



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101291653 B

(45) 授权公告日 2012.06.27

(21) 申请号 200480025168.2

(22) 申请日 2004.07.16

(30) 优先权数据

60/488,144 2003.07.16 US

60/503,279 2003.09.15 US

60/529,406 2003.12.11 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2006.03.02

(86) PCT申请的申请数据

PCT/CA2004/001051 2004.07.16

(87) PCT申请的公布数据

W02005/007196 EN 2005.01.27

(73) 专利权人 普洛维生物治疗公司

地址 加拿大不列颠哥伦比亚省

(72) 发明人 I·麦克拉克伦 E·G·安贝吉亚

J·海斯

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任

公司 11021

代理人 程金山

(51) Int. Cl.

A61K 9/127 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

(56) 对比文件

WO 02/087541 A1, 2002.11.07, 说明书第 2

页第 10-30 行, 第 5 页第 14-18 行, 第 8 页地
19-20 行, 第 26 页第 13 行.

Cynthia P. Paul, et al. Effective
expression of small interfering RNA
in human cells. nature biotechnology 20
5. 2002, 20(5), 505-508.

Sayda M. Elbashir, et al. Duplexes
of 21-nucleotide RNAs mediate
RNA interference in cultured mammalian cells.
NATURE 411 24. 2001, 411(24), 494-498.

审查员 张溪

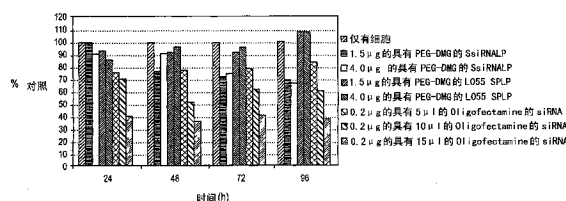
(54) 发明名称

脂质包封的干扰 RNA

(57) 摘要

本发明提供组合物和方法, 所述组合物和方法通过将包含 siRNA 分子的核酸-脂质颗粒传递给细胞使基因表达沉默。

在稳定转染的 GT26-CL25 细胞中的 B-gal 表达被抗-B-gal siRNA 下调



1. 一种核酸-脂质颗粒,所述核酸-脂质颗粒包含:
化学合成的 siRNA;
阳离子脂质;
非-阳离子脂质;和
抑制颗粒聚集的缀合的脂质,其中所述抑制颗粒聚集的缀合的脂质包括聚乙二醇-二烷氧基丙基 (PEG-DAA) 缀合物。
2. 权利要求 1 的核酸-脂质颗粒,其中所述核酸-脂质颗粒的所述 siRNA 组分在水溶液中对核酸酶的降解具有抗性。
3. 权利要求 1 的核酸-脂质颗粒,其中所述颗粒具有小于 150nm 的中位数直径。
4. 权利要求 1 的核酸-脂质颗粒,其中所述 siRNA 包括 15 至 60 个核苷酸。
5. 按照权利要求 1 的核酸-脂质颗粒,其中所述阳离子脂质是选自由 N,N-二油基-N,N-二甲基氯化铵 (DODAC),N,N-二硬脂基-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),及其组合组成的组中的成员。
6. 按照权利要求 1 的核酸-脂质颗粒,其中所述非-阳离子脂质是选自由二油酰磷脂酰乙醇胺 (DOPE),棕榈酰油酰磷脂酰胆碱 (POPC),卵磷脂酰胆碱 (EPC),二硬脂酰磷脂酰胆碱 (DSPC),胆固醇及其组合组成的组中的成员。
7. 按照权利要求 1 的核酸-脂质颗粒,其中抑制颗粒聚集的缀合的脂质还包含 PEG-二酰基甘油 (DAG),PEG-磷脂,PEG-神经酰胺,或其组合。
8. 按照权利要求 1 的核酸-脂质颗粒,其中所述 PEG-DAA 缀合物是选自由 PEG-二月桂基氧基丙基 (C₁₂),PEG-二肉豆蔻基氧基丙基 (C₁₄),PEG-二棕榈基氧基丙基 (C₁₆),PEG-二硬脂基氧基丙基 (C₁₈) 及其组合组成的组中的成员。
9. 按照权利要求 1 的核酸-脂质颗粒,其中所述阳离子脂质构成在所述颗粒中存在总脂质的 2%至 60%。
10. 按照权利要求 1 的核酸-脂质颗粒,其中所述阳离子脂质构成在所述颗粒中存在总脂质的 5%至 45%。
11. 按照权利要求 1 的核酸-脂质颗粒,其中所述阳离子脂质构成在所述颗粒中存在总脂质的 5%至 15%。
12. 按照权利要求 1 的核酸-脂质颗粒,其中所述阳离子脂质构成在所述颗粒中存在总脂质的 40%至 50%。
13. 按照权利要求 1 的核酸-脂质颗粒,其中所述非-阳离子脂质构成在所述颗粒中存在的总脂质的 5%至 90%。
14. 按照权利要求 1 的核酸-脂质颗粒,其中所述非-阳离子脂质构成在所述颗粒中存在的总脂质的 20%至 85%。
15. 按照权利要求 1 的核酸-脂质颗粒,其中所述抑制颗粒聚集的缀合的脂质构成在所述颗粒中存在的总脂质的 0.5%至 50%。
16. 按照权利要求 1 的核酸-脂质颗粒,其中所述抑制颗粒聚集的缀合的脂质构成在所述颗粒中存在的总脂质的 0.5%至 25%。

17. 按照权利要求 1 的核酸-脂质颗粒,其中所述抑制颗粒聚集的缀合的脂质构成在所述颗粒中存在的总脂质的 1%至 20%。

18. 按照权利要求 1 的核酸-脂质颗粒,其中所述抑制颗粒聚集的缀合的脂质构成在所述颗粒中存在的总脂质的 3%至 15%。

19. 按照权利要求 1 的核酸-脂质颗粒,其中所述抑制颗粒聚集的缀合的脂质构成在所述颗粒中存在的总脂质的 4%至 10%。

20. 按照权利要求 1 的核酸-脂质颗粒,其中所述非-阳离子脂质包括二棕榈酰磷脂酰胆碱 (DPPC)。

21. 按照权利要求 1 的核酸-脂质颗粒,其中所述核酸-脂质颗粒还包含胆固醇。

22. 按照权利要求 21 的核酸-脂质颗粒,其中所述胆固醇构成在所述颗粒中存在总脂质的 10%至 60%。

23. 按照权利要求 21 的核酸-脂质颗粒,其中所述胆固醇构成在所述颗粒中存在总脂质的 20%至 45%。

24. 按照权利要求 1 的核酸-脂质颗粒,其中所述非-阳离子脂质包括磷脂和胆固醇。

25. 按照权利要求 1 的核酸-脂质颗粒,其中所述 siRNA 充分包封在所述核酸-脂质颗粒的脂双层中。

26. 按照权利要求 1 的核酸-脂质颗粒,其中所述颗粒具有的 siRNA : 脂质的比率 (mg : mg) 为 0.01 至 0.08。

27. 按照权利要求 1 的核酸-脂质颗粒,其中所述颗粒具有的 siRNA : 脂质的比率 (mg : mg) 为 0.04。

28. 按照权利要求 1 的核酸-脂质颗粒,其中所述颗粒具有小于 100nm 的中位数直径。

29. 核酸-脂质颗粒用于配制组合物的应用,所述组合物用于将 siRNA 引入细胞,其中所述核酸-脂质颗粒包含:

化学合成的 siRNA ;

阳离子脂质 ;

非阳离子脂质 ;和

抑制颗粒聚集的缀合的脂质,其中所述抑制颗粒聚集的缀合的脂质包括聚乙二醇-二烷氧基丙基 (PEG-DAA) 缀合物。

30. 权利要求 29 的应用,其中所述核酸-脂质颗粒在靶细胞中的存在在施用所述颗粒后可检测达至少 48 小时。

31. 权利要求 29 的应用,其中所述核酸-脂质颗粒的存在在施用所述颗粒后可检测达至少 24 小时。

32. 权利要求 29 的应用,其中所述细胞在哺乳动物中。

33. 权利要求 32 的应用,其中超过 10%的所述颗粒在施用后 24 小时在所述哺乳动物的血浆中存在。

34. 权利要求 32 的应用,其中所述 siRNA 在施用位点远端的位点中的存在在施用所述颗粒后至少 48 小时是可检测的。

35. 权利要求 32 的应用,其中在施用所述颗粒后至少 24 小时,所述 siRNA 在施用位点的远端位点是可检测的。

36. 权利要求 35 的应用,其中所述哺乳动物是人。

37. 权利要求 29 的应用,其中所述颗粒具有权利要求 2-28 任一项的特征。

38. 核酸-脂质颗粒用于配制药剂的应用,所述药剂用于在哺乳动物受试者中使靶序列的表达沉默,其中所述核酸-脂质颗粒包含:

化学合成的 siRNA;

阳离子脂质;

非阳离子脂质;和

抑制颗粒聚集的缀合的脂质,其中所述抑制颗粒聚集的缀合的脂质包括聚乙二醇-二烷氧基丙基 (PEG-DAA) 缀合物。

39. 权利要求 38 的应用,其中配制所述核酸-脂质颗粒用于静脉内施用。

40. 权利要求 38 的应用,其中所述哺乳动物是人。

41. 权利要求 40 的应用,其中所述人患有与基因表达相关的疾病或病症,所述基因包含所述 siRNA 的靶序列。

42. 权利要求 41 的应用,其中所述疾病或病症是肝炎。

43. 权利要求 38 的应用,其中所述颗粒具有权利要求 2-28 任一项的特征。

44. 核酸-脂质颗粒用于配制药剂的应用,所述药剂用于在哺乳动物中体内传递 siRNA,其中所述核酸-脂质颗粒包含:

化学合成的 siRNA;

阳离子脂质;

非阳离子脂质;和

抑制颗粒聚集的缀合的脂质,其中所述抑制颗粒聚集的缀合的脂质包括聚乙二醇-二烷氧基丙基 (PEG-DAA) 缀合物。

45. 权利要求 44 的应用,其中所述核酸-脂质颗粒是配制用于静脉内施用。

46. 权利要求 44 的应用,其中所述哺乳动物是人。

47. 权利要求 46 的应用,其中所述人患有与基因表达相关的疾病或病症,所述基因包括所述 siRNA 的靶序列。

48. 权利要求 47 的应用,其中所述疾病或病症与所述基因的过表达相关。

49. 权利要求 47 的应用,其中所述疾病或病症是肝炎。

50. 权利要求 44 的应用,其中所述颗粒具有权利要求 2-28 任一项的特征。

51. 核酸-脂质颗粒用于配制药剂的应用,所述药剂用于将 siRNA 体内传递到哺乳动物的肝细胞,其中所述核酸-脂质颗粒包含:

化学合成的 siRNA;

阳离子脂质;

非阳离子脂质;和

抑制颗粒聚集的缀合的脂质,其中所述抑制颗粒聚集的缀合的脂质包括聚乙二醇-二烷氧基丙基 (PEG-DAA) 缀合物。

52. 权利要求 51 的应用,其中所述哺乳动物是人。

53. 权利要求 52 的应用,其中所述人患有与基因的表达相关的疾病或病症,所述基因包含所述 siRNA 的靶序列。

54. 权利要求 53 的应用,其中所述疾病或病症与所述基因的过表达相关。
55. 权利要求 53 的应用,其中所述疾病或病症是肝炎。
56. 权利要求 51 的应用,其中所述核酸-脂质颗粒是配制用于静脉内施用。
57. 权利要求 51 的应用,其中所述颗粒具有权利要求 2-28 任一特征。
58. 将核酸-脂质颗粒用于配制药剂的应用,所述药剂用于治疗哺乳动物受试者中的疾病,其中所述核酸-脂质颗粒包含:
 - 化学合成的 siRNA ;
 - 阳离子脂质 ;
 - 非阳离子脂质 ;和
 - 抑制颗粒聚集的缀合的脂质,其中所述抑制颗粒聚集的缀合的脂质包括聚乙二醇-二烷氧基丙基 (PEG-DAA) 缀合物,并且其中所述疾病与基因的表达相关,所述基因包含所述 siRNA 的靶序列。
59. 权利要求 58 的应用,其中所述哺乳动物是人。
60. 权利要求 58 的应用,其中所述疾病是肝炎。
61. 权利要求 60 的应用,其中所述肝炎是乙型肝炎。
62. 权利要求 60 的应用,其中所述肝炎是丙型肝炎。
63. 权利要求 58 的应用,其中所述药剂适合于静脉内施用。
64. 权利要求 58 的应用,其中所述颗粒具有权利要求 2-28 任一特征。

脂质包封的干扰 RNA

[0001] 对相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2003 年 12 月 11 日提交的美国临时专利申请号 60/529,406 ;2003 年 9 月 15 日提交的 60/503,279, 和 2003 年 7 月 16 日提交的 60/488,144, 的利益, 将它们每个的公开内容全文特此并入作为参考以满足所有的目的。

发明领域

[0003] 本发明涉及组合物和方法, 其通过传递包封核酸的血清稳定性脂质传递载体来对核酸进行治疗性传递从而提供在细胞或哺乳动物中有效的 RNA 干扰 (RNAi)。更具体地, 本发明涉及使用被包封在血清稳定性脂质颗粒中的小干扰 RNA (siRNA), 所述颗粒具有适合于全身传递的小直径。

[0004] 发明背景

[0005] RNA 干扰 (RNAi) 是进化上是保守的、由双链 RNA (dsRNA) 引发的序列特异性机制, 所述双链 RNA (dsRNA) 诱导互补靶单链 mRNA 的降解并使相应的翻译序列“沉默”。(McManus 和 Sharp, *Nature Rev. Genet.* 3 :737 (2002))。RNAi 通过将更长的 dsRNA 链酶促裂解成约 21-23 个核苷酸长度的生物活性的“短干扰 RNA” (siRNA) 序列来发挥功能 (Elbashir, et al., *GenesDev.* 15 :188 (2001))。siRNA 可以用于使目的基因产物的翻译下调或沉默。例如, 理想的是下调与各种疾病和病症相关的基因。

[0006] siRNA 的传递仍旧是个问题 (见例如, Novina 和 Sharp, *Nature* 430 :161-163 (2004) ;和 Garber, *J. Natl. Cancer Inst.* 95 (7) :500-2 (2003))。一种有效的和安全的核酸传递系统是 siRNA 有效用于治疗所必需的。施用给大多数受试者的裸 dsRNA 将 : (1) 被内源核酸酶降解 ;和 (2) 将不能穿越细胞膜从而接触并使它们的靶基因序列沉默。

[0007] 病毒载体是相对有效的基因传递系统, 但是会遇到各种安全性问题, 诸如不理想的免疫应答的可能。而且, 病毒系统从循环中迅速被清除, 限制到“初次通过 (first-pass)”器官诸如肺、肝和脾中的转染。此外, 这些系统诱导免疫应答, 所述免疫应答损害通过连续注射的传递。结果, 非病毒基因传递系统正在受到越来越多的注意 (Worgall, et al., *Human Gene Therapy* 8 :37 (1997) ;Peeters, et al., *Human Gene Therapy* 7 :1693 (1996) ; Yei, et al., *Gene Therapy* 1 :192 (1994) ;Hope, et al., *Molecular Membrane Biology* 15 :1 (1998))。

[0008] 质粒 DNA- 阳离子脂质体复合物是目前最常使用的非病毒基因传递载体 (Felgner, *Scientific American* 276 :102 (1997) ;Chonn, et al., *Current Opinion in Biotechnology* 6 :698 (1995))。例如, 由两亲性化合物、中性脂质和去污剂组成以转染昆虫细胞的阳离子脂质体复合物公开于美国专利号 6,458,382。阳离子脂质体复合物还公开于美国专利申请公开 2003/0073640。然而, 阳离子脂质体复合物较大, 系统很不确定, 其不适于全身应用并可激发相当大的毒性副作用 (Harrison, et al., *Biotechniques* 19 :816 (1995) ;Li, et al., *The Gene* 4 :891 (1997) ;Tam, et al., *Gene Ther.* 7 :1867 (2000))。

作为较大的带正电荷的聚集体,当被体内施用时, lipoplexes 被迅速清除,伴随在初次通过器官,特别是肺中观察到最高的表达水平 (Huang, et al., Nature Biotechnology 15 : 620(1997) ;Templeton, et al., Nature Biotechnology 15 :647(1997) ;Hofland, et al., Pharmaceutical Research 14 :742(1997))。

[0009] 其它的脂质体传递系统包括,例如,如分别在例如美国专利号 6,429,200 ;美国专利申请号 2003/0026831 ;和美国专利申请号 2002/0081736 和 2003/0082103 中公开的反胶团、阴离子和聚合物脂质体的应用。

[0010] 最近的工作已经显示核酸可被包封在小的 (约 70nm 直径)“稳定的质粒-脂质颗粒”(SPLP) 中,其由包封在双层脂质载体中的单一质粒组成 (Wheeler, et al. Gene Therapy 6 :271(1999))。这些 SPLPs 典型地包含“融合性的 (fusogenic)”脂质二油酰磷脂酰乙醇胺 (DOPE),低水平的阳离子脂质 (即,10%或更少),并在存在聚 (乙二醇) (PEG) 包衣时在水性介质中是稳定的。SPLP 具有全身应用,因为在静脉内 (i. v.) 注射后,它们显示延长的循环生存期,由于在这些区域增加的血管通透性,它们优先聚集在远侧肿瘤位点,并可在这些肿瘤位点介导转基因表达。在 i. v. 注射包含荧光素酶标记基因的 SPLP 后,在肿瘤位点观察到的转基因表达的水平优于使用质粒 DNA- 阳离子脂质体复合物 (lipoplexes) 或裸 DNA 可获得的水平。

[0011] 然而,在本领域中仍存在对于将核酸,诸如 siRNA 引入细胞中的新的和更有效方法及组合物的强烈需要。本发明解决这个和其它需求。

[0012] 发明概述

[0013] 本发明提供有效用于包封一个或多个 siRNA 分子的稳定的核酸-脂质颗粒 (SNALP),制备包含 siRNA 的 SNALPs 的方法,包含 siRNA 的 SNALPs 和将所述 SNALPs 传递和/或施用到受试者以使靶基因序列表达沉默的方法。

[0014] 在一个实施方案中,本发明提供核酸-脂质颗粒,其包含:阳离子脂质、非阳离子脂质、抑制颗粒聚集的缀合的脂质,和 siRNA。在一些实施方案中,siRNA 分子被充分包封在核酸-脂质颗粒的脂双层中从而使在核酸-脂质颗粒中的核酸在水溶液中对于核酸酶的降解具有抗性。所述核酸对于哺乳动物是基本无毒的。所述 siRNA 分子可包含约 15 至约 60 个核苷酸。所述 siRNA 分子可衍生自长度大于约 25 个核苷酸的双链 RNA。在一些实施方案中,所述 siRNA 转录自质粒,特别是包含靶序列的 DNA 模板的质粒。

[0015] 阳离子脂质可以是 N,N-二油基-N,N-二甲基氯化铵 (DODAC),N,N-二硬脂基-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-(2,3-二油基氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵 (DOTMA),和 N,N-二甲基-2,3-二油基氧基)丙胺 (DODMA),及其混合物的一个或多个。非阳离子脂质可以是二油酰磷脂酰乙醇胺 (DOPE),棕榈酰油酰磷脂酰胆碱 (POPC),卵磷脂酰胆碱 (EPC),二硬脂酰磷脂酰胆碱 (DSPC),胆固醇及其组合的一个或多个。

[0016] 抑制颗粒聚集的缀合的脂质可以是聚乙二醇 (PEG)-脂质缀合物,聚酰胺 (ATTA)-脂质缀合物及其组合的一个或多个。PEG-脂质缀合物可以是 PEG-二烷氧基丙基 (DAA),PEG-二酰基甘油 (DAG),PEG-磷脂,PEG-神经酰胺及其组合的一个或多个。PEG-DAG 缀合物可以是 PEG-二月桂酰甘油 (C₁₂),PEG-二肉豆蔻酰甘油 (C₁₄),PEG-二棕榈酰甘油 (C₁₆),和 PEG-二硬脂酰甘油 (C₁₈),及其组合的一个或多个。PEG-DAA 缀合物可以是 PEG-二

月桂基氧基丙基 (C₁₂)，PEG- 二肉豆蔻基氧基丙基 (C₁₄)，PEG- 二棕榈基氧基丙基 (C₁₆) 和 PEG- 二硬脂基氧基丙基 (C₁₈)，及其组合的一个或多个。所述核酸-脂质颗粒还可包含阳离子聚合物脂质。

[0017] 在一些实施方案中，通过在第一个储存器中提供水溶液和在第二个储存器中提供有机脂质溶液并将水溶液与有机脂质溶液混和从而基本瞬间产生包封干扰 RNA 的脂质体来形成所述颗粒。在一些实施方案中，通过在基于去污剂或基于有机溶剂的系统中形成疏水中间体复合体，随后去除去污剂或有机溶剂来制成所述颗粒。优选的实施方案是电荷中性的。

[0018] 在一个实施方案中，干扰 RNA 转录自质粒并且质粒在去污剂溶液中与阳离子脂质结合从而提供包被的核酸-脂质复合体。接着，所述复合体与非阳离子脂质接触以提供去污剂、核酸-脂质复合体和非阳离子脂质的溶液，接着去污剂被去除从而提供血清稳定性的核酸-脂质颗粒的溶液，其中所述包含干扰 RNA 模板的质粒被包封在脂双层中。因此，形成的颗粒具有约 50-150nm 的大小。

[0019] 在另一个实施方案中，通过在有机溶剂中制备阳离子脂质和非阳离子脂质的混和物来形成血清稳定性核酸-脂质颗粒；使包含干扰 RNA 的核酸的水溶液与阳离子和非阳离子脂质的混和物接触从而提供清晰的单相；并且去除有机溶剂从而提供核酸-脂质颗粒的混悬液，其中核酸被包封在脂双层中，所述颗粒在血清中是稳定的并且具有约 50-150nm 大小。

[0020] 本发明的核酸-脂质颗粒有效用于治疗性传递包含 siRNA 序列的核酸。具体而言，本发明的目的是提供通过下调或使靶核酸序列的翻译沉默来在哺乳动物中治疗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，并将所述颗粒施用到需要这些治疗的患者中（例如，被诊断患有与包含靶核酸序列的基因的表达或过表达相关的疾病或病症的患者）。或者，将细胞从患者中移去，siRNA 被体外传递，并将所述细胞再注射到患者中。在一个实施方案中，本发明提供通过使细胞与核酸-脂质颗粒接触来将 siRNA 分子引入细胞的方法，所述核酸-脂质颗粒包括阳离子脂质、非阳离子脂质、抑制聚集的缀合脂质和 siRNA。

[0021] 可以，例如通过静脉内、肠胃外或腹膜内施用核酸-脂质颗粒。在一个实施方案中，在注射后约 24, 36, 48, 60, 72, 84, 或 96 小时，核酸-脂质颗粒的总施用剂量至少的约 10% 出现在血浆中。在一个实施方案中，在注射后 24, 36, 48, 60, 72, 84, 或 96 小时，超过 20%, 30%, 40% 的并且多至 60%, 70% 或 80% 的核酸-脂质颗粒的总注射剂量出现在血浆中。在一个实施方案中，siRNA 在靶组织（即，肺、肝、肿瘤或在炎症位点）的细胞中的存在可在施用后 24, 48, 72 和 96 小时后检测得到。在一个实施方案中，靶序列表达的下调可在施用后 24, 48, 72 和 96 小时后检测得到。在一个实施方案中，靶序列表达的下调优先发生在肿瘤细胞或在炎症位点的细胞中。在一个实施方案中，siRNA 在施用位点远侧位点的存在可在核酸-脂质颗粒的静脉内注射至少 4 天后检测得到。在另一个实施方案中，siRNA 在靶组织（即，肺、肝、肿瘤或在炎症位点）的细胞中的存在可在核酸-脂质颗粒注射的至少 4 天后检测得到。

[0022] 所述颗粒适合用于静脉内核酸转移因为它们在循环中是稳定的，大小是药物动力学性质所需要的，导致了与血管外位点和靶细胞群的接近。本发明还提供包含核酸-脂质

颗粒的药用组合物。

[0023] 本发明的另一个实施方案提供体内传递 siRNA 的方法。将所述核酸-脂质颗粒施用（例如，静脉内地，皮下地，腹膜内地，或真皮下地（subdermally）给受试者（例如，哺乳动物诸如人），所述核酸-脂质颗粒包含阳离子脂质、非阳离子脂质、抑制颗粒聚集的缀合脂质，和 siRNA。在一些实施方案中，本发明提供将干扰 RNA 传递给哺乳动物受试者肝脏的体内传递。

[0024] 本发明的另一个实施方案提供治疗哺乳动物受试者的疾病或病症的方法。将治疗有效量的核酸-脂质颗粒施用给患有疾病或病症的哺乳动物受试者（例如，啮齿动物诸如小鼠，灵长类动物诸如人或猴），所述核酸-脂质颗粒包含阳离子脂质、非阳离子脂质、抑制颗粒聚集的缀合脂质，和 siRNA。在一些实施方案中，所述疾病或病症与基因的表达和 / 或过量表达相关并且基因的表达或过量表达被 siRNA 沉默。在一些实施方案中，所述疾病是病毒性疾病诸如，例如肝炎（例如，甲型肝炎、乙型肝炎、丙型肝炎、丁型肝炎、戊型肝炎、G 型肝炎，或其组合）。在一些实施方案中，所述疾病或病症是肝疾病或病症，诸如，例如血脂异常（dyslipidemia）。

[0025] 附图简述

[0026] 图 1 举例说明通过在 DSPC: 胆固醇 :DODMA:PEG-DMG 脂质体中体外传递被包封的抗- β -半乳糖苷酶 siRNA 来下调 β -半乳糖苷酶在 CT26. CL25 细胞中的表达。

[0027] 图 2 举例说明 PEG-二酰基甘油和 PEG-神经酰胺 C₂₀ 的结构。

[0028] 图 3 举例说明用 LUVs 进行的清除率研究显示包含 PEG-DAGs 的 SNALPs 是可与包含 PEG-神经酰胺 C₂₀ 的 SNALPs 相比较的。

[0029] 图 4 举例说明包含 PEG-DAGs 的 SNALPs 可通过去污剂透析方法来进行配制。

[0030] 图 5 举例说明包含 PEG-DAGs 的 SNALPs 的药物代谢动力学特性。

[0031] 图 6 举例说明包含 PEG-DAGs 的 SNALPs 的生物分布特性。

[0032] 图 7 举例说明在携带 Neuro-2a 肿瘤的雄性 A/J 小鼠中，在 IV 施用包含 PEG-神经酰胺 C₂₀ 的 SPLPs 后 24 小时对比 IV 施用包含 PEG-DAGs 的 SPLPs 后 24 小时的萤光素酶基因的表达。

[0033] 图 8 举例说明在携带 Neuro-2a 肿瘤的雄性 A/J 小鼠中，在 IV 施用包含 PEG-神经酰胺 C₂₀ 的 SPLPs 后 48 小时对比 IV 施用包含 PEG-DAGs 的 SPLPs 后 48 小时的萤光素酶基因的表达。

[0034] 图 9 举例说明在携带 Neuro-2a 肿瘤的雄性 A/J 小鼠中，在 IV 施用包含 PEG-神经酰胺 C₂₀ 的 SPLPs 后 72 小时对比 IV 施用包含 PEG-DAGs 的 SPLPs 后 72 小时的萤光素酶基因的表达。

[0035] 图 10 举例说明适合用在本发明中的三个示范性 PEG-二烷氧基丙基衍生物，即 N-(2,3-二肉豆蔻基氧基丙基)氨基甲酸酯 PEG₂₀₀₀ 甲基醚（即，PEG-C-DMA），N-(2,3-二肉豆蔻基氧基丙基)酰胺 PEG₂₀₀₀ 甲基醚（即，PEG-A-DMA），和 N-(2,3-二肉豆蔻基氧基丙基)琥珀酰胺 PEG₂₀₀₀ 甲基醚（即，PEG-S-DMA）的结构。

[0036] 图 11 举例说明显示在静脉内施用包含 PEG-DAA 缀合物和 PEG-DAG 缀合物的 SPLP 后 48 小时在肿瘤中的萤光素酶基因表达的数据。

[0037] 图 12 举例说明显示在静脉内施用包含 PEG-DAA 缀合物和 PEG-DAG 缀合物的 SPLP

后在肝、肺、脾、心脏和肿瘤中的荧光素酶基因表达的数据。

[0038] 图 13 举例说明在施用 SPLPs 和 SNALPs 后在具有 Neuro-2a 肿瘤的雄性 A/J 小鼠中的清除率研究的数据,所述 SPLPs 包括 PEG-DAA 缀合物和在 CMV 启动子控制下包含编码荧光素酶的质粒,所述 SNALPs 包括 PEG-DAA 缀合物和包含抗 - 荧光素酶 siRNA。

[0039] 图 14 举例说明在具有 Neuro-2a 肿瘤的雄性 A/J 小鼠中,对 SPLPs 和 SNALPs 的药物代谢动力学特性研究的数据,所述 SPLPs 包括 PEG-DAA 缀合物并包含在 CMV 启动子控制下的编码荧光素酶的质粒,所述 SNALPs 包括 PEG-DAA 缀合物并包含抗 - 荧光素酶 siRNA。

[0040] 图 15 举例说明在施用 SPLPs, pSPLPs 和 SNALPs 后在具有 Neuro-2a 肿瘤的雄性 A/J 小鼠中的清除率研究的数据,所述 SPLPs 包括 PEG-DAA 缀合物或 PEG-DAG 缀合物并包含在 CMV 启动子控制下编码荧光素酶的质粒,所述 pSPLPs 包含 PEG-DAG 缀合物并包含在 CMV 控制下的编码荧光素酶的质粒,所述 SNALPs 包括 PEG-DAA 缀合物并包含抗 - 荧光素酶 siRNA。

[0041] 图 16 举例说明在具有 Neuro-2a 肿瘤的雄性 A/J 小鼠中对 SPLPs, pSPLPs 和 SNALPs 的药物代谢动力学特性的研究的数据,所述 SPLPs 包括 PEG-DAA 缀合物或 PEG-DAG 缀合物并包含在 CMV 启动子下的编码荧光素酶的质粒,所述 pSPLPs 包括 PEG-DAG 缀合物并包含在 CMV 启动子控制下的编码荧光素酶的质粒,所述 SNALPs 包括 PEG-DAA 缀合物并包含抗荧光素酶 siRNA。

[0042] 图 17 举例说明体外数据,所述体外数据证明在用 SPLPs 和 SNALPs 处理的表达荧光素酶的细胞中的荧光素酶表达的沉默,所述 SPLPs 包括 PEG- 脂质缀合物并包含在 CMV 启动子的控制下编码荧光素酶的质粒,所述 SNALPs 包括 PEG- 脂质缀合物并包含抗荧光素酶 siRNA。

[0043] 图 18 举例说明体内数据,所述体内数据证明在用 SPLPs 和 SNALPs 处理的具有 Neuro-2a 肿瘤的雄性 A/J 小鼠中的荧光素酶表达的沉默,所述 SPLPs 包括 PEG-DAA 缀合物并包含在 CMV 启动子的控制下编码荧光素酶的质粒,所述 SNALPs 包括 PEG-DAA 缀合物并包含抗荧光素酶 siRNA。

[0044] 图 19 举例说明体内数据,所述体内数据证明在用 SPLPs 和 SNALPs 处理的具有 Neuro-2a 肿瘤的雄性 A/J 小鼠中的荧光素酶表达的沉默,所述 SPLPs 包括 PEG-DAA 缀合物并包含在 CMV 启动子的控制下编码荧光素酶的质粒,所述 SNALPs 包括 PEG-DAA 缀合物并包含抗荧光素酶 siRNA。

[0045] 图 20 举例说明体内数据,所述体内数据证明在用 SPLPs 和 SNALPs 处理的具有 Neuro-2a 肿瘤的雄性 A/J 小鼠中的荧光素酶表达的沉默,所述 SPLPs 包括 PEG-DAA 缀合物并包含在 CMV 启动子的控制下编码荧光素酶的质粒,所述 SNALPs 包括 PEG-DAA 缀合物并包含抗荧光素酶 siRNA。

[0046] 图 21 举例说明体内数据,所述体内数据证明在用 SPLPs 和 SNALPs 处理的具有 Neuro-2a 肿瘤的雄性 A/J 小鼠中的荧光素酶表达的沉默,所述 SPLPs 包括 PEG-DAA 缀合物并包含在 CMV 启动子的控制下编码荧光素酶的质粒,所述 SNALPs 包括 PEG-DAA 缀合物并包含抗荧光素酶 siRNA。

[0047] 图 22 举例说明体内数据,所述体内数据证明在用 SPLPs 和 SNALPs 处理的具有 Neuro-2a 肿瘤的雄性 A/J 小鼠中的荧光素酶表达的沉默,所述 SPLPs 包括 PEG-DAA 缀合物并包含在 CMV 启动子的控制下编码荧光素酶的质粒,所述 SNALPs 包括 PEG-DAA 缀合物并包

含抗荧光素酶 siRNA。

[0048] 发明详述

[0049] I. 介绍

[0050] 本发明提供有效用于包封一个或多个 siRNA 分子的稳定核酸-脂质颗粒 (SNALP)，制备包含 siRNA 的 SNALPs 的方法，包含 siRNA 的 SNALPs，和传递和 / 或施用 SNALPs 给受试者以使靶基因序列的表达沉默的方法。

[0051] 本发明基于在 SNALPs 中包封短的干扰 RNA (siRNA) 分子的意外的成功。使用本发明的方法，将 siRNA 分子以大于 70% 的效率，更通常地大于 80-90% 的效率来将 siRNA 分子包封在 SNALPs 中。本文所述的 SNALPs 可方便地进行体外和体内使用从而有效地将 siRNA 分子局部地或全身地传递施用到表达靶基因的细胞中。一旦进行传递，在 SNALPs 中的 siRNA 分子使靶基因的表达沉默。

[0052] 本文所述的 SNALPs 的直径典型地 < 150nm 并在更长的时间阶段内在循环中保持完整从而成功将 siRNA 传递给靶组织。所述 SNALPs 是不与细胞和血管区室的其它成分相互作用的高度稳定的、包含血清抗性核酸的颗粒。而且，所述 SNALPs 还容易地在疾病位点与靶细胞相互作用从而促进所需的核酸（例如，siRNA 或编码 siRNA 的质粒）的细胞内传递。

[0053] II. 定义

[0054] 术语“脂质”指一组有机化合物，其包括，但不限于脂肪酸的酯，并且特征是在水中不溶的，但是在许多有机溶剂中是可溶的。通常将它们分成三类：(1) “简单的脂质”其包括脂肪和油以及蜡；(2) “化合物脂质”其包括磷脂和糖脂；(3) “衍生的脂质”诸如类固醇。

[0055] “脂质小泡”指可用于传递化合物的任何脂质组合物，其包括，但不限于，脂质体，其中水体积被两亲性脂双层所包封；或其中脂质包被包括大分子组分的内部，诸如包括干扰 RNA 序列的质粒，伴随减少的水性内部；或脂质聚集体或胶团，其中被包封的成分包含在相对混乱的脂质混合物中。

[0056] 用于本文时，“包封的脂质”可指提供具有充分包封、部分包封或两者的化合物的脂质制剂。在一个优选的实施方案中，将所述核酸充分包封在脂质制剂中。

[0057] 用于本文时，术语“SNALP”指稳定的核酸脂质颗粒。SNALP 代表包被减少的水性内部的脂质的小泡，所述内部包括核酸诸如干扰 RNA 序列或其中干扰 RNA 被转录的质粒。

[0058] 术语“形成小泡的脂质”倾向于包括任何具有疏水部分和极性头部基团的两亲性脂质并且其本身可以在水中自发形成双层小泡，示例为大多数磷脂。

[0059] 术语“采用小泡的脂质”倾向于包括稳定与脂双层结合的任何两亲性脂，以及其它的两亲性脂质，其疏水部分与内部，双层膜的疏水区域接触，并且其极性头部基团部分朝向外部，膜的极性表面。采用小泡的脂质包括这样的脂质，其能够独立地适宜于采用非层状的相，还能够在存在双层稳定组分时，采取双层结构。典型的实例是 DOPE（二油酰磷脂酰乙醇胺）。双层稳定组分包括，但不限于，抑制 SNALPs 聚集的缀合的脂质，聚酰胺低聚物（例如，ATTA-脂质衍生物）、肽、蛋白质、去污剂、脂质衍生物、PEG-脂质衍生物诸如与二烷氧基丙基偶联的 PEG、与二酰基甘油偶联的 PEG、与磷脂酰乙醇胺偶联的 PEG，和与神经酰胺缀合的 PEG（见，美国专利号 5,885,613，将其并入本文作为参考）。

[0060] 术语“两亲性脂质”部分地指任何适合的材料，其中脂质材料的疏水部分朝向疏水

相,而亲水部分朝向水相。两亲性脂质通常是脂质小泡的主要成分。亲水性质来自极性或带电基团诸如碳水化合物,磷酸盐(酯),羧基、硫酸根合、氨基、巯基、硝基、羟基和其它类似基团的存在。疏水性可以通过非极性基团的包含来赋予,所述基团包括,但不限于,长链饱和和不饱和脂族烃基团和由一个或多个芳香族、脂环族或杂环基团取代的这样的基团。两亲性化合物的实例包括,但不限于,磷脂、氨脂质和神经鞘脂类。磷脂的代表性实例包括,但不限于,磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、磷脂酸、棕榈酰油酰磷脂酰胆碱、溶血磷脂酰胆碱、溶血磷脂酰乙醇胺、二棕榈酰磷脂酰胆碱、二油酰磷脂酰胆碱、二硬脂酰磷脂酰胆碱或二亚油酰磷脂酰胆碱。缺乏磷的其它化合物,诸如鞘磷脂、鞘糖脂家族、二酰基甘油和 β -酰氧基酸也在被称为两亲性脂质的组中。另外,上述的两亲性脂质可与其它脂质混和,所述脂质包括甘油三酯和固醇。

[0061] 术语“中性脂质”指在选定的 pH 以未带电荷或中性两性离子形式存在的许多脂质种类中的任何一种。在生理 pH,这样的脂质包括,例如,二酰基磷脂酰胆碱、二酰基磷脂酰乙醇胺、神经酰胺、神经鞘磷脂、脑磷脂、胆固醇、脑苷脂和二酰基甘油。

[0062] 术语“非阳离子脂质”指如上所述的任何中性脂质以及阴离子脂质。

[0063] 术语“阴离子脂质”指在生理 pH 带负电荷的任何脂质。这些脂质包括,但不限于,磷脂酰甘油、心磷脂、二酰基磷脂酰丝氨酸、二酰基磷脂酸、N- 十二烷酰磷脂酰乙醇胺、N- 琥珀酰磷脂酰乙醇胺、N- 戊二酰磷脂酰乙醇胺,赖氨酰磷脂酰甘油、棕榈酰油酰磷脂酰甘油(POPG),和其它与中性脂质连接的阴离子基团。

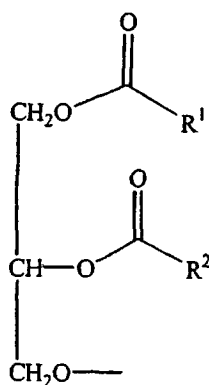
[0064] 术语“阳离子脂质”指许多脂质种类中的任何一种,其在选定的 pH,诸如生理 pH 携带净正电荷。这些脂质包括,但不限于,N,N- 二油基-N,N- 二甲基氯化铵(“DODAC”);N-(2,3- 二油基氧基)丙基)-N,N,N- 三甲基氯化铵(“DOTMA”);N,N- 二硬脂基-N,N- 二甲基溴化铵(“DDAB”);N-(2,3- 二油酰氧基)丙基)-N,N,N- 三甲基氯化铵(“DOTAP”);3-(N-(N',N'- 二甲基氨基乙烷)氨基甲酰基)胆固醇(“DC-Chol”)和 N-(1,2 二肉豆蔻基氧基丙-3-基)-N,N- 二甲基-N- 羟乙基溴化铵(“DMRIE”)。如下的脂质是阳离子的并且在低于生理 pH 时具有正电荷:DODAP, DODMA, DMDMA 等。

[0065] 术语“疏水脂质”指具有非极性基团的化合物,其包括,但不限于,长链饱和和不饱和脂族烃基团并且这些基团任选地被一个或多个芳香族、脂环族或杂环族基团所取代。合适的实例包括,但不限于,二酰基甘油、二烷基甘油、N,N- 二烷基氨基、1,2- 二酰氧基-3- 氨基丙烷和 1,2- 二烷基-3- 氨基丙烷。

[0066] 术语“融合性的”指脂质体,SNALP 或其它药物传递系统与细胞膜融合的能力。所述膜可以是质膜或围绕细胞器,例如内体、核等的膜。

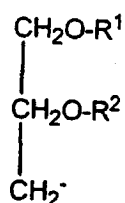
[0067] 术语“二酰基甘油”指具有 2- 脂肪酰基链的化合物,其 R^1 和 R^2 都独立地具有通过酯键与甘油的 1- 和 2- 位置键合的 2-30 个碳原子。所述酰基基团可以是饱和的或具有不同程度的不饱和。二酰基甘油具有如下的通式:

[0068]



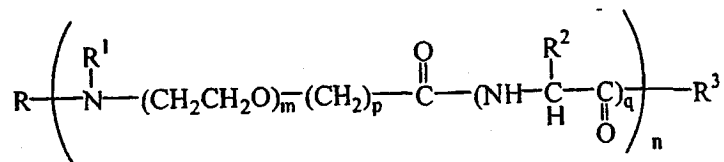
[0069] 术语“二烷氧基丙基”指具有 2-烷基链的化合物,其 R^1 和 R^2 都独立地具有 2-30 个碳。烷基基团可以是饱和的或具有不同程度的不饱和。二烷氧基丙基具有如下的通式:

[0070]



[0071] 术语“ATTA”或“聚酰胺”指,但不限于,在美国专利号 6,320,017 和 6,586,559 中公开的化合物,将它们都并入本文作为参考。这些化合物包括具有如下式的化合物:

[0072]



[0073] 其中:R 是选自由氢、烷基和酰基组成的组中的成员; R^1 是选自由氢和烷基组成的组中的成员;或任选地,R 和 R^1 和它们所结合的氮原子形成叠氮基部分; R^2 是选自氢、任选地取代的烷基、任选地取代的芳基和氨基酸侧链的组的成员; R^3 是选自由氢、卤素、羟基、烷氧基、巯基、胍基、氨基和 NR^4R^5 组成的组的成员,其中 R^4 和 R^5 独立地是氢或烷基;n 是 4-80;m 是 2-6;p 是 1-4;并且 q 是 0 或 1。那些本领域技术人员将清楚的是其它聚酰胺可用在本发明的化合物中。

[0074] 术语“核酸”或“聚核酸”指包含至少两个脱氧核苷酸或核苷酸的以单或双链形式存在的聚合物。除非具体限制,该术语涵盖包含天然核苷酸的已知类似物的核酸,其具有与参照核酸相似的结合特性并且以与天然存在的核苷酸相似的方式进行代谢。除非另外指出,具体的核酸序列还暗含涵盖其保守性修饰的变体(例如,简并密码子取代),等位基因,直向同源物,SNPs 和互补序列以及明显指出的序列。具体地,可通过产生序列来获得简并密码子取代,在所述序列中一个或多个选定(或所有)的密码子的第三个位置由混和的碱基和/或脱氧肌苷残基所取代(Batzer et al., Nucleic Acid Res. 19:5081(1991); Ohtsuka et al., J. Biol. Chem. 260:2605-2608(1985); 和 Cassol et al. (1992); Rossolini et al., Mol. Cell. Probes 8:91-98(1994))。“核苷酸”包含糖脱氧核糖(DNA)或核糖(RNA),

碱基,和磷酸基团。核苷酸通过磷酸基团进行连接。“碱基”包括嘌呤和嘧啶,其进一步包括天然化合物腺嘌呤、胸腺嘧啶、鸟嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶、肌苷,和天然类似物,以及嘌呤和嘧啶的合成衍生物,其包括,但不限于取代新的反应基的修饰,所述反应基诸如,但不限于,胺、醇、硫醇、羧酸盐(酯)和卤代烷。DNA 可以以反义、质粒 DNA、质粒 DNA 的部分、预压缩的 DNA、聚合酶链反应(PCR)的产物、载体(P1,PAC,BAC,YAC,人工染色体)、表达盒、嵌合序列、染色体 DNA 或这些组的衍生物存在。术语核酸与基因、cDNA、由基因编码的 mRNA 和干扰 RNA 分子可交替地使用。

[0075] 术语“基因”指包括部分长度或全长的编码序列的核酸(例如,DNA 或 RNA)序列,所述编码序列是产生多肽或多肽前体(例如,来自 A,B,C,D,E,G 型肝炎病毒;或单纯疱疹病毒的多肽或多肽前体)所必需的。

[0076] 用于本文时,“基因产物”指基因的产物诸如包括,例如 mRNA 的 RNA 转录物。

[0077] 术语“干扰 RNA”或“RNAi”或“干扰 RNA 序列”指双链 RNA(即,双链体 RNA),其当所述干扰 RNA 在与靶基因相同的细胞中时,能减少或抑制靶基因的表达(即,通过介导与干扰 RNA 的序列互补的 mRNAs 的降解)。因此,干扰 RNA 指由两个互补的链或由单个的,自我互补的链形成的双链 RNA。干扰 RNA 典型地具有与靶基因基本或完全的同源性。干扰 RNA 的序列可与全长的靶基因或其亚序列(subsequence)一致。干扰 RNA 包括小的“干扰 RNA”或“siRNA”,即长度约 15-60,15-50,15-50,或 15-40(双链体)核苷酸,更典型地约 15-30,15-25 或 19-25(双链体)核苷酸的干扰 RNA,并且优选地是约 20-24 或约 21-22 或 21-23(双链体)核苷酸的长度(例如,双链 siRNA 的每个互补序列是 15-60,15-50,15-50,15-40,15-30,15-25 或 19-25,优选地约 20-24 或约 21-22 或 21-23 核苷酸长度,并且所述双链 siRNA 是约 15-60,15-50,15-50,15-40,15-30,15-25 或 19-25,优选地约 20-24 或约 21-22 或 21-23 碱基对长度)。siRNA 双链体可包括约 1 至约 4 个核苷酸,优选地约 2 至约 3 个核苷酸的 3' 突出端和 5' - 磷酸末端。所述 siRNA 可以通过化学合成或可能由质粒编码(例如,转录为自动折叠为具有发夹环的双链体的序列)。siRNA 还可通过用大肠杆菌(*E. coli*) RNase III 或切酶裂解更长的 dsRNA(例如,超过约 25 个核苷酸长度的 dsRNA)来产生。这些酶将 dsRNA 处理为生物活性的 siRNA(见,例如,Yang et al.,PNAS USA 99:9942-7(2002); Calegari et al.,PNAS USA 99:14236(2002); Byrom et al.,Ambion TechNotes 10(1): 4-6(2003); Kawasaki et al.,Nucleic Acids Res. 31:981-7(2003); Knight 和 Bass,Science 293:2269-71(2001);和 Robertson et al.,J. Biol. Chem. 243:82(1968))。优选地,dsRNA 在长度上是至少 50 个核苷酸到约 100,200,300,400 或 500 个核苷酸。dsRNA 可以在长度上长至 1000,1500,2000,5000 个核苷酸或更长。所述 dsRNA 可以编码完整的基因转录物或部分基因转录物。

[0078] “基本同一性”指在严格条件下与参照序列杂交的序列,或在参照序列的具体区域上具有具体百分比同一性的序列。

[0079] 短语“严格杂交条件”指这样的条件,在所述条件下,探针与其靶序列杂交,但不与其它序列杂交,所述靶序列典型地在核酸的复杂混合物中。严格条件是序列依赖性的并在不同的情形下是不同的。更长的序列在更高的温度特异性杂交。对于核酸杂交的广泛指导见于 Tijssen, Techniques in Biochemistry and Molecular Biology—Hybridization with Nucleic Probes, “Overview of principles of hybridization and the strategy

of nucleic acid assays”(1993)。通常,选定的严格条件在限定离子强度 pH 对于具体序列是低于热熔点 (T_m) 约 5–10°C。所述 T_m 是这样的温度 (在限定的离子强度、pH 和核酸浓度下),在所述温度下 50% 的与靶标互补的探针与靶序列平衡地杂交 (当靶序列是过量存在的,在 T_m , 50% 的探针被平衡地占据)。严格条件还可添加去稳定剂诸如甲酰胺来获得。对于选择性或特异性杂交,阳性信号至少是两倍于背景的,优选 10 倍于背景杂交的信号。

[0080] 示范性严格杂交条件可以如下: 50% 甲酰胺, 5x SSC, 和 1% SDS, 在 42°C 温育, 或 5x SSC, 1% SDS, 在 65°C 温育, 其中在 65°C 在 0.2x SSC, 和 0.1% SDS 中进行洗涤。对于 PCR, 约 36°C 的温度对于低严格扩增是典型的, 尽管取决于引物的长度, 退火温度可在约 32°C 和 48°C 之间变化。对于高严格 PCR 扩增, 约 62°C 的温度是典型的, 尽管取决于引物长度和特异性, 退火温度可以在约 50°C 和约 65°C 之间变化。高和低严格扩增两者的典型循环条件包括: 90°C–95°C 的变性阶段 30 秒到 2 分钟, 退火阶段持续 30 秒到 2 分钟, 约 72°C 的延伸阶段 1–2 分钟。低和高严格扩增反应的方案和指导在例如, Innis et al. (1990) PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, Academic Press, Inc. N. Y.) 中进行提供。

[0081] 在严格条件下不彼此杂交的核酸仍旧是基本同一的, 如果它们编码的多肽是基本同一的。这发生在, 例如, 使用遗传密码允许的最大密码子简并性产生核酸的拷贝时。在这些情形中, 所述核酸典型地在适度严格杂交条件下进行杂交。示例性“适度严格杂交条件”包括于 37°C 在 40% 甲酰胺, 1M NaCl, 1% SDS 的缓冲液中的杂交, 和于 45°C 在 1xSSC 中的洗涤。阳性杂交至少两倍于背景。本领域技术人员将容易地认识到选择性的杂交和洗涤条件可用于提供相似严格性的条件。确定杂交参数的另外的指导在许多参考文献, 例如 Current Protocols in Molecular Biology, ed. Ausubel, et al 中进行提供。

[0082] 在两个或多个核酸背景中的术语“基本上同一”或“基本同一性”指两个或多个序列或亚序列, 它们是相同的或其具体百分比的核苷酸是相同的 (即, 在具体区域上至少约 60%, 优选地 65%, 70%, 75%, 优选地 80%, 85%, 90%, 或 95% 的同一性), 当如使用如下序列比较算法之一或通过手工对比和肉眼观察进行测量, 在比较窗, 或指定区域上比较和对比最大对应时。当上下文指出时, 该定义还类似地指序列的互补体。优选地, 所述基本同一性存在于长度至少为约 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75, 或 100 个核苷酸的区域上。

[0083] 对于序列比较, 典型地, 一个序列充当与测试序列比较的参照序列。当使用序列比较算法时, 将测试和参照序列输入计算机, 指定亚序列坐标, 如果必要, 指定序列算法程序参数。可以使用默认程序参数, 或可以指定选择性的参数。接着基于程序参数, 所述序列比较算法计算相对于参照序列的测试序列的百分比序列同一性。

[0084] 用于本文时, “比较窗”包括与任一个连续位置数目的片段的参比, 所述连续位置的数目选自由 20–600, 通常约 50 至约 200, 更通常地约 100 至约 150 的组, 其中在两个序列被优化地进行比对后, 序列可以与相同数目的连续位置的参照序列进行比较。对比序列从而进行比较的方法是本领域众所周知的。进行比较的序列的最优对比可以通过 Smith&Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482(1981) 的局部同源性算法, 通过 Needleman&Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443(1970) 的同源性对比算法, 通过 Pearson&Lipman, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 85:2444(1988) 的对相似性搜索的方法, 通过这些算法的计算机化执行 (在 Wisconsin Genetics Software Package 中的 GAP, BESTFIT, FASTA, 和 TFASTA, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), 或通过手工对比和视

觉观察（见，例如，Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds. 1995 增补）进行。

[0085] 适合于确定百分比序列同一性和序列相似性的算法的优选实例是 BLAST 和 BLAST 2.0 算法，其分别描述于 Altschul et al., Nuc. Acids Res. 25 :3389-3402(1977) 和 Altschul et al., J. Mol. Biol. 215 :403-410(1990)。使用 BLAST 和 BLAST 2.0，以本文描述的参数，来确定本发明的核酸和蛋白质的百分比序列同一性。执行 BLAST 分析的软件是可通过 National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 来公开获得。该算法包括首先通过在待查询序列中鉴定长度 W 的短序列 (words) 来鉴定高分序列对 (HSPs)，当与数据库序列中的相同长度的序列进行比对时，其匹配或满足某些正值的阈值分数 T。T 指邻近的序列评分阈值 (Altschul et al., 同上)。这些起始的邻近字命中 (hits) 充当起始搜索的开端来寻找更长的包含它们的 HSPs。只要累积对比评分可被增加，字节命中沿每个序列在两个方向上延伸。对于核苷酸序列，使用参数 M (对于每对匹配残基的奖赏评分；一直 > 0) 和 N (对于不匹配残基的惩罚评分；一直 < 0)，来计算累积评分。对于氨基酸序列，将评分矩阵用于计算累积评分。当累积对比评分从其最大获得值下降数量 X 时，每个方向中的字节命中的延伸中断；由于一个或多个负评分残基对比的聚集，累积评分到达 0 或更低；或达到任一序列的末端。所述 BLAST 算法参数 W, T, 和 X 确定序列对比的敏感性和速度。所述 BLASTN 程序 (对于核苷酸序列) 使用作为默认值的字长 (W) 11, 预期值 (E) 10, M = 5, N = -4 和两条链的比较。对于氨基酸序列，所述 BLASTP 程序使用作为默认值的字长 3, 预期值 (E) 10, 和 BLOSUM62 评分矩阵 (见, Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 :10915 (1989)), 序列比对 (B) 50, 预期值 (E) 10, M = 5, N = -4 和两条链的比较。

[0086] 所述 BLAST 算法还进行两个序列之间相似性的统计学分析 (见，例如，Karlin & Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 :5873-5787 (1993))。由 BLAST 算法提供的相似性的一个措施是最小的总和或然性 (P(N))，其提供或然性的指示，通过它，在两个核苷酸或氨基酸序列之间的匹配将偶然发生。例如，如果在测试核酸和参照核酸比较中的最小总和或然性少于约 0.2，更优选地少于约 0.01，并且最优选地少于约 0.001，认为核酸与参照序列相似。

[0087] 短语“抑制靶基因的表达”指本发明的 siRNA 启动使靶基因沉默的基因的能力。为了确定基因沉默的程度，将目标生物或培养物中的细胞的样品或测定与对照样品进行比较，所述目标生物或培养物的细胞表达具体构建体，所述对照不表达所述构建体。将对照样品 (缺乏构建体的表达) 设定为 100% 的相对值。当相对于对照的测试值是约 90%，优选地 50%，更优选地 25-0% 时，成功获得对靶基因的表达的抑制。合适的测定包括，例如，使用本领域技术人员已知的技术诸如点渍法、RNA 印迹法、原位杂交、ELISA、免疫沉淀法、酶作用、以及本领域技术人员已知的表型测定来检测蛋白质或 mRNA 水平。

[0088] “核酸”指以单或双链形式存在的脱氧核苷酸或核苷酸及其聚合物。术语涵盖包含这样的核酸，其包含已知核苷酸类似物或修饰的主链残基或键，其是合成的、天然存在的和天然不存在的，其具有与参照核酸相似的结合性质，并且其以与参照核苷酸相似的方式进行代谢。这些类似物的实例包括，但不限于，硫代磷酸酯、氨基磷酸酯、磷酸甲酯、手性 - 磷酸甲酯、2-O- 甲基核苷酸、肽 - 核酸 (PNAs)。

[0089] 所谓使基因或核酸“沉默”或“下调”倾向于指与在缺乏干扰 RNA 或其它核酸序列时检测到的水平相比,靶核酸序列,即被 RNAi 靶向的序列翻译的可检测的减少,或在靶序列或蛋白质的量或活性中的减少。可检测的减少可以小到约 5% 或 10%,或大到约 80%, 90% 或 100%。更典型地,可检测到的减少是约 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 或 70%。

[0090] siRNA 的“治疗有效量”或“有效量”是足以产生理想效果的量,所述理想效果是例如与在缺乏 siRNA 时检测到的正常表达水平比较靶序列表达的减少。

[0091] 用于本文时,术语“水溶液”指全部或部分包含水的组合物。

[0092] 用于本文时,术语“有机脂质溶液”指全部或部分包含具有脂质的有机溶剂的组合物。

[0093] 用于本文时,“远端位点”指物理上的分离位点,其不限于邻近的毛细血管床,而包括广泛分布于整个生物体的位点,在一些实施方案中,远端位点指在物理上与疾病位点(例如,肿瘤位点,炎症位点,或感染位点)分离的位点。

[0094] 与核酸-脂质颗粒相关的“血清-稳定性”指在暴露于将显著降解游离 DNA 的血清或核酸酶测定后不被明显降解的颗粒。合适的测定包括,例如,标准血清测定或 DNase 测定诸如那些在下面的实施例中描述的。

[0095] 用于本文时,“全身传递”指导致化合物在生物体广泛生物分布的传递。一些施用的技术可以导致某些化合物的全身传递,但是不能导致其它化合物的全身传递。全身传递指有效的,优选地,治疗量的化合物与身体的大部分接触。为了获得广泛的生物分布,通常需要血液生存期从而使化合物在到达施用位点远端的疾病位点前,不被迅速降解或清除(诸如通过初次通过器官(肝、肺等))或通过迅速、非特异性的细胞结合)。核酸-脂质颗粒的全身传递可以以本领域已知的任何方式进行,所述方式包括,例如,静脉内、皮下、腹膜内,在一个优选的实施方案中,核酸-脂质颗粒的全身传递是通过静脉内的传递。

[0096] 用于本文时,“局部传递”指在生物体内,化合物直接向靶位点的传递。例如,化合物可以通过直接注射到疾病位点诸如肿瘤或其它靶位点诸如炎症位点或靶器官诸如肝、心脏、胰腺、肾等来进行局部传递。

[0097] III. 稳定的核酸-脂质颗粒

[0098] 本文描述的稳定的核酸-脂质颗粒(SNALPs)典型地包括核酸(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 SNALPs 的聚集的缀合的脂质。本发明的 SNALPs 具有小于约 150nm 的平均直径并且是基本无毒的。此外,包封在本发明的 SNALPs 中的核酸在水溶液中对于用核酸酶进行的降解是具有抗性的。

[0099] A. 阳离子脂质

[0100] 各种合适的阳离子脂质可以单独或与一个或多个其它的阳离子脂质种类或中性脂质种类结合而在本文描述的 SNALPs 中进行使用。

[0101] 有效用在本发明中的阳离子脂质可以是许多脂质种类中的任何一种,其在生理 pH 上携带净正电荷,例如:DODAC, DOTMA, DDAB, DOTAP, DOSPA, DOGS, DC-Chol 和 DMRIE,或其组合。还有有效用在本发明中的许多这些脂质和相关类似物已经在美国专利号 5, 208, 036, 5, 264. 618, 5, 279, 833, 5, 283, 185, 5, 753, 613 和 5, 785, 992 中有所描述,将其每个的发明内容并入本文作为参考。

[0102] 阳离子脂质典型地包括在所述颗粒中存在总脂质的约 2% 至约 60%，优选地在所述颗粒中出存在的总脂质的约 5% 至约 45%。在某些优选的实施方案中，阳离子脂质包括在所述颗粒中存在的总脂质的约 5% 至约 15%。在其它优选的实施方案中，所述阳离子脂质包括在所述颗粒中出现的总脂质的约 40% 至约 50%。取决于核酸-脂质颗粒的倾向用途，所述组分比例发生变化并且具体制剂的传递效率可使用内体释放参数 (ERP) 试验进行测量。例如，对于全身传递，所述阳离子脂质可以包括在所述颗粒中存在的总脂质的约 5% 至约 15%，并且对于局部或区域性传递，所述阳离子脂质包括在所述颗粒中存在的总脂质的约 40% - 约 50%。

[0103] B. 非阳离子脂质

[0104] 本文描述的 SNALPs 的非阳离子脂质组分可以是能产生稳定复合体的多种中性不带电荷、两性离子或阴离子脂质的任一个。它们优选地是中性的，尽管它们可以替代地是带阳性或阴性电荷的。有效用在本发明中的非阳离子脂质的实例包括：磷脂相关物质，诸如卵磷脂，磷脂酰乙醇胺，溶血卵磷脂，溶血磷脂酰乙醇胺，磷脂酰丝氨酸，磷脂酰肌醇，神经鞘磷脂，脑磷脂，心磷脂，磷脂酸，脑苷酯，联十六烷基磷酸酯、二硬脂酰磷脂酰胆碱 (DSPC)，二油酰磷脂酰胆碱 (DOPC)，二棕榈酰磷脂酰胆碱 (DPPC)，二油酰磷脂酰甘油 (DOPG)，棕榈酰油酰磷脂酰甘油 (POPG)，二棕榈酰磷脂酰甘油 (DPPG)，二油酰磷脂酰乙醇胺 (DOPE)，棕榈酰油酰磷脂酰胆碱 (POPC)，棕榈酰油酰磷脂酰乙醇胺 (POPE) 和二油酰-磷脂酰乙醇胺 4-(N-马来酰亚胺基甲基)-环己烷-1-羧酸酯 (DOPE-mal)。非阳离子脂质或固醇诸如胆固醇可以存在。另外的不包含磷的脂质是例如，十八胺，十二胺，十六胺，乙酰基十六烷酯，甘油蓖麻醇酸酯，硬脂酸十六烷基酯，十四烷酸异丙酯，两性丙烯酸酯类聚合物，三乙醇胺-硫酸月桂酯；烷基-芳基硫酸酯聚乙氧基化 (polyethyloxylated) 脂肪酸酰胺，双十八烷基二甲基溴化铵等，二酰基磷脂酰胆碱，二酰基磷脂酰乙醇胺，神经酰胺，神经鞘磷脂，脑磷脂和脑苷脂。其它的脂质诸如溶血磷脂酰胆碱和溶血磷脂酰乙醇胺可存在。非阳离子脂质还包括基于聚乙二醇的聚合物诸如 PEG2000，PEG 5000 和与磷脂或与神经酰胺缀合的聚乙二醇（称为 PEG-Cer），如在美国专利号 5,820,873，中所描述的，将其并入本文作为参考。

[0105] 在优选的实施方案中，非阳离子脂质是二酰基磷脂酰胆碱（例如，二硬脂酰磷脂酰胆碱、二油酰磷脂酰胆碱、二棕榈酰磷脂酰胆碱和二亚油酰磷脂酰胆碱），二酰基磷脂酰乙醇胺（例如，二油酰磷脂酰乙醇胺和棕榈酰油酰磷脂酰乙醇胺），神经酰胺或神经鞘磷脂。在这些脂质中的酰基基团优选是衍生自具有 C_{10} - C_{24} 碳链的脂肪酸的酰基基团。更优选地，所述酰基基团是月桂酰、十四烷酰、棕榈酰、硬脂酰或油酰。在特别优选的实施方案中，非阳离子脂质将包括一个或多个胆固醇、1,2-sn-二油酰磷脂酰乙醇胺，或卵神经鞘磷脂 (ESM)。

[0106] 所述非阳离子脂质典型地包括在所述颗粒中存在的总脂质的约 5% 至约 90%，优选地包括在所述颗粒中总脂质的约 20% 至约 85%。所述 PEG-DAG 缀合物典型地包括在所述颗粒中总脂质的 1% 至约 20%，优选地包括在所述颗粒中总脂质的 4% 至约 15%。本发明的核酸-脂质颗粒还可包括胆固醇。如果存在，所述胆固醇典型地包括在所述颗粒中存在的总脂质的约 10% 至约 60%，优选地包括在所述颗粒中总脂质的约 20% 至约 45%。

[0107] C. 双层稳定组分

[0108] 在一个实施方案中，所述 SNALP 还包括双层稳定组分 (BSC)。合适的 BSCs 包括，

但不限于,聚酰胺低聚物、肽、蛋白质、去污剂、脂质衍生物、PEG-脂质,诸如与二烷氧基丙基(PEG-DAA)偶联的PEG,与二酰基甘油偶联的PEG(PEG-DAG),与磷脂酰乙醇胺(PE)偶联的PEG(PEG-PE),或与神经酰胺缀合的PEG,或其混合物(见,美国专利号5,885,613,将其并入作为参考)。在一个实施方案中,双层稳定组分是PEG-脂质,或ATTA-脂质。在一个优选的实施方案中,所述BSC是抑制SNALPs聚集的缀合的脂质。合适的缀合的脂质包括,但不限于PEG-脂质缀合物、ATTA-脂质缀合物、阳离子-聚合物-脂质缀合物(CPLs)或其混合物。在一个优选的实施方案中,所述SNALPs包括与CPL一起的PEG-脂质缀合物或ATTA-脂质缀合物。

[0109] 典型地,双层稳定组分存在的范围是所述颗粒中出现的总脂质的约0.5%至约50%。在一个优选的实施方案中,所述双层稳定组分的存在在所述颗粒中的总脂质的约0.5%至约25%。在其它优选实施方案中,所述双层稳定组分的存在在所述颗粒中总脂质的约1%至约20%,或约3%至约15%或约4%至约10%。本领域技术人员将理解双层稳定组分的浓度可以取决于使用的双层稳定组分以及脂质体成为融合的速度而变化。

[0110] 通过控制组合物和双层稳定组分的浓度,可以控制双层稳定组分交换出脂质体的速度并且再控制脂质体成为融合的速度。例如,当将聚乙二醇-磷脂酰乙醇胺缀合物或聚乙二醇神经酰胺缀合物用作双层稳定组分时,例如通过改变双层稳定组分的浓度,通过改变聚乙二醇的分子量,或通过改变在磷脂酰乙醇胺或神经酰胺上的酰基链基团的链长度和饱和程度,脂质体成为融合的速度可以变化。此外,其它的变量,包括,例如pH、温度、离子强度等可以用于改变和/或控制脂质体成为融合的速度。阅读本说明书后,本领域技术人员将清楚可用于控制脂质体成为融合的速度其它方法。

[0111] 1. 二酰基甘油-聚乙二醇缀合物

[0112] 在一个实施方案中,双层稳定组分包括二酰基甘油-聚乙二醇缀合物,即DAG-PEG缀合物或PEG-DAG缀合物。在一个优选的实施方案中,所述DAG-PEG缀合物是二月桂基甘油(C_{12})-PEG缀合物、双十四烷基甘油(C_{14})-PEG缀合物(DMG),二棕榈酰甘油(C_{16})-PEG缀合物或二硬脂基甘油(C_{18})-PEG缀合物(DSG)。本领域技术人员将容易地理解其它二酰基甘油可以用在本发明的DAG-PEG缀合物中。用在本发明中的合适的DAG-PEG缀合物和制备及使用它们的方法公开于被公布作U. S. P. A 2003/0077829的美国申请号10/136,707,和PCT专利申请号CA 02/00669中,将其每个的全部内容并入作为参考。

[0113] 2. 二烷氧基丙基缀合物

[0114] 在另一个实施方案中,双层稳定组分包括二烷氧基丙基缀合物,即PEG-DAA缀合



[0115] 在式I中, R^1 和 R^2 被独立地进行选择并且是具有约10至约22个碳原子的长链烷基基团。长链烷基基团可以是饱和的或不饱和的。合适的烷基基团包括,但不限于,月桂基(C_{12})、十四烷基(C_{14})、十六烷基(C_{16})、十八烷基(C_{18})和icosyl(C_{20})。在优选的实施方案中, R^1 和 R^2 是相同的,即 R^1 和 R^2 都是十四烷基(即双十四烷基), R^1 和 R^2 都是十八烷基

(即双十八烷基)等。在式 I 中,PEG 是具有约 550 至约 8,500 道尔顿的平均分子量的聚乙二醇。在一个优选的实施方案中,所述 PEG 具有约 1000- 约 5000 道尔顿的平均分子量,更优选地,约 1,000 至约 3,000 道尔顿的平均分子量并且甚至更优选地,约 2000 道尔顿的平均分子量。所述 PEG 可以任选地被烷基、烷氧基、酰基或芳基基团所取代。在式 I 中, L 是接头部分。可以使用任何适合于将 PEG 偶联到二烷氧基丙基主链的接头部分。合适的接头部分包括,但不限于,酰氨基 ($-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$)、氨基 ($-\text{NR}-$)、羰基 ($-\text{C}(\text{O})-$)、碳酸酯 ($\text{O}-\text{C}(\text{O})\text{O}-$)、氨基甲酸酯 ($-\text{NHC}(\text{O})\text{O}-$)、尿素 ($-\text{NHC}(\text{O})\text{NH}-$)、琥珀酰 ($-(\text{O})\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-$)、醚,二硫化物和其组合。其它合适的接头是本领域众所周知的。

[0116] 可以将磷脂酰乙醇胺与聚乙二醇缀合从而形成双层稳定组分,所述磷脂酰乙醇胺具有不同链长度和饱和程度的各种酰基链基团。这些磷脂酰乙醇胺是可商购的,或可以使用那些本领域技术人员已知的常规技术来分离或合成。包含饱和的或不饱和的脂肪酸的磷脂酰乙醇胺是优选的,其具有在 C_{10} - C_{20} 范围内的碳链长度。还可以使用这样的磷脂酰乙醇胺,其具有单或双不饱和脂肪酸及饱和和不饱和脂肪酸的混合物。合适的磷脂酰乙醇胺包括,但不限于,如下:双肉豆蔻酰磷脂酰乙醇胺 (DMPE),二棕榈酰磷脂酰乙醇胺 (DPPE),二油酰磷脂酰乙醇胺 (DOPE) 和二硬脂酰磷脂酰乙醇胺 (DSPE)。

[0117] 如磷脂酰乙醇胺,神经酰胺可以与聚乙二醇偶联从而形成双层稳定组分,所述神经酰胺具有不同链长度和饱和程度的多个酰基链基团。本领域技术人员将清楚的是与磷脂酰乙醇胺比较,神经酰胺仅具有一个酰基基团,所述酰基基团可以根据其链长度和饱和程度来容易地进行变化。适合于按照本发明应用的神经酰胺是可以商购的。此外,使用众所周知的分离技术可以例如从卵和脑中分离神经酰胺,或使用在美国专利号 5,820,873 中公开的方法和技术来合成它们,将美国专利号 5,820,873 并入本文作为参考。使用在前述申请中提出的合成途径,可以制备具有饱和或不饱和脂肪酸的神经酰胺,所述脂肪酸具有在 C_2 - C_{31} 范围内的碳链长度。

[0118] 3. 阳离子聚合物脂质

[0119] 还可将阳离子聚合物脂质 (CPLs) 用在本文所述的 SNALPS 中。合适的 CPL 典型地具有如下的结构特色:(1) 将 CPLs 结合到脂双层中的脂质锚,诸如疏水脂质;(2) 将脂质锚定于阳离子头部基团的亲水间隔臂,诸如聚乙二醇;和 (3) 产生可质子化的阳离子头部基团的聚阳离子部分,诸如天然存在的氨基酸。用在本发明中的合适的 SNALPs 和 SNALP-CPLs,以及制备使用 SNALPs 和 SNALP-CPLs 的方法公开于例如美国申请号 09/553,639 和 09/839,707 (公布为 U. S. P. A. 2002/0072121) 中和 PCT 专利申请号 CA00/00451 (公布为 WO 00/62813) 中,将其每个全文并入本文作为参考。

[0120] 简而言之,本发明提供式 II 的化合物:

[0121] $\text{A}-\text{W}-\text{Y}$ I

[0122] 其中 A, W 和 Y 如下。

[0123] 参考式 II,“A”是脂质部分诸如两亲性脂质,中性脂质或充当脂质锚的疏水性脂质。合适的脂质实例包括小泡-形成脂质或小泡采用脂质并包括,但不限于二酰基甘油基、二烷基甘油基、N-N-二烷基氨基、1,2-二酰氧基-3-氨基丙烷和 1,2-二烷基-3-氨基丙烷。

[0124] “W”是聚合物或低聚物,诸如亲水性聚合物或低聚物。优选地,亲水性聚合物是生

物相容的聚合物,其是非免疫原性的或具有低内在免疫原性。或者,如果与合适的佐剂一起使用,所述亲水聚合物可以是弱抗原性的。合适的非免疫原性聚合物包括,但不限于, PEG、聚酰胺、聚乳酸、聚乙醇酸、聚乳酸 / 聚乙醇酸共聚物及其组合。在一个优选的实施方案中,所述聚合物具有约 250 至约 7000 道尔顿的分子量。

[0125] “Y”是聚阳离子部分。所述术语聚阳离子部分指化合物、衍生物,或在选定的 pH,优选生理 pH 上带正电荷、优选地带至少 2 个正电荷的官能团。合适的聚阳离子部分包括碱性氨基酸和它们的衍生物诸如精氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、赖氨酸和组氨酸;精胺;亚精胺;阳离子树状聚体;聚胺;聚胺糖;和氨基多糖。所述聚阳离子部分在结构上可以是线性的诸如线性四赖氨酸(tetralysine)、支链或树状聚体。聚阳离子部分在选定的 pH 值,具有介于约 2- 约 15 个之间的正电荷,优选地具有约 2 至约 12 之间的正电荷,并且更优选地具有介于约 2 至约 8 个之间的正电荷。选择使用的聚阳离子部分的类型可以通过理想的脂质体应用的类型来进行确定。

[0126] 在聚阳离子部分上的电荷可以分布在整个脂质体部分周围或,它们可以是在脂质体部分的一个具体区域中电荷密度的不连续集中,例如电荷突起。如果电荷密度分布在脂质体上,电荷密度可以相等地分布或不相等地分布。聚阳离子部分的电荷分布的所有变化包含在本发明中。

[0127] 脂质“A”和非免疫原性的聚合物“W”可以通过各种方法以及优选地通过共价连接进行连接。本领域那些技术人员已知的方法可以用于“A”和“W”的共价连接。合适的键合物包括,但不限于,酰胺、胺、羧基、碳酸酯、氨基甲酸酯、酯和脰键合物。本领域技术人员将清楚的是“A”和“W”必需具有互补的官能团从而完成所述键合。这样两个官能团的反应将提供理想的键合,所述官能团一个在脂质上并且另一个在聚合物上。例如,当所述脂质是二酰基甘油并且所述末端羟基被用例如 NHS 和 DCC 激活从而形成活性酯,接着与包含氨基基团的聚合物诸如与聚酰胺反应时(见,美国专利号 6,320,017 和 6,586,559,其都并入作为参考),酰胺键将在两个基团之间形成。

[0128] 在某些情形中,聚阳离子部分可以具有连接的配体诸如靶向配体或络合钙的螯合部分。优选地,在所述配体连接后,所述阳离子部分维持正电荷。在某些情形中,连接的配体具有正电荷。合适的配体包括,但不限于,具有反应官能团的化合物或装置并包括脂质,两亲性脂质,载体化合物,生物亲和性化合物,生物材料,生物聚合物,生物医用装置,在分析上可检测的化合物,治疗上有活性的化合物,酶,肽,蛋白质,抗体,免疫刺激物,放射性标记,荧光,生物素,药物,半抗原, DNA, RNA, 多糖,脂质体,病毒体,微团,免疫球蛋白,官能团,其它靶向部分或毒素。D. siRNA

[0129] SNALPs 的核酸组分典型地包括可以以数种形式提供的干扰 RNA(即, siRNA),所述形式包括,例如,一个或多个分离的小-干扰 RNA(siRNA) 双链体,更长的双链 RNA(dsRNA) 或翻译自 DNA 质粒中转录盒的 siRNA 或 dsRNA。

[0130] RNA 群可以用于提供长的前体 RNAs,或与可用于制备 siRNA 的选定靶序列具有基本或完全同一性的长前体 RNAs。所述 RNAs 可以按照本领域技术人员中众所周知的方法从细胞或组织中分离,合成,和 / 或克隆。所述 RNA 可以是混和的群(获自细胞或组织,转录自 cDNA,扣除的(subtracted),选择等),或可以代表单一靶序列。RNA 可以是天然存在的,例如分离自组织或细胞样品,例如使用 T7 或 SP6 聚合酶和 PCR 产物或克隆的 cDNA 在体

外合成的 ;或以化学方法合成的。

[0131] 为了形成长 dsRNA,对于合成性 RNAs,互补体还可以在体外转录并杂交以形成 dsRNA。如果使用天然存在的 RNA 群,例如通过转录相应于 RNA 群的 cDNAs,或通过使用 RNA 聚合酶,还提供了 RNA 互补体(例如,形成 dsRNA,其通过大肠杆菌 (*E. coli*) RNase III 或切酶进行消化)。接着前体 RNA 杂交以形成双链 RNAs 从而消化。所述 dsRNAs 可直接被包封在 SNALPs 中或可在包封前被体外消化。

[0132] 或者,可以将一个或多个编码一个或多个 siRNA 模板的 DNA 质粒包封在核酸-脂质颗粒中。例如,基于小核 RNAU6 或人 RNase P RNA H1 的天然存在转录单位,可以从质粒中的 DNA 模板将 siRNA 转录为自动折叠为具有发夹环的双链体的序列,所述质粒具有 RNA 聚合酶 III 转录单位(见,Brummelkamp, et al., Science 296 :550(2002);Donzé, 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))。典型地,转录单位或盒将包含 RNA 转录启动子序列,诸如 H1-RNA 或 U6 启动子和终止序列,所述启动子序列可操作地与转录所需 siRNA 序列的模板连接,所述终止序列包括 2-3 个尿苷残基和聚胸苷 (T5) 序列(多腺苷酸化信号)(Brummelkamp, Science, 同上)。选定的启动子可以提供组成性或可诱导的转录。将组合物和 DNA- 指导的 RNA 干扰分子的转录的方法详细描述于美国专利号 6,573,099,将其并入本文作为参考。优选地,所述合成性或转录的 siRNA 具有约 1-4 个,优选地约 2-3 个核苷酸的 3' 突出端以及 5' 磷酸末端(Elbashir, et al., Genes Dev. 15 :188(2001);Nykänen, et al., Cell 107 :309(2001))。将转录单位结合到质粒或 DNA 载体中,干扰 RNA 转录自所述质粒或 DNA 载体。将适合于体内传递遗传物质用于治疗目的的质粒详细描述于美国专利号 5,962,428 和 5,910,488 中,它们两者都结合到本文作为参考。选定的质粒可以提供靶细胞的瞬时或稳定的传递。本领域那些技术人员将清楚的是起初被设计用于表达所需基因序列的质粒可以被进行修饰从而包含转录 siRNA 的转录单位盒。

[0133] 分离 RNA,合成 RNA,杂交核酸,制备和筛选 cDNA 文库以及进行 PCR 的方法是本领域众所周知的(见,例如., Gubler&Hoffman, Gene 25 :263-269(1983);Sambrook et al., 同上;Ausubel et al., 同上),PCR 方法也是这样(见美国专利 4,683,195 和 4,683,202;PCR Protocols :A Guide to Methods and Applications(Innis et al., eds,1990))。表达文库也是本领域技术人员众所周知的。公开用在本发明中的一般方法的另外的基本书籍包括 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))。

[0134] 1. 靶基因

[0135] 通常,传递 SNALPS 从而使目标基因产物的翻译(即,表达)下调或沉默是理想的。基因产物的合适的分类包括,但不限于,与病毒感染和存活相关的基因,与代谢疾病和病症(例如,其中肝作为靶的疾病和病症,和肝疾病和病症)相关的基因,与肿瘤发生和细胞转化相关的基因,生血管基因,免疫调节剂基因诸如与炎症和自身免疫应答相关的那些,配体受体基因和与神经变性病症相关的基因。

[0136] 与病毒感染和存活相关的基因包括通过病毒表达从而结合,进入并在细胞中复制的那些。与慢性病毒疾病相关的病毒序列是特别感兴趣的。特别感兴趣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 FIELDSVIROLOGY(Knipe et al.eds. 2001)),人免疫缺陷病毒 (HIV) (Banerjea, 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 (Jia, et al., J. Virol. 77 :3301(2003)), 和人乳头状瘤病毒 (HPV) (Hall, et al., J. Virol. 77 :6066(2003) ;Jiang, et al., Oncogene 21 :6041(2002))。可以被沉默的示例性肝炎病毒核酸序列包括,但不限于:涉及转录和翻译的核酸序列(例如, En1, En2, X, P),编码结构蛋白质的核酸序列(例如,包括 C 和 C 相关的蛋白质的核心蛋白;包括 S, M, 和 / 或 L 蛋白质的衣壳和包膜蛋白质,或其片段)(见,例如, FIELDS VIROLOGY, 2001, 同上)。可以被沉默的丙型肝炎核酸序列包括但不限于:丝氨酸蛋白酶(例如, NS3/NS4),解旋酶(例如, NS3),聚合酶(例如, NS5B)和包膜蛋白(例如, E1, E2, 和 p7)。甲型肝炎核酸序列在例如 Genbank 登记号 NC_001489 中提及;乙型肝炎核酸序列在例如 Genbank 登记号 NC_003977 中提及;丙型肝炎核酸序列在例如 Genbank 登记号 NC_004102 中提及;丁型肝炎核酸序列在例如 Genbank 登记号 NC_001653 中提及;戊型肝炎核酸序列在例如 Genbank 登记号 NC_001434 中提及;并且 G 型肝炎核酸序列在例如 Genbank 登记号 NC_001710 中提及。使编码与病毒感染和存活相关的基因的序列沉默可以方便地与用于治疗病毒疾病的常规药剂的施用结合来进行使用。

[0137] 与代谢疾病和病症(例如,其中肝被靶向的病症和肝疾病以及病症)相关的基因包括,例如,在例如血脂异常(例如,肝 X 受体(例如, LXR α 和 LXR β Genbank 登记号 NM_007121)),类法尼醇 X 受体 (FXR) (Genbank 登记号 NM_005123),固醇调节元件结合蛋白质 (SREBP),位点 -1 蛋白酶 (S1P),3- 羟基 -3- 甲基戊二酰基辅酶 -A 还原酶 (HMG 辅酶 -A 还原酶),载脂蛋白 (ApoB),和载脂蛋白 (ApoE) 和糖尿病(例如,葡萄糖 -6- 磷酸)中表达的基因(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(1997) ;Peet, et al., Cell 93 :693-704(1998))。本领域技术人员将理解与代谢疾病和病症(例如其中肝被靶向的疾病和病症以及肝疾病和病症)相关的基因包括在肝本身中表达的基因以及在其它器官和组织中表达的基因。使编码与代谢疾病和病症相关的基因的序列沉默可以方便地与用于治疗所述疾病或病症的常规药剂的施用结合来进行使用。

[0138] 与肿瘤发生和细胞转化相关的基因的实例包括易位序列诸如 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)) ;过度表达的序列诸如多药物抗性基因 (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., CancerRes. 63 :3593(2003) ;Zou, et al., Genes Dev. 16 :2923(2002)), β - 联蛋白 (Verma, et al., Clin Cancer Res. 9 :1291(2003)), 端粒末端转移酶基因 (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)) ;和突变序列诸如 RAS(综述于 Tuschl 和 Borkhardt, Mol. Interventions, 2 :158(2002))。使编码 DNA 修复酶的序列沉默与化疗剂的施用结合使用 (Collis, et al., CancerRes. 63 :1550(2003))。编码与肿瘤迁移相关的蛋白质的基因也是目标靶序列, 所述蛋白质, 例如整联蛋白、选择蛋白和金属蛋白水解酶。前述实例并不是排外的。可以将有利于或促进肿瘤发生或细胞转化, 肿瘤生长或肿瘤迁移的任何完整或部分基因序列包括进来作为模板序列。

[0139] 生血管基因能够促进新血管的形成。血管内皮生长因子 (VEGF) 是特别感兴趣的 (Reich, et al., Mol. Vis. 9 :210(2003))。

[0140] 免疫调节剂基因是调节一个或多个免疫应答的基因。免疫调节剂基因的实例包括细胞因子诸如生长因子 (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 配体基因也是目标免疫调节剂靶序列 (Song, et al., Nat. Med. 9 :347(2003))。在造血和淋巴样细胞中编码次级信号分子的基因也包括在本发明中, 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))。

[0141] 细胞受体配体包括这样的配体, 其能结合细胞表面受体 (例如, 胰岛素受体、EPO 受体、G- 蛋白质偶联受体、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) 以调节 (例如, 抑制, 激活等) 受体涉及的生理途径 (例如, 葡萄糖水平调节、血液细胞发展、有丝分裂发生等)。细胞受体配体的实例包括细胞因子、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- 蛋白质偶联受体配体等)。编码三核苷酸重复序列 (例如, CAG 重复序列) 扩张的模板发现用于使在神经变性疾病中的病原序列沉默, 所述疾病由三核苷酸重复序列的扩张所引起, 诸如脊髓延髓肌肉萎缩和亨廷顿病 (Caplen, et al., Hum. Mol. Genet. 11 :175(2002))。

[0142] IV. 制备 SNALPs

[0143] 本发明提供制备血清稳定性核酸脂质颗粒, 从而使核酸 (例如, siRNA 或编码 siRNA 的质粒) 被包封在脂双层中并被保护以免于降解的方法。通过本发明的方法制备的 SNALPs 直径典型地是约 50 至约 150nm。它们通常具有小于约 150nm 的中位数直径, 更典型地具有少于约 100nm 的直径, 其中大部分颗粒具有约 65 至约 85nm 的中位数直径。通过使用本领域已知的任何方法来形成所述颗粒, 所述方法包括, 例如去污剂透析方法或通过改进反相方法, 所述反相方法利用有机溶剂来在混和成分的过程中提供单相。不倾向于被任何具体形成机制所束缚, 质粒或其它核酸 (即, siRNA) 与阳离子脂质的去污剂溶液接触从而形成被包被的核酸复合物。这些被包被的核酸可以聚集并沉淀。然而, 去污剂的存在减少了这种聚集并且使被包被的核酸与过量脂质 (典型地, 非阳离子脂质) 接触从而形成颗粒, 在所述颗粒中, 质粒或其它核酸被包封在脂双层中。下面描述的使用有机溶剂形成核酸- 脂质颗粒的方法按照相似的方案。制备 SNALPS 的示范性方法公开于美国专利号 5, 705, 385 ; 5, 981, 501 ; 5, 976, 567 ; 6, 586, 410 ; 6, 534, 484 ; 美国申请系列号 09/553, 639 ; U. S. P. A. 公

开号 2002/0072121 和 2003/0077829)W096/40964 ;和 WO 00/62813。

[0144] 在一个实施方案中,本发明提供通过一种方法产生的核酸-脂质颗粒,所述方法包括在第一个储存器中提供水溶液,在第二个储存器中提供有机脂质溶液,并将所述水溶液和有机脂质溶液混和从而使有机脂质溶液混和以水溶液以基本瞬间地产生包封核酸的脂质体。这种方法和进行该方法的装置详细描述在 2003 年 6 月 30 日提交的美国专利申请号 10/611,274 中,将其并入本文作为参考。

[0145] 将脂质和缓冲溶液持续引入混和环境,诸如混和室中的操作导致了用缓冲液对脂质溶液的持续稀释,由此在混和后基本瞬时地产生脂质体。用于本文时,短语“用缓冲液持续稀释脂质溶液”(和变化)通常指用足够完成小泡形成的力量在水合作用过程中充分迅速地稀释所述脂质溶液。通过将水溶液和有机脂质溶液进行混和,在存在缓冲(水性)溶液时,有机脂质溶液经历持续逐步的稀释从而产生脂质体。

[0146] 在一些实施方案中,使用去污剂透析来形成所述颗粒。因此,本发明提供制备血清稳定性核酸-脂质颗粒的方法,所述方法包括:

[0147] (a) 在去污剂溶液中使核酸与阳离子脂质结合从而形成被包被的核酸-脂质复合体;

[0148] (b) 使非阳离子脂质与被包被的核酸-脂质复合体接触从而形成包括核酸-脂质复合体和非阳离子脂质的去污剂溶液;和

[0149] (c) 透析步骤(b)中的去污剂溶液从而提供血清稳定性核酸-脂质颗粒的溶液,其中所述核酸被包封在脂双层中并且所述颗粒具有约 50 至约 150nm 之间的大小。

[0150] 通过在去污剂溶液中使核酸与阳离子脂质结合来形成被包被的核酸-脂质复合体的起始溶液。

[0151] 在这些实施方案中,所述去污剂溶液优选地是具有临界胶束浓度为 15-300mM,更优选地为 20-50mM 的中性去污剂的水溶液。合适的去污剂的实例包括,例如,N,N'-((辛酰基亚氨基)-二(1,3-亚丙基))-二-(D-葡萄糖酰胺(gluconamide))(BIGCHAP);BRIJ 35;脱氧-BIGCHAP;十二烷基聚(乙二醇)醚;吐温 20;吐温 40;吐温 60;吐温 80;吐温 85;Mega 8;Mega 9;Zwittergent® 3-08;Zwittergent® 3-10;Triton X-405;己基-,庚基-,辛基-和壬基-β-D-吡喃葡萄糖苷;和庚基硫代吡喃葡萄糖苷;其中辛基 β-D-吡喃葡萄糖苷和吐温 20 是最优选的。去污剂在去污剂溶液中的浓度典型地是约 100mM 至约 2M,优选地是约 200mM 至约 1.5M。

[0152] 将阳离子脂质和核酸典型地进行结合从而产生约 1:1 至约 20:1 比率,优选地约 1:1 至约 12:1 比率,以及更优选地约 2:1 至约 6:1 比率的电荷比率(+/-)。另外,在溶液中的核酸总浓度将典型地是约 25 μg/ml 至约 1mg/ml,优选地是约 25 μg/ml 至约 200 μg/ml,并且更优选地是约 50 μg/ml 至约 100 μg/ml。在一段时间内,在去污剂溶液中使核酸与阳离子脂质的结合典型地保持在室温,所述时间足够被包被的复合体形成。或者,核酸和阳离子脂质可以在去污剂溶液中结合并被加热到达到约 37℃ 的温度。对于对温度特别敏感的核酸,被包被的复合体可以在更低的温度形成,所述温度典型地低至约 4℃。

[0153] 在一个优选的实施方案中,在形成的 SNALP 中的核酸与脂质的比率(质量/质量比率)的范围在约 0.01 至约 0.08 之间。起始物质的比率也在这个范围内,因为纯化步骤典型地将未被包封的核酸以及空脂质体去除。在另一个优选的实施方案中,所述 SNALP 制

剂使用每 10mg 总脂质约 400 μ g 核酸,或约 0.01 至约 0.08,更优选地约 0.04 的核酸与脂质比率,所述 0.04 的比率对应于每 50 μ g 核酸,1.25mg 的总脂质。

[0154] 接着,使被包被的核酸-脂质复合体的去污剂溶液与非阳离子脂质接触从而提供核酸-脂质复合体和非阳离子脂质的去污剂溶液。有效用在该步骤中的非阳离子脂质包括,二酰基磷脂酰胆碱,二酰基磷脂酰乙醇胺,神经酰胺,神经鞘磷脂,脑磷脂,心磷脂和脑苷脂。在优选的实施方案中,所述非阳离子脂质是二酰基磷脂酰胆碱,二酰基磷脂酰乙醇胺,神经酰胺或神经鞘磷脂。在这些脂质中的酰基基团优选地是衍生自具有 C_{10} - C_{24} 碳链的脂肪酸的酰基基团。更优选地,所述酰基基团是月桂酰、肉豆蔻酰、棕榈酰、硬脂酰或油酰。在特别优选的实施方案中,所述非阳离子脂质将是 1,2-sn-二油酰磷脂酰乙醇胺 (DOPE),棕榈酰油酰磷脂酰胆碱 (POPC),卵磷脂酰胆碱 (EPC),二硬脂酰磷脂酰胆碱 (DSPC),胆固醇,或其混合物。在最优选的实施方案中,所述核酸-脂质颗粒将是在体内具有提高特性的融合颗粒,所述非阳离子脂质将是 DSPC 或 DOPE。此外,本发明的核酸-脂质颗粒还可包含胆固醇。在其它优选的实施方案中,所述非阳离子脂质将还包含基于聚乙二醇的聚合物,诸如 PEG 2000, PEG 5000 和与二酰基甘油、神经酰胺或磷脂缀合的聚乙二醇,如在美国专利号 5,820,873 和在共同待审的专利申请号 10/136,707 (公开为 U.S.P.A. 公开号 2003/0077829) 中所描述的,将其两者并入本文作为参考。在另一个优选的实施方案中,非阳离子脂质将还包含基于聚乙二醇的聚合物诸如 PEG 2000, PEG 5000 和与二烷氧基丙基缀合的聚乙二醇。

[0155] 用于本发明方法的非阳离子脂质的量典型地是约 2 至约 20mg 的总脂质比上 50 μ g 的核酸。优选地,总脂质的量是每 50 μ g 的核酸约 5 至约 10mg。

[0156] 形成核酸-脂质复合体和非阳离子脂质的去污剂溶液后,优选地通过透析来去除去污剂。去污剂的去除导致围绕核酸的脂质双层的形成,从而提供血清稳定性的核酸-脂质颗粒,所述颗粒具有约 50nm 至约 150nm 的大小。因此形成的颗粒不聚集并且任选地以大小排列 (size) 以获得均一颗粒大小。

[0157] 可以通过任一可获得的方法来对血清稳定性的核酸-脂质颗粒进行大小排列以获得按粒度分级的脂质体。可以进行按粒度分级从而获得理想的大小范围并且相对较窄的颗粒大小分布。

[0158] 可获得一些技术从而对所述颗粒进行按大小排列到理想的大小。用于脂质体并等同地可应用于本颗粒的一个大小排列的方法描述于美国专利号 4,737,323,将其并入本文作为参考。通过水浴或探针超声波处理对颗粒混悬液进行超声波处理来产生进行性的颗粒大小减少为少于约 50nm 的大小。匀浆法是依赖于剪切力将更大的颗粒断裂为更小的颗粒的另一个方法。在一个典型的匀浆方法中,通过标准的乳状液匀浆器使颗粒再循环直到观察到典型地在约 60 和 80nm 之间的选定颗粒大小。在两种方法中,颗粒大小分布可以通过常规激光束颗粒大小辨别,或 QELS 来进行监测。

[0159] 通过小孔聚碳酸酯膜或不对称的陶膜来挤压颗粒也是将颗粒大小减少到相对清楚确定的大小分布的有效方法。典型地,通过膜来将混悬液循环一次或数次直到获得理想的颗粒大小分布。可以通过连续更小孔的膜来挤压所述颗粒从而获得大小的逐渐减少。

[0160] 在另一组实施方案中,本发明提供制备血清稳定性核酸-脂质颗粒的方法,所述方法包括:(a) 在有机溶剂中制备包括阳离子脂质和非阳离子脂质的混合物;(b) 使核酸的

水溶液与步骤 (a) 中的所述混合物接触从而提供清晰的单相 ;和

[0161] (c) 移去所述有机溶剂来提供核酸 - 脂质颗粒的混悬液, 其中所述核酸被包封在脂双层中, 所述颗粒在血清中是稳定的并且具有约 50-150nm 的大小。

[0162] 用于该组实施方案中的核酸 (或质粒), 阳离子脂质和非阳离子脂质如对于上述去污剂透析方法所描述的。

[0163] 对于有机溶剂的选择将典型地包括对溶剂极性和所述溶剂可在颗粒形成的后期被去除的容易性的考虑。也可被用作增溶剂的有机溶剂以足以提供核酸和脂质的清晰单相混合物的量存在。合适的溶剂包括, 但不限于, 氯仿、二氯甲烷、二乙醚、环己烷、环戊烷、苯、甲苯、甲醇或其它脂族醇诸如丙醇、异丙醇、丁醇、叔 - 丁醇、异丁醇、戊醇和己醇。两种或更多溶剂的组合也可用在本发明中。

[0164] 通过将核酸的第一溶液, 其典型地是水溶液和脂质的第二有机溶液混和在一起来完成核酸与阳离子和非阳离子脂质的有机溶液接触。本领域技术人员将理解可以通过任何数目的方法, 例如通过机械方式诸如通过使用涡旋混和器来使该混和发生。

[0165] 在核酸已经与脂质的有机溶液接触后, 去除所述有机溶剂, 因此形成血清稳定性核酸 - 脂质颗粒的水性混悬液。用于去除有机溶剂的方法将典型地包括在减压下蒸发或将惰性气体 (例如, 氮或氩气) 的气流鼓风吹过所述混合物。

[0166] 因此形成的血清稳定性核酸脂质颗粒将典型地大小在约 50nm 和 150nm 之间。为了获得进一步的颗粒大小减少或大小的均一性, 可以按照如上所述进行筛分。

[0167] 在其它的实施方案中, 所述方法将还包括加入非脂质聚阳离子, 其可用于利用本发明的组合物进行传递。合适的非脂质聚阳离子的实例包括, 但不限于, 海地美溴铵 (hexadimethrine bromide) (商标名 **POLYBRENE®** 下, 从 Aldrich Chemical Co., Milwaukee, Wisconsin, USA 购得) 或其它 hexadimethrine 的盐。其它合适的聚阳离子包括, 例如, 聚 -L- 鸟氨酸, 聚 -L- 精氨酸, 聚 -L- 赖氨酸, 聚 -D- 赖氨酸, 聚烯丙胺和聚乙烯亚胺的盐。

[0168] 在某些实施方案中, 可以在单相系统 (例如, Bligh 和 Dyer 单相或水性和有机溶剂的混合物) 或两相系统中进行核酸 - 脂质颗粒的形成, 伴以合适的混和。

[0169] 当在单相系统中进行复合体的形成时, 阳离子脂质和核酸每个都溶解在一体积的单相混合物中。两种溶液的组合提供单一混合物, 复合体形成在所述混合物中。或者, 所述复合体可以在两相混合物中形成, 在所述两相混合物中, 阳离子脂质与核酸 (其出现在水相中) 结合, 并将其“推”到有机相中。

[0170] 在另一个实施方案中, 本发明提供制备核酸 - 脂质颗粒的方法, 所述方法包括:

[0171] (a) 使核酸与包括非阳离子脂质和去污剂的溶液接触以形成核酸 - 脂质混合物;

[0172] (b) 使阳离子脂质与核酸 - 脂质混合物接触从而中和核酸的阴性电荷的部分并形成核酸和脂质的中和电荷的核酸的混合物 ;和

[0173] (c) 使去污剂从电荷被中和的混合物中去除从而提供核酸 - 脂质颗粒, 其中所述核酸被保护免于降解。

[0174] 在一组实施方案中, 非阳离子脂质和去污剂的溶液是水溶液。通过将核酸的第一溶液与脂质和去污剂的第二溶液混和在一起典型地完成核酸与非阳离子脂质和去污剂的溶液接触。本领域技术人员将理解通过任何数目的方法, 例如通过机械方式诸如通过使

用涡旋混合器该混和可以发生。优选地,所述核酸溶液还是去污剂溶液。用在本方法中的非阳离子脂质的量典型地基于所用的阳离子脂质的量进行确定,并典型地是阳离子脂质的量的约 0.2-5 倍,优选地是所用的阳离子脂质的量的约 0.5 至约 2 倍。

[0175] 在一些实施方案中,将所述核酸如在例如美国专利申请号 09/744,103 中描述的那样进行预浓缩。

[0176] 将因此形成的核酸-脂质混合物与阳离子脂质接触从而中和负电荷部分,其与存在的核酸(或其它聚阴离子物质)关联。所用的阳离子脂质的量将典型地足以中和所述核酸的至少 50% 的负电荷。优选地,所述负电荷将至少有 70% 被中和,更优选地有至少 90% 被中和。有效用在本发明中的阳离子脂质包括,例如 DODAC, DOTMA, DDAB, DOTAP, DC-Chol 和 DMR1E。这些脂质和相关的类似物已经在美国专利号 5,208,036, 5,264,618, 5,279,833, 5,283,185, 5,753,613 和 5,785,992, 中有所描述,将其每个的说明书都并入本文作为参考。

[0177] 可以通过许多技术的任一个,优选地通过将阳离子脂质的溶液和包含所述核酸脂质混合物的溶液混合在一起,来完成阳离子脂质与核酸-脂质混合物的接触。在将两种溶液混和(或以任一个其它方式接触)后,与核酸关联的负电荷部分被中和。但是,核酸仍旧保持在未压缩的状态并获得亲水特性。

[0178] 在阳离子脂质已经与核酸-脂质混合物接触后,将去污剂(或去污剂和有机溶剂的组合)去除,因此形成所述核酸-脂质颗粒。用于去除去污剂的方法将典型地包括透析。当有机溶剂存在时,通过在减压下蒸发或通过惰性气体(例如,氮气或氩气)的气流鼓风吹过混合物来典型地成功去除它。

[0179] 因此形成的颗粒将典型地从约 100nm 到数微米来按大小排列。为了进一步获得在所述颗粒大小减少或大小的均一性,可以将所述核酸-脂质颗粒进行超声波处理、过滤或进行其它用在脂质体制剂中并且是本领域技术人员所熟知的大小排列技术。

[0180] 在其它实施方案中,该方法将还包括添加非脂质聚阳离子,其可用于利用本发明的组合物实施脂质转染。合适的非脂质聚阳离子的实例包括,但不限于,海地美溴铵(商标名 POLYBRENE® 下,从 Aldrich Chemical Co., Milwaukee, Wisconsin, USA 购得)或其它 hexadimethrine 的盐。其它合适的聚阳离子包括,例如,聚-L-鸟氨酸,聚-L-精氨酸,聚-L-赖氨酸,聚-D-赖氨酸,聚烯丙胺和聚乙烯亚胺的盐。这些盐的添加优选地在颗粒已经形成后进行。

[0181] 在另一方面,本发明提供制备核酸-脂质颗粒的方法,所述方法包括:

[0182] (a) 在溶液中使一定量的阳离子脂质与核酸接触;所述溶液包括约 15-35% 的水和约 65-85% 的有机溶剂并且阳离子脂质的量足以产生从约 0.85 至约 2.0 的 +/- 电荷比率,从而提供疏水核酸-脂质复合体;

[0183] (b) 在溶液中使疏水,核酸-脂质复合体与非阳离子脂质接触从而提供核酸-脂质混合物;和

[0184] (c) 从核酸-脂质混合物去除有机溶剂从而提供核酸-脂质颗粒,其中核酸被保护免于降解。

[0185] 有效用在本发明该方面中的所述核酸、非阳离子脂质、阳离子脂质和有机溶剂与对于上面使用去污剂的方法所述的那些相同。在一组实施方案中,步骤 (a) 的溶液是单相

的。在另一组实施方案中,步骤(a)的溶液是两相的。

[0186] 在优选的实施方案中,所述阳离子脂质是 DODAC, DDAB, DOTMA, DOSPA, DMRIE, DOGS 或其组合。在其它优选的实施方案中,非阳离子脂质是 ESM, DOPE, DOPC, DSPC, 基于聚乙二醇的聚合物(例如, PEG2000, PEG 5000, PEG- 修饰的二酰基甘油, 或 PEG 修饰的二烷氧基丙基), 二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC), 胆固醇或其组合。在其它优选的实施方案中,有机溶剂是甲醇、氯仿、二氯甲烷, 乙醇, 二乙醚或其组合。

[0187] 在一个实施方案中,核酸是质粒,干扰 RNA 转录自所述质粒。所述阳离子脂质是 DODAC, DDAB, DOTMA, DOSPA, DMRIE, DOGS 或其组合;所述非阳离子脂质是 ESM, DOPE, DAG-PEGs, 二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC), 胆固醇, 或其组合(例如 DSPC 和 DAO-PEGs);并且所述有机溶剂是甲醇、氯仿, 二氯甲烷、乙醇、二乙醚或其组合。

[0188] 如上,优选地通过机械方式诸如通过使用涡旋混和器将核酸的第一溶液,和脂质的第二溶液混和在在一起,来典型地完成所述核酸与阳离子脂质的接触。得到的混合物包含如上所述的复合体。接着,通过添加非阳离子脂质和去除有机溶剂来将这些复合体转化成颗粒。非阳离子脂质的添加通过简单将非阳离子脂质的溶液添加到包含所述复合体的混合物中典型地完成。还可以使用反向添加。可以通过本领域那些技术人员已知的并也如上所述方法来完成有机溶剂的随后的去除。

[0189] 使用在本发明该方面中的非阳离子脂质的量典型地是用于提供电荷被中和的核酸-脂质复合体的阳离子脂质的量(基于摩尔基础)的约 0.2 至约 15 倍。优选地,所述量是所用的阳离子脂质的量的约 0.5 至约 9 倍。

[0190] 在另一方面中,本发明提供核酸-脂质颗粒,其通过如上所述的方法进行制备。在这些实施方案中,所述核酸-脂质颗粒是净电荷中性的或携带总电荷,所述总电荷给所述颗粒提供更大的基因转移活性。优选地,所述颗粒的核酸组分是干扰不需要的蛋白质的产生的核酸。在一个优选的实施方案中,所述核酸包括干扰 RNA,所述非阳离子脂质是卵神经鞘磷脂并且所述阳离子脂质是 DODAC。在一个优选的实施方案中,所述核酸包括干扰 RNA,所述非阳离子脂质是 DSPC 和胆固醇混合物,并且所述阳离子脂质是 DOTMA。在其它优选的实施方案中,所述非阳离子脂质还可包括胆固醇。

[0191] 如本文所讨论的进行多种制备 SNALP-CPLs(包含 CPL 的 SNALPs)的通用方法。两种通用技术包括“插入后”技术,即将 CPL 插入,例如预形成的 SNALP,和“标准”技术,其中在例如,SNALP 形成步骤中,CPL 被包括在脂质混合物中。所述插入后技术导致这样的 SNALPs,所述 SNALPs 主要在 SNALP 双层膜的外面中具有 CPLs,而标准技术提供这样的 SNALPs,所述 SNALPs 在内面和外面都具有 CPLs。所述方法特别适用于由磷脂制备的小泡(其可包含胆固醇)并还适用于包含 PEG- 脂质的小泡(诸如 PEG-DAGs)。在例如美国专利号 5,705,385, 6,586,410,5,981,501 和 6,534,484;在美国申请系列号 09/553,639 和 09/839,707(公开为 U.S.P.A. 公开号 2002/0072121)以及 PCT 国际申请 PCT/CA00/00451(公开为 WO 00/62813)中教导制备 SNALP-CPL 的方法,将其每个并入本文作为参考。

[0192] 本发明的核酸-脂质颗粒可以单独或在具有生理可接受的载体(诸如生理盐水或磷酸盐缓冲液)的混合物中进行施用,所述生理可接受的载体按照施用途和标准的药用实践来选择。一般地,生理盐水将被应用作为药用载体。其它合适的载体包括,例如水,缓冲的水,0.4%的盐水,0.3%的甘氨酸等,包括增加稳定性的糖蛋白,诸如白蛋白,脂蛋白,

球蛋白等。

[0193] 药用载体通常是在颗粒形成后被添加的。因此，在颗粒形成后，所述颗粒可以被稀释到药用载体诸如生理盐水中。

[0194] 在药用制剂中颗粒的浓度可以在广泛范围内变化，即从少于约 0.05 重量%，通常在或至少约 2.5 重量%到多至 10-30 重量%，并将按照选定的特定施用模式主要通过液体体积、粘度等进行选择。例如，可以将浓度增加以降低与治疗相关的流体负荷。这可以在患有与动脉粥样硬化相关的充血性心力衰竭或严重高血压病的患者中是特别理想的。或者，由刺激性脂质组成的颗粒可以被稀释到低浓度从而在施用位点减少炎症。

[0195] 如上所述，在本发明一些实施方案中，核酸-脂质颗粒包含 DAG-PEG 缀合物。在本发明其它实施方案中，核酸-脂质颗粒包括 PEG-二烷氧基丙基缀合物。包括其它组分通常是理想的，所述其它组分以与 DAG-PEG 缀合物或 PEG-二烷氧基丙基缀合物相似的方式作用，并作用于阻止颗粒聚集和提供增加循环生存期以及增加核酸-脂质颗粒到靶组织的传递的方式。这些组分包括，但不限于，PEG-脂质缀合物，诸如到颗粒中的 PEG-神经酰胺或 PEG-磷脂（诸如 PEG-PE），神经节苷脂 GM 1-修饰的脂质或 ATTA-脂质。典型地，颗粒中成分的浓度将是约 1-20%并且更优选地从约 3-10%开始。

[0196] 本发明的药物组合物可以通过常规，众所周知的灭菌技术进行灭菌。可以对水溶液进行包装以进行使用或在无菌条件下进行过滤并冷冻干燥，在施用前将所述冷冻干燥的制剂与无菌水溶液结合。所述组合物可以如合适的生理条件所要求包含药用辅助物质，所述辅助物质诸如 pH 调节剂和缓冲剂，毒性调节剂等，例如乙酸钠、乳酸钠、氯化钠、氯化钾和氯化钙。另外，所述颗粒混悬液可以包括脂质-保护性试剂，其在储存时，保护脂质免于自由基和脂质-过氧化损伤。亲脂性自由基猝灭剂，诸如 α -生育酚和水溶性铁特异性螯合剂，诸如铁草胺 (ferrioxamine) 是合适的。

[0197] V. SNALPs 的施用

[0198] 本发明的 SNALPs 可以方便地用于将核酸引入细胞（例如，治疗或预防与靶基因的表达相关的疾病或病症）。因此，本发明还提供给将核酸（例如，干扰 RNA）引入细胞的方法。通过首先形成如上所述的颗粒，在体外或体内进行所述方法，接着使所述颗粒与细胞接触一段时间，所述时间足以使 siRNA 的传递发生。

[0199] 本发明的 SNALPs 可以被几乎任何细胞类型吸附，所述细胞类型可以与它们混和或接触。一旦被吸附，所述颗粒可以被细胞的部分内吞，与细胞膜交换脂质，或与细胞融合。颗粒的核酸部分的转移或结合可以通过这些途径的任何一个发生。具体而言，当融合发生时，所述颗粒的膜被整合到细胞膜中并且所述颗粒的内容物与细胞内液体接触。

[0200] 在细胞类型中，最经常靶向 siRNA 的细胞内传递的是赘生性细胞（例如肿瘤细胞）和肝细胞。可以被靶向的其它的细胞，例如造血前体（干）细胞，成纤维细胞，角质化细胞，肝细胞，内皮细胞，骨骼和平滑肌细胞，成骨细胞，神经元，静止淋巴细胞，终末分化细胞，慢或非循环初级细胞，实质细胞，淋巴样细胞，上皮细胞，骨细胞等。在一个优选的实施方案中，肝细胞是被靶向的。

[0201] 细胞的组织培养可以被要求的程度是本领域众所周知的。Freshney (1994) (Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique, third edition WileyLiss, New York), Kuchler et al. (1977) Biochemical Methods in Cell Culture and Virology,

Kuchler, R. J., Dowden, Hutchinson and Ross, Inc., 和其引用的参考文献提供细胞培养的一般指导。培养的细胞系统将通常以细胞的单层形式存在, 尽管还使用细胞的混悬液。

[0202] A. 体外基因转移

[0203] 对于体外应用, 可以将 siRNA 传递到培养在培养物中的任何细胞, 所述培养物不管是植物或动物起源, 脊椎动物或无脊椎动物, 并且是任何组织或类型的。在优选的实施方案中, 细胞将是动物细胞, 更优选地是哺乳动物细胞, 并且最优选地是人细胞。

[0204] 当在体外进行时, 在细胞和脂质核酸颗粒之间的接触发生在生物相容性的培养基中。取决于具体应用, 颗粒的浓度在广泛范围内变化, 但是通常是介于约 $1 \mu\text{mol}$ 和约 10mmol 之间。用核酸-脂质颗粒对细胞进行处理通常在生理温度 (约 37°C) 进行约 1 到约 48 小时的时期, 优选地从约 2-4 小时。

[0205] 在一组优选的实施方案中, 脂质核酸颗粒混悬液被加入 60-80% 汇合的被接种细胞, 所述细胞具有从约 10^3 至约 10^5 细胞 /mL, 更优选地约 2×10^4 细胞 /mL 的密度。被添加到细胞中的混悬液的浓度是优选地从约 0.01-0.2 $\mu\text{g/mL}$, 更优选地约 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 。

[0206] 使用内体释放参数 (ERP) 测定, 可以对 SNALP 或其它的基于脂质的载体系统的传递效率进行优化。ERP 测定详细描述在美国专利申请号 10/136,707 (公开为 U.S.P.A. 公开号 2003/0077829), 将其并入本文作为参考。更具体地, ERP 测定的目的是基于它们对内体膜的结合 / 吸收或与其的融合 / 不稳定化的相对影响来区分各种阳离子脂质和 SNALPs 的辅助脂质成分的作用。该测定可从数量上确定 SNALP 的每个组分或其它基于脂质的载体系统怎样影响传递效率, 由此使 SNALPs 或其它的基于脂质的载体系统优化。通常, ERP 测定测量报告蛋白 (例如, 萤光素酶、 β -半乳糖苷酶、绿色荧光蛋白等) 的表达, 并且在一些情形中, SNALP 制剂还将对于包封干扰 RNA 是合适的, 所述 SNALP 制剂对于表达质粒是被优化的。在其它情形中, ERP 测定还可在干扰 RNA 存在或缺乏的情形中适用于测量靶序列的翻译的下调。通过比较各种 SNALPs 的每个或其它基于脂质的制剂, 可以容易地确定被优化的系统, 例如在细胞中具有最大吸收的 SNALP 或其它基于脂质的制剂。

[0207] 进行本发明的 ERP 测定的合适的标记包括, 但不限于, 光谱标记, 诸如荧光染料 (例如, 荧光素和衍生物, 诸如异硫氰酸荧光素 (FITC) 和 OregonGreen™; 若丹明和衍生物, 诸如 Texas red, tetra-rhodamine isothiocyanate (TRITC), 等, 洋地黄毒苷, 生物素, 藻红蛋白, AMCA, CyDyes™ 等; 放射性标记, 诸如 ^3H , ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C , ^{32}P , ^{33}P , 等; 酶诸如辣根过氧化物酶, 碱性磷酸酶等; 光谱比色标记诸如胶态金或有色玻璃或塑料珠, 诸如聚苯乙烯, 聚丙烯, 胶乳等。使用本领域众所周知的方法, 可以将标记直接或间接与 SNALP 的组分或其它的基于脂质的载体系统进行偶联。如上指出, 可以使用广泛种类的标记, 其中取决于所需的敏感性, 与 SNALP 的组分缀合的容易性, 稳定性需求和可获得的使用仪器和处理方案来选择标记。

[0208] B. 体内基因转移

[0209] 在一些实施方案中, 可以将 SNALPs 用于将 siRNA 体内传递到广泛种类的脊椎动物, 包括哺乳动物诸如犬, 猫, 马, 牛, 绵羊, 山羊, 啮齿动物, 兔类动物 (lagomorphs), 猪, 灵长类, 所述灵长类包括, 例如人。SNALPs 的体内传递可以是局部的 (即, 直接到目的位点) 或全身性的 (即, 在目标位点远距离处)。

[0210] 使用核酸-脂质颗粒诸如在公开的 PCT 专利申请 WO 96/40964, 美国专利号

5, 705, 385, 5, 976, 567, 5, 981, 501, 和 6, 410, 328 中公开的那些, 已经成功通过身体系统诸如循环进行体内基因疗法的全身传递, 即将治疗性核酸传递到远距离靶细胞, 将所述专利申请的每个并入本文作为参考。该后者方式提供保护核酸免于血清中的核酸酶降解的充分包封的核酸-脂质颗粒, 是非免疫原性的, 是小尺寸的并且适合于重复给药。

[0211] 本发明的 SNALPs 可以通过任何本领域已知的途径进行施用, 所述途径包括, 例如静脉内地、肌内地、皮下地、皮内地、腹膜内地、口服地、鼻内地或局部地。例如, Zhu, 等., Science 261:209(1993) 描述质粒-阳离子脂质复合体的静脉内传递; Hyde, 等., Nature 362:250(1993) 描述质粒-脂质体复合体(即, 脂复合体(lipoplexes))的鼻内传递; 和 Brigham, et al., Am. J. Med. Sci. 298:278(1989) 描述质粒-阳离子脂质复合体的静脉内和气管内传递。所述 SNALPs 可以单独或在具有生理可接受载体(诸如生理盐水或磷酸盐缓冲溶液)的混合物中进行施用, 所述载体按照施用的路径和标准药物实践进行选择。

[0212] 当制备本发明的核酸-脂质颗粒的药物制剂时, 使用定量的核酸-脂质颗粒是优选的, 已经对所述颗粒进行了纯化从而减少或去除空脂质颗粒或具有与外面关联的核酸部分的颗粒。通常在颗粒形成后将药物载体加入。因此, 在形成颗粒后, 可以将所述颗粒稀释到药用载体中。

[0213] 药用制剂中的颗粒的浓度可以在广泛范围内变化, 即从少于约 0.05 重量%, 通常在或至少约 2.5 重量%到多至 10-30 重量%并将按照选定的施用的具体模式, 主要通过液体体积、粘度等被选择。

[0214] 被施用的颗粒的量将取决于核酸与脂质的比率; 所用的具体核酸, 被诊断的疾病状态; 年龄, 体重, 和患者的疾病以及临床医师的判断; 但是将通常在约 0.01 和约 50mg/kg 体重之间; 优选地在约 0.1 和约 5mg/kg 体重或约 10^8 - 10^{10} 颗粒/注射剂之间。

[0215] 1. 可注射的传递

[0216] 在某些情形中, 如美国专利 5, 543, 158; 美国专利 5, 641, 515 和美国专利 5, 399, 363 所述, 通过肠胃外, 静脉内, 肌内, 皮下, 皮内或腹膜内来传递本文公开的 SNALPs 是理想的。可以将所述 SNALPs 局部注射到目标位点(例如, 疾病位点诸如炎症或肿瘤形成或到靶器官或组织)或全身注射以广泛分布到生物体。可以在水中制备所述 SNALPs 的溶液, 所述水合适地混和以表面活性剂。还可以在甘油, 液体聚乙二醇及其混合物中以及在油中制备分散体。典型的, 这些制剂包含防腐剂以阻止微生物的生长。通常, 当被静脉内施用时, 将核酸-脂质颗粒制剂与合适的药用载体一起进行配制。通常, 普通缓冲盐溶液(135-150mM NaCl)将被用作药用载体, 但是其它合适的载体将足够满足需求。另外的合适载体描述在例如 REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, Mack Publishing Company, Philadelphia, PA, 17th ed. (1985)。用于本文时, “载体”包括任何和所有的溶剂, 分散介质, 媒介, 包衣, 稀释剂, 抗菌剂和抗真菌剂, 等渗和吸收延缓剂, 缓冲剂, 载体溶液, 混悬液, 胶体等。短语“药用”指分子实体和组合物, 所述分子实体和组合物被施用给人时, 不产生变态或相似的不良反应。水性组合物的制剂是本领域充分理解的, 所述组合物包含作为活性成分的蛋白质。典型地, 将这些组合物制备为注射液, 液体溶液或混悬液; 还可以制备在注射前适合于在液体中的溶液或混悬液的固体形式。还可以将所述制剂进行乳化。

[0217] 可以通过常规脂质体灭菌技术, 诸如过滤来对这些组合物进行灭菌。所述组合物可以包含药用辅助物质, 所述药用辅助物质是合适的生理条件, 诸如 pH 调节剂和缓冲剂,

毒性调节剂,润湿剂等。使用上文所指的技术可以对这些组合物进行灭菌,或者替代地,它们可以在无菌条件下产生。可以对得到的水溶液包装以进行使用或在无菌条件下进行过滤并进行冷冻干燥,在施用前将冷冻干燥的制剂与无菌水溶液结合在一起。

[0218] 2. 口服传递

[0219] 在某些应用中,可以将本文公开的 SNALPs 通过口服施用传递给个体。甚至可以将活性化合物与赋形剂结合并以可摄取的片剂,颊含片剂,锭剂,胶囊,酏剂,漱口剂,混悬剂,口服喷雾剂,糖浆,干胶片等形式存在 (Mathiowitz et al., 1997 ;Hwang et al, 1998 ;美国专利 5,641,515 ;美国专利 5,580,579 和美国专利 5,792,451)。所述片剂,锭剂,丸剂,胶囊等还可以包含如下:粘合剂,明胶;赋形剂,润湿剂或芳香剂。当所述剂量单位形式是胶囊时,除上述类型的物质之外,其还包含液体载体。各种其它物质可以作为包衣出现或修饰所述剂量单位的物理形式。当然,用在制备任何剂型中的物质应该是药用纯的并且在所用的量中是基本无毒性的。

[0220] 典型地,这些制剂可以包含活性化合物的至少约 0.1%或更多,尽管活性成分的百分比可以,当然是变化的并可以方便地介于总制剂的重量或体积的约 1 或 2%之间以及约 60%或 70%之间或更多之间。天然地,可以以这样的方式制备在每个治疗上有用的组合物的活性化合物的量,在所述方式中,合适的剂量将被包含在任何给定单位剂量的化合物中。制备这种药物制剂的领域的技术人员将考虑因素诸如溶出度、生物利用度、生物半衰期、施用路径、产品贮存期以及其它的药用考虑并且象这样,各种剂量和治疗方案可以是理想的。

[0221] 3. 鼻施用

[0222] 在某些实施方案中,可以通过鼻内喷雾剂,吸入,和 / 或其它气溶胶传递媒介来传递药物组合物。通过鼻气溶胶喷雾剂直接将核酸组合物传递到肺中的方法已经在例如美国专利 5,756,353 和美国专利 5,804,212 中有所描述。同样,使用鼻内微粒树脂的药物的传递 (Takenaga et al., 1998) 以及溶血磷脂酰 - 甘油化合物 (美国专利 5,725,871) 也是药物领域中众所周知的。同样地,以聚四氟乙烯支持基质的形式进行的跨粘膜药物传递描述在美国专利 5,780,045 中。

[0223] 4. 局部传递

[0224] 在它们的应用的另一个实例中,可以将核酸 - 脂质颗粒与广泛范围的局部剂型结合,所述局部剂型包括,但不限于,凝胶,油,乳化剂等。例如,可以对包含核酸 - 脂质颗粒的混悬液进行配制并施用为局部乳膏剂,糊剂,软膏剂,凝胶,洗剂等。

[0225] C. 预防性和治疗性的处理

[0226] 在一些实施方案中,可以将所述 SNALPs 用于对患有疾病或病症的受试者 (例如,哺乳动物受试者) 的预防性或治疗性的处理,所述疾病或病症与靶序列的表达或过表达相关。将所述 SNALPs 以足够激发患者的治疗性应答的量施用给受试者。将足以完成此的量定义为“治疗上有效的剂量或量”或“有效剂量或量”。在确定待施用于疾病的治疗或预防中的 SNALP 的有效量中,所述疾病由于靶基因的表达或过表达导致,所述内科医师评价 SNALPs 的循环血浆水平,SNALP 毒性和与靶基因的表达或过表达相关的疾病的进展。施用可以通过单一或分剂量来完成。

[0227] 例如,可以将所述 SNALP 施用给受试者,所述受试者被病原微生物感染或有被病原微生物感染的风险。所述 siRNA 应该优选地对应于序列,并还应该对于微生物是唯一的

(或至少在经历治疗的患者的天然基因组的基因组中是缺乏的),所述序列在微生物的生活史中具有关键作用。通过来自体内(ex vivo)或静脉内注射以治疗上有效的剂量将所述核酸-脂质复合体引入靶细胞,组织或器官。使编码与病原感染相关的基因的序列沉默可以方便地与用于治疗病原疾病的常规试剂的施用结合进行使用。所述治疗可以被预防性地施用给有风险被病原微生物感染或已经被病原微生物感染的人。

[0228] 在一个优选的实施方案中,本发明的组合物和方法可以方便地用于治疗肝病诸如,例如肝炎。例如,对于抑制乙型肝炎病毒的合适位点包括编码 S, C, P 和 X 蛋白质, PRE, EnI, 和 EnII 的核酸序列(见,例如, FIELDSVIROLOGY, 2001, 同上)。本领域的技术人员将理解与肝炎感染相关的基因沉默可以与对于肝炎的常规治疗,诸如,例如免疫球蛋白、干扰素(例如, PEG 化和未 PEG 化的干扰素 a)(见,例如, Medina et al., Antiviral Res. 60(2):135-143(2003); 利巴韦林(见,例如, Hugle 和 Cerny, Rev. Med. Virol. 13(6):361-71(2003); 阿德福韦和拉米夫定(见,例如, Kock et al., Hepatology 38(6):1410-8(2003); 异戊二烯化抑制剂(见,例如 Bordier et al., J. Clin. Invest. 112(3):407-414(2003)); 泛昔洛韦(见,例如, Yurdaydin et al., J Hepatol. 37(2):266-71(2002); 和柴胡皂苷 c 和 d(见,例如, Chiang et al., Planta Med. 69(8):705-9(2003))。

[0229] 在另一个示范性实施方案中,所述病原微生物是 HIV。例如,对于 HIV 病毒的抑制的合适位点包括 TAR, REV 或 nef(Chatterjee et al., Science 258:1485-1488(1992))。Rev 是调节 RNA 结合蛋白,其促进未被剪接的 HIV 前-mRNA 从核中的输出。Malim et al., Nature 338:254(1989)。认为 Tat 是转录激活剂,其通过结合 5' 侧翼 mRNA 中的识别序列来发挥功能。Karn&Graeble, Trends Genet. 8:365(1992)。通过来自体内或通过静脉内注射,以治疗上有效的剂量,将核酸-脂质复合体引入白细胞或造血干细胞。可以将所述治疗预防性地施用给有风险感染 HIV 的人或已经被 HIV 感染的人。类似的方法用于抑制编码黏着蛋白的内源受体细胞基因的表达。

[0230] 在另一个实施方案中,本发明的组合物和方法可以便利地用于治疗特征在于基因的或基因群的表达或过表达的疾病和病症。在一些方面中,本发明的组合物和方法可以用于治疗代谢性疾病和病症(例如,其中肝是靶目标的疾病和病症以及肝疾病和病症)诸如,例如,血脂异常和糖尿病。本领域技术人员将理解与代谢疾病和病症相关的基因的沉默可以与这些疾病的常规治疗结合。例如,涉及血脂异常的基因的沉默可以与用抑制素、胆汁酸螯合剂/树脂和胆固醇吸收抑制剂诸如依泽替米贝,植物甾烷醇/甾醇,多元酚,以及营养制品诸如燕麦糠,亚麻籽和大豆蛋白,植物甾烷醇(phytostanol)类似物,角鲨烯合成酶抑制剂,胆汁酸转运抑制剂 SREBP 裂解激活蛋白质(SCAP)激活配体,烟酸(烟酸),阿西莫司,高剂量鱼油,抗氧化剂和甘蔗脂肪醇,微粒体三酰甘油转运蛋白(MTP)抑制剂,脂酰辅酶 A:胆固醇酰基转移酶(ACAT)抑制剂, gemcabene, 利非贝罗,泛酸类似物,烟酸-受体激动剂,抗炎剂(诸如 Lp-PLA(2)拮抗剂和 AGI1067)功能油,PPAR- α , γ , δ 激动剂,以及双重 PPAR- α , γ 和 'pan' PPAR- α / γ , δ 激动剂,胆甾醇酯转移蛋白(CETP)抑制剂(诸如 torcetrapib), CETP 疫苗, ATP-结合盒式转运蛋白(ABC)A1 的上调剂,卵磷脂胆固醇酰基转移酶(LCAT)和清除剂受体类 B 类型 1(SRB1),以及合成性载脂蛋白(Apo)E-相关肽,延缓释放的烟酸/洛伐他汀,阿托伐他汀/氨氯地平,依泽替米贝/辛伐他汀,阿托伐他汀

/CETP 抑制剂, statin/PPAR 激动剂, 在开发中的延缓释放的烟酸 / 辛伐他汀和普伐他汀 / 阿司匹林, 以及抗 - 肥胖症试剂进行的治疗结合 (见, 例如, Bays 和 Stein, Expert Opin. Pharmacother. 4(11) :1901-38 (2003))。同样地, 涉及糖尿病的基因的沉默可以与用胰岛素进行的治疗以及饮食修改和锻炼结合。

[0231] 类似的方法用于抑制内源受体细胞基因的表达, 所述内源受体基因与肿瘤发生和细胞转化, 肿瘤生长和肿瘤迁移相关; 抑制生血管基因的表达; 抑制免疫调节剂基因, 诸如那些与炎症和自身免疫应答相关的那些的表达; 抑制配体受体基因的表达; 抑制与神经变性病相关的基因的表达; 和抑制另外的与病毒感染和存活相关的另外的基因的表达。具体目标的靶基因序列同上描述。

[0232] D. SNALPs 的检测

[0233] 在一些实施方案中, 在施用所述颗粒后 8, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 或 96 小时后, 所述核酸 - 脂质颗粒在受试者的血浆和 / 或细胞中可以检测到的。可以通过本领域已知的任何方式检测所述颗粒的存在, 所述方式包括, 例如, 直接检测所述颗粒, 检测干扰 RNA 序列, 检测目标靶序列 (即, 通过检测目标序列的表达或减少的表达), 或其组合。

[0234] 1. 检测所述颗粒

[0235] 使用本领域已知的任何方法检测本文的核酸 - 脂质颗粒。例如, 使用本领域众所周知的方法将标记直接或间接与 SNALP 的成分或其它基于脂质的载体系统偶联。可以使用广泛种类的标记, 其中基于需要的敏感性, 与 SNALP 成分的缀合的容易性, 稳定性要求和可获得的工具和处理的准备来进行选择。合适的标记包括, 但不限于, 光谱标记, 诸如荧光染料 (例如, (例如, 荧光素和衍生物, 诸如异硫氰酸荧光素 (FITC) 和 Oregon Green™; 若丹明和衍生物, 诸如德克萨斯红, tetra-rhodimine isothiocyanate (TRITC), 等, 洋地黄毒苷, 生物素, 藻红蛋白, AMCA, CyDyes™ 等; 放射性标记, 诸如 ³H, ¹²⁵I, ³⁵S, ¹⁴C, ³²P, ³³P, 等; 酶诸如辣根过氧化物酶, 碱性磷酸酶等; 光谱比色标记诸如胶态金或有色玻璃或塑料珠, 诸如聚苯乙烯, 聚丙烯, 胶乳等)。使用本领域已知的任何方式来对标记进行检测。

[0236] 2. 核酸的检测

[0237] 通过本领域那些技术人员众所周知的许多方式的任何一种来对本文的核酸进行检测和定量。通过本领域众所周知的方法诸如 DNA 印迹分析, RNA 印迹分析, 凝胶电泳, PCR, 放射性标记, 闪烁计数和亲和性层析法来进行核酸的检测。还可以应用另外的分析生化方法诸如分光光度测定法, X 光线照相术, 电泳, 毛细管电泳, 高效液相层析 (HPLC), 薄层层析法 (TLC), hyperdiffusion 层析法。

[0238] 核酸杂交格式的选择不是关键性的。多种核酸杂交格式是本领域技术人员已知的。例如, 常见格式包括夹层 (sandwich) 测定和竞争性或置换分析法。杂交技术通常描述在 “Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach,” Ed. Hames, B. D. 和 Higgins, S. J., IRL Press, 1985 中。

[0239] 通过应用核酸扩增系统可以提高杂交测定的敏感性, 所述核酸扩增系统使被检测的靶核酸成倍增加。已知适合于扩增用作分子探针的序列或产生核酸片段以进行随后的亚克隆的体外扩增技术。通过这些体外扩增方法, 包括聚合酶链反应 (PCR), 连接酶链反应 (LCR), Q β - 复制酶扩增和其它的 RNA 聚合酶介导技术 (例如, NASBA™) 足以指导技术人员的技术实例见于 Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory

Manual, ColdSpring Harbor Laboratory Press, 2000, 和 Ausubel et al., SHORT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, eds., Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. 和 John Wiley & Sons, Inc., (2002), 以及 Mullis et al. (1987), 美国专利号 4,683,202; PCR Protocols A Guide to Methods and Applications (Innis et al. eds) Academic Press Inc. San Diego, CA (1990) (Innis); Arnheim & Levinson (October 1, 1990), C&EN 36; The Journal Of NIH Research, 3:81 (1991); (Kwoh et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:1173 (1989); Guatelli et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:1874 (1990); Lomell et al., J. Clin. Chem., 35:1826 (1989); Landegren et al., Science, 241:1077 (1988); Van Brunt, Biotechnology, 8:291 (1990); Wu 和 Wallace, Gene, 4:560 (1989); Barringer et al., Gene, 89:117 (1990), 和 Sooknanan 和 Malek, Biotechnology, 13:563 (1995)。克隆体外扩增核酸的改善的方法描述于 Wallace et al., 美国专利号 5,426,039。本领域描述的其它方法是基于核酸序列的扩增 (NASBA™, Cangene, Mississauga, Ontario) 和 Q β 复制酶系统。

[0240] 如 Needham VanDevanter et al., Nucleic Acids Res., 12:6159 (1984) 所述, 典型地按照 Beaucage 和 Caruthers, Tetrahedron Letts., 22(20):1859-1862 (1981) 所述的固相亚磷酰胺三酯方法, 例如使用自动合成仪来化学合成寡核苷酸, 所述寡核苷酸用作例如在体外扩增方法的探针, 用作基因探针, 或作为抑制剂成分。如果必要, 如 Pearson 和 Regnier, J. Chrom., 255:1371-149 (1983) 所述, 通过天然丙烯酰胺凝胶电泳或通过阴离子交换 HPLC 来典型地进行寡核苷酸的纯化。使用 Maxam 和 Gilbert (1980) 在 Grossman 和 Moldave (eds.) Academic Press, New York, Methods in Enzymology, 65:499 中的化学降解方法可以证实合成性寡核苷酸的序列。

[0241] 确定翻译水平的替代方式是原位杂交。原位杂交分析是众所周知的并且通常描述于 Angerer et al., Methods Enzymol., 152:649 (1987) 中。在原位杂交分析中, 将细胞固定于固体支持物, 典型地载玻片上。如果要探测 DNA, 用热或碱使细胞变性。接着, 在适合的温度, 使细胞与杂交溶液接触以容许被标记的特异性探针的退火。用放射性同位素或荧光报道分子来优选地对探针进行标记。

[0242] VI. 试剂盒

[0243] 本发明还提供试剂盒形式的核酸-脂质颗粒。所述试剂盒将典型地包括容器, 所述容器被进行划分以容纳核酸-脂质颗粒的各种组分以及内体膜的去稳定剂 (例如, 钙离子)。所述试剂盒包含本发明的组合物, 其优选地以脱水形式存在, 以及它们的再水合和施用的说明书。在其它实施方案中, 所述颗粒和/或包括所述颗粒的组合物将具有附着于颗粒表面的靶向部分。将靶向部分 (例如, 抗体, 蛋白质) 附着于脂质 (诸如用在本颗粒中的那些) 的方法是本领域那些技术人员已知的。

[0244] 实施例

[0245] 随后的实施例提供举例说明, 但不限定被要求的本发明。本领域那些技术人员将容易地识别各种非关键性的参数, 其可以在实质上产生相同的结果。

[0246] 实施例 1. 包封 siRNA 的 SNALP 制剂

[0247] 本实施例证实将 siRNA 包封在 SNALP 中, 用短或长链 PEG-DAG 来配制或通过将有有机脂质和水性缓冲溶液持续混和在一起产生所述 SNALP。所用的 PEG-DAG 脂质是 PEG-二

肉豆蔻基甘油 (C_{14}) (PEG-DMG) 和 PEG-二硬脂基甘油 (C_{18}) (PEG-DSG)。被包封在 DSPC:胆固醇:DODMA:PEG-DMG/PEG-DSG SNALP 中的抗- β -半乳糖苷酶 (β -gal) siRNA 导致 $\geq 90\%$ 的包封 (Ribogreen 测定) 和 $\sim 120\text{nm}$ 颗粒大小 (Malvern 分级机)。所述制剂具有如下特性:

[0248] 4ml prep:在 DSPC:Chol:DODMA:PEG-DMG 脂质体中的抗-B-gal siRNA

[0249] 起始混和 = 94% 包封

[0250] 稀释后混和 = 98% 包封

[0251] 温育后混和 = 97% 包封

[0252] 过夜透析后 = 96% 包封

[0253] 颗粒大小 = 109.7nm

[0254] 多分散性 = 0.14

[0255] 8ml prep:在 DSPC:Chol:DODMA:PEG-DMG 脂质体中的抗-B-gal siRNA

[0256] 稀释后 & 温育的混和 = 89%

[0257] 过夜透析后 = 91%

[0258] 颗粒大小 = 127.5nm

[0259] 多分散性 = 0.11

[0260] 8ml prep:在 DSPC:Chol:DODMA:PEG-DSG 脂质体中的抗-B-gal siRNA

[0261] 稀释后 & 温育的混和 = 90%

[0262] 过夜透析后 = 90%

[0263] 无菌过滤后 = 90%

[0264] 颗粒大小 = 111.6nm

[0265] 多分散性 = 0.24

[0266] 实施例 2 通过体外传递包封 siRNA 的 SNALP 制剂进行细胞中细胞内表达的下调

[0267] 该实施例证明在 CT26.CL25 细胞中的 β -Gal 表达的下调,将包封抗- β -Gal siRNA 的 DSPC:胆固醇:DODMA:PEG-DMG 脂质体体外传递到所述细胞中。将结果描述于图 1 中。

[0268] 与未接触的对照细胞相比,0.2 μg 的 Oligofectamine-包封的抗- β -Gal siRNA 的体外传递将 β -Gal 活性减少了约 60%。与未接触的对照细胞相比,将 1.5 μg 的抗- β -Gal siRNA 包封在 DSPC:胆固醇:DODMA:PEG-DMG 脂质体中减少了 β -Gal 的活性约 30%。

[0269] 实施例 3. 血清稳定性的测定

[0270] 按照上述指出的技术配制的脂质/治疗性核酸颗粒可以通过各种方法来进行血清稳定性的测定。

[0271] 例如,在典型的 DNase I 消化中,将被包封在目标颗粒中的 1 μg DNA 在 100 μL 总体积的 5mM HEPES,150mM NaCl,10.0mM MgCl_2 pH7.4 中进行温育。用 100 或 10U 的 DNase I (Gibco-BRL) 来处理被 DNase 处理的样品。可以将 1.0% 的 Triton X-100 加入对照实验中以确保脂质制剂不直接使所述酶失活。将样品在 37°C 温育 30 分钟,然后通过加入 500 μL 的 DNAzol,随后加入 1.0mL 的乙醇来分离 DNA。将样品在台式离心机中以 15,000rpm 离心 30 分钟。倾去上清液并用 80% 的乙醇洗涤 DNA 沉淀两次并进行干燥。将该 DNA 重悬于 30 μL 的 TE 缓冲液中。将 20 μL 的该样品上载到 1.0% 的琼脂糖凝胶中并在 TAE 缓冲液中进行电

泳。

[0272] 在典型的血清测定中,将游离的,被包封的,或被包封的 +0.5% TritonX100 形式的 50 μ gDNA 等分到 1.5mL Eppendorf 管中。向所述管中加入 45 μ l 的正常鼠或人血清, dH₂O(使终体积为 50 μ L)。用石蜡膜密封所述管并在 37°C 进行温育。将没有用核酸酶(标准)消化的游离的,被包封的,或被包封的 +0.5% Triton X100 的样品在 Eppendorf 管中在液氮中冷冻并贮存于 -20°C。在各个时间点取出等份试样,将其加入包含蛋白酶 K(133 μ g/mL) 的 GDP 缓冲液中,立即在液氮中冷冻以停止反应。一旦收集了所有的时间点,在水浴中以 55°C 温育所述样品从而激活蛋白酶 K 来使任何残余的核酸外切酶变性。将被蛋白酶 K 消化的样品施放到聚丙烯酰胺凝胶中以评价核酸外切酶降解的水平。

[0273] 上述揭示的颗粒通过甚至在存在 100U DNase 1 时,显示这些处理的结果是少于 5% 和优选地不可检测的量的 DNA 降解(部分或总的),来证明血清稳定性。其有利地与游离 DNA, 和质粒/脂质复合体(诸如 DOTMA 或 DODAC:DOPE 复合体)比较,所述游离 DNA 被彻底降解,在所述质粒/脂质复合体中 DNA 在这些处理后被基本降解(即,大于 20%,通常 80%)。

[0274] 实施例 4. SNALPs 的特点

[0275] 该实施例描述在具有肿瘤的小鼠中,疾病位点靶向和由静脉内施用 SNALP 导致的基因表达。在该实施例中,被包封的核酸是质粒。

[0276] 所述 SNALP 方法导致在小的(直径~70nm)“稳定的核酸-脂质颗粒”(SNALP)中的质粒 DNA 的包封。SNALP 由每个颗粒一个质粒组成,所述颗粒被包封在脂双层中,通过双层稳定成分,诸如聚(乙二醇)(PEG)包衣的存在来稳定所述脂双层。SNALP 显示在静脉内施用后的延伸的循环生存生存期和促进完整的质粒传递到远距离肿瘤位点导致在疾病位点的报告基因表达。

[0277] 具有长循环时间的 SNALP 累积到对应于每克肿瘤总注射剂量的百分之五到百分之十的水平或大于每个细胞 1000 个拷贝的质粒 DNA 的水平,给出基因表达的水平,所述基因表达的水平比在任何其它组织中观察到的那些大于超过两个数量级。有趣的是,尽管肝积累 20-30% 的总注射剂量,在肝中观察到非常低的基因表达水平。认为这是由于 PEG 化的 SNALP 的肝细胞吸收受到限制所引起的。见,图 7-9。

[0278] 通过阳离子 PEG 脂质(CPL)的结合,进一步提高包含双层稳定成分的核酸-脂质颗粒的体内传递和转染潜力。所述阳离子 PEG 脂质(CPL)由 DSPE 锚,PEG₃₄₀₀ 间隔臂链和阳离子头部基团组成。当 CPL 以 2-4mol% 的浓度将 CPL 结合到 SNALP 中时,得到的 CPL-SNALP 与天然 SNALP 具有相似的大小和稳定性。CPL 的结合导致了在体外和体内测量的细胞内传递的急剧增加和转染活性的伴随增加。具体地,CPL-SNALP 产生 10⁵ 倍更多于天然 SNALP 的体外基因表达。当 CPL-SNALP 被静脉内施用时,与天然 SNALP 相比,它们产生了肝基因表达的基本增加(250 倍)。CPL-SNALP 功效的增加特异于肝。在肺、肾、脾或心脏中测量的基因表达的水平保持不变,解释了在肝中测量的基因表达水平与其它器官相比多于两个数量级的差异。

[0279] 这些结果举例说明了调节包含 PEG-脂质的系统的传递特性的功效同时需要保持稳定性和小的均一大小以获得系统基因传递。特别地,它们说明了疾病位点靶向和组织特异性基因表达可以通过改变非病毒基因传递系统的脂质组成来重新被进行规划。

[0280] 实施例 5. 包含 PEG-DAG 缀合物的 SNALPs

[0281] 该实施例说明了一系列 PEG- 二酰基甘油脂质 (PEG-DAG) SNALPs 的制备。在该实施例中,被包封的核酸是质粒。

[0282] 结合 10mol 百分比的 PEG- 二月桂基甘油 (C_{12}), PEG- 二肉豆蔻基甘油 (C_{14}), PEG- 二棕榈酰甘油 (C_{16}) 或 PEG- 二硬脂基甘油 (C_{18}) 制备 PEG-DAGSNALP, 并评价其体外传染活性, 药物代谢动力学和在具有肿瘤的小鼠中由全身施用导致的基因表达的生物分布。包含 PEG-DAG 脂质的 SNALP 证明在酰基链长度和体外传染活性之间的与包含 PEG- 神经酰胺的那些相似的关系。更短的酰基链锚 (二肉豆蔻基 (C_{14}) 和二棕榈酰 (C_{16})) 导致了与结合更长酰基链锚 (二硬脂基 (C_{18})) 的那些相比, 较不稳定的 SNALP 颗粒在体外具有更高的传染活性。包含 PEG-DAG 的 SNALP 的药物代谢动力学的评价证实了在 PEG 脂质组成的稳定性和 SNALP 的循环生存期之间的相关性。包含 PEG- 二肉豆蔻基甘油 (C_{14}), PEG- 二棕榈酰甘油 (C_{16}) 和 PEG- 二硬脂基甘油 (C_{18}) 的 SNALP 证明了循环半寿期分别为 0.75, 7 和 15 小时。延长的循环生存期依次与肿瘤传递的增加和伴随的基因表达相关。

[0283] 在静脉内施用后, 包含 PEG- 二硬脂基甘油 (C_{18}) 的 SNALP 绕过所谓的“第一通过”器官, 包括肺, 并在远端肿瘤组织中激发基因表达。在肿瘤中观察到的报告基因表达的水平比在任何其它组织中观察到的表现出了 100-1000 倍的差异。这可完全与包含 PEG- 神经酰胺 C_{20} 的 SNALP 的行为相比。在 SNALP 中 PEG-DAG 的结合证实了小尺寸, 低表面电荷和延长的循环生存期是被动疾病位点靶向的必要条件, 其导致了在非病毒转染系统的全身施用后在肿瘤中的质粒 DNA 和基因表达的累积。见, 图 3-9。

[0284] 材料与方法

[0285] 材料

[0286] DOPE 和 DSPC 获自 Northern Lipids (Vancouver, BC)。DODAC 和 PEG- 二酰基甘油由 Inex Pharmaceuticals (Burnaby, BC) 生产。其它的材料, HEPES, OGP 和 3H - 胆甾烯基十六烷基醚, 获自许多不同的商业来源。

[0287] 通过在 Hepes 缓冲盐溶液 (150mM NaCl 和 10mM HEPES) 进行去污剂透析 48 小时来制备 DOPE:DODAC:PEG- 二酰基甘油 (82.5 : 7.5 : 10) 大单层囊胚泡。在乙醇中制备脂质贮存液, 接着进行干燥以产生脂质薄膜, 所述脂质在终 200mM OGP 中重构的脂质薄膜。用 3H - 胆甾烯基十六烷基醚以 1uCi/1mg 脂质对 LUVs 进行标记。通过 nicomp 分析来确定颗粒大小。通过用 Picofluor20 进行闪烁计数来确定放射性。

[0288] 通过改变盐浓度使 DNA 包封的百分比最大化的去污剂透析来对包含 PEG- 二酰基甘油的 SNALP 进行配制。选择最佳的盐浓度来进行 48 小时的去污剂透析。通过一步蔗糖离心来将空小泡去除。将 3.5% 的蔗糖用于从包含质粒的 PEG- 二酰基甘油制剂中去除空颗粒, 除了包含 PEG- 二肉豆蔻基甘油的 SNALP 使用 5.0% 的蔗糖。空小泡迁移到试管的顶部, 其被分成小片段并被去除。

[0289] 体外转染

[0290] 将 5×10^4 细胞 /ml 接种到 24- 孔板上 (1ml)。将细胞培养 24 小时。加入 500 μ l 的转染培养基 (2.5 μ g / 孔) 并接着温育一定的时间。在时间点后, 将转染培养基吸出, 接着在 37°C 于 5.0% CO_2 中与完全培养基再接触 24 小时。去除完全培养基。用 PBS 将细胞洗涤 2 次并贮存于 -70°C 直到实验当天。用 150 μ l 的包含蛋白酶抑制剂的 1x CCLR 来裂解细

胞。将平板摇动 5 分钟。在 96 孔发光平板上重复测定 20 μ l 的每个样品的荧光素酶活性。药物代谢动力学,生物分布和体内基因表达

[0291] 药物代谢动力学和生物分布都通过使数据标准化来量化出现的放射性进行确定。通过心脏穿刺术 (cardiac puncture) 来获得约 500 μ l 的血液。通过离心 (4°C, 3000rpm, 10 分钟) 来分离红血细胞和血浆并将 100 μ l 的血浆用于确定放射性计数。在具体时间点收集器官并在裂解基质管 (FastPrep, 2 $\times$ 15 秒, 4.5 强度) 中进行搅匀来测定混合物的部分。

[0292] 通过荧光素酶测定来确定基因表达。收集器官,进行搅匀并在整个实验中将其保持在冰上。将裂解物进行离心 (10,000rpm, 5 分钟) 并在 96 孔发光平板上重复测定 20 μ l 的上清液的荧光素酶活性。结果描述于图 6-9 中。

[0293] 体外基因沉默

[0294] 按照上述方法,用 SPLP 和 SNALPs 来转染细胞,所述 SPLP 包含 PEG- 脂质缀合物并包含在 CMV 启动子控制下编码荧光素酶的质粒,所述 SNALPs 包含抗 - 荧光素酶 siRNA。通过荧光素酶测定来确定基因表达。将结果描述于图 17 中。

[0295] 实施例 6. 被包封在 SPLP 中的核酸的表达,所述 SPLP 包括 PEG- 二烷氧基丙基缀合物

[0296] 该实施例描述这样的实验,所述实验比较被包封在 SPLP 中的核酸的表达,所述 SPLP 包括 PEG- 二烷氧基丙基缀合物。所有的 SPLP 制剂包括在 CMV 启动子控制下编码荧光素酶的质粒 (pL055)。

[0297]

组	# 小鼠	肿瘤	途径	处理	途径	# 剂量	时间	测定***
A	4	Neuro-2a	SC	PBS	IV	1	48 hrs	体重, 血液分析, 荧光素酶 活性
B	5	Neuro-2a	SC	SPLP PEG-DSG	IV	1	48 hrs	
C	5	Neuro-2a	SC	SPLP PEG-A-DSA	IV	1	48 hrs	
D	5	Neuro-2a	SC	SPLP PEG-A-DPA	IV	1	48 hrs	
E	5	Neuro-2a	SC	SPLP PEG-A-DMA	IV	1	48 hrs	

[0298] 所述脂质 (DSPC:CHOL:DODMA:PEG- 脂质) 在 SPLP 中以随后的摩尔比 (20 : 55 : 15 : 10) 存在。下列的制剂由

[0299] A: 无菌过滤的 PBS, 5mL.

[0300] B: 具有 PEG-DSG 的 pL055-SPLP, 2mL, 0.50mg/mL.

[0301] C: 具有 PEG-A-DSA 的 pL055-SPLP, 2mL, 0.50mg/mL.

[0302] D: 具有 PEG-A-DPA 的 pL055-SPLP, 2mL, 0.50mg/mL.

[0303] E: 具有 PEG-A-DMA 的 pL055-SPLP, 2mL, 0.50mg/mL. 制作。

[0304]

组	# 小鼠	接种日期	处理	注射日期	收集日期
A	4	第 0 天	PBS	第 12 天	第 14 天
B	5	第 0 天	SPLP PEG-DSG	第 12 天	第 14 天
C	5	第 0 天	SPLP PEG-A-DSA	第 12 天	第 14 天
D	5	第 0 天	SPLP PEG-A-DPA	第 12 天	第 14 天
E	5	第 0 天	SPLP PEG-A-DMA	第 12 天	第 14 天

[0305] 在第 0 天, 将 1.5×10^6 Neuro2A 细胞施用给每只小鼠。当肿瘤是合适大小 (200–400mm³) 时, 小鼠被随机安排并通过静脉内 (IV) 注射用 1 剂量的 SPLP 制剂或 PBS 进行处理。剂量的量基于在给药日每天进行的体重测量。在 SPLP 施用后 48 小时, 将小鼠处死, 并收集它们的血液, 收集下列组织: 肿瘤, 肝 (切成两半), 肺, 脾 & 心脏, 进行称重, 立即冷冻并贮存于 -80°C 直到进一步分析。

[0306] 通过测定被表达的萤光素酶报告蛋白的酶促活性来确定在收集的组织中的基因表达。将结果显示于图 11 和 12 中。

[0307] 所述结果说明包括 PEG- 二烷氧基丙基 (即, PEG-DAA) 的 SPLP 可以方便地用于将远端肿瘤转染到与包括 PEG- 二酰基甘油的 SPLP 相同的程度。而且, 用包含 PEG- 二烷氧基丙基的 SPLP 所见的转染水平与用包含 PEG- 二酰基甘油 (例如, PEG-DSG) 的 SPLP 所见的那些相似。还显示与 PEG- 二酰基甘油系统相似, 在非肿瘤组织中发生非常低的转染。而且, 与其它 SPLP 制剂相比, 包括 PEG- 二烷氧基丙基的 SPLP 显示减少的毒性。

[0308] 实施例 7. 包含 PEG- 二烷氧基丙基缀合物的 SNALPs

[0309] 该实施例描述实验, 所述实验分析一系列 PEG- 二烷氧基丙基脂质 SNALPs (即, 包含被包封的 siRNA 的 SPLP) 的生物分布 (局部和全身的) 和药物代谢动力学。

[0310] 局部生物分布

[0311] 通过荧光显微镜, 确定由对具有 Neuro-2a 肿瘤的小鼠施用包含抗- β 半乳糖苷酶 siRNA 的 SNALP 所导致的 SPLP 的局部分布。

[0312] A : PBS

[0313] B : 抗- β gal siRNA- 若丹明 -PE 标记 -DSPC:Chol:DODMA:PEG-A-DMASNALP (1 : 20 : 54 : 15 : 10)

[0314]

组	小鼠	细胞	处理	时间	测定
A	2	Neuro2A	PBS	24hr	荧光可照相显微镜
B	5	Neuro2A	抗-Bgal siRNA- 若丹明-PE 标记的 -DSPC:Chol:DODMA:PEG-A-DMA	24hr	荧光可照相显微镜

[0315] 在第 0 天, 将 1.5×10^6 Neuro2A 细胞施用给每只小鼠。当肿瘤是合适的大小时 ($200-400\text{mm}^3$, 典型地第 9-12 天), 将小鼠随机安排, 处死并通过静脉内 (IV) 注射用 1 剂量的包含 $100\text{ }\mu\text{g}$ siRNA 的 SNALP 制剂或 PBS 进行处理, 总体积为 $230\text{ }\mu\text{l}$ 。剂量的量基于在给药日进行的体重测量。在 SPLP 施用后 24 小时, 将小鼠处死, 并收集它们的血液, 收集如下的组织: 肿瘤, 肝 (切成两半), 肺, 脾 & 心脏, 立即将其进行冷冻并贮存于 -80°C 直到进一步的分析。

[0316] 通过荧光显微镜来确定 SNALP 的局部分布。SNALP 的积累见于例如, 肝中, 说明包括 PEG-二烷氧基丙基的 SNALP 能够外渗, 即脱离循环并回到靶组织或器官。

[0317] 药物代谢动力学和全身生物分布

[0318] 该实施例举例说明在皮下接种了 Neuro2A 肿瘤的小鼠中 SPLPs 和 SNALPs 的药物代谢动力学和生物分布, 所述 SPLPs 包含在 CMV 启动子控制下编码萤光素酶的质粒 (L055), 所述 SNALPs 包含抗-萤光素酶 siRNA。

[0319]

组	小鼠	细胞	处理	时间点 (h)
A	6	Neuro2A	[3-H]CHE-L055-DSPC:Chol:DODMA: PEG-A-DMA	0.25, 1, 4, 8, 24
B	6	Neuro2A	[3-H]CHE- 抗-luc siRNA-DSPC:Chol:DODMA:PEG-A- DMA	0.25, 1, 4, 8, 24
C	6	Neuro2A	[3-H]CHE-L055 -DSPC:Chol:DODMA:PEG-C-DMA	0.25, 1, 4, 8, 24
D	6	Neuro2A	[3-H]CHE-L055-pSPLP (PEI)	0.25, 1, 4, 8, 24
E	6	Neuro2A	[3-H]CHE-L055-DSPC:Chol:DODMA: PEG-DSG	0.25, 1, 4, 8, 24

[0320] 所有的样品以 0.5mg/ml 核酸进行提供。制备如下的 SPLP 和 SNALP 制剂:

[0321] A. $[^3\text{H}]$ CHE-L055-DSPC:Chol:DODMA:PEG-A-DMA (20 : 55 : 15 : 10)

[0322] B. $[^3\text{H}]$ CHE- 抗-luc siRNA-DSPC:Chol:DODMA:PEG-A-DMA (20 : 55 : 15 : 10)

[0323] C. [^3H]CHE-L055-DSPC:Chol:DODMA:PEG-C-DMA (20 : 55 : 15 : 10)

[0324] D. [^3H]CHE-L055-pSPLP (PEI) (即., 预浓缩的 SPLP)

[0325] E. [^3H]CHE-L055-DSPC:Chol:DODMA:PEG-DSG (20 : 55 : 15 : 10)

[0326]

组	# 小鼠	接种日期	处理	注射日期	收集日期
A	6	第 0 天	[^3H]CHE-L055-DSPC:Chol:DODMA:PEG-A-DMA	第 12 天	7 月 31
B	6	第 0 天	[^3H]CHE-抗-luc siRNA-DSPC:Chol:DODMA:PEG-A-DMA	第 12 天	7 月 31
C	6	第 0 天	[^3H]CHE-L055 -DSPC:Chol:DODMA:PEG-C-DMA	第 13 天	第 14 天
D	6	第 0 天	[^3H]CHE-L055-pSPLP (PEI)	第 13 天	第 14 天
E	6	第 0 天	[^3H]CHE-L055-DSPC:Chol:DODMA:PEG-DSG	第 14 天	第 15 天

[0327] 在第 0 天, 以在 50 μL 磷酸盐缓冲溶液中的 1.5×10^6 细胞的剂量, 用 Neuro 2A 细胞对 30 只雄性 A/J 小鼠 (Jackson Laboratories) 进行皮下接种。在肿瘤达到合适大小后 (典型地在第 9 天或其后), 将 200 μL (100 μg 核酸) 的上述的 SPLP 或 SNALP 制剂进行静脉内施用。在施用 SPLP 或 SNALP 0.25, 1, 2, 4, 和 8 小时后, 将小鼠进行称重并通过尾端切口来收集血液 (典型地 25 μL)。在 SPLP 或 SNALP 施用后 24 小时, 将小鼠处死, 收集血液并测定 [^3H]CHE 的清除率。收集器官 (例如, 肝、肺、脾、肾、心脏) 和肿瘤并进行 [^3H]CHE 积累的评价。结果显示于图 13-16。

[0328] 对于所有的制剂, 包含 PEG-DSG 的 SPLP 在循环中保持的时间最长, 其中在 6 小时后, 50% 的被注射剂量仍旧保持。有趣的是, 似乎在最初的 15 分钟内, 起始快速清除 pSPLP, 这在任何其它制剂中都没有观察到。1 小时后, pSPLP 的清除模式与 SPLP 的非常相似。这种对于 pSPLP 样品的起始快速清除可以说明实际上有两种类型的颗粒存在, 一种非常迅速的清除, 一种与 SPLP 非常相似。

[0329] 与包含 C18PEG-DSG 的 SPLP 相比, 用 C14PEG-A-DMA 配制的包含抗-Luc siRNA 的小泡 (SNALP) 显示从血液中更加快速的清除。但是, 与用相同的 PEG 脂质配制的 SPLP 相比, 这种 SNALP 制剂显示明显更慢的血清清除。这种结果可能的原因可能是包含 siRNA 的颗粒可以比包含质粒的 SPLP 更容易地逃避细胞免疫系统。

[0330] 包含 PEG-C-DMA 的 SPLP 说明从血液中的快速清除, 其基本与在包含 PEG-A-DMA 的 SPLP 中观察到相同。对于这两种制剂而言, 血浆半寿期是约 2 小时, 比包含 C18PEG-脂质的 SPLP 更低。

[0331] 在每克组织 10.9% 的注射剂量, 包含 PEG-DSG 的 SPLP 具有最高的肿瘤积累。包

含 C14PEG- 脂质, PEG-A-DMA 和 PEG-C-DMA 的这两种 SPLP 制剂在每克组织 6.1% 和 5.9% 注射剂量具有更低的肿瘤积累。在 7.3%, 与具有相同的 PEG- 脂质的 SPLP 样品相比, siRNA SNALP 具有稍稍更高的肿瘤积累, 其还与这种 SNALP 的血浆半寿期具有相对良好的相关性。在 7.5%, 所述 pSPLP 制剂具有肿瘤积累, 其比可比较的 PEG-DSG SPLP 更低。

[0332] 在心脏和肺中包含 SPLP 和 pSPLP 的 PEG-DSG 的积累比其它 SPLP 和 SNALP 更高, 其与具有 C18PEG- 脂质的颗粒的增加的循环半寿期具有一致性。毫不令人惊奇地, 对于所有被测试的样品而言, 在血浆半寿期和肝中的积累之间存在反比关系, 而对于脾中的样品累积则没有明显的趋势。对于所有的被测试制剂, 在肾中的积累是非常低的, 其中积累介于每克组织 1.2 和 2.4% 被注射的剂量之间。

[0333] 实施例 8 : 用 SNALPS 使基因表达沉默

[0334] 该实施例举例说明在共施用 SPLPs 和 SNALPs 后, 在具有 Neuro 2A 肿瘤的小鼠中的基因表达的沉默, 所述 SPLPs 包含在 CMV 启动子控制下编码萤光素酶的质粒, 所述 SNALPs 包含抗 - 萤光素酶 siRNA。

[0335]

组	# 小鼠	肿瘤	途径	处理	时间点	途径	# 剂量
1	3	Neuro-2a	SQ	PBS / PBS	48 h	IV	1
24A	4			L055-SPLP / PBS 混和	24 h		
24B	4			L055-SPLP / 抗 -luc siRNA 脂质体 混和			
48A	4			L055-SPLP / PBS 混和	48 h		
48B	4			L055-SPLP / 抗 -luc siRNA 脂质体 混和			
72A	4			L055-SPLP / PBS 混和	72 h		
72B	4			L055-SPLP / 抗 -luc siRNA 脂质体 混和			

[0336]

组	#小鼠	接种日期	途径	IV 处理	时间点	注射日期	收集日期
1	3	第 0 天	SQ	PBS / PBS	48 h	第 13 天	第 15 天
24A	4			L055-SPLP / PBS 混和	24 h	第 14 天	
24B	4			L055-SPLP / 抗-luc siRNA 脂质体混和		第 14 天	
48A	4			L055-SPLP / PBS 混和	48 h	第 13 天	
48B	4			L055-SPLP / 抗-luc siRNA 脂质体混和		第 13 天	
72A	4			L055-SPLP / PBS 混和	72 h	第 12 天	
72B	4			L055-SPLP / 抗-luc siRNA 脂质体混和		第 12 天	

[0337] 在第 0 天,以在 50 μ L 磷酸盐缓冲溶液总体积中 1.5×10^6 细胞的剂量,用 Neuro 2A 细胞对 36 只雄性 A/J 小鼠 (Jackson Laboratories) 进行皮下接种。一旦肿瘤达到合适大小后 (典型地在第 9 天或其后),将 200-240 μ l 的 PBS 或如上述实施例 6 描述所制备的 SPLP, SNALP 制剂 (总共 100 μ g 核酸) 进行静脉内施用。在施用 PBS, SPLP 或 SPLP 和 SNALP 的混合物 24, 48 或 72 小时后,将小鼠处死,收集器官 (例如,肝、肺、脾、肾、心脏) 和肿瘤并进行荧光素酶活性的评价。将结果显示于图 18-22 中。

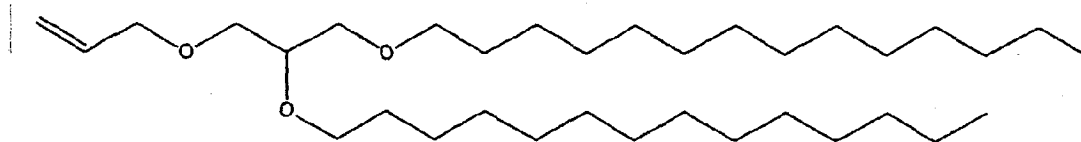
[0338] 所述结果说明在单一 iv 给药 48 小时后, pL055SPLP 和抗-luc siRNASNALP (都包含 PEG-A-DMA) 的共施用最大地减少荧光素酶基因表达达 40%。

[0339] 实施例 9. PEG-二烷氧基丙基 (PEG-DAA' s) 的合成

[0340] 随后的实施例举例说明了三种 PEG-脂质, PEG-A-DMA (7), PEG-C-DMA (8), 和 PEG-S-DMA (9) 的合成。它们具有共同的前体, 胺脂质 1,2-肉豆蔻基氧基丙胺 (5)。该脂质具有烷基链 14 碳单位 (C_{14}) 的长度。适合于本发明的其它的 PEG DAAs 可以使用相似的方案进行合成。例如,使用 (5) 的 C_{18} 类似物可以合成 PEG-A-DSA 和 PEG-C-DSA。在起初步骤中 (化合物 (1) 的合成) 可以通过简单用等克分子量的硬脂酰溴化物取代肉豆蔻基溴化物来合成 C_{18} 类似物。

[0341] 1,1,2-二肉豆蔻基氧基-3-烯丙氧基丙烷 (1) 的制备

[0342]

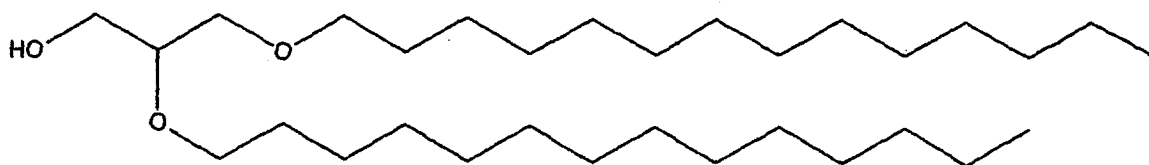


[0343] 将苯 (250ml) 加入 95% 的氢化钠 (11.4g, 450.0mmol), 用氮气冲洗烧瓶, 并进行密封。将 3-烯丙氧基-1,2-丙二醇 (6.6g, 50.0mmol) 的苯 (75ml) 溶液加入烧瓶中。使用注射器, 将 97% 的 1-溴四癸烷 (36.7ml, 120.0mmol) 加入烧瓶中并在持续的氮气流下使反应留待回流过夜。一旦被冷却到室温, 将过量的氢化钠用乙醇缓慢淬灭直到没有观察到进一步

的泡腾。将溶液转移到具有苯 (250ml) 的分液漏斗中,并用蒸馏水洗涤 (3×200ml)。用硫酸镁对有机层进行干燥并在旋转式汽化器上去除溶剂从而产生无色的油。TLC(5% 醚-己烷,在钼酸盐中显影)说明大多数起始材料已经反应形成了产物。通过闪蒸塔层析法 (1-5% 醚-己烷)对得到的产物进行进一步的纯化以产生 15.0g (57.3%) 的 1,2-二肉豆蔻基氧基-3-烯丙氧基丙烷 (1)。

[0344] 2. 1,2-二肉豆蔻基氧基丙烷-3-醇 (2) 的制备

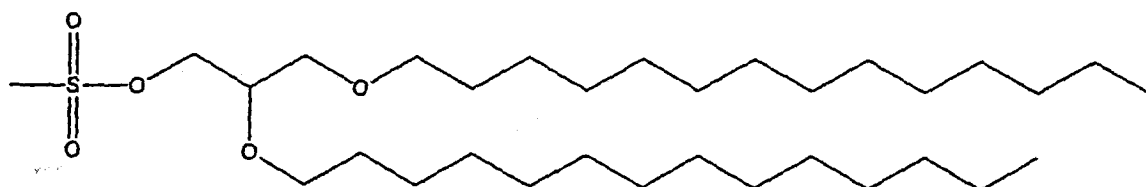
[0345]



[0346] 将 1,2-二肉豆蔻基氧基-3-烯丙氧基丙烷 1 (15.0g, 28.6mmol) 溶解在乙醇 (250ml) 中。加入三氟乙酸 (20ml),随后加入四 (三苯基膦) 钨 (0) (4.5g, 3.9mmol)。用锡纸包裹烧瓶并用氮气冲洗它以减少与光和空气的接触,然后在 80℃ 搅拌过夜。在旋转式汽化器上去除乙醇。TLC(100% CHCl₃,在钼酸盐中显影)说明大多数起始材料已经反应形成了产物。通过闪蒸塔层析法 (100% DCM) 对得到的产物进行进一步的纯化以产生 11.5g (83.1%) 的 1,2-二肉豆蔻基氧基-丙烷-3-醇 2。

[0347] 3. 0-(2,3-二肉豆蔻基氧基丙基) 甲磺酸 (methanesulphonate) (3) 的制备

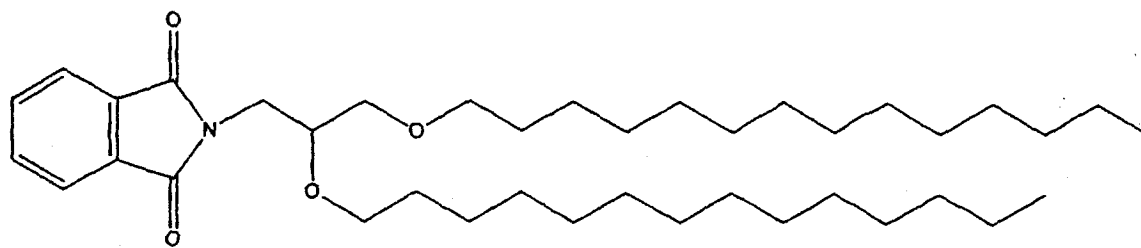
[0348]



[0349] 用氮气洗涤包含 97% 甲磺酐 (methanesulphonic anhydride) (8.4g, 48.0mmol) 的烧瓶并溶解在无水二氯甲烷 (50ml) 中。缓慢加入无水吡啶 (3.9ml, 48.0mmol),形成白色沉淀。将 1,2-二肉豆蔻基氧基丙烷-3-醇 15 (11.5g, 24.0mmol) 的无水二氯甲烷 (100ml) 溶液加入,并于室温将反应搅拌过夜。将溶液转移到具有二氯甲烷 (100ml) 的分液漏斗中,用蒸馏水洗涤 (3×100ml)。接着用二氯甲烷 (100ml) 将合并的水性洗涤物进行反萃取。用硫酸镁对合并的有机层进行干燥并在旋转式汽化器上去除二氯甲烷以产生无色的油。TLC(100% CHCl₃,在钼酸盐中显影)说明起始材料都已经反应形成了产物。该反应产生了 11.9g 的粗制 0-(2,3-二肉豆蔻基氧基丙基) 甲磺酸 (3)。

[0350] 4. N-(2,3-二肉豆蔻基氧基丙基) 苯邻二甲酰亚胺的制备 (4)

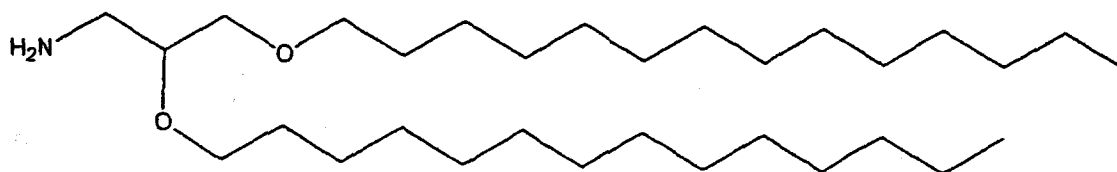
[0351]



[0352] 将粗 0-(2,3-二肉豆蔻基氧基丙基)甲磺酸 3 (14.2g, 25.3mmol) 和苯邻二甲酰亚胺钾 (13.9g, 75.0mmol) 用氮冲洗并溶解在无水 N,N-二甲基甲酰胺 (250ml) 中。将所述反应于 70℃ 在稳定的氮气流下搅拌过夜。使用高真空泵取代通常的吸气器在旋转式汽化器上去除 NN-二甲基甲酰胺。将残余物溶解在氯仿 (300ml) 中并将其转移到用氯仿漂洗 (50ml) 的分液漏斗中,接着用蒸馏水和乙醇 (3×300ml 蒸馏水, 50ml 乙醇) 洗涤。用氯仿对合并的水性洗涤物进行反萃取 (2×100ml)。用硫酸镁对合并的有机层进行干燥并在旋转式汽化器上去除氯仿。TLC (30% 醚-己烷, 在钼酸盐中显影) 显示起始物质已经反应形成产物。该反应产生 13.5g 的粗制 N-(2,3-二肉豆蔻基氧基丙基)苯邻二甲酰亚胺 4。

[0353] 5.1,2-二肉豆蔻基氧基丙胺 (5) 的制备

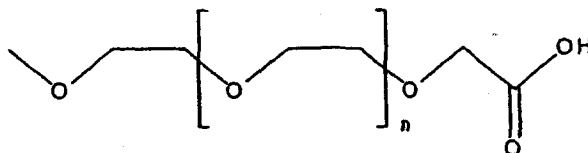
[0354]



[0355] 将粗制 N-(2,3-二肉豆蔻基氧基丙基)苯邻二甲酰亚胺 4 (20.0g, 25.0mmol) 溶解于乙醇 (300ml)。加入一水合肼 (20ml, 412.3mmol) 并将所述反应回流过夜。在旋转式汽化器上去除所述乙醇并将所述残余物溶解在氯仿中 (200ml)。过滤所述沉淀物并在旋转式汽化器上去除氯仿。TLC (10% MeOH-CHCl₃, 在钼酸盐中显影) 说明大多数起始物质已经反应以形成产物。通过闪蒸塔层析法 (0-5% MeOH-CHCl₃) 对该得到的产物进行进一步的纯化以产生 10.4g (89.7%, 从 1,2-二肉豆蔻基氧基丙烷-3-醇 2 的三个步骤) 的 1,2-二肉豆蔻基氧基丙胺 (5)。

[0356] 6. 甲氧基 PEG₂₀₀₀ 乙酸 (6) 的制备

[0357]

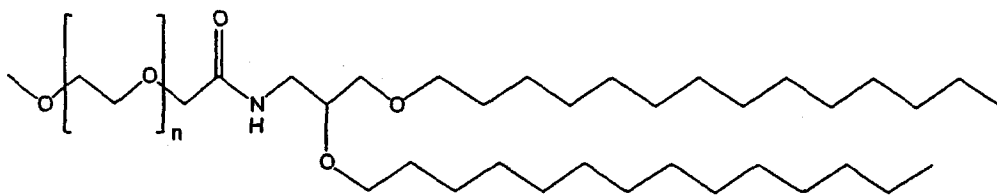


[0358] 将 10% 的浓缩的硫酸 (20ml) 水 (180ml) 溶液加入重铬酸钠 (3.0g, 10mmol)。将 PEG₂₀₀₀ 甲醚 (20.0g, 10mmol) 溶解在这种鲜橙色溶液中,并将反应在室温进行搅拌过夜。接着,用氯仿 (3×250ml) 对所述产物进行抽提,将深蓝色留在水层中。在旋转式汽化器上去除氯仿溶剂,得到淡蓝色蜡。TLC (13% MeOH-CHCl₃, 在碘中显影) 显示大多数起始物质已经反应形成产物。接着,通过闪蒸塔层析法 (0-15% MeOH-CHCl₃) 对这种粗制物质进行进一步的纯化。接着,将得到的产物在醚中进行结晶以产生 5.6g (27.1%) 的白色固体形式的甲氧

基 PEG₂₀₀₀ 乙酸 6。

[0359] 7. N-(2,3-二肉豆蔻基氧基丙基)酰胺 PEG₂₀₀₀ 甲醚 (7) 的制备

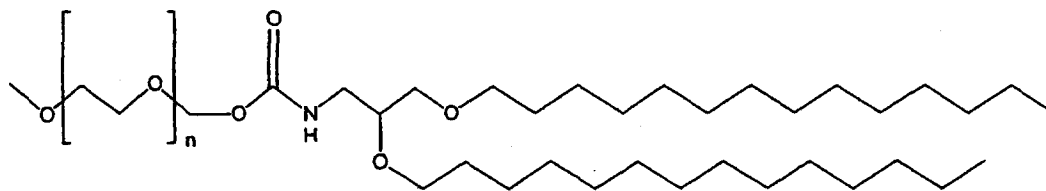
[0360]



[0361] 对于 N-(2,3-二肉豆蔻基氧基丙基)酰胺 PEG₂₀₀₀ 甲醚 (即, PEG-A-DMA) 的制备, 将甲氧基 PEG₂₀₀₀ 乙酸 6 (3.4g, 1.7mmol) 溶解在苯 (40ml) 中并用氮气冲洗。通过注射器和针穿过 subaseal 将草酰氯 (1.7ml, 2.5g, 20mmol) 缓慢加入。将该反应搅拌 2 小时, 接着在旋转式汽化器上将苯溶剂去除。将 2,3-肉豆蔻基氧基丙胺 5 (0.87g, 1.8mmol) 加入烧瓶中, 随后加入无水二氯甲烷 (40ml) 和三乙胺 (1.5ml, 10mmol)。将反应搅拌 48 小时。加入蒸馏水 (250ml), 用盐酸 (1.5ml) 对所述溶液进行酸化并进行摇动, 收集有机层。用氯仿 (2×65ml) 从水层中抽提产物。用硫酸镁对合并的有机层进行干燥。在旋转式汽化器上去除氯仿从而产生黄色固体。TLC (10% MeOH-CHCl₃, 在硫酸铜和碘中显影) 说明大多数起始物质已经反应以形成产物。通过闪蒸塔层析法 (0-7% MeOH-CHCl₃) 对粗制物质进行进一步的纯化。接着通过加入活性炭 (2g) 和乙醇 (100ml) 对其进行漂白并将所述混合物在旋转式汽化器上于 55℃ 旋转 30 分钟。将炭滤去并在旋转式汽化器上去除乙醇。将所述产物进行冷冻干燥以产生 1.7g 蓬松白色粉末形式的 (38.1%) 的 N-(2,3-二肉豆蔻基氧基丙基) 酰胺 PEG₂₀₀₀ 甲醚 7。

[0362] 8. N-(2,3-二肉豆蔻基氧基丙基)氨基甲酸酯 PEG₂₀₀₀ 甲醚 (8) 的制备

[0363]



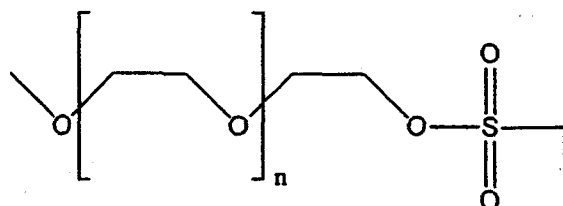
[0364] 对于 N-(2,3-二肉豆蔻基氧基丙基)氨基甲酸酯 PEG₂₀₀₀ 甲醚 (即 PEG-C-DMA) 的制备, 按照上述 1-5 步骤进行。接着用氮气冲洗 PEG₂₀₀₀ 甲醚 (2.0g, 1.0mmol) 并将其溶解在无水二氯甲烷 (15ml) 中。加入双光气 (300 μl, 2.5mmol) 并将所述反应在室温搅拌 3 小时。在旋转式汽化器上去除二氯甲烷并使用高真空泵将任何残余的双光气去除。用氮气冲洗所述烧瓶并加入 2,3-二肉豆蔻基氧基丙胺 5 (0.7g, 1.5mmol)。将此溶解在无水二氯甲烷 (15ml) 中, 并加入三乙胺 (280 μl), 将该反应在室温搅拌过夜。将该溶液转移到具有二氯甲烷 (5ml) 的分液漏斗中并用蒸馏水洗涤 (2×20ml)。用硫酸镁干燥有机层并在旋转式汽化器上去除二氯甲烷。TLC (3% MeOH-CHCl₃, 在钼酸盐和碘中显影) 显示大多数起始物质已经反应形成了产物。通过闪蒸塔层析法 (1.5-10% MeOH-CHCl₃) 对得到的产物进行进一步的纯化以得到 1.2g (46.5%) 的 N-(2,3-二肉豆蔻基氧基丙基)氨基甲酸酯 PEG₂₀₀₀ 甲醚 8。

[0365] 9. N-(2,3-二肉豆蔻基氧基丙基)琥珀酰胺 PEG₂₀₀₀ 甲醚 (13) 的制备

[0366] 对于 N-(2,3-二肉豆蔻基氧基丙基)琥珀酰胺 PEG₂₀₀₀ 甲醚 (13) 的制备,按照上述 1-5 步骤进行。剩下的步骤按照”

[0367] a. PEG₂₀₀₀ 甲磺酸酯 (9) 的制备

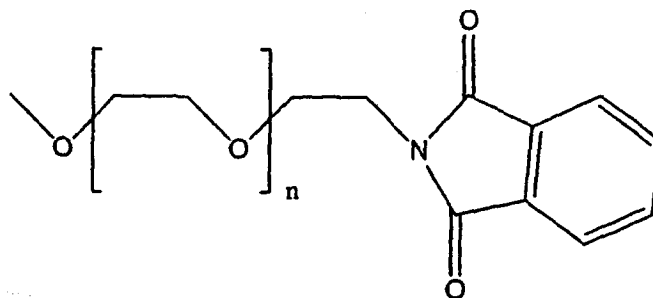
[0368]



[0369] 甲磺酰酐 (8.2g, 47.1mmol) 溶解在无水氯仿 (80ml) 中。将吡啶 (3.8ml, 47.0mmol) 加入所述溶液中并观察到发烟同时有白色沉淀物形成。将 PEG₂₀₀₀ 甲醚 (31.5g, 15.5mmol) 的无水氯仿 (70ml) 溶液加入,将该反应搅拌 3 小时。将已经形成的白色沉淀物滤去并在旋转式汽化器上去除过滤物的氯仿溶剂。TLC (5% MeOH-CHCl₃, 在碘中显影) 显示大多数起始物质已经反应以形成产物。通过闪蒸塔层析法 (0-10% MeOH-CHCl₃) 对该产物进行进一步的纯化以产生白色固体形式的 30.1g (92.8%) 的 PEG₂₀₀₀ 甲磺酰 9。

[0370] b. PEG₂₀₀₀ 苯邻二甲酰亚胺 (10) 的制备

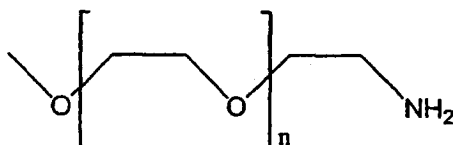
[0371]



[0372] 将钾苯邻二甲酰亚胺 (11.1g, 59.7mmol) 溶解在无水 N,N-二甲基甲酰胺 (400ml) 中。将 PEG₂₀₀₀ 甲磺酰 9 (35.0g, 16.7mmol) 的无水 N,N-二甲基甲酰胺 (100ml) 加入烧瓶中并使该反应于 75℃ 搅拌过夜。使用高真空泵取代通常的吸气器来在旋转式汽化器上去除 N,N-二甲基甲酰胺溶剂。将得到的产物溶解在二氯甲烷 (250ml) 中并用蒸馏水 (2×250ml) 和盐水 (250ml) 进行洗涤。将二氯甲烷溶剂的合并有机层在旋转式汽化器上进行去除。TLC (7% MeOH-CHCl₃, 用 UV 光和 Mary's 试剂观察) 显示大多数起始物质已经反应形成产物。通过闪蒸塔层析法 (0-10% MeOH-CH₂Cl₂) 对得到的产物进行进一步的纯化。将该产物从醚中进行结晶以产生 19.4g (54.1%) 的 PEG₂₀₀₀ 苯邻二甲酰亚胺 10。

[0373] c. PEG₂₀₀₀ 胺 (11) 的制备

[0374]

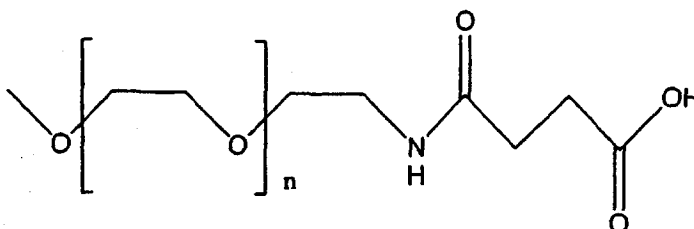


[0375] 将 PEG₂₀₀₀ 苯邻二甲酰亚胺 10 (10.3g, 4.8mmol) 溶解在乙醇 (200ml) 中。将一水合

肟 (6.0ml, 123.7mmol) 缓慢加入并将反应在 100℃回流过夜。将白色沉淀物滤去并在旋转式汽化器上去除乙醇溶剂。将得到的产物溶解在氯仿中并将在氯仿中不溶的剩余白色固体滤去,再次将氯仿在旋转式汽化器上滤去。TLC (10% MeOH-CHCl₃, 在碘, 钼酸盐和 Mary's 试剂中显影) 说明所有的起始物质已经反应以形成产物。接着,将该产物从醚中结晶以产生白色粉末形式的 9.0g (93.0%) 的 PEG₂₀₀₀ 胺 11。

[0376] d. PEG₂₀₀₀ 琥珀酰胺 (12) 的制备

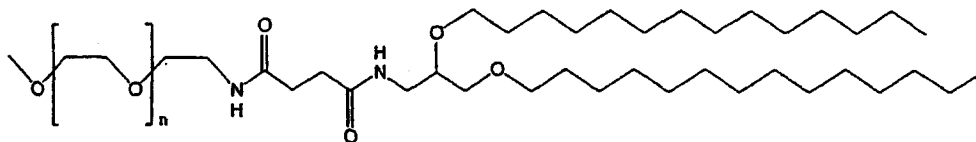
[0377]



[0378] 将 PEG₂₀₀₀ 胺 11 (9.0g, 4.4mmol) 和琥珀酐 (3.8g, 38.1mmol) 溶解在吡啶 (100ml) 中并将该反应搅拌过夜。将吡啶溶剂在旋转式汽化器上于 60℃ 进行去除。将所述残余物溶解在蒸馏水 (100ml) 中, 并用盐酸进行酸化, 用二氯甲烷进行抽提 (100ml, 2×70ml), 用硫酸镁进行干燥。TLC (10% MeOH-CHCl₃, 在碘中显影) 说明大多数起始物质已经反应形成了产物。通过闪蒸塔层析法 (0-10% MeOH-CHCl₃) 对该产物进行进一步的纯化以产生 5.2g (55.9%) 的 PEG₂₀₀₀ 琥珀酰胺 12。

[0379] e. N-(2,3-二肉豆蔻基氧基丙基)琥珀酰胺 PEG₂₀₀₀ 甲醚 (13) 的制备

[0380]



[0381] 将PEG₂₀₀₀琥珀酰胺(2.0g, 0.9mmol)和N-羟基琥珀酰胺(0.2g, 2.0mmol)溶解在无水氯仿(10ml)中。接着,将1,3-二环己基-碳二亚胺(0.3g, 1.5mmol)的无水氯仿(5ml)溶液加入,并将所述反应搅拌1小时。加入1,2-二肉豆蔻基氧基丙胺5(0.48g, 1.0mmol)的无水氯仿(5ml)和三乙胺(0.6ml, 4mmol)的溶液中,将反应搅拌1小时。TLC(12% MeOH-CHCl₃, 在钼酸盐中显影)说明大多数起始物质已经反应形成了产物。将溶液通过具有二氯甲烷的硅藻土进行过滤,用盐酸进行酸化,并用蒸馏水(2×50ml)和盐水(50ml)进行洗涤。将水层用二氯甲烷(50ml)进行反萃取,并在硫酸镁上来干燥合并的有机层。通过(my)闪蒸塔层析法(0-7% MeOH-CHCl₃)来对所述产物进行进一步的纯化以产生1.8g(69.0%)的N-(2,3-二肉豆蔻基氧基丙基)琥珀酰胺PEG₂₀₀₀甲醚13。

[0382] 要理解的是上述描述倾向于描述性的和非限制性的。在阅读上述描述后,许多实施方案将对于那些本领域技术人员是显而易见的。因此,本发明的范围应该,在不参考上述描述而应该替代地参考后附的权利要求的情况下连同这些权利要求有权获得的等价物的全部范围进行确定。出于所有的目的,将包括专利申请,申请和 PCT 公开物的所有的登记号的文章和参考文献的公开内容并入本文作为参考。

在被稳定转染的 CT26. CL25 细胞中的 B-gal 表达被抗-B-gal siRNA 下调

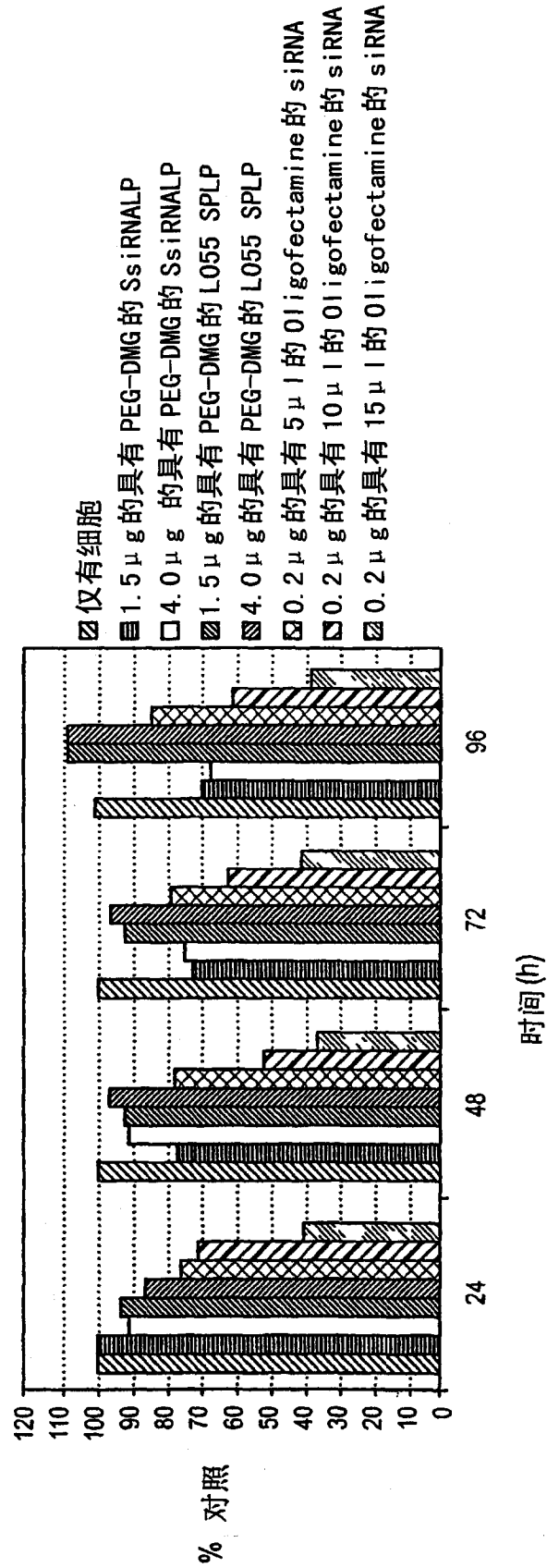


图 1

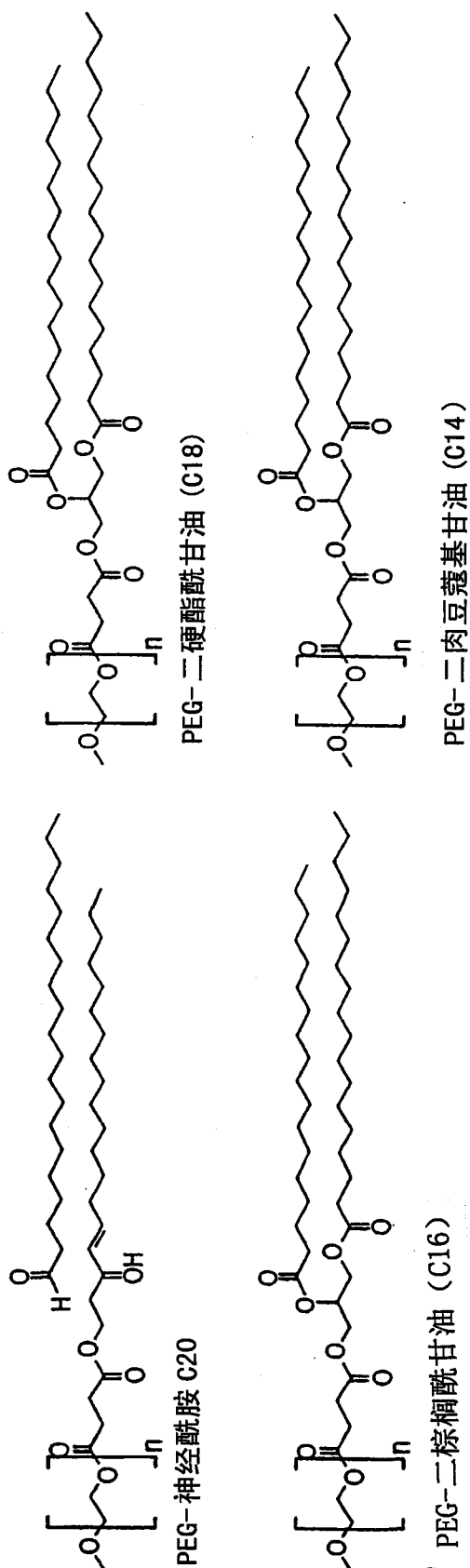


图 2

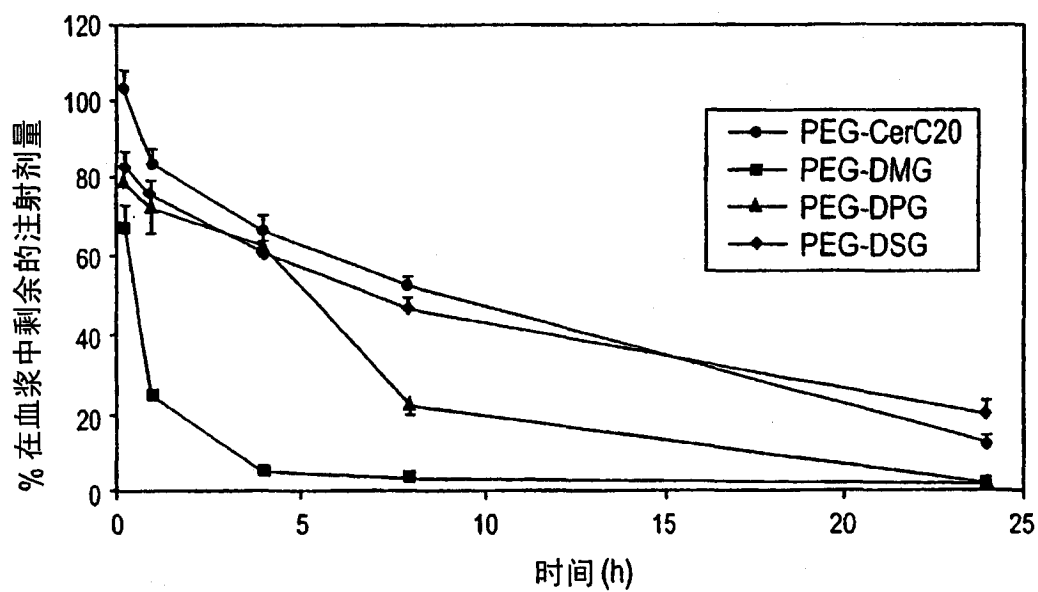


图 3

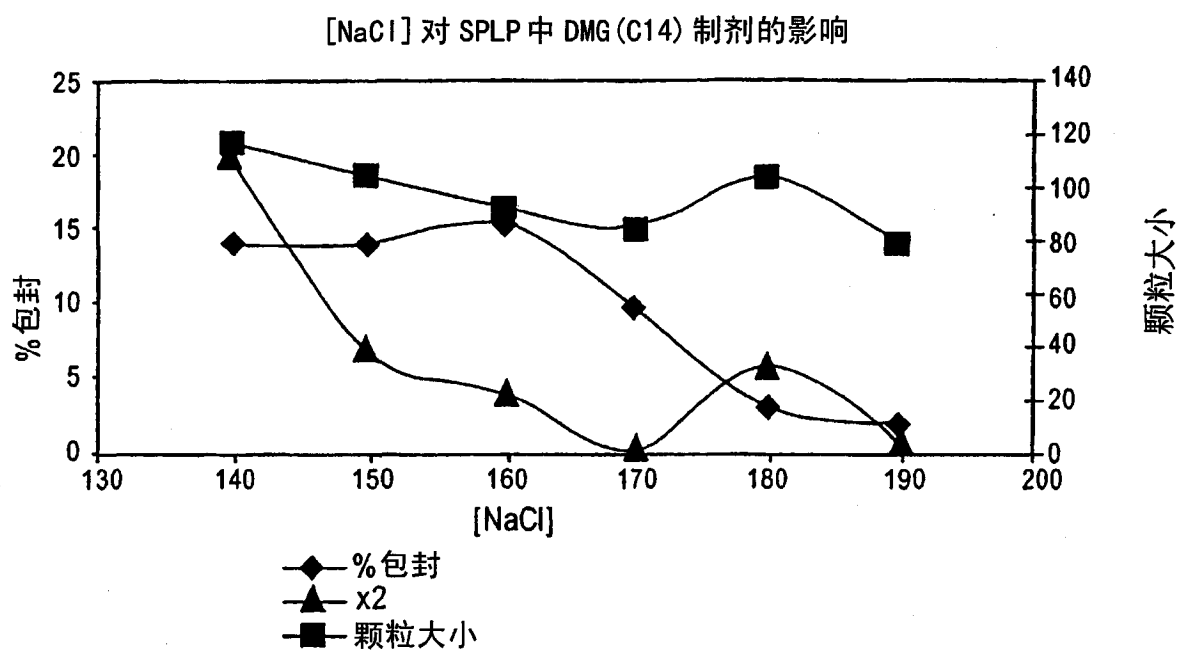


图 4A

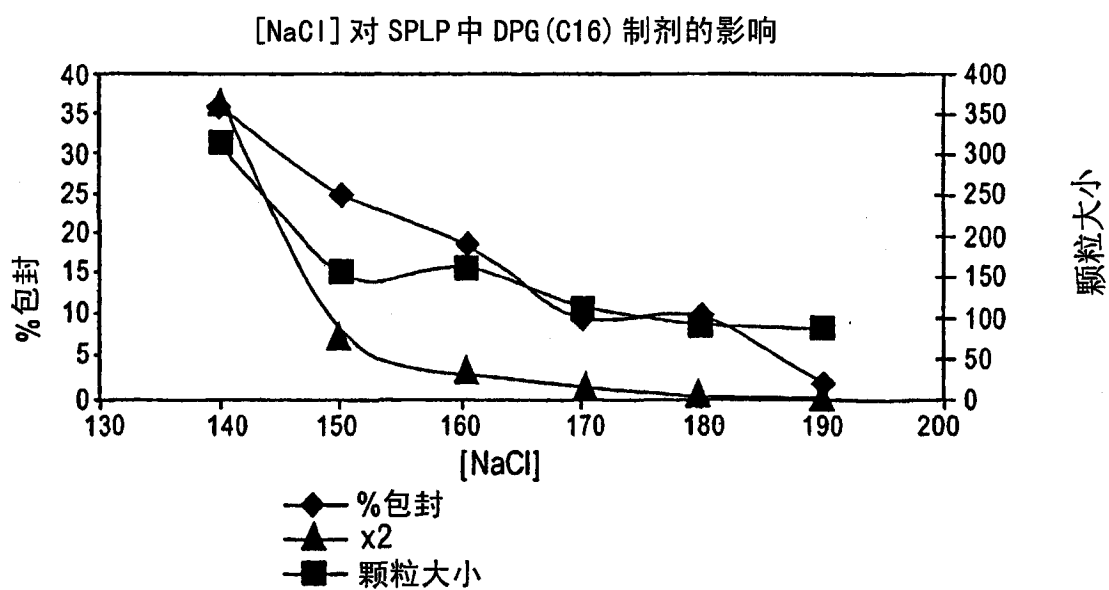


图 4B

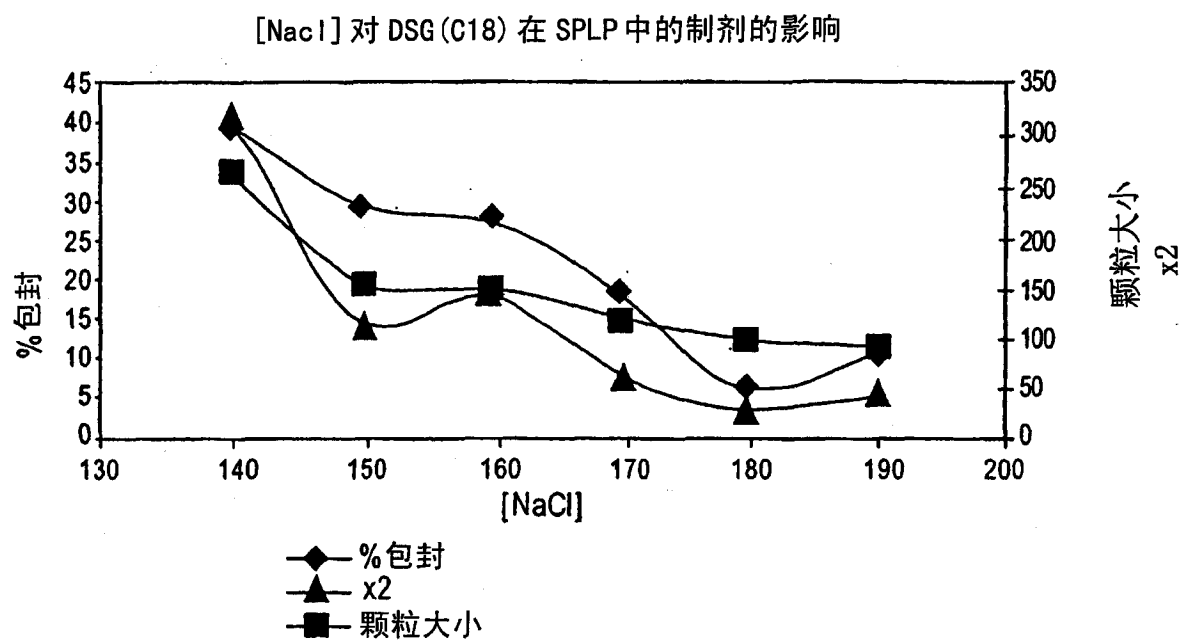


图 4C

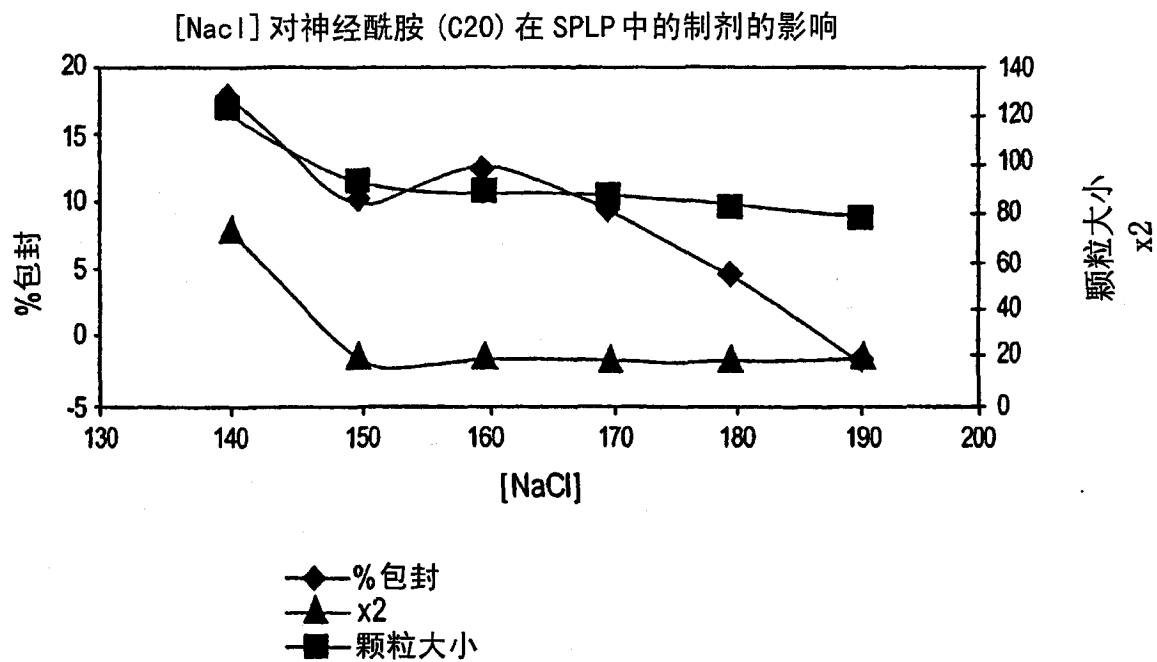


图 4D

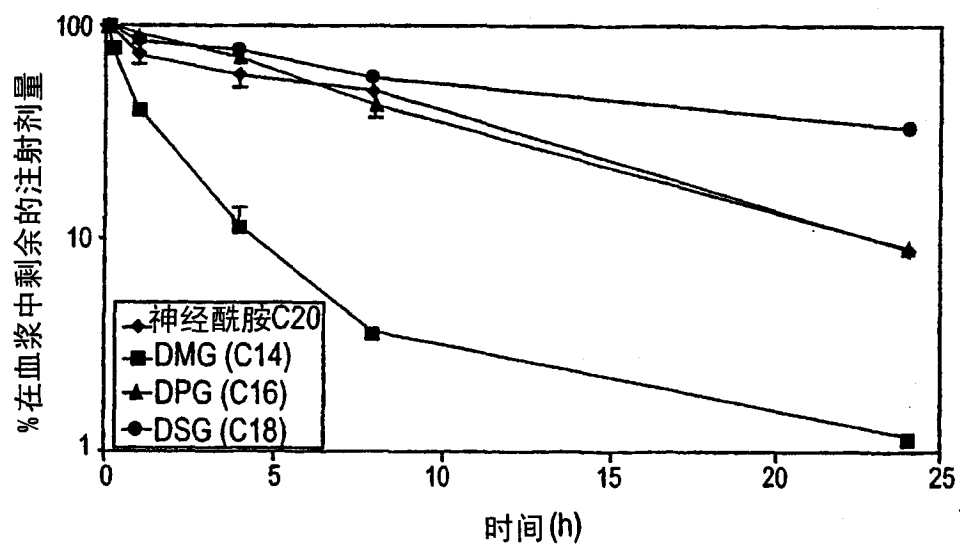


图 5

在包含 PEG-二酰基甘油的 SPLP 的单-静脉内施用后，
在具有 Neuro-2a 肿瘤的雄性 A/J 小鼠中的肝 DNA 浓度分布

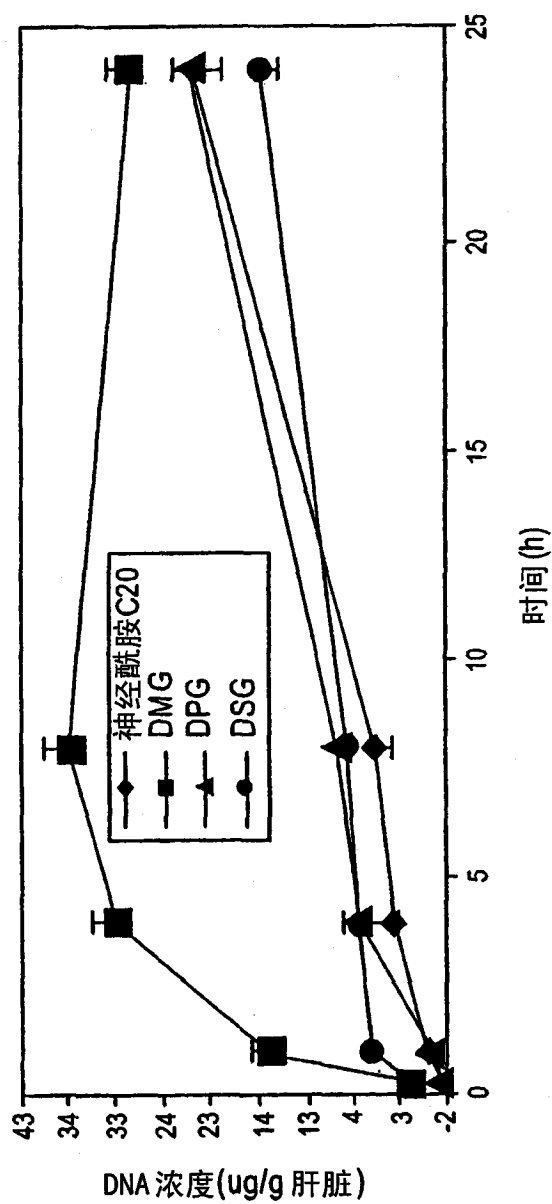


图 6A

在包含 PEG-二酰基甘油的 SPLP 的单—静脉内施用后，
在具有 Neuro-2a 肿瘤的雄性 A/J 小鼠中的脾 DNA 浓度分布

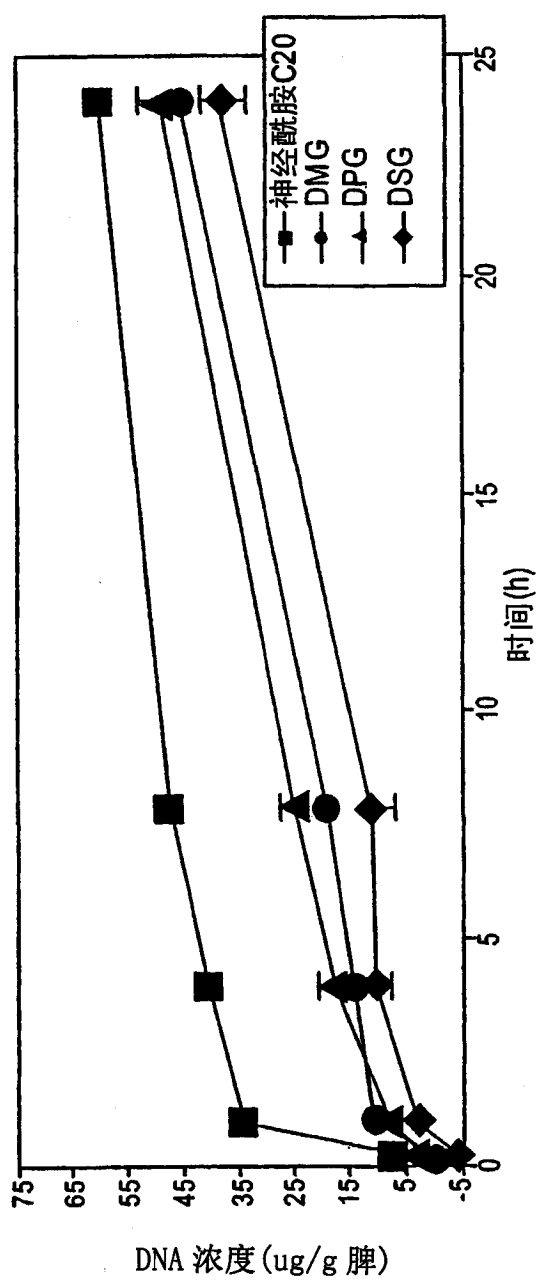


图 6B

在包含 PEG-二酰基甘油的 SPLP 的单—静脉内施用后，
在具有 Neuro-2a 肿瘤的雄性 A/J 小鼠中的肺 DNA 浓度分布

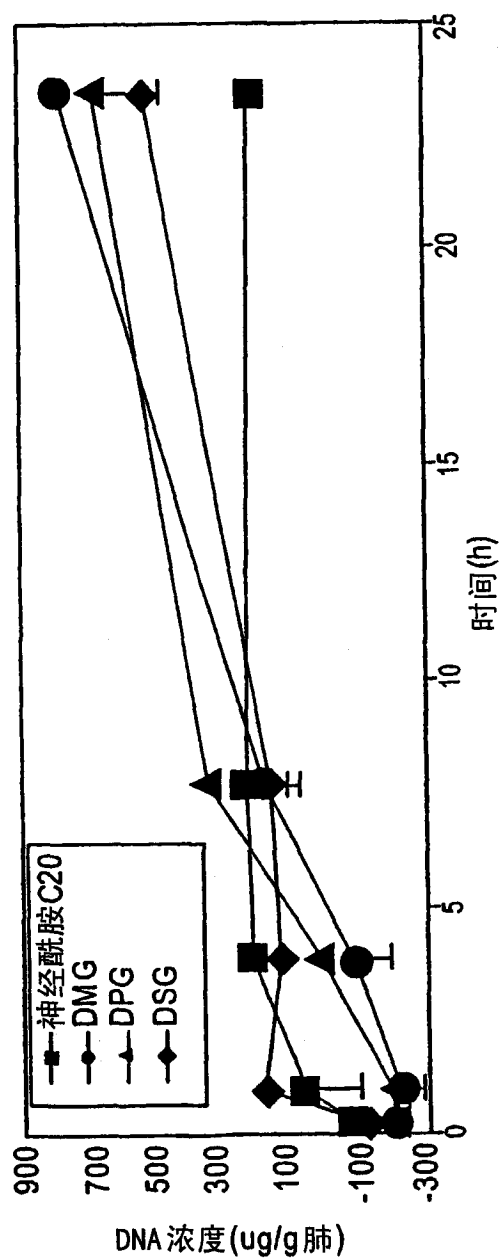
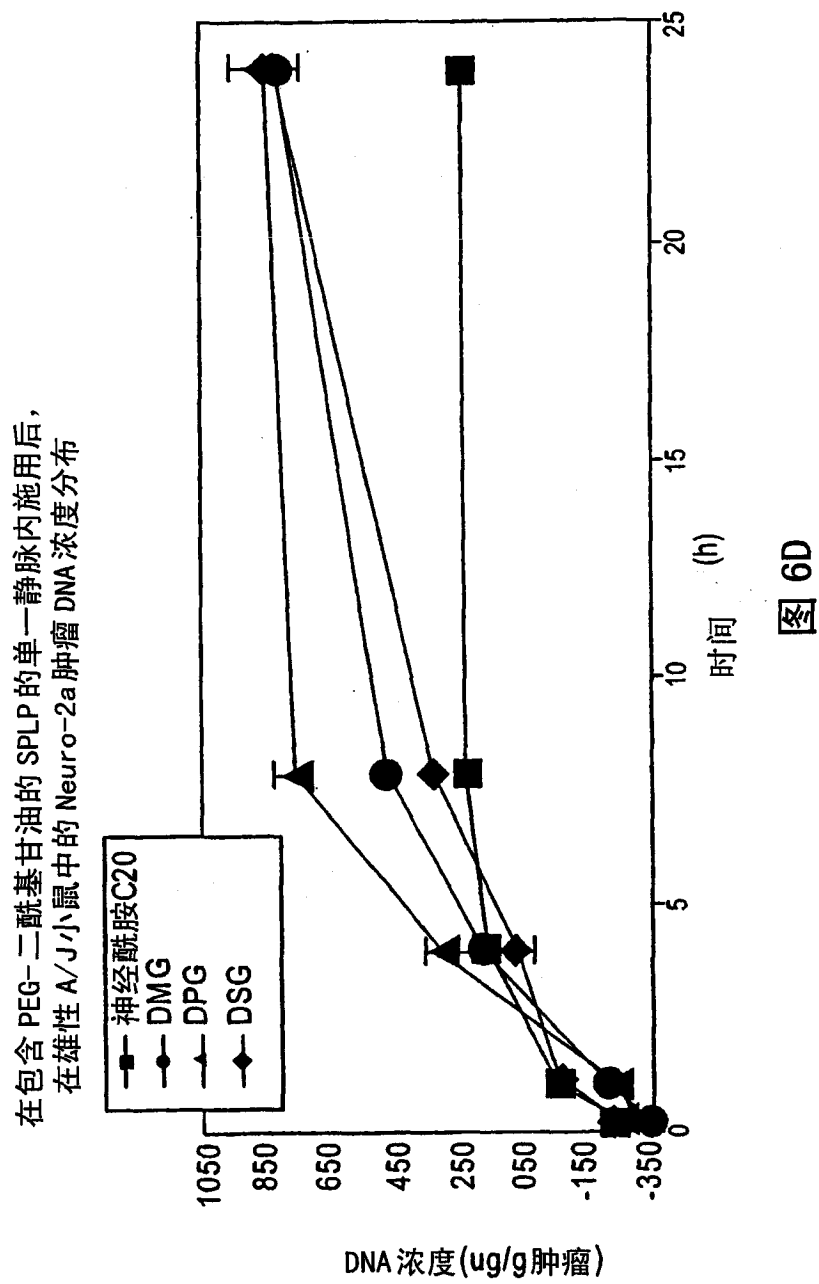


图 6C



在具有 Neuro-2a 肿瘤的雄性 A/J 小鼠中，用包含 PEG- 神经酰胺 C20 的 SPLP IV 施用后 24 小时对比包含 PEG- 二酰基甘油的 SPLP IV 施用后 24 小时的萤光素酶基因表达

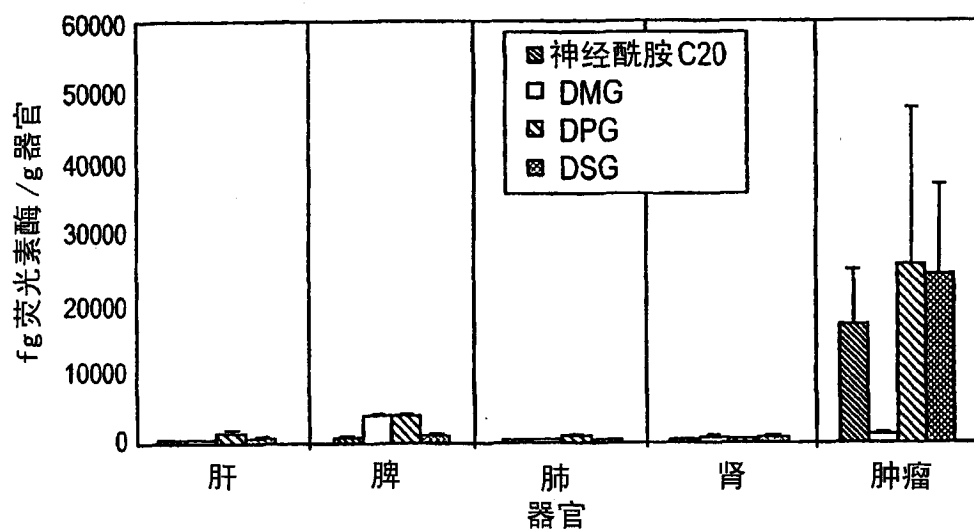


图 7

在具有 Neuro-2a 肿瘤的雄性 A/J 小鼠中,用包含 PEG- 神经酰胺 C20 的 SPLP IV 施用后 48 小时对比包含 PEG- 二酰基甘油的 SPLP IV 施用后 48 小时的荧光素酶基因表达

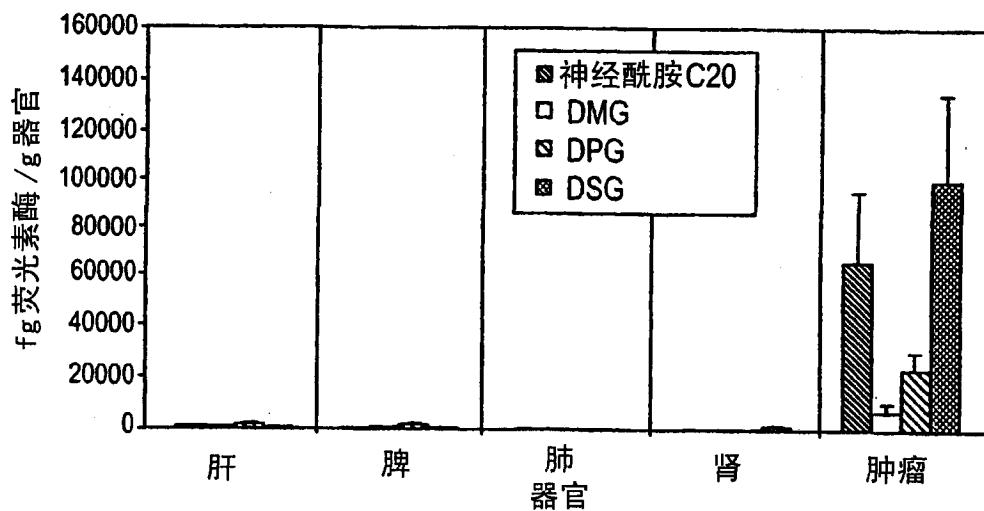


图 8

在具有 Neuro-2a 肿瘤的雄性 A/J 小鼠中,用包含 PEG- 神经酰胺 C20 的 SPLP IV 施用后 72 小时对比包含 PEG- 二酰基甘油的 SPLP IV 施用后 72 小时的荧光素酶基因表达

用包具有各种烷基链长度的 PEG-A-DAA (PRO-221)
的 SPLP IV 施用后 48 小时在肿瘤中的荧光素酶基因表达

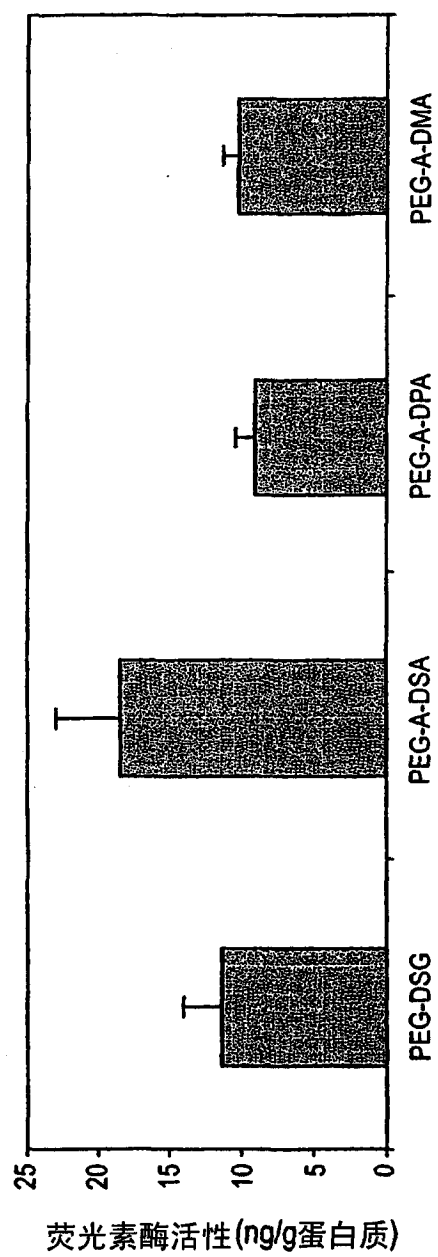


图 11

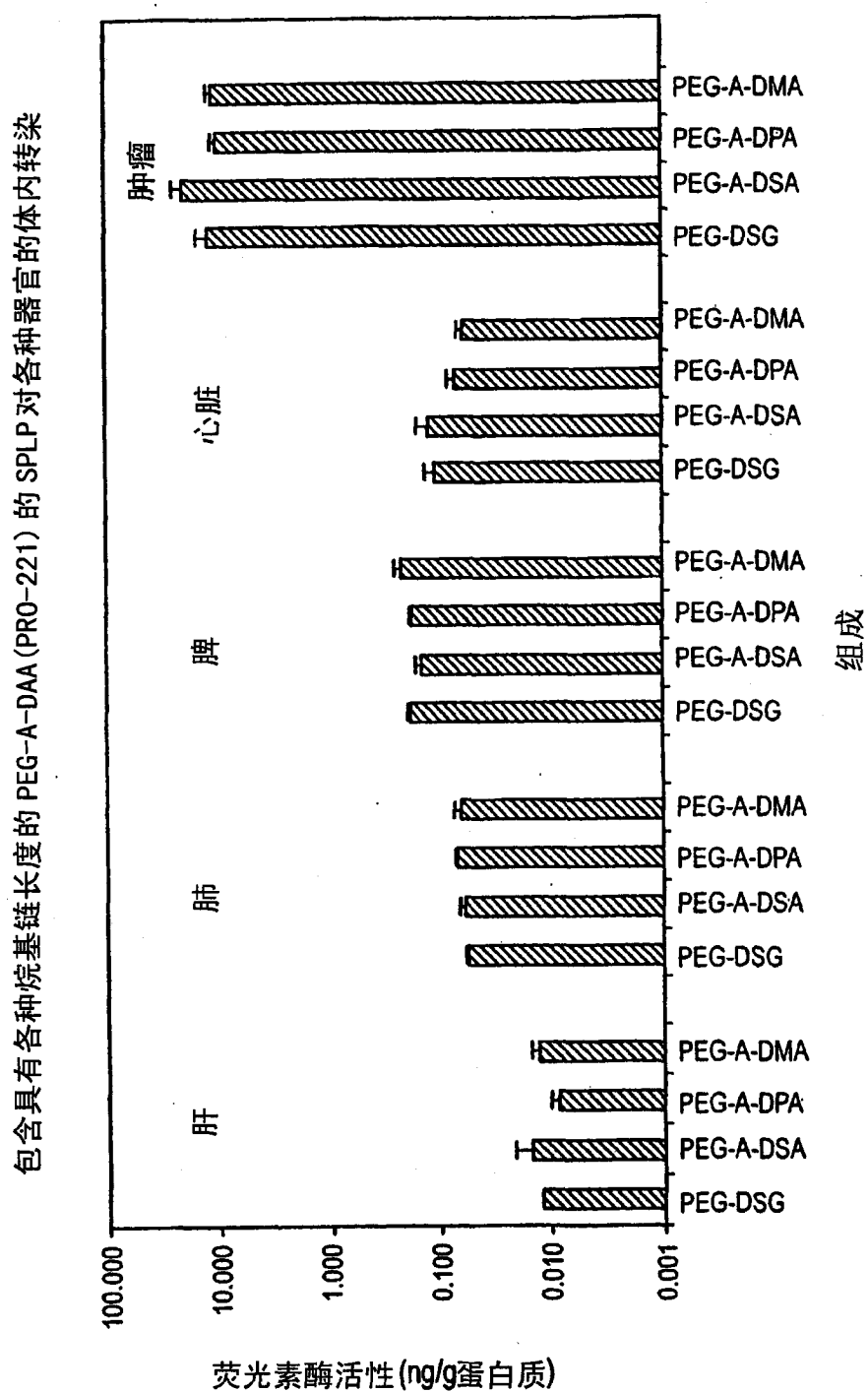


图 12

在具有 Neuro-2a 肿瘤的雄性 A/J 小鼠中，抗-Luc siRNA 的单一 iv 注射对比 L055 SNALPs 单一 iv 注射的 24 小时血液清除率，所述 L055 SNALPs 包含 DSPC:Chol:DODMA:PEG-A-DMA 脂质体

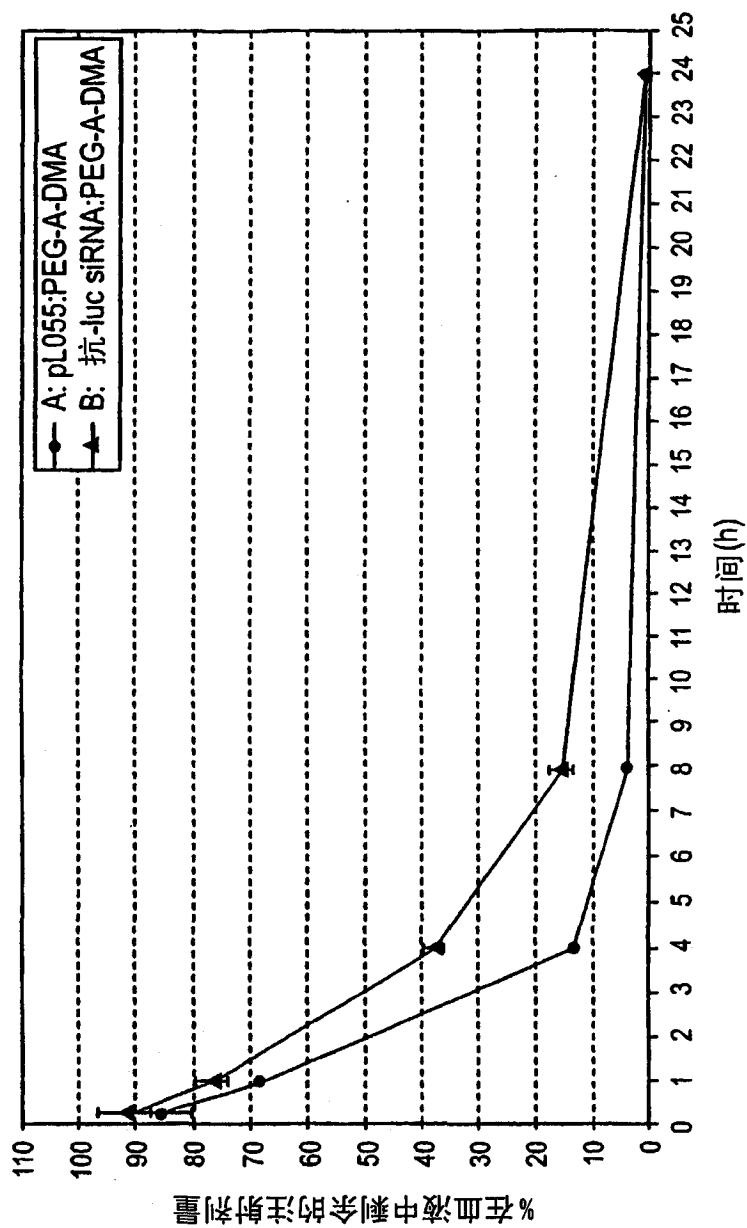


图 13

在 SNALPS 的单一 iv 注射后 24 小时的每克组织的注射剂量 %
(L055 对比抗-luc siRNA)，所述 SNALPS 包含 DSPC:Chol:DODMA:PEG-A-DMA

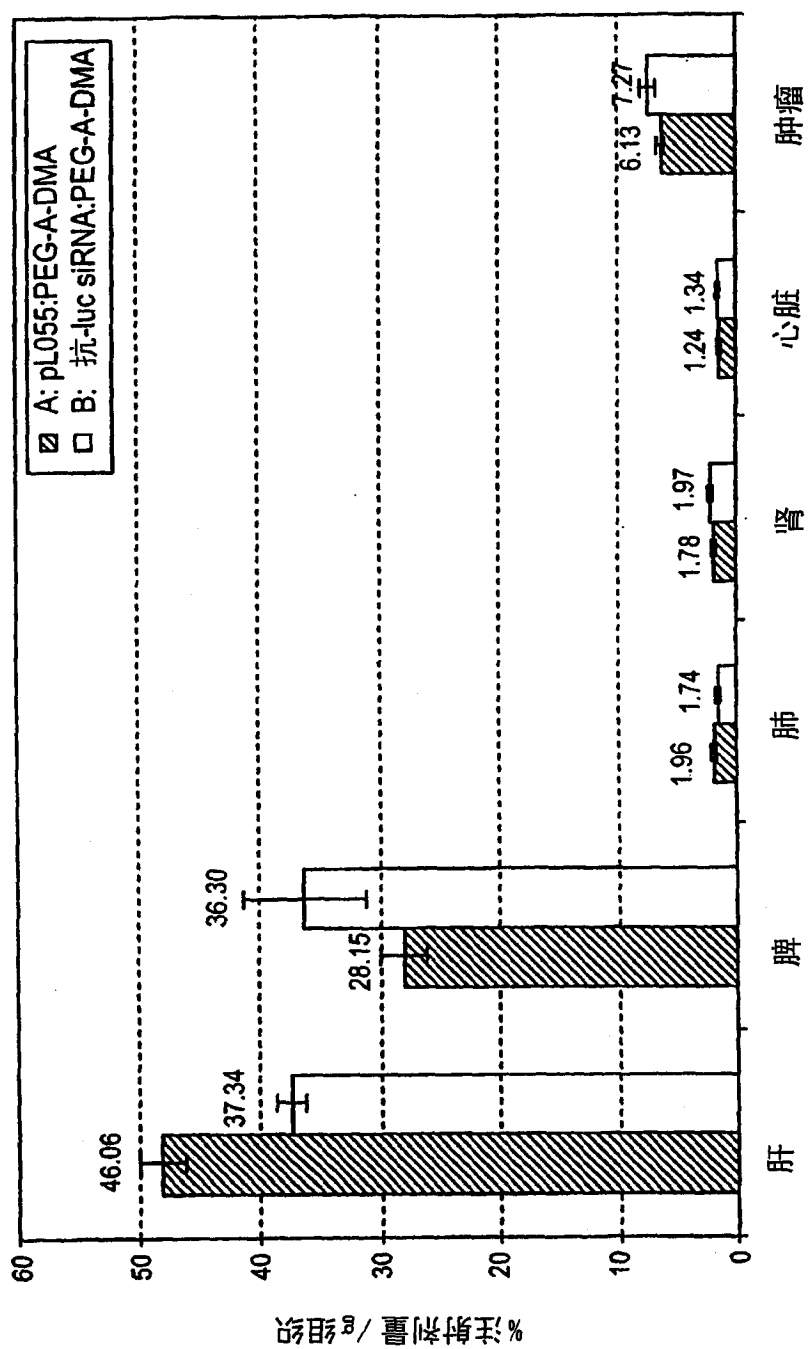


图 14

PRO-231: 在具有 Neuro-2a 肿瘤的雄性 A/J 小鼠中, 用 ^3H -CHE 标记的 pL055 SPLP, pSPLP 和 SNALP ($100\ \mu\text{g DNA}$) 的单一 IV 注射的血液清除率

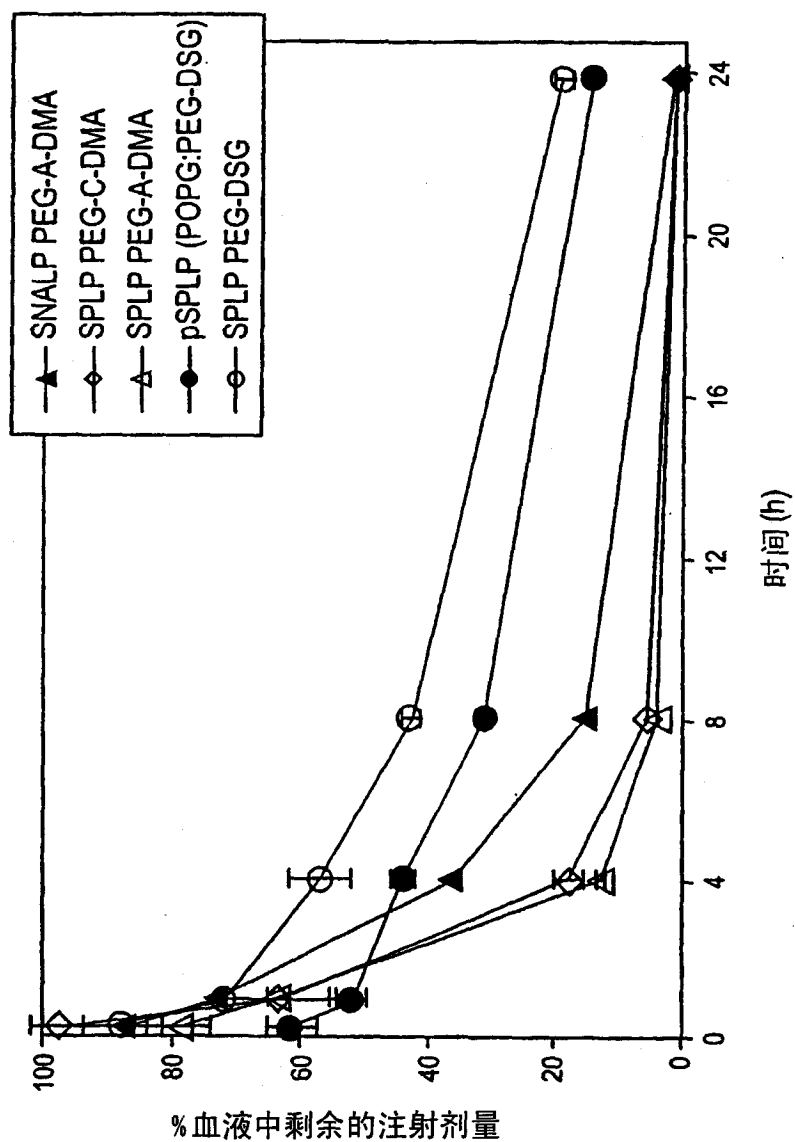


图 15

PRO-231: 在具有 Neuro-2A 肿瘤的 A/J 小鼠中在
24 小时 3H-CHE 标记的 SPLP, pSPLP 和 SNALP 的生物分布

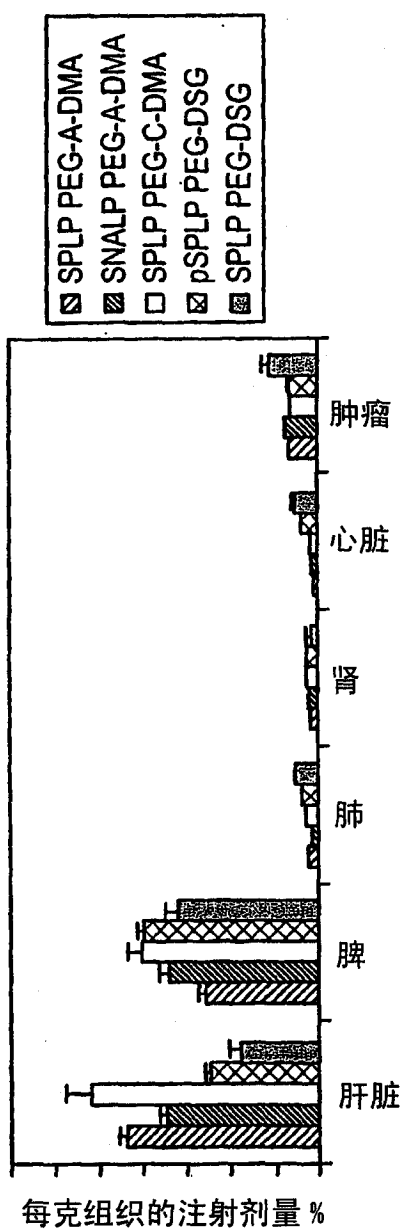


图 16

siRNA 的 SNALP 传递导致靶蛋白的有效沉默 - 体外

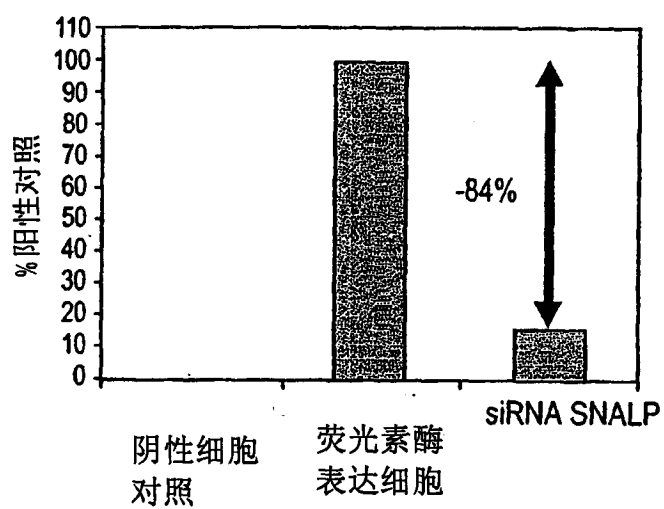


图 17

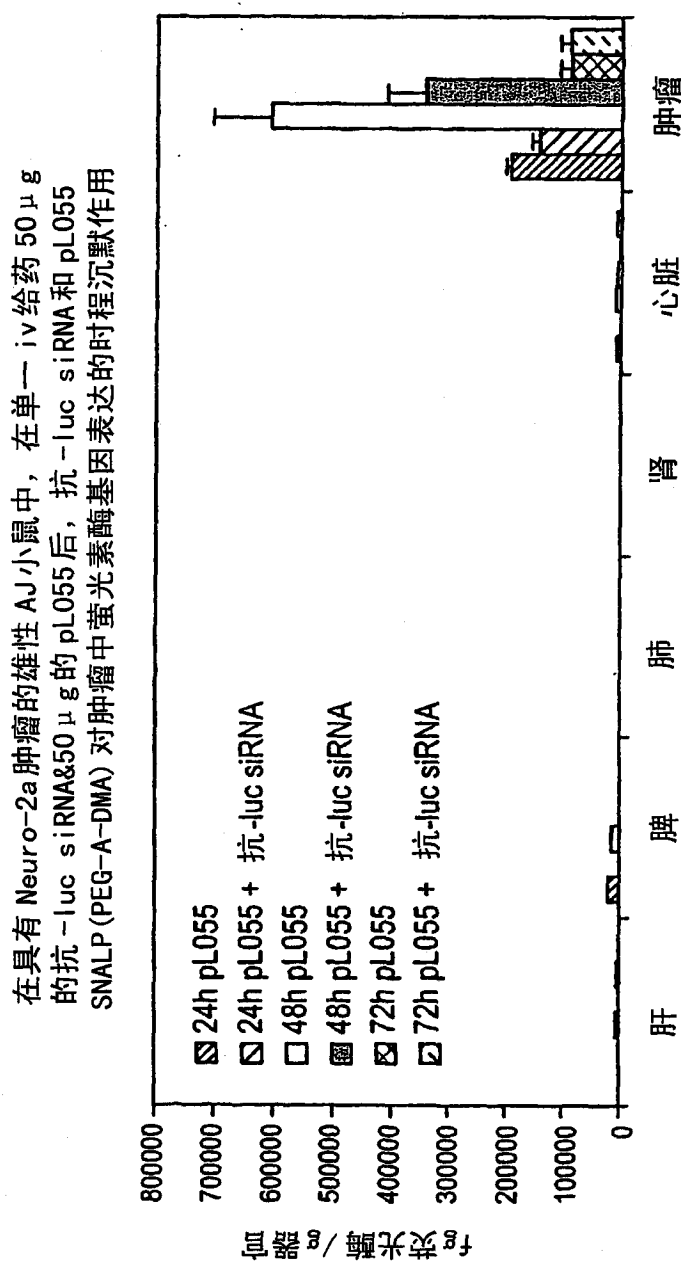


图 18

在具有 Neuro-2a 肿瘤的雄性 AJ 小鼠中，在单-iv 给药 50 μ g 的抗-luc siRNA & 50 μ g 的 pL055 后，抗-luc siRNA 和 pL055 SNALP (PEG-A-DMA) 对肿瘤中萤光素酶基因表达的时程沉默作用

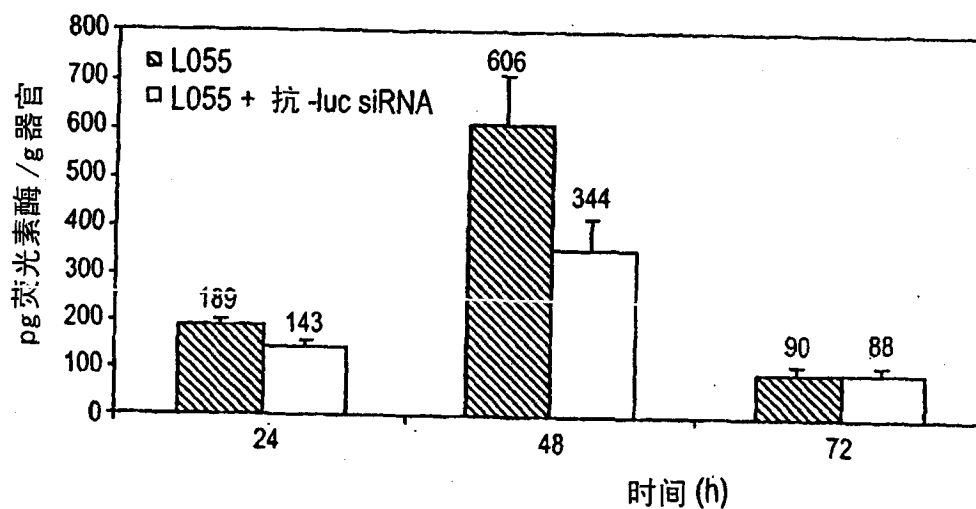


图 19

在具有 Neuro-2a 肿瘤的雄性 AJ 小鼠中,在单-iv 给药 50 μ g 的抗-lucsiRNA & 50 μ g 的 pL055 后,抗-luc siRNA 和 pL055 SNALP (PBG-A-DMA) 对肿瘤中萤光素酶基因表达的时程沉默作用

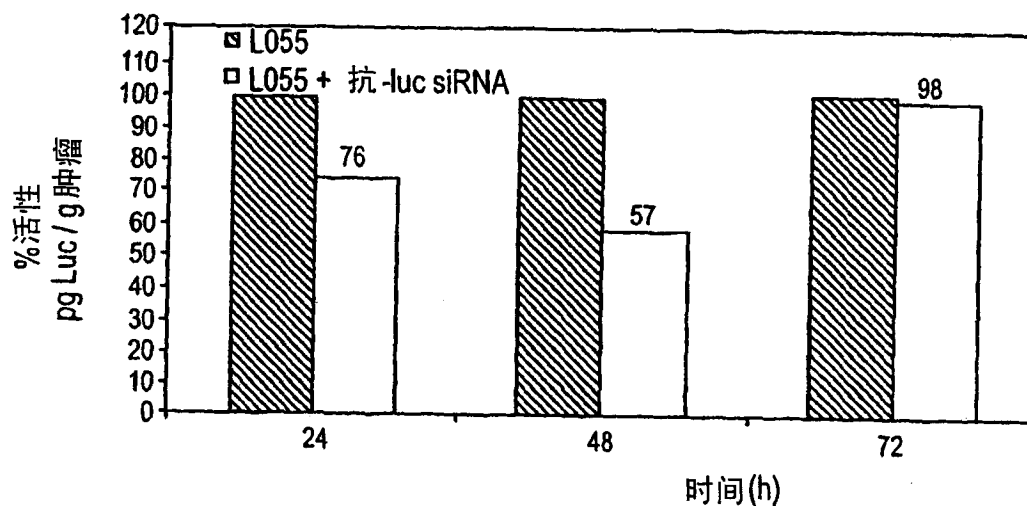


图 20

在具有 Neuro-2a 肿瘤的雄性 AJ 小鼠中,在单-iv 给药 50 μ g 的抗-lucsiRNA & 50 μ g 的 pL055 后,抗-luc siRNA 和 pL055 SNALP (PBG-A-DMA) 对肿瘤中萤光素酶基因表达的时程沉默作用

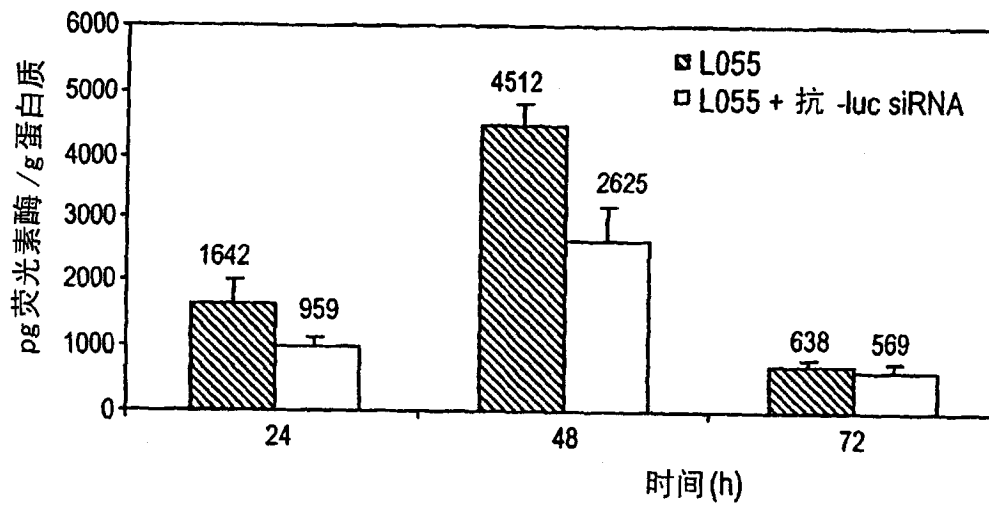


图 21

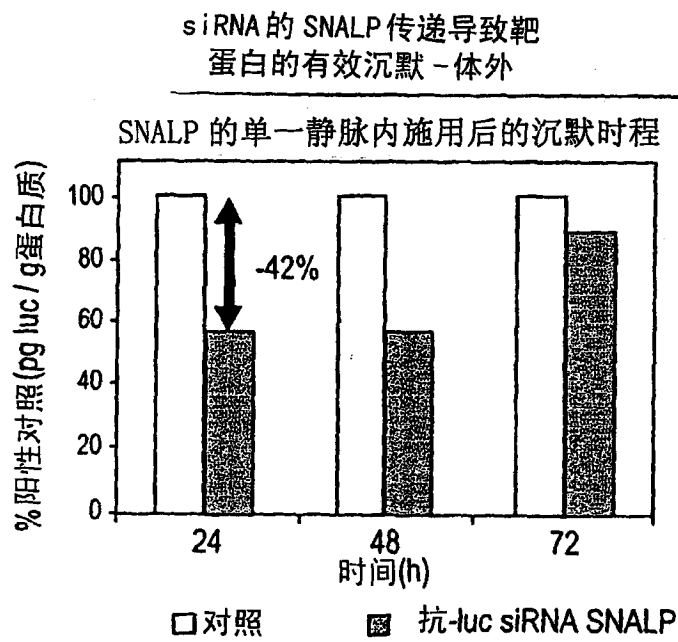


图 22