



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 102438978 B

(45)授权公告日 2017.02.22

(21)申请号 201080022046.3

(22)申请日 2010.03.19

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 102438978 A

(43)申请公布日 2012.05.02

(30)优先权数据
61/161,828 2009.03.20 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2011.11.21

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2010/028000 2010.03.19

(87)PCT国际申请的公布数据
W02010/108108 EN 2010.09.23

(73)专利权人 CLSN实验室股份有限公司
地址 美国特拉华州

(72)发明人 G.斯洛伯德金 R.康戈 M.玛塔
J.费威尔 K.安沃 B.J.斯帕克斯

(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
11105
代理人 刘蕾 沙捷

(51)Int.Cl.
C07C 233/38(2006.01)
C12N 15/88(2006.01)
A61K 9/127(2006.01)

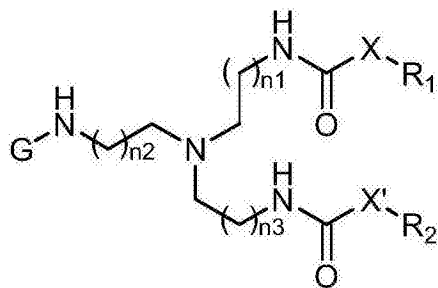
(56)对比文件
WO 03/106636 A2,2003.12.24,
WO 00/30444 A1,2000.06.02,
审查员 冯媛

权利要求书4页 说明书55页
序列表2页 附图8页

(54)发明名称
聚胺衍生物

(57)摘要
本发明公开了用于生物活性分子的系统和
局部递送的化合物、组合物和方法。

1. 下式的化合物：



其中

n_1 、 n_2 和 n_3 独立地是1、2、3或4；

X和X'独立地是化学键或氧；

其中当X和X'独立地是化学键时， $C(O)XR_1$ 和 $C(O)X'R_2$ 独立来自具有10-22个碳原子的饱和、单不饱和或多不饱和的脂肪酸；

当X和X'独立地是氧时， R_1 和 R_2 独立地来自具有10-22个碳原子的饱和或多不饱和的脂肪酸；且

G是选自下述的聚合物部分：聚氧化烯、聚乙烯吡咯烷酮、聚丙烯酰胺、聚二甲基丙烯酰胺、聚乙烯醇、葡聚糖、聚(L-谷氨酸)、苯乙烯马来酸酐、聚-N-(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺或聚二乙烯醚马来酸酐，其中所述聚合物部分任选用选自下述的靶向配体取代：叶酸盐、半乳糖、氨基半乳糖、N-乙酰基氨基半乳糖、LHRH肽和RGD肽。

2. 根据权利要求1所述的化合物，其中 n_1 、 n_2 和 n_3 都是1，且X和X'都是化学键。

3. 根据权利要求1所述的化合物，其中 R_1 和 R_2 中的至少一个来自具有10-22个碳原子的多不饱和的脂肪酸。

4. 根据权利要求1所述的化合物，其中 R_1 和 R_2 都来自具有10-22个碳原子的多不饱和的脂肪酸。

5. 根据权利要求1所述的化合物，其中 R_1 和 R_2 独立地来自具有12-20个碳原子的多不饱和的脂肪酸。

6. 根据权利要求1所述的化合物，其中 R_1 和 R_2 独立地来自具有14-18个碳原子的多不饱和的脂肪酸。

7. 根据权利要求1所述的化合物，其中 $-C(O)X-R_1$ 和 $-C(O)X'-R_2$ 均表示油酰基团。

8. 根据权利要求1所述的化合物，其中X是氧。

9. 根据权利要求1所述的化合物，其中所述聚合物包括在聚合物单元之间的至少一个连接基团。

10. 根据权利要求1所述的化合物，其中所述聚合物部分是聚氧化烯。

11. 根据权利要求1所述的化合物，其中所述聚合物的分子量为200-10,000Da。

12. 根据权利要求9所述的化合物，其中所述聚合物部分包括至少一个选自下组的连接体： $-C(O)-$ 、 $-O-$ 、 $-O-C(O)O-$ 、 $-C(O)CH_2CH_2C(O)-$ 、 $-S-S-$ 、 $-NR^3-$ 、 $-NR^3C(O)O-$ 、 $-OC(O)NR^3-$ 、 $-NR^3C(O)-$ 、 $-C(O)NR^3-$ 、 $-NR^3C(O)NR^3-$ 、 $-$ 亚烷基 $-NR^3C(O)O-$ 、 $-$ 亚烷基 $-NR^3C(O)NR^3-$ 、 $-$ 亚烷基 $-OC(O)NR^3-$ 、 $-$ 亚烷基 $-NR^3-$ 、 $-$ 亚烷基 $-O-$ 、 $-$ 亚烷基 $-NR^3C(O)-$ 、 $-$ 亚烷基 $-C(O)NR^3-$ 、 $-NR^3C(O)O-$ 、 $-$ 亚烷基 $-NR^3C(O)NR^3-$ 、 $-$ 亚烷基 $-OC(O)NR^3-$ 、 $-NR^3-$ 、 $-O-$ 、 $-NR^3C(O)-$ 。

亚烷基-、-C(O)NR³-亚烷基-、-亚烷基-NR³C(O)O-亚烷基-、-亚烷基-NR³C(O)NR³-亚烷基-、-亚烷基-OC(O)NR³-亚烷基-、-亚烷基-NR³-亚烷基-、-亚烷基-O-亚烷基-、-亚烷基-NR³C(O)-亚烷基-、-C(O)NR³-亚烷基-、-NR³C(O)O-亚烷氧基-、-NR³C(O)NR³-亚烷氧基-、-OC(O)NR³-亚烷氧基-、-NR³-亚烷氧基-、-O-亚烷氧基-、-NR³C(O)-亚烷氧基-、-C(O)NR³-亚烷氧基-、-亚烷氧基-NR³C(O)O-亚烷氧基-，以及—D——E—

其中

选自芳基、取代芳基、环烷基、取代环烷基、包括杂芳基的杂环基和包括取代杂芳基的取代杂环基，且D和E独立地选自化学键、-O-、CO-、NR³-、-NR³C(O)O-、-OC(O)NR³-、-NR³C(O)-、-C(O)NR³-、-NR³C(O)NR³-、-亚烷基-NR³C(O)O-、-亚烷基-NR³C(O)NR³-、-亚烷基-OC(O)NR³-、-亚烷基-NR³-、-亚烷基-O-、-亚烷基-NR³C(O)-、亚烷基-C(O)NR³-、-NR³C(O)O-亚烷基-、-NR³C(O)NR³-亚烷基-、-OC(O)NR³-亚烷基-、-NR³-亚烷基-、-O-亚烷基-、-NR³C(O)-亚烷基-、-NR³C(O)O-亚烷氧基-、-NR³C(O)NR³-亚烷氧基-、-OC(O)NR³-亚烷氧基-、-NR³-亚烷氧基-、-O-亚烷氧基-、-NR³C(O)-亚烷氧基-、-C(O)NR³-亚烷氧基-、-亚烷氧基-NR³C(O)O-亚烷氧基-、-C(O)NR³-亚烷基-、-亚烷基-NR³C(O)O-亚烷基-、-亚烷基-NR³C(O)NR³-亚烷基-、-亚烷基-OC(O)NR³-亚烷基-、-亚烷基-NR³-亚烷基-、亚烷基-O-亚烷基-、-亚烷基-NR³C(O)-亚烷基-和-C(O)NR³-亚烷基-，其中R³是氢或任选取代的烷基。

13. 根据权利要求9所述的化合物，其中所述聚合物是聚氧化烯，其中氧化烯基团独立地是在其重复单元中具有2-5个碳原子的直链或支链的聚氧化烯基团。

14. 根据权利要求13所述的化合物，其中所述聚氧化烯是聚氧乙烯、直链或支链的聚氧丙烯或直链或支链的聚氧丁烯。

15. 根据权利要求13所述的化合物，其中所述聚氧化烯是聚氧乙烯。

16. 根据权利要求7所述的化合物，其中所述聚合物包括在聚合物单元之间的至少一个连接基团。

17. 根据权利要求7所述的化合物，其中所述聚合物部分是聚氧化烯。

18. 根据权利要求7所述的化合物，其中所述聚合物的分子量为200-10,000Da。

19. 根据权利要求16所述的化合物，其中所述聚合物部分包括至少一个选自下组的连接体：-C(O)-、-O-、-O-C(O)O-、-C(O)CH₂CH₂C(O)-、-S-S-、-NR³-、-NR³C(O)O-、-OC(O)NR³-、-NR³C(O)-、-C(O)NR³-、-NR³C(O)NR³-、-亚烷基-NR³C(O)O-、-亚烷基-NR³C(O)NR³-、-亚烷基-OC(O)NR³-、-亚烷基-NR³-、-亚烷基-O-、-亚烷基-NR³C(O)-、-亚烷基-C(O)NR³-、-NR³C(O)O-亚烷基-、-NR³C(O)NR³-亚烷基-、-OC(O)NR³-亚烷基-、-NR³-亚烷基-、-O-亚烷基-、-NR³C(O)-亚烷基-、-C(O)NR³-亚烷基-、-亚烷基-NR³C(O)O-亚烷基-、-亚烷基-NR³C(O)NR³-亚烷基-、-亚烷基-OC(O)NR³-亚烷基-、-亚烷基-NR³-亚烷基-、-亚烷基-O-亚烷基-、-亚烷基-NR³C(O)-亚烷基-、-C(O)NR³-亚烷基-、-NR³C(O)O-亚烷氧基-、-NR³C(O)NR³-亚烷氧基-、-OC(O)NR³-亚烷氧基-、-NR³-亚烷氧基-、-O-亚烷氧基-、-NR³C(O)-亚烷氧基-、-C(O)NR³-亚烷氧基-、-亚烷氧基-NR³C(O)O-亚烷氧基-，以及—D——E—

其中

C 选自芳基、取代芳基、环烷基、取代环烷基、包括杂芳基的杂环基和包括取代杂芳基的取代杂环基,且D和E独立地选自化学键、-O-、CO-、-NR³-、-NR³C(O)O-、-OC(O)NR³-、-NR³C(O)-、-C(O)NR³-、-NR³C(O)NR³-、-亚烷基-NR³C(O)O-、-亚烷基-NR³C(O)NR³-、-亚烷基-OC(O)NR³-、-亚烷基-NR³-、-亚烷基-O-、-亚烷基-NR³C(O)-、亚烷基-C(O)NR³-、-NR³C(O)O-亚烷基-、-NR³C(O)NR³-亚烷基-、-OC(O)NR³-亚烷基-、-NR³-亚烷基-、-O-亚烷基-、-NR³C(O)-亚烷基-、-NR³C(O)O-亚烷氧基-、-NR³C(O)NR³-亚烷氧基-、-OC(O)NR³-亚烷氧基-、-NR³-亚烷氧基-、-O-亚烷氧基-、-NR³C(O)-亚烷氧基-、-C(O)NR³-亚烷氧基-、-亚烷氧基-NR³C(O)O-亚烷氧基-、-C(O)NR³-亚烷基-、-亚烷基-NR³C(O)O-亚烷基-、-亚烷基-NR³C(O)NR³-亚烷基-、-亚烷基-OC(O)NR³-亚烷基-、-亚烷基-NR³-亚烷基-、亚烷基-O-亚烷基-、-亚烷基-NR³C(O)-亚烷基-和-C(O)NR³-亚烷基-,其中R³是氢或任选取代的烷基。

20. 根据权利要求7所述的化合物,其中所述聚合物是聚氧化烯,其中氧化烯基团独立地是在其重复单元中具有2-5个碳原子的直链或支链的聚氧化烯基团。

21. 根据权利要求7所述的化合物,其中所述聚氧化烯是聚氧乙烯、直链或支链的聚氧丙烯或者直链或支链的聚氧丁烯。

22. 根据权利要求7所述的化合物,其中所述聚氧化烯是聚氧乙烯。

23. 一种制剂,包含如权利要求1-22中任一项所述的化合物以及选自下组的分子:核蛋白体RNA;RNA或DNA的反义多核苷酸;适配体;核酶;siRNA;shRNA;miRNA;以及编码治疗有效蛋白的遗传DNA、cDNA或mRNA的多核苷酸;蛋白;肽;胆固醇;激素;小分子药物化合物;维生素和辅因子。

24. 根据权利要求23所述的制剂,其中所述制剂包括由所述化合物和所述分子形成的颗粒。

25. 根据权利要求24所述的制剂,其中所述颗粒的中值粒径小于500nm。

26. 根据权利要求23所述的制剂,其中所述分子和所述化合物形成脂质复合体。

27. 根据权利要求23所述的制剂,其中所述分子至少部分在由所述化合物形成的脂质体内。

28. 根据权利要求27所述的制剂,其中所述分子被包封在所述脂质体内。

29. 权利要求23所述的制剂在制备用于向细胞中引入核蛋白体RNA;RNA或DNA的反义多核苷酸;适配体;核酶;siRNA;shRNA;miRNA;或编码治疗有效蛋白的遗传DNA、cDNA或mRNA的多核苷酸的药物中的用途。

30. 权利要求23所述的制剂在制备用于调控目标序列表达的药物中的用途。

31. 权利要求23所述的制剂在制备用于核蛋白体RNA;RNA或DNA的反义多核苷酸;适配体;核酶;siRNA;shRNA;miRNA;或编码治疗有效蛋白的遗传DNA、cDNA或mRNA的多核苷酸的体内递送的药物中的用途。

32. 权利要求23所述的制剂在制备用于治疗或预防哺乳动物受试者的肺组织中的疾病或者与肿瘤生成基因、血管新生基因、免疫调节基因、配体受体基因或神经变性失调基因的表达有关的疾病的药物中的用途。

33. 权利要求23所述的制剂在制备用于抑制基因在细胞中的表达的药物中的用途。

34. 根据权利要求33所述的用途,其中所述细胞在体外进行接触。

35. 根据权利要求33所述的用途,其中所述细胞在体内进行接触。
36. 根据权利要求34或35所述的用途,其中所述细胞是哺乳动物细胞。
37. 根据权利要求36所述的用途,其中所述哺乳动物细胞是人细胞。
38. 权利要求23所述的制剂在制备用于质粒DNA的体内递送的药物中的用途。
39. 一种可植入器件,其包含夹带或包封在所述器件内的权利要求26所述的制剂,且除了所述制剂之外,所述器件还包含生物可降解和/或生物可相容的药物释放物质。
40. 根据权利要求39所述的器件,其中所述器件的尺寸和形状适于植入到受试者体内。
41. 一种可注射器件,其包含夹带或包封在所述器件内的权利要求23所述的制剂,且除了所述制剂之外,所述器件还包含生物可降解和/或生物可相容的药物释放物质。
42. 根据权利要求41所述的器件,其中所述器件的尺寸和形状适于注射到受试者体内。

聚胺衍生物

发明领域

[0001] 本发明涉及对称聚胺衍生物及包含这种化合物的制剂,更具体的说,涉及部分丙烯酰化并任选载有辅助基团的聚胺衍生物。这种化合物可用于向细胞中引入siRNA,使目标序列的表达沉默,在体内递送siRNA,以及治疗疾病和/或失调。

背景技术

[0002] 本发明的化合物、组合物和方法可用于依靠生物活性分子向细胞、组织和器官中的有效转移的治疗、研究和诊断用途。以下讨论仅提供用于理解本发明。

[0003] 各种治疗化合物诸如抗病毒剂和化学治疗剂的细胞递送通常会妥协于两项限制。首先,许多治疗剂的选择性通常很低,导致对正常组织具有高毒性。其次,很多化合物进入活细胞中的运输则受限于复杂的细胞膜系统。特定的转运子允许营养物质或调节分子的选择性进入,而排除了大多数外源分子,诸如核酸和蛋白。许多策略可用于改善化合物向细胞的输送,包括使用脂质载体、生物可降解的聚合物以及各种轭合物系统。

[0004] 大多数已被充分研究的用于改善外源核酸向细胞内的输送的方法涉及使用病毒载体或阳离子脂质以及相关的细胞转染剂。病毒载体可用于有效地将基因输送到一些细胞类型中,但它们通常不能用于向细胞中引入化学合成的分子。一种替代方法是使用加入阳离子脂质的递送制剂,所述递送制剂通过一端与核酸相互作用并通过另一端与脂质或膜系统相互作用。合成核酸以及质粒可使用细胞转染剂来递送,尽管这种化合物的效用通常受细胞类型特异性、转染期间对低血清的要求以及毒性的限制。

[0005] 递送生物活性分子的另一种方法涉及轭合物的使用。轭合物通常根据特定分子被选择性地输送到特定细胞中的能力来选择,例如经由受体介导的细胞内吞作用。通过将所关注的化合物连接到可被主动输送穿过细胞膜的分子,可实现该化合物到细胞或特定细胞器官中的有效递送。可选地,能穿透细胞膜但不具有活性输送机制的分子(诸如各种亲脂性分子)可用于递送所关注的化合物。能用作轭合物的分子的例子包括但不限于肽、激素、脂肪酸、维生素、黄酮、糖、报道分子、报道酶、螯合剂、卟啉、嵌入剂以及能够通过主动输送或被动输送穿透细胞膜的其他分子。

[0006] 向特定细胞类型(例如癌细胞或对特殊组织和器官具有特异性的细胞)递送化合物可通过利用与特定细胞类型有关的受体来进行。特殊受体在特定癌细胞中过度表达,包括高亲和力的叶酸受体。例如,高亲和力的叶酸受体是在多种瘤(neoplastic)组织(包括乳腺、卵巢、脑、结肠直肠、肾和鼻咽部肿瘤)中过度表达、但在正常组织中表达程度非常有限的肿瘤标记物。使用叶酸类轭合物输送外源化合物穿过细胞膜能为疾病治疗和诊断提供靶向递送方法,并且能提供治疗化合物所需剂量的减少。此外,治疗生物可利用度、药效学和药代动力学参数可通过使用生物轭合物(包括叶酸生物轭合物)来进行调控。生物活性的蝶酰基低聚-L-谷氨酸盐的合成已有报道。特定寡核苷酸-叶酸轭合物以及用特定轭合物基团修饰的寡核苷酸的固相合成方法已有描述。使用生物素和叶酸轭合物来增强外源分子(包括特定寡核苷酸)的跨膜输送已见报道。一些叶酸轭合物(包括带有连接到轭合物核酸部分

的亚磷酰胺的特定核酸叶酸轭合物)以及合成这些叶酸轭合物的方法已见描述。可用于合成特定类型的叶酸-核苷酸轭合物的中间体, α -[2-(三甲基甲硅烷基)乙氧羰基]叶酸的合成已有报道。

[0007] 化合物向其它细胞类型的递送可通过利用与特定类型的细胞(诸如肝细胞)相关的受体来进行。例如,利用受体介导的细胞内吞作用的药物递送系统已被用于实现药物寻靶以及药物摄取增强。脱唾液酸糖蛋白受体(ASGPr)是只有肝细胞才有的,并且其结合支化的半乳糖-终端的糖蛋白,诸如脱唾液酸血清类粘蛋白(ASOR)。这种糖蛋白或合成糖轭合物与受体的结合发生时的亲和力强烈取决于低聚糖链的支化程度,例如,三天线型结构比两天线型或单天线型链的结合具有更大的亲和力(这种高特异性的例子通过使用N-乙酰基-D-氨基半乳糖作为糖 部分,其与半乳糖相比对受体具有更高的亲和力)。这种“聚类效应(clustering effect)”也已被描述用于甘露糖基-封端的糖蛋白或糖轭合物的结合与摄取。使用半乳糖和氨基半乳糖类轭合物来输送外源化合物穿过细胞膜可提供治疗诸如HBV和HCV感染的肝疾病或肝细胞癌的靶向递送方法。使用生物轭合物也可提供治疗所需的治疗化合物的所需剂量的减少。此外,治疗生物可利用度、药效学和药代动力学参数可通过生物轭合物的使用来进行调控。

[0008] 若干研究组已开发出多种肽类细胞转运蛋白。这些肽能够在体内和体外高效地跨越细胞膜。这样的融合肽(fusogenic peptide)的例子包括ANTENNAPEDIA同源域的16-氨基酸片段,果蝇转录因子;表达带有或不带NLS域的卡波济成纤维细胞生长因子的信号序列的疏水区的17-mer片段;凯门鳄属窄吻鳄(caiman crocodylus)的Ig(5)轻链的17-mer信号肽序列;HIV包膜糖蛋白gp4114的17-氨基酸融合序列;HIV-1 Tat49-57片段;由神经肽甘丙肽(neuropeptide glanine)的N-终端片段和膜相互作用黄蜂毒液肽胡蜂蜂毒肽(mastroporan)组成的转运肽(transportan)A-无嵌合(achimeric)27-mer;以及衍生自流感病毒血凝素包膜糖蛋白的24-mer。这些肽被成功地用作反义寡去氧核糖核苷酸-肽轭合物的部分以用于不带有脂质的细胞培养转染。在许多情况中,这样的轭合物显示了比使用脂质递送转染的母本寡核苷酸更好的细胞培养功效。另外,使用噬菌体展示技术已鉴定了若干在体内器官寻靶和肿瘤寻靶肽。肿瘤寻靶肽与阿霉素的轭合已显示显著改善了毒性曲线,并显示了阿霉素在体内鼠类癌症模型MDA-MB-435乳腺癌中的功效提高。

[0009] 生物活性分子的细胞内递送的另一种方法涉及阳离子聚合物的使用(例如,已描述了使用高分子量赖氨酸聚合物来提高多种分子跨越细胞膜的输送)。已披露了用于输送药物和大分子跨越生物膜的特定方法和组合物,其中所述药物或大分子共价连接到由6到25个子单位构成的输送聚合物上,所述子单位中的至少50%包含胍或脒侧链。所述输送聚合物优选为由全部D-、全部L-或D-与L-精氨酸混合物组成的聚精氨酸肽。还描述了用于递送药物和其它药剂跨越上皮组织(包括皮肤、胃肠道、肺上皮组织和血脑屏障)的某些聚赖氨酸和聚精氨酸化合物。还已公开了用于药物的眼内递送的某些聚精氨酸化合物和某些聚赖氨酸与聚精氨酸化合物。还已公开了某些环糊精聚合物组合物,其包括交联的阳离子聚合物组分以及特定的脂质类制剂。

[0010] 生物活性分子的细胞内递送的另一种方法涉及脂质体或其它颗粒形成组合物的使用。自从在1965年首次描述了脂质体之后,已持续关注和致力于开发用于药学活性化合物的脂质类载体系统的领域。脂质体是有吸引力的药物载体,因为它们保护生物分子免于

降解同时改善其细胞摄取。最常用于递送聚阴离子(例如DNA)的脂质体制剂种类之一是含有阳离子脂质的那些。脂质聚集体可用单独使用阳离子脂质或包含其它脂质及两性分子(诸如磷脂酰乙醇胺)的大分子形成。本领域中公知脂质制剂组合物以及其制备方法对所得的阴离子大分子-阳离子脂质聚集体的结构和尺寸有影响。这些因素可进行调控以优化聚阴离子在体外和体内对特定细胞类型的递送。使用阳离子脂质进行生物活性分子的细胞内递送具有若干优点。由于静电相互作用,使用阳离子脂质来包封阴离子化合物是基本定量的。另外,据信阳离子脂质与带负电的细胞膜相互作用从而引发细胞膜输送。

[0011] 实验已显示质粒DNA能被包封在小颗粒中,所述小颗粒由包封在双层脂质小泡内的单个质粒组成。这些颗粒通常含有融合质粒二油酰磷脂酰乙醇胺(DOPE)、低水平的阳离子脂质,并且可在水性介质中通过聚(二乙醇)(PEG)包衣的存在而被稳定。这些颗粒具有系统性的用途,因为其显示了在静脉(i.v.)注射后的延长的循环寿命,可以因其在多种组织和器官或者肿瘤中增强的血管渗透能力而在这些区域中优选积累,并且可以设计为通过破坏核内体膜而逃离细胞内吞作用的溶酶体路径。这些性质可用于将生物活性分子递送至多种细胞类型以用于实验和治疗用途。例如,诸如短干扰RNA(siRNA)、反义、核酶、假目标(decoys)、三螺旋形成寡核苷酸(triplex forming oligonucleotide)、2-5A寡核苷酸以及适配体(aptamer)的核酸技术的体外和体内有效应用可受益于这些化合物跨越细胞膜的有效递送。由siRNA、某些两性化合物和某些聚阳离子的组合组成的某些组合物已被公开。用于多核苷酸的细胞内递送的某些脂质类制剂、某些脂质包封的干扰RNA制剂和某些聚阳离子组合物已见描述。短干扰核酸分子(siNA)和用于递送siNA分子及其它多核苷酸的多种技术也已有描述。

[0012] 另外,近年来涉及阳离子脂质颗粒的研究证实了两种包含核酸(或其它聚阴离子化合物)及阳离子脂质的结构上不同的复合物的形成。一种结构包括带有夹在阳离子脂质双层中间的核酸单层的多层结构(“层状结构”)。第二种结构包括二维六方柱相结构(“反向六角形结构”),其中核酸分子在六角结构形成时被阳离子脂质所环绕。发明人还证实了反向六角形结构与层状结构相比能更有效地转染哺乳动物细胞。此外,光学显微镜研究显示包含层状结构的复合物牢固地与阴离子小泡结合而不会与该小泡融合,但包含反向六角形结构的复合物是不稳定的,并且迅速地与该小泡融合,在融合时释放出核酸。

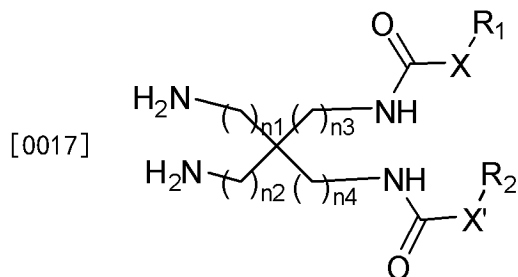
[0013] 从层状相到反向六角相复合物的结构转化可通过以下方式实现:加入合适的辅助脂质,其有助于反向六角形结构的采纳;或者使用助表面活性剂,诸如己醇。然而,这些转染条件无一适用于在生物系统中的递送。此外,尽管反向六角形复合物显示更大的转染效率,其与层状复合物相比具有非常差的血清稳定性。因此,仍然需要设计具有血清稳定性的递送药剂。

发明内容

[0014] 本发明提供了用于改进生物活性分子的系统和局部递送效率的化合物、组合物和方法。另外,本发明提供了用于制造和使用以下递送药剂的化合物、组合物和方法,所述递送药剂在循环中稳定,并且在合适的生理条件(例如,pH)下经历结构变化,其提升了生物活性分子的递送效率。

[0015] 在广泛的方面,本发明包含如下所示的式I-VI的化合物。

[0016] 因此,本发明的一个方面提供了式I的化合物:



[0018] I

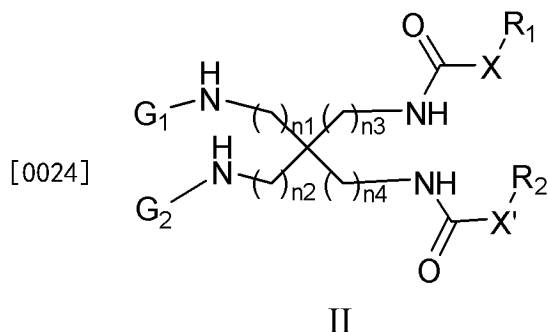
[0019] 其中

[0020] n_1 、 n_2 、 n_3 和 n_4 独立地是1、2、3或4;

[0021] X和X'独立地是化学键、氧或氮;且

[0022] R_1 和 R_2 独立地是任选含有1-4个双键或三键的 C_8 - C_{25} 烃基团。

[0023] 本发明的第二方面提供了式II的化合物:



[0025] 其中

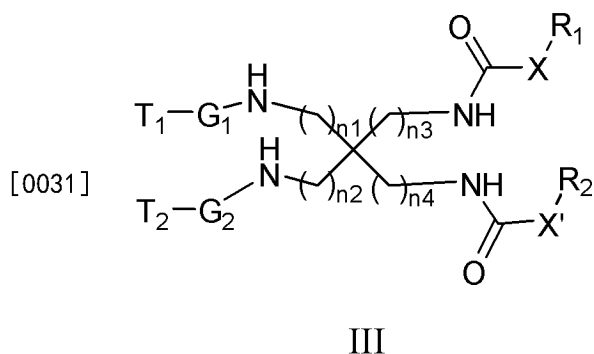
[0026] n_1 、 n_2 、 n_3 和 n_4 独立地是1、2、3或4;

[0027] X和X'独立地是化学键、氧或氮;且

[0028] R_1 和 R_2 独立地是任选含有1-4个双键或三键的 C_8 - C_{25} 烃基团;且

[0029] G_1 和 G_2 独立地是氢或聚合物部分。

[0030] 本发明的第三方面提供了式III的化合物:



[0032] 其中

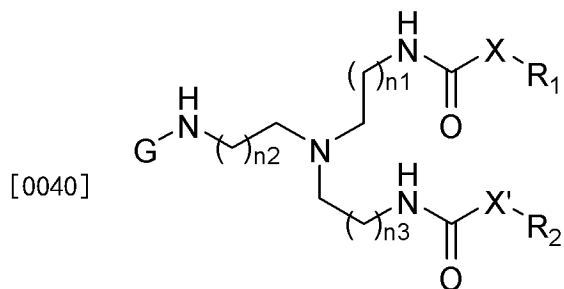
[0033] n_1 、 n_2 、 n_3 和 n_4 独立地是1、2、3或4;

[0034] X和X'独立地是化学键、氧或氮;

[0035] R_1 和 R_2 独立地是任选含有1-4个双键或三键的 C_8 - C_{25} 烃基团;且

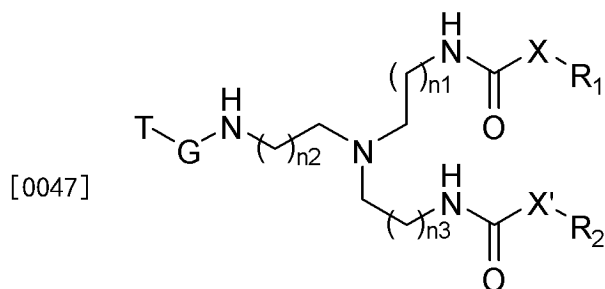
[0036] T_1 和 T_2 独立地是氢或靶向配体;

- [0037] G_1 和 G_2 独立地是化学键或聚合物部分，
 [0038] 其中 T_1 和 T_2 中的至少一个是靶向配体。
 [0039] 本发明的第四方面提供了式IV的化合物：



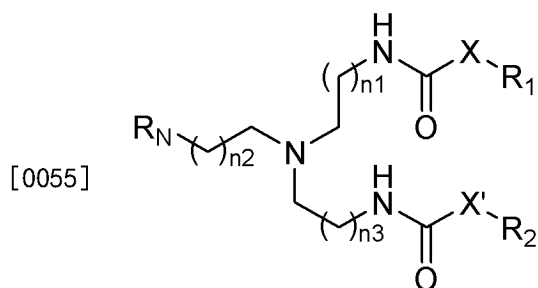
IV

- [0041] 其中
 [0042] n_1 、 n_2 和 n_3 独立地是1、2、3或4；
 [0043] X 和 X' 独立地是化学键、氧或氮；
 [0044] R_1 和 R_2 独立地是任选含有1-4个双键或三键的 C_8 - C_{25} 烃基团；且
 [0045] G 是氢或聚合物部分。
 [0046] 本发明的第五方面提供了式V的化合物：



V

- [0048] 其中
 [0049] n_1 、 n_2 和 n_3 独立地是1、2、3或4；
 [0050] X 和 X' 独立地是化学键、氧或氮；
 [0051] R_1 和 R_2 独立地是任选含有1-4个双键或三键的 C_8 - C_{25} 烃基团；且
 [0052] T 是靶向配体；且
 [0053] G 是化学键或聚合物部分。
 [0054] 在另一方面，本发明提供了式VI的化合物：



VI

[0056] 其中

[0057] n_1 、 n_2 和 n_3 独立地是1、2、3或4；

[0058] X和X'独立地是化学键、氧或氮；

[0059] R_1 和 R_2 独立地是任选含有1-4个双键或三键的 C_8 - C_{25} 烃基团；且

[0060] R_N 表示 NHR_4 、 NR_4R_5 或 $N^+R_4R_5R_6$ ；其中

[0061] R_4 、 R_5 和 R_6 独立地表示 C_1 - C_6 烷基基团。

[0062] 本发明还提供了可用于制备式I-VI的化合物的合成中间体。

[0063] 本发明的一个方面提供了包含式I-VI中任一个的化合物的制剂。本发明的制剂含有由式I-VI的化合物形成的脂质复合物(lipoplexes)或脂质体。

[0064] 本发明的一个方面提供了包含式I-VI中任一个的化合物及另一种分子的制剂，所述另一种分子可以是生物活性分子。所述生物活性分子可以选自：(a)核蛋白体RNA；RNA或DNA的反义多核苷酸；核酶；siRNA；shRNA；miRNA；以及编码治疗有效蛋白的遗传DNA、cDNA或mRNA的多核苷酸；或(b)蛋白质、肽、胆固醇、激素、诸如抗病毒剂或化疗剂的小分子、维生素和辅因子。

[0065] 在相关方面，本发明提供了包含式I-VI中任一个的化合物及适配体。在这些制剂中，所述适配体不与所述化合物共价结合。因此，当所述化合物包含靶向配体T时，得到的制剂可包含共价结合的靶向配体和非共价结合的适配体。在这些制剂中，所述适配体和靶向配体可以相同或不同。

[0066] 本发明的另一方面提供了包含由式I-VI中任一个的化合物及另一种分子形成的颗粒的制剂，所述另一种分子可以是生物活性分子。在此方面，本发明提供了可用于包封例如一种或多种siRNA分子的稳定颗粒。

[0067] 本发明的一个方面提供了一种向细胞中引入siRNA的方法，包括将所述细胞与本发明的制剂接触。

[0068] 本发明的一个方面提供了一种对目标序列的表达进行调控的方法，所述方法包括对哺乳动物受试者施用治疗有效量的本发明的制剂。

[0069] 本发明的另一方面提供了一种用于siRNA的体内递送的方法，所述方法包括对哺乳动物受试者施用治疗有效量的本发明的制剂。

[0070] 本发明的另一方面提供了一种用于质粒DNA的体内递送的方法，所述方法包括对哺乳动物受试者施用治疗有效量的本发明的制剂。

[0071] 在本发明的又另一方面，提供了一种治疗或预防哺乳动物受试者的疾病的方法，所述方法包括对所述受试者施用治疗有效量的本发明的制剂。

[0072] 已惊奇地发现使用本发明化合物(例如，二油酰基单胺)制备的制剂和递送系统对于转染特异性敲弱(knockdown)都是有效的，并且都是相对无毒的。

[0073] 还已惊奇地发现使用本发明的制剂和递送系统导致药物在肺组织中的优先摄取，并且还导致在肺中相对于其它组织(诸如肝)中的优先的转录敲弱。

附图说明

[0074] 图1是显示在使用鼠鳞状细胞癌VII(SCCVII)细胞进行体外转染之后VEGF在细胞培养基中的蛋白表达水平的图表。以用二油酰基单胺配制的siRNA来转染细胞。

[0075] 图2是显示在使用鼠鳞状细胞癌VII(SCCVII)细胞进行体外转染之后VEGF在细胞培养基中的蛋白表达水平的图表。以用二油酰基单胺或甲基-二油酰基单胺配制的siRNA来转染细胞。

[0076] 图3是显示在单次静脉注射用二油酰基单胺配制的siRNA之后在小鼠的肺和肝中的siRNA特异性转录敲弱(窖蛋白-1)的图表。

[0077] 图4A和图4B是显示在瘤内注射用二油酰基单胺配制的VEGF siRNA之后SCCVII肿瘤中mVEGF转录水平的图表(图4A)和在瘤内施用经配制的VEGF siRNA之后小鼠中的肿瘤生长抑制的图表(图4B)。

[0078] 图5A和图5B是显示在使用鼠鳞状细胞癌VII(SCCVII)细胞进行体外转染之后窖蛋白-1(Cav-1)在细胞培养基中的相对转录水平的图表。以siRNA与二油酰基单胺/mPEG-二油酰基单胺复合物(图5A)或以用二油酰基单胺/mPEG-二油酰基单胺包封的siRNA(图5B)来转染细胞。

[0079] 图6显示了在单次静脉注射与二油酰基单胺和mPEG-二油酰基单胺复配的siRNA之后在小鼠的肺中与剂量相关的(10 μ g-100 μ g)的siRNA特异性转录敲弱(Cav-1)。

[0080] 图7显示了在使用HepG2细胞进行体外转染之后 β -肌动蛋白在细胞培养基中的蛋白表达水平。以用二油酰基单胺/乳糖酰基-二油酰基单胺配制的siRNA来转染细胞。

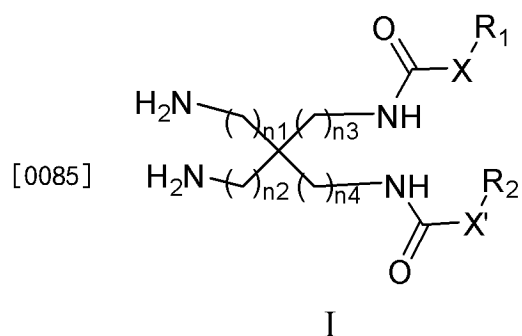
[0081] 图8显示了与二油酰基单胺复配的Cav-1 siRNA从含有或不含EDTA的藻酸盐凝胶中的受控释放。

[0082] 图9显示了在单次静脉注射与二油酰基单胺和mPEG-二油酰基单胺或与DOTAP:DOPE(1:1)或与BPEI复配的siRNA之后在小鼠的肺和肝中的siRNA特异性转录敲弱(Cav-1)。

[0083] 图10显示了用二油酰基交叉胺/前列腺特异性膜抗原(PSMA)靶向适配体包封的siRNA的转染活性。

具体实施方式

[0084] 本发明的一个方面提供了式I的化合物:



[0086] 及其可药用盐,其中

[0087] n1、n2、n3和n4独立地是1、2、3或4;

[0088] X和X'独立地是化学键、氧或氮;和

[0089] R1和R2独立地是任选含有1-4个双键或三键的C₈-C₂₅烃基团。

[0090] 在一个实施方式中,本发明提供了式I的化合物,其中n1、n2、n3和n4都是1,且X和X'都是化学键。

[0091] 在一个实施方式中,本发明提供了式I的化合物,其中R1和R2中的至少一个是含有

1-4个双键的C₈-C₂₅烃基团。

[0092] 在另一个实施方式中,本发明提供了式I的化合物,其中R₁和R₂都是含有1-4个双键的C₈-C₂₅烃基团。

[0093] 在又一个实施方式中,本发明提供了式I的化合物,其中R₁和R₂独立地是含有1或2个双键的C₈-C₂₅烃基团。

[0094] 在一个实施方式中,本发明提供了式I的化合物,其中R₁和R₂独立地是含有1个双键的C₈-C₂₅烃基团。

[0095] 在一个实施方式中,本发明提供了式I的化合物,其中R₁和R₂独立地是含有1或2个双键的C₁₄-C₂₀烃基团。

[0096] 在又一个实施方式中,本发明提供了式I的化合物,其中R₁和R₂独立地是含有1个双键的C₁₄-C₂₀烃基团。

[0097] 在一个实施方式中,本发明提供了式I的化合物,其中-C(O)X-R₁和-C(O)X'-R₂均表示油酰基。

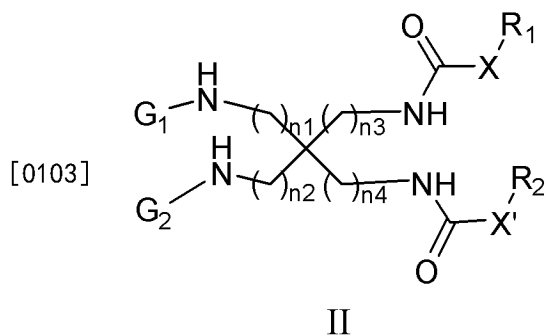
[0098] 在另一个实施方式中,本发明提供了式I的化合物,其中n₁、n₂、n₃和n₄是相同的,并且是1或2;X和X'是化学键;并且R₁和R₂中的至少一个是含有1-4个双键的C₈-C₂₅烃基团。

[0099] 在仍然另一个实施方式中,本发明提供了式I的化合物,其中n₁、n₂、n₃和n₄是相同的,并且是1或2;X和X'是化学键;并且R₁和R₂是相同的,并且表示含有1-4个双键的C₈-C₂₅烃基团。

[0100] 在又一个实施方式中,本发明提供了式I的化合物,其中n₁、n₂、n₃和n₄是相同的,并且是1或2;X和X'是化学键;并且R₁和R₂是相同的,并且表示含有1-2个、优选1个双键的C₈-C₂₅烃基团。

[0101] 在又一个实施方式中,本发明提供了式I的化合物,其中n₁、n₂、n₃和n₄是1;X和X'是化学键;并且R₁和R₂是相同的,并且表示含有1-2个、优选1个双键的C₁₄-C₂₀烃基团。

[0102] 本发明的另一方面提供了式II的化合物:



[0104] 其中

[0105] n₁、n₂、n₃和n₄独立地是1、2、3或4;

[0106] X和X'独立地是化学键、氧或氮;和

[0107] R₁和R₂独立地是任选含有1-4个双键或三键的C₈-C₂₅烃基团;且

[0108] G₁和G₂独立地是氢或聚合物部分。

[0109] 在一个实施方式中,本发明提供了式II的化合物,其中n₁、n₂、n₃和n₄都是1,且X和X'都是化学键。

[0110] 在一个实施方式中,本发明提供了式II的化合物,其中R₁和R₂中的至少一个是含有

1-4个双键的C₈-C₂₅烃基团。

[0111] 在另一个实施方式中,本发明提供了式II的化合物,其中R₁和R₂都是含有1-4个双键的C₈-C₂₅烃基团。

[0112] 在又一个实施方式中,本发明提供了式II的化合物,其中R₁和R₂独立地是含有1或2个双键的C₈-C₂₅烃基团。

[0113] 在又一个实施方式中,本发明提供了式II的化合物,其中R₁和R₂独立地是含有1个双键的C₈-C₂₅烃基团。

[0114] 在一个实施方式中,本发明提供了式II的化合物,其中R₁和R₂独立地是含有1或2个双键的C₁₄-C₂₀烃基团。

[0115] 在又一个实施方式中,本发明提供了式II的化合物,其中R₁和R₂独立地是含有1个双键的C₁₄-C₂₀烃基团。

[0116] 在一个实施方式中,本发明提供了式II的化合物,其中-C(O)X-R₁和-C(O)X'-R₂均表示油酰基。

[0117] 在一个实施方式中,本发明提供了式II的化合物,其中G₁和G₂中的一个为聚合物部分,且另一个为氢。

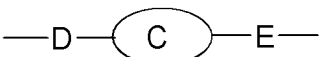
[0118] 在一个实施方式中,本发明提供了式II的化合物,其中G₁和G₂之一是聚氧化烯、聚乙烯吡咯烷酮、聚丙烯酰胺、聚二甲基丙烯酰胺、聚乙烯醇、葡聚糖、聚(L-谷氨酸)、苯乙烯马来酸酐、聚-N-(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺或聚二乙烯醚马来酸酐。

[0119] 在另一个实施方式中,本发明提供了式II的化合物,其中所述聚合物包括在聚合物单元之间的至少一个连接基团(linker group)。

[0120] 在又一个实施方式中,本发明提供了式II的化合物,其中所述聚合物部分是聚氧化烯。

[0121] 在又一个实施方式中,本发明提供了式II的化合物,其中所述聚合物的分子量为约200-10,000Da。优选的聚合物的分子量在约1,000-5,000Da的范围内。

[0122] 在一个实施方式中,本发明提供了式II的化合物,其中所述聚合物部分包括至少一个选自下组的连接体:-C(O)-、-O-、-O-C(O)O-、-C(O)CH₂CH₂C(O)-、-S-S-、-NR³-、-NR³C(O)O-、-OC(O)NR³-、-NR³C(O)-、-C(O)NR³-、-NR³C(O)NR³-、-亚烷基-NR³C(O)O-、-亚烷基-NR³C(O)NR³-、-亚烷基-OC(O)NR³-、-亚烷基-NR³-、-亚烷基-O-、-亚烷基-NR³C(O)-、-亚烷基-C(O)NR³-、-NR³C(O)O-亚烷基-、-NR³C(O)NR³-亚烷基-、-OC(O)NR³-亚烷基-、-NR³-亚烷基-、-O-亚烷基-、-NR³C(O)-亚烷基-、-C(O)NR³-亚烷基-、-亚烷基-NR³C(O)O-亚烷基-、-亚烷基-NR³C(O)NR³-亚烷基-、-亚烷基-OC(O)NR³-亚烷基-、-亚烷基-NR³-亚烷基-、-亚烷基-O-亚烷基-、-亚烷基-NR³C(O)-亚烷基-、-C(O)NR³-亚烷基-、-NR³C(O)O-亚烷基氧基-、-NR³C(O)NR³-亚烷基氧基-、-OC(O)NR³-亚烷基氧基-、-NR³-亚烷基氧基-、-O-亚烷基氧基-、-NR³C(O)-亚烷基氧基-、-C(O)NR³-亚烷基氧基-和-亚烷基氧基-NR³C(O)O-亚烷基氧基-,其中R³是氢或任选取代的烷基,以及

[0123] 

[0124] 其中

[0125] 选自芳基、取代芳基、环烷基、取代环烷基、杂芳基、取代杂芳基、杂环基和取代杂环基,且D和E独立地选自化学键、-O-、CO-、-NR³-、-NR³C(O)O-、-OC(O)NR³-、-NR³C

(O)-、-C(O)NR³-、-NR³C(O)NR³-、-亚烷基-NR³C(O)O-、-亚烷基-NR³C(O)NR³-、-亚烷基-OC(O)NR³-、-亚烷基-NR³-、-亚烷基-O-、-亚烷基-NR³C(O)-、-亚烷基-C(O)NR³-、-NR³C(O)O-亚烷基-、-NR³C(O)NR³-亚烷基-、-OC(O)NR³-亚烷基-、-NR³-亚烷基-、-O-亚烷基-、-NR³C(O)-亚烷基-、-NR³C(O)O-亚烷氧基-、-NR³C(O)NR³-亚烷氧基-、-OC(O)NR³-亚烷氧基-、-NR³-亚烷氧基-、-O-亚烷氧基-、-NR³C(O)-亚烷氧基-、-C(O)NR³-亚烷氧基-、-亚烷氧基-NR³C(O)O-亚烷氧基-、-C(O)NR³-亚烷基-、-亚烷基-NR³C(O)O-亚烷基-、-亚烷基-NR³C(O)NR³-亚烷基-、-亚烷基-OC(O)NR³-亚烷基-、-亚烷基-NR³-亚烷基-、-亚烷基-O-亚烷基-、-亚烷基-NR³C(O)-亚烷基-和-C(O)NR³-亚烷基-，其中R³如上所定义。

[0126] 在一个实施方式中，本发明提供了式II的化合物，其中所述聚合物是聚氧乙烯，其中所述氧化烯基团独立地是在其重复单元中具有2-5个碳原子的直链或支链的聚氧化烯基团。

[0127] 在一个实施方式中，本发明提供了式II的化合物，其中所述聚氧化烯是聚氧乙烯、直链或支链的聚氧丙烯或者直链或支链的聚氧丁烯。

[0128] 在一个实施方式中，本发明提供了式II的化合物，其中所述聚氧化烯是聚氧乙烯。

[0129] 在另一个实施方式中，本发明提供了式II的化合物，其中n₁、n₂、n₃和n₄都是相同的，并且是1或2；X和X'都是化学键；并且R₁和R₂中的至少一个是含有1-4个双键的C₈-C₂₅烃基团。

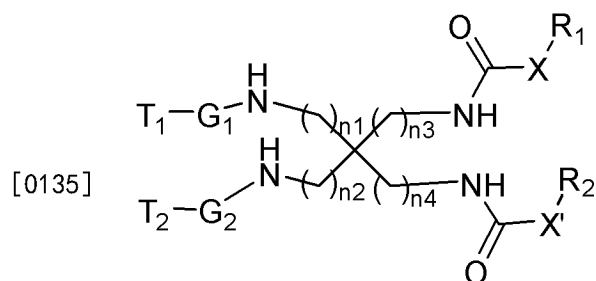
[0130] 在另一个实施方式中，本发明提供了式II的化合物，其中n₁、n₂、n₃和n₄都是相同的，并且是1或2；X和X'都是化学键；且R₁和R₂是相同的，并且表示含有1-4个双键的C₈-C₂₅烃基团。

[0131] 在另一个实施方式中，本发明提供了式II的化合物，其中n₁、n₂、n₃和n₄都是相同的，并且是1；X和X'都是化学键；且R₁和R₂是相同的，并且表示含有1-4个双键的C₈-C₂₅烃基团。

[0132] 在仍然另一个实施方式中，本发明提供了式II的化合物，其中n₁、n₂、n₃和n₄都是相同的，并且是1；X和X'都是化学键；且R₁和R₂是相同的，并且表示含有1-4个双键的C₁₄-C₂₀烃基团。

[0133] 在又一个实施方式中，本发明提供了式II的化合物，其中n₁、n₂、n₃和n₄都是相同的，并且是1；X和X'都是化学键；且R₁和R₂是相同的，并且表示含有1或2个双键的C₁₄-C₂₀烃基团。

[0134] 本发明的另一方面提供了式III的化合物：

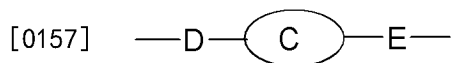


III

[0136] 其中

- [0137] n_1 、 n_2 、 n_3 和 n_4 独立地是1、2、3或4；
- [0138] X和X'独立地是化学键、氧或氮；
- [0139] R_1 和 R_2 独立地是任选含有1-4个双键或三键的 C_8 - C_{25} 烃基团；且
- [0140] T_1 和 T_2 独立地是氢或靶向配体；
- [0141] G_1 和 G_2 独立地是化学键或聚合物部分，
- [0142] 其中 T_1 和 T_2 中的至少一个是靶向配体。
- [0143] 在一个实施方式中，本发明提供了式III的化合物，其中 n_1 、 n_2 、 n_3 和 n_4 都是1，且X和X'都是化学键。
- [0144] 在一个实施方式中，本发明提供了式III的化合物，其中 R_1 和 R_2 中的至少一个是含有1-4个双键的 C_8 - C_{25} 烃基团。
- [0145] 在一个实施方式中，本发明提供了式III的化合物，其中 R_1 和 R_2 都是含有1-4个双键的 C_8 - C_{25} 烃基团。
- [0146] 在另一个实施方式中，本发明提供了式III的化合物，其中 R_1 和 R_2 独立地是含有1或2个双键的 C_8 - C_{25} 烃基团。
- [0147] 在又一个实施方式中，本发明提供了式III的化合物，其中 R_1 和 R_2 独立地是含有1个双键的 C_8 - C_{25} 烃基团。
- [0148] 在又一个实施方式中，本发明提供了式III的化合物，其中 R_1 和 R_2 独立地是含有1或2个双键的 C_{14} - C_{20} 烃基团。
- [0149] 在一个实施方式中，本发明提供了式III的化合物，其中 R_1 和 R_2 独立地是含有1个双键的 C_{14} - C_{20} 烃基团。
- [0150] 在一个实施方式中，本发明提供了式III的化合物，其中 $-C(O)X-R_1$ 和 $-C(O)X'-R_2$ 都表示油酰基团。
- [0151] 在一个实施方式中，本发明提供了式III的化合物，其中 G_1 和 G_2 中的一个为聚合物部分，且另一个为氢。
- [0152] 在又一个实施方式中，本发明提供了式III的化合物，其中 G_1 和 G_2 之一是聚氧化烯、聚乙烯吡咯烷酮、聚丙烯酰胺、聚二甲基丙烯酰胺、聚乙烯醇、葡聚糖、聚(L-谷氨酸)、苯乙炔马来酸酐、聚-N-(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺或聚二乙炔马来酸酐。
- [0153] 在另一个实施方式中，本发明提供了式III的化合物，其中所述聚合物包括在聚合物单元之间的至少一个连接基团。
- [0154] 在又一个实施方式中，本发明提供了式III的化合物，其中所述聚合物部分是聚氧化烯。
- [0155] 在一个实施方式中，本发明提供了式III的化合物，其中所述聚合物的分子量为约200-10,000Da。优选的聚合物的分子量在约1,000-5,000Da的范围内。
- [0156] 在一个实施方式中，本发明提供了式III的化合物，其中所述聚合物部分包括至少一个选自下组的连接体： $-C(O)-$ 、 $-O-$ 、 $-O-C(O)O-$ 、 $-C(O)CH_2CH_2C(O)-$ 、 $-S-S-$ 、 $-NR^3-$ 、 $-NR^3C(O)O-$ 、 $-OC(O)NR^3-$ 、 $-NR^3C(O)-$ 、 $-C(O)NR^3-$ 、 $-NR^3C(O)NR^3-$ 、 $-$ 亚烷基- $NR^3C(O)O-$ 、 $-$ 亚烷基- $NR^3C(O)NR^3-$ 、 $-$ 亚烷基- $OC(O)NR^3-$ 、 $-$ 亚烷基- NR^3- 、 $-$ 亚烷基- $O-$ 、 $-$ 亚烷基- $NR^3C(O)-$ 、 $-$ 亚烷基- $C(O)NR^3-$ 、 $-NR^3C(O)O-$ 亚烷基-、 $-NR^3C(O)NR^3-$ 亚烷基-、 $-OC(O)NR^3-$ 亚烷基-、 $-NR^3-$ 亚烷基-、 $-O-$ 亚烷基-、 $-NR^3C(O)-$ 亚烷基-、 $-C(O)NR^3-$ 亚烷基-、 $-$ 亚烷基- $NR^3C(O)O-$ 亚烷基-、 $-$ 亚烷基-

NR³C(O)NR³-亚烷基-、-亚烷基-OC(O)NR³-亚烷基-、-亚烷基-NR³-亚烷基-、-亚烷基-O-亚烷基-、-亚烷基-NR³C(O)-亚烷基-、-C(O)NR³-亚烷基-、-NR³C(O)O-亚烷氧基-、-NR³C(O)NR³-亚烷氧基-、-OC(O)NR³-亚烷氧基-、-NR³-亚烷氧基-、-O-亚烷氧基-、-NR³C(O)-亚烷氧基-、-C(O)NR³-亚烷氧基-和-亚烷氧基-NR³C(O)O-亚烷氧基-，其中R³如上所定义，以及



[0158] 其中

[0159] $\textcircled{\text{C}}$ 选自芳基、取代芳基、环烷基、取代环烷基、杂芳基、取代杂芳基、杂环基和取代杂环基，且D和E独立地选自化学键、-O-、CO、-NR³-、-NR³C(O)O-、-OC(O)NR³-、-NR³C(O)-、-C(O)NR³-、-NR³C(O)NR³-、-亚烷基-NR³C(O)O-、-亚烷基-NR³C(O)NR³-、-亚烷基-OC(O)NR³-、-亚烷基-NR³-、-亚烷基-O-、-亚烷基-NR³C(O)-、亚烷基-C(O)NR³-、-NR³C(O)O-亚烷基-、-NR³C(O)NR³-亚烷基-、-OC(O)NR³-亚烷基-、-NR³-亚烷基-、-O-亚烷基-、-NR³C(O)-亚烷基-、-NR³C(O)O-亚烷氧基-、-NR³C(O)NR³-亚烷氧基-、-OC(O)NR³-亚烷氧基-、-NR³-亚烷氧基-、-O-亚烷氧基-、-NR³C(O)-亚烷氧基-、-C(O)NR³-亚烷氧基-、-亚烷氧基-NR³C(O)O-亚烷氧基-、-C(O)NR³-亚烷基-、-亚烷基-NR³C(O)O-亚烷基-、-亚烷基-NR³C(O)NR³-亚烷基-、-亚烷基-OC(O)NR³-亚烷基-、-亚烷基-NR³-亚烷基-、亚烷基-O-亚烷基-、-亚烷基-NR³C(O)-亚烷基-和-C(O)NR³-亚烷基-，其中R³如上所定义。

[0160] 在一个实施方式中，本发明提供了式III的化合物，其中所述聚合物是聚氧乙烯，其中所述氧化烯基团独立地是在其重复单元中具有2-5个碳原子的直链或支链的聚氧化烯基团。

[0161] 在另一个实施方式中，本发明提供了式III的化合物，其中所述聚氧化烯是聚氧乙烯、直链或支链的聚氧丙烯或者直链或支链的聚氧丁烯。

[0162] 在一个实施方式中，本发明提供了式III的化合物，其中所述聚氧化烯是聚氧乙烯，且所述靶向配体是药理学活性小分子、溶内体剂(endosomolytic agent)、融合肽、细胞膜渗透剂、电荷掩蔽剂、核酸或细胞受体配体。

[0163] 在一个实施方式中，本发明提供了式III的化合物，其中所述靶向配体是具有抗增殖活性的药理学活性小分子。

[0164] 在一个实施方式中，本发明提供了式III的化合物，其中所述聚氧化烯是聚氧乙烯，且所述靶向配体是抗增殖活性的药理学活性小分子。

[0165] 在一个实施方式中，本发明提供了式III的化合物，其中所述靶向配体是叶酸基团。

[0166] 在一个实施方式中，本发明提供了式III的化合物，其中所述聚氧化烯是聚氧乙烯，且所述靶向配体是叶酸基团。

[0167] 在一个实施方式中，本发明提供了式III的化合物，其中所述靶向配体是融合肽。

[0168] 在一个实施方式中，本发明提供了式III的化合物，其中所述聚氧化烯是聚氧乙烯，且所述靶向配体是融合肽。

[0169] 在一个实施方式中，本发明提供了式III的化合物，其中所述靶向配体选自生物素、半乳糖、乙酰水杨酸、茶普生和细胞受体配体。

[0170] 在一个实施方式中，本发明提供了式III的化合物，其中所述聚氧化烯是聚氧乙烯

和所述靶向配体选自生物素、半乳糖、乙酰水杨酸、萘普生和细胞受体配体。

[0171] 在另一个实施方式中,本发明提供了式III的化合物,其中 n_1 、 n_2 、 n_3 和 n_4 是相同的,并且是1或2;X和X'都是化学键;且 R_1 和 R_2 中的至少一个是含有1-4个双键的 C_8 - C_{25} 烃基团。

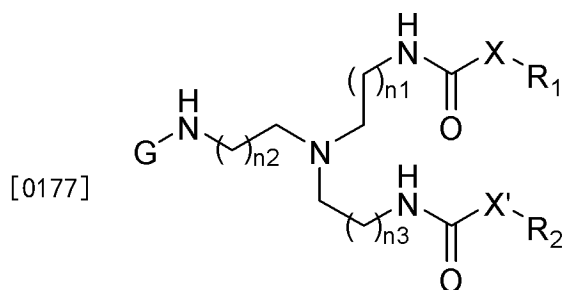
[0172] 在另一个实施方式中,本发明提供了式III的化合物,其中 n_1 、 n_2 、 n_3 和 n_4 是相同的,并且是1或2;X和X'都是化学键;且 R_1 和 R_2 是相同的,并且表示含有1-4个双键的 C_8 - C_{25} 烃基团。

[0173] 在另一个实施方式中,本发明提供了式III的化合物,其中 n_1 、 n_2 、 n_3 和 n_4 是1;X和X'都是化学键;且 R_1 和 R_2 是相同的,并且表示含有1-4个双键的 C_8 - C_{25} 烃基团。

[0174] 在另一个实施方式中,本发明提供了式III的化合物,其中 n_1 、 n_2 、 n_3 和 n_4 是1;X和X'都是化学键;且 R_1 和 R_2 是相同的,并且表示含有1-2个双键的 C_8 - C_{25} 烃基团。

[0175] 在另一个实施方式中,本发明提供了式III的化合物,其中 n_1 、 n_2 、 n_3 和 n_4 是1;X和X'都是化学键;且 R_1 和 R_2 是相同的,并且表示含有1个双键的 C_{14} - C_{20} 烃基团。

[0176] 本发明的一个方面提供了式IV的化合物:



IV

[0178] 及其可药用盐,其中

[0179] n_1 、 n_2 和 n_3 独立地是1、2、3或4;

[0180] X和X'独立地是化学键、氧或氮;

[0181] R_1 和 R_2 独立地是任选含有1-4个双键或三键的 C_8 - C_{25} 烃基团;且

[0182] G是氢或聚合物部分。

[0183] 在一个实施方式中,本发明提供了式IV的化合物,其中 n_1 、 n_2 和 n_3 都是1,且X和X'都是化学键。

[0184] 在一个实施方式中,本发明提供了式IV的化合物,其中 R_1 和 R_2 中的至少一个是含有1-4个双键的 C_8 - C_{25} 烃基团。

[0185] 在另一个实施方式中,本发明提供了式IV的化合物,其中 R_1 和 R_2 都是含有1-4个双键的 C_8 - C_{25} 烃基团。

[0186] 在又一个实施方式中,本发明提供了式IV的化合物,其中 R_1 和 R_2 独立地是含有1或2个双键的 C_8 - C_{25} 烃基团。

[0187] 在另一个实施方式中,本发明提供了式IV的化合物,其中 R_1 和 R_2 独立地是含有1个双键的 C_8 - C_{25} 烃基团。

[0188] 在一个实施方式中,本发明提供了式IV的化合物,其中 R_1 和 R_2 独立地是含有1或2个双键的 C_{14} - C_{20} 烃基团。

[0189] 在另一个实施方式中,本发明提供了式IV的化合物,其中R₁和R₂独立地是含有1个双键的C₁₄-C₂₀烃基团。

[0190] 在一个实施方式中,本发明提供了式IV的化合物,其中-C(O)X-R₁和-C(O)X'-R₂都表示油酰基团。

[0191] 在一个实施方式中,本发明提供了式IV的化合物,其中X是氧。

[0192] 在一个实施方式中,本发明提供了式IV的化合物,其中X是氮。

[0193] 在一个实施方式中,本发明提供了式IV的化合物,其中G是聚氧化烯、聚乙烯吡咯烷酮、聚丙烯酰胺、聚二甲基丙烯酰胺、聚乙烯醇、葡聚糖、聚(L-谷氨酸)、苯乙烯马来酸酐、聚-N-(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺或聚二乙烯醚马来酸酐。

[0194] 在另一个实施方式中,本发明提供了式IV的化合物,其中所述聚合物包括在聚合物单元之间的至少一个连接基团。

[0195] 在又一个实施方式中,本发明提供了式IV的化合物,其中所述聚合物部分是聚氧化烯。

[0196] 在又一个实施方式中,本发明提供了式IV的化合物,其中所述聚合物的分子量为约200-10,000Da。优选的聚合物的分子量在约1,000-5,000Da的范围内。

[0197] 在一个实施方式中,本发明提供了式IV的化合物,其中所述聚合物部分包括至少一个选自下组的连接体:-C(O)-、-O-、-O-C(O)O-、-C(O)CH₂CH₂C(O)-、-S-S-、-NR³-、-NR³C(O)O-、-OC(O)NR³-、-NR³C(O)-、-C(O)NR³-、-NR³C(O)NR³-、-亚烷基-NR³C(O)O-、-亚烷基-NR³C(O)NR³-、-亚烷基-OC(O)NR³-、-亚烷基-NR³-、-亚烷基-O-、-亚烷基-NR³C(O)-、-亚烷基-C(O)NR³-、-NR³C(O)O-亚烷基-、-NR³C(O)NR³-亚烷基-、-OC(O)NR³-亚烷基-、-NR³-亚烷基-、-O-亚烷基-、-NR³C(O)-亚烷基-、-C(O)NR³-亚烷基-、-亚烷基-NR³C(O)O-亚烷基-、-亚烷基-NR³C(O)NR³-亚烷基-、-亚烷基-OC(O)NR³-亚烷基-、-亚烷基-NR³-亚烷基-、-亚烷基-O-亚烷基-、-亚烷基-NR³C(O)-亚烷基-、-C(O)NR³-亚烷基-、-NR³C(O)O-亚烷基氧基-、-NR³C(O)NR³-亚烷基氧基-、-OC(O)NR³-亚烷基氧基-、-NR³-亚烷基氧基-、-O-亚烷基氧基-、-NR³C(O)-亚烷基氧基-、-C(O)NR³-亚烷基氧基-和-亚烷基氧基-NR³C(O)O-亚烷基氧基-,其中R³如上所定义,以及

[0198] $\text{---D---}\textcircled{\text{C}}\text{---E---}$

[0199] 其中

[0200] $\textcircled{\text{C}}$ 选自芳基、取代芳基、环烷基、取代环烷基、杂芳基、取代杂芳基、杂环基和取代杂环基,且D和E独立地选自化学键、-O-、CO-、-NR³-、-NR³C(O)O-、-OC(O)NR³-、-NR³C(O)-、-C(O)NR³-、-NR³C(O)NR³-、-亚烷基-NR³C(O)O-、-亚烷基-NR³C(O)NR³-、-亚烷基-OC(O)NR³-、-亚烷基-NR³-、-亚烷基-O-、-亚烷基-NR³C(O)-、亚烷基-C(O)NR³-、-NR³C(O)O-亚烷基-、-NR³C(O)NR³-亚烷基-、-OC(O)NR³-亚烷基-、-NR³-亚烷基-、-O-亚烷基-、-NR³C(O)-亚烷基-、-NR³C(O)O-亚烷基氧基-、-NR³C(O)NR³-亚烷基氧基-、-OC(O)NR³-亚烷基氧基-、-NR³-亚烷基氧基-、-O-亚烷基氧基-、-NR³C(O)-亚烷基氧基-、-C(O)NR³-亚烷基氧基-、-亚烷基氧基-NR³C(O)O-亚烷基氧基-、-C(O)NR³-亚烷基-、-亚烷基-NR³C(O)O-亚烷基-、-亚烷基-NR³C(O)NR³-亚烷基-、-亚烷基-OC(O)NR³-亚烷基-、-亚烷基-NR³-亚烷基-、亚烷基-O-亚烷基-、-亚烷基-NR³C(O)-亚烷基-和-C(O)NR³-亚烷基-,其中R³如上所定义。

[0201] 在一个实施方式中,本发明提供了式IV的化合物,其中所述聚合物是聚氧乙烯,其

中所述氧化烯基团独立地是在其重复单元中具有2-5个碳原子的直链或支链的聚氧化烯基团。

[0202] 在另一个实施方式中,本发明提供了式IV的化合物,其中所述聚氧化烯是聚氧乙烯、直链或支链的聚氧丙烯或者直链或支链的聚氧丁烯。

[0203] 在又一个实施方式中,本发明提供了式IV的化合物,其中所述聚氧化烯是聚氧乙烯。

[0204] 在另一个实施方式中,本发明提供了式IV的化合物,其中 n_1 、 n_2 和 n_3 是相同的,并且是1或2; X 和 X' 是化学键;并且 R_1 和 R_2 中的至少一个是含有1-4个双键的 C_8 - C_{25} 烃基团。

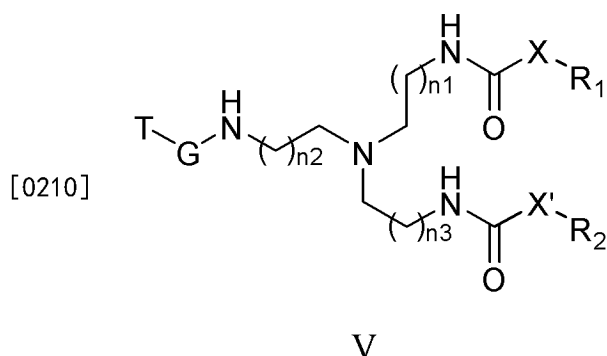
[0205] 在另一个实施方式中,本发明提供了式IV的化合物,其中 n_1 、 n_2 和 n_3 是相同的,并且是1或2; X 和 X' 是化学键;并且 R_1 和 R_2 都是含有1-4个双键的 C_8 - C_{25} 烃基团。

[0206] 在另一个实施方式中,本发明提供了式IV的化合物,其中 n_1 、 n_2 和 n_3 是相同的,并且是1或2; X 和 X' 是化学键;并且 R_1 和 R_2 是相同的,并且表示含有1-4个双键的 C_8 - C_{25} 烃基团。

[0207] 在又一个实施方式中,本发明提供了式IV的化合物,其中 n_1 、 n_2 和 n_3 是相同的,并且是1或2; X 和 X' 是化学键;并且 R_1 和 R_2 是相同的,并且表示含有1-2个双键的 C_8 - C_{25} 烃基团。

[0208] 在又一个实施方式中,本发明提供了式IV的化合物,其中 n_1 、 n_2 和 n_3 是1; X 和 X' 是化学键;并且 R_1 和 R_2 是相同的,并且表示含有1个双键的 C_{14} - C_{20} 烃基团。

[0209] 本发明的另一方面提供了式V的化合物:



[0211] 其中

[0212] n_1 、 n_2 和 n_3 独立地是1、2、3或4;

[0213] X 和 X' 独立地是化学键、氧或氮;

[0214] R_1 和 R_2 独立地是任选含有1-4个双键或三键的 C_8 - C_{25} 烃基团;且

[0215] T 是靶向配体;且

[0216] G 是化学键或聚合物部分。

[0217] 在一个实施方式中,本发明提供了式V的化合物,其中 n_1 、 n_2 和 n_3 都是1,且 X 和 X' 都是化学键。

[0218] 在一个实施方式中,本发明提供了式V的化合物,其中 R_1 和 R_2 中的至少一个是含有1-4个双键的 C_8 - C_{25} 烃基团。

[0219] 在另一个实施方式中,本发明提供了式V的化合物,其中 R_1 和 R_2 都是含有1-4个双键的 C_8 - C_{25} 烃基团。

[0220] 在又一个实施方式中,本发明提供了式V的化合物,其中 R_1 和 R_2 独立地是含有1或2个双键的 C_8 - C_{25} 烃基团。

[0221] 在又一个实施方式中,本发明提供了式V的化合物,其中R₁和R₂独立地是含有1个双键的C₈-C₂₅烃基团。

[0222] 在一个实施方式中,本发明提供了式V的化合物,其中R₁和R₂独立地是含有1或2个双键的C₁₄-C₂₀烃基团。

[0223] 在又一个实施方式中,本发明提供了式V的化合物,其中R₁和R₂独立地是含有1个双键的C₁₄-C₂₀烃基团。

[0224] 在一个实施方式中,本发明提供了式V的化合物,其中-C(O)X-R₁和-C(O)X'-R₂都表示油酰基团。

[0225] 在另一个实施方式中,本发明提供了式V的化合物,其中G是聚合物部分。

[0226] 在又一个实施方式中,本发明提供了式V的化合物,其中G是聚氧化烯、聚乙烯吡咯烷酮、聚丙烯酰胺、聚二甲基丙烯酰胺、聚乙烯醇、葡聚糖、聚(L-谷氨酸)、苯乙烯马来酸酐、聚-N-(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺或聚二乙烯醚马来酸酐。

[0227] 在又一个实施方式中,本发明提供了式V的化合物,其中所述聚合物包括在聚合物单元之间的至少一个连接基团。

[0228] 在一个实施方式中,本发明提供了式V的化合物,其中所述聚合物部分是聚氧化烯。

[0229] 在另一个实施方式中,本发明提供了式V的化合物,其中所述聚合物的分子量为约200-10,000Da。聚合物的优选分子量为约1,000-5,000Da。

[0230] 在一个实施方式中,本发明提供了式V的化合物,其中所述聚合物部分包括至少一个选自下组的连接体:-C(O)-、-O-、-O-C(O)O-、-C(O)CH₂CH₂C(O)-、-S-S-、-NR³-、-NR³C(O)O-、-OC(O)NR³-、-NR³C(O)-、-C(O)NR³-、-NR³C(O)NR³-、-亚烷基-NR³C(O)O-、-亚烷基-NR³C(O)NR³-、-亚烷基-OC(O)NR³-、-亚烷基-NR³-、-亚烷基-O-、-亚烷基-NR³C(O)-、-亚烷基-C(O)NR³-、-NR³C(O)O-亚烷基-、-NR³C(O)NR³-亚烷基-、-OC(O)NR³-亚烷基-、-NR³-亚烷基-、-O-亚烷基-、-NR³C(O)-亚烷基-、-C(O)NR³-亚烷基-、-亚烷基-NR³C(O)O-亚烷基-、-亚烷基-NR³C(O)NR³-亚烷基-、-亚烷基-OC(O)NR³-亚烷基-、-亚烷基-NR³-亚烷基-、-亚烷基-O-亚烷基-、-亚烷基-NR³C(O)-亚烷基-、-C(O)NR³-亚烷基-、-NR³C(O)O-亚烷基氧基-、-NR³C(O)NR³-亚烷基氧基-、-OC(O)NR³-亚烷基氧基-、-NR³-亚烷基氧基-、-O-亚烷基氧基-、-NR³C(O)-亚烷基氧基-、-C(O)NR³-亚烷基氧基-和-亚烷基氧基-NR³C(O)O-亚烷基氧基-,其中R³如上所定义,以及

[0231] $\text{---D---}\textcircled{\text{C}}\text{---E---}$

[0232] 其中

[0233] $\textcircled{\text{C}}$ 选自芳基、取代芳基、环烷基、取代环烷基、杂芳基、取代杂芳基、杂环基和取代杂环基,且D和E独立地选自化学键、-O-、CO-、-NR³-、-NR³C(O)O-、-OC(O)NR³-、-NR³C(O)-、-C(O)NR³-、-NR³C(O)NR³-、-亚烷基-NR³C(O)O-、-亚烷基-NR³C(O)NR³-、-亚烷基-OC(O)NR³-、-亚烷基-NR³-、-亚烷基-O-、-亚烷基-NR³C(O)-、亚烷基-C(O)NR³-、-NR³C(O)O-亚烷基-、-NR³C(O)NR³-亚烷基-、-OC(O)NR³-亚烷基-、-NR³-亚烷基-、-O-亚烷基-、-NR³C(O)-亚烷基-、-NR³C(O)O-亚烷基氧基-、-NR³C(O)NR³-亚烷基氧基-、-OC(O)NR³-亚烷基氧基-、-NR³-亚烷基氧基-、-O-亚烷基氧基-、-NR³C(O)-亚烷基氧基-、-C(O)NR³-亚烷基氧基-、-亚烷基氧基-NR³C(O)O-亚烷基氧基-、-C(O)NR³-亚烷基-、-亚烷基-NR³C(O)O-亚烷基-、-亚烷基-NR³C(O)NR³-亚烷基-、-亚

烷基-OC(O)NR³-亚烷基-、-亚烷基-NR³-亚烷基-、亚烷基-O-亚烷基-、-亚烷基-NR³C(O)-亚烷基-和-C(O)NR³-亚烷基-，其中R³如上所定义。

[0234] 在另一个实施方式中，本发明提供了式V的化合物，其中所述聚合物是聚氧乙烯，其中所述氧化烯基团独立地是在其重复单元中具有2-5个碳原子的直链或支链的聚氧化烯基团。

[0235] 在又一个实施方式中，本发明提供了式V的化合物，其中所述聚氧化烯是聚氧乙烯、直链或支链的聚氧丙烯或者直链或支链的聚氧丁烯。

[0236] 在一个实施方式中，本发明提供了式V的化合物，其中所述聚氧化烯是聚氧乙烯，且所述靶向配体是药理学活性小分子、溶内体剂、融合肽、细胞膜渗透剂、电荷掩蔽剂或核酸。

[0237] 在一个实施方式中，本发明提供了式V的化合物，其中所述靶向配体是具有抗增殖活性的药理学活性小分子。

[0238] 在一个实施方式中，本发明提供了式V的化合物，其中所述聚氧化烯是聚氧乙烯，且所述靶向配体是具有抗增殖活性的药理学活性小分子。

[0239] 在又一个实施方式中，本发明提供了式V的化合物，其中所述靶向配体是叶酸基团。

[0240] 在又一个实施方式中，本发明提供了式V的化合物，其中所述聚氧化烯是聚氧乙烯，且所述靶向配体是叶酸基团。

[0241] 在一个实施方式中，本发明提供了式V的化合物，其中所述靶向配体是融合肽。

[0242] 在一个实施方式中，本发明提供了式V的化合物，其中所述聚氧化烯是聚氧乙烯，且所述靶向配体是融合肽。

[0243] 在一个实施方式中，本发明提供了式V的化合物，其中所述靶向配体选自生物素、半乳糖、乙酰水杨酸和萘普生。

[0244] 在一个实施方式中，本发明提供了式V的化合物，其中所述聚氧化烯是聚氧乙烯和所述靶向配体选自生物素、半乳糖、乙酰水杨酸和萘普生。

[0245] 在另一个实施方式中，本发明提供了式V的化合物，其中n₁、n₂和n₃是相同的，并且是1或2；X和X'是化学键；并且R₁和R₂中的至少一个是含有1-4个双键的C₈-C₂₅烃基团。

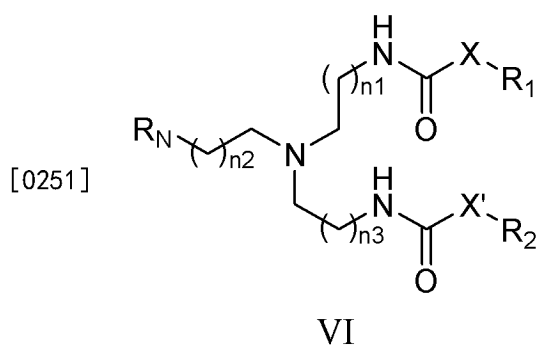
[0246] 在另一个实施方式中，本发明提供了式V的化合物，其中n₁、n₂、n₃和n₄是相同的，并且是1或2；X和X'是化学键；并且R₁和R₂都是含有1-4个双键的C₈-C₂₅烃基团。

[0247] 在另一个实施方式中，本发明提供了式V的化合物，其中n₁、n₂和n₃是相同的，并且是1或2；X和X'是化学键；并且R₁和R₂是相同的，并且表示含有1-4个双键的C₈-C₂₅烃基团。

[0248] 在又一个实施方式中，本发明提供了式V的化合物，其中n₁、n₂和n₃是相同的，并且是1或2；X和X'是化学键；并且R₁和R₂是相同的，并且表示含有1-2个双键的C₁₄-C₂₀烃基团。

[0249] 在又一个实施方式中，本发明提供了式V的化合物，其中n₁、n₂和n₃是1；X和X'是化学键；并且R₁和R₂是相同的，并且表示含有1个双键的C₈-C₂₅烃基团。

[0250] 本发明的另一方面提供了式VI的化合物：



[0252] 其中

[0253] n_1 、 n_2 和 n_3 独立地是1、2、3或4；

[0254] X和X'独立地是化学键、氧或氮；

[0255] R_1 和 R_2 独立地是任选含有1-4个双键或三键的 C_8 - C_{25} 烃基团；且

[0256] R_N 表示 NHR_4 、 NR_4R_5 或 $N^+R_4R_5R_6$ ；其中

[0257] R_4 、 R_5 和 R_6 独立地表示 C_1 - C_6 烷基基团。

[0258] 在一个实施方式中，本发明提供了式VI的化合物，其中 n_1 、 n_2 和 n_3 都是1，且X和X'都是化学键。

[0259] 在一个实施方式中，本发明提供了式VI的化合物，其中 R_1 和 R_2 中的至少一个是含有1-4个双键的 C_8 - C_{25} 烃基团。

[0260] 在另一个实施方式中，本发明提供了式VI的化合物，其中 R_1 和 R_2 都是含有1-4个双键的 C_8 - C_{25} 烃基团。

[0261] 在又一个实施方式中，本发明提供了式VI的化合物，其中 R_1 和 R_2 独立地是含有1或2个双键的 C_8 - C_{25} 烃基团。

[0262] 在又一个实施方式中，本发明提供了式VI的化合物，其中 R_1 和 R_2 独立地是含有1个双键的 C_8 - C_{25} 烃基团。

[0263] 在一个实施方式中，本发明提供了式VI的化合物，其中 R_1 和 R_2 独立地是含有1或2个双键的 C_{14} - C_{20} 烃基团。

[0264] 在又一个实施方式中，本发明提供了式VI的化合物，其中 R_1 和 R_2 独立地是含有1个双键的 C_{14} - C_{20} 烃基团。

[0265] 在一个实施方式中，本发明提供了式VI的化合物，其中 $-C(O)X-R_1$ 和 $-C(O)X'-R_2$ 都表示油酰基团。

[0266] 在另一个实施方式中，本发明提供了式VI的化合物，其中 R_N 表示 NHR_4 ，其中 R_4 表示 C_1 - C_2 烷基基团。

[0267] 在另一个实施方式中，本发明提供了式VI的化合物，其中 R_N 表示 NR_4R_5 ，其中 R_4 和 R_5 独立地表示 C_1 - C_2 烷基基团。

[0268] 在另一个实施方式中，本发明提供了式VI的化合物，其中 R_N 表示 $N^+R_4R_5R_6$ ，其中 R_4 、 R_5 和 R_6 独立地表示 C_1 - C_2 烷基基团。

[0269] 在另一个实施方式中，本发明提供了式VI的化合物，其中 n_1 、 n_2 和 n_3 是相同的，并且是1或2；X和X'是化学键；并且 R_1 和 R_2 中的至少一个是含有1-4个双键的 C_8 - C_{25} 烃基团。

[0270] 在另一个实施方式中，本发明提供了式VI的化合物，其中 n_1 、 n_2 、 n_3 和 n_4 是相同的，并且是1或2；X和X'是化学键；并且 R_1 和 R_2 都是含有1-4个双键的 C_8 - C_{25} 烃基团。

[0271] 在另一个实施方式中,本发明提供了式VI的化合物,其中 n_1 、 n_2 和 n_3 是相同的,并且是1或2;X和X'是化学键;并且 R_1 和 R_2 是相同的,并且表示含有1-4个双键的 C_8 - C_{25} 烃基团。

[0272] 在又一个实施方式中,本发明提供了式VI的化合物,其中 n_1 、 n_2 和 n_3 是相同的,并且是1或2;X和X'是化学键;并且 R_1 和 R_2 是相同的,并且表示含有1-2个双键的 C_{14} - C_{20} 烃基团。

[0273] 在又一个实施方式中,本发明提供了式VI的化合物,其中 n_1 、 n_2 和 n_3 是1;X和X'是化学键;并且 R_1 和 R_2 是相同的,并且表示含有1个双键的 C_8 - C_{25} 烃基团。

[0274] 在又一个实施方式中,本发明提供了式VI的化合物,其中 n_1 、 n_2 和 n_3 是1;X和X'是化学键; R_1 和 R_2 是相同的,并且表示含有1个双键的 C_8 - C_{25} 烃基团;且 R_N 表示 $N^+R_4R_5R_6$,其中 R_4 、 R_5 和 R_6 独立地表示 C_1 - C_6 烷基基团。

[0275] 在又一个实施方式中,本发明提供了式VI的化合物,其中 n_1 、 n_2 和 n_3 是1;X和X'是化学键; R_1 和 R_2 是相同的,并且表示含有1个双键的 C_8 - C_{25} 烃基团;且 R_N 表示 $N^+R_4R_5R_6$,其中 R_4 、 R_5 和 R_6 独立地表示 C_1 - C_2 烷基基团。

[0276] 在其中X和X'都表示化学键的式I-VI的化合物的另一个实施方式中,合适的 $C(O)XR_1$ 和 $C(O)X'R_2$ 部分包括衍生自以下的基团:具有10-22个碳原子,优选具有12-20个碳原子,更优选具有14-18个碳原子的饱和、单不饱和及多不饱和的脂肪酸。代表性的 $C(O)XR_1$ 和 $C(O)X'R_2$ 部分包括衍生自以下的那些:例如,肉豆蔻油酸、棕榈油酸、油酸、亚油酸、亚麻酸、花生四烯酸、二十碳五烯酸、芥酸、二十二碳六烯酸、异硬脂酸、反油酸、洋芫荽子酸、桐酸或月桂油酸。

[0277] 在其中X和X'独立地表示氮或氧的式I-VI的化合物的另一个实施方式中,合适的 R_1 和 R_2 部分包括衍生自以下的基团:具有10-22个碳原子的饱和及多不饱和脂肪酸,优选具有12-20个碳原子,更优选具有14-18个碳原子。代表性的 R_1 和 R_2 部分包括衍生自以下的那些,例如,诸如衍生自以下的那些:肉豆蔻油酸、棕榈油酸、油酸、亚油酸、亚麻酸、花生四烯酸、二十碳五烯酸、芥酸、二十二碳六烯酸、异硬脂酸、反油酸、洋芫荽子酸、桐酸或月桂油酸。

[0278] 本发明的一个方面提供了包括式I-VI中任一个的化合物的制剂。

[0279] 本发明的一个方面提供了包括式I-VI中任一个和另一种分子的制剂,所述另一种分子可以是生物活性分子,其中所述分子选自核蛋白体RNA;RNA或DNA的反义多核苷酸;核酶;siRNA;shRNA;miRNA;以及编码治疗有效蛋白的遗传DNA、cDNA或mRNA的多核苷酸。

[0280] 本发明的另一方面提供了包括由式I-VI中任一个的化合物与生物活性分子形成的颗粒的制剂。

[0281] 本发明的另一方面提供了包括式I-VI中任一个的化合物和生物活性分子的制剂,其中所述生物活性分子和所述化合物形成脂质复合物(lipoplex)。

[0282] 本发明的另一方面提供了包括式I-VI中任一个的化合物和生物活性分子的制剂,其中所述生物活性分子至少部分在由所述化合物形成的脂质体内。

[0283] 本发明的另一方面提供了包括式I-VI中任一个的化合物和生物活性分子的制剂,其中所述生物活性分子被包封在脂质体内。

[0284] 在一个实施方式中,本发明提供了以下制剂:其中颗粒的中值粒径小于约500nm。

[0285] 本发明的一个方面提供了向细胞中引入siRNA的方法,包括将所述细胞与本发明的制剂接触,其中所述制剂包括式I-VI中任一个的化合物和siRNA。

[0286] 本发明的另一方面提供了向细胞中引入合成shRNA的方法,包括将所述细胞与本发明的制剂接触,其中所述制剂包括式I-VI中任一个的化合物和shRNA。

[0287] 在本发明的又一方面,提供了向细胞中引入miRNA的方法,包括将所述细胞与本发明的制剂接触,其中所述制剂包括式I-VI中任一个的化合物和miRNA。

[0288] 本发明的另一方面提供了向细胞中引入反义核酸的方法,包括将所述细胞与本发明的制剂接触,其中所述制剂包括式I-VI中任一个的化合物和反义核酸。

[0289] 本发明的一个方面提供了对目标序列的表达进行调控的方法,所述方法包括对哺乳动物受试者施用治疗有效量的包含式I-VI中任一个的化合物和生物活性分子的制剂。

[0290] 本发明的另一方面提供了用于体内递送siRNA的方法,所述方法包括对哺乳动物受试者施用治疗有效量的本发明的制剂。

[0291] 本发明的另一方面提供了治疗或预防哺乳动物受试者的疾病的方法,所述方法包括对所述受试者施用治疗有效量的包括式I-VI中任一个的化合物和生物活性分子的制剂。

[0292] 本发明的另一方面提供了抑制基因表达的方法,包括将细胞与包含能够抑制所述基因表达的生物活性分子及式I-VI中任一个的化合物的制剂接触。在一个实施方式中,所述细胞是哺乳动物细胞,优选人细胞。另外,这些方法可在体内或体外实施。在一个实施方式中,所述生物活性分子选自,例如,siRNA、shRNA、miRNA、反义核酸、核蛋白体RNA、RNA或DNA的反义多核苷酸、核酶以及编码治疗有效蛋白的遗传DNA、cDNA或mRNA的多核苷酸。这样的制剂还可包含胆固醇、激素、抗病毒剂、肽、化疗剂、小分子、维生素、辅因子或蛋白(诸如抗体)。

[0293] 在本发明的另一方面,不抑制基因表达的生物活性分子(例如,各种小分子药物化合物)可包含在含有本发明化合物的制剂中以便用于不同于涉及基因表达抑制的那些的治疗中。

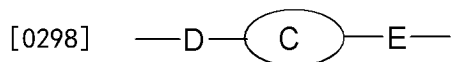
[0294] 在另一个实施方式中,本发明提供了包含(i)一种或多种式I-VI中任一个的化合物与(ii)一种或多种生物活性分子的制剂的可植入或可注射器件。在这些器件中,所述制剂被夹带或包封在所述器件内,并且除了所述制剂之外,所述器件还包括生物可降解和/或生物可相容的药物释放物质。所述器件的尺寸和形状适于注射或植入受试者体内,优选受试者为哺乳动物受试者,更优选人类受试者。

[0295] 如上所述,本发明的具体化合物包括聚合物部分,例如G、G₁或G₂。这些聚合物基团的分子量在约200Da到约10,000Da的范围内。

[0296] 所述聚合物部分优选为聚氧化烯或包含两个或更多个聚氧化烯基团或单元。聚氧化烯基团通过聚合烯化氧单体以提供所需尺寸和分子量的聚合物部分来形成。当所述聚合物部分包含两个或更多个聚氧化烯基团时,各个聚氧化烯基团通过连接基团彼此相连。合适的连接基团的例子是:

[0297] $-C(O)-$ 、 $-O-$ 、 $-O-C(O)O-$ 、 $-C(O)CH_2CH_2C(O)-$ 、 $-S-S-$ 、 $-NR^3-$ 、 $-NR^3C(O)O-$ 、 $-OC(O)NR^3-$ 、 $-NR^3C(O)-$ 、 $-C(O)NR^3-$ 、 $-NR^3C(O)NR^3-$ 、 $-$ 亚烷基 $-NR^3C(O)O-$ 、 $-$ 亚烷基 $-NR^3C(O)NR^3-$ 、 $-$ 亚烷基 $-OC(O)NR^3-$ 、 $-$ 亚烷基 $-NR^3-$ 、 $-$ 亚烷基 $-O-$ 、 $-$ 亚烷基 $-NR^3C(O)-$ 、 $-$ 亚烷基 $-C(O)NR^3-$ 、 $-NR^3C(O)O-$ 亚烷基 $-$ 、 $-NR^3C(O)NR^3-$ 亚烷基 $-$ 、 $-OC(O)NR^3-$ 亚烷基 $-$ 、 $-NR^3-$ 亚烷基 $-$ 、 $-O-$ 亚烷基 $-$ 、 $-NR^3C(O)-$ 亚烷基 $-$ 、 $-C(O)NR^3-$ 亚烷基 $-$ 、 $-$ 亚烷基 $-NR^3C(O)O-$ 亚烷基 $-$ 、 $-$ 亚烷基 $-NR^3C(O)NR^3-$ 亚烷基 $-$ 、 $-$ 亚烷基 $-OC(O)NR^3-$ 亚烷基 $-$ 、 $-$ 亚烷基 $-NR^3-$ 亚烷基 $-$ 、 $-$ 亚烷基 $-O-$ 亚烷基 $-$ 、 $-$ 亚烷基 $-$

NR³C(O)-亚烷基-、-C(O)NR³-亚烷基-、-NR³C(O)O-亚烷氧基-、-NR³C(O)NR³-亚烷氧基-、-OC(O)NR³-亚烷氧基-、-NR³-亚烷氧基-、-O-亚烷氧基-、-NR³C(O)-亚烷氧基-、-C(O)NR³-亚烷氧基-和-亚烷氧基-NR³C(O)O-亚烷氧基-，其中R³是氢或任选取代的烷基，以及



[0299] 其中

[0300] $\textcircled{\text{C}}$ 选自芳基、取代芳基、环烷基、取代环烷基、杂芳基、取代杂芳基、杂环基和取代杂环基，且D和E独立地选自化学键、-O-、CO-、-NR³-、-NR³C(O)O-、-OC(O)NR³-、-NR³C(O)-、-C(O)NR³-、-NR³C(O)NR³-、-亚烷基-NR³C(O)O-、-亚烷基-NR³C(O)NR³-、-亚烷基-OC(O)NR³-、-亚烷基-NR³-、-亚烷基-O-、-亚烷基-NR³C(O)-、-亚烷基-C(O)NR³-、-NR³C(O)O-亚烷基-、-NR³C(O)NR³-亚烷基-、-OC(O)NR³-亚烷基-、-NR³-亚烷基-、-O-亚烷基-、-NR³C(O)-亚烷基-、-NR³C(O)O-亚烷氧基-、-NR³C(O)NR³-亚烷氧基-、-OC(O)NR³-亚烷氧基-、-NR³-亚烷氧基-、-O-亚烷氧基-、-NR³C(O)-亚烷氧基-、-C(O)NR³-亚烷氧基-、-亚烷氧基-NR³C(O)O-亚烷氧基-、-C(O)NR³-亚烷基-、-亚烷基-NR³C(O)O-亚烷基-、-亚烷基-NR³C(O)NR³-亚烷基-、-亚烷基-OC(O)NR³-亚烷基-、-亚烷基-NR³-亚烷基-、-亚烷基-O-亚烷基-、-亚烷基-NR³C(O)-亚烷基-和-C(O)NR³-亚烷基-，其中R³如上所定义。

[0301] 优选的连接基团是-C(O)-、-O-、-NR³-、-NR³C(O)O-、-OC(O)NR³-、-NR³C(O)-和-C(O)NR³-，其中每个R³如上所定义。

[0302] 当G、G₁或G₂由通过例如酰胺基团连接的独立单元形成时，所述单元可选自具有大范围的大小和分子量的短链聚合物或单元。如上所述，聚合物G、G₁和G₂的分子量可为约200-10,000Da；这些聚合物中的任一个可由若干较短的、大小独立的单元形成。所述单元的分子量可独立地在约50(即，聚乙二醇的一个重复单元的)、200或500Da直到约3000、4000或5000Da的范围内。

[0303] 因此，当化合物包括分子量约为3000Da的聚合物部分G、G₁或G₂时，所述聚合物可以，例如，

[0304] (a)是分子量为约3000Da的聚氧乙烯基团；

[0305] (b)由四个通过三个酰胺连接(-C(O)NH-)基团彼此共价结合的聚氧乙烯基团组成，其中每个聚氧化烯基团的分子量为约750Da，由此使所述聚合物部分的分子量为约3000Da；或

[0306] (c)由五个通过四个酰胺连接(-C(O)NH-)基团彼此共价结合的聚氧乙烯基团组成，其中所述五个聚氧化烯基团的分子量分别为约500、1000、250、1000和250Da。

[0307] 这些聚合物部分仅作为例子而被包含；本领域技术人员将会意识到可适当地在本发明的化合物中采用的其它聚合物部分。

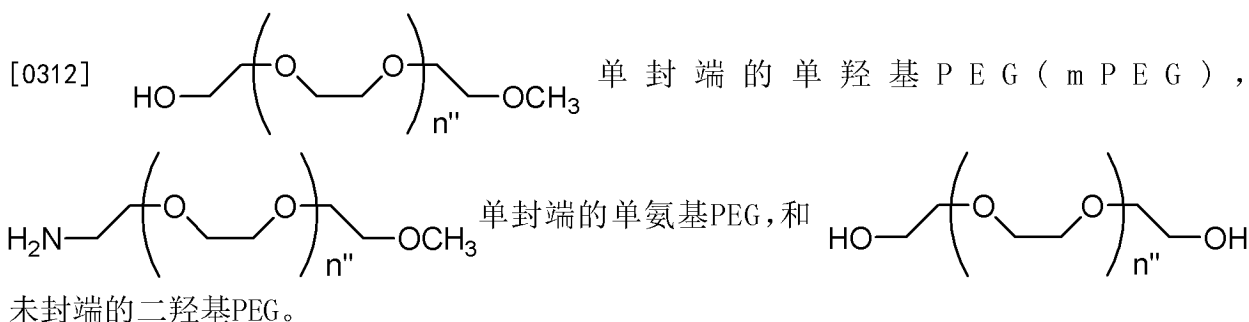
[0308] 可用于制备本发明的聚合物部分的试剂的非限制性例子包括以下：

[0309]

HO(亚烷基-O) _{pp} R ^{bb}	单封端的单羟基PEG(mPEG)
H ₂ N(亚烷基-O) _{pp} R ^{bb}	单封端的单氨基PEG
HO(亚烷基-O) _{pp} R-OH	未封端的二羟基PEG
H ₂ N(亚烷基-O) _{pp} R-OH	未封端的单氨基PEG

[0310] 其中pp和亚烷基如本文所定义,且R^{bb}优选选自烷基和取代烷基。

[0311] 这样的实际的具体例子包括:



[0313] 在一些实施方式中,可通过以下方式制备颗粒:提供在第一储器中的水性溶液和在第二储器中的有机脂质溶液(即,本发明化合物在水中的溶液),并将所述水性溶液与所述有机脂质溶液混合以基本上即时制备脂质体包封的例如干扰RNA。在一些实施方式中,所述颗粒通过以下方式制备:在洗涤剂类或有机溶剂类系统中形成疏水的中间体复合物,随后去除所述洗涤剂或有机溶剂。优选的实施方式是电荷中和的。

[0314] 在一个实施方式中,从质粒转录干扰RNA,并将所述质粒与阳离子脂质在洗涤剂溶液中合并以提供带包衣的核酸-脂质复合物。然后将所述复合物与非阳离子脂质接触以提供洗涤剂、核酸-脂质复合物和非阳离子脂质的溶液,然后去除洗涤剂以提供血清稳定的核酸-脂质颗粒的溶液,其中包含干扰RNA模板的质粒被包封在脂质双层中。由此形成的颗粒的大小为约50-500nm。

[0315] 在另一个实施方式中,通过以下方式形成稳定的脂质颗粒:制备阳离子脂质和非阳离子脂质在有机溶剂中的混合物;将包含例如干扰RNA的核酸水溶液与阳离子脂质和非阳离子脂质的混合物接触以提供澄清的单相;随后去除有机溶剂以提供核酸-脂质颗粒的悬浮液,其中核酸包封在脂质双层中,且颗粒在血清中稳定并具有约50-500nm的尺寸。

[0316] 具有所需尺寸和/或电荷的本发明的颗粒和复合物(例如式I-VI中任一个的化合物与siRNA的复合物)可通过以下方式得到:将如上所述制备的混合物通过合适的过滤器。参见,例如,下面的实施例32和33。

[0317] 本发明的脂质颗粒可用于包含siRNA序列的核酸的治疗性递送。特别是,本发明的目的之一是提供通过向下调节目标核酸序列的翻译或使其沉默来治疗哺乳动物的疾病的体外和体内方法。在这些方法中,将siRNA分子配制到核酸-脂质颗粒中,并将该颗粒施用给需要这种治疗的患者(例如,被诊断患有与包含目标核酸序列的基因的表达或过度表达相关的疾病或失调的患者)。可选地,从患者中移出细胞,在体外递送siRNA,并将该细胞重新注射给该患者。在一个实施方式中,本发明提供了通过将细胞与包含阳离子脂质、非阳离子脂质、抑制聚集的轭合脂质及siRNA的核酸-脂质颗粒接触来向细胞中引入siRNA分子的方法。在另一个实施方式中,本发明提供了通过将细胞与包含阳离子脂质、抑制聚集的轭合脂质及siRNA的核酸-脂质颗粒接触来向细胞中引入siRNA分子的方法。在又一个实施方式中,本发明提供了通过将细胞与包含阳离子脂质和siRNA的核酸-脂质颗粒接触来向细胞中引入siRNA分子的方法。

[0318] 所述脂质颗粒例如可静脉内或腹腔内施用。在一个实施方式中,在注射后核酸-脂质颗粒的总施用剂量的至少约10%在血浆中存在约1、6、12、24、36、48、60、72、84或96小时。

在其它实施方式中,在注射后核酸-脂质颗粒的总注射剂量的多于20%、30%、40%且至多60%、70%或80%在血浆中存在1、6、12、24、36、48、60、72、84或96小时。在一个实施方式中,在施用后24、48、72和96小时可在目标组织(即,肺、肝、肿瘤、血管内皮或炎症部位)的细胞中检测到siRNA的存在。在一个实施方式中,在施用后24、48、72和96小时可检测到目标序列表达的向下调节。在一个实施方式中,目标序列表达的向下调节优先发生在肿瘤细胞中或者炎症或任何其它疾病组织部位处的细胞中。在一个实施方式中,在静脉注射核酸-脂质颗粒的至少4天后可在远离施用部位的部分处的细胞中检测到siRNA的存在。在另一个实施方式中,在注射核酸-脂质颗粒的至少4天后可在目标组织(即,肺、肝、肿瘤或炎症部位)的细胞中检测到siRNA的存在。

[0319] 所述颗粒适合用于静脉内的核酸转移,因为它们在循环中是稳定的,具有导致接近血管外部位和目标细胞群的药效行为所需的尺寸。本发明还提供了包含脂质颗粒的可药用组合物。

[0320] 所述颗粒适合用于静脉内的核酸转移,因为它们在循环中是稳定的,具有导致接近血管外部位和目标细胞群的药效行为所需的尺寸。

[0321] 如本文所述的稳定的核酸-脂质颗粒通常含有核酸(例如,siRNA序列或编码siRNA序列的DNA序列)、阳离子脂质、非阳离子脂质和双层稳定组分,诸如,例如,抑制脂质颗粒聚集的轭合脂质。本发明的脂质颗粒的中值粒径小于约500nm,并且基本无毒。另外,包封在本发明的脂质颗粒中的核酸在水溶液中具有对核酶降解的抗性。

[0322] 核酸-脂质颗粒的核酸组分通常包含干扰RNA(即,siRNA),其可以若干形式提供,包括例如一种或多种独立的小干扰RNA(siRNA)双链体、较长的双链RNA(dsRNA)或者例如从DNA质粒中的转录盒转录的siRNA或dsRNA。

[0323] RNA种群可用于提供长链前体RNA或具有与可用于制备siRNA的所选目标序列基本或完全同源性的长链前体RNA。可根据本领域技术人员公知的方法来从细胞或组织分离,合成,和/或克隆RNA。RNA可以是混合种群(从细胞或组织得到,从cDNA转录,削减(subtrated),选择等),或者可表示单个目标序列。RNA可以是天然存在的,例如,从组织或细胞样品中分离的;在体外合成的,例如,使用T7或SP6聚合物酶和PCR产品或克隆cDNA;或者是化学合成的。

[0324] 为形成用于合成RNA的长链dsRNA,还在体外转录补体并进行杂交以形成dsRNA。如果使用了天然存在的RNA种群,则也提供了RNA补体(例如,通过大肠杆菌RNA酶III或Dicer形成用于消化的dsRNA),例如,通过转录对应于所述RNA种群的cDNA或通过使用RNA聚合物酶。然后将前体RNA杂交以形成用于消化的双链RNA。该dsRNA可被直接包封在核酸-脂质颗粒中或可以在包封前在体外进行消化。

[0325] 可选地,可将编码一个或多个siRNA模板的一种或多种DNA质粒包封在核酸-脂质颗粒中。siRNA可以从具有RNA聚合物酶III转录单元的质粒中的DNA模板转录为能自动折叠为具有发夹环(hairpin loops)的双链体的序列,例如,基于用于小核RNA U6或人RNA酶PRNA H1的天然存在的转录单元(参见,Brummelkamp,et al.,Science 296:550(2002);Donze,et al.,Nucleic Acids Res.30:e46(2002);Paddison,et al.,Genes Dev.16:948(2002);Yu,et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.99:6047(2002);Lee,et al.,Nat.Biotech.20:500(2002);Miyagishi,et al.,Nat.Biotech.20:497(2002);Paul,et al.,Nat.Biotech.20:505

(2002);和Sui,et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.99:5515(2002))。通常,转录单元或盒会包含RNA转录启动子序列,诸如H1-RNA或U6启动子,其可操作地与用于所需siRNA序列和终止序列的转录的模板连接,所述终止序列由2-3个尿嘧啶残基和聚胸腺嘧啶(T5)序列组成(多腺苷酸化信号(polyadenylation signal))(Brummelkamp,Science,同上)。所选的启动子可提供用于组成性或诱导性转录。用于RNA干扰分子的由DNA-引导的转录的组合物和方法在美国专利第6,573,099号中详细描述,该文献通过引用并入本文。优选地,合成或转录的siRNA具有约1-4个核苷酸、优选约2-3个核苷酸的3'突出端和5'磷酸盐末端(Elbashir,et al.,Genes Dev.15:188(2001);Nykanen,et al.,Cell 107:309(2001))。将转录单元加入到质粒或DNA载体中,并从所述质粒或DNA载体转录干扰RNA。适于体内递送用于治疗目的的遗传物质的质粒在美国专利第5,962,428号和第5,910,488号中详细描述,这两篇文献通过引用并入本文。所选的质粒可提供用于目标细胞的临时或稳定递送。本领域技术人员明显可知,最初设计用于表达所需基因序列的质粒可进行修饰以包含用于siRNA转录的转录单元盒。

[0326] 用于分离RNA、合成RNA、杂交核酸、制备和筛选cDNA库和实施PCR的方法在本领域中是公知的(参见,例如,Gubler & Hoffman,Gene 25:263-269(1983);Sambrook et al.,同上;Ausubel et al.,同上),如PCR方法(参见美国专利第4,683,195号和第4,683,202号;PCR Protocols:A Guide to Methods and Applications(Innis et al.,eds,1990))。表达文库对于本领域技术人员来说也是公知的。公开了本发明中的一般使用方法的其它基础性文本包括Sambrook et al.,Molecular Cloning,A Laboratory Manual(2nd ed.1989);Kriegler,Gene Transfer and Expression:A Laboratory Manual(1990);和Current Protocols in Molecular Biology(Ausubel et al.,eds.,1994))。

[0327] 一般来说,需要递送核酸-脂质颗粒以向下调节所关注的基因产物的翻译(即表达)或使其沉默。合适的基因产物类别包括但不限于与病毒感染及存活相关的基因,与代谢疾病和失调(例如,其中肝是目标的疾病和失调,以及肝病和肝失调)相关的基因,与肿瘤生成和细胞转化相关的基因,血管新生基因,免疫调节基因,诸如与炎症反应和自体免疫反应有关的那些,配体受体基因,以及与神经变性失调相关的基因。

[0328] 与病毒感染和存活相关的基因包括那些通过病毒表达以在细胞中结合、进入和复制的基因。特别受关注的是与慢性病毒疾病相关的病毒序列。特别关注的病毒序列包括肝炎病毒的序列(Hamasaki,et al.,FEBS Lett.543:51(2003);Yokota,et al.,EMBO Rep.4:602(2003);Schlomai,et al.,Hepatology 37:764(2003);Wilson,et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.100:2783(2003);Kapadia,et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.100:2014(2003);和FIELDS VIROLOGY(Knipe et al.eds.2001))、人免疫缺陷病毒(HIV)的序列(Banerjee,et al.,Mol.Ther.8:62(2003);Song,et al.,J.Virol.77:7174(2003);Stephenson JAMA 289:1494(2003);Qin,et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.100:183(2003))、疱疹病毒的序列(Jia,et al.,J.Virol.77:3301(2003))和人乳头状瘤病毒(HPV)的序列(Hall,et al.,J.Virol.77:6066(2003);Jiang,et al.,Oncogene 21:6041(2002))。可被沉默的示例性肝炎病毒核酸序列包括但不限于:在转录和翻译中涉及的核酸序列(例如、En1、En2、X、P),编码结构蛋白的核酸序列(例如,包括C蛋白和C-相关蛋白的核心蛋白;包括S、M和/或L蛋白或其片段的衣壳蛋白和包膜蛋白)(参见,例如,FIELDS VIROLOGY,2001,同

上)。可被沉默的示例性C型肝炎核酸序列包括但不限于：丝氨酸蛋白酶(例如,NS3/NS4),解螺旋酶(例如NS3),聚合物酶(例如,NS5B)和包膜蛋白(例如,E1、E2和p7)。A型肝炎核酸序列在例如Genbank登录号NC_001489中描述;B型肝炎核酸序列在例如Genbank登录号NC_003977中描述;C型肝炎核酸序列在例如Genbank登录号NC_004102中描述;D型肝炎核酸序列在Genbank登录号NC_001653中描述;E型肝炎核酸序列在Genbank登录号NC_001434中描述;且G型肝炎核酸序列在例如Genbank登录号NC_001710中描述。使编码与病毒感染和存活相关的基因的序列沉默可方便地与用于治疗病毒状态的常规药剂的施用结合使用。

[0329] 与代谢疾病和失调(例如,其中肝是目标的失调以及肝病和肝失调)相关的基因包括,例如,在例如血脂异常中表达的基因(例如,肝X受体(例如,LXR α 和LXR β ,Genback登录号NM_007121),法尼醇X受体(FXR)(Genbank登录号NM_005123),固醇调节元件结合蛋白(SREBP),1-位蛋白酶(S1P),3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶-A还原酶(HMG辅酶-A还原酶),载脂蛋白(ApoB)和载脂蛋白(ApoE))和在糖尿病中表达的基因(例如,葡萄糖6-磷酸酶)(参见,例如,Forman et al.,Cell 81:687(1995);Seol et al.,Mol.Endocrinol.9:72(1995),Zavacki et al.,PNAS USA 94:7909(1997);Sakai,et al.,Cell 85:1037-1046(1996);Duncan,et al.,J.Biol.Chem.272:12778-12785(1997);Willy,et al.,Genes Dev.9(9):1033-45(1995);Lehmann,et al.,J.Biol.Chem.272(6):3137-3140(1997);Janowski,et al.,Nature 383:728-731(1996);Peet,et al.,Cell 93:693-704(1998))。本领域技术人员将会意识到,与代谢疾病和失调(例如其中肝是目标的疾病和失调,以及肝病 和失调)相关的基因包括在肝自身中表达的基因和在其它器官和组织中表达的基因。使编码与代谢疾病和失调相关的基因的序列沉默可方便地与用于治疗所述疾病或失调的常规药剂的施用结合使用。

[0330] 与肿瘤生成和细胞转化有关的基因序列的例子包括易位序列(translocation sequence),诸如MLL融合基因、BCR-ABL(Wilda,et al.,Oncogene,21:5716(2002);Scherr,et al.,Blood 101:1566)、TEL-AML1、EWS-FLI1、TLS-FUS、PAX3-FKHR、BCL-2、AML1-ETO和AML1-MTG8(Heidenreich,et al.,Blood 101:3157(2003));过度表达序列,诸如多抗药性基因(Nieth,et al.,FEBS Lett.545:144(2003);Wu,et al,Cancer Res.63:1515(2003)),细胞周期蛋白(Li,et al.,Cancer Res.63:3593(2003);Zou,et al.,Genes Dev.16:2923(2002)), β -连环蛋白(Verma,et al.,Clin Cancer Res.9:1291(2003)),端粒酶基因(Kosciulek,et al.,Mol Cancer Ther.2:209(2003)),c-MYC、N-MYC、BCL-2、ERBB1和ERBB2(Nagy,et al.Exp.Cell Res.285:39(2003));以及突变序列,诸如RAS(参见Tuschl和Borkhardt,Mol.Interventions,2:158(2002))。使编码DNA修复酶的序列沉默可与化学治疗剂的施用结合应用(Collis,et al.,Cancer Res.63:1550(2003))。编码与肿瘤转移相关的蛋白的基因也是受关注的目标序列,例如,整合蛋白、选择蛋白和金属蛋白酶。前述例子不是排他性的。有助于或促进肿瘤生成或细胞转化、肿瘤生长或肿瘤转移的任何整体或部分基因序列均可包含作为模板序列。

[0331] 血管新生基因能促进新血管的形成。特别受关注的是血管内皮生长因子(VEGF)(Reich,et al.,Mol.Vis.9:210(2003))。

[0332] 免疫调节基因是调控一种或多种免疫反应的基因。免疫调节基因的例子包括细胞因子(cytokines),诸如生长因子(例如,TGF- α 、TGF- β 、EGF、FGF、IGF、NGF、PDGF、CGF、GM-

CSF、SCF等),白细胞介素(例如,IL-2、IL-4、IL-12(Hill,et al.,J.Immunol.171:691(2003))、IL-15、IL-18、IL-20等),干扰素(例如,IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 等)和TNF。Fas和Fas配体基因也是受关注的免疫调节目标序列(Song,et al.,Nat.Med.9:347(2003))。在造血细胞和淋巴细胞中编码二级信号分子的基因也包含在本发明中,例如,Tec家族激酶,诸如Bruton's酪氨酸激酶(Btk)(Heinonen,et al.,FEBS Lett.527:274(2002))。

[0333] 本发明的细胞受体配体可以是蛋白或类固醇分子。细胞受体配体包括能与细胞表面受体(例如,胰岛素受体、EPO受体、G-蛋白偶联受体,具有酪氨酸激酶活性的受体,细胞因子受体,生长因子受体等)结合以调控(例如,抑制、激活等)其中涉及该受体的生理路径(例如,葡萄糖水平调控、血细胞发展、有丝分裂发生等)的配体。细胞表面受体配体的例子包括细胞因子、生长因子、白细胞介素、干扰素、促红细胞生成素(EPO)、胰岛素、胰高血糖素、G-蛋白偶联受体配体等)。编码用于三核苷酸重复(例如,CAG重复)的扩增的模板在使由三核苷酸重复的扩增引发的神经变性失调(disorder)中的致病序列沉默方面找到用途,所述神经变性失调诸如脊髓延髓性肌萎缩和亨廷顿舞蹈症(Caplen,et al.,Hum.Mol.Genet.11:175(2002))。细胞受体配体还包括不与细胞表面受体结合而是与细胞内受体(例如,位于细胞核和细胞质中的类固醇受体,位于内质网中的肌醇磷酸酯受体)结合的配体。细胞内受体配体的例子包括亲脂性激素如类固醇激素,肌醇三磷酸酯和胞分泌肽激素。

[0334] 定义

[0335] 如本文所用的,术语“烷基”包括含有1-10个碳原子的那些烷基基团。烷基基团可以是直链或支链的。“烷基”的例子包括甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异-、仲-和叔-丁基、戊基、异戊基、己基、3-甲基己基、庚基、辛基、壬基、3-乙基丁基等。优选的烷基基团是C₁-C₆烷基。本发明的烷基基团可任选地被如本文所提供的多种基团取代。因此,任何可用于取代的碳原子可进一步与多种取代基相结合,诸如,例如,卤素、OH、NO₂、CN、NH₂、C₁-C₈烷基、C₁-C₈烷氧基、NH(C₁-C₈烷基)、N(C₁-C₈烷基)(C₁-C₈烷基)、C₃-C₁₀环烷基、(C₃-C₁₀环烷基)烷基、(C₃-C₁₀环烷基)烷氧基、C₂-C₉杂环烷基、C₁-C₈烯基、C₁-C₈炔基、卤代(C₁-C₈)烷基、卤代(C₁-C₈)烷氧基、氧代、氨基(C₁-C₈)烷基、单-和双(C₁-C₈烷基)氨基(C₁-C₈)烷基、C₁-C₈酰基、C₁-C₈酰氧基、C₁-C₈磺酰基、C₁-C₈硫代基团、C₁-C₈亚磺酰氨基和C₁-C₈氨磺酰基。

[0336] 术语“亚烷基”是指优选具有1-5个且更优选具有1-3个碳原子的二价饱和脂族烃基基团,其可以是直链或支链的。该术语的例子可通过以下基团来例示:诸如亚甲基(-CH₂-)、亚乙基(-CH₂CH₂-)、正-亚丙基(-CH₂CH₂CH₂-)、异-亚丙基(-CH₂CH(CH₃)-)等。

[0337] 术语“亚烷氧基(alkyleneoxy)”是指与氧结合的二价饱和脂族烃基基团,其中所述脂族烃基基团优选具有1-5个且更优选具有1-3个碳原子,该基团可为直链或支链的。

[0338] 术语“芳基”是指含有至少一个芳环的芳族烃环系统。所述芳环可任选与其它芳烃环或非芳烃环稠合或以其它方式结合。芳基基团的例子包括,例如,苯基、萘基、蒽基、1,2,3,4-四氢化萘基、茛基、2,3-二氢茛基和联苯基。优选的芳基基团的例子包括苯基、萘基、1,2,3,4-四氢化萘基和2,3-二氢茛基。更优选的芳基基团是苯基和萘基。最优选的是苯基。本发明的芳基基团可任选地被如本文所提供的多种基团取代。因此,芳环系统中存在的可用于取代的任何碳原子可进一步与多种环取代基结合,诸如,例如,卤素、OH、NO₂、CN、NH₂、C₁-C₈烷基、C₁-C₈烷氧基、NH(C₁-C₈烷基)、N(C₁-C₈烷基)(C₁-C₈烷基)、C₃-C₁₀环烷基、(C₃-C₁₀环烷基)烷基、(C₃-C₁₀环烷基)烷氧基、C₂-C₉杂环烷基、C₁-C₈烯基、C₁-C₈炔基、卤代(C₁-C₈)烷基、卤

代(C₁-C₈)烷氧基、氧代、氨基(C₁-C₈)烷基、单-和二(C₁-C₈烷基)氨基(C₁-C₈)烷基、C₁-C₈酰基、C₁-C₈酰氧基、C₁-C₈磺酰基、C₁-C₈硫代基团、C₁-C₈亚磺酰氨基和C₁-C₈氨磺酰基。

[0339] 术语“环烷基”是指C₃-C₈环状烃基。环烷基的例子包括环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基和环辛基。更优选的是C₃-C₆环烷基基团。本发明的环烷基基团可任选地被本文提供的多种基团取代。因此，环烷基环系统中存在的可用于取代的任何碳原子可进一步与多种环取代基结合，诸如，例如，卤素、OH、NO₂、CN、NH、C₁-C₈烷基、C₁-C₈烷氧基、NH(C₁-C₈烷基)、N(C₁-C₈烷基)(C₁-C₈烷基)、C₃-C₁₀环烷基、(C₃-C₁₀环烷基)烷基、(C₃-C₁₀环烷基)烷氧基、C₂-C₉杂环烷基、C₁-C₈烯基、C₁-C₈炔基、卤代(C₁-C₈)烷基、卤代(C₁-C₈)烷氧基、氧代、氨基(C₁-C₈)烷基、单-和二(C₁-C₈烷基)氨基(C₁-C₈)烷基。

[0340] 术语“杂环烷基”是指含有至少一个选自氮、氧和硫的杂原子的环或环系统，其中所述杂原子在非芳环中且所述环系统通过非芳环(之一)中的成员连接到母体基团。所述杂环烷基环任选与其它杂环烷基环和/或非芳烃环和/或苯环稠合。因此，适用于本发明的杂环烷基基团具有至少3个成员并且可以具有多达20成员。优选的杂环烷基基团具有3-10个成员。某些更优选的杂环烷基基团具有8-10个成员。其它更优选的杂环烷基基团具有5或6个成员。杂环烷基基团的例子包括，例如，1,2,3,4-四氢异喹啉基、1,2-二氢喹啉基、1,2,3,4-四氢喹啉基、苯并[1,4]噁嗪基、2,3-二氢苯并[1,4]噁嗪基、二氢吡啶基、苯并[1,3]二氧杂环戊烯基、2H-苯并吡喃基、哌嗪基、吗啉基、哌啶基、哌嗪基、四氢呋喃基、吡咯烷基、吡啶酮基(pyridinonyl)、氮杂环丁烷基、吡丙啶基和吡唑烷基。优选的杂环烷基基团包括哌啶基、哌嗪基、吗啉基、吡咯烷基、吡啶酮基、二氢吡咯烷基、氮杂环丁烷基、吡丙啶基、1,2,3,4-四氢喹啉基、2,3-二氢苯并[1,4]噁嗪基、二氢吡啶基、苯并[1,3]二氧杂环戊烯基和吡咯烷酮基(pyrrolidinonyl)。更优选的杂环烷基基团是吡咯烷基、哌啶基、氮杂环丁烷基、吡丙啶基、哌嗪基、吗啉基、1,2,3,4-四氢喹啉基、2,3-二氢苯并[1,4]噁嗪基、二氢吡啶基和苯并[1,3]二氧杂环戊烯基。本发明的杂环烷基基团可任选地被本文提供的多种基团取代。因此，存在于杂环烷基环中的可用于取代的任何原子可进一步与多种环取代基结合，诸如，例如，卤素、OH、NO₂、CN、NH₂、C₁-C₈烷基、C₁-C₈烷氧基、NH(C₁-C₈烷基)、N(C₁-C₈烷基)(C₁-C₈烷基)、C₃-C₁₀环烷基、(C₃-C₁₀环烷基)烷基、(C₃-C₁₀环烷基)烷氧基、C₂-C₉杂环烷基、C₁-C₈烯基、C₁-C₈炔基、卤代(C₁-C₈)烷基、卤代(C₁-C₈)烷氧基、氧代、氨基(C₁-C₈)烷基以及单-和二(C₁-C₈烷基)氨基(C₁-C₈)烷基。

[0341] 术语“杂芳基”是指包含至少一个选自氮、氧和硫的杂原子的芳环系统，所述环系统通过芳环(之一)的一个成员连接到母体基团上。所述杂芳基环可与一个或多个杂芳基环、芳族或非芳族烃环或杂环烷基环稠合。因此，适用于本发明的杂芳基基团具有至少5个成员，并且可具有多达20个成员。杂芳基基团的例子包括，例如，吡啶基、呋喃基、噻吩基、5,6,7,8-四氢异喹啉基和嘧啶基。优选的杂芳基基团包括噻吩基、苯并噻吩基、吡啶基、喹啉基、吡唑基、嘧啶基、咪唑基、苯并咪唑基、呋喃基、苯并呋喃基、二苯并呋喃基、噻唑基、苯并噻唑基、异噻唑基、噁二唑基、异噻唑基、苯并异噻唑基、三唑基、吡咯基、吡唑基、5,6-二氢喹啉基、4,5,6,7-四氢吡啶基、4,5-二氢-2H-吡啶基、5,6-二氢喹啉基、吡唑基和苯并吡唑基。更优选的杂芳基基团是苯并噻唑基、吡啶基、吡唑基和喹啉基。本发明的杂芳基基团可任选地被本文提供的多种基团取代。因此，存在于杂芳基环系统中并且可用于取代的任何碳原子可进一步与多种环取代基结合，诸如，例如，卤素、OH、NO₂、CN、NH₂、C₁-C₈烷基、C₁-

C₈烷氧基、NH(C₁-C₈烷基)、N(C₁-C₈烷基)(C₁-C₈烷基)、C₃-C₁₀环烷基、(C₃-C₁₀环烷基)烷基、(C₃-C₁₀环烷基)烷氧基、C₂-C₉杂环烷基、C₁-C₈烯基、C₁-C₈炔基、卤代(C₁-C₈)烷基、卤代(C₁-C₈)烷氧基、氧代、氨基(C₁-C₈)烷基以及单-和二(C₁-C₈烷基)氨基(C₁-C₈)烷基。

[0342] 本文所使用的“抗增殖活性”是指针对特征在于如本领域已知的未调节的细胞生长或复制的任何疾病、不良状态、特性、基因型或显型的生物活性；包括白血病，例如，急性粒细胞性白血病(AML)、慢性粒细胞性白血病(CML)、急性淋巴细胞性白血病(ALL)和慢性淋巴细胞性白血病，与AIDS相关的癌症，诸如卡波济肉瘤；乳腺癌；骨癌，诸如骨肉瘤、软骨肉瘤、尤因肉瘤(Ewing's sarcoma)、纤维肉瘤、巨细胞瘤、黏质瘤和脊索瘤；脑癌，诸如脑膜瘤、胶质母细胞瘤、低级星形细胞瘤、少突胶质细胞瘤、垂体瘤、神经鞘瘤和转移性脑癌；头颈部癌症，包括多种淋巴瘤诸如套细胞淋巴瘤、非何杰金氏淋巴瘤，腺瘤，鳞状细胞癌，喉癌，胆囊和胆管癌，视网膜癌症诸如成视网膜细胞瘤，食管癌，胃癌，多发性骨髓瘤，卵巢癌，子宫癌，甲状腺癌，睾丸癌，子宫内膜癌，黑色素瘤，结肠直肠癌，肺癌，膀胱癌，前列腺癌，肺癌(包括非小细胞肺癌)，胰腺癌，肉瘤，维尔姆斯氏瘤(Wilms' tumor)，宫颈癌，头颈癌，皮肤癌，鼻咽癌，脂肪肉瘤，上皮细胞癌，肾细胞癌，胆囊腺癌，腮腺癌，子宫内膜肉瘤，多抗药性癌症；以及增生性疾病和不良状态，诸如与肿瘤血管生成相关的新血管生成，黄斑变形(例如，湿/干性AMD)，角膜新血管生成，糖尿病性视网膜病，新血管青光眼，近视性变性以及其它增生性疾病和不良状态，诸如再狭窄和多囊性肾病，以及能在单独或与其它治疗组合的情况下对细胞或组织中与疾病相关的基因表达的调控做出反应的任何其它癌症或增生性疾病、不良状态、特性、基因型或显型。

[0343] 术语“适配体”是指与另一种分子结合的核酸。这种结合相互作用不包括例子为Watson-Crick碱基对形成(例如，A与U或T结合以及G与C结合)的标准核酸/核酸氢键形成，但包括所有其它类型的非共价(或在某些情况中，为共价的)结合。非共价结合的非限制性例子包括氢键形成、静电相互作用、范德华相互作用以及疏水相互作用。适配体通过这些相互作用中的任一种或全部或者在某些情况中通过共价相互作用与另一种分子结合。适配体与另一种分子的共价结合可发生在以下情况下，即当所述适配体或目标分子含有化学活性或光反应性部分时。术语“适配体”是指能与预期的目标物质形成复合物的核酸。“靶向特异性”表示所述适配体与目标分析物的亲和力程度比其与污染物质的亲和力程度更高。

[0344] 本文所用的术语“生物活性分子”是指能引发或改变系统中的生物反应的化合物或分子。生物活性分子的非限制性例子包括抗体(例如，单克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体等)、胆固醇、激素、抗病毒剂、肽、蛋白质、化疗剂、小分子、维生素、辅因子、核苷、核苷酸、寡核苷酸、酶促核酸(例如，核酶等)、反义核酸、三链结构寡核苷酸、2,5-A嵌合体、dsRNA(例如，siRNA、siRNA等)、等位酶、适配体、诱杀剂(decoys)、核蛋白体RNA、RNA或DNA或者RNA与DNA的组合的反义多核苷酸、miRNA、shRNA，以及编码治疗有效蛋白的遗传DNA、cDNA或mRNA的多核苷酸，以及它们的类似物。本发明的生物活性分子还包括能调控其它生物活性分子的药代动力学和/或药效学的分子，例如，脂质和聚合物，诸如聚胺、聚酰胺、聚乙二醇和其它聚醚。在某些实施方式中，术语生物活性分子与本文中的术语“分子”或“所关注的分子”互换使用。

[0345] 本文所用的“阳离子脂质”表示任何在大致生理pH下具有净正电荷的亲脂性化合物，诸如具有式I-VI中任一个的化合物。

[0346] 本文所用的“中性脂质”表示在大致生理pH下不带有净电荷的不同于本文所定义的阳离子脂质的任何亲脂性化合物。在大致生理pH下不具有净电荷的合适的化合物包括两性离子。

[0347] 如本文所用的，“细胞”以其一般生物学意义使用，并且不指整个多细胞生物体，例如，特别不指人。细胞可存在于生物体中，例如，禽类、植物和哺乳动物，诸如人、牛、绵羊、猿、猴、猪、狗和猫。细胞可以是原核的（例如，细菌细胞）或真核的（例如，哺乳动物或植物细胞）。细胞可以是体细胞或生殖细胞起源的、全能细胞或多能细胞的、分裂或非分裂的。细胞也可来自或可包括配子或胚胎，干细胞或完全分化细胞。

[0348] 本文所用的术语“双链RNA”或“dsRNA”是指能进行RNA干扰的双链RNA分子，包括短干扰RNA(siRNA)。

[0349] “基因”是指编码RNA的核酸，例如，核酸序列，包括但不限于，编码多肽的结构基因。基因或目标基因也能编码功能RNA(frRNA)或非编码RNA(ncRNA)，诸如小模板RNA(stRNA)、微RNA(miRNA)、小核RNA(snRNA)、短干扰RNA(siRNA)、核仁小RNA(snRNA)、核蛋白体RNA(rRNA)、转移RNA(tRNA)及它们的前体RNAs。

[0350] “抑制(inhibit或inhibition)”表示基因的表达或者编码一种或多种蛋白或蛋白子单元的RNA分子或等效RNA分子的水平或者一种或多种蛋白或蛋白子单元的活性被降低到低于在不存在核酸分子及本发明的分子的情况下所观察到的水平。在一个实施方式中，利用siNA分子的抑制低于在惰性或削弱分子的存在下所观察到的水平。在另一个实施方式中，利用siNA分子的抑制低于在存在例如具有颠倒序列(scrambled sequence)或具有错配的siNA分子的情况下所观察到的水平。在另一个实施方式中，利用本发明的核酸分子进行的基因表达的抑制在存在核酸分子时大于在不存在核酸分子时的水平。在一个实施方式中，基因表达的抑制与转录后的沉默（诸如RNAi介导的目标核酸分子（例如RNA）的解离）或对翻译的抑制有关。在一个实施方式中，抑制与转录前的沉默有关。

[0351] 术语“连接体”和“连接基团”是指将一个或多个分子彼此连接的多价的、优选二价的部分。例子是将聚合物部分G的多个部分连接在一起或将靶向配体T连接到聚合物部分G的部分。连接体可以是生物可降解或生物稳定的。生物可降解的连接体被设计为可对其稳定性进行调控移以实现特定目的，诸如递送到特定的组织或细胞类型。合适的连接基团的例子包括以下基团： $-C(O)-$ 、 $-O-$ 、 $-O-C(O)O-$ 、 $-C(O)CH_2CH_2C(O)-$ 、 $-S-S-$ 、 $-NR^3-$ 、 $-NR^3C(O)O-$ 、 $-OC(O)NR^3-$ 、 $-NR^3C(O)-$ 、 $-C(O)NR^3-$ 、 $-NR^3C(O)NR^3-$ 、 $-$ 亚烷基 $-NR^3C(O)O-$ 、 $-$ 亚烷基 $-NR^3C(O)NR^3-$ 、 $-$ 亚烷基 $-OC(O)NR^3-$ 、 $-$ 亚烷基 $-NR^3-$ 、 $-$ 亚烷基 $-O-$ 、 $-$ 亚烷基 $-NR^3C(O)-$ 、 $-$ 亚烷基 $-C(O)NR^3-$ 、 $-NR^3C(O)O-$ 亚烷基 $-$ 、 $-NR^3C(O)NR^3-$ 亚烷基 $-$ 、 $-OC(O)NR^3-$ 亚烷基 $-$ 、 $-NR^3-$ 亚烷基 $-$ 、 $-O-$ 亚烷基 $-$ 、 $-NR^3C(O)-$ 亚烷基 $-$ 、 $-C(O)NR^3-$ 亚烷基 $-$ 、 $-$ 亚烷基 $-NR^3C(O)O-$ 亚烷基 $-$ 、 $-$ 亚烷基 $-NR^3C(O)NR^3-$ 亚烷基 $-$ 、 $-$ 亚烷基 $-OC(O)NR^3-$ 亚烷基 $-$ 、 $-$ 亚烷基 $-NR^3-$ 亚烷基 $-$ 、 $-$ 亚烷基 $-O-$ 亚烷基 $-$ 、 $-$ 亚烷基 $-NR^3C(O)-$ 亚烷基 $-$ 、 $-C(O)NR^3-$ 亚烷基 $-$ 、 $-NR^3C(O)O-$ 亚烷基氧基 $-$ 、 $-NR^3C(O)NR^3-$ 亚烷基氧基 $-$ 、 $-OC(O)NR^3-$ 亚烷基氧基 $-$ 、 $-NR^3-$ 亚烷基氧基 $-$ 、 $-O-$ 亚烷基氧基 $-$ 、 $-NR^3C(O)-$ 亚烷基氧基 $-$ 、 $-C(O)NR^3-$ 亚烷基氧基 $-$ 和 $-$ 亚烷基氧基 $-NR^3C(O)O-$ 亚烷基氧基 $-$ ，其中 R^3 是氢或任选取代的烷基，以及

[0352] 

[0353] 其中

[0354] **C**选自芳基、取代芳基、环烷基、取代环烷基、杂芳基、取代杂芳基、杂环基和取代杂环基,且D和E独立地选自化学键、-O-、CO、-NR³-、-NR³C(O)O-、-OC(O)NR³-、-NR³C(O)-、-C(O)NR³-、-NR³C(O)NR³-、-亚烷基-NR³C(O)O-、-亚烷基-NR³C(O)NR³-、-亚烷基-OC(O)NR³-、-亚烷基-NR³-、-亚烷基-O-、-亚烷基-NR³C(O)-、亚烷基-C(O)NR³-、-NR³C(O)O-亚烷基-、-NR³C(O)NR³-亚烷基-、-OC(O)NR³-亚烷基-、-NR³-亚烷基-、-O-亚烷基-、-NR³C(O)-亚烷基-、-NR³C(O)O-亚烷氧基-、-NR³C(O)NR³-亚烷氧基-、-OC(O)NR³-亚烷氧基-、-NR³-亚烷氧基-、-O-亚烷氧基-、-NR³C(O)-亚烷氧基-、-C(O)NR³-亚烷氧基-、-亚烷氧基-NR³C(O)O-亚烷氧基-、-C(O)NR³-亚烷基-、-亚烷基-NR³C(O)O-亚烷基-、-亚烷基-NR³C(O)NR³-亚烷基-、-亚烷基-OC(O)NR³-亚烷基-、-亚烷基-NR³-亚烷基-、亚烷基-O-亚烷基-、-亚烷基-NR³C(O)-亚烷基-和-C(O)NR³-亚烷基-,其中R³如上所定义。

[0355] 术语“靶向配体”是指能直接或间接与另一种化合物(诸如受体)相互作用的任何化合物或分子,诸如药物、肽、激素或神经传递介质。与配体相互作用的受体可以存在于细胞表面上,或者可以另外地是细胞间受体。配体与受体的相互作用可导致生物化学反应,或者可简单地是一种物理相互作用或联系。配体的非限制性例子包括药理学活性的小分子、溶内体剂(endosomolytic agent)、融合肽、细胞膜渗透剂、电荷掩蔽剂和核酸。配体的其它非限制性例子包括糖和碳水化合物,诸如半乳糖、氨基半乳糖和N-乙酰基氨基半乳糖;激素,诸如雌激素、睾丸激素、黄体酮、类皮质酮(glucocortisone)、肾上腺素、胰岛素、胰高血糖素、皮质醇、维生素D、甲状腺激素、视黄酸和生长激素;生长因子,诸如VEGF、EGF、NGF和PDGF;胆固醇;胆汁酸;神经传递介质,诸如GABA、谷氨酸盐、乙酰胆碱;NOGO;肌醇三磷酸酯;二乙酰基甘油;肾上腺素;去甲肾上腺素;肽,维生素诸如叶酸盐、吡哆醇和生物素,药物诸如乙酰水杨酸和萘普生,抗体,以及能在体内或体外与受体相互作用的的任何其它分子。配体可使用连接分子连接到本发明的化合物上,所述连接分子诸如酰胺、羰基、酯、肽、二硫化物、硅烷、核苷、脱碱基核苷(abasic nucleoside)、聚醚、聚胺、聚酰胺、糖类、脂质、聚炔、磷酸酯、氨基磷酸酯、硫代磷酸酯、烷基磷酸酯或光不稳定的连接体。在一个实施方式中,所述连接体是生物可降解的连接体。适用于解离的条件包括但不限于pH、UV照射、酶促活性、温度、水解、消除和取代反应以及连接键的热力学性质。

[0356] 如本文所用的,术语“脂质”是指任何亲脂性化合物。脂质化合物的非限制性例子包括脂肪酸及其衍生物,包括直链、支链、饱和及不饱和的脂肪酸、类胡萝卜素、萜、胆汁酸和类固醇,包括胆固醇以及其衍生物或类似物。

[0357] 术语“脂质颗粒”或“脂质颗粒组合物”是指包含一种或多种单独或与阳离子脂质、中性脂质和/或聚乙二醇-二酰基甘油辄合物(即,聚乙二醇二酰基甘油(PEG-DAG)、PEG-胆固醇或PEG-DMB)组合的生物活性分子的组合物。经配制的分子组合物可进一步包含胆固醇或胆固醇衍生物。本发明的阳离子脂质可包括具有式I-VI中任一个的化合物、N,N-二油酰基-N,N-二甲基氯化铵(DODAC)、N,N-二硬脂酰基-N,N-二甲基溴化铵(DDAB)、N-(1-(2,3-二油酰氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTAP)、N-(1-(2,3-二油酰氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTMA)、N,N-二甲基-2,3-二油酰氧基)丙胺(DODMA)、1,2-二油酰基-3-二甲基铵-丙烷(DODAP)、1,2-二油酰基氨基甲酰基-3-二甲基铵-丙烷(DOCDAP)、1,2-二亚油酰基(Dilinoyl)-3-二甲基铵-丙烷(DLINDAP)、3-二甲氨基-2-(胆甾-5-烯-3-β-氧基丁-4-氧

基)-1-(顺式,顺式-9,12-十八碳二烯氧基)丙烷(CLinDMA)、2-[5'-(胆甾-5-烯-3-β-氧基)-3'-氧杂戊氧基)-3-二甲基-1-(顺式,顺式-9',12'-十八碳二烯氧基)丙烷(CpLinDMA)、N,N-二甲基-3,4-二油酰氧基苄胺(DMOBA)和/或其混合物。中性脂质可包含二油酰基磷脂酰基乙醇胺(DOPE)、棕榈酰基油酰基磷脂酰基胆碱(POPC)、卵磷脂酰基胆碱(EPC)、二硬脂酰基磷脂酰基胆碱(DSPC)、胆固醇和/或混合物。PEG 衍合物可包含PEG-二月桂基甘油(C12)、PEG-二肉豆蔻基甘油(C14)、PEG-二棕榈酰基甘油(C16)、PEG-二硬脂基(disteryl)甘油(C18)、PEG-二月桂基咪唑双酰胺(C12)、PEG-二肉豆蔻基咪唑双酰胺(C14)、PEG-二棕榈酰基咪唑双酰胺(C16)、PEG-二硬脂基咪唑双酰胺(C18)、PEG-胆固醇或PEG-DMB。阳离子脂质组分可占制剂中存在的总脂质的约2%到约60%、约5%到约45%、约5%到约15%或约40%到约50%。中性脂质组分可占制剂中存在的总脂质的约5%到约90%或约20%到约85%。PEG-DAG 衍合物(例如,聚乙二醇二酰基甘油(PEG-DAG)、PEG-胆固醇或PEG-DMB)可占制剂中存在的总脂质的约1%到约20%或约4%到约15%。胆固醇组分可占制剂中存在的总脂质的约10%到约60%或约20%到约45%。在一个实施方式中,经配制的本发明的分子组合物包括占制剂中存在的总脂质的约7.5%的阳离子脂质组分、占制剂中存在的总脂质的约82.5%的中性脂质和占制剂中存在的总脂质的约10%的PEG 衍合物。在一个实施方式中,经配制的本发明的分子组合物包括生物活性分子、DODMA、DSPC和PEG-DAG 衍合物。在一个实施方式中,所述PEG-DAG 衍合物是PEG-二月桂基甘油(C12)、PEG-二肉豆蔻基甘油(C14)、PEG-二棕榈酰基甘油(C16)或PEG-二硬脂基甘油(C18)。在另一个实施方式中,经配制的分子组合物还包含胆固醇或胆固醇衍生物。

[0358] “纳米颗粒”意指其尺寸经测量在纳米尺度的微观颗粒。本发明的纳米颗粒通常直径在约1到约999nm的范围内,并且可包括包封或密封的生物活性分子。

[0359] “PEG”意指任何聚乙二醇或其它聚亚烷基醚或等效聚合物。

[0360] 本文所用的术语“短干扰核酸”、“siNA”、“短干扰RNA”、“siRNA”和“短干扰核酸分子”是指能通过以序列-特异性方式介导RNA干扰“RNAi”或基因沉默来抑制或向下调节基因表达或病毒复制的任何核酸分子。例如,siNA可以是包括自补偿的正义和反义区的双链核酸分子,其中反义区包括与目标核酸分子或其部分中的核苷酸序列互补的核苷酸序列,且正义区具有与目标核酸序列或其部分相对应的核苷酸序列。所述siNA可由两个独立的寡核苷酸装配,其中一链是有义链且另一链是反义链,其中反义和正义链是自补偿的(即,每一链包含与另一链中的核苷酸互补的核苷酸序列;诸如,其中反义链和有义链来自双螺旋或双链结构,例如其中双链区域为约15到约30个碱基对,例如,约15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个碱基对;反义链包括与目标核酸分子或其部分中的核苷酸序列互补的核苷酸序列,且有义链包含与目标核酸序列或其部分相对应的核苷酸序列(例如,siNA分子的约15到约25或更多个核苷酸与目标核酸或其部分互补)。可选地,所述siNA由单个寡核苷酸装配,其中所述siNA的自补偿正义和反义区通过核酸类或非核酸类连接体来连接。所述siNA可以是具有双螺旋、不对称双螺旋、发夹形或不对称发夹形次级结构的多核苷酸,所述多核苷酸具有自补偿正义和反义区,其中反义区包含与独立的目标核酸分子或其部分中的核苷酸序列互补的核苷酸序列,且正义区具有与目标核酸序列或其部分相对应的核苷酸序列。所述siNA可以是具有两个或更多个环形结构以及包含自补偿正义和反义区的主干的环形单链多核苷酸,其中反义区包括与目标核酸分子或其部分中的核苷酸序列互

补的核苷酸序列,且正义区具有与目标核苷酸序列或其部分相对应的核苷酸序列,且其中所述环形多核苷酸可在体内或体外加工以生成能介导RNAi的活性siNA分子。所述siNA还可包括具有与模板核酸分子或其部分中的核苷酸序列互补的核苷酸序列的单链多核苷酸(例如,其中这样的siNA分子不需要在所述siNA分子中存在与目标核苷酸序列或其部分相对应的核苷酸序列),其中所述单链多核苷酸可进一步包含末端的磷酸盐基团,诸如5'-磷酸盐(参见例如Martinez et al.,2002,Cell.,110,563-574和Schwarz et al.,2002,Molecular Cell,10,537-568)或5',3'-二磷酸盐。在某些实施方式中,本发明的siNA分子包含单独的正义和反义序列或区,其中所述正义和反义区通过本领域已知的核苷酸或非核苷酸连接分子共价相连,或者另外地它们通过离子相互作用、氢键、范德华相互作用、疏水相互作用和/或堆叠相互作用(stacking interactions)而非共价相连。在某些实施方式中,本发明的siNA分子包括与目标基因的核苷酸序列互补的核苷酸序列。在另一个实施方式中,本发明的siNA分子与目标基因的核苷酸序列以下述方式相互作用,所述方式导致对目标基因表达的抑制。如本文所用的,siNA分子无需限制为仅含RNA的那些分子,而是可进一步包含化学修饰的核苷酸和非核苷酸。在某些实施方式中,本发明的短干扰核酸分子缺乏包含2'-羟基(2'-OH)的核苷酸。申请人在某些实施方式中描述了不需要存在用于调节RNAi的具有2'-羟基基团的核苷酸的短干扰核酸,因此本发明的短干扰核酸分子任选不包含包括任何核糖核苷酸(例如,具有2'-OH基团的核苷酸)。然而,不需要在siNA分子内存在核糖核苷酸来支持RNAi的这样的siNA分子具有附着的连接体或多个连接体或者其它包含一个或多个具有2'-OH基团的核苷酸的附着的或相连的基团、部分或链。任选地,siNA分子可在约5、10、20、30、40或50%的核苷酸位置处包含核糖核苷酸。本发明的经修饰的短干扰核酸分子还可称为短干扰修饰寡核苷酸。如本文所用的,术语siNA意欲相当于用于描述能够介导序列特异性RNAi的核酸分子的其它术语,例如短干扰RNA(siRNA)、双链RNA(dsRNA)、微-RNA(miRNA)、短发夹RNA(shRNA)、短干扰寡核苷酸、短干扰核酸、短干扰修饰寡核苷酸、化学修饰siRNA、转录后基因沉默RNA(ptgsRNA)及其它。本发明的siNA分子的非限制性例子如2005年9月23日提交的USSN11/234,730中所示,该文献通过引用整体并入本文。这样的siNA分子与本领域中已知的介导基因表达抑制的其它核酸技术完全不同,诸如,核酶、反义、三倍体形成(triplex forming)、适配体、2,5-A嵌合体或诱杀剂寡核苷酸(decoy oligonucleotide)。

[0361] 本文所用的“目标”意指由目标基因编码的任何目标蛋白、肽或多肽。术语“目标”也指编码具有目标活性的任何目标蛋白、肽或多肽的核酸序列,诸如由目标RNA编码者。术语“目标”还意指其它目标编码序列,诸如其它目标同种型、突变目标基因、目标基因的剪接变体和目标基因多晶型物(polymorphisms)。

[0362] 药物组合物

[0363] 本发明的化合物可以含有常规无毒可药用载体、辅药和媒介物的剂量单位制剂通过口服、局部、肠胃外、吸入或喷雾或直肠施用。本文所用的术语肠胃外施用包括经皮、皮下、血管内(例如,静脉内)、肌内或胸内注射或输注技术等。另外,提供了一种包含本发明化合物以及可药用载体的药物制剂。本发明的一种或多种化合物可与一种或多种无毒可药用载体和/或稀释剂和/或辅药以及如果需要的话其它活性成分一起存在。含有本发明化合物的药物组合物可具有适于口服用途的形式,例如,作为片剂、锭剂、糖锭、水性或油性悬浮

液、可分散粉剂或颗粒、乳液剂、硬或软胶囊或者糖浆或酏剂。

[0364] 意图用于口服用途的组合物可根据本领域已知用于制备药物组合物的任何方法来制备,并且这样的组合物可包含一种或多种选自甜味剂、香味剂、着色剂和防腐剂的物质以提供药学上高品质和美味的制剂。片剂含有与适于制造片剂的无毒可药用赋形剂混合的活性成分。这些赋形剂可以是,例如,惰性稀释剂,诸如碳酸钙、碳酸钠、乳糖、磷酸钙或磷酸钠;粒化和崩解剂,例如,玉米淀粉或褐藻酸;粘合剂,例如淀粉、明胶或阿拉伯树胶;以及润滑剂,例如硬脂酸镁、硬脂酸或滑石。片剂可以是无包衣的,或者其可以通过已知技术进行包衣。在某些情况中,这样的包衣可以通过已知技术制备以延缓在胃肠道中的崩解和吸收,由此提供在较长时间内的持续作用。例如,可使用诸如甘油单硬脂酸酯或甘油二硬脂酸酯的延时物质。

[0365] 用于口服用途的制剂也可作为硬明胶胶囊呈现,其中活性成分与惰性固体稀释剂(例如硬脂酸钙、硫酸钙或高岭土)混合;或者可作为软明胶胶囊呈现,其中活性成分与水或油性介质(诸如花生油、液体石蜡或橄榄油)混合。

[0366] 用于口服用途的制剂也可作为糖锭呈现。

[0367] 水性悬浮液含有与适于制造水性悬浮剂的赋形剂混合的活性物质。这样的赋形剂是悬浮剂,例如,羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羟丙基-甲基纤维素、藻酸钠、聚乙烯吡咯烷酮、黄芪胶和阿拉伯树胶;分散或湿润剂可以是天然存在的磷脂(例如,卵磷脂)或烯化氧与脂肪酸的缩合产物(例如,聚氧乙烯硬脂酸酯)或环氧乙烷与长链脂族醇的缩合产物(例如,十七碳亚乙氧基鲸蜡醇)或环氧乙烷与衍生自脂肪酸和己糖醇的部分酯的缩合产物(诸如,聚氧乙烯山梨糖醇单油酸酯)或环氧乙烷与衍生自脂肪酸和己糖醇酐的部分酯的缩合产物(例如,聚乙烯去水山梨糖醇单油酸酯)。水性悬浮液还可包含一种或多种防腐剂(例如对羟基苯甲酸乙酯或对羟基苯甲酸正丙酯)、一种或多种着色剂、一种或多种香味剂以及一种或多种甜味剂(诸如蔗糖或糖精)。

[0368] 油性悬浮液可通过将活性成分悬浮在植物油(诸如花生油、橄榄油、芝麻油或椰子油)或者矿物油(诸如液体石蜡)中来配制。油性悬浮液可包含增稠剂(例如蜂蜡、硬石蜡或鲸蜡醇)。可加入甜味剂和香味剂以提供美味的口服制剂。这些组合物可通过加入诸如抗坏血酸的抗氧化剂来防腐。

[0369] 适用于通过加入水来制备水性悬浮液的可分散粉剂和颗粒提供了与分散或湿润剂、悬浮剂以及一种或多种防腐剂混合的活性成分。合适的分散或湿润剂或者悬浮剂可通过上面已经提及的那些来例示。其也可存在诸如甜味剂、香味剂和着色剂的其它赋形剂。

[0370] 本发明的药物组合物也可以水包油乳液剂的形式存在。油相可为植物油或矿物油或它们的混合物。合适的乳化剂可以是天然存在的树胶(例如阿拉伯树胶或黄芪胶),天然存在的磷脂(例如大豆磷脂、卵磷脂),以及衍生自脂肪酸和己糖醇、酐的酯或部分酯(例如去水山梨糖醇单油酸酯)和所述部分酯与环氧乙烷的缩合产物(例如聚氧乙烯去水山梨糖醇单油酸酯)。乳液剂还可包含甜味剂和香味剂。

[0371] 糖浆和酏剂可用甜味剂来配制,例如甘油、丙二醇、山梨糖醇、葡萄糖或蔗糖。这样的制剂也可包含缓和剂、防腐剂以及香味剂和着色剂。所述药物组合物可具有无菌可注射水性或油性悬浮液的形式。该悬浮液可根据已知技术使用上面已经提及的那些合适的分散或湿润剂以及悬浮剂来配制。无菌可注射制剂也可在无毒肠胃外可接受的稀释剂或溶剂

中的无菌可注射溶液或悬浮液,例如作为在1,3-丁二醇中的溶液。水、林格氏溶液和等渗氯化钠溶液在可采用的可接受的载剂和溶剂之列。另外,无菌的不挥发油通常用作溶剂或悬浮介质。为此目的,任何温和的不挥发油可被采用,包括合成的单-或双甘油酯。另外,诸如油酸的脂肪酸可用于可注射制剂的制备。

[0372] 本发明的化合物也可以栓剂的形式施用,例如,用于药物的直肠施用。这些组合物可通过以下方式配制:将药物与合适的非刺激性赋形剂相混合,所述非刺激性赋形剂在常温下为固体,但在直肠温度下是液体,因此在直肠中熔化释放药物。这样的物质包括可可油和聚乙二醇。

[0373] 本发明的化合物可在无菌介质中经肠胃外施用。根据所用的载剂和浓度,药物可悬浮或溶解在载剂中。有利地,诸如局部麻醉剂、防腐剂和缓冲剂的辅药可溶解在载剂中。

[0374] 对于眼部或其它外部组织(例如,嘴部和皮肤)的失调,所述制剂优选作为局部凝胶、喷雾剂、油膏或乳膏或者作为栓剂来施加,所述制剂含有总量为例如0.075到30%w/w、优选0.2到20%w/w且最有选0.4到15%w/w的活性物质。当配制为油膏时,活性成分可与石蜡或可与水混溶的油膏基底一起使用。

[0375] 可选地,活性成分可用水包油的乳膏基底配制为乳膏。如需要,乳膏基底的水相可包含,例如,至少30%w/w的多元醇,诸如丙二醇、丁-1,3-二醇、甘露醇、山梨糖醇、甘油、聚乙二醇及其混合物。局部制剂可理想地包含增强活性成分通过皮肤或其它受感染区域的吸收或渗透的化合物。这样的皮肤渗透增强剂的例子包括二甲亚砷及相关类似物。本发明的化合物也可通过透皮装置来施用。优选地,局部施用将使用储器及多孔膜类型的贴剂或固体基质种类的贴剂来实现。在每一种情况中,活性成分连续地从储器或微胶囊通过膜递送到活性成分可渗透的粘合剂中,所述粘合剂与受者的皮肤或粘膜接触。如果活性成分通过皮肤吸收,则将受控和预定的活性药剂流施用给受者。在微胶囊的情况中,包封剂也可用作膜。透皮贴剂可包括在带有粘合剂系统的合适溶剂体系中的化合物,诸如丙烯酸乳液剂和聚酯贴剂。本发明的乳液剂的油相可以已知方式由已知成分构成。尽管该相可仅包含乳化剂,其可包括至少一种乳化剂与脂肪和/或油的混合物。优选地,亲水性乳化剂与亲脂性乳化剂一起包含,后者用作稳定剂。还优选同时包含油和脂肪。共同地,含有或不含稳定剂的乳化剂制成了所谓的乳化蜡,且所述蜡与油和脂肪一起制成了所谓的乳化油膏基底(ointment base),所述乳化油膏基底形成了乳膏制剂的油分散相。适用于本发明的制剂中的乳化剂和乳液稳定剂包括吐温60、斯潘80、鲸蜡硬脂醇、肉豆蔻醇、甘油单硬脂酸酯和月桂基硫酸钠等。用于所述制剂的合适的油或脂肪的选择基于实现所需的化妆品性质,因为活性化合物在可能用于药物乳液制剂的大多数油中的溶解性都非常低。因此,乳膏应优选为具有合适稠度的非多脂的、非染色性的且可洗的产品,以避免从管子或其它容器中的泄漏。可使用直链或支链的、一元或二元烷基酯,诸如二异己二酸酯、硬脂酸异鲸蜡酯、椰子脂肪酸的丙二醇二酯、肉豆蔻酸异丙酯、油酸癸酯、棕榈酸异丙酯、硬脂酸丁酯、棕榈酸2-乙基己酯或支链酯的掺合物。这些可单独使用,或根据所需性质组合使用。或者可选地,可使用高熔点脂质(诸如白软石蜡和/或液体石蜡或其它矿物油)。

[0376] 适用于对眼部进行局部施用的制剂还包括眼部滴剂,其中活性成分溶解或悬浮在合适的载体中,尤其是在用于活性成分的水性溶剂中。消炎的活性成分优选以下述浓度存在于这样的制剂中:0.5到20%,有利地为0.5到10%,且特别地为约1.5%w/w。对于治疗目

的,该组合发明的活性化合物通常与适于所示施用途的一种或更多种辅药组合。如果经口施用,所述化合物可与乳糖、蔗糖、淀粉粉末、链烷酸纤维素酯、纤维素烷基酯、滑石、硬脂酸、硬脂酸镁、氧化镁、磷酸和硫酸的钠盐和钙盐、明胶、阿拉伯树胶、藻酸钠、聚乙烯吡咯烷和/或聚乙烯醇掺和,然后进行压片或装入胶囊以方便地施用。这样的胶囊或片剂可包含受控释放的制剂,如可以在活性化合物在羟丙基甲基纤维素中的分散剂所提供的那样。用于肠胃外施用的制剂可具有水性或非水性等渗无菌注射溶液或悬浮液的形式。这些溶液和悬浮液可从具有已提及用于口服施用制剂的一种或更多种载体或稀释剂的无菌粉末或颗粒来制备。所述化合物可溶解于水、聚乙二醇、丙二醇、乙醇、玉米油、棉籽油、花生油、芝麻油、苯甲醇、氯化钠和/或多种缓冲剂中。其它辅药和施用形式在制药领域中是广泛已知的。

[0377] 每日每千克体重约0.1mg到约140mg等级的剂量水平可用于治疗上面所述的不良状态(每日每患者约0.5mg到约7g)。可与载体物质组合以生产单个剂型的活性成分的量将取决于待治疗的宿主和施用的具体模式而改变。单位剂型通常含有约1mg到约500mg的活性成分。日剂量可每日分1到4次剂量施用。在皮肤不良状态的情况中,可优选对受感染的区域每日2至4次涂敷本发明化合物的局部制剂。

[0378] 然而应理解用于任何具体患者的特定剂量水平将取决于多个因素,包括所采用的特定化合物的活性、年龄、体重、总体健康、性别、饮食、施用时间、施用途和排泄速度、药物组合以及经受治疗的具体疾病的严重程度。

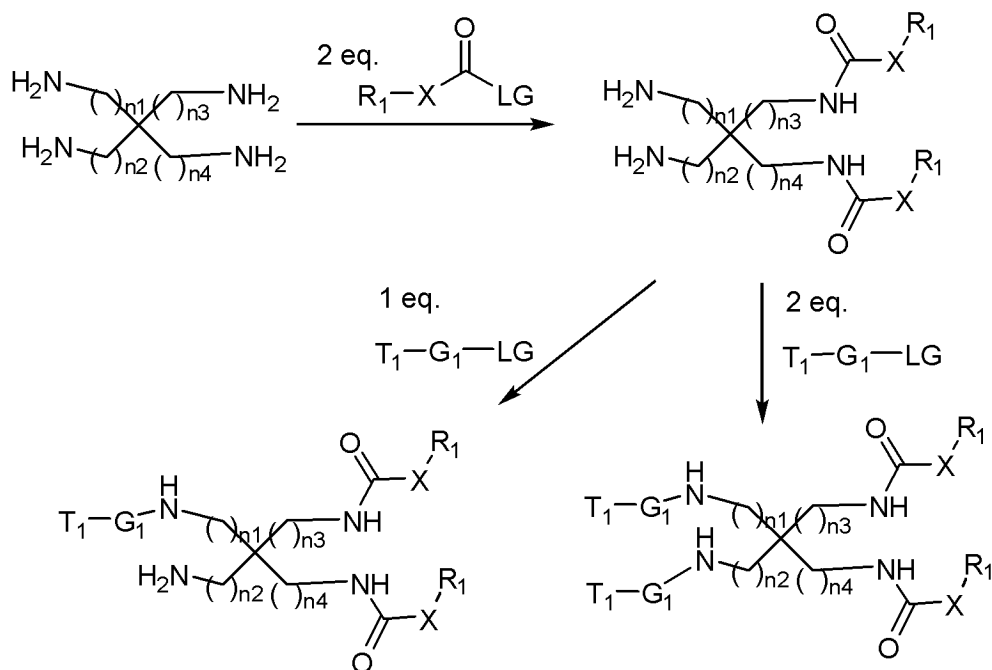
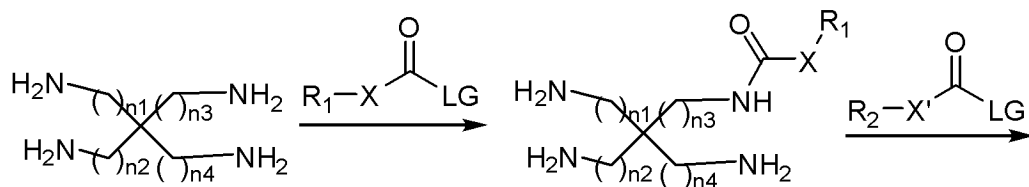
[0379] 一般程序

[0380] 用于制备本发明化合物的代表性的合成程序在下文中的以下方案中详细列出。本领域技术人员将意识到,为制备所需的化合物,原物料和反应条件是可改变的,反应的顺序可变,且可采用额外的步骤。在一些情况中,可能必须对某些反应性官能团进行保护以实现一些上述转化。大体上,对这样的保护基团的需要以及必须连接和去除这样的基团的情况对有机合成领域技术人员来说将会是很明显的。

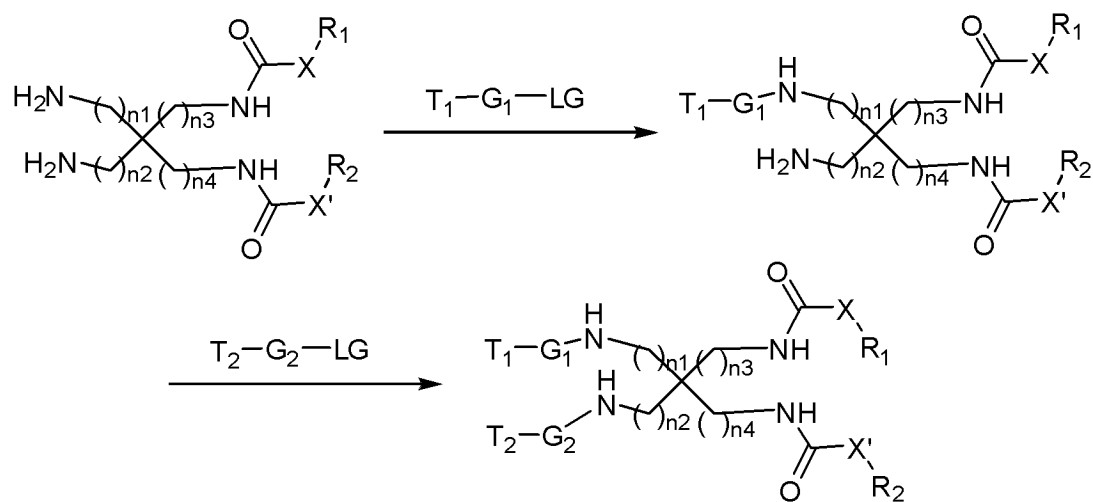
[0381] 除非另外表明, R_1 、 R_2 、 X 、 X' 、 g 、 G 、 G_1 、 G_2 、 T 、 T_1 、 T_2 、 n_1 、 n_2 、 n_3 和 n_4 具有上面所述与式I-VI相关的定义。变量LG表示合适的离去基团,包括但不限于卤素、甲苯磺酰基、甲磺酰基、三氟甲磺酰基、2,2,2-三氟乙氧基、N-羟基琥珀酰亚胺基等。

[0382] 方案1

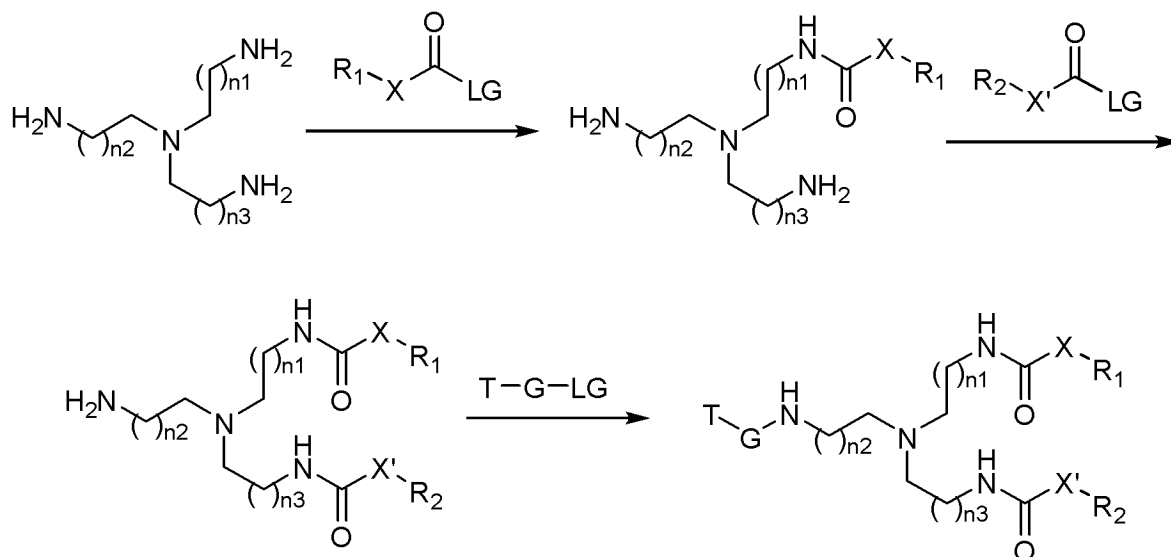
[0383]

[0384] 方案2

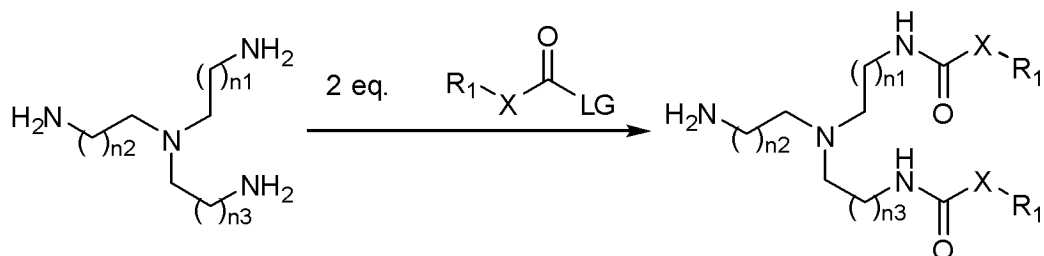
[0385]

[0386] 方案3

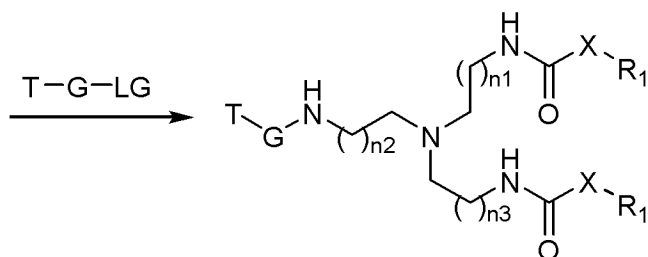
[0387]



[0388] 方案4



[0389]



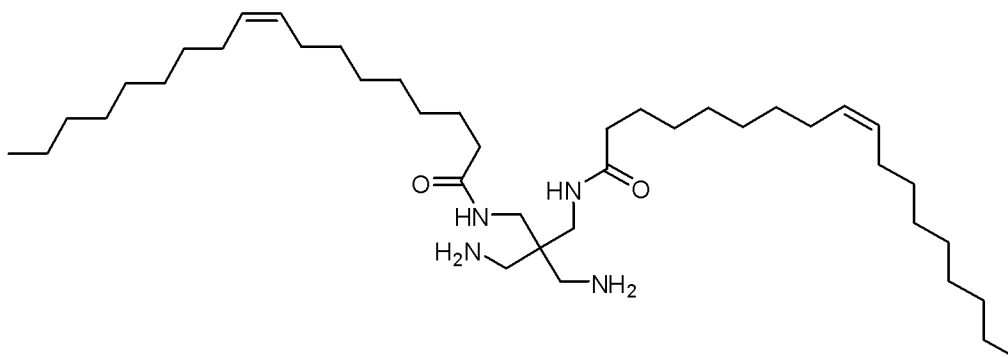
[0390] 实施例

[0391] 本发明化合物的制备通过以下实施例进一步举例说明,所述实施例并非被解释为将本发明的范围和精神限制到其中所述的具体程序和化合物。用于合成本发明化合物的代表性的方法如下所述。应理解预期目标化合物所需的取代基的性质通常决定了优选的合成方法。

[0392] 实施例1

[0393] $\text{N,N}'$ -二油酰基四(氨甲基)甲烷(“二油酰基交叉胺”)的合成

[0394]

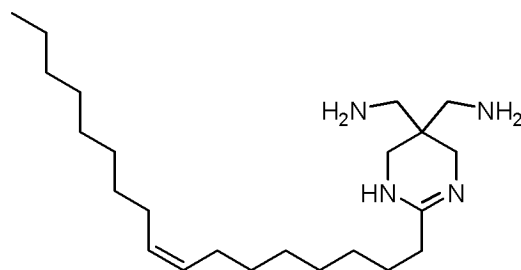


二油酰基交叉胺 (1)

[0395] 四(氨甲基)甲烷通过已知程序制备(Adil,K.et al.,Solid State Sciences,6 (2004),1229-1235)。50mL烧瓶配有回流冷凝器和磁力搅拌器。向烧瓶中装填四氯化四(氨甲基)甲烷(800mg,2.88mmol)、甲醇(10mL)和NaOMe/MeOH溶液(2.10g 5.457M,11.50mmol)。将混合物搅拌并回流4小时,然后冷却。倾析以将甲醇溶液与无机盐分离,并且将该盐再悬浮于无水乙醇(15mL)中。将悬浮液离心,并将合并的有机物真空浓缩。将残余物溶解在二氯甲烷(15mL)中并使用针筒(0.45微米过滤器)将其过滤与剩余的无机盐分离。将滤液浓缩得到定量产率的游离四(氨甲基)甲烷,其是白色半固体物质(残余的醇通过NMR估算)。NMR(D_2O) δ 2.9(s, CH_2)。

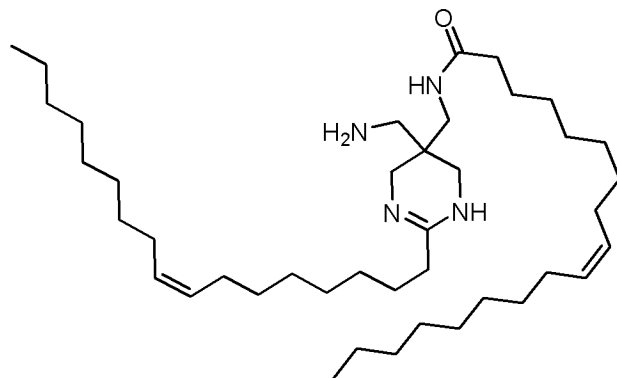
[0396] 将所得的四(氨甲基)甲烷(420mg,90%纯度,2.86mmol)溶解在无水乙醇(15mL)中并加入三氟乙酸(400mg,3.50mmol),然后加入2,2,2-三氟乙基油酸酯(2.08g,5.72mmol)[见后文,实施例3]。将均相混合物于室温反应72小时,并真空浓缩。将残余物溶解在MeOH/水(10%)/三氟乙酸(0.1%)(40mL)中,并用三氟乙酸将pH调节到约pH 2。残余物通过色谱在C-8改性硅胶上纯化,使用MeOH/水(10%)/三氟乙酸(0.1%)作为洗脱液。将N,N'-二油酰基四(氨甲基)甲烷(“二油酰基交叉胺”)作为二(三氟乙酸盐)分离(0.9g)。MS(TFA盐)661[M+1];NMR($CDCl_3$) δ 8.5(br,6H),8.05(br,2H),5.37(m,4H),3.07和2.95(拆分较差,每个4H);2.15(t,4H),2.01(m,8H),1.35(m,48H),0.9(t,6H)

[0397] 当反应在较高pH(例如,没有三氟乙酸或在NaOMe存在下)进行时,产生少量的2、3和4,它们可容易地被去除(例如色谱):

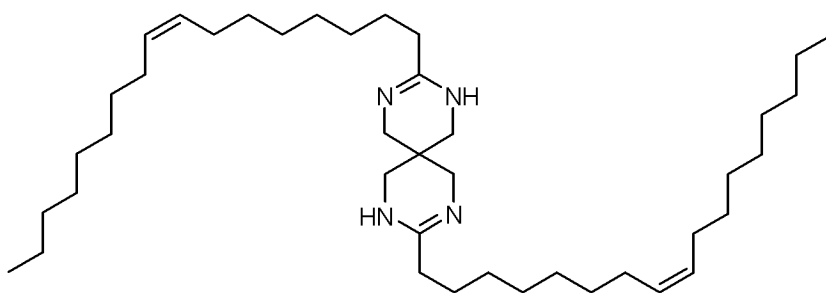


(2) MS 379.4 [M+1]

[0398]



(3) MS 643.6 [M+1]

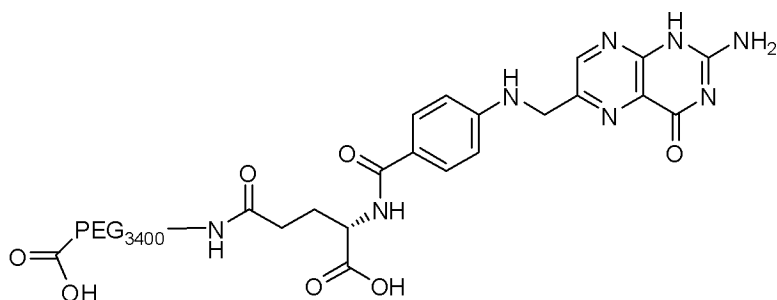


(4)

[0399] 实施例2

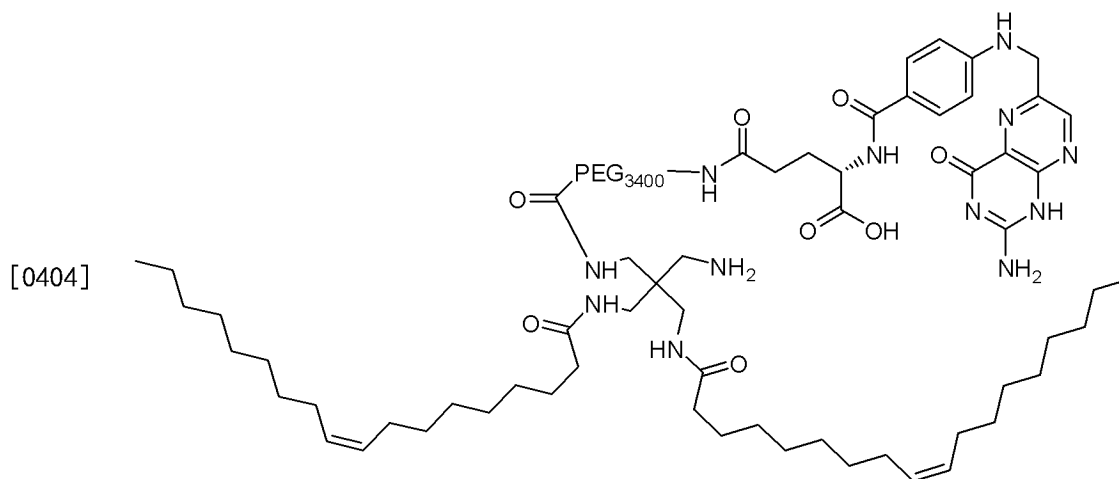
[0400] 2.1.叶酸盐-PEG3400-COOH

[0401]



[0402] 将170mg的 $\text{H}_2\text{N}-\text{PEG}_{3400}-\text{COOH}$ (Laysan制造)溶解在干DMSO(2mL)和干氯仿(2mL)中。加入Hunig's碱(15 μL),然后加入叶酸-NHS酯(60mg,通过已知方法制备,R.J.;Low,P.S.;“Methods in Molecular Medicine”,25,69-76, April 2000)。额外的80mg叶酸-NHS作为在DMSO(2.5mL)中的溶液加入。将搅拌着的混合物于室温保持24小时;真空去除氯仿,并将残余物用去离子水(60mL)稀释。使用3500D的切断膜将得到的均相黄色溶液相对去离子水进行渗析,用数滴TFA调节到2-3。在六次更换渗析浴之后,收集黄色溶液并真空浓缩,得到叶酸盐-PEG3400-COOH。

[0403] 2.2.与叶酸盐-PEG3400-COOH偶联以得到“叶酸盐-PEG-二油酰基交叉胺”(5)

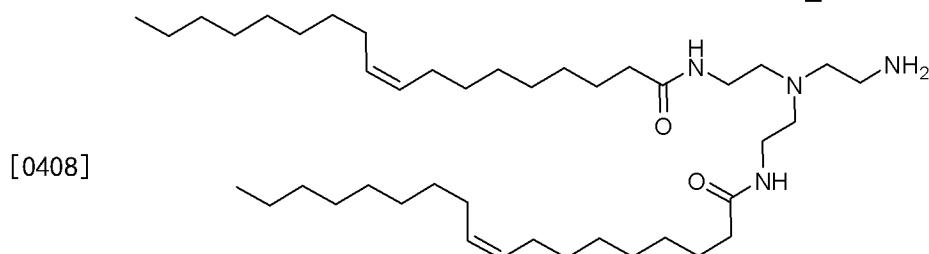


叶酸盐-PEG-二油酰基交叉胺(5)

[0405] 将150mg叶酸盐-PEG3400-COOH溶解在干DMSO(2mL)中,并加入NHS(9mg),然后加入DCC(16mg)。将混合物在黑暗中反应20小时以得到叶酸盐-PEG3400-COONHS。向该溶液中加入30mg N,N'-二油酰基四(氨甲基)甲烷在干DMSO(2mL)中的溶液。在反应混合物反应24小时之后,将其用去离子水(60mL)稀释。使用3500D的切断袋将得到的均相黄色溶液相对去离子水进行渗析,得到叶酸盐-PEG-基化的N,N'-二油酰基四(氨甲基)甲烷(“叶酸盐-PEG-二油酰基交叉胺”),其是含有未反应叶酸盐-PEG3400-COOH的约50%的混合物。

[0406] 实施例3

[0407] N,N'-二油酰基三(氨乙基)胺(“二油酰基单胺”)(6)的合成



二油酰基单胺(6)

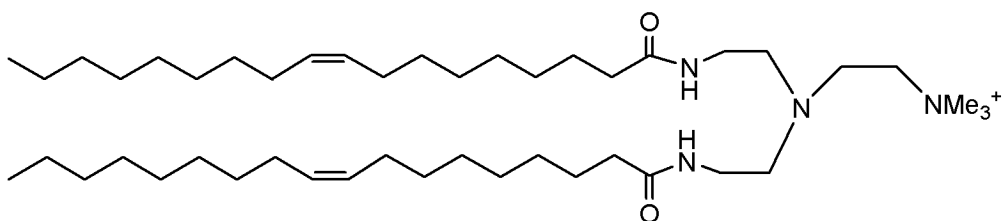
[0409] 将油酰氯(75g,250mmol)与2,2,2-三氟乙醇(60g,600mmol)一起回流加热16小时。在HCl生成(evolution)停止后,真空去除过量三氟乙醇。残余物真空蒸馏,得到87.6g油酸2,2,2-三氟乙酯,其是无色液体,沸点150°/0.3。

[0410] 将三-(2-氨乙基)胺(1.45g,10mmol)溶解在20mL乙醇中。向该溶液中加入油酸2,2,2-三氟乙酯(5.6g),并将反应混合物回流24小时。将混合物真空浓缩,残余物溶解在90%乙腈/10%水中并用三氟乙酸(TFA)酸化至pH 2-3。将该溶液在C8硅胶上进行反相色谱(洗脱液89.9%乙腈/10%水/0.1%TFA),得到1.8g N,N'-二油酰基三(氨乙基)胺(“二油酰基单胺”),为其三氟乙酸盐。MS(TFA盐)675[M+1];NMR(CDCl₃)δ7.4(br,2H),5.37(m,4H),3.55,3.37和3.05(拆分较差,总计12H),2.15(t,4H),2.01(m,8H),1.35(m,48H),0.9(t,6H)。

[0411] 实施例3A

[0412] 甲基-二油酰基单胺(6.1)的制备

[0413]



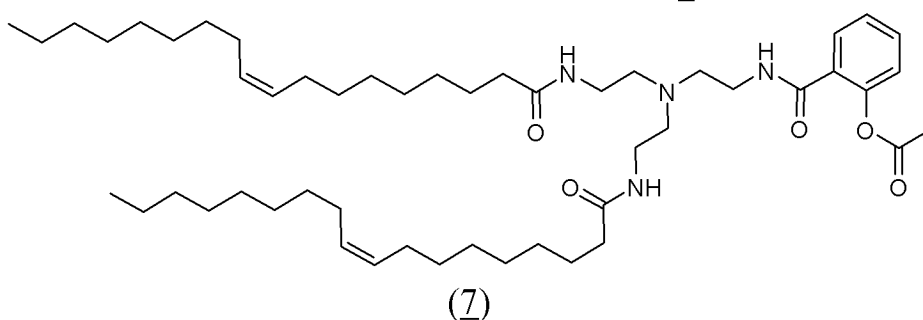
甲基-二油酰基单胺(6.1)

[0414] 标题化合物通过用过量的碘甲烷来对实施例3的产物N,N'-二油酰基三(氨乙基)胺{"二油酰基单胺"}进行甲基化来制备。

[0415] 实施例4

[0416] N,N'-二油酰基-N''-乙酰基水杨酰三(氨乙基)胺(7)的合成

[0417]



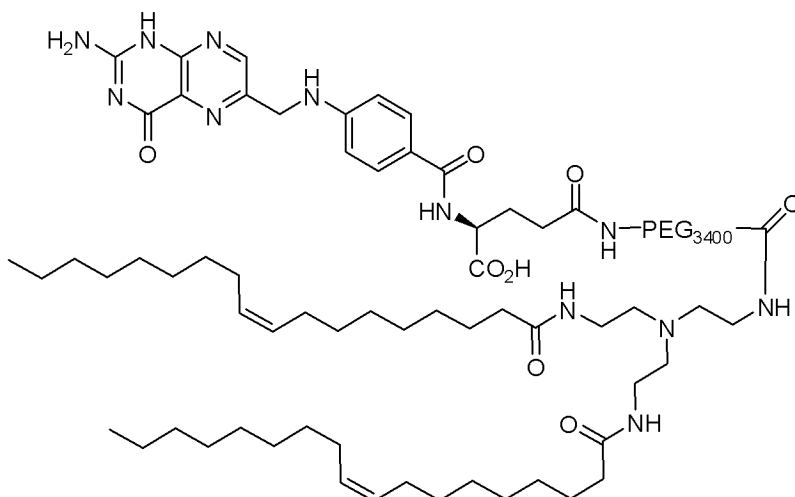
(7)

[0418] 将三氟乙酸N,N'-二油酰基-三(氨乙基)胺(80mg, 100 μ mol)溶解在5mL氯仿中并用3mL 10%K₂CO₃水溶液处理。分离有机相,干燥并真空浓缩,得到N,N'-二油酰基-三(氨乙基)胺,其是游离碱。将该物质溶解在3mL干氯仿中并将该溶液用乙酰基水杨酰氯(20mg, 100 μ mol)处理,得到标题化合物。

[0419] 实施例5

[0420] 与叶酸盐-PEG3400-COOH偶联以得到“叶酸盐-PEG-二油酰基单胺”(8)

[0421]



叶酸盐-PEG-二油酰基单胺(8)

[0422] 基本如实施例2所述由叶酸盐-PEG3400-COOH和二油烯基单胺得到叶酸盐-二油酰基单胺。

[0423] 实施例6

[0424] 二油酰基交叉胺与siRNA的复合物;纳米颗粒的形成

[0425] 所用的siRNA是意图产生外源血管内皮生长因子(VEGF)转录和蛋白水平的敲弱(knockdown)的双链核苷酸序列。所用的阳离子脂质是二油酰基交叉胺。在注射用水中单独制备siRNA(3mg/mL)和二油酰基交叉胺(5mg/mL)溶液并随后在5%右旋糖中稀释到siRNA为0.3mg/mL且二油酰基交叉胺为1.5mg/mL。使用微量滴定管将在右旋糖溶液中的siRNA添加到在右旋糖溶液中的二油酰基交叉胺中,配料比为5:1(正:负)。将该制剂于室温温育15分钟,以使得复合物形成。

[0426] 实施例7

[0427] 二油酰基交叉胺与DNA的复合物;纳米颗粒的形成

[0428] 所用的核酸是编码荧光素酶基因的质粒DNA。所用的阳离子脂质是二油酰基交叉胺。在注射用水中单独制备质粒DNA(3mg/mL)和二油酰基交叉胺(5mg/mL)溶液,并随后在5%右旋糖中稀释到质粒DNA为0.3mg/mL且二油酰基交叉胺为1.5mg/mL。使用微量滴定管将在右旋糖溶液中的质粒DNA添加到在右旋糖溶液中的二油酰基交叉胺中,配料比为5:1(正:负)。将该制剂于室温温育15分钟,以使得复合物形成。

[0429] 实施例8

[0430] 叶酸盐-PEG-二油酰基交叉胺与siRNA的复合物

[0431] 所用的siRNA是意图产生外源血管内皮生长因子(VEFG)转录和蛋白水平敲弱的双链核苷酸序列。所用的阳离子脂质是以不同摩尔比((1:1)、(2:1)、(4:1)或(10:1))与叶酸类配体轭合或与叶酸盐化二油酰基交叉胺共同配制的二油酰基交叉胺。向二油酰基交叉胺氯仿溶液中加入共同配制剂,并且如实施例9所述进行脂质体的制备。在注射用水中单独制备siRNA(3mg/mL)和叶酸盐-PEG-二油酰基交叉胺(5mg/mL)溶液,并随后用5%右旋糖稀释到siRNA为0.3mg/mL且叶酸盐-PEG-二油酰基交叉胺为1.9mg/mL。使用微量滴定管将在右旋糖溶液中的siRNA添加到在右旋糖溶液中的叶酸盐-PEG-二油酰基交叉胺,配料比为5:1(正:负)。将该制剂于室温温育15分钟,以使得复合物形成。

[0432] 实施例9

[0433] 二油酰基单胺与siRNA的复合物;纳米颗粒的形成

[0434] 所用的siRNA是意图产生外源血管内皮生长因子(VEGF)转录和蛋白水平的敲弱的双链核苷酸序列。所用的阳离子脂质是二油酰基单胺。在注射用水中单独配制siRNA(3mg/mL)和二油酰基单胺(5mg/mL)溶液,并随后在5%右旋糖中稀释到siRNA为0.3mg/mL且二油酰基单胺为1.5mg/mL。使用微量滴定管将在右旋糖溶液中的siRNA添加到在右旋糖溶液中的二油酰基单胺,配料比为5:1(正:负)。将该制剂于室温温育15分钟,以使得复合物形成。

[0435] 实施例10

[0436] 二油酰基单胺与DNA的复合物;纳米颗粒的形成

[0437] 所用的核酸是用于编码荧光素酶基因的质粒DNA,且所用的阳离子脂质是二油酰基单胺。在注射用水中单独制备质粒DNA(3mg/mL)和二油酰基单胺(5mg/mL)溶液,并随后在5%右旋糖中稀释至0.3mg/mL的质粒DNA和1.5mg/mL的二油酰基单胺。使用微量滴定管将在右旋糖溶液中的质粒DNA添加到在右旋糖溶液中的二油酰基单胺中,配料比为5:1(正:负)。将该制剂于室温温育15分钟,以使得复合物形成。

[0438] 实施例11

[0439] 用二油酰基交叉胺制备包封的siRNA

[0440] 本实施例说明了使用二油酰基交叉胺的siRNA的脂质体包封。所用的siRNA是意图产生外源血管内皮生长因子(VEGF)转录和蛋白水平的敲弱的双链核苷酸序列。所用的阳离子脂质是二油酰基交叉胺。为制备包封脂质体,将脂质溶解并混合于氯仿中以确保均匀的脂质混合物。通过旋转蒸发去除有机溶剂,得到在圆形烧瓶侧面上的薄脂质膜。通过将该圆形烧瓶置于真空泵上过夜来进一步蒸发氯仿。将得到的脂质薄膜首先溶解于100%乙醇中,然后变为50%。将溶于水中的siRNA添加到脂质体/乙醇溶液中。通过旋转蒸发系统从所述脂质体/siRNA混合物中蒸发掉乙醇。通过向包封的siRNA颗粒加入等量的10%右旋糖而将得到的纳米颗粒悬浮在5%右旋糖中。

[0441] 实施例12

[0442] 用叶酸盐-PEG-二油酰基交叉胺制备包封的siRNA

[0443] 本实施例说明了使用叶酸盐-PEG-二油酰基交叉胺的siRNA的脂质体包封。所用的siRNA是意图产生外源血管内皮生长因子(VEGF)转录和蛋白水平的敲弱的双链核苷酸序列。所用的阳离子脂质是叶酸盐-PEG-二油酰基交叉胺。为制备包封脂质体,将脂质溶解并混合于氯仿中以确保均匀的脂质混合物。通过旋转蒸发去除有机溶剂,得到在圆形烧瓶侧面上的薄脂质膜。通过将所述圆形烧瓶置于真空泵上过夜来进一步去除氯仿。将得到的脂质膜首先溶解在100%乙醇中,然后变为50%。将溶解于水的siRNA添加到脂质体/乙醇溶液中。通过旋转蒸发系统从脂质体/siRNA混合物中蒸发掉乙醇。通过向包封的siRNA颗粒中加入等量的10%右旋糖来将得到的纳米颗粒悬浮在5%右旋糖中。

[0444] 实施例13

[0445] 用带有共同配制剂的二油酰基单胺制备siRNA转染复合物

[0446] 所用的siRNA是意图产生外源血管内皮生长因子(VEGF)转录和蛋白水平的敲弱的双链核苷酸序列。二油酰基单胺以(4:1)的摩尔比与其它脂质一起配制。所用的脂质是1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-550]、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-乳糖基酰基(Lactosyl)和胆固醇。向在氯仿中的二油酰基单胺中加入共同配制剂(co-formulants)。如先前在实施例9中所述制备脂质体。在注射用水中单独配制siRNA(3mg/mL)和二油酰基单胺(5mg/mL)溶液,并随后在5%右旋糖中稀释至0.3mg/mL的siRNA和1.9mg/mL的二油酰基单胺。使用微量滴定管将在右旋糖溶液中的siRNA添加到在右旋糖溶液中的二油酰基单胺中,配料比为5:1(正:负)。将该制剂于室温温育15分钟,以使得复合物形成。

[0447] 实施例14

[0448] 用二油酰基单胺制备DNA转染复合物

[0449] 所用的核酸是编码荧光素酶基因的质粒DNA和二油酰基单胺脂质。在注射用水中单独制备质粒DNA(3mg/mL)和二油酰基单胺(5mg/mL)溶液,并随后在5%右旋糖中稀释至0.3mg/mL的质粒DNA和1.9mg/mL的二油酰基单胺。使用微量滴定管将在右旋糖溶液中的质粒DNA添加到在右旋糖溶液中的二油酰基单胺中,配料比为5:1(正:负)。将该制剂于室温温育15分钟,以使得复合物形成。

[0450] 实施例15

[0451] 用带有共同配制剂的二油酰基单胺制备DNA转染复合物

[0452] 所用的核酸是编码荧光素酶基因的质粒DNA,且所用的阳离子脂质是二油酰基单

胺。在本实施例中所使用的阳离子脂质实施例是以(4:1)的摩尔比与其它脂质配制在一起的二油酰基单胺。所用的脂质是1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-550]、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-乳糖基酰基和胆固醇。将共同配制剂添加到二油酰基单胺氯仿溶液中。如先前在实施例9中所述制备脂质体。在注射用水中单独制备DNA(3mg/mL)和二油酰基单胺共同配制剂(5mg/mL)溶液,并随后在5%右旋糖中稀释至0.3mg/mL的DNA和1.9mg/mL的二油酰基单胺。使用微量滴定管将在右旋糖溶液中的DNA添加到在右旋糖溶液中的二油酰基单胺中,配料比为5:1(正:负)。将该制剂于室温温育15分钟,以使得复合物形成。

[0453] 实施例16

[0454] 用与叶酸盐-PEG-二油酰基单胺共同配制的二油酰基单胺制备siRNA转染复合物

[0455] 所用的siRNA是意图产生外源血管内皮生长因子(VEGF)转录和蛋白水平的敲弱的双链核苷酸序列。所用的阳离子脂质是以不同摩尔比((1:1)、(2:1)、(4:1)或(10:1))与叶酸盐-PEG-二油酰基单胺共同配制的二油酰基单胺。将共同配制剂添加到二油酰基单胺氯仿溶液中。如先前在实施例9中所述制备脂质体。在注射用水中单独制备 siRNA(3mg/mL)和二油酰基单胺/叶酸盐-PEG-二油酰基单胺(5mg/mL)溶液,并随后在5%右旋糖中稀释至0.3mg/mL的siRNA和1.9mg/mL的二油酰基单胺。使用微量滴定管将在右旋糖溶液中的siRNA添加到在右旋糖溶液中的二油酰基单胺中,配料比为5:1(正:负)。将该制剂于室温温育15分钟,以使得复合物形成。

[0456] 实施例17

[0457] 用二油酰基单胺脂质体制备包封的siRNA

[0458] 所用的siRNA是意图产生外源血管内皮生长因子(VEGF)转录和蛋白水平的敲弱的双链核苷酸序列。所用的阳离子脂质是二油酰基单胺。为制备包封脂质体,将脂质溶解并混合于氯仿中以确保均匀的脂质混合物。通过旋转蒸发去除有机溶剂,得到在圆形烧瓶侧面上的薄脂质膜。通过将所述圆形烧瓶置于真空泵上过夜来进一步去除氯仿。将得到的脂质膜首先溶解在100%乙醇中,然后变为50%。将溶解于水的siRNA添加到脂质体/乙醇溶液中。通过旋转蒸发系统从脂质体/siRNA混合物中蒸发掉乙醇。通过向包封的siRNA颗粒中加入等量的10%右旋糖来将得到的纳米颗粒悬浮在5%右旋糖中。

[0459] 实施例18

[0460] 用叶酸盐-PEG-二油酰基单胺脂质体制备包封的siRNA

[0461] 所用的siRNA是意图产生外源血管内皮生长因子(VEGF)转录和蛋白水平的敲弱的双链核苷酸序列。所用的阳离子脂质是叶酸盐-PEG-二油酰基单胺。为制备包封脂质体,将脂质溶解并混合于氯仿中以确保均匀的脂质混合物。通过旋转蒸发去除有机溶剂,得到在圆形烧瓶侧面上的薄脂质膜。通过将所述圆形烧瓶置于真空泵上过夜来进一步去除氯仿。将得到的脂质膜首先溶解在100%乙醇中,然后变为50%。将溶解于水的siRNA添加到脂质体/乙醇溶液中。通过旋转蒸发系统从脂质体/siRNA混合物中蒸发掉乙醇。通过向包封的siRNA颗粒中加入等量的10%右旋糖来将得到的纳米颗粒悬浮在5%右旋糖中。

[0462] 实施例19

[0463] siRNA与二油酰基交叉胺复合物的转染活性

[0464] 如下所述在体外测定siRNA与二油酰基交叉胺复合物的转染活性。通过实施例9中

所述的方法制备包含mVEGF或荧光素酶siRNA构建物的转染复合物。将SCCVII细胞(0.5×10^5 细胞/孔;鼠鳞状上皮细胞癌)接种到在10%胎牛血清(FBS)中的24-孔组织培养板上。每个孔用在总体积为250 μ L的Dulbecco Modified Eagle's Minimal Essential Medium(DMEM)中且存在或不存在FBS的0.5 μ g复合siRNA温育6小时。当在其培养基中缺乏FBS的细胞的温育时间结束时,向转染细胞中加入用20%FBS补充的250 μ L DMEM,并进一步再温育40小时。对于在其转染培养基中具有FBS的细胞,向转染细胞中加入用10%FBS补充的250 μ L DMEM,并进一步再温育40小时。在温育时间结束时,在细胞培养基(蛋白质)或细胞溶解产物(转录体)中评价mVEGF蛋白和转录的敲弱。对于mVEGF蛋白水平测量,通过mVEGF ELISA实验直接分析细胞培养基。对于mVEGF转录分析,使用Tri-试剂溶解细胞,然后使用qRT-PCR检测试剂盒定量测量mVEGF转录水平。

[0465] 实施例20

[0466] 用二油酰基交叉胺包封的siRNA的转染活性

[0467] 本实施例举例说明了使用二油酰基单胺、二油酰基交叉胺或这两种阳离子剂的混合物的siRNA的脂质体包封。所用的siRNA是意图产生外源血管内皮生长因子(VEGF)转录和蛋白水平的敲弱的双链核苷酸序列。所用的阳离子脂质是二油酰基单胺(实施例3)、二油酰基交叉胺(实施例1)或该两者的混合物。为制备包封脂质体,将脂质溶解并混合于氯仿中以确保均匀的脂质混合物。通过旋转蒸发去除有机溶剂,得到在圆形烧瓶侧面上的薄脂质膜。通过将所述圆形烧瓶置于真空泵上过夜来进一步去除氯仿。将得到的脂质膜首先溶解在100%乙醇中,然后变为50%。将溶解于水的siRNA加入到在乙醇溶液中的脂质体中。通过旋转蒸发系统从脂质体/siRNA混合物中蒸发掉乙醇。通过向包封的siRNA颗粒中加入等量的10%右旋糖来将得到的纳米颗粒悬浮在5%右旋糖中。将SCCVII细胞(0.5×10^5 细胞/孔)接种到在10%FBS中的24-孔组织培养板中。每个孔用在总体积为250 μ L的DMEM中且存在或不存在FBS的0.5 μ g复合siRNA温育6小时。当在其培养基中缺乏FBS的细胞的温育时间结束时,向转染细胞中加入用20%FBS补充的250 μ L DMEM,并进一步再温育40小时。对于在其转染培养基中具有FBS的细胞,向转染细胞中加入用10%FBS补充的250 μ L DMEM,并进一步再温育40小时。在温育时间结束时,在细胞培养基(蛋白质)或细胞溶解产物(转录体)中评价和测量mVEGF蛋白和转录的敲弱。对于mVEGF蛋白水平的测量,通过mVEGF ELISA实验直接分析细胞培养基。对于mVEGF转录分析,使用Tri-试剂溶解细胞,然后使用qRT-PCR检测试剂盒定量测量mVEGF转录的水平。

[0468] 实施例21

[0469] 用叶酸盐-PEG-二油酰基交叉胺包封的siRNA的转染活性

[0470] 本实施例举例说明了使用叶酸盐-PEG-二油酰基单胺、叶酸盐-PEG-二油酰基交叉胺或这两种阳离子剂的混合物的siRNA的脂质体包封。所用的siRNA是意图产生外源血管内皮生长因子(VEGF)转录和蛋白水平的敲弱的双链核苷酸序列。所用的阳离子脂质是叶酸盐-PEG-二油酰基单胺(实施例5)、叶酸盐-PEG-二油酰基交叉胺脂质体(实施例2)或二者的混合物。为制备包封脂质体,将脂质溶解并混合于氯仿中以确保均匀的脂质混合物。通过旋转蒸发去除有机溶剂,得到在圆形烧瓶侧面上的薄脂质膜。通过将所述圆形烧瓶置于真空泵上过夜来进一步去除氯仿。将得到的脂质膜首先溶解在100%乙醇中,然后变为50%。将溶解于水的siRNA加入到在乙醇溶液中的脂质体中。通过旋转蒸发系统从脂质体/siRNA混

合物中蒸发掉乙醇。通过向封装的siRNA颗粒中加入等量的10%右旋糖来将得到的纳米颗粒悬浮在5%右旋糖中。将SCCVII细胞(0.5×10^5 细胞/孔)接种到在10%FBS中的24-孔组织培养板中。每个孔用在总体积为250 μ L的DMEM中且存在或不存在FBS的0.5 μ g复合siRNA温育6小时。当在其培养基中缺乏FBS的细胞的温育时间结束时,向转染细胞中加入用20%FBS补充的250 μ L DMEM,并进一步再温育40小时。对于在其转染培养基中具有FBS的细胞,向转染细胞中加入用10%FBS补充的250 μ L DMEM,并进一步再温育40小时。在温育时间结束时,在细胞培养基(蛋白质)或细胞溶解产物(转录体)中评价和测量mVEGF蛋白和转录的敲弱。对于mVEGF蛋白水平的测量,通过mVEGF ELISA实验直接分析细胞培养基。对于mVEGF转录分析,首先使用Tri-试剂溶解细胞,然后使用qRT-PCR检测试剂盒定量测量mVEGF转录水平。

[0471] 实施例22

[0472] 在经阴道内施用二油酰基单胺复合siRNA之后子宫VEGF蛋白的敲弱

[0473] 在siRNA施用前两天,对雌性ICR小鼠(17-22克)每日两次给予黄体酮(0.5mg,溶解在芝麻油中)皮下注射,以便在动物中营造正常的发情周期。然后对小鼠经阴道内施用靶向VEGF转录的经配制的siRNA或非靶向的siRNA对照物。siRNA与二油酰基单胺以5:1N:P配料比复合。施用在30 μ L的最终体积内的总共9 μ g siRNA(0.3mg/mL)。在施用后48小时,对动物实施安乐死,收集阴道/子宫颈和子宫(包括子宫角),切割以不含其它组织,并在液氮中冷冻存储。仅将具有与黄体酮处理一致的总体外观的动物组织用于分析。将组织在溶解缓冲液中均化,并通过ELISA进行VEGF蛋白测定。

[0474] 实施例23

[0475] 在施用交叉胺siRNA之后患有弥散性腹腔恶性肿瘤的动物中腹水和腹腔内肿瘤结节中的蛋白和生长因子转录的敲弱

[0476] 对患有弥散性卵巢癌的动物施用包含siRNA和二油酰基交叉胺的制剂以努力降低已与疾病发展有关的VEGF水平。为诱导弥散性卵巢癌,对雌性C57BL/6小鼠腹腔内植入 2.5×10^6 ID8(鼠卵巢肉瘤)细胞。在肿瘤植入后的预定日期,对小鼠注射与二油酰基交叉胺以5:1的N:P比配制的200 μ g siVEGF(或非编码的对照siRNA)。在处理24小时后,对动物实施安乐死,从腹腔内收获肿瘤和腹水液体,并分析VEGF蛋白和转录水平。对于腹水转录分析,首先将样品进行红细胞溶解处理,并在RNA分离之前富集有核细胞。

[0477] 实施例24

[0478] 使用叶酸盐-PEG-二油酰基交叉胺的肿瘤靶向的siRNA

[0479] 将用叶酸盐-PEG-二油酰基交叉胺配制的VEGF siRNA经静脉内或经腹腔内递送到带有皮下SCCVII肿瘤的小鼠中。在施用后的指定时间点,收获肿瘤并测定靶向转录的转录和蛋白测定。

[0480] 实施例25

[0481] 使用肽修饰的二油酰基交叉胺的增强的siRNA系统摄取

[0482] 将siRNA用二油酰基交叉胺配制,所述二油酰基交叉胺已通过加入具有保守性Arg-Gly-Asp基序的肽而被功能性修饰为靶整合素受体。将该复合物经静脉内或经腹腔内递送到带有肿瘤的动物中。在施用后指定的时间点,收获各种组织并测定靶向转录/蛋白的转录和蛋白测定。

[0483] 实施例26

[0484] 与二油酰基单胺递送试剂复合的siRNA的体外转染后的蛋白敲弱

[0485] 在体外测定siRNA和二油酰基单胺递送试剂复合物复合物的转染活性。含有simVEGF siRNA构建物的转染复合物通过先前在实施例9中描述的方法制备。将SCCVII细胞(0.5×10^5 细胞/孔)接种到在10%FBS中的24-孔组织培养板中。每个孔用在总体积为250 μ L的DMEM中的0.5 μ g复合siRNA温育6小时。当温育时间结束时,向转染细胞中加入用20%FBS补充的250 μ L DMEM,并进一步再温育40小时。在温育时间结束时,进行上清液mVEGF蛋白的测定。结果显示了VEGF蛋白的显著($\sim 95\%$)敲弱(图1)。

[0486] 实施例27

[0487] 与二油酰基甲胺和甲基-二油酰基单胺递送试剂复合的siRNA体外转染后的蛋白敲弱

[0488] 在体外测定含二油酰基单胺(实施例3)或甲基-二油酰基单胺(实施例3A)递送试剂的siRNA复合物的转染活性。包含simVEGF siRNA构建物的转染复合物通过先前所述的方法制备。将SCCVII细胞(0.5×10^5 细胞/孔)接种到在10%FBS中的24-孔组织培养板中。每个孔用在总体积为250 μ L的DMEM中的0.5 μ g复合siRNA温育6小时。当温育时间结束时,向转染细胞中加入用20%FBS补充的250 μ L DMEM,并进一步再温育40小时。在温育时间结束时,如上所述进行上清液mVEGF蛋白测定。结果显示了VEGF蛋白的显著($\sim 95\%$)敲弱(图2)。

[0489] 实施例28

[0490] 与叶酸盐-PEG-二油酰基单胺复合的siRNA在体外转染后的蛋白和转录敲弱

[0491] 在体外测定siRNA和叶酸盐-PEG-二油酰基单胺复合物复合物的转染活性。包含simVEGF siRNA构建物的转染复合物通过先前所述的方法制备。将SCCVII细胞(0.5×10^5 细胞/孔)接种到在10%FBS中的24-孔组织培养板中。每个孔用在总体积为250 μ L的DMEM中且存在或不存在浓度可变的叶酸盐底物的0.5 μ g复合siRNA温育6小时。当温育时间结束时,向转染细胞中加入用20%FBS补充的250 μ L DMEM,并进一步再温育40小时。在温育时间结束时,分别从细胞培养基和细胞溶解产物测量mVEGF蛋白和mVEGF转录水平。对于mVEGF蛋白水平的测量,通过mVEGF ELISA实验直接分析细胞培养基。对于mVEGF转录分析,使用Tri-试剂溶解细胞,然后使用qRT-PCT检测试剂盒定量测量mVEGF转录的水平。计算所发生的VEGF蛋白和转录敲弱相对于已用未沉默的对照siRNA转染的细胞的百分比。

[0492] 实施例29

[0493] 在施用与二油酰基单胺递送试剂复合的siRNA后肺和肝中的窖蛋白-1转录敲弱

[0494] 对雌性ICR小鼠(17-22克)静脉注射靶向窖蛋白-1(Cav-1)转录的经配制的siRNA或非靶向的siRNA对照物。siRNA与二油酰基单胺递送试剂以10:1的比率复合。总量为100 μ g的siRNA以200 μ L(0.5mg/mL)的最终体积注射。在注射后48小时,对动物实施安乐死,并收获肺和肝以使用qRT-PCT进行Cav-1转录分析。转录水平被标准化为 β -激动蛋白以作为内部对照。结果(图3)显示了在肺(76%敲弱)和肝(62%敲弱)中均显示靶特异性Cav-1转录水平的显著降低。对于每一组, $n=5$ 。

[0495] 实施例30

[0496] 在对小鼠的皮下肿瘤注射用二油酰基单胺配制的siVEGF之后导致肿瘤抑制的VEGF转录敲弱。

[0497] 在本实施例中,通过注射 5×10^5 个鳞状上皮细胞癌细胞来将肿瘤植入CH3小鼠的后

肋。使肿瘤生长,直到它们达到 $\sim 40\text{mm}^3$ 的尺寸。然后对肿瘤注射以用二油酰基单胺以5:1的N:P比配制的靶向VEGF的市售siRNA,或者注射以类似配制的未沉默对照siRNA。siRNA的终浓度为 0.3mg/mL 。向肿瘤中注射总量为 $30\mu\text{L}$ 的经配制的siRNA溶液,并每3-4天重复注射,共进行6次注射。在第二次注射经配制的siRNA之后48小时从一些动物身上收获肿瘤以进行转录分析。该研究的结果(图4)表明施用VEGF siRNA导致VEGF转录相对于未沉默的对照组降低了32%。在最后一次肿瘤后一周,VEGF siRNA组相对于未沉默的siRNA组肿瘤体积缩小了31%,且相对于未处理对照动物体积缩小了57%。VEGF siRNA处理进一步导致动物相对于未沉默对照(siNON)组或未处理组的半数存活提高了13%。

[0498] 实施例31

[0499] 通过过滤制备含二油酰基单胺的浓缩的siRNA转染复合物

[0500] 所用的siRNA是意图产生外源血管内皮生长因子(VEGF)转录和蛋白水平的敲弱的双链核苷酸序列。阳离子脂质的脂质体如先前在实施例9中描述制备。在注射用水中单独制备siRNA(20mg/mL)和二油酰基单胺(6.4mg/mL)溶液。将 $25\mu\text{L}$ siRNA溶液与 $500\mu\text{L}$ 二油酰基单胺溶液合并。然后,将复合物在5%右旋糖中稀释到 0.03mg/mL 的siRNA。将稀释的复合物转移到25-50kDa离心过滤单元中,并离心数分钟以在保留物中达到所需的siRNA浓度。

[0501] 实施例32

[0502] 通过过滤制备含二油酰基交叉胺的浓缩的siRNA转染复合物

[0503] 所用的siRNA是意图产生外源血管内皮生长因子(VEGF)转录和蛋白水平的敲弱的双链核苷酸序列。阳离子脂质的脂质体如先前在实施例9中描述制备。在注射用水中单独制备siRNA(20mg/mL)和二油酰基交叉胺(5mg/mL)溶液。将 $25\mu\text{L}$ siRNA溶液与 $500\mu\text{L}$ 二油酰基单胺溶液合并。随后,将复合物在5%右旋糖稀释到 0.03mg/mL siRNA。将稀释的复合物转移到25-50kDa离心过滤单元中,并离心数分钟,直到在保留物中达到所需的siRNA浓度。

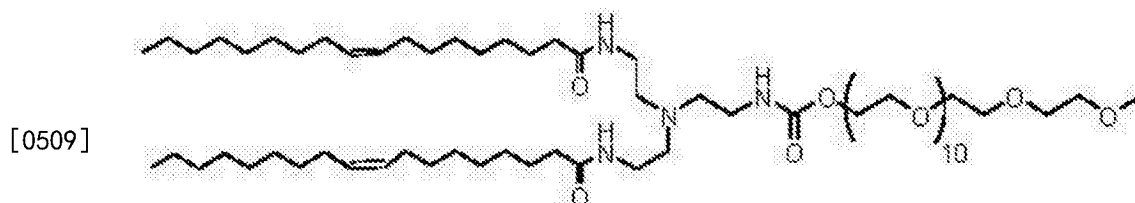
[0504] 实施例33

[0505] 纳米颗粒的粒径和 ξ 电势测定

[0506] 如实施例6和9中所述般配制二油酰基交叉胺/siRNA和二油酰基单胺/siRNA复合物,并在 50mM NaCl中稀释至合适浓度。然后将样品加入到聚苯乙烯比色杯(cuvet),并使用90Plus/Bi-MAS粒径分级器测量粒径和 ξ 电势。观察到的粒径介于80-400nm之间,且观察到的 ξ 电势介于+10到+40mV之间。

[0507] 实施例34

[0508] 二-[2-(油酰基氨基)乙基][2-[(甲氧基十二甘醇羰基氨基)乙基]胺“mPEG-二油酰基单胺”(9)的合成



mPEG-二油酰基单胺(9)

[0510] 将甲氧基(十二甘醇)(MW 550,多分散,含有约12个乙二醇单元, 720mg , 1.30mmol)溶解在 8mL 干甲苯中。向其中加入光气的甲苯溶液(4mL 的 2M 溶液, 8mmol)。将反应混合物于

室温搅拌3小时,然后于室温真空浓缩,得到810mg(1.31mmol)粗制的甲氧基(十二甘醇)氯甲酸酯。

[0511] 将上述的甲氧基(十二甘醇)氯甲酸酯(810mg,1.31mmol)溶解在6.313g干二氯甲烷中。通过用碳酸钾处理并用二氯甲烷萃取将二油酰基单胺转化为游离碱。将有机相干燥以提供干燥的油性物质(700mg,1.04mmol),将其再溶解于6mL干二氯甲烷中。将5.66g甲氧基(十二甘醇)氯甲酸酯溶液(1.04mmol的mPEG氯甲酸酯)边搅拌边加入到二油酰基单胺游离碱溶液中。将混合物于室温搅拌3小时,然后浓缩并使用硅胶进行色谱提纯(甲醇在二氯甲烷中的3到15%梯度洗脱液)。提纯后得到PEG-二油酰基单胺(830mg,0.664mmol)。

[0512] 实施例35

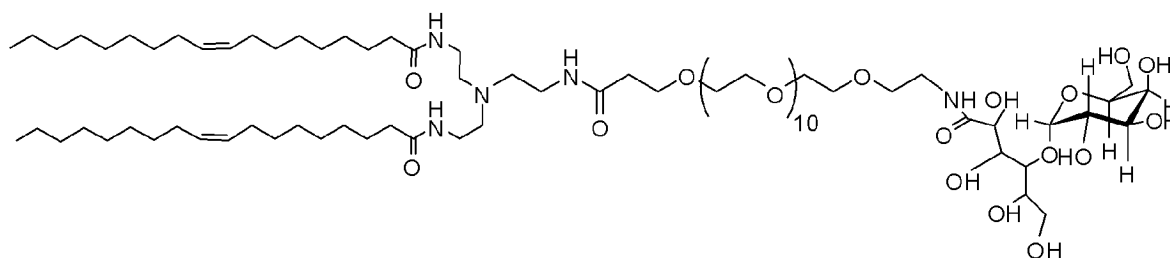
[0513] 带有荧光标记的单胺的制备

[0514] 将磺酰罗丹明B酰氯[Fluka,115mg,0.2mmol]溶解在7mL干氯仿中。将该溶液加入到充分搅拌的二油酰基单胺游离碱[140mg,约0.2mmol,如上所述通过用碳酸钾对其TFA盐的氯仿溶液进行处理来制备]在5mL干氯仿中的溶液中。将混合物于室温搅拌3小时,然后浓缩,并使用2000微米厚层状硅胶制备塔进行色谱提纯[随后以在二氯甲烷中的3到15%甲醇洗脱]。提纯后得到[罗丹明B磺酰基]二油酰基单胺(120mg,0.1mmol)。

[0515] 实施例36

[0516] α -乳糖酰基酰胺基- ω -丙酸十一甘醇二-[2-(油酰基氨基)乙基](2-氨基乙基)胺“乳糖酰基-二油酰基单胺”(10)的合成

[0517]



乳糖酰基-二油酰基单胺(10)

[0518] 将Fmoc氨基- ω -丙酸-十一甘醇连接体(Fmoc-PEG₁₁-COOH)(100mg,0.119mmol)和对-硝基苯酚(18mg,0.129mmol)溶解在1mL二氯甲烷中。将DCC(27mg,0.131mmol)溶解在1mL二氯甲烷中,并加入到搅拌中的PEG/对-硝基苯酚溶液中。使反应于室温进行3小时,然后使用0.45 μ m针筒过滤器去除DCU。通过用碳酸钾处理并用二氯甲烷萃取将二油酰基单胺转化为游离碱。将有机相干燥以提供75mg(0.111mmol)干物质,将该干物质再溶解于0.5mL二氯甲烷中。将该溶液加入到对-硝基苯酚-活化的 α -Fmoc氨基- ω -丙酸-十一甘醇酸溶液中。使反应于室温进行18小时。将粗制材料干燥并再溶解于1.8mL二甲基甲酰胺中,在所述二甲基甲酰胺中加入了200 μ L哌啶。使Fmoc解离进行15分钟,然后在高真空中去除二甲基甲酰胺和哌啶。通过在含有在甲醇中的80%二氯甲烷、然后是75%的硅胶柱上进行分离来分离 α -氨基- ω -丙酸-十一甘醇二-[2-(油酰基氨基)乙基](2-氨基乙基)胺。将合适的馏分干燥,得到75mg(0.59mmol)的棕色油状物质。

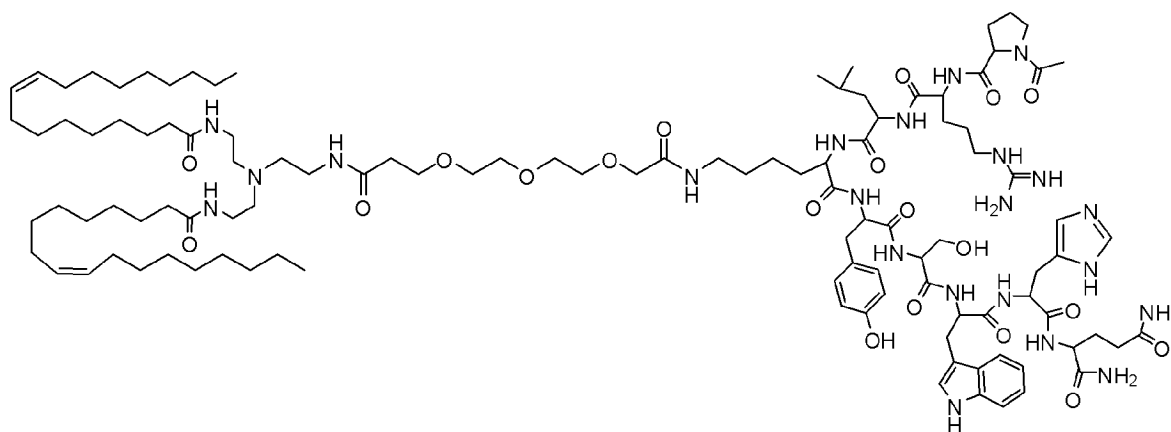
[0519] 首先通过于50 $^{\circ}$ C在含有1滴三氟乙酸的甲醇中脱水来将乳糖酸转化为对应的内酯。将 α -氨基- ω -丙酸-十一甘醇二-[2-(油酰基氨基)乙基](2-氨基乙基)胺(50mg,

0.039mmol)溶解在1.5mL的含有15 μ L二异丙基乙胺的甲醇中。向该搅拌的溶液中加入干乳糖酸内酯(15mg, 0.044mmol)。将烧瓶密封,并将反应于60 $^{\circ}$ C搅拌20小时。通过针筒过滤去除少量沉淀物,并将 α -乳糖酰基酰胺基- ω -丙酸-十一甘醇二-[2-(油酰基氨基)乙基](2-氨基乙基)胺在高真空下干燥,以得到57mg(0.035mmol)的纯物质。

[0520] 实施例37

[0521] 二-[2-(油酰氨基)乙基][2-[-丙酰-LHRH-八甘醇丙酰氨基)乙基]胺“LHRH-二油酰单胺”(11)的合成

[0522]



LHRH-二油酰基单胺(11)

[0523] 将八甘醇二丙酸(347mg, 0.675mmol)溶解在8mL干二氯甲烷中。向其中加入对-硝基苯酚(210mg, 1.5mmol),然后加入二环己基碳二亚胺(DCC)(313mg, 1.52mmol)。第二天,将反应混合物过滤除去沉淀的二环己基脲,将滤液浓缩,并通过在二氧化硅上进行色谱来提纯标题化合物(首先,用醚洗脱以去除未反应的对-硝基苯酚,然后用4%甲醇/二氯甲烷洗脱)。

[0524] 将上述八甘醇二丙酸二-对-硝基苯酯(510mg, 0.68mmol)溶解在6mL干二氯甲烷中。通过用碳酸钠处理并用二氯甲烷萃取将二-[2-(油酰氨基)乙基](2-氨基乙基)胺转化为游离碱。将有机相干燥以提供干燥的油性物质(390mg, 0.58mmol),其被再溶解于3mL二氯甲烷中。将混合物搅拌过夜,然后使用如上述用于二-对-硝基苯酯的相同程序进行色谱提纯。在未反应的二-[2-(油酰氨基)乙基](2-氨基乙基)胺馏分之后,收集二-[2-(油酰氨基)乙基][2-[-丙酰八甘醇丙酰氨基)乙基]胺对-硝基酚盐(268mg, 0.207mmol)。

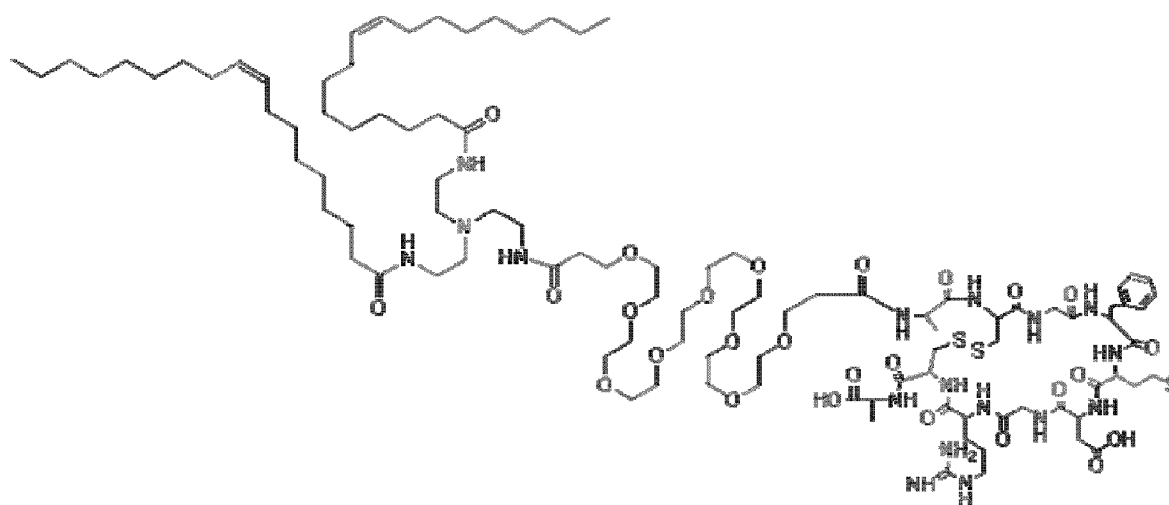
[0525] 将市售的LHRH肽(序列:Ac-QHWSYKLRP-Am, 98mg的TFA盐, 0.078mmol)溶解在2mL干二甲基甲酰胺中,并将该溶液在高真空中蒸发以干燥所述肽。将残余物溶解在1mL干二甲基甲酰胺中;加入上述二-[2-(油酰氨基)乙基][2-[-丙酰八甘醇丙酰氨基)乙基]胺对-硝基酚盐(135mg, 0.104mmol)在1mL二甲基甲酰胺中的溶液,然后加入三乙胺(0.028mL, 0.201mmol)。将搅拌过的反应混合物于室温保持17小时,然后真空浓缩。通过反相制备色谱使用C8柱进行目标物质的纯化,乙腈/水梯度洗脱[30%乙腈/水(0.1%TFA)到90%,经过15分钟]提供了97mg二-[2-(油酰氨基)乙基][2-[-丙酰-LHRH八甘醇丙酰氨基)乙基]胺。

[0526] 实施例38

[0527] 二-[2-(油酰氨基)乙基][2-[-丙酰-RGD-八甘醇丙酰氨基)乙基]胺“RGD-二油

酰基单胺”(12)的合成

[0528]



RGD-二油酰基单胺(12)

[0529] 将八甘醇二丙酸(347mg, 0.675mmol)溶解在8mL干二氯甲烷中。向其中加入对-硝基苯酚(210mg, 1.5mmol), 然后加入二环己基碳二亚胺(DCC)(313mg, 1.52mmol)。第二天, 将反应混合物过滤除去沉淀的二环己基脬, 将滤液浓缩并通过在二氧化硅上进行色谱分离以提纯标题化合物(首先, 用醚洗脱以去除未反应的对-硝基苯酚, 然后用4%甲醇/二氯甲烷洗脱)。

[0530] 将上述八甘醇二丙酸二-对-硝基苯酯(510mg, 0.68mmol)溶解在6mL干二氯甲烷中。通过用碳酸钾处理并用二氯甲烷萃取将二油酰基单胺转化为游离碱。将有机相干燥以提供干燥的油性物质(390mg, 0.58mmol), 其随后被再溶解于3mL二氯甲烷中。将混合物搅拌过夜, 然后使用上面所述用于二-对-硝基苯酯的相同程序进行色谱提纯。在未反应的二油酰基单胺馏分之后, 收集二-[2-(油酰氨基)乙基][2-[ω-丙酸八甘醇-丙酰氨基)乙基]胺对-硝基苯盐(268mg, 0.207mmol)。

[0531] 将市售的RGD肽[序列: A*CRGDMFG*CA(2-9二硫化物桥)、117mg TFA盐, 0.100mmol]溶解在3mL干二甲基甲酰胺中, 并将该溶液于高真空中蒸发以干燥所述肽。将残余物溶解在3mL干甲醇中; 加入上述二-[2-(油酰氨基)乙基][2-[ω-丙酸八甘醇-丙酰氨基)乙基]胺对-硝基苯盐(135mg, 0.104mmol)在3mL二氯甲烷中的溶液, 随后加入Hunig's碱(0.065mL, 0.370mmol)。反应混合物于室温搅拌72小时, 然后真空浓缩。通过反相制备色谱使用C8柱和乙腈/水梯度洗脱进行目标物质的提纯, 得到了43mg(0.020mmol)二-[2-(油酰氨基)乙基][2-[ω-丙酰-RGD-八甘醇丙酰氨基)乙基]胺。

[0532] 实施例39

[0533] 用二油酰基单胺和mPEG-二油酰基单胺制备复合的siRNA

[0534] 所用的siRNA是意图产生外源血管内皮生长因子(VEGF)转录和蛋白水平的敲弱的双链核苷酸序列。所用的阳离子脂质是二油酰基单胺(实施例3)和mPEG-二油酰基单胺(实施例34)的混合物。为制备脂质体, 将该脂质溶解并混合于氯仿中以确保均匀的混合物。通过旋转蒸发去除有机溶剂, 得到在圆底烧瓶壁上的薄脂质膜。通过将圆底烧瓶置于真空泵上过夜来进一步蒸发去除氯仿。将得到的脂质膜用蒸馏水再水化到合适的浓度, 并剧烈涡

旋数分钟。将该溶液于超声浴中放置1小时,然后通过200nm无菌针筒式过滤器过滤,得到最终的脂质体溶液。将溶解于水的siRNA加入到该脂质体溶液中。

[0535] 实施例40

[0536] 用二油酰基单胺和mPEG-二油酰基单胺制备包封的siRNA

[0537] 本实施例举例说明了使用mPEG-二油酰基单胺进行的siRNA的脂质体包封。所用的siRNA是意图产生外源性目标转录和蛋白水平的敲弱的双链核苷酸序列。所用的阳离子脂质是二油酰基单胺(实施例3)和mPEG-二油酰基单胺(实施例34)的混合物。为制备包封脂质体,将脂质溶解并混合于氯仿中以确保均匀的混合物。通过旋转蒸发去除有机溶剂,得到在圆底烧瓶壁上的薄脂质膜。通过将圆底烧瓶置于真空泵上过夜以进一步蒸发掉氯仿。将得到的脂质膜首先溶解在100%乙醇中,然后变为50%。将溶解于水的siRNA加入到在乙醇溶液中的脂质体中。通过旋转蒸发系统从脂质体/siRNA混合物中蒸发掉乙醇。通过向包封的siRNA颗粒中加入等量的10%右旋糖来将得到的纳米颗粒悬浮在5%右旋糖中。

[0538] 实施例41

[0539] siRNA与二油酰基单胺/mPEG-二油酰基单胺复合物的转染活性

[0540] 如下所述在体外测定siRNA与二油酰基单胺/mPEG-二油酰基单胺复合物的转染活性。所用的siRNA是意图产生外源性窖蛋白-1(Cav-1)转录水平的敲弱的双链核苷酸序列。所用的阳离子脂质是二油酰基单胺(实施例3)和mPEG-二油酰基单胺(实施例34)的混合物。为制备脂质体,将脂质溶解并混合于氯仿中以确保均匀的混合物。通过旋转蒸发去除有机溶剂,得到在圆底烧瓶壁上的薄脂质膜。通过将圆底烧瓶置于真空泵上过夜以进一步蒸发掉氯仿。用蒸馏水将得到的脂质膜再水化到合适的浓度,并剧烈涡旋数分钟。将该溶液在超声浴中放置1小时,随后通过200nm针筒式过滤器进行无菌针筒式过滤以得到最终的脂质体溶液。将溶解于水的siRNA加入到该脂质体溶液中。通过向复合siRNA颗粒中加入等量的10%右旋糖来将得到的纳米颗粒悬浮在5%右旋糖中。将SCCVII细胞(0.5×10^5 细胞/孔)接种到在10%FBS中的24-孔组织培养板中。每个孔用在总体积为250 μ L的DMEM中且存在或不存在FBS的0.5 μ g复合siRNA温育6小时。当在其培养基中缺乏FBS的细胞的温育时间结束时,向转染细胞中加入用20%FBS补充的250 μ L DMEM,并进一步再温育40小时。对于在其转染培养基中具有FBS的细胞,向转染细胞中加入用10%FBS补充的250 μ L DMEM,并进一步再温育40小时。在温育时间结束时,在细胞溶解产物中测量Cav-1转录的敲弱。为进行Cav-1转录分析,使用Tri-试剂溶解细胞,然后使用qRT-PCR检测试剂盒定量测量Cav-1转录水平。与未沉默的对照物相比,Cav-1转录的抑制达到90%(图5A)。

[0541] 实施例42

[0542] 用二油酰基单胺/mPEG-二油酰基单胺包封的siRNA的转染活性

[0543] 如下所述在体外测定含二油酰基单胺/mPEG-二油酰基单胺的包封的siRNA的转染活性。所用的siRNA是意图产生外源性窖蛋白-1(Cav-1)转录水平的敲弱的双链核苷酸序列。所用的阳离子脂质是二油酰基单胺(实施例3)和mPEG-二油酰基单胺(实施例34)的化合物。为制备包封脂质体,将脂质溶解并混合在氯仿中以确保均匀的混合物。通过旋转蒸发去除有机溶剂,得到在圆底烧瓶壁上的薄脂质膜。通过将该圆底烧瓶置于真空泵上过夜来进一步蒸发掉氯仿。将得到的脂质膜首先溶解在100%乙醇中,然后变为50%。将溶解在水中的siRNA加入到在乙醇溶液中的脂质体中。通过旋转蒸发系统从脂质体/siRNA混合物中蒸发

掉乙醇。通过向包封的siRNA颗粒中加入等量的10%右旋糖来将得到的纳米颗粒悬浮在5%右旋糖中。将SCCVII细胞(0.5×10^5 细胞/孔)接种到在10%FBS中的24-孔组织培养板中。用总体积为250 μ L的DMEM中的存在或不存在FBS的0.5 μ g包封的siRNA将每个孔温育6小时。当在其介质中缺乏FBS的细胞温育时间终止时,向转染细胞中加入用20%FBS补充的250 μ L的DMEM并且再进一步温育40小时。对于在其转染介质中含有FBS的细胞,向转染细胞中加入用10%FBS补充的250 μ L DMEM并且进一步再温育40小时。在温育时间结束时,在细胞溶解产物中测量Cav-1转录的敲弱。对于Cav-1转录分析,使用Tri-试剂将细胞溶解,然后使用qRT-PCR检测盒定量测量VEGF转录的水平。与未沉默对照组相比,Cav-1转录的抑制达到45%(参见图5B)。

[0544] 实施例43

[0545] 在施用与二油酰基单胺和mPEG-二油酰基单胺复合的siRNA之后肺中的窖蛋白-1转录敲弱

[0546] 对雌性ICR小鼠(17-22g)静脉注射(IV)以200 μ L先前制备的靶向窖蛋白-1(Cav-1)转录的siRNA。siRNA复合物包含10:1的二油酰基单胺和mPEG-二油酰基单胺混合物,以及100、60、40、20或10 μ g的siRNA(N:P比为20:1)(参见实施例9)。在注射后48小时,对动物实施安乐死,并收获肺以进行目标Cav-1转录分析和使用qRT-PCR 进行siRNA定量测量。CAV-1转录水平(标准化为 β -肌动蛋白以作为内部对照)表达为相对于未处理的对照动物的表达百分数。结果表明了动物肺中的剂量依赖的Cav-1转录水平降低,其范围是在动物中的>60%(假定100 μ g siRNA)到在动物中的~13%(假定10 μ g siRNA)。注射siRNA的定量测量表明了分配给肺的siRNA绝对量的剂量依赖型升高(图6)。在最低剂量时,~5%的注射siRNA被分配给肺。在最高剂量时,~50%的注射siRNA被分配给肺。每一组中动物的数量("n")为6。

[0547] 实施例44

[0548] 含二油酰基单胺/乳糖酰基-二油酰基单胺的包封的siRNA的转染活性

[0549] 如下所述在体外测定含二油酰基单胺/乳糖酰基-二油酰基单胺的包封siRNA的转染活性。所用的siRNA是意图产生 β -肌动蛋白转录水平的敲弱的双链核苷酸序列。所用的阳离子脂质是二油酰基单胺(实施例3)和乳糖酰基-二油酰基单胺(实施例35)的混合物。为制备包封脂质体,将脂质溶解并混合于氯仿中以确保均匀的混合物。通过旋转蒸发去除有机溶剂,得到在圆底烧瓶壁上的薄脂质膜。通过将圆底烧瓶置于真空泵上过夜以进一步蒸发掉氯仿。将得到的脂质膜首先溶解在100%乙醇中,然后变为50%。将溶解于水的siRNA加入到在乙醇溶液中的脂质体中。通过旋转蒸发系统从脂质体/siRNA混合物中蒸发掉乙醇。通过向包封的siRNA颗粒中加入等量的10%右旋糖来将得到的纳米颗粒悬浮于5%右旋糖中。将Hepa16细胞(0.5×10^5 细胞/孔)接种到在10%FBS中的24-孔组织培养板中。每个孔用在总体积为250 μ L的DMEM中且存在或不存在FBS的0.5 μ g包封siRNA温育6小时。当在其培养基中缺乏FBS的细胞的温育时间结束时,向转染细胞中加入250 μ L用20%FBS补充的DMEM,并进一步再温育40小时。对于在其转染培养基中具有FBS的细胞,向转染细胞中加入用10%FBS补充的250 μ L DMEM,并进一步再温育40小时。在温育时间结束时,在细胞溶解产物中测量 β -肌动蛋白转录的敲弱。对于转录分析,使用Tri-试剂溶解细胞,然后使用qRT-PCT检测试剂盒定量测量 β -肌动蛋白转录水平。与未沉默的对照物相比, β -肌动蛋白转录被抑制了90%,而含有缺乏LBA配体的相同颗粒的样品与未沉默的对照物相比显示仅57%的抑制(图

7)。

[0550] 实施例45

[0551] 与二油酰基单胺复合的siRNA从交联凝胶的受控释放

[0552] 如实施例39中所述配制与二油酰基单胺复合的siRNA,其含有50 μ g Cav-1 siRNA和1.4 μ g二油酰基单胺,体积为50 μ L。将藻酸钠(A型)溶解在水中以提供2%溶液。将藻酸盐溶液(100 μ L)加入到96-孔板的单个孔中,随后加入50 μ L的二油酰基单胺/Cav-1 siRNA溶液。在充分混合后,向先前的混合物中加入50 μ L的0.68M CaCl₂溶液以使凝胶交联。然后加入100 μ L水或0.1M EDTA(其用于通过与Ca²⁺例子络合而破坏凝胶)以确保凝胶能彻底浸没于水溶液中。在指定时间点,除去上清液(200 μ L),并替换以新鲜的200 μ L水或0.1M EDTA。在84小时之后,使用qRT-PCR对所有收集的样品分析Cav-1 siRNA含量。在每个时间点收集的siRNA量相加以确定随时间释放的量。在已加入EDTA的样品中,100%加载的二油酰基单胺配制的siRNA在84小时之后被释放。在不包含EDTA的样品中,观察到显著较慢的释放动力学,其中在84小时之后<20%的所加载的总siRNA被释放(图8)。

[0553] 实施例46

[0554] 相比于与其它市售阳离子脂质和阳离子聚合物系统复合的siRNA,在与二油酰基单胺和mPEG-二油酰基单胺复合的siRNA的施用之后肺和肝中的癌蛋白-1转录敲弱

[0555] 对雌性ICR小鼠(17-22g)静脉注射(IV)以200 μ L先前配制的靶向癌蛋白-1(Cav-1)转录的siRNA。siRNA复合物包含10:1的二油酰基单胺和mPEG-二油酰基单胺混合物,以及40 μ g的siRNA(N:P比为20:1)(参见实施例39)。另外,用DOTAP:DOPE(1:1)以20:1的N:P比配制siRNA,或用25kDa的支化PEI(10:1)配制siRNA。将总量为40 μ g的用DOTAP:DOPE(200 μ L)配制的siRNA静脉注射给小鼠,或将总量为20 μ g的用支化PEI(100 μ L)配制的siRNA静脉注射给小鼠。支化PEI以较低量使用以尝试和减轻与该制剂相关的已知毒性。在注射后48小时,对动物实施安乐死,并收获肺和肝以进行目标Cav-1转录分析和使用qRT-PCR进行siRNA的定量测量。CAV-1转录水平(标准化为 β -肌动蛋白以作为内部对照)表达为相对于未处理对照动物的表达百分数。每一组的动物数量("n")为5。结果表明在肺组织中CAV-1表达的显著(~60%)转录敲弱和在肝中的~33%转录敲弱(图9)。对于用DOTAP:DOPE配制的siRNA,未注意到显著的转录敲弱。对于用支化PEI配制的siRNA,动物在组织收获之前就因与该制剂相关的毒性而死亡,因此不能进行分析;用二油酰基单胺/mPEG-二油酰基单胺配制的siRNA和用DOTAP:DOPE配制的siRNA的施用几乎没有毒性。

[0556] 实施例47

[0557] 含二油酰基交叉胺(crossamine,交联胺)/PSMA靶向适配体的包封siRNA的转染活性

[0558] 如下所述在体外测定含二油酰基交叉胺/PSMA靶向适配体的包封siRNA的转染活性。所用的siRNA是意图用于产生Cav-1转录水平的敲弱的双链核苷酸序列。所用的阳离子脂质是二油酰基交叉胺(实施例1)。RNA适配体靶向前列腺特异性膜抗原,并且在3'端上包含ssRNA尿嘧啶核苷尾部(PSMA适配体序列:5' GGGAGGACGAUGCGGAUCAGCCAUGUUUACGUCACUCCUAAUUUUUUUUUUUUUUUUUUUU 3')。非结合性突变适配体被包含作为阴性对照物(突变PSMA适配体序列:5' GGGAGGACGAUGCGGAUCAGCCAUCUUACGUCACUCCUAAUUUUUUUUUUUUUUUUUUUU 3')。如实施例45

所述制备包封的脂质体。如下制备靶定的脂质体,将RNA适配体加入到包封的脂质体中,并将混合物于室温温育30分钟。将LNCaP细胞(2.5×10^5 细胞/孔)接种到在10%FBS中的12孔组织培养板中。将每个孔用在总体积为500 μ L的RPMI中且在不存在FBS的0.1 μ g靶定的脂质体或非靶定的对照脂质体(与非结合性突变适配体复合)温育5小时。当温育时间结束时,将培养基更换为用10%FBS补充的500 μ L RPMI,并再温育 40小时。在温育时间结束时,在细胞溶解产物中测量Cav-1转录的敲弱。对于转录分析,将细胞溶解,并使用Qiagen's RNEasy试剂盒(Qiagen产品号:74106)纯化总RNA。使用qRT-PCR检测试剂盒定量测量Cav-1和GAPDH(内部对照)的转录水平。与未沉默的对照物相比,在用PSMA靶向脂质体处理的细胞中Cav-1转录水平削弱了70%。这与用未靶向突变PSMA适配体处理的细胞相反,所述未靶向突变PSMA适配体与未沉默的对照物相比显示对Cav-1转录没有削弱。与靶向适配体同源性无关的未沉默对照物相比,缺乏前列腺特异性膜抗原的细胞(中国仓鼠卵巢细胞)的处理显示了相似水平的Cav-1削弱($\sim 35\%$)(图10)。

[0559] 现在以这种完整、清楚、简洁和精确的术语将本发明及其制造和使用方式和方法描述出来以使所属领域技术人员能够制造和使用这些发明。应理解前述内容描述了本发明的优选实施方式,并且可在其中做出修改而不背离如权利要求中所阐述的本发明的精神或范围。为具体指出和清楚要求保护被认为是本发明的主题,所附权利要求总结了本说明书。

序 列 表

<110> 艾根股份有限公司
G. 斯洛伯德金
R. 康戈
M. 玛塔
J. 费威尔
K. 安沃
B. J. 斯帕克斯

<120> 聚胺衍生物

<130> 09-319-WO

<140> PCT/US2010/028000
<141> 2010-03-19

<150> US 61/161,828
<151> 2009-03-20

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

[0001] <210> 1
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> N-端乙酰化

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> C-端酰胺化

<400> 1

Gln His Trp Ser Tyr Lys Leu Arg Pro
1 5

<210> 2
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

[0002]

<220>

<223> 合成

<220>

<221> DISULFID

<222> (2) .. (9)

<400> 2

Ala Cys Arg Gly Asp Met Phe Gly Cys Ala
1 5 10

<210> 3

<211> 61

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 3

gggaggacga ugcggaucag ccauguuuac gucacuccua auuuuuuuuu uuuuuuuuuu 60

u 61

<210> 4

<211> 61

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 4

gggaggacga ugcggaucag ccauccuuac gucacuccua auuuuuuuuu uuuuuuuuuu 60

u 61

由于用二油酰基单胺配制的 VEGF siRNA 而导致的 SCCVII 细胞中的
VEGF 基因敲弱

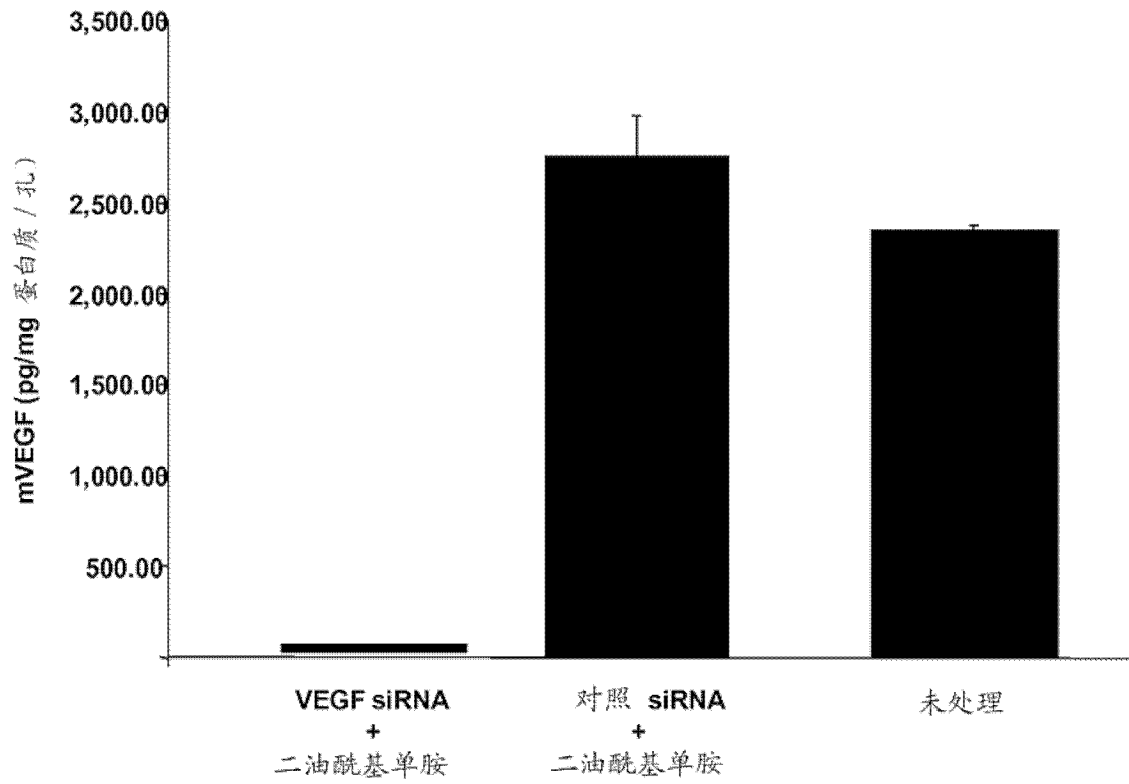


图1

由于用二油酰基单胺或甲基二油酰基单胺配制的 VEGF siRNA 而导致的 SCCVII 细胞中的 VEGF 基因敲弱

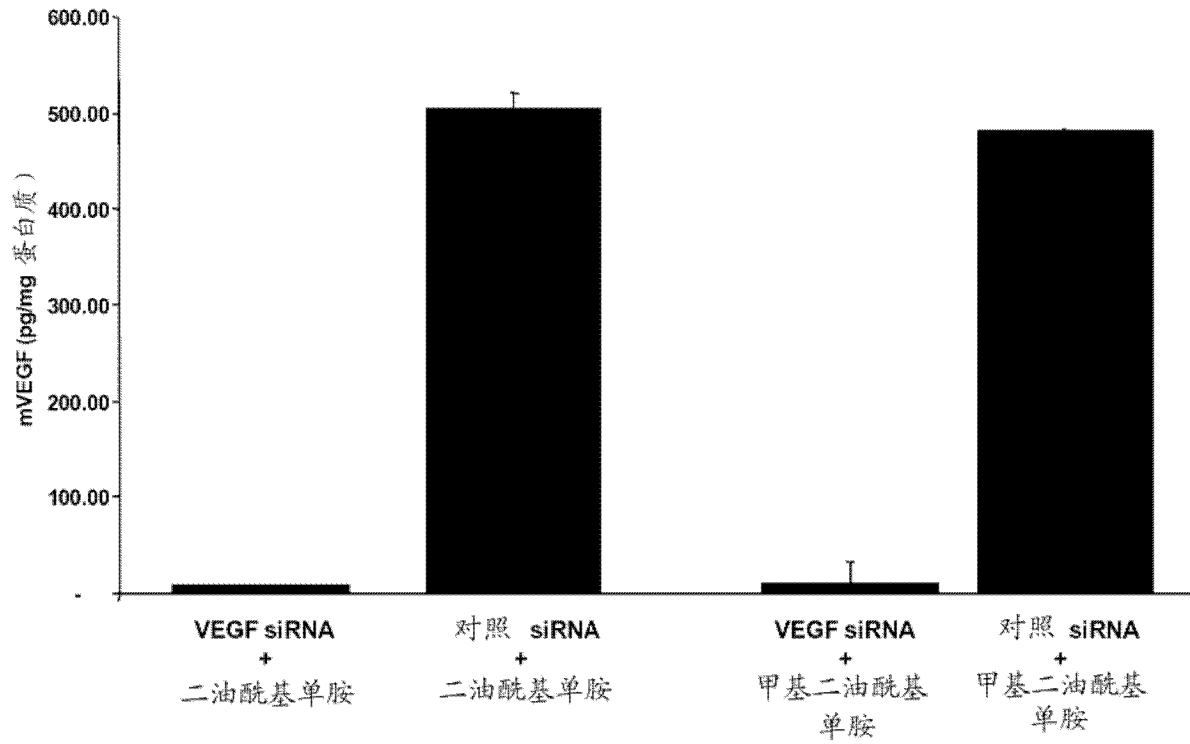


图2

肺和肝中的害蛋白-1 转录水平

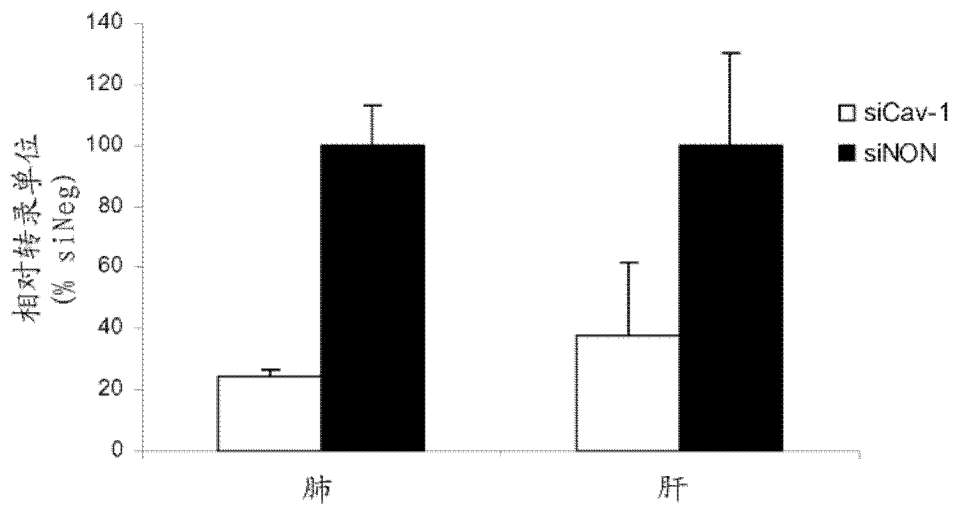


图3

在两次瘤内注射用二油酰基单胺配制的 siRNA 之后
SCCVII 肿瘤中的 mVEGF 表达水平

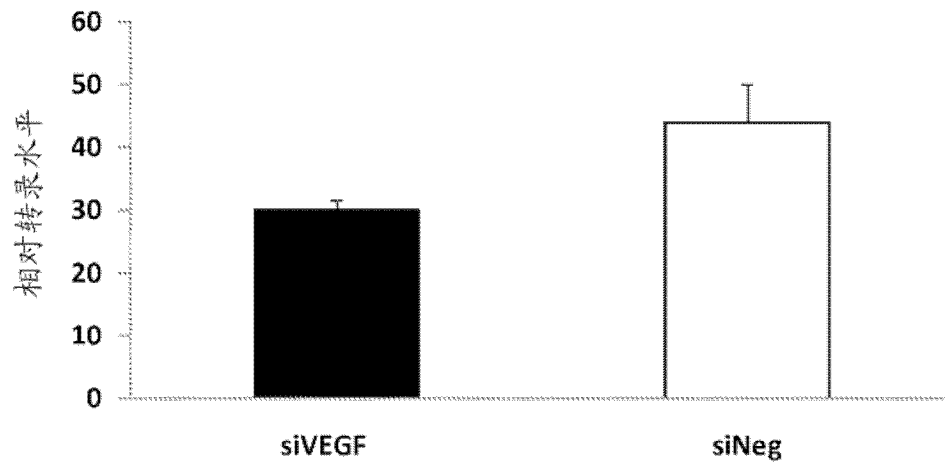


图4A

在重复瘤内施用经配制的 VEGF siRNA 之后的
SCCVII 肿瘤体积

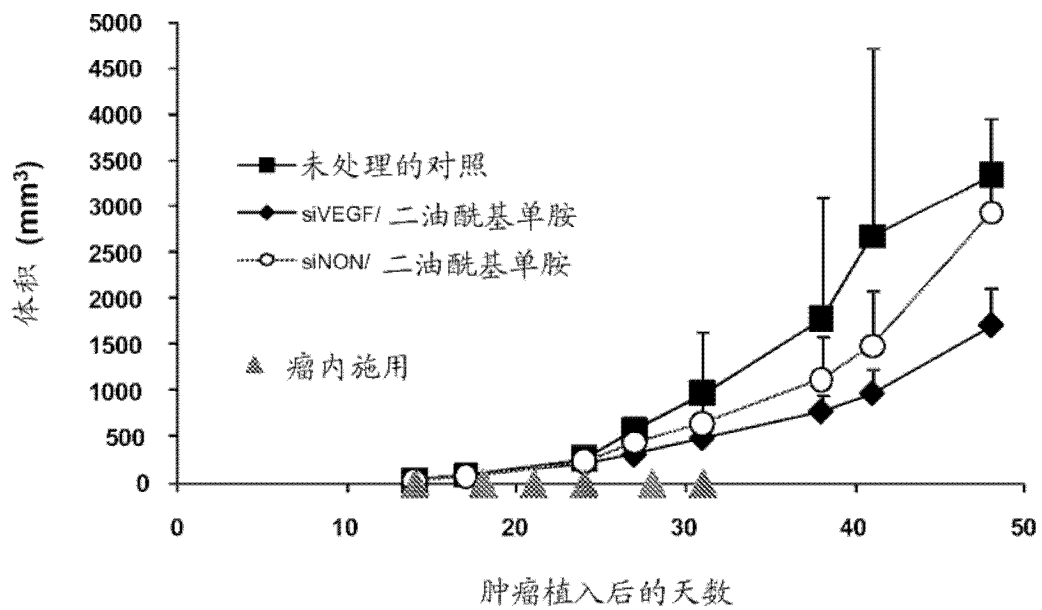


图4B

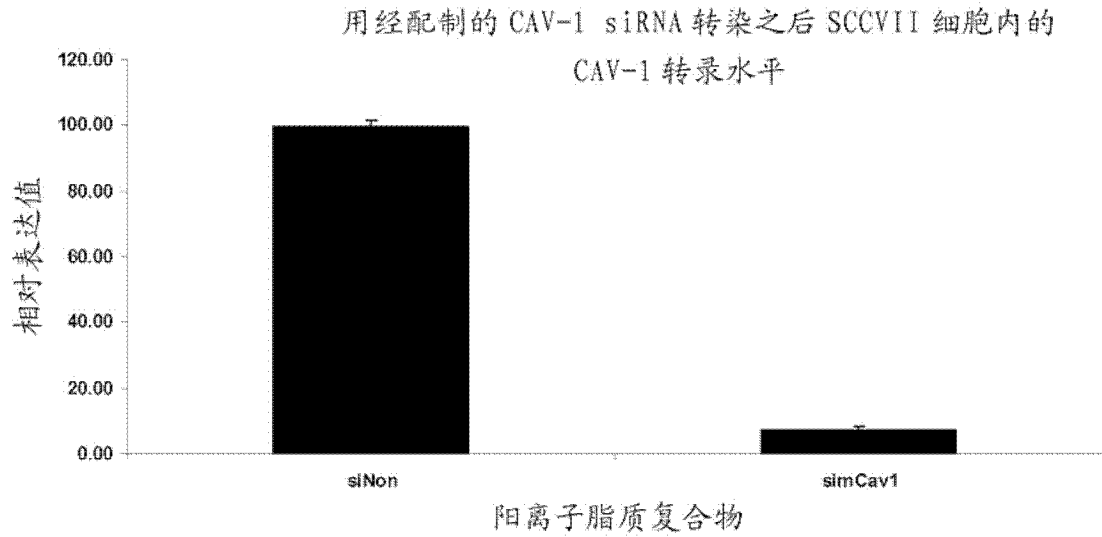


图5A

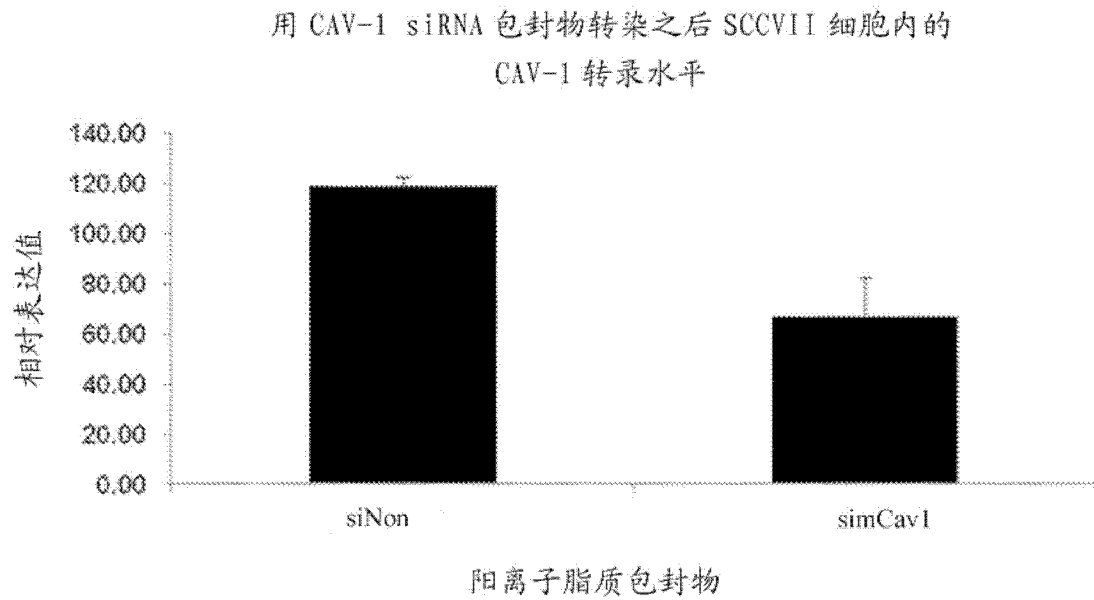


图5B

剂量依赖型 CAV-1 敲弱和 siRNA 分配

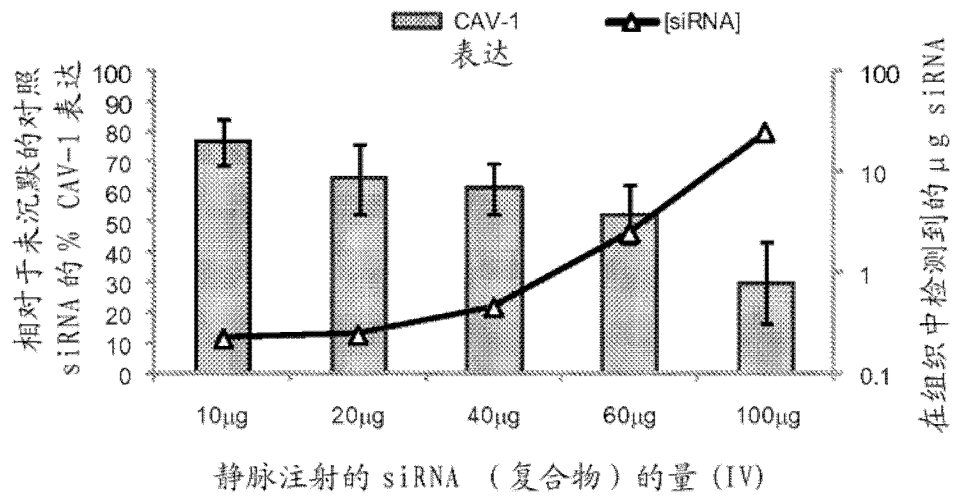


图6

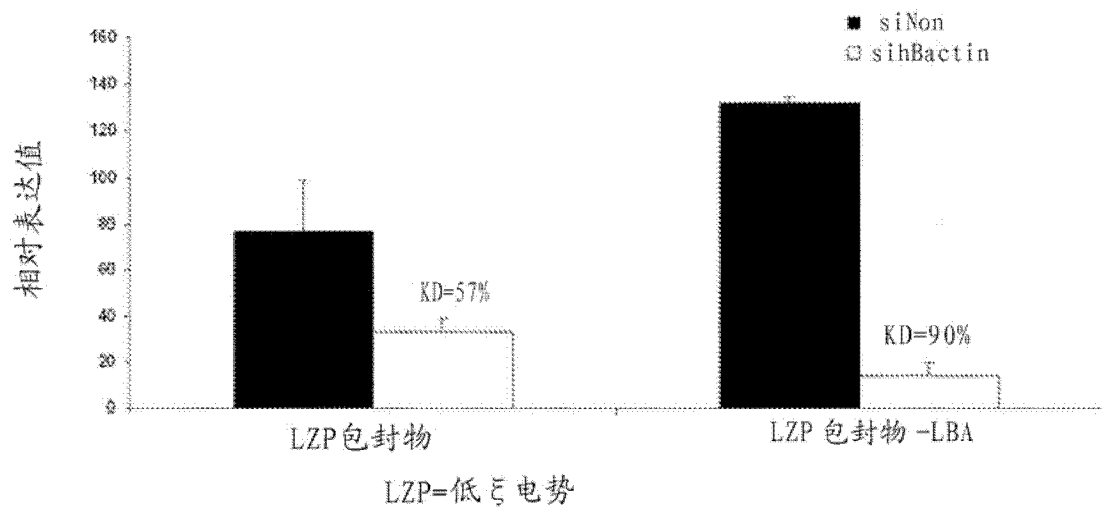
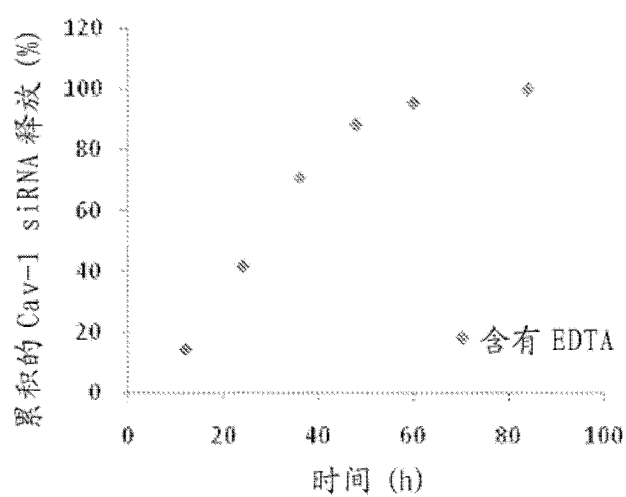
使用靶向 LBA 的具有 LZP 包封物的部分的
增强的敲弱活性

图7

CAV-1 siRNA 的受控释放



CAV-1 siRNA 的受控释放

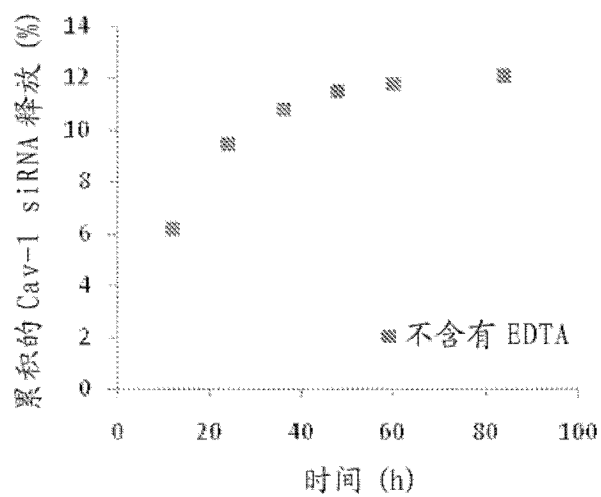
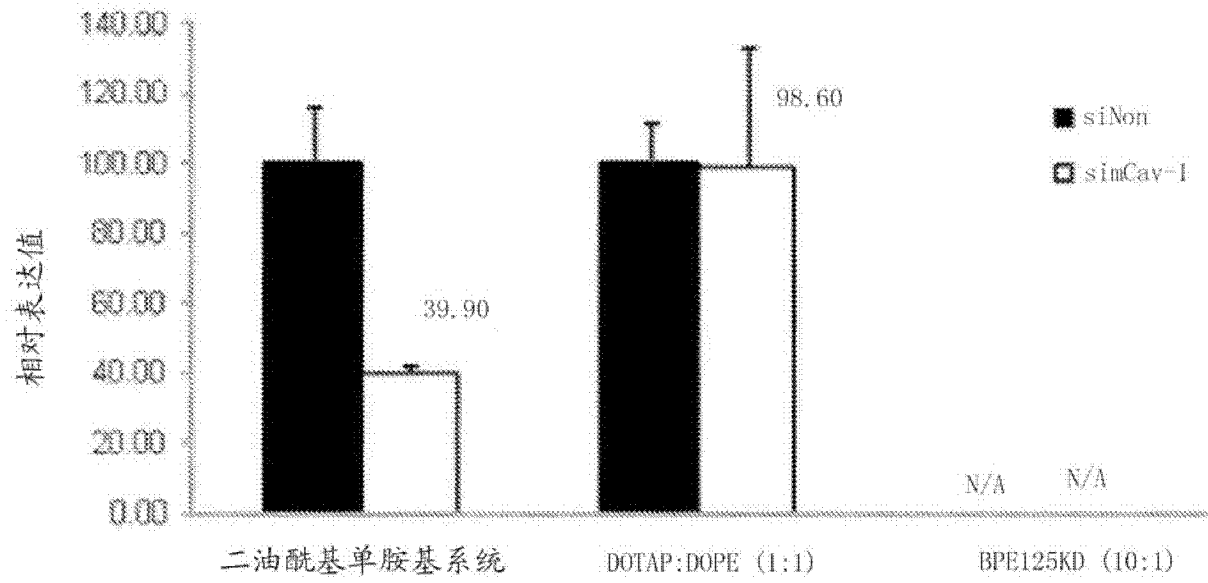


图8

在静脉注射多种 siRNA 制剂之后肺中的 mCav-1 表达水平



在静脉注射多种 siRNA 制剂之后肝中的 mCav-1 表达水平

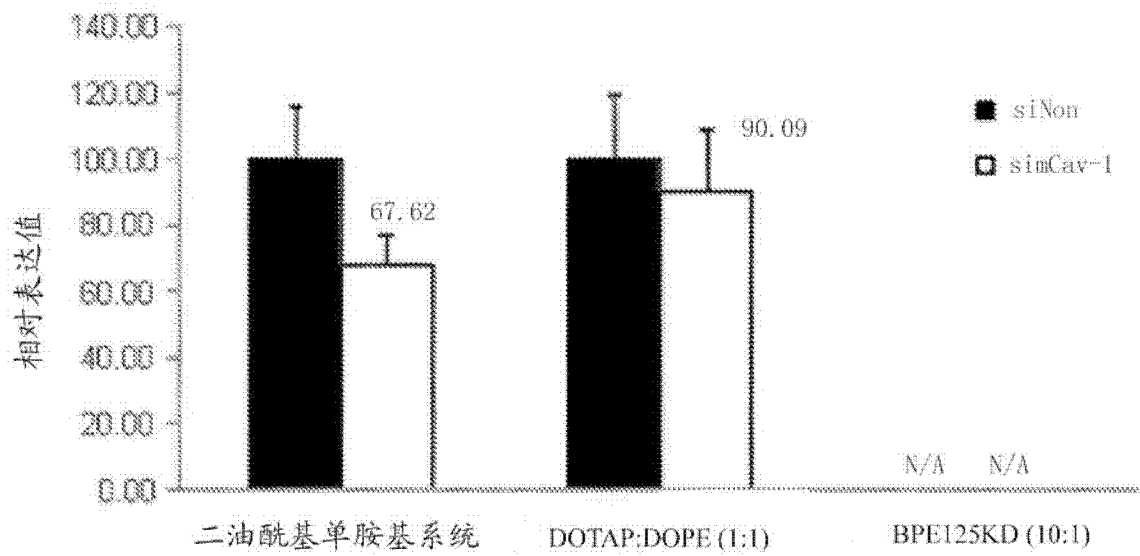


图9

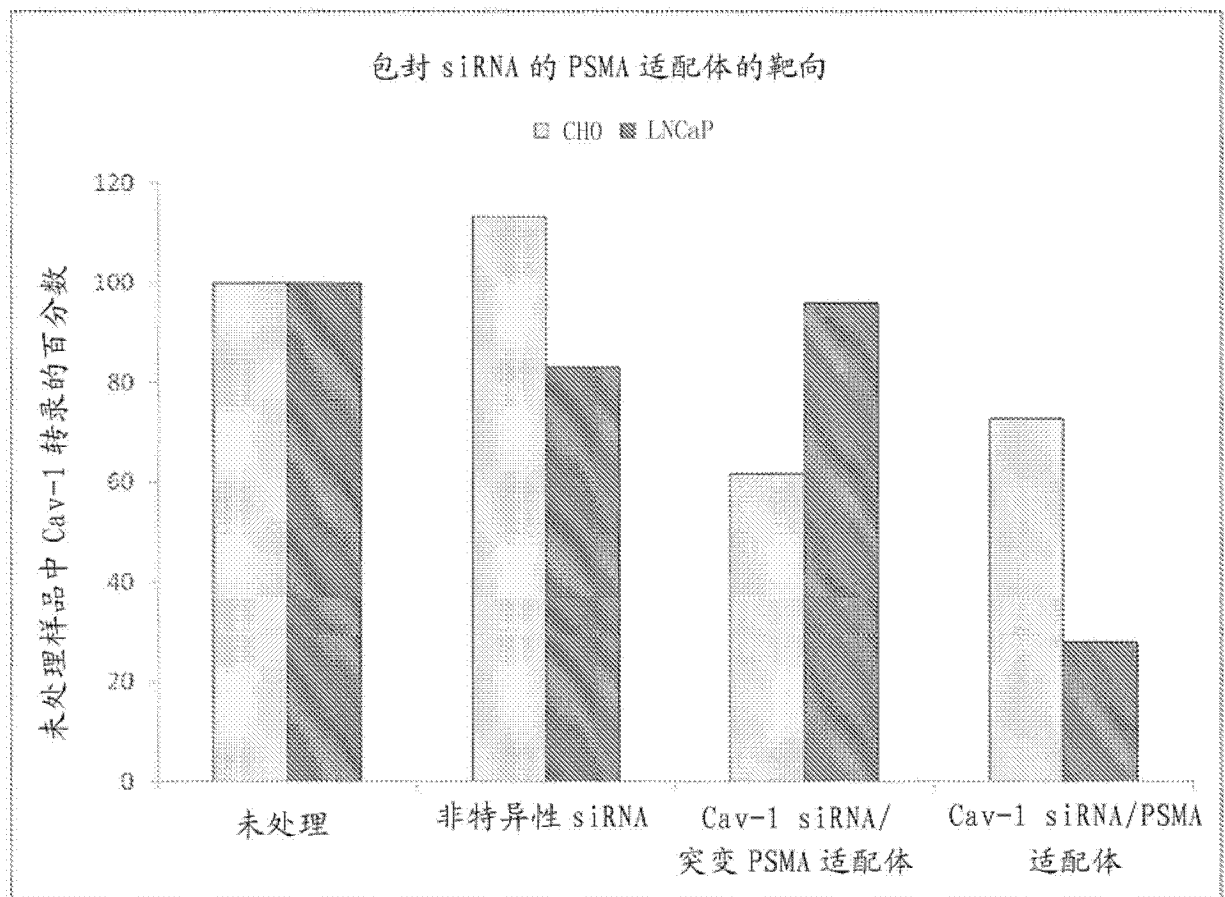


图10