(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 117098558 A
(43)申请公布日 2023.11.21

(21)申请号 202280026034.0
(22)申请日 2022.02.04
(30)优先权数据
63/147470 2021.02.09 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2023.09.28
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2022/015314 2022.02.04
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2022/173667 EN 2022.08.18
(71)申请人 塞瑞纳治疗公司
地址 美国阿拉巴马州
(72)发明人 J·M·哈里斯 M·本特利 T·维加斯 R·莫里迪斯 R·J·夏普 K·尹 方志浩 R·韦默
(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
专利代理师 童春媛 彭昶
(51)Int.Cl.
A61K 47/59(2006.01)

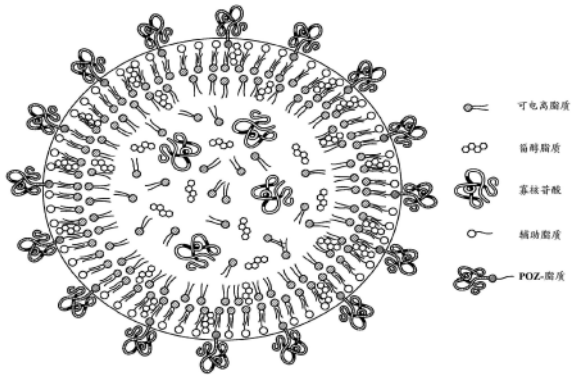
权利要求书9页 说明书65页 附图1页

(54)发明名称

聚噁唑啉-脂质缀合物及包含其的脂质纳米颗粒和药物组合物

(57)摘要

使用POZ-脂质缀合物和包含POZ-脂质缀合物的脂质纳米颗粒(LNP)来促进封装的有效载荷的递送。公开了包含POZ-脂质缀合物和核酸有效载荷如但不限于mRNA或经修饰的mRNA的LNP。与含有PEG-脂质的相应LNP相比,这样的LNP不具有免疫原性或具有降低的免疫原性。



CN 117098558 A

1.一种式I的化合物：

R-POZ-L-脂质I

其中R包含引发基团，

POZ包含聚噁唑啉聚合物，

L包含在生理介质中具有可控的降解性的连接基团，并且

脂质包含含有至少一个疏水部分的不带电脂质。

2.根据权利要求1所述的化合物，其中POZ为-{[N(COX)CH_2CH_2]$_o$-[N(COR_2)CH_2CH_2]$_n$}$_a$-

其中X包含官能团，包括炔基团、附连有羧酸的三唑或其组合，o的范围为0至10，n的范围为1至1000，且R_2包含氢、取代或未取代的烷基、炔取代的烷基、或取代或未取代的芳烷基基团，且a为ran，其表示无规共聚物，或为block，其表示嵌段共聚物。

3.根据权利要求2所述的化合物，其中所述POZ具有约1.01至约1.20的多分散性指数。

4.根据权利要求2所述的化合物，其中所述POZ具有500道尔顿至5,000道尔顿之间的分子量。

5.根据权利要求1所述的化合物，其中R包含氢、取代或未取代的烷基、炔取代的烷基、附连有羧酸的三唑、或取代或未取代的芳烷基基团。

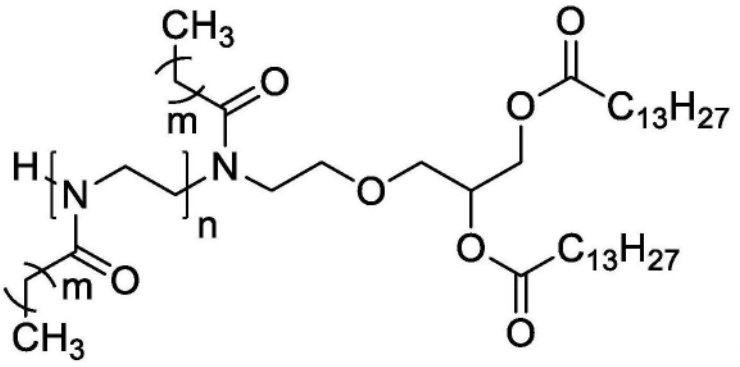
6.根据权利要求1所述的化合物，其中L包含醚、酯、羧酸酯、碳酸酯、氨基甲酸酯、胺、酰胺、二硫化物及其组合。

7.根据权利要求1所述的化合物，其中脂质包含两个疏水部分。

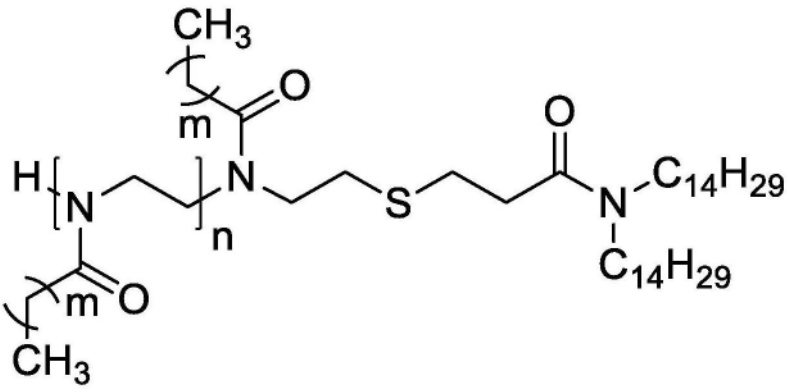
8.根据权利要求1所述的化合物，其中脂质包含磷脂、甘油脂、二烷基胺或其组合。

9.根据权利要求1所述的化合物，其中脂质包含1,2-二肉豆蔻酰-sn-甘油、1,2-二月桂酰-sn-甘油或其组合。

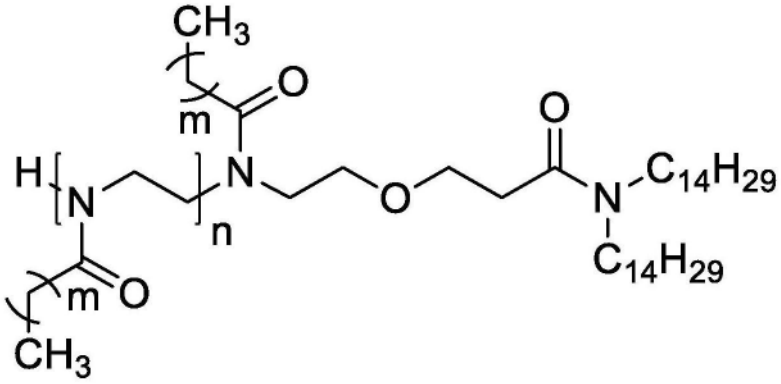
10.根据权利要求1所述的化合物，其中式I为以下中之一：



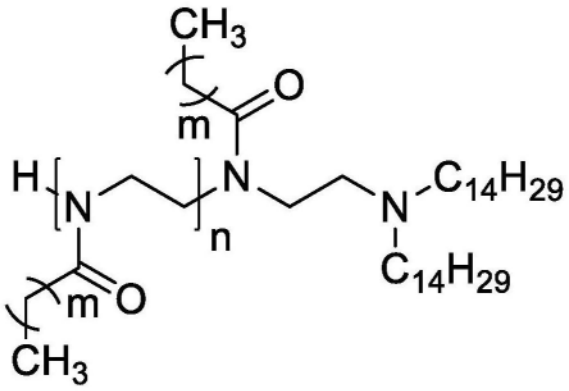
;



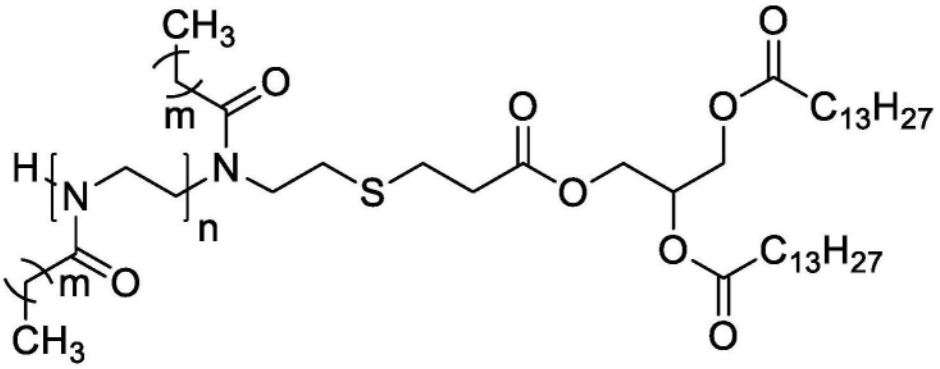
;



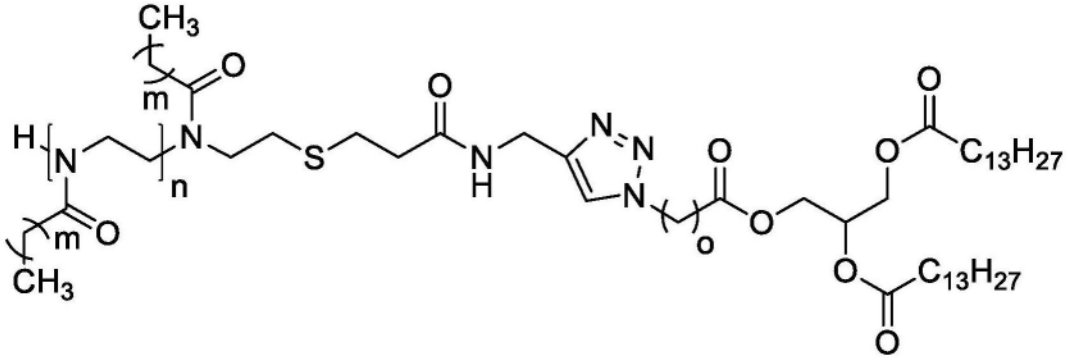
;



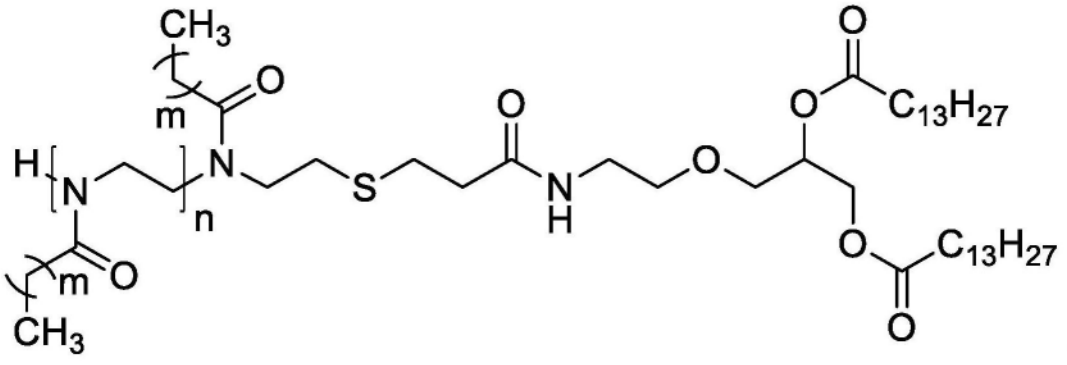
;



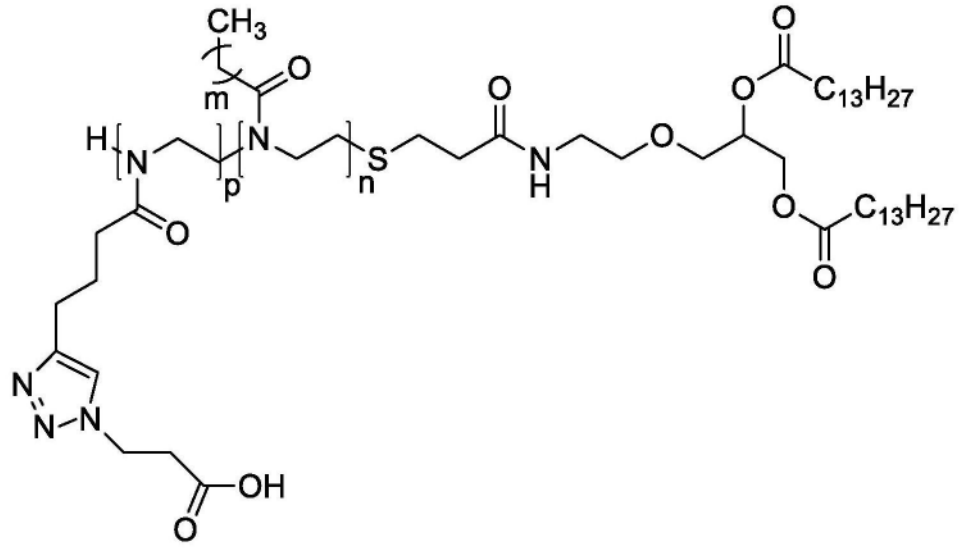
;



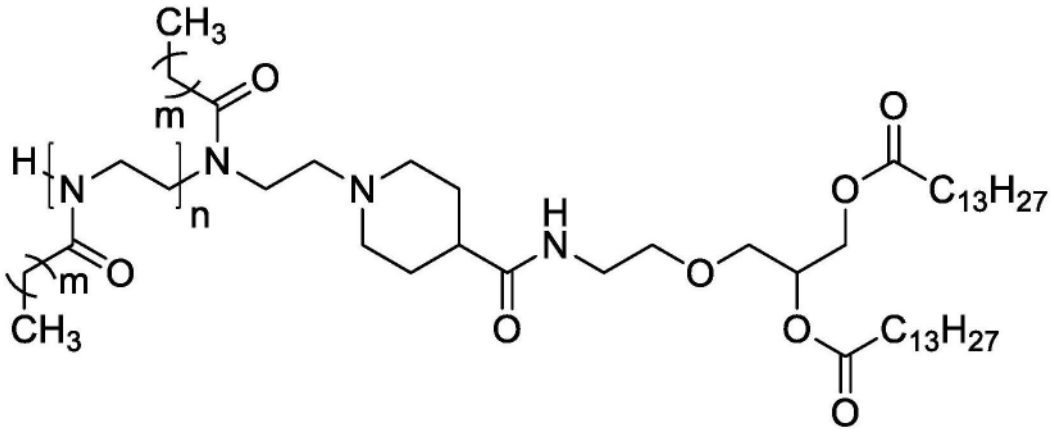
;



;



；和



，

其中m为1-2,n的范围为1至1000,且p的范围为1至10。

11.根据权利要求1所述的化合物,所述化合物具有至少部分地由L决定的水解速率。

12.根据权利要求1所述的化合物,所述化合物在50％人血浆中具有约10分钟或更短的水解半衰期。

13.根据权利要求1所述的化合物,所述化合物在50％人血浆中具有约120小时或更长的水解半衰期。

14.一种式II的化合物

脂质-L_1-$(POZ)_n^a$-T II

其中

脂质包含含有至少一个疏水部分的不带电脂质,

L_1包含在生理介质中具有可控的降解性的连接基团,

POZ包含结构[$N(COR_2)CH_2CH_2$]的聚噁唑啉聚合物,其中对于聚噁唑啉聚合物的每个重复单元,R_2独立地选自未取代或取代的烷基、烯基、芳烷基、杂环基烷基、炔取代的烷基或活性官能团,

n的范围为1至1,000,

a为ran,其表示无规共聚物,或为block,其表示嵌段共聚物,并且

T包含封端末端处的基团。

15.根据权利要求14所述的化合物,其中L_1包含醚、酯、羧酸酯、碳酸酯、氨基甲酸酯、胺、酰胺、二硫化物及其组合。

16.根据权利要求14所述的化合物,其中L_1包含三唑。

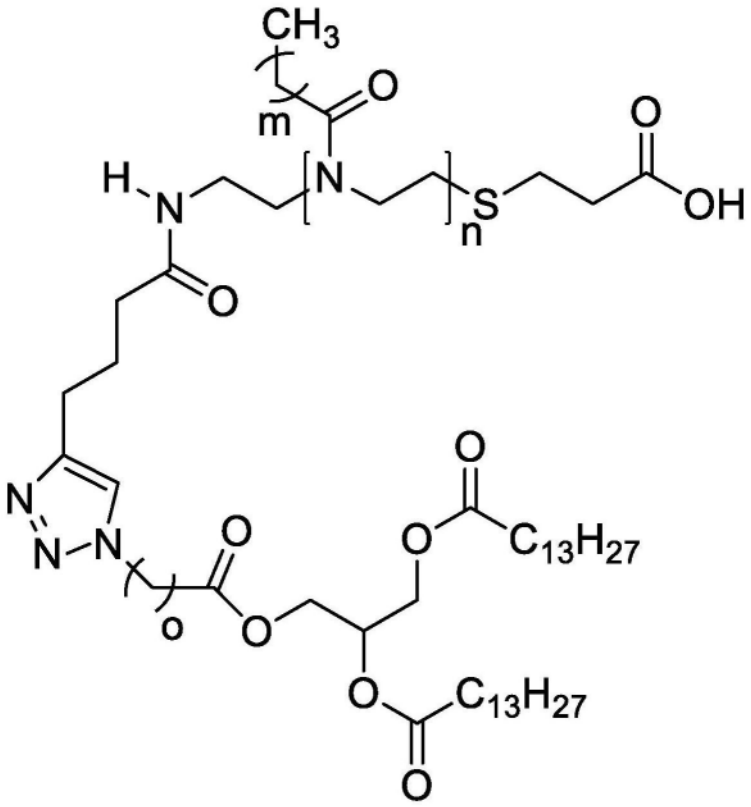
17.根据权利要求14所述的化合物,其中T包含Z-B-Q,并且其中Z包含S、O或N,B为任选的连接基团,Q为封端亲核体的一部分。

18.根据权利要求14所述的化合物,其中脂质包含两个疏水部分。

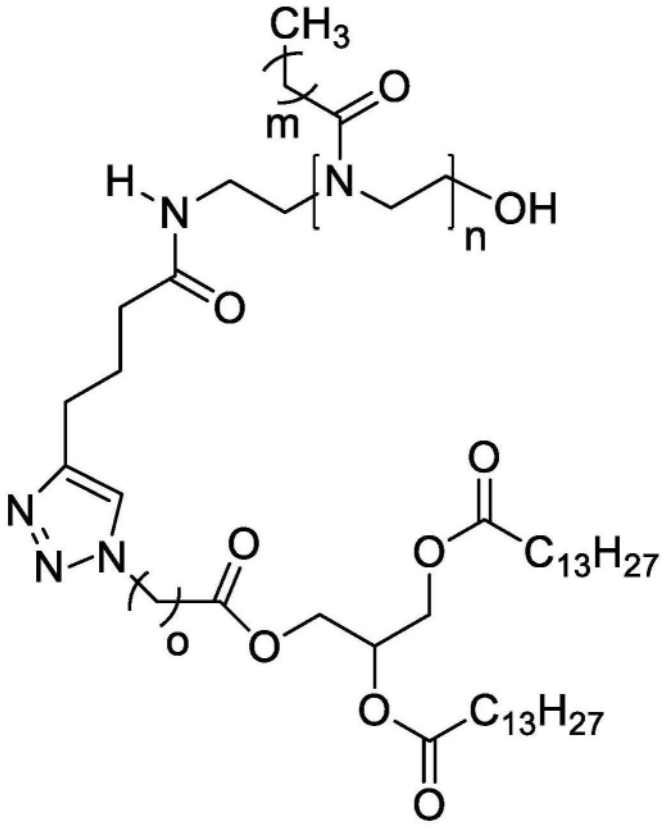
19.根据权利要求14所述的化合物,其中脂质包含磷脂、甘油脂、二烷基胺或其组合。

20.根据权利要求14所述的化合物,其中脂质包含1,2-二肉豆蔻酰-sn-甘油、1,2-二月桂酰-sn-甘油或其组合。

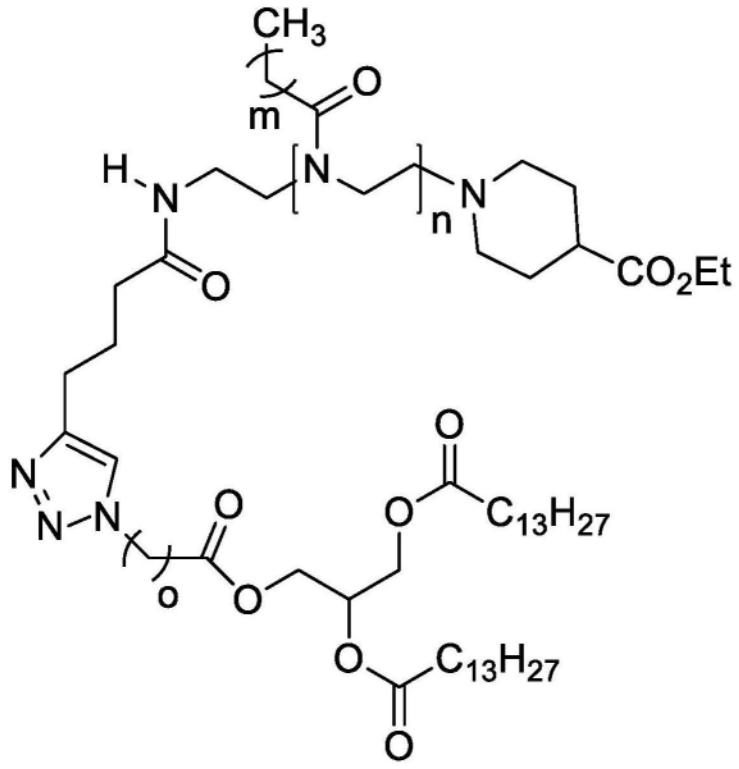
21.根据权利要求14所述的化合物,其中式II为以下中之一:



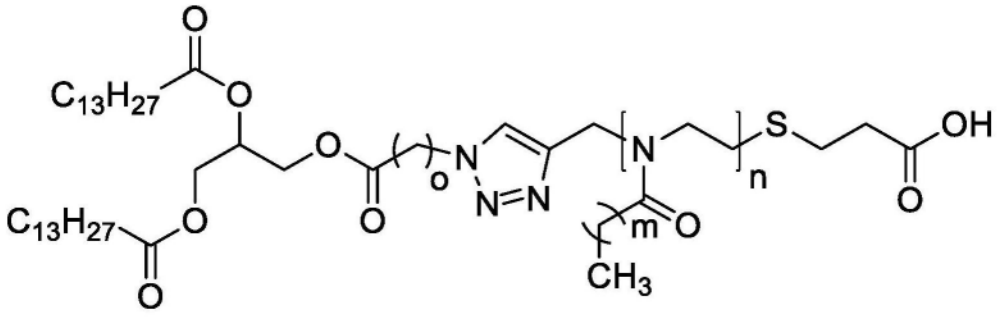
;



;



；和



，

其中m为1-2,n的范围为1至1000,且o的范围为1至5。

22.根据权利要求14所述的化合物,所述化合物具有至少部分地由L决定的水解速率。

23.根据权利要求14所述的化合物,所述化合物在50％人血浆中具有约10分钟或更短的水解半衰期。

24.根据权利要求14所述的化合物,所述化合物在50％人血浆中具有约120小时或更长的水解半衰期。

25.一种式III的化合物

$R-(POZ)_n^a-Z-L_2-$脂质 III

其中R包含引发基团;

POZ包含结构[$N(COR_2)CH_2CH_2$]的聚噁唑啉聚合物,其中对于聚噁唑啉聚合物的每个重复单元,R_2独立地选自未取代或取代的烷基、烯基、芳烷基、杂环基烷基基团、炔取代的烷基或活性官能团;

n的范围为1至1,000,

a为ran,其表示无规共聚物,或为block,其表示嵌段共聚物,

Z包含S、O或N,

L_2包含在生理介质中具有可控的降解性的连接基团,并且

脂质包含含有至少一个疏水部分的不带电脂质。

26.根据权利要求25所述的化合物,其中L_2包含醚、酯、羧酸酯、碳酸酯、氨基甲酸酯、胺、酰胺、二硫化物及其组合。

27.根据权利要求25所述的化合物,其中脂质包含两个疏水部分。

28.根据权利要求25所述的化合物,其中脂质包含磷脂、甘油脂、二烷基胺或其组合。

29.根据权利要求25所述的化合物,其中脂质包含1,2-二肉豆蔻酰-sn-甘油、1,2-二月桂酰-sn-甘油或其组合。

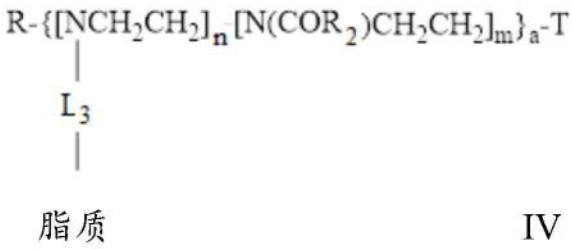
30.根据权利要求25所述的化合物,其中R包含氢、或取代或未取代的烷基,并且其中n的范围为15至35。

31.根据权利要求25所述的化合物,所述化合物具有至少部分地由L决定的水解速率。

32.根据权利要求25所述的化合物,所述化合物在50%人血浆中具有约10分钟或更短的水解半衰期。

33.根据权利要求25所述的化合物,所述化合物在50%人血浆中具有约120小时或更长的水解半衰期。

34.一种式IV的化合物:



IV

其中

R包含引发基团,

L_3包含在生理介质中具有可控的降解性的连接基团,

脂质包含含有至少一个疏水部分的不带电脂质,

n的范围为1至5,

对于每个重复单元,R_2独立地选自未取代或取代的烷基、烯基、芳烷基、杂环基烷基、炔取代的烷基或活性官能团,

m的范围为1至100,

a为ran,其表示无规共聚物,或为block,其表示嵌段共聚物,并且

T包含封端末端处的基团。

35.根据权利要求34所述的化合物,其中L_3包含醚、酯、羧酸酯、碳酸酯、氨基甲酸酯、胺、酰胺、二硫化物及其组合。

36.根据权利要求34所述的化合物,其中L_3包含三唑。

37.根据权利要求34所述的化合物,其中T包含Z-B-Q,并且其中Z包含S、O或N,B为任选的连接基团,且Q为封端亲核体的一部分。

38.根据权利要求34所述的化合物,其中脂质包含两个疏水部分。

39.根据权利要求34所述的化合物,其中脂质包含磷脂、甘油脂、二烷基胺或其组合。

40.根据权利要求34所述的化合物,其中脂质包含1,2-二肉豆蔻酰-sn-甘油、1,2-二月

桂酰-sn-甘油或其组合。

41.根据权利要求34所述的化合物,所述化合物具有至少部分地由L决定的水解速率。

42.根据权利要求34所述的化合物,所述化合物在50％人血浆中具有约10分钟或更短的水解半衰期。

43.根据权利要求34所述的化合物,所述化合物在50％人血浆中具有约120小时或更长的水解半衰期。

44.一种组合物,所述组合物包含根据权利要求1所述的化合物。

45.根据权利要求44所述的组合物,所述组合物还包含阳离子或可电离脂质。

46.一种在动物中提升保护性免疫应答的方法,所述方法包括向动物施用有效量的根据权利要求45所述的组合物的步骤。

47.根据权利要求46所述的方法,其中所述施用步骤包括经由皮下、静脉内、肌内、皮内或气溶胶途径向所述动物递送所述组合物。

48.一种治疗动物的病症或疾病的方法,所述方法包括向动物施用有效量的根据权利要求45所述的组合物的步骤。

49.一种组合物,所述组合物包含根据权利要求14所述的化合物。

50.根据权利要求49所述的组合物,所述组合物还包含阳离子或可电离脂质。

51.一种在动物中提升保护性免疫应答的方法,所述方法包括向动物施用有效量的根据权利要求50所述的组合物的步骤。

52.根据权利要求51所述的方法,其中所述施用步骤包括经由皮下、静脉内、肌内、皮内或气溶胶途径向所述动物递送脂质纳米颗粒组合物。

53.一种治疗动物的病症或疾病的方法,所述方法包括向动物施用有效量的根据权利要求50所述的组合物的步骤。

54.一种组合物,所述组合物包含根据权利要求25所述的化合物。

55.根据权利要求54所述的组合物,所述组合物还包含阳离子或可电离脂质。

56.一种在动物中提升保护性免疫应答的方法,所述方法包括向动物施用有效量的根据权利要求55所述的组合物的步骤。

57.根据权利要求56所述的方法,其中所述施用步骤包括经由皮下、静脉内、肌内、皮内或气溶胶途径向所述动物递送脂质纳米颗粒组合物。

58.一种治疗动物的病症或疾病的方法,所述方法包括向动物施用有效量的根据权利要求55所述的组合物的步骤。

59.一种组合物,所述组合物包含根据权利要求34所述的化合物。

60.根据权利要求59所述的组合物,所述组合物还包含阳离子或可电离脂质。

61.一种在动物中提升保护性免疫应答的方法,所述方法包括向动物施用有效量的根据权利要求60所述的组合物的步骤。

62.根据权利要求61所述的方法,其中所述施用步骤包括经由皮下、静脉内、肌内、皮内或气溶胶途径向所述动物递送脂质纳米颗粒组合物。

63.一种治疗动物的病症或疾病的方法,所述方法包括向动物施用有效量的根据权利要求60所述的组合物的步骤。

聚噁唑啉-脂质缀合物及包含其的脂质纳米颗粒和药物组合物

技术领域

[0001] 本公开涉及聚噁唑啉-脂质缀合物、合成方法及这些缀合物在脂质纳米颗粒和药物组合物中的用途。还涵盖了掺入寡核苷酸如mRNA、DNA和siRNA以递送至活细胞中的脂质纳米颗粒。

背景技术

[0002] 基于核酸(特别是mRNA)的疫苗比其他疫苗技术具有一些优势。例如,通过使用通用的制造平台和纯化方法,无论寡核苷酸有效载荷如何,都可以快速地生产基于核酸的疫苗,同时减少开发时间和成本。另外,基于mRNA的疫苗在被能够翻译所编码的蛋白质的细胞摄取时可能能够呈递一种或多种多肽作为抗原。这些细胞包括抗原呈递细胞如巨噬细胞和树突状细胞。

[0003] 然而,当前的基于核酸的疫苗存在若干缺点。例如,mRNA会被体内的核酸酶快速降解,并且如果它只是与多胺如精蛋白复合,则不容易被大多数细胞类型所摄取。而且,阻碍DNA和mRNA两者疫苗开发的一个关键因素在于缺乏强效的、耐受性良好的、非免疫原性的递送系统,该系统允许反复施用而无严重的不良事件。

[0004] 为了解决这些缺点,已努力将mRNA有效载荷(以及其他寡核苷酸有效载荷)封装到脂质纳米颗粒(LNP)中,和与多胺复合的mRNA相比,这保护mRNA免于酶促降解并将细胞摄取和表达增强高达1000倍。这样的LNP通常由可电离脂质(其与寡核苷酸复合)、胆固醇(以提供柔韧性)、包含聚乙二醇(PEG)部分的脂质(以稳定脂质纳米颗粒并防止与其他纳米颗粒融合)和辅助脂质(以提供结构完整性)如二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)组成。例如,美国专利公开号2020/0230058公开了一种其内封装有编码目的免疫原的RNA的脂质体,其中该脂质体包含至少一种PEG-脂质并且其中PEG存在于脂质体的外部上并具有1kDa至3kDa之间的平均分子质量。

[0005] 小干扰RNA(siRNA)的早期研究已确定可电离脂质是效力所必需的主要组分之一。一旦LNP通过细胞中的内体区室运输,可电离脂质对于内体逃逸就至关重要。

[0006] LNP通常被认为是生物相容性纳米载体,具有可接受的安全性特性和携带寡核苷酸有效载荷的能力。然而,正如上面简要指出的,人们已经注意到某些LNP在施用于动物和人类时的免疫原性问题。特别地,LNP中常用的PEG-脂质可能会因抗PEG免疫应答的影响而损害疫苗安全性。事实上,人们越来越认识到,用PEG化组分(包括PEG-脂质)治疗患者可以导致特异性识别并结合PEG的抗体(即,抗PEG抗体)的形成。在从未接受过PEG化药物治疗但暴露于过含有PEG的产品(例如,化妆品和食品)的患者中也发现了抗PEG抗体。

[0007] 因此,用含有PEG-脂质的LNP治疗已预先形成抗PEG抗体的患者可能导致含有PEG-脂质的LNP的加速血液清除、功效降低/受损、超敏反应,并且在一些情况下导致对PEG的严重过敏反应。当受试者随着时间的推移接受含有PEG-脂质的LNP的反复疫苗接种时,或者如果受试者之前已暴露于过含有PEG的产品,则PEG的这种免疫原性可能导致严重的不良事

件。事实上,在使用来自Pfizer/BioNTech和Moderna的mRNA疫苗针对SARS-CoV-2("COVID-19")进行全球疫苗接种的第一波浪潮中,据护理人员报告,包括过敏在内的危及生命的副作用的发生率异常高。绝大多数过敏发生在女性中(大约90%),这已被证明是由于对PEG的抗体所致。虽然介导过敏的确切机制尚不清楚,但危及生命的免疫应答很可能是由于之前因暴露于含有PEG的化妆品、食品或药物而对PEG敏感的患者的嗜碱性粒细胞脱颗粒所致。

[0008] 因此,仍然需要解决当前LNP技术的缺点并改进递送核酸疫苗的方法。特别地,找到具有显著降低的免疫原性或缺乏免疫原性的LNP制剂将是有利的。找到在初始施用LNP之后和随后施用LNP之后具有可接受的反应原性特征的LNP制剂也将是有利的。另外,虽然LNP制剂中聚合物-脂质的细胞内稳定性的作用仍有待充分探索,并且细胞摄取和寡核苷酸向细胞中的随后释放的细节仍然知之甚少,但通常认为LNP中的聚合物-脂质从LNP脱落是必要的,以便将有效载荷释放到细胞中(但这一点存在争议)。出于这个原因以及其他原因,LNP技术领域必须提供一种降低免疫原性的或非免疫原性的聚合物脂质以提供一系列的体内稳定性。本公开的POZ-脂质缀合物提供了当前LNP制剂中使用的PEG-脂质的降低免疫原性的或非免疫原性的替代物,并因此还提供了用于疫苗递送系统中的改进的、非免疫原性的LNP。另外,根据本公开制备的LNP具有对本领域潜在有益的多种性质,包括但不限于粒度、多分散性、冻/融稳定性、寡核苷酸封装效率、寡核苷酸完整性的保持、内体逃逸、转染效率等。

发明内容

[0009] 本公开涉及新颖的聚合物脂质,其包含附连至脂质的聚噁唑啉(POZ),在生物系统中,聚合物和脂质之间具有不同程度的稳定性。在此方面,聚噁唑啉-脂质(POZ-脂质)缀合物经由POZ和脂质之间的连接而具有可控的降解性。POZ-脂质缀合物可以被掺入到脂质纳米颗粒中,并且这样做将赋予脂质纳米颗粒独特的性质。

[0010] 在一个实施方案中,本公开的脂质纳米颗粒组合物可包含如本文所述的POZ-脂质。在另一个实施方案中,本公开的组合物包含如本文所述的POZ-脂质、阳离子或可电离脂质、以及任选的另外的脂质。在还另一个实施方案中,本公开的组合物包含如本文所述的POZ-脂质以及另外的脂质如磷脂、结构脂质和胆固醇、寡核苷酸有效载荷及其组合。封装寡核苷酸有效载荷的脂质纳米颗粒组合物可提供有效载荷在摄取脂质纳米颗粒的合适细胞类型中的表达,从而提供对有效载荷的治疗应答。在一个实施方案中,寡核苷酸有效载荷包括但不限于针对传染病如SARS-CoV-2、狂犬病、流感等的mRNA疫苗。在另一个实施方案中,脂质纳米颗粒组合物还可用在各种治疗方法,包括但不限于癌症免疫疗法、基因疗法、酶替代及其组合。

[0011] 本公开还涉及式I的化合物

[0012] R-POZ-L-脂质 I

[0013] 其中R包括引发基团,

[0014] POZ包括聚噁唑啉聚合物,

[0015] L包括在生理介质中具有可控的降解性的连接基团,并且

[0016] 脂质包括含有至少一个疏水部分的不带电脂质。

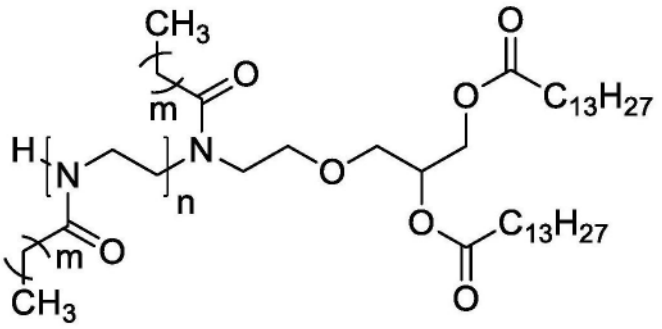
[0017] 在一个实施方案中,式I中的POZ为

[0018] $-\{[N(COX)CH_2CH_2]_o-[N(COR_2)CH_2CH_2]_n\}_a-$

[0019] 其中X包括官能团,包括炔基团、附连有羧酸的三唑或其组合,o的范围为0至10,n的范围为1至1000,且R_2包括氢、取代或未取代的烷基、炔取代的烷基、或取代或未取代的芳烷基基团,且a为ran,其表示无规共聚物,或为block,其表示嵌段共聚物。

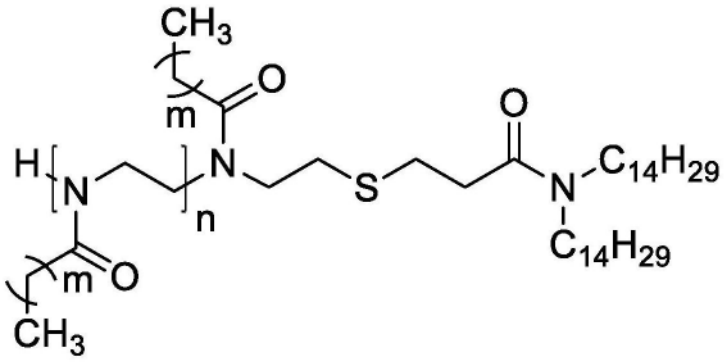
[0020] 在另一个实施方案中,POZ具有约1.01至约1.20的多分散性指数。在仍另一个实施方案中,POZ具有500道尔顿至5,000道尔顿之间的分子量。在还另一个实施方案中,R包括氢、取代或未取代的烷基、炔取代的烷基、附连有羧酸的三唑、或取代或未取代的芳烷基基团。L可包括醚、酯、羧酸酯、碳酸酯、氨基甲酸酯(包括但不限于氨基甲酸乙酯(氨酯))、胺、酰胺、二硫化物及其组合。在另一个实施方案中,脂质可包括两个疏水部分。例如,脂质可包括磷脂、甘油脂、二烷基胺或其组合。在一个实施方案中,脂质包括1,2-二肉豆蔻酰-sn-甘油、1,2-二月桂酰-sn-甘油或其组合。

[0021] 在本公开的这个方面,式I可以是以下中之一:

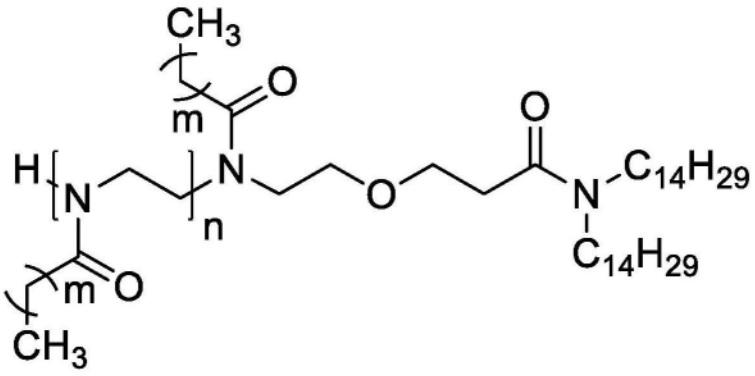


;

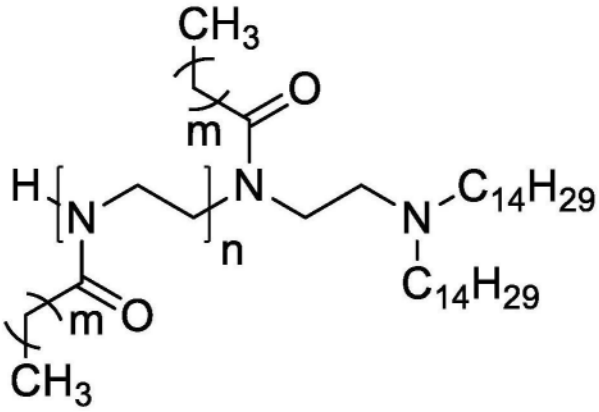
[0022]



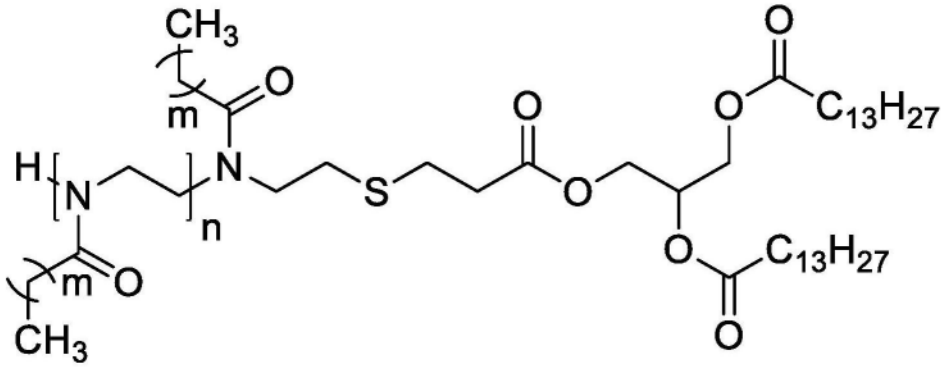
;



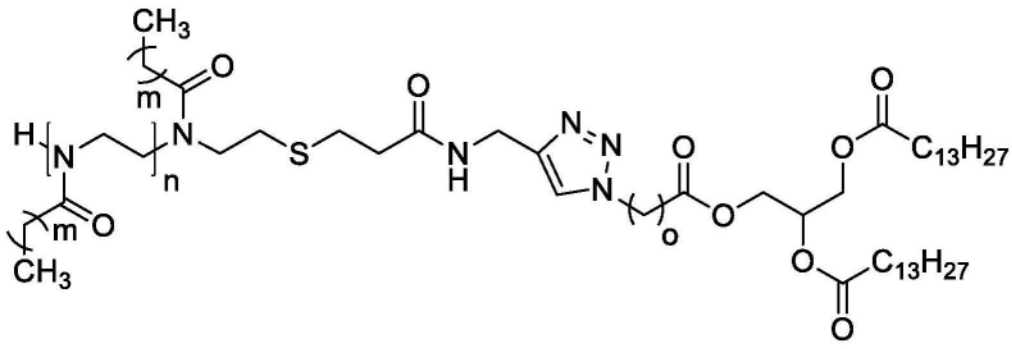
;



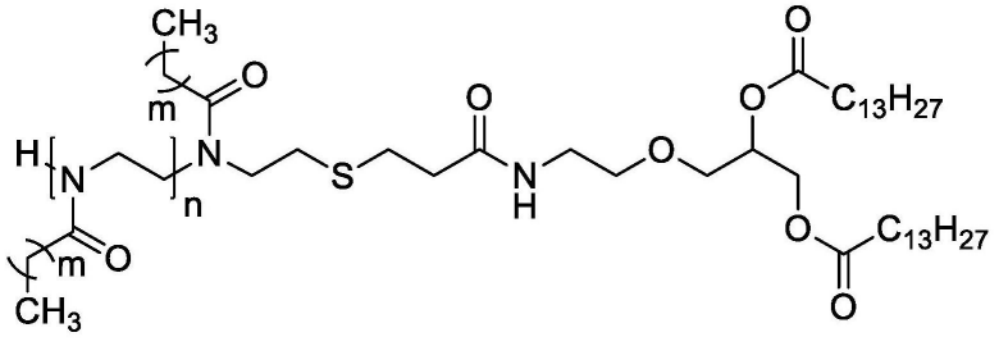
[0023] ;



;

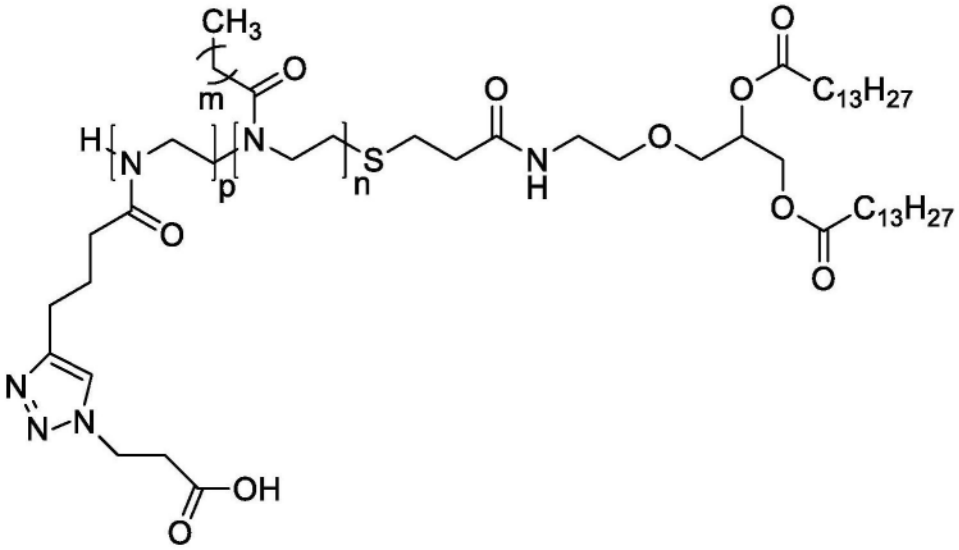


;

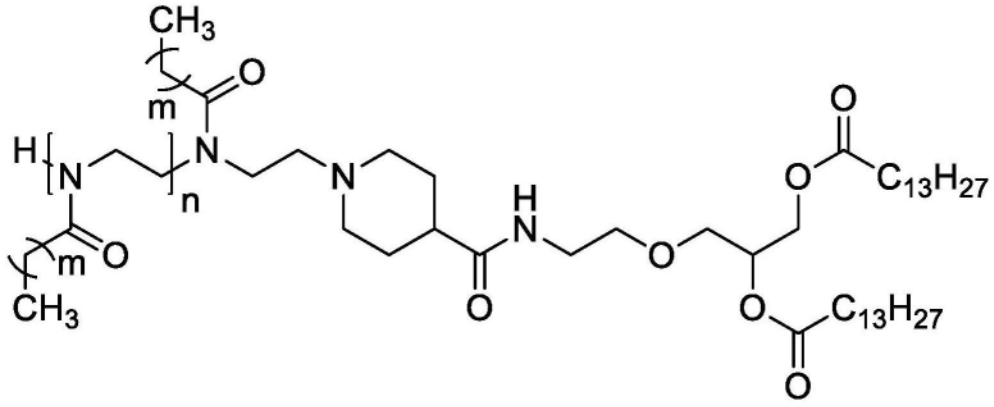


;

[0024]



; 和



,

[0025] 其中m为1-2,n的范围为1至1000,o的范围为1至5,p的范围为1至10。

[0026] 本公开还涉及式II的化合物

[0027] 脂质-L_1-$(POZ)_n^a$-T II

[0028] 其中

[0029] 脂质包括含有至少一个疏水部分的不带电脂质,

[0030] L_1包括在生理介质中具有可控的降解性的连接基团,

[0031] POZ包括结构[$N(COR_2)CH_2CH_2$]的聚噁唑啉聚合物,其中对于聚噁唑啉聚合物的每个重复单元,R_2独立地选自未取代或取代的烷基、烯基、炔取代的烷基、芳烷基、杂环基烷基或活性官能团,

[0032] n的范围为1至1,000,

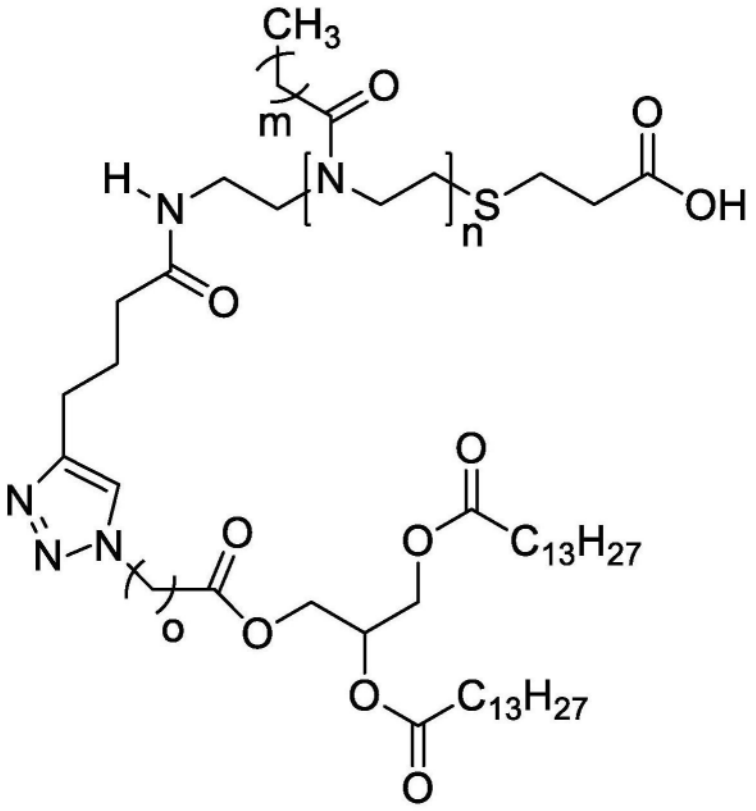
[0033] a为ran,其表示无规共聚物,或为block,其表示嵌段共聚物,并且

[0034] T包含封端末端处的基团。

[0035] 在此方面,L_1可包括醚、酯、羧酸酯、碳酸酯、氨基甲酸酯(包括但不限于氨基甲酸乙酯(氨酯))、胺、酰胺、二硫化物及其组合。在一个实施方案中,L_1为三唑。在另一个实施方案中,T包括Z-B-Q,其中Z包括S、O或N,B为任选的连接基团,Q为封端亲核体或其部分。

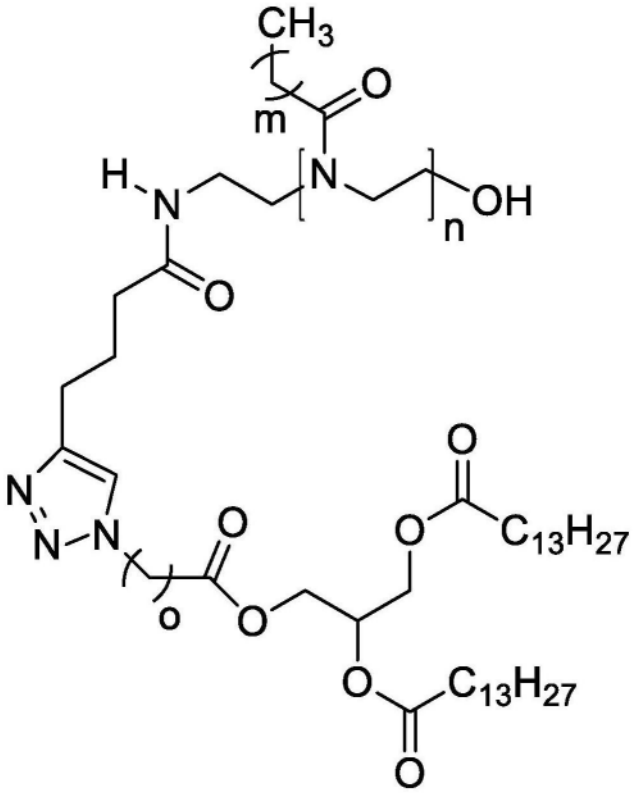
[0036] 在此方面,脂质可包括两个疏水部分。例如,脂质可包括磷脂、甘油脂、二烷基胺或其组合。在一个实施方案中,脂质包括1,2-二肉豆蔻酰-sn-甘油、1,2-二月桂酰-sn-甘油或其组合。

[0037] 在一个实施方案中,式II为以下中之一:

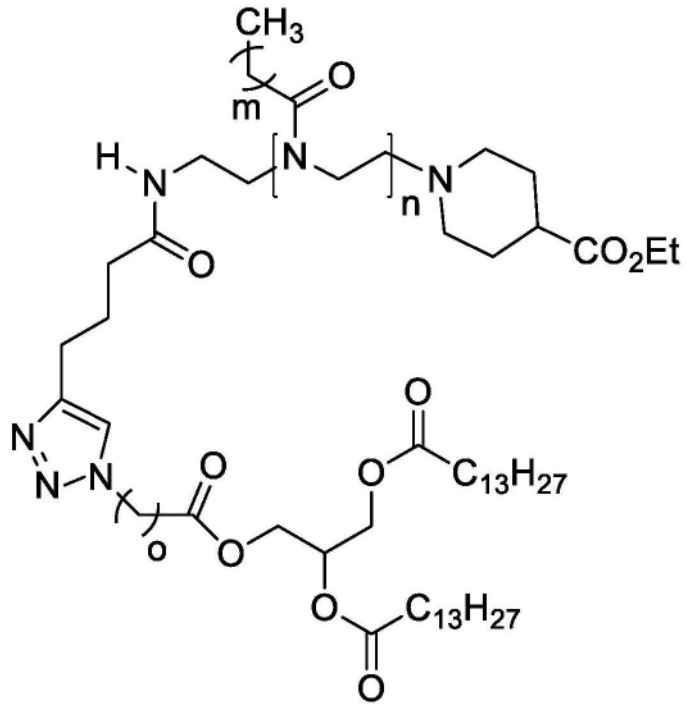


;

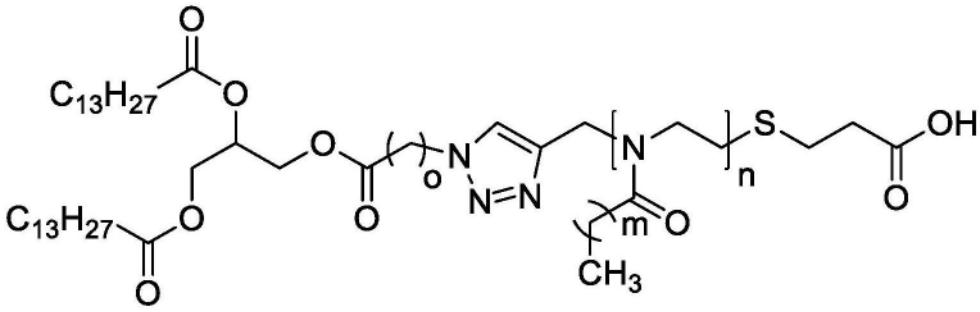
[0038]



;

[0039] 

；和



，

[0040] 其中m为1-2,n的范围为1至1000,且o的范围为1至5。

[0041] 本公开还涉及式III的化合物

[0042] R-(POZ)$_n^a$-Z-L_2-脂质III

[0043] 其中R包括引发基团;

[0044] POZ包括结构[N(COR$_2$)CH$_2$CH$_2$]的聚噁唑啉聚合物,其中对于聚噁唑啉聚合物的每个重复单元,R$_2$独立地选自未取代或取代的烷基、烯基、炔取代的烷基、芳烷基、杂环基烷基或活性官能团,

[0045] n的范围为1至1,000,

[0046] a为ran,其表示无规共聚物,或为block,其表示嵌段共聚物,Z包括S、O或N,

[0047] L_2包括在生理介质中具有可控的降解性的连接基团,并且

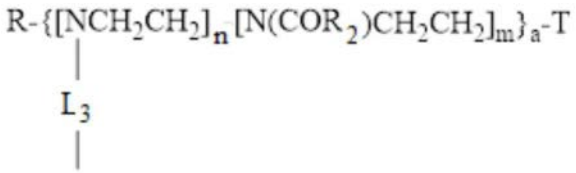
[0048] 脂质包括含有至少一个疏水基团的不带电脂质。

[0049] 在此方面,L_2可包括醚、酯、羧酸酯、碳酸酯、氨基甲酸酯(包括但不限于氨基甲酸乙酯(氨酯))、胺、酰胺、二硫化物及其组合。在一个实施方案中,脂质包括两个疏水部分。例如,脂质可包括磷脂、甘油脂、二烷基胺或其组合。在另一个实施方案中,脂质包括1,2-二肉豆蔻酰-sn-甘油、1,2-二月桂酰-sn-甘油或其组合。

[0050] 在一个实施方案中,R包括氢、或取代或未取代的烷基,并且其中n的范围为15至

35。

[0051] 本公开还涉及式IV的化合物



[0052]

脂质 IV

[0053] 其中

[0054] R包括引发基团，

[0055] L_3包括在生理介质中具有可控的降解性的连接基团，

[0056] 脂质包括含有至少一个疏水部分的不带电脂质，

[0057] n的范围为1至5，

[0058] 对于每个重复单元，R_2独立地选自未取代或取代的烷基、烯基、炔取代的烷基、芳烷基、杂环基烷基或活性官能团，

[0059] m的范围为1至100。

[0060] a为ran，其表示无规共聚物，或为block，其表示嵌段共聚物，并且

[0061] T包括封端末端处的基团。

[0062] 在此方面，L_3可包括醚、酯、羧酸酯、碳酸酯、氨基甲酸酯、胺、酰胺、二硫化物及其组合。在一个实施方案中，L_3包括三唑。在另一个实施方案中，T包括Z-B-Q，其中Z包括S、O或N，B为任选的连接基团，且Q为封端亲核体或其部分。

[0063] 脂质可包括两个疏水部分。例如，脂质可包括磷脂、甘油脂、二烷基胺或其组合。在一个实施方案中，脂质可包括1,2-二肉豆蔻酰-sn-甘油、1,2-二月桂酰-sn-甘油或其组合。

[0064] 在一个实施方案中，任何以上式I-IV的化合物的水解速率至少部分地由L、L_1、L_2或L_3(如果适用的话)决定。在另一个实施方案中，任何以上式I-IV的化合物在50％人血浆中具有约10分钟或更短的水解半衰期。在还另一个实施方案中，任何以上式I-IV的化合物在50％人血浆中具有约120小时或更长的水解半衰期。

[0065] 可以形成包含任何以上式I-IV的化合物的组合物。在一个实施方案中，这样的组合物还可包含阳离子或可电离脂质。在另一个实施方案中，本公开涉及一种治疗动物的病症或疾病的方法，其包括向动物施用有效量的此类组合物的步骤。在还另一个实施方案中，本公开涉及一种在动物中提升保护性免疫应答的方法，其包括向动物施用有效量的此类组合物的步骤。在任一方面，施用步骤可包括经由皮下、静脉内、肌内、皮内或气溶胶途径向动物递送此类组合物。

附图说明

[0066] 本发明的进一步的特征和优点可以从结合下述附图提供的以下具体实施方式确定：

[0067] 图1示出了根据本公开的一个实施方案的脂质纳米颗粒。

具体实施方式

[0068] 本公开提供了一系列新型POZ-脂质缀合物和包含本公开的POZ-脂质缀合物的脂质纳米颗粒(LNP)。LNP可用于促进生物活性和治疗分子的细胞内递送。在一个实施方案中,LNP可用于递送经封装的有效载荷,例如,核酸有效载荷,包括但不限于mRNA或经修饰的mRNA。因为与含有PEG-脂质的相应LNP相比,包含本公开的POZ-脂质缀合物的LNP不具有免疫原性或具有降低的免疫原性,所以此类LNP提供了更安全的递送核酸疫苗的方法。此外,虽然不受特定理论的束缚,但预期新型POZ-脂质,作为LNP的组分,与PEG-脂质相比也可赋予独特的性质,并且所得LNP在作为治疗剂施用时可表现出独特的摄取、分布和功效。而且,本公开的POZ-脂质具有不同程度的稳定性,这可有利地在"设计"包含POZ-脂质的LNP时提供额外的灵活性。本公开还涉及包含此类LNP并且可用于向患者的细胞中递送治疗有效量的生物活性分子的药物组合物。

[0069] 聚噁唑啉(POZ)是生物相容性聚合物,并且在许多亲水性和疏水性溶剂中保持良好的溶解性。POZ还是抗氧化降解的,并且不会发生生物蓄积。当与二氧化硅颗粒、金颗粒、ZnO纳米晶体和磁性颗粒接枝时,POZ已赋予隐形能力和良好的粘膜组织渗透性。

[0070] LNP是由一个或多个脂质层包封水性芯形成的两亲性球形囊泡,尺寸范围为约20nm至几微米。现有技术的LNP通常包含与以下组合的阳离子或可电离脂质:(i)支持双层结构并促进内吞作用的辅助脂质;(ii)甾醇脂质(即,胆固醇)以稳定LNP的脂质双层;(iii)PEG-脂质以提供LNP水合层来改善胶体稳定性、防止新生颗粒的融合、减少蛋白质吸附和非特异性摄取并防止网状内皮清除。然而,如上所述,由于潜在的抗PEG免疫应答,故这些LNP中的PEG-脂质可能会损害患者的安全。使用尚未在LNP、特别是用于递送核酸的LNP中使用的本公开的POZ-脂质,提供了用PEG化LNP的免疫原性问题的解决方案,并且在作为治疗剂施用时还提供了LNP独特的摄取、分布和功效(如与PEG化LNP相比)。

[0071] 定义

[0072] 本文引用的所有专利申请、专利和印刷出版物均通过引用整体并入本文,除了任何定义、主题否定声明或否定外,并且除了就并入的材料与本文明确公开的内容不一致来说,在这种情况下以本公开中的语言为准。

[0073] 冠词"一(a)"和"一个(an)"在本文中用于指代一个或多于一个(即,至少一个)该冠词的语法对象。举例来说,"一个要素"指的是一个要素或多于一个要素。

[0074] 术语"约"和"大约"通常指的是在给定测量的性质或精度的情况下测量的量的可接受的误差或变化程度。除非另有说明,否则本说明书中给出的数值量为近似值,这意味着在没有明确说明时,可以推断术语"约"或"大约"。

[0075] 如本文所用,术语"活性的"或"活化的"当与特定的官能团结合使用时是指易于与另一分子上的亲电体或亲核体反应的官能团。这与那些需要催化剂或不切实际的反应条件以进行反应的基团(即,"非反应性"或"惰性"基团)相反。

[0076] 如本文所用,术语"可生理降解"或"可生理释放"是指含有可裂解部分的连接。术语可降解和可释放并不暗示通过其裂解连接体的任何特定机制。

[0077] 如本文所用,术语"连接(link)"、"连接的"、"连接(linkage)"或"连接体"在涉及本文描述的POZ聚合物、POZ缀合物、试剂或化合物或其组分使用时,是指通常作为化学反应的结果形成并且通常为共价键的键。

[0078] 如本文所用,术语“脂质纳米颗粒”或“LNP”用于涵盖许多类型的纳米颗粒中的任何一种,包括脂质体,其由一个或多个脂质层围绕含有待释放到体内的分子的芯形成。脂质体通常具有封装水性芯的一个或多个邻接的脂质双层。其他形式的脂质体样纳米载体可具有脂质单层或非邻接的双层,并且可具有或可不具有水性芯。

[0079] 如本文所用,术语“亲水性”,例如提及亲水性基团时,是指其中与水的相互作用在热力学上比与油或其他疏水性溶剂的相互作用更有利的化合物或分子或其部分。亲水性化合物能够溶解或分散在水中。

[0080] 如本文所用,术语“疏水性”,例如提及疏水性部分时,是指其中与水的相互作用在热力学上不如与油或其他疏水性溶剂的相互作用有利的化合物或分子或其部分。疏水性化合物能够溶解或分散在油或其他疏水性溶剂中。

[0081] 如本文所用,术语“惰性的”或“非反应性的”当与特定的官能团结合使用时是指不易于与另一分子上的亲电体或亲核体反应并且需要催化剂或不切实际的反应条件以进行反应的官能团。

[0082] 如本文所用,术语“侧挂基团”是指附连至POZ聚合物的POZ聚合物的一部分。

[0083] 如本文所用,术语“侧挂部分”是指经由连接基团连接至POZ聚合物部分的取代基;侧挂部分由如本文所述的式IV的R_2示例。

[0084] 如本文所用,术语“药学上可接受的”是指与组合物的其他成分相容并且对接受该化合物或组合物的受试者无害的化合物。在一些实施方案中,术语“药学上可接受的”指的是由联邦或州政府的监管机构批准或在美国药典或其他普遍认可的药典中列出用于动物中、更特别是人类中。

[0085] 如本文所用,术语“药学上可接受的形式”意指包括可施用于受试者的化合物或POZ缀合物的已知形式,包括但不限于化合物的溶剂化物、水合物、前药、同晶型物、多晶型物、假晶型物、中性形式和盐形式。在某些实施方案中,药学上可接受的形式不包括前药、同晶型物和/或假晶型物。在某些实施方案中,药学上可接受的形式限于药学上可接受的盐、中性形式、溶剂化物和水合物。在某些实施方案中,药学上可接受的形式限于药学上可接受的盐和中性形式。在某些实施方案中,药学上可接受的形式限于药学上可接受的盐。

[0086] 如本文所用,术语“烷基”,无论单独使用还是作为取代基基团的一部分使用,都是本领域的术语并且是指任选地含有一个或多个杂原子(如O、S或N)的饱和脂族基团,其可任选地被取代,包括直链烷基基团、支链烷基基团、环烷基基团、烷基取代的环烷基基团和环烷基取代的烷基基团。在某些实施方案中,直链或支链烷基在其主链中具有约30个或更少的碳原子(例如,对于直链,C_1-C_{30},对于支链,C_3-C_{30}),或者,约20个或更少,或10个或更少。在某些实施方案中,术语“烷基”是指C_1-C_{10}直链烷基基团或C_1-C_3直链烷基基团。在某些实施方案中,术语“烷基”是指C_3-C_{12}支链烷基基团。在某些实施方案中,术语“烷基”是指C_3-C_8支链烷基基团。烷基的代表性实例包括但不限于甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、仲丁基、异丁基、叔丁基、正戊基、异戊基、新戊基和正己基。在某些实施方案中,术语“烷基”是指含有一个或多个代替碳原子的杂原子(如O、S或N)的C_1-C_{10}直链烷基基团,其中所述杂原子可任选地被取代。在某些实施方案中,术语“烷基”是指被至多5个选自OH、NH_2和=O的基团所取代的C_1-C_{10}直链烷基基团。

[0087] 如本文所用,术语“烯基”,无论单独使用还是作为取代基基团的一部分使用,都是

本领域的术语并且是指任选地含有一个或多个杂原子(如O、S或N)的不饱和脂族基团,其可任选地被取代,包括含有2至30个碳并且含有至少一个通过除去两个氢而形成的碳-碳双键的直链或支链烃基团。烯基的代表性实例包括但不限于乙烯基、2-丙烯基、2-甲基-2-丙烯基、3-丁烯基、4-戊烯基、5-己烯基、2-庚烯基、2-甲基-1-庚烯基和3-癸烯基。烯基基团的不饱和键可以位于该部分中的任何地方并且可以关于双键具有(Z)或(E)构型。

[0088] 如本文所用,术语"炔基",无论单独使用还是作为取代基基团的一部分使用,都是本领域的术语并且是指任选地含有一个或多个杂原子(如O、S或N)的不饱和脂族基团,其可任选地被取代,包括含有2至30个碳原子并且含有至少一个碳-碳三键的直链或支链烃基团。炔基的代表性实例包括但不限于乙炔基、1-丙炔基、2-丙炔基、3-丁炔基、2-戊炔基、4-戊炔基和1-丁炔基。

[0089] 如本文所用,术语"取代的烷基"、"取代的烯基"和"取代的炔基"是指如上文所定义的烷基、烯基和炔基基团,其中与碳或氢的一个或多个键被替换为与非氢或非碳原子的键,所述非氢或非碳原子例如但不限于卤化物中的卤素原子如F、Cl、Br和I;基团如羰基、羧基、羟基基团、烷氧基基团、芳氧基基团、杂环基氧基基团和酯基团中的氧原子;基团如硫醇基团、烷基和芳基硫醚基团、砜基团、磺酰基团和亚砜基团中的硫原子;基团如胺、酰胺、烷基胺、二烷基胺、芳基胺、烷基芳基胺、二芳基胺、N-氧化物、酰亚胺、烯胺亚胺、肟、脒、杂环基胺、(烷基)(杂环基)-胺、(芳基)(杂环基)胺、二杂环基胺、三唑和腈中的氮原子;基团如三烷基甲硅烷基基团、二烷基芳基甲硅烷基基团、烷基二芳基甲硅烷基基团和三芳基甲硅烷基基团中的硅原子;以及各种其他基团中的其他杂原子。在一个具体的实施方案中,"极性烷基"、"极性烯基"和"极性炔基"是指被产生极性共价键的原子所取代的烷基、烯基和炔基基团。在另一个具体的实施方案中,"极性烷基"、"极性烯基"和"极性炔基"是指被产生极性共价键的原子所取代的C1至C5烷基、烯基和炔基基团。在一个具体的实施方案中,"极性烷基"、"极性烯基"和"极性炔基"是指被-OH基团和/或-C(O)-OH基团所取代的烷基、烯基、炔基基团,如C1至C5烷基、烯基和炔基基团。

[0090] 如本文所用,术语"卤代"或"卤素",无论单独使用还是作为取代基基团的一部分使用,都是本领域的术语并且是指-F、-Cl、-Br或-I。

[0091] 如本文所用,术语"烷氧基",无论单独使用还是作为取代基基团的一部分使用,都是本领域的术语并且是指通过氧原子附加至母体分子部分的如本文所定义的烷基基团。烷氧基的代表性实例包括但不限于甲氧基、乙氧基、丙氧基、2-丙氧基、丁氧基、叔丁氧基、戊氧基和己氧基。

[0092] 如本文所用,术语"芳烷基"或"芳基烷基",无论单独使用还是作为取代基基团的一部分使用,都是本领域的术语并且是指被芳基基团所取代的烷基基团,其中该部分通过烷基基团附加至母体分子。芳基烷基基团可以是任选被取代的。"取代的芳烷基"相对于未取代的芳烷基基团具有与取代的芳基基团相对于未取代的芳基基团具有的相同的含义。然而,取代的芳烷基基团还包括其中该基团的烷基部分的碳或氢键被替换为与非碳或非氢原子的键的基团。

[0093] 如本文所用,术语"杂芳烷基"或"杂芳基烷基",无论单独使用还是作为取代基基团的一部分使用,都是本领域的术语并且是指被杂芳基基团所取代的烷基基团,其中该部分通过烷基基团附加至母体分子部分。杂芳基烷基可以是任选被取代的。术语"取代的杂芳

基烷基”相对于未取代的杂芳基烷基基团具有与取代的芳基基团相对于未取代的芳基基团具有的相同的含义。

[0094] 如本文所用,术语“杂环基烷基”,无论单独使用还是作为取代基基团的一部分使用,都是本领域的术语并且是指未取代或取代的烷基、烯基或炔基基团,其中所述未取代或取代的烷基、烯基或炔基基团的氢键或碳键被替换为与杂环基基团的键。杂环基烷基可以是任选被取代的。术语“取代的杂环基烷基”相对于未取代的杂环基烷基基团具有与取代的芳基基团相对于未取代的芳基基团具有的相同的含义。然而,取代的杂环基烷基基团还包括其中非氢原子键合至杂环基烷基基团的杂环基基团中的杂原子的基团,所述杂环基烷基基团的杂环基基团中的杂原子例如但不限于哌啶基烷基基团的哌啶环中的氮原子。

[0095] 如本文所用,术语“芳基”,无论单独使用还是作为取代基基团的一部分使用,都是本领域的术语并且是指包括单环状、双环状和多环状芳族烃基团,例如苯、萘、蒽和芘。芳环可以在一个或多个环位置处被一个或多个取代基如卤素、叠氮基、烷基、芳烷基、烯基、炔基、环烷基、羟基、烷氧基、氨基、硝基、巯基、亚氨基、酰胺基、膦酸酯、次膦酸酯、羰基、羧基、甲硅烷基、醚、烷硫基、磺酰基、磺酰氨基、酮、醛、酯、杂环基、芳族或杂芳族部分、氟代烷基(如三氟甲基)、氰基等所取代。术语“芳基”还包括具有两个或更多个环状环的多环状环系,其中两个或更多个碳为两个邻接环(这些环为“稠合环”)所共有,其中至少一个环为芳族烃,例如,其他环状环可为环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂芳基和/或杂环基。在某些实施方案中,术语“芳基”是指苯基基团。芳基基团可以是任选被取代的。

[0096] 如本文所用,术语“环烷基”,无论单独使用还是作为取代基基团的一部分使用,都是本领域的术语并且是指含有三至六个环碳原子的饱和碳环基团,其中这样的环可以任选地被取代或未取代的烷基基团或如针对取代的烷基基团所述的取代基所取代。示例性的环烷基基团包括但不限于环丙基、环丁基、环戊基、环己基、2-甲基环丁基和4-乙基环己基。

[0097] 如本文所用,术语“杂芳基”,无论单独使用还是作为取代基基团的一部分使用,都是本领域的术语并且是指在环结构中具有3至30个总原子(包括一个或多个杂原子如氮、氧或硫)的单环状、双环状和多环状芳族基团。示例性的杂芳基基团包括氮杂吲哚基、苯并(b)噻吩基、苯并咪唑基、苯并呋喃基、苯并噁唑基、苯并噻唑基、苯并噻二唑基、苯并三唑基、苯并噁二唑基、呋喃基、咪唑基、咪唑并吡啶基、吲哚基、吲哚啉基、吲唑基、异吲哚啉基、异噁唑基、异噻唑基、异喹啉基、噁二唑基、噁唑基、嘌呤基、吡喃基、吡嗪基、吡唑基、吡啶基、嘧啶基、吡咯基、吡咯并[2,3-d]嘧啶基、吡唑并[3,4-d]嘧啶基、喹啉基、喹唑啉基、三唑基、噻唑基、硫代苯基、四氢吲哚基、四唑基、噻二唑基、噻吩基、硫代吗啉基、三唑基或莨菪烷基(tropanyl)等。“杂芳基”可以在一个或多个环位置处被一个或多个取代基如卤素、叠氮基、烷基、芳烷基、烯基、炔基、环烷基、羟基、烷氧基、氨基、硝基、巯基、亚氨基、酰胺基、膦酸酯、次膦酸酯、羰基、羧基、甲硅烷基、醚、烷硫基、磺酰基、磺酰氨基、酮、醛、酯、杂环基、芳族或杂芳族部分、氟代烷基(如三氟甲基)、氰基等所取代。术语“杂芳基”还包括具有两个或更多个环状环的多环状环系,其中两个或更多个碳为两个邻接环(这些环为“稠合环”)所共有,其中至少一个环为在环结构中具有一个或多个杂原子的芳族基团,例如,其他环状环可为环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂芳基和/或杂环基。

[0098] 如本文所用,术语“杂环基”,无论单独使用还是作为取代基基团的一部分使用,都是本领域的术语并且是指非芳族环系的基团,包括但不限于单环状、双环状和三环状环,其

可以是完全饱和的或其可以含有一个或多个不饱和单元,为避免疑义,不饱和度不导致芳族环系,并且具有3至15个原子,包括至少一个杂原子如氮、氧或硫。就举例说明的目的而言,其不应解释为限制本发明的范围,以下为杂环状环的实例:氮杂环丙基、氮杂环丙烯基(azirinyl)、环氧乙烷基、硫杂环丙烷基、硫杂环丙烯基(thiirenyl)、二氧杂环丙烷基、二氮杂环丙烯基、二氮杂环庚烷基、1,3-二噁烷基、1,3-二氧杂环戊烷基、1,3-二硫杂环戊烷基、1,3-二噻烷基、咪唑烷基、异噻唑啉基、异噻唑烷基、异噁唑啉基、异噁唑烷基、氮杂环丁烯基(azetyl)、氧杂环丁烷基、氧杂环丁烯基(oxetyl)、硫杂环丁烷基、硫杂环丁烯基(thietyl)、二氮杂环丁烷基、二氧杂环丁烷基、二氧杂环丁烯基、二硫杂环丁烷基、二硫杂环丁烯基、二噁烷基(dioxanyl)、噁唑基、噻唑基、三嗪基、异噻唑基、异噁唑基、氮杂䓬、氮杂环丁烷基、吗啉基、噁二唑啉基、噁二唑烷基、噁唑啉基、噁唑烷基、氧代哌啶基、氧代吡咯烷基、哌嗪基、哌啶基、吡喃基、吡唑啉基、吡唑烷基、吡咯啉基、吡咯烷基、奎宁环基、硫代吗啉基、四氢吡喃基、四氢呋喃基、四氢噻吩基、噻二唑啉基、噻二唑烷基、噻唑啉基、噻唑烷基、硫代吗啉基、1,1-二氧化硫代吗啉基(硫代吗啉砜)、硫代吡喃基和三噻烷基(trithianyl)。杂环基基团可以在一个或多个环位置处被一个或多个取代基如卤素、叠氮基、烷基、芳烷基、烯基、炔基、环烷基、羟基、烷氧基、氨基、硝基、巯基、亚氨基、酰胺基、膦酸酯、次膦酸酯、羰基、羧基、甲硅烷基、醚、烷硫基、磺酰基、磺酰氨基、酮、醛、酯、杂环基、芳族或杂芳族部分、氟代烷基(如三氟甲基)、氰基等所取代。

[0099] 如本文所用,术语“治疗(treatment)”、“治疗(treat)”和“治疗(treating)”是指作用过程(如施用如本文所述的缀合物或包含如本文所述的缀合物的药物组合物)以预防、消除或减少疾病或病况的症状、方面或特征。这样的治疗不必绝对有效。在一个实施方案中,治疗包括在疾病或病况的症状、方面或特征发作的同时或之后开始的作用过程。在另一个实施方案中,治疗包括在疾病或病况的症状、方面或特征发作之前开始的作用过程。

[0100] 如本文所用,术语“需要治疗”是指护理人员做出的患者需要治疗或将从治疗中受益的判断。该判断是基于护理人员专业知识范围内的各种因素做出的,但其包括患者因可由本公开的方法或化合物治疗的疾病或病况而生病或将要生病的知识。

[0101] 如本文所用,术语“个体”、“受试者”或“患者”是指任何动物,包括哺乳动物,如小鼠、大鼠、其他啮齿动物、兔、狗、猫、猪、牛、羊、马或灵长类动物和人。这些术语可以指定雄性或雌性或两者,或者排除雄性或雌性。在一个优选的实施方案中,术语“个体”、“受试者”或“患者”是指人。

[0102] 如本文所用,术语“治疗有效量”是指单独的或作为药物组合物的一部分的缀合物的量,其能够对疾病或病况的任何症状、方面或特征具有任何可检测的、积极的作用。这样的作用不必是绝对有益的。

[0103] 应理解,“取代”或“被……所取代”包括隐含的条件,即这种取代符合被取代原子和取代基的允许化合价,并且取代产生稳定的化合物,例如,其不会自发地进行转化,如通过重排、断裂、分解、环化、消除或其他反应。

[0104] 应理解,当基团被指定为化合物的一部分时,可以调节基团的取代以适应特定的键。例如,当烷基基团与两个其他基团连接时,该烷基基团被认为是亚烷基基团。

[0105] 术语“取代的”还预期包括有机化合物的所有允许的取代基。在广义方面,允许的取代基包括有机化合物的无环和环状、支链和非支链取代基、碳环和杂环基、芳族和非芳族

取代基。示意性的取代基包括例如上文描述的那些。就本公开的目的而言,杂原子如氧或氮可具有氢取代基和/或本文描述的有机化合物的任何允许的取代基,其满足杂原子的价态。示例性的取代包括但不限于羟基、卤素、叠氮基、烷基、芳烷基、烯基、炔基、环烷基、羟基、烷氧基、氨基、硝基、巯基、亚氨基、酰胺基、膦酸酯、次膦酸酯、羰基、羧基、甲硅烷基、醚、烷硫基、磺酰基、磺酰氨基、酮、醛、酯、杂环基、芳族或杂芳族部分、氟代烷基(如三氟甲基)、氰基等。本发明不旨在以任何方式受到有机化合物的允许取代基的限制。

[0106] 本文的其他化学术语根据本领域的常规用法使用,如由The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms(Parker,S.编辑,1985),McGraw-Hill,San Francisco,通过引用并入本文)所例示。除非另有定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域普通技术人员通常所理解相同的含义。

[0107] 如本文所用,术语“药学上可接受的盐”包括衍生自无机酸或有机酸的盐,所述无机酸或有机酸包括例如盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、高氯酸、磷酸、甲酸、乙酸、乳酸、马来酸、富马酸、琥珀酸、酒石酸、乙醇酸、水杨酸、柠檬酸、甲磺酸、苯磺酸、苯甲酸、丙二酸、三氟乙酸、三氯乙酸、萘-2-磺酸及其他酸。药学上可接受的盐形式可以包括其中包含盐的分子的比率不为1:1的形式。例如,盐可包含每分子碱多于一个无机或有机酸分子,如每分子缀合物两个盐酸分子。作为另一个实例,盐可包含每分子碱少于一个无机或有机酸分子,如每个无机或有机酸分子两分子的缀合物。

[0108] 如本文所用,术语“载体”和“药学上可接受的载体”是指与化合物一起施用或配制以便施用的稀释剂、佐剂、赋形剂或媒介物。这样的药学上可接受的载体的非限制性实例包括液体,如水、盐水和油;以及固体,如阿拉伯树胶、明胶、淀粉糊、滑石、角蛋白、胶体二氧化硅、尿素等。另外,可以使用辅助剂、稳定剂、增稠剂、等渗剂、低温防腐剂、润滑剂、调味剂和着色剂。合适的药物载体的其他实例见述于Remington's Science and Practice of Pharmacy(第23版,ISBN 9780128200070)和Handbook of Pharmaceutical Excipients(第8版,978-0-85-711271-2)中,其各自通过引用整体并入本文。

[0109] 如本文所用,术语“靶分子”是指具有治疗或诊断应用或靶向功能的任何分子,或与化合物一起施用或配制以便施用的媒介物,其中靶分子能够与本公开的POZ聚合物或POZ衍生物上的活性官能团形成连接,包括但不限于治疗剂(例如但不限于药物)、诊断剂、靶向剂、有机小分子、寡核苷酸、多肽、抗体、抗体片段、蛋白质、碳水化合物如肝素或透明质酸、或脂质如甘油脂、糖脂或磷脂。

[0110] 如本文所用,“脂质”或“脂质部分”指的是(i)包含脂肪酸的酯或其衍生物并且特征在于不溶于水但可溶于许多有机溶剂中的有机化合物,并包括但不限于简单脂质如脂肪、油和蜡,复合脂质如磷脂、糖脂、阳离子脂质、非阳离子脂质、中性脂质和阴离子脂质,以及衍生脂质如类固醇,以及(ii)不包含脂肪酸的酯但通过其两亲特性模拟这样的有机化合物的有机化合物,即,其同时具有疏水性和亲水性部分,并因此能够在水性环境中以特定的方式聚集形成层、囊泡和LNP。

[0111] 如本文所用,“小干扰RNA(siRNA)”指的是一类长度为16-40个核苷酸的双链RNA分子,其参与RNA干扰(RNAi)途径,在其中,它干扰特定基因的表达。除了在RNAi途径中发挥作用外,siRNA还在RNAi相关途径中发挥作用。

[0112] 如本文所用,“RNA”指的是包含至少一个核糖核苷酸残基的分子,包括siRNA、反义

RNA、单链RNA、microRNA、mRNA、非编码RNA和多价RNA。“核糖核苷酸”指的是在β-D-核糖-呋喃糖部分的2’位置处具有羟基基团的核苷酸。该术语包括双链RNA、单链RNA、分离的RNA如部分纯化的RNA、基本上纯的RNA、合成RNA、重组产生的RNA以及通过一个或多个核苷酸的添加、删除、取代和/或改变而与天然存在的RNA不同的改变的RNA。

[0113] POZ-脂质缀合物

[0114] 本公开的POZ-脂质缀合物包含连接至聚噁唑啉聚合物的脂质部分。POZ-脂质缀合物的组分将在下文更详细地讨论。

[0115] POZ部分

[0116] 多种POZ聚合物可用于本公开的POZ-脂质缀合物中并将在下文更详细地讨论。但通常,POZ聚合物可含有单一类型或类别的官能团,或者可含有多于一种类型或类别的官能团。POZ可以是线形POZ聚合物、支化POZ聚合物、侧挂POZ聚合物或多臂POZ聚合物。代表性的POZ聚合物见述于美国专利号7,943,141、8,088,884、8,110,651、8,101,706、8,883,211和9,284,411以及美国专利申请号13/003,306、13/549,312和13/524,994中,它们中的每一者出于这样的教导通过引用整体并入。聚噁唑啉聚合物可以是均聚物;同样,聚噁唑啉聚合物可以是无规或嵌段共聚物,其含有一个或多个第一聚噁唑啉聚合物的单元,这些单元被一个或多个第二聚噁唑啉聚合物的单元分开。同样,POZ可以是相当亲水的聚(甲基噁唑啉)(PMOZ),或不那么亲水的聚(乙基噁唑啉)(PEOZ)。

[0117] 在一个实施方案中,POZ聚合物通过活性阳离子聚合制备。也可使用本领域已知的其他方法来制备POZ聚合物。如下文更详细地讨论的,POZ可以直接缀合至脂质或可以经由连接体部分连接至脂质。可以使用适合于将POZ偶联至脂质的任何连接体部分,包括但不限于不含酯的连接体部分和含酯的连接体部分。并且,如下文更详细地讨论的,POZ聚合物可经由聚合物的引发剂或末端上的适当的化学基团或经由聚合物上的侧挂位置处的适当的化学基团与脂质部分缀合。

[0118] 在本公开中,任何时候在提及聚噁唑啉衍生物或聚噁唑啉聚合物时,聚噁唑啉聚合物可以是特征在于具有低多分散性(PD)值和/或增加的纯度的聚合物,因为这样的聚合物可用于药物应用中。在一个特别的实施方案中,本公开的方法提供了在增加的分子量(MW)值下具有低PD值的聚噁唑啉衍生物。在一个实施方案中,例如,POZ部分具有约500至约10000道尔顿的分子量。在另一个实施方案中,POZ部分具有约500至约5,000道尔顿的分子量。在仍另一个实施方案中,POZ部分具有约1,000道尔顿至约2,500道尔顿的分子量。在还另一个实施方案中,POZ部分具有约2,000道尔顿至约5,000道尔顿的分子量。在仍另一个实施方案中,POZ部分具有约5,000道尔顿至约10,000道尔顿的分子量。在这样的实施方案中,至少一种聚噁唑啉聚合物链具有小于或等于1.2、小于或等于1.1、或小于或等于1.05的多分散性值。合成具有低PD值的聚噁唑啉聚合物及其衍生物的方法在国际申请号PCT/US2008/002626和PCT/US2008/078159中讨论,这些申请出于这样的教导通过引用整体并入。

[0119] 脂质部分

[0120] 在一个实施方案中,POZ-脂质缀合物的脂质部分包括至少一个疏水部分。在另一个实施方案中,脂质部分包括两个疏水部分。在此方面,疏水部分可以是酰基链、烷基链或其组合。酰基链和烷基链的长度可以不同。另外,酰基链和烷基链可以是饱和的或含有一个

或多个不饱和区域(如一个或多个双键)。

[0121] 无论疏水部分的数量如何,脂质部分还包括能够与POZ聚合物上的化学基团形成连接的化学基团。在此方面,化学基团可以是胺基团、羟基基团、醛基团、羧酸基团及其不排除的其他化学基团的组合。在一个实施方案中,脂质部分可含有可用于与POZ聚合物形成连接的反应性氨基基团。

[0122] 在一些实施方案中,脂质上的化学基团可位于亲水头基位置处。并且,如上所述,POZ聚合物可经由聚合物的引发剂或末端上的适当的化学基团或经由聚合物上的侧挂位置处的适当的化学基团与脂质缀合。

[0123] 如下文将更详细地讨论的,连接的性质取决于POZ聚合物上存在的化学基团和脂质部分上存在的化学基团。在一些实施方案中,连接在某些酶的存在下是可降解的。在其他实施方案中,连接在这些相同的酶的存在下是稳定的。

[0124] 在一个实施方案中,POZ-脂质缀合物的脂质部分为不带电脂质。例如,任何能够形成层、囊泡和/或LNP组合物的不带电脂质,无论是单独的还是与其他脂质组分组合,都适合用于形成本公开的POZ-脂质缀合物。在另一个实施方案中,脂质部分可以是合成的或天然存在的。

[0125] 可选择POZ-脂质缀合物的脂质部分以赋予本文描述的LNP所需的特性。例如,可选择脂质的不饱和度以提供本文描述的LNP所需的性质。例如,增加脂质部分的不饱和度可赋予LNP组合物流动性。另外,不饱和区域周围的顺式构型也可赋予LNP组合物增加的流动性。同样,饱和脂质部分可赋予LNP组合物刚性。可选择流动性和/或刚性以至少部分地控制LNP组合物的稳定性和/或POZ-脂质缀合物从LNP组合物的释放速率。

[0126] 在一个实施方案中,POZ-脂质缀合物的脂质部分为磷脂。例如,POZ-脂质缀合物的脂质部分可以是磷脂酰甘油(PG)、磷脂酰胆碱(PC)、磷脂酰乙醇胺(PE)、磷脂酸(PA)、磷脂酰肌醇(PI)、磷脂酰丝氨酸(PS)或其组合。

[0127] 在另一个实施方案中,POZ-脂质缀合物的脂质部分为甘油脂。例如,脂质部分可以是αβ-二酰基甘油。

[0128] 在进一步的实施方案中,POZ-脂质缀合物的脂质部分为二烷基胺。例如,脂质部分可以是二肉豆蔻胺。

[0129] 在某个方面,POZ-脂质缀合物中的脂质部分的两个酰基或烷基链中的至少一个是饱和的。在另一个方面,POZ-脂质缀合物中的脂质的两个酰基或烷基链中的每一个都是饱和的。在还另一个方面,POZ-脂质缀合物中的脂质的两个酰基或烷基链中的一个是饱和的而另一个酰基或烷基链是不饱和的。在仍另一个方面,POZ-脂质缀合物中的脂质的两个酰基或烷基链中的每一个都是不饱和的。当POZ-脂质缀合物中的脂质的一个或多个酰基或烷基链是不饱和的时,该酰基或烷基链可含有1至6、1至4、1至3或1至2个不饱和区域。当存在时,双键可以是顺式或反式构型,或顺式和反式构型的混合。

[0130] 在一个方面,POZ-脂质缀合物中的脂质的两个酰基或烷基链中的至少一个的长度为1至5个碳、长度为6至10个碳、长度为11至16个碳、或长度为17-21个碳。在另一个方面,POZ-脂质缀合物中的脂质的两个酰基或烷基链中的每一个的长度为1至5个碳、长度为6至10个碳、长度为11至16个碳、或长度为17-21个碳。这样的酰基或烷基链,无论长度如何,都包括偶数和奇数链长,并且可以如上所述是饱和的或不饱和的。

[0131] 在一个特别的方面,POZ-脂质缀合物中的脂质部分的两个酰基或烷基链中的至少一个的长度为6至10个碳。在另一个方面,POZ-脂质缀合物中的脂质的两个酰基或烷基链中的每一个的长度为6至10个碳。这样的酰基或烷基链,无论长度如何,都包括偶数和奇数链长,并且可以如上所述是饱和的或不饱和的。

[0132] 在另一个方面,POZ-脂质缀合物中的脂质部分的两个酰基或烷基链中的至少一个的长度为11至16个碳。在另一个方面,POZ-脂质缀合物中的脂质的两个酰基或烷基链中的每一个的长度为11至16个碳。这样的酰基或烷基链,无论长度如何,都包括偶数和奇数链长,并且可以如上所述是饱和的或不饱和的。

[0133] 在还另一个方面,POZ-脂质缀合物中的脂质的两个酰基或烷基链中的至少一个的长度为17至21个碳。在仍另一个方面,POZ-脂质缀合物中的脂质的两个酰基或烷基链中的每一个的长度为17至21个碳。这样的酰基或烷基链,无论长度如何,都包括偶数和奇数链长,并且可以如上所述是饱和的或不饱和的。

[0134] 在一个方面,POZ-脂质缀合物中的脂质的两个酰基或烷基链中的每一个的长度为5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或21个碳,所述酰基或烷基链是饱和的或不饱和的。在另一个方面,POZ-脂质缀合物中的脂质的两个烷基或酰基链中的每一个为长度为11、12、13、14、15或16个碳的酰基链,所述酰基链是饱和的或不饱和的。在进一步的方面,POZ-脂质缀合物中的脂质的两个酰基或烷基链中的每一个为长度为12、13、14或15个碳的酰基链,所述酰基链是饱和的或不饱和的。在仍进一步的方面,POZ-脂质缀合物中的脂质的两个酰基或烷基链中的每一个为长度为13或14个碳的酰基链,所述酰基链是饱和的或不饱和的。在仍另一个方面,POZ-脂质缀合物中的脂质的两个烷基或酰基链中的每一个为长度为11、12、13、14、15或16个碳的烷基链,所述烷基链是饱和的或不饱和的。在进一步的方面,POZ-脂质缀合物中的脂质的两个酰基或烷基链中的每一个为长度为12、13、14或15个碳的烷基链,所述烷基链是饱和的或不饱和的。在仍进一步的方面,POZ-脂质缀合物中的脂质的两个酰基或烷基链中的每一个为长度为13或14个碳的烷基链,所述烷基链是饱和的或不饱和的。

[0135] 在仍另一个方面,POZ-脂质缀合物中的脂质部分的每个酰基或烷基链具有相同的长度并且是不饱和的。例如,酰基或烷基链的长度可为6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或21个碳,长度可为11、12、13、14、15或16个碳,长度可为12、13、14或15个碳,或者长度可为13或14个碳,并且是不饱和的。

[0136] 在另一个方面,POZ-脂质缀合物中的脂质部分为1,2-二肉豆蔻酰-sn-甘油或1,2-二月桂酰-sn-甘油。在仍另一个方面,POZ-脂质缀合物中的脂质部分为二(十四烷基)乙酰胺或二(十二烷基)乙酰胺。在还另一个方面,POZ-脂质缀合物中的脂质部分为N,N-二(十四烷基)乙酰胺或N,N-二(十二烷基)乙酰胺。在仍另一个方面,脂质部分可为1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-聚(乙二醇)(DSPE)。

[0137] POZ-脂质缀合物

[0138] 一般而言,POZ与脂质的共价附连通过POZ聚合物上的活性化学基团与脂质上的互补化学基团的反应实现。POZ聚合物和/或脂质上的化学基团可以在反应之前被活化(例如但不限于除去任何保护基团)。羟基、胺或羧基基团可由单官能活化剂如N-羟基琥珀酰亚胺、氯甲酸乙酯、DCCD、Woodward's试剂K、氰尿酸和三氟甲磺酰氯等活化以进行偶联。也可

使用许多含有不同反应性的基团的双官能交联试剂,如一些二异氰酸酯。

[0139] 用于包含在POZ-脂质缀合物中的具体脂质在上文和本文中进行了描述。

[0140] 在一个实施方案中,本公开的POZ-脂质缀合物可由通式I表示,其中脂质在封端末端处附连至聚合物链:

[0141] R-POZ_n-L-脂质I

[0142] 或其药学上可接受的形式,例如但不限于药学上可接受的盐,其中,

[0143] R为引发基团;

[0144] POZ为聚噁唑啉聚合物;

[0145] n为1至1,000并表示构成聚噁唑啉聚合物的单体单元数;

[0146] L为任选地含有其中裂解速率受控的可裂解部分的连接基团并表示通过脂质上的反应性基团和聚合物上的反应性基团的直接连接,其中该直接连接可形成其中裂解速率可以从高度不稳定到稳定受控的可裂解部分;并且

[0147] 脂质表示如本文所述的脂质部分。

[0148] 在结构I的一个实施方案中,POZ聚合物含有至少一个能够与脂质或连接基团形成连接的反应性基团。聚合物与脂质之间的连接(无论是直接连接还是利用连接基团的连接)可在聚合物主链上的任何反应性基团(包括在末端位置或侧挂位置(在末端处)处的反应性基团)与脂质上的反应性基团之间形成。在一个方面,连接基团与聚合物之间的连接可在聚合物的末端处形成。在另一个方面,连接基团与聚合物之间的连接可在聚合物的侧挂位置处形成。此外,连接(无论是直接连接还是利用连接基团的连接)可包括最初存在于聚合物或脂质上的反应性基团的组分。连接(无论是直接连接还是利用连接基团的连接)可以是可生理降解的。在此方面,连接可含有可裂解部分。合适的连接基团包括但不限于醚、酯、胺、酰胺及其组合。

[0149] 在此实施方案的一个方面,L为稳定的连接。在此实施方案的另一个方面,L是可生理降解的并包括可裂解部分。例如,在一个实施方案中,L可选自酯、羧酸酯(-C(O)-O-)、碳酸酯(-O-C(O)-O-)、氨基甲酸酯(-O-C(O)-NH-)和酰胺(-C(O)-NH-)。在此实施方案的还另一个方面,L为不含可裂解部分的连接。

[0150] 示例性的R基团包括但不限于氢、烷基和取代的烷基。在一个实施方案中,引发基团为烷基基团,如C1至C4烷基基团。在前述的一个具体实施方案中,引发基团为甲基基团。在另一个实施方案中,引发基团为H。在一些方面,引发基团可选择为缺乏活性官能团。在其他方面,引发基团可选择为包括活性官能团。另外的合适的引发基团公开于美国专利号7,943,141、8,088,884、8,110,651、8,101,706、8,883,211和9,284,411以及美国专利申请号13/003,306、13/549,312和13/524,994中,它们中的每一者出于这样的教导通过引用整体并入。

[0151] 在一些实施方案中,R为H或CH_3。

[0152] 在一个方面,结构I中的POZ聚合物可以是由$[N(COR_2)CH_2CH_2]_n$表示的聚合物,其中对于POZ聚合物的每个重复单元,R_2独立地选自未取代或取代的烷基、烯基、芳烷基和杂环基烷基基团,且R为H或CH_3,并且聚合度"n"的范围可为15至35、20至30、或25。

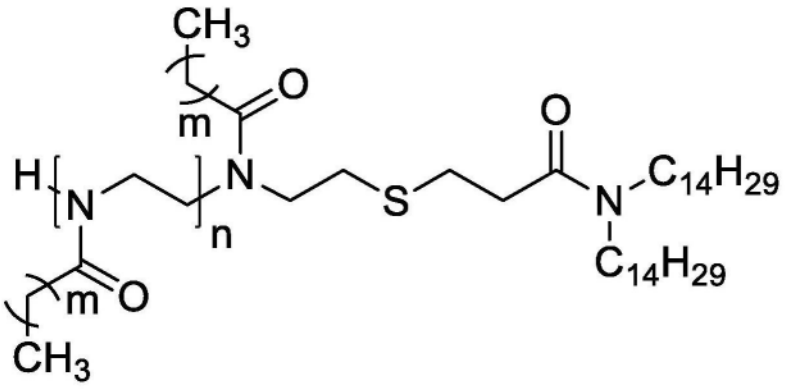
[0153] 在另一个方面,结构I中的POZ聚合物可以是由$[N(COR_2)CH_2CH_2]_n$表示的聚合物,其中对于POZ聚合物的每个重复单元,R_2独立地选自未取代和取代的烷基,且R为H或CH_3,并且n

的范围可为15至35、20至30、或25。

[0154] 在还另一个方面,结构I中的POZ聚合物为由$[N(COR_2)CH_2CH_2]_n$表示的聚合物,其中对于POZ聚合物的每个重复单元,R_2独立地选自$-CH_3$和$-CH_2-CH_3$,任选地,R为H或CH_3,并且n的范围可为15至35、20至30、或25。

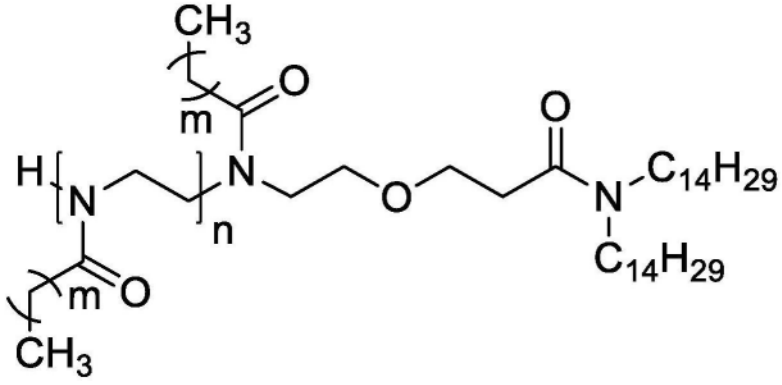
[0155] 当POZ聚合物为由$[N(COR_2)CH_2CH_2]_n$表示的聚合物时,缀合物的POZ聚合物可溶于水性环境中。侧挂基团(R_2)的性质可以在一定程度上改变溶解性。例如,当R_2是甲基(如在PMOZ中)时,聚合物是高度水溶性的,而当R_2是乙基(如在PEOZ中)时,聚合物保持水溶性,但程度低于PMOZ。POZ聚合物的溶解性允许POZ聚合物延伸超出脂质体表面并进入到脂质体外环境中。以这样的方式,POZ聚合物可以有效地屏蔽脂质体表面。

[0156] 前述结构I的具体实施方案包括但不限于L为酰胺酶可裂解的酰胺,如下面在I(a)(1)和I(a)(2)中所示:



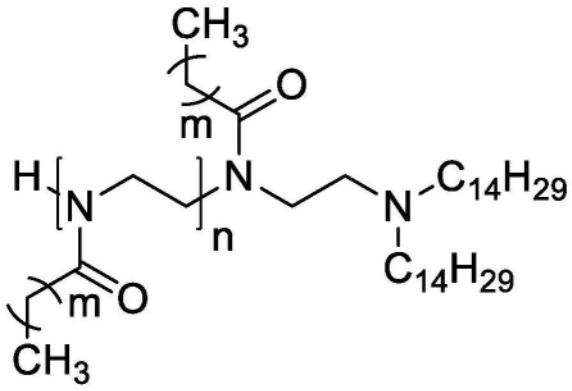
I(a)(1)

[0157]



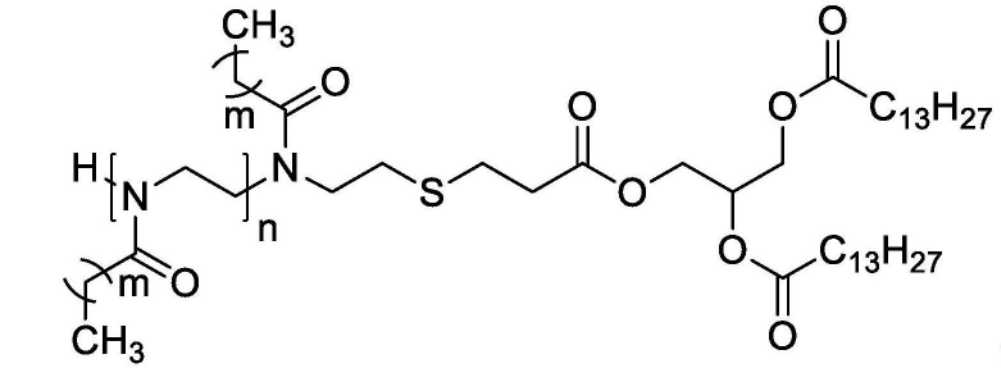
I(a)(2)。

[0158] 在结构I的一个替代实施方案中,相同的脂质基团可以作为稳定的胺(而不是酰胺)引入,如下面在I(b)中所示:

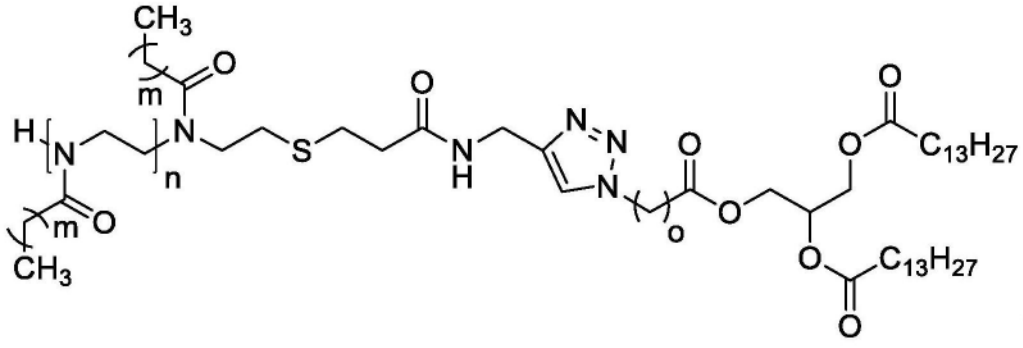
[0159] 

I(b)。

[0160] 在结构I的还另一个实施方案中,类似的脂质可以经由相对不稳定的酯键偶联,如下面在I(c)和I(d)中所示:

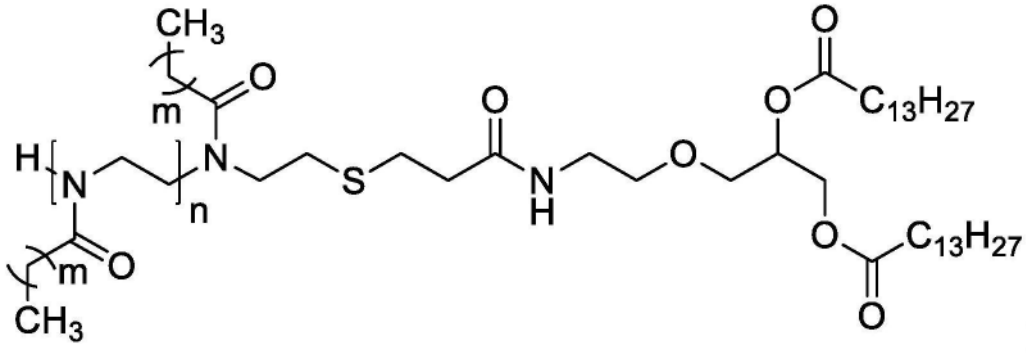
[0161] 

I(c)

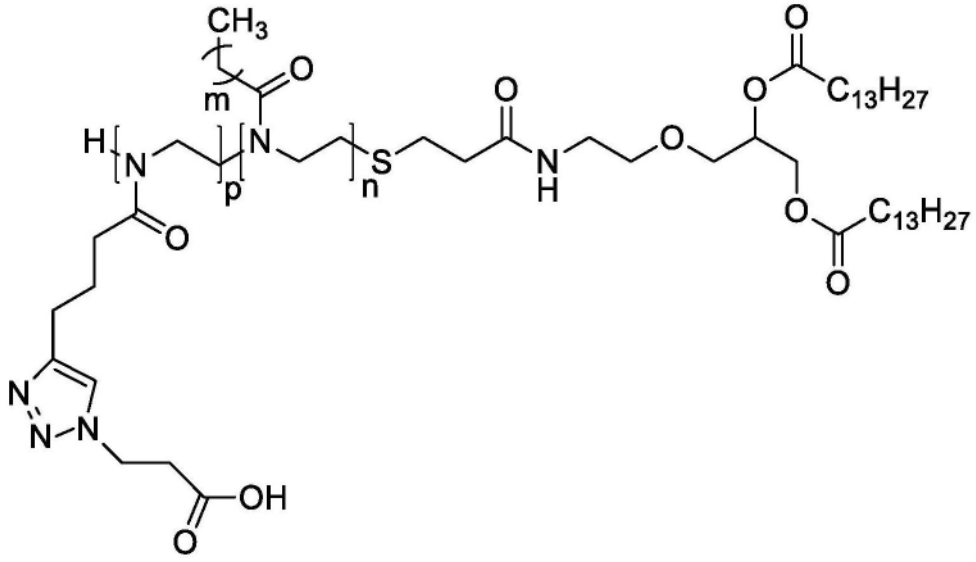


I(d)。

[0162] 在结构I的还另一个实施方案中,脂质可以经由相对稳定的醚键偶联,如下面在I(e)和I(f)中所示:

[0163] 

I(e)

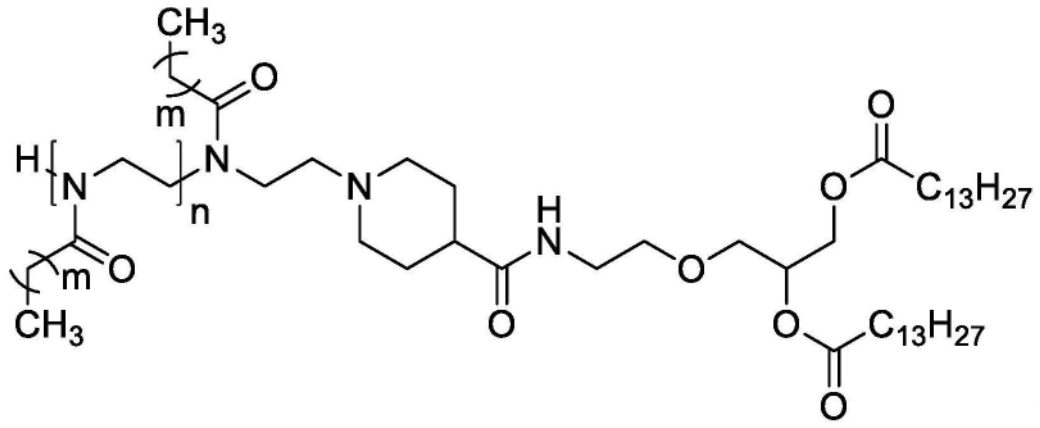
[0164] 

I(f)。

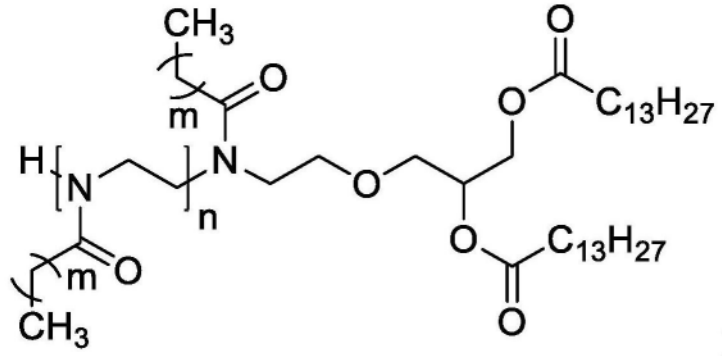
[0165] 在一个实施方案中,对于结构I(a)-I(f)(如果适用的话),m为1或2,n的范围为1至1000,o的范围为1至5,且p的范围为1至10。

[0166] 如下面在实施例部分中所证实的,结构I的上述实施方案(I(a)-I(f))在血浆中以不同的速率水解,从而说明了本公开的新型POZ-脂质缀合物的关键要素之一。

[0167] 前述结构I的其他具体实施方案包括但不限于下面在I(g)和I(h)中示出的那些:

[0168] 

I(g)

[0169] 

I(h)。

[0170] 在一个实施方案中,对于结构I(g)-I(h),m为1或2,n的范围为1至1000。

[0171] 在本发明的另一个实施方案中,本公开的POZ-脂质缀合物可由通式II表示,其中脂质在引发剂末端处而不是如式I中在封端末端处附连至聚合物链:

[0172] 脂质-L_1-$(POZ)_n^a$-T II

[0173] 或其药学上可接受的形式,例如但不限于药学上可接受的盐,其中:

[0174] POZ为结构[N(COR$_2$)CH$_2$CH$_2$]的聚噁唑啉聚合物;

[0175] L$_1$为任选地含有其中裂解速率可受控的可裂解部分的连接基团或表示通过脂质上的反应性基团和聚合物上的反应性基团的直接连接,其中该直接连接可形成其中裂解速率可受控的可裂解部分;

[0176] 对于聚噁唑啉聚合物的每个重复单元,R$_2$独立地选自未取代或取代的烷基、烯基、炔取代的烷基、芳烷基、杂环基烷基或活性官能团;

[0177] T为在封端末端处的基团;

[0178] a为ran,其表示无规共聚物,或为block,其表示嵌段共聚物;并且

[0179] n为1至1,000的整数。

[0180] 侧挂基团(R$_2$)的性质可以在一定程度上改变溶解性。POZ聚合物的溶解性允许POZ聚合物延伸超出脂质体表面并进入到脂质体外环境中。以这样的方式,POZ聚合物可以有效地屏蔽脂质体表面并防止LNP形成过程中的聚集。另外,不受任何特定理论的束缚,据信POZ-脂质缀合物在施用后必须从LNP表面"脱落",以便高效地递送核酸有效载荷。在某些方面,在R$_2$位置处向POZ-脂质缀合物添加高亲水性基团允许在LNP形成和/或施用期间额外的屏蔽和/或增强POZ-脂质缀合物从LNP的脱落以促进有效载荷的递送。在一个实施方案中,R$_2$包括至少一个亲水基团。在另一个实施方案中,R$_2$包括多个亲水基团。

[0181] L$_1$(无论是直接连接还是连接基团)可包括最初存在于聚合物或脂质上的反应性基团的组分。合适的连接基团在本文中描述。L$_1$可任选地含有可裂解部分,例如但不限于酯、羧酸酯(-C(O)-O-)、碳酸酯(-O-C(O)-O-)、氨基甲酸酯(-O-C(O)-NH-)和酰胺(-C(O)-NH-)。

[0182] 示例性的活性官能团包括但不限于炔、烯、胺、羟胺、醛、酮、缩醛、硫醇、缩酮、马来酰亚胺、酯、羧酸、活化的羧酸(例如但不限于N-羟基琥珀酰亚胺基(NHS)和1-苯并三嗪活性酯)、活性碳酸酯、氯甲酸酯、醇、叠氮化物、乙烯基砜或邻吡啶基二硫化物(OPSS)。在某些方面,活性官能团为亲水基团。在某些实施方案中,活性官能团用于向POZ-脂质缀合物添加亲水基团,例如通过使用炔或叠氮化物活性官能团的点击化学。

[0183] 在此实施方案的一个方面,L$_1$为稳定的连接。在此实施方案的另一个方面,L$_1$是可生理降解的并包括可裂解部分。在此实施方案的一个替代方面,L$_1$为不含可裂解部分的连接。合适的L$_1$连接在本文中描述。

[0184] 在此实施方案的一个方面,L$_1$为三唑连接基团,这将在下文更详细地讨论。

[0185] 在此实施方案的另一个方面,T为封端亲核体。例如,T可以是Z-B-Q,其中Z为S、O或N;B为任选的连接基团;Q为封端亲核体或亲核体的封端部分。

[0186] B基团可包括但不限于亚烷基基团。在一个特别的实施方案中,B为-(CH$_2$)$_y$-,其中y为选自1至16的整数。

[0187] 在一个特别的方面,Z为S。如本文所述的含有硫基团的POZ-脂质缀合物可通过用硫醇盐试剂封端POZ阳离子来制备,所述硫醇盐试剂例如但不限于巯基酯(例如,-S-CH$_2$CH$_2$-CO$_2$CH$_3$)或巯基保护的胺(例如,-S-CH$_2$CH$_2$-NH-tBoc)。这样的POZ缀合物通过离子交换色谱法(以除去仲胺)来提供有效的大规模纯化,并允许控制多分散性值(多分散性值为1.10或更小)和产生具有较高分子量POZ聚合物的缀合物。在另一个方面,Z为N。在进一步的方面,Z

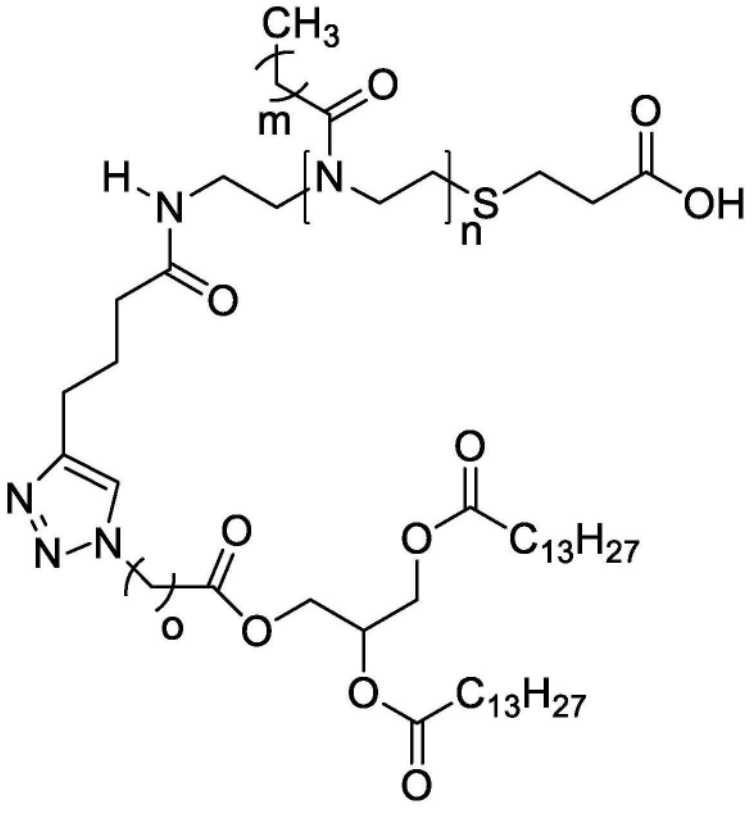
为O。

[0188] 在某些方面,Q是惰性的(即,不含官能团)。当Q为惰性基团时,可使用任何惰性基团,包括但不限于-C_6H_5、烷基和芳基硫醇盐基团。在一个替代的方面,Q为活性官能团或含有活性官能团。当Q为活性官能团或含有活性官能团时,合适的官能团包括但不限于炔、烯、胺、羟胺、醛、酮、缩醛、硫醇、缩酮、马来酰亚胺、酯、羧酸、活化羧酸(例如但不限于N-羟基琥珀酰亚胺基(NHS)和1-苯并三嗪活性酯)、活性碳酸酯、氯甲酸酯、醇、叠氮化物、乙烯基砜或邻吡啶基二硫化物(OPSS)。当Q为活性官能团或含有活性官能团时,Q可与R_2相同或者Q可与R_2不同(即,Q和R_2可在化学上彼此正交)。

[0189] 在此实施方案的一个特别的方面,对于聚噁唑啉聚合物的每个重复单元,R_2独立地选自未取代或取代的烷基,并且任选地R为H或CH_3,且n为15至35、20至30、22至28、或25。在此实施方案的另一个方面,对于聚噁唑啉聚合物的每个重复单元,R_2独立地选自CH_3和CH_2-CH_3,并且任选地R为H或CH_3,且n为15至35、20至30、22至28、或25。在任何前述方面中,T为Z-B-Q,其中Z为S,B为-$(CH_2)_y$-,并且Q为惰性基团,例如但不限于-C_6H_5、烷基和芳基硫醇盐基团。或者,在任何前述方面中,T为Z-B-Q,其中Z为S,B为-$(CH_2)_y$-,并且Q为官能团或含有官能团例如但不限于炔、烯、胺、羟胺、醛、酮、缩醛、硫醇、缩酮、马来酰亚胺、酯、羧酸、活化的羧酸(例如但不限于N-羟基琥珀酰亚胺基(NHS)和1-苯并三嗪活性酯)、活性碳酸酯、氯甲酸酯、醇、叠氮化物、乙烯基砜或邻吡啶基二硫化物(OPSS)。

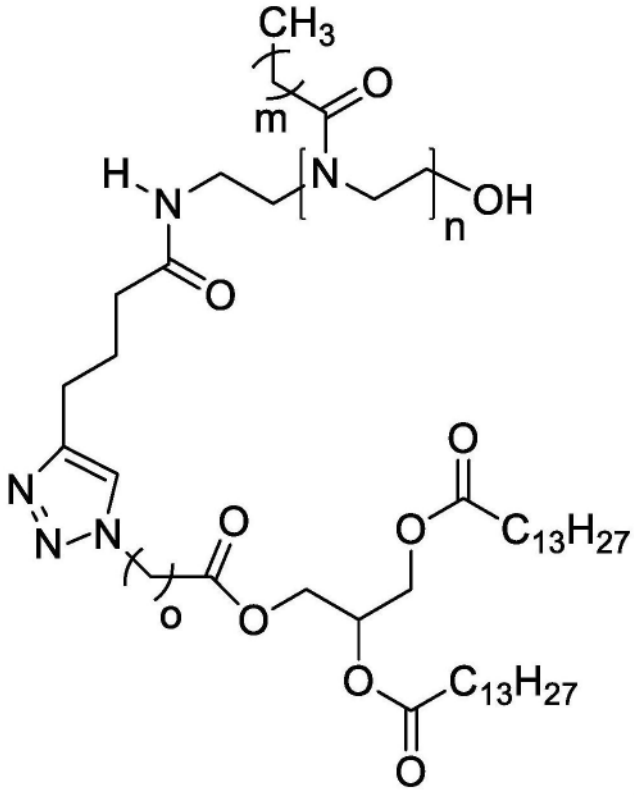
[0190] 上述结构II的一个具体实施方案包括但不限于以下结构II(a),其中脂质附连在引发剂末端处,同时封端亲核体为硫:

[0191]



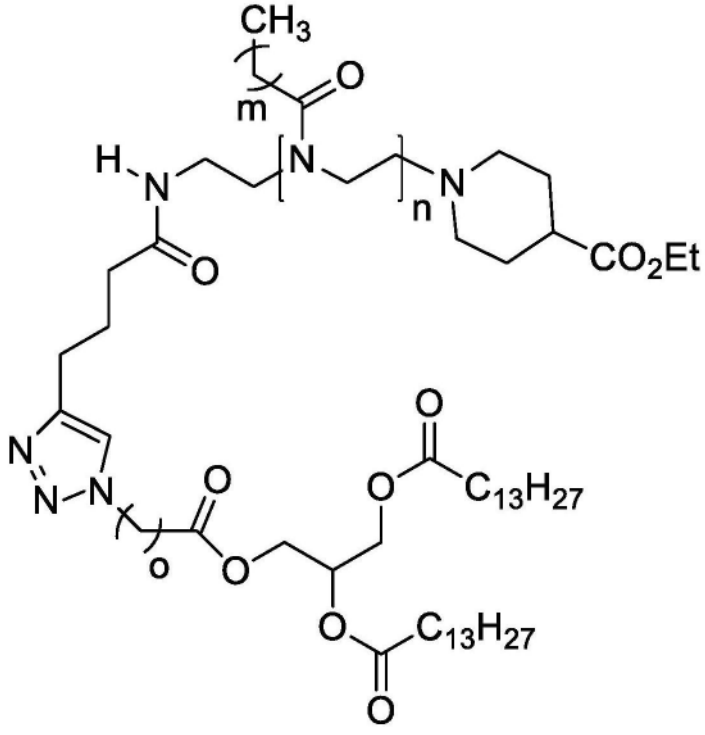
II(a)。

[0192] 在如下面II(b)中所示的结构II的一个替代实施方案中,脂质附连至引发剂末端,同时封端亲核体为-OH:

[0193] 

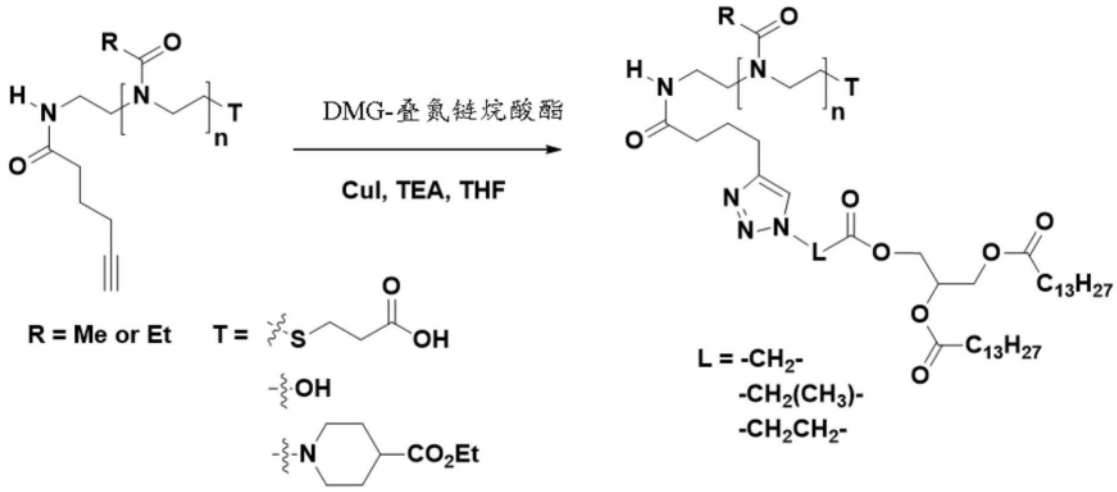
II(b)。

[0194] 在下面II(c)中所示的结构II的一个替代实施方案中,脂质附连至引发剂末端,同时封端亲核体为氮,并且脂质经由2-丙酸酯附连:

[0195] 

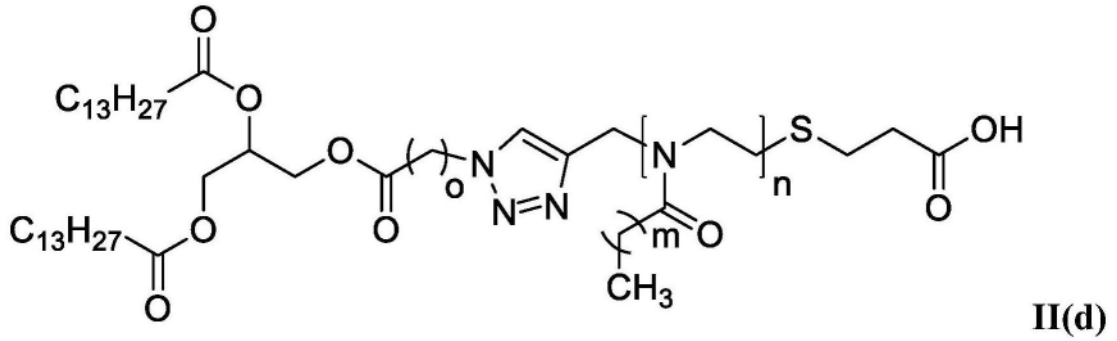
II(c)。

[0196] 化合物II(a)-II(c)通过如下所示叠氮化物与侧挂炔基团的“点击”反应制备:

[0197] 

。

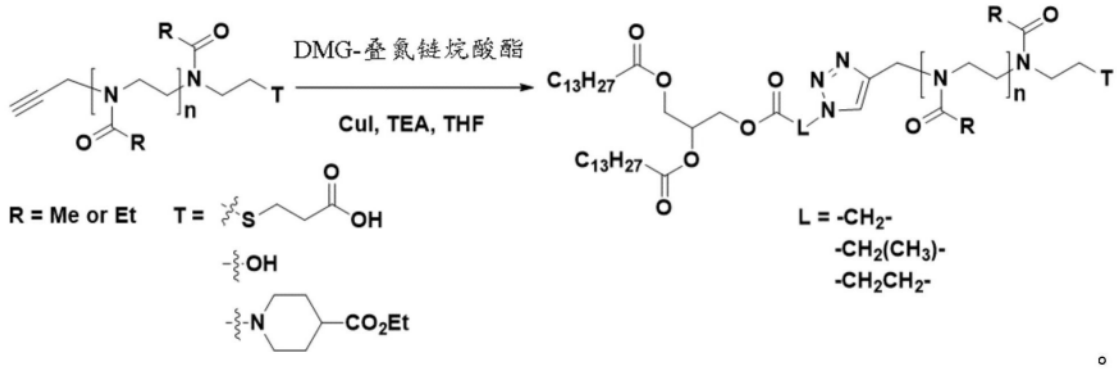
[0198] 在下面II(d)中所示的结构II的还另一个替代实施方案中,脂质附连至引发剂末端,同时封端亲核体为硫,并且脂质通过乙酸酯附连:

[0199] 

II(d)

。

[0200] II(d)通过如下所示叠氮化物与炔引发基团的“点击”反应制备:

[0201] 

。

[0202] 在一个实施方案中,对于结构II(a)-II(d),m为1-2,n的范围为1至1000,o的范围为1至5(如果适用的话)。

[0203] 在另一个实施方案中,本公开的POZ-脂质缀合物可由通式III表示:

[0204] $R-(POZ)_n^a-Z-L_2-$脂质 III

[0205] 或其药学上可接受的形式,例如但不限于药学上可接受的盐,其中:

[0206] POZ为结构$[N(COR_2)CH_2CH_2]$的聚噁唑啉聚合物;

[0207] L_2为任选地含有其中裂解速率可受控的可裂解部分的连接基团或表示通过脂质上的反应性基团和聚合物上的反应性基团的直接连接,其中该直接连接可形成其中裂解速率可受控的可裂解部分;

[0208] R为引发基团;

[0209] 对于聚噁唑啉聚合物的每个重复单元,R_2独立地选自未取代或取代的烷基、烯基、炔取代的烷基、芳烷基、杂环基烷基基团或活性官能团;

[0210] Z为S、O或N;

[0211] a为ran,其表示无规共聚物,或为block,其表示嵌段共聚物;并且

[0212] n为1至1,000的整数。

[0213] 与结构II一样,侧挂基团(R_2)的性质可以在一定程度上改变溶解性。聚噁唑啉聚合物的溶解性允许聚噁唑啉聚合物延伸超出脂质体表面并进入到脂质体外环境中。以这样的方式,聚噁唑啉聚合物可以有效地屏蔽脂质体表面。另外,POZ-脂质缀合物在施用后必须从LNP表面"脱落",以便高效地递送核酸有效载荷。在某些方面,在R_2位置处向POZ-脂质缀合物添加高亲水性基团允许在LNP形成和/或施用期间额外的屏蔽和/或增强POZ-脂质缀合物从LNP的脱落以促进有效载荷的递送。

[0214] L_2(无论是直接连接还是连接基团)可包括最初存在于聚合物或脂质上的反应性基团的组分。合适的连接基团在本文中描述。L_2可任选地含有可裂解部分,例如但不限于酯、羧酸酯(-C(O)-O-)、碳酸酯(-O-C(O)-O-)、氨基甲酸酯(-O-C(O)-NH-)和酰胺(-C(O)-NH-)。

[0215] R基团包括但不限于氢、烷基和取代的烷基。在一个实施方案中,引发基团为烷基基团,如C1至C4烷基基团。在前述的一个具体实施方案中,引发基团为甲基基团。在另一个实施方案中,引发基团为H。引发基团可选择为缺乏活性官能团。或者,引发基团可选择为包括活性官能团。另外的示例性引发基团公开于美国专利号7,943,141、8,088,884、8,110,651、8,101,706、8,883,211和9,284,411以及美国专利申请号13/003,306、13/549,312和13/524,994中,它们中的每一者出于这样的教导通过引用整体并入。

[0216] 活性官能团包括但不限于炔、烯、胺、羟胺、醛、酮、缩醛、硫醇、缩酮、马来酰亚胺、酯、羧酸、活化的羧酸(例如但不限于N-羟基琥珀酰亚胺基(NHS)和1-苯并三嗪活性酯)、活性碳酸酯、氯甲酸酯、醇、叠氮化物、乙烯基砜或邻吡啶基二硫化物(OPSS)。在某些方面,活性官能团为亲水基团。在某些实施方案中,活性官能团用于向POZ-脂质缀合物添加亲水基团,例如通过使用炔或叠氮化物活性官能团的点击化学。

[0217] 在此实施方案的一个方面,L_2为稳定的连接。在此实施方案的另一个方面,L_2是可生理降解的并包括可裂解部分。在此实施方案的一个替代方面,L_2为不含可裂解部分的连接。合适的L_2连接在本文中描述。

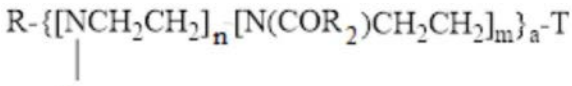
[0218] 在一个特别的方面,Z为S。如本文所述的含有硫基团的POZ缀合物可通过用硫醇盐试剂封端POZ阳离子来制备,所述硫醇盐试剂例如但不限于巯基酯(例如,-S-CH_2CH_2-CO_2CH_3)或巯基保护的胺(例如,-S-CH_2CH_2-NH-tBoc)。这样的POZ缀合物通过离子交换色谱法(以除去仲胺)来提供有效的大规模纯化,并允许控制多分散性值(多分散性值为1.10或更小)和产生具有较高分子量POZ聚合物的缀合物。在另一个方面,Z为N。在进一步的方面,Z为O。

[0219] 在此实施方案的一个方面,对于聚噁唑啉聚合物的每个重复单元,R_2独立地选自未取代或取代的烷基,并且任选地R为H或CH_3,且n为15至35、20至30、或25。

[0220] 在此实施方案的另一个方面,对于聚噁唑啉聚合物的每个重复单元,R_2独立地选

自CH_3和CH_2-CH_3,并且任选地R为H或CH_3,且n为15至35、20至30、或25。

[0221] 在另一个实施方案中,本公开的POZ-脂质缀合物可由通式IV表示:



[0222]



脂质 IV

[0223] 或其药学上可接受的形式,例如但不限于药学上可接受的盐,其中:

[0224] R为引发基团;

[0225] 对于聚噁唑啉聚合物的每个重复单元,R_2独立地选自未取代或取代的烷基、烯基、炔取代的烷基、芳烷基、杂环基烷基基团或活性官能团;

[0226] L_3为任选地含有其中裂解速率可受控的可裂解部分的连接基团或表示通过脂质上的反应性基团和聚合物上的反应性基团的直接连接,其中该直接连接可形成其中裂解速率可受控的可裂解部分;

[0227] 脂质为脂质;

[0228] T为在封端末端处的基团;

[0229] a为ran,其表示无规共聚物,或为block,其表示嵌段共聚物;

[0230] m为1至100的整数;并且

[0231] n为1至5的整数。

[0232] 在一个方面,n为1并且该单体单元为与R相邻的初始单元。

[0233] 侧挂基团(R_2)的性质可以在一定程度上改变溶解性。聚噁唑啉聚合物的溶解性允许聚噁唑啉聚合物延伸超出脂质体表面并进入到脂质体外环境中。以这样的方式,聚噁唑啉聚合物可以有效地屏蔽脂质体表面。另外,POZ-脂质缀合物在施用后必须从LNP表面"脱落",以便高效地递送核酸有效载荷。在某些方面,在R_2位置处向POZ-脂质缀合物添加高亲水性基团允许在LNP形成和/或施用期间额外的屏蔽和/或增强POZ-脂质缀合物从LNP的脱落以促进有效载荷的递送。

[0234] L_3(无论是直接连接还是连接基团)可包括最初存在于聚合物或脂质上的反应性基团的组分。合适的连接基团在本文中描述。L_3可任选地含有可裂解部分,例如但不限于酯、羧酸酯(-C(O)-O-)、碳酸酯(-O-C(O)-O-)、氨基甲酸酯(-O-C(O)-NH-)和酰胺(-C(O)-NH-)。

[0235] R基团包括但不限于氢、烷基和取代的烷基。在一个实施方案中,引发基团为烷基基团,如C1至C4烷基基团。在前述的一个具体实施方案中,引发基团为甲基基团。在另一个实施方案中,引发基团为H。引发基团可选择为缺乏活性官能团。或者,引发基团可选择为包括活性官能团。另外的示例性引发基团公开于美国专利号7,943,141、8,088,884、8,110,651、8,101,706、8,883,211和9,284,411以及美国专利申请号13/003,306、13/549,312和13/524,994中,它们中的每一者出于这样的教导通过引用整体并入。

[0236] 活性官能团包括但不限于炔、烯、胺、羟胺、醛、酮、缩醛、硫醇、缩酮、马来酰亚胺、酯、羧酸、活化的羧酸(例如但不限于N-羟基琥珀酰亚胺基(NHS)和1-苯并三嗪活性酯)、活

性碳酸酯、氯甲酸酯、醇、叠氮化物、乙烯基砜或邻吡啶基二硫化物(OPSS)。在某些方面,活性官能团为亲水基团。在某些实施方案中,活性官能团用于向POZ-脂质缀合物添加亲水基团,例如通过使用炔或叠氮化物活性官能团的点击化学。

[0237] 在此实施方案的一个方面,L_3为稳定的连接。在此实施方案的另一个方面,L_3是可生理降解的并包括可裂解部分。在此实施方案的一个替代方面,L_3为不含可裂解部分的连接。合适的L_3连接在本文中描述。

[0238] 在此实施方案的一个方面,T为封端亲核体。在此实施方案的一个方面,T为Z-B-Q,其中Z为S、O或N;B为任选的连接基团;且Q为封端亲核体或亲核体的封端部分。

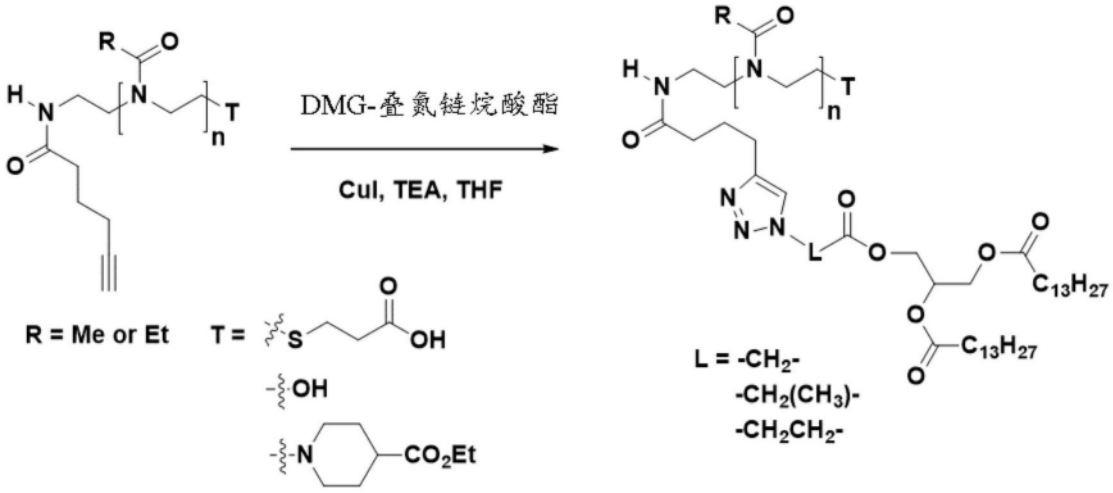
[0239] B基团包括但不限于亚烷基基团。在一个特别的实施方案中,B为$-(CH_2)_y-$,其中y为选自1至16的整数。

[0240] 在一个特别的方面,Z为S。如本文所述的含有硫基团的POZ缀合物可通过用硫醇盐试剂封端POZ阳离子来制备,所述硫醇盐试剂例如但不限于巯基酯(例如,$-S-CH_2CH_2-CO_2CH_3$)或巯基保护的胺(例如,$-S-CH_2CH_2-NH-tBoc$)。这样的POZ缀合物通过离子交换色谱法(以除去仲胺)来提供有效的大规模纯化,并允许控制多分散性值(多分散性值为1.10或更小)和产生具有较高分子量POZ聚合物的缀合物。在另一个方面,Z为N。在进一步的方面,Z为O。

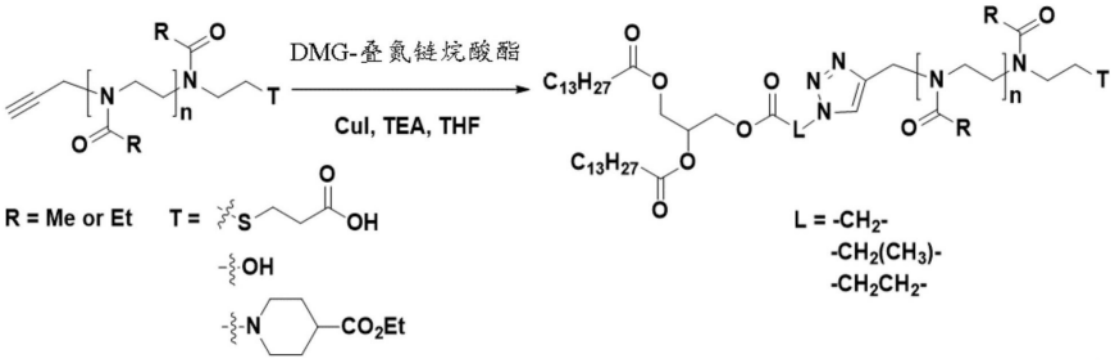
[0241] 在某些方面,Q是惰性的(即,不含官能团)。当Q为惰性基团时,可使用任何惰性基团,包括但不限于$-C_6H_5$、烷基和芳基硫醇盐基团。在其他方面,Q为活性官能团或含有活性官能团。当Q为活性官能团或含有活性官能团时,示例性的基团包括但不限于炔、烯、胺、羟胺、醛、酮、缩醛、硫醇、缩酮、马来酰亚胺、酯、羧酸、活化的羧酸(例如但不限于N-羟基琥珀酰亚胺基(NHS)和1-苯并三嗪活性酯)、活性碳酸酯、氯甲酸酯、醇、叠氮化物、乙烯基砜或邻吡啶基二硫化物(OPSS)。当Q为活性官能团或含有活性官能团时,Q可与R_2相同或者Q可与R_2不同(即,Q和R_2在化学上彼此正交)。

[0242] 在此实施方案的一个方面,对于聚噁唑啉聚合物的每个重复单元,R_2独立地选自未取代或取代的烷基,并且任选地R为H或CH_3,m为15至35、20至30、或25,并且n为1。在此实施方案的另一个方面,对于聚噁唑啉聚合物的每个重复单元,R_2独立地选自CH_3和CH_2-CH_3,并且任选地R为H或CH_3,m为15至35、20至30、或25,并且n为1。在任何这些方面中,T为Z-B-Q,其中Z为S,B为$-(CH_2)_y-$,并且Q为惰性基团,例如但不限于$-C_6H_5$、烷基和芳基硫醇盐基团。在任何这些方面中,T为Z-B-Q,其中Z为S,B为$-(CH_2)_y-$,并且Q为官能团或含有官能团,例如但不限于炔、烯、胺、羟胺、醛、酮、缩醛、硫醇、缩酮、马来酰亚胺、酯、羧酸、活化的羧酸(例如但不限于N-羟基琥珀酰亚胺基(NHS)和1-苯并三嗪活性酯)、活性碳酸酯、氯甲酸酯、醇、叠氮化物、乙烯基砜或邻吡啶基二硫化物(OPSS)。

[0243] 在通式IV的一个具体实施方案中,本公开的POZ-脂质缀合物包括以下:

[0244] 

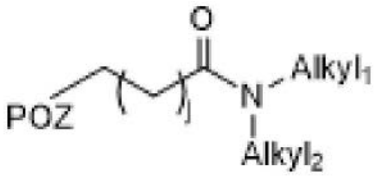
[0245] 一组类似的化合物通过如下所示将叠氮化物与引发炔基团偶联而制成：

[0246] 

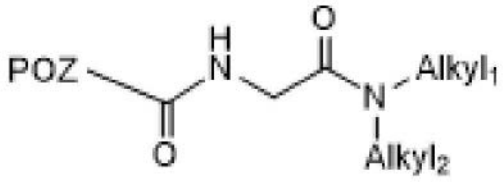
[0247] 这些化合物包含三唑环。有证据表明，该三唑环是一种特权支架，能够通过26S蛋白酶(一种负责细胞内多肽裂解的酶)运输与其附连的配体。这些所谓的蛋白水解靶向嵌合体(PROTACS)是一类有前景的药物，已示出会“敲低”与PROTAC的一端结合的蛋白质的水平并穿梭通过26S蛋白酶进行切割。不受任何特定理论的束缚，预期并入三唑环的POZ聚合物可使POZ聚合物穿梭通过26S蛋白酶，从而防止不经历蛋白水解切割的POZ聚合物的免疫呈递。值得注意的是，可降解酯键的水解释放脂质将留下附连于聚合物的侧挂酸基团。发明人已发现，具有经由三唑环附连的这些剩余侧挂基团的可溶性POZ是非免疫原性的，尽管被皮下区室中的树突状细胞摄取。另外，对附连有罗替戈汀的C^{14}标记20kD POZ聚合物进行的标记研究表明，该聚合物缀合物经由排出皮下注射部位的淋巴管摄取。标记的缀合物最终出现在脾脏中，在这里，其几乎被红髓(巨噬细胞区室)选择性地摄取。不受任何特定理论的束缚，预期本公开的POZ-脂质LNP也可被树突状细胞选择性地摄取。同样地，不受任何特定理论的束缚，预期本公开的POZ-脂质LNP可被巨噬细胞选择性地摄取。如果是这样，那么LNP中的寡核苷酸有效载荷可能会优先在树突状细胞/巨噬细胞区室中表达，这可能会对免疫呈递产生影响。值得注意的是，在一个方面，另外的三唑侧挂酸可作为R基团直接附连在上述结构中。不受任何特定理论的束缚，这些基团可进一步有助于降低LNP中所含的POZ-脂质的免疫原性。

[0248] 另外的POZ-脂质缀合物在下面的式V至VII中表示，其中POZ聚合物通过L、L_1、L_2或L_3与脂质连接：

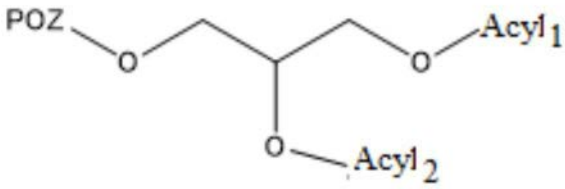
[0249]



V



VI



VII,

[0250] 其中

[0251] $Alkyl_1$和$Alkyl_2$各自独立地为长度为5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或21个碳、长度为11、12、13、14、15、16个碳、长度为12、13、14、15个碳、或长度为13或14个碳的饱和或不饱和烷基链;优选地$Alkyl_1$和$Alkyl_2$具有相同的碳原子数并且各自是不饱和的;

[0252] $Acyl_1$和$Acyl_2$各自独立地为长度为5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或21个碳、长度为11、12、13、14、15、16个碳、长度为12、13、14、15个碳、或长度为13或14个碳的饱和或不饱和酰基链;优选地$Acyl_1$和$Acyl_2$具有相同的碳原子数并且各自是不饱和的;并且

[0253] j为1至8的整数。

[0254] 可裂解连接基团

[0255] 如上文所讨论的,在上述实施方案中的一些中,脂质可经由可裂解键连接至POZ聚合物。在一个方面,在POZ聚合物和含有可裂解部分的脂质之间提供连接基团。换句话说,连接基团含有可生理降解的键,因为它可以在特定环境中裂解。例如,在向受试者施用本公开的POZ-脂质缀合物或含有POZ-脂质缀合物的LNP组合物之后,该键可在受试者体内裂解。

[0256] 在一个实施方案中,可裂解部分通过化学反应裂解。在该实施方案的方面,裂解通过容易还原的基团例如但不限于二硫化物的还原进行。在另一个实施方案中,可裂解部分由受试者中天然存在或诱导存在的物质裂解。在该实施方案的一个方面,这样的物质为酶或多肽。因此,在一个实施方案中,可裂解部分通过酶促反应裂解。在还另一个实施方案中,可裂解部分通过前述的组合裂解。连接基团可含有POZ聚合物的部分和/或脂质的部分,因为这些部分已经反应形成连接基团,如下文所讨论的。

[0257] 在此方面,合适的可裂解部分包括但不限于酯、羧酸酯(-C(O)-O-)、碳酸酯(-O-C(O)-O-)、氨基甲酸酯(-O-C(O)-NH-)和酰胺(-C(O)-NH-,包括肽中的酰胺基团);本文讨论了其他可释放部分。在一个特别的实施方案中,可裂解部分为酯。在另一个特别的实施方案中,可裂解部分为碳酸酯或羧酸酯。另外,连接基团可以是天然存在的氨基酸、非天然存在

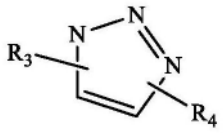
的氨基酸或含有一种或多种天然存在和/或非天然存在的氨基酸的聚合物。连接基团可包括来自聚合物链和/或脂质的某些基团。

[0258] 在式I至IV的POZ-脂质缀合物的某些方面,L、L_1、L_2和L_3为可生理降解的键,其含有在每次出现时独立地选自酯、羧酸酯(-C(O)-O-)、碳酸酯(-O-C(O)-O-)、氨基甲酸酯(-O-C(O)-NH-)、酰胺(-C(O)-NH-)及其组合的可裂解部分。

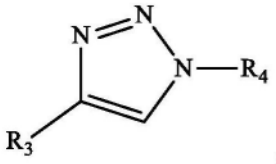
[0259] 在式I至IV的POZ-脂质缀合物的其他某些方面,L、L_1、L_2和L_3在每次出现时独立地选自-$(CH_2)_f$-(可裂解部分)-$(CH_2)_g$-,其中f和g各为独立地选自0-10、1-9、1-8、1-7、1-6或1-5的整数。在一个方面,f和g各为独立地选自1-4的整数。在另一个方面,L、L_1、L_2和L_3中的任一个可以是如本文所述的二取代的三唑。

[0260] 在式I至IV的POZ-脂质缀合物的某些方面,L、L_1、L_2和L_3在每次出现时独立地选自-$(CH_2)_f$-C(O)-$(CH_2)_g$-、-$(CH_2)_f$-C(O)-$(CH_2)_h$-NHC(O)-$(CH_2)_g$-、-$(CH_2)_f$-NH(CO)-$(CH_2)_h$-C(O)-$(CH_2)_g$-、-$(CH_2)_f$-NHC(O)-$(CH_2)_g$-、-$(CH_2)_f$-C(O)NH-$(CH_2)_g$-、-$(CH_2)_f$-NHOC(O)-$(CH_2)_g$-、-$(CH_2)_f$-OC(O)NH-$(CH_2)_g$-、-$(CH_2)_f$-OC(O)ONH-$(CH_2)_g$-、-$(CH_2)_f$-NHOC(O)O-$(CH_2)_g$-、O-$(CH_2)_h$、$(CH_2)_h$-O或$(CH_2)_h$,其中f、g和h各为独立地选自0-10、0-9、0-8、0-7、0-6或0-5的整数。在此特别的实施方案的一个方面,f、g和h各可为0-4。

[0261] 在式I至IV的POZ-脂质缀合物的另一个方面,L、L_1、L_2和L_3在每次出现时独立地选自二取代的三唑,其在R_3或R_4基团中的一个中含有可裂解部分。可裂解部分优选存在于R_4基团中。在一个具体的方面,二取代的三唑具有结构:

[0262]  ;

或

[0263]  ,

[0264] 其中:

[0265] R_3为连接三唑部分与聚合物链的连接体。R_3可部分地由聚合物链上的官能团定义;换句话说,R_3可含有聚合物链上的部分官能团。在一个方面,R_3为-C(O)-R_5-,其中R_5不存在或为长度为1至10个碳的取代或未取代的烷基。

[0266] R_4为连接三唑部分与脂质的连接体。R_4可部分地由试剂上的官能团定义;换句话说,R_4可含有脂质上的部分官能团。在一个方面,R_4为-R_6-R_7-R_8-,其中R_6为取代或未取代的烷基、取代或未取代的芳烷基,R_7为含有可裂解部分或可裂解部分的一部分的基团,R_8不存在或为O、S、CR_c或NR_c,其中R_c为H或取代或未取代的烷基。在某些方面,R_7和R_8可组合形成可裂解部分。在一个实施方案中,R_7为-R_a-(O)-R_b-、-R_a-O-C(O)-R_b-、-R_a-C(O)-NH-环状-O-C(O)-R_b-(其中环状表示取代或未取代的芳基、杂环烷基、杂环或环烷基)、-R_a-C(O)-NH-(C_6H_4)-O-C(O)-R_b-、-R_a-C(O)-R_b-、-R_a-C(O)-O-R_b-、-R_a-O-C(O)-O-R_b-、-R_a-O-C(O)-NR_{15}-R_b-(其中R_{15}为H或取代或未取代的C1-C5烷基)、-R_a-CH(OH)-O-R_b-、-R_a-S-S-R_b-、-R_a-O-P(O)

(OR_{11})-O-R_b-(其中R_{11}为H或取代或未取代的C1-C5烷基)、或-R_a-C(O)-NR_{15}-R_b-(其中R_{15}为H或取代或未取代的C1-C5烷基),其中R_a和R_b各自独立地不存在或为取代或未取代的烷基。在另一个实施方案中,R_a和R_b各自独立地不存在或为取代或未取代的C2-C16烷基。在前述的一个实施方案中,R_6为直链的取代或未取代的C1-C8烷基或者支链的取代或未取代的C1-C8烷基,R7为-R_a-C(O)-O-R_b-,R_8不存在。在前述的另一个实施方案中,R_6为直链的取代或未取代的C1-C4烷基或者支链的取代或未取代的C1-C4烷基,R_7为-R_a-C(O)-O-R_b-,R8不存在。在前述的一个实施方案中,R_6为-CH_2-、-CH_2-CH_2-或-$CH_2(CH_3)$-,R_7为-C(O)-O-,R_8不存在。

[0267] 在一个特别的实施方案中,R_3为-C(O)-$(CH_2)_3$,且R_4为-CH_2-C(O)-O-、-CH_2-CH_2-C(O)-O-或-$CH_2(CH_3)$-C(O)-O-。

[0268] 在一个特别的实施方案中,R_3为-C(O)-$(CH_2)_3$,且R_4为-CH_2-CH_2-O-C(O)、-CH_2-CH_2-CH_2-O-C(O)、-CH_2-CH_2-CO-NH-(C_6H_4)-O-C(O)-。

[0269] 在式I至IV的POZ-脂质缀合物的某些方面,L、L_1、L_2和L_3在每次出现时独立地选自上述可裂解部分中的一个或多个。在一个特别的方面,当POZ-脂质缀合物中存在多于一个L、L_1、L_2或L_3键时,L、L_1、L_2和L_3各自相同。在另一个特别的方面,当POZ-脂质缀合物中存在多于一个L、L_1、L_2或L_3键时,至少一个L、L_1、L_2和L_3与其余的键不同。

[0270] 下面的实施例37和38表明,根据本公开制备的多种POZ-脂质在暴露于血浆酶以及酰胺酶时会降解。特别地,可以控制连接POZ与脂质的酯键以减慢或加速裂解,从而在血浆中从POZ-脂质释放脂质。一些其他的POZ-脂质,特别是具有酰胺键的那些,似乎不会在血浆中降解,但当暴露于某些组织中存在的酰胺酶时会降解。其他POZ-脂质,例如具有胺键的那些,似乎对血浆和酰胺酶均稳定。

[0271] 因此,本公开包括在血浆中稳定的POZ-脂质(例如,胺、酰胺)、可以调节或控制以在血浆中以期望的速率降解的POZ-脂质(例如,酯)以及在血浆中稳定但在特定环境中降解的POZ-脂质。的确,通过仔细选择POZ与脂质之间的连接,可以提供对分解速率的基本上精确的控制。在此方面,本公开的POZ-脂质可在生理介质中具有可控的降解性。例如,在一个实施方案中,连接基团的可控降解性导致在生理介质中稳定的POZ-脂质。在此方面,POZ-脂质的水解速率,即降解POZ-脂质所需的时间(通常以其半衰期来度量),是POZ与脂质之间的连接的稳定性/降解性的指标。在一个方面,POZ聚合物与脂质之间的连接基团使得POZ-脂质在50%人血浆中具有至少约120小时的水解半衰期。

[0272] 在另一个实施方案中,连接基团的可控降解性导致在生理介质中随时间降解的POZ-脂质。在某些方面,POZ聚合物与脂质之间的连接基团使得POZ-脂质在50%人血浆中具有约10分钟或更短的水解半衰期。例如,可选择POZ聚合物与脂质之间的连接基团,使得POZ-脂质在50%人血浆中具有约3分钟至约7分钟的水解半衰期。在其他方面,选择POZ聚合物与脂质之间的连接基团,使得POZ-脂质在50%人血浆中具有约大于约10分钟的水解半衰期。例如,可选择POZ聚合物与脂质之间的连接基团,使得POZ-脂质在50%人血浆中具有约11分钟至约8小时的水解半衰期。在一个实施方案中,POZ-脂质在50%人血浆中具有约2小时至约5小时的水解半衰期。

[0273] 包含POZ-脂质的组合物

[0274] 由于脂质是两亲性的,即它们同时含有疏水性和亲水性部分,故这些分子能够在水性环境中以特定的方式聚集形成层、囊泡和LNP。例如,磷脂是具有这样的两亲性特征的

一类脂质,即磷脂的头基是亲水性的而尾基是疏水性的。亲水头基含有带负电的磷酸酯基团并且可含有其他极性基团。疏水尾基通常包含长脂肪酸烃链。当置于水性环境中时,取决于磷脂的具体性质,磷脂形成多种结构。

[0275] 因此,本公开的POZ-脂质特别适合形成LNP组合物。并且,掺入如本文所述的POZ-脂质缀合物的本公开的LNP组合物提供了优于未掺入本公开的POZ-脂质聚合物的类似LNP组合物的许多优点。例如,本公开的LNP组合物基本上是非免疫原性的。在一个方面,当掺入到如本文所述的LNP组合物中时,本公开的POZ-脂质缀合物不生成显著的免疫应答,包括但不限于生成对POZ特异性的IgM和/或IgG抗体。在另一个方面,当掺入到如本文所述的LNP组合物中时,如与掺入PEG-脂质缀合物的相应LNP组合物相比,本公开的POZ-脂质缀合物生成降低的免疫应答,包括但不限于生成对聚合物部分特异性的IgM和/或IgG抗体。在另一个方面,在第二次施用包含本公开的POZ-脂质缀合物的LNP组合物之后,与第一次施用相比,LNP组合物以至少75%、如80%、85%、90%、95%或更高的浓度存在于受试者的血液或组织中。在另一个方面,包含本公开的POZ-脂质缀合物的LNP组合物不经历加速的血液清除。

[0276] 本公开的任何POZ-脂质缀合物可用于制备根据本公开的LNP组合物。在一个实施方案中,可用本公开的POZ-脂质缀合物和阳离子或可电离脂质中的至少一种形成LNP组合物。例如,可用本公开的POZ-脂质缀合物和阳离子脂质形成组合物。在另一个实施方案中,可用本公开的POZ-脂质缀合物和可电离脂质形成组合物。在仍另一个实施方案中,根据本公开的组合物包含本公开的POZ-脂质缀合物、阳离子或可电离脂质以及能够形成囊泡和/或脂质体(未衍生化脂质)的其他脂质组分(不含聚噁唑啉组分)。合适的未衍生化脂质的实例包括但不限于辅助脂质和稳定组合物的脂质。

[0277] 在一个方面,根据本公开形成的LNP包含本公开的POZ-脂质缀合物、阳离子或可电离脂质和(i)辅助脂质以提供结构支持并促进内吞作用和/或(ii)用于稳定性的甾醇脂质。

[0278] 根据本公开形成的LNP还可包含有效载荷。在此方面,有效载荷可以是寡核苷酸、蛋白质或其组合。例如,在图1中示出的一个具体实施方案中,本公开的LNP可包含(i)可电离脂质;(ii)辅助脂质;(iii)甾醇脂质;(iii)本公开的POZ-脂质;和(iv)寡核苷酸。在另一个具体的实施方案中(未示出),本公开的LNP可包含阳离子脂质、辅助脂质、甾醇脂质、本公开的POZ-脂质和寡核苷酸。在还另一个具体的实施方案中(未示出),本公开的LNP可包含阳离子或可电离脂质、辅助脂质、甾醇脂质、本公开的POZ-脂质和蛋白质。

[0279] 在一个实施方案中,寡核苷酸包含DNA、siRNA、自我复制的mRNA、由经修饰的核苷组成的mRNA和由天然存在的核苷组成的mRNA。在一个方面,寡核苷酸为DNA。在另一个方面,寡核苷酸为siRNA。在仍另一个方面,寡核苷酸为自我复制的mRNA、由经修饰的核苷组成的mRNA或由天然存在的核苷组成的mRNA。

[0280] 在一个实施方案中,当掺入LNP组合物中时,POZ-脂质缀合物以约0.25%至约5%摩尔百分比的摩尔比存在于LNP组合物的脂质层中,以约0.5%至约3%摩尔百分比的摩尔比存在于LNP组合物的脂质层中,以约0.75%至约2%摩尔百分比的摩尔比存在于LNP组合物的脂质层中,或以约0.8%至约1.5%摩尔百分比的摩尔比存在于LNP组合物的脂质层中。

[0281] 适合根据本发明使用的阳离子脂质的一个非限制性实例为1,2-二油酰基-3-三甲基铵-丙烷(DOTAP)。合适的可电离脂质包括但不限于MC3 98、Lipid 319、C12-200、5A2-SC8、3060i10、Moderna Lipid 5、Moderna Lipid H、SM-102、Acuitas A9[59]、Arcturus

Lipid 2,2(8,8)4CCH3、Genevant CL1。在一个实施方案中,如通过TNS染料结合测定法所测量,阳离子或可电离脂质的pKa在6-7的范围内。

[0282] 辅助脂质是指具有疏水和极性头基部分并且可以在水中自发形成双层囊泡的两亲性脂质,例如磷脂,或者稳定地掺入到脂质双层中的两亲性脂质,其中疏水部分与双层膜的内部、疏水区域接触,并且极性头基部分朝向膜的外部、极性表面。这样的辅助脂质通常包含一个或两个疏水酰基烃链或类固醇基团,并且可在极性头基处含有化学反应性基团,如胺、酸、酯、醛或醇。非限制性实例包括磷脂,如磷脂酰胆碱(PC)、磷脂酰乙醇胺(PE)、磷脂酸(PA)、磷脂酰肌醇(PI)和鞘磷脂(SM),其中两个烃链长度通常在约14-22个碳原子之间,并具有不同的不饱和度。其他合适的辅助脂质包括但不限于糖脂,如脑苷脂和神经节苷脂。在一个方面,辅助脂质为1,2-二油酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)、1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DSPC)和POPE(1-棕榈酰-2-油酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺)中的至少一种。

[0283] 一种合适的根据本公开使用的甾醇脂质为胆固醇。在一个特别的实施方案中,根据本公开的LNP包含与以下组合的阳离子或可电离脂质:(i)DSPC;(ii)胆固醇;(iii)本公开的POZ-脂质;和(iv)寡核苷酸。

[0284] 重要的是要注意,对本公开的LNP组合物的改变或添加(即便非常微小)可能不仅影响LNP的结构,而且影响封装的有效载荷的递送。例如,当甾醇脂质如胆固醇与可电离脂质和本公开的POZ-脂质一起包含在LNP组合物中时,所得LNP具有单个双层。如果添加植物甾醇,则LNP的结构会变得更加复杂,并因此可能不同地递送有效载荷。在这方面,包含POZ-脂质缀合物的本公开的组合物可以是单层的或非单层的。

[0285] 根据本公开制备的LNP的粒度可以变化。在一个实施方案中,根据本公开形成的LNP是由一个或多个脂质双层包封水性芯形成的两亲性球形囊泡,尺寸范围为约10nm至约10微米。在另一个实施方案中,根据本公开形成的LNP具有约25nm至约8微米的粒度。在还另一个实施方案中,根据本公开形成的LNP具有约30nm至约5微米的粒度。在此方面,LNP的粒度可在约20nm至约3微米之间。在另一个实施方案中,LNP可在约10nm至约1000nm之间、在约25nm至约500nm之间、在约35nm至约250nm之间、在约40nm至约150nm之间、或在约45nm至约100nm之间。本文公开了尺寸分级的方法。然而,在某些方面,不需要尺寸分级。

[0286] 本公开的LNP组合物可通过多种方法制备。在一个实施方案中,通过反相蒸发方法制备脂质体(Szoka等人.PNAS1978第75卷,4194-4198;Smirnov等人.,Byulleten' Éksperimental'noi Biologiii Meditsiny,1984,第98卷,第249-252页;美国专利号4,235,871)。在此方法中,将形成脂质体的脂质的有机溶液(其可包含聚噁唑啉-脂质缀合物,具有或不具有连接的靶分子)与较小体积的水性介质混合,并将混合物分散形成油包水乳液,优选使用无热原组分。在亲脂性靶分子的情况下,将待递送的靶分子添加到脂质溶液中,或者在水溶性靶分子的情况下,将待递送的靶分子添加到水性介质中。通过蒸发除去脂质溶剂,并将所得凝胶转化为脂质体。反相蒸发囊泡(REV)具有约0.2-0.4微米之间的典型平均尺寸并且主要是寡层状的,即含有一个或几个脂质双层壳。如下文所讨论的,可通过挤出容易地确定REV的尺寸,以得到具有选定尺寸(优选在约0.05至0.2微米之间)的寡层状囊泡。

[0287] 另外,可以产生多层状囊泡(MLV)。在此方法中,将如本文所述的形成脂质体的脂

质的混合物(其可包含聚噁唑啉-脂质缀合物,具有或不具有连接的靶分子)溶解在合适的溶剂中并在容器中蒸发形成薄膜。然后用水性介质覆盖该薄膜。脂质膜水合形成MLV。MLV通常表现出约0.1至10微米之间的尺寸。可通过挤出和本文描述的其他方法将MLV的尺寸减小到期望的尺寸范围。

[0288] 对于REV和MLV,一种有效的确定尺寸的方法涉及将脂质体的水性悬浮液通过具有选定的均匀孔隙尺寸的聚碳酸酯膜挤出,所述孔隙尺寸通常为0.05、0.08、0.1、0.2或0.4微米(Szoka等人PNAS1978第75卷,4194-4198)。膜的孔隙尺寸大致对应于通过该膜挤出而产生的脂质体的最大尺寸,特别是在制剂通过同一膜挤出两次或更多次的情况下。Zhu等人(PLoS One.2009;4(4):e5009.Epub 2009Apr 6)提供了确定较大尺寸MLV的尺寸的方法。

[0289] 当需要小粒度时,可以对REV或MLV制剂进行处理以产生小的单层状囊泡(SUV),其特征在于尺寸在0.04-0.08微米范围内。这样的颗粒可用于靶向肿瘤组织或肺组织,在这里,颗粒可通过毛细血管壁被吸收(大于0.1微米的颗粒可能不会被吸收)。

[0290] 此外,可在使用上述技术形成脂质体之后将POZ-脂质缀合物引入到LNP组合物中。在此方法中,将预先形成的脂质体在POZ-脂质缀合物的存在下温育;POZ-脂质缀合物通过扩散掺入到脂质体中。可监测溶液中游离的或被脂质体摄取的POZ-脂质缀合物的浓度,并在达到LNP组合物中POZ-脂质缀合物的期望浓度时终止该过程。温育溶液可含有表面活性剂或其他试剂以促进POZ-脂质缀合物向LNP组合物中的扩散。

[0291] 可在使用之前处理LNP组合物以除去外来组分。例如,如果如上文所讨论使用表面活性剂,则可在使用之前除去过量的表面活性剂。另外,当有效载荷如上文所讨论的寡核苷酸被包埋在LNP组合物中时,可在使用之前除去过量或未包埋的有效载荷。完成该任务的分离技术是本领域已知的,并且所选择的具体方法可取决于待除去的组分的性质。合适的方法包括但不限于离心、透析和分子筛色谱法。该组合物可以通过常规的0.22微米深度过滤器过滤来灭菌。

[0292] LNP可以通过传统方法制备,该方法涉及含有POZ-脂质缀合物、可电离脂质、辅助脂质和胆固醇的脂质膜的水合。此过程涉及将这些材料溶解在有机溶剂如氯仿或二氯甲烷中并然后蒸发溶剂以产生薄膜。然后用含有药物或核酸的水性缓冲液水合该膜以被动封装有效载荷。通常形成具有低封装度的非均质颗粒的LNP,这需要通过挤出或超声来减小尺寸。

[0293] 另一种合适的技术使用采用微流化器的快速混合。通过将脂质溶解在有机溶剂如乙醇中来制备脂质储备溶液。水性储备溶液含有溶解在已知pH、离子强度和缓冲容量的缓冲溶液中的核酸。两种储备溶液以预定的速率通过微混合器以允许阳离子脂质与带负电的核酸相互作用,从而产生更高的封装效率(即,>90%)和均匀的尺寸分布。混合过程期间水对有机溶剂的比率很重要。通过透析、切向流过滤或离心或其他技术来除去有机溶剂。通过控制微流控操作参数来产生限定尺寸的LNP,从而产生低多分散性和均匀粒度的LNP。LNP的平均颗粒直径(<100nm)、多分散性(<0.40,更特别地,<0.20)和ζ电位是用于表征制剂的三种方法。

[0294] 可以改变POZ-脂质对离子脂质对胆固醇的比率以实现最佳尺寸、高有效载荷释放和转染以及改善的水合制剂稳定性。在一个实施方案中,LNP中POZ-脂质的摩尔百分比为约0.5%至60%。在另一个实施方案中,POZ-脂质的摩尔百分比为约1%至约40%。在还另一个

实施方案中,POZ-脂质以约小于LNP中脂质总量的10％的量存在。在此方面,POZ-脂质可以约0.5％至约5％、约1％至约4％、或约1.5％至约3.5％的量存在。在此方面,LNP组合物的其余部分可以是约35％至约50％的甾醇脂质、约30％至约70％的阳离子脂质和约5％至约15％的辅助脂质。

[0295] 在一个实施方案中,LNP组合物包含封装水性芯的脂质双层,其中脂质双层包含至少一种POZ-脂质缀合物,其中POZ的平均分子量在约0.5至5kDa之间并且水性芯包含寡核苷酸。在另一个实施方案中,LNP组合物包含封装水性芯的脂质双层,其中脂质双层包含至少一种POZ-脂质缀合物,其中POZ的平均分子量在约2至5kDa之间并且水性芯包含寡核苷酸。

[0296] 寡核苷酸可以以高效率封装到LNP中。在一个实施方案中,寡核苷酸以至少90％的效率封装到LNP中。在另一个实施方案中,寡核苷酸以约90％至约99％的效率封装到LNP中。在仍另一个实施方案中,寡核苷酸以约90％至约95％的效率封装到LNP中。在仍另一个实施方案中,寡核苷酸以大于约95％的效率封装到LNP中。

[0297] 施用

[0298] 本公开的LNP可被递送至细胞。在体内施用LNP后,释放寡核苷酸。在此方面,本公开的LNP可包含在能够引发对病症或疾病的治疗的药物组合物中。例如,包含根据本公开制备的LNP的药物组合物可用于预防或治疗传染病,包括但不限于SARS-CoV-2、狂犬病、流感等。另外,包含根据本公开制备的LNP的药物组合物可用作癌症和遗传疾病的治疗剂。除了LNP之外,这样的药物组合物还可包含药学上可接受的载体。

[0299] 在一个实施方案中,可以将包含有效量的本公开的LNP的药物组合物递送至动物。在此方面,有效量的本公开的LNP的递送可经由皮下、静脉内、肌内、皮内或气溶胶途径进行。在一个实施方案中,动物为人。

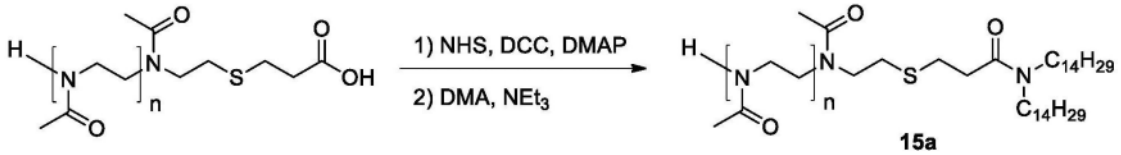
[0300] 实施例

[0301] 以下非限制性实施例仅示意本发明的优选实施方案,并且不应解释为限制本发明,本发明的范围由附随的权利要求书限定。

[0302] 材料

[0303] 1,2-二肉豆蔻酰-rac-甘油(DMG)购自Bachem。PEOZ-炔丙基酰胺2K、3-叠氮丙酰氯、3-(2-氨基乙氧基)丙烷-1,2-二醇由Serina Therapeutics,Inc.合成。Solketal(1,2-异亚丙基甘油)、肉豆蔻酸、碘化铜(I)、三乙胺(TEA)和无水吡啶购自Sigma-Aldrich。无水硫酸钠、无水硫酸镁、四氢呋喃(THF)、二氯甲烷(DCM)、乙腈(ACN)和乙醚购自EMD Millipore。氯化钠(NaCl)购自Fluka。Ambersep M4195(或Dowex M4195)购自Supelco。用于柱纯化的SNAP Ultra 25g柱和Isolera System购自Biotage。

[0304] 实施例1.PMOZ-二肉豆蔻酰胺(2.2kD的化合物15a)的合成。

[0305] 

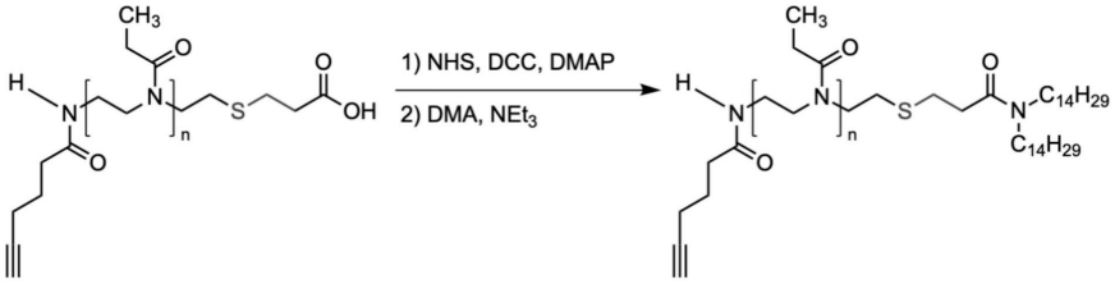
15a

[0306] 在氩气氛下向经烘干的250-mL圆底烧瓶中加入PMOZ-COOH(12.00克,5.45mmol,1.00当量),然后加入DCM(50mL)、N-羟基琥珀酰亚胺(1.25克,10.9mmol,2.00当量),最后加入DMAP(0.033克,0.28mmol,0.05当量)。一次性加入DCC(2.25g,10.9mmol,2.00当量),并让

所得溶液于室温搅拌至少12小时。在该时间段之后,将反应混合物通过粗烧结玻璃筛板(glass frit)过滤,随后用另外的DCM冲洗筛板。然后将所得溶液缓慢转移至含有搅拌的Et_2O溶液(2000mL)的烧杯中。经由真空过滤收集沉淀物,并将固体在真空下干燥。然后在氩气氛下将固体溶到配备有搅拌棒的干燥的250mL圆底烧瓶中的DCM(50mL)中。然后向反应混合物中加入二肉豆蔻胺(4.46g,10.9mmol,2.00当量),随后加入NEt_3(1.52mL,10.9mmol,2.00当量),并让反应混合物于室温搅拌至少12小时。经过该时间段后,将反应混合物沉淀到含有搅拌的2000mL乙醚溶液的烧杯中。经由真空过滤收集固体并在真空下干燥。然后将固体溶解在200mL去离子水中并通过含有200克Amberlite IR-67和200克Amberlite IR-120H的amberlite柱。收集滤液直至水溶液显示PAA测试阴性。然后将所得溶液通过1000mL DEAE柱,用去离子水洗脱,直至PAA测试显示阴性结果。将所得水溶液在旋转蒸发器上浓缩至干。将残余物溶到二氯甲烷(100mL)中,用硫酸钠干燥并沉淀到含有搅拌的2000mL Et_2O溶液的烧杯中。经由真空过滤收集固体并在真空下干燥,得到10.9克标题化合物。

[0307] ^1H NMR分析显示PMOZ的标准主链信号(500MHz,DMSO)δ7.92(m,NH末端信号);3.34(CH_2CH_2主链);3.21(N-CH_2);2.75-2.72(S-CH_2);1.98(-CH_3);1.80(CH_2-CO_2R)。在δ1.49-1.41(N-(CH_2)$_2$);1.24(CH_2);0.85(CH_3)处存在脂质部分的额外信号。

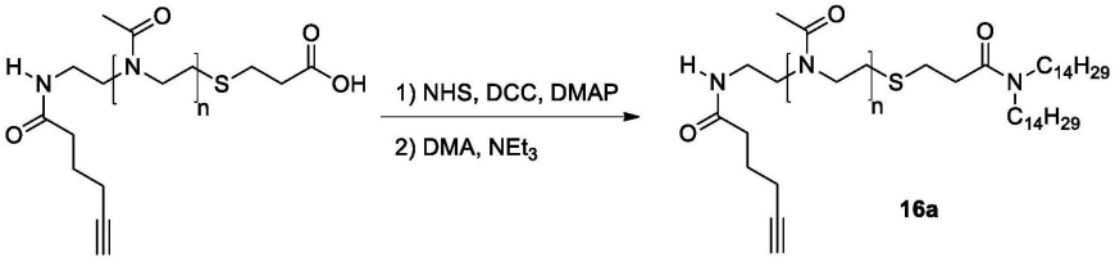
[0308] 实施例2.PEOZ(2.2kD)-二肉豆蔻酰胺-2.2kD的化合物2b。

[0309] 

[0310] 经由用来制备化合物15B的相同程序来制备化合物2B。在此重复中,分离出1.3克材料。

[0311] ^1H NMR。HNMR分析显示PEOZ的标准主链信号(500MHz,CDC13)δ3.64(CH2CH2主链);3.27(N-CH2);2.72(S-CH2);2.32-2.19(C(O)-CH2);1.12(CH3)。在δ1.49-1.54(N-(CH2)2);1.27(CH2);0.87(CH3)处存在脂质部分的额外信号。在δ1.65ppm(CH2)处存在侧挂基团的信号。先前从聚合物起始材料计算出侧挂基团的数目为1.21。

[0312] 实施例3-PMOZ-二肉豆蔻酰胺的合成,化合物16a,1.3个侧挂,2.2kD。

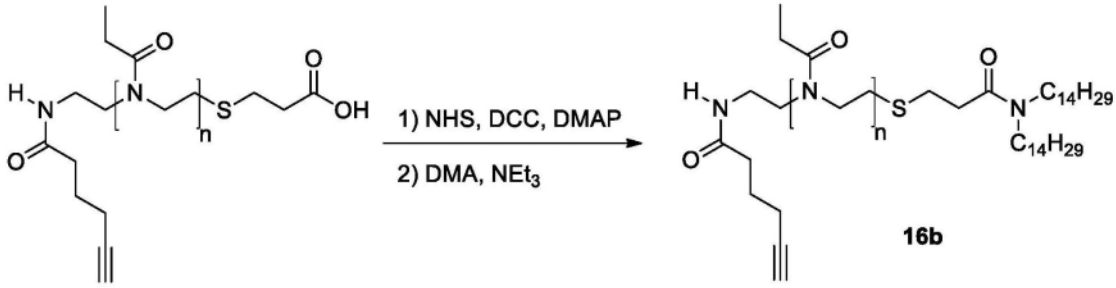
[0313] 

[0314] 以与上面针对PMOZ 2.2kD二肉豆蔻酰胺所述类似的方式制备该化合物。分离出7.7g。

[0315] ^1H NMR分析显示PMOZ的标准主链信号(500MHz,DMSO)δ7.90(m,NH末端信号);3.33(CH_2CH_2主链);3.21(N-CH_2);2.75-2.72(S-CH_2);1.98(-CH_3);1.80(CH_2-CO_2R)。在δ1.49-

1.41(N-$(CH_2)_2$);1.24((CH_2));0.85((CH_3)处存在脂质部分的额外信号。在δ1.65ppm((CH_2)处存在侧挂基团的信号。经由聚合物主链的积分与侧挂基团的信号的比较来计算侧挂基团的数目。在此情况下,侧挂基团的数目被确定为1.35。

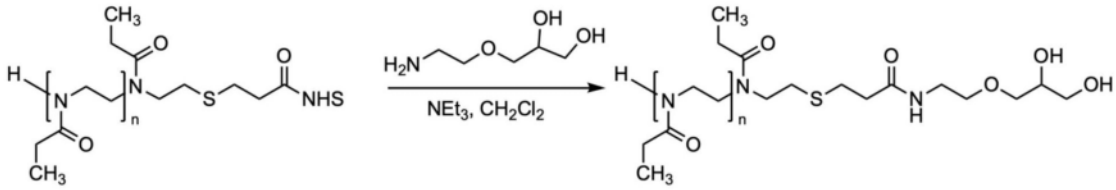
[0316] 实施例4.PEOZ-二肉豆蔻酰胺的合成,化合物16b,1.5个侧挂,2.2kD。

[0317] 

[0318] 以与上面针对PEOZ 2.2kD二肉豆蔻酰胺所述类似的方式制备该化合物。分离出7.0g。

[0319] ^{1}H NMR分析显示PEOZ的标准主链信号(500MHz,$CDCl_3$)δ3.64(CH_2CH_2主链);3.27(N-CH_2);2.72(S-CH_2);2.32-2.19(C(O)-CH_2);1.12(CH_3)。在δ1.49-1.54(N-$(CH_2)_2$);1.27((CH_2));0.87((CH_3)处存在脂质部分的额外信号。在δ1.65ppm((CH_2)处存在侧挂基团的信号。经由聚合物主链的积分与侧挂基团的信号的比较来计算侧挂基团的数目。在此情况下,侧挂基团的数目被确定为1.50。

[0320] 实施例5.PEOZ-二肉豆蔻酰甘油醚的合成,化合物17b,5kD。

[0321] 

[0322] 在氩气氛下将NHS酯(2.6克,0.49mmol,1.00当量,如美国专利7,943,141中那样合成)溶到配备有搅拌棒的干燥的250mL圆底烧瓶中的DCM(30mL)中。然后向反应混合物中加入3-(2-氨基乙氧基)丙烷-1,2-二醇(0.200克,1.48mmol,3.00当量)和NEt_3(0.68mL,4.9mmol,10当量)在3mL DMF中的溶液,并让反应混合物于室温搅拌至少12小时。经过该时间段后,将反应混合物沉淀到含有搅拌的2000mL乙醚溶液的烧杯中。经由真空过滤收集固体并在真空下干燥。分离出2.3克材料。

[0323] ^{1}H NMR分析显示PEOZ的标准主链信号(500MHz,DMSO)δ7.82(末端NH);3.35(CH_2CH_2主链);3.18(N-CH_2);3.02(S-CH_2);2.32-2.27(C(O)-CH_2);0.96((CH_3)。在δ4.59(OH)和4.46(OH)处存在双-羟基酰胺部分的额外信号。

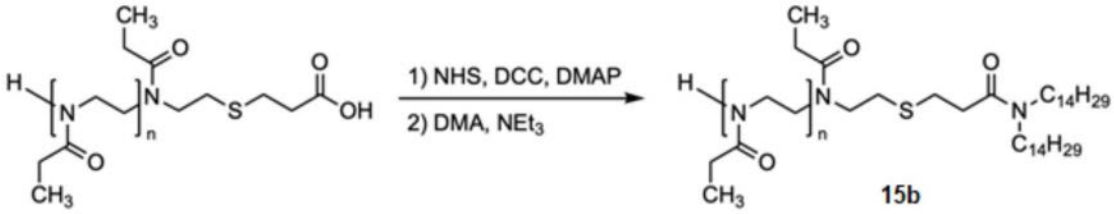
[0324] 

[0325] 在氩气氛下将上述酰胺(2.3克,0.43mmol,1.00当量)加到100mL圆底烧瓶中。将材料溶解在30mL DCM中。加入肉豆蔻酸(0.49克,2.123mmol,5.00当量),随后加入DMAP(0.01g,0.09mmol,0.2当量),最后加入DCC(0.44克,2.13mmol,5.00当量),并让反应混合物

在氩气氛下搅拌过夜。第二天早上,将反应混合物过滤并沉淀到含有1600mL乙醚的烧杯中。经由真空过滤收集固体。产物经由反相C18色谱柱使用乙腈和甲醇作为洗脱剂纯化,得到标题化合物(1.2克)。

[0326] ^{1}H NMR分析显示PEOZ的标准主链信号(500MHz,DMSO)δ7.82(末端NH);3.35(CH_2CH_2主链);3.18(N-CH_2);3.02(S-CH_2);2.32-2.27(C(O)-CH_2);0.96(CH_3)。在δ5.10(CH);4.25(CH_2);4.08(CH_2);1.48(C(O)CH_2);1.22(CH_2);0.84(CH_3)处存在脂质衍生物部分的额外信号

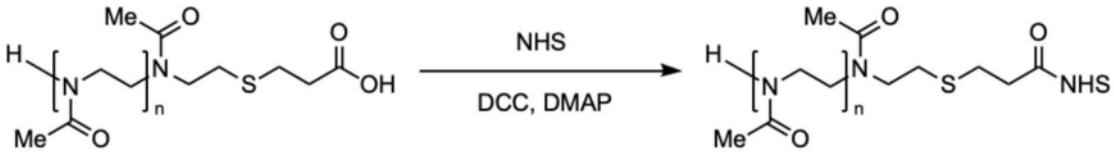
[0327] 实施例6.化合物15b的合成。

[0328] 

[0329] 在氩气氛下向经烘干的250-mL圆底烧瓶中加入PEOZ-COOH(7.00克,3.18mmol,1.00当量),然后加入DCM(50mL)、N-羟基琥珀酰亚胺(0.48克,4.14mmol,1.30当量),最后加入DMAP(0.04克,0.31mmol,0.1当量)。一次性加入DCC(0.854g,4.14mmol,1.30当量),并让所得溶液于室温搅拌至少12小时。在该时间段之后,将反应混合物通过粗烧结玻璃筛板过滤,随后用另外的DCM冲洗筛板。然后将所得溶液缓慢转移至含有搅拌的Et_2O溶液(2000mL)的烧杯中。经由真空过滤收集沉淀物,并将固体在真空下干燥。然后在氩气氛下将固体溶到配备有搅拌棒的干燥的250mL圆底烧瓶中的DCM(50mL)中。然后向反应混合物中加入二肉豆蔻胺(2.6g,6.36mmol,2.00当量),随后加入NEt_3(0.89mL,6.36mmol,2.00当量),并让反应混合物于室温搅拌至少12小时。经过该时间后,将反应混合物沉淀到含有搅拌的2000mL己烷溶液的烧杯中。经由真空过滤收集固体并在真空下干燥。然后将固体溶解在200mL去离子水中并通过含有200克Amberlite IR-67和200克Amberlite IR-120H的amberlite柱。将所得水溶液在旋转蒸发器上浓缩至干。将残余物溶到二氯甲烷(100mL)中,用硫酸钠干燥并浓缩,得到4.5克标题化合物。

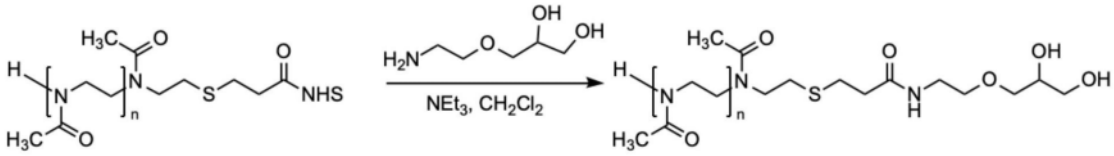
[0330] ^{1}H NMR分析显示PEOZ的标准主链信号(500MHz,$CDCl_3$)δ3.64(CH_2CH_2主链);3.27(N-CH_2);2.72(S-CH_2);2.32-2.19(C(O)-CH_2);1.12(CH_3)。在δ1.49-1.54(N-(CH_2)$_2$);1.27(CH_2);0.87(CH_3)处存在脂质部分的额外信号

[0331] 实施例7.化合物17a的合成。

[0332] 

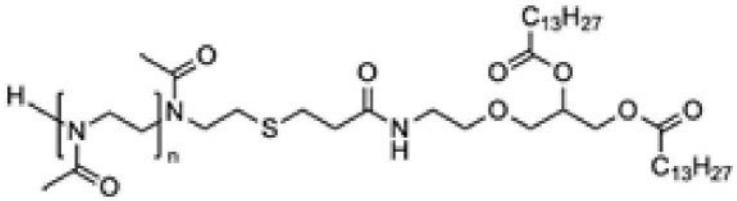
[0333] 以与上文针对PEOZ 5K NHS所述类似的方式制备PMOZ 5KNHS酯。分离出3.0克。

[0334] ^{1}H NMR分析显示PMOZ的标准主链信号(500MHz,DMSO)δ7.92(m,NH末端信号);3.34(CH_2CH_2主链);3.21(N-CH_2);2.75-2.72(S-CH_2);1.98(-CH_3);1.80(CH_2-CO_2R)。在δ2.81(CH_2)处存在NHS部分的额外信号。

[0335] 

[0336] 以与上文所述类似的方式制备PMOZ 5K酰胺。HNMR分析揭示产物材料是产物与起始NHS酯的～50:50的不可分离混合物。该混合物不经进一步纯化即转到下一步。

[0337] ^{1}H NMR分析显示PMOZ的标准主链信号(500MHz,DMSO)δ7.92(m,NH末端信号);3.34(CH_2CH_2主链);3.21(N-CH_2);2.75-2.72(S-CH_2);1.98(-CH_3);1.80(CH_2-CO_2R)。在δ4.61(CH)和4.48(CH_2)处存在二醇部分的额外信号。

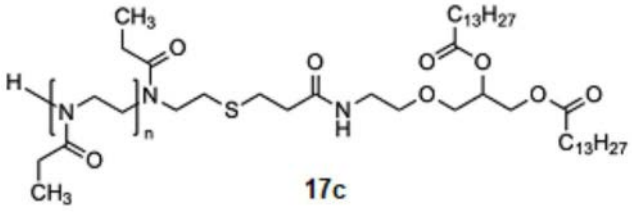
[0338] 

17a

[0339] 以与上文所述类似的方式制备PMOZ 5k二肉豆蔻酰甘油醚。分离出740mg。

[0340] ^{1}H NMR。HNMR分析显示PMOZ的标准主链信号(500MHz,DMSO)δ7.92(m,NH末端信号);3.34(CH_2CH_2主链);3.21(N-CH_2);2.75-2.72(S-CH_2);1.98(-CH_3);1.80(CH_2-CO_2R)。在δ5.10(CH);4.26(CH_2);4.08(CH_2);1.49(C(O)CH_2);1.23(CH_2);0.84(CH_3)处存在脂质衍生物部分的额外信号

[0341] 实施例8.化合物17c的合成。

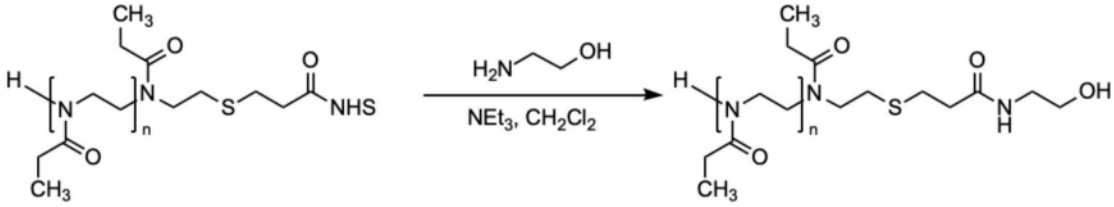
[0342] 

17c

[0343] 以与针对PEOZ 5K二肉豆蔻酰甘油醚所述相同的方式制备PEOZ 2K二肉豆蔻酰甘油醚。

[0344] ^{1}H NMR分析显示PEOZ的标准主链信号(500MHz,DMSO)δ7.82(末端NH);3.35(CH_2CH_2主链);3.18(N-CH_2);3.02(S-CH_2);2.32-2.27(C(O)-CH_2);0.96(CH_3)。在δ5.10(CH);4.25(CH_2);4.08(CH_2);1.48(C(O)CH_2);1.22(CH_2);0.84(CH_3)处存在脂质衍生物部分的额外信号。

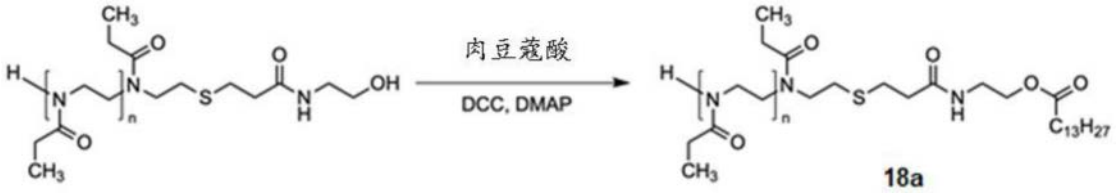
[0345] 实施例9.化合物18a的合成。

[0346] 

[0347] 在氩气氛下将NHS酯(先前描述的合成,1.4克,0.67mmol,1.00当量)溶到配备有搅拌棒的干燥的250mL圆底烧瓶中的DCM(30mL)中。然后向反应混合物中加入乙醇胺(0.15mL,

2.00mmol,3.00当量),随后加入三乙胺(0.28mL,2.00mmol,3.00当量),并让反应混合物于室温搅拌至少12小时。经过该时间段后,将反应混合物沉淀到含有搅拌的1500mL乙醚溶液的烧杯中。经由真空过滤收集固体并在真空下干燥。分离出1.1克材料。

[0348] ^{1}H NMR分析显示PEOZ的标准主链信号(500MHz,DMSO)δ7.82(末端NH);3.35(CH_2CH_2主链);3.18(N-CH_2);3.02(S-CH_2);2.32-2.27(C(O)-CH_2);0.96(CH_3)。在δ4.63(OH);3.08(N-CH_2);2.69(HO-CH_2)处存在乙醇胺酰胺的额外信号。

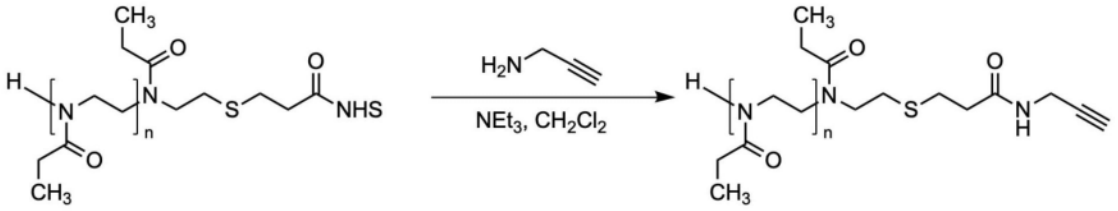
[0349] 

18a

[0350] 在氩气氛下将上述酰胺(1克,0.45mmol,1.00当量)加到100mL圆底烧瓶中。将材料溶解在30mL DCM中。加入肉豆蔻酸(0.52克,2.27mmol,5.00当量),随后加入DMAP(0.01g,0.09mmol,0.2当量),最后加入DCC(0.47克,2.27mmol,5.00当量),并让反应混合物在氩气氛下搅拌过夜。第二天早上,将反应混合物过滤并沉淀到含有1600mL乙醚的烧杯中。经由真空过滤收集固体。产物经由反相C18色谱柱使用乙腈和甲醇作为洗脱剂纯化,得到标题化合物(0.740克)。

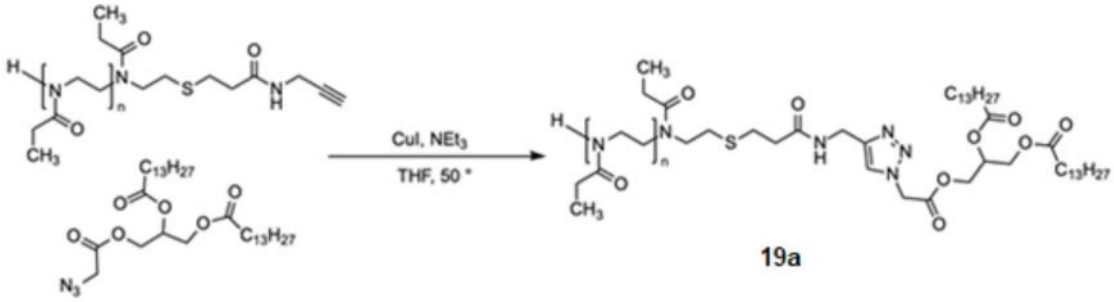
[0351] ^{1}H NMR分析显示PEOZ的标准主链信号(500MHz,$CDCl_3$)δ3.45(CH_2CH_2主链);2.74(S-CH_2);2.40-2.30(C(O)-CH_2);1.12(CH_3)。在δ4.10(O-CH_2);2.85(N-CH_2);1.99(脂质CH_2);1.58(脂质CH_2);1.24(脂质CH_2);0.87(脂质CH_3)处存在脂质部分的额外信号。

[0352] 实施例10.化合物19a的合成。

[0353] 

[0354] 在氩气氛下将NHS酯(先前描述的合成,6.00克,2.86mmol,1.00当量)溶到配备有搅拌棒的干燥的250mL圆底烧瓶中的DCM(100mL)中。然后向反应混合物中加入炔丙基胺(0.55mL,8.57mmol,3.00当量),随后加入三乙胺(1.19mL,8.57mmol,3.00当量),并让反应混合物于室温搅拌至少12小时。经过该时间段后,将反应混合物沉淀到含有搅拌的2500mL乙醚溶液的烧杯中。经由真空过滤收集固体并在真空下干燥。分离出1.8克材料。

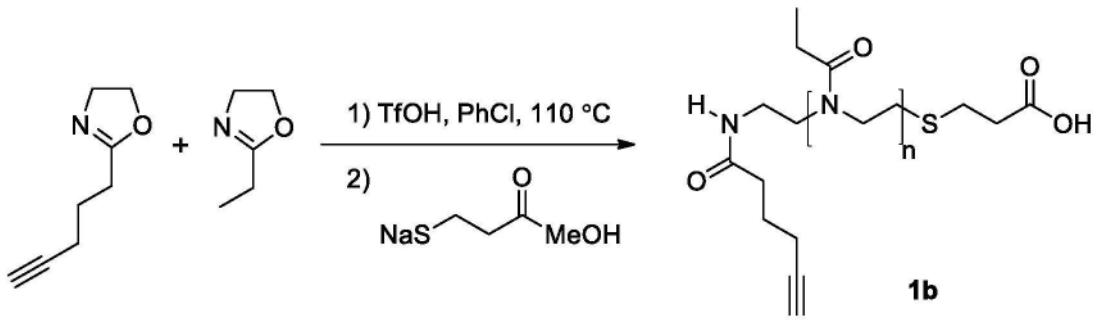
[0355] ^{1}H NMR分析显示PEOZ的标准主链信号(500MHz,DMSO)δ7.82(末端NH);3.35(CH_2CH_2主链);3.18(N-CH_2);3.02(S-CH_2);2.32-2.27(C(O)-CH_2);0.96(CH_3)。在δ3.85(N-CH_2);3.75(CCH)处存在炔丙基酰胺的额外信号。

[0356] 

[0357] 向100mL圆底烧瓶中加入上述酰胺(0.92g,0.44mmol,1.00当量),然后加入叠氮乙酸酯(0.39g,0.66mmol,1.50当量)、THF(50mL)、CuI(0.34g,1.76mmol,4.00当量),最后加入三乙胺(0.62mL,4.40mmol,10.0当量)。将所得混合物加热至50℃并搅拌过夜。此后,将反应混合物冷却至室温,经由添加0.1M HCl(30mL)来淬灭并搅拌10分钟。将所得混合物通过预先准备的60mL Dowex柱。将所得溶液在旋转蒸发器上于35℃浓缩,随后转移至分液漏斗。添加盐水(20mL),并用20mL份的DCM将混合物萃取3次。合并有机萃取物,用硫酸钠干燥,并真空浓缩。产物经由反相C18色谱柱使用乙腈和甲醇作为洗脱剂纯化,得到标题化合物(0.540克)。

[0358] ^{1}H NMR分析显示PEOZ的标准主链信号(500MHz,$CDCl_3$)δ7.71(NH末端);3.45(CH_2CH_2主链);2.72(S-CH_2);2.40-2.30(C(O)-CH_2);1.12(CH_3)。在δ5.16(CH);4.43(CH_2);4.11(CH_2);2.29(N-CH_2);1.61(脂质CH_2);1.25(脂质CH_2);0.88(脂质CH_3)处存在脂质部分的额外信号。在δ5.29(三唑CH);4.53(酯CH_2);4.23(HN-CH_2)处存在三唑部分的额外信号。

[0359] 实施例11.化合物1b的合成。

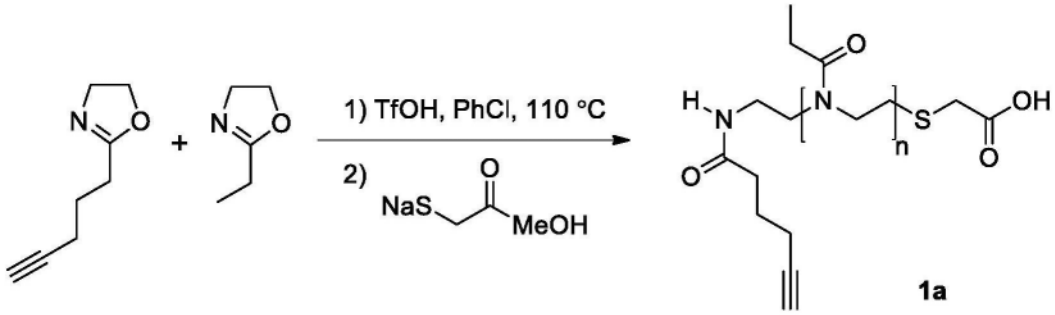
[0360] 

[0361] 在氩气氛下,向经烘干的500mL圆底烧瓶中加入PhCl(300mL),随后加入搅拌棒和2-(5-戊炔基)-2-噁唑啉(5.40mL,39.79mmol,1.20当量)。逐滴加入TfOH(2.94mL,33.16mmol,1.00当量),并让混合物于室温搅拌10分钟。在此时间段之后,加入2-乙基-2-噁唑啉(60.15g,605.3mmol,18.30当量),并将所得混合物于室温搅拌10分钟。然后将反应温热至110℃并搅拌35分钟。向单独的经烘干的1000mL圆底烧瓶中加入PhCl(300mL),随后加入NaH(3.97g,在油中的60%分散体,99.22mmol,3.00当量)。然后逐滴加入3-巯基丙酸甲酯(22.00mL,198.42mmol,6.00当量),并在使用之前让混合物搅拌至少5小时。然后将聚合混合物冷却至室温并随后在氩气氛下经10分钟时间段转移至封端混合物。让反应混合物于室温搅拌至少12小时。此后,减压浓缩反应混合物。加入0.1M $NaOH_{(aq.)}$(1000mL),并将混合物搅拌2小时。将所得水溶液通过Amberlite IRA-67(200g)和Amberlite IR120H(200克)的混合柱。产物酸经由DEAE Sepharose色谱法纯化,将所得水溶液酸化至pH=3,用CH_2Cl_2(2×300mL)萃取,合并的有机物用硫酸钠干燥并浓缩至300mL的体积。然后将溶液沉淀到含有

3500mL Et_2O的4L烧杯中,经由真空过滤收集固体并在真空下干燥,得到46.2克产物。

[0362] ^1H NMR分析显示PEOZ的标准主链信号(500MHz,DMSO)δ7.82(末端NH);3.35(CH_2CH_2主链);3.18(N-CH_2);3.02(S-CH_2);2.32-2.27(C(O)-CH_2);0.96(CH_3)。在δ1.65ppm(CH_2)处存在侧挂基团的信号。经由聚合物主链的积分与侧挂基团的信号的比较来计算侧挂基团的数目。在此情况下,侧挂基团的数目被确定为1.21。

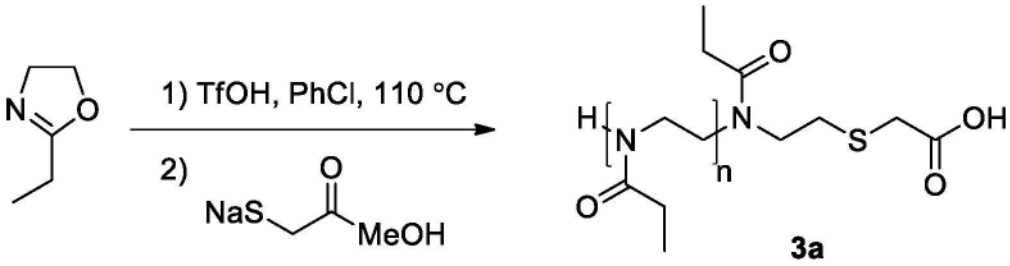
[0363] 实施例12.化合物1a的合成。

[0364] 

[0365] 在氩气氛下,向经烘干的500mL圆底烧瓶中加入PhCl(300mL),随后加入搅拌棒和2-(5-戊炔基)-2-噁唑啉(2.70mL,19.85mmol,1.20当量)。逐滴加入TfOH(1.46mL,16.54mmol,1.00当量),并让混合物于室温搅拌10分钟。在此时间段之后,加入2-乙基-2-噁唑啉(30.0g,302.63mmol,18.30当量),并将所得混合物于室温搅拌10分钟。然后将反应温热至110℃并搅拌35分钟。向单独的经烘干的1000mL圆底烧瓶中加入PhCl(150mL),随后加入NaH(1.98g,在油中的60%分散体,49.61mmol,3.00当量)。然后逐滴加入巯基乙酸甲酯(8.86mL,99.24mmol,6.00当量),并在使用之前让混合物搅拌至少5小时。然后将聚合混合物冷却至室温并随后在氩气氛下经10分钟时间段转移至封端混合物。让反应混合物于室温搅拌至少12小时。此后,减压浓缩反应混合物。加入0.1M $NaOH_{(aq.)}$(1000mL),并将混合物搅拌2小时。将所得水溶液通过Amberlite IRA-67(200g)和Amberlite IR120H(200克)的混合柱。产物酸经由DEAE Sepharose色谱法纯化,将所得水溶液酸化至pH=3,用CH_2Cl_2(2×300mL)萃取,合并的有机物用硫酸钠干燥并浓缩至300mL的体积。然后将溶液沉淀到含有3500mL Et_2O的4L烧杯中,经由真空过滤收集固体并在真空下干燥,得到27.6克产物。

[0366] ^1H NMR分析显示PEOZ的标准主链信号(500MHz,DMSO)δ7.82(末端NH);3.35(CH_2CH_2主链);3.18(N-CH_2);2.32-2.27(C(O)-CH_2);0.96(CH_3)。封端基团的α-亚甲基据推断位于聚合物主链的信号下方。在δ1.65ppm(CH_2)处存在侧挂基团的信号。经由聚合物主链的积分与侧挂基团的信号的比较来计算侧挂基团的数目。在此情况下,侧挂基团的数目被确定为1.32。

[0367] 实施例13.化合物3a的合成。

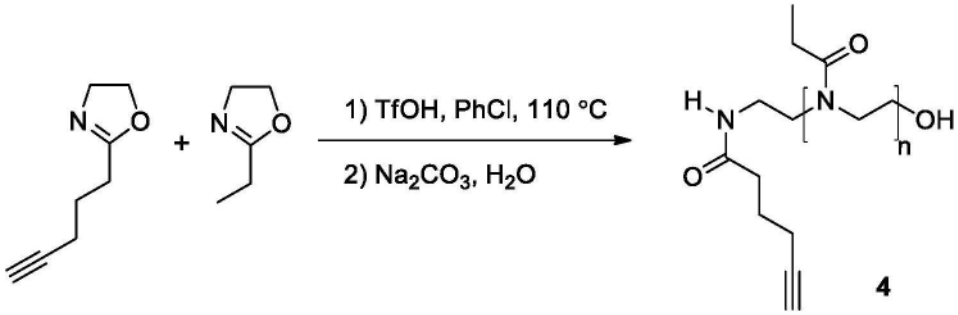
[0368] 

[0369] 在氩气氛下,向经烘干的500mL圆底烧瓶中加入2-乙基-2-噁唑啉(32.14g,

324.22mmol,19.00当量),然后加入PhCl(150mL)和搅拌棒。逐滴加入TfOH(1.51mL,17.06mmol,1.00当量),并让混合物于室温搅拌5分钟。然后将反应温热至110℃并搅拌35分钟。向单独的经烘干的1000mL圆底烧瓶中加入PhCl(150mL),随后加入NaH(1.91g,在油中的60%分散体,47.8mmol,3.00当量)。然后逐滴加入巯基乙酸甲酯(8.55mL,95.60mmol,6.00当量),并在使用之前让混合物搅拌至少5小时。然后将聚合混合物冷却至室温并随后在氩气氛下经10分钟时间段转移至封端混合物。让反应混合物于室温搅拌至少12小时。在此时间段之后,减压浓缩反应混合物。加入0.1M $NaOH_{(aq.)}$(1000mL),并将混合物搅拌2小时。将所得水溶液通过Amberlite IRA-67(200g)和Amberlite IR120H(200克)的混合柱。产物酸经由DEAE Sepharose色谱法纯化,将所得水溶液酸化至pH=3,用CH_2Cl_2(2×300mL)萃取,合并的有机物用硫酸钠干燥并浓缩至300mL的体积。然后将溶液沉淀到含有3500mL Et_2O的4L烧杯中,经由真空过滤收集固体并在真空下干燥,得到8.0克产物。

[0370] ^1H NMR分析显示PEOZ的标准主链信号(500MHz,DMSO)δ7.82(末端NH);3.35(CH_2CH_2主链);3.18(N-CH_2);2.32-2.27(C(O)-CH_2);0.96(CH_3)。封端基团的α-亚甲基据推断位于聚合物主链的信号下方。

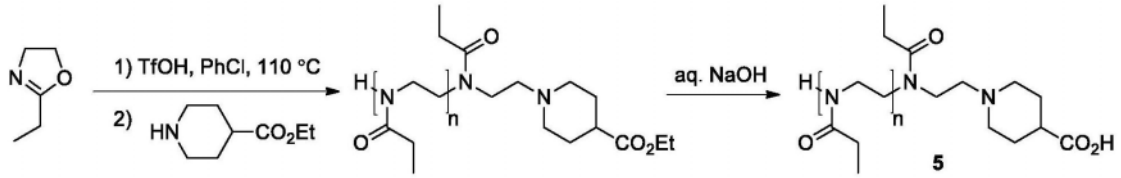
[0371] 实施例14.化合物4的合成。

[0372] 

[0373] 在氩气氛下,向经烘干的500mL圆底烧瓶中加入PhCl(300mL),随后加入搅拌棒和2-(5-戊炔基)-2-噁唑啉(5.47mL,40.27mmol,1.20当量)。逐滴加入TfOH(2.97mL,33.56mmol,1.00当量),并让混合物于室温搅拌10分钟。在此时间段之后,加入2-乙基-2-噁唑啉(60.88g,614.14mmol,18.30当量),并将所得混合物于室温搅拌10分钟。然后将反应温热至110℃并搅拌35分钟。然后将聚合混合物冷却至室温并加入Na_2CO_3(22.5g,212.3mmol,7.00当量)在H_2O(400mL)中的水溶液。让反应混合物搅拌至少12小时。在此时间段之后,将反应混合物转移至分液漏斗并用盐水(400mL)稀释。所得混合物用CH_2Cl_2(2×300mL)萃取,合并的有机物浓缩至300mL的体积。然后将溶液沉淀到含有3500mL Et2O的4L烧杯中,经由真空过滤收集固体并在真空下干燥,得到57克产物。

[0374] ^1H NMR分析显示PEOZ的标准主链信号(500MHz,DMSO)δ7.82(末端NH);4.83-4.65(CH_2CH_2OH末端);3.35(CH_2CH_2主链);3.18(N-CH_2);2.32-2.27(C(O)-CH_2);0.96(CH_3)。在δ1.65ppm(CH_2)处存在侧挂基团的信号。先前从聚合物起始材料计算出侧挂基团的数目为1.13。

[0375] 实施例15.化合物5的合成。

[0376] 

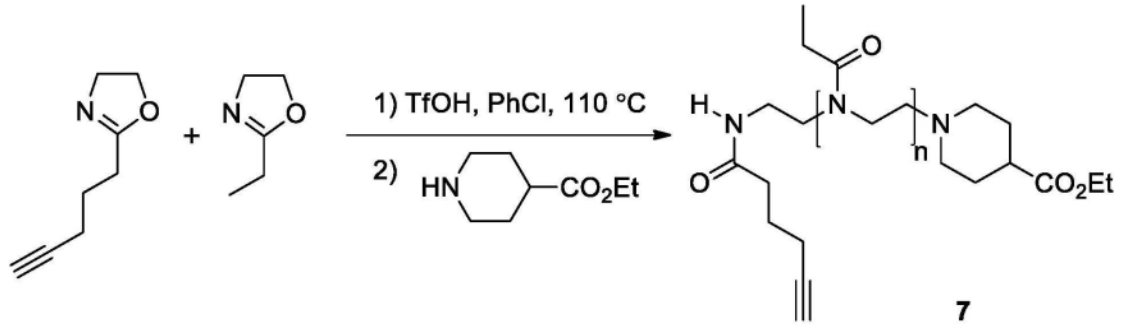
[0377] 在氩气氛下,向经烘干的500mL圆底烧瓶中加入2-乙基-2-噁唑啉(30.46g,307.3mmol,19.00当量),然后加入PhCl(150mL)和搅拌棒。逐滴加入TfOH(1.43mL,16.17mmol,1.00当量),并让混合物于室温搅拌5分钟。然后将反应温热至110℃并搅拌35分钟。然后将聚合混合物冷却至室温并加入异哌啶酸乙酯(4.98mL,32.34mmol,2.00当量)。让反应混合物于室温搅拌至少12小时。在此时间段之后,将反应混合物转移至分液漏斗并用盐水(400mL)稀释。所得混合物用CH_2Cl_2(2×300mL)萃取,合并的有机物浓缩至300mL的体积。然后将溶液沉淀到含有3500mL乙醚的4L烧杯中,经由真空过滤收集固体并在真空下干燥。在此重复中,分离出25克。

[0378] ^{1}H NMR分析显示PEOZ的标准主链信号(500MHz,DMSO)δ7.82(末端NH);4.05(乙酯CH_2);3.35(CH_2CH_2主链);3.18(N-CH_2);2.81(CH_2-N);2.32-2.27(C(O)-CH_2);2.04(末端哌啶的CH);1.78(末端哌啶的CH_2);1.50(末端哌啶的CH_2);1.16(乙酯CH_3);0.96(CH_3)。

[0379] 从上面收集的材料中,将6.00克乙酯转移至250mL圆底烧瓶中并加入1M $NaOH_{(aq.)}$(30mL)。将反应混合物于室温搅拌12小时,随后将混合物酸化至pH=3。经由旋转蒸发除去,将残余物溶在DMF中,过滤,用硫酸钠干燥,并真空浓缩。将所得凝胶溶解在CH_2Cl_2中,用硫酸钠干燥,并真空浓缩。然后将产物沉淀到含有2000mL乙醚的烧杯中。经由真空过滤收集固体并在真空下干燥。分离出5.80克材料。

[0380] ^{1}H NMR分析显示PEOZ的标准主链信号(500MHz,DMSO)δ7.82(末端NH);3.35(CH_2CH_2主链);3.18(N-CH_2);2.96(CH_2-N);2.32-2.27(C(O)-CH_2);2.06(末端哌啶的CH);1.86(末端哌啶的CH_2);0.96(CH_3)。

[0381] 实施例16.化合物7的合成。

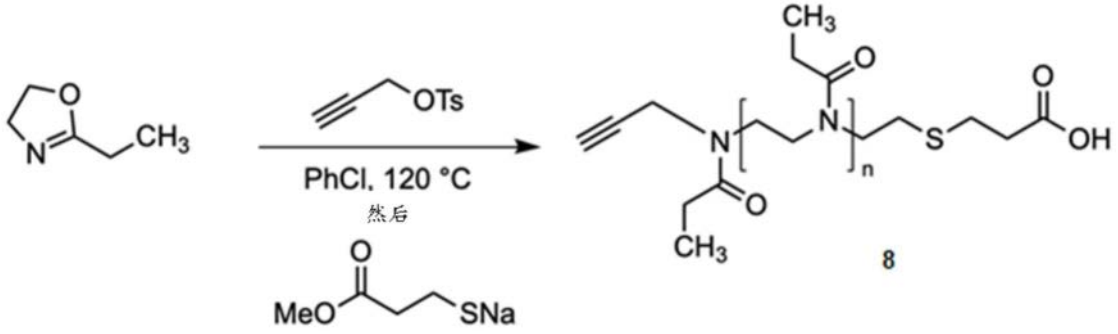
[0382] 

[0383] 在氩气氛下,向经烘干的500mL圆底烧瓶中加入PhCl(150mL),随后加入搅拌棒和2-(5-戊炔基)-2-噁唑啉(2.7mL,19.85mmol,1.20当量)。逐滴加入TfOH(1.46mL,16.54mmol,1.00当量),并让混合物于室温搅拌10分钟。在此时间段之后,加入2-乙基-2-噁唑啉(30.00g,302.6mmol,18.30当量),并将所得混合物于室温搅拌10分钟。然后将反应温热至110℃并搅拌35分钟。然后将聚合混合物冷却至室温。然后加入异哌啶酸乙酯(4.98mL,33.08mmol,2.00当量)。让反应混合物于室温搅拌至少12小时。在此时间段之后,将反应混合物转移至分液漏斗并用盐水(400mL)稀释。所得混合物用CH_2Cl_2(2×300mL)萃取,合并的有机物浓缩至300mL的体积。然后将溶液沉淀到含有3500mL Et2O的4L烧杯中,经由真空过

滤收集固体并在真空下干燥。分离出25克材料。

[0384] ^{1}H NMR分析显示PEOZ的标准主链信号(500MHz,DMSO)δ7.82(末端NH);4.05(乙酯CH_2);3.35(CH_2CH_2主链);3.18(N-CH_2);2.81(CH_2-N);2.32-2.27(C(O)-CH_2);2.04(末端哌啶的CH);1.78(末端哌啶的CH_2);1.50(末端哌啶的CH_2);1.16(乙酯CH_3);0.96(CH_3)。在δ1.65ppm(CH_2)处存在侧挂基团的信号。先前从聚合物起始材料计算出侧挂基团的数目为0.9。

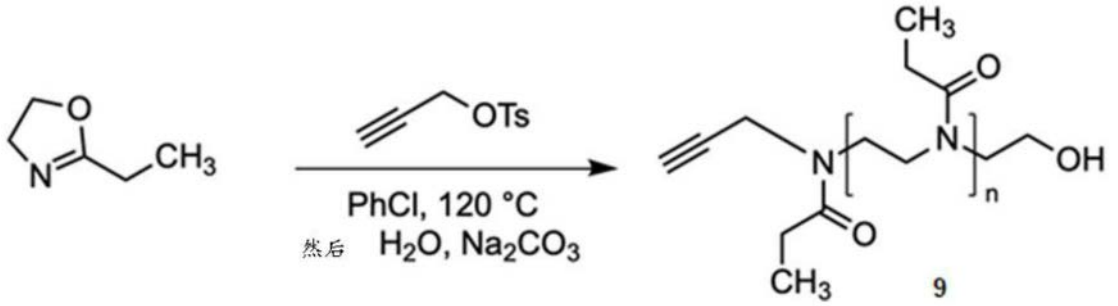
[0385] 实施例17.化合物8的合成。

[0386] 

[0387] 在氩气氛下,向经烘干的500mL圆底烧瓶中加入氯苯(150mL),随后加入搅拌棒和2-乙基-2-噁唑啉(30g,302.63mmol,19.00当量)。加入甲苯磺酸炔丙酯(2.76mL,15.93mmol,1.0当量),将反应混合物温热至110℃并搅拌40分钟。向单独的经烘干的1000mL圆底烧瓶中加入氯苯(150mL),随后加入NaH(1.91g,在油中的60%分散体,47.79mmol,3.00当量)。然后逐滴加入3-巯基丙酸甲酯(10.48mL,95.58mmol,6.00当量),并让混合物搅拌5小时。然后在40分钟的保温时间后将聚合混合物冷却至室温并随后在氩气氛下经10分钟时间段转移至封端混合物。让反应混合物于室温搅拌12小时。在此时间段之后,减压浓缩反应混合物。加入0.1M $NaOH_{(aq.)}$(1000mL),并将混合物搅拌2小时。将所得水溶液通过Amberlite IRA-67(200g)和Amberlite IR120H(200克)的混合柱。产物酸经由DEAE Sepharose色谱法纯化,将所得水溶液酸化至pH 3,用CH_2Cl_2(2×300mL)萃取,合并的有机物用硫酸钠干燥并浓缩至300mL的体积。然后将溶液沉淀到含有3500mL Et_2O的4L烧杯中,经由真空过滤收集固体并在真空下干燥,得到15.2克产物。经由HPLC分析确定分析纯度为98%。

[0388] ^{1}H NMR分析显示PEOZ的标准主链信号(500MHz,DMSO)δ3.35(CH_2CH_2主链);3.18(N-CH_2);3.02(S-CH_2);2.32-2.27(C(O)-CH_2);0.96(CH_3)。在δ4.22-3.82ppm(CH_2和CH)处存在炔基基团的信号。

[0389] 实施例18.化合物9的合成。

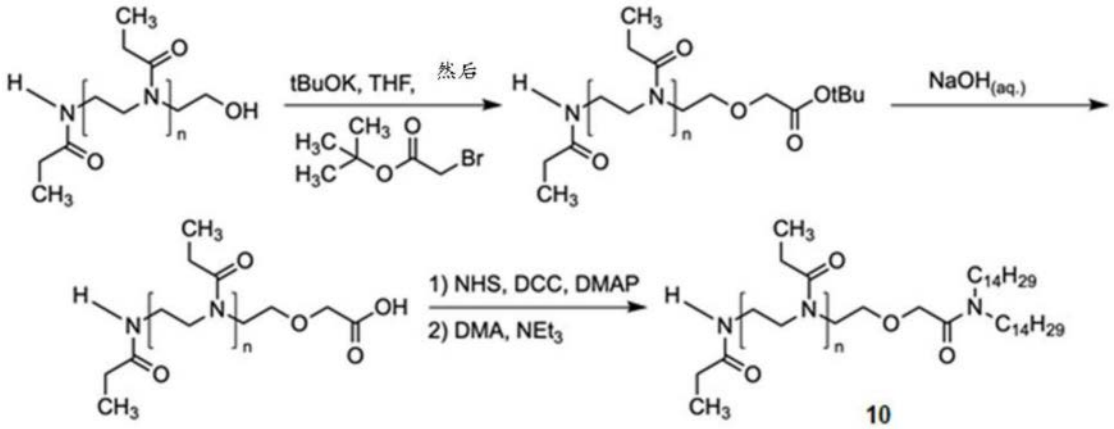
[0390] 

[0391] 在氩气氛下,向经烘干的500mL圆底烧瓶中加入PhCl(75mL),随后加入搅拌棒和2-乙基-2-噁唑啉(15.41g,155.47mmol,20.00当量)。加入甲苯磺酸炔丙酯(1.34mL,

7.77mmol,1.0当量),将反应混合物温热至110℃并搅拌一小时。然后将反应混合物冷却至室温并加入Na_2CO_3(6.00g,57.00mmol,7.00当量)在H_2O(100mL)中的水溶液。让反应混合物搅拌至少12小时。在此时间段之后,将反应混合物转移至分液漏斗并用盐水(200mL)稀释。所得混合物用CH_2Cl_2(2×200mL)萃取,合并的有机物浓缩至15000mL的体积。然后将溶液沉淀到含有2000mL Et_2O的4L烧杯中,经由真空过滤收集固体并在真空下干燥,得到6.05克产物。

[0392] ^1H NMR分析显示PEOZ的标准主链信号(500MHz,DMSO)δ4.83-4.65(CH_2CH_2OH末端);3.35(CH_2CH_2主链);3.18(N-CH_2);2.32-2.27(C(O)-CH_2);0.96(CH_3)。在δ4.17ppm(CH_2和CH)处存在炔基基团的信号。

[0393] 实施例19.化合物10的合成。

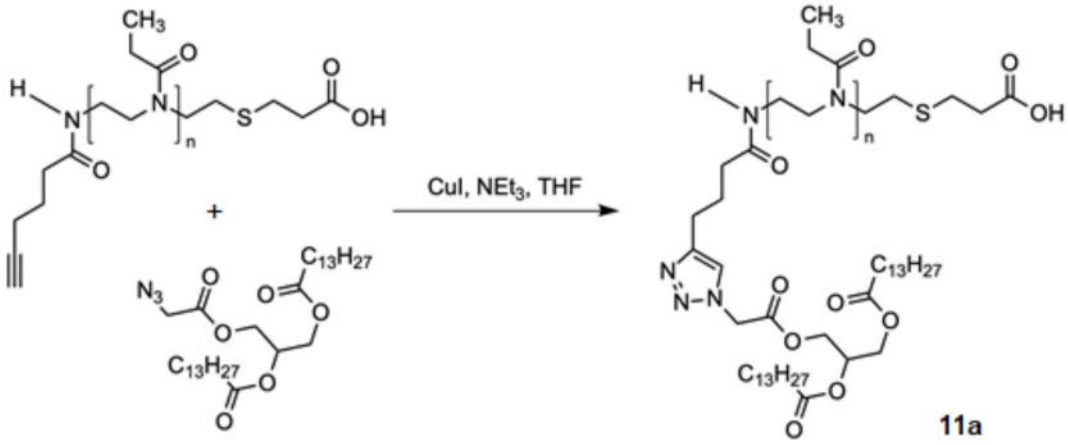
[0394] 

[0395] 将聚(乙基噁唑啉)(OH封端,0.5克,0.27mmol,1.00当量)溶解在30mL THF中并转移至经烘干的250mL圆底烧瓶中。加入叔丁醇钾(0.09g,0.81mmoL,3.00当量),并让反应混合物于室温搅拌30分钟。在此时间段之后,加入溴乙酸叔丁酯(0.24mL,1.62mmol,6.00当量),并让反应混合物于室温搅拌至少12小时。在此时间段之后,将反应混合物与盐水(50mL)一起转移至分液漏斗。混合物用CH_2Cl_2(2×25mL)萃取,合并的有机物用硫酸钠干燥,并真空浓缩。将所得固体溶解在1M的NaOH水溶液(20mL)中并于室温搅拌至少12小时。然后将溶液酸化至pH=3,用CH_2Cl_2(2×30mL)萃取,合并的有机物用硫酸钠干燥,并真空浓缩,得到0.4克中间体羧酸,其不经进一步纯化即直接使用。

[0396] 向100mL圆底烧瓶中加入来自上面的羧酸(1g,0.45mmol,1.00当量),随后加入CH_2Cl_2(30mL)、DMAP(0.01g),最后加入NHS(0.04克,0.36mmol,2.00当量)。然后加入DCC(0.08g,036mmol,2.00当量),并让反应混合物于室温搅拌至少12小时。然后过滤所得混合物并浓缩,得到中间体NHS酯,其不经进一步纯化即直接使用。然后将NHS酯转移至100mL圆底烧瓶,并加入CH_2Cl_2(30mL)。加入二肉豆蔻胺(0.56克,1.36mmol,3.00当量),随后加入三乙胺(0.20mL,1.36mmol,3.00当量)。将反应混合物搅拌至少12小时,随后用盐水(20mL)稀释该混合物并转移至分液漏斗。混合物用CH_2Cl_2(2×20mL)萃取,合并的有机物用硫酸钠干燥,并真空浓缩。产物经由反相色谱法(C18,乙腈:甲醇)纯化,得到0.27克标题化合物。

[0397] ^1H NMR分析显示PEOZ的标准主链信号(500MHz,DMSO)δ4.27-3.93(CH_2O和O-CH_2-N);3.35(CH_2CH_2主链);2.96(N-CH_2);2.32-2.27(C(O)-CH_2);0.96(CH_3)。在δ1.49-1.54(N-$(CH_2)_2$);1.27(CH_2);0.87(CH_3)处存在脂质部分的额外信号

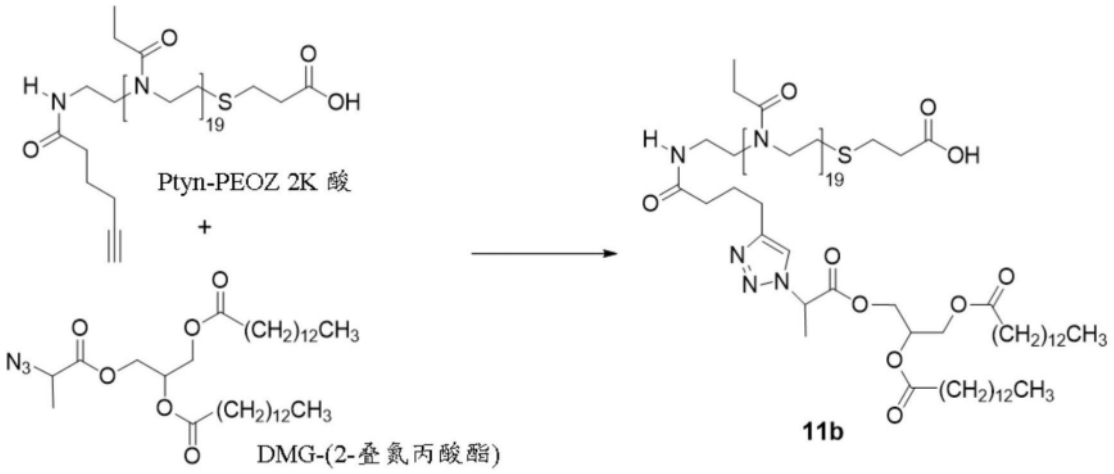
[0398] 实施例20.化合物11a的合成。

[0399] 

[0400] 向100mL圆底烧瓶中加入上述酸(0.68g,0.31mmol,1.00当量),然后加入叠氮乙酸酯(0.27g,0.46mmol,1.50当量)、THF(50mL)、CuI(0.24g,1.24mmol,4.00当量),最后加入三乙胺(0.64mL,4.60mmol,10.0当量)。将所得混合物加热至50℃并搅拌过夜。在此时间段之后,将反应混合物冷却至室温,经由添加0.1M HCl(30mL)来淬灭并搅拌10分钟。将所得混合物通过预先准备的60mL Dowex柱。将所得溶液在旋转蒸发器上于35℃浓缩,随后转移至分液漏斗。添加盐水(20mL),并用20mL份的DCM将混合物萃取3次。合并的有机萃取物用硫酸钠干燥,并真空浓缩。产物经由反相C18色谱柱使用乙腈和甲醇作为洗脱剂纯化,得到标题化合物(0.18克)。

[0401] ^{1}H NMR分析显示PEOZ的标准主链信号(500MHz,DMSO)δ7.82(末端NH);3.35(CH_2CH_2主链);3.18(N-CH_2);3.02(S-CH_2);2.32-2.27(C(O)-CH_2);0.96(CH_3)。在δ5.10(CH);4.26(CH_2);4.08(CH_2);1.49(C(O)CH_2);1.23(CH_2);0.84(CH_3)处存在脂质衍生物部分的额外信号。在δ5.34(三唑CH);4.35(酯CH_2);4.11(HN-CH_2)处存在三唑部分的额外信号。

[0402] 实施例21.化合物11b的合成。

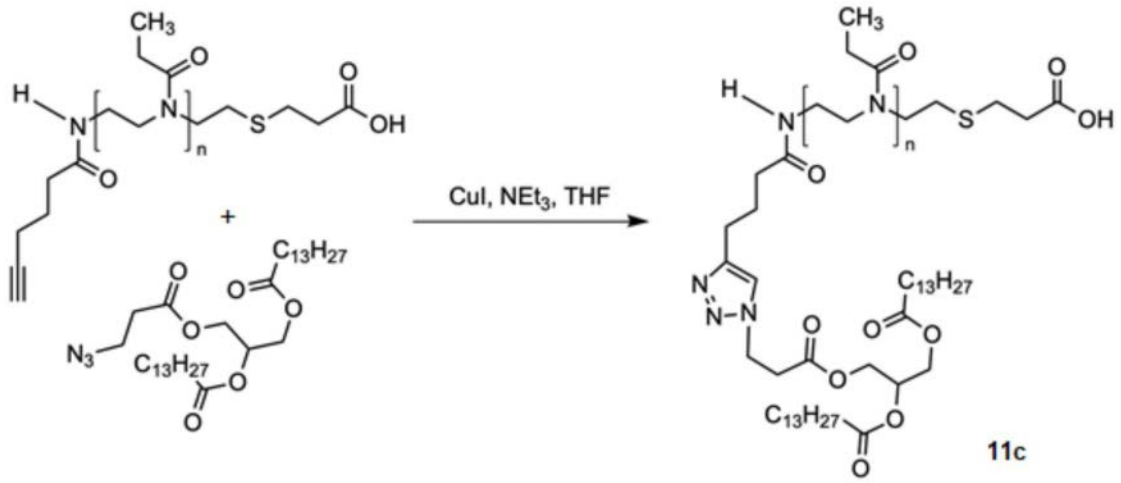
[0403] 

[0404] 向Ptyn-PEOZ 2K酸(0.500g,0.227mmol,1.0当量,Mn 2199Da)和DMG-(2-叠氮丙酸酯(0.166g,0.273mmol,1.2当量)在THF(10mL)中的溶液中加入CuI(0.0217g,0.114mmol,0.5当量)和TEA(0.0634mL,0.455mmol,2.0当量)。将所得混合物于室温搅拌5分钟并然后让其于50℃搅拌18小时,得到浑浊的黄色溶液。冷却至室温后,通过加入0.1N HCl水溶液(6mL)来淬灭反应混合物,随后搅拌5分钟。使混合物通过Dowex®M4195柱,然后使用旋转蒸发器从滤液中除去THF。使用0.5g NaCl(水体积的5w/v%)将所得水溶液与20mL二氯甲烷

一起搅拌。收集有机相,经Na_2SO_4干燥,过滤并浓缩。将残余物溶解在5mL DCM中,通过加到乙醚(60mL)中来沉淀,过滤,并真空干燥。使用Biotage(SNAP ultra C-18柱,MeCN/MeOH)进一步纯化所得浅黄色结晶以除去聚合物杂质。收集级分5-21并浓缩,得到所需产物(0.20g,收率31.3%,纯度99.8%),呈白色结晶。

[0405] DMG-(2-叠氮丙酸酯)的附连通过^{1}H NMR(Varian,500MHz,10mg/mL DMSO-d6)光谱证明,除了通常的聚合物主链峰外,其在0.84ppm(t,6H,J=6.5Hz,-$(CH_2)_{10}CH_3$)、1.23ppm(m,40H,-$(CH_2)_{10}CH_3$)、1.49ppm(m,4H,-$CH_2(CH_2)_{10}CH_3$)、1.81ppm(d,3H,J=5.0Hz,三唑-$CH(CH_3)C(=O)O$-)、2.28ppm(m,4H,-$CH_2CH_2(CH_2)_{10}CH_3$)、3.07ppm、4.23ppm和4.33ppm(m,4H,-$OCH_2CH(O-)CH_2O$-)、5.18ppm(m,1H,-$OCH_2CH(O-)CH_2O$-)、5.59ppm(m,1H,三唑-$CH(CH_3)C(=O)O$-)及8.09ppm(s,1H,三唑环,由'点击'反应产生)处显示DMG质子。

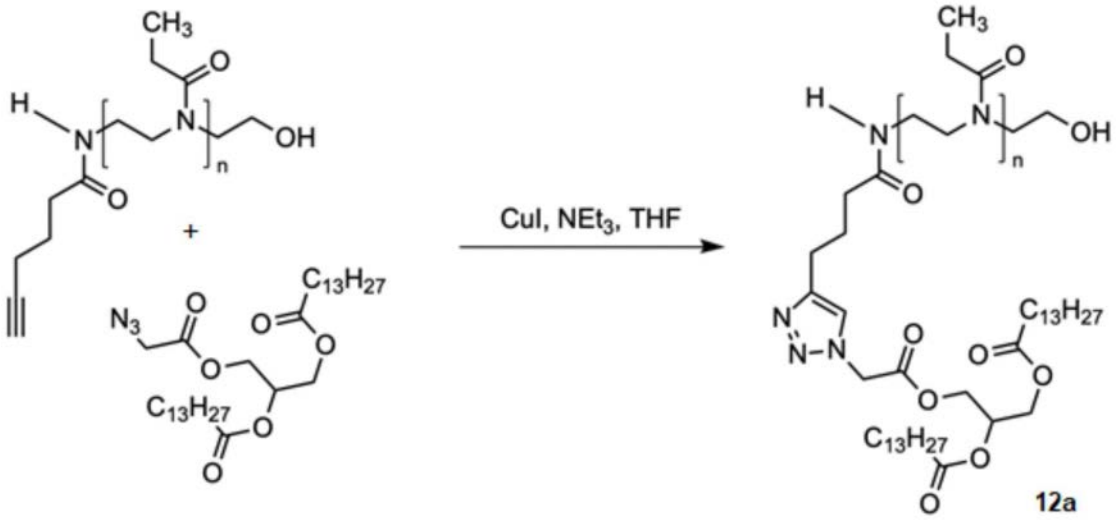
[0406] 实施例22.化合物11c的合成。

[0407] 

[0408] 向100mL圆底烧瓶中加入上述酸(1.42g,0.65mmol,1.00当量),然后加入叠氮乙酸酯(0.59g,0.97mmol,1.50当量)、THF(50mL)、CuI(0.5g,2.6mmol,4.00当量),最后加入三乙胺(0.91mL,6.50mmol,10.0当量)。将所得混合物加热至50℃并搅拌过夜。在此时间段之后,将反应混合物冷却至室温,经由添加0.1M HCl(30mL)来淬灭并搅拌10分钟。将所得混合物通过预先准备的60mL Dowex柱。将所得溶液在旋转蒸发器上于35℃浓缩,随后转移至分液漏斗。添加盐水(20mL),并用20mL份的DCM将混合物萃取3次。合并的有机萃取物用硫酸钠干燥,并真空浓缩。产物经由反相C18色谱柱使用乙腈和甲醇作为洗脱剂纯化,得到标题化合物(0.34克)。

[0409] ^{1}H NMR分析显示PEOZ的标准主链信号(500MHz,DMSO)δ7.82(末端NH);3.35(CH_2CH_2主链);3.18(N-CH_2);3.02(S-CH_2);2.32-2.27(C(O)-CH_2);0.96(CH_3)。在δ5.10(CH);4.51(CH_2);4.26(CH_2);4.08(CH_2);1.49(C(O)CH_2);1.23(CH_2);0.84(CH_3)处存在脂质衍生物部分的额外信号。在δ4.35(酯CH_2);4.11(HN-CH_2)处存在三唑部分的额外信号。

[0410] 实施例23.化合物12a的合成。

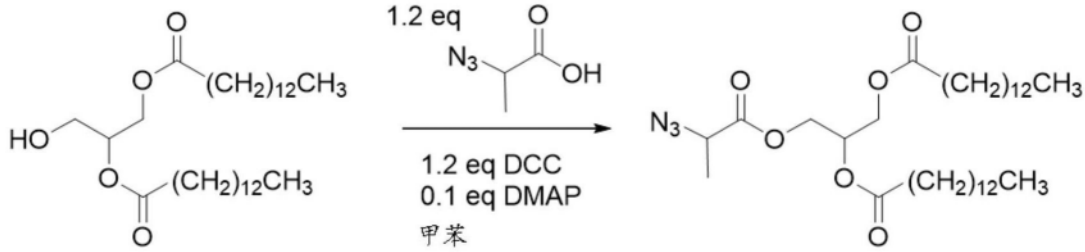
[0411] 

[0412] 向100mL圆底烧瓶中加入上述酸(0.82g,0.37mmol,1.00当量),然后加入叠氮乙酸酯(0.40g,0.67mmol,1.80当量)、THF(50mL)、CuI(0.28g,1.48mmol,4.00当量),最后加入三乙胺(0.52mL,3.70mmol,10.0当量)。将所得混合物加热至50℃并搅拌过夜。在此时间段之后,将反应混合物冷却至室温,经由添加0.1M HCl(30mL)来淬灭并搅拌10分钟。将所得混合物通过预先准备的60mL Dowex柱。将所得溶液在旋转蒸发器上于35℃浓缩,随后转移至分液漏斗。添加盐水(20mL),并用20mL份的DCM将混合物萃取3次。合并的有机萃取物用硫酸钠干燥,并真空浓缩。产物经由反相C18色谱柱使用乙腈和甲醇作为洗脱剂纯化,得到标题化合物(0.22克)。

[0413] ^{1}H NMR分析显示PEOZ的标准主链信号(500MHz,DMSO)δ7.82(末端NH);3.35(CH_2CH_2主链);3.18(N-CH_2);3.02(S-CH_2);2.32-2.27(C(O)-CH_2);0.96(CH_3)。在δ5.20(CH);4.26(CH_2);1.49(C(O)CH_2);1.23(CH_2);0.84(CH_3)处存在脂质衍生物部分的额外信号。在δ5.35(酯CH_2);4.11(HN-CH_2)处存在三唑部分的额外信号。

[0414] 实施例24.化合物19b的合成。

[0415] A.DMG-(2-叠氮丙酸酯)的合成

[0416] 

DMG

(1,2-二肉豆蔻酰-*rac*-甘油)

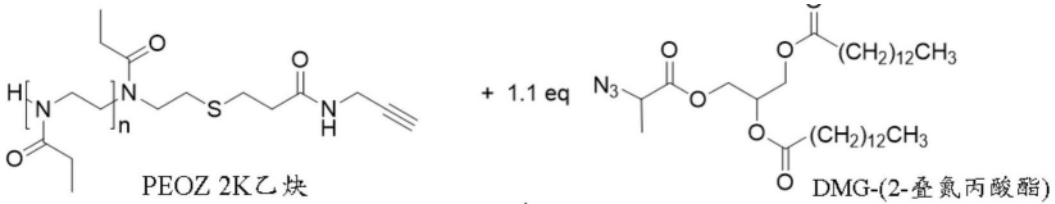
DMG-(2-叠氮丙酸酯)

[0417] 向DMG(1.02g,1.900mmol,1.0当量)在甲苯(20mL)中的溶液中加入2-叠氮丙酸(0.289g,2.280mmol,1.2当量,90.8wt%)和DMAP(0.0232g,0.019mmol,0.1当量)。在加入DCC(0.470g,2.280mmol,1.2当量)后,让所得混合物于室温搅拌2小时。使用注射器过滤器过滤所得混合物并使用旋转蒸发器浓缩。残余物使用Biotage纯化(SNAP ultra-硅胶柱,EtOAc/Hex),得到所需产物(1.09g,收率93.9%,纯度99.9%)。

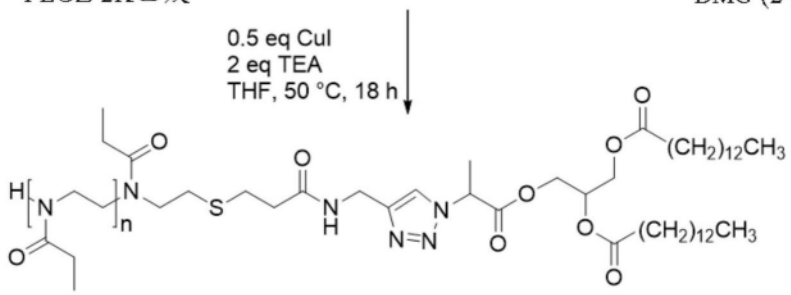
[0418] 2-叠氮丙酸的附连通过^{1}H NMR(Varian,500MHz,10mg/mL DMSO-d6)光谱证明,其

在0.85ppm(t,6H,J＝6.5Hz,-$(CH_2)_{10}CH_3$)、1.23ppm(m,40H,-$(CH_2)_{10}CH_3$)、1.32ppm(m,3H,$N_3CH(CH_3)C(=O)O$-)、1.50ppm(m,4H,-$CH_2(CH_2)_{10}CH_3$)、2.28ppm(m,4H,-$CH_2CH_2(CH_2)_{10}CH_3$)、4.15ppm和4.35ppm(m,4H,-$OCH_2CH(O-)CH_2O$-)、4.29ppm(m,1H,$N_3CH(CH_3)C(=O)O$-)及5.24ppm(m,1H,-$OCH_2CH(O-)CH_2O$-)处显示质子。

[0419] B.PEOZ 2K DMG-(三唑-2-丙酸酯)的合成



[0420]



19b

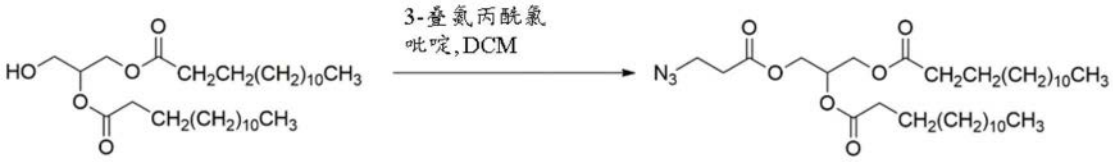
[0421] 向PEOZ 2K乙炔(1.01g,0.450mmol,1.0当量,Mn 2249Da)和DMG-(2-叠氮丙酸酯)(0.302g,0.495mmol,1.1当量)在THF(10mL)中的溶液中加入CuI(0.0429g,0.225mmol,0.5当量)和TEA(0.125mL,0.900mmol,2当量)。将所得混合物于室温搅拌4分钟,并然后让其于50℃搅拌18小时。冷却至室温后,通过加入0.1N HCl水溶液(12mL)来淬灭反应混合物,随后搅拌5分钟。使混合物通过Dowex®M4195柱,并使用旋转蒸发器从滤液中除去THF。使用2g NaCl(水体积的10w/v%)将所得水溶液与30mL二氯甲烷一起搅拌。收集有机相,经Na_2SO_4干燥,过滤并浓缩。将残余物溶解在6mL DCM中,通过加到乙醚(70mL)中来沉淀,过滤,并真空干燥。所得浅黄色结晶使用Biotage(SNAP ultra C-18柱,MeCN/MeOH)进一步纯化以除去聚合物杂质,随后冻干,得到所需产物(0.560g,收率43.8%,纯度99.8%),呈白色结晶。

[0422] DMG-(2-叠氮丙酸酯)的附连通过^1H NMR(Varian,500MHz,10mg/mL DMSO-d6)光谱证明,除了通常的聚合物主链峰外,其在0.84ppm(t,6H,J＝6.5Hz,-$(CH_2)_{10}CH_3$)、1.23ppm(m,40H,-$(CH_2)_{10}CH_3$)、1.49ppm(m,4H,-$CH_2(CH_2)_{10}CH_3$)、1.71ppm(d,3H,J＝7.5Hz,三唑-$CH(CH_3)C(=O)O$-)、2.28ppm(m,4H,-$CH_2CH_2(CH_2)_{10}CH_3$)、4.06ppm和4.28ppm(m,4H,-$OCH_2CH(O-)CH_2O$-)、5.18ppm(m,1H,-$OCH_2CH(O-)CH_2O$-)、5.64ppm(m,1H,三唑-$CH(CH_3)C(=O)O$-)及8.00ppm(s,1H,三唑环,由'点击'反应产生)处显示DMG质子。

[0423] 实施例25.化合物19c的合成。

[0424] 步骤1-1,2-二肉豆蔻酰-3-叠氮丙酰-rac-甘油(DMG-3-叠氮丙酸酯)的合成。

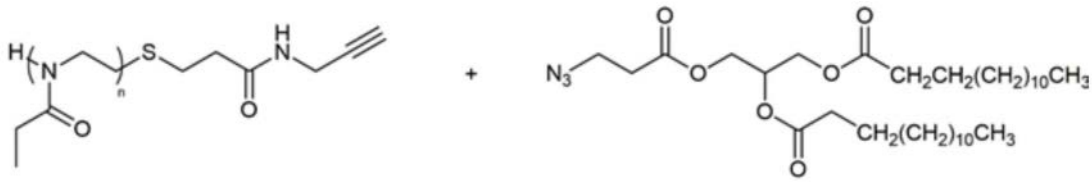
[0425]



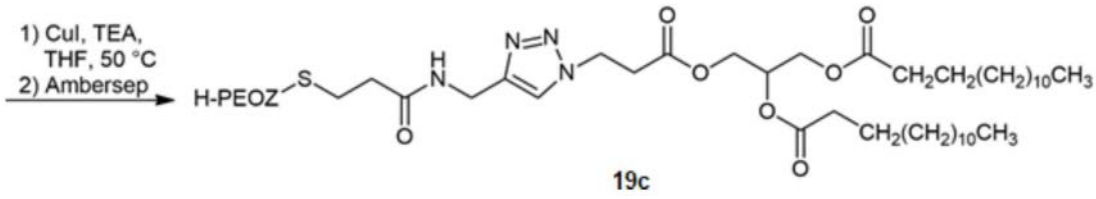
[0426] 将1,2-二肉豆蔻酰-rac-甘油(DMG,1.00gm,1.95mmol,1.0当量.)溶解在无水DCM(50mL)中。在氩气下,加入无水吡啶(632μL,7.80mmol,4.0当量.),随后加入3-叠氮丙酰氯

(521mg,3.90mmol,2.0当量.)。让反应混合物在氩气下于室温搅拌。反应一小时后,将溶液蒸发至干。将残余物溶解在DCM(100mL)中,用0.05M HCl(2×40mL)洗涤。用无水$MgSO_4$(4gm)干燥DCM相。过滤混合物。将澄清的滤液蒸发至干,得到1.228gm粗产物(黄色液体)。该粗产物通过快速色谱法在Biotage Isolera系统上使用Biotage SNAP Ultra 25g柱纯化,使用已烷和乙酸乙酯作为流动相。柱纯化后,蒸发产物级分中的流动相,并将残余物进一步真空干燥过夜,得到0.72gm无色液体/白色蜡。TLC(硅胶60)显示一个斑点。^{1}H NMR(Varian,500MHZ,4mg/mL DMSO-d6,δ,ppm,TMS):0.85(t,2×3H,-CH_3),1.23(m,分辨不良,2×20H,-$(CH_2)_{10}$-),1.50(m,2×2H,-(C=O)CH_2CH_2-),2.28(t,2×2H,-(C=O)CH_2-),2.61(t,2H,$N_3CH_2CH_2$-),3.54(t,2H,N_3CH_2-),4.14,4.20(qq,2H,-CH_2O(C=O)$C_{13}H_{27}$),4.28(d,2H,-CH_2O(C=O)$C_2H_4N_3$),5.20(m,1H,-$(OCH_2)_2$CH-O-)。

[0427] 步骤2-PEOZ-(三唑-3-丙酰-DMG)2K,19c通过点击反应的合成



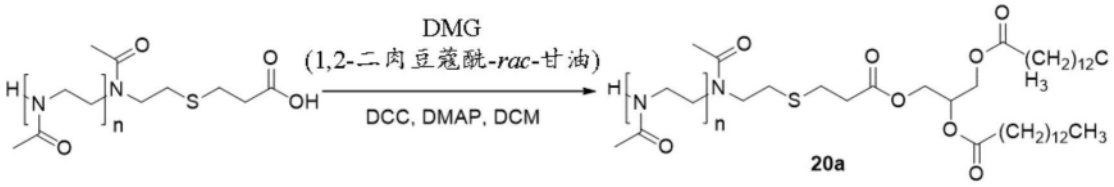
[0428]



19c

[0429] 将H-PEOZ-炔丙酰胺2K(1.0gm,0.67mmol,1当量.)与DMG-3-叠氮丙酸酯(0.464gm,0.76mmol,1.1当量.)一起溶解在50mL圆底烧瓶中的25mL THF中。将溶液在缓慢的氩气流下搅拌。然后向烧瓶中加入CuI(72.4mg,0.38mmol,0.5当量.),随后加入TEA(185.4μL,1.33mmol,1.9当量.)。让绿色溶液在氩气氛下在油浴中于50℃搅拌过夜。如反应混合物的反相HPLC分析所指示,反应完成。将溶液与26.6mL50mM HCl(1.33mmole)和THF(25mL)混合。通过使溶液通过装在玻璃柱中的Ambersep M4195介质来除去溶液中的铜。用THF-2mM HCl(2:1v/v)洗脱该柱。蒸发洗脱液(150mL)直至除去THF。向剩余的白色浑浊水溶液中加入NaCl(5gm),用DCM(4×50mL)萃取。用无水硫酸镁(3gm)和无水硫酸钠(20gm)干燥DCM相。过滤除去硫酸镁和硫酸钠后,将滤液浓缩至接近干燥,然后再溶解于4mL DCM中,接着在乙醚(160mL)中沉淀。过滤后收集沉淀物,并真空干燥,得到0.87克琥珀色粉末(PEOZ-(三唑-3-丙酰-DMG)2K)。根据反相HPLC,纯度为99.7%。^{1}H NMR(Varian,500MHZ,10mg/mL DMSO-d6,δ,ppm,TMS):0.85(t,2×3H,-$C_{13}H_{24}CH_3$),1.23(m,分辨不良,2×20H,-$(CH_2)_{10}$-),1.49(m,2×2H,-(C=O)CH_2CH_2-),2.04(t,2×2H,-(C=O)CH_2-),2.97(t,2H,-三唑-CH_2CH_2-),4.10,4.16(mm,2H,-CH_2O(C=O)$C_{13}H_{27}$),4.28(d,2H,-CH_2O(C=O)C_2H_4-三唑),4.54(t,2H,-三唑-CH_2-),5.17(m,1H,-$(OCH_2)_2$CH-O-),7.90(s,1H,三唑环上的-CH-),8.51(t,分辨不良,1H,-(C=O)NH-CH_2-三唑-)PEOZ主链峰在0.95(中)(s,3nH,CH_3CH_2(C=O)NH-),2.27(小)(s,2nH,-CH_2(C=O)NH-)和3.35(大)(s,4nH,-NCH_2CH_2N-)处。

[0430] 实施例26.化合物20a的合成。

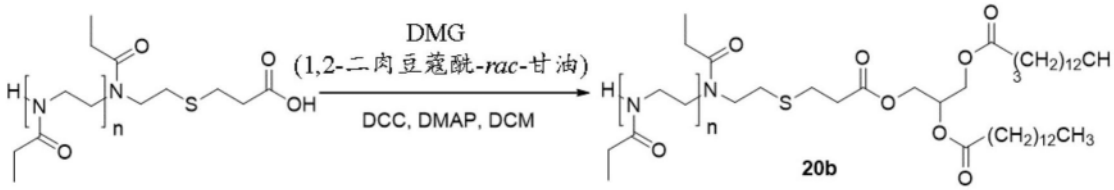
[0431] 

[0432] PMOZ 2K DMG酯的合成

[0433] 向PMOZ 2K酸(1.08g,0.500mmol,1.0当量,Mn 2166Da)在DCM(12mL)中的溶液中加入1,2-二肉豆蔻酰-rac-甘油(0.283g,0.525mmol,1.05当量,95%)和DMAP(0.0062g,0.050mmol,0.1当量)。于45℃加入DCC(0.108g,0.525mmol,1.05当量)并让所得混合物搅拌1小时。将另外的DMG(0.283g,0.525mmol,1.05当量,95%)和DCC(0.108g,0.525mmol,1.05当量)新鲜添加到混合物中。在45℃搅拌16小时后,将反应混合物冷却至室温,使用注射器过滤器过滤,并使用旋转蒸发器浓缩。残余物使用Biotage纯化(SNAP ultra C18柱,MeCN/MeOH),得到所需产物(0.40g,收率30%,纯度99.8%)

[0434] DMG的附连通过^{1}H NMR(Varian,500MHz,10mg/mL DMSO-d6)光谱证明,除了通常的聚合物主链峰外,其在0.85ppm(t,6H,J=6.5Hz,-$(CH_2)_{10}CH_3$)、1.23ppm(m,40H,-$(CH_2)_{10}CH_3$)、1.50ppm(m,4H,-$CH_2(CH_2)_{10}CH_3$)、2.72ppm(t,4H,J=6.5Hz,-$CH_2CH_2(CH_2)_{10}CH_3$)、4.15ppm和4.27ppm(m,各2H,-$OCH_2CH(O-)CH_2O-$)及5.19ppm(m,1H,-$OCH_2CH(O-)CH_2O-$)处显示DMG质子。

[0435] 实施例27.化合物20b的合成。

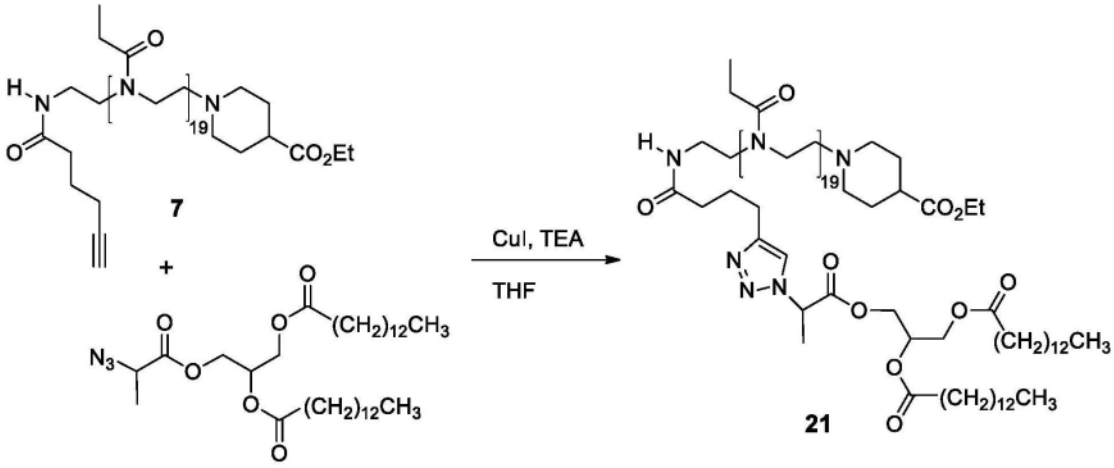
[0436] 

[0437] PEOZ 2K DMG酯的合成

[0438] 向PEOZ 2K酸(0.660g,0.300mmol,1.0当量,Mn 2200Da)在DCM(12mL)中的溶液中加入1,2-二肉豆蔻酰-rac-甘油(0.170g,0.315mmol,1.05当量,95%)和DMAP(0.0037g,0.030mmol,0.1当量)。在加入DCC(0.065g,0.315mmol,1.05当量)后,让所得混合物搅拌18小时。使用注射器过滤器过滤该混合物,并使用旋转蒸发器浓缩。残余物使用Biotage纯化(SNAP ultra C18柱,MeCN/MeOH),得到所需产物(0.624g,收率78%,纯度>99.9%)

[0439] DMG的附连通过^{1}H NMR(Varian,500MHz,10mg/mL DMSO-d6)光谱证明,除了通常的聚合物主链峰外,其在0.85ppm(t,6H,J=6.5Hz,-$(CH_2)_{10}CH_3$)、1.23ppm(m,40H,-$(CH_2)_{10}CH_3$)、1.50ppm(m,4H,-$CH_2(CH_2)_{10}CH_3$)、2.70ppm(t,4H,J=6.5Hz,-$CH_2CH_2(CH_2)_{10}CH_3$)、4.15ppm和4.26ppm(m,各2H,-$OCH_2CH(O-)CH_2O-$)及5.19ppm(m,1H,-$OCH_2CH(O-)CH_2O-$)处显示DMG质子。

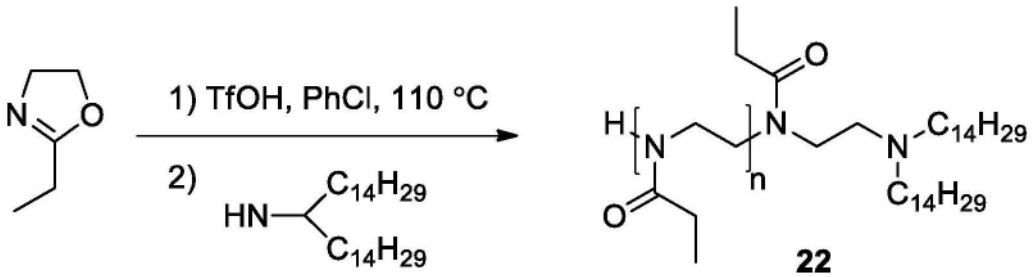
[0440] 实施例28.化合物21的合成。

[0441] 

[0442] 向Ptyn-PEOZ 2K异哌啶酸酯(化合物7,0.500g,0.274mmol,1.0当量,Mn 1823Da)和DMG-(2-叠氮丙酸酯(0.277g,0.455mmol,1.6当量)在THF(15mL)中的溶液中加入CuI(0.0433g,0.227mmol,0.83当量)和TEA(0.095mL,0.682mmol,2.5当量)。将所得混合物于室温搅拌5分钟并然后让其于50℃搅拌18小时,得到浑浊的黄色溶液。冷却至室温后,通过加入0.1N HCl水溶液(8mL)来淬灭反应混合物,随后搅拌5分钟。使混合物通过Dowex® M4195柱,然后使用旋转蒸发器从滤液中除去THF。使用0.5g NaCl(水体积的5w/v%)将所得水溶液与20mL二氯甲烷一起搅拌。收集有机相,经Na_2SO_4干燥,过滤并浓缩。将残余物溶解在5mL DCM中,通过加到乙醚(60mL)中来沉淀,过滤,并真空干燥。使用Biotage(SNAP ultra C-18柱,乙腈/甲醇)进一步纯化所得浅黄色结晶以除去聚合物杂质。收集级分5-21并浓缩,得到所需产物(0.140g,收率21%,纯度99.8%),呈黄色结晶固体。

[0443] DMG-(2-叠氮丙酸酯)的附连通过^1H NMR(Varian,500MHz,10mg/mL DMSO-d6)证明,除了通常的聚合物主链峰外,其在0.84ppm(t,6H,J=6.5Hz,-$(CH_2)_{10}CH_3$)、1.23ppm(m,40H,-$(CH_2)_{10}CH_3$)、1.49ppm(m,4H,-$CH_2(CH_2)_{10}CH_3$)、1.72ppm(d,3H,J=7.0Hz,三唑-$CH(CH_3)$C(=O)O-)、2.28ppm(m,4H,-$CH_2CH_2(CH_2)_{10}CH_3$)、4.08ppm、4.23ppm和4.33ppm(m,4H,-OCH_2CH(O-)CH_2O-)、5.18ppm(m,1H,-$OCH_2CH(O-)CH_2O$-)、5.59ppm(m,1H,三唑-$CH(CH_3)$C(=O)O-)及8.00ppm(s,1H,三唑环,由'点击'反应产生)处显示DMG质子。

[0444] 实施例29.化合物22的合成。

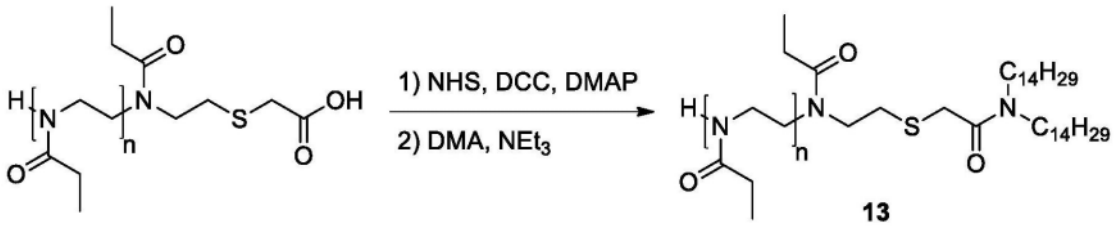
[0445] 

[0446] 在氩气氛下,向经烘干的500mL圆底烧瓶中加入2-乙基-2-噁唑啉(30g,302.63mmol,19.00当量),然后加入PhCl(150mL)和搅拌棒。逐滴加入TfOH(1.41mL,15.93mmol,1.00当量),并让混合物于室温搅拌5分钟。然后将反应温热至110℃并搅拌35分钟。然后将聚合混合物冷却至室温并加入二肉豆蔻胺(13.00克,31.86mmol,2.00当量)。让反应混合物于室温搅拌至少12小时。当该时间段完成时,用盐水(300mL)稀释反应混合物并

转移至分液漏斗。混合物用CH_2Cl_2(2×150mL)萃取,用硫酸钠干燥,并真空浓缩,得到25.6克粗材料。将2克粗材料样品经由反相C18色谱法使用乙腈和甲醇作为洗脱剂纯化,得到标题化合物(0.55克)。

[0447] ^1H NMR。^1H NMR分析显示PEOZ的标准主链信号(500MHz,$CDCl_3$)δ3.42(CH_2CH_2主链);3.27(N-CH_2);2.37-2.25(C(O)-CH_2);1.11(CH_3)。在δ2.74(N-(CH_2)$_2$);2.50(N-CH_2);1.66(CH_2);1.35(CH_2);1.22(脂质烷基链);0.85(CH_3)处存在脂质部分的额外信号。

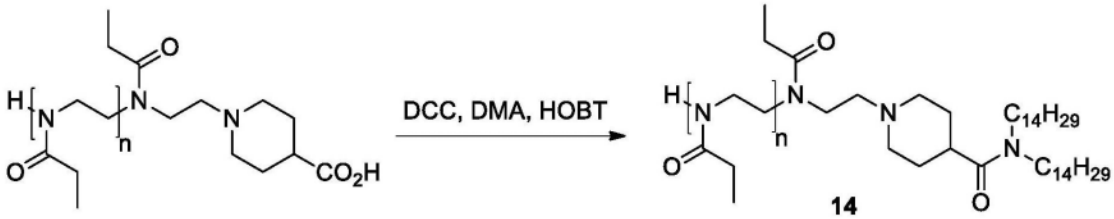
[0448] 实施例30.化合物13的合成。

[0449] 

[0450] 以与化合物15B类似的方式制备化合物13。分离出1.4克。

[0451] ^1H NMR。^1H NMR分析显示PEOZ的标准主链信号(500MHz,$CDCl_3$)δ3.43(CH_2CH_2主链);3.24(N-CH_2);2.8(S-CH_2);2.32-2.19(C(O)-CH_2);1.12(CH_3)。在δ1.49-1.65(N-(CH_2)$_2$);1.27(CH_2);0.87(CH_3)处存在脂质部分的额外信号。

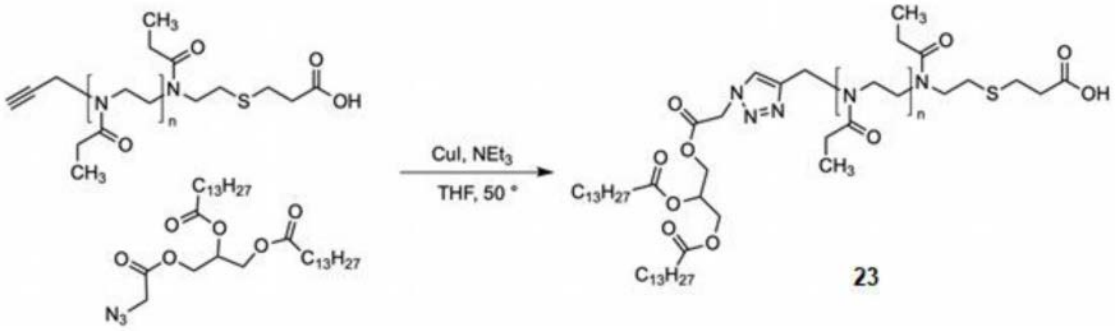
[0452] 实施例31.化合物14的合成。

[0453] 

[0454] 将羧酸(2.00克,0.91mmol,1.00当量)转移至250mL圆底烧瓶中并与乙腈共沸。重复该过程,并将残余物在真空下干燥1小时。将残余物溶解在CH_2Cl_2(30mL)中,并加入HOBT(0.05g,0.36mmol,0.4当量),随后加入二肉豆蔻胺(1.12克,2.73mmol,3.00当量),最后加入DCC(0.6克,2.73mmol,3.00当量)。让反应混合物搅拌至少12小时,随后过滤混合物并沉淀到含有1600mL已烷的烧杯中。通过真空过滤收集固体并在真空下干燥。产物经由反相C18色谱柱使用乙腈和甲醇作为洗脱剂纯化,得到标题化合物(0.47克)。

[0455] ^1H NMR。^1H NMR分析显示PEOZ的标准主链信号(500MHz,$CDCl_3$)δ3.42(CH_2CH_2主链);2.93(N-CH_2);2.39-2.27(C(O)-CH_2);1.11(CH_3)。在δ2.92(N-CH);1.83(CH_2);1.76(CH_2);1.74(CH_2);1.63(CH_2)处存在哌啶部分的额外信号。在δ3.25(N-CH_2);3.19(N-CH_2);2.05(CH_2);1.52-1.46(CH_2);1.25(脂质烷基链);0.86(CH_3)处存在脂质部分的额外信号。

[0456] 实施例32.化合物23的合成。

[0457] 

[0458] 以与化合物12A类似的方式制备化合物23。在这种情况下,分离出0.19g。经由HPLC分析确定分析纯度为93%。

[0459] ^{1}HNMR分析显示PEOZ的标准主链信号(500MHz,DMSO)δ3.35(CH_2CH_2主链);2.71(S-CH_2);2.32-2.27(C(O)-CH_2);0.96(CH_3)。在δ5.19(CH);4.26(CH_2);1.49(C(O)CH_2);1.23(CH_2);0.84(CH_3)处存在脂质衍生物部分的额外信号。在δ5.46(酯CH_2);4.07(HN-CH_2)处存在三唑部分的额外信号。

[0460] 实施例33-含有N,N-二甲基十四胺(DMA)的脂质纳米颗粒的制备。

[0461] 在乙醇中制备1,2-二油酰氧基-3-(三甲基铵)丙烷[DOTAP](Sigma D6182)、1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱[DSPC](Bachem 4005619)、超纯胆固醇(VWR 0433)和2K聚合物(PEG、PMOZ或PEOZ)缀合DMA(如上面实施例中所述)的新鲜脂质储备溶液作为储备溶液。混合储备溶液,使得最终的脂质混合物储备液含有1.30mg/mL的DOTAP、0.28mg/mL的DSPC、0.59mg/mL的胆固醇和0.19mg/mL的聚合物DMA。该溶液含有2.38mg/mL的总脂质。然后将70μL储备溶液移入到1.5mL LoBind离心管(Eppendorf 022431081)中并使用高速真空系统(GeneVac EZ-2)蒸发乙醇溶液。使干燥后的样让在通风通气管下再干燥10分钟。将干燥后的脂质混合物与250μL柠檬酸盐缓冲液(pH 4.0)水合,混合并超声处理约10分钟以制备脂质纳米颗粒(LNP)。

[0462] 将质粒DNA(phMGFP,Promega E6421)储备溶液与柠檬酸盐缓冲液(pH 4.0)以100μL 0.34μg/μL浓度与66.7μL柠檬酸盐缓冲液的比率混合,使得总体积为166.7μL。将含有10μg DNA的50μL质粒溶液等分试样加到250μL脂质纳米颗粒混合物中,用移液器混合并超声处理不到1分钟,得到半透明状悬浮液。将管以14,000rpm离心30分钟(Eppendorf微量离心机)。从LNP沉淀物分离出约300μL上清液,并使用1.2%的琼脂糖凝胶和Qubit定量测定任何残余的DNA。结果显示上清液中不存在DNA,表明完全封装。

[0463] 将沉淀物重悬于300μL 5mM HEPES缓冲液(pH 7.40)中,并用移液器吸头充分混合2分钟。为了验证每种聚合物DMA制剂的DNA封装,用Triton X-100裂解LNP悬浮液的等分试样。首先在HEPES缓冲液中制备10%Triton储备溶液。将3μL该溶液加到27μL LNP悬浮液中,使得最终体积为30μL并且Triton X-100表面活性剂的浓度为1%。将悬浮液涡旋混合2分钟并在4℃下静置过夜。使用1.2%的琼脂糖凝胶和Qubit定量测定混合物的任何残余的DNA。结果显示混合物中DNA浓度高,表明每种LNP制剂的封装效率>90%。该悬浮液易于通过0.22和0.1μm PVDF低蛋白结合33-mm注射器过滤器(Millex-W and Millex-GV,Millipore)过滤。

[0464] 实施例34-含有1,2-二肉豆蔻酰-sn-甘油(DMG)的脂质纳米颗粒的制备。

[0465] 在乙醇中制备1,2-二油酰氧基-3-(三甲基铵)丙烷[DOTAP](Sigma D6182)、1,2-

二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱[DSPC](Bachem 4005619)、超纯胆固醇(VWR 0433)及2K和5K聚合物(PEG、PMOZ或PEOZ)缀合DMG(如上面实施例中所述)的新鲜脂质储备溶液作为储备溶液。混合储备溶液,使得最终的脂质混合物储备液含有1.48mg/mL的DOTAP、0.28mg/mL的DSPC、0.57mg/mL的胆固醇和0.15mg/mL的2K聚合物DMG。该溶液含有2.49mg/mL的总脂质。当选择5K聚合物DMG缀合物时,浓度为0.32mg/mL并且溶液含有2.67mg/mL的总脂质。

[0466] 然后将62μL储备溶液移入到1.5mL LoBind离心管(Eppendorf022431081)中并使用高速真空系统(GeneVac EZ-2)蒸发乙醇溶液。使干燥后的样品在通风通气管下再干燥10分钟。将干燥后的脂质混合物与275μL柠檬酸盐缓冲液(pH 4.0)水合,混合并超声处理约10分钟以制备脂质纳米颗粒(LNP)。

[0467] 将质粒DNA(phMGFP,Promega E6421)储备溶液与柠檬酸盐缓冲液(pH 4.0)以80μL 2.7μg/μL浓度与190μL柠檬酸盐缓冲液的比率混合,使得总体积为270μL。将含有20μg DNA的25μL质粒溶液等分试样加到275μL脂质纳米颗粒混合物中,用移液器混合并超声处理不到1分钟,得到半透明状悬浮液。将管以14,000rpm离心30分钟(Eppendorf微量离心机)。从LNP沉淀物分离出约300μL上清液,并使用1.2%的琼脂糖凝胶和Qubit定量测定任何残余的DNA。结果显示上清液中不存在DNA,表明完全封装。

[0468] 将沉淀物重悬于300μL 5mM HEPES缓冲液(pH 7.40)中,并用移液器吸头充分混合2分钟。为了验证每种聚合物DMA制剂的DNA封装,用Triton X-100裂解LNP悬浮液的等分试样。首先在HEPES缓冲液中制备10%Triton储备溶液。将3μL该溶液加到27μL LNP悬浮液中,使得最终体积为30μL并且Triton X-100表面活性剂的浓度为1%。将悬浮液涡旋混合2分钟并在4℃下静置过夜。使用1.2%的琼脂糖凝胶和Qubit定量测定混合物的任何残余的DNA。结果显示混合物中DNA浓度高,表明每种LNP制剂的封装效率>90%。该悬浮液易于通过0.22和0.1μm PVDF低蛋白结合33-mm注射器过滤器(Millex-W and Millex-GV,Millipore)过滤。

[0469] 在另一个实验中,将离心沉淀物重悬于含有磷酸二氢钠、磷酸氢二钠和蔗糖的缓冲溶液(pH 7.4)中。将悬浮液冻干,得到均匀且稳定的干饼,该干饼易于在注射用水中重构。

[0470] 实施例35.从LNP转染DNA并使用HEK-293细胞。

[0471] HEK-293是一种人胚肾细胞系,常用于细胞生物学中的转染研究。这些细胞源自ATCC(CRL-1573)并已被证实转染效率>85%。在研究方案中,转染前24小时将低传代(<5)细胞以每孔100μL无抗生素培养基(EMEM+10%FBS)中20,000个细胞的密度接种在测定板上。转染前即刻进行完整的培养基交换并向每个孔中加入新鲜的100μL无抗生素培养基(EMEM+10%FBS)。

[0472] 将制得的含有聚合物DMA脂质和封装的质粒DNA的LNP以2.6至20.8μL的体积加到每个孔中以每孔递送50至450ng之间的DNA phMGFP。

[0473] 阳性对照为3:1比率的FuGENE-HD(Promega E3211)和DNA。将DNA溶液在无血清培养基(Opti-MEM)中稀释。将两种溶液在96孔PCR板中以3:1的比率一式三份混合(每孔0.3μL试剂与100ng质粒DNA)并添加Opti-MEM至7.33μL体积。将板在室温下温育25分钟。向每个孔中的细胞中添加7.33μL DNA/转染混合物。

[0474] 将板盖上提供的盖子并放置在37℃、5%CO_2、95%RH的温育箱中。将它们温育24-

48小时。在每个时间点,在Evos显微镜上读板。所有GFP滤光器照片均以4X读取,所有透射光照片均以10X读取。GFP荧光细胞的数目如下表1中所示。透射光照片显示,在对所有聚合物DMA脂质制剂测试的最高浓度下有一些不健康的细胞,特别是对于具有最高GFP荧光细胞数目的PEG DMA脂质。

[0475]

表 1

样品	转染量	荧光细胞数目 T= 24 h
PEOZ 2K	58ng	1
	116ng	3
	233ng	18
	466ng	50
PMOZ 2K	44ng	1
	88ng	3
	175ng	14
	350ng	25
PEG 2K	56ng	20
	112ng	40
	225ng	80
	450ng	100
阳性对照	100ng	200

[0476] 在48小时时间点,荧光高并观察到30-35%的细胞发出荧光(阳性对照);10%(466ng DNA与PMOZ DMA脂质);10%(350ng DNA与PEOZ DMA脂质);和5%(450ng DNA与PEG DMA脂质)的细胞死亡数目最高。

[0477] 实施例36.从LNP转染DNA并使用HepG2细胞。

[0478] HepG2是一种常用于转染研究中的人肝细胞癌细胞系。这些细胞源自ATCC(HB-8065)并已被证实转染效率高达95%。在研究方案中,转染前24小时将低传代(<5)细胞以每孔100μL无抗生素培养基(DMEM+10%FBS)中40,000个细胞的密度接种在测定板上。转染前即刻进行完整的培养基交换并向每个孔中加入新鲜的100μL无抗生素培养基(DMEM+10%FBS)。

[0479] 将制得的含有聚合物DMG脂质和封装的质粒DNA的LNP以1.9至11.7μL的体积加到每个孔中以每孔递送100至1000ng之间的DNA phMGFP。

[0480] 阳性对照为3:1比率的FuGENE-HD(Promega E3211)和DNA。将DNA溶液在无血清培养基(Opti-MEM)中稀释。将两种溶液在96孔PCR板中以3:1的比率一式三份混合(每孔0.3μL试剂与100ng质粒DNA)并添加Opti-MEM至7.33μL体积。将板在室温下温育25分钟。向每个孔中的细胞中添加7.33μL DNA/转染混合物。

[0481] 将板盖上提供的盖子并放置在37℃、5％CO_2、95％RH的温育箱中。将它们温育48-72小时。在每个时间点,在Evos显微镜上读板。所有GFP滤光器照片均以4X读取,所有透射光照片均以10X读取。GFP荧光细胞的数目如下表2中所示。透射光照片没有显示出细胞毒性的迹象。

[0482]

表 2

样品	转染量	T= 48 h	T= 72 h

[0483]

PEOZ 5K	100ng	5	7
	200ng	7	17
	500ng	20	100
	1000ng	100	400
PMOZ 5K	100ng	3	4
	200ng	10	23
	500ng	10	40
	1000ng	40	100
PEOZ 2K	100ng	3	5
	200ng	7	25
	500ng	40	200
	1000ng	100	400
PMOZ 2K	100ng	3	4
	200ng	4	14
	500ng	20	40
	1000ng	40	80
PEG 2K	100ng	3	9
	200ng	20	45
	500ng	15	45
	1000ng	100	300
阳性对照	100ng	200	400

[0484] 实施例37.POZ-脂质缀合物的水解动力学。

[0485] 在pH 7.4的磷酸盐盐水缓冲液(PBS)和含有稀释于PBS中的100％或50％大鼠和人血浆的生物介质中测定本公开的几种POZ-脂质缀合物的水解速率。准确称量POZ-脂质样品并溶解在PBS中以制备储备溶液。将这些溶液添加到PBS或者大鼠或人血浆介质中并让于37℃温育。在不同的时间间隔从水解介质中取出样品并通过加入冷冻的0.2％甲酸的甲醇溶液来淬灭。将样品离心,将上清液转移至0.1％的甲酸水溶液中,然后使用反相柱(300SB C3)及0.1％的甲酸铵水溶液和0.1％甲酸铵的甲醇溶液的梯度流作为流动相通过高效液相色谱法(HPLC)分析样品。通过210nm下的UV吸收检测POZ-脂质缀合物,并然后通过质谱法检测其分解和降解代谢物。从浓度-时间曲线外推50％的POZ-脂质降解的时间并报告在下表3

中。

[0486]

表 3			
样品	半衰期，小时#		
	1X PBS	50%大鼠血浆	50%人血浆
PMOZ2kDMA **15a**	NRx	NRx*	NRx*
PEOZ2kDMA **15b**	NRx	NRx*	NRx*
PEOZ2kDMG-三唑-乙酸酯 **19a**	106	1	3
PEOZ2kDMG-2'-丙酸酯 **19b**	168**	1	5
PEOZ2kDMG-3'-丙酸酯 **19c**	NRx	<1	7
PMOZ2k DMG 酯 **20a**	NRx	1	7
PEOZ2k DMG 酯 **20b**	NRx	<1	10
PEOZ2k DMG 醚 **17c**	NRx	1	180**
PMOZ5k DMG 醚 **17a**	NRx	<1	258**
PEOZ5k DMG 醚 **17b**	NRx	<1	166**

[0487] NRx＝120小时后无明显反应(水解)

[0488] *用100％血浆进行实验

[0489] **使用Microsoft Excel™软件从曲线图外推

[0490] 结果显示,具有酯键的化合物(化合物19a、19b、19c、20a和20b)在血浆中水解的速率比具有醚键的化合物(化合物17a、17b和17c)快。

[0491] 实施例38.聚合物脂质缀合物的酰胺酶水解。

[0492] 本实验的目的在于确定在PBS、大鼠血浆或人血浆中(上面的实施例)未显示出明显反应(水解)的各种聚合物脂质缀合物是否会在脂酰胺酶的存在下反应。化合物13、15a和15b在POZ与脂质之间具有酰胺键。化合物22具有胺键。准确称量POZ-脂质样品并溶解在PBS中以制备储备溶液。选择的酰胺酶为源自Bio-Vision的“脂肪酸酰胺水解酶1,活性人重组体(FAAH1)”,其比活性≥9mU/mg。通过向每瓶酰胺酶中添加PBS pH 8.0、轻轻混合并置于37℃水浴中两小时来活化该酰胺酶。酰胺酶溶液的浓度为~2μg/μL。将POZ-脂质储备溶液的等分试样添加到经活化的脂酰胺酶溶液中,轻轻混合并让于37℃温育过夜。水解过夜后,加入甲醇,离心样品,并将上清液转移至HPLC小瓶中。使用反相柱(300SB C3)及0.1％的甲酸铵水溶液和0.1％甲酸铵的甲醇溶液的梯度流作为流动相通过高效液相色谱法(HPLC)分析样品。通过210nm下的UV吸收来测量聚合物脂质缀合物的峰面积。比较初始时和酰胺酶温育过夜时的峰面积,结果示于下表4中。

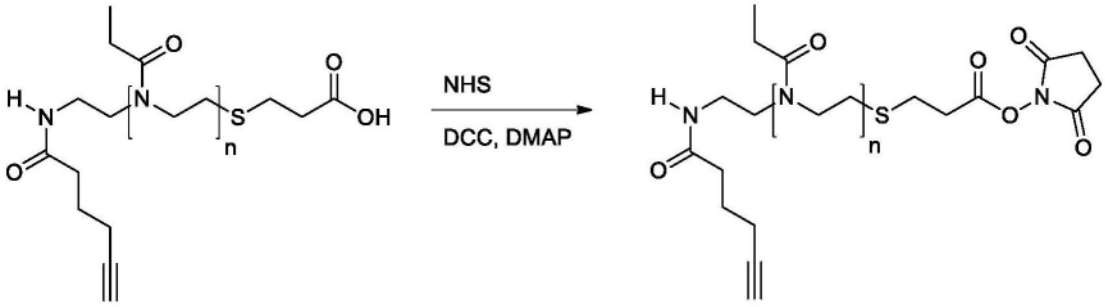
[0493]

表 4. POZ-脂质在脂酰胺酶的存在下的过夜水解	
化合物#	POZ-DMA 分析物的峰面积
15a 零时间	1139
15a 具有酰胺酶	771
15b 零时间	1329
15b 具有酰胺酶	808
13 零时间	1720
13 具有酰胺酶	820
22 零时间	1015
22 具有酰胺酶	894

[0494] 结果显示,具有酰胺键的化合物(化合物15a、15b和13)受到脂酰胺酶的影响,观察到过夜水解后POZ-DMA峰面积的下降,即变化30-50%。相反,具有胺键的化合物22显示出峰面积的小幅减小,但并不显著,并且在实验条件的误差范围内,即±10%。

[0495] 实施例39.化合物24的合成。

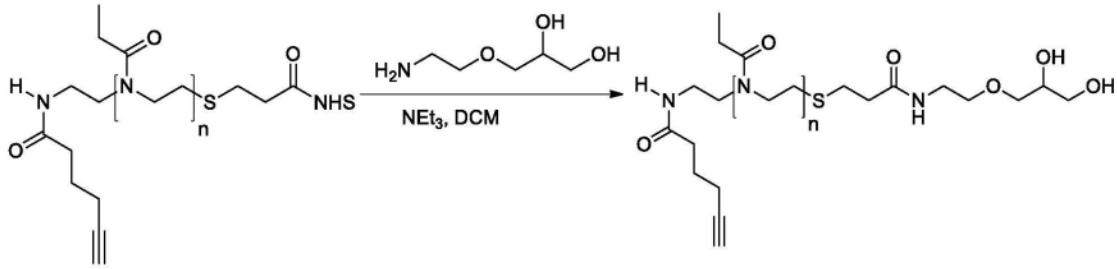
[0496] 步骤1.

[0497] 

[0498] 以与前述类似的方式制备PEOZ 2K(1.21p)NHS酯。

[0499] ^{1}H NMR。HNMR分析显示PEOZ的标准主链信号(500MHz,DMSO)δ7.82(末端NH);3.35(CH_2CH_2主链);3.18(N-CH_2);3.02(S-CH_2);2.32-2.27(C(O)-CH_2);0.96(CH_3)。在δ2.81((CH_2)$_2$)处存在NHS部分的额外信号。在δ1.63ppm处检测到炔部分的CH_2信号。

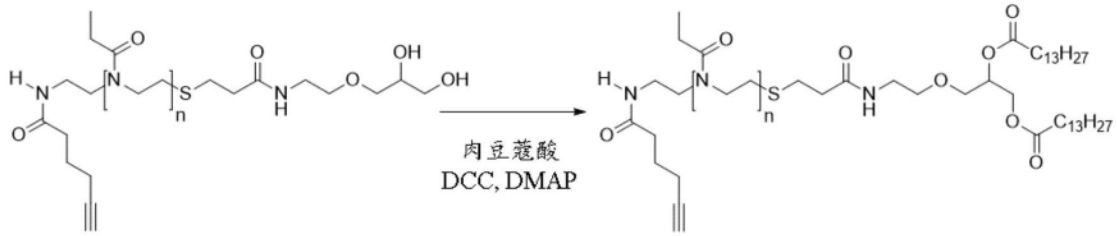
[0500] 步骤2.

[0501] 

[0502] 以与前述类似的方式制备PEOZ 2K(1.21p)乙醇胺甘油酰胺。

[0503] ^{1}H NMR。HNMR分析显示PEOZ的标准主链信号(500MHz,DMSO)δ7.82(末端NH);3.35(CH_2CH_2主链);3.18(N-CH_2);3.02(S-CH_2);2.32-2.27(C(O)-CH_2);0.96(CH_3)。在δ1.63ppm处检测到炔部分的CH_2信号。在δ4.56(CH_2);4.53(CH)处存在二醇部分的额外信号。

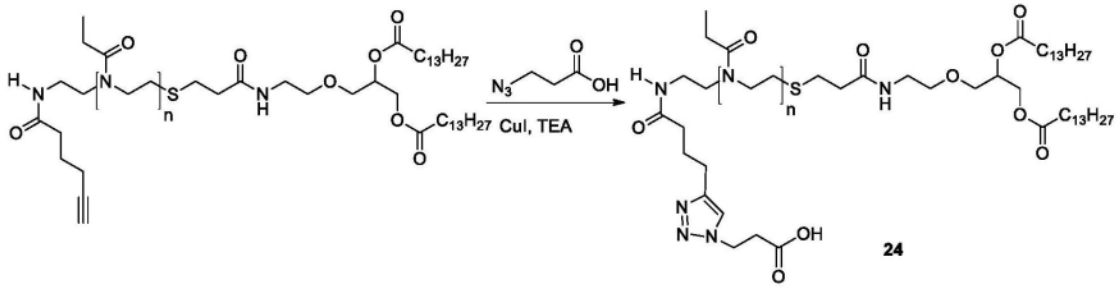
[0504] 步骤3.

[0505] 

[0506] 以与前述类似的方式制备PEOZ 2K(1.21p)DMG。

[0507] ^{1}H NMR。HNMR分析显示PEOZ的标准主链信号(500MHz,DMSO)δ7.82(末端NH);3.35(CH_2CH_2主链);3.18(N-CH_2);3.02(S-CH_2);2.32-2.27(C(O)-CH_2);0.96(CH_3)。在δ5.20(CH);4.26(CH_2);1.49(C(O)CH_2);1.23(CH_2);0.84(CH_3)处存在脂质衍生物部分的额外信号。在δ1.63ppm处检测到炔部分的CH_2信号。

[0508] 步骤4.

[0509] 

[0510] 以与前述类似的方式制备PEOZ 2K(1.21p)DMG(3-叠氮丙酸酯),化合物24。

[0511] ^{1}H NMR。HNMR分析显示PEOZ的标准主链信号(500MHz,DMSO)δ7.82(末端NH);3.35(CH_2CH_2主链);3.18(N-CH_2);3.02(S-CH_2);2.32-2.27(C(O)-CH_2);0.96(CH_3)。在δ5.20(CH);4.26(CH_2);1.49(C(O)CH_2);1.23(CH_2);0.84(CH_3)处存在脂质衍生物部分的额外信号。在δ7.78(三唑CH);4.54(酯CH_2)处存在三唑部分的额外信号。

[0512] 本文描述和要求保护的POZ-脂质、LNP和药物组合物不限于本文公开的特定实施方案的范围,因为这些实施方案旨在示意本公开的若干方面。任何等同实施方案均旨在包括在本公开的范围内。事实上,除了本文示出和描述的那些外,根据前述描述,对本领域技术人员来说,式和结构的各种修改将变得显而易见。此类修改也意在落在附随的权利要求书的范围内。前述文本中引用的所有专利和专利申请均明确地通过引用整体并入本文。本

文的任何章节标题只是为了与37C.F.R.§1.77的建议保持一致或以其他方式提供组织队列而提供。这些标题不应限制或表征本文阐述的发明。

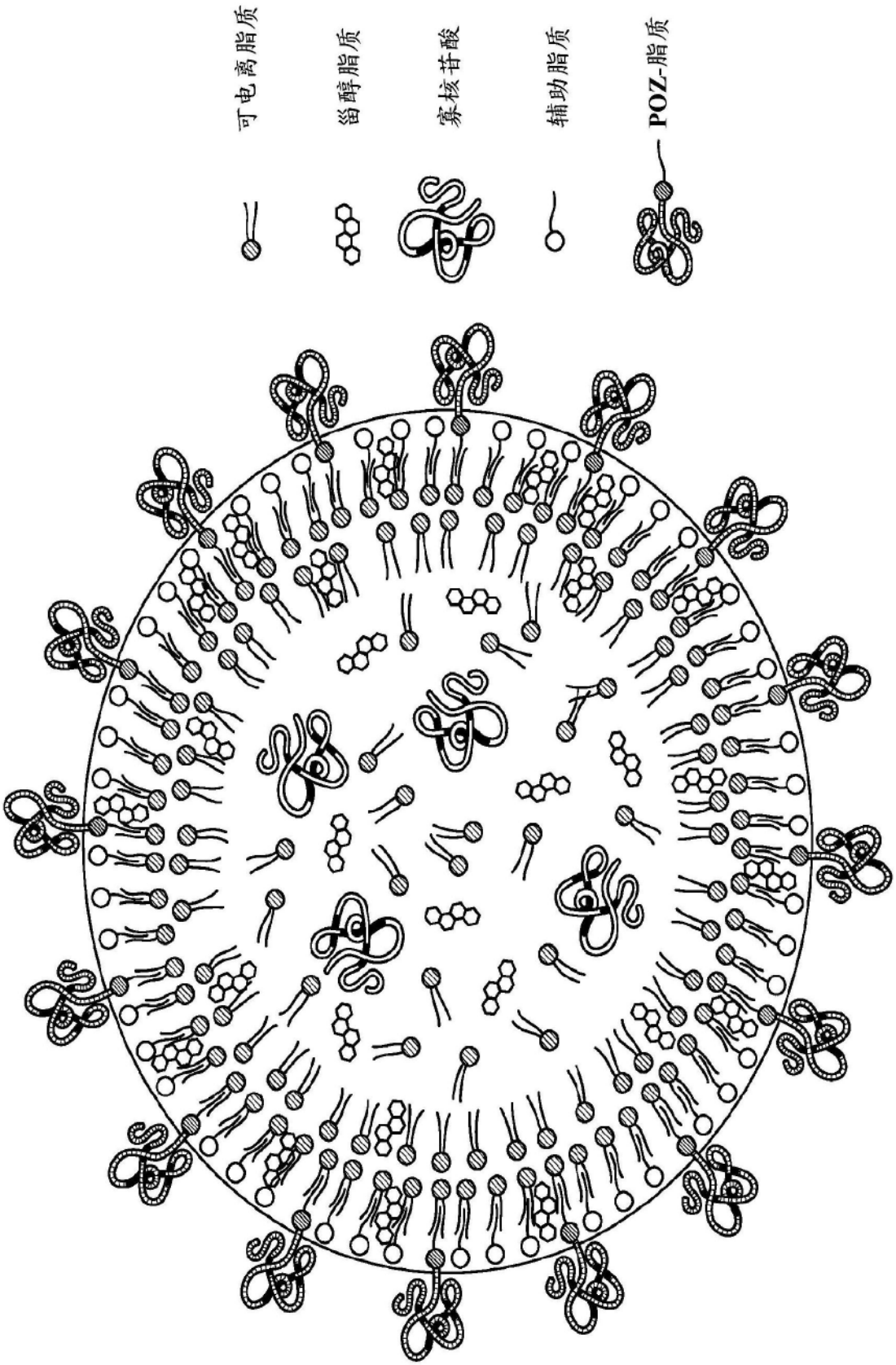


图1