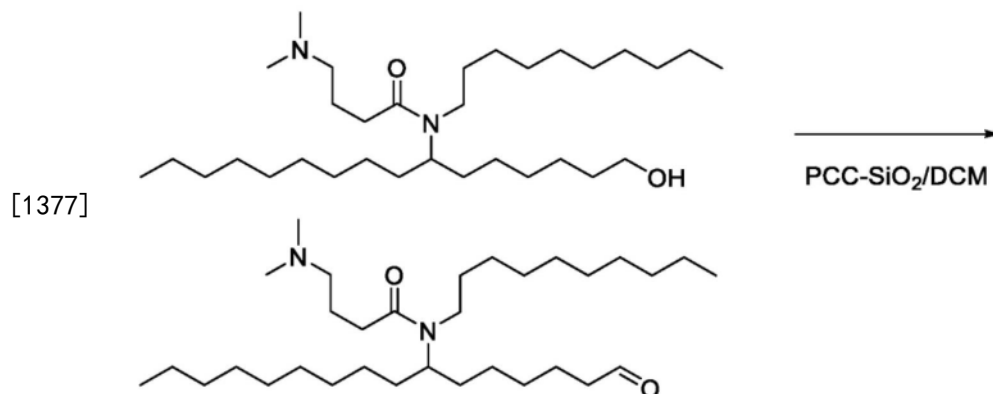
[1374]



[1375] 将N-癸基-4-(二甲基氨基)-N-[1-(噁烷-2-基氧基)十六烷-7-基]丁酰胺(4.6g,

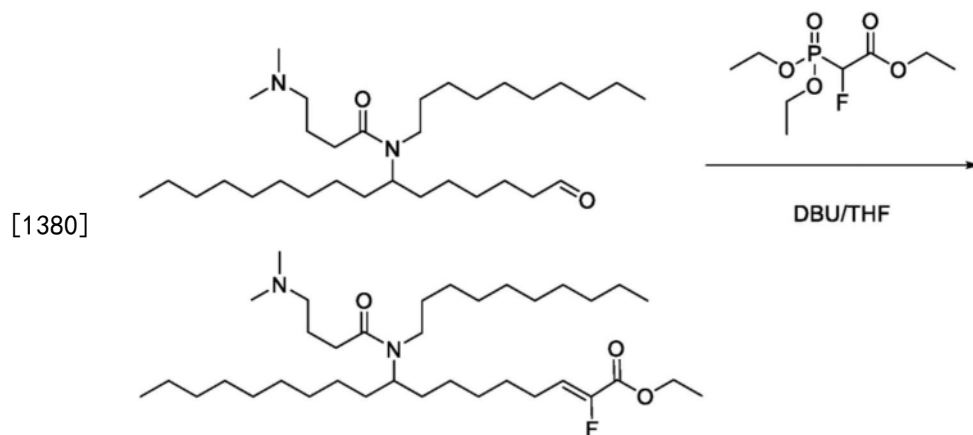
7.7mmol)和p-TsOH(67mg,0.4mmol)在MeOH(150mL)中在RT下搅拌16hr。在真空中除去甲醇,将残余物溶解于EtOAc中并用饱和NaHCO₃洗涤。将有机物干燥(MgSO₄),过滤并在真空中浓缩,得到N-癸基-4-(二甲基氨基)-N-(1-羟基十六烷-7-基)丁酰胺(3.5g,88.6%),其不经纯化即使用。

[1376] 步骤4.N-癸基-4-(二甲基氨基)-N-(1-氧代十六烷-7-基)丁酰胺的合成



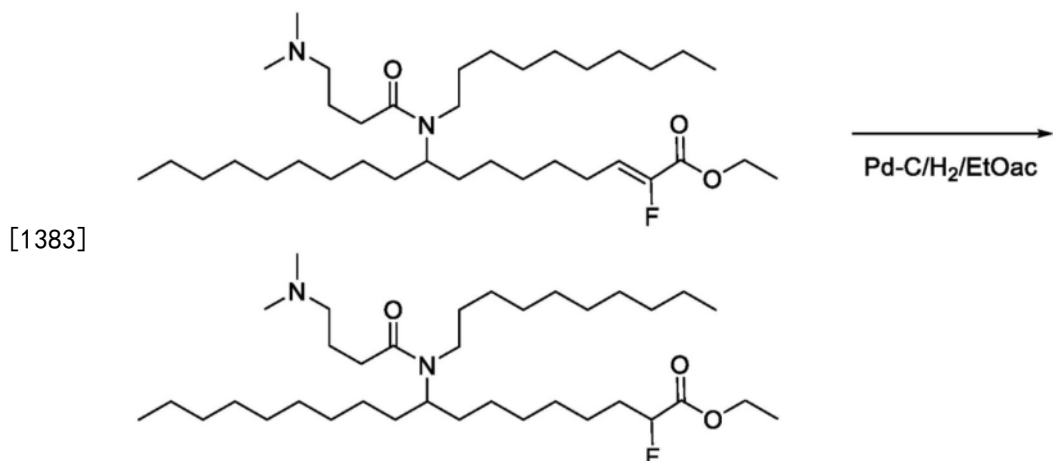
[1378] 将N-癸基-4-(二甲基氨基)-N-(1-氧代十六烷-7-基)丁酰胺(3.5g,6.9mmol)和二氧化硅上的PCC(1:1)(5.9g,13.7mmol)在DCM(100mL)中在RT下搅拌16hr。将混合物通过二氧化硅过滤,在真空中浓缩并通过自动快速色谱(0%-15% MeOH/DCM)纯化残余物,得到N-癸基-4-(二甲基氨基)-N-(1-氧代十六烷-7-基)丁酰胺(1.8g,51.6%)。

[1379] 步骤5.(2Z)-9-[N-癸基-4-(二甲基氨基)丁酰胺基]-2-氟十八碳-2-烯酸乙酯的合成



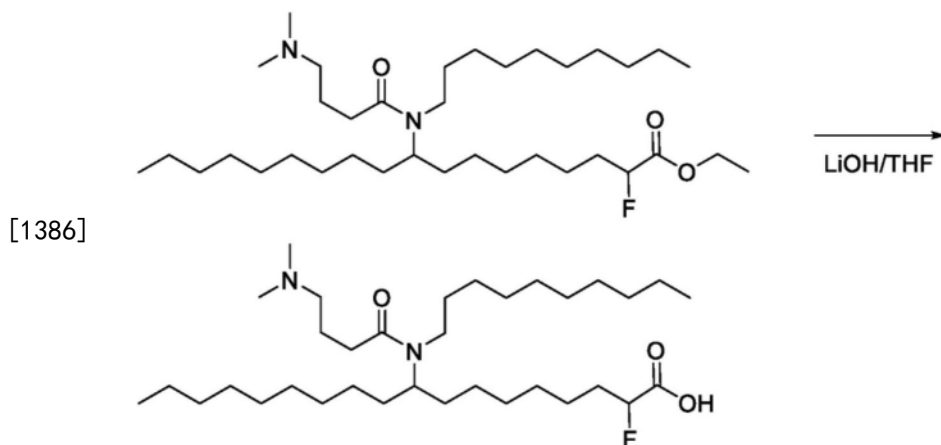
[1381] 将N-癸基-4-(二甲基氨基)-N-(1-氧代十六烷-7-基)丁酰胺(1.8g,3.5mmol)、2-(二乙氧基磷酰基)-2-氟乙酸乙酯(1.7g,7.1mmol)和DBU(1.1g,7.1mmol)在THF(25mL)中在RT下搅拌16hr。将反应物在真空中浓缩,并将残余物通过自动快速色谱(0%-100% EtOAc/己烷)纯化,得到(2Z)-9-[N-癸基-4-(二甲基氨基)丁酰胺基]-2-氟十八碳-2-烯酸乙酯(1.54g,72.9%)。

[1382] 步骤6.9-[N-癸基-4-(二甲基氨基)丁酰胺基]-2-氟十八烷酸乙酯的合成



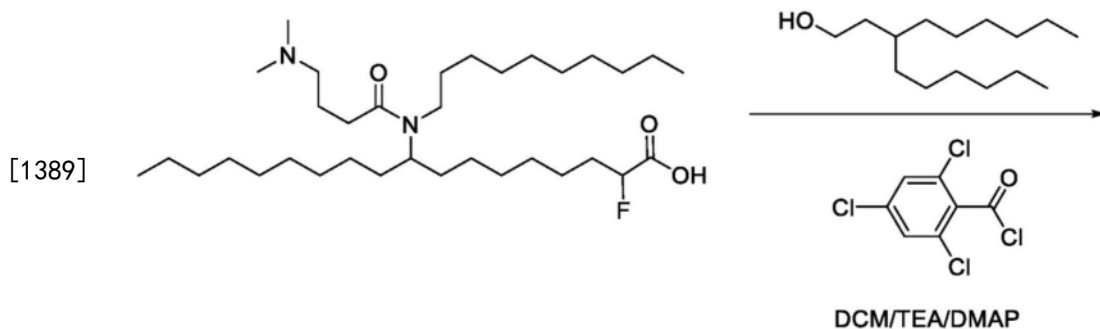
[1384] 将(2Z)-9-[N-癸基-4-(二甲基氨基)丁酰胺基]-2-氟十八碳-2-烯酸乙酯(1.5g, 2.5mmol)在RT下在EtOAc中经Pd-C 10% (150mg)催化氢化16hr。将反应物通过硅藻土过滤,在真空中浓缩,得到9-[N-癸基-4-(二甲基氨基)丁酰胺基]-2-氟十八烷酸乙酯(1.2g, 79.7%)。

[1385] 步骤7.9-[N-癸基-4-(二甲基氨基)丁酰胺基]-2-氟十八烷酸的合成

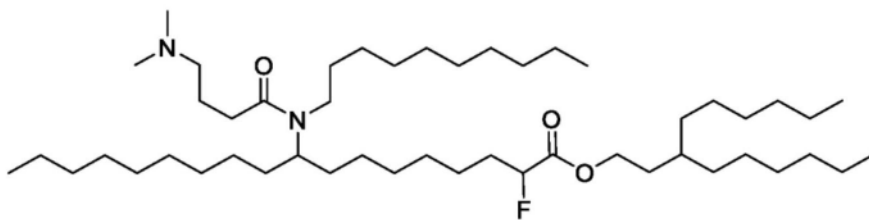


[1387] 将9-[N-癸基-4-(二甲基氨基)丁酰胺基]-2-氟十八烷酸乙酯(1.2g, 2.0mmol)和LiOH(144mg, 6.0mmol)在THF(50mL)中在RT下搅拌16hr。添加6M HCl(1.3mL)并用DCM萃取反应物。将合并的萃取物干燥(MgSO₄),过滤并在真空中浓缩,得到9-[N-癸基-4-(二甲基氨基)丁酰胺基]-2-氟十八烷酸(810mg, 70.8%),其不经纯化即使用。

[1388] 步骤8.9-[N-癸基-4-(二甲基氨基)丁酰胺基]-2-氟十八烷酸3-己基壬酯(76)的合成



[1390]

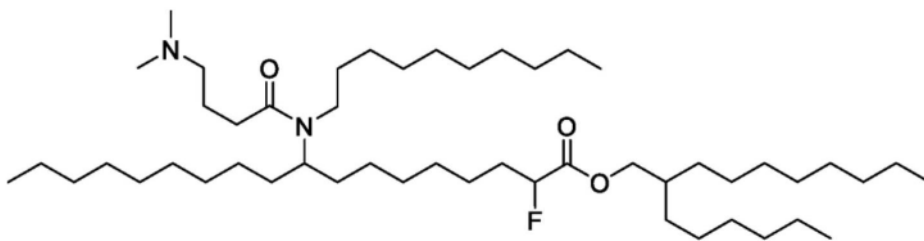


(76)

[1391] 将9-[N-癸基-4-(二甲基氨基)丁酰胺基]-2-氟十八烷酸(800mg, 1.4mmol)、2,4,6-三氯苯甲酰氯(684mg, 2.8mmol)、3-己基壬-1-醇(400mg, 1.75mmol)和DMAP(514mg, 4.2mmol)在DCM(10mL)中在RT下搅拌16hr。将反应物在真空中浓缩,将残余物溶解于EtOAc(50mL)中并用0.5M NaOH(2x 25mL)、水(25mL)和盐水(25mL)洗涤。将有机物干燥(MgSO₄),在真空中浓缩,并将残余物通过自动快速色谱(0%-15% MeOH/DCM)纯化,得到9-[N-癸基-4-(二甲基氨基)丁酰胺基]-2-氟十八烷酸3-己基壬酯(76)(468mg, 42.7%)。¹H NMR(400MHz, CDCl₃) δ4.92(d, J=5.8Hz, 1H), 4.83-4.76(m, 1H), 4.20(t, J=7.2Hz, 2H), 3.62(s, 1H), 3.04(q, J=7.2Hz, 2H), 2.51-2.23(m, 10H), 1.99-1.55(m, 16H), 1.44(q, J=7.6Hz, 10H), 1.26(d, J=8.5Hz, 55H), 0.93-0.84(m, 12H)。¹⁹F NMR(376MHz, CDCl₃) δ-191.86(dtd, J=49.6, 25.4, 19.6Hz)。MS(ESI)m/z: C₄₉H₉₇FN₂O₃的[M+H]⁺计算值: 781.8; 实测值: 781.2

[1392] 使用如上所述的类似方法制备以下化合物。

[1393]

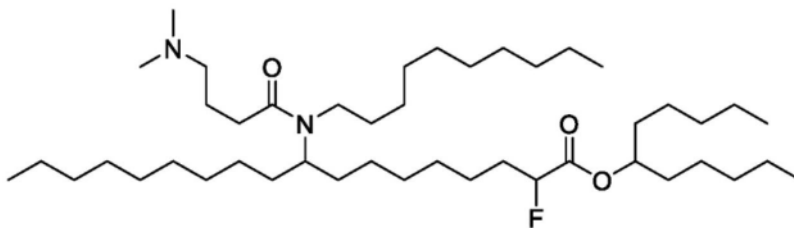


(77)

[1394] 9-(N-癸基-4-(二甲基氨基)丁酰胺基)-2-氟十八烷酸2-己基癸酯(77)。¹H NMR(400MHz, CDCl₃) δ5.01-4.74(m, 1H), 4.08(d, J=5.7Hz, 2H), 3.63-3.50(m, 1H), 3.25(ddt, J=11.1, 5.9, 2.2Hz, 2H), 3.13-3.01(m, 2H), 2.91(d, J=8.4Hz, 6H), 2.79-2.72(m, 1H), 2.68(t, J=5.6Hz, 1H), 2.00(d, J=7.8Hz, 3H), 1.95-1.80(m, 2H), 1.60-1.39(m, 1H), 1.37-1.08(m, 58H), 0.88(td, J=6.9, 1.7Hz, 12H)。MS(ESI)m/z: C₅₀H₉₉FN₂O₃的[M+H]⁺计算值: 795.8; 实测值: 795.6。

[1395] 使用如上所述的类似方法制备以下化合物。

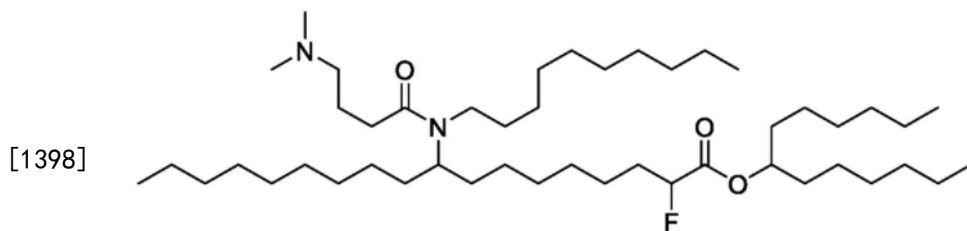
[1396]



(112)

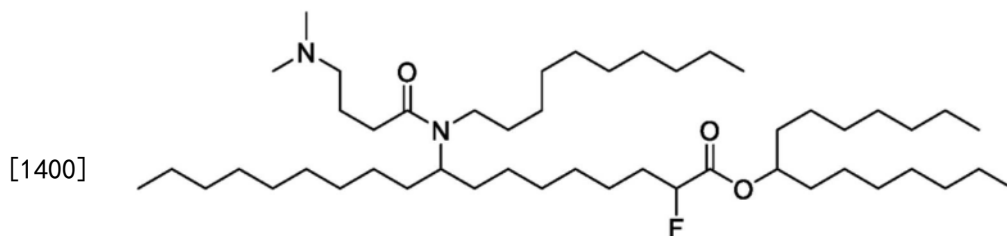
[1397] 9-(N-癸基-4-(二甲基氨基)丁酰胺基)-2-氟十八烷酸十一烷-6-基酯(112)。¹H

NMR (400MHz, CDCl_3) δ 5.13-4.90 (m, 2H), 4.82 (q, $J=5.4\text{Hz}$, 0H), 3.75-3.60 (m, 1H), 3.06 (q, $J=7.2\text{Hz}$, 2H), 2.35 (q, $J=6.9\text{Hz}$, 4H), 2.26 (s, 6H), 1.86 (dp, $J=14.5, 6.3\text{Hz}$, 4H), 1.75-1.09 (m, 64H), 0.90 (td, $J=6.8, 2.7\text{Hz}$, 12H)。



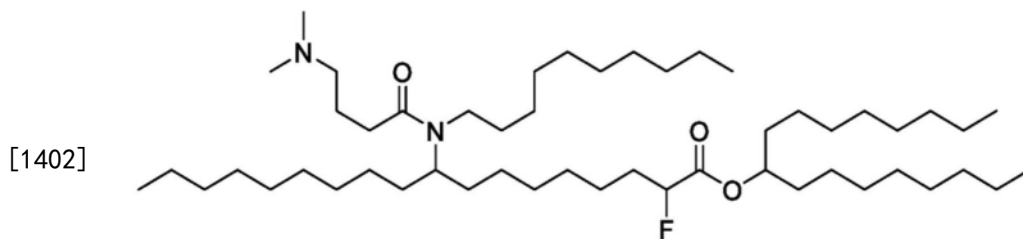
(113)

[1399] 9-(N-癸基-4-(二甲基氨基)丁酰胺基)-2-氟十八烷酸十三烷-7-基酯 (113)。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 5.12-4.92 (m, 2H), 4.82 (q, $J=5.4\text{Hz}$, 0H), 3.73-3.57 (m, 1H), 3.11-3.01 (m, 2H), 2.35 (q, $J=6.8\text{Hz}$, 4H), 2.27 (s, 6H), 1.87 (td, $J=12.5, 5.6\text{Hz}$, 4H), 1.77-1.39 (m, 17H), 1.30 (dq, $J=11.4, 6.4\text{Hz}$, 53H), 0.90 (t, $J=6.6\text{Hz}$, 12H)。



(114)

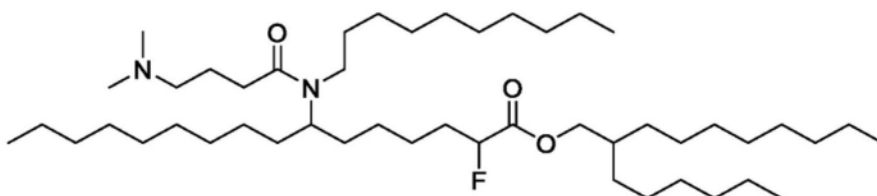
[1401] 9-(N-癸基-4-(二甲基氨基)丁酰胺基)-2-氟十八烷酸十五烷-8-酯 (114)。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 5.10-4.90 (m, 1H), 4.82 (q, $J=5.4\text{Hz}$, 0H), 3.74-3.57 (m, 1H), 3.06 (q, $J=7.3\text{Hz}$, 2H), 2.35 (q, $J=6.7\text{Hz}$, 4H), 2.26 (s, 6H), 1.87 (tt, $J=10.7, 6.0\text{Hz}$, 4H), 1.81-1.16 (m, 73H), 0.90 (t, $J=6.7\text{Hz}$, 12H)。



(115)

[1403] 9-(N-癸基-4-(二甲基氨基)丁酰胺基)-2-氟十八烷酸十七烷-9-基酯 (115)。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 5.08-4.90 (m, 1H), 4.82 (q, $J=5.5\text{Hz}$, 0H), 3.79-3.58 (m, 1H), 3.15-2.95 (m, 2H), 2.35 (q, $J=7.0\text{Hz}$, 4H), 2.25 (s, 6H), 1.86 (dp, $J=14.5, 6.4\text{Hz}$, 4H), 1.77-1.13 (m, 80H), 0.90 (t, $J=6.7\text{Hz}$, 12H)。

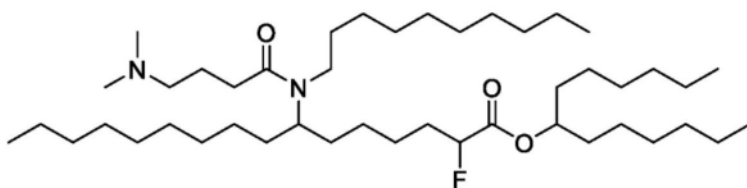
[1404]



(120)

[1405] 7-(N-癸基-4-(二甲基氨基)丁酰胺基)-2-氟十六烷酸2-己基癸酯(120)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ4.97 (t, J=5.8Hz, 0H), 4.84 (q, J=5.9Hz, 0H), 4.11 (t, J=4.9Hz, 2H), 3.05 (d, J=9.5Hz, 2H), 2.57-2.24 (m, 10H), 2.20 (s, 1H), 1.95-1.80 (m, 4H), 1.67 (s, 6H), 1.48 (tt, J=14.2, 8.8Hz, 7H), 1.28 (dd, J=10.0, 5.6Hz, 53H), 0.95-0.86 (m, 12H)。

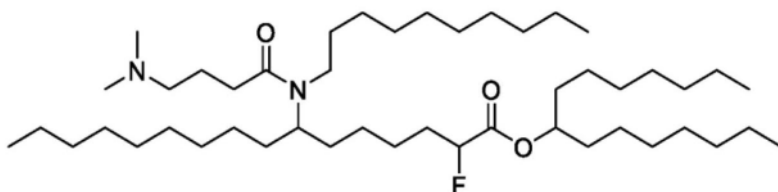
[1406]



(121)

[1407] 7-(N-癸基-4-(二甲基氨基)丁酰胺基)-2-氟十六烷酸十三烷-7-基酯(121)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ5.05-4.85 (m, 2H), 4.79 (t, J=6.0Hz, 1H), 3.65 (s, 1H), 3.03 (t, J=8.5Hz, 2H), 2.32 (dt, J=11.9, 6.9Hz, 4H), 2.22 (s, 6H), 1.84 (dt, J=15.0, 7.3Hz, 4H), 1.73-1.35 (m, 16H), 1.27 (p, J=6.9Hz, 47H), 0.88 (t, J=6.6Hz, 12H)。

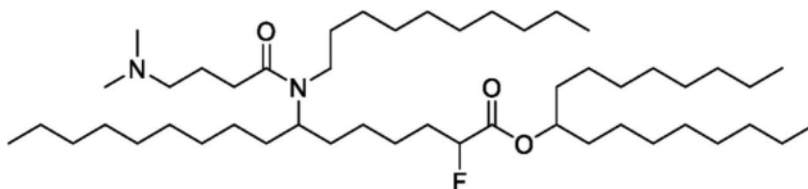
[1408]



(122)

[1409] 7-(N-癸基-4-(二甲基氨基)丁酰胺基)-2-氟十六烷酸十五烷-8-基酯(122)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ5.12-4.85 (m, 1H), 4.78 (d, J=5.9Hz, 1H), 3.64 (s, 1H), 3.02 (d, J=9.0Hz, 2H), 2.34 (p, J=7.1Hz, 4H), 2.26 (s, 6H), 1.85 (dd, J=15.6, 8.3Hz, 6H), 1.67-1.36 (m, 12H), 1.26 (q, J=7.3Hz, 51H), 0.88 (t, J=6.6Hz, 12H)。

[1410]

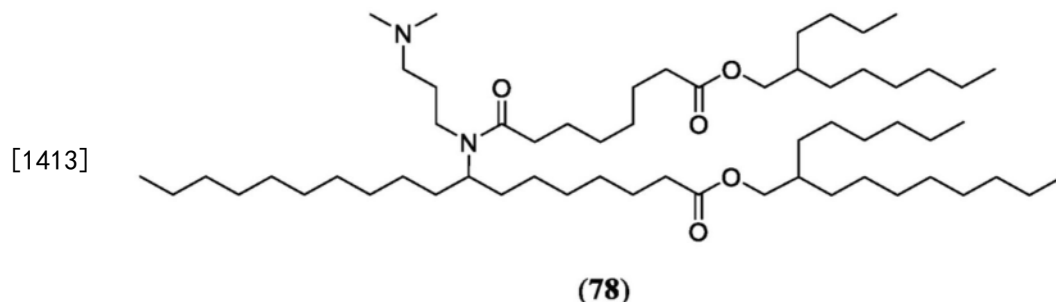


(123)

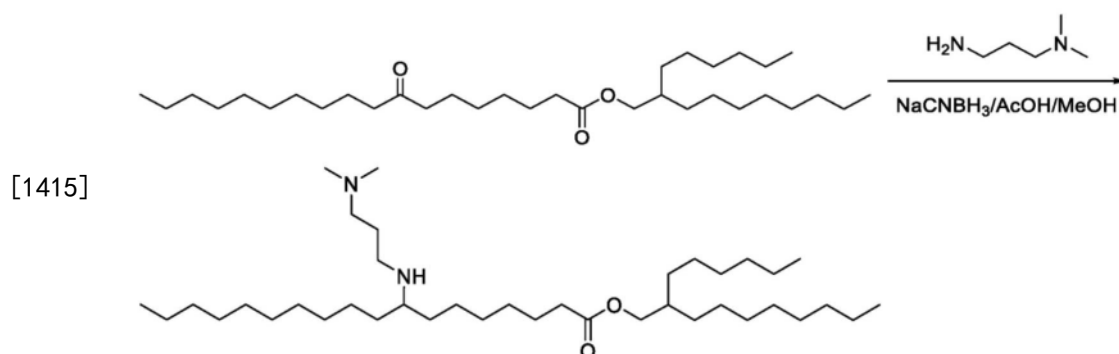
[1411] 7-(N-癸基-4-(二甲基氨基)丁酰胺基)-2-氟十六烷酸十七烷-9-基酯(123)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ5.09-4.87 (m, 2H), 4.79 (t, J=5.8Hz, 1H), 3.04 (q, J=9.7Hz, 2H), 2.33 (q, J=7.1Hz, 4H), 2.24 (s, 5H), 1.84 (tt, J=17.5, 8.4Hz, 6H), 1.65-1.40 (m, 12H),

1.27 (d, $J=8.5\text{Hz}$, 57H), 0.88 (t, $J=6.6\text{Hz}$, 12H)。

[1412] 实施例24.8- {8-[(2-丁基辛基)氧基]-N-[3-(二甲基-氨基)丙基]-8-氧代辛酰胺基}十八烷酸2-己基癸酯(78)的合成

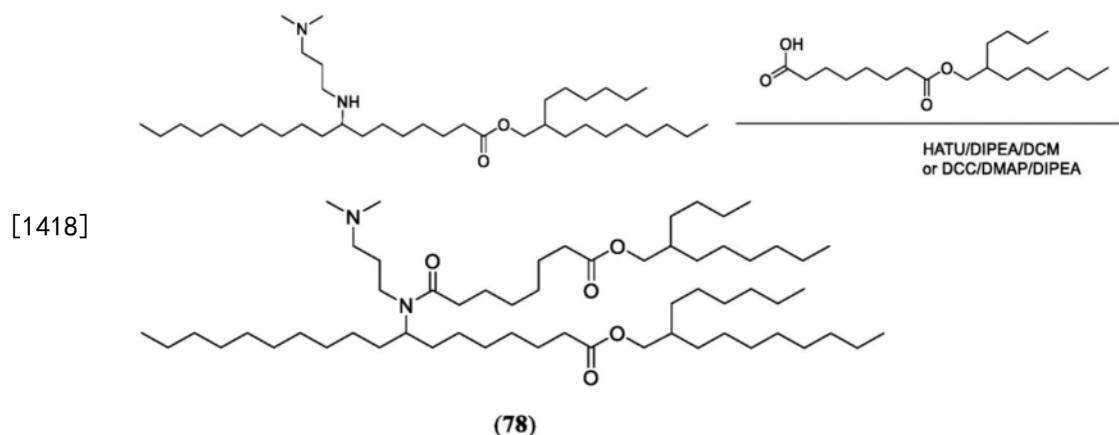


[1414] 步骤1.8- {[3-(二甲基氨基)丙基]氨基}十八碳烯酸2-己基癸酯的合成



[1416] 将8-氧代十八烷酸2-己基癸酯(500mg, 1.0mmol)、二甲基氨基丙胺(117mg, 1.14mmol)和AcOH(0.11mL, 1.9mmol)在MeOH(15mL)中在50℃下搅拌1hr。将反应物冷却至RT, 添加NaCNBH₃(180mg, 2.9mmol)并继续搅拌16hr。在真空中浓缩反应物, 将残余物溶解于EtOAc(50mL)中并用饱和NaHCO₃和盐水洗涤。将有机物干燥(MgSO₄), 过滤, 在真空中浓缩并将残余物通过自动快速色谱(0%-20%MeOH/DCM)纯化, 得到8- {[3-(二甲基氨基)丙基]氨基}十八烷酸2-己基癸酯(430mg, 73.8%)。

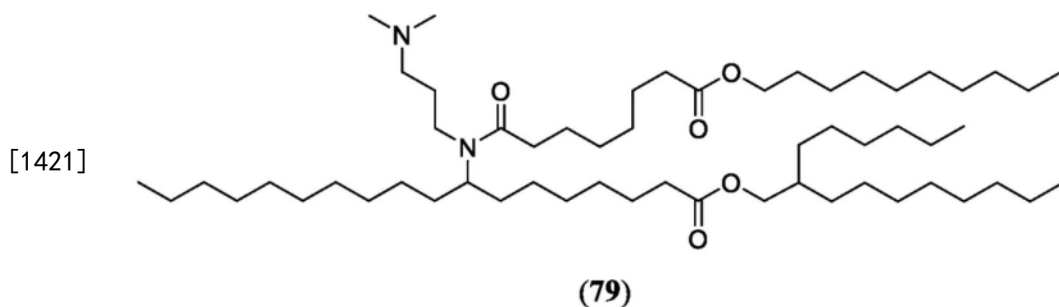
[1417] 步骤2.8- {8-[(2-丁基辛基)氧基]-N-[3-(二甲基氨基)丙基]-8-氧代辛酰胺基}十八烷酸2-己基癸酯(78)的合成



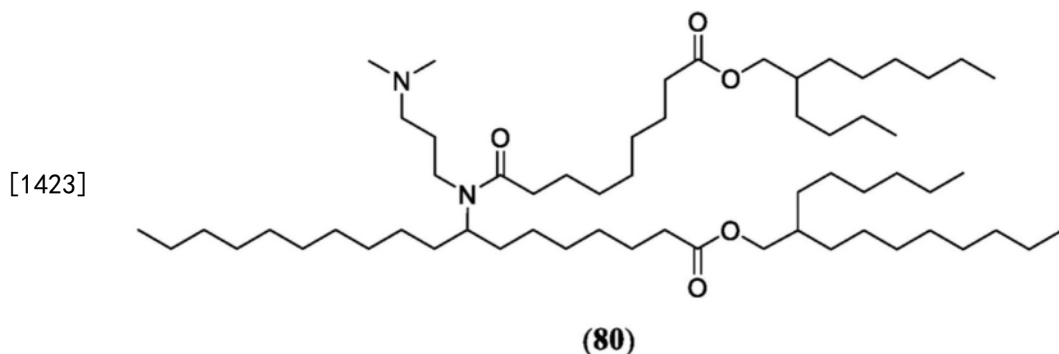
[1419] 将8-[(2-丁基辛基)氧基]-8-氧代辛酸(169mg, 0.5mmol)、HATU(187mg, 0.5mmol)和DIPEA(0.12mL, 0.66mmol)在DCM(5mL)中在RT下搅拌15分钟。添加8- {[3-(二甲基氨基)丙基]氨基}十八烷酸2-己基癸酯(200mg, 0.33mmol)并继续搅拌16hr。将反应物在真空中浓

缩,将残余物溶解于EtOAc (50mL) 中,用NaHCO₃和盐水洗涤,干燥(MgSO₄),过滤并在真空中浓缩。将残余物通过自动快速色谱(0% -5%MeOH/DCM,100%EtOAc)纯化,得到8-{8-[(2-丁基辛基)氧基]-N-[3-(二甲基氨基)丙基]-8-氧代辛酰胺基}十八碳烯酸2-己基癸酯(78) (112mg,36.5%)。¹H NMR (400MHz,CDCl₃) δ3.96 (dd,J=5.9,3.0Hz,4H),3.70 (s,1H),3.30 (bs,2H),3.13 (bs,2H),2.94 (s,6H),2.38 (t,J=7.6Hz,2H),2.30 (td,J=7.4,3.8Hz,4H),1.96 (s,2H),1.62 (p,J=6.6Hz,14H),1.38-1.06 (m,64H),0.88 (t,J=6.5Hz,15H)。

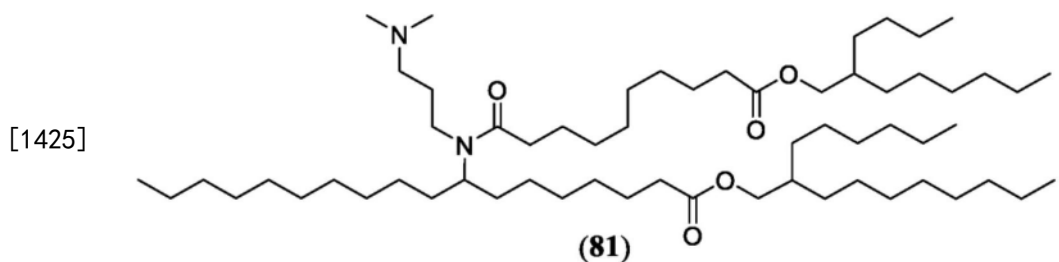
[1420] 注意,最终的酰胺偶联可使用DCC/DMAP/DIPEA偶联方法实现使用如上所述的类似方法制备以下化合物。



[1422] 8-(8-(癸氧基)-N-(3-(二甲基氨基)丙基)-8-氧代辛酰胺基)-十八碳烯酸2-己基癸酯(79)。¹H NMR (400MHz,CDCl₃) δ4.08 (t,J=6.8Hz,2H),3.99 (d,J=5.8Hz,2H),3.74 (s,1H),3.33 (t,J=6.0Hz,2H),3.17 (s,2H),2.97 (s,5H),2.41 (t,J=7.7Hz,2H),2.33 (t,J=7.5Hz,4H),1.99 (s,2H),1.64 (t,J=7.4Hz,12H),1.29 (s,57H),0.91 (t,J=6.7Hz,12H)。

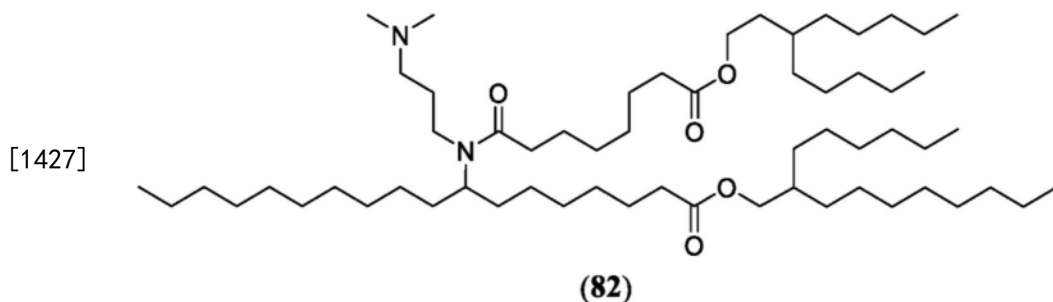


[1424] 8-(9-((2-丁基辛基)氧基)-N-(3-(二甲基氨基)丙基)-9-氧代壬酰胺基)-十八碳烯酸2-己基癸酯(80)。¹H NMR (400MHz,CDCl₃) δ3.98 (dd,J=5.8,2.3Hz,4H),3.71 (s,1H),3.29 (t,J=6.2Hz,2H),3.04 (s,2H),2.86 (s,6H),2.82 (s,20H),2.38 (dd,J=8.6,6.2Hz,2H),2.32 (t,J=7.5Hz,4H),1.94 (t,J=6.5Hz,2H),1.50 (dd,J=29.4,6.7Hz,13H),1.38-1.24 (m,68H),0.94-0.88 (m,15H)。

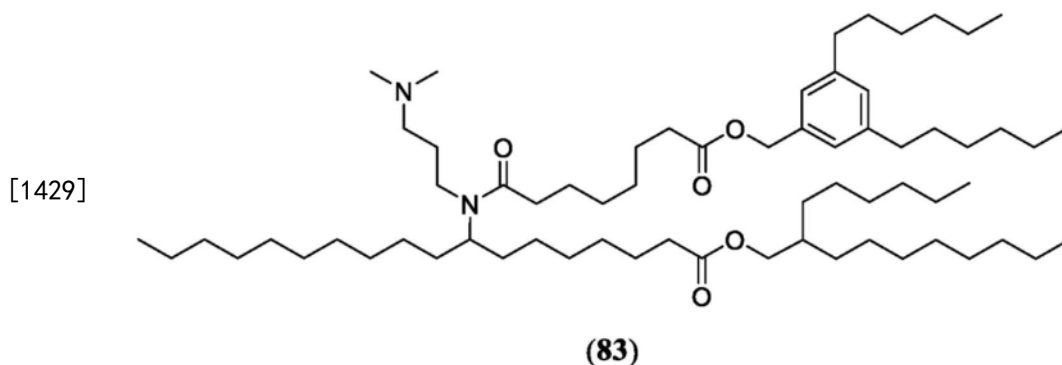


[1426] 8-(10-((2-丁基辛基)氧基)-N-(3-(二甲基氨基)丙基)-10-氧代癸酰胺基)-十八碳烯酸2-己基癸酯(81)。¹H NMR (400MHz,CDCl₃) δ4.10 (t,J=7.1Hz,2H),3.98 (d,J=5.8Hz,

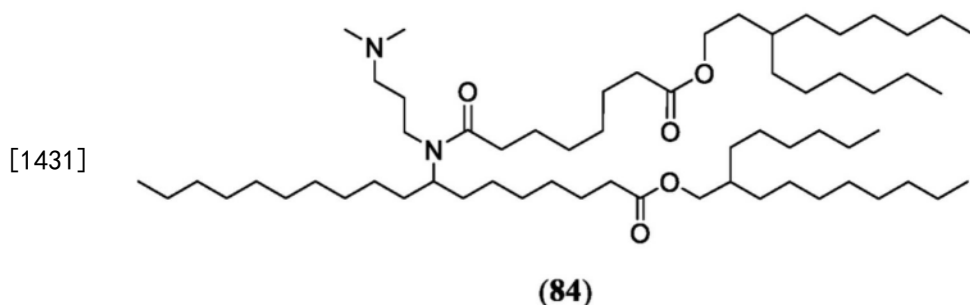
2H), 3.29 (t, J=6.5Hz, 2H), 3.06 (d, J=7.0Hz, 2H), 2.87 (s, 6H), 2.83 (s, 1H), 2.38 (dd, J=8.5, 6.5Hz, 2H), 2.32 (td, J=7.5, 2.5Hz, 4H), 2.01-1.93 (m, 2H), 1.61 (dq, J=20.5, 6.7Hz, 10H), 1.41-1.17 (m, 68H), 0.91 (t, J=6.7Hz, 15H)。



[1428] 8-(N-(3-(二甲基氨基)丙基)-8-氧代-8-((2-戊基辛基)氧基)-辛酰胺基)-十八碳烯酸2-己基癸酯 (82)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 4.10 (t, J=7.1Hz, 2H), 3.98 (d, J=5.8Hz, 2H), 3.29 (t, J=6.5Hz, 2H), 3.06 (d, J=7.0Hz, 2H), 2.87 (s, 6H), 2.83 (s, 1H), 2.38 (dd, J=8.5, 6.5Hz, 2H), 2.32 (td, J=7.5, 2.5Hz, 4H), 2.01-1.93 (m, 2H), 1.61 (dq, J=20.5, 6.7Hz, 10H), 1.41-1.17 (m, 68H), 0.91 (t, J=6.7Hz, 15H)。

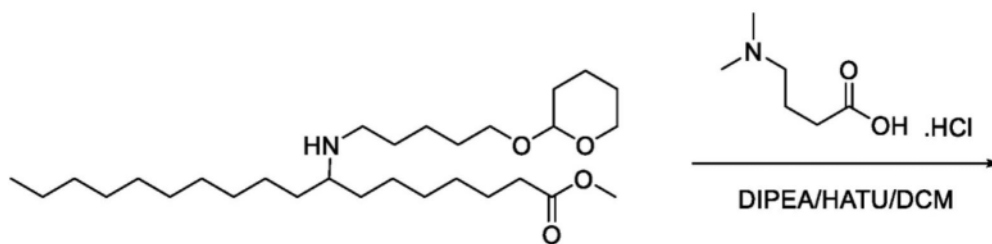


[1430] 8-(8-((3,5-二己基苄基)氧基)-N-(3-(二甲基氨基)丙基)-8-氧代辛酰胺基)-十八碳烯酸2-己基癸酯 (83)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 6.98 (m, 3H), 5.07 (s, 2H), 3.98 (dd, J=5.9, 2.8Hz, 2H), 3.69-3.56 (m, 1H), 3.12 (t, J=8.0Hz, 2H), 2.59 (t, J=7.8Hz, 4H), 2.42-2.20 (m, 13H), 1.79-1.56 (m, 21H), 1.46 (t, J=7.2Hz, 4H), 1.41-1.10 (m, 61H), 0.98-0.86 (m, 15H)。

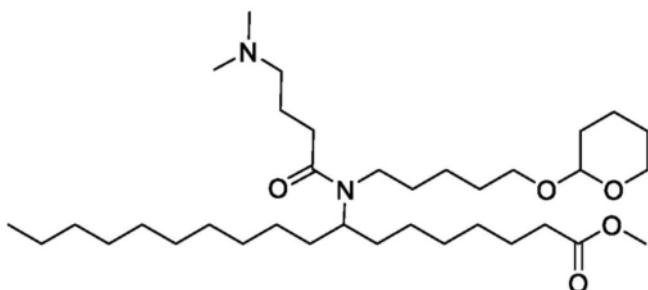


[1432] 8-(N-(3-(二甲基氨基)丙基)-8-((3-己基壬基)氧基)-8-氧代辛酰胺基)-十八碳烯酸2-己基癸酯 (84)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 4.10 (t, J=7.1Hz, 2H), 3.98 (dd, J=5.8, 1.9Hz, 2H), 3.20 (t, J=7.5Hz, 2H), 2.75 (s, 2H), 2.58 (s, 6H), 2.31 (qd, J=7.5, 2.9Hz, 6H), 2.26 (s, 2H), 1.88 (t, J=7.4Hz, 2H), 1.74-1.55 (m, 10H), 1.49 (td, J=13.1, 5.6Hz, 4H), 1.41-1.19 (m, 69H), 0.90 (t, J=6.7Hz, 15H)。

[1441]



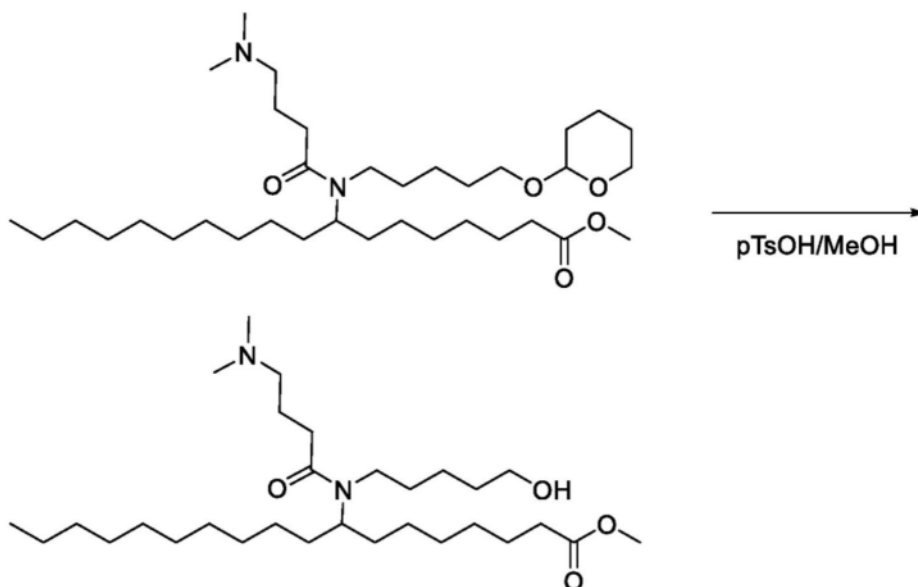
[1442]



[1443] 将4-(二甲基氨基)丁酸HCl (1.30g, 9.9mmol)、DIPEA (3.5mL, 20.0mmol) 和HATU (3.8g, 9.9mmol) 在DCM (50mL) 中在RT下搅拌30分钟。添加DCM (10mL) 中的8-[[5-(噁烷-2-基氧基)戊基]氨基]十八烷酸甲酯 (1.6g, 3.3mmol), 并在RT下继续搅拌16hr。将反应物在真空中浓缩并将残余物溶解于EtOAc中。将合并的有机物用0.5M NaOH、水和盐水 (25mL) 洗涤, 干燥 (MgSO₄) 并在真空中浓缩。将粗物质通过自动快速色谱 (0% - 15% MeOH/DCM) 纯化, 得到8-[4-(二甲基氨基)-N-[5-(噁烷-2-基氧基)戊基]丁酰胺基]十八烷酸甲酯 (1.85g, 93.7%)。

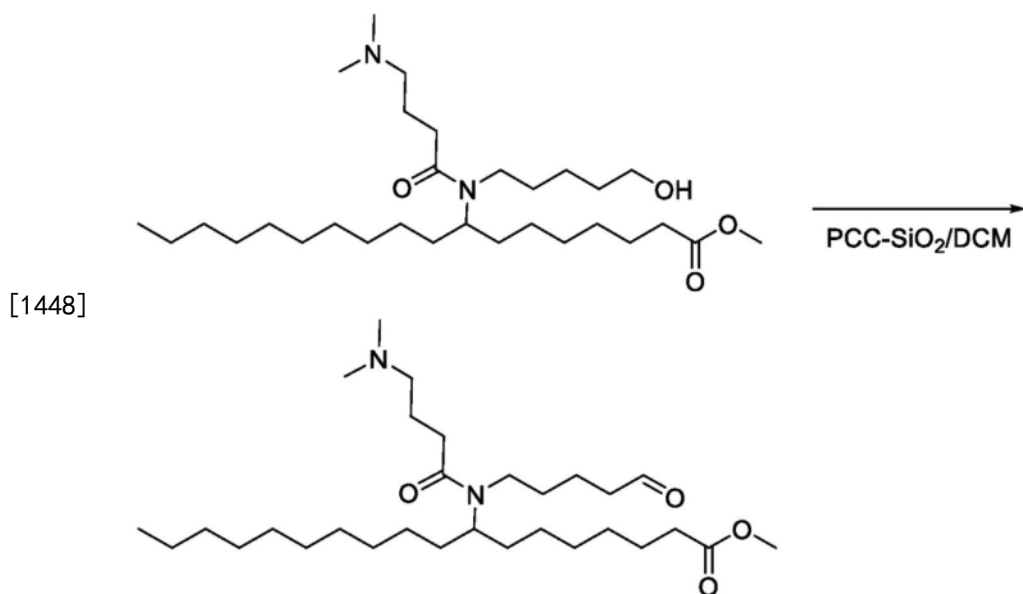
[1444] 步骤3.8-[4-(二甲基氨基)-N-(5-羟基戊基)丁酰胺基]-十八碳烯酸甲酯的合成

[1445]



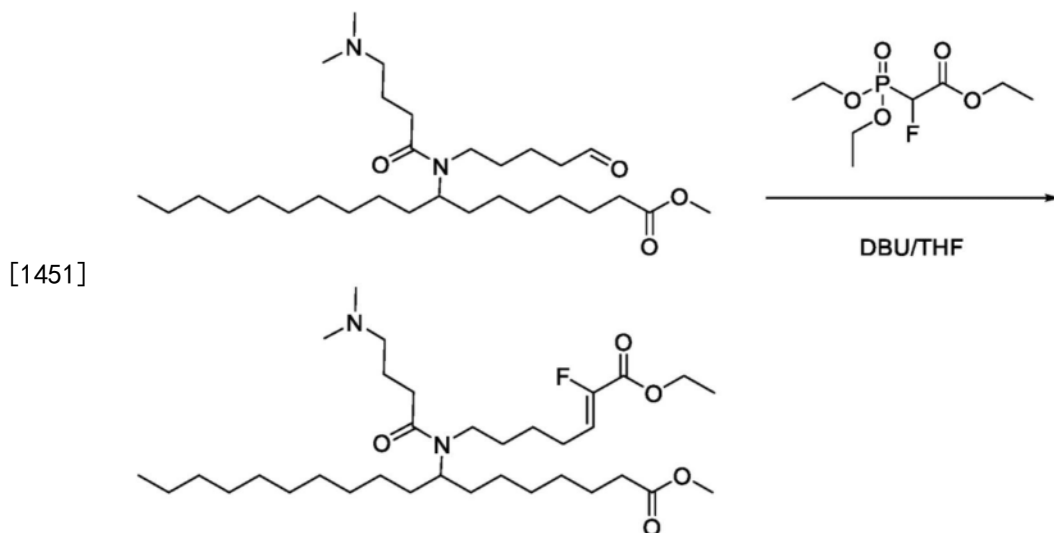
[1446] 将8-[4-(二甲基氨基)-N-[5-(噁烷-2-基氧基)戊基]丁酰胺基]十八烷酸甲酯 (1.9g, 3.2mmol) 和p-ToSH·H₂O (27mg 0.16mmol) 在MeOH (25mL) 中在RT下搅拌16hr。将反应物在真空中浓缩, 将残余物溶解于EtOAc (100mL) 中, 用饱和NaHCO₃洗涤, 干燥 (MgSO₄), 过滤并在真空中浓缩, 得到8-[4-(二甲基氨基)-N-(5-羟基戊基)丁酰胺基]十八烷酸甲酯 (定量), 其不经纯化即使用。

[1447] 步骤4.8-[4-(二甲基氨基)-N-(5-氧代戊基)丁酰胺基]-十八碳烯酸甲酯的合成



[1449] 将8-[4-(二甲基氨基)-N-(5-羟基戊基)丁酰胺基]十八烷酸甲酯(1.6g, 3.1mmol)和PCC/二氧化硅1:1wt(1.3g, 3.12mmol)在DCM(50mL)中在RT下搅拌16hr。将反应物通过硅胶过滤,用DCM洗脱。将滤液在真空中浓缩并将残余物通过自动快速色谱(0%-20%MeOH/DCM)纯化,得到8-[4-(二甲基氨基)-N-(5-氧代戊基)丁酰胺基]十八烷酸甲酯(1.6g, 定量)。

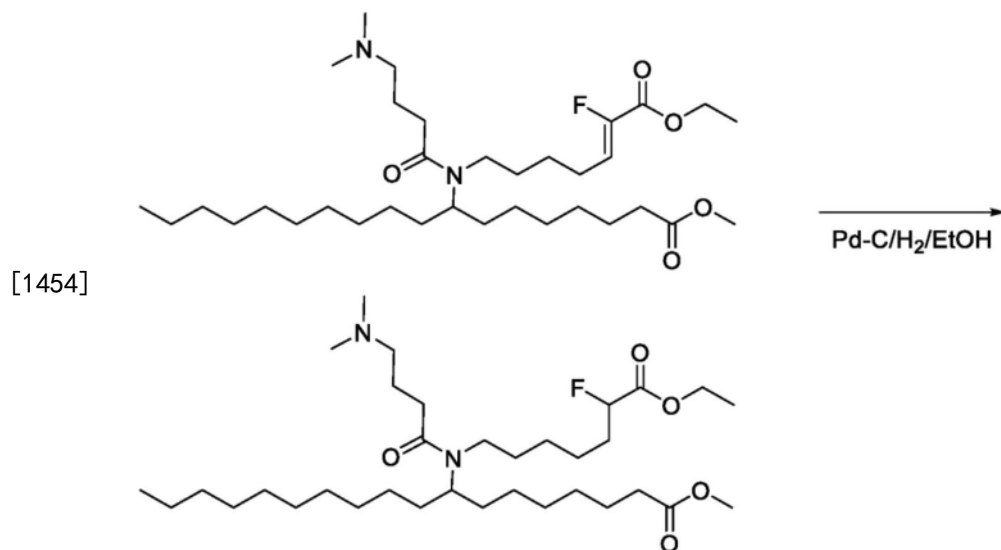
[1450] 步骤5.8-[4-(二甲基氨基)-N-(7-乙氧基-6-氟-7-氧代庚-5-烯-1-基)丁酰胺基]十八碳烯酸甲酯的合成



[1452] 将8-[4-(二甲基氨基)-N-(5-氧代戊基)丁酰胺基]十八烷酸甲酯(1.6g, 3.1mmol)、2-(二乙氧基磷酰基)-2-氟乙酸乙酯(1.9g, 7.8mmol)和DBU(1.17mL, 7.8)在无水THF(25mL)中在RT下搅拌16hr。添加额外的2-(二乙氧基磷酰基)-2-氟乙酸乙酯(379mg, 1.6mmol)和DBU(0.23mL, 1.6mmol)并继续搅拌3hr。将反应物在真空中浓缩,并将残余物通过自动快速色谱(0%-15% MeOH/DCM, 0%-100%EtOAc/Hex)纯化,得到8-[4-(二甲基氨基)-N-(7-乙氧基-6-氟-7-氧代庚-5-烯-1-基)丁酰胺基]十八碳烯酸甲酯(500mg, 26.7%)。

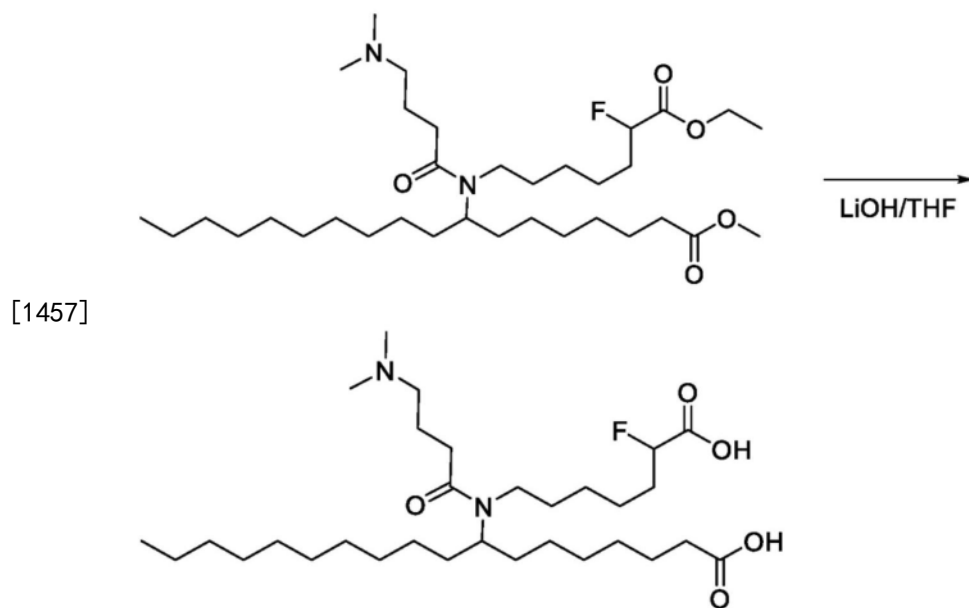
[1453] 步骤6.8-[4-(二甲基氨基)-N-(7-乙氧基-6-氟-7-氧代庚基)丁酰胺基]十八碳烯

酸甲酯的合成



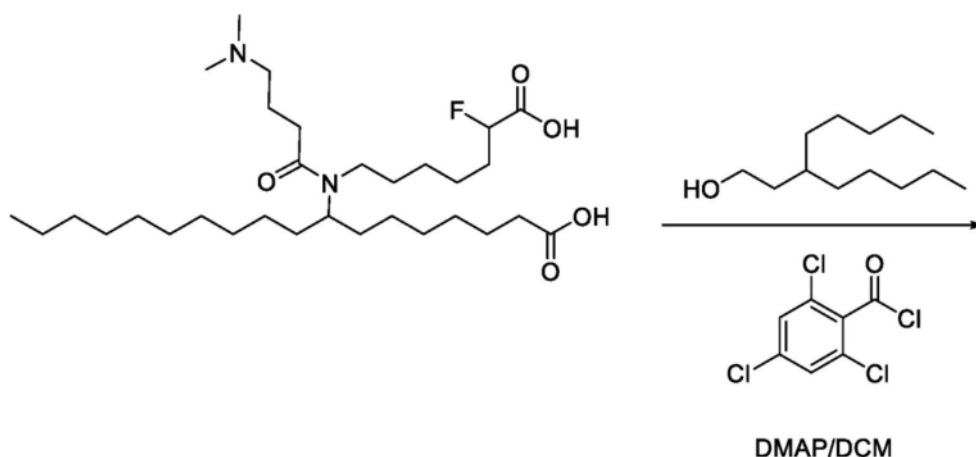
[1455] 将8-[4-(二甲基氨基)-N-(7-乙氧基-6-氟-7-氧代庚-5-烯-1-基)丁酰胺基]十八烷酸甲酯(500mg, 0.84mmol)在RT下在EtOH(25mL)中经钯碳(50mg)催化氢化16hr。将反应物通过硅藻土过滤,并将滤液在真空中浓缩,得到8-[4-(二甲基氨基)-N-(7-乙氧基-6-氟-7-氧代庚基)丁酰胺基]十八烷酸甲酯(375mg, 74.7%),其不经纯化即使用。

[1456] 步骤7.8-[N-(6-羧基-6-氟己基)-4-(二甲基氨基)丁酰胺基]-十八烷酸的合成

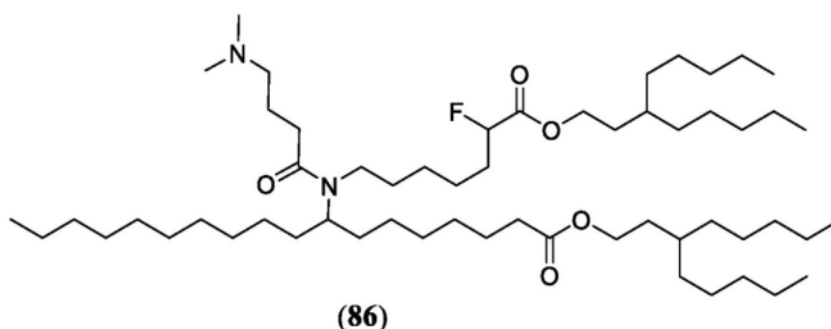


[1458] 将8-[4-(二甲基氨基)-N-(7-乙氧基-6-氟-7-氧代庚基)丁酰胺基]十八烷酸甲酯(375mg, 0.6mmol)和LiOH(60.0mg, 2.5mmol)在THF(10mL)中在RT下搅拌16hr。添加6M HCl(0.6mL),用H₂O稀释反应物并用DCM萃取反应物。将合并的有机物干燥(MgSO₄),过滤并在真空中浓缩,得到8-[N-(6-羧基-6-氟己基)-4-(二甲基氨基)丁酰胺基]十八烷酸(205mg, 59.0%),其不经纯化即使用。

[1459] 步骤8.8-[4-(二甲基氨基)-N-{6-氟-7-氧代-7-[(3-戊基辛基)氧基]庚基}丁酰胺基]十八碳烯酸3-戊基辛酯(86)的合成



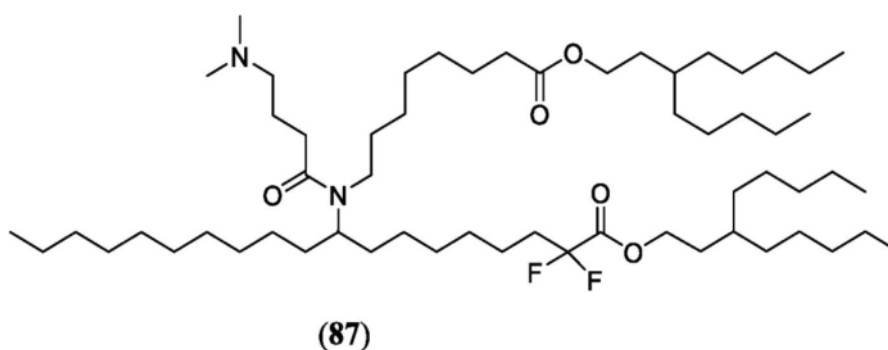
[1460]



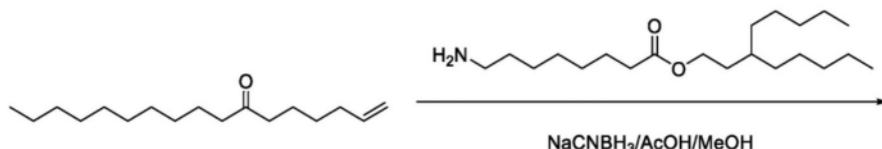
[1461] 将8-[N-(6-羧基-6-氟己基)-4-(二甲基氨基)丁酰胺基]十八烷酸(200mg, 0.36mmol)、3-戊基辛-1-醇(215mg, 1.0mmol)、DMAP(175mg, 1.4mmol)和2,4,6-三氯苯甲酰氯(262mg, 1.0mmol)在DCM(10mL)中在RT下搅拌16hr。将反应物在真空中浓缩,将残余物溶解于EtOAc中并用0.5M NaOH、H₂O和盐水洗涤,干燥(MgSO₄),过滤并在真空中浓缩。将残余物通过自动快速色谱(0%-25% ACN/DCM, 0%-15% MeOH/DCM)纯化,得到8-[4-(二甲基氨基)-N-{6-氟-7-氧代-7-[(3-戊基辛基)氧基]庚基}丁酰胺基]十八碳烯酸3-戊基辛酯(86)(93mg, 28.14%)。¹H NMR(400MHz, CDCl₃) δ4.97(ddd, J=6.9, 4.5, 2.3Hz, 1H), 4.85(ddd, J=7.1, 5.1, 2.4Hz, 1H), 4.23(tt, J=7.3, 2.0Hz, 2H), 4.09(t, J=7.1Hz, 2H), 3.59(s, 1H), 3.33-3.23(m, 2H), 3.10(d, J=9.1Hz, 2H), 2.95(d, J=11.7Hz, 6H), 2.82-2.76(m, 1H), 2.72(t, J=5.6Hz, 1H), 2.30(td, J=7.5, 3.1Hz, 2H), 2.06-1.84(m, 4H), 1.71-1.38(m, 22H), 1.38-1.16(m, 55H), 0.91(tt, J=7.1, 1.5Hz, 15H)。MS(ESI)m/z: C₅₇H₁₁₁FN₂O₅的[M+H]⁺计算值: 923.9; 实测值: 923.2

[1462] 实施例26.9-[4-(二甲基氨基)-N-{8-氧代-8-[(3-戊基辛基)氧基]辛基}丁酰胺基]-2,2-二氟十九烷酸3-戊基辛酯(87)的合成

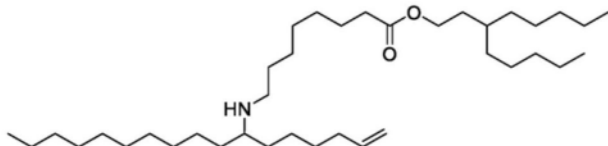
[1463]



[1464] 步骤1.8-(十七碳-1-烯-7-基氨基)辛酸3-戊基辛酯的合成



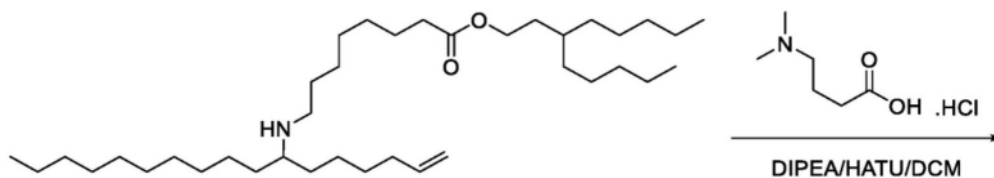
[1465]



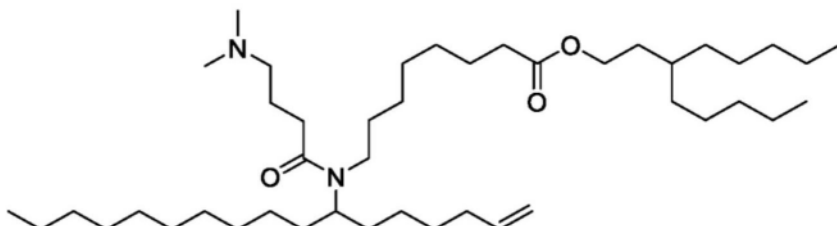
[1466] 将8-氨基辛酸3-戊基辛酯(1.2g, 3.5mmol)、十七碳-1-烯-7-酮(872mg, 3.5mmol)和AcOH酸(200μL, 3.5mmol)在MeOH中在60℃下搅拌30分钟。添加NaCNBH₃并继续搅拌16hr。将反应物在真空中浓缩,将残余物溶解于DCM中,用NaHCO₃(饱和水溶液)和盐水洗涤,干燥(MgSO₄),过滤并在真空中浓缩。将粗物质通过自动快速色谱(0%-60% EtOAc/Hex)纯化,得到8-(十七碳-1-烯-7-基氨基)辛酸3-戊基辛酯(1.33g, 66.7%)。

[1467] 步骤2.8-[4-(二甲基氨基)-N-(十七碳-1-烯-7-基)丁酰胺基]辛酸3-戊基辛酯的合成

[1468]

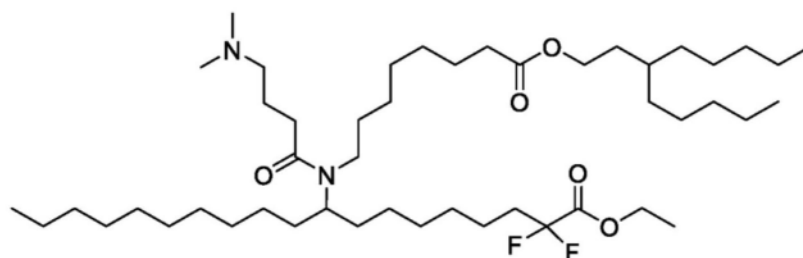
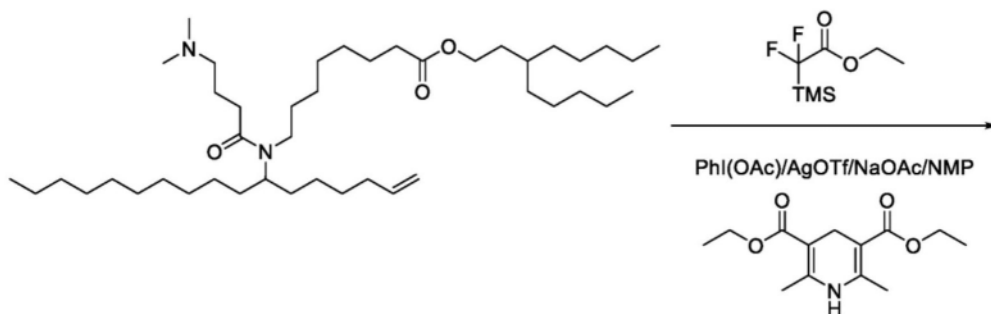


[1469]



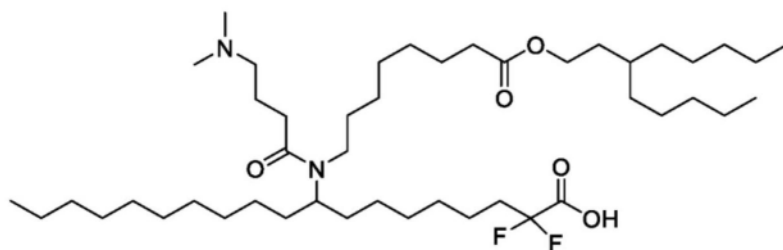
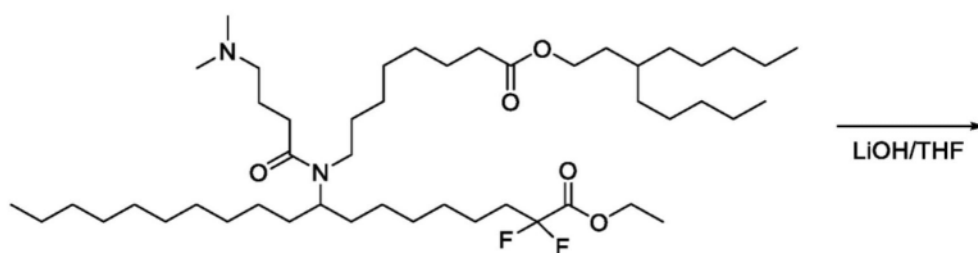
[1470] 将4-(二甲基氨基)丁酸盐(1.16g, 6.9mmol)、HATU(3.15g, 8.3mmol)和DIPEA(3.6mL, 20.7mmol)在DCM(40mL)中在RT下搅拌3hr。添加DCM(40mL)中的8-(十七碳-1-烯-7-基氨基)辛酸3-戊基辛酯(1.33g, 2.3mmol),并继续搅拌18hr。将反应物在真空中浓缩,将残余物溶解于EtOAc中,用饱和NaHCO₃洗涤,并用EtOAc反萃取水层。将合并的有机物干燥(MgSO₄),过滤并在真空中浓缩。将粗物质通过自动快速色谱(0%-100% EtOAc/Hex和0%-20% MeOH/EtOAc)纯化,得到8-[4-(二甲基氨基)-N-(十七碳-1-烯-7-基)丁酰胺基]辛酸3-戊基辛酯(1.54g, 97.1%)。

[1471] 步骤3.9-[4-(二甲基氨基)-N-{8-氧代-8-[(3-戊基辛基)氧基]-辛基}丁酰胺基]-2,2-二氟十九烷酸乙酯的合成



[1473] 在热/真空干燥的烧瓶中,将Hantsch酯(566mg,2.24mmol)、NaOAc(367mg,4.5mmol)、AgOTf(1.44g,5.6mmol)和二乙酸碘苯(1.44g,4.471mmol,2当量)在 N_2 下在NMP(15mL)中搅拌。添加NMP(7mL)中的8-[4-(二甲基氨基)-N-(十七碳-1-烯-7-基)丁酰胺基]辛酸3-戊基辛酯(1.55g,2.24mmol)和2,2-二氟-2-(三甲基甲硅烷基)乙酸乙酯(2.2g,11.2mmol),并将反应物在RT下搅拌18hr。将反应物通过硅藻土过滤,用 Et_2O 洗脱。将合并的有机物用盐水洗涤,干燥($MgSO_4$),过滤并在真空中浓缩。将粗物质通过自动快速色谱(0%-25%ACN/DCM)纯化,得到9-[4-(二甲基氨基)-N-{8-氧代-8-[(3-戊基辛基)氧基]辛基}丁酰胺基]-2,2-二氟十九烷酸乙酯(588mg,32.3%)。

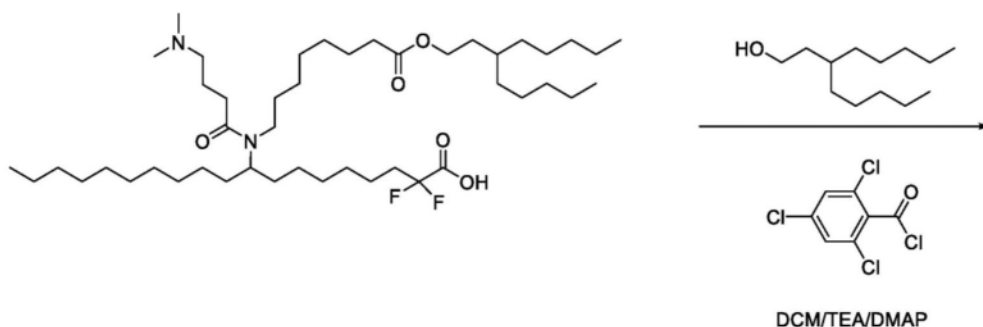
[1474] 步骤4.9-[4-(二甲基氨基)-N-{8-氧代-8-[(3-戊基辛基)氧基]辛基}-丁酰胺基]-2,2-二氟十九烷酸的合成



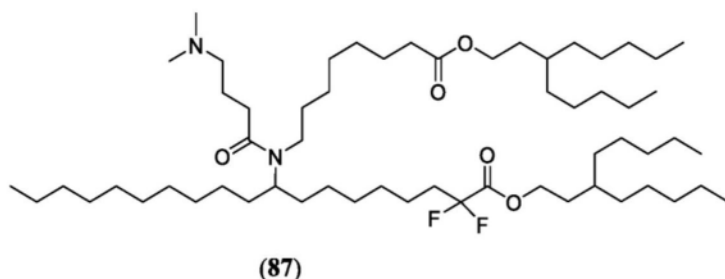
[1476] 将9-[4-(二甲基氨基)-N-{8-氧代-8-[(3-戊基辛基)氧基]辛基}丁酰胺基]-2,2-二氟十九烷酸乙酯(588mg,0.7mmol)和LiOH 1M(2.2mL,2.2mmol)在THF(10mL)中在0℃下搅拌,直至反应完成。添加6M HCl(0.36mL),并使反应物与甲苯共沸。将残余物溶解于DCM中,干燥($MgSO_4$),过滤并在真空中浓缩,得到9-[4-(二甲基氨基)-N-{8-氧代-8-[(3-戊基辛基)氧基]辛基}丁酰胺基]-2,2-二氟十九烷酸。

基) 氧基] 辛基} 丁酰胺基]-2,2-二氟十九烷酸 (600mg, 98.8%), 其不经纯化即使用。

[1477] 步骤5.9-[4-(二甲基氨基)-N-{8-氧代-8-[(3-戊基辛基) 氧基]-辛基} 丁酰胺基]-2,2-二氟十九烷酸3-戊基辛酯 (87) 的合成

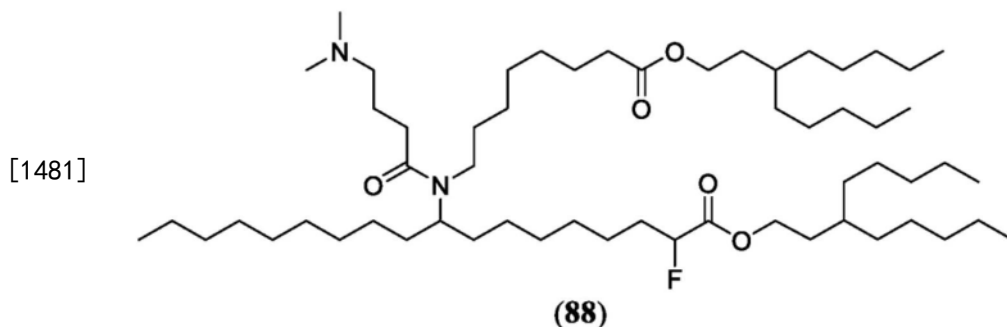


[1478]



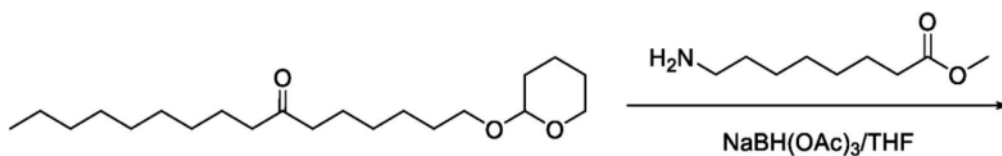
[1479] 将9-[4-(二甲基氨基)-N-{8-氧代-8-[(3-戊基辛基) 氧基]辛基} 丁酰胺基]-2,2-二氟十九烷酸 (561mg, 0.7mmol)、3-戊基辛-1-醇 (157mg, 0.78mmol)、2,4,6-三氯苯甲酰氯 (382mg, 1.6mmol) 和DMAP (261mg, 2.1mmol) 在0℃下在DCM (10mL) 中合并。将反应物搅拌16hr, 使其升温至RT。添加Et₂O并通过过滤除去所得PPT。将有机物用NaHCO₃洗涤, 干燥 (MgSO₄), 过滤, 在真空中浓缩, 并将残余物通过自动快速色谱 (0%-10% MeOH/DCM和1:1ACN/DCM 3CV, 0%-20% MeOH/DCM) 纯化, 得到9-[4-(二甲基氨基)-N-{8-氧代-8-[(3-戊基辛基) 氧基]辛基} 丁酰胺基]-2,2-二氟十九烷酸3-戊基辛酯 (87) (128mg, 18.5%)。¹H NMR (400MHz, MeOD) δ4.33 (t, J=6.7Hz, 2H), 4.12 (t, J=6.8Hz, 2H), 3.19 (d, J=8.3Hz, 1H), 3.12 (d, J=9.0Hz, 2H), 2.81 (t, J=7.5Hz, 3H), 2.62 (s, 6H), 2.52 (dt, J=10.2, 7.0Hz, 3H), 2.33 (td, J=7.3, 4.3Hz, 3H), 1.93 (h, J=7.1Hz, 3H), 1.64 (dq, J=29.9, 6.6Hz, 9H), 1.55 (s, 3H), 1.46 (s, 3H), 1.39 (d, J=3.8Hz, 7H), 1.37 (s, 9H), 1.31 (d, J=4.2Hz, 39H), 0.93 (t, J=6.9Hz, 15H)。

[1480] 实施例27.9-[4-(二甲基氨基)-N-{8-氧代-8-[(3-戊基辛基) 氧基]辛基} 丁酰胺基]-2-氟十八烷酸3-戊基辛酯 (88) 的合成

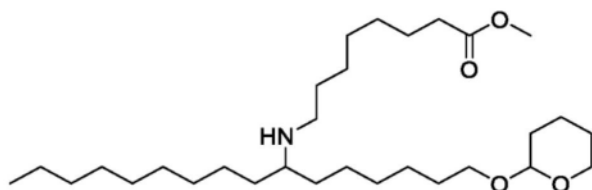


[1481]

[1482] 步骤1.8-{[1-(噁烷-2-基氧基)十六烷-7-基]氨基}辛酸甲酯的合成

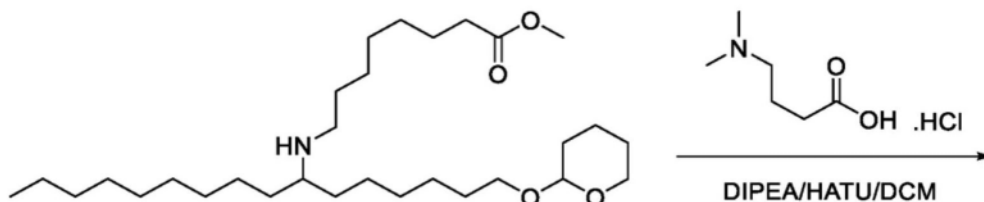


[1483]

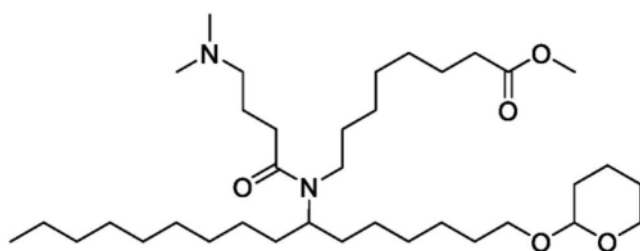


[1484] 将1-(噁烷-2-基氧基)十六烷-7-酮(5.7g, 16.7mmol)、8-氨基辛酸甲酯(2.9g, 16.7mmol)和 $\text{NaCN}(\text{OAc})_3$ (10.6g, 50.2mmol)在THF中在50℃下搅拌16hr。将反应物过滤,用EtOAc洗脱并将有机物用 NaHCO_3 饱和溶液、水和盐水洗涤。将有机物干燥(MgSO_4),在真空中浓缩,并通过自动快速色谱(7% MeOH/DCM)纯化,得到8-{[1-(噁烷-2-基氧基)十六烷-7-基]氨基}辛酸甲酯(2.9g, 34.2%)。

[1485] 步骤2.8-[4-(二甲基氨基)-N-[1-(噁烷-2-基氧基)十六烷-7-基]丁酰胺基]辛酸甲酯的合成



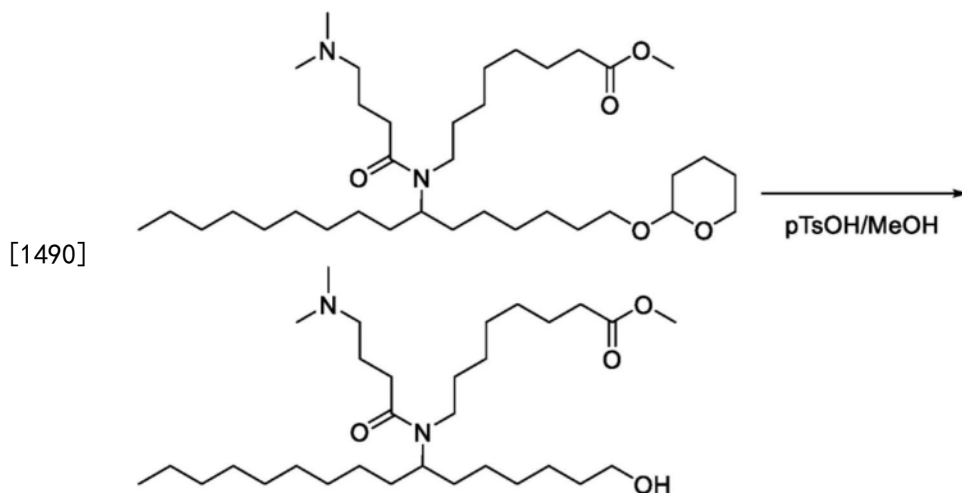
[1486]



[1487]

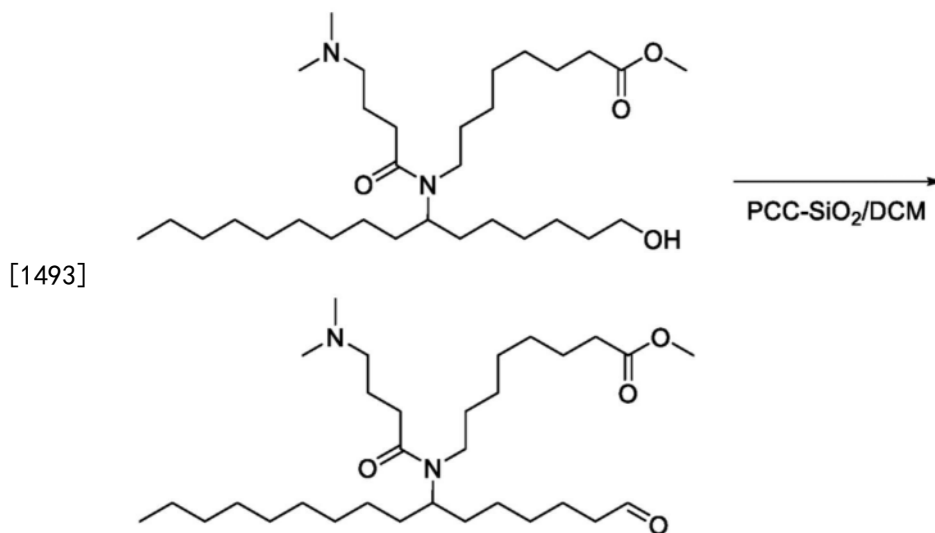
[1488] 将4-二甲基氨基丁酸HCl盐(3.84g, 22.9mmol)、HATU(8.7g, 22.9mmol)和DIPEA(8.0mL, 45.8mmol)在DCM(40mL)中在RT下搅拌3hr。添加DCM(40mL)中的8-{[1-(噁烷-2-基氧基)十六烷-7-基]氨基}辛酸甲酯(2.85g, 5.7mmol)并继续搅拌18hr。将反应物在真空中浓缩,将残余物溶解于EtOAc中,用饱和 NaHCO_3 洗涤,并用额外的EtOAc萃取水层。将合并的有机物在真空中浓缩,并将粗物质通过自动快速色谱(0%-100% EtOAc/Hex和0%-20% MeOH/EtOAc)纯化,得到8-[4-(二甲基氨基)-N-[1-(噁烷-2-基氧基)十六烷-7-基]丁酰胺基]辛酸甲酯(定量)。

[1489] 步骤3.8-[4-(二甲基氨基)-N-(1-羟基十六烷-7-基)丁酰胺基]辛酸甲酯的合成



[1491] 将8-[4-(二甲基氨基)-N-[1-(噁烷-2-基氧基)十六烷-7-基]丁酰胺基]-辛酸甲酯(3.5g, 5.7mmol)和pTsOH-H₂O(109mg, 0.57mmol)在MeOH中在RT下搅拌2.5hr。将反应物在真空中浓缩,得到8-[4-(二甲基氨基)-N-(1-羟基十六烷-7-基)丁酰胺基]辛酸甲酯(5.06g),其不经纯化即使用。

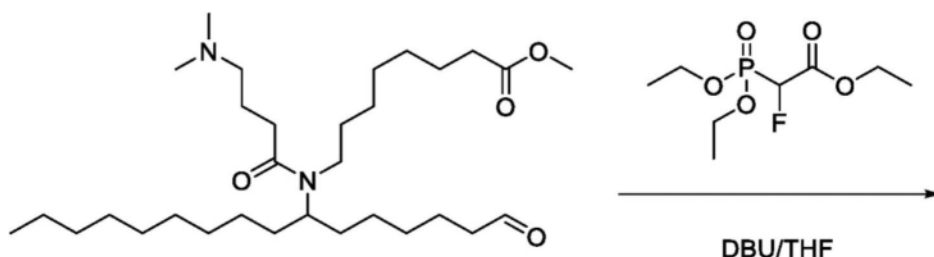
[1492] 步骤4.8-[4-(二甲基氨基)-N-(1-氧代十六烷-7-基)丁酰胺基]辛酸甲酯的合成



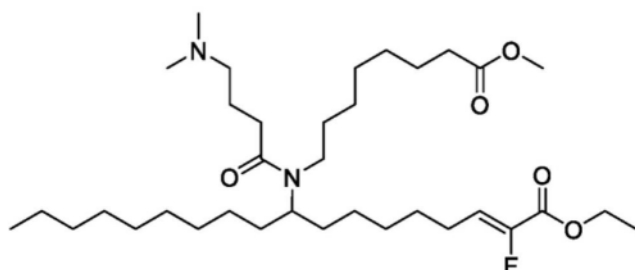
[1494] 将8-[4-(二甲基氨基)-N-(1-羟基十六烷-7-基)丁酰胺基]辛酸甲酯(3.02g, 5.73mmol)和PCC-SiO₂(1:1)(4.3g, 10.0mmol)在DCM中在RT下搅拌16hr。添加MeCN并将反应物通过二氧化硅过滤,用1:1MeCN/DCM洗脱。将滤液在真空中浓缩,将残余物溶解于EtOAc中并通过硅藻土过滤。将滤液在真空中浓缩,并通过自动快速色谱(0%-50% ACN/DCM)纯化,得到8-[4-(二甲基氨基)-N-(1-氧代十六烷-7-基)丁酰胺基]辛酸甲酯(1.79g, 59.3%)

[1495] 步骤5.(2Z)-9-[4-(二甲基氨基)-N-(8-甲氧基-8-氧代辛基)丁酰胺基]-2-氟十八碳-2-烯酸乙酯的合成

[1496]



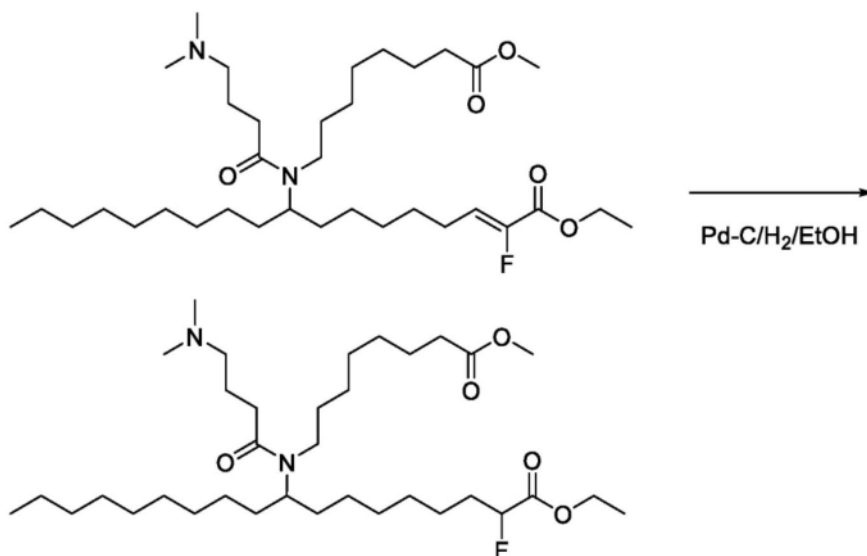
[1497]



[1498] 将8-[4-(二甲基氨基)-N-(1-氧代十六烷-7-基)丁酰胺基]辛酸甲酯(1.79g, 3.4mmol)、2-(二乙氧基磷酰基)-2-氟乙酸乙酯(1.4g, 6.0mmol)和DBU(0.9mL, 6.0mmol)在THF中在RT下搅拌16hr。将反应物在真空中浓缩并将残余物溶解于EtOAc中。将有机物用NaHCO₃和盐水洗涤,干燥(MgSO₄),过滤并在真空中浓缩。将粗材料通过自动快速色谱(0%-100% EtOAc/Hex和0%-15% MeOH/DCM)纯化,得到(2Z)-9-[4-(二甲基氨基)-N-(8-甲氧基-8-氧代辛基)丁酰胺基]-2-氟十八碳-2-烯酸乙酯的合成(626mg, 30.0%)

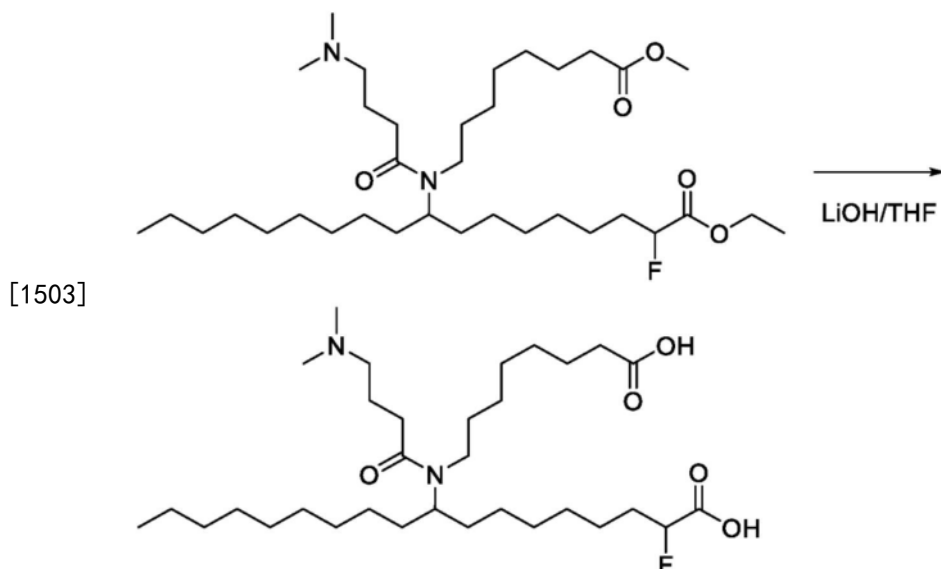
[1499] 步骤6.9-[4-(二甲基氨基)-N-(8-甲氧基-8-氧代辛基)丁酰胺基]-2-氟十八烷酸乙酯的合成

[1500]



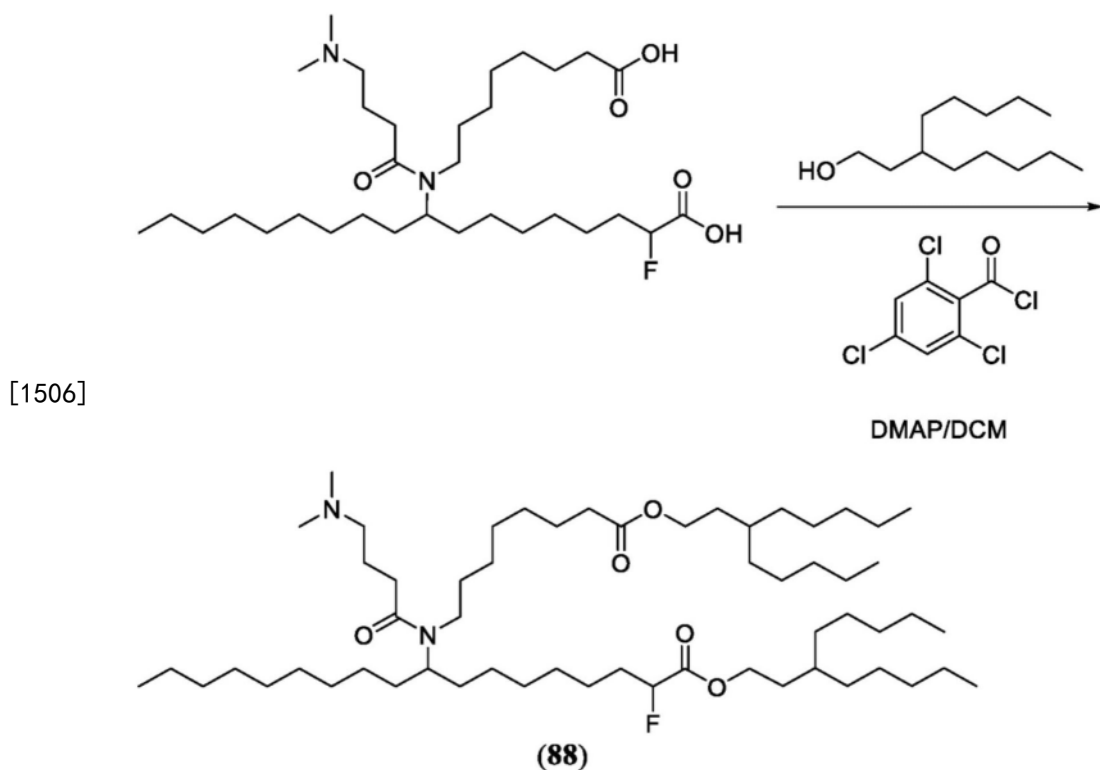
[1501] 将(2Z)-9-[4-(二甲基氨基)-N-(8-甲氧基-8-氧代辛基)丁酰胺基]-2-氟十八碳-2-烯酸乙酯(620mg, 1.0mmol)在RT下在EtOH中经Pd-C催化氢化16hr。将反应物通过硅藻土过滤并在真空中浓缩,得到9-[4-(二甲基氨基)-N-(8-乙氧基-8-氧代辛基)丁酰胺基]-2-氟十八烷酸乙酯(550mg, 88.4%),其不经纯化即使用。

[1502] 步骤7.9-[N-(7-羧基庚基)-4-(二甲基氨基)丁酰胺基]-2-氟十八烷酸的合成



[1504] 将9-[4-(二甲基氨基)-N-(8-甲氧基-8-氧代辛基)丁酰胺基]-2-氟十八烷酸乙酯(550mg, 0.90mmol)和LiOH(96mg, 4.0mmol)在THF中在RT下搅拌16hr。将反应物在真空中浓缩,用6M HCl(1.0mL)酸化,并萃取至DCM(50mL)中。将有机物用盐水洗涤并用DCM进一步萃取水层。将合并的有机物干燥(MgSO₄),过滤并在真空中浓缩,得到9-[N-(7-羧基庚基)-4-(二甲基氨基)丁酰胺基]-2-氟十八烷酸(284mg, 55.4%),其不经纯化即使用。

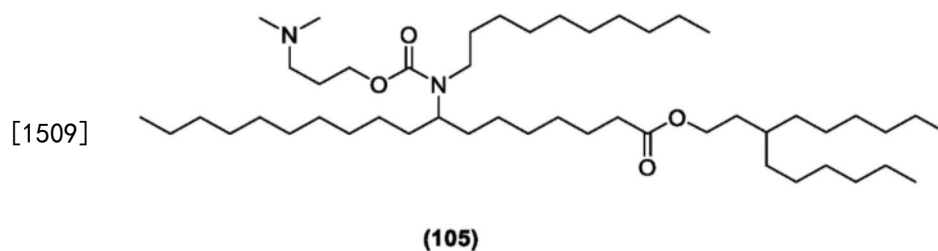
[1505] 步骤8.9-[4-(二甲基氨基)-N-{8-氧代-8-[(3-戊基辛基)氧基]辛基}丁酰胺基]-2-氟十八烷酸3-戊基辛酯(88)的合成



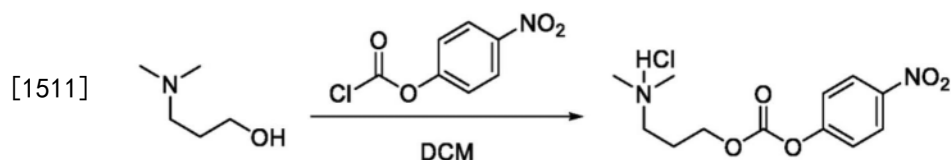
[1507] 将9-[N-(7-羧基庚基)-4-(二甲基氨基)丁酰胺基]-2-氟十八烷酸(275mg, 0.48mmol)、3-戊基辛-1-醇(289mg, 1.44mmol)、2,4,6-三氯苯甲酰氯(351mg, 1.44mmol)和DMAP(235mg, 1.92mmol)在0℃下在DCM(10mL)中合并。将反应物搅拌16hr,使其升温至RT。将

反应物在真空中浓缩并将残余物溶解于EtOAc中。将合并的有机物用饱和NaHCO₃和盐水洗涤,干燥(MgSO₄),过滤并在真空中浓缩。将残余物通过自动快速色谱(0%-10% MeOH/DCM)纯化,得到9-[4-(二甲基氨基)-N-{8-氧代-8-[(3-戊基辛基)氧基]辛基}丁酰胺基]-2-氟十八烷酸3-戊基辛酯(88)(211mg,46.9%)。¹H NMR(400MHz,CDCl₃) δ4.23(td,J=7.1,2.1Hz,2H),4.10(td,J=7.1,4.0Hz,2H),3.09-3.01(m,2H),2.33(dt,J=23.1,7.3Hz,9H),1.69-1.53(m,11H),1.38-1.18(m,57H),0.95-0.86(m,15H)。¹⁹F NMR(376MHz,CDCl₃) δ-191.67--192.07(m)。

[1508] 实施例28.8-(癸基((3-(二甲基氨基)丙氧基)羰基)-氨基)十八烷酸3-己基壬酯(105)的合成

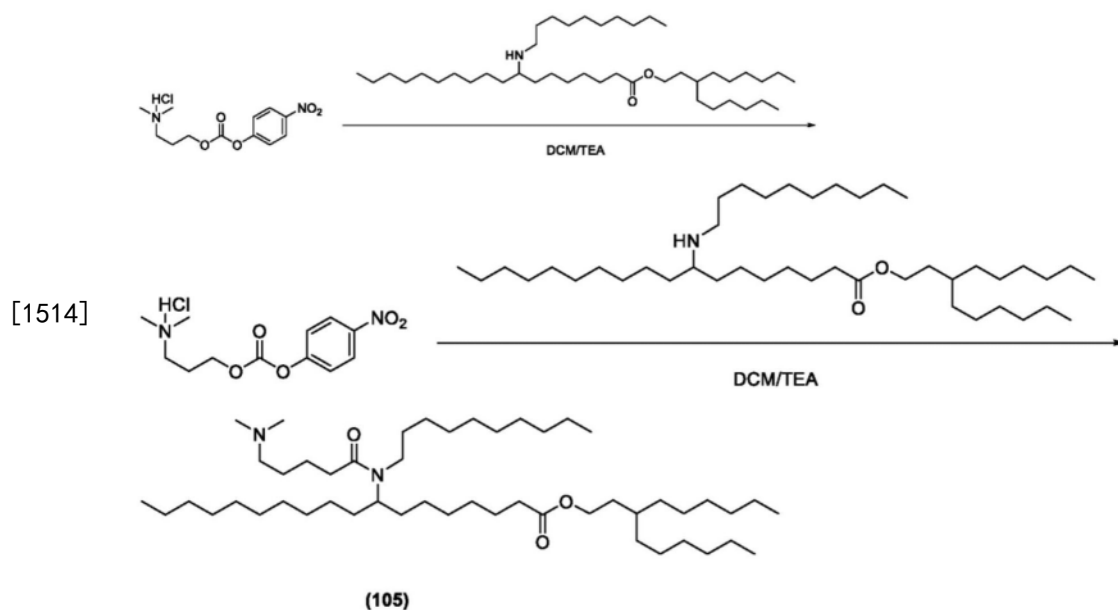


[1510] 步骤1:(4-硝基苯基)碳酸3-(二甲基氨基)丙酯盐酸盐的合成



[1512] 在0℃下将DCM(20mL)中的3-(二甲基氨基)丙-1-醇(2.5g,24.2mmol)逐滴添加至氯甲酸4-硝基苯酯(4.9g,24.2mmol)于DCM(80mL)中的搅拌溶液中。将反应物搅拌16h,使其升温至RT。在真空中除去溶剂,得到呈粗混合物的(4-硝基苯基)碳酸3-(二甲基氨基)丙酯盐酸盐(5.3g,70.9%),其不经进一步纯化即使用。

[1513] 步骤2:8-(N-癸基-5-(二甲基氨基)戊酰胺基)十八碳烯酸3-己基壬酯(105)的合成



[1515] 将8-(癸基氨基)十八烷酸3-己基壬酯(0.61g,0.94mmol)、三乙胺(0.29g,

2.82mmol) 和 4-硝基苯基碳酸 3-(二甲基铵基)丙酯盐酸盐 (0.36g, 1.18mmol) 在 DCM 中在 RT 下搅拌 16h。将另外 1 当量的 4-硝基苯基碳酸 3-(二甲基氨基)丙酯盐酸盐和三乙胺与 DMAP (催化量) 一起添加, 并将反应物在回流下加热 16h。在真空中除去溶剂并将残余物溶解于己烷中, 过滤并浓缩。将所得油状物溶解于 DCM 中并添加癸酰氯 (90mg, 0.5 当量), 并且搅拌 15 分钟。将反应物在真空中浓缩, 用乙醚稀释, 用 NaHCO₃ 饱和溶液和盐水洗涤, 干燥 (MgSO₄), 过滤并浓缩。将残余物用自动快速色谱 (0% - 10% MeOH/DCM) 纯化, 得到 8-[癸基 ({3-(二甲基氨基)丙氧基}羰基)氨基]十八烷酸 3-己基壬酯 (0.30g, 40.5%)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 4.09 (dt, J = 17.8, 6.7Hz, 4H), 3.02-2.89 (m, 2H), 2.39 (d, J = 7.6Hz, 2H), 2.26 (d, J = 4.5Hz, 7H), 1.82 (s, 6H), 1.57 (dp, J = 16.8, 8.4Hz, 4H), 1.41 (d, J = 10.5Hz, 3H), 1.35-1.23 (m, 55H), 0.88 (td, J = 6.8, 1.9Hz, 12H)。

[1516] 一般方法

[1517] 脂质纳米颗粒制剂

[1518] 脂质溶液含有 4 种组分: PEG 缀合脂质、可电离脂质、胆固醇和磷脂 (例如, DSPC)。使用如所描述的脂质特性和摩尔比制备脂质储备液, 以在 100% 乙醇中达到约 7mg/mL 的总浓度。将萤火虫荧光素酶 mRNA (TriLink Biotechnologies, L-7202) 或鸟氨酸转氨甲酰酶 (OTC) mRNA (TriLink Biotechnologies, custom designed) 在乙酸盐 (pH 5) 缓冲液和不含核酸酶的水中稀释, 以实现 100mM 乙酸盐 (pH 5) 中 0.366mg/mL mRNA 的目标浓度。通过 T 形连接件将等体积的脂质和核酸溶液以 400mL/min 的流速掺混, 并用约 4 体积的 PBS (pH 7.4) 稀释。将制剂放置于 Slide-A-Lyzer 透析单元 (MWCO 10,000) 中, 并且用 10mM Tris、500mM NaCl (pH 8) 缓冲液透析过夜。透析后, 使用 VivaSpin 浓缩器单元 (MWCO 100,000) 将制剂浓缩至约 0.6mg/mL, 并且用 5mM Tris、10% 蔗糖 (pH 8 缓冲液) 透析过夜。将制剂通过 0.2μm 针筒式过滤器 (PES 膜) 过滤。通过 RiboGreen 测定确定核酸浓度。使用 Malvern Nano 系列 Zetasizer 测定粒度和多分散性。

[1519] 荧光素酶 LNP 的体内施用

[1520] 将包封萤火虫荧光素酶 mRNA 的 LNP 制剂以 0.5mg/kg 静脉注射至雌性 BALB/c 小鼠 (6-8 周龄) 中。在注射当天, 将 LNP 储备液过滤并且用磷酸盐缓冲盐水稀释至所需给药浓度。在施用后 6 小时, 用致死剂量的氯胺酮/赛拉嗪对动物进行麻醉。收集肝脏样品 (左外叶), 称重, 并且在液氮中快速冷冻。将肝脏样品在 -80°C 下储存在 FastPrep® 管中直至对荧光素酶活性进行分析。

[1521] 荧光素酶活性分析

[1522] 将肝脏的冷冻等分试样解冻并且使用 FastPrep® 均质器在 1mL 的 1xCCLR (细胞培养溶解试剂) 中均质化。然后将匀浆在 4°C 下在 16,000RPM 下离心 10 分钟。将二十 (20) μL 的上清液加载至 96 孔白色板中并且在添加荧光素酶试剂 (Promega 荧光素酶分析系统) 之后测量发光。通过将均质化样品的发光与荧光素酶蛋白质标准品相比较来确定荧光素酶活性。为了解释肝脏匀浆中的组分对发光的任何淬灭, 将荧光素酶添加至未处理动物的肝脏匀浆中并且测量所得发光。将所得淬灭因子应用于所有样品以获得校正的荧光素酶活性并且根据每单位所分析组织的质量进行归一化。

[1523] OTC LNP 的体内施用

[1524] 将包封鸟氨酸转氨甲酰酶 mRNA 的 LNP 制剂以指定剂量水平静脉注射至雄性 C57BL/

6小鼠(6-8周龄)。在注射当天,将LNP储备液过滤并且用磷酸盐缓冲盐水稀释至所需给药浓度。在施用后24小时,用致死剂量的氯胺酮/赛拉嗪对动物进行麻醉。收集肝脏样品(左外叶),称重,并且在液氮中快速冷冻。将肝脏样品在-80℃下储存在FastPrep®管中直至对OTC表达进行分析。

[1525] 人OTC表达分析

[1526] 用PBS、Halt蛋白酶抑制剂混合物和FastPrep均质化制备肝脏匀浆,用BCA蛋白质测定标准化至2mg/mL蛋白质,然后通过ELISA进行分析。简言之,用PBS稀释样品并置于Nunc Maxisorp板上。从初次接受试验的动物对照(媒介物)制备使用人蛋白质1蛋白的标准曲线。孵育2h后,洗涤板并添加第一抗体。孵育1h后,添加第二抗体并再孵育一小时。洗涤后,添加TMB底物以便显色,并用2N硫酸终止反应。在450/570nm处读取板。

[1527] EGFP LNP的体内施用

[1528] 将包封增强型绿色荧光蛋白mRNA的LNP制剂以0.5mg/kg静脉注射至雌性BALB/c小鼠(6-8周龄)。在注射当天,将LNP储备液过滤并且用磷酸盐缓冲盐水稀释至所需给药浓度。在施用后24小时,用致死剂量的氯胺酮/赛拉嗪对动物进行麻醉。收集肝脏样品(左外叶),称重,并且在液氮中快速冷冻。将肝脏样品在-80℃下储存在FastPrep®管中直至对EGFP表达进行分析。

[1529] EGFP表达分析

[1530] 根据制造商的说明书(Abcam,GFP ELISA试剂盒),在细胞提取缓冲液中制备肝脏匀浆,稀释,并且使用ELISA对EGFP蛋白水平进行分析。

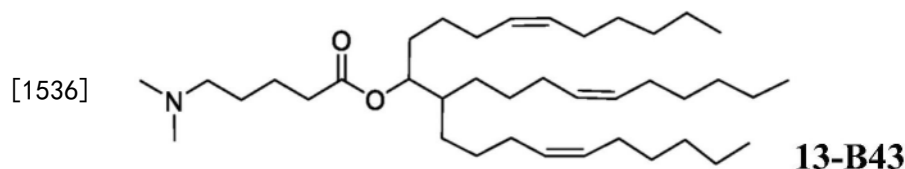
[1531] 脂质LC-MS分析

[1532] 用PBS处理肝脏组织并用FastPrep机器进行均质化,5m/s x 15s的3个循环。汇集来自PBS处理的对照动物的匀浆并用于标准曲线制备。用250uL内部适用性标准品将样品提取至深孔板中。将板在4℃和2000rpm下离心15分钟。分析使用与Agilent 1290UHPLC耦合的Agilent 6520QTOF,使用反相LC分离进行。根据加标至适当匹配的空白基质中的校准曲线,通过MS/MS定量可电离脂质。校准使用类似类别的合成脂质作为内标。

[1533] 实施例29. 含有新型可电离脂质的LNP制剂的颗粒特性

[1534] 含有新型可电离脂质的LNP制剂都产生了具有高包封效率的稳定颗粒(表1-7)。

[1535] 包括以下化合物(标识为13-B43)用于以下比较:



[1537] 表1. 用于体内施用的含有荧光素酶mRNA和新型可电离脂质的LNP的颗粒特性

	LNP 摩尔比为 1.6 : 54.6 : 32.8 : 10.9, PEG2000-C-DMA : 可电离脂质 : 胆固醇 : DSPC	最终产物	
		Z 平均值 (PDI) nm	% EE
[1538]	13-B43	70 (0.13)	94
	化合物 48	71 (0.04)	96
	化合物 49	61 (0.08)	96
	化合物 50	61 (0.07)	93
	化合物 51	62 (0.09)	94
	化合物 52	72 (0.05)	95

[1539] 表2. 用于体内施用的含有荧光素酶mRNA和新型可电离脂质的LNP的颗粒特性

	LNP 摩尔比为 1.6 : 54.6 : 32.8 : 10.9, PEG2000-C-DMA : 可电离脂质 : 胆固醇 : DSPC	最终产物	
		Z 平均值 (PDI) nm	% EE
[1540]	13-B43	72 (0.03)	99
	化合物 53	106 (0.07)	97
	化合物 21	77 (0.03)	98
	化合物 22	74 (0.04)	98
	化合物 40	87 (0.05)	98
	化合物 55	94 (0.17)	98
	化合物 58	81 (0.13)	99
	化合物 56	97 (0.10)	96
	化合物 25	78 (0.03)	99

[1541] 表3. 用于体内施用的含有荧光素酶mRNA和新型可电离脂质的LNP的颗粒特性

	LNP 摩尔比为 1.6 : 54.6 : 32.8 : 10.9, PEG2000-C-DMA : 可电离脂质 : 胆固醇 : DSPC	最终产物	
		Z 平均值(PDI) nm	% EE
[1542]	13-B43	72 (0.06)	99
	化合物 59	82 (0.07)	99
	化合物 54	82 (0.05)	97
	化合物 57	84 (0.03)	80
	化合物 32	85 (0.02)	99
	化合物 4	82 (0.03)	99
	化合物 3	91 (0.05)	99
	化合物 60	73 (0.05)	99
	化合物 61	76 (0.05)	99
	化合物 62	67 (0.08)	98
	化合物 23	69 (0.06)	97
	化合物 24	72 (0.08)	96

[1543] 表4. 用于体内施用的含有荧光素酶mRNA和新型可电离脂质的LNP的颗粒特性

[1544]

LNP 摩尔比为 1.6 : 54.6 : 32.8 : 10.9, PEG2000-C-DMA : 可电离脂质:胆固醇: DSPC	最终产物	
	Z 平均值(PDI) nm	% EE
13-B43	72 (0.07)	98
化合物 35	85 (0.06)	99
化合物 36	81 (0.04)	96
化合物 37	73 (0.05)	82
化合物 26	97 (0.03)	98
化合物 27	86 (0.04)	98
化合物 28	90 (0.20)	95
化合物 78	65 (0.03)	99
化合物 79	65 (0.06)	99

[1545] 表5. 用于体内施用的含有荧光素酶mRNA和新型可电离脂质的LNP的颗粒特性

[1546]

LNP 摩尔比为 1.6 : 54.6 : 32.8 : 10.9, PEG2000-C-DMA : 可电离脂质:胆固醇: DSPC	最终产物	
	Z 平均值	% EE
	(PDI) nm	
13-B43	69 (0.06)	98
化合物 44	68 (0.06)	98
化合物 63	70 (0.03)	99
化合物 64	84 (0.00)	99
化合物 42	65 (0.10)	97
化合物 2	81 (0.08)	96
化合物 1	77 (0.04)	99
化合物 29	80 (0.02)	98
化合物 67	77 (0.04)	99
化合物 30	79 (0.03)	98
化合物 41	70 (0.04)	94
化合物 31	79 (0.04)	98
化合物 68	67 (0.06)	99
化合物 80	75 (0.08)	99
化合物 81	73 (0.06)	99
化合物 82	64 (0.03)	99
化合物 83	75 (0.08)	96

[1548] 表6. 用于体内施用的含有荧光素酶mRNA和新型可电离脂质的LNP的颗粒特性

[1549]

LNP 摩尔比为 1.6 : 54.6 : 32.8 : 10.9, PEG2000-C-DMA : 可电离脂质 : 胆固醇 : DSPC	最终产物	
	Z 平均值 (PDI) nm	% EE
13-B43	77 (0.07)	99
化合物 84	80 (0.04)	98
化合物 85	84 (0.03)	99
化合物 43	73 (0.05)	99
化合物 45	83 (0.01)	99
化合物 46	72 (0.11)	99
化合物 17	68 (0.10)	99
化合物 16	76 (0.10)	95
化合物 18	73 (0.07)	98
化合物 19	71 (0.09)	99
化合物 69	68 (0.07)	99
化合物 5	68 (0.05)	99
化合物 65	83 (0.01)	98
化合物 71	86 (0.02)	97
化合物 72	79 (0.00)	99

[1550] 表7. 用于体内施用的含有荧光素酶mRNA和新型可电离脂质的LNP的颗粒特性

[1551]

LNP 摩尔比为 1.6 : 54.6 : 32.8 : 10.9, PEG2000-C-DMA : 可电离脂质 : 胆固醇 : DSPC	最终产物	
	Z 平均值 (PDI) nm	% EE
13-B43	74 (0.06)	98
化合物 73	82 (0.00)	99
化合物 47	77 (0.07)	98
化合物 76	69 (0.07)	98
化合物 74	89 (0.05)	99
化合物 33	61 (0.12)	99
化合物 75	84 (0.03)	99
化合物 20	72 (0.08)	98
化合物 39	59 (0.19)	98
化合物 87	78 (0.05)	98
化合物 66	73 (0.04)	99
化合物 34	70 (0.10)	99
化合物 88	72 (0.04)	99
化合物 86	65 (0.23)	99
化合物 77	63 (0.09)	99
化合物 38	65 (0.17)	98

[1552] 实施例30. 含有新型可电离脂质的LNP在静脉内小鼠模型中的表现

[1553] 将含有荧光素酶mRNA有效载荷和不同的新型可电离脂质的LNP制剂针对静脉内施用后在荧光素酶小鼠模型中的活性与基准对照进行比较。给药后6h, 新型脂质制剂介导了

肝脏中高水平的荧光素酶活性。一些新型脂质报告了与基准相当或更优的活性,而其他脂质在此模型中的活性不如基准,但可能在其他LNP应用中具有实用性(表8-14)。

[1554] 表8.含有萤火虫荧光素酶mRNA和各种可电离脂质的0.5mg/kg LNP在BALB/c小鼠(n=4)中静脉内施用后6h的荧光素酶活性

	治疗 [LNP 摩尔比为 1.6 : 54.6 : 32.8 : 10.9, PEG-脂质:可电离脂质:胆固醇: DSPC]	IV 施用后 6h	
		Luc 活性 (pg/g 肝脏)	标准偏差 (pg/g 肝脏)
[1555]	13-B43	5.94E+07	1.73E+07
	化合物 48	6.49E+06	1.26E+06
	化合物 49	8.36E+06	1.18E+06
	化合物 50	4.82E+06	1.06E+06
	化合物 51	2.50E+07	1.93E+06
	化合物 52	5.65E+06	1.17E+06

[1556] 表9.含有萤火虫荧光素酶mRNA和各种可电离脂质的0.5mg/kg LNP在BALB/c小鼠(n=4)中静脉内施用后6h的荧光素酶活性

	治疗 [LNP 摩尔比为 1.6 : 54.6 : 32.8 : 10.9, PEG-脂质:可电离脂质:胆固醇: DSPC]	IV 施用后 6h	
		Luc 活性 (pg/g 肝脏)	标准偏差 (pg/g 肝脏)
[1557]	13-B43	7.29E+07	9.59E+06
	化合物 53	8.02E+06	1.36E+06
	化合物 21	4.58E+07	4.10E+06
	化合物 22	4.71E+07	8.19E+06
	化合物 40	3.57E+07	7.78E+06
	化合物 55	1.22E+06	3.01E+05
	化合物 58	3.11E+05	7.64E+04
	化合物 56	9.00E+06	1.82E+06
	化合物 25	7.76E+06	1.42E+06

[1558] 表10.含有萤火虫荧光素酶mRNA和各种可电离脂质的0.5mg/kg LNP在BALB/c小鼠(n=4)中静脉内施用后6h的荧光素酶活性

治疗 [LNP 摩尔比为 1.6 : 54.6 : 32.8 : 10.9, PEG-脂质:可电离脂质:胆固醇: DSPC]	IV 施用后 6h	
	Luc 活性 (pg/g 肝脏)	标准偏差 (pg/g 肝脏)
13-B43	7.04E+07	2.41E+07
化合物 59	1.12E+06	9.00E+05
化合物 54	3.28E+06	8.08E+05
化合物 57	2.43E+06	7.28E+05
化合物 32	3.07E+07	7.90E+06
化合物 4	7.84E+07	1.06E+07
化合物 3	5.94E+07	1.18E+07
化合物 60	8.23E+06	1.18E+06
化合物 61	2.45E+07	6.04E+06

[1559]

化合物 62	7.84E+06	1.51E+06
化合物 23	4.44E+06	5.65E+05
化合物 24	3.98E+06	6.96E+05

[1560] 表11. 含有萤火虫荧光素酶mRNA和各种可电离脂质的0.5mg/kg LNP在BALB/c小鼠(n=4)中静脉内施用后6h的荧光素酶活性

[1561]

治疗 [LNP 摩尔比为 1.6 : 54.6 : 32.8 : 10.9, PEG-脂质:可电离脂质:胆固醇: DSPC]	IV 施用后 6h	
	Luc 活性 (pg/g 肝脏)	标准偏差 (pg/g 肝脏)
13-B43	6.86E+07	1.11E+07
化合物 35	1.40E+07	4.66E+06
化合物 36	5.54E+06	1.36E+06
化合物 37	3.01E+06	2.58E+05
化合物 26	2.03E+07	2.75E+06
化合物 27	9.17E+06	1.49E+06
化合物 28	6.50E+06	8.73E+05
化合物 78	5.30E+07	1.18E+07
化合物 79	1.05E+07	3.29E+06

[1562] 表12. 含有萤火虫荧光素酶mRNA和各种可电离脂质的0.5mg/kg LNP在BALB/c小鼠(n=4)中静脉内施用后6h的荧光素酶活性

治疗 [LNP 摩尔比为 1.6 : 54.6 : 32.8 : 10.9, PEG-脂质:可电离脂质:胆固醇: DSPC]	IV 施用后 6h	
	Luc 活性 (pg/g 肝脏)	标准偏差 (pg/g 肝脏)
13-B43	7.83E+07	5.16E+06
化合物 44	6.17E+07	6.12E+07
化合物 63	6.23E+07	1.45E+07
化合物 64	9.76E+07	2.26E+07
化合物 42	1.14E+07	6.81E+05
化合物 2	7.11E+07	5.10E+06
化合物 1	1.70E+08	2.64E+07
化合物 29	6.74E+07	4.00E+07
化合物 67	1.31E+08	2.94E+07
化合物 30	3.76E+07	9.34E+06
化合物 41	6.69E+06	5.40E+05
化合物 31	1.47E+07	2.93E+06
化合物 68	4.36E+07	1.00E+06
化合物 80	3.28E+07	8.20E+06
化合物 81	3.47E+07	4.92E+06

[1563]

化合物 82	1.23E+07	2.69E+06
化合物 83	4.59E+07	2.41E+06

[1564] 表13. 含有萤火虫荧光素酶mRNA和各种可电离脂质的0.5mg/kg LNP在BALB/c小鼠(n=4)中静脉内施用后6h的荧光素酶活性

[1565]

治疗 [LNP 摩尔比为 1.6 : 54.6 : 32.8 : 10.9, PEG-脂质 :可电离脂质:胆固醇: DSPC]	IV 施用后 6h	
	Luc 活性 (pg/g 肝脏)	标准偏差 (pg/g 肝脏)
13-B43	7.60E+07	8.27E+06
化合物 84	6.26E+07	2.01E+07
化合物 85	4.79E+07	1.30E+07
化合物 43	1.04E+08	4.11E+07
化合物 45	8.00E+07	1.41E+07
化合物 46	1.08E+08	2.22E+07
化合物 17	5.52E+07	5.92E+06
化合物 16	4.39E+07	1.07E+07
化合物 18	4.32E+07	4.15E+06
化合物 19	1.25E+06	2.48E+05
化合物 69	4.10E+07	7.07E+06
化合物 5	9.49E+07	1.06E+07
化合物 65	3.88E+07	1.74E+07
化合物 71	4.58E+07	4.96E+06
化合物 72	2.26E+07	9.80E+06

[1566] 表14.含有萤火虫荧光素酶mRNA和各种可电离脂质的0.5mg/kg LNP在BALB/c小鼠(n=4)中静脉内施用后6h的荧光素酶活性

治疗 [LNP 摩尔比为 1.6 : 54.6 : 32.8 : 10.9, PEG-脂质:可电离脂质:胆固醇: DSPC]	IV 施用后 6h	
	Luc 活性 (pg/g 肝脏)	标准偏差 (pg/g 肝脏)
13-B43	6.02E+07	8.72E+06
化合物 73	3.64E+07	5.95E+06
化合物 47	8.09E+07	4.67E+06
化合物 76	2.09E+07	7.52E+06
化合物 74	6.77E+07	1.21E+07
化合物 75	2.58E+07	3.61E+06
化合物 20	2.71E+07	5.48E+06
化合物 39	4.30E+06	8.30E+05
化合物 87	1.18E+06	5.56E+05

[1567]

化合物 66	2.00E+07	4.53E+06
化合物 34	1.91E+06	4.04E+05
化合物 88	1.64E+07	7.91E+06
化合物 86	1.21E+07	6.99E+06
化合物 77	3.26E+07	7.41E+06
化合物 38	2.13E+07	8.50E+06

[1568] 实施例31.含有新型可电离脂质的LNP在静脉内施用后在剂量反应研究中的表现

[1569] 将含有OTC mRNA有效载荷和不同的新型可电离脂质的LNP制剂针对静脉内施用后在小鼠中的活性与基准对照进行比较。给药后24h,新型脂质制剂报告了肝脏中人OTC表达的剂量依赖性增加(表15)。

[1570] 表15.含有人OTC mRNA和各种可电离脂质的LNP在雄性C57BL/6小鼠(n=4)中静脉内施用后24h的剂量反应

[1571]

治疗 [LNP 摩尔比为 1.6 : 54.6 : 32.8 : 10.9, PEG-脂质:可电离脂质: 胆固醇: DSPC]	人 OTC 表达(肝脏中 ng hOTC/mg 蛋白质)					
	0.3 mg/kg	标准 偏差	1 mg/kg	标准偏 差	3 mg/kg	标准偏 差
13-B43	908	175	6651	3325	12413	1946
化合物 43	1247	404	5713	775	12887	1260
化合物 16	1155	330	4127	366	10316	1762
化合物 33	660	204	2954	765	11080	3883

[1572] 实施例32:静脉内施用后6小时在肝脏中检测到母体可电离脂质

[1573] 将含有荧光素酶mRNA有效载荷和不同的新型可电离脂质的LNP制剂针对静脉内施用后肝脏中残留的可电离脂质的量与基准进行比较。给药后6h,一些治疗组报告了与基准相比小鼠肝脏中新型可电离脂质的较低水平(表16-18)。总体而言,这些新型可电离脂质与

对照相比显示出优异的活性和/或清除率。

[1574] 表16. 在雌性BALB/c小鼠 (n=4) 中静脉内施用0.5mg/kg荧光素酶mRNA LNP后6h肝脏中残留的母体可电离脂质

[1575]	治疗 [LNP 摩尔比为 1.6 : 54.6 : 32.8 : 10.9, PEG-脂质:可电离脂质:胆固醇: DSPC]	平均值 (nmol/g 肝脏)	标准偏差 (nmol/g 肝脏)
	13-B43	22.64	5.62
	化合物 59	22.67	2.58
	化合物 54	17.78	0.68
	化合物 57	15.88	1.68
	化合物 32	21.66	2.21
	化合物 4	18.97	2.38
	化合物 3	7.72	0.77
	化合物 60	35.39	5.02
	化合物 61	27.21	3.49
	化合物 62	20.17	4.14
	化合物 23	31.85	2.88
	化合物 24	35.16	20.53

[1576] 表17. 在雌性BALB/c小鼠 (n=4) 中静脉内施用0.5mg/kg荧光素酶mRNA LNP后6h肝脏中残留的母体可电离脂质

[1577]	治疗 [LNP 摩尔比为 1.6 : 54.6 : 32.8 : 10.9, PEG-脂质:可电离脂质:胆固醇: DSPC]	平均值 (nmol/g 肝脏)	标准偏差 (nmol/g 肝脏)
	13-B43	43.87	15.72
	化合物 84	38.96	3.46
	化合物 85	37.66	10.20
	化合物 43	25.97	12.36
	化合物 45	36.39	14.81
	化合物 46	47.63	16.10
	化合物 17	24.00	7.00
	化合物 16	6.32	0.66
	化合物 18	17.02	3.14
	化合物 19	20.22	6.27
	化合物 69	50.57	14.28
	化合物 5	49.53	33.93
	化合物 65	27.84	10.74
	化合物 71	27.52	5.53
	化合物 72	47.56	12.24

[1578] 表18. 在雌性BALB/c小鼠 (n=4) 中静脉内施用0.5mg/kg荧光素酶mRNA LNP后6h肝脏中残留的母体可电离脂质

[1579]

治疗 [LNP 摩尔比为 1.6 : 54.6 : 32.8 : 10.9, PEG-脂质:可电离脂质:胆固醇: DSPC]	平均值 (nmol/g 肝脏)	标准偏差 (nmol/g 肝脏)
13-B43	63.32	7.62
化合物 67	31.32	6.01
化合物 17	36.58	20.51
化合物 16	17.06	3.48
化合物 43	23.83	3.74
化合物 73	31.41	4.58
化合物 47	54.78	9.98
化合物 76	17.86	2.26
化合物 74	17.92	1.40
化合物 75	20.44	3.29
化合物 20	1.82	0.66
化合物 39	2.91	0.72
化合物 87	3.23	0.64
化合物 66	34.35	4.06
化合物 34	1.78	0.65
化合物 88	7.88	1.49
化合物 86	12.79	5.26
化合物 77	30.63	5.83
化合物 38	3.14	2.44

[1580] 实施例33.含有新型可电离脂质的LNP在静脉内施用后的清除

[1581] 将含有OTC mRNA有效载荷和不同的新型可电离脂质的LNP制剂针对静脉内施用后肝脏中的脂质清除与基准进行比较。在给药后的不同时间点,评估了肝脏中的脂质水平。一些新型可电离脂质报告了与基准相比更快的清除率(表19)。

[1582] 表19.在雄性C57BL/6小鼠(n=4)中静脉内施用0.5mg/kg人OTC mRNA LNP后肝脏中残留的母体可电离脂质

[1583]

治疗 [LNP 摩尔比为 1.6 : 54.6 : 32.8 : 10.9, PEG-脂质:可电离脂质:胆固醇: DSPC]	给药后时 间(h)	平均值 (nmol/g 肝脏)	标准偏差 (nmol/g 肝脏)
13-B43	0.25	29.17	10.45

[1584]

	1	46.37	7.13
	3	63.61	9.80
	6	45.23	2.66
	24	40.01	2.93
	168	34.42	3.91
化合物 67	0.25	12.37	1.61
	1	21.11	0.44
	3	16.12	1.48
	6	10.82	2.69
	24	11.31	1.80
	168	0.72	0.20
化合物 43	0.25	22.97	4.05
	1	38.91	6.47
	3	28.99	2.81
	6	24.19	4.79
	24	13.50	3.24
	168	0.19	0.02
化合物 16	0.25	11.11	3.02
	1	15.47	2.03
	3	10.91	1.84
	6	4.71	0.60
	24	1.33	0.43
	168	0.04	0.03
化合物 33	0.25	33.97	5.84
	1	98.57	22.91
	3	76.20	14.36
	6	86.57	8.83
	24	58.68	6.57
	168	6.22	0.46

[1585] 实施例34. 含有新型可电离脂质的LNP制剂的颗粒特性

[1586] 含有新型可电离脂质的LNP制剂都产生了具有高包封效率的稳定颗粒 (表20-23)。

[1587] 表20. 用于体内施用的含有EGFP mRNA和新型可电离脂质的LNP的颗粒特性

[1588]

LNP 摩尔比为 1.6 : 54.6 : 32.8 : 10.9, PEG2000-C-DMA:可电离脂质:胆固醇:DSPC	最终产物	
	Z 平均值 (PDI) nm	% EE
13-B43	75 (0.07)	98
化合物 89	83 (0.03)	99
化合物 90	79 (0.07)	99
化合物 91	85 (0.03)	99

[1589] 表21. 用于体内施用的含有EGFP mRNA和新型可电离脂质的LNP的颗粒特性

[1590]

LNP 摩尔比为 1.6 : 54.6 : 32.8 : 10.9, PEG2000-C-DMA : 可电离脂质 : 胆固醇 : DSPC	最终产物	
	Z 平均值 (PDI) nm	% EE
13-B43	75 (0.08)	97
化合物 92	71 (0.09)	99
化合物 93	69 (0.02)	98
化合物 94	83 (0.06)	98
化合物 95	80 (0.08)	96
化合物 96	88 (0.05)	99
化合物 97	85 (0.07)	99
化合物 98	84 (0.06)	99
化合物 99	86 (0.04)	97
化合物 100	72 (0.08)	98
化合物 101	70 (0.10)	100
化合物 102	67 (0.09)	98
化合物 103	67 (0.09)	98

[1591] 表22. 用于体内施用的含有EGFP mRNA和新型可电离脂质的LNP的颗粒特性

[1592]

LNP 摩尔比为 1.6 : 54.6 : 32.8 : 10.9, PEG2000-C-DMA : 可电离脂质 : 胆固醇 : DSPC	最终产物	
	Z 平均值 (PDI) nm	% EE
13-B43	73 (0.08)	97
化合物 104	74 (0.07)	99
化合物 105	82 (0.08)	97
化合物 106	73 (0.13)	95
化合物 107	76 (0.06)	98
化合物 108	80 (0.07)	95
化合物 109	75 (0.10)	98
化合物 110	67 (0.11)	98
化合物 111	69 (0.09)	97
化合物 112	82 (0.08)	95
化合物 113	72 (0.05)	98
化合物 114	73 (0.08)	98
化合物 115	72 (0.04)	98
化合物 116	75 (0.09)	98
化合物 117	80 (0.06)	99

[1593]

化合物 118	83 (0.06)	98
化合物 119	73 (0.09)	97

[1594] 表23. 用于体内施用的含有EGFP mRNA和新型可电离脂质的LNP的颗粒特性

	LNP 摩尔比为 1.6 : 54.6 : 32.8 : 10.9, PEG2000-C-DMA : 可电离脂质 : 胆固醇 : DSPC	最终产物	
		Z 平均值 (PDI) nm	% EE
[1595]	13-B43	76 (0.15)	98
	化合物 120	69 (0.15)	99
	化合物 121	77 (0.10)	99
	化合物 122	70 (0.13)	100
	化合物 123	73 (0.15)	99

[1596] 实施例35. 含有新型可电离脂质的LNP在静脉内小鼠模型中的表现

[1597] 将含有EGFP mRNA有效载荷和不同的新型可电离脂质的LNP制剂针对静脉内施用后在EGFP小鼠模型中的活性与基准对照进行比较。给药后24h, 新型脂质制剂介导了肝脏中高水平的EGFP表达。一些新型脂质报告了与基准相当或更优的活性, 而其他脂质在此模型中的活性不如基准, 但可能在其他LNP应用中具有实用性(表24-27)。

[1598] 表24. 含有EGFP mRNA和各种可电离脂质的0.5mg/kg LNP在BALB/c小鼠 (n=4) 中静脉内施用后24h的EGFP表达

	治疗 [LNP 摩尔比为 1.6 : 54.6 : 32.8 : 10.9, PEG-脂质:可电离脂质:胆固醇: DSPC]	IV 施用后 24h	
		EGFP (pg/g 肝脏)	标准偏差 (pg/g 肝脏)
[1599]	13-B43	3.75E+07	1.11E+07
	化合物 89	2.01E+07	4.14E+06
	化合物 90	2.12E+07	5.94E+06
	化合物 91	3.15E+07	1.17E+07

[1600] 表25. 含有EGFP mRNA和各种可电离脂质的0.5mg/kg LNP在BALB/c小鼠 (n=4) 中静脉内施用后24h的EGFP表达

	治疗 [LNP 摩尔比为 1.6 : 54.6 : 32.8 : 10.9, PEG-脂质:可电离脂质:胆固醇: DSPC]	IV 施用后 24h	
		EGFP (pg/g 肝脏)	标准偏差 (pg/g 肝脏)
[1601]	13-B43	9.74E+04	4.62E+04
	化合物 92	6.34E+05	1.69E+05
	化合物 93	1.77E+05	8.03E+04
	化合物 94	1.20E+06	5.66E+05
	化合物 95	8.76E+05	2.75E+05
	化合物 96	1.50E+06	1.60E+05
	化合物 97	1.48E+06	3.22E+05
	化合物 98	9.76E+05	2.33E+05
	化合物 99	1.05E+06	2.26E+05
	化合物 100	5.98E+05	2.47E+05
	化合物 101	2.25E+05	3.52E+04
	化合物 102	1.94E+05	1.26E+05
	化合物 103	9.54E+04	9.11E+04

[1602] 表26. 含有EGFP mRNA和各种可电离脂质的0.5mg/kg LNP在BALB/c小鼠 (n=4) 中静脉内施用后24h的EGFP表达

[1603]

治疗 [LNP 摩尔比为 1.6 : 54.6 : 32.8 : 10.9, PEG-脂质:可电离脂质:胆固醇: DSPC]	IV 施用后 24h	
	EGFP (pg/g 肝脏)	标准偏差 (pg/g 肝脏)
13-B43	5.23E+07	1.18E+07
化合物 104	7.36E+06	1.26E+05
化合物 105	1.86E+07	3.14E+06
化合物 106	2.45E+07	5.36E+06
化合物 107	3.66E+07	6.62E+06
化合物 108	5.41E+07	1.10E+07
化合物 109	5.30E+07	5.45E+06
化合物 110	4.01E+07	4.19E+06
化合物 111	3.89E+07	2.12E+06
化合物 112	4.78E+07	8.51E+06
化合物 113	3.45E+07	6.79E+06
化合物 114	4.29E+07	1.15E+07
化合物 115	6.06E+07	9.14E+06
化合物 116	2.93E+07	8.42E+06
化合物 117	3.15E+07	2.86E+06
化合物 118	1.86E+07	1.19E+06
化合物 119	1.60E+07	1.73E+06

[1604] 表27. 含有EGFP mRNA和各种可电离脂质的0.5mg/kg LNP在BALB/c小鼠 (n=4) 中静脉内施用后24h的EGFP表达z

[1605]

治疗 [LNP 摩尔比为 1.6 : 54.6 : 32.8 : 10.9, PEG-脂质:可电离脂质:胆固醇: DSPC]	IV 施用后 24h	
	EGFP (pg/g 肝脏)	标准偏差 (pg/g 肝脏)
13-B43	6.46E+07	1.37E+07
化合物 120	1.90E+07	5.37E+06
化合物 121	3.81E+07	6.70E+06
化合物 122	2.35E+07	4.61E+06
化合物 123	3.94E+07	4.23E+06

[1606] 实施例36. 静脉内施用后24小时在肝脏中检测到母体可电离脂质

[1607] 将含有EGFP mRNA有效载荷和不同的新型可电离脂质的LNP制剂针对静脉内施用后肝脏中残留的可电离脂质的量与基准进行比较。给药后24h, 一些治疗组报告了与基准相比小鼠肝脏中新型可电离脂质的较低水平(表28-31)。总体而言, 这些新型可电离脂质与对照相比显示出优异的活性和/或清除率。

[1608] 表28. 在雌性BALB/c小鼠 (n=4) 中静脉内施用0.5mg/kg EGFP mRNA LNP后24h肝脏中残留的母体可电离脂质

[1609]

治疗 [LNP 摩尔比为 1.6 : 54.6 : 32.8 : 10.9, PEG-脂质:可电离脂质:胆固醇: DSPC]	IV 施用后 24h	
	平均值(nmol/g 肝脏)	标准偏差 (nmol/g 肝 脏)
13-B43	38.48	6.56
化合物 89	4.32	0.80
化合物 90	13.37	0.36
化合物 91	18.58	0.83

[1610] 表29.在雌性BALB/c小鼠 (n=4) 中静脉内施用0.5mg/kg EGFP mRNA LNP后24h肝脏中残留的母体可电离脂质

[1611]

治疗 [LNP 摩尔比为 1.6 : 54.6 : 32.8 : 10.9, PEG-脂质:可电离脂质:胆固醇: DSPC]	IV 施用后 24h	
	平均值(nmol/g 肝脏)	标准偏差 (nmol/g 肝 脏)
13-B43	29.77	4.09
化合物 92	8.83	1.83
化合物 93	24.61	6.54
化合物 94	6.57	1.14
化合物 95	9.44	2.33
化合物 96	17.68	1.69
化合物 97	19.31	1.44
化合物 98	30.21	4.04
化合物 99	19.93	2.90
化合物 100	5.03	1.03
化合物 101	16.30	1.84
化合物 102	5.72	1.13
化合物 103	0.00	0.00

[1612] 表30.在雌性BALB/c小鼠 (n=4) 中静脉内施用0.5mg/kg EGFP mRNA LNP后24h肝脏中残留的母体可电离脂质

治疗 [LNP 摩尔比为 1.6 : 54.6 : 32.8 : 10.9, PEG-脂质:可电离脂质:胆固醇: DSPC]	IV 施用后 24h	
	平均值 (nmol/g 肝脏)	标准偏差 (nmol/g 肝脏)
13-B43	50.86	2.51
化合物 104	51.14	15.83
化合物 105	18.96	2.32
化合物 106	56.97	24.23
化合物 107	28.74	4.34
化合物 108	3.86	1.02
化合物 109	7.32	1.44
化合物 110	33.07	3.52
化合物 111	17.74	3.63
化合物 112	1.73	0.32
化合物 113	4.68	1.48
化合物 114	12.79	1.71
化合物 115	27.15	7.40
化合物 116	60.05	7.75
化合物 117	49.53	8.08
[1613]		
化合物 118	62.81	6.24
化合物 119	25.25	4.12

[1614] 表31. 在雌性BALB/c小鼠 (n=4) 中静脉内施用0.5mg/kg EGFP mRNA LNP后24h肝脏中残留的母体可电离脂质

治疗 [LNP 摩尔比为 1.6 : 54.6 : 32.8 : 10.9, PEG-脂质:可电离脂质:胆固醇: DSPC]	IV 施用后 24h	
	平均值 (nmol/g 肝脏)	标准偏差 (nmol/g 肝脏)
13-B43	23.9	7.13
化合物 120	4.8	1.33
化合物 121	2.1	0.68
化合物 122	6.3	1.25
化合物 123	10.5	1.23

[1616] 实施例37. 含有新型可电离脂质的LNP在静脉内施用后在剂量反应研究中的表现

[1617] 将含有EGFP mRNA有效载荷和不同的新型可电离脂质的LNP制剂针对静脉内施用后在小鼠中的活性与基准对照进行比较。给药后24h, 新型脂质制剂报告了肝脏中EGFP表达的剂量依赖性增加(表32)。

[1618] 表32. 含有EGFP mRNA和各种可电离脂质的LNP在雌性BALB/c小鼠 (n=4) 中静脉内施用后24h的剂量反应

[1619]

治疗 [LNP 摩尔比为 1.6 : 54.6 : 32.8 : 10.9, PEG-脂质:可电离 脂质:胆固醇 :DSPC]	EGFP 表达(ng EGFP/g 肝脏)					
	0.3 mg/kg	标准偏差	1 mg/kg	标准偏差	3 mg/kg	标准偏差
13-B43	3.65E+07	6.48E+06	1.88E+08	3.84E+07	4.40E+08	7.11E+07
化合物 101	2.65E+07	1.11E+07	1.04E+08	2.70E+07	3.90E+08	5.54E+07
化合物 111	1.34E+07	1.88E+06	8.58E+07	4.87E+06	2.48E+08	2.88E+07
化合物 115	2.98E+07	2.81E+06	1.31E+08	2.64E+07	3.41E+08	5.46E+07

[1620] 实施例38:含有新型可电离脂质的LNP在静脉内施用后的清除

[1621] 将含有EGFP mRNA有效载荷和不同的新型可电离脂质的LNP制剂针对静脉内施用后肝脏中的脂质清除与基准进行比较。在给药后的不同时间点,评估了肝脏中的脂质水平。一些新型可电离脂质报告了与基准相比更快的清除率(表33)。

[1622] 表33.在雌性BALB/c小鼠(n=4)中静脉内施用0.5mg/kg EGFP mRNA LNP后肝脏中残留的母体可电离脂质

[1623]

治疗 [LNP 摩尔比为 1.6 : 54.6 : 32.8 : 10.9, PEG-脂质:可电离脂质:胆 固醇: DSPC]	给药后时间 (h)	平均值 (nmol/g 肝脏)	标准偏差 (nmol/g 肝脏)
13-B43	0.25	29.8	2427
	1	31.2	1763
	3	40.2	5235
	6	45.2	2210
	24	26.4	688
	168	25.6	1767
化合物 101	0.25	23.8	3753
	1	42.4	2078
	3	26.9	2103
	6	30.6	718
	24	12.6	1727
	168	0.6	35
化合物 111	0.25	30.4	1174
	1	43.0	2145
	3	39.1	1934
	6	32.0	1151
	24	12.8	2732
	168	0.0	0
化合物 115	0.25	36.7	4930
	1	51.3	7591
	3	44.8	4707
	6	45.3	630
	24	0.0	0
	168	1.3	232