



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 102985548 B

(45)授权公告日 2016.10.26

(21)申请号 201080031986.9

(22)申请日 2010.05.16

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 102985548 A

(43)申请公布日 2013.03.20

(30)优先权数据
61/178,962 2009.05.16 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2012.01.16

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2010/035049 2010.05.16

(87)PCT国际申请的公布数据
W02010/135207 EN 2010.11.25

(73)专利权人 崔坤元
地址 美国华盛顿州
专利权人 梁东 大卫·斯威德勒

(72)发明人 崔坤元 梁东 大卫·斯威德勒

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

代理人 顾晋伟 郑斌

(51)Int.Cl.
C12N 15/88(2006.01)

(56)对比文件
US 20010044147 A1, 2001.11.22,
US 20010044147 A1, 2001.11.22,
US 20050175682 A1, 2005.08.11,
CN 1882693 A, 2006.12.20,
US 20080299177 A1, 2008.12.04,
US 005948767 A, 1999.09.07,
US 20020102297 A1, 2002.08.01,
审查员 张林

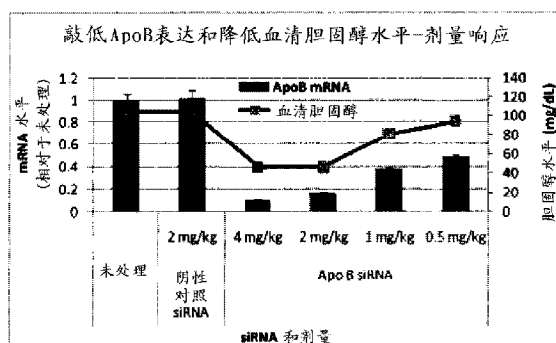
权利要求书1页 说明书52页 附图4页

(54)发明名称

用于递送治疗分子的包含阳离子两亲物和辅脂质的组合物

(57)摘要

本公开内容提供组合物,所述组合物可用于与治疗剂相联合,并可用于疾病和病症的诊断和治疗中。所述组合物可用于将药剂(例如,核酸治疗剂)递送至细胞、组织、器官和对象。



1. 一种包含阳离子脂质分子与多核苷酸的组合物, 其中所述组合物通过包括以下步骤的方法产生:

(i) 将有机溶剂中的阳离子脂质与水溶液中的多核苷酸混合以形成脂质与多核苷酸的水不溶性离子电荷复合物,

(ii) 从水溶液中回收沉淀, 并对沉淀进行干燥, 阳离子脂质与多核苷酸的摩尔电荷比为1:1; 所述阳离子脂质选自N-(1-(2,3-二油基氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵;

(iii) 将所述沉淀完全溶解在无水有机或极性质子惰性溶剂中以产生第一溶液,

(iv) 将辅脂质溶于无水有机或极性质子惰性溶剂中以产生第二溶液, 所述辅脂质由重量份为4.4份N6-四(3-氨基丙基)-1,3-丙二胺胆固醇氨基甲酸酯/2.7~4.4份磷脂/14.4份胆固醇PEG/1.6份胆固醇组成的; 所述磷脂选自: 磷脂酰乙醇胺、磷脂酰胆碱、磷脂酰肌醇、鞘磷脂和二磷脂酰甘油; 所述磷脂包含8~22个碳的烷基链; 所述烷基链选自: 18:2、20:4和22:6烷基链; 所述PEG具有200至5000kDa之间的分子量;

(v) 将所述第一溶液与所述第二溶液混合, 以及

(vi) 从步骤(v)所产生的溶液中除去溶剂。

2. 权利要求1的组合物, 其中步骤(iii)和(iv)的所述无水有机或极性质子惰性溶剂选自: 二甲基乙酰胺、二甲基甲酰胺、N-甲基吡咯烷、二醇、氯仿、二氯甲烷、亚甲基氯和环醚。

3. 权利要求1的组合物, 其中所述多核苷酸选自: DNA和RNA及其混合物。

4. 权利要求1的组合物, 其还包含水性溶剂, 并且其中所述组合物通过还包括以下步骤的方法产生:

(vii) 添加水性溶剂以形成脂质和核酸的自乳化悬液, 其中所述悬液由小于400nm单分散的粒度分布组成,

其中所述组合物适于施用至对象。

5. 权利要求4的组合物, 其适于将所述多核苷酸递送至皮肤。

6. 权利要求4的组合物, 其适于注射。

7. 权利要求4的组合物, 其适于将所述多核苷酸递送至肝。

8. 权利要求4的组合物, 其适于将所述多核苷酸递送至肺。

9. 权利要求4的组合物, 其适于将所述多核苷酸递送至肿瘤。

用于递送治疗分子的包含阳离子两亲物和辅脂质的组合物

技术领域

[0001] 所描述的是核酸与阳离子脂质的稳定储存的盐和使用所述盐来制备脂质制剂的方法,当施用至哺乳动物时,所述制剂用于将核酸递送至组织细胞。

背景技术

[0002] 目前,很多不同类型的核酸正被开发为用于治疗很多疾病的治疗剂。这些核酸包括基因治疗中的DNA、基于质粒的干扰核酸、用于RNA干扰(RNA interference, RNAi)的小干扰核酸(包括siRNA、miRNA、反义分子、核酶和适配体(aptamer))。随着这些分子被开发,已建立起以这样的形式生产它们的需要:稳定和具有长的保质期,并且其可很容易地被整合进入无水有机或无水极性质子惰性溶剂,以使得可以包封核酸而没有可发生于极性水溶液或非极性溶剂中的副反应。

[0003] 本发明涉及协助细胞内递送生物活性和治疗性分子的新脂质组合物。本发明还涉及包含所述脂质组合物的药物组合物,并且其可用于递送治疗有效量的生物活性分子进入患者的细胞。

[0004] 将治疗性化合物递送至对象对于其治疗作用是重要的,并且其可经常受到化合物到达靶细胞和组织之能力有限的阻碍。通过各种递送方式改善所述化合物进入组织的目标细胞是至关重要的。本发明涉及有利于生物活性分子的靶向性细胞内递送的新颖的脂质、组合物和制备方法。

[0005] 经常无法实现有效靶向患者组织的生物活性分子的例子包括:(1)许多蛋白,包括免疫球蛋白,(2)多核苷酸,例如,基因组DNA、cDNA或mRNA(3)反义多核苷酸;和(4)很多合成的或天然的低分子量化合物,例如,肽激素和抗生素。

[0006] 医药从业者现在面临的一个根本性挑战是很多不同类型的核酸正被开发为用作治疗很多疾病的治疗剂。这些核酸包括基因治疗中的DNA、用于RNA干扰(RNAi)的质粒小干扰核酸(interfering nucleic acid, iNA)、反义分子、核酶、antagomir、微RNA和适配体。随着这些核酸被开发,有需要生产容易制造并且可被容易地递送至目标组织的脂质制剂。

发明内容

[0007] 本发明的一个方面是由阳离子脂质和多核苷酸的固体混合物组成的组合物,其中所述阳离子脂质分子与所述多核苷酸形成水不溶性离子复合物(下文中称为脂质/核酸盐)。一个实施方案是这样的脂质/核酸盐,其中阳离子脂质与多核苷酸的核苷酸单体的摩尔比在0.1至10之间,优选在0.5至2之间。本发明的一个实施方案是这样的脂质/核酸盐,其中所述阳离子脂质选自:N,N-二油基-N,N-二甲基氯化铵(N,N-dioleoyl-N,N-dimethylammonium chloride, DODAC);N-(1-(2,3-二油基氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵(N-(1-(2,3-dioleoyloxy)propyl)-N,N,N-trimethylammonium chloride, DOTMA);N,N-二甲基-(2,3-二油基氧基)丙胺("N,N-dimethyl-(2,3-dioleoyloxy)propylamine, DODMA");N,N-二硬脂基-N,N-二甲基溴化铵("N,N-distearyl-N,N-dimethylammonium

bromide, DDAB"); N-(1-(2,3-二油酰基氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵("N-(1-(2,3-dioleoyloxy)propyl)-N,N,N-trimethylammonium chloride, DOTAP"); 3-(N-(N',N'-二甲基氨基乙烷)-氨基甲酰基)胆固醇(3-(N-(N',N'-dimethylaminoethane)-carbamoyl)cholesterol, DC-Chol); N-(1,2-二肉豆蔻基氧基丙-3-基)-N,N-二甲基-N-羟乙基溴化铵("N-(1,2-dimyristyloxyprop-3-yl)-N,N-dimethyl-N-hydroxyethyl ammonium bromide, DMR1E"); 1,2-二亚油基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(1,2-dilinoleyloxy-N,N-dimethylaminopropane, DLinDMA); 和1,2-二亚麻基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(1,2-Dilinolenyloxy-N,N-dimethylaminopropane, DLenDMA)、双十八烷基二甲基铵(dioctadecyl dimethyl ammonium, DODMA)、二硬脂基二甲基铵(distearyl dimethyl ammonium, DSDMA)、1,2-二亚油基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(1,2-dilinoleyloxy-N,N-dimethylaminopropane, DLinDMA)、1,2-二亚麻基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(1,2-dilinolenyloxy-N,N-dimethylaminopropane, DLenDMA)、N⁴-精胺胆固醇氨基甲酸酯(GL-67)、N⁴-亚精胺胆固醇氨基甲酸酯(GL-53)、1-(N⁴-精胺)-2,3-二月桂基甘油氨基甲酸酯(GL-89)和其混合物。最优选的是,所述脂质选自DOTAP、DODAP、DLinDMA、DC-Chol和DOTMA。本发明的另一方面是脂质/核酸盐,其中所述核酸选自:DNA、RNA、反义核酸、适配体、antagamer、基于质粒的干扰核酸(iNA)、核酶、小干扰核酸(small interfering nucleic acid, siRNA)、微RNA(miRNA)和其混合物。优选地,所述脂质/核酸盐为无水固体的形式(即,其中的水已在真空中或通过气流(优选氮气)中干燥而被除去)。

[0008] 本发明的另一个方面是脂质/核酸盐,其是通过这样的方法制造的:在水溶剂中将阳离子脂质与多核苷酸组合,产生水不溶性沉淀,分离所述沉淀,并干燥所述沉淀。一个实施方案是能够溶于有机的或极性质子惰性溶剂的脂质/核酸盐。

[0009] 本发明的另一方面是包含溶于有机或质子惰性溶剂中的脂质/核酸盐的溶液("所述溶液")。

[0010] 一个实施方案是还包含氨基甲酸酯的所述溶液,优选的氨基甲酸酯选自:N6-四(3-氨基丙基)-1,3-丙二胺胆固醇氨基甲酸酯、N4-精胺胆固醇氨基甲酸酯、N4-亚精胺胆固醇氨基甲酸酯、1-(N4-精胺)-2,3-二月桂基甘油氨基甲酸酯和2,3-二油基氧基-N-[2(精胺甲酰胺基)乙基]-N,N-二甲基-1-丙胺三氟乙酸盐。

[0011] 另一个实施方案是还包含中性磷脂的所述溶液,优选的磷脂选自:磷脂酰乙醇胺、磷脂酰胆碱、磷脂酰肌醇、鞘磷脂和二磷脂酰甘油,并且优选包含8~22个碳的烷基链的磷脂,最优选的链选自:18:2、20:4和22:6烷基链。

[0012] 另一个实施方案是还包含固醇的所述溶液,优选的固醇选自:胆固醇、羊毛固醇、24-异丙基胆固醇、nicasterol、7-脱水胆固醇、24-脱水胆固醇、柳珊瑚固醇(gorgosterol)、黑海固醇(dinosterol)、24S-羟基胆固醇、植物固醇(phytosterol)、麦角固醇、豆固醇、菜油固醇、岩藻固醇、β-谷固醇、植物甾烷醇(phytostanol)、固醇酯、固醇基糖苷和固醇基烷基醚。

[0013] 另一个实施方案是还包含脂质-PEG化合物的所述溶液,优选地,其中的脂质为磷脂或固醇,并且优选具有200至5000kDa之间分子量的PEG。

[0014] 本发明的另一方面是使所述溶液还包含一种或多种脂质的溶液,所述脂质选自:胆固醇、连接了聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)的胆固醇(1K)、磷脂和N6-四(3-氨基

丙基)-1,3-丙二胺胆固醇氨基甲酸酯。一个实施方案是这样的所述溶液,其中磷脂酰乙醇胺是由具有或不具有不饱和键的8~24烷基链组成的。另一个实施方案是还包含多种比例的上述组合物的所述溶液,优选地,1份多核苷酸/4.4份N6-四(3-氨基丙基)-1,3-丙二胺胆固醇氨基甲酸酯/4.4份磷脂酰乙醇胺/14.4份胆固醇PEG/1.6份胆固醇(重量/重量)。另一个实施方案是还包含1份多核苷酸/8.8份N6-四(3-氨基丙基)-1,3-丙二胺胆固醇氨基甲酸酯/2.2份磷脂酰乙醇胺/14.4份胆固醇PEG/1.6份胆固醇(重量/重量)的溶液。另一个实施方案是还包含1份多核苷酸/6.6份N6-四(3-氨基丙基)-1,3-丙二胺胆固醇氨基甲酸酯/2.2份磷脂酰乙醇胺/14.4份胆固醇PEG/1.6份胆固醇(重量/重量)的溶液。另一个实施方案是还包含1份多核苷酸/4.4份N6-四(3-氨基丙基)-1,3-丙二胺胆固醇氨基甲酸酯/4.4份磷脂酰乙醇胺/21.6份胆固醇PEG/4.8份胆固醇(重量/重量)的溶液。

[0015] 本发明的另一方面是还包含1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、胆固醇和C16PEG750神经酰胺的溶液。

[0016] 本发明的另一方面是还包含1,2-二亚油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、胆固醇和脂质-PEG的溶液,所述脂质-PEG选自:DSPE-PEG、DOPE-PEG、胆固醇-PEG。

[0017] 本发明的另一方面是适合将核酸递送至皮肤的任何上述溶液。

[0018] 本发明的另一方面是通过从任何上述溶液中除去溶剂而获得的固体制剂。

[0019] 本发明的另一方面是通过从任何上述溶液中除去溶剂并将所产生的固体悬浮在水溶液中而获得的含水制剂(aqueous formulation),优选产生适于施用至对象的溶液,最优选适于注射。

[0020] 本发明的另一方面是适于将治疗性分子递送至肝、肺或肿瘤的任何上述制剂。

附图说明

[0021] 图1.其显示肝(ApoB)siRNA递送制剂的剂量应答曲线。以指定的剂量水平给Balb/C小鼠静脉施用单剂量的0.2ml配制的ApoB siRNA。注射之后两天,收获肝,用于以实时RT-PCR方法(GAPDH为参比基因)分析基因表达。还收获了血清,用于分析总胆固醇的水平。每个数据点表示平均值+SEM(n=6)。小鼠肝中ApoB基因的敲低与血清胆固醇水平的改变相关。

[0022] 图2.其显示在Balb/C小鼠中对ApoB基因表达和相应胆固醇降低的时间过程研究,以给药体积0.2ml/小鼠和2mg/kg给所述小鼠静脉施用单剂量的配制的siRNA。在限定的时间点收获肝组织,按上文的描述用于分析基因表达。肝中的基因敲低和血清中的胆固醇改变持续了几乎3周。

[0023] 图3.以0.2ml(4mg/kg siRNA)的给药体积,给129S1/svImJ小鼠静脉施用单剂量的siRNA肺特异性递送制剂。三天之后,收获肺和肝,用于以实时RT-PCR法(GAPDH和 β -肌动蛋白为参比基因)分析基因表达。每个数据点表示平均值+SEM(n=5)。目标基因的表达水平在肺(A)中被显著敲低(knock down),而在肝(B)中没有被显著敲低。Specs-11和Specs-12是靶向不同基因的siRNA。

[0024] 图4.以指定的剂量水平给129S1/svImJ小鼠静脉施用单剂量的0.2ml配制的siRNA。3天之后,收获肺(A)和肝(B),用于以实时RT-PCR法(GAPDH和 β -肌动蛋白为参比基因)分析基因表达。每个数据点表示平均值+SEM(n=5)。在肺中,目标基因的表达水平以剂量响应的方式被敲低。

[0025] 图5.以2mg/kg给Balb/C小鼠静脉施用0.2ml单剂量的配制的siRNA。两天之后,收获肿瘤(A)和肝(B),用于以实时RT-PCR法(GAPDH为参比基因)分析基因表达。该肿瘤模型是通过注射EMT6细胞(源自Balb/C小鼠的小鼠乳腺肉瘤)进入左下肝叶的Glisson被膜(Glisson capsule)而产生的。每个数据点表示平均值+SEM(n=6)。

具体实施方式

[0026] 通过提供新方法和采用具有有机反离子的核酸的组合物,本发明满足了这些需要并且实现了其他目的和优势。

[0027] 通过以非水溶的和稳定的形式提供有机反离子核酸盐(尤其是有机盐-干扰核酸),本发明进一步满足了该需要。这些非水溶性的沉淀是通过在其中的阳离子脂质分子复合物与核酸形成阳离子化合物-核酸沉淀的条件下,使有机阳离子(即,具有疏水/亲脂基团的正电荷的化合物,包括但不限于含有质子化的有机胺为阳离子的有机化合物,例如,阳离子脂质和普鲁卡因)的溶液与核酸的水溶液相接触而产生的。具有导致核酸不溶于水的碳数目或足够程度疏水性的阳离子有机分子发生沉淀。所产生的沉淀含有与核酸中存在的核苷酸数目1:1电荷摩尔浓度量的阳离子脂质分子正电荷。也将使用小于核酸中存在的核苷酸数目1:1电荷摩尔浓度用于部分核酸沉淀。可使用过滤、离心以及化学和物理方法领域的技术人员可获得的其他方法从水性液(aqueous liquor)中回收核酸-有机阳离子脂质沉淀。可干燥沉淀出的阳离子脂质盐,并进行多种机械处理以使其适于整合进核酸药物制剂的固体和液体剂型中。出人意料的是,某些有机阳离子核酸的水不溶性有机沉淀已被确定可以很容易地溶于很多常见的有机溶剂中,所述溶剂包括极性质子惰性类的溶剂(二甲基乙酰胺、二甲基甲酰胺、N-甲基吡咯烷、二甘醇二甲醚(diglyme)和其他醚二醇、氯仿、二氯甲烷和其他卤化有机溶剂、四氢呋喃和其他环醚溶剂),可在无水条件下应用这些溶剂,并且其具有在化学转化和试剂反应成为新化学形式中使用的工业价值。

[0028] 本领域技术人员会很容易地理解的是,当溶于无水的、质子惰性的溶液中时,可使核酸沉淀与多种反应性中间体接触以通过化学反应将所述核酸转化成为新形式的核酸。这些反应包括但不限于核糖和脱氧核糖上伯醇和仲醇的酰化以连接荧光探针或报告分子,甲基化化学以转化核糖核酸成为耐核酸酶的2'-O-甲基化的核糖核酸,尿嘧啶、胸腺嘧啶、胞嘧啶、腺嘌呤和鸟嘌呤环外氨基基团的酰胺化以保护核酸的反应性游离氨基基团。预想末端一级羟基基团的化学修饰是非常简便的反应,并可用于将胆固醇和其他疏水实体偶连入应用于治疗性药物和基因递送应用的核酸聚合物中。该方法的应用可扩展至组分天然核苷(包括肌苷和在转运核糖核酸中发现的很多修饰的RNA核苷)的回收和化学修饰。化学转化可影响新的物理和化学特性,例如,增加对化学和酶降解的耐受,器官、组织和细胞特异性的疾病靶向和增加核酸用于其他药学和工业应用中的价值。

[0029] 通过将核酸的第一溶液(其通常为水溶液)与阳离子脂质的溶液一起混合来完成核酸溶液与阳离子脂质的接触。所述阳离子脂质可处于有机或水性溶剂的溶液中。本领域的技术人员会理解,可通过任何数目的方法来进行该混合,例如通过机械方法(例如通过使用涡旋混合器或注射泵和搅拌反应器)来进行混合。

[0030] 可在阳离子脂质核酸盐的制造中使用的阳离子脂质的例子包括多种脂质种类的任何一种,所述脂质种类在选定的pH下(例如生理pH(例如,约为7.0的pH))带有净正电荷。

本文中使用的生理pH是指生物流体(biological fluid)(例如,血液或淋巴液)的pH,以及细胞区室(例如,内体(endosome)、酸性内体或溶酶体)的pH。所述脂质包括但不限于N,N-二油基-N,N-二甲基氯化铵("DODAC");N-(1-(2,3-二油基氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵("DOTMA");N,N-二甲基-(2,3-二油基氧基)丙胺("DODMA");N,N-二硬脂基-N,N-二甲基溴化铵("DDAB");N-(1-(2,3-二油酰基氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵("DOTAP");3-(N-(N',N'-二甲基氨基乙烷)-氨基甲酰基)胆固醇("DC-Chol");N-(1,2-二肉豆蔻基氧基丙-3-基)-N,N-二甲基-N-羟乙基溴化铵("DMRIE");1,2-二亚油基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLinDMA);和1,2-二亚麻基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLenDMA)。以下脂质是阳离子脂质,并且在低于生理pH时具有正电荷:1,2-二肉豆蔻酰-3-二甲基铵丙烷(1,2-dimyristoyl-3-dimethylammonium propane,DODAP)、DODMA、DMDMA等。这些脂质和相关的类似物已在共同未决定的U.S.Ser.No.08/316,399;U.S.Pat.No.5,208,036;5,264,618;5,279,833和5,283,185中描述。此外,很多阳离子脂质的商品化制剂是可获得的,并且其可被用于本发明。除了阳离子脂质之外,也可以使用带有正电荷的任何有机阳离子用于核酸沉淀,并且使用了所述有机阳离子。

[0031] 可在阳离子-核酸沉淀的制造中使用的有机阳离子可处于水中以形成胶束,或以增溶状态处于醇中或处于水和醇的混合物中。在一些情况下,所述有机阳离子也处于其他有机溶剂中(例如,氯仿),以与含有核酸的水溶液混合。蒸发有机溶剂之后将形成沉淀。

[0032] 本公开内容提供药学上可接受的核酸组合物,所述组合物用于治疗性递送核酸、质粒、siRNA、miRNA、反义核酸、核酶、适配体、antagomir和基因沉默核酸等。这些组合物和方法可用于预防和/或治疗哺乳动物中的疾病。本发明的阳离子脂质核酸盐导致阳离子核酸盐在有机溶剂(例如,二氯甲烷、氯仿、THF、1-辛醇和很多生物相容溶剂(例如,DMSO、二甲基乙酰胺、月桂酰二醇)和其他油性载体(例如,肉豆蔻酸异丙酯,油酸酯,甲基、乙基、异丙基和更高级烷基取代基)中具有显著提高的溶解性。

[0033] 随后,这些阳离子脂质核酸盐可被重悬于有机溶剂中,并在与其他脂质的混合后产生核酸脂质复合物,所述复合物可被施用至个体,用于基因治疗(使用质粒DNA作为核酸),或用于下调基因(使用反义核酸、siRNA、miRNA、核酶),或抑制其他病症(使用适配体为核酸)。

[0034] 定义

[0035] 本文中提供的技术术语的定义应被解释为无需提及地包括与本领域技术人员已知的这些术语相关的那些意义,并不意在限制本发明的范围。

[0036] 在描述本发明中和在权利要求书中,没有数量词修饰的名词表示一个/种或多个/种。术语“包含”、“具有”、“包括”和“含有”要解释为开放性术语,其意为例如“包括但不限于”。本文中一系列值的记载分别涉及落入该范围之内的每个和任何分别的值,如同其在本文中分别被记载,无论范围内的某些值是否被明确地列举。本文中使用的特定值将被理解为举例而非限制本发明的范围。

[0037] 术语“有机阳离子”和“阳离子脂质”是指在选定的pH(例如,生理pH(例如,约7.0的pH))下带有净正电荷的若干脂质种类或有机化合物中的任一种。U.S.专利公开No.20060083780;U.S.Pat.No.5,208,036;5,264,618;5,279,833;5,283,185;5,753,613;U.S.Pat.No.5,767,099和5,785,992;和PCT公开No.WO 96/10390中描述了很多阳离子脂质

和相关的类似物,其在本发明中也有用。阳离子脂质的例子包括但不限于N,N-二油基-N,N-二甲基氯化铵(DODAC)、双十八烷基二甲基铵(DODMA)、二硬脂基二甲基铵(DSDMA)、N-(1-(2,3-二油基氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTMA)、N,N-二硬脂基-N,N-二甲基溴化铵(DDAB)、N-(1-(2,3-二油酰基氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTAP)、3-(N-(N',N'-二甲基氨基乙烷)-氨基甲酰基)胆固醇(DC-Chol)、N-(1,2-二肉豆蔻基氧基丙-3-基)-N,N-二甲基-N-羟乙基溴化铵(DMRIE)、1,2-二亚油基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLinDMA)和1,2-二亚麻基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLenDMA)、N⁴-精胺胆固醇氨基甲酸酯(GL-67),N⁴-亚精胺胆固醇氨基甲酸酯(GL-53),1-(N⁴-精胺)-2,3-二月桂基甘油氨基甲酸酯(GL-89)和其混合物。作为非限制性的例子,在低于生理pH时具有正电荷的阳离子脂质包括但不限于1,2-二肉豆蔻酰基-3-二甲基铵丙烷(DODAP)、DODMA和DSDMA。在一些情况下,阳离子脂质包含可质子化的叔胺头基、C18烷基链、头基和烷基链之间的醚连接和0至3个双键。所述脂质包括例如DSDMA、DLinDMA、DLenDMA和DODMA。阳离子脂质还可包含醚连接和pH可滴定的头基。所述脂质包括例如DODMA。所述阳离子脂质可为例如DODAC、DDAB、DOTAP、DOTMA、DODMA、DLinDMA、DLenDMA或其混合物。在本发明中有用的阳离子脂质可为在生理pH下带有净正电荷的若干脂质种类的任一种。所述脂质包括但不限于DODAC、DODMA、DSDMA、DOTMA、DDAB、DOTAP、DOSPA、DOGS、DC-Chol、DMRIE和其混合物。此外,阳离子脂质的很多商业化制剂是可获得的,并可用于本发明。

[0038] 本文中使用的术语干扰核酸(iNA)是指具有有义(sense)和反义(antisense)链的核酸双链,当进入RISC复合物时,其诱导mRNA的酶促降解。一般来说,每条链含有预先确定的RNA核苷酸,所述链可含有RNA类似物、RNA和RNA类似物、RNA和DNA、RNA类似物和DNA,或一条完全是DNA的链和一条是RNA的链,只要iNA构建体诱导同源mRNA的酶促降解即可。

[0039] 极性质子惰性溶剂是与离子溶剂共有离子溶解能力但缺乏酸性氢的溶剂。这些溶剂一般具有高介电常数和高极性。极性质子惰性溶剂的例子为二甲亚砜、二甲基甲酰胺、二氧六环和六甲基磷酸三酰胺、丙酮、乙腈、N,N-二甲基甲酰胺(N,N-dimethylformamide, DMF)、N-甲基吡咯烷酮(N-methylpyrrolidone, NMP)、二甲基乙酰胺、二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)、环丁砜(sulfolane)、乙腈、六甲基磷酸三酰胺(hexamethylphosphoric triamide, HMPA)、吡啶、四甲基脲(TMU, tetramethylurea)、尿素类似物、N,N-二甲基甲酰胺HCON(CH₃)₂、N,N-二甲基乙酰胺(N,N-dimethylacetamide, DMA)CH₃CON(CH₃)₂和四甲基脲、(CH₃)₂NCON(CH₃)₂、1,3-二甲基-2-咪唑啉酮(1,3-dimethyl-2-imidazolidinone, DMI)和1,3-二甲基-3,4,5,6-四氢-2(1H)-嘧啶酮(1,3-dimethyl-3,4,5,6-tetrahydro-2(1H)-pyrimidinone, DMPU)。可以用DMPU替代相对毒性的六甲基磷酸三酰胺(hexamethylphosphoramide, HMPA)。

[0040] 本文中使用的术语“适配体”或“核酸适配体”包含与目标分子特异性结合的核酸分子,其中所述核酸分子含有在天然条件下可被目标分子识别的序列。或者,适配体可为与目标分子结合的核酸分子,其中所述目标分子并不天然地结合核酸。

[0041] 例如,适配体可用于结合蛋白的配体结合结构域,因而阻止天然配体与蛋白的相互作用。参见例如Gold, et al., Annu. Rev. Biochem. 64:763, 1995; Brody and Gold, J. Biotechnol. 74:5, 2000; Sun, Curr. Opin. Mol. Ther. 2:100, 2000; Kusser, J. Biotechnol. 74:27, 2000; Hermann and Patel, Science 287:820, 2000; 和Jayasena,

Clinical Chemistry 45:1628,1999。

[0042] “反义核酸”意为通过RNA-RNA或RNA-DNA或RNA-PNA(protein nucleic acid; Egholm et al.,1993 Nature 365,566)相互作用结合目标RNA并改变所述目标RNA活性的非酶核酸分子(对于其进展,参见Stein and Cheng,1993 Science 261,1004和Woolf et al.,U.S.Pat.No.5,849,902)。一般地来说,反义分子沿着所述反义分子的单连续序列与目标序列互补。然而,在某些实施方案中,反义分子可结合底物以使底物分子形成环,和/或反义分子可结合以使所述反义分子形成环。因此,所述反义分子可与两个(或甚至多个)非连续的底物序列互补,或反义分子的两个(或甚至多个)非连续的序列部分可与目标序列互补,或两者兼而有之。此外,通过DNA-RNA相互作用,反义DNA可用于靶向RNA,从而激活RNA酶H(RNase H),所述酶消化双链体中的目标RNA。反义寡核苷酸可包含一种或多种RNA酶H激活区,其能够激活RNA酶H切割目标RNA。反义DNA可化学合成或通过使用单链DNA表达载体或其等同物来表达。“反义RNA”是具有与目标基因mRNA互补的序列的RNA链,其可通过结合目标基因的mRNA来诱导RNAi。“反义RNA”是具有与目标基因mRNA互补的序列的RNA链,并且被认为可以通过结合目标基因mRNA来诱导RNAi。“有义RNA”具有与所述反义RNA互补的序列,并且与其互补反义RNA退火形成iNA。已经使用RNA合成仪(RNA synthesizer)常规地合成这些反义和有义RNA。

[0043] “核酸”是指脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸及其单链或双链形式的聚合物。该术语包括含有已知核苷酸类似物或修饰的主链残基或连接的核酸,所述核酸是合成的、天然的和非天然的,其与参考核酸具有类似结合特性,并且以与参考核苷酸类似的方式被代谢。所述类似物的例子非限制性地包括硫代磷酸酯、氨基磷酸酯、甲基磷酸酯、手性-甲基磷酸酯、2'-O-甲基核糖核苷酸、肽-核酸(peptide-nucleic acid,PNA)。

[0044] “RNA”意为包含至少一个核糖核苷酸残基的分子。“核糖核苷酸”意为在β-D-核糖-呋喃糖部分的2'位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(例如,部分纯化的RNA、基本纯的RNA)、合成的RNA、重组产生的RNA以及通过添加、删除、替代和/或改变一个或多肽核苷酸而不同于天然RNA的改变的RNA。所述改变可包括将非核苷酸物质添加至例如干扰RNA的末端或内部,例如在RNA的一个或多个核苷酸添加非核苷酸物质。本发明的RNA分子中的核苷酸还可包含非标准的核苷酸,例如非天然核苷酸或化学合成的核苷酸或脱氧核苷酸。这些改变的RNA可被称为类似物或天然RNA的类似物。本文中使用的术语“核糖核苷酸”和“RNA”是指含有至少一个核苷酸残基的分子。核糖核苷酸是在β-D-核糖-呋喃糖基团的2'位具有羟基基团的核苷酸。这些术语包括双链RNA、单链RNA、分离的RNA(例如,部分纯化的RNA、基本纯的RNA)、合成的RNA、重组产生的RNA以及通过添加、删除、替代和/或改变一个或多肽核糖核苷酸而不同于天然RNA的改变的RNA。所述改变可包括将非核苷酸物质添加至例如干扰RNA的末端或内部,例如在RNA的一个或多个核苷酸处添加非核苷酸物质。RNA分子中的核苷酸还可包含非标准的核苷酸,例如非天然核苷酸或化学合成的核苷酸或脱氧核苷酸。这些改变的RNA可被称为类似物。

[0045] 如本领域中认可的那样,本文中使用的“核苷酸”包括天然碱基(标准的)和本领域中公知的修饰碱基。所述碱基通常位于核苷酸糖部分的1'位。核苷酸通常包含碱基、糖和磷酸基团。所述核苷酸在糖、磷酸和/或碱基基团处可为未修饰的或修饰的(也可替换地称为核苷酸类似物、修饰的核苷酸、非天然核苷酸、非标准核苷酸等;参见例如Usman and

McSwiggen, 上文; Eckstein, et al, 国际PCT公开No. WO 92/07065; Usman, et al, 国际PCT公开No. WO 93/15187; Uhlman&Peyman, 上文, 其均通过引用并入本文)。Limbach, et al, Nucleic Acids Res. 22:2183, 1994总结了本领域中已知的修饰的核酸碱基的例子。可引入核酸分子的碱基修饰的一些非限制性的例子包括肌苷、嘌呤、吡啶-4-酮、吡啶-2-酮、苯基、假尿嘧啶、2,4,6-三甲氧基苯、3-甲基尿嘧啶、二氢尿苷、茶基、氨基苯基、5-烷基胞苷(例如, 5-甲基胞苷)、5-烷基尿苷(例如, 核糖胸苷)、5-卤代尿苷(5-溴代尿苷)或6-氮杂嘧啶或6-烷基嘧啶(例如, 6-甲基尿苷)、丙炔等(Burgin, et al., Biochemistry 35:14090, 1996; Uhlman&Peyman, 上文)。在该方面中, “修饰的碱基”意为在1'位不是腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶和尿嘧啶的核苷酸碱基或其等同物。

[0046] 本文中使用的互补核苷酸碱基是彼此形成氢键的一对核苷酸碱基。腺嘌呤(A)与胸腺嘧啶(T)配对或在RNA中与尿嘧啶(U)配对, 鸟嘌呤(G)与胞嘧啶(C)配对。核酸的互补区段或链彼此杂交(通过氢键结合而连接)。“互补”意为核酸可通过常规的Watson-Crick或其他非常规的结合模式与另一核酸序列形成氢键。

[0047] Antagomir是一种新型化学设计的反义寡核苷酸。Antagomir用于沉默内源性微RNA。

[0048] 微RNA(miRNA)是约21~23个核苷酸长度的调节基因表达的单链RNA分子。miRNA是由基因编码的, 其从DNA转录但不被翻译成蛋白(非编码RNA); 其反而从被称为pri-miRNA的一级转录本被加工成短的被称为pre-miRNA的茎环结构, 并最终被加工为功能性miRNA。成熟的miRNA分子与一个或多个信使RNA(messenger RNA, mRNA)分子部分互补, 并且其主要功能是下调基因表达。

[0049] 本文中使用的术语小干扰RNA(siRNA)(有时称为短干扰RNA或沉默RNA)是指一类16~29个核苷酸长度的双链RNA分子, 其发挥多种生物学作用。最显著的是, siRNA参与RNA干扰(RNAi)通路, 其中其干扰特异性基因的表达。除了其在RNAi通路中的作用之外, siRNA还在RNAi相关的通路中发挥作用, 例如作为抗病毒机制或在基因组的染色质结构的形成中发挥作用; 这些通路的复杂性仅在现在被阐明。

[0050] 本文中使用的术语RNAi是指受RNA诱导的沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC)控制的RNA依赖的基因沉默过程, 并且是通过细胞中的短双链RNA分子起始的, 其中其与催化性的RISC组分argonaute相互作用。当双链RNA或RNA样iNA或siRNA为外源性(来自具有RNA基因组的病毒感染或来自转染的iNA或siRNA)时, RNA或iNA被直接输入细胞质, 并被dicer酶切割成短的片段。初始的dsRNA也可为内源性的(来自细胞), 如从基因组的RNA编码基因表达的pre-微RNA。来自该基因的一级转录本首先被加工形成核仁中pre-miRNA的特征性茎环结构, 随后输出至细胞质以供dicer切割。因此, 外源性和内源性的两个dsRNA通路在RISC复合物处汇合。RNA诱导的沉默复合物(RISC)的活性组分是被称为argonaute蛋白的核酸内切酶, 其切割与其结合的siRNA或iNA的互补目标mRNA链。因为dicer产生的片段是双链的, 它们理论上各自可以产生功能性的siRNA或iNA。然而, 两条链中的仅一条(称为引导链(guide strand))结合所述argonaute蛋白, 并指导基因沉默。另一条反引导链(anti-guide strand)或乘客链(passenger strand)在RISC激活的过程中被降解。

[0051] 防腐剂的例子包括苯酚、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸酯、m-甲酚、硫柳汞、苯扎氯

铵和其混合物。

[0052] 核心复合物

[0053] 所述制剂优选通过将阳离子脂质核酸盐放入处于有机溶剂(尤其是质子惰性的极性溶剂)溶液中,并与上述一种或多种脂质的溶液混合而形成。所述脂质处于有机溶剂(优选离子惰性的极性溶剂)的溶液中。

[0054] 可在阳离子脂质核酸盐的制造中使用的阳离子脂质的例子包括多种脂质种类的任何一种,所述脂质种类在选定的pH下(例如,生理pH(例如,约为7.0的pH))带有净正电荷。本文中使用的生理pH是指生物流体(例如,血液或淋巴液)的pH,以及细胞区室(例如,内体、酸性内体或溶酶体)的pH。所述脂质包括但不限于N,N-二油基-N,N-二甲基氯化铵("DODAC");N-(1-(2,3-二油基氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵("DOTMA");N,N-二甲基-(2,3-二油基氧基)丙胺("DODMA");N,N-二硬脂基-N,N-二甲基溴化铵("DDAB");N-(1-(2,3-二油酰基氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵("DOTAP");3-(N-(N',N'-二甲基氨基乙烷)-氨基甲酰基)胆固醇("DC-Chol");N-(1,2-二肉豆蔻基氧基丙-3-基)-N,N-二甲基-N-羟乙基溴化铵("DMRIE");1,2-二亚油基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLinDMA);和1,2-二亚麻基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLenDMA)。以下脂质是阳离子脂质,并且在低于生理pH下具有正电荷:1,2-二肉豆蔻酰-3-二甲基铵丙烷(DODAP)、DODMA、DMDMA等。这些脂质和相关的类似物已在共同待定的U.S. Ser. No. 08/316,399; U.S. Pat. No. 5,208,036、5,264,618、5,279,833和5,283,185中描述。此外,很多阳离子脂质的商业化制剂是可获得的,并且其可被用于本公开内容。

[0055] 碳数目大于6,优选大约15,最优选大于18的某些有机阳离子的核酸阳离子有机盐沉淀可很容易地溶于很多常见的有机溶剂,包括极性质子惰性类的溶剂(二甲基乙酰胺、二甲基甲酰胺、N-甲基吡咯烷、二甘醇二甲醚和其他醚二醇、氯仿、二氯甲烷和其他卤代有机溶剂、四氢呋喃和其他环醚溶剂)。可在无水条件下应用这些溶剂,并且其具有在化学转化和试剂反应成为新化学形式中使用的工业价值。

[0056] 通过将核酸溶液(其通常为水溶液)与阳离子脂质的溶液一起混合来完成核酸溶液与阳离子脂质溶液的接触。所述阳离子脂质可处于有机或水性溶剂的溶液中。阳离子脂质与核酸中存在的核苷酸之比应当优选按重量2~3比1。本领域的技术人员会理解,可通过任何数目的方法来进行该混合,例如通过机械方法(例如通过使用涡旋混合器或注射泵和搅拌反应器)来进行混合。

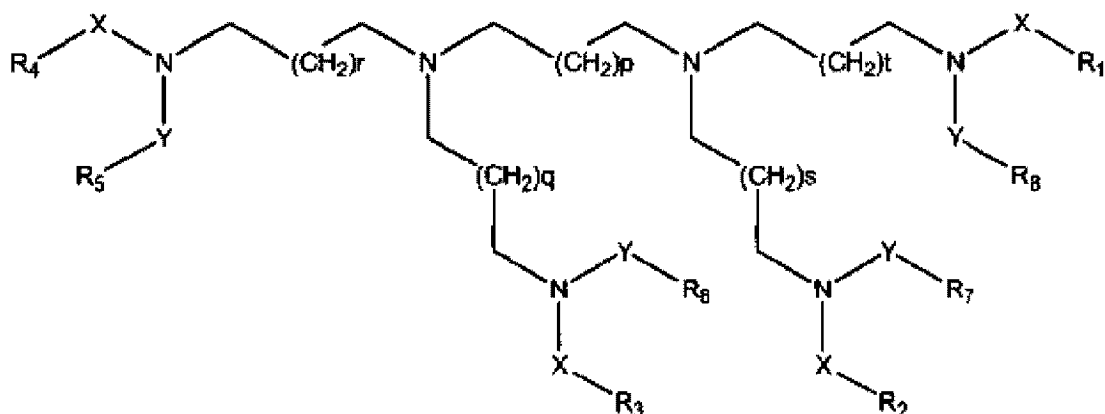
[0057] 具有辅脂质(colipid)的制剂

[0058] 在设计用于辅助细胞内递送生物活性分子(尤其是核酸分子,例如DNA和siRNA)的众多化合物中,大多具有可与极性和非极性环境相互作用的极性和非极性结构域。具有两种所述结构域的化合物可被称为两亲物(amphiphile),并且已公开很多满足该定义的用于辅助所述细胞内递送(无论体外或体内应用)的脂质和合成脂质。

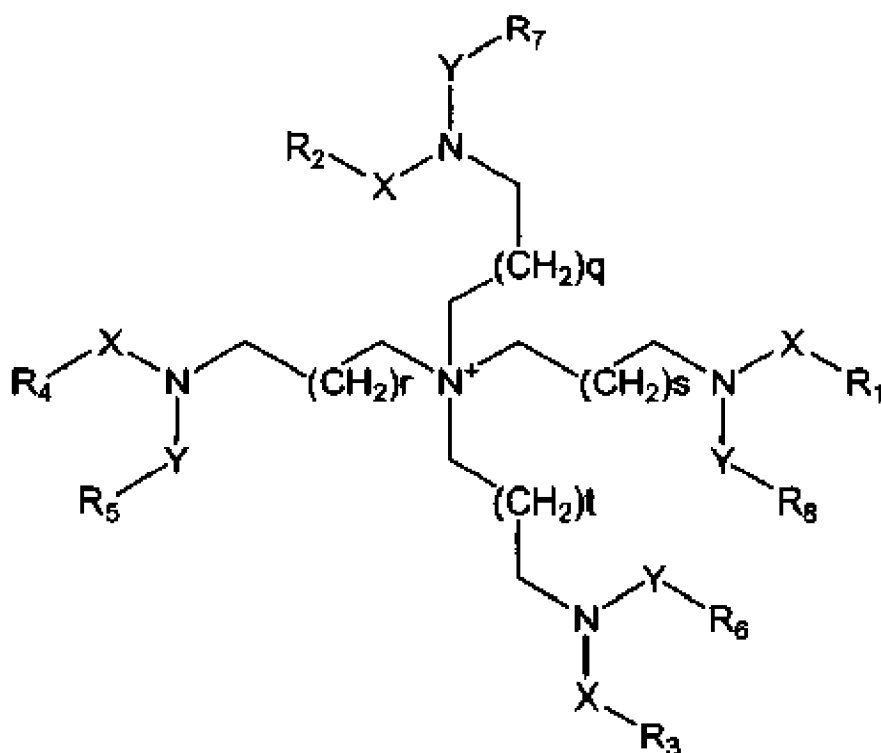
[0059] 该核心复合物可在有机或极性质子惰性溶剂中与辅脂质组合。所述辅脂质为一种或多种选自(i)脂质氨基甲酸酯、(ii)中性的磷脂、(iii)固醇和(iv)固醇-PEG化合物的脂质。

[0060] 脂质氨基甲酸酯包括以下分子:

[0061]



或



[0062] 其中

[0063] p、q、r、s和t各自独立地选自0至16；

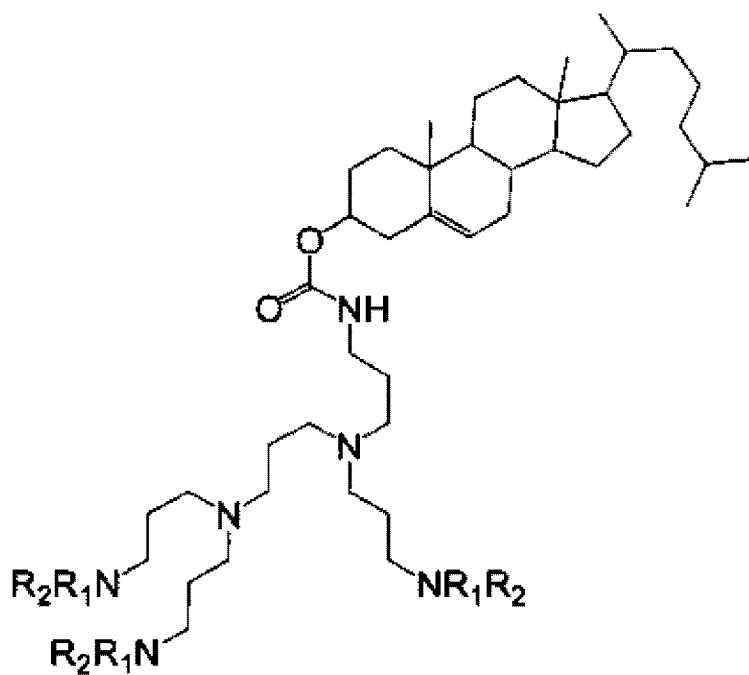
[0064] X和Y各自独立地选自H、Ac、Boc或Piv，或选自由C、酰胺、氨基甲酸酯、琥珀酰胺、马来酰亚胺、环氧化物和聚氨酯组成的接头基团；和

[0065] R₁、R₂、R₃、R₄、R₅、R₆、R₇和R₈各自独立地选自：任何组合的C₁~C₂₆烷或烯、多不饱和脂质、类固醇、PUFA、甾或精氨酸；并且其中所述类固醇选自羊毛固醇、麦角固醇、链固醇(desmosterol)、植物固醇(例如，豆固醇)或者胆盐或胆盐衍生物(例如，胆酸、脱氧胆酸、氢脱氧胆酸(hydrodeoxycholic acid)或脱氢胆酸)。[0066] 以下列表中提供优选的实施方案(组α、β和γ；式I~LXVIII)，其中R₁为H；R₂为Me或

叔丁氧基羰基(Boc); R_1 和 R_2 为胍基或N-CNNH);或 R_1 为氢并且 R_2 为通过酰胺键形成的精氨酸。胆固醇部分可替换为羊毛固醇、麦角固醇、链固醇、植物固醇(例如,豆固醇)或胆盐或胆盐衍生物(例如,胆酸、脱氧胆酸、猪脱氧胆酸(hyodeoxycholic acid)和脱氢胆酸)。

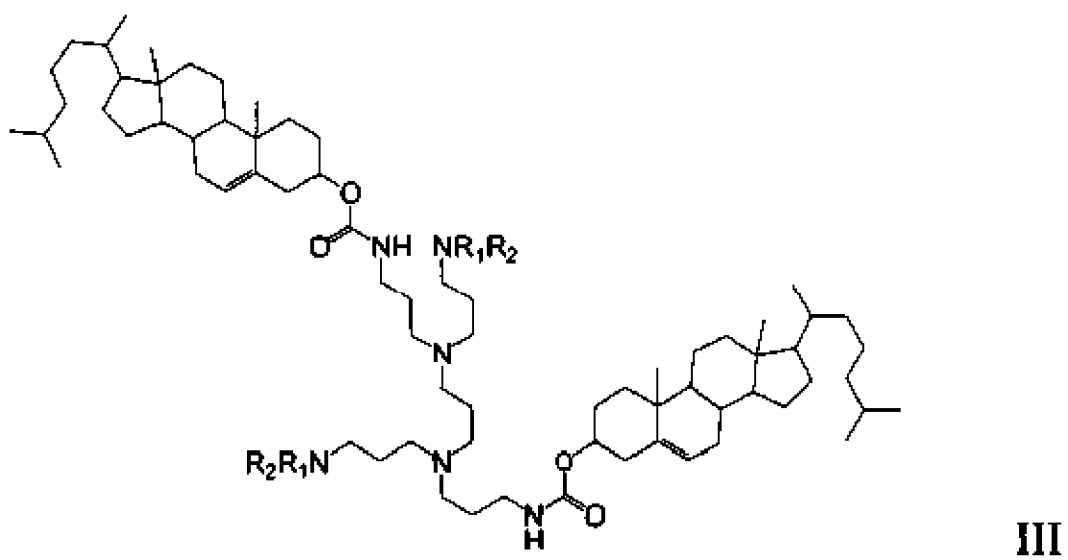
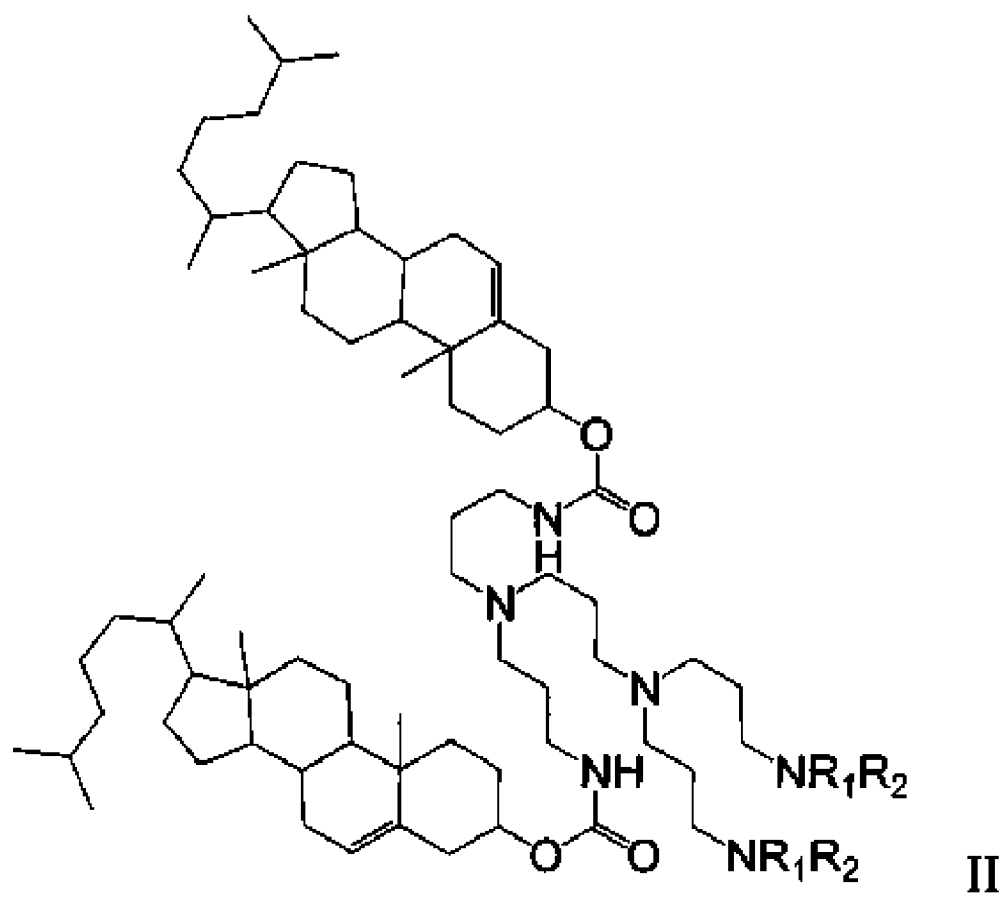
[0067] α 组脂质:

[0068]

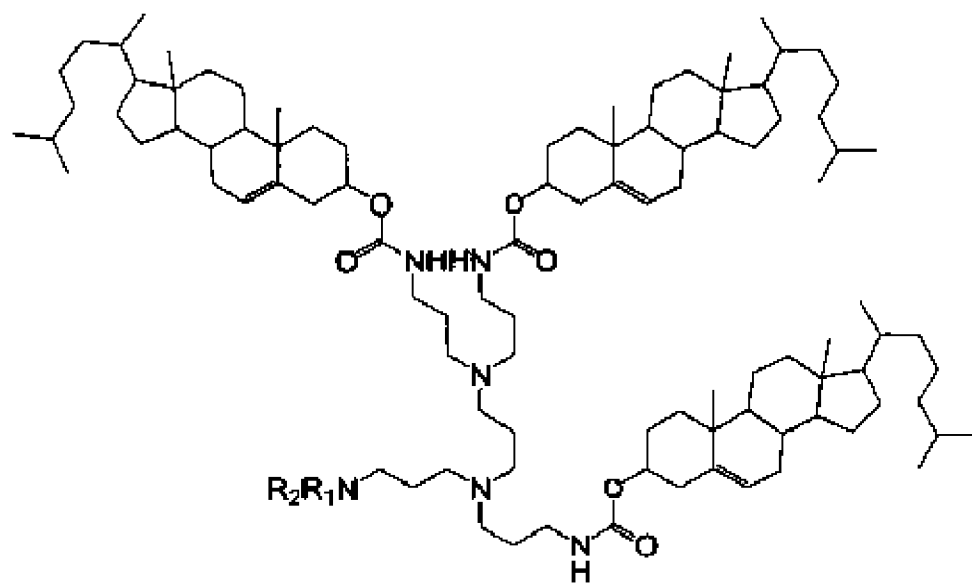


I

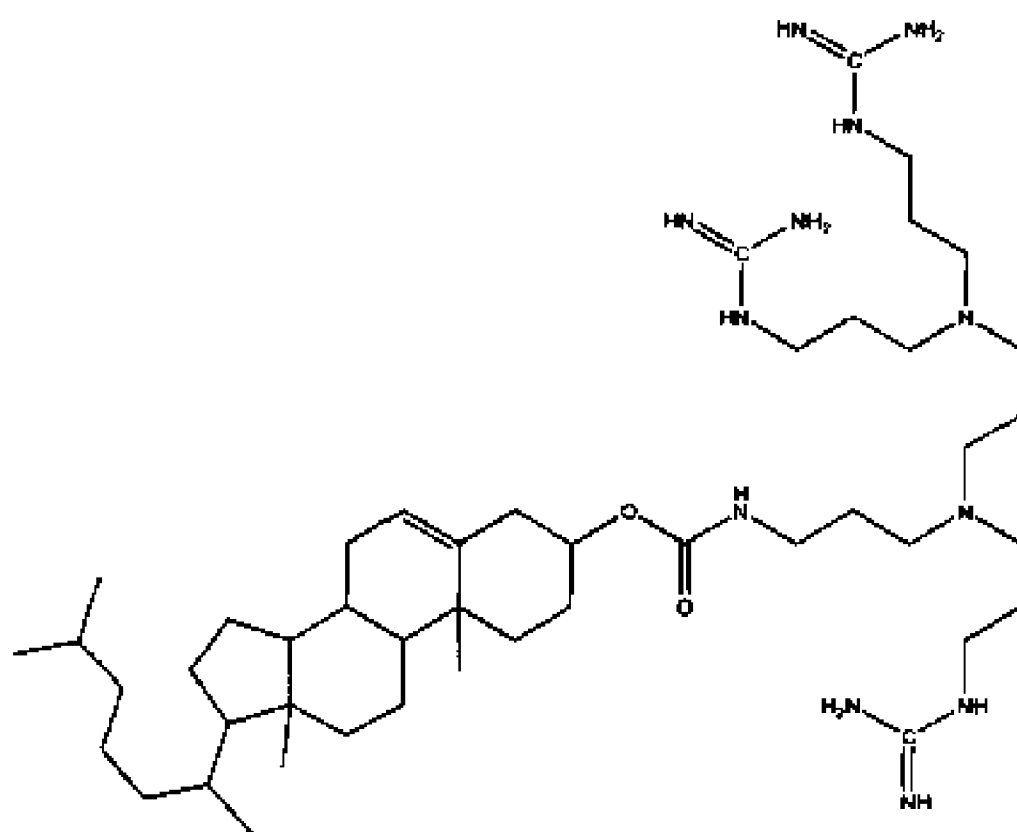
[0069]



[0070]



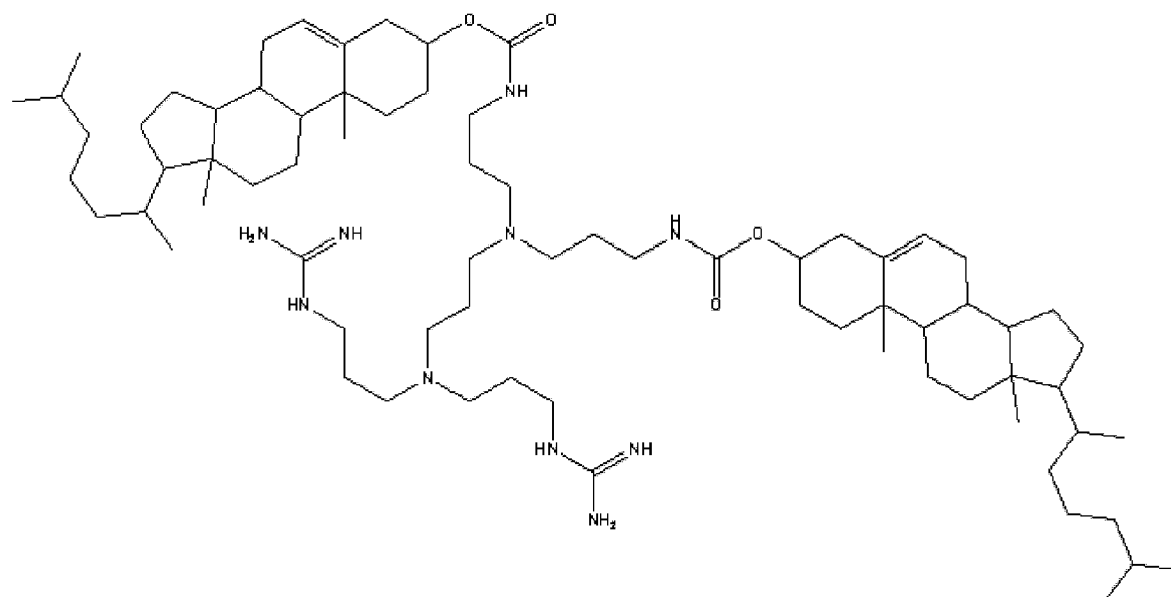
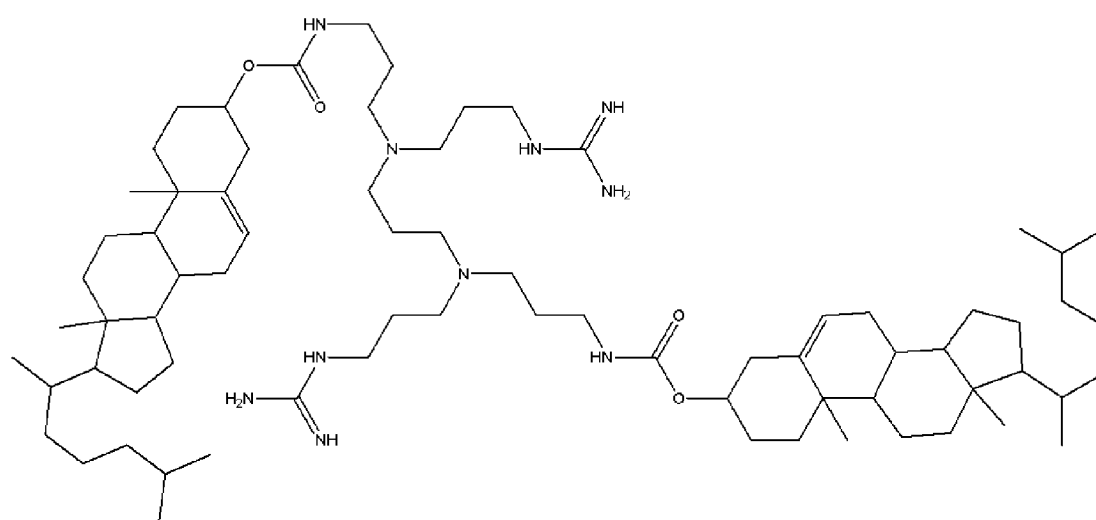
IV



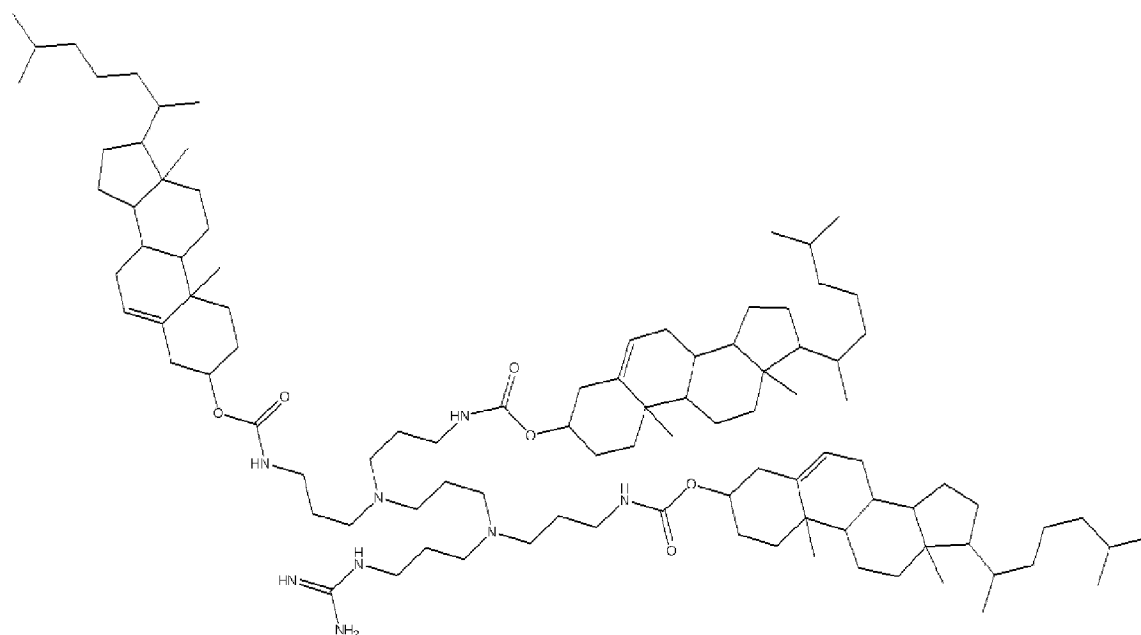
V

[0071] 相同Di-Chol衍生物的2位置-异构体

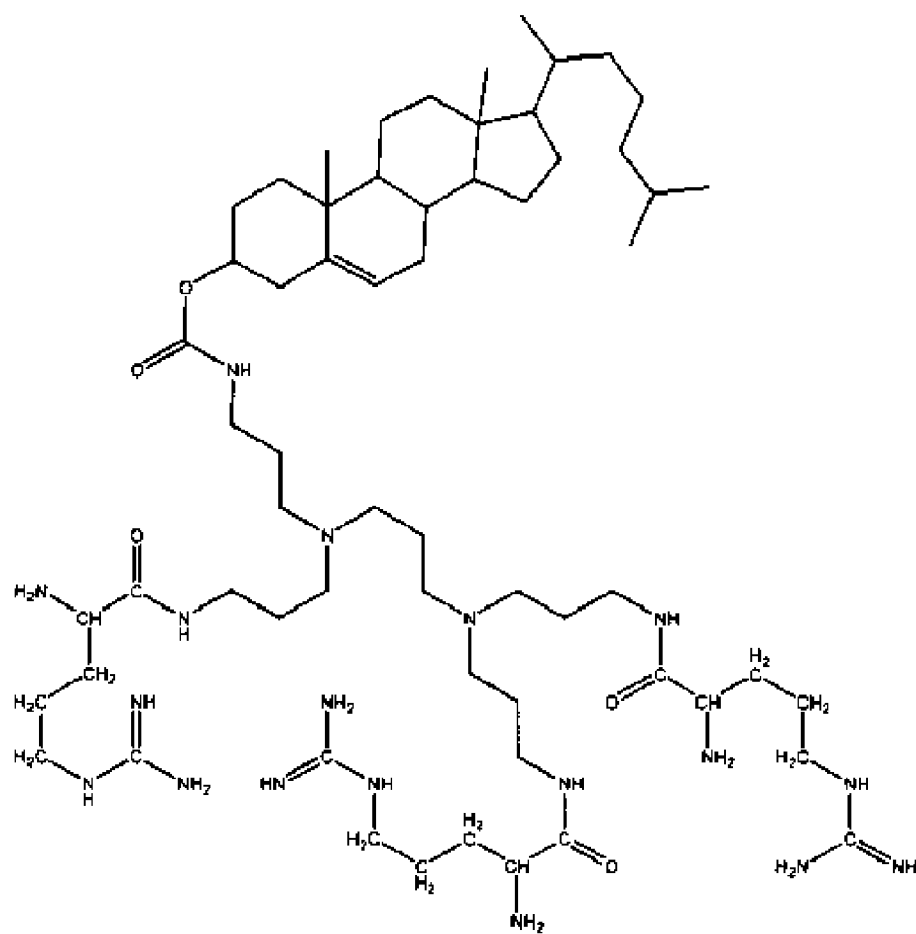
[0072]

**VI****VII**

[0073]

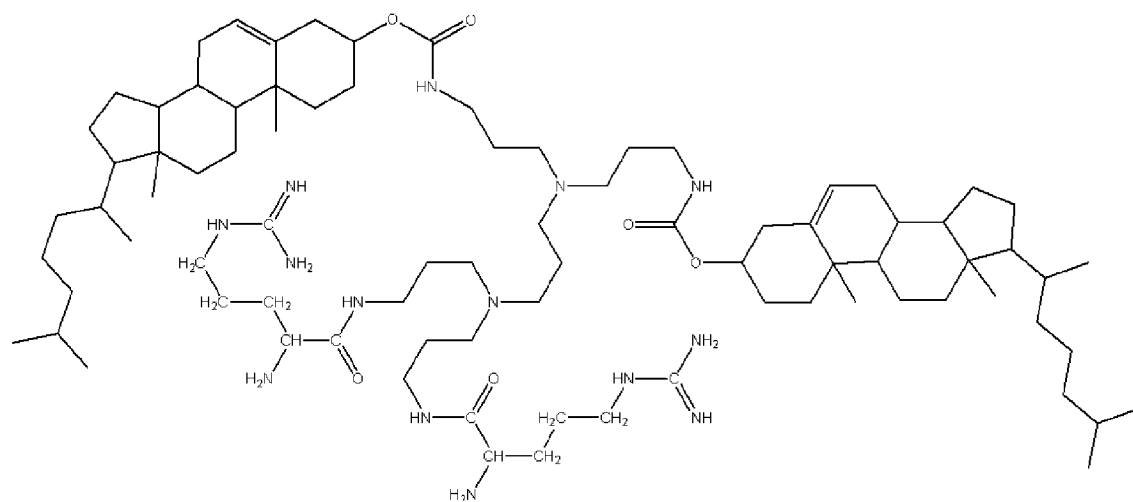
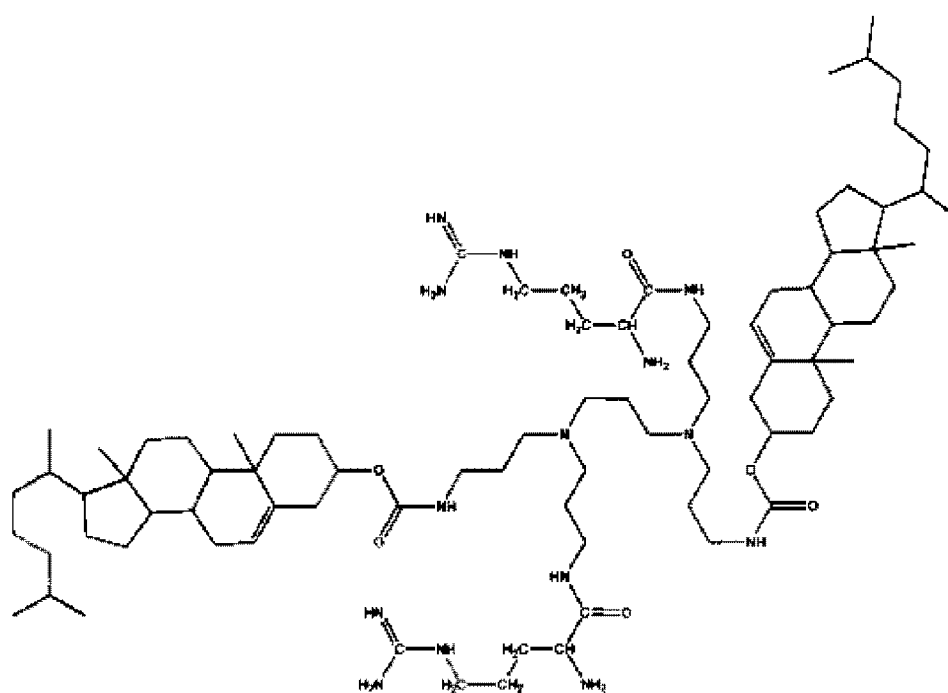


VIII

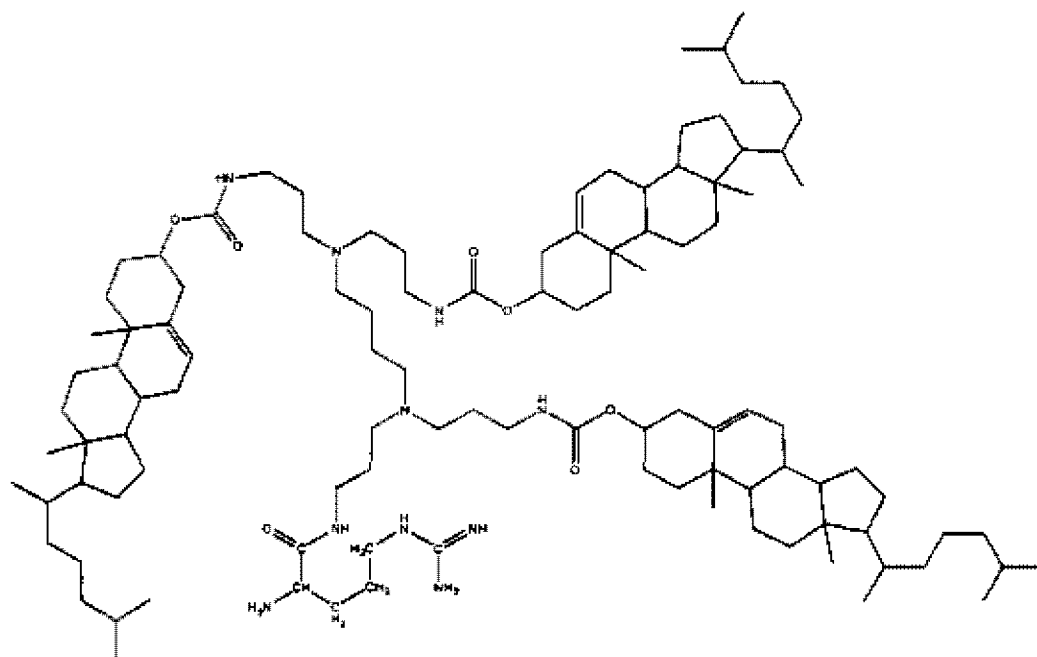


IX

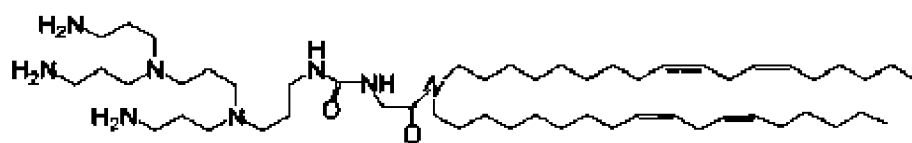
[0074]

**X****XI**

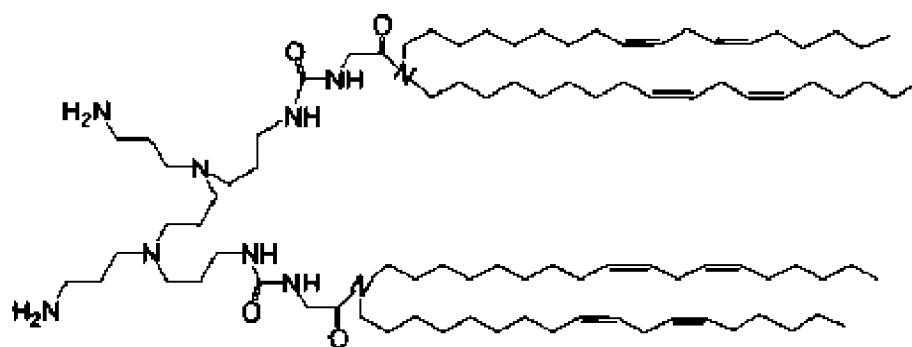
[0075]



XII

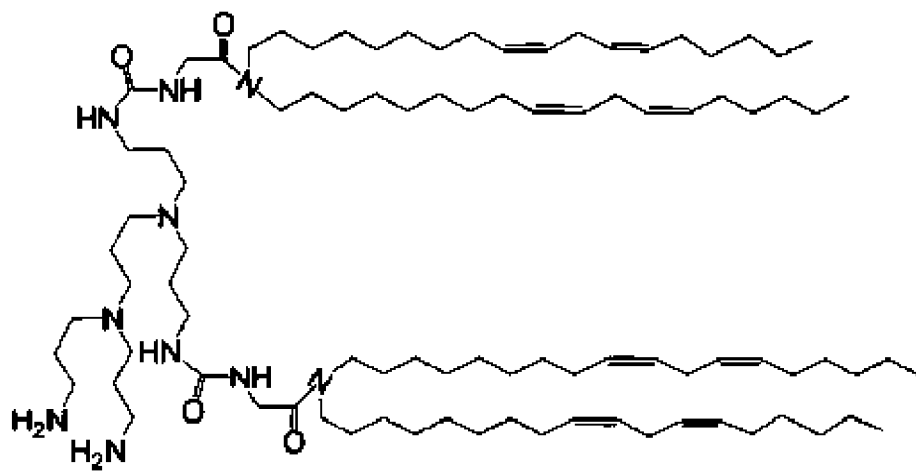


XIII

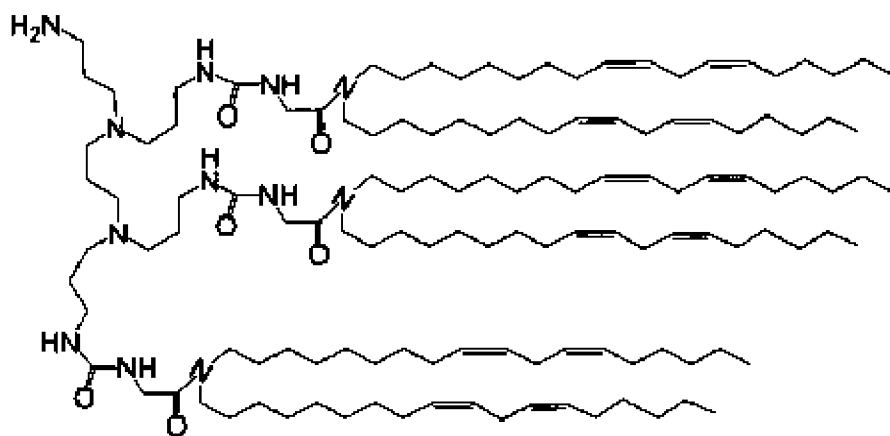


XIV

[0076]



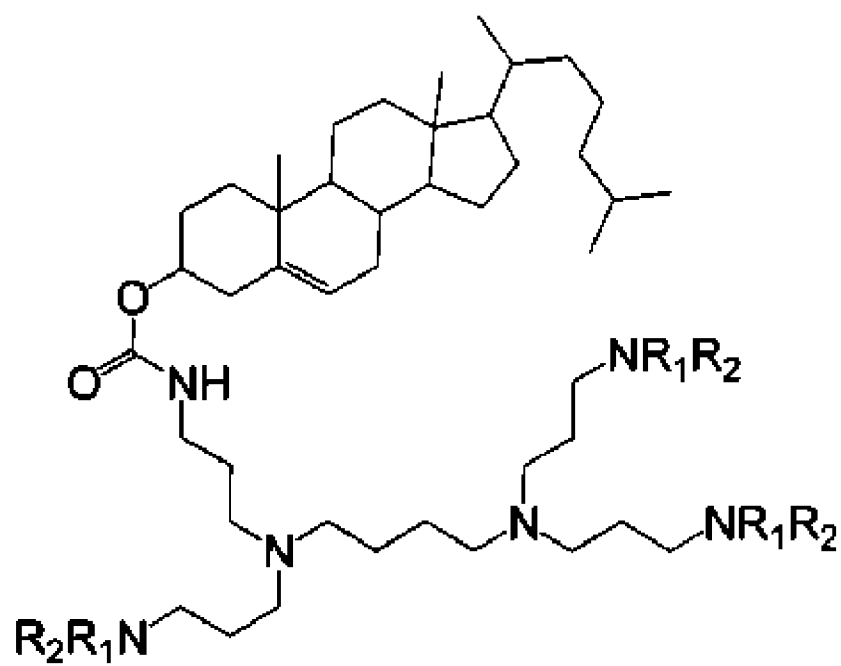
XV



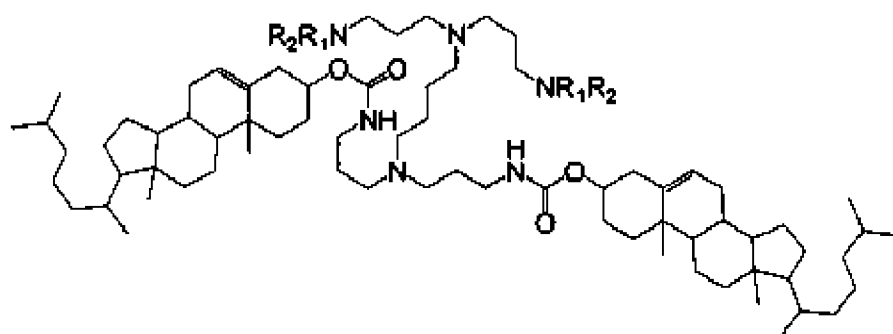
XVI

[0077] β 组脂质

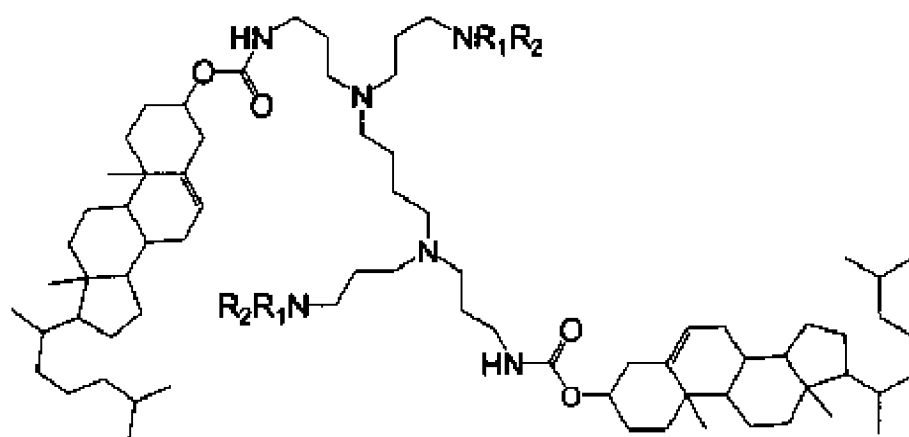
[0078]



XVII

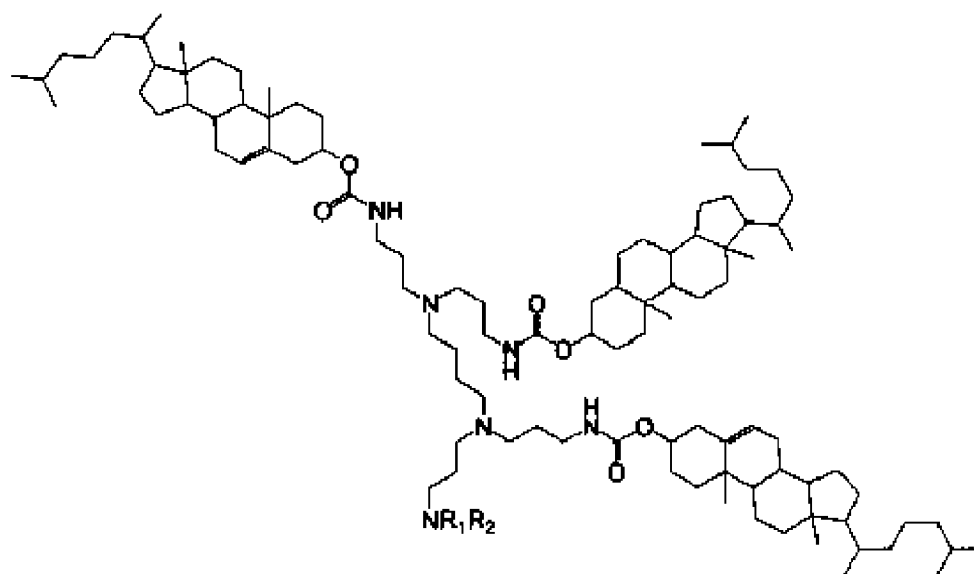


XVIII

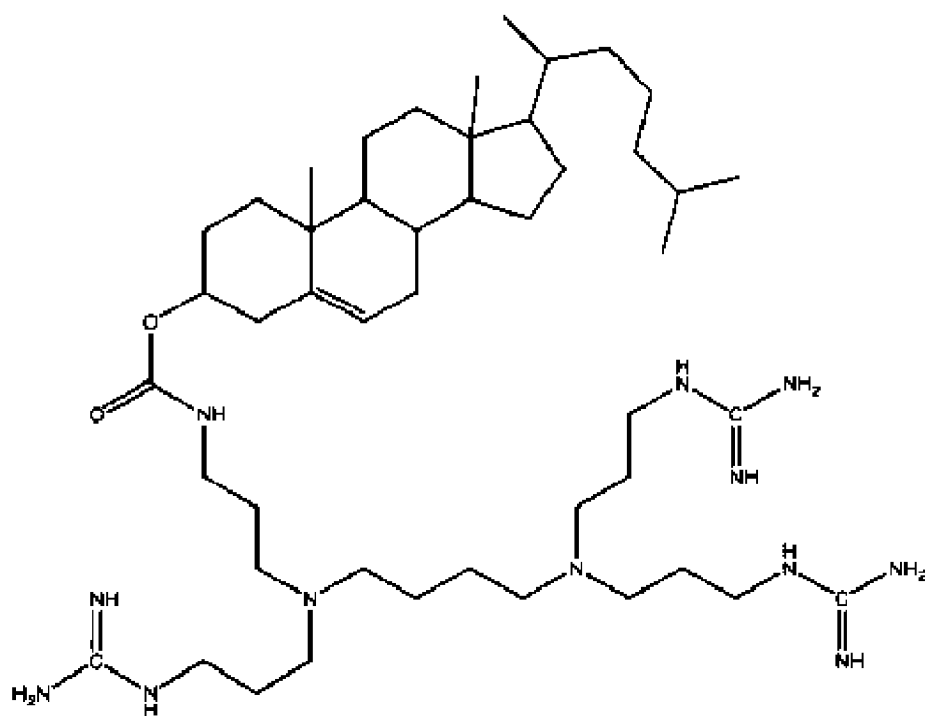


XIX

[0079]

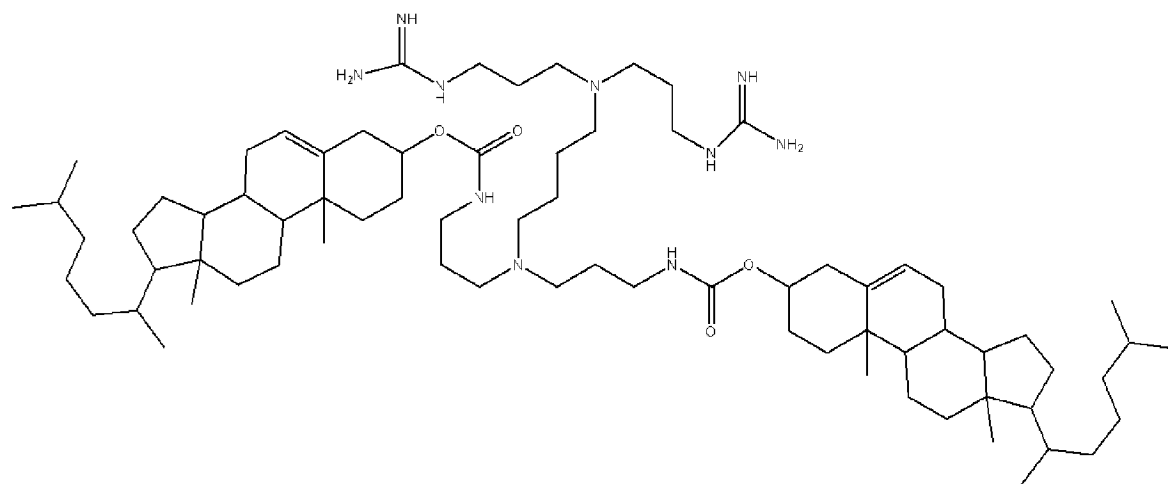
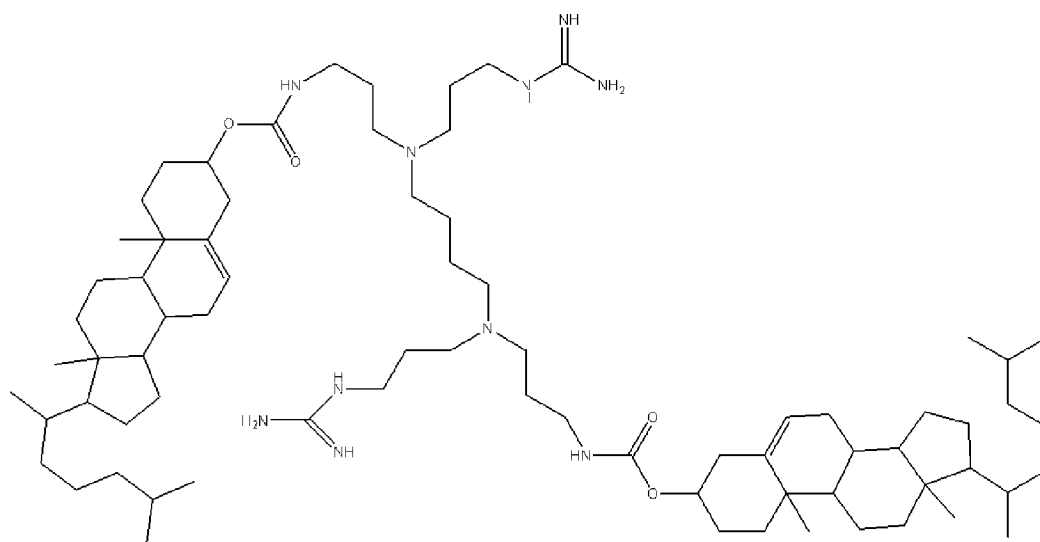


XX

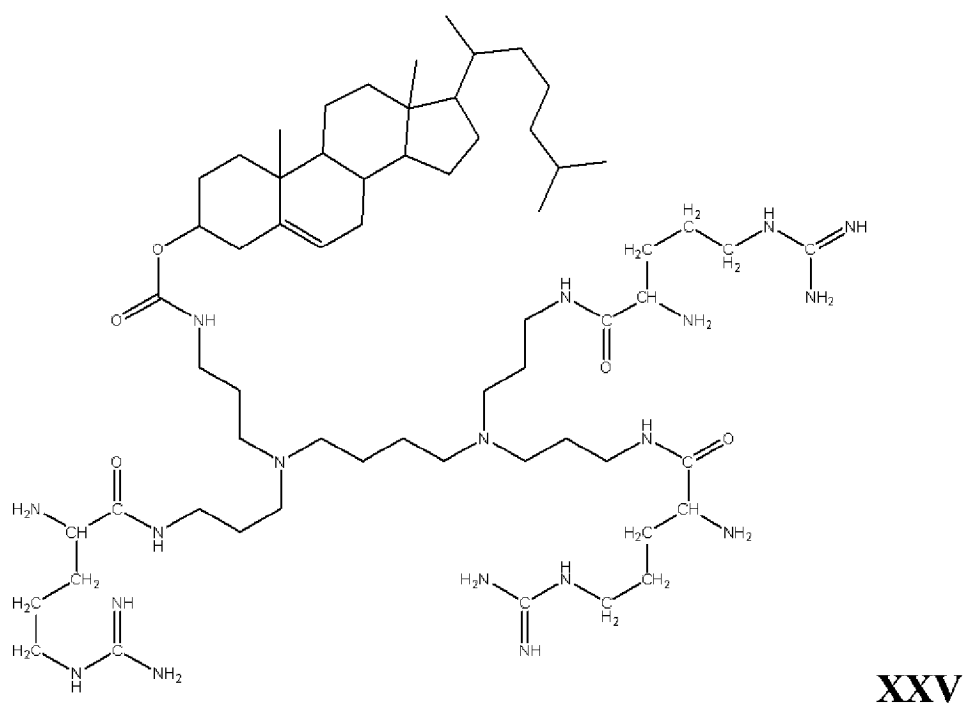
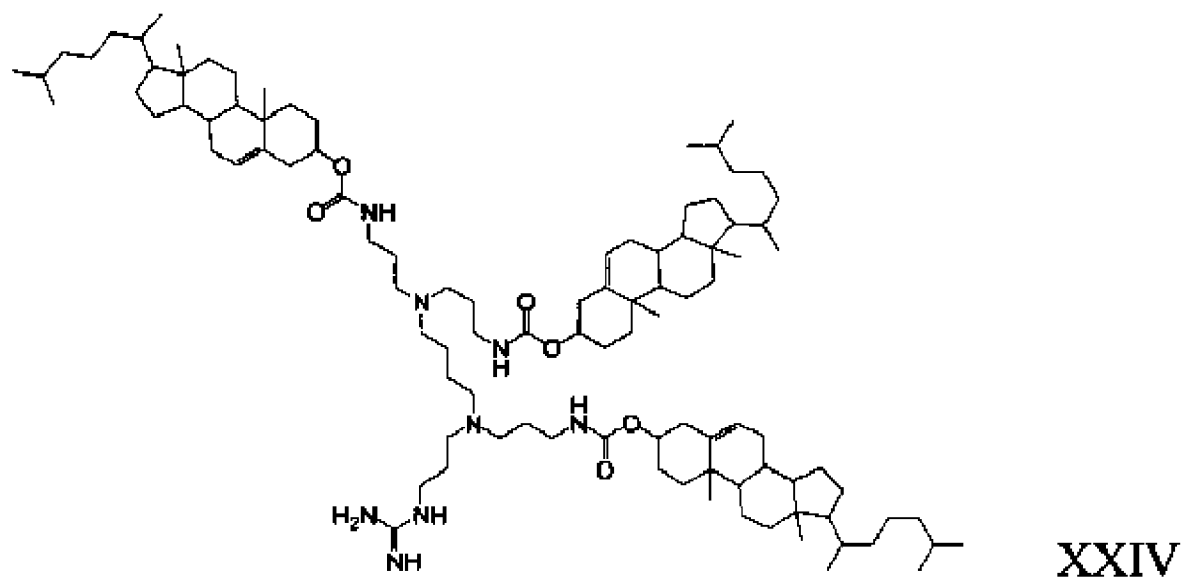


XXI

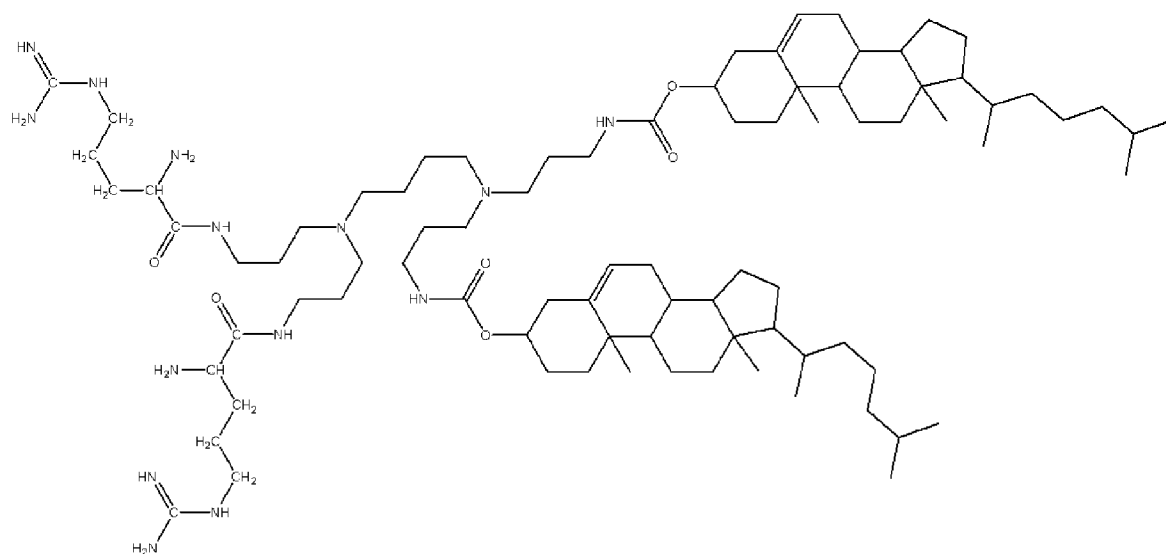
[0080]

**XXII****XXIII**

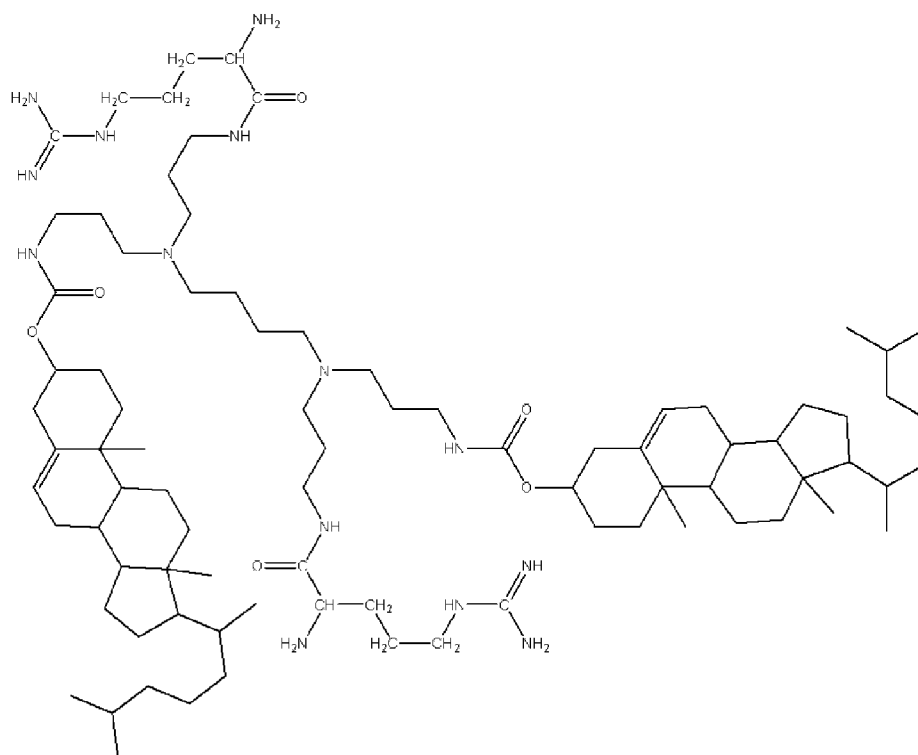
[0081]



[0082]

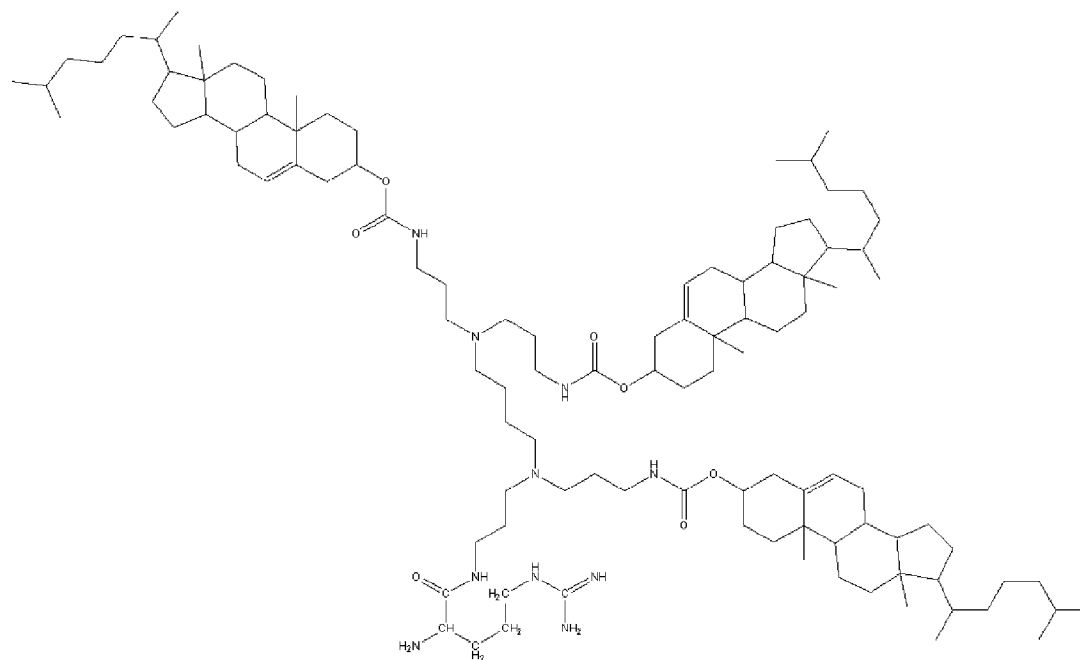


XXVI

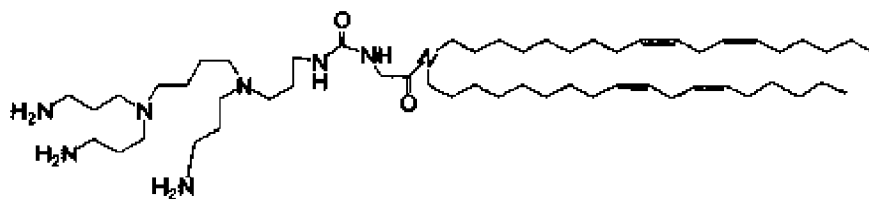


XXVII

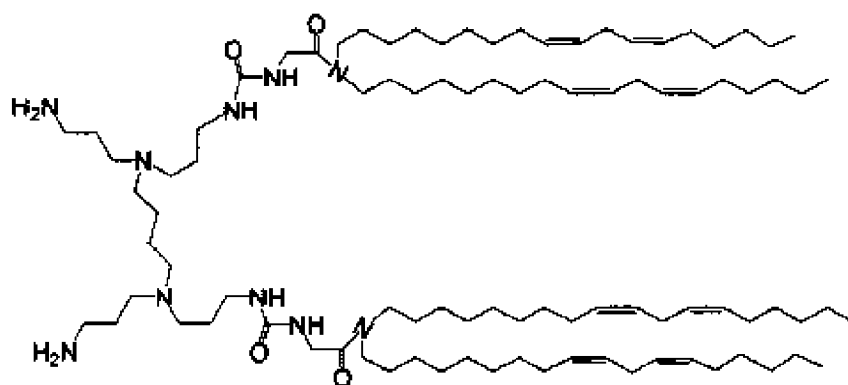
[0083]



XXVIII

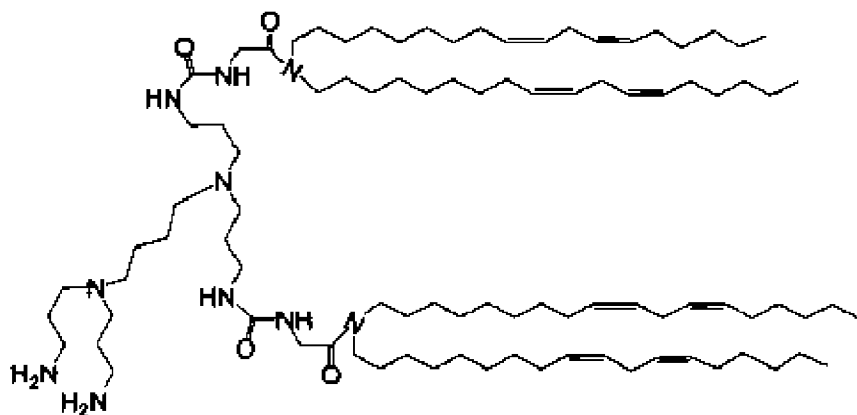


XXIX

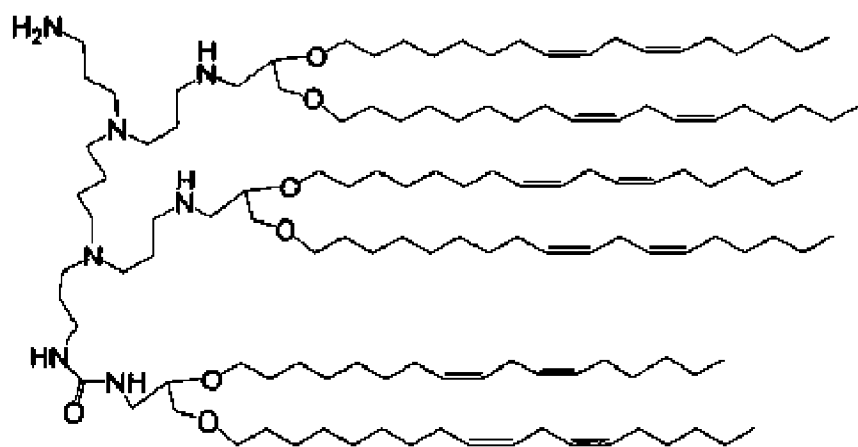


XXX

[0084]



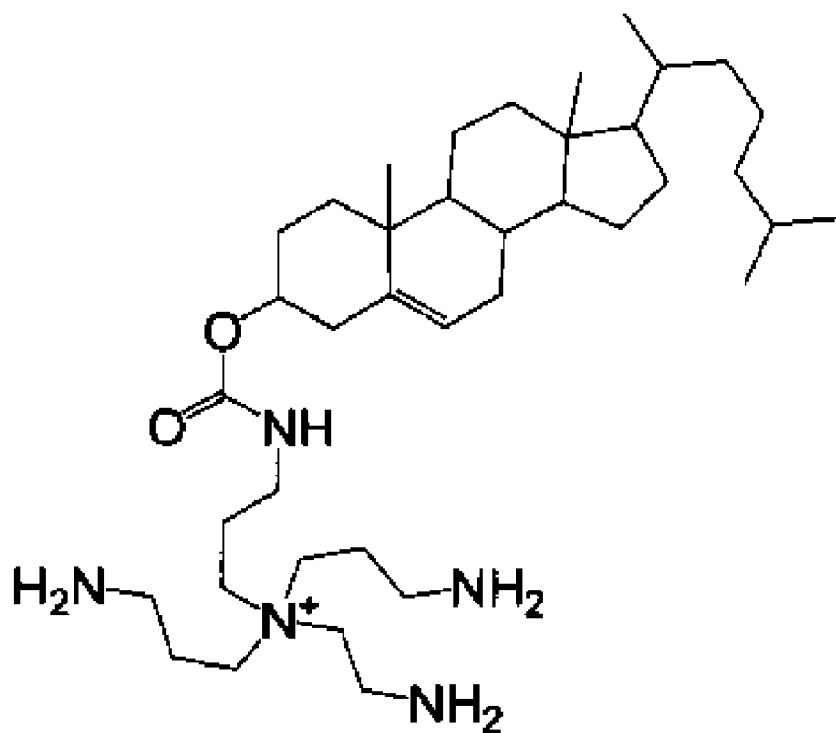
XXXI



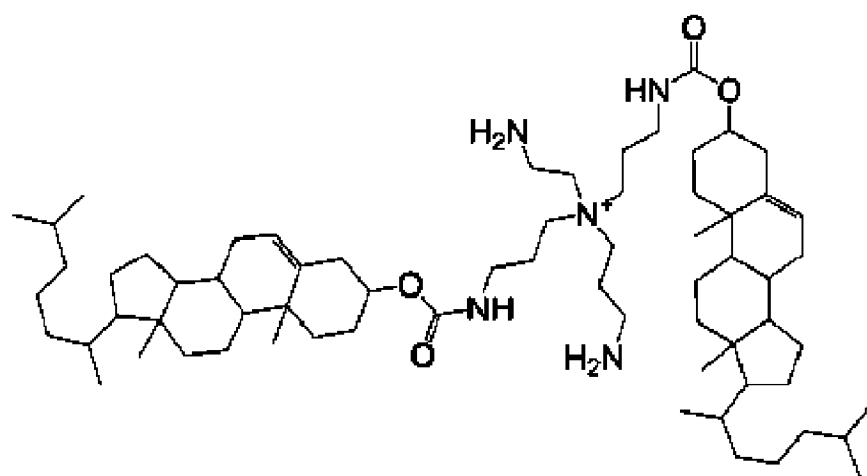
XXXII

[0085] γ 组脂质

[0086]

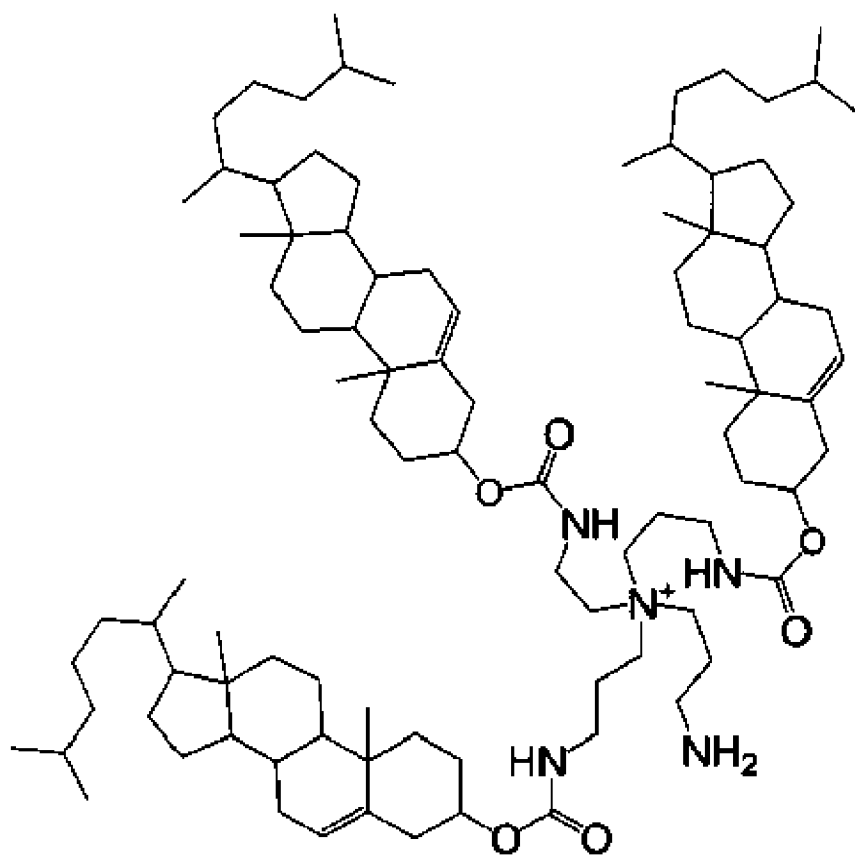


XXXIII

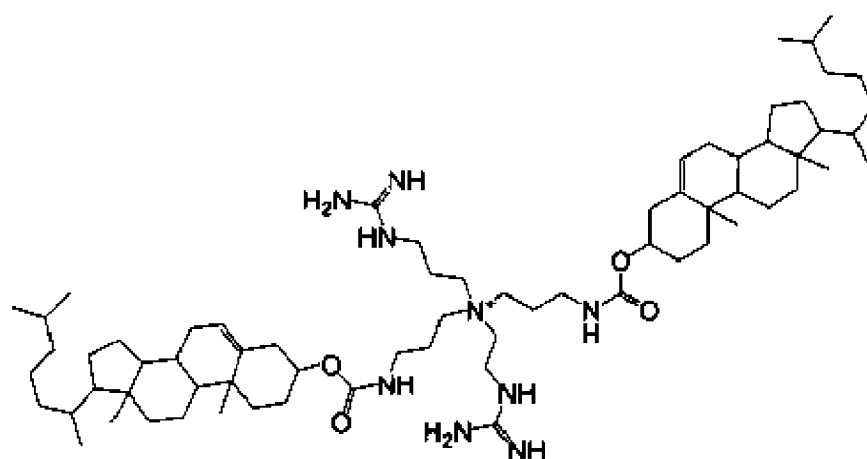


XXXIV

[0087]

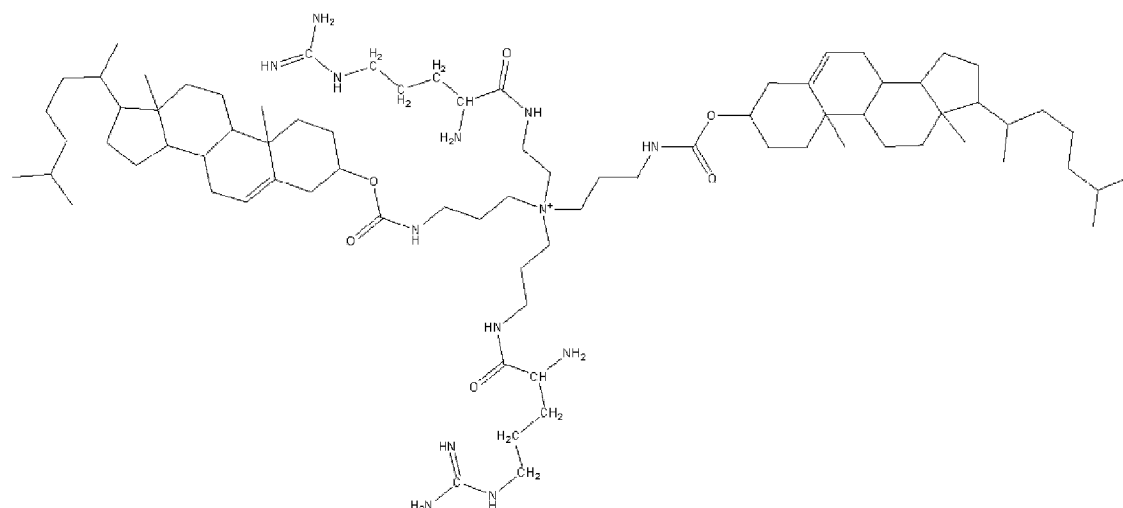


XXXV

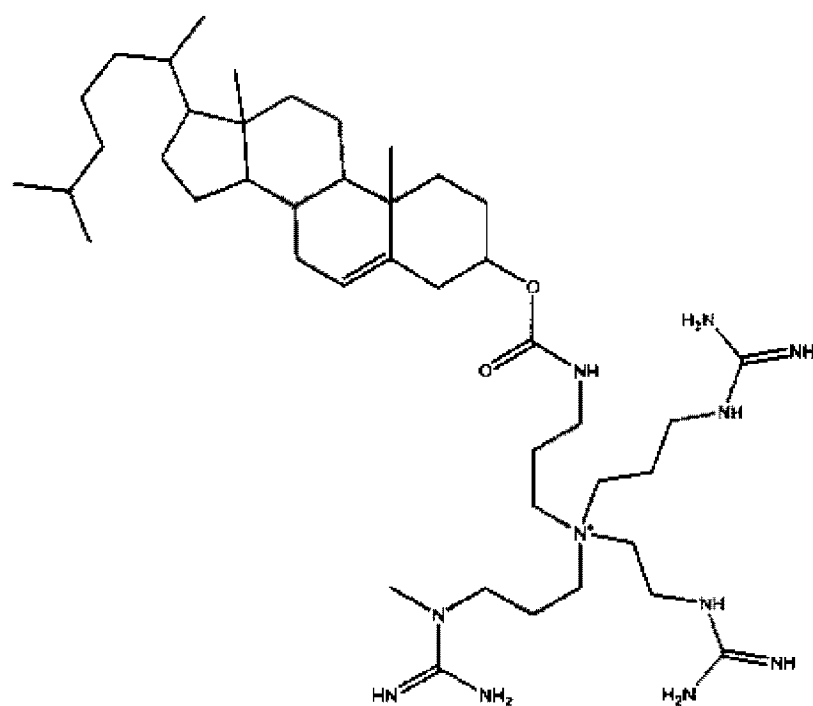


XXXVI

[0088]

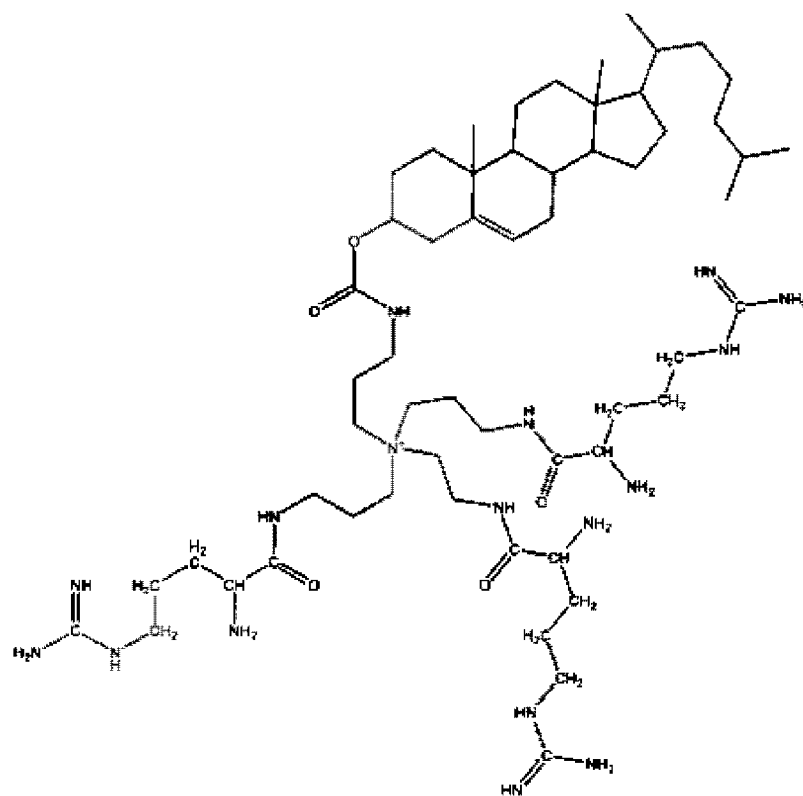


XXXVII

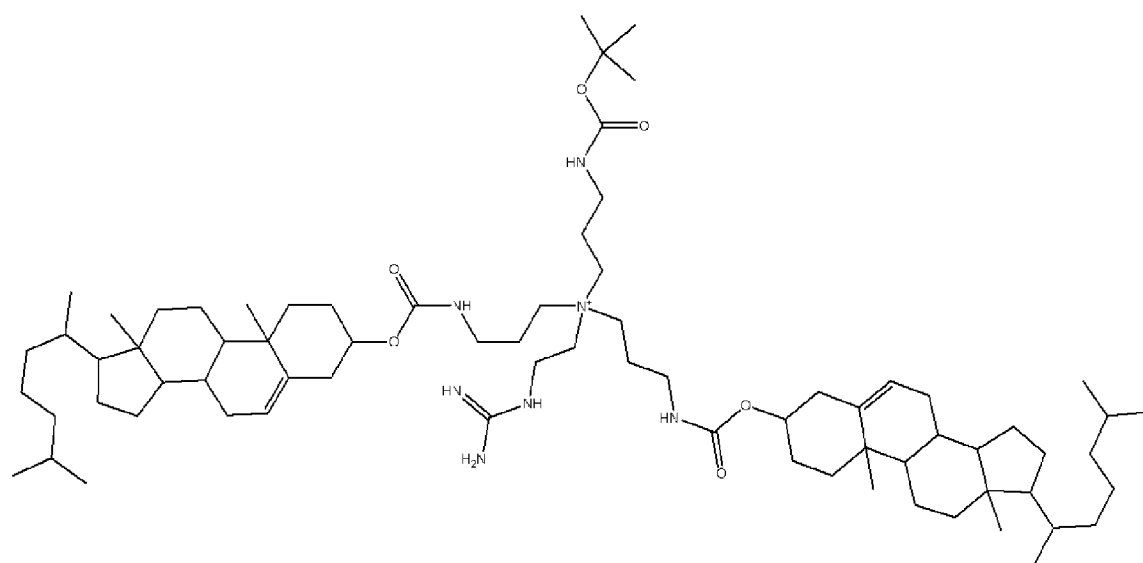


XXXVIII

[0089]

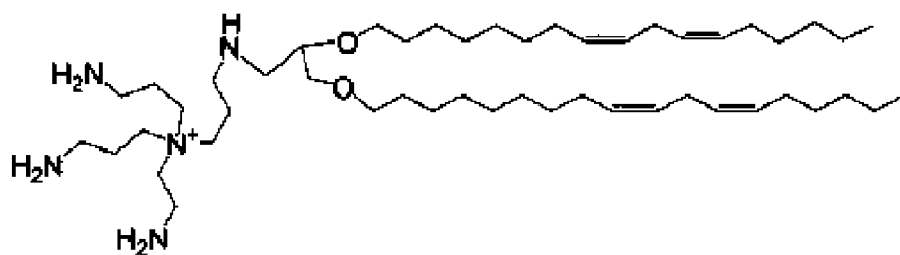


XXXIX

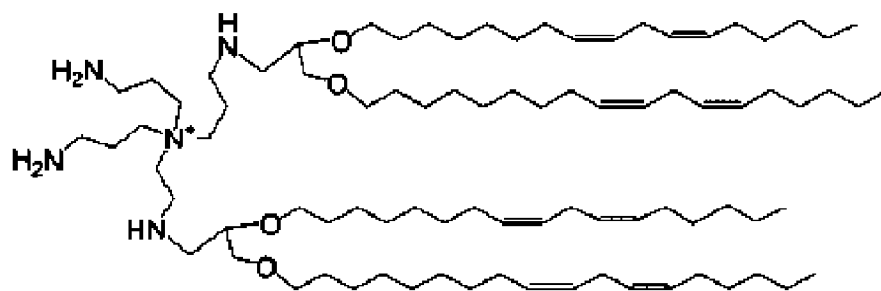


XL

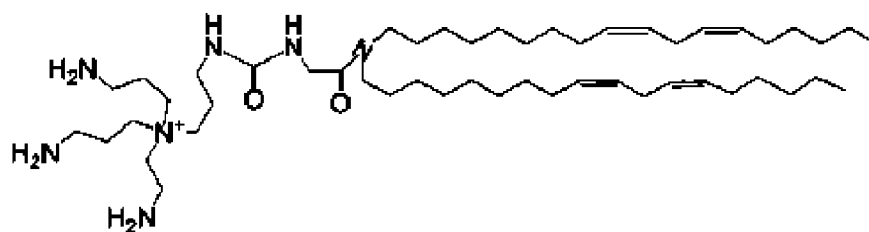
[0090]



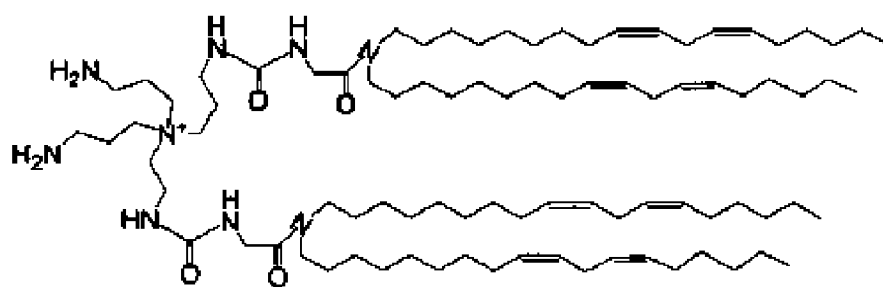
XLI



XLII

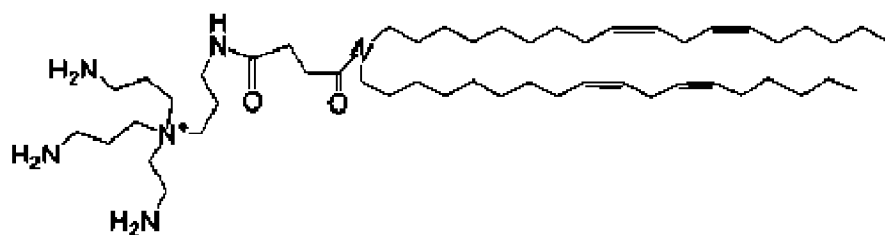


XLIII

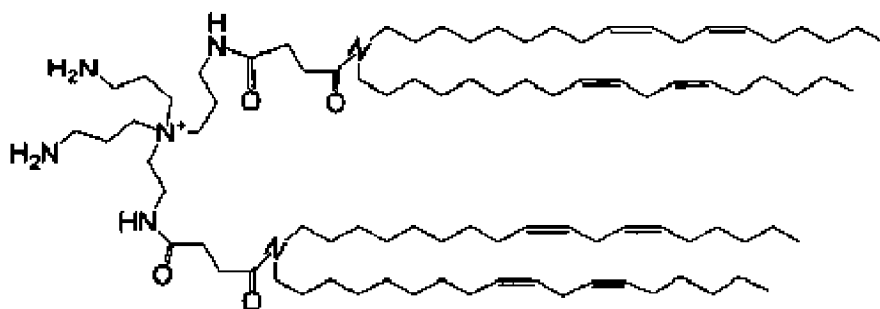


XLIV

[0091]



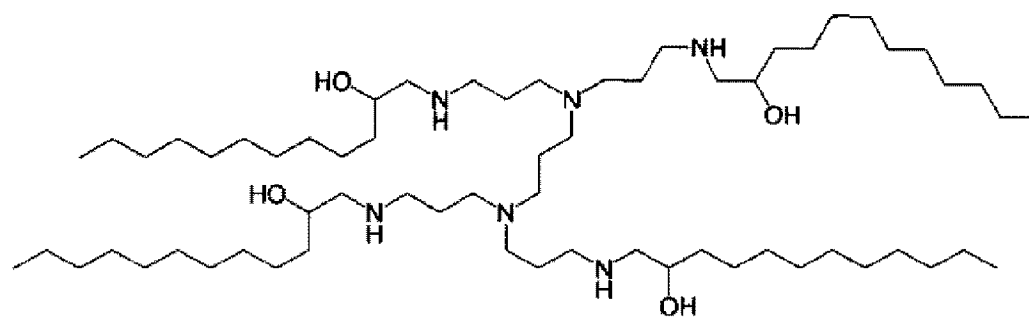
XLV



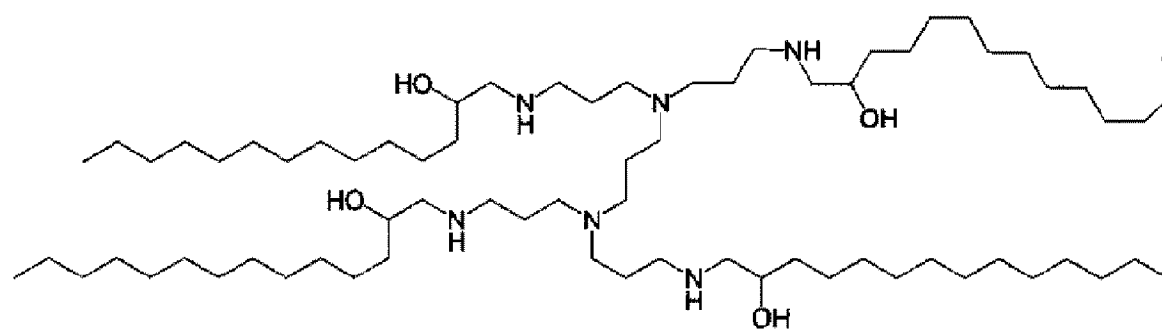
XLVI

[0092] 衍生于三种基本多胺分子之分子的其他例子如下：

[0093]

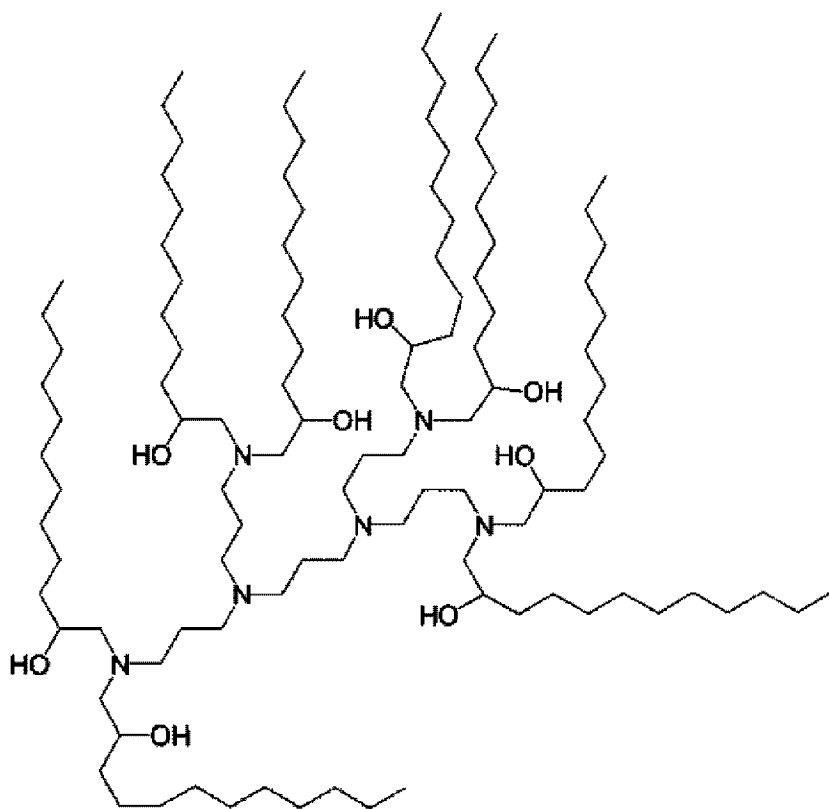


XLVII



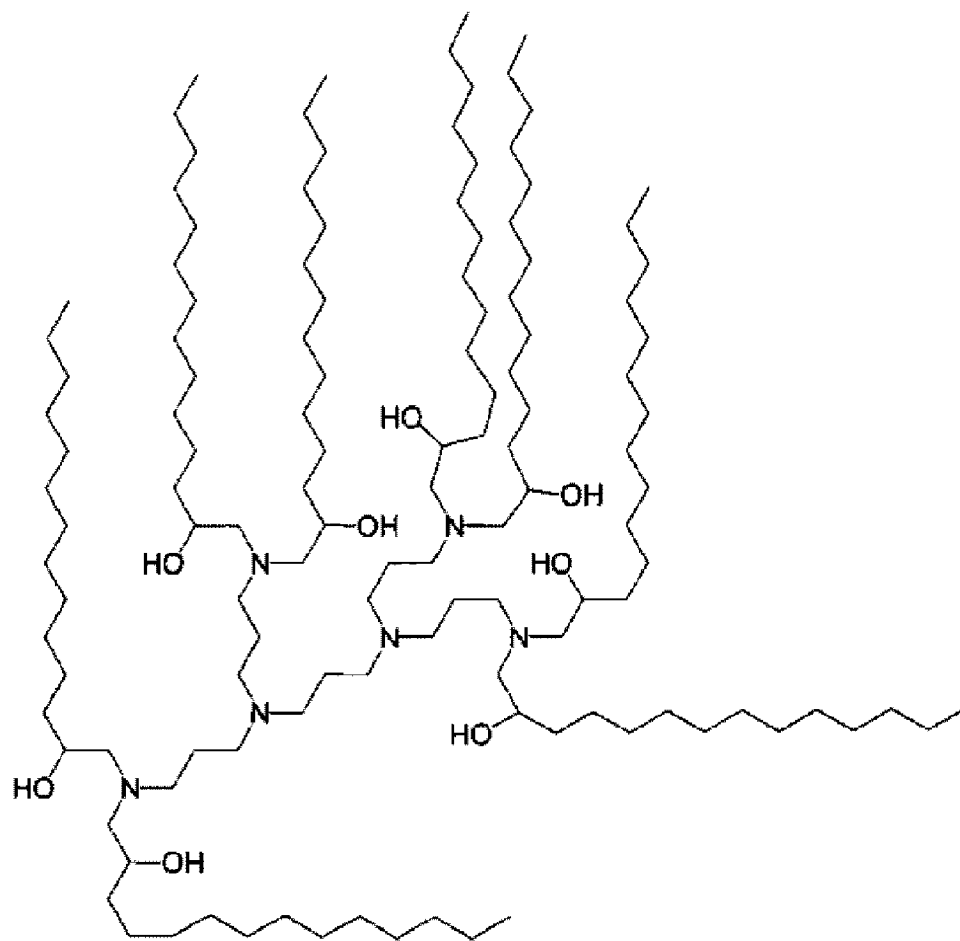
XLVIII

[0094]

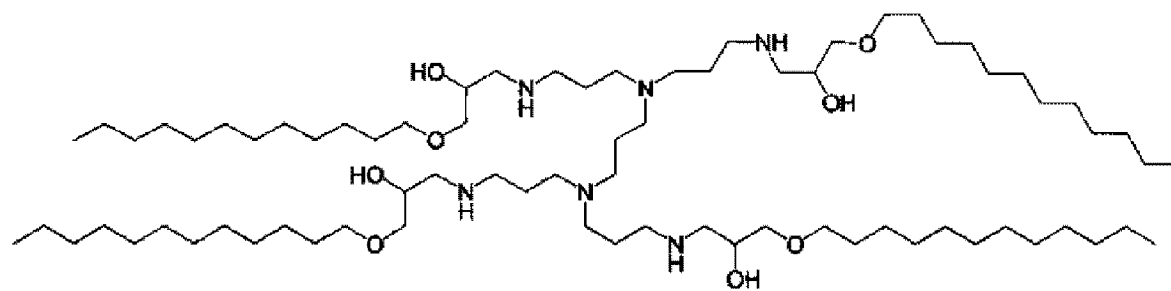


XLIX

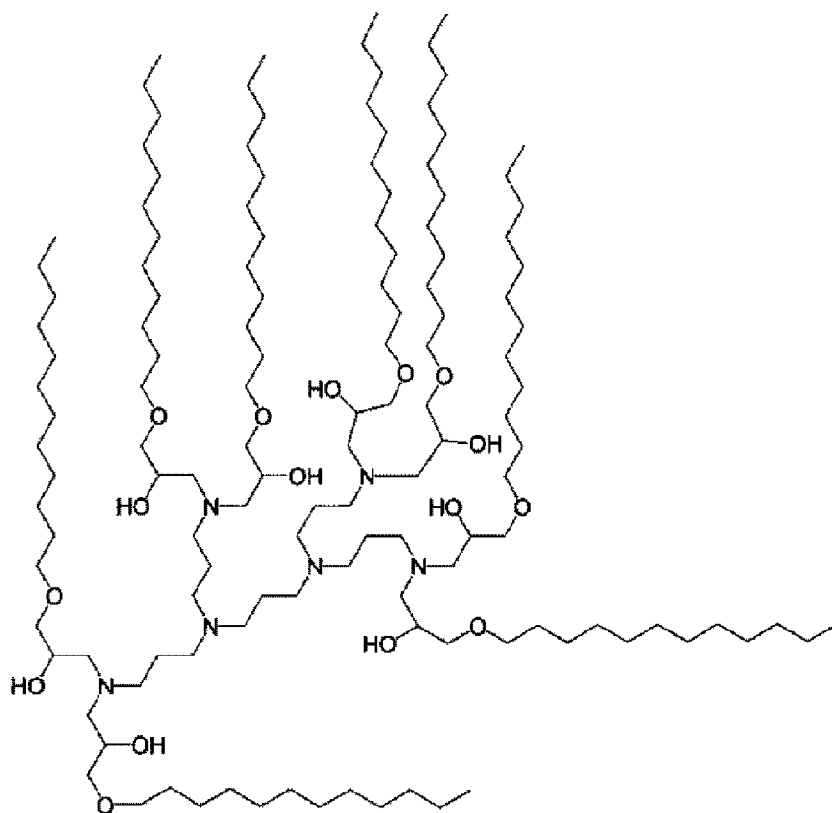
[0095]



L

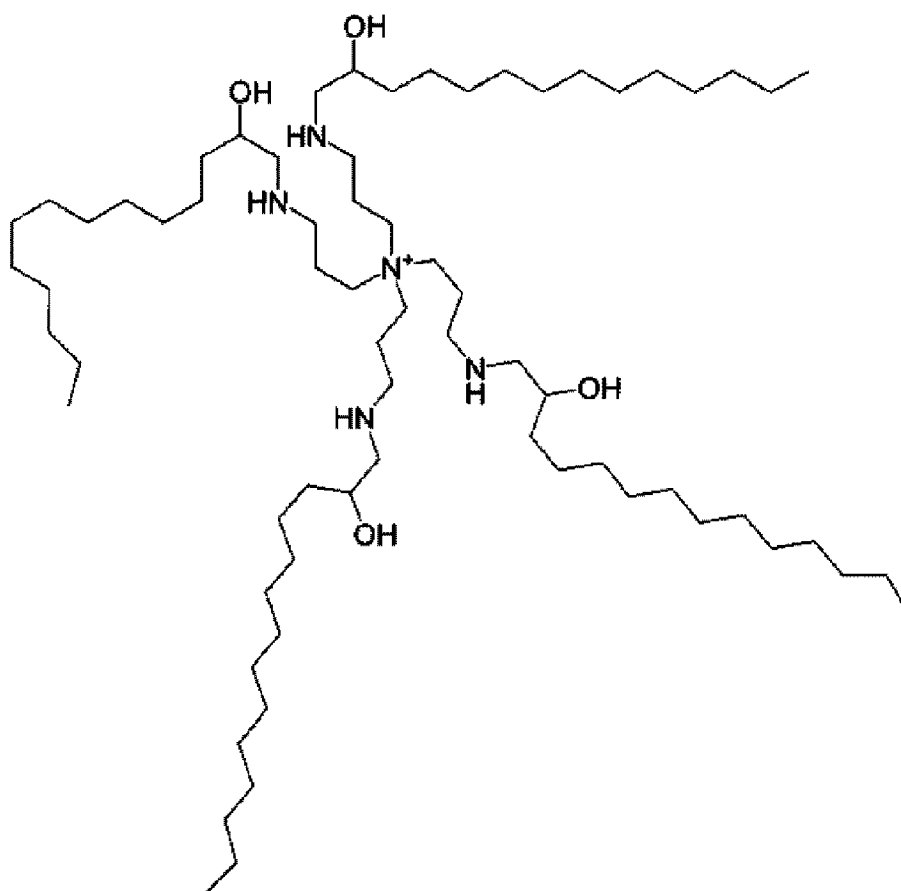


LI

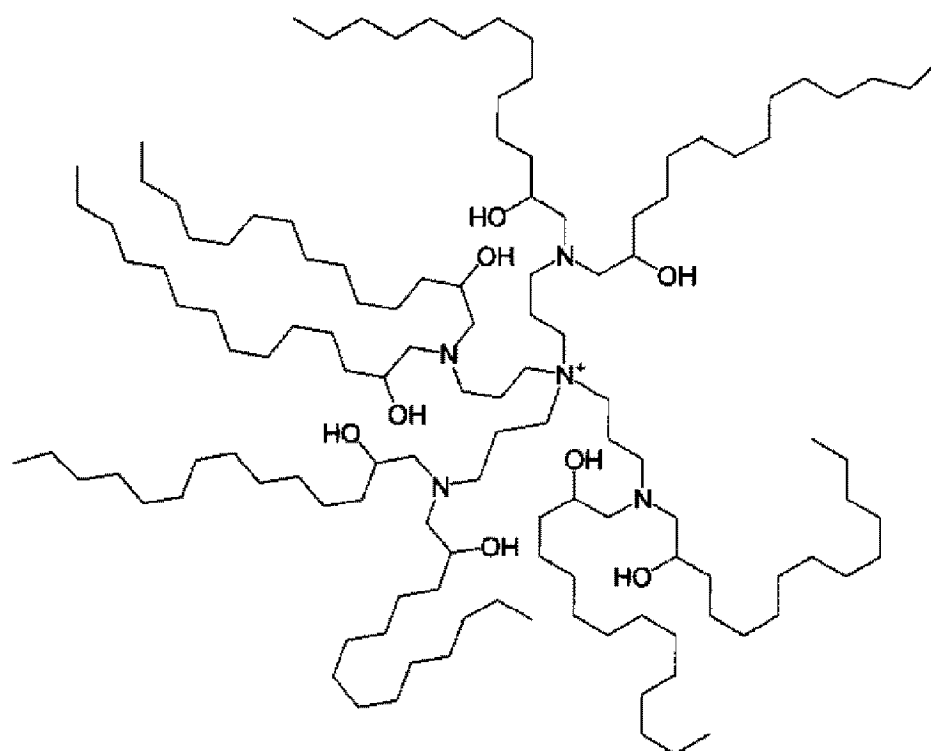


LII

[0096]

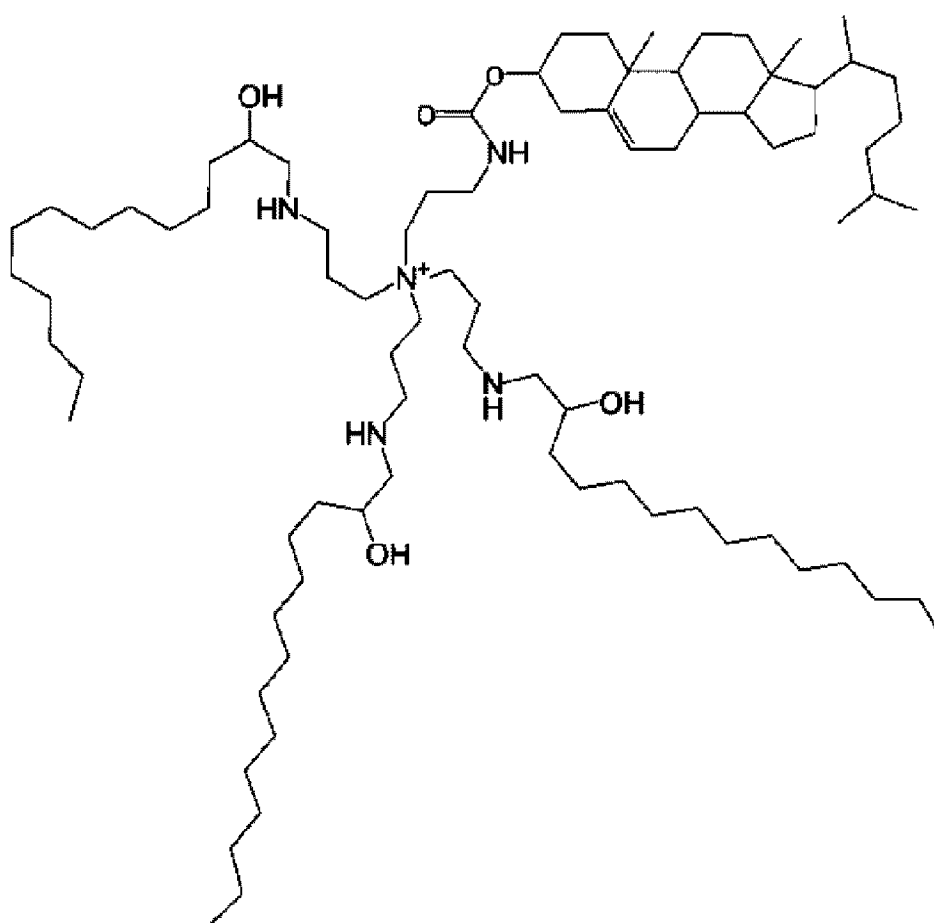


LIII

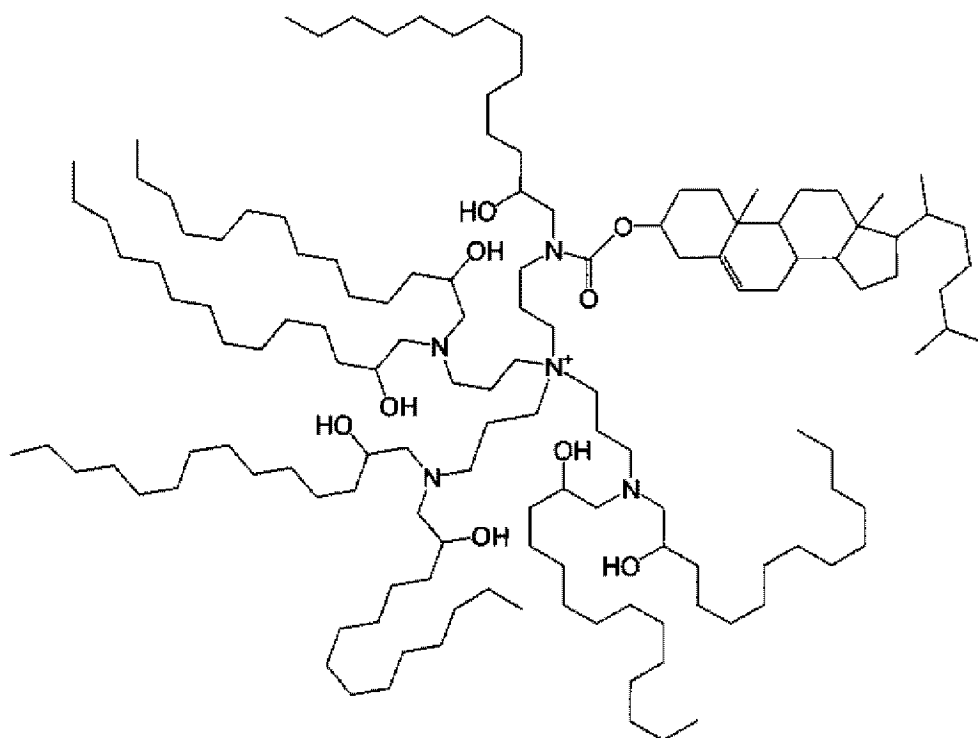


LIV

[0097]

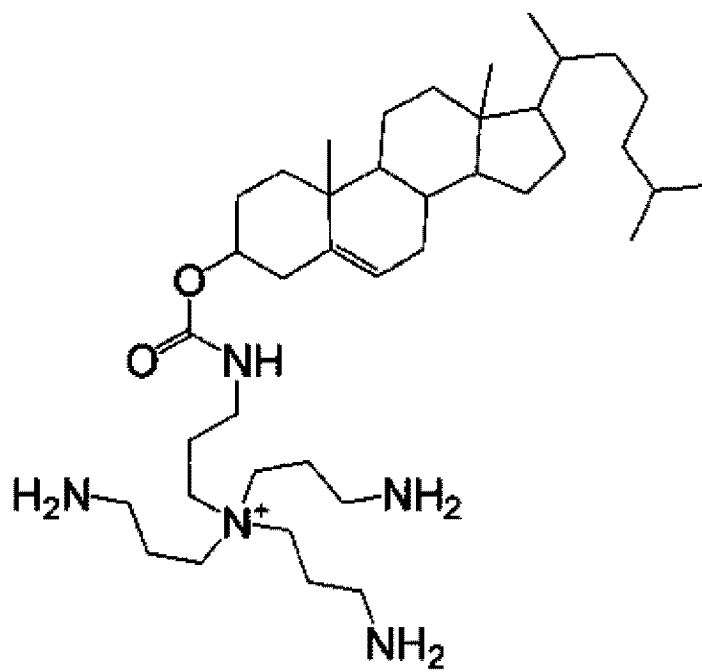


LV

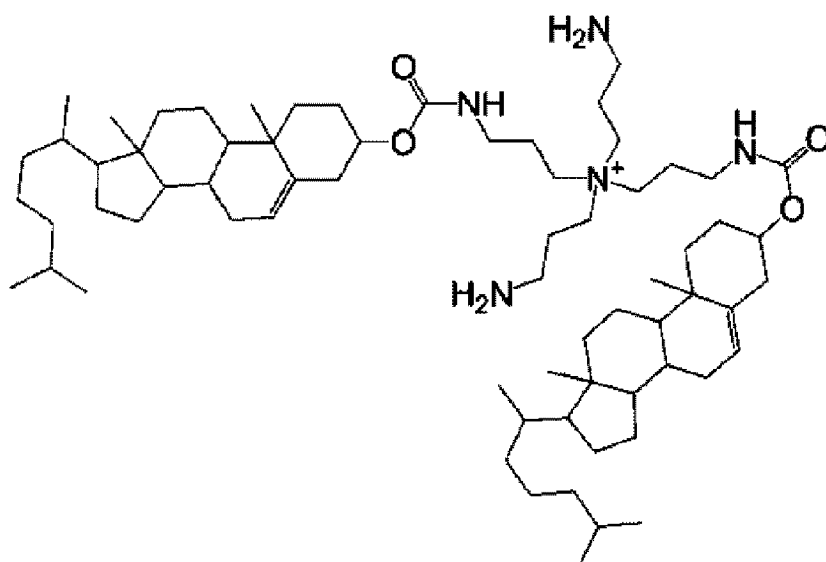


[0098]

LVI

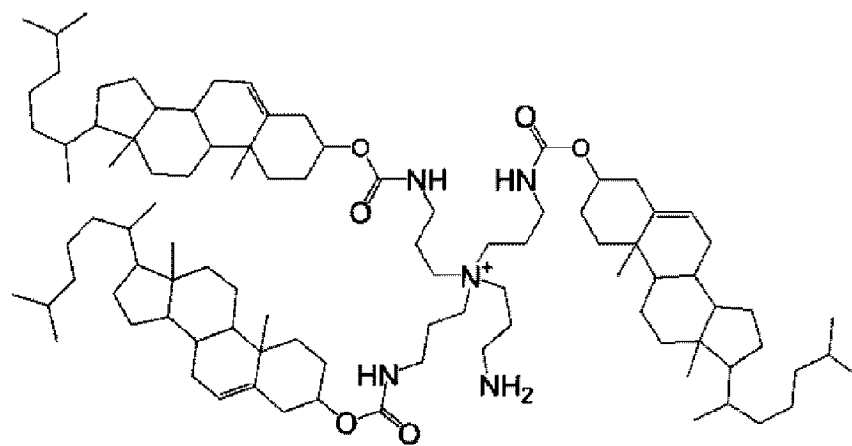


LVII

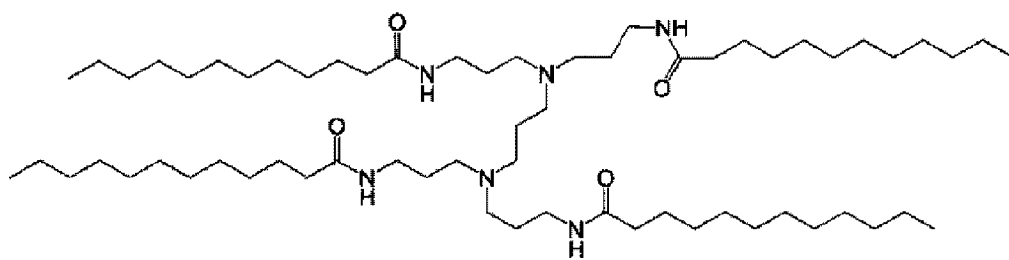


LVIII

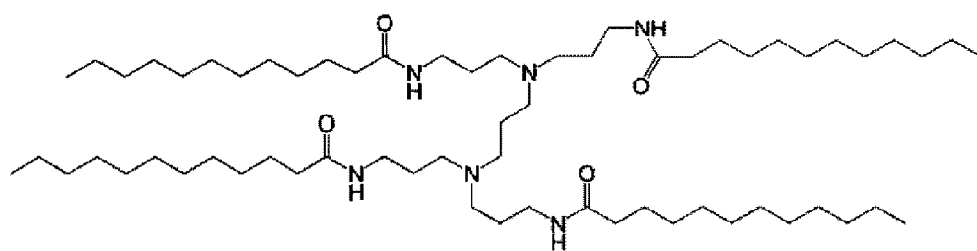
[0099]



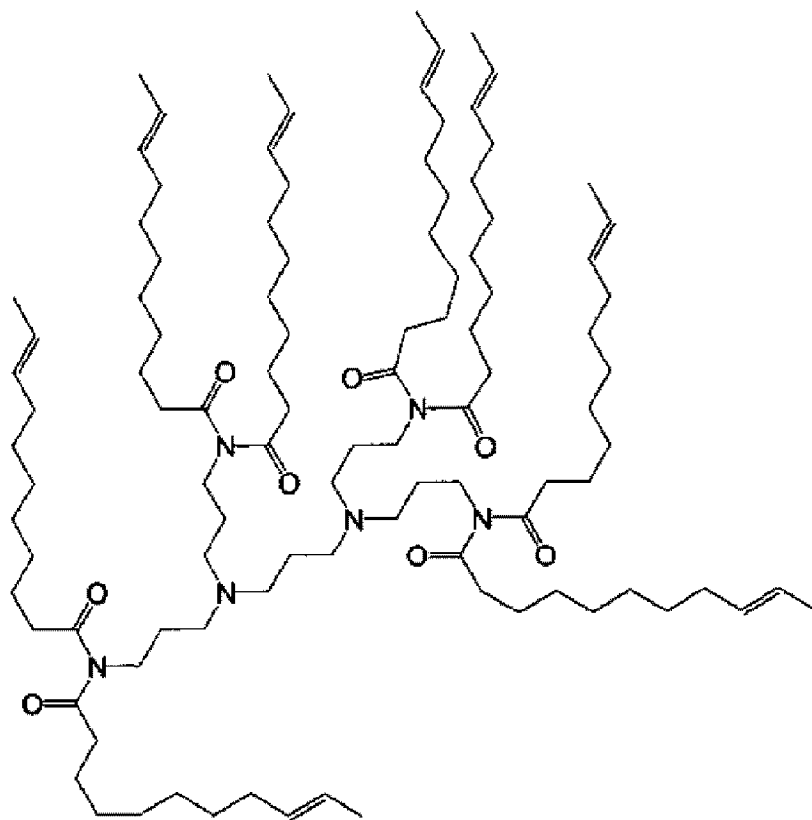
LIX



LX

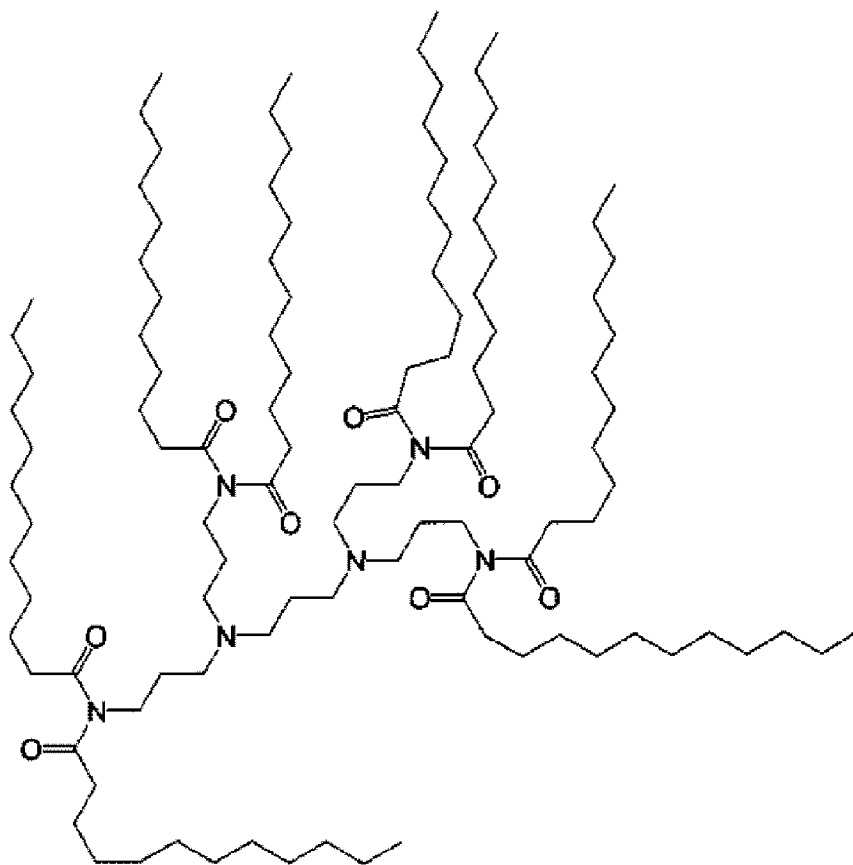


LXI



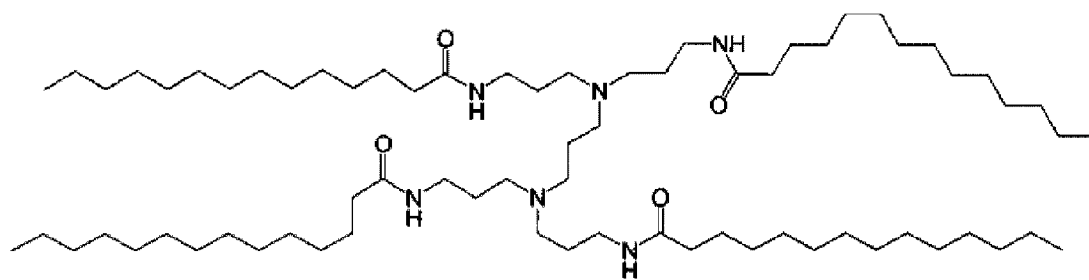
LXII

[0100]

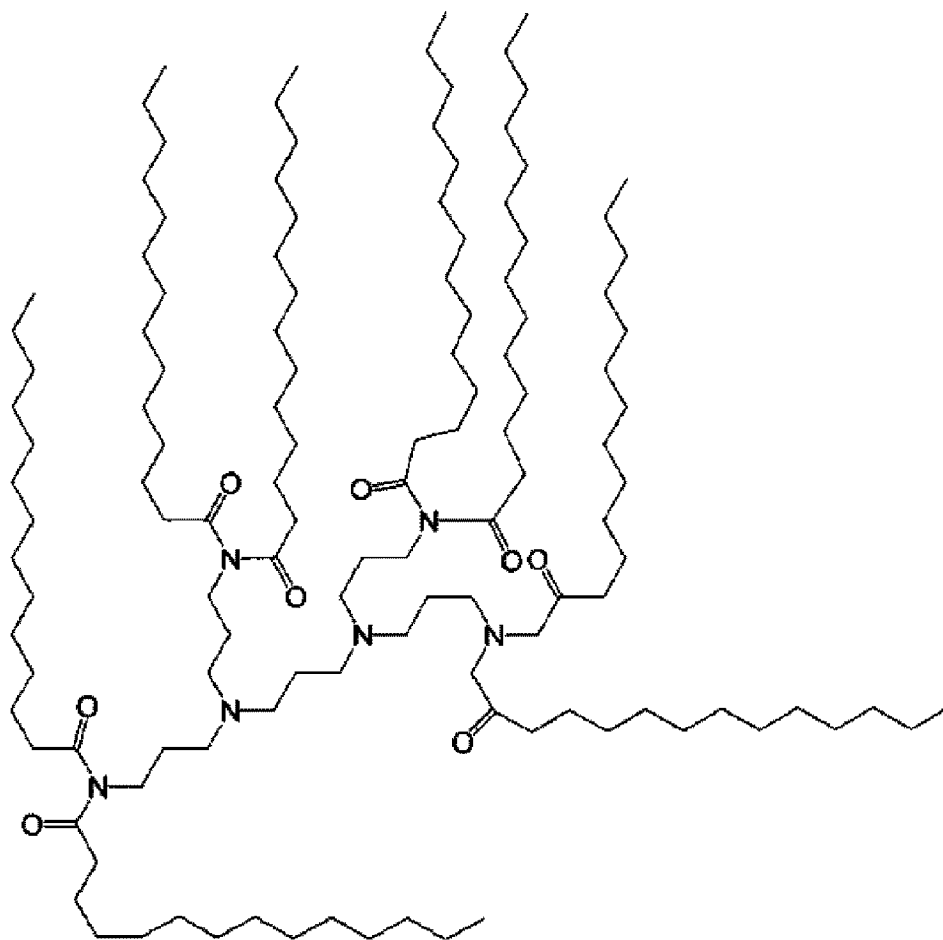


LXII

[0101]

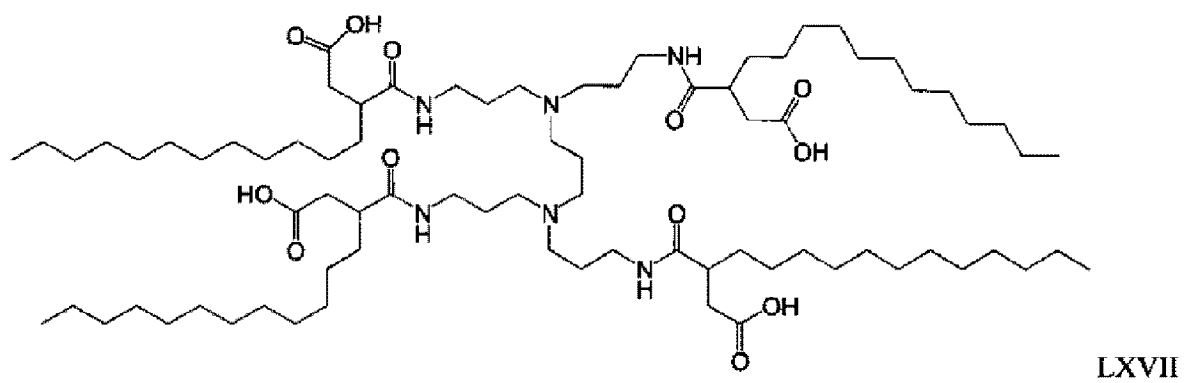
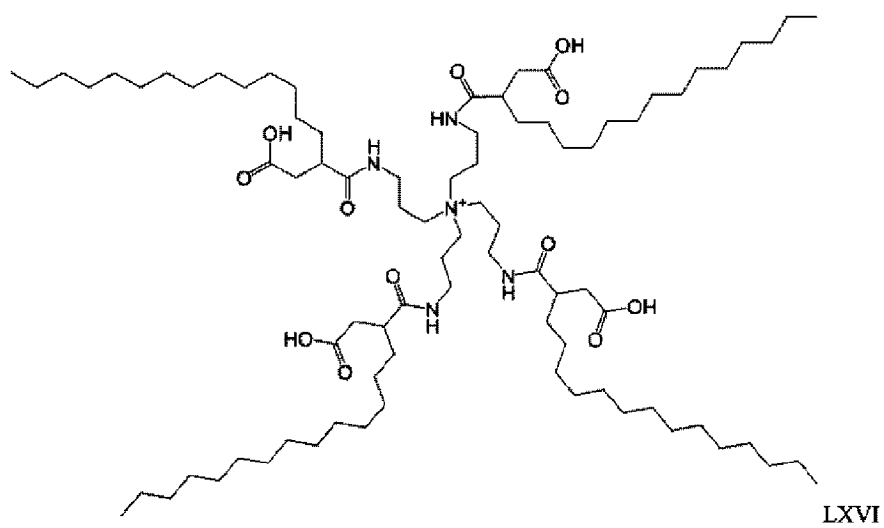
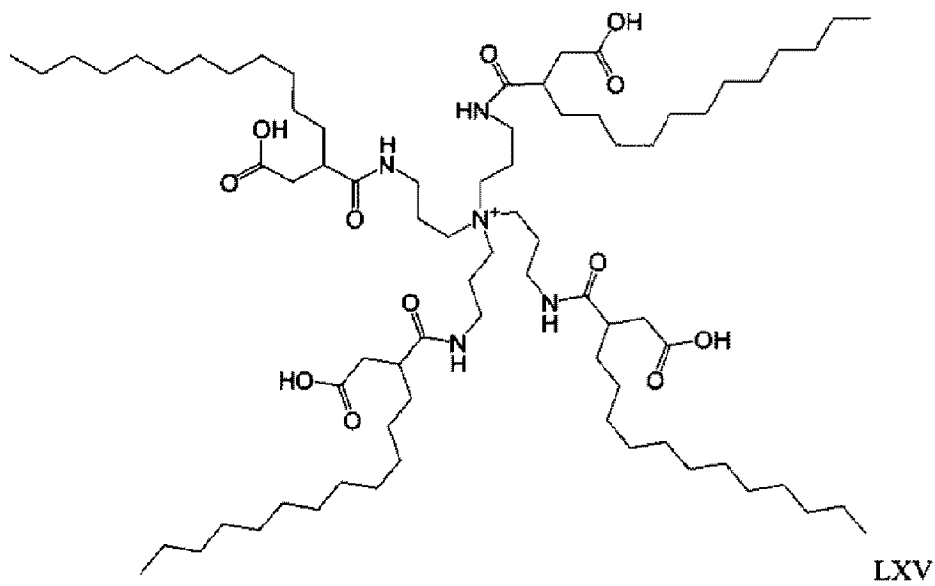


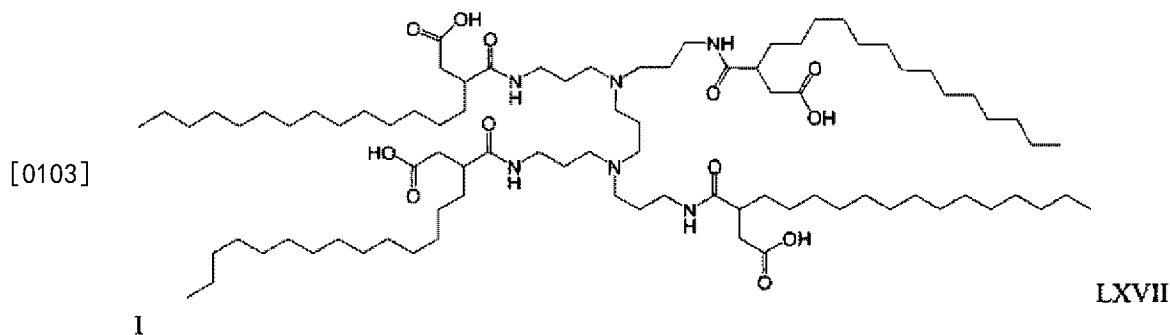
LXIII



LXIV

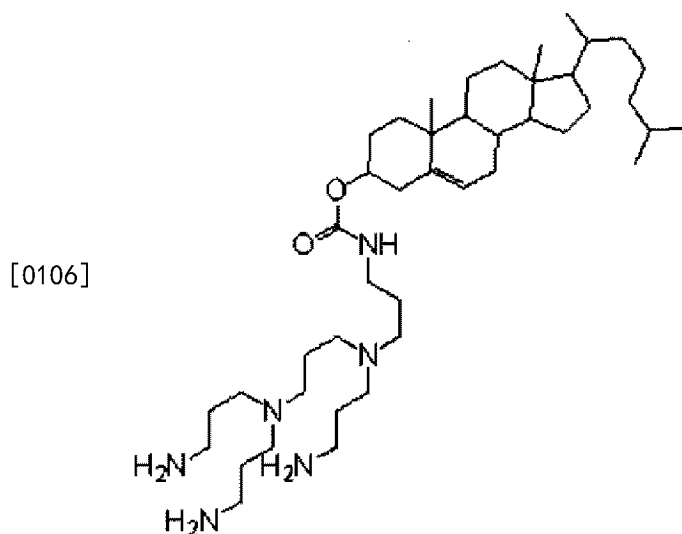
[0102]





[0104] 多价阳离子脂质多胺的例子例如N⁶-四(3-氨基丙基)-1,3-丙二胺胆固醇氨基甲酸酯),可使用的脂精氨(lipospermine)包括N4-精胺胆固醇氨基甲酸酯(GL-67)、N4-精亚胺胆固醇氨基甲酸酯(GL-53)、1-(N4-精胺)-2,3-二月桂基甘油氨基甲酸酯(GL-89)、(二棕榈酰基磷脂酰乙醇戊基精胺(dipalmitoylphosphatidylethanolamyl spermine, DPPES))、双十八烷基酰胺基甘氨酸精胺(Transfectam, dioctadecylamido glycylspermine, DOGS)、2,3-二油基氧基-N-[2(精胺甲酰胺基)乙基]-N,N-二甲基-1-丙铵三氟乙酸盐。脂精胺和脂亚精胺(lipospermidine)是由一个或多个疏水链共价连接至阳离子基团组成的双官能团分子,所述阳离子基团具有三个或多个酰胺氢,所述酰胺氢可与核酸链的磷酸酯氧复合形成离子电荷复合物。

[0105] 优选的氨基甲酸酯为胆固醇样化合物:N⁶-四(3-氨基丙基)-1,3-丙二胺胆固醇氨基甲酸酯,其具有以下结构:



[0107] 中性磷脂包括但不限于磷脂酰乙醇胺、磷脂酰胆碱、磷脂酰肌醇、鞘磷脂和二磷脂酰甘油。磷脂酰基(脂肪酸)链可由饱和键组成(或具有一个或多个不饱和键),其中每条酰基链分别具有8至约26个碳原子,并且所述链相同(对称)或不同(不对称)。酰基链中的双键可独立地为顺式(cis)或反式(trans);其例子分别包括1-酰基链和2-酰基链,所述酰基独立地选自:亚油酰基(18:2)、亚麻酰基(18:3)、花生四烯酰基(20:4)和二十二碳六烯酰基(22:6)。

[0108] 固醇包括胆固醇、羊毛固醇、24-异丙基胆固醇、nicasterol、7-脱氢胆固醇、24-脱氢胆固醇、柳珊瑚固醇、黑海固醇、24S-羟基胆固醇和植物固醇,包括麦角固醇、豆固醇、菜油固醇、岩藻固醇、β-谷固醇和植物甾烷醇,以及固醇酯、固醇基糖苷和固醇基烷基醚。

[0109] 固醇-PEG化合物是连接至聚乙二醇(PEG)的固醇,例如连接PEG的胆固醇,其中所述PEG低于5000道尔顿,优选低于2000道尔顿,最优选在200至1000道尔顿之间。

[0110] 在所要求的制剂中使用的固体和稳定形式的阳离子脂质核酸盐(尤其是阳离子脂质干扰核酸盐)是通过在阳离子脂质分子与核酸复合形成阳离子脂质核酸盐沉淀的条件下使阳离子脂质的溶液与核酸的水溶液接触而产生的。具有导致核酸不溶于水的碳数目或足够程度疏水性的阳离子有机分子发生沉淀。所产生的沉淀含有一定量的阳离子脂质分子正电荷,其比例使得核酸从完全亲水降至较低亲水或导致核酸部分或完全疏水,优选与核酸中存在的核苷酸数1比1的摩尔比。使用过滤、离心以及化学和物理方法领域的技术人员可获得的其他方法,可从水性液中回收核酸有机阳离子脂质沉淀。可干燥沉淀出的阳离子脂质盐,并进行多种机械处理以使其适于整合进入核酸药物的固体和液体剂型。

[0111] 随后通过将阳离子脂质核酸盐与一种或多种脂质混合而产生制剂,所述脂质包括其他阳离子脂质,两亲物(例如,N6-四(3-氨基丙基)-1,3-丙二胺胆固醇氨基甲酸酯)、磷脂、疏水脂质(优选固醇,包括胆固醇)和PEG连接的脂质(优选PEG连接的固醇)。

[0112] 聚乙二醇(PEG)连接的脂质包括PEG连接的胆固醇和PEG连接的胆固醇衍生物和PEG连接的植物固醇(例如,PEG-菜油固醇、PEG-谷固醇和PEG-豆固醇、DSPE-PEG、DOPE-PEG和神经酰胺-PEG)。

[0113] 本公开内容提供用于治疗性递送核酸、质粒、反义核酸、核酶、适配体、antagomir、siRNA、miRNA、基因沉默干扰核酸和其混合物的药学上可接受的核酸组合物。这些组合物和方法可在哺乳动物中用于预防和/或治疗疾病。

[0114] 可通过在有机或质子惰性溶剂中重悬阳离子脂质核酸盐来制造所要求的脂质/核酸制剂,并与其他脂质混合和进一步加工(例如,蒸发溶剂)来产生可施用至个体用于基因治疗(使用质粒DNA为核酸),或用于下调基因(使用反义核酸、核酶、antagomir、siRNA、miRNA、iNA),或抑制其他病症(使用适配体为核酸)的核酸脂质复合物。

[0115] 通过提供单分散的具有小于600nm,优选小于400nm,最优选低于200nm的粒度分布的脂质和核酸自乳化复合物,本公开内容也满足这些需要并且实现了其他目的和优势。

[0116] 用于施用的组合物和制剂

[0117] 可通过多种途径施用本公开内容的核酸-脂质组合物,例如通过静脉、胃肠外、腹膜内以产生全身递送,或局部途径施用。在一些实施方案中,siRNA可被细胞内递送,例如递送进入目标组织(例如,肺或肝或发炎的组织)的细胞。在一些实施方案中,本公开内容提供用于体内递送siRNA的方法。可将核酸-脂质组合物静脉、皮下或腹膜内施用给对象。在一些实施方案中,本公开内容提供用于体内递送干扰RNA至哺乳动物对象之肺的方法。

[0118] 在一些实施方案中,本公开内容提供在哺乳动物对象中治疗疾病或病症的方法。可将治疗有效量的本公开内容的组合物施用至患有与基因的表达或过表达相关疾病或紊乱的对象,所述组合物含有核酸、阳离子脂质、两亲物、磷脂、胆固醇和PEG连接的胆固醇,所述基因的表达或过表达可被所述组合物降低、减少、下调或沉默。

[0119] 可通过多种黏膜施用方式将本公开内容的组合物和方法施用至对象,包括通过口腔、直肠、阴道、鼻内、肺内或透皮或皮肤施用,或通过局部递送至眼、耳、皮肤或其他黏膜表面。在本公开内容的一些方面中,黏膜组织层包括上皮细胞层。所述上皮细胞可为肺、气管、支气管、肺泡、鼻、口腔、表皮或胃肠道的上皮细胞。可使用常规的驱动器(actuator)(例如

机械喷雾装置,以及加压的、电驱动的或其他类型的驱动器)来施用本公开内容的组合物。

[0120] 可作为鼻或肺喷雾剂在水溶液中施用本公开内容的组合物,并可通过多种本领域技术人员已知的方法以喷雾剂的形式分散。通过以滴剂、颗粒剂或喷雾剂(其可为例如气雾的(aerosolized)、雾化的(atomized)或喷雾的(nebulized))的形式施用来实现肺递送本公开内容的组合物。组合物的颗粒、喷雾剂或气雾剂可为液体或固体形式。U.S.Pat.No.4,511,069中公开了作为鼻喷雾剂用于分散液体的优选的系统。该制剂可通过在水中溶解根据本公开内容的组合物以产生水溶液并使所述溶液无菌来方便地制备。所述制剂可存在于多剂量容器中,例如,存在于U.S.Pat.No.4,511,069中公开的密封分散系统中。Transdermal Systemic Medication,Y.W.Chien ed.,Elsevier Publishers,New York,1985和U.S.Pat.No.4,778,810中描述了其他合适的鼻喷雾递送系统。其他的气雾剂递送形式可包括例如压缩空气、喷射、超声和压电喷雾器,其递送溶解于或悬于药用溶剂(例如,水、乙醇或其混合物)中的生物活性剂。

[0121] 本公开内容的鼻和肺喷雾溶液通常包含药物或要递送的药物,任选地以表面活性剂(例如,非离子表面活性剂(例如,聚山梨醇酯-80))和一种或多种缓冲剂在一起配制。在本公开内容的一些实施方案中,鼻喷雾溶液还包含抛射剂。鼻喷雾溶液的pH可为约pH6.8至7.2。所采用的药用溶剂还可为pH4~6的弱酸性水缓冲液。可添加其他组分以增强或维持化学稳定性,所述组分包括防腐剂、表面活性剂、分散剂或气体。

[0122] 在一些实施方案中,本公开内容为包含含有本公开内容的组合物的溶液和用于肺、黏膜或者鼻内喷雾剂或气雾剂的驱动器的药用产品。

[0123] 本公开内容的组合物的剂型可为液体,所述液体为液滴或乳剂的形式或为气雾剂的形式。

[0124] 本公开内容的组合物的剂型可为固体,所述固体可在施用前在液体中重建。可作为粉末施用所述固体。所述固体可为胶囊、片剂或凝胶的形式。

[0125] 为了配制本发明中的用于肺递送的组合物,可将使用生物活性剂与多种药学上可接受的添加剂以及用于分散所述活性剂的基质(base)或载体相组合。添加剂的例子包括pH控制剂,例如,精氨酸、氢氧化钠、甘氨酸、盐酸、柠檬酸和其混合物。其他添加剂包括局部麻醉剂(例如,苯甲醇)、等张剂(例如,氯化钠、甘露醇、山梨醇)、吸附抑制剂(例如,吐温80)、溶解性增强剂(例如,环糊精及其衍生物)、稳定剂(例如,血清白蛋白)和还原剂(例如,谷胱甘肽)。当用于黏膜递送的组合物是液体时,所测得的制剂的张力(参照0.9%(w/v)生理盐水溶液的张力测定)一般被调节至不会在施用位点的黏膜中诱导显著的、不可逆的组织损伤的值。一般来说,溶液的张力被调节至约1/3至3,更通常为1/2至2,并且最通常为3/4至1.7。

[0126] 可在基质或载体中分散生物活性剂,所述基质或载体可包含能分散所述活性剂和任何所需的添加剂的亲水化合物。所述基质可选自广泛范围的合适载体,其包括但不限于聚羧酸或其盐、羧酸酐(例如,马来酸酐)与其他单体(例如,丙烯酸甲酯、丙烯酸等)的共聚物、亲水的乙烯基聚合物(例如,聚乙酸乙烯酯、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮)、纤维素衍生物(例如,羟甲基纤维素、羟丙基纤维素等)和天然聚合物例如壳聚糖、胶原、海藻酸钠、凝胶、透明质酸和其非毒性的金属盐。通常来说,选择生物可降解的聚合物作为基质或载体,例如,聚乳酸、聚(乳酸-乙醇酸)共聚物、聚羟基丁酸、聚(羟基丁酸-乙醇酸)共聚物和其混合

物。或者还可应用合成的脂肪酸酯(例如,聚甘油脂肪酸酯、蔗糖脂肪酸酯等)作为载体。可单独或联合使用亲水聚合物和其他载体,并且可通过部分结晶、离子结合、交联等赋予所述载体增强的结构完整性。可以以多种形式提供所述载体,所述形式包括流体或粘稠溶液、凝胶、糊状物、粉末、微球和用于直接应用至鼻黏膜的膜。在该情况下,使用所选载体可导致促进生物活性剂的吸收。

[0127] 用于黏膜、鼻或肺递送的制剂可含有亲水的低分子量化合物作为基质或赋形剂。所述亲水的低分子量化合物提供通道媒介(passage medium),水溶性活性剂(例如,生理活性肽或蛋白)可通过所述通道媒介扩散通过所述基质,到达吸收所述活性剂的身体表面。所述亲水低分子量化合物任选地从黏膜或施用大气环境中吸收水分并溶解所述水溶性活性肽。亲水低分子量化合物的分子量一般不超过10,000,并优选不超过3000。亲水低分子量化合物的例子包括多元醇化合物(例如,寡糖、二糖和单糖)包括蔗糖、甘露醇、乳糖、L-阿拉伯糖、D-赤藓糖、D-核糖、D-木糖、D-甘露糖、D-半乳糖、乳果糖、纤维二糖、龙胆二糖(gentibiose)、甘油、聚乙二醇和其混合物。亲水低分子量化合物的其他例子包括N-甲基吡咯烷酮、醇(例如,寡乙烯基醇、乙醇、乙二醇、丙二醇等)和其混合物。

[0128] 本公开内容的组合物可作为替换地含有近似生理条件所需要的药学上可接受的载体物质,例如pH调节和缓冲剂、张力调节剂和润湿剂,例如,乙酸钠、乳酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、山梨醇月桂酸酯、油酸三乙醇胺和其混合物。对于固体组合物,可使用的常规的非毒性的药学上可接受的载体包括例如药用级的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、滑石粉、纤维素、葡萄糖、蔗糖、碳酸镁等。

[0129] 在本公开内容的某些实施方案中,可以以时间释放制剂施用生物活性剂,例如,以包含低释放聚合物的组合物的形式施用。可与载体一起制备活性剂,所述载体避免迅速释放,所述载体例如控释载体(例如,聚合物、微囊化的递送系统或生物粘附凝胶)。在本公开内容的各种组合物中,可通过在所述组合物中包含延缓吸收的试剂(例如,单硬脂酸铝水凝胶和凝胶)来产生活性剂的延长递送。

[0130] 虽然本公开内容是联系某些实施方案而描述的,并且为了说明的目的详细地解释了很多细节,但很明显的是,对于本领域技术人员来说,本公开内容包括其他实施方案,并且只要不偏离本公开内容,本文中描述的一些细节可相当程度地改变。本公开内容包括这样的其他实施方案、修改和等同方案。特别是本公开内容包括各种说明性部分和实施例之特征、术语或要素的任何组合。

[0131] 虽然本发明是联系某些实施方案而描述的,并且为了说明的目的,详细地解释了很多细节,但很明显的是,对于本领域技术人员来说,本发明包括其他实施方案,并且只要不偏离本发明,本文中描述的一些细节可相当程度地改变。本发明包括这样的其他实施方案、修改和等同方案。特别是本发明包括各种说明性部分和实施例之特征、术语或要素的任何组合。

实施例

[0132] 实施例1~4:核酸/阳离子脂质盐

[0133] 通过以下方法制备核酸/阳离子脂质盐。在清洁、干燥的硼硅酸盐透明玻璃小瓶中,将2mg阳离子脂质溶于0.1mL氯仿中,并通过向所述小瓶中吹入氮气而蒸发掉氯仿,并通

过在真空室中真空干燥而除去任何残余的痕量氯仿。从所述真空室中取出所述小瓶并添加0.1mL乙醇。用TEFLON®-衬盖(lined cap)密封所述小瓶,并用密封带包紧。震荡或/和超声处理所述小瓶以溶解阳离子脂质。

[0134] 将阳离子脂质的乙醇溶液添加至含有1mg siRNA的水溶液中。添加所述阳离子脂质至所述siRNA溶液中立即引起聚集,形成包含所述阳离子脂质和siRNA的水不溶性阳离子脂质/核酸盐。

[0135] 随后,在Eppendorf微离心机中,以最大速度离心管中的水不溶性阳离子脂质/核酸盐15分钟,以形成沉淀(pellet)。收集每次离心的上清液,并以OD260测量所述上清液中siRNA的量。

[0136] 对于其余的实施例,所述核酸/阳离子脂质盐溶解于有机溶剂中,以待与其他脂质一同混合成制剂。

[0137] 表1列出了用于使用该方法形成核酸/阳离子脂质盐的阳离子脂质。

[0138] 表1

[0139]

实施例1	DOTMA (N-(1-(2,3-二油基氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵)
实施例2	DC-Chol (胆固醇 3β-N-(二甲基氨基乙基)氨基甲酸酯氢氯化物)
实施例3	DODAP (1,2-二肉豆蔻酰基-3-二甲基铵丙烷)
实施例4	DOTAP (N-(1-(2,3-二油基氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵)

[0140] 表2是对导致siRNA不溶于水的siRNA/脂质比例之测量的总结。

[0141] 表2

[0142]

siRNA/脂质的比值	水中剩余的 siRNA			
	DOTAP	DODAP	DC-Chol	DOTMA
0	100	100	100	100
0.5	63	56	72	61
0.75	55	52	63	57
1	45	46	57	46
1.5	28	30	35	29
2	10	12	13	6

[0143] 实施例5~18:肝siRNA递送制剂

[0144] 通过以下方法制备肝siRNA递送制剂。离心和干燥实施例1~4中制造的阳离子脂质/siRNA盐(含有1mg与所述阳离子脂质复合的siRNA)之后,将所述盐重悬于100 μ L的氯仿中,并根据表3中确定的特定氨基甲酸酯、磷脂和脂质-PEG,将所述盐与氯仿中的脂质混合物混合:4.4mg氨基甲酸酯、2.7至4.4mg磷脂、3.2mg胆固醇和14.4mg脂质-PEG。在真空中干燥所述混合物并在4 $^{\circ}$ C下储存待用。注射之前,摇动中添加9%蔗糖溶液以形成siRNA/脂质制剂的等张的和自乳化的siRNA/脂质混悬液。以0.2ml的剂量体积,通过尾静脉将所述制剂

给药至CD1小鼠。两天后,处死小鼠并收获肝用于以实时RT-PCR法分析基因表达。在2mg/kg剂量的siRNA中观察到了目标基因大于80%的沉默。

[0145] 表3:肝递送制剂

[0146]

	阳离子脂质	氨基甲酸酯	中性脂质	固醇-PEG
实施例 5	DOTMA	N ⁶ -四(3-氨基丙基)-1,3-丙二胺胆固醇	1,2-二花生四烯酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺	胆固醇-PEG 1000
实施例 6	DC-Chol	N ⁶ -四(3-氨基丙基)-1,3-丙二胺胆固醇	1,2-二花生四烯酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺	胆固醇-PEG 1000
实施例 7	DOTMA	N ⁶ -四(3-氨基丙基)-1,3-丙二胺胆固醇	1,2-双二十二碳六烯酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺	胆固醇-PEG 1000
实施例 8	DC-Chol	N ⁶ -四(3-氨基丙基)-1,3-丙二胺胆固醇	1,2-双二十二碳六烯酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺	胆固醇-PEG 1000
实施例 9	DOTMA	N ⁶ -四(3-氨基丙基)-1,3-丙二胺胆固醇	1,2-双二十二碳六烯酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺	胆固醇-PEG 660
实施例 10	DC-Chol	N ⁶ -四(3-氨基丙基)-1,3-丙二胺胆固醇	1,2-双二十二碳六烯酰基-sn-甘	胆固醇-PEG 660

[0147]

			油-3-磷酸乙醇 胺	
实施例 11	DOTMA	N ⁶ -四(3-氨基丙基) -1,3-丙二胺胆固醇	1,2-二亚油酰基 -sn-甘油-3-磷 酰乙醇胺	胆固醇 -PEG 660
实施例 12	DC-Chol	N ⁶ -四(3-氨基丙基) -1,3-丙二胺胆固醇	1,2-二亚油酰基 -sn-甘油-3-磷 酰乙醇胺	胆固醇 -PEG 660
实施例 13	DOTMA	N ⁶ -四(3-氨基丙基) -1,3-丙二胺胆固醇	1,2-二亚油酰基 -sn-甘油-3-磷 酰乙醇胺	胆固醇 -PEG 1000
实施例 14	DOTMA	N ⁶ -四(3-氨基丙基) -1,3-丙二胺胆固醇	1,2-二亚油酰基 -sn-甘油-3-磷 酰乙醇胺	胆固醇 -PEG 750
实施例 15	DOTMA	N ⁴ -精胺胆固醇氨基 甲酸酯	1,2-二亚油酰基 -sn-甘油-3-磷 酰乙醇胺	胆固醇 -PEG 1000
实施例 16	DOTMA	N ⁴ -精胺胆固醇氨基 甲酸酯	1,2-双二十二碳 六烯酰基-sn-甘 油-3-磷酸乙醇 胺	胆固醇 -PEG 1000
实施例 17	DOTMA	N ⁶ -四(3-氨基丙基) -1,3-丙二胺胆固醇	1,2-二亚油酰基 -sn-甘油-3-磷 酰乙醇胺	DSPE-PEG 2000
实施例 18	DOTMA	N ⁶ -四(3-氨基丙基) -1,3-丙二胺胆固醇	1,2-二亚油酰基 -sn-甘油-3-磷 酰乙醇胺	DSPE-PEG 2000
实施例 19	DOTMA	精胺胆固醇氨基甲酸 酯	1,2-二花生四烯 酰基-sn-甘油 -3-磷酸乙醇胺	胆固醇 -PEG 1000

[0148] 图1描述了小鼠中注射实施例11的制剂的测试结果。该结果显示,以0.5~4mg siRNA/kg的剂量注射所要求制剂中的ApoB siRNA有效地敲低了肝中ApoB基因的表达并且有效地降低了血清胆固醇水平。

[0149] 图2显示身体对实施例11的所要求制剂中的ApoB siRNA应答的时间过程。该结果显示,注射后长达14天,ApoB siRNA表达和血清胆固醇降低。

[0150] 实施例20~25:肺siRNA递送制剂

[0151] 通过以下方法制备肺siRNA递送制剂。离心并干燥实施例1~4中制造的阳离子脂质/siRNA盐(含有1mg与所述阳离子脂质复合的siRNA)之后,将所述盐重悬于100μL的氯仿中,并根据表4中确定的特定氨基甲酸酯、磷脂和脂质-PEG,将所述盐与氯仿中的脂质混合物混合:8.8mg氨基甲酸酯、2.2mg磷脂、1.6mg胆固醇和14.4mg脂质-PEG。在真空下干燥所述混合物并在4℃下储存待用。注射之前,摇动中添加9%蔗糖溶液以形成siRNA/脂质制剂的等张的和自乳化的siRNA/脂质混悬液。以0.2ml的剂量体积,通过尾静脉将所述制剂给药至129S1/svImJ小鼠。两天后,处死小鼠并收获肺和肝用于以实时RT-PCR法分析基因表达。

[0152] 表4:肺递送制剂

[0153]

	阳离子脂质	氨基甲酸酯	磷脂	脂质-PEG
实施例 20	DOTMA	N ⁶ -四(3-氨基丙基)-1,3-丙二胺胆固醇氨基甲酸酯	1,2-二亚油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺	胆固醇-PEG 660
实施例 21	DOTMA	N ⁶ -四(3-氨基丙基)-1,3-丙二胺胆固醇氨基甲酸酯	1,2-二亚油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺	胆固醇-PEG 1000
实施例 22	DOTMA	N ⁴ -精胺胆固醇氨基甲酸酯	1,2-二亚油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺	胆固醇-PEG 660
实施例 23	DOTMA	N ⁶ -四(3-氨基丙基)-1,3-丙二胺胆固醇氨基甲酸酯	1,2-双二十二碳六烯酰基	胆固醇-PEG 660

[0154]

实施例 24	DOTMA	胆固醇氨基甲酸酯 N ⁶ -四(3-氨基丙基)-1,3-丙二胺胆固醇氨基甲酸酯	-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺 1,2-二花生四烯酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺	胆固醇-PEG 660
实施例 25	DOTMA	精胺胆固醇氨基甲酸酯	1,2-二花生四烯酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺	胆固醇-PEG 1000

[0155] 图3描述了小鼠中注射所要求的制剂的测试结果。结果显示,注射实施例20的制剂中的GAPDH siRNA和 β -肌动蛋白有效地敲低肺中相应基因的表达,但该制剂仅最低程度地改变这些基因在肝中的表达。

[0156] 图4显示肺对注射实施例20的所要求制剂中的GAPDH siRNA和 β -肌动蛋白ApoB siRNA的剂量应答。该结果显示,2~12mg siRNA/kg的剂量降低了这些的表达,并且2~8mg siRNA/kg的剂量最低程度地影响肝表达。

[0157] 实施例26~32:肿瘤siRNA递送制剂

[0158] 通过以下方法制备肿瘤siRNA递送制剂。离心并干燥实施例1~4中制造的阳离子脂质/siRNA盐(含有1mg与所述阳离子脂质复合的siRNA)之后,将所述盐重悬于100 μ L的氯仿中,并根据表5中确定的特定氨基甲酸酯、磷脂和脂质-PEG,将所述盐与氯仿中的脂质混合物混合:4.4mg氨基甲酸酯、4.4mg磷脂、2.4mg胆固醇和21.6mg脂质-PEG。在真空下干燥所述混合物并在4 $^{\circ}$ C下储存待用。注射之前,摇动中添加9%蔗糖溶液以形成siRNA/脂质制剂的等张的和自乳化的siRNA/脂质混悬液。以0.2ml的剂量体积,通过尾静脉将所述制剂给药至Balb/c小鼠。siRNA制剂给药前5天,将EMT6细胞植入小鼠的肝。两天后,处死小鼠。收获肿瘤和肝用于以实时RT-PCR法分析基因表达。

[0159] 表5:肿瘤递送制剂

[0160]

	阳离子脂质	氨基甲酸酯	磷脂	脂质-PEG
实施例 26	DOTMA	N ⁶ -四(3-氨基丙基)-1,3-丙二胺胆固醇氨基甲酸酯	1,2-二亚油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺	胆固醇-PEG 660
实施例 27	DOTMA	N ⁶ -四(3-氨基丙基)-1,3-丙二胺胆固醇氨基甲酸酯	1,2-二亚油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺	胆固醇-PEG 1000
实施例 28	DOTMA	N ⁶ -四(3-氨基丙基)-1,3-丙二胺胆固醇氨基甲酸酯	1,2-二亚油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺	胆固醇-PEG 2000
实施例 29	DOTMA	N ⁶ -四(3-氨基丙基)-1,3-丙二胺胆固醇氨基甲酸酯	1,2-二亚油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺	胆固醇-PEG 2000
实施例 30	DOTMA	N ⁶ -四(3-氨基丙基)-1,3-丙二胺胆固醇氨基甲酸酯	1,2-二亚油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺	11.6 mg 胆固醇-PEG 660 和 10 mg DSPE-PEG 2000
实施例 31	DOTMA	N ⁶ -四(3-氨基丙基)-1,3-丙二胺胆固醇氨基甲酸酯	1,2-二花生四烯酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺	胆固醇-PEG 660
实施例 32	DOTMA	N ⁶ -四(3-氨基丙基)-1,3-丙二胺胆固醇氨基甲酸酯	1,2-双二十二碳六烯酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺	胆固醇-PEG 660

[0161] 图5描述了小鼠中注射所要求的制剂的测试结果。该结果显示,注射实施例27的制剂中的核纤层蛋白siRNA有效地敲低肿瘤中相应基因的表达,但该制剂较低程度地改变肝中基因的表达。

[0162] 实施例33:骨髓siRNA递送制剂

[0163] 通过以下方法制备骨髓siRNA递送制剂。离心并干燥实施例1~4中制造的DOTMA/siRNA盐(含有1mg与DOTMA复合的siRNA)之后,将所述盐重悬于100μL的氯仿中,并将所述盐与氯仿中的以下脂质混合:6.6mg N⁶-四(3-氨基丙基)-1,3-丙二胺胆固醇氨基甲酸酯、2.2mg DlinPE(1,2-二亚油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺)、2.4mg胆固醇和21.6mg胆固醇-

PEG(胆固醇-聚(乙二醇))660。在真空下干燥所述混合物并在4℃下储存待用。注射之前,摇动中添加9%蔗糖溶液以形成siRNA/脂质制剂的等张的和自乳化的siRNA/脂质混悬液。以0.2ml的剂量体积,通过尾静脉将所述制剂给药至CD1小鼠。两天后,处死小鼠。收获骨髓和肝用于以实时RT-PCR法分析基因表达。

[0164] 实施例34:皮肤制剂

[0165] 通过以下方法制备皮肤siRNA递送制剂。使用带有或不带有荧光标记的siRNA用于本实验。按照实施例1制备siRNA/DOTMA阳离子脂质盐。随后,将siRNA/DOTMA阳离子脂质盐溶于1-辛醇。添加含有月桂酰二醇和氮酮的其他赋形剂之后,将所述制剂应用于猪皮肤表面。孵育5小时之后,除去所述制剂并清洗皮肤表面以除去未吸收的siRNA。随后,固定皮肤组织,切片(5um厚),用DAPI核染色并在荧光显微镜下检测荧光强度。

[0166] 实施例35:体内基因敲低检测

[0167] 在所进行的动物研究中使用的所有操作均经过机构动物管理与使用委员会(Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)的批准,且符合适用的地区、州和联邦法规。小鼠以0.2ml的剂量体积通过尾静脉接受siRNA制剂。给药后2天,收获小鼠组织,并用Turbocapture试剂盒(Qiagen)分离mRNA用于以实时RT-PCR法(SensiMix SYBR One-Step Kit, Bioline)分析基因表达的改变。

[0168] 实施例36:用阳离子脂质进行siRNA沉淀的规模扩大

[0169] 为产生更高量的用于体内递送siRNA临床研究的沉淀,在室温下将1g ApoB siRNA完全溶于500ml无RNA酶的水中。通过将2克干燥的DOTMA溶于25ml无水乙醇来制备DOTMA溶液。一边在搅拌盘上搅拌siRNA溶液,一边将DOTMA溶液缓慢地添加至所述siRNA溶液中。立即形成沉淀。在室温下孵育混合物20分钟,随后在4℃下孵育30分钟至几个小时。以30,000g离心所述混合物30分钟。除去上清液,并在真空下干燥固体。

[0170] 实施例37:制备阳离子脂质DOTMA(N-[1-(2,3-二油基氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵)的水溶液和核酸/DOTMA盐

[0171] 在清洁、干燥的硼硅酸盐透明玻璃小瓶中,将2mg DOTMA溶于0.1mL氯仿中,并通过向所述小瓶中吹入氮气而蒸发掉氯仿,并通过在真空室中真空干燥而除去任何残余的痕量氯仿。从所述真空室中取出所述小瓶并添加1mL无菌水。用TEFLON®-衬盖密封所述小瓶,并用密封带包紧。震荡或/和超声处理所述小瓶至澄清。

[0172] 将含有1mg siRNA的水溶液添加至DOTMA的水溶液中。添加siRNA至DOTMA阳离子脂质的水溶液中立即引起聚集,形成由DOTMA和siRNA组成的水不溶性阳离子脂质/核酸盐。

[0173] 将管中的水不溶性阳离子脂质/核酸盐在冰上冷却至少10分钟。随后,在Eppendorf微离心机中,以最大速度离心管中的水不溶性阳离子脂质/核酸盐15分钟,以形成沉淀(pellet)。小心地除去水层,并在真空室中真空干燥盐沉淀以除去额外的水分。

[0174] 实施例38:制备阳离子脂质DOTMA(N-[1-(2,3-二油基氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵)的水溶液和核酸/DOTMA盐

[0175] 进行实施例35的方法,只是添加siRNA至DOTMA之后直接离心所产生的混合物,而不在冰上冷却。

[0176] 实施例39:制备阳离子脂质DOTMA(N-[1-(2,3-二油基氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵)的水溶液和核酸/DOTMA盐

- [0177] 进行实施例36的方法,只是将DOTMA的水溶液添加至siRNA溶液。
- [0178] 实施例40:制备阳离子脂质1,2-二亚油基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLinDMA)的乙醇溶液和核酸/DLinDMA盐
- [0179] 进行实施例35的方法,只是使用DLinDMA作为阳离子脂质。
- [0180] 实施例41:制备阳离子脂质N-(1-(2,3-二油酰基氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵("DOTAP")的乙醇溶液和核酸/DOTAP盐
- [0181] 进行实施例35的方法,只是使用DOTAP为阳离子脂质,并且该脂质被溶于乙醇。
- [0182] 实施例42:制备阳离子脂质DOTMA(N-[1-(2,3-二油基氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵)的水溶液和核酸/DOTMA盐
- [0183] 进行实施例35的方法,只是使用细菌质粒替代siRNA。
- [0184] 实施例43:制备阳离子脂质DOTMA(N-[1-(2,3-二油基氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵)的乙醇溶液和核酸/DOTMA盐
- [0185] 进行实施例40的方法,只是DOTMA溶于乙醇中而非水中。
- [0186] 实施例44:核酸与阳离子脂质混合之后,从液体中分离核酸/阳离子脂质盐
- [0187] 按实施例1~4和35~41混合核酸和阳离子脂质之后,离心前在冰上冷却该混合物至少10分钟。
- [0188] 实施例45:核酸与阳离子脂质混合之后,从液体中分离核酸/阳离子脂质盐
- [0189] 按实施例42制备核酸和阳离子脂质盐,只是不经离心就干燥该混合物。
- [0190] 实施例46:核酸与阳离子脂质混合之后,从液体中分离核酸/阳离子脂质盐
- [0191] 按实施例43制备核酸和阳离子脂质盐,只是过滤该混合物来收集所沉淀的盐。
- [0192] 实施例47:核酸与阳离子脂质混合之后,从液体中分离核酸/阳离子脂质盐
- [0193] 按实施例42制备核酸和阳离子脂质盐,只是离心前不冷却混合物。

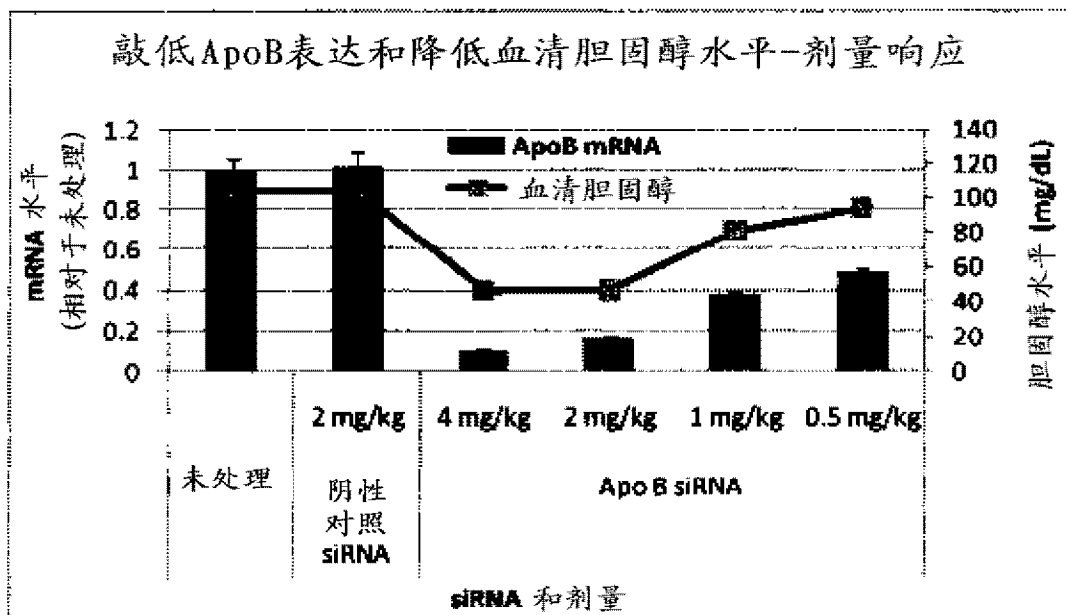


图1

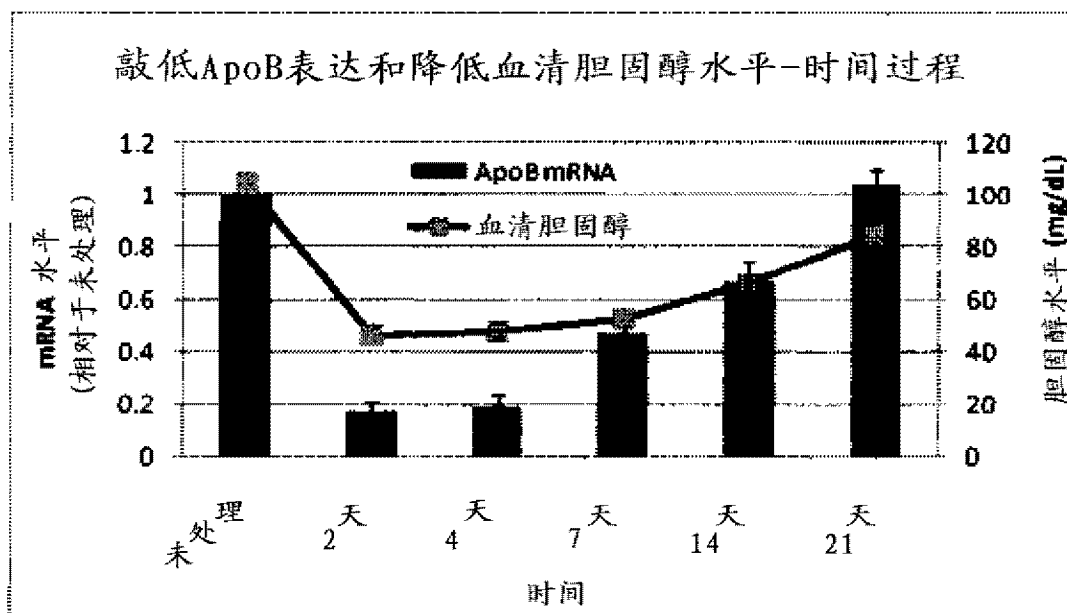
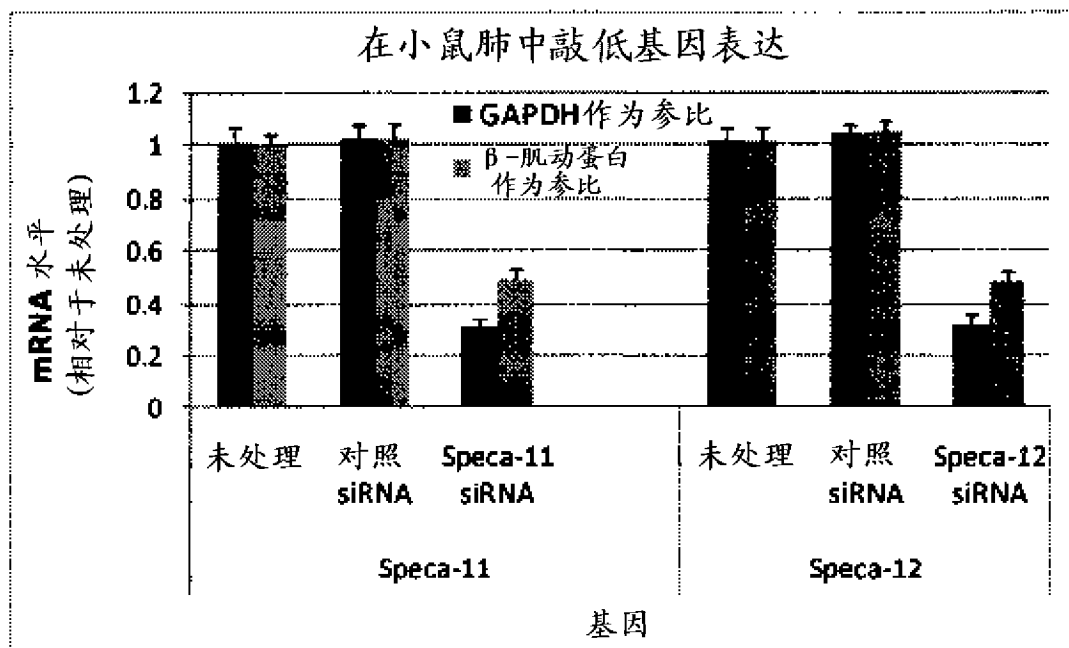


图2

A



B

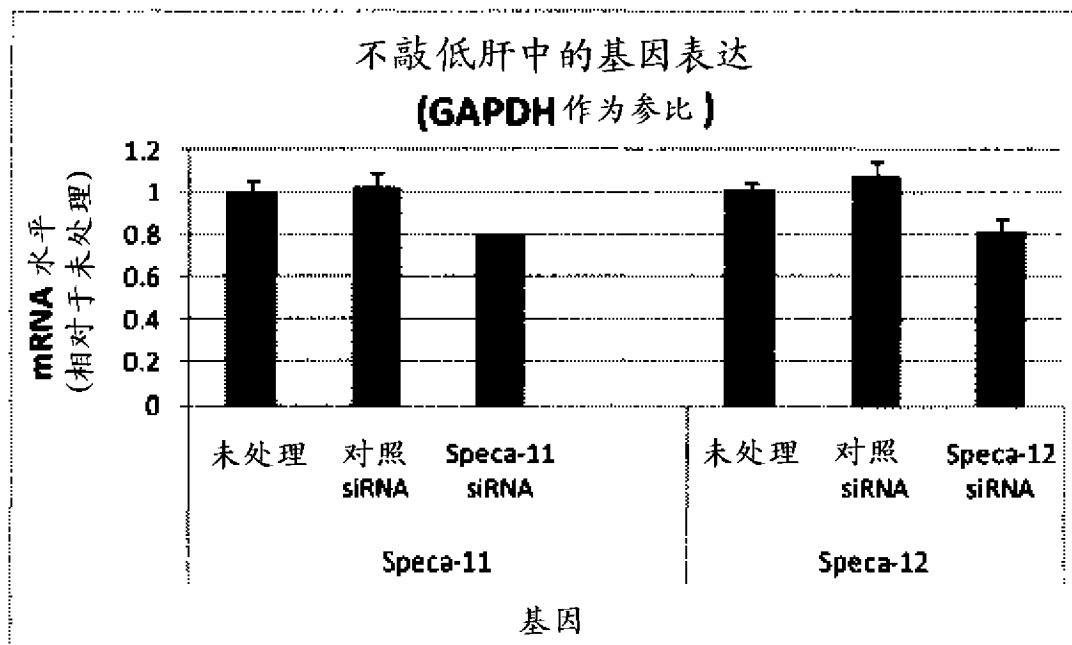
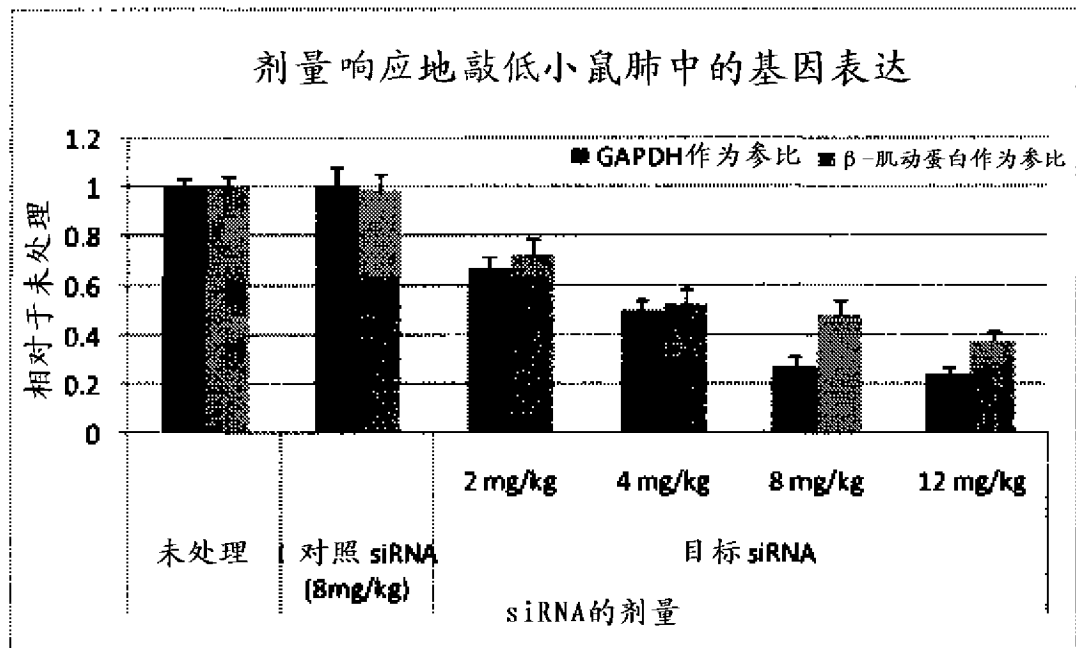


图3

A



B

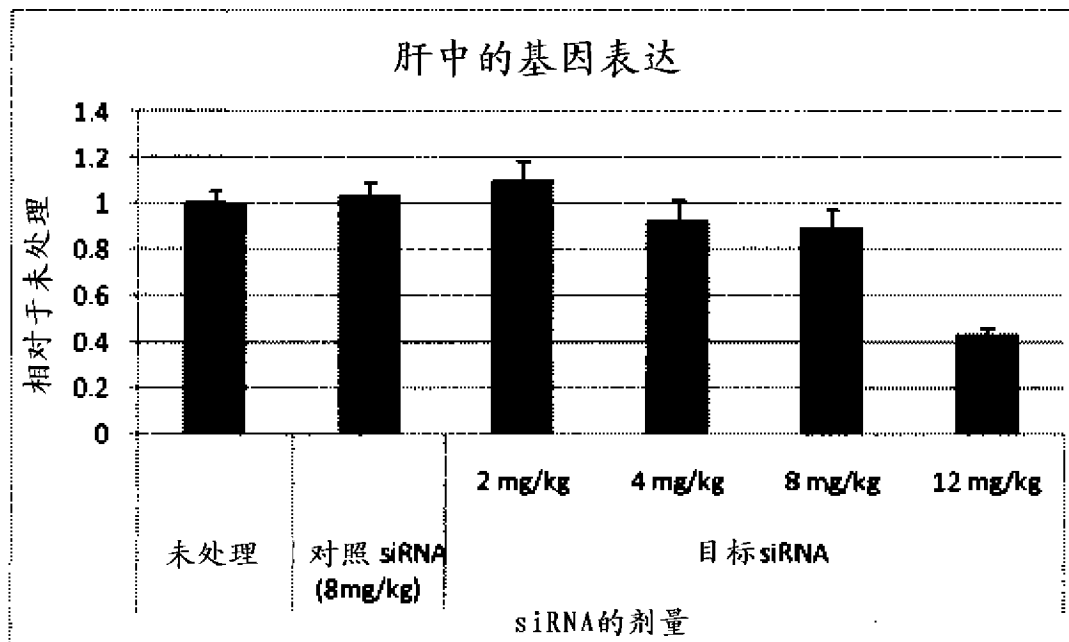
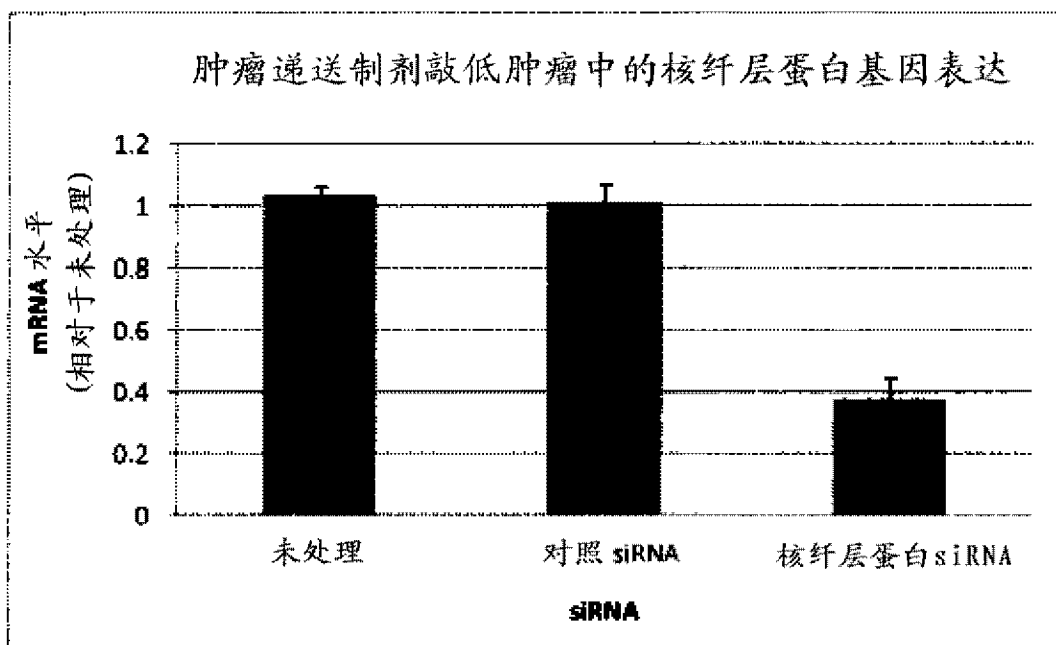


图4

A



B

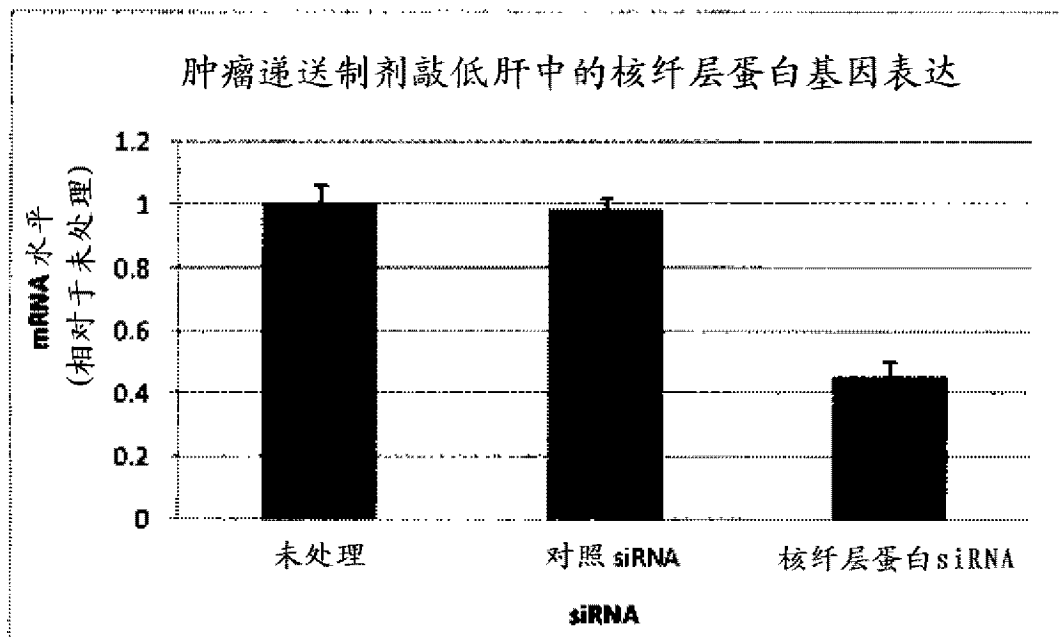


图5